

文章编号:1673-1689(2005)05-0107-04

# 蛹虫草产类胡萝卜素的 research

付鸣佳

(江西师范大学 生命科学院,江西 南昌 330027)

**摘要:** 蛹虫草(*Cordyceps militaris* L.)在光照条件下培养,其菌落呈橙黄色,菌丝体中有高含量的类胡萝卜素积累.通过丙酮抽提和硅胶柱层析纯化,获得的蛹虫草类胡萝卜素3个光谱吸收峰为416,439,468 nm.该类胡萝卜素在蛹虫草中随时间的变化而有一个产量的高峰期,其最高产量可达472.3  $\mu\text{g/g}$ 鲜重以上.

**关键词:** 蛹虫草;类胡萝卜素;类胡萝卜素含量;光谱分析

中图分类号:Q 939.9

文献标识码:A

## Study on the Carotenoid produced from *Cordyceps militaris* L

FU Ming-jia

(College of Life science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China)

**Abstract:** Under the illumination condition, colony of *Cordyceps militaris* L showed the colour of orange and there was a very high content of carotenoid in its mycelia. Through acetone extraction and silica gel chromatographic purification of carotenoid from *Cordyceps militaris* L, the spectrum of the purified substance had three well-defined peaks, with the wavelengths of 416, 439 and 468 nm, respectively. The accumulation of the carotenoid was affected by illumination and could reach an peak value of 472.3  $\mu\text{g/g}$ .

**Key words:** *Cordyceps militaris* L; carotenoid; carotenoid content; spectrum analysis

天然类胡萝卜素主要是由八个异戊二烯组成的萜类化合物,在自然界生物体中分布十分丰富,且在结构上是多样化的天然色素.天然类胡萝卜素有着多种重要功能,这些功能包括光合、营养和抗光氧化造成的损伤等<sup>[1]</sup>.此外,类胡萝卜素作为抗氧化剂对包括癌症和心血管疾病在内的多种疾病起到预防的作用<sup>[2]</sup>.类胡萝卜素在许多微生物种类中也有广泛的分布,其中真菌中有多种类胡萝卜素存在,在脉胞菌中有 $\beta$ 胡萝卜素,它的形成还受光诱导<sup>[3]</sup>,在真菌中与类胡萝卜素相关的研究也有报

道<sup>[4~7]</sup>.

蛹虫草(*Cordyceps militaris* L.)又名北冬虫夏草,其功能成分与天然虫草基本一致,富含虫草素、虫草酸、虫草多糖、D2甘露醇、核苷酸及多种微量元素.但蛹虫草产类胡萝卜素的相关研究还未见报道,作者就蛹虫草产类胡萝卜素的特性进行了研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

收稿日期:2004-10-25; 修回日期:2005-03-04.

作者简介:付鸣佳(1964-),男,江西高安人,副教授,工学博士.

万方数据

马铃薯 200 g 和 30 g 的蚕蛹干粉加 900 mL 水,煮沸 20 min 后纱布过滤,滤液加入 20 g 蔗糖和 20 g 琼脂,加水至 1 000 mL, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min,使用时加热融化后倒入平皿中。

## 1.2 菌种和菌落培养

蛹虫草菌种保存于作者所在实验室。菌种从 4 °C 冰箱中取出后转接于平皿培养基上,25 °C 培养 5 d 后进行菌种活化,再转接于新的平皿培养基上,25 °C 黑暗培养 5 d,平皿培养基上长出的白色菌落置于 25 °C 下光照培养。光照培养时间隔时间取样,提取类胡萝卜素。

## 1.3 类胡萝卜素的提取和质量测定

参照杨文等方法<sup>[8]</sup>。从不同时间光照培养的菌落上刮取菌丝体,立即液氮处理研磨,而后按照 0.1 g 新鲜菌丝体加入 1 mL 3 mol/L 盐酸的比例加盐酸,室温下浸泡 2.5 h,沸水浴中 4 min,迅速冷却,10 000 r/min 离心 5 min,水洗两次,加入 1 mL 丙酮振荡 30 min 或浸提过夜以提取类胡萝卜素,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,在 Shimadzu UV-2450 紫外—可见光分光光度计上测定 468 nm 处的吸光值,类胡萝卜素含量按以下公式计算:

$$\text{类胡萝卜素的含量}(\mu\text{g/g 鲜菌体}) = \text{OD}_{468} \cdot n \cdot V / 0.16 W$$

其中  $\text{OD}_{468}$  为 468 nm 处的吸光值; $n$  为稀释倍数; $V$  为加入的溶剂体积 (mL); $W$  为菌丝体鲜重;0.16 为类胡萝卜素的克分子消光系数。

## 1.4 薄层层析

将硅胶 G 的 TLC 薄板(青岛海洋化工厂产品)浸于 6%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液中,10 min 后取出,晾干后

110 °C 活化 30 min。展开剂为  $V(95\% \text{乙醇}) : V(\text{氯仿}) = 1 : 9$ ,类胡萝卜素的点样用氯仿溶液。

## 1.5 类胡萝卜素的柱层析

在 100 g 硅胶(粒度为 200~300 目,青岛海洋化工厂产品)中加入 100 mL 6% 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和 200 mL 丙酮,60 °C 风干,110 °C 活化 30 min。以  $V(\text{丙酮}) : V(\text{石油醚}) = 4 : 1$  为淋洗剂,将所得硅胶以淋洗剂浸泡以后装填于 2 cm×40 cm 玻璃层析柱中,加入 1.5 mL 浓缩的类胡萝卜素丙酮液样品于顶端,体积流量为 2.5 mL/min 进行柱层析。

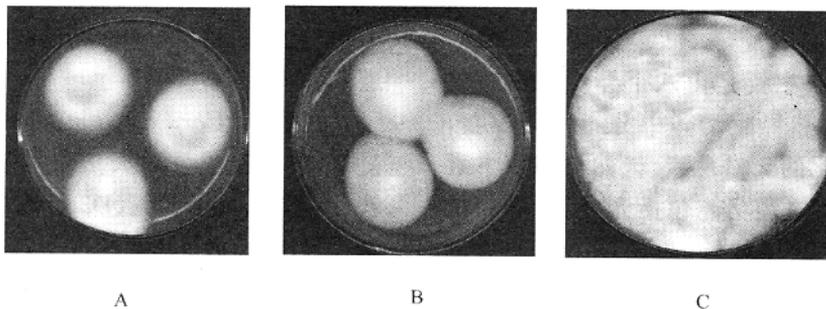
## 1.6 紫外—可见光吸收光谱测定

将提取的类胡萝卜丙酮溶液在 Shimadzu UV-2450 紫外—可见光分光光度计下进行 360~600 nm 的光谱扫描,同时将类胡萝卜素溶解于甲醇、乙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯和石油醚中,同样进行紫外—可见光的光谱扫描。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产类胡萝卜素蛹虫草的菌落特征

蛹虫草菌落在黑暗中培养,其菌落颜色基本为白色(图 1A)。但是当黑暗培养 5 d 的菌落置于光照培养的条件下时,菌落将转变为橙黄色(图 1B),这表明菌落中有色素成分形成。由此看来光照是导致菌落颜色改变的主要原因。此外,当蛹虫草菌接种在平皿培养基上,并使之长满整个培养皿后,光照培养 7 d,发现菌落的颜色并没有多大改变,并不出现橙黄色(图 1C)。即菌落长满培养皿以后,光照培养菌丝体中也不会有类胡萝卜素生成。



A. 黑暗中的菌落为白色;B. 光照条件下的菌落呈橙黄色;C. 黑暗中长满培养皿的菌落在光照条件下颜色仍为白色

图 1 蛹虫草菌落的颜色

Fig. 1 The colour of colony of *Cordyceps militaris* L

### 2.2 蛹虫草类胡萝卜素的纯化和薄层析分析

粗提的蛹虫草类胡萝卜素可能还含有较多的杂质。将粗提的蛹虫草类胡萝卜素过硅胶柱以后,在  $\text{OD}_{468}$  处检测可见有一个主要的吸收峰(见图

2),收集洗脱峰的类胡萝卜素进行减压浓缩备用。以过柱纯化后浓缩的类胡萝卜素氯仿溶液点在硅胶 G 的 TLC 薄板上,层析检测类胡萝卜素的纯化情况,表明类胡萝卜素经层析后可产生一个色斑

(见图 3A), 而类胡萝卜素的粗提液也只是产生一个色斑, 但有明显的拖尾(见图 3B).

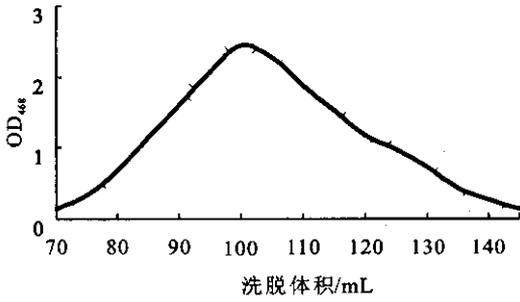
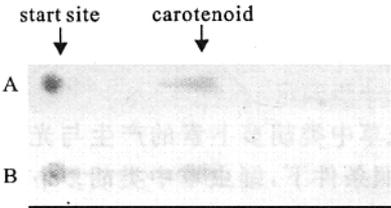


图 2 蛹虫草类胡萝卜素的硅胶柱层析

Fig. 2 Silica gel chromatography of carotenoid from *Cordyceps militaris* L



A. 纯化的类胡萝卜素; B. 粗提类胡萝卜素

图 3 蛹虫草类胡萝卜素的薄层析

Fig. 3 Thin layer chromatography of carotenoid from *Cordyceps militaris* L

2.3 蛹虫草类胡萝卜素丙酮溶液紫外—可见光光谱分析

类胡萝卜素由于其中的共轭双键体系形成的光吸收载色体, 除了使其有特殊的颜色外, 还有特征的吸收光谱, 它可作为类胡萝卜素进行初步鉴定的依据<sup>[9]</sup>. 蛹虫草类胡萝卜素经硅胶柱层析纯化以后, 蛹虫草类胡萝卜素丙酮溶液在 360~600 nm 波长范围内进行吸收光谱分析, 结果见图 4. 整个蛹虫草类胡萝卜素吸收光谱图从左至右有 3 个峰——I、II 和 III, 各吸收峰的波长  $\lambda_{max}$  值分别为 416, 439, 468 nm. 除了吸收峰的波长  $\lambda_{max}$  值外, 峰 III 和峰 II 面积比也是各种类胡萝卜素的特征值. 蛹虫草类胡萝卜素的峰 III 面积: 峰 II 面积 = 0.48 (即 48%). 根据蛹虫草类胡萝卜素  $\lambda_{max}$  值和峰面积比, 该类胡萝卜素与许多类胡萝卜素都有所不同. 表 1 为蛹虫草类胡萝卜素与 Rodriguez-Amaya<sup>[9]</sup> 所列前人的研究结果进行比较, 表明蛹虫草类胡萝卜素与这几种主要的类胡萝卜素均不相同.

2.4 蛹虫草类胡萝卜素在不同有机溶液中的溶解特性

蛹虫草类胡萝卜素在不同的有机溶剂中有不同的溶解特性. 通过蛹虫草类胡萝卜素溶解甲醇、乙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚和丙酮的溶解特性来看, 在丙酮溶液中加入 100  $\mu$  的蛹虫草类胡

萝卜素后, 在甲醇、乙醇和丙酮中基本都能溶解, 丙酮中溶解最快, 乙酸乙酯中有少量不能溶解, 在三氯甲烷中只有微量溶解, 而在石油醚中很难溶解. 表明这几种溶剂中丙酮是最好的溶剂, 而石油醚并非蛹虫草类胡萝卜素的良好溶剂.

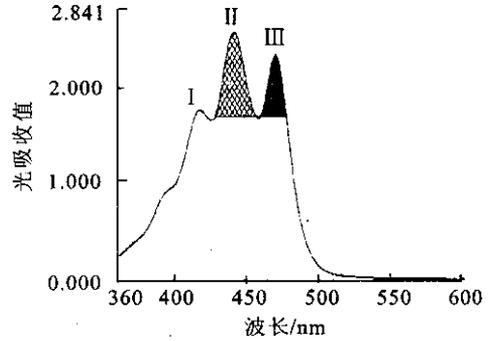


图 4 蛹虫草类胡萝卜素的光谱分析

Fig. 4 Absorption spectra of carotenoid from *Cordyceps militaris* L

表 1 类胡萝卜素的紫外-可见光光吸收数据

Tab. 1 Ultraviolet and visible absorption data for carotenoids

类胡萝卜素	$\lambda_{max}$			峰面积比 (III/II)/%
	I	II	III	
蛹虫草类胡萝卜素	416	439	468	48
金黄质	381	402	427	101
$\alpha$ -胡萝卜素	424	448	476	55
$\beta$ -胡萝卜素	429	452	478	15
$\gamma$ -胡萝卜素	439	461	491	
番茄红素	448	474	505	
新叶黄素	416	440	470	85

2.5 蛹虫草类胡萝卜素在不同有机溶液中的紫外—可见光光谱分析

蛹虫草类胡萝卜素在不同的有机溶剂中, 其 3 个峰的  $\lambda_{max}$  值会发生改变. 与蛹虫草类胡萝卜素溶解在丙酮中的  $\lambda_{max}$  值比较, 除了该类胡萝卜素溶解于三氯甲烷中  $\lambda_{max}$  值出现较大的红移以外, 其它 3 种溶液中类胡萝卜素的  $\lambda_{max}$  值相差不大(见表 2), 表明三氯甲烷对类胡萝卜素的共轭双键有影响.

表 2 蛹虫草类胡萝卜素在不同溶剂中的最大光吸收值

Tab. 2 Visible absorption data for carotenoid from *Cordyceps militaris* L in different solvent

溶剂	峰 I / nm	峰 II / nm	峰 III / nm
甲醇	419.2	441.0	468.8
乙醇	419.4	442.2	471.0
三氯甲烷	426.2	450.4	480.0
乙酸乙酯	414.2	436.2	465.2
丙酮	415.8	439.2	467.8

## 2.6 蛹虫草中类胡萝卜素的质量变化

蛹虫草在 25 ℃ 光照培养的条件下, 它所产类胡萝卜素可随时间而发生变化. 如图 5 所示, 蛹虫草中类胡萝卜素在最初的 48 h 内, 其质量增长很快, 在 48~72 h 类胡萝卜素质量达到最高峰, 其最高质量  $\geq 472.3 \mu\text{g/g}$  鲜重, 表明蛹虫草类胡萝卜素的产量很高. 但是在类胡萝卜素质量达最高峰以后, 其质量在慢慢下降.

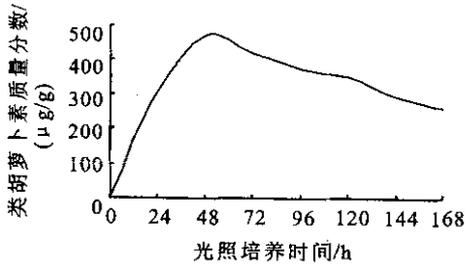


图 5 蛹虫草中类胡萝卜素的质量随光照时间的变化

Fig. 5 The change of carotenoid content in *Cordyceps militaris* L. with regards to illumination culture time

## 3 结 论

蛹虫草在液体和固体培养的条件下, 当受到光

照以后, 其菌丝颜色都可发生变化, 由白色转变为橙黄色, 说明光照条件是蛹虫草产生类胡萝卜素的一个必要条件.

除了少数类胡萝卜素外, 大多数类胡萝卜素都有 3 个最大光吸收值, 蛹虫草类胡萝卜素也不例外. 类胡萝卜素的共轭双键数越多, 其  $\lambda_{\text{max}}$  值越大. 因此, 不饱和的非环状脂肪链上的共轭双键数越多, 类胡萝卜素更趋向于红色, 反之其颜色偏向于淡黄色<sup>[9]</sup>. 蛹虫草类胡萝卜素的颜色为橙黄色, 显然其非环状的脂肪链上共轭双键数不会是最多的. 将蛹虫草类胡萝卜素在不同溶剂中的  $\lambda_{\text{max}}$  值和峰面积比 III / II 同 Rodriguez-Amaya 所列的 33 种类胡萝卜素<sup>[9]</sup> 的相关数值进行比较, 表明蛹虫草类胡萝卜素与这 33 种类胡萝卜素都不同, 其分子结构还有待于进一步确定.

蛹虫草中类胡萝卜素的产生与光照有一定关系, 在光照条件下, 蛹虫草中类胡萝卜素的含量随时间而发生变化, 表现在有一个类胡萝卜素产生的高峰期. 由此可以推测, 随着蛹虫草菌的生长, 培养基成分也在发生变化, 这也会影响到类胡萝卜素的产量.

## 参考文献:

- [1] Gregory A A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1997, 51: 629-659.
- [2] Tapiero H, Townsend D M, Tew K D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004, 58: 100-110.
- [3] Mitzka U, Rau W. Composition and photoinduced biosynthesis of the carotenoids of a protoplast-like *Neurospora crassa* "slime" mutant[J]. *Arch Microbiol*, 1977, 111(3): 261-263.
- [4] Avalos J, Bejarano E R, Cerda Olmedo E. Photoinduction of carotenoid biosynthesis[J]. *Methods Enzymol*, 1993, 214: 283-294.
- [5] 韩建荣, 徐军. 青霉 PT95 菌株固态发酵产生类胡萝卜素的研究[J]. *微生物学报*, 1999, 39(2): 148-153.
- [6] Schmidhauser T J, Lauter F R, Russo V E A, et al. Cloning, sequence and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*[J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 5064-5070.
- [7] Avalos J, Cerda Olmedo E. Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*[J]. *Curr Genet*, 1987, 11: 505-511.
- [8] 杨文, 刘炯, 吴晨曦. 从红酵母中提取色素[J]. *食品与发酵工业*, 1993, 4: 24-28.
- [9] Rodriguez Amaya D B. A guide to carotenoid analysis in foods[M]. Washington D C: ILSI Press, 2001. 14-22.

(责任编辑: 李春丽)