

蛹虫草拟青霉固体发酵条件优化*

陈自宏, 虞泓**, 曾文波, 杨俊媛, 杨钟林, 袁静

(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: 为了提高蛹虫草拟青霉 *cmily-02* 产虫草素得率, 采用正交实验优化固体发酵培养基配方。以虫草素产量为指标, 通过高效液相色谱法检测, 筛选出最优固体培养基为: 大米粉 2.0%、青稞粉 0.5%、玉米粉 3.0%、黄豆粉 0.5%、粗麦麸 30%、 KH_2PO_3 0.05%、 MgSO_4 0.1%。从培养温度和干燥温度 2 方面, 探讨了温度对虫草素产量的影响, 得出产虫草素的最佳培养温度为 28℃, 最佳干燥温度为 30℃。通过固体发酵条件优化, 虫草素产量可达到 1 850 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

关键词: 蛹虫草拟青霉; 固体发酵; 正交实验; HPLC

中图分类号: S646.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-8310 (2009) 06-0045-03

Study on Optimizing the Solid Fermentation Condition of *Paecilomyces militaris*

CHEN Zi-hong, YU Hong, ZENG Wen-bo, YANG Jun-yuan, YANG Zhong-lin, YUAN Jing

(Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091)

Abstract: In order to increase the yield of cordycepin in the culture mycelia of *Paecilomyces militaris* *cmily-02*, the best solid culture medium was screened by orthogonal tests and the content of cordycepin in the culture mycelia was determined by HPLC. The results showed that the optimum medium components were rice flour 2.0%, highland barley flour 0.5%, indian meal 3.0%, soybeans meal 0.5%, outerbran 30%, KH_2PO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% and so on. The optimum culture conditions were culture temperature 28℃, drying temperature 30℃ with the total yield of cordycepin reaching as high as 1 850 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Key words: *Paecilomyces militaris*; Solid fermentation; Orthogonal test; HPLC

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link, 隶属真菌界 (Fungi)、子囊菌门 (Ascomycota)、子囊菌纲 (Ascomycetes)、粪壳菌亚纲 (Sordariomycetidae)、肉座菌目 (Hypocreales)、麦角菌科 (Clavicipitaceae)、虫草属 (*Cordyceps*)^[1]。别名北冬虫夏草、北虫草。在 1772 年巴黎科学院院士会上, 被作为虫草属的模式种, 正式命名为 *Cordyceps militaris*。

1951 年, Cunningham 等^[2,3]观察到被蛹虫草寄生的昆虫组织不易腐烂, 随后从中分离到一种腺苷类活性物质, 命名为虫草菌素 (Cordycepin)。在此之后 Kaczka 等^[4]从无冠构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中亦可分离出这种物质, 这是迄今在虫草属真菌以外惟一报道分离出虫草菌素

的菌种。此后在虫草属一些其它种中也检测到了虫草菌素的存在^[5]。

虫草菌素又称虫草素、蛹虫草菌素, 3'-脱氧腺苷, 它是第 1 个从真菌中分离出来的核苷类抗菌素。其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$, 分子量为 251 D, 熔点 230℃~231℃, 溶于水、热乙醇和甲醇, 不溶于苯、乙醚和氯仿, 紫外光的最大吸收波长为 259 nm^[6,7]。经研究表明虫草素具有抑制肿瘤、抗病毒、免疫调节、降血糖和抑制 mRNA 翻译的作用, 其中治疗白血病已进入 II 期临床试验^[8-11]。

刘祝等^[12]研究最好的培养基配比可将该菌株的虫草素含量提高到 1.12%, 比用 Czapek 培养基提高 8.1 倍。文庭池^[13]报道液体培养蛹虫草生物量的最佳温度为 20℃, 而产

* 项目来源: 云南省自然科学基金重点项目“云南虫草遗传资源及其开发利用研究”(2008CC019)。

作者简介: 陈自宏 (1978-), 男, 在读硕士, 主要从事大型真菌研究及开发应用。

** 通讯作者: 虞泓, 教授, 博士生导师。E-mail: hongyu@ynu.edu.cn 或 herbfish@163.com

收稿日期: 2009-10-29

生虫草素的最佳温度为 26℃。

采用正交设计, 以蛹草拟青霉 cmily-02 为实验菌株, 筛选出最优固体培养基, 并优化了其培养温度及干燥温度。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

蛹草拟青霉 cmily-02 为云南云百草实验室保存菌。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基

PDA 加 1% 蛋白胨 (PPDA)。

1.2.2 种母摇瓶培养基

未加琼脂的 PPDA 营养液。

1.3 固体发酵条件优化

1.3.1 固体培养基配方

采用大米粉、黄豆粉、青稞粉、玉米粉 4 个因素, 应用 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交试验, 因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素/%			
	A 大米粉	B 青稞粉	C 玉米粉	D 黄豆粉
1	0.5	0.5	1.0	0.5
2	2.0	1.0	2.0	1.0
3	3.5	1.5	3.0	1.5

按正交设计组合配制 9 种培养基, 并装入 500 mL 三角瓶中 (已装入粗麦麸 30 g); 按 KH_2PO_4 0.05%、 MgSO_4 0.1% 配制营养液, 每个三角瓶加入 50 mL 营养液, 用玻棒搅拌均匀, 透气胶塞塞紧, 常规灭菌 35 min, 冷却待用。每个处理设 3 次重复。

1.3.2 干燥温度

设 20℃、30℃、40℃、50℃ 四个温度梯度, 干燥箱鼓风干燥。

1.3.3 培养温度

设 10℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃ 六个温度梯度, 第 16 天终止培养。

1.4 虫草素的 HPLC 检测

1.4.1 仪器

戴安 ULTIMATE 3000 高效液相色谱仪; LPG-3400A 四元梯度泵, WPS-3000SL 自动进样器, PDA-3000 二极管阵列检测器, TCC-3000 柱温箱, “变色龙” 控制分析色谱工作站软件。

1.4.2 试剂

20% 甲醇 (色谱纯)、重蒸水、虫草素对照品购自中国药品生物制品检定所, 纯度为 99% 以上。

1.4.3 标准品溶液的制备

准确称取干燥至恒重的虫草素对照品 2.1 mg, 用 20% 甲醇溶解定容至 100 mL。

1.4.4 样品溶液的制备

准确称取干燥至恒重的样品 0.1 g 左右, 置 5 mL 离心管中, 准确加 20% 甲醇 2 mL, 盖紧, 超声处理 120 min, 冷却至室温 (22℃ 左右), 离心 15 min, 吸取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液供 HPLC 分析。

1.4.5 色谱条件

戴安原装 ACCLAIM C18 色谱柱, 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm; 流动相 V (甲醇):V (水) = 15:85; 柱温: 30℃; 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 紫外检测波长 260 nm。

2 结果

2.1 体发酵培养基配方优化

本实验以虫草素产量为指标筛选培养基配方, 正交试验结果经直观分析, 按极差大小决定因素的主次, 影响虫草素产量的主次顺序为: D>A>C>B, 最优组合为: $A_2B_1C_3D_1$, 见表 2。

表 2 培养基正交试验结果及直观分析

试验号	影响因素/%				虫草素/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	A	B	C	D	重复 1	重复 2	重复 3	平均
1	0.5	0.5	1.0	0.5	1483	1196	1219	1299
2	0.5	1.0	2.0	1.0	1306	1424	956	1229
3	0.5	1.5	3.0	1.5	1332	1041	1299	1224
4	2.0	0.5	2.0	1.5	1351	1701	985	1346
5	2.0	1.0	3.0	0.5	1466	1062	1768	1432
6	2.0	1.5	1.0	1.0	1288	1242	1382	1304
7	3.5	0.5	3.0	1.0	1310	1063	1574	1316
8	3.5	1.0	1.0	1.5	1025	1031	1160	1072
9	3.5	1.5	2.0	0.5	1400	1440	1100	1313
K_1	3752	3961	3675	4044	-	-	-	-
K_2	4082	3733	3888	3849	-	-	-	-
K_3	3701	3841	3972	3642	-	-	-	-
k_1	1251	1320	1225	1348	-	-	-	-
k_2	1361	1244	1296	1283	-	-	-	-
k_3	1234	1280	1324	1214	-	-	-	-
极差 R	127	76	99	134	-	-	-	-

从表 2 可以看出, 生产虫草素最佳培养基配方为: 大米粉 2.0%、青稞粉 0.5%、玉米粉 3.0%、黄豆粉 0.5%、粗麦麸 30%、 KH_2PO_4 0.05%、 MgSO_4 0.1%。

2.2 干燥温度对虫草素产量的影响

干燥温度对虫草素产量的影响见图 1。

适宜的干燥温度有利于保持虫草素不被降解。干燥温度过低, 会延长干燥时间, 降低虫草素产量; 随着干燥温度升高, 干燥时间缩短, 但会导致虫草素降解。选择 30℃ 鼓风干燥, 虫草素产量最高达到 1 789 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 培养温度对虫草素产量的影响

培养温度对虫草素产量的影响见图 2。

培养温度对蛹草拟青霉产虫草素的影响较大。在 10℃

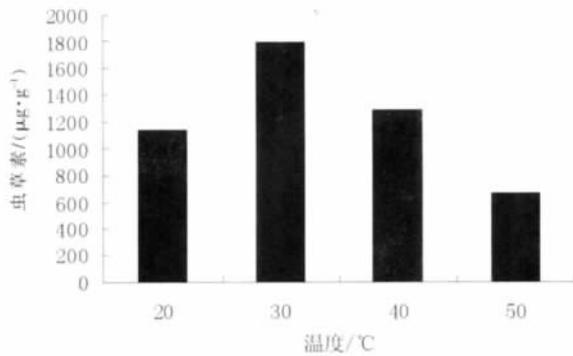


图 1 干燥温度对虫草素产量的影响

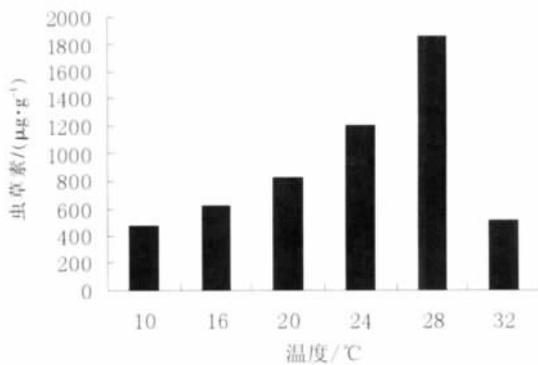


图 2 培养温度对虫草素产量的影响

培养时, 菌丝生长缓慢, 虫草素产量也低。随着培养温度的升高, 菌丝生长加快, 虫草素产量逐渐增加; 但培养温度达到 32℃时, 菌丝生长明显缓慢, 并出现菌丝易老化的现象, 虫草素产量急剧下降。在 28℃培养, 约 7 d 左右, 菌丝布满整个三角瓶, 白色, 继续培养至 16 d, 菌丝颜色由白色转成稍暗色, 镜检可看到有大量分生孢子产生, 此时虫草素产量最高达到 1 850 μg·g⁻¹。

3 讨论

为提高虫草素产量, 温鲁等^[14]优选出 20%豆粉为最佳氮源; 最佳水料比值为 1.0; 经过光照实验, 虫草素产量不因光照延长而提高, 相反, 光照有抑制作用。王菊凤^[15]研究蛹虫草 CM-C 菌株在不同温度条件下虫草素的产量, 发现温度能显著影响蛹虫草子实体虫草素的含量, 两者呈正相关关系; 分别采用 40 W 日光灯以及自然光作为光源发现, 自然光表现出对虫草素的形成有抑制作用, 自然光强度与子实体虫草素含量呈负相关; 但日光灯光照强度与蛹虫草子实体的虫草素含量呈正相关; 在生产实际中, 通过光暗处理增加子实体重量, 再在强光下培养, 以提高虫草素产量。本实验结果支持温度对虫草素含量的正相关性, 在 28℃时达到最高值, 温度超过 28℃, 虫草素含量急剧下降。

固体培养蛹虫草菌丝体鲜品的干燥方法, 直接影响虫草素得率。高温干燥会导致虫草素的降解, 超过 30℃的干燥方法, 都有不同程度的虫草素损失; 但干燥温度过低会延长干燥时间, 菌丝在不良条件下继续生长, 也不利于高产虫草素。建议根据生产实际选择 30℃左右的干燥温度, 并通过鼓风、增加干燥表面积等措施缩短干燥时间, 最大限度减少虫草素的损失。

选择植物源碳氮营养, 固体发酵蛹虫草拟青霉以获得高产虫草素, 具有成本低, 工艺简单, 产率相对高的优势, 值得在规模化生产中推广。

【参考文献】

- [1] Kirk PM, Cannon PF, David JC, et al. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2001.
- [2] Cunningham KG, Manson W, Sping FS, et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (L.) Link[J]. Nature, 1950, 4231 (166) : 949.
- [3] 苏哈道尼克 RJ. 核苷类抗菌素[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [4] Kaczka EA, Dulaney EL, Gitterman CO. Isolation and inhibitory effects on KB cultures of 3'-deoxyadenosine from *Aspergillus nidulans*[J]. Biochemical and biophysical research communication, 1964, 14 (15) : 452-455.
- [5] 刘东泽, 陈伟, 高新华, 等. 虫草菌素(3'-脱氧腺苷) 研究进展(综述)[J]. 上海农业学报, 2004, 20 (20) : 89-93.
- [6] 抗菌素生物理化特性编写组. 抗菌素生物理化特性(第一分册)[M]. 北京: 人民出版社, 1977.
- [7] 焦彦朝, 梁宗瑜, 刘爱英, 等. 虫草生物活性物质研究概况[J]. 贵州农业, 1990, (3) : 53-54.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Seldin D, Urbano SIA, Mccaffrey R, et al. Phase I trial of cordycepin and coxycformycin in TdT-positive acute leukemia[J]. Blood, 1997, 90 (1) : 246.
- [12] Liu Zhu, Liang Zong-qi, Liu Ai-ying. Effect of the components of medium on increasing the content of cordycepin[J]. Journal of Fungal Research, 2003, 1 (1) : 9.
- [13] 文庭池. 蛹虫草高产虫草菌素的深层培养工艺研究[D]. 贵州大学, 2006 届硕士研究生学位论文.
- [14] 温鲁, 夏敏, 宋虎卫, 等. 固体培养蛹虫草核苷类次生代谢物的产率[J]. 食品科学, 2005, 26 (11) : 65-68.
- [15] 王菊凤. 蛹虫草培养及其生理活性物质研究[D]. 中南林业科技大学, 2006 届硕士学位论文.