

蛹虫草液体菌种培养基的优化

徐方旭, 刘诗扬, 王升厚

(沈阳师范大学 特种菌业研究所, 辽宁 沈阳 110034)

摘 要:通过正交实验优化蛹虫草液体菌种培养基,以干菌体得率为指标,选择出蛹虫草液体发酵的最适培养基。结果表明:最适液体培养基配方为:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 16 g/L,磷酸二氢钾 6 g/L,硫酸镁 2 g/L,水 1 000 mL,pH 自然,干菌体得率为 46.5 g/L,与其它试验组结果的差异显著,说明碳源和氮源为其生长的最重要营养因素。

关键词:蛹虫草;干菌体;液体培养基;因素;水平

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0199-03

蛹虫草是我国名贵的中药材之一,其所含药用成分和多种药效可与冬虫夏草相媲美^[1-2],近年来蛹虫草人工栽培技术已日渐成熟,在整个栽培环节中菌种因素仍然是最核心的。由于蛹虫草目前栽培主要采用液体菌种,因此如何生产出单位体积最大菌丝产率的液体菌种就显得尤为重要^[3-4]。蛹虫草液体菌种配方所含成分虽然差异不大,但其成分含量千差万别,多数使用者是凭自身经验确定的,配方是否科学无法考究^[5-6]。为优化蛹虫草液体菌种培养基配方,现按正交实验设计,通过调整液体培养基中营养因子碳源、氮源和无机盐的含量,以期探寻蛹虫草液体菌种最佳配方,为蛹虫草规模化生产提供种源保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 尖头蛹虫草液体菌种,由沈阳聚鑫菌业有限公司提供。

1.1.2 试验药品 葡萄糖、蛋白胨、磷酸二氢钾和硫酸镁,药品均为化学纯。

1.1.3 试验仪器 电子天平、高压灭菌锅、超净工作台、离心机、恒温摇床、干燥箱等。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基单因素优化试验 碳源单因素最佳浓度的筛选:以蛋白胨 5 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,硫酸镁 1 g/L,水 1 000 mL,葡萄糖浓度依次为 0、10、15、20、25、30 g/L 组成配方,pH 自然。采用 250 mL 锥形瓶,每瓶

装 100 mL 培养基,按常规方法灭菌、接种、震荡培养^[7-8]。接种量为 5 mL,在 20℃、120 r/min 条件下震荡培养 7 d,然后将发酵液以 4 000 r/min 离心 20 min,除去上清液,于干燥箱中 100℃烘干至恒重,用分析天平称取全部菌丝体质量,确定碳源的最佳浓度^[9-10]。氮源单因素最佳浓度的筛选:葡萄糖为 20 g/L,磷酸二氢钾为 2 g/L,硫酸镁为 1 g/L,水 1 000 mL,蛋白胨浓度依次为 0、2、4、6、8、10、12、14、16 g/L,pH 自然。测其菌丝体干重来确定氮源的最佳浓度,具体方法同上。无机盐单因素最佳浓度的筛选:葡萄糖为 20 g/L,蛋白胨为 5 g/L,水 1 000 mL,磷酸二氢钾浓度依次为 0、2、4、6、8 g/L,硫酸镁浓度依次为 0、1、2、3、4、5 g/L,pH 自然。测其菌丝体干重来确定磷酸二氢钾和硫酸镁的最佳浓度,具体方法同碳源单因素最佳浓度的筛选。

1.2.2 正交实验 依据蛹虫草生长的营养需求来设计试验的因素和水平,以 4 因素 5 水平进行,见表 1。从中选取碳源、氮源、无机盐的最佳搭配方案。对照组配方为加富 PDA:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 3 g/L,酵母浸粉 2 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,硫酸镁 1 g/L,水 1 000 mL。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	葡萄糖 A /g·L ⁻¹	蛋白胨 B /g·L ⁻¹	磷酸二氢钾 C /g·L ⁻¹	硫酸镁 D /g·L ⁻¹
1	0	0	0	0
2	7.5	4	2	1
3	15	8	4	2
4	22.5	12	6	3
5	30	16	8	4

2 结果与分析

2.1 碳源单因素最佳浓度的筛选结果

从图 1 可看出,培养基的葡萄糖含量在 0~25 g/L 之间,菌丝生长量是呈递进关系的,也就是说在此范围内,菌丝生长量是随着含糖量的增加而增加的,当葡萄

第一作者简介:徐方旭(1986-),女,在读硕士,研究方向为食用菌病虫害防治。

通讯作者:王升厚(1963-),男,本科,教授,硕士生导师,研究方向为菌物资源开发与利用。E-mail:wshhwq2009@163.com。

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20072058)。

收稿日期:2010-11-17

糖浓度为 25 g/L 时,菌丝体干重得率最高,可达到 23.1 g/L,但随着葡萄糖浓度的继续增加,菌丝干重反而下降。

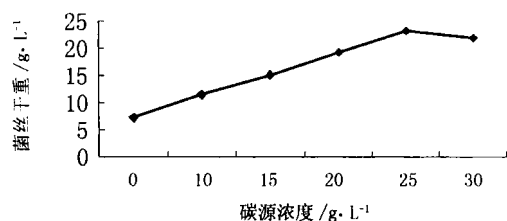


图1 不同浓度碳源对菌丝干重的影响

2.2 氮源单因素最佳浓度的筛选结果

氮源是合成蛋白质的主要原料,而蛋白质是细胞的主要组成成分,是保持生命的基本物质,因此,氮源是蛹虫草生长所需的主要营养源。由图2可知,蛋白胨浓度为 16 g/L 时,干菌丝体得率最高,为 30.86 g/L。

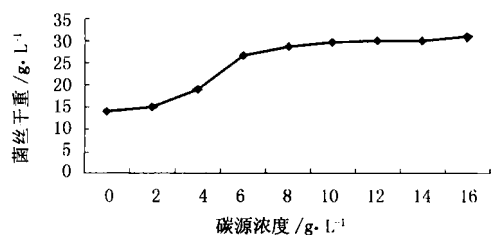


图2 不同浓度氮源对菌丝干重的影响

2.3 无机盐单因素最佳浓度的筛选结果

无机盐浓度试验主要做了磷酸二氢钾和硫酸镁,结果见图3、4。从图3可看出,添加磷酸二氢钾后菌丝生长量明显高于未添加区,以含量 6 g/L 为最高,但 2 g/L 和 6 g/L 之间差距不是很明显。而添加硫酸镁后菌丝生长量也高于对照,但是以添加量 2 g/L 时明显高于其它处理。

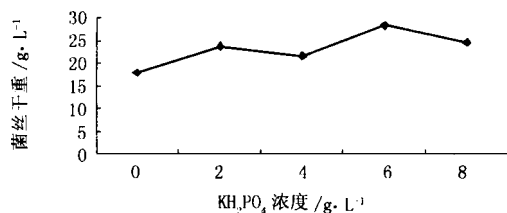


图3 不同浓度的 KH_2PO_4 对菌丝干重的影响

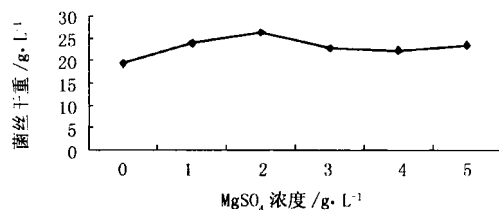


图4 不同浓度的 MgSO_4 对菌丝干重的影响

2.4 正交实验结果

2.4.1 直观分析

由表2数据分析可知,比较A因素

Kn 值,为 K_5 值最大,说明其最优水平为 5(30 g/L)。同理 B 因素最优水平为 5(16 g/L),C 因素最优先水平为 5(8 g/L),D 因素最优水平为 5(4 g/L)。由表2数据可知,A 因素的 R 值最大,因素的极差越大,说明该因素的变动对结果的影响越大,即 A 因素(碳源)为最重要的营养因素。根据极差 R 值可见,影响大小排序依次为:因素 A>因素 B>因素 C>因素 D。试验组 25 的干菌丝得率 46.5 g/L 明显高于对照组加富 PDA 的干菌丝得率 32.2 g/L,通过 spss 软件对菌丝干重平均值进行处理可知,40.6 g/L 和 46.5 g/L 的差异显著,因此,在此次试验范围中,蛹虫草液体菌种最适培养基配方为:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 16 g/L,磷酸二氢钾 6 g/L,硫酸镁 2 g/L,水 1 000 mL。

表2 $L_{25}(5^4)$ 正交实验结果分析计算表

试验号	葡萄糖 A	蛋白胨 B	磷酸二氢钾 C	硫酸镁 D	菌丝干重 平均值/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.2
2	1	2	2	2	5.9
3	1	3	3	3	12.6
4	1	4	4	4	20.9
5	1	5	5	5	27.9
6	2	1	2	3	10.8
7	2	2	3	4	15.6
8	2	3	4	5	21.6
9	2	4	5	1	22.4
10	2	5	1	2	21.9
11	3	1	3	5	23.9
12	3	2	4	1	20.7
13	3	3	5	2	27.2
14	3	4	1	3	24.9
15	3	5	2	4	26.7
16	4	1	4	2	28.6
17	4	2	5	3	34.0
18	4	3	1	4	30.2
19	4	4	2	5	37.0
20	4	5	3	1	36.4
21	5	1	5	4	40.0
22	5	2	1	5	38.3
23	5	3	2	1	36.0
24	5	4	3	2	40.6
25	5	5	4	3	46.5
K1	6.75	10.35	11.55	11.57	
K2	9.23	11.45	11.64	12.42	
K3	12.34	12.76	12.91	12.88	
K4	16.62	14.58	13.83	13.34	
K5	20.14	15.94	15.15	14.87	$\sum x_i = 65.8$
k1	1.35	2.07	2.31	2.314	$n = 25$
k2	1.846	2.29	2.33	2.48	$\bar{R} = 2.6$
k3	2.468	2.55	2.58	2.58	
k4	3.324	2.92	2.77	2.67	
k5	4.028	3.19	3.03	2.97	
R	2.678	1.12	0.72	0.66	

注: Kn , kn 分别代表以 n 为水平的实验菌丝体干重之和及其平均数, R 表示因素的极差。

2.4.2 方差分析 由表3数据分析可知:A 因素(碳源)和 B 因素(氮源)的 F 值相对最大,C、D 因素(无机盐)的

F 值相对较小。F 数值较大时表明,该因素采取不同的水平对试验结果影响显著,所以在配制蛹虫草液体菌种培养基时,应选择的最优的碳源和氮源数量与相对比值。而 C、D 因素(无机盐)F 值较小,则取任一水平,对结果影响不大。这与宏观观察结果一致。

表 3 方差分析结果

计算	葡萄糖 A	蛋白胨 B	磷酸二氢钾 C	硫酸镁 D
SS	23.55	4.12	1.85	1.20
DF	4	4	4	4
MS	5.88	1.03	0.46	0.30
F	173.29	30.33	13.63	8.83

注:SS、DF、MS、F 分别代表平方和、自由度、均方和方差。

3 结论

在相同接种量和培养条件下,正交实验设计中 25 号配方为该轮实验设计中最佳配方,其组成成分为:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 16 g/L,磷酸二氢钾 6 g/L,硫酸镁 2 g/L,水 1 000 mL。该配方与传统的加富 PDA 配方相比,具有菌丝产率高,分生孢子多、相同接种量菌丝发菌点多封面快的特点,而且操作简便,节约成本,很适合蛹虫草大规模工厂化栽培液体菌种生产所需。

该试验最佳配方中原料成分和传统加富 PDA 没有什么区别,但在成分含量使用上却有明显区别,这是过

去相关报道中未能看到的。另外,目前所确立的最佳配方只是到目前试验所得结论,当碳源和氮源继续提高后菌丝产率会不会继续显著提高,值得探讨。

参考文献

- [1] 张俊涛,李亚洁,温志新,等. 蛹虫草常用菌种选育技术[J]. 食用菌, 2010(3):20.
- [2] 孟繁宇. 蛹虫草高产菌株人工栽培条件的优化[J]. 食用菌, 2009(4):55.
- [3] 范卫强,尹鸿萍,周长林. 虫草多糖的分离、纯化和初步药效活性研究[J]. 生物加工过程, 2008, 6(1):69-73.
- [4] 边银丙. 食用菌菌种质量问题与菌种管理对策的商榷[J]. 中国食用菌, 1999, 18(4):12-14.
- [5] 王普,郑明,何军邀,等. 虫草多糖的化学结构及药理活性研究进展[J]. 浙江工业大学学报, 2010, 38(2):130.
- [6] 陈顺志. 冬虫草和北虫草研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 1995, 16(5):242.
- [7] 李亚洁,王鹤,孟楠,等. 蛹虫草菌种复壮技术的研究[J]. 食用菌, 2006(2):18-19.
- [8] 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.
- [9] 张金霞. 食用菌的菌种质量及其保持[J]. 中国食用菌, 1996, 15(2):11-12.
- [10] 张金霞,张树庭. 草菇菌种保藏效果鉴定的研究[J]. 中国食用菌, 1992, 11(4):3-6.

Liquid Medium for Optimization of *Cordyceps militaris*

XU Fang-xu, LIU Shi-yang, WANG Sheng-hou

(Institute of Special Edible Fungi, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034)

Abstract: To optimize the liquid culture medium of *Cordyceps militaris* by orthogonal layout and with the desiccant weights of the mycelium being a index to choose the most suitable liquid medium for *Cordyceps militaris*. The results showed that the optimum liquid culture medium was glucose 30 g/L, peptone 16 g/L, KH_2PO_4 6 g/L, MgSO_4 2 g/L, water 1 000 mL, pH natural. The desiccant weights of the mycelium was 46.5 g/L, with the other experimental groups significantly different results. The carbon and nitrogen compound were the most important tropho-factor for the growth of *Cordyceps militaris*.

Key words: *Cordyceps militaris*; desiccant mycelium; liquid medium; factor; level