

固体培养蛹虫草核苷类次生代谢物的产率

温 鲁¹, 夏 敏², 宋虎卫¹, 张 乐¹, 周 昊¹, 蒋 洁¹, 袁丞墅¹

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

摘 要: 为提高固体培养蛹虫草核苷类代谢物的产率, 用高效液相色谱法对培养物的虫草素和腺苷含量进行检测, 从菌株、氮源、氮源水平、加水量、培养时间和光照等方面进行研究, 在以 20% 豆粉为氮源、按 1:1 加营养液、接种 Cm-2 菌株、遮光培养 35d 的条件下, 培养物的虫草素含量可达 5.49mg/g, 高于蛹虫草全草, 为保健食品增加了新品种和新原料。

关键词: 大米; 蛹虫草; 虫草素; 腺苷; 固体培养; 高效液相色谱法; 保健食品

Yield of Nucleotides Secondary Metabolite in Cordyceps militaris by Corn Culture

WEN Lu¹, XIA Min², SONG Hu-wei¹, ZHANG Le¹, ZHOU Hao¹, JIANG Jie¹, YUAN Cheng-shu¹

(1. Department of Biology, Huaiyin Normal College, Huai'an 223300, China

2. Center of Analysis and Testing, Huaiyin Normal College, Huai'an 223300, China)

Abstract: In order to increase the yield of nucleotide metabolite in Cordyceps militaris by corn culture, the strains, nitrogen resources and levels, water supply, culture period and illumination were assayed by determining the contents of cordycepin and adenosine in the culture produce by HPLC. The results showed that under 20% bean powder as nitrogen resource, adding nutrient solution of equal volume, inoculating Cm-2 strain with light covering and culturing for 35 days, the content of cordycepin in the culture produce reached 5.49mg/g, significantly higher than that of the whole Cordyceps militaris. Therefore this study added new

收稿日期: 2004-11-16

作者简介: 温鲁(1947-), 男, 副教授, 研究方向为食用菌与相关保健品。

氏菌。应用 Accuprobe 基因探针法鉴定, 可直接从选择性平板上挑选典型菌落, 无需次代培养及重新分离纯化, 鉴定过程仅需 30min, 而从前增菌、VIDAS 初筛到选择性平板划线纯化仅需 72h, 比用 API Listeria 鉴定法缩短了 2d, 更比用常规方法大大缩短了整个检测鉴定周期。但基因探针鉴定法也存在缺点, 检测一种菌就需要制备一种探针, 尚未建立所有致病菌的探针; 由于样品中待检菌量若含有复杂成分的杂质会限制探针检测的敏感性, 样品中的单增李斯特氏菌的数量一般低于 10^2 cfu/g, 而基因探针检测极限为 $10^3 \sim 10^5$ cfu/g^[5], 因此一般仍需前增菌、划线培养和挑取典型菌落等步骤。但当增菌肉汤检测极限达到 7.5×10^7 cfu/g 时, 也可直接用基因探针法检测肉汤, 整个检测时间仅需 2d^[6]。

为适应日益扩大的对外贸易的发展, 提高日常工作的检出率, 防止受恶性细菌污染的食品出入境, 保障消费者的食品安全, 在口岸引进简便、快速、准确的检验方法势在必行。基因探针法明显提高了细菌的诊断

水平, 大大缩短了检测周期, 随着核酸杂交技术的不断发展和研究的不断深入, 基因探针法必将在食源性病原的检测鉴定上得到越来越广泛的应用。

参考文献:

- [1] Foodborne Listeriosis Report of a WHO Informel Working Group[M]. Geneva, 1988. 15-19.
- [2] Afnor Validation BIO'procedure for the detection of Listeria monocytogenes"[M]. France, 1995.
- [3] 张子平. 李斯特氏菌-一种适冷性食物中毒细菌[J]. 肉类工业, 2000, 226(4): 34.
- [4] 翁文川, 覃文. 联用 VIDAS 法和 API Listeria 法对食品中李斯特氏菌检验及分类[J]. 食品科学, 2000, 21(4): 59-62.
- [5] 陈森, 辛显桐, 金蓉培. 食品中单增李斯特氏菌及快速检测[J]. 中华预防医学杂志, 1995, 29(1): 49-50.
- [6] 翁文川, 李志勇, 胡科锋, 等. 基因探针快速检测食品中单增李斯特氏菌[J]. 食品科技, 2003, (1): 75-77.

species and new material for health care food.

Key words: rice Cordyceps militaris cordycepin adenosine solid culture HPLC health care food

中图分类号 R151.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0065-04

用谷物生产保健食品,是食品行业的一个重要课题。保健食品涉及的学科较多,其中一个重要领域,就是食用菌和传统食品的结合^[1~4]。虫草是一类具有显著医疗保健功效的食用菌,其中最著名的是冬虫夏草。蛹虫草是冬虫夏草的近缘种,也是虫草属的模式种,含有和冬虫夏草类似的多种活性成分,其中虫草素含量比冬虫夏草高数十倍,腺苷含量也比冬虫夏草高数倍^[5,6]。虫草素具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤,以及抗疲劳、抗衰老、提高人体免疫力等显著功效,并有明显的雄性激素样作用;腺苷是虫草素的直接前体,本身也具有多种医疗保健功效^[7,8]。它们都是虫草的核苷类次生代谢产物,其含量多少是衡量虫草品质高低的重要依据。我们用大米为主要培养料,接种蛹虫草菌进行固体培养,采用高效液相色谱法对培养物的虫草素和腺苷含量进行检测,力求提高培养物中以虫草素和腺苷为代表的核苷类活性成分的含量,现将研究情况报告如下。

1 材料与方法

1.1 设备与材料

1.1.1 设备

LDZX-40B 型自动蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; 洁净工作台 北京冠鹏净化设备有限责任公司; GNP-9160 恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; SPX-250B 生化培养箱 上海佳胜实验设备有限公司; 101-2 干燥箱 上海仪器总厂; JYL-350 型多功能食品料理机 山东九阳小家电有限公司; 冰箱、扭力天平及各种玻璃器皿等,均为实验室常规仪器。

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 × 300mm, 4 μm; 流动相为 KH₂PO₄-K₂HPO₄+1% 四氢呋喃缓冲液, pH6.86, 流量 1ml/min; 检测波长 260nm。另有岛津 AW 电子天平, KS-600D 超声波振荡仪等。

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,其余均为国产分析纯试剂。

1.1.4 菌种

我院生物系虫草课题组选育的蛹虫草 Cm-1、Cm-2, 菌株介绍另文报告; 其余蛹虫草菌种从国内十多家供种单位引进(引进单位略)。所有菌株制成斜面菌种, 培养

基为加富 PDA, 遮光培养 10d 后, 见光 3d 备用。

1.1.5 碳氮源

豆粕、大豆、脱脂奶粉、全脂奶粉、鱼粉、蚕蛹、鸡蛋、大米、砂糖等, 均为市售商品。

1.2 方法

1.2.1 培养

1.2.1.1 菌株比较 因参比菌株较多, 除 Cm-1、Cm-2 外, 其余随机选取 5 株进行品比, 分别是 C1、C3、C4、C7 和 C9。培养基为大米 90%, 鱼粉 10%, 按 1:1 加营养液; 营养液配方为砂糖 2%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, 其余为自来水。

制作: 取 Φ 20mm × 200mm 试管, 每管装干料 5g, 加营养液 5ml, 用聚丙烯薄膜和乳胶管剪成的小皮筋封口, 125~126℃ (1.3 × 10⁵~1.4 × 10⁵ Pa) 灭菌 1h, 按无菌操作接入 5mm × 5mm 斜面母种, 每管接 1 块, 每菌株接 5 管, 置 25℃ 恒温箱培养 30d。

1.2.1.2 氮源比较 参比氮源为豆粕、豆粉、脱脂奶粉、全脂奶粉、鱼粉、蛹粉和鸡蛋。每种氮源设 10%、15%、20%、25% 四个浓度水平, 鸡蛋用量加倍。除氮源和菌株外, 其余均同 1.2.1.1, 菌株用 Cm-2。

1.2.1.3 加水量 采用以 20% 豆粉为氮源的培养基, 5g 干料中分别加入 4ml 和 5ml 营养液, 另向加 5ml 营养液的试管中, 依次补加 0、1、2、3ml 水, 形成的水料比分别为 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6, 每处理 3 重复, 灭菌后接种 Cm-2, 培养 30d 待测。

1.2.1.4 培养时间 采用以 20% 豆粉为氮源的培养基, 按 1:1 加营养液, 制作 30 支试管, 接种 Cm-2 菌株, 在培养到 25、30、35、40、45、50d 时, 各取出 3 管, 放入冰箱中止培养。

1.2.1.5 光照试验 在 1.2.1.4 试验中, 第 30d 时从培养箱中取出 12 支供试试管放入生化培养箱, 按自然光条件进行光照处理, 在 35、40、45、50d 时, 各取 3 支放入冰箱中止培养。

1.2.2 检测

1.2.2.1 样品处理 将各样品从试管中掏出, 置培养皿中, 于干燥箱内 60℃ 烘干, 用多功能食品料理机粉碎备用。

1.2.2.2 检测方法 称取待测样品 0.25g 左右, 用 25ml 容量瓶定容, 置超声波振荡器中振荡提取 1h, 先

用滤纸粗滤,再用0.2 μm 微孔滤膜压滤,用微量进样器吸取10 μl 滤液进样。标准曲线的回归方程为:

$$\text{虫草素 } y = 3.16 \times 10^6 x - 2.48 \times 10^4 \quad R = 0.9999$$

$$\text{腺苷 } y = 3.60 \times 10^6 x - 1.14 \times 10^4 \quad R = 0.9998$$

式中x为进样滤液中虫草素或腺苷含量(μg/10μl),y为虫草素或腺苷峰面积,其余同文献[5]。

2 结果与分析

2.1 菌株比较

用高效液相色谱法检测各菌株的虫草素和腺苷含量,结果见图1。

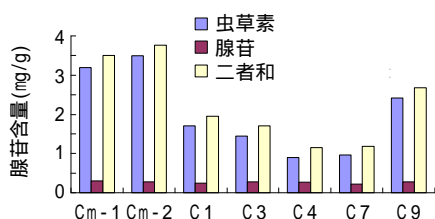


图1 不同菌株培养物的虫草素和腺苷含量

Fig.1 The contents of cordycepin and adenosine in cultured substance of different strains

各菌株以Cm-2的虫草素含量最高,Cm-1次之,二者均较其它菌株高出许多;腺苷以Cm-1最高,Cm-2次之,但与其它菌株无显著差异。虫草素和腺苷相加,仍以Cm-2最高。

2.2 氮源种类

各氮源均取10%水平进行比较,结果见图2。

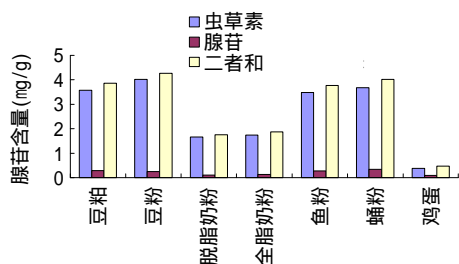


图2 不同氮源培养物的虫草素和腺苷含量

Fig.2 The contents of cordycepin and adenosine in cultured substance from different nitrogen resources

虫草素最高的氮源是豆粉,其次为蛹粉、豆粕和鱼粉,后三者无显著差异;两种奶粉和鸡蛋的虫草素含量均很低,尤以鸡蛋最低;腺苷则以蛹粉最高,鸡蛋仍然最低。虫草素和腺苷之和,前4种依次为豆粉、蛹粉、豆粕和鱼粉。

2.3 氮源水平

选择2.2中表现好的豆粉和蛹粉,比较氮源的不同浓度水平,结果见图3。

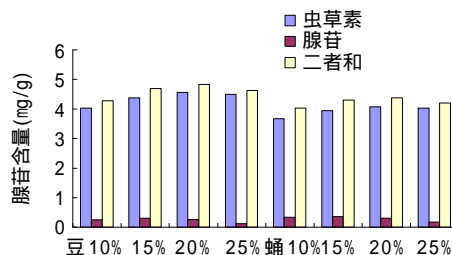


图3 氮源不同浓度水平的虫草素和腺苷含量

Fig.3 The contents of cordycepin and adenosine under different concentration levels of nitrogen resources

两种氮源不同水平的虫草素含量,均以20%最高,豆粉各水平的虫草素含量高于同水平的蛹粉;腺苷则以15%最高,蛹粉各水平的腺苷含量高于同水平豆粉。二者之和,仍以20%豆粉最高。

2.4 加水量

不同加水量的检测结果见图4。

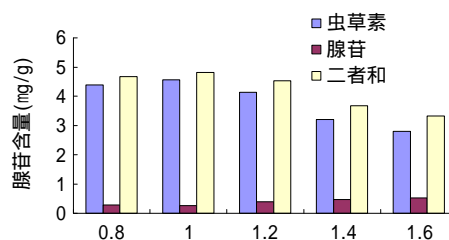


图4 不同加水量的虫草素和腺苷含量

Fig.4 The contents of cordycepin and adenosine under different water supply

不同加水量中,以水料比为1.0的虫草素含量最高,随着水料比提高,虫草素含量明显降低,这点和培育虫草子实体正好相反;水料比为0.8时,水分和糖不足,因此虫草素较1.0的水料比要低一些。腺苷含量则随水料比的提高而提高。虫草素和腺苷之和,仍以1.0的水料比最高。

2.5 培养时间和光照试验

培养不同时间和光照不同时间的虫草素及腺苷含量见图5。

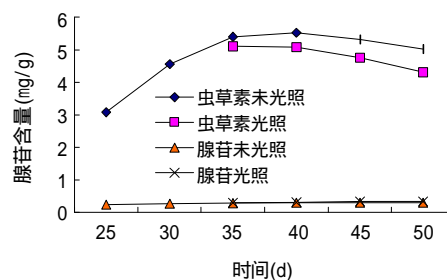


图5 不同天数和光照的虫草素及腺苷含量

Fig.5 The contents of cordycepin and adenosine under different days and illumination

随着培养时间延长,虫草素含量上升,培养40d时的虫草素含量最高;继续培养,虫草素又逐渐减少;由于从35d到40d仅有少量增加,故培养时间以35d为宜。

光照试验显示,经过光照的虫草素含量,较同时未光照的明显减少,这是因为菌丝生长发育不需光照,虫草素的代谢也不需光照的缘故,光照对它们反而有抑制作用。而光照有利于腺苷含量的提高,但提高幅度很小。

3 结论与讨论

3.1 以大米为主要原料,添加20%豆粉,按1:1加营养液制成培养基,接入蛹虫草Cm-2,于25℃遮光培养35d,可获得虫草素含量高达5.49mg/g的培养物;而豆粉、蛹粉、豆粕、鱼粉不同用量(10%~25%)、不同培养时间(25~50d)所获得的培养物,其虫草素含量也都高于普通蛹虫草全草的含量(2.83mg/g)^[5],可用于制作多种保健食品。我们还成功获得虫草素含量高于10mg/g(即≥1%)的培养物,可作为有关药品的加工原料或直接生产相应剂型的药品。

3.2 谷物中添加10%及以上的豆粉、豆粕等高蛋白物质,不仅有利于蛹虫草菌的生长发育,同时也提高了谷物的蛋白质含量,改善了谷物的蛋白质品质;特别是培养出大量的蛹虫草菌体,这些菌体蛋白和多种代谢产物,对提高谷物营养价值的作用,更是不可低估。

3.3 本研究 and 用大米培育蛹虫草子实体不同,不是追求子实体的产生和产量,而是改进和利用固体培养物,

因此技术难度较小,培养周期较短,生产成本较低,培养物能全部加以利用,而且不受气候和季节影响,可为保健食品持续提供优质原料,保证有关保健食品生产的正常进行。

3.4 本研究主要以培养物中的虫草素和腺苷为检测指标,探求提高培养物核苷类活性成分含量的途径;培养物中还含有虫草多糖、虫草酸等多种生理活性物质,也可用来检测培养物的品质,如与虫草素及腺苷共同作为检测指标,将会使培养物的品质更为优良。

参考文献:

- [1] 曹德宾,柳明山,姬脉良,等.菌粉挂面食品研究[J].食用菌,1996,18(3):36-37.
- [2] 温鲁.虫草冲剂研制初报[J].食用菌,1998,20(3):40-41.
- [3] 温鲁.金针菇冲调粉及其生产新工艺[J].中国食用菌,1998,17(6):44-45.
- [4] 王新风,温鲁.杏鲍菇速溶即食营养保健麦片的研制[J].中国食用菌,2002,21(3):41-43.
- [5] 温鲁,尹起范,唐玉玲,等.蚕虫草与有关虫草活性成分检测比较[J].食品科学,2004,25(8):155-157.
- [6] 张平,朱述钧,钱大顺,等.北冬虫夏草功能成分及保健作用分析[J].江苏农业科学,2003,(6):105-107.
- [7] 李祝,刘爱英,梁宗琦.虫草菌素的生物活性及检测方法[J].食用菌学报,2002,9(1):57-62.
- [8] 韦会平,肖波,胡开治.蛹虫草药用价值考[J].中药材,2004,27(3):215-217.



中国乳业的窗口

欢迎订阅2006年

《中国乳业》杂志

一刊在手 所需皆有

《中国乳业》(月刊)杂志创刊于2002年1月,是由农业部主管,中国农业科学院农业信息研究所主办;是为全国乳业产业提供全方位信息服务的专业性期刊。经数年精心运作,已成为中国奶业行业主流媒体。内容翔实丰富,集权威性、时效性、可读性、观赏性于一体。主要栏目有:专题报道、热点评述、政策法规、乳业经济、奶牛养殖、乳品加工、市场营销、国外乳业、新闻简报等。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:82-764,全年12期,每期定价:8.00元,全年:96.00元。如在邮局漏订,可从编辑部直接订阅。

户名:农牧产品开发杂志社

账号:110060435012015094566

开户行:北京市交通银行农科院支行

地址:北京市海淀区中关村南大街12号《中国乳业》编辑部100081

电话:(010)68919890 68919914

传真:(010)68977484

E-mail:zhgry@mail.caas.net.cn