

拟黑虫草菌 cnig-56 固体发酵生产虫草素工艺

陈自宏, 虞泓*, 曾文波, 杨俊媛, 袁静, 陈毅坚
(云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室, 云南昆明 650091)

摘要: 以虫草素含量为指标, 采用正交实验优化了适合拟黑虫草 (*Cordyceps nigrella*) 菌株 cnig-56 固体发酵的培养基, 并探讨了该菌株固体发酵的最佳条件。结果表明, 菌龄为 3 d 的拟黑虫草菌种按 10% 接种量接入优化的固体培养基上 (配方为大米粉 9.9%, 青稞粉 6.6%, 玉米粉 9.9%, 蚕蛹粉 3.3%, 粗麸皮 70.15%, KH_2PO_4 0.05%, MgSO_4 0.1%) 于 24 ℃ 发酵培养 30 d, 其产物的虫草素含量最高为 101 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 拟黑虫草; 固体培养; 正交实验; 虫草素

虫草是一种重要的传统中药, 虫草属中的大部分种都具有很高的应用价值, 如冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*)、蛹虫草 (*C. militaris*)、蝉花 (*C. cicadae*)、古尼虫草 (*C. gunnii*) 等^[1]。虫草素是虫草属真菌产生的一种重要的核苷类次生代谢产物, 具有抑制肿瘤、抗病毒、免疫调节、降血糖和抑制 mRNA 翻译的作用^[2~5]。虫草属真菌开发应用的重要途径是对其无性型发酵, 生产虫草素, 其中液体发酵是目前生产的主要形式^[1], 然而固体发酵也逐渐显现出其优势, 受到研究者的重视^[6~9]。拟黑虫草 (*Cordyceps nigrella*) 是虫草属的一种, 具有较高的药用价值, 民间主要用来医治眼疾等。陈毅坚等研究了拟黑虫草子实体的人工培养条件^[10], 而关于该种的其它研究鲜有报道。笔者采用正交试验, 以虫草素含量为指标, 优化了拟黑虫草菌 cnig-56 菌株的固体发酵条件, 以期发酵生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

拟黑虫草 (*C. nigrella*) 菌种 cnig-56 由云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室分离并保存。

1.2 培养基

摇瓶培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 蛋白胨 1%。

斜面培养基: 成分同摇瓶培养基, 另添加琼脂 2%。

1.3 固体发酵条件优化

1.3.1 菌种制备

将菌种接在斜面培养基上 28 ℃ 培养 4 d, 取 1 cm × 1 cm 的菌块接入装有 100 mL 摇瓶培养基的 500 mL 三角瓶中, 120 r/min, 28 ℃ 培养。

1.3.2 正交试验优化固体培养基配方

以大米粉、蚕蛹粉、青稞粉、玉米粉 4 个因素, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 因素水平见表 1。按正交设计组合配制 9 组配方, 装入 500 mL 三角瓶中, 再加入 KH_2PO_4 0.05% 和 MgSO_4 0.1%, 补充加入粗麸皮 (用 16 目筛除去细麸皮), 使培养基干重达到 45 g, 料水比为 1:1.2, 搅拌均匀后用

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels

水平 Level	因素 Factor			
	A 大米粉	B 青稞粉	C 玉米粉	D 蚕蛹粉
	Rice powder (%)	Barley powder (%)	Corn powder (%)	Silkworm chrysalis powder (%)
1	3.3	3.3	3.3	3.3
2	6.6	6.6	6.6	6.6
3	9.9	9.9	9.9	9.9

收稿日期: 2009-11-26 原稿; 2010-03-10 修改稿

基金项目: 云南省自然科学基金重点项目 (编号: 2008CC019) 的部分研究内容

作者简介: 陈自宏 (1978 -), 男, 云南大学在读硕士研究生, 主要从事大型真菌及其开发应用研究。

* 本文通讯作者 E-mail: herbfish@163.com

透气胶塞塞紧,常规灭菌,冷却后接入菌龄 4 d 的拟黑虫草菌种,接种量 10 % (w/w),于 28 ℃ 黑暗培养 25 d。取出三角瓶中的培养物,50 ℃ 干燥至恒重,粉碎过 60 目筛,用 HPLC 法检测虫草素含量^[11]。以发酵产物的虫草素含量为指标,确定最佳培养基配方。每个处理重复 3 次。

1.3.3 接种菌龄

将在母种摇瓶培养基上培养 3、4、5 d 的菌种分别接入正交试验筛选出的最优培养基中,其它操作按 1.3.2 进行,以虫草素含量为指标,确定最佳接种菌龄。

1.3.4 接种量

将最佳菌龄的菌种接入最优培养基中,设 5 %、10 %、15 % 3 个接种量,其它操作按 1.3.2 进行,确定最佳接种量。

1.3.5 发酵时间

最佳菌龄的菌种按最适接种量接入最优培养基中,28 ℃ 黑暗培养,分别在第 14、18、22、26、30、34 天取样,按 1.3.2 中的方法测定虫草素含量,确定最佳发酵时间。

1.3.6 发酵温度

设 10、16、20、24、28 ℃ 5 个培养温度,采用上述试验得到的最佳条件,其它操作按 1.3.2 进行,确定最佳发酵温度。

2 结果与分析

2.1 固体发酵培养基配方优化

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal test data

试验号 No.	因素 Factor				虫草素含量 Cordycepin content (μg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	41
2	1	2	2	2	37
3	1	3	3	3	32
4	2	1	2	3	37
5	2	2	3	1	67
6	2	3	1	2	26
7	3	1	3	2	52
8	3	2	1	3	47
9	3	3	2	1	65
K ₁	110	130	114	173	
K ₂	130	151	139	125	
K ₃	164	123	151	116	
K _{1/3}	36.7	43.3	38.0	57.7	
K _{2/3}	43.3	50.3	46.3	41.7	
K _{3/3}	54.7	41.0	50.3	38.7	
R	18.0	9.3	12.3	19.0	

正交试验结果表明,影响虫草素含量的主次顺序为: D > A > C > B, 最优组合为: A₃B₂C₃D₁ (见表 2); 即生产虫草素最优培养基配方为: 大米粉 9.9 %, 青稞粉 6.6 %, 玉米粉 9.9 %, 蚕蛹粉 3.3 %, 粗麸皮 70.15 %, KH₂PO₄ 0.05 %, MgSO₄ 0.1 %, 料水比为 1 : 1.2。

2.2 菌龄

菌龄为 3 d 时,虫草素含量最高,随菌龄的增加,虫草素含量显著下降。当菌龄为 1、2 d 时,菌丝体刚开始生长,菌丝含量很少,当菌龄增加,菌丝开始老化,不利于在新鲜固体培养基上生长,所以菌种的最佳菌龄为 3 d。

2.3 接种量

接种量的试验表明,接种量为 15 % 时,虫草素含量最高,但统计分析结果表明,接种量为 10 % 和 15 % 之间差异不显著,考虑到实际生产中减少菌种制备的工作量,选择 10 % 的接种量为最佳接种量。

2.4 发酵时间

在固体培养基中接种拟黑虫草菌后,随培养时间的延长,培养基中的菌丝不断增多,初期呈白色小点分布其间;约 10 d 左右,整瓶培养基都密布白色菌丝;而后菌丝不断增多增密,后期(约 30 d)可产生约 1 cm 厚的菌苔;28 d 左右,菌苔表面菌丝颜色发青,镜检可看到有较多的分生孢子产生。随着固体发酵时间的延长虫草素含量逐渐升高,30 d 时,虫草素含量为 55.59 μg/g,但 30 d 后虫草素含量有下降趋势,故最佳发酵时间为 30 d。

2.5 温度

在 10 ℃ 培养时,菌丝生长缓慢,虫草素含量也低。随着培养温度的升高,菌丝生长加快,虫草素含量逐渐增加,24 ℃ 时,虫草素含量最高,达到 101 μg/g。28 ℃ 时,虫草素的含量显著下降,故 24 ℃ 为最佳发酵温度。

3 讨论

试验结果表明,菌龄为 3 d 的拟黑虫草接种于固体培养基上(配方为大米粉 9.9 %, 青稞粉 6.6 %, 玉米粉 9.9 %, 蚕蛹粉 3.3 %, 粗麸皮 70.15 %, KH₂PO₄ 0.05 %, MgSO₄ 0.1 %) 于 24 ℃ 发酵培养 30 d 得到的虫草素含量最高为 101 μg/g, 这个结果低于液体发酵菌粉(液体发酵培养液经旋转蒸发器浓缩后 50 ℃ 干燥至恒重的

混合物)的虫草素含量(425 $\mu\text{g/g}$),高于野生拟黑虫草的虫草素含量(39 $\mu\text{g/g}$)^[12],但显著低于蛹虫草固体发酵得到的虫草素含量^[13],这可能是由于物种的差别造成的。

许多现代生物制品固体发酵的产率比液体深层发酵高得多,这是因为液体深层发酵产生的大量发酵废水、通气与机械搅拌的高动力能耗,成为液体深层发酵进一步发展的障碍,迫使其向高浓度、高黏度方向发展,然而高浓度、高黏度的极限就是固体发酵^[14]。韦会平等优化了蛹虫草的固体发酵条件,使培养基中的虫草素含量比传统液体发酵方法的最高产量高近 2 倍,并且培养时间缩短 2 d^[13]。笔者仅测定了固体发酵产物中的虫草素含量,关于固体和液体发酵对拟黑虫草虫草素产量的影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 林群英,钟月金,李泰辉,等. 虫草属生物学研究进展[J]. 食用菌学报,2006,13(2):89-92.
- [2] 李祝,刘爱英,梁宗琦. 虫草菌素的生物活性及检测方法[J]. 食用菌学报,2002,9(1):57-62.
- [3] 陈畅,罗珊珊,张长铠,等. 3 种虫草抗氧化活性的研究[J]. 中国生化药物杂志,2004,25(4):212-214.
- [4] 陈桂宝,罗梅初,刘实晶,等. 蛹虫草的药理作用研究[J]. 中草药,1997,28(7):415-417.
- [5] SELDIN D,URBANO SIA,MCCAFFREY R, et al. Phase I trial of cordycepin and eoxycoformycin in TdT-positive acute leukemia [J]. Blood,1997,90(1):246.
- [6] 周礼红,蒋春玲. 红曲霉与蛹虫草固体共发酵初步研究[J]. 食用菌,2008,30(3):40-42.
- [7] 刘杰麟,梁宗琦,刘爱英. 古尼虫草子实体的人工培养[J]. 西南农业学报,1990,3(4):6-10.
- [8] 徐莉,李春如,荣跃文,等. 3 种植物激素对粉被虫草子实体形成的影响[J]. 安徽农业大学学报,2008,35(1):80-83.
- [9] 王常鑫,杨春伟. 人工栽培虫草的工艺研究与分析[J]. 医药世界,2005(12):76-78.
- [10] 陈毅坚,陈名红. 拟黑虫草子实体的人工培育研究[J]. 中国食用菌,2007,26(1):21-23.
- [11] 陈自宏,虞泓,曾文波,等. 蛹草拟青霉固体发酵条件优化[J]. 中国食用菌,2009,28(6):45-47.
- [12] 马荣锋. 五种虫草无性型研究[D]. 昆明:云南大学,2009.
- [13] 韦会平,叶小莉,张华英,等. 用蛹虫草固体发酵法高效生产虫草素的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(19):2159-2162.
- [14] 宋欣. 微生物酶转化技术[M]. 北京:化学工业出版社,2004:202-203.

[本文编辑] 朱丽娜

Solid Fermentation Technique for Cordycepin Production by *Cordyceps nigrella* Strain cnig-56

CHEN Zihong, YU Hong*, ZENG Wenbo, YANG Junyuan, YUAN Jing, CHEN Yijian
(Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: Orthogonal testing was used to optimize selected parameters affecting cordycepin production by *Cordyceps nigrella* (strain cnig-56) grown under solid-state conditions. Highest cordycepin levels (101 $\mu\text{g/g}$) were recorded after 30 d cultivation at 24 °C on a medium consisting of 9.9% rice powder, 6.6% highland barley powder, 9.9% corn powder, 3.3% dried silkworm chrysalis powder, 70.15% unrefined wheat bran, 0.05% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a solid water ratio of 1:1.2, and using 3-day-old mycelium (10% w/w) as inoculum.

Key words: *Cordyceps nigrella*; solid fermentation; orthogonal test; cordycepin