

## 5 种虫生拟青霉高产 VE 菌株的筛选及优化

张延威, 韩燕峰, 梁建东, 梁宗琦\*, 周礼红

(1. 贵州教育学院化学系, 贵州贵阳550003; 2. 贵州大学生命科学学院真菌资源研究所, 贵州贵阳550025)

**摘要** [目的] 为从真菌中开发利用天然 VE 提供一定的科学依据和参考。[方法] 用紫外分光光度法测定 5 种虫生拟青霉中天然 VE 的含量, 采用正交试验对细脚拟青霉进行高产 VE 培养基的优化。[结果] 细脚拟青霉中的天然 VE 含量最高; 所得优化的培养基碳源为甘露糖, 氮源为尿素, 微量元素为铁, pH 值自然。[结论] 该研究中的真菌资源具有开发脂溶性物质的极大潜力。

**关键词** 虫草无性型; 虫生真菌; 代谢产物; 开发应用

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)04-01314-02

### Screening and Optimization of High-yield Strain of VE from Five Entomogenous Paecilomyces

ZHANG Yanwei et al (Department of Chemistry, Guizhou Educational College, Guiyang, Guizhou 550003)

**Abstract** [Objective] The aim of the study was to supply some scientific basis and reference for exploiting and utilizing natural VE from fungi. [Method] The natural VE contents in 5 entomogenous Paecilomyces were determined by ultraviolet spectrophotometry. The orthogonal experiment was used to optimize the medium with high yield of VE for Paecilomyces tenuipes. [Result] The natural VE content in *P. tenuipes* was highest. In the optimized medium, the carbon source was mannose, the nitrogen source was urea, the microelement was iron and the pH value was natural. [Conclusion] The fungi resource in the research had great potential of exploiting liposoluble matter.

**Key words** Anamorph of cordyceps; Entomogenous fungi; Metabolite; Exploitation application

维生素 E (Vitamin E) 又称生育酚, 通常为淡黄色油状, 不溶于水; 在无氧或氧化剂存在时, 对热、酸、碱一般稳定, 反之则氧化成醌类; 对可见光稳定, 但可被紫外光破坏。VE 在人体内不能自行合成, 必须从外界摄取<sup>[1-2]</sup>。VE 是一种很强的抗氧化剂, 可延缓机体衰老, 激发机体的免疫系统, 杀死新产生的变形细胞, 还能将某些恶性肿瘤细胞逆转为正常表现型的细胞, 具有维持结缔组织弹性、促进血液循环等功能。天然 VE 广泛分布于动植物组织中, 特别良好的来源有麦胚油、棉籽油、菜籽油、花生油、芝麻油以及油脂加工产物脱臭馏出物<sup>[3-5]</sup>。刘爱英等测定古尼虫草无性型—古尼拟青霉发酵菌丝中的各种营养物质时发现, VC 和 VE 含量较高<sup>[6]</sup>。虫生拟青霉不仅是重要的昆虫病原真菌, 可用于生物防治, 而且还能产生很多有用的次生代谢产物, 可用于医药、美容、饲料添加等领域。因此, 从虫生拟青霉中开发天然 VE 具有开发应用前景。韩燕峰等测定了多种拟青霉中的 VE 含量, 并对古尼拟青霉菌丝体提取天然 VE 的工艺进行了初步研究<sup>[7-8]</sup>。笔者测定了 5 种常见虫生拟青霉中的 VE 含量, 并对高产菌株进行优化, 以期从真菌中天然 VE 的开发利用提供一定的科学依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 供试菌株** 古尼拟青霉(*P. gummii* 5-19)、细脚拟青霉(*P. tenuipes* 01-05)、蝉拟青霉(*P. cicadae* 07)、玫烟色拟青霉(*P. fumosoroseus* 03)和蛹草拟青霉(*P. militaris* 04), 均保存于贵州大学真菌资源研究室。

**1.2 仪器和药品试剂** 紫外分光光度仪 752 型, 由上海第三分析仪器厂生产。甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、1,10-二氮杂菲、三氯化铁、磷酸均为国产分析纯。VE 标品购自 Sigma 公司。

**1.3 维生素 E 标准曲线的绘制** 生育酚还原三价铁离子成二价铁离子, 而二价铁离子与 1,10-二氮杂菲试剂产生有色反应, 在 510 nm 波长处有最大吸收。在一定浓度范围内, 吸收值与生育酚含量成正比例关系。

精密吸取标准生育酚溶液(2 mg/ml) 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 ml 于试管中, 均以无水乙醇稀释至 3.5 ml, 加 0.5 ml 6.0 mmol/L 1,10-二氮杂菲试剂(以 95% 乙醇配制, 其余为无水乙醇), 轻轻摇动试管片刻, 混匀, 再加入 0.5 ml 1.0 mmol/L 三氯化铁溶液, 15 s 后立即加入 0.5 ml 40 mmol/L 磷酸溶液, 混匀。按同样方法, 以无水乙醇为对照, 在光电比色计上于 510 nm 波长处测定有色溶液的光密度值。以光密度值为纵坐标, 相应的生育酚含量(μg) 为横坐标, 绘制工作曲线。

**1.4 维生素 E 的提取及测定** 参照何照范等的方法<sup>[9]</sup>。称取一定量制好的菌丝粉, 用滤纸包好, 置于 20 ml 95% 乙醇中浸泡 12 h。吸取乙醇浸泡液, 用 95% 乙醇补足至 20 ml, 加入 1 ml 饱和氢氧化钾溶液置于 30℃ 水浴锅中加热皂化 15 min。将皂化后的氢氧化钾-乙醇溶液全部倾入盛有 20 ml 蒸馏水的分液漏斗中, 加 20 ml 乙醚振摇抽提, 静置分层后, 将下层水相用 20 ml 乙醚抽提 2 次, 合并乙醚提取液于另一干净的分液漏斗中, 以蒸馏水洗去碱液, 用无水硫酸钠干燥, 过滤到烧瓶中, 用旋转蒸发器将乙醚蒸干, 再用 10 ml 无水乙醇溶解。取样品液 1~3 ml, 以无水乙醇稀释至 3.5 ml, 按“1.3”操作, 测定样品光密度, 计算 VE 含量。

**1.5 拟青霉菌株高产维生素 E 的筛选** 将试验用拟青霉菌株接于沙氏液体培养基中, 摇瓶培养 3~5 d, 待长成均匀的菌丝球后, 转接于查氏液体培养基中, 同样条件下摇床培养到前面所测的 VE 含量最高的天数后, 取下, 烘干菌丝, 测定 VE 含量。

**1.6 高产维生素 E 拟青霉菌株培养基的优化** 以查氏培养基为基本培养基(以初始 pH 值为准), 设计不同的碳源、氮源、微量元素及 pH 值, 比较不同的培养基配方对 VE 含量的影响, 其因素位级表见表 1。

**基金项目** 国家自然科学基金项目重大子项目(30499340); 贵州省国际科技合作重点项目计划; 贵州教育学院基金(社科 2006)。

**作者简介** 张延威(1979-), 男, 山西山阴人, 讲师, 从事真菌资源利用及分子生物学研究。\* 通讯作者。

收稿日期 2007-10-03

2 结果与分析

2.1 维生素 E 的标准曲线 VE 的标准曲线见图 1, 其回归方程为  $y = 0.00523x - 0.00031$ , 相关系数为 0.99962。其中,  $y$  为 510 nm 下的吸光度,  $x$  为维生素 E 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )。回归方程表明, 维生素 E 在 1 ~ 8  $\mu\text{g/ml}$  范围内与吸光度呈良好的线性关系。

表1  $L_{16}(4^4)$  正交试验因素

Table 1 Factors in orthogonal test  $L_{16}(4^4)$

编号 No.	A(碳源) Csource	B(氮源) Nsource	C(微量元素) Microelement	D(pH 值) pHvalue
1	葡萄糖 Glucose	$\text{NaNO}_3$	铁 Fe	5
2	甘露糖 Mannose	尿素 Urea	锰 Mn	6
3	麦芽糖 Maltose	蛋白胨 Peptone	铜 Cu	7
4	洋芋粉 Yamflour	干酪素 Casein	锌 Zn	自然 pH 值 Natural pHvalue

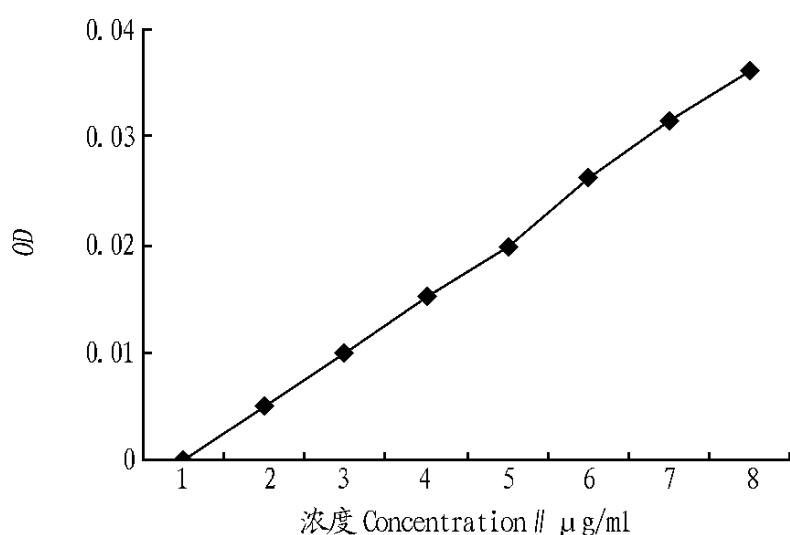
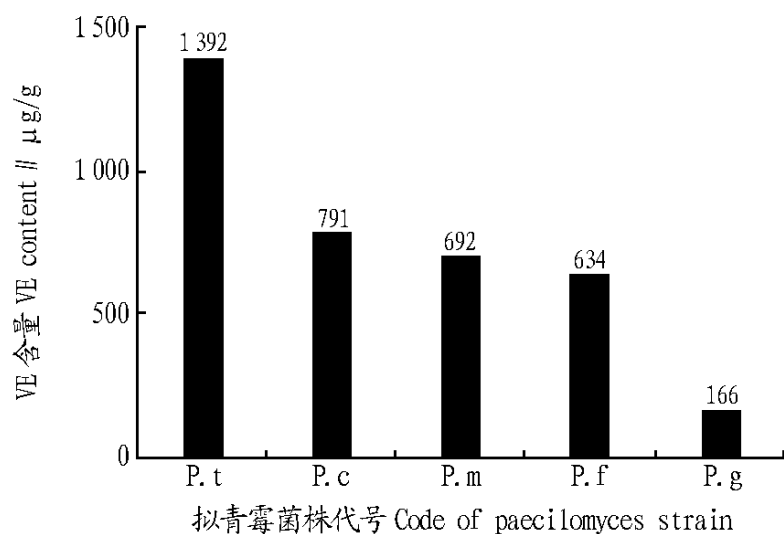


图1 维生素 E 的标准曲线

Fig.1 The standard curve of VE

2.2 5 种虫生拟青霉菌株维生素 E 含量的差异 由图 2 可知, 在相同培养条件下, 采用紫外分光光度法测定的 5 种虫生拟青霉维生素 E 含量有明显的差异。其中, 细脚拟青霉 *P. tenuipes* 01-05 菌株 VE 含量最高, 达 1392  $\mu\text{g/g}$ , 而古尼拟青霉 *P. gunnii* 5-19 菌株含量相对较低, 仅达 166  $\mu\text{g/g}$ 。细脚拟青霉在天然维生素 E 的开发上展现了利用潜力。



注: P.t 为细脚拟青霉 01-05; P.c 为蝉拟青霉 07; P.m 为蛹草拟青霉 04; P.f 为玫烟色拟青霉 03; P.g 为古尼拟青霉 5-19。

Note: P.t means *P. tenuipes* 01-05; P.c means *P. cicadae* 07; P.m means *P. militaris* 04; P.f means *P. fumosoroseus* 03; P.g means *P. gunnii* 5-19.

图2 5 种虫生拟青霉维生素 E 的含量

Fig.2 VE content in 5 species of entomogenous Paecilomyces

2.3 培养基成分对细脚拟青霉 01-05 维生素 E 含量的影响

以查氏液体培养基为对照, 对细脚拟青霉的生物量和 VE 含量做极差分析。由表 2 可知, 氮源 (B) 对 VE 含量具有 0.01 水平显著的影响, 其次为微量元素 (C), 而 pH 值 (D) 的影响最小。因此, 各因素的最佳组合为  $A_2B_2C_1D_4$ , 即碳源为甘露糖, 氮源为尿素, 微量元素为铁, pH 值自然。

表2 培养基成分对细脚拟青霉 VE 含量的影响

Table 2 Effects of media components on VE content in *P. tenuipes*

处理 Treatment	A	B	C	D	比率 Ratio
CK					1.00
1	1	1	1	1	1.78
2	1	2	2	2	1.73
3	1	3	3	3	1.16
4	1	4	4	4	1.12
5	2	1	2	3	1.96
6	2	2	1	4	2.89
7	2	3	4	1	0.81
8	2	4	3	2	0.90
9	3	1	3	4	1.03
10	3	2	4	3	1.19
11	3	3	1	2	0.97
12	3	4	2	1	0.98
13	4	1	4	2	1.07
14	4	2	3	1	1.22
15	4	3	2	4	1.01
16	4	4	1	3	1.15
I	1.45	1.46	1.70	1.20	
II	1.64	1.76	1.42	1.17	
III	1.04	0.99	1.08	1.37	
IV	1.11	1.04	1.06	1.51	
R	0.53	0.77	0.64	0.34	

注: CK 值为查氏液体培养基发酵后菌丝的 VE 量, 其提取的 VE 设为 1。  
Note: VE content of CK is that fermented in Czapek liquid medium, assuming CK as 1.

3 讨论

虫生真菌是一类非常宝贵的微生物资源。它们不仅在害虫的生物防治方面起着重要作用, 而且在医药、食品和化妆品等领域都有广泛的应用。文中 5 种拟青霉都是常见的虫生真菌。它们具有镇静、镇痛、提高肌体免疫力、抗肿瘤等作用, 在医药、保健等方面有重要价值<sup>[10-14]</sup>。研究表明, 它们能产生脂溶性维生素 E, 而且不同的培养条件能影响 VE 的产量。从这些真菌资源中开发脂溶性物质有极大的潜力。

参考文献

[1] 韩燕峰, 梁宗琦, 刘爱英. 天然维生素 E 的开发应用前景 J. 贵州农业科学, 2003, 31(4): 70-72.  
 [2] 姚忠, 吴守一, 马海乐, 等. 维生素 E 及其工艺研究进展 J. 江苏理工大学学报, 1998, 19(5): 18-23.  
 [3] 雷炳福, 孙文登. 维生素 E 的生理作用与营养 J. 陕西粮油科技, 1996, 21(3): 19-23.  
 [4] 刘志诚, 于守祥. 营养与食品卫生学 M. 2 版. 北京: 人民出版社, 1988.  
 [5] D. 斯沃恩. 贝雷. 油脂化学与工艺学 M. 秦洪万, 译. 北京: 轻工业出版社, 1989.  
 [6] 刘爱英, 梁宗琦, 曹蕾. 古尼虫草人工培养物的营养成分含量分析 J. 贵州农业科学, 1991(2): 5-8.  
 [7] 韩燕峰, 梁宗琦, 周礼红. 古尼虫草 *Cordyceps gunnii* 无性型菌丝体中天然 VE 提取工艺研究 J. 贵州大学学报: 自然科学版, 2006, 23(4): 371-374.  
 [8] HAN Y F, LIANG Z Q, LIU A Y. Binary studies and application of fat-soluble ingredients from Paecilomyces spp J. Journal of Guizhou Agricultural University, 2004, 23(1): 171-172.

法进程。同时,国家环保总局将继续推进第三批、第四批规划环评试点,开展全国开发区(工业园区)环评执法专项检查,尽快促进规划环评由被动为主动“虚”变“实”。种种态势显示,中国的规划环评已从理论走向实践,规划环评中的分层评价、公众参与,在有关能源、交通、城市总体规划等方面已进行了试点。借鉴国外的成功经验,我国将全面开展规划环评,从层次上包括国家和地方两个层面,从行业上覆盖铁路、公路、港口、矿区、流域开发等领域,从全局和预防性角度推进可持续发展。

**2.3 环境信息披露及公众参与机制将进一步健全和完善** 信息披露(Information announcement)与公众参与(Public participation)环境影响评价既是贯彻环境民主原则的要求,又可以提高决策、建设项目的效率和公众对决策活动、建设活动的认同,更有助于提高公民的环境意识<sup>[7]</sup>。借鉴一些发达国家的做法<sup>[8-11]</sup>,我国政府正在加快这一制度的建设。2005年,两起事件倍受中外关注,也促成了《环境影响评价公众参与暂行办法》的出台。先是2005年4月13日,就社会各界广泛关注的“圆明园铺膜事件”(即圆明园东部湖底防渗工程环境影响评价事件),国家环保总局首次就一个建设项目单独召开了我国环保史上规模和影响最大的一次听证会<sup>[12]</sup>。经过100多天的争论、听证、评价、论证、审批,2005年7月7日,国家环保总局做出了要求该项目全面整改的决定。圆明园防渗工程空前的公众参与,在社会上引起了极大的反响。与“圆明园铺膜事件”截然不同的是:2005年11月13日,吉林省境内中国石油吉化公司双苯厂胺苯车间发生爆炸,百吨苯类污染物流入松花江,引发了震惊中外的“松花江”污染事件。这起重大水污染事件,给生态环境造成了无法估量的损害,凸显了我国环境信息披露和公众参与制度的不健全。经历了沱江污染、松花江污染、北江污染等重大环境事故,理论界和学术界人士也就信息披露,公众参与环境评价的途径、主体、范围、程序、救济明确,公民参与权的性质和内容、适当限制等一系列问题广泛进行了深入探讨和研究工作<sup>[13-17]</sup>。

2006年2月22日,国家环保总局出台《环境影响评价公众参与暂行办法》,成为2006年中国十大环境新闻之一。《办法》对《评价法》作了有益的细化和补充,规定了公众参与环境影响评价的具体内容、方式、期限和程序,使环境影响评价公众参与制度具备了可操作性,充实了公众参与权的内容;明确了公众参与的组织形式、程序和效力;标志着公众参

与环评有了实质性进展;表明了我国政府对公众知情权和表达权的重视。国家环保总局副局长潘岳强调,国家环保总局将以环评为突破口,建立一支覆盖环保行政许可各领域、各层次的环境信息披露制度,用更加具体的制度和更加可行的程序,来保证公众对环境事务的有效性。让公众充分行使《宪法》赋予的知情权、参与权、表达权、监督权,对各类环保公共事务进行深度参与。显然,健全和完善信息披露和公众参与机制,最大限度地听取民意、吸纳民智,实现民主、科学决策,防患于未然,把污染消灭在萌芽之中,对于真正发挥环评“环保第一关”的作用,无疑是未来我国环评的必然选择。

### 3 结语

我国所面临的环境现状形势严峻,只有提高全民环境意识,加大环保力度,强化包括环境评价在内的系列环境管理手段,才能实现环境的真正好转。随着环评力度的加大,环评层次的提升,环境信息披露与公众参与机制的健全,环境影响评价制度必将对我国的环境事业发挥更大的作用。

### 参考文献

- [1] 佚名. 全国人民代表大会常务委员会公报[J]. 北京:2004.
- [2] 李艳芳. 论公众参与环境影响评价中的信息公开制[J]. 江海学刊,2004(1):126-132.
- [3] 潘岳. 我们维护着环评法的权威性[N]. 法制日报,2005-06-20.
- [4] 李明光, 游江峰, 郑武. 战略环境评价在中国的发展及方法学探讨[J]. 中国·人口资源与环境,2003,13(2):23-26.
- [5] 李明光. 规划环境影响评价的工作程序与评价内容框架研究[J]. 环境保护,2003(7):31-34.
- [6] 陈漫, 李锡龙. 战略环评是构建环境友好型社会的切入点——访国家环境保护总局副局长潘岳[J]. 环境保护,2005(11):6-12.
- [7] 吕忠梅. 环境法新视野[M]. 北京:中国政法大学出版社,2000:257-259.
- [8] 李玉文, 孙洪刚. 我国环境影响评价公众参与的现状和对策[J]. 环境科学动态,2004(1):3-5.
- [9] 李艳芳. 美国的环境影响评价公众参与制度[J]. 环境保护,2001(10):33-34.
- [10] 陶红英. 美国环境法中的公民诉讼制度[J]. 法学评论,1990(6):60.
- [11] SHEPHERD A, BOWLER C. Beyond the requirements in improving public participation in EIA[J]. Journal of Environmental Planning and Management, 1997, 40(6):725-738.
- [12] 王灿发, 于文轩. “圆明园铺膜事件”拷问我国环境影响评价法[J]. 环境经济,2005(11):41-45.
- [13] 洪阳, 栾胜基. 中国环境影响评价中的公众参与[J]. 重庆环境科学, 1999,21(1):28-30.
- [14] 赵俊. 论我国环境法公众参与制度的缺陷及其完善[J]. 环境科学与技术,2005(2):54-55.
- [15] 何蕾. 论我国环境影响评价中的公民参与[J]. 法制与社会,2006(12):202-203.
- [16] 郑春宏, 沈林玲, 陶书峰. 环境影响评价中公众参与的问题与对策[J]. 环境科学与管理,2006,31(5):1-3.
- [17] 陆长清, 程浩. 环境影响评价中公众参与定量评价方法研究[J]. 环境科学与技术,1999(2):3-4.
- [18] 作用[J]. 中国免疫学杂志,1997,13(3):139-141.
- [19] 陈巍巍, 冯明光. 玫瑰色拟青霉的研究与应用现状[J]. 昆虫天敌, 1999,21(3):140-144.
- [20] 金丽琴, 吕建新, 袁谦, 等. 蝉拟青霉对大鼠免疫功能和血液生化指标的影响[J]. 温州医学院学报,2001,31(6):344-346.
- [21] 李祝, 梁宗琦, 刘爱英. 虫草菌素的生物活性及检测方法[J]. 食用菌学报,2002,9(1):57-61.

(上接第1315页)

- [9] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997:97-98.
- [10] 李淑芳, 孙光春, 熊正梅. 古尼拟青霉对心血管的作用[J]. 贵阳医学院学报,2000,25(3):244-248.
- [11] 吕建新, 金丽琴, 陈国荣, 等. 细脚拟青霉对大鼠腹腔巨噬细胞的激活