

蛹虫草液体发酵培养基的优化

叶晶晶¹, 曹宁宁², 刘刚¹, 吴建梅¹, 殷浩¹, 胡祚忠¹, 张剑飞¹

(1. 四川省农业科学院 蚕业研究所, 四川 南充 637000; 2. 四川省南充蚕种场, 四川 南充 637000)

摘要: 采用统计学方法对 1 株蛹虫草 *Cordyceps militaris* DY-1 菌株进行液体发酵配方优化, 以期得到适合蛹虫草生长的最佳培养基配方。以菌丝体干质量浓度为指标, 首先采用单次单因子方法筛选出培养基中的最优碳源、氮源及无机盐和正交试验方法得出最佳的碳氮比(C/N); 然后采用 Plackett-Burman(BP)设计筛选出影响菌丝体干质量浓度的关键因素, 通过中心组合和响应面法确定关键因素的最佳浓度, 从而得到出菌株 DY-1 的液体发酵最佳培养基配方为: 葡萄糖 16.40 g·L⁻¹, 酵母浸膏粉 5.00 g·L⁻¹, 硝酸钾 1.00 g·L⁻¹, 硫酸镁 0.20 g·L⁻¹, 磷酸二氢钾 1.80 g·L⁻¹, 硫酸亚铁 0.02 g·L⁻¹。经验证, 菌丝体干质量浓度为 32.11 g·L⁻¹, 与模型的预测值基本一致。运用最佳培养基配方进行液体发酵, 菌丝体干质量浓度较基础培养基提高了 4.12 倍。图 3 表 9 参 28

关键词: 蛹虫草; 菌丝体干质量浓度; PB 设计; 响应面法; 中心组合设计

中图分类号: S567.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2014)03-0465-08

Optimization of a liquid fermentation medium for *Cordyceps militaris*

YE Jingjing¹, CAO Ningning², LIU Gang¹, WU Jianmei¹, YIN Hao¹, HU Zuozhong¹, ZHANG Jianfei¹

(1. Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agriculture, Nanchong 637000, Sichuan, China; 2. Nanchong Silkworm Farm of Sichuan Province, Nanchong 637000, Sichuan, China)

Abstract: To obtain the optimal medium for growth of *Cordyceps militaris* DY-1, statistical designs were utilized on the fermentation medium. The dry weight of mycelium was measured analytically. First, the carbon source, nitrogen source, and inorganic salts were screened one factor at a time, and the carbon: nitrogen ratio was optimized through orthogonal testing. Then, the Plackett-Burman design was used to screen the critical factors of mycelium production. Last, a central composite design and response surface methodology were utilized to determine the optimal concentrations of the critical factors. After, the optimal medium was used in inoculation experiments to verify the predicted values. Results demonstrated that the optimal media was composed of the following factors: maltose, 16.40 g·L⁻¹; yeast extract powder, 5.00 g·L⁻¹; KNO₃, 1.00 g·L⁻¹; MgSO₄, 0.20 g·L⁻¹; KH₂PO₄, 1.80 g·L⁻¹; and FeSO₄, 0.02 g·L⁻¹. The practical corresponding response of 32.11 g·L⁻¹ was closer to the predicted response of 32.22 g·L⁻¹. Using the optimum medium, the dry weight of the mycelium active substances was effectively enhanced 4.12 times compared with the initial level. The present study laid the foundation for the further research and application of *Cordyceps militaris* DY-1. [Ch, 3 fig. 9 tab. 28 ref.]

Key words: *Cordyceps militaris*; dry weight of mycelium; Plackett-Burman design; response surface

收稿日期: 2013-07-02; 修回日期: 2013-11-12

基金项目: 四川省农业科学院提升项目新兴学科专项(2013XXXX-016); 四川省科技支撑项目(2011NZ0020); 四川省农业科学院提升项目青年基金专项(2013QNJJ-019); 科技部星火计划项目(2011GA810011); 农业部国家蚕桑产业技术体系养蚕设施与机械岗位项目(CARS-22-ZJ0401)

作者简介: 叶晶晶, 助理研究员, 从事生物技术及综合利用研究。E-mail: yjjsuccess2008@163.com。通信作者: 张剑飞, 副研究员, 从事生物技术及综合利用研究。E-mail: 783890694@qq.com

methodology; central composite design

蛹虫草 *Cordyceps militaris*, 又称为北虫草, 北冬虫夏草, 隶属于真菌界的子囊菌门 Ascomycota 肉座菌目 Hypocreales 麦角菌科 Clavicipitaceae, 是世界性广布种^[1]。其所含的虫草素比天然冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 还要高, 药效与天然冬虫夏草相似^[2], 具有明显的抗疲劳、抗肿瘤、抗衰老等作用^[3-5]。人工栽培蛹虫草子实体生产周期长, 产量有限, 国内外学者一直致力于蛹虫草液体发酵培养的研究^[6-7]。研究表明, 采用液体培养的虫草菌丝体, 其所含的主要成分与天然子实体十分接近^[8], 且具有培养条件易控制、产量高、生长周期短且活性物质易于提取等特点, 有望成为野生虫草的替代品^[9-11]。因此, 液体发酵生产蛹虫草菌丝体不仅具有重要的应用价值, 而且对保护有限的野生虫草资源也具有重要的意义。近年来, 蛹虫草液体培养的研究取得了很大进展, 但由于蛹虫草菌株及培养基配方等原因, 使培养产物有诸多差异^[12-13]。目前, 对蛹虫草液体培养基配方的优化主要从单因素试验和正交试验两方面^[14-19], 对配方的优化方法的研究还不够深入, 不能确定各因素之间的协同关系。本研究分别采用单因素试验、正交试验、Plackett-Burman(BP)设计、中心组合试验及响应面法系统全面地对蛹虫草液体培养的培养基配方进行优化, 以菌丝体干质量浓度为响应值, 采用多元二次回归拟合方程, 通过求偏导获得主要影响因子的最佳浓度配比, 筛选出最佳的培养基配方。

1 材料与方 法

1.1 材料及主要试剂和仪器

蛹虫草菌株 DY-1 由四川省农业科学院蚕业研究所养蚕法研究室分离并保存。

所用试剂硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸亚铁、硝酸钾、氯化钠等均为分析纯, 购自国药集团药业股份有限公司, 试验用水为自制双蒸水和去离子水。

BP1211S 1/10J 电子天平(德国赛多利斯有限公司), ZK-82A 型真空干燥箱(上虞市宏兴机械仪器制造有限公司), KQ-600 型超声波清洗器(苏州江东精密仪器有限公司), DHZ-DA 恒温振荡培养箱(江苏太仓仪器设备有限公司), TG16-WS 台式离心机(湖南沪康离心机有限公司); YX400 高压蒸汽灭菌锅(上海安锐自动化仪表有限公司)。

1.2 培养基配方

1.2.1 种子液培养基配方 土豆 200.00 g, 葡萄糖 20.00 g, 蒸馏水 1 000.00 mL, 自然 pH 值。121 °C 灭菌 30 min, 备用。

1.2.2 基础培养基配方 M1: 土豆 200.00 g, 牛肉膏 5.00 g, 硫酸镁 1.00 g, 磷酸二氢钾 0.60 g, 硫酸铵 1.00 g, 碳酸钙 3.00 g, 蒸馏水 1 000.00 mL; M2: 酵母粉 5.00 g, 蛋白胨 10.00 g, 氯化钠 10.00 g, 蒸馏水 1 000.00 mL; M3: 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 10.00 g, 硫酸镁 1.50 g, 磷酸二氢钾 1.50 g, 蒸馏水 1 000.00 mL; M4: 牛肉膏 3.00 g, 蛋白胨 5.00 g, 蔗糖 10.00 g, 酵母膏 1.00 g, 蒸馏水 1 000.00 mL; M5: 葡萄糖 16.00 g, 可溶性淀粉 2.50 g, 蛋白胨 10.00 g, 豆饼粉 26.00 g, 玉米浆 1.00 g, 氯化钠 7.50 g, 硫酸铵 4.00 g, 蒸馏水 1 000.00 mL。自然 pH 值。培养基用聚乙烯膜封口, 121 °C 灭菌 30 min, 备用。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的活化方法 从固体斜面培养基上取 1.0 cm² 的菌丝块 2 块, 接种到已灭菌的装有 400.00 mL 种子培养基的 1 000.00 mL 三角瓶中, 22 °C, 180 r·min⁻¹, 振荡培养 72 h, 备用。

1.3.2 接种及培养方法 将 10.00 mL 活化的菌株孢子悬液接种于已灭菌的装有 100.00 mL 基础培养基的 500.00 mL 三角瓶中(孢子浓度用血球计数板测定为 2.0×10⁶ 个·mL⁻¹), 22 °C, 180 r·min⁻¹, 振荡培养 5 d, 重复 2 次·处理⁻¹。

1.3.3 菌丝体生物量测定方法 采用菌丝体干质量法, 取发酵液 100.00 mL, 转速 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 倾去上清液, 菌丝体于 80 °C 烘干至恒量, 用分析天平称量, 取 2 次重复试验的平均值为菌丝体质量。

1.4 培养基配方优化的方法

1.4.1 基础培养基的筛选 分别采用 1.2.2 节中的 5 种基础培养基对菌株 DY-1 进行液体发酵, 通

过测定菌丝体干质量浓度, 筛选出干质量浓度最高的培养基配方, 在此基础上进行培养基配方的优化。

1.4.2 单因素试验 所筛选出的基础培养基中的碳源采用葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、土豆、玉米粉, 以 $20.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加, 以不含碳源的培养基为对照, 重复 2 次·处理⁻¹。测定菌丝体干质量浓度, 比较不同碳源对菌丝体干质量浓度的影响。有机氮源分别选取蛋白胨、牛肉膏、黄豆饼粉、酵母浸膏粉进行单因素分析, 基础培养基以 $10.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加; 无机氮源分别选取硝酸钾、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵进行单因素分析, 基础培养基以 $1.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加; 其他方法同 1.4.2 节。

1.4.3 不同碳氮比(C/N)对菌株 DY-1 菌丝体干质量浓度的影响 将筛选到的最佳碳源、有机氮源和无机氮源参照正交表 $L_{16}(4^5)$ 进行正交试验设计, 其因素与水平的设置见表 1, 重复 2 次·处理⁻¹。测定菌丝体干质量浓度, 比较不同 C/N 比对菌丝体干质量浓度的影响。

1.4.4 不同无机盐对菌株 DY-1 菌丝体干质量浓度的影响 本研究首先进行了不同无机盐对 DY-1 菌株菌丝干质量浓度的单因素影响试验, 筛选出了对菌丝干质量浓度影响较大的 3 种无机盐硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸亚铁。本研究对这 3 种无机盐, 根据正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验设计, 其因素与水平的设置见表 2, 重复 2 次·处理⁻¹。测定菌丝体干质量浓度, 比较不同 C/N 比对菌丝干质量浓度的影响。

表 1 因素与水平的设置

Table 1 Arrangement of factors and levels

处理	因素水平/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	葡萄糖	酵母浸膏粉	硝酸钾
1	2.00	1.00	0.50
2	5.00	2.00	1.00
3	10.00	5.00	2.00
4	20.00	10.00	5.00

表 2 因素与水平的设置

Table 2 Arrangement of factors and levels

处理	因素水平/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	硫酸镁	磷酸二氢钾	硫酸亚铁
1	0.20	1.00	0.01
2	0.50	1.50	0.02
3	1.00	3.00	0.05

1.4.5 Plackett-Burman(BP)试验设计 根据以上试验结果, 选取 6 个影响显著的因子进行试验, 其因素水平及编码见表 3。

1.4.6 最陡爬坡试验 利用 Minitab 14 软件对试验数据进行一元线性回归分析, 根据试验拟合的一次多项式方程找出主要影响因子, 并确定最陡爬坡的方向及步长, 由此接近最大响应区域^[20]。

1.4.7 中心组合试验 在部分因子试验和最陡爬坡试验的基础上, 进行中心组合试验设计。本阶段试验设计、数据分析及模型的建立是借助于 Design Expert 7.0 和 SAS 9.0 辅助完成^[21]。

1.5 数据处理

试验数据采用 SAS 9.0 数据分析软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

由图 1 可知: M3 培养基中菌丝体干质量浓度最高, 经 SAS 9.0 分析, 选择 M3 培养基作为基础培养基进行其他因素的筛选。筛选出的最佳碳源、最佳有机氮源和最佳无机氮源分别为葡萄糖、酵母浸膏粉和硝酸钾。

2.2 不同 C/N 比对菌株 DY-1 菌丝体干质量浓度的影响结果

以葡萄糖为最佳碳源, 酵母浸膏粉、硝酸钾为最佳有机氮源、无机氮源, 进行正交试验。采用 SAS

表 3 Plackett-Burman(PB)试验设计的因素及其编码值

Table 3 Factors and coded values of PB design

因素	因素水平/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	-1	0	1
葡萄糖	5.00	10.00	15.00
酵母浸膏粉	2.00	5.00	7.00
硝酸钾	0.50	1.00	1.50
硫酸镁	0.10	0.20	0.40
磷酸二氢钾	0.50	1.50	2.00
硫酸亚铁	0.10	0.20	0.30

9.0 数据分析软件对正交试验结果进行方差分析, 分析结果见表 4。葡萄糖、酵母浸膏粉、硝酸钾对菌丝体干质量浓度均有极显著影响。分别分析 3 种因素结果表明: 葡萄糖 $10.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母浸膏粉 $5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 硝酸钾 $1.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳的 C/N 比组合。

2.3 不同无机盐对菌株 DY-1 菌丝体干质量浓度的影响结果

以 4 种不同无机盐对菌株 DY-1 菌丝体干质量浓度的影响进行正交试验。经 SAS 9.0 数据分析软件对其结果进行方差分析, 结果见表 5。分析结果表明: 硫酸镁、磷酸二氢钾和硫酸亚铁对菌丝体干质量浓度的影响均达到显著水平。分析可知影响菌丝体干质量浓度最高的无机盐的组合为: 硫酸镁 $0.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾 $1.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 硫酸亚铁 $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 Plackett-Burman(PB)试验结果

根据上述试验可知, 对蛹虫草菌丝体具有显著影响作用的共有以下 6 个因素: 葡萄糖、酵母浸膏粉、硝酸钾、硫酸镁、磷酸二氢钾和硫酸亚铁。采用 Minitab 软件进行 PB 试验设计, 并对试验结果进行方差分析, 得到各因素对菌丝体干质量浓度的影响效果(表 6)。由表 6 可以看出: 影响菌丝体干质量浓度的极显著因素有葡萄糖($P=0.000$)和磷酸二氢钾($P=0.006$)。其他因素如酵母浸膏粉($P=0.099$), 硝酸钾($P=0.219$), 硫酸镁($P=0.141$)和硫酸亚铁($P=0.632$)等对菌丝体干质量浓度的影响均不显著。对试验数据进行分析, 并拟合一次回归方程, 其模型为: $C_7 = 26.3 + 2.41C_1 - 0.439C_2 + 0.312C_3 - 0.384C_4 + 0.907C_5 - 0.116C_6$ 。(其中: C_1 代表葡萄糖; C_2 代表酵母浸膏粉; C_3 代表硝酸钾; C_4 代表硫酸镁; C_5 代表磷酸二氢钾; C_6 代表硫酸亚铁; C_7 代表菌丝体干质量浓度)。该方程的 $R^2(\text{adj})$ 为 90.7%, 表明该回归方程拟合良好^[21]。

2.5 最陡爬坡试验结果

根据 PB 试验结果, 进一步选择葡萄糖, 磷酸二氢钾这 2 个显著因素进行最陡爬坡试验, 当葡萄糖为 $15.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾为 $1.70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌丝体干质量浓度最高, 为 $32.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 试验结果见表 7。

2.6 中心组合试验结果

根据最陡爬坡试验结果可知: 处理 3 的菌丝体干质量浓度已接近最大, 故选用处理 3 的培养基作为中心组合试验的中心点, 进行中心组合试验设计。其因素水平见表 8。利用 SAS

9.0 中的响应面回归命令对试验结果数据进行分析, 建立以菌丝体干质量浓度为响应面的多元线性回归模型, 并且对模型系数和概率进行统计分析, 结果见表 9。响应面图及等高线见图 2。从等高线图可以直观的反映出两变量相互作用的显著程度, 圆形表示 2 因素交互作用不显著, 而椭圆形与之相反。图 2 中等高线呈近似圆形, 表明两因素的交互作用不显著。中心组合试验的失拟性分析结果见图 3。从图 3 中可以看出试验数据的拟合度较好, 试验数据

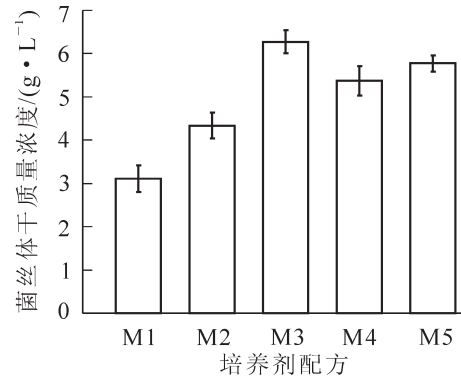


图 1 不同发酵培养基中菌丝体干质量浓度

Figure 1 Dry weight of mycelium in different mediums

表 4 不同 C/N 对菌株 DY-1 菌丝体干质量浓度的影响

Table 4 Effects of different C/N on mycelium dry weight of strain DY-1

因素	均方	F 值	P>F
葡萄糖	10.773	11.67	0.006 5
酵母浸膏粉	5.377	5.83	0.003 3
硝酸钾	8.954	9.70	0.010 2

表 5 不同无机盐对菌丝体干质量浓度的影响

Table 5 Effect of different inorganic salts on mycelium dry weigh

因素	均方	F 值	P>F
硫酸镁	12.568	35.64	0.027 3
磷酸二氢钾	26.348	74.72	0.013 2
硫酸亚铁	11.013	31.23	0.031 0

表 6 各因素的主效应

Table 6 The main effects of factors

自变量	系数	T	P
常量	26.300	122.70	0.000
葡萄糖	2.410	10.41	0.000
酵母浸膏粉	-0.439	-1.90	0.099
硝酸钾	0.312	1.35	0.219
硫酸镁	-0.384	-1.66	0.141
磷酸二氢钾	0.907	3.92	0.006
硫酸亚铁	-0.116	-0.50	0.632

的可信度高。由表 9 拟合的全变量编码水平的二次回归方程(y 为菌丝体干质量浓度):

$$y=32.07+0.77A+0.51B+0.09AB-1.42A^2-1.44B^2。$$

其中: A 代表葡萄糖; B 代表磷酸二氢钾; AB 代表葡萄糖与磷酸二氢钾的交互作用项。

表 7 最陡爬坡试验设计及结果

Table 7 Experimental designs and results of the steepest ascent experiment

组合	规范变量		自然变量/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		菌丝体干质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	葡萄糖	磷酸二氢钾	葡萄糖	磷酸二氢钾	
	1	0.38	5.00	0.20	
原点 $-\Delta$	-1	-0.38	5.00	1.30	24.34
原点	0	0	10.00	1.50	26.45
原点 $+\Delta$	1	0.38	15.00	1.70	32.00
原点 $+2\Delta$	2	0.76	20.00	1.90	30.65
原点 $+3\Delta$	3	1.14	25.00	2.10	27.67
原点 $+4\Delta$	4	1.52	30.00	2.30	24.32
原点 $+5\Delta$	5	1.90	35.00	2.50	22.32

模型的可靠性可由方差分析及决定系数来检验, $P=0.0014$ ($P<0.01$) 说明模型是极显著的。决定系数 $R^2(\text{adj})=97.44$, 这表明 97.44% 的试验数据可用此模型解释, 因此, 回归方程拟合程度良好。由方程可知: 由于二次项系数均为负值, 方程代表的抛物面开口向下, 因而该方程有极大值点。对方程利用 SAS 9.0 进行分析, 得到模型的极值点 ($A=0.277; B=0.186$), 即葡萄糖为 $16.40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾为 $1.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌丝体干质量浓度达到最高, 预测值达到 $32.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 实测值 ($32.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 与预测值基本相符。

表 8 中心组合试验设计的因素及其编码值

Table 8 Factors and coded values of central composite design

因素	水平/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	-1.414	-1	0	1	-1.414
葡萄糖	7.90	10.00	15.00	20.00	22.10
磷酸二氢钾	1.00	1.20	1.70	2.20	2.40

表 9 中心组合试验回归方程方差分析表

Table 9 ANOVA for the regression equation of central composition design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P>F$
模型	35.114	5	7.023	109.793	<0.000 1
$A-A$	4.779	1	4.779	74.715	<0.000 1
$B-B$	2.085	1	2.085	32.598	0.000 7
AB	0.035	1	0.035	0.541	0.486 0
A^2	14.989	1	14.989	234.331	<0.000 1
B^2	15.397	1	15.397	240.710	<0.000 1
残差	0.448	7	0.064		
失拟值	0.438	3	0.146	58.821	0.000 9
系统误差	0.010	4	0.003		
总误差	35.677	13			

说明: A 代表葡萄糖, B 代表磷酸二氢钾, AB 代表葡萄糖与磷酸二氢钾的交互作用项。

3 讨论

通常优化培养基的方法主要包括单次单因子法和正交试验设计法。单次单因子试验是讨论一种因素的影响, 由于考察因素间经常存在交互作用, 所以该方法并非总能获得最佳的优化条件^[22]; 而正交试验不能给出整个区域上因素和响应值之间的一个明确的函数表达式即回归方程, 从而无法找到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最佳组合。因此, 国内外不少学者^[23-24]通过响应面分析法在培养基优化方面

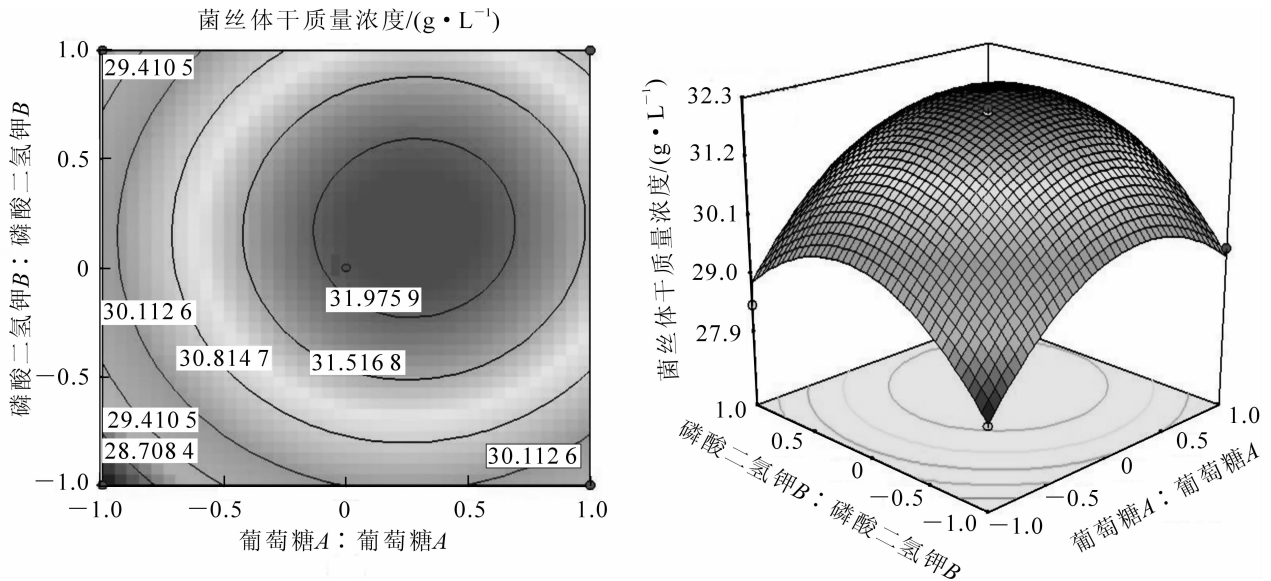


图2 响应面分析图

Figure 2 Response surface analysis

取得了良好效果。

通过响应面分析法建立各因素与响应值之间的数学模型,可以较直观看出不同因素之间的交互作用,进行有针对性的调整,减少试验次数,提高效率,在生产实际中有广泛的应用价值。在本研究中,通过响应面分析法建立了葡萄糖和磷酸二氢钾等2个影响显著的因素和响应值菌丝体生物量之间的数学模型,并通过直观的等高线图证实2个影响显著因素的交互作用不显著。通过试验验证,在响应面优化后所获得实际值与预测的最大响应值间拟合程度良好,模型的回归效果显著,能很好地预测蛹虫草菌丝的生长状况,表明中心组合设计和响应面分析法在培养基优化方面的应用具有实际指导作用。优化得到蛹虫草液体培养的最佳培养基配方为:葡萄糖 $16.40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母浸膏粉 $5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 硝酸钾 $1.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 硫酸镁 $0.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾 $1.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 硫酸亚铁 $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此条件下,通过验证菌丝体生物量达到 $32.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,比单因素优化提高了1.01倍,较基础培养基提高了4.12倍;而蔡友华等^[25]、周广麒等^[26]及李珺等^[27]对虫草液体发酵培养基优化得到的菌丝体生物量均低于此值。

在所试验的6种碳源中,葡萄糖最有利于虫草菌的生长;这与蔡友华等^[25]和刘苗苗等^[28]的研究一致,而周广麒等^[26]筛选出的蛹虫草的最佳碳源是蔗糖,这可能与蛹虫草菌株的性状不同有关系;在所选的氮源中,酵母浸膏粉和硝酸钾能很好地促进菌丝体的生长,碳氮源是微生物生长所必须的营养物质,碳氮源的种类不仅影响微生物的生长,还会影响多糖等代谢产物的合成。液体培养的周期比固体培养时间大大缩短,而生物量达到 $30.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上,且发酵产生的菌丝体呈白色,味清香,可以加入到面食糕点中,提高营养价值。

利用最陡爬坡试验及响应面分析法,对解决优化发酵工艺,获得高产量的蛹虫草菌丝体的问题,具有重要的意义和广泛的应用前景,同时这种工艺可在其他微生物发酵过程中得到广泛应用。

参考文献:

- [1] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. *Dictionary of Fungi* [M]. 9th ed. Wallingford Oxon: CAB International,

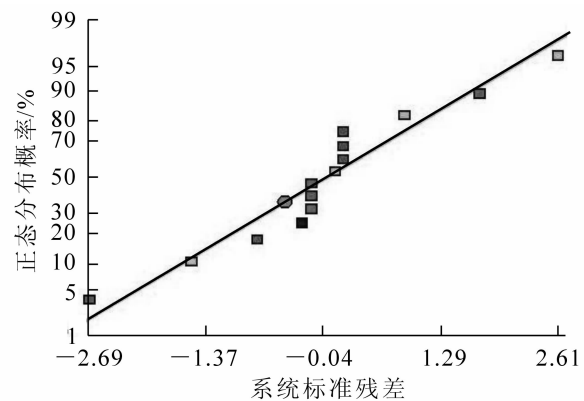


图3 中心组合试验失拟性分析图

Figure 3 Normal plot of residuals

- 2001: 655 – 657.
- [2] 温鲁, 尹起范, 唐玉玲. 蚕虫草与有关虫草活性成分检测比较[J]. 食品科学, 2004, **25**(8): 155 – 157.
WEN Lu, YI Qifan, TANG Yuling. Assay and comparison of the effective compositions produced in *Cordyceps militaris* (*Bombyx Mori*) [J]. *Food Sci*, 2004, **25**(8): 155 – 157.
- [3] 张雪超, 王云. 蛹虫草栽培技术[J]. 吉林林业科技, 2009, **38**(2): 56 – 57.
ZHANG Xuechao, WANG Yun. *Cordyceps* cultivation techniques [J]. *J Jilin For Sci Technol*, 2009, **38**(2): 56 – 57.
- [4] 李昊, 吴百昌, 李春兰. 蛹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] 王战勇, 张建东. 北冬虫夏草液体培养基的研究[J]. 辽宁石油化工大学学报, 2004, **24**(1): 19 – 25.
WANG Zhanyong, ZHANG Jiandong. Liquid culture medium of *Cordyceps militaris* [J]. *J Liaoning Univ Petrole & Chem Technol*, 2004, **24**(1): 19 – 25.
- [6] MASUDA M, URABE E, HONDA H, *et al.* Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **40**(5): 1199 – 1201.
- [7] 周洪波, 肖升木, 阮承超, 等. 蛹虫草液体的深层发酵研究[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2006, **37**(6): 1098 – 1102.
ZHOU Hongbo, XIAO Shengmu, RUAN Chengchao, *et al.* Submerged fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. *J Cent South Univ Sci Technol*, 2006, **37**(6): 1098 – 1102.
- [8] 张绪璋. 北冬虫夏草的人工培植及其营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2003, **22**(2): 19 – 21.
ZHANG Xuzhang. The artificial culture and its nutrition composition of *Cordyceps militaris* (L. Fr.) Link [J]. *Edible Fungi China*, 2003, **22**(2): 19 – 21.
- [9] 侯友松, 周广麒, 于玲, 等. 麦芽汁培养基中蛹虫草液体发酵的研究[J]. 大连轻工业学院学报, 2000, **19**(4): 271 – 273.
HOU Yousong, ZHOU Guangqi, YU Ling, *et al.* Deep fermentation of *Cordyceps militaris* in wort medium [J]. *J Dalian Inst Light Ind*, 2000, **19**(4): 271 – 273.
- [10] 王国栋. 冬虫夏草类生态培植应用[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1995: 168 – 171.
- [11] 梁宗琦. 我国虫草属真菌的研究开发的现状与思考[J]. 食用菌学报, 2001, **8**(2): 53 – 62.
LIANG Zongqi. Current situation and ponderation of *Cordyceps* Fr. research and exploitation in China [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2001, **8**(2): 53 – 62.
- [12] 温鲁, 夏敏, 宋虎卫, 等. 液体培养蛹虫草虫草素和腺苷的代谢量[J]. 微生物学通报, 2005, **32**(3): 91 – 94.
WEN Lu, XIA Min, SONG Huwei, *et al.* The metabolism yield of cordycepin and adenosine in *Cordyceps militaris* by liquid culture [J]. *Microbiol China*, 2005, **32**(3): 91 – 94.
- [13] 宋越冬. 蛹虫草鲁山株 C0511 菌丝液体培养条件[J]. 食用菌学报, 2010, **17**(1): 48 – 50.
SONG Yuedong. Optimization of selected parameters affecting mycelium production by *Cordyceps militaris*, strain Lu Shan C0511, in submerged culture [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2010, **17**(1): 48 – 50.
- [14] 尹萍, 涂艳丽, 王飞, 等. 北虫草液体发酵培养基优化研究[J]. 江西农业学报, 2006, **18**(4): 102 – 103.
YIN Ping, TU Yanli, WANG Fei, *et al.* Study on optimization of culture medium of *Cordyceps militaris* fermentation [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2006, **18**(4): 102 – 103.
- [15] 顾寅钰, 张亚平, 陈传杰, 等. 蛹虫草培养基碳源和氮源对菌丝生长量的影响[J]. 山东农业科学, 2008(7): 77 – 79.
GU Yinyu, ZHANG Yaping, CHEN Chuanjie, *et al.* Effects of carbon and nitrogen sources in culture medium on growth amount of *Cordyceps militaris* hyphae [J]. *Shandong Agric Sci*, 2008(7): 77 – 79.
- [16] 陈晋安, 黄浩, 郑忠辉, 等. 蛹虫草液体发酵条件的研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2001, **6**(3): 219 – 222.
CHEN Jinan, HUANG Hao, ZHENG Zhonghui, *et al.* A study on liquid fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. *J Jimei Univ Nat Sci*, 2001, **6**(3): 219 – 222.
- [17] 毛永强, 李娜. 虫草发酵培养基研究[J]. 山西农业科学, 2009, **37**(11): 20 – 22.
MAO Yongqiang, LI Na. Study on the fermentation culture medium of caterpillar fungus [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2009, **37**(11): 20 – 22.
- [18] 徐方旭, 刘诗扬, 王升厚. 蛹虫草液体菌株培养基的优化[J]. 北方园艺, 2011(4): 199 – 201.

- XU Fangxu, LIU Shiyang, WANG Shenghou. Liquid medium for optimization of *Cordyceps militaris* [J]. *Northern Horticult*, 2011(4): 199 – 201.
- [19] 宋越冬. 蛹虫草鲁山株 C0511 菌丝液体培养基筛选试验[J]. 河南农业科学, 2010(12): 107 – 110.
SONG Yuedong. Selection of submerged culture medium for *Cordyceps militaris* strain Lushan C0511 [J]. *J Henan Agric Sci*, 2010(12): 107 – 110.
- [20] 王智文. 多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)Cp-S316 抗真菌活性物质的发酵、分离纯化与性质研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
WANG Zhiwen. *Fermentation, Isolation, Purification and Properties of Antifungal Active Substances Produced by Paenibacillus polymyxa Cp-316* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2007.
- [21] ZHANG Nan, QI Zeming, DUAN Huiguo, *et al.* Optimization of medium composition for production of antifungal active substance from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112 [J]. *Afri J Microbiol Res*, 2012, **6**(1): 71 – 80.
- [22] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药: 抗生素分册, 1999, **20**(2): 58 – 60, 66.
CHU Yiwen. Medium optimization method and OPTI software to optimize the microbial culture [J]. *World Notes Anti*, 1999, **20**(2): 58 – 60, 66.
- [23] AMBAT P, AYYANNA C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method [J]. *World J Microbiol & Biotechnol*, 2001, **17**: 331 – 335.
- [24] 张大皓, 谭天伟, 王炳武. 响应面试验设计优化脂肪酶发酵培养基[J]. 北京化工大学学报, 2006, **33**(2): 41 – 45.
ZHANG Dahao, TAN Tianwei, WANG Bingwu. Response surface analysis of lipase production by *Penicillium camembertii* Thom [J]. *J Beijing Univ Chem Technol Nat Sci Ed*, 2006, **33**(2): 41 – 45.
- [25] 蔡友华, 范文霞, 刘学铭, 等. 响应面法优化巴西虫草发酵培养基的研究[J]. 食用菌学报, 2007, **14**(2): 55 – 59.
CAI Youhua, FAN Wenxia, LIU Xueming, *et al.* Study on the optimization of medium of Brazil *Cordyceps* fermentation by response surface method [J]. *Acta Edul Fung*, 2007, **14**(2): 55 – 59.
- [26] 周广麒, 戴娜. 响应面法优化虫草培养的研究[J]. 中国酿造, 2011(1): 112 – 115.
ZHOU Guangqi, DAI Na. Optimization of cultivation conditions for *Cordyceps* by response surface methodology [J]. *China Brewing*, 2011(1): 112 – 115.
- [27] 李珺. 响应面法优化蛹虫草深层发酵工艺[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报, 2012, **25**(6): 32 – 34.
LI Jun. Optimization of *Cordyceps militaris* fermentation process by response surface method [J]. *J Heilongjiang Vocat Inst Ecol Eng*, 2012, **25**(6): 32 – 34.
- [28] 刘苗苗, 宁尚勇, 崔西勇, 等. 响应面法优化蛹虫草液体培养条件[J]. 中国农学通报, 2008, **24**(5): 127 – 131.
LIU Miaomiao, NING Shangyong, CUI Xiyong, *et al.* Optimization of submerged culture condition for *Cordyceps militaris* using response surface methodology [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2008, **24**(5): 127 – 131.