

蛹虫草新菌株 ZA10-C4 的培养体系优化及虫草素高效制备

麦梦贤^{1,2,3} 郭丽琼^{1,2,3} 魏 韬^{1,2,3} 邹 苑^{1,2,3} 郑倩望^{1,2,3} 叶志伟^{1,2,3} 林俊芳^{1,2,3*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学食品生物技术研究所, 广东 广州 510640;
3. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510640)

摘要: 蛹虫草菌株 ZA10-C4 是经杂交育种得到的高产虫草素的新菌株, 为了获得适合其生长的培养基, 提高虫草素产量, 作者通过响应面法优化培养基配方, 并用大孔树脂 NKA-II 吸附法提取纯化发酵液中的虫草素。ZA10-C4 菌株的最佳发酵培养基配方为: 麦芽糖 17.99 g/L、酵母提取粉 41.13 g/L、L-丙氨酸 11.83 g/L、KH₂PO₄ 2.00 g/L、MgSO₄ 1.50 g/L、维生素 B₁ 12 mg/L。在此优化条件下, 虫草素产量达到 (4 503.14±15.54) mg/L, 较优化前提高 1.66 倍。同时, 得到最佳提取纯化工艺为: 自然 pH、上样体积 600 mL、上样和洗脱流量 240 mL/h、乙醇 (体积分数 70%) 洗脱体积 800 mL。在此条件下得到的虫草素纯度为 94.89%, 得率为 89.57%。该研究为蛹虫草新菌株 ZA10-C4 的大规模生产及虫草素的高效制备提供了技术参考。

关键词: 蛹虫草; 虫草素; 菌株培养; 纯化; 高效制备

Cultivation System of a Novel *Cordyceps militaris* Strain ZA10-C4 and Efficient Preparation of Cordycepin

MAI Mengxian^{1,2,3} GUO Liqiong^{1,2,3} WEI Tao^{1,2,3} ZOU Yuan^{1,2,3} ZHENG Qianwang^{1,2,3}
YE Zhiwei^{1,2,3} LIN Junfang^{1,2,3*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 2. Institute of Food Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 3. Guangdong Micro-Ecological Preparation Engineering Technology Research Centre, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Cordyceps militaris* strain ZA10-C4, a newly developed strain through hybrid breeding, exhibits high cordycepin production. In order to obtain a suitable medium formulation for its growth and further improve cordycepin yield, the fermentation medium need to be optimized and the response surface method was applied. Cordycepin was extracted and purified from the fermentation broth using the macroporous resin NKA-II. The optimal fermentation medium formulation was determined to contain maltose 17.99 g/L, yeast extract powder 41.13 g/L, L-alanine 11.83 g/L, KH₂PO₄ 2.00 g/L, MgSO₄ 1.50 g/L, and vitamin B₁ 12 mg/L, respectively. Under these optimized conditions, the yield of cordycepin reached (4 503.14±15.54) mg/L, a 1.66-fold increase compared to before optimization levels. Meanwhile, the optimal extraction and purification process was identified as follows: natural pH, a sample loading volume of 600 mL, a sample loading and elution flow rate of 240 mL/h, and ethanol elution with 70% volume fraction at 800 mL. The resulting cordycepin achieved a purity of 94.89% with a yield of 89.57%. This study provides technical reference for the large-scale production of novel *Cordyceps militaris*

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772373, 32072646, 32272785); 广东省重点领域研发计划项目 (2022B0202050002); 广东省现代农业产业技术体系创新团队 (食用菌) 建设项目 (2022KJ103, 2023KJ103)。

通信作者: 林俊芳 (1962—), 男, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事食品组学与健康研究。E-mail: linjf@scau.edu.cn

收稿日期: 2022-12-13 **改回日期:** 2023-04-26

strain ZA10-C4 and the efficient preparation of cordycepin.

Keywords: *Cordyceps militaris*; cordycepin; strain culture; purification; efficient preparation

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)是一种珍贵的食药菌,富含多种生物活性成分,如虫草多糖、虫草素、虫草酸、腺苷、甾醇、氨基酸和超氧化物歧化酶等^[1-2]。其中,虫草素是蛹虫草特有的核心活性成分^[3],具有抗癌和抗炎^[4-5]、抗病毒^[6-7]、抗菌^[8-10]、调节免疫^[11-13]、治疗伊氏锥虫感染^[14]等多种功能。因此,虫草素应用前景广阔。

虫草素可通过化学合成和生物法获取,其中蛹虫草液体发酵是高效制备虫草素的途径之一。目前,提高蛹虫草菌株大量合成虫草素的方法主要有菌种选育^[15-16]、发酵条件优化^[17-18]、分离纯化方法改良^[19]和生物合成途径的探究^[20-23]。刘金彬等用离子束和亚硝基胍诱变法获得蛹虫草新菌株,并优化该菌株液体发酵培养基组分,使虫草素产量提高了 5 倍^[24]。也有研究发现在葡萄糖 86.2 g/L、酵母提取物 93.8 g/L 的培养条件下,蛹虫草突变株 G81-3 发酵产生的虫草素比野生型提高 2.79 倍^[25]。通过菌株筛选、诱变和育种得到的蛹虫草新菌株对培养基要求不同。因此,为了提高新菌株合成虫草素的能力,需要对其发酵培养基进行优化。

该研究中的蛹虫草菌株 ZA10-C4 是以 ZGCM 菌株和 CM17 菌株为亲本,通过杂交育种获得的高产虫草素新菌株。在杂交育种的过程中,基因会发生重组,使亲本的不同优良性状集中在同一个后代个体身上。因此新菌株与亲本基因存在一定的差异,对物质的代谢和营养吸收有所不同,为提高新菌株 ZA10-C4 的虫草素产量,需要对培养基进行优化。另一方面,培养基成分的选择对发酵产物有较大影响,碳源、氮源、

无机盐和生长因子等组分与细胞生长代谢密切相关。虫草素作为次级代谢产物,由嘌呤中间代谢产物在 *Cns3*、*Cns2* 和 *Cns1* 编码的磷酸转移酶、磷酸水解酶和氧化还原酶的作用下转化形成^[26],表明虫草素生物合成与细胞的初级代谢有关。因此,培养基优化可使蛹虫草菌体更好地生长和代谢。作者所在课题组首先探究了碳源、氮源、无机盐、生长因子和促进剂的种类及质量浓度对新菌株产虫草素的影响;然后通过 Plackett-Burman (PB) 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 试验确定最优发酵配方;最后将发酵液中的虫草素提取纯化,以期提高蛹虫草新菌株 ZA10-C4 的虫草素产量,获得高纯度虫草素。

1 材料与方法

1.1 菌株和种子液

蛹虫草菌株 ZA10-C4: 作者所在课题组选育^[27],保存于 -80 °C 冰箱。从活化的 PDA 培养基中切割两块蛹虫草菌块,放入 100 mL PDB 培养基,150 r/min 摇床培养 5 d,制成种子液。

1.2 发酵培养基

起始发酵培养基配方:蔗糖 24.7 g、蛋白胨 20 g、KH₂PO₄ 0.9 g、MgSO₄ 1.11 g、维生素 B₁ 10 mg,纯水定容到 1 000 mL,121 °C 灭菌 30 min。接种体积分数 10%,装液量 100 mL,接种后置于 25 °C 避光静置培养 14 d。

1.3 单因素试验

在起始发酵培养基的基础上,采用控制变量的方法探究培养基成分及质量浓度对虫草素产量的影响,单因素试验设计见表 1。

表 1 单因素试验设计

Table 1 Single factor experimental design

营养成分类	成分	质量浓度/(g/L)
碳源	葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、麦芽糖	5、15、25、35、45
氮源	蛋白胨、酵母提取粉、牛肉膏、蚕蛹粉、大豆蛋白胨	10、25、40、55、70
无机盐	KH ₂ PO ₄ 、MgSO ₄ 、FeSO ₄ 、ZnSO ₄ 、GaSO ₄ 、KCl	0.5、1.0、1.5、2.0、2.5
生长因子	维生素 B ₁ 、维生素 B ₂ 、维生素 C、萘乙酸	0.004、0.012、0.016、0.020
促进剂	L-丙氨酸	0、4、8、12、16、20

1.4 PB 试验和最陡爬坡试验

将单因素试验所得最优培养基用于 PB 试验, 得到显著影响的因素, 通过合理计算爬坡步长, 进行最陡爬坡试验。

1.5 Box-Benhnken 试验

根据 PB 试验得出显著影响虫草素产量的因素。根据最陡爬坡试验得出曲面弯曲的大致范围, 运用 Design-Expert 软件进行 Box-Benhnken 试验, 设计三因素三水平响应面试验, 并验证结果。

1.6 虫草素的提取纯化

参照文献[28-29]的方法并略加修改。用大孔树脂 NKA-II 对发酵液中的虫草素进行提取纯化, 计算吸附容量、吸附率和解析率。同时, 探究 pH、乙醇体积分数、上样和洗脱体积、上样和洗脱流量对大孔树脂 NKA-II 吸附、解析虫草素的影响。绘制吸附-洗脱曲线, 计算利用树脂纯化虫草素的得率和纯度。

1.7 虫草素的测定

虫草素采用高效液相色谱 (HPLC) 法进行测定^[30]。将待测液稀释到合适浓度, 过 0.22 μm 滤膜于进样瓶中, 进行 HPLC 测定, 检测条件: 色谱柱 C_{18} ; 流动相为体积分数 85% 的 ddH_2O 和体积分数 15% 的甲醇; 流量 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 260 nm; 进样体积 10 μL ; 出峰时间 10~11 min。虫草素标品的质量浓度为 0.03~0.96 mg/mL, 通过标准曲线对发酵液中虫草素进行定量。

1.8 数据统计与分析

用 SPSS 20 软件进行数据分析和正交试验设计, 结果以平均值 $\pm$ 标准误差表示, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。PB 试验和响应面试验设计软件为 Design-Expert v8.0.6.1。制图软件为 GraphPad v8.0.2.263。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 碳源的筛选 将葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖和麦芽糖进行对比, 发现麦芽糖作为碳源时, 发酵液中虫草素产量最高, 推测原因是麦芽糖水解能产生两分子葡萄糖, 菌丝能更好地利用, 维持生长代谢。如图 1(a) 所示, 当麦芽糖质量浓度为 15 g/L 时, 虫草素达到最大产量 (1 689.86 $\pm$ 20.05) mg/L, 麦芽糖质量浓度继续增加时, 虫草素产量反而下

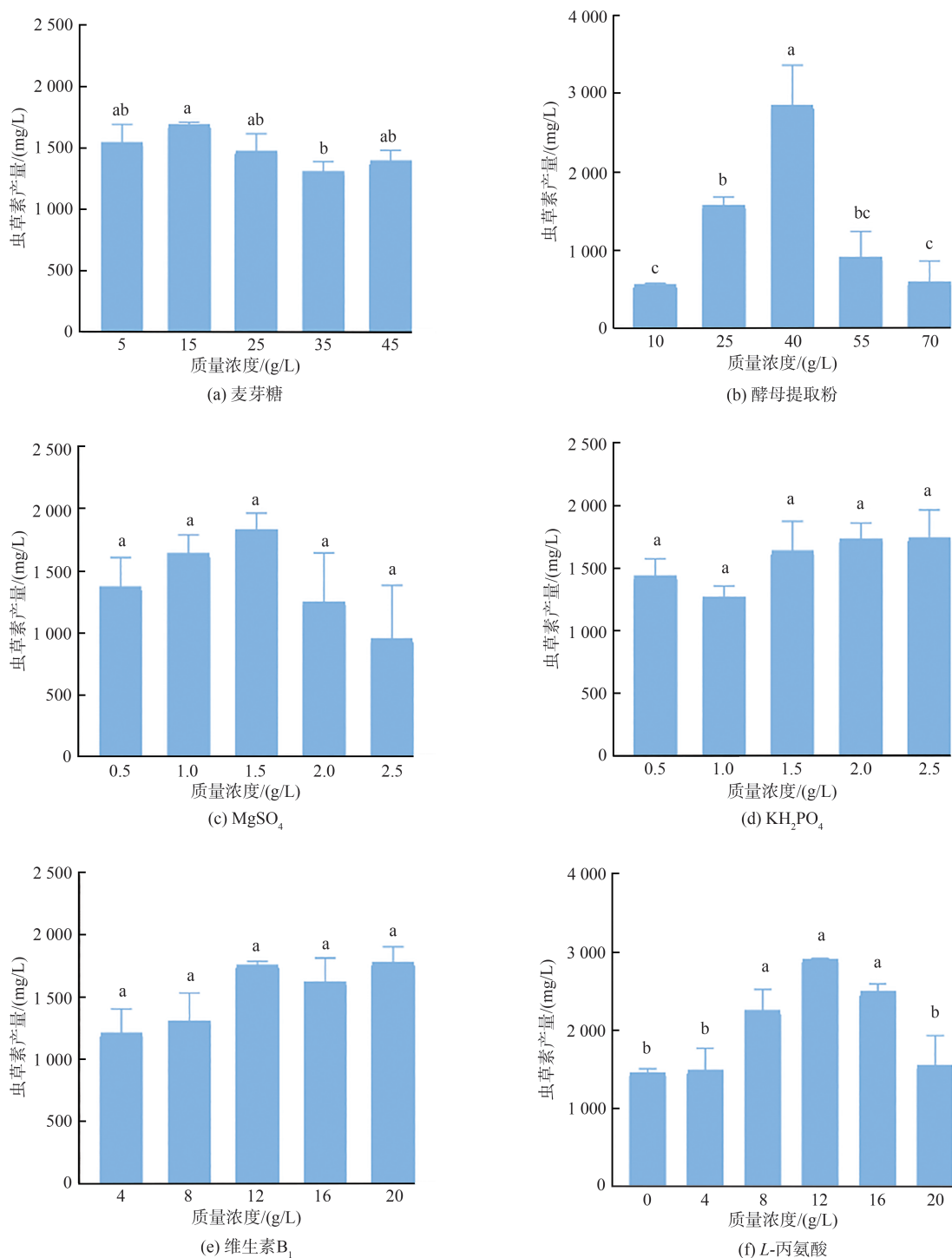
降, 这是因为培养基 pH 受到影响, 且细胞外环境浓度增加使其渗透失水, 从而影响细胞代谢。因此, 15 g/L 麦芽糖为最适宜的碳源质量浓度。

2.1.2 氮源的筛选 以酵母提取粉作为氮源进行发酵时, 虫草素产量显著高于以蛋白胨、牛肉浸膏、蚕蛹粉和大豆蛋白胨等为氮源时的产量。如图 1(b) 所示, 随着酵母提取粉质量浓度提高, 虫草素产量呈先上升后下降的趋势。在质量浓度为 10 g/L 时, 氮源不足, 菌体生长缓慢, 繁殖量少, 因而产生的代谢物少; 质量浓度为 40 g/L 时, 虫草素产量达到最高, 为 (2 855.00 $\pm$ 358.95) mg/L; 酵母提取粉质量浓度更高时, 由于氮源过剩, 菌丝徒长, pH 偏高, 不利于代谢物的积累, 导致虫草素产量下降。因此, 40 g/L 酵母提取粉为最适宜的氮源质量浓度。

2.1.3 无机盐的筛选 将 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 FeSO_4 、 ZnSO_4 、 GaSO_4 、 KCl 作为无机盐分别添加到发酵液中, 发现添加 FeSO_4 和 ZnSO_4 后虫草素产量显著降低, 添加 KH_2PO_4 、 MgSO_4 和 GaSO_4 的发酵液中, 虫草素产量略有增加。考虑生产成本, 最后选择 KH_2PO_4 和 MgSO_4 作为无机盐添加到发酵培养基中。如图 1(c)、1(d) 所示, 当 MgSO_4 质量浓度为 1.5 g/L、 KH_2PO_4 质量浓度为 2.0 g/L 时, 虫草素产量分别达到最大, 但各质量浓度处理组间无显著差异。因此, 适宜的无机盐及质量浓度为 MgSO_4 1.5 g/L 和 KH_2PO_4 2.0 g/L。

2.1.4 生长因子的筛选 采用维生素 B_1 、维生素 B_2 、维生素 C 和 羧乙酸作为生长因子, 探究其对虫草素产量的影响。结果发现, 生长因子对虫草素合成虽有影响, 但差异不显著。综合成本和常用性考虑, 选择维生素 B_1 作为生长因子。如图 1(e) 所示, 随着维生素 B_1 质量浓度的增加, 虫草素产量逐渐升高, 后略微下降。因此, 选择维生素 B_1 的质量浓度为 12 mg/L。

2.1.5 促进剂的筛选 根据文献报道, 氨基酸能够显著提高虫草素产量, 如丙氨酸、赖氨酸、羟基脯氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺等^[30-31]。Chen 等通过转录组分析发现, L -丙氨酸能通过激活能量产生和氨基酸相互转化的途径提高虫草素产量^[32]。因此, 选取 L -丙氨酸作为促进剂, 探究其对虫草素产量的影响。结果如图 1(f) 所示, 相对于空白对照组, 添加了 L -丙氨酸的培养基中, 虫草素产量显著提高, 呈



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 培养基组分及质量浓度对虫草素产量的影响

Fig. 1 Effect of media component and additive levels on the yield of cordycepin

先上升后下降趋势,在质量浓度为 12 g/L 时,虫草素达到最大产量 ($2\,933.63 \pm 13.14$) mg/L。由于 L -丙氨酸也是一种氮源,培养基中氮源过多会导致菌丝生长过旺,代谢物积累减少。因此,选取最适宜的 L -丙氨酸质量浓度为 12 g/L。

2.2 PB 试验结果

根据单因素试验得出最佳培养基配料,分别是麦芽糖、酵母提取粉、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、维生素 B_1 和 L -丙氨酸。通过 PB 试验可从配料中得出影响虫草素产量的显著因素,试验设计和结果见表 2。

根据 PB 试验结果建立的模型具有显著性, P 为 0.037, 说明 PB 试验结果可靠。回归分析结果如表 3 和公式(1)所示, A 、 B 、 D 和 G 具有正效应, C 和 E 显示负效应。其中, 麦芽糖和酵母提取粉的 P 分别为 0.034 9 和 0.007 8, 均小于 0.05, 说明麦芽糖和酵

母提取粉是影响虫草素产量的显著因素。另外, L -丙氨酸的 P 为 0.066 6, 位于 0.05~0.08, 表明 L -丙氨酸对虫草素产量有影响。综合考虑, 选取麦芽糖、酵母提取粉和 L -丙氨酸作为虫草素产量的影响因子, 进行最陡爬坡试验和响应面试验。

表 2 PB 试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of the PB test

序号	麦芽糖 质量浓度/(g/L)	酵母提取粉 质量浓度/(g/L)	KH ₂ PO ₄ 质量浓度/(g/L)	MgSO ₄ 质量浓度/(g/L)	维生素 B ₁ 质量浓度/(mg/L)	L -丙氨酸 质量浓度/(g/L)	虫草素产量/ (mg/L)
1	5	10	0.5	1.0	5	4	393.04
2	35	60	3.0	1.0	5	4	2 363.67
3	35	10	3.0	2.5	5	20	2 710.28
4	5	60	3.0	1.0	20	20	1 498.56
5	35	10	0.5	1.0	20	4	628.48
6	5	10	0.5	2.5	5	20	1 572.47
7	5	60	0.5	2.5	20	4	2 834.57
8	35	10	3.0	2.5	20	4	1 142.92
9	35	60	0.5	1.0	5	20	4 038.88
10	5	60	3.0	2.5	5	4	1 719.90
11	35	10	3.0	1.0	20	20	1 705.75
12	35	60	0.5	2.5	20	20	3 323.69

表 3 PB 试验回归分析结果

Table 3 Regression analysis results from the PB test

因素	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1.14×10 ⁷	6	1.90×10 ⁶	5.76	0.037 0*
麦芽糖 (A)	2.72×10 ⁶	1	2.72×10 ⁶	8.25	0.034 9*
酵母提取粉 (B)	6.06×10 ⁶	1	6.06×10 ⁶	18.39	0.007 8*
KH ₂ PO ₄ (C)	5.85×10 ⁵	1	5.85×10 ⁵	1.77	0.240 3
MgSO ₄ (D)	1.12×10 ⁶	1	1.12×10 ⁶	3.38	0.125 2
维生素 B ₁ (E)	5.91×10 ⁵	1	5.91×10 ⁵	1.79	0.238 1
L -丙氨酸 (G)	1.80×10 ⁶	1	1.80×10 ⁶	5.46	0.066 6
残差	1.65×10 ⁶	5	3.30×10 ⁵		
综合	1.30×10 ⁷	11			

注: *表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

由 PB 试验得到公式(1)。

$$Y = -422.61 + 34.76A + 28.90B - 179.53C + 413.15D - 30.08E + 49.21G \quad (1)$$

式中:

Y ——虫草素产量, mg/L;

A ——麦芽糖质量浓度, g/L;

B ——酵母提取粉质量浓度, g/L;

C ——KH₂PO₄质量浓度, g/L;

D ——MgSO₄质量浓度, g/L;

E ——维生素 B₁质量浓度, g/L;

G —— L -丙氨酸质量浓度, g/L。

2.3 最陡爬坡试验结果

根据 PB 试验所得公式(1)设计最陡爬坡步长, 得到各因素的步长分别为 8、11 和 6。因选择的 3 个因素具有正效应, 所以爬坡试验根据步长的增加进行设计, 结果如表 4 所示。随着麦芽糖、酵母提取粉和 L -丙氨酸质量浓度的增加, 虫草素产量也逐渐增加, 直至营养物质过多, 导致其产量降低。因此在麦芽糖质量浓度为 13~53 g/L、酵母提取粉质量浓度为 21~76 g/L、 L -丙氨酸质量浓度为 10~40 g/L 时, 预测有响应曲面。

2.4 Box-Benhnken 试验和验证分析

根据单因素试验、最陡爬坡试验和预试验结果, 选取麦芽糖、酵母提取粉和 L -丙氨酸进行三因素三水平的 Box-Benhnken 试验, 试验设计及结果见表 5。

以虫草素产量为响应值, 得到二元多次方程。

$$Y = -5\,252.82 + 132.39A + 270.69B + 526.70C + 1.47AB - 1.04AC - 3.01BC - 5.02A^2 - 3.18B^2 - 16.24C^2 \quad (2)$$

式中:

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 Experimental design and results of the steepest climbing test

序号	麦芽糖 质量浓度/ (g/L)	酵母提取粉 质量浓度/ (g/L)	L-丙氨酸 质量浓度/ (g/L)	虫草素产量/ (mg/L)
1	5	10	4	851.89±69.59 ^d
2	13	21	10	911.01±265.58 ^d
3	21	32	16	1 171.36±188.51 ^{cd}
4	29	43	22	2 102.09±6.05 ^a
5	37	54	28	1 725.86±213.14 ^{ab}
6	45	65	34	1 606.33±88.09 ^{abc}
7	53	76	40	1 344.50±18.53 ^{bcd}

注：上标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

表 5 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 5 Experimental design and results of the Box-Behnken test

序号	麦芽糖 质量浓度/ (g/L)	酵母提取粉 质量浓度/ (g/L)	L-丙氨酸 质量浓度/ (g/L)	虫草素 产量/ (mg/L)
1	35	40	4	2 486.66
2	35	40	20	2 171.71
3	20	40	12	4 884.35
4	20	20	20	2 617.30
5	5	60	12	2 587.72
6	20	20	12	4 471.77
7	20	60	20	1 866.14
8	5	40	4	2 425.31
9	20	20	4	1 728.77
10	20	40	12	4 946.89
11	20	40	12	4 301.40
12	35	20	12	910.88
13	20	40	12	4 351.35
14	5	20	12	2 918.23
15	5	40	20	2 608.11
16	20	60	4	2 907.09
17	35	60	12	2 345.67

Y ——虫草素产量,mg/L;

A ——麦芽糖质量浓度,g/L;

B ——酵母提取粉质量浓度,g/L;

C ——L-丙氨酸质量浓度,g/L。

结果如表 6 所示,响应面模型的 P 为 0.000 4 ($P<0.01$),表明该模型极显著,而失拟项不显著 ($P>0.05$),说明响应面模型拟合程度较好,得到的回归方程可靠,试验中其他因素对试验结果影响

较小。同时,相关系数 $R^2=0.961\ 5$ 也表明回归方程能较好地拟合实际情况。校正系数 $R^2_{\text{adj}}=0.912\ 0$,表明 91.20% 的数据变异可用该响应面模型解释。因此,可用该响应面模型确定最佳发酵配方。各因素对虫草素产量的影响大小依次是酵母提取粉(B)>L-丙氨酸(C)>麦芽糖(A),且二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 均表现出极显著影响($P<0.01$)。另外, AB 和 BC 的交互作用能显著影响虫草素产量($P<0.05$),但 AC 交互作用对虫草素产量的影响不显著($P>0.05$)。

表 6 Box-Behnken 试验模型分析结果

Table 6 Model analysis results from the Box-Behnken design

因素	平方和	自由度	均方	F	P
模型	2.16×10^7	9	2.40×10^6	19.44	0.000 4 ^{**}
麦芽糖(A)	1.17×10^6	1	1.17×10^6	9.45	0.017 9 [*]
酵母提取粉(B)	5.94×10^6	1	5.94×10^6	48.11	0.000 2 ^{**}
L-丙氨酸(C)	4.79×10^6	1	4.79×10^6	38.77	0.000 4 ^{**}
AB	7.79×10^5	1	7.79×10^5	6.31	0.040 3 [*]
AC	6.19×10^4	1	6.19×10^4	0.50	0.501 8
BC	9.31×10^5	1	9.31×10^5	7.53	0.028 7 [*]
A^2	5.36×10^6	1	5.36×10^6	43.42	0.000 3 ^{**}
B^2	6.81×10^6	1	6.81×10^6	55.13	0.000 1 ^{**}
C^2	4.55×10^6	1	4.55×10^6	36.83	0.000 5 ^{**}
残差	8.65×10^5	7	1.24×10^5		
失拟项	4.97×10^5	3	1.66×10^5	1.8	0.287 0
纯误差	3.68×10^5	4	9.21×10^4		
总和	2.25×10^7	16			

注：^{*}表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著；^{**}表示在 $P<0.01$ 水平上差异极显著。

经过响应面试验得到最佳发酵配方组合和预测的响应值,即发酵配方为麦芽糖 17.99 g/L、酵母提取粉 41.13 g/L、L-丙氨酸 11.83 g/L、 KH_2PO_4 2.00 g/L、 MgSO_4 1.50 g/L 和维生素 B_1 12 mg/L 时,预测虫草素产量为 4 618.77 mg/L。此时,期望值为 0.919(越接近 1 说明结果可信度越高)。为了验证模型的准确性,用最优化配方按照同样的条件进行 3 次发酵试验,虫草素产量达到 $(4\ 503.14\pm15.54)$ mg/L,较优化前提高 1.66 倍,且相对误差为 2.5%,由此说明该模型能够较好地预测实际发酵情况。

相关研究中,孙翠等以蛹虫草 C-8 为出发菌株,经 $^{60}\text{Co}\gamma\text{-UV}$ 复合诱变得到蛹虫草突变株 C1-7,此时虫草素产量比出发菌株提高 79%,后通过固态

发酵优化提高至 132.9%^[33]。有研究分别采用分离筛选、诱变驯化等方法获得蛹虫草新菌株 HB8 和新菌株 CGMCC 18581, 经优化发酵后得到最适虫草素生产的配方和工艺条件^[34-37]。

2.5 虫草素的提取和纯化结果

2.5.1 静态吸附率和解析率 通过上述优化的培养体系发酵可得到虫草素质量浓度为 4.5 g/mL 的发酵液, 且由于菌株特性, 发酵液中的代谢物质和含量不同, 故有必要优化分离纯化工艺, 以提高虫草素的生产规模。当发酵液中的虫草素质量浓度为 3 757.68 mg/L 时, 大孔树脂 NKA-II 对虫草素的吸附容量为 18.28 mg/g, 吸附率为 97.32%, 解析率为 86.99%, 与相关文献的结果相似^[29, 38-39]。

2.5.2 影响动态吸附和解析的因素

(1) pH: 当上样发酵液 pH>4.5、洗脱剂 pH>6.0 时, 吸附率为 60%~80%, 解析出的虫草素质量浓度未增加。考虑强酸、强碱容易对树脂填料造成破坏, 同时为减少操作步骤, 故选择原始发酵液, 洗脱剂 pH 为 6.0~9.0。

(2) 乙醇体积分数: 将已吸附虫草素的树脂用不同体积分数的乙醇洗脱。当乙醇体积分数为 70% 时, 所得洗脱液中虫草素质量浓度明显高于其他体积分数的乙醇洗脱液, 说明体积分数 70% 的乙醇能够更好地破坏树脂与虫草素之间的作用力。因此, 选择乙醇体积分数 70% 作为虫草素洗脱剂。

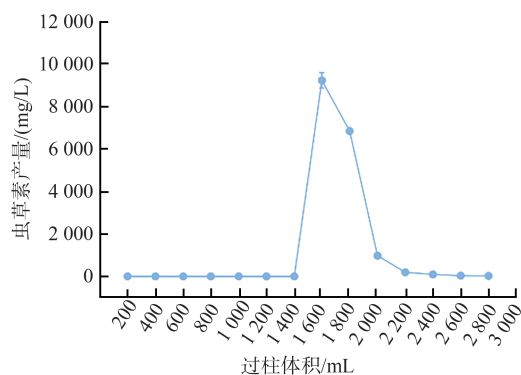
(3) 上样量: 将虫草素质量浓度为 4 780.14 mg/L 的发酵液以 300 mL/h 的流量上样, 每 200 mL 收集 1 次流出液, 检测虫草素质量浓度。当上样量为 600 mL 时, 流出液中几乎不含虫草素, 说明树脂将虫草素紧密吸附。当上样量为 800 mL 时, 树脂逐渐达到吸附饱和, 虫草素随流出液溢出。当上样量为 1 000~1 200 mL 时, 虫草素大量溢出, 树脂达到吸附容量上限。因此, 最适宜的上样量为 600 mL。

(4) 上样流量: 一般而言, 流出液中虫草素质量浓度达到上样质量浓度的 10% 时, 即为泄漏点^[27]。将 600 mL 发酵液以不同流量上样, 测定流出液中未被吸附的虫草素质量浓度, 进而比较不同上样流量下树脂对虫草素的吸附能力。即使在最大上样流量 600 mL/h 时也未达到泄漏点, 发酵液中的虫草素基本被树脂完全吸附。同时, 考虑

虫草素得率和损耗问题, 最终选取上样流量为 240 mL/h。

(5) 洗脱流量和体积: 采用体积分数 70% 乙醇, 分别以不同流量将吸附在树脂上的虫草素洗脱下来, 每 200 mL 收集 1 次洗脱液, 测定虫草素质量浓度。当洗脱流量为 120 mL/h 时, 由于流量过慢, 可能将吸附在树脂上的其他杂质也一并洗脱, 导致洗脱液中的虫草素质量分数降低。当洗脱流量为 240 mL/h 时, 吸收峰最大, 且洗脱液中虫草素质量浓度达到最大值 ($4\,581.48 \pm 104.27$) mg/L。当洗脱流量逐步增大时, 洗脱液会因来不及洗脱而流出柱外, 造成吸收峰逐渐下降、峰形变宽, 收集到的虫草素质量浓度减少。另外, 在收集 800 mL 洗脱液后, 树脂上吸附的虫草素基本被解析出来。因此, 选取适宜的洗脱流量为 240 mL/h, 且只需收集前 800 mL 的洗脱液。

2.5.3 动态吸附-洗脱曲线 利用上述所得最佳条件进行虫草素的提取纯化, 即自然 pH、上样发酵液质量浓度 4 000 mg/L、上样体积 600 mL、上样和洗脱流量为 240 mL/h、洗脱剂为体积分数 70% 乙醇、洗脱体积为 800 mL, 所得的吸附-解析曲线如图 2 所示。将虫草素质量浓度为 ($4\,820.16 \pm 55.35$) mg/L 的发酵液过柱吸附, 用 800 mL 超纯水洗脱杂质, 然后经过体积分数 70% 乙醇洗脱, 洗脱液中的虫草素质量浓度最高可达 ($9\,228.69 \pm 260.27$) mg/L, 得率为 89.57%。



200~600 mL 表示发酵液; 800~1 400 mL 表示超纯水;
1 600~2 800 mL 表示体积分数 70% 乙醇。

图 2 大孔树脂 NKA-II 对虫草素的吸附-解析曲线

Fig. 2 Adsorption-analytical curve of macroporous resin NKA-II for cordycepin

2.5.4 虫草素结晶 参照文献[40]的方法,从大孔树脂 NKA-II 上解析得到的虫草素平均质量浓度较低,需要进一步浓缩。当乙醇完全蒸发,浓缩液将要出现沉淀物的时候停止浓缩,将浓缩液置于 4 °C 冰箱,过夜冷却结晶。将虫草素结晶进行抽滤,用 4 °C 超纯水洗去色素等杂质,然后经冷冻干燥 36 h 得到虫草素粉末。经 HPLC 检测,测得冻干品中虫草素纯度为 94.89%。

3 结论

为了让蛹虫草新菌株 ZA10-C4 更好地生长和代谢,进一步提高虫草素产量,将发酵培养基和虫草素提取工艺进行优化,最后得到该菌株高产虫草素的培养体系及虫草素高效制备体系。结果表明,蛹虫草菌株 ZA10-C4 的最佳发酵培养基配方为:麦芽糖 17.99 g/L、酵母提取粉 41.13 g/L、L- 丙氨酸 11.83 g/L、KH₂PO₄ 2.00 g/L、MgSO₄ 1.50 g/L、维生素 B₁ 12 mg/L。此培养体系下,虫草素产量达到(4 503.14±15.54) mg/L,较优化前提高 1.66 倍。在新工艺条件下,即自然 pH、上样体积 600 mL、上样和洗脱流量 240 mL/h、洗脱剂为体积分数 70% 乙醇、洗脱体积 800 mL,从发酵液中提取得到的虫草素纯度为 94.89%,得率为 89.57%。优化后的蛹虫草新菌株 ZA10-C4 培养体系和虫草素提取工艺为后续大规模发酵、产品开发和功能研究提供了依据,同时该发酵过程和提取纯化方法简单,得到的虫草素纯度高,具有一定的开发应用价值。

参考文献

- [1] 张娇娇,刘梦潜,杨涛,等. 野生和人工栽培蛹虫草的交配型[J]. 食用菌学报,2021,28(6):38-46.
ZHANG J J, LIU M Q, YANG T, et al. Mating type of wild and cultivated *Cordyceps militaris* [J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(6):38-46. (in Chinese)
- [2] 左锦辉,贡晓燕,董银卯,等. 蛹虫草的活性成分和药理作用及其应用研究进展[J]. 食品科学,2018,39(21):330-339.
ZUO J H, GONG X Y, DONG Y M, et al. Research achievements in bioactive components, pharmacological effects and applications of *Cordyceps militaris* [J]. Food Science, 2018, 39(21):330-339. (in Chinese)
- [3] 林培捷,陈柏雄,陈乐涛,等. 高产虫草素的蛹虫草新品种选育[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(3):59-65.
LIN P J, CHEN B X, CHEN L T, et al. Breeding of *Cordyceps militaris* with high content of cordycepin [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(3):59-65. (in Chinese)
- [4] 胡贤达,岳颖,武鹏,等. 虫草素药理作用研究及展望[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(12):180-182,185.
HU X D, YUE Y, WU P, et al. Progress and prospects on pharmacological research of cordycepin [J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2015, 35(12):180-182,185. (in Chinese)
- [5] 周艳丽,许剑怡,王宏娟,等. 虫草素的药理作用及应用前景[J]. 中国医药导报,2020,17(8):39-42.
ZHOU Y L, XU J Y, WANG H J, et al. Pharmacological effects and application prospects of cordycepin [J]. China Medical Herald, 2020, 17(8):39-42. (in Chinese)
- [6] UEDA Y, MORI K, SATOH S, et al. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 447(2):341-345.
- [7] PANYA A, SONGPRAKHON P, PANWONG S, et al. Cordycepin inhibits virus replication in dengue virus-infected vero cells [J]. Molecules, 2021, 26(11):3118.
- [8] JIANG Q, LOU Z X, WANG H X, et al. Antimicrobial effect and proposed action mechanism of cordycepin against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Microbiology, 2019, 57(4):288-297.
- [9] KONG W J, LIU W D, WANG M, et al. Cordycepin exhibits anti-bacterial and anti-inflammatory effects against gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice [J]. Pathogens and Disease, 2022, 80(1):1-10.
- [10] EIAMTHAWORN K, KAEWKOD T, BOVONSOMBUT S, et al. Efficacy of *Cordyceps militaris* extracts against some skin pathogenic bacteria and antioxidant activity [J]. Journal of Fungi, 2022, 8(4):327.
- [11] ZHOU X X, MEYER C U, SCHMIDTKE P, et al. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2002, 453(2):309-317.
- [12] 戚梦,刘城移,李琳,等. 虫草素对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 菌物学报,2019,38(9):1510-1518.
QI M, LIU C Y, LI L, et al. Protective effects of cordycepin on CCl₄ induced acute liver injury in mice [J]. Mycosystema, 2019, 38(9):1510-1518. (in Chinese)
- [13] 朱双杰,董丽丽,潘见,等. 超高压提取蛹虫草鲜汁中虫草素工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(4):187-191+200.

- ZHU S J, DONG L L, PAN J, et al. Optimization improving dissolved quantity of cordycepin from *Cordyceps militaris* juice by ultra-high pressure processing [J]. *Food & Machinery*, 2016, 32(4): 187-191+200. (in Chinese)
- [14] DALLA R L, DA SILVA A S, OLIVEIRA C B, et al. Dose finding of 3'deoxyadenosine and deoxycorformycin for the treatment of *Trypanosoma evansi* infection: an effective and nontoxic dose [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 85: 21-28.
- [15] 汤佳鹏, 汪建雄. 紫外-硫酸二乙酯复合诱变高通量筛选虫草素高产蛹虫草突变株 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(3): 97-100.
- TANG J P, WANG J X. High-throughput screening of *Cordyceps militaris* for cordycepin production by UV-DES compound mutation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(3): 97-100. (in Chinese)
- [16] 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.
- [17] 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.
- ZHONG S M, DU M, CHEN W B, et al. Liquid culture conditions for promoting cordycepin secreted from *Cordyceps militaris* mycelia [J]. *Mycosystema*, 2011, 30(2): 229-234. (in Chinese)
- [18] 王晓玉, 于金艳, 罗佳豪, 等. 基于氧化应激反应提高蛹虫草中虫草素产量的激发子筛选及发酵条件优化 [J]. *北方园艺*, 2022(16): 113-120.
- WANG X Y, YU J Y, LUO J H, et al. Screening of elicitors and optimization of fermentation conditions for enhancing cordycepin production in *Cordyceps militaris* based on oxidative stress [J]. *Northern Horticulture*, 2022(16): 113-120. (in Chinese)
- [19] 殷东林, 陈琼, 孙伟. 蛹虫草虫草素提取工艺的研究 [J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(18): 4560-4562.
- YIN D L, CHEN Q, SUN W. Study on extraction of cordycepin from *Cordyceps militaris* [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(18): 4560-4562. (in Chinese)
- [20] 吴秀云. 蛹虫草虫草素合成基因簇的异源表达 [D]. 天津: 天津商业大学, 2022.
- [21] DUAN X Y, TIAN Y, SONG Z Q, et al. High-level *de novo* biosynthesis of cordycepin by systems metabolic engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127862.
- [22] HUO C H, LI H Y, LI Q, et al. Construction and optimization of cordycepin-producing *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(9): 3334-3347.
- [23] 林培捷, 陈柏雄, 陈乐涛, 等. 高产虫草素的蛹虫草新品种选育 [J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(3): 59-65.
- LIN P J, CHEN B X, CHEN L T, et al. Breeding of *Cordyceps militaris* with high content of cordycepin [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2022, 41(3): 59-65. (in Chinese)
- [24] 刘金彬, 沈建增, 蔡宇杰, 等. 蛹虫草 *Cordyceps militaris* JN168 菌株的诱变育种及液态发酵产虫草素 [J]. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(8): 806-813.
- LIU J B, SHEN J Z, CAI Y J, et al. Mutation breeding and cordycepin production study of *Cordyceps militaris* JN168 [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(8): 806-813. (in Chinese)
- [25] DAS S K, MASUDA M, HATASHITA M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation [J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(1): 129-132.
- [26] XIA Y L, LUO F F, SHANG Y F, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(12): 1479-1489.
- [27] LIN P J, YE Z W, WEI T, et al. Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using *MAT* genes as selectable markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 290: 110492.
- [28] 周精卫, 王松涛, 沈才洪, 等. 吸附树脂分离蛹虫草发酵液中虫草素 [J]. *生物加工过程*, 2021, 19(3): 274-279, 305.
- ZHOU J W, WANG S T, SHEN C H, et al. Separation of cordycepin from fermentation broth by adsorption resins [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2021, 19(3): 274-279, 305. (in Chinese)
- [29] 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.
- LI C Z, MAO N. Purification of cordycepin from medium residues by macroporous resin [J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(1): 90-94. (in Chinese)
- [30] KANG C, WEN T C, KANG J C, et al. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture [J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 510627.
- [31] 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.
- LIU Y T, TANG J P, ZHOU C, et al. Optimization of submerged fermentation condition on cordycepin production with glycine addition by *Cordyceps militaris* [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(7):28-32. (in Chinese)
- [32] CHEN B X, WEI T, XUE L N, et al. Transcriptome analysis reveals the flexibility of cordycepin network in *Cordyceps militaris* activated by L-alanine addition[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11:577.
- [33] 孙翠, 王钰, 李阔阔, 等. 蛹虫草高产虫草素复合诱变育种及固态发酵优化[J]. 生物学杂志, 2019, 36(2): 103-106, 117.
- SUN C, WANG Y, LI K K, et al. Screen high-producing cordycepin by *Cordyceps militaris* through composite mutagenesis and optimization of solid state fermentation [J]. Journal of Biology, 2019, 36(2): 103-106, 117. (in Chinese)
- [34] LI J F, HOANG V A, AHN J C, et al. Isolation of new strain of *Cordyceps militaris* HB8 and optimal condition for production of adenosine and cordycepin in fruit body[J]. Korean Journal of Plant Resources, 2020, 6(33): 696-706.
- [35] 赵南, 王松涛, 刘庆国, 等. 蛹虫草复合诱变育种与温度驯化研究[J]. 江苏农业学报, 2020, 32(4): 108-112.
- ZHAO N, WANG S T, LIU Q G, et al. Study on compound mutation breeding and temperature acclimation of *Cordyceps militaris* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2020, 32(4): 108-112. (in Chinese)
- [36] 邹亚男, 刘庆国, 王松涛, 等. 蛹虫草浅层发酵产虫草素培养基优化[J]. 江西农业学报, 2021, 33(10): 97-102.
- ZOU Y N, LIU Q G, WANG S T, et al. Optimization of medium for cordycepin production by shallow fermentation of *Cordyceps militaris*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2021, 33(10):97-102. (in Chinese)
- [37] 唐成伦, 王松涛, 赵南, 等. 蛹虫草发酵产虫草素工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5):106-110.
- TANG C L, WANG S T, ZHAO N, et al. Optimization of cordycepin production from *Cordyceps militaris* [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 106-110. (in Chinese)
- [38] 刘艳芳, 唐庆九, 杨焱, 等. 大孔树脂分离纯化虫草素及其抗纤维化作用[J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 109-112, 123.
- LIU Y F, TANG Q J, YANG Y, et al. Purification of cordycepin from fermentation broth by macroporous resin and its antifibrosis activity[J]. Journal of Fungal Research, 2013, 11(2): 109-112, 123. (in Chinese)
- [39] ZHANG W C, LI B, DONG X L, et al. Enzyme-assisted extraction of cordycepin and adenosine from cultured *Cordyceps militaris* and purification by macroporous resin column chromatography [J]. Separation Science and Technology, 2017, 52(8):1350-1358.
- [40] MASUDA M, HATASHITA M, FUJIHARA S, et al. Simple and efficient isolation of cordycepin from culture broth of a *Cordyceps militaris* mutant [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(6):732-735.

(责任编辑:史润东东)