

马麦艳,陈方圆,张相锋,等. 人工栽培蛹虫草液体菌种发酵工艺优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):143-147.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.030

人工栽培蛹虫草液体菌种发酵工艺优化

马麦艳^{1,2},陈方圆^{1,2},张相锋¹,焦子伟¹

(1.伊犁师范大学生物与地理科学学院,新疆伊宁 835000; 2.新疆大学生命科学学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:近年,随着人工栽培蛹虫草面积逐年扩大,迫切需求大规模培育蛹虫草菌种,尤其是液体菌种来满足日益扩大的再生产的需要。采用正交试验设计,选取 pH 值、温度、通气量 3 个因素,每个因素设置 3 个水平,进行液体菌种发酵工艺试验,分析蛹虫草子实体生长影响及生物转化率变化情况。通过试验得到人工栽培蛹虫草液体菌种发酵的最佳组合条件。不同处理对蛹虫草子实体生长有明显变化,3 种因素对蛹虫草的生物转化率影响为:温度 > 通气量 > pH 值,其最优组合为温度 20 ℃、pH 值 5.5、通气量 2 L/min。

关键词:蛹虫草;子实体;液体发酵;工艺优化

中图分类号: S567.3+50.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0143-05

近年来,由于野生虫草(*Cordyceps militaris*)过度开采造成产量急剧下降且使其生长环境遭到破坏,人工栽培蛹虫草面积逐年扩大,这就迫切需求大规模培育蛹虫草菌种,尤其是液体菌种来满足日益扩大的再生产的需要。国外已进行了蛹虫草人工栽培相关技术的研究,采用仿生栽培、固体培养基栽培、液体培养基培养等多种方式进行了人工培养并得到了蛹虫草的子实体^[1-2]。深层发酵技术目前已运用到食品、药剂等产品生产方面,Kitakaze 等和 Vinadé 等在蛹虫草液体培养方面做了大量的工作^[3-4]。国内学者对蛹虫草液体发酵技术进行了相关研究,任昕雯等以大米、啤酒糟共培养的蛹虫草固态发酵产物为原料,利用响应面法优化提取条件研究了液体发酵条件对蛹虫草产虫草素的影响^[5]。张楠等对蛹虫草深层发酵产虫草素培养基进行了优化^[6]。秦鹏等研究了不同添加物对蛹虫草液体发酵虫草素的影响,确定了 3 种生长素使用的最佳质量浓度,并对各质量浓度下蛹虫草生长情况进行了分析与讨论^[7]。蛹虫草液体发酵相关研究大多是针对其某一影响因素进行了探讨,但针对蛹虫草

菌种资源用于液体发酵的研究仍较少。结合新疆伊犁当地实际,本研究利用新疆蛹虫草菌种,采用正交试验设计,选取 pH 值、温度、通气量 3 个因素,每个因素设置 3 个水平,研究液体菌种发酵对蛹虫草产子实体生长的影响,分析蛹虫草生长情况及生物转化率。进一步掌握蛹虫草液体菌种扩大发酵的最佳工艺条件,提供优质蛹虫草液体发酵菌种,满足伊犁乃至新疆地区大面积规模化人工栽培蛹虫草的需要。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株均来源于笔者实验室,人工筛选获得的 MAT1-1 和 MAT1-2 不同交配型代表菌株^[8]。

1.1.2 供试培养基 改良 PDA 固体培养基:参照努尔买买提^[9]等所述方法。

改良 PD 液体培养基(g/L):马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蛋白胨 3 g、磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 2 g、七水硫酸镁(MgSO₄·7H₂O) 1 g 和复合维生素 B 25 mg, pH 值 6.5~7.0。

种子发酵培养基采用改良 PD 液体培养基。

1.1.3 供试培养设备与介质 Liflus GX 多功能生物发酵系统、组培玻璃瓶(规格:350 mL,高 108 mm,直径 75 mm,口径 69 mm)、人工栽培基质大米等。

1.2 液体菌种发酵

1.2.1 种子液制备 将不同遗传交配型代表菌株

收稿日期:2019-01-17

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目(编号:2017E0239)。

作者简介:马麦艳(1994—),女,新疆霍城人,硕士研究生,研究方向为人工蛹虫草栽培与示范。E-mail:1034277602@qq.com。

通信作者:张相锋,硕士,讲师,研究方向为微生物生态,E-mail:759737497@qq.com;焦子伟,博士,教授,研究方向为微生物生态及绿色有机农业有害生物防控,E-mail:741285332@qq.com。

无菌接种至改良 PDA 培养基,于 21 ℃ 下恒温光照培养 15 d 后,用灭菌牙签挑取分生孢子,接种至含有 50 mL 改良 PD 液体培养基的锥形瓶中,170 r/min,21 ℃ 恒温下摇培 3~4 d 后备用。

1.2.2 发酵罐调试与灭菌 进行溶氧电极(INPRO6800)准备;按照要求配制不同 pH 值校准液对 pH 值电极 405-BPASP 值进行校准;将每个相关部件都安装到发酵罐对应位置上,121 ℃ 下灭菌 20~30 min,再快速移至无菌操作台下备用。

1.2.3 发酵培养 在无菌条件下先倒入灭菌的 PD 培养基于发酵罐中,将不同遗传交配型的种子液等体积混合,再按发酵液体培养基:种子液=(10~15):1(体积比)的比例,加入适量的混合种子液于发酵罐中;开通各个电源,通过蠕动泵调节对应条件的酸、碱量;按不同处理的发酵条件分别进行发酵培养,每个处理培养 3~4 d,当发酵罐中菌丝球布满培养液时发酵完成。

1.2.4 发酵液保存 将不同处理的发酵液体菌种无菌条件下倒入已灭菌的玻璃容器内现用,或放入 4 ℃ 冰箱暂时保存备用。

1.3 人工栽培

1.3.1 栽培培养基灭菌 参照努尔买买提等的方法^[9],每个组织培养瓶装入 20 g 大米,加入 15 mL 改良 PD 培养基,摇均加盖后放入大灭菌锅内,115 ℃ 下灭菌 3 h 后备用。

1.3.2 人工培养 无菌条件下分别吸取 7.5 mL 不同处理的发酵液体菌种接种于每瓶栽培培养基中,并将接种好的不同处理的组织培养瓶放置于(21±1) ℃ 的人工栽培室培养架上培养 55~60 d,直至蛹虫草子实体成熟。每个处理设置 3 个重复,每个重复接种 100 瓶。

1.3.3 观测与分析 定期对不同处理的蛹虫草菌丝体、子实体生长情况进行观测,并对不同处理所收获的蛹虫草子实体长度、鲜质量、干质量、生物转化率以及产量等指标进行分析与评价。

1.4 试验方法

1.4.1 试验设计 根据预试验结果,本试验采用正交试验设计,选取 pH 值(A)、温度(B)、通气量(C) 3 个因素,每个因素 3 个水平,即 3 因素 3 水平进行优化,计 9 个处理(表 1)。

1.4.2 数据处理 本试验数据以平均值为依据,采用 Excel 软件、SPSS 软件(Version 11.5, USA) 进行数据处理和正交分析。

表 1 蛹虫草液体菌种发酵正交试验处理

处理	A:pH 值	B:温度(℃)	C:通气量(L/min)
1	5.5	20	1
2	5.5	25	2
3	5.5	30	3
4	6.5	20	2
5	6.5	25	3
6	6.5	30	1
7	7.5	20	3
8	7.5	25	1
9	7.5	30	2

2 结果与分析

2.1 蛹虫草菌丝生长分析

通过对不同发酵条件处理的蛹虫草菌丝生长情况进行观察与记录,获得相关数据。不同处理经接菌、人工栽培后,刚开始各处理的蛹虫草菌丝生长情况均表现较好态势,接种后 3~5 d 蛹虫草菌丝体布满整个培养基,呈白色。但随时间推移,不同处理的蛹虫草菌丝在菌丝密度、菌丝转色及菌饼变黄时间情况开始出现明显差异。其中,处理 1、处理 4 组蛹虫草菌丝密度最好,菌丝转成橘黄色速度最快,菌饼变黄时间最短,为 9 d;处理 2、3、5、8、9 组蛹虫草菌丝密度较好,变黄时间短及菌丝转成橘黄色速度较快;处理 6、7 组蛹虫草菌丝密度最差,菌丝转成橘黄色速度慢且菌饼变黄时间最长,为 12 d(表 2)。

2.2 蛹虫草子实体生长分析

对不同处理的蛹虫草子实体生长情况进行观察与记录,获得相关结果。不同处理的蛹虫草子实体生长及生物学指标各不相同。除处理 6 和处理 7 外,其他各处理的蛹虫草子实体均生长良好。其中,处理 1 及处理 4 组表现最好,子实体形成时间最早、子座粗长、均匀、子实体正常,橘红色、有子囊壳、出草质量好;处理 2、3、5、8、9 组均表现较好,出草时间较早、子座较粗长、均匀、子实体较正常,橘红色、有子囊壳、出草质量较好;处理 6 和处理 7 出草较晚、子座粗而短、仅部分出草,橘红色、出草质量一般(表 3、图 1)。

2.3 蛹虫草出草比较

待子实体成熟后,对不同处理蛹虫草子实体的相关生物学指标进行记录分析,可以看出不同处理蛹虫草在子实体长度、鲜质量、干质量、鲜干比和生物转化率方面均呈显著性差异($P < 0.05$)。

表2 不同处理蛹虫草的菌丝生长情况比较

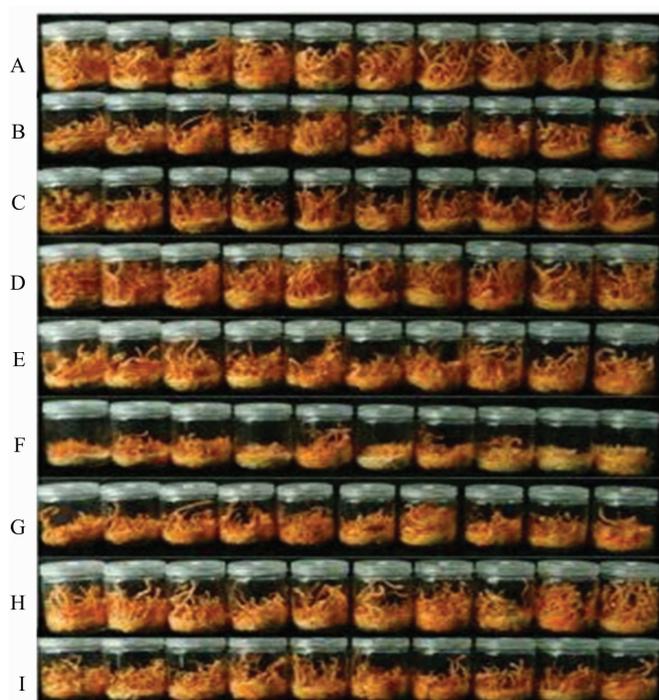
处理	菌丝长满时间 (d)	菌丝密度	菌丝转色	菌饼变黄时间 (d)
1	3	++++	白色变橘黄色快	9
2	4	+++	白色变橘黄色较快	11
3	4	+++	白色变橘黄色较快	11
4	3	++++	白色变橘黄色快	9
5	4	+++	白色变橘黄色较快	11
6	5	+	白色变橘黄色慢	12
7	5	++	白色变橘黄色慢	12
8	4	+++	白色变橘黄色较快	11
9	4	+++	白色变橘黄色较快	11

注：“++++”密度最好；“+++”密度较好；“++”密度好；“+”密度差。

表3 蛹虫草的子实体生长情况比较

处理	出草时间	子座生长	子实体生长及色泽	子囊壳	出草质量
1	26	子座粗长,均匀	出草早,正常,橘红色	有	++++
2	29	子座较粗长,均匀	出草较早,较正常,橘红色	有	++
3	29	子座较粗长,均匀	出草较早,较正常,橘红色	有	+++
4	26	子座较粗长,均匀	出草较早,较正常,橘红色	有	++++
5	29	子座较粗长,均匀	出草较早,较正常,橘红色	有	++
6	32	子座较粗短,不均匀	出草晚,较差,仅部分出草,橘红色	有	+
7	32	子座较粗短,不均匀	出草晚,较差,仅部分出草,橘红色	有	+
8	29	子座较粗长,均匀	出草较早,较正常,橘红色	有	+++
9	29	子座粗长,均匀	出草早,正常,橘红色	有	+++

注：“++++”表示80%的子实体直径 ≥ 3 mm,长度 ≥ 7 cm;“+++”表示80%的子实体直径 ≥ 2 mm,长度 ≥ 6 cm;“++”表示80%的子实体直径 ≥ 1 mm,长度 ≥ 5 cm。“+”表示80%的子实体直径 < 1 mm,长度 < 5 cm。



A—处理1; B—处理2; C—处理3; D—处理4; E—处理5; F—处理6; G—处理7; H—处理8; I—处理9

图1 不同处理蛹虫草子实体效果

其中,处理4蛹虫草的各项指标最好,子实体平均长度为6.01 cm、鲜质量为10.19 g、干质量为1.48 g、鲜干比为7.02、生物转化率为50.93%;处理1蛹虫草的各项指标表现略次于处理4,除鲜质量、鲜干比及生物转化率指标外,子实体长度和干质量指标均低于处理4,且呈显著性差异;处理6和处理7蛹虫草的各项指标均表现较差,这2个处理之间除子实体长度呈显著性差异外,其他指标如鲜干质量、鲜

干比、生物转化率方面未呈现显著性差异(表4)。

由表4可知,不同处理在子实体长度、鲜质量、干质量、鲜干比和生物转化率方面均有差异。图2以生物转化率为例,发现不同处理的蛹虫草生物转化率均有差异。其中,处理4组表现最好,生物转化率最高,为50.93%;处理1、2、3、5、8、9组生物转化率较高;处理6和处理7生物转化率较低,分别为11.23%和16.4%。

表4 不同处理的蛹虫草子实体相关指标分析

处理	子实体长度 (cm)	鲜质量 (g/瓶)	干质量 (g/瓶)	鲜干比	生物转化率 (%)
1	4.52 ± 0.69a	7.97 ± 1.65ab	1.25 ± 0.18ab	6.15 ± 0.41ab	39.83 ± 8.23ab
2	4.10 ± 0.25abc	4.82 ± 0.46cd	0.85 ± 0.09cd	5.73 ± 0.31b	24.99 ± 2.62cd
3	4.50 ± 0.34ab	6.18 ± 0.73bc	1.06 ± 0.11bc	5.84 ± 0.26ab	30.89 ± 3.93bc
4	6.01 ± 0.29a	10.19 ± 0.74a	1.48 ± 0.17a	7.02 ± 0.55a	50.93 ± 5.30a
5	3.05 ± 0.45abc	4.18 ± 0.68cde	0.97 ± 0.13cd	5.49 ± 0.55b	20.89 ± 1.84cde
6	2.68 ± 0.51c	2.25 ± 0.63e	0.38 ± 0.05e	5.96 ± 0.33ab	11.23 ± 1.39e
7	4.63 ± 0.38ab	3.27 ± 0.59de	0.59 ± 0.06de	5.45 ± 0.15b	16.40 ± 1.15de
8	3.38 ± 0.33bc	5.10 ± 0.55cd	0.78 ± 0.09cd	6.57 ± 0.49ab	26.58 ± 1.14cd
9	3.92 ± 0.41abc	4.78 ± 0.52cd	0.90 ± 0.05cd	5.34 ± 0.29b	23.92 ± 1.12cd

注:数据为平均值 ± 标准误差。数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

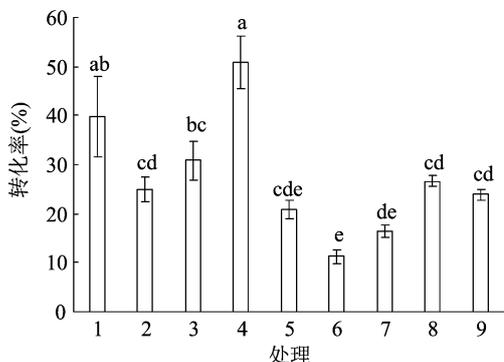


图2 不同处理的蛹虫草生物转化率比较

以生物转化率为例对不同处理的蛹虫草子实体数据进行正交分析,发现不同发酵条件对蛹虫草生物转化率影响为:温度(B) > 通气量(C) > pH值(A),3个因素均不显著($P < 0.05$)。最优组合为 $A_1B_1C_2$,即温度20℃,pH值5.5,通气量2 L/min(表5、表6)。

3 讨论

目前,国外在蛹虫草液体深层发酵方面也进行了摸索^[10-12],并取得了一定的成果。国内大都对其液体发酵某一影响因素进行相关研究,如杨杰等研究以蛹虫草菌丝生物量为指标,通过单因素试验从装液量、通气量、发酵起始pH值和接种量4个方面

进行优化,结果表明装液量为35 L/罐,通气量为0.9 m³/h,起始pH值6.45,接种量20瓶(每瓶500 mL)/罐(60 L)为最佳^[13]。周广麒等研究发现使用30 L大型生物反应器中进行发酵菌丝体,通气量为1.21 m³/h较好^[14],与杨杰等研究的结果^[13]相似。本研究采用3因素3水平正交试验,结果表明,不同处理对蛹虫草生长有一定的影响,不同温度、不同pH值和不同通气量对蛹虫草子实体生长有明显影响,3种因素对蛹虫草子实体的生物转化率影响为:温度(B) > 通气量(C) > pH值(A),其最优组合为温度20℃、pH值5.5、通气量2 L/min。进一步明确了蛹虫草液体菌种发酵的不同影响因素和最佳工艺条件,这为蛹虫草液体发酵技术提供了技术依据和支撑。当然不同体积的发酵罐,以及在不同小试、中试生产阶段对蛹虫草液体发酵工艺条件均有影响,还需要以此为基础做进一步分析与研究。此外,还需要对发酵罐进行优化,实现液体发酵与接种有机统一,节本增效,用于规模化生产。

4 结论

采用正交试验法进行了蛹虫草液体菌种发酵工艺优化,3个因素影响其生物转化率顺序为温度 > 通气量 > pH值,得到了最优发酵组合条件,即

表 5 不同处理的蛹虫草子实体正交法分析

处理	pH 值	温度 (°C)	通气量 (L/min)	虫草长度 (cm)	鲜质量 (g/瓶)	干质量 (g/瓶)	鲜干比	生物转化率 (%)
1	5.5	20	1	4.52	7.97	1.25	6.15	39.83
2	5.5	25	2	4.10	4.82	0.85	5.73	24.99
3	5.5	30	3	4.50	6.18	1.06	5.84	30.89
4	6.5	20	2	6.01	10.19	1.48	7.02	50.93
5	6.5	25	3	3.05	4.18	0.97	5.49	20.89
6	6.5	30	1	2.68	2.25	0.38	5.96	11.23
7	7.5	20	3	4.63	3.27	0.59	5.45	16.40
8	7.5	25	1	3.38	5.10	0.78	6.57	26.58
9	7.5	30	2	3.92	4.78	0.90	5.34	23.92
均值 1	31.90	35.72	25.88					
均值 2	27.68	24.15	33.28					
均值 3	22.30	22.01	22.73					
极差	9.60	13.71	10.53					
最优水平	A ₁	B ₁	C ₂					

表 6 正交试验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值
pH 值	139.013	2	69.506	0.181	19.00
温度	326.240	2	163.120	0.425	19.00
通气量	176.076	2	88.038	0.229	19.00
误差	522.358	2			

最优组合为 A₁B₁C₂, 即温度 20 °C, pH 值 5.5, 通气量 2 L/min。

参考文献:

- [1] 梁月. 蛹虫草生物学性状观察与交配型初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [2] 周思静, 刘桂君, 尚宏忠, 等. 蛹虫草人工培养技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 24(7): 13-17.
- [3] Kitakaze M, Hori M. Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2000, 9(11): 2519-2535.
- [4] Vinadé E R, Schmidt A P, Frizzo M E, et al. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice[J]. Brain Research, 2003, 977(1): 97-102.
- [5] 任昕雯, 李宇轩, 吴兆琦. 液体发酵条件对蛹虫草产虫草素的影响[J]. 陕西农业科学, 2018, 64(4): 58-60.
- [6] 张楠, 黎勇, 徐洁, 等. 蛹虫草深层发酵产虫草素培养基的优化[J]. 北方园艺, 2017(5): 134-141.
- [7] 秦鹏, 王龙, 路等学, 等. 不同添加物对蛹虫草液体发酵虫草素的影响[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(1): 68-75.
- [8] 焦子伟, 陈方园, 伍梦迪, 等. 人工栽培蛹虫草菌种培养液发酵生产工艺流程[J]. 现代农业科技, 2016(21): 75-77.
- [9] 努尔买买提, 焦子伟, 孙清花. 蛹虫草子实体人工栽培技术[J]. 现代农业科技, 2015(15): 91.
- [10] 程红艳, 郭伟, 常明昌, 等. 山西省北冬虫夏草优良菌株与母种培养基的筛选[J]. 山西农业科学, 2010, 38(11): 35-37, 56.
- [11] Park J P, Kim S W, Hwang H J, et al. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(1): 76-81.
- [12] Kim S W, Hwang H J, Xu C P, et al. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(1): 120-126.
- [13] 杨杰, 程红艳, 孙绪春, 等. 蛹虫草发酵罐培养的工艺优化[J]. 食用菌, 2011, 33(2): 11-12.
- [14] 周广麒, 万晓星, 侯友松, 等. 蛹虫草液态深层发酵的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(8): 39-43.