研究论文

高产蛹虫草诱变菌株发酵条件优化及放大

翟景波 *1,2

（1. 内蒙古民族大学 医学院，内蒙古 通辽 028042；2. 中国医科大学 基础医学院，辽宁 沈阳 110001）

摘要：考察高产蛹虫草诱变菌株放大发酵条件，为产业化奠定实验基础。以蛹虫草菌丝体干重、多糖、腺苷和虫草酸质量浓度为指标，采用单因素试验的方法优化 5 L 发酵罐发酵条件：搅拌转速、发酵培养基初始 pH 值和接种量，并在此条件下重复 4 次实验，以考察发酵条件的稳定性；进一步考察 15 L 和 100 L 发酵罐发酵条件。5 L 发酵罐发酵条件为：转速 250 r/min、起始 pH 值 7、接种体积分数 6%，发酵温度 26 ℃，通气量 250 L/h，菌丝体干重、多糖、腺苷和虫草酸质量浓度分别达到 23.29 g/L、0.94 g/L、162.84 mg/L 和 2.06 g/L，4 次重复实验发酵条件稳定（P<0.01）。15 L 发酵罐的最佳发酵时间为 72 h，菌丝体干重、多糖、腺苷和虫草酸质量浓度分别达到 30.84 g/L、1.10 g/L、233.22 mg/L 和 1.89 g/L；100 L 发酵罐的最佳发酵时间为 47 h，菌丝体干重、多糖、腺苷和虫草酸质量浓度分别达到 32.05 g/L、1.33 g/L、187.20 mg/L 和 3.51 g/L。5 L 发酵罐发酵条件稳定，以菌丝体干重、多糖、腺苷和虫草酸质量浓度为综合考察指标，分别绘制了高产蛹虫草诱变菌株 15 L、100 L 发酵罐发酵生长曲线，为生产提供了数据依据。

关键词：高产蛹虫草诱变菌株；放大发酵；单因素试验；发酵生长曲线

中图分类号：Q 819　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)08—0884—07

Optimizing the Fermentation Conditions of *Cordyceps militaris* Hyperproduction Mutant Strain and Investigating Its´ Mass-Culture

ZHAI Jingbo[*1,2]

(1. Medical college, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028042, China; 2. College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: To industrialize *Cordyceps militaris* hyperproduction mutant strain, investigating and optimizing fermentation conditions, and laying a experimental foundation for industrial production. Comprehensively considering the yields of mycelium biomass, the content of polysaccharides and cordyceps acid, adenosine, optimizing fermentation conditions of high production mutant strain through applying single factor test method in 5 L fermentor. Meanwhile, implementing the validation experiments under the optimum conditions, and investigating the mass-culture of hyper-yield mutant strain in 15 L and 100 L fermentor. The optimal fermentation conditions of 5 L jar were obtained as follows: rotating speed 250 rpm, the initial pH of fermentation media 7, volume of

收稿日期：2013-10-18

基金项目：内蒙古自治区自然科学基金项目(2013MS1178)；内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(NJZC13183)。

* **通信作者**：翟景波(1970—)，男，吉林白城人，生物制药博士研究生。E-mail：laozhaisc@hotmail.com

inoculation 6%, temperature 26 ℃, air flow speed 250 L/h. The yields of mycelium biomass and the content of polysaccharide, adenosine and cordyceps acid were obtained as 23.29 g/L, 0.94 g/L, 162.84 mg/L and 2.06 g/L respectively in 5 L fermentor; 30.84 g/L, 1.10 g/L, 233.22 mg/L and 1.89 g/L with optimal culture time as 72 hours in 15 L fermentor and 32.05 g/L, 1.33 g/L, 187.20 mg/L and 3.51 g/L with optimal culture time as 47 hours in 100 L fermentor. The results were stable. With evaluating the yields of mycelium biomass, the content of polysaccharides, cordyceps acid and adenosine at the same time, plotting fermentation growth curve of 15 L and 100 L fermentor for the first time, This study provides valuable data for industrial production of *Cordyceps militaris* high production mutant strain.

Keywords: *Cordyceps militaris* high production mutant strain, mass culture, single factor test method, fermentation growth curve

虫草具有扩张气管、镇静、抗心律失常、降血压、抗病原微生物、抗恶性肿瘤等多种药理活性[1-2]，天然资源缺乏。蛹虫草天然资源数量也很少[3]，液体发酵法生产蛹虫草是解决办法。蛹虫草含有 30 多种元素，其含量与冬虫夏草含量相似。大量研究结果表明：蛹虫草与冬虫夏草类似，具有多种功能，对人体具有明显的保护作用，可以作为冬虫夏草的替代品[4-12]。

目前蛹虫草液体发酵的研究很多，但大多数仅局限于单一的菌丝体生物量或代谢物产量的研究，进行 100 L 罐发酵规模的研究尚未见到，因此，同时以菌丝体干重和有效成分腺苷、多糖、虫草酸质量浓度为指标，进行小规模生产的发酵条件优化具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 高产蛹虫草诱变菌株 H4025：作者所在研究室通过化学方法和物理方法诱变蛹虫草菌株 CGMCC5.699 筛选出来的高产蛹虫草突变菌株[13]。

1.1.2 主要仪器 5 L 发酵罐：上海保兴生物设备工程有限公司，型号 5BGZ；15 L 发酵罐：B Braun Germany，Model ES15 Biostat Fermentor；100 L 发酵罐：上海保兴生物设备工程有限公司，型号 BIOTECH-100JS。

1.1.3 方法 各种活性成分测试的技术和方法见文献[13、15]，发酵条件优化采用单因素试验方法[13]。

1.2 5 L 发酵罐发酵条件优化

1.2.1 培养基 斜面培养基：采用 PDA (Potato extract Dextrose Agar)综合固体培养基[14-15]。

种子培养基(g/L)：蔗糖 20.00，蛋白胨 10.00，酵母浸粉 10.00，KH_2PO_4 为 3.00，$MgSO_4$ 为 3.00，维生素 B_1 0.235、$(NH_4)_2SO_4$ 10.00；121 ℃灭菌 30 min。

发酵培养基(g/L)：蔗糖 18.50，蛋白胨 10.00，酵母浸粉 18.97，KH_2PO_4 3.00，$MgSO_4$ 3.00，维生素 B_1 0.235，$ZnCl_2$ 0.011，$(NH_4)_2SO_4$ 10.00；121 ℃灭菌 30 min。

1.2.2 种子液的制备 制备方法见文献[13-15]。

1.2.3 搅拌转速优化 种龄 84 h、装液量 3.3 L、通气量 200 L/h、接种体积分数为 2%、发酵温度 26 ℃、发酵时间 86 h，分别考察发酵搅拌转速 150、200、250、300、350 r/min 对蛹虫草菌丝体干重，多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响，同一实验取三个平行样品测定，取平均值。

1.2.4 发酵培养基初始 pH 优化 发酵转速采用 1.2.3 优化的结果，转速 250 r/min，发酵培养基初始 pH 分别考察了 4、5、6、7、8 对蛹虫草菌丝体干重，多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响，取三个平行样品测定，取平均值。

1.2.5 接种体积分数优化 转速和发酵培养基初始 pH 分别采用 1.2.3 和 1.2.4 优化的结果，分别考察了接种体积分数 4%、6%、8%和 10%对蛹虫草菌丝体干重，多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响，同一实验取三个平行样品测定，取平均值。

1.2.6 橄榄油添加量优化 采用 1.2.3~1.2.5 优化的发酵条件，转速 250 r/min、初始 pH 7.0、接种体积分数 6%，橄榄油添加量分别考察了 0.0%、0.5%、0.75%和 1 %对蛹虫草菌丝体干重，多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响，取 3 个平行样品的平均值。

1.2.7 验证试验 以上述单因素法优化得到的发酵条件进行 4 个平行验证实验。

1.3 15 L 罐放大发酵

发酵培养基（组分 g/L）：蔗糖 18.50，蛋白胨 10.00，酵母浸粉 18.97，KH_2PO_4 3.00，$MgSO_4$ 3.00，维生素 B_1 0.235，$ZnCl_2$ 0.011，$(NH_4)_2SO_4$ 10.00；橄榄油 1%。

发酵条件：转速 250 r/min，接种体积分数 6%，起始 pH 值 7，发酵温度 26 ℃，通气量 8 m^3/min，在此条件下进行 15 L 发酵罐对高产蛹虫草诱变株发酵培养，每 8 小时取样，观察菌丝体形状，测定菌丝体干重，多糖、虫草酸和腺苷质量浓度，同一实验取三个平行样品测定，取平均值，绘制 15 L 发酵罐蛹虫草发酵生长曲线。

1.4 100 L 罐放大发酵

发酵培养基（组分 g/L）：蔗糖 18.50，蛋白胨 10.00，酵母浸粉 18.97，KH_2PO_4 3.00，$MgSO_4$ 3.00，维生素 B_1 0.235，$ZnCl_2$ 0.011，$(NH_4)_2SO_4$ 10.00；橄榄油 1%。

发酵条件：转速 250 r/min，接种体积分数 6%，起始 pH 7，发酵温度 26 ℃，通气量 12 m^3/min，罐体压力保持在 0.06 MPa，在此条件下进行 100 L 发酵罐对蛹虫草诱变菌株发酵培养，每 2 小时取样，观察菌丝体形状，测定菌丝体干重，多糖、虫草酸、腺苷和胞外多聚物质量浓度，同一实验取三个平行样品测定，取平均值，绘制 100 L 发酵罐蛹虫草发酵生长曲线。

1.5 统计学方法

实验数据通过统计软件 SPSS12.0 处理，以均值±标准差（$x\pm s$）表示，采用 t 检验进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 搅拌转速优化结果

由表 1 可以看出，随着搅拌转速的提升，菌丝体干重和各活性成分质量浓度均有所提升，但搅拌转速过大，菌丝体干重和各活性成分质量浓度均有所降低，当转速大于 300 r/min 后，菌体生长缓慢，活性成分降低严重，从菌丝体干重和活性成分质量浓度综合角度考虑，搅拌转速应当选择 250~300 r/min 之间，决定选用 250 r/min。

表 1 发酵转速对菌丝体干重、多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响（$\bar{X}\pm S$，n=3）

Table 1 Effect of fermentation rotating speed to the yields of mycelium biomass, the content of cordyceps acid, polysaccharides and adenosine

搅拌转速/(r/min)	菌丝体干重/(g/L)	多糖质量浓度/(g/L)	虫草酸质量浓度/(g/L)	腺苷质量浓度/(mg/L)
150	15.7±0.03*	0.702±0.006**	1.591±0.002**	85.39±0.02
200	17.1±0.03*	0.594±0.005*	0.712±0.003	105.25±0.05*
250	16.8±0.06*	0.750±0.006**	0.698±0.004*	98.70±0.03*
300	17.4±0.05*	0.973±0.003*	0.615±0.002**	97.08±0.02*
350	15.1±0.06*	0.374±0.004*	0.255±0.005	75.70±0.04*

注：*P<0.05；**P<0.01。

2.2 发酵培养基初始 pH 值优化结果

由表 2 可以看出，随着发酵培养基初始 pH 值的升高，菌丝体干重先升高，当 pH 值达到 7 时，菌丝体产量达到最大值，继续升高 pH 值，菌丝体干重开始下降，发酵培养基初始 pH 值越高，蛹虫草多糖质量浓度越低，初始 pH 值对虫草酸质量浓度影响比较复杂，而发酵培养基的初始 pH 值为 5~7 时，腺苷质量浓度较高，从菌丝体干重和活性成分质量浓度综合角度考虑，发酵培养基初始 pH 值定为 7。

2.3 接种体积分数的优化结果

接种体积分数为 6%时，菌丝体干重、多糖和腺苷质量浓度均达到最高值，故选择接种体积分数为 6%，见表 3。

2.4 橄榄油添加量优化结果

由表 4 可以看出，橄榄油浓度对菌丝体干重的影响不大，但对多糖质量浓度影响较大，对虫草酸质量浓度影响更大；随着橄榄油添加量的增加，多糖和虫草酸质量浓度增大，当橄榄油添加量达到 1%时，有效提高了多糖质量浓度。但是，添加橄榄油也给发酵生产带来很大的不便。罐体的清洗非常困难，综合考虑发酵培养基选择添加 1%的橄榄油。

2.5 验证实验结果

根据 2.1~2.4 优化结果，获得高产蛹虫草诱变株最佳的发酵条件：转速 250 r/min，起始 pH 7，接种体积分数 6%，发酵温度 26 ℃，通气量 250 L/h，在此条件下进行 4 个平行的验证实验，结果见表 5。

表 2　发酵培养基初始 pH 对菌丝体干重、多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响($\bar{X}\pm S$, n=3)

Table 2　Effect of culture media initial pH to the yields of mycelium biomass, the content of adenosine、polysaccharides and cordyceps acid

发酵培养基初始 pH 值	菌丝体干重/(g/L)	多糖质量浓度/(g/L)	虫草酸质量浓度/(g/L)	腺苷质量浓度/(mg/L)
4	13.2±0.09	0.788±0.005*	1.242±0.003*	72.55±0.05*
5	16.2±0.05*	0.743±0.003	0.916±0.002*	106.56±0.05*
6	16.7±0.07*	0.736±0.003*	7.790±0.008**	89.20±0.04
7	17.5±0.01**	0.728±0.004*	1.339±0.003*	100.01±0.03*
8	11.3±0.10	0.617±0.002*	1.733±0.007*	70.66±0.02

注：*P<0.05；**P<0.01。

表 3　接种体积分数对菌丝体干重、多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响($\bar{X}\pm S$, n=3)

Table 3　Effect of inoculation volume to the yields of mycelium biomass, the content of adenosine、polysaccharides and cordyceps acid

接种体积分数/%	菌丝体干重/(g/L)	多糖质量浓度/(g/L)	虫草酸质量浓度/(g/L)	腺苷质量浓度/(mg/L)
4	17.2±0.02**	0.544±0.005	0.805±0.002*	98.53±0.03*
6	18.5±0.01**	0.801±0.003*	0.734±0.005*	109.31±0.05*
8	16.4±0.07*	0.501±0.002**	0.569±0.003	86.59±0.02*
10	16.3±0.06*	0.498±0.004*	1.151±0.004*	78.5±0.04*

注：*P<0.05；**P<0.01。

表 4　橄榄油添加量对菌丝体干重、多糖、虫草酸和腺苷质量浓度的影响($\bar{X}\pm S$, n=3)

Table 4　Effect of olive oil adding volume to the yields of mycelium biomass, the content of a polysaccharides、cordyceps acid and denosine

橄榄油添加量/%	菌丝体干重/(g/L)	多糖质量浓度/(g/L)	虫草酸质量浓度/(g/L)	腺苷质量浓度/(mg/L)
0	11.2±0.03*	0.596±0.006*	0.528±0.004	98.6±0.04
0.5	12.1±0.01	0.607±0.004*	0.876±0.005*	87.5±0.03*
0.75	11.1±0.04*	0.587±0.002*	0.459±0.002*	87.1±0.03*
1	11.9±0.01**	0.632±0.005*	1.115±0.007*	84.9±0.02*

注：*P<0.05；**P<0.01。

表 5　最佳发酵条件验证实验结果($\bar{X}\pm S$, n=4)

Table 5　Result of optimum fermentation conditions for validation experiment

实验号	菌丝体干重(g/L)	多糖质量浓度/(g/L)	虫草酸质量浓度/(g/L)	腺苷质量浓度/(mg/L)
1	20.00	0.96	1.04	154.59
2	20.61	0.97	1.42	161.32
3	22.72	0.93	2.35	166.89
4	23.29	0.94	2.06	162.84
	21.66±1.60	0.95±0.018**	1.72±0.60	161.41±5.12

注：**P<0.01。

由表 5 可以看出，菌株 H4025 在优化后的发酵条件下，生长稳定(P<0.01)，菌丝体干重和活性成分质量浓度变化不大。

2.6　15 L 发酵罐放大发酵培养

按照 1.3 方法进行诱变菌株 H4025 15 L 罐发酵，其菌丝体形态随发酵时间推移变化见图 1。

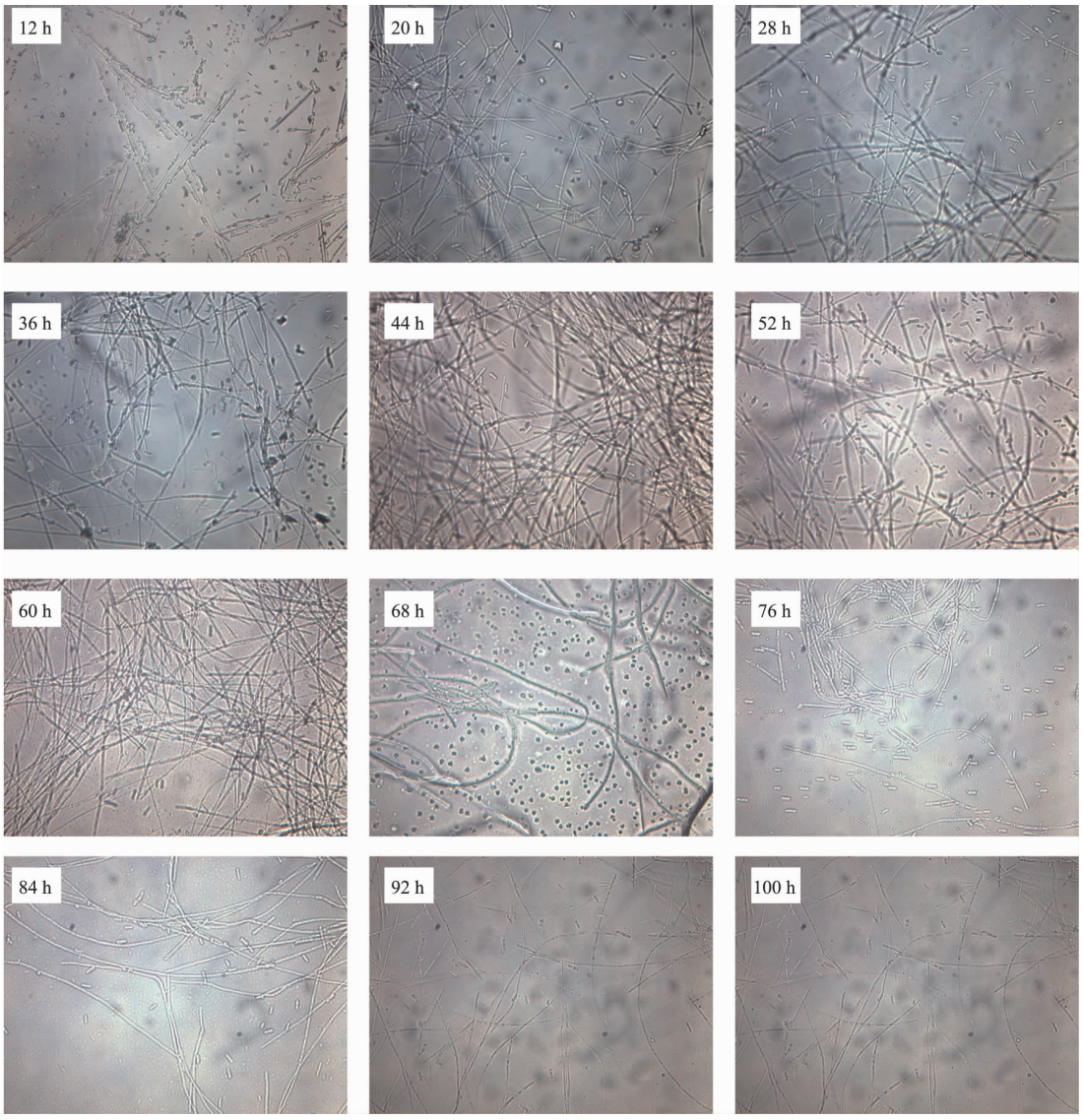


图 1　15 L 发酵罐高产蛹虫草突变菌株菌丝体生长形态

Fig. 1　Mycelium growth form of *Cordyceps militaris* mutant high production strain in 15 L fermentor

12 h 时菌丝体短小，到 20 h 时菌丝体开始变长，但菌丝体较细，28 h 时菌丝体变得粗壮，到 44 h 时菌丝体密度达到最大，52 h 菌丝体断片开始出现，60 h 菌丝体交错集中，68 h 孢子出现，92 h 菌丝体比较细长，菌丝开始断裂。菌株 H4025 15 L 发酵罐发酵生长曲线见图 2。

由图 2 可以看出，菌丝体干重和腺苷质量浓度均在 92 h 到达最大，虫草酸质量浓度在 84 h 时达最大，蛹虫多糖发酵生长曲线比较复杂，其质量浓度是在 48 h 时达到最大，综合考虑，定发酵时间为 72 h，此时菌丝体干重、多糖、虫草酸和腺苷质量浓度分别为 30.84 g/L、1.10 g/L、1.89 g/L、233.22 mg/L。

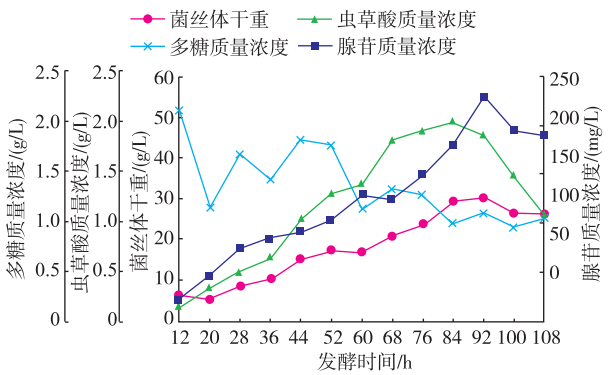


图 2　高产蛹虫草突变菌株的 15 L 发酵罐发酵生长曲线

Fig. 2　Fermentation growth curve of *Cordyceps militaris* mutant high production strain in 15 L fermentor

2.7 100 L 发酵罐放大发酵培养

按照 1.4 方法进行诱变菌株 H4025 100 L 发酵罐发酵，其菌丝体形态随发酵时间变化见图 3。

由图 3 可以看出，在 12 h 时，菌丝体已经长得较长，到 16 h 时菌丝体变得粗壮，到 42 h 菌丝体断片开始出现，49 h 较多孢子出现，59 h 菌丝体自溶严重。

图 4 为诱变菌株 H4025 100 L 发酵罐发酵生长曲线。菌丝体干重在 44 h 达平稳，蛹虫多糖发酵生长曲线比较复杂，其质量浓度在 22 h 时达到最大，虫草酸质量浓度在 47 h 时达到最大，腺苷质量浓度在 47 h 后达平稳，综合考虑，定发酵时间为 47 h，此时菌丝体干重、多糖、虫草酸、腺苷质量浓度和胞外多聚

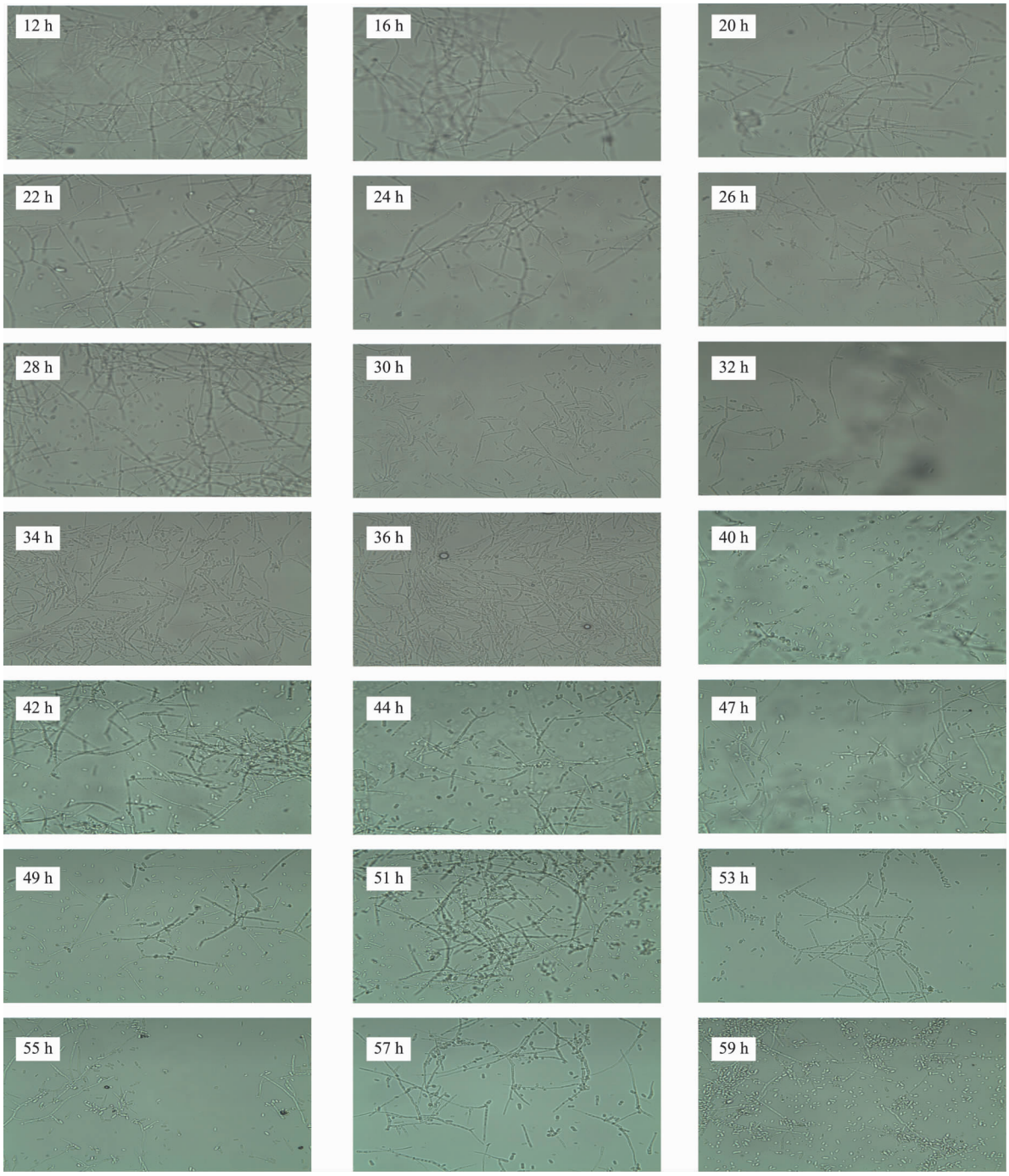


图 3　100 L 发酵罐高产蛹虫草突变菌株菌丝体发酵生长形态

Fig. 3　Mycelium growth form of *Cordyceps militaris* mutant high production strain in 100 L fermentor

物分别为 32.05 g/L、1.33 g/L、3.51 g/L、187.20 mg/L 和 0.104 g/L。

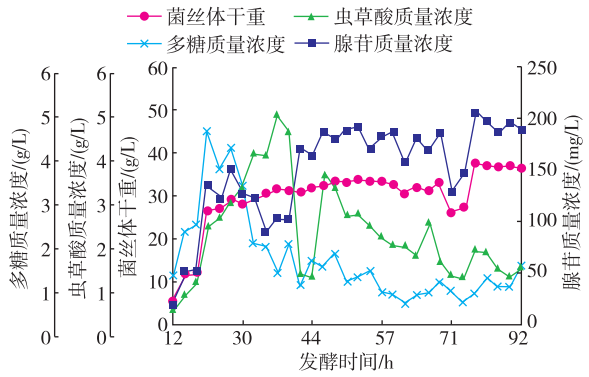


图 4　高产蛹虫草突变菌株的 100 L 发酵罐发酵生长曲线

Fig. 4　Fermentation growth curve of *Cordyceps militaris* mutant high production strain in 100 L fermentor

蛹虫草菌种深层液体发酵生长代谢受环境影响大，发酵培养基 pH 和发酵温度均会影响菌体内酶的活性和生物化学反应速度等，进而会影响代谢途径、产物合成和菌丝体生长速度等，发酵过程中装液量、搅拌转速和通气量等会影响到氧气在发酵液中的传输，也会影响菌体的呼吸[15]等。

作者采用单因素试验方法对蛹虫草菌株 H4025 发酵条件进行了优化，获得了较好的发酵条件，并考察了诱变菌株 H4025 的放大发酵情况。结果表明，高产蛹虫草诱变菌株 H4025 在放大发酵过程中，菌丝体干重和菌丝体中各种活性成分均有不同程度的提升，发酵条件稳定（$P<0.01$），且发酵时间变短，节省发酵成本和缩短生产周期，为其产业化奠定了基础。

参考文献：

[1] Shonkor Kumar Das, Mina Masuda, Akihiko Sakurai, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects[J]. **Fitoterapia**, 2010, 81(8): 961-968.

[2] Yu R, Yang W, Song L, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*[J]. **Carbohydr Polym**, 2007, 70(4): 430-436.

[3] Lee S J, Moon G S, Jung K H, et al. c-jun N-terminal kinase 1 is required for cordycepin-mediated induction of G2/M cell-cycle arrest via p21WAF1 expression in human colon cancer cells[J]. **Food Chem Toxicol**, 2010, 48(1): 277-283.

[4] Noh E M, Kim J S, Hur H, et al. Cordycepin inhibits IL-1β-induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. **Rheumatology**, 2009, 48(1): 45-48.

[5] Russell R, Paterson M. Cordyceps-A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory[J]. **Phytochemistry**, 2008, 69(7): 1469-1495.

[6] Lin Y W, Chiang B H. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*[J]. **Process Biochemistry**, 2008, 43(3): 244-250.

[7] Mao X B, Eksriwong T, Chauvatcharin S, et al. Optimizatio of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. **Proc Biochem**, 2004, 11(4): 1667-1672.

[8] Xie C Y, Gu Z X, Fan G J, et al. Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2009, 158(2): 483-492.

[9] Lee J S, Kwon J S, Won D Pi, et al. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharide from the liquid culture broth of *Cordyceps militaris*[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2010, 82(3): 982-988.

[10] Zhou X W, Gong Z H, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products[J]. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2009, 61(3): 279-291.

[11] Carlos Illana Esteban. Cordyceps sinensis, a fungi used in the Chinese traditional medicine [J]. **Rev Iberoam Micol**, 2007, 24(4): 259-262.

[12] 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.
ZHU Yahong, GUI Zhongzheng. Liquid fermentation with venti lation of *Cordyceps militaris* and its components analysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 699-704.(in Chinese)

[13] 翟景波，滕利荣，黄宝玺. 高产蛹虫草菌株的选育[J]. 中国生物制品学杂志，2011，24(10)：1230-1232.
ZHAI Jingbo, TENG Lirong, HUANG Baoxi. Screening of high-producing *Cordyceps militaris* strain [J]. **Chin J Biologicals**, 2011, 24(10): 1230-1232.(in Chinese)

[14] 翟景波，滕利荣，黄宝玺. 高产蛹虫草菌株发酵培养基的研究[J]. 工业微生物，2012，42(2)：43-50.
ZHAI Jingbo, TENG Lirong, HUANG Boxi. Optimizing the fermentation medium conditions of *Cordyceps militaris* hyperproduction strain[J]. **Industrial Microbiology**, 2012, 42(2): 43-50.(in Chinese)

[15] 滕利荣，孟庆繁. 生物学基础实验教程（第 3 版）[M]. 北京：科学出版社，2008.