

## 发酵蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性研究

顾宇翔<sup>1</sup>, 李素霞<sup>2</sup>, 袁勤生<sup>2</sup>

1 (上海市质量监督检验技术研究院, 上海, 200233)

2 (华东理工大学生物反应器国家重点实验室, 上海, 200237)

**摘 要** 胞外几丁质酶等多种水解酶系在虫草侵染宿主的过程中发挥着重要的作用, 增强酶活对于提高虫草子实体人工培养的成功率有着重要的意义。文中研究考查了多种碳、氮源、初始培养基 pH 值和培养时间对于液态培养的蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响。结果表明, 几丁质酶的活性主要取决于碳源, 几丁质对几丁质酶的诱导合成十分重要, 其中以 1% 胶状几丁质最佳。当培养基中不存在几丁质、细胞优先利用其它营养物质或存在酶解产物阻遏时, 酶的合成就会被抑制。最终确定的优化培养基以 2% 胶状几丁质为碳源, 0.1% 酵母膏为氮源, 初始培养基 pH 值 6.0; 培养时间 5 d, 此时胞外几丁质酶的活性为 12.0 mU/mL 以上。

**关键词** 蛹虫草, 菌丝体, 发酵, 培养基, 几丁质酶

虫草(包括冬虫夏草和蛹虫草等)具有多种药理活性<sup>[1,2]</sup>, 是我国名贵中药之一。由于天然虫草严格的寄生性以及特殊的生长条件致使其产量很低, 人工培养已是大势所趋。人工虫草主要有发酵菌丝体和子实体 2 种, 由于接种于寄生虫体上的子实体其性状最接近于天然产品, 因而更易被大众所接受。目前虫草子实体的培养存在菌体对寄主昆虫的侵染力低、产率低等问题, 因此提高虫草对昆虫的侵染能力迫在眉睫。

虫草侵入寄主体内需要分泌出的能够分解昆虫表皮和体壁的水解酶系, 如几丁质酶、蛋白酶等<sup>[3,4]</sup>。这些酶对于真菌侵入虫体至关重要<sup>[5]</sup>, 它们不仅能帮助菌体进入寄主体内还能通过降解表皮提供生长所需的部分营养。多篇报道认为胞外几丁质酶的活性与微生物对昆虫的侵染力有着密切的关系<sup>[6~8]</sup>, 因此运用几丁质酶来帮助虫草对昆虫的侵染以提高人工子实体得率是可行的。

虽然虫草中的几丁质酶在综述中已被提及<sup>[9]</sup>, 但并没有涉及酶活的研究。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<sup>[10]</sup>, 本研究选用了液体发酵培养的方式来考查多种因素(碳、氮源、初始培养基 pH 值和培养时间)对于虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响, 并据此进行优化。

## 1 材料

## 1.1 菌种和试剂

天然冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*) 采自四川省, 天然蛹虫草(*Cordyceps militaris*) 采于辽宁省。N-乙酰-β-D-葡萄糖胺(GlcNAc), Sigma 公司; 几丁质及其它药品、试剂, 中国医药集团上海化学试剂公司。

## 1.2 培养基

琼脂斜面培养基: 20% 土豆汁(质量百分数, 下同), 0.5% 葡萄糖, 0.3% 酵母膏, 0.05% MgCl<sub>2</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 2% 琼脂; 种子培养基: 不含琼脂, 其它配比同琼脂斜面培养基。在以下各组测试中培养基中均含有 0.05% MgCl<sub>2</sub> 和 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。

## 1.3 培养条件

分离出的天然冬虫夏草和蛹虫草菌株最初生长在琼脂斜面培养基中, 23℃ 培养 15 d, 取出一小块菌块接入含 100 mL 种子培养基的 250 mL 种子瓶中, 160 r/min 23℃ 培养 5 d, 以 5% 接种量转入含 200 mL 培养基的 500 mL 摇瓶中培养 5 d。将发酵液离心 4 000 r/min 20 min 即得上清液, 将剩余的菌丝体称重以测定生物量。

## 2 方法

## 2.1 几丁质酶的测定

几丁质酶的活性是通过测定其降解几丁质生成的具有还原性的 N-乙酰-β-D-葡萄糖胺(GlcNAc)及其聚合体来定义的<sup>[11]</sup>, 反应产物 N-乙酰-β-D-葡萄糖

第一作者: 博士, 工程师。

收稿日期: 2008-08-05, 改回日期: 2008-10-24

胺及其聚合体以 DNS 法来测定<sup>[12]</sup>。1 个酶活力单位 (U) 定义为在 40℃、最佳反应条件下, 每分钟生成的还原性物质相当于 1 μmol GlcNAc 所需要酶的量。

实验中所有组上清液的量都近似 188 mL (±7 mL), 因而酶活 (mU/mL) 高的组则同样意味着这组总的几丁质酶活性 (酶活 × 上清液体积) 也高。

2.2 碳源种类对冬虫夏草和蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

测试的碳源包括: (1) 单种碳源: 2% 胶状几丁质、小片状几丁质、粉状几丁质、葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖。(2) 复合碳源: 以 2% 胶状几丁质为基础碳源, 分别加入 1% 的葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖。氮源为 0.3% 酵母膏。

2.3 初始碳源浓度对蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

分别以 0.5%、1%、2% 和 4% 胶状几丁质为碳源, 氮源为 0.3% 酵母膏。

2.4 氮源对蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

测试的氮源包括: 0.1%、0.3%、0.5% 酵母膏、蛋白胨和硫酸铵, 碳源为 1% 胶状几丁质。

2.5 初始培养基 pH 和培养温度对蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

测定的初始 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0。碳源为 1% 胶状几丁质, 氮源为 0.1% 酵母膏。

2.6 蛹虫草菌丝体培养周期中胞外几丁质酶活性的变化

自接种后起, 每 24h 收获检测生物量、几丁质酶的活性 1 次, 至 168h 为止。

3 结果与分析

3.1 碳源种类对冬虫夏草和蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

碳源是生物体的重要营养来源, 它对于细胞的生长和代谢产物的合成有着重要的影响, 不同碳源对蛹虫草和冬虫夏草生物量和胞外几丁质酶活性的影响结果见表 1。数据说明虫草菌丝体的量与碳源密切相关, 相比较而言各种糖类比几丁质对于菌体的生长更有利, 因为它们容易被吸收, 其中蔗糖最能促进菌体生长。冬虫夏草菌丝体的生长状况明显不如蛹虫草, 菌丝体重量仅为相应蛹虫草组 1/3 左右, 且难以在仅以几丁质为碳源的情况下生长。各单种糖组的几丁质酶活性都很低, 酶活最高的组是菌丝体量处于中游的 2% 胶状几丁质组, 粉状、片状几丁质组无论

在生物量还是在酶活方面都不如胶状几丁质组。

表 1 不同碳源对蛹虫草和冬虫夏草菌丝体生物量和几丁质酶活性的影响

碳源	蛹虫草		冬虫夏草
	生物量 (湿重)/g	几丁质酶活性 /mU·mL <sup>-1</sup>	生物量 (湿重)/g
2% 葡萄糖	15.3	0.8	6.5
2% 蔗糖	17.8	0.5	6.2
2% 麦芽糖	13.6	0.9	5.4
2% 果糖	15.5	0.5	5.7
2% 小片状几丁质	3.9	4.8	/
2% 粉状几丁质	6.9	6.3	/
2% 胶状几丁质	9.7	9.9	<1.0
2% 胶状几丁质 +1% 葡萄糖	14.7	5.8	3.7
2% 胶状几丁质 +1% 蔗糖	17.1	4.5	3.9
2% 胶状几丁质 +1% 麦芽糖	12.8	5.9	3.3
2% 胶状几丁质 +1% 果糖	15.4	5.6	3.0

在胶状几丁质基础上加入各种糖均能使菌体的生长得到有效地促进, 好于仅使用胶状几丁质的情况, 此时蛹虫草菌丝体的生物量已经接近于以 2% 糖类为培养基的组, 但冬虫夏草菌丝体的量仍较低, 这再次证明了其难以利用几丁质。蛹虫草复合碳源组分泌几丁质酶的能力强于单种糖组, 但仍不及胶状几丁质组。胶状几丁质尽管不是最有利于菌体生长的, 但却最能促进几丁质酶合成, 是最适合的碳源。

在相同条件下冬虫夏草菌丝体的生物量和胞外几丁质酶的活性均远不如蛹虫草, 而且在液体培养条件下似乎只能利用糖类等容易摄取的碳源, 难以在仅含几丁质的培养基中生长。推测这就是冬虫夏草较蛹虫草更难以人工培养、尤其是进行子实体培养的原因之一, 在以下的实验中不再继续考察。

3.2 初始碳源浓度对蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

如表 2, 随着胶状几丁质用量的增加, 菌丝体的量呈线性增加, 但几丁质酶的活性并不呈类似的趋势。在 1% 浓度时酶活最高, 此后随胶状几丁质用量的增加而下降, 因此 1% 被确认为最佳初始碳源用量。

表 2 不同初始碳源浓度对蛹虫草菌丝体生物量和几丁质酶活性的影响

碳源	生物量(湿重)/g	几丁质酶活性/mU·mL <sup>-1</sup>
0.5% 胶状几丁质	7.3	9.1
1% 胶状几丁质	8.7	12.1
2% 胶状几丁质	9.4	10.3
4% 胶状几丁质	10.5	9.6

3.3 氮源对蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

氮源的种类和浓度对于蛹虫草生物量的作用相比碳源要小不少,但它们对胞外几丁质酶的活性也有一定影响。单独增加氮源的量反而会导致几丁质酶活性下降,各组中以 0.1% 酵母膏组酶活最高,它被确定为优选的氮源。

表 3 不同氮源对蛹虫草菌丝体生物量和几丁质酶活性的影响

氮源	浓度/%	生物量(湿重)/g	几丁质酶活性/mU·mL <sup>-1</sup>
酵母膏	0.1	9.3	12.9
	0.3	9.9	11.7
	0.5	9.7	10.2
蛋白胨	0.1	9.7	10.1
	0.3	10.1	9.5
	0.5	10.0	8.9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1	9.4	9.6
	0.3	9.4	8.4
	0.5	9.9	7.8

3.4 初始培养基 pH 对蛹虫草菌丝体胞外几丁质酶活性的影响

培养基的 pH 值对于菌丝体的生长和酶的活性有着重要的影响(表 4)。最利于蛹虫草生长的 pH 约为 6.0,这也接近在普通培养基(含糖类、丰富的氮源等)上生长的蛹虫草菌丝体最佳 pH 条件,蛹虫草胞外几丁质酶的活性也在此 pH 时达到最高(数据未列出)。相比较而言,在更酸性的环境下(pH<6.0),其上清液的酶活下降较少,而在碱性环境下酶活则降低较多,这是由于包括蛹虫草在内多数真菌胞外几丁质酶的活性在弱酸性条件下比在弱碱性条件要高<sup>[13]</sup>。

表 4 不同初始培养基 pH 对蛹虫草菌丝体生物量和几丁质酶活性的影响

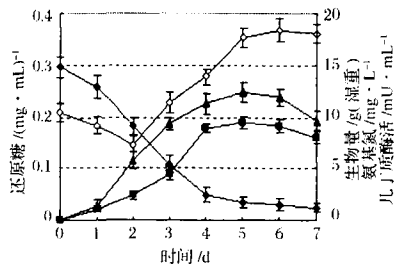
pH 值	生物量(湿重)/g	几丁质酶活性/mU·mL <sup>-1</sup>
4.0	7.1	10.0
5.0	8.6	11.6
6.0	9.2	12.4
7.0	6.8	9.5
8.0	4.7	6.3

3.5 蛹虫草菌丝体培养周期中胞外几丁质酶活性的变化

培养基优化之后,研究考察了发酵周期中几丁质酶活性的变化情况。如图 1 所见,经过约 1d 的环境适应后,蛹虫草在接种后的 2~4 d 内生长得十分快

速,在此时间段大部分的营养被消耗殆尽(氨基氮的量由最初的 14.8 减少到 2.4 mg/L)。用肉眼可以观察到培养基中的胶状几丁质逐渐减少,直至最后不存在明显的胶状几丁质。菌丝体的量在 4~5 d 达到顶峰,然后进入稳定期,此时生物量保持稳定,当衰亡期到来时细胞开始自溶,生物量下降。进入对数生长的末期之后,培养基中的氨基氮的量减少地比较缓慢。

由于还原糖是几丁质酶的降解产物,因而对培养基中其含量的监测十分重要。在整个培养周期中,还原糖的量呈现出 2 个高峰,即最初时的 0.209 mg/mL 和第 6 天的 0.368 mg/mL。自接种起还原糖的量逐渐减少,至 48 h 时到达最低值,其后开始快速上升至第 6 天的又一个顶峰,最后再次呈下降趋势。蛹虫草生长初期培养基中的还原糖主要来自于酵母膏,因为此时几丁质酶的活性还很低,不会降解产生大量的酶解产物还原糖。随着菌体对这些还原糖的吸收和利用,其浓度逐渐降低。进入指数生长期之后,随着菌体量的增加和几丁质酶被大量诱导合成出来,酶活呈快速增长的趋势,在第 5 天即细胞进入稳定期时达到最高(12.4 mU/mL)。在这段时间内,被几丁质降解产生的还原糖日益增多。进入衰退期后,由于没有了底物、存在酶解产物遏制以及细胞死亡后产生的蛋白酶的降解,几丁质酶的活性下降很快。



■ 生物量;◇ 还原糖;◆ 氨基氮;▲ 几丁质酶活性

图 1 蛹虫草菌丝体培养周期中菌丝体生物量、培养基中还原糖、氨基氮的含量和胞外几丁质酶活性的变化

4 讨论

糖类虽然有利于细胞生长,却并不适合几丁质酶的生产。几丁质是不利于虫草生长的碳源,因为细胞需要相对长的一段时间合成几丁质酶以分解这种复杂碳源,但其上清液中几丁质酶的活性比单独使用糖类要高很多,推测酶主要是由几丁质所诱导和调节的。相比于胶状几丁质,小片状、粉状几丁质为碳源时细胞的生长和几丁质酶的分泌都较低,原因是胶状

几丁质在培养基中分布的更为均匀,比表面积较大,且在胶状几丁质的制备过程中会有一些几丁质会被部分降解成较短的链,因而更易被细胞所利用。此外,也可能是由于不同几丁质底物对酶的诱导效果不同所致<sup>[14]</sup>。实验曾考虑将2种碳源混合以达到生物量和几丁质酶活性的共同最优化,但事实证明复合碳源虽然有利于蛹虫草生长,但糖类的加入同时抑制了几丁质酶的合成。由于菌体会首先利用易吸收的糖类,此时几丁质不能充分的诱导几丁质酶的产生。

随着碳源中胶状几丁质含量的增加,细胞量呈线性增加,在0.5%~4%,生物量与胶状几丁质的浓度成正相关。但胶状几丁质的量与胞外几丁质酶活性仅在0.5%~1%内成正比,随着几丁质用量的继续增加酶活呈下降趋势。导致这一结果的原因是较高含量的胶状几丁质会使菌体较为快速地生长,从而使培养基中几丁质酶降解几丁质的最终产物即还原糖的量上升很快,在指数生长期就达到一个足以阻遏几丁质酶继续合成的浓度(见图2)。因此,培养基中过高的还原糖的量应该被避免。

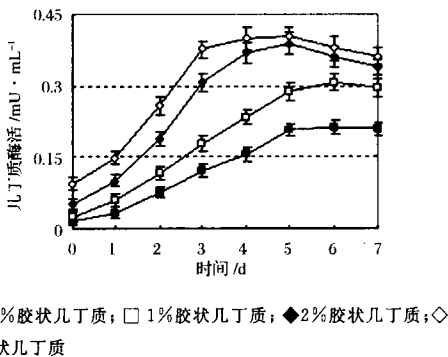


图2 蛹虫草培养周期中不同初始胶状几丁质浓度组的培养基还原糖含量的变化

氮源对细胞生物量和胞外几丁质酶活性影响较碳源要小,研究表明使用硫酸铵和蛋白胨为氮源会导致酶活显著下降,与对照组相比活性降低了14%~33%。对于蛋白胨来说,活性下降的原因是蛹虫草可以同时利用它为碳源,使几丁质的诱导作用变低。酵母膏含有多种营养物质、生长因子以及GlcNAc的寡聚体,其中GlcNAc寡聚体亦能诱导几丁质酶的产生。但由于它比单纯的胶状几丁质更易被细胞吸收,因而较高的酵母膏在促进菌体生长的同时也会导致酶活的降低。因此较低浓度的酵母膏才有利于几丁质酶的产生,Monreal等的研究也获得了类似的结果<sup>[15]</sup>。

蛹虫草菌丝体的生物量和胞外几丁质酶的活性同时在pH6.0时达到最高,这也印证了胞外酶的活性通常在对于生长最有利的酸碱条件下达到最高这一看法<sup>[16]</sup>。以几丁质为碳源时,酶活性的变化趋势与菌体生物量的曲线近似。几丁质酶活性的高低与菌体量、培养基中胶状几丁质和还原糖的浓度和菌体所处的时期密切相关。

综上所述,培养条件能显著影响蛹虫草胞外几丁质酶的活性,而且酶活主要取决于碳源,而非氮源。几丁质(尤其是胶状几丁质)对几丁质酶的诱导合成是十分重要的,当培养基中不存在几丁质、细胞优先利用其它营养物质或存在产物阻遏时,酶的合成就会被抑制。研究确定的优化培养基以2%胶状几丁质为碳源,0.1%酵母膏为氮源,初始培养基pH值为6.0,培养时间5d,此时胞外几丁质酶的活性达到12.0mU/mL以上。本研究的结果为今后从虫草菌丝体发酵液中提取、纯化胞外几丁质酶,并用于人工子实体的培养打下基础。

#### 参考文献

- 1 Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I[J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 1998(4): 289~303
- 2 Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part II[J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 1998(4): 429~457
- 3 Krieger MC, Schrank A, Vainstein M H. Regulation of extracellular chitinase and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*[J]. Current Microbiology, 2003, 46: 205~210
- 4 St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes[J]. Journal of General Microbiology, 1986, 132: 1 509~1 517
- 5 St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka M, et al. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 907~912
- 6 张爱文. 白僵菌的致病力与菌株生长特性及几丁质酶活性的关系[J]. 生物防治通报, 1990, 6(4): 161~164
- 7 刘智辉, 陈守文, 郭志红, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶和几

- 丁质酶活性与对亚洲玉米螟毒力的相关性分析[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 364~368
- 8 徐红革, 彭辉银. 沙雷氏杆菌 S3 菌株产几丁质酶对棉铃虫不同虫龄幼虫的后致死作用[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 58~61
  - 9 Qiu Liyou. Microbe chitinase and its application to pest control[J]. Acta Agriculturae Universitatis Henancensis, 1995, 29: 184~191
  - 10 周广麒, 万晓星, 侯友松, 等. 蛹虫草液态深层发酵的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(8): 39~43
  - 11 Imoto T, Ragishita K. A simple activity measurement of lysozyme [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1971, 35: 1 154~1 156
  - 12 Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426~428
  - 13 Havukkala I, Mitamura C, Hara S, et al. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1993, 61: 97~102
  - 14 Svitil AL, Chadhain SM, Moore JA, et al. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 408~413
  - 15 Monreal J and Reese ET. The chitinase of *Serratia marcescens* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1969, 15: 689~696
  - 16 McTigue MA, Kelly CT, Fogarty WM, et al. Production studies on the alkaline amylase of three alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. Biotechnology Letters, 1994, 16: 569~574

## Extracellular Chitinase Activity of Fermented *Cordyceps militaris* Mycelium

Gu Yuxiang<sup>1</sup>, Li Suxia<sup>2</sup>, Yuan Qinsheng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

<sup>2</sup> (State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**ABSTRACT** The extracellular chitinase is one of the crucial factors for *Cordyceps militaris* in infecting hosts; thus, increasing its activity will be helpful to the development of artificial *C. militaris* fruit body cultivation. In this study, the abilities of *C. militaris* for chitinase production under multiple conditions (carbon sources, nitrogen sources, initial pH of medium and fermentation time) were explored. Results showed that the production of chitinase mainly depended on carbon sources, and 1% colloidal chitin was the best inducer of chitinase. If the inducer was removed, or *C. militaris* preferentially utilize other nutrition, or the end products of chitinase reaction were excessive, the enzyme synthesis will be inhibited. The most suitable medium for accumulation of chitinase was found to be 1% colloidal chitin, 0.1% yeast extract, pH 6.0; the duration of fermentation was 5 days. Under optimized condition, the extracellular chitinase activity was increased to 12mU/mL.

**Key words** *Cordyceps militaris*, mycelium, fermentation, medium, chitinase

市场动态

### 萨伦意大利冰淇淋推出木糖醇系列冰淇淋

2009年,萨伦首推木糖醇系列:经过多年的奋斗,萨伦人终于研制出了用木糖醇代替冰淇淋甜味素的技术。使萨伦冰淇淋中的糖分大幅度降低,从此解决了众多女性消费者害怕长胖的烦恼,实现了她们梦寐以求的愿望。萨伦推出的AD钙系列同样大受欢迎,AD钙系列的研制历时3年,将适合儿童吸收的AD钙加入冰淇淋里,使那些喜爱冰淇淋的孩子们在享受冰淇淋美味的同时,还能从中吸收大量的AD钙,以达到增强体质效果。

另外,萨伦低脂低糖系列也深受大众的喜欢,这款采用了萨伦专有的脱脂技术结合木糖醇替代技术,本为中老年爱冰族开发的冰淇淋新秀,上市以来,不仅受到了他们的一致好评,还意外的赢得了一大批青年爱冰族的欢心。不仅如此,萨伦还专门为一些有特殊需要的爱冰族开发了最独特的无脂无糖系列,彻底的除了那些整日因身体烦恼,而不得不远离冰淇淋的爱冰族的病痛威胁。