

北冬虫夏草人工培养固体培养基优化研究

秦秀丽, 邢力, 尹锐

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:对北冬虫夏草人工培养固体培养基进行了优化。结果表明:北冬虫夏草能够利用的固体培养基的种类较多,在单一的固体培养基中,以大米为固体基质菌丝长势最好,出草率最高;但在大米中加入10%~15%麦麸,其菌丝长势和出草率都优于单一大米的基质;对营养液进行对比试验及 $L_9(3^4)$ 的正交实验,确定营养液的适宜配方为蔗糖2.0%,酵母膏1.5%, $MgSO_4$ 0.10%, KH_2PO_4 0.10%;北冬虫夏草固体培养基基质的适宜配方为大米85%、麦麸15%,500 mL的装量为60 g,pH值5.5~6.5,料水比(固体基质:营养液)1:1.5。

关键词:北冬虫夏草;固体培养;营养液;正交实验

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0149-04

北冬虫夏草(*Cordyceps militaris*)又称蛹虫草,是著名的食药两用真菌。其菌体内含有多种营养成分和药用

成分,含有较高的蛋白质、虫草酸、虫草素、虫草多糖、多种氨基酸、维生素及微量元素。此外还含有甘露醇、SOD等多种有效成分^[1-2],其药理作用和药用成分与冬虫夏草极其相近,具有提高机体免疫力、抗肿瘤、抗衰老、补肺益肾、补虚损等保健功效^[3]。近年来人们通过人工培养北冬虫夏草作为冬虫夏草的理想代用品,广泛用于食品、医药、膳食、保健等领域,市场需求量极大,具有较高经济价值^[4-5]。目前,北冬虫夏草的人工培养分

第一作者简介:秦秀丽(1966-),女,吉林永吉人,硕士,副教授,现主要从事微生物及食药两用菌的教学与科研工作。

基金项目:吉林省科技厅发展计划资助项目(201105071);吉林省教育厅“十一五”科学技术研究资助项目(吉教科合字[2011]第274号)。

收稿日期:2012-12-13

- [4] 张甫生,庞杰,李文东,等.魔芋精粉的性质及其在食品与饲料上的应用[J].粮食与饲料工业,2003(1):23-25.
- [5] 颜治,刘勤晋.魔芋葡甘聚糖的特性、保健功能及作用[J].饮料工业,2003,6(2):33-36.
- [6] 刘岱,张馨月.利用魔芋开发具有减肥功能的黑色食品[J].吉林蔬菜,2007(3):80-81.
- [7] 付红军,彭湘莲,李雪巧.绿茶果冻关键工艺研究[J].食品工业,2010(6):50-52.
- [8] 程道梅.绿茶果冻的制作[J].农产品加工(学刊),2005(1):53-55.
- [9] 吕海鹏,谷记平,林智,等.普洱茶的化学成分及生物活性研究进展[J].茶叶科学,2007(1):8-18.
- [10] 李改燕,裘迪红,郭丽萍.红枣汁与魔芋凝胶复合果冻的研制[J].宁波大学学报(理工版),2010,23(2):6-10.

- [11] 梅承耀,李凤华.魔芋果果冻的研制[J].食品研究与开发,1999,20(4):32-33.
- [12] 张进业,林轩.魔芋-卡拉胶果冻的生产工艺及质量控制[J].广州食品工业科技,1999(3):46-48.
- [13] 张雁.显齿蛇葡萄保健果冻的研制[J].食品科技,2002(7):22-23.
- [14] 李安平,周晓媛,张华,等.乳酸魔芋果果冻加工工艺的研究[J].广州食品工业科技,2001,17(2):36-37.
- [15] 宋照军,刘玺,耿超,等.金银花保健果冻的工艺研究[J].食品工业科技,2008(4):229-231.
- [16] 冯颖,王建国.姜汁果果冻的研制[J].食品科技,2005(4):49-50.
- [17] 李向红,邓放明,刘展.藕粉果冻的研制[J].食品科技,2003(8):45-48.

Development of Compound Jelly of Green Tea and *Amorphophallus konjac*

WANG Xi-ping, JIANG Jun-cheng

(The Research Center of Zymotechnics Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: Taking green tea powder and *Amorphophallus konjac* powder as the main raw materials, the best technology of compound jelly of green tea and *Amorphophallus konjac* were studied by orthogonal test. The results showed that jelly was good with uniform color, and clear transparent, and delicate cool sliding taste, and unique flavor, when adding 30% green tea powder, 1% gelata (*Amorphophallus konjac* jellies : carrageenan = 1 : 1), 15% sugar (granulated sugar : honey = 2 : 1), 0.25% citric acid and 0.1% potassium chloride; the production had higher nutrition value and health features.

Key words: green tea; *Amorphophallus konjac*; jelly

为寄主体培养和用固体基质进行人工培养。用固体基质培养具有原料易得,成本低的特点。但固体基质选择及配方直接影响出草的质量和产量。该试验对北冬虫夏草的固体基质进行了研究,筛选出固体培养基的最适宜配方,为其人工固体基质培养提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:由吉林农业科技学院微生物实验室以野生北冬虫夏草为材料分离纯化得到的纯菌种。

栽培设施及主要设备:培养室(内设栽培架,宽60 cm,高150 cm,分4层,每层间隔30 cm,底层离地面30 cm,内设有照明灯及紫外线灯)、电热恒温培养箱、立式高压蒸汽灭菌锅、超净工作台。

1.2 试验方法

1.2.1 供试菌种的培养 PDA加富培养基:马铃薯20%(煮汁15 min,4层纱布过滤),蔗糖2%,琼脂2%,奶粉10%,蚕蛹粉5%(煮汁10 min,4层纱布过滤),pH 5.5~6.5^[6]。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,经高压蒸汽灭菌后,制成斜面试管培养基备用,在无菌条件下接种,23℃下培养7 d,挑选菌丝洁白、生长健壮、浓密、无污染的斜面作为供试菌种。

1.2.2 固体培养基质的筛选 单一固体基质的筛选:供试固体基质为大米、黑米、小米、玉米粉、麦粒、高粱米。分别取固体基质60 g装入500 mL的罐头瓶中,将60 mL营养液(葡萄糖2%,蛋白胨2%,KH₂PO₄ 0.1%,MgSO₄ 0.2%,pH 6.5)装入罐头瓶中,用聚丙烯塑料封口后,在126℃下高压蒸汽灭菌1 h,在无菌条件下接入3块0.5 cm²菌种块,放入培养室内进行培养。每种基质装20瓶。观察菌种的萌发、菌丝长势、长满瓶的时间、出草情况等,筛选出适宜固体基质。混合固体基质的筛选:在上述筛选的适宜固体基质中分别加入玉米粉、麦麸、豆饼粉、米糠,配制成混合固体基质。500 mL的罐头瓶中装入60 g混合基质,玉米粉、麦麸、豆饼粉、米糠加入量分别为10%、15%、20%、25%,加入60 mL的营养液,每个水平装20瓶。放入培养室内进行培养,以生物学效率为指标,确定混合固体基质的适宜比例。

1.2.3 营养液配方筛选 营养液中碳源筛选:500 mL的罐头瓶中装入60 g大米为固体基质,营养液为1%蛋白胨,KH₂PO₄ 0.1%,MgSO₄ 0.2%,分别加入2%的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖,调pH值6.5。每瓶注入60 mL营养液,每个供试碳源装20瓶。放入培养室内进行培养。营养液中氮源筛选:500 mL的罐头瓶中装入60 g大米为固体基质,营养液为2%葡萄糖,KH₂PO₄ 0.1%,MgSO₄ 0.2%,分别加入1%的蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、大豆浆,调pH值6.5。每瓶注入60 mL营养液,每个供

试氮源装20瓶。放入培养室内进行培养。营养液正交实验:500 mL的罐头瓶中装入60 g大米为固体基质,以确定的碳源和氮源以及MgSO₄、KH₂PO₄为试验因素,设计L₉(3⁴)正交实验(表1),配制9种营养液,每瓶注入60 mL营养液,每个试验组装20个罐头瓶,3次重复,以生物学效率为检测指标,取平均值,筛选出固体培养营养液的适宜配方。

表1 L₉(3⁴)营养液正交实验因素及水平

水平	因素			
	(A)蔗糖/%	(B)酵母膏/%	(C)KH ₂ PO ₄ /%	(D)MgSO ₄ /%
1	1.0	1.0	0.10	0.10
2	1.5	1.5	0.15	0.15
3	2.0	2.0	0.20	0.20

1.2.4 固体培养基质配方筛选 根据上述试验结果,以筛选出的混合固体基质、料水比(固体基质/营养液)、pH值为因素,通过L₉(3³)正交实验(试验设计见表2),每个试验组装20个罐头瓶,3次重复,确定北冬虫夏草固体培养基质的适宜配方。

表2 L₉(3³)固体培养基质正交实验因素及水平

水平	因素		
	(A)大米(85%) + 麦麸(15%)/g	(B)pH	(C)固体基质/营养液
1	34+6	5.0~5.5	1:1
2	42.5+7.5	5.5~6.5	1:1.2
3	51+9	6.5~7.0	1:1.5

1.2.5 培养方法 采用500 mL的罐头瓶进行熟料瓶栽方法。发菌条件:温度15~18℃,空气相对湿度为70%~80%,光照强度300~400 lx;原基及子座形成条件:温度18~21℃,空气相对湿度为75%~95%,光照强度800~1 000 lx^[7-8]。

2 结果与分析

2.1 固体培养基质的筛选

2.1.1 单一固体培养基质的筛选 由表3可以看出,北冬虫夏草在供试的几种固体基质上菌丝体及子实体生长情况是不同的。在以大米为固体基质上菌种萌发的快,菌丝长势粗壮,生长速度较快,长满瓶的时间短,生物学效率最高,为86.6%。其次是黑米的固体基质,其生物学效率与大米相差2.3个百分点;而在小米和玉米粉为固体基质上北冬虫夏草菌种萌发的较慢,长满瓶的时间较长,生物效率小米最低为66.8%,其次是玉米粉为73.5%。分析其原因,主要是北冬虫夏草菌丝体及子实体生长不仅与不同基质的营养成分有关,同时还与基质的透气性质密切相关。小米和玉米粉的固体基质,颗粒较小,保水性较好,但透气性较差,而菌丝体生长需要充足的氧气,因此菌丝体在这2种基质中生长受到影响。通过试验确定大米为最佳的固体基质,其次为黑米。

表3 单一固体培养基质的菌丝体及子实体生长情况

固体基质	菌种萌发	菌丝长势	满瓶时间/d	原基形成	生物效率/%
大米	快	粗壮	28	快	86.6
黑米	快	粗壮	28	较快	84.3
小米	慢	较弱	34	慢	66.8
玉米粉	慢	较粗壮	32	较慢	73.5
麦粒	较快	较粗壮	29	较快	82.4
高粱米	较快	较粗壮	29	较快	79.7

2.1.2 混合固体培养基质的筛选 从图1可以看出,在大米中加入不同量的玉米粉、麦麸、豆饼粉、米糠4种基质配制成的混合固体基质其菌丝的生长速度是不同的。在大米中分别加入10%的4种基质,其菌丝的生长速度没有太大的差异。随着加入量的增加,菌丝的生长速度表现出明显的差异。在大米中加入不同量的麦麸要比加入其它基质菌丝生长速度快。在大米中加入玉米粉,菌丝的生长速度是最慢的。而豆饼粉加入量为10%~15%时,菌丝的生长速度加快,但超过15%以后,菌丝的生长速度反而下降。米糠随着加入量的增加,菌丝的生长速度加快。从图2可以看出,菌丝的生长速度快,其生物效率并不一定高。在大米中加入15%的麦麸其生物效率最高,其次是加入20%的豆饼粉。加入25%的米糠生物效率最低。从培养过程中菌丝的长势来看,在大米中加入10%~15%4种固体基质,菌丝长势都比较粗壮,但加入量达到20%以上时,菌丝的长势不如10%~15%的加入量。

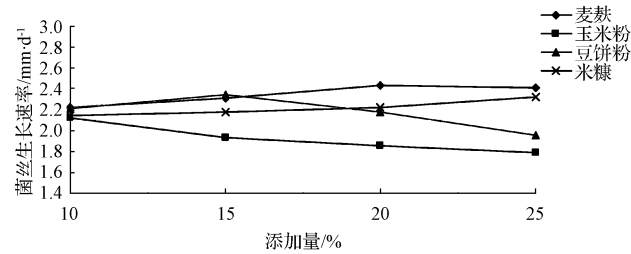


图1 不同混合固体基质菌丝生长速度比较

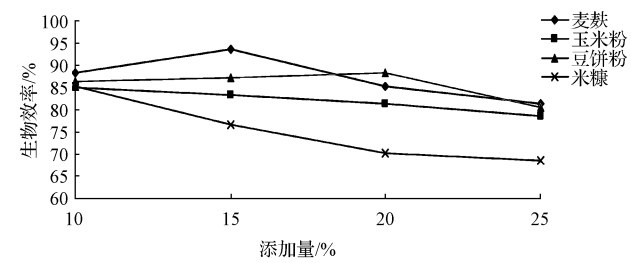


图2 不同混合固体基质生物效率比较

2.2 营养液配方筛选

2.2.1 营养液中碳源筛选 固体基质主要为北冬虫夏草菌丝体生长提供大分子的有机碳源,营养液中加入小分子的有机碳源主要为菌丝生长提供速效有机碳源。该试验在营养液中加入2%的葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽

糖等不同的有机碳源,其菌丝体及子实体生长情况见表4。从表4可以看出,以蔗糖为速效有机碳源的瓶内菌丝及子实体的生长状况最好,其菌种萌发快,菌丝长势粗壮,原基形成的快,生物效率最高。葡萄糖和果糖为速效有机碳源的瓶内菌种萌发、菌丝长势满瓶时间以及原基形成没有太大的差别,生物效率葡萄糖高于果糖。而以麦芽糖为速效碳源的瓶内菌丝和子实体的生长情况最差,生物效率最低。以蔗糖为营养液中速效有机碳源菌丝及子实体的生长状况最好,同时,蔗糖又是这4种速效有机碳源中价格最低的,因此,蔗糖是培养北冬虫夏草营养液中首选的速效有机碳源。

表4 营养液中不同碳源菌丝体及子实体生长情况

碳源	菌种萌发	菌丝长势	满瓶时间/d	原基形成	生物效率/%
葡萄糖	较快	粗壮	29	快	88.3
果糖	较快	粗壮	29	较快	84.5
蔗糖	快	粗壮	28	快	90.8
麦芽糖	较慢	较粗壮	31	较慢	78.7

2.2.2 营养液中氮源筛选 北冬虫夏草生长所需的有机氮源主要来自于营养液。该试验在营养液中加入1%的蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、大豆浆等有机氮源,其菌丝体及子实体生长情况见表5。从表5可以看出,以酵母膏为有机氮源的瓶内菌丝及子实体的生长状况最好,其菌种萌发快,菌丝长势粗壮,原基形成的快,生物效率最高。蛋白胨和牛肉膏为有机氮源的瓶内菌种萌发、菌丝长势满瓶时间以及原基形成没有太大的差别,生物效率蛋白胨略高于牛肉膏。而以大豆浆为氮源的瓶内菌丝和子实体的生长情况最差,生物效率最低。该试验表明酵母膏是培养北冬虫夏草营养液中首选的有机氮源,而蛋白胨和牛肉膏也是北冬虫夏草较好的有机氮源。

表5 营养液中不同氮源菌丝体及子实体生长情况

氮源	菌种萌发	菌丝长势	满瓶时间/d	原基形成	生物效率/%
蛋白胨	较快	粗壮	29	较快	87.4
牛肉膏	较快	粗壮	29	较快	86.7
酵母膏	快	粗壮	28	快	91.5
大豆浆	较慢	较粗壮	30	较慢	80.6

2.2.3 营养液正交实验 由表6可知,营养液的最适宜的配方为A₃B₂C₁D₁,即为蔗糖2.0%、酵母膏1.5%、KH₂PO₄0.10%、MgSO₄0.10%。从极差分析结果可以看出,对北冬虫夏草生物效率影响的排序为酵母膏>蔗糖>KH₂PO₄>MgSO₄。

2.3 固体培养基配方正交实验

由表7可知,固体培养基的适宜配方为A₃B₂C₃,即大米为85%,麦麸为15%,500 mL的罐头瓶装量为60 g,pH为5.5~6.5,料水比为1:1.5。从极差分析结果看出,在固体培养基中,料水比对北冬虫夏草的生物学效率影响最大,其次是pH值,影响最小的是固体基质的装量。

表 6 营养液 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

序号	(A)蔗糖 /%	(B)酵母膏 /%	(C)KH ₂ PO ₄ /%	(D)MgSO ₄ /%	生物学效率 /%
1	1	1	1	1	72.3
2	1	2	2	2	78.6
3	1	3	3	3	75.5
4	2	1	2	3	74.8
5	2	2	3	1	85.4
6	2	3	1	2	87.7
7	3	1	3	2	76.3
8	3	2	1	3	92.8
9	3	3	2	1	90.2
K1	226.4	223.4	252.8	247.9	
K2	247.9	256.8	243.6	242.6	
K3	259.3	253.4	237.2	243.1	
R	32.9	33.4	15.6	5.3	
	A3	B2	C1	D1	

表 7 固体培养基 $L_9(3^3)$ 正交实验结果

序号	(A)大米(85%) + 麦麸 (15%)/g	(B)pH	(C)固体基质 /营养液(料水比)	生物学效率 /%
1	1	1	1	70.3
2	1	2	2	85.6
3	1	3	3	89.5
4	2	1	2	84.8
5	2	2	3	93.4
6	2	3	1	73.7
7	3	1	3	87.3
8	3	2	1	75.8
9	3	3	2	91.2
K1	245.4	242.4	219.8	
K2	251.9	254.8	261.6	
K3	254.3	254.4	270.2	
R	8.9	12.4	50.4	
	A3	B2	C3	

3 结论

该试验结果表明,北冬虫夏草能够利用的固体培养基质的种类较多,在单一的固体培养基质中,以大米为基质菌丝长势最好,出草率最高;复合固体基质比单一

固体基质营养全面充分,由于麦麸中含有丰富的维生素,能为北冬虫夏草提供充足的生长因子,在大米中加入 10%~15%麦麸配制混合基质的营养成分及透气性更适合菌丝生长,其菌丝长势和出草率都优于大米为单一的固体基质。通过单因素试验确定固体培养北冬虫夏草营养液中首选的碳源为蔗糖,其次为葡萄糖;首选的氮源为酵母膏,其次为蛋白胨。通过正交实验优化北冬虫夏草固体培养营养液的适宜配方为蔗糖 2.0%、酵母膏 1.5%、KH₂PO₄ 0.10%、MgSO₄ 0.1%。通过正交实验确定固体培养基质的适宜配方为大米 85%,麦麸 15%,500 mL 的罐头瓶装量为 60 g,pH 值 5.5~6.5,料水比(固体基质/营养液)1:1.5,即固体培养基的含水量为 60%。在此配方中,料水比对北冬虫夏草的菌丝生长和生物学效率影响最大,过高影响培养基质的透气性,菌丝体长势弱,过低使菌丝生长后期水分不足,严重影响菌丝体生长,生物学效率下降。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 张显科,王玉柱,刘文霞.蛹虫草与冬虫夏草化学成分比较[J].辽宁大学学报,1996,23(4):20-23.
- [3] 陈俐彤,曹红峰,黄文芳.蛹虫草的化学成分、药效及应用[J].现代食品科技,2005,21(3):192-197.
- [4] 刘华晶,许修宏,高士刚.不同培养基对北虫草生长的影响[J].东北农业大学学报,2004,35(3):325-328.
- [5] 林群英,宋斌,钟月金,等.蛹虫草人工栽培条件优化研究[J].中国食用菌,2006,25(6):17-18.
- [6] 秦秀丽,杨国会,李凤林.蛹虫草液体深层发酵的研究[J].北方园艺,2010(23):167-170.
- [7] 肖波,韦会平,胡会平.蛹虫草人工培养料高产培育技术[J].食用菌,2004(5):36-37.
- [8] 马文石,李凤芹,金英.柞蚕蛹虫草栽培技术[J].食用菌,2008(4):45-46.

Study on Artificial Cultivation Optimization of Solid Culture Medium of *Cordyceps militaris*

QIN Xiu-li, XING Li, YIN Rui

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

Abstract: Artificial cultivation of solid culture medium of *Cordyceps militaris* were optimized in this experiment. The results showed that the *C. militaris* could be cultivated in many types of solid culture medium, the growth rate and density of the hyphae were the highest in a single solid culture medium with rice as the solid substrate, but adding 10%~15% wheat bran in rice solid culture medium, the growth rate and density of the hyphae were better than the single matrix of rice; the suitable nutrient solution was determined by contrast test and $L_9(3^4)$ orthogonal test, the composition was sucrose 2.0%, yeast extract 1.5%, MgSO₄ 0.10%, KH₂PO₄ 0.10%; the suitable solid culture medium of the *C. militaris* sinensis was determined by $L_9(3^3)$ orthogonal test, the composition was rice 85%, wheat bran 15%, with 60 g substance in 500 mL bottle, pH 5.5~6.5, the ratio of solid and water (solid matrix/nutrient solution) was 1:1.5.

Key words: *Cordyceps militaris*; solid culture; nutrient solution; orthogonal test