

冬虫夏草液态发酵菌丝体中化学成分分析

谭之磊, 殷海松, 黄 皓, 贾士儒*

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 对冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)液态发酵菌丝体的主要化学成分进行了分析。冬虫夏草液体发酵菌丝体中粗蛋白和粗脂肪的含量分别为24.53%和6.69%;腺苷含量为0.3755mg/g, D-甘露醇含量为88.80mg/g, 胞内多糖含量为133.9mg/g, 麦角甾醇含量为1.80mg/g。冬虫夏草液态发酵菌丝体主要成分含量与天然虫草相似。

关键词: 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*); 发酵菌丝体; 化学成分

Chemical Ingredients of Submerged Cultivation Mycelium of *Cordyceps sinensis*

TAN Zhi-lei, YIN Hai-song, HUANG Hao, JIA Shi-ru*

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This investigation characterized the main chemical ingredients of submerged cultivation mycelium of *Cordyceps sinensis*. The contents of crude protein and crude fat were 24.53% and 6.69% respectively; The contents of adenosine, mannitol, intracellular polysaccharide and ergosterol were 0.3755, 88.80, 133.9 and 1.80 mg/g respectively. The level of main ingredients in the submerged cultivation mycelium was similar to that in the natural *Cordyceps sinensis*.

Key words *Cordyceps sinensis*; submerged cultivation mycelium; chemical ingredients

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0328-04

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*), 又名虫草, 是麦角科真菌冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*(Berk.) Sacc.)寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合物, 在中国、日本、韩国等国被广泛用作滋补食品或补药。冬虫夏草具有多种药理作用如: 抗肿瘤^[1-3]、免疫调节^[4]、抗氧化^[5]等。其中虫草多糖具有抗肿瘤作用和抗氧化作用; 腺苷具有抑制血小板凝聚作用; 甾醇类物质具有抗肿瘤作用; D-甘露醇具有利尿脱水、镇咳、祛痰和平喘作用。冬虫夏草子实体及无性型菌丝体的化学成分的种类基本相同^[6], 但是含量差异明显^[7]。

近年来, 由于过量采集, 自然界中野生虫草越来越少; 同时, 市场的需求量在不断增大, 野生虫草已经远远不能满足市场的需求。因此, 大量人工培养的虫草菌丝体被开发成保健品和药品。与冬虫夏草人工栽培和固体培养相比, 液体深层培养具有容易控制培养条件、易于大规模工业化生产等优点。开发人工虫草产品, 使其化学成份和含量接近于野生虫草的化学成份, 对确保其疗效是非常重要的。本研究对深层液体培养获得的冬虫夏草菌丝体的有效成分进行了分析, 为开发人

工虫草产品提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

冬虫夏草菌(*Cordyceps sinensis*) 天津科技大学食品工程与生物技术学院。

将PDA斜面菌种接种到装有50ml土豆葡萄糖培养基(土豆200g/L, 葡萄糖30g/L, 蛋白胨15g/L, KH₂PO₄ 3.0g/L, MgSO₄·7H₂O 1.5g/L, 灭菌前pH调到5.5)的250ml三角瓶中, 150r/min, 24℃培养3d, 作为液体种子。用5L发酵罐进行发酵培养, 发酵培养基与种子培养基相同, 工作体积为3L, 接种量10%, 24℃培养6d。初期搅拌速率为200r/min, 发酵第3d升至350r/min, 第4d后为400r/min。培养基的通气速率为1vvm。发酵结束后7000×g离心15min收集菌丝体。菌丝体冷冻干燥后用粉碎机研磨成粉末备用。

1.2 试剂

腺苷标准品、麦角甾醇(分析纯) Sigma公司; 乙醇、甲醇为国产色谱纯; 其他试剂为国产分析纯。

收稿日期: 2007-02-02

基金项目: 国家“863”资助项目(2006AA10Z347); 天津科技大学自然科学基金资助项目(20060207)

作者简介: 谭之磊(1977-), 男, 助理研究员, 研究方向为微生物学与分子生物学。E-mail: tanzhilei@yahoo.com.cn

*通讯作者: 贾士儒(1954-), 男, 教授, 研究方向为发酵微生物学。E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

1.3 仪器

1100 Series LC Chemstation高效液相色谱仪、1100系列VWD可变波长检测器 Agilent公司。

1.4 方法

1.4.1 粗蛋白含量测定

凯氏定氮法^[8]。

1.4.2 水溶性蛋白含量的测定

考马斯亮蓝染色法^[9]。

1.4.3 粗脂肪含量的测定

索氏脂肪抽提法-Soxhlet^[8]。

1.4.4 总糖含量的测定^[10]

取冬虫夏草发酵菌粉0.2g,精密称定,置于50ml圆底烧瓶中,加入6mol/L HCl 10ml,蒸馏水15ml,在沸水浴中水解1.5h,过滤,用蒸馏水冲洗残渣,以酚酞为指示剂,用10% NaOH中和至微红色,最后定容至100ml,苯酚-硫酸法比色测定总糖。

1.4.5 腺苷含量的分析^[11]

取虫草发酵菌粉1.0g,精密称定,于索氏提取器中加50%乙醇50ml,回流提取2.0h,提取液浓缩至10ml,经0.45μm微孔滤膜过滤,即为供试液。采用高效液相色谱测含量。色谱条件:色谱柱:TSK-GEL ODS-100S(4.6×250mm);柱温:30℃;检测波长:260nm;流动相:0.02mol/L磷酸二氢钾:甲醇(80:20);流速:1.0ml/min;进样量:20μl。标准曲线与含量分析参见文献^[11]。

1.4.6 冬虫夏草胞内多糖含量的分析^[12]

取冬虫夏草菌粉2.0g,精密称定,以20倍体积的水浸泡,加热至微沸,维持温度1.0h,冷却至室温,4000r/min离心20min,残渣重复提取2次,合并三次上清液,真空浓缩至溶液浓度约0.5g生药/ml,加入2倍体积的95%乙醇醇析24h,离心收集沉淀,冷冻干燥即得到冬虫夏草粗多糖。将粗胞内多糖用蒸馏水溶解,用苯酚-硫酸法测定胞内多糖含量。

1.4.7 D-甘露醇含量的分析^[13]

取发酵菌丝体粉2.0g,精密称定,加蒸馏水50ml,回流2h后过滤,用蒸馏水洗残渣,将滤液、洗液合并于50ml容量瓶中,加蒸馏水至刻度。精密量取滤液

1.0ml置100ml容量瓶中,加蒸馏水至刻度为供试品溶液。通过比色法分析冬虫夏草中D-甘露醇含量。

1.4.8 麦角甾醇含量的分析^[14]

取0.5g冬虫夏草菌丝体粉,精密称定,置250ml圆底回流瓶中,加入20%氢氧化钾溶液20ml和无水乙醇10ml,沸水浴中回流2.5h。冷至室温,加乙醚25ml,剧烈震荡15min,静置2h,分层,取上层萃取液于波长281.5nm测定吸收度。

2 结果与分析

2.1 粗蛋白、粗脂肪和总糖的分析

冬虫夏草发酵菌丝体中粗蛋白、水溶性蛋白、粗脂肪和总糖含量见表1。

冬虫夏草液体发酵菌丝体中的粗蛋白质含量为24.53%,低于天然冬虫夏草和固体发酵菌丝体中粗蛋白的含量^[7,15-16];但高于Tai-Hao H等^[7]报道的冬虫夏草液体发酵菌丝体中粗蛋白含量14.80%。冬虫夏草液体发酵菌丝体中粗脂肪含量为6.69%,略低于Tai-Hao H等^[7]报道天然冬虫夏草虫体和子实体中粗脂肪含量(分别为8.62%和9.09%),与王尊生等^[15]报道的冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)菌丝体固体发酵粉中的粗脂肪含量6.45%和Tai-Hao H等^[7]报道液体发酵菌丝体中粗脂肪含量6.63%基本一致。水溶性蛋白质含量为1.77%,高于张巧霞等^[17]测得的天然冬虫夏草水溶性蛋白含量1.00%和虫草菌HK-1液体发酵菌丝体中水溶性蛋白含量1.20%。冬虫夏草发酵菌丝体中总糖含量为41.75%,高于Tai-Hao H等^[7]报道的野生冬虫夏草及固体发酵菌丝体中的总糖含量(分别为24.90%和23.30%),与其报道的液体发酵菌丝体中总糖含量39.40%非常接近。

2.2 主要活性成分分析

冬虫夏草液态发酵菌丝体中腺苷、胞内多糖、D-甘露醇和麦角甾醇含量见表2。

腺苷是冬虫夏草中的主要活性成分,通过HPLC测定的冬虫夏草发酵菌丝体中腺苷含量为0.3755mg/g,色谱图见图1,与天然冬虫夏草腺苷含量接近^[7,18];高于赵祥军等报道的人工虫草菌丝体中腺苷含量0.2652mg/g^[19]。本实验室通过液体培养获得的冬虫夏草菌丝体符合2005年《中国药典》冬虫夏草腺苷含量大于0.1mg/g的要求。

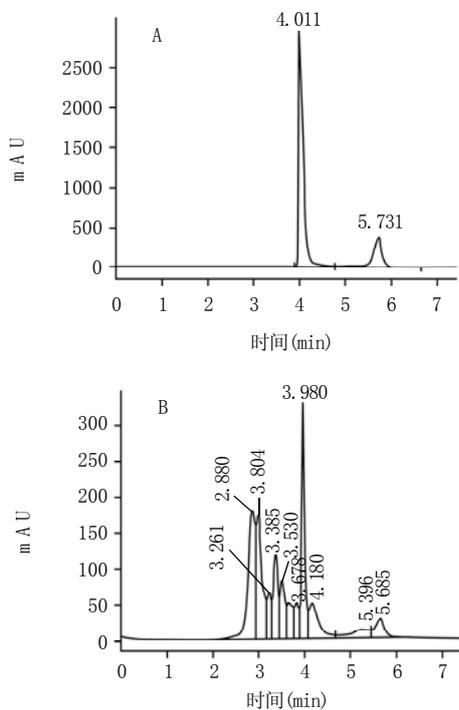
表1 冬虫夏草液态发酵菌丝体粗成分分析

Table 1 Analysis of proximate composition of submerged cultivation mycelium of *Cordyceps sinensis*

成分	含量(%)			
	冬虫夏草液体发酵菌丝体	天然冬虫夏草子实体	冬虫夏草液体发酵菌丝体	冬虫夏草菌丝体固体发酵粉
粗蛋白	24.53	30.40 ^[7]	14.80 ^[7]	30.81 ^[15]
粗脂肪	6.69	9.09 ^[7]	6.63 ^[7]	6.45 ^[15]
水溶性蛋白	1.77	1.00 ^[17]	1.20 ^[17]	
总糖	41.75	24.90 ^[7]	39.40 ^[7]	23.30 ^[15]

表2 冬虫夏草液态发酵菌丝体生物活性成分分析
Table 2 Analysis of bioactive ingredients of submerged cultivation mycelium of *Cordyceps sinensis*

生物活性成分	含量(mg/g)		
	冬虫夏草液态发酵菌丝体	天然冬虫夏草	人工培养冬虫夏草菌丝体
腺苷	0.3755	0.3966 ^[18] 0.311 ^[7] 1.930 ^[7]	0.2652 ^[19]
胞内多糖	133.9	30.0 ^[21]	175.9 ^[15]
D-甘露醇	88.8	84.0 ^[22] 110.0 ^[13]	68.3 ^[13]
麦角甾醇	1.80	3.57~10.68 ^[23]	0.89~1.44 ^[23] 1.38 ^[15]



A: 腺苷标准品; B: 液体发酵菌丝体提取物。
图1 腺苷的色谱图

Fig.1 Chromatogram of adenosine

近年来, 由于多糖具有清除自由基、抗氧化、抗病毒、肝保护、抗纤维化和降低胆固醇等功效而倍受人们的关注^[20]。但是由于提取和检测方法的不同, 不同文献报道的冬虫夏草多糖含量存在比较大的差异。本实验室通过深层液体培养获得的冬虫夏草液体发酵菌丝体中多糖含量为133.9mg/g, 与虫草固体发酵粉中多糖含量接近^[15], 高于沈晓云等报道的天然冬虫夏草胞内多糖含量3%^[21]。

通过比色法测得的冬虫夏草液体发酵菌丝体中D-甘露醇的含量为88.8mg/g。汪宝琪等用薄层扫描分析法测定西藏冬虫夏草中的D-甘露醇含量为84.0mg/g^[22]。李雪芹等通过比色法测定天然冬虫夏草的甘露醇含量

为110.0mg/g, 而人工虫草胶囊中甘露醇含量最高为68.3mg/g^[13]。本实验及汪宝琪等人的研究结果表明人工培养的虫草中D-甘露醇含量一般要低于天然冬虫夏草中的含量。本实验室通过液体培养获得的菌丝体中D-甘露醇含量要高于其他报道的人工培养虫草中D-甘露醇含量, 而且比较接近天然冬虫夏草中的D-甘露醇含量。

麦角甾醇是VD₂的前体物质, 它也被用于生产可的松和黄酮激素, 具有重要的药用价值。冬虫夏草液体发酵菌丝体中麦角甾醇含量为1.80mg/g, 高于李绍平等报道的人工冬虫夏草菌丝体中麦角甾醇的含量0.89~1.44mg/g和王尊生等报道的固体发酵菌丝体中麦角甾醇的含量1.38mg/g^[15], 但低于李绍平等报道的天然冬虫夏草中麦角甾醇的含量^[23]。

3 结论

从以上分析结果中可知, 本实验室通过深层液体培养获得的冬虫夏草菌丝体中虫草多糖、腺苷、D-甘露醇、麦角甾醇等主要功能成分与天然冬虫夏草一致且含量相近, 甚至高于天然冬虫夏草。由于目前野生虫草越来越少, 药理实验证明冬虫夏草液态发酵菌丝体与天然冬虫夏草有相似的药理作用^[5], 通过人工栽培和固体发酵获得生物活性物质又还存在一些缺点, 因此通过冬虫夏草深层液体培养获得生物活性物质是一种非常有应用前途的方法。

参考文献:

- [1] BOK J W, LERMER L. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(7): 891-898.
- [2] NAKAMURA K, YAMAGUCHI Y, KAGOTA S, et al. Activation of Kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats [J]. *Japanese journal of pharmacology*, 1999, 79(4): 505-508.
- [3] CHO M A, LEE D S, KIM M J, et al. Antimutagenicity and cytotoxicity of cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2003, 12(5): 472-475.
- [4] YANG L Y, HUANG W J, HSIEH H G, et al. H1-A extracted from

- Cordyceps sinensis* suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL[J]. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2003, 141(1): 74-83.
- [5] LI S P, LI P, DONG T T X, et al. Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*[J]. *Phytochemistry*, 2001, 8(3): 207-212.
- [6] LI S P, SU Z R, DONG T T X, et al. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity[J]. *Phytochemistry*, 2002, 9(4): 319-324.
- [7] TAI-HAO H, LI-HUA S, CHIENYAN H, et al. A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78: 463-469.
- [8] 王福荣. 生物工程分析与检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 118-170.
- [9] 李建武, 萧能赓, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 人民教育出版社, 1994: 174-177.
- [10] 薛德钧, 章明. 三种肉苁蓉糖类成分的分析[J]. *中药材*, 1994, 17(2): 36-37.
- [11] 吴春敏, 叶榕平. HPLC法测定冬虫夏草中腺苷含量[J]. *中草药*, 1999, 30(9): 658-660.
- [12] 张国华, 李绍平, 季晖, 等. 正交设计优化冬虫夏草多糖的提取工艺[J]. *安徽医药*, 2004, 8(6): 404-405.
- [13] 李雪芹, 包天桐, 王雁. 比色法测定冬虫夏草中甘露醇的含量[J]. *中草药*, 1999, 30(1): 19-21.
- [14] 惠丰立, 魏明卉, 诸学英. 产麦角固醇酵母菌株的筛选及发酵条件优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2004, 35(3): 138-140.
- [15] 王尊生, 顾宇翔, 周丽, 等. 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)菌丝体固体发酵粉化学成分的分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(3): 331-336.
- [16] 徐锦堂. 中国药用真菌学[J]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997: 365.
- [17] 张巧霞. 冬虫夏草菌抗肿瘤活性及其作用机理的研究[D]. 天津: 天津大学, 2005.
- [18] 夏文娟, 曾晓英, 袁海龙, 等. 不同产地冬虫夏草腺苷含量的测定[J]. *中国中药杂志*, 2001, 26(8): 540-542.
- [19] 赵祥军, 丘瑞桂, 袁海龙, 等. 冬虫夏草道地药材与人工虫草菌丝体的分析比较[J]. *中药材*, 2003, 26(6): 408-409.
- [20] OOI V E C, LIU F. A review of pharmacological activity of mushroom polysaccharides[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1999(1): 195-206.
- [21] 沈晓云, 李兆兰, 田军. 冬虫夏草与虫草菌丝有效成分分析比较[J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 1998, 21(1): 80-85.
- [22] 汪宝琪, 庞志功. 西藏冬虫夏草中D-甘露醇的薄层扫描分析[J]. *中草药*, 1995, 26(4): 189-190.
- [23] 李绍平, 李萍, 季辉, 等. RP-HPLC测定天然与人工冬虫夏草中游离麦角甾醇的含量[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2001, 18(4): 297-299.