

不同栽培温度对蛹虫草主要活性成分的影响

李居宁¹, 方华舟²

(1. 荆楚理工学院 科研处, 湖北 荆门 448000; 2. 荆楚理工学院 生物工程学院, 湖北 荆门 448000)

摘要:以优质蛹虫草菌株为试材, 分别以 12、16、20、24、28 ℃ 5 种不同温度进行单因子对照试验, 比较不同温度处理后蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸含量等的变化, 探索不同温度处理对蛹虫草主要活性成分的影响及规律。结果表明: 蛹虫草发菌、转色、原基分化、子实体生长等主要生长阶段的培养温度分别为约 20、24、24、16 ℃ 时, 蛹虫草主要活性成分含量相对较高; 栽培实际以约 16~20、20~24、20~24、16~20 ℃ 为宜。说明实行变温管理是提高蛹虫草主要活性成分及产品质量的重要措施之一。

关键词:蛹虫草; 温度; 蛋白质; 多糖; 虫草素; 虫草酸; 含量

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0157-05

蛹虫草 (*Cordyceps militaris* Link) 属真菌界 (Fungi)、双核菌亚界 (Bikarya)、子囊菌门 (Ascomycota)、子囊菌纲 (Ascomycetes)、粪壳菌亚纲 (Sordariomycetidae)、肉座菌目 (Hypocreales)、麦角菌科 (Clavicipitaceae)、虫草属 (*Cordyceps* Link) 模式种, 又名北冬虫夏草、北虫草, 是我国宝贵的重要虫草资源^[1]。大量研究证实蛹虫草主要活性成分及医疗保健功效与著名冬虫夏草相类似, 甚至虫草素等活性成分明显高于冬虫夏草, 被认为是冬虫夏草的理想替代品及药用真菌的后起之秀^[2-3], 因而引起人们的广泛重视。研究证实, 蛹虫草含有充足的虫草类主

要活性物质如虫草素、虫草酸、虫草多糖、蛋白质、必需氨基酸以及中微量元素、多种维生素等成分, 具有滋补营养、增强免疫及抗肿瘤、抑制病毒、抵抗辐射、抗菌消炎等多种营养、保健及药用功能^[2], 已在东亚地区被广泛用作进补滋养及药用保健佳品, 我国也于 2009 年批准为新资源食品 (现名新食品原料)^[3]。自我国在国际上第一个以昆虫蛹人工培育蛹虫草获得成功以来, 我国蛹虫草人工种植技术快速发展, 现已广泛实现人工栽培并已基本实现产业化, 年产值可达 100 亿人民币以上^[3]。近年来尽管人们对蛹虫草优良菌种制备、栽培原料选择及优化、生长条件控制等取得重大成绩并实现高产稳产, 但提高和保持其主要活性成分含量并实现优质高产是蛹虫草产业更进一步发展所面临的又一重大课题^[4-6]。温度等是蛹虫草正常生长与发育的最重要基本条件之一, 无疑对蛹虫草主要成分的合成、代谢和积累产生重要影响。比较并系统研究不同栽培温度对蛹虫草主要活性物质的影响及规律有重要现实意义, 但少见

第一作者简介:李居宁(1969-), 女, 湖北荆门人, 硕士, 讲师, 研究方向为生物技术及应用。E-mail: lijuning613@163.com.

责任作者:方华舟(1965-), 男, 湖北罗田人, 本科, 教授, 现主要从事食用菌与农业微生物学等研究工作。E-mail: 434761170@qq.com.

基金项目:湖北省教育厅重点科研资助项目(D20126101)。

收稿日期:2016-09-27

showed that the high voltage electrostatic field reduced relative water content and increased root shoot ratio and root length and plant height of seedling stage licorice; with the increase of licorice seedling age, the content of chlorophyll a increased first and then decreased. The 18 kV group was higher than the control group while the 15 kV group was inverse. And the content of chlorophyll b in the 18 kV group was higher than control group at the first 45 days then lower than the control group during 45-90 days, while the 15 kV group was always lower than the control group; the content of soluble protein in high voltage electrostatic field treated group was lower than control group during 30-75 days but higher than control group during 75-90 days.

Keywords: high voltage electrostatic field; licorice; physiological and biochemical index

相关报道。该试验拟根据一般栽培实际,系统探讨不同栽培温度对蛹虫草主要活性成分的影响,以期为蛹虫草规范种植、确保蛹虫草优良品质和质量提供一定理论依据及技术参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蛹虫草菌种 D1 由荆楚理工学院生物工程学院食用菌实验室分离、保藏和提供,并经实际栽培证实具有良好生长及出草性能。

大米、马铃薯、蚕蛹粉为市场购买;可溶性淀粉、蛋白胨、葡萄糖为化学纯,天津福晨化学试剂厂生产;琼脂、磷酸二氢钾、硫酸镁为化学纯,天津凯通化学试剂有限公司生产;维生素 B₁ 为华中药业公司生产及其它常见药品。

虫草素标准品(纯度>98%,Sigma)、葡萄糖标准品(纯度>98%,西安天丰生物科技有限公司)、甘露醇标准品(纯度>98%,上海永叶生物科技有限公司)及其它常规试剂。

YX-400A 高压蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司)、FA2104 分析电子天平(良平仪器有限公司)、SW-CJ-1F 超净工作台(苏州净化设备有限公司)、TP22 恒温摇床(中国科学院武汉科学仪器厂)、HP1500GS 及 LRH-250-GSI 智能人工气候箱(武汉瑞华仪器设备有限责任公司、广东韶关市泰宏医疗器械有限公司)、250B 生化培养箱(江苏金坛医疗器械厂)、电热恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)、紫外可见分光光度计(上海谱元仪器有限公司)、WATERS-1C 超高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司)及其它常用栽培工具与分析检测仪器等。

液体菌种培养基:可溶性淀粉 30 g,葡萄糖 10 g,蛋白胨 10 g,磷酸二氢钾 2 g,硫酸镁 2 g,VB₁ 10 mg,水 1 000 mL,pH 6.5^[7];栽培出草培养基:大米 30 g,营养液 45 mL;其中营养液配方为蚕蛹粉 20 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.8 g,维生素 B₁ 10 mg,水 1 000 mL,pH 6.5~7.0^[7-8]。上述液体培养基分装至锥形瓶,出草培养基以 500 mL 罐头瓶为容器,按常规高压蒸汽灭菌。

1.2 试验方法

将蛹虫草菌种 D1 经 PDA 培养基活化无菌接入液体菌种培养基,于 20 ℃、150 r·min⁻¹ 摇床培养至液体菌种成熟^[9],按 10% 体积量将液体菌种无菌接入栽培培养基(实际接种量约为 6 mL),在适宜光照、湿度等适宜条件下^[9],分别设置 12、16、20、24、28 ℃

5 个温度条件进行发菌、转色、芽基分化、出草等蛹虫草生长发育各阶段温度试验(其它生长发育阶段温度均为 20 ℃)并栽培出草。其中,原基分化阶段将夜间温度较设定温度降低 5 ℃以保持昼夜温差。不同温度处理子实体采收后,于室内通风处阴干后置烘箱 50 ℃烘干至恒重。

1.3 项目测定

蛋白质含量采用分光光度法测定^[10],多糖含量采用苯酚-硫酸法测定^[11],虫草素含量采用高效色谱法测定^[12],虫草酸含量采用高碘酸钠法测定^[13]。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同发菌温度对蛹虫草主要活性成分的影响

从图 1~4 可以看出,不同发菌温度对蛹虫草主要成分含量有较明显影响。发菌温度为 12~20 ℃时,蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸含量随发菌温度升高而呈现不同程度地升高;发菌温度为 20~28 ℃时,蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸含量则随发菌温度升高而不同程度地迅速下降。由图 1~4 可知,发菌温度为 16~20 ℃时,蛹虫草各主要成分含量较为接近;发菌温度为 24~28 ℃时,蛹虫草主要成分含量下降迅速,尤其虫草素含量下降明显,达到差异极显著水平($P<0.01$)。发菌为蛹虫草菌丝生长、细胞代谢、相关物质积累等的重要营养生长阶段,是生殖生长的重要基础。李居宁等^[14]栽培试验也证实发菌温度为 16~20 ℃时产量较高,与该试验结果较为吻合。显然过高的发菌温度不利于蛹虫草细胞的营养吸收、物质代谢和相关成分积累,不利于后续生殖生长及相关物质代谢、合成、积累。说明以 16~20 ℃进行发菌培养较为适宜,可为蛹虫草主要成分与活性物质的代谢与合成提供良好的营养、代

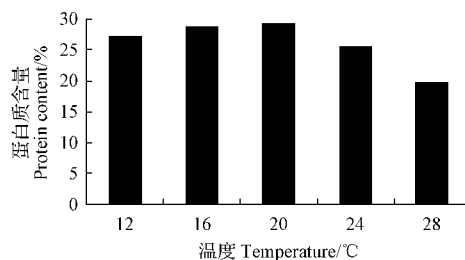


图 1 不同发菌温度对蛋白质含量的影响

Fig. 1 Influence of the temperature of spore germination on the content of protein

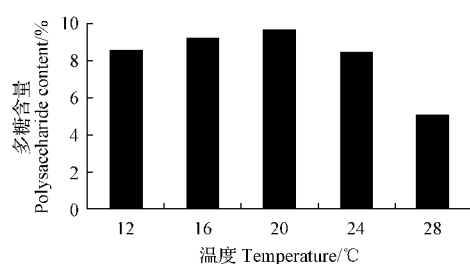


图2 不同发菌温度对虫草多糖含量的影响

Fig. 2 Influence of the temperature of spore germination on the content of polysaccharide

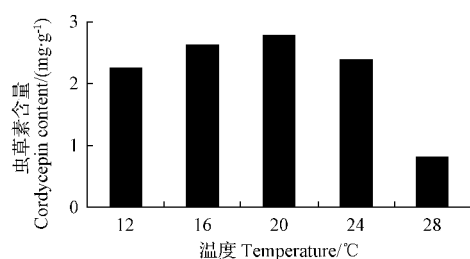


图3 不同发菌温度对虫草素含量的影响

Fig. 3 Influence of the temperature of spore germination on the content of cordycepin

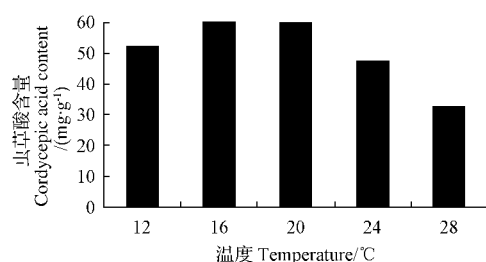


图4 不同发菌温度对虫草酸含量的影响

Fig. 4 Influence of the temperature of spore germination on the content of cordycepic acid

谢及物质基础,保证了蛹虫草进一步生长发育及各主要成分含量达到较高水平。

2.2 不同转色温度对蛹虫草主要活性成分的影响

转色是蛹虫草生长周期的重要阶段之一。从表1可以看出,不同转色温度对蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸含量均有较明显影响。其中,蛋白质含量约在20℃时最高,在16、24℃较为接近,28℃显著下降;多糖、虫草素含量在24℃最高,分别达10.37%、3.31 mg·g⁻¹,分别较20、16℃多糖含量提高5.49%、10.44%及虫草素含量提高20.81%、34.40%,28℃极显著下降;虫草酸含量16℃最高,20、24℃次之,28℃显著下降。说明蛹虫草转色阶段的培养温度对蛹虫草主要物质的代谢、合成有着重要作用,且对不同成分的影响存在明显差异。转

色是蛹虫草从营养生长转入生殖生长的重要标志,显然此阶段生长发育状况对蛹虫草进一步生长发育及相关物质的代谢与合成有重要影响。鉴于虫草素含量十分微少,约24℃达到最高,兼顾蛹虫草多糖、蛋白质、虫草酸等主要成分的含量,以及20~24℃条件下进行转色蛹虫草产量较高等因素,转色温度以20~24℃较为适宜。

表1 不同转色温度对蛹虫草主要活性成分的影响

Table 1 Influence of the temperature of color changing on the key active ingredients

处理温度 Treatment temperature /°C	蛋白质含量 Protein content /%	多糖含量 Polysaccharide content /%	虫草素含量 Cordycepin content /(mg·g ⁻¹)	虫草酸含量 Cordycepic acid content /(mg·g ⁻¹)
12	—	—	—	—
16	27.7Bbc	9.39Bb	2.47Bb	62.7Dd
20	28.2Cc	9.83Bc	2.74Cc	54.4Cc
24	26.6Bb	10.37Cc	3.31Dd	49.9Bb
28	18.3Aa	4.28Aa	1.42Aa	29.1Aa

注:栽培基质为大米,字母为差异显著性。下表同。

Note: Culture medium, rice, the letter indicated significance of difference. The same as following Table.

2.3 不同原基分化温度对蛹虫草主要活性成分的影响

原基分化是蛹虫草出草及产品产量、质量高低的重要前提条件,且需要一定温差刺激。温度过低原基不能分化,过高原基稀少、畸形甚至死亡^[10]。原基分化良好且主要活性成分含量较高是蛹虫草产量和质量的基本保证。从表2可以看出,原基分化阶段培养温度16~24℃,蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素含量均随原基分化温度上升而随之较明显增加,继而至28℃下降明显。其中,原基分化温度从20~24℃,蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素的含量增加达到显著水平($P<0.01$),且此时虫草酸含量也相对较

表2 不同原基分化温度对蛹虫草主要活性成分的影响

Table 2 Influence of the temperature of primordium differentiation on the key active ingredients

处理温度 Treatment temperature /°C	蛋白质含量 Protein content /%	多糖含量 Polysaccharide contents /%	虫草素含量 Cordycepin content /(mg·g ⁻¹)	虫草酸含量 Cordycepic acid content /(mg·g ⁻¹)
12	—	—	—	—
16	25.2Bb	9.11Bb	1.98Aa	60.5Dd
20	29.8Cc	9.93Cc	2.62Bb	54.8Cc
24	34.1Dd	11.52Dd	3.86Dd	51.6Bb
28	20.3Aa	6.37Aa	3.01Cc	46.5Aa

高;同时栽培试验也证实,约 20~24 ℃原基分化良好,产量较高^[10],说明原基分化温度以 20~24 ℃较为适宜。

2.4 不同子实体生长温度对蛹虫草主要活性成分的影响

从图 5~8 可以看出,不同子实体生长温度对蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸含量均产生影响。蛋白质含量在 20~24 ℃最高,12~16 ℃次之,28 ℃明显较低;多糖含量在 16 ℃最高,12、20 ℃次之,其它温度下降明显;虫草素含量在 24 ℃最高,20、28 ℃次之,说明相对较高温度有利于虫草素的合成和积累;虫草酸含量在 12~16 ℃最高,20 ℃次之,说明相对较低温度有利于虫草酸的合成和积累。综合考虑各主要活性成分含量状况,以 16~20 ℃为佳。同时,李居宁等^[14]在栽培实践中亦发现以 16~20 ℃的相对较低温度对蛹虫草子实体进行培养生长,产品产量及商品性状较好,说明以 16~20 ℃进行子实体培养可以获得较好的产品产量和质量。

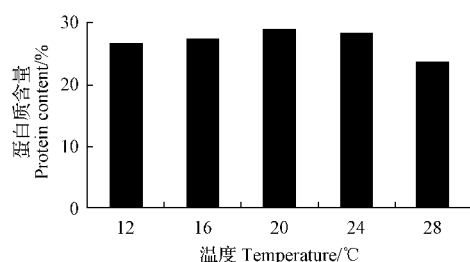


图 5 不同子实体生长温度对蛋白质含量的影响
Fig. 5 Influence of the temperature of sporocarp growth on the content of protein

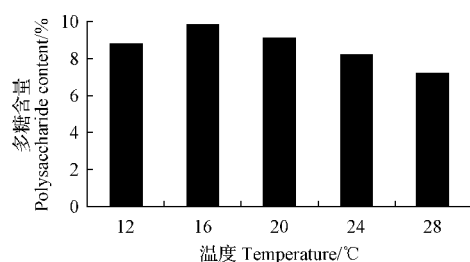


图 6 不同子实体生长温度对多糖含量的影响
Fig. 6 Influence of the temperature of sporocarp growth on the content of polysaccharide

3 结论与讨论

该研究结果表明,蛹虫草发菌温度、转色温度、原基分化温度、子实体生长温度分别以约 16~20、20~24、20~24、16~20 ℃为宜,蛹虫草蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸等主要活性成分含量较其它温度

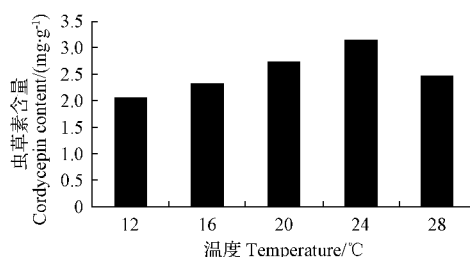


图 7 不同子实体生长温度对虫草素含量的影响
Fig. 7 Influence of the temperature of sporocarp growth on the content of cordycepin

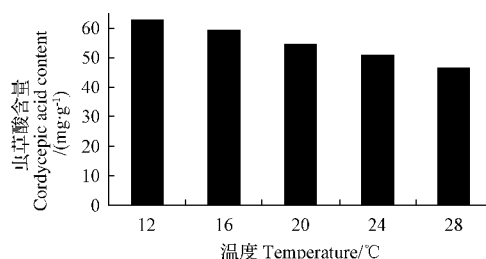


图 8 不同子实体生长温度对虫草酸含量的影响
Fig. 8 Influence of the temperature of sporocarp growth on the content of cordycepic acid

条件较高。该研究结果与李居宁等^[14]不同温度条件下进行的产量结果基本吻合,尤其与蛹虫草蛋白质、多糖含量与蛹虫草生长及产量较为一致,说明蛹虫草主要成分合成、代谢、积累与蛹虫草生长发育有着密切的关系^[15-16];以适当温度等栽培条件能促进蛹虫草良好生长发育,以切实提高蛹虫草产量和质量^[15-17]。

该研究结果还说明,各阶段栽培温度对蛹虫草虫草素、虫草酸含量影响较大。发菌阶段,虫草素、虫草酸含量在 20 ℃时最高;转色、原基分化、子实体生长,虫草素含量以约 24 ℃最高,虫草酸含量以约 12 ℃最高,说明相对较高温度有利于虫草素合成,相对较低温度有利于虫草酸的合成,二者很可能以不同的代谢途径进行相关物质合成与积累,可通过调节温度等栽培条件促进相应主要活性成分合成,提高产品的针对性和质量^[3,18-19],促进蛹虫草产品深加工和蛹虫草产业深入发展。

参考文献

- [1] 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会(梁宗琦主编). 中国真菌志(第三十二卷·虫草属)[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [2] 蒋志涛,戴国梁,潘金火,等. 蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2015,29(5):80-83.
- [3] 董彩红,李文佳,李增智,等. 我国虫草产业发展现状、问题与展望:虫草产业金湖宣言[J]. 菌物学报,2016,35(1):1-15.
- [4] 周思静,刘桂君,尚宏忠,等. 蛹虫草人工培养技术研究进展

- [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 13-17.
- [5] 康家盛, 田娇, 高日. 蛹虫草栽培研究进展及发展前景展望[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(8): 2309-2310.
- [6] 孟泽彬, 陈林会, 韩近雨, 等. 蛹虫草化学活性成分的研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 2147-2154.
- [7] 方华舟, 向会耀, 王小艳. 不同碳源对蛹虫草菌丝及子实体生长状况的影响[J]. 荆楚理工学院学报, 2010, 25(2): 5-8.
- [8] 方华舟, 王小艳, 向会耀. 不同氮源对蛹虫草菌丝及子实体生长状况的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(11): 2734-2737.
- [9] 李菲. 蛹虫草人工高产栽培技术[J]. 福建农业科技, 2015(6): 54-56.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 食品中蛋白质的测定: GB5009. 5-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] 中华人民共和国农业部. 食用菌中粗多糖的测定: NY/T1676-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] 中华人民共和国农业部. 虫草制品中虫草素和腺苷的测定 · 高效液相色谱法: NY/T2116-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [13] 闫文娟, 李泰辉, 姜子德. 比色法测定广东虫草虫草酸含量[J]. 食用菌, 2010(5): 73-74, 78.
- [14] 李居宁, 方华舟. 温度对蛹虫草菌丝及子实体生长的影响[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(2): 385-389.
- [15] 施新琴, 顾寅钰, 李化秀, 等. 不同蛹虫草菌株栽培蛹虫草的形态性状及活性成分含量比较[J]. 蚕业科学, 2015, 41(1): 134-139.
- [16] 康丽娜. 野生与人工栽培蛹虫草主要成分对比分析[J]. 新农业, 2013(2): 48-49.
- [17] 赵潇, 董悦涵. 蛹虫草发酵条件的初步优化[J]. 现代农业科技, 2013(23): 102-103.
- [18] 秦鹏, 王龙, 路等学, 等. 响应面法优化蛹虫草菌液体发酵条件[J]. 北方园艺, 2016(8): 138-141.
- [19] 段鸿斌, 乔新荣, 殷东林, 等. 提高蛹虫草中的虫草素产量的研究综述[J]. 北方园艺, 2015(2): 178-181.

Variations of Key Active Ingredients of *Cordyceps militari* Under Different Temperatures

LI Juning¹, FANG Huazhou²

(1. Department of Science and Technology, Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448000; 2. Bioengineering College, Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448000)

Abstract: Taking high quality *Cordyceps militari* as test material, the contents of proteins, polysaccharide, cordycepin, cordycepic acid were compared in *Cordyceps militari* under the temperatures of 12, 16, 20, 24, 28 °C to explore the variations of the key ingredients of *Cordyceps militari* under different temperatures. The results showed that the contents were relatively high when *Cordyceps militari* was respectively during spore germination, color changing, primordium differentiation and sporocarp growth correspondingly under the temperatures of 20, 24, 24, 16 °C. Therefore, changing the temperatures of *Cordyceps militari* during cultivations could promote the contents of the key ingredients, and then the quality of *Cordyceps militari*.

Keywords: *Cordyceps militari*; temperature; protein; polysaccharide; cordycepin; cordycepic acid; content

认识虫草—蛹虫草的医用价值与功效(二) 知识窗

蛹虫草的保健功能成分不仅有虫草素, 还有虫草多糖是国际医学公认的人体免疫增强剂。虫草酸即 D-甘露醇是治疗心脑血管疾病的基本药物, 具有清除自由基、扩张血管、降低血压的作用。人工培养的蛹虫草纯子实体, 作为食品用于人体, 经研究是完全安全的, 可广泛用于保健食品、保健膳食和其它滋补类食品。蛹虫草子实体还可与一些中药配伍, 对一些疾病有治疗作用。其功效包括: 扶正益气, 提高免疫和造血功能; 补肺平喘, 改善呼吸系统; 改善调节心脑血管系统; 调节体内血脂; 具有补肺益肾, 提高免疫力、大脑记忆力的功效; 健脾安神, 对于失眠多梦、神经衰弱有很好的治疗作用。对老年慢性支气管炎、肺原性心脏病有显著疗效, 能提高肝脏解毒能力, 起护肝作用, 提高身体抗病毒和抗辐射能力。

(来源: 百度百科)