

蛹虫草抑菌活性研究开发 现状与发展趋势

徐德峰,孙力军,王雅玲

(广东海洋大学食品科技学院,广东湛江 524088)

摘要:食源性致病菌的绿色控制是目前食品安全面临的难题和瓶颈。本文就蛹虫草抑菌活性的研究与开发现状进行了综述,并就发展趋势进行了分析,以便为蛹虫草资源抑菌活性的基础研究和在食源性致病菌绿色控制方面的开发利用提供参考。

关键词:蛹虫草,抑菌活性,绿色控制

Current status and prospect of the research and development of *Cordyceps militaris* resource in antibacterial activity

XU De-feng, SUN Li-jun, WANG Ya-ling

(School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Currently, the green control over foodborne pathogen is a bottle-neck problem for food security system. For better understanding the antibacterial activity and facilitating its utilization of *Cordyceps militaris* resource in food protective industry, the status of research and development of *Cordyceps militaris* were summarized and its future prospect was subsequently analyzed in this paper.

Key words: *Cordyceps militaris*; antibacterial activity; green control

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)08-0424-04

近年来,食品安全已成为继人口、能源及环境问题后的第四大世界性问题^[1-2]。研究发现,在众多引起食品安全问题中,由病原细菌引起的食源性疾病是影响食品安全的最主要因素之一^[3-4]。目前,由于传统物理和化学方法对食源性致病微生物的控制存在着这样或那样的缺陷,因此寻求安全、广谱、高效的天然生物制剂是研究和开发的必然选择。蛹虫草(*Cordyceps militaris*),又名北冬虫夏草,是我国名贵滋补中药冬虫夏草的良好代用品,具有多种生物活性^[5-8]。研究发现,从蛹虫草深层发酵产物中可提取许多有效成分,其中有些成分能显著影响细菌的生长,这些天然成分不但对人体无毒副作用,而且具有一定的抗癌保健功效^[9],因此将它们作为天然抗菌成分代替化学防腐剂,应用于食源性致病菌的绿色控制具有广泛的应用前景和重大的现实意义。本文在分析国内外相关文献的基础上,就蛹虫草抑菌活性的研究现状与开发状况进行综述,并就发展趋势进行分析,以便为蛹虫草资源抑菌活性的基础研究和

在食源性致病菌绿色控制方面的开发利用提供参考。

1 研究现状

目前,国内外学者就蛹虫草的抑菌活性均持肯定态度,并围绕抑菌活性在菌种选育与发酵优化方面均开展了不同深度和广度的研究,但不同学者在抑菌谱、抑菌组分和抑菌机理方面有所分歧。现就蛹虫草抑菌活性与机理、菌种选育与发酵优化的国内外研究现状概述如下。

1.1 抑菌活性与机理

蛹虫草对多种病原微生物均有抑制作用,目前较多学者认为其主要抑菌活性成分是虫草素^[10-12]。Yeon等^[12]将蛹虫草接种于蝙蝠蛾蛹上培养,甲醇萃取子实体,滤纸片法考查萃取液对乳酸菌和11种肠道有害菌的生长抑制活性。结果发现,10mg/片的剂量就能强烈抑制11种肠道有害菌中部分梭菌属细菌的生长,而对8种乳酸菌无生长抑制。光谱学分析表明其抑菌活性组分是虫草素,且含量在干基子实体中可达0.69%。虫草素结构-梭菌生长抑制相关性表明,其结构中3'-或2'-脱氧对于其抑制活性是至关重要的。天然虫草素及其两种结构类似物(2'-脱氧核苷和杀结核菌素),作为一种对肠道有害菌如梭菌具有强烈生长抑制作用的活性物质,有潜

收稿日期:2011-06-01

作者简介:徐德峰(1978-),男,博士,讲师,主要从事水产食品质量与安全控制研究。

基金项目:广东海洋大学引进人才科研启动项目(E11001)。

力成为一种新的抗菌药物,值得进一步深入研究。同时,部分学者研究了虫草菌液体发酵物的抑菌活性。武忠伟等^[13]研究了冬虫夏草和蛹虫草发酵液的抑菌特性。结果表明,两种虫草的发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌均有较好的抑制作用,且对前两者的抗菌作用强于后两者;热稳定性实验表明,发酵液中的抑菌物质具有较强的热稳定性;虫草发酵液与25%糖液和10%盐液协同作用可以增加对参试细菌的抑菌作用;对比实验得出,蛹虫草发酵液的抑菌活性较冬虫夏草发酵液的抑菌活性强,表明高活性虫草菌在食品防腐剂和功能产品的研发方面具有开发潜力。刘阳等^[14]研究了蛹虫草浸提条件对金黄色葡萄球菌的控制效果。结果表明,在采用50%乙醇水溶液,料液比为1:30,温度80℃,时间2h的参数下,其浸提液对菌体的MIC值为12.5mg/mL。在构-效关系研究方面,韦会平等^[15-16]在分析虫草素结构的基础上,通过酰化反应手段,将虫草素的伯氨基用酰胺键保护起来,并同时接入不同长度的直链烷基来改变虫草素的分配系数。结果发现,虫草素被化学结构修饰变成其直链烷酰胺衍生物后,抗菌活性会发生较大变化,且抗菌活性和分子结构中侧链烷基的碳原子数目间的关系可以用一个二次回归方程来进行定量描述。该研究进一步证实了虫草素的结构和抑菌活性之间的紧密相关性。

除虫草素外,也有研究表明蛹虫草抑菌活性组分是多糖、多肽、酶类。陈宏伟等^[17]探讨了不同浓度乙醇分级虫草多糖的生理功能。结果表明,70%的醇沉胞内多糖可使黑曲霉的抑菌圈直径达13.4mm、大肠杆菌的抑菌圈直径达11.3mm,分别是对照组直径的2.19和1.85倍。翁梁^[18]对比了野生虫草和人工虫草多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制效果,结果表明两种多糖对三种细菌均有抑制效应,且抑制效果与多糖浓度成正比,尤其对大肠杆菌抑制效果最为明显。Wang等^[19]从蛹虫草发酵液中分离得到一种虫草多肽,该肽对玉米小斑菌等真菌具有强烈的抑制作用,而对黄曲霉和镰刀菌无效。Park等^[20]从蛹虫草子实体中分离出一种新的丝氨酸蛋白酶,该酶对镰刀菌属有强烈的抑制作用。甚至还有学者认为蛹虫草抗菌成分是其中的酚类,如Choi等^[21]发现蛹虫草子实体挥发性酚类化合物对弧菌具有较强的抑制作用。

1.2 菌种选育与发酵优化

为了从源头上提高抑菌活性组分的产率,国内外学者首先采用不同途径对蛹虫草进行了菌种改良,取得了较为满意的结果^[22-26]。Masuda等^[20]以虫草素含量为目标,采用高能离子束对野生株进行辐照诱变,经反复筛选获得了一株虫草素含量较野生株提高30%以上的突变株。翟景波^[24]分别采用亚硝基胍和激光诱变对蛹虫草CGMCC5.699进行诱变,以菌丝体生长快慢和菌落大小进行初筛,然后综合考虑蛹虫草菌丝体干重和菌丝体中腺苷、多糖和虫草酸含量,采用摇瓶方法进行复筛,获得了高产蛹虫草

突变株。此外,周洪英^[25]采用双亲原生质体非对称灭活融合技术,选育虫草素高产融合子,经反复筛选获得了5株虫草素含量较亲本有不同程度提高的融合子,且遗传性能稳定。

鉴于液态培养具有生产效率高、易于优化培养条件、方便产物分离提取及纯化的优点。国内外学者分别从代谢工程角度对发酵过程进行了优化研究,并取得了一定进展^[27-31]。Mao等^[27]采用化学组成限定培养基考查了 NH_4^+ 对蛹虫草发酵产虫草素含量的影响。结果发现,相对于不添加 NH_4^+ 而言,虫草素含量提高了70%。Das等^[31]运用中心组合实验设计考查了培养基组成对蛹虫草离子束诱变株G81-3液体发酵产虫草素的影响。发现在最适碳源葡萄糖和最适氮源酵母抽提物含量分别为86.2、93.8g/L时,发酵液中虫草素含量达到6.84g/L,为目前已报道的最大虫草素发酵产率。

2 开发状况

蛹虫草是冬虫夏草的良好代用品,与冬虫夏草具有同样卓越的生物活性。基于蛹虫草显著的生物活性,其开发和利用早在2000多年前就已经开始。随着研究的不断深入,人们对蛹虫草天然保健功效的认识日益深刻,因此对资源的需求量也日益扩大。但由于天然蛹虫草资源极其稀少,加上近年来的滥采滥挖,天然蛹虫草已成了濒危物种。目前产业化开发的资源主要来源于三个方面:a.将菌丝人工接种于家蚕或蝉蛹上形成的动物源蛹虫草,这部分资源开发的产品主要是作为名贵滋补食品或药品,售价昂贵,市场上可见的主要是各种包装精美的原态干基礼品;b.采用类似栽培蘑菇的方式,将菌丝接种于农业废弃物进行代料栽培,收获子实体,这是目前市场开发的主流,产品主要有普通虫草干品、虫草胶囊、虫草茶饮料、虫草口服液等;c.菌体接种液体培养基,通过液体发酵获得含有虫草素和虫草酸等多种生物活性成分的发酵液和菌丝体,然后分别加以利用,目前这种资源的产品在市场上较少,但长远看来会有很大程度地发展。

3 发展趋势

随着人们对蛹虫草保健和医疗作用认识的不断加深,对蛹虫草的需求量也在不断加大,从而其研究和开发工作必然进一步加强。就抑菌活性而言,下一步的研究和开发重点将会集中在以下几个方面。首先,应明确蛹虫草的抑菌组分及其抑菌机理。不同学者的研究在此方面存在较大差异,如有的认为是虫草素,有的认为是多糖,还有的认为是酶和多肽类。当然也有可能是多组分协同作用,但针对某种微生物而言,其主要抑菌活性物质应该是一类或一种物质。尽管将蛹虫草抑菌活性应用于食源性致病菌的绿色控制具有很大潜力,但仍有许多问题需深入研究。如发酵液抑菌效应及其主要活性组分的筛选评价;复杂食品基质和外界环境因素综合作用下活性组分剂量与抑菌活性之间的动力学相关性;细胞和分子水平上组分对菌体的作用方式及其分子机理等。这些实际和理论问题的阐明,不仅有望解决

食品基质中致病菌的绿色控制问题,而且也将丰富和发展蛹虫草活性组分的抑菌机理。

其次,围绕抑菌活性而进行的菌种选育和发酵优化将会在更深层次上进行。菌种是发酵的基础,菌种技术是现代发酵核心技术之一。为了提高蛹虫草某种活性组分,除了不断从自然界中分离筛选野生株之外,目前理化诱变和原生质体融合技术仍是蛹虫草菌种选育的主要手段。但长期重复使用某种诱变源,往往导致突变率低、突变谱窄和抗性饱和等缺陷。纵观发酵工业菌种改良途径可以看出,菌种改良无论怎么发展,最终都会归结到分子设计的理性轨道上来。因此,蛹虫草菌种的分子改良是必然趋势。在目前菌种水平下,发酵优化对于提高活性组分含量则显得更具现实可操作性。尽管国内外学者已在发酵方式、发酵组分、发酵条件等方面开展了不同深度的研究,但由于对液体发酵动力学研究的局限性,以及菌体次生代谢途径的极端复杂性,蛹虫草液体发酵优化的研究尚需不断深入。

再次,基于理论研究的资源高效综合利用将会以更快的速度向广度和深度拓展。随着人们对蛹虫草药用和保健功效认识的逐步深入,对蛹虫草资源的需求量必将会进一步扩大。在天然资源稀缺性和现实需求量不断扩大的矛盾作用下,必然要求一方面对现有天然资源做到科学开发和高效综合利用,另一方面要积极拓宽资源生产渠道,在规模上满足量的需求。通过近几年研究的不断推进,目前固体代料栽培和液体发酵初步产业化所产的子实体和菌丝体基本可以缓解资源不足的矛盾,但栽培和发酵产物的利用状况仍停留在低端水平,造成了资源的浪费和部分环境污染。因此,随着研究的持续深入和需求的不断扩大,蛹虫草人工资源的利用必将走向高值化轨道。

4 展望

面对食品基质中食源性致病菌日益严重的污染现状,鉴于传统理化抑菌方法所存在的现实缺陷,寻找安全、经济、有效的天然抑菌组分已成为众多学者和企业的重要研发方向之一。随着人们对蛹虫草抑菌活性和保健医疗作用认识的不断加深,对蛹虫草的需求量也在不断加大。但在天然资源稀缺性和现实需求量不断扩大的矛盾下,必然要求一方面对现有天然资源做到科学开发和高效利用,另一方面积极拓宽资源生产渠道,在规模上满足量的需求。鉴于液态培养具有生产效率高,且产物提取纯化方便等优点,未来蛹虫草抑菌活性组分的生产将会采取以液体发酵为主。在明确了抑菌组分的组成、结构、性质等基本问题,并运用建模程序建立特定条件下的组分剂量与抑菌效应之间动力学模型后,蛹虫草发酵液天然抑菌组分在食源性致病微生物的绿色控制方面必将得到广泛应用和迅猛发展。

参考文献

- [1] Powell DA, Jacob CJ, Chapman B J. Enhancing food safety culture to reduce rates of food-borne illness [J]. Food Control, 2011, 22(6): 817-822.
- [2] Qusted TE, Cook PE, Gorris LGM, et al. Trends in technology trade and consumption likely to impact on microbial food safety [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(S1): 29-42.
- [3] 陈君石. 食品安全—中国的重大公共卫生问题 [J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(8): 649-650.
- [4] 李泰然. 中国食源性疾病现状及管理建议 [J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(8): 651-653.
- [5] Mizuno T. Medicinal effects and utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (Mitosporic Fungi) Chinese caterpillar fungi [J]. International Journal of Medicine Mushroom, 1999(1): 251-261.
- [6] Nag TB, Wang H X. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57: 1509-1519.
- [7] Jiang Y, Wong JH, Fu M, et al. Isolation of adenosine, isosinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. Phytomedicine, 2011, 18(2): 189-193.
- [8] Rao YK, Fang SH, Wu WS, et al. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 131(2): 363-367.
- [9] Yan WJ, Li TH, Lin QY, et al. Safety assessment of *cordyceps guangdongensis* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(11): 3080-3084.
- [10] Sugar AM, Mccaffrey RP. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1998, 42(6): 1424-1427.
- [11] Ahn YJ, Park SJ, Lee SG, et al. Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 2744-2747.
- [12] Yeon SH, Kim JR, Ahn YJ. Comparison of growth-inhibiting activities of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica* cultured on *Bombyx mori* pupae towards human gastrointestinal bacteria [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87: 54-59.
- [13] 武忠伟, 王运兵, 赵现方, 等. 冬虫夏草和蛹虫草发酵液抗菌活性研究 [J]. 微生物学杂志, 2008, 48(4): 47-50.
- [14] 刘阳, 王雅玲, 袁思杨, 等. 优化蛹虫草浸提条件对金黄色葡萄球菌的控制效果 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 139-142.
- [15] 韦会平, 叶小利, 张华英, 等. 通过化学结构修饰提高虫草素抗菌活性的实验研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(1): 29-32.
- [16] 韦会平. 虫草素的生物合成及化学结构修饰 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [17] 陈宏伟, 朱蕴兰, 邵颖, 等. 蛹虫草乙醇分级多糖生理功能研究 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(9): 16-19.
- [18] 翁梁. 虫草生物活性研究及蛹虫草多糖单糖组分的初步鉴定 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009.

- [19] Wong JH, Ng TB, Wang H, et al. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(5):387-392.
- [20] Park BT, Na KH, Jung EC, et al. Antifungal and anticancer activities of a protein from the Mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Korean Journal of Physiology Pharmacology*, 2009, 13(1):49-54.
- [21] Choi MA, Lee WK, Kim MS. Identification and antibacterial activity of volatile flavor components of *Cordyceps militaris* [J]. *Journal of Food Science and Nutrition*, 1999, 4(1):18-22.
- [22] Masuda M, Das SK, Fujihara S, et al. Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111(1):55-60.
- [23] 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.
- [24] 翟景波. 高产蛹虫草菌株的选育及其发酵工艺的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [25] 周洪英. 灭活原生质体融合法在蛹虫草优良菌株选育中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [26] 王建芳. 蛹虫草优良菌株筛选与高产技术研究[D]. 北京: 中国医学科学院药用植物研究所, 2006.
- [27] Mao XB, Zhong JJ. Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(3):343-350.
- [28] 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.
- [29] Das SK, Masuda MH, Masanori S, et al. A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(6):534-538.
- [30] Xie CY, Gu ZX, Fan GJ, et al. Production of Cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 158(2):483-492.
- [31] Das SK, Masuda MH, Masanori S, 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.
- [22] Beggs KT, Holmes AR, Cannon RD, et al. Detection of *Candida albicans* mRNA in archival histopathology samples by reverse transcription-PCR [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2004, 5:2275-2278.
- [23] Arancia S, Carattoli A, Valle RL, et al. Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in Real Time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2006(20):263-268.
- [24] Kofla G, Ruhnke M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68:178-183.
- [25] Xiang HG, Xiong LK, Liu XL, et al. Rapid simultaneous detection and identification of six species *Candida* using polymerase chain reaction and reverse line hybridization assay [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69:282-287.
- [26] 刘有旺, 李雅林, 刘翠燕, 等. 牛白色念珠菌性乳腺炎的PCR检测方法的建立 [J]. *西南农业学报*, 2008, 4(21):116-119.
- [27] Mulero R, Lee DH, Kutzler MA, et al. Ultra-Fast Low Concentration Detection of Candida Pathogens Utilizing High Resolution Micropore Chips [J]. *Sensors*, 2009, 9:1590-1598.

(上接第423页)

hypermutable contingency locus [J]. *Genome Research*, 2003, 13:2005-2017.

[16] Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, et al. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1994(1):228-231.

[17] Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New Method for Detection of *Candida albicans* in Human Blood by Polymerase Chain Reaction [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1993(12):3344-3347.

[18] Lischewski A, Amann RI, Harnen D, et al. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent in situ hybridization with an 18s rRNA-targeted oligonucleotide probe [J]. *Microbiology*, 1996, 142:2731-2740.

[19] Mardh PA, Rodrigues AG, Genc M, et al. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: A review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy [J]. *International Journal of STD & AIDS*, 2002, 12(8):522-539.

[20] 卢雪红, 罗萍, 崔英春, 等. 复合PCR检测老年人腹膜透出液中的金黄色葡萄球菌和白色念珠菌 [J]. *中国老年学杂志*, 2003, 23(9):586-587.

[21] Mirhendi SH, Makimura K. PCR - Detection of *Candida albicans* in Blood Using a New Primer Pair to Diagnosis of Systemic Candidiasis [J]. *Public Health*, 2003, 32(1):1-5.

《食品工业科技》愿为企业铺路搭桥!