

# 蛹虫草菌丝体发酵培养过程中 氨基酸添加技术研究

贾松彬<sup>1</sup>, 李惠娇<sup>2</sup>, 黄子琪<sup>1</sup>, 桑育黎<sup>2</sup>, 孟程程<sup>1</sup>, 侯 潇<sup>1</sup>, 牟 藤<sup>1</sup>, 陈长兰<sup>2,\*</sup>

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036)

**摘 要:** 组氨酸、精氨酸、赖氨酸是对蛹虫草生长影响较大的3种碱性氨基酸, 本实验研究在蛹虫草液体发酵过程中添加上述氨基酸的不同条件对蛹虫草菌丝体生物量和其中主要抗癌功能成分虫草素的影响。首先进行添加氨基酸种类、氨基酸的添加量、初始pH值、培养温度对蛹虫草菌丝体生物量和虫草素含量的单因素试验, 在此基础上进行四因素三水平的正交试验。结果表明: 对蛹虫草菌丝体生物量影响从大到小的顺序依次是: 氨基酸种类>培养温度>初始pH值>氨基酸添加量。增加蛹虫草菌丝体生物量的最佳培养条件为: 添加氨基酸种类为精氨酸, 培养温度为26℃, 培养初始pH值为6, 100mL PDA发酵培养液添加精氨酸0.3g。对蛹虫草菌丝体中虫草素含量影响从大到小的顺序依次是: 氨基酸种类>初始pH值>培养温度>氨基酸添加量。增加菌丝体中虫草素含量的最佳培养条件是添加氨基酸种类为精氨酸, 培养温度为24℃, 100mL PDA发酵培养液添加0.3g, 培养的初始pH值为6。

**关键词:** 蛹虫草; 虫草素; 氨基酸; 添加工艺

## Amino Acid Addition Technology during Mycelium Fermentation of *Cordyceps militaris*

BEN Song-bin<sup>1</sup>, LI Hui-jiao<sup>2</sup>, HUANG Zi-qi<sup>1</sup>, SANG Yu-li<sup>2</sup>, MENG Cheng-cheng<sup>1</sup>, HOU Xiao<sup>1</sup>,

MU Teng<sup>1</sup>, CHEN Chang-lan<sup>2,\*</sup>

(1. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

**Abstract:** Histidine, arginine and lysine are alkaline amino acids that have an important effect on the growth of *Cordyceps militaris*. In this study, the effects of amino acid addition under various conditions on the growth of mycelium and the production of cordycepin as an anti-cancer functional ingredient during the fermentation process was investigated. Single factor experiments confirmed that the order of factors to affect the growth of mycelium during fermentation process from strong to weak was amino acid type, fermentation temperature, initial pH and amino acid amount. The optimal fermentation conditions for the growth of mycelium were explored by orthogonal experiments to be lysine as the selected amino acid, fermentation temperature of 26 °C, initial pH of 6 and lysine amount of 0.3 g in 100 mL of medium. Similarly, single factor experiments confirmed that the order of factors to affect the production of cordycepin during fermentation process from strong to weak was amino acid type, initial pH, fermentation temperature and amino acid amount. The optimal fermentation conditions for the production of cordycepin were achieved by orthogonal experiments to be arginine as the selected amino acid, initial pH of 6, fermentation temperature of 24 °C and arginine amount of 0.3 g in 100 mL of medium.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; cordycepin; amino acid; addition technology

中图分类号: S567.35; TQ266.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0233-05

收稿日期: 2010-06-30

基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室项目(2009S046); 国家自然科学基金项目(30671176); 辽宁大学校级三期“211工程”项目; 沈阳市人才资源开发专项(2008040403035)

作者简介: 贾松彬(1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为生物化学。E-mail: bensongbin007@163.com

\* 通信作者: 陈长兰(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为遗传学。E-mail: chenchanglanbio@yahoo.com.cn

蛹虫草(*Cordyceps militaris* L. Link.)又名北虫草、蛹草、北冬虫夏草, 属于囊菌亚门、核菌纲、球壳菌目、麦角菌科、虫草属<sup>[1]</sup>, 其主要药用成分有虫草多糖类<sup>[2-6]</sup>、氨基酸类、糖醇和甾醇类<sup>[7-11]</sup>、虫草素(cordycepin, 化学结构为3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine))等核苷类化合物<sup>[12-14]</sup>、肽类、维生素类<sup>[8]</sup>以及无机元素及其他类物质。虫草及虫草菌丝体制剂能明显提高机体的免疫功能<sup>[15]</sup>, 具有抗肿瘤作用<sup>[16-17]</sup>、镇静作用<sup>[18]</sup>、抗放疗作用<sup>[19]</sup>, 以及对心脑血管、肾病的治疗作用和延缓衰老的作用<sup>[20-24]</sup>。

氨基酸是构成生物体蛋白质并同生命活动有关的最基本的物质, 是在生物体内构成蛋白质分子的基本单位, 与生物的生命活动有着密切的关系。它在体内具有特殊的生理功能, 是生物体内不可缺少的营养成分之一。Masuda等<sup>[25]</sup>发现在液体发酵培养基内添加甘氨酸, L-天门冬氨酸以及L-谷氨酰胺可以提高蛹虫草的产量, 最大可以达到2.5g/L。本实验通过在蛹虫草液体培养液中添加组氨酸、精氨酸和赖氨酸3种碱性氨基酸, 探讨添加碱性氨基酸对于蛹虫草菌丝体生长的影响, 以及对蛹虫草中主要抗癌成分虫草素含量的影响, 并通过多因素多水平的正交试验对最佳添加技术进行研究, 以便达到提高蛹虫草菌丝体培养效率的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

虫草素标准品 美国Sigma公司; 乙腈和甲醇(色谱纯) 汉邦科技有限公司进口分装; 氨水、NaOH、盐酸等均为分析纯。

DHG-9146电热恒温鼓风干燥箱、DNP-9082型电热恒温培养箱 上海精密实验设备有限公司; PB-10 pH计 北京赛多利斯仪器系统有限公司; LabAlliance 3500G高效液相色谱仪 美国SSI公司; SW-GJ-2FD洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; 681磁力加热搅拌器 上海南汇电讯器材厂; 高速冷冻离心机 美国科峻仪器公司; HZS-H型水浴振荡器 哈尔滨东联电子开发有限公司; RE5299旋转蒸发仪 上海亚荣仪器有限公司。

### 1.2 菌种与培养基

蛹虫草菌L4由本实验室自行分离(子实体来自沈阳市蛹虫草培养基地)。

斜面培养基: PDA固体培养基; 种子培养基: 蔗糖5.0%、蛋白胨1.0%、酵母膏1.0%; PDA发酵培养基: 土豆20.0%、葡萄糖2.0%、蛋白胨0.5%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%、琼脂2.0%、VB<sub>1</sub> 1mg/L。

### 1.3 蛹虫草液体培养方法

#### 1.3.1 发酵种子制备

先将制备好的斜面培养基上的母种用接种铲取一块约20m<sup>2</sup>大小的菌苔接入种子培养基(装样量为

100mL/300mL三角瓶)中, 在26℃、130r/min恒温振荡器上发酵3d, 形成微小的菌球。

#### 1.3.2 发酵培养

采用摇瓶培养, 在300mL三角瓶中装入100mL PDA发酵液, 121℃、20min灭菌后接入培养3d的种子发酵液5mL, 培养温度26℃, 摇床转速130r/min, 培养时间为5d。

### 1.4 添加氨基酸培养条件的单因素试验

#### 1.4.1 添加氨基酸种类对蛹虫草生物量和虫草素产量的影响

氨基酸作为有机氮源, 对蛹虫草的生长会起到一定的作用。为考察添加不同氨基酸对蛹虫草生物量及虫草素产量的影响, 在100mL发酵培养基中分别加入组氨酸、精氨酸、赖氨酸各0.2g<sup>[5]</sup>, 并作空白对照。在26℃, pH值自然, 130r/min的条件下, 培养5d, 测定其生物量及虫草素产量。

#### 1.4.2 氨基酸添加量对蛹虫草生物量和虫草素产量的影响

添加精氨酸使蛹虫草生物量及虫草素产量提高最显著, 为考察精氨酸促进蛹虫草生长和提高虫草素产量的最佳用量, 向发酵培养基中分别加入0.1、0.2、0.3、0.4、0.5g的精氨酸, 在26℃, pH值自然, 130r/min的条件下, 培养5d, 测定其生物量及虫草素产量。

#### 1.4.3 初始pH值对蛹虫草生物量和虫草素含量的影响

蛹虫草深层液体培养要求适宜的pH值。为考察不同初始pH值对蛹虫草生物量及虫草素产量的影响, 将发酵培养基初始pH值用2mol/L的HCl和2mol/L的NaCl分别调至2、3、4、5、6、7、8、9, 添加精氨酸的量为0.2g, 在26℃、130r/min的条件下, 培养5d, 测定其生物量及虫草素产量。

#### 1.4.4 温度对蛹虫草生物量和虫草素产量的影响

温度会影响细胞内酶活性和发酵液的溶氧量。很多虫生真菌的最适生长温度都在20~30℃之间。为考察不同温度对蛹虫草生物量及虫草素产量的影响, 将培养温度分别定为22、24、26、28、30℃, 在初始pH7.0, 130r/min的条件下, 培养5d, 测定其生物量及虫草素产量。

### 1.5 添加氨基酸培养条件的四因素三水平正交试验

在根据单因素试验大致确定最佳实验条件后, 以氨基酸种类、氨基酸浓度、培养温度、培养酸碱度做四因素三水平的正交试验。

### 1.6 菌丝体生物量的测定

采用干质量法。发酵结束后, 将发酵液抽滤, 分离得到菌丝体用蒸馏水冲洗2次后放入60℃烘箱烘12h至质量恒定, 称量记录干菌质量, 用干菌丝得率 $\eta$ (即蛹

虫草生物量)来表示。

$$\eta = m/V$$

式中:  $\eta$  为干菌丝得率/(g/L);  $m$  为干菌丝质量/g;  $V$  为发酵液体积/L。

## 1.7 虫草素产量测定

### 1.7.1 虫草素标准溶液的配制

准确称取虫草素标准品 5mg, 超纯水溶解定容至 10mL, 配制成 500  $\mu$ g/mL 的标准储备液。再将其稀释成 10、20、40、60、80、100  $\mu$ g/mL 虫草素标准液, 待测定。

### 1.7.2 虫草素产量的 HPLC 测定

HPLC 测定: 所用高效液相色谱仪为美国 SSI 公司的 LabAlliance 3500G 型高效液相色谱仪, 色谱柱采用 Waters Nova-pak C<sub>18</sub>(4.6mm  $\times$  250mm); 检测器为 CS420x HARDWARE 型; 检测波长为 260nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 流动相: 乙腈、超净水(体积分数=15:85); 流速为 1mL/min; 进样量为 20  $\mu$ L。

### 1.7.3 虫草素提取

将干菌丝研细粉进行微波提取, 向 150mL 三角瓶中加入 0.25g 样品, 再加 25mL 生理盐水(容量瓶定容), 微波中火(500W)处理 2min, 反复进行两次, 将提取液 12000r/min 离心 6min, 上清液用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤器压滤, 定容到 25mL, 待测。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加氨基酸培养条件的单因素试验结果

#### 2.1.1 添加氨基酸种类对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

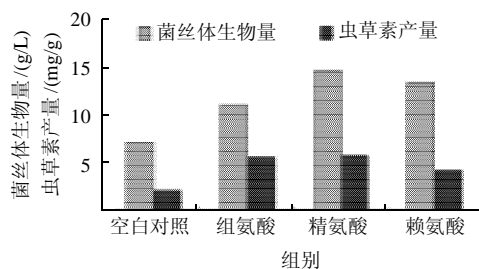


图1 氨基酸种类对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

Fig.1 Effect of amino acid type on the growth of mycelium and the production of cordycepin during the fermentation process and that of cordycepin

氨基酸作为蛋白质的组成成分, 参与蛋白质的代谢, 可以起到促进生长的作用。由图1可知, 添加氨基酸的培养液中菌丝体生物量及虫草素产量明显提高, 其中添加精氨酸的培养液中菌丝体生物量及虫草素产量提高最大, 其菌丝体生物量和虫草素产量由空白对照(不添加处理)的 7.19g/L(培养液)和 2.01mg/g(菌丝体干质

量)提高到 14.82g/L 和 5.84mg/g。其次是组氨酸和赖氨酸, 添加组氨酸的处理组菌丝体生物量和虫草素产量提高到 11.24g/L 和 5.67mg/g, 添加赖氨酸的处理组菌丝体生物量和虫草素产量提高到 13.52g/L 和 4.23mg/g。

#### 2.1.2 氨基酸添加量对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

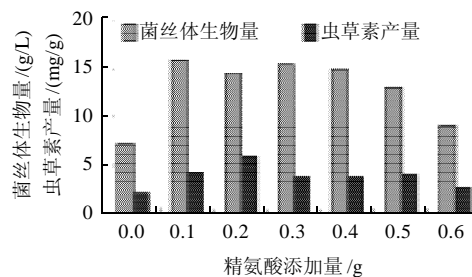


图2 精氨酸添加量对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

Fig.2 Effect of amino acid addition amount on the growth of mycelium and the production of cordycepin during the fermentation process

由图2可知, 精氨酸的添加量对菌丝体生物量及虫草素的产量都有很大影响。添加 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6g 的精氨酸后蛹虫草的菌丝体生物量分别从不添加处理的 7.19g/L 上升到 15.80、14.57、15.40、14.97、13.06、8.97g/L, 菌丝体中虫草素含量从不添加处理的 2.15mg/g 上升到 4.13、5.87、3.82、3.82、3.92、2.73mg/g。添加 0.1g 的精氨酸适于虫草素菌丝体生长。添加 0.2g 的精氨酸适于生产虫草素。随着精氨酸添加量的进一步提高, 菌丝体的生物量与虫草素的产量并没有随之提高, 反而开始下降。

#### 2.1.3 初始 pH 值对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

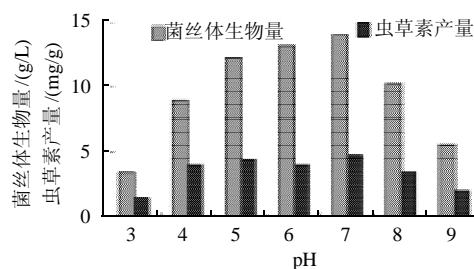


图3 初始 pH 值对菌丝体生物量及虫草素产量的影响

Fig.3 Effect of initial pH on the growth of mycelium and the production of cordycepin during the fermentation process

由图3可知, 由于培养液中的 pH 值会影响到细胞内 pH 值的变化, 进而影响细胞内酶的活性, 也影响到蛹虫草菌对一些微量元素的利用, 所以培养液的初始 pH 值对菌丝体生物量及虫草素产量均有很大影响。培养液初始 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9 时培养液中的菌丝体生物量分别为 3.41、9.03、12.33、13.27、14.02、

10.32、5.50g/L, 菌丝体中虫草素含量分别为 1.41、3.96、4.35、4.02、4.77、3.41、2.01mg/g。适于蛹虫草细胞生长和生产虫草素的最佳初始 pH 值同为 7.0。

2.1.4 培养温度对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

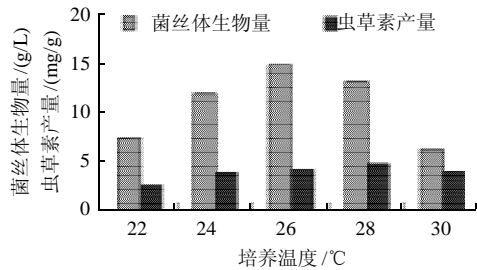


图 4 培养温度对菌丝体生物量和虫草素产量的影响

Fig.4 Effect of fermentation temperature on the growth of mycelium and the production of cordycepin during the fermentation process

由图 4 可知, 培养温度对菌丝体生物量及虫草素产量有很大影响。培养温度为 22、24、26、28、30℃时培养液中的菌丝体生物量分别为 7.44、12.00、14.90、13.21、6.35g/L, 菌丝体中虫草素含量分别为 2.69、3.88、4.15、4.77、3.94mg/g。适于蛹虫草菌丝体生长的最佳温度为 26℃, 而产虫草素的最佳温度为 28℃。

2.2 添加氨基酸培养条件的正交试验结果

根据单因素试验结果, 拟定添加氨基酸影响蛹虫草液体培养生产虫草素的 4 个因素即 A(添加氨基酸种类)、B(氨基酸添加量)、C(初始 pH 值)、D(培养温度)为优选因素, 每个因素选 3 个水平进行正交试验, 正交试验条件见表 1, 正交试验结果见表 2。

表 1 正交试验设计的因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

| 因素 | A 氨基酸种类  | B 氨基酸添加量/g | C pH | D 温度/℃ |
|----|----------|------------|------|--------|
| 1  | 组氨酸(His) | 0.1        | 6    | 24     |
| 2  | 精氨酸(Arg) | 0.2        | 7    | 26     |
| 3  | 赖氨酸(Lys) | 0.3        | 8    | 28     |

从菌丝体生长量的偏差平方和和  $F$  值可以看出(表 2), 影响蛹虫草生长量的因素由大到小依次为: 添加氨基酸种类>培养温度>初始 pH 值>添加氨基酸量; 从菌丝体生物量的均值可看出, 最佳培养条件的组合为  $A_2B_3C_1D_2$ , 即添加氨基酸种类为精氨酸, 添加量为 0.3g, 培养的初始 pH 值为 6, 培养温度为 26℃。

从虫草素产量的偏差平方和和  $F$  值可以看出(表 2), 影响蛹虫草菌丝体中虫草素含量的因素由大到小依次为: 添加氨基酸种类>初始 pH 值>培养温度>

添加氨基酸量; 从虫草素产量可以看出, 最佳培养条件的组合为  $A_2B_3C_1D_1$ , 即添加氨基酸种类为精氨酸, 添加量为 0.3g, 培养的初始 pH 值为 6, 培养温度为 24℃。

表 2 添加氨基酸培养蛹虫草的四因素三水平正交试验结果分析

Table 2 Result analysis of orthogonal experiments

| 试验号          | A      | B      | C      | D      | 菌丝体生物量/(g/L) | 虫草素产量/(mg/g) |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------------|
| 1            | 1      | 1      | 1      | 1      | 12.95        | 4.92         |
| 2            | 1      | 2      | 2      | 2      | 13.97        | 3.97         |
| 3            | 1      | 3      | 3      | 3      | 12.08        | 4.95         |
| 4            | 2      | 1      | 2      | 3      | 14.55        | 4.08         |
| 5            | 2      | 2      | 3      | 1      | 13.99        | 5.00         |
| 6            | 2      | 3      | 1      | 2      | 15.92        | 4.93         |
| 7            | 3      | 1      | 3      | 2      | 11.97        | 3.52         |
| 8            | 3      | 2      | 1      | 3      | 11.98        | 3.73         |
| 9            | 3      | 3      | 2      | 1      | 12.08        | 3.82         |
| $k_1$        | 13.000 | 13.151 | 13.617 | 13.007 |              |              |
| 菌丝体生物量 $k_2$ | 14.820 | 13.313 | 13.533 | 13.953 |              |              |
| $k_3$        | 12.010 | 13.360 | 12.680 | 12.870 |              |              |
| 偏差平方和        | 12.189 | 0.068  | 1.162  | 2.088  |              |              |
| 自由度          | 2      | 2      | 2      | 2      |              |              |
| $F$ 比        | 7.561  | 0.042  | 1.000  | 1.295  |              |              |
| $k_1$        | 4.613  | 4.173  | 4.527  | 4.580  |              |              |
| 虫草素产量 $k_2$  | 4.670  | 4.233  | 3.957  | 4.140  |              |              |
| $k_3$        | 3.690  | 4.567  | 4.490  | 4.253  |              |              |
| 偏差平方和        | 1.816  | 0.269  | 0.611  | 0.313  |              |              |
| 自由度          | 2      | 2      | 2      | 2      |              |              |
| $F$ 比        | 6.751  | 1.000  | 2.271  | 1.164  |              |              |

2.3 正交试验结果验证

根据以上添加氨基酸对菌体生物量和虫草素生产最优培养条件, 即对菌体生物量的影响的最优组合为  $A_2$ (精氨酸)、 $B_2$ (0.3g)、 $C_1$ (pH6)、 $D_2$ (培养温度为 26℃), 对菌丝体中虫草素产量影响的最优组合为  $A_2$ (精氨酸)、 $B_3$ (0.3g)、 $C_1$ (pH6)、 $D_1$ (培养温度为 24℃)。验证实验结果见表 3。

表 3 正交试验所确定的最佳条件的验证实验

Table 3 Validation of orthogonal experimental results

| 指标           | 对照组  |      |      |      | 处理组   |       |       |         |
|--------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|---------|
|              | 1    | 2    | 3    | 均值   | 1     | 2     | 3     | 均值      |
| 菌体生物量/(g/L)  | 6.89 | 7.05 | 7.25 | 7.06 | 16.25 | 17.09 | 16.99 | 16.77** |
| 虫草素产量/(mg/g) | 1.98 | 2.09 | 2.12 | 2.06 | 5.15  | 4.94  | 5.05  | 5.05**  |

注: \*\*.处理组与对照组相比较  $t$  检验差异极显著。

由表 3 可知, 最优的实验组合与对照组相比均能提高蛹虫草的菌丝体生物量以及提高其生产虫草素的能力。处理组合的菌丝体生物量和虫草素含量分别达到对照的 237.5% 和 245.1%, 差异极显著。

### 3 讨 论

氨基酸作为蛋白质的组成成分,参与蛋白质的代谢,可以起到促进生长的作用。从本实验结果,添加氨基酸,尤其是精氨酸后,蛹虫草生物量及虫草素产量明显提高,但当氨基酸产量达到一定值后继续增加时,菌丝体生物量及虫草素产量则有下降趋势,这可能是由于细胞的生长和代谢需要一定的C/N比,而氨基酸作为有机氮源,影响了这一比值,此问题需进一步深入研究。

本实验仅是添加技术的初步实验,在本实验中仅研究了氨基酸种类、氨基酸添加量、初始pH值和培养温度这4个因素,还有很多其他因素如培养基成分、装样量、通气量等因素都有可能对发酵过程及结果产生重要影响。以前实验中对添加硒对蛹虫草菌丝体生长和虫草素含量的影响进行了研究<sup>[26-27]</sup>,在以后的实验中,还要进行更多的实验找出更加优化的培养条件。

本研究仅对影响蛹虫草菌丝体发酵培养过程中生物量和虫草素产量最为显著的3种碱性氨基酸进行系统研究。在后续研究还将对包含其他17种氨基酸的所有氨基酸以及它们之间的相互作用进行研究分析。

蛹虫草的活性有效成分除虫草素外,还包括虫草多糖和虫草酸等,二者也具有很大的药用价值和保健功效。本实验只针对添加氨基酸后对虫草素含量的影响进行了考察,在以后的实验中将要对虫草多糖和虫草酸进行考察,更全面系统的掌握添加氨基酸对蛹虫草有效成分的影响,找到最佳培养条件。

### 参考文献:

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995: 354-395.
- [2] 李晓明, 戴如琴, 朱勤, 等. 虫草发酵液中多糖研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(2): 31-33.
- [3] MIYAZAKI J, NAKO O, YAMADA H. Studies on fungal polysaccharides XX, galactomannan of *Cordyceps sinensis*[J]. Chem Pharm Bul, 1977, 25(12): 3324-3328.
- [4] KIHOTO T, TABATA H, UKAI S, HARA C. A minor protein containing galactomannan from a sodium carbamate extract of *Cordyceps sinensis* [J]. Carbohydrate Research, 1986, 156: 189-197.
- [5] YAMADA H, KAWAGUCHI N, OHMORI T, et al. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*[J]. Carbohydrate Research, 1984, 125(1): 107-115.
- [6] 盖新杰, 张翼仲. 蛹虫草胞外多糖的研究[J]. 真菌学报, 1992, 11(4): 300-307.
- [7] 张甲生, 丁长江, 夏爱华, 等. 蚕蛾虫草和冬虫夏草中游离氨基酸的比较分析[J]. 白求恩医科大学学报, 1994, 20(1): 24-26.
- [8] 张显科, 刘文霞. 蛹虫草化学成分测定[J]. 菌物系统, 1997, 16(1): 78-80.
- [9] 姜平. 冬虫夏草的成分、药理与功能[J]. 西北医学杂志, 1987, 2(4): 43-45.
- [10] 刘静明, 钟裕荣, 杨智, 等. 蛹虫草化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(10): 32-33.
- [11] 岳德超, 包天桐. 中草药现代研究 I[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995: 221-227.
- [12] 刘静明, 刘岱, 杨立新, 等. 蛹虫草菌丝与冬虫夏草中核苷类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(10): 615-617.
- [13] 徐文豪, 薛智, 马建民. 虫草水溶性成分: 核苷类物质研究[J]. 中药通报, 1988, 13(4): 34-36.
- [14] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 354-390.
- [15] 张叔兰, 孙云汗, 刘晓, 等. 冬虫夏草及人工虫草菌丝抗小鼠 Lewis 肺癌的研究[J]. 中药通报, 1987, 12(2): 53-54.
- [16] 刘灿坤. 冬虫夏草菌丝体药理研究近况[J]. 山东中医杂志, 1991, 10(5): 42-44.
- [17] 李绍平, 季辉, 李萍, 等. 冬虫夏草抗肿瘤作用研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(4): 373-375.
- [18] 叶于聪, 陈钦铭, 柴凤玲. 青海冬虫夏草菌丝的药理研究[J]. 药物研究, 1988(1): 49-53.
- [19] 许周善, 周晓燕. 冬虫夏草多糖的研究进展[J]. 工业微生物, 2000, 30(1): 56-57.
- [20] TRIGG P, GUTTERIDGE W E, WILLAMSON J. The effect of cordycepin on malaria parasites[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1971, 65: 514-520.
- [21] PENMAN S, ROSBACH N, MESSENGER M. Messenger and heterogeneous nuclear RNA in HeLa cells: different inhibition by cordycepin[J]. Proc Natl Acad Sci (USA), 1970, 67: 1878-1885.
- [22] SUGER A M, MCCAFFREY R P. Antifungal activity of 3' - deoxyadenosine (*Cordycepin*)[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42: 1424-1427.
- [23] MUELLER W E G, WEILER B E, CHARUBALA R, et al. Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase[J]. Biochemistry Wash, 1991, 30: 2027-2033.
- [24] AHN Y J, PARK S J, LEE S G, et al. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp.[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2744-2748.
- [25] MASUDA M, URABE E, HONDA H, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 1199-1205.
- [26] 贲松彬, 黄子琪, 王莹, 等. 蛹虫草富硒条件优化及硒对其中主要活性成分的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 176-180.
- [27] 黄子琪, 贲松彬, 代颖, 等. 微波法与超声破碎法提取蛹虫草菌丝体中虫草素的比较研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 266-269.