冬虫夏草与韩芝液体混合发酵条件研究

武忠伟[1]，赵新亮[2]，窦艳萍[1]，赵现方[1]
(1.河南科技学院生物工程系,河南 新乡 453003; 2.河南科技学院农学系,河南 新乡 453003)

摘 要：平板培养基上比较了冬虫夏草、韩芝及树舌的菌丝生长速度和对淀粉的利用情况，结果显示三者的生长速度分别达到1.28、0.64和0.55cm/d，且韩芝与树舌对淀粉的利用均优于冬虫夏草；混合培养结果得出菌种的最佳菌龄比为虫草:韩芝=3d:5d，最佳的接种比例为2:3；正交试验混合发酵最佳的培养基配方为(%)：葡萄糖1.0 、淀粉2.0、黄豆粉2.0、酵母粉0.5。在此条件下，菌丝生物量达到最大值1.97g/100ml。

关键词：冬虫夏草；韩芝；混合培养

Study on Submerged Mixed Fermentation Condition of *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma lucidum* HG

WU Zhong-wei[1], ZHAO Xin-liang[2], DOU Yan-ping[1], ZHAO Xian-fang[1]
(1. Department of Bioengineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;
2. Department of Agriculture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The mycelium growth speed and the decomposition ability to starch of *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum* HG and *Ganoderma applanatumuan* were compared on the flat medium. It was found that their mycelium growth speed reached 1.28 cm/d, 0.64 cm/d, 0.55 cm/d respectively, and the utilization ability to the starch *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatumuan* were superior to *Cordyceps sinensis*. The mixed culture results showed the optimum inoculation age of *Cordyceps sinensis* to *Ganoderma lucidum* HG was 3 d to 5 d, also the optimum inoculation proportion of *Cordyceps sinensis* to *Ganoderma lucidum* HG was 2:3; The best fermentation medium was tested by orthogonal design, and the the optimum nutrient ingredients combination (%): glucose 1.0, starch 2.0, soya flour 2.0, and yeast extract 0.5. on these conditions, the verification experimental results showed and the maximal biomass is 1.97 g/100 ml.

Key words: *Cordyceps sinensis*; *Ganoderma lucidum* HG; mixed culture
中图分类号：Q815 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0307-04

人工冬虫夏草菌丝体和发酵液的理化性质研究表明：虫草含有多种功能性有效成分，如对病菌有抑制作用的虫草菌素、有抗癌作用的生物多糖和对人体有益的腺甙类、麦角甾醇类、多肽类、甘露醇、多糖、有机酸、多胺、磷脂酰胆碱、微量元素及VB_{12}等成分[1-3]。它们的生理活性极其丰富，可抗菌、抗癌、抗血小板凝结、抗辐射、改善和提高记忆力、调节机体免疫能力、钙离子拮抗、对脑和心脏在常压缺氧下有保护作用、镇静和镇痛等[4-6]。同时，灵芝也具有丰富的营养成分，含有人体必需的氨基酸、脂肪酸、微量元素等，是影响人体健康的膳食纤维的很好来源。药理研究也表明灵芝对人体免疫系统、神经系统、心血管系统等均有很好的调节作用[7]。在培养过程中发现虫草菌最适碳氮比为3.0:1～4.0:1，而灵芝菌最适碳氮比则与一般食用菌相似20:1～25:1，混合培养过程中能够充分利用虫草菌剩余的碳素营养，提高菌体得率[8]。

为此，本实验以冬虫夏草与韩芝的生长量为指标，优选冬虫夏草生长混合发酵的最佳的培养条件和混合发酵培养基，为利用冬虫夏草与韩芝混合发酵提供新的技术途径，并进而对所产生新型共酵多糖和二者的混合特性加以研究，为开发出高生物活性的功能型生物制品提供途径[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*，简称虫草)、韩芝(*Ganoderma lucidum* HG)、树舌灵芝(*Ganoderma applanatumuan*)均由本实验室保藏。

收稿日期：2007-07-25
基金项目：河南科技学院重点科研项目(5048)
作者简介：武忠伟（1979-），男，硕士，主要从事应用微生物学研究。E-mail：wuzhongwei0417@sina.com

1.1.2 供试培养基

斜面和平板培养基(%)：土豆20，蛋白胨0.5，酵母膏0.5，KH_2PO_4 0.1，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05，VB_1 0.001～0.005，琼脂2.0，pH自然。用于活化菌种和生长速度测定。

冬虫夏草发酵基础培养基(%)：葡萄糖1.2，玉米粉1.5，黄豆粉2.0，酵母膏0.57，麦芽汁1.0，pH6.4。

灵芝液体培养液(%)：大豆粉1.5，淀粉1.0，葡萄糖2.0，KH_2PO_4 0.3，$MgSO_4$ 0.15。

混合发酵液体培养液(%)：玉米粉1.5，大豆粉1.2，酵母粉0.5，葡萄糖1.0，KH_2PO_4 0.3，$MgSO_4$ 0.15。

可溶性淀粉培养基(%)：可溶性淀粉2.0，蛋白胨0.2，KH_2PO_4 0.15，$MgSO_4$ 0.1，KCl 0.01，$CaCl_2$ 0.05，琼脂2.0。用于测试不同菌株对淀粉的利用能力。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备

将斜面菌种活化2～3次，取培养4d的斜面菌种刮取菌苔，用无菌生理盐水稀释成菌悬液，备用。

1.2.2 摇瓶发酵培养

各组实验均取250ml锥形瓶若干，编号后，分别加入上述摇瓶培养基80ml于121℃灭菌20min，冷却后分别接种种子液5ml；培养温度24℃；静置培养1d后，振荡培养6～8d，摇床转速160r/min[10]。

1.2.3 观察与测定

对于已经接种好的发酵液，在摇床上培养需每天观察其菌丝球的生长情况，发酵液的特性，不同混合方式下的菌丝产生的情况。

1.2.4 菌丝体干重的测定

收取的发酵醪以2500r/min离心或过滤获得菌丝球，70℃烘干至恒重，以每100ml发酵醪中菌丝体干重(g/100ml)计。

1.2.5 染菌检测

观察发酵液的色泽、气味、固液相状况；培养液涂片，棉兰染色后镜检。同时，用牛肉膏蛋白胨培养基培养24～48h检查。

2 结果与分析

2.1 不同菌株的平板培养特性

由表1可以看出，在平板培养基上树舌的生长速度明显高于韩芝和虫草，分别为1.28、0.64和0.55cm/d，它们的宏观特征也有所不同；韩芝与虫草生长速度相近，能够平衡生长，因此初步确定用韩芝与虫草进行混合培养的研究。

2.2 不同菌株在淀粉培养基上生长特性的比较

由表2可以看出，在淀粉培养基上虫草、韩芝及树舌菌丝均可良好生长，但树舌菌丝的生长速度明显高于韩芝和虫草；三个菌株在该培养基上的菌落特征特别是透明圈大小说明，树舌及韩芝对淀粉的利用能力较

表1 不同菌株平板培养特性的比较

Table 1 Comparaison of flat culture characters of different strains

菌 株	生长速度(cm/d)	宏观特征	微观特征
虫 草	0.55	菌丝白色绒毛状，菌苔较厚，背面紫红色	单核菌丝，无锁状联合
韩 芝	0.64	菌丝淡黄色，蔓延平坦，菌落较薄，放射状	双核菌丝，有锁状联合
树 舌	1.28	菌丝白色，生长迅速，表面不平整	双核菌丝，有锁状联合
虫草+韩芝	0.55+0.65	特征分别同上，生长较平衡	特征分别同上
虫草+树舌	0.56+1.20	特征分别同上，树舌菌丝生长快，二者生长不平衡	特征分别同上

表2 不同菌种在淀粉培养基上的生长特性比较

Table 2 Comparaison of culture characters of different strains on starch medium

菌 株	生长速度(cm/d)	培养特征
虫 草	0.41	菌落白色，背面紫红色，菌丝绒毛状，稀疏，蓬松，较缓慢，透明圈较小
韩 芝	0.58	菌落淡黄色，较平整，菌丝匍匐生长，致密，速度较快，透明圈明显，较大
树 舌	1.09	菌落淡黄色，平整，菌丝匍匐生长，致密，生长速度快，透明圈明显，很大

表3 不同菌龄菌种混合培养特性

Table 3 Mixed culture characters of different inoculation age strains

菌种菌龄 虫草(d):韩芝(d)	发酵情况	显微镜观察	菌丝干重 (g/100ml)
3:3	发酵液2d后变粘，开始淡黄色，5d后变紫红色，7d呈红褐色	绝大多数为单核菌丝，仅有少量双核菌丝	1.35
3:4	发酵液2d后变粘，淡黄色， 6d后呈紫红色	多数为单核菌丝，双核菌丝明显增多	1.43
3:5	发酵液2d后变粘，淡黄色，5d后变为淡红色	单核菌丝与双核菌丝大致相当	1.89
3:6	发酵液2d后变粘，之后呈淡黄色，菌丝球生长较均匀	双核菌丝较单核菌丝多	1.69
3:7	发酵液2d后变粘，之后呈淡黄色，菌丝球较小，均匀	主要为双核菌丝，少量为单核菌丝	1.49

强，而虫草的利用能力较弱。所以，在混合培养基的碳源选择时以淀粉和葡萄糖作为混合碳源。

2.3 不同液体菌种种龄对混合培养的影响

以不同菌龄的虫草和韩芝的液体菌种等比例接种，振荡培养的结果表明，接种菌种的菌龄对混合培养的生长量有明显的影响，其中用培养3d的虫草菌种与培养5d的韩芝菌种接种时，菌丝干重达到最高水平1.89g/100ml。以有无锁状联合为鉴定二者菌丝的形态特征，表明在上述同样同样条件下，二者菌丝能达到生长平衡。

2.4 不同接种比例对混合培养的影响

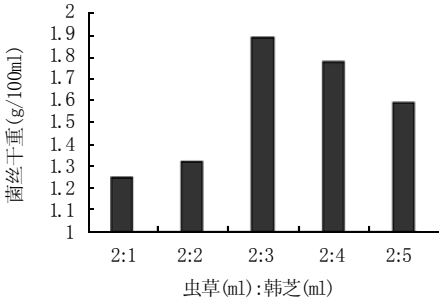


图1 不同接种比例对混合培养的影响

Fig.1 Effects of different inoculation ratios on mixed culture

用培养4d的虫草和韩芝菌种以不同比例接种进行混合培养，结果表明不同接种比例对菌丝生物量有显著影响，在虫草菌种与韩芝菌种接种比例为2:3时，菌丝生物量达到最大值1.87g/100ml。

2.5 混合发酵培养基的优化

表4 $L_9(3^4)$正交试验因素水平(g/100ml)

Table 4 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test (g/100 ml)

水平	因素			
	A 葡萄糖	B 淀粉	C 黄豆粉	D 酵母粉
1	0.5	1.0	1.0	0.1
2	1.0	1.5	1.5	0.3
3	1.5	2.0	2.0	0.5

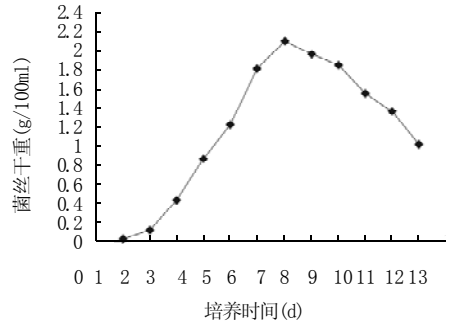


图2 优化培养条件下混合培养的生长曲线

Fig.2 Growth curve of mixed culture on optimal conditions

表5 $L_9(3^4)$正交试验结果和极差分析

Table 5 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal tests and analysis of range

试验批次	试验因素(%)				试验结果(g/100ml)		
	A	B	C	D	T_1	T_2	T_1+T_2
1	0.5	1.0	1.0	0.1	1.03	1.10	2.13
2	0.5	1.5	1.5	0.3	1.31	1.35	2.66
3	0.5	2.0	2.0	0.5	1.69	1.64	3.33
4	1.0	1.0	2.0	0.3	1.82	1.79	3.61
5	1.0	1.5	1.0	0.5	1.97	1.92	3.89
6	1.0	2.0	1.5	0.1	1.87	1.76	3.63
7	1.5	1.0	1.5	0.5	1.89	1.79	3.68
8	1.5	1.5	2.0	0.1	1.75	1.80	3.55
9	1.5	2.0	1.0	0.3	1.82	1.69	3.51
K_1	8.12	8.97	9.53	9.31	15.15	14.84	29.99
K_2	11.13	10.10	9.97	9.78			
K_3	10.74	10.47	10.49	10.90			
R	3.01	1.50	0.96	1.59			

从表5中的R值可以看出，不同营养成分对混合培养的影响次序为A＞D＞B＞C，最佳配方为$A_2B_3C_3D_3$，即(%)：葡萄糖1.0g、淀粉2.0g、黄豆粉2.0g、酵母粉0.5g。

2.6 优化条件下混合培养特性

在上述优化培养基的条件下，实验了冬虫夏草与韩芝的混合培养情况，得出混合培养至第7d时，菌丝生物量达到最大值1.97g/100ml。

3 结 论

3.1 在平板培养基上比较了冬虫夏草、韩芝及树舌的生长情况，发现树舌的生长速度明显高于韩芝和虫草，分别为1.28、0.64和0.55cm/d，且它们的菌丝性状也有所不同，其中韩芝与虫草能够平衡生长；在淀粉培养基上比较了冬虫夏草、韩芝及树舌的生长速度和生长情况，结果显示树舌及韩芝对淀粉的利用要优于冬虫夏草。

3.2 不同种龄的液体菌种按等比例接种结果表明，二者菌龄比虫草:韩芝为3d:5d时能达到平衡生长，生物量达到最大；不同接种比例的混合培养结果表明，接种比例虫草:韩芝为2:3时最佳。

3.3 正交试验比较了不同培养基成分对混合培养的影响。结果表明：影响因素的次序为A＞D＞B＞C，最佳配方为$A_2B_3C_3D_3$，即(%)：葡萄糖1.0g、淀粉2.0g、黄豆粉2.0g、酵母粉0.5g。在此条件下，在混合培养至第7d时，菌丝生物量达到最大值1.97g/100ml。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：第二部[M]. 北京：化学工业出版社, 2005.

[2] KAWAGUCHI N, OHMORI T, TAKESHITA Y, et al. Occurrence of Gal beta(1-3)GalNAc-Ser/Thr in the linkage region of polygalactosamine containing fungal glycoprotein from *Cordyceps ophioglossoides*[J]. Biochems Biophys Res Commun, 1986, 140(1):350.

[3] KIHO T, HUI J, YAMANE A, et al. Polysaccharides in fungi XXXⅡ hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Biol Pharm Bull, 1993, 16(12): 1292-1293.

[4] KIHO T, OOKUBO K, USUI S, et al. Structual features and hypoglycemic activity of a polysaccharides (CS-F10) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*[J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(9): 966-970.

[5] KIHO T, YAMANE A, HUI J, et al. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(2): 294-296.

[6] 李绍平, 李晖, 李萍, 等. 冬虫夏草抗肿瘤作用研究[J]. 中草药, 2001, 32(4): 373-374.

[7] 马礼金, 姚汝华. 灵芝的药用及食用研究[J]. 食品与发酵工业, 1997, 24(1): 62-63.

[8] 王兴红, 李旗德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J]. 中草药, 2001, 32(3): 267-268.

[9] 刘美琴, 李建中, 孔繁柞. 灵芝多糖的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3): 173-175.

[10] 董彩虹. 冬虫夏草研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 195-197.