

蛹虫草栽培过程中胞外蛋白酶活性变化研究

林群英^{1,2}, 吴亮亮^{1,2}, 张锋伦¹, 吴素玲¹, 孙晓明^{1,3}, 项春荣³

(1. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042; 2. 江苏鸿丰果蔬食品有限公司, 江苏 宿迁 223700;

3. 镇江市丹徒区正东生态农业发展中心, 江苏 镇江 212000)

摘要:以蛹虫草为试材, 研究蛹虫草生长过程中子实体鲜重、培养基 pH 值、胞外酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶的活性变化。结果表明: 蛹虫草酸性蛋白酶的活性大小受氮源的影响, 由 112 U/g 提高至 213 U/g, 但形成规律基本一致。胞外中性和碱性蛋白酶的活性高低及形成规律均受到氮源的影响。中性蛋白酶活性在氮源培养基中第 30 天达到最高峰, 为 10.2 U/g, 而在空白培养基上却未检测得显著的峰值。碱性蛋白酶活性受氮源的影响在第 10 天开始上升, 至第 50 天达到最大值(10 U/g)。在空白培养基上, 碱性蛋白酶活性在第 50 天开始上升, 培养结束时达最大值(6.5 U/g)。这 3 种蛋白酶中, 酸性蛋白酶活性与子实体的生长趋势相关性最大。该研究将为蛹虫草子实体生产的营养生理研究提供参考依据。

关键词:蛹虫草; 子实体栽培; 胞外蛋白酶

中图分类号:S 567.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0148-03

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)亦称北冬虫夏草或北虫草, 是我国传统珍贵中草药, 具有抗肿瘤、抗病原微生物、保护肝肾及呼吸系统和调节免疫系统作用等功效^[1-2]。自 1987 年我国首次成功人工栽培蛹虫草子实体以来, 人工栽培技术和工艺研究一直备受关注^[3-4]。目前, 蛹虫草已经实现了商业性规模化栽培生产, 产量持续增长。在人工条件下, 蛹虫草子实体的生长以大米等谷物类为较理想的基质, 以动植物性蛋白质为主要氮源, 蛋白质对子实体的发生甚至有着决定性的作用^[5-6]。蛋白酶不仅是虫生真菌包括虫草侵染寄主的主要毒力因子之一, 在营养生殖方面亦有重要意义^[7]。但目前关于蛹虫草子实体生长过程中胞外蛋白酶变化尚鲜见报道, 因此有必要对此进行研究, 以了解胞外酶在蛹虫草生长发育过程中的规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蛹虫草斜面菌株由南京野生植物综合利用研究院保存。接种于 PDA 培养基上, 25℃ 培养 14 d, 5℃ 下保存备用。

第一作者简介:林群英(1979-), 女, 博士, 助理研究员, 现主要从事食用菌栽培与应用等研究工作。E-mail: linqunying1007@126.com.

责任作者:孙晓明(1964-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事食用菌栽培与深加工等研究工作。E-mail: sunxm64@163.com.

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2013BAD16B07)。

收稿日期:2014-05-20

液体菌种为将斜面菌种接入液体培养基中, 25℃ 下, 120 r/min 振荡培养 7 d, 待菌丝球完全充满培养液, 即可用于接种。

1.2 试验方法

蛹虫草的栽培条件参照林群英等^[8]研究。添加营养液配制所得的培养基称为营养培养基(NS)。以纯净水代替营养液, 与大米按相同比例配制成空白培养基(CK)。接种后的 2 组培养基放置在人工气候箱内, 分别在培养的第 10、20、30、40、50、60 天进行采样。自第 30 天起, 采收相应的子实体, 称其鲜重。每个处理设置 3 次重复。

1.3 项目测定

1.3.1 培养基 pH 测定 称取培养基 4 g, 压碎, 加入纯净水 10 mL, 稍加振荡, 放置 30 min, 用 pH 计进行测定。

1.3.2 粗酶液提取及活性测定 将原基或子实体去掉, 仅取带菌丝的培养基。称取带菌丝的培养基 4.0 g, 压散, 加入适当的缓冲液 20 mL, 室温放置 2 h, 过滤, 滤液即为粗酶液。酸性蛋白酶采用乳酸缓冲液(pH 3.0), 中性蛋白酶采用磷酸缓冲液(pH 7.5), 碱性蛋白酶采用硼酸缓冲液(pH 10.5)。以 1% 酪素为底物, 加入粗酶液 1.0 mL, 40℃ 保温 10 min, 加入三氯乙酸终止反应, 采用福林法测定产物含量^[9]。利用不同浓度的 L-酪氨酸溶液作标准曲线。以煮沸失活的酶液为对照, 每组设 3 次重复。酶活单位(IU)定义为 40℃ 下, 1 min 生成 1 μg 酪氨酸所需要的酶量。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草生长过程中子实体鲜重的变化

蛹虫草子实体栽培周期约为 60 d,在 NS 培养基子实体重量的增长速度由第 40 天开始加快,并持续至栽培结束(图 1)。而在 CK 培养基中,蛹虫草子实体的产量明显低于 NS 组。

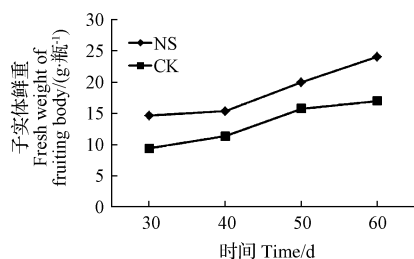


图 1 蛹虫草生长过程中子实体鲜重的变化

Fig. 1 Changes of fresh weight of fruiting body during growth of *Cordyceps militaris*

2.2 蛹虫草生长过程中培养基 pH 值的变化

蛹虫草生长过程中 NS 培养基 pH 值一开始出现下降,随后保持平稳,在培养的第 50 天又升到最高值。这可能是由于蛹虫草分解淀粉或糖分子产生酸性物质所致。与 CK 培养基相比,NS 培养基中,pH 值变化较大,酸性更强(图 2)。

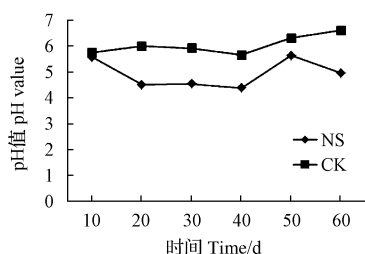


图 2 蛹虫草生长过程中培养基 pH 值的变化

Fig. 2 Changes of pH value in medium during growth of *Cordyceps militaris*

2.3 蛹虫草生长过程胞外酸性蛋白酶的活性变化

蛹虫草生长过程中胞外酸性蛋白酶活性呈上升趋势。受 NS 培养基中氮源的影响,胞外酸性蛋白酶远远高于 CK 培养基。在 NS 培养基上,胞外酸性蛋白酶在栽培终点时活性最高,为 25 U/g,是 CK 的 2 倍。在 CK 培养基上,胞外酸性蛋白酶的活性呈现小幅度的增长,至栽培结束时达到最高峰,为 13 U/g(图 3)。

2.4 蛹虫草生长过程胞外中性蛋白酶的活性变化

蛹虫草生长过程中,胞外中性蛋白酶活性受到 NS 培养基中氮源的影响而与 CK 培养基上的活性有较大差异。NS 培养基上,胞外中性蛋白酶活性在培养的第 30

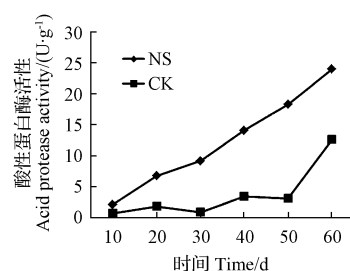


图 3 蛹虫草生长过程中胞外酸性蛋白酶的活性变化

Fig. 3 Extracellular acid protease activity during growth of *Cordyceps militaris*

天达到最高峰,为 10.2 U/g,而在 CK 培养基上却未检测得明显的最高活性(图 4)。中性蛋白酶的最大活性出现在蛹草原基形成后,开始进入生长期时,可能是由于生长需求导致了酶活性的峰值出现。

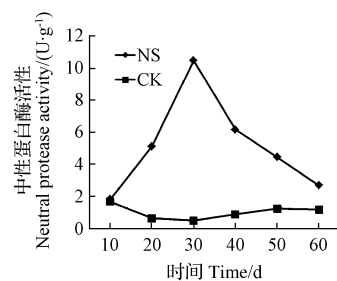


图 4 蛹虫草生长过程中胞外中性蛋白酶的活性变化

Fig. 4 Extracellular neutral protease activity during growth of *Cordyceps militaris*

2.5 蛹虫草生长过程胞外碱性蛋白酶的活性变化

蛹虫草生长过程中胞外碱性蛋白酶活性受 NS 培养基的氮源影响。在 NS 培养基上,胞外碱性蛋白酶活性在第 10 天开始上升,至第 30 天时出现轻微的下降外,至第 50 天达到最大活性,为 10 U/g,之后开始下降(图 5)。在 CK 培养基上,除了在第 10 天和第 60 天外,蛹虫草的胞外碱性蛋白酶活性保持在 2 U/g 左右。

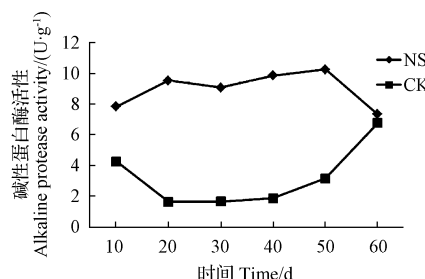


图 5 蛹虫草生长过程中胞外碱性蛋白酶的活性变化

Fig. 4 Extracellular alkaline protease activity during growth of *Cordyceps militaris*

3 讨论与结论

在栽培过程中,蛹虫草胞外蛋白酶受到培养基中氮源的强烈影响,3种不同类型的蛋白酶活性均有较大幅度的提高。蛹虫草生长发育主要以酸性蛋白酶为主,其次是碱性蛋白酶和中性蛋白酶。栽培过程中培养基的pH值均维持在弱酸性范围内,利于酸性蛋白酶的产生。蛹虫草蛋白酶活性规律与白灵菇(*Pleurotus nerbroden-sis*)相似,白灵菇的酸性蛋白酶和中性蛋白酶活性在菌丝生长阶段比较稳定,现蕾前相对较低,子实体生长阶段2种酶的活性又明显增强。整个生长阶段酸性蛋白酶的活性明显高于中性蛋白酶的活性^[10]。彭志妮等^[11]研究发现,以黄豆为生长基质时,蛹虫草的胞外蛋白酶活性最高峰出现在第20天,为18 U/g(干培养物),与该研究的结果相近,但在第25天开始下降,这可能是由于固体培养菌丝体并未进行子实体栽培,对基质的利用程度不同所致。

食用菌胞外酶与子实体生长发育之间的联系是食用菌生理研究的热点之一。目前研究食用菌胞外酶的种类主要集中在担子菌,它们的生长发育阶段分明,利于研究。蛹虫草作为一种子囊菌,对其栽培过程中胞外酶开展研究,以获得可反映其代谢活动的生化指标。蛹虫草胞外蛋白酶活性与菌丝体及子实体的生长发育并未显示出强烈的相关性,但酸性蛋白酶与子实体生长情况呈较好的正相关性,可继续系统分析酸性蛋白酶与

子实体生长的联系,以更利于蛹虫草子实体的栽培生产。

参考文献

- [1] Das S K, Masuda M, Sakurai A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8):961-968.
- [2] 林群英,宋斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(4):154-157.
- [3] 谷恒生,梁曼逸. “虫草”人工培育研究简报[J]. *吉林蚕业*, 1986(2):38.
- [4] Shrestha B, Han S K, Sung J M, et al. Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolat their single ascospore progeny strains[J]. *Mycobiology*, 2012, 40(2):100-106.
- [5] Basith M, Madelin M E. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1968, 46:473-480.
- [6] 方华舟,王小艳,向会耀. 不同氮源对蛹虫草菌丝及子实体生长状况的影响[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(11):2734-2737.
- [7] 姚剑,李增智,樊美珍. 虫生真菌入侵过程中酶的研究[J]. *安徽农业大学学报*, 1996, 23(3):303-308.
- [8] 林群英,宋斌,钟月金,等. 蛹虫草人工栽培条件优化研究[J]. *中国食用菌*, 2006, 25(6):17-19.
- [9] 姜锡瑞,段钢. 新编酶制剂实用技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002.
- [10] 周长青,王秀峰,李玉. 白灵菇生长发育过程中胞外酶活性的变化规律[J]. *食用菌学报*, 2008, 15(2):64-68.
- [11] 彭志妮,郭丽琼,张新超,等. 蛹虫草固体发酵大豆基质的成分及抗氧化活性变化研究[J]. *菌物学报*, 2011, 30(2):338-342.

Study on Extracellular Protease Activity Change During Fruitbody Growth of *Cordyceps militaris*

LIN Qun-ying^{1,2}, WU Liang-liang^{1,2}, ZHANG Feng-lun¹, WU Su-ling¹, SUN Xiao-ming^{1,3}, XIANG Chun-rong³

(1. Nanjing Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing, Jiangsu 210042; 2. Jiangsu Hongfeng Fruit and Vegetable Co. Ltd., Suqian, Jiangsu 223700; 3. Zhengdong Ecological Agriculture Development Center of Zhenjiang City Dantu District, Zhenjiang, Jiangsu 212000)

Abstract: Taking *Cordyceps militaris* as materials, the fresh weight of fruit body, pH value in medium, and the activity of extracellular acid protease, neutral protease and alkaline protease during growth of *Cordyceps militaris* were investigated. The results showed that the activity of acid protease could be affected obviously by nitrogen but not the profile. The highest activity of 112 U/g was promoted to 213 U/g by nitrogen supplement. Both activities and profiles of neutral and alkaline proteases were affected by nitrogen supplement. The highest activity of neutral protease was recorded on the 30th day with 10.2 U/g. And no obvious maximum was detected on substrate without nitrogen supplement. Alkaline protease activity began to rise on the 10th day and reached to the highest (10 U/g) at the 50th day on nitrogen-supplemented substrate. And alkaline protease activity started to rise only on the 50th day and got to highest (6.5 U/g) at the end of the culture. The findings could be helpful for the nutritional physiology researches of *Cordyceps militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*; fruiting body cultivation; extracellular proteases