

提高蛹虫草中的虫草素产量的研究进展

段 鸿 斌, 乔 新 荣, 殷 东 林, 王 瑞 丽

(信阳农林学院 生物技术系, 河南 信阳 464000)

摘 要:虫草素是一种具有广泛生物活性和药理作用的核苷类物质,其药用价值及生物活性的多样性已众所周知。现从菌种选育、培养条件优化及提取工艺 3 方面综述了提高蛹虫草中虫草素产量的措施,以期对今后的研究方向进行展望。

关键词:蛹虫草;虫草素;优化

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0178-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris* (L.) Link)分类学上属于真菌门(Eumycota),子囊菌亚门(Ascomycotina),核菌纲(Pyrenomycetes),球壳目(Sphaeriales),麦角菌科(Clavicipitales),虫草属(*Cordyceps*)。又名北冬虫夏草、北虫草、蛹草。它是蛹虫草真菌寄生在鳞翅目、鞘翅目、双翅目等夜蛾科昆虫蛹体及幼虫上形成的虫菌复合体^[1-2]。蛹虫草菌与被推荐为中国的“国菌”的异种冬虫夏草菌有着相似的生物活性成分和药理作用^[3],而且蛹虫草生长较快,容易人工培养,因此,人们常把蛹虫草作为冬虫夏草的替代品进行开发利用。

虫草素(cordycepin)又称虫草菌素或 3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine),是第一个从蛹虫草菌中分离出来的核苷类抗生素。具有抗癌、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节、抗衰老、扩张支气管等多种药理作用^[4]。因此,虫草素的研究现已成为药物化学、抗衰老、美容、保健品领域中一个极其活跃的领域。现从菌株选育、培

养条件优化及提取工艺 3 方面综述了提高蛹虫草中虫草素产量的研究进展。

1 高产菌种选育

获得稳定遗传的高产菌株是提高蛹虫草中虫草素含量的一项重要措施。李文等^[5]采用低能离子束诱变蛹虫草菌株,选育出了 15 株虫草素含量较高的菌株,比原始菌株增长了近 30%。Das 等^[6]利用高能离子束诱变蛹虫草,获得了虫草素含量比对照提高了 72%的突变菌株。周洪英等^[7]采用灭活原生质体融合技术,获得了 5 个稳定融合子虫草素含量高的稳定菌株。周礼红等^[8]通过对蛹虫草原生质体进行紫外诱变,筛选到 1 株虫草菌素含量高于初始菌株 2 倍的优良菌株,并经连续 15 代传代培养,虫草菌素和腺苷的含量保持稳定。周晓东等^[9]对液体培养的蛹虫草菌丝体进行 20 W 紫外灯下 32 cm 处照射 100 s 的紫外诱变,也筛选到虫草素含量较高的突变菌株。此外,航天搭载蛹虫草诱变后,虫草素含量较原始菌株也提高了 2.5 倍^[10]。

2 培养条件优化

培养条件是影响微生物生长及代谢的重要因素。培养基的碳源、氮源及碳氮比是影响虫草素产生的基本

第一作者简介:段鸿斌(1970-),男,河南罗山人,硕士,副教授,现主要从事生物技术等研究工作。E-mail:dhb19700102@163.com.

基金项目:河南省科技攻关资助项目(132102110047)。

收稿日期:2014-09-22

The Regulation Mechanism of Fruits Development and Ripening

ZHOU Feng

(School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract: The fruit is an essential part of human diet. It is important to study regulation mechanism of fruit development and ripening, which is the base of improving fruit quality. The nomenclature, evolution and diversity of fruits were firstly introduced in this paper. The molecular regulation mechanism of the gynoecium development, fertilization, fruits development, dry fruits dehiscence and fleshy fruits color in fruits formation process were also summarized present.

Keywords: fruits; development; ripening; regulation

因子。碳源主要有葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等,氮源主要是酵母膏、蛋白胨、牛肉膏及粮食代料等。较低的碳氮比有利于提高蛹虫草的虫草素产量^[11-12]。另外,培养基中虫草素代谢相关的物质及某些金属离子的添加都会影响到虫草素的产生。

2.1 培养基探究

顾冬艳等^[13]在大豆培养基中添加不同的碳源、氮源等进行单因素试验,发现葡萄糖是最佳的碳源、牛肉膏是合适的氮源。蔡水淋等^[14]通过单因素试验和响应面设计对蛹虫草液体深层发酵工艺进行优化,结果表明,最适的碳氮源是葡萄糖和蛋白胨,在装液量 100 mL、初始 pH 值 5.0、发酵培养基中葡萄糖 31.58 g/L、蛋白胨 34.48 g/L、腺嘌呤 0.88 g/L、甘氨酸 15.48 g/L 培养条件下,发酵 8 d 后测得虫草素较优化前提高了 108.3%。钟思敏等^[15]通过对蛹虫草菌丝产虫草素的液体培养条件进行探讨,总结出蛹虫草菌丝产虫草素的条件为 D-果糖 10 g/L、蛋白胨 15 g/L、pH 7.0、培养温度 24℃、转速 180 r/min、培养时间 9 d,可显著提高培养液虫草素含量。施渺筱等^[16]对蛹虫草培养成分进行正交实验,结果显示最佳培养基成分为 2%蛋白胨、3%酵母膏、3%麦芽糖、4%蔗糖、0.1%KH₂PO₄、0.1%NaNO₃、0.2%NH₄Cl。

蛹虫草人工培养多采用大米、燕麦、小麦、豆类等粮食配制的代料培养基。温鲁等^[17]以蛹粉、豆粉、豆粕、鱼粉为氮源培养蛹虫草,测得豆粕和豆粉为氮源的栽培效果均优于蛹粉。当采用 20%豆粕为氮源、水料比为 1.4 : 1 mg/L 的条件下,虫草素含量比以蚕蛹为寄主的蛹虫草高出 50%以上。顾冬艳等^[13]也检测到以大豆粉作为固态发酵培养基原料时,蛹虫草含量显著高于玉米粉、小麦粉、大米粉、发芽糙米粉。可能是由于大豆中蛋白质产量高,因此其碳氮比低,提高了虫草素的产量。此外,豆粕也是液体培养蛹虫草的较好氮源^[18]。当大豆粉与麦麸质量比为 4 : 1、液料比为 39 : 30 mg/L 及营养液中葡萄糖浓度为 10 g/L、牛肉膏 2 g/L、硫酸锰 0.3 g/L 条件下,固态发酵蛹虫草,虫草素产量也显著提高^[13]。韦会平等^[19]对影响虫草素产量的因素进行系统优化,报道最佳固体发酵配方为:营养水和大米的水料比为 1.1 : 1 mg/L,营养物中酵母膏、蛋白胨、葡萄糖的用量分别为 22.6、6.0、25.4 g/L, pH 6.6。最佳的环境条件为光照强度 4 400 lx,每日光照时间 18 h,温度 18~22℃。此条件下经过约 13 d 的培养,培养基中虫草素达到 0.60%,比传统液体发酵方法的最高产量高约 2 倍,且培养时间缩短 2 d。叶晶晶等^[20]配制了以市售东北珍珠大米为代料培养基,含有的营养液组分为 0.1 g/L

MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g/L KH₂PO₄, 10 g/L 蛋白胨, 20 g/L 蔗糖。检测了添加蚕蛹粉及营养液的初始 pH 值对虫草素含量的影响。发现当培养基中的蚕蛹粉质量分数为 10%、营养液的初始 pH 为 6.0 时,子实体产量和总虫草素含量最高。郭涛等^[21]比较了粳米、糯米及其各自添加蚕蛹质量分数为 10%的浸提液制成的 4 种培养基中虫草素的含量,结果表明,粳米培养基中添加家蚕蛹浸提液可显著提高蛹虫草中的虫草素含量。

2.2 添加物探究

从微生物代谢角度进行分析可知,腺苷是虫草素合成的直接前体物,核糖、谷氨酰胺、甘氨酸、次黄嘌呤等间接参与虫草素合成。荆留萍等^[22]研究表明,腺苷、核糖、谷氨酰胺、甘氨酸均能明显提高蛹虫草液体发酵中虫草素含量,其最适添加量分别为 4.0、2.0~3.0、0.5~1.0、0.5 mg/mL。Masuda 等^[23]在基本培养基中加入 1 g/L 的腺嘌呤和 16 g/L 的氨基乙酸使得虫草素产量提高了 4.1 倍。陈长兰等^[24]分析了蛹虫草液体摇瓶培养过程中分别添加 20 种含量为 0.2 g/100mL 的氨基酸,测得精氨酸、组氨酸、苏氨酸、天冬酰胺及丙氨酸的添加增加了虫草素含量。

顾冬艳等^[13]在大豆培养基中添加 MnSO₄ 和 FeSO₄ 均能提高虫草素含量。在液体培养基中添加不同浓度的锰离子(0~100 g/L),也增加了菌丝体中虫草素的合成^[25]。蔡水淋等^[14]对蛹虫草液体深层发酵工艺进行优化,发现影响虫草素产量最显著的无机盐为 FeSO₄。另外,硒、氯化钙及 NH₄⁺ 等无机盐离子的施加,也促进了虫草素产量的提高^[26-28]。

此外,激素的适量添加也会促进虫草素的产生。在培养营养液中加入生长调节因子 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、柠檬酸三胺、秋水仙素、链霉素、β-蜕皮激素及保幼激素Ⅲ等也能有效地促进虫草素的产生^[29-30]。

2.3 液体培养方式探究

采用先摇床培养后静止培养的两段式液体发酵培养模式,能显著提高虫草素的产量和产率^[12],与光照条件培养相比,黑暗条件下进行的振荡发酵培养,虫草素产量显著提高^[31]。而且,振荡培养时采用孢子接种比种子液接种方法,所产的虫草素产量高^[32]。另外,在不同的发酵阶段,菌丝生长对氧气的需求量也影响虫草素的合成。Mao 等^[33]研究表明,培养的前期溶氧控制在 60%,当虫草素产率开始下降时将溶氧降至 30%,虫草素的产量可增加 15%。补料分批培养策略也在促进蛹虫草虫草素的产生优化中得到了应用,柳依婷等^[32]采用两段式液体发酵法,在振荡培养 4 d 后,分别向不同的摇

瓶中补加不同浓度的甘氨酸,混匀后进行静置发酵,静置培养 7 d 后。甘氨酸的补加量为 6 g/L 的处理比振荡发酵的最佳虫草素产量提高了 63.7%。

最近发现,利用场强为 0.1、0.25、0.4 T 恒定磁场,以流速为 1 m/s,分别对普通水进行 9 次处理,串联(SC)磁场处理 3 次的磁处理水,用于栽培蛹虫草,结果表明,0.25 T 处理组有利于虫草素的积累,比对照组提高了 11.31%^[34]。

3 提取纯化方法优化

优化虫草素提取方法是提高其产率的有效措施。根据虫草素的溶解性,大多采用水、乙醇、甲醇及其混合液作为溶剂提取虫草素。提取方法主要有浸提法、索氏提取法和超临界萃取法等。几年来,在此基础上又开发了微波、超声波、生物酶法及大孔树脂柱层析法等辅助手段。

王陶等^[35]利用超声波、微波、微波-超声波联合辅助法,提取蛹虫草菌丝体中的虫草素,结果表明微波-超声协同提取较其它 2 种效果好。其最佳条件组成:超声波 40 kHz、70%乙醇、微波功率 200 W、提取时间 110 s、料液比 1:240 g/mL。李辰等^[36]从蛹虫草大米培养残基中提取虫草素,利用 40%乙醇水溶液及超声波、微波辅助浸提提取虫草素,比较了超声波提取 2 次、微波提取 2 次、微波-超声波联合提取以及超声-微波联合提取等方式对虫草素的提取效率,最终确定微波提取 2 次为最佳工艺。邓黎等^[37]优化了水浸提和超声辅助法提取蛹虫草子实体中虫草素的工艺,结果表明,超声提取的优化工艺条件为超声温度 50℃,超声提取时间 47 min,液料比 30:1 mL/g,提取次数 3 次。

谢红旗等^[38]研究了中性蛋白酶、酸性蛋白酶及果胶酶辅助热水提取蛹虫草子实体中虫草素,最佳工艺组成:中性蛋白酶在酶用量为 1.5%,预处理料液比为 1:10 g/mL,pH 5.5,温度 50℃,酶处理时间 60 min。相对普通热水浸提,虫草素提取率提高 6.2 倍。

李从镇等^[39]采用 40℃ 的水浸提 3 次,每次 2 h,料液比 1:15 g/mL 的条件下,对蛹虫草废弃培养基中的虫草素进行粗提后,用 NKA-II 型树脂纯化虫草素的最佳吸附条件为 pH 9.0,吸附流速 2 BV/h,该树脂对虫草素的吸附量可达 16.5 mg/g,提取的虫草素纯度可达 95%以上。而曾昱等^[40]利用优化热水浸法,在浸提温度 70℃、浸提时间 8 h、料液比 1:20 g/mL 的条件下,同样对蛹虫草废弃培养基中的虫草素进行粗提后,用 XAD16 树脂吸附洗脱后,提取的虫草素纯度达到 98%以上。

4 小结

许多医学证明,虫草素具有多种药用功效,在医疗保健领域具有广阔的应用前景。当前,蛹虫草菌仍是生产虫草素的主要菌株。虽然现已对提高蛹虫草中虫草素含量及提取分离方法进行了大量的研究和探讨,但还不够深入、不系统化。今后,除选育蛹虫草优良菌种、克服菌株退化以及优化高产培养条件仍是研究的重点之外,应加强对虫草素生物学合成途径和调控方面的研究,从分子生物学层面、克隆虫草素生物合成相关基因,深入挖掘影响其合成的关键酶代谢及其相关基因表达调控机制,便于高效、正确的指导大规模的人工栽培。此外,还应就目前虫草素提取分离纯化技术的优缺点进行深入比对分析,进一步研发高效、低成本技术,提高虫草素提取效率及其纯度。另外,寻找异于蛹虫草的高产虫草素菌株也是未来研究的一个重要方向。

参考文献

- [1] Sung G H, Hywel-Jones N L, Sung J M, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57: 5-59.
- [2] 林晓民,李振岐,侯军. 中国大型真菌多样性[M]. 北京:中国农业出版社,2004:38-39.
- [3] 王建芳,杨春清. 蛹虫草有效成分及药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2005, 22(5): 30-32.
- [4] 蒋宁,刘红锦,刘芳,等. 虫草菌素研究与开发的现状与前景[J]. *江西农业学报*, 2011, 23(1): 121-123.
- [5] 李文,赵世光,陈宏伟,等. 低能离子束修饰蛹虫草菌株高产虫草素[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1725-1731.
- [6] Das S K, Masuda M, Hatashita M, et al. A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(6): 534-538.
- [7] 周洪英,边银丙. 蛹虫草虫草素高产原生质体融合子鉴定与筛选[J]. *食用菌学报*, 2007, 14(2): 65-70.
- [8] 周礼红,王仕敏,罗丽美. 高产虫草菌素蛹虫草菌株的紫外线诱变选育[J]. *食用菌*, 2009(4): 20-21.
- [9] 周晓东,李明,田景花,等. 北虫草菌丝体诱变及优良菌株的筛选[J]. *北方园艺*, 2013(8): 154-156.
- [10] 温鲁,张诚,夏敏,等. 蛹虫草航天搭载对活性成分含量的影响[J]. *食品科学*, 2008, 29(5): 382-384.
- [11] Mao X B, Eksriwong T, Chauvatcharin S, et al. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1667-1672.
- [12] Shih I L, Tsai K L, Hsieh C, et al. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 33(3): 193-201.

- [13] 顾冬艳,尹永祺,杨润强,等.北虫草固态发酵产虫草素培养基优化[J].食品科学,2013,34(21):254-258.
- [14] 蔡水淋,郑永标,王明兹,等.响应面法优化蛹虫草深层培养产菌丝及虫草素的发酵工艺[J].农产品加工,2013,311(3):13-18.
- [15] 钟思敏,杜梅,陈往滨,等.蛹虫草菌丝产虫草素液体培养条件的研究[J].菌物学报,2011,30(2):229-234.
- [16] 施渺筱,舒星,肖洋,等.正交实验优化蛹虫草培养成分提高虫草菌素含量[J].时珍国医国药,2009,20(9):2221-2222.
- [17] 温鲁,夏敏,葛宜和,等.以虫草素和腺苷含量为指标优化蛹虫草人工栽培[J].江苏农业学报,2005,21(4):359-363.
- [18] 温鲁,夏敏,宋虎卫,等.液体培养蛹虫草虫草素和腺苷的代谢量[J].微生物学通报,2005,232(3):91-94.
- [19] 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.
- [20] 叶晶晶,张剑飞,曹宁宇,等.添加蚕蛹粉和改变营养液 pH 对人工培养蛹虫草子实体产量及虫草素含量的影响[J].蚕业科学,2013,9(3):624-627.
- [21] 郭涛,张龙,王兵,等.不同培养基培育蛹虫草中的虫草素和腺苷含量测定[J].蚕业科学,2011,37(6):1117-1122.
- [22] 荆留萍,杜双田,金凌云.8种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(11):156-160.
- [23] Masuda M,Urabe E,Honda H,et al.Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J].Enzyme and Microbial Technology,2007,40(5):1199-1205.
- [24] 陈长兰,孟程程,佟丽.不同种类氨基酸对蛹虫草菌丝体生长和虫草素含量的影响[J].食品科学,2012,33(23):236-239.
- [25] 左言美,程显好,朱萌,等.锰离子胁迫对蛹虫草菌丝体内虫草素、腺苷含量的影响[J].中国药理学杂志,2013,48(16):1363-1368.
- [26] 文庭池,康冀川,李光荣,等.固体培养条件对蛹虫草产子实体和虫草菌素的影响[J].贵州农业科学,2008,36(4):92-94.
- [27] 周毅峰,蔡忠雄,秦恩华,等.硒对蛹虫草菌丝代谢和总抗氧化能力的影响[J].中国酿造,2009(4):48-51.
- [28] Mao X B,Zhong J J.Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J].Enzyme and Microbial Technology,2006,38(3):343-350.
- [29] 肖正华,李再新,李建章,等.添加剂对蛹虫草子实体生长分化影响的研究[J].食品与发酵科技,2010,46(3):60-64.
- [30] 施明珠,李有贵,钟石,等.保幼激素 III 对蛹虫草液体发酵生长代谢的调控作用[J].科技通报,2009,25(1):114-119.
- [31] 康超,文庭池,康冀川,等.不同培养条件和前体对蛹虫草液体发酵产虫草素的影响[J].菌物学报,2012,31(3):389-397.
- [32] 柳依婷,汤佳鹏,周成,等.甘氨酸补加产虫草素的蛹虫草液体发酵条件的优化[J].食品科技,2013,38(7):28-32.
- [33] Mao X B,Zhong J J.Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors[J].Biotechnology Progress,2004,20(5):1408-1413.
- [34] 赵博,张国财,林连男,等.生物磁效应对蛹虫草活性物质含量的影响[J].植物研究,2013,33(4):508-511.
- [35] 王陶,李文,陈宏伟,等.虫草素的微波-超声波协同提取[J].食品科学,2010,31(10):86-90.
- [36] 李辰,吴盼盼,卿宁,等.蛹虫草废弃培养残基中虫草素的提取工艺研究[J].五邑大学学报(自然科学版),2012,26(3):35-41.
- [37] 邓黎,周同永,皮立,等.用响应面法优化人工蛹虫草子实体中虫草素的超声提取工艺[J].江苏农业科学,2012,40(5):225-228.
- [38] 谢红旗,胡瑕,罗巍,等.酶法提取蛹虫草中虫草素的研究[J].时珍国医国药,2011,22(9):2145-2147.
- [39] 李从镇,毛宁.大孔吸附树脂分离纯化培养基残基中虫草素[J].中国生物工程杂志,2014,34(1):90-94.
- [40] 曾昱,陈作红.大孔树脂柱层析法提取蛹虫草废弃培养基中的虫草素[J].湖南师范大学自然科学学报,2013,36(3):66-69.

Research Progress on Enhanced Cordycepin Production of *Cordyceps militaris*

DUAN Hong-bin, QIAO Xin-rong, YIN Dong-lin, WANG Rui-li

(Department of Biotechnology, Xinyang College of Agriculture and Forestry, Xinyang, Henan 464000)

Abstract: Cordycepin is a member of nucleoside compounds which show extensive biological activity and pharmacological effects. Its medicinal value and biological activity has been widely accepted. Here some methods of improving the yield of cordycepin in *Cordyceps militaris* were reviewed, that including strain breeding, optimization of culture conditions, and extraction techniques. Additionally, future research directions were discussed.

Keywords: *Cordyceps militaris*; cordycepin; optimization