

野生蝉花液体菌种培养条件的优化

谢春芹, 曹正, 凡军民, 许俊齐, 贾君

(江苏农林职业技术学院 生物工程系, 江苏 句容 212400)

摘要:以野生蝉花菌种为试材,采用液体培养法,研究了碳源、氮源、微量营养和 pH 对野生蝉花菌种生长的影响,以期标准化、规模化、产业化人工栽培蝉花提供优质种源。结果表明:将野生蝉花菌株接种到液体培养基中,在 19℃,转速 120 r·min⁻¹ 恒温振荡摇床内培养,蝉花菌种的最适液体培养基组分为可溶性淀粉 20 g,奶粉 10 g,磷酸二氢钾 0.5 g,硫酸镁 1 g,维生素 B₁₂ 10 片,水 1 000 mL,最适 pH 5.0~6.0。

关键词:野生蝉花;液体菌种;培养基

中图分类号:S 646.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0165-05

蝉花属肉座菌目虫草科棒束孢属(*Isaria* Pers.),是寄生在蝉若虫上的真菌子座及若虫尸体的复合体^[1],其学名应为蝉棒束孢(*Isaria cicadae* Miq.),又名金蝉花、蝉茸、蝉蛹草、虫花,而蝉虫草(*Cordyceps cicadae* (Miq.) Massee)和蝉拟青霉(*Paecilomyces cicadae* Samson)是蝉花的异名^[2]。野生蝉花资源稀少,利用人工培养技术,把野生资源变为可持续利用的药用资源,集保护和利用于一体,而且人工培养的蝉花菌不含重金属,比天然冬虫夏草相对更安全。

蝉花的主要活性物质与冬虫夏草相似^[3-4],包括甘露醇、虫草多糖 CT-4^[5]、D-甘露醇^[6]、多球壳菌素(ISP-1)^[7-12]、麦角固醇(ergosterol)、麦角固醇过氧化物^[13-14]、环肽化合物^[13]、半乳甘露聚糖 C-3^[5]和虫草酸(甘露醇)等,对多种疾病如糖尿病等具有辅助治疗功能^[14]。

第一作者简介:谢春芹(1976-),女,硕士,副教授,现主要从事食用菌真菌教学与科研等工作。E-mail: xiechunqin@163.com。

责任作者:贾君(1966-),女,博士,教授,现主要从事食品检测与分析等研究工作。E-mail: jnujia66@163.com。

基金项目:2015 年江苏省“六大人才高峰”资助项目(NY-024);江苏农林职业技术学院资助项目(2014KJ28)。

收稿日期:2016-08-04

蝉花菌种的生产方式主要有液体和固体培养^[6],液体菌种生长周期短,便于规模化生产^[16],但目前,蝉花液体菌种生产的方法主要是参照蛹虫草^[17-18],而针对蝉花液体菌种生产所需的营养及成分配比研究甚少,该试验以句容地区野生蝉花为试材,研究了碳源、氮源、微量营养元素及培养基初始 pH 对液体菌种菌丝生长的影响,以期标准化、规模化、产业化人工栽培蝉花提供优质的种源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生蝉花菌种由江苏农林职业技术学院提供,样品采自江苏句容瓦屋山林场,用组织分离方法获得。

供试试剂:葡萄糖、麦芽糖、乳糖和可溶性淀粉,国药集团化学试剂有限公司生产;蔗糖,南京甘汁园糖业有限公司生产;奶粉,双城雀巢有限公司生产;蛋白胨、尿素、酵母膏,北京奥博星生物技术有限责任公司生产;维生素 B₁、B₂、B₆、B₁₂,华中药业股份有限公司生产;磷酸二氢钾、硫酸镁,上海统亚化工科技发展有限公司生产。

仪器设备:DHZ-DA 型恒温振荡器、PL203 梅特勒-托利多电子天平、PRX-250A 恒温箱、超净工作台、

under low temperature stress were studied. The results showed that treated with exogenous BR, the activities of antioxidant enzymes, such as CAT, POD and SOD, and soluble protein content all increased compared with the control, reduced membrane potential and activities of Ca²⁺-ATP enzyme and Mg²⁺-ATP enzyme in the chloroplast membrane also increased at variable degrees. Under the stress of low temperature, exogenous BR would enhance activities of Ca²⁺-ATP enzyme and Mg²⁺-ATP enzyme in the chloroplast membrane and ease damage to the cell membrane by enhancing activity of antioxidant enzymes, content of antioxidants and osmolytes, which could improve capabilities of *Rhodiola kirilowii* seedling to resist low temperature.

Keywords: exogenous substances; brassinosteroids; low temperature; *Rhodiola fastigiata*

YX-400A 高压蒸汽灭菌锅及其它常用工具等由江苏食用菌研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 基础培养基配方 野生蝉花液体菌种的基础培养基配方为葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸镁 1 g, 维生素 B₁ 10 片, 水 1 000 mL。

1.2.2 优化碳源培养基配方 分别用麦芽糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉, 以同等量替代基础培养基中的葡萄糖作为碳源, 基础培养基中的其它组分与配比不变^[18-19]。

1.2.3 优化氮源培养基配方 以酵母膏、奶粉、尿素、氯化铵同等量替代基础培养基中的蛋白胨作为氮源, 基础培养基中的其它组分与配比不变^[18-19]。

1.2.4 优化微量营养培养基配方 用维生素 B₂、维生素 B₆、维生素 B₁₂ 以同等量替代基础培养基中的维生素 B₁, 基础培养基中的其它组分与配比不变。

1.2.5 优化培养基 pH 通过上述试验比较, 将最优碳源、氮源、微量营养同等量加入到基础培养基中, 其它组分与配比不变, 配制成液体培养基, 用柠檬酸(2 mol·L⁻¹)和 NaOH(1 mol·L⁻¹)将液体培养基的 pH 从自然调到 1~10, 进行常规高压灭菌 40 min, 冷却备用^[19]。

1.2.6 最适培养基配方的优化 在上述试验的基础上, 将最优的碳源、氮源、微量营养等量替换到 1.2.1 基础培养基中, 此配方为最优基础培养基(CK), 并对 CK 配方中的营养进行减半(配方 I), 增加 2 倍(配方 II), 增加 4 倍(配方 III), 增加 6 倍(配方 IV), 在相同的培养条件下, 测定各配方蝉花菌丝生长性状, 以筛选出最优的培养基各组分的配比。

1.2.7 液体培养基的制备 按常规液体培养基配制方法^[20], 将已配制好的液体培养基按每瓶 100 mL(500 mL 的三角瓶)分装于三角瓶内, 用组培专用封口膜封口, 进行常规高压灭菌 40 min, 冷却备用。

1.2.8 接种与培养 按无菌操作的要求, 每瓶接入 2 块直径为 0.5 cm 的菌饼块, 接种后立即放入 19 °C 恒温的培养箱中静置培养 24 h, 然后放入转速 120 r·min⁻¹ 的摇床中继续振荡培养。

1.3 项目测定

1.3.1 液体菌种菌丝球直径的测定 接种后 48 h 开始测定, 以后每隔 24 h 测定 1 次。每次测量取液时均需在超净工作台内进行, 用移液枪取 3 mL 培养液放入垫有吸水纸的培养皿中, 随机取 30 个菌丝球排成一行, 用游标卡尺测总长度^[20], 并计算出平均每个菌丝球的直径。

1.3.2 液体菌种菌丝球密度的测定 测量时间及取液方法同 1.3.1, 取出 3 mL 的培养液放入垫有彩色吸水纸的培养皿中, 通过计数法求出 1 mL 培养液中的菌丝球数量。

1.3.3 液体菌种菌丝生物量的测定 测量时间及取液方法同 1.3.1, 取出 3 mL 培养液放入垫有滤纸的培养皿中, 静止 60 s, 将菌丝球全部移入烘干的培养皿中, 置于电子天平上测质量。

1.3.4 液体培养基 pH 的测定 在超净工作台内, 以无菌操作的方式, 用灭过菌的移液枪取培养液置于 pH 测定仪中测 pH 并记录。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对蝉花液体培养菌丝生长的影响

碳元素是真菌最重要的营养, 它不仅是碳水化合物, 还是蛋白质的基本组成元素, 同时又是重要的能源来源。培养基中添加不同碳源, 对蝉花菌丝的生长存在明显差异(表 1), 在 5 种碳源中, 以可溶性淀粉作为液体培养基的菌丝生长最优, 菌丝的生长量、菌丝密度分别是基础培养基和加入葡萄糖培养基的 14 倍和 4 倍。液体菌种培养到第 3~4 天是菌丝生长是最旺盛时期(图 1), 5 种碳源培养基中的液体菌丝生长量的大小, 依次为可溶性淀粉>乳糖>麦芽糖>葡萄糖>蔗糖。

表 1 不同碳源对蝉花液体培养菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different carbon sources on *Isaria cicadae* growth in liquid culture

碳源	菌丝球直径	单个菌丝球质量	菌丝球密度	培养液颜色
Carbon	Hypha ball	Single hypha	Hypha ball density	Culture solution
source	diameter/mm	ball weight/mg	/(个·mL ⁻¹)	color
葡萄糖 Glucose	1.05	5.500	11.00	茶褐色
麦芽糖 Maltose	1.18	4.650	9.33	茶褐色
蔗糖 Sucrose	1.35	3.900	6.50	茶褐色
乳糖 Lactose	1.57	8.050	11.50	茶褐色
可溶性淀粉 Starch	1.72	78.933	49.33	紫红色

注: 取液体菌种培养第 3 天的菌丝球进行测定。

Note: Hypha balls after cultured in liquid bacteria cultivation on the third day are determined.

2.2 不同氮源对蝉花菌丝生长的影响

5 种氮源对蝉花液体培养菌丝生长的影响差异显著, 以奶粉作为氮源的菌丝生长最优, 酵母膏和蛋白胨有机氮的菌丝球密度稠密, 但菌丝球的直径大小不一致, 奶粉和蛋白胨的直径高于其它的氮源, 而尿素作为氮源培养基中的菌丝几乎未长(图 2)。在培养过程中培养液的颜色也是有变化的, 酵母膏的呈红褐色, 奶粉培养液的呈粉红色(图 3)。



注:从左到右培养基中的碳源分别为葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉。

Note: From left to right the carbon source in the culture medium is glucose, maltose, sucrose, lactose and soluble starch, respectively.

图1 不同碳源液体培养基中第4天蝉花菌丝生长情况

Fig. 1 Growth of *Isaria cicadae* hypha in liquid culture of different carbon source on the fourth day

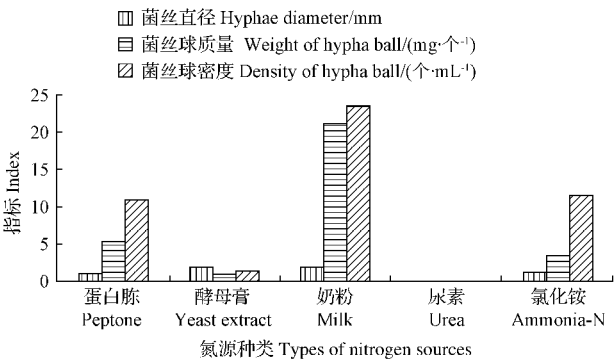
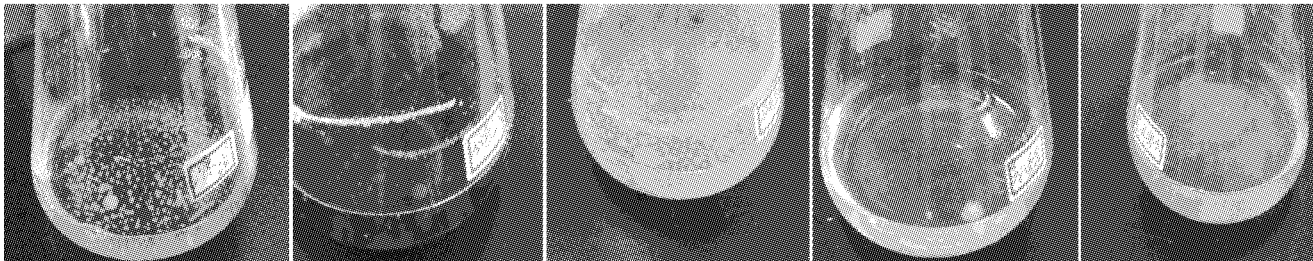


图2 培养基中添加不同氮源对蝉花液体菌丝生长的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on *Isaria cicadae* growth in liquid culture



注:从左到右培养基中的氮源分别为蛋白胨、酵母膏、奶粉、尿素和氯化铵。

Note: From left to right the nitrogen source in the culture medium is peptone, yeast extract, milk powder, urea and ammonium chloride, respectively.

图3 不同氮源液体培养基培养第4天蝉花菌丝生长情况

Fig. 3 Growth of *Isaria cicadae* hypha in liquid culture of different nitrogen sources on the fourth day

2.3 不同微量元素对蝉花菌丝生长的影响

B族维生素作为微量营养,对蝉花的生长有着明显的影响。在液体培养基中适当的加入一些B族维生素可促进菌丝的生长,在维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、维生素B₁₂4种培养基中,其中添加维生素B₁₂的培养基蝉花菌丝生长量明显高于维生素B₁、维生素B₂和维生素B₆(图4)。

在蝉花液体菌种培养过程中第4天时只有维生素B₁培养基没有变色,而其它3种维生素的培养基均变为红褐色(图5)。

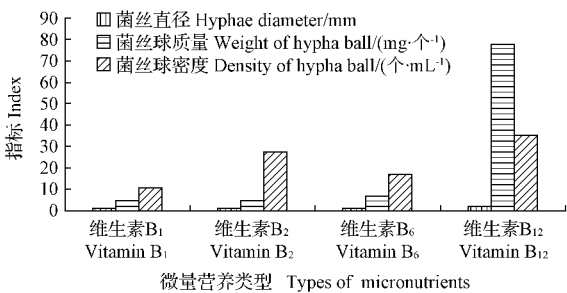


图4 培养基中添加不同微量营养对蝉花液体菌种丝生长的影响

Fig. 4 Effect of different micronutrients on *Isaria cicadae* growth liquid culture

2.4 液体培养基不同 pH 对蝉花菌丝生长的影响

在液体培养基初始 pH 在 1.0~10.0 的配方中,蝉花菌丝生长存在一定差异。pH 在 5.0~9.0 的蝉花菌

丝生长量明显优于其它 pH 范围内的菌丝。其中 pH 在 5.0~6.0 范围,菌丝球的密度最高,菌丝的生长量最大,而菌丝球的直径适中(表 2)。

表 2

不同初始 pH 对蝉花菌丝生长的影响(取培养第 5 天的菌丝)

Table 2

Effect of different initial pH on *Isaria cicadae* hypha growth (the fifth day)

初始 pH	菌丝直径	单个菌丝球质量	菌丝球密度	培养液颜色
Initial pH	Hypha diameter/mm	Single hypha ball weight/mg	Hypha ball density/(个·mL ⁻¹)	Culture color
1.0	0.00	0.000	0.00	乳白色
2.0	0.68	1.100	3.67	乳白色
3.0	1.36	14.933	18.67	乳白色
4.0	0.87	12.667	12.67	灰白色
5.0	1.17	227.000	107.67	粉红色
6.0	2.31	33.180	4.20	深红色
7.0	1.43	126.800	105.67	粉红色
8.0	2.42	47.533	15.33	深红色
9.0	1.526 6	68.200 0	22.00	咖色
10.0	1.272 5	1.833 3	0.67	咖色

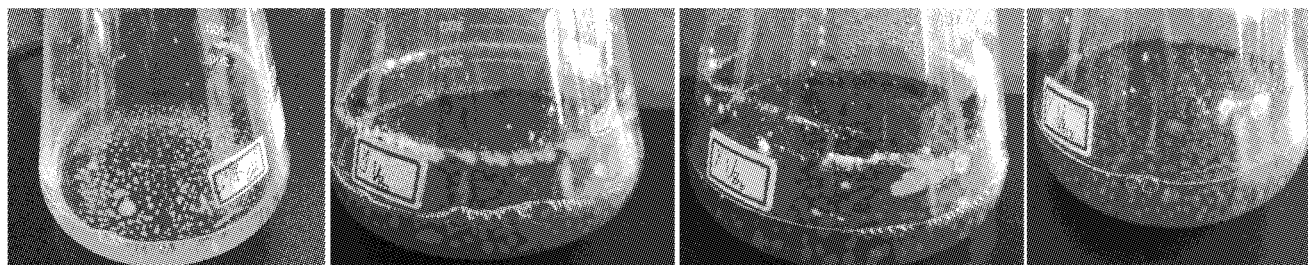
注:从左向右培养基中的微量营养依次为维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、维生素 B₁₂。Note: From left to right the micronutrient in the culture medium is vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, vitamin B₁₂.

图 5 不同微量营养液体培养基培养第 4 天蝉花菌丝生长情况

Fig. 5 Growth of *Isaria cicadae* hypha in liquid culture of different micronutrients on the fourth day

2.5 液体菌种最适培养基的优化

在液体培养基中,最优碳源、氮源、微量营养的不同添加量对蝉花液体菌丝的生长有着显著的影响,其中最优化基础培养基(CK)的菌丝生长最佳(图 6),而减半培养基的菌丝生长最差,培养至第 5 天的菌丝球密度仅为最优培养基的 1/8 (图 7)。

3 结论

通过在液体培养基中添加不同的碳源、氮源和微量营养对蝉花菌种生长的影响比较,最佳培养基配方为可溶性淀粉 20 g,奶粉 10 g,磷酸二氢钾 0.5 g,硫酸镁 1 g,维生素 B₁₂ 10 片,水 1 000 mL。

在基础培养基配方不变的情况下,培养基的初始 pH 在 5.0~6.0 菌丝生长速率明显高于其它 pH,因此,

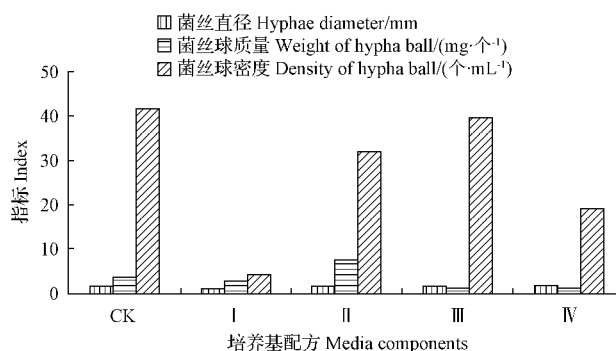


图 6 培养基中添加不同量的最适营养对蝉花液体菌种丝生长的影响

Fig. 6 Effect of different the most suitable nutritions on *Isaria cicadae* growth in liquid culture

图 7 不同量最优营养配方的液体培养基培养第 4 天蝉花菌丝生长情况

Fig. 7 Growth of *Isaria cicadae* hypha in liquid culture of the optimal nutritions on the fourth day

蝉花菌丝液体发酵培养的初始最适宜 pH 为 5.0~6.0。蝉花液体菌种的菌丝培养在第 3~4 天是菌丝生长最旺盛时期,此时,菌丝直径适中,密度大,菌丝生长最快,是液体发酵培养最最佳的接种时期,因此,商业化栽培蝉花可利用培养 3~4 d 的菌丝球作为菌种,有利获得高产。

该试验中菌丝的生长速度明显比文欣^[6]选用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉 5 种碳源进行液体培养的蝉花菌种快 24 h 左右,可能是由于不同地区蝉花对营养的需求存在差异,也可能与菌株间的遗传特性有关,还需进一步试验验证。该研究能为句容地区野生蝉花的人工培养提供优质的菌种。

参考文献

- [1] 滕晔,宋玉良,官宗华. 蝉花人工培养的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2012(12):111-112.
- [2] 董彩虹,李文佳,李增智,等. 我国虫草产业发展现状、问题及展望[J]. 菌物学报, 2016, 35(1):1-15.
- [3] 于士军,柴新义,樊美珍. 蝉花菌质主要营养成分和活性成分分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(1):155-158.
- [4] 陈成,许佳伟,孙细涓,等. 茅山地区蝉花菌株的分离及其多糖生物活性的研究[J]. 江苏农业科学, 2015(4):347-352.
- [5] KIHOTO T, NAGAI K, MIYAMOTO I, et al. Polysaccharides in fungi. XXV. Biological activities of two galactomannans from the insect-body portion of Chan hua (fungus: *Cordyceps cicadae*) [J]. Yakugaku Zasshi, 1990, 110: 286-288.
- [6] 文欣. 蝉花真菌的筛选及其液态发酵工艺的优化[D]. 长沙:湖南农业大学, 2013.
- [7] FUJITA T, INOUE K, YAMAMOTO S, et al. Fungal metabolites. Part II. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite [J]. J Antibiot, 1994, 47:208-215.
- [8] WASSER S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60:

258-274.

- [9] HOJJATI M R, LI Z Q, ZHOU H W, et al. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in Apo E-deficient mice[J]. J Biol Chem, 2005, 280:10284-10289.
- [10] PARK T S, ROSEBURY W, KINDT E K, et al. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces the regression of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic Apo E-deficient mice[J]. Pharmacol Res, 2008, 58:45-51.
- [11] GLAROS E N, KIM W S, RYE K A, et al. Inhibition of atherosclerosis by the serine palmitoyl transferase inhibitor myriocin is associated with reduced plasma glycosphingolipid concentration[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73:1340-1346.
- [12] PARK T S, PANEK R L, REKTHEL M D, et al. Modulation of lipoprotein metabolism by inhibition of sphingomyelin synthesis in Apo E knockout mice [J]. Atherosclerosis, 2006, 189:264-272.
- [13] KUO Y C, LIN L C, DON M J, et al. Cyclodipeptide and dioxomorpholine derivatives isolated from the insect-body portion of the fungus *Cordyceps cicadae* [J]. J Chin Med, 2002, 13:209-219.
- [14] KUO Y C, WENG S C, CHOU C J, et al. Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadae* [J]. Br J Pharmacol, 2003, 140:895-906.
- [15] 何亚红,何晓青,杨渊,等. 蝉花对治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(2):868-869.
- [16] 杨辉德. 推广液体菌种以改变食用菌生产方式[J]. 现代农业科技, 2009(11):93.
- [17] 汪宇,于荣敏,佟志清,等. 蛹虫草液体培养条件的优化及生长动力学考[J]. 中国野生植物资源, 2003(4):56-60.
- [18] 王稳. 食用菌液体菌种的工艺研究及应用[D]. 镇江:江苏大学, 2005.
- [19] 马瑞霞,刘慧. 杏鲍菇液体菌种培养基的筛选及培养条件的探讨[J]. 中国农学通报, 2011(7):452-456.
- [20] 郑婷婷. 蛹虫草液体培养及其有效成分含量分析[D]. 西安:西北大学, 2006.

Optimization of Wild *Isaria cicadae* Stain Liquid Culture

XIE Chunqin, CAO Zheng, FAN Junmin, XU Junqi, JIA Jun

(Biological Engineering Department, Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangsu 212400)

Abstract: *Isaria cicadae* strain was used as material. The effect of different carbon sources, nitrogen sources, micronutrients, and pH on *Isaria cicadae* strain growth in liquid culture were studied. The results showed that when the culture condition was 19 °C, revolving speed 120 r · min⁻¹, the best component of *I. cicadae* strain were soluble starch 20 g, milk powder 10 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄ 1 g and vitamin B₂ 10 plates, water 1 000 mL, initial pH 5.0—6.0.

Keywords: *Cordyceps cicadae*; liquid strain; medium