

块磷鹅膏的培养条件及所产 Amanitins 毒素的分析

郭学武^{1,2}, 汪国轮^{1,2}, 龚建华^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 采集并组织分离到块磷鹅膏 *Amanita spissa* 的纯培养菌丝。探讨了各种培养条件对块磷鹅膏菌丝生长的影响,实验结果表明,在 28℃, pH 6.0, 避光的条件下块磷鹅膏的菌丝体生长最好。液体反应器人工培养块磷鹅膏获得成功,其液体培养的菌丝体干重在摇瓶中为 0.893 g/L,在气升式反应器内可达到 2.33 g/L。固体斜面培养和气升式反应器液体培养的菌丝体的 HPLC 分析表明菌丝体内含有鹅膏毒肽,而不含有鬼笔毒肽。两种培养条件下菌丝体的 α -amanitin 毒素含量略有不同,固体斜面菌丝体为 26.02 μ g/gDCW、反应器培养菌丝体为 15.25 μ g/gDCW。通过抑芽法试验也证明固体和液体培养菌丝体中含有 α -amanitin,且具有和子实体中 α -amanitin 相同的生物学活性。结果表明有可能通过液体大规模培养鹅膏菌丝体来生产鹅膏毒素。

关键词 鹅膏菌, 生长速率, 抑芽法, HPLC 分析

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)03-0373-06

鹅膏属(*Amanita*)隶属于伞菌目(Agaricales),鹅膏科(Amanitaceae),是一类可以产生多种多肽类毒素的大型真菌^[1]。其产生的 Amanitins(AMA)毒素是真核细胞 RNA 聚合酶 II 阻断抑制剂,可以抑制真核细胞基因的转录^[2]。目前主要有四类 Amanitins(α , β , γ 和 ϵ)用于真核细胞转录的分子生物学实验中。商品化的 Amanitins 主要分离自绿盖鹅膏(*A. phalloides*),由于受到自然界鹅膏资源的限制,人们一直以来尝试用人工培养的方式来获取 Amanitins,但这种研究还处于初期阶段,目前除我们实验室有人工液体培养鹅膏菌的研究外(另文发表),尚没有其它人工培养鹅膏菌获得 Amanitins 的报道。鉴于此,本文报道了块磷鹅膏从分离纯培养菌丝到固体培养及至气升式反应器大规模培养过程和相关菌丝生长形态,以及对鹅膏毒素 HPLC 检测分析的结果。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

XSP-8CE 生物显微成像系统购自上海精密仪器厂;气升式 *Airlift/ff* 生物反应器(3L)为自制;高效液相色谱系统是 Waters 600E, pH-HJ90 酸度计购自北京海淀航天公司;玉米浆购自华北制药厂;malt extract 购自 Difco 公司,酪蛋白酸水解物和木糖购自

Sigma 公司,酵母膏为生化试剂,其余试剂均为分析纯级别。

1.2 菌种的分离

块磷鹅膏 *Amanita spissa* (Fr.) Quél. 采自湖南省八大公山国家森林公园,组织分离法得到纯培养菌丝。

1.3 固体培养基条件

菌种的保藏参照白毒伞培养条件^[3],采用改良的 PDM 培养基:马铃薯水提取液 20%,麦芽汁(8°Be)15%,葡萄糖 0.5%,磷酸二氢钾 0.1%,硫酸镁 0.06%,硫酸铵 0.2%,VB₁ 10mg/L,氯化钠 0.05%,氯化钙 0.01%,硝酸钾 0.1%,自然 pH 值(5.8 ± 0.1)。每个月转接一次。

固体培养条件的筛选:根据相关文献报道,选择了 6 种常见的外生菌根菌培养基:Moster 培养基^[4]、综合 PDA 培养基、PGK 培养基^[5]、PDM 培养基、SPDM 培养基和 MMN 培养基^[6][葡萄糖 10g, malt extract 1g, 酪蛋白酸水解物 1g (NH₄)₂HPO₄ 0.25g, NaCl 0.025g, MgSO₄ · 7H₂O 0.15g, 1% FeCl₃ 1.2mL, CaCl₂ 0.05g, 麦芽汁(8°Be) 150mL, VB₁ 10mg, 蒸馏水 850mL]。

所有培养基灭菌前都分别以 1mol/L NaOH 或者 1 mol/L HCl 调节到 pH 5.5。

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62545134; E-mail: gongjh@sun.im.ac.cn

作者简介 郭学武(1980-),男,湖南人,硕士研究生,研究方向是真菌生物学。E-mail: guoxuewu@yahoo.com

收稿日期 2005-07-06 接受日期 2005-07-19 修回日期 2005-07-25

1.4 不同培养条件对块磷鹅膏生长的影响

1.4.1 温度对块磷鹅膏生长速率的影响 :设置 10、15、20、25、28、32、37℃ 共计 7 个不同温度处理(温度变幅为 $\pm 2^\circ\text{C}$)。将块磷鹅膏在 SPDM 平板上进行二次活化,在 26℃、避光培养 4 周后,用直径为 5mm 的打孔器截取菌落外缘制备菌饼,分别接种在 SPDM 平板中央,于不同温度处理下避光培养,5 次重复,用十字交叉法测量菌落直径,按照下列公式计算出各处理菌落平均生长速率(下同)。

平均生长速率(mm/d) = (测定菌落直径 - 菌饼直径) / 培养天数

1.4.2 pH 值对块磷鹅膏生长的影响 :实验设计同

1.3.1, pH 值依次设定为 3、4、5、5.5、6、7、8、9。

1.4.3 光照对块磷鹅膏生长的影响 :实验设计同

1.3.1, 设置 24h 光照、12h 光暗交替和 24h 黑暗 3 个处理。

1.4.4 供试菌株碳源利用的差异 :实验设计同

1.3.1, 以 MMN 为基础培养基, 分别以 1% 的葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、木糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、山梨醇代替 MMN 中的葡萄糖。

1.4.5 供试菌株氮源利用的差异 :以 MMN 为基础

培养基, 在液体培养基中分别添加 0.03% 的 His、Lys、Cys、Met、Val、Leu、Ile、Asp、Arg、牛血清白蛋白(BSA) 制备分别以十种氨基酸为唯一氮源的液体培养基, 以培养 30d 的斜面纯培养菌丝转接至摇瓶, 每只摇瓶接种面积为 2cm^2 , 观察块磷鹅膏生长对氨基酸的利用情况。

1.4.6 菌丝液体培养生长量的测定 :液体培养产物 50mL 先 4 层纱布过滤, 弃去滤液, 再以 20mL 无离子水淋洗过滤, 菌丝 60℃ 烘干称重, 重复 5 次, 计算平均值; 干物质处理步骤同斜面培养菌丝, 重复 3 次, 计算平均值, 菌丝生长量等于干物质重量减去接种斜面培养菌丝重量。

1.5 气升式反应器(Airlift/ff)培养参数

Airlift/ff 表示 air lift bioreactor / filamentous fungi, 是本研究室自行研究设计的丝状真菌专用气升式生物反应器, 已申请专利。

体积 3L, 温度 28℃, 通气速率 1500mL/min, 导流系数 4.5。

摇瓶种子培养基(MMNC): 葡萄糖 10g, malt extract(Difco) 1g, 酪蛋白酸水解物(Sigma) 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25g, NaCl 0.025g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g, 1% FeCl_3 1.2mL, CaCl_2 0.05g, 麦芽汁(8°Be) 150mL, VB1 10mg, 水 850mL。

反应器培养基: MMN。每 24h 取样, 样品离心后, 菌丝体以无离子水冲洗 3 次, 离心收集菌丝体, 80℃ 烘干至恒重, 取 3 个样本的平均值, 还原糖以 DNS 比色法测定。

1.6 RNA 聚合酶 II 阻断抑制试验

参照文献[7]的方法。按对照组和处理组分别选取颗粒饱满、大小均一绿豆种 20 粒, 放入衬有双层滤纸的培养皿中, 3 组重复, 加不同目标毒素溶液 4mL 后置于 28℃ 恒温箱中进行暗萌发, 定时(一般约 24h)补充毒素溶液, 并换气 5min。48h 后分别测量根的长度, 并按下式计算抑制率:

抑制率% = (对照生物量 - 处理生物量) / 对照生物量 $\times 100$ 。

1.7 高效液相色谱毒素检测

块磷鹅膏液体培养产物 4000r/min 离心, 以无离子水洗涤 3 次后收集菌丝体, 80℃ 烘干后研磨。取 1g 研磨后的菌丝体粉末, 溶解于 10mL 50% 甲醇中, 室温下振荡抽提 24h, 8000r/min 离心后收集上清液。沉淀以 10mL 50% 甲醇抽提 12h 后, 离心收集并合并上清液, 将上清液于 -40℃ 冻干, 干物质重新溶解于双蒸水中, 加入 10mL 乙醚振荡抽提 2h 去除脂肪, 弃去乙醚层, 并重复去脂肪一次得到含有毒素的提取液。

高效液相色谱系统为 Waters Delta 600, 分离柱为 $300\text{mm} \times 4.0\text{mm}$, YWG C18 $10\mu\text{m}$ 的反相分析柱, 紫外检测器为 Waters2487, 检测波长 295nm, 分析在杭州英谱公司色谱工作站进行。洗脱液由 A、B 两相混合, A 相为 10% 乙腈 + 90% 0.02mol/L 醋酸铵, B 液 24% 乙腈 + 76% 0.02mol/L 醋酸铵, 用冰醋酸调节 pH 至 5.0。流动相流速为 1.0mL/min, 进样量 20 μL 。

2 结果和分析

2.1 不同培养基上块磷鹅膏的生长速率

由表 1 可以看出块磷鹅膏菌在 MMN 培养基上生长速率最快, 生长速率可达到 1.4mm/d。在其它几种培养基上也能较快地生长, 但以 PGK 培养基上生长最慢。可见块磷鹅膏在以有机氮源存在的培养基的生长速率要好于没有有机氮源的培养基。而添加有麦芽汁的培养基在相同培养条件和周期下, 块磷鹅膏菌丝体的生长速率明显高于不含有麦芽汁的培养基, 表明麦芽汁有利于块磷鹅膏菌丝的生长, 这与此前在固体培养鹅膏菌时的结论是一致的^[2,8]。

表 1 块磷鹅膏在不同培养基上的菌丝体生长速率(30d)

Table 1 Growth rate of *A. spissa* in different culture media(30d)

Culture medium	Moster	SPDA	PGK	PDM	SPDM	MMN
Growth rat(mm/d)	0.675	1.210	0.175	1.167	1.233	1.401

2.2 不同培养条件下块磷鹅膏的生长速率

2.2.1 温度对块磷鹅膏生长的影响 :观测表明(图1),块磷鹅膏比较适合的温度生长范围为 20 ~ 30℃ ,在 28℃ 生长速度最快 ;当温度低于或者高于 28℃ ,块磷鹅膏的生长速率会明显降低 ,当温度低于 15℃ 或者高于 32℃ ,块磷鹅膏基本上不能生长。可能的原因是温度过高或者过低会导致块磷鹅膏菌体内酶活性降低或丧失。

2.2.2 pH 对块磷鹅膏生长的影响 :如图 1 所示 ,块磷鹅膏生长的 pH 值范围为 4~7 ,其生长最适 pH 值为 6.0 ;当 pH 值低于 3 或者高于 7 ,块磷鹅膏均不能生长。通过菌丝生长的 pH 值范围 4~7 ,最适生长 pH 值为 5.5 左右。

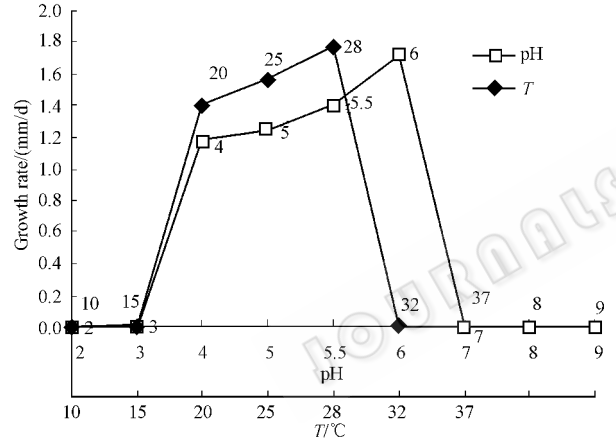


图 1 温度 pH 对块磷鹅膏菌丝生长的影响

Fig.1 Effect of temperature pH on growth rate of *A. spissa* strains.

表 2 不同碳源对块磷鹅膏生长速率的影响(30d)

Table 2 Effect of C on growth rate of *A. spissa* strains(30d)

Carbon	Galactose	Sucrose	Sorbitol	Lactose	Starch soluble	Maltose	Glucose	Xylose
Growth rate(mm/d)	1.121	1.533	0.302	1.210	0.964	1.282	1.585	0

表 3 不同氮源对块磷鹅膏生长影响(30d)

Table 3 Effect of N on growth of *A. spissa* strains(30d)

Nitrogen	Glu	Gln	Met	Asp	His	Arg	Cys	Ile	Val	BSA
Growth rate(mm/d)	0.820	0.355	0.384	0.401	0.081	0.504	0.297	0.189	0.378	0.485

2.3 气升式反应器 (Airlift/ff) 培养过程

块磷鹅膏在反应器中菌丝体的生长过程是一个逐渐增加的过程 ,呈近 S 型生长 ,这与普通的细菌和霉菌液体培养条件下的生长曲线有显著区别 ,而一些植物细胞液体培养过程的生长曲线相似 ,这可能是外生菌根真菌较为普遍的培养特征(如图 2-A ,

2.2.3 光照对块磷鹅膏生长的影响 :光照对于鹅膏菌生长有一定的影响 ,在黑暗的环境下块磷鹅膏菌的菌丝生长速率最快 ,达到 1.653mm/d ,在有光照的情况下 ,块磷鹅膏的生长速率相对较慢 ,只有 1.472mm/d。可见光照对于块磷鹅膏菌的生长没有促进作用 ,这可能与真菌不含有叶绿素 ,对光的要求不高有关。迄今为止大部分的真菌的纯培养都是在避光的条件下进行的。

2.2.4 不同碳源对块磷鹅膏生长的影响 :块磷鹅膏对于 8 种碳源的利用能力各有不同 ,如表 2 所示 ,块磷鹅膏对于葡萄糖和蔗糖的利用最好 ,生长速率可达到 1.58mm/d ;对于半乳糖、乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖没有明显差异 ;对山梨醇和木糖的利用能力最差 ,特别是木糖 ,基本上不能利用。

单因素 8 水平设计资料的 SAS 程序方差的分析结果 : $F = 553.21$ 、 $P < 0.0001$,说明 8 组数据均数之间的差别具有非常显著性意义。故可以认为在实验的 8 种碳源中菌丝对葡萄糖的利用最好。

2.2.5 不同氮源对块磷鹅膏生长的影响 :如表 3 所示 ,液体培养条件下 ,谷氨酸和精氨酸作为唯一氮源时 ,块磷鹅膏可以良好的生长 ,菌丝干重最大可达到 0.826mg/mL ;对于半胱氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、丝氨酸没有明显的差别 ;不善于利用组氨酸和异亮氨酸 ;同时块磷鹅膏菌还可以利用牛血清白蛋白。结果表明块磷鹅膏菌虽然可以利用氨基酸作为唯一氮源 ,但是对不同的氨基酸存在偏好。单因素 10 水平设计资料的 SAS 程序方差分析结果 : $F = 75.26$ 、 $P < 0.0001$,说明十组数据均数之间的差别具有非常显著性意义。故可以认为在实验的 10 种氮源中产生的菌丝干重以谷氨酸为最好。

B)。块磷鹅膏菌培养过程中 pH 值下降到 3 左右 ,这与我们在对毒蝇鹅膏的培养研究的生长相似 ,但与假褐云斑鹅膏和致命鹅膏生长不同 ,假褐云斑鹅膏和致命鹅膏都会导致培养体系的 pH 值缓慢上升。鹅膏毒肽在发酵过程中(图 2-B)基本上和菌丝的生长呈正相关 ,随着菌丝菌龄的生长和菌体量的

增多鹅膏毒肽的含量相应增加。

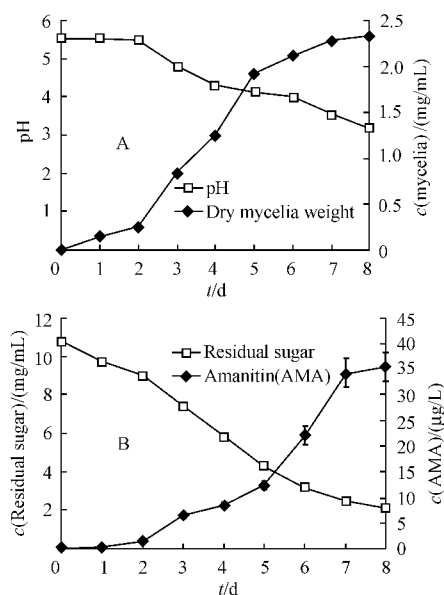


图2 块磷鹅膏在气升式反应器中的培养进程

Fig.2 Profiles of *A. spissa* in Airlift/ff bioreactor.

2.4 块磷鹅膏菌丝生长形态

块磷鹅膏在固体培养基 PDM 上的菌落致密,中央有突起,菌落为绒毛状,纯白色,反面为棕黄色,菌落表面平坦,前者边缘规则,后者菌落边缘在培养基内,表面无渗出液,也没有可溶性色素产生。在摇瓶培养中,块磷鹅膏的菌丝只是松散地悬浮在培养基内,不聚集。而在反应器液体培养过程中,初始阶段与摇瓶培养的形态没有明显差别,但是随着培养过程的进行,松散的菌丝逐渐聚集,同时密度增加,并且形成光滑的球状。相对于摇瓶培养过程,反应器中液体培养的一个最明显的特征是菌丝密度的增加,而密度的增加意味着在有限的空间内可以容纳更多的菌丝,这是反应器液体大规模培养菌丝体的基础。溶氧是液体培养中的一个限制性因素,摇瓶和反应器溶氧的差异能够影响菌丝的生长形态,此外气升式反应器培养体系内不同的流体动力学也是造成菌丝形态差异的原因之一。

2.5 块磷鹅膏粗毒素对 RNA 聚合酶 II 阻断抑制

2.5.1 粗毒素对绿豆芽生长的抑制作用:如图 3 所示,块磷鹅膏固体培养菌丝体和液体培养菌丝体的毒素粗提液都表现出对绿豆种子下胚轴的抑制活性,但两者的活性有一定的差别,它们对绿豆种子下胚轴的抑制率分别达到了 42.58% 和 73.70%,这和 α -amanitin 的含量有关,如图 4 所示,在固体培养菌丝体中,鹅膏毒素 α -amanitin 含量为 26.02 $\mu\text{g/g}$ DCW,而在液体培养菌丝体中毒素含量为 15.25 $\mu\text{g/g}$ DCW,

可见毒素对绿豆种子下胚轴的抑制率与毒素含量成正相关。

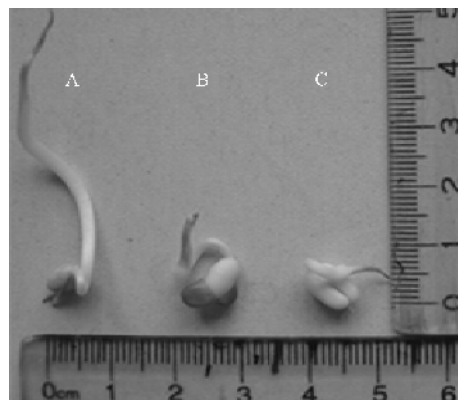


图3 块磷鹅膏粗毒素对绿豆芽生长 48h 的抑制作用

Fig.3 The effect of α -amanitin extracted from *A. spissa* on embryo root length of bean sprouts in 48h. A: Distill water; B: Mycelia culture on liquid medium (airlift bioreactor); C: Mycelia culture on solid medium.

2.6 块磷鹅膏反应器菌丝体的 HPLC 分析

HPLC 是目前分析鹅膏毒素最准确的方法^[9]。对菌丝体进行 HPLC 分析发现在 14.890min 有一明显的吸收峰(图 4),表明其菌丝体主要含有鹅膏肽类毒素 amanitin,但是不含有 phalloidin,其它可以检测的成分的量也很少,这与此前完成的块磷鹅膏子实体的 HPLC 分析结果是一致的^[10]。因此可以利用培养的块磷鹅膏菌丝体分离毒素。 $Y = 376245.4001x + 38781.0188$ $r = 0.9995$ (x :进样量(μg); Y :峰面积; r :相关系数)

3 讨论

此前国内外关于鹅膏菌的研究主要在毒蝇鹅膏(*A. muscaria*)和绿盖鹅膏(*A. phalloides*)中展开,侧重于鹅膏子实体内毒素的分析与提取,还未有过对鹅膏菌进行大规模液体培养的报道。

鹅膏菌可以利用的碳源和氮源是多样性的,鹅膏菌不仅可以利用葡萄糖、果糖等单糖,还可以利用淀粉及类似物质作为碳源^[11],甚至还可以利用脂肪酸和脂类物质^[12];在氮源的利用上,鹅膏菌不仅可以利用 NH_4^+ 、 NO_3^- 、氨基酸等常规氮源,还可以利用短肽如谷胱甘肽和缬氨酸三肽,蛋白质如牛血清白蛋白和麦醇溶蛋白作为氮源^[13,14]。我们对块磷鹅膏的碳、氮源利用的实验结果也表明,鹅膏菌能够利用的碳、氮源十分广泛,对各种不同的碳、氮源都能加以利用。

关于块磷鹅膏的毒性问题,文献资料报道的很不一致,从可食、有毒到极毒。张志光等^[15]对块磷

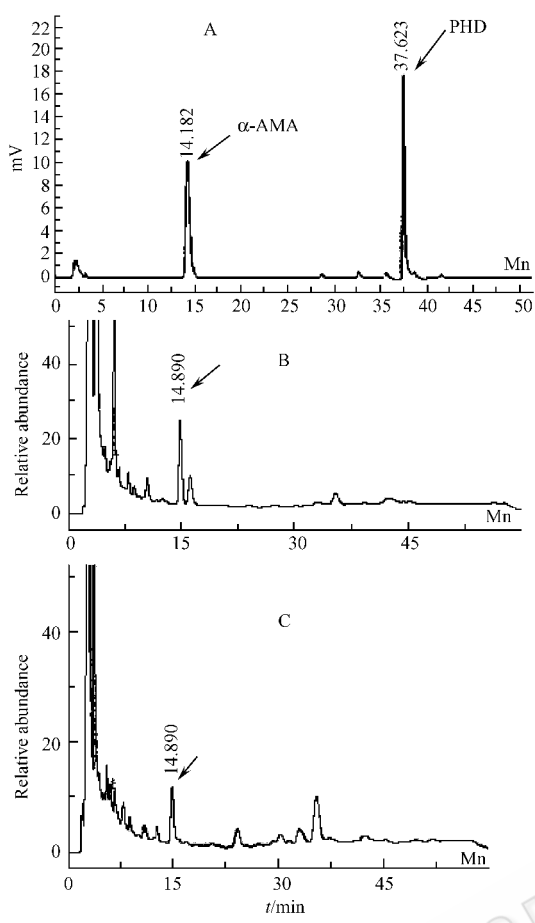


图4 固体培养和反应器培养的块磷鹅膏菌丝体提取液的高效液相色谱定量分析

Fig.4 HPLC quantitative analysis of mycelia of *A. spissa* in Airlift/bioreactor and solid culture. A: HPLC of pure α -amanitin; B: Mycelia culture on solid medium; C: Mycelia culture on liquid medium.

鹅膏菌子实体进行了毒性和毒素含量的报道,每克子实体含有 $34.90\mu\text{g/g}$ DCW 的 α -鹅膏毒肽,说明块磷鹅膏是属于有毒性的。在我们的研究中表明在固体培养基上和液体培养中菌丝体都含有 α -鹅膏毒肽毒素,但两者之间的含量有一定的差别,可能和提取时研磨不够充分,抽提的时间有关。我们在研磨中发现液体培养菌丝中含有大量的油脂,而固体几乎不含有,这也可能是其中的一个原因。

迄今为止已经分离纯化鉴定的鹅膏肽类毒素主要包括鹅膏毒肽(Amatoxins, AMA)和鬼笔毒肽(phallotoxins, PHD)两大类。对人工培养的块磷鹅膏菌丝体中毒素的 HPLC 分析(如图4所示)表明主要含有 α -鹅膏毒肽,鬼笔毒肽没有测到,可能和含量的多少、HPLC 的检测的下限有关系。此前的研究也表明块磷鹅膏子实体中含有 α -鹅膏毒肽,没有说明是否含有鬼笔毒肽^[15]。

α -鹅膏毒肽的作用机理是对植物种子萌发过程

中的 RNA 转录特异性抑制,阻碍了蛋白质的合成,从而使绿豆种子的下胚轴生长受到抑制^[7]。本文采取的简易的方法得到的数据与文献资料吻合,说明人工培养获得的 α -鹅膏毒肽与从野外子实体获得的 α -鹅膏毒肽有相同的生物学活性。固体培养基上的纯培养菌丝虽然可以作为替代品,但是其培养效率太低,而应用生物反应器液体培养菌已经是一种比较成熟的生物技术,因此利用液体深层培养大规模生产鹅膏菌丝体来获取鹅膏毒素是可能的。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所卯晓岚先生在鹅膏菌分类学方面的指导;感谢湖南师范大学张志光先生、陈作红教授和张平博士在菌采集、菌种鉴定以及 HPLC 分析中给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] 卯晓岚. 中国鹅膏菌科毒菌及毒素. 微生物学通报, 1991, 18(3): 160-165.
- [2] 张志光, 张晓元, 李东屏. 鹅膏多肽毒素在生命科学研究中的应用. 卫生研究, 1999, 28(1): 60-63.
- [3] 蒋盛岩, 张志光, 张平. 外生菌根菌白毒伞菌丝纯培养条件. 湖南师范大学学报, 2002, 25(1): 75-77.
- [4] Hutchison LJ. Description and identification of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon*, 1991, 41(2): 387-354.
- [5] Kueh C. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45: 319-326.
- [6] Marx DH. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to roots to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 1969, 59: 153-163.
- [7] 张志光, 刘建强, 张晓元, 等. 一种简便、快速测定鹅膏多肽毒素的方法-抑芽法. 菌物系统, 2001, 20(3): 381-386.
- [8] 陈豫, 李东平, 张志光. 外生菌根真菌鳞柄白鹅膏的纯培养研究. 安徽农业大学学报, 1999, 26: 345-348.
- [9] Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, et al. Amatoxins and phallotoxins in *Amanita* species: high-performance liquid chromatographic determination. *Mycologia*, 1993, 85(4): 579-584.
- [10] 陈作红, 张志光, 张平. 我国 28 种鹅膏菌主要肽类毒素的检测分析. 菌物系统, 2003, 22(4): 565-573.
- [11] Ohta A. Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience*, 1997, 38: 403-408.
- [12] Hattori T, Ohta A, Itaya M, et al. The ability of ectomycorrhizal fungi to utilize fatty acids and a lipid as a carbon source for mycelial growth. *Can J Bot*, 2003, 81(12): 1285-1292.
- [13] Abuzinadah RA, Read DJ. Amino acids as nitrogen sources for ectomycorrhizal fungi: utilisation of individual amino acids. *Trans Br Mycol Soc*, 1988, 91(4): 473-479.
- [14] Abuzinadah RA, Read DJ. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytol*, 1986, 103(4): 481-493.

[15] 张志光, 陈作红, 刘建强, 等. 块鳞灰鹅膏菌和角鳞灰鹅膏菌

毒性及多肽毒素测定. 菌物系统, 2001, 20(4): 572–574.

Culture conditions and analysis of amanitins on *Amanita spissa*

GUO Xue-wu^{1,2}, WANG Guo-lun^{1,2}, GONG Jian-hua^{1*}

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049 China)

Abstract: Isolate of *Amanita spissa* was obtained from basidiome stipe material collected from environment. It could utilize a broad range of carbon and nitrogen resources. Study on the influence of different conditions for solid culture was carried out. Optimal culture conditions were at 28°C, pH6, in the dark. *A. spissa* was then fermented in liquid culture for more mycelia. In flask and Airlift/ff bioreactor, maximum dry mycelia weight of *A. spissa* reached 0.893g/L and 2.33g/L, respectively. Mycelia obtained from solid culture and Airlift/ff bioreactor were then analyzed by HPLC. The results showed that mycelia from both cultures contained amatoxins but no phallotoxins. α -amanitin in mycelia reached 26.02 μ g/DWg under solid culture condition, and 15.25 μ g/DWg under liquid culture condition. The amanitins were also confirmed by bud-inhibited assay. The results revealed that the effect of amanitin on mung bean cell was identical to that of authentic amanitins. This work suggests that it is possible to produce amatoxin by liquid culturing of *A. spissa*.

Keywords: *Amanita*; Growth rate; Bud-inhibited assay; HPLC analysis

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62545134; E-mail: gongjh@sun.im.ac.cn

Received: 6 July 2005/Accepted: 19 July 2005/Revised: 25 July 2005