DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.14.014

两段培养冬虫夏草菌丝体中腺苷积累动态研究

沈伟[1],胡玲玲[2],李赫宇[3],胡高升[4,*]
(1. 山东中医药高等专科学校,山东 烟台 264199;2. 即墨市第一人民医院,山东 即墨 266219;3. 天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457;4. 沈阳药科大学 中药学院,辽宁 沈阳 110016)

摘　要:对冬虫夏草进行了两阶段培养,运用RP-HPLC法对菌丝体进行了腺苷和虫草素含量测定,重点考察起始静置培养时间对菌丝体中腺苷积累的影响,此外还比较了市售冬虫夏草药材和人工栽培北虫草子实体中腺苷和虫草素的含量。结果表明,当静置培养起始时间为第3天时,培养6 d得到的菌丝体中腺苷含量为全程振荡培养组的1.5倍,起始静置培养时间越长,菌丝体中腺苷含量越低。培养菌丝体中腺苷含量为市售冬虫夏草药材的7倍左右,但两者的虫草素含量均显著低于人工栽培的北虫草子实体。

关键词:冬虫夏草;两阶段培养;腺苷;北虫草;含量测定

Studies on Adenosine Accumulation in Two-Stage Cultured *Cordyceps sinensis* Mycelium

SHEN Wei[1], HU Ling-ling[2], LI He-yu[3], HU Gao-sheng[4,*]
(1. Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, Shandong, China; 2. The First Peoples's Hospital of Jimo City, Jimo 266219, Shandong, China; 3. Tianjin Ubasichealth Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 4. School of Traditional Chinese Material Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China)

Abstract: Two-stage culture process was applied in mycelium of *Cordyceps sinensis*. The contents of adenosine and cordycepin was determined using RP-HPLC method to investigate the effects of initiation static culture time on the accumulation of biomass and adenosine. The contents of two compounds in cultured mycelium and medicinal material of *C. sinensis* and artificial cultured *C. militaris* fruiting body was also determined and compared. Our results demonstrated that, when static culture was conducted on third day of culture and for 6 days, the content of adenosine was 1.5 times of samples obtained in shaking condition. When the static initiation time was 5th and 7th day after culture, the content of adenosine was both lower than that in 3rd day. Besides, content of adenosine in static cultured mycelium is about 7 times of that in medicinal material of *C. sinensis*. artificial cultured *C. militaris* fruiting body contains much lower adenosine but higher cordycepin than *C. sinensis* mycelium and medicinal material.

Key words: *Cordyceps sinensis*; two-stage culture; adenosine; *Cordyceps militaris*; content determination

冬虫夏草是麦角菌科(Clavicepitaceae)真菌冬虫夏草菌[*Cordyceps sinensis*(Berk.)Sacc.]寄生在蝙蝠蛾科昆虫蝙蝠蛾(*Hepialus armoricnus* Oberthur)幼虫上的子座和幼虫尸体的复合体[1],中国传统医学认为冬虫夏草性味甘、平,入肺、肾经,功能益肺肾,止咳嗽,补虚损、益精气,主要用于治疗久咳虚喘、劳嗽痰血、阳痿遗精、腰膝酸痛等症[2]。现代药理学研究表明它还有抑菌、抗癌、抗病毒、抗辐射、镇静、降血压等作用[3]。

冬虫夏草因其具备广泛的药理活性,从古至今就已广泛用做民间的滋补品,但因其生长环境严格和寄生条件特殊,加上人为采挖过渡,天然资源稀少,价格昂贵。近年来关于冬虫夏草的研究主要集中于无性形的确定、人工栽培、液体深层发酵培养、化学成分以及药理作用的研究。经大量研究表明人工发酵培养得到的菌丝体,经毒理、药效和植化等研究,证明与天然虫草化学组成、药理作用基本一致,且一些成分的含量

作者简介:沈伟(1982—),男(汉),讲师,硕士,研究方向:中药化学与中药炮制学。
* 通信作者:胡高升(1982—),男(汉),讲师,博士,研究方向:中药资源学。

高于天然冬虫夏草[4-8]，因此长期以来人们一直致力于深层发酵培养虫草菌丝体作为替代品[9]。腺苷和虫草素是冬虫夏草的主要活性物质。腺苷($C_{10}H_{13}N_5O_4$)，具有改善心脑血液循环[10]、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[11]等药理作用，目前已作为冬虫夏草的质控指标[2]。虫草素即3′-脱氧腺苷，具有免疫调节、抗菌、抗病毒、抗癌以及抗衰老等作用[12]。

目前冬虫夏草的发酵培养形式主要为液体培养，而最近的研究表明，两阶段培养法(振荡培养+静置培养)被证明在多种药用真菌的培养中能显著提高有效成分的积累[13]，目前冬虫夏草的该方面研究较落后，仅见有对两阶段培养法中多糖积累的影响[14]，而未见该培养方法对腺苷和虫草素积累的影响，基于上述研究现状，本文在本课题组前期研究基础上[15]，对两阶段培养法中较重要的影响因素——静置培养起始时间——进行了优化，并对得到的冬虫夏草菌丝体进行了腺苷和虫草素的含量测定，同时与市售冬虫夏草药材、北虫草人工栽培品中两种成分的含量进行了比较。

1 材料和方法

1.1 菌株

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis.*)由沈阳药科大学中药学院中药生物技术研究室保藏，保藏形式为冻干管，临用时接种至斜面种子培养基上进行活化培养。

1.2 材料鉴定

所用冬虫夏草药材和北虫草子实体均购自药店，经沈阳药科大学中药学院贾凌云副教授鉴定为冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)药材和北虫草(*Cordyceps militaris*)干燥子实体。

1.3 培养基

1.3.1 斜面种子培养基

固体PDA培养基：马铃薯25 %，蔗糖2 %，琼脂1.8 %。

1.3.2 发酵培养基

土豆200 g/L + 蔗糖20 g/L + $MgSO_4$ 1.0 g/L + KH_2PO_4 2.0 g/L + 酵母提取物2.0 g/L + 蛋白胨3.0 g/L + V_{B_1} 0.01 g/L + V_{B_2} 0.01g/L。

1.4 发酵培养方法

1.4.1 种子液的发酵培养

在无菌条件下，用接种环在斜面培养基上刮取2 cm^2的菌种，转入至150 mL三角烧瓶中，培养基装量：50 mL，培养温度：(25±1)℃；光照强度：58.4 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$；光照时间：24 h/d；摇床转速：120 r/min，培养时间为7 d。

1.4.2 发酵培养与取样方法

将种子液按体积接种量为5 %进行接种至装有50 mL培养基的150 mL三角烧瓶，培养条件同1.3.1，在振荡培养开始的不同时间取出进行静置培养。静置培养环境温度(25±1)℃；光照强度：58.4 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$；光照时间：24 h/d。静置培养的取样时间为振荡培养的第3天，第5天和第7天，隔一定时间进行取样，取样时用60目不锈钢筛网滤取菌丝体，50 ℃烘干至恒重，称取重量，用研钵研成细粉，装到离心管中，密封后置于干燥器中备用。考察周期为19 d。取样示意图如图1所示。

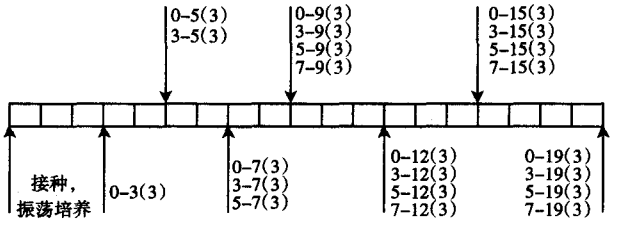

图1 两阶段培养法样品取样示意图

Fig.1 Diagrammatic sketch of two-stage cultured mycelium sampling of *C. sinensis*

1.5 仪器与试药

1.5.1 仪器

高效液相色谱仪(L-2455 UV-VIS Diode-Array Detector，L-2420 Autosampler、L-2200 Pump，Heater AT-330，D2000色谱工作站)(HITACHI)，PLATISIL C18色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)：迪马科技有限公司；HDL-超净工作台：北京东联哈尔仪器制造有限公司；SPX-80BSH-II型生化培养箱：上海新苗医疗器械制造有限公司；LDZM立式压力蒸汽灭菌器：上海申安医疗器械厂；KH2200B型超声波清洗器：昆山禾创超声仪器有限公司；ZQLY-300F振荡培养箱：上海知楚仪器；TGL-18R冷冻高速离心机：珠海黑马医学仪器有限公司。

1.5.2 试药

高效液相分析中所用色谱纯乙腈，甲醇均购自百灵威科技有限公司，液相用水为娃哈哈纯净水；培养基配制过程中水为二次蒸馏水，所用无机盐、乙醇、酵母粉、琼脂、蛋白胨、维生素等试剂均为分析纯，购自山东禹王化学试剂有限公司，土豆为市售；所用腺苷和虫草素标准品购自中国生物制品检定院。

1.6 分析条件

参照2010年版《中华人民共和国药典》方法，并结合本研究室前期研究结果[15]，采用反相高效液相色谱法测定菌丝体中腺苷和虫草素的含量。

检测方法：流动相为乙腈：水：甲醇=2：85：2（v：v：v）；检测波长：260 nm；流速：1.0 mL/min；柱温：40 ℃，进样量 10 μL，含量测定方法为标准曲线法。

1.7　菌丝体干重及腺苷和虫草素的含量测定方法

1.7.1　菌丝体干重测定

将培养物用 60 目不锈钢筛网过滤，滤出物用等体积蒸馏水洗涤，于 50 ℃鼓风干燥箱中烘干至恒重，称定即为菌丝体干重。

1.7.2　腺苷和虫草素标准品溶液的配制

分别精密称取 3.0 mg 腺苷和虫草素对照品，加入 90 %甲醇溶解，量瓶中定容至 25 mL，摇匀，用 90 %甲醇依次稀释，最终分别得到浓度为 0.3、0.9、1.5、3.0、6.0、9.0、15.0、30.0 μg/mL 的腺苷和虫草素系列对照品溶液，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得。

1.7.3　标准曲线与线性范围考察

取 1.7.2 中得到的腺苷和虫草素标准品，分别进行标准曲线的制备，进样量 10 μL，每个浓度重复进样 3 次，取平均值进行标准曲线的绘制，将对照品浓度（μg/mL）（Y）与峰面积（X）进行线性回归，得腺苷对照品标准曲线方程为：Y=0.000 072X+0.000 58（R^2=0.999 6），在所测试浓度范围内线性良好；虫草素标准曲线方程为：Y=0.000 089X+0.003 1（R^2=0.999 8），在所测试浓度范围内线性良好。

1.7.4　供试品样品溶液配制

精密称取 20 mg 各组菌丝体粉末（80 目），精密加入 1 mL 90 %甲醇，充分混悬后，称取重量，超声提取 30 min，补足失重，离心（13 000 r/min，10 min，室温），取上清液，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，将滤液进行分析，记录腺苷标准品的出峰时间和峰面积，记录样品溶液中与标准品保留时间一致的峰面积，利用 1.7.3 中得到的标准曲线进行含量计算。冬虫夏草药材和北虫草干燥子实体均同法烘干，研成粉末（80 目），同法提取。

1.7.5　精密度考察

取 3.0 μg/mL 的腺苷和虫草素标准品溶液进样分析 5 次，RSD 均<3 %。

1.7.6　回收率考察

平行称取 9 份已知含量样品各 20 mg，分别加入相当于样品中腺苷和虫草素含有量的 80 %，100 %，120 %对照品溶液，每组 3 份，50 ℃挥干溶剂后，按 1.7.4 项下操作，将测得值减去已知量，再除以加入量，计算加样回收率，结果表明，腺苷和虫草素的加样回收率均在 95 %~105 %范围内。

1.7.7　重现性考察

取同一批样品 5 份，按 1.7.4 项下操作，分析后，读取峰面积，求得样品中腺苷和虫草素的含量，计算 RSD 值，结果表明，两者的 RSD 值均<3 %。

2　结果与讨论

2.1　静置培养对菌丝体形态的影响

图 2 显示的为振荡培养 3 d 后取出，静置培养 6 d 的菌饼（3~9 号样品）。

图 2　静置培养冬虫夏草菌饼（3~9 号样品）形态

Fig.2　Characteristics of static cultured mycelium of *C. sinensis* (Sample number 3–9)

由图 2 可见，静置培养对菌丝体外观具有显著影响，在振荡培养条件下，菌丝体为直径不超过 0.5 cm 的菌球，肉眼可见表面触手状菌丝体，但是在静置培养中，在第三天，已经可见培养物表面呈现细密的白色茸毛，并互相连接在一起，形成一整块具有一定机械强度的菌饼，菌饼形态见图 2，仅有少量菌丝体仍以菌球状态存在。

2.2　不同培养方式对冬虫夏草菌丝体生物量的影响

不同培养方式对冬虫夏草菌丝体生物量的影响见图 3。

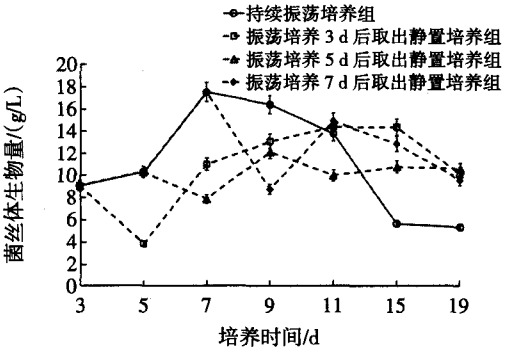

图 3　不同培养方式对菌丝体生物量的影响

Fig.3　Effects of starting time of static culture on biomass accumulation of cultured *C. sinensis* mycelium

在振荡培养条件下，菌丝体生物量最高点为培养的第 7 天，达到 17.5 gDW/L，此生物量产量亦为所有培养条件下最高值，可见，振荡培养有利于得到更高的生物量。此后至 12 d，生物量缓慢减少，12 d 以后，生

物量迅速降低，这与培养基中碳源已经基本消耗完毕，菌丝体生长进入衰亡期。在静置培养起始时间不同的条件下，生物量均在静置培养的第 3 天有一明显下降趋势，随后生物量才开始上升。静置培养条件下的生物量最高值为第 3 天开始静置培养 9 d 时达到，为 13.9 g/L(以干重计)。此外，由图 3 可见，随着起始静置培养时间的延长，各处理组的最大生物量逐渐减小。

2.3 不同培养方式对冬虫夏草菌丝体中腺苷含量的影响

不同培养方式对冬虫夏草菌丝体中腺苷含量的影响见图 4。

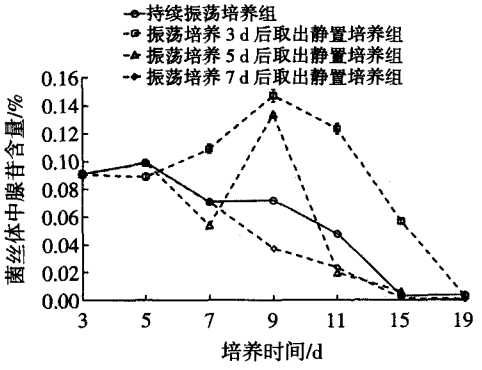

图 4 不同培养方式处理组腺苷含量随时间变化趋势

Fig.4 Effects of starting time of static culture on adenosine content in cultured *C. sinensis* mycelium

在振荡培养菌丝体中腺苷的含量最高点在培养的第五天，为 0.105 %，此后逐渐降低，而在静置培养条件下，最高值为起始静置培养时间为第 3 天的处理组，其含量最高点在培养的第 9 天，高达 0.14 %，高于对照组的最高含量 40 %左右，此外，在静置培养起始时间为第 5 天的处理组，腺苷含量的最高点相同，最高含量为 0.132 %，此后，两处理组中腺苷含量均呈显著下降趋势，起始时间为第 7 天的菌丝体中，腺苷含量持续下降，与全程振荡培养的处理组中趋势类似，几种培养条件下，在第 19 天，菌丝体中的腺苷含量降到最低值。由此可见，合适的起始静置培养时间可显著提高冬虫夏草菌丝体中腺苷的积累。

2.4 不同培养方式对冬虫夏草菌丝体中腺苷产量的影响

为了得到优化的培养条件，合理的收获时间是重要考察指标，不同培养方式对冬虫夏草菌丝体中腺苷产量的影响见图 5。

振荡培养条件下，菌丝体中腺苷的最大产量为培养的第 7 天，为 12.5 mg/L，而在两阶段培养条件下，起始静置培养为 3 d 和 5 d 的处理组中，腺苷产量的最高点均在培养的第 9 天，分别达到18.5 mg/L 和 16.1 mg/L，

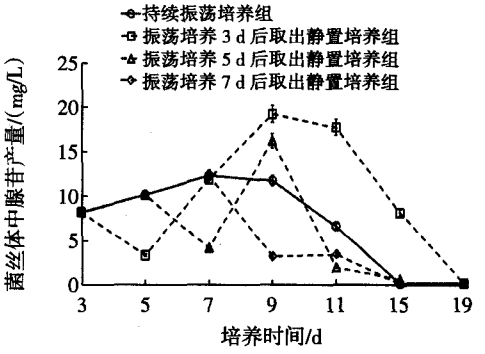

图 5 不同培养方式处理组腺苷产量随时间变化趋势

Fig.5 Effects of starting time of static culture on adenosine yield in cultured *C. sinensis* mycelium

较全程振荡培养组高 48 %和 28.8 %。由此可见，静置培养的确能显著提高培养体系中目标成分的积累。

2.5 北虫草栽培品，冬虫夏草药材和菌丝体中腺苷和虫草素的含量测定

在对冬虫夏草菌丝体进行含量测定的过程中，我们发现其中虫草素的含量极低，因此，我们对市场上常见的北虫草人工栽培品，药店中零售的冬虫夏草药材进行了两种成分的含量测定和比较，结果见图 6。

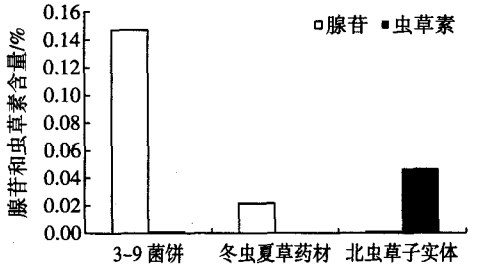

图 6 人工培养北虫草，冬虫夏草药材与冬虫夏草菌丝体提取物腺苷和虫草素含量比较

Fig.6 Content determination of adenosine and cordycepin in two-stage cultured mycelium and medicinal material of *C. sinensis* and artificial cultured *C. militaris* fruiting body

该结果表明，冬虫夏草菌丝体和药材中腺苷含量均能满足药典要求[2](0.01 %)，但虫草素含量远远低于北虫草子实体，而北虫草中虽然虫草素含量高，但是腺苷含量却又远低于冬虫夏草菌丝体和药材。

3 结论

两阶段培养法中，起始静置培养时间为该工艺中的重要影响因素，本文的研究结果表明，起始静置培养时间为第 3 天时，菌丝体中的腺苷含量以及培养体系中的腺苷产量均显著高于全程振荡培养的菌丝体。与全程振荡相比，虽然培养时间稍长，但由于该过程

（下转第 120 页）

[15] Zhao C X, Li X N, Liang Y Z, et al. Comparative analysis of chemical components of essential oils from different samples of Rhododendron with the help of chemometrics methods[J]. Chemom Intell Lab Syst, 2006,82: 218-228

[16] Cho S -K, Abd El-Aty] A M, Choi J -H, et al. Optimized conditions for the extraction of secondary volatile metabolites in Angelica roots by accelerated solvent extraction[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44 (5): 1154-1158

[17] Saroglou V, Dorizas N, Kypriotakis Z, et al. Analysis of the essential oil composition of eight Anthemis species from Greece[J]. J Chromatogr A, 2006, 1104(1/2): 313-322

[18] Vagionas K, Ngassapa O, Runyoro D, et al. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania[J]. Food Chem, 2007, 105: 1711-1717

[19] Cerny C,Guntz-Dubini R. Role of the solvent glycerol in the Maillard reaction of D-fructose and L-aniline[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(2): 574-577

[20] Ansorena D, Gimeno O, Astiasaran I, et al. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona [J]. Food Res Int, 2001, 34: 67-75

[21] Benkaci-Ali F, Baaliouamer A, Meklati B Y, et al. Chemical composition of seed essential oils from Algerian Nigella sativa extracted by microwave and hydrodistillation[J]. Flavour Fragr J, 2007, 22(2): 148-153

[22] 张玉玉,黄明泉,田红玉,等."六必居"面酱挥发性成分 SDE 法提取及 GC-MS 分析[J].中国食品学报,2010,10(2) :154-159

[23] 朱瑞鸿,薛群成,李忠臣,等.合成食用香料手册[M].北京:中国轻工业出版社,1993:607

[24] 孙宝国. 食用调香术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 121-140

收稿日期:2015-06-25

(上接第 56 页)

除光照外无需额外的能源消耗,因此,对于降低冬虫夏草菌丝体培养成本,得到腺苷含量更高的菌丝体具有实际应用价值。此外,培养菌丝体中的腺苷含量高于药店所售冬虫夏草药材 6 倍左右,人工栽培的北虫草中的腺苷含量极低,但其中的虫草素含量却远高于冬虫夏草药材及其培养菌丝体。我们将对该菌丝体的培养工艺进行进一步优化,以求其中腺苷和虫草素的含量均有显著积累。

参考文献:

[1] 林群英,钟月金,李泰辉,等.虫草属生物学研究进展[J].食用菌学报,2006,13(2):89-92

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2010 版一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:106

[3] 郭宏春,高继全,习欠云,等.冬虫夏草研究进展[J].微生物学杂志,2003,23(1): 50-55

[4] 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].药学学报,2001,36(6) :436-439

[5] 沈晓云,李兆田,田军.冬虫夏草与虫草菌丝有效成分分析比较[J].山西大学学报,1998,21(1):80-85

[6] 董方霆, 廖杰.HPLC 分析天然及人工培殖冬虫夏草菌丝体中的甘露醇[J].药物分析杂志,1998,12(S1): 124-125

[7] 龚晓健,季晖,卢顺高,等.人工虫草多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国药科大学学报,2000,31(1): 53-55

[8] 卢玉兰,翁开敏.冬虫夏草的药理作用研究[J].中国药师,2003,6(6):371-372

[9] 魏涛,魏威凛,贡晓娟,等.冬虫夏草菌丝体镇咳、祛痰及抗菌消炎作用的研究[J].食品科学,2002,23(3) :126-130

[10] Toda N,Okunishi H,Taniyama K,et al.Responses to adenine nucleotides and related compounds of isolated dog cerebral,coronary and mesenteric arteries[J].Blood Vessel,1982,19(5):226-236

[11] Pelleg A, Porter R S. The pharmacology of adenosine[J]. Pharmacotherapt,1990,10(3):157-174

[12] 李婧.虫草菌素(cordycepin)研究进展[J].美国中华健康卫生杂志,2005,8(3):27-30

[13] Qinghua Fang, Jianjiang Zhong. Two-stage cultue process for improved production of Ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus Ganoderma lucidum[J]. Biotechnol Prog, 2002,18(1):51-54

[14] 崔建东,张思,齐红彦.冬虫夏草多糖合成两阶段培养的设计与优化[J].食品工业科技,2012,33(2):182-188

[15] 王海霞,胡高升,蒙娅,等.RP-HPLC 法测定冬虫夏草发酵液冻干粉中虫草素和腺苷含量[J].中国食品卫生杂志,2007,19(4):309-312

收稿日期:2015-06-08