

# 球孢白僵菌高壳聚糖酶突变株的筛选\*

方祥年<sup>2</sup> 杜昱光<sup>1</sup> 黄秀梨<sup>3</sup> 洪 洞<sup>3</sup>

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)<sup>1</sup> (浙江大学生命科学院 杭州 310027)<sup>2</sup>  
(北京师范大学生物系 北京 100875)<sup>3</sup>

**摘要:** 以球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 1316 为出发菌株, 通过紫外线和高能电子束分别诱变分生孢子, 采用平板透明圈法初筛和摇瓶培养复筛的方法, 经 3 轮诱变, 筛选到 5 株高产突变株。其中一株最高产的定名为 *Beauveria bassiana* 1316-V1, 其壳聚糖酶活力是原始菌株的 16 倍; 而且经传代培养, 其高产特性能够稳定遗传。

**关键词:** 球孢白僵菌; 壳聚糖酶, 诱变

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0060-05

## SCREENING OF HIGHER CHITOSANASE-PRODUCING MUTANT OF *BEAUVERIA BASSIANA*

FANG Xiang-Nian<sup>2</sup> DU Yu-Guang<sup>1</sup> HUANG Xiu-Li<sup>3</sup> HONG Jiong<sup>3</sup>

(Institute of chemical and physical research, Dalian 116023)<sup>1</sup>

(College of life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027)<sup>2</sup>

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)<sup>3</sup>

**Abstract:** The conidia of *Beauveria bassiana* 1316 were mutagenized by UV and energy-rich electron beam injection. Through three times mutagenesis five higher chitosanase-producing mutant strains were obtained by screening with the method of transparent zones and chitosanase activity measurement of culture filtrate. The highest-yield mutant's chitosanase activity was raised 16 times compared with the original strain. It was named as *Beauveria bassiana* 1316-V1. Its higher chitosanase-producing ability could be inherited after several subcultures.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, Chitosanase, Mutigenesis

1973年, Monaghan 首次报道了壳聚糖酶 (Chitosanase, EC 3.2.1.132) 是一种能水解壳聚糖 [由 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和葡萄糖胺 (GlcN) 通过  $\beta$ -1, 4 糖苷键相连的多糖] 的水解酶<sup>[1]</sup>。以后从许多微生物及低、高等植物中都找到了不同性质的壳聚糖酶<sup>[2]</sup>。发现壳聚糖酶参与某些真菌的菌丝生长, 并作为一种植物病原相关蛋白 (Pathogenesis-Related Protein), 在研究提高植物抗性方面具有重要意义<sup>[3]</sup>。壳聚糖酶在食品、轻工、医药、农业、环保等领域有着较大的应用前景<sup>[4]</sup>。获得高产量、高活性的壳聚糖酶生产菌株将成为重要工作。而球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 作为一种杀虫真菌, 已发现并选育出了高产几丁质酶菌株, 对其酶的特性进行了研究<sup>[5,6]</sup>。本工作是以本室保存的球孢白僵菌 1316 为起始菌株, 通过紫外线和高能电子束诱变其分生孢子,

\* 国家九五攻关项目 (No. 96-C03-01-011)

收稿日期: 1999-11-15, 修回日期: 2000-07-10

最后筛选出5株高产壳聚糖酶突变株。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 1316 为本实验室保藏菌种。

### 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 (完全培养基): 20% 土豆汁 1,000mL, 葡萄糖 20g, 琼脂 15g, pH5.6。

1.2.2 初筛培养基 (固体诱导培养基): 葡萄糖 2g, 蛋白胨 5g, 干酪素 2g, 酵母膏 2g, 20% 土豆汁 200mL, 脱氧胆酸钠 1.5g, 蒸馏水 800mL, 琼脂 15g, pH5.6, 为 A 部分; 1% 胶体壳聚糖, pH5.6, 为 B 部分; 将 A、B 两部分单独灭菌后, 按 1:1 体积比混匀。

1.2.3 复筛培养基 (液体诱导培养基): 葡萄糖 2g, 蛋白胨 5g, 干酪素 2g, 酵母膏 5g, 20% 土豆汁 200mL, 10g 胶体壳聚糖, 蒸馏水 800mL, pH5.6。

### 1.3 仪器和试剂

壳聚糖 (大连海产品公司), GlcN-HCl、 $K_3Fe(CN)_6$  为优级纯, 其余试剂均为分析纯, 胶体壳聚糖按 Yabuki<sup>[7]</sup>法制备。4.5mV 静电加速器。

### 1.4 测定方法

1.4.1 标准壳聚糖酶活力测定方法: 将 Imoto<sup>[8]</sup>法加以改进, 1mL 1% 的胶体壳聚糖 (pH5.6), 加入 1mL 用 0.05mol/L, pH5.6 的乙酸缓冲液适当稀释的酶液, 37℃ 保温 10min, 沸水煮 5min 终止反应, 加入 1mL 0.25mol/L NaOH 使未反应完全的壳聚糖沉淀, 离心 4,000r/min, 10min, 去沉淀, 取上清液至另一干净空试管中, 加入 2mL  $K_3Fe(CN)_6-Na_2CO_3$  试剂 (按 Imoto<sup>[8]</sup>法配制), 加试管帽, 沸水煮 15min, 冷却后于 420nm 测定  $A_{420}$  值。对照管与酶反应管  $A_{420}$  差值 ( $\Delta A_{420}$ ) 与酶活力成正比。在上述条件下, 1 个酶活力单位定义为每分钟释放相当于  $1\mu\text{mol}$  GlcN-HCl 还原糖的酶量。

1.4.2 壳聚糖降解琼脂平板 (Chitosan degraded agar Plate, CDA) 透明圈法快速粗测各收集管酶活力: 按文献 [9] 进行。在复筛过程中, 先用此法粗测各菌株发酵液酶活力, 再用 Imoto<sup>[8]</sup>改进法精确测量。

1.4.3 蛋白质浓度的测定: 按 Bradford<sup>[10]</sup>法进行。

### 1.5 分生孢子悬液的制备

在完全培养基上接种原始菌株 *B. bassiana* 1316, 28℃ 培养 4~5d 至形成大量分生孢子; 用灭菌生理盐水冲洗孢子, 倒入装有玻璃珠的 250mL 三角瓶中, 28℃ 振荡 2~3h, 于显微镜下检查, 待孢子充分分散后, 用灭菌纱布过滤除菌丝, 将浓度调至  $10^6 \sim 10^7$  个/mL。

### 1.6 紫外线 (UV)、高能电子束诱变及突变株的筛选

1.6.1 诱变: 灭菌的小平皿中装 5mL 分生孢子悬液, 在磁力搅拌下, 用 30W 紫外灯 (距离 35cm) 照射处理, 28℃ 避光放置 30min 后, 悬液在无菌室红灯下适当稀释; 另于小试管中装 5mL 分生孢子悬液, 用电子能量  $E = 2.4\text{MeV}$  的高能电子束注入不同时间,

然后，按紫外线照射后的操作处理。

1.6.2 两次初筛：取上述悬液 0.1mL 涂布于种子培养基上，28℃避光培养，计算存活率。并同时接种于初筛培养基上，28℃避光培养 5~6d，观察并测量单菌落及其周围水解透明圈大小。比较透明圈直径与菌落直径之比值 D/d 大小进行第 1 次初筛。选取 D/d 值较大的单菌落，用灭菌牙签点种到新的固体诱导培养基上，待长出单菌落，并出现水解透明圈后，进行第 2 次初筛，第 2 次选取 D/d 值大的单菌落。

1.6.3 复筛：根据初筛结果，从固体诱导培养基上挑取 D/d 值大的单菌落，经完全培养基扩大培养后，接入液体诱导培养基中，28℃摇瓶培养 5~6d (250mL 三角瓶，60mL/瓶，250r/min)，4000r/min 离心 15min 取上清液，经 60%~90% 硫酸铵分级沉淀获得粗酶，以 0.05mol/L 乙酸缓冲液 (pH5.6) 复溶到初始体积。检测各菌株发酵液中壳聚糖酶活力，选取酶活力较高的突变株作为下一轮诱变筛选的出发菌株。

## 2 结果

### 2.1 分生孢子的紫外线诱变

紫外线有较强的杀菌能力和诱变能力，一般以存活率略小于 10% 的照射剂量作为诱变育种的参考剂量。图 1 是球孢白僵菌 1316 分生孢子的紫外照射存活率曲线。据此，我们选取 5min (存活率为 0.012%) 的照射时间诱变分生孢子。

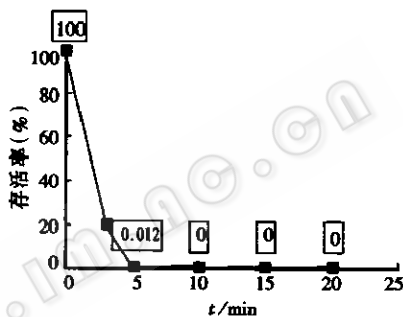


图 1 *B. bassiana* 1316 菌株分生孢子的紫外线照射存活曲线

### 2.2 分生孢子的高能电子束诱变

图 2 是高能电子束注入 *B. bassiana* 1316 突变株分生孢子的存活率曲线 (照射时孢子浓度为  $1 \times 10^8$  个/mL)。据此，我们选取 20s 的照射时间进行诱变。

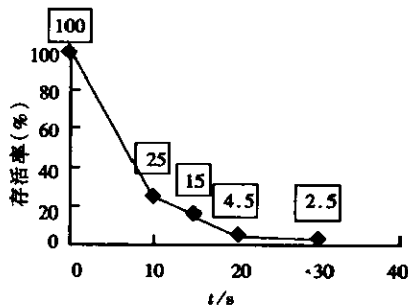


图 2 高能电子束注入 *B. bassiana* 1316 突变株分生孢子的存活曲线

### 2.3 壳聚糖酶高产菌株的筛选

2.3.1 第 1 轮诱变筛选：孢子浓度  $10^6 \sim 10^7$  个/mL，UV 照射 5min 后，按方法 1.6 方法操作，选出 100~150 个有明显透明圈的单菌落，为第 1 次初筛，然后点种到新的固体诱导培养基上，待长出直径约 1.0cm 的大菌落时，测量透明圈及菌落直径，为第 2 次初筛。选出 25~30 株 D/d 值较大的菌株进行摇瓶培养为复筛，同时以原始菌株作对照。通过检测酶活性而选出 5 株酶活较高的菌株，分别记录为 U-1 至 U-5，进行下一轮诱变。第 1 轮的筛选结果见表 1。

2.3.2 第 2 轮诱变筛选：以第 1 轮选出的 5 株产酶量较高菌株为出发菌株进行第 2 轮诱变筛选，按第 1 轮方法操作，结果见表 2。

表1 高壳聚糖酶突变株的第1轮筛选\*

菌株	透明圈直径/ 菌落直径 (D/d)	壳聚糖酶活力 $\Delta A_{420}$
B. b-1316	1.20	0.039
U-1	2.2	0.08
U-2	2.1	0.156
U-3	2.3	0.127
U-4	2.3	0.156
U-5	2.5	0.075

\* 测酶活时, 按 Imoto<sup>[10]</sup>法, 酶用量 200 $\mu$ L 粗酶液/管, 表中酶活性为 4 次测量的平均值

表2 高壳聚糖酶突变株的第2轮筛选\*

菌株	透明圈直径/ 菌落直径 (D/d)	壳聚糖酶活力 $\Delta A_{420}$
B. b-1316	1.22	0.043
U-5-1	2.13	0.572
U-4-4	1.67	0.274
U-1-3	1.90	0.262
U-2-1	2.0	0.125
U-1-6	2.0	0.160

\* 测酶活时, 按 Imoto<sup>[10]</sup>法, 酶用量 200 $\mu$ L 粗酶液/管, 表中酶活性为 4 次测量的平均值

2.3.3 第3轮诱变筛选: 以第2轮筛选出的高产菌株 U-5-1 和 U-4-4 两株为出发菌株, 两菌株均分别作 2 种诱变处理: 一半孢子悬液用紫外照射 5min 诱变, 另一半用高能电子束注入 20s 诱变, 两份诱变处理后的孢子悬液, 均适当稀释后涂布于固体诱导培养基上, 其余筛选工作同前 2 轮。第 3 轮筛选结果见表 3。

#### 2.4 高壳聚糖酶突变株的遗传稳定性

将第 3 轮选出的 4 株和第 2 轮选出的 U-5-1 共 5 株酶产量较高的菌株与原始菌株一起连续传 10 代; 每传 2 代用摇瓶发酵液检测各菌株的酶活力。从表 4 可看出, 有 3 株其高产壳聚糖酶的特性在传代中能稳定遗传; 我们最后选定酶活力最高的 1 株 U-5-1 作为分离纯化壳聚糖酶的生产菌株, 定名为 *Beauveria bassiana* 1316-V1。

表3 高产壳聚糖酶突变株的第3轮筛选\*

处理菌株	透明圈直径/ 菌落直径 (D/d)	壳聚糖酶活力 $\Delta A_{420}$
B. b-1316	1.25	0.01
U-5-1-1 (电子束)	2.00	0.090
U-5-1-9 (UV)	2.73	0.070
U-4-4-12 (UV)	2.30	0.103
U-4-4-15 (UV)	2.30	0.145
U-5-1 (UV)	2.50	0.158

\* 测酶活时, 按 Imoto<sup>[10]</sup>法, 酶用量为 10 $\mu$ L 粗酶液/管, 表中酶活性为 4 次测量的平均值

表4 高壳聚糖酶突变株的遗传稳定性\*

菌株	壳聚糖酶活力 ( $\Delta A_{420}$ )				
	F <sub>2</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>10</sub>
B. b-1316	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
U-5-1-1	0.060	0.052	0.050	0.053	0.050
U-5-1-9	0.045	0.042	0.040	0.040	0.040
U-4-4-12	0.0105	0.0100	0.0102	0.0103	0.0102
U-4-4-15	0.0120	0.0125	0.0120	0.0120	0.0125
U-5-1	0.0160	0.0161	0.0162	0.0161	0.0160

\* 以上菌株的代号为 U-5-1, 表示由第 1 轮诱变筛选出的 U-5 株经过第 2 轮诱变筛选出的 1 号菌株, 其余同理, F 为传代的次数

通过统计学分析, 计算样品组间离差平方和 ( $S_A$ ) 及样品内部离差平方和 ( $S_B$ )

进行方差分析, 用下式计算出 F 值:  $F = \frac{S_A / (r-1)}{S_B / (n-r)}$

进行 F 检验, 得到其 F 值  $< F_{0.05}$ , 说明传代次数的酶活性变化不显著, 传代次数未对其产酶活性产生影响, 故表明其遗传的稳定性。

### 3 讨论

1973 年 Monaghan<sup>[1]</sup>首次报道的 *B. bassiana* 壳聚糖酶产量只有 3.8mu/mL。而本室保存的 *B. bassiana* 1316 菌株的起始产酶量也只有 130mu/mL。为了提高其壳聚糖酶产量, 我们将其作为出发菌株进行紫外线和高能电子束注入诱变, 采用平板透明圈法初筛和摇瓶培养复筛的方法筛选, 得到 5 株高产壳聚糖酶突变株, 其中 *B. bassiana* 1316-V1 的产酶能力提高为起始菌株的近 16 倍, 达到 2.32u/mL, 并已成功地用于分离纯化壳聚糖酶 (论文另发)。本次实验发现: 对球孢白僵菌而言, 紫外线比高能电子束的诱变效果好, 获得的高产菌株中只有 U-5-1-1 株为高能电子束诱变所得。

在固体诱导培养基中, 实验反复证实: 必须补充最低量碳源, 如葡萄糖 0.2%, 否则孢子不能萌发。最适诱导产壳聚糖酶的碳源条件为: 0.2% 的葡萄糖, 1.0% 的胶体壳聚糖; 如果胶体壳聚糖浓度大于 2.0%, 则孢子萌发明显受抑制。在固、液体诱导培养基中补加 0.5% 蛋白胨, 0.2% 干酪素, 0.5% 酵母膏, 能大大提高诱导效果, 使产生的透明圈增大且更加清晰, 利于筛选并提高液体发酵的产酶量。但因壳聚糖易沉淀, 故在制作固体诱导培养基中, 有时会因分布不均造成初筛误差, 而增加筛选工作量。

### 参 考 文 献

- [1] Monaghan R L, Eveleigh D E, Tewari R P, et al. Nature New Biol, 1973, 245: 78 ~ 80.
- [2] Pedraza-Reyes M, Gutierrez-Corona F. Arch Microbiol, 1997, 168: 321 ~ 327.
- [3] Quakfaoui S E I, Potvin C, Brzezinski R, et al. Plant cell Reports, 1995, 15: 222 ~ 226.
- [4] Izume M, Ohtakara A. Agric Biol Chem, 1987, 51: 1189 ~ 1191.
- [5] 彭仁旺, 黄秀梨. 微生物学报, 1995, 35 (6): 427 ~ 432.
- [6] 彭仁旺, 管考梅, 黄秀梨. 微生物学报, 1996, 36 (2): 103 ~ 108.
- [7] Yabuki M, Uchiyama A, Suzuki K, et al. J Gen Appl Microbiol, 1988, 34: 225 ~ 270.
- [8] Imoto T, Yagishita K. Agric Biol Chem, 1971, 35 (7): 1154 ~ 1156.
- [9] Boucher I, Dupuy A, Vidal P, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1992, 38: 188 ~ 193.
- [10] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248 ~ 254.