

球孢白僵菌液体培养条件下淀粉酶的产生 及活性影响因子*

张丽靖 冯明光** 应盛华

(浙江大学微生物研究所 杭州 310029)

摘 要 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 是一种经典的昆虫病原真菌。利用自蚜虫分离的菌株 SG8702 对该菌产淀粉酶的条件及理化特性进行了研究。从二次旋转组合设计的 13 种液体培养基中, 筛选出适合该菌产淀粉酶的培养基配方, 其成份为可溶性淀粉 0.3%、葡萄糖、蛋白胨和酵母粉各 0.5%。含 10^6 个分生孢子/mL 的此培养液恒温 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 振荡 (120r/min) 培养 3.5d, 菌丝生物量为 16.7mg/mL, 产淀粉酶量达 527.1u/mg 菌丝的最大值。培养液初始 pH 4~6 最有利淀粉酶的产生, 产酶量为 1315.8~1439.2u/mg 菌丝。淀粉酶活性在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.0 条件下最高, 在 pH 3~8 范围内 20 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 20min 或在 pH4~6 范围内 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 1h 酶活较为稳定, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 20min 酶活保持 90% 以上, 50 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 下处理相同时间则酶活分别丧失 52% 和 91%。一定浓度的 Ca^{2+} 有利于酶活提高, 但 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^{+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 等常见金属离子则不同程度地抑制酶活。

关键词 球孢白僵菌, 淀粉酶, 产酶条件, 最适 pH 和温度, 酶活影响因子

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)06-0720-06

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 是最常见的昆虫病原真菌之一, 被广泛研究用于害虫的微生物防治, 其孢子粉的生产常采用液-固两相发酵法, 生产周期一般在 2 周左右^[1,2]。我们在以缩短发酵生产周期和提高孢子粉质量为目的的工艺研究中, 发现一菌株能有效利用低值陈米作为固相发酵基质, 不仅使白僵菌孢子粉质量大幅提高并易于收获, 还使生产周期缩短。该菌株能有效利用大米作为固相发酵基质, 说明它具有产淀粉酶的能力。在昆虫病原真菌的研究中, 虽然胞外蛋白酶、几丁酶和脂酶等常被联想到与侵染过程中的寄主体壁穿透有关而广受关注^[3-6], 但其产淀粉酶的特性却很少研究报道。曾有人注意到金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 产生的淀粉酶与毒力的相关性^[7]和几种虫霉产淀粉酶的特性^[8], 但至今未见球孢白僵菌产淀粉酶及其相关特性的报道。本文报道一球孢白僵菌株产淀粉酶及其特性的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

实验所用球孢白僵菌 SG8702 菌株自麦二叉蚜 (*Schizaphis graminum* (Rondani)) 上分离

* 国家自然科学基金(30070514)和教育部分“长江学者奖励计划”资助

** 通讯联系人 E-mail: mgfeng@cls.zju.edu.cn

作者简介 张丽靖(1979-), 女, 浙江金华人, 硕士研究生, 从事昆虫病原真菌及害虫微生物防治研究。

收稿日期 2002-03-27, 修回日期 2002-06-24

获得^[9],在萨氏培养基(SDAY)^[9]平板上保存于4℃冰箱中。

1.2 粗酶液的制备和菌丝生物量测定

供试菌株在SDAY平板上培养产孢,取少许孢子粉配制成浓度为 2×10^7 个孢子/mL的悬液,按5%的比例接入盛有40mL萨氏培养液(SDAY中去掉琼脂,简称SDB)的100mL锥形瓶中,使培养液中孢子浓度为 10^6 个孢子/mL,然后在25℃下振荡培养3.5d,过滤后离心(2000 r/min)10min,上清液即为测定用粗酶液。过滤物在60℃下烘至恒重,精确称量干菌丝重量,换算为单位容积的菌丝生物量。

1.3 酶活测定

参照Hamilton等的方法^[10]略加改进。取0.2%可溶性淀粉溶液1mL,置于10mL试管中,加入0.5mL pH 6.0广泛缓冲液,于40℃水浴预热5 min,加入0.5mL粗酶液,摇匀保温酶解15 min。反应结束时取0.5mL反应液在5 mL稀碘液中显色,再在紫外分光光度计(Spectronic® Genesys™ 5 Spectrophotometer, Spectronic Instruments, Inc., NY)620 nm下比色,记录吸光度(OD值),并计算相应水解的淀粉量。重复3次。

在上述条件下测定的酶活为标准酶活,一个酶活力单位(u)定义为在此条件下每分钟水解1μg淀粉所需的酶量。

1.4 产淀粉酶的条件

1.4.1 液体培养基配方优化 在固定蛋白胨和酵母粉含量(100 mL中含0.5g)的条件下,通过添加适量分析纯可溶性淀粉而考查葡萄糖和淀粉两因子对淀粉酶产生的影响。采用二次旋转组合设计方法^[11],每100mL液体培养基中可溶性淀粉和葡萄糖的零水平分别为0.3g和0.5g,步长分别为0.2g和0.3g,共产生13个配方。各配方培养基灭菌后,接种球孢白僵菌孢子悬液,恒温(25±1)℃,振荡(120r/min)培养3.5d,然后测定发酵液中的淀粉酶活性。

1.4.2 培养时间的影响 在含0.5%葡萄糖、0.3%淀粉、0.5%蛋白胨及0.5%酵母粉的液体培养基中接入孢子悬液,分别恒温(25±1)℃振荡(120r/min)培养24、48、72、96、120及144 h。每处理重复3次,测定发酵液中菌体生物量和淀粉酶活性。

1.4.3 初始pH的影响 液体培养基同上,用1.0 mol/L盐酸和氢氧化钠溶液将培养基的初始pH分别调到4.0、5.0、6.0、6.5、7.0和8.0。接菌后振荡培养4 d,测定发酵液中的菌丝干重、淀粉酶活性和终pH值。

1.5 淀粉酶的特性测定

1.5.1 酶作用最适pH及其稳定性 分别取不同pH值的广泛缓冲液0.5mL,在酶反应前与1.0mL 0.2%可溶性淀粉溶液共预热5min,然后加入酶液进行反应,以测定其在不同pH下的活性。另外,先用广泛缓冲液将酶液调到pH 2.6、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0和9.0,在20℃下保温20min或37℃下保温1 h,然后将其pH值调回到6.0,再测定酶的活力。不同pH下的酶活测定值与标准酶活测定值之比,即为剩余活力。

1.5.2 酶作用最适温度及稳定性 将酶反应体系温度分别调到30、40、45、50、60及70℃,然后在pH6.0条件下测定淀粉酶的活性,以明确酶反应的适宜温度。将酶液在40、50、60和70℃下分别处理20、40、60和80min,冷却至室温时测定酶的剩余活力,以分析酶的热稳定性。

1.5.3 金属离子的影响: 分别将 20 mmol/L 的 CuSO_4 、 MnSO_4 、 EDTA-Na_2 、 HgCl_2 、 MgSO_4 、 CaCl_2 和 FeSO_4 溶液与酶液 1:1 混合, 37°C 反应 2min, 以蒸馏水作对照, 测定酶剩余活力。

2 结果

2.1 产酶培养基

对二次旋转组合设计试验结果的分析表明, 供试菌在 13 种液体培养基中的淀粉酶产量存在明显差异, 变幅为 221.6 ~ 527.1 u/mg 菌丝。淀粉酶产量 y 与培养液中葡萄糖含量 x_1 和可溶性淀粉含量 x_2 之间存在优化关系: $y = 495.92 + 53.33x_1 - 91.73x_1^2 - 25.12x_2^2$ ($P < 0.05$)。

根据该模型的优化结果, 含淀粉 0.3% 和葡萄糖 0.5% (蛋白胨和酵母粉固定在 0.5%) 的培养基产淀粉酶量最大, 达 495.9 u/mg 菌丝, 与试验观察最大值相对应的培养基完全吻合。作为对照的标准 SDB 培养基的产酶量为 16.6 u/mg, 仅相当于上述最佳培养基产酶量的 3.1%。因此, 以下有关试验均以该液体培养基作为淀粉酶的产生基质。

2.2 培养时间对淀粉酶的影响

供试菌株在液体培养的前 72h 以菌体生长和增殖为主, 至 72h 时菌丝生物量达到最大值。在液培的第 24 h 至 96 h 期间, 发酵液中的淀粉酶浓度不断上升, 在第 96 h 时达最大值 (图 1)。

在菌丝生物量达到高峰后继续培养, 由于菌丝老化而自溶, 使菌丝生物量不断下降, 淀粉酶活性也随之下降。因此, 供试菌株产淀粉酶的液培时间以 4 d 为宜。

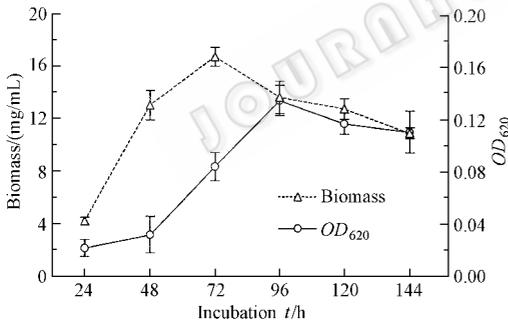


图 1 液体培养时间对球孢白僵菌 SG8702 菌丝生物量和产淀粉酶的影响

Fig. 1 The effect of incubation time on the mycelial biomass and amylase production of *B. bassiana* SG8702 in liquid culture

2.4 淀粉酶的特性

2.4.1 最适 pH 及其稳定性: 供试菌淀粉酶活性受酸碱度影响较大, 在偏酸的反应条件下酶活较高 (图 2 - A)。pH 3 ~ 6 是较适宜的酶活范围, pH 4.0 时酶活最高, 达 5637 u/mL。在 20°C 下处理 20 min, 淀粉酶在 pH 3 ~ 8 范围内稳定性良好, 剩余活力保持在 75% 以上, 在 pH 4 ~ 6 范围内剩余活力达 88% ~ 96%。37°C 下处理 1 h, 酶活的 pH 稳定范围变窄, 在 pH 4 ~ 6 范围内酶活保存 75% ~ 86%, 在此范围之外酶活锐减 (图 2 - B)。

2.3 培养基初始 pH 对淀粉酶产生的影响

初始 pH 为 4.0 ~ 8.0 的液体培养基接种后经 4 d 培养产酶, 终 pH 值绝大多数不超过 4.5, 仅初始 pH 为 6.0 处理的终 pH 为 4.9。方差分析表明, 不同初始 pH 处理下的淀粉酶产量存在极显著差异 ($F = 94.95, P < 0.01$)。在初始 pH 等于 4.0、5.0 和 6.0 的培养液中, 淀粉酶产量分别为 (1439.2 ± 41.6) (1315.8 ± 91.5) 和 (1421.0 ± 29.2) u/mg 菌丝, 显著高于初始 pH 为 6.5 时的产酶量 [(859.5 ± 122.42) u/mg 菌丝] 和 8.0 时的产酶量 [(778.7 ± 48.1) u/mg 菌丝]。

2.4.2 最适温度及其稳定性 供试菌淀粉酶在 25 ~ 70℃ 内表现不同程度的活性 (图 2-C)。当反应温度低于 40℃ 时,其活性随着温度的上升而增强,超过 40℃ 则酶活性随温度升高而不断下降,而 40℃ 时酶活最高,达 3518 u/mL。热稳定试验 (图 2-D) 表明,淀粉酶在 40℃ 下处理 20 min 后仍保持 90% 以上活性,但 50℃ 和 60℃ 下处理 20 min 则酶活分别丧失 52% 和 91%。

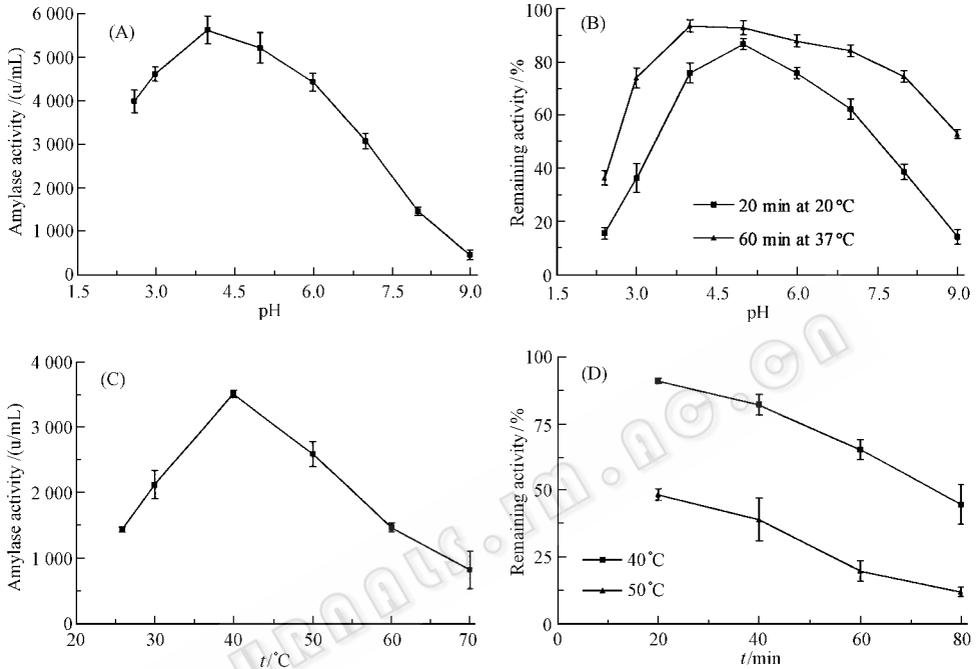


图 2 不同 pH (A、B) 和不同温度 (C、D) 下球孢白僵菌淀粉酶的活性及稳定性

Fig. 2 Activity and stability of *B. bassiana* amylases at different pH (A and B) and temperature (C and D)

2.4.3 金属离子的影响 测定了 7 种金属离子,除 Ca^{2+} 对酶活略有激活作用外,其它离子都表现为不同程度的抑制作用,其差异极为显著 ($F = 28.80, P < 0.01$)。图 3 给出不同金属离子对酶活影响的程度及其多重比较结果,各处理间不同字母表示在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异显著,相同字母则表示差异不显著。其中, Fe^{2+} 的抑制作用最强,与对照相比的相对酶活力仅 8.6%; Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶活的抑制作用依次减弱,而 Na^{+} 对酶活的抑制作用明显比上述 4 种金属离子更弱,但与对照相比仍达显著水平。

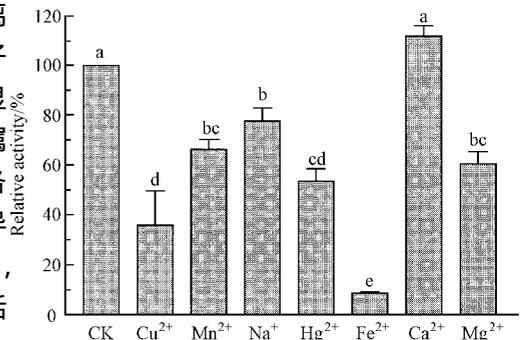


图 3 金属离子对球孢白僵菌淀粉酶活性的影响

Fig. 3 The influence of different metal cations on the activity of *B. bassiana* amylases

3 讨论

球孢白僵菌能产生降解寄主昆虫体壁的

蛋白酶、几丁酶和脂酶等胞外酶,在致病机理和筛选高效杀虫菌株的研究中颇受重视^[3-6]。尽管有报道称虫瘟霉和绿僵菌可产生淀粉酶并与其对寄主的毒力有关^[7,8],但在昆虫病原真菌的研究中淀粉酶较少被关注。在本研究中,球孢白僵菌产生的淀粉酶在40℃和pH 4.0条件下活性最高,产酶量逾1400u/mg菌丝,且一定浓度的Ca²⁺有利于酶活提高。这是首次关于球孢白僵菌产淀粉酶及其特性的报道。

值得注意的是,作为一种经典的杀虫微生物,球孢白僵菌近年的研究出现了超越害虫微生物防治领域的势头。该菌经诱导可产生高亮聚糖酶^[12],其液培菌丝可产生用于生物催化的环氧化物水解酶^[13]和可识别Thomsen-Friedenreich抗原及相关结构的凝血素^[14],还能作为特殊的生物反应器合成倍半萜、双萜及其衍生物^[15,16]。因此,该菌在生物医药和生物化工领域的应用前景初见端倪。淀粉酶是被广泛应用的大宗酶系,因分解淀粉的方式不同而分为 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、糖化酶、异淀粉酶及环糊精葡萄糖基转移酶等。本研究揭示了球孢白僵菌产淀粉酶的能力及基本理化特性,但其所属类型和用途有待于进一步探索。

球孢白僵菌产淀粉酶的特性是其能利用谷物营养固相发酵生产气生分生孢子粉的生化基础。事实上,除白僵菌外,其它丝孢类杀虫真菌也能在谷物表面上生长产孢。这为固相发酵生产用于害虫防治目的的高纯度孢子粉提供了重要依据。

参 考 文 献

- [1] Feng M G, Poprawski T J, Khachatourians G G. *Biocontrol Sci Technol*, 1994, **4** : 3 ~ 34
- [2] 殷凤鸣, 陈权才, 马辉腾, 等. 安徽农业大学学报, 1996, **23** (3) : 213 ~ 220.
- [3] 冯明光. 微生物学报, 1998, **38** (6) : 461 ~ 467.
- [4] 唐晓庆, 李增智. 安徽农业大学学报, 1996, **23** (3) : 279 ~ 284.
- [5] Bidochka M J, Khachatourians G G. *J Invertebr Pathol*, 1990, **56** : 362 ~ 370.
- [6] St Leger R J, Cooper R M, Charnley A K. *J Gen Microbiol*, 1986, **132** : 1509 ~ 1517.
- [7] Silva J C, Siqueira-Junior J P, Marcondes C B, et al. *Revista Brasileira de Genetica*, 1989, **12** : 1 ~ 7.
- [8] Urbanczyk M J, Zabza A, Balazy S, et al. *J Invertebr Pathol*, 1992, **59** : 250 ~ 257
- [9] Feng M G, Johnson J B, Kish L P. *Environ Entomol*, 1990, **19** : 1534 ~ 1542.
- [10] Hamilton L M, Kelly C T, Fogarty W M. *Biotechnol Lett*, 1999, **21** : 111 ~ 115.
- [11] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [12] 方祥年. 微生物学通报, 2001, **28** (3) : 60 ~ 64.
- [13] Moussou P, Archelas A, Furstoss R, et al. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **26** : 414 ~ 420.
- [14] Kossowska B, Lamer-Zarawska E, Olczak M, et al. *Compar Biochem Physiol*, Part B, 1999, **123** : 23 ~ 31.
- [15] Buchanan G O, Reese P B. *Phytochemistry*, 2001, **56** : 141 ~ 151.
- [16] Buchanan G O, Williams L A D, Reese P B. *Phytochemistry*, 2000, **54** : 39 ~ 45.

Production of *Beauveria bassiana* Amylase in Liquid Culture and Activity Influential Factors *

Zhang Lijing Feng Mingguang Ying Shenghua

(Institute of Microbiology , College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract : Cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* as a classic entomopathogenic fungus have been well investigated but little attention has been paid to production of its amylase. A liquid medium including 0.3% of soluble starch and 0.5% of glucose ,peptone and yeast extract was found being optimal to produce amylase in liquid culture of *B. bassiana* SG 8702 , an aphid-derived isolate , among 13 media generated from central composite design. Shaking culture of the liquid containing 10^6 conidia/mL for 3.5 d at the regime of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 120 r/min resulted in mycelial biomass of 16.7 mg/mL and amylase yield of 527.1 units/mg. An initial range of pH 4.0 ~ 6.0 in the liquid culture was found being most favorable to amylase production with the yields of 1315.8 ~ 1439.2 units/mg. The activity of *B. bassiana* amylase was highest at 40°C and pH4.0. Its stability to pH apparently varied with temperature and reaction time length. The amylase was considerably stable at pH 3.0 ~ 8.0 for 20 min at 20°C and at pH 4.0 ~ 6.0 for 1 h at 37°C . The activity of the amylase remained > 90% after 20-min maintenance at 40°C ,but lost 52% and 91% after the same period of time at 50°C and 60°C ,respectively. Moreover , the presence of Ca^{2+} had little effect on the activity of the amylase whereas other cations including Cu^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Hg^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} could be significantly inhibitory to its activity at different levels. This is the first report on the production and features of amylase produced by *B. bassiana* .

Key words : *Beauveria bassiana* , Amylase , Optimal pH and temperature , Activity-influential factors

* A contribution to the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30070514) and the ' Cheung Kong Scholars Programme ' , Ministry of Education , China