

北冬虫夏草固体发酵产胞外多糖条件的研究

谭彦琦^{1,2}, 郭焯¹, 龚秋红^{1,2}, 兰时乐^{1*}

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 湖南食品药品职业学院, 湖南长沙 410208)

摘要 [目的]研究北冬虫夏草固体发酵产胞外多糖的条件。[方法]采用固体发酵法培养北冬虫夏草,研究碳源和氮源种类、酵母粉含量、 KH_2PO_4 含量、初始 pH 值、接种量、种龄及发酵时间对北冬虫夏草发酵产胞外多糖的影响。[结果]单因素试验和正交试验表明,最佳的发酵条件为:大米:米糠=90:10,酵母粉 1.0%、 KH_2PO_4 0.25%、初始 pH 6.0、种龄 4 d、接种量 8% (V/W)、温度 28 °C、固水比 1:1 (W/V)、发酵时间 6 d。在此发酵条件下,北冬虫夏草胞外多糖产量达 38.625 mg/g。干基。[结论]该研究为开发新型动物保健饲料提供了理论支持。

关键词 北冬虫夏草; 固体发酵; 胞外多糖; 正交试验

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)18-07792-04

Study on Exopolysaccharide Production with Solid-fermentation Conditions by *Cordyceps militaris*

TAN Yan-qi et al (College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract [Objective] The aim was to study the solid-fermentation conditions of exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris*. [Method] *C. militaris* was cultured by solid-fermentation method, and the effects of carbon sources, nitrogen sources, yeast powder content, KH_2PO_4 content, initial pH value, amount of inoculum, seed age and fermentation time on the exopolysaccharide production of *C. militaris* were studied. [Result] The single factor tests and orthogonal test showed that, the best fermentation conditions were as follows: rice: rice bran = 90:10, yeast powder 1.0%, KH_2PO_4 0.25%, initial pH 6.0, seed age 4 days, amount of inoculum 8% (V/W), temperature 28 °C, solid-water ratio 1:1 (W/V), fermentation time 6 days. Under these conditions, the yield of exopolysaccharides reached 38.625 mg/g. dry substrate. [Conclusion] The study provided theoretical support for the development of new health feed of animal.

Key words *Cordyceps militaris*; Solid fermentation; Exopolysaccharide; Orthogonal test

北冬虫夏草(*Cordyceps militaris* (L.) Link)又名北虫草、蛹虫草,既是一种珍稀的食用菌,又是一种珍贵的中药材,主要分布在吉林、辽宁、陕西等地^[1]。北冬虫夏草含虫草酸、虫草素、多糖、SOD、氨基酸、维生素及微量元素等化学成分^[2-3]。据药理学及临床研究表明,虫草多糖具有增强免疫力、抗肿瘤及降血糖等功能^[4],因此虫草多糖的研究是目前虫草利用研究的热点^[5]。目前,国内对北冬虫夏草的研究主要集中在子实体固体栽培培养基及条件的研究^[6-8]、液体发酵产胞外多糖的培养基优化和发酵条件的研究、深层发酵高产虫草素的工艺优化等^[9-15]方面。文中以大米和麦麸作为培养基的主要原料,采用固体发酵技术,探究北冬虫夏草固体发酵产胞外多糖的发酵培养基及发酵条件,以期为生产动物保健饲料添加剂和北冬虫夏草胞外多糖的工业化生产提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 北冬虫夏草由湖南农业大学生物科学技术学院生物工程系提供。

1.1.2 培养基 斜面培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20, KH_2PO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0,琼脂 20, pH 自然。种子培养基(%):葡萄糖 1.0,蛋白胨 1.5, KH_2PO_4 0.15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, CMC-Na 0.2, pH 自然。基础固体发酵培养基(g):大米 20,酵母粉 0.2, KH_2PO_4 0.04,固水比为 1:1, pH 自然。

1.1.3 主要仪器 超净工作台(SW-CJ-1B(U),苏州净化设备有限公司);高压蒸汽灭菌锅(SX-500,日本株式会社);恒温振荡培养箱(QYC2112,上海福玛实验设备有限公司);可见分光光度计(V-5000,上海元析仪器有限公司);高速冷冻离心机(CR-21G,日本日立公司)。

1.1.4 主要试剂 葡萄糖, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 苯酚,浓硫酸(AR,国药集团化学试剂有限公司);蛋白胨(BR,上海盛思生化科技有限公司);95%乙醇(CP,天津市恒兴化学试剂制造有限公司);CMC-Na(珠海天鸿润生物工程有限公司);鱼粉、酵母粉、豆饼粉、大米、麦麸、玉米粉等,由市场购得,无虫蛀和霉变。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 斜面培养方法:将保存于 4 °C 冰箱的菌种接种至新鲜的斜面培养基上,于 27 °C 的恒温培养箱中培养至成熟,备用。液体种子培养方法:将活化好的斜面菌种接种于液体种子培养基中,于 28 °C、150 r/min 下振荡培养 5 d。固体发酵培养方法:250 ml 三角瓶装入 20 g 固体培养基,固水比 1:1,于 121 °C 灭菌 25 min 后,按 5% (V/W) 的接种量接入培养成熟的液体种子,充分摇匀,置于 28 °C 恒温培养箱中培养。

1.2.2 发酵条件研究

(1) 培养基筛选:在基础固体发酵培养基的基础上,分别改变碳源种类及添加量、氮源种类及添加量、 KH_2PO_4 添加量,在固水比 1:1、28 °C、pH 自然条件下静置培养 4 d,60 °C 烘干后粉碎,测定胞外多糖含量,考察不同培养基成分对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。

(2) 培养条件筛选:分别改变培养基初始 pH 值、接种量、种龄、发酵时间,在固水比为 1:1、28 °C 条件下静置培养,

作者简介 谭彦琦(1988-),女,湖南长沙人,助讲,在读硕士研究生,研究方向:食用菌深加工,E-mail:28643293@qq.com。* 通讯作者,副教授,硕士生导师,从事微生物资源与利用研究,E-mail:hulanshl@126.com。

收稿日期 2013-06-09

60 ℃ 烘干后粉碎,测定胞外多糖含量,考察不同培养条件对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。

1.2.3 发酵条件优化。在单因素试验基础上,选取初始 pH 值、接种量、种龄和发酵时间 4 因素为考查对象,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验(表 1)。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素			
	发酵时间	接种量	种龄	初始 pH
	d(A)	% (B)	d(C)	值(D)
1	4	7.0	3	6.0
2	5	8.0	4	6.5
3	6	9.0	5	7.0

1.2.4 北冬虫夏草胞外多糖的测定。

(1) 样品处理。称取经干燥粉碎的待测样品 5 g 于 250 ml 三角瓶中,加入 100 ml 蒸馏水,于 90 ℃ 水浴中振荡提取 2 h 后于 4 ℃、8 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液。残渣按上述条件重提一次,合并上清液,真空浓缩至 30 ~ 50 ml,加入 3 倍体积 95% 乙醇静置 12 h,过滤,取沉淀于 80 ℃ 热水中溶解,过滤,转入 100 ml 容量瓶,定容,待测。

(2) 多糖测定。参照文献[16]提供的方法进行多糖含量的测定。准确吸取 0.2 ml 待测溶液置于 10 ml 刻度试管中,补蒸馏水至 2.0 ml,加入 6% 苯酚溶液 1 ml,迅速加入浓硫酸 5 ml,摇匀,静置 5 min 后置于沸水浴中加热 15 min,取出冷却至室温,于 490 nm 处测定 OD 值,同时以蒸馏水为空白对照。

$$\text{多糖}(\text{mg/g. 干基}) = A \times (V_1/V_2) \times (V_3/5) \times 90\%$$

其中, A 为多糖含量(mg/L); V_1 为样品定容量(ml); V_2 为样品测定取样量(ml); V_3 为样品稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基筛选

2.1.1 碳源种类对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。在 250 ml 三角瓶中分别加入 20 g 大米、米糠、玉米粉、麸皮,调节固水比为 1:1,其他成分不变,于 28 ℃ 下恒温静置培养 4 d,60 ℃ 烘干后粉碎,测定胞外多糖产量,结果见图 1。从图 1 可看出,不同碳源对北冬虫夏草的胞外多糖产量影响较大,当以大米粉为碳源时,胞外多糖产量达 19.439 mg/g. 干基,其次为米糠,产量为 17.831 mg/g. 干基,麸皮和玉米粉的产量较低,说明麸皮和玉米粉不适合作为北冬虫夏草固体发酵产多糖的碳源。

2.1.2 大米粉与米糠比例对胞外多糖产量的影响。为降低生产成本,采用大米粉和米糠作为北冬虫夏草固体发酵产多糖的碳源,研究其合适的比例。其他条件不变,设定大米:米糠比例分别为 100:0、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30,考察大米粉与米糠不同比例对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图 2。图 2 表明,当碳源为大米:米糠为 90:10 时,北冬虫夏草胞外多糖含量最高,到达 21.992 mg/g. 干基,高于以纯大米作碳源的固体培养基的多糖含量 19.603 mg/g. 干基。这是由于在大米培养基中加入适量米糠,不仅

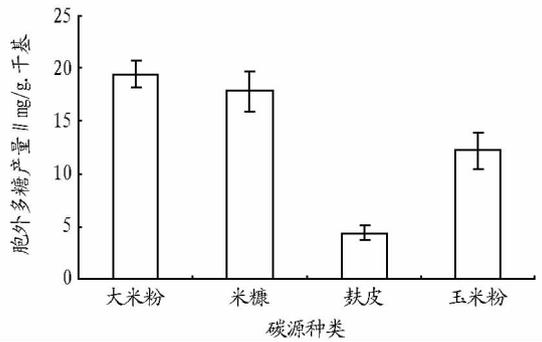
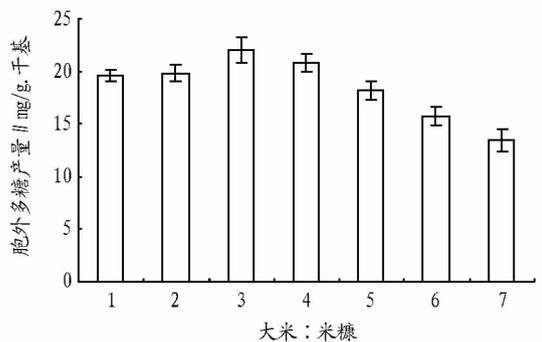


图 1 胞外多糖产量随碳源种类的变化

改变了培养基的通气条件,而且增加了微生物生长所需维生素等生长因子的含量,但随着米糠用量的增加,改变了培养基碳氮比,从而影响了北冬虫夏草的生长和胞外多糖的合成和分泌。



注:1~7 分别代表比例为 100:0、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30。

图 2 胞外多糖随大米与米糠不同比例的变化

2.1.3 氮源种类对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。在等氮条件下,在基础发酵培养基中分别加入酵母粉、鱼粉、豆粕粉、脲、和硫酸铵,其他条件不变,分别考察不同氮源种类对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图 3。由图 3 可知,在等氮条件下,氮源对供试菌株胞外多糖产量影响较大。当氮源为酵母粉时,胞外多糖产量达 26.069 mg/g. 干基,鱼粉和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作氮源时胞外多糖的产量较低。由此可知,北冬虫夏草产胞外多糖固体发酵培养基中适宜的氮源为酵母粉。

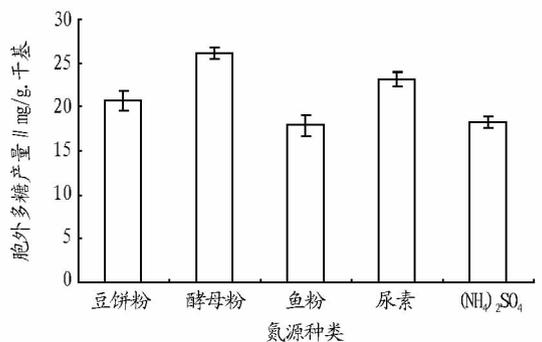


图 3 胞外多糖随不同氮源的变化

2.1.4 酵母粉含量对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。在培养基中分别加入 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%

酵母粉,其他条件不变,考察酵母粉含量对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图4。由图4可看出,在一定范围内,随着酵母粉添加量增加,北冬虫夏草的多糖产量逐渐增加。当酵母粉添加量为1.0%时,胞外多糖产量达25.653 mg/g。但随着酵母粉含量增加,北冬虫夏草产多糖产量降低明显。氮源是微生物生长繁殖不可缺少的营养物质,合适的氮源比例可促进微生物的生长和产物的合成分泌。氮源浓度过高,改变了培养基的碳氮比,导致微生物生长过于旺盛而影响产物的合成,但氮源含量过低,不能满足北冬虫夏草对氮素营养的需求,从而降低胞外多糖产量。

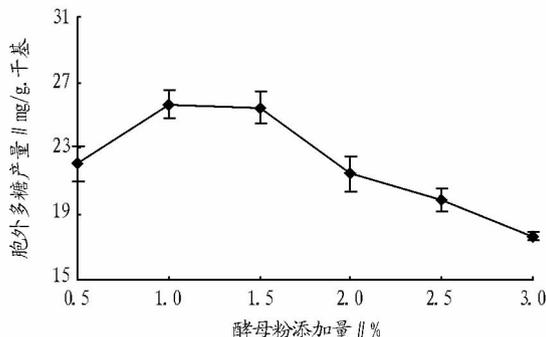


图4 胞外多糖产量随不同酵母粉添加量的变化曲线

2.1.5 KH_2PO_4 添加量对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。在培养基中加入0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30% KH_2PO_4 ,其他条件不变,分别考察不同 KH_2PO_4 添加量对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图5。磷是核酸和蛋白质合成的必要成分,它在菌体的生长、繁殖和代谢中起着极其重要的作用。适量的磷有利于菌体生长和糖代谢的进行,但磷过量时,许多产物的合成常受到抑制。图5表明,当培养基中 KH_2PO_4 浓度为0.25%时,胞外多糖产量达27.158 mg/g。干基。

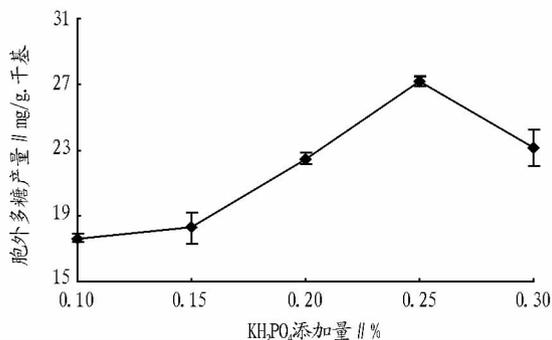


图5 胞外多糖产量随不同 KH_2PO_4 添加量的变化曲线

2.2 发酵条件研究

2.2.1 初始 pH 值对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。分别调节培养基初始 pH 值为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,其他条件不变,测定培养基中北冬虫夏草胞外多糖产量,结果见图6。由图6可知,北冬虫夏草固体发酵培养产多糖的适宜初始 pH 值为6.5,多糖产量达26.436 mg/g。干基。

2.2.2 接种量对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。由培养

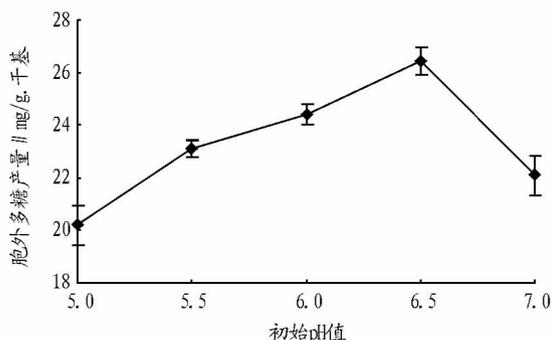


图6 胞外多糖产量随不同初始 pH 值的变化曲线

基中分别接入5%、6%、7%、8%、9%、10% (W/V) 培养成熟的液体种子,考察不同接种量对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图7。由图7可知,随着接种量增加,胞外多糖产量也增加。当接种量为10%时,胞外多糖产量最大,达26.158 mg/g。干基。接种量超过10%,胞外多糖产量下降,原因为接种量过大,导致发酵前期营养物质消耗过快、代谢废物积累过多及培养基 pH 值改变等,从而影响胞外多糖的积累和分泌。

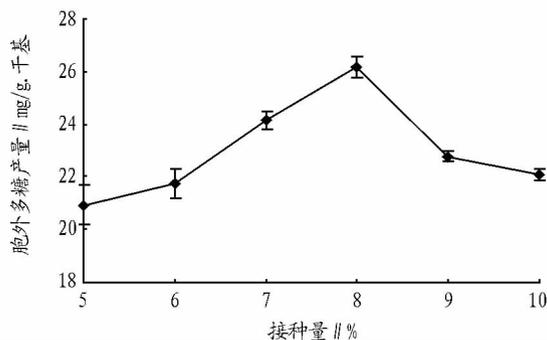


图7 胞外多糖产量随不同接种量的变化曲线

2.2.3 种龄对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。向培养基中分别接种培养3、4、5、6、7 d 的种子液,其他条件不变,于28℃下恒温静止培养4 d,考察不同种龄对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图8。种龄过小,接入菌种的生物量不够,导致发酵前期菌体生长缓慢,延长发酵周期;种龄过大,菌种老化及带入的发酵副产物过多,导致生产能力下降。图8显示,接种种龄为4 d时,胞外多糖产量最高,达33.431 mg/g。干基。

2.2.4 培养时间对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响。改变培养时间分别为3、4、5、6、7 d,其他条件不变,分别考察不同培养时间对北冬虫夏草胞外多糖产量的影响,结果见图9。图9表明,发酵时间为5 d时,胞外多糖产量最高,达38.547 mg/g。干基。

2.3 发酵条件优化结果在单因素试验基础上,选取初始 pH 值、接种量、种龄和发酵时间作为考察对象,以胞外多糖产量为考察指标进行正交试验,结果见表2。表2表明,发酵过程中影响最大的因素为种龄,其次为发酵时间。通过极差分析,得到各因素的最优组合为 $A_3B_2C_2D_1$,但试验最优组合为 $A_3B_3C_2D_1$ 。因此,需对2个组合进行验证试验,结果见表

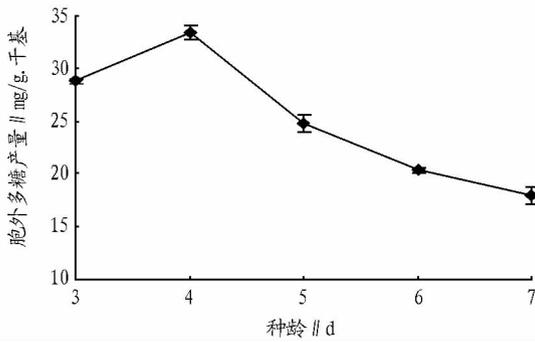


图8 胞外多糖产量随不同种龄的变化曲线

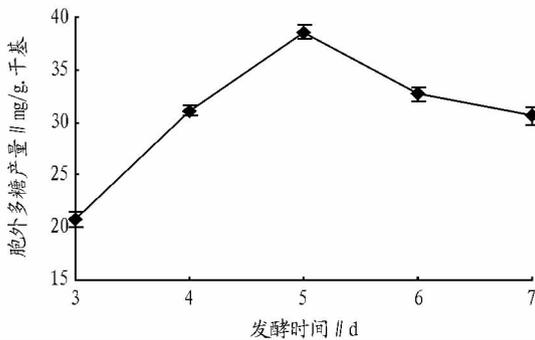


图9 胞外多糖产量随不同发酵时间的变化曲线

3。从表3可知,2组合在同等条件下5次重复胞外多糖的平均产量相差5.10%。因此,发酵条件的最优组合为:初始pH值6.0,接种量8.0%,种龄4d,发酵时间6d。

表2 正交试验结果

试验 编号	因素水平				多糖产量 mg/g. 干基
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	25.593
2	1	2	2	2	33.442
3	1	3	3	3	32.893
4	2	1	2	3	36.992
5	2	2	3	1	36.473
6	2	3	1	2	31.129
7	3	1	3	2	35.742
8	3	2	1	3	33.127
9	3	3	2	1	38.834
K_1	91.928	98.327	89.849	100.900	
K_2	104.594	103.042	108.818	103.405	
K_3	107.703	102.856	105.108	103.012	
k_1	30.643	32.776	29.950	36.633	
k_2	34.865	34.347	36.273	34.468	
k_3	35.901	34.285	35.036	34.337	
R	5.258	1.571	6.323	2.296	

(上接第7791页)

参考文献

- [1] DYKES C W, HALLIDAY I J, READ M J, et al. Nucleotide Sequences of Four Variants of the K88 Gene of Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Infect and Immun*, 1985, 50(1): 279-283.
- [2] TURNES C G, ALEIXO J A, MONTEIOR A V, et al. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the faeG adhesion gene of *Escherichia coli* F4ab induced immune responses in mice and pigs [J]. *Vaccine*, 1999, 17(15/16): 2089-2095.
- [3] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999: 149-482.
- [4] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 1995.

表3 发酵条件验证结果

组合	多糖产量 / mg/g. 干基 (重复)					多糖平均 产量 mg/g. 干基
	1	2	3	4	5	
A ₃ B ₂ C ₂ D ₁	38.106	39.271	38.923	37.975	38.852	38.625
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	36.371	36.862	37.059	36.143	37.315	36.750

3 结论

该试验通过单因素试验确定了北冬虫夏草产胞外多糖的最佳培养基为:大米:米糠=90:10,酵母粉1.0%,KH₂PO₄0.25%,固水比1:1;在单因素试验基础上,采用4因素3因子正交试验对发酵条件进行优化,得到了最优发酵条件组合为初始pH值6.0,接种量8.0%,种龄4d,发酵时间6d。在此条件下,北冬虫夏草胞外多糖产量达38.625 mg/g. 干基。该研究为开发新型动物保健饲料提供了理论支持。

参考文献

- [1] 马定远. 冬虫夏草及其菌丝的药理学研究进展[J]. *中药材*, 2001, 24(6): 455.
- [2] 李楠, 宋健国, 刘金云, 等. 蛹虫草与冬虫夏草化学成分比较[J]. *吉林农业大学学报*, 1995, 17(S1): 80-83.
- [3] 朱雅红, 桂仲争. 蛹虫草液体菌种通气发酵培养及其营养成分分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(5): 699-704.
- [4] AN D, ZHU B W. Optimization of Enzyme Extraction Conditions of Cordycepin Polysaccharide Using Response Surface Methodology [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2012, 13(9): 1977-1981.
- [5] 余晓斌, 罗长才, 缪静. 冬虫夏草多糖提取工艺的优化[J]. *中草药*, 2002, 33(12): 1086-1087.
- [6] 苏涛. 北虫草高产菌株在改良人工培养基生长的研究[J]. *中国食用菌*, 2008, 27(2): 23-24.
- [7] 郑树生, 徐冲, 韩宁宁, 等. 北虫草人工栽培培养基最佳碳源筛选[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2008, 20(1): 8-11.
- [8] 方华舟, 王小艳, 向会耀. 不同氮源对蛹虫草菌丝及子实体生长状况的影响[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(11): 2734-2737.
- [9] 王飞, 陈柳萌, 肖靖, 等. 北虫草液体发酵产多糖培养基优化研究[J]. *江西农业学报*, 2007, 19(5): 86-87.
- [10] 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.
- [11] 陈怀宇, 许延宗, 王德枝, 等. 北冬虫夏草菌丝体培育条件的研究[J]. *泉州师范学院学报*, 2008, 26(2): 106-109.
- [12] XIE C Y. Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium [J]. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(2): 293-299.
- [13] 刘艳芳, 汤庆九, 顾俊杰, 等. 北冬虫夏草深层发酵高产虫草素工艺的优化[J]. *上海农业学报*, 2010, 26(3): 26-30.
- [14] 兰时乐, 李佩, 曹杏芝. 北冬虫夏草液体发酵产胞外多糖发酵条件的研究[J]. *生物技术*, 2006(6): 72-75.
- [15] CUI J D, JIA S R. Optimization of Medium on Exopolysaccharides Production in Submerged Culture of *Cordyceps militaris* [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2010, 19(6): 1567-1571.
- [16] 鲁晓岩. 苯酚-硫酸法测定北冬虫夏草多糖含量[J]. *食品工业科技*, 2002(4): 69-70.

出版社, 1995.

- [5] 李毅, 刘秀梵. 抗大肠埃希氏菌 F4ab, F4ac 和 F4ad 特异单克隆抗体 [J]. *微生物学报*, 1989, 29(5): 348-353.
- [6] BARERR D, WILLEMSSEN P T, SIMONS L H, et al. Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of F4 fimbriae [J]. *Mol Microbiol*, 1992, 6(2): 247-255.
- [7] HUISMAN T T, DE GRAAF F K. Negative control of fae(F4) expression by the 'global' regulator Lrp is modulated by the 'local' regulator FaeA and affected by DNA methylation [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 16(5): 943-953.
- [8] VAN ZIJDERVELD F G, ANAKOTA J, BROUWERS R A, et al. Epitope analysis of the F4 fimbrial antigen complex of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(6): 1870-1878.