

微波辅助乙醇/硫酸铵双水相提取分离蛹虫草发酵产物中虫草素和虫草酸的研究

陆秀华, 刘琳*

(青岛农业大学生命科学学院, 山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要: 采用微波辅助乙醇/硫酸铵双水相提取分离蛹虫草(*Cordyceps militaris*)发酵产物中的虫草素和虫草酸。确定了双水相系统中乙醇质量分数为25%、硫酸铵质量分数为22%。正交试验优化的微波提取条件为微波功率540 W, 提取时间120 s, 固液比1:100[菌丝体干重(g):双水相体系的质量(g)]。在此条件下, 虫草素和虫草酸的提取率分别为 $(99.35 \pm 0.12)\%$ 和 $(99.02 \pm 0.16)\%$, 虫草素在上相中的分配率为 $(95.24 \pm 0.25)\%$, 虫草酸在下相中的分配率为 $(91.83 \pm 0.19)\%$ 。该方法提取率高, 虫草素和虫草酸分离效果好, 有利于产品的后续纯化。

关键词: 微波辅助; 乙醇/硫酸铵双水相; 虫草素; 虫草酸

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又名北冬虫夏草, 是一种药、食两用真菌, 含有虫草素、虫草酸等多种活性成分^[1]。虫草素的化学名称为3'-脱氧腺苷, 具有抗菌、降血脂、抗肿瘤和抗癌等作用, 其降血脂效果优于非诺贝特(法国力博福尼制药公司生产)^[2-5]。虫草素作为治疗白血病的新药已在临床上试用^[6]。目前, 虫草素在国际市场上价格昂贵(每克约11万元)且需求量日益增加。虫草酸又名甘露醇, 能抑制各种病原菌的生长, 可预防和治疗脑血栓、脑出血、心肌梗塞等多种疾病^[7-9]。

蛹虫草子实体人工栽培生产成本高, 生长周期长且虫草素含量较低(小于20 mg/g)^[10]。液体发酵具有周期短、生产效率高、成本低等优点, 且液体发酵产物中含有与子实体中相似的活性成分, 因此发酵培养已成为获得蛹虫草活性成分的主要途径。为了提高虫草素的得率, 研究者在菌种选育、发酵培养条件的优化方面进行了大量研究^[11-13], 但获得的最高虫草素得率仅为8.57 g/L^[14]。高效的提取分离纯化方法是提高虫草素得率的有效手段。浸提法、索氏提取法和回流法等传统提取方法不仅耗时且提取液中虫草素和虫草酸混合在一起, 传统的后续分离纯化方法如离子交换树脂吸附法、硅胶柱层析法以及大孔树脂吸附法只能针对性的纯化一种产物, 另一种产物随废液丢弃, 造成资源的浪费。双水相提取技术是将两种化学结构不同的亲水性聚合物或一种亲水性聚合物和无机盐在水中以适当的浓度形成互不相溶的两相, 利用分配物质在两相的分配差异而进行提取的一种新型生物化工分离技术。短链醇/无机盐体系作为一种新型的双水相体系, 具有价格低廉、溶剂粘度小、传质速度快、试剂易回收等优点, 其中, 乙醇无毒、易回收, 是新型短链醇/无机盐双水相体系中应用最为广泛的有机溶剂^[15]。笔者采用微波辅助乙醇/碳酸钾双水相体系实现了桦褐孔菌发酵液中的三萜和多糖的提取分离^[16], 两类化合物分别富集在上、下相, 提取率分别为 $(99.22 \pm 0.68)\%$ 和 $(98.34 \pm 0.83)\%$ 。本研究采用微波辅助乙醇/无机盐双水相对蛹虫草发酵产物进行提取分离, 探索蛹虫草发酵产物中虫草素和虫草酸的高效提取分离方法。

1 材料与方法

1.1 材料

蛹虫草(*C. militaris*)菌株(QDY01)由青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室提供。

收稿日期:2016-12-02 原稿; 2017-03-03 修改稿

基金项目:山东省高等学校科技计划项目(J16LE04)资助

作者简介:陆秀华(1971—), 女, 讲师, 主要从事药用真菌活性物筛选研究。

* 本文通讯作者 E-mail:liulin@qau.edu.cn

1.2 试剂与主要仪器

虫草素(纯度 $\geq 99\%$)购自中国食品药品检定研究院;虫草酸(纯度 $\geq 99\%$)购自美国 Sigma 公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,购自美国 Tedia 公司;其它试剂均为国产分析纯。

美的 MM721 NH1-PW 微波炉(美的微波电器制造有限公司);Waters 2690 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 蛹虫草的发酵培养

液体培养基:2%蛋白胨,2%蔗糖,0.3% KH_2PO_4 ,0.1% K_2HPO_4 ,0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

发酵培养方法:将 PDA 斜面菌种转接于 PDA 平板,28℃ 培养 5 d,取 4 块直径为 5 mm 菌块接入装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃ 培养 5 d 得到液体菌种。将液体菌种接入装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,接种量为 10%(v/v),28℃ 培养 7 d,获得蛹虫草发酵产物。

1.4 虫草素和虫草酸的测定

用 HPLC 检测虫草素的含量^[17]。色谱条件为 Venusil MP-C18 色谱柱(5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm),柱温 25℃;流动相为甲醇和蒸馏水;洗脱条件为 0~15 min 15% 甲醇等梯度洗脱,20~30 min 100% 甲醇洗脱,流速 1 mL/min,检测波长 260 nm,进样量 20 μL 。

用分光光度法检测虫草酸含量^[18]。

1.5 双水相体系中无机盐的选择

将 1.3 中得到的发酵产物用微波提取(540 W,150 s),1776 g 离心 15 min,弃沉淀,上清定容至 100 mL 获得粗提液。取部分粗提液置于 25 mL 具塞试管中,分别加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2CO_3 、 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 4 种无机盐,溶解后再加入无水乙醇,利用漩涡混匀仪充分混合,室温静置 30 min,制成体系总质量为 8 g 的双水相体系,其中盐质量分数为 21%,醇质量分数为 25%,其余为粗提液。吸取上相萃取液 500 μL ,50℃ 水浴使溶剂挥发完全,再加入 500 μL 无水甲醇,充分溶解后过 0.22 μm 微孔滤膜;取下相萃取液 500 μL ,加入 1000 μL 无水甲醇,混匀后,静置 20 min,离心,取上清,挥干后用无水甲醇定容至 500 μL 。分别测定上、下相中虫草素和虫草酸的含量。每个处理 3 次重复。

1.5.1 提取率的计算

将 1.3 中得到的发酵产物,移入索氏提取器中提取 9 h,1776 g 离心 15 min,上清保存备用。菌丝体沉淀加入 100 mL 50% 乙醇再提取 9 h,1776 g 离心收集上清液。将水提上清和醇提上清分别用水和乙醇定容至 100 mL,检测虫草素和虫草酸的含量。索氏提取后水提和醇提上清中虫草素和虫草酸的量为发酵产物中虫草素和虫草酸的总量,以此为基准,分别计算双水相提取虫草素和虫草酸的提取率。索氏提取实验重复 5 次。

$$\text{虫草素提取率} = \frac{\text{上、下相中虫草素总量}(\text{mg})}{\text{索氏提取获得的虫草素总量}(\text{mg})} \times 100\%$$

$$\text{虫草酸提取率} = \frac{\text{上、下相中虫草酸总量}(\text{mg})}{\text{索氏提取获得的虫草酸总量}(\text{mg})} \times 100\%$$

1.5.2 虫草素和虫草酸上、下相中分配率的计算

分别计算上、下相中虫草素和虫草酸在体系中分配的百分比(分配率)。

$$\text{虫草素或虫草酸上相中分配率} = \frac{C_{\text{上相}} \times V_{\text{上相}}}{C_{\text{上相}} \times V_{\text{上相}} + C_{\text{下相}} \times V_{\text{下相}}} \times 100\%$$

$$\text{虫草素或虫草酸下相中分配率} = \frac{C_{\text{下相}} \times V_{\text{下相}}}{C_{\text{上相}} \times V_{\text{上相}} + C_{\text{下相}} \times V_{\text{下相}}} \times 100\%$$

式中: C 为物质在上、下相的浓度(mg/mL); V 为上、下相的体积(mL)。

根据虫草素和虫草酸的提取率和分配率选择双水相体系中无机盐的种类进行以下实验。

1.6 乙醇/无机盐双水相体系相图的绘制

采用浊度法^[19]绘制乙醇/无机盐双水相体系相图。取一定量的无机盐(m_1)放入试管中,分别加入一定量粗提液(m_2)或水(m_2')溶解,然后逐滴加入无水乙醇(m_3),直至混合溶液恰好出现浑浊。计算双水相体系中各组成成分的质量分数 y ,绘制相图。

$$y=\frac{m_1 \text{ 或 } m_2 \text{ 或 } m_2' \text{ 或 } m_3}{m_1+m_2+m_3}$$

1.7 乙醇和无机盐质量分数对双水相体系虫草素和虫草酸分配的影响

粗提液、乙醇和无机盐配制成总质量为 8 g 的双水相体系。根据 1.6 中得到的相图,分别选择成相区域处于中间位置的 3 个乙醇质量分数,在固定乙醇含量下,改变双水相体系中硫酸铵的质量分数,考察双水相体系中醇、盐浓度对虫草素、虫草酸分配的影响。体系中硫酸铵初始浓度为固定醇浓度下成相点的硫酸铵含量,硫酸铵终浓度为该乙醇浓度下盐析点的硫酸铵含量。上、下相中虫草素和虫草酸的分配率计算方法同 1.5.2。选择上相中虫草素和下相中虫草酸分配率相对高的乙醇和无机盐质量分数进行以下实验。

1.8 微波辅助乙醇/无机盐双水相提取条件的优化

发酵结束后向装有发酵产物的 250 mL 三角瓶中加入乙醇、无机盐和水,配制成双水相体系,其中乙醇、无机盐质量分数按 1.7 选择的结果。以微波时间、微波功率和固液比[菌丝体干重(g):双水相体系的质量(g)]为因素,设计 3 因素

3 水平的 $L_9(3^3)$ 正交试验(表 1),以虫草素和虫草酸提取率为指标优化微波辅助双水相提取工艺。实验时取 5 个 250 mL 三角瓶中的发酵产物,测菌丝体干重,取其平均值。提取剂为双水相体系,参考测定的菌丝体干重,在发酵产物中加入蒸馏水、盐和乙醇,调整双水相体系质量。实验重复 3 次。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Levels and factors of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	A 功率	B 时间	C 固液比 ¹⁾
	Power(W)	Time(s)	Solid to liquid ratio ¹⁾
1	340	60	1:60
2	540	120	1:80
3	720	150	1:100

¹⁾ 固液比:菌丝体干重(g):双水相体系的质量(g)
¹⁾ Solid to liquid ratio (w:w):mycelium dry weight (g):weight of aqueous two-phase extraction system (g)

2 结果与分析

2.1 双水相体系中无机盐的确定

分别选择强酸弱碱盐[(NH₄)₂SO₄]和强碱弱酸盐(K₂CO₃、KH₂PO₄、K₂HPO₄)与乙醇形成双水相,分别考察其对蛹虫草发酵产物微波辅助提取后粗提液中虫草素和虫草酸的提取率及分配率。从表 2 可知,对虫草素和虫草酸的提取率依次为(NH₄)₂SO₄>KH₂PO₄>K₂CO₃>K₂HPO₄。4 种无机盐中,硫酸铵体系中虫草素、虫草酸的提取率最高,分别为(96.53±0.19)%和(95.65±0.15)%。双水相体系中,上相以乙醇溶剂为主,下相以盐溶液为主。虫草素主要富集在上相,虫草酸主要富集在下相。在 4 种无机盐中,乙醇/硫酸铵体系对虫草素和虫草酸的富集效果最好,上相中虫草素分配率为(93.74±0.32)%,下相中虫草酸分配率为(85.43±0.30)%。因此,确定乙醇/硫酸铵为提取分离虫草素和虫草酸的双水相体系。

表 2 双水相体系中无机盐种类对虫草素和虫草酸提取的影响

Table 2 Effect of different mineral salts on cordycepin and cordycepic acid extraction using the aqueous two-phase system

无机盐 Mineral salt	提取率 Extraction yield		虫草素分配率 Percentage of cordycepin		虫草酸分配率 Percentage of cordycepic acid	
	虫草素 Cordycepin	虫草酸 Cordycepic acid	上相 Upper phase	下相 Lower phase	上相 Upper phase	下相 Lower phase
(NH ₄) ₂ SO ₄	96.53±0.19 a	95.65±0.15 a	93.74±0.32 a	6.26±0.18 d	14.57±0.19 c	85.43±0.30 a
K ₂ CO ₃	85.25±0.26 c	84.14±0.23 c	74.16±0.19 b	25.84±0.24 c	9.89±0.21 d	80.11±0.17 b
KH ₂ PO ₄	90.37±0.12 b	88.54±0.20 b	60.37±0.25 c	39.63±0.31 b	43.37±0.29 b	56.63±0.21 c
K ₂ HPO ₄	82.95±0.23 c	82.21±0.27 c	53.46±0.28 d	46.54±0.22 a	47.92±0.26 a	52.08±0.24 d

同列不同小写字母表示 0.05 水平差异显著
Different lower case letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 level

2.2 虫草素和虫草酸在乙醇/硫酸铵体系中的分配规律

2.2.1 成相规律

为了考察乙醇/硫酸铵的成相规律,进一步明确蛹虫草发酵液对成相的影响,分别以水和蛹虫草发酵粗提液为溶剂配制乙醇/硫酸铵双水相,并以硫酸铵质量分数为横坐标,乙醇质量分数为纵坐标,绘制相图(图1)。由图1可知,蛹虫草发酵粗提液和水对乙醇/硫酸铵的成相规律相同。在双水相体系中,由于盐、醇的相互排斥作用,形成了乙醇和盐溶液的分界面,图1中曲线上方为成相区。双水相体系中,醇浓度过低(或过高)会导致下(或上)相体积过大,不利于物质的分配和后续的分相。在乙醇/硫酸铵体系中,当乙醇质量分数在20%~30%时,体系中上、下相体积比为0.5~2.2。因此,确定后续试验中乙醇的质量分数为20%、25%和30%。

2.2.2 乙醇和硫酸铵质量分数对虫草素和虫草酸分配的影响

双水相体系中盐或醇的质量分数能够显著影响体系中物质的分配。根据相图,分别固定乙醇质量分数为20%、25%和30%,改变硫酸铵浓度,考察体系中乙醇和硫酸铵的质量分数对虫草素和虫草酸分配率的影响(图2)。在固定乙醇质量分数下,虫草素在上相中的分配率和虫草酸在下相中的分配率均随着硫酸铵质量分数的增加先上升后降低。当乙醇质量分数由20%增加到25%,虫草素在上相中的分配率提高约10%,继续增加乙醇质量分数至30%,虫草素在上相中分配率仅提高1%~3%。虫草酸在下相中的分配率随着乙醇质量分数的增加而降低。当乙醇质量分数为30%时,上相中虫草素分配率超过90%,但下相中虫草酸分配率较低(75%~83%)。当乙醇质量分数为25%、硫酸铵质量分数为22%时,虫草素和虫草酸的在上、下相中的分配率分别为(90.78±0.26)%和(93.20±0.39)%,因此,确定双水相体系中乙醇质量分数为25%,硫酸铵质量分数为22%。

2.3 微波辅助乙醇/硫酸铵双水相提取虫草素和虫草酸

正交试验结果表明(表3),虫草素的最优提取条件为 $A_2B_2C_3$,此条件下,虫草素提取率为(99.35±0.12)%,虫草酸提取率为(99.02±0.16)%。虫草酸的最佳提取条件为 $A_2B_3C_3$,此时,虫草酸的提取率为(99.32±0.25)%。两种条件下,虫草酸的提取率无显著差异。最终确定同时提取虫草素和虫草酸的最优条件为 $A_2B_2C_3$,即:微波功率540 W、微波时间120 s、固液比1:100,此条件下,虫草素在上相中的分配率为(95.24±0.25)%,虫草酸在下相中的分配率为(91.83±0.19)%。正交试验极差分析表明,影响虫草素和虫草酸提取率的因素主次顺序为微波功率>固液比>微波时间。正交试验方差分析表明(表4):微波功率对虫草素和虫草酸提取率的影响显著;根据 F 值可知,影响虫草素和虫草酸提取率的因素主次顺序与极差分析结果一致。

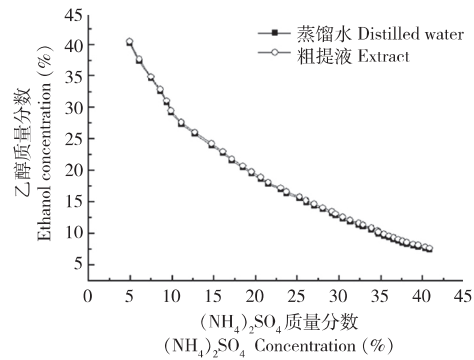
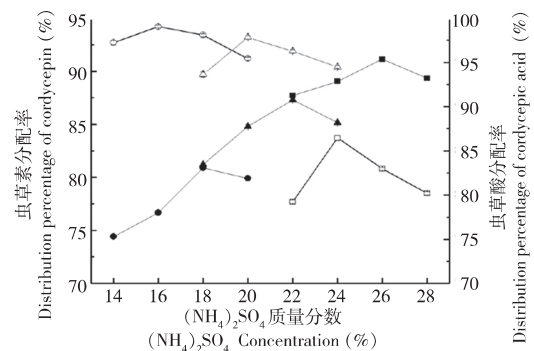


图1 乙醇/硫酸铵双水相体系相图

Fig. 1 Phase diagram of the ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ two-phase extraction system



- 虫草素, 30%乙醇 Cordycepin, 30% ethanol
- △虫草素, 25%乙醇 Cordycepin, 25% ethanol
- 虫草素, 20%乙醇 Cordycepin, 20% ethanol
- 虫草酸, 30%乙醇 Cordycepic acid, 30% ethanol
- ▲虫草酸, 25%乙醇 Cordycepic acid, 25% ethanol
- 虫草酸, 20%乙醇 Cordycepic acid, 20% ethanol

图2 乙醇和硫酸铵质量分数对上相虫草素和下相虫草酸分配的影响

Fig. 2 Effect of ethanol and ammonium sulfate concentrations on the distribution of cordycepin and cordycepic acid in the upper and lower phases of the two-phase extraction system

表 3 正交试验结果
Table 3 Orthogonal test data

编号 No.	Factor 因素			虫草素提取率 Yield of extracted cordycepin(%)	虫草酸提取率 Yield of extracted cordycepic acid(%)
	A	B	C		
1	1	1	1	81.25±0.22	83.69±0.19
2	1	2	2	86.96±0.14	88.72±0.15
3	1	3	3	88.08±0.16	90.07±0.23
4	2	1	2	97.79±0.18	98.43±0.22
5	2	2	3	99.35±0.12	99.02±0.16
6	2	3	1	96.45±0.19	97.66±0.12
7	3	1	3	98.58±0.18	98.72±0.17
8	3	2	1	96.46±0.21	96.81±0.18
9	3	3	2	97.66±0.20	97.25±0.13
虫草素 Cordycepin	K ₁	85.430	92.540	91.387	
	K ₂	97.863	94.257	94.137	
	K ₃	97.567	94.063	95.337	
	R	12.433	1.717	3.950	
虫草酸 Cordycepic acid	K ₁	98.370	94.850	94.800	
	K ₂	97.593	94.993	95.937	
	K ₃	87.493	93.613	92.720	
	R	10.877	1.380	3.217	

表 4 正交试验方差分析
Table 4 Analysis of variance of orthogonal test

方差来源 Variance origin	虫草素提取率 Yield of extracted cordycepin			虫草酸提取率 Yield of extracted cordycepic acid		
	离差平方和	自由度	F 值	离差平方和	自由度	F 值
	Sum of squares	Degree of freedom	F value	Sum of squares	Degree of freedom	F value
功率 Power(W)	301.974	2	88.842*	220.915	2	36.091*
时间 Exposure time(s)	5.305	2	1.561	3.454	2	0.564
固液比 Solid:liquid ratio	24.605	2	7.239	15.965	2	2.608
误差 Error	3.399	2	1.000	6.121	2	1.000

* 表示方差分析具有显著性
* Indicates microwave power significantly affected the extraction yield

3 讨论

本实验以乙醇/硫酸铵双水相体系为提取剂,采用微波辅助提取技术同时实现了蛹虫草发酵液中虫草素和虫草酸的提取分离。在双水相体系中,物质的分配受到无机盐的种类、相对分子质量、离子强度和 pH 等多种因素的影响^[19]。翁梁等^[20]的研究表明,提取液的 pH 值对虫草素的提取率有显著影响,酸性较中性提取率提高 7%,硫酸铵为强酸弱碱盐,溶剂呈酸性可能是虫草素提取率高于另外 3 种强碱弱酸盐的主要原因。在微波辅助双水相提取过程中,活性物质的提取率取决于物料、溶剂对微波能的吸收及活性成分在溶剂中的溶解性。各种无机盐得到的虫草酸提取率不同可能是上述多种因素的综合作用结果。成相规律实验证明蛹虫草发酵粗提液对乙醇/硫酸铵的成相规律几乎没有影响,说

明粗提液中不含有影响分相行为的溶质。LI 等^[21]用乙醇/硫酸铵体系提取肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)发酵液中的 2,3-丁二醇,在乙醇/硫酸铵体系中添加 2,3-丁二醇对成相规律影响不大。MA 等^[22]用乙醇/ K_2HPO_4 体系提取降香黄檀叶子中的异黄酮,在体系中添加降香黄檀的叶子提取物对成相规律几乎没有影响,这些均说明在双水相体系中,溶剂体系组成是影响有效成分分配率的主要因素,在一定范围内,有效成分的浓度增加不会影响分配效果。通过对虫草素、虫草酸在乙醇/硫酸铵双水相体系中分配规律的研究,筛选虫草素和虫草酸分别富集在上、下相的最佳相组成为 25%乙醇,22%硫酸铵。虫草素易溶于稀乙醇,而高浓度的乙醇不利于其溶解。因此,在一定范围内提高乙醇浓度有利于虫草素在上相富集,然而,乙醇浓度过高反而使虫草素转移入下相,使上相中的分配比率下降。虫草酸与水分子的结合能力较强,当体系中乙醇浓度增加时,更多的水分子转移入上相,一部分虫草酸和水分子一起被转移,从而导致下相中分配率下降。

各种传统提取方法均能使菌体细胞中的虫草素和虫草酸溶出,但两种活性组分混合在一起,难以分离,传统分离纯化方法只能针对性的纯化一种产物,另外一种产物随废液丢弃。微波辅助乙醇/硫酸铵双水相提取后虫草素和虫草酸分别富集于上、下相,菌丝体形成沉淀层。该方法将虫草素、虫草酸的提取分离以及菌丝体和提取液的固液分离,整合为一步操作,同时获得虫草素和虫草酸,具有一定的工业化应用前景。目前,一步操作同时获得蛹虫草中虫草素和虫草酸的分离纯化方法尚未见相关报道。

参考文献

- [1] SUNG GH, HYWEIL NL, SUNG JM, *et al.* Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. *Stud Mycol*, 2007, 57:5-59.
- [2] SUGAR AM, MCCAFFERY RP. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin)[J]. *Antimicrob agents chemother*, 1998, 42(6):1424-1427.
- [3] 朱平, 朱海波, 朱慧新, 等. 3'-脱氧腺苷在制备降血脂药物中的应用:中国, CN200310101650.7[P]. 2004-10-27.
- [4] KIM SK, KIM SW, LEE SC, *et al.* A pharmaceutical composition comprising cordycepin for the treatment and prevention of obesity: Europe, EP 2 077 851 B1[P]. 2010-10-20.
- [5] LIN YW, CHIANG BH. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*[J]. *Process Biochem*, 2008, 43(3):244-250.
- [6] SELADIN D, LAHEY S, URBANO A, *et al.* Phase I trial of cordycepin and deoxycoformycin in TdT-positive acute leukemia[J]. *Blood*, 1997, 90(10):3847.
- [7] 张兴辉, 石力夫, 胡晋红. 冬虫夏草化学成分和药理作用研究进展[J]. *中药材*, 2000, 23(11):722-724.
- [8] 刘极健. 甘露醇的应用和生产[J]. *化学工程师*, 2000, 28(2):40-43.
- [9] 连云岚, 杨中林. 北虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. *山西医药杂志*, 2006, 35(1):44-46.
- [10] 张志军. 人工培养蛹虫草(*Cordyceps militaris*)SY₁₂新型有效成分的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2007.
- [11] DAS SK, 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]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(6):534-538.
- [12] MAO XB, EKSRIWONG T, CHAUVATCHARIN S, *et al.* Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. *Process Biochem*, 2005, 40 (5):1667-1672.
- [13] SHIH IL, TSAI KL, HSIEH C. Effects of culture conditions on the mycelia growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*[J]. *Biochem Engin J*, 2007, 33(3):193-201.
- [14] DAS SK, MASUDA M, SAKURAI A, *et al.* Effects of additives on production using a *Cordyceps militaris* mutant induced by ion beam irradiation[J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(13):3041-3047.
- [15] 田明玉. 双水相萃取白蛋白和酶的初步研究[D]. 大连:大连理工大学, 2009.
- [16] 刘琳, 宋丽敏. 桦褐孔菌发酵液中三萜化合物和多糖的微波辅助双水相萃取[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(5): 246-252.
- [17] 代玲玲, 李婷婷, 王雅玲, 等. 高效液相色谱法检测蛹虫草中的虫草素含量[J]. *食用菌*, 2010, 32(6): 65-66.

- [18] 张晓卿,李媚,蓝丽红,等. 比色法测定发酵液中甘露醇的含量[J]. 化工技术与开发,2004,33(2):32-35.
- [19] 刘绍鹏,宗志敏,魏晴,等. 双水相体系中成相及有机物分配机理的初步研究[J]. 化工时刊,2010,24(12):21-24.
- [20] 翁梁,温鲁. 不同 pH 值提取液浸提虫草素研究[J]. 食品科学,2006,27(11):274-276.
- [21] LI ZG, TENG H, XIU ZL. Aqueous two-phase extraction of 2, 3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/ammonium sulfate system [J]. Process Biochem, 2010, 45(5):731-737.
- [22] MA FY, GU CB, LI CY, *et al.* Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of isoflavonoids from *Dalbergia odorigera* T. Chen leaves[J]. Sep Purific Technol, 2013, 115(5):136-144.

Microwave-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction of Cordycepin and Cordycepic Acid from *Cordyceps militaris* Mycelium Grown in Submerged Culture

LU Xiuhua, LIU Lin*

(Shandong Province Key Laboratory of Applied Mycology, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Microwave-assisted aqueous two-phase extraction technology was applied to extract and separate cordycepin and cordycepic acid from *Cordyceps militaris* mycelium grown in submerged culture. The optimal phase composition was ethanol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with a mass fraction of 25% and 22%, respectively. Orthogonal testing determined the optimal microwave assisted extraction conditions to be: microwave power 540 W, microwave exposure time 120 s, solid to liquid ratio 1:100 [mycelium dry weight (g):weight of aqueous two-phase extraction system (g)]. Under these conditions, cordycepin and cordycepic acid extraction yields were $(99.35 \pm 0.12)\%$ and $(99.02 \pm 0.16)\%$, respectively, and the percentage distribution of cordycepin in the upper phase and cordycepic acid in the lower phase were $(95.24 \pm 0.25)\%$ and $(91.83 \pm 0.19)\%$, respectively. The high extraction yields and good separation of cordycepin and cordycepic acid achieved should facilitate subsequent purification operations.

Key words: Microwave-assisted extraction; aqueous two-phase system of ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; cordycepin; cordycepic acid

[中文编辑] 朱丽娜

[英文编辑] BUSWELL John