

# 培养条件对蛹虫草液体培养生产虫草素的影响

万涛<sup>1,2</sup>, 杜连祥<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

(2. 天津药业集团三隆制药厂, 天津 300163)

**摘要:** 本文研究了摇瓶液体培养的不同培养条件对蛹虫草液体培养生产虫草素的影响。实验结果表明, 蛹虫草液体培养生产虫草素的最宜条件为: 培养温度 25 °C, 转速 150 r/min, 初始 pH 5.0。在此条件下, 经摇瓶培养, 获得的生物量和虫草素产量分别为 16.20 g/L 和 264.00 mg/L。

**关键词:** 蛹虫草; 培养条件; 温度; 转速; 初始 pH

中图分类号: R282.71; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0029-03

## Effects of Cultivation Conditions on Cordycepin Production by

### *Cordyceps militaris*

WAN Tao<sup>1,2</sup>, DU Lian-xiang<sup>1</sup>

(1. College of Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Industrial Microbiology Key Lab of Tianjin, Tianjin 300457, China)(2. Sanlong Pharmaceutical Factory, Tianjin Pharmaceuticals Group Corp., Tianjin 300163, China)

**Abstract:** The influences of cultivation conditions on the cordycepin production *via* submerged cultivation of *Cordyceps militaris* in the shake flask, were investigated by single factor and orthogonal experiments. The results indicated that the optimal temperature, shaking speed and initial pH value for cordycepin production were 25 °C, 150 r/min and 5.0, respectively, under which 16.20 g/L of biomass and 264.00 mg/L of cordycepin were achieved.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; Culture Conditions; temperature; shaking speed; initial pH value

蛹虫草 (*Cordyceps militaris* (L.) Link) 是麦角菌科虫草属真菌, 从萌发到成草周期长, 资源稀少。蛹虫草中含有虫草菌素 (cordycepin)、虫草多糖 (cordycepic polysaccharide) 和虫草酸 (cordycepic acid) 等, 是能提高人体免疫机能的生物活性物质。它的主要化学成分如蛋白质、氨基酸、有机酸、生物碱、甾醇及酚类和无机元素等, 与冬虫夏草基本相同<sup>[1-4]</sup>。虫草素 (cordycepin) 又称虫草菌素, 即 3'-脱氧腺苷 (3'-deoxyadenosine), 是一种核苷类抗生素, 具有多种生理活性, 如抑菌、抗肿瘤、抑制病毒, 以及增强免疫功能、防治心脑血管疾病等<sup>[5-6]</sup>。蛹虫草是虫草素的主要产生菌, 是获得虫草素的主要来源。

通过液态深层培养可以快速生产蛹虫草菌丝体, 同时, 还可以优化生产条件, 提高其生物活性物质的含量, 方便提取目的组分<sup>[7-9]</sup>。因此通过深层液体培养获得菌丝体和代谢产物是一种非常有前途的方法。

本文对蛹虫草培养条件进行了研究, 探讨了不同

培养条件对蛹虫草液体培养生产虫草素的的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

蛹虫草 (*Cordyceps militaris* (L.) Link), 购自中科院微生物研究所。

### 1.2 培养基

(1) 斜面种子培养基: PDA 培养基。

(2) 种子培养基: 蔗糖 40 g/L、蛋白胨 10 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L。

(3) 液体发酵培养基: 蔗糖 40 g/L、蛋白胨 10 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L。

### 1.3 仪器与设备

YHG-II 迴转式恒温调速摇瓶柜; LD5-10 型低速离心机; DGG 型电热鼓风干燥箱; PHSJ-4A 型数字 pH 计; Agilent-1100 型高效液相色谱。

### 1.4 测定方法

#### 1.4.1 菌体量的测定方法

取摇瓶发酵液, 4000 r/min 离心 20 min, 弃上清

收稿日期: 2007-06-15

作者简介: 万涛, 男, 高级工程师, 研究方向为生物制药

液, 菌体用水洗、再离心, 直至上清液不在带有发酵液颜色为止。收集菌体, 在 60 °C 恒温烘箱中烘干至恒重, 在干燥器中冷却到常温, 称量。

#### 1.4.2 pH 值的测定

pH 计测定。

#### 1.4.3 虫草素含量的测定

虫草素含量通过 HPLC 分析<sup>[10]</sup>。HPLC 测定用 Agilent1100 型 HPLC 分析仪; 色谱柱采用岛津 ODS-100S C<sub>18</sub> (4.6×250 mm); 检测波长为 254 nm; 柱温 30 °C; 流动相为含 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的甲醇双蒸水溶液 (v/v=15:85), 流速为 1.0 mL/min; 进样量为 20 μL。发酵液先经 0.45 μm 滤膜过滤除去固体杂质后再检测其中的虫草素含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛹虫草发酵培养基的初始 pH 研究

蛹虫草深层液体培养要求适宜的 pH 值。为考察培养基不同初始 pH 对虫草素产量及生物量的影响, 将发酵培养基初始 pH 分别调至 2、3、4、5、6、7、8、9、10, 在 25 °C, 150 r/min 的条件下培养 15 d, 测定虫草素产量及生物量, 结果见图 1。

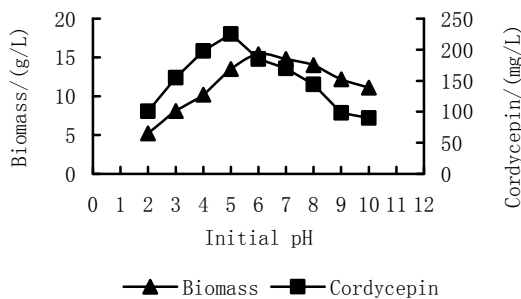


图 1 初始 pH 值对蛹虫草生物量和虫草素产量的影响

Fig.1 Effect of initial pH on biomass and cordycepin production of *Cordyceps militaris*

从图1可知, 培养液的初始pH值对蛹虫草生物量和虫草素的产量均有很大的影响。适于蛹虫草细胞生长的最佳初始pH值为6.0, 而产虫草素的最佳初始pH值为5.0。

### 2.2 蛹虫草培养温度研究

温度会影响细胞的酶活和发酵液的溶氧量。很多虫生真菌的最适生长温度都在 20 °C~30 °C 之间。为考察不同培养温度对蛹虫草生物量及虫草素产量的影响。将培养温度分别定为 16 °C、19 °C、22 °C、25 °C、28 °C、31 °C、34 °C, 在初始 pH 值为 5.0, 150 r/min 的条件下培养 15 d, 测定虫草素产量及生物量, 结果

见图 2。

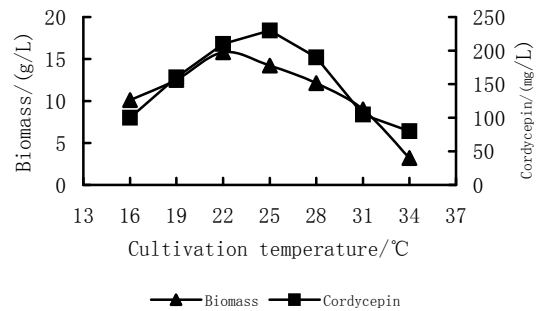


图 2 培养温度对蛹虫草生物量和虫草素产量的影响

Fig.2 Effect of cultivation temperature on biomass and cordycepin production of *Cordyceps militaris*

从图 2 可知, 培养温度对蛹虫草生物量和虫草素的产量都有很大的影响。适于蛹虫草细胞生长的最佳温度为 22 °C, 而产生虫草素的最佳温度为 25 °C。

### 2.3 摇床转速的研究

摇床转速可以影响深层液体培养时发酵液的溶氧量, 进而影响真菌的生长和代谢产物的形成。为考察适于蛹虫草产虫草素的摇床转速, 同时也为放大生产提供参考。将摇床转速分别设定为 100 r/min、125 r/min、150 r/min、175 r/min、200 r/min, 在初始 pH 值为 5.0, 25 °C 的条件下培养 15 d, 测定虫草素产量及生物量, 结果见图 3。

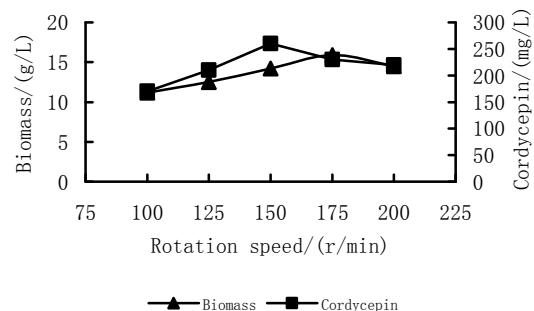


图 3 转速对蛹虫草生物量和虫草素产量的影响

Fig.3 Effect of rotation speed on biomass and cordycepin production of *Cordyceps militaris*

从图 3 可知, 当摇床转速为 175 r/min 时获得了最大的生物量, 而适于虫草素生产的摇床转速为 150 r/min。

### 2.4 蛹虫草培养条件正交试验<sup>[11]</sup>

根据单因素试验结果, 拟定影响蛹虫草液体培养生产虫草素的 3 个主要因素即 A (培养温度), B (摇床转速)、C (初始 pH 值) 为优选因素, 每个因素三个水平进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验。因素水平表见表 1, 结果

和方差分析见表2和表3。

表1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验因素水平

Table 1 The factors and levels of the L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiments

因素	培养温度/°C (A)	转速/r/min (B)	初始 pH 值(C)
1	22	125	4
2	25	150	5
3	28	175	6

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果及极差分析

Table 2 The results of the L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiments and the analysis of range

试验 批次	试验因素				虫草素产量 (mg/L)
	A	B	C	空白	
1	1	1	1	1	168.01
2	1	2	2	2	236.21
3	1	3	3	3	185.04
4	2	1	2	3	261.12
5	2	2	3	1	257.99
6	2	3	1	2	175.01
7	3	1	3	2	158.98
8	3	2	1	3	148.10
9	3	3	2	1	139.05
K <sub>1</sub>	196.33	197.33	163.67	188.33	
K <sub>2</sub>	232.67	214.00	213.33	190.00	
K <sub>3</sub>	148.67	166.33	200.67	199.33	
R	84.00	47.67	49.67	11.00	

由表 2 可知,影响蛹虫草虫草素产量各因素的主次顺序为 A、C、B; 最优水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>。即最优培养条件为培养温度 25 °C、转速 150 r/min、初始 pH 值 5.0。可知最优条件并不在表 2 之列,有必要对其进行验证,实验结果见表 3。

表 3 验证试验结果

Table 3 The results of verifying experiment

验证实验	实验 1	实验 2	实验 3	平均值
生物量/g/L	15.98	16.49	16.13	16.20
虫草素产量/mg/L	262.98	263.28	265.74	264.00

从表 3 知验证实验结果知,蛹虫草在最优培养条件下获得的生物量和虫草素产量分别为 16.20 g/L 和 264.00 mg/L。其虫草素产量高于表 2 中含量最高的第 4 号实验的 261.12 mg/L。

## 参考文献

- [1] 刘洁,陈正,杨旭,等.蚕蛹虫草抗肿瘤作用的研究[J].白求恩医科大学学报,1992,18(5):423-425
- [2] 刘静明,钟裕容.蛹虫草化学成分研究[J].中国中药杂志,1989,14(10):32-35
- [3] 贡成良,吴友良.家蚕蛹虫草的人工培育及其成分分析[J].中国食用菌,1989,12(4):21-24.
- [4] Liu J, Yang S, Yang X, et al. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris* Link[J]. Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih, 1997, 2, 22(2):111-113
- [5] 李祝,刘爱英,梁宗琦.虫草菌素的生物活性及检测方法[J].食用菌学报,2002,9(1):57-62
- [6] 张平,朱述钧,钱大顺,等.北冬虫夏草功能成分及保健作用分析[J].江苏农业科学,2003,(6):105-107
- [7] 钟裕容,崔淑莲,杨智,等.蛹虫草菌丝与冬虫夏草中氨基酸,甘露醇的含量[J].中国中药杂志,1990,15(4):39-40
- [8] Zhao-Long W, Xiao-Xia W, Wei-Ying C. Inhibitory effect of cordyceps sinensis and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation induced by native LDL [J]. Cell Biochem Funct, 2000, 18(2):93-97
- [9] Kim SW, Hwang H J, Xu C P et al. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(1):120-126
- [10] 贾景明,张剑侠,吴立军.发酵培养生产虫草素的方法[P].CN1335389A,2001,8
- [11] 吴贵生.试验设计与数据处理[M].北京:冶金工业出版社,1997