

球孢白僵菌的紫外诱变及几丁质酶高产菌株的筛选

彭仁旺* 管考梅 黄雪梨

(北京师范大学生物系 北京 100875)

摘要 以球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 1316 为出发菌株, 通过 20min 和 30min 的紫外线交替诱变分生孢子, 采用透明圈法初筛和摇瓶培养复筛的方法, 得到一突变株 CH-1316。和原始菌株相比, 该突变株的几丁质酶活力提高了近 3 倍, 经传代培养, 该菌株的几丁质酶高产特性能稳定遗传。

关键词 球孢白僵菌, 几丁质酶高产菌株, 诱变

几丁质酶 (Chitinase, EC. 3.2.1.14) 广泛存在于动物、植物及微生物中, 参与多种生理过程^[1], 几丁质酶降解自然界中数量巨大的天然多聚物几丁质, 在自然界的物质循环中起着不可替代的作用。另外, 在环境保护、医药、食品和基础生命科学研究中几丁质酶也具有巨大的潜在应用价值^[2]。目前, 几丁质酶主要从生物体中提取, 显然应用微生物发酵生产几丁质酶将是最具前景的方法之一。球孢白僵菌可以合成并分泌几丁质酶^[3], 但由于受气候、产地等因素的影响, 原始菌株的几丁质酶产量往往很低, 因此开发有实际应用价值的高产几丁质酶

突变株显得尤为重要。本文报道在初筛不同来源菌株的基础上, 以一株球孢白僵菌 1316 为出发菌株, 通过紫外诱变而筛选到一株高产几丁质酶突变株的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

球孢白僵菌 1316 为本实验室保藏菌株。

1.2 种子斜面培养基

本文为国家自然科学基金资助项目

* 现为中国科学院微生物研究所博士生
1994-11-08 收稿

20%土豆汁 1000ml, 葡萄糖 20g, pH 6.0, (完全培养基)。

1.3 初筛培养基 (W/V)

蛋白胨 0.5%, KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl 各 0.05%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 脱氧胆酸钠 0.15%, 胶体几丁质 1.0%, pH 6.0, (固体)。

1.4 复筛培养基 (W/V)

MgSO_4 , KH_2PO_4 , KCl 各 0.05%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 1% 胶体几丁质, pH 6.0, (液体)。

1.5 胶体几丁质制备

按 Jeuniaux^[4] 法制备。

1.6 分生孢子悬液的制备

1.6.1 菌种活化: 将保存的菌种转接到斜面培养基上, 28℃ 培养 3—4d 至出现大量分生孢子。

1.6.2 分生孢子悬液的制备: 活化菌种以无菌生理盐水冲洗, 将分生孢子洗入装有玻璃珠的三角瓶中, 28℃ 振荡 2—3h, 显微镜检查, 孢子分散即可, 纱布过滤除去菌丝, 调整分生孢子浓度至 10^5 /ml。

1.7 紫外线 (UV) 诱变处理及突变株的筛选

1.7.1 诱变: 灭菌的小平皿中装 5ml 分生孢子悬液, 在磁力搅拌下用紫外灯 (30W, 照射距离为 35cm) 照射, 处理后的悬液在无菌室红灯下适当稀释。

1.7.2 初筛: 取上述悬液 0.1ml 涂布于①种子培养基上, 避光培养, 计数存活菌落, 计算存活率。②初筛培养基上, 避光培养 3—4d, 观察并测量菌落周围水解透明圈大小。

1.7.3 复筛: 根据初筛结果, 从固体平皿中挑取需要的单菌落, 接入液体诱导培养基(即复筛培养基)中, 28℃ 摇瓶培养 96h, 检测发酵液中几丁质酶的活力情况。根据复筛结果, 选出几丁质酶活力较高的突变株作为第二轮诱变筛选的出发菌株。

1.8 几丁质酶活力的测定

按 Ohtakara^[5] 法。1.5ml 胶体几丁质与适当稀释的酶液 40℃ 反应 1h, 离心, 上清液中

还原糖的量按 DNS^[6] 法测定。一活力单位定义为每分钟释放 1μmol 还原糖所需的酶量。

1.9 蛋白质浓度测定

按 Lowry 法^[7] 测定。

2 结果与讨论

2.1 分生孢子的紫外线诱变

UV 有较强的杀菌能力和诱变能力, 一般而言, 存活率小于 10% 的照射剂量, 常用作诱变育种的参考剂量。图 1 是球孢白僵菌 1316 分生孢子的存活曲线。根据存活曲线我们选用 20min 和 30min 两个时间区段交替诱变。

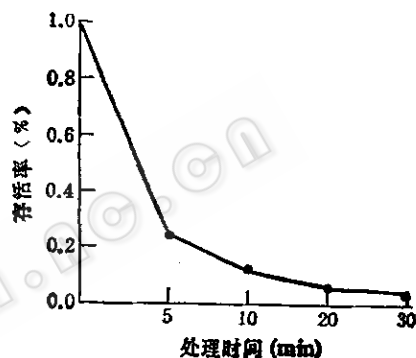


图 1 紫外线对球孢白僵菌生长的影响

2.2 几丁质酶高产菌株的筛选

2.2.1 第一轮: 孢子浓度 10^6 /ml, UV 处理 20 min, 28℃ 培养 4—5d, 选择 200 个在培养基上分开生长的菌落, 分别测量其菌落直径和透明圈直径, 根据两者之比, 从中初筛出 50 个菌落摇瓶复筛, 同时以原始菌株作对照。表 1 是经第一轮筛选后酶活力较高的部分菌株。

表 1 高产几丁质酶突变株的第一轮筛选

突变株	菌落直径 (D, mm)	透明圈直径 (d, mm)	d/D	几丁质酶活力 (对照的倍数)
m 1	3.0	2.8	0.93	1.5
m 2	2.5	2.6	1.04	1.5
m 3	2.0	1.5	0.75	1.32
m 4	3.2	3.4	1.06	1.1
m 5	2.3	2.5	1.08	1.0
m 6	3.2	3.3	1.03	0.8
m 7	1.5	1.5	1.0	0.8
m 8	1.8	2.0	1.11	0.7

2.2.2 第二轮: 以第一轮选出的 5 株酶产量最

高的菌株为出发菌株,进行第二轮诱变和筛选(包括初筛和复筛),诱变时间 30 min,其余同第一轮筛选。第二轮筛选结果见表 2。

表 2 高产几丁质酶突变株的第二轮筛选

突变株	菌落直径 (D, mm)	透明圈直径 (d, mm)	d/D	几丁质酶活力 (对照的倍数)
m 11	3.0	8.0	2.6	1.8
m 21	2.5	7.0	2.8	2.0
m 31	3.0	7.0	2.3	1.6
m 41	3.0	7.0	2.3	1.8
m 51	2.5	7.5	3.0	2.2

m11: 表示第一轮筛选出的突变株 m1 经第二轮筛选后得到的最高酶产量突变株,其余类推

2.2.3 第三轮: 以第二轮筛选出的 5 株高产酶突变株为出发菌株,经 20min 诱变,初筛,复筛,最后选出 5 株高产酶的突变株(表 3)。

表 3 高产几丁质酶突变株的第三轮筛选

突变株	菌落直径 (D, mm)	透明圈直径 (d, mm)	d/D	几丁质酶活力 (对照的倍数)
m 111	4.0	12.0	3.0	2.1
m 211	4.0	13.0	3.25	2.9
m 311	4.0	13.0	3.25	2.6
m 411	6.0	17.0	2.83	1.9
m 511	5.0	15.5	3.1	1.9

m111: 表示第二轮筛选出的 m11 突变株经第三轮筛选后得到的最高酶产量突变株,其余类推

2.2.4 稳定遗传的几丁质酶高产突变株的获得: 将上述第三轮选出的 5 株突变菌株连续传代培养,每 10d 转接一次,共转接 8 次,并通过摇瓶发酵检测几丁质酶活力,结果发现有三株其高产几丁质酶的特性在传代中逐渐丧失,只有两株能稳定遗传,结果如表 4。我们最后选

表 4 突变株的几丁质酶活力在传代培养中的变化

几丁质酶活力 (对照的倍数)	培养代数								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
m 111	2.1	2.0	2.2	2.2	2.1	2.2	2.2	2.2	2.2
m 211	2.9	2.8	2.9	3.0	3.0	2.9	2.9	2.8	2.9
m 311	2.6	2.3	1.5	0.9	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6
m 411	1.9	1.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8
m 511	1.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8

定活力较高的一株作为分离纯化几丁质酶的实验生产菌株,定名为 CH-1316。

球孢白僵菌原始菌株产几丁质酶的活性很低,不适于作为分离几丁质酶的生产菌株。黄秀梨报道^[9],以紫外线及高能电子束交替诱变球孢白僵菌的分生孢子和芽生孢子,可以获得高产几丁质酶的突变株。本文运用紫外线交替诱变,结合透明圈法初筛及摇瓶培养复筛的选育方法,成功地筛选到一株高产几丁质酶突变株,并已成功用于分离、纯化几丁质酶。和原始菌株相比,该突变株的产酶活性提高了近三倍^[9]。与其它育种手段相比,本文报道的方法简单,快速,且设备要求低。对其它类型水解酶

生产菌株的选育也有一定指导意义。

参 考 文 献

- [1] 陈三凤,李季伦. 微生物学通报, 1993, 20(3): 156—160.
- [2] Granham W Gooday. Biodegradation, 1990, 1: 177—190.
- [3] 黄秀梨, 荣倩, 戴忠新. 北京师范大学学报, 1987, 4: 71—80.
- [4] Jeuniaux C. Methods Enzymol, 1966, 8: 644—650.
- [5] Ohtakara A, Mitsutomi M, Uchida Y. J Ferment Technol, 1979, 57(3): 169—177.
- [6] Tsukamoto T, Koga D, Ide A, et al. Agric Biol Chem, 1984, 48: 931—939.
- [7] Lowry OH, J Biol Chem, 1951, 193: 265—275.
- [8] 黄秀梨. 生物工程进展, 1989, 9: 32—37.
- [9] 彭仁旺, 管考梅, 黄秀梨. 微生物学报(待发表).

THE UV MUTAGENESIS OF *BEAUVERIA BASSIANA* AND THE SCREENING OF A HIGH CHITINASE- PRODUCING MUTANT STRAIN

Peng Renwang Guan Kaomei Huang Xiuli

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract The conidia of *Beauveria bassiana* 1316 were mutagenized by UV treatment for 20 minutes and 30 minutes alternately. A high chitinase-producing mutant strain was obtained by screening with the method of transparent zones and chitinase activity measurement of culture filtrate. The chitinase activity of the mutant was raised 3 times as compared with the original strain. The high chitinase-producing ability of the mutant could be inherited after several subcultures.

Key words *Beauveria bassiana*, high chitinase-producing strain, mutagenesis