

虫草发酵菌粉的活性成分分析

许春燕¹, 李恒², 陆震鸣^{2*}

(1. 江苏省微生物研究所有限责任公司, 江苏无锡 214063; 2. 江南大学药学院, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的]比较虫草头孢和蝙蝠蛾被孢霉2种发酵菌粉中活性组分的差异,为虫草发酵菌种的开发提供数据参考。[方法]采用重量法测定多糖含量,采用离子色谱法检测粗多糖的单糖组成,采用高效液相色谱法测定核苷类物质含量,采用Folin-Ciocalteu法测定总多酚含量,采用香草醛-高氯酸法测定总三萜含量。[结果]2种菌粉中粗多糖含量在7%左右,均由6种单糖构成;发酵菌粉中均检测到含量较高的胞苷、鸟苷和腺苷等核苷类化合物;2种虫草发酵菌粉中总多酚的含量约5 mg/g,三萜物质含量约8 mg/g。[结论]虫草头孢和蝙蝠蛾被孢霉2种发酵菌粉在多糖、核苷、多酚和三萜类物质的含量上无显著差异,均具有较高的药用活性和良好的开发前景。

关键词 虫草;虫草头孢;蝙蝠蛾被孢霉;发酵菌粉;活性成分

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)34-168-02

Analysis of the Active Components in *Cordyceps* Fermented Culture

XU Chun-yan¹, LI Heng², LU Zhen-ming^{2*} (1. Jiangsu Institute of Microbiology Co. Ltd, Wuxi, Jiangsu 214063; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective] The research aimed to compare the active components of two kinds of *Cordyceps* fermented culture (*Cephalosporium sinensis* Chen and *Mortierella hepalid* C. T. Chen & B. Liu), which provides data reference for the development of *Cordyceps* fermentation bacteria. [Method] Using gravimetric method for determination of polysaccharides content, using ion chromatography for determination of monosaccharide composition, using high performance liquid chromatography method for determination of nucleosides contents, using Folin-Ciocalteu method for determination of total polyphenols content, and vanillin-perchloric acid method for the determination of total triterpene content. [Result] The contents of polysaccharides of these two fermented culture were about 7%, and the polysaccharides were both composed of six kinds of monosaccharides. Both fermentation powders were composed of high contents of nucleosides, including cytidine, guanosine and adenosine. The content of total polyphenol of these two fermented powders was nearly 5 mg/g, while the content of total triterpene was about 8 mg/g. [Conclusion] The contents of polysaccharides, nucleosides, polyphenols and triterpene showed no significant differences between the fermented culture of *Cephalosporium sinensis* Chen and *Mortierella hepalid* C. T. Chen & B. Liu, suggesting high potential activities and promising future.

Key words *Cordyceps*; *Cephalosporium sinensis* Chen; *Mortierella hepalid* C. T. Chen & B. Liu; Fermented culture; Active components

冬虫夏草 (*Chinese cordyceps*) 在分类学上属于子囊菌亚门、麦角菌目、麦角菌科、虫草属,是一种传统的中草药和保健品^[1]。虫草中含有多种活性成分,如虫草多糖、核苷、甾醇等^[2]。现代医学已经证实了虫草具有清除自由基^[3]、抗肿瘤、增强免疫^[4]、降低血糖^[5]、抗感染^[6]等多种药理活性。虫草的多种疗效与其内在化学成分的种类与含量是密切相关的^[2]。近年来,虫草因其特有的生理药理活性已经引起了广泛的关注。然而,野生冬虫夏草资源稀少,仅分布于青藏高原及海拔3 000 m以上、雪线以下的地区。随人工开发力度的增大,野生冬虫夏草资源逐渐趋于匮乏,而虫草的人工栽培较为困难,这些现实问题促使了虫草发酵技术的产生以及规模化生产的快速发展。目前,虫草发酵已经实现了工业化生产,能够满足人民健康的需求。

虫草发酵研究的关键问题之一是菌种。目前已从野生冬虫夏草中分离得到了众多冬虫夏草菌,其中,用于虫草发酵研究与开发的菌种主要有中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis* X. J. Liu, Y. L. Guo, Y. X. Yu & W. Zeng)、虫草头孢 (*Cephalosporium sinensis* Chen)、蝙蝠蛾被孢霉 (*Mortierella hepalid* C. T. Chen & B. Liu) 等^[7-8]。利用相关菌种已研发出相应的一系列保健品,并形成了一定的产业规模,有关虫草发酵菌粉的成分研究也已经开展。然而,各种发酵菌粉中的活性成分以及相应的药理活性尚需要进一步鉴定与比较。笔者在此对

虫草头孢和蝙蝠蛾被孢霉2种发酵菌粉中的多糖、核苷、多酚及三萜类物质进行了测定,比较这些活性组分在种类及含量上的差异,为虫草发酵菌种的开发提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫草菌粉。虫草头孢、蝙蝠蛾被孢霉发酵菌粉均由国内某企业提供。

1.1.2 试剂。齐墩果酸、没食子酸标准品购于中国食品药品检定研究院。其余试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器。UV-2100紫外分光光度计,上海 Unico 仪器有限公司;气相色谱仪 (GC-2010),日本 Shinadzu 公司;高效液相色谱仪 (HPLC),美国 Agilent 公司;ICS-5000 离子色谱仪,美国 Dionex 公司;高速冷冻离心机, Sigma 公司;真空干燥仪,美国 Savant 公司。

1.2 方法

1.2.1 虫草多糖含量及单糖组成分析。采用重量法测定虫草多糖含量。取虫草菌粉1 g加入20 ml去离子水,90℃水浴0.5 h,冷却后离心收集上清。重复该过程3次并合并上清。上清液浓缩后,缓慢滴加无水乙醇至乙醇含量达75%,4℃过夜后离心,沉淀干燥至恒重后称重。准确称取5 mg多糖加入到2 ml 2 mol/L HCl 溶液中,95℃水浴5 h后加入等体积的2 mol/L NaOH 溶液中和,12 000 r/min 离心10 min后取上清进行离子色谱分析。色谱柱为 CarboPac PA20;柱温45℃;流动相为水:NaOH 溶液(250 mmol/L) = 98.2:1.8 (V/

作者简介 许春燕(1975-),女,江苏泰州人,工程师,从事微生物学研究。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事药食真菌资源研究。

收稿日期 2015-11-04

V), 流速 0.5 ml/min; 脉冲安培检测器。

1.2.2 核苷类物质含量测定。称取 0.1 g 菌粉于 EP 管中, 加入 2 ml 甲醇-水(1:1, V/V) 溶液, 超声提取 30 min 后静置过夜, 12 000 r/min 离心后取上清过滤膜供分析。色谱柱为 Diamonsil C18(4.6 × 250 mm); 流动相为甲醇: 去离子水: 磷酸 = 5: 95: 0.05 (V/V/V), 流速 0.8 ml/min, 260 nm 紫外检测; 柱温 30 °C。

1.2.3 总多酚含量测定。准确称取菌粉 5.0 g 于 250 ml 三角瓶中, 加入 50 ml 70% 乙醇超声提取 30 min, 重复操作 3 次并合并滤液, 并定容至 100 ml。取待测样品溶液 1.0 ml, 再分别依次加 1.0 ml Folin-Ciocalteu 试剂及 1.0 ml 10% Na₂CO₃ 溶液, 然后用蒸馏水定容至 5.0 ml, 在室温下静置 30 min 后用 0.5 cm 光径比色杯在波长为 765 nm 的条件下进行比色测定, 以空白试剂为参比^[9]。根据没食子酸标准曲线进行总多酚的定量。没食子酸标准曲线为 $y = 0.1191x + 0.0533$ ($R^2 = 0.997$), 其中 x 为没食子酸浓度 ($\mu\text{g/ml}$), y 为吸光值。

1.2.4 总三萜含量测定。准确称取菌粉 0.5 g 于 2 ml EP 管中, 加入 500 μl 甲醇, 50 Hz 超声 15 min 后过夜, 取甲醇提取液 100 μl 于 10 ml 具塞试管中, 水浴蒸干, 加 0.3 ml 新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 1 ml 高氯酸, 60 °C 反应 20 min, 冰水冷却, 加入 10 ml 冰醋酸, 摇匀后在 550 nm 波长下测定吸光度, 根据齐墩果酸标准曲线进行总三萜含量测定^[10]。齐墩果酸标准曲线为 $y = 0.0101x - 0.0095$, 其中 x 为齐墩果酸浓度 ($\mu\text{g/ml}$), y 为吸光值。

2 结果与分析

2.1 虫草多糖的分析测定 大量医学试验证实, 多糖是冬虫草中的重要活性成分之一, 可活化巨噬细胞刺激抗体产生, 提高免疫, 抑制炎症与肿瘤, 同时具有修复细胞等功能^[11-12]。经检测, 虫草头孢和蝙蝠蛾被孢霉 2 种虫草发酵菌粉中的粗多糖含量相近, 分别为 6.24%、7.57%。进一步分析单糖组成发现(表 1), 2 种菌粉的单糖相对含量有所差异, 但均由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖 6 种单糖构成, 其中, 半乳糖、葡萄糖和甘露糖为主要组分, 约占多糖含量的 70%, 这与赵秋蓉等^[13]研究得出的虫草多糖的单糖组成一致。

表 1 虫草多糖的单糖组成 %

样品	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
虫草头孢	1.05	3.19	1.49	21.2	22.0	27.0
蝙蝠蛾被孢霉	1.38	4.86	1.55	16.6	18.2	26.8

2.2 核苷类物质的分析测定 核苷是虫草中的有效成分之一, 尤以腺苷具有明显的药理作用, 如改善心脑血管血液循环、防止心律失常、抑制神经递质释放和调节腺苷酸环化酶活性等。我国也已将冬虫草腺苷含量的测定写入药典^[14]。由表 2 可知, 2 种虫草发酵菌粉中均检测到了含量较高的胞苷、鸟苷和腺苷, 其中, 腺苷含量远高于冬虫草子实体(1.93 mg/g)及固体发酵冬虫草菌丝中的腺苷含量(0.75 mg/g),

这与 Yang 等^[15]的研究结果一致。而与其他发酵菌粉相比, 虫草头孢与蝙蝠蛾被孢霉发酵菌粉中的腺苷含量显著高于市售蝙蝠蛾拟青霉(金水宝胶囊)、中华束丝孢(百令胶囊)和粉红胶霉(心肝宝胶囊)发酵菌粉。虫草头孢发酵菌粉与市售其他虫草头孢菌粉(宁心宝胶囊)相比, 则可能由于生产工艺不同, 使得不同来源的发酵菌粉中的含量差异较大^[16]。虫草头孢与蝙蝠蛾被孢霉发酵菌粉的核苷物质含量差异不显著。肌苷和虫草素均未检测到。

表 2 虫草菌粉中核苷类物质含量 mg/g

样品	胞苷	鸟苷	肌苷	腺苷	虫草素
虫草头孢	9.88	2.06	N. D.	5.34	N. D.
蝙蝠蛾被孢霉	8.72	1.87	N. D.	5.90	N. D.

注: N. D. 表示未检出。

2.3 总多酚的分析测定 多酚类化合物普遍具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、保护心脑血管系统等药理活性^[17]。经测定, 2 种虫草发酵菌粉中均含有较高含量的多酚类物质, 虫草头孢中的总多酚含量(5.11 mg/g)略高于蝙蝠蛾被孢霉(4.52 mg/g)。与其他来源虫草相比, 多酚含量差异较为显著, 这是由于发酵菌种的不同以及发酵条件的差异引起的^[18]。

2.4 总三萜的分析测定 三萜类化合物被证明具有抗肿瘤、抑制组织胺释放、抗 HIV、抑制胆固醇生物合成与吸收等多种药理学活性^[19]。经检测, 2 种虫草菌粉均含有较高的三萜含量, 蝙蝠蛾被孢霉中的含量(8.29 mg/g)略高于虫草头孢中的含量(7.73 mg/g)。

3 结论

该试验对虫草头孢与蝙蝠蛾被孢霉 2 种虫草发酵菌粉中的多糖、核苷、多酚及三萜类物质进行了测定, 比较这些活性组分在种类及含量上的差异。结果表明, 2 种菌粉中粗多糖含量在 7% 左右, 均由 6 种单糖构成; 2 种虫草发酵菌粉中均检测到含量较高的胞苷、鸟苷和腺苷等核苷类化合物, 总多酚的含量约 5 mg/g, 三萜类物质含量约 8 mg/g。2 种菌粉在这些有效成分的含量上并无显著差异, 表明 2 种菌粉均具有较高的潜在药用活性和良好的开发前景。

参考文献

- [1] 林群英, 李泰辉, 宋斌, 等. 广东虫草与冬虫草及蛹虫草的成分比较[J]. 食用菌学报, 2009, 16(4): 54-57.
- [2] 王尊生, 顾宇翔, 周丽, 等. 冬虫草(*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.
- [3] 李晓磊, 赵琨, 李丹, 等. 冬虫草深层发酵菌丝体和蛹虫草子实体抗氧化活性的对比研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 75-78.
- [4] 宋林霞. 冬虫草抗肿瘤作用的研究进展及展望[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(14): 3387-3388.
- [5] ZHANG G, HUANG Y, BIAN Y, et al. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(6): 1152-1159.
- [6] WON S Y, PARK E H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(3): 555-561.
- [7] 劳景辉, 闫文娟, 方佳茂, 等. 冬虫草发酵技术的研究进展[J]. 中国食用菌, 2012, 31(6): 5-7.

(下转第 231 页)

发挥。

这样差异性、特质性强的乡村旅游不但对于城镇旅游者能产生特别的吸引力,增加了农民收入,农民的遗产保护意识也会不知不觉地得到提高。

6.3 提高和完善基础设施与配套设施 对旅游来说,基础设施是前提条件,甘泉宫遗址旅游的发展,基础设施、配套设施不完善是乡村旅游发展的阻碍因素之一,所以,因消极保护决定的基础设施,配套设施滞后的状况需要被改善,首先就需转变消极保护方式为积极保护,毕竟有些遗址遗迹在人们生产生活区,重视有保护意愿人们的主观能动性,结合当地生产生活,提高和完善基础设施与配套设施条件。比如,在原有路网的基础上,建成并完善淳化县城进入遗址区的道路交通,形成完整的现代交通体系,解决好人流物流运输问题。具体为建好淳化县城至铁王乡政府的二级公路,做好铁王乡与甘泉宫遗址区、遗址区与甘泉山的路面硬化处理。道路规划的过程中,应充分利用地形,合理确定道路走向,注意乡村景观和面貌要求。遗址区内的步行系统要有科学合理规划,步行系统要具有相对的自由特性,以减少对遗址区遗址遗迹格局的破坏。改善沿途公共设施,适当设立休息餐饮场地(如可结合晒场),满足游客食、行、游、娱等多方面要求。

特质性的乡村旅游发展会促进农村经济实力的增强,在持续完善基础设施与配套设施的情况下,地方政府有能力对旅游环境资源进行再投资、再建设,实现遗址保护与经济发展良性互动。

6.4 整体规划,整合资源,系统的乡村旅游开发对策 甘泉宫大遗址区域地处陕西省淳化县铁王乡农村腹地,因此加强铁王乡镇的建设就显得十分必要。首先要修好乡镇自身的路网,加强基础设施建设,特别应加大对集“吃、住、行、游、购、娱”为一体的旅游服务设施的建设,使其成为农村腹地的旅游名镇。同时依托陕西旅游大省的旅游战略:加强东线西安—临潼—华山、西线西安—乾陵—法门寺的旅游优势,拓

展西安至延安的北部线路,使其成为北部线路的重要节点。

甘泉宫遗址区目前要发展乡村旅游,应该从整体着手,通过调查、分析遗址区的景观资源各要素,使其各资源要素在一定规模范围内进行整合调整,从而对遗址区乡村旅游进行系统科学有效的开发。例如,充分利用遗址区内及附近地区的相关遗址景观资源,整合建筑遗址资源与遗迹资源,整合遗址古迹与乡村风貌,整合历史文化资源与农业景观资源。让游客看到多面的遗址遗迹,增加其对当地的文化民俗的了解,吸引更多的旅游观光。例如,以甘泉宫遗址区为主,辐射程家堡汉洪崖宫遗址、塔尔寺村汉代遗址、寇家村汉代遗址等历史遗址资源,整合这些遗址资源,整体规划,提升开发水平,形成长期战略发展规划,使这些遗址遗迹资源形成旅游资源,从而系统开发遗址区及周边乡村旅游,促进当地区域经济发展。

以遗址区景观资源保护为基础的乡村旅游蕴涵着巨大的发展潜力,基于乡村旅游的农业空间从生产空间转变为消费与生产二元空间,不断带动着当地乡村经济的开发。只有在保持当地的特质性中坚持差异化、整体、系统的开发,才能实现甘泉宫遗址区乡村旅游更好的发展,才能全面展开遗址保护“反哺”乡村旅游,乡村旅游促进遗址保护的策略,这也是农村经济、社会、环境协调发展的内在要求。

参考文献

- [1] 姚生民. 甘泉宫志[M]. 西安:三秦出版社,2003:13-17.
- [2] 周云庵. 陕西园林史[M]. 西安:三秦出版社,1997:68-70.
- [3] 刘华. 我国农村生态旅游发展趋势研究[J]. 农业经济,2013(12):92-93.
- [4] 许兰州,王希珍. 陕西省地图册[M]. 4版. 西安:西安地图出版社,2006.
- [5] 淳化果业简介[EB/OL]. (2012-11-26) [2015-10-08]. <http://www.sncunhua.gov.cn/index.php?a=lists&cortid=10618&m=content>.
- [6] 张峰. 汉长安城遗址保护中的农业景观演化引导模式研究[D]. 西安:西安建筑科技大学,2009.
- [7] 淳化乡村旅游围绕“绿”和“乐”字做文章[EB/OL]. (2012-06-19) [2015-10-08]. http://news.cnwest.com/content/2012-06/19/content_6691309.htm.
- [8] 李晓明,戴如琴,朱勤. 冬虫夏草菌发酵滤液多糖的组分分析[J]. 中国中药杂志,1989,14(2):31-34.
- [9] 张梅梅,魏志文,刘玉冰,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定桦褐孔菌多酚的条件优化[J]. 菌物学报,2011,30(2):295-304.
- [10] 王伟,尚德静,温磊. 灵芝发酵菌丝三萜类化合物含量的测定[J]. 中国食用菌,2006,25(1):30-32.
- [11] 万朋,高俊涛,吕世. 蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志,2015,49(6):95-97.
- [12] YAN J K, LI L, WANG Z M. Acidic degradation and enhanced antioxidant activities of exopolysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelial culture [J]. Food Chem, 2009, 117:641-646.
- [13] 赵秋蓉,李建平,吴迪,等. 冬虫夏草中多糖提取、纯化及抗氧化性能的研究[J]. 中国农学通报,2012,28(15):238-242.
- [14] 李绍平,李萍,季晖,等. 天然与发酵培养冬虫夏草中核苷类成分的含量及其变化[J]. 药学报,2001,36(6):436.
- [15] YANG F Q, GE L Y, YONG J W H, et al. Determination of nucleosides and nucleobases in different species of *Cordyceps* by capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed, 2009, 50(3):307-314.
- [16] 张萍,肖新月,李远科,等. 5种发酵虫草制剂中核苷及碱基成分的分析[J]. 药物分析杂志,2009,29(6):889-893.
- [17] 牛俊瑞,吕瑞霞. 多酚类物质潜在药理活性及其研究进展[J]. 内蒙古中医药,2013(9):128-129.
- [18] 顾宇翔,宋幸文,范立强,等. 虫草及其发酵制品抗氧化能力研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(11):1028-1031.
- [19] SHI L, REN A, MU D, et al. Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids [J]. Appl Microbiol Biotech, 2010, 88(6):1243-1251.

(上接第169页)