

薄盖灵芝菌种的保藏

徐贵祥 胡秋 岳德超 王淑芳

(中国医学科学院药物研究所北京)

摘要 本文报告了4种方法保藏薄盖灵芝工业化生产菌株 GC₁ 的实验结果。通过对发酵菌丝干重、菌丝中尿嘧啶核苷、腺嘌呤核苷等有效成分的测定,表明常温石蜡油加橡胶塞的方法保藏薄盖灵芝菌种是简便可靠的。

关键词 薄盖灵芝;菌种保藏

灵芝属 (*Ganoderma*) 真菌是一类重要药用真菌,历代本草中都将它列为滋补强壮,扶正固本之良药。现代药理学证明,薄盖灵芝 [*Ganoderma capense* (Lloyd) Teng.] 发酵提取物有调节神经系统和肝脏功能的生物活性^[1]。工业发酵法生产的薄盖灵芝醇水提取物制成的增肌注射液已广泛应用于临床。余竞光^[2]报道,尿嘧啶核苷和腺嘌呤核苷为水溶部分的主要成分。尿嘧啶核苷对实验性肌强直症小鼠血清醛缩酶有降低作用。腺嘌呤核苷有镇静、抗缺氧作用。

关于薄盖灵芝菌种的保藏,已有很多报道。李钟庆^[3]用矿油法保藏8年,王富民^[4]用橡胶塞保藏39个月,刘凤春^[5]用生理盐水保藏22个月,均保持存活。陈燕妍^[6]用液氮超低温保藏17个月,并进行出菇试验,亦获满意结果。薄盖灵芝菌种作为药物的生产菌种,在菌种保藏过程中需进一步了解其发酵培养特性及有效成分变化情况。本文报告了薄盖灵芝菌种用4种不同的方法保藏4年后的存活、菌丝干重及有效成分的变化情况。

材料和方法

(一) 菌种

薄盖灵芝 [*Ganoderma capense* (Lloyd) Teng.]

GC₁ 为已生产的增肌注射液原始菌株。

(二) 保藏培养基

5% 的麦麸煮汁1000ml,蔗糖20g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5g, 维生素 B₁ 微量, pH 自然。1kg/cm² 灭菌30分钟。

(三) 保藏方法

将薄盖灵芝菌种 GC₁ 接种在斜面培养基上, 24—26℃ 培养10—14天,待菌丝长满斜面后,分别用棉塞、橡胶塞、石蜡油和棉塞、石蜡油和橡胶塞四种方法封口。每种方法准备两份,分别置地下室(常温18—25℃)和冰柜(-8—8℃)中保藏。另将长满斜面的 GC₁ 菌种进行发酵培养,对尿嘧啶核苷和腺嘌呤核苷进行含量测定,做为菌种保藏前的对照指标。

(四) 存活检查

保藏4年后(1984—1988年),将每种方法保藏的菌种转管,于24—26℃ 培养10—20天,观察存活情况。

(五) 发酵培养

1. 培养基: 斜面培养基、种子培养基和发酵培养基见文献[7]。

2. 培养工艺: 菌种 GC₁ 斜面培养10—14天即接入一级液体种子培养基内,一支斜面接一个250ml的三角瓶。待培养4天后再接入二级液体种子培养基内,培养3天后再接入液体发酵培养基。发酵培养9天后,过滤。菌丝在60—80℃ 下烘干,恒重后称重。接种量均为10%,培养温度24—26℃,旋转摇床,转速120r/min。

(六) 菌丝中尿嘧啶核苷和腺嘌呤核苷含

量测定

1. 样品制备: 将干菌丝研磨, 过 40 目筛。称取 0.2—0.5g 样品粉末置 50ml 磨口具塞三角瓶中, 加入 15ml 50% 乙醇超声波提取 30 分钟, 抽滤。用 20ml 50% 乙醇分三次冲洗, 合并滤液。在水浴锅上蒸去乙醇, 剩余水溶液用乙醚脱脂(15ml × 3)。合并水溶部分, 水层在水浴锅上蒸干。用 50% 乙醇定容在 1—2ml 容量瓶中, 放入冰箱备用。

2. 薄层层析: 方法见文献[8], 点样量 8—12 μ l。

3. 含量测定: 将层析板在紫外灯下观察, 根据尿嘧啶核苷及腺嘌呤核苷标准品确定样品中这两种物质所在的位置, 将其分别刮下, 放入离心管中, 加入 5ml 蒸馏水, 离心, 吸取上清液在 260nm 处比色, 测 O. D. 值, 查标准曲线, 算出相应含量。分光光度仪为岛津 UV300。

实验结果

(一) 存活情况

薄盖灵芝 GC₁ 菌株, 经过 4 年的保藏, 存活情况见表 1。

保存在冰柜中经各种处理的 GC₁ 菌株均

无一株存活, 这与冰柜的温度有关。冰柜内温度控制在 0—8 $^{\circ}$ C, 但由于冰柜质量问题, 常常会降至 -8 $^{\circ}$ C 或 -10 $^{\circ}$ C 以下, 对菌株细胞造成冻伤而死亡, 说明 GC₁ 菌株是不耐低温的。如果冰箱温度能恒定在 0—8 $^{\circ}$ C 时, 结果可能是另一种情况, 这方面工作今后有待进一步进行。

在常温下保藏的菌种, 均能很好地存活。但因上述几种保藏方法不同, 而使菌种在保藏过程中与外界通气量不同, 在菌丝形态上表现也不同。如单纯橡胶塞保藏的菌种, 在斜面顶部长有白色气生菌丝; 单纯石蜡油保藏的菌种, 斜面顶部菌丝变为褐色, 斜面的中部与基部菌丝仍为白色; 石蜡油加橡胶塞保藏的菌种, 斜面顶部也有变褐色的菌丝, 但颜色较前者浅, 中部与基部的菌丝也为白色。各种处理保藏的菌种经转管后表现也不同。如单纯橡胶塞保藏的菌种在转管的培养基上恢复生长迅速, 菌丝稠密; 石蜡油保藏的菌种转管后恢复生长较慢, 菌丝稀疏, 这是由于菌丝接种块沾有一些石蜡油使得恢复生长中通气不良所致, 在以后的转管中即可迅速生长, 菌丝稠密。

(二) 干重及有效成分测定结果

在常温中存活的菌株, 通过发酵培养, 测定

表 1 4 种保藏方法 GC₁ 菌株存活情况

温度	方法 存活	继代保藏(棉塞)		橡胶塞		石蜡油棉塞		石蜡油橡胶塞	
		保藏支数	存活支数	保藏支数	存活支数	保藏支数	存活支数	保藏支数	存活支数
		低温	5	0	9	0	6	0	6
常温	4	4	7	6	6	6	6	5	

表 2 4 种常温保藏方法菌丝干重及尿苷和腺苷含量

指标	方法	继代保藏	橡胶塞	石蜡油	石蜡油胶塞	CK
干重(g)		1.45	1.46	1.35	1.55	—
尿苷(%)		0.155	0.155	0.160	0.175	0.170
腺苷(%)		0.110	0.125	0.110	0.140	0.140

菌丝干重、尿嘧啶核苷和腺嘌呤核苷的含量(表 2)。

表 2 结果可以看出, 不论菌丝干重, 还是菌丝中尿嘧啶核苷和腺嘌呤核苷的含量, 用常温

石蜡油加橡胶塞的方法保藏最好，其它两种方法次之，继代保藏较差。用常温石蜡油加橡胶塞的方法，尿嘧啶核苷含量高于保藏前(CK)，腺嘌呤核苷含量与保藏前相同。这很可能是由于1984年和1988年两次培养条件不完全相同而导致有效成分含量的变化。所以CK值只起参考作用，但至少可以说明用石蜡油加橡胶塞的方法，在保藏前后菌株特性变化不大。

讨 论

药用真菌生产菌种的保藏问题，多年来一直被认为是药用真菌研究的薄弱环节之一，薄盖灵芝也是如此。常规的继代保藏，保藏时间短，菌种变异退化大。目前采用的超低温液氮保藏法虽然在很大程度上解决了保藏时间及菌

种变异退化问题，但设备昂贵，费用太高，广泛应用有一定困难。本试验用的常温下石蜡油加橡胶塞的方法，可以较为圆满地解决了上述问题。我们认为，薄盖灵芝生产菌种采用液体石蜡油加橡胶塞封口在常温下保藏，是简便可靠的。

参 考 文 献

1. 刘耕陶等：中华医学杂志，10：607，1977。
2. 余竟光等：药学学报，14(6)：374，1979。
3. 李钟庆等：微生物学报，21(1)：45，1981。
4. 王富民等：微生物学通报，8(6)：294，1981。
5. 刘凤春等：微生物学通报，5(4)：35，1978。
6. 陈燕妍等：真菌学报，6(2)：110，1987。
7. 杨云鹏等：药学学报，14(7)：434，1979。
8. 章观德等：药用真菌，1：33，1985。