



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111117896 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201911308715.2

C12R 1/645(2006.01)

(22)申请日 2019.12.18

(83)生物保藏信息

CGMCC No. 18581 2019.09.24

(71)申请人 江苏集萃工业生物技术研究所有限
公司

地址 210000 江苏省南京市江北新区药谷
大道11号加速器二期5幢202室

(72)发明人 刘庆国 应汉杰 陈勇 赵南
邹亚男 唐成伦 柳东 余斌

(74)专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237
代理人 胡建华

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12P 19/40(2006.01)

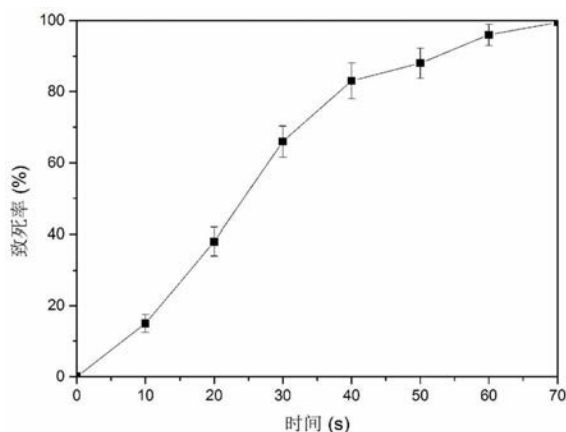
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一株蛹虫草及其在产虫草素中的应用

(57)摘要

本发明公开了一株蛹虫草及其在产虫草素中的应用,其中,所述的蛹虫草,其分类命名为蛹虫草(*Cordyceps militaris*),菌株名为CY1909,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2019年9月24日,保藏编号为CGMCC No.18581。本发明还公开了上述蛹虫草在制备虫草素中的应用,包括单批次发酵和反复批次发酵。其通过菌皮转接实现了蛹虫草的反复批次液态发酵,节省了蛹虫草斜面制备及种子液生长时间,虫草素的产量达到11.7g/L,发酵周期比单批次液态发酵缩短4天,提高了生产效率,实现了虫草素的快速合成,为虫草素工业化生产提供参考。



1. 一株蛹虫草,其分类命名为蛹虫草 (*Cordyceps militaris*),菌株名为CY1909,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2019年9月24日,保藏编号为CGMCC No.18581。

2. 权利要求1所述蛹虫草在制备虫草素中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,包括如下步骤:将由CGMCC No.18581制得的种子液接入到发酵培养基中,静置发酵,得到第一批次发酵液。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述种子液的制备方法为将蛹虫草斜面菌种接种到种子培养基中进行培养,得到种子液。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的发酵培养基中各组分的浓度为葡萄糖40~45g/L、蛋白粉15~20g/L、酵母粉5~10g/L、 KH_2PO_4 0.5~1g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~1.5g/L、腺嘌呤4~6g/L,溶剂为水。

6. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,按照10~20v/v%的接种量将种子液接入到发酵培养基。

7. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的静置发酵为25~27℃下静置培养21~28天。

8. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,将所述的第一批次发酵液中的菌皮接种到新鲜发酵培养基中,先动态培养,再静置发酵,得到第二批次发酵液;将第二批次发酵液中的菌皮接种到新鲜发酵培养基中,先动态培养,再静置发酵,得到第三批次发酵液,以此类推,重复分批次发酵过程,当最后一批次发酵液中的虫草素产量比第一批次发酵液中的虫草素产量降低20%以上时,结束发酵。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,菌皮的大小为2.5~10cm²/L发酵培养基。

10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,动态培养的条件为25~27℃,150~180rpm培养2~3天;所述的静置发酵为25~27℃下静置培养18~21天。

一株蛹虫草及其在产虫草素中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及到一株蛹虫草及其在产虫草素中的应用。

背景技术

[0002] 蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又称北冬虫夏草、北虫草,为子囊菌亚门、核菌纲、麦角菌目、麦角菌科、冬虫夏草属真菌,其作为新资源食品 and 一类新药已获得卫生部和国家食品药品监督管理局批准进入市场。蛹虫草含有多种活性物质,主要有虫草素、腺苷、虫草酸、多糖等,同时含有多种人体必需氨基酸和微量元素,其功效与冬虫夏草类似,在保健食品和医药等面具有很好的实用价值,可作为野生冬虫夏草的有效替代品。

[0003] 虫草素(Cordycepin)是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗生素,具有抑菌、抗肿瘤、免疫调节和抗炎症等广谱的生物学活性。虫草素主要来源于蛹虫草子实体,但固体栽培蛹虫草劳动强度大、成本高、子实体生长缓慢、产量较低,而液体培养可以克服以上缺点,已成为大量获取蛹虫草菌丝和虫草素的主流。

[0004] 然而,自然界原始菌株虫草素生产活性较低,蛹虫草斜面菌体生长周期长,种子液的制备耗时耗力,使得虫草素产率仍不理想,严重制约了其大规模生产及开发应用。通过诱变选育,往往可以得到稳定高产的菌株,加以高效的发酵生产工艺,可有效促进虫草素的工业化生产及其产品的开发应用。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一株高产虫草素的蛹虫草,以解决现有技术问题中虫草素产量低、发酵周期长的问题。

[0006] 为了解决上述问题,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一株蛹虫草,其分类命名为蛹虫草(*Cordyceps militaris*),菌株名为CY1909,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2019年9月24日,保藏编号为CGMCC No.18581。

[0008] 本发明的蛹虫草*Cordyceps militaris* CY1909的筛选方法,将蛹虫草出发菌株CICC14014经等离子体诱变后,利用初筛得到的虫草素生产菌株,再经过复筛得到高产虫草素的菌株。

[0009] 其具体步骤如下:

[0010] (1)孢子悬液制备:将活化好的蛹虫草菌种接种至种子培养基中,26℃,180rpm恒温震荡培养2d后用Miracloth滤布过滤,收集滤液并稀释,使得悬液含孢子量 10^6 – 10^7 个/mL。

[0011] (2)ARTP诱变:将步骤(1)所得悬液,取10μL均匀涂布在灭菌载片表面,在工作功率120W、工作气流10SLM、照射距离2mm条件下设置照射时间0~180s,处理完毕后,将带菌载片于装有生理盐水的EP管中充分混匀,稀释涂布于固体培养基,26℃培养2~3d。

[0012] (3)初筛:将步骤(2)培养所得的平板菌落接种至96孔板种子培养基中(每孔装液

量1mL), 26℃培养2~3d, 按10%接种量接入96孔板发酵培养基中, 26℃下恒温静置发酵21~28d, 测定虫草素浓度, 将高产虫草菌株进行摇瓶复验。

[0013] (4) 摇瓶复筛: 将步骤(3)所验证的高产虫草素的突变菌株, 接种于装有200mL种子培养基的1L三角瓶中, 于26℃下培养2~3d, 按10%接种量接入摇瓶发酵培养基(200mL/1L三角瓶), 26℃下静置发酵21~28d, 测定虫草素含量, 虫草素含量最高的菌株选为目标菌种, 完成筛选。

[0014] 在上述筛选方法中, 所述的种子培养基为: 葡萄糖40~45g/L、蛋白粉15~20g/L、酵母粉5~10g/L、 KH_2PO_4 1~2g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~1.5g/L, pH 5~6.0。

[0015] 在上述筛选方法中, 所述的固体培养基为: 马铃薯提取液1L, 葡萄糖15~20g, KH_2PO_4 1~2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~1.5g, 维生素B1 0.1~0.3g, 琼脂15~20g。

[0016] 在上述筛选方法中, 所述的发酵培养基为: 葡萄糖40~45g/L、蛋白粉15~20g/L、酵母粉5~10g/L、 KH_2PO_4 0.5~1g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~1.5g/L、腺嘌呤4~6g/L, pH 5~6.0。

[0017] 上述蛹虫草在制备虫草素中的应用在本发明的保护范围内。

[0018] 利用蛹虫草CGMCC No.18581发酵产虫草素的方法, 包括如下步骤: 接种发酵: 将由CGMCC No.18581制得的种子液接入到发酵培养基中, 静置发酵, 得到第一批次发酵液。

[0019] 其中, 所述种子液的制备方法为将蛹虫草斜面菌种接种到种子培养基中进行培养, 得到种子液。

[0020] 其中, 所述的种子培养基中各组分的浓度为葡萄糖40~45g/L、蛋白粉15~20g/L、酵母粉5~10g/L、 KH_2PO_4 1~2g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~1.5g/L。优选的, 葡萄糖42g/L、蛋白粉15g/L、酵母粉10g/L、 KH_2PO_4 2g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, 溶剂为水; 所述种子培养基的pH值为5~6.0, 优选5.5; 所述的培养条件为25~27℃, 150~180rpm培养3~5天。

[0021] 其中, 所述的发酵培养基中各组分的浓度为葡萄糖40~45g/L、蛋白粉15~20g/L、酵母粉5~10g/L、 KH_2PO_4 0.5~1g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~1.5g/L、腺嘌呤4~6g/L, 溶剂为水。

[0022] 优选的, 所述的发酵培养基中各组分的浓度为葡萄糖42g/L、蛋白粉15g/L、酵母粉10g/L、 KH_2PO_4 1g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L, 腺嘌呤6g/L, 溶剂为水。

[0023] 其中, 所述发酵培养基的pH值为5~6.0, 优选5.5。

[0024] 其中, 按照10~20v/v%的接种量将种子液接入到发酵培养基。

[0025] 其中, 所述的静置发酵条件为25~27℃下静置培养21~28天。

[0026] 优选地, 在得到第一批次发酵液后, 不结束发酵, 继续反复批次发酵, 具体为: 将所述的第一批次发酵液中的菌皮接种到新鲜发酵培养基中, 先动态培养, 再静置发酵, 得到第二批次发酵液; 将第二批次发酵液中的菌皮接种到新鲜发酵培养基中, 先动态培养, 再静置发酵, 得到第三批次发酵液, 以此类推, 重复分批次发酵过程, 当最后一批次发酵液中的虫草素产量比第一批次发酵液中的虫草素产量降低20%以上时, 结束发酵。

[0027] 其中, 菌皮的大小为2.5~10cm²/L发酵培养基; 所述的动态培养有利于让发酵液菌皮进行快速生长增殖。

[0028] 其中, 所述的动态培养的条件为25~27℃, 150~180rpm培养2~3天; 所述的静置发酵条件为25~27℃下静置培养18~21天。

[0029] 其中,通过菌皮转接实现了蛹虫草的反复批次液态发酵,可以省略现有技术中重复蛹虫草斜面制备和种子液的制备过程,从而缩短了虫草素生产周期,提高了生产效率。生产周期包括斜面制备、种子液培养和发酵三部分的时间,其中省去的斜面制备、种子液培养的时间有8~12天,在反复批次发酵过程中发酵时间比单批次缩短4天,综合生产周期缩短12天以上。

[0030] 有益效果:相对于现有技术,本发明优势如下:

[0031] 本发明以一株产虫草素的蛹虫草18581为生产菌株,建立一种虫草素液态发酵新工艺。通过菌皮转接实现了蛹虫草的反复批次液态发酵,节省了蛹虫草斜面制备及种子液生长时间,虫草素的产量达到11.7g/L,发酵周期比单批次液态发酵缩短4天,提高了生产效率,实现了虫草素的快速合成,为虫草素工业化生产提供参考。

附图说明

[0032] 图1为蛹虫草ARTP诱变致死率曲线。

[0033] 图2为本发明实施例4中虫草素反复批次发酵结果。

具体实施方式

[0034] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0035] 实施例1:蛹草原始菌株进行ARTP诱变的方法。

[0036] 蛹草原始菌株进行ARTP诱变的方法如下:

[0037] 将蛹草原始菌株活化培养,接种至种子培养基中,26℃,180rpm恒温震荡培养2d后用Miracloth滤布过滤,收集滤液并稀释,使得悬液含孢子量 10^6 ~ 10^7 个/mL,取10μL均匀涂布在灭菌载片表面,用无菌空气吹干。在工作功率120W、工作气流10SLM、照射距离2mm条件下,以0~180s作为辐照时间对菌株进行ARTP诱变,处理完毕后,将载片上的菌膜洗脱下来,稀释涂布于固体培养基,26℃培养3d,绘制致死率曲线,结果如图1所示。由图1可知,50s是最佳诱变辐照时间。

[0038] 实施例2:说明筛选出高产虫草素的蛹虫草的方法。

[0039] 用的培养基配方如下所示:

[0040] (1) 固体培养基:马铃薯提取液1L,葡萄糖20g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, 维生素B1 0.2g, 琼脂15g。

[0041] (2) 种子培养基:葡萄糖42g/L、蛋白粉15g/L、酵母粉10g/L、 KH_2PO_4 2g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, pH 5.5。

[0042] (3) 发酵培养基:葡萄糖42g/L、蛋白粉15g/L、酵母粉10g/L、 KH_2PO_4 1g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L, 腺嘌呤6g/L, pH 5.5。

[0043] 筛选步骤:

[0044] (1) 96孔板初筛:

[0045] 将诱变后的带菌载片于装有生理盐水的EP管中充分震荡混匀,稀释涂布于固体培养基,26℃培养2~3d后,将培养所得的平板菌落接种至96孔板种子培养基中(每孔装液量

1mL), 26℃培养2~3d, 按10%接种量接入96孔板发酵培养基中(每孔装液量1mL), 26℃下恒温静置发酵21~28d, 测定虫草素浓度, 虫草素产量高的菌株选为初筛菌株。

[0046] (2) 摇瓶复筛:

[0047] 将初筛所得的高产虫草素的突变菌株, 接种于装有200mL种子培养基的1L三角瓶中, 于26℃下培养2~3d, 按10%接种量接入摇瓶发酵培养基(200mL/1L三角瓶), 26℃下静置发酵21~28d, 测定虫草素含量, 虫草素含量最高的菌株选为目标菌种, 完成筛选。

[0048] 表1原始菌株及ARTP诱变正突变菌株产虫草素情况

	菌株编号	虫草素产量	菌株编号	虫草素产量	菌株编号	虫草素产量
	A0	5.14±0.11	A40-11	7.83±0.19	A50-18	8.51±0.25
[0049]	A40-3	8.05±0.26	A50-2	9.24±0.15	A50-21	6.94±0.17
	A40-7	6.23±0.12	A50-5	7.92±0.23	A50-23	11.46±0.31
	A40-8	10.77±0.27	A50-13	12.01±0.34		

[0050] 注: 以原始菌株为对照, 以虫草素含量为评估值, 评估值大于10%为正突变。

[0051] 如表1, 经过摇瓶复筛获得的10株突变株虫草素产量明显高于原始菌株A0, 最终筛选出摇瓶发酵虫草素产量最高的突变株A50-13, 将该菌株命名为CY1909, 已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 其保藏编号为CGMCC NO.18581, 保藏日期为2019年9月24日。

[0052] 实施例3: 摇瓶中进行虫草素单批次液态发酵

[0053] 1) 摇瓶种子液制备: 用蛹虫草CGMCC NO.18581斜面菌株作为发酵菌种, 刮取两个试管斜面接接入装有200mL种子培养基的1L三角瓶中, 在26℃, 180rpm培养3天获取成熟种子液。

[0054] 2) 按照如下配方制备发酵培养基: 葡萄糖42g/L、蛋白粉15g/L、酵母粉10g/L、KH₂PO₄ 1g/L、K₂HPO₄ · 3H₂O 1g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.5g/L, 腺嘌呤6g/L, 用盐酸调pH至5.5。

[0055] 3) 接种发酵: 将制备成熟的种子液以10(v/v%)接种量接入装有200mL上述发酵培养基的1L三角瓶中, 在26℃下静置发酵培养至腺嘌呤消耗完全, 25天结束发酵, 虫草素产量为11.5g/L。

[0056] 实施例4: 摇瓶中蛹虫草的反复批次液态发酵

[0057] 发酵培养基的组成与实施例3相同。

[0058] 按照实施例3方法制备成熟的种子, 以10(v/v%)接种量接入装有200mL发酵培养基的1L三角瓶中, 26℃静置发酵至腺嘌呤消耗完全, 第一批次发酵结束, 在无菌条件下挑取1cm²大小的第一批发酵液的菌皮, 转接入200mL新鲜摇瓶发酵培养基中, 在26℃, 180rpm条件下振荡培养2天后, 再于26℃下静置培养至腺嘌呤消耗完全, 结束第二批次发酵; 依次进行12个批次发酵, 第12批次发酵产量比第一批次下降20.2%, 结束发酵。发酵结果如图2所示, 虫草素平均产量为11.7g/L, 平均发酵周期21天。

[0059] 与单批次液态发酵相比, 反复批次液态发酵工艺不仅省去了斜面制备和种子液培养的过程, 且发酵周期缩短了4天, 有效提高了虫草素生产效率。

[0060] 本发明提供了一株蛹虫草及其在产虫草素中的应用的思路及方法, 具体实现该技

术方案的方法和途径很多,以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。本实施例中未明确的各组成部分均可用现有技术加以实现。

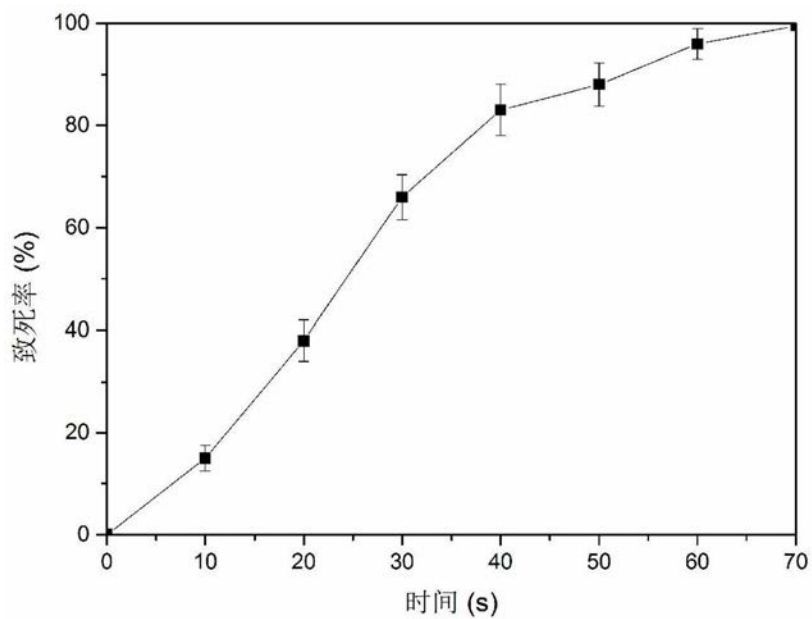


图1

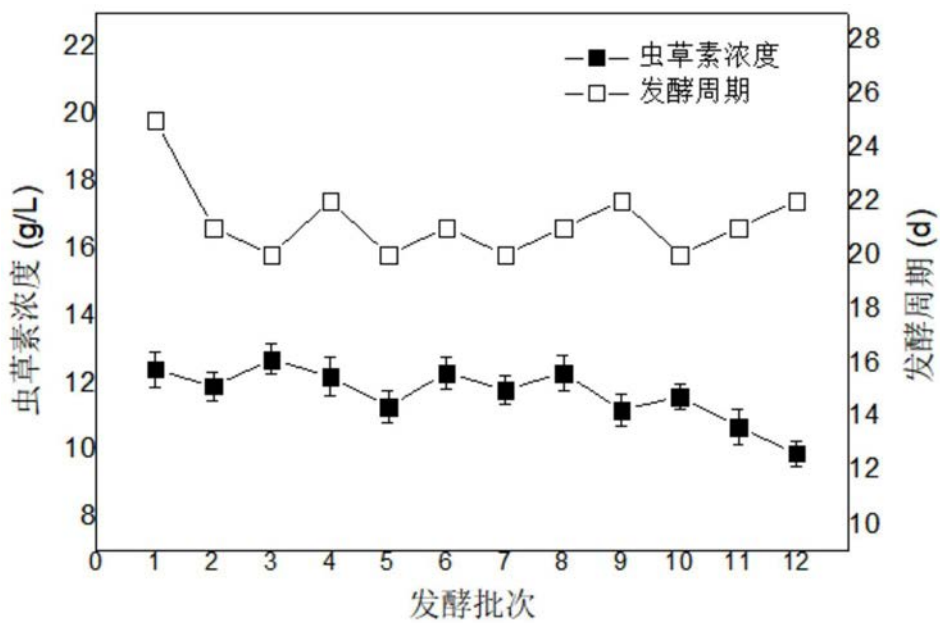


图2