



赵国柱

北京林业大学微生物学科负责人，教授，博士生导师。中国菌物学会菌物多样性专业委员会委员、水生真菌专业委员会委员，北京微生物学会理事。主要从事丝状真菌分类、食药菌资源培育与活性筛选等研究。发表真菌新属 2 个，新种 30 个，中国新记录属、种上百个；承担及参与多卷《中国真菌志》编研；围绕桑黄、灵芝、虫草、灰树花、绣球菌等，开展珍稀食药菌资源培育、活性筛选，提升食药营养保健价值；已在《Fungal Diversity》《Mycological Progress》《Indoor Air》《International Journal of Medicinal Mushrooms》等学术期刊发表论文 40 余篇。

优良性状蚕蛹虫草的筛选及高产虫草素液态发酵条件优化

刘朋肖 马婕馨 刘警鞠 赵国柱[✉] 何湘伟

北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

摘要：蛹虫草是重要的食药菌，虫草素为其主要活性成分，在抗肿瘤、抗菌、降血糖等方面具有较为突出的功效。蛹虫草菌株间的形态及环境条件差异，对菌株次级代谢产物虫草素产生影响显著。本研究对不同来源的 6 株蛹虫草菌株（YCC-B、YCC-C、YCC-H、YCC-W、YCC-Y、CGMCC 3.4655），从蚕蛹体培养子实体性状，液体发酵条件（培养天数、培养方式、外源金属离子等）和传代稳定性等方面筛选优良性状菌株，提高其发酵合成虫草素的能力及稳定性。结果表明，蛹虫草菌株 YCC-W 在蚕蛹子实体出草及菌体液体发酵产虫草素上综合表现优良，传代稳定；液体发酵培养基中添加外源金属离子 Mn^{2+} 作为酶的辅基，可以促进虫草素合成；采用振荡-静置相结合的混合发酵培养方式，可以避免单纯振荡培养溶氧量大、菌丝体生长旺盛，而虫草素产生不佳的问题。先振荡培养 3d 后静置培养至 25d 时，菌株 YCC-W 合成虫草素含量最高，可达 $(874.13 \pm 24.25) \mu g/mL$ ，且稳定性良好。为进一步开发菌种及扩大规模生产提供参考。

关键词：金属离子，活性产物，腺苷，传代培养

[引用本文] 刘朋肖，马婕馨，刘警鞠，赵国柱，何湘伟，2021. 优良性状蚕蛹虫草的筛选及高产虫草素液态发酵条件优化. 菌物学报, 40(11): 3046-3057

Liu PX, Ma JX, Liu JJ, Zhao GZ, He XW, 2021. Screening of *Cordyceps militaris* with excellent traits and optimization of liquid fermentation conditions for highly yielding cordycepin. Mycosystema, 40(11): 3046-3057

✉ Corresponding author. E-mail: zhaogz@im.ac.cn

ORCID: ZHAO Guo-Zhu (0000-0001-5746-834X)

Received: 2021-03-21, accepted: 2021-05-21

Screening of *Cordyceps militaris* with excellent traits and optimization of liquid fermentation conditions for highly yielding cordycepin

LIU Peng-Xiao MA Jie-Xin LIU Jing-Ju ZHAO Guo-Zhu[✉] HE Xiang-Wei

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: *Cordyceps militaris* is an important edible and medicinal fungus, having active ingredient with outstanding effects in anti-tumor, anti-bacteria, reducing blood sugar and other functions. The differences of morphological characters and growth environment of *C. militaris* strains significantly influence the production of secondary metabolites. In this study, six strains of *C. militaris* (YCC-B, YCC-C, YCC-H, YCC-W, YCC-Y and CGMCC 3.4655) from different sources were selected based on properties of stromata on tussah pupae, liquid fermentation conditions (culture duration, culture methods, exogenous metal ions, etc.) and reproduction stability for screening the most excellent strain to improve ability and stability of fermentation and synthesis of cordycepin. The results showed that *C. militaris* YCC-W fruiting body properties performed well on tussah pupae and cordycepin production was promoted in liquid fermentation, showing stable reproduction in subculture. The synthesis of cordycepin was greatly improved by adding the metal ion Mn^{2+} to the liquid fermentation medium as a coenzyme. The mixed culture method (shaking + standing) can avoid the poor production of cordycepin caused by the strong growth of mycelium with large dissolved oxygen in the simple shaking culture. On the conditions of 3d shake culture proceeded with 22d static culture, production of cordycepin of strain YCC-W reached the highest yield of $(874.13 \pm 24.25) \mu g/mL$. The results provide reference for further development of the strains and expanding cordycepin production.

Key words: metal ions, active product, adenosine, subculture

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Fr. 是真菌虫草属的模式种 (<http://www.indexfungorum.org/>)，也是一种重要的食药保健用真菌，具有与冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung *et al.* (Sung *et al.* 2007) 相近的功能物质及药用功效 (Wu *et al.* 2019)，常被作为冬虫夏草的替代品，其中虫草酸、虫草多糖、虫草素、溶栓酶 (Cui *et al.* 2008) 以及超氧化物歧化酶 (Das *et al.* 2010) 等被应用到食品及保健品中 (Das *et al.* 2010; Xiao *et al.* 2014)，受到越来越多的关注，表现巨

大的市场需求和开发潜力，成为虫草研究及产业化发展中的热点。

虫草素又称 3'-脱氧腺苷，是首个分离自真菌的核苷酸抗生素 (Cunningham *et al.* 1950)，为蛹虫草中主要的活性成分 (Xia *et al.* 2017)，具有抗菌 (董宏鸿等 2016)、抗氧化 (王延明 2013)、抗炎 (李晖等 2016)、抗肿瘤 (陈丽冰等 2016)、溶血栓降血脂 (王长文等 2019)、免疫调节 (李兵 2016) 等广泛的药理作用。近年研究揭示蛹虫草中虫草素伴随保护分子喷司他丁的生物合成 (Xia

et al. 2017), 而后者为美国已临床上市的治疗毛干细胞白血病的重要药物, 另外虫草素和喷司他丁还可联合治疗二期非洲锥虫病, 并且已经进行临床前评估 (Vodnala *et al.* 2009)。虫草素在医疗、食品、保健品等领域都具有良好的开发前景。但目前产虫草素的菌种资源不够稳定, 无法满足市场的需求, 为了提高虫草素产量, 国内外在虫草素菌株筛选、发酵条件优化、遗传改良、诱变育种等方面进行了研究, 以期提高虫草素的产量 (Masuda *et al.* 2014; Wen *et al.* 2019; Raethong *et al.* 2020; Wongsu *et al.* 2020)。研究表明, 不同发酵方式对合成虫草素有重要影响 (刘希文和汤佳鹏 2021)。但是, 蛹虫草菌株人工培养具有一定的退化, 单一液体发酵方式周期长, 产率低。筛选性状优良、可稳定合成虫草素的蛹虫草菌株是提高合成虫草素的关键。本研究对 6 株不同来源的蛹虫草菌株, 从虫体培养、液体发酵合成虫草素能力、传代稳定性等方面筛选优良性状虫草菌, 并对其合成虫草素的影响因素 (培养天数、培养方式、外源金属离子) 进行考察, 以提高虫草素的含量, 为虫草素的开发利用及相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株: 蛹虫草 YCC-B、YCC-C、YCC-H、YCC-W、YCC-Y、CGMCC 3.4655 菌株为实验室保存, 来自不同途径收集及野生蛹虫草分离的菌株。

1.1.2 培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA); 种子液培养基: 蔗糖 2%, 蛋白胨 2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, pH 自然; 基础液体发酵培养基: 葡萄糖 2%、鱼蛋白胨 2%、 K_2HPO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、维生素 B_1 0.002%, pH 5。

1.1.3 试剂与仪器: 甲醇为色谱纯, 购自美国 Sigma 公司; 腺苷、虫草素标准品, HPLC $\geq$ 98%, 购自上海源叶生物科技有限公司; 其他药品均为分析纯, 购自北京易秀博谷生物科技有限公司。TG16A-WS 离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); LC-20A 高效液相色谱仪 [岛津企业管理 (中国) 有限公司]; HZC-250 全温振荡培养箱 (苏州培英实验设备有限公司); SPX-250 生化培养箱 (上海龙跃仪器设备有限公司)。

1.2 优良性状蛹虫草菌株的筛选

1.2.1 蛹虫草虫蛹体培养性状筛选: 蛹虫草虫蛹体培养参照马婕馨 (2020) 的方法, 基本操作如下: (1) 注射接种: 寄主选为东北柞蚕蛹 (长约 5cm/只)。将鲜活蚕蛹于 75%乙醇浸泡 2–3min, 用无菌水清洗晾干。用注射器将蛹虫草的种子液过滤掉菌丝体从蚕蛹翅膀和腹部环节交界处注入约 1mL/只。(2) 虫体僵化: 将注射种子液的柞蚕蛹置于发菌室, 20–22℃, 湿度 60%, 待蚕蛹逐渐僵化后 (约 5–7d), 移入灭菌的培养瓶中 (规格为 240mL)。(3) 菌丝培养: 将僵化虫体于 21℃培养箱中避光发菌, 约 1 周, 直至蛹体和环节处长出洁白的菌丝体。(4) 转色: 完成菌丝培养后, 给予光强为 200lx 的白光, 诱导转色为橘色。(5) 子座培养: 在持续光照情况下, 进行温差刺激, 白天保持 20–22℃, 夜间调至 15–17℃, 湿度保持在 65%左右。当原基生长到 1cm 左右, 子座培养结束。(6) 出草: 每天维持光照 8–10h, 当子实体高度约 5–8cm 时, 结束培养。

1.2.2 蛹虫草液体发酵产虫草素菌株初筛: 用无菌接种针在平板上挑取上述 6 株供试菌株约 1cm² 的新鲜菌块, 分别接种于装有 100mL/250mL 种子液培养基中, 以 26℃、130r/min 培养 84h。以 3%的接种量接种于 100mL/250mL 液体发酵培养基中, 26℃、

130r/min 培养 25d, 收集发酵液用 HPLC 测定虫草素。

1.2.3 发酵液虫草素与腺苷的测定: 发酵液检测前处理: 分别取 2mL 菌株发酵液, 8 000r/min 离心 5min, 收集上清液。经过 0.45 μ m 滤膜过滤, 待测。

高效液相色谱检测条件: 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6mm $\times$ 250mm, 5 μ m); 检测波长: 260nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 1mL/min; 进样体积: 10 μ L; 流动相: 甲醇:水=15:85。

1.2.4 蛹虫草菌株的传代培养产虫草素稳定性筛选: 将发酵初筛得到合成虫草素能力较强的菌株进行多代传代稳定性考察。每代培养时间 25d, HPLC 测定比较菌株合成虫草素的能力及稳定性, 筛选最佳的虫草素发酵菌株。

1.3 培养条件对蛹虫草菌株 YCC-W 产虫草素的影响

1.3.1 培养天数对蛹虫草菌株 YCC-W 产虫草素的影响: 以虫草素含量为指标, 对 1.2.4 筛选传代稳定好的 YCC-W 进行液体发酵培养, 每天取样, 共培养 27d, 按 1.2.3 方法处理测定。

1.3.2 培养方式对蛹虫草菌株 YCC-W 产虫草素的影响: 以虫草素含量为指标, 考察振荡培养、静置培养、混合培养(振荡+静置) 3 种培养方式对 YCC-W 菌株发酵合成虫草素的影响, 按 1.2.3 方法处理测定。

1.3.3 外源金属离子对蛹虫草菌株 YCC-W 产虫草素的影响: 以虫草素含量为指标, 设置液体发酵培养基分别添加 7 种金属离子实验组 (MgSO₄、CaCl₂、CaSO₄、FeSO₄、MnSO₄、ZnSO₄ 和 CuSO₄), 2 组对照组 (空白对照、腺苷对照)。在实验组中, 每种金属离子均在培养第 0 天添加, 含量均为 0.5g/L; 腺苷以 0.5g/L 添加量为对照, 各组按上述方法优化最佳结果, HPLC 检测发酵液中的虫草素和腺苷含量。

1.4 数据分析方法

数据处理采用 SPSS 20.0 和 Excel 软件, 应用 Origin 8.0 作图。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草虫蛹体培养筛选

以活体蚕蛹寄主为基质进行蛹虫草仿生培养是筛选优良性状蛹虫草的一个重要方面, 本研究通过将各菌株的种子液接种于鲜活柞蚕蛹上以考察菌株生长、出草及退化情况, 在适宜的条件下培养 55d 观察结果。菌株 YCC-H、YCC-C、CGMCC 3.4655 在虫体中无菌丝体生长, 无转色, 并认定其为退化菌株。菌株 YCC-B、YCC-Y、YCC-W 经过培养顺利出草, 长出子实体, 其中菌株 YCC-B 子实体呈橘黄色, 转色较快, 但子实体短且粗, 数量较少, 原基分化慢; YCC-W、YCC-Y 菌株呈亮橘黄色, 子实体粗细适中, 数量适中, 菌丝生长期和转色、原基诱导分化期时间较短, 且转色快 (图 1)。

2.2 腺苷和虫草素的定性与定量

腺苷是合成虫草素的前体物质, 根据 1.2.3 方法, 通过 HPLC 检测, 可以检测到腺苷与虫草素标准品高效液相色谱峰 (图 2), 并通过检测不同浓度的腺苷和虫草素分别得到其标准曲线, 并根据外标法计算虫草素含量。

2.3 蛹虫草菌株液体培养产虫草素初筛

液体培养具有周期短、易操作、条件可控等优点, 蛹虫草液体培养得到的发酵产物, 主要活性成分与蛹虫草子实体类似, 且转化效率高, 液体培养方式可以缓解野生食用菌及其中的活性成分资源紧张 (Wongsa *et al.* 2020)。通过液体发酵方式对 6 株蛹虫草菌株进行筛选, 以虫草素和腺苷为指标, 发现不同菌株之间存在显著差异, 菌株 YCC-B 发酵液中的虫草素含量明显高于其他菌株, 菌株 YCC-W 次之 (图 3)。



图 1 蛹虫草不同菌株接种虫蛹体培养情况 培养 55d

Fig. 1 Growth status of different strains of *Cordyceps militaris* inoculated on tussah pupae. Culture for 55d.

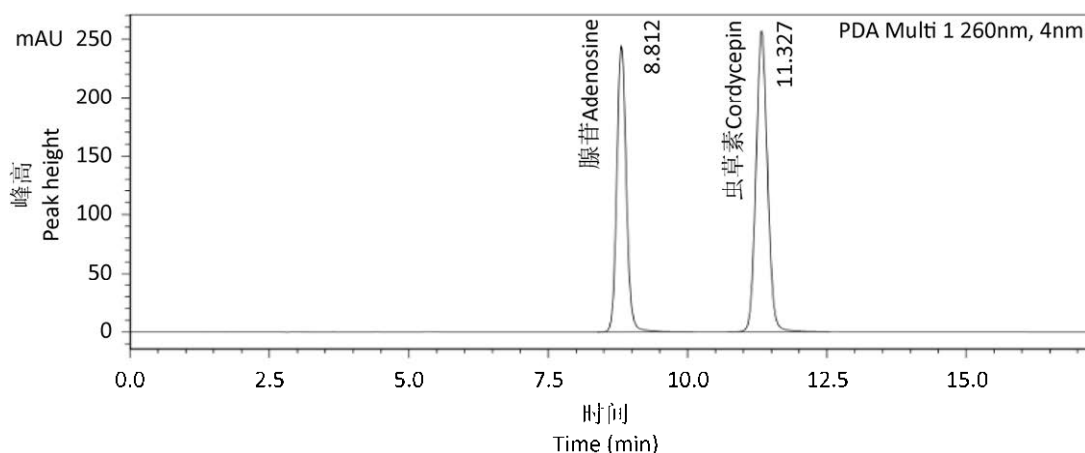


图 2 标准品腺苷和虫草素高效液相色谱峰 100 μ g/mL 混合标准溶液

Fig. 2 Chromatographic peak of adenosine and cordycepin standards. 100 μ g/mL mixed standard solution.

2.4 菌株传代次数对虫草素的影响

由于虫草素等次级代谢产物产生与菌株性状稳定性密切相关,一般转接 3 次及以上可能会出现蛹虫草菌株退化的情况(宁宝云等 2020),不利于积累次级代谢产物。因此,单纯考察原种分泌虫草素的能力,不能直接判断该菌株合成虫草素的稳定性。因此,考察两株合成虫草素能力较强的蛹虫草菌株 YCC-B 和 YCC-W 的传代次数对虫草素含量的影响。通过对 YCC-B 和 YCC-W 进行 5 次传代

研究,结果显示,传代次数对虫草素的产生有影响,随着传代次数的增加,两株菌的虫草素含量不断降低(图 4)。其中,YCC-W 菌株具有相对稳定的合成虫草素的能力,与第 1 代相比,第 5 代的 YCC-W 菌株合成虫草素的含量轻微降低了约 1.33 倍,同时,腺苷和虫草素被很好地分离,附近也无明显杂峰干扰(图 5)。然而,YCC-B 菌株的稳定性较差,从第 2 代开始,合成虫草素的能力迅速降低,传到第 5 代,相比第 1 代合成虫草素的能力

降低了约 170 倍（图 4）。综合蚕蛹虫草子实体的生长性状，选取 YCC-W 作为性状优良、可稳定合成虫草素的菌株，继续考察影响虫草素合成的因素，提高发酵虫草素产量。

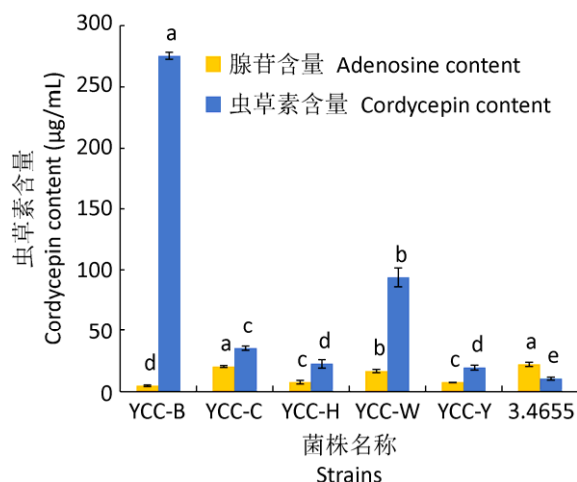


图 3 蛹虫草菌株发酵液中腺苷和虫草素含量相同字母表示采用“Tukey test”检验，组间没有显著差异 ($P>0.05$)，不同字母表示有显著差异 ($P<0.05$)。下同

Fig. 3 Content of adenosine and cordycepin in fermentation broth of different strains of *Cordyceps militaris*. The same letter indicated “Tukey test”, and there was no significant difference between groups ($P>0.05$), while different letters indicated significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.5 培养天数对蛹虫草菌株 YCC-W 合成虫草素的影响

结果显示，YCC-W 菌株合成虫草素的能力随着培养天数的增加而增加，虫草素的含量在 3–21d 增长最快，随后逐渐变缓，培养时间在 25–27d 时，虫草素含量增长趋势无显著变化 ($P>0.05$) (图 6 和表 1)。虫草素作为蛹虫草的次级代谢产物，符合微生物积累次

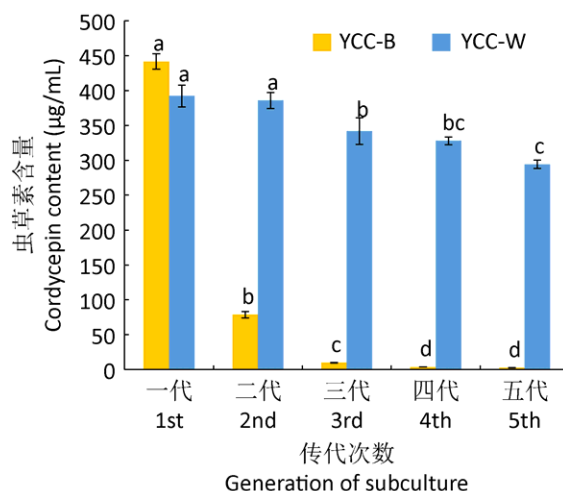


图 4 传代次数对 YCC-B 和 YCC-W 菌株合成虫草素的影响

Fig. 4 The content of synthetic cordycepin of *Cordyceps militaris* YCC-B and YCC-W in different generation of subculture.

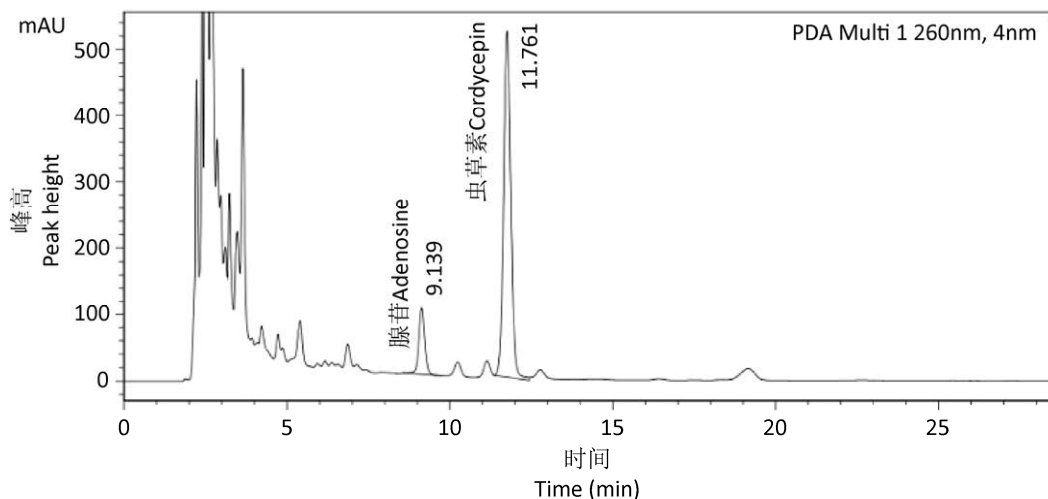


图 5 YCC-W 发酵液中腺苷和虫草素高效液相色谱峰

Fig. 5 Chromatographic peak of adenosine and cordycepin in fermented liquid of the strain YCC-W.

级代谢产物的一般特性，在菌体生长的中后期大量积累。从时间和经济成本角度考虑，YCC-W 菌株在液体培养方式下选择第 25 天作为最适培养天数。

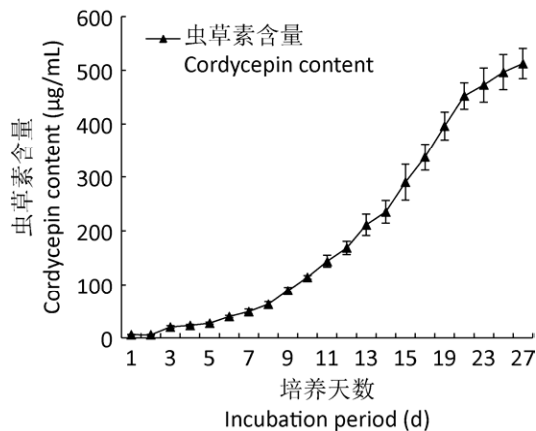


图 6 YCC-W 菌株液体培养 1–27d 虫草素的含量
Fig. 6 Content of cordycepin in the strain YCC-W incubated in liquid culture for 1–27d.

2.6 培养方式对蛹虫草菌株 YCC-W 合成虫草素含量的影响

合适的液体培养方式对虫草素的合成具有促进作用。结果显示，不同培养方式对

YCC-W 菌株发酵液合成虫草素能力有所影响（图 7）。混合培养方式（振荡 3d+静置 22d）培养 25d 时，YCC-W 菌株合成虫草素的能力明显高于单纯振荡培养或静置培养方式。有研究显示，在振荡培养的过程中，发酵液通气良好，会促进菌丝体的过度生长，反而抑制次级代谢产物的合成，因此，静置培养更利于虫草素的合成（Suparmin *et al.* 2017）。

2.7 不同的外源金属离子对蛹虫草菌株 YCC-W 合成腺苷和虫草素含量的影响

在培养基中添加等量（0.5g/L）不同金属离子（MgSO₄、CaCl₂、CaSO₄、FeSO₄、MnSO₄、ZnSO₄ 和 CuSO₄）对培养物生长性状影响存在一定的差异。从外观上看，在 MgSO₄、腺苷、CaCl₂ 和 CaSO₄ 各组间生长状态与空白对照组相比无显著差异（图 8），在发酵液表面形成厚厚的白色絮状相对疏松的菌膜，菌体附着三角瓶壁较多，发酵液浅褐色；而分别添加 0.5g/L FeSO₄、MnSO₄、ZnSO₄ 和 CuSO₄ 组，菌膜较薄，但出现皱缩凝结，菌膜附着瓶壁较少，发酵液深至黑褐色（图 8），推测这几种

表 1 YCC-W 菌株每日虫草素的含量（n=3， $\bar{x} \pm s$ ）
Table 1 Daily content of cordycepin in YCC-W strain (n=3, $\bar{x} \pm s$)

培养天数	虫草素含量	培养天数	虫草素含量
Culture time (d)	Cordycepin content (µg/mL)	Culture time (d)	Cordycepin content (µg/mL)
1	5.50±0.63 ⁿ	12	168.60±12.30 ^h
2	5.37±0.72 ⁿ	13	211.37±19.75 ^g
3	20.09±2.43 ^{mn}	14	235.51±20.84 ^g
4	23.04±2.13 ^{mn}	15	290.30±33.27 ^f
5	27.26±1.72 ^{lmn}	17	337.05±24.48 ^e
6	39.69±2.19 ^{lmn}	19	395.83±25.94 ^d
7	48.97±4.46 ^{lm}	21	452.00±24.72 ^{bc}
8	62.82±4.52 ^{kl}	23	472.53±31.81 ^{bc}
9	88.89±6.34 ^{jk}	25	496.43±32.56 ^{ab}
10	114.14±3.34 ^{ij}	27	512.63±28.24 ^a
11	143.76±11.14 ^{hi}		

注：数值表示为平均值±标准差；不同小写字母表示在 $P<0.05$ 时具有显著差异
Note: Values are expressed as mean ± standard deviation; different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$.

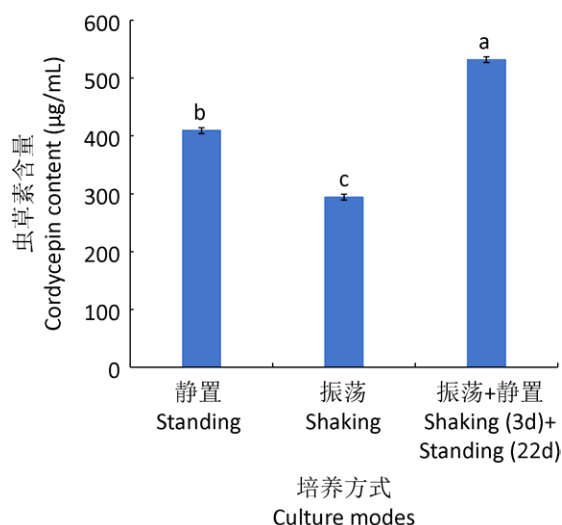


图 7 不同培养方式对 YCC-W 菌株合成虫草素的影响

Fig. 7 Effects of different culture methods on the synthesis of cordycepin by YCC-W strain.

金属离子可能对菌丝生长具有不同程度的抑制作用，而对产生代谢产物有促进作用。

菌株 YCC-W 受不同金属离子影响，合成虫草素的能力不尽相同（图 9）。与空白对照

组相比，除添加 CuSO_4 外，添加其他的金属离子均提高了虫草素的含量。与腺苷对照组相比， MnSO_4 、 FeSO_4 和 ZnSO_4 组虫草素含量显著提高，并且在培养基中添加 MnSO_4 培养时，虫草素的含量最高可达 $(895.94 \pm 35.86) \mu\text{g/mL}$ ，是腺苷对照组的 1.61 倍，是空白组的 3.04 倍。另外， CaCl_2 组 $[(360.26 \pm 6.44) \mu\text{g/mL}]$ 和 CaSO_4 组 $[(401.24 \pm 21.29) \mu\text{g/mL}]$ 的数据表明，同种金属离子不同阴离子似乎对虫草素的合成和分泌无显著影响 ($P > 0.05$)。

因腺苷对照组是人工添加 0.5g/L 的腺苷，故其明显高于其他组（图 9）。其他 8 组， CuSO_4 组的腺苷含量明显高于其余 7 组 ($11.09 \mu\text{g/mL}$) ($P < 0.05$)，而虫草素含量相对较高的 FeSO_4 、 MnSO_4 和 ZnSO_4 组中，腺苷含量明显低于 CuSO_4 组，仅为其 1/10 左右 ($P < 0.05$)，剩余组间差异相对较小。结果显示，添加 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 金属离子的处理组与 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 相比较，表现出虫草素含量高，腺苷含量较低（图 9）。腺苷是合成虫



图 8 添加不同金属离子 YCC-W 菌体液体发酵表现情况（25d）

Fig. 8 Liquid fermentation status of the strain YCC-W with different metal ion addition (25d).

虫草素的重要前体物质 (Suhadolnik *et al.* 1964; Lennon & Suhadolnik 1976), 不同金属离子转化腺苷合成虫草素的能力不同。腺苷可在 Cns3 酶、Cns2 酶和 Cns1 酶的催化下, 依次生成 3'-AMP、2'-羧基-3'-脱氧腺苷和虫草素 (Xia *et al.* 2017)。分析在培养基中添加适量的金属离子使菌株合成虫草素的能力提高, 是因为金属离子可以作为虫草素合成过程中重要酶的辅基, 在腺苷合成虫草素中起到了重要的作用, 从而出现“虫草素含量高, 腺苷含量低”的现象。腺苷对照组含量极高, 因大量添加腺苷, 造成腺苷过剩而含量高 (图 9)。因此, 在培养基中添加腺苷及金属离子均可提高虫草素含量。本研究中, 腺苷与 Mn^{2+} 相比, Mn^{2+} 对提高虫草素含量的效果更好, 且考虑到腺苷的经济成本, 若通过液体发酵 YCC-W 获得虫草素, 在培养基中添加适量的 Mn^{2+} , 是一种更为合适的方法。

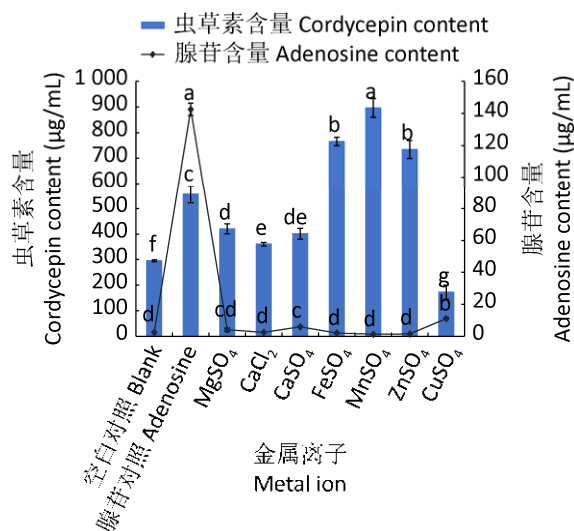


图 9 金属离子添加对 YCC-W 虫草素含量的影响

Fig. 9 Effects of metal ion addition on cordycepin content of the strain YCC-W.

2.8 蛹虫草菌株 YCC-W 液体培养方法验证

按照上述最优条件, 对 YCC-W 菌株进行液体培养, 收集发酵液, 经 HPLC 检测, 该发酵液中虫草素含量为 $(874.13 \pm 24.25) \mu\text{g/mL}$,

重复性较好, 为该菌株的大规模应用生产和商业化液体发酵虫草素提供理论参考。

3 讨论

本研究结果表明, 不同来源的蛹虫草菌株通过虫蛹体培养及液体培养, 发现其性状差异较大, 菌株在传代过程中出现退化现象。如何克服菌株退化这一情况变成当前一大难题 (孟小丽和李翠新 2017), 在研究中筛选性状优良稳定的菌株十分必要, 本研究通过考察菌株传代次数, 并以虫草素合成稳定性为重要评价指标, 筛选出性状及稳定性较好的 YCC-W 菌株。

采用单纯振荡培养方式对蛹虫草进行培养时, 发酵液通气良好, 菌丝体消耗培养基中的营养成分生长迅速, 而虫草素的合成在一定程度上受到抑制, 培养液中虫草素含量处于较低水平; 单纯的静置培养时, 前期菌体生长缓慢, 也不利于后期虫草素的生成。而采用先振荡后静置的培养方式, 在前期振荡可以快速提高菌体生长的生物量, 而中后期静置培养及营养成分大量消耗后, 有利于虫草素的合成。静置培养可以在发酵液表面形成厚厚的一层菌膜, 阻断了空气与发酵液接触, 减少溶氧, 促进虫草素合成, 这与 Suparmin *et al.* (2017) 的研究结果一致。但随着时间延长, 虫草菌进入衰退期, 虫草素含量极少量增加, 这与罗巍等 (2011) 的研究结果一致。因此采用混合培养方式 (振荡 3d+静置 22d) 更能促进菌株合成虫草素, 摇动培养积聚菌体为静置培养生成更多的虫草素提供基础。随着培养的进行, 液体表面的菌膜越来越厚, 虫草素含量也不断上升, 这与 Shih *et al.* (2007) 的研究结果一致。

金属离子作为酶的辅基, 是生物体代谢所必需的, 理论上, 通过添加合适的金属离

子可以刺激某些组分的产生,进而促进细胞的合成与代谢。Hung *et al.* (2015) 研究发现海水中的一些金属离子 (Mg^{2+} 、 Na^{+} 等)可以促进虫草素合成, Fan *et al.* (2012) 发现 Fe^{2+} 可以促进发酵液中虫草素的合成。上述研究说明金属离子与细胞的生长和代谢有着密切的关系,能促进虫草素的产生。而是否有其他金属离子能更有效促进虫草素产生,本研究中除了上述离子还增加了 Mn^{2+} 与所述几种金属离子共同比较,发现 Mn^{2+} 对 YCC-W 菌株合成虫草素优于其他几种金属离子,分析 Mn^{2+} 可以诱导抗氧化酶的产生,对生物合成具有一定的促进作用 (Wang *et al.* 2006),另外, Mn^{2+} 有可能更多地作为酶的辅基参与虫草素合成的系列催化反应。腺苷作为合成虫草素的前体物质,虽然对提升虫草素合成有一定效果,但金属离子 Mn^{2+} 相较腺苷在转化合成虫草素方面效果更加显著。

通过对 6 株蛹虫草菌株进行液体培养、虫体培养及传代稳定性研究,选择蛹虫草 YCC-W 作为性状优良、稳定性好的试验菌株对象,从培养天数、培养方式、外源金属离子等方面对其合成虫草素的含量进行研究,最终确定在培养基中添加外源金属离子 Mn^{2+} ,采用混合培养,先振荡培养 3d 后静置培养至 25d 时,该菌株合成虫草素含量最高,可达 $(874.13 \pm 24.25) \mu\text{g/mL}$,且稳定性良好。本研究为蛹虫草的深度开发、虫草素的规模生产、质量评价等提供参考。

[REFERENCES]

- Chen LB, Wu GX, Cheng W, Fan XZ, Shi DF, Shi M, Gao H, 2016. Extraction, purification, and antitumor activity of cordycepin from *Cordyceps militaris* residue medium. *Journal of Food Science and Technology*, 34(4): 73-79 (in Chinese)
- Cui L, Dong MS, Chen XH, Jiang M, Lv X, Yan GJ, 2008. A novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*, a Chinese traditional medicinal mushroom. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4): 483-489
- Cunningham KG, Manson W, Spring FS, Hutchinson SA, 1950. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris*. *Nature*, 166(4231): 949-949
- Das SK, Masuda M, Sakurai A, Kakibara MS, 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8): 961-968
- Dong HH, Li JJ, Zhou X, Jiang YX, 2016. Research progress on extraction and pharmacological activity of cordycepin from *Cordyceps militaris*. *Journal of Jilin Medical University*, 37(6): 465-467 (in Chinese)
- Fan DD, Wang W, Zhang JJ, 2012. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. *Biochemical Engineering Journal*, 60: 30-35
- Hung YP, Wang JJ, Wei BL, Lee CL, 2015. Effect of the salts of deep ocean water on the production of cordycepin and adenosine of *Cordyceps militaris*-fermented product. *AMB Express*, 5(1): 53-62
- Lennon MB, Suhadolnik RJ, 1976. Biosynthesis of 3'-deoxyadenosine by *Cordyceps militaris*: mechanism of reduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 425: 532-536
- Li B, 2016. Extraction and separation of cordycepin and adenosine from cultured *Cordyceps militaris* and inhibitory effect on oxidative stress in kidneys of diabetic mice. Master Thesis, Hefei University of Technology, Hefei. 1-73 (in Chinese)
- Li H, Sun JY, Liao KH, Wang Z, Shan AY, 2016. Anti-inflammatory effect and mechanism study of cordycepin. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33(5): 303-306 (in Chinese)
- Liu XW, Tang JP, 2019. Process optimization of semisolid fermentation of *Cordyceps militaris* with loofah for cordycepin production. *Science*

- and Technology of Food Industry, 42(6): 118-124 (in Chinese)
- Luo W, Liu DB, Wu ZW, Xia ZL, Xie HQ, 2011. Study on the active components accumulation in *Cordyceps militaris* through fermentation process. Food and Fermentation Industries, 37(10): 96-99 (in Chinese)
- Ma JX, 2020. Purification and antibacterial and antitumor activity analysis of liquid fermentation cordycepin from *Cordyceps militaris*. Master Thesis, Beijing Forestry University, Beijing. 1-91 (in Chinese)
- Masuda M, Das SK, Hatashita M, Fujihara S, Sakurai A, 2014. Efficient production of cordycepin by the *Cordyceps militaris* mutant G81-3 for practical use. Process Biochemistry, 49(2): 181-187
- Meng XL, Li CX, 2017. Detection method and influencing factors of strain degradation of *Cordyceps militaris*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 45(13): 133-134 (in Chinese)
- Ning BY, Xue SS, Liu H, Liu K, Hao JW, 2020. Study on methods of regeneration of *Cordyceps militaris* strains. Edible Fungi, 42(3): 24-26+28 (in Chinese)
- Raethong N, Wang H, Nielsen J, Vongsangnak W, 2020. Optimizing cultivation of *Cordyceps militaris* for fast growth and cordycepin overproduction using rational design of synthetic media. Computational and Structural Biotechnology Journal, 18: 1-8
- Shih IL, Tsai KL, Hsieh C, 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochemical Engineering Journal, 33(3): 193-201
- Suhadolnik RJ, Weinbaum G, Meloche HP, 1964. The biosynthesis of cordycepin. Journal of the American Chemical Society, 86: 948-949
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Spatafora JW, 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology, 57(1): 5-59
- Suparmin A, Kato T, Dohra H, Park EY, 2017. Insight into cordycepin biosynthesis of *Cordyceps militaris*: comparison between a liquid surface culture and a submerged culture through transcriptomic analysis. PLoS One, 12(11): e0187052
- Vodnala SK, Ferella M, Lundén-Miguel H, Betha E, Reet NV, Amin DN, Oberg B, Andersson B, Kristensson K, Wigzell H, Rottenberg ME, 2009. Preclinical assessment of the treatment of second-stage African trypanosomiasis with cordycepin and deoxycoformycin. PLoS Neglected Tropical Diseases, 3(8): e495
- Wang CW, Wang Z, Wang JF, Wu HX, 2019. Research progress of cordycepin in *Cordyceps militaris*. Fujian Agricultural Science and Technology, 50(2): 66-70 (in Chinese)
- Wang YM, 2013. The research of genome shuffling breeding and *in vitro* antioxidant activity of *Cordyceps kyushuensis*. Master Thesis, Shandong University, Jinan. 1-101 (in Chinese)
- Wang ZS, Gu YX, Yuan QS, 2006. Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. Current Microbiology, 52(1): 74-79
- Wen ZX, Du XF, Meng N, Li YJ, Mi R, Sun YX, Ma SH, Li SY, 2019. Tussah silkworm pupae improve anti-tumor properties of *Cordyceps militaris* (L.) Link by increasing the levels of major metabolite cordycepin. RSC Advances, 9(10): 5480-5491
- Wongsa B, Raethong N, Chumnpanpuen P, Wong-ekkabut J, Laoteng K, Vongsangnak W, 2020. Alternative metabolic routes in channeling xylose to cordycepin production of *Cordyceps militaris* identified by comparative transcriptome analysis. Genomics, 112(1): 629-636
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Xiao Y, Xing GL, Rui X, Li W, Chen XH, Jiang M, Dong

- MS, 2014. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of Functional Foods*, 10: 210-222
- Xia YL, Luo FF, Shang YF, Chen PL, Lu YZ, Wang CS, 2017. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin. *Cell Chemical Biology*, 24(12): 1479-1489
- [附中文参考文献]
- 陈丽冰, 吴光旭, 程薇, 范秀芝, 史德芳, 石猛, 高虹, 2016. 北虫草培养残基中虫草素的提取纯化及抗肿瘤活性. *食品科学技术学报*, 34(4): 73-79
- 董宏鸿, 李建军, 周行, 姜艳霞, 2016. 蛹虫草中虫草素的提取及药理活性研究进展. *吉林医药学院学报*, 37(6): 465-467
- 李兵, 2016. 蛹虫草中虫草素和腺苷的提取分离及其对糖尿病小鼠肾脏氧化应激的影响. 合肥工业大学硕士学位论文, 合肥. 1-73
- 李晖, 孙佳瑜, 廖康汉, 王喆, 单爱云, 2016. 虫草素抗炎作用及机制研究. *天津中医药*, 33(5): 303-306
- 罗巍, 刘东波, 吴郑武, 夏志兰, 谢红旗, 2011. 蛹虫草液态发酵过程中有效成分的动态积累变化. *食品与发酵工业*, 37(10): 96-99
- 刘希文, 汤佳鹏, 2021. 蛹虫草丝瓜络半固态发酵产虫草素的工艺优化. *食品工业科技*, 42(6): 118-124
- 马婕馨, 2020. 蛹虫草液体发酵虫草素纯化及抗菌抑癌活性分析. 北京林业大学硕士论文, 北京. 91
- 孟小丽, 李翠新, 2017. 蛹虫草菌种退化的检测方法和影响因素. *安徽农业科学*, 45(13): 133-134+156
- 宁宝云, 薛姗姗, 刘慧, 刘康, 郝继伟, 2020. 蛹虫草菌种复壮方法探讨. *食用菌*, 42(3): 24-26+28
- 王长文, 王忠, 王锦锋, 吴鸿雪, 2019. 蛹虫草虫草素研究进展. *福建农业科技*, 50(2): 66-70
- 王延明, 2013. 九州虫草基因组改组育种与体外抗氧化活性研究. 山东大学硕士论文, 济南. 1-101

(本文责编: 韩丽)