蛹虫草液体种制备及发酵生产菌丝体和虫草菌素工艺优化

文庭池¹, 李光荣^{1,2}, 康冀川^{1,*}, 康超^{1,2}, 雷帮星¹

(1. 贵州大学 西南药用生物资源教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为获得蛹虫草液体种制备和液体发酵生产菌丝体和虫草菌素的最佳工艺, 以蛹草拟青霉 *Peecilomyces militaris* BCEC07 菌株为菌种, 通过对接种量(孢子浓度)的考察, 探索不同孢子浓度对蛹虫草液体母种制作效果的影响; 通过单因素和正交试验, 优化生产虫草菌素各营养因子的最佳种类和配比。结果表明: 在 1.5×10^{10} 孢子数的接种量时制作的母种最适合用于蛹虫草液体发酵产菌丝体和虫草菌素; 蔗糖、蛋白胨、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 和 NAA 是最适合的碳源、氮源、无机盐及生长因子; 工艺优化后得出蛹虫草液体发酵产菌丝体的最佳配方为 30g/L 蔗糖、25g/L 蛋白胨、1.5g/L KH_2PO_4 、0.5g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 4.0mg/L NAA; 产虫草菌素的最佳配方为: 30g/L 蔗糖、25g/L 蛋白胨、1.5g/L KH_2PO_4 、0.5g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 3.0mg/L NAA。优化后生物量和虫草菌素总产量分别提高了 43.00%(达 31.60g/L)和 31.60%(达 645.12mg/L)。为进一步提高蛹虫草菌丝体及虫草菌素的单位产量提供参考。

关键词: 蛹虫草; 液体发酵; 虫草菌素; 生物量; 液体种; 工艺优化

Preparation of Liquid Seed and Optimal Fermentation Conditions for Mycelial Biomass and Cordycepin Production in Submerged Cultivation of *Cordyceps militaris*

WEN Ting-chi¹, LI Guang-rong^{1,2}, KANG Ji-chuan^{1,*}, KANG Chao^{1,2}, LEI Bang-xing^{1,2}

(1. Engineering and Research Center of Southwest Bio-pharmaceutical Resources, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to explore the optimal preparation method of liquid seed and fermentation conditions for mycelial biomass and cordycepin production in submerged cultivation of *Cordyceps militaris* (BCEC07), effect of liquid seed on mycelial growth and cordycepin production by inoculating different concentrations of spores in seed culture was investigated. Single factor tests were used to investigate the effects of medium compositions on mycelial growth and cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*. Among these factors, sucrose, peptone, $MgSO_4$, K_2HPO_4 and NAA were the most suitable carbon, nitrogen and mineral sources as well as growth factors, respectively. Through orthogonal tests and the analysis of variance, the optimal liquid media was composed of 30 g/L sucrose, 25 g/L peptone, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 g/L KH_2PO_4 and 4.0 mg/L NAA for mycelial growth and 30 g/L sucrose, 25 g/L peptone, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 g/L KH_2PO_4 and 3.0 mg/L NAA for cordycepin production, respectively. This optimal liquid medium culture resulted in the yield of cordycepin up to 645.12 mg/L and the yield of mycelial biomass up to 31.60 g/L in 500 mL shake-flask culture, which revealed the enhancement by 0.316 fold and 0.43 fold compared with the basal medium.

Key words: *Cordyceps militaris*; submerged culture; cordycepin; mycelial growth; liquid seed; optimization

中图分类号: TQ927

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0144-06

虫草菌素(cordycepin)是蛹虫草产生的一种重要次生代谢产物。Cunningham 等首次报道从蛹虫草(*Cordyceps*

收稿日期: 2011-04-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30870009); 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教科(2009)0129 号); 贵州省“十二五”农业科技攻关计划项目(黔科合 NY 字[2011]3054 号)

作者简介: 文庭池(1979—), 男, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为应用微生物学。E-mail: tingchiwen@yahoo.com

* 通信作者: 康冀川(1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为应用微生物学与分子生物学。E-mail: jichuan@yahoo.co.uk

militaris(L.) Link.)培养液中分离出核苷抗菌素,后来由 Suhadolnik^[1]命名为虫草菌素。虫草菌素具有广泛的药理作用,它的降血脂作用^[2]、减肥作用^[3]、抗肿瘤和抗癌作用^[4-5]是最近研究的热点和主要方向。在治疗急性前B和前T淋巴细胞白血病方面虫草菌素也由FDA批准进入了临床研究(1997年11月美国癌症研究所和OXiGENE(NASDAQ:OXGN)-NCT00003005,2008年7月OncoVista(NASDAQ:OVIT)-NCT00709215)。

目前虫草菌素的大规模生产有两条途径:化学法和生物法;Aman等^[6]报道用化学合成的方法大规模生产虫草菌素相当麻烦而且不易纯化。从生产工艺和成本考虑,通过生物法来大规模生产虫草菌素是目前最佳的选择。国内外对虫草菌素的研究较多,但多数都是对发酵工艺以及药理作用的研究,且发酵工艺以菌丝体得率或者子实体得率作为优化指标的居多,对菌株的研究和以产虫草菌素作为优化指标的较少。液体培养由于发酵时间短等优点在虫草菌素的生产上有重要的应用价值。

本研究较系统地优化蛹虫草液体发酵生产菌丝体和虫草菌素的工艺,并首次报道用于液体发酵的蛹虫草液体种制备的优化方法。为进一步提高蛹虫草菌丝体产量及虫草菌素的单位产量及其工艺放大提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

蛹虫草(*C. militaris*)无性型蛹草拟青霉(*Paecilomyces militaris*) BCEC07 菌株,分离自四川省瓦屋山自然保护区采集的蛹虫草鲜标本,保存于西南药用生物资源教育部工程研究中心生物种质资源库。

菌种活化培养基(PDA):取马铃薯200g煮沸过滤取汁、葡萄糖20g、琼脂20g、水1000mL、pH值自然;蛹虫草液体母种培养基:蛋白胨20g、蔗糖20g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、KH₂PO₄ 1.0g、水1000mL,pH值自然,121℃灭菌30min;蛹虫草液体发酵基础培养基:蛋白胨20g、蔗糖20g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、KH₂PO₄ 1g、水1000mL,pH值自然,121℃灭菌30min。

1.2 试剂与仪器

虫草菌素标准品 美国Sigma公司;其他试剂均为分析纯。

1100 Series 分析型高效液相色谱仪 美国安捷伦公司;JA2003 电子天平 上海天平仪器厂;ZK-82A 型真空干燥箱 上海实验仪器总厂;SB2200 型超声波清洗机 上海Branson公司;YX400 高压蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 供试菌株的活化

将蛹虫草菌株分别转接于PDA斜面培养基上,置于

26℃人工气候箱中培养5d,活化两次后置于冰箱内备用。

1.3.2 蛹虫草液体一级种制作方法的考察

为考察蛹虫草孢子的接种浓度对液体一级种的影响,将BCEC07菌株孢子悬液进行稀释,在显微镜下通过血球计数板计数,并制作一系列不同的孢子浓度梯度。然后将蛹虫草液体种培养基调到如下孢子浓度:1.5×10²、1.5×10³、1.5×10⁴、1.5×10⁵、1.5×10⁶、1.5×10⁷、1.5×10⁸、2×10⁸、2.5×10⁸、3×10⁸、3.5×10⁸、4×10⁸个/mL进行发酵,每个浓度5个重复。连续4d观察不同浓度梯度的孢子接种后液体一级种菌丝球的形态、大小、数量及发酵液的状态变化。

1.3.3 蛹虫草种子液的制备与接种发酵方法

将BCEC07菌株孢子悬液进行稀释,然后按3×10⁸个/mL的孢子浓度接入到液体母种培养基(装液量为50mL/250mL)中,于23℃、150r/min摇床培养4d。再按体积分数5%接种量将种子液接入发酵摇瓶(装液量为50mL/250mL)中,在23℃、150r/min摇床发酵12d,每组3个重复,数据取其平均值。

1.3.4 取样

将蛹虫草液体培养物离心获得菌丝体和上清液,用双蒸水冲洗菌丝2~3次。得到基本无培养基的菌丝体,将其置于干燥箱中,50℃烘至质量恒定,得干菌丝体。菌丝体和发酵液中虫草菌素的检测参照康冀川等^[7]方法采用HPLC测定。每个平行取3瓶,数据取其3次平均值。

$$\text{虫草菌素总产量}/(\text{mg/L}) = \frac{\text{胞外虫草菌素质量}/\text{mg} + \text{胞内虫草菌素质量}/\text{mg}}{\text{发酵液体积}/\text{L}}$$

1.3.5 碳源筛选

以蛋白胨20g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5g/L、KH₂PO₄ 1.0g/L为基础培养基,以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、乳糖分别作为5种碳源加入,制备培养基,装液量为50mL/250mL(所有优化实验均同),再分别以5%的接种量将种子液接入不同的培养基中,pH值自然,23℃、150r/min摇瓶培养12d,分别对比这5种碳源对虫草菌素总产量及生物量的影响。

1.3.6 氮源筛选

以蔗糖20g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5g/L、KH₂PO₄ 1.0g/L为基础培养基,对比牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、麸皮、胰蛋白、酪蛋白分别为氮源时对虫草菌素总产量及生物量的影响。其中,麸皮经煮沸水解10min,经过滤取滤液加入。

1.3.7 无机盐筛选

以蛋白胨20g/L、蔗糖20g/L作为基础培养基,将

KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 这 5 种无机盐以质量浓度 0.5g/L 分别添加到基础培养基中, 对比不同无机盐对虫草菌素总产量及生物量的影响。

1.3.8 生长因子筛选

真菌的生长需要一些少量的有机物质, 这些物质不能从普通的碳源、氮源合成, 需要额外少量加入才能促使其良好的生长, 这些有机物质被称为生长因子^[8], 本试验考察了植物生长激素 NAA、IAA、IBA 和 VB₁、VC 对虫草菌素产量及生物量的影响。

1.3.9 正交试验优化研究

在温度 23℃、初始 pH 值为自然、接种菌龄 4d、接种量 5%、摇床转速 150r/min、发酵时间 12d 的条件下, 在液体培养基优化得到的最佳碳源、氮源、无机盐和生长因子单因素试验结果基础上, 进行五因素四水平(L₁₆(4⁵))正交试验设计进行考察, 具体设计见表 1。发酵结果经极差和方差分析, 找出各培养基成分的最佳浓度和它们对蛹虫草生物量和产虫草菌素总产量的影响程度。

表 1 L₁₆(4⁵) 正交试验设计
Table 1 L₁₆(4⁵) orthogonal desing

水平	因素				
	A 蔗糖 / (g/L)	B 蛋白 胨 / (g/L)	C KH_2PO_4 / (g/L)	D $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / (g/L)	E NAA / (mg/L)
1	10	10	0.5	0.5	1.0
2	20	15	1.0	1.0	2.0
3	30	20	1.5	1.5	3.0
4	40	25	2.0	2.0	4.0

1.3.10 验证实验

将正交试验所获得的最佳培养工艺条件进一步验证并放大(装液量 100mL/500mL), 并设置对照, 比较优化培养基与基础培养基同条件培养下其生物量及虫草菌素总产量的差异。

1.3.11 数理统计方法

将实验数据用 SPSS 进行统计分析, 并进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草液体一级种制作方法的优化

从表 2 可以看出, 经不同孢子浓度接种液体种子培养基后发现, 蛹虫草菌丝球的大小随孢子浓度的增大而减小, 但数量却在增多, 且发酵液也逐渐由澄清变得有一定的黏度、较浑浊、散在菌丝增多。结果显示孢子浓度 1.5×10^8 个/mL 时液体种的生长状况良好。为了寻求最佳的孢子接种量, 进一步将浓度扩大, 在孢子浓度 3.0×10^8 个/mL 的接种量时菌丝球颗粒小且均匀, 淡黄色, 直径约为 1.2mm 左右, 数量很多, 均匀布满摇瓶, 发酵液也澄清、透明。从菌丝球的大小、数量、均匀度、发酵液的澄清度及能接种的体积等考虑, 选择 3.0×10^8 个/mL 作为最佳一级种的接种孢子浓度。

2.2 碳源筛选

表 3 不同碳源对蛹虫草液体发酵虫草菌素总产量及生物量的影响
Table 3 Effect of different carbon sources on mycelial biomass and cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*

碳源	生物量 / (g/L)	胞外虫草菌素 产量 / (mg/L)	胞内虫草菌素 产量 / (mg/g)	虫草菌素 总产量 / (mg/L)
葡萄糖	20.90 ^{bb}	164.70 ^{bb}	10.67 ^{dc}	380.23 ^c
麦芽糖	22.13 ^{aa}	136.11 ^{cc}	9.46 ^{cd}	345.46 ^{bd}
蔗糖	19.00 ^{cc}	309.30 ^{aa}	12.22 ^{bb}	541.48 ^{aa}
乳糖	21.80 ^{ab}	94.760 ^{de}	13.55 ^{aa}	390.15 ^{bb}
甘露醇	18.60 ^{cc}	107.55 ^{dd}	11.23 ^{cc}	316.43 ^{de}

注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表 3 可知, 在 5 种碳源中, 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖都能得到较高的生物量, 但只有蔗糖效果最佳, 虫草菌素总产量达到最高, 为 541.48mg/L。

表 2 接种不同孢子浓度对蛹虫草液体一级种的影响

Table 2 Effect of different concentrations of spores on liquid seed of *C. militaris*

孢子浓度 / (个/mL)	生物量 / (g/L)	菌丝球的形态和大小	菌丝球大致粒数	发酵液状态
1.5×10^2	1.50	菌丝球极少, 淡黄色, 直径约 4.0mm 左右	10	澄清、透明
1.5×10^3	2.20	菌丝球较少, 淡黄色, 直径约 3.0mm 左右	20	澄清、透明
1.5×10^4	3.10	菌丝球较少, 淡黄色, 直径约 2.5mm 左右	40	澄清、透明
1.5×10^5	3.60	菌丝球较多, 淡黄色, 直径约 2.5mm 左右	60	澄清、透明
1.5×10^6	4.20	菌丝球较多, 淡黄色, 直径约 2.0mm 左右	100	澄清、透明
1.5×10^7	5.00	菌丝球较多, 淡黄色, 直径约 2.0mm 左右	140	澄清、透明
1.5×10^8	5.80	菌丝球多, 淡黄色, 大小较均匀, 直径约 1.8mm 左右	200	澄清、透明
2.0×10^8	6.70	颗粒大小均匀, 淡黄色, 直径约 1.6mm 左右, 均匀布满摇瓶	350	澄清、透明
2.5×10^8	7.20	颗粒大小均匀, 淡黄色, 直径约 1.4mm 左右, 均匀布满摇瓶	500	澄清、透明
3.0×10^8	7.80	颗粒大小均匀, 淡黄色, 直径约 1.2mm 左右, 均匀布满摇瓶	800	澄清、透明
3.5×10^8	8.00	颗粒大小均匀, 淡黄色, 絮状, 直径约 1.0mm 左右, 均匀布满摇瓶	1000	澄清、透明, 有较少散在的菌丝
4.0×10^8	8.50	颗粒大小均匀, 淡黄色, 絮状, 直径约 0.8mm 左右, 均匀布满摇瓶	1200	较澄清、透明, 有较多散在的菌丝, 黏度较大

2.3 氮源筛选

表4 不同氮源对蛹虫草液体发酵虫草菌素总产量及生物量的影响
Table 4 Effect of different nitrogen sources on mycelial growth and cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*

氮源	生物量/(g/L)	胞外虫草菌素		虫草菌素总产量/(mg/L)
		产量/(mg/L)	产量/(mg/g)	
牛肉膏	16.33 ^c	400.57 ^{bb}	4.80 ^c	478.95 ^{bb}
蛋白胨	23.13 ^{aa}	410.13 ^{aa}	10.91 ^{aa}	662.48 ^{aa}
酵母膏	16.60 ^c	250.40 ^c	1.22 ^{ee}	270.65 ^{dd}
麦麸	5.60 ^{ee}	44.79 ^{ff}	0.31 ^{ff}	46.53 ^{ff}
胰蛋白	21.70 ^{bb}	83.69 ^{ee}	10.00 ^{bb}	294.69 ^{cc}
酪蛋白	13.53 ^{dd}	208.17 ^{dd}	1.96 ^{dd}	234.69 ^{ee}

从表4可以看出,不同氮源对虫草菌素总产量及生物量的影响较大。在6种氮源中,蛋白胨能得到最高的生物量(23.13g/L)和虫草菌素总产量(662.48mg/L)。牛肉膏作为氮源也获得较高的虫草菌素总产量,仅次于蛋白胨。麦麸这种天然氮源在发酵中得到的生物量和虫草菌素总产量都很低,这说明天然氮源可能不利于真菌次生代谢产物的积累。而胰蛋白、酵母膏和酪蛋白在发酵过程中所获得的虫草菌素总产量相差不是很大。不同氮源对虫草菌素总产量的巨大差异说明氮源及合适的量能促进蛹虫草液体发酵产生虫草菌素。

2.4 无机盐筛选

表5 不同无机盐对蛹虫草液体发酵虫草菌素总产量及生物量的影响

Table 5 Effect of different mineral sources on mycelial biomass and cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*

无机盐	生物量/(g/L)	胞外虫草菌素		虫草菌素总产量/(mg/L)
		产量/(mg/L)	产量/(mg/g)	
对照	18.27 ^c	170.85 ^{ee}	8.88 ^{aa}	333.09 ^{ee}
MgSO ₄ ·7H ₂ O	17.73 ^c	268.35 ^{cc}	9.73 ^{aa}	440.86 ^{cc}
K ₂ HPO ₄	21.07 ^{bb}	311.33 ^{bb}	7.06 ^{aa}	460.08 ^{bb}
KH ₂ PO ₄	22.47 ^{aa}	341.57 ^{aa}	6.82 ^{aa}	494.82 ^{aa}
CaCl ₂	17.93 ^c	252.73 ^{dd}	7.61 ^{aa}	389.18 ^{dd}

从表5可以看出,4种无机盐对生物量的影响不是很大,与空白对照(不添加无机盐)相比,MgSO₄·7H₂O和KH₂PO₄、K₂HPO₄能同时获得高产量的虫草菌素。值得注意的是,CaCl₂的添加反而抑制了虫草菌素的产生。基于K、P、S和Mg作为微生物生长所需的营养元素和虫草菌素总产量考虑,同时选用MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄作为培养基中的无机盐组分,保证微生物能更好的生长。

2.5 生长因子筛选

表6 不同生长因子对蛹虫草液体发酵虫草菌素总产量及生物量的影响

Table 6 Effect of different growth factors on mycelial biomass and cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*

生长因子	生物量/(g/L)	胞外虫草菌素		虫草菌素总产量/(mg/L)
		产量/(mg/L)	产量/(mg/g)	
对照	19.93 ^c	392.67 ^{cc}	6.56 ^{ed}	523.41 ^{ff}
VC	22.67 ^{aa}	346.47 ^{ee}	9.10 ^{cb}	552.77 ^{dd}
VB ₁	20.07 ^c	388.04 ^{dd}	8.35 ^{dc}	555.62 ^{cc}
NAA	19.40 ^c	437.16 ^{aa}	9.90 ^{aa}	629.22 ^{aa}
IAA	21.80 ^{bb}	344.60 ^{ee}	9.17 ^{cb}	544.51 ^{ee}
IBA	20.67 ^{bb}	422.27 ^{bb}	9.32 ^{bb}	614.91 ^{bb}

从表6可以看出,IAA、IBA和VC都能促进蛹虫草菌丝体的生长,NAA得到了最高的虫草菌素总产量(629.22mg/L),IBA次之,达614.91mg/L,说明适量的NAA能更好地促进虫草菌素的积累。

2.6 液体培养基的正交试验结果

表8 蛹虫草液体发酵生物量的方差分析结果

Table 8 Variance analysis for the results of mycelial growth in liquid fermentation of *C. militaris*

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F _{临界值}	显著性
A	80.39	3	1.000	9.28	
B	64.38	3	0.801	9.28	
C	4.66	3	0.0058	9.28	
D	21.50	3	0.267	9.28	
E	2.84	3	0.035	9.28	
误差	80.39	3			

表9 蛹虫草液体发酵虫草菌素总产量的方差分析结果

Table 9 Variance analysis for the results of cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F _{临界值}	显著性
A	17845.22	3	0.221	9.28	
B	19576.41	3	0.242	9.28	
C	14986.36	3	0.185	9.28	
D	80919.19	3	1.000	9.28	
E	17827.99	3	0.220	9.28	
误差	80919.19	3			

从表8、9可以看出,各种营养因子对发酵所得生物量和虫草菌素总产量的影响均不显著。从表7直观分析可以看出,培养基的成分对蛹虫草液体发酵产生生物量的影响顺序为:蔗糖>蛋白胨>MgSO₄·7H₂O>KH₂PO₄>NAA,最优水平为A₃B₄C₃D₁E₄,即30g/L蔗糖、25g/L蛋白胨、1.5g/L KH₂PO₄、0.5g/L MgSO₄·7H₂O和4.0mg/L NAA。培养基的成分对蛹虫草产虫草菌素总产量的影响顺序为:MgSO₄·7H₂O>蔗糖>蛋白胨>NAA>

表7 蛹虫草液体发酵产生生物量和虫草菌素总产量的正交试验结果

Table 7 Results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal tests for optimizing the mycelial growth and cordycepin production in liquid fermentation of *C. militaris*

试验号	A	B	C	D	E	生物量/(g/L)	胞外虫草菌素/(mg/L)	胞内虫草菌素/(mg/g)	虫草菌素总产量/(mg/L)
1	1	1	1	1	1	15.10	266.27	8.47	394.17
2	1	2	2	2	2	14.05	251.10	7.68	359.30
3	1	3	3	3	3	16.17	314.57	7.17	430.51
4	1	4	4	4	4	20.90	282.43	7.94	448.39
5	2	1	2	3	4	15.63	269.47	6.14	365.44
6	2	2	1	4	3	18.50	312.13	8.27	465.30
7	2	3	4	1	2	21.67	368.03	7.97	540.74
8	2	4	3	2	1	22.00	309.00	5.90	438.80
9	3	1	3	4	2	20.23	334.70	6.16	459.32
10	3	2	4	3	1	21.40	345.40	4.43	440.20
11	3	3	1	2	4	22.17	292.40	4.16	386.83
12	3	4	2	1	3	26.30	479.85	9.26	723.39
13	4	1	4	2	3	17.83	326.97	4.21	402.03
14	4	2	3	1	4	23.67	458.57	7.43	634.44
15	4	3	2	4	1	21.57	293.63	4.62	393.28
16	4	4	1	3	2	21.93	283.00	4.25	376.20
生物量	k_1	16.56	17.20	19.43	21.69	20.02			
	k_2	19.45	19.41	19.39	19.01	19.47			
	k_3	22.53	20.40	20.52	18.78	19.70	最优水平: $A_3B_4C_3D_1E_4$		
	k_4	21.25	22.78	20.45	20.30	20.59			
	R_1	5.97	5.59	1.13	2.90	1.12			
虫草菌素总产量	k_1	408.09	405.24	405.63	573.19	416.61			
	k_2	452.57	474.81	460.35	396.74	433.89			
	k_3	502.44	437.84	490.77	403.09	505.31	最优水平: $A_3B_4C_3D_1E_3$		
	k_4	451.49	496.70	457.84	441.57	458.78			
	R_2	94.34	91.46	85.14	176.45	88.70			

KH_2PO_4 , 最优水平为 $A_3B_1C_3D_1E_3$, 即 30g/L 蔗糖、25g/L 蛋白胨、1.5g/L KH_2PO_4 、0.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 3.0mg/L NAA。在上述优化条件下, 蛹虫草生物量和虫草菌素总产量都要比正交试验最高组(第 14 组)高, 优化后生物量提高了 33.50%; 虫草菌素总产量提高了 1.68%。由以上分析可知, 蛹虫草生物量和虫草菌素总产量呈正相关, 生物量的大量产生是虫草菌素积累的基础。

2.7 验证实验结果

表 10 基础培养基与优化后的培养基验证结果比较

Table 10 Comparison between basal medium and optimal medium

培养基	生物量/(g/L)	胞外虫草菌素/(mg/L)	胞内虫草菌素/(mg/g)	虫草菌素总产量/(mg/L)
基础培养基	22.10	343.50	6.64	490.24
优化后培养基	31.60	378.75	8.43	645.12

从表 10 可知, 在验证实验中, 工艺优化后蛹虫草生物量和虫草菌素总产量都要比未优化的高得多, 优化后生物量提高了 43.00%; 虫草菌素总产量提高了 31.60%。说明优化后各种适宜浓度的营养因子能更好的促进生物量和虫草菌素的生产。

3 讨论与结论

在真菌发酵过程中, 生物量的大量产生是次生代谢积累的基础。孢子的接种浓度不仅影响到真菌液体一级种的制作效果(比如菌丝球大小、形态、密度、发酵液透明度等), 而且还影响到发酵的最终结果(如菌丝球状态、发酵液状态、生物量、次生代谢产物的积累)。经不同孢子浓度进行接种发酵考察, 母种菌丝球的大小随孢子浓度的增大而减小, 但数量却在增多, 且发酵液也逐渐由澄清变得有一定的黏度、较浑浊、散在菌丝增多。结果显示, 在 50mL 发酵液中孢子数为 1.5×10^{10} 个的接种量时菌丝球颗粒小且均匀, 淡黄色, 直径约为 1.2mm 左右, 数量很多, 均匀布满摇瓶, 发酵液也澄清、透明。此时有效接种体积最大。故此接种浓度最适合用作蛹虫草液体发酵母种。这和日本拟青霉 *P. japonica* 当散在菌丝最少、菌丝球最紧密细小时发酵生产多糖产量最高的结论相似^[9]。

Monaghan 等^[10]报道, 当需要的发酵产物是次生代谢产物时, 发酵培养基的设计显得特别重要。在本研究文中, 蛹虫草 BCEC07 菌株生长和产虫草菌素的最佳碳源是蔗糖, 这与周洪波^[11]、陈晋安^[12]等报道的一致, 他们报道的最佳培养碳源均为葡萄糖。而汪宇等^[13]报道

蛹虫草液体发酵的最佳碳源为葡萄糖,这和本的结果不一致,从生产成本来看,显然蔗糖更廉价,更适合工业化生产。

氮是有机体的重要组织元素,真菌能利用的氮包括铵态氮、硝态氮和有机氮,但是有机氮源比无机氮源能获得更高的生物量和代谢产物。本实验在对蛹虫草液体深层培养的研究中,发现了无机氮源获得了较低的生物量和虫草菌素产量,而优化后以25g/L的蛋白胨添加量作为氮源获得总的虫草菌素产量达到了645.12mg/L,说明适量的蛋白胨可促进虫草菌素的产生。陈磊^[14]研究结果与本实验结果相似,他们以蛋白胨为培养液中的氮源时蛹虫草菌丝体生物量和胞外多糖产量都达到最高,分别为19.54、3.37g/L;而以无机氮为氮源的发酵液中胞外多糖只有很少的积累,还报道了添加NH₄⁺不仅能够成倍地增加虫草素的含量,同时还在一定程度上提高了胞外多糖的产量。

无机盐在蛹虫草的生长和虫草菌素的产生中扮演着重要的角色。Papagianni^[15]报道Ca²⁺的积累能抑制真菌生物多聚物的合成。本实验的研究证明发现了所有添加的无机盐均能提高虫草菌素的产量,只是Ca²⁺在添加以后虫草菌素的增加的量和其他无机盐相比要少,即影响虫草菌素的积累。

生长因子具有促进和抑制微生物生长的作用。在本研究中,与对照实验相比,其虫草菌素总产量都比未添加生长因子的要高,这说明适量的植物激素和维生素能刺激蛹虫草菌丝的生长并促进其代谢物的产生,特别是对胞外虫草菌素的总产量影响最显著。

对蛹虫草整个发酵过程的分析可以看出,液体一级种的菌丝球形态、大小、均匀度、发酵液的澄清度对生物量和虫草菌素的总产量都有很大的影响,更重要的是液体种的制作在蛹虫草液体发酵中对其培养基配方的选择和环境因子的考察具有不可低估的实用价值,这也对进一步提高蛹虫草发酵生产虫草菌素和优质菌丝体的生产效率,提高经济效益有着重要的意义。

参考文献:

- [1] SUHADOLNIK R J. 核苷类抗菌素[M]. 谢其明,王恕蓉,译.北京:科学出版社,1982:476-482.
- [2] GUO Peng, KAI Qu, GAO Jian, et al. Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2010, 113(4): 395-403.
- [3] KIM S K, SUNG W L, SU C, et al. A pharmaceutical composition comprising cordycepin for the treatment and prevention of obesity: Korea, WO/2008/038973[P]. 2008-04-03.
- [4] JEN Chunyi, LIN Chunyu, HUANG Bumiin, et al. Cordycepin induced MA-10 mouse leydig tumor cell apoptosis through caspase-9 pathway [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2009, 984537: 11pages.
- [5] KODAMA E N, McCAFFREY R P, YUSA K, et al. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT⁺) leukemic cells[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(3): 273-281.
- [6] AMAN S, JASON ANDERSON D, CONNOLLY T J, et al. From adenosine to 3'-deoxyadenosine: development and scale-up[J]. Org Process Res Dev, 2000, 4(6): 601-605.
- [7] 康冀川,文庭池,雷帮星,等.红曲协同发酵提高蛹虫草子实体和虫草菌素产量的方法:中国,ZL200810068734.8[P]. 2009-09-16.
- [8] 刑来君,李明春.普通真菌学[M].北京:高等教育出版社,1999:78.
- [9] JAYANTA S, JUN T B, JONG P P, et al. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor[J]. Enzyme and Microb Technol, 2001, 29(6): 392-399.
- [10] MONAGHAN G R L, KOUPAL L R. Use of the Plackett and Burman technique in a discovery program of new natural products[M]//DEMAIN A L, SOMKUTI G A, HUNTER-CEVERA J C, et al. Novel microbial products for medicine and agriculture. New York: Elsevier, 1989: 25-32.
- [11] 周洪波,肖升木,阮承超,等.蛹虫草液体的深层发酵[J].中南大学学报:自然科学版,2006,37(6):1098-1102.
- [12] 陈晋安,黄浩,郑忠辉,等.蛹虫草液体发酵条件的研究[J].集美大学学报:自然科学版,2001,6(3):219-223.
- [13] 汪宇,于荣敏,佟志清,等.蛹虫草液体培养条件的优化及生长动力学考察[J].中国野生植物资源,2003,22(4):56-60.
- [14] 陈磊.蛹虫草(*Cordyceps militaris*)生物学特性及发酵研究[D].北京:北京协和医学院,2009.
- [15] PAPAGIANNI M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes[J]. Biotechnol Adv, 2004, 22(3): 189-259.