

8 种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响

荆留萍^a, 杜双田^a, 金凌云^b, 马 璐^a

(西北农林科技大学 ^a 生命科学学院, ^b 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究不同前体物及营养物对蛹虫草液体发酵中虫草素和虫草多糖含量的影响,筛选提高虫草素及虫草多糖的最适添加物及其添加质量浓度。【方法】将不同质量浓度的腺苷、核糖、次黄嘌呤、谷氨酰胺、甘氨酸、核黄素、苯丙氨酸及甲硫氨酸 8 种物质添加到蛹虫草液体发酵培养基中,提取菌丝体中的虫草素与多糖,分别用 HPLC 法、硫酸-苯酚法对其含量进行检测。【结果】在 8 种添加物中,腺苷、核糖、谷氨酰胺、甘氨酸均能明显提高虫草素及虫草多糖的含量,其最适添加量分别为 4.0, 2.0~3.0, 0.5~1.0, 0.5 mg/mL;苯丙氨酸、甲硫氨酸、次黄嘌呤对蛹虫草液体发酵中虫草素和多糖含量的促进作用不明显;核黄素对虫草素与多糖合成有抑制作用。【结论】蛹虫草发酵过程中添加腺苷合成途径中的前体物能明显提高其中的虫草素与虫草多糖含量。

【关键词】 蛹虫草;前体物;虫草素;虫草多糖

【中图分类号】 Q935;S567.3⁺5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0156-05

Effect of eight kinds of precursor and nutrient on cordycepin and polysaccharide production

JING Liu-ping^a, DU Shuang-tian^a, JIN Lin-yun^b, MA Lu^a

(^a College of Life Sciences, ^b College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The present study was to investigate the effect of eight kinds of additives on cordycepin and polysaccharide in production of *Cordyceps militaris* in submerged culture, to select the optimal additive and its concentration to increase the cordycepin and polysaccharide. 【Method】 Eight kinds of substances were studied in liquid medium, determination of cordyceps and polysaccharide by HPLC and phenol-sulphate acid method. 【Result】 Ribose, adenosine, glutamine and glycine were shown to be more effective additives. The results showed that the optimal additive was 4.0, 2.0—3.0, 0.5—1.0, 0.5 mg/mL; Phenylalanine, methionine and hypoxanthine were shown less effective additive; Riboflavin was shown inhibitory effect. 【Conclusion】 Adding precursor of adenosine in submerged culture can increase the content of cordycepin and polysaccharide in production.

Key words: *Cordyceps militaris*; precursor; cordycepin; polysaccharide

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又名北虫草,是一种具有滋补作用的药食两用真菌^[1],所含虫草素、虫草多糖具有独特的药理及保健功效。虫草素具有抗病毒^[2-3]、抑制肿瘤、抗疟原虫^[4]和抑制 mRNA 翻

译的作用^[5]。虫草多糖能提高机体免疫功能,增加人体胰岛素的分泌,降低糖尿病人的血糖水平^[6-7]。目前对虫草素、多糖的开发利用存在多重制约因素,天然虫草资源稀缺,价格昂贵,虫草素、多糖含量甚

* [收稿日期] 2010-03-29

[基金项目] 陕西杨凌示范区农业科技专项基金(YLTG2006-2-23)

[作者简介] 荆留萍(1984—),女,河南郑州人,在读硕士,主要从事微生物资源与利用研究。E-mail:Jingliuping198404@126.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

微;而其化学合成途径复杂且产量极低。为提高蛹虫草中虫草素、多糖的含量,需筛选出高产虫草素的菌株,并寻求提高产量的有效途径。目前对蛹虫草的研究主要集中在培养条件^[8-10]、活性成分提取方法的优化上^[11-12],较少有人从生物代谢的角度进行分析。本试验结合虫草素在菌丝体内的合成代谢途径,考察 8 种不同物质对虫草素及虫草多糖含量的影响,以期找到提高虫草素及虫草多糖含量的有效途径,为虫草素研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种 蛹虫草无性型(*Cordyceps militaris*),编号 CM-01,保存于陕西杨凌西北农林科技大学食用菌研究室。

1.1.2 试 剂 虫草素标准品为美国 Sigma 公司

表 1 蛹虫草液体发酵中 8 种添加物及其供试水平

Table 1 Amount of eight kinds of additive in submerged culture mg/mL

水平 Level	添加物 Additive							
	次黄嘌呤 Hypoxanthine	甲硫氨酸 Formaldehyde	核黄素 Riboflavin	谷氨酰胺 Glutamine	甘氨酸 Glycine	苯丙氨酸 Phenylalanine	腺苷 Adenosine	核糖 Ribose
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0	2.0
3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0
4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	4.0	4.0
5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	5.0	5.0

1.2.3 菌丝体培养及收集 1)菌种制备。将蛹虫草菌株接于蛹虫草斜面培养基上,(24±1)℃培养 4 d,活化 2 次后在无菌条件下接入液体培养基(150 mL 三角瓶中装液量为 50 mL)中,置于往复式摇床上,(24±1)℃、180 r/min 条件下培养 3 d 备用。

2)菌丝体培养。按 50 mL/L 的接种量接入装有 80 mL 蛹虫草液体培养基的 250 mL 三角瓶中。置于往复式摇床上培养,(24±1)℃、180 r/min 条件下发酵培养 18 d。将发酵液于 4 000 r/min 离心 20 min,收集菌丝体,用无菌水冲洗 3 次,60℃烘干至恒质量。

1.2.4 虫草素、多糖提取 采用水浸提法提取虫草素、多糖。提取条件为:温度 100℃,*m*(菌丝体):*V*(蒸馏水)为 25:1,时间 5.5 h。收集提取液,并将残渣再提取 2 次。将 3 次提取液合并,用活性炭脱色,然后取适量氧化铝层析柱。用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[13],HPLC 法测定虫草素含量。

1.2.5 高效液相色谱条件 Phenomenex NH₂ 色谱柱(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相:*V*(乙腈):*V*(蒸馏水)=75:25;流速 1 mL/min;检测波

产品;腺苷、核糖、次黄嘌呤、谷氨酰胺、甘氨酸、核黄素、甲硫氨酸、苯丙氨酸、乙腈、中性氧化铝、活性炭、苯酚、硫酸,均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 培养基 蛹虫草斜面培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,KH₂PO₄ 1 g,MgSO₄ 0.5 g,蒸馏水 1 000 mL,琼脂 12 g,pH 为 6.5~7.0。

蛹虫草液体培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,KH₂PO₄ 1 g,MgSO₄ 0.5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 为 6.5~7.0。

1.2.2 试验方案 采用单因素试验,研究虫草素合成直接前体物腺苷,腺苷合成前体物核糖、谷氨酰胺、甘氨酸、次黄嘌呤,菌丝生长营养物甲硫氨酸、苯丙氨酸、核黄素共计 8 种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素、多糖含量的影响。8 种前体物及营养物的供试水平见表 1。

长 260 nm;柱温 25℃;进样量为 10 μL。

1.2.6 虫草素标准曲线的制作 以虫草素标准品配制质量浓度分别为 5,10,20,40 和 60 mg/L 的溶液进行 HPLC 检测,进样量为 10 μL。以虫草素的峰面积(*y*)对其相应的质量浓度(*x*)作图,计算其回归方程,用于虫草素含量计算。

1.2.7 虫草多糖的测定 称取在 105℃干燥至恒质量的无水葡萄糖标准品 1.000 0 g,用蒸馏水定容配制成 0.05 mg/mL 的溶液,分别取该溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 至 25 mL 具塞试管中,用蒸馏水补至 2 mL,各加入体积分数为 5%的苯酚溶液 1 mL 摇匀,再迅速加入 5 mL 的浓硫酸,摇匀,室温下放置 30 min,在波长 490 nm 处测定吸光度(OD 值),以吸光度为纵坐标、葡萄糖质量浓度为横坐标作图,计算其函数关系。用上述方法测定蛹虫草菌丝提取液在 490 nm 处的 OD 值,根据葡萄糖标准曲线计算葡萄糖质量浓度,再由换算因子得到虫草的多糖含量。

1.2.8 换算因子的测定^[14] 精密称取干燥至恒质量的虫草多糖 5.0 mg,用蒸馏水定容至 100 mL 容

量瓶中,摇匀得蛹虫草多糖储备液。吸取 2.0 mL 测定其吸光度,同时做空白对照。由回归方程计算出蛹虫草多糖储备液中葡萄糖的质量浓度,并按下式计算换算因子 f : $f=m/(c\times D\times V)$; 式中: m 为蛹虫草多糖的质量(mg), c 为蛹虫草多糖储备液中葡萄糖的质量浓度(mg/L), D 为蛹虫草多糖的稀释倍数, V 为样品体积。

2 结果与分析

2.1 8 种前体物及营养物对虫草素含量的影响

2.1.1 腺苷与核糖 由图 1 可见,随着腺苷添加量的增加,虫草素含量缓慢增加,当腺苷添加量为 4.0 mg/mL 时,虫草素的含量达 2.70 mg/g; 随着腺苷添加量的继续增加,虫草素含量逐渐下降,当腺苷添加量为 5.0 mg/mL 时,虫草素含量降为 1.56 mg/g。随着核糖添加量的增加,虫草素含量迅速增加,当核糖的添加量为 2.0 mg/mL 时,虫草素的含量达到 2.5 mg/g; 核糖添加量为 4.0 mg/mL 时,虫草素含量接近对照(核糖添加量为 0 mg/mL)水平; 之后再增加核糖,则对虫草素含量无促进作用。

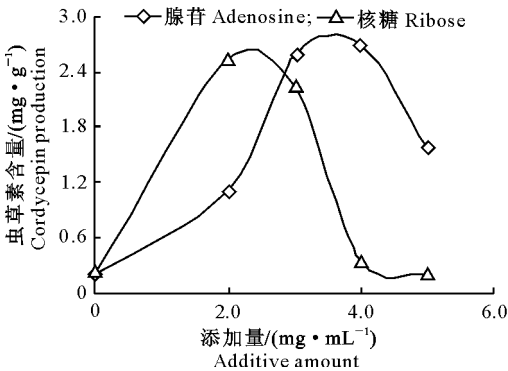


图 1 腺苷与核糖对虫草素含量的影响
Fig. 1 Effects of adenosine and ribose on cordycepin production

2.1.2 其他 6 种前体物及营养物 由图 2 可见,在其他 6 种前体物及营养物中,以谷氨酰胺的作用最明显,并在谷氨酰胺添加量为 0~1.0 mg/mL 时,虫草素含量迅速增多,当谷氨酰胺添加量为 1.0 mg/mL 时,虫草素含量达到 1.6 mg/g; 之后随着谷氨酰胺添加量的进一步增大,虫草素含量缓慢下降。随着甘氨酸添加量的增加,虫草素含量也逐渐增大,当甘氨酸添加量为 0.5 mg/mL 时,虫草素含量达到 0.84 mg/g; 随着甘氨酸添加量的进一步增加,虫草素含量逐渐下降; 当甘氨酸添加量高于 1.5 mg/mL 后,虫草素含量趋于稳定。次黄嘌呤、苯丙氨酸、甲

硫氨酸 3 种物质对虫草素含量的提高有不同程度的促进作用,当其添加量增加至 1.0 mg/mL 时,虫草素含量都达到最大值,分别为 0.79, 0.49, 0.62 mg/g; 之后随着添加量的继续增加,虫草素含量均缓慢下降。次黄嘌呤添加量超过 1.5 mg/mL 后,对虫草素的合成有抑制作用。虫草素含量随着核黄素添加量的增加而逐渐下降,显示核黄素对虫草素具有明显的抑制作用。

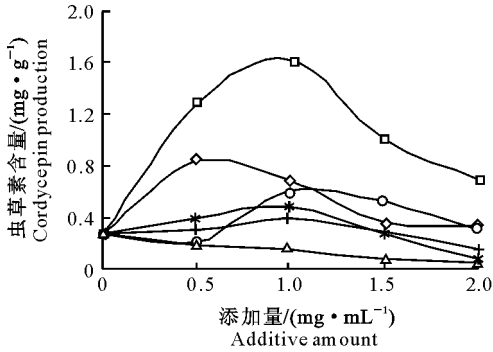


图 2 6 种前体物及营养物对虫草素含量的影响
—○—, 甲硫氨酸; —△—, 核黄素; —◇—, 甘氨酸; —□—, 谷氨酰胺;
—*—, 苯丙氨酸; —+—, 次黄嘌呤
Fig. 2 Effects of six kinds of precursor and nutrient on cordycepin production
—○—, Met; —△—, Riboflavin; —◇—, Gly; —□—, L-Glu;
—*—, Phe; —+—, Hyp

2.2 8 种前体物及营养物对虫草多糖含量的影响

2.2.1 腺苷与核糖 由图 3 可见,当腺苷添加量为 0~4.0 mg/mL 时,多糖含量逐渐增加,并在腺苷添加量为 4.0 mg/mL 时,多糖含量达 232.2 mg/g; 之后随着腺苷添加量的增加,多糖含量逐渐降低。核糖添加量为 0~3.0 mg/g 时,多糖含量迅速增加,并在核糖添加量为 3.0 mg/mL 时,多糖含量达到 231.1 mg/g; 当核糖添加量大于 3.0 mg/mL 时,多糖含量降低。

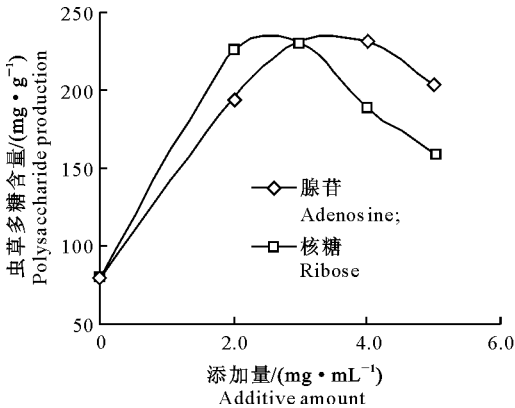


图 3 腺苷与核糖对虫草多糖含量的影响
Fig. 3 Effect of adenosine and ribose on polysaccharide production

2.2.2 其他 6 种前体物及营养物 由图 4 可见,谷氨酰胺与甘氨酸对多糖含量的促进作用较为明显,当其添加量均为 0.5 mg/mL 时,多糖含量分别为 183.1,158.7 mg/g;随着甘氨酸与谷氨酰胺添加量的进一步增加,多糖含量逐渐下降,至添加量均为 1.5 mg/mL 时,多糖含量已经接近对照(添加量为 0 mg/mL)水平;当其添加量大于 1.5 mg/mL 时,则对多糖合成均有抑制作用。随着次黄嘌呤、苯丙氨酸、甲硫氨酸添加量的增加,多糖含量缓慢上升,当其添加量均为 1.0 mg/mL 时,多糖含量均较高,分别为 138.7,137.8,120.7 mg/g;当其添加量增至 1.5 mg/mL 时,多糖接近对照水平;当添加量高于 1.5 mg/mL 时,则其对多糖合成有抑制作用。随着核黄素添加量的增加,多糖含量逐渐下降,显示核黄素对多糖的合成有明显的抑制作用。

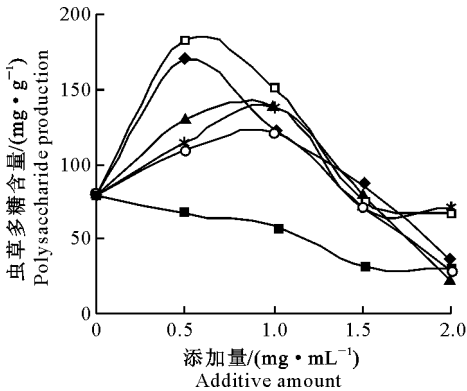


图 4 6 种前体物及营养物对虫草多糖含量的影响

— * —. 次黄嘌呤; — ◆ —. 甘氨酸; — □ —. 谷氨酰胺;
— ▲ —. 苯丙氨酸; — ○ —. 甲硫氨酸; — ■ —. 核黄素

Fig. 4 Effects of six kinds of precursor and nutrient on polysaccharide production

— * —. Hyp; — ◆ —. Gly; — □ —. L-Glu; — ▲ —. Phe;
— ○ —. Met; — ■ —. Riboflavin

3 讨论

本研究结果表明,供试 8 种前体物及营养物的添加均对蛹虫草中虫草素与多糖的合成有不同程度的影响,其中分别添加腺苷、核糖、谷氨酰胺、甘氨酸 4 种物质,对虫草素与多糖合成的促进作用均较明显;当腺苷添加量为 4.0 mg/mL 时,虫草素含量达到 2.70 mg/g,多糖含量达到 232.2 mg/g。李祝等^[15]研究发现,当腺苷添加量为 3.6 mg/mL 时,虫草素含量最大,这与本试验结果相似。本研究中,核糖添加量为 2.0 mg/mL 时,虫草素的含量达到 2.5 mg/g,当其添加量为 3.0 mg/mL 时,多糖含量为

231.1 mg/g;谷氨酰胺添加量为 1.0 mg/mL 时,虫草素含量达到 1.6 mg/g,当其添加量为 0.5 mg/mL 时,多糖含量达到 183.1 mg/g;甘氨酸添加量为 0.5 mg/mL 时,虫草素含量达到 0.84 mg/g,多糖含量达到 158.7 mg/g。文庭池等^[16]证实,谷氨酰胺与甘氨酸对虫草素的含量有促进作用,这与本试验结果相似。蛹虫草人工培养存在的区域差异、培养条件差异及提取条件的不同^[17],也会导致其中的虫草素与虫草多糖含量存在差异。在本研究中,苯丙氨酸、甲硫氨酸、次黄嘌呤对蛹虫草中虫草素与多糖合成的促进作用不明显;核黄素的添加则对虫草素和多糖的合成有抑制作用。以上结果表明,虫草素的合成以腺苷作为前体物,添加腺苷合成物质的同时,也能增加腺苷向虫草素的转化率。

从微生物代谢角度进行分析可知,虫草素(3'-脱氧腺苷)的合成是以腺苷作为直接前体物还原合成的^[18]。而嘌呤核苷酸的合成有 2 个途径:一是补救合成途径,即机体利用体内游离的嘌呤或嘌呤核苷,经过简单的反应过程合成嘌呤核苷酸,因此腺苷的添加能直接促进虫草素的转化合成,同时腺苷分解过程中产生的核糖,可以参与糖类代谢促进多糖合成;二是从头合成途径,即机体以磷酸核糖、氨基酸、一碳单位及 CO₂ 等简单物质为原料,经过一系列酶促反应,合成嘌呤核苷酸,在脱氧核酸酶的作用下,部分嘌呤核苷酸转化为脱氧核糖。因此,核糖、谷氨酰胺、甘氨酸分别作为嘌呤核苷酸从头合成途径所需的磷酸核糖、氮源、碳源,这 3 种物质的添加对嘌呤核苷酸的合成有明显的促进作用,不仅能够间接促进腺苷向虫草素的转化,而且同时可以参与糖类代谢促进多糖合成。本研究中,次黄嘌呤作为腺苷合成的前体物与代谢产物,受到了核苷酸的反馈性调节,其添加对虫草素与多糖合成无明显促进作用。甲硫氨酸与苯丙氨酸作为必需氨基酸,可以参与虫草的糖类代谢转化,对多糖与菌丝的生长有促进作用,但是关于其对虫草素的合成促进机理还不明确。核黄素为生长所需微量元素,是机体多种氧化还原酶的辅酶,具有递氢作用,是生长不可缺少的生长因子,但本研究结果表明,核黄素对虫草素的合成有一定的抑制作用,其机理还有待于进一步探讨。

[参考文献]

[1] Alexopoulos C J. 菌物学概论 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002:293.

ALexopoulos C J. Introductory mycology [M]. Beijing: China Agricultural Press,2002;293. (in Chinese)

[2] 张 平,朱述均,钱大顺,等. 北冬虫夏草功能成分及保健作用分析 [J]. 江西农业科学,2003(6):105-107.

Zhang P,Zhu S J,Qian D S,et al. *Cordyceps* functional components and health effects [J]. Jiangxi Agricultural Science,2003 (6):105-107. (in Chinese)

[3] 林群英,宋 斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展 [J]. 微生物学通报, 2006,33(4):154-157.

Lin Q Y, Song B, Li T H. Advances in the studies on *Cordyceps militaris* [J]. Microbiology, 2006, 33(4): 154-157. (in Chinese).

[4] Trigg P,Gutteridge W E,Williamson J. The effect of cordycepin on malaria parasites [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1971,65(4):514-520.

[5] Penman S,Rosbach N,Messenger M. Messenger and heterogeneous nuclear RNA in Hela cells; different inhibition by cordycepin [J]. Proc Nata Acad Sci (USA), 1970, 67: 1878-1885.

[6] 杜 梅,张 松. 食用菌多糖降血糖机理研究 [J]. 微生物学杂志,2007,27(2):83-87.

Du M,Zhang S. Mechanism of edible fungal polysaccharide on reducing blood sugar [J]. Journal of Microbiology, 2007, 27 (2):832-871. (in Chinese)

[7] 孙运凤. 食用菌多糖的药理作用及应用前景 [J]. 社区医学杂志,2006,4(1):29-31.

Sun Y F. Mushroom polysaccharide and application prospect of pharmacological effects [J]. Journal of Community Medicine, 2006,4(1):29-31. (in Chinese)

[8] 郑婷婷,李多伟,王英娟. 等. 蛹虫草液体培养条件优化及有效成分含量分析 [J]. 菌物研究,2004,2(4):22-25.

Zheng T T,Li D W,Wang Y J,et al. Optimum conditions for deep fementation of *Cordyceps militaris* and content analysis of its active substance [J]. Journal of Fungal Research,2004,2 (4):22-25. (in Chinese)

[9] 朱 姣,王德源,任 燕. 蛹虫草菌丝体液体培养条件研究 [J]. 山东科学,2007,20(3):45-48.

Zhu J, Wang D Y, Ren Y. Research on zymotic technics of *Cordyceps militari*(L.) Link. in liquid [J]. Shandong Science, 2007,20(3):45-48. (in Chinese)

[10] 刘丽丽,周剑书,王姝嫵. 虫草菌最适培养基的正交试验研究 [J]. 天津师大学报,1999,6(2):40-44.

Liu L L, Zhou J S,Wang Z Y. The orthogonal experiment study on the optimum culture condition of *C. sinsensis* [J]. Journal of Tianjin Normal University, 1999, 6(2): 40-44. (in Chinese)

Chinese)

[11] 凌建亚,孙迎节,吕 鹏,等. 虫草属真菌中虫草素的超声波提取及其毛细管电泳测定 [J]. 菌物系统,2002,21(3):394-399.

Ling J Y,Sun Y J,Lü P,et al. Capillary zone electrophoresis determination of cordycepin in cordyceps spp. extracted by u-sing ultrasonic [J]. Mycosystema, 2002, 21(3): 394-399. (in Chinese)

[12] 刘春泉,宋江峰,李大婧. 等. 虫草素的提取纯化及测定方法研究进展 [J]. 食品科学,2007,28(11):596-599.

Liu C Q,Song J F,Li D J,et al. Research progress review on cordycepin extraction and determination methods [J]. Food Science,2007,28(11):596-599. (in Chinese)

[13] 鲁晓岩. 硫酸-苯酚法测定北冬虫夏草多糖含量 [J]. 食品工业科技,2002,23(4):69-70.

Lu X Y. Phenol sulfuric acid method for the determination of *Cordyceps* polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry,2002,23(4):69-70. (in Chinese)

[14] 薛 阳,张沙艳,李 峰. 苯酚-硫酸法测定蛹虫草中多糖含量 [J]. 中国实用医药杂志,2007,2(15):87-89.

Xue Y,Zhang S Y,Li F. Phenol sulfuric acid method for the determination of Cordyceps Polysaccharide [J]. China Practical Medicine,2007,2(15):87-89. (in Chinese)

[15] 李 祝,郁建平,梁宗琦,等. 前体物质与真菌激发子对虫草菌素产量的影响 [J]. 食品科学,2008,29(6):293-295.

Li Z,Yu J P,Liang Z Q,et al. Effect of precursor and fungal elicitor on cordycepin production [J]. Food Science, 2008, 29 (6):293-295. (in Chinese)

[16] 文庭池,雷帮星,康冀川,等. 添加前体促进蛹虫草发酵生产菌丝体和虫草菌素的研究 [J]. 食品与发酵工业,2009,29(8):49-52.

Wen T C,Lei B X,Kang J C,et al. Enhanced production of mycelial and Cordycepin by submerged culture using additives in *Cordyceps militaris* [J]. Food and Fermentation Industries, 2009,29(8):49-52. (in Chinese)

[17] 杨 昕,斯陆勤,李 高. 不同产地人工蛹虫草子实体及冬虫夏草中核苷类成分的比较 [J]. 医药导报,2009,28(10):1354-1356.

Yang X,Si L Q,Li G. The comparison of nucleosides in cultured *Cordyceps militaris* mycelia from different habitats and natural *Cordyceps sinensis* [J]. Herald of Medicine, 2009, 28 (10):1354-1356. (in Chinese)

[18] 苏哈道尼克. 核苷类抗菌素 [M]. 北京:科学出版社,1982:45-48.

Suhadolnik R J. Nucleoside antibiotics [M]. Beijing: Science Press,1982:45-48. (in Chinese)