

# 蛹虫草深层发酵产虫草素培养基的优化

张楠, 黎勇, 徐洁, 熊茂, 周欣, 段辉国

(四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 四川 内江 641100)

**摘要:**以蛹虫草(*Cordyceps militaris* (L.) Link) NS-810 为菌种, 通过对接种量的考察, 探索不同孢子浓度对蛹虫草液体一级种制作效果的影响; 通过单次单因子试验和正交实验, 优化深层发酵产虫草素的最佳培养基, 筛选制备蛹虫草液体一级种和液体发酵生产虫草素的最佳工艺。结果表明: 孢子浓度  $3.0 \times 10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 时制作的母种最适合作为蛹虫草菌种扩大培养中的一级种子液; 深层发酵的最佳培养基配方为葡萄糖 25 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、土豆 100 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、鱼蛋白胨 18 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、MgSO<sub>4</sub>  $\cdot$  7H<sub>2</sub>O 0.5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、蚕蛹粉 5.0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、维生素 B<sub>1</sub> 18 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、水 1 L。优化后虫草素的总产量为 1 144.31 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 较基础培养基提高了 1.46 倍。分别以价格低廉葡萄糖和鱼蛋白胨作为发酵培养基的碳源和有机氮源, 利于蛹虫草产业化发酵生产虫草素。

**关键词:**蛹虫草; 深层发酵; 虫草素; 生物量; 培养基; 优化

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)05-0134-08

蛹虫草(*Cordyceps militaris* (L.) Link) 属真菌门、子囊菌亚门、核菌纲、麦角菌科、虫草属, 又名北冬虫夏草, 主要成分为多糖、虫草素、虫草酸等, 富含人体必需的多种氨基酸和微量元素, 具有和冬虫夏草相似的药效成分和医疗保健功效<sup>[1-2]</sup>。蛹虫草是冬虫夏草的近缘种, 为虫草属的模式种, 但不象冬虫夏草需要专一寄主和特殊生境<sup>[3]</sup>。虫草素是蛹虫草最重要的活性成分, 具有广泛的药理作用, 在护肝、保肾、润肺方面效果显著, 且大补气血, 能消除痛经、偏头痛、颈椎增生等疾病, 还有抗肿瘤、抗衰老、抗菌、抗病毒、免疫调节、改善新陈代谢等多种药理作用。虫草素的研究现正成为抗癌、抗衰老、美容、保健品领域中一个极其活跃的领域。虫草素化学合成工艺复杂、生产成本低、价格昂贵<sup>[4]</sup>, 人工栽培的蛹虫草周期长、提取虫草素含量低<sup>[5]</sup>。因此, 从生产工艺和成本考虑, 深层发酵是目前快速获得虫草素的

最为有效途径, 且液体深层发酵技术具有成熟、周期短、可控性好等特点。

蛹虫草多采用无性繁殖, 培养基起着决定性的作用。在完全人工培养的条件下, 不同的培养基、不同的生长环境对虫草子实体品质(活性成分含量、活性功能等)的优良与否起着重要作用<sup>[6]</sup>。可以说不同的培养基直接决定了虫草子实体活性成分和培养菌丝混合物中的活性成分的含量。因此, 该研究采用单因素试验和正交实验设计, 对蛹虫草液体菌种的制备和蛹虫草深层发酵生产虫草素的培养基进行了优化, 为蛹虫草规模化生产提供种源保障和提高蛹虫草菌丝体产量及其工艺放大提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试蛹虫草分离自四川省甘孜藏族自治州九龙县瓦灰山自然保护区采集的蛹虫草鲜标本, 命名为蛹虫草 NS-810, 经驯化保存于实验室。

菌种活化培养基: 葡萄糖 20 g, 土豆 200 g, 鱼蛋白胨 5 g, 水 1 L。蛹虫草液体母种培养基和发酵基础培养基为液体改良 PDA: 葡萄糖 20 g, 土豆 200 g, 蛋白胨 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub>  $\cdot$  7H<sub>2</sub>O 1.5 g, 水 1 L。

试剂与仪器: 虫草素标准品购于美国 Sigma 公

**第一作者简介:**张楠(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为微生物学与食用菌种植。E-mail: nan25000@163.com.

**责任作者:**段辉国(1967-), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为生物化学。E-mail: duanhuiguo6@163.com.

**基金项目:**四川省教育厅重点资助项目(11ZA029); 川西珍稀植物资源研究与利用创新团队资助项目(14TD0025)。

**收稿日期:**2016-12-12

司;鱼蛋白胨(工业级)购于上海缘肽生物技术有限公司;Agilent 1100 HPLC 购于安捷伦公司;50 L 发酵罐江苏丰泽生物工程设备制造有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化 采用打孔器( $D=10\text{ mm}$ )将蛹虫草菌饼接种于 PDA 培养基( $15\text{ mL}$ )中央上,于  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  人工气候箱中倒置培养  $4\sim 5\text{ d}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.2 液体菌种制备的优化 将 NS-810 菌株孢子悬液进行稀释并计数,将蛹虫草液体种培养基孢子浓度调至: $2.0\times 10^5$ 、 $2.0\times 10^6$ 、 $2.0\times 10^7$ 、 $2.0\times 10^8$ 、 $2.5\times 10^8$ 、 $3.0\times 10^8$ 、 $3.5\times 10^8$ 、 $4.0\times 10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养,从第 2~5 天连续观察不同接种量后一级菌种菌丝球的形态、大小、数量及种子液的状态变化,每处理 3 次重复。

1.2.3 种子液制备 将 NS-810 菌株按最佳孢子浓度或者菌饼数接种液体母种培养基(装液量为  $50\text{ mL}\cdot(250\text{ mL})^{-1}$ )中,  $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养  $4\text{ d}$ ,以  $10\%(v/v)$  接种量接入发酵摇瓶(装液量为  $100\text{ mL}\cdot(500\text{ mL})^{-1}$ )中,  $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养  $4\text{ d}$ ,每处理 3 次重复。

1.2.4 液体发酵 发酵罐中装料系数为  $0.8$ ,接种量  $10\%$ ,发酵温度  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,通气量  $1.25\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ ,培养  $10\text{ d}$ ,转速  $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,静置培养  $2\text{ d}$ 。

1.2.5 液体发酵培养基配方的优化 各项优化试验均以蛹虫草的生物量和虫草素的总产量为考察指标,每处理 2 次重复。1)速效碳源选择:在液体发酵培养基中分别采用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇作为速效碳源(质量浓度均为  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),其它组分与蛹虫草发酵基础培养基相同,以不加速效碳源的蛹虫草发酵基础培养基作为对照。2)缓效碳源选择:在液体发酵培养基中分别采用土豆(质量浓度分别为  $100$ 、 $200$ 、 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、玉米粉(质量浓度分别为  $10$ 、 $20$ 、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和可溶性淀粉(质量浓度分别为  $10$ 、 $20$ 、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )作为缓效碳源,培养基中的速效碳源选用筛选出的最佳速效碳源,其它组分与发酵基础培养基相同,另以不加缓效碳源的液体培养基作为对照。其中,土豆去皮切成薄片,煮沸  $20\text{ min}$ ,取滤液加入培养基中。3)有机氮源选择:在培养基中分别采用鱼蛋白胨、酵母浸粉、牛肉浸膏、黄豆饼粉(质量浓度分别为  $10$ 、 $20$ 、 $10$ 、 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,氮素含量基本相同)作为有机氮源,碳源选用筛选出的最佳速效和缓效碳源,其它组分与发酵基础培养基相同,以不加有机氮源的培养基作为对照。4)无机氮源选择:在发

酵培养基中分别采用  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ (质量浓度分别为  $0.6$ 、 $0.8$ 、 $1.0$ 、 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,氮素含量基本相同)作为无机氮源,另选用筛选出的最佳有机氮源、最佳速效和缓效碳源,其它组分与液体培养基相同,以不加无机氮源的液体培养基作为对照。5)无机盐选择:在发酵培养基中分别加入 3 种无机盐  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCl}$ (质量浓度分别为  $2.0$ 、 $1.5$ 、 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )并进行无机盐的营养限制试验,探讨不同的无机盐及其组合对蛹虫草生物量的影响。以筛选出的最佳碳、氮源组合作为液体培养基的碳源和氮源,其它组分与液体培养基相同,以不加无机盐的液体培养基作为对照。6)生长因子选择:发酵培养基中分别添加蚕蛹粉、玉米浆粉、L-Glu、L-Cys、腺嘌呤、维生素  $\text{B}_6$ 、维生素  $\text{B}_1$ 、NAA(质量浓度分别为  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )进行生长因子的筛选<sup>[6]</sup>,其它组分为筛选出的最佳碳源、氮源和无机盐,以不加生长因子的液体培养基作为对照。其中,蚕蛹粉采用缫丝蚕蛹,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘干,粉碎,煮沸  $30\text{ min}$ ,取滤液加入。7)发酵培养基的正交优化:在单因素试验优化得到的最佳碳源、氮源、无机盐和生长因子的基础上,采用  $\text{L}_{27}(3^{13})$  正交实验设计(表 1),以获得发酵培养基配方中各成分的最佳浓度以及它们对蛹虫草生物量和产虫草素总产量的影响程度。8)发酵培养基配方的验证:优化后的发酵培养基和发酵基础培养基在相同的培养条件下进行深层发酵试验,测定发酵液中虫草素产量和生物量,比较优化前后发酵培养基对虫草素产量和生物量的影响,以验证优化后的发酵培养基配方。

## 1.3 项目测定

虫草素测定标准曲线:用高纯水配制浓度为  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  虫草素溶液。稀释使虫草素浓度分别为  $0.010$ 、 $0.025$ 、 $0.050$ 、 $0.075$ 、 $0.100$ 、 $0.125$ 、 $0.150\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,取  $20\text{ }\mu\text{L}$  进行 HPLC 检测。以虫草素标准溶液质量浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为 X 轴,峰面积为 Y 轴,绘制标准曲线。

将蛹虫草液体培养物于  $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10\text{ min}$  获得发酵上清液和菌丝体,上清液稀释至一定的浓度用于检测虫草素的含量;菌丝体用蒸馏水冲洗 3 次,于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘干至恒重,即为生物量,研磨,精密称取菌丝样品  $0.1\text{ g}$ ,加  $10\text{ mL}$  的高纯水,摇匀,用微波中火处理  $2\text{ min}$ ,  $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10\text{ min}$  获得上清液用于测定菌丝体中虫草素的含量;发酵上

清液和菌丝体中的虫草素测定采用 HPLC 色谱法,参照刘桂君等<sup>[7]</sup>方法并进行了优化,HPLC 色谱条件:Extend-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相甲醇:水(82:18),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 260 nm,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。先根据测定的结果计算出发酵液(胞外)和菌丝体(胞内)中虫草素的

产量,然后利用公式计算出虫草素的总产量,虫草素总产量(mg·L<sup>-1</sup>)=胞外虫草素产量(mg·L<sup>-1</sup>)+胞内虫草素产量(mg·g<sup>-1</sup>)×生物量(g)/发酵液体积(L)。标准品溶液及样品液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,每处理 3 次重复。

表 1

因素与水平设计

Table 1

Arrangement of factors and levels

| 水平<br>Level | 因素 Factor                           |                                   |   |  |  |   |  |  |
|-------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|--|--|---|--|--|
|             | 葡萄糖<br>Glucose/(g·L <sup>-1</sup> ) | 土豆<br>Potato/(g·L <sup>-1</sup> ) | 鱼蛋白胨<br>Peptone (fish)/(g·L <sup>-1</sup> ) | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>/(g·L <sup>-1</sup> ) | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>/(g·L <sup>-1</sup> ) | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O<br>/(g·L <sup>-1</sup> ) | 蚕蛹粉 Silkworm<br>pupa powder/(g·L <sup>-1</sup> ) | 维生素 B <sub>1</sub><br>Vitamin B <sub>1</sub><br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) |
| 1           | 15                                  | 75                                | 18  | 0.6  | 1  | 0.5   | 3  | 18   |
| 2           | 20                                  | 100                               | 20  | 0.8  | 1.5  | 1.0   | 5  | 20   |
| 3           | 25                                  | 125                               | 22  | 1.0  | 2  | 1.5   | 7  | 22   |

#### 1.4 数据分析

采用 SAS 9.0 分析软件进行数据方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 液体菌种制备

由表 2 可知,菌丝球的数量随孢子浓度的增大而增多,但菌丝球的大小却在减小,种子液由澄清变得浑浊且开始有一定的黏性。接种孢子浓度 3.0×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 时菌丝球颗粒大小均匀,直径约为 1.2 mm,数量约为 820 个,菌丝球颜色呈淡黄色,均匀布满三角瓶,种子液澄清、透明。从菌丝球的数量、大

小、均匀程度、种子液的澄清度及能接种的体积等方面考虑,选择孢子浓度 3.0×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 作为发酵母种的最佳接种浓度。

### 2.2 速效碳源

从表 3 可见,发酵培养基中不添加碳源菌丝体生长量和虫草素总产量都很少,说明碳源对蛹虫草的生长起着非常重要的作用,以蔗糖和葡萄糖为速效碳源的虫草素总产量最大,分别达到了 548.93、547.44 mg·mL<sup>-1</sup>,从成本和发酵生产方面考虑,选择 20 g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖糖作为发酵培养基的速效碳源。

表 2

不同孢子浓度对蛹虫草液体菌种的影响

Table 2

Effects of different concentrations of spores on liquid seed of NS-810

| 孢子浓度 Concentrations<br>of spores/(cfu·mL <sup>-1</sup> ) | 生物量 Mycelial<br>biomass/(g·L <sup>-1</sup> ) | 菌丝球的形态<br>Morphology of mycelial pellet | 菌丝球颗粒数<br>Number of mycelial pellet/个 | 种子液状态<br>Seed state |
|--|--|---|---------------------------------------|---------------------|
| 2.0×10 <sup>6</sup>                                      | 4.20   | 菌丝球淡黄色,直径约 2.0 mm                       | 约 130                                 | 澄清、透明               |
| 2.0×10 <sup>7</sup>                                      | 5.44   | 菌丝球淡黄色,直径约 2.0 mm                       | 约 190                                 | 澄清、透明               |
| 2.0×10 <sup>8</sup>                                      | 6.65   | 菌丝球淡黄色,大小较均匀,直径约 1.8 mm                 | 约 350                                 | 澄清、透明               |
| 2.5×10 <sup>8</sup>                                      | 7.23   | 菌丝球淡黄色,均匀布满三角瓶,直径约 1.4 mm               | 约 550                                 | 澄清、透明               |
| 3.0×10 <sup>8</sup>                                      | 7.72   | 菌丝球淡黄色,均匀布满三角瓶,直径约 1.2 mm               | 约 820                                 | 澄清、透明               |
| 3.5×10 <sup>8</sup>                                      | 8.04   | 菌丝球淡黄色,均匀布满三角瓶,直径约 1.0 mm               | 约 950                                 | 絮状,有少量分散的菌丝         |
| 4.0×10 <sup>8</sup>                                      | 8.36   | 菌丝球淡黄色,直径约 0.8 mm                       | 约 1 050                               | 絮状,有大量分散的菌丝,黏度较大    |

表 3

发酵培养基中不同速效碳源对虫草素总产量及生物量的影响

Table 3

Effects of different available carbon on cordycepin production and mycelial biomass in fermentation medium

| 碳源<br>Carbon<br>sources | 生物量<br>Mycelial biomass<br>/(g·L <sup>-1</sup> ) | 胞外虫草素产量<br>Production of extracellular cordycepin<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 胞内虫草素产量<br>Production of intracellular cordycepin<br>/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 虫草素总产量<br>Cordycepin production<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|--|---|---|---|
| 对照(CK)                  | 3.71 <sup>c</sup> C                              | 21.52 <sup>d</sup> D  | 0.86 <sup>c</sup> C   | 24.72 <sup>c</sup> D                                      |
| 葡萄糖                     | 18.71 <sup>a</sup> A                             | 330.32 <sup>a</sup> A   | 11.64 <sup>b</sup> B  | 547.44 <sup>a</sup> A                                     |
| 蔗糖                      | 18.37 <sup>a</sup> A                             | 331.41 <sup>a</sup> A   | 11.83 <sup>a</sup> A  | 548.93 <sup>a</sup> A                                     |
| 麦芽糖                     | 16.85 <sup>b</sup> B                             | 196.93 <sup>b</sup> B   | 11.89 <sup>a</sup> A  | 397.23 <sup>b</sup> B                                     |
| 乳糖                      | 17.14 <sup>b</sup> B                             | 104.86 <sup>c</sup> C   | 9.15 <sup>b</sup> B   | 261.64 <sup>d</sup> C                                     |
| 甘露醇                     | 17.26 <sup>b</sup> B                             | 98.26 <sup>c</sup> C  | 10.37 <sup>b</sup> BA   | 294.62 <sup>c</sup> C                                     |

注:不同小写字母代表  $P \leq 0.05$  水平上差异显著,大写字母代表  $P \leq 0.01$  水平上差异显著,下同。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at  $P \leq 0.05$  level, and the capital letters mean significant difference at  $P \leq 0.01$  level, the same below.

## 2.3 缓效碳源

发酵培养基中添加  $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  土豆为缓效碳源的虫草素总产量最大,达到了  $644.08\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因

此,选择  $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  土豆作为发酵培养基的缓效碳源,以葡萄糖和土豆作为复合碳源。

表 4 发酵培养基中不同缓效碳源对虫草素总产量及生物量的影响

Table 4 Effects of different slow-release carbon on cordycepin production and mycelial biomass in fermentation medium

| 缓效碳源                                     | 生物量   | 胞外虫草素产量  | 胞内虫草素产量  | 虫草素总产量  |
|--|---|--|--|---|
| Slow-release carbon sources              | Mycelial biomass<br>$/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | Production of extracellular cordycepin<br>$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | Production of intracellular cordycepin<br>$/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ | Cordycepin production<br>$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |
| 对照(CK)                                   | 18.30 <sup>bc</sup> BCDE                              | 332.41 <sup>bc</sup> BC  | 11.94 <sup>a</sup> A   | 555.18 <sup>bc</sup> BC                                     |
| 土豆( $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 21.36 <sup>a</sup> A                                  | 376.45 <sup>a</sup> A  | 12.00 <sup>a</sup> A   | 644.08 <sup>a</sup> A                                       |
| 土豆( $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 19.93 <sup>ab</sup> ABC                               | 339.06 <sup>b</sup> B  | 10.59 <sup>b</sup> BA  | 565.73 <sup>b</sup> B                                       |
| 土豆( $300\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 18.21 <sup>bc</sup> BCDE                              | 319.74 <sup>cd</sup> BC  | 10.30 <sup>bc</sup> BA   | 518.26 <sup>cd</sup> BCD                                    |
| 玉米粉( $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 18.89 <sup>bc</sup> ABC                               | 314.13 <sup>d</sup> CD   | 10.65 <sup>b</sup> AB  | 513.62 <sup>d</sup> CD                                      |
| 玉米粉( $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 19.25 <sup>b</sup> ABC                                | 328.20 <sup>bcd</sup> BC   | 9.65 <sup>bc</sup> BC  | 517.09 <sup>d</sup> BCD                                     |
| 玉米粉( $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 18.47 <sup>bc</sup> BCD                               | 295.13 <sup>e</sup> DE   | 9.30 <sup>cd</sup> BCD   | 473.04 <sup>e</sup> DE                                      |
| 淀粉( $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  | 15.89 <sup>d</sup> E                                  | 266.74 <sup>f</sup> F  | 7.63 <sup>e</sup> DE   | 379.87 <sup>g</sup> FG                                      |
| 淀粉( $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  | 17.11 <sup>cd</sup> CDE                               | 281.41 <sup>ef</sup> EF  | 8.05 <sup>de</sup> CDE   | 422.99 <sup>f</sup> EF                                      |
| 淀粉( $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  | 16.11 <sup>d</sup> DE                                 | 244.74 <sup>g</sup> G  | 7.30 <sup>e</sup> E  | 365.27 <sup>g</sup> G                                       |

## 2.4 有机氮源

由表 5 可知,当培养基中添加鱼蛋白胨时,虫

草素总产量最大,达到了  $634.36\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,选择  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼蛋白胨作为发酵培养基中的有机氮源。

表 5 发酵培养基中不同有机氮源对虫草素总产量及生物量的影响

Table 5 Effects of different organic nitrogen on cordycepin production and mycelial biomass in fermentation medium

| 有机氮源             | 生物量   | 胞外虫草素产量  | 胞内虫草素产量  | 虫草素总产量  |
|------------------|---|--|--|---|
| Organic nitrogen | Mycelial biomass<br>$/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | Production of extracellular cordycepin<br>$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | Production of intracellular cordycepin<br>$/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ | Cordycepin production<br>$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |
| 对照               | 12.63 <sup>d</sup> C                                  | 206.06 <sup>c</sup> B  | 7.97 <sup>b</sup> B  | 306.86 <sup>d</sup> D                                       |
| 鱼蛋白胨             | 21.13 <sup>b</sup> A                                  | 375.79 <sup>a</sup> A  | 12.24 <sup>a</sup> A   | 634.36 <sup>a</sup> A                                       |
| 牛肉浸膏             | 18.59 <sup>c</sup> B                                  | 371.06 <sup>a</sup> A  | 7.26 <sup>b</sup> B  | 506.22 <sup>b</sup> B                                       |
| 酵母浸粉             | 23.21 <sup>a</sup> A                                  | 216.41 <sup>b</sup> C  | 5.97 <sup>c</sup> C  | 355.02 <sup>c</sup> C                                       |
| 黄豆饼粉             | 17.55 <sup>c</sup> B                                  | 225.13 <sup>b</sup> B  | 3.88 <sup>d</sup> D  | 293.28 <sup>d</sup> D                                       |

## 2.5 无机氮源

由表 6 可知,添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时虫草素产量和菌

丝体的生长量均高于对照。因此,选择  $1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为发酵培养基的无机氮源。

表 6 发酵培养基中不同无机氮源对虫草素总产量及生物量的影响

Table 6 Effects of different inorganic nitrogen on cordycepin production and mycelial biomass in fermentation medium

| 无机氮源                         | 生物量   | 胞外虫草素产量  | 胞内虫草素产量  | 虫草素总产量  |
|------------------------------|---|--|--|---|
| Inorganic nitrogen           | Mycelial biomass<br>$/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | Production of extracellular cordycepin<br>$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | Production of intracellular cordycepin<br>$/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ | Cordycepin production<br>$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |
| 对照                           | 18.41 <sup>bc</sup> C                                 | 386.77 <sup>b</sup> B  | 11.52 <sup>b</sup> A   | 598.85 <sup>c</sup> C                                       |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$     | 18.51 <sup>bc</sup> C                                 | 397.79 <sup>ab</sup> AB  | 12.97 <sup>ab</sup> A  | 638.10 <sup>b</sup> B                                       |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$       | 19.71 <sup>b</sup> B                                  | 402.73 <sup>a</sup> A  | 11.59 <sup>b</sup> A   | 630.33 <sup>b</sup> B                                       |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 22.38 <sup>a</sup> A                                  | 415.08 <sup>a</sup> AB   | 13.14 <sup>a</sup> A   | 710.59 <sup>a</sup> A                                       |
| $\text{NaNO}_3$              | 16.89 <sup>c</sup> D                                  | 281.80 <sup>c</sup> C  | 9.22 <sup>c</sup> B  | 437.12 <sup>d</sup> D                                       |

## 2.6 无机盐

液体培养基中分别添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCl}$  作为无机盐,通过无机盐选择和营养限制试验,可以寻找到虫草素产量和生物量的最佳无机盐组合。从表 7 可以看出, $2.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $1.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  组合的虫草素总产量和生物量最高,分别为  $709.54\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $22.37\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.7 生长因子

从表 8 可以看出,蚕蛹粉、维生素  $\text{B}_6$ 、维生素  $\text{B}_1$ 、 $\text{L-Glu}$ 、 $\text{NAA}$ 、腺嘌呤对蛹虫草 NS-810 菌株产虫草素的能力都有一定的促进作用。其中,蚕蛹粉对蛹虫草生产虫草素的促进作用最强(虫草素总产量  $907.64\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),维生素  $\text{B}_1$  次之,达  $863.10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,说明适量的蚕蛹粉和维生素  $\text{B}_1$  能更好地促进虫草素的积累。

表 7 发酵培养基中的不同无机盐组合对虫草素总产量及生物量的影响

Table 7 Effects of different combination of inorganic salt on cordycepin production and mycelial biomass in fermentation medium

| 无机盐<br>Inorganic salt  | 生物量<br>Mycelial biomass<br>/(g · L <sup>-1</sup> ) | 胞外虫草素产量<br>Production of extracellular<br>cordycepin/(mg · L <sup>-1</sup> ) | 胞内虫草素产量<br>Production of intracellular<br>cordycepin/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 虫草素总产量<br>Cordycepin production<br>/(mg · L <sup>-1</sup> ) |
|--|--|--|--|---|
| 对照   | 11.09 <sup>e</sup> E                               | 276.79 <sup>f</sup> F  | 7.60 <sup>e</sup> EF   | 360.96 <sup>f</sup> F                                       |
| 2.0 g · L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 18.05 <sup>c</sup> BC                              | 355.12 <sup>c</sup> C  | 10.50 <sup>bc</sup> BC   | 544.74 <sup>c</sup> C                                       |
| 1.5 g · L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O  | 17.18 <sup>c</sup> CD                              | 337.93 <sup>d</sup> D  | 9.84 <sup>cd</sup> CD  | 507.06 <sup>d</sup> D                                       |
| 2.0 g · L <sup>-1</sup> NaCl   | 10.38 <sup>e</sup> E                               | 264.41 <sup>e</sup> F  | 7.30 <sup>c</sup> F  | 340.23 <sup>f</sup> F                                       |
| 2.0 g · L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1.5 g · L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                                | 22.37 <sup>a</sup> A                               | 415.47 <sup>a</sup> A  | 13.17 <sup>a</sup> A   | 709.54 <sup>a</sup> A                                       |
| 2.0 g · L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2.0 g · L <sup>-1</sup> NaCl   | 16.94 <sup>cd</sup> CD                             | 342.12 <sup>d</sup> CD   | 9.86 <sup>cd</sup> CD  | 509.07 <sup>d</sup> D                                       |
| 2.0 g · L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O + 2.0 g · L <sup>-1</sup> NaCl   | 15.94 <sup>d</sup> D                               | 321.26 <sup>e</sup> E  | 8.92 <sup>d</sup> DE   | 463.39 <sup>e</sup> E                                       |
| 2.0 g · L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1.5 g · L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O + 2.0 g · L <sup>-1</sup> NaCl | 19.27 <sup>b</sup> B                               | 397.13 <sup>b</sup> B  | 11.50 <sup>b</sup> B   | 618.55 <sup>b</sup> B                                       |

表 8 发酵培养基中的不同生长因子对虫草素总产量及生物量的影响

Table 8 Effects of different combination of growth factor on cordycepin production and mycelial biomass in fermentation medium

| 生长因子<br>Growth factor                      | 生物量<br>Mycelial biomass<br>/(g · L <sup>-1</sup> ) | 胞外虫草素产量<br>Production of extracellular<br>cordycepin<br>/(mg · L <sup>-1</sup> ) | 胞内虫草素产量<br>Production of intracellular<br>cordycepin<br>/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 虫草素总产量<br>Cordycepin production<br>/(mg · L <sup>-1</sup> ) |
|--|--|--|--|---|
| 对照   | 23.54 <sup>ab</sup> AB                             | 416.13 <sup>e</sup> D  | 13.28 <sup>cd</sup> CD   | 728.48 <sup>f</sup> F                                       |
| 蚕蛹粉 5 g · L <sup>-1</sup>                  | 22.38 <sup>bc</sup> B                              | 553.79 <sup>a</sup> A  | 15.79 <sup>a</sup> A   | 907.64 <sup>a</sup> A                                       |
| 玉米浆粉 2 g · L <sup>-1</sup>                 | 19.71 <sup>d</sup> C                               | 427.93 <sup>d</sup> D  | 12.37 <sup>d</sup> D   | 671.49 <sup>g</sup> G                                       |
| L-Glu 2 g · L <sup>-1</sup>                | 21.85 <sup>c</sup> B                               | 515.08 <sup>b</sup> B  | 14.20 <sup>bc</sup> ABC  | 825.53 <sup>cd</sup> BCD                                    |
| L-Cys 2 g · L <sup>-1</sup>                | 24.40 <sup>a</sup> A                               | 424.47 <sup>de</sup> D   | 13.17 <sup>cd</sup> CD   | 745.71 <sup>f</sup> EF                                      |
| 腺嘌呤 0.5 g · L <sup>-1</sup>                | 22.34 <sup>bc</sup> B                              | 478.12 <sup>c</sup> C  | 13.86 <sup>bc</sup> BCD  | 787.85 <sup>e</sup> DE                                      |
| 维生素 B <sub>1</sub> 20 mg · L <sup>-1</sup> | 22.84 <sup>bc</sup> AB                             | 521.60 <sup>b</sup> B  | 14.96 <sup>ab</sup> AB   | 863.10 <sup>b</sup> AB                                      |
| 维生素 B <sub>6</sub> 20 mg · L <sup>-1</sup> | 22.27 <sup>c</sup> B                               | 517.47 <sup>b</sup> B  | 14.50 <sup>b</sup> ABC   | 840.89 <sup>bc</sup> BC                                     |
| NAA 3 mg · L <sup>-1</sup>                 | 23.04 <sup>bc</sup> AB                             | 482.23 <sup>c</sup> C  | 13.87 <sup>bc</sup> BCD  | 801.48 <sup>de</sup> CD                                     |

## 2.8 发酵培养基配方的优化

从表 9、10 可以看出,葡萄糖、鱼蛋白胨、维生素 B<sub>1</sub>、蚕蛹粉和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 对发酵生产菌体生物量的影响达到显著水平,另外 3 个因素影响不显著。从表 9 可以得出,最优水平为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>F<sub>2</sub>G<sub>1</sub>H<sub>1</sub>,即葡萄糖 25 g · L<sup>-1</sup>,土豆 100 g · L<sup>-1</sup>,鱼蛋白胨 20 g · L<sup>-1</sup>,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6 g · L<sup>-1</sup>,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g · L<sup>-1</sup>,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.0 g · L<sup>-1</sup>,蚕蛹粉 3.0 g · L<sup>-1</sup>,维

生素 B<sub>1</sub> 18 mg · L<sup>-1</sup>,水 1 L;而对发酵生产虫草素总产量的影响达到显著水平的因素是葡萄糖、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和蚕蛹粉,最优水平为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>F<sub>1</sub>G<sub>2</sub>H<sub>1</sub>,即葡萄糖 25 g · L<sup>-1</sup>,土豆 100 g · L<sup>-1</sup>,鱼蛋白胨 18 g · L<sup>-1</sup>,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g · L<sup>-1</sup>,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g · L<sup>-1</sup>,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g · L<sup>-1</sup>,蚕蛹粉 5.0 g · L<sup>-1</sup>,维生素 B<sub>1</sub> 18 mg · L<sup>-1</sup>,水 1 L。

表 9 发酵培养基各组分分配比优化的正交实验结果

Table 9 The results of orthogonal test for every proportion of fermentation medium

| 处理<br>Treatment | A    | B     | C    | D   | E   | F   | G   | H    | 生物量<br>Mycelial biomass | 虫草素总产量<br>Cordycepin production |
|-----------------|------|-------|------|-----|-----|-----|-----|------|-------------------------|---------------------------------|
| 1               | 15.0 | 75.0  | 18.0 | 0.6 | 1.0 | 0.5 | 3.0 | 18.0 | 17.25                   | 937.27                          |
| 2               | 15.0 | 75.0  | 18.0 | 0.8 | 1.5 | 1.0 | 5.0 | 20.0 | 15.36                   | 947.83                          |
| 3               | 15.0 | 75.0  | 18.0 | 1.0 | 2.0 | 1.5 | 7.0 | 22.0 | 13.52                   | 565.65                          |
| 4               | 15.0 | 100.0 | 20.0 | 0.6 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 22.0 | 17.84                   | 832.58                          |
| 5               | 15.0 | 100.0 | 20.0 | 0.8 | 1.5 | 1.5 | 5.0 | 18.0 | 22.38                   | 863.39                          |
| 6               | 15.0 | 100.0 | 20.0 | 1.0 | 2.0 | 0.5 | 7.0 | 20.0 | 15.53                   | 1 024.58                        |
| 7               | 15.0 | 125.0 | 22.0 | 0.6 | 1.0 | 1.5 | 5.0 | 20.0 | 14.65                   | 925.21                          |
| 8               | 15.0 | 125.0 | 22.0 | 0.8 | 1.5 | 0.5 | 7.0 | 22.0 | 13.38                   | 939.54                          |
| 9               | 15.0 | 125.0 | 22.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 18.0 | 15.85                   | 649.84                          |
| 10              | 20.0 | 75.0  | 22.0 | 0.6 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 22.0 | 18.82                   | 726.87                          |
| 11              | 20.0 | 75.0  | 22.0 | 0.8 | 1.0 | 1.5 | 5.0 | 18.0 | 16.59                   | 1 095.53                        |
| 12              | 20.0 | 75.0  | 22.0 | 1.0 | 1.5 | 0.5 | 7.0 | 20.0 | 15.32                   | 734.37                          |
| 13              | 20.0 | 100.0 | 18.0 | 0.6 | 2.0 | 1.5 | 7.0 | 20.0 | 15.87                   | 752.52                          |

表 9(续)

Table 9(Continued)

| 处理<br>Treatment | A           | B      | C      | D      | E      | F      | G      | H        | 生物量<br>Mycelial biomass | 虫草素总产量<br>Cordycepin production   |
|-----------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|-------------------------|---|
| 14              | 20.0        | 100.0  | 18.0   | 0.8    | 1.0    | 0.5    | 3.0    | 22.0     | 17.08                   | 1 134.08  |
| 15              | 20.0        | 100.0  | 18.0   | 1.0    | 1.5    | 1.0    | 5.0    | 18.0     | 20.87                   | 1 090.87  |
| 16              | 20.0        | 125.0  | 20.0   | 0.6    | 2.0    | 0.5    | 5.0    | 18.0     | 21.85                   | 1 001.85  |
| 17              | 20.0        | 125.0  | 20.0   | 0.8    | 1.0    | 1.0    | 7.0    | 20.0     | 17.68                   | 857.68  |
| 18              | 20.0        | 125.0  | 20.0   | 1.0    | 1.5    | 1.5    | 3.0    | 22.0     | 20.24                   | 819.34  |
| 19              | 25.0        | 75.0   | 20.0   | 0.6    | 1.5    | 1.5    | 3.0    | 20.0     | 24.89                   | 935.58  |
| 20              | 25.0        | 75.0   | 20.0   | 0.8    | 2.0    | 0.5    | 5.0    | 22.0     | 21.57                   | 905.35  |
| 21              | 25.0        | 75.0   | 20.0   | 1.0    | 1.0    | 1.0    | 7.0    | 18.0     | 24.82                   | 884.56  |
| 22              | 25.0        | 100.0  | 22.0   | 0.6    | 1.5    | 0.5    | 7.0    | 18.0     | 23.36                   | 963.47  |
| 23              | 25.0        | 100.0  | 22.0   | 0.8    | 2.0    | 1.0    | 3.0    | 20.0     | 19.18                   | 1 016.42  |
| 24              | 25.0        | 100.0  | 22.0   | 1.0    | 1.0    | 1.5    | 5.0    | 22.0     | 22.27                   | 934.25  |
| 25              | 25.0        | 125.0  | 18.0   | 0.6    | 1.5    | 1.0    | 5.0    | 22.0     | 21.29                   | 1 214.57  |
| 26              | 25.0        | 125.0  | 18.0   | 0.8    | 2.0    | 1.5    | 7.0    | 18.0     | 18.52                   | 953.21  |
| 27              | 25.0        | 125.0  | 18.0   | 1.0    | 1.0    | 0.5    | 3.0    | 20.0     | 22.68                   | 1 053.45  |
| 生物量             | $\bar{x}_1$ | 16.19  | 18.68  | 18.05  | 19.54  | 18.98  | 18.63  | 19.82    | 20.17                   |   |
|                 | $\bar{x}_1$ | 18.26  | 19.38  | 20.76  | 17.97  | 19.68  | 19.26  | 18.89    | 17.91                   | A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> F <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>1</sub> |
|                 | $\bar{x}_3$ | 22.06  | 18.46  | 17.71  | 19.01  | 17.86  | 18.77  | 17.80    | 18.45                   |   |
| 虫草素总产量          | $\bar{x}_1$ | 853.99 | 859.22 | 961.05 | 921.10 | 961.62 | 960.73 | 904.03   | 937.78                  |   |
|                 | $\bar{x}_1$ | 912.57 | 956.91 | 902.77 | 968.11 | 945.44 | 906.73 | 1 015.56 | 916.40                  | A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> F <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>1</sub> |
|                 | $\bar{x}_1$ | 984.54 | 934.97 | 887.28 | 861.88 | 844.03 | 871.63 | 831.51   | 896.91                  |   |

表 10 液体培养基各组分对菌丝体干质量影响的 SAS 分析结果

Table 10 Variance analysis for the results of orthogonal design optimized fermentation medium

| 因素<br>Factor                                    | 生物量 Mycelial biomass<br>均方 Mean square | F 值 F value | P>F      | 虫草素总产量 Cordycepin production<br>均方 Mean square | F 值 F value | P>F     |
|---|--|-------------|----------|--|-------------|---------|
| 葡萄糖   | 79.781                                 | 46.37       | <0.000 1 | 38 483.249 8                                   | 4.34        | 0.043 8 |
| 土豆  | 2.053                                  | 1.19        | 0.343 1  | 23 640.495 3                                   | 2.67        | 0.117 8 |
| 鱼蛋白胨  | 25.041                                 | 14.55       | 0.001 1  | 13 618.647 4                                   | 1.54        | 0.261 7 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5.706                                  | 3.32        | 0.078 6  | 25 505.647 4                                   | 2.88        | 0.168 1 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 7.595                                  | 4.41        | 0.042 3  | 36 559.660 6                                   | 4.13        | 0.049 3 |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O           | 0.905                                  | 0.53        | 0.606 4  | 20 150.854 0                                   | 2.28        | 0.153 3 |
| 蚕蛹粉   | 9.075                                  | 5.27        | 0.027 3  | 77 359.986 1                                   | 8.73        | 0.006 4 |
| 维生素 B <sub>1</sub>                              | 12.527                                 | 7.28        | 0.011 2  | 3 789.529 8                                    | 0.42        | 0.665 4 |

### 2.9 发酵培养基配方验证

在深层发酵条件下,采用优化后的发酵培养基配方,蛹虫草生物量和虫草素总产量都要比未优化

的高得多,虫草素总产量提高了 145.61%。说明优化后的培养基配方对蛹虫草的生物量和产虫草素能力有显著的促进作用。

表 11 发酵基础培养基与优化后的培养基验证结果比较

Table 11 Result comparison between basal fermentation medium and optimal medium

| 培养基<br>Medium | 生物量<br>Mycelial biomass<br>/(g · L <sup>-1</sup> ) | 胞外虫草素产量<br>Production of extracellular cordycepin<br>/(mg · L <sup>-1</sup> ) | 胞内虫草素产量<br>Production of intracellular cordycepin<br>/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 虫草素总产量<br>Cordycepin production<br>/(mg · L <sup>-1</sup> ) |
|---------------|--|---|---|---|
| 发酵基础培养基       | 17.24  | 273.15  | 11.18   | 465.89  |
| 优化后的发酵培养基     | 22.23  | 754.18  | 17.55   | 1 144.31  |

## 3 讨论

在高等真菌深层发酵过程中,种子的制备、培养基和发酵操作条件是 3 个主要影响因素,其中种子的制备是生物量的产生和次生代谢产物积累的基础。目前,液体菌种在蛹虫草人工栽培中得到广泛的应用,与传统的固体接种相比,液体菌种的优势是

有生产自动化和集约化程度高,缩短发菌时间,降低菌种污染率,菌种生产成本低,菌种质量有较大提高<sup>[8]</sup>。在真菌液体菌种尤其是一级种的制作过程中,接种孢子的浓度对种子液的状态有直接的影响,而种子液的状态又是决定发酵生产成功与否的重要因素。该研究发现在 50 mL 一级种子培养液中接种

孢子浓度  $3.0 \times 10^8$  cfu · mL<sup>-1</sup> 时,菌丝球的数量、大小、均匀程度、种子液的澄清度均处在最佳的状态,且具有最大的有效接种体积,因此,接种孢子浓度  $3.0 \times 10^8$  cfu · mL<sup>-1</sup> 时制作的母种最适合作为蛹虫草菌种扩大培养中的一级种子液。在制作液体种子液过程中,选用无菌透气封口膜(12 cm×12 cm)代替棉塞,定期对培养室和摇床等进行消毒,培养的时间不宜过长,可较好的防止绿霉菌和黄曲霉等杂菌对种子液的污染。

蛹虫草可以很好的利用单糖、二糖,试验结果也证明这一点,筛选出的产虫草素发酵培养基的最佳速效碳源为葡萄糖和蔗糖。在工业生产中葡萄糖被淀粉水解糖所代替,淀粉质原料作为微生物工业常用的原料之一,经糖化所制得的糖液即为淀粉水解糖,它所含主要成分就是葡萄糖,从以后工业化生产方面考虑,选择葡萄糖作为深层发酵培养基的碳源。此外,将土豆作为缓效碳源添加到发酵培养基中,可以有效地提高蛹虫草的生物量和胞外虫草素的产量,使虫草素总产量提高近 20%。土豆浸汁容易获得,成本低且营养较丰富,可在发酵后期为蛹虫草 NS-810 菌株提供充足的碳源,延长了产生虫草素的过程。因此,土豆汤作为深层发酵培养基中的缓效碳源,达到了降低成本和提高虫草素产量的目的。

鱼蛋白胨为鱼蛋白酶解或微生物发酵法而成的短肽链、小分子多肽(氮含量高)(小分子肽含量高于骨蛋白胨)和各种氨基酸等,及氨基氮的粉末状产品,其中小分子肽含量高于骨蛋白胨,有较好的水溶性,易于微生物吸收,可为微生物发酵提供高含量优质有机氮源。蛹虫草作为虫生真菌,动物蛋白对其生长发育更为有利,温鲁等<sup>[9]</sup>以鱼粉为氮源液体培养蛹虫草虫草素,鱼粉表现较好。所以该研究选用鱼蛋白胨作为氮源,发现能有效提高虫草素的产量,鱼蛋白胨成本廉价且来源广泛,作为发酵培养基的氮源可以大大降低生产成本,这对于菌株 NS-810 在虫草素产业化生产方面具有重要的意义。该研究还发现,添加无机氮源  $\text{NH}_4^+$  对虫草素的生成起促进作用,这与陈磊<sup>[10]</sup>研究结果与相一致。铵盐是一种低廉的、效果很好的无机氮源, $\text{NH}_4^+$ 被蛹虫草细胞用来合成谷氨酰胺,谷氨酰胺在生物合成反应中充当氮的供体,也是核苷的间接前体,并生成核苷<sup>[11]</sup>,而虫草素是核苷的衍生物,这可能是发酵培养中添加  $\text{NH}_4^+$  会提高虫草素含量的原因。

该研究证明无机盐在蛹虫草的生长和虫草素的产生过程中起着非常重要的作用,添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  均能较大的提高菌体生物量和虫草素产量,其中, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对虫草素产量影响显著,低浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  优于高浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,这可能是高浓度  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  会造成细胞质的渗透压增加,从而抑制蛹虫草分泌产生虫草素;镁是许多酶的激活剂而且它可影响基质的氧化和蛋白质的合成,这可能是  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  促进菌体生长和产生虫草素的原因。而添加  $\text{NaCl}$  作为无机盐时则抑制菌体的生长和虫草素的产生,这与岳翠翠等<sup>[5]</sup>报道结果相一致。

蚕蛹是蚕丝业的主要副产物,极具营养价值,含有丰富的蛋白质、脂肪酸、维生素(包括维生素 A、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 D 及麦角甾醇等)及微量元素等<sup>[12]</sup>。该试验在发酵培养基中添加蚕蛹粉作为生长因子,结果表明蚕蛹粉在虫草素合成累积方面表现出了明显优势,特别是对胞外虫草素的产量影响最显著。另外,蚕蛹中的油脂含量很高,占蚕蛹干质量的 25%~30%,蚕蛹粉的浸提液表面漂浮由少量的蚕蛹油,它既可以促进蛹虫草菌丝体生长及虫草素的分泌,又可以在深层发酵中起到消泡的作用。维生素 B<sub>1</sub> 作为生长因子对发酵液中虫草素合成累积也有较好的促进作用,这与雷坤等<sup>[13]</sup>和欧阳召等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。

该研究通过单因素试验和正交实验确定了蛹虫草菌株 NS-810 产虫草素最佳深层发酵培养基:葡萄糖 25 g · L<sup>-1</sup>,土豆 100 g · L<sup>-1</sup>,鱼蛋白胨 18 g · L<sup>-1</sup>, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.8 g · L<sup>-1</sup>, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g · L<sup>-1</sup>, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g · L<sup>-1</sup>,蚕蛹粉 5.0 g · L<sup>-1</sup>,维生素 B<sub>1</sub> 18 mg · L<sup>-1</sup>,水 1 L。采用此培养基,蛹虫草菌丝生物量约为 22.23 g · L<sup>-1</sup>,虫草素的总产量高达 1 141.31 mg · L<sup>-1</sup>,发酵原料来源广泛、价格便宜,发酵液清澈、质量稳定,这对工业化大规模发酵生产虫草素和优质菌丝体,提高经济效益有着重要的意义。

## 参考文献

- [1] 申鸿,张龙,王兵,等. 蚕体和蛹粉代料培养基上的蛹虫草生长状况与品质检测[J]. 蚕业科学,2012,38(1):130-134.
- [2] 袁明生,孙佩琼. 中国真菌原色图集[M]. 成都:四川科学技术出版社,2007.
- [3] 温鲁,尹起范,唐玉玲,等. 蚕虫草与有关虫草活性成分检测比较[J]. 食品科学,2004,25(8):155-157.
- [4] NI H, ZHOU X H, LI H H, et al. Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waster medium[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2009, 877(22): 2135-2141.
- [5] 岳翠翠,沈健增,蔡宇杰,等. 蛹虫草 *Cordyceps militaris* JN168 产虫草素液态发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32

(2);135-141.

[6] 文庭池,李光荣,康冀川,等. 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[J]. 食品科学,2012,33(5):144-149.

[7] 刘桂君,周思静,杨素玲,等. 蛹虫草中虫草素的研究进展[J]. 食品科学,2013,34(21):408-412.

[8] 王兰青,高玉千,戚元成,等. 菇液体菌种摇瓶和发酵罐生长动力学模型的比较[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(6):929-933.

[9] 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,2005,32(3):91-94.

[10] 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.[11] XIAO J H, CHEN D X, XIAO Y, et al. Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa* [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 2241-2247.

[12] 叶晶晶,张剑飞,曹宁宁,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, 39(3):624-627.

[13] 雷坤,柯轶,毛宁. 蛹虫草 Fjnu-01 高产虫草素的液体培养基优化[J]. 药物生物技术,2011,18(6):504-508.

[14] 欧阳召,王春梅,陶志. 适合虫草素积累的蛹虫草液体培养条件的优化[J]. 中国食用菌,2012,31(1):26-28.

## Medium Optimization for Cordycepin Production From *Cordyceps militaris* by Submerged Fermentation

ZHANG Nan, LI Yong, XU Jie, XIONG Mao, ZHOU Xin, DUAN Huiguo

(Key Laboratory of Regional Characteristic Agricultural Resources, Department of Education, Neijiang, Sichuan 641100)

**Abstract:** In order to explore the optimal preparation method of liquid seed and medium for cordycepin production in submerged cultivation of *Cordyceps militaris* (L.) Link NS-810, effect of liquid seed on mycelial growth by inoculating different concentrations of spores in seed culture was investigated. Single factor experiment and orthogonal experiment were used to select the optimal medium compositions for cordycepin production in liquid fermentation. The results showed that the best concentration of spores for first-degree spawn was  $3.0 \times 10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. Under this condition, the pale yellow hypha ball dispersed homogeneously in the seed liquid and their diameters were in the range of 1.1 mm to 1.3 mm, and the seed liquid was clear and transparent. Furthermore, the optimal media was composed of the following factors: glucose 25 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, potato 100 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, peptone (fish) 18 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>  $\cdot$  7H<sub>2</sub>O 0.5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, silkworm pupa powder 5.0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, water 1 L. This optimization strategy enhanced the production of cordycepin nearly 1.46 times compared with the initial level. Low-cost glucose and peptone (fish) were used as quick-release carbon source and organic nitrogen source of fermentation medium respectively, which was beneficial for industrial production of cordycepin from the strain NS-810 by submerged fermentation.

**Keywords:** *Cordyceps militaris*; submerged fermentation; cordycepin; mycelial growth; medium; optimization

## 知识窗

虫草素(cordycepin)又称冬虫夏草素、虫草菌素、蛹虫草菌素,是冬虫夏草和蛹虫草中(尤其是核苷类)主要活性成分,也是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗生素。虫草素是一种天然来源的药物,具有中医医理中冬虫夏草一样的阴阳同补和双向调节人体平衡的功能;它在护肝、保肾、润肺方面效果更好,而且大补气血,能消除现在不能治愈的痛经、偏头痛、颈椎增生等疾病。从西医医理角度看虫草素具有抗肿瘤、抗衰老、抗菌、抗病毒、免疫调节、改善新陈代谢、清除自由基等多种药理作用,有良好的临床应用前景。目前虫草素的研究现正成为药物化学、抗衰老、美容、保健品领域中一个极其活跃的领域。最近研究表明虫草素还有降血脂的效果。

(来源:百度百科)