

产虫草素真菌资源的研究现状及应用前景

买尔哈巴·艾合买提, 古丽·艾合买提, 杨新平*

新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091

摘要: 虫草素是中国传统中药冬虫夏草中特有活性成分, 它具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫、治疗白血病等多种功效, 作为一种新的抗菌素, 虫草素已成为一个研究热点。人工合成虫草素过程复杂且产量极低, 且会产生毒副产品, 含有虫草素的天然材料稀少, 高效率提取纯化工艺有待于优化。本文对虫草素的菌株来源、测定方法、提取方法、国内外研究现状及应用前景进行了总结, 提出通过资源调查拓宽虫草素来源, 找出虫草素合成酶活性更好的菌种, 为降低生产成本、提高生物合成量, 提供相应的基因和种质资源, 为其进入更加广泛的使用范围奠定基础。

关键词: 虫草素; 蛹虫草; 真菌资源; 资源调查; 腺苷含量

中图分类号: S567.3+5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.033

Present Situation and Application Prospect of Cordycepin-Production Fungus

Maierhaba · AIHEMAITI, Guli · AIHEMAITI, YANG Xin-ping*

Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agriculture of Sciences, Xinjiang Urumqi 830091, China

Abstract: Cordycepin, the unique active ingredients in Chinese traditional medicine *Cordyceps sinensis*, is a hot spot nowadays due to its bio-activities, such as anti-tumor, anti-virus, immune regulation, treatment of leukemia, etc. Synthetic process of cordycepin is complex and low yield with toxic by-products. Natural resources of cordycepin is rare. The fungal sources, measurement, extraction, application prospect and the present research situation of cordycepin-production fungus at home and abroad were reviewed in this study. It was proposed to broaden the sources of cordycepin by resources investigation, to find out the strains which produce high cordycepin with lower cost, and to lay the ground for its more widespread usage.

Key words: cordycepin; *Cordyceps militaris* fungi resources; resources survey; adenosine content

虫草素(Cordycepin)是中国传统中药冬虫夏草中特有活性成分, 又称蛹虫草菌素、虫草菌素。冬虫夏草具有护心养脑、强肾固本、改善血液循环、抗疲提神、改善亚健康状况等作用, 是众所周知的滋补品。现代药理学研究表明虫草素具有: 抗肿瘤、抗菌、抗病毒、调节免疫、降血糖、降血脂、治疗白血病等多种功效, 对十大恶性疾病的临床治疗具有功能显著的、潜在的应用空间^[1]。虫草素作为虫草中特有的活性成分, 已引起世界范围内的广泛关注, 具有良好的应用前景。

虫草素分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_3$, 相对分子质量为 251D, 碱性, 针状或片状结晶, 熔点为 230 ~ 231 °C, 溶于水、热乙醇和甲醇, 不溶于苯、乙醚和氯仿, 紫外

光的最大吸收波长为 259 nm^[2]。以虫草素为主要成分的新药已在临床上试用于白血病等绝症的治疗, 但大量提取分离其纯品非常不易, 化学合成也存在一定的弊端, 因此国际市场上虫草素的价格非常昂贵, 极大的限制了其使用量和应用范围。

从资源总量来看, 虫草属于资源稀缺品种, 由于虫草的药用价值不断地被人类所发现, 虫草资源的产业化应用量和优质虫草的市场需求量急剧膨胀, 滥采过挖, 使得野生虫草资源日益匮乏。可以预见, 这种状态如不改变, 冬虫夏草进入濒危物种名录为期不远。我国是野生虫草资源的主产国, 也是虫草资源的出口大国, 是最早发现、认识和应用虫草的国家, 虫草作为珍稀名贵滋补中药材, 与人参、鹿茸一起被列为我国中药“三大宝”。但是, 迄今我国对野生虫草资源的开发、利用和替代上, 仍存在着十分明显的空白与差距, 主要表现在: 野生虫草产品多为原料或粗制品; 对野生虫草的功能基因、特殊活性物质

及其潜在的巨大利用价值尚未得到挖掘和系统开发;对野生濒危资源缺乏可持续利用的工厂化生产的重大关键技术;对野生虫草所特有的活性物质“虫草素”,更缺乏高纯度工厂化制备的关键技术和临床前系统研究。

半个多世纪以来,人们对虫草素从菌株来源、产量提高、人工合成修饰、药理活性、作用机制及产品开发等多方面进行了研究,尤其在虫草素抗肿瘤活性试验、虫草素对在胚胎细胞中细胞核和细胞质RNA合成的影响作用、对X射线诱导的潜在致命损伤修复作用、对人体免疫缺陷与5型病毒转录酶和传染的抑制作用、对人体外周血单核细胞生产白细胞介素-10的作用效果、对抗白血病活性和作用机理等领域的应用研究方面都取得了开创性的成果。因此,充分挖掘产生虫草素的菌种资源和对它的有效利用,将为虫草素的药理活性、临床药理学研究以及化学修饰等奠定坚实的基础。

1 产生虫草素的真菌资源

1.1 蛹虫草

虫草素最早是从蛹虫草中检测分离出来的。蛹虫草的生态适应幅度大,广泛分布于世界各地,包括中国、美国、俄罗斯、加拿大、意大利等国,在中国的吉林、湖北、贵州、云南、四川、河南等省均有发现^[3,4]。我国在世界上第一个成功完成人工蛹虫草培养并已大面积展开。目前,虫草素的研究以人工培养蛹虫草子实体或蛹虫草全体为主。人工培养蛹虫草产物中虫草素的检测量在0.0%~1.80%,平均0.387%。虫草素在不同来源的蛹虫草中检测含量差异很大,不同产地野生蛹虫草中虫草素含量也存在差异,陆槐杰^[5]等用高效液相色谱法对我国南方、北方、野生、人工培育的各种食用菌中虫草素的测定结果表明,虫草素作为虫草属真菌的特有功效成分,仅存在于冬虫夏草和北冬虫夏草中,在其他食用菌中未检出。与人工虫草比较,野生冬虫夏草的子实体部位比虫部位的虫草素含量高。野生北冬虫夏草中的虫草素含量是冬虫夏草的10倍左右。孙月^[6]等采用高效液相色谱测定分析的结果表明,同种培养基中蛹虫草不同部位和不同培养基中蛹虫草相同部位的虫草酸、虫草素含量均有不同。培养条件的改变也会使发酵液中虫草素含量有所差异^[7]。贡成良^[8]等对家蚕蛹虫草中的虫草素含量进行了薄层色谱和高效液相色谱分析,确定家蚕蛹

虫草中的虫草素含量明显高于天然冬虫夏草。

除了蛹虫草子实体及其无性型蛹草拟青霉发酵菌丝体^[9]外,还有泰山虫草、九州虫草、蝉花及其无性型蝉拟青霉、香棒虫草、虫草头孢菌、古尼虫草、无冠构巢菌霉、蝙蝠蛾被孢霉、拟黑虫草、蝙蝠蛾柱霉、克列特尼棒束孢霉^[10-19]等,用豆天蛾的幼虫为寄主接种蛹虫草菌得到的豆虫草中也检测到了虫草素,但是含量低于蚕蛹虫草,并在某些样品中,如古尼虫草,虫草素是否稳定存在,尚待进一步研究。

虽然可以利用蛹虫草发酵合成虫草素,其虫草素合成量也远远高于冬虫夏草等菌株,但其子实体生产周期长,导致虫草素生产成本高,制约了虫草素进一步的研究和开发利用。目前从蛹虫草人工培养液及菌丝体中分离出了虫草素,甚至从培养基残基中也能检测到含量值,其含量在0.072%~1.250%,平均0.447%。培养基中含有丰富的菌丝体,其中还有大量的虫草素和腺苷及多糖类等活性物质^[20]。张红霞^[21]等于1964年在Kaczka无冠构巢曲霉菌发酵液研究的基础上进一步研究表明,采用高效液相色谱法首次对无冠构巢曲霉菌株发酵液中虫草素和腺苷的含量进行了检测,发现无冠构巢曲霉菌株在温度为28℃和35℃时,虫草素和腺苷含量均高于北冬虫夏草菌株在最适温度下的含量,在提取虫草素和腺苷能力方面更有优势,且成本较北冬虫夏草菌的低,有望成为提取虫草素和腺苷的第二生物来源。日本的Mina Masuda^[18]从培养的菌丝体中获得了2.5 g/L的虫草素含量。许勤勤等^[22]利用深层发酵培养模式在接种90 h后得到了20.2 g/L的生物量。蔡水淋测得蛹虫草液体深层发酵液中虫草素的生物量为30.06 g/L^[23]。通过液态深层培养可以快速生产虫草菌丝体,同时,还可以优化生产条件,提高其生物活性物质的量,方便目的组分的提取。

除此之外,虫草培养基残余体中含有虫草素、虫草多糖、腺苷等虫草特有的活性物质,此外还含有生物碱、甾类化合物、甾醇、萜类、酚类、酶、维生素、SOD等有效成分^[24]。姜虹^[25]等采用水浴煎煮法提取蛹虫草大米培养基活性粗多糖,多糖的最高得率为0.74%。谭琪明^[26]等用水提取、pH 5、料液比1:50、温度70℃、时间3 h的提取工艺从蛹虫草小麦培养基中提取虫草素,提取率可达94.87%。王雅玲^[27]等以蛹虫草大米培养基残基为原料,采用超声波辅助提取法,根据虫草素的理化性质,用不同提取溶剂、

温度、时间和 pH 进行单因素实验。结果表明,蛹虫草大米培养残基中虫草素含量为 2.011 ~ 2.185 g/kg。韦会平^[28]等研究表明蛹虫草培养基残基的主要成分为淀粉类物质。有效利用虫草培养基残余体不仅能提高蛹虫草生产的附加值,也能解决环保问题,具有重要的经济效益和生态效益。因此,近年来虫草培养基残余体和发酵液的综合利用研究备受关注。

1.2 冬虫夏草

冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 又名虫草、夏草冬虫,民间被称为大成草,系麦角科虫草真菌感染鳞翅目蝙蝠蛾科幼虫后,最终成熟后伸出虫壳的外表面而形成的虫—菌结合体,是我国特有珍稀名贵中药材。该药具有益精髓,补虚损,保肺,益肾,止血,化痰等功效,主要用于久咳虚喘,劳嗽咯血,阳痿遗精,腰膝酸痛等症。现代药理和临床研究结果表明冬虫夏草具有镇强心、降血脂、降低胆固醇、调节机体免疫功能、抗肿瘤等多种药理活性,对高血压、冠心病、慢性肝炎、慢性肾炎、支气管炎以及食道癌、肝癌、自身多发性疾病等均有较好疗效。关于天然冬虫夏草及其发酵菌丝体中虫草素的存在与否一直存在争议,仅以不同产区的冬虫夏草子实体及不同地理来源的冬虫夏草菌株发酵菌丝体检测得到的数据分析,天然冬虫夏草子实体中的虫草素因地而异。黄兰芳和徐健君等报道野生冬虫夏草中虫草素的检测含量 0.00054% ~ 0.04480%, 平均 0.01200%^[29]。陆魏杰测得的产自西藏和青海的野生冬虫夏草中虫草素含量分别为 0.069% 和 0.071%, 发现草部位比子实体部位的虫草素含量高,且比人工蛹虫草的含量低。

1.3 新疆虫草

新疆虫草 [*C. grsacilis* (Grev.) Dur et Mont] 为新疆阿勒泰山和伊犁地区特有的虫草资源,寄生在阿尔泰蝙蝠蛾 (*Hepialus altaicola* W.) 昆虫幼虫上的复合体^[30,31],为新疆传统哈萨克民族药,主要功效为补精髓、保肺肾、保肝、止咳化痰等。研究发现,新疆虫草与冬虫夏草有相同的化学成分,两者为同属真菌,具有与冬虫夏草相同的临床作用,被收入新疆维吾尔自治区药品标准。其部分主要活性成分腺苷、虫草素、多糖等含量接近甚至还略高于冬虫夏草。索菲娅^[32]等测定新疆虫草中虫草素含量高达 38.9 μg/g,为冬虫夏草含量(4.2 ~ 11.3 μg/g)的 3 ~ 10 倍左右,因此从亲缘关系上讲新疆虫草是目前

我国各种虫草和蛹草中最接近冬虫夏草的药材,有可能成为冬虫夏草新资源。索菲娅^[33]以野生新疆细虫草为实验材料,对其提取物抗菌和抗氧化活性进行的研究结构表明,新疆细虫草醇提取物对大肠杆菌的抑菌作用最强,其抑菌圈直径达到 11.8 mm; 其水提取物和醇提取物对 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 值分别为 1.77 mg/mL 和 1.23 mg/mL。目前,由于新疆虫草的野生资源已面临濒危,人工培养虫草已是大势所趋。实验证明天然虫草与发酵制品的化学组成基本一致^[34],因此发酵产物常被用作替代品。利用新疆虫草液体发酵可以在较短的时间内获得大量菌丝体及其发酵产物,由于这一过程量高、周期短、且生产成本较低,因此,以药食两用的真菌作为天然抗氧化剂代替防腐剂应用到食品防腐剂、食品添加剂、药材等,不仅具有重大意义而且前景广阔。

2 虫草素的测定

我国是最早认识和利用虫草的国家,过去由于技术水平和观念的限制,检测和提取虫草素方面只限制在层析、水煮和超微粉碎等比较原始和低层次的技术。虫草素作为一种有效的生物活性成分,对其含量的测定方法很多,主要有紫外分光光度法、高效液相色谱法 (HPLC)、毛细管电泳法、高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-ESI/MS) 法及薄层色谱扫描法等。而目前虫草素的分析测定多采用高效液相色谱 (HPLC) 分析法,一般均采用反相色谱法,以十八烷基键合硅胶为固定相,流动相有很多种,如甲醇-水 (85:15)、甲醇-pH 6 的磷酸盐缓冲液 (17:3) 或乙腈-水 (90:10) 等等。采用 C₁₈ 填料的色谱柱,柱子填料粒径为 5 μm,柱子直径为 4.6 mm,柱子长为 150 mm 和 250 mm,流动相为甲醇、水或甲醇、磷酸盐缓冲液,检测波长为 254、259 和 260 nm,检测温度为 20 ~ 40 °C,柱流速为 0.5 ~ 1.0 mL/min,进样量为 5 ~ 20 μL^[35-37]。薄层色谱扫描法 (thin-layer chromatography scanning, TLCS) 具有展开时间短、显色方便、价格较便宜的特点,但此法测定虫草素含量的准确度和精密度均略低于 HPLC^[38]。国内有人综合 HPLC 与 TLCS 的优点,将两者结合起来,对虫草素含量进行定性定量测定^[39]。李文等^[40]采用紫外分光光度法测定蛹虫草菌丝体中虫草素含量,样品中虫草素用 50% 乙醇微波-超声提取,测定时首先全波长扫描选定 259 nm 为测定波长,然后制作标准曲

线,测定样品虫草素含量。紫外分光光度法与 HPLC 方法相比, HPLC 方法检测虫草素,能够在测定时候将样品出峰时间与标样出峰时间比对,保证检测的样品成分为虫草素,能够保证结果的准确性,而紫外分光光度法是检测样品在 259 nm 波长处的吸光度,测定的样品是提取得到的混合物,不能排除样品中其他核苷类物质等的影响,不能精确的测定虫草素的含量。高效毛细管电泳技术(High performance capillary electrophoresis, HPCE)是近年来分析化学中发展迅速的领域之一,它兼有高压电泳的高速、高分辨率及高效液相色谱的高效等优点,同时又因其样品预处理简单,用量少,自动化程度高等优点,也用于虫草素的测定及鉴别。Rao 等^[41]采用毛细管电泳法对蛹虫草中虫草素进行定性和定量分析,检测波长为 254 nm,检测条件为:20 mmol/L 的硼酸钠溶于 28.6% 甲醇的缓冲液,pH 9.5,分离电压 20 kv,水力喷射时间 10 s,温度 25 °C,线性范围为 20 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与 HPLC 检测结果有可比性,优点是快速分析和低检测成本。

由于地理环境和生长条件的不同,不同产地野生虫草的虫草素含量有所不同,产生这种差异除了生长环境方面的因素以外,也包括提取方法、测定方法等人为了的因素,其具体原因有待进一步分析研究;一些人工培养产物中检测不到虫草素含量,而另一些检测含量则很高。黄国鑫等测定出人工蛹虫草子实体中的虫草素含量为 0.503 mg/g。何余堂等利用超声波酶法辅助分离提取人工栽培北虫草中虫草素的提取率为 0.923%,而郭涛等利用高效液相色谱法测定人工蛹虫草中的虫草素提取率为 1.537%^[42],夏敏等人的虫草素提取率是 1.216%^[43]。当然,人工培养的蛹虫草中虫草素检测含量受到各种培养条件的影响。如硒、硫酸铵、半胱氨酸、丝氨酸、丙氨酸、硫酸亚铁、氯化钙、日光灯照度、温度、液体发酵的最适条件等,都对虫草素在人工培养产物中的检测含量有明显的影响^[44]。有关如何从蛹虫草子实体中提取纯化得到虫草素的研究报告也较多。多数都是采取水或水与甲醇(或乙醇)的混合溶剂,进行加热震荡提取、回流提取、或超声波震荡提取,经过简单萃取后,过阳离子交换柱或硅胶柱,最后结晶得到纯品。但报道的这些方法均十分粗略,没有对各步的工艺条件进行优化,因此提取效率不够理想,提取纯化的成本没有降到最低。

3 虫草素的提取

获取虫草素的方法包括三条途径:从天然虫草中提取、人工合成和通过生物工程的方法从虫草组织液中提取。人工合成虫草素虽然在上个世纪六十年代我国曾有报道,但由于合成的起始原料较贵或设备投入巨大或产业化工艺缺失或总收率太低或合成工艺技术无法重复,迄今难以实现产业化。目前,国内也有几家企业能够通过生物工程的方法从人工培育的虫草子实体中提取虫草素,但由于工厂化大规模培育和提取纯化的关键技术尚未突破,其产品的虫草素含量很低,难以为虫草素开发新药,并实现产业化提供原料药的保障。虽然目前发现的天然虫草资源稀缺,价格昂贵,含量甚微,还未成为主要原料,但本研究室前期对新疆天山北部一带大型真菌的资源调查研究结果表明,某些药用食用真菌中检测到虫草素和腺苷含量,其具体分析研究正在进行中,可见有望成为虫草素的新生资源。

除了获取途径,还要考虑提取虫草素的原料,目前主要有 3 种:虫草菌丝体、子实体和发酵液。所采用的原料不同,提取虫草素的方法也有一定差别。根据虫草素溶于水、热乙醇和甲醇的性质,虫草素的提取一般采用水、50% 乙醇、乙醇和甲醇等溶剂。除直接进行提取外,还可先用乙醚脱脂,再进行提取。提取方法主要有浸提法、回流法、渗漉法、超声法、索氏提取法和超临界萃取法等,不同的提取原料适用的方法不同。

4 虫草素的研究现状及应用前景

自 1997 年发现虫草素具有特殊的选择性杀死白血病癌细胞的作用以来,已引起国内外专家的极大关注,涉及领域从提取制备、生物活性、药用价值、功能作用、作用机理以及利用开发的各个方面。目前用虫草素制成的治疗白血病新药已由美国国家癌症研究所波士顿医学中心(BMC)和 OXIGEN 公司合作进入第三期临床实验。日本、韩国等已有虫草素产品出口至欧美市场。也有不少以虫草素为主的药品、保健品及化妆品投放国内市场。陈顺志^[45]等采用生物技术和超临界萃取技术成功获得了蛹虫草中的虫草素,经加工处理研制成虫草活性素软胶囊。在国内由虫草素合成的治疗白血病新药也已进入 I 期临床阶段。最近二十多年来,在虫草素抗肿瘤活性试验、虫草素对在胚胎细胞中细胞核和细胞质

RNA 合成的影响作用、对 X 射线诱导的潜在致命损伤修复作用、对人体免疫缺陷与 5 型病毒转录酶和传染的抑制作用、对人体外周血单核细胞生产白细胞介素-10 的作用效果、对抗白血病活性和作用机理等领域的应用研究方面都取得了开创性的成果。所以,随着科学技术的飞速发展,虫草素的独特功效将会进一步的被发掘和利用,因此,其具有重要的开发和应用价值。

草素疗效显著但大量提取分离得到纯品存在困难,导致国际市场上虫草菌素的价格非常昂贵,以致纯品价格高达 2000 美元/g 以上^[46]。虫草素的合成途径异常复杂,生物合成的虫草素含量还是相对较低且成本高,化学合成产品由于纯度问题可能对人的健康造成威胁,所以生产量远不能满足市场需求。涂红艳等对虫草素的化学合成方法进行了总结,主要包括 4 种方法:1)以 3'-O-对硝基苯磺酰基腺苷为原料的合成方法;2)以叔戊酸-2-羟基-4-戊炔酯为原料的合成方法;3)以 6-N-苯甲酰基-5'-叔丁基二甲基硅氧基-2',3'-环氧腺苷为原料的合成方法;4)以 3'-O-2,4,5-三羟基腺苷为原料的合成方法。其中以第 4 种合成方法制备虫草素的报道较多^[47]。但是化学合成始终存在很大的缺陷,得率低再加上合成过程中使用的大量的有机溶剂(如氯仿等)对环境造成的污染,成为限制其发展的瓶颈。目前应用最多的还是利用虫草属真菌进行生物合成来获得虫草素。对虫草素生物合成途径的研究始于 20 世纪六十年代,终止于八十年代,其间获得许多重要结论,但是迄今尚未分离出虫草素合成途径中的关键酶类。虽然虫草素能够通过化学及生物的方式合成,近几年也未见关于虫草素合成途径和相关酶调控机制的文献报道,其生物合成机制尚存在不清楚的地方。虫草素究竟以何种磷酸腺苷(AMP、ADP、ATP)为直接底物生成,目前尚无定论。毛先兵^[48]认为,虫草素通过对 ADP 的 3'-位碳进行还原生成。同时根据 5'-磷酸虫草素对蛹虫草自身具有毒性该事实,推断无论底物为哪种磷酸腺苷,5'-磷酸虫草素生成后须脱磷酸化。张琦申请的发明专利涉及了一种与虫草素合成有关酶及其编码基因^[49]。他通过扩增编码单磷酸酶(Mono-phosphatase)的基因,获得高表达的重组单磷酸酶。该多肽能以 3'-脱氧-单磷酸腺苷为底物合成虫草素。并以 3'-脱氧-单磷酸腺苷为底物合成虫草素的单磷酸酶称为虫草素合成酶(Cordycepin synthetase),用已知的蛋白纯

化技术(如 Histag 纯化)进一步纯化,获得纯的重组虫草素合成酶。重组虫草素合成酶粗提蛋白或纯酶进一步固定化,获得固定化重组虫草素合成酶。最终测定重组虫草素合成酶的活力,即以 3'-脱氧-单磷酸腺苷为底物进行酶催化反应,测定反应产物中虫草素的含量。

从已有的研究报道来看,国外对虫草素生物合成的研究以液体发酵培养方式为主,液体培养基中虫草素的浓度所能达到的最高水平为 2214.5 mg/L,生产周期大约需要 16 d^[50-53]。而在国内,对虫草素生物合成的研究以固体发酵培养方式为主,生产周期约需 30 d,产出的蛹虫草子实体中虫草素的含量大致在 0.2%~0.6%之间,而子实体采收后的培养基中虫草素的含量大致在 0.1%~0.3%之间^[54]。

虽然有报道无冠构巢曲霉及一些其他种的虫生真菌也能产生虫草素,但对于其菌株诱变筛选、培养条件优化等进一步研究还不够。研究探索虫草素新的微生物来源,寻找生长速度较快且产虫草素能力强的其他菌株,将可能成为虫草素的另一个重要生物源。笔者认为,首先目前所要做的是尽可能充分挖掘产虫草素的新生物资源,经过多方位地理环境及气候条件下进行资源调查,收集含虫草素可能性大的微生物,使用规范的提取工艺测定其虫草素含量,应用生理生化、分子生物学方法对其系统整理、分类鉴定。其次,与现有虫草素资源中虫草素含量进行比较,如蛹虫草、冬虫夏草、泰山虫草、九州虫草、古尼虫草和无冠构巢菌霉等等。最后,进一步对生物合成途径中所调控的酶进行研究,从基因水平以及蛋白质水平上阐明虫草素的合成途径,克隆与虫草素合成相关的酶基因,从而构建转基因菌株,将会是虫草素生产的突破口。可通过改进培养条件,促进生物体内合成虫草素,提高产量,同时加速虫草素分离、纯化及产业化的研究,建立标准的虫草素检测方法,这不仅符合国内外研究的发展趋势,而且具有重要的经济价值和社会意义。

参考文献

- 1 Wang CM(王成明), *et al.* The research progress of clinical application of cordycepin-the main active constituents of *Cordyceps militaris*. *Guangzhou Chem Ind*(广州化工), 2009, 37(5):42-43.
- 2 Jiao YC(焦彦朝), *et al.* Metabolites with biological activity in the genus *cordyceps* and its anamorph. *Guizhou Agric Sci*

- (贵州农业科学), 1990, 3: 53-54.
- 3 Liang ZQ (梁宗琦). Chinese fungus · Chinese Caterpillar Fungus(中国真菌志·虫草属): Beijing: Science Press, 2007. 32; 27.
 - 4 LI F(李峰), et al. New discovery, identification, and characteristics of *Cordyceps militaris* in Henan province. *J Henan Agric Univ*(河南农业大学学报), 2014, 48: 52-57.
 - 5 Lu WJ(陆巍杰), et al. Comparative study on nucleoside kind of efficacy composition in *North cordyceps*, *Cordyceps sinensis* and edible fungi. *Sci Tech Ind Chin*(中国科技产业), 2012, 9: 56-59.
 - 6 Sun Y(孙月), et al. Determination and analysis of cordyceps acid content and cordycepin in *Cordyceps militaris*. *Edible Fungi Chin*(中国食用菌), 1999, 18(6): 19.
 - 7 Xie CY, et al. Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium. *Ann Microbiol*, 2009, 59: 293-299.
 - 8 Gong CL(贡成良), et al. Analysis of chemical compositions of silkworm *Cordyceps militaris*. *Sericultural Sci*(蚕业科学), 2002, 28: 168-172.
 - 9 Wen L(温鲁), et al. Detection and comparison Cicada with relevant cordycepin active ingredient. *Jiangsu J TCM*(江苏中医药), 2006, 27: 45-46.
 - 10 Li RX(李瑞雪), et al. Studies on culture technology of cordycepin in *Paecilomyces cicadae*. *J Xuzhou Inst Tech*(徐州工程学院学报), 2007, 22(10): 23-30.
 - 11 Chang H(常泓), Zhang P(张鹏). Comparison and analysis of the cordycepin in *Cordyceps Barnessii Thwaites* and *Cordyceps Sinensis*. *J Shanxi Agric Univ*(山西农业大学学报), 2003, 23: 345-347.
 - 12 Li X(李鑫), et al. The development of the cordyceps fungus powder fermented beverage. *J Microbiol*(微生物学杂志), 2003, 23: 55.
 - 13 Chen ZH(陈作红), et al. Determination of nucleosides in *Cordyceps Gunnii* by HPLC. *Mycosystema*(菌物系统), 2003, 22: 489-493.
 - 14 Chen QT(陈庆涛), et al. A study on morphology of *Mortierella hepiali* sp. nov. *J Shanxi Univ*(山西大学学报), 1986, 4: 70-74.
 - 15 Chen ZH(陈自宏), et al. Solid fermentation technique for cordycepin production by *Cordyceps nigrella* strain cnig-56. *Acta Edulis Fungi*(食用菌学报), 2010, 17: 80-82.
 - 16 Li ZL(李兆兰), Sun YH(孙云汉). A new species of *Scytalidium--Scytalidium Hepiali*. *Acta Mycologica Sin*(真菌学报), 1988, 7: 23-28.
 - 17 Zhu XN(褚西宁), et al. The determination of the main components in mycelia of *Isaria cretacea Morris*. *J Shanxi Univ, Nat Sci Ed*(山西大学学报, 自科版), 1991, 14: 278-284.
 - 18 Hua C(华春), Wen L(温鲁). Determination of active components in *Cordyceps militaris*. *J Huaiyin Inst Tech*(淮阴工学院学报), 2005, 14(5): 55-56.
 - 19 Masuda M, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb Tech*, 2007, 40: 1199-1205.
 - 20 Li XL(李祥玲), et al. Determination of cordycepin and adenosine in cultured *Cordyceps militaris* by HPLC. *J Nat Sci Hunan Normal Univ*(湖南师范大学, 自然科学学报), 2010, 33: 107-111.
 - 21 Zhang HX(张红霞), et al. Comparative analysis of cordycepin and adenosine contents in fermentation supernatants between *Aspergillus nidulans* and *Cordyceps militari*. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报), 2006, 22(2): 28-31.
 - 22 Xu QQ(许勤勤), et al. Isolation of *cordyceps ophioglossoides* L2 from fruit body and optimization of fermentation conditions for its mycelial growth. *Chin Chem Eng*(中国化学工程学报), 2009, 17: 278-285.
 - 23 Cai SL(蔡水淋), et al. Enhanced production of mycelia biomass and cordycepin by submerged culture of *Cordyceps militaris* with response surface methodology. *Acad Period Farm Prod Proc*(农产品加工), 2013, 311(3): 13-21.
 - 24 Sun SQ(孙诗清). The comprehensive utilization of *Cordyceps militaris* culture medium. Xi'an: Northwestern University(西北大学), MSc. 2007.
 - 25 Lou H(娄虹), et al. The extraction of active polysaccharide of *Cordyceps militaris* in the rice medium and its effects of immune function. *Special Wild Econo Anim Plant Res*(特产研究), 2006, 4: 45-46.
 - 26 Tan QM(谭琪明), et al. Extraction protocol of cordycepin from cordyceps wheat medium. *J Mountain Agric Biol*(山地农业生物学), 2011, 30: 357-361.
 - 27 Wang YL(王雅玲), et al. Study on optimization of cordycepin extraction from cordyceps residue medium. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2009, 37: 3364-3366.
 - 28 Wei HP(韦会平), et al. An efficient method of extraction and purifying cordycepin from wast rice medium of *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*(菌物学报), 2009, 28: 220-225.
 - 29 Xu JJ(徐健君), et al. Determination of effective constitution in natural *Cordyceps sinensis* and cultured coedyclops mycelia by capillary electrophoresis with high frequency conductivity Detection. *Chemi Res Appl*(化学研究与应用), 2005, 17: 644-647.
 - 30 Sung GH, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and

- the *Clavicipitaceous* fungi. *Stud Mycol*, 2007, 57: 5-59.
- 31 Liu F (刘飞), et al. The species and distribution of *Cordyceps sinensis* host insects. *Chongqing J Res Chin Drugs Herb* (重庆中草药研究), 2006, 1: 47-50.
- 32 Suo FY (索菲娅), et al. Determination of comparison cordycepin and adenosine in Xinjiang *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps* by HPLC method. *J Med Pharm Chin Minor* (中国民族医药杂志), 2008, 3: 65-67.
- 33 Suo FY (索菲娅), et al. Antibacterial and antioxidant activities of a *Ophiocordyceps gracilis* strain from Xinjiang. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2014, 21: 51-54.
- 34 Tong YK (童应凯), et al. Comparison of cordyceps mycelium and the natural cordyceps ingredients. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 1997, 12: 40.
- 35 Zhang HX (张红霞), et al. Different culture *Cordyceps militaris* strains producing cordycepin and adenosine diversity research. *Edible Fungi* (食用菌), 2011, 5: 63-64.
- 36 Sun JD (孙军德), et al. Determination of cordycepin in *Cordyceps militaris*. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 2011, 42: 212-215.
- 37 Ni H, et al. Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waster medium. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 2135-2141.
- 38 Yu RM, et al. Fingerprint analysis of fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 818-823.
- 39 Weng L (翁梁), Wen L (温鲁). Review of research on fungi ploysacchaarides. *Food Sci* (食品科学), 2008, 29: 748-751.
- 40 Li W (李文), et al. Low energy ion beam modification *Cordyceps militaris* strains of high yield of cordycepin. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2009, 25: 1725-1731.
- 41 Rao YK, et al. A simple and rapid method for identification and determination of cordycepin in *Cordyceps militaris* by capillary electrophoresis. *Analyt Chim Acta*, 2006, 566: 253-258.
- 42 Guo T (郭涛), et al. Contents of cordycepin and adenosine in *Codyceps militaris* cultured on different culture media. *Sci Seric* (蚕业科学), 2011, 37: 1117-1122.
- 43 Xia M (夏敏), Wen L (温鲁). Study on extraction of cordycepin with microwave. *Food Sci* (食品科学), 2006, 27: 248-251.
- 44 Mao XB (毛先兵), Tu YQ (涂永勤). Study on using amino acid filling material batch cultivation strategy to promote the production of cordycepin from *Cordyceps militaris*. *Chongqing Chin Med Res* (重庆中草药研究), 2005, 51: 18-22.
- 45 Chen SZ (陈顺志). A method of supercritical fluid extraction of Chinese caterpillar fungus deoxyadenosine production (一种超临界萃取虫草脱氧腺苷的生产方法). CN 1339440. 2002-03-13.
- 46 Hua M (夏敏), et al. Determination of adenosine and cordycepin in culture medium of *Coedycaps militaris* by HPLC. *West Chin J Pham Sci* (华西药学杂志), 2006, 21: 485-486.
- 47 Tu HY (涂红艳), et al. Review on chemosynthesis of 3'-deoxyadenosine. *Chem Ind Times* (化工时刊), 2006, 20(2): 66-69.
- 48 Mao XB (毛先兵). Study on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Shanghai: East China University of Science and Technology (华东理工大学), PhD. 2004.
- 49 Zhang Q (张琦). Cordycepin synthetase (虫草素合成酶). CN201210395708, 2012-10-17.
- 50 Masuda M, et al. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbial Technol*, 2006, 39: 641-646.
- 51 Masuda M, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbial Technol*, 2007, 40: 1199-1205.
- 52 Shih IL, et al. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochem Eng J*, 2007, 33: 193-201.
- 53 Xiao B (肖波), et al. *Cordyceps militaris* artificial substrates and high yield cultivation technology. *Edible Fungi* (食用菌), 2004, 5: 36-37.
- 54 Wei HP (韦会平), et al. Observation of *Cordyceps militaris* planting with liquidseeds. *Res Prac Chin Med* (现代中药研究与实践), 2003, 6: 33.