

研究报告

一株感染家蚕的高致病性白僵菌的筛选及发酵条件优化

王露露¹, 房耀维¹, 刘姝¹, 杨光¹, 吴新财¹, 陈静^{*2}, 侯晓月^{*1}

1 江苏海洋大学食品科学与工程学院, 江苏 连云港 222005

2 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005

王露露, 房耀维, 刘姝, 杨光, 吴新财, 陈静, 侯晓月. 一株感染家蚕的高致病性白僵菌的筛选及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2233-2244

Wang Lulu, Fang Yaowei, Liu Shu, Yang Guang, Wu Xincan, Chen Jing, Hou Xiaoyue. Screening and fermentation optimization of a highly pathogenic *Beauveria bassiana* strain infecting silkworm larvae[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2233-2244

摘 要:【背景】球孢白僵菌是一种重要的昆虫病原真菌, 通过侵染幼蚕可制备白僵蚕。白僵蚕中的生物活性物质在医疗、保健品及化妆品行业有着广泛的应用。【目的】从 7 株不同来源的白僵菌中筛选获得高毒力白僵菌并优化其发酵条件, 为制备白僵蚕提供优质的菌种资源。【方法】从不同白僵蚕体内分离获得 7 株白僵菌菌株(SDJC-1、SDJC-2、SDJC-3、GXHC-1、SDND-BB、AT-3006 和 SQJC-1), 通过生物学特性观察、产蛋白酶和几丁质酶活力分析及对家蚕的致死力等研究, 筛选得到一株致病力高、性状优异的白僵菌株, 并对其最适发酵条件进行探索。【结果】菌株 SDJC-3 的生物学性状优异, 产孢量较高, 家蚕致死率达 75%, 其制备的白僵蚕成品个头大且饱满, 横截面丝腺环清晰, 品质较好。通过对菌株 SDJC-3 进一步进行发酵优化, 发现其最适生长温度为 27 °C、最优发酵转速为 180 r/min、最适的发酵液体积占比为 1/5 (250 mL 培养瓶)。【结论】本研究将为人工利用白僵菌制备白僵蚕及提高其产量和品质提供理论基础。

关键词: 白僵蚕; 白僵菌; 生物学特性; 发酵优化

基金项目: 国家自然科学基金(31772016, 32102270); 江苏省政策引导类计划(苏北科技专项)(SZ-SQ2018051); 江苏省海洋科技创新专项(JSZRHYKJ202008); 江苏省第五期“333 工程”科研项目(BRA2019243); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目(20KJA550001); 江苏省自然科学基金(BK20210923); 江苏海洋大学青年基金(KQ20052); 江苏省研究生科研与实践创新计划(SJCX20_1323)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31772016, 32102270); Policy Guidance Plan of Jiangsu Province (Special Science and Technology Project of North Jiangsu Province) (SZ-SQ2018051); Jiangsu Provincial Marine Science and Technology Innovation Project (JSZRHYKJ202008); The Fifth “Project 333” Scientific Research Project of Jiangsu Province (BRA2019243); Major Natural Science Research Project of Jiangsu Provincial Colleges and Universities (20KJA550001); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210923); Jiangsu Ocean University Youth Foundation (KQ20052); Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX20_1323)

***Corresponding authors:** E-mail: CHEN Jing: 1995000023@jou.edu.cn; HOU Xiaoyue: 15822552894@163.com

Received: 2021-10-15; **Accepted:** 2022-01-10; **Published online:** 2022-03-03

Screening and fermentation optimization of a highly pathogenic *Beauveria bassiana* strain infecting silkworm larvae

WANG Lulu¹, FANG Yaowei¹, LIU Shu¹, YANG Guang¹, WU Xincui¹, CHEN Jing^{*2}, HOU Xiaoyue^{*1}

1 School of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

2 School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Beauveria bassiana*, a major entomopathogenic fungus, infects silkworm larvae, producing the white muscardine silkworm *Bombyx Batryticatus*. The bioactive substances in *Bombyx Batryticatus* are widely used in medical, healthcare, and cosmetic industries. [Objective] In order to provide high-quality strain resources for the preparation of *Bombyx Batryticatus*, a highly pathogenic *B. bassiana* strain was screened from 7 *B. bassiana* strains from different samples of *Bombyx Batryticatus*, and the fermentation conditions of this strain were optimized. [Methods] We isolated 7 *B. bassiana* strains (SDJC-1, SDJC-2, SDJC-3, GXHC-1, SDND-BB, AT-3006 and SQJC-1) from different samples of *Bombyx Batryticatus*. Based on the results of biological characteristics, protease and chitinase activities, and the lethality in silkworm, a strain with high pathogenicity and excellent traits was screened out. Moreover, the fermentation conditions of this strain were optimized. [Results] The strain SDJC-3 had excellent biological characteristics, high sporulation, and the lethal rate of 75% to silkworm. The *Bombyx Batryticatus* prepared with SDJC-3 was large and plump and had clear ring of silk gland in the cross-section, exhibiting good quality. The optimum fermentation conditions of SDJC-3 were 27 °C of the temperature, 180 r/min of the rotational speed, and 1/5 of the broth volume ratio (250 mL culture flask). [Conclusion] The findings of this study provide a theoretical basis for the use of *B. bassiana* to prepare and improve the yield and quality of *Bombyx Batryticatus*.

Keywords: *Bombyx Batryticatus*; *Beauveria bassiana*; biological characteristics; fermentation optimization

白僵菌在分类上属于虫草菌科(*Cordycipitaceae*)白僵菌属(*Beauveria*), 是一种寄生真菌。由于白僵菌寄主种类不同及生活环境多样导致其具有多种形态, 根据其产孢不同可将白僵菌分为卵孢白僵菌和球孢白僵菌^[1]。白僵菌属于昆虫病原真菌, 主要应用于生物防治。目前大量研究发现白僵菌能够产生多种生物活性代谢产物, 在开发保健品和医药方面具有很大潜力^[2]。有研究者通过生物活性测定、体外活性测定模型发现, 白僵菌的代谢产物可抑制多巴胺降解

过程中产生的自由基, 并且具有保护多巴胺能神经元的作用, 在美容、保健品和生物药物方面有着巨大的应用潜力^[3-4]。

白僵菌在自然或人工条件下可以感染家蚕幼体制备白僵蚕^[5]。白僵菌孢子沾染家蚕表面后, 迅速分泌几丁质酶溶解家蚕表皮和体壁, 侵入家蚕体内不断繁殖, 导致家蚕变硬僵死, 表面覆盖上白色的白僵菌分生孢子, 因此得名白僵蚕。白僵蚕是一种传统的中药, 在治疗头痛、咳嗽、高血压和高血脂等疾病方面具有广

泛的药用价值^[6-7], 如今在保健品和化妆品方面也有着丰富的应用。天然的白僵蚕主要来源于蚕农在养蚕过程中病死的僵蚕, 随着养蚕技术的提高, 自然感染白僵菌的家蚕越来越少, 菌株、品种及环境的影响导致家蚕的品质参差不齐, 更有甚者裹石灰冒充僵蚕^[8]。人工来源的白僵蚕存在培养方式简单粗放、菌株施用浓度得不到控制等缺点, 导致僵蚕的致死率波动浮动大, 品质也偏低。目前市场上的白僵蚕出现产量不高和质量不好等现象, 导致优质的白僵蚕供不应求^[9]。

白僵菌在自然情况下通过体表侵染幼蚕, 在其体内生长产生多种生物活性化合物, 如白僵菌素、多糖类、多肽类、酶类和草酸铵等^[10-12]。多项研究证实, 从白僵菌发酵的僵蚕中提取出来的多糖及多肽类物质具有抗氧化活性^[13]。这些产物的优良特性极大地拓展了白僵菌的应用。为了进一步提高白僵菌的利用率, 对其进行发酵条件的探索具有重要意义。白僵菌发酵优化的方式分为液相发酵、固相发酵和液固两相发酵^[14]。在白僵菌发酵过程中, 发酵体积、温度、时间等条件能显著影响其发酵产孢量^[15-17]。白僵菌所产生的芽生孢子、分生孢子和菌丝体都可导致昆虫死亡, 提高白僵菌活性孢子量可通过优化发酵条件达到^[1,18]。

本实验对不同来源的 7 株白僵菌的生物学特性进行研究, 通过菌株形态学观察、产孢量和致死率分析, 筛选到一株感染家蚕的高毒力白僵菌, 并对其发酵条件进一步优化, 以期为量化制备白僵蚕菌种的开发及其工业化应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 SDJC-1、SDJC-2 和 SDJC-3, 本实验

室从山东蚕区赠送的白僵蚕分离纯化所得; 菌株 GXHC-1, 实验室分离自广西来源白僵蚕; SDND-BB 菌株, 山东农业大学惠赠; 菌株 AT-3006 (用于生物杀虫剂), 本课题组合作企业惠赠; 菌株 SQJC-1, 本实验室分离自 GXHC-1 白僵蚕。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0; 自然 pH。

PDSA 培养基(g/L): 马铃薯 250.0, 白砂糖 50.0, 琼脂 20.0, 另加入酱油 50 mL; 自然 pH。

明胶-琼脂培养基(g/L): NaCl 0.3, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.3, 明胶 10.0, 琼脂 15.0; pH 7.0。

蛋白酶诱导培养基(g/L): 明胶 10.0, K₂HPO₄ 0.3, NaCl 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.3; 用 0.02 mol/L 的 pH 7.0 磷酸缓冲液配制。

几丁质酶诱导培养基(g/L): 蛋白胨 2.250, KCl 0.225, K₂HPO₄ 0.225, MgSO₄·7H₂O 0.225, ZnSO₄·7H₂O 0.450, 胶体几丁质 4.500; 用 0.02 mol/L 的 pH 6.0 磷酸缓冲液配制。

发酵液体培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 酵母提取物 10.0; 自然 pH。

1.2 白僵菌的形态学观察

1.2.1 白僵菌的菌落形态

将 7 株菌接种后, 置于 28 °C、相对湿度 95%条件下培养 14-15 d, 每株菌设置 3 个重复, 观察菌落形态。

孢子悬浮液的制备: 取培养好的白僵菌, 用 0.1%吐温-80 洗取孢子, 制备浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬浮液。

1.2.2 白僵菌的分生孢子形态和产孢时间

挑取白僵菌单菌落接种到 PDSA 培养基上, 将灭菌后的盖玻片 45°斜插到平板中, 待玻片表面有白色丝状物生成, 用镊子取出, 放置于显微镜下观察。

1.3 营养生长量的测定和产孢量测定

1.3.1 营养生长量测定

将配制好的孢子悬浮液分别接种于 PDA 和 PDSA 培养基, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养, 每一菌株设置 3 个平行。从第 6 天开始测量菌落直径, 共记录 9 d。比较 7 株菌在 PDA 和 PDSA 平板培养基上的日均营养生长情况。

1.3.2 产孢量测定

将白僵菌培养至 15 d, 用直径 8 mm 琼脂打孔器取菌落中心至边缘中点处的菌落, 用 0.1% 吐温-80 溶液洗脱孢子, 于血球计数板中对其产孢量计数, 每种菌取 3 个样进行计数, 比较 7 株菌在 PDA 和 PDSA 平板培养基上的产孢量。

$$1 \text{ mL 菌液中的总孢子数} = \frac{A}{5} \times 25 \times 10^4 \times B$$

式中: A: 5 个中方格总孢子数; B: 菌液稀释倍数。

1.4 不同白僵菌菌株对家蚕致死率及白僵蚕品质鉴定

参照 Pelizza 等^[19]的方法进行改良。制备 7 株白僵菌的浓度为 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液, 用体表喷涂法均匀喷洒到五龄醒眠幼蚕体表, 空白对照采用无菌水处理, 每株菌设置 3 个重复, 每组处理家蚕个体总数为 30, 用新鲜的桑叶喂养。处理过的家蚕养在 28 °C 和 80% 相对湿度条件下, 计数每组家蚕 1-7 d 的死亡数量, 计算每株菌的感染死亡率。将僵死蚕继续培养 5 d 收获得到僵蚕半成品, 这时蚕体布满白色的菌丝和分生孢子, 放入 60 °C 的烘箱中烘干得成品, 取出后用手术刀在僵蚕中间位置切开观察其横截面。

1.5 不同白僵菌菌株产蛋白酶和几丁质酶活性

1.5.1 胞外蛋白酶活性测定

胞外蛋白酶活性测定参照 Bidochka 等^[20]的方法。将 7 种菌株的孢子悬浮液接种到明胶-琼

脂平板上, 26 °C 培养 3 d 后, 用 15% HgCl_2 溶液铺满平板表面, 菌落的周围显示出清晰透明的环状, 产酶量的大小以透明环直径来表示。每株菌设置 3 个平行。

参照刘智辉等^[21]的方法进行改良。在蛋白酶诱导培养基中加入配制好的孢子悬浮液, 28 °C、150 r/min 条件下培养 6 d。取培养好的酶液于 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即为粗酶液。

以 2% 酪蛋白为底物测量蛋白酶活性, 将粗酶液和 2% 的酪蛋白混合, 在 40 °C 水浴锅中反应 10 min 后取出, 加入三氯乙酸终止反应, 25 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 加入 Na_2CO_3 和福林酚试剂混匀后显色反应 20 min, 在 680 nm 处测量吸光度, 每种酶取样 3 次测定吸光度取平均值, 根据标准曲线计算蛋白酶活力, 定义每分钟转化生成 1 μmol 的酪氨酸所需要的酶量即为 1 个单位酶活。

1.5.2 胞外几丁质酶活性测定

胞外几丁质酶活性测定依据杨帆等^[22]的方法。配制 1×10^7 个/mL 浓度的孢子悬浮液, 加到几丁质酶诱导培养基中, 于 26 °C、100 r/min 振荡培养 7 d 后, 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即为粗酶液。

以 1% 的胶体几丁质为底物测量几丁质酶活性, 将粗酶液和 1% 胶体几丁质混合, 放入 40 °C 水浴锅中反应 1 h 后加入 DNS 试剂, 沸水煮 5 min 后取出, 待冷却至室温后加入蒸馏水, 在 540 nm 处测量吸光度, 每种酶取样 3 次测定吸光度取平均值, 根据标准曲线计算几丁质酶活力, 定义每分钟转化生成 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖所需要的酶量即为 1 个单位酶活。

1.5.3 胞外蛋白酶的活性比较

通过观察白僵菌侵染家蚕, 发现蚕僵死时间与僵死后的质量有着明显的不同, 蛋白酶是

与毒力相关的主要酶类。将 GXHC-1、SQJC-1 和 SDJC-3 这 3 株菌按 1.5.1 方法在第 2、4、6、8 天分别取粗酶液测量酶活进行比较。

1.6 菌株 SDJC-3 的最适液体发酵条件研究

1.6.1 温度对白僵菌发酵的影响

将 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液接种到液体发酵培养基中, 该实验进行了 3 次生物学重复, 在 120 r/min、自然 pH 条件下, 分别于 23、25、27、29、31 °C 恒温振荡培养 2 d, 测定菌丝体干重, 即为菌丝体生物量。

1.6.2 转速对白僵菌发酵的影响

将 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液接种到液体发酵培养基中, 该实验进行了 3 次生物学重复, 在 26 °C、自然 pH 条件下, 分别于 120、150、180、210、240 r/min 恒温振荡培养 2 d, 测定其菌丝体生物量。

1.6.3 装样量对白僵菌发酵的影响

将 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液接种到发酵培养基装样量分别为 1/3、1/4、1/5、1/6、1/7 的 250 mL 培养瓶中, 该实验进行了 3 次生物学重

复, 在 26 °C、120 r/min 条件下振荡培养 2 d, 测定其菌丝体生物量。

1.7 数据处理

实验进行 3 次以上生物学重复, 采用 *t* test 对实验数据进行显著性分析, 用 Origin 9.0 软件进行图片绘制。

2 结果与分析

2.1 白僵菌生物学特性研究结果

2.1.1 白僵菌营养生长量、产孢量及其家蚕致死率分析

如表 1 所示, 白僵菌在 PSDA 培养基上的营养生长量明显优于 PDA。从菌落大小来看, 菌株 GXHC-1 和 SDND-BB 在 PDA 和 PSDA 培养基上的营养生长量都较高。菌株 SDJC-1 和 SDJC-3 从产孢量来看在 PDA 和 PSDA 培养基上的产量均为最高。根据致死率结果, 菌株 GXHC-1 和 SDND-BB 致死率分别为 91.6% 和 96.6%, 家蚕在接种 2–3 d 开始大量死亡且致死率超过 90%, 继而通过观察发现致死时间过早的

表 1 不同来源白僵菌菌株日均营养生长量、产孢量及其致死率测定结果

Table 1 Results of the daily nutrient growth, sporulation and lethality of different *Beauveria bassiana* strains

Strains	Medium	Average daily nutritional growth (mm/d)	Conidial production ($\times 10^7$ /mL)	Mortality (%)
SDJC-1	PDA	3.14 $\pm$ 0.04c	5.43 $\pm$ 0.019b	68.8 $\pm$ 2.22c
	PSDA	4.62 $\pm$ 0.18b	10.2 $\pm$ 0.026a	
SDJC-2	PDA	2.38 $\pm$ 0.12d	1.72 $\pm$ 0.001e	68.8 $\pm$ 4.26c
	PSDA	4.07 $\pm$ 0.05c	2.19 $\pm$ 0.006e	
SDJC-3	PDA	2.81 $\pm$ 0.06d	7.02 $\pm$ 0.008a	75 $\pm$ 1.34b
	PSDA	4.31 $\pm$ 0.15c	10.5 $\pm$ 0.029a	
SQJC-1	PDA	4.11 $\pm$ 0.09a	1.84 $\pm$ 0.004e	58.3 $\pm$ 3.18c
	PSDA	4.29 $\pm$ 0.14c	2.90 $\pm$ 0.006d	
AT-3006	PDA	3.88 $\pm$ 0.12b	2.04 $\pm$ 0.002d	23.3 $\pm$ 1.00d
	PSDA	4.29 $\pm$ 0.12c	2.32 $\pm$ 0.005e	
GXHC-1	PDA	4.31 $\pm$ 0.07a	5.39 $\pm$ 0.008b	91.6 $\pm$ 1.35a
	PSDA	4.93 $\pm$ 0.13a	6.89 $\pm$ 0.007b	
SDND-BB	PDA	4.36 $\pm$ 0.10a	4.58 $\pm$ 0.007c	96.6 $\pm$ 2.14a
	PSDA	4.81 $\pm$ 0.26a	5.42 $\pm$ 0.004c	

注: 同列数据后不同小写字母表示 5% 水平上差异显著, 下同

Note: Values in the same column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 level. The same below.

僵蚕成品个头干瘪，横截面丝腺环呈空心状，质量差。菌株 SDJC-3 虽然致死时间较晚，但是观察发现致死后的家蚕成品个头饱满、横截面丝腺环清晰、品质佳，而且致死率达到了 75%。

2.1.2 白僵菌分生孢子形态及产孢时间测定

如表 2 所示，菌株 SDJC-1、SDJC-2 和 SDJC-3 孢子多以团状分布，产孢时间和菌丝状态大致相同，菌株 AT-3006 和 GXHC-1 产生孢子时间最快，菌株 GXHC-1 产生孢子量最多、

菌丝量最少。菌株 SDND-BB 和 SQJC-1 孢子依附菌丝分布。

2.1.3 僵蚕成品的横截面丝腺环研究

根据《中华人民共和国药典》^[23]中僵蚕的性状进行观察。观察横截面丝腺环是最快速、直观检验僵蚕质量的方法，因此对侵染后僵蚕的横截面丝腺环进行观察。

如图 1 所示，从丝腺环横截面可以看出，菌株 SDJC-1、SDJC-2、SDJC-3 和 AT-3006 感

表 2 不同来源白僵菌菌株分生孢子形态及产孢时间测定结果

Table 2 Results of the sporulation morphology and sporulation time of different *Beauveria bassiana* strains

Strains	Spores and sporulation time
SDJC-1	The hyphae were more and crisscrossed on the 4th day. A small amount of spores began to be produced at 5 d, and a large number of spores began to be produced on the 8th day
SDJC-2	The hyphae were crisscrossed on the 4th day. A small amount of spores began to be produced on the 5th day, and clusters of spores were scattered far from the hyphae
SDJC-3	More spores than SDJC-1, less than SDJC-2 on the 4th day. The number of spores were more than that of SDJC-1 and SDJC-2 on the 12th day
SQJC-1	Hyphae were few, and the spores were abundant but scattered on the 4th day. Spores were densely distributed in the center of the hyphae on the 12th day
AT-3006	The hyphae were more and crisscrossed on the 4th day, and conidia began to be produced. Spores increased significantly on the 7th day
GXHC-1	The hyphae were few and spores were scattered around them on the 4th day. The spores spread all over on the 12th day
SDND-BB	The hyphae were roughly dendritic and no spores appeared on the 4th day. The hyphae were dense, and a few spores began to appear on the 6th day. The spores were produced in abundance on the 12th day

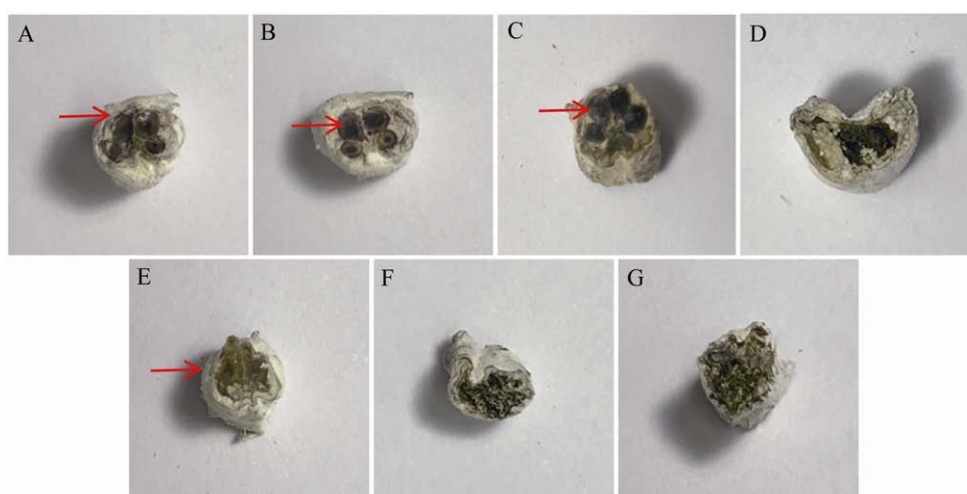


图 1 横截面丝腺环

Figure 1 Cross-section filament gland ring. A: SDJC-1; B: SDJC-2; C: SDJC-3; D: SQJC-1; E: AT-3006; F: GXHC-1; G: SDND-BB.

染的僵蚕成品横截面丝腺环清晰饱满, 而菌株 SQJC-1、GXHC-1 和 SDND-BB 丝腺环横截面呈空壳干瘪现象。

2.2 白僵菌的产酶活性检测

酶类在白僵菌的侵染过程中起着重要的作用。本研究对 7 株白僵菌的胞外蛋白酶和几丁质酶活性进行检测的结果见图 2 和表 3, 胞外蛋白酶采用平板法和 Lowry 法检测, 平板法检测结果显示菌株 AT-3006 的透明圈半径最大, 为 2.60 cm; 菌株 SDJC-2 和 SDJC-3 次之。采用 Lowry 法检测发现菌株 SDJC-3 所产的胞外蛋白酶活性最高, 酶活力为 10.25 U/mL; 菌株 SDJC-2 次之, 酶活力为 9.24 U/mL; 而菌株 AT-3006 所产的胞外蛋白酶活力明显低于菌株 SDJC-2 和 SDJC-3。因此, 菌株 SDJC-3 的胞外蛋白酶活性最高。采用 DNS 法检测了 7 株白僵菌的胞外几丁质酶酶活, 菌株 SDJC-3 的胞外几丁质酶活力最高, 为 372 U/mL, 而菌株 AT3006 和 SDND-BB 的酶活力明显低于其他菌株。

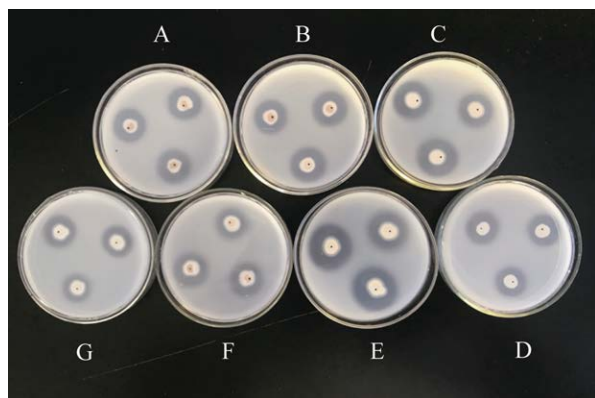


图 2 不同来源的白僵菌胞外蛋白酶透明圈

Figure 2 Transparent zones caused by the extracellular proteases from different *Beauveria bassiana* strains. A: SDJC-1; B: SDJC-2; C: SDJC-3; D: SQJC-1; E: AT-3006; F: GXHC-1; G: SDND-BB.

表 3 不同来源的白僵菌胞外酶活力

Table 3 Extracellular enzyme activity of different *Beauveria bassiana* strains

Strains	Extracellular proteases		Extracellular chitinase activity level (U/mL)
	Transparent circle diameter (cm)	Enzyme activity level (U/mL)	
SDJC-1	1.80±0.04c	8.97±0.49b	131±6.94c
SDJC-2	1.87±0.02b	9.24±0.63a	272±11.04b
SDJC-3	1.83±0.05b	10.25±0.22a	372±9.31a
SQJC-1	1.53±0.01e	3.61±0.53c	109±4.63c
AT-3006	2.60±0.05a	3.19±0.32c	39±1.99d
SDND-BB	1.73±0.02d	2.29±0.03d	30±0.94e
GXHC-1	1.57±0.03e	3.61±0.34c	275±7.90b

2.3 菌株 SQJC-1、SDJC-3 和 GXHC-1 胞外蛋白酶的活性比较

通过测定蛋白酶活进一步比较发现, 如图 3 所示, 菌株 SDJC-3 第 2 天产酶量最高, 后续几天的产酶水平比较稳定, SQJC-1 第 2 天产酶酶活不高, 第 2-3 天增长很快, 到第 5 天产酶酶活达到最高, 之后开始下降。菌株 GXHC-1 无产酶酶活, 根据结果推测其不产胞外蛋白酶。

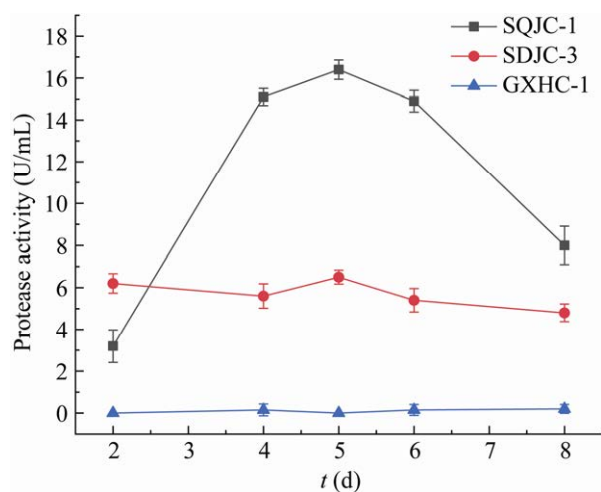


图 3 SQJC-1、SDJC-3 和 GXHC-1 的胞外蛋白酶活性

Figure 3 Extracellular enzyme activity of SQJC-1, SDJC-3 and GXHC-1.

2.4 白僵菌 SDJC-3 发酵条件优化

从生物学特性、致死率及酶活综合来看,菌株 SDJC-3 从形态和性能上均优于其他菌株,因此选择菌株 SDJC-3 为发酵优化的菌株。

如图 4 所示,白僵菌在 23–27 °C 条件下其生物量随着温度的升高而增多,温度在 27–31 °C 时其生物量随着温度的升高而减少。因此,当温度为 27 °C 时生物量最大,最佳发酵温度为 27 °C。

如图 5 所示,当白僵菌发酵转速设置为 120 r/min 时生物量较小,随着转速的增加生物量开始上升,当转速达到 150–210 r/min 时生物量趋于稳定,而当转速达到 180 r/min 时生物量最大。因此,白僵菌最佳发酵转速为 180 r/min。

如图 6 所示,相同条件下,当装样量为 1/3–1/5 时,生物量随着装样量的增加有明显的增加;当装样量达到 1/6–1/7 时,生物量开始大幅度地下降;当装样量在 1/5 时,生物量达到最大值。因此,白僵菌最佳装样量为 1/5。

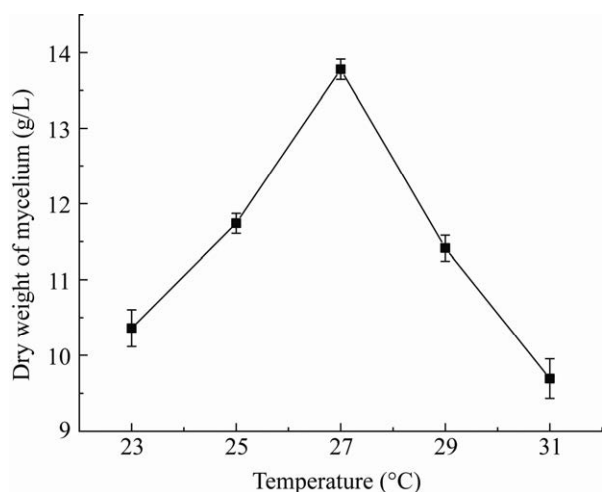


图 4 温度对菌株 SDJC-3 菌体生长的影响
Figure 4 Effect of temperature on the dry weight of SDJC-3.

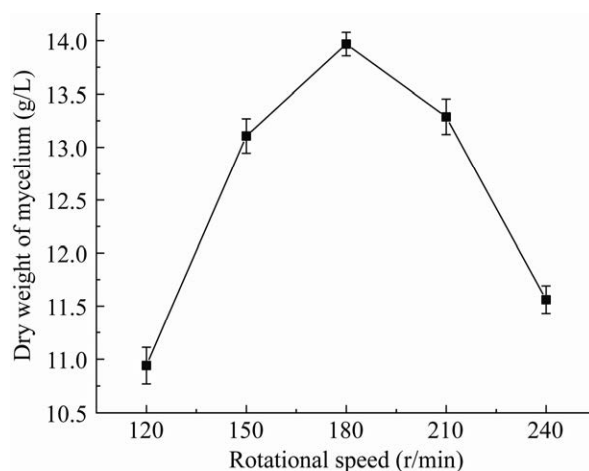


图 5 转速对菌株 SDJC-3 菌体生长的影响
Figure 5 Effect of rotational speed on the dry weight of SDJC-3.

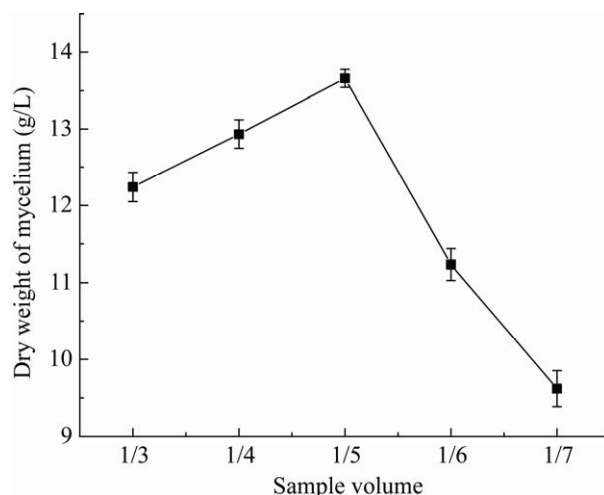


图 6 不同装样量对菌株 SDJC-3 菌体生长的影响
Figure 6 Effect of loading volume on SDJC-3 growth.

3 讨论与结论

白僵菌是一种广谱性昆虫病原真菌,可寄生的宿主特别广泛。限制白僵菌生长的因素有很多,如生长温度、湿度、菌株的生长形态、产孢时间和产孢量等^[24]。在实验条件下,7 株菌的营养生长量差距不大,3 株同源菌株 SDJC-1、2 和 3 的产孢时间大致相同,但是菌

株 SDJC-1 和 SDJC-3 产孢量明显高于菌株 SDJC-2。用 7 株菌侵染家蚕 7 d 测定其致死率的结果发现, 菌株 GXHC-1 和 SDND-BB 对家蚕致死较快, 致死率分别达到 91.6% 和 96.6%。菌株 SDJC-1、2 和 3 对家蚕的致死时间基本相同, 菌株 SDJC-1 和 2 的致死率均为 68.8%, 菌株 SDJC-3 的致死率略高, 为 75%。Rezende 等^[25]在研究对黑菌虫的防治时发现, 接种黑菌虫成虫和幼虫 9 d 后其死亡率为 52%; 雷妍圆等^[26]在应用白僵菌菌株用于小菜蛾幼虫防治时得到的校正死亡率范围是 39.81%–83.79%; 苒娜娜等^[27]在不同类型白僵菌对家蚕的致病力研究中得到菌株 CA-12 和 CA-15 的致死率分别为 76.67% 和 53.33%, 而菌株 TX-1、CA-1 和 CA-6 这 3 个菌株的致死率分别为 28.33%、16.67% 和 10.00%, 因此本研究中白僵菌致死率均比较高。僵蚕的丝腺环饱满度是决定僵蚕品质的重要因素^[28-29], 将致死的家蚕烘干, 做成僵蚕成品观察横截面发现, 菌株 SDJC-1、2 和 3 致死的僵蚕成品个头大、饱满且横截面丝腺环清晰, 菌株 AT-3006 横截面丝腺环较清晰, 而其他 3 株菌制备的僵蚕成品都出现了干瘪现象, 部分横截面丝腺环呈空心。

真菌一般通过破坏宿主的角质层感染宿主, 角质层由蛋白质、脂质和几丁质组成。球孢白僵菌通过分泌蛋白酶和几丁质酶等胞外酶降解昆虫角质层的主要成分, 从而侵入寄主体内^[30]。几丁质酶在白僵菌侵染家蚕的过程中起重要作用, 而蛋白酶是导致家蚕死亡的主要因素^[31-33]。刘智辉等^[21]在研究球孢白僵菌的胞外蛋白酶和几丁质酶活性对亚洲玉米螟毒力的相关性分析中, 以 5 日龄玉米螟幼虫为试虫进行毒物测定及分析, 结果发现胞外蛋白酶和胞外几丁质酶主要作用于病菌穿透寄主体壁的过程中, 酶活高的菌株穿透体壁的时间短、侵染率高。通过

测定 7 株菌的胞外蛋白酶和几丁质酶, 发现菌株 SDJC-3 所产的蛋白酶活性和几丁质酶活性达到 10.25 U/mL 和 372 U/mL, 均高于其他菌株。杨帆等^[22]在研究寄生沙棘木蠹蛾的白僵菌胞外蛋白酶和几丁质酶中, 测得最优菌株的胞外蛋白酶及胞外几丁质酶分别为 55.3 U/mL 和 137.9 U/mL; 林海萍等^[34]对 15 株球孢白僵菌进行蛋白酶和几丁质酶测定, 得到最高蛋白酶活及几丁质酶活分别为 62.288 U/mL 和 60.023 U/mL, 比本研究筛选得到的白僵菌 SDJC-3 的蛋白酶活及几丁质酶酶活低, 但较高的蛋白酶活和几丁质酶活导致其有着较高的致死率, 因此, 综合 7 株菌的生物学特性研究及产酶活性, 发现菌株 SDJC-3 生物学性状优异、产酶活性高、致病力强、制备的僵蚕品质较好, 最终选择 SDJC-3 进行后续的发酵条件优化。

本研究采用菌体生物量作为发酵结果的考察因素。通过对 SDJC-3 菌株在不同温度、不同转速和不同装液量下的生物量进行测定, 最终得到的最适温度为 27 °C、最优转速为 180 r/min、最佳装样量为 1/5 (250 mL 培养瓶)。周晓妹等研究发现, 不同温度、pH、装样量和吐温-80 含量对白僵菌的产孢与菌丝生长有着显著的影响, 其中, 最适温度范围为 25–28 °C、装液量为 40–60 mL 时最有利于菌丝的生长, 可得到较高的生物量, 而装液量为 50 mL (250 mL 培养瓶) 时产孢率最高, 最利于芽生孢子的生成, 生物量最高^[15-17], 这与本研究的结果相一致。

通过对 7 株不同来源白僵菌菌株的生物学特性及产酶进行研究, SDJC-3 菌株性状优异、产酶活性高, 被筛选作为发酵条件优化的目的菌株。经过对发酵体积、温度及转速进行研究, 得到 SDJC-3 菌株的最适温度为 27 °C、最优转速为 180 r/min、最适发酵液装样量的体积占比为 1/5 (250 mL 培养瓶)。综上所述, 本研究获

得一株致病力高且易于发酵的白僵菌菌株, 这将为白僵菌优良品种的选育及大规模制备高品质僵蚕提供参考。

REFERENCES

- [1] MacLeod DM. Investigations on the genera *beauveria* vuill, and *tritirachium* limber[J]. Canadian Journal of Botany, 1954, 32(6): 818-890
- [2] 金洁, 张作法, 时连根. 昆虫病原白僵菌的分子生物学研究进展[J]. 科技通报, 2007, 23(6): 842-847
Jin J, Zhang ZF, Shi LG. Advances in molecular biology of entomopathogenic fungus, *Beauveria*[J]. Bulletin of Science and Technology, 2007, 23(6): 842-847 (in Chinese)
- [3] 胡丰林, 樊美珍, 李增智, Mathias Hamburger, Karen Schmidt, Schubert Barbara. 一种白僵菌代谢产物中生物活性物质的研究 I. 具有清除自由基的活性物质的分离和制备[J]. 菌物系统, 2000, 19(4): 522-528
Hu FL, Fan MZ, Li ZZ, Hamburger M, Schmidt K, Barbara S. Studies on bioactive compounds from *Beauveria* sp. isolation of free radical scavenging active compounds[J]. Mycosystema, 2000, 19(4): 522-528 (in Chinese)
- [4] 丁晓娟, 胡丰林, 樊美珍, 李增智. 不同菌株白僵菌代谢产物对大鼠肝线粒体单胺氧化酶的抑制作用研究[J]. 生物学杂志, 2004, 21(3): 37-39, 42
Ding XJ, Hu FL, Fan MZ, Li ZZ. Study on monoamine oxidase inhibition of extracts from eight strains of *Beauveria* sp.[J]. Journal of Biology, 2004, 21(3): 37-39, 42 (in Chinese)
- [5] Hu MB, Yu ZJ, Wang JL, Fan WX, Liu YJ, Li JH, Xiao H, Li YC, Peng W, Wu CJ. Traditional uses, origins, chemistry and pharmacology of *Bombyx Batryticatus*: a review[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2017, 22(10): 1779
- [6] 米红霞, 刘吉平. 白僵蚕应用研究进展[J]. 广东蚕业, 2010, 44(1): 46-48
Mi HX, Liu JP. Research progress on application of *Bombyx Batryticatus*[J]. Guangdong Sericulture, 2010, 44(1): 46-48 (in Chinese)
- [7] 金洁. 家蚕病原白僵菌的遗传多样性及白僵蚕药理作用的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2009
Jin J. Genetic polymorphism research on *Beauveria bassiana* from the silkworm, *Bombyx mori* and pharmacological effects of Jiangcan, *Bombyx Batryticatus*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009 (in Chinese)
- [8] 邢东旭, 李丽, 廖森泰, 肖阳, 李庆荣, 叶明强, 杨琼. 一株感染家蚕的高致病性白僵菌的鉴定及在僵蚕生产中的应用[J]. 蚕业科学, 2014, 40(5): 879-883
Xing DX, Li L, Liao ST, Xiao Y, Li QR, Ye MQ, Yang Q. Identification of a *Beauveria bassiana* strain with high pathogenicity to *Bombyx mori* and its application in *Bombyx Batryticatus* production[J]. Science of Sericulture, 2014, 40(5): 879-883 (in Chinese)
- [9] 李文学, 青学刚, 陈宝瑞, 肖文福, 邹邦兴, 刘俊凤. 家蚕致病性白僵菌的分离鉴定及其在僵蚕人工饲养中的应用[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(3): 93-95
Li WX, Qing XG, Chen BR, Xiao WF, Zou BX, Liu JF. Identification of a pathogenesis *Beauveria bassiana* strain isolated from *Bombyx mori* and its application in artificial feeding of *Bombyx Batryticatus*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(3): 93-95 (in Chinese)
- [10] 卫功庆, 鞠贵春, 李慧萍, 赵静. 白僵蚕化学成分的分析[J]. 吉林农业大学学报, 1995, 17(3): 46-49
Wei GQ, Ju GC, Li HP, Zhao J. Analysis of chemical compounds in the larva of a silkworm with batrytis[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1995, 17(3): 46-49 (in Chinese)
- [11] 黄居敏, 苏明声, 张亚梅, 邵峰, 杨明, 张普照. 僵蚕化学成分研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 87-89
Huang JM, Su MS, Zhang YM, Shao F, Yang M, Zhang PZ. Chemical constituents from *Bombyx Batryticatus*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(1): 87-89 (in Chinese)
- [12] 周心晨, 解鸿青, 李聪慧, 崔诗遥, 但彩云, 刘雪, 李文乐, 金洁, 时连根. 白僵蚕主要营养成分的分析[J]. 蚕桑通报, 2020, 51(4): 11-14
Zhou XC, Xie HQ, Li CH, Cui SY, Dan CY, Liu X, Li WL, Jin J, Shi LG. Analysis of the main nutritional components of *Bombyx Batryticatus*[J]. Bulletin of Sericulture, 2020, 51(4): 11-14 (in Chinese)
- [13] 邢东旭, 廖森泰, 罗国庆, 李丽, 肖阳, 李庆荣, 叶明强, 杨琼. 白僵蚕多糖的提取工艺条件优化及抗氧化活性测定[J]. 蚕业科学, 2015, 41(6): 1088-1093
Xing DX, Liao ST, Luo GQ, Li L, Xiao Y, Li QR, Ye MQ, Yang Q. Extraction process optimization and antioxidant activity determination of polysaccharide from *Bombyx Batryticatus*[J]. Science of Sericulture, 2015, 41(6): 1088-1093 (in Chinese)
- [14] 张媛媛. 白僵菌菌株 JG-17 生物学特性及发酵技术优化[D]. 张家口: 河北北方学院硕士学位论文, 2019
Zhang YY. Biological characteristics and fermentation technology optimization of *Beauveria bassiana* strain

- JG-17[D]. Zhangjiakou: Master's Thesis of Hebei North University, 2019 (in Chinese)
- [15] 周晓妹. 白僵菌液体深层培养的研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2007
- Zhou XM. Study on *Beauveria bassiana* cultivated in submerged culture[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2007 (in Chinese)
- [16] 孙佰平, 任娟, 赵思峰, 侯彩霞, 王斌, 刘启鹏. 响应面法优化球孢白僵菌 CXJ-1 的发酵工艺条件[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2011, 29(6): 689-695
- Sun BP, Ren J, Zhao SF, Hou CX, Wang B, Liu QP. Optimization of fermentation conditions for *Beauveria bassiana* CXJ-1 spore by response surface methodology[J]. Journal of Shihezi University: Natural Science, 2011, 29(6): 689-695 (in Chinese)
- [17] 孙明, 任巧云, 关贵全, 刘志杰, 李有全, 马米玲, 刘爱红, 牛庆丽, 杨吉飞, 殷宏, 罗建勋. 对蜚致病性球孢白僵菌培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1022-1030
- Sun M, Ren QY, Guan GQ, Liu ZJ, Li YQ, Ma ML, Liu AH, Niu QL, Yang JF, Yin H, Lou JX. Optimization of cultural conditions of *Beauveria bassiana* pathogenic for ticks[J]. Microbiology China, 2011, 38(7): 1022-1030 (in Chinese)
- [18] Thomas KC, Khachatourians GG, Ingledew WM. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, 33(1): 12-20
- [19] Pelizza SA, Medina H, Ferreri NA, Eliades LA, Pocco ME, Stenglein SA, Lange CE. Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae)[J]. Journal of King Saud University-Science, 2020, 32(1): 44-47
- [20] Bidochka MJ, Khachatourians GG. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1990, 56(3): 362-370
- [21] 刘智辉, 陈守文, 郭志红, 喻子牛. 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
- Liu ZH, Chen SW, Guo ZH, Yu ZN. Correlation of extracellular protease, chitinase activities and virulence to *Ostrinia furnacalis*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2005, 24(4): 364-368 (in Chinese)
- [22] 杨帆, 段立清, 宋钢, 特木钦, 王英凯, 靳荣. 寄生沙棘木蠹蛾的白僵菌菌株特性及其胞外蛋白酶、几丁质酶的活性[J]. 植物保护, 2011, 37(2): 67-71
- Yang F, Duan LQ, Song G, Te MQ, Wang YK, Jin R. Characteristics and extracellular protease and chitinase activity of *Beauveria bassiana* isolated from *Holcocerus hippophaecolus*[J]. Plant Protection, 2011, 37(2): 67-71 (in Chinese)
- [23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 352
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 352
- [24] 耿涛. 家蚕与白僵菌互作机制的研究[D]. 镇江: 江苏科技大学博士学位论文, 2016
- Geng T. Studies on the interaction mechanism of silkworm (*Bombyx mori*) and *Beauveria bassiana*[D]. Zhenjiang: Doctoral Dissertation of Jiangsu University of Science and Technology, 2016 (in Chinese)
- [25] Rezende S, Curvello FA, Fraga ME, Reis R, Castilho A, Agostinho T. Control of the *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) with entomopathogenic fungi[J]. Revista Brasileira De Ciência Avícola, 2009, 11(2): 121-127
- [26] 雷妍圆, 吕利华, 何余容, 陈冬虹. 球孢白僵菌生物学特性与其对小菜蛾致病力相关性分析[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 143-148
- Lei YY, Lü LH, He YR, Chen DH. Correlation between biological characteristics of *Beauveria bassiana* and its virulence to *Plutella xylostella*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 143-148 (in Chinese)
- [27] 苒娜娜, 马焕艳, 鲁华云, 倪春霄, 孟祥坤, 余荣峰, 鲁兴萌. 不同分子类型家蚕病原性白僵菌的分离及致病性试验[J]. 中国蚕业, 2015, 36(3): 32-37
- Qing NN, Ma HY, Lu HY, Ni CX, Meng XK, Yu RF, Lu XM. Isolation and pathogenicity test of different molecular types of *Bombyx mori* pathogenic *Beauveria bassiana*[J]. China Sericulture, 2015, 36(3): 32-37 (in Chinese)
- [28] 李晓华. 僵蚕质量标准规范化研究[D]. 成都: 成都中医药大学硕士学位论文, 2006
- Li XH. Research on the quality standard constitution of *Bombyx Batryticatus*[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu University of TCM, 2006 (in Chinese)
- [29] 陈静, 赖晓芳, 彭洁怡, 王焕宇, 孙施乐. 一株家蚕病原白僵菌的鉴定及人工生产白僵蚕初探[J]. 蚕业科学, 2020, 46(2): 178-183

- Chen J, Lai XF, Peng JY, Wang HY, Sun SL. Identification of a pathogenic *Beauveria bassiana* strain from *Bombyx mori* and preliminary study on artificial production of *Bombyx Batryticatus*[J]. Science of Sericulture, 2020, 46(2): 178-183 (in Chinese)
- [30] Dhawan M, Joshi N. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(3): 522-529
- [31] Pinnamaneni R, Kalidas P, Rao KRSS. Studies on the cloning and expression of *bbchit1* gene of *Beauveria bassiana* NCIM 1216[J]. Indian Journal of Microbiology, 2011, 51(3): 396-402
- [32] Pelizza SA, Ferreri NA, Eliades LA, Galarza B, Cabello MN, Russo ML, Vianna F, Scorsetti AC, Lange CE. Enzymatic activity and virulence of *Cordyceps locustiphila* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on the south American locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae)[J]. Journal of King Saud University-Science, 2021, 33(4): 101411
- [33] 王刚, 董建臻, 曹伟平, 王金耀, 王容燕, 杜立新, 宋健, 冯书亮. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及几丁质酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 175-178
- Wang G, Dong JZ, Cao WP, Wang JY, Wang RY, Du LX, Song J, Feng SL. Advances in extracellular protease and chitinase of *Beauveria bassiana*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(13): 175-178 (in Chinese)
- [34] 林海萍, 魏锦瑜, 毛胜凤, 陈喜, 张立钦, 马良进. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性[J]. 中国生物防治, 2008, 24(3): 290-292
- Lin HP, Wei JY, Mao SF, Chen X, Zhang LQ, Ma LJ. Correlation between protease, chitinase and lipase activities and virulence of *Beauveria bassiana* against *Monochamus alternatus*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(3): 290-292 (in Chinese)