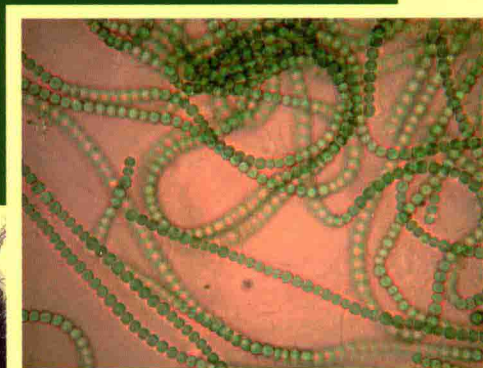




天津市科协资助出版

发菜细胞培养

贾士儒 韩培培 戴玉杰 吕和鑫 等著



科学出版社

天津市科协资助出版

发菜细胞培养

贾士儒 韩培培 戴玉杰 吕和鑫 等 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

作为我国一级保护的珍稀陆生蓝细菌,传统食材——发菜(学名发状念珠蓝细菌),因具有较高的营养价值和药用价值及在荒漠化治理中具有重要的生态学作用,为人们所关注。如何解决发菜的来源问题,既不破坏环境,又能满足人们的需要,一直是人们所追求的。本书基于作者长期进行发菜生物学和培养技术的研究,结合国内外相关研究成果,全面、系统地介绍了发菜的食用与药用价值、发菜的分布与研究历史、发菜的形态学与生理生化性质、发菜细胞的分离及不同模式的液体培养、发菜的固态培养、发菜细胞的规模化培养,以及发菜细胞与多糖的应用。通过现代发酵技术解决濒危生物资源的来源问题,为保护与开发利用特种生物资源,提供必要的基础理论数据与技术方法。

本书可为初涉相关领域的本科生、研究生提供较为系统的技术知识,也可作为工业生物技术领域的科研人员和工程技术人员提供研究思路与研究方向。

图书在版编目(CIP)数据

发菜细胞培养 / 贾士儒等著. —北京: 科学出版社, 2014.12

天津科技大学研究生教材

ISBN 978-7-03-042513-3

I. ①发… II. ①贾… III. ①发菜-细胞培养-研究生-教材
IV. ①S647.01

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 268403 号

责任编辑: 刘 畅 / 责任校对: 韩 杨
责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 迷底书装

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 1 月第 一 版 开本: 720 × 1000 B5

2015 年 1 月第一次印刷 印张: 13 7/8

字数: 266 000

定价: 58.00 元

(如有印装质量问题 我社负责调换)

《发菜细胞培养》编辑委员会

著者（以姓氏汉语拼音为序）：

陈雪峰	戴玉杰	丁 振
韩培培	贾士儒	吕和鑫
苏建宇	谭之磊	肖玉朋
于海峰	岳思君	钟 成

前 言

基于人们对发菜的传统食用习惯及发菜在荒漠化防治和生态恢复中的重要作用，加上国内外市场对发菜极大的需求，发菜相关的科学研究一直为人们所关注。尤其是 2000 年我国政府发布通知，全面禁止对野生发菜的采收、加工和销售，将发菜列为国家一级保护植物（20 世纪从分类学角度将其归为念珠蓝细菌属）之后。以上因素均促使人们急切地寻求一种既不破坏环境，又能满足市场需求的技术路线。

发酵工程技术是利用微生物细胞获得有用产品的技术方法。因此，从理论的角度讲，利用发菜细胞培养的方法获得发菜及其产品，同样是可行的。基于这一理念，我们自 1998 年起便开始进行发菜及其不同培养模式下生物学特性的研究。十余年来，先是确立筛选方法以获得纯发菜藻种；然后为解决野生发菜年生长率非常低（约为 10%）这一急需解决的问题，建立了发菜细胞高密度悬浮培养的方法；通过联产发菜多糖，将人工培养的发菜细胞在宁夏荒漠化地区进行“种植”试验，提出了一条服务于荒漠化土地改造的新技术路线；建立了有效利用二氧化碳提高发菜生长效率等一系列方法，提高了发菜产率；确立了发菜多糖的分离与纯化工艺；开发了多种发菜及其多糖相关的产品。正是在以上科研工作的基础上，我们编写了本书，一方面是对前一阶段工作的总结，另一方面是利用天津科技大学发酵学科的优势，展示发酵过程技术的特色。

几年前便曾计划将所获得的发菜研究结果作一总结，但由于时常出现预期的研究结果难以实现等情况，而将此总结工作拖到现在。自然科学规律具有相同性，一些看似复杂的问题，实际上答案非常简单。野生发菜生长缓慢，就是生物自身适应环境的结果。

全书共分 8 章，在介绍发菜的分布、研究历史、食用和药用价值、形态与结构及其生理生化性质的基础上，重点论述了发菜单体细胞分离、野生发菜的人工培养、液体条件下发菜细胞的光合自养和异养及混合营养培养、封闭式光反应器培养、发菜细胞的固态培养、发菜细胞的规模化培养、发菜细胞与多糖的应用等方面。

天津科技大学生化工程实验室发菜相关的研究先后得到了国家自然科学基金项目、863 计划项目“极端微生物——发菜活性多糖分离技术”、973 计划项目“聚肽或多糖耦联循环发酵过程的基础研究”，以及天津市科学技术委员会应用基础研

究重点项目及国内外企业资助。相关师生的研究工作是本书得以出版的重要前提。韩培培老师编写了第1章~第3章、第6章、第8章,并负责全书的统稿工作;吕和鑫博士参加编写了第2章~第3章和第4章~第5章,并参加了全书的统稿工作;戴玉杰老师编写了第7章~第8章;苏建宇老师参与了第3章~第4章的撰写;陈雪峰老师参与了第6章的撰写;岳思君老师参与了第2章的撰写;谭之磊与钟成老师参与了第5章的撰写;于海峰和丁振老师参与了第5章的撰写;肖玉朋参与了第7章的撰写。本实验室的研究生夏锋、申世刚、符宏磊、王会艳、岳利芳和崔相敢协助进行了本书图表的整理、参考文献的核实等工作。另外,何茜、林永贤、姚谨、王静文、徐鹏、丁文杰、郭伟、秦韶燕、常永红、张峰、贾梦瑶、袁楠楠、陈楠、谭宁、孙莹、侯茂霞等同学也为本书的出版作出了重要贡献。日本微藻有限公司(MAC) Hiroyuki Takenaka先生和福清市新大泽螺旋藻有限公司董事长郑行在实验过程中给予了极大的帮助,在此表示衷心的感谢。此外,文中参考了其他同行的研究成果,在此一并表示感谢!

本书出版得到了天津市自然科学学术著作出版基金资助,在此一并表示衷心的感谢!

书中若有不妥之处,敬请批评指正,欢迎来函指导(Email: jiashiru@tust.edu.cn)。

天津科技大学

贾士儒

2014年9月

目 录

前言	
第1章 概述	1
1.1 发菜的分布	1
1.2 发菜研究的历史与现状	4
1.3 发菜的食用价值	9
1.4 发菜的药用价值	11
参考文献	12
第2章 形态学与生理生化性质	19
2.1 发菜的形态	19
2.1.1 原植体外部形态	19
2.1.2 原植体形态类型	20
2.1.3 群体形态类型	21
2.1.4 发菜群体形态的形成和交替	22
2.1.5 水分对发菜形态的影响	22
2.2 发菜的结构	23
2.2.1 发菜的解剖结构	23
2.2.2 发菜的显微形态结构	25
2.2.3 原植体的表面结构	27
2.2.4 营养细胞的超微结构	28
2.3 发菜的生长和繁殖	29
2.3.1 发菜的生长	30
2.3.2 发菜的发育与繁殖	31
2.4 发菜的生理生化性质	32
2.4.1 光合生理	32
2.4.2 呼吸作用	43
2.4.3 固氮作用	44
参考文献	46
第3章 发菜藻体的人工培养	50
3.1 野生发菜与其附生微生物体系	50

3.1.1	野生发菜附生微生物分析	50
3.1.2	附生微生物对野生发菜的影响	54
3.2	野生发菜藻体的室内人工培养	55
3.2.1	藻体表面灭菌实验	55
3.2.2	沙培实验	56
3.2.3	发菜藻体的生长条件	56
3.3	野生发菜小区人工培养	57
3.3.1	培养方法	58
3.3.2	发菜藻体生长量的测定	58
3.3.3	培养条件对发菜藻体生长的影响	58
3.4	野生发菜藻体大面积人工培养	61
3.4.1	试验地的选择	61
3.4.2	微喷灌培养及其影响因素	62
3.4.3	发菜藻体的人工培养技术方案	64
	参考文献	65
第4章	发菜细胞的分离与培养	66
4.1	发菜单体细胞分离	66
4.2	抗生素法纯化发菜细胞	67
4.2.1	发菜细胞对抗生素的敏感性	68
4.2.2	抗生素法纯化过程	72
4.3	发菜细胞形态特征	73
4.3.1	发菜细胞光谱特性	73
4.3.2	发菜细胞形态类型	74
4.4	液体培养条件下发菜细胞的生长	75
4.4.1	细胞的生长过程	75
4.4.2	氮源对发菜细胞形态和发育的影响	76
4.4.3	发菜聚合体的形成	76
4.5	发菜细胞光合和呼吸特性	77
4.5.1	光照强度对发菜细胞光合速率的影响	77
4.5.2	温度与 pH 对发菜细胞光合和呼吸的影响	78
4.5.3	培养基成分对发菜细胞光合作用和呼吸作用的影响	78
4.6	发菜细胞的光自养培养条件	80
4.6.1	光照对发菜细胞生长的影响	80
4.6.2	温度与 pH 对发菜细胞生长的影响	81
4.6.3	培养基成分对发菜细胞生长的影响	81

4.6.4	光强在发菜细胞培养液中的衰减	82
4.7	发菜细胞的封闭式光反应器培养	84
4.7.1	发菜细胞光反应器中培养过程特性	84
4.7.2	操作条件对发菜细胞生长的影响	86
	参考文献	87
第 5 章	发菜细胞的异养与混合营养	89
5.1	发菜细胞的异养培养	89
5.1.1	发菜细胞的异养分批培养	89
5.1.2	发菜细胞的异养流加培养	94
5.2	发菜的混合营养培养	95
5.2.1	混养过程中碳、氮源对发菜细胞培养的影响	95
5.2.2	培养基中主要营养盐浓度的优化	100
5.2.3	培养条件对发菜细胞生长和胞外多糖产量的影响	102
5.2.4	发菜细胞混合营养培养条件的优化与过程放大	107
5.2.5	混合营养对发菜细胞大小和形态的影响	110
5.2.6	混合营养对发菜细胞光谱的影响	111
5.2.7	混合营养发菜细胞的光合呼吸特性	113
5.2.8	光合作用抑制剂 DCMU 对发菜细胞生长的影响	116
5.2.9	混合营养培养过程中光的衰减	119
5.3	不同营养模式对发菜细胞及其多糖性能的影响	120
5.3.1	不同营养模式对发菜细胞及其生长的影响	120
5.3.2	不同营养模式对发菜细胞胞外多糖的影响	123
	参考文献	125
第 6 章	发菜细胞的固态培养	127
6.1	固体基质材料的性质	127
6.2	发菜细胞在固体基质上的培养	135
6.2.1	发菜细胞生长及其胞外多糖的分泌	136
6.2.2	不同培养基质下的发菜细胞光谱图	140
6.2.3	在固体基质上发菜细胞的培养模型	141
6.3	发菜细胞的固态培养	144
6.3.1	沙粒上发菜细胞的生长	145
6.3.2	影响发菜细胞固态培养的因素	148
6.3.3	固态培养发菜细胞的生态学特性及其在生态恢复中的应用	153
6.3.4	沙培发菜细胞的光补偿点、光饱和点和光抑制点的测定	156
6.3.5	发菜细胞生物结皮的形成及其在生态恢复中的作用	157

参考文献	160
第7章 发菜细胞放大培养及其多糖制备	163
7.1 发菜细胞放大培养	163
7.1.1 发菜细胞的两阶段放大培养	163
7.1.2 发菜细胞的室外培养	165
7.2 发菜多糖的制备	168
7.2.1 发菜多糖的提取分离	169
7.2.2 发菜多糖的纯化	173
7.2.3 发菜多糖 NFP2 的理化性质	178
7.3 径向色谱分离技术纯化发菜多糖	181
7.3.1 径向色谱柱装置概述	181
7.3.2 径向色谱分离纯化多糖	184
参考文献	186
第8章 发菜细胞及其多糖的应用	187
8.1 液体培养发菜细胞与野生发菜的性质比较	187
8.1.1 脂肪酸组成的比较	187
8.1.2 可溶性蛋白组成的比较	188
8.1.3 氨基酸组成的比较	190
8.2 液体培养发菜细胞多糖与野生发菜多糖的理化性质比较	192
8.2.1 两种多糖的光谱比较	192
8.2.2 两种多糖的热稳定性比较	194
8.2.3 两种多糖的微观形态分析	195
8.2.4 两种多糖其他理化性质比较	197
8.2.5 两种多糖的溶解行为分析	198
8.3 发菜多糖的免疫调节性能	199
8.3.1 两种多糖的体外免疫调节性能	199
8.3.2 两种发菜多糖的体内免疫调节性能	200
8.4 发菜细胞及其提取物的抗肿瘤和抗病毒作用	205
8.4.1 发菜细胞及其提取物对海拉细胞生长的影响	205
8.4.2 发菜细胞及其提取物的抗病毒活性	207
8.5 发菜细胞及其多糖的清除自由基作用	208
8.5.1 发菜细胞及其多糖清除超氧阴离子自由基的作用	208
8.5.2 发菜细胞及其提取物清除羟自由基的作用	209
参考文献	211

第 1 章 概 述

发菜，学名发状念珠蓝细菌 (*Nostoc flagelliforme*)，又名发状念珠藻，是一种生长在荒漠、半荒漠地带的陆生性蓝细菌（蓝藻）（图 1-1）。其藻体呈黑色，贴附于地表，缠绕成团，外观与人的头发相似，故人们将其称为“发菜”，在有些地区也被称为“地毛”。发菜在蒙古族语言中为“嘎吉力乌苏”，是“大地的头发”的意思。



图 1-1 野生发菜

1.1 发菜的分布

发菜不是普生性生物，主要分布在中国、法国、捷克、美国、墨西哥、加拿大、摩洛哥、索马里、阿尔及利亚、蒙古、哈萨克斯坦、吉尔吉斯斯坦、乌兹别克斯坦、土库曼斯坦等国。我国是发菜地域分布最广的国家之一，东起内蒙古东部，西至新疆西部，南自河北省蔚县和青海，北达中蒙边境，都有发菜的分布。发菜的分布具有很强的地域性，主要分布在宁夏的同心县、中宁县、海原县、盐池县等，内蒙古的四子王旗、达茂旗、西苏旗、阿拉善左旗、阿拉善右旗和额济纳旗等，甘肃的河西走廊两侧、景泰川周围及兰州以西。即使在这些地区，发菜也不是全境分布，而是有着明显的地带以至地段分隔^[1, 2]。

发菜主要生长在海拔 1000~2800m 的山地丘陵、山前平原、洪积冲积扇和荒滩戈壁，其分布区属荒漠草原和荒漠带。发菜在迎风坡面上生长较少或无生长，在小环境中表现为在岩石、土坎或各种突起物的迎风处分布较多（图 1-2）。风对于发菜的水分调节和分布范围的扩大具有重要作用。多风的环境有利于发菜在吸水后迅速失水，以提高其对高温、干旱等各种胁迫的抗性。另外，粘贴在地面上的发菜当被动物践踏或受其他外力作用时，发菜藻丝体易断裂脱离地面，断裂的藻丝体很容易随风移动，进而扩大了发菜的分布范围。

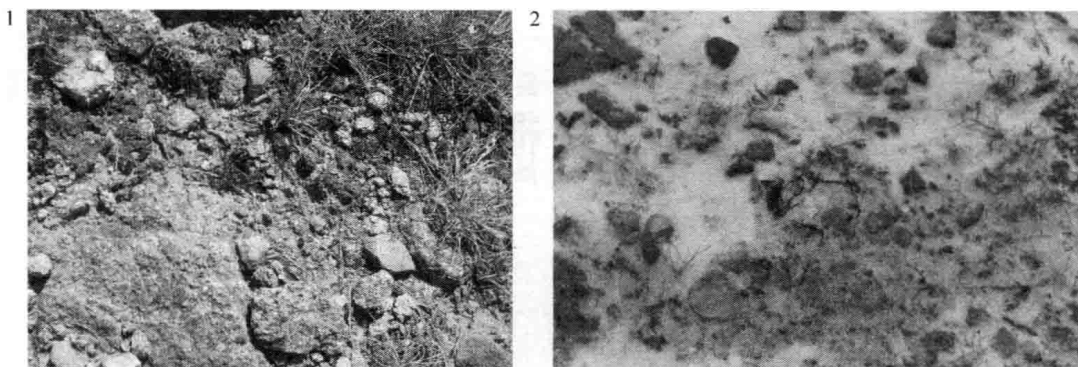


图 1-2 自然生存状态下的发菜

1. 夏天; 2. 冬天

发菜分布地区属于典型的温带大陆性气候, 年平均气温为 $4.4\sim 8.1^{\circ}\text{C}$, 年最高气温 38.3°C , 最低气温 -22.9°C , 具有明显的季节和昼夜温差变化。地表温度变化较气温变化更为剧烈, 年地表温度最高可达 77.9°C , 最低可至 -36.5°C 。年温差大, 昼夜温差明显是发菜分布区域的温差变化特征。发菜对高温、低温、变温条件均表现出了惊人的适应能力。干燥状态的发菜对高温具有极强的忍受能力, 但湿润状态的发菜对高温的忍受能力会急剧降低, 在持续的高温环境下易解体死亡。

发菜分布地区干燥多风, 雨量稀少, 年降水量为 $167.3\sim 447.4\text{mm}$, 平均为 261.2mm , 极端最低降水量为 47.9mm ^[1]。发菜分布区的年降水量分布具有明显的规律, 降水集中在5~9月, 而降水高峰为6~8月, 这3个月的降水量占全年降水量的62%~69%, 降水方式以短促零星为主, 极少连续降雨。发菜分布地区的水分蒸发量大, 一般超过降水量的10~20倍。空气干燥, 年平均相对湿度40%~70%, 最小可达0。宁夏盐池县17年间曾出现11个月中有194天空气相对湿度为0的情况^[3]。

发菜对干旱环境有很强的适应能力。发菜具有亲水性极强的胶质鞘, 藻体含水量在一定范围内随环境(土壤和地表大气)湿度的变化而变化。在短暂的降雨和露水后, 藻丝体迅速吸水而得以生长; 在干燥环境条件下, 发菜藻体则失水变干, 生长减慢或停止, 处于休眠状态。干燥发菜能在相对湿度大于28.4%的空气中吸取水分, 发菜的含水量随环境而变化, 在阴暗或弱光照的环境中具有较高的含水量。测定表明, 自然风干的发菜含水量低于10%^[4], 而干燥发菜在水分充足的条件下, 2h后质量增加9倍, 而后吸水速度减缓, 至24h发菜质量增加到16倍^[5]。达到吸水饱和状态的发菜, 置于干燥器中6h后, 仍可保持4倍于其干重的水分。在强烈的日光照射下, 发菜的胶质鞘又可延缓藻体内水分的蒸发速度, 但在长期的干旱条件下, 发菜藻体内水分逐渐耗尽, 藻体变干, 生长减缓以至停止。发菜在这种湿润与干燥交替的反复节律中积累生长。试验表明, 在干燥状态下保存3~5

年甚至更长时间的发菜藻体，遇水后仍能恢复正常的生长活动。此外，发菜藻体表面粗糙呈波浪状无规则皱折起伏，并有许多指状突起和裂隙，这些发达的旱生结构，具有减少蒸腾、通气、散热、增加吸水和光合面积等生理功能。因此，无论是从其生理生态方面，还是从其形态结构特征来看，发菜对干旱环境都具有极强的适应能力^[6]。

发菜分布地区年平均日照时数为 2700~3000h，6~8 月上旬 8 时日照强度为 1000~6000lx，中午 12 时为 10 000~13 000lx，下午 8 时为 1400~2000lx。发菜通常匍匐生长于一些强旱生矮小草本或灌木植物间的土表，或是空旷裸露的地表，裸露性大，接受阳光直射，发菜对于光胁迫具有很强的抗性。

发菜的光饱和点高达 $1200\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ，当光强提高到 $1800\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时，发菜的光合作用尚未出现光抑制现象^[7]。从发菜的形态结构来看，其厚而坚实的胶质鞘对紫外线的辐射具有一定的抵抗能力，并且表面呈皱折起伏的沟棱状结构，能蔽盖阳光、避免强光对藻体内细胞的辐射，保证正常的光合作用。此外，发菜提取液对紫外线 A 和紫外线 B 均有很强的抵抗能力，这表明发菜可以产生吸收紫外线的物质^[8]，这些特征对发菜能在高原地区生存生长具有重要意义。

发菜分布地区土壤非常贫瘠，有机质含量低，约为 1%，腐殖质积累过程弱，氮和磷的含量极低。发菜分布地区土质类型有黑垆土、灰钙土、栗钙土、棕钙土和灰漠土等，其共同特征是质地轻，土壤结构性差，呈粉末状或块状结构，土壤表面多有龟裂。调查发现，在第三纪红层出现的地方，土层薄，土壤尤其贫瘠，几乎无其他植物生长，而发菜却能单独生存生长^[6]。发菜是一种固氮蓝细菌，藻体的特化细胞异形胞中存在固氮酶，可以转化空气中的氮为可利用的氨，进而转化为生长必需的氨基酸，因此发菜可以在营养贫乏的土壤上生长^[1]。发菜生长的土壤中富含碱土金属氧化物，其中钙盐含量较高，土质呈强碱性，pH 9.0 左右^[3]。发菜可以在这样的环境中正常生长，说明发菜对盐碱有较强的适应能力。表 1-1 列出了甘肃省永登县和内蒙古自治区阿拉善左旗地区发菜生长地土壤的化学成分。

表 1-1 发菜生长地土壤化学成分^[9]

地点	土壤成分及含量/%										
	N	P	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	TiO ₂	MnO ₂	K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO
永登县	0.06	0.09	54.92	2.73	13.35	0.52	0.10	2.85	0.21	6.50	5.90
阿拉善左旗	0.01	0.07	66.16	2.06	0.47	0.49	0.70	2.24	0.15	4.06	4.13

发菜生长的土壤类型虽有差异，但也有一些共同特征。地表土层薄，沙性大，结构松散，但有一定的紧实度，土壤表面常龟裂形成荒漠孔状结皮。这种特殊结

构使得地表不易积水,有利于发菜与土壤之间进行充分的物质交换。流动的物体易将发菜掩埋,不利于其生长。

发菜生态区的植被以干草原、荒漠草原及荒漠植被为主,植被覆盖率不足30%。干草原以长芒草为优势种群落,荒漠草原以短花针茅为优势种群落,荒漠植被以强旱生或超旱生灌木为主要群落,分别伴生西北针茅、甘青针茅、戈壁针茅、冷蒿、白莲蒿、猪毛蒿、骆驼蓬、红砂、西北利亚刺和毛莲蒿等。在各群落中,发菜分布于灌丛小丘间裸地,多数藻体聚集成团,随机分布,有的沿径流方向呈线形延伸,或因风力搬运受阻,同枯枝落叶或小草缠绕共存^[5]。

1.2 发菜研究的历史与现状

我国有很多关于发菜的传说。公元前100年,苏武出使匈奴,被扣在青海牧羊19年,历尽千辛万苦,有“渴饮雪,饥吞旃”的记载,“旃”即头发菜的古称,而头发菜为发菜的另一种古称。从汉代起,权贵常把“发菜”作为贡品献给皇帝食用^[10]。此说法如有根据,则从汉代起便已食用“发菜”。也有报道认为,西晋时代(公元265~316年)《尔雅注疏》中记载有“发菜”,称其为“发毛”^[11]。另外,据传唐代已有人采集加工“头发菜”作为商品出售,销售到南洋一些国家^[12]。但是,这些报道都缺乏准确的记载。例如,《尔雅注疏》中并没有“发菜”,只有“薄,石衣”的记载。而“薄”又称“石衣”,是一种称为“水苔”的藻类植物^[13]。可能是其形态如乱发状,人们误认为是“发菜”。清代李渔(1611~1680年)在《闲情偶寄》饮馔部中这样记载,“菜有色相最奇,而为《本草》、《食物志》诸书之所不载者,则西秦所产之头发菜是也。予为秦客,传食于塞上诸侯。一日脂车将发,见坑上有物,俨然乱发一卷,谬谓婢子栉发所遗,将欲委之而去。婢子曰:‘不然,群公所饷之物也’。询之土人,知为头发菜,浸以滚水,拌以姜醋,其可口倍于藕丝、鹿角等菜。携归饷客,无不奇之,谓珍馐中所未见”^[14]。清乾隆,《宁夏省中卫县志》物产蔬类中这样记载“头发菜,出边外沙地似发可食”^[15]。清乾隆44年(1779年)钟赓起修纂的《甘州府志》物产中^[16]和民国时期白册侯原纂、余炳元续纂的《新修张掖县志》第一卷物产中都有头发菜的记载^[17]。

1913年(大正)日本学者在《植物学》杂志上发表文章,记录了其朋友自日本去欧洲途经中国上海、广东、香港时,看到销售“发菜”的场景。同时记载了“1885年自中国汉口输出‘发菜’35 080斤^①”^[18]。仅从此数据来看,足可见当时“发菜”出口量之大。但是,可能是对“发菜”的认识不够清楚,这篇文章中将“发菜”与其同一属的葛仙米或地木耳混淆了,文中记载的出口量可

① 1斤=0.5kg。

能包括了葛仙米或地木耳。20世纪60年代,内蒙古自治区对外贸易局编写的《出口宣传手册》中将发菜列为内蒙古自治区土产进出口公司经营的主要出口产品之一。1982年第10期的《今日中国》杂志(中文版)中的“中国物产”栏目中这样介绍,“发菜是我国传统的出口商品之一。据考证,发菜早在唐宋时代,已远销南洋和许多国家”^[19]。这从一个侧面表明,在我国“发菜”作为食材的传统已有上千年历史。2000年以前,人们更多的是关心其食用和药用价值,以及出口换取外汇。

从分类学角度看,1857年,有人在北美发现、采集标本,并将“发菜”定名为 *Nostoc flagelliforme*^[20]。在藻类分类系统中,发菜属于蓝藻门(Cyanophyta)蓝藻纲(Cyanophyceae)念珠藻目(Nostocales)念珠藻科(Nostocaceae)念珠藻属(*Nostoc*)^[21, 22]。1873年, Nylander 将其定名为 *Nematonostoc rhizomorphoides*; 1880年, Bronet 和 Thuret 将其更名为 *Nostoc flagelliforme* Born. et Thur.; 1888年, Bronet 和 Flahault 将其放到普通念珠藻(*Nostoc commune*)中作为一个变种: *Nostoc commune* (Vauch.) var. *flagelliforme* Born. et Flah.。1931年, Elenkin 又将其定名为 *Nematonostoc flagelliforme* (Berk. Ct Curt.) Elenk. 以上除 *Nostoc flagelliforme* 以外, 其余3种命名在不同文献中均出现过^[23]。《伯杰细菌鉴定手册》第九版的分类体系中, 发菜属薄壁菌门(Gracilicutes)产氧光细菌纲(Oxyphotobacteria)念珠蓝细菌目(Nostocales)念珠蓝细菌科(Nostocaceae)念珠蓝细菌属(*Nostoc*)^[24]。20世纪70年代, 美国伊利诺伊大学 C. R. Woese 等基于16S和18S rRNA的寡核苷酸测序, 比较微生物和其他生物同源性水平后, 提出了一种称为“三域学说”的新系统分类方法。该方法将含发菜的蓝细菌归属为细菌域, 蓝细菌与其他细菌的区别是其具有合成叶绿素的能力。随着基于以表型、实用性鉴定指标为主的旧体系转向鉴定遗传型的系统进化新体系, 《伯杰细菌鉴定手册》改名为《伯杰氏系统细菌学手册》, 并于1994年出版^[25], 此书中发菜属于蓝细菌门(Cyanobacteria)蓝细菌纲(Cyanobacteria)念珠蓝细菌目(Nostocales)念珠蓝细菌科(Nostocaceae)念珠蓝细菌属(*Nostoc*)^[26]。张闻根据美国国家生物技术信息中心的生物分类数据库[National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy] 编译的《物种纲目》一书中记载有 *Nostoc flagelliforme*, 即发菜^[27]。

在我国, 早在1671年就已见关于发菜的文字记载^[14]。1947年, 我国著名藻类学家饶钦止先生在甘肃采集发菜样本, 并将其定名为 *Nostoc commune* var. *flagelliforme*^[28]。1959年, 陈华葵编写的《微生物学》一书中记有发菜可以作为食品^[29]。1996年, 蔡妙英主编的《细菌名称》一书的第二版中, 较第一版增补了发状念珠蓝细菌^[30]。杨文博等主编的普通高等学校“十一五”国家级规划教材《微生物学》^[31]中记有发菜是一种有经济价值的食用种类。

1671年至20世纪70年代初,除进行了关于发菜的形态构造及对分类定名作了一般性的基本描述外,国内外专门研究发菜的文章寥寥无几。1980年,何宗智和廖振佑在《辞书研究》上发表文章指出,1979年以前的版本,包括1979年版的《辞海》中,在对于发菜分布的说明上,都说其是分布在流水中,实际上是将发菜与生长在海水中的江蓠[也称“龙须菜”或“海绵条”(Gracilaria verrucosa)]、生长在淡水中的水绵(Spirogyra)和生长在陆地阴湿处的乌蕨[也称“乌韭”或“石发”(Stenoloma chusanum)]3种植物相混淆了^[32]。但是,在1999年版的《辞海》中仍这样说其“生长在荒漠草原和浅水中”^[33]。发菜作为一种陆生藻类,如何生长在浅水中,显然不准确。

自然环境中的发菜生长极为缓慢。戴治稼经过多年野外定点观测,发现由于气候干燥恶劣,一年内其年增长率仅为6%左右。即使采用人工节段培养,在半年成活期中,增长率也仅为10%左右^[20]。野生发菜自然蕴藏量有限,而市场需求量却不断上升,使其价格快速上涨。据早期调查,我国发菜主要产地之一的宁夏回族自治区,20世纪60年代其生长地面积约为360.7万hm²,至80年代中期减少到173.3万hm²,到90年代末已减至不足100万hm²,发菜的产量则从70年代的每公顷3~7.5kg,到1986年下降至每公顷约0.15kg^[20]。对发菜的不合理采收,造成对其生长地的生态环境严重破坏,致使草场退化,荒漠化程度加剧。根据2000年的报道,我国内蒙古自治区因采收发菜而被完全破坏的草地面积达400万hm²,遭严重破坏的草地1266.67万hm²,每年由于采收发菜破坏草地所造成的损失高达20.7亿元^[34]。由于发菜具有固氮能力,在氮源缺乏的荒漠化草原上发菜可能是最为重要的优势生长的固氮蓝藻^[35, 36]。鉴于这一局面,我国于2000年7月起明令禁止发菜的采收、加工和销售,同时发菜被列为国家一级重点保护植物。

在已查阅的文献中,发菜的研究工作主要集中在国内,国外报道较少。国内较早开展发菜研究的单位是宁夏农科所(现宁夏农林科学院)。自20世纪70年代起,宁夏农林科学院戴治稼等开展了发菜的生态、分布及人工培养方面的研究^[3, 20, 37~39]。随后,内蒙古林学院何宗智^[40],内蒙古四子王旗科委崔志有^[41],内蒙古农业大学金洪等^[42],宁夏大学姜翠萱^[43]、华振基等^[44, 45],南京大学朱浩然等^[23],北京大学方昭希等^[46],复旦大学倪大洲^[47],中国农业科学院土壤肥料研究所陈延伟等^[35],内蒙古大学王志本^[2],西北师范大学程子俊^[48]、梅俊学^[49]、唐进年等^[4],甘肃农业大学赵萍^[50, 51],甘肃省农业科学院高彦仪等^[5, 52],甘肃省治沙研究所张昫明^[53]、赵明^[54]、唐进年^[6]等,兰州大学王勋陵等^[55],中国科学院兰州沙漠研究所刘家琼等^[56],中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所关桂兰^[57]、康金花^[58]等,河北师范大学李建华等^[59],长沙大学刘明志^[60],同济大学朱乘婧等^[61],青海师范大学马文儒等^[62],浙江大学钱凯先等^[9],华南师范大学刘明志等^[63],青海畜牧兽医学院刁治民等^[64]分别对发菜的基础知识、分类与形态结构、生理生化性质、

组成、分布、生态、生长发育条件及人工栽培途径等方面进行了研究。

20世纪90年代以来,中国科学院植物研究所钟泽璞等研究了温度、含水量和光照对发菜固氮酶活性的影响^[65, 66]。施定基等进行了发菜的光合作用、呼吸作用和形态学方面的研究^[67],王梅等采用改进的Allen's绿胶系统,对发菜类囊体膜色素蛋白复合物进行了分离与其光学性质的研究^[68]。路荣昭等分离了发菜藻胆体,并对其进行了光谱特性的研究^[69]。王发珠和张云报道了发菜的持水性与固氮作用^[70]。张建中等用氧自旋探针方法微量测定发菜光合与呼吸过程的氧变化^[71]。1998年,厦门大学高坤山等在《应用藻类学》杂志上发表综述文章,全面介绍了中国国内进行野生发菜生态学、生理学、生长繁殖、形态学及培养等方面的研究状况^[11]。通过分析复水后的野生发菜光依赖情况下的光恢复性,阐述了高光强对光合活性恢复的促进作用^[72]。研究报道了金属离子及各种营养盐在发菜的光合活性恢复过程中具有重要作用^[73]。研究确定了发菜藻体及藻体细胞的液体培养条件^[74]。研究了发菜细胞光合作用对盐胁迫的响应^[75]。分析了野生发菜在干燥及复水情况下其光合活性对阳光紫外辐射(ultraviolet radiation, UVR)的响应^[76]。探讨了阳光UVR对水培发菜生长、有效光合效率和色素的影响,阐述了紫外吸收物质伪枝藻素(scytonemin)和类菌胞素氨基酸(mycosporine-like amino acid)在降低光抑制、适应阳光辐射中起到的重要作用^[77]。研究了CO₂浓度、光照强度及水对发菜生长的影响^[78]。中国科学院水生生物所胡征宇等研究了生长条件与培养基成分对发菜的影响,结果表明,提高培养系统的CO₂浓度并没有显著促进发菜细胞生长,并且高浓度的CO₂会抑制其细胞的生长;同时,培养基中K⁺和CO₃²⁻的缺失并没有显著影响发菜生长^[79]。虽然发菜具有固氮能力,但培养基中缺少N时,由于其要固定空气中的N来供自身生长所需,发菜细胞的生长慢于含N时的生长速度。Ca、P和N是发菜生长的必需营养元素,不但影响其生长,而且影响其多糖及蛋白质含量^[80]。氮元素的缺乏在一定程度上可以促进胞外多糖的合成和分泌^[81]。以叶绿素、类胡萝卜素、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蛋白的含量为指标,初步确定了BG11培养基为发菜生长最适培养基^[82]。研究了培养基组成对发菜细胞生长和光合活性的影响,以及水分对发菜生理活性的影响和发菜细胞培养物对盐胁迫的响应^[82~84]。考察了不同温度下发菜复水后光合活性与其多糖对自由基的清除作用^[85, 86]。香港大学陈峰等研究了发菜液体悬浮培养过程中细胞分化、固体培养中细胞菌落的变化^[87]与不同温度、不同生长阶段发菜细胞脂肪酸组成的变化^[88]。华南理工大学刘世名和梁世中研究表明,稀土元素镧对发菜细胞培养及其所含氨基酸成分有显著影响^[89]。天津科技大学贾士儒等^[90~138]对发菜的形态、解剖、生理、生态学特性和生长条件等方面进行了较为系统的研究。国外,日本学者针对发菜多糖的功能及其应用开展了工作^[139~144]。

相比于人们对发菜生理、生态特征和生长发育条件等方面的了解,目前对发