



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109082382 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201810618888.3

(22) 申请日 2018.06.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109082382 A

(43) 申请公布日 2018.12.25

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO.M 2018108 2018.03.08

(73) 专利权人 浙江工业大学
地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18号
专利权人 华东医药(杭州)百令生物科技有
限公司

(72) 发明人 柳志强 郑裕国 易明 张博
秦祥田 许峰 滕毅 袁水金
金美英

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 李世玉

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105586265 A, 2016.05.18
Lin, Shan等. "Biosynthetic Pathway
Analysis for Improving the Cordycepin and
Cordycepic Acid Production in *Hirsutella
sinensis*".《APPLIED BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY》. 2016, 第179卷(第4期), 第633-
649页.

审查员 王琳

权利要求书1页 说明书15页
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种冬虫夏草中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*) ZJB18002及在产虫草酸中的应用, 本发明所提供的中国被毛孢分离所用新型斜面培养基及生物学鉴定方法, 以及通过诱变获得虫草酸产量提高2-3倍菌株的方法, 为扩大中国被毛孢的生物应用提供了有效途径, 具有重大应用前景。

1. 一种冬虫夏草中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) ZJB18002在产虫草酸中的应用,其特征在于所述应用是将冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002接种至发酵培养基,在10-25℃、150rpm条件下发酵培养,离心,沉淀提取获得虫草酸;所述发酵培养基终浓度组成为:葡萄糖20-60g/L、玉米粉10-30g/L、糊精5-10g/L、酵母粉5-20g/L、麸皮10-30g/L、蚕蛹粉20-40g/L、蛋白胨10-30g/L、硫酸镁0.5-2g/L、磷酸二氢钾0.5-2g/L、溶剂为蒸馏水,pH值6-8;所述冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期2018年3月8日,保藏编号CCTCC NO.M 2018108,保藏地址为中国武汉,武汉大学,邮编430072。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于所述冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002在发酵培养前先进行活化培养和种子培养,再将种子液以体积浓度2-10%的接种量接种至发酵培养基,所述活化培养为:将冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002接种至斜面培养基,16℃培养10天,取孢子,使用棉花棒将表面孢子洗脱至无菌水中,将洗下的孢子悬液用含有棉花的注射器过滤,过滤后的孢子12000rpm离心5min后去上清液,加入无菌水重悬后,12000rpm离心5min重新洗脱一次,用无菌水重悬作为孢子悬液;所述种子培养为:将孢子悬液接种至种子培养基中,16℃,150rpm培养96h,获得种子液;斜面培养基终浓度组成:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、土豆汁5g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、琼脂粉10g/L,溶剂为双蒸水,pH值自然;种子培养基终浓度组成:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值自然。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于所述发酵培养在发酵罐中进行,发酵条件为:罐压0.05Mpa,发酵罐通气量为0.5vv·m,搅拌转速120rpm。

4. 如权利要求2所述的应用,其特征在于所述发酵培养基终浓度组成为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值6.0。

冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002及其应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一株来自“百令”生产菌冬虫夏草无性型中国被毛孢虫草酸高产菌株的筛选及其应用。

(二) 背景技术

[0002] 冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) 是冬虫夏草菌寄生在鳞翅目 (Lepidoptera) 蝙蝠蛾科昆虫 (*Hepialus armoricanus* Oberthur) 幼虫上的子座及幼虫尸体上的复合体 (包括子座和虫体)。冬虫夏草是一类珍惜的传统真菌药材资源, 具有代谢产物和生物活性多样的特点, 在生物医药领域展现出巨大的应用和发展前景。冬虫夏草因药用功效广泛、明显而备受关注, 在世界范围内备受推崇。中医认为, 冬虫夏草入肺肾二经, 既能补肺阴, 又能补肾阳, 主治肾虚, 阳痿遗精, 腰膝酸痛, 病后虚弱, 久咳虚弱, 劳咳痰血, 自汗盗汗等, 是唯一的一种能同时平衡、调节阴阳的中药。现代药理学已证实, 冬虫夏草具有免疫调节、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、降血糖血脂、性激素样作用等广泛的生物活性。冬虫夏草菌是一种子囊菌, 在其生活史中具有分生孢子阶段 (无性型) 和子囊孢子阶段 (有性型)。而在人工培养、液体发酵等实际生产中使用的是无性阶段的冬虫夏草菌, 因而冬虫夏草无性型的鉴定非常重要。国内外学者在冬虫夏草资源调查、无性型确证、活性成分分离分析和作用机理、开发应用方面做了大量工作。冬虫夏草中国被毛孢已被证明是冬虫夏草的无性型存在形式, 具有与天然冬虫夏草相同的活性成分和药效。天然冬虫夏草生长周期长, 生长的环境较为特殊, 自然环境也遭到破坏, 再加上人为的过度挖掘, 使得野生虫草资源面临枯竭, 因此人工发酵培养的中国被毛孢菌丝体可作为其替代品。

[0003] 虫草酸, 又名甘露醇、D-甘露糖醇, 分子式是 $C_6H_{14}O_6$, 是山梨醇的一种同分异构体, 属于六元醇。它作为冬虫夏草中的一种主要活性成分常用于人工培养冬虫夏草的质量控制标准之一。在1957年, Chatterjee等人首次从冬虫夏草中分离得到了一种结构式为1, 3, 4, 5-四羟基环己烷酸的物质, 并将其命名为“虫草酸”, 但是后来经过Sprecher等人的进一步结构鉴定, 发现“虫草酸”的真实结构是D-甘露醇。甘露醇作为一种重要的精细化工产品被广泛应用于医药、食品和化工等领域。有研究表明, 冬虫夏草中的甘露醇, 可以作为一种非特异性免疫调节剂或增强剂, 用于机体免疫活性细胞 (T淋巴细胞、单核-巨噬细胞和淋巴因子等) 的激活, 并对癌细胞发起攻击, 从而发挥其抗肿瘤功效。研究表明, 天然冬虫夏草甘露醇含量为5-14.71%, 而中国被毛孢发酵菌丝体甘露醇含量为10.99%, 为进一步提高中国被毛孢发酵菌丝体甘露醇含量, 拟采用诱变技术提高中国被毛孢发酵菌丝体甘露醇含量。

(三) 发明内容

[0004] 本发明目的是针对野生冬虫夏草生长周期长, 人工发酵培养中国被毛孢菌丝体甘露醇含量不高等问题, 创造性地应用形态学、分子生物学的方法来分离鉴定出一株中国被毛孢新型菌株L0106 (*Hirsutella sinensis* L0106), 通过人工发酵方式扩大培养, 并利用诱变技术提高中国被毛孢虫草酸含量。提供一种全面可靠的“百令”生产菌冬虫夏草无性型

中国被毛孢的分离鉴定方法,及诱变新型菌株ZJB18002在人工发酵培养中国被毛孢菌丝体中的应用。

[0005] 本发明采用的技术方案是:

[0006] 本发明提供一种冬虫夏草中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) ZJB18002,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期2018年3月8日,保藏编号CCTCC NO.M2018108,保藏地址为中国武汉,武汉大学,邮编430072。

[0007] 本发明还提供一种所述冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002在产虫草酸中的应用,所述应用是将冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002接种至发酵培养基,在10-25℃、150rpm条件下发酵培养,离心,沉淀干燥后提获得虫草酸,具体提取方法为:沉淀干燥后,加入25% (V/V) 乙醇水溶液(乙醇水溶液体积用量以干燥沉淀重量计为30-60ml/g),沸水浴浸提2h,过滤后再浸提一次,合并滤液,提取虫草酸;所述发酵培养基终浓度组成为:葡萄糖20-60g/L、玉米粉10-30g/L、糊精5-10g/L、酵母粉5-20g/L、麸皮10-30g/L、蚕蛹粉20-40g/L、蛋白胨10-30g/L、硫酸镁0.5-2g/L、磷酸二氢钾0.5-2g/L、溶剂为蒸馏水,pH值6-8(优选6.0)。

[0008] 进一步,所述冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002在发酵培养前先进行活化培养和种子培养,再将种子液以体积浓度2-10%的接种量接种至发酵培养基,所述活化培养为:将冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002接种至斜面培养基,16℃培养10天,取孢子,使用棉花棒将表面孢子洗脱至无菌水中,将洗下的孢子悬液用含有棉花的注射器过滤,过滤后的孢子12000rpm离心5min后去上清液,加入无菌水重悬后,12000rpm离心5min重新洗脱一次,用无菌水重悬作为孢子悬液;所述种子培养为:将孢子悬液接种至种子培养基中,16℃,150rpm培养96h,获得种子液;斜面培养基终浓度组成:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、土豆汁5g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、琼脂粉10g/L,溶剂为双蒸水,pH值自然;种子培养基终浓度组成:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值自然。

[0009] 进一步,所述发酵培养在发酵罐中进行,发酵条件为:罐压0.05Mpa,发酵罐通气量为0.5v_v·m,搅拌转速为120rpm。

[0010] 进一步,所述发酵培养基终浓度组成为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值自然(即6.0)。

[0011] 虫草酸是冬虫夏草主要活性物质之一,又名D-甘露醇,虫草酸能抑制各种病菌的成长,可预防与治疗脑血栓、脑出血、心肌梗塞、长期衰竭。目前虫草酸的含量已成为对人工冬虫夏草及其保健品的质量标准之一。

[0012] 从青海玉树采集的野生冬虫夏草,清洗干净并且用1%的升汞严格消毒后进行内菌核的无菌切割操作,并将内菌核置于一种新型的斜面培养基上进行萌发,萌发物用于后续纯化培养。首先用形态学的方法对纯培养后的单菌落形态进行初步鉴定,然后利用分子生物学的方法对分离物进行分子鉴定,其18S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示,得到了原始菌株,并经菌种鉴定该菌株为中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*),然后对获得的原始菌株进行物理化学诱变,得到虫草素含量稳定提高的菌株ZJB18002,该菌种保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2018108。

[0013] 由于所采用新型斜面培养基的特殊性,任何与培养基配方相同的均属于本发明保护范围之列。由于冬虫夏草采集地的差异性,导致分离到的物种也具有一定的差异性,只要其与该18S rDNA序列具有95%以上同源性,均属于本发明保护范围之列。所述改变可包括核苷酸序列中核苷酸的缺失、插入或替换。

[0014] 本发明的有益效果主要体现在:本发明对一种中国被毛孢新型菌株ZJB18002的分离鉴定进行了详细研究,提供了“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的形态学观察结果、18S rDNA序列。本发明所提供的中国被毛孢分离所用新型斜面培养基及生物学鉴定方法,以及通过诱变,获得虫草酸产量提升2-3倍的方法,为扩大中国被毛孢的生物应用提供了有效途径,具有重大应用前景。

(四)附图说明

[0015] 图1为野生冬虫夏草菌核分离物的斜面培养情况;

[0016] 图2为野生冬虫夏草菌核分离物的扫描电镜图;

[0017] 图3为野生冬虫夏草菌核分离物的18S rDNA序列PCR扩增argrose电泳图;

[0018] 图4为野生冬虫夏草菌核分离物的18S rDNA序列系统发育树;

[0019] 图5为冬虫夏草中国被毛孢菌丝体干重曲线;

[0020] 图6为冬虫夏草中国被毛孢虫草酸标准曲线;

[0021] 图7为中国被毛孢中虫草酸稳定性分析;

[0022] 图8为野生型菌株*Hirsutella sinensis* L0106 (A) 及突变株ZJB18002 (B) 发酵过程虫草酸及pH变化曲线。

(五)具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0024] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为常规生化试剂。

[0025] 实施例1:野生冬虫夏草中国被毛孢的筛选培养及鉴定

[0026] 1、筛选培养

[0027] 从青海玉树海拔4000-4300米的山坡上采挖45株子实体粗壮饱满、虫体粗大的冬虫夏草完整菌虫复合体,寄主昆虫为蝙蝠蛾幼虫。放入15℃培养箱中养护。用清洁刷清除子实体表面杂质,用无菌纯化水冲洗,再用0.1%的升汞进行消毒,在超净台中用无菌解剖刀剖开虫体的内菌核部分,挑取上中下三个部位的组织放在已灭菌的且含有庆大霉素的斜面培养基上(50μg/mL),置于16℃恒温培养箱中培养,每天观察记录。分离组织在斜面培养基上培养15天后开始萌发,此时转接到液体培养基中,16℃,100r/min振荡培养,观察记录。振荡培养60天后,菌丝体长满于液体培养基中。吸取少许涂布于斜面培养基上,16℃、15天后培养基表面长满白色单菌落,获得野生型菌株*Hirsutella sinensis* L0106,保藏编号CCTCC NO:M2011278,已在先前申请的专利CN102373190A中公开,如图1所示。

[0028] 斜面培养基配方为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、土豆汁5g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、琼脂粉

10g/L,溶剂为双蒸水,pH值自然。首先将组分中的玉米粉、麸皮及蚕蛹粉用双蒸水混合后于121℃液化20min,然后离心取上清液溶解其他组分,115℃灭菌30min。

[0029] 液体培养基组成:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、土豆汁5g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L,溶剂为双蒸水,pH值自然。

[0030] 实施例2、冬虫夏草分离物的形态学鉴定

[0031] 对实施例1野生型菌体L0106在斜面培养基的生长情况和单菌落形态进行观察,并且利用扫描电镜对固定载玻片上的微生物进行观察,了解微生物的形态。经鉴定,菌丝体生长缓慢,斜面大约需培养40d,菌丝体致密,不易挑取,呈雪白色隆起,随着培养时间的延长,菌丝体背面慢慢呈现灰褐色或棕褐色,表面不再圆润,象蚯蚓粪状,多褶皱,菌丝向外蓬松,如图1所示。电镜观察菌丝体形态显示菌丝发育良好,细长,有横隔,直径1.5~2.0 μm ,可以观察到形成孢子的孢子器,结果如图2所示。经形态学鉴定,初步判断出此分离物形成的菌落为中国被毛孢。

[0032] 实施例3、冬虫夏草分离物的分子生物学鉴定

[0033] (1) 18S rDNA引物设计

[0034] 引物:

[0035] p1:5' -TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3' 及

[0036] p2:5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。引物由上海生工公司合成。

[0037] (2) 基因组提取

[0038] 利用快速核酸提取仪及微生物基因组提取试剂盒(美国MP公司)提取实施例1野生型菌体L0106基因组DNA。

[0039] (3) 18S rDNA序列扩增

[0040] 以基因组DNA为模板,利用通用引物进行PCR扩增(美国BioRad公司,PTC200扩增仪),反应条件为:95℃预变性5min,循环参数为94℃变性45s,55℃复性60s,72℃延伸90s,重复35个循环后,72℃继续延伸10min,最终用0.9%的琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物。

[0041] (4) 目的基因的连接与转化(试剂盒:pMD18-T Vector,TaKaRa code D101A)

[0042] 1) 连接体系:pMD18-T 1 μL ,Slution1 4 μL ,目的基因5 μL 。

[0043] 2) 连接、转化条件:

[0044] 连接:16℃,16h;灭活:65℃,15min;将10 μL 反应体系转至感受态细胞JM109中,冰浴30min;热击:42℃,90s;冰浴:2~3min;加入800 μL 液体LB培养基,37℃,250rpm,1h;涂布含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp抗性的LB平板;37℃培养箱培养过夜。液体LB培养基组成:5g/L酵母粉,10g/L NaCl,10g/L蛋白胨,溶剂为去离子水,pH值自然。LB平板组成:5g/L酵母粉,10g/L NaCl,10g/L蛋白胨,2%琼脂粉,溶剂为去离子水,pH值自然。

[0045] (5) 重组菌筛选:

[0046] 1) 挑取步骤(4)中2)平板单菌落,标号;每个单菌落一半用于接种试管培养;另一半用于菌落PCR;

[0047] 2) 试管培养:5mL液体LB培养基/试管,3 μL Amp(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/5mL LB;37℃,250rpm培养过夜,12000g离心1min,弃上清,获得重组大肠杆菌;

[0048] 3) 菌落PCR:将步骤(4)中2)单菌落挑至50 μL 无菌水中,沸水浴30min,电泳检测;

PCR体系为:无核酸水20.375 μ L,缓冲液2.5 μ L,4 \times dNTP 0.125 μ L,上游引物(p1)0.5 μ L,下游引物(p2)0.5 μ L,DNA 0.5 μ L,Taq酶0.5 μ L。

[0049] (6) 质粒提取(试剂盒:AxyPrep质粒DNA小量试剂盒)

[0050] 1) 取1-4mL步骤2) 培养过夜的培养液,12000g离心1min,弃上清;

[0051] 2) 加250 μ L Buffer S1(4 $^{\circ}$ C冰箱贮存),悬浮均匀;

[0052] 3) 加250 μ L Buffer S2,温和并充分地上下翻转4~6次,使菌体充分裂解,直至形成透亮的溶液,时间不宜超过5min;

[0053] 4) 加350 μ L Buffer S3,温和并充分地翻转混合6~8次,12000g离心10min;

[0054] 5) 将上清转移至制备管(置于2mL离心管(试剂盒提供)),12000g离心1min,弃滤液;

[0055] 6) 加500 μ L Buffer W1,12000g离心1min,弃滤液;

[0056] 7) 加700 μ L Buffer W2,12000g离心1min,弃滤液,再用700 μ L Buffer W2洗涤一次,弃滤液;

[0057] 8) 将制备管置回离心管,12000g离心1min;

[0058] 9) 将制备管移入新的1.5mL离心管(试剂盒提供),在制备管膜中央加60~80 μ L超纯水(65 $^{\circ}$ C预热),室温静置1min,12000g离心1min;

[0059] 10) -20 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 7、18S rDNA序列检测

[0061] 提取质粒后用自动序列仪进行测序,利用软件Blast对18S rDNA测序结果进行同源性分析。以提取到的细胞总DNA为模板,利用设计的引物(p1和p2)扩增菌株的18S rDNA序列,将PCR产物进行0.9%的琼脂糖凝胶电泳,从图3可以看出经PCR扩增成功获得了一长约0.55kb的片段,符合预期结果。

[0062] 引物:

[0063] p1:5' -TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3' 及

[0064] p2:5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。引物由上海生工公司合成。

[0065] 8、18S rDNA序列的测定与分析

[0066] 将经PCR扩增的片段克隆到T载体后,抽提质粒后的含有本实验获得的18S rDNA片段的重组质粒,经测序确认片段实际长度。样品的实际长度为555bp,序列如下(SEQ ID NO.1):

[0067] SEQ New:555bp;

[0068] Composition 119 A;199 C;152 G;85 T;00THER

[0069] Percentage:21% A;36% C;27% G;15% T;0%OTHER

[0070] Molecular Weight(kDa):ssDNA:170.61 dsDNA:342.2

[0071] ORIGIN

1 CCTGCGGAGG GATCATTATC GAGTCACCAC TCCCAAACCC CCTGCGAACA CCACAGCAGT
 61 TGCCCTCGGCG GGACCGCCCC GGCGCCCCAG GGCCCGGACC AGGGCGCCCG CCGGAGGACC
 121 CCCAGACCCT CCTGTCGCAG TGGCATCTCT CAGTCAAGAA GCAAGCAAAT GAATCAAAAC
 181 TTTCAACAAC GGATCTCTTG GTTCTGGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGCGATAAGT
 [0072] 241 AATGTGAATT GCAGAATTCA GTGAACCATC GAATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCGCCAG
 301 CACTCTGGCG GGCATGCCTG TCCGAGCGTC ATCTCAACCC TCGAGCCCCC CGCCTCGCGG
 361 CGGCGGGGCC CGGCCTTGGG GGTACGGCC CCGCGCCGCC CCCTAAACGC AGTGGCGACC
 421 CCGCCGCGGC TCCCCTGCGC AGTAGCTCGC TGAGAACCTC GCACCGGGAG CGCGGAGGCG
 481 GTCACGCCGT GAAACCACCA CACCCTCCAG TTGACCTCGG ATCAGGTAGG GATACCCGCT
 541 GAACTTAAGC ATATC

[0073] 获得的序列与genBank中保存的数据进行相似性分析发现,本实验所鉴定微生物与*Ophiocordyceps sinensis* 同源性最高(同源性,100%/555bps,基于18S rDNA),根据微生物分子遗传学鉴定原则,基于18S rDNA序列的同源性高于95%,鉴定菌基本属于对照菌。18S rDNA序列经过系统发育树分析,其亲缘关系与*Ophiocordyceps sinensis*最近(图4)。因此,本实验鉴定的微生物为*Ophiocordyceps*属*sinensis*种。

[0074] 实施例4:冬虫夏草分离物的Biolog代谢指纹图谱鉴定

[0075] 利用Biolog (FF) 自动鉴定系统测定碳源利用情况。由于试验菌株的形态特征和培养特征类似于真菌,所以本试验使用FF鉴定微平板对试验菌株的碳源利用情况进行测定。

[0076] 1、菌悬液制备:

[0077] (1) 取无菌棉签在Biolog自动鉴定系统的接种液(FF-IF)中蘸湿;

[0078] (2) 将棉签在实施例1菌落表面滚动,粘取孢子,注意不要带出培养基;

[0079] (3) 在接种液管液面上沿内壁转动棉签,使孢子附着在内壁上,同时将孢子均匀打散;

[0080] (4) 倾斜接种液管,用棉签将孢子分散于接种液中。如有小的菌团,应使之沉到管底;

[0081] (5) 调整浊度:

[0082] (a) 关闭电源,调整指针至“0”刻度;

[0083] (b) 擦干空白接种液管外壁,置于浊度计中,接通电源,调整指针至100%T;

[0084] (c) 使用浊度标准品检查浊度计的准确性,并调整至标准浊度值;

[0085] (d) 擦干菌悬液管外壁,插入浊度计,读取菌悬液浊度值;

[0086] (e) 通过添加孢子调整浊度值,使其在75%±3%范围内。

[0087] 2、FF微平板接种:

[0088] (1) 将制备好的菌悬液倒入加样槽中,使用八道电动移液器,将其接种于微平板96孔中;

[0089] (2) 使用FF鉴定微平板,接种量为100μL/孔。

[0090] 3、FF微平板培养:

[0091] 接种丝状真菌的FF鉴定微平板在26℃,空气中培养至24h、48h、72h、96h、168h和240h,培养环境不宜过湿。

[0092] 4、FF微平板读数及结果保存:

[0093] (1) 打开“MicroLog”应用程序,输入用户名和密码,点击“OK”进入主界面;

[0094] (2) 先进入“Setup”界面,点击“initialize reader”,进行初始化设置,等到界面上红色的“ComNot Open”键变成绿色的“Ready”时,点击“Read”;

[0095] (3) 进入“Read”界面后,选择阅读器模式—Reader,如采用人工读数,进入手动模式(Manual);在“Data File Name”后输入数据保存名称和保存地址;点击“Read New Plate”选择微平板类型和培养时间,在“Strain type”下拉菜单中选择丝状真菌类型;

[0096] (4) 将微平板放入读数仪托架上,合上读数仪盖子,准备读数;

[0097] (5) 按“Read Next”键开始读数。

[0098] (6) 以PDF格式保存结果。

[0099] 5、Biolog鉴定的结果分析

[0100] 利用Biolog自动微生物鉴定系统考察菌株对95种不同碳源的代谢情况:将实施例1野生型菌株L0106接种于真菌PDA培养基,14℃恒温培养5天,用无菌棉签将平板上的菌体洗下,与接种液(FF-IF)混合,制成菌悬液,用浊度计调整至75%T/FF。用8孔电动加液器将菌悬液分别加在Biolog FF微孔鉴定板的各孔中,每孔100uL。将微孔鉴定板放在14微孔培养箱中,分别在培养24h、48h、72h、96h、168h和240h后将其置于Biolog读数仪上读取结果。经Biolog读数仪分析代谢指纹,菌株可较强利用26种碳源,对其他69种碳源不能利用或利用能力较弱与标准数据库对比后,发现与冬虫夏草菌无性型的相似性指数大于0.5。Biolog系统给出168h鉴定结果,如表1所示。因此实施例1获得的野生型菌株L0106为冬虫夏草中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)。

[0101] 表1. 冬虫夏草分离物对Biolog FF板上95种碳源的利用能力

NO.	Carbon substrate		NO.	Carbon substrate	
0	Water	-	48	D-Ribose	+
1	Tween 80	+	49	Salicin	+
2	N-Acetyl-D-Galactosamine	B	50	Sedoheptulosan	B
3	N-Acetyl-β-D-Glucosamine	B	51	D-Sorbitol	-
4	N-Acetyl-β-D-Mannosamine	+	52	L-Sorbose	+
[0102] 5	Adonitol	B	53	Stachyose	-
6	Amygdalin	+	54	Sucrose	-
7	D-Arabinose	+	55	D-Tagatose	-
8	L-Arabinose	+	56	D-Trehalose	-
9	D-Arabitol	+	57	Turanose	+
10	Arbutin	-	58	Xylitol	B
11	D-Cellobiose	-	59	D-Xylose	+

	12	a-Cyclodextrin	-	60	γ -Aminobutyric Acid	-
	13	β -Cyclodextrin	-	61	Bromosuccinic Acid	-
	14	Dextrin	+	62	Fumaric Acid	-
	15	i-Erythritol	+	63	β -Hydroxybutyric Acid	-
	16	D-Fructose	+	64	γ -Hydroxybutyric Acid	-
	17	L-Fucose	-	65	p-Hydroxy-phenylacetic Acid	-
	18	D-Galactose	B	66	a-Ketoglutaric Acid	-
	19	D-Galacturonic Acid	-	67	D-Lactic Acid Methyl Ester	B
	20	Gentiobiose	-	68	L-Lactic Acid	B
	21	D-Gluconic Acid	+	69	D-Malic Acid	-
	22	D-Glucosamine	-	70	L-Malic Acid	+
	23	a-D-Glucose	-	71	Quinic Acid	-
	24	a-D-Glucose-1-Phosphate	-	72	D-Saccharic Acid	-
	25	Glucuronamide	B	73	Sebacic Acid	+
	26	D-Glucuronic Acid	-	74	Succinamic Acid	+
	27	Glycerol	+	75	Succinic Acid	-
	28	Glycogen	+	76	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	-
[0103]	29	m-Inositol	B	77	N-Acetyl-L-Glutamic Acid	B
	30	2-Keto-D-Gluconic Acid	-	78	L-Alaninamide	-
	31	a-D-Lactose	B	79	L-Alanine	-
	32	Lactulose	+	80	L-Alanyl-Glycine	-
	33	Maltitol	B	81	L-Asparagine	-
	34	Maltose	-	82	L-Aspartic Acid	B
	35	Maltotriose	-	83	L-Glutamic Acid	-
	36	D-Mannitol	B	84	Glycyl-L-Glutamic Acid	-
	37	D-Mannose	-	85	L-Ornithine	-
	38	D-Melezitose	B	86	L-Phenylalanine	-
	39	D-Melibiose	B	87	L-Proline	-
	40	a-Methyl-D-Galactoside	-	88	L-Pyroglutamic Acid	-
	41	β -Methyl-D-Galactoside	-	89	L-Serine	+
	42	a-Methyl-D-Glucoside	+	90	L-Threonine	-
	43	β -Methyl-D-Glucoside	-	91	2-Aminoethanol	+
	44	Palatinose	-	92	Putrescine	+
	45	D-Psicose	B	93	Adenosine	+
	46	D-Raffinose	-	94	Uridine	-
	47	L-Rhamnose	-	95	Adenosine-5'-Monophosphate	-

[0104] Notes: +, positive; -, negative; B, borderline

[0105] 实施例5: 高产冬虫夏草中国被毛孢虫草酸突变株的筛选

[0106] (1) 将实施例1野生型冬虫夏草中国被毛孢L0106菌接种至斜面培养基(同

[0107] 实施例1), 16°C培养30天, 取白色孢子, 使用棉花棒将表面孢子洗脱至10mL无菌水中, 将洗下的孢子悬液用含有棉花的注射器过滤, 过滤后的孢子12000rpm离心5min后去上清液, 加入10mL无菌水重悬后, 12000rpm离心5min重新洗脱一次, 用5mL无菌水重悬作为孢子悬液。

[0108] (2) EMS-UV诱变方法: 将制备好的孢子悬液5mL置于直径9cm无菌平皿中, 在紫外灯下25cm处振荡照射30s, 取一定量转于无菌试管, 并立即浸入冰水中2h后, 取样涂布于斜面固体培养基(同实施例1), 16°C避光培养24-32h, 收集诱变后菌体, 使用EMS处理, 处理方式: 每1mL菌体悬液使用50mM含5mg/mL甲基磺酸乙酯(EMS)的pH 7.0的PBS缓冲液搅拌处理

0.5h,8000rpm离心5min,收集菌体使用无菌水清洗3次,重悬后涂布在斜面培养基(同实施例1)中,16℃避光培养,初步筛选颜色形态有差异的菌株,挑取单菌落,按照实施例4进行发酵,收集发酵液检测虫草酸产量(方法同实施例7),直至获得虫草酸产量提升明显的突变株。突变次数、突变率和致死率如表2所示。

[0109] 表2紫外-EMS复合诱变过程

突变次数/轮	致死率/%	突变率/%	
		正突变率	负突变率
[0110] 1	95	9	27
2	91	7	30
3	87	6	18

[0111] (3) Co⁶⁰诱变方法:将步骤(2)筛选的高产突变株活化后的菌株涂布于斜面培养基(同实施例1),16℃培养12-18天至长出孢子,收集孢子12000rpm离心5min,用无菌生理盐水洗涤3次,收集孢子,悬浮在生理盐水中,控制菌数约为10⁸个/mL,以0GY、200GY、400GY、600GY、800GY、1000GY和1200GY的不同的剂量的Co⁶⁰对孢子进行诱变。将经Co⁶⁰诱变的孢子用生理盐水稀释至10⁻⁵后涂板于斜面培养基(同实施例1),16℃培养12-18天,初步筛选颜色形态有差异的菌株,挑取单菌落,按照实施例4进行发酵,进行后续的发酵培养,收集发酵液检测虫草酸产量(方法同实施例8),直至获得高产突变株。突变次数、突变率和致死率如表3所示。

[0112] 表3 Co⁶⁰诱变方法诱变过程

突变次数/轮	致死率/%	突变率/%	
		正突变率	负突变率
[0113] 1	87	3	38
2	92	6	65
3	91	5	41
4	90	5	23

[0114] (4) 离子诱变方法:将步骤(3)筛选的高产突变菌株活化后的菌株涂布于斜面培养基(同实施例1),16℃培养8天至长出孢子,收集孢子12000rpm离心5min,用无菌生理盐水洗涤3次,收集孢子,悬浮在生理盐水中,控制菌数约为10⁸个/mL,均匀涂在斜面固体培养基(同实施例1)上,无菌风干。将带菌平板置IBB Device 1多功能离子注入机靶室内,脉冲25,能量35keV,离子束流200mA,按2、8、20、40、60、80、100、200×10¹⁴ions·cm⁻²剂量进行照射。将上述经过氮离子注入的带菌平板以及未接受辐射的对照带菌平板,用0.5mL无菌水洗脱,涂布到斜面筛选培养基(同实施例1)中,放到16℃的培养箱中培养96h,初步筛选颜色偏黄的菌株,挑取单菌落,按照实施例4进行发酵,收集发酵液检测虫草酸产量(方法同实施例8),直至获得高产突变株。突变次数、突变率和致死率如表4所示。

[0115] 表4离子诱变过程

突变次数/轮	致死率/%	突变率/%		
		正突变率	负突变率	
[0116]	1	91	11	38
	2	95	8	25
	3	92	7	31
	4	91	9	27

[0117] 步骤(2) - (4)依次突变为一轮,对于每轮诱变获得的高产菌株,重新作为初始菌株按照上述方法进行复合诱变。最终筛选获得虫草酸产量达10.9%的突变株ZJB18002,即为冬虫夏草中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*),保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期2018年03月08日,保藏编号CCTCC NO.M2018108,保藏地址为中国武汉,武汉大学,邮编430072。

[0118] 本发明包含但不仅限于上述三种诱变方式。

[0119] 实施例6:冬虫夏草中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)ZJB18002的培养条件优化

[0120] 1、斜面培养

[0121] 将实施例5获得的冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002接种至斜面培养基(组成同实施例1),16℃培养15天,获得斜面菌体;

[0122] 2、种子培养

[0123] 将步骤(1)斜面菌体接种至种子培养基(组成同实施例1),16℃、150rpm培养15天,获得种子液;

[0124] 3、发酵培养

[0125] (1)发酵培养基优化

[0126] 1)首先根据培养基单因素优化方法对培养基中的各个成分进行优化,括号内为设置的优化浓度梯度,在进行单因素优化时,对一组成分进行优化,其他组浓度均取最低值。玉米粉(10、20、30g/L)、麸皮(10、20、30g/L)、蚕蛹粉(20、30、40g/L)、硫酸镁(0.5、1、1.5、2g/L)、磷酸二氢钾(0.5、1、1.5、2g/L)溶剂为蒸馏水,pH值自然。温度(16、18、20℃)、装液量100/500mL三角瓶、接种量5.0%、发酵时间9天。葡萄糖、糊精、酵母粉、蛋白胨浓度固定,分别为葡萄糖40g/L、糊精3g/L、酵母粉5g/L、蛋白胨15g/L。经过单因素优化得到的最优组成为:玉米粉10g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L,溶剂为蒸馏水,pH值自然(6.0)。装液量为在500mL三角瓶中装100mL发酵培养基,并按体积浓度5%的接种量将步骤2种子液接种摇瓶发酵培养基,在16℃、150rpm条件下进行摇瓶培养。在最优条件下得到的菌体干重为9.2357g/L。

[0127] 2)C、N源为虫草生长和活性成分合成的主要营养物质,其浓度合适时虫草生长良好;浓度过低不能满足虫草生长所需;浓度过高则可能对虫草生长有抑制作用。在步骤1)的基础上,为确定发酵培养基最佳C/N,故进行了正交试验,设计4因素4水平L16(4⁴)IF交试验,每个试验号3次重复。

[0128] 装液量为在500mL三角瓶中装100mL发酵培养基,并按体积浓度5%的接种量将步骤2种子液接种摇瓶发酵培养基,在16℃、150rpm条件下进行摇瓶培养。其中pH值以1 mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠进行调节,在培养过程中每隔3天调节一次。对发酵培养基中的葡萄糖、酵母膏、蛋白胨、糊精浓度进行优化,发酵培养基其他成分浓度组成为:玉米粉10g/L、麸

皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水，pH值自然(6.0)。

[0129] 表5 1水平因素表

水平	因素	葡萄糖	酵母膏	蛋白胨	糊精
	[0130]	1	10 g/L	10 g/L	5 g/L
	2	20 g/L	15 g/L	10 g/L	10 g/L
	3	30 g/L	20 g/L	15 g/L	15 g/L
	4	40 g/L	25 g/L	20 g/L	20 g/L

[0131] 表6 $L_{16}(4^4)$ 正交表

实验号	糊精	酵母膏	葡萄糖	蛋白胨	干重 g/L
1	1	1	1	1	7.9325
2	1	2	2	2	8.6731
3	1	3	3	3	7.2827
4	1	4	4	4	6.3055
5	2	1	2	3	8.0256
6	2	2	1	4	8.4589
7	2	3	4	1	5.7463
8	2	4	3	2	5.9377
9	3	1	3	4	7.0814
10	3	2	4	3	7.9263
[0132]	11	3	1	2	8.1638
	12	3	2	1	6.7953
	13	4	1	2	7.1556
	14	4	2	3	6.3805
	15	4	3	4	5.8641
	16	4	4	1	6.9502
	K1	7.5485	7.5488	7.8764	6.7137
	K2	7.0421	7.8597	7.3395	7.4826
	K3	7.4917	6.7642	6.6706	7.5462
	K4	6.5876	6.4972	6.7834	6.9275
	R	0.9609	1.3625	1.2058	0.7689

[0133] 在最适培养基条件下，发酵液在转速10000g离心10min，沉淀(湿菌体)用蒸馏水洗涤2次后，置60℃干燥箱中烘干至恒重，称量。得率测定：将新华滤纸在60℃条件下烘干至恒重，记为W1；使用该滤纸对菌丝体进行过滤，再在60℃条件下烘干至恒重，记为W2；则菌丝体得率为 $W3=W2-W1$ 。

[0134] 从表6可见，由1222组成的C、N源比例的发酵水平最高，而经K值计算可知，1212为最佳组合，两者基本吻合。由此可得最佳C、N源组合为：葡萄糖20g/L，酵母膏15g/L，糊精5g/L，蛋白胨10g/L。采用此C、N源含量可将干重提高到8.7012g/L，比对照提高了10.6%。对照组发酵培养基终浓度组成为：葡萄糖40g/L、糊精10g/L、酵母粉10g/L、蛋白胨5g/L、玉米粉5g/L、麸皮5g/L、蚕蛹粉10g/L、蛋白胨15g/L、硫酸镁1g/L、磷酸二氢钾1g/L、溶剂为蒸馏水，pH值自然(6.0)。

[0135] 以干菌丝体得率为指标,通过单因素和正交实验对虫草菌株的液体发酵条件进行优化,确定最佳培养基配方和最适培养条件为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值自然(6.0)。温度16℃、装液量100/500mL三角瓶、接种量5.0%、150rpm发酵时间9天。在最佳发酵条件下,最大生物量可达12-18g/L(图5)。

[0136] (2) pH值优化

[0137] 发酵培养基配方为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH分别设6(自然)、7、8三个梯度,震荡频率150rpm,温度16℃。

[0138] 在发酵起始pH值为微酸性时生长好,产量高,pH值越低,对菌丝体生长越不利,当pH值为6时(自然pH),菌丝体得率最大为12.3145g/L。继续提高pH值,则菌丝的生长速度逐渐降低,在pH值7时,菌丝体得率为11.4028g/L,菌丝易老化,pH值8时,菌丝体得率为9.6181g/L。

[0139] (3) 振荡频率优化

[0140] 发酵培养基配方为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH 6.0,震荡频率设120rpm、130rpm、140rpm、150rpm、160rpm。温度16℃。从菌丝体得率以及易于收集两方面来看,震荡频率以150rpm为最适宜,菌丝体得率为11.86181g/L。

[0141] 在最优条件下,对野生型菌株中国被毛孢L0106(*Hirsutella sinensis* L0106)及突变菌株冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002(*Hirsutella sinensis* ZJB18002)进行发酵,菌体发酵过程pH及虫草酸含量变化如图8所示。

[0142] 实施例7:冬虫夏草中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)ZJB18002的深层发酵培养

[0143] 将实施例5获得的冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002接种至斜面培养基(组成同实施例1),16℃培养15天,获得斜面菌体;

[0144] 将灭好菌的种子液培养基取出,在无菌的条件下从斜面培养基上挖取2平方厘米含有中国被毛孢ZJB18002单菌落的菌块,接至种子培养基中,16℃,120rpm条件下振荡培养25天,获得种子液。种子液培养基的配方为:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值自然。首先将组分中的玉米粉、麸皮及蚕蛹粉用双蒸水混合后于121℃下液化20min,然后离心取上清液用于溶解其他组分,115℃下灭菌30min。

[0145] 以体积浓度5%的接种量将种子液接种至发酵培养基,于气升式发酵罐中,罐压0.05Mpa,发酵罐通气量为0.5vv·m;培养温度16℃,120rpm培养40天至发酵终点,放罐,获得发酵液,发酵液在转速10000g离心10min,沉淀(湿菌体)用蒸馏水洗涤2次后,置60℃干燥箱中烘干至恒重,获得中国被毛孢ZJB18002菌体粉。

[0146] 发酵培养基配方:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH 6.0。

[0147] 实施例8:中国被毛孢ZJB18002菌丝体中虫草酸的快速提取及检测

[0148] 为获得更为高效的虫草酸提取方法,对4个因素,即提取时间(1-3h)、提取温度(40-100℃)、提取剂(25%-85%乙醇水溶液)、提取次数(1-3次),利用L9(34)表设计4因素3

水平正交实验(表7、表8)。每实验组准确称取实施例7制备的中国被毛孢ZJB18002菌体粉1.000g,料液比例1:30(g:mL),按照设计的正交实验的方法提取,沸水浴浸提2h,过滤后再浸提一次,合并滤液,测量体积,置4℃备用,即为提取液,3次重复,结果见表8。4个影响因素,影响大小依次为提取次数>提取剂>提取时间>提取温度,最终确定最佳提取条件为:40℃下,用超纯水提取3次,每次1小时。

[0149] 表7因素取值表

水平	因素	时间 (h)	温度 (℃)	提取剂	次数
[0150]	1	1	100	85 %	1
	2	2	60	55 %	2
	3	3	40	25 %	3

[0151] 表8提取时间、提取温度、提取剂、提取次数正交试验

实验	时间	温度	提取剂	次数	虫草酸得率 (%)
[0152]	1	1	1	1	8.36±0.26
	2	1	2	2	7.18±0.37
	3	1	3	3	11.67±0.58
	4	2	1	2	5.95±0.13
	5	2	2	3	6.64±0.28
	6	2	3	1	9.82±0.78
	7	3	1	3	3.44±0.6
	8	3	2	1	11.37±0.42
[0153]	9	3	3	2	8.08±1.07
	K1	27.48	25.68	29.55	23.08
	K2	22.41	25.19	21.21	20.44
	K3	22.89	29.57	21.75	28.99
	R	5.07	4.38	8.34	8.55
最优水平	1	3	1	3	

[0154] 虫草酸得率测定方法:精确提取液0.2mL,超纯水定容至20mL,充分混匀后取1mL于洁净试管中,同时加入1mL高碘酸钾溶液,25℃反应10min,再加入质量浓度0.1%L-鼠李糖水溶液2mL,振荡均匀,加入4mL新鲜配制Nash试剂,53℃显色15min,冷却至室温得到虫草酸反应液,4℃保藏待检测。用超纯水做空白,取200μL虫草酸反应液于96孔酶标板内,每个虫草酸反应液3个复孔。在380nm-450nm的波长范围内进行扫描,确定最大吸收波长为430nm。根据430nm处虫草酸反应液吸光值和虫草酸标准曲线获得虫草酸含量。

[0155] 所用试剂的配制方法如下,高碘酸钾溶液:15mM高碘酸钾溶解于1L 0.12M盐酸水溶液中。NASH试剂:150g醋酸铵、2mL冰醋酸与2mL乙酰丙酮用超纯水溶解,并定容至1L。0.1%鼠李糖溶液:L-鼠李糖100mg,超纯水溶解,定容至100mL。

[0156] 虫草酸标准曲线的绘制:

[0157] 精确称取干燥至恒重的甘露醇,用容量瓶精确配制质量浓度分别为10mg/L、20mg/L、30mg/L、40mg/L、50mg/L、60mg/L的标准品水溶液,然后各取1mL不同浓度的标准品水溶液于6支洁净试管中,再按实施例8方法(虫草酸得率检测方法)检测430nm处吸光值。以标准液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制虫草素标准曲线, $y=5.8914x+0.0078$, $R^2=0.9993$ (图6)。

[0158] 对比色法检测中国被毛孢中虫草酸进行稳定性分析。检测2小时内虫草酸标准品吸光度值的变化,每20min测定一次,结果见图7,相对标准偏差值(RSD)为0.43%,因此采用比色法测定虫草酸含量稳定性好。

[0159] 经检测,中国被毛孢ZJB18002发酵菌体中虫草酸含量219mg/g,同样条件下野生型菌株中国被毛孢L0106发酵菌丝体中虫草酸的平均含量为109.9mg/g

[0160] 实施例9:摇瓶发酵产虫草酸

[0161] (1) 孢子悬液的制备:将冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002 (*Hirsutella sinensis* ZJB18002) 接种至斜面培养基(同实施例1),16℃培养10天,取孢子,使用棉花棒将表面孢子洗脱至10mL无菌水中,将洗下的孢子悬液用含有棉花的注射器过滤,过滤后的孢子12000rpm离心5min后去上清液,加入10mL无菌水重悬后,12000rpm离心5min重新洗脱一次,用5mL无菌水重悬作为孢子悬液。

[0162] (2) 种子液的制备:

[0163] 将步骤(1)孢子悬液接种至种子培养基(同实施例6)中,16℃,150rpm培养96h,获得种子液。

[0164] (3) 发酵培养

[0165] 500mL规格摇瓶装样100mL发酵培养基,发酵时按体积浓度5%接种种子液,16℃,150rpm发酵培养336h。发酵培养基组成:葡萄糖20g/L、玉米粉10g/L、糊精5g/L、酵母粉5g/L、麸皮10g/L、蚕蛹粉20g/L、蛋白胨10g/L、硫酸镁0.5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、溶剂为蒸馏水,pH值6.0。

[0166] 上述中国被毛孢菌丝体通过摇瓶发酵生产,按照实施例8方法检测,所得发酵菌丝体中虫草酸含量为218mg/g,同样条件下,突变前野生型菌株中国被毛孢L0106发酵菌丝体中虫草酸含量为108mg/g。

[0167] 实施例10:粗蛋白及氨基酸含量的测定

[0168] 氨基酸是冬虫夏草的重要组成部分之一、是主要的营养指标。对经过诱变获得的冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002 (*Hirsutella sinensis* ZJB18002) (保藏编号CCTCC M 2018108) 实施例9发酵菌丝体、发酵滤液中蛋白质水解后,利用氨基酸自动分析仪检测其氨基酸组成,以实施例9方法制备野生型菌株中国被毛孢L0106发酵液。分析结果见表9,中国被毛孢发酵菌丝体中氨基酸总含量为306.28-320.4mg/g,发酵滤液中为2.53-3.05mg/mL,说明发酵过程中,大部分氨基酸在胞内生成。天然冬虫夏草中氨基酸总含量为292.4-315.4mg/g,与突变体冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002 (*Hirsutella sinensis* ZJB18002) (保藏编号CCTCC M 2018108) 的氨基酸含量没有明显差别。同样,在具体的氨基酸类型及种类方面两者也没有明显差异。中国被毛孢菌丝体中含量较高的几种氨基酸为组氨酸、精氨酸、谷氨酸分别为40.93、36.13、28.25mg/g;天然冬虫夏草中为组氨酸、精氨酸、谷氨酸,含量分

别为35.6、32.4、26.9mg/g;可见谷氨酸是样品中含量最丰富的氨基酸种类。另外,冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002(*Hirsutella sinensis* ZJB18002)(保藏编号CCTCC M 2018108)中必须氨基酸,包括缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、赖氨酸、络氨酸,含量也非常丰富。而且必需氨基酸在临床上有补益,辅助治疗消化系统及神经系统疾病,抑制病菌和增强免疫功能等作用。而中国被毛孢发酵滤液中氨基酸种类与含量均较低。

[0169] 表9中国被毛孢ZJB18002发酵菌丝体、发酵滤液与天然冬虫夏草中氨基酸组成

氨基酸成分	ZJB18002菌丝体(mg/g)	ZJB18002发酵滤液 (mg/mL)	天然冬虫夏草 (mg/g)
ASP	24.43	0.128	19.3
THR	13.875	-	14.8
SER	14.45	0.052	13.7
GLU	28.25	0.171	35.6
GLY	15.85	0.344	13.6
ALA	24.5	0.226	23.0
CYS	24.43	-	3.0
[0170] VAL	14.875	-	17.2
MET	9.75	-	7.8
ILE	7.25	-	12.2
LEU	17.55	0.031	10.5
TYR	6.23	-	32.4
PHE	8.08	-	14.2
HIS	40.93	0.186	9.0
LYS	19.7	0.118	26.9
ARG	36.13	-	16.2
氨基酸总含量	306.28	2.53	292.4

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江工业大学、华东医药(杭州)百令生物科技有限公司
- [0003] <120> 冬虫夏草中国被毛孢ZJB18002及其应用
- [0004] <160> 1
- [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 555
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 冬虫夏草中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)
- [0010] <400> 1
- [0011] cctgCGGagg gatcattatc gagtcaccac tcccaaacc cctgcgaaca ccacagcagt 60
- [0012] tgcctcggcg ggaccgcccc ggcgccccag ggcccggacc agggcgcccc cggaggacc 120
- [0013] cccagacct cctgtcgcag tggcatctct cagtcaagaa gcaagcaaat gaatcaaaac 180
- [0014] tttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt 240
- [0015] aatgtgaatt gcagaattca gtgaaccatc gaatctttga acgcacattg cgcccgccag 300
- [0016] cactctggcg ggcatgcctg tccgagcgtc atctcaacc tcgagcccc cgctcgcgg 360
- [0017] cggcggggcc cggccttggg ggtcacggcc ccgcgccgcc ccctaaacgc agtggcgacc 420
- [0018] ccgccgggc tcccctgcgc agtagctcgc tgagaacctc gcaccgggag cgcggaggcg 480
- [0019] gtcacgccgt gaaaccacca caccctccag ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct 540
- [0020] gaacttaagc atatc 555



图1

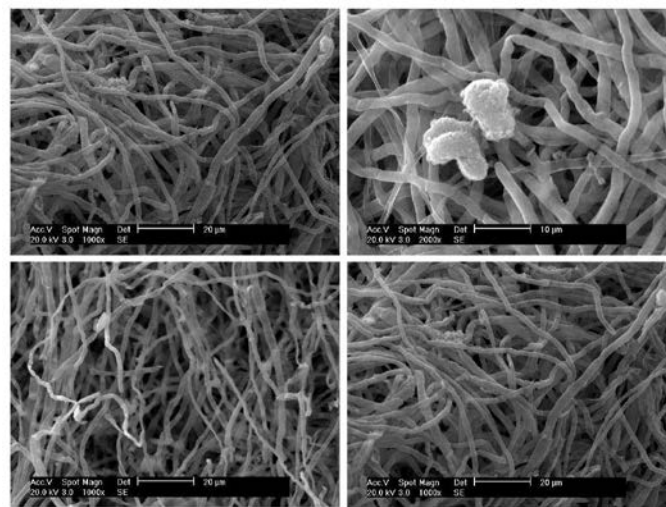


图2

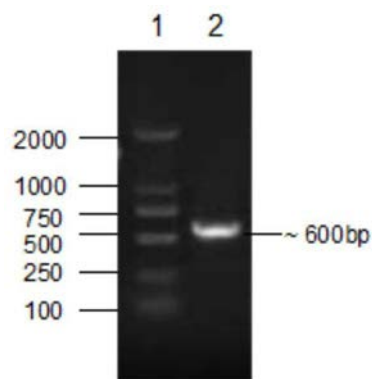


图3

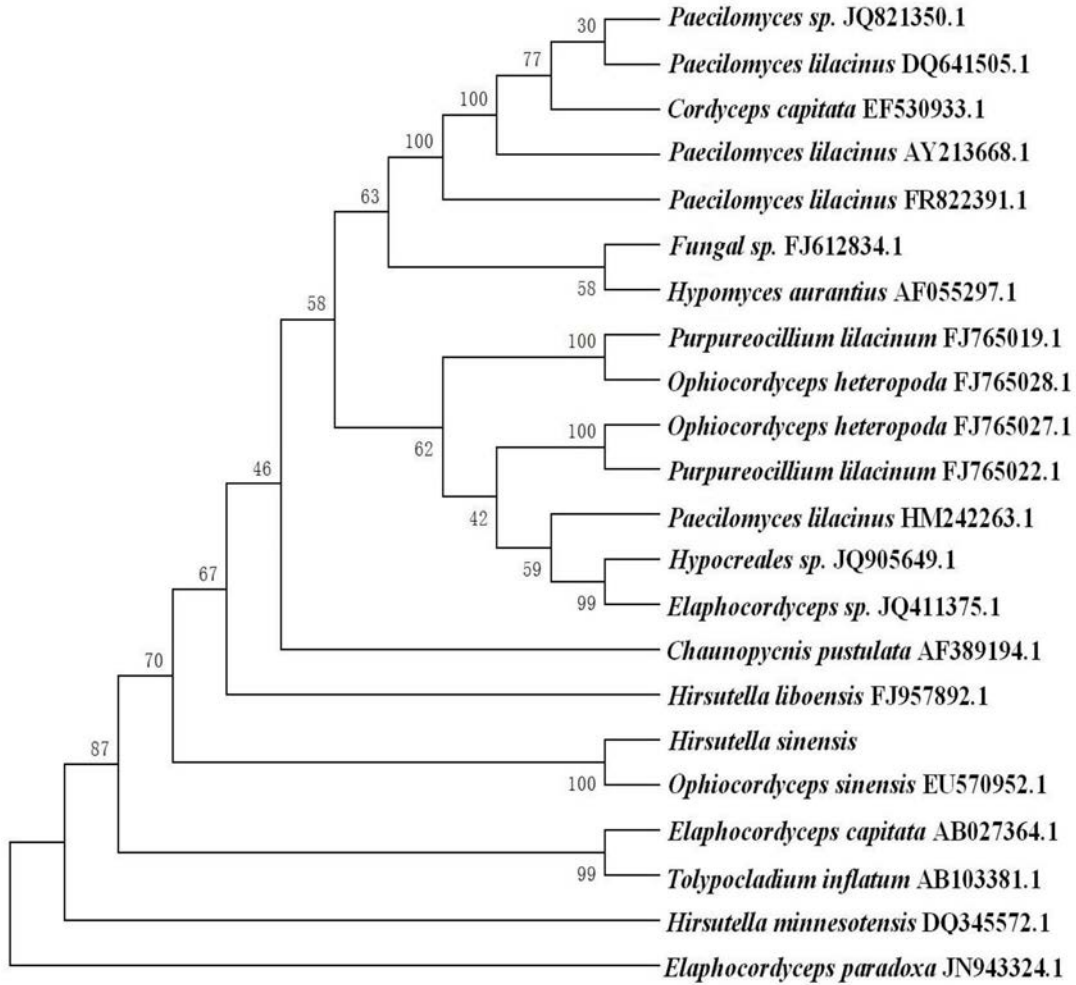


图4

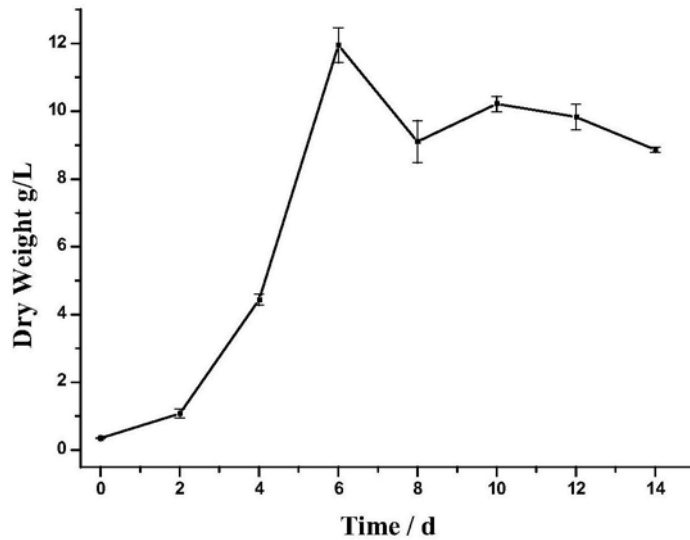


图5

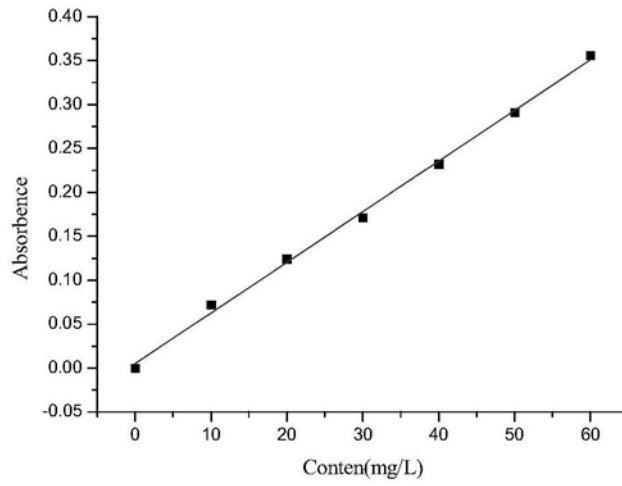


图6

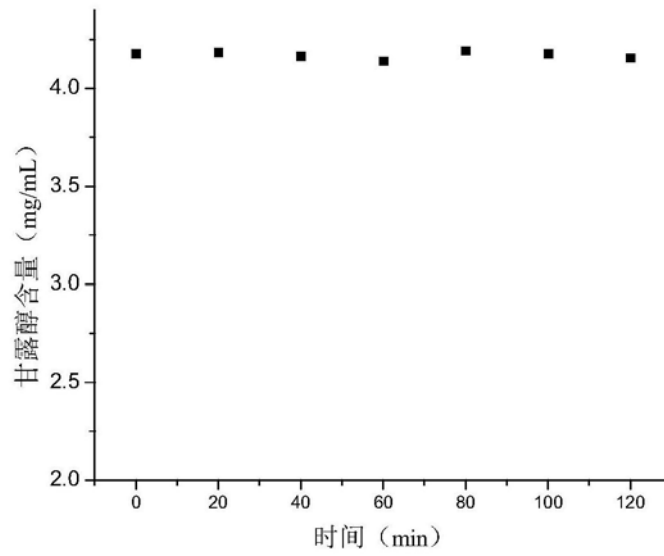
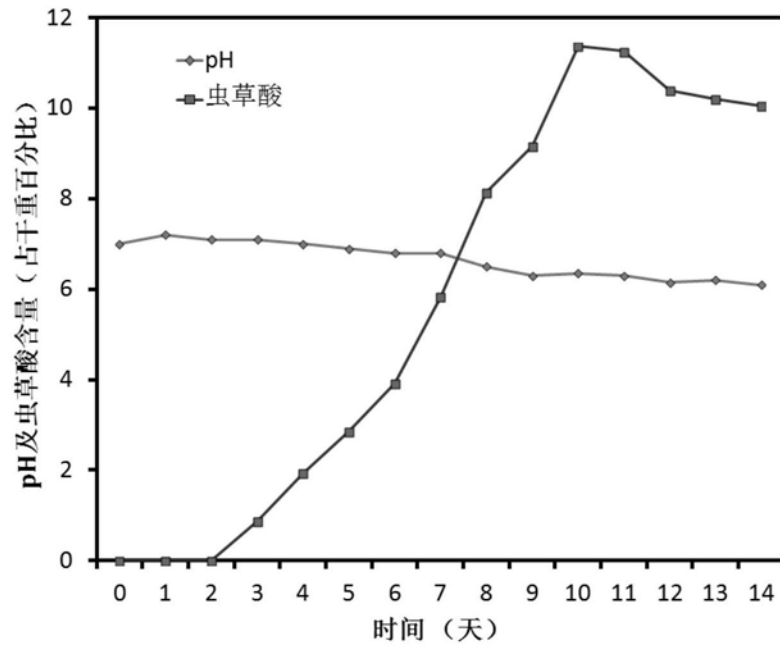


图7

A



B

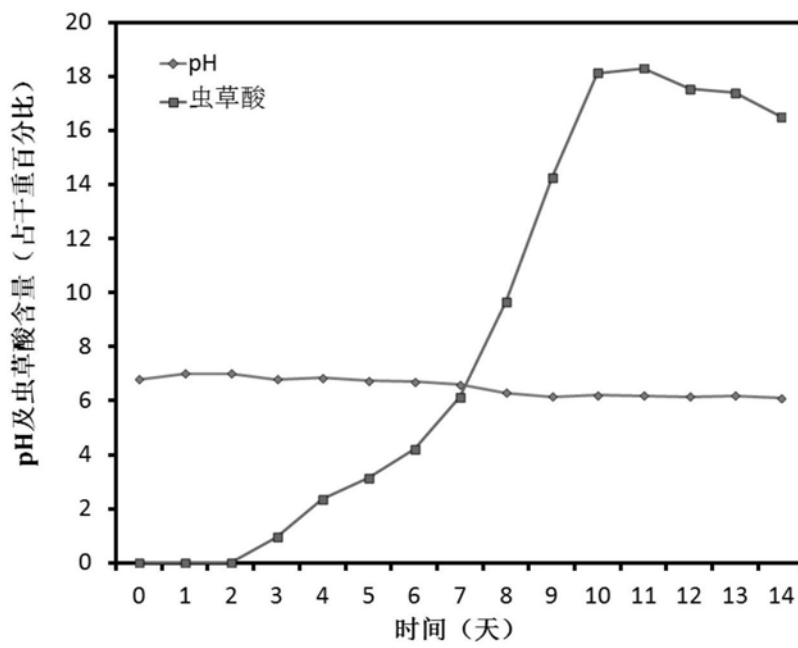


图8