

冬虫夏草头孢菌菌丝体液体发酵条件研究*

钟士清 胡文锋 罗国威 刘坚真

(华南农业大学食品科学系, 广州, 510642)

摘要 通过对冬虫夏草头孢菌(*Cephalosporium dongchongxiacae*)改良菌株 A10 的菌丝体液体发酵条件的研究, 我们掌握了其菌丝生长规律。其生长曲线呈典型的微生物生长曲线特点; 其发酵生长适宜温度为 26 ~ 28 ℃, 适宜 pH 值在 5 ~ 7 之间, 接种量以 5%(v/v) 为佳; 在整个发酵过程中, 对发酵通气量要求不高。

关键词 冬虫夏草头孢菌; 菌丝体; 菌丝体发酵

中图分类号 TQ920. 1

冬虫夏草作为一种昆虫寄生真菌, 由于其药用价值越来越受到人们的注意。但是要获得天然冬虫夏草子实体, 或全人工条件下培养冬虫夏草, 条件复杂、周期太长、产量有限、成本太高(沈发荣等, 1988, 高祖训等, 1991)。如果采用冬虫夏草液体发酵方法, 收获其发酵菌丝体和发酵液, 替代天然和人工栽培的子实体, 也许是一种解决问题的办法。据有关文献报道(罗信昌, 1994), 冬虫夏草液体发酵所获得菌丝体及发酵液, 其内含成份与子实体的相近, 药用与有效成份也相似。本研究旨在对虫草菌菌丝体液体发酵的发酵动力学、发酵工艺、发酵产品的质量作一个系统的研究, 以获得冬虫夏草菌丝体液体深层发酵工业化生产的完整的理论数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 冬虫夏草头孢菌(*Cephalosporium dongchongxiacae*)原始菌株由上海农科院食用菌研究所提供, 其改良菌株由本系微生物教研室提供, 编号为 A10。

1.1.2 斜面母种培养基 PDA 培养基, 0.11 MPa 灭菌 20 min。

1.1.3 种子培养基(%) 葡萄糖 2, 酵母粉 0.5, 蛋白胨 0.5, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05。pH 6.5。0.11 MPa 灭菌 20 min。

1.1.4 发酵培养基(%) 葡萄糖 4, 酵母粉 1, 蛋白胨 0.5, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05。pH 6.0, 0.11 MPa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 斜面母种培养 28 ℃ 培养 7 d。

1.2.2 种子培养 150 mL 三角瓶装 30 mL 种子基, 每瓶接种已培养 7 d 的斜面母种菌丝块适量, 用旋转式水浴摇床于 28 ℃, 200 r/min 培养 48 h。旋转式水浴摇床由美国 Lab-Line 公司出品。

1995-03-10 收稿

* 广东省六所高校联合攻关课题内容之一。

- 1.2.3 发酵培养 除装瓶量试验外,其余发酵试验项目,都用 150 mL三角瓶装 20 mL 发酵基,于旋转式水浴摇床 200 r/min培养,接种量 5%(V/V),除非特别说明培养温度均为 28℃。
- 1.2.4 发酵时间与菌丝生长关系 150 mL三角瓶装 20 mL 发酵基 28℃、200 r/min培养,接种量为 5%(V/V)。每隔 5 h 随机抽检发酵样品,收集菌丝体测干重;测定发酵液 O.D 值。
- 1.2.5 发酵温度与菌丝生长关系 设置 24, 26, 28, 30, 32℃ 作为发酵温度,分别在发酵 20, 30 h 测定发酵液 O.D 值和菌丝体干重。
- 1.2.6 发酵起始 pH 值与菌丝生长的关系 分别将发酵基起始 pH 值设定为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0。发酵 30 h 后测定发酵液 O.D 值和菌丝体干重。
- 1.2.7 装瓶量与菌丝生长关系 150 mL三角瓶分别装发酵基 10 mL,20 mL,30 mL,40 mL, 50 mL, 发酵 30 h 后测定发酵液 O.D 值及菌丝体干重。
- 1.2.8 接种量与菌丝生长关系 设定接种量为 5%, 7.5%, 10%(V/V), 发酵20,30 h后分别测发酵液O.D 值及菌丝体干重。
- 1.2.9 O.D 值测定 用上海第三分析仪器厂生产的 752 型分光光度计测定。取 10 mL 发酵液准确加入 10 mL 蒸馏水,混匀后在波长 560 nm 测定其 O.D 值。
- 1.2.10 菌丝干重测定 发酵液经稀释离心,蒸馏水洗涤再离心。取菌丝体于干燥箱中 80℃ 烘干,用分析天平测定菌丝体干重。
- 1.2.11 pH 值测定 上海雷磁仪器厂生产的 PHS-29A 型酸度计测定。

2 结果

2.1 发酵时间与菌丝生长关系

结果见表 1。发酵总时间 35 h。以发酵时间为横坐标,O.D 值和菌丝体干重为纵坐标绘制生长曲线。见图 1。

表 1 发酵时间与菌丝生长关系

发酵时间/h	0	5	10	15	20	25	30	35
发酵液 O.D 值	0.52	0.53	0.54	0.63	0.71	0.91	1.24	1.44
菌丝干重/g·L ⁻¹	1.4	1.5	2.9	5.2	7.7	18.0	21.0	20.7

由表 1 和图 1 可知,菌丝生长与发酵时间的关系呈典型的微生物生长曲线特性。其滞留适应期达 10 h, 10 h 后进入对数生长期。30~35 h 左右达到最高菌丝量,进入稳定期。O.D 值在发酵 35 h 达到最大值;但菌丝量在 30 h 达到最大值,35 h 菌丝量已呈下降趋势。发酵 30 h 后 O.D 值进一步上升,可能是因为随着发酵时间的延长菌丝代谢产物和胞外分泌物也随之增加而造成的。并且我们在

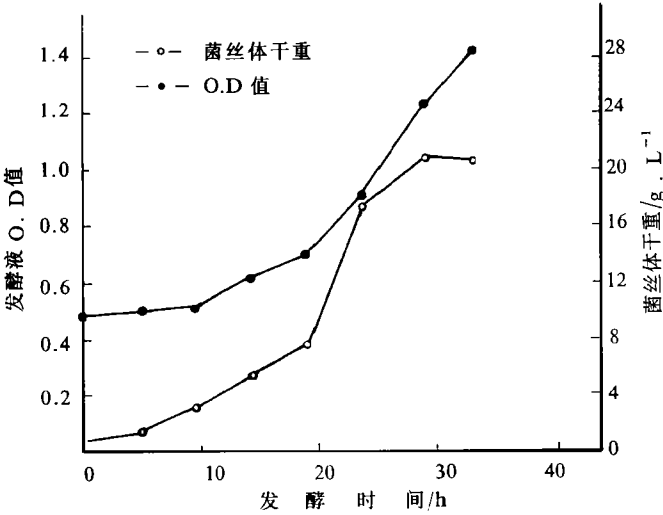


图 1 菌丝体生长曲线

试验过程中还观察到发酵 30 h 后,由于菌丝分泌的胞外物质越来越多,发酵液越来越浓稠,200 r/min 的旋转速度也难将其摇动,类似于静置培养,从而使通气量减少,这可能就是造成菌丝体量不再增加的原因。

2.2 发酵温度与菌丝生长关系

结果见表 2。可以看出当发酵温度由 24 ℃ 上升到 26 ℃,发酵 30 h,相同体积发酵液菌丝体干重随发酵温度的升高而增加。但当发酵温度为 28 ℃ 或更高时,相同体积的菌丝体干重明显减少。另外我们还观察到,当发酵温度为 32 ℃ 时,发酵 20 h 后菌丝体干重已不再增加。因此发酵温度对冬虫夏草头孢菌菌丝体生长有显著影响,其适宜的发酵温度在 26 ~ 28 ℃ 之间,比文献(张长铠,1992)报道的温度要高 3 ~ 4 ℃。说明 A10 菌株更适合于中温发酵,有利于大规模工业化生产。

表 2 发酵温度与菌丝生长关系

温度 / ℃	24	26	28	30	32
菌丝体干重/g · L ⁻¹	20.5	26.0	23.5	21.0	11.8

2.3 发酵起始 pH 与菌丝生长关系

结果见表 3。可看出该菌种有较广的生长适宜 pH 值范围,pH 值在 5.0 ~ 7.0 之间最适合于菌丝体生长。pH 值低于 5.0 或高于 7.0,菌丝体生长受到不同程度的抑制。

表 3 发酵起始 pH 对菌丝生长的影响

pH 值	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
菌丝体干重/g · L ⁻¹	14.2	17.8	20.8	20.6	22.3	20.4	16.4

2.4 装瓶量与菌丝生长的关系

结果见表 4。可发现,冬虫夏草头孢菌菌丝体发酵其菌丝体生长对装瓶量多少不是很敏感;发酵 30 h 后,装瓶量为 20 mL 的处理其菌丝体干重为 20.5 g · L⁻¹;装瓶量为 50 mL 的处理其菌丝体干重也能达到 18.1 g · L⁻¹。由此可推断该冬虫夏草头孢菌菌丝体发酵过程对装瓶量,或者说通气量要求不是很高,所以试验研究或工业化大生产的发酵基装瓶量可以适当提高。就我们的研究条件而言,如果考虑到其他因素如杂菌污染、粘稠度影响,当用 150 mL 三角瓶作发酵瓶时,还是以 20 mL/瓶的装量为好。

表 4 装瓶量对菌丝生长的影响

装量/ml	10	20	30	40	50
菌丝体干重/g · L ⁻¹	20.0	20.5	19.9	18.9	18.1

2.5 接种量与菌丝生长关系

结果见表 5。可知当发酵至 30 h,接种量对菌丝体生长量的影响不是很明显,各个处理的结果基本一致。从生产和研究方面来考虑应以低成本、低耗为前提,我们建议以 5%(V/V)的接种量为宜。

表5 接种量对菌丝生长的影响

接种量(V:V) / %	20h 菌丝体干重 /g · L ⁻¹	30h 菌丝体干重 /g · L ⁻¹
5.0	13.8	25.6
7.5	16.0	26.2
10.0	21.2	27.7

3 讨 论

综合以上结果得知:在本试验的条件下,该菌株的菌丝体发酵适宜温度在 26 ~ 28 ℃ 之间,pH 值 5~7。接种量为 5%(V/V),发酵 30 h 后菌丝达到最高生长量。

本文所报道的“冬虫夏草头孢菌菌丝体液体发酵条件的研究”只不过是系列研究的一部分。我们将在该研究结果的基础上,继续对该菌的营养要求、发酵工艺等方面作更深入的研究。

致谢 本校食品系 95 届毕业生:卢传宝、郑德华、骆文字参加部分工作。

参 考 文 献

- 沈发荣,杨跃雄,杨大荣,等.1988.云南冬虫夏草初步研究.微生物学通报,15(2):49 ~ 51
张长铠,赵友春,吴志红,等.1992.冬虫夏草菌丝生长的营养要求.微生物学通报,19(3):129~133
罗信昌.1994.冬虫夏草研究进展.中国食用菌,13(4):3~5
高祖训,陈 健,余 红,等.1991.全人工培养冬虫夏草研究.浙江农业大学学报,17(1):1~5

STUDY ON FERMENTATION CONDITIONS OF *Cephalosporium dongchongxiacae* MYCELIUM

Zhong Shiqing Hu Wenfeng Luo Guowei Liu Jianzhen
(Dept. of Food Science, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The mycelial growth pattern of the improved *Cephalosporium dongchongxiacae* strain A10 was found after studying fermentation conditions. The mycelium was cultured for 30 hours at 26 ~ 28 ℃ on a rotary bath shaker at a rotary speed of 200 r/min. The suitable initial pH of the medium was between 5~7. The optimal inoculation ratio was found to be 5%(V/V).

Key words *Cephalosporium dongchongxiacae*; mycelium; mycelial fermentation