

人工培养长座线虫草子实体及其菌丝体的挥发性成分分析

张颖裕, 刘洋, 李扬眉, 张龙娃, 李春如*

(安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 首次采用同时蒸馏萃取法(SDE)提取了人工培育的长座线虫草子实体及摇瓶菌丝体的挥发性成分, 并用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)进行了分析。结果表明, 不同培养方式对长座线虫草挥发性物质的数目和含量有较大影响, 对挥发性成分的类型影响较大, 液体摇瓶菌丝体挥发性物质种类主要有: 酮类、醇类、烷烃类、烯烃类、醌类和醚类化合物; 子实体中挥发性物质种类主要有: 醇类、醛类和酚类。液体摇瓶菌丝体鉴定出 20 种挥发性物质, 以 1-辛烯-3-醇(37.70%)为主, 人工培养子实体鉴定出 6 种挥发性物质, 以 1-辛烯-3-醇(51.93%)和 2,6-二叔丁基对甲苯酚(38.37%)为主。2 种人工培养物挥发性物质的共有成分为共有成分 1-辛烯-3-醇、2, 6-二叔丁基对甲苯酚在菌丝体中占 51.66%, 在子实体的挥发性成分中占 90.30%。

关键词: 长座线虫草; 菌丝体; 子实体; 挥发性成分; SDE; GC-MS

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)06-0994-05

Volatile components in mycelia and fruiting bodies of the artificial culture of *Ophiocordyceps longissima*

ZHANG Yingyu, LIU Yang, LI Yangmei, ZHANG Longwa, LI Chunru

(Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The volatile compounds were extracted from the mycelia and fruiting bodies of the artificial culture of *Ophiocordyceps longissima* using simultaneous distillation and extraction (SDE) method. Their volatile components were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that culture conditions had great influence on the content and number of volatile components; however, little impact on component classes was observed. The main volatile substances in mycelia were ketones, alcohols, alkenes, phenols and ethers, while alcohols, aldehydes, and phenols are main volatile compounds in fruiting bodies. Twenty compounds were detected in the mycelia liquid in which the content of 1-octene-3-alcohol (37.70%) was the highest. Six compounds were identified from the artificial culture of the fruiting bodies with the content of 1-octene-3-alcohol (51.93%) and butylated hydroxytoluene (38.37%) being relatively high. The compounds of 1-octen-3-ol and butylated hydroxytoluene are two common constituents in both artificial cultures and their contents were accounted for 51.66% and 90.30% of the total volatile components in mycelia and fruiting body, respectively.

Key words: *Ophiocordyceps longissima*; fruiting body; mycelia; volatile component; SDE; GC-MS

泛义的虫草属真菌是一类寄生于昆虫体上并利用寄主的营养完成其生活史的虫菌复合体, 是一类具有复型生活史的真菌。研究表明, 虫草属真菌含有多种生物活性物质, 具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、杀虫、增强人体免疫等功能, 能治疗人体多种疾病, 在医药、农业、食品工业及现代技术应

用中具有广泛的应用价值^[1-2]。

长座线虫草 *Ophiocordyceps longissima* (Kobayasi) Sung et al. 是寄生于同翅目蝉若虫上的一种重要的虫生真菌, 其无性型为长座被毛孢 *Hirsutella longissima*。1963 年在日本首次发现^[3]。1999 年, 在国内首次采到此虫草, 并成功培育出未成熟的子

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(30570004), 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2007AA021506) 共同资助。

作者简介: 张颖裕, 硕士研究生。

* 通信作者: 李春如, 博士, 教授。E-mail: chunruli@hotmail.com

座和孢梗束^[4]。最近, 关于人工培育长座线虫草子实体方法获得了国家发明专利^[5]。Sung 等人对长座线虫草菌丝体的适宜生长条件进行了探索^[6]。目前, 关于长座线虫草其他方面的研究未见报道。

本研究采用同时蒸馏萃取法, 可以实现对挥发性成分的较大保留^[7-8], 利用气象色谱—质谱联用 (GC-MS) 对挥发性物质进行定量定性分析^[2,9], 比较不同人工培养物挥发性成分的差异, 为规模开发利用长座线虫草奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 长座被毛孢 RCEF 3891 为专利菌株, 由安徽农业大学虫生真菌研究中心提供。该菌株现已保藏在中国科学院微生物菌种保藏中心, 编号为 CGMCC No.5826。

1.1.2 培养基 液体摇瓶培养液: 马铃薯 200 g (切成小块, 加水煮沸 20 min, 过滤, 弃渣), 葡萄糖 10 g, 麦芽糖 10 g, 蛋白胨 10 g, $MgSO_4$ 1.5 g, KH_2PO_4 3 g, 复合维生素 B₄ 每升 1 片, 柠檬酸三胺 0.4 g, 加蒸馏水至 1000 mL, pH 为 6.0。人工子实体培养基: 以大米为介质, 料液比为 1:2, 浸泡 2 h, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器和试剂 LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海华线医用核子仪器有限公司); ZHJH-C 豪华型超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司); HZQ-F160 全温震荡培养箱 (哈尔滨东联电子公司); GZX-300BS-III 光照培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); 人工模拟环境培养室 (合肥兴科石化设备技术有限公司), SHZ-D 循环水式真空泵 (河南巩义予华仪器有限责任公司); 040520111G 冷冻干燥系统 (美国 Labconco 公司); FA/JA 电子天平 (上海良平仪器仪表有限公司); GC7890A-MSD5975C 气相色谱与质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); 同时蒸馏萃取装置 (simultaneous distillation-extraction), 简称 SDE, (合肥市悦达化玻经营部); 分析纯无水乙醚为上海振企化学试剂有限公司产品; 高纯氦气, 纯度为 99.999%, 购自合肥众益化工产品有限公司。

1.2 样品制备

1.2.1 菌丝体及子实体准备 液体摇瓶培养: 250 mL 的三角瓶装营养液 100 mL, 用接种针挑取一定量的斜面种子接种到液体培养基中, $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、25 °C 的全温振荡培养箱中震荡培养 10 d。真空抽滤得到菌丝体, 并用蒸馏水滤洗 3 次, 冷冻干燥, 粉碎备用^[10]。

人工子实体培养: 400 mL 的罐头瓶装取 20 g 大米, 营养液 40 mL, 浸泡 2 h, 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却, 用移液枪吸取 9 mL 种子液均匀接种于罐头瓶内, 置于人工模拟环境培养室中, 前期黑暗培养, 待菌丝体铺满瓶底后光照培养 40 d, 采摘子实体, 冷冻干燥, 粉碎备用^[11]。

1.2.2 气质样品制备 分别称取长座线虫草菌丝体冻干粉 10 g, 置于 1000 mL 圆底烧瓶中, 加入 400 mL 去离子水, 安装 SDE 装置, 用电热套加热并保持水的沸腾; 另取 500 mL 圆底烧瓶, 装入 50 mL 无水乙醚, 以水浴锅加热, 在 (45 ± 1) °C 温度下连续蒸馏萃取 4 h; 冷却至室温, 弃去水 (下层), 用旋转蒸发仪浓缩至 5 mL, 然后用分析纯 N₂ 吹去溶剂, 将样品浓缩至 1 mL, 过滤, 吸取 500 μL 于样品瓶内, 4 °C 保存, 备用^[8,12]。人工培养子实体冻干粉的操作步骤同上。

1.3 GC-MS 检测

GC-MS 分析仪器采用美国安捷伦公司气象色谱与质谱联用仪 (GC7890A-MSD5975C)。检测条件: 色谱柱为 HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 进样口温度: 230 °C; 进样量: 1 μL ; 不分流; 接口温度为 280 °C; 电离方式 EI; 电子能量 70 eV; 质谱扫描范围为 45~400 amu。载气 (He) 流量: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 程序升温: 初温 60 °C, 保持 1 min, 以 $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 上升到 200 °C, 保持 5 min, 再以 $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 上升到 250 °C, 程序结束^[13-17]。

1.4 数据分析

数据经 Xcalibur 工作站中的 NIST 质谱库检索, 并结合有关文献人工图谱解析鉴定, 确定各色谱峰对应的化学物质。并用色谱峰面积归一化法测定得各挥发性成分的峰面积。

2 结果与分析

按上述试验条件, 分别对长座线虫草摇瓶培养

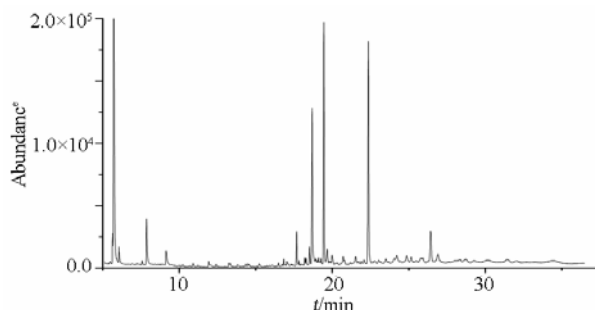


图 1 长座线虫草菌丝体中挥发性成分的总离子流图谱
Figure 1 Total ion chromatogram of volatile constituents in mycelia of *Ophiocordyceps longissima*

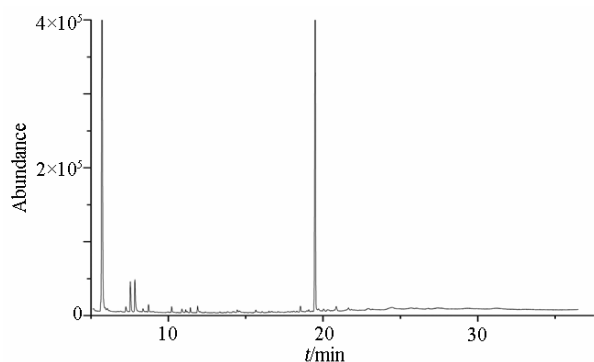


图 2 长座线虫草子实体中挥发性成分的总离子流图谱
Figure 2 Total ion chromatogram of volatile constituents in fruiting body of *Ophiocordyceps longissima*

菌丝和人工培养子实体的挥发性成分进行了 GC-MS 分析。GC-MS 总离子图分别见图 1 和图 2。通过检索 MS 图库 NIST2005, 并结合人工图谱解析和鉴定化学成分结构, 通过峰面积归一法确定了各

成分的相对百分含量。

2.1 液体摇瓶菌丝体挥发性成分分析

通过 GC-MS 分析, 从液体培养菌丝体挥发物中共鉴定出 20 种化学成分 (见表 1), 20 种挥发性成分中相对含量较高的物质有 (以占挥发物质总量计): 1-辛烯-3-醇 (37.70%)、 α -柏木烯 (16.66%)、2,6-二叔丁基对甲苯酚 (13.96%)、5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮 (10.82%) 等。

2.2 固体培养子实体挥发性成分的 GC-MS 分析

通过 GC-MS 分析, 从人工培养子实体挥发物中共鉴定出 6 种化学成分 (见表 2)。其中相对含量的较高的挥发性物质有 (以占挥发物质总量计): 1-辛烯-3-醇 (51.93%)、2,6-二叔丁基对甲苯酚 (38.37%) 等。相对含量较低的壬醛 (0.72%)、2-甲氧基-2,3-二氢呋喃-3-醛 (0.77%) 在菌丝粉中未发现。

表 1 长座线虫草菌丝体中挥发性成分的 GC-MS 分析

Table 1 GC-MS analysis of volatile components in the mycelia of *Ophiocordyceps longissima*

序号 No.	保留时间/min RT	化合物名称 Compound name	分子式 Formula	相对含量/% Relative content
1	5.64	1-辛烯-3-酮 1-Octen-3-one	C ₈ H ₁₄ O	1.18
2	5.73	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	37.70
3	6.06	3-辛醇 3-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	1.20
4	7.86	反式-2-辛烯-1-醇 (E)-2-Octen-1-ol	C ₈ H ₁₆ O	3.43
5	9.14	苯乙醇 Phenylethyl Alcohol	C ₈ H ₁₀ O	1.45
6	16.83	1,7,7-三甲双环[2.2.1]庚-5-烯-2-酮 1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-one	C ₁₀ H ₁₄ O	0.35
7	17.68	1,2-二甲撑环己烷 1,2-bis(methylene)-Cyclohexane	C ₈ H ₁₂	1.86
8	18.21	雪松烯 Di-epi- α -cedrene-(I)	C ₁₅ H ₂₄	0.38
9	18.29	2,6-二叔丁基-1,4-苯醌 2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione,2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	0.46
10	18.52	4-羟基-3-叔丁基-苯甲醚 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1.07
11	18.69	5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮 2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-6-pentyl-	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	10.82
12	19.45	2,6-二叔丁基对甲苯酚 Butylated Hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	13.96
13	19.67	5-氨基-1-乙基吡唑 5-Amino-1-ethylpyrazole	C ₅ H ₉ N ₃	1.66
14	19.99	2-羟基-4,6-二甲氧基苯乙酮 Ethanone, 1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	0.96
15	20.71	橙花叔醇 Nerolidol 2	C ₁₅ H ₂₆ O	0.45
16	21.53	正十六烷 Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	0.65
17	22.37	α -柏木烯 α -Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	16.66
18	24.22	氯代十四烷 Tetradecane, 1-chloro-	C ₁₄ H ₂₉ Cl	1.07
19	26.43	2,3-二乙基-4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-十氢-苯并环十二碳烯 Benzocyclododecene, 2,3-diethyl-4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-decahydro-	NF	3.47
20	26.92	4-(1,3,3-三甲基-6-氮二环[3.2.1]辛烷-甲酰基)-苯胺 Benzenamine, 4-(1,3,3-trimethyl-6-azabicyclo[3.2.1]octan-ylcarbonyl)-	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O	1.22

注: NF 未查到。Note: NF=not found.

表 2 长座线虫草子实体中挥发性成分的 GC-MS 分析

Table 2 GC-MS analysis of volatile components in the fruiting body of *Ophiocordyceps longissima*

序号 No.	保留时间/min RT	化合物名称 Compound name	分子式 Formula	相对含量/% Relative content
1	5.72	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	51.93
2	7.55	反-2-辛烯醛 2-Octenal, (E)-	C ₈ H ₁₄ O	3.79
3	7.84	2-辛烯-1-醇 2-Octen-1-ol, (Z)-	C ₈ H ₁₆ O	4.42
4	8.72	壬醛 Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	0.72
5	11.89	2-甲氧基-2,3-二氢呋喃-3-醛 Furan-3-carboxaldehyde, 2-methoxy-2,3-dihydro-	C ₆ H ₈ O ₃	0.77
6	19.49	2,6-二叔丁基对甲苯酚 Butylated Hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	38.37

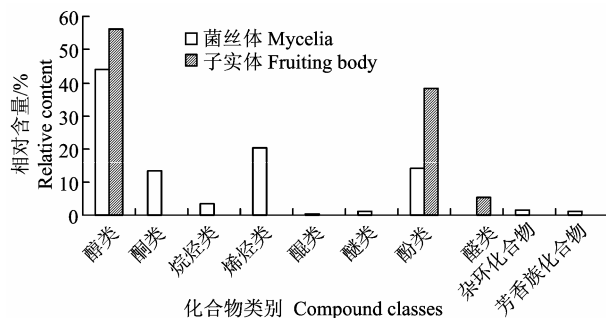


图 3 长座线虫草 2 种人工培养物中挥发性物质类别及相对含量

Figure 3 Type and relative content of volatile substances in the two kinds of artificial culture of *Ophiocordyceps longissima*

3 讨论

3.1 长座线虫草 2 种人工培养物挥发物的共有成分比较

通过 GC-MS 分析发现, 2 种长座线虫草人工培养物的挥发物中都含有 1-辛烯-3-醇、2,6-二叔丁基对甲苯酚, 这 2 种物质在长座线虫草人工培养物中所占的比例较高, 但它们的相对含量有较大差别 (见图 3)。其中 1-辛烯-3-醇在人工培养子实体中含量最高 (51.93%), 是液体培养菌丝体 (37.70%) 中相对含量的 1.38 倍。1-辛烯-3-醇大量存在于几乎所有品种的蘑菇中, 又名松覃醇、蘑菇醇, 具有蘑菇香气和甜的草药样的味道, 常用于各种食品、香精的调香, 特别是蘑菇香精的调配中^[18-20], 因此人工培养子实体比菌丝体的蘑菇味更浓郁。在人工培养子实体中 2,6-二叔丁基对甲苯酚 (38.37%) 的相对含量是液体摇瓶菌丝体 (13.96%) 的 2.75 倍, 而 2,6-二叔丁基对甲苯酚通常叫作 BHT, 是一种油溶性的有机化合物, 主要在食品添加剂中作为抗氧化剂, 也用于化妆品、药物、飞机燃料、高分子、橡胶和石油制品中^[21-22]。

3.2 长座线虫草 2 种人工培养物挥发物的数目和类型比较

长座线虫草菌丝体中含有 18 种不同于子实体中的挥发性物质, 其中酮类 4 种 (13.31%)、醇类 4 种 (6.53%)、烷烃类 3 种 (3.58%)、烯烃类 3 种 (20.51%)、醛类 1 种 (0.46%)、醚类 1 种 (1.07%)、杂环化合物 1 种 (1.66%)、芳香族化合物 1 种 (1.22%); 子实体中含有 4 种特有成分, 其中醛类 3 种 (52.8%)、醇类 1 种 (44.2%)。菌丝体中的 5, 6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮具有椰子香味, 是一种抗生素类物质^[23-24]; α -柏木烯具有柏木、檀香气; 苯乙醇具有花香味; 子实体中的反-2-辛烯醛具有脂肪和肉类香气, 并有黄瓜和鸡肉香味; 壬醛具有玫瑰香味^[25]。所有这些挥发性物质是形成长座线虫草子实体特殊香味的重要组成部分。从图 3 可以看出化合物数目, 相比较人工培养子实体 (鉴定出 6 种) 的挥发性物质比液体瓶菌丝少的多, 可能因为长座线虫草的子实体的高致密性和其相对开放的培养环境更易氧化。

4 结论

从上面的分析可以得到以下结论: 2 种培养方式对长座线虫草挥发性物质的含量、数目有很大影响。液体摇瓶菌丝含有较多数目的挥发性成分。2 种培养物挥发性成分的类型差异较大, 液体摇瓶菌丝体主要为酮类、醇类、烷烃类、烯烃类、醛类、醚类和杂环化合物等, 而子实体主要以醇类、酚类和醛类为主。在这些化合物中, 1-辛烯-3-醇、2,6-二叔丁基对甲苯酚是 2 种人工培养物共有的挥发性成分, 且都是 2 种不同人工培养物挥发性成分的主要成分。从相对含量较高, 用途较广的挥发性成分考虑, 长座线虫草在医药化工领域具有一定开发潜力。

参考文献:

- [1] Sung G H, Hywel-Jones N L, Sung J M, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous

- fungi[J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57 (1): 5-59.
- [2] 张宁, 曹彭. 风味物质分离方法研究进展[J]. *中国调味品*, 1998(4): 7-11.
- [3] 李春如, 樊美珍, 黄勃, 等. 被毛孢属一新种—长座虫草的无性型[J]. *菌物系统*, 2001, 20(1): 29-34.
- [4] Kobayasi Y, Shimizu D. Monographic studies of *Cordyceps* 2. group parasitic on Cicadidae[J]. *Bulletin of the National Science Museum*, 1963, 6(3): 286-314.
- [5] 李春如, 樊美珍, 刘洋, 等. 一种人工培养长座虫草子实体的方法[P]. ZL201210180691.9.
- [6] Sung G H, Shrestha B, Han S K, et al. Growth and cultural characteristics of *Ophiocordyceps longissima* collected in Korea[J]. *Mycobiology*, 2011, 39(2): 85-91.
- [7] 闫克玉, 贾玉红, 闫洪洋. 水蒸气蒸馏萃取法和同时蒸馏萃取法提取款冬花挥发油的比较[J]. *河南农业科学*, 2008(7): 91-93.
- [8] 李炎强, 洗可法. 同时蒸馏萃取法与水蒸气蒸馏法分离分析烟草挥发性、半挥发性中性成分的比较[J]. *烟草科技*, 2000(2): 18-21.
- [9] 刘雪梅, 程宇红, 田 丁. 药用虫草属真菌的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 1999, 11 (2): 87-92.
- [10] 董建飞, 肖岩岩, 陈 超, 等. 台湾虫草子实体人工培养条件的初步研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2011(4): 298-301; 305.
- [11] 李春如, 樊美珍, 董建飞. 一种人工培养台湾虫草子实体的方法[P]. CN 10006137 A. 2011-08-03.
- [12] 闫克玉, 贾玉红, 闫洪洋. 水蒸气蒸馏萃取法和同时蒸馏萃取法提取款冬花挥发油的比较[J]. *河南农业科学*, 2008(7): 91-93.
- [13] Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation[J]. *Anticancer Research*, 2006, 26 (1A): 43.
- [14] 刘春香, 何付. 番茄、黄瓜的风味物质及研究[J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2003(2): 95-100.
- [15] 刘信中. 气相色谱法测定啤酒中低沸点风味物质含量[J]. *广州食品工业科技*, 2002(4): 32-33; 45.
- [16] 李祝, 刘爱英, 梁宗琦. 虫草菌素的生物活性及检测方法[J]. *食用菌学报*, 2002, 9(1): 57-62.
- [17] 陈安徽, 陈宏伟, 夏成润, 等. 几种虫草无性型菌株深层发酵菌丝体的有效成分分析[J]. *徐州工程学院学报*, 2007, 22(2): 5-9.
- [18] 王建新, 朱同胜. 食用香料 1-辛烯-3-醇的合成[J]. *无锡轻工大学学报: 食品与生物技术*, 1998, 17(1): 89-91.
- [19] 袁履冰, 周宁章. 叔丁酚类的性质, 用途及合成[J]. *辽宁化工*, 1994(6): 8-16.
- [20] 葛飞, 夏成润, 李春如, 等. 蝉拟青霉菌丝体与天然蝉花中化学成分的比较分析[J]. *菌物学报*, 2007, 26(1): 68-75.
- [21] 郑婷婷. 蛹虫草液体培养及其有效成分含量分析[D]. 西安: 西北大学, 2006.
- [22] 李康乐, 包佳源, 陆瑞利, 等. SDE-GC-MS 法分析三种虫生真菌菌丝中挥发性成分[J]. *菌物学报*, 2012, 31(1): 92-101.
- [23] Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, et al. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614[J]. *Planta Medica*, 2000, 66 (8): 756-758.
- [24] 侯秀云, 陈发奎. 百合化学成分分离和结构的鉴定[J]. *中草药*, 1998, 33 (12): 923-926.
- [25] 陈安徽, 李春如, 葛飞, 等. 古尼拟青霉小孢变种的主要有效成分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(12): 124-126.