

# 硒和钙对蛹虫草活性物质含量的影响

翁 梁<sup>1</sup>, 温 鲁<sup>2</sup>

(1. 江苏食品职业技术学院 食品工程系, 江苏 淮安 223003; 2. 淮阴师范学院 资源微生物研究所, 江苏 淮安 223300)

**摘 要:**向培养液中分别添加不同浓度的亚硒酸钠、氯化钙, 用液体振荡培养法培养蛹虫草菌丝体, 用 HPLC 法测定虫草素与腺苷含量, 用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 用高碘酸钠比色法测定虫草酸含量。以研究 2 种微量元素对蛹虫草菌丝体中虫草素、腺苷、多糖和虫草酸含量的影响。结果表明: 向培养液中添加适量的硒或钙, 可显著提高蛹虫草活性物质含量。添加 15 mg/L 亚硒酸钠, 虫草素和虫草酸含量比对照组分别提高了 29.0% 和 34.9%; 添加 16 mg/L 氯化钙, 虫草素含量比对照提高 24.05%。

**关键词:**蛹虫草; 亚硒酸钠; 氯化钙; 液体振荡培养; 活性物质

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)22-0159-03

蛹虫草(*Cordyceps militaris* (L. ex. Fr.) Link) 别名北冬虫夏草、北虫草、蛹草等, 是冬虫夏草的近缘种, 为我国特有的传统名贵中药材, 其性平味甘, 具有益肺肾、补精髓、补虚损、止血化痰等功效, 《中华药海》和《新华本草纲要》均有记注<sup>[1]</sup>。蛹虫草的生理活性物质主要有虫草素、腺苷、多糖和虫草酸, 这些物质能增强机体免疫力, 有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗衰老、保肝、消炎抗菌等多种功能<sup>[2-3]</sup>。

**第一作者简介:**翁梁(1982-), 男, 硕士, 助教, 研究方向为生物活性物质与功能食品。E-mail: wjwengliang@126.com.

**收稿日期:**2012-07-17

微量元素在食用菌栽培中具有重要作用, 主要是利用食用菌菌丝体的富集能力, 富集对人体有益的微量元素, 增加食用菌的营养保健效果。近年来, 研究者开始注重微量元素的添加对药用真菌本身活性物质的变化所带来的影响<sup>[4]</sup>。该试验采用液体振荡培养, 在培养液中添加硒或钙, 研究 2 种微量元素对蛹虫草菌丝体中虫草素、腺苷、多糖和虫草酸含量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌种: 蛹虫草 3<sup>#</sup> 液体菌种由淮阴师范学院资源微生物研究所提供。药品与试剂: 磷酸二氢钾、硫酸

[9] Kim S H, Arnold D, Lloyd A, et al. Antisense expression of an *Arabidopsis* ran Binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress[J]. The Plant Cell, 2001, 13(12): 2619-2630.

[10] Rahman A, Bannigan A, Sulaman W, et al. Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root[J]. The Plant Journal, 2007, 50(3): 514-528.

## Effect of Two Plant Growth Regulators on Seedling Growth of *Eucommia ulmoides* Oliv

TANG Ping, HAN Cun-cun

(Lianyungang Teacher's College, Lianyungang, Jiangsu 222006)

**Abstract:** The effect of different concentration of naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on seedling growth of *Eucommia ulmoides* Oliv were analyzed. The results showed that NAA and 2,4-D with different concentration had different effects on the growth of root and stem of *E. ulmoides* Oliv. NAA and 2,4-D, in the range of 0.0001~1 mg/L, could promote the growth of the weight and length of stem. The effect of 2,4-D was more significantly. 2,4-D above 0.1 mg/L can performed significant inhibition to root elongation, but NAA must get to 1 mg/L. The root growth of *E. ulmoides* Oliv was more sensitive to 2,4-D than to NAA. Number of lateral roots were the most at the concentration of beginning to inhibit root growth (NAA was 1 mg/L, and 2,4-D was 0.1 mg/L).

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv; NAA; 2,4-D; root; stem

镁、葡萄糖、亚硒酸钠、氯化钙、D-甘露醇、高碘酸钠、乙酸铵、冰醋酸、95%乙醇、无水乙醇、苯酚、98%浓硫酸、磷酸氢二钾和四氢呋喃等均为分析纯试剂,蛋白胨为生化试剂,培养用水为自来水,分析用水为双蒸水。腺苷对照品、虫草素对照品由上海化学试剂公司进口分装。仪器与设备:培养设备有高压蒸汽灭菌锅,超净工作台,振荡培养箱,移液枪。样品处理设备有电热恒温鼓风干燥箱,多功能食品料理机,电子精密天平,精密数显酸度计,微波炉等;检测设备有美国 Waters 高效液相色谱仪系统(600Epump, 600controller, 2487 紫外检测器, In-line Degasser A F 在线脱气机, Empower 色谱数据管理系统)。其余玻璃仪器均为常规仪器。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 样品培养** 在基本配方基础上添加亚硒酸钠、氯化钙母液,使培养液中亚硒酸钠浓度依次为 0、5、10、15、20、25、40 mg/L,氯化钙浓度依次为 0、4、8、12、16、20、24 mg/L。将配制好的培养液分装于摇瓶中,115℃灭菌 30 min,冷却。按无菌操作要求,每瓶接入 2 mL 蛹虫草 3<sup>#</sup> 液体菌种,置于 25℃ 条件下,120 r/min 振荡培养 15 d。

**1.2.2 样品处理** 培养结束后,将培养液离心。菌丝体用蒸馏水洗涤 2 次,再离心。将菌丝体在 60℃ 烘干,粉碎。称取一定量菌丝粉末,用水作提取介质,料液比为 1:100,采用微波法辅助提取<sup>[5]</sup>。提取液离心,得上清液,备用。

**1.2.3 虫草素与腺苷测定** 蛹虫草虫草素与腺苷测定采用 HPLC 法<sup>[6]</sup>,上清液经 0.2 μm 微孔滤膜压滤,色谱条件为:Waters Nova-pak C<sub>18</sub> (3.9 mm × 300.0 mm, 4 μm);流动相为 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1% (体积分数) 四氢呋喃缓冲液,pH 6.86,流速为 1.0 mL/min,检测波长 260 nm。

**1.2.4 蛹虫草多糖测定** 蛹虫草多糖测定采用苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>。用葡萄糖配制系列标准溶液,于 490 nm 处测定吸光度,得到葡萄糖含量 C 与吸光度 A 的回归方程: $A=7.3542C+0.0532, R^2=0.9993$ 。

**1.2.5 虫草酸测定** 虫草酸测定采用高碘酸钠比色法<sup>[8]</sup>。用甘露醇配制系列标准溶液,于 420 nm 处测定吸光度,得到甘露糖含量 C 与吸光度 A 的回归方程: $C=104.55A+0.3012, R^2=0.9999$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加硒对蛹虫草活性成分含量的影响

培养液中添加一定量的亚硒酸钠后对蛹虫草虫草素、腺苷、多糖和虫草酸含量的影响结果见图 1、2。由图 1 可知,随着培养液中亚硒酸钠添加量的增加,蛹虫草菌丝体虫草素、多糖和虫草酸含量均有所增加。在亚硒酸钠为 10 mg/L 时,多糖含量达到最高,为 53.73 mg/g,较

对照提高了 7.0%;亚硒酸钠为 15 mg/L 时,虫草素和虫草酸含量达到最高,分别为 17.43 mg/g 和 31.27 mg/g,比对照组分别提高 29.0% 和 34.9%。随着亚硒酸钠浓度继续增加,虫草素和虫草酸含量显著下降。由图 2 可知,培养液中亚硒酸钠浓度为 10 mg/L 时,蛹虫草菌丝体腺苷含量最大,达到 0.28 mg/g。亚硒酸钠继续增加,腺苷含量反而逐渐降低。

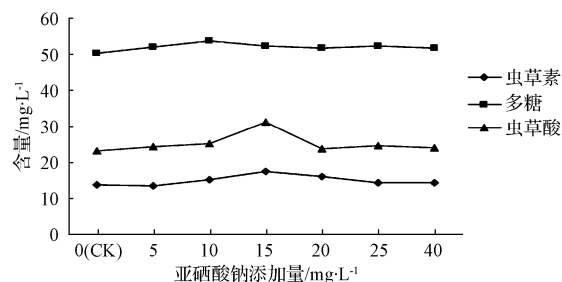


图 1 硒对蛹虫草虫草素、多糖和虫草酸含量影响

Fig. 1 The effects of selenium on the content of cordycepin, polysaccharide and cordycepic acid

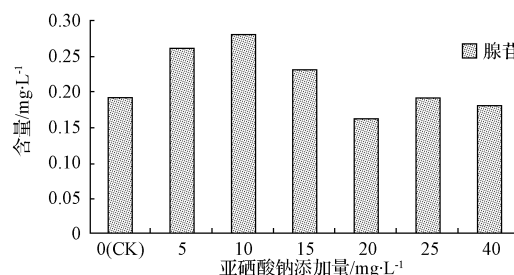


图 2 硒对蛹虫草腺苷含量影响

Fig. 2 The effects of selenium on the content of adenosine

### 2.2 添加钙对蛹虫草活性成分含量的影响

在培养液中添加一定量的氯化钙对蛹虫草虫草素、腺苷、多糖和虫草酸含量影响结果见图 3、4。由图 3 可知,随着培养液中氯化钙浓度增加,蛹虫草菌丝体虫草素、多糖和虫草酸含量是先升后降。氯化钙浓度为 8 mg/L 时,多糖和虫草酸含量达到最大值,分别为 66.90 mg/g 和 28.40 mg/g,较对照组提高了 14.52% 和 13.06%;随着氯化钙浓度的继续增加,多糖的含量逐渐

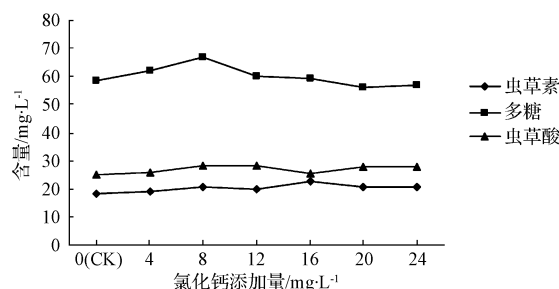


图 3 钙对蛹虫草虫草素、多糖和虫草酸含量影响

Fig. 3 The effects of calcium on the content of cordycepin, polysaccharide and cordycepic acid

降低,达到 20 mg/L 时,多糖含量开始低于对照组。培养液中氯化钙浓度为 16 mg/L 时,虫草素含量最高,达到 22.54 mg/g,比空白对照提高了 24.05%。由图 4 可知,腺苷的含量在氯化钙浓度为 4 mg/L 时最高,比对照提高 38.46%,但随后腺苷含量逐渐降低,且低于对照组。

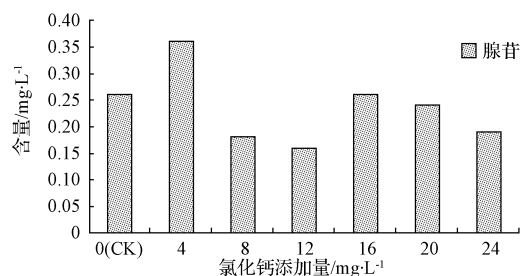


图 4 钙对蛹虫草腺苷含量影响

Fig. 4 The effects of calcium on the content of adenosine

### 3 结论与讨论

该试验结果表明,采用液体振荡培养,在培养液中添加亚硒酸钠,可明显提高蛹虫草菌丝体中虫草素和虫草酸的含量。在亚硒酸钠浓度为 1 mg/L 时,虫草素和虫草酸含量均达到最大值,比对照组分别提高了 29.0% 和 34.9%。蛹虫草菌丝体中腺苷含量在亚硒酸钠浓度为 10 mg/L 时最高,比对照组提高 47.37%。培养液中添加不同浓度的亚硒酸钠对多糖含量影响不显著。综上所述,在蛹虫草培养液中添加 10~15 mg/L 的亚硒酸钠,有利于提高蛹虫草菌丝体中活性物质含量。蛹虫草培养液中,氯化钙浓度为 8 mg/L 时,虫草酸和多糖含量达到最高值。氯化钙浓度达到 16 mg/L 时,虫草素含量最高,比对照组提高 24.05%,但此时,虫草酸和多糖含

量下降。综合考虑,在蛹虫草培养液中添加 4~12 mg/L 的氯化钙较为适宜,并可有效提高蛹虫草菌丝体中活性物质含量。

虫草素、腺苷、多糖和虫草酸是蛹虫草中主要的活性物质。筛选出活性物质产量高的蛹虫草菌株或培养方法有利于蛹虫草相关药品、保健品的开发。在蛹虫草培养液中添加适量的硒和钙,采用液体振荡培养获取菌丝体,既缩短了培养周期,又能很好的提高活性物质的产量,为蛹虫草相关产品进一步加工生产提供帮助。

该试验未对硒钙组合后对蛹虫草菌丝体中活性物质含量变化及蛹虫草培养液中虫草素、腺苷、多糖和虫草酸含量变化进行研究。硒钙组合后能否对蛹虫草菌丝体中活性物质含量变化及培养液中各物质含量变化产生影响,有待进一步研究。

### 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] 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.
- [3] 林群英,宋斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):154-157.
- [4] 王志高,温鲁,袁小传,等. 加硒对蛹虫草主要活性成分含量的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(29):93-94.
- [5] 夏敏,温鲁. 微波法提取虫草素研究[J]. 食品科学,2006,27(10):248-251.
- [6] 翁梁,温鲁. TLCs 与 HPLC 对比测定虫草中虫草素和腺苷含量[J]. 江苏农业学报,2008,24(4):539-540.
- [7] 翁梁,温鲁,杨芳,等. 不同提取方法对蛹虫草活性多糖抗氧化性影响[J]. 食品科技,2008,33(11):180-182.
- [8] 温鲁,翁梁,朱明伟,等. 不同林区蛹虫草活性成分含量的比较[J]. 林业科学,2008,44(8):149-151.

## Effects of Selenium and Calcium on the Content of *Cordyceps militaris* Active Substances

WENG Liang<sup>1</sup>, WEN Lu<sup>2</sup>

(1. Department of Food Engineering, Jiangsu Food Science College, Huai'an, Jiangsu 223003; 2. Institute of Resource Microorganism, Huaiyin Normal University, Huai'an, Jiangsu 223300)

**Abstract:** Adding different levels of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and CaCl<sub>2</sub> to the culture medium, with the method of liquid shake culture, the effect of 2 trace elements on the content of cordycepin and adenosine, polysaccharide and cordyceps acid were studied, with HPLC to test the level of cordycepin and adenosine; with phenol-sulphate acid to test the level of polysaccharide; with sodium periodate colorimetric to test the level of cordyceps acid. The results showed that adding suitable selenium or calcium could obviously raised the content of *Cordyceps militaris* active substances. Adding 15 mg/L Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> to the culture medium and the level of cordycepin and cordyceps acid had raised 29.0% and 34.9% respectively. Adding 16 mg/L CaCl<sub>2</sub> and the level of cordycepin had raised 24.05%.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; CaCl<sub>2</sub>; liquid shake culture; active substances