

北冬虫夏草抗氧化系统对金属离子和氧化物的响应分析

袁越¹, 何伟俊¹, 谭国桢¹, 赵逸¹, 陈海盈¹, 邹苑¹, 刘英丽², 郭丽琼^{1,3}, 林俊芳^{1,3}, 叶志伟^{1,3}

(1. 华南农业大学食品学院生物工程系, 食品生物技术研究, 广东广州 510642) (2. 北京工商大学中加食品营养与健康联合实验室, 北京 100048) (3. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要: 本研究探讨了 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 等金属离子和高锰酸钾、过氧化氢等氧化物对北冬虫夏草类胡萝卜素累积和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响, 结果表明 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 以及高浓度的 Mg^{2+} 对蛹虫草类胡萝卜素的积累起到抑制作用; Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 和低浓度的 Mg^{2+} 则能促进类胡萝卜素的积累; 低浓度的高锰酸钾和中高浓度的过氧化氢对类胡萝卜素的积累起抑制作用; 0.3%、0.4% 的高锰酸钾和 1% 的过氧化氢能促进类胡萝卜素的积累。其中促进北冬虫夏草类胡萝卜素积累效果最好的是 2% 的 Mg^{2+} , 该胁迫条件下类胡萝卜素产量达到 279.21 $\mu g/g$, 比空白对照组提升了 184.9%。 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 在低浓度时提高 SOD 活性, 高浓度时降低 SOD 活性, 当浓度均为 3% 时, SOD 活性最高; Cu^{2+} 则相反, 在低浓度时抑制 SOD 活性, 高浓度时提高 SOD 活性; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 SOD 的影响较为复杂, 随着浓度升高, SOD 活性先升高再下降再升高, SOD 酶活性峰值均出现在离子浓度为 1% 处; Na^{+} 对 SOD 活性整体影响不大; 高锰酸钾明显促进 SOD 酶的活性, 而过氧化氢明显抑制 SOD 酶活。其中促进北冬虫夏草 SOD 酶活效果最好的是 3% 的 Al^{3+} , 该胁迫条件下 SOD 酶活达到 167.62 U/g, 比空白对照组提升了 4.82 倍。研究结果显示, 金属离子和氧化物等胁迫因子能够引起北冬虫夏草抗氧化系的应激反应并在一定程度上提高抗氧化物质累积量, 这为利用北冬虫夏草菌丝体发酵生产抗氧化物质奠定实验基础。

关键词: 北冬虫夏草; 金属离子; 氧化物; 类胡萝卜素; SOD

文章编号: 1673-9078(2020)10-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0380

Response of Antioxidant System of *Cordyceps militaris* to Metal Ions and Oxidizing Agents

YUAN Yue¹, HE Wei-jun¹, TAN Guo-shen¹, ZHAO Yi¹, CHEN Hai-ying¹, ZOU Yuan¹, LIU Ying-li², GUO Li-qiong^{1,3}, LIN Jun-fang^{1,3}, YE Zhi-wei^{1,3}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. China-Canada Joint Lab of Food Nutrition and Health (Beijing), Beijing Technology & Business University, Beijing 100048, China) (3. Research Center for Micro-ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, the effects of metal ions such as Mn^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} and oxides such as potassium permanganate, hydrogen peroxide on the accumulation of carotenoids and the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) in *Cordyceps militaris* were investigated. The results showed that the accumulation of carotenoids in *C. militaris* was inhibited by Mn^{2+} , Cu^{2+} , and Mg^{2+} at a high concentration, but promoted by Na^{+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , and Mg^{2+} at a low concentration. The accumulation of carotenoids in *C. militaris* was

引文格式:

袁越, 何伟俊, 谭国桢, 等. 北冬虫夏草抗氧化系统对金属离子和氧化物的响应分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 1-7

YUAN Yue, HE Wei-jun, TAN Guo-shen, et al. Response of antioxidant system of *Cordyceps militaris* to metal ions and oxidizing agents [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 1-7

收稿日期: 2020-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801918, 31772373); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (食用菌) (2019KJ103); 广东省自然科学基金 (2016A030313404); 北京工商大学中加食品营养与健康联合实验室开放课题基金资助课题

作者简介: 袁越 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程

通讯作者: 叶志伟 (1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物与微生物工程

inhibited by potassium permanganate at a low concentration and hydrogen peroxide at a medium-high concentration, but promoted by potassium permanganate at 3% and 4% and hydrogen peroxide at 1%. Among which, Mg^{2+} at 2% promoted the greatest carotenoid accumulation in *C. militaris*. Under this stress condition, the carotenoid production reached 279.21 $\mu\text{g/g}$ (an increase by 184.9% compared with the control group). The activity of SOD was increased by Mn^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+} at low concentrations, but decreased by them at high concentrations, with the highest SOD activity occurring at the concentration of 3%. In contrast, the activity of SOD was inhibited by Cu^{2+} at low concentrations but increased at high concentrations. The effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on SOD were complicated. With an increase in their concentrations, the activity of SOD was increased initially, then decreased and finally increased, with the peak SOD activity occurring at the concentration of 1%. In general, Na^+ had little effect on SOD. The activity of SOD was promoted significantly by potassium permanganate, but inhibited by hydrogen peroxide significantly. Al^{3+} at 3% was the most effective to promote carotenoid accumulation in *C. militaris*. Under this stress condition, the activity of SOD reached 167.62 U/g (increased by 4.82 times compared with the control group). The research results showed that the stress factors including metal ions and oxides could induce the stress responses of the antioxidant system in *C. militaris* and increase the accumulation of antioxidants to a certain extent. These results have laid an experimental foundation for using *C. militaris* mycelium to produce antioxidants via fermentation.

Key words: *Cordyceps militaris*; metal ions; oxidizing agents; carotenoids; SOD

北冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) 又名蛹虫草、北虫草, 北冬虫夏草与冬虫夏草同属异种, 两者功效相似^[1]。自北冬虫夏草被关注研究, 发现北冬虫夏草具有免疫调节^[2]、抗癌^[3]、抑菌、抗感染、抗氧化^[4,5]和降血糖^[6]等多种生理功能。因为北冬虫夏草里面含有多样的化学成分如核苷类化合物、虫草酸甾醇类、虫草多糖、蛋白质氨基酸、多种矿物质、维生素、类胡萝卜素^[7]以及超氧化物歧化酶 (SOD) ^[8]。

类胡萝卜素是一类自然界中普遍存在于细菌, 真菌, 藻类和植物的有机化学色素^[9]。动物依靠饮食来获得足够水平的类胡萝卜素^[10]。由于类胡萝卜素在亲脂性环境中起抗氧化剂的作用, 因此对人体健康有益, 并可以降低各种疾病的风险, 特别是某些癌症和眼疾^[11,12]。近年来, 研究者发现在蛹虫草中有类胡萝卜素的存在, 蛹虫草能呈现出橙黄色就是因为其自身所含的类胡萝卜素造成的^[13]。

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是一种抗氧化酶, 能清除自由基, 在生物抗衰老、抗肿瘤以及辐射防护方面起到关键作用^[14]。动物植物微生物均能提取 SOD, 然而动物类的 SOD 原料成分复杂, 来源有限, 且存在使使用者过敏的风险, 植物类的原料具有来源广、生产工艺简单等优点, 而真菌生产 SOD 则更有优势: 高水平的抗氧化物呼吸作用^[15], 而且微生物培养周期较短, 与植物相比, 产率更高。

类胡萝卜素和 SOD 酶作为北冬虫夏草抗氧化系统中的重要活性物质, 使得北冬虫夏草对人体具有很高的养护抗氧化作用, 市场对这类抗氧化物质具有高需求, 因此本文尝试利用金属离子和氧化物进行胁迫, 观察北冬虫夏草的抗氧化系统作出如何反应, 对类胡萝卜素和 SOD 的产量有何影响。这对提高北冬虫夏

草中的抗氧化活性物质含量具有重要意义, 可以为开发抗氧化活性物质一系列产品提供参考, 为以后其工业化规模化的生产打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

北冬虫夏草 *Cordyceps militaris*, 菌株编号 CM-SCY01; 所用试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器

SPH-2102C 立式小容量恒温摇床, 购买于上海世平实验设备有限公司; MQT-60G 光照摇床, 购买于上海旻泉仪器有限公司; UV2310II 双光束紫外可见分光光度计, 购买于杭州奥盛公司; JY92-2D 超声波破碎机, 购买于宁波新芝公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法

菌种 CM-SCY01 经过活化及传代培养后, 用小刀切割 3 块 5 mm×5 mm 的菌块, 接种于 100 mL PDB 培养基中, 于 150 r/min、25 °C、黑暗条件下摇瓶 5 d。

1.2.2 添加胁迫因素

本实验的胁迫因素分为金属离子和氧化物, 其中金属离子分别为 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} , 氧化物分别为高锰酸钾和过氧化氢。金属离子组配置成质量分数分别为 0、1%、2%、3%、4%、5% 的金属氯化物溶液; 氧化物组中配置成质量分数分别为 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 和 0.5% 的高锰酸钾溶

液,和0%、1%、2%、3%、4%和5%的过氧化氢溶液。在黑暗摇瓶发酵5 d后,往发酵液中分别加入除菌的金属氯化物溶液和氧化物溶液,以10 mL蒸馏水作为空白对照,每个水平设置三个平行,于150 r/min、25℃、光照条件下摇瓶6 d。

1.2.3 发酵菌丝类胡萝卜素含量的测定

发酵液及发酵菌丝用4层纱布过滤,蒸馏水洗涤沉淀3次,去除沉淀中的玻璃珠以及接种时用的菌块(含琼脂),55℃烘干至恒重。称取0.5 g干菌丝体,按1:20加入10 mL 60%乙醇作为提取溶剂,50℃水浴30 min,8000 r/min离心10 min,取上清液于紫外分光光度计中进行全波长扫描,在400~600 nm中选择最大吸收波长445 nm作为类胡萝卜素的测定吸收波长^[16]。按以下公式计算类胡萝卜素含量:

$$\text{类胡萝卜素含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V \times D}{0.16W}$$

式中: A: 吸光度; V: 提取剂用量(mL); D: 提取液稀释倍数; E: 消光系数(0.16); W: 样品干重(g)。

1.2.4 粗酶液的制备

称取0.5 g中用蒸馏水洗涤后的菌丝,按料液比1:5加入2.5 mL 50 mmol/L的pH为7.4的PBS缓冲液(含1 mmol/L EDTA),冰浴以防止局部过热导致酶失活,于330 W超声提取,每次30 s,共进行30次,每次间隔10 s。提取完成后,8000 r/min离心10 min,上清液即为粗酶液^[15]。

1.2.5 SOD活性的测定

采用连苯三酚自氧化法测定菌丝体超氧化物歧化酶(SOD)的活性^[17]。SOD活定义为:5 min内,在325 nm吸收波长下,抑制每毫升反应液自氧化速率50%的酶量为一个单位(U)。

1.2.6 数据分析

试验数据采用SPSS 17.0软件进行多因素方差分析,显著性分析采用Tukey test进行多重比较,显著性水平设为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 金属离子对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

2.1.1 Mn^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

由图1可知,经 Mn^{2+} 处理过后的北冬虫夏草类胡萝卜素含量显著减少($p < 0.05$),且随着 Mn^{2+} 浓度升高,类胡萝卜素累积逐渐减少,说明 Mn^{2+} 对于北冬虫夏草菌丝体中类胡萝卜素的累积起到明显的抑制作

用。原因可能是 Mn^{2+} 影响了北冬虫夏草类胡萝卜素代谢途径相关酶的活性或菌丝细胞间的信号传递,对北冬虫夏草的细胞生长产生了影响。据文献报道^[15],北冬虫夏草中SOD酶为Cu, Zn-SOD。随着 Mn^{2+} 浓度升高,SOD酶活呈现出先上升后下降的趋势。低浓度的 Mn^{2+} 能提高蛹虫草中SOD活性,其中3%的 Mn^{2+} 处理后的北冬虫夏草菌丝体中SOD活性最高,达到61.97 U/g,比空白对照组提升了2.76倍。北冬虫夏草应对外界胁迫环境时会产生活性氧,而SOD是在消除活性氧的过程中起作用的第一种酶,单纯考虑这一点时,金属离子浓度越高,SOD活性也应该更高。但实际上,过高浓度的金属离子可能对蛹虫草的菌丝生长造成抑制效果,使得产生SOD的细胞数目更少。

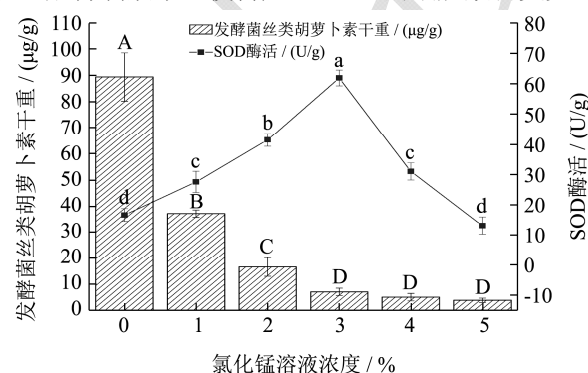


图1 Mn^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.1 Effects of Mn^{2+} on the antioxidant system of *C. militaris*

注:相同的大写字母表示类胡萝卜素含量在0.05水平无显著差异,不同小写字母表示在0.05水平差异显著;相同的小写字母表示SOD酶活在0.05水平无显著差异,不同小写字母表示在0.05水平差异显著;下同。

2.1.2 Cu^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

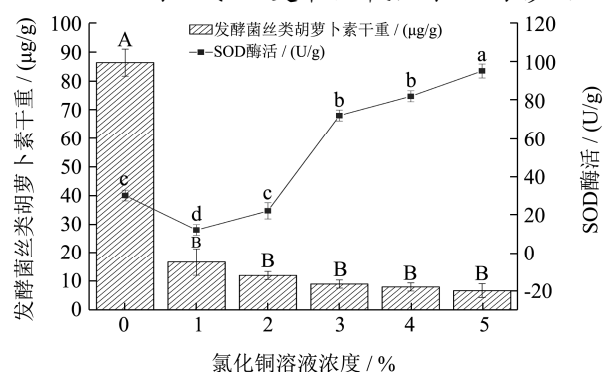


图2 Cu^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.2 Effects of Cu^{2+} on the antioxidant system of *C. militaris*

从图2中可以看出,加入 Cu^{2+} 后,北冬虫夏草的类胡萝卜素积累量显著下降($p < 0.05$),说明 Cu^{2+} 会明显抑制北冬虫夏草中类胡萝卜素的积累。有研究^[18]发现 Cu^{2+} 处理类胡萝卜素12 h后能明显降低类胡萝卜素溶液的吸光值,可能是 Cu^{2+} 降低类胡萝卜素稳定性从

而破坏了类胡萝卜素,使其无法累积。低浓度的 Cu^{2+} 溶液处理的蛹虫草菌丝体的 SOD 活性比空白对照组低,当 Cu^{2+} 溶液浓度不低于 3% 时, SOD 活性比空白对照组显著提高,5% 的 Cu^{2+} 溶液处理的北冬虫夏草的 SOD 活性最高,达到 95.10 U/g,比空白对照组提升了 2.17 倍。何卓晶等^[19]发现,当 Cu^{2+} 溶液浓度小于 0.3% 时(即培养基中 Cu^{2+} 浓度不超过 300 $\mu\text{g/mL}$), Cu^{2+} 可促进 SOD 酶活性;当 Cu^{2+} 溶液浓度在 0.3%~1% 时,随着 Cu^{2+} 溶液浓度增大, SOD 酶活降低。

2.1.3 Na^+ 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

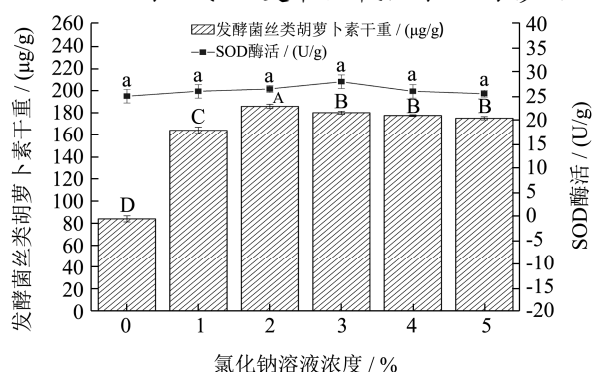


图3 Na^+ 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.3 Effects of Na^+ on the antioxidant system of *C. militaris*

如图3所示,添加了氯化钠后菌丝体中类胡萝卜素含量都比空白对照组显著增加,当氯化钠浓度大于3%时,类胡萝卜素积累无显著变化 ($p < 0.05$)。张颖鑫等^[20]研究也发现, Na^+ 的添加可明显提高红酵母菌类胡萝卜素的产量。在氯化钠浓度为2%的时候,北冬虫夏草中类胡萝卜素含量最高,达到 185.75 $\mu\text{g/g}$,比空白对照组提升了 121.13%,说明 Na^+ 明显促进了北冬虫夏草类胡萝卜素积累。加入了氯化钠后的北冬虫夏草中 SOD 活性变化幅度不大,可能是因为盐浓度与 SOD 的作用途径没有直接或间接关系。杨学山等^[21]研究不同金属离子在体外对 SOD 影响时也发现, Na^+ 对 SOD 活性几乎无影响。

2.1.4 Ca^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

不同浓度的氯化钙溶液对北冬虫夏草类胡萝卜素和 SOD 酶活的影响如图4所示。低浓度(1%~3%)的氯化钙溶液对类胡萝卜素的积累无显著影响 ($p < 0.05$),经4%与5%的氯化钙溶液处理后,发酵菌丝类胡萝卜素含量显著提高,与空白对照组相比,类胡萝卜素含量分别提高了 32.56%与 45.94%,其中 Ca^{2+} 浓度为5%时,北冬虫夏草类胡萝卜素含量达到 125.51 $\mu\text{g/g}$ 。有研究^[18]表明 Ca^{2+} 对类胡萝卜素的稳定性影响不大,且长时间处理后,吸光值差异不显著。随着添加的 Ca^{2+} 的浓度升高,北冬虫夏草菌丝体中 SOD 活性先升高再减低,其后又升高。1%的 Ca^{2+} 溶

液处理的北冬虫夏草的 SOD 活性最高,达到 50.9 U/g,比对照组提升了 112.08%。据相关文献报道^[21], Ca^{2+} 对 SOD 活性有一定激活和稳定作用。

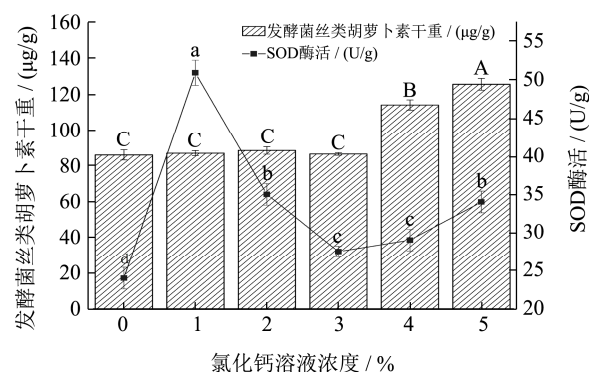


图4 Ca^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.4 Effects of Ca^{2+} on the antioxidant system of *C. militaris*

2.1.5 Mg^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

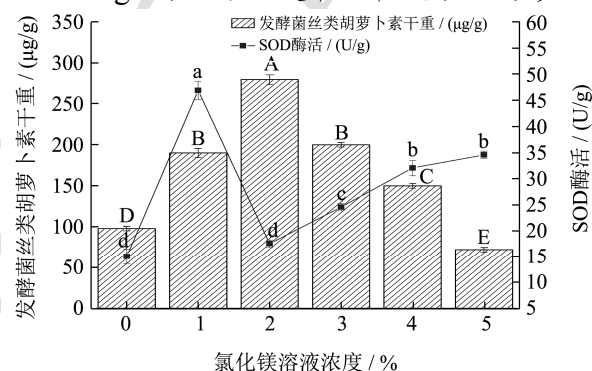


图5 Mg^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.5 Effects of Mg^{2+} on the antioxidant system of *C. militaris*

由图5可看出,加入1%~4%的 Mg^{2+} 溶液后,发酵菌丝中类胡萝卜素的积累显著增加 ($p < 0.05$),其中2%的 Mg^{2+} 浓度使类胡萝卜素积累量最高,达到 279.21 $\mu\text{g/g}$,比空白对照组提升了 184.90%,说明低浓度的 Mg^{2+} 可明显促进北冬虫夏草类胡萝卜素积累;而加入5%的 Mg^{2+} 溶液后,即培养基中最终 Mg^{2+} 质量浓度为 0.59%,则会使菌丝中类胡萝卜素含量低于对照组。经 Mg^{2+} 溶液处理的北冬虫夏草中, SOD 酶活均不低于对照组。1%的 Mg^{2+} 溶液处理后的蛹虫草的 SOD 活性最高,达到 46.81 U/g,比对照组提升了 2.12 倍;经2%的 Mg^{2+} 溶液处理后的北冬虫夏草的 SOD 活性降低,当浓度大于2%时,随着 Mg^{2+} 浓度逐步升高, SOD 活性呈升高趋势。 Mg^{2+} 作为北冬虫夏草培养基的营养成分之一,对蛹虫草类胡萝卜素具有良好的稳定性,且对 SOD 具有一定激活作用^[18]。

2.1.6 Ba^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

由图6可看出,在研究 Ba^{2+} 对北冬虫夏草积累类胡萝卜素的影响时,空白对照组、1%与2%的 Ba^{2+} 溶液影响下检测的类胡萝卜素含量并无显著区别

($p<0.05$)。在高浓度的 Ba^{2+} 刺激下,使得北冬虫夏草生成了更多的类胡萝卜素,其中 4% 的 Ba^{2+} 溶液处理后的菌丝的类胡萝卜素积累量最高,达到 $120.10 \mu\text{g/g}$,比对照组提升了 39.65%。经 Ba^{2+} 溶液处理的北冬虫夏草中,SOD 酶活均不低于对照组。其中 3% 的 Ba^{2+} 溶液处理后的菌丝的 SOD 活性最高,达到 82.21 U/g ,比对照组提升了 3.44 倍。当 Ba^{2+} 溶液浓度大于 3%,随着其浓度增大,相应菌丝体中 SOD 酶活呈下降趋势。

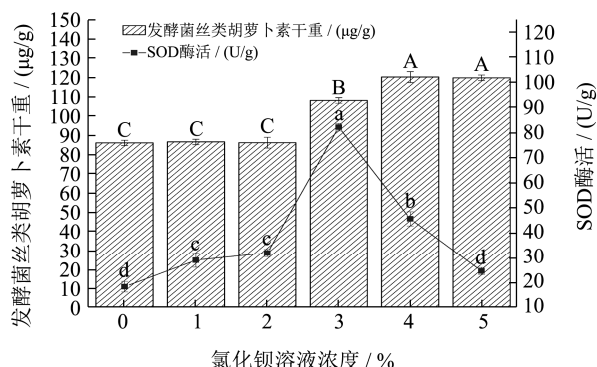


图 6 Ba^{2+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.6 Effects of Ba^{2+} on the antioxidant system of *C. militaris*

2.1.7 Al^{3+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

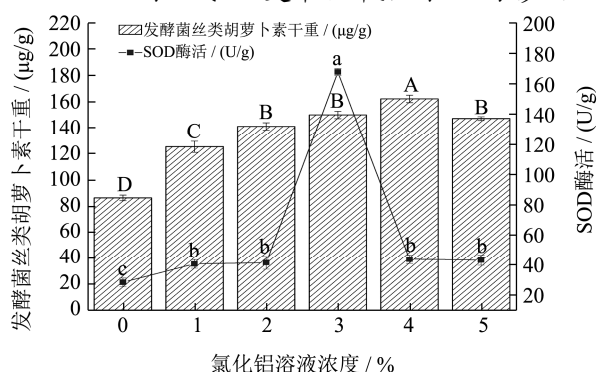


图 7 Al^{3+} 对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.7 Effects of Al^{3+} on the antioxidant system of *C. militaris*

如图 7 所示,经 Al^{3+} 处理后,CM-SCY01 中类胡萝卜素的积累量显著提高 ($p<0.05$),其中 4% 的 Al^{3+} 溶液使 CM-SCY01 的类胡萝卜素积累量最高,达到 $162.23 \mu\text{g/g}$,比对照组提升了 87.51%,说明 Al^{3+} 明显促进了北冬虫夏草类胡萝卜素积累。经 Al^{3+} 溶液处理的北冬虫夏草中,SOD 酶活均高于对照组。其中 3% 的 Al^{3+} 溶液处理的北冬虫夏草菌丝体中 SOD 活性最高,达到 167.62 U/g ,比空白对照组增加了 4.82 倍,其他浓度的 Al^{3+} 溶液对蛹虫草中 SOD 酶活的影响不大。可能的原因是 Al^{3+} 对蛹虫草的生长造成胁迫,迫使蛹虫草产生 SOD 来消除氧自由基,而高浓度的 Al^{3+} 对蛹虫草的生长起到了抑制作用,从而影响其 SOD 产量。

2.2 氧化物对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

2.2.1 高锰酸钾对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

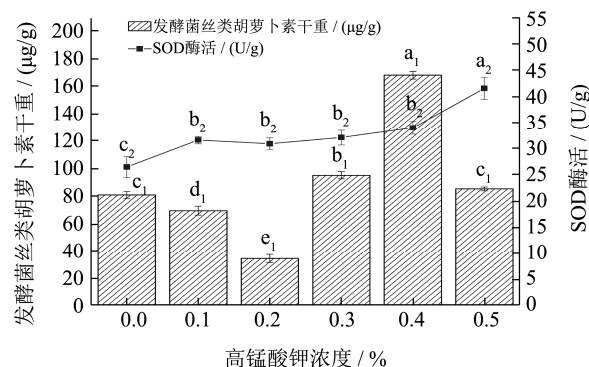


图 8 高锰酸钾对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.8 Effects of potassium permanganate on the antioxidant system of *C. militaris*

如图 8 所示,添加了高锰酸钾后,菌丝体中产类胡萝卜素含量出现先下降再上升最后下降的趋势。0.1% 和 0.2% 的高锰酸钾会明显抑制类胡萝卜素生产,而 0.3% 和 0.4% 的高锰酸钾会明显促进类胡萝卜素的生产 ($p<0.05$)。其中当高锰酸钾浓度为 0.4% 的时候,菌丝体中类胡萝卜素含量最高,达到 $168.05 \mu\text{g/g}$,比对照组提升了 108.24%。加入了高锰酸钾后,北冬虫夏草中的 SOD 酶活显著升高,可见高锰酸钾的强氧化性刺激了北冬虫夏草的抗氧化系统,相应的提高了 SOD 的活性。尤其当高锰酸钾浓度为 0.5% 的时候,SOD 的活性最高,达到 41.5 U/g ,比对照组提升了 57.2%。

2.2.2 过氧化氢对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

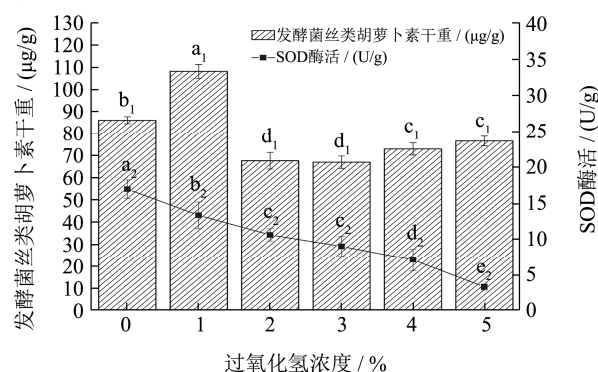


图 9 过氧化氢对北冬虫夏草抗氧化系统的影响

Fig.9 Effects of hydrogen peroxide on the antioxidant system of *C. militaris*

如图 9 所示,添加了过氧化氢溶液后,浓度为 1% 时北冬虫夏草菌丝体中类胡萝卜素的含量显著升高 ($p<0.05$),达到 $108.24 \mu\text{g/g}$,比对照组提升了 25.67%。

当过氧化氢浓度不低于 2%时,明显抑制菌丝体中类胡萝卜素的积累。类胡萝卜素具有抗氧化性,然而通过本实验结果发现,添加的强氧化剂仅在特定浓度下才对类胡萝卜素积累有促进作用。由于一些北冬虫夏草存在白化突变、退化的现象,因此本实验中有的实验组有可能正是因为北冬虫夏草发生了退化,导致对实验结果可能产生一定影响^[22]。而在过氧化氢的胁迫下,北冬虫夏草中的 SOD 活性明显受到抑制。由于过氧化氢是参与 SOD 的两步反应,作为其中之一的产物理论上会抑制 SOD 酶活的,周艳玲^[23]在测定北虫草 SOD 酶学特性时也证明了过氧化氢对 SOD 酶活有明显抑制作用。

3 结论

3.1 本实验研究表明, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对北冬虫夏草类胡萝卜素的积累起到抑制作用; Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 能促进北冬虫夏草类胡萝卜素的积累,使类胡萝卜素积累量最高的浓度分别为 2%、5%、4%、4%;随着 Mg^{2+} 浓度升高,类胡萝卜素累积量先上升后下降,促进效果最好的 Mg^{2+} 浓度为 2%。0.3%、0.4%的高锰酸钾和 1%的过氧化氢均能促进北冬虫夏草类胡萝卜素积累。其中促进北冬虫夏草类胡萝卜素积累效果最好的是 2%的 Mg^{2+} ,该胁迫条件下类胡萝卜素产量达到 279.21 $\mu g/g$,比空白对照组提升了 184.9%。

3.2 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 在低浓度时提高 SOD 活性,高浓度时降低 SOD 活性,最高 SOD 活性时的金属离子浓度均为 3%; Cu^{2+} 则相反,低浓度时会抑制 SOD 活性,当浓度不低于 2%时,离子浓度越大,酶活越高; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 SOD 的影响较为复杂,随着浓度升高, SOD 活性先升高再下降再升高, SOD 酶活峰值均出现在离子浓度为 1%处; Na^{+} 对 SOD 酶活整体影响不大。高锰酸钾明显促进 SOD 酶活,而过氧化氢明显抑制 SOD 酶活。其中促进北冬虫夏草 SOD 酶活效果最好的是 3%的 Al^{3+} ,该胁迫条件下 SOD 酶活达到 167.62 U/g,比空白对照组提升了 4.82 倍。

3.3 结果表明,在金属离子和氧化物的胁迫下,北冬虫夏草中的抗氧化系统做出了不同的应激反应,说明在适当的胁迫物下,提高北冬虫夏草中抗氧化物的产量是可行的。可以进一步通过比对转录组信息,找出实验组与对照组的 mRNA 差异来分析金属离子和氧化物对北冬虫夏草基因的表达是否有影响,从分子层面研究金属离子和氧化物对其累积类胡萝卜素与 SOD 的影响的机制。

参考文献

- [1] 张姝,张永杰,Bhushan S,等.冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J].菌物学报,2013,32(4):577-597
ZHANG Shu, ZHANG Yong-jie, Bhushan S, et al. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: research advances, issues and perspectives [J]. Mycosystema, 2013, 32(4): 577-597
- [2] Lee H H, Lee S, Lee K, et al. Anti-cancer effect of *Cordyceps militaris* in human colorectal carcinoma RKO cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis [J]. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 23(1): 35
- [3] LIU Fei, ZHU Zhen-yuan, SUN Xiao-li, et al. The preparation of three selenium-containing *Cordyceps militaris* polysaccharides: characterization and anti-tumor activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 196-204
- [4] ZHU Zhen-yuan, LIU Fei, GAO Hui, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 1090-1099
- [5] 张明亮,刘靖宇,常明昌,等.蛹虫草黄色素提取工艺优化及其体外抗氧化研究[J].菌物学报,2018,37(6):761-771
ZHANG Ming-liang, LIU Jing-yu, CHANG Ming-chang, et al. Extraction and anti-oxidative activity of yellow pigment from *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2018, 37(6): 761-771
- [6] 陈春娟,朱振元,陈璐.低分子量蛹虫草多糖降血糖活性的研究[J].现代食品科技,2017, 33(4): 25-30
CHEN Chun-juan, ZHU Zhen-yuan, CHEN Lu. Study of the hypoglycemic activity of low molecular weight polysaccharides from *Cordyceps militaris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 25-30
- [7] Dong J Z, Wang S H, Ai X R, et al. Composition and characterization of cordyxanthins from *Cordyceps militaris* fruit bodies [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(3): 1450-1455
- [8] 李陈雪,刘雅芳.蛹虫草的化学成分与药理作用研究进展[J].化学工程师,2019,33(10):55-57,54
LI Chen-xue, LIU Ya-fang. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of *Cordyceps militaris* [J]. Chemical Engineer, 2019, 33(10): 55-57, 54
- [9] Sandmann G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 385(1): 4-12
- [10] 孙玉敬,乔丽萍,钟烈洲,等.类胡萝卜素生物活性的研究进展[J].中国食品学报,2012,12(1):160-166

- SUN Yu-jing, QIAO Li-ping, ZHONG Lie-zhou, et al. Research progress of carotenoid biological activity [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(1): 160-166
- [11] Krinsky N I, Johnson E J. Carotenoid actions and their relation to health and disease [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2005, 26(6): 459-516
- [12] Joanna F, Květoslava B. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease [J]. Nutrients, 2014, 6(2): 466-488
- [13] 付鸣佳. 蛹虫草产类胡萝卜素的研[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 107-110
- FU Ming-jia. Study on the carotenoid produced from *Cordyceps militaris* L [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(5): 107-110
- [14] Gui-Qing L, Xue-Hong Q, Li C, et al. Scratching stimuli of mycelia influence fruiting body production and ROS-scavenging gene expression of *Cordyceps militaris* [J]. Mycobiology, 2018, 46(4): 382-387
- [15] 贺佳. 固体培养蛹虫草中 SOD 的提取分离和性质研究[D]. 西安: 西北大学, 2014
- HE Jia. Study on purification and characteristic of SOD from *Cordyceps militaris* by solid culture [D]. Xi'an: Northwest University, 2014
- [16] 殷林, 林俊芳, 钱璟, 等. 高产类胡萝卜素的蛹虫草液体培养基优化及其提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 79-84
- YIN Lin, LIN Jun-fang, QIAN Jing, et al. Optimization of the liquid culture medium composition for high carotenoid production by *Cordyceps militaris* and the investigation on the improvement of carotenoid extraction [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(18): 79-84
- [17] Xican L. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(25): 6418-6424
- [18] 高燕燕, 黄磊. 蛹虫草所产类胡萝卜素的稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 278-280, 286
- GAO Yan-yan, HUANG Lei. Study on the stabilities of carotenoid of *Cordyceps militaris* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(21): 278-280, 286
- [19] 何卓晶, 王尊生, 李素霞等. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 胁迫对蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 抗氧化酶活性及脂氧化水平的影响[J]. 药物生物技术, 2006, 1: 36-39
- HE Zhuo-jing, WANG Zun-sheng, LI Su-xia, et al. The effect of Cu^{2+} , Zn^{2+} stress on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation level of *Cordyceps militaris* [J]. Pharm Aceutical Biotechnology, 2006, 1: 36-39
- [20] 张颖鑫, 辛嘉英, 刘书娟, 等. 金属离子对红酵母菌产类胡萝卜素影响的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 65-67, 70
- ZHANG Ying-xin, XIN Jia-ying, LIU Shu-juan, et al. Effect of metal ion on carotenoid production by *Rhodotorula* sp. [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(1): 65-67, 70
- [21] 杨学山, 杨孝朴, 吴兵, 等. 金属离子对羊血超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 89-91
- YANG Xue-shan, YANG Xiao-pu, WU bing, et al. Effect of metal ions on activities of SOD extracted from sheep blood [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(1): 89-91
- [22] WANG Fen, LIU Qing, ZHANG Jiao-jiao, et al. Comparative transcriptome analysis between a spontaneous albino mutant and its sibling strain of *Cordyceps militaris* in response to light stress [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1237
- [23] 周艳玲, 陈文颖, 赵雯, 等. 北虫草超氧化物歧化酶的分离纯化及酶学特性[J]. 中国食用菌, 2010, 29(4): 28-31
- ZHOU Yan-ling, CHEN Wen-ying, ZHAO Wen, et al. Purification and characterization of superoxide dismutase from *Cordyceps militaris* [J]. Edible Fungi of China, 2010, 29(4): 28-31