蛹虫草液体培养基的研究

顾寅钰　张亚平　施新琴　刘志斐　李化秀

(山东省蚕业研究所)

蛹虫草与冬虫夏草同属异种,是我国分布最广的具有药用价值的两种虫草菌。蛹虫草(Cordyceps militaris L. link)亦称北虫草或北冬虫夏草,属于真菌门(Eumycota),子囊菌亚门(Ascomycotina)、肉座菌目(Hypocreales)、麦角菌科(Clavicipitaceae)、虫草属(Cordyceps),寄生于夜蛾科等蛹体上,分布于世界各地,是一种国内外公认的既可食用又可药用的真菌。研究表明蛹虫草与冬虫夏草具有相同的属性,相似的药理功能及相近的临床效果,可替代冬虫夏草入药。

野生虫草资源有限,因此人们开始转而研究蛹虫草的人工栽培。蛹虫草对于生长环境的要求相对较低,人工培养相比之下较为容易,除了可经液体发酵形成菌丝体外,还可通过人工大规模固体培养获得子实体,另外通过活体培养进行规模化蛹虫草生产也成为现实。而且现有的多数文献认为人工培养的蛹虫草其有效成分和含量与冬虫夏草相仿,有的甚至更高。所以,近年来蛹虫草的研究取得了迅速的发展。培养基的成分对蛹虫草的生长影响较大,碳源、氮源、无机盐和 PH 值等都是影响蛹虫草生长的重要因素,因此本文对其液体培养基进行了研究。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌种　菌种为来自锦州的草头 6-1。

1.1.2　药品　葡萄糖、土豆、蛋白胨、硫酸、氢氧化钠、磷酸二氢钾和硫酸镁。

1.1.3　基础培养基　葡萄糖(适量)、蛋白胨(适量)、硫酸镁 1g、磷酸二氢钾 2g、水 1 000 mL,制备方法同常规。

1.1.4　设备和仪器　恒温培养箱、高压灭菌锅、超净工作台、电子称、光电显微镜、高温干燥箱、血球计数板、滤纸等。

1.2　方法

1.2.1　接种与培养　每个三角瓶内培养基为 100ml,接种时按无菌操作要求,向各三角瓶中央接入菌悬液 0.1ml,孢子液的浓度用血球计数板测定。每个设区有三个重复,接种后置于 22℃恒温箱遮光培养,7d后调查。

1.2.2　测定方法　采用菌丝重量法。用滤纸过滤,置入高温干燥箱中 80℃烘至恒重,采用电子称称取菌丝干重。

1.2.3　试验方法

1.2.3.1　碳源实验　在基础培养基中,葡萄糖浓度依次为 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%,测其菌

©

丝体干重来确定碳源的最佳浓度。

1.2.3.2 氮源实验 在基础培养基中,蛋白胨浓度依次为 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%,测其菌丝体干重来确定碳源的最佳浓度。

1.2.3.3 正交实验 碳源与氮源的含量各设为 1%,2%,3%进行正交试验,其余按常规配方,测其菌丝干重。

1.2.3.4 无机盐含量实验 无机盐含量试验测定了磷酸二氢钾和硫酸镁,含量分为 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%和 0%, 0.05%, 0.15%, 0.2%,其余为常规配方,测其菌丝干重。

1.2.3.5 PH值实验 按常规培养基配方,用硫酸和氢氧化钠调 PH值,设区为 4, 4.5, 5, 5.5, 5.8, 6, 6.5, 7,测定菌丝干重。

2 结果与分析

2.1 碳源含量试验

在对液体培养基的碳源含量进行的研究中,采用的是葡萄糖,接种用孢子浓度为 950000个/ml,试验结果见图 1,从图中可以看出培养基的葡萄糖含量从 0%～5%之间,菌丝生长量是呈递进关系的,也就是说在此范围内,菌丝生长量是随着含糖量的增加而增加的。

2.2 氮源含量试验

在对液体培养基的氮源含量进行的研究中,采用的是蛋白胨,接种用孢子浓度为 675000个/ml,试验结果见图 2,从图中可以看出培养基的蛋白胨含量从 0%～5%之间,菌丝生长量也是呈递进关系的,也就是说在此范围内,菌丝生长量是随着含氮量的增加而增加的。

2.3 正交试验

从碳源与氮源的正交试验结果(表 1)可以看出氮源浓度的变化对菌丝干重的影响较大,相对氮源来说,碳源影响较小,且二者的菌丝干重均随浓度的增加而增加。本试验只做到 3%,所以以碳、氮浓度各 3%的设区为最高。

表 1 碳源浓度与氮源浓度正交试验结果

试验序号	碳源浓度(%)	氮源浓度(%)	菌丝干重(g)
1	1	1	0.308
2	1	2	0.528
3	1	3	0.668
4	2	1	0.370
5	2	2	0.672
6	2	3	0.734
7	3	1	0.364
8	3	2	0.755
9	3	3	1.101
均值 1	0.501	0.348	
均值 2	0.592	0.652	
均值 3	0.740	0.834	
极差	0.239	0.487	

©

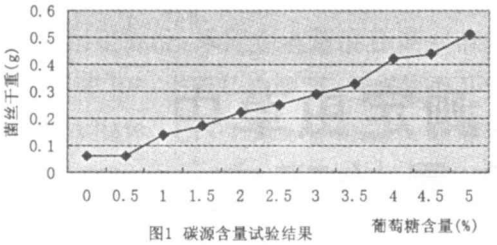

图1 碳源含量试验结果

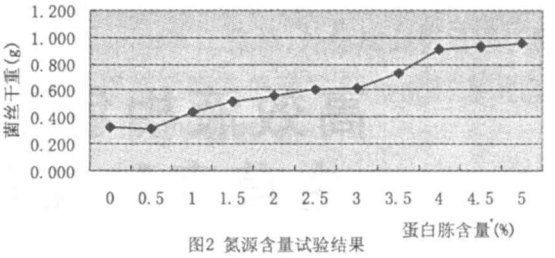

图2 氮源含量试验结果

2.4　无机盐试验

无机盐试验主要做了磷酸二氢钾和硫酸镁,结果见图 3和图 4,从图中可以看出添加磷酸二氢钾后菌丝生长量明显高于未添加区,以

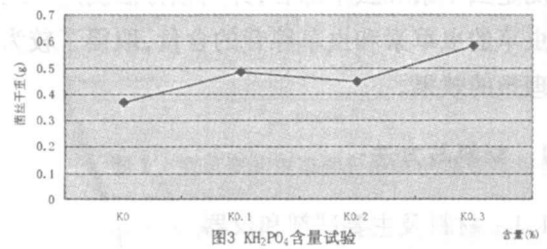

图3 KH_2PO_4含量试验

2.5　PH值试验

PH值试验结果见图 5,从图中可以看出PH为 6时菌丝生长量最高,而从 4.5至 7之间对菌丝生长量的影响不是很明显。

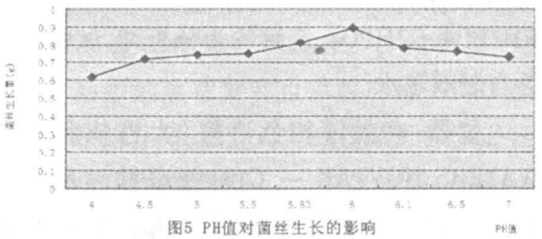

图5 PH值对菌丝生长的影响

3　小结与讨论

3.1　在 0%～5%的范围内菌丝生长量随葡萄糖的含量增加而增加,但是常规上多采用 2%的比例,张以俭、尹萍、朱姣等都认为 2%最好,王飞等认为 3%为佳,这可能与采用的菌种、接种方法、培养条件等有关,另外,有的人是根据接种于活体寄主后的表现判断的,这也

含量 0.3%为最高,但 0.1%和 0.3%之间差距不是很明显。而添加硫酸镁后菌丝生长量也高于对照,但是以添加量 0.2%时明显高于其它设区。

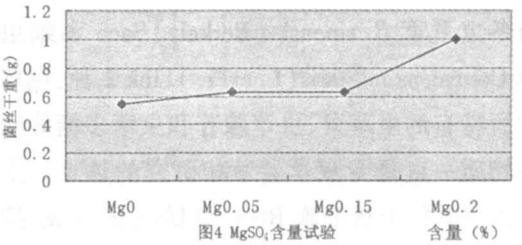

图4 $MgSO_4$含量试验

可能是导致结果不同的一个原因。还有一个原因可能是糖类在高压灭菌的情况下均发生某种程度的改变,导致含高糖分的培养基颜色不同程度的加深,时间越长,糖分越高的培养基颜色越深;同时糖在高温时易形成焦糖,也影响微生物的培养效果。

3.2　在 0%～5%的范围内菌丝生长量随蛋白胨的含量增加而增加,即在葡萄糖的含量一定的前提下,蛋白胨的含量越高则菌丝干重越高,反之则越低。正交试验结果也证明了以上结论。这也与其他人的实验结果和常规采用的浓度不同,张以俭和王飞等都认为 3%较好,而朱姣则认为 2.5%最好,一般人都采用 3%左右的氮源含量。这也可能是实验方法和目的不同所致。

3.3　本试验所设浓度是参考其它文献和教材确定的,所以最高只设到 5%,(下转第 10页)

©

RSD为 0.024 7%。此结果表明,本方法的重现性良好。

2.6 加样回收率试验

取测定过虫草素和虫草腺苷含量的北虫草 5份,精密称量后分别加入 2种标准品,按 1.2方法操作,进行 HPLC分析,测定虫草素和虫草腺苷的含量,计算加样回收率。研究发现平均加样回收率为 100.7%和 99.01%, RSD为 0.375%和 0.501%。此结果表明,本测定方法符合加样回收率的要求。

3 讨 论

用该方法测定样品中虫草素和虫草腺苷的含量,目标色谱峰分离效果好,结果稳定可靠,是测定各种虫草样品中虫草素和虫草腺苷含量的有效方法。该方法具有流动相低毒、少有机溶剂、高分离度等优点,且目标峰保留时间适中,减少了分析样品的分析时间,提高分析效率、分析质量,同时改进的提取方法可以快速、有效的提取虫草素和虫草腺苷,因此本测定方法具有良好的实用性。

为提高测定的准确性和可靠性,本方法在实际应用过程中需要注意以下问题:首先,对虫草素和虫草腺苷的提取,采用双蒸水微波处理 1min,提取率达到 99%以上,该方法方便、快捷,微波处理时应注意不要沸腾漾出,以免影响测定结果。其次,虫草素和虫草腺苷的水提液,在室温下能稳定存在 6h,超过 12h后,虫草素和虫草腺苷发生变化,产生新的物质,干扰目标峰,所以,应及时测定虫草提取液的虫草素和虫草腺苷。最后,色谱柱的更换、柱温和流动相的比例等对样品的分离效果、保留时间和峰面积均有影响,以上条件改变之后,需要重新制作标准曲线。

(上接第 7页)

结果碳源、氮源均未出现最高峰,所以想获得最高值只能再提高浓度,鉴于生产上多采用 2%～3%的浓度,可能是综合考虑的结果,因此在选择碳氮源的含量时应根据自己的需要综合考虑选择所需浓度。

3.4 磷酸二氢钾的浓度以 0.3% 较好,硫酸镁以 0.2%的菌丝生长量为最高, PH值则是等于 6的情况下菌丝生长最好。

(上接第 32页)

大棚升温,同时达到排湿目的。

6 注意事项

6.1 提高健蚕率是防止蚕病发生的根本。同时发动蚕农搞好选茧,也是防止僵菌孢子在茧内、好蛹内蔓延的一种措施。

6.2 户内管理要加强,不能做表面文章,保证踏步池使用率及换鞋率 100%。另外户内小环境的每日消毒要跟上,保证清洁卫生。

6.3 对于没有备足草木灰的地区,要大力推广用漂白粉液喷体的方法。

6.4 桑叶添食,尤其是在阴雨天气下添食氯霉素,预防细菌病的发生,保证蚕体健壮。

6.5 保持种叶平衡,合理用桑,尽量不要外出买桑,买回的桑叶也要及时消毒。

6.6 当地农民蔬菜及果园所用农药,禁止使用僵菌制剂的药类。

©