

网络出版时间:2013-09-22 16:57

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130922.1657.009.html>

蛹虫草子座培养剩余基质中虫草素提取工艺的优化

孟胜楠¹, 杜双田¹, 简利茹², 徐鸿雁¹, 张园园¹, 张疏雨¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】优化蛹虫草子座培养剩余基质中虫草素的提取工艺。【方法】以蛹虫草子座培养剩余基质为材料, 采用二次通用旋转组合设计, 研究提取温度、提取时间、液料比及提取液 pH 对虫草素提取得率的影响, 建立虫草素提取得率与 4 个因素间的关系模型, 分析其单因子和交互影响效应, 通过参数优化得到虫草素的最佳提取工艺条件。【结果】4 个因素对虫草素提取得率的影响大小依次为液料比>提取温度>提取液 pH>提取时间。在最佳提取工艺条件下, 即提取温度为 63.3 ℃、提取时间为 4.8 h、液料比为 36.8、提取液 pH 为 6.7 时, 虫草素得率可达 1.32%。【结论】获得了从蛹虫草子座培养剩余基质中高效提取虫草素的优化工艺。

【关键词】 蛹虫草; 子座培养剩余基质; 虫草素; 二次通用旋转组合设计

【中图分类号】 R284.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)10-0131-06

Optimization of the extraction process of cordycepin from *Cordyceps militaris* culture medium

MENG Sheng-nan¹, DU Shuang-tian¹, JIAN Li-ru², XU Hong-yan¹,
ZHANG Yuan-yuan¹, ZHANG Shu-yu¹

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was conducted to enhance the extraction yield of cordycepin from *Cordyceps militaris* culture medium. 【Method】 Taking *C. militaris* culture medium as raw material, the quadratic general rotation unitized design method was used to analyze the influence of extraction temperature, extraction time, water material ratio and pH value on cordycepin extraction yield. The model between yield of cordycepin and the four factors was established, single factor and interaction effects were analyzed, and the optimum conditions of extracting cordycepin by optimizing the technological parameters were obtained. 【Result】 The influences of four studied factors on the extraction yield were in a descending order of water material ratio>extraction temperature>pH value>extraction time. The yield of cordycepin was 1.32% when extraction temperature, extraction time, water material ratio and pH value were 63.3 ℃, 4.8 h, 36.8 and 6.7, respectively. 【Conclusion】 The technology obtained in this study improved the extraction of cordycepin from *C. militaris* culture medium.

Key words: *Cordyceps militaris*; culture medium; cordycepin; quadratic general rotation unitized design

蛹虫草(*Cordyceps militaris*), 又名北冬虫夏 草, 简称北虫草, 隶属子囊菌亚门(Ascomycotina),

【收稿日期】 2012-12-11

【基金项目】 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTCL02-16)

【作者简介】 孟胜楠(1987—), 女, 河南灵宝人, 在读硕士, 主要从事微生物资源与利用研究。E-mail: msn52189@163.com

【通信作者】 杜双田(1961—), 男, 陕西扶风人, 副教授, 主要从事食用与药用真菌研究。E-mail: dst6107@126.com

核菌纲(Pyrenomycetes), 麦角菌目(Clavicipitales), 麦角菌科(Clavicipitiaceae), 虫草属(*Cordyceps*), 与冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)同属异种^[1]。蛹虫草的主要药用成分有虫草素(*Cordycepin*)、虫草酸、虫草多糖及超氧化物歧化酶(SOD)^[2-4]。虫草素, 即 3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine), 为含氮配糖体的核酸衍生物, 属嘌呤类生物碱, 是一种核苷类抗生素^[5], 其分子式为 C₁₀ H₁₃ N₅ O₃, 分子质量 251 u, 碱性, 晶体为针状或片状物, 熔点 230~231 ℃, 紫外光最大吸收波长为 259 nm^[6]。

虫草素具有抗肿瘤、抗病毒、抑菌、调节免疫功能和抑制 mRNA 翻译等多种功能^[7-12], 在美国用其治疗白血病的研究已进入Ⅱ期临床试验阶段^[13]。目前, 虫草素主要从蛹虫草子座中提取纯化而来^[14], 由于蛹虫草子座生产成本较高, 导致虫草素的生产成本较高, 高昂的市场价格成为虫草素开发利用的瓶颈。研究发现, 蛹虫草子座培养剩余基质中含有大量的虫草素, 从这些剩余基质中提取分离虫草素, 可大幅降低虫草素的生产成本, 具有巨大的潜在商业价值^[15]。

虫草素可溶于水、热乙醇、甲醇, 故可采用水、乙醇或甲醇作为溶剂来提取。常见提取方法有浸提法、索氏提取法、水热回流法和醇热回流法, 但索氏提取法、水热回流法及醇热回流法存在着被提取成

分损失大、工序多、提取效果一般等缺点^[16]。近年来, 发展较快的超声波提取法虽有快速、操作简单、提取效果好等优点, 但是超声波设备不易大型化, 从而限制了产业的规模化发展。因此, 本研究以蛹虫草子座培养剩余基质为原料, 采用热水浸提法提取虫草素, 对影响热水浸提效果的主要因素(提取温度、提取时间、液料比及提取液 pH)进行二次通用旋转组合设计试验, 以优化虫草素的提取工艺参数, 为从蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

以小麦为主要原料的蛹虫草子座培养剩余基质, 由西北农林科技大学生命科学院微生物教研组提供, 将收集到的剩余基质在 60 ℃ 条件下烘干, 粉碎, 过孔径 0.177 mm 筛后备用。

1.2 试验设计及方法

1.2.1 试验设计 采用二次通用旋转组合设计, 对虫草素提取过程中的提取温度(x_1)、提取时间(x_2)、液(mL)料(g)比(x_3)、提取液 pH(x_4)4 个影响因素的最优组合进行研究, 虫草素提取试验的因素及水平编码见表 1。

表 1 虫草素提取试验的因素及水平编码
Table 1 Code table of factors and levels of the cordycepin extraction test

水平 Levels	因素 Factors			
	提取温度(x_1)/℃ Temperature	提取时间(x_2)/h Extraction time	液料比(x_3) Water material ratio	提取液 pH(x_4) pH value
$r(x_{2j})$	90.0	5.00	40.00	8.0
$1(x_{0j} + \Delta_j)$	82.5	4.25	33.75	7.0
$0(x_{0j})$	75.0	3.50	27.50	6.0
$-1(x_{0j} - \Delta_j)$	67.5	2.75	21.25	5.0
$-r(x_{1j})$	60.0	2.00	15.00	4.0
Δ_j	7.50	0.75	6.25	1.0
$X_j = (x_j - x_{0j}) / \Delta_j$	$X_j = 0.13x_j - 10.00$	$X_j = 1.33x_j - 4.67$	$X_j = 0.16x_j - 4.40$	$X_j = x_j - 6.00$

注: $r=2$; x_{2j} 、 x_{0j} 、 x_{1j} 分别表示第 j 个因素 x_j 的上水平、零水平、下水平。
Note: $r=2$; x_{2j} 、 x_{0j} 、 x_{1j} represent the upper level, zero level and the lower level of the factor j .

1.2.2 方 法 准确称取处理好的样品 2 g 置于锥形瓶中, 按表 1 中的二次通用旋转组合设计方案, 调整其提取温度(x_1)、提取时间(x_2)、液料比(x_3)、提取液 pH(x_4), 置于恒温水浴锅中进行热水浸提, 提取期间定时振摇, 提取结束后, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液进行虫草素测定, 按照式(2)计算虫草素提取得率。

$$D=\frac{C\times V\times 10^{-6}}{m}\times 1\,000\%。$$

(1)

式中: D 为虫草素提取得率(%), C 为虫草素质量浓度($\mu\text{g/mL}$), V 为提取液体积(mL), m 为称取的蛹虫草子座培养剩余基质的质量(g)。

对二次通用旋转组合设计的试验结果进行分析, 建立虫草素提取得率与 4 个影响因素之间的关系模型, 分析单因子及交互作用对虫草素提取得率的影响效应, 进一步对数学模型进行优化, 得到从蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素的最优工艺条件。

1.3 虫草素的检测

1.3.1 标准品溶液制备 精密称取虫草素标准品(纯度≥98%,Sigma 公司),用蒸馏水配成质量浓度分别为 1,5,10,20,45 和 85 mg/L 的溶液,对标准品进行高效液相色谱(HPLC)检测,制作标准曲线。

1.3.2 样品溶液的制备与检测 将试验样品于 12 000 r/min 离心 15 min 以去除固体杂质,经过 0.22 μm 微滤后上机备测。

采用 Waters 600E 高效液相色谱仪(包括 600E pump,600controller,2487 紫外检测器,In-line Degasser AF 在线脱气机,Empower 色谱数据管理系统)检测提取液中虫草素的质量浓度,具体条件为:色谱柱 C18 柱;流动相:甲醇、乙腈、水的体积比为 5:5:90;检测波长:260 nm;流速:0.8 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 5 μL。

1.4 数据处理与分析

采用 DPS 7.05 软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 虫草素质量浓度标准曲线的建立

以质量浓度为 1,5,10,20,45 和 85 mg/L 的虫草素标准待测液进样(5 μL)分析,以虫草素的峰面

积(A_s)与相应的虫草素质量浓度(C_s ,mg/L)作曲线得图 1,二者的函数关系为: $A_s = 72\ 076\ C_s - 2\ 441.1$, $R^2 = 0.999\ 6$,表明在虫草素质量浓度为 1~85 mg/L 时,峰面积与虫草素标准品质量浓度呈良好的线性关系。

虫草素标准品和从蛹虫草子座培养剩余基质中提取得到的待测虫草素样品的 HPLC 分析结果见图 2。由图 2 可以看出,待测虫草素样品与虫草素标准品的移动时间基本相同,为同一物质,说明所采用的色谱条件适合虫草素的检测分析。

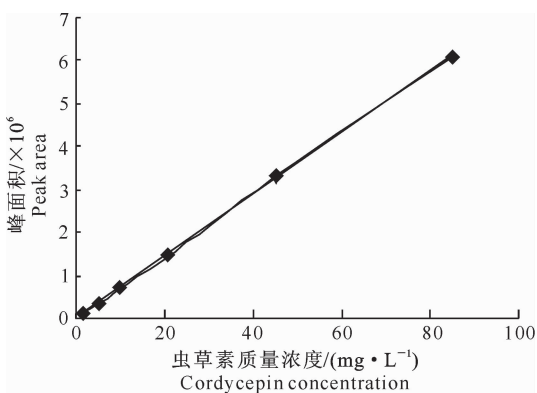


图 1 虫草素 HPLC 检测的标准曲线
Fig.1 Cordycepin standard curve of HPLC detection

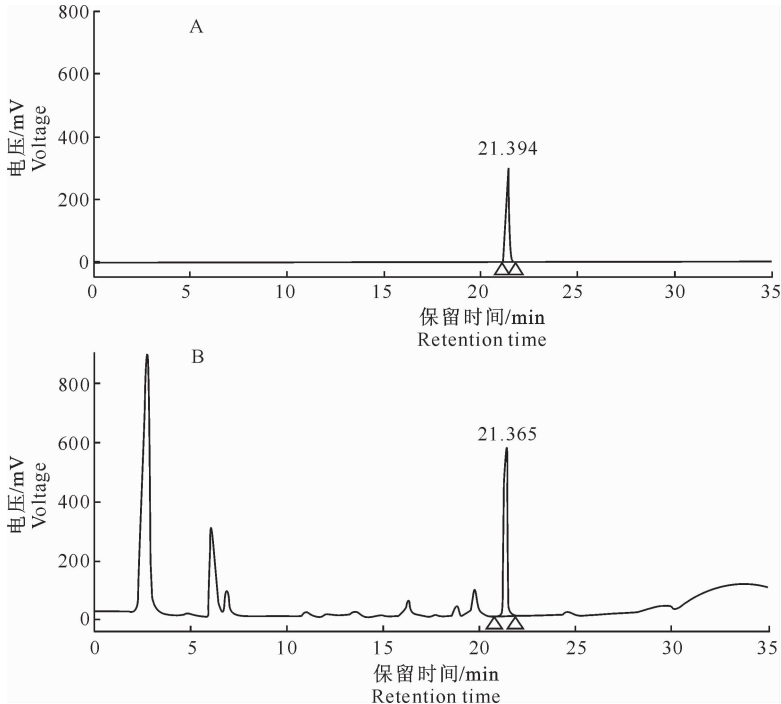


图 2 虫草素标准品(A)和待测虫草素样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig.2 HPLC chromatograms of cordycepin standard sample(A) and test sample(B)

2.2 虫草素得率及其影响因素关系模型的建立与分析

从蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素的二

次通用旋转组合试验结果见表 2。根据表 2 中的数据,计算得到虫草素提取得率(Y)与提取温度(x_1)、提取时间(x_2)、液料比(x_3)、提取液 pH(x_4)对应编

码值 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 的回归方程为：

$$Y=1.158\ 57-0.064\ 17X_1+0.028\ 33X_2+0.07X_3-0.04X_4-0.016\ 73X_1^2-0.016\ 73X_2^2-0.021\ 73X_3^2-0.015\ 48X_4^2+0.005X_1X_2+0.01X_1X_3-0.026\ 25X_1X_4+0.013\ 75X_2X_3+0.022\ 5X_2X_4-0.015X_3X_4。$$

(2)

由表 3 可知,回归方程失拟检验 $F_1=MS_{失拟}/MS_{误差}=1.710\ 70<F_{0.01}(10,6)=7.874\ 1$,差异不显著,说明未控制因素对试验结果的影响很小,可进一步对回归模型进行拟合检验;拟合检验 $F_2=$

$MS_{回归}/MS_{剩余}=5.530\ 91>F_{0.01}(14,16)=3.450\ 6$,达到极显著水平,说明方程与实际情况拟合良好,能够反映 4 个影响因素与虫草素提取得率的关系。

对 4 个影响因素的偏回归系数的检验结果(表 3)表明:提取温度、液料比和提取液 pH 的偏回归系数均达到极显著水平($P<0.01$),说明提取温度、液料比和提取液 pH 对虫草素得率影响极显著,且不是简单的线性关系;提取时间的偏回归系数达到显著水平($P<0.05$),说明提取时间对虫草素得率有显著影响。

表 2 从蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素的二次通用旋转组合设计试验结果

Table 2 Results of quadratic general rotation unitized design of cordycepin extraction from *C. militaris* culture medium

试验编号 Number	虫草素得率/% Yield of cordycepin	试验编号 Number	虫草素得率/% Yield of cordycepin	试验编号 Number	虫草素得率/% Yield of cordycepin
1	1.15	12	1.09	23	1.14
2	1.17	13	1.17	24	1.02
3	0.96	14	1.20	25	1.20
4	0.98	15	1.10	26	1.22
5	0.94	16	1.08	27	1.12
6	1.24	17	1.26	28	1.18
7	0.85	18	0.89	29	1.18
8	1.08	19	0.96	30	1.15
9	1.16	20	1.19	31	1.06
10	1.29	21	0.91		
11	1.08	22	1.20		

表 3 4 个影响因子对虫草素得率影响试验结果的方差分析

Table 3 Variance analysis of results for the four factors on the yield of cordycepin

项目 Item	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P
X_1	0.098 8	1	0.098 8	23.213 2	0.000 2
X_2	0.019 3	1	0.019 3	4.526 0	0.049 3
X_3	0.117 6	1	0.117 6	27.625 6	0.000 1
X_4	0.038 4	1	0.038 4	9.020 6	0.008 4
X_1^2	0.008 0	1	0.008 0	1.879 3	0.189 3
X_2^2	0.008 0	1	0.008 0	1.879 3	0.189 3
X_3^2	0.013 5	1	0.013 5	3.170 8	0.094 0
X_4^2	0.006 8	1	0.006 8	1.608 9	0.222 8
X_1X_2	0.000 4	1	0.000 4	0.094 0	0.763 1
X_1X_3	0.001 6	1	0.001 6	0.375 9	0.548 4
X_1X_4	0.011 0	1	0.011 0	2.589 9	0.127 1
X_2X_3	0.003 0	1	0.003 0	0.710 6	0.411 7
X_2X_4	0.008 1	1	0.008 1	1.902 8	0.186 7
X_3X_4	0.003 6	1	0.003 6	0.845 7	0.371 4
回归 Regression	0.329 6	14	0.023 5	$F_2=5.530\ 91$	0.001 3
剩余 Residual	0.068 1	16	0.004 3		
失拟 Lack of fit	0.050 4	10	0.005 0	$F_1=1.710\ 70$	0.163 2
误差 Error	0.017 7	6	0.002 9		
总和 Total	0.397 7	30			

2.3 虫草素得率的单因子影响效应

对方程(2)进行降维处理后得：

$$Y_1=1.158\ 57-0.064\ 17X_1-0.016\ 73X_1^2。$$

(3)

$$Y_2=1.158\ 57+0.028\ 33X_2-0.016\ 73X_2^2。$$

(4)

$$Y_3=1.158\ 57+0.07X_3-0.021\ 73X_3^2。$$

(5)

$$Y_4=1.158\ 57-0.04X_4-0.015\ 48X_4^2。$$

(6)

根据方程(3)–(6)可得图 3。

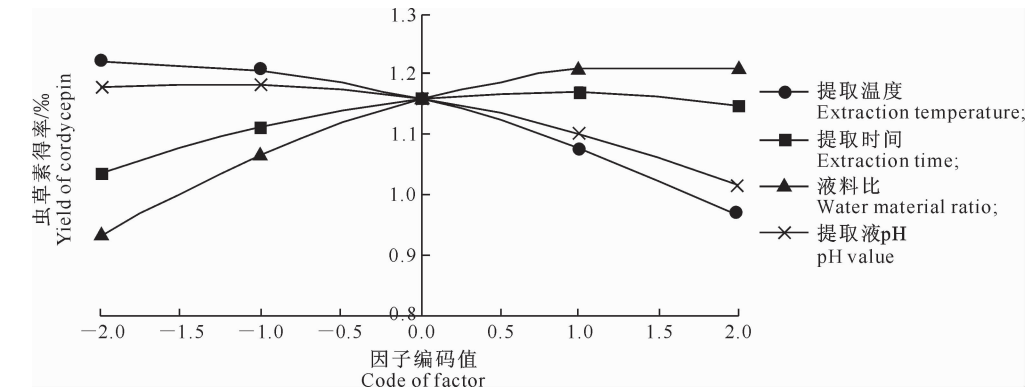


图 3 蛹虫草子座培养剩余基质中虫草素得率的单因子影响效应曲线

Fig. 3 Simple factor utility curves of cordycepin yield from *C. militaris* culture medium

由图 3 可知,提取温度、提取时间、液料比、提取液 pH 4 个因素表征的效应曲线均是开口向下的抛物线,表明这 4 个因素均存在最佳值,过高或过低都会影响虫草素的提取得率。具体表现在:(1)随着提取温度的增加,虫草素得率整体呈下降趋势,在提取温度的编码值为-1.9,即温度为 62.2 ℃时,虫草素得率最高;此后随着温度的增加,虫草素得率降低,因为随着提取温度的升高,提取液黏性增加,不利于虫草素的析出。(2)随着提取时间的延长,虫草素得率增大,在提取时间编码值为 0.8,即提取时间为 4.1 h 时,虫草素得率最高;之后虫草素得率趋缓甚至有所下降,这是因为达到一定时间后,虫草素与提取液中的大分子物质相结合,阻碍了虫草素的析出。(3)随着液料比的增大,虫草素的提取得率也随之增加,在液料比的编码值为 1.6,即液料比为 37.6 时,虫草素的得率最高。液料比越大,提取液中的虫草素质量浓度越低,提取速度越快;但是液料比过大,后期浓缩提取液的工作量加大,因此要选择合适的

液料比。(4)随着提取液 pH 的增大,虫草素得率呈先增大后减小的趋势,当提取液 pH 的编码值为-1.3,即提取液 pH 为 4.7 时,虫草素得率最高;原因是虫草素分子中含有 5 个碱基氮原子,具有一定的碱性,可结合质子成为阳离子,因此提高了虫草素在酸性溶剂中的溶解度^[17]。

2.4 虫草素得率的交互影响效应

由表 3 可知,在影响虫草素提取得率的 4 个因素中,交互项中的 X_1X_4 和 X_2X_4 在 $P=0.25$ 水平上差异显著,其余 4 个交互项差异不显著,因此,仅考虑 X_1X_4 项和 X_2X_4 项对虫草素得率的影响。

对方程(2)降维得:

$$Y_{(1,4)}=1.158\ 57-0.064\ 17X_1-0.04X_4-0.016\ 73X_1^2-0.015\ 48X_4^2-0.026\ 25X_1X_4。(7)$$

$$Y_{(2,4)}=1.158\ 57+0.028\ 33X_2-0.04X_4-0.016\ 73X_2^2-0.015\ 48X_4^2+0.022\ 5X_2X_4。(8)$$

由方程(7)、(8)可得图 4。

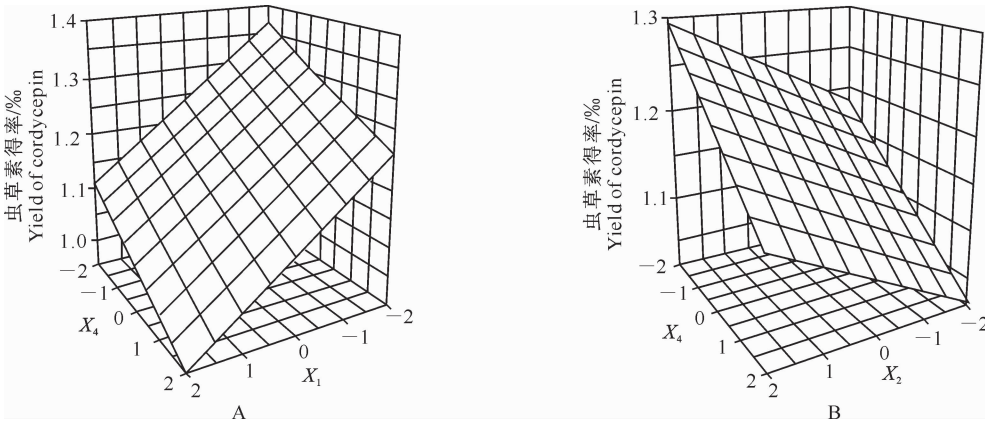


图 4 提取温度(X_1)与提取液 pH(X_4)及提取时间(X_2)与提取液 pH(X_4)的交互作用对虫草素得率的影响

Fig. 4 Interaction effects of extraction temperature-pH value(X_1X_4) and extraction time-pH value (X_2X_4) on the yield of cordycepin

由图 4A 可知,在一定的提取温度下,虫草素得率随着提取液 pH 的增大而减小,表明在提取温度一定时,酸性提取液有利于提高虫草素的得率。而在提取液 pH 不变时,虫草素得率随着提取温度的升高而减小,表明提取液 pH 一定时,温度过高不利于虫草素的提取。

由图 4B 可知,在提取液 pH 一定时,虫草素得率随着提取时间的延长逐渐增大;而在提取时间一定时,随着提取液 pH 的不断增大,虫草素提取得率逐渐降低。

2.5 虫草素提取工艺的优化

采用薛尔维德斯(SyLvester J J)不等式判别法对方程(2)进行极值分析,计算可得:

$$X_1 = -1.772\ 0, X_2 = 1.662\ 6, X_3 = 1.488\ 1, X_4 = 0.697\ 8.$$

经因子转换得: $x_1 = 63.292\ 3$, $x_2 = 4.761\ 4$, $x_3 = 36.800\ 6$, $x_4 = 6.697\ 8$ 。

即提取温度 63.3 ℃、提取时间 4.8 h、液料比 36.8、提取液 pH 值 6.7,是从蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素的最优工艺参数,用此最优条件从蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素,得率为 1.32%,实测值与理论值(1.28%)较为接近,说明本研究得到的虫草素提取工艺参数有实用价值。

3 结论与讨论

1)4 个影响因素对虫草素提取得率影响的顺序为:液料比>提取温度>提取液 pH>提取时间。采用热水浸提法提取蛹虫草子座培养剩余基质中虫草素的最佳工艺参数为:提取温度 63.3 ℃,提取时间 4.8 h,液料比 36.8,提取液 pH 值 6.7,在此条件下,虫草素提取得率可达 1.32%。

2)从以小麦为主要栽培原料的子座培养基质中提取虫草素的最佳温度为 63.3 ℃,提取温度较高或较低都会影响虫草素的得率。这是因为温度较高时基质中的剩余淀粉会发生糊化,致使提取液黏度增大,不利于虫草素的提取;温度过低,分子运动速率降低,也不利于虫草素的提取。

3)在液料比为 36.8 时,虫草素得率最高,表明较大的液料比有利于虫草素的提取。虫草素的提取过程,实际上就是虫草素溶出的过程;液料比越大,提取液中虫草素的含量越低,提取速度就越快;但是液料比过大时,提取溶剂的用量也会增多,使得后期浓缩提取液的难度加大,同时溶出其他杂质的机会也增多,因此要选择合适的液料比。

4)目前对蛹虫草小麦培养基中虫草素提取工艺的研究较少,大多数研究是以大米为培养基原料,且提取得率差异较大,原因是虫草素为次级代谢产物,主要在蛹虫草生长后期合成,蛹虫草菌株的不同,培养条件及培养时间的不同,都会显著影响蛹虫草子座培养剩余基质中虫草素的含量,进一步影响虫草素的提取得率。本试验采用热水浸提法,从以小麦为主要栽培原料的蛹虫草子座培养剩余基质中提取虫草素,操作简单,不需特殊设备,在原料处理上不需脱脂,减少了有机溶剂的使用及环境污染,同时简化了提取工序。采用该工艺提取蛹虫草子座培养剩余基质中的虫草素,生产成本较低,在生产上具有较高的推广应用价值。

[参考文献]

- [1] 郑壮丽,黄春花,梅彩英,等.蛹虫草国内外研究的新进展[J].环境昆虫学报,2011,3(2):225-233.
Zheng Z L, Huang C H, Mei C Y, et al. Current advance on the research of *Coedycaps militaris* [J]. Journal of Environmental Entomology, 2011, 3(2): 225-233. (in Chinese)
- [2] 都兴范,李 军,米 锐,等.蛹虫草和冬虫夏草主要活性成分含量比较[J].食用菌,2010(6):61-62.
Du X F, Li J, Mi R. Comparision of the main active components contents between *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* [J]. Edible Fungi, 2010(6): 61-62. (in Chinese)
- [3] 王建芳,杨春清.蛹虫草有效成分及药理作用研究进展[J].中药研究进展,2005,22(5):30-32.
Wang J F, Yang C Q. The research progress of effective constituent and pharmacological action of *Cordyceps sinensis* [J]. The Research Progress of Chinese Medicine, 2005, 22(5): 30-32. (in Chinese)
- [4] Russell R, Paterson M. Cordyceps: A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory [J]. Phytochemistry, 2008, 69: 1469-1495.
- [5] 王雅玲,刘 竞,刘 阳,等.虫草素抗癌机理研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(34):15046-15047.
Wang Y L, Liu J, Liu Y, et al. Research progress on the anti-cancer mechanism of cordycepin [J]. Anhui Agricultural Science, 2008, 36(34): 15046-15047. (in Chinese)
- [6] 焦彦朝,梁宗琦,刘爱英,等.虫草生物活性物质研究概况[J].贵州农业科学,1990(3):53-54.
Jiao Y C, Liang Z Q, Liu A Y, et al. The general situation of active substance in *Cordyceps* [J]. Guizhou Agricultural Science, 1990(3): 53-54. (in Chinese)
- [7] 闵三弟.真菌的药用价值[J].食用菌学报,1996,3(4):55-64.
Min S D. The medicinal value of fungi [J]. Acta Edulis Fungi, 1996, 3(4): 55-64. (in Chinese)