

黄小忠,谢正林,许俊齐,等. 蝉花真菌的分离及液体发酵培养基优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):153-155.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.041

蝉花真菌的分离及液体发酵培养基优化

黄小忠, 谢正林, 许俊齐, 张宝珍

(江苏农林职业技术学院, 江苏镇江 212400)

摘要:通过蝉花僵虫体、子座芽、孢子 3 个部分的分离培养,利用单因素和正交试验,优化生产虫草酸各营养因子的最佳种类和配比,以达到蝉花真菌的分离及液体发酵培养基的优化效果。结果表明,分离得到的蝉花真菌为拟青霉属蝉拟青霉 [*Paecilomyces cicadae* (Miquel.) Samson]; 工艺优化后得出蝉花液体发酵最佳培养基配方为蔗糖 40 g/L、蛋白胨 15 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; 生物量和虫草酸总产量能分别提高 1.852 g/L、17.774 mg/g。

关键词:蝉花真菌; 分离培养; 液体发酵; 工艺优化; 培养基优化

中图分类号: S567.3⁺90.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0153-03

蝉花 (*Cordyceps cicadae*) 别称蝉虫草、蝉茸、胡蝉等,主要产于江浙一带丘陵竹林中,云南和四川等地也有分布。蝉花药性甘寒、无毒,《本草纲目》记载“蝉花可治疗惊痫,夜啼心悸,功同蝉蜕”。蝉花中含有丰富的氨基酸、蛋白质、真菌多糖等生理活性物质,具有镇痛退热、镇静明目、降低血压、抗疲劳、抗肿瘤及提高免疫力的功效^[1]。蝉花一般生长在针阔混交林带,山峦平缓起伏,生态环境优良,分布满山遍野的毛竹林,阴蔽较好的林地都有金蝉花,尤其在向阳坡地的竹林下,落叶和腐殖层很厚,透气、透水、保温,密布粗壮、浓白的菌丝体^[2-4]。

由于野生蝉花生长环境被破坏及滥采现象严重,导致当前野生蝉花资源日益减少,另外人工采集野生蝉花劳动强度大,其作为中药材走向国际市场存在功能活性组分不明、原料不纯等问题^[5-6]。本研究通过用蝉拟青霉 [*Paecilomyces cicadae* (Miquel.) Samson] 的分离培养,优化液体发酵工艺来生产菌丝体,旨在解决以上资源短缺及产品品质等问题。

1 材料与方法

1.1 蝉花来源

蝉花标本采集于江苏省句容市磨盘山海拔高度 200 ~ 400 m 的竹林中,冰袋低温保存新鲜金蝉花,24 h 内处理。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 甘露醇标准品、Nash(乙酸铵、冰醋酸、乙酰丙酮)、高碘酸钠、L-鼠李糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、麸皮、蛋白胨、酵母膏、豆粉、酪蛋白、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、KCl、CaCl₂。

1.2.3 仪器 水浴恒温振荡器(SHZ-28A,江苏省太仓市华美生化仪器厂);电子天平(KF6102,浙江凯丰集团有限公司);千分之一精密电子天平(JA5003N,上海精密科学仪器有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗

设备厂);数显恒温水浴锅(HH-4,江苏省金坛市杰瑞尔电器有限公司);可见分光光度计(WFJ-7200,上海尤尼柯仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 培养基

1.3.1.1 分离培养基 土豆 15.00%,葡萄糖 2.00%,蛋白胨 0.20%, KH_2PO_4 0.10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,琼脂粉 1.50%;pH 值自然,121 ℃ 灭菌 30 min。

1.3.1.2 母种培养基 土豆 20.00%,葡萄糖 2.00%,蛋白胨 0.15%, KH_2PO_4 0.10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,琼脂粉 1.50%~2.00%;pH 值自然,121 ℃ 灭菌 30 min。

1.3.1.3 液体菌种培养基 土豆 20.00%,蔗糖 5.00%,豆粉 0.50%, KH_2PO_4 0.50%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%;pH 值自然,121 ℃ 灭菌 30 min。

1.3.2 蝉花真菌的分离培养

1.3.2.1 僵虫体分离 无菌水浸泡虫体 10 min 搅拌出泥沙,0.1% 氯化汞溶液浸泡 2~3 min,75% 乙醇棉球擦拭,无菌水漂洗 3 次;取虫体前段,切开外壳,取血腔菌丝 3~4 mm,接入分离培养基^[2];于 28 ℃ 培养 48 h,分离培养去杂菌,移入试管斜面培养并低温保存。

1.3.2.2 子座芽分离 取子座芽,无菌水洗净,0.1% 氯化汞溶液浸泡 2~3 min,无菌水洗净,取中间 3~4 mm 组织块接入培养基,置于 28 ℃ 培养 48 h,挑取少量菌丝分离培养去杂菌,移入试管斜面培养并低温保存。

1.3.2.3 孢子分离 取无菌纸袋套住蝉花(花蕾),反复振荡,使孢子黏附到袋壁上,将纸浸入 25% 葡萄糖液中,洗孢子,混匀。取 0.1 mL 原液,加入 1.0 mL 无菌水,1.0 mL 0.1% NaOH,2~3 min 后加入无菌水,离心洗涤 3 次,加入 25% 葡萄糖溶液,28 ℃ 培养。每天镜检,孢子萌发后,微吸管吸取单个孢子滴于平板中培养。

1.3.3 种子发酵液培养

1.3.3.1 菌种活化 将保藏的金蝉花菌种无菌操作接种至试管斜面上,25 ℃ 下培养 5~7 d,此时菌丝长满斜面,即可使用。

1.3.3.2 种子液制备 从斜面上取大小相近的 0.5 cm × 0.5 cm 的母种块,接种于液体培养基中(菌块要薄,稍带培养

收稿日期:2016-11-11

基金项目:江苏农林职业技术学院院级科研项目(编号:2016KJ013)。

作者简介:黄小忠(1981—),男,江苏南通人,硕士,讲师,研究方向为发酵工程。E-mail:523855294@qq.com。

基,尽量使菌块漂浮在液面上),每瓶接种 3 块。装液量为 40%,培养温度为 25 ℃,转速为 180 r/min,一级种培养 3 d,二级种在与一级种同样条件下培养 2 d。

1.3.3.3 发酵培养 装液量为 40%,接种量为 10%,培养温度为 25 ℃,转速为 180 r/min,培养 48 h,静置 16 h。每个试验 3 次重复。250 mL 三角瓶分装,100 mL/瓶。

1.3.4 液体培养基优化工艺

1.3.4.1 碳源筛选 以豆粉 2.00%、KH₂PO₄ 0.10%、MgSO₄·7H₂O 0.05% 为基础培养基,分别加入 3.00% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露醇 5 种碳源,pH 值自然,于 25 ℃、180 r/min 恒温水浴摇床培养 5 d,分别对比这 5 种碳源对生物量及虫草酸含量的影响。其中,豆粉煮沸 20 min,经过滤取滤液加入。

1.3.4.2 氮源筛选 以蔗糖 2.00%、可溶性淀粉 1.00%、KH₂PO₄ 0.10%、MgSO₄·7H₂O 0.05% 为基础培养基,分别将蛋白胨、酵母膏、麸皮、酪蛋白、豆粉 5 种氮源以 2.00% 的量加入,pH 值自然,于 25 ℃、180 r/min 恒温水浴摇床培养 5 d,分别对比这 5 种碳源对生物量及虫草酸含量的影响。其中,麸皮经煮沸水解 10 min 后,经过滤取滤液加入。

1.3.4.3 无机盐筛选 以蛋白胨 2.00%、蔗糖 2.00% 为基础培养基,分别加入 0.05% 的 KH₂PO₄、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、KCl、CaCl₂ 5 种无机盐,pH 值自然,于 25 ℃、180 r/min 恒温水浴摇床培养 5 d,分别对比这 5 种碳源对生物量及虫草酸含量的影响。

1.3.4.4 生物量的测定 采用细胞干重法^[7],取液体培养后发酵液,用 100 目尼龙纱网过滤得菌丝体和胞外液,并用蒸馏水反复冲洗,至滤出液澄清为止,收集菌丝体,60 ℃烘干至恒质量,称质量。

1.3.4.5 虫草酸含量测定 取样品液 1 mL,用高碘酸钠比色法^[8-9]在 420 nm 处测吸光度,制作甘露醇标准曲线见图 1,并计算样品中的虫草酸含量(mg/g) = C × 50/m。式中:C 为提取液中的虫草酸含量(mg/mL);50 是样品提取液体积(mL);m 为称取样品的质量(g)。

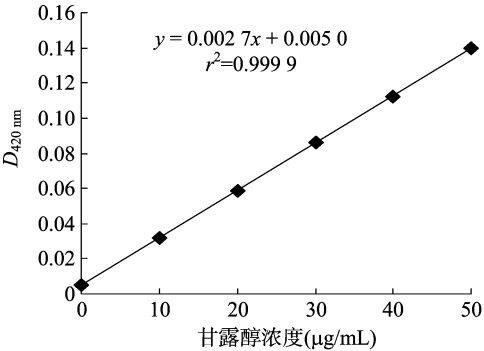


图1 甘露醇标准曲线

1.3.4.6 不同因素和水平正交试验优化研究 培养温度 25 ℃、初始 pH 值自然、接种量 10%、接种菌龄 4 d、摇床转速 180 r/min、培养时间 5 d,在碳源、氮源、无机盐单因素试验基础上,进行 4 个因素 4 个水平[L₁₆(4⁴)]正交试验设计考察,具体设计见表 1。发酵结果经极差和方差分析,找出各种培养基成分的最佳浓度和它们对蝉花生生物量和虫草酸含量的影响程度。

表 1 液体培养基的 L₁₆(4⁴) 正交试验设计

水平	因素			
	A:蔗糖含量(g/L)	B:蛋白胨含量(g/L)	C:KH ₂ PO ₄ 含量(g/L)	D:MgSO ₄ ·7H ₂ O含量(g/L)
1	10	10	0.5	0.5
2	20	15	1.0	1.0
3	30	20	1.5	1.5
4	40	25	2.0	2.0

1.3.4.7 验证试验 将正交试验所获得的最佳培养工艺条件进一步验证,并设置对照,比较优化培养基与基础培养基同条件下蝉花真菌生物量及虫草酸含量的差异。

1.3.4.8 数理统计方法 试验数据用 SPSS 进行统计分析,并进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 蝉花真菌的分离与鉴定

僵虫体、子座芽和孢子 3 种来源的组织材料均可以分离得到蝉花真菌。子座芽和孢子的分离效果较好,杂菌污染率较低,菌落生长 48 h 左右即可见,起初星状放射生长、菌丝平伏,菌丝逐渐呈白色绒毛状,菌落白色、圆形隆起,表面有细小水珠,之后中间颜色加深,呈紫色,初步鉴定为拟青霉属的蝉拟青霉。僵虫体分离染菌率较高,分离效果略差。

2.2 蝉花真菌液体培养基优化结果

2.2.1 蝉花真菌液体培养基的碳源筛选 由表 2 可知,在 5 种碳源中,葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖和乳糖都能得到较高的生物量,而虫草酸含量最高的是甘露醇,由于标准品的主要成分是甘露醇,所以适合的碳源是蔗糖,虫草酸的含量是 28.148 mg/g。

表 2 不同碳源对蝉花液体发酵生物量及虫草酸含量的影响

碳源	生物量(g/L)	虫草酸含量(mg/g)
葡萄糖	1.305	19.012
麦芽糖	2.014	27.222
甘露醇	1.839	61.173
蔗糖	1.757	28.148
乳糖	1.245	21.173

2.2.2 蝉花真菌液体培养基的氮源筛选 由表 3 可知,不同氮源对虫草酸含量及生物量的影响较大。在 5 种氮源中,蛋白胨和豆粉对蝉花液体发酵虫草酸含量的影响比较明显,但是豆粉在碳源筛选中作为基础培养基中的氮源,对氮源筛选有一定干扰,所以合适的氮源是蛋白胨,其生物量为 1.361 g/L,虫草酸含量为 32.284 mg/g。

表 3 不同氮源对蝉花液体发酵生物量及虫草酸含量的影响

氮源	生物量(g/L)	虫草酸含量(mg/g)
麸皮	0.933	31.432
蛋白胨	1.361	32.284
酵母膏	1.372	25.309
豆粉	1.848	32.084
酪蛋白	2.577	14.938

2.2.3 蝉花真菌液体培养基的无机盐筛选 由表 4 可以看出,5 种无机盐对生物量的影响不是很大,但根据虫草酸含量可以看出,MgSO₄·7H₂O 和 KH₂PO₄、K₂HPO₄ 能同时获得高

产量的虫草酸。值得注意的是, CaCl_2 的添加反而抑制了虫草酸的产生。基于钾(K)、磷(P)、硫(S)、镁(Mg)作为微生物生长所需的营养元素和虫草素产量考虑,同时选用 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 为培养基中的无机盐组分,保证微生物能更好生长。

表 4 不同无机盐对蝉花液体发酵生物量及虫草酸含量的影响

氮源	生物量(g/L)	虫草酸含量(mg/g)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.810	23.951
K_2HPO_4	1.634	20.988
KH_2PO_4	1.636	21.790
CaCl_2	1.512	18.025
KCl	1.011	18.580

2.3 蝉花真菌液体培养基的正交试验结果

从表 5 直观分析可以看出,培养基的成分对蝉花液体发酵产生生物量的影响顺序为蔗糖 > 蛋白胨 > KH_2PO_4 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,最优水平为 $\text{A}_3\text{B}_4\text{C}_1\text{D}_1$,即蔗糖 30 g/L、蛋白胨 25 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

表 5 蝉花真菌液体发酵产生生物量和虫草酸含量正交试验结果

试验号	A:蔗糖含量	B:蛋白胨含量	C: KH_2PO_4 含量	D: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量	生物量(g/L)	虫草素含量(mg/g)
1	1	1	1	1	1.395	10.432
2	1	2	2	2	0.399	17.963
3	1	3	3	3	0.439	14.259
4	1	4	4	4	2.405	8.457
5	2	1	2	3	2.015	18.395
6	2	2	1	4	2.101	16.358
7	2	3	4	1	2.744	17.099
8	2	4	3	2	1.871	21.728
9	3	1	3	4	2.900	23.025
10	3	2	4	3	3.916	33.889
11	3	3	1	2	3.698	24.383
12	3	4	2	1	3.776	29.321
13	4	1	4	2	2.025	15.213
14	4	2	3	1	2.585	43.827
15	4	3	2	4	2.137	35.802
16	4	4	1	3	4.082	24.383
k_1 (生物量)	1.159	2.084	2.819	2.625		
k_2 (生物量)	2.183	2.250	2.082	1.998		
k_3 (生物量)	3.572	2.255	1.949	2.613		
k_4 (生物量)	2.707	3.304	2.772	2.386		
R_1 (生物量)	2.413	0.950	0.870	0.627		
k_1 (虫草酸含量)	12.778	16.766	18.889	25.170		
k_2 (虫草酸含量)	18.395	28.009	25.370	19.822		
k_3 (虫草酸含量)	27.654	22.886	25.710	22.732		
k_4 (虫草酸含量)	29.806	20.972	18.665	20.910		
R_2 (虫草酸含量)	17.028	11.243	7.045	5.348		

培养基成分对蝉花液体发酵产生虫草酸含量的影响顺序为蔗糖 > 蛋白胨 > KH_2PO_4 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,最优水平为 $\text{A}_4\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_1$,即蔗糖 40 g/L、蛋白胨 15 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。在上述优化条件下,蝉花生物量和蝉花虫草酸含量都要比正交试验最高组(第 10 组)高。由以上分析可知,蝉花生物量和虫草酸含量呈正相关,生物量的大量产生是虫草酸积累的基础。

2.4 基础培养基和改良培养基验证试验结果

从表 6 可知,在验证试验中,工艺优化后蝉花生物量和虫草酸含量都有所提高,优化后生物量提高 1.852 g/L,虫草酸含量提高 17.774 mg/g。说明优化后各种适宜浓度的营养因子能更好地促进生物量和虫草酸的产生。

表 6 基础培养基和改良培养基验证结果比较

培养基	生物量(g/L)	虫草酸含量(mg/g)
基础培养基	2.959	26.543
改良培养基	4.811	44.317

3 结论与讨论

碳源优化试验中培养基中加入豆粉、麸皮效果较好,可能与向真菌寄主体内提供类似的激素等促进因子有关。在本研究中,蝉花菌株的生长和虫草酸产生的最佳碳源是蔗糖,也有用葡萄糖作为小试发酵碳源的报道,但从生产成本来看,蔗糖更适合工业生产。氮是有机体的重要组成元素,本试验中有机氮源比无机氮源能获得更高的生物量和代谢产物,优化后以 15 g/L 蛋白胨添加量作为氮源获得总的虫草酸含量达到 44.317 mg/g,说明适量的蛋白胨可促进虫草酸的产生。有报道发现,添加 NH_4^+ 不仅能够成倍地增加虫草酸含量,同时还一定程度上提高了胞外多糖的产量^[10]。无机盐在蝉花的生长和虫草酸的产生中起着重要作用。本试验中添加的几种无机盐均能提高虫草酸的产量, Ca^{2+} 效果较不明显,可能影响虫草酸的积累。

从蝉花液体发酵过程分析可知,蝉花真菌的分离、菌种的纯化、液体菌种的培养等因素对生物量和虫草酸的总产量都有很大的影响,更重要的是液体发酵培养基的优化对培养的碳源、氮源、无机盐、温度、摇床的转速等必要因素的考察更具有价值,这也为进一步提高蝉花发酵生产虫草酸和优质菌丝体的生产效率提供参考,对提高经济效益有重要的意义。

参考文献:

- [1] 文庭池,李光荣,康冀川,等. 蛹虫草液体种制备及发酵生产菌丝体和虫草菌素工艺优化[J]. 食品科学,2012,33(5):144-147.
- [2] 李 颜,史薇娜,唐庆九,等. 比色法测定冬虫夏草和蛹虫草中多糖和甘露醇的含量[J]. 食用菌学报,2007,14(3):53-57.
- [3] 程大庆,丁志山,林美爱,等. 蝉花真菌的分离及液体发酵培养[J]. 中药材,2006,29(2):99-101.
- [4] 董钰明,刘 晖,张 军,等. 比色法测定复方虫草颗粒中甘露醇的含量[J]. 中草药,2001,32(8):697.
- [5] 张信旭,高海波. 分光光度法测定古尼虫草中甘露醇的含量[J]. 贵州化工,2002,27(2):29.
- [6] 文 欣,刘素纯,黄晓晗. 蝉花菌株筛选及菌丝体成分分析[J]. 长沙,2005,29(3):61-64.
- [7] 周洪波,肖升木,阮承超,等. 蛹虫草液体的深层发酵[J]. 中南大学学报(自然科学版),2006,37(6):1098-1102.
- [8] 陈晋安,黄 浩,郑忠辉,等. 蛹虫草液体发酵条件的研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2001,6(3):219-223.
- [9] 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察[J]. 中国野生植物资源,2003,22(4):56-60.
- [10] 陈 磊. 蛹虫草生物学特性及发酵研究[D]. 北京:北京协和医学院,2009.