

富硒虫草的研究进展

孟泽彬^{1*} 文庭池² 姜金仲¹

(1. 贵州师范学院 贵州省生物资源开发利用特色重点实验室 贵州 贵阳 550018)

(2. 贵州大学 西南药用生物资源教育部工程研究中心 贵州 贵阳 550025)

摘要: 虫草是传统名贵中药, 具有抗癌、抗菌、调节免疫、降血脂、降血糖等广泛的药理作用; 硒是人体必需的微量元素, 具有抗癌、抗氧化、抗衰老等多种生理功能, 与许多种疾病密切相关。利用虫草菌将无机硒转化为有机硒, 实现虫草与硒的有机结合, 研究功能更好的富硒虫草, 无论作为药用、保健品还是补硒食品都具有很重要的现实意义。本文综述二十余年来富硒虫草的研究状况。

关键词: 虫草, 硒, 进展

Review on Selenium-enriched *Cordyceps*

MENG Ze-Bin^{1*} WEN Ting-Chi² JIANG Jin-Zhong¹

(1. Guizhou Bioresource Development and Utilization Key Laboratory, Guizhou Normal College, Guiyang, Guizhou 550018, China)

(2. Engineering Research Center of Southwest Bio-Pharmaceutical Resources, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: *Cordyceps* is precious Traditional Chinese Medicine, having a wide range of pharmacological effects such as anti-cancer, anti-bacterial, immune regulation, lowering blood lipid, lowering blood sugar, etc. Selenium is an essential trace element, which has broad physiological functions including anti-cancer, anti-oxidation, anti-aging, etc. and closely associated with a variety of diseases. Combinating *Cordyceps* fungus and Selenium to produce Selenium-enriched *Cordyceps* has important significance as medicine, health care products and food Selenium supplementation. This article gives a review on Selenium-enriched *Cordyceps* research in the past 20 years.

Keywords: *Cordyceps*, Selenium, Review

基金项目: 教育部项目(No. 2012287); 贵州省学位办项目(No. 2011231); 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31200016); 贵州省农业科技攻关项目(No. 黔科合 NY 字[2011]3054 号)

*通讯作者: Tel: 86-851-5816647; 信箱: mengzi2003@126.com

收稿日期: 2014-06-11; 接受日期: 2014-09-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-26

虫草是一种虫菌复合体或菌菌复合体(真菌菌核上寄生),是一类十分重要的药用真菌,传统上和鹿茸、人参并称三大珍贵补品。在传统分类系统中,虫草隶属于真菌界 Fungi,子囊菌门 Ascomycota,子囊菌纲 Ascomycetes,粪壳菌亚纲 Sordariomycetidae,肉座菌目 Hypocreales,麦角菌科 Clavicipitaceae,虫草属 *Cordyceps*,广泛分布于世界各地^[1]。目前最新的虫草分类系统根据多基因分子系统学的结果,将原来的虫草类真菌属分为了3个科、6个属,分别为:*Metacordyceps*、*Polycephalomyces*、*Tyrannicordyceps* (Clavicipitaceae)、*Elaphocordyceps*、*Ophiocordyceps* (Ophiocordycipitaceae); *Cordyceps* (Cordycipitaceae)^[2-4]。目前为止,全世界报道的虫草菌约530多种^[5],国内正式报道的有130余种^[6]。其中具有药用价值并可人工培养(包括菌丝发酵)的虫草菌主要有冬虫夏草、蛹虫草、蝉花、巴西虫草、古尼虫草、九州虫草、蜂头虫草、双翅目虫草、大团囊虫草等^[7]。现代研究表明,虫草具有多种生理活性,包括抗病毒^[8]、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗增殖、抗转移、抗细菌、抗真菌、抗疟疾,调节免疫、细胞凋亡、降血糖、降血脂、杀虫、保护神经、保护肾脏、保护肝脏,作用于生殖系统、心血管系统、系统性红斑狼疮及DNA酶活性^[9-10],治疗锥虫病^[11]、风湿病^[12],抗辐射、改善提高记忆力、钙离子拮抗、镇静和镇痛^[7],治疗白血病^[13]、调节呼吸系统等多种生理作用^[14]。迄今已检测或分离到的虫草活性物质主要有虫草素及其类似物、虫草多糖、虫草酸、麦角甾醇、糖蛋白、肽类等^[7,9]。

硒是人体必需的微量元素,被称为微量元素中的“生命奇效元素”^[15]。过去很长的一段时间内,硒都被认为是有毒试剂,被严格限制使用,直到1957年德国科学家 Schwarz 和 Foliz 证实硒对肝脏具有很强的保护作用^[16]。众多研究表明,硒具有调节免疫、抗肿瘤、抗 HIV 等病毒、保护大脑、增强男性生殖功能,与甲状腺功能和自身免疫性甲状腺疾病、败血症等危重疾病、心血管疾病、糖尿病、

哮喘病、克山病、大骨节病、关节炎、肝病等几十种疾病密切相关^[17-22]。硒是人体多种酶的重要组成部分,通过同位素标记^[23]和生物信息学^[24]的方法已从人类基因组中发现了25种硒蛋白,包括谷胱甘肽过氧化物酶、脱碘酶、硫氧还蛋白还原酶、硒代磷酸合成酶等。硒在哺乳动物和人体主要以硒代半胱氨酸(Secys)的形式存在于蛋白质中,Chambers 等和 Zinoni 等分别报告了2种硒蛋白的基因序列,其中硒代半胱氨酸残基对应的密码子均是 TGA; Secys 现被认为是蛋白中天然存在的第21个氨基酸^[25-26]。1973年联合国世界卫生组织宣布硒是人和动物不可缺少的微量元素,1988年中国营养学会将硒列为人体必需的15种每日膳食营养素之一^[21],美国将人的硒每日摄入量定为93-134 μg ^[22],欧洲食品科学委员会建议为每日40 μg ^[27]。目前,国际食品法典委员会(CAC)和多数国家、地区已将硒从食品污染物中删除,我国新的《食品中污染物限量》(GB2762-2012)标准已于2013年6月1日正式施行,其中卫生部取消了《食品中污染物限量》(GB2762-2005)中硒指标(2011年第3号公告),不再将硒作为食品污染物控制^[28]。

然而,硒在自然界的分布极不均匀,全世界有40多个国家缺硒,中国是缺硒大国,2/3的地区为缺硒区和低硒区,有近10亿人生活在缺硒地区,缺硒导致的克山病等疾病已经严重威胁到人民的健康,补硒已经成为当下刻不容缓的事情^[29]。卢良恕、李振声等院士均呼吁加强富硒产品开发,营养专家于若木还提出要像当年抓“补碘”一样抓“补硒”工作^[30-32]。硒的生理活性取决于它的化学形态,自然界的硒分为有机硒和无机硒两大类,有机硒的生物活性要好于无机硒,生物体内主要以有机硒的形式存在^[15]。无机硒毒性强、在体内不易吸收,有机硒吸收率高、毒性小、可以在人体组织内储存,但含量极少,因而科学补硒应补有机硒,而非无机硒^[29]。有机硒的获得主要有化学合成和生物转化两种方式。化学合成有机硒目前技术还不够成熟且常伴有污染;生物转化中微生物具有比动物、植物

转化效率高、周期短的特点。虫草菌是一种大型药食真菌,具有较强的元素有机转化能力,以虫草为载体将无机硒转化为虫草有机硒,将传统名贵中药“虫草”与奇效元素“硒”有机结合起来,发挥虫草菌和硒固有的以及协同的生理作用,研究功能更好的富硒虫草无论是作为药品、保健品以及补硒功能食品均具有重要意义。

在中华人民共和国国家知识产权局的专利数据库中,以硒、虫草和硒、冬虫夏草为关键词检索,检索到 51 条富硒虫草相关专利,包括 48 条发明专利、2 条实用新型专利和 1 条外观设计专利(截止 2014 年 5 月 20 日)。专利内容涵盖富硒虫草的培养方法、富硒虫草的产品开发、富硒虫草的生产工具、包装盒等几个方面,其中发明专利中关于富硒虫草的产品开发专利最多有 26 个,占 50.98%;富硒虫草的培养方法专利次之有 22 个,占 43.14% (图 1)。在产品开发方面,均是以蛹虫草、冬虫夏草的子实体或菌丝体或虫菌复合体为原料进行的开发,包含了富硒虫草的口服液、酒、各种药膳(鸡、鸡蛋、罐头、面、粥、蔬菜汁、茶、粉、肉、禽、鱼、火腿、香肠、水饺、汤药膳)、胶囊、保健品等。

以 *Cordyceps*、Selenium 为关键词在欧洲专利局的数据库中检索到 24 条富硒虫草相关专利记录(截止 2014 年 5 月 20 日),内容和国内专利基本一致,其中关于富硒虫草的培养方法最多有 18 个,占 75%;有 6 个关于硒虫草产品开发,含 1 个新处方。有意思的是,所有国内、国际有关富硒虫草的专利,专利权人都是中国人。国际专利的分布与人们对虫草的认识相关,冬虫夏草在中国历史悠久,以富硒虫草为原料的保健品、药材在中国有着良好的基础,因此相关研究和产品开发也最多。这也表明中国在研究富硒虫草方面走在了世界的前面,但是也应该看到我们在富硒虫草的应用研究方面存在低水平的重复现象,缺乏高附加值的创新产品。

富硒虫草研究从 20 世纪 90 年代兴起,已发展了二十多年,目前还没有系统地进行过总结。本文将这这些年有关富硒虫草的研究情况归类综述如下。

1 富硒虫草的生理作用

1.1 抗氧化

富硒虫草有很好的抗氧化作用,其抗氧化能力比普通虫草强,比相同剂量的无机硒效果好。富硒虫草的抗氧化研究多采用体外实验,少数采用体内

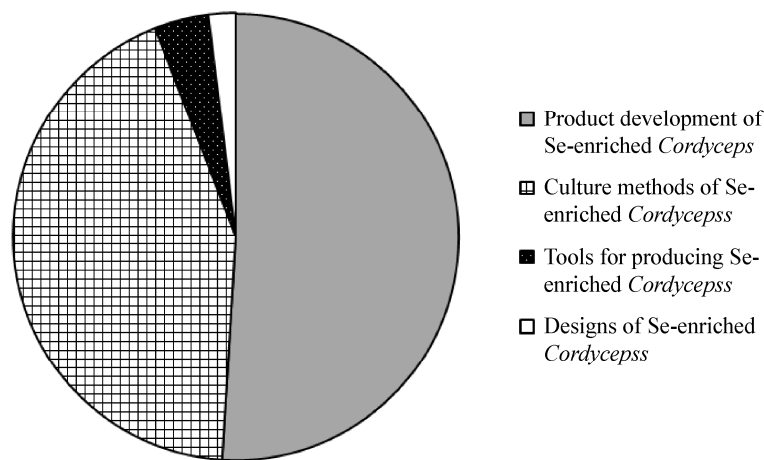


图 1 富硒虫草国内专利内容分析

Figure 1 Analysis of the Selenium-enriched *Cordyceps* related patents in China

实验。具有抗氧化作用的物质主要有富硒虫草全粉、提取物、硒虫草多糖、硒虫草蛋白质和 SOD 等。

1.1.1 体外抗氧化：周毅峰等^[33]报道富硒后的蛹虫草菌丝提取物总抗氧化能力显著提高，富硒子实体水提液清除羟自由基能力可以达到未富硒菌丝体的 6 倍^[34]，此外邵颖等^[35]报道富硒蛹虫草子实体的甲醇提取物对 DPPH 自由基的清除率显著高于普通子实体。富硒蛹虫草多糖清除羟自由基的效果比相同浓度的无机硒、普通虫草多糖都要明显；对羟自由基的最高清除率可达 38.02%，显示其具有很强的抗脂质过氧化、保护支撑磷脂双层膜的作用^[36]。冬虫夏草多糖对 O_2^- 和 H_2O_2 的清除能力依次为富硒虫草胞外多糖>富硒虫草胞内多糖>虫草胞外多糖>虫草胞内多糖，而对 $\cdot OH$ 的清除能力依次为：富硒虫草胞外多糖>虫草胞外多糖>富硒虫草胞内多糖>虫草胞内多糖^[37]。蛹虫草胞内硒多糖清除自由基的能力强于普通虫草多糖，且具有显著差异 ($P<0.01$)，其清除自由基能力依次为 DPPH>羟自由基>超氧阴离子自由基^[38]。铁梅^[39]研究显示虫草硒蛋白比硒多糖对羟自由基清除效果好，因富硒蛋白为兼型抗氧化剂，通过双重的机制发挥其抗氧化作用，即硒蛋白对自由基的直接清除和动力学上对自由基形成的延迟。李华等为^[40]报道蛹虫草硒蛋白清除羟自由基的效果也强于相同浓度的无机硒、普通虫草蛋白，其最高清除率可达 75%。此外，Dong 等^[41]等报道富硒高蛹虫草的 SOD 活性高于普通蛹虫草和冬虫夏草。

1.1.2 体内抗氧化：钟鸣等用富硒蛹虫草硒蛋白多糖作用于荷瘤小鼠，富硒虫草组谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力极显著高于普通虫草组；并且富硒虫草组比普通虫草组超氧化物歧化酶(SOD)活力提高幅度较大，丙二醛(MDA)含量下降也较为明显。小鼠试验也表明，富硒蛹虫草组与高脂模型组相比，GSH-Px 和 SOD 活性升高，MDA 含量降低，均达到了显著水平 ($P<0.05$)；富硒蛹虫草的抗氧化作用高于普通蛹虫草^[42-43]。此外，小鼠灌胃不同蛹

虫草菌丝体后，测定安静时、运动后即刻及运动休息后 3 个阶段的血乳酸和血尿素氮含量，富硒蛹虫草菌丝 SOD 酶活力分别比普通菌丝体高 60.9%^[44]。邵颖等^[35]报道饲喂小鼠富硒蛹虫草子实体的试验组 II 小鼠血液中 GSH-Px 活性显著高于饲喂普通虫草的试验组 I 和对照组；试验组 I 和 II 小鼠血液中 SOD 活性显著高于对照组，但两试验组间差异不显著；试验组 II 小鼠血液中 MDA 含量显著低于对照组，但与试验组 I 间不存在显著性差异。果蝇伤害试验表明，富硒蛹虫草多糖和普通虫草多糖均对降低果蝇体内氧化压力和神经伤害效果显著，相同浓度下富硒虫草多糖保护效果好于普通虫草多糖，其中 1% (质量体积比)富硒虫草多糖溶液添加组逆重力爬行能力可恢复到对照组的 85%，部分氧化压力指标和酶活基本恢复至对照组水平^[45]。

综合来看，富硒虫草有很好抗氧化作用，其效果比普通虫草好，也好于同剂量的无机硒。

1.2 提高免疫力、延缓衰老、抗疲劳

富硒虫草能提高机体免疫力，延缓衰老抗疲劳，其效果优于普通虫草。小白鼠、果蝇试验均表明发酵生产的富硒冬虫夏草菌丝体具有明显延缓衰老的作用，在耐缺氧、抗疲劳等功能方面均优于天然虫草^[46]。钟鸣等^[42]报道富硒蛹虫草硒蛋白多糖能提高荷瘤小鼠的免疫功能，抑制由环磷酰胺造成的荷瘤小鼠肝脏系数和脾脏系数的下降。富硒蛹虫草能显著延长小鼠负重游泳力竭时间，比普通虫草组提高 3.18 倍；同时还延缓和减少运动时小鼠体内乳酸的产生，加快运动后体内的乳酸清除；表明富硒蛹虫草可以缓解小鼠运动性疲劳的产生，具有抗疲劳作用^[44]。非小细胞肺癌患者在化疗中同时使用硒虫草胶囊可使外周血 CD_3^+ 、 CD_4^+ 升高，而未使用硒虫草的对照组则显著降低，表明在化疗同时服用硒虫草胶囊可使病人顺利渡过化疗期，而不至于使机体免疫功能下降^[47]。

1.3 降血脂

钟鸣等^[43]用富硒蛹虫草、普通蛹虫草等不同

饲料饲喂昆明种雄性小鼠 5 周后,富硒蛹虫草组与高脂模型组相比,血清总胆固醇(T-CHO)和甘油三酯(TG)含量降低,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量升高,均达到了显著水平($P<0.05$);低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量降低($P>0.05$)。实验表明富硒虫草有降血脂作用,效果好于普通虫草。

1.4 抗肿瘤

钟鸣等^[42]采用荷瘤小鼠模型,检测小鼠体重及抑瘤率、外周血淋巴细胞转化率、廓清指数 K、吞噬系数 α 、肝脏系数及脾脏系数、GSH-Px 和 SOD 活力及 MDA 含量,观察富硒蛹虫草硒蛋白多糖的体内抑瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响。结果表明:富硒蛹虫草硒蛋白多糖对荷瘤小鼠具有显著的抑瘤作用,抑瘤率达 46.92%。蛹虫草硒多糖能有效的抑制 HeLa 细胞的增殖,其与普通蛹虫草多糖(100 mg/L)对 HeLa 细胞的抑制率分别为 91.87% 和 77.98%, IC_{50} 分别为 18.5 mg/L 和 48.5 mg/L^[48]。陈金林等^[49]在临床上验证富硒蛹虫草胶囊的抑瘤作用,治疗组在化疗的同时服用富硒蛹虫草胶囊,对照组仅进行化疗;测定淋巴母细胞转化实验,巨噬细胞吞噬功能试验,免疫球蛋白, IgG、IgM、IgA,迟发型变态反应。结果富硒蛹虫草胶囊具有棉线的抗肿瘤作用,且无毒性。试验表明富硒虫草有较好的抗癌作用,其效果好于普通虫草。

2 硒对虫草的影响

2.1 硒对虫草生长发育的影响

几乎所有研究都表明低浓度硒促进虫草的生长,而高浓度硒对虫草生长产生抑制作用。然而对于何种浓度的硒对虫草生长起最佳作用,何种浓度的硒对虫草生长起抑制,各研究者结果不完全相同,这可能与采用的不同的菌株、培养条件不同有关。

铁梅等^[50-51]研究表明,营养液中硒在 0.5–5.0 $\mu\text{g/g}$ 范围内,蛹虫草子实体生长速度较快;在含硒 10.0–20.0 $\mu\text{g/g}$ 范围内,子实体生长受到抑制;硒浓度超过 30 $\mu\text{g/g}$,菌丝不能生长。凌宏通等^[52]

的研究显示添加 40 mg/L 的亚硒酸钠营养液时表现出抑制蛹虫草生长。马国良等^[53]报道营养液中硒浓度在 21.0–23.0 mg/L 范围内,蛹虫草菌丝生长最快,形成原基、子实体的生物量最高;在 25.0 mg/L 时,菌丝几乎停止生长,且子实体生长受到抑制;同时添加适量肌醇能促进蛹草原基的分化、菌丝生长。杜双田等^[54]在平板培养基上,当亚硒酸钠质量浓度 ≤ 100 mg/L 时,蛹虫草的菌落形态基本正常,菌落直径的变化幅度较小;当浓度为 450 mg/L 时,蛹虫草菌丝仍能缓慢生长。采用常规瓶栽法栽培蛹虫草时,随着亚硒酸钠质量浓度的增加,蛹虫草的长势评分和子座产量呈先增加后减小的趋势,子座硒含量呈逐渐增加趋势。拟合方程显示,营养液中亚硒酸钠质量浓度为 28.2 mg/L 时,蛹虫草的长势最好;亚硒酸钠质量浓度为 58.17 mg/L 时,蛹虫草子座产量最高。

2.2 硒对虫草化学成分的影响

研究表明硒不会改变虫草营养成分类别,但可以改变其各营养成分含量。于田田等^[55]研究表明富硒蛹虫草菌丝体 4 种营养成分粗蛋白、粗脂肪、总糖、总灰分的含量要高于普通蛹虫草。冬虫夏草发酵富硒大豆 48 h 的发酵液与对照相比,脂类总量变化不明显,酸价增加 2.8 倍,碘价增加 1.2 倍,亚麻酸、亚油酸、油酸、花生四烯酸分别增加 5.3、2.9、6.8 和 5.6 倍^[56]。硒能增加虫草中虫草素等许多成分的含量,但是对一些活性成分无明显影响。Dong 等^[41]研究表明硒可以将蛹虫草中 SOD 活力、虫草素、虫草酸、腺苷、虫草多糖、氨基酸含量分别提高 121%、124%、325%、130%、121% 和 157%,还能提高矿物元素的含量,多数研究结果都与此一致^[55,57-58]。

不过,刘少霞等^[59]报道硒在提高多糖含量的同时会降低虫草酸的含量和 SOD 的活力。胡昆等^[60]研究表明硒能提高蛋白质、虫草酸、虫草多糖和氨基酸的含量,但与腺苷含量无影响。王志高等^[61]报道硒能提高虫草素、虫草酸含量,但与腺

苷、虫草多糖含量无明显相关性。邵颖等^[35]报道硒能提高蛹虫草子实体中鸟苷、腺苷、虫草素、多糖的含量；肌苷、蛋白质的含量无显著性变化；但却降低尿苷、虫草酸的含量。

3 虫草中硒的赋存形态

自然界的无机硒主要包括硒、硒酸盐、亚硒酸盐(亚硒酸钠、亚硒酸锌等)氧化硒、硫化硒、氯化硒以及硒化物(硒化氢、硒化钠、硒化钾等)等；有机硒主要包括硒多糖、含硒蛋白质、烷基硒、甲基硒酸、含 R-Se-R'形式的氨基酸以及人工合成的具有生物活性的有机硒化合物,此外一部分有机硒以 RNA、多糖果胶、多酚结合态存在^[15]。虫草中硒主要以有机硒化合物的形式存在,目前发现的有虫草硒蛋白、硒多糖、核酸硒等,其中硒蛋白是主要形式,也研究得最多。硒在虫草中具体的结合方式还研究的非常的少,一般认为硒是取代含硫氨基酸中的硫生成硒代氨基酸,然后再被结合于蛋白质中;但硒对硫的取代只能是部分的,能取代正常硫需要量的 30%–40%^[62]。

邓桂春等^[63]采用连续浸提法研究富硒蛹虫草中硒的赋存形态,结果显示,碱溶态硒(35.2%)>盐溶态硒(23.05%)>水溶态硒(18.5%)>乙醇溶态硒(6.1%)>残渣态硒(2.7%),硒蛋白是主要存在形式。铁梅等^[64]对富硒蛹虫草中可溶性蛋白质的形态及分子量进行了研究,经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析,可溶性硒占总硒含量的 69.3%以上;所得的各级蛋白组分中,除 0–30%饱和度的盐析组分无硒蛋白,其余组分均有,其含量高低顺序为 30%–50%饱和度的盐析组分>50%–75%饱和度的盐析组分>75%–100%饱和度的盐析组分;其硒蛋白分子量在 114–1 kD 之间。邓桂春等^[65]报道人工富硒蛹虫草硒多糖中多糖含量为 47.5%,硒多糖中含硒量为 92.3 $\mu\text{g/g}$ 。钟鸣等^[66]报道富硒蛹虫草子实体中最高硒含量为 89.486 $\mu\text{g/g}$,有机硒占 85.96%;蛋白硒、多糖硒和核酸硒分别占有有机硒的 71.4%–77.1%、19.7%–32.3%和 0.138%–2.727%,

蛋白结合硒是主要赋存形态;在硒蛋白组分中盐溶性蛋白硒>水溶性蛋白硒>醇溶性蛋白硒>碱溶性蛋白硒,分别占总蛋白硒的 55.13%–56.80%、20.47%–24.60%、15.30%–16.49%和 2.99%–3.35%,盐溶性蛋白硒量最多。张驰^[67]研究也表明蛋白结合硒是主要赋存形态,占总硒含量的 51.44%;不过却以碱溶性蛋白硒量最多,占总可溶性蛋白硒含量的 31.18%;硒多糖中硒占总硒含量的 12.01%。

4 虫草富硒发酵工艺的优化

在提高虫草富硒能力方面,研究者们从菌株诱变、筛选、培养基优化、培养条件优化等方面开展了一些工作,取得了一些进展。

4.1 菌株诱变和筛选

就菌株而言,自然界原始菌株的富硒能力往往不高,然而高产菌株的诱变和筛选报道非常的少。陈宏伟等^[68]、朱蕴兰等^[69]以冬虫夏草为材料,经原生质体诱变获得了生物量和富硒能力均高于出发菌株的无性型菌株,经紫外线诱变的 8 号再生菌株的生物量和富硒能力分别是 13.445 g/L 和 125.8 $\mu\text{g/g}$,分别比出发菌株提高 55.16%和 50.12%。王陶等^[70]采用低能离子束注入蛹虫草诱变,离子束最佳注入参数为:注入离子为 N^+ ,注入能量 10 Kev,注入剂量 1.82×10^{15} ions/ cm^2 ,选育出富集微量元素硒较高的 10 株菌株,最高达 309.684 $\mu\text{g/g}$,同时硒富集率达 30.97%,比出发菌株对照高了近 41%。

4.2 培养基、培养条件的优化

关于虫草富硒培养基的优化研究相对较多,培养条件的优化相对较少,在参考虫草优化培养基础上对虫草富硒进行了研究,但研究尚不够系统。虫草的富硒培养方式可分为固体培养和液体培养,目前论文以液体优化富硒研究相对较多,专利中以固体培养较多;硒源一般采用亚硒酸钠、动植物硒、硒泉水、硒酵母等。

4.2.1 液体培养:常用富硒虫草培养基成分与普通虫草相似,一般采用亚硒酸钠作硒源。陈宏伟等^[71]

报道虫草最优富硒培养条件为:培养基硒 60 mg/L, 培养时间 5 d, pH 6.0, 培养基(%): 蔗糖 3, 麸皮 2, NaNO_3 0.2, KH_2PO_4 0.5; 菌丝量为 19.16 g/L, 有机硒含量可达(5.090 mg/L)。虫草有机硒转化率最佳培养条件为:培养基硒 20 mg/L, 培养时间 5 d, pH 7.0, 培养基为(%): 蔗糖 3, 马铃薯 20, NaNO_3 0.2, KH_2PO_4 0.5; 其有机硒转化率为 18.44%。于田田等^[72]报道蛹虫草富硒的最佳培养基配方为: 大豆粉 30 g/L, 蔗糖 40 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, 硫酸素 50 $\mu\text{g/L}$, Na_2SeO_3 12 mg/L, pH 6.0; 富硒蛹虫草菌丝体的硒含量 350 $\mu\text{g/g}$ 左右, 其中 95% 以上为有机硒。左志宇等^[48]用富硒培养基: 马铃薯 200 g, 玉米粉 100 g, 蔗糖 20 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 3 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, 复方维生素 B2 片, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 L, 一定浓度 Na_2SeO_3 , 采用循环富硒法有效促进蛹虫草菌丝体对硒的富集, 硒含量达 680.2 $\mu\text{g/g}$, 多糖含量为 47.4%。

贲松彬等^[57]研究表明蛹虫草富硒中, 对富硒率影响较大的因素依次为: 硒浓度>培养基种类>培养时间>装液量; 对菌丝体生物量影响较大的因素分别为: 培养时间>硒浓度>培养基种类>装液量。王陶等^[70]报道蛹虫草最佳富集硒元素的培养条件为蛋白胨 3%, 葡萄糖 3%, 亚硒酸钠 8 mg/L, pH 7.0, 对硒富集的影响次序为蛋白胨>葡萄糖>亚硒酸钠>pH, 最优条件下, 硒的富集率达 21.58%。

4.2.2 固体培养: 目前固体优化虫草富硒文献报道较少, 仅杜双田等^[54]采用常规瓶栽法栽培蛹虫草, 拟合方程显示, 营养液中亚硒酸钠浓度为 28.2 mg/L 时, 蛹虫草的长势最好; 浓度为 58.17 mg/L 时, 蛹虫草子座产量最高; 浓度为 200 mg/L 时, 子座硒含量最高达 92.68 $\mu\text{g/g}$ 。在专利中很多使用固体培养法, 使用的培养基组分与普通虫草培养类似。也有使用一些比较特殊的营养成分, 比如蛋白水解液、活蚱蝉蛹、黑蚂蚁^[73], 动物血^[74], 桑叶提取物等^[75]。培养多为获取子实体, 也有的采取仿野生培养。

此外, 虫草对硒的富集程度, 研究结果也不尽

相同。铁梅等^[51]研究表明: 蛹虫草对硒的富集能力在 10 倍左右, 且不受培养基浓度的影响, 培养基中硒浓度与虫草样品中的硒浓度呈正相关性, 其富集倍数基本不变。而邓桂春等^[63]报道蛹虫草富硒前的硒含量为 11.4 $\mu\text{g/g}$, 而富硒后为 343.4 $\mu\text{g/g}$, 富集了三十多倍。不过有趣的是蒋盛岩等^[56]采用冬虫夏草菌丝体发酵富硒大豆, 检测了 96 h 内发酵液中硒含量, 结果不同时间段的发酵液中硒含量基本不变。这提示富硒效果可能与时间有密切关系

5 展望

富硒虫草兼具虫草和硒的优良特性, 具有很好的药理活性, 是值得研究开发的新型药食用菌资源。当前, 硒的重要性已吸引越来越多人的关注, 硒产品的价格很高, 市场供应很少, 硒产业越来越被政府和广大群众认识和重视, 做好富硒虫草研究是一项重要的工作。

在富硒虫草的研究中, 首先我们应该明确研究目的, 研究目的不同, 研究方式侧重点不同。若是作为药用、保健食品、添加剂等, 那么虫草中的有机硒含量应尽可能高; 培养方式宜选用液体发酵培养, 这样在放大培养时更有借鉴意义。若是直接食用, 虫草中有机硒含量应尽可能的高; 培养方式宜选用固体发酵培养, 应考虑到子实体的生长情况及一些商品特性。无论哪种方式, 都不应降低虫草中主要生物活性成分的含量, 从而失去虫草本身的独特特性。

目前的富硒虫草研究中, 所涉及的虫草种类仅见蛹虫草和冬虫夏草两种, 其它虫草都还没有涉及。传统中药群众认可度很高, 蛹虫草作为卫生部认定的新资源食品和药品应用非常广泛, 但其它虫草在富硒研究中也不应忽视, 这对扩大种质资源、优选富硒能力更好的载体具有重要意义。我们在试验中用粉被虫草进行了富硒研究, 结果显示粉被虫草耐硒能力超过大多数虫草文献报道, 在 100 mg/L 的亚硒酸钠液体培养基中, 生长旺盛; 粉被虫草有较强的富硒能力, 虫草中有机硒含量较高, 主要活

性成分含量高于不加硒的对照(试验结果另文发表)。在选用虫草时,一定要对虫草菌种的来源、种类做好鉴定工作,因为虫草菌种类非常多,很多种以前主要依靠形态学的特征来鉴定,没有结合分子生物学的证据,其中不少种可能鉴定有误,这对后续研究影响很大。用形态学结合分子生物学的手段先对供试菌株进行鉴定,确定种类是非常重要的。

在富硒虫草优化培养工艺上,应将硒作为必选元素开始就纳入基础培养基,这对后续试验更有参考意义。宜选择有机硒含量、有机硒总量为主要考察指标,结合生物量、有机硒转化率、虫草素、多糖等主要活性成分含量综合进行考察。对培养基组分中常用的碳源、氮源、无机盐、生长因子等进行筛选;对接种量、装液量(装料量)、培养时间、温度、湿度、pH、转速、溶氧、光照强度、硒的添加方式(一次或多次)等培养条件进行优化筛选。一个重要的问题是硒属于微量元素,硒浓度过高会对菌体产生毒害,不利于有机硒的转化,这也成为制约虫草转化有机硒的瓶颈,也是当前高有机硒含量的富硒虫草报道很少的原因。对此,我们一是可以通过菌株耐硒适应性驯化提高其富硒能力;二是通过诱变等方式筛选出富硒能力更好的菌株;三是优化筛选培养基和培养条件;四是扩大虫草种类增加种质资源等方式解决。

虫草中硒的赋存形态还处于初步研究阶段。目前的研究硒都限于虫草细胞内,对细胞外硒的赋存形态还未有涉及;硒在虫草多糖、蛋白等物质中的具体结合方式也未深入研究,如能分离纯化出单一的虫草硒多糖、硒蛋白进行结构及活性等研究将更有意义。在活性测试时应考虑到富硒虫草与同剂量的普通虫草、无机硒做对比;考察虫草硒多糖、硒蛋白等成分功能时,也应与同剂量的普通虫草多糖、蛋白、无机硒对比,这样的研究结果才更有说服力。虫草中硒的检测仪器需要比较高,会用到一些有毒试剂,客观上一定程度限制了富硒虫草的

研究。

目前报道的富硒虫草中有机硒占总硒的比例多在70%左右,报道最多的能达95%,这导致在应用时会有一定限制和不便。我们应当致力于提高无机硒的转化率,同时提高菌体有机硒的含量和产量,这样在实际应用中会更有意义。目前,报道的富硒微生物中,富硒酵母的有机硒含量已能达到1 000 $\mu\text{g/g}$ 以上^[76],而虫草有机硒含量最多为332.5 $\mu\text{g/g}$ ^[72],虽有报道硒含量达680 $\mu\text{g/g}$,但没有报道有机硒的含量^[48],如何提高虫草有机硒含量和产量是我们面临的一个难题。相信通过广大科技工作者的努力,富硒虫草一定会有更加美好的未来。

参考文献

- [1] 梁宗琦,刘爱英,刘作易. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57: 5-59.
- [3] Kepler RM, Sung GH, Harada Y, et al. Host jumping onto close relatives and across kingdoms by *Tyrannicordyceps* (Clavicipitaceae) gen. nov. and *Ustilaginoidea* (Clavicipitaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2012, 99: 552-561.
- [4] Kepler R, Ban S, Nakagiri A, et al. The phylogenetic placement of hypocrealean insect pathogens in the genus *Polycephalomyces*: An application of One Fungus One Name[J]. *Fungal Biology*, 2013, 117: 611-622.
- [5] 国际真菌名录[DB/OL]. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>.
- [6] 宋斌,林群英,李泰辉,等. 中国虫草属已知种类及其分布[J]. *菌物研究*, 2006, 4(4): 10-26.
- [7] 夏春雨,孙巍,刘学铭. 虫草有效成分的研究进展[J]. *中国食用菌*, 2009, 28(2): 3-7.
- [8] Lovinger GG, Klein RA, Gilden RV, et al. The effect of cordycepin on cell transformation by RNA tumor viruses[J]. *Virology*, 1973, 55: 524-526.
- [9] Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2005, 57(12): 1509-1519.
- [10] Russell R, Paterson M. *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(7): 1469-1495.
- [11] Vodnala SK, Ferella M, Lunden-Miguel H, et al.

- Preclinical assessment of the treatment of second-stage African trypanosomiasis with cordycepin and deoxycoformycin[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2009, 3(8): e495.
- [12] Noh EM, Kim JS, Hur H, et al. Cordycepin inhibits IL-1 β -induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. *Rheumatology*, 2009, 48: 45-48.
- [13] 康冀川, 康超, 文庭池, 等. 虫草菌素药理学研究进展[J]. *菌物学报*, 2011, 30(2): 191-197.
- [14] Tuli HS, Sandhu SS, Sharma AK. Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin[J]. *3 Biotech*, 2014, 4(1): 1-12.
- [15] 陈宝泉, 史艳萍, 李彩文, 等. 基于硒元素的抗癌药物研究进展[J]. *化学通报*, 2011, 74(8): 709-714.
- [16] Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor against dietary necrotic liver degeneration[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, 70(32): 92-93.
- [17] Rayman MP. Selenium and human health[J]. *Lancet*, 2012, 379: 1256-1268.
- [18] Himeno S, Imura N. New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium[J]. *Journal of Health Science*, 2000, 46(6): 393-398.
- [19] Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2001, 10(4): 153-158.
- [20] Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review[J]. *Public Health Nutrition*, 2001, 4(2B; SPI): 593-600.
- [21] 屈兰竺, 杨松杰, 嵇苏, 等. 微量必需元素硒的作用探析[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(7): 94-97.
- [22] Rayman MP. The importance of selenium to human health[J]. *Lancet*, 2000, 356(9225): 233-241.
- [23] Behne D, Weiss-Nowak C, Kalckl \ddot{o} sch M, et al. Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins[J]. *Analyst*, 1995, 120(3): 823-825.
- [24] Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1439-1443.
- [25] Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, et al. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA[J]. *Embo Journal*, 1986, 5(6): 1221-1227.
- [26] Zinoni F, Birkmann A, Leinfelder W, et al. Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84(10): 3156-3160.
- [27] WHO Food and Agriculture Organisation, International Atomic Energy Agency expert group. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: WHO, 1996.
- [28] 中华人民共和国中央人民政府网. 《食品中污染物限量》(GB2762-2012)问答[EB/OL]. http://www.gov.cn/fwxx/jk/2013-01/30/content_2322782.htm.
- [29] 陈志杰, 袁书林. 食(药)用真菌富硒及产品开发研究进展[J]. *中国食用菌*, 2009, 28(6): 9-11,22.
- [30] 卢良恕. 富硒食物发展趋势[J]. *中国食物与营养*, 1996, 3: 20.
- [31] 王俊, 黄明. 硒及富硒功能食品研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2003(2): 53-56.
- [32] 全民补硒工程网[EB/OL]. <http://www.qmbxgc.org/a/zhongguoxiqing/xizhigaikuang/2010/0904/161.html>.
- [33] 周毅峰, 蔡忠雄, 秦恩华, 等. 硒对蛹虫草菌丝代谢和总抗氧化能力的影响[J]. *中国酿造*, 2009(4): 48-51.
- [34] 孙军德, 侯静, 杨逸, 等. 富硒蛹虫草水浸提物的体外抗氧化活性研究[J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(2): 179-183.
- [35] 邵颖, 袁凤健, 陈安徽, 等. 富硒蛹虫草活性成分及抗氧化作用分析[J]. *食品工业*, 2013 (4): 126-129.
- [36] 铁梅, 赵素云, 马勇, 等. 富硒蛹虫草的抗氧化活性研究[J]. *分析科学学报*, 2009, 25(3): 285-289.
- [37] 武忠伟, 许桂芳, 曹蓬勃, 等. 虫草与富硒虫草多糖的体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 76-78.
- [38] 朱蕴兰, 陈宏伟, 张城. 富硒蛹虫草胞内多糖对自由基的清除作用[J]. *农业工程*, 2011, 1(3): 53-57.
- [39] 铁梅. 食用菌中硒的形态分析[D]. 上海: 华东师范大学博士学位论文, 2006.
- [40] 李华为, 赵素云, 铁梅. 富硒蛹虫草抗氧化作用研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 61-64.
- [41] Dong JZ, Lei C, Ai XR, et al. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(5): 1215-1224.
- [42] 钟鸣, 王丽贺, 马慧, 等. 富硒蛹虫草提取物硒蛋白多糖对荷瘤小鼠的影响[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(18): 2120-2123.
- [43] 钟鸣, 高丹, 胡昆, 等. 富硒蛹虫草对小鼠降血脂和抗氧化作用的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(12): 3142-3144.
- [44] 张清华, 徐飞, 陈宏伟. 富硒蛹虫草主要化学成分测定及其对运动小鼠的抗疲劳作用研究[J]. *山东体育学院学报*, 2011, 27(5): 43-48.
- [45] 孙军德, 侯静, 杨逸. 富硒蛹虫草多糖对鱼藤酮诱导伤害果蝇的保护功效[J]. *食品科学*, 2013, 7: 266-269.
- [46] 胡敏, 谭新国. 富硒虫草菌丝体的发酵培养及其生物学

- 功能研究[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2006, 28(3): 309-312.
- [47] 莫益增, 莫文杰, 罗丽华. 硒虫草联合化疗对非小细胞肺癌患者免疫功能的影响[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(5): 407.
- [48] 左志宇, 王泉, 宋晓涛, 等. 蛹虫草菌丝体循环富硒法的建立及其硒多糖抑癌作用初探[J]. 食用菌, 2008(3): 9-11.
- [49] 陈金林. 富硒蛹虫草胶囊对肿瘤、免疫功能的观察[J]. 北方药学, 2012, 9(5): 66-67.
- [50] 铁梅, 杨淑琴, 娄虹, 等. 硒对蛹虫草生长发育的影响[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2005, 32(1): 25-27.
- [51] 铁梅, 张巍, 李晶, 等. 蛹虫草富硒栽培特性的研究[J]. 食用菌, 2005(4): 38-39.
- [52] 凌宏通, 曾振基, 宋斌, 等. 蛹虫草的富硒栽培技术初步研究[J]. 中国食用菌, 2006, 25(4): 52-53.
- [53] 马国良, 马琪, 看措, 等. 不同浓度硒对蛹虫草菌丝生长发育的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18539-18541, 18547.
- [54] 杜双田, 辛亚平, 阳慧慧, 等. 亚硒酸钠对蛹虫草生长及子座硒含量的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(7): 209-214.
- [55] 于田田, 钱和. 生物富硒对蛹虫草菌丝体化学成分的影响[J]. 食品科技, 2006(1): 133-135.
- [56] 蒋盛岩, 王瑶琼, 赵良忠. 冬虫夏草液体发酵富硒大豆对脂类和硒含量的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 178-181.
- [57] 贲松彬, 黄子琪, 王莹, 等. 蛹虫草富硒条件优化及硒对其中主要活性成分的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 266-269.
- [58] 翁梁, 温鲁. 硒和钙对蛹虫草活性物质含量的影响[J]. 北方园艺, 2012(22): 159-161.
- [59] 刘少霞, 马慧, 陈立静, 等. 硒对人工栽培蛹虫草生长和组分的影响[J]. 辽宁农业科学, 2001(2): 46.
- [60] 胡昆, 钟鸣, 刘玉东, 等. 硒对蛹虫草营养成分及活性成分的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2006, 23(1): 6-8.
- [61] 王志高, 温鲁, 袁小转, 等. 加硒对蛹虫草主要活性成分含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9293-9294.
- [62] 徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1994.
- [63] 邓桂春, 侯松媚, 铁梅, 等. 富硒蛹虫草试样中硒的形态分析[J]. 分析科学学报, 2006, 22(1): 21-24.
- [64] 铁梅, 臧树良, 方禹之, 等. SE-HPLC-ICP-MS 联用技术在富硒蛹虫草硒蛋白形态分析中的应用研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(7): 1232-1236.
- [65] 邓桂春, 侯松媚, 田冬梅, 等. 富硒蛹虫草中硒多糖的分离与分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(3): 522-525.
- [66] 钟鸣, 王丽贺. 蛹虫草中硒的赋存形态及蛋白硒分析[J]. 广东微量元素科学, 2008, 15(3): 35-40.
- [67] 张驰. 富硒虫草中硒的赋存形态及分布特点[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 193-195.
- [68] 陈宏伟, 陈安徽, 朱蕴兰, 等. 原生质体诱变选育高富硒量冬虫夏草菌株的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(3): 15-18.
- [69] 朱蕴兰, 陈安徽, 王陶, 等. 冬虫夏草原生质体诱变育种研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 256-260.
- [70] 王陶, 李文, 陈宏伟, 等. 氮离子注入蛹虫草选育高效富硒菌株的研究[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 136-140.
- [71] 陈宏伟, 陈小莉, 朱蕴兰. 虫草液体深层发酵富硒的研究[J]. 食用菌, 2005(5): 10-12.
- [72] 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.
- [73] 李江. 富硒北冬虫夏草人工栽培方法: 中国, 1094754 [P]. 1994-11-09.
- [74] 赵凤英. 东北虫草的培养方法及其制品: 中国, 93117581.X [P]. 2002-09-18.
- [75] 李宏. 富硒蛹虫草的人工培养方法及子实体的应用: 中国, 1861782 [P]. 2006-11-15.
- [76] 刘杰, 徐林, 吴根福. 富硒酵母的研究进展[J]. 饲料工业, 2009, 30(22): 44-48.