

冬虫夏草发酵条件的研究

孙琳杰,王宇平,李友广*

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:通过对冬虫夏草菌 Cs11 的深层发酵条件如 pH、接种量、装液量、转速及其培养基碳源、氮源和无机盐的研究,得出其最适培养条件为 24℃、170r/min、150mL/500mL、pH6.5,接种量 10%,菌丝生长的最佳培养基:葡萄糖 4%,豆饼粉 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%。发酵结果得到虫草菌丝粉中有效成分含量:腺苷 >0.16%;甘露醇 >8.0%。

关键词:冬虫夏草,深层发酵,甘露醇,腺苷

Study on fermented condition of *Cordyceps sinensis*

SUN Lin-jie, WANG Yu-ping, LI You-guang*

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The fermented conditions of *Cordyceps sinensis* including original pH, the quantity of inoculation, poured solution volume, rocking bed rate of rotation and medium composition including carbon sources, nitrogen sources and inorganic salt were studied. The results showed that the optimum fermented conditions were 24℃, 170r/min, pH6.5, inoculum quantity 10%. The optimum conditions were as follows: glucose 4%, bean cake 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%. The contents of the active components in *Cordyceps sinensis* were manna alcohol >8.0% and adenosine >0.16%.

Key words: *Cordyceps sinensis*; deep fermentation; manna alcohol; adenosine

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2008)04-0158-03

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)别名虫草、冬虫草、夏草冬虫,属于真菌门(*Eumycota*)、子囊菌亚门(*Ascomycotina*)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)、虫草属(*Cordyceps*),为一种寄生于鳞翅目昆虫蝙蝠蛾幼虫中所形成的虫生真菌^[1,2]。冬虫夏草是传统的名贵中药材,它除了具有滋补强身,补精益气,扶正固本之功效外,还具有舒筋活络、活血化癖、祛风散寒、解毒消炎、利水消肿、止血、抗癌、润肤美容等多种医疗保健作用^[3,4],目前已弄清的成分包括虫草多糖、蛋白和氨基酸、D-甘露醇、脂肪和脂肪酸、虫草素和生物碱、抗菌活性物质、微量元素、免疫抑制剂等^[5]。由于冬虫夏草有其严格的寄主性及特殊的生长环境,自然资源稀少,而且价格昂贵,为改变这一局面,可用冬虫夏草深层发酵的方法来生产菌粉。又因人工液体发酵生产的菌丝体和天然冬虫夏草的成分和药理基本相同,因此有必要研究虫草菌液体发酵技术,以最大限度地获得菌丝体和有效成分。本实验主要着重于研究冬虫夏草的最佳培养基组成及培养条件,据此设计合理的发酵工艺,提高菌体的生物量,使菌种处于最佳的产物合成状态。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期:2007-10-08 *通讯联系人

作者简介:孙琳杰(1983-),女,在读研究生,研究方向:食品科学。

冬虫夏草菌 Cs11 自编号,由虫草子座分离得到;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 斜面培养基:PDA 培养基;种子培养基:葡萄糖 20g,蛋白胨 5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g,麦麸 50g,水 1000mL, pH 自然(6.2~6.3);基础培养基:马铃薯 200g,蔗糖 20g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g,水 1000mL, pH 自然。

1.2.2 培养方法 将冬虫夏草菌接种于 PDA 斜面上,于 24~25℃ 下培养 5~6d,菌丝即可长满斜面;将新鲜的 Cs11 斜面菌种接种于种子培养基(装液量 20%)中,于 160r/min、24℃ 下振荡培养 48h,菌种变稠即可作为种子培养液以备用。

1.2.3 单因素对菌株 Cs11 发酵的影响

1.2.3.1 接种量的影响 分别以 1%、5%、10%、15% 的量接种,测定甘露醇和腺苷含量。

1.2.3.2 装液量的影响 在 500mL 三角瓶中分别装入 50、100、150、200、250、300mL 的基础培养基,测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.3.3 初始 pH 的影响 将初始 pH 调整为 4、5、6、7、8、9、10,测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.3.4 摇床转速的影响 转速分别为 150、160、170、180、190、200r/min,培养后测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.3.5 碳源的影响 在基础培养基中分别加入 2%

的葡萄糖、麦芽糖、乙酸钠、可溶性淀粉、蔗糖和玉米粉代替蔗糖作为碳源,测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.3.6 氮源的影响 在基础培养基中分别加入1%的蛋白胨、豆饼粉、酵母膏、氯化铵和硝酸铵代替马铃薯作为氮源,测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.3.7 KH_2PO_4 的影响 分别以0.05%、0.1%、0.15%、0.2%的量加入 K_2HPO_4 ,测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.3.8 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的影响 分别以0.025%、0.05%、0.075%、0.1%的量加入 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,测定甘露醇和腺苷的含量。

1.2.4 培养基配方正交实验 在1.2.3实验的基础上,进行正交实验,因素水平见表1。

表1 培养基配方正交实验因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	因素(%)			
	A 葡萄糖	B 豆饼粉	C KH_2PO_4	D $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1	3	1	0.10	0.050
2	4	2	0.15	0.075
3	5	3	0.20	0.100

1.2.5 培养条件正交实验 在1.2.3实验的基础上,进行正交实验,因素水平表见表2。

表2 培养条件正交实验因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	因素			
	A 接种量(%)	B 装液量(mL)	C pH	D 摇床转速(r/min)
1	5	100	5.5	150
2	7.5	150	6	160
3	10	200	6.5	170

1.2.6 甘露醇含量的测定方法 高碘酸盐法^[4]。

1.2.7 腺苷含量的测定方法 高效液相色谱法^[5]。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,7%乙腈溶液为流动相,检测波长为260nm,进样量为20 μL 。

1.2.8 菌体生物量的测定方法 细胞干重法。取一定量发酵液离心(4000r/min, 10min),收集菌体,鲜菌体105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重。

2 结果与讨论

2.1 单因素对菌株 Cs11 培养的影响

2.1.1 接种量对菌株 Cs11 培养的影响 接种量对菌体生长的影响表现为:接种量过小,菌体生长缓慢,发酵迟缓;接种量过大,则会因菌体生长过快而导致营养和氧气缺乏,从而影响菌体的生长。实验结果如表3所示,5%~10%接种量为 Cs11 菌株培养的最佳接种量。

表3 接种量对菌株 Cs11 培养的影响

接种量(%)	1	5	10	15
腺苷(%)	0.09	0.18	0.18	0.13
甘露醇(%)	6.8	8.6	8.7	8.2

2.1.2 装液量对菌株 Cs11 培养的影响 装液量影响着菌体的通气状况。在微生物发酵过程中,能够提供充足的氧分条件对于提高菌体生长量具有重要的作用。实验结果如表4所示,在装液量为150mL/500mL的虫草培养结果中的各项数据均高于其他装液量虫草发酵结果,因此装液量为150mL为最适装液量。

表4 装液量对菌株 Cs11 培养的影响

装液量(mL)	50	100	150	200	250	300
腺苷(%)	0.15	0.17	0.19	0.16	0.16	0.14
甘露醇(%)	7.9	8.6	8.8	8.1	8.4	8.3

2.1.3 初始 pH 对菌株 Cs11 培养的影响 在发酵过程中,菌丝体生长受到 pH 的影响,必须严格控制发酵液的 pH。实验结果如表5所示,在对菌株 Cs11 培养中 pH6 为最佳。

表5 pH 对菌株 Cs11 培养的影响

pH	4	5	6	7	8	9	10
腺苷(%)	0.12	0.15	0.18	0.14	0.18	0.16	0.16
甘露醇(%)	6.9	8.3	8.8	7.9	6.9	5.4	5.2

2.1.4 摇床转速对菌株 Cs11 培养的影响 实验结果如表6所示,160r/min 为 Cs11 菌株培养的最适转速。

表6 转速对菌株 Cs11 培养的影响

转速(r/min)	150	160	170	180	190	200
腺苷(%)	0.14	0.18	0.16	0.16	0.14	0.1
甘露醇(%)	7.8	8.7	8.5	8.4	8.2	7.9

2.1.5 碳源对菌株 Cs11 培养的影响 实验结果如表7所示,葡萄糖作为培养基碳源在虫草培养结果中的各项数据均高于其他四种碳源培养基配方,因此葡萄糖为最适培养基碳源。

表7 碳源对菌株 Cs11 培养的影响

碳源(2%)	玉米粉	葡萄糖	蔗糖	可溶性淀粉	麦芽糖	乙酸钠
腺苷(%)	0.13	0.17	0.15	0.13	0.15	0.12
甘露醇(%)	8.1	8.8	8.4	8.0	8.3	7.6

2.1.6 氮源对菌株 Cs11 培养的影响 结果如表8所示,氯化铵和硝酸铵作为氮源其生长量、腺苷、甘露醇指标较低,豆饼粉作为氮源与蛋白胨、酵母膏作为氮源所得到的发酵产物腺苷、甘露醇相近,从经济角度来看豆饼粉作为氮源是最合适的。

表8 氮源对菌株 Cs11 培养的影响

氮源(1%)	蛋白胨	酵母膏	豆饼粉	氯化铵	硝酸铵
腺苷(%)	0.18	0.18	0.17	0.11	0.09
甘露醇(%)	8.8	8.7	8.7	7.4	7.3

2.1.7 KH_2PO_4 对菌株 Cs11 培养的影响 结果如表9所示,当 KH_2PO_4 的浓度为0.15%时最佳,发酵产物腺苷、甘露醇得率均达到最高。

表9 KH_2PO_4 对菌株 Cs11 培养的影响

KH_2PO_4 (%)	0.05	0.10	0.15	0.2
腺苷(%)	0.10	0.14	0.18	0.16
甘露醇(%)	8.0	8.3	8.7	8.4

2.1.8 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对菌株 Cs11 培养的影响 由表10可以得出结论, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为0.08%最佳,腺苷、甘露醇得率均达到最高。

表10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对菌株 Cs11 培养的影响

MgSO_4 (%)	0.03	0.05	0.08	0.10
腺苷(%)	0.1	0.15	0.18	0.14
甘露醇(%)	8.1	8.4	8.8	8.3

2.2 正交实验

(下转第162页)

表2 不同条件下小肠结肠炎耶尔森菌预测模型方程

条件	模型方程	标准差(S)	相关系数(R)
50℃	$\text{Log}(\text{No}/\text{Nt}) = 1.0477287 + 0.1705726\text{T}$	0.17643471	0.99161525
-18℃	$\text{Log}(\text{No}/\text{Nt}) = 0.091057233 + 0.036013901\text{T}$	0.02426666	0.99566692
速冻	$\text{LogNt} = -0.0651058 + 0.97683871\text{LogNo}$	0.05583935	0.99965457

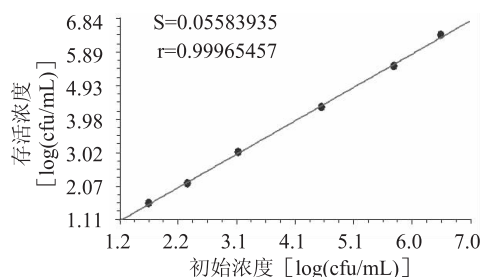


图5 Linear方程拟合的猪肉中小肠结肠炎耶尔森菌在速冻过程中的失活曲线

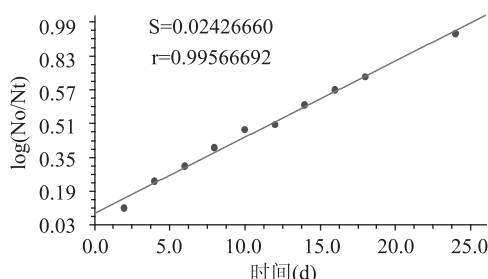


图6 Linear方程拟合的-18℃小肠结肠炎耶尔森菌在猪肉中的存活曲线

从实验结果可以得出,小肠结肠炎耶尔森氏菌对高温特别敏感,温度越高,杀菌时间越短。在生猪肉中接种不同浓度的小肠结肠炎耶尔森菌,通过速冻机,使其中心温度在30min内达到-18℃,只能使部分小肠结肠炎耶尔森菌失去活性。因此在猪肉加工中,应在速冻前控制小肠结肠炎耶尔森菌的数量,

在速冻以及贮存、销售时应主要防止交叉污染。小肠结肠炎耶尔森菌可以在低温储存的食品中繁殖,对于在冰箱内长期冷冻保存的猪肉,应注意冰箱卫生,以防二次污染。

参考文献:

- [1] 景怀琦,徐建国. 小肠结肠炎耶尔森菌感染性疾病[J]. 疾病监测,2005,20(9):449~450.
- [2] 郑浩轩,姜泊. 小肠结肠炎耶尔森菌研究概况[J]. 中国微生物学杂志,2006,18(5):416~419.
- [3] Walls I, Scott V N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment[J]. Int J Food Microbiol, 1997,36:97~102.
- [4] 郭全友,钱志伟. 预测微生物学在食品品质和安全评估上的运用[J]. 海洋渔业,2003,25(3):157~161.
- [5] Asplund K,等. 育肥猪和猪肉小肠结肠炎耶尔森氏菌流行情况调查[J]. 肉品卫生,1992,91(1):26~28.
- [6] 朱虹波. 我国猪肉屠宰加工及销售业特点及发展趋势[J]. 中外食品,2004(10):20~21.
- [7] McMeekin T A. Predictive microbiology: theory and application[M]. Taunton,UK:Research Studies Press,1993.
- [8] 夏云,胡宏. 小肠结肠炎耶尔森氏菌致病性研究的进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1989,10(5):1~2,6.
- [9] 李国强,马溶慧,朱云集. CurveExpert在农业实验数据曲线拟合中的应用[J]. 农业网络信息. 2005(5):49~51.

(上接第159页)

2.2.1 培养基配方的正交实验 根据正交实验分析,葡萄糖、豆饼粉、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度对Cs11深层发酵的影响程度由大到小依次为:豆饼粉>葡萄糖> KH_2PO_4 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,培养基配方的最佳组合为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_2$,即豆饼粉2%、葡萄糖4%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%。

2.2.2 培养条件的正交实验 根据正交实验分析,接种量、装液量、pH和摇床转速四个因素对Cs-4深层发酵的影响程度由大到小依次为:接种量>摇床转速>装液量>pH,培养条件的最佳组合为 $\text{A}_3\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_3$,即接种量10%、装液量150mL/500mL、pH6.5、摇床转速170r/min。

2.3 验证实验

以正交实验所得最佳培养基配方为葡萄糖4%,豆饼粉2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%,并在最适培养条件:24℃、170r/min、pH6.5,接种量10%,培养菌丝体,可获得腺苷>0.16%,甘露醇>8.0%,菌粉得率高达2.35%等较高的综合效果。

3 结论

通过对冬虫夏草菌(Cs11)的深层发酵条件,如

pH、接种量及转速的探讨及对深层发酵培养基碳氮源和无机盐的筛选,确定了其深层培养所需条件及最佳碳氮源和无机盐。实验结果表明:冬虫夏草菌深层发酵的最适培养条件应为24℃、170r/min、pH6.5,接种量10%,装液量150mL/500mL,菌丝生长的最佳碳源为葡萄糖2%,最佳氮源为豆饼粉0.2%,最佳无机盐为 KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075%,可获得菌粉得率和甘露醇、腺苷含量等较高的综合效果。

参考文献:

- [1] 许超德. 冬虫夏草的研究进展[J]. 菌物研究,2006,4(2):60~64.
- [2] 雷万生,谢联斌,陈和平. 冬虫夏草的研究概况[J]. 海军医学杂志,2006,27(3):262~268.
- [3] 武忠伟,郭爱莲,张海滨. 不同培养条件对冬虫夏草菌丝体甘露醇的影响[J]. 食品科学,2004,25(12):90~92.
- [4] 吕献康,沈建华,舒小英. 冬虫夏草生态生物学特性考察报告[J]. 中国现代应用药学,2005,22(2):134~135.
- [5] 魏玲,赵应华,郭遂. 冬虫夏草活性成分的含量研究概况[J]. 华西药学杂志,2003,18(5):359~360.