

## 加硒对蛹虫草主要活性成分含量的影响

王志高, 温鲁\*, 袁小转, 刘伟 (淮阴师范学院资源微生物研究所, 江苏淮安 223300)

**摘要** [目的]明确不同加硒量对蛹虫草主要活性成分含量的影响。[方法]向固体培养基中加入不同含量的亚硒酸钠, 接种培养后用高效液相色谱法测定虫草素和腺苷, 用高碘酸钠法测定虫草酸, 用苯酚-硫酸法测定虫草多糖。[结果]虫草素在加硒量为 5.5 mg/kg 时达到 4.50 mg/g, 虫草酸在加硒量为 4.0 mg/kg 时达到 30.06 mg/g, 腺苷和虫草多糖含量与加硒量无明显相关性。[结论]加硒可显著提高蛹虫草固体培养物中虫草素和虫草酸含量, 但医疗保健功效的提高还需通过动物试验加以验证。

**关键词** 蛹虫草; 亚硒酸钠; 虫草素; 腺苷; 虫草多糖; 虫草酸

中图分类号 Q949.95 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)29-09293-02

Effect of Adding Selenium on Main Active Component Contents of *Cordyceps militaris*

WANG Zhi-gao et al (Institution of Resource Microorganism; Huaiyin Teachers College, Huaian, Jiangsu 223300)

**Abstract** [Objective] The aim of this paper was to acquire the effect of different adding amount of selenium on main active component contents of *Cordyceps militaris* (CM). [Method] Different contents of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  were added into the solid substrate. After inoculation, HPLC method was used for determination of cordycepsins and adenosines. Sodium periodate method and phenol-sulphuric acid method were used for the determination of mannitols and polysaccharides. [Result] Content of cordycepsins attained 4.50 mg/g when 5.5 mg/kg selenium was added. Mannitols content reached 30.06 mg/g at selenium being 4.0 mg/kg. Adenosines and polysaccharides had no obvious relativity with the amount of selenium. [Conclusion] Contents of cordycepsins and mannitols of CM could be advanced by adding selenium. But the function of medical treatment and health care needed to be verified by animal experiment.

**Key words** *Cordyceps militaris*;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ; Cordycepsins; Adenosines; Cordyceps polysaccharides; Mannitols

蛹虫草[*Cordyceps militaris* Fr.] Link.]是冬虫夏草的近缘种,也是虫草属真菌的模式种<sup>[1]</sup>,具有和冬虫夏草相似的活性成分,特别是虫草素的含量是冬虫夏草的几十至上百倍,有着抗菌、抗病毒、抗癌、抗疲劳、抗衰老等保健功效<sup>[2-3]</sup>,是代替冬虫夏草的首选菌种。硒是人体最重要的微量元素之一,有防治心脑血管疾病、抗肿瘤、提高人体免疫力等作用,蛹虫草富硒后可进一步提高其医疗保健功效<sup>[4]</sup>。关于蛹虫草富硒的研究,主要见于液体培养<sup>[4-5]</sup>和代料栽培<sup>[6]</sup>,也有关于活性成分的研究报道<sup>[7]</sup>。笔者在蛹虫草的固体培养中添加不同含量的亚硒酸钠,研究了加硒对蛹虫草活性成分含量的影响,现将研究结果报告如下。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 菌种。蛹虫草 4#,由淮阴师范学院资源微生物研究所提供。

1.1.2 试剂。亚硒酸钠、硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、四氢呋喃、氯化钠、D-甘露醇、鼠李糖、高碘酸钠、乙酸铵、冰醋酸、乙酰丙酮、葡萄糖、无水乙醇、苯酚、浓硫酸等,均为国产分析纯试剂,虫草素和腺苷标准品由上海化学试剂公司进口分装,试验用水为二次蒸馏水。

1.1.3 设备。培养设备为高压灭菌器、洁净工作台、恒温培养箱等;样品处理设备为电热恒温鼓风干燥箱、多功能食品加工机、电子天平、微波炉、台式离心机、水浴锅等;检测设备为 Waters 600E 高效液相色谱系统, Waters 2487 紫外检测器, Empower 色谱数据管理系统, 721S 分光光度计等。其余器材为实验室常规仪器。

## 1.2 方法

1.2.1 培养基制备。向基础培养基中加入亚硒酸钠溶液,使亚硒酸钠含量(以干料和水总重为基数)依次为 0.0、0.5、

1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 mg/kg,料水比为 1:1.5。用 100 ml 试剂瓶为培养容器,每瓶装配好的湿培养基 50 g,在高压锅中以  $1.3 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^5$  Pa 压力灭菌 1 h。

1.2.2 接种培养。在洁净工作台中,向培养基接入蛹虫草 4# 菌种,置培养箱中于 23~25 °C 下培养,培养好后挖出培养料,于 60 °C 烘干,粉碎待测。

1.2.3 虫草素和腺苷测定。采用高效液相色谱法<sup>[8]</sup>测定。色谱柱为 Waters NOVA-PAK C<sup>18</sup> 反相柱, 3.9 mm×300 mm, 4 μm;流动相为  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 pH 值为 6.86,浓度 0.01 mol/L + 1% 四氢呋喃,流速为 1.0 ml/min;检测波长 260 nm。虫草素标准曲线的回归方程为  $Y=3.10 \times 10^6 X - 1.34 \times 10^4$ ,  $R^2=0.9999$ ;腺苷标准曲线的回归方程为  $Y=3.55 \times 10^6 X - 5.72 \times 10^3$ ,  $R^2=0.9999$ [Y 为色谱峰面积, X 为虫草素或腺苷的进样量 (μg)]。

样品提取采用微波法<sup>[9]</sup>。向 100 ml 样品瓶中加入精确称量的 0.250 0 g 样品,再加入 25.00 ml 生理盐水提取液,6 瓶 1 组,放入微波炉中均匀排成一圈,用中火 (P50) 处理 2.0 min,在离心机中离心,上清液用 0.2 μm 水系针头过滤器过滤,压滤液进行高效液相色谱检测。

1.2.4 虫草酸测定。采用高碘酸钠比色法<sup>[10]</sup>测定。虫草酸的化学成分为 D-甘露醇,准确称取甘露醇标准品 0.500 0 g,配成 5 mg/ml 的甘露醇标准溶液,稀释成不同浓度的系列标准溶液;用微量取样器分别取不同浓度的标准溶液 300 μl,加 700 μl 蒸馏水,然后加 1.00 ml 高碘酸钠试液(取 0.015 mol 高碘酸钠溶于 1000 ml 0.12 mol/L HCl 溶液),混匀,室温放置 10 min;加 2 ml 浓度 0.1% 鼠李糖,再加 4 ml 新配制的 Nash 试剂(用冰醋酸和乙酰丙酮等配制),53 °C 水浴 15 min;用分光光度计在 420 nm 处测吸光度,得甘露醇含量 C 与吸光度 A 的回归方程:  $C=0.3962 A - 0.0048$ ,  $R^2=0.9999$ 。

样品提取采用微波法。称取 0.100 0 g 样品,放入 100 ml 试剂瓶中,加入 25.00 ml 蒸馏水,6 瓶 1 组,置微波炉以中火 (P50) 处理 1 min,在离心机中 4 000 r/min 离心 10 min,取上

作者简介 王志高 (1985-),男,江苏淮安人,本科,专业:生物技术。

\* 通讯作者,教授, E-mail: ijlqj@163.com。

收稿日期 2007-06-24

清液 300  $\mu\text{l}$ , 其余操作与标准溶液测定步骤相同。测得吸光度后, 按回归方程计算提取液的虫草酸含量, 则:

样品中的虫草酸含量  $(\text{mg/g}) = C \times 25/m$

式中,  $C$  为样品溶液中虫草酸含量  $(\text{mg/ml})$ ;  $25$  是样品提取液体积  $(\text{ml})$ ;  $m$  为称取样品的质量  $(\text{g})$ 。

1.2.5 虫草多糖测定。采用苯酚-硫酸法<sup>[1]</sup>。多糖在酸性条件下水解成葡萄糖等单糖, 以葡萄糖为标样配制系列标准溶液, 分别取各浓度标准溶液 1.00 ml, 加入浓度 5% 苯酚溶液 1.5 ml, 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.5 ml, 常温显色 30 min, 于 490 nm 处测定吸光度, 得葡萄糖含量  $C$  与吸光度  $A$  的回归方程:  $C = 0.1531A - 0.0024$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。

样品提取时, 称取 0.500 0 g 样品放入试剂瓶, 加入 20.00 ml 蒸馏水, 以中火 (P50) 处理 3.5 min, 离心后取上清液 5.00 ml, 加 20 ml 无水乙醇, 待多糖沉降, 离心去上清液, 将沉淀晾干, 加热水溶解, 定容至 10 ml, 从中取 0.10 ml, 用水补足 1.00 ml, 其余操作与标准溶液测定步骤相同。则:

样品中多糖含量  $(\text{mg/g}) = C \times 100 \times 4/m$

式中,  $C$  为 0.10 ml 测试液中多糖含量  $(\text{mg})$ ;  $100$  是多糖测试液总体积 10 ml 与 0.10 ml 取出液的体积比;  $4$  为微波提取液总体积 20 ml 与醇沉时取出液 5 ml 的体积比;  $m$  为称取样品的质量  $(\text{g})$ 。

## 2 结果与分析

2.1 不同加硒量对虫草素含量的影响 表 1 表明, 虫草素含量在加硒量很少时, 几乎没有变化; 随着硒水平的提高, 虫草素含量逐渐升高, 同时升高幅度也逐渐加大; 当加硒量增至 5.5 mg/kg 时, 虫草素含量达到 4.50 mg/g, 较空白对照

提高 18.7%; 继续提高硒水平, 虫草素含量未进一步升高。

2.2 不同加硒量对虫草酸含量的影响 表 1 表明, 虫草酸含量也随着硒水平的提高而升高, 在加硒量为 4.0 mg/kg 时达最高值 30.06 mg/g, 较空白对照提高 29.1%; 此时硒水平比虫草素最高时的硒水平要低一些, 说明 2 种活性成分受硒水平的影响存在一定差异。

2.3 不同加硒量对腺苷和虫草多糖含量的影响 表 1 表明, 腺苷和虫草多糖的含量, 随着硒水平的提高未呈现规律性升高变化。于田田等研究表明, 富硒可使虫草多糖提高 2 倍<sup>[7]</sup>, 分析原因, 一是他们采用的是液体发酵, 笔者采用的是固体培养; 二是培养物的硒水平存在较大差异; 三是菌株不同, 从而导致了研究结果的不同。

## 3 结论与讨论

(1) 在培养基中加硒, 可显著提高培养物中虫草素和虫草酸的含量, 但在该试验条件下, 腺苷和虫草多糖的含量未获显著提高。如要提高腺苷和多糖含量, 还需再作进一步研究。

(2) 试验结果表明, 虫草素含量虽有提高, 但提高倍数不如于田田等试验结果<sup>[7]</sup>大, 这可能是样品的虫草素含量较高, 以致进一步提高的幅度受到了制约。

(3) 在蛹虫草固体培养中加入适量的亚硒酸钠, 可显著提高培养物中几种活性成分的含量, 加上硒的作用, 从理论上讲应能提高培养物的医疗保健功效, 但实际能否提高或提高程度有多大, 还需通过动物试验加以验证。

## 参考文献

- [1] 敬一兵, 陆鲁生. 虫草[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1986: 24.
- [2] 梁宗琦. 中国真菌志. 虫草属. 32 卷[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 36.
- [3] 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.
- [4] 于田田, 王乐, 钱和. 蛹虫草富硒研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 19-21.
- [5] 陈宏伟, 陈小莉, 朱蕴兰. 虫草液体深层发酵富硒的研究[J]. 食用菌, 2005(5): 10-12.
- [6] 铁梅, 张威, 李晶, 等. 蛹虫草富硒栽培特性的研究[J]. 食用菌, 2005(4): 38-39.
- [7] 于田田, 钱和. 生物富硒对蛹虫草菌丝体化学成分的影响[J]. 食品科技, 2006(1): 133-135.
- [8] 夏敏, 尹起范, 温鲁, 等. 高效液相色谱法测定蛹虫草中腺苷和虫草素[J]. 理化检验-化学分册, 2007, 43(5): 386-388.
- [9] 夏敏, 温鲁. 微波法提取虫草素研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 248-251.
- [10] 温鲁, 尹起范, 唐玉玲, 等. 蛹虫草与有关虫草活性成份检测比较[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 155-157.
- [11] 来永斌, 王琦, 孙月. 蛹虫草多糖含量的测定与分析[J]. 中成药, 2001, 23(7): 517-518.

表 1 蛹虫草培养基不同加硒量的活性成分

加硒量 mg/kg	虫草素 mg/g	腺苷 mg/g	虫草多糖 mg/g	虫草酸 mg/g
0	3.79	0.27	31.75	23.28
0.5	3.79	0.27	31.34	23.48
1.0	3.80	0.28	31.75	23.70
1.5	3.84	0.26	31.75	24.02
2.0	3.89	0.28	31.95	24.47
2.5	3.95	0.25	32.16	25.33
3.0	4.02	0.27	30.73	26.49
3.5	4.08	0.29	31.75	28.54
4.0	4.20	0.28	32.16	30.06
4.5	4.31	0.25	31.75	29.91
5.0	4.43	0.24	32.57	29.14
5.5	4.50	0.27	32.16	28.40
6.0	4.49	0.28	34.00	27.80