

蝙蝠蛾拟青霉和中国弯颈霉蛋白质氨基酸分析及质量评价

汪家春¹, 张阵阵¹, 徐军², 李兆兰^{3*}, 栾洁¹, 陈雅琳¹

1. 第二军医大学海军医学研究所科技计划处, 医学科技信息中心, 上海 200433

2. 上海健康医学院医疗器械学院, 上海 200093

3. 南京大学生命科学院藻菌工程室, 南京 210093

[摘要] **目的** 对蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)和中国弯颈霉(*Tolypocladium sinensis*) 2种虫生真菌菌丝的蛋白质氨基酸进行含量分析及质量评价,为2种真菌的其他相关研究和应用提供依据。**方法** 采用盐酸水解法水解菌丝粉,用 Agilent 1200 高效液相色谱仪 C₁₈反相柱梯度进行分离,上柱前加入邻苯二甲酰-氯甲酸苄甲酯(OPA-FMOC)自动衍生化。参照标准品氨基酸,计算待测样品的氨基酸含量。**结果** 测定了17种蛋白水解氨基酸的含量,其中蝙蝠蛾拟青霉中有4种氨基酸(天冬氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸)的含量高于中国弯颈霉,中国弯颈霉中有11种氨基酸(谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、脯氨酸)的含量高于蝙蝠蛾拟青霉。中国弯颈霉氨基酸总量、必需氨基酸总量、非必需氨基酸总量高于蝙蝠蛾拟青霉,蝙蝠蛾拟青霉支链氨基酸含量高于中国弯颈霉。两者必需氨基酸的模式均符合世界卫生组织和联合国粮农组织(WHO/FAO)提出的必需氨基酸模式谱和参考标准。

结论 蝙蝠蛾拟青霉与中国弯颈霉均具有较高的营养价值,但两者的蛋白质氨基酸含量并不等同。

[关键词] 蝙蝠蛾拟青霉;中国弯颈霉;氨基酸类;必需氨基酸类;氨基酸比值系数

[中图分类号] R 284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2017)11-1462-05

Content analysis and nutritional evaluation of amino acids in *Paecilomyces hepiali* and *Tolypocladium sinensis*

WANG Jia-chun¹, ZHANG Zhen-zhen¹, XU Jun², LI Zhao-lan^{3*}, LUAN Jie¹, CHEN Ya-lin¹

1. Office of Scientific and Technical Research Administration, Medical Science & Technology Information Center, Navy Medical Research Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Medical Instrument, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 200093, China

3. Algae & Bacteria Engineering Room, College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To analyze the contents of amino acids in *Paecilomyces hepiali* (*P. hepiali*) and *Tolypocladium sinensis* (*T. sinensis*) and their nutritive values, so as to provide a basis for related researches and applications of the two kinds of fungi. **Methods** The mycelia of *P. hepiali* and *T. sinensis* were hydrolyzed with 6 mol · L⁻¹ HCl, and the amino acids from the mycelia were separated by C₁₈ reversed-phase column with gradient elution and *o*-phthalaldehyde-fluorenylmethyl chloroformate (OPA-FMOC) pre-column derivation using Agilent 1200 high-performance liquid chromatograph. The content of sample amino acids was determined by the peak areas ratio between the samples and standard amino acids. **Results** A total of 17 proteolytic amino acids from *P. hepiali* and *T. sinensis* were determined in this study. The contents of 4 kinds of amino acids (aspartic acid, valine, isoleucine and leucine) in *P. hepiali* were higher than those in *T. sinensis*, while the contents of 11 kinds of amino acids (glutamic acid, serine, glycine, threonine, arginine, alanine, tyrosine, cystine, methionine, lysine and proline) in *T. sinensis* were higher than those in *P. hepiali*. The total contents of amino acids, essential amino acids and non-essential amino acids in *T. sinensis* were higher than those in *P. hepiali*, and the content of branched chain amino acids in *P. hepiali* was higher than that in *T. sinensis*. World Health Organization/Food and Agriculture Organization (FAO/WHO) reference model of essential amino acids was used to evaluate the nutritional values of amino acids in *P. hepiali* and *T. sinensis*, and the

[收稿日期] 2017-05-16 **[接受日期]** 2017-11-09

[基金项目] 解放军总后勤部科研项目(11DJZ2b),上海市2016年度“科技创新行动计划”技术标准项目指南(16DZ0501400)。Supported by Project for Scientific Research of General Logistic Department of PLA (11DJZ2b) and 2016 “Science and Technology Innovation Action Plan” Technical Standard Project Guide of Shanghai (16DZ0501400)。

[作者简介] 汪家春,副研究员。E-mail: biyanj@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 025-83594059, E-mail: xujiejie@hotmail.com

results showed that the scores of ratio coefficient of amino acids in *P. hepiali* and *T. sinensis* were 92.06 and 88.17, respectively. **Conclusion** The contents of protein amino acids in *P. hepiali* and *T. sinensis* are different, but they both have relatively high nutritional values.

[**Key words**] *Paecilomyces hepiali*; *Tolypocladium sinensis*; amino acids; essential amino acids; ratio coefficient of amino acid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(11): 1462-1466]

蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)和中国弯颈霉(*Tolypocladium sinensis*)都是从冬虫夏草的菌核和子座的菌丝组织分离而得到的虫生真菌,有资料表明中国弯颈霉的基因测序结果与基因数据库收录的冬虫夏草的基因测序(登录号 AF291749)进行比对其相似性达 99%^[1]。我们前期研究发现天然冬虫夏草、冬虫夏草菌丝和发酵液中游离氨基酸的种类和含量并不相同^[2],但目前尚未见对蝙蝠蛾拟青霉和中国弯颈霉 2 种虫生真菌菌丝的蛋白质氨基酸分析和研究的报道。本研究采用世界卫生组织和联合国粮农组织(World Health Organization/Food and Agriculture Organization, WHO/FAO)提出的必需氨基酸模式谱作为评价的参考标准,对 2 种虫生真菌菌丝的蛋白质氨基酸进行含量分析和质量评价,并且与标准蛋白质的氨基酸模式^[3-7]进行比对,为 2 种真菌的其他相关研究和应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌种 蝙蝠蛾拟青霉和中国弯颈霉的菌种均是从冬虫夏草的菌核组织和子座产孢组织中分离获得的纯菌种^[8]。试管母种通过人工发酵培养而获得大量菌丝体,菌丝体经过冷冻干燥、粉碎,制成发酵菌粉,保存在 4 ℃ 以下,用于蛋白质氨基酸的分析。

1.2 试剂与仪器 氨基酸标准品购自美国 Sigma 公司。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。水为超纯水。Agilent 1200 高效液相色谱仪购于美国安捷伦公司, Hypersil Gold C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)购自美国赛默飞公司;D2900 型旋转式振荡器购自江苏省太仓市强乐实验设备厂;CP225D 型电子分析天平购自德国赛多利斯公司;JL 型超声波清洗器购自上海杰理科技有限公司。

1.3 样品溶液的制备 准确称取菌丝粉 200 mg,置于水解管中,加入 20 mL 6 mol/L 盐酸封管,在 110 ℃ 烘箱中水解 24 h 后,冷却,启封,过滤,定容至 10 mL,待测样品液上样。上柱前,向样品液中加入邻苯二甲醛-氯甲酸苄甲酯(*o*-phthalaldehyde-fluorenylmethyl chloroformate, OPA-FMOC),混合

均匀后自动衍生化,然后上柱,上样量 10 μL。

1.4 高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)技术测定游离氨基酸的含量^[2] 色谱柱为 Hypersil Gold C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 40 ℃,检测波长 338 nm。流动相 A 为 20 mmol/L NaAc + 0.3% 四氢呋喃、0.02% 三乙胺,流动相 B 为 100 mmol/L 醋酸钠-甲醇-乙腈(200:450:350, 体积比),pH 2.2。梯度:0~60 min, B 相 5% 升至 56%;60~64 min, B 相保持 56%;64~68 min, B 相 100%。流速 1.0 mL/min。采用外标法定量,参照标准品氨基酸,计算各种蛋白质氨基酸的含量。由于采用盐酸水解法,色氨酸不稳定,本研究对色氨酸的分析不讨论。

1.5 蛋白质氨基酸的质量评价 根据 WHO/FAO 提出和推荐的必需氨基酸模式和计算方法^[4-6],作为蛋白质氨基酸质量评价的参考标准。

1.5.1 必需氨基酸的质量分数 即每一种必需氨基酸占总氨基酸量的百分含量。WHO/FAO 根据氨基酸平衡理论设计了必需氨基酸模式谱,每一种必需氨基酸的质量分数越接近 WHO/FAO 模式谱其质量就越优。

1.5.2 必需氨基酸的氨基酸比值(ratio of amino acid, RAA)、氨基酸比值系数(ratio coefficient of amino acid, RC)和比值系数分(score of RC, SRC) 利用必需氨基酸模式计算样品中 RAA、RC 和 SRC。RAA 的含义为样品中蛋白质的某种必需氨基酸含量相当于模式中相应必需氨基酸的多少倍,计算公式:RAA=待测样品某必需氨基酸含量/模式中相应必需氨基酸含量。由于不同的食品和药品中各种必需氨基酸 RAA 往往不相同,故可计算 RAA 的平均数,从而计算 RC。RC=待测样品某必需氨基酸 RAA/RAA 的平均数。模式氨基酸的 RC 为 1,如果待测样品中蛋白质必需氨基酸组成含量比例与模式氨基酸一致,则待测样品中各种必需氨基酸的 RC 等于 1;RC 大于或小于 1 均表示偏离氨基酸模式,RC>1 表明该种必需氨基酸相对过剩,RC<1 则表明该种必需氨基酸相对不足。SRC=

100-CV×100,其中 CV 为 RC 的变异系数(CV=标准差/平均数)。如果生物制品的必需氨基酸组成比例与必需氨基酸模式一致,则 CV=0, SRC=100;生物制品蛋白质必需氨基酸的 RC 越分散,表明这些必需氨基酸在氨基酸平衡生理方面所起的负作用就越大,导致 CV 变大, SRC 变小,蛋白质的营养价值越差;相反, SRC 越接近 100,其氨基酸组成就越接近人体需要,其利用率就越高。

1.5.3 每种必需氨基酸在必需氨基酸总量中的含量 WHO/FAO 设计了一种标准蛋白质的必需氨基酸模式,该方法含义是:在标准蛋白质中每种必需氨基酸在必需氨基酸总量中所占的含量(mg·g⁻¹),依据标准蛋白质的模式含量为参考标准,对生物制品蛋白质的营养价值进行评定。

2 结果

2.1 2种虫生真菌菌丝的氨基酸组成 在2种虫生真菌菌丝的氨基酸分析中共测出17种氨基酸,其中7种为必需氨基酸,2种为半必需氨基酸(精氨酸、组氨酸)。2种真菌菌丝的蛋白质氨基酸含量差异较大,蝙蝠蛾拟青霉有4种氨基酸(天冬氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸)含量超过中国弯颈霉,而中国弯颈霉有11种氨基酸(谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、脯氨酸)含量超过蝙蝠蛾拟青霉。两者含量最高的氨基酸是谷氨酸,分别为20.69 mg/g和24.83 mg/g;含量最低的为蛋氨酸,分别为1.30 mg/g和2.20 mg/g。中国弯颈霉的氨基酸总量(203.05 mg/g)、必需氨基酸总量(68.03 mg/g)和非必需氨基酸总量(135.02 mg/g)都高于蝙蝠蛾拟青霉(分别为176.40、62.71和113.69 mg/g),蝙蝠蛾拟青霉的支链氨基酸含量(34.59 mg/g)高于中国弯颈霉

(32.00 mg/g),2种真菌支链氨基酸与芳香族氨基酸的比值较接近(分别为2.28和2.08)。详见表1。

表1 2种虫生真菌菌丝的蛋白质氨基酸含量

氨基酸	w _B /(mg·g ⁻¹)	
	蝙蝠蛾拟青霉	中国弯颈霉
天冬氨酸	17.44	15.45
谷氨酸	20.69	24.83
丝氨酸	11.84	13.95
组氨酸	5.17	5.14
甘氨酸	10.75	18.50
苏氨酸	8.94	9.20
精氨酸	12.07	16.25
丙氨酸	13.65	15.71
酪氨酸	5.82	6.04
缬氨酸	11.33	10.67
胱氨酸	6.07	7.96
蛋氨酸	1.30	2.20
苯丙氨酸	9.32	9.33
异亮氨酸	8.83	7.50
亮氨酸	14.43	13.83
赖氨酸	9.86	17.50
脯氨酸	10.18	11.19
氨基酸总量	176.40	203.05
必需氨基酸总量	62.71	68.03
非必需氨基酸总量	113.69	135.02
支链氨基酸总量	34.59	32.00
芳香族氨基酸总量	15.14	15.37
支链氨基酸/芳香族氨基酸	2.28	2.08

2.2 各种必需氨基酸占总氨基酸含量的质量分数 蝙蝠蛾拟青霉的各种必需氨基酸的质量分数与WHO/FAO模式谱比对后,除蛋氨酸+胱氨酸略低于WHO/FAO模式谱外,其他必需氨基酸均高于WHO/FAO模式谱标准;中国弯颈霉除亮氨酸略低于WHO/FAO模式谱外,其他必需氨基酸都高于WHO/FAO模式谱的标准(表2)。说明2种虫生真菌菌丝蛋白的必需氨基酸与推荐的人体必需氨基酸模式相比,其营养比较均衡,有很高的营养价值。

表2 2种虫生真菌菌丝各种必需氨基酸占总氨基酸的质量分数

氨基酸	质量分数		WHO/FAO 模式谱
	蝙蝠蛾拟青霉	中国弯颈霉	
苏氨酸	5.01	4.53	4.0
缬氨酸	6.42	5.30	5.0
蛋氨酸+胱氨酸	3.44	3.92	3.5
异亮氨酸	5.00	4.23	4.0
亮氨酸	8.18	6.81	7.0
苯丙氨酸+酪氨酸	8.58	7.46	6.0
赖氨酸	5.64	8.61	5.5

2.3 RAA、RC 和 SRC 氨基酸的营养价值主要由

必需氨基酸的种类、数量和组成比例决定。蛋白质

中所含必需氨基酸组成比例越接近人体必需氨基酸比例,其质量越好。为了确定 2 种冬虫夏草中氨基酸的营养价值,将其所含必需氨基酸与 WHO/FAO 推荐的氨基酸模式谱标准值进行比较,2 种冬虫夏

草种各种必需氨基酸的 RAA、RC、SRC 结果见表 3。蝙蝠蛾拟青霉中的蛋氨酸+胱氨酸 RC 最小,其次为赖氨酸,缬氨酸最大。而中国弯颈霉中亮氨酸的 RC 最小,其次为异亮氨酸,赖氨酸最大。

表 3 2 种虫生真菌菌丝必需氨基酸的 RAA、RC 和 SRC 分析

氨基酸	蝙蝠蛾拟青霉			中国弯颈霉		
	RAA	RC	SRC	RAA	RC	SRC
苏氨酸	1.252	1.067		1.132	0.972	
缬氨酸	1.284	1.094		1.060	0.910	
蛋氨酸+胱氨酸	0.983	0.838		1.120	0.962	
异亮氨酸	1.250	1.065		1.057	0.908	
亮氨酸	1.168	0.955		0.973	0.835	
苯丙氨酸+酪氨酸	1.263	1.076		1.243	1.066	
赖氨酸	1.017	0.867		1.572	1.349	
			92.06			88.17

RAA: 氨基酸比值; RC: 氨基酸比值系数; SRC: 比值系数分

2.4 每种必需氨基酸在必需氨基酸总量中的含量 蝙蝠蛾拟青霉所有的必需氨基酸都高于标准蛋白质模式含量;中国弯颈霉除了异亮氨酸低于标准蛋白质模式外,其他必需氨基酸在必需氨基酸总量的含量都高于标准蛋白质的模式含量(表 4)。证实 2 种虫生真菌菌丝蛋白质氨基酸的优质性和营养性。

表 4 2 种虫生真菌菌丝必需氨基酸与标准蛋白质模式比较
 $w_B/(mg \cdot g^{-1})$

氨基酸	某种必需氨基酸量/必需氨基酸总量		
	蝙蝠蛾拟青霉	中国弯颈霉	标准蛋白质
异亮氨酸	141	111	129
亮氨酸	230	203	172
赖氨酸	157	257	125
苯丙氨酸	148	137	114
苏氨酸	143	135	99
缬氨酸	180	157	141

3 讨论

冬虫夏草是我国一味名贵的中药材,在我国西藏、青海、云南、贵州、四川、甘肃、广东及广西都有出产。其主要有效成分有虫草多糖、蛋白质和氨基酸、甘露醇、脂肪和脂肪酸、抗菌活性物质、虫草素和生物碱及微量元素等,其中氨基酸是虫草补益强壮、辅助治疗消化系统和神经系统疾病及增强免疫功能的物质基础之一^[9-10]。

我们前期研究发现天然冬虫夏草、冬虫夏草菌丝和发酵液中游离氨基酸的种类和含量并不等同^[2],提示冬虫夏草不同部位的氨基酸含量和种类有所差异。高观世等^[7]对 6 种食用菌进行蛋白质评价,发现食用菌因品种、来源不同,组成蛋白质的氨基酸含量和几种必需氨基酸的组成比例与 WHO/FAO 模式谱有一定程度的差异,但可利用各品种之间的氨基酸互补性以改善这种差异,从而提高食用菌的营养价值。张登友等^[11]评价了 4 种金福菇菌株子实体的蛋白质营养价值,发现菌盖总氨基酸和 RC 均较菌柄的高,而各菌株菌柄的必需氨基酸指数和生物价均高于菌盖^[2],这与我们前期在冬虫夏草中得出的结论一致。

为了深入探讨冬虫夏草的营养价值和生物活性,本研究对蝙蝠蛾拟青霉和中国弯颈霉 2 种来源于冬虫夏草的虫生真菌菌丝的蛋白质氨基酸进行分析,结果发现 2 种虫生真菌菌丝蛋白质氨基酸含量较高,种类齐全,富含多种药效氨基酸,两者必需氨基酸与 WHO/FAO 提出的蛋白质氨基酸参考模式比较,结果显示蝙蝠蛾青霉略高于模式标准,中国弯颈霉与模式标准相接近。采用氨基酸比值系数求得 SRC,2 种虫生真菌菌丝蛋白质的必需氨基酸 SRC (蝙蝠蛾拟青霉 92.06、中国弯颈霉 88.17) 相对接近氨基酸模式(SRC 为 100),两者的 SRC 均高于药用真菌松茸菌 (*Tricholoma matsutake*, SRC 为 80.43)、食用菌真姬菇 (*Hypsizygu marmoreus*,

SRC为80.43),更高于几种植物蛋白质的必需氨基酸的SRC,如大米的SRC为70.5,绿茶为72.5,桑叶为69.71,乌饭树叶为77.05^[12-15]。说明2种虫生真菌菌丝均具有较高的营养价值。但我们同时也发现,蝙蝠蛾拟青霉中天冬氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸以及支链氨基酸的含量高于中国弯颈霉,中国弯颈霉中谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、脯氨酸以及氨基酸总量、必需氨基酸总量、非必需氨基酸的含量则高于蝙蝠蛾拟青霉,说明两者的蛋白质氨基酸含量并不等同。

综上所述,本研究发现蝙蝠蛾拟青霉与中国弯颈霉2种来源于冬虫夏草的虫生真菌菌丝均具有较高的营养价值,但二者的蛋白质氨基酸含量并不等同,为进一步探讨冬虫夏草的辅助治疗功能提供了实验依据。

[参考文献]

[1] CHEN J, ZHANG W, LU T, LI J, ZHENG Y, KONG L. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2742-2748.

[2] 汪家春,杨睿倩,李兆兰,陈雅琳.天然冬虫夏草、冬虫夏草菌丝及发酵液游离氨基酸的种类及含量测定[J]. *解放军药学报*, 2014, 30: 249-250, 268.

[3] 朱圣陶,吴坤.蛋白质营养价值评价——氨基酸比值系数法[J]. *营养学报*, 1998, 10: 187-190.

[4] FAO/WHO. Energy and protein requirements [J].

FAO Nutr Meet Rep Ser, 1973, 522: 52-63.

[5] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Energy and Protein requirement Report of joint FAO/WHO[R]. Geneva: WHO, 1973: 62-64.

[6] FAO/WHO. Protein Quality evaluation in human diets [M]. Rome: Food and Agriculture Organization, 1991: 35-36.

[7] 高观世,张陶,吴素蕊,桑兰.食用菌蛋白质评价及品种间氨基酸互补性分析[J]. *中国食用菌*, 2012, 31: 35-38.

[8] 李兆兰.中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究[J]. *真菌学报*, 1988, 7: 93-98.

[9] 严冬,杨鑫岷.西藏不同产地冬虫夏草中氨基酸成分分析及其营养价值评价[J]. *中国农学通报*, 2014, 30: 281-284.

[10] 刘彦威,刘娜,刘利强.冬虫夏草有效成分的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2004, 25: 51-53.

[11] 张登友,杨树德,董洪新,蔡德华,程显好.4种金福菇菌株子实体的蛋白质营养价值评价[J]. *生物加工过程*, 2017, 15: 22-27.

[12] 林忠宁,陈敏健,刘明春,周代顺.真姬菇脚和菌糠氨基酸含量测定及营养评价[J]. *中国食用菌*, 2012, 31: 44-46.

[13] 刘刚,王辉,周本宏.松茸氨基酸含量的测定及营养评价[J]. *中国食用菌*, 2007, 26: 51-52.

[14] 王芳,乔璐,张庆庆,沈斌.桑叶蛋白氨基酸组成分析及营养价值评价[J]. *食品科学*, 2015, 36: 225-228.

[15] 钱爱萍,林虹,颜孙安,林香信,吴立强.乌饭树叶蛋白质中氨基酸含量及营养价值评价[J]. *福建农业学报*, 2008, 23: 306-309.

[本文编辑] 孙岩