

蛹虫草液体深层发酵的研究

秦秀丽, 杨国会, 李风林

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:以蛹虫草菌丝体生物量为指标, 运用单因素对比试验和正交实验, 对蛹虫草液体培养基的碳、氮营养源以及最佳配方和培养条件进行了优化研究。结果表明: 筛选出蛹虫草液体培养基最佳碳源为蔗糖, 其次为麦芽糖; 最佳氮源为酵母膏, 其次为蛋白胨。筛选出蛹虫草液体培养基适宜配方为: 蔗糖 3%、酵母膏 3%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.15%; 液体培养适宜条件的温度为 24℃, pH 5.5, 接种量为 15%, 摇瓶转速为 140 r/min, 发酵罐通气量为 1 : 1.2~1 : 1.6V/(V·min)。

关键词: 蛹虫草; 液体发酵; 培养基; 菌丝体; 生物量

中图分类号: Q 949.325 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0167-04

蛹虫草[*Cordyceps militaris* (Vuill; L. ex. Fr) Link] 是子囊菌亚门(Ascomycotinia)、核菌纲(Pyrenomycetes)、麦角菌科(Clavicipitiaceae) 虫草属(*Cordyceps*)食药用真菌, 又称北冬虫夏草^[1]。经中国中医研究院等权威机构检测发现, 其所含药用成分和多种药效可与冬虫夏草相媲美^[2]。具有补肺益肾、补虚损、益精气、抗疲劳、抗肿瘤、抗衰老、美容、养颜等保健作用以及显著增强免疫力的食药用功能^[3,4]。

由于冬虫夏草人工栽培还没有获得成功, 天然冬虫夏草有限资源已日益枯竭, 市场价格十分昂贵。近年来, 人们已经把与其有相同药用和滋补功效, 并能人工培育的蛹虫草作为冬虫夏草的替代品, 以替代天然冬虫夏草的不足。而蛹虫草在人工条件下培育其子实体, 具有周期长、培养条件复杂等困难。研究表明, 蛹虫草的菌丝体和子实体具有基本相同的有效成分, 可用发酵获得的菌丝体代替子实体生产各种药用和保健产品。通过液体深层发酵培养蛹虫草菌丝体, 具有菌丝体生长快, 生产周期短^[5], 可以进行大规模产业化生产的特点, 是发展蛹虫草生产的一条崭新的途径, 具有很好的开发前景。但在蛹虫草的液体深层发酵中, 所用发酵培养基的配方是否优良及发酵条件的控制, 直接影响着蛹虫草菌丝体的生长和其代谢产物的产生, 为此, 现对蛹虫草液体培养基进行试验研究, 筛选出适合蛹虫草菌丝生长

第一作者简介: 秦秀丽(1967-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为微生物和食药用菌, 现从事微生物及食药用菌的教学及科研工作。E-mail: qinxiuli88@126.com。
基金项目: 吉林省教育厅“ 十一五” 科学技术研究资助项目(吉教科合字[2008] 第 249 号)。
收稿日期: 2010-09-12

Comparative of Different Preservatives on the Fresh-keeping Effect of Cut Peony Flowers

HAN Chun-miao, ZOU Zeng ZHANG Qin, ZHANG Qian-xiang, LI Meng-si, YI Yong-mei

(School of Biological Science and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

Abstract: The vase treatment on ‘ Jinpaohong’ and ‘ Jianshifen’ were conducted with 9 kinds of preservatives and CK confected to study the fresh-keeping effects of preservatives on cut peony flower by using the methods such as vase life, fresh weight and water balance. The results showed that the vase life of cut peony flowers were prolonged in varying degrees by the 9 preservatives compared with the control. The best preservatives on ‘ Jinpaohong’ and ‘ Jianshifen’ were water 1 L+10 g sucrose+10 mL/L ethyl alcohol and water 1 L+200 mg/L 8-HQ+30 g sucrose respectively. Variation trends of water balance and fresh weight with time series were different, and there was no obvious correlation between the two and vase life. Variation curve with time of water balance values accord with fresh weight, but the variational time of the latter was later than the former.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; cut flower; preservative; fresh-keeping effect

的液体培养基最佳配方和发酵的工艺参数,从而为蛹虫草深层液体培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种:蛹虫草试管母种从吉林省蚕业研究所引进;葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 为分析纯;蛋白胨、酵母浸膏、可溶性淀粉、琼脂为生化试剂;95%的酒精,pH 试纸;马铃薯、大豆、蚕蛹为食品级。

1.2 仪器及设备

AIR-TECH 超净工作台(苏净集团安泰公司);LRH-150B 生化培养箱(广东省医疗器械厂);HZQ-X100 型恒温振荡培养箱(哈尔滨市东明有限公司);LD5-10 型离心机(北京医用离心机厂);YXQ.SG41.280 电热手提式压力蒸汽灭菌锅(上海生银医疗仪器仪表厂);10L 在位灭菌自动台式发酵罐(上海世远生物设备工程有限公司);电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);DZF-6020 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);以及试管和三角瓶等常用玻璃仪器。接种所用的物品及工具。

1.3 培养基的制备

1.3.1 菌种活化培养基 PDA 加富培养基:马铃薯 20%,蔗糖 2%,琼脂 2%,奶粉 10%,蚕蛹 5%,pH 5.5~6.5。其中,蚕蛹剪碎放入铝锅中煮沸 10 min,用 4 层纱布过滤取汁。将配制的培养基装入 18 mm×180 mm 的试管中,常规方法灭菌处理后备用。

1.3.2 种子液体培养基 马铃薯 20%,酵母膏 2%,葡萄糖 2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%,pH 6.0。

1.3.3 供试培养基 碳源供试培养基:配方为蛋白胨 2%、 MgSO_4 0.15%、 KH_2PO_4 0.2%、pH 5.5~6.5 分别加入各供试碳源。氮源供试培养基:配方为葡萄糖 2%、 MgSO_4 0.15%、 KH_2PO_4 0.2%、pH 5.5~6.5,分别加入各供试氮源。

1.4 试验方法

1.4.1 供试菌种的活化 为保证该试验所用的菌种具有优良的种性,且为该试验提供生活力强的菌种,应将蛹虫草供试母种进行活化,具体方法是在无菌条件下,将供试母种转接至菌种活化培养基上,在 25℃下培养 10 d,挑选菌丝洁白、生长健壮、浓密、无污染的斜面试管作为供试菌种。

1.4.2 液体菌种的制备 取 100 mL 种子液体培养基装入 300 mL 的三角瓶中,灭菌后在无菌条件下接入 0.5 cm² 蛹虫草斜面菌种 4 块,放入振荡培养箱中,在 25℃下静止培养 24 h,然后在 140 r/min,温度为 25℃的条件下,振荡培养 5 d 时终止培养^[9],得到液体菌种。

1.4.3 培养基的筛选 摇瓶培养:分别取供试培养基 100 mL,装入 300 mL 的三角瓶中,灭菌后在无菌条件下,以 10%的接种量接入液体菌种,置于振荡培养箱中,在 25℃条件下,140 r/min 下振荡培养 5 d 终止培养。碳、氮营养源的筛选:在碳源和氮源供试培养基中,分别加入不同的供试碳源和氮源进行单因素对比试验,供试碳源为马铃薯(煮汁)、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖,供试氮源为蚕蛹(煮汁)、大豆浆、酵母膏、蛋白胨、 NH_4NO_3 ,每个处理设 3 个水平(表 1、2),3 次重复。该试验所用马铃薯去皮切成丝再用水煮沸 15 min,用 4 层纱布过滤取滤液;蚕蛹剪碎后在水煮沸 20 min,再用 6 层纱布过滤取滤液。液体培养基最佳配方的筛选:根据碳、氮源筛选试验的结果,以选出的最佳碳源蔗糖和最佳氮源酵母膏,以及无机盐(MgSO_4 、 KH_2PO_4)为试验因素,设计 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验(表 3),配制 9 种培养基 3 次重复,以菌丝体生物量为指标,取平均值。

表 1 不同碳源的水平

水平	马铃薯	可溶性淀粉	麦芽糖	葡萄糖	蔗糖
1	10	2	1	1	1
2	20	4	2	2	2
3	30	6	3	3	3

表 2 不同氮源的水平

水平	蚕蛹汁	大豆浆	酵母膏	蛋白胨	NH_4NO_3
1	5	30	1	1	0.5
2	10	50	2	2	0.8
3	15	80	3	3	1.0

表 3 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验因素及水平

水平	因 素			
	A:蔗糖 / %	B:酵母膏 / %	C: MgSO_4 / %	D: KH_2PO_4 / %
1	1	1	0.1	0.1
2	2	2	0.15	0.15
3	3	3	0.2	0.2

1.4.4 液体培养条件的筛选 以筛选出的最佳配方为培养基进行摇瓶培养,以温度、pH、接种量、转数为试验因素,设计 $\text{L}_{16}(4^4)$ 正交实验(表 4),以菌丝体生物量为指标,3 次重复,确定最佳液体培养条件。将蛹虫草的液体菌种接种到 10 L 发酵罐(装液量 5 L)中,以筛选出的最佳液体培养基配方为培养液,在试验得出的最佳条件下,进行通气培养,通气量分别设为 1:0.4、1:0.8、1:1.2、1:1.6、1:2 V/(V·min),培养 5 d 以菌丝体生物量为指标,确定最佳通气量。

1.4.5 菌丝体生物量的测定 将发酵液以 3 000 r/min 离心 20 min,去除上清液,用无菌水反复冲洗后,以在 70℃下烘干至恒重,用电子天平称取菌丝体干重^[7]。

表 4 L₁₆(4³)培养条件正交实验因素及水平

水平	因 素			
	A: 温度/℃	B: pH 值	C: 接种量/%	D: 转速/r·min ⁻¹
1	20	4.5	5	100
2	22	5.5	8	120
3	24	6.5	10	140
4	26	7.5	15	160

2 结果与分析

2.1 不同碳源对蛹虫草菌丝生物量的影响

由图 1 可知,不同碳源对蛹虫草菌丝体生物量影响是不同的。以蔗糖作为碳源时,蛹虫草菌丝体生物量最高,麦芽糖次之;蛹虫草菌丝体对可溶性淀粉的利用最差。因此,通过试验筛选出适合蛹虫草菌丝体生长的最佳碳源为蔗糖,其次为麦芽糖。

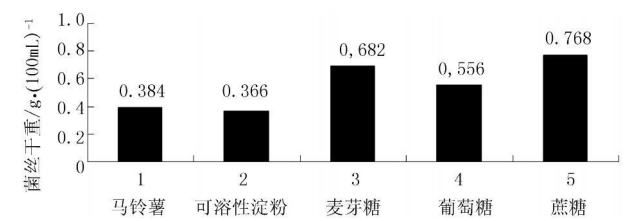


图 1 不同碳源对蛹虫草生物量的影响

2.2 不同氮源对蛹虫草菌丝生物量的影响

由图 2 可知,蛹虫草菌丝体对有机氮源的利用较好,对无机氮源 NH₄NO₃ 的利用不佳。而以酵母膏为氮源时,蛹虫草菌丝体生物量最高,蛋白胨次之。因此,通过试验筛选出适合蛹虫草菌丝体生长的最佳氮源为酵母膏,其次为蛋白胨。

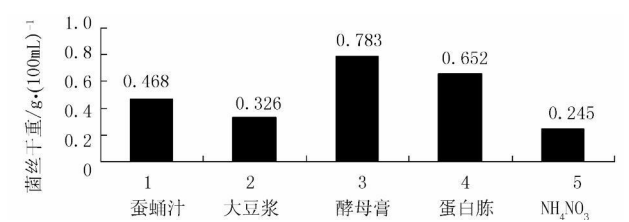


图 2 不同氮源对蛹生物量的影响

2.3 正交实验优化液体培养基的最佳配方

由表 5 可知,不同组合之间蛹虫草菌丝体生物量是不同的,以 A₃B₃C₂D₁ 组合的生物量最高,100 mL 的菌丝干重达到 3.032 g。从极差分析结果可看出,对菌丝生长影响的排序为酵母膏> 蔗糖> KH₂PO₄> MgSO₄。试验结果表明,液体培养基最适合组合为 A₃B₃C₂D₁,即培养基的最佳配方为酵母膏 3%、蔗糖 3%、MgSO₄ 0.15%、KH₂PO₄ 0.1%。

2.4 培养条件的筛选

2.4.1 液体培养条件的正交实验 由表 6 可知,培养条件不同的组合之间蛹虫草菌丝体生物量是不同的,以 A₃B₂C₄D₃ 组合的生物量最高,100 mL 的菌丝干重达到

3.468 g。从极差分析结果可看出,对菌丝生长影响的排序为接种量> 温度> pH> 转速,试验结果表明,液体培养条件最佳组合为 A₃B₂C₄D₃,即温度为 24℃、pH 5.5、接种量为 15%、转速为 140 r/min。

表 5 L₉(3⁴)正交实验结果

序号	A 酵母膏/%	B 蔗糖/%	C MgSO ₄ /%	D KH ₂ PO ₄ /%	菌丝干重 /g·(100mL) ⁻¹
1	1	1	1	1	0.498
2	1	2	2	2	0.465
3	1	3	3	3	0.722
4	2	1	2	3	1.425
5	2	2	3	1	1.770
6	2	3	1	2	2.148
7	3	1	3	2	1.896
8	3	2	1	3	2.221
9	3	3	2	1	3.032
K ₁	1.685	3.819	4.867	5.300	
K ₂	5.343	4.456	4.922	4.509	
K ₃	7.149	5.902	4.388	4.368	
R	5.464	2.083	0.534	0.932	

表 6 L₁₆(4⁴)正交实验结果

序号	A: 温度/℃	B pH 值	C: 接种量/%	D: 转速 /r·min ⁻¹	菌丝干重 /g·(100mL) ⁻¹
1	1	1	1	1	1.151
2	1	2	2	2	1.872
3	1	3	3	3	2.284
4	1	4	4	4	1.724
5	2	1	2	3	1.862
6	2	2	1	4	2.013
7	2	3	4	1	3.205
8	2	4	3	2	2.108
9	3	1	3	4	2.432
10	3	2	4	3	3.468
11	3	3	1	2	2.216
12	3	4	2	1	2.153
13	4	1	4	2	2.712
14	4	2	3	1	2.848
15	4	3	2	4	2.876
16	4	4	1	3	1.657
K ₁	7.031	8.157	7.037	9.357	
K ₂	9.188	10.201	8.763	8.908	
K ₃	10.269	10.581	9.672	9.271	
K ₄	10.093	7.642	11.109	9.045	
R	3.238	2.939	4.072	0.449	

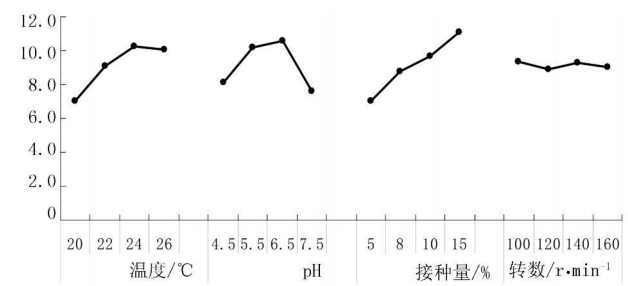


图 3 液体培养条件正交实验极差趋势

2.4.2 通气量的对比试验 该试验在温度 24℃、pH

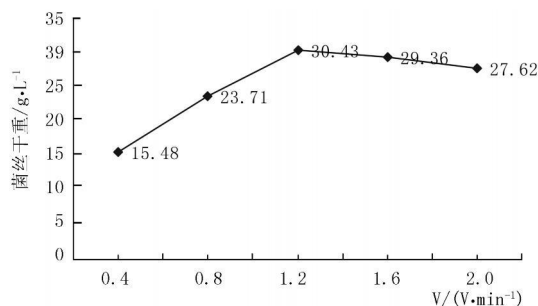


图4 不同通气量对蛹虫草生物量的影响

5.5、接种量为 15%、搅拌速度为 140 r/min 的条件下进行通气培养。从图 4 可知,随着通气量的增加,其菌丝体的生物量也随之升高,当通气量为 1 : 1.2 V/(V · min) 时,蛹虫草的生物量最高,当通气量再升高时,蛹虫草的生物量又缓慢下降,因此可确定进行蛹虫草液体深层发酵培养时,其最佳通气量为 1 : 1.2 ~ 1 : 1.6 V/(V · min)。

3 结论与讨论

通过试验确定蛹虫草液体培养基的最佳碳源为蔗糖,其次为麦芽糖,最佳氮源为酵母膏,其次为蛋白胨;通过正交实验筛选出液体培养基适宜配方为酵母膏为 3%、蔗糖 3%、 $MgSO_4$ 0.15%、 KH_2PO_4 0.1%;蛹虫草液体深层发酵的培养的适宜条件为温度 24 °C、pH 5.5、接种量为 15%、摇瓶转速为 140 r/min,发酵罐通气量为 1 : 1.2 ~ 1 : 1.6 V/(V · min)。

Submerged Fermentation of *Cordyceps militaris*

QIN Xiu-li, YANG Guo-hui, LI Feng-lin

(Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: In this experiment, the best formula of carbon, nitrogen nutrition source and culture conditions on liquid medium of *Cordyceps militaris* were optimized using *cordyceps militaris* mycelia biomass as target by single factor contrast experiment and orthogonal test. The optimal liquid medium of *Cordyceps militaris* were selected, sucrose was the best carbon source, followed by maltose, Yeast extract was the best nitrogen source, followed by peptone. The suitable formula for liquid medium of *Cordyceps militaris* were confirmed, sucrose 3%, yeast extract 3%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.15%; The optimum temperature was 24 °C, pH 5.5, inoculation was 15%, rotate of the flask at 140 r/m, ventilation of the fermentor at 1 : 1.2 ~ 1 : 1.6 V/(V · min). This study provides a theoretical basis for liquid culture of the *Cordyceps militaris*.

Key words: *Cordyceps militaris*; fermentation; medium; mycelia; biomass

该试验筛选的最适碳源为蔗糖,而蔗糖与葡萄糖相比,更为经济易得,是蛹虫草液体培养基首选的碳源。筛选的最适氮源为酵母膏,是天然的有机物质,含有多种的营养物质,特别是含有丰富的 B 族维生素和各种氨基酸,不仅为菌丝体的生长提供氮源,而且还提供了生长因子,促进了蛹虫草菌丝体的生长,是蛹虫草液体培养基首选的氮源。

试验表明在进行摇瓶培养时转速不能太快,太快易使培养液溢出,也不利于菌丝体的生长和收集,发酵罐的通气量也应掌握在适宜范围内,过高不能增加溶氧量,反而会增加空气过滤器的负担和染菌的可能。

参考文献

- [1] 王徐锦堂,孙冬平. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997.
- [2] 连云岚,杨中林. 北虫草化学成分及药理作用的研究进展[J]. 山西医药杂志,2006 35(1): 44-46.
- [3] 柴建萍,辛开艳,田学军,等. 蛹虫草主要有效成分及其药理功效[J]. 云南农业科技,2003,12(4): 22-23.
- [4] 张绪璋. 北虫草的人工培植及其营养成分分析[J]. 中国食用菌,2003,22(2): 19-21.
- [5] 郑婷婷,李多伟,王英娟,等. 蛹虫草液体培养条件优化及有效成分含量分析[J]. 菌物研究,2004 4(2): 22-25.
- [6] 刘小莉,周剑忠,王英,等. 虫草深层发酵的培养条件和培养基优化研究[J]. 江苏农业科学,2008(6): 85-87.
- [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.