

咖啡基质培养蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的初步研究

何朝鼎^{1,2} 王中煜¹ 罗祥志¹ 管毓虎^{1,2} 王 珪^{*1} 龙庆德¹

1. 贵州医科大学 贵州 贵阳 561113

2. 贵州省高等学校道地药材慢性病防治工程研究中心 贵州 贵阳 561113

摘要:目的 旨在对咖啡基质培养蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的方法进行初步研究,并获得其最优发酵条件。方法 对咖啡基质培养的蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的生物量进行显著性分析,筛选出影响两种虫草生物量的三个主要因素;运用 Box-Behnken 试验设计及响应面分析法分别确定蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的最优发酵条件;测定多糖、甘露醇、总黄酮和类胡萝卜素四种活性成分。结果 响应面分析得到蛹虫草菌丝体的最优发酵条件为:温度 26.0 ℃、接种量 6.7 mL、装瓶量 132.8 mL。蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体的最优发酵条件为:温度 26.1 ℃、装瓶量 152.6 mL、咖啡粉含量 1.2 g/L。除甘露醇外,咖啡基质培养的蛹虫草菌丝体的多糖、总黄酮和类胡萝卜素含量明显多于基础液体培养基培养的蛹虫草菌丝体;而咖啡基质培养的蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体的总黄酮和类胡萝卜素含量明显多于基础液体培养基培养的蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体。结论 咖啡基质可促进蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草活性成分的积累,本研究为规模化培育药用价值较高的蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体提供参考。

关键词:蛹虫草;蝙蝠蛾鳞翅虫草;液体发酵;响应面法;活性成分

Preliminary study on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* and *Samsoniella hepiali* with Coffee substrate

Chaoding He^{1,2} Zhongyu Wang¹ Xiangzhi Luo¹ Yuhu Guan^{1,2} Yao Wang^{*1} Qingde Long¹

1. Guizhou Medical University.

2. University Engineering Research Center for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases by Authentic Medicinal Materials in Guizhou Province, Guizhou Guiyang 561113.

Abstract: Objective The aim was to conduct a preliminary study on the method of coffee substrate culture of *Cordyceps militaris* and *Samsoniella hepiali* and to obtain their optimal fermentation conditions. Methods The biomass of *Cordyceps militaris* and *Samsoniella hepiali* cultured in coffee substrate was analyzed for significance, and three main factors affecting the biomass of the two species were screened out; the optimal fermentation conditions of *Cordyceps militaris* and *Samsoniella hepiali* were determined by using Box-Behnken design of experiments and response surface analysis, respectively; and the four active ingredients, namely, polysaccharides, mannitol, total flavonoids, and carotenoids, were determined. Results The optimal fermentation conditions for *Cordyceps militaris* mycelium were as follows: temperature 26.0 ℃, inoculum volume 6.7 mL, and bottling volume 132.8 mL, while the optimal fermentation conditions for *Samsoniella hepiali* mycelium were as follows: temperature 26.1 ℃, bottling volume 152.6 mL, and the content of coffee powder 1.2 g/L. In addition to mannitol, the content of polysaccharides, total flavonoids, and carotenoids was significantly higher than that of the basal mycelia of *Cordyceps militaris* cultured in coffee substrate. In addition to mannitol, the content of polysaccharides, total flavonoids and carotenoids of *Samsoniella hepiali* mycelium cultured in coffee substrate was significantly more than that of *Cordyceps militaris* cultured in basal liquid medium, while the content of total flavonoids and carotenoids of *Samsoniella hepiali* cultured in coffee substrate was significantly more than that of *Samsoniella hepiali* cultured in basal liquid medium. Conclusion Coffee substrate can promote the accumulation of active components of *Cordyceps militaris* and *Samsoniella hepiali*, and this study provides a reference for the large-scale cultivation of *Cordyceps militaris* and *Samsoniella hepiali* mycelium with high medicinal value.

Key Words: *Cordyceps Militaris*; *Samsoniella Hepiali*; Liquid Fermentation; Response Surface Methodology; Active Ingredients

引言:

蛹虫草 *Cordyceps militaris* 作为一种昆虫病原真菌,现代研究证实蛹虫草有抗肿瘤、抑制流感病毒,对辐射损伤的保护及抗炎等多种药理作用^[1]。蝙蝠蛾鳞翅虫草 *Samsoniella hepiali* 原名蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali*, 该虫草的菌丝体与天然冬虫夏草的主要成分、药理作用基本相似,具有增强免疫力,抗菌消炎,保护肺、肝、肾和睾丸等器官,抑制肿瘤,预防和治疗心脑血管疾病、糖尿病和抑郁症等功效^[2]。蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草作为重要的真菌资源,拥有极大的食药用价值。然而,目前这两类虫草产品主要以初级原料形式存在,产品附加值较低,

开发高附加值产品是未来虫草产业化发展大趋势。咖啡含有丰富的油脂、糖类和蛋白质^[3],对于食用菌的栽培可起到良好的辅助效果。就以往研究来看,利用咖啡渣栽培金针菇、平菇、灵芝等都获得良好效果^[3-5]。本研究利用咖啡豆培育蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草,筛选最优培养条件,旨在提高这两种虫草的功效成分,为其深加工和另类开发提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验使用的所有菌种信息见表 1。

表 1 菌种信息

| 菌种 | 菌株原始编号 | 采集地点 |
|---------|--------|----------|
| 蛹虫草 | YN-HP | 云南, 水富 |
| | YNY | 云南, 水富 |
| | NY288 | 贵州, 纳雍 |
| | NY308 | 贵州, 纳雍 |
| | NY32 | 贵州, 纳雍 |
| | Sa34 | 越南, 帕萨 |
| 蝙蝠蛾鳞翅虫草 | 822 | 云南, 白马雪山 |
| | 823 | 云南, 白马雪山 |
| | 824 | 云南, 白马雪山 |

1.2 培养基

斜面培养基: PDA 培养基。

基础液体培养基: 土豆 200 g/L (煮汁), 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, KH_2PO_4 2g/L, MgSO_4 1g/L, 维生素 B_1 0.05 g/L, 介质为水, pH 自然。

1.3 主要仪器

BBS-DDC 超净工作台 (济南鑫贝生物技术有限公司); BJPX11502209090 生化培养箱 (山东博科科学仪器有限公司); UV-1900PC 紫外/可见分光光度计 (上海美析仪器有限公司); MLS-3750 高压灭菌器 (三洋物产贸易 (上海) 有限公司); FA-2004B 电子天平 (绍兴博纬仪器设备有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 优质菌株的筛选

将虫草真菌接种于 PDA 固体培养基上, 24℃ 恒温培养 7 d。根据菌落的形态特征 (如: 大小、颜色、形状等) 进行筛选, 确定最优蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌株。

1.4.2 孢子悬液的制备

将筛选后的蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草接种于 PDA 固体培养基上培养 14 d, 温度 24℃。用无菌水洗下已活化的菌株孢子并配成 1×10^7 个/mL 的孢子悬液。

1.4.3 蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体的培养及其生物量的测定

按照表 2 的接种量将孢子悬液接种于装有相应体积的已灭菌冷却的咖啡液体培养基锥形瓶中, 采用静置培养的方式, 温度和培养时间根据具体实验要求确定。液体发酵结束后, 将发酵液过滤。菌丝体沉淀经去离子水清洗 3 次、45℃ 烘干, 用于蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的测定。

1.4.4 液体培养条件优化

1.4.4.1 显著性分析

采用 SPSS 27.0.1 和 Excel 2019 软件对蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体经咖啡培养基培养后的生物量进行统计和显著性分析。

1.4.4.2 Box-Behnken 试验设计

根据显著性分析结果筛选的三个显著因素, 利用 Box-Behnken 中心组合设计原理, 对咖啡基质培养蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体的条件进行三因素三水平的响应面分析试验。

1.4.4.3 模型拟合和验证

对 Box-Behnken 试验所得数据进行回归方程拟合

表 2 蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体单因素培养条件的优化

| 变量 | 梯度 | | | | 时间 | 温度 | 接种量 | 装瓶量 | 咖啡粉含量 |
|-------|---------|---------|---------|--------|-----|-------|-------|---------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | | |
| 时间 | 30d | 35d | 40d | - | - | 24.0℃ | 5.0ml | 150.0ml | 1.2g/L |
| 温度 | 24.0℃ | 26.0℃ | 28.0℃ | 30.0℃ | 30d | - | 5.0ml | 150.0ml | 1.2g/L |
| 接种量 | 3.0ml | 5.0ml | 7.0ml | - | 30d | 24.0℃ | - | 150.0ml | 1.2g/L |
| 装瓶量 | 100.0ml | 125.0ml | 150.0ml | - | 30d | 24.0℃ | 5.0ml | - | 1.2g/L |
| 咖啡粉含量 | 0g/L | 0.6g/L | 1.2g/L | 1.8g/L | 30d | 24.0℃ | 5.0ml | 150.0ml | - |

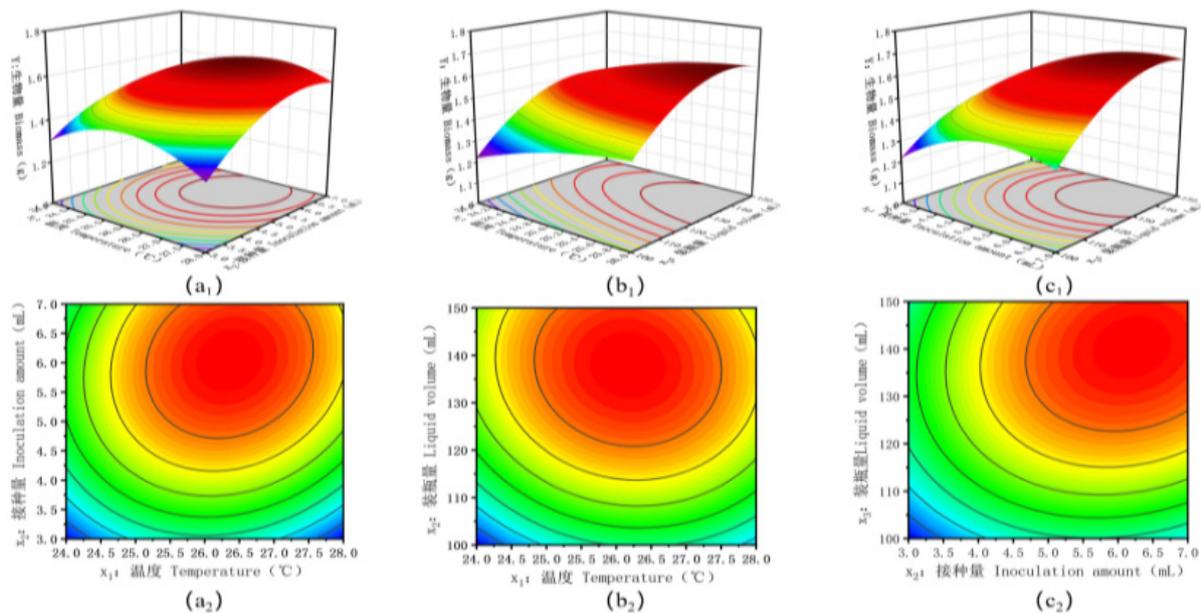


图 1 交互作用影响蛹虫草生物量的响应面图及等高图

注：a₁. 温度和接种量影响蛹虫草生物量的响应面图 b₁. 温度和装瓶量影响蛹虫草生物量的响应面图 c₁. 接种量和装瓶量影响蛹虫草生物量的响应面图

a₂. 温度和接种量影响蛹虫草生物量的等高图 b₂. 温度和装瓶量影响蛹虫草生物量的等高图 c₂. 接种量和装瓶量影响蛹虫草生物量的等高图

和方差分析，确定显著因素最佳值。然后按照计算所得参数进行实验，验证模型的可靠性，确定优化结果。实验数据采用软件 Design Expert 13 处理分析。

1.4.5 活性成分测定

采用蒽酮-硫酸法测定总多糖；高碘酸钾比色法测定甘露醇；AlCl₃ 法结合三波长法测定总黄酮；参考娄海伟等^[6]和张晓薇等^[7]的方法测定虫草中类胡萝卜素的含量。

2 结果与分析

2.1 两种虫草优质菌株的最优选择

分别比较 6 种蛹虫草菌株和 3 种蝙蝠蛾鳞翅虫草的菌落平均直径和菌落生长状况，最终选定编号为 YNY 的蛹虫草菌株和 823 的蝙蝠蛾鳞翅虫草菌株用于后续的优化试验。

2.2 咖啡基质培养蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草条件优化

2.2.1 显著影响因素的筛选

通过显著性分析分别从五个培养条件中筛选出影响蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的三个主要因素，即蛹虫草培养条件的三个显著因素为温度，接种量，装瓶量；蝙蝠蛾鳞翅虫草培养条件的三个显著因素为温度，装瓶量，咖啡粉含量。

2.2.2 显著影响因素的响应面优化

2.2.2.1 蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草培养条件拟合分析

分别对上述三个显著性因素运用 Box-Behnken 设计方案，使用软件 Design Expert 13 对所得数据进行拟合分析，可以得到蛹虫草模型的回归方程： $Y=1.62+0.0277x_1+0.0983x_2+0.1228x_3+0.0294x_1x_2-0.0153x_1x_3+0.0350x_2x_3-0.1204x_1^2-0.1003x_2^2-0.1147x_3^2$ 。可以得到蝙蝠蛾鳞翅虫草模型的回归方程： $Y=1.91+0.0258x_1+$

$0.0861x_2+0.0033x_3-0.0265x_1x_2+0.0252x_1x_3-0.0291x_2x_3-0.2712x_1^2-0.4051x_2^2-0.3481x_3^2$ 。分别对该结果进行显著性检验和方差分析，即知上述两种模型对实验数据的拟合度均高，模型选择正确，能较好地预测蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量，且模型的可信度和精密度较高，预测值与实测值之间存在较好的相关性，响应面分析实验操作可信。综上，可以利用蛹虫草回归模型优化和预测温度、接种量和装瓶量对其生物量的影响；可以利用蝙蝠蛾鳞翅虫草回归模型优化和预测温度、装瓶量和咖啡粉含量对其生物量的影响。

2.2.2.2 蛹虫草培养条件响应面优化

各因素的交互作用对蛹虫草生物量的等高线与响应面见图 1。从等高线可以看出两个因素之间的交互作用的强弱，等高线越圆相互作用越弱，等高线椭圆形越明显，相互作用越强^[8]。从响应面曲线可以看出各因素对响应值（即蛹虫草生物量）的影响程度，曲面越陡，影响程度越大、越平坦，影响程度就越小^[9]。对比图 1(a₂) 与图 1(b₂)，可以发现温度与接种量的交互作用比

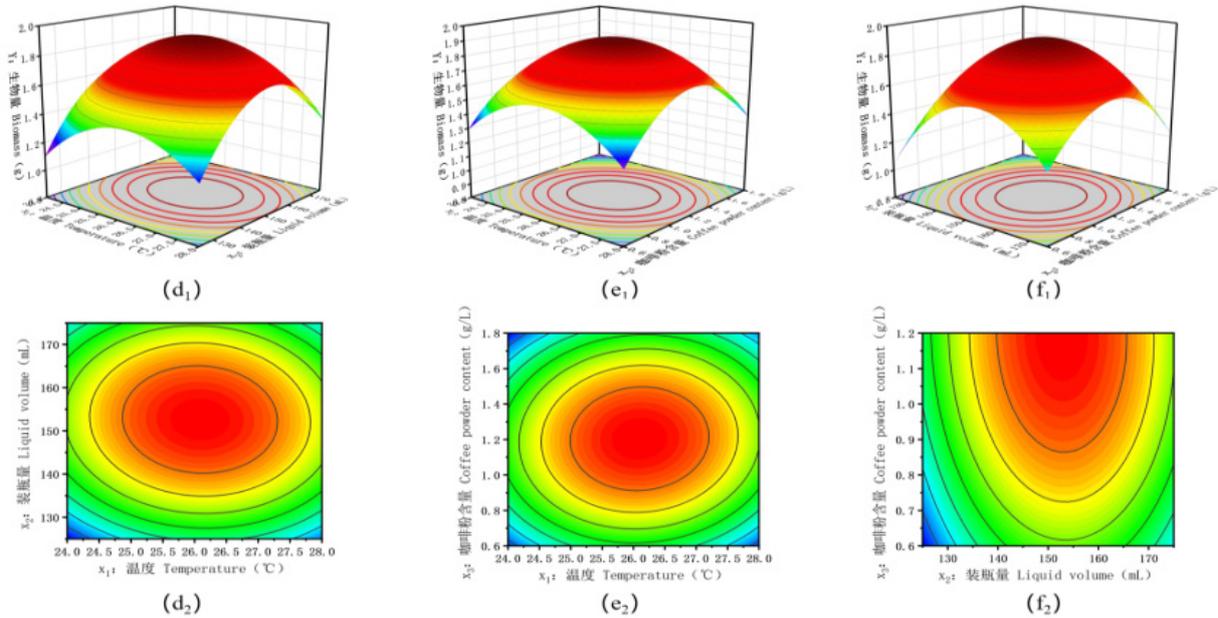


图2 交互作用影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的响应面图及等高图

注: d_1 . 温度和装瓶量影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的响应面图 e_1 . 温度和咖啡粉含量影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的响应面图

f_1 . 装瓶量和咖啡粉含量影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的响应面图

d_2 . 温度和装瓶量影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的等高图 e_2 . 温度和咖啡粉含量影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的等高图

f_2 . 装瓶量和咖啡粉含量影响蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的等高图

温度与装瓶量的交互作用更强, 从图 1(c_1) 可以看出装瓶量对蛹虫草生物量的影响程度比接种量大。综合比较图 a_1 –图 b_1 , 发现三个响应面均存在极值, 且存在极值的条件分别在曲面的最高点处; 经软件 Design Expert 13 进一步计算可得出最优培养条件, 即温度 26.0 °C、接种量 6.7 L、装瓶量 132.8 mL。在此条件下, 预测蛹虫草生物量有最大值, 为 1.6716 g/L。

2.2.2.3 蝙蝠蛾鳞翅虫草培养条件响应面优化

由图 2 (f_1) 可知, 装瓶量与咖啡粉含量的交互作用响应面图坡度较陡, 说明装瓶量与咖啡粉含量的交互作用较强, 对蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的影响显著; 温度与咖啡粉含量的交互作用响应面图坡度较缓, 说明这 2 个交互作用较弱, 对蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的含量影响较小 (见图 2 (e_1)); 从图 2 (d_2) 看出, 温度与接种量的等高图近圆形, 表明温度与接种量间的相互作用对蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的影响不显著。综合比较图 d_1 –图 f_1 , 发现三个响应面均存在极值, 且存在极值的条件分别在曲面的最高点处; 经软件 Design Expert 13 进一步计算可得出最优培养条件, 即温度 26.1 °C、装瓶量 152.6 mL、咖啡粉含量 1.2 g/L。在此条件下, 预测蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量有最大值, 为 1.9163 g/L。

2.2.3 验证实验

为检验响应面优化模型的可靠性及优化效果, 对其预测的优化条件进行验证实验。三次重复实验蛹虫草生物量的平均值为 1.6690 g/L, 与预测值 1.6716 g/L 接近; 蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的平均值为 1.9008 g/L, 与预测值 1.9163 g/L 接近, 说明本次优化的两种模型准确可靠。同初始发酵条件下蛹虫草生物量 1.1648 g/L 相比, 优化后蛹虫草生物量提高了 43.29%, 优化效果明显; 同初始发酵条件下蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量 1.6236 g/L 相比, 优化后蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量提高了 17.07%, 优化效果较明显。

2.3 咖啡基质培养蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的活性成分分析

蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草含有丰富的活性物质, 其中多糖、甘露醇、总黄酮、类胡萝卜素均为该两种虫草的主要活性成分。实验以这四种主要活性成分为指标, 考察咖啡基质培养蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体药用价值, 其结果如表 3 所示。实验结果表明, 适量的咖啡粉添加能够促进蛹虫草中虫草多糖、总黄酮和虫草酸等活性成分的积累, 并有助于蝙蝠蛾鳞翅虫草中总黄酮和类胡萝卜素活性成分的增加, 而这些活性成分具有抗氧化、提高免疫力的功效, 这预示着新的功能蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的开发培养潜力。

表 3 优化条件下蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的四种活性成分分析

| 菌株 | 培养基类型 | 虫草多糖, mg/mL | 甘露醇, mg/mL | 总黄酮, mg/mL | 类胡萝卜素, mg/mL |
|---------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|--------------|
| 蛹虫草 | 基础液体培养基 | 0.330±0.076 | 855.263±264.699 | 0.340±0.023 | 0.762±0.012 |
| | 0.6 g/L 咖啡液体培养基 | 0.370±0.070 | 721.207±107.960 | 0.341±0.036 | 0.815±0.064 |
| | 1.2 g/L 咖啡液体培养基 | 0.578±0.080 | 821.150±150.764 | 0.612±0.091 | 0.494±0.055 |
| | 1.8 g/L 咖啡液体培养基 | 0.776±0.181 | 851.118±209.307 | 0.869±0.179 | 0.431±0.090 |
| 蝙蝠蛾鳞翅虫草 | 基础液体培养基 | 0.318±0.013 | 322.770±23.265 | 0.277±0.025 | 0.273±0.044 |
| | 0.6 g/L 咖啡液体培养基 | 0.298±0.007 | 236.946±26.613 | 0.321±0.026 | 0.561±0.221 |
| | 1.2 g/L 咖啡液体培养基 | 0.252±0.028 | 247.497±92.350 | 0.331±0.031 | 0.451±0.142 |
| | 1.8 g/L 咖啡液体培养基 | 0.247±0.021 | 286.329±99.801 | 0.349±0.054 | 0.444±0.034 |

结 论：

本研究选取时间、温度、接种量、装瓶量和咖啡粉含量五个培养条件，考察其对蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的影响。通过显著性分析分别从五个培养条件中筛选出影响蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量的三个主要因素，即蛹虫草培养条件的三个显著因素为温度，接种量，装瓶量；蝙蝠蛾鳞翅虫草培养条件的三个显著因素为温度，装瓶量，咖啡粉含量。运用 Box-Behnken 试验设计及响应面分析法确定蛹虫草的三个主要因素的最优发酵条件为：温度 26.0 °C、接种量 6.7 L、装瓶量 132.8 mL；蝙蝠蛾鳞翅虫草的三个主要因素的最优发酵条件为：温度 26.1 °C、装瓶量 152.6 mL、咖啡粉含量 1.2 g/L。在最优条件下，蛹虫草生物量达到 1.6690 g/L，较未优化前提高了 43.29%；蝙蝠蛾鳞翅虫草生物量达到 1.9008 g/L，较未优化前提高了 17.07%。以多糖、甘露醇、总黄酮和类胡萝卜素四种主要活性成分为指标，考察咖啡基质培养的蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体药用价值。结果表明，适量的咖啡粉添加能够促进蛹虫草中虫草多糖、总黄酮和虫草酸等活性成分的积累，并有助于蝙蝠蛾鳞翅虫草中总黄酮和类胡萝卜素活性成分的增加，而这些活性成分具有抗氧化、提高免疫力的功效，这预示着新的功能蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草的开发培养潜力。综上，本研究为规模化培育药用价值较高的蛹虫草和蝙蝠蛾鳞翅虫草菌丝体提供了参考。

参考文献：

[1] 董彩虹, 李文佳, 李增智, 等. 我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言 [J]. 菌

物学报, 2016, 35(01):1-15. DOI:10.13346/j.mycosystema.150207.

[2] 孙涛, 李天昊, 黄偶, 等. 蝙蝠蛾鳞翅虫草 *Samsoniella hepiali* 模式菌株线粒体基因组系统发育分析 [J]. 菌物学报, 2022, 41(10):1572-1584. DOI:10.13346/j.mycosystema.220030.

[3] 荆留萍, 杜双田, 金凌云, 等. 8 种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38(11):156-160. DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2010.11.019.

[4] 鲁晓岩. 硫酸—苯酚法测定北冬虫夏草多糖含量 [J]. 食品工业科技, 2002, (04):69-70.

[5] 吕作舟. 食用菌 400 问——栽培保鲜加工菜谱 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

[6] 娄海伟, 余颖豪, 叶志伟, 等. 超声辅助提取蛹虫草类胡萝卜素工艺参数优化 [J]. 中国食品添加剂, 2018, (12):51-59.

[7] 张晓薇, 冯佳茵. 不同植物中类胡萝卜素的提取和含量比较 [J]. 光明中医, 2021, 36(23):3986-3988.

[8] YIN G H, DANG Y L. Optimization of extraction technology of the lycium barbarum polysaccharides by Box-Behnken statistical design [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74:603-610.

[9] 吴灿, 夏延斌, 唐鑫. 响应面法优化莲子黄酒的发酵工艺条件 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(07):1675-1679. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2013.07.041.

作者简介:何朝鼎(2004.12—)男,土家,贵州医科大学,大学本科在读,研究方向:贵州道地药材慢性病防治。

基金资助:贵州省教育厅高校科技成果转移转化服务乡村振兴示范基地项目“基于教育部科技成果转化基地的昆虫转化处理农业废弃物循环利用助力乡村振兴示范基地”(项目编号黔教技【2022】064号)