

冬虫夏草内生菌NS2-B1发酵培养基筛选*

郭梦圆¹ 高艳华¹ 郑雨璋¹ 王萍³ 夏飞^{2**} 周选围^{1**}

¹上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究中心, 农业部都市农业(南方)重点实验室 上海 200240

²陕西科技大学食品与生物工程学院 西安 710021

³天津理工大学化学化工学院 天津 300384

摘要 以核苷类物质为目标产物筛选冬虫夏草内生真菌NS2-B1生产具有和冬虫夏草相似活性成分的培养基。通过单因素实验, 分别从5种碳源(蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉)和5种氮源(尿素、硝酸铵、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨)中各筛选出2种最佳碳源和氮源; 然后通过4因素3水平正交实验 $L_9(3^4)$, 以代谢产物总核苷(尿苷、鸟苷、腺苷和虫草素)为指标筛选最佳的碳、氮源组合。结果显示: NS2-B1液体发酵培养基组合为麦芽糖2%、淀粉1.5%、酵母膏1.5%、蛋白胨1%, 附加 KH_2PO_4 0.8 g/L和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/L; 利用该培养基在25 °C、210 r/min条件下震荡培养, 5 d后菌丝体发酵液中总核苷的产量达到 $(92.62 \pm 4.19) \mu\text{g/mL}$ 。综上, 从天然冬虫夏草中分离的内生真菌NS2-B1具有替代冬虫夏草生产核苷类物质的潜力。(图4 表4 参30)

关键词 冬虫夏草; 内生真菌; 液体培养基; 正交试验; 代谢产物

CLC Q93-3: Q929

Screening of liquid fermentation media of an endophytic fungus NS2-B1 isolated from *Ophiocordyceps sinensis**

GUO Mengyuan¹, GAO Yanhua¹, ZHENG Yuzhang¹, WANG Ping³, XIA Fei^{2**} & ZHOU Xuanwei^{1**}

¹Ministry of Agriculture Key Laboratory of Urban Agriculture (South), Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

²School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China

³College of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin, 300384, China

Abstract Based on nucleosides as the target produces, the suitable liquid media for fermenting an endophytic fungus NS2-B1 isolated from *Ophiocordyceps sinensis* was investigated to produce active ingredients which were similar to *O. sinensis*. Two optimum carbon sources and two optimum nitrogen sources were selected from five carbon sources (including sucrose, fructose, glucose, maltose and starch) and five nitrogen sources (including urea, beef extract, yeast extract and peptone) by one-factor-at-a-time experiments. The suitable culture medium for producing the nucleosides was studied by orthogonal test. Table $L_9(3^4)$ was used to test four factors with three levels. The nucleosides (uridine, guanosine, adenosine, cordycepin) of *O. sinensis* metabolites in the mycelial fermentation broth were determined by HPLC. The results showed that the suitable liquid medium for the endophytic fungus isolated from *O. sinensis* consisted of 2% maltose, 1.5% starch, 1.5% yeast extract, 1% peptone, plus to 0.8 g/L KH_2PO_4 and 0.8 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The yield of the nucleosides in the mycelial fermentation broth reached to $92.62 \pm 4.19 \mu\text{g/mL}$ under the conditions of 25 °C and 210 r/min for 5 days. Therefore, the endophytic fungus NS2-B1 had the potential to replace the *Ophiocordyceps sinensis* in producing nucleosides.

Keywords *Ophiocordyceps sinensis*; endophytic fungus; liquid media; orthogonal test; metabolites

冬虫夏草(Chinese cordyceps)是生长在青藏高原草甸土壤草丛中的一种名贵药材^[1], 被誉为中华医药瑰宝。其中文名源于其生长过程: 冬天幼虫被真菌侵染后形成菌核即“冬

虫”, 进入春夏子实体长出地面即“夏草”^[2]。现代医学研究发现, 冬虫夏草内含有核苷、虫草多糖、虫草酸、麦角甾醇、蛋白质、氨基酸、微量元素等活性成分, 具有抑制肿瘤、抗癌、抗高血糖^[3]和显著提高人体免疫功能等独特功效^[4-5], 其药用价值及在当地经济中发挥的作用已在世界范围内得到了广泛认可^[6-7]。天然冬虫夏草生长环境特殊, 种质资源十分稀少, 主要分布于我国青海、西藏、四川、甘肃和云南等地以及印度、尼泊尔和不丹等国海拔3 000-5 000 m的高纬度地区^[5]。近年来, 随着自然生态环境的恶化以及干旱缺水等环境因素, 加之药材市场冬虫夏草价格的逐年攀升, 人为乱采乱挖

收稿日期 Received: 2016-11-10 接受日期 Accepted: 2016-12-09

*“十二五”农村领域国家科技计划项目(2013BAD16B012)和西藏圣龙实业有限公司项目(2013310031001210)资助 Supported by the National “12th Five-year Plan” Science and Technology Project for Rural Development of China (2013BAD16B012) and the Tibet Shenglong Industry Company (2013310031001210)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xuanweizhou@sytu.edu.cn; xiafei@sust.edu.cn)

现象日趋严重,冬虫夏草野生资源逐年萎缩,巨大的环境压力和生态问题引起了多方的关注^[8]。因此,利用现代生物技术研究冬虫夏草的内生菌(Endophyte),从内生菌中寻找新的化合物或冬虫夏草类似代谢产物,已经成为研究冬虫夏草的热点之一^[9-11]。

植物内生菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生存于植物各组织或器官内部的真菌或细菌。生物学基础研究已经证明,生活在同一环境中的生物在长期的进化过程中会发生基因交流,产生某些结构类似的代谢产物^[12-13]。例如,治疗乳腺癌的药物紫杉醇最初是从红豆杉树皮提取的,后来从红豆杉树皮中分离到的内生真菌也可产生紫杉醇^[13]。已有研究表明,存在于冬虫夏草的内生真菌也可以产生与天然冬虫夏草相同或相似的化学成分并具有相同的药理作用^[2, 14]。对这种现象目前有两种理论认识,即“基因转移理论”以及“内共生理论”。前者认为宿主与内生真菌长期共同生活,可能会发生基因的遗传交换或基因片段的直接传递,使内生菌也具有相同的次级代谢产物合成途径^[15];后者认为次生代谢过程中生物化学途径的连续演化会导致一些物质进入到共生体中,其基本的生化过程信息有时还会传递到其他生物中去,在连续演化中形成与宿主相同的次生代谢产物合成途径^[16]。因此,冬虫夏草内生真菌的分离、无性型的确定和无性型人工发酵培养已成为冬虫夏草的研究热点^[17-19],另涉及内生真菌所产生的药用成分也有报道^[20-24]。尽管冬虫夏草中有多种内生真菌,但目前研究和利用其代谢产物产物的仅有*Hirsutella sinensis*、*Paecilomyces hepialid*、*P. sinensis*、*Metarhizium anisopliae*^[25]等若干种。关于冬虫夏草无性型菌株分离培养方面的研究已有很多,并已应用于发酵产业化、人工栽培冬虫夏草等方面,通过发酵工程手段生产天然冬虫夏草相关药用成分对于发掘新型药用微生物资源替代冬虫夏草和保护种质资源具有关键意义。本研究对一株新近从天然冬虫夏草中分离的镰刀菌属真菌NS2-B1的发酵培养基进行优化筛选,以总核苷类物质产量为筛选标准,以期建立NS2-B1的最适发酵条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源 内生真菌NS2-B1分离自天然冬虫夏草,由上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究鉴定。内生菌的鉴定基于菌株NS2-B1菌落、菌丝的形态学及产孢特征,结合核糖体DNA上的内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS),确定该菌株与*Fusarium torulosum*的亲缘关系最近,初步鉴定该菌株为*Fusarium* sp.(数据尚未发表)。

1.1.2 试剂 虫草素标准品购自北京仪化通标科技有限公司;鸟苷、尿苷、腺苷标准品购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲醇(色谱纯,美国Fisher)、超纯水、蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、尿素、硝酸铵、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨等试剂均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,均为分析纯级别。

1.1.3 培养基 (1) 固体PDA(Potato Dextrose Agar)培养

基:葡萄糖20 g、去皮土豆200 g(煮汁)、琼脂18 g,加超纯水定容至1 000 mL,分装,121 °C高温湿热灭菌20 min后备用。

(2) 液体PDA培养基,无琼脂加入。

1.1.4 仪器 THZ-C恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),Centrifuge 5810R离心机(德国Eppendorf公司),高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)仪(日本HITACHI公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 菌丝培养 无菌条件下挑取斜面试管菌种NS2-B1菌丝转接至数个PDA平板培养基上,25 °C倒置培养5 d后,选取菌斑生长良好的平板。在无菌条件下挑取3个1 cm³大小的菌株NS2-B1的内生菌菌块,接入装液量为50 mL的250 mL锥形瓶中。在210 r/min、25 °C恒温摇床中震荡培养5 d。

1.2.2 菌丝收集 发酵液中的菌丝体通过5 000 r/min离心10 min,用吸水纸吸干多余水分后称重即为菌丝湿重。

1.2.3 培养基碳源与氮源的筛选 以液体PDA为基本培养基,分别筛选碳源和氮源。首先固定氮源为蛋白胨,筛选最适碳源,分别选用蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉;进而固定碳源为麦芽糖,氮源分别添加尿素、硝酸铵、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨进行发酵培养,分别观察其对菌丝生长的影响,以菌丝湿重以及发酵液中总核苷类物质包括鸟苷、尿苷、腺苷以及虫草素的产量为依据,选择最佳碳源及氮源^[26]。

1.2.4 正交试验优化复合碳氮源组合 (1) 正交试验的设计:利用L₉(3⁴)正交试验筛选复合碳源和氮源组成的最优培养基,其氮源和碳源分别使用1.2.3筛选的碳源和氮源结果,正交实验的因素和水平如表1,正交实验设计如表2所示。为促进菌株生长,除上述4因素外,各培养基中再加入KH₂PO₄

表1 不同碳源和氮源筛选正交试验的因素和水平(%, m/V)

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test for selecting different carbon and nitrogen sources(%, m/V)

水平 Level	因素 Factor			
	碳源 Carbon source		氮源 Nitrogen source	
	A	B	C	D
1	1	0.5	0.5	0.5
2	1.5	1	1	1
3	2	1.5	1.5	1.5

表2 不同碳源和氮源筛选L₉(3⁴)正交实验表头设计

Table 2 Design of L₉(3⁴) table head for selecting different carbon and nitrogen sources

组别 Group	碳源 Carbon source		氮源 Nitrogen source	
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

组别下方的数字表示正交实验设计不同的碳源和氮源组合;碳源与氮源下方的数字代表各自3个不同的水平。

The numbers below the group indicate the combination of different carbon and nitrogen sources in the orthogonal experiment; The numbers below the carbon and nitrogen sources represent three different levels.

0.8 g/L和 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/L作为微量元素来源。

(2) 代谢产物样品的制备: 把正交试验设计中各种组合的液体培养基按1.2.1中方法培养菌种NS2-B1, 培养结束后, 发酵菌液在4 ℃、5 000 r/min条件下离心10 min, 取上清液。将沉淀在-80 ℃冰箱中反复冻融3次后, 再倒入上清液, 反复振荡之后再次离心后取上清。上清液经0.22 μm滤膜过滤后备用。

(3) HPLC检测核苷类物质: 本研究高效液相色谱配备的分析柱为YMC-Pack Pro C18 (250 mm × 4.6 mm I.D.S-5 μm.12 nm) 柱。色谱条件: 流动相为甲醇/水 (V/V = 15:85), 流速0.8 mL/min; 柱温为35 ℃; 紫外光检测器检测波长为260 nm; 进样量10 μL; 采集时间20 min^[27]。以鸟苷、尿苷、腺苷以及虫草素的标准样品以已知浓度混合后经HPLC上样测定, 依据检测结果绘制标准曲线。发酵液中有效成分含量的计算以标准曲线为基础, 通过HPLC系统自带软件进行计算。

1.2.5 数据处理 文中数据均为同一条件下3次重复的平均值。采用SPSS19.0软件 (International Business Machines Corporation) 进行单因素分析。实验数据以平均值 ± 标准方差表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 培养基碳源与氮源的筛选结果

通过对不同碳源与氮源培养基的菌丝产量进行统计, 筛选菌株NS2-B1的最适碳源、氮源。结果发现, 若以蛋白胨作为固定氮源, 淀粉为最佳碳源, 50 mL发酵液中菌丝湿重平均可达到 (6.41 ± 0.03) g, 显著高于其他碳源 ($P < 0.05$) (图1);

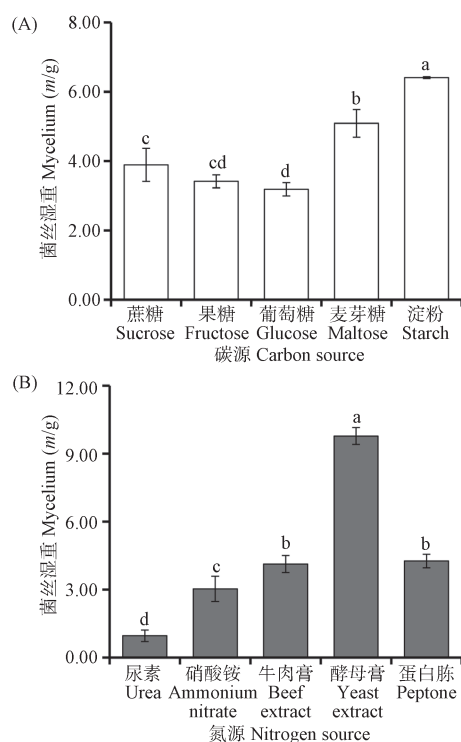


图1 不同碳源 (A) 和氮源 (B) 对菌株NS2-B1菌丝体生物量的影响。
Fig. 1 Effects of different carbon sources (A) and nitrogen sources (B) on mycelial biomass of NS2-B1.

麦芽糖次之, 蔗糖、果糖、葡萄糖更次。若以麦芽糖作为固定碳源, 酵母膏为最佳氮源, 50 mL发酵液中菌丝湿重平均可达到 (9.77 ± 0.37) g, 显著高于其他氮源类型 ($P < 0.05$) (图1); 蛋白胨与牛肉膏次之, 硝酸铵与尿素更次。综上, 表1中优选的碳源A、B分别为麦芽糖和淀粉, 优选的氮源C、D分别为酵母膏和蛋白胨。

2.2 建立HPLC测定虫草内生菌核苷类物质含量的方法

通过HPLC对NS2-B1发酵液中尿苷、鸟苷、腺苷和虫草素4种核苷类药用成分含量进行检测, 建立标准曲线 (图2)。结果表明, 各种核苷类物质HPLC检测建立的标准曲线线性关系良好 (图3), 说明HPLC检测体系稳定、准确, 标准曲线可以用于发酵液中相关药用成分浓度的检测。依据建立的标准曲线对菌株NS2-B1发酵液中尿苷、鸟苷、腺苷和虫草素4种药用成分的含量进行计算, 结果如表3所示。总核苷类物质在不同培养基组成条件下产量差别较大, 产量最低只有 (8.32 ± 1.46) μg/mL, 最高可达 (92.62 ± 4.19) μg/mL。

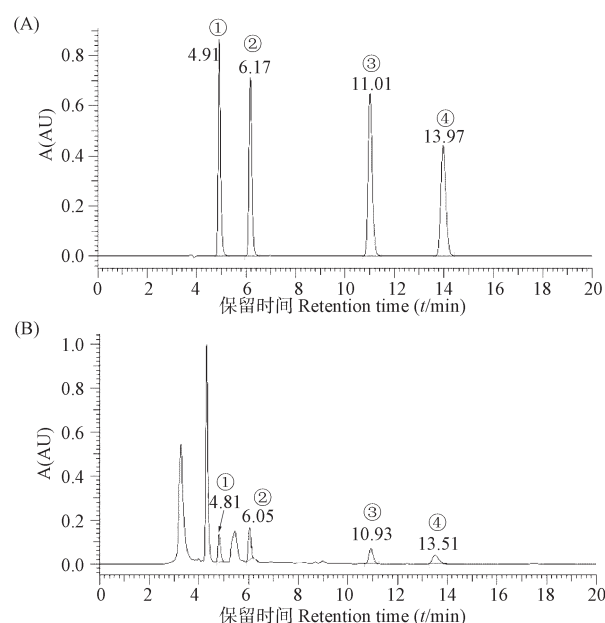


图2 菌株NS2-B1发酵液中4种核苷类活性成分高效液相图。(A) 4种核苷类活性成分标准样品; (B) 菌株NS2-B1发酵液中4种核苷类活性成分HPLC图谱。① 尿苷; ② 鸟苷; ③ 腺苷; ④ 虫草素。

Fig. 2 HPLC profile of four nucleosides metabolites from NS2-B1 fermentation broth. (A) The mixed stand samples of four nucleosides metabolites; (B) HPLC profil of four nucleosides metabolites in NS2-B1 fermentation broth. ① Uridine; ② Guanosine; ③ Adenosine; ④ Cordycepin.

2.3 正交试验结果

根据已经建立的HPLC检测核苷类物质的具体方法, 将计算所得的各种培养基组合发酵条件下, 各个培养基配方中核苷的含量 (表3) 带入 $L_9(3^4)$ 表中, 确定适合于冬虫夏草内生菌株NS2-B1发酵产生总核苷类物质的培养基。正交试验分析结果见表4, 分析显示在影响菌株NS2-B1液体发酵生产核苷类物质的培养基中, (1) 按表1的正交实验因素, 比较表4中各考察因素的极差R, 总核苷含量的顺序为 $R_C > R_D > R_A > R_B$; 所以各因素的主次顺序分别为 $C \rightarrow D \rightarrow A \rightarrow B$ 。即酵母膏是主要因素, 蛋白胨次之, 麦芽糖再次之, 淀粉是次要因

表3 菌株NS2-B1发酵液中核苷类代谢产物含量
Table 3 Nucleosides metabolites contents in NS2-B1 fermentation broth

组别 Group	尿苷 Uridine ($\rho/\mu\text{g mL}^{-1}$)	鸟苷 Guanosine ($\rho/\mu\text{g mL}^{-1}$)	腺苷 Adenosine ($\rho/\mu\text{g mL}^{-1}$)	虫草素 Cordycepin ($\rho/\mu\text{g mL}^{-1}$)	总核苷 Nucleoside ($\rho/\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	2.39 ± 1.07f	1.86 ± 0.08g	1.67 ± 0.24f	2.41 ± 0.33f	8.32 ± 1.46f
2	17.92 ± 0.62b	27.89 ± 3.73c	12.17 ± 1.91c	11.25 ± 0.85c	69.24 ± 4.17c
3	26.51 ± 1.47a	20.98 ± 1.66d	20.08 ± 1.09a	23.68 ± 1.27a	91.24 ± 1.73a
4	15.17 ± 0.08c	35.21 ± 2.93b	15.02 ± 3.60b	15.21 ± 1.25b	80.61 ± 3.01b
5	19.06 ± 2.01b	26.52 ± 0.35c	14.40 ± 1.58b	16.33 ± 1.42b	76.31 ± 3.56b
6	2.94 ± 0.44f	3.13 ± 0.32fg	2.91 ± 0.23f	3.64 ± 1.03ef	12.62 ± 1.42f
7	8.68 ± 0.70d	46.23 ± 4.21a	21.70 ± 0.88a	16.00 ± 1.06b	92.62 ± 4.19a
8	4.81 ± 0.31e	5.77 ± 0.20f	4.92 ± 0.21e	4.42 ± 0.28de	19.92 ± 0.57e
9	3.14 ± 0.63f	12.08 ± 0.07e	7.83 ± 0.08d	5.65 ± 0.45d	28.70 ± 0.82d

组别表示不同正交实验设计碳源和氮源的组合; 数据为平均值±标准方差. 同列数据后字母不同表示具有显著性差异 ($P < 0.05$).
The combination of different carbon and nitrogen sources in different orthogonal experiments; The data was mean ± standard deviation. The different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

素. (2)以各因素不同水平下的均值对各水平作图(图4), 对于因素A, 呈先上升后下降的趋势, 因素B呈下降趋势, 因素C和D呈上升趋势. 经比较后发现, 在 A_2 、 B_1 、 C_3 、 D_3 每一因素的3个水平下(表4), 总核苷含量最高. 上述分析结果表明, 菌株NS2-B1产核苷总量最佳的培养基配方为 $A_2B_1C_3D_3$, 即麦芽糖1.5%、淀粉0.5%、酵母膏1.5%、蛋白胨1.5%、 KH_2PO_4 0.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/L.

表4 复合碳源和氮源筛选的 $L_9(3^4)$ 实验结果
Table 4 The $L_9(3^4)$ trial results for selecting different carbon and nitrogen sources

试验号 Experiment No.	A	B	C	D
K_1	168.80	181.55	40.86	113.33
K_2	169.54	165.47	178.55	174.48
K_3	141.24	132.56	260.17	191.77
$\bar{K}_1$	56.27	60.52	13.62	37.78
$\bar{K}_2$	56.51	55.12	59.52	58.16
$\bar{K}_3$	47.08	44.19	86.72	63.92
K_g	9.43	16.33	73.10	26.14

3 讨论与结论

冬虫夏草是中国传统的中药材, 其中蕴含着丰富的微生物菌群^[28], 包括细菌和真菌^[29-30], 冬虫夏草菌(*Ophiocordyceps sinensis*) 仅是其中的一个物种. 把冬虫夏草中分离的真菌应用于药用成分生产, 对于保护天然冬虫夏草种质资源、发现潜在药用新型化合物以及西藏草地生态系统平衡具有重要的意义. 尽管目前国内外开展了大量的分离真菌的工作, 然而目前仅有为数不多的几种真菌应用于发酵工程生产冬虫夏草相关药效物质. 本研究中报道的镰刀菌属真菌NS2-B1为首次报道冬虫夏草中存在的镰刀菌属也可以产生与冬虫夏草相同的核苷类物质, 并且经过优化培养基后, 总核苷类物质产量最高可达到(92.62 ± 4.19) $\mu\text{g/mL}$, 其腺苷含量为(21.70 ± 0.88) $\mu\text{g/mL}$ (表1), 也远远高于《中华人民共和国药典》(2015版)中对冬虫夏草中腺苷含量(0.010%)的规定, 由此推断该真菌有潜力开发成为冬虫夏草的替代产品. 在先对冬虫夏草及其无性型活性成分的研究中, 多数研究者把冬虫夏草或其无性型的代谢产物局限在虫草素和虫草酸上, 自从提倡利用指纹图谱对中药产品进行质量评价以来, 国内

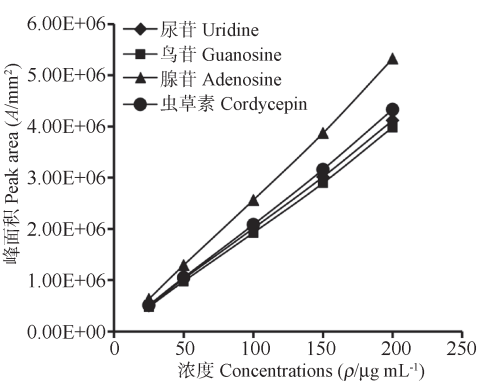


图3 尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素HPLC检测标准曲线. 尿苷标准方程: $Y = 20497X - 17816$, $R^2 = 0.9995$; 鸟苷标准方程: $Y = 19870X - 35245$, $R^2 = 0.9992$; 腺苷标准方程: $Y = 26607X - 57794$, $R^2 = 0.9993$; 虫草素标准方程: $Y = 21686X - 49361$, $R^2 = 0.9994$.
Fig. 3 Standard curves of uridine, guanosine, adenosine and cordycepin detected by HPLC. The standard equation of uridine: $Y = 20497X - 17816$, $R^2 = 0.9995$; The standard equation of guanosine: $Y = 19870X - 35245$, $R^2 = 0.9992$; The standard equation of adenosine: $Y = 26607X - 57794$, $R^2 = 0.9993$; The standard equation of cordycepin: $Y = 21686X - 49361$, $R^2 = 0.9994$.

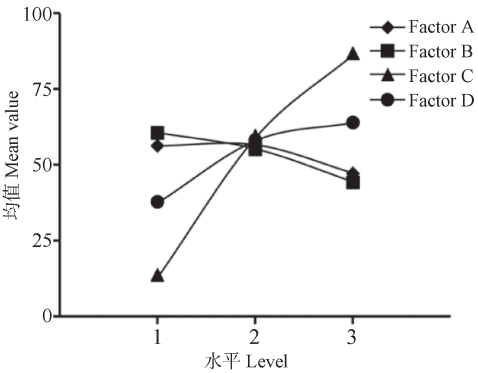


图4 不同碳、氮源筛选正交实验各因素在不同水平下均值的变化.
Fig. 4 Changes of mean values of factors at different levels in orthogonality experiment for selecting different carbon and nitrogen sources.

外许多学者都致力于中药指纹图谱的方法学研究; 而在冬虫夏草研究和生产方面的应用仍处于初始阶段, 尽管冬虫夏草及其相关菌丝体发酵产品不论是在药品还是在保健食品上都得到了一定程度的开发和利用, 但总的来讲科技含量较

低,大多是原始材料的简单加工,其产品的质量标准几乎处于空白,《中国药典》中活性成分含量测定中仅用腺苷($C_{10}H_{13}N_5O_4$)一种成分指标来判定冬虫夏草的质量还有待于进一步探讨.该研究首次以冬虫夏草中存在的4种核苷类活性成分^[5](尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素)的标准品的混合样品、用HPLC来综合分析冬虫夏草内生菌中的活性成分,为利用HPLC建立冬虫夏草化学指纹图谱进行了有益的尝试,为冬虫夏草的品质评鉴和质量标准的建立具有一定的借鉴作用.

在真菌的深层发酵过程中,完善的培养基设计是实验室试验和生产规模放大中重要的一个步骤.发酵过程中的目标产品通常为菌体或菌体的代谢产物;发酵培养基是否适合于菌体的生长或代谢产物的积累,对最终产品的得率影响较大^[2, 26],在通常的培养基设计中,必须满足细胞生长和代谢产物分泌所需要的元素,并提供细胞生物合成和维持细胞活力所需要的能量.本研究首先利用单因素实验,以菌丝体的生物量为指标,分别从5种碳源和5种氮源中筛选了对菌丝体生物量影响较大的2种碳源和2种氮源,然后选择相对对菌丝生物量影响较大的2种碳源和2种氮源按 $L_9(3^4)$ 进行正交试验设计,以冬虫夏草中4种核苷类活性成分^[5]为指标筛选出相对适用于该内生真菌生长和核苷类代谢产物积累的培养基;这种利用菌丝体生物量和代谢产物的含量来选择培养基的方法,对利用真菌发酵方法生产活性成分具有广泛的参考价值.该研究仅仅针对内生真菌摇瓶发酵培养基的碳氮源进行了筛选,筛选的碳氮源的范围也十分有限,影响丝状真菌发酵的其他条件,如培养基的初始pH值、温度、溶氧、前体饲喂等还有待进一步试验探索.本研究中内生真菌菌株NS2-B1产生核苷类物质的培养基配方组成为麦芽糖1.5%、淀粉0.5%、酵母膏1.5%、蛋白胨1.5%、 KH_2PO_4 0.8 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 g/L.从筛选出的培养基的组成来看,成分组合相对简单,主要成分多为常见原料,来源方便也不失为该内生真菌最初发酵或扩大培养的优良培养基.

参考文献 [References]

- 董彩虹,李文佳,李增智,闫文娟,李泰辉,刘杏忠.我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言[J].菌物学报, 2016, **35** (1): 1-15 [Dong CH, Li WJ, Li ZZ, Yan WJ, Li TH. Cordyceps industry in China: current status, challenges and perspectives - Jinhu declaration for cordyceps industry development [J]. *Mycosystema*, 2016, **35** (1): 1-15]
- Zhou XW, Li LJ, Tian EW. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, **34** (3): 233-243
- Lo HC, Hsieh C, Lin FY, Hsu TH. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao (冬虫夏草 Dōng Chóng Xià Cǎo) and related bioactive ingredients [J]. *J Tradit Complem Med*, 2013, **3** (1): 16-32
- Paterson RRM. Cordyceps-A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? [J]. *Phytochemistry*, 2008, **69** (7): 1469-1495
- Zhou XW, Gong Z, Su Y, Lin J, Tang KX. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, **61** (3): 279-291
- Weckerle CS, Yang Y, Huber FK, Li Q. People, money, and protected areas: the collection of the caterpillar mushroom *Ophiocordyceps sinensis* in the Baima Xueshan Nature Reserve, Southwest China [J]. *Biodivers Conserv*, 2010, **19** (9): 2685-2698
- Zhang Y, Xu L, Zhang S, Liu X, An Z, Wang M, Guo Y. Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: implications for its evolution and conservation [J]. *BMC Evol Biol*, 2009, **9** (1): 290
- 李文才,邱建军,邱锋.西藏那曲地区冬虫夏草资源可持续开发利用研究[J].生态经济, 2011 (6): 112-114 [Li WC, Qiu JJ, Qiu F. Research on sustainable utilization of *Cordyceps sinensis* resources in Naqu Region of Xizang Zizhiqu [J]. *Ecol Econ*, 2011 (6): 112-114]
- Xia F, Liu Y, Guo MY, Shen GR, Lin J, Zhou XW. Pyrosequencing analysis revealed complex endogenetic microorganism community from natural DongChong XiaCao and its microhabitat [J]. *BMC Microbiol*, 2016, **16** (1): 196
- Xia F, Chen X, Guo MY, Bai XH, Liu Y, Shen GR, Li YL, Lin J, Zhou XW. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese Cordyceps reveals unexpectedly high fungal diversity [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 33437
- Xia F, Liu Y, Shen GR, Guo LX, Zhou XW. Investigation and analysis of microbiological communities in natural *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Can J Microbiol*, 2014, **61** (2): 104-111
- Stierle AG. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, **260**: 214-216
- Zhou XW, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang KX. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi [J]. *App Microbiol Biotechnol*, 2010, **86** (6): 1707-1717
- 金成, 邬晓敏, 陈高阳, 金水宝的临床应用[J].首都医药, 2006, **12** (18): 42-43 [Jin C, Wu XM, Chen GY. Clinical application of Jinshuibao [J]. *Capital Med*, 2006, **12** (18): 42-42]
- Roger PA, Heong KL, Teng PS, Hawksworth DL. The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture [C]. Proceedings of the 1st Workshop on the Ecological Foundations of Sustainable Agriculture (WEFSA'91), 1991: 117-136
- 梁宗琦.真菌次生代谢产物多样性及其潜在应用价值[J].生物多样性, 1999, **7** (2): 145-150 [Liang ZQ, The diversity of fungal secondary metabolites and their potential applications [J]. *Chin Biodiv*, 1999, **7** (2): 145-150]
- 张永杰, 孙炳达, 张姝, 旺姆, 刘杏忠, 巩文峰.分离自冬虫夏草可培养真菌的多样性研究[J].菌物学报, 2010, **29** (4): 518-527 [Zhang YJ, Sum BD, Zhang S, Wang M, Liu XZ, Gong WF. Mycobiotal investigation of natural *Ophiocordyceps sinensis* based on culture-dependent investigation [J]. *Mycosystema*, 2010, **29** (4): 518-527]
- 姚艺桑, 朱佳石.中药冬虫夏草和所含多种冬虫夏草菌拉丁名混用的历史和现状[J].中国中药杂志, 2016, **41** (7): 1361-1366 [Yao YS, Zhu JS. Indiscriminate use of Latin name for natural *Cordyceps sinensis* insect-fungi complex and multiple *Ophiocordyceps sinensis* fungi [J]. *China J Chin Mater Med*, 2016, **41** (7): 1361-1366]
- 张晓芳, 陈琼, 刘慧娜, 彭璐璐, 朱艳丽.探析冬虫夏草无性型发酵技术研究新进展[J].生物技术世界, 2015 (1): 57 [Zhang XF, Chen Q, Liu HN, Peng LL, Zhu YL. New advances in the fermentation technique of *Cordyceps sinensis* anamorph [J]. *Biotech World*, 2015 (1): 57]
- 车永胜.特殊生境真菌来源的新结构活性物质研究[J].国际药学研究杂志, 2011, **38** (1): 12-27 [Che YS. Discovery of new bioactive natural

- products from fungi of unique ecological niches [J]. *J Int Pharm Res*, 2011, **38** (1): 12-27]
- 21 胡丰林, 李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性[J]. 菌物学报, 2007, **26** (4): 607-632 [Hu FL, Li ZZ. Secondary metabolites and their bioactivities of cordyceps and its related fungi [J]. *Mycosystema*, 2007, **26** (4): 607-632]
- 22 Guo H, Hu H, Liu S, Liu X, Zhou Y, Che Y. Bioactive p-Terphenyl derivatives from a Cordyceps-colonizing isolate of *Gliocladium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2007, **70** (9): 1519-1521
- 23 Yamada T, Iwamoto C, Yamagaki N, Yamanouchi T, Minoura K, Yamori T, Uehara Y, Andoh T, Umemura K, Numata A. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities [J]. *Tetrahedron*, 2002, **58** (3): 479-487
- 24 Zhang Y, Liu S, Che Y, Liu X. Epicoccins A-D, Epipolythiodioxo-piperazines from a Cordyceps-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum* [J]. *J Nat Prod*, 2007, **70** (9): 1522-1525
- 25 魏江春, 魏鑫丽, 郑维发, 郭威, 柳润东. 现代工业化培植的冬虫夏草物种鉴定与成分检测[J]. 菌物学报, 2016, **35** (4): 404-410 [Wei JC, Wei XL, Zheng WF, Guo W, Liu RD, Species identification and component detection of *Ophiocordyceps sinensis* cultivated by modern industry [J]. *Mycosystema*, 2016, **35** (4): 404-410]
- 26 Liu Y, Yuan WN, Zhou XW. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial biomass and bioactive metabolites production by *Cordyceps militaris* [J]. *J Pure Appl Microbiol*, 2014, **8** (6): 4245-4256
- 27 Huang L, Li QZ, Chen Y, Wang X, Zhou XW. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2009, **3** (12): 957-961
- 28 Xia F, Liu Y, Guo MY, Shen GR, Lin J, Zhou XW. Pyrosequencing analysis revealed complex endogenetic microorganism community from natural DongChong XiaCao and its microhabitat [J]. *BMC Microbiol*, 2016, **6** (1): 196
- 29 Xia F, Chen X, Guo MY, Bai XH, Liu Y, Shen GR, Li YL, Lin J, Zhou XW. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese Cordyceps reveals unexpectedly high fungal diversity [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 33437
- 30 Xia F, Liu Y, Shen GR, Lin J, Zhou XW. Investigation and analysis of microbiological communities in natural *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Can J Microbiol*, 2015, **61** (2): 104-111