DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.01.029

中国拟青霉液体深层发酵条件的优化

周家萍[1,2],孟梦[2,3*],夏国强[4]

(1. 天津科技大学 现代分析技术研究中心,天津 300457; 2. 天津科技大学 食品营养与安全国家重点实验室,天津 300457; 3. 天津科技大学 食品科学学院,天津 300457; 4. 优滋福(天津)食品科技有限公司,天津 300457)

摘　要:中国拟青霉(*Paecilomyces sinensis* sp nov,PS)属于冬虫夏草中的一个无性型菌株,研究表明其与冬虫夏草在生物活性成分方面十分接近。该文通过单因素和正交试验对中国拟青霉液体深层发酵进行条件优化。对中国拟青霉进行发酵培养,选取菌丝体生物量为指标,确定碳源、氮源和无机盐的最佳比例和最优发酵条件。中国拟青霉液体深层发酵的最佳培养基配比为:玉米粉 4.0%、葡萄糖 1.5%、黄豆粉 2.0%、酵母粉 0.3%、KH_2PO_4 0.2%、$MgSO_4$ 0.1%、$CaSO_4$ 0.1%、$ZnSO_4$ 0.03%。优化后的菌丝体生物量比优化前提高了 1.22 倍,而胞内糖肽产量与优化前相比提高了 54.0%。

关键词:中国拟青霉;液体发酵;生物量;正交试验;工艺优化

The Optimization of Liquid Submerged Fermentation Conditions of *Paecilomyces sinensis*

ZHOU Jia-ping[1,2], MENG Meng[2,3*], XIA Guo-qiang[4]

(1. Research Centre of Modern Analytical Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 3. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 4. Youzifu (Tianjin) Food Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: *Paecilomyces sinensis* sp nov is an anamorphic strain isolated from *Cordyceps sinensis*, which is traditional Chinese medicine. It exhibits high similarity to cordyceps sinensis in bioactive components. In this study, the conditions of submerged fermentation were optimized through single factor screening test and orthogonal experiments. The optimal ratio of carbon source ,nitrogen source and inorganic salt was identified, accessing to the mycelia biomass. The optimal medium ratio of the submerged fermentation was as follows: corn flour 4.0%, glucose 1.5%, soybean meal 2.0%, yeast extrct 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4$ 0.1%, $CaSO_4$ 0.1%, $ZnSO_4$ 0.03%. The biomass of mycelium after optimization was 1.22 times higher than that before. The yield of intracellular glycopeptide was increased by 54.0% compared with that before.

Key words: *Paecilomyces chinensis*; liquid fermentation; biomass; orthogonal experiments; process optimization

引文格式:

周家萍,孟梦,夏国强. 中国拟青霉液体深层发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发,2021, 42(1):172-176.

ZHOU Jiaping,MENG Meng,XIA Guoqiang. The Optimization of Liquid Submerged Fermentation Conditions of *Paecilomyces sinensis*[J]. Food Research and Development,2021, 42(1):172-176.

中国拟青霉(*Paecilomyces sinensis* sp nov,PS)是从虫草中分离后,进行发酵培养的无性型菌株[1]。并且中国拟青霉与天然虫草相比,药理学、形态学[2]及所含的有效化学成分极为相似[3]。因此从中国拟青霉中分离出具有生物活性的菌体对虫草的研究与应用具有非

作者简介:周家萍(1987—),女(汉),实验师,硕士研究生,研究方向:食品营养。

* 通信作者

常重要的意义。与传统的食药用真菌生产方式相比，真菌液体深层发酵技术有更为明显的优点[4]。研究人员对真菌进行液体发酵培养后，通过对其菌丝体进行检测，结果表明其菌丝体与该真菌的野生型子实体相比，生物活性物质的组成十分相似[5]。在真菌液体发酵培养过程中，不仅菌丝体会大量增殖，其发酵液中也会产生很多生理活性物[6]。因此，研究真菌液体深层发酵技术的意义重大[7]。本文以中国拟青霉为原材料，研究其培养基成分及发酵条件不同对中国拟青霉液体深层发酵产生的影响，从而优化了中国拟青霉液体深层发酵条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中国拟青霉(*Paecilomyces sinensis*)：保存于天津科技大学菌种保藏中心。

葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、果糖、麦芽糖、蛋白胨、酵母粉、氯化铵、硝酸铵、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、三氟乙酸：分析纯，天津市北方天医化学试剂厂；乙醇、丙酮、乙醚、浓硫酸、冰醋酸、无水葡萄糖、盐酸：分析纯，天津化学试剂一厂；Sepharose 4B：上海 Pharmacia 拜力公司；透析袋（COMW 7000）：北京 Sorlabio 生物科技公司。

1.2 仪器与设备

SQ810C 高压蒸汽灭菌锅：日本雅玛拓公司；DGG-102-2BS 电热鼓风干燥箱：天津天宇机电有限公司；FE28 pH 测定计：瑞士 Mettler Toledo 有限公司；BSA822 电子天平：美国 Sartorius 公司；EPOCH 酶标仪：美国 BioTek 公司；SP88857195 磁力搅拌器：美国Thermo Fisher 公司；Vortex 涡旋振荡混合器：德国 IKA 公司；KQ5200DB 超声波清洗器：昆山市超声仪器有限公司；5920R 冷冻高速离心机：德国 Eppendorf 公司；UV-2550PC 紫外可见分光光度计：日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化及培养

在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上接种保存的中国拟青霉母种，将其置于 25 ℃ 培养箱中进行培养，菌丝长满斜面后备用。从斜面上挑取活化好两块菌丝体，将其接入到装有液体种子培养基的三角瓶中，置于 25 ℃的摇床上振荡，从而获取一级种子液。将菌丝体打碎，将一级种子液接入到装有液体种子培养基的三角瓶中，置于 25 ℃的摇床上振荡 4 d，从而获取二级种子液。最后将种子液接入装有发酵培养基的三角瓶中，将其置于 25 ℃的摇床中振荡培养 5 d。

1.3.2 中国拟青霉液体深层发酵培养基的优化

1.3.2.1 碳源、氮源的单因素筛选试验

碳源筛选试验：葡萄糖分别以 4.0%的玉米粉、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、果糖替代；氮源筛选试验：蛋白胨分别以酵母粉、黄豆粉、麸皮、硝酸铵、氯化铵替代，含量以 0.5%蛋白胨的全氮含量计。各组设计 3 个重复，然后进行发酵培养。

1.3.2.2 碳源、氮源正交试验

根据碳源与氮源的单因素筛选的结果，选择试验结果较好的碳源、氮源各两个，设计 $L_9(3^4)$正交试验，发酵培养条件同 1.3.2.1，每组设 3 个重复，如表 1 所示。

表 1 碳源、氮源正交试验设计表

Table 1 Scheme of carbon and nitrogen source in orthogonal test

水平	因素			
	A 玉米粉/%	B 葡萄糖/%	C 黄豆粉/%	D 酵母粉/%
1	3.5	1.0	1.0	0.1
2	4.0	1.5	2.0	0.2
3	4.5	2.0	3.0	0.3

1.3.2.3 无机盐正交试验

根据最佳碳源、氮源培养基的试验结果，选取 KH_2PO_4、$MgSO_4$、$CaSO_4$、$ZnSO_4$，设计 $L_9(3^4)$正交试验，发酵条件同 1.3.2.1，每组设 3 个重复，如表 2 所示。

表 2 无机盐正交试验设计表

Table 2 Scheme of inorganic saltin in orthogonal test

水平	因素			
	E KH_2PO_4/%	F $MgSO_4$/%	G $CaSO_4$/%	H $ZnSO_4$/%
1	0.100	0.050	0.100	0.000
2	0.200	0.100	0.200	0.001
3	0.300	0.150	0.300	0.003

1.3.3 菌丝体生物量的测定

首先过滤液体发酵所得菌体，再用蒸馏水反复漂洗菌体，将洗好的菌体放置于预处理好的玻璃平皿上，在 60 ℃恒温的鼓风干燥箱干燥至质量不发生改变为止，将其放在分析天平称重，然后减去玻璃平皿的质量，即为发酵液菌体的质量，最后除以该发酵液的体积，即为生物量。每组重复 3 次，取平均值[8]。

1.3.4 胞内糖肽的测定

1.3.4.1 胞内糖肽的提取

将烘干的菌丝体粉碎，过筛后称取 1.0 g，加入 100 mL 的蒸馏水，在 90 ℃条件下水浴提取 2 h，然后 7 000 r/min 离心 20 min，取上清液，50 ℃条件下进行旋蒸，加入无水乙醇，在4 ℃条件下放置 24 h 进行醇沉，6 000 r/min 离心 15 min，沉淀经 sevage 法除蛋白沉淀 60 ℃真空干燥至恒重，即得中国拟青霉胞内糖肽粗

品,命名为 CPS-Ⅰ。

1.3.4.2 糖含量的测定

标准曲线的绘制：称取干燥的无水葡萄糖标准品,配成 50 mL 的 100 μg/mL 的标准溶液。分别吸取标准溶液 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 放于具塞比色管中,以超纯水补至 1 mL,然后加入 6%苯酚 500 μL,混匀,迅速加入浓硫酸 2.5 mL,摇匀后沸水浴处理 15 min,冷水浴冷却后于 490 nm 处测吸光度,以葡聚糖浓度(mg/mL)为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得标准回归方程。标准曲线线性回归方程为：$y=4.577\,9x+0.004$($R^2=0.999$)。

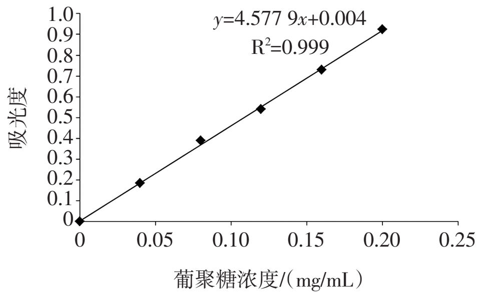

图 1 葡聚糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucanase

1.3.4.3 换算系数的计算

糖肽粗品组成成分不单一，单糖组分也不单一，这些单糖经苯酚-硫酸法显色后吸光度也不完全一样，而制作标准曲线时采用的是单一葡萄糖为标准品,这样会存在一定的误差,因此需用换算因子 f 加以校正。

f=实际的 CPS-I 质量/测定的理论 CPS-I 质量

理论 CPS-Ⅰ质量：称取 5 mg CPS-Ⅰ定容至 50 mL,分别取 1.0 mL 到 3 支具塞试管中，按 1.3.4.2 方法显色,于 490 nm 波长处测定吸光度,以 1.0 mL 蒸馏水为空白。最后根据回归方程计算理论 CPS-Ⅰ含量。

2 结果与分析

2.1 最佳碳源的选择

碳源对中国拟青霉液体发酵的影响见图 2。

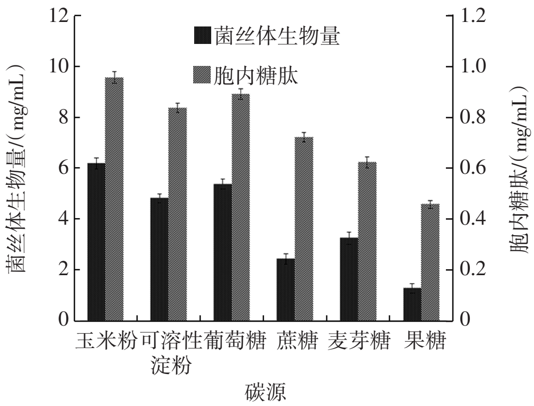

图 2 碳源对中国拟青霉液体发酵的影响

Fig.2 Effect of carbon sources on liquid fermentation of *Paecilomyces sinensis*

碳源是发酵培养基的重要优化因素之一,同时也是细胞生命活动所需的主要能量来源[9]。由图 2 可知,中国拟青霉菌丝体都可利用这 6 种碳源，表明中国拟青霉既可利用复合碳源,也可利用小分子碳源。其中以菌丝体生物量为指标时,以玉米粉、葡萄糖和可溶性淀粉最佳,分别为 6.19、5.37 mg/mL 和 4.81 mg/mL,其次是麦芽糖和蔗糖,分别为 3.25 mg/mL 和 2.42 mg/mL,果糖最少,为 1.28 mg/mL。以胞内糖肽产量为指标时,玉米粉和葡萄糖较佳，分别为 0.957、0.891 mg/mL,其次是可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖和果糖,分别为 0.837、0.721、0.062 3 mg/mL 和 0.045 8 mg/mL。由于玉米粉价格低,来源广,因此最终选择玉米粉;同时菌体可直接利用葡萄糖,将发酵周期缩短。因此最终选择玉米粉、葡萄糖作为正交试验中的碳源。

2.2 最佳氮源的选择

氮源对中国拟青霉液体发酵的影响见图 3。

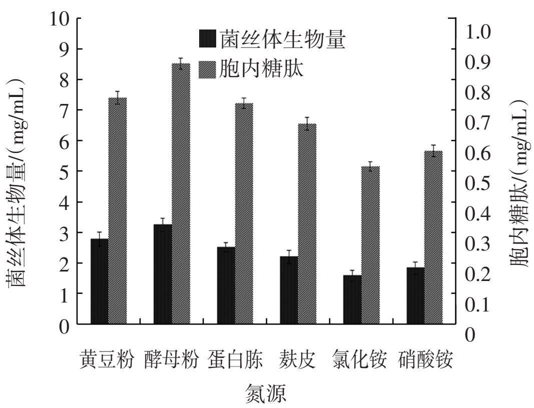

图 3 氮源对中国拟青霉液体发酵的影响

Fig.3 Effect of nitrogen source on liquid fermentation of *Paecilomyces sinensis*

有研究表明绝大多数的真菌培养基经过含有机氮源的培养基发酵后,与含无机氮源(硝酸盐、铵盐)的培养基相比,生物量和产量均得到一定程度的提升[10]。从图 3 可以看出,中国拟青霉在含酵母粉、黄豆粉、蛋白胨、麸皮的培养基中均能得到较好的生长,而在含氯化铵、硝酸铵的培养基中生长较为缓慢,说明中国拟青霉对有机氮的利用比无机氮好。以菌丝体生物量和胞内糖肽产量为指标,以酵母粉作为氮源时效果最佳,分别为 3.25、0.853 mg/mL,其次为黄豆粉,分别为 2.78、0.741 mg/mL。由于黄豆粉价格低,来源广,因此最

终选择黄豆粉，同时酵母粉作为生长因子，对菌体的生长有利并能够使发酵周期有效缩短。因此，选择黄豆粉和酵母粉作为氮源进行正交试验。

2.3 碳源、氮源最佳组合的确定

碳、氮源正交试验的结果见表 3。以菌丝体生物量为指标的碳、氮源正交试验结果的极差分析见表 4，以胞内糖肽为指标的碳、氮源正交试验结果的极差分析见表 5。

表 3 碳、氮源正交试验的结果

Table 3 Results of orthogonal experiments on carbon and nitrogen sources

序号	A	B	C	D	菌丝体生物量/(mg/mL)	胞内糖肽/(mg/mL)
1	1	1	1	1	8.21±0.11	0.741±0.031 2
2	1	2	2	2	9.57±0.13	1.123 1±0.020 9
3	1	3	3	3	10.09±0.13	1.251 3±0.028 7
4	2	1	2	3	10.55±0.12	1.610 2±0.025 3
5	2	2	3	1	10.18±0.09	1.295 0±0.028 4
6	2	3	1	2	9.96±0.11	1.139 4±0.029 2
7	3	1	3	2	10.13±0.08	1.279 5±0.030 1
8	3	2	1	3	10.21±0.11	1.321 9±0.028 5
9	3	3	2	1	9.48±0.10	1.099 4±0.020 5

表 4 以菌丝体生物量为指标的碳、氮源正交试验结果的极差分析

Table 4 Analysis of orthogonal test on carbon and nitrogen sources with mycelial biomass as target

菌丝体生物量	A	B	C	D
k_1	27.87	28.89	28.38	27.87
k_2	30.69	29.96	29.60	29.66
k_3	29.82	29.53	30.40	30.85
R	0.94	0.36	0.67	0.99

选取玉米粉(A)、葡萄糖(B)、黄豆粉(C)和酵母粉(D)作为正交试验中的因素，从而筛选出培养基中碳源、氮源的最佳组合。由表 3 的结果可以看出，不同组合的选择导致发酵的结果也不同。观察表 4、表 5 中极

表 5 以胞内糖肽为指标的碳、氮源正交试验结果的极差分析

Table 5 Analysis of orthogonal test on carbon and nitrogen sources with glycopeptides as target

胞内糖肽	A	B	C	D
k_1	3.115 4	3.630 7	3.202 3	3.135 4
k_2	4.044 6	3.740 0	3.832 7	3.542 0
k_3	3.700 8	3.490 1	3.825 8	4.184 3
R	0.31	0.26	0.21	0.35

差分析可见，以菌丝体生物量为指标，极差顺序为酵母粉>玉米粉>黄豆粉>葡萄糖，极差数据为 0.99、0.94、0.67、0.36。以胞内糖肽为指标，极差顺序为酵母粉>玉米粉>葡萄糖>黄豆粉，极差数据为 0.35、0.31、0.26、0.21。两种指标均表明酵母粉的浓度是对发酵影响最大的因素。对菌丝体生物量而言，应该选择 $A_2B_2C_3D_3$ 组合。以胞内糖肽产量而言，应选择 $A_2B_2C_2D_3$ 组合。由于黄豆粉(C)的影响对发酵的影响作用较小，故选择组合 $A_2B_2C_3D_3$ 或者 $A_2B_2C_2D_3$ 相差并不大，但考虑到降低试验成本，因此选择黄豆粉(C)的水平为 C_2，试验最终选择组合 $A_2B_2C_2D_3$，即玉米粉 4.0%、葡萄糖 1.5%、黄豆粉 2.0%、酵母粉 0.3%。在此最优组合下，菌丝体生物量为 10.78 mg/mL，胞内糖肽为 1.701 2 mg/mL。

2.4 无机盐最佳组合的确定

在确定碳源、氮源最佳组合后，选择 KH_2PO_4(E)、$MgSO_4$(F)、$CaSO_4$(G)、$ZnSO_4$(H)4 种无机盐作为正交试验中的因素，从而筛选出无机盐的最佳组合。正交试验结果见表 6。以菌丝体生物量和胞内糖肽为指标的正交试验极差分析见表 7 和表 8。

由表 6 结果可知，不同组合的选择导致发酵结果也是不同的。由表 7、表 8 的极差分析可见，以菌丝体生物量为指标，极差顺序为 $CaSO_4$>KH_2PO_4>$MgSO_4$>$ZnSO_4$，极差数据为 0.61、0.51、0.40、0.29。以胞内糖肽为指标，极差顺序为 KH_2PO_4>$MgSO_4$>$CaSO_4$>$ZnSO_4$，极

表 6 无机盐正交试验的结果

Table 6 Results of orthogonal tests on inorganic salts

序号	E(KH_2PO_4)	F($MgSO_4$)	G($CaSO_4$)	H($ZnSO_4$)	菌丝体生物量/(mg/mL)	胞内糖肽/(mg/mL)
1	1	1	1	1	9.65±0.10	1.605 2±0.013 1
2	1	2	2	2	10.28±0.11	1.548 7±0.012 7
3	1	3	3	3	10.49±0.09	1.491 9±0.028 7
4	2	1	2	3	10.67±0.13	1.712 4±0.015 5
5	2	2	3	1	11.13±0.12	1.742 1±0.013 2
6	2	3	1	2	10.14±0.14	1.660 8±0.018 0
7	3	1	3	2	10.21±0.11	1.568 7±0.012 6
8	3	2	1	3	10.34±0.10	1.691 1±0.017 5
9	3	3	2	1	10.57±0.13	1.483 2±0.014 7

表 7 以菌丝体生物量为指标的无机盐正交试验结果的极差分析

Table 7 Analysis of orthogonal test on inorganic salt with mycelial biomass as target

菌丝体生物量	E（KH_2PO_4）	F（$MgSO_4$）	G（$CaSO_4$）	H（$ZnSO_4$）
k_1	30.42	30.53	30.13	31.35
k_2	31.94	31.75	31.52	30.63
k_3	31.12	31.20	31.96	31.50
R	0.51	0.40	0.61	0.29

表 8 以胞内糖肽为指标的无机盐正交试验结果的极差分析

Table 8 Analysis of orthogonal test on inorganic salt with glycopeptides as target

胞内糖肽	E（KH_2PO_4）	F（$MgSO_4$）	G（$CaSO_4$）	H（$ZnSO_4$）
k_1	4.645 8	4.886 3	4.957 1	4.830 5
k_2	5.115 3	4.981 9	4.744 3	4.778 2
k_3	4.743 0	4.632 9	4.802 7	4.895 4
R	0.16	0.12	0.07	0.04

差数据为 0.16、0.12、0.07、0.04。结果表明在中国拟青霉液体发酵过程中，$CaSO_4$ 的浓度是对菌丝体生物量的影响最大的因素，而 KH_2PO_4 的浓度是对胞内糖肽得率的影响最大的因素。对菌丝体生物量而言，应当选择组合 $E_2F_2G_3H_3$，对胞内糖肽产量而言，应当选择组合 $E_2F_2G_1H_3$。由极差顺序可知，$CaSO_4$ 的浓度对发酵的影响作用较小，因此选择组合 $E_2F_2G_3H_3$、$E_2F_2G_1H_3$ 相差不大，考虑到降低试验成本，因此选择 $CaSO_4$（G）的水平选择为 G_1，最终确定组合 $E_2F_2G_1H_3$，选择无机盐的配比为：KH_2PO_4 0.2%，$MgSO_4$ 0.1%，$CaSO_4$ 0.1%，$ZnSO_4$ 0.03%。在此最优组合下，菌丝体生物量为 11.02 mg/mL，胞内糖肽为 2.012 5 mg/mL。

3 结论

本文对中国拟青霉液体深层发酵工艺进行了优化，以发酵获取的菌丝体生物量和胞内糖肽产量为指标，通过单因素筛选试验和正交试验，对碳源、氮源及无机盐进行筛选，确定了中国拟青霉液体深层发酵的最优培养基配比为玉米粉 4.0%、葡萄糖 1.5%、黄豆粉 2.0%、酵母粉 0.3%、KH_2PO_4 0.2%，$MgSO_4$ 0.1%，$CaSO_4$ 0.1%，$ZnSO_4$ 0.03%。本试验在进行接种前将制备好的所有种子液混合到一个三角瓶中，然后将其接种到优化前的发酵培养基和优化后的发酵培养基分别发酵 5 d。优化后的菌丝体生物量与优化前相比提高了 1.22 倍，而胞内糖肽产量与优化前相比提高了 54.0%。

参考文献：

[1] 陈英洋，陈国熙. 中国拟青霉与冬虫夏草的微量元素含量分析比较[J]. 福建医科大学学报，1989(3): 201–203 .

[2] 张传开，袁盛榕. 冬虫夏草和中国拟青霉对细胞免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床，1998(3): 21–23.

[3] 张传开，袁盛榕，刘进学. 冬虫夏草和中国拟青霉水提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 首都医科大学学报，1999, 20(1): 17–20.

[4] Misaki A, Kakuta M, Sasaki T, et al. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 1981, 92(1):115–129.

[5] Lee J S, Cho J Y, Hong E K. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78:162–168.

[6] Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation[J]. Research in Immunology,1998,149(7/8): 685–688.

[7] Oh P S, Lim K T. Antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne glycoprotein[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226 (3): 507–515.

[8] 宋士良，杨瑞长，陀永. 金针菇 FV008 深层发酵工艺的研究[J]. 食品与发酵工业，1998, 24 (3): 8–12.

[9] Okhrel C P, Ohga S. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*[J]. Food Chemistry, 2007, 105: 641–646.

[10] Xiao J H, Chen D X, Wan W H, et al. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps* jiangxiensis using desirability functions[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(8): 1887–1893.

加工编辑：冯娜

收稿日期：2019–12–04