



蛹虫草工厂化生产栽培基质优化

高倩倩, 张 洁, 石 佳, 段腾益, 郝继伟

(临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276000)

摘要:为促进蛹虫草工厂化生产的发展,以虫草子座干重为指标,采用正交设计法优化蛹虫草固体培养基质。结果表明:蛹虫草工厂化生产最佳培养基质配方为小麦 90%、豆粕 10%,营养液为葡萄糖 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、VB₁ $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、柠檬酸铵 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,料液比为 1.0:1.6。应用该配方,每一标准盆虫草子座干重产量可达 62 g 以上。

关键词:蛹虫草;工厂化生产;栽培基质;正交设计

蛹虫草[*Cordyceps militaris* (L.) Link] 又叫北虫草,北冬虫夏草,隶属于子囊菌纲肉座菌目麦角菌科^[1],是蛹虫草真菌寄生在鳞翅目夜蛾科的昆虫蛹体上形成的子座与北体的结合体^[2]。因其化学成分和药理作用与冬虫夏草相似^[3-4],在临床上常代替冬虫夏草入药^[5]。特别是含有虫草素、虫草酸以及各种氨基酸等营养物质,具有滋补肺肾、止血化痰、抗各类细菌、提高免疫力、降血压等功效,具较高食用和药用价值^[6-7]。

蛹虫草经多年研究,现已拥有固体基质规模化人工培养和深层发酵两种应用方式。尤其是固体基质规模化人工培养既可为人们提供大量的虫草子座,又可为提取虫草素、虫草多糖等活性物质提供原材料,同时具有产量高、成本低等优点,已成为目前蛹虫草应用的主要方式。

近几年来,随着蛹虫草固体基质现规模化人工培养的发展,已经由最初的单纯利用大米作为培养基质主料,逐步开发出由大米、小米、玉米以及小麦等一种或多种原料混合作为主料的培养基质。特别是应用我国北方主要农作物小麦作为培养基质生产蛹虫草已经有较多的研究^[8-11]。徐君等^[12-13]研究表明小麦作为培养基质对虫草有效成分含量并无显著影响,甚至虫草中多糖、15 种氨基酸、腺苷及虫草素等含量均高于大米基质培养的子座。小麦又具有产量高、生产成本低等特点,因此,利用小麦作为蛹虫草固体基质的主料已

经是蛹虫草规模化生产的一种大趋势。

本试验针对山东省蛹虫草规模化发展尚处于初始阶段的现状,结合地方资源探讨适合当地的优化培养基质配方,既有利于促进蛹虫草工厂化生产的发展,提高农民的经济效益,又可带动地方农业发展。

1 材料与方法

1.1 材料

采自费县盛成农业科技有限公司的大头品种蛹虫草子座,通过组织分离法得到试管母种。前期蛹虫草斜面菌种与液体菌种制备于 2017 年 3-6 月在山东省临沂大学发酵实验室内进行;后期蛹虫草栽培试验于 2017 年 6-12 月在山东省费县盛成农业科技有限公司实验温室内进行。

供试仪器设备有 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-50SII 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);010A-1E 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器总厂)等。

供试培养基主要有母种培养基:马铃薯(去皮)200 g、蔗糖 20 g、麸皮 30 g(煮汁)、VB₁ 0.5 g、 KH_2PO_4 2 g、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL;

液体菌种培养基:红薯 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,可溶性淀粉 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,牛肉膏 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,酵母膏 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 1.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,VB₁ 0.05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 自然。

1.2 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 0.01~0.03 cm^3 大小的组织块,在无菌条件下接种到斜面培养基中部,置于 23~25 $^{\circ}\text{C}$ 的

收稿日期:2018-05-14

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201810452016)。

第一作者简介:高倩倩(1999-),女,在读学士,从事微生物开发利用研究。E-mail:2380137353@126.com。

通讯作者:郝继伟(1971-),男,硕士,副教授,从事食药真菌菌开发利用及野生资源保护研究。E-mail:haojw@126.com。

培养箱中培养 15~20 d,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 液体菌种的制备 将配制好的液体培养基,按每瓶 300 mL 的量倒入干净的 500 mL 三角瓶中,用双层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 2~3 块 0.10~0.25 cm³ 的母种块接入液体基础培养基中。在 20 ℃ 下,120 r·min⁻¹ 振荡培养 4~5 d,在瓶中即可看到大量菌球形成。

1.2.3 栽培模式及出菇管理 试验按规模化多层架盆栽技术的标准,采用 30 cm×30 cm×10 cm 的栽培盆,将各种原料按比例称好份量置于栽培盆内,主料与辅料共 450 g,按一定配比加入营养液,用聚丙烯薄膜封好盆口后,置于自制常压灭菌锅内加热灭菌,要求温度不低于 100 ℃ 灭菌 8 h 以上。培养基质灭菌接种后,将栽培盆以倾斜 75~80° 角放置于培养架上,可保证每层有充足

的光照。

此后的整个管理过程分为发菌期和出菇期两个阶段。第一阶段温度控制在 16℃~17℃,湿度控制在 60% 左右,在黑暗环境下培养;第二阶段温度升为 20℃ 左右,湿度增加到 80% 左右,并加强通风透光管理。以栽培盆为单位测量干菇产量。

1.2.4 正交试验设计 试验共设置主料、辅料、营养液以及料液比 4 个因素。利用当地主要农产品小麦、玉米以及购置的大米为试验的主料因素;以豆粕、麦麸作为辅料因素;营养液在薛变丽等^[14-16] 的研究结果基础上,参照当前应用较多的主要成分及浓度设置了 3 种配方,并以井水作对照;料液比以当前生产中常用的比例设置。4 因素分别设置 4 种水平,按 L₁₆(4⁵) 正交表进行栽培基质优化试验(表 1)。试验设 2 次重复,完全随机设计。

表 1 蛹虫草培养基质正交实验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment of cordyceps culture medium

水平 Levels	因素 Factors			
	A 主料 Main material	B 辅料 Auxiliary material	C 营养液 Nutrient solution	D 料液比 Solid-liquid ratio
1	小麦 90%	不加辅料(小麦 10%)	葡萄糖 15 g·L ⁻¹ 、蛋白胨 10 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 1 g·L ⁻¹ 、MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 g·L ⁻¹ 、VB ₁ 1 g·L ⁻¹ 、柠檬酸铵 1 g·L ⁻¹	1.0:1.4
2	小麦 80%+大米 10%	豆粕 10%	葡萄糖 15 g·L ⁻¹ 、蛋白胨 10 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 1 g·L ⁻¹ 、MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 g·L ⁻¹ 、VB ₁ 1 g·L ⁻¹	1.0:1.5
3	小麦 80%+玉米 10%	豆粕 5%+麦麸 5%	蔗糖 15 g·L ⁻¹ 、酵母膏 10 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 1 g·L ⁻¹ 、MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 g·L ⁻¹ 、VB ₁ 1 g·L ⁻¹	1.0:1.6
4	小麦 70%+玉米 20%	麦麸 10%	井水	1.0:1.7

1.2.5 验证试验 以蛹虫草栽培基质正交设计优化配方与正交试验中产量最高处理作对比试验,以验证最佳配方的可靠性,试验设 6 次重复,完全随机设计。

1.2.6 数据分析 采用 Excel 2007 和 DPS 7.5 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

由表 2 可知,蛹虫草最佳培养基配方为 A1B2C1D3,即小麦 90%、豆粕 10%,营养液为葡萄糖 15 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹、VB₁ 1 g·L⁻¹、柠檬酸铵 1 g·L⁻¹,料液比为 1.0:1.6。根据极差 R 值大小可知,4 因素对实验指标影响程度的大小排序为主料>营养液>辅料>料液比。

由表 3 方差分析可知,主料、辅料与营养液 3 因素对试验指标均有极显著影响($P<0.01$),而料液比对试验结果无显著影响。根据 F 值与 P 值大小可知,4 因素对实验指标影响程度的大小排序为主料>营养液>辅料>料液比,结果与极差分析结果一致。

为进一步检验各水平间的差异,对各因素水平进行多重比较(Duncan 新复极差法),结果见表 4。由表 4 结果分析可知,主料因素水平 1 与水平 2 产量相近,且二者均较水平 3 显著增产,而水平 3 产量又极显著高于水平 4,表明以小麦或以小麦添加 10% 大米为主料效果较好,但小麦添加 10%~20% 的玉米产量低;辅料水平 2 产量略高于水平 3,二者极显著高于水平 1 与水平 4,表明主料中不添加辅料或单纯以麦麸为辅料不利于增

产,而用豆粕为辅料培养效果好;营养液水平 1 产
量略高于水平 2,但差异不显著,水平 2 与水平 3
间差异不显著但二者显著高于水平 4,表明在营
养液中添加柠檬酸铵有一定增产效果,但效果不
显著,分别用蔗糖取代葡萄糖,用酵母膏取代蛋白
胨无增产效果;料液比水平 3 最高,但各水平间差
异未达显著水平。

表 2 蛹虫草培养基质正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test of cordyceps culture medium

处理 Treatments	因素 Factors					产量(干重)/g Yield(dry weight)	
	A 主料	B 辅料	空列	C 营养液	D 料液比	重复 1	重复 2
	Main material	Auxiliary material	Empty column	Nutrient solutio	Solid-liquid ratio	Repeat 1	Repeat 2
1	1	1	1	1	1	56.56	55.15
2	1	2	2	2	2	57.91	58.05
3	1	3	3	3	3	57.47	59.25
4	1	4	4	4	4	52.92	50.63
5	2	1	2	3	4	54.23	54.47
6	2	2	1	4	3	54.41	56.42
7	2	3	4	1	2	58.98	57.73
8	2	4	3	2	1	57.07	53.62
9	3	1	3	4	2	49.86	51.31
10	3	2	4	3	1	53.82	55.74
11	3	3	1	2	4	55.1	56.42
12	3	4	2	1	3	58.23	53.63
13	4	1	4	2	3	48.95	50.73
14	4	2	3	1	4	52.49	54.36
15	4	3	2	4	1	47.08	48.52
16	4	4	1	3	2	48.07	47.52
K1	55.99	52.66	53.71	55.89	53.45		
K2	55.87	55.40	54.02	54.73	53.68		
K3	54.26	55.07	54.43	53.82	54.89		
K4	49.72	52.71	53.69	51.39	53.83		
R	6.28	2.74	0.74	4.50	1.44		

表 3 正交设计方差分析(完全随机模型)
Table 3 Variance analysisof orthogonal design(complete random model)

变异来源 Sources of variation	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P
x(1)	207.0171	3	69.0057	36.6754	0.0001
x(2)	52.4705	3	17.4902	9.2957	0.0005
x(3) *	2.8912	3	0.9637		
x(4)	87.4355	3	29.1452	15.4902	0.0001
x(5)	9.7586	3	3.2529	1.7288	0.1950
模型误差 Model error	2.8912	3	0.9637	0.4693	0.8636
重复误差 Repeat error	32.8578	16	2.0536		
合并误差 Consolidation error	35.7490	19	1.8815		

表 4 因素水平多重比较结果(Duncan 法)

Table 4 Multiple comparison of factor levels(Duncan)

因素水平	主料	辅料	营养液	料液比
Factor	Main	Auxiliary	Nutrient	Solid-liquid
level	material	material	olutio	ratio
1	55.99 aA	52.66 bB	55.89 aA	53.45 aA
2	55.87 aA	55.40 aA	54.73 abB	53.68 aA
3	54.26 bA	55.07 aA	53.82 bB	54.89 aA
4	49.72 cB	52.71 bB	51.39 cB	53.83 aA

同列数据中不同大小写字母表示差异显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$),下同。
Different capital and lowercase letters within the same column indicate significant difference at 0.01 and 0.05, the same below.

2.2 验证试验结果

通过正交试验及分析结果可知,最佳培养基

表 5 优化配方验证试验结果

Table 5 Verify test results of optimum formula

试验处理	干重/g Dry weight						
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	重复 6	平均干重
Experimental treatments	Repeat1	Repeat2	Repeat3	Repeat4	Repeat5	Repeat6	Average dry weight
优化配方 Optimized formula	60.91	63.55	62.69	62.13	62.57	63.92	62.63±1.07 aA
对照 Contrast	58.25	58.82	56.83	58.27	57.86	53.52	57.26±1.95 bB

3 结论与讨论

研究结果表明用当地主要农产品小麦做为主料,用豆粕做辅料,添加特定配比的营养液,可达较好的栽培效果,采用最佳栽培基质配方即小麦 90%、豆粕 10%,营养液为葡萄糖 15 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹、VB₁ 1 g·L⁻¹、柠檬酸铵 1 g·L⁻¹,料液比为 1.0:1.6,每一标准盆虫草子座干重产量可达 62 g 以上,高于一般传统栽培方法,适于在蛹虫草规模化生产中应用。该结论对于促进蛹虫草规模化生产的发展,提高农民的经济效益有重要意义。

从培养基质的主料来看,本研究结果用小麦或小麦加大米作主料增产效果相似,与冯景刚等^[17]与玉米、小米相比,小麦上生长的子实体干重较大,质量高的结论类似,也与王金寿^[18]小麦加大米结合产量高的结论一致。鉴于小麦价格较大米更低,因此完全用小麦作主料生产效益更高。

培养基质的辅料方面,本研究结果表明用豆

质配方为 A1B2C1D3,即小麦 90%、豆粕 10%,营养液为葡萄糖 15 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹、VB₁ 1 g·L⁻¹、柠檬酸铵 1 g·L⁻¹,料液比 1.0:1.6。根据表 2 正交试验结果可知第 7 个处理及 A2B3C1D2(即小麦 80%、大米 10%、豆粕 5%、麦麸 5%,营养液为葡萄糖 15 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹、VB₁ 1 g·L⁻¹、柠檬酸铵 1 g·L⁻¹,料液比为 1.0:1.5)产量最高,以该配方作为验证试验的对照。

正交设计验证试验结果表明,蛹虫草最佳培养基配方为小麦 90%、豆粕 10%,营养液为葡萄糖 15 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹、VB₁ 1 g·L⁻¹、柠檬酸铵 1 g·L⁻¹,料液比为 1.0:1.6,较对照配方增产 9.38%,达极显著水平(表 5)。

粕为辅料较麦麸增产效果更好与袁蜜等^[13]研究结果相似。早在 20 世纪 90 年代周晓燕等^[19]研究表明用豆粕粉作氮源培养的虫草菌丝体其多数有效成分与天然虫草极其相似,因此用豆粕做培养基质辅料是蛹虫草生产的最优选择。

本研究结论中培养基质中添加营养液具有显著的培养效果,特别是柠檬酸铵的效果更好,与袁泰斗等^[20]的研究结果一致。基质料液比未达显著水平,但随着料水比的增加,蛹虫草子座产量呈先增加后降低的趋势,以及得到的 1.0:1.6 的最优结果与张园园等^[21]的研究结果一致。

本研究中测定的试验指标仅有蛹虫草产量(干重),对于优化基质配方中主要原料成分对虫草多糖、虫草素、腺苷等多种活性物质的影响,文中虽然分析引用了部分资料的结果但并未予以直接测定,建议在蛹虫草的规模化生产中对这些指标逐一测定,以达在蛹虫草规模化生产中生产出高产优质的虫草,利于进一步提高经济效益。

参考文献:

- [1] 戴玉成,周丽伟,杨祝良,等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报,2010,29(1):1-21.
- [2] 温慧颖,辛树权. 北虫草生长发育条件的初步探究[J]. 东北农业科学,2016,41(3):99-103.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Masuda M, Urabe E, Sskurai A, et al. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 641-646.
- [7] 叶文姣,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.
- [8] 简利茹,杜双田. 不同碳源下蛹虫草的产量及虫草素和腺苷含量[J]. 贵州农业科学,2015,43(12):110-112.
- [9] 罗莹,周永斌,刘连强,等. 蛹虫草栽培料的优化[J]. 食用菌,2016,38(2):44-45.
- [10] 努尔买买提,焦子伟,杨晓绒,等. 不同人工栽培培养基对蛹虫草子实体发育的影响及效益分析[J]. 新疆农业科学,2016,53(2):359-366.
- [11] 孙军德,肖彩玲,康婷婷,等. 不同配方培养基对北虫草生长的影响[J]. 农业科技与装备,2013(6):5,9.
- [12] 徐君. 人工培养北虫草质量控制关键技术与质量评价体系研究[D]. 济南:山东中医药大学,2009.
- [13] 袁蜜. 蛹虫草培植技术及有效成分分析[D]. 上海:上海交通大学,2013.
- [14] 薛变丽. 北冬虫夏草的工厂化盘式栽培[D]. 晋中:山西农业大学,2014.
- [15] 方方舟,肖习明. 不同氮源对蛹虫草主要活性成分的影响及规律研究[J]. 荆楚理工学院学报,2016,31(6):5-10.
- [16] 杨东生,孟凡欣,吴丽艳,等. 响应面法优化蛹虫草固体栽培工艺[J]. 中国酿造,2011(5):127-131.
- [17] 冯景刚,张迪,刘在民. 不同培养基对蛹虫草子实体产量与质量的影响[J]. 辽宁林业科技,2008(6):24-25.
- [18] 王金寿. 不同配方培养料栽培蛹虫草比较试验[J]. 食用菌,2011,33(6):33-34.
- [19] 周晓燕,许周善. 以豆粕为氮源生产虫草菌丝体的研究[J]. 工业微生物,1999(1):3-7.
- [20] 袁泰斗,陈月仍,吴坤林. 影响蛹虫草子实体产量及质量的因素研究[J]. 广东农业科学,2006(10):22-23.
- [21] 张园园,杜双田,孟胜楠,等. 基质料水比对蛹虫草生长发育的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(9):169-174,185.

Optimization of Medium for Industrial Production of *Cordyceps militaris*

GAO Qian-qian, ZHANG Jie, SHI Jia, DUAN Teng-yi, HAO Ji-wei

(College of Life Science, Linyi University, Linyi 276000, China)

Abstract: In order to promote the development of industrial production of *Cordyceps militaris*, the dry weight of *Cordyceps* was used as an index to optimize the solid culture medium of *Cordyceps militaris* by orthogonal design. The results showed that the best medium of *Cordyceps militaris* was wheat 90%, soybean meal 10%, and nutrient solution was glucose 15 g·L⁻¹, peptone 10 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹, VB₁ 1 g·L⁻¹, Ammonium citrate 1 g·L⁻¹, and the solid-liquid ratio was 1.0:1.6. Application of the formula, dry weight production of each standard basin *Cordyceps* up to 62 g or more.

Keywords: *Cordyceps militaris*; industrial production; cultivation matrix; orthogonal design

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网出版总库》及CNKI等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部