

蛹虫草摇瓶菌种培养基的优化

龙海涛, 刘标, 颜小明, 郝继伟* (临沂大学生命科学学院, 山东临沂 276000)

摘要 [目的] 优化蛹虫草摇瓶菌种培养基。[方法] 以菌丝体干质量为指标, 首先采用单因素试验筛选适于菌丝体生长的最佳碳氮源, 再以正交试验优化碳源与氮源以及无机盐与 VB_1 的最佳配比。[结果] 蛹虫草优化的摇瓶培养基配方为红薯 50 g/L、可溶性淀粉 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 10 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L、 VB_1 0.10 g/L, pH 自然, 利用该配方菌丝干质量可达 36.33 g/L。[结论] 优化的摇瓶培养基可为后续研究和生产提供基础数据。

关键词 单因素试验; 正交设计; 摇瓶培养基; 蛹虫草

中图分类号 S567.3⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)10-0089-03

Optimization of Culture Medium for Shaking Flask of *Cordyceps militaris*

LONG Hai-tao, LIU Biao, YAN Xiao-ming et al (College of Life Science, Linyi University, Linyi, Shandong 276000)

Abstract [Objective] To optimize culture medium for shaking flask of *Cordyceps militaris*. [Method] Using mycelium dry quality as the index. First, the best carbon and nitrogen source suitable for mycelia growth was selected by single factor test. Then, the optimum ratio of carbon source and nitrogen source, inorganic salt and VB_1 was optimized by orthogonal experiment. [Result] The optimum shaking flask medium for *Cordyceps militaris* was as follow: sweet potato 50 g/L, soluble starch 10 g/L, beef paste 10 g/L, yeast extract 10 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, VB_1 0.10 g/L, pH natural. The dry weight of mycelia produced by this formula can reach 36.33 g/L. [Conclusion] The optimizing culture medium for shaking flask of *Cordyceps militaris* can provide basic data for subsequent research and production.

Key words Single factor experiment; Orthogonal design; Shaking flask culture medium; *Cordyceps militaris*

蛹虫草, 又名北虫草, 学名北冬虫夏草, 因其化学成分和药理作用与冬虫夏草相似^[1-2], 在临床上常代替冬虫夏草入药^[3]。现代医药学研究证明, 虫草中含有虫草素、虫草酸以及各种氨基酸等营养物质, 具有滋肺补肾、止化痰、抗各类细菌、提高免疫力、降血压等功效, 具有较高的食用和药用价值^[4-5]。

蛹虫草经多年研究, 现已实现规模化人工培养和深层发酵 2 种应用方式。规模化人工培养既可为人们提供大量的虫草子实体(子座), 又可为提取虫草素、虫草多糖等活性物质提供原材料, 而人们通过深层发酵可直接从菌丝体以及发酵液中提取有效成分^[6]。但不论哪一种应用方式, 高质量、高标准的摇瓶菌种都是生产中最重要的一环。鉴于蛹虫草在临沂研究较少、尚未大面积推广的现状, 笔者在许庆国等^[7]、王战勇等^[8]研究的基础上, 以当地主栽品种为研究对象, 尝试寻找复合碳源和复合氮源与无机盐最佳配比, 以优化摇瓶菌种培养基, 为后继研究和生产提供基础数据。

1 材料与方

1.1 供试材料

1.1.1 菌种。采自费县盛成农业科技有限公司的蛹虫草子座, 通过组织分离法得到试管母种。

1.1.2 仪器设备。VS-840KVU 型生物超净工作台(苏州安泰); HZQ-Q 型全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); YXQ-LS-50S II 型全自动立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); FA2004N 型电子天平(苏州安泰); 010A-1E 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器总厂)等。

1.1.3 培养基。

1.1.3.1 母种培养基。马铃薯 200 g、琼脂 20 g、葡萄糖 20 g、牛肉膏 10 g、 KH_2PO_4 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 水 1 000 mL。

1.1.3.2 液体菌种基础培养基。葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 10 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L。

1.1.3.3 碳源初选培养基。分别以 20 g/L 蔗糖、20 g/L 乳糖、20 g/L 可溶性淀粉、200 g/L 马铃薯、200 g/L 红薯取代基础培养基中的葡萄糖为碳源, pH 自然。

1.1.3.4 氮源初选培养基。分别以 10 g/L 酵母浸膏、20 g/L 麦麸、10 g/L 牛肉浸膏、10 g/L 豆粕取代基础培养基中的蛋白胨为氮源, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 斜面菌种制备。蛹虫草子座经消毒后, 在其内部取 0.5 cm² 左右大小的组织块, 在无菌条件下接种到斜面培养基中部, 置于 23 ℃ 的培养箱中培养 15 d 左右, 即可得蛹虫草的斜面菌种。挑选无污染、健壮的菌种备用。

1.2.2 液体菌种制备。将配制好的液体培养基, 按每瓶 150 mL 的量倒入干净的 250 mL 三角瓶中, 用透气封口膜封口并用牛皮纸包裹瓶口, 于 121 ℃ 下灭菌 20 min。冷却后, 通过无菌操作取 1 块 0.5 ~ 1.0 cm² 的母种块接入液体基础培养基中。20 ℃、120 r/min 振荡培养 5 d, 在瓶中即可看到大量菌球形成。

1.2.3 发酵试验。无菌条件下按 10% (V/V) 的接种量用无菌吸管吸取液体菌种, 接种于灭菌后的相应液体培养基中, 20 ℃、120 r/min 振荡培养 6 d。

1.2.4 菌丝重量测定。发酵试验后将无污染三角瓶中的菌体与培养液的混合物置于孔径为 0.125 mm 的网筛上过滤, 用蒸馏水冲洗 3 次后, 置于 60 ℃ 干燥箱内至干燥恒重, 称重。

基金项目 国家级大学生创新创业训练计划项目(201610452023)。
作者简介 龙海涛(1993—), 男, 山东临沂人, 研究方向: 农业生物技术。* 通讯作者, 副教授, 硕士, 从事食药真菌开发利用及野生资源保护研究。

收稿日期 2018-01-18

1.3 试验设计

1.3.1 碳氮源初选试验。以蛹虫草菌丝干质量为指标,以液体菌种基础培养为对照,分别通过碳源初选培养基和氮源初选培养基,筛选出适宜于蛹虫草液体发酵的碳源和氮源各2种。

1.3.2 碳氮源正交法优选试验。根据碳氮源初选试验结果分别选择表现最好的2种碳源和2种氮源作为4个试验因素,并分别取3种适宜浓度作为3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行碳氮源的优化组合试验。

1.3.3 无机盐及维生素正交优选试验。以优化碳氮源配比为基础培养基,以 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 以及 VB_1 为3个试验因素,并分别取3种浓度为3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行常用无机盐与 VB_1 的优化组合试验,试验设计见表1。

表1 无机盐与 VB_1 正交优化试验因素与水平

Table 1 Factors and level of orthogonal optimization test of inorganic salt and VB_1

水平 Level	因素 Factor			
	A KH_2PO_4 g/L	B $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g/L	空列 Vacant column	D VB_1 g/L
1	0.5	0.5	—	0
2	1.0	1.0	—	0.05
3	1.5	1.5	—	0.10

2 结果与分析

2.1 碳氮源初选试验结果 碳氮源初选试验结果见图1、2。经初级筛选得到最佳碳源为红薯和可溶性淀粉;经初级筛选得到最佳氮源为酵母膏和牛肉膏。

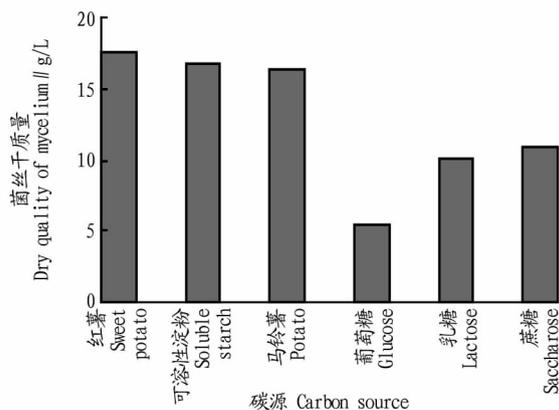


图1 碳源初选试验结果

Fig.1 Primary selection test result of carbon source

2.2 碳氮源优化试验结果 根据碳氮源初选试验结果,参与碳氮源优化试验的试验因素及水平见表2。

由表3极差分析结果可知,红薯取第1水平、可溶性淀粉取第2水平、牛肉膏取第2水平、酵母膏取第2水平为最佳配方。即蛹虫草液体培养基最佳氮源配比为红薯50 g/L、可溶性淀粉10 g/L、牛肉膏10 g/L、酵母膏10 g/L。根据极差 R 值大小可知,4个试验因素对试验指标影响程度的大小排序为牛肉膏、红薯、酵母膏、可溶性淀粉。

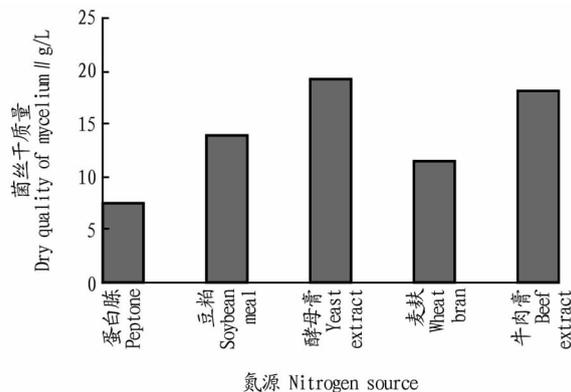


图2 氮源初选试验结果

Fig.2 Primary selection test result of nitrogen source

表2 碳氮源正交优化试验因素与水平

Table 2 Factors and level of orthogonal optimization test of carbon source and nitrogen source

水平 Level	因素 Factor			
	A 红薯 Sweet potato	B 可溶性淀粉 Soluble starch	C 牛肉膏 Beef extract	D 酵母膏 Yeast extract
1	50	5	5	5
2	100	10	10	10
3	150	15	15	15

表3 碳氮源正交试验极差分析结果

Table 3 Range analysis results of orthogonal test of carbon source and nitrogen source

试验号 No.	A 红薯 Sweet potato	B 可溶性淀粉 Soluble starch	C 牛肉膏 Beef extract	D 酵母膏 Yeast extract	菌丝干质量 Dry quality of mycelium g/L
1	1	1	1	1	26.04
2	1	2	2	2	32.84
3	1	3	3	3	16.51
4	2	1	2	3	23.36
5	2	2	3	1	19.47
6	2	3	1	2	26.47
7	3	1	3	2	17.67
8	3	2	1	3	20.49
9	3	3	2	1	18.58
K_1	25.13	22.36	24.33	21.36	
K_2	23.10	24.27	24.93	25.66	
K_3	18.91	20.52	17.88	20.12	
R	6.22	3.75	7.04	5.54	

2.3 无机盐及维生素正交优选试验结果 由表4极差分析结果可知,最佳无机盐配比为 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L、 VB_1 0.10 g/L。根据极差 R 值大小可知,4个试验因素对试验指标影响程度的大小排序为 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 VB_1 。

2.4 优化配方验证试验结果 以表4中菌丝产量最大的配方即红薯50 g/L、可溶性淀粉10 g/L、牛肉膏10 g/L、酵母膏10 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L、 VB_1 0.10 g/L,验证正交试验优化配方,试验结果见表5。结果表明,优化配

方菌丝产量为 36.33 g/L, 高于对照 11.31%, 达极显著水平。

表 4 无机盐及 VB₁ 正交试验极差分析结果

Table 4 Range analysis results of orthogonal test of inorganic salt and VB₁

试验号 No.	A KH ₂ PO ₄	B MgSO ₄ · 7H ₂ O	空列 Vacant column	D VB ₁	菌丝干质量 Dry quality of mycelium g/L
1	1	1	1	1	26.33
2	1	2	2	2	30.75
3	1	3	3	3	22.79
4	2	1	2	3	31.68
5	2	2	3	1	33.73
6	2	3	1	2	31.07
7	3	1	3	2	33.52
8	3	2	1	3	36.26
9	3	3	2	1	29.09
K ₁	26.62	30.51	31.22	29.72	
K ₂	32.16	33.58	30.51	31.78	
K ₃	32.96	27.65	30.01	30.24	
R	6.33	5.93	1.21	2.06	

表 5 优化配方验证试验结果

Table 5 Verify test results of optimum formula

培养基配方 Culture medium formula	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	重复 4 Repeat 4	平均菌丝干质量 Average dry quality of mycelium/g/L
优化配方 Optimum formula	34.60	36.80	37.35	36.57	36.33 ± 1.20 aA
对照 Control group	31.57	32.44	34.10	32.44	32.64 ± 1.06 bB

注:不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$), different capital letters within the same column show extremely significant differences ($P < 0.01$)

参考文献

- [1] 张薇薇, 龚韬, 韩东河, 等. 人工虫草与冬虫夏草成分的比较研究[J]. 北京中医药, 2016, 35(1): 87-91.
- [2] 吴雪晶, 马慧君, 刘宁. 北虫草与冬虫夏草的药用价值比较[J]. 浙江食用菌, 2009, 17(5): 12-14.
- [3] 郑壮丽, 黄春花, 梅彩英, 等. 蛹虫草国内外研究的新进展[J]. 环境昆虫学报, 2011, 33(2): 225-233.
- [4] 李昊, 吴百吕, 李春兰. 虫草人工栽培与深度开发[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2008: 2-3.
- [5] 叶文皎, 冯武, 黄文, 等. 蛹虫草胞外多糖的体外抗氧化活性分析[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5): 105-110.

3 讨论与结论

在类似的蛹虫草液体菌种培养基优化研究中, 许庆国等^[7]认为马铃薯和蔗糖为最优碳源, 牛肉膏和蛋白胨为最优氮源; 邹湘月等^[9]认为最佳碳源为玉米粉, 最佳氮源为麸皮。该研究的蛹虫草液体菌种最佳配方为红薯 50 g/L、可溶性淀粉 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 10 g/L、KH₂PO₄ 1.5 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L、VB₁ 0.10 g/L, 主要碳氮源与许庆国等^[7]、邹湘月等^[8]不同。分析最主要的原因是菌种差异, 其次是培养条件所致。此外, 由于配制培养基所利用的各种农产品地域及品种的不同以及牛肉膏、蛋白胨等复合材料生产厂家和生产原料的差异, 其有效成分均有所不同^[10]。

该研究配方在 20 °C、120 r/min 的条件下振荡培养 6 d, 菌丝干质量可达 36.33 g/L, 较许庆国等^[7]的研究结果明显偏高, 表明当地蛹虫草品种应用该配方有较高的生产潜力, 该研究成果对促进地方蛹虫草生产与推广有一定的应用价值。

- [6] 郑剑玲, 齐贺, 黄竹青, 等. 北虫草菌丝发酵液和子实体抗氧化活性测定[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(6): 93-95.
- [7] 许庆国. 北虫草液体培养菌种碳氮源的研究[J]. 食用菌, 2011, 33(6): 13-14.
- [8] 王战勇, 张建东, 李莹, 等. 北虫草液体培养基的研究[J]. 辽宁石油化工大学学报, 2004, 24(1): 19-21, 25.
- [9] 邹湘月, 罗巍, 吴郑武, 等. 北虫草液体培养基配方的优化[J]. 食用菌, 2012, 34(4): 10-12, 31.
- [10] 李学如, 涂俊铭. 发酵工艺原理与技术[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2014: 75.

(上接第 74 页)

- [10] 杨存建, 魏一鸣, 王思远, 等. 基于 DEM 的 SAR 图像洪水水体的提取[J]. 自然灾害学报, 2002, 11(3): 121-125.
- [11] 杨魁, 杨建兵, 江冰茹. Sentinel-1 卫星综述[J]. 城市勘测, 2015(2): 24-27.
- [12] 何连, 秦其明, 任华忠, 等. 利用多时相 Sentinel-1 SAR 数据反演农田地表土壤水分[J]. 农业工程学报, 2016, 32(3): 142-148.
- [13] 施雅风, 姜彤, 苏布达, 等. 1840 年以来长江大洪水演变与气候变化关系初探[J]. 湖泊科学, 2004, 16(4): 289-297.
- [14] 许有鹏, 于瑞宏, 马宗伟. 长江中下游洪水灾害成因及洪水特征模拟分析[J]. 长江流域资源与环境, 2005, 14(5): 638-643.
- [15] 曾玲方, 李霖, 万丽华. 基于 Sentinel-1 卫星 SAR 数据的洪水淹没范围快速提取[J]. 地理信息世界, 2015, 22(5): 100-103.
- [16] 韩春明, 郭华东, 王长林. SAR 图像斑点噪声抑制的本质[J]. 遥感学报, 2002, 6(6): 470-474.
- [17] 陈玲艳, 刘智, 张红. 基于水体散射特性的 SAR 图像水体检测[J]. 遥感技术与应用, 2014, 29(6): 963-969.

- [18] 王庆, 廖静娟. 基于 SAR 数据的鄱阳湖水体提取及变化监测研究[J]. 国土资源遥感, 2010, 22(4): 91-97.
- [19] 朱俊杰, 郭华东, 范湘涛, 等. 基于纹理与成像知识的高分辨率 SAR 图像水体检测[J]. 水科学进展, 2006, 17(4): 525-530.
- [20] 胡玉福, 邓良基, 匡先辉, 等. 基于纹理特征的高分辨率遥感图像土地利用分类研究[J]. 地理与地理信息科学, 2011, 27(5): 42-45.
- [21] OTSU N. A threshold selection method from gray-level histograms[J]. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 1979, 9(1): 62-66.
- [22] 李景刚, 黄诗峰, 李纪人. ENVISAT 卫星先进合成孔径雷达数据水体提取研究——改进的最大类间方差阈值法[J]. 自然灾害学报, 2010, 19(3): 139-145.
- [23] GONG P, WANG J, YU L, et al. Finer resolution observation and monitoring of global land cover: First mapping results with Landsat TM and ETM+ data[J]. Int J Remote Sens, 2013, 34(7): 2607-2654.
- [24] 冉有华, 李新. 全球第一个综合高分辨率土地覆盖图——中国 30m 分辨率全球土地覆盖图评述[J]. 中国科学: 地球科学, 2015, 45(8): 1243-1244.