

北冬虫夏草液体菌种制备工艺研究

方华舟, 李淑玲, 左雪枝, 安冬梅, 路彩云, 李文君

(荆楚理工学院 生物工程学院 湖北 荆门 448000)

摘要:以培养液营养成分的不同溶解状态、不同口径及培养容器、不同装液量、不同接种量、不同震荡频率等为研究对象,探索北冬虫夏草液体菌种制备适宜工艺参数。结果表明:培养液中各营养成分呈溶液或均匀分布状态,培养瓶壁倾斜、装液量小于1/2、接种量0.5%、多1接种单位、震荡频率120 r/min最佳。

关键词:北冬虫夏草;液体菌种;工艺参数;菌球;生物量

中图分类号:S 567.3⁺5 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)14-0164-04

北冬虫夏草(*Cordyceps militaris* (L.) Link)又名蛹虫草,为冬虫夏草的近缘种,属真菌门、子囊菌亚门、核菌纲、麦角菌目、麦角菌科、虫草属的模式种^[1]。研究证实,北冬虫夏草蛋白质含量高,氨基酸种类齐全,尤其人体必需的全部8种氨基酸含量高达其氨基酸总量的35.47%,且比例恰当;已查明含有21种微量元素,其中硒、铁、锌、锰、钼、钙等含量丰富;维生素类物质VA、VB₂、VE、VD₃、VB₁、VB₆、VC等含量超过或显著

超过天然冬虫夏草等;同时还查明,其所含虫草活性成分如虫草酸、虫草素、虫草多糖、超歧氧化酶(SOD)、腺苷等含量达到或明显高于天然冬虫夏草^[2],被誉为虫草属真菌的后起之秀,对消除疲劳、缓解紧张、提高人体免疫力及预防和治疗慢性支气管炎、各种肝炎、高血压、心脑血管疾病、肾炎肾衰、癌症肿瘤、性功能障碍等有着显著作用,是我国历史上珍稀名贵药用真菌^[1-3],具有十分重要的滋补、保健及药用价值。

近年来,随着种植技术的深入研究,尤其以液体菌种代替固体菌种、液体菌种直接代替栽培种等制种技术的应用,极大地促进了人工种植北冬虫夏草的发展。然而,北冬虫夏草液体菌种的制作工艺及其技术参数目前仍报道较少。现拟对其制作工艺及其参数进行系列研究,并努力模拟一般种植户简陋条件,对各工艺参数进

第一作者简介:方华舟(1965-),男,副教授,湖北罗田人,研究方向为食用菌与农业微生物学。E-mail: fanghuazhou2000@yahoo.com.cn.

基金项目:湖北省荆门市科技局研究与推广资助项目(2010-4-2010S21)。

收稿日期:2011-04-13

Phytopathology, 1993, 31(1): 127-150.

[6] 杨立红,黄清荣,梁建光等.白平菇不同菌株的酯酶同工酶分析及优良菌株筛选[J].食用菌学报,2004,11(2):41-44.

[7] 叶明,叶生梅,戚中田等.香菇(*Lentinula edodes*)双单杂交后代不同发育阶段酯酶同工酶研究[J].微生物学杂志,2004,5(1):54-56.

[8] 冯改静,李明,田景花等.6个白灵菇菌株酯酶和过氧化物同工酶分析[J].食用菌,2006(6):10-12.

[9] 蔡为明,方菊莲,杜新法等.双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)菌株的低温结实形状及酯酶同工酶比较研究[J].浙江农业学报,2001,13(3):130-132.

[10] 任桂梅,陈国梁,高小朋等.陕北羊肚菌不同生长期酯酶同工酶的分析[J].延安大学学报,2005,24(1):78-79.

[11] 陈文强,邓百万,丁锐等.猴头不同菌株酯酶同工酶研究[J].安徽农业科学,2006,34(5):916-917.

[12] Burgess B T, Bihon W, Wingfield M J, et al. A simple and rapid method to determine vegetative compatibility groups in fungi[J]. Supplement to Mycologia, 2009 60(6).

[13] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985:52-58.

Study on Biochemical Marker in the Identification of Cultivated Oyster Mushroom in Hebei Province

ZHENG Si-yue ZHANG Qing-qiao

(College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038)

Abstract: Vegetative compatible and esterase isozyme electrophoresis were employed on the taxonomic identification and genetic diversity of 54 cultivated oyster mushroom strains from Hebei province. The results showed that 54 tested strains were divided into 12 different vegetative compatibility groups according to antagonism reaction. The esterase isozyme electrophoresis analysis showed that the different isozymograms were in the strains of different VCG and the same isozymograms were in the strains of same VCG. Cluster analysis showed that the similar coefficient of different strains of VCG was 53%~91%.

Key words: Hebei province; cultivated oyster mushroom; vegetative compatible group; isozyme analysis

行探讨, 以期为北冬虫夏草液体菌种制作提供一定理论依据及技术规范, 供栽培实践及相关人员借鉴参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种: 由华中农业大学试验菌种中心提供优良原始母种 HJ-4。供试原料: 马铃薯(市场购买)、可溶性淀粉、葡萄糖(化学纯, 天津福晨化学试剂厂生产)、琼脂、磷酸二氢钾、硫酸镁(化学纯, 天津凯通化学试剂有限公司生产)、维生素 B₁(华中药业公司)及其它常见药品。仪器: YX-400A 高压蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司), FA 2104 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), LXJ-HIB 离心机(上海精密仪器仪表有限公司), 恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司), 及其它常用工具等。

1.2 试验设计

1.2.1 液体菌种制备工艺 液体菌种培养条件是工艺流程中关键因素, 包括营养液营养状况、接种量、通气条件、搅拌速度等^[3-7]。

培养基原料选择与处理 → 配制液体培养基(简称营养液) → 灭菌 → 接入菌种 → 适宜条件培养 → 液体菌种成熟

1.2.2 液体培养基配方 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^[6-7]。

1.2.3 菌种萌发生长检测培养基(平板培养基) 马铃薯(去皮)200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 磷酸二氢钾 1 g, VB₁ 10 mg, 水 1 000 mL, pH 自然^[6-7]。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基原料不同溶解状态 加热条件下以少量水将可溶性淀粉调成糊状, 然后慢慢加入培养基中, 搅拌均匀, 使可溶性淀粉在培养液中呈溶解、均匀分布的悬浮状态; 以可溶性淀粉直接加入培养基中(大部呈沉淀状态)为对照, 对比不同溶液状态对母种菌丝在该营养液中生长及液体菌种状况。

表 1 不同溶液状况对液体菌种菌丝及菌种质量的影响

液体菌种菌丝状况							平板培养基上生长状况			
溶液状况	菌丝形态	菌丝色泽	菌丝密度	成熟速度 / mm · d ⁻¹	菌球数量 / 个 · (10mL) ⁻¹	菌丝干重 / mg · (100mL) ⁻¹	萌发速度 / mm · d ⁻¹	菌丝色泽	菌丝状况	菌丝密度
均匀	健壮	洁白	浓密	7Aa	67Aa	513Aa	3. 2Aa	洁白	健壮	浓密
沉淀	较健壮	洁白	较浓密	8Aab	42 Bb	4 32Bb	2. 7Bb	洁白	较健壮	较浓密

注: 表中不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著, 不同大写字母表示 $P < 0.01$ 水平差异显著, 下同。

2.2 不同口径及培养容器对菌丝生长及液体菌种质量的影响

由表 2 可以看出, 不同口径大小及不同培养容器对菌丝生长及质量有一定影响。从菌球数量看, 锥形瓶数量最多, 菌球圆细、浓密, 分布均匀; 广口瓶次之, 菌球较大; 盐水瓶最少, 但菌球更大, 三者差距达显著水平; 从菌丝生物量看, 亦为锥形瓶最佳达 532 mg/10mL, 广口

1.3.2 不同培养容器及装液量 以普通 500 mL 盐水瓶(细口)、250 mL 广口瓶(广口)、250 mL 锥形瓶模拟不同口径大小及不同培养容器, 以及锥形瓶分别装培养液 1/3、1/2、2/3, 比较不同通气状况下母种菌丝在该培养液中的生长及液体菌种状况。

1.3.3 不同接种量 以母种斜面 5 mm × 5 mm 为 1 个接种单位(接种量约为 0.125%), 分别接入 1、3、5 个接种单位, 比较观察母种菌丝生长及液体菌种状况。

1.3.4 不同振荡频率 设振荡频率 0(静置)、100、120、150、200 r/min 进行培养, 观察不同振荡频率下母种菌丝生长及液体菌种情况。各试验组 5 次重复(除特别说明外, 均以 250 mL 锥形瓶为实验容器), 试验过程按一般常规进行, 20℃培养, 直至各试验组液体菌种成熟^[3-7]。

1.3.5 菌丝生长及液体菌种质量状况检测 比较观察各液体菌种菌丝色泽、形态、密度、菌球数量等状况; 比较各液体菌种成熟速度; 随机以接种环取各液体菌种菌液一环, 接种至平板培养基中央, 20℃恒温培养, 观察菌种萌动时间, 菌丝状况及生长速度(菌丝生长速度 = 菌落半径/时间)等; 将各液体菌种过滤取菌丝, 离心机 8 000 r/min 离心 10 min, 55℃下烘干至恒重, 称量, 比较生物量的大小^[4-10]。

2 结果与分析

2.1 不同溶液状况对菌丝生长及液体菌种质量的影响

由表 1 可以看出, 当营养成分在液体培养基中分布均匀、呈溶液状态, 则菌丝生长健壮、生长速度快, 菌丝浓密, 菌丝球数量、菌丝生物量显著高于沉淀组; 在平板培养基上亦萌发快, 生长健壮、浓密。显然, 营养成分均匀分布, 可显著促进菌丝在整个培养液空间内广泛生长和分布, 有利于菌丝细胞在较长时间内保持对数生长状态, 促进菌丝细胞保持更旺盛的生命力。同时一些淀粉颗粒可在培养液中悬浮, 有利于菌丝断裂为众多片段, 形成大量新的菌丝生长点, 促进菌丝球形成, 菌丝生物量显著提高, 因此液体菌种也更佳。

瓶、盐水瓶分别次之。综合菌丝形态、密度、色泽、萌发速度及生物量等, 锥形瓶最佳, 广口瓶、盐水瓶分别次之, 但三者差距并不显著, 尤其后二者较为接近。分析原因, 锥形瓶瓶壁倾斜, 菌丝球易于形成, 菌丝易于生长, 因此菌丝球细小、数多, 生物量也高; 广口瓶口径大, 利于空气进入, 也较有利于菌丝代谢和生长; 由于液体菌种繁育时间短, 对氧气需求量不大, 因此三者差距并

表 2

不同口径及培养容器对菌丝生长及菌种质量的影响

液体菌种菌丝状况							平板培养基上生长状况			
培养容器	菌丝形态	菌丝色泽	菌丝密度	成熟速度 / mm ° d ⁻¹	菌球数量 / 个 ° (10mL) ⁻¹	菌丝干重 / mg ° (100mL) ⁻¹	萌发速度 / mm ° d ⁻¹	菌丝色泽	菌丝状况	菌丝密度
盐水瓶	健壮	洁白	浓密	8Aab	8Cc	494 Bbc	2. 8Bb	洁白	健壮	浓密
广口瓶	健壮	洁白	较浓密	7Aa	22 Bb	503 Bb	2. 9Bb	洁白	健壮	浓密
锥形瓶	健壮	洁白	菌丝少	7Aa	67Aa	532 Aa	3. 3Aa	洁白	健壮	浓密

不显著。说明以盐水瓶等常用容器作为液体菌种制备及菌丝发酵培养的容器亦可。

2.3 不同装液量对菌丝生长及菌种质量的影响

由表 3 可以看出, 不同装液量对液体菌种质量有较大影响。随着装液量的增加, 菌种质量呈下降趋势。当装液量超过 1/2 达到 2/3 时, 菌丝下降显著, 菌丝干重从 548 mg 显著降低为 365 mg, 菌球数从 42 个显著下降为 6 个, 菌丝色泽、密度及健壮程度、成熟时间、萌

发速度等均明显下降。而装液量从 1/3 增加为 1/2 时, 菌丝状况变化不显著。显然这是由于培养瓶内空气及溶入培养液内的氧气多或少所致。当装液量超过 1/2 时, 可溶入的氧较少, 不能完全满足菌丝生长需要, 菌丝生长迟缓, 有害物质积累增加, 不利于菌丝生长与萌发, 因而培育的液体菌种质量也较差。说明装液量以 1/2 较为适宜。

表 3

不同装液量对菌丝生长及菌种质量的影响

装液量	菌丝形态	菌丝色泽	菌丝密度	液体菌种菌丝状况				平板培养基上生长状况		
				成熟速度	菌球数量	菌丝干重	萌发速度	菌丝色泽	菌丝状况	菌丝密度
				/mm°d ⁻¹	/个°(10 mL) ⁻¹	/mg°(100mL) ⁻¹	/mm°d ⁻¹			
2/3	较健壮	较白	较浓密	9Bb	6Cc	365 Bc	2.4Bc	较白	较健壮	较浓密
1/2	健壮	洁白	浓密	7Aa	62Bb	548Aab	3.0Aab	洁白	健壮	浓密
1/3	健壮	洁白	浓密	7Aa	76Aa	563Aa	3.2Aa	洁白	健壮	浓密

2.4 不同接种量对液体菌种成熟速度及菌种质量的影响

在培养瓶中接入不同量母种, 对培育的液体菌种菌丝及菌种质量状况的影响, 见表 4。

从表 4 可以看出, 不同接种量对菌丝生长及菌种质量有一定影响。当接种量为 1 个单位时, 菌丝干重为 509 mg、菌球 61 个、菌种成熟速度 9 d; 当接种量增加至 3 个单位, 菌丝生物量增加至 558 mg、菌球数 78 个、成熟速度减少为 7 d, 差别较显著, 菌丝及萌发状况亦较好; 当接种量增加为 5 个单位, 差别不明显。显然, 接种量及接种单位增加, 菌丝生长点显著增多, 菌球数、菌丝生长速度、菌丝数量随之增加, 液体菌种成熟速度加快, 菌种质量亦更好, 但当接种量增加到一定值时, 菌丝生长呈现一定饱和状态。说明接种量约为 0.5%、多个接种单位为佳。

2.5 不同振动频率对菌丝生长及菌种质量的影响

由表 5 可以看出, 不同震动频率对菌丝生长及菌种质量有较大影响。震荡频率 120 r/min 最优, 其菌丝干重和菌球数均明显好于 100、150 r/min 组; 震荡速度 200、150 r/min 时菌丝贴壁、粘壁现象明显, 菌丝生物量、菌球数显著下降, 在平板上萌发速度慢于静置培养。显然, 适当的震动频率, 可显著促进氧气在培养液中的溶解及均衡分布, 但震荡速度过快, 因离心力等因素, 导致大量菌丝分布于瓶壁边缘乃至粘壁、贴壁, 形成粗大菌索、菌膜, 培养液中菌丝量少、生长受到一定抑制, 液体菌种质量亦下降。而静置时, 虽培养液表面也形成一层菌膜, 一定程度上抑制菌丝细胞对氧气的需求, 但因培养时间较短, 影响不显著, 因此其液体菌种质量亦较好。

表 4

不同接种量对菌丝生长及菌种质量的影响

接种量	菌丝形态	菌丝色泽	菌丝密度	液体菌种菌丝状况				平板培养基上生长状况		
				成熟速度	菌球数量	菌丝干重	萌发速度	菌丝色泽	菌丝状况	菌丝密度
				/mm ² ·d ⁻¹	/个·(10mL) ⁻¹	/mg·(100mL) ⁻¹	/mm ² ·d ⁻¹			
1 单位	健壮	洁白	较浓密	9Bb	61Bc	509 Bc	3. 0Bb	洁白	健壮	较浓密
3 单位	健壮	洁白	浓密	7Aa	78 Aab	558Aab	3. 2Aa	洁白	健壮	浓密
5 单位	健壮	洁白	浓密	7Aa	83Aa	576Aa	3. 3Aa	洁白	健壮	浓密

注: 母种斜面 5 mm×5 mm 为 1 个接种单位(接种量约为 0. 125%)。

表 5

不同振动频率对菌丝生长及菌种质量的影响

震动频率 v/ min	液体菌种菌丝状况						平板培养基上生长状况			
	菌丝 状态	菌丝 色泽	菌丝 密度	成熟速度	菌球数量	菌丝干重	萌发速度	菌丝 色泽	菌丝 状况	菌丝 密度
				/ mm · d ⁻¹	/ 个 · (10mL) ⁻¹	/ mg · (100mL) ⁻¹	/ mm · d ⁻¹			
100	较健壮	洁白	较浓密	7Aa	42Bb	482Bb	2. 8Bb	洁白	健壮	浓密
120	健壮	洁白	浓密	7Aa	64Aa	509Aa	3. 0Aa	洁白	健壮	浓密
150	菌丝粘壁	洁白	较浓密	7Aa	37Bbc	473Bbc	2. 7Bb	洁白	健壮	浓密
200	菌丝粘壁	洁白	一般	8Aab	17Cc	423Dd	2. 5C c	洁白	较健壮	较浓密
静置	表面菌膜	洁白	一般	8Aab	—	464C c	2. 7Bb	洁白	较健壮	较浓密

3 结论与讨论

该试验结果说明, 培养液各营养成分以呈溶液或均匀分布为佳。可采取粉碎、溶解、煮汁、过滤等措施^[10-12], 使培养原料之营养成分均匀分布, 在根本上保证菌丝在全部液体范围内均衡分布和生长, 有利于菌球形成和菌龄一致, 有利于菌丝细胞保持旺盛生命力。

培养容器以锥形瓶(瓶壁一定程度倾斜)为佳, 装液量以小于 1/2 为佳。锥形瓶瓶壁倾斜, 显著有利于菌丝片段断裂、多生长点产生及众多细小菌丝球的形成, 有利于菌丝生长; 装液量小于 1/2, 可保证培养瓶内具有充足空气溶入培养液中, 保证菌丝代谢和生长, 保证菌丝生命力。同时, 该试验还说明, 盐水瓶(细口)^[13-14]、广口瓶等普通容器, 只要能保证培养液及菌丝生长对氧气需求, 如装液量不超过 1/2 或输入无菌空气, 亦可获得较高菌丝生物量, 因此亦可作为栽培实践制备液体菌种的培养容器。

接种量以 0.5%、多个接种单位为佳。接种量过小, 菌丝萌发及生长慢, 菌丝易老化; 接种量大则造成菌种浪费和液体菌种不足。该试验 3 个接种单位(接种量约 0.5%), 菌丝萌发快、生长迅速, 因此在实践中可将欲接入的菌种块分解为多个小接种块^[3, 6], 可缩短菌种成熟时间, 提高菌种质量。

震荡频率以 120 r/min 为佳。震荡可促进培养瓶内的空气溶入培养液中, 促进菌丝在培养液内均衡分布和生长, 促进菌丝球的形成。震荡频率过高, 菌丝更多分布于瓶壁及粘壁、贴壁, 不利于菌丝均衡生长和菌丝易于老化。静置条件下, 由于菌膜较薄, 只要及时收获, 并进行搅拌、打碎等处理, 菌丝生物量亦较高, 亦可

以作为优良液体菌种使用^[3, 6, 11-14]。

该试验结论及技术参数亦可供北冬虫夏草菌丝发酵、生产等借鉴参考。

(该本文作者还有姚书兵, 单位同第一作者。)

参考文献

- [1] 胡昭庚. 17 种药用真菌栽培 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 张平, 朱述钧, 钱大顺, 等. 北冬虫夏草功能成分及保健作用分析 [J]. 江苏农业科学, 2003(6): 105-107.
- [3] 丁米田, 李灿. 食用菌液体菌种摇瓶培养操作技术要点 [J]. 现代农业科技, 2009 16(4): 53-54.
- [4] 王稳, 朱忠贵, 李萍萍. 食用菌液体菌种的几种使用检测方法 [J]. 食用菌, 2005(1): 20-21.
- [5] 安燕, 丁立孝, 丁振, 等. 北冬虫夏草液体发酵培养基碳氮比的优化 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(1): 73-75.
- [6] 锁现民, 蔡树威, 张现法. 浅谈蛹虫草栽培菌种制作及鉴定 [J]. 食用菌, 2009(4): 41-42.
- [7] 耿丽娟, 何莉莉, 鄂玉洋, 等. 菌种保藏条件对蛹虫草菌丝生长及产量的影响 [J]. 沈阳农业大学学报, 2009 40(2): 165-168.
- [8] 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.
- [9] 方华舟, 向会耀, 王小艳. 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): 2734-2727.
- [10] 麦焯棉. 不同碳源对北冬虫夏草菌丝生长影响的研究 [J]. 现代农业科技, 2007(16): 17-19.
- [11] 孙叶, 陈秀兰, 严巧玲, 等. 蛹虫草规模化人工栽培技术要点 [J]. 江苏农业科学, 2008(6): 145-146.
- [12] 龚兰芳. 玉溪市蛹虫草栽培技术 [J]. 中国林副特产, 2008(6): 35-37.
- [13] 赵战春, 姜新良, 杨新国, 等. 北虫草工厂化高产栽培技术 [J]. 食用菌, 2006(5): 42-43.
- [14] 包建忠, 蒋宁, 陈秀兰, 等. 北冬虫夏草规模化生产技术研究示范推广 [J]. 现代农业科学, 2009 16(1): 68-73.

Study on the Processing Technology of Preparative Liquid Stains of *Cordyceps militaris* (L). Link

FANG Hua-zhou, LI Shu-ling, ZUO Xue-zhi, AN Dong-mei, LU Cai-yun, LI Wen-jun, YAO Shu-bing
(Faculty of Bioscience Engineering, Jingchu Science and Technology College, Jingmen, Hubei 448000)

Abstract: Through the various nutrient of the culture fluid, the different caliber and the raise vessel, the different liquid volume, the different inoculating quantity, the different shake frequency and so on as object of study, the optimal processing parameters of preparative sliquid stains of *Cordyceps militaris* (L). Link were probed. The results showed that the various nutrient of the culture fluid assumed the solution or the uniform distribution, the culture bottle inclined, the liquid volume was smaller than 1/2, inoculating quantity was 0.5%, many inoculating unit, the optimal shaking frequency was 120 r/min.

Key words: *Cordyceps militaris* (L). Link; liquid stains; processing parameter; biomass; coccus