

蛹虫草液体发酵过程中虫草素含量的分析

李晓薇¹, 张敏¹, 沈丽君¹, 官国强², 徐赫韩¹, 李海燕¹

(1. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省食品检验所, 吉林 长春 130033)

摘要:以 2 个蛹虫草菌株 2014072503-1 和 2014072301-1 为试材, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 分析蛹虫草 40 d 液体发酵过程中其发酵液中的虫草素产量, 研究了蛹虫草发酵时间对虫草素产量的影响, 旨在确定虫草素开始产生、产量迅速升高、产量最高的 3 个关键时间点, 为下一步对以上时间节点的菌丝样品进行转录组测序分析, 进而挖掘与虫草素产量密切相关的候选基因奠定基础。结果表明: 2 个蛹虫草菌株发酵过程中产生虫草素的起始时间点为发酵后 3 d, 迅速升高的时间点是 12 d, 虫草素产量最高的时间点 2014072503-1 号菌株为发酵后 37 d, 而 2014072301-1 号菌株为发酵后 34 d。2014072301-1 号菌株发酵产生的虫草素含量高 ($382.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 时间短 (34 d), 更适于作为生产虫草素的菌株。

关键词:蛹虫草; 液体发酵; 虫草素; HPLC; 产量

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)19-0170-04

虫草素又称 3'-脱氧腺苷, 是第一个从真菌中分离出的核苷类抗菌素^[1]。虫草素是冬虫夏草和蛹虫草中的主要活性成分和药效成分, 且蛹虫草是 300 多种虫草中唯一能大量产生虫草素的虫草^[2], 因此蛹虫草已成为生产虫草素最为理想的菌株。利用蛹虫草菌丝发酵生产虫草素的研究已有报道, 多集中在虫草素的含量测定方法、活性鉴定、高产菌株选择和发酵条件的优化等^[3], 尚鲜见有系统研究虫草素发酵过程中的基因表达调控相关报道。该研究选用前期优化建立的蛹虫草液体发酵最适条件, 对 2 个蛹虫草菌株 2014072503-1

和 2014072301-1 进行液体发酵, 监测发酵 40 d 过程中其发酵液中的虫草素产量, 旨在确定虫草素开始产生、产量迅速升高、产量最高的 3 个关键时间点, 为下一步对以上时间节点的菌丝样品进行转录组测序分析, 进而挖掘与虫草素产量密切相关的候选基因, 研究基因的表达调控机制奠定基础。另外, 该研究中建立的蛹虫草液体发酵条件和虫草素测定方法, 可为液体发酵工艺放大及虫草素含量检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2014072503-1 和 2014072301-1 蛹虫草菌株, 由吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心李长田老师惠赠。

虫草素标准品 (MUST-11072701) 购自北京盛世康普化工技术研究院。

1.2 试验方法

1.2.1 虫草素标准品及标样配制

准确称取虫草素标准品 0.001 0 g, 用甲醇 (色谱纯) 定容于 10 mL 容量瓶, 即为储备液

第一作者简介:李晓薇 (1981-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为菌物生物反应器的开发与利用。E-mail: xiaoweili1206@163.com

责任作者:李海燕 (1971-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为菌物生物反应器的开发与利用。E-mail: hyl99@163.com

基金项目:国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2011AA100606); 吉林省科技厅资助项目 (20150204027NY); 吉林省发改委资助项目 (JF2012C002-04)。

收稿日期:2017-05-10

表 1
Table 1
虫草素标准品梯度液
Gradient solution of cordycepin

配制 5 mL 标准溶液 Prepared 5 mL standard solution					
标液浓度 Concentration of standard solution/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2	4	6	8	10
储备液($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)吸取量 Suck out volume of stock solution/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
甲醇吸取量 Suck out volume of methyl alcohol/mL	4.9	4.8	4.7	4.6	4.5

($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。按表 1 准确量取上述储备液一定体积,用甲醇配制虫草素浓度为 2、4、6、8、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。

1.2.2 标准曲线的制定

美国安捷伦高效液相色谱仪(SR1200 QUATERNARY),色谱条件为色谱柱:C18(4.6 mm \times 250 mm,5 mm);检测器:多波长检测器(检波长范围 190~950 nm);流动相:水:甲醇=85:15;流速:1 mL \cdot min $^{-1}$;检测波长:260 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。根据以上色谱条件测定不同浓度的标准品液,分别以浓度和峰面积为横纵坐标作回归方程,得到虫草素标准品的标准曲线。

1.2.3 蛹虫草菌丝体培养及液体发酵

PDA 基础培养基(新鲜马铃薯 200 g \cdot L $^{-1}$ +葡萄糖 20 g \cdot L $^{-1}$ +磷酸二氢钾 3 g \cdot L $^{-1}$ +硫酸镁 1.5 g \cdot L $^{-1}$)用来扩繁菌丝,25 $^{\circ}\text{C}$,避光培养,菌丝长到培养皿 3/4 位置较好。用打孔器在以上菌板上取直径 1 cm 的菌块 1 块,接种到 150 mL (500 mL 瓶)培养基中(培养基配方如表 2,pH 为 6.0),25 $^{\circ}\text{C}$,130 r \cdot min $^{-1}$,培养 40 d,分别在发酵的 3、9、12、15、18、21、24、27、31、34、37、40 d 取

发酵液,经过预处理后,用 HPLC 检测发酵液中虫草素含量,所有样品平行 3 次重复。

1.2.4 样品预处理

将蛹虫草液体发酵液充分震荡,取 1 mL 液体发酵液于 1.5 mL 离心管中,平行取 3 管,5 000 r \cdot min $^{-1}$,离心 5 min,取上清液混合后,用 0.45 μm 过滤器压滤,除去颗粒杂质,HPLC 检测发酵液虫草素含量。所有样品设 3 次重复,求其峰面积的平均值,根据标准曲线计算样品中的虫草素含量。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 13.0 软件进行分析,采用 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 虫草素标准曲线的绘制

由虫草素标准曲线图 1 得到回归方程 $y=46.892x+3.3478$, R^2 为 0.999 8,应用此方程来计算 2014072503-1 和 2014072301-1 蛹虫草菌株发酵液中的虫草素质量浓度。

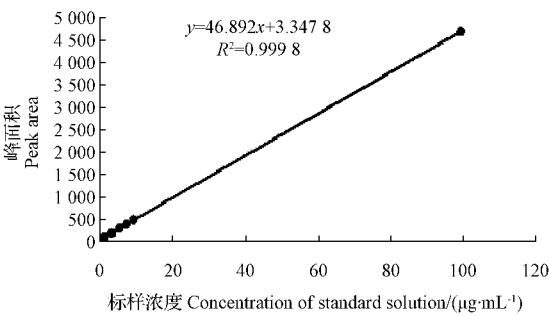


图 1 虫草素标准曲线
Fig.1 Standard curve of cordycepin

2.2 蛹虫草发酵过程中虫草素含量分析

由图 2、3 可知,发酵 3 d 后即可在 2014072503-1 和 2014072301-1 蛹虫草菌株发酵液中检测到虫草素,分别为 20.58 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和

表 2 液体发酵培养基配方

Table 2 Composition of liquid fermentation medium

成分 Ingredient	含量 Content/(g \cdot L $^{-1}$)
蛋白胨 Peptone	2.5
酵母粉 Yeast extract powder	7.5
葡萄糖 Glucose	20.0
KH ₂ PO ₄	0.5
柠檬酸 Citric acid	0.46×10^{-3}
柠檬酸钠二水合物 Sodium citrate 2 hydrate	0.28
NH ₄ NO ₃	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.50×10^{-3}
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.10×10^{-3}
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025×10^{-3}
H ₃ BO ₃	0.50×10^{-3}
MnSO ₄ ·(4-5)H ₂ O	0.50×10^{-3}
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.50×10^{-3}

18.98 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含量较少。至发酵后 9 d, 发酵液中的虫草素含量基本没有增长, 而从发酵 12 d 起虫草素含量迅速增加 (41.62 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 48.94 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在发酵后期达到最高值, 2014072503-1 号菌株在发酵 37 d 时虫草素含量达最高值 249.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而 2014072301-1 号菌株在发酵 34 d 时就已达最高值 383.43 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且比 2014072503-1 号菌株高 134.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

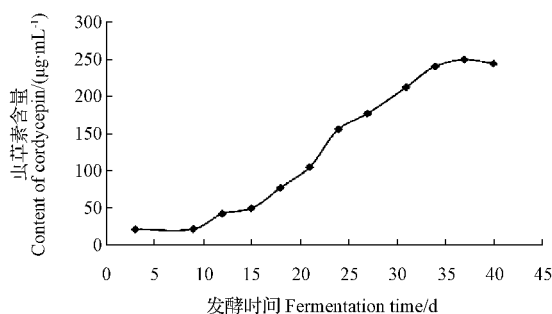


图2 发酵过程中 2014072503-1 号菌株产虫草素含量

Fig. 2 Content of cordycepin in liquid fermentation of 2014072503-1 strain

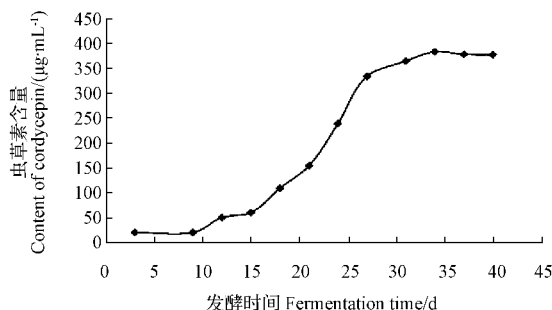


图3 发酵过程中 2014072301-1 号菌株产虫草素含量

Fig. 3 Content of cordycepin in liquid fermentation of 2014072301-1 strain

3 讨论

虫草素作为蛹虫草的主要活性成分之一, 具有明显的抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、抗细菌、调节免疫力等作用^[4-9], 越来越受到人们的青睐。但由于化学合成难度大成本高, 虫草素主要依靠从蛹虫草培养物中分离提取。人工栽培蛹虫草子实体的生产周期长, 且产量有限, 因此采用液体发酵来生产虫草素无疑是更好的选择。采用液体发酵培养

的虫草菌丝体, 其含有的主要成分与天然子实体非常接近, 且具有培养条件易控制、产量高、生长周期短且活性物质易于提取等特点, 有望成为野生虫草的替代品^[10-11]。近年来, 蛹虫草液体发酵培养的研究取得了很大进展, 但由于蛹虫草菌株、培养基配方及培养条件等原因, 使培养产物有诸多差异, 且产量不够稳定^[11-13]。如果能够了解虫草素的代谢途径, 明确其中的基因互作和调控关系, 那么就可以利用基因工程手段调控相关基因的表达, 从源头上提高虫草素的产量。但是, 蛹虫草发酵过程中虫草素相关基因资源极其匮乏, 尚鲜见有系统研究虫草素发酵过程中的基因表达调控的相关报道。

该研究通过前期优化建立的蛹虫草液体发酵最适条件, 即在 150 mL (500 mL 瓶) 培养基 (配方见表 2) 中接种直径 1 cm 的菌块 1 块, 25 $^{\circ}\text{C}$, 130 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 振荡培养 40 d。利用 HPLC 方法, 检测了在发酵过程中发酵液中的虫草素含量, 发现在发酵后 3 d 即可检测到虫草素, 12 d 后发酵液中的虫草素含量成倍增长, 且分别在发酵后 37 d (2014072503-1 号菌株) 和 34 d (2014072301-1 号菌株) 虫草素含量达最大值, 为 249.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 383.43 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过该研究, 蛹虫草菌丝体在液体发酵 40 d 过程中的虫草素产生规律及关键的时间节点被找到, 为下一步开展对应时间点的菌丝体转录组测序分析、挖掘虫草素合成重要基因资源提供了有力保障。另外, 2014072301-1 号菌株在发酵 34 d 后发酵液中虫草素含量高达 383.43 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可作为生产虫草素的优良菌株。

参考文献

- [1] 杨涛, 董彩虹. 虫草素的研究开发现状与思考[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 180-190.
- [2] 王菊凤. 蛹虫草培养及其生理活性物质研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2006.
- [3] 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): 408-413.
- [4] KODAMA E N, MCCAFFREY R P, YUSA K, et al. Anti-leukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase positive (TdT+) leukemic cells[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59: 273-281.
- [5] LEE H J, BURGER P, VOGEL M, et al. The nucleoside antagonist cordycepin causes DNA double strand breaks in breast

cancer cells[J]. Invest New Drugs, 2012, 30: 1917-1925.

[6] JEONG J W, JIN C Y, PARK C, et al. Inhibition of migration and invasion of LNCaP human prostate carcinoma cells by cordycepin through in activation of Akt[J]. Int J Oncol, 2012, 40: 1697-1704.

[7] AHN Y J, PARK S J, LEE S G, et al. Cordycepin; selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2744-2748.

[8] JEONG M H, SEO M J, PARK J U, et al. Effect of cordycepin purified from *Cordyceps militaris* on Th1 and Th2 cytokines in mouse splenocytes[J]. J Microbiol Biotechnol, 2012(22): 1161-1164.

[9] JEONG J W, JIN C Y, KIM G Y, et al. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV₂ microglial cells[J]. Int Immunopharmacol, 2010(10): 1580.

[10] MASUDAA M, DASA S K, HATASHITAB M, et al. Effi-

cient production of cordycepin by the *Cordyceps militaris* mutant G81-3 for practical use[J]. Process Biochemistry, 2014, 49: 181-187.

[11] DASA S K, MASUDAA M, HATASHITAB 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: 534-538.

[12] DASA S K, MASUDAA M, HATASHITAB M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation[J]. Process Biochemistry, 2010, 45: 129-132.

[13] FAN D D, WANG W, ZHONG J J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 60: 30-35.

Analysis of Content of Cordycepin in Liquid Fermentation of *Cordyceps militaris*

LI Xiaowei¹, ZHANG Min¹, SHEN Lijun¹, GONG Guoqiang², XU Hehan¹, LI Haiyan¹

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Jilin Institute for Food Control, Changchun, Jilin 130033)

Abstract: The yield of cordycepin in fermentation liquid from *Cordyceps militaris* strains 2014072503-1 and 2014072301-1 during 40 days by HPLC were determined. The effects of fermentation time of *Cordyceps militaris* on yield of cordycepin to find the key point time of cordycepin producing were investigated, and this would be laid a foundation for further research of transcriptome sequencing and of functional identification about cordycepin synthesis related genes. The results showed that the three key point time of cordycepin synthesis in submerged culture during 40 days were 3 days, 12 days, 37 days for 2014072503-1 strain and 3 days, 12 days, 34 days for 2014072301-1 strain, respectively. The maximal amount of cordycepin reached $382.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of 2014072301-1 strain, so it might be a suitable strain to produce cordycepin in the future.

Keywords: *Cordyceps militaris*; liquid fermentation; cordycepin; HPLC; yield