

周思静, 刘桂君, 尚宏忠, 等. 蛹虫草人工培养技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 13-17.

蛹虫草人工培养技术研究进展

周思静, 刘桂君, 尚宏忠, 杨素玲, 孟佑婷, 王 平, 顾海科

(北京市辐射中心, 北京 100015)

摘要:蛹虫草是一种重要的食药两用真菌。本文概述了蛹虫草人工培养技术的研究进展, 包括菌种选育、蚕蛹虫草培养技术、人工固体培养技术、液体发酵培养技术, 为蛹虫草在我国进一步扩大培养提供参考。

关键词:蛹虫草; 人工培养; 固体培养; 液体发酵培养

中图分类号: S567.3+50.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0013-04

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 别称北虫草、北冬虫夏草, 是虫草属的模式菌, 分类学上属于子囊菌门 (Ascomycota) 粪壳菌纲 (Sordariomycetes) 肉座菌亚纲 (Hypocreomycetidae) 肉座菌目 (Hypocreales) 虫草菌科 (Cordycipitaceae) 虫草属 (*Cordyceps*)^[1]。蛹虫草作为一种重要的食药两用真菌, 营养成分丰富, 除含有蛋白质、氨基酸等营养成分外, 还含有多种维生素、磷、锌、铜、铁等微量元素及多种药用有效成分如虫草酸、虫草素、虫草多糖等, 使其具有抗肿瘤, 抗病原微生物, 抗氧化, 调节免疫系统, 调节内分泌, 抗疲劳及对肝、肾和呼吸系统具有保护作用等一系列药理作用。大量研究表明, 蛹虫草有效成分和含量与冬虫夏草类似, 可作为冬虫夏草的替代品, 而冬虫夏草与人参、鹿茸并称为中药宝库中的 3 大补品。目前冬虫夏草尚不能人工培养, 且野生冬虫夏草资源在逐年下降, 无法满足市场需求。因此, 作为冬虫夏草替代品的蛹虫草需求量日益增加。由于蛹虫草对生长环境要求较低, 可人工培养, 目前已经形成了蛹虫草人工培养技术、人工固体培养技术、液体发酵培养等 3 种培养技术。本文综述了近年来上述 3 种培养技术的研究进展, 以期对蛹虫草产业化、工业化栽培提供参考。

1 菌种的选育

蛹虫草在培养过程中极易出现菌种退化, 进而导致子实体原基减少, 出草畸形, 产量、质量下降等问题, 因此优良菌株的选育和复壮是蛹虫草培养成功的关键。研究认为, 导致蛹虫草菌种退化的原因主要是两方面, 一是菌种的遗传背景因素, 二是外界的不良条件。遗传背景导致菌种退化的机理有核型改变、基因突变、胞内有害物质积累等, 核型改变是目前比较认同的机理。汪虹等为探明蛹虫草菌种退化的遗传背景, 根据蛹虫草交配型基因的序列设计 3 对特异性引物, 对收集到的 13 株蛹虫草正常菌株和退化菌种进行 PCR 鉴定; 结

果表明, 3 株正常菌株含有 *MAT-HMG*、*MAT-alpha* 两类交配型基因, 判定为异核体; 11 株退化菌株仅含有 *MAT-HMG* 或 *MAT-alpha* 交配型基因, 判定为同核体; 由此作者推测导致蛹虫草产生不形成子实体的菌种退化的原因之一是核相发生了变化, 即异核体变成了同核体^[2]。谭琦等研究也表明, 菌种退化是因为核相发生变化, 由异核型变为同核型^[3]。

建立退化菌种的鉴定方法有助于提前淘汰退化菌种, 减少经济损失。目前可根据生理生化特征来鉴定退化菌株^[4]。如可根据脱氢酶活性进行鉴定, 正常菌株的酶活力高于退化菌株; 可利用溴麝香草酚蓝指示剂法进行鉴定, 退化菌株为蓝色或绿色。此外, 适当的保藏方法有助于防止菌种退化。夏凤娜等比较了 5 种保藏条件下保藏半年、1 年后菌丝活化的情况以及菌丝活化后的深层培养和固体培养长势情况, 结果表明适合蛹虫草的最佳保藏温度为 $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ^[5]。方华舟等研究了保藏温度、时间及代次对蛹虫草菌种质量的影响, 发现 $4 ^\circ\text{C}$ 保藏 1~2 个月为佳, $10 ^\circ\text{C}$ 保藏 1 个月为佳, 菌种传代以 3 代内为佳^[6]。

菌种选育是筛选蛹虫草菌株的关键, 常用方法有菌落形态观察法、海选法、化学诱变、物理诱变、原生质体融合、基因改良等。孙军德等通过对比 5 株蛹虫草的菌丝形态、生长速率、液体培养生物量和胞外多糖、人工栽培和子实体中活性物质虫草多糖和虫草素, 筛选出 6 号菌株, 该菌株菌丝的生长速率比其他菌株快, 液体培养生物量和胞外多糖含量明显高于其他菌株, 人工培养的蛹虫草子实体头部大, 子囊壳丰富, 颜色橘黄, 出草整齐均匀, 出草率高, 子实体中虫草多糖、虫草素含量均高于其他菌株^[7]。王蕾等通过对 14 株蛹拟青霉菌株进行摇瓶液体培养试验, 筛选出虫草素产量最高的蛹虫草菌株 CM001^[8]。在蛹虫草的化学诱变选育方面, 翟景波等采用亚硝基胍诱变, 成功选育出 1 株高产蛹虫草诱变菌株 H4025^[9]; 莫红丽利用吡啶橙诱变选育出高产虫草素的诱变菌株^[10]。物理诱变选育是目前蛹虫草选育中较常见的选育手段, 主要包括紫外诱变选育、辐射诱变选育及航天诱变选育。王陶等利用离子束注入诱变, 选育出富锗能力强的蛹虫草 10 号菌株, 该菌株诱变后的锗含量高达 $1\,201\ \mu\text{g/g}$, 比诱变前增加了 61.25%^[11]。李文等采用低能离子束注入, 当注入剂量为 $2.6 \times 10^{15}\ \text{ions/cm}^2$ 时, 筛选出 15 株虫草素含量较高的蛹虫草菌株, 通过 70% 乙醇微波-超声提取, 紫外分光光度检测, 15 株菌株中虫草素含量最高可达 $(11.924 \pm 0.063)\ \text{mg/g}$, 比原始

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 北京市科学技术研究院青年骨干计划 (编号: 201311); 北京市科学技术研究院萌芽计划。

作者简介: 周思静 (1985—), 女, 陕西咸阳人, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向为食药两用真菌。E-mail: zhousijing@hotmail.com。

通信作者: 刘桂君, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向为食药两用真菌。E-mail: Liu_guijun01@163.com。

菌株增长了近 30%^[12]。Das 等通过离子束辐照诱变获得高产虫草素的蛹虫草突变菌株 G81-3^[13]。利用基因手段进行蛹虫草优良菌种的选育方面,目前虽有一些研究,但取得的成果不是很显著。熊承慧等报道,利用基因工程方法可以改善蛹虫草菌株继代稳定性^[14]。周洪英等利用灭活原生质体融合法进行蛹虫草优良菌株的选育^[15]。

2 蚕蛹虫草人工培养技术

1987 年梁曼逸等率先以家蚕和柞蚕为寄主培养蛹虫草,获得了与天然蛹虫草相似的子实体^[16]。后来蛹虫草相继在桑蚕、蓖麻蚕(马桑蚕)、天蚕、茶蚕、斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)、烟野夜蛾(*Heliothis virescens*)、豆天蛾、甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)、玉米螟等寄主上成功进行培养^[17]。

蚕蛹虫草培养技术主要包括蚕蛹的选择、接种、培养等步骤。一般选择化蛹 2~4 d 的蚕蛹,剔除不良蚕蛹,对蛹体表面进行适当消毒,接种蛹虫草培养,将消毒接种过的蚕蛹放入培养室,在温度 15~25℃、湿度 60%~80%、自然光照、通风条件下培养 12~20 d,待蛹体长出子实体原基后,置于温度 21~24℃、湿度 65%~95%、光照 12 h/d 的环境中,直到子实体成熟。李亚洁等研究了柞蚕蛹虫草高产条件,结果表明采用孢子分离技术选育菌种保证了虫草高产;接种液体菌种效果好,硬化率高,产量高;接种剂量在 0.3~0.5 mL 时蛹体完全僵蛹时间明显短,产量高;菌丝生长期 25℃恒温培养,蛹体完全变硬时改 20℃恒温培养,蛹体硬化快,子实体分布均匀,长势好,产量较高^[18]。申鸿等以蛹虫草菌株 YCC-XD-2 为目标菌,比较了家蚕蛹、蛾培养基和蛹粉代料培养基上蛹虫草的生长情况和虫草素含量;结果表明蛹虫草菌种在蚕体和蛹粉代料培养基上均生长良好,其中蚕体培养基以蚕蛾培养基上的蛹虫草生长较好;蛹粉代料培养基以糯米+蛹粉培养基上的蛹虫草生长较好;蚕体培养基培育的蛹虫草子实体中的虫草素含量显著高于蛹粉代料培养基培育的蛹虫草,其中蚕蛾培养基培育蛹虫草子实体中的虫草素含量高达 21.97 mg/g,在相同培养条件下,蛹虫草子实体中的虫草素含量高于菌丝体和培养基质;利用家蚕蛹、蛾培养基可以生产出高品质蛹虫草^[19]。

以蚕蛹为培养基质生长的蛹虫草中氨基酸总量及人体必需的 8 种氨基酸总量均高于人工栽培的蛹虫草,具有一定抗氧化、延缓衰老的作用。蓖麻蚕蛹虫草中的虫草素含量明显高于野生蛹虫草,而腺苷含量与野生蛹虫草相当^[20]。此外,家蚕在医学上有许多用途,是一种非常重要的药用昆虫,有广阔的开发前景。因此,将蚕作为宿主接种蛹虫草菌进行半人工培养以及药化等方面的研究,为养蚕业开辟了一条效益更好的新途径,也为虫草生产提供了新资源。

3 人工固体培养技术

蚕蛹虽是蛹虫草的理想培养基,但其生产具有一定的季节性,且蚕蛹在处理时较为复杂,易染杂菌,因此,寻找合适的有机培养基替代蚕蛹更有利于蛹虫草的大规模种植。1932 年日本的小林等最先成功采用米饭添加其他有机物制成的培养基,成功培养出蛹虫草子座^[1],此后许多学者开始了蛹虫草代料人工固体培养技术的研究。

目前,人工固体培养蛹虫草的培养基是以大米、小麦、高粱米、玉米、豆粉、木屑、棉籽壳粉等为主要基质,并添加其他营养成分,生产周期为 45~60 d,且可采用玻璃瓶栽和浅盘栽培。在人工固体培养蛹虫草过程中,培养基的组分、环境因素及前体物质的添加对蛹虫草子实体的生长、产量及活性物质含量均有影响。

3.1 不同培养基对蛹虫草人工固体培养的影响

选择合适的培养基有助于提高子实体产量,增加出草率以及降低生产成本。目前针对培养基优化的研究结果不尽一致,其原因可能是所选蛹虫草菌株不同、培养条件不同等造成的。张显科等认为,大米是栽培蛹虫草的最佳培养基,此外高粱米、小米、玉米渣、蚕蛹等也可代替大米栽培蛹虫草^[21]。冯景刚等研究认为,小麦培养基培养的蛹虫草子实体干重大,出草质量好,优于大米、玉米、小米等^[22]。钟冬晖等研究认为,以大米为主要培养基,添加麦麸、玉米等混料培养基,更有利于子实体的萌发^[23]。王栩等利用大米加猪血作为培养基,可提高蛹虫草子实体的产量^[24]。以大米、小米等作为主要培养基的基础上,添加一些碳源、氮源等更有利于子实体的萌发、生长。在碳源方面,添加小分子的碳源如蔗糖、葡萄糖;在氮源方面,有机氮源优于无机氮源,有机氮源中蚕蛹粉优于蛋白胨、鱼粉、蛋清液。

3.2 环境因素对蛹虫草人工固体培养的影响

在蛹虫草子实体生长过程中,除了培养基组成对其生长产生影响外,环境因子湿度、温度、光照、pH 值、氧气等对蛹虫草菌丝分化、子实体生长都会产生一定影响。

有关光照的研究表明,蛹虫草菌丝体生长阶段不需要光照,强光照对菌丝生长有抑制作用,子实体分化阶段则须要适当光照处理。王菊凤等研究认为,蛹虫草菌丝体生长要求黑暗的无光条件,子实体分化形成要求光照在 150 lx 以上,日光灯强光对子实体的生长发育没有不良影响;自然光光照度与子实体生物量呈负相关;子实体生长过程中,日光灯光照度、温度与子实体中的虫草素含量呈正相关;在子实体生长发育过程中,黑暗处理可增加子实体重量和直径^[25]。高晓梅等研究表明,50~100 lx 弱光对蛹虫草原基分化、子实体诱导有促进作用,光强 1 000 lx 条件下子实体生长好、产量高,橙黄光条件下子实体的质量和产量都有所提高^[26]。Chen 等研究发现,在子实体生长阶段进行 12 h 黑暗/光照循环交替后,再进行 18 h 或 24 h 的光照,比一直进行光照培养更有利于子实体生长^[27]。付鸣佳等研究发现,蓝光诱导有利于蛹虫草菌丝体类胡萝卜素含量的积累^[28]。赵博等研究发现,生物磁效应有助于蛹虫草中活性物质虫草素、虫草酸、多糖含量的积累^[29]。

杜双田等报道,蛹虫草发菌阶段的最适温度为 22.7℃,转色阶段最适温度为 20.2℃,高温、低温均不利于转色;当子实体分化阶段温度为 18.1℃时,子座虽然生长较慢,但形成的子座粗而长,产量高且商品性好,且适当温差有利于子实体原基的分化^[30]。在蛹虫草菌丝体生长阶段最适 pH 值为 5.5~6.5,子实体生长阶段最适 pH 值为 6.0 左右。蛹虫草生长过程中基质含水量应调控在 60%~65%^[1]。

3.3 添加因子对蛹虫草生长的影响

植物激素中的 2,4-D、柠檬酸铵、秋水仙素、玉米素等,矿物质元素中的 K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 等以及一些生物素可促进子

实体的生长。肖正华研究了不同添加剂(2,4-D、玉米粉、柠檬酸三铵、秋水仙素、链霉素)对蛹虫草子实体生长分化的影响,认为2,4-D、柠檬酸三铵可缩短蛹虫草的生长周期,提高子实体产量,玉米粉对提高蛹虫草子实体产量的影响不明显,秋水仙素、链霉素可诱导原基分化,增强培养基的抑菌能力,同时提高子实体产量^[31]。步岚等研究发现,真菌激发子疫霉(*Phytophthora* sp.) YL粗提物可提高虫草素含量^[32]。张绪璋研究认为,添加中草药淫羊藿可提高蛹虫草的蛋白质、氨基酸含量。此外,赤霉素以及吲哚乙酸、玉米素等植物激素均对子实体生长具有促进作用^[33]。

4 液体发酵培养技术

液体发酵培养一般用来生产蛹虫草菌丝体,也有报道指出,静置发酵可生产蛹虫草子实体。

液体发酵培养技术较人工固体培养技术具有明显的优点。一是菌丝生长速度快,菌丝体产量高;二是可以提高蛹虫草的代谢产物(虫草素、虫草多糖等)的产量;液体培养克服了直接从蛹虫草子实体中提取代谢产物劳动量大、耗时多、产量低等缺点;三是便于工业化生产。由于蛹虫草液体发酵技术的理化条件易于控制、便于机械化操作、生产工艺规范、生产周期短、产品质量稳定、产量高等优点,使得蛹虫草液体发酵技术受到广泛研究。研究还表明,液体深层发酵得到的菌丝体不但具有与子实体相当的营养价值及药用效果,还可以得到胞外多糖等子实体所不具备的营养保健成分。

近年来对蛹虫草液体发酵培养的研究表明,不同碳源、氮源、碳氮比、无机元素以及培养基温度、pH值等环境因素对于蛹虫草菌丝生长和活性物质的产量均有影响。

4.1 培养基营养成分

培养基组成直接影响蛹虫草菌丝体的生长及生物活性物质产量,因此寻找最优的培养基组成一直是蛹虫草培养研究的重点。由于蛹虫草菌株筛选的优化指标及采用优化方法不同,所筛选出的最佳营养配方也各有差异。国内外很多学者针对蛹虫草培养基进行了大量研究,其中大多数是以蛹虫草菌丝体为筛选指标进行的,此外还有以生物活性物质虫草素及胞外多糖含量等为指标进行筛选的。

Park等研究认为,蔗糖、玉米粉为蛹虫草液体培养产菌丝体的最适碳源和氮源^[34]。陈晋安等以菌丝体生长为指标,得出最适蛹虫草发酵的液体培养基组分为蔗糖50 g/L、玉米浆30 g/L、酵母膏5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L^[35]。牛帅科等以菌体干重为指标,研究认为适合蛹虫草菌的液体发酵最佳培养基为葡萄糖53.36 g/L、蛋白胨26.72 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.20 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L^[36]。文庭池等研究发现,蔗糖、蛋白胨、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、NAA(萘乙酸)为蛹虫草生长的最佳碳源、氮源、无机盐及生长因子^[37]。

Mao等研究认为,有利于蛹虫草虫草素积累的最佳氮源为蛋白胨,最佳碳源为葡萄糖,当碳氮比为2.65时(42.0 g/L葡萄糖和15.8 g/L蛋白胨),虫草素含量达到最大值^[38]。Shih等研究表明,适合蛹虫草菌株(*Cordyceps militaris* CCRC 32219)高产虫草素液体培养的氮源为45 g/L酵母提取物^[39]。Cui等研究发现,适合胞外多糖的最优培养基为葡萄

糖48.67 g/L、蛋白胨12.56 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、酵母提取物10 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L^[40]。此外,于田田等研究了富硒蛹虫草液体培养基,认为最适培养基为大豆粉30 g/L、蔗糖40 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、硫胺素50 $\mu g/L$ 、 Na_2SeO_3 12 mg/L^[41]。通过对上述文献进行总结,发现适合蛹虫草菌丝生长的碳源为小分子碳源,主要为蔗糖、葡萄糖;而氮源方面用得较多的为蛋白胨和酵母提取物。

4.2 培养条件

液体培养条件主要涉及培养温度、pH值、通风量、发酵时间、光照等条件。郑婷婷等研究认为,接种量10%(V/V)、初始pH值7.0、发酵温度27℃、发酵时间4 d为蛹虫草菌丝体液体培养的最适条件^[42]。欧阳召等研究了适合虫草素积累的蛹虫草液体培养条件,发现最适条件为pH值7.0、温度25℃、光照时间12 h^[43]。Kwon等研究发现最适产胞外多糖的蛹虫草培养条件为24℃、pH值自然、200 r/min、1.5 vvm的通气量^[44]。研究还发现,不同波长的光对虫草素含量、腺苷含量以及菌丝体生长产生重要影响;对于虫草素积累来说,蓝光>粉红色光>白光、黑暗、红光;对于腺苷积累来说,红光>粉红色光、黑暗、白光、蓝光;对于菌丝体生长来说,红光>粉红色光、黑暗、白光>蓝光^[45]。

4.3 添加物

液体培养基组成除了基本碳源、氮源、无机盐成分外,常添加一些添加物以提高蛹虫草产活性物质的产量。研究发现,在培养基中添加虫草素的前体物质腺嘌呤、腺苷酸、甘氨酸、精氨酸、L-天门冬氨酸、L-谷氨酰胺可提高虫草素含量^[46]。Mn、Fe、Se、Cu、Zn、Ca等金属元素及 NH_4^+ 也有助于虫草素的生成^[39,47-48]。植物油中的葵花籽油有助于胞外高分子聚合物的分泌,橄榄油有助于菌丝体生长;油酸和棕榈酸能促进胞外高分子聚合物的分泌,亚油酸能显著促进菌丝体的生长和胞外高分子聚合物的分泌^[49]。此外,家蚕蛾油对蛹虫草菌丝体的生长及胞外高分子聚合物的分泌也有促进作用,并可增加菌丝体中胞内多糖的含量和发酵液中胞内多糖的产量^[50]。昆虫激素中蜕皮激素能促进虫草素的产生,一定剂量的保幼激素Ⅲ可加快蛹虫草液体培养过程中的生长代谢,使胞内多糖含量、胞外多糖含量和虫草素含量的最大值提前出现。植物生长素中萘乙酸对虫草素提高也有促进作用。

5 研究展望

蛹虫草作为一种重要的、具有较高保健价值的食药两用真菌,对其研究和开发已成为国内外的研究热点。人工固体培养技术是目前替代蚕蛹虫草培养技术获得子实体的市场化培养技术,但在人工固体培养过程中,培养基组成及培养条件是影响子实体质量和产量的关键因素。由于液体培养技术具有接种方便、发菌快速、生产期短、易于控制等优点,是目前获得菌丝体及提取蛹虫草活性物质的主要培养技术,特别是随着蛹虫草中活性物质虫草素的保健价值和药用价值被不断证实,使得市场对于虫草素产量的需求日趋增加,因此快速、高效获得虫草素的液体培养技术具有极大的发展潜力。此外,蛹虫草菌种的退化问题是蛹虫草培养过程中的关键性技术难题,因此未来可加大对蛹虫草菌种退化机制的研究,进而选育出高产、稳定以及具有特定功能(如高虫草素)的蛹虫草优良菌种。

参考文献:

- [1] 黄年来,林志彬,陈国良,等. 中国食药用菌学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2010:1761-1772.
- [2] 汪虹,魏静,林楠,等. 交配型基因作为分子标记鉴定蛹虫草退化菌株的核相初步研究[J]. 食用菌学报,2010,17(4):1-4.
- [3] 谭琦,蔡涛,汪虹,等. 蛹虫草无性孢子的交配型基因类型的分子鉴定[J]. 上海农业学报,2011,27(3):5-8.
- [4] 林清泉,丘雪红,郑壮丽,等. 蛹虫草退化菌株的特征研究[J]. 菌物学报,2010,29(5):670-677.
- [5] 夏凤娜,胡惠萍,邵满超,等. 蛹虫草菌种五种保藏条件的保藏效果对比试验[J]. 食用菌,2010,32(5):30-31.
- [6] 方方舟,董海波,肖习明,等. 保藏温度、时间及代次对蛹虫草菌种质量的影响[J]. 荆楚理工学院学报,2011,26(2):5-10.
- [7] 孙军德,宋思丹,王颖,等. 蛹虫草优良菌株的筛选[J]. 微生物学杂志,2011,31(2):40-43.
- [8] 王蕾,罗巍,胡瑕,等. 虫草素高产菌株的筛选及不同添加物对虫草素产量的影响研究[J]. 菌物学报,2012,31(3):382-388.
- [9] 翟景波,滕利荣,黄宝玺. 高产蛹虫草菌株的选育[J]. 中国生物制品学杂志,2011,24(10):1230-1232.
- [10] 莫红丽. 吡啶橙诱变提高蛹虫草虫草素含量的研究[J]. 广东蚕业,2011,45(2):23-26.
- [11] 王陶,李文,陈宏伟,等. 离子束注入选育富锗蛹虫草菌株[J]. 食品工业科技,2009(2):68-70,73.
- [12] 李文,赵世光,陈宏伟,等. 低能离子束修饰蛹虫草菌株高产虫草素[J]. 生物工程学报,2009,25(11):1725-1731.
- [13] Das S K, Masuda M, Hatashita M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(1):129-132.
- [14] 熊承慧,夏永亮,李琳,等. 基因工程方法改善蛹虫草菌株继代培养稳定性[C]//中国菌物学会第五届会员代表大会暨2011年学术年会论文摘要集,2011:89.
- [15] 周洪英,刘启燕,边银丙. 灭活原生质体融合法在蛹虫草优良菌株选育中的应用[C]. 首届全国食用菌中青年专家学术交流会,2006:104-108.
- [16] 梁曼逸,谷恒生. 蛹虫草人工培育获得成功[J]. 沈阳农业大学学报,1987,18(3):103-104.
- [17] Shrestha B, Zhang W M, Zhang Y J, et al. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development [J]. Mycological Progress, 2012, 11(3):599-614.
- [18] 李亚洁,孟楠,石理鑫,等. 柞蚕蛹虫草高产栽培技术的研究[J]. 食用菌,2009,31(1):34-35.
- [19] 申鸿,张龙,王兵,等. 蚕体和蛹粉代料培养基上的蛹虫草生长状况与品质检测[J]. 蚕业科学,2012,38(1):130-134.
- [20] 李亚洁,石理鑫,温志新,等. 蓖麻蚕蛹虫草的培育及其虫草素腺苷分析[J]. 食用菌,2011,33(3):53-54.
- [21] 张显科,刘文霞. 不同培养料栽培蛹虫草试验研究[J]. 中国食用菌,1997,16(2):21-22.
- [22] 冯景刚,张迪,刘在民. 不同培养基对北虫草子实体产量与质量的影响[J]. 辽宁林业科技,2008(6):24-25.
- [23] 钟冬晖,丘志忠,陈逸湘. 营养辅料和水分对蛹虫草生长的影响[J]. 广东农业科学,2008(7):126-127.
- [24] 王栩,刘守华. 蛹虫草的代料栽培试验[J]. 食用菌,2003,25(1):23.
- [25] 王菊凤,杨道德,李鹤鸣,等. 蛹虫草的光温反应及生长发育特性[J]. 山地农业生物学报,2006,25(2):136-140.
- [26] 高晓梅,陈月仍. 光照对人工培养蛹虫草子实体形成和生长的影响[J]. 广东农业科学,2006(6):31-32.
- [27] Chen Y S, Liu B L, Chang Y N. Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011, 28(3):875-879.
- [28] 付鸣佳,王小菁,黄文芳. 蓝光诱导蛹虫草菌丝类胡萝卜素的积累[J]. 微生物学通报,2005,32(5):24-28.
- [29] 赵博,张国财,林连男,等. 生物磁效应对蛹虫草活性物质含量的影响[J]. 植物研究,2013,33(4):508-511.
- [30] 杜双田,周锋利,陈德育. 温度对蛹虫草生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(5):159-162.
- [31] 肖正华,李再新,李建章,等. 添加剂对蛹虫草子实体生长分化影响的研究[J]. 食品与发酵科技,2010,46(3):60-64.
- [32] 步岚,朱振元,梁宗琦,等. 真菌激发子对提高蛹虫草虫草素的作用[J]. 菌物系统,2002,21(2):252-256.
- [33] 张绪璋. 北虫草新菌株选育及栽培技术研究[J]. 中国农学通报,2010,26(19):206-210.
- [34] Park J P, Kim S W, Hwang H J, et al. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(1):76-81.
- [35] 陈晋安,黄浩,郑忠辉,等. 蛹虫草液体发酵条件的研究[J]. 集美大学学报:自然科学版,2001,6(3):219-223.
- [36] 牛帅科,杨自洁,李艳. 蛹虫草菌的液态培养基优化[J]. 食品与机械,2012,28(2):202-205.
- [37] 文庭池,李光荣,康冀川,等. 蛹虫草液体种制备及发酵生产菌丝体和虫草菌素工艺优化[J]. 食品科学,2012,33(5):144-149.
- [38] Mao X B, Zhong J J. Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(3/4):343-350.
- [39] Shih I L, Tsai K L, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 33(3):193-201.
- [40] Cui J D, Jia S R. Optimization of medium on exopolysaccharides production in submerged culture of *Cordyceps militaris* [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(6):1567-1571.
- [41] 于田田,王乐,钱和. 蛹虫草富硒研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):19-21,29.
- [42] 郑婷婷,李多伟,王英娟,等. 蛹虫草液体培养条件优化及有效成分含量分析[J]. 菌物研究,2004,2(4):22-25.
- [43] 欧阳召,王春梅,陶志. 适合虫草素积累的蛹虫草液体培养条件的优化[J]. 中国食用菌,2012,31(1):26-28.
- [44] Kwon J S, Lee J S, Shin W C, et al. Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 14(6):756-762.

王恒生,刁治民,陈克龙,等. 冰核微生物的研究动态及开发应用前景[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):17-21.

冰核微生物的研究动态及开发应用前景

王恒生¹, 刁治民¹, 陈克龙¹, 魏波²

(1. 青海师范大学生命与地理科学学院, 青海西宁 810008; 2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230011)

摘要:冰核微生物是近年来的研究热点,本文综述了冰核微生物的研究动态、应用现状,指出了其研究中存在的不足,提出雾霾的形成与冰核微生物相联系的观点,并对冰核微生物开发前景进行了展望,以期为冰核微生物的进一步研究开发提供理论基础。

关键词:冰核微生物;研究动态;应用;雾霾;开发前景

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0017-05

冰核是引起水由液态变为固态的物质,它可以是无机物、有机物等非生物,也可以是生物^[1]。冰核存在是结冰发生的初始条件,因为冰核可作为晶核而凝结水分子,使其整齐排列,进而诱发结冰过程的形成。自然状态下,当水的温度高于一定值时,少量水分子开始有序排列成晶格状,形成同源冰核,并逐渐形成冰晶。理想状态下的小体积纯水在将近 -40℃ 才会结冰^[2]。冰核微生物作为一种生物冰核可以诱导水的冰点升高,其分布广泛,可在 -5 ~ -2℃ 下形成规则、细腻、微小异质冰晶。目前各国研究者对冰核微生物深入开展了基础理论和应用研究,在冰核微生物的分布、种类、影响成冰活性的因素、冰核细菌分子生物学及其应用等方面取得了较大的进展。

1 冰核微生物的种类及分布

1.1 冰核细菌

1972 年 Schnell 等首次在即将腐烂的植物叶内发现一种很重要的成冰核生物源物质^[3]。同年, Fresh 从即将腐烂的赤杨(*Alnus tenuifolia*) 树叶中分离出 1 株在 -5.0 ~ -2.5℃ 下具有冰核活性的细菌(ice nucleation-active bacteria, 简称

INA)^[4]。1974 年, Maki 等将这一具有冰核活性的细菌菌株鉴定为丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*), 并进行了较为详细的研究^[5]。目前为止, 已发现 4 个属 23 个种或变种的细菌具有冰核活性。我国发现的冰核活性细菌分布在 3 个属 17 种或变种中, 优势种类为丁香假单胞菌和草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)。

1.2 冰核真菌种类及分布

Kieft 于 1988 年首次报道红脐鳞菌(*Rhizoplacachrys oleuca*) 在 -1.9℃ 具有冰核活性^[6]。目前已报道了 4 属 11 个种或变种的冰核真菌, 除 3 种为地衣真菌外, 其余 8 种均为镰刀菌属(*Fusarium*)。冰核真菌分布在地衣、岩石表面、昆虫体内、土壤等, 研究证明真菌比细菌冰核抗热且耐酸碱、抗紫外线能力强, 这些重要的生理生化特性已引起科学家的关注, 认为冰核真菌比冰核细菌冰核活性稳定, 更具开发应用前景^[7]。

1.3 冰核病毒

研究发现接种黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV) 的小麦农作物比对照提高霜冻温度 1 ~ 2℃, 且霜冻温度与病毒含量成正相关^[8]。

其他微生物如硅藻也发现具有冰核活性。

2 冰核微生物的研究现状

2.1 冰核细菌的分子生物学研究

目前, 关于冰核的分子生物学研究主要是以冰核细菌为研究对象。

2.1.1 细菌的冰核基因 研究发现冰核的成冰活性是由单个结构基因决定的, 每个冰核基因仅含 1 个开放阅读框架

(15):30-35.

[48] Gu Y X, Wang Z S, Li S X, et al. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris* [J]. Food Chemistry, 2007, 102(4):1304-1309.

[49] Park J P, Kim S W, Hwang H J, et al. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3):250-255.

[50] 施明珠, 李有贵, 李增智, 等. 家蚕蛾油对蛹虫草液体发酵培养的影响[J]. 蚕业科学, 2008, 34(1):166-168.

收稿日期:2014-04-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260130、41261020);国家社会科学基金(编号:10CJY015);青海省自然科学基金(编号:2013-z-902)。

作者简介:王恒生(1988—),男,安徽合肥人,硕士研究生,研究方向为资源微生物学。E-mail:365553207@qq.com。

通信作者:刁治民,教授,主要从事资源微生物学研究。E-mail:diao_zhimin@126.com。

[45] Dong J Z, Liu M R, Lei C, et al. Effects of Selenium and light wavelengths on liquid culture of *Cordyceps militaris* Link [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(8):2030-2036.

[46] Masuda M, Urabe E, Honda H, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5):1199-1205.

[47] Fan D D, Wang W, Zhong J J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 60