

# 北虫草子实体核酸的提取研究

丘明泉<sup>1</sup>, 莫树平<sup>1</sup>, 柏建玲<sup>1</sup>, 张菊梅<sup>1</sup>, 吴清平<sup>1, 2</sup>, 王惠惠<sup>1</sup>

(1. 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 广东广州 510070)

(2. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东广州 510663)

**摘要:** 本研究利用超声波辅助提取技术, 结合生物酶破壁技术, 以北虫草子实体为研究对象, 以核酸提取率为评价指标, 进行单因素实验和正交实验, 摸索食用菌子实体风味成分提取的方法及各工艺参数。研究结果表明: 影响北虫草子实体核酸提取率的因素从大到小依次为: 超声波功率>纤维素酶添加量>超声波处理时间>提取温度。最佳条件为: 超声波功率 175 W, 纤维素酶添加量 1.6 g/L, 超声波处理时间 50min, 提取温度 75℃, 提取率为 77.03%。

**关键词:** 北虫草; 超声波; 纤维素酶; 核酸提取

**文章编号:** 1673-9078(2012)10-1366-1368

## Extraction of North Cordyceps Nucleic Acid

QIU Ming-quan, MO Shu-ping, BAI Jian-ling, ZHANG Ju-mei, WU Qing-ping, WANG Hui-hui

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou 510070, China)

(2. Guangdong Huankai Microbiol Sci. & Tech. Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** In this article, the extraction of the flavor substance from North Cordyceps were studied. Using RNA extraction rate as evaluation indexes, the single factor experiments and the orthogonal experiment were designed and done. The results showed that the order of effects of extraction factors on extraction rate was: ultrasonic power > cellulase dosage > ultrasonic treatment time > extraction temperature. The best conditions were as follows: ultrasonic power 175 W, adding amount of the cellulase 1.6 g/L, ultrasonic treatment time of 50 min, and extraction temperature 75℃.

**Key words:** North cordyceps; ultrasonic; cellulase; nucleic acid extraction

北虫草(又称虫草花)是蛹虫草(*Cordyceps militaris*)人工栽培子实体的俗称。它是目前可进行人工栽培并大量生产的虫草属真菌。由于其含有的药用有效成分与天然的冬虫夏草相近, 而价格低廉了几十倍, 况且食用口感甚佳, 因此深受消费者欢迎, 是一种很有发展前景的药用真菌和保健食品。

据资料报道, 北虫草不仅含有丰富的蛋白质(是猪肉、牛肉、羊肉蛋白质含量的 1.8、1.5、1.9 倍)和氨基酸, 而且含有 30 多种人体所需的微量元素。其中磷的含量是冬虫夏草的 3.5 倍, 锌、铜、铁三种元素的含量是 28 种补益药平均值的 1.8、2.1 和 8.8 倍, 硒的含量与黄芪的含量相当。

而其主要药用成分有: 虫草素、虫草多糖、虫草

酸、超氧化物歧化酶(SOD)。其中虫草素具有抗病毒的功能, 能提高骨髓的造血机能, 升高白细胞, 抑制癌细胞的生长。并且有降血糖作用; 虫草多糖则具有扶正固本, 具有极强的免疫促进作用, 能促进淋巴细胞转化, 激活 T 细胞、B 细胞, 促进抗体形成; 虫草酸: 是止咳平喘的药效成分之一, 预防脑血栓心肌梗塞, 并具有利尿作用和免疫调节, 促进机体新陈代谢, 虫草酸可扩张冠状动脉, 增加红血球, 使回送心脏的血量增加, 而且能降血压; 超氧化物歧化酶(SOD): 可有效清除人体内超氧自由基, 保护免疫系统, 抗衰老和美容的作用, 亦可消除机体内超氧自由基, 具有抗衰老、抗癌、抑癌等作用。

由于北虫草子实体是革质的, 若采用常规的热热水抽提法, 其内含核酸抽提率也仅为 50%, 显然, 在规模化生产中, 必须寻找更有效的提取技术。

本研究利用超声波辅助提取技术, 结合生物酶破壁技术, 以核酸提取率为评价指标, 进行单因素实验

收稿日期: 2012-06-03

基金项目: 广东省国际合作项目(2011B050300014)

作者简介: 丘明泉(1979-), 男, 本科, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 吴清平, 研究员

和正交实验,探索北虫草子实体风味成分提取方法及各工艺参数,进而亦为食用菌子实体风味成分提取方法提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

北虫草 (*Cordyceps militaris*),来自广东新会的益元生物工程实业有限公司的产品(材料鉴定人:广东省微生物研究所研究员章卫民)。

### 1.2 试剂

纤维素酶:食品级,广州明远工贸有限公司;无菌生理盐水:自备;高氯酸、乙醇、乙醚、盐酸、氢氧化钠:AR,广东环凯微生物科技有限公司。

### 1.3 设备与仪器

752 紫外光栅分光光度计:上海第三分析仪器厂;Avanti J-301 高速冷冻离心机:德国 BECKMAN;DK-S26 电热恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司;HZQ-F100 振荡培养箱:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;KQ-50DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;DS-1 高速组织捣碎机:上海标本模型厂;101-1 电热鼓风干燥箱:上海浦东跃新仪器厂。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 核酸含量测定方法

采用紫外分光光度法测定核酸含量。用冷的高氯酸处理样品,除去酸可溶部分(核酸、核苷酸等),残渣脱脂,用稀碱处理分离 RNA 及 DNA,再用紫外分光光度法测定核酸含量,测定波长为 260 nm。

#### 1.4.2 核酸提取方法

利用超声波辅助提取技术,结合生物酶破壁技术,针对北虫草子实体进行单因素实验和正交实验,摸索食用菌子实体风味成分提取的方法及各工艺参数;将北虫草子实体拣选,去除杂质及泥沙,接着切碎成短杆状,置于烘箱中烘干,后用粉碎机切成 60~80 目粉状备用,最后按 1:20 比例加水调成混悬液后加热至一定温度进行试验;试验条件选择为超声波输出功率(50~200 W)、处理时间(0~60 min)、提取温度(35~95 °C)、纤维素酶添加量(0.4~2.0 g/L),分别进行单因素试验。根据单因素试验结果,以超声波功率、超声波处理时间、处理温度及纤维素酶添加量作为考察因素,每个因素选三个水平,进行正交试验,得出北虫草核酸提取最佳工艺条件。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 超声波功率对北虫草子实体核酸提取率的影响

表 1 结果表明,核酸提取率与超声波输出功率呈正相关,输出功率越大,提取率越高。功率在 50 W 时,基本无效。功率达到 100 W 时提取率明显增加。但随着超声波输出功率的增大,提取率增加趋势变缓。

表 1 不同超声波输出功率的核酸提取率

Table 1 Different ultrasonic power output of nucleic acid extraction yield

超声波输出功率/W	50	75	100	125	150	175	200
核酸提取率/%	30.03	42.21	60.33	67.25	72.36	76.40	78.19

### 2.2 超声波处理时间对北虫草子实体核酸提取率的影响

在处理温度 75 °C,超声波输出功率 175 W,不添加纤维素酶的条件下,变更处理时间,测定不同时间,子实体核酸的提取率。

表 2 不同处理时间的核酸提取率

Table 2 Effect of different processing time on nucleic acid extraction yield

处理时间/min	0	10	20	30	40	50	60
核酸提取率/%	7.52	35.38	52.37	67.40	73.31	77.27	78.19

表 2 结果表明,核酸提取率与提取时间呈正相关关系,随着提取时间增加,提取率增大。但明显变化出现在处理 50 min,以后的增加幅度变缓。

### 2.3 提取温度对北虫草子实体核酸提取率的影响

在处理时间 50 min,超声波输出功率 175 W,不添加纤维素酶的条件下,变更处理温度,测定不同温度,子实体核酸的提取率。

表 3 不同提取温度的核酸提取率

Table 3 Effect of extraction temperature on nucleic acid extraction yield

温度/°C	35	45	55	65	75	85	95
核酸提取率/%	45.33	52.14	60.03	68.45	76.24	77.36	76.28

表 3 结果表明,核酸提取率与提取温度有关,但当温度增加到 75 °C 以上时,提取率增加不明显。

### 2.4 纤维素酶添加量对北虫草子实体核酸提取率的影响

在处理时间 50 min,超声波输出功率 175 W,处理温度 75 °C 的条件下,变更纤维素酶添加量,测定不同纤维素酶添加量,子实体核酸的提取率。

表 4 不同纤维素酶添加量的核酸提取率

Table 4 Effect of cellulose enzyme dosage on extraction rate of nucleic acids

纤维素酶添加量(g/L)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
核酸提取率/%	45.02	56.12	62.35	77.16	78.22

表 4 结果表明,核酸提取率与纤维素酶添加量呈正相关,输出功率越大,提取率越高;但随着纤维素

酶添加量的增大,核酸提取率增加趋势变缓,当纤维素酶添加量增加到 1.6 g/L~20 g/L,核酸提取率增加不明显。

### 2.5 正交试验

根据单因素试验结果,以超声波功率、超声波处理时间、提取温度、纤维素酶添加量作为考察指标,每个因素选三个水平,选用  $L_9(3^4)$  进行试验,因素水平及结果见下表:

表 5 正交试验因素水平表

Table 5 The factors and levels of the orthogonal experiment

水平	因素			
	A(超声波功率/W)	B(超声波处理时间/min)	C(提取温度/°C)	D[纤维素酶添加量(% , g/L)]
1	150	30	75	1.2
2	175	40	85	1.6
3	200	50	95	2.0

表 6 正交试验结果

Table 6 The results of the orthogonal test results

实验号	A	B	C	D	核酸提取率/%
1	1	1	1	1	75.80
2	1	2	2	2	76.10
3	1	3	3	3	76.20
4	2	1	2	3	76.40
5	2	2	3	1	76.70
6	2	3	1	2	77.03
7	3	1	3	2	76.50
8	3	2	1	3	76.70
9	3	3	2	1	76.00
$K_1$	228.10	228.70	229.53	228.50	
$K_2$	230.13	229.50	228.80	229.63	
$K_3$	229.50	229.23	229.40	229.30	
R	0.677	0.267	0.243	0.376	

对其进行极差分析可知,影响北虫草子实体核酸提取率的因素从大到小依此为:超声波功率>纤维素酶添加量>超声波处理时间>提取温度。最佳条件为:超声波功率 175 W,纤维素酶添加量 1.6 g/L 超声波处理时间 50 min,提取温度 75 °C,提取率为 77.03%。

### 3 结论

3.1 在北虫草内含物中,核酸的含量并不高,但它只存在于细胞中,因此它的提取率可真实反映整个内含物的提取率。

3.2 在常规的热热水抽提中,其内含核酸抽提率也仅为 50%,故本文采用采用超声提取法进行北虫草子实体核酸提取。在对各因素采用响应面试验进行了优化,得到提取核酸的最佳工艺条件为:超声波功率 175 W,纤维素酶添加量 1.6 g/L,超声波处理时间 50 min,提取温度 75 °C,提取率为 77.03%。

### 参考文献

- [1] 向洪平,葛建芳,张蓝月.超声波辅助萃取功能性天然色素的研究与应用进展[J].江苏农业科学,2010,3:360-362
- [2] 赵淑英,盛永丽,李慧芝.超声波强化有机溶剂萃取 nimbin 的研究[J].江苏农业科学,2010,2:303-304,309
- [3] 项昭保,霍丹群,任绍光.超声波在中草药化学成分提取中的应用[J].自然杂志,2001,23(5):289-291
- [4] 李超,王卫东.原花青素提取方法的研究进展[J].粮油加工,2009,9:145-148
- [5] 王倩倩,王振斌,王世清,等.葡萄籽多酚的超声波辅助提取技术[J].江苏农业科学,2011,39(6):436-438
- [6] 蔡其辉,田宏现,邓凯东,等.北虫草子实体营养成分分析[J].上海农业科技,2008,12:22-23
- [7] 魏宝阳,魏林,梁志怀,等.北虫草发酵菌丝体主要营养成分分析[J].湖南农业科学,2007,6:178-179
- [8] 季丽娜,陈葆春,刘洪德,等.北虫草制品免疫功能、调节血脂和抗疲劳功能与营养的实验研究[J].实用预防医学,2002,2:178-179
- [9] 史敏,赵宇,温学森.人工培养北虫草子座和培养基中多糖和核苷类成分的含量分析[J].食品与药品,2009,11(1):45-47
- [10] 石俊英,徐君,刘献宏,等.RP-HPLC 法测定北虫草中腺苷、虫草素含量[J].山东中医杂志,2008,27(10):706-708
- [11] 金晶,徐志宏,魏振承,等.超声微波辅助法提纯菜籽蛋白的研究[J].现代食品科技,2009,25(3):275-278,265
- [12] 吴建中,欧仕益,汪勇.甘蔗叶中黄酮类物质的提取及其抗氧化性研究[J].现代食品科技,2009,25(2):165-167