

不同添加物对蛹虫草液体发酵虫草素的影响

秦鹏 王龙* 路等学 赵玉卉 韩融冰

(甘肃省科学院 生物研究所,兰州 730000)

摘要 为探讨 8 种微量添加物(维生素 B₁、核黄素、烟酰胺、腺嘌呤、D-泛酸钙、叶酸、钴胺素以及甘氨酸与腺嘌呤混合物)对蛹虫草菌发酵液虫草素产量的影响,筛选提高虫草素产量的最佳方法,将不同质量浓度的微量添加物单独加入蛹虫草液体发酵培养基中,以 HPLC 法测定发酵液的虫草素产量。结果表明:甘氨酸和腺嘌呤的混合物、腺嘌呤、核黄素、D-泛酸钙均能显著促进虫草素的生物合成,适宜添加质量浓度为:甘氨酸 14 g/L 和腺嘌呤 2 g/L 的混合物、腺嘌呤 2 g/L、核黄素 1 g/L、D-泛酸钙 2 g/L;维生素 B₁ 和钴胺素均能促进虫草素的生物合成,适宜添加质量浓度均为 2 和 2 g/L;而烟酰胺和叶酸均抑制虫草素的生物合成。其中,添加甘氨酸 14 g/L 和腺嘌呤 2 g/L 的混合物对发酵液虫草素产量的提高作用最显著,比对照提高了 103%。当甘氨酸与腺嘌呤的质量浓度比为 7:1 时,两者通过协同互补过程促进虫草素合成的作用最为显著;此外,本研究认为甘氨酸和腺嘌呤分别由从头合成和补救合成途径共同促进了虫草素的生物合成。

关键词 蛹虫草;微量添加物;液体发酵;虫草素

中图分类号 TS201.3

文章编号 1007-4333(2017)01-0068-08

文献标志码 A

Effects of different additives on cordycepin production by liquid fermentation using *Cordyceps militaris* mycelia

QIN Peng, WANG long*, LU Dengxue, ZHAO Yuhui, HAN Rongbing

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract In order to select additive from 8 kinds of additives and its optimal concentration, different concentrations of vitamin B₁, riboflavin, nicotinamide, adenine, D-calcium pantothenate, folic acid, cobalamin, mixture of glycine and adenine were added to liquid fermentation broth, and the effects of these additives on cordycepin production by *Cordyceps militaris* mycelia were detected by HPLC. The results showed that four additives promoted cordycepin production significantly. These additives were mixture of glycine and adenine (14 and 2 g/L), adenine (2 g/L), riboflavin (1 g/L), D-calcium pantothenate (2 g/L). Vitamin B₁ and cobalamin were less effective additives while nicotinamide, and folic acid inhibited cordycepin production. The mixture of glycine and adenine (14 g/L and 2 g/L, respectively) was the best of 8 kinds of additives where the production of cordycepin reached 300.868 g/mL. Synergism effect was strongest of all ratios when the concentration ratio between glycine and adenine was 7:1. Glycine and adenine promoted materials production of biosynthesis of cordycepin through denovo and salvage pathway, respectively.

Keywords *Cordyceps militaris*; trace additives; liquid fermentation; cordycepin

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)是一种药食两用真菌,现为虫草属真菌研究的模式种,其多种活性成份(虫草素、腺苷、虫草多糖等)含量均明显高于冬虫

夏草^[1],其中,虫草素作为蛹虫草重要的生物活性成份,具有抑制肿瘤、抑菌、增强免疫等诸多功效^[2],而且,虫草素通过 ROS 介导的细胞凋亡途径治疗 T

收稿日期:2016-01-20

基金项目:甘肃省科学院青年科技创新基金项目(2014QN-07);甘肃省科学院青年科技创新基金项目(2013QN-05)

第一作者:秦鹏,助理研究员,主要从事食(药)用真菌学研究,E-mail:kingkerberos@163.com

通讯作者:王龙,副研究员,主要从事草地微生物多样性及其资源利用研究,E-mail:wanglong-0106@163.com

淋巴细胞白血病^[3-4]，美国食品药品监督管理局(FDA)已批准将虫草素作为治疗 T 淋巴细胞白血病的药物进入临床 2 期试验^[5]。

目前，虫草素的生产途径为化学合成和生物合成，化学合成难度大、成本高、工艺复杂、产量极低且易产生毒副产品，此外，从蛹虫草子实体提取虫草素的生产周期长且成本高，也不利于虫草素的生产，而利用蛹虫草的液体发酵生产虫草素具有效率高、生产周期短和易于控制等诸多优点，使得液体发酵方式成为虫草素生产的主要途径，然而，国内的蛹虫草液体发酵虫草素产量较低，提高虫草素产量的问题亟待解决。

目前，通过优化温度、培养方式、碳氮源、提取及测定方法等手段提高虫草素产量的研究报道较多^[6]，而从生物代谢的角度研究微量添加物对虫草素产量影响的研究报道较少。

发酵液和菌丝体均含虫草素，虫草素作为蛹虫草菌丝体的次级代谢产物，90% 以上被分泌到发酵液中^[7]，故胞外虫草素含量是衡量蛹虫草液体发酵虫草素含量的重要指标。本研究对 8 种微量添加物维生素 B₁、核黄素、烟酰胺、腺嘌呤、D-泛酸钙、叶酸、钴胺素、不同质量比的甘氨酸和腺嘌呤混合物对发酵液虫草素产量的影响从生物代谢的角度进行探讨，旨在为蛹虫草液体发酵虫草素产量的提高提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株：蛹虫草(*Cordyceps militaris*)菌株(编号：3.4655)，购自中科院微生物研究所菌种保藏中心。

虫草素标准品购自中国药品生物制品检定所。甲醇为德国默克公司色谱纯甲醇。其余试剂除营养琼脂(NA)外，均为市售分析纯，水为市售纯净水。平皿培养基：营养琼脂 3.3 g、纯净水 1 000 mL。种子培养基：葡萄糖 30 g/L，蛋白胨 8 g/L，酵母粉 8 g/L，KH₂PO₄ 1 g/L，pH 为自然值。基础发酵培养基：葡萄糖 35 g/L、蛋白胨 17 g/L，KH₂PO₄ 1 g/L，MgSO₄·7H₂O 1 g/L，pH 为自然值。

Waters 1525 高效液相色谱，配二极管阵列检测器(2998 PDA)和在线脱气机，美国 Waters 公司；PHS3C 型 pH 计，E-201-C 复合电极，上海乐平科学仪器有限公司；SPJ-150 生化培养箱，上海君竺仪器制造有限公司；HZQ-QX 卧式空气恒温摇床，北京

东联哈尔仪器制造有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 方 法

平皿培养：将 15 mL 灭菌平皿培养基在无菌条件下倒入平皿制成平板，冷却后，用打孔器向平板中心接入 3 mm 大小菌块，20 °C 黑暗条件下培养 9 d。

种子液：无菌条件下，用打孔器向装有 300 mL/500 mL 种子培养基的三角瓶中接入 3 mm 大小的 6 个菌块，25 °C、黑暗、120 r/min 摇床培养 3 d 制成种子液。

第 1 组微量添加物筛选：设置维生素 B₁、核黄素、烟酰胺、腺嘌呤、D-泛酸钙的添加质量浓度梯度为 0.5、1.0、2.0 和 4.0 g/L，对照组 CK1 不添加微量添加物。将 200 mL 基础培养基倒入 500 mL 锥形瓶，分别单独添加不同质量浓度梯度的微量添加物，121 °C 灭菌 30 min，待冷却后，无菌条件下接入 5% 的种子液，于 25 °C、黑暗、160 r/min 摇床培养 6 d，发酵液经 0.22 μm 滤膜过滤后测定虫草素产量和 pH。

第 2 组微量添加物筛选：通过第 1 组试验明确高产虫草素的微量添加物及其添加方法，将该微量添加物及其添加方法带入第 2 组试验。在第 2 组试验中，设置微量添加物叶酸、钴胺素的添加质量浓度梯度为 0.5、1.0、2.0 和 4.0 g/L，甘氨酸和腺嘌呤混合物中两者质量浓度比值：0 : 1、1 : 1、4 : 1、7 : 1、10 : 1 和 13 : 1，对照组 CK2 不添加微量添加物。第 2 组试验的处理方法与第 1 组相同，最终筛选出最佳的高产虫草素的微量添加物及其添加方法。

1.2.2 HPLC 法测虫草素条件

色谱柱：Zorbax SB C18 柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相：甲醇与水的体积比为 15 : 85，流速 1 mL/min，柱温 35 °C，进样量 20 μL，检测波长 260 nm。

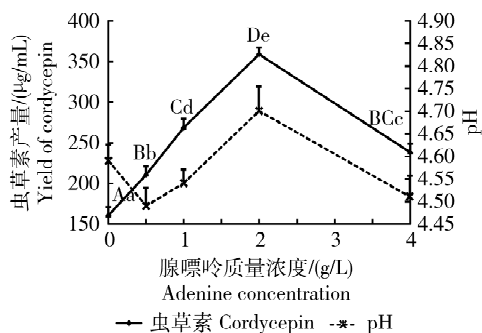
每组试验设置 3 个重复，结果采用均值±标准差表示，数据用 SPSS 软件进行统计，采用 Tukey 法进行多重检验，绘图软件采用 EXCEL。

2 结果与分析

2.1 腺嘌呤对虫草素产量的影响

在设置的腺嘌呤添加质量浓度范围内，发酵液虫草素产量均显著高于对照(图 1)，说明添加腺嘌呤能显著促进虫草素的生物合成。随着腺嘌呤添加质量浓度的增大，虫草素产量迅速增加，当腺嘌呤质

量浓度为 2 g/L 时,虫草素产量达到 358.958 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 优于其他添加质量浓度下的虫草素产量 ($P < 0.01$), 说明腺嘌呤作为虫草素生物合成的前体物质, 直接迅速的促进虫草素的生物合成。当腺嘌呤添加质量浓度超过 2 g/L 后, 虫草素产量随腺嘌呤质量浓度的增大反而快速下降, 说明腺嘌呤 2 g/L 的添加质量浓度为一阈值, 超过该阈值后, 菌体的代谢产物失衡, 使得虫草素的生物合成开始受到抑制; pH 呈先上升后下降趋势。因此, 腺嘌呤的适宜添加质量浓度为 2 g/L, 发酵液虫草素产量比对照提高了 124%。



对照组 (CK1 和 CK2) 微量营养物的添加质量浓度均为 0 g/L; 图中数据点上的标识为虫草素产量的统计分析结果。不同大写字母表示在 0.01 显著性水平下有差异; 不同小写字母表示在 0.05 显著性水平下有差异。下同。

Concentration of additive added to control (CK1 and CK2) was 0 g/L. Different letters above data points in the figure are results of statistical analysis of cordycepin production. Different capital letters mean difference at the 0.01 level. Different lowercase letters mean difference at the 0.05 level. The same as follows.

图 1 腺嘌呤对虫草素产量的影响

Fig. 1 Effects of adenine on cordycepin production

2.2 核黄素对虫草素产量的影响

在菌体内, 核黄素主要以递氢体 FAD^+ 等的形式参与呼吸链的能量传递过程。如图 2 所示, 随着核黄素添加质量浓度的增大, 虫草素产量快速上升至峰值 (275.308 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 该峰值显著高于其他添加质量浓度下的虫草素产量, 说明随着核黄素的添加质量浓度的增加, ATP 的生成量增多, 菌体反馈抑制高能荷而使虫草素生物合成的原料腺苷酸 AMP 快速生成; 在核黄素添加质量浓度 1~2 g/L 内, 发酵液虫草素产量随着核黄素添加质量浓度的增加反而快速降低, 显示 AMP 生成量开始快速减少, 说明 AMP 的大量生成使得菌体开始迅速地反馈抑制低能荷状态, 而此时反馈抑制高能荷的作用

开始减弱; 继续增大核黄素添加质量浓度, 发酵液虫草素产量开始缓慢下降, 说明随着能荷开始恢复平衡, 高能荷与低能荷的反馈抑制作用都开始减弱, 高能荷的反馈抑制作用尚强于低能荷反馈抑制作用, AMP 生成速率的减缓, 显示为虫草素的生物合成速率减缓; pH 呈持续上升趋势。因此, 核黄素的适宜添加质量浓度为 1 g/L, 发酵液虫草素产量比对照提高了 72%。

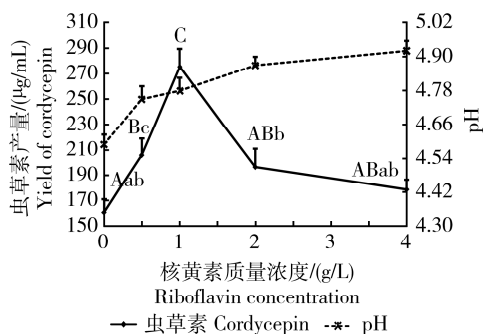


图 2 核黄素对虫草素产量的影响

Fig. 2 Effects of riboflavin on cordycepin production

2.3 烟酰胺对虫草素产量的影响

烟酰胺细胞内主要以递氢体 NAD^+ 等的形式参与呼吸链的能量代谢过程, 但与 FAD^+ 等不同, NAD^+ 参与鸟苷酸 GMP 的合成。如图 3 所示, 烟酰胺的添加显著抑制虫草素的生物合成。在设置的添加质量浓度范围内, 随烟酰胺添加质量浓度的增加, 虫草素产量持续快速下降, 说明烟酰胺的添加促进了 GMP 的合成, 同时竞争性的消耗了次黄嘌呤核苷酸 IMP, 使得 AMP 的生成量持续下降, 进而抑制了虫草素的生物合成; pH 呈持续上升趋势。

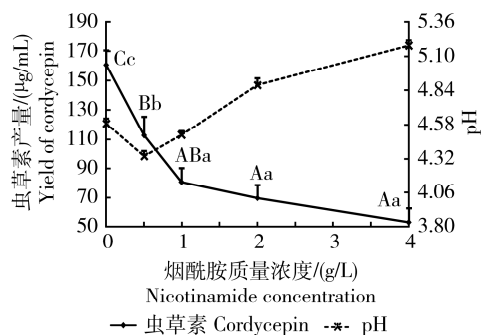


图 3 烟酰胺对虫草素产量的影响

Fig. 3 Effects of nicotinamide on cordycepin production

2.4 维生素 B₁ 对虫草素产量的影响

维生素 B1 对虫草素产量的提高作用较弱

(图 4)。随着维生素 B1 添加质量浓度的增加,发酵液虫草素产量呈先上升后下降的趋势。当维生素 B1 添加质量浓度为 2 g/L 时,发酵液虫草素产量达到峰值(186.687 g/mL),与其他添加质量浓度下虫草素产量差异不显著($P < 0.05$),当维生素 B1 添加质量浓度超过 2 g/L 时,发酵液虫草素产量开始下降,说明菌体的代谢产物失衡,影响了虫草素的生物合成;pH 呈先上升后下降趋势。因此,维生素 B1 适宜添加质量浓度为 2 g/L,发酵液虫草素产量比对照提高了 19%。

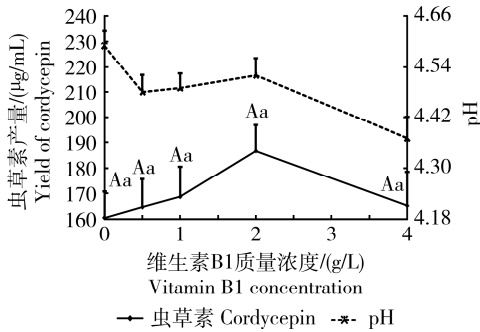


图 4 维生素 B1 对虫草素产量的影响

Fig. 4 Effects of vitamin B1 on cordycepin production

2.5 D-泛酸钙对虫草素产量的影响

D-泛酸钙在菌体内以辅酶 A 和钙离子的形式存在,辅酶 A 对菌体能量代谢有着重要的作用。D-泛酸钙的添加能促进虫草素的生物合成(图 5)。随 D-泛酸钙添加质量浓度的增加,虫草素产量快速增加,当 D-泛酸钙质量浓度为 2 g/L,虫草素产量达到 241.022 µg/mL,优于其他质量浓度下的虫草素产量($P < 0.05$),说明 D-泛酸钙的添加不仅为细胞提供了钙素,而且促进生成大量 ATP 而使细胞呈高能荷状态,菌体反馈抑制高能荷,促进 AMP 的生成;

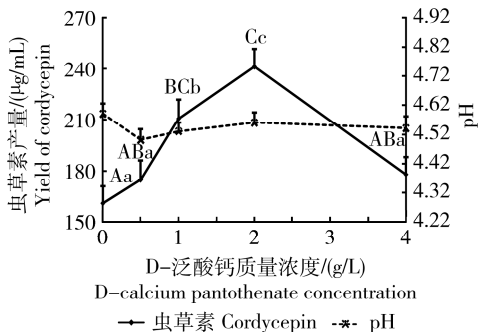


图 5 D-泛酸钙对虫草素产量的影响

Fig. 5 Effects of D-calcium pantothenate on cordycepin production

继续增加 D-泛酸钙质量浓度,虫草素产量迅速下降,说明较高的钙离子质量浓度影响了菌体的正常生理代谢,同时,由于 AMP 能荷的比例增高,菌体反馈抑制 AMP 的生成;pH 值呈先上升后下降趋势。故 D-泛酸钙适宜添加质量浓度为 2 g/L,发酵液虫草素产量比对照提高了 50%。

2.6 叶酸对虫草素产量的影响

叶酸在菌体内主要以四氢叶酸的形式存在,四氢叶酸参与了 IMP 的合成。然而,叶酸的添加抑制虫草素的生物合成(图 6)。在设置的添加质量浓度范围内,叶酸的添加降低虫草素产量,而且随着叶酸添加质量浓度的增加,虫草素产量下降越快,说明叶酸的添加可能影响了虫草素的生物合成途径或破坏了虫草素生物合成的关键原料,而且随着叶酸添加质量浓度的持续增加,虫草素产量下降速度越快,说明叶酸的添加对虫草素合成关键原料的消耗也越大;pH 呈持续下降趋势。

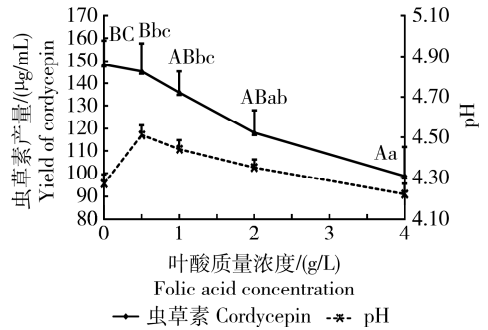


图 6 叶酸对虫草素产量的影响

Fig. 6 Effects of folic acid on cordycepin production

2.7 钴胺素对虫草素产量的影响

钴胺素的添加对虫草素生物合成的促进作用较弱(图 7)。随着钴胺素添加质量浓度的增加,虫草素产量缓慢上升至最大 165.537 µg/mL,与其他添

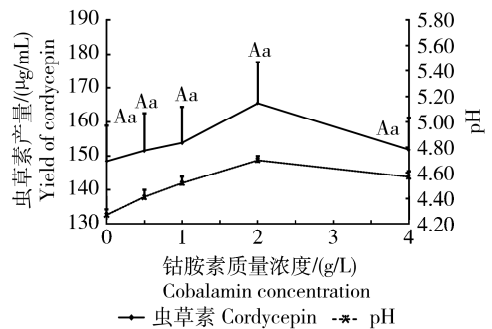


图 7 钴胺素对虫草素产量的影响

Fig. 7 Effects of cobalamin on cordycepin production

加质量浓度下的虫草素产量无显著差异 ($P < 0.05$), 说明钴胺素添加有利于菌体初级代谢产物的生成, 进而促进虫草素的生物合成; 继续增加钴胺素的添加质量浓度, 虫草素产量开始缓慢下降, 说明钴胺素添加质量浓度超过 2 g/L 后, 初级代谢产物失衡影响了虫草素的生物合成过程; pH 呈先上升后下降趋势。故钴胺素适宜添加质量浓度为 2 g/L, 发酵液虫草素产量比对照提高了 12%。

2.8 甘氨酸和腺嘌呤混合物对虫草素产量的影响

设置 6 份混合物中的甘氨酸添加质量浓度依次为 0、2、8、14、20 和 26 g/L, 腺嘌呤质量浓度均为其适宜添加质量浓度 2 g/L (图 1)。甘氨酸和腺嘌呤联合添加促进虫草素的生物合成 (图 8), 随甘氨酸和腺嘌呤添加质量浓度比值的增加, 虫草素产量先缓慢上升后开始快速增加, 直至达到最大值 300.868 $\mu\text{g/mL}$, 优于其他添加质量浓度下发酵液虫草素产量水平 ($P < 0.01$)。说明混合物中的甘氨酸通过补救合成途径促进虫草素的生物合成, 添加质量浓度比 4:1 为一临界值, 超过该临界值后, 虫草素的生物合成速率增加; 当添加质量浓度比超过 7:1 后, 发酵液虫草素产量开始迅速下降, 说明添加质量浓度比 7:1 为一阈值, 超过该阈值后, 过量的 IMP 反馈抑制 IMP 的合成, 使得虫草素的从头合成途径受限。pH 呈先下降后上升趋势。故 14 g/L 甘氨酸和 2 g/L 腺嘌呤联合添加为混合物的适宜添加方法, 发酵液虫草素产量比对照增加了 103%。

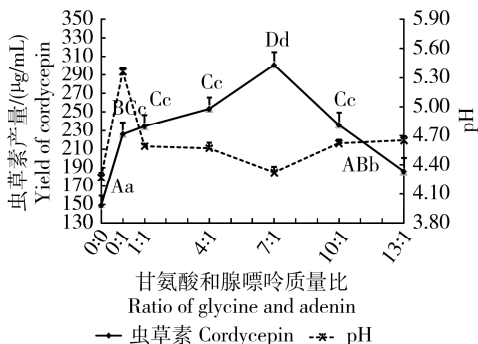


图 8 甘氨酸和腺嘌呤质量比对虫草素产量的影响

Fig. 8 Effects of the ratio of glycine and adenine on cordycepin production

3 讨论

3.1 结论

8 种微量添加物对虫草素的生物合成有不同程

度的影响。甘氨酸和腺嘌呤的混合物、腺嘌呤、核黄素、D-泛酸钙均能显著提高虫草素产量, 适宜添加质量浓度为: 甘氨酸 14 g/L 和腺嘌呤 2 g/L 混合物、腺嘌呤 2 g/L、核黄素 1 g/L 和 D-泛酸钙 2 g/L。维生素 B1、钴胺素均能提高虫草素产量, 适宜质量浓度为: 维生素 B1 2 g/L、钴胺素 2 g/L; 添加烟酰胺、叶酸均降低虫草素产量。本研究认为 14 g/L 甘氨酸和 2 g/L 腺嘌呤联合添加为提高发酵液虫草素产量的最佳方法, 发酵液虫草素产量达到 300.868 $\mu\text{g/mL}$, 比对照增加了 103%。本研究第 2 组试验的虫草素产量比第 1 组试验有所降低, 可能与菌种老化有关。

本研究将发酵液的虫草素进行了分离和提纯: 发酵液经 0.22 μm 滤膜过滤, 收集滤液, 将滤液浓缩 10 倍, 以 1 g/5 mL 固液比将预处理后的 NKA-II 大孔树脂加入到浓缩的发酵液中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min 摇床吸附 6 h, 过滤收集树脂, 将收集到的树脂按 1:5 的体积比加入到 50% 的乙醇溶液中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 温度下静态解吸 3 h, 过滤并收集滤液, 将滤液浓缩 20 倍, 用 1 mol/L 氨水调节 pH 到 9.0, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中结晶, 得到虫草素的粗结晶体, 再分别用乙醇和水对粗结晶体反复重结晶后得到纯度 90% 以上的虫草素晶体。

3.2 微量添加物对虫草素生物代谢的影响

虫草素即 3'-脱氧腺苷, 属嘌呤类生物碱, 为蛹虫草重要的次级代谢产物之一, 腺嘌呤、腺苷为其前体物质^[8-10]。通常细胞对外界刺激(培养条件、添加物等)作出应答反应, 反馈调节腺嘌呤和腺苷生成量, 从而影响虫草素的生物合成。Fan 等^[11]认为 *purA* 为调控虫草素生物合成的关键基因, 而 Fe^{2+} 可诱导 IMP 合成虫草素。Lin 等^[12] 研究显示 5' 核苷酸酶能显著促进虫草素的生物合成, 5' 核苷酸酶促进 AMP 水解为腺苷, 说明 AMP 水解为虫草素生物合成重要环节。Fan 等^[11] 和 Lin 等^[12] 分别由从头合成和补救合成途径初步探讨了虫草素生物合成机制。国内外关于微量添加物对虫草素产量的影响如表 1 所示。

甘氨酸^[15,20-21]、不同类型的氨基酸^[16]、腺嘌呤^[22] 均能促进虫草素的生物合成, 而且甘氨酸和腺嘌呤通过协同互补作用显著促进虫草素的生物合成^[23], 但相关研究均未就甘氨酸和腺嘌呤的最佳联合添加的方法进行探讨。本研究认为单独添加腺嘌呤、甘氨酸和腺嘌呤联合添加均能显著促进虫草素

表 1 微量营养物质对蛹虫草菌丝体液体发酵产虫草素的影响

Table 1 Effects of trace nutrients on cordycepin production by mycelium of *Cordyceps militaris* in liquid fermentation

参考文献 References	微量营养物质/(g/L) Minor component	虫草素产量 增长率/% Growth rate of cordycepin production	虫草素产量 Cordycepin production
[11]	硫酸亚铁(1.000)	70.0	(596.59±85.50)/(μg/mL)
	甘氨酸(1.000)	22.0	1 220.00/(μg/mL)
	L-天冬氨酸(1.000)	16.0	1 160.00/(μg/mL)
	L-谷氨酰胺(1.000)	24.0	1 240.00/(μg/mL)
	腺嘌呤(0.100)	20.0	1 200.00/(μg/mL)
[7]	腺苷(0.500)	18.0	1 180.00/(μg/mL)
	NADP ⁺ (0.010)		
	鸟嘌呤(0.100)	≈对照	≈1 000.00/(μg/mL)
	叶酸(0.100)		
	聚乙二醇-3000 PEG-3000(1.000)		
[13]	腺苷(6.000)	200.0	8 600.00/(μg/mL)
[14]	硫酸铵(2.643)	70.0	(420.50±15.10)/(μg/mL)
	腺苷(6.000)	28.0	8 570.00/(μg/mL)
[15]	酵母膏/甘氨酸(90.000/10.000)	12.4	6 800.00/(μg/mL)
	精氨酸(2.000)	91.0	(5.87±0.05)/(mg/g)
	组氨酸(2.000)	90.0	(5.86±0.06)/(mg/g)
[16](胞内虫草素)	苏氨酸(2.000)	43.0	(4.92±0.03)/(mg/g)
	天冬酰胺(2.000)	42.0	(4.89±0.06)/(mg/g)
	丙氨酸(2.000)	5.0	(4.14±0.05)/(mg/g)
	MnSO ₄ (0.050)、	480.0	189.00/(μg/mL)
[17]	CaCl ₂ (0.600)、	370.0	153.00/(μg/mL)
	MgSO ₄ (1.000)	500.0	182.40/(μg/mL)
[9](胞内虫草素)	疫霉(0.080)和腺苷(2.000)混合物	114.0	(8.25±0.08)/(mg/g)
	维生素 B1(0.830)	75.0	82.00/(μg/mL)
[18]	B6(0.830)	50.0	120.00/(μg/mL)
	2,4-D(0.015)	60.0	96.00/(μg/mL)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O(0.500)	32.0	440.86/(μg/mL)
[19]	NAA(0.001)	20.0	629.22/(μg/mL)
[20]	甘氨酸(6.000)	63.7	1.67/(μg/mL)

生物合成：嘌呤环的 4' 碳、5' 碳和 7' 氮均来自甘氨酸，甘氨酸参与 IMP 的合成，因此，甘氨酸和腺嘌呤分别由从头合成和补救合成途径促进虫草素的生物合成；叶酸是四氢叶酸构成物质。Masuda 等^[7]认为添加 0.1 g/L 叶酸的发酵液虫草素产量接近对照水平，与本研究结论相近。本研究认为甘氨酸和四

氢叶酸依次参与了 5-磷酸核糖 PRPP 合成 IMP 的过程，但两者对虫草素生物合成的作用相反，甘氨酸在腺苷酸合成途径中促进了虫草素从头合成的关键原料的生成，而叶酸的添加促进了该关键原料的消耗。此外，Mao 等^[14]研究报道 NH⁴⁺ 显著促进虫草素的生物合成，外源性的 NH⁴⁺ 可被合成谷氨酰胺，

从而参与 PRPP 合成 IMP 的过程。因此,虫草素从头合成的关键原料可能为甘氨酸核苷酸 GAR;维生素 B₁ 为含硫维生素,是焦磷酸硫胺素 TPP 组成物质,TPP 参与 α -酮酸的氧化脱羧和酮基转移。有研究报道维生素 B₁^[18] 和含硫营养物^[19] 均能促进虫草素生物合成,与本研究结论一致。本研究认为:维生素 B₁ 是含硫营养因子,其虽然不参与 AMP 的代谢过程,但其对菌体的物质和能量代谢有促进作用,有利于虫草素的生物合成;核黄素为 FMN⁺ 和 FAD⁺ 的前体物质,烟酰胺和烟酸为 NAD⁺ 和 NADP⁺ 的前体物质。Masuda 等^[7] 的研究报道烟酸、NAD⁺、NADP⁺、NADH、NADPH 均抑制虫草素的生物合成,荆留萍等^[24] 认为添加核黄素降低胞内虫草素产量,本研究与荆留萍等的研究结论不同,可能因发酵条件、菌株差异等原因导致,而关于添加核黄素对胞内与胞外虫草素产量的影响有待深入探究。本研究认为 FMN⁺、FAD⁺、NAD⁺、NADP⁺ 促进呼吸链电子传递过程而释放大 ATP,菌体反馈抑制高能荷而促进 AMP 的生成,然而,NADPH 可反馈抑制磷酸戊糖途径的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,使得 5'磷酸核糖的生成量降低,最终影响 IMP 的合成,此外,在嘌呤核苷酸的合成途径中,IMP 是腺苷酸 AMP 和鸟苷酸 GMP 合成的共同原料,一方面,NAD⁺ 促进 GMP 的合成,消耗 IMP,另一方面,过量 GMP 的生成又反馈抑制 IMP 的合成,使得 AMP 的合成受限;泛酸钙有 D-泛酸钙、DL-泛酸钙和 L-泛酸钙 3 种形式,仅 D-泛酸钙有生物活性^[25]。本研究认为 D-泛酸钙是辅酶 A 的构成物质,虽然辅酶 A 没有直接参与嘌呤类核苷酸的代谢过程,但其主要参与能量代谢释放大 ATP 而呈高能荷状态,菌体反馈抑制高能荷促进 AMP 的生成;泛酸钙也为菌体生长提供钙素,周思静等^[13] 认为添加钙离子可促进虫草素的生物合成;钴胺素主要为(基团)变位酶和甲基转移酶的辅酶。本研究认为钴胺素的相关辅酶对维持菌体正常的生理代谢功有重要作用,但其并不直接参与嘌呤核苷酸的代谢过程,因此,钴胺素对虫草素的生物合成有较弱的促进作用,其可能与虫草素生物合成过程的结构修饰作用联系不紧密。

本研究认为甘氨酸核苷酸 GAR 可能为虫草素从头合成的关键原料,虫草素补救合成依赖 AMP 的水解。目前,虫草素的生物合成机制尚不明确,本研究仅从添加物对虫草素产量影响的角度初步推断虫草素生

物合成途径,期望相关研究能在虫草素的生物合成机制、酶系、高产虫草素菌株^[25] 等方面有所突破。

参考文献 References

- [1] 罗巍,刘东波,吴正武,夏志兰,谢红旗. 蛹虫草液态发酵过程中有效成分的动态积累变化[J]. 食品与发酵工业,2011,37(10): 96-99
Luo W, Liu D B, Wu Z W, Xia Z L, Xie H Q. Dynamic accumulation of effective components of *Cordyceps militaris* fermentation process[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011,37(10):96-99 (in Chinese)
- [2] Lee J H, Hong S M, Yun J Y, Myoung H, Kim M J. Anti-cancer effects of cordycepin on oral squamous cell carcinoma proliferation and apoptosis *in vitro* [J]. *Journal of Cancer Therapy*, 2011,2:224-234
- [3] Jeong J W, Jin C Y, Park C, Hong S H, Kim G Y, Jeong Y K, Lee J D, Yoo Y H, Choi Y H. Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 2011,25(4):817-824
- [4] Chou S M, Lai W J, Hong T W, Lai J Y, Tsai S H, Chen Y H, Yu S H, Kao C H, Chu R, Ding S T, Li T K, Shen T L. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells [J]. *Phytomedicine*, 2014,21(12):1516-1524
- [5] OncoVista Inc, AAIPharma Inc. Study of cordycepin plus pentostatin in patients with refractory TdT-positive leukaemia [DB/OL]. (2008-06-30) [2009-01-08] <https://clinicaltrials.gov/show/NCT00709215>
- [6] 刘桂君,周思静,杨素玲,孟佑婷,王平,尚宏忠. 蛹虫草中虫草素的研究进展[J]. 食品科学,2013,34(21):408-413
Liu G J, Zhou S J, Yang S L, Meng Y T, Wang P, Shang H Z. Research process of cordycepin in *Cordyceps militaris*[J]. *Food Science*, 2013,34(21):408-413 (in Chinese)
- [7] Masuda M, Urabe E, Honda H, Sakurai A, Sakakibara M. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007,40(5):1199-1205
- [8] 康超,文庭池,康冀川,钱一鑫,雷帮星. 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 C, Wen T C, Kang J C, Qian Y X, Lei B X. Effects of additives and different culture conditions on cordycepin production by the medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. *Mycosystema*, 2012,31(3):389-397 (in Chinese)
- [9] 李祝,郁建平,梁宗琦,肖洋. 前体物质与真菌诱导子对虫草素产量的影响. 食品科学,2008,29(6):273-275
Li Z, Yu J P, Liang Z Q, Xiao Y. Effect of precursor and fungal elicitor on cordycepin production [J]. *Food Science*, 2008,29(6):273-275 (in Chinese)

- [10] 左言美,程显好,朱萌,李维焕. 锌富集对蛹虫草菌丝体内虫草素、腺苷含量的影响[J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 124-128
Zuo Y M, Chen X H, Zhu M, Li W H. Effect of zinc accumulation on cordycepin and adenosine content in mycelia of *Cordyceps militaris* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2013, 11(2): 124-128 (in Chinese)
- [11] 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
- [12] Lin S, Liu Z Q, Xue Y P, Baker P J, Wu H, Xu F, Teng Y, Brathwaite M E, Zheng Y G. Biosynthetic Pathway Analysis for Improving the Cordycepin and Cordycepic Acid Production in *Hirsutella sinensis* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016 (doi:10. 1007/s12010-016-2020-0)
- [13] Masuda M, Das S K, Fujihara S, Hatashita M, Sakurai A. 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
- [14] Mao X B, Zhong J J. Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(3/4): 343-350
- [15] Das S K, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. Effects of additives on cordycepin production using a *Cordyceps militaris* mutant induced by ion beam irradiation [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(13): 3041-3047
- [16] 陈长兰,孟程程,佟丽,黄子琪,桑育黎,马靖淇,侯潇,牟藤,贲松彬. 不同种类氨基酸对蛹虫草菌丝体生长和虫草素含量的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 236-239
Chen C L, Meng C C, Tong L, Huang Z Q, Sang Y L, Ma J Q, Hou X, Mu T, Ben S B. Effects of different kinds of amino acids on mycelial growth and cordycepin content in *Cordyceps militaris* [J]. *Food Science*, 2012, 33(23): 236-239 (in Chinese)
- [17] 周思静,刘桂君,王平,尚宏忠,顾海科,杨素玲,孟佑婷,郑洁. 金属离子对蛹虫草液体培养产胞外虫草素产量的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(16): 213-216
Zhou S J, Liu G J, Wang P, Shang H Z, Gu H K, Yang S L, Meng Y T, Zheng J. Effect of metal ions on extracellular cordycepin production in submerged cultivation of *Cordyceps militaris* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(16): 213-216 (in Chinese)
- [18] 阮元,马进川,薛元,申进文,王晓龙,麻兵继. 维生素 B1、B6 和生长激素 2,4-D 对蛹虫草液体发酵虫草素产量的影响[J]. 菌物学报, 2014, 33(2): 477-482
Ruan Y, Ma J C, Xue Y, Shen J W, Wang X L, Ma B J. The influence of vitamin B1, B6 and 2, 4-D on the production of cordycepin in the liquid fermentation of *Cordyceps militaris* [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(2): 477-482 (in Chinese)
- [19] 文庭池,李光荣,康冀川,康超,雷帮星. 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
Wen T C, Li G R, Kang J C, Kang C, Lei B X. Preparation of liquid seed and optimal fermentation conditions for mycelial biomass and cordycepin production in submerged cultivation of *Cordyceps militaris* [J]. *Food Science*, 2012, 33(5): 144-149 (in Chinese)
- [20] 柳依婷,汤佳鹏,周成,曹娟,王芳芳,朱俐. 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, Cao X, Wang F F, Zhu L. 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)
- [21] 王蕾,罗巍,胡瑕,刘东波,夏志兰,谢红旗. 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 L, Luo W, Hu X, Liu D B, Xia Z L, Xie H Q. Screening of high-yields strain and medium optimization for maximum production of cordycepin by *Cordyceps militaris* [J]. *Mycosystema*, 2012, 31(3): 382-388 (in Chinese)
- [22] 蔡水淋,郑永标,王明兹,林清强,黄杨,黄建忠. 响应面法优化蛹虫草深层培养产菌丝及虫草素的发酵工艺[J]. 农产品加工: 学刊, 2013, (6): 13-18, 21
Cai S L, Zheng Y B, Wang M Z, Lin Q Q, Huang Y, Huang J Z. Enhanced production of mycelia biomass and cordycepin by submerged culture of *Cordyceps militaris* with response surface methodology [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2013, (6): 13-18, 21 (in Chinese)
- [23] 文庭池,康冀川,雷帮星,李光荣,何劲. 前体及微量营养物质提高蛹虫草虫草菌素产量的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 175-179
Wen T C, Kang J C, Lei B X, Li G R, He J. Enhanced production of cordycepin in *Cordyceps militaris* by submerged culture using additives [J]. *Food Sciences*, 2010, 31(5): 175-179 (in Chinese)
- [24] 荆留萍,杜双田,金凌云,马璐. 8 种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(11): 156-160
Jing L P, Du S T, Jin L Y, Ma L. Effect of eight kinds of precursor and nutrient on cordycepin and polysaccharide production [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2010, 38(11): 156-160 (in Chinese)
- [25] 程劼,谢建春,苏晓鸥. 饲料中 D-泛酸钙的超临界流体色谱测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(4): 418-420
Cheng J, Xie J C, Su X O. Determination of D-calcium pantothenate in animal feeds by supercritical fluid chromatography [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(4): 418-420 (in Chinese)