

液体培养蛹虫草虫草素和腺苷的代谢量

温 鲁¹ 夏 敏² 宋虎卫¹ 蒋 洁¹ 袁丞墅¹

(淮阴师范学院生物系 淮安 223300)¹ (淮阴师范学院分析测试中心 淮安 223300)²

摘要: 为提高虫草素和腺苷的代谢量, 用高效液相色谱法作检测手段, 以二者含量为检测指标, 对液体培养的氮源种类、氮源水平、碳源水平、动态变化、培养体系的虫草素及腺苷含量和总量进行研究, 结果表明: 不仅蚕蛹粉, 豆粕和豆粉也是很好的氮源; 培养液以 3 % 氮源、4 % 碳源为佳; 振荡培养 8d, 培养液中虫草素总量是菌丝体中虫草素总量的 6 倍多; 振荡培养 7 ~ 9d, 可使每瓶培养物的虫草素和腺苷总量达到 10mg 以上。

关键词: 蛹虫草, 虫草素、腺苷, 液体培养, 高效液相色谱法

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0091-04

The Metabolism Yield of Cordycepin and Adenosine in *Cordyceps militaris* by Liquid Culture

WEN Lu SONG Hu-Wei JIANG Jie YUAN Chen-Shu

(Department of Biology , Huaiyin Teachers College , Huai'an 223300)

XIA Min

(Center of Analysis and Testing , Huaiyin Teachers College , Huai'an 223300)

Abstract: In order to improve the metabolism yield of cordycepin and adenosine, we studied nitrogen sources, the levels of nitrogen sources and carbon sources, dynamic development in liquid culture, as well as the total yield of cordycepin and adenosine in culture system through determining the contents of cordycepin and adenosine by HPLC. The results are as follows: not only animal protein but also some plant protein is very good nitrogen sources; in culture solution the suitable levels of nitrogen sources and carbon sources is respectively 3% and 4%; the content of adenosine in culture solution is very low, while it is quite high in mycelia; it is much higher than the total yield of cordycepin in culture solution than in mycelia; when the culture system is oscillated and cultured after 7 ~ 9 days, the total yield of cordycepin and adenosine are both high.

Key words: *Cordyceps militaris*, Cordycepin, Adenosine, Liquid culture, HPLC

虫草属真菌含有多种具有医疗保健功效的活性物质, 其中备受关注的是虫草素和腺苷。蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 是虫草素的主要产生菌, 其含量比冬虫夏草高得多^[1-3]; 腺苷是虫草素的直接前体, 本身也具有很好的生理活性^[4], 但有关提高虫草素含量的研究报道却不多见^[5]。我们采用高效液相色谱法对虫草素和腺苷进行检测, 对液体振荡培养提高虫草素和腺苷代谢量进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养设备: LDZX—40B 型自动电热压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂),

作者还有: 周 昊¹ 张 乐¹

通讯作者 Tel: 0517-3288085, E-mail: ijlqgj@163.com

收稿日期: 2004-09-01, 修回日期: 2004-11-10

洁净工作台(北京冠鹏净化设备有限责任公司), HZQ-Q 全温振荡培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); 冰箱、烘箱、玻璃仪器等均为实验室常规仪器设备。

1.1.2 检测仪器: Waters 高效液相色谱仪, Waters 紫外检测器, 色谱柱为 NOVA-PAK C18 反相柱, $3.9 \times 300\text{mm}$, $4\mu\text{m}$; 流动相为 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4 + 1\%$ 四氢呋喃缓冲液, $\text{pH} = 6.86$, 流量 $1\text{mL}/\text{min}$; 检测波长 260nm 。

1.1.3 试剂: 虫草素标准品和腺苷标准品为上海化学试剂公司进口分装, 其余为国产分析纯试剂。

1.1.4 菌种: 我院生物系虫草课题组选育的 Cm-1, 菌株介绍另文报告。

1.1.5 碳、氮源: 除蛋白胨和牛肉膏为生化试剂外, 其余均为市售商品。

1.2 方法

1.2.1 培养方法: (1) 氮源比较: 基本培养液为砂糖 $20\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸镁 $0.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余为水。氮源分别为蛋白胨、牛肉膏、脱脂奶粉、全脂奶粉、鱼粉、蛹粉、鸡蛋、豆粕、豆粉, 除鸡蛋用量为 $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 外, 其余氮源均为 $20\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。蛋白胨和牛肉膏直接溶入基本培养液, 然后分装 250mL 三角瓶, 每瓶 100mL ; 其余氮源加入培养液后, 高压蒸煮 30min ($0.7 \times 10^5\text{Pa}$), 过滤, 再将滤液分装三角瓶。以上每处理 3 个重复, 高压蒸汽灭菌 30min ($0.7 \times 10^5\text{Pa}$)。采用 Cm-1 菌株斜面母种, 每瓶接入 4 块 0.5cm^2 的表面菌种, 静置 1d 后放入振荡培养箱, 25°C , $130\text{r}/\text{min}$ 培养, 5d 后终止培养, 滤出菌丝体, 剔除接种块, 60°C 烘干, 称重, 和滤液一起保存待测。(2) 氮源水平: 选择在 (1) 中表现较好的豆粕、蛹粉、豆粉和鱼粉 4 种蛋白源, 每种设 $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度水平制备培养液, 其余同 (1)。(3) 碳源水平: 选择在 (2) 中表现较好的 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 豆粕、蛹粉、豆粉和鱼粉, 以砂糖为碳源, 设 $20\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度水平制备培养液, 其余同 (1)。(4) 动态变化: 选择 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鱼粉为氮源、 $40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 砂糖为碳源制备培养液, 除碳氮源和振荡培养天数外, 其余均同 (1)。从振荡培养第 2d (振荡 1d) 起, 每 d 取 3 瓶置冰箱内中止培养, 第 11d (振荡 10d) 培养结束, 将各样品滤出菌丝体, 离心, 上清液返回滤液, 测量培养液剩余体积和菌丝体 (经 60°C 烘干) 重量, 然后分别测定各培养液和菌丝体的虫草素及腺苷含量。(5) 综合比较: 对 (4) 中培养液、菌丝体的虫草素和腺苷分别计算总量, 培养液中的总量按含量乘以培养液体积计, 菌丝体中的总量按含量乘以菌丝重量计。

1.2.2 检测方法: 培养液先用滤纸粗滤, 再用 $0.2\mu\text{m}$ 微孔滤膜压滤; 菌丝样品准确称取 0.25g 左右 (精确到 0.0001g), 用 25mL 容量瓶定容, 置超声波振荡器中振荡提取 1h , 随后粗滤, 再用 $0.2\mu\text{m}$ 微孔滤膜压滤, 测定时用微量进样器吸取 $10\mu\text{L}$ 滤液进样。标准曲线的回归方程为: 虫草素 $y = 3.16 \times 10^6 x - 2.48 \times 10^4$, $R = 0.9999$;

腺苷 $y = 3.60 \times 10^6 x - 1.14 \times 10^4$, $R = 0.9998$ 。

式中 x 为进样滤液中虫草素或腺苷含量 ($\mu\text{g}/10\mu\text{L}$), y 为虫草素或腺苷峰面积。其余同文献 [2]。

以上试验按同样操作进行了 3 批次, 下述结果为 3 批试验的平均值。

2 结果与分析

2.1 氮源比较

培养液各种氮源中, 以牛肉膏虫草素含量最高, 达 $0.063\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其余依次为

豆粕 ($0.043 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、蛹粉 ($0.042 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、豆粉 ($0.038 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、鱼粉 ($0.035 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、蛋白胨 ($0.029 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)，两种奶粉和鸡蛋的虫草素含量很低，均低于 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；腺苷则以蛋白胨最高，为 $0.026 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其余均处于很低水平。由于牛肉膏和蛋白胨为生化试剂，价格很高，从降低成本考虑，氮源以豆粕、蛹粉和豆粉为宜。鱼粉表现也较好，可根据原料供应及价格情况合理选用。

2.2 氮源和碳源水平

从图 1 可看出，3 % 氮源浓度是较佳水平。尽管 4 % 氮源的虫草素含量更高一些，但上升幅度明显减缓。由于腺苷含量较虫草素低得多，为节省篇幅，本文略去了氮源水平的腺苷图。从图 2 可知，碳源浓度以 4 % 较佳。除豆粕外，碳源水平进一步提高，虫草素含量反而有所下降，豆粕也仅略有增加。

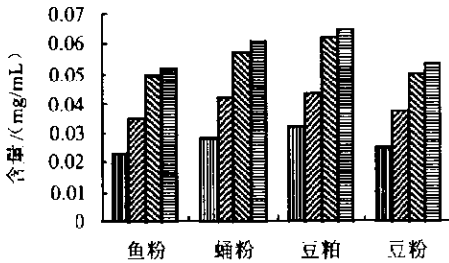


图 1 4 种氮源不同氮水平的虫草素含量

■ 1%, ■ 2%, ■ 3%, ■ 4%

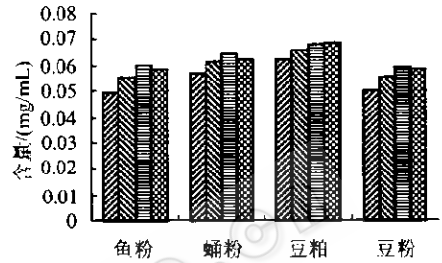


图 2 4 种氮源不同碳水平的虫草素含量

■ 2%, ■ 3%, ■ 4%, ■ 5%

2.3 动态变化

从图 3 可以看出，随着培养时间延长，三角瓶中培养液体积逐渐减少，菌丝体产量逐渐增加，但在第 7d 达到最高值后开始缓慢降低。由于采用的培养液配方不是最佳配方，每瓶菌丝体产量与其它配方相比，不是最高，但各配方菌丝产率的动态变化是一致的。

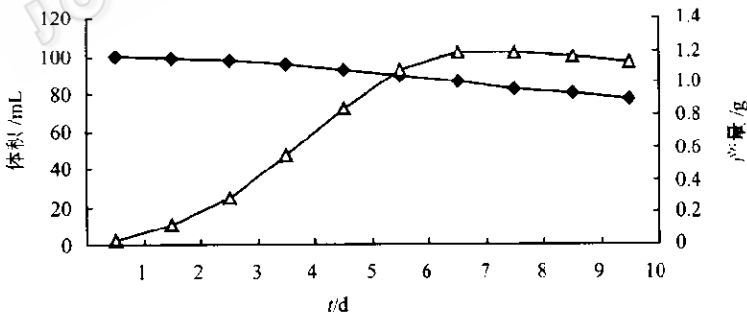


图 3 不同天数培养液体积和菌丝体产量

● 培养液体积, △ 菌丝体产量

从图 4 可看出，培养液中的虫草素从第 1d 就开始产生，以后几乎呈直线上升，直至第 8d 接近 0.09 mg/mL ，再向后涨势迅速趋缓。腺苷则始终处于很低水平，随时间延长虽略有波动，但一直未突破 0.01 mg/mL 。

从图 5 可看出，菌丝的腺苷含量前期上升很快，并在前 8d 一直高于虫草素，而且高出很多，第 6d 时达最高，随后开始下降，第 8d 时与虫草素相等，以后即低于虫草素。虫草素始终呈上升趋势，只是第 9d 后升势渐缓。

从图 4 和图 5 的纵坐标还可看出, 菌丝中的虫草素和腺苷含量, 比培养液高得多。

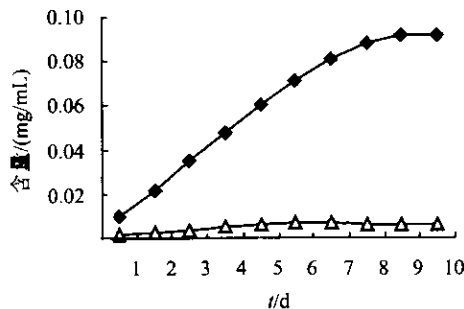


图 4 不同天数培养液中虫草素和腺苷

● 虫草素, △ 腺苷

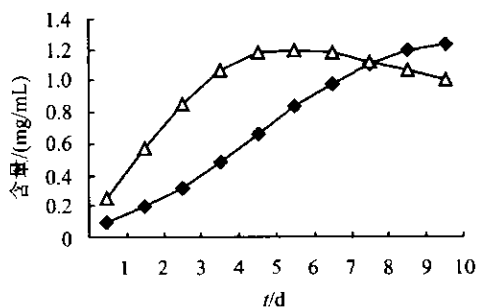


图 5 不同天数菌丝体中虫草素和腺苷

● 虫草素, △ 腺苷

2.4 综合比较

经计算, 培养液中虫草素总量比菌丝体高得多。尽管培养液单位体积的虫草素含量低, 但体积大; 菌丝体虽然含量高, 但菌丝量少。每 100mL 初始培养液, 在第 8d 时的虫草素总量为 7.94mg, 菌丝体为 1.27mg, 前者是后者的 6 倍多。而虫草素和腺苷之和, 仍然是培养液高于菌丝体。培养体系 (培养液加菌丝体) 的虫草素和腺苷总量, 第 7d 天时突破了 10mg, 第 8d 达到最高后, 开始缓慢下降, 但仍高于 10mg 水平。

3 小结与讨论

(1) 蛹虫草作为虫生真菌, 一般认为动物蛋白对其生长发育更为有利, 本研究发现植物蛋白也适合蛹虫草的生长发育, 其中以豆粕和豆粉为佳; 相反, 虽是动物蛋白, 但奶粉和鸡蛋并不好。本研究首次采用鱼粉作为培养基的氮源, 尽管表现不是最好, 但仍是较好的, 拓宽了可用的氮源领域。

(2) 4% 碳源、3% 氮源是很好的碳氮源浓度, 尤以豆粕作氮源的效果更好。本研究未作正交法试验, 其实不同的实验条件, 所得到的最佳条件并不相同。

(3) 蛹虫草液体培养的时间, 以 7~9d 为宜, 8d 较佳, 时间过短则虫草素和腺苷含量低, 过长则周期长、培养成本高。如目的是获得菌丝, 可以选择 7d; 若以获取虫草素为目的, 可培养 9d 左右; 若以获取腺苷为目的, 6~7d 即可。

(4) 液体培养的菌丝体中, 腺苷含量特别高。如目的是腺苷, 可只取菌丝体; 若考虑虫草素或二者并重, 则必须重视培养液, 虽然培养液中虫草素含量比菌丝体低, 但培养液量大, 虫草素总量比菌丝体高得多, 而且好的培养液配方中虫草素含量更高。

参考文献

- [1] 张平, 朱述钧, 钱大顺, 等. 江苏农业科学, 2003, 6: 105~107.
- [2] 温鲁, 尹起范, 唐玉玲, 等. 食品科学, 2004, 25 (8): 155~157.
- [3] 韦会平, 肖波, 胡开治. 中药材, 2004, 27 (3): 215~217.
- [4] 李祝, 刘爱英, 梁宗琦. 食用菌学报, 2002, 9 (1): 57~62.
- [5] 步岚, 朱振元, 梁宗琦. 菌物系统, 2002, 21 (2): 252~256.