

双重营养缺陷型蛹虫草突变株的选育及其高产虫草素的研究

王亮, 刘文静, 曹照平, 田晶, 金朝霞, 周广麒
(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要: 虫草素是蛹虫草菌发酵的重要生物活性物质之一, 具有多种医学功效, 然而, 低产率限制了其大规模生产和应用。为了提高虫草素产率, 本研究通过超声波和硫酸二乙酯复合诱变、定向筛选得到一株黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型突变株 *xan⁻gua⁻-c*, 其虫草素产量较原始菌株提高约 40%, 达到 1.76 g/L (发酵 20 d)。本研究进一步考察了外源添加虫草素结构类似物对突变株合成虫草素的影响, 发现添加 1.0 g/L 腺苷和 1.0 g/L 腺嘌呤后, 第 20 d 虫草素产量分别提高了 33.5% 和 103.5%, 达到 2.35 g/L 和 3.59 g/L。代谢途径分析表明, 蛹虫草菌中可能同时存在由腺嘌呤或腺苷合成虫草素的代谢途径, 甚至这两条合成途径本就是重合的, 且阻断黄嘌呤和鸟嘌呤的合成代谢是促进蛹虫草菌积累虫草素的有效策略。

关键词: 蛹虫草菌; 虫草素; 双重营养缺陷型突变

文章编号: 1673-9078(2017)3-54-59

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.009

Screening of a Double Auxotrophic *Cordyceps militaris* Mutant and Its High Fermentation Yield of Cordycepin

WANG Liang, LIU Wen-jing, CAO Zhao-ping, TIAN Jing, JIN Zhao-xia, ZHOU Guang-qi
(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Cordycepin, with a variety of medical and health benefits, is one of the key bioactive compounds in *Cordyceps militaris*. However, the low fermentation yield restricts its industrial production and applications. To enhance the yield of cordycepin, a xanthine-guanine double auxotrophic mutant, *xan⁻gua⁻-c*, was obtained by ultrasound mutagenesis combined with diethyl sulfate treatments, followed by directional screening, and its yield of cordycepin was improved to 1.76 g/L on the 20th day of batch fermentation, about 40% higher than that of the control. The effects of structural analogs of cordycepin on the cordycepin production capacity of the mutant were then investigated. The results showed that the addition of 1.0 g/L adenosine and 1.0 g/L adenine could improve the production of cordycepin (on the 20th day) by 33.5% (to 2.35 g/L) and 103.5% (to 3.59 g/L), respectively, compared with that of the control. Metabolic pathway analysis indicated that there might be two metabolic pathways used to synthesize cordycepin from adenine or adenosine. The two metabolic processes might overlap, and blocking the anabolism of xanthine and guanine might be an effective strategy to promote *Cordyceps militaris* to accumulate cordycepin.

Key words: *Cordyceps militaris*; cordycepin; double auxotrophic mutagenesis

3'-脱氧腺苷, 又名虫草素, 是从蛹虫草菌 *Cordyceps militaris* (Linn.) Link 中发现的天然核苷化合物^[1]。医学研究表明, 虫草素具有广谱的生物活性和药理作用, 可以通过抑制 mRNA 合成使细胞分化、

收稿日期: 2016-04-10

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (715020); 大连工业大学青年基金项目 (67007907)

作者简介: 王亮 (1986-), 男, 博士, 讲师, 主要从事微生物发酵与生理代谢研究

通讯作者: 金朝霞 (1972-), 女, 博士, 副教授, 主要从事资源微生物及其生物活性物质研究; 周广麒 (1957-), 男, 教授, 主要从事微生物技术及产业化研究

凋亡, 达到具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌、抑制肿瘤生长和抗肿瘤转移等功能^[2,3]。

虫草素可以通过化学合成和生物方法获得。化学合成法由于其原料成本高、合成工艺繁琐、产物收率低以及副产物多等缺点限制了其工业应用。生物法获得虫草素包括两条途径: 1) 直接从天然或人工培育的蛹虫草子实体中提取; 2) 经过液体发酵, 从蛹虫草菌丝体和发酵液中提取。由于蛹虫草子实体的培养周期长, 培养条件复杂且不易控制, 而且其虫草素含量仅有 0.2~0.6%, 不能满足生产要求。液体发酵生产周期短, 发酵过程容易控制, 产物生成目的性强。虽然液体发酵已经应用于虫草素生产, 且逐渐发展为虫草素

的主要生产手段,但虫草素的产量较低,限制了其进一步大规模发展。

如何提高虫草素产量成为学术界和生产研究的工作中心,目前,相关研究工作主要集中在高产突变菌株的选育和发酵工艺条件优化上。国内外学者通过原生质体融合技术、亚硝基胍等理化因子诱变、离子束修饰^[4]、高能质子束辐射^[4,5]等突变手段成功获得了虫草素高产菌株,此外,应用不同发酵策略(光照振荡、光照静止以及黑暗静止实验^[6,7]等)、外源添加前体物质(腺嘌呤、腺苷、丙氨酸、L-天冬氨酸以及甘氨酸^[8,9]等)和关键金属离子(FeSO_4 ^[10]等)进一步提高了虫草素的产量。日本 Fukui 大学的 SK Das 等通过高能质子束辐射处理蛹虫草菌,获得突变菌株 G81-3,经发酵优化后虫草素产量达到了 14.30 g/L,是目前文献报道的最高浓度^[4,5,9]。

微生物嘌呤代谢途径中,肌苷酸(IMP)可代谢形成黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤,腺嘌呤相关代谢途径被认为参与虫草素的合成。如果阻断黄嘌呤和鸟嘌呤的合成代谢,使代谢通量更多地流向腺嘌呤或腺苷,有利于提高虫草素的产量。本研究利用超声波辐射和硫酸二乙酯复合诱变技术对野生型蛹虫草菌进行诱变,定向筛选黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型突变菌株,并比较了其液体深层发酵性能。最后,考查了虫草素结构类似物的添加对双重营养缺陷型突变菌株虫草素合成的影响,并对虫草素的生物合成途径进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 菌种

本实验中所涉及蛹虫草菌(*Cordyceps militaris* CGMCC 3.3149)以及枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* CGMCC 1.1849)均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,保存于大连工业大学生物工程系。

1.1.2 培养基

(1)基础培养基(Minimal medium, MM):蔗糖 30 g/L、 NaNO_3 3 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g/L、KCl 0.50 g/L 和琼脂 20 g/L。

(2)嘌呤添加培养基(Purine supplemented medium, PSM):向基础培养基中添加 0.10 g/L 黄嘌呤和 0.10 g/L 鸟嘌呤,调节 pH 至 7.00±0.01。

(3)PDA 培养基:取马铃薯 200 g,去皮切碎后,加水煮沸,经 8 层纱布过滤获得滤液,加入葡萄糖 20 g,维生素 B1 0.01 g,加去离子水定容至 1 L,自然 pH。

(4)发酵培养基:葡萄糖 30 g/L、酵母粉 15 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g/L、 KH_2PO_4 0.50 g/L、黄嘌呤 0.10 g/L 和鸟嘌呤 0.10 g/L,调节 pH 至 7.00±0.01。

(5)营养琼脂培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 15 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂 20 g/L,蒸馏水 1 L, pH 7.00±0.01。

以上培养基均使用高压蒸汽灭菌,灭菌条件为 121 °C, 20 min。

1.1.3 化学试剂

本研究中所涉及鸟嘌呤(Guanine)、腺嘌呤(Adenine)、黄嘌呤(Xanthine)、次黄嘌呤(Hypoxanthine)、腺苷(Adenosine)和虫草素(Cordycepin)等标准品均购自美国 Sigma 公司,此外,分析纯硫酸二乙酯(Diethyl Sulfate, DES)购自天津市光复精细化工研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬液制备

将斜面活化的 *C. Militaris* CGMCC 3.3149,接种于液体活化培养基中,于 26 °C, 160 r/min 培养 6 d,取样收集发酵液,经无菌脱脂棉过滤收集孢子,用 0.90% (m/V) 无菌生理盐水重悬稀释,使孢子浓度在 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 范围内,获得孢子悬液。

1.2.2 超声波辐射诱变、DES 诱变以及复合诱变

(1)超声波辐射诱变:取 8 mL 孢子悬液置于 0 °C 冰水浴中,经 200 W、22 kHz 的超声波辐射处理 0、15、25、35、45、50 和 60 min 后,吸取 100 μL 菌液涂布于基础培养基上,26 °C 培养 7 d,统计培养皿中的单菌落数,计算致死率,以此确定超声波辐射诱变的时间。

(2)硫酸二乙酯(DES)诱变:用无菌的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS, pH 7.00±0.01)将孢子悬液稀释 10、10²、10³ 和 10⁴ 倍,分别吸取 20 mL 于小烧杯中,在磁力搅拌下加入 200 μL、0.10% DES 溶液,室温诱变 0、15、25、35、45、50 和 60 min。吸取 1 mL 诱变后的孢子悬液,加入 1 mL、1 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液终止反应,吸取 100 μL 涂于基础培养基上,26 °C 培养 7 d,计算致死率,并以此确定 DES 诱变的时间。

(3)复合诱变:依据超声波辐射诱变和 DES 诱变的致死率结果,选择合适倍数稀释孢子悬液,向烧杯中缓慢加入 DES 使溶液浓度达到 1%(V/V),在 0 °C 冰水浴中进行超声波辐射诱变(200 W, 22 kHz)处

理 0、15、25、35、45、50 和 60 min, 加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液终止反应, 吸取 100 μL 涂于基础培养基上, 26 $^\circ\text{C}$ 培养 7 d, 计算致死率, 细胞致死率为 75~90% 之间为宜, 并以此确定复合诱变的最适条件。

1.2.3 致死率计算

致死率计算公式如下:

$$\text{致死率}(\%) = \frac{N_0 - N}{N_0} \times 100\%$$

式中, N_0 为对照实验组的单菌落数; N 为实验组的单菌落个数。

1.2.4 营养缺陷型突变株定向筛选实验

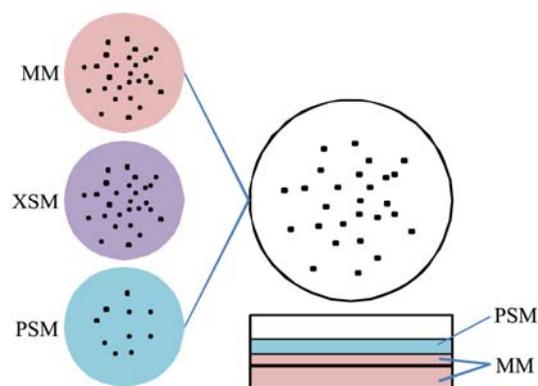


图1 黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型的筛选

Fig.1 Screening of xanthine and guanine auxotrophic mutants

本研究采用夹层培养法筛选营养缺陷型突变株, 如图1所示。首先在无菌的空培养皿中倒入少量基础培养基 (Minimal medium, MM), 待凝固后, 加入 100 μL 经诱变的孢子悬液, 涂布均匀, 静置 10 min 后, 继续倒入薄层基础培养基, 凝固后, 恒温 26 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h, 对首次出现的菌落作出标记, 然后再向皿内倒入一层嘌呤添加培养基 (Purine supplemented medium, PSM), 继续培养后长出形态较小的新菌落。用灭菌的牙签将小菌落菌株逐一接种于装有基础培养基 (MM)、黄嘌呤添加培养基 (Xanthine supplemented medium, XSM)、嘌呤添加培养基 (PSM) 的培养皿中, 仅在后者长出菌落的为黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型突变菌株 (*xan⁻*, *gua⁻*)。

在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 发酵培养基, 按 10% (V/V) 接种量接入活化后的黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型突变株 (*xan⁻*, *gua⁻*), 在 26 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min 条件下连续培养 16 d, 取样检测生物量、残糖和虫草素浓度, 经过筛选获得虫草素高产菌株。

1.2.5 腺嘌呤、次黄嘌呤和腺苷添加实验

取 250 mL 三角瓶 24 个, 分为 4 组, 每瓶装入发酵培养基 90 mL, 按 10% (V/V) 接入双重营养缺陷型突变株 (*xan⁻*, *gua⁻*) 种子液, 26 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min 摇瓶培

养。第 6 d 向其中 3 组三角瓶中分别添加腺嘌呤、次黄嘌呤和腺苷各 1.0 g/L, 另一组不添加任何物质, 为对照组, 同时发酵 20 d, 每隔 48 h 取样, 检测发酵液中虫草素、腺苷、腺嘌呤、及次黄嘌呤的含量。

1.2.6 抑菌实验

将革兰氏阳性指示菌枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* CGMCC 1.1849 的细胞悬浊液均匀涂布于营养琼脂培养基上。制作直径为 60 mm 的滤纸片, 浸渍 10 μL 上述提取的虫草素发酵液, 放置于指示菌平板上, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 观测各突变株对枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 生长的抑菌情况, 测量抑菌圈大小, 以此评定相应突变菌株的虫草素生产能力。

1.3 分析方法

蛹虫草菌发酵液经 9000 r/min、5 min 离心获得上清液和菌体部分, 上清液部分中虫草素、腺苷、腺嘌呤和次黄嘌呤的含量采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定。选用 Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪系统结合 Waters 2998 紫外可见光检测器进行定量分析。选用反相 C18 高效液相色谱柱 (Unitary, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 分别以 20 mM NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (pH 6.89 \pm 0.01) 和甲醇 (色谱纯) 为流动相 A 和流动相 B 进行梯度洗脱, 流速设定为 1 mL/min, 柱温为 30 $^\circ\text{C}$, 进样量为 10 μL , 检测波长为 260 nm, 色谱分离梯度洗脱条件如表 1 所示。

表1 HPLC梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions for HPLC analysis

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	100	0
5	100	0
10	95	5
40	60	40
50	60	40
55	100	0
60	100	0

此外, 菌体部分用去离子水清洗两遍, 再次离心收集菌体, 经真空冷冻干燥 (-50 $^\circ\text{C}$) 获得冻干菌体, 称量并计算出生物量浓度。

1.4 数据统计分析

每组实验均设置 3 个生物重复, 同时对于每个样品重复检测 3 次, 利用 Excel 软件对实验数据进行统计分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 超声波辐射和 DES 诱变条件的选择

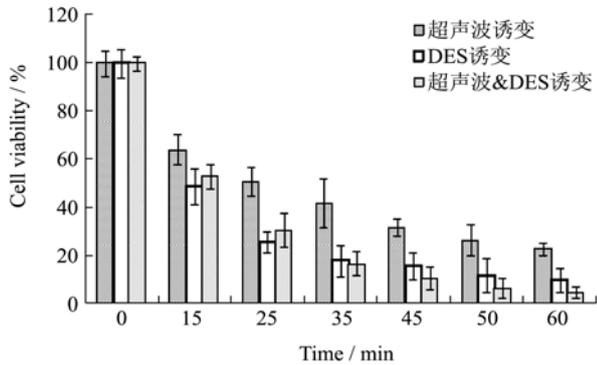


图2 三种诱变条件下细胞存活率变化

Fig.2 Changes in the cell viability of *C. militaris* under three mutagenesis conditions

微生物嘌呤代谢途径中，肌苷酸（IMP）的代谢途径可分为：1) IMP→AMP；2) IMP→XMP→GMP；3) IMP→肌苷→次黄嘌呤→黄嘌呤。另外，还有 GMP→鸟苷→鸟嘌呤，以及 XMP→黄苷→黄嘌呤，而 AMP 可进一步代谢形成腺苷和腺嘌呤，这被认为是虫草素代谢的可能途径。对于虫草素发酵研究而言，如果阻断黄嘌呤和鸟嘌呤的代谢过程，使代谢通量更多的流向腺苷或腺嘌呤的方向，有利于提高虫草素的产量，因此，本研究尝试通过物理、化学诱变获得黄嘌呤和鸟嘌呤营养缺陷型突变株。

选取 *C.militaris* CGMCC 3.3149 孢子悬液 ($10^6\sim 10^7$ 个/mL)，分别稀释至 10^3 倍，利用物理诱变因子超声波辐射和化学诱变因子 DES 对其进行单因子诱变及复合诱变，诱变时间为 0、15、25、35、45、50 和 60 min，结果如图 2 所示。复合诱变具有协同效应，能提高正突变率，从诱变强度和诱变效果看，采用复合诱变均优于单因子诱变。

通常当微生物致死率在 75~90% 时，发生正向突变的几率比较高，此时正向突变概率较高。图 2 中三种诱变条件下细胞死亡率随诱变时间延长而增大，但当复合诱变 35 min 和 45 min 时，致死率分别为 83% 和 89%，均比较适合菌落的筛选。本研究最终选用的最佳诱变条件为：1% DES 和 22 kHz 超声波辐射复合诱变，诱变时间 45 min。

2.2 高产虫草素的营养缺陷型突变株的定向筛选

针对夹层培养法筛选得到的 7 株黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型突变株 (*xan⁻, gua⁻*)，将其分别接种到发酵培养基中摇瓶培养 16 d，然后将发酵液离心收

集菌体和上清液，在指示菌 *B. subtilis* 培养皿上进行上清液抑菌试验，结果如图 3 所示。

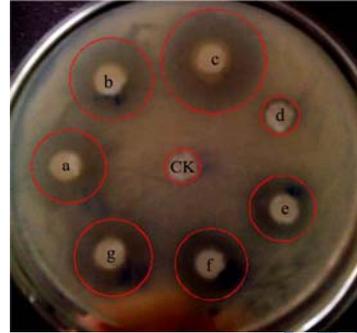


图3 双重营养缺陷型突变株 (*xan⁻, gua⁻*) 发酵液的抑菌试验
Fig.3 Antimicrobial activity of the fermentation broth from the double auxotrophic mutants (*xan⁻gua⁻*)

利用高效液相色谱对 7 株双重营养缺陷型突变株 (*xan⁻, gua⁻*) 第 16 d 的发酵液中虫草素进行了定量分析，结果如表 2 所示。虫草素产量与 *B.subtilis* 平板上抑菌圈大小基本相符。突变株 *xan⁻gua⁻-c* 的抑菌圈最大，同时生产虫草素的能力较出发菌株提高了约 40%。

表2 *C. militaris* 双重营养缺陷型突变株的抑菌效果和虫草素产量

Table 2 Antibacterial activity and cordycepin production of double auxotrophic mutant of *C. militaris*

Mutants	D/mm	<i>C_{broth}</i> /(mg/L)
<i>xan⁻gua⁻-a</i>	14.99±0.89	715.3
<i>xan⁻gua⁻-b</i>	15.08±0.39	850.3
<i>xan⁻gua⁻-c</i>	20.45±0.93	988.8
<i>xan⁻gua⁻-d</i>	6.51±0.31	744.3
<i>xan⁻gua⁻-e</i>	12.38±0.90	725.2
<i>xan⁻gua⁻-f</i>	14.15±0.77	957.9
<i>xan⁻gua⁻-g</i>	16.80±0.21	821.7
Control	6.09±0.16	705.4

注：*C_{broth}* 表示第 16 d 发酵液中虫草素浓度，g/L；D 表示抑菌圈直径，mm。

2.3 腺嘌呤和腺苷添加对虫草素生成的影响

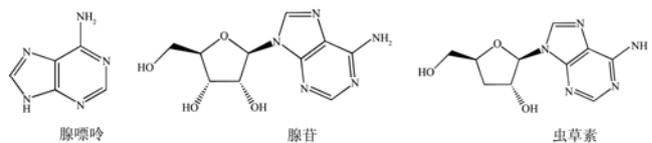


图4 腺嘌呤、腺苷和虫草素的化学结构式

Fig.4 Chemical structures of adenine, adenosine, and cordycepin

为了研究嘌呤结构类似物对蛹虫草菌液体发酵产虫草素的影响，并根据发酵过程中核苷类物质含量的变化规律，进一步探索核苷类代谢物之间彼此的内在

联系。本研究考查了添加腺嘌呤和腺苷(图4)对于营养缺陷型突变株 xan^-gua^- -c液体发酵合成虫草素的影响。

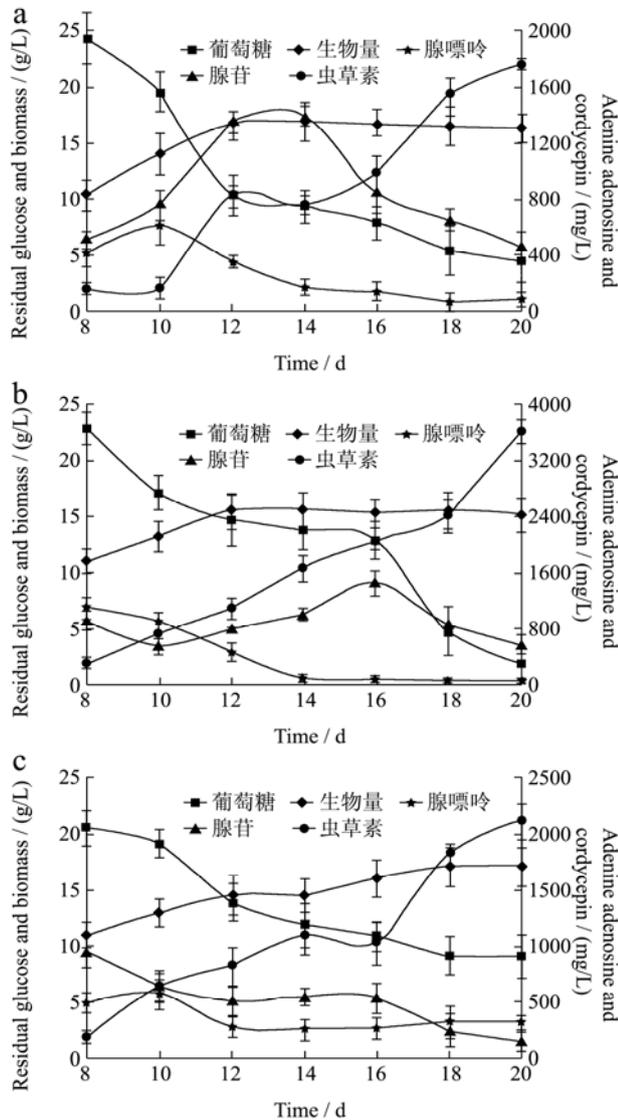


图5 腺嘌呤和腺苷添加对突变株 xan^-gua^- -c液体发酵的影响

Fig.5 Impact of the addition of adenine and adenosine on the fermentation of mutant xan^-gua^- -c

注: a, 对照组; b, 腺嘌呤添加组; c, 腺苷添加组。

图5是添加1.0 g/L腺嘌呤和1.0 g/L腺苷后发酵液中残糖、生物量、虫草素、腺嘌呤和腺苷的浓度的变化曲线。结果显示, 外源添加腺嘌呤和腺苷能明显提高双重营养缺陷型突变株 xan^-gua^- -c液体发酵合成虫草素的能力, 第20 d发酵液中虫草素浓度分别达到3.59 g/L和2.35 g/L, 是对照组(1.76 g/L)的2.04和1.34倍; 实验组和对照组的发酵液中葡萄糖浓度在第20 d均有残留, 对照组、腺嘌呤添加组合腺苷添加组的残糖浓度分别为4.40 g/L、2.00 g/L和9.10 g/L, 然而, 腺嘌呤的添加能促进底物葡萄糖的利用, 而腺苷的添加却不利于菌体利用葡萄糖。对照组和嘌呤添加组的生物量

浓度在第12 d都达到最大值, 分别为16.60 g/L和15.40 g/L, 之后的8 d生物量浓度几乎保持不变, 然而, 腺苷添加组的生物量浓度处于不断上升阶段, 第20 d达到17.10 g/L, 表明蛹虫草菌液体发酵过程中虫草素合成与生物量积累无直接关联。

此外, 本研究还考察了发酵液中腺嘌呤、腺苷以及虫草素浓度的变化, 对照组和实验组中腺嘌呤浓度均在500 mg/L以下, 即使是腺嘌呤添加组, 其发酵液中腺嘌呤浓度也被迅速吸收利用。有趣的是, 在对照组中(图5a), 第8~12 d之间发酵液中虫草素浓度与腺嘌呤浓度变化相反, 而第12~20 d虫草素浓度与腺苷浓度变化相反; 对于腺嘌呤添加组(图5b), 在第16~20 d发酵液中腺苷与虫草素浓度变化趋势相反, 然而, 在第8~16 d发酵液中虫草素与腺嘌呤浓度的变化相反; 在腺苷添加组中(图5c), 第8 d以后发酵液中腺苷与虫草素浓度变化趋势相反, 表明腺嘌呤和腺苷都可能是虫草素合成的前体, 其中某一种物质大量存在时会优先利用其作为虫草素合成的前体, 而在自然发酵条件下, 蛹虫草菌倾向于优先利用腺嘌呤作为虫草素合成的前体物质。

2.4 虫草素生物合成机理初探

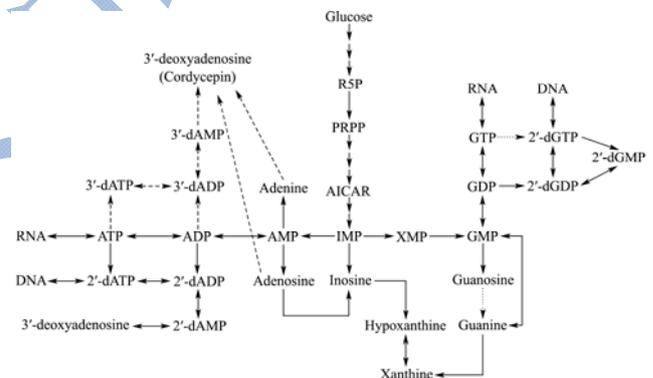


图6 嘌呤代谢及虫草素代谢途径

Fig.6 De novo purine nucleotide pathway and cordycepin biosynthetic pathway

从虫草素的发现至今已经半个多世纪了, 但对于虫草素生物合成途径的了解仍相当有限。1961年, NM Kredich等利用同位素标记的[8-¹⁴C]腺嘌呤和[1-¹⁴C]和[6-¹⁴C]葡萄糖对虫草素的生物合成途径进行了研究^[11], 结果表明腺嘌呤和葡萄糖都能转化为葡萄糖; 随后, R J Suhadolnik等通过外源添加腺苷证实了其可作为前体参与虫草素合成, 且不发生糖苷键断裂^[12]。1976年, M B Lennon等利用同位素标记的[U-¹⁴C]腺苷和[3-³H]核糖考查虫草素的生物合成, 推测其存在类似于2'-脱氧腺苷的合成途径^[13,14]。之后, 却鲜见对虫草素生物合成途径的直接报道。

迄今,对于虫草素的合成机理存在三种假说(图6):1)以腺嘌呤为前体物质进行虫草素合成;2)以腺苷为前体物质进行虫草素合成;3)认为虫草素(3'-脱氧腺苷)具有类似2'-脱氧腺苷的合成途径:IMP进一步反应生成AMP、ADP和ATP,其中ADP和ATP可以脱氧生成2'-dADP、2'-dATP、3'-dADP以及3'-dATP,类似2'-dAMP的形成,3'-dADP和3'-dATP经过脱磷酸基团形成3'-dAMP,再进一步脱磷酸基团形成虫草素。在本研究中,通过添加一定浓度的腺嘌呤和腺苷,发现腺嘌呤和腺苷均能大大促进虫草素的积累,且蛹虫草菌会优先选择腺嘌呤作为前体物,研究结果表明蛹虫草菌中可能同时存在腺嘌呤→虫草素以及腺苷→虫草素的代谢途径,甚至这两条合成途径本就是重叠的,但作为前体物质而言,腺嘌呤较腺苷更为直接。

3 结论

本研究利用一株生长性状良好的蛹虫草野生菌为出发菌株,采用联合DES-超声波辐射复合诱变技术,经过*B. subtilis*抗菌试验初筛,液体发酵复筛,获得了黄嘌呤和鸟嘌呤双重营养缺陷型突变株*xan⁻gua⁻c*,虫草素产量比出发菌株提高了40%,约1.76 g/L(发酵20 d)。通过向发酵培养基中添加腺苷和腺嘌呤,终点虫草素产量较对照组分别提高了33.5%和103.5%,达到2.35 g/L和3.59 g/L。研究表明,腺嘌呤或腺苷可能同时作为前体物质参与虫草素合成,且阻断黄嘌呤和鸟嘌呤的合成代谢是促进蛹虫草菌积累虫草素的有效策略之一。

参考文献

- [1] Cunningham K, Manson W, Spring F. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) link [J]. Nature, 1950, 166(4231): 949
- [2] Pan Bo-syong, Wang Yang-kao, Lai Meng-shao, et al. Cordycepin induced MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis by regulating p38 MAPKs and PI3K/AKT signaling pathways [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13372
- [3] Tuli H S, Sharma A K, Sandhu S S, et al. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential [J]. Life Sciences, 2013, 93(23): 863-869
- [4] Das S, 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
- [5] 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
- [6] 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
KANG Chao, WEN Ting-chi, KANG Ji-chuan, et al. Effects of additives and different culture conditions on cordycepin production by the medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2012, 31(3): 389-397
- [7] 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
- [8] 王蕾,罗巍,胡瑕,等.虫草素高产菌株的筛选及不同添加物对虫草素产量的影响研究[J].菌物学报,2012,31(3):382-388
WANG Lie, LUO Wei, HU Xia, et al. Screening of high-yield strain and medium optimization for maximum production of cordycepin by *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2012, 31(3): 382-388
- [9] Masuda M, Das S K, Fujihara S, et al. Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(1): 55-60
- [10] Fan Dan-dan, Wang Wei, Zhong Jian-jiang. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 60(2): 30-35
- [11] Kredich N M, Guarino A J. Studies on the biosynthesis of cordycepin [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1961, 47(3): 529-534
- [12] Suhadolnik R, Weinbaum G, Meloche H. The biosynthesis of cordycepin [J]. Journal of the American Chemical Society, 1964, 86(5): 948-949
- [13] Lennon M B, Suhadolnik R J. Biosynthesis of 3'-deoxyadenosine by *Cordyceps militaris*: mechanism of reduction [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1976, 425(4): 532-536
- [14] Li Xiang, Li Ying, Zhu Ying-jie, et al. Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps Sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis [J]. Genomics, 2014, 103(1): 154-159