



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Enzymatic Characterization of Two Entomopathogenic Fungi with the API ZYM System and Their Secretion Time Series 【Research report】

利用API ZYM系統分析白殭菌及蠟蚧輪枝菌之胞外酶分泌種類及時程【研究報告】

Chiao-Chih Chien, and Wen-Feng Hsiao Ping-Lin Ong*
簡巧治、蕭文鳳、翁秉霖*

*通訊作者E-mail: peterong@mail.nyu.edu.tw

Received: 2005/10/21 Accepted: 2006/08/14 Available online: 2006/12/01

Abstract

The enzymatic profiles and enzyme secretion time series of protease and lipase of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* were studied using an API ZYM system and culture media. The diameter of the hydrolytic zone when both fungi were cultured with two media below 30°C was larger than these of fungi cultured at the remaining temperatures 7 days later. In the in vitro test, these two fungi were able to produce protease and lipase at the tested temperatures, except at 35°C. None of the isolates showed any reaction to substrates with β -glucuronidase. All isolates showed little activity or were completely without activity to substrates with valine aminopeptidase, cysteine aminopeptidase, trypsin, α -galactosidase, α -glucosidase, and α -mannosidase. Three isolates of *B. bassiana* (35502, 35517, and HO212) showed moderate activity to substrates of esterase, esterase lipase, lipase, acid phosphatase, phosphoamidase, β -glucosidase, and β -glucosaminidase. Two isolates of *V. lecanii* (35548 and 35556) showed moderate activity to substrates of alkaline phosphatase, acid phosphatase, phosphoamidase, β -glucosidase, and α -fucosidase. Among them, *B. bassiana* isolate 35502 showed stronger reactions to the substrates of alkaline phosphatase, acid phosphatase, phosphoamidase, β -glucosidase and α -fucosidase than did the other two *B. bassiana* isolates that reached a category of four. Results suggest that these two entomopathogenic fungi produce extracellular enzymes, e.g., esterase, lipase, acid phosphatase, phosphoamidase, and chitinase, during their spore germination period. In the enzyme secretion series conducted with *B. bassiana*, glucosidase and glucosaminidase appeared on day 2 to digest the carbohydrate. Meanwhile, phosphatase and phosphoamidase appeared on day 2 to digest the protein. The results of these studies indicate that the API ZYM technique provides a rapid and reproducible semiquantitative method for revealing the enzymatic activity and secretion time series.

摘要

實驗利用固體培養基及API ZYM系統對蟲生真菌白殭菌(*Beauveria bassiana*)及蠟蚧輪枝菌(*Verticillium lecanii*)的蛋白酶(protase)、脂解(lipase)及其他胞外酶進行定性分析。以營養培養基添加gelatin及Tween 20培養基培養真菌。於30°C下恆溫培養七天後，所產生之水解環直徑遠較培養於20、25及35°C溫度下真菌產生之水解環直徑來的大；除35°C外，真菌在其他三種溫度培養下，菌體外皆分泌蛋白酶及脂解酶。另以API ZYM系統分析真菌體外分泌酵素，結果顯示白殭菌並未偵測到 β -葡萄糖苷酶(β -glucuronidase)、 α -半乳糖苷酶(α -galactosidase)、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)及甘露糖苷酶(α -mannosidase)；蠟蚧輪枝菌未偵測到 β -葡萄糖苷酶，但有微量的缬氨酸胺酶(valine aminopeptidase)、半胱氨酸胺酶(cysteine aminopeptidase)、胰蛋白酶(trypsin)、 α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶及甘露糖苷酶活性(1等級)；另三株白殭菌供試菌株(35502、35517及H0212)有較高酯酶(esterase)、酯解脂酶(esterase lipase)、脂解酶(lipase)、酸性磷酸酶(acid phosphatase)、磷酸醯胺酶(phosphoamidase)、 β -葡萄糖苷酶及 β -氨基葡萄糖苷酶(β -glucosaminidase)等活性(2~3等級)。而另二株蠟蚧幹枝孢菌供試菌株(35548與35556)亦具有acid phosphatase、phosphoamidase、 β -galactosidase、 β -glucosidase、 β -glucosaminidase及 α -岩藻糖苷酶(α -fucosidase)等水解活性(等級2~3)。此外較特殊的是白殭菌35502菌株，較其他兩株白殭菌菌株具較高alkaline phosphatase、acid phosphatase、phosphoamidase、 β -glucosidase及 α -fucosidase酵素活性(等級4)。以上的結果顯示此二蟲生真菌在孢子發芽階段能產生esterase、lipase、acid phosphatase、phosphoamidase及chitinase等胞外酵素。API ZYM測試系統可提供快速半定量真菌細胞外酶活性測試，分析蟲生真菌入侵寄主昆蟲可能之水解酵素產生種類。本實驗發現白殭菌於培養第二天即產生可能參與昆蟲體表脂質水解的esterase及lipase酵素，及可能分解蟲體幾丁質的glucosidase及glucosaminidase酵素，及與蛋白質修飾有關的acid phosphatase及phosphoamidase酵素，上述大量分泌體外酵素在蟲生真菌侵入蟲體過程中扮演著特定角色。

Key words: enzymes, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, API ZYM

關鍵詞: 白殭菌、蠟蚧輪枝菌、酶、API ZYM

Full Text: [PDF \(0.41 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

利用 API ZYM 系統分析白殭菌及蠟蚧輪枝菌之胞外酶分泌種類及時程

簡巧治 蕭文鳳 國立嘉義大學生物資源與植物保護系 嘉義市學府路 300 號
翁秉霖* 國立嘉義大學分子及生物化學系 嘉義市學府路 300 號

摘 要

本實驗利用固體培養基及 API ZYM 系統對蟲生真菌白殭菌(*Beauveria bassiana*)及蠟蚧輪枝菌(*Verticillium lecanii*)的蛋白酶(protase)、脂解酶(lipase)及其他胞外酶進行定性分析。以營養培養基添加 gelatin 及 Tween 20 培養基培養真菌，於 30°C 下恆溫培養七天後，所產生之酶水解環直徑遠較培養於 20、25 及 35°C 溫度下真菌產生酶水解環直徑來的大；除 35°C 外，真菌在其三種溫度培養下，菌體外皆分泌蛋白酶及脂解酶。另以 API ZYM 系統分析真菌體外分泌酵素，結果顯示白殭菌並未偵測到 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase)、 α -半乳糖苷酶(α -galactosidase)、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)及甘露糖苷酶(α -mannosidase)；蠟蚧輪枝菌未偵測到 β -葡萄糖苷酸酶，但有微量的羥胺酸胺基分解酶(valine aminopeptidase)、半胱氨酸胺基分解酶(cysteine aminopeptidase)、胰蛋白酶(trypsin)、 α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶及甘露糖苷酶活性(≤ 1 等級)；另三株白殭菌供試菌株(35502、35517 及 H0212)有較高酯解酶(esterase)、酯解脂解酶(esterase lipase)、脂解酶(lipase)、酸性磷酸酶(acid phosphatase)、磷酸醯胺酶(phosphoamidase)、 β -葡萄糖苷酶及 β -氨基葡萄糖苷酶(β -glucosaminidase)等活性(2~3 等級)。而另二株蠟蚧輪枝菌供試菌株(35548 與 35556)亦具有 acid phosphatase、phosphoamidase、 β -galactosidase、 β -glucosidase、 β -glucosaminidase 及 α -岩藻糖苷酶(α -fucosidase)等水解活性(等級 2~3)。此外較特殊的是白殭菌 35502 菌株，較其他兩株白殭菌菌株具較高 alkaline phosphatase、acid phosphatase、phosphoamidase、 β -glucosidase 及 α -fucosidase 酵素活性(等級 4)。以上的結果顯示此二蟲生真菌在孢子發芽階段能產生 esterase、lipase、acid phosphatase、phosphoamidase 及 chitinase 等胞外酵素。API ZYM 測試系統可提供快速半定量真菌細胞外酶活性測試，分析蟲生真菌入侵寄生昆蟲可能之水解酵素產生種類。本實驗發現白殭菌於培養第二天即產生可能參與昆蟲體表脂質水解的 esterase 及 lipase 酵素，及可能分解昆蟲體幾丁質的 glucosidase 及 glucosaminidase 酵素，及與蛋白質修飾有關的 acid phosphatase 及 phosphoamidase 酵素，上述大量分泌體外酵素在蟲生真菌侵入昆蟲過程中扮演著特定角色。

關鍵詞：白殭菌、蠟蚧輪枝菌、酶、API ZYM。

*論文聯繫人
e-mail: peterong@mail.ncyu.edu.tw

前 言

長久以來，化學農藥幾乎已是作物蟲害防治唯一的依賴，在人類過量使用下，也產生諸多的副作用，包括對環境的污染、對人體的危害和生態的破壞…等，因此不論是在降低對化學農藥的依賴或在蟲害綜合管理的策略應用，採行生物防治法已是必然的趨勢(Kao and Tsai, 2003)。目前已商品化的生物農藥有綠蟲、蘇力菌、真菌及病毒等(Kaya and Gaugler, 1993)，而蟲生真菌(entomopathogenic fungi)優於蘇力菌及病毒的主要原因，乃是它具有穿透昆蟲體壁之能力，不須經由口腔侵染，能被應用於刺吸式口器害蟲之防治(Hajek and St. Leger, 1994)。昆蟲遭受蟲生真菌感染後，通常會造成食慾降低，身體呈現軟弱無力，表皮失去原有光澤，罹病之蟲體會有菌絲產生，死亡後硬化乾枯成木乃伊狀，故又稱為硬化病或殭病(Lin, 2002)。

蟲生真菌對昆蟲感染方式、毒性及對寄主專一性，各物種間差異相當大(Deacon, 1983)。如蠟蚧輪枝菌(*V. lecanii*)感染蚜蟲之方式為孢子與昆蟲體表接觸，在適合之溼度下，孢子開始發芽並產生發芽管，前端形成膨大附著器(appressorium)；但在蟲霉屬(*Entomophthora*)真菌是直接由孢子形成附著器，並產生 lipases、protease 及 chitinase 等酶，隨後產生貫穿菌絲(penetration hypha)貫穿表皮，菌絲開始擴展並大量繁殖，繼續侵入上皮及皮下組織，使血腔內增加芽生孢子或是菌絲體的數量，同時亦產生毒素(mycotoxins)，造成蚜蟲快速死亡(Deacon, 1983)。

昆蟲的體壁為極複雜的結構，通常是由蛋白質、類脂物質、幾丁質和酚類等化合物所複合而成，蟲生真菌的菌絲欲貫穿昆蟲表皮，必

須能夠先行分泌細胞外酶，如蛋白酶、幾丁質酶、及脂解酶等，分解受感染部位，受菌體入侵組織部位伴隨變黑，可能是因為蟲生真菌能夠產生分解酚類化合物之酶所造成(St. Leger *et al.*, 1988)。

本實驗利用固體培養來測試二種蟲生真菌蛋白酶及脂解酶之活性，並藉助 API ZYM 系統分析白殭菌(*B. bassiana*)及蠟蚧輪枝菌(*V. lecanii*)產生胞外酶的種類及分泌時間，便於了解蟲生真菌所分泌胞外酶在昆蟲致病作用機制中扮演的角色。

材料與方法

一、供試菌株來源

本實驗所用之五個供試菌株，其中三株為白殭菌品系，代號 35502 及 35517 購自新竹財團法人食品工業發展研究所，代號 H0212 源自於國立台灣大學植物病理與微生物系曾顯雄教授實驗室；二株為蠟蚧輪枝菌品系，代號 35548 及 35556 同樣購自於食品工業發展研究所，各菌株來源列於附錄；菌株培養以 yeast peptone dextrose agar (0.2% 酵母菌，1% 蛋白胨，2% 葡萄糖，3% 瓊脂；以下簡稱 YPDA) 作為培養基(Hsiao and Katchatourian, 1997)，放置於 25°C 無光照恆溫箱培養，七天後長出菌絲及孢子，繼代培養一代後，即進行以下之測試。

二、蟲生真菌所產生之酶檢測

1. 固體培養基測試

主要測定菌體是否產生下列兩種胞外酶為目的，係採用 Hankin and Anagnostakis (1975) 方法分別進行測定。以 nutrient agar (NA; Difco) 作為供試培養基進行培養，以打孔器將濾紙打成直徑 0.6 cm 濾紙圓片而後滅

菌，將已滅菌的濾紙圓片置於培養基中央，加入 5 μ l 孢子懸浮液，接種後之培養皿置於 25°C 恆溫箱，無光照培養七天，待後將孢子洗下作為接種源。

a. 蛋白酶(Protease)

供試培養基 NA 中添加 0.4% gelatin，滅菌後製成平板，每個培養皿接種 5 μ l 10^5 spores/ml 孢子懸浮液，並將濾紙圓片翻面貼於培養基表面，分別放置於 20、25、30 及 35°C 無光照之恆溫箱中培養一星期，每種溫度五重複，培養 7 天後取出，每培養皿加入 20 ml 5% sulphosalicylic acid 溶液，靜置 5 分鐘，使培養基呈現渾濁後，觀察濾紙圓片周圍是否有透明環產生，若出現透明環則表示該菌株分泌出活性之蛋白酶。

b. 脂解酶(Lipase)

供試培養基(10 g Difco peptone; 5 g NaCl; 0.6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 20 g agar per liter)先行滅菌，待培養基溫度降為 40~50°C，再加入 1% Tween 20 製成平板，每個培養皿取 5 μ l 10^5 spores/ml 孢子懸浮液加入滅菌圓片濾紙上，分別放置於 20、25、30 及 35°C 無光照之恆溫箱培養一星期，每種溫度五重複，培養後，觀察置中滅菌圓片濾紙周圍是否有沉澱物產生，若有即表示該菌株分泌出活性之脂解酶。

紀錄蛋白酶及脂解酶分泌產生之作用環大小，以 SPSS 之單變量分析，採用鄧肯氏多變域分析法(Duncan's new multiple range test) (Duncan, 1955)，在 5% 顯著水準下做檢測，比較其差異性。

2. API ZYM 系統測試

a. 根據 Hsiao (1998)及 St. Leger *et al.* (1986)之方法，利用 API ZYM 系統(API laboratory LTD, Quebec, Canada)快速檢測供試蟲生真菌產生之不同胞外酶種類及活

性；首先將五種供試菌株以 YPDA 培養，置於 25°C 恆溫箱下無光照培養 7 天後，以含 0.05% Tween 80 無菌水洗下孢子，配製成 1×10^5 spores/ml 溶液，放置於 -20°C 一天備用；測試前先讓 API ZYM kit 檢測器充滿溼氣，於每種受質(substrate)測試孔中加入 100 μ l 的孢子懸浮液，放置於 25°C 恆溫箱內培養 7 天後，在各測試孔中滴入 0.005 μ l ZYM A 染劑後，再加入 0.005 μ l ZYM B 染劑反應 5 分鐘，藉由產生的顏色強弱與 API ZYM kit 標準比色表加以比較，進行評比其活性級數。

b. 由寄主 Elephant beetle 所分離出之白殭菌 35502 菌株，以 YPDA 培養，置於 25°C 恆溫箱無光照下，進行 2、4、6 天不同時間長短培養，以含 0.05% Tween 80 無菌水洗下孢子，配製成 1×10^5 spores/ml 溶液，放置於 -20°C 三天備用；利用 API ZYM 系統檢測於不同時間培養後，分析各菌株胞外酶分泌種類及活性的差異。

結 果

各菌株產生之酶檢測

1. 固體培養基測試

在蛋白酶活性檢測分析，發現五個菌株在各測試溫度下培養，其菌落周圍皆會產生透明水解環，但在其他四種不同溫度下培養，以 30°C 的蠟蚧輪枝菌 35548 及 35556 菌株產生的透明水解環直徑為最大，分別為 3.50 及 3.70 cm，明顯地較其他溫度下培養所檢測之透明環直徑大。整體上，五株真菌在四種溫度下培養，除了白殭菌 35502 菌株在 30°C 下培養比 25°C 下培養產生透明水解環直徑減少 0.40 cm 外，其餘四個菌株在 30°C 所產生的澄清透明水解環直徑為最大，表示白殭菌及蠟蚧輪枝菌的測試菌株，在 30°C 溫度下培養可產生最

表一 利用固體培養基測試供試蟲生真菌產生之酶活性

Table 1. Enzymatic activities of the two entomopathogenic fungi detected by solid culture medium

Isolate	Diameter of hydrolytic ring by Protease (mm)				Diameter of the hydrolytic ring by lipase (mm)			
	20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
	<i>Beauveria bassiana</i>							
35517	16.0c ¹⁾	18.5a	23.0b	13.5c	34.0c	31.0a	34.0a	0.0a
35502	17.5c	24.5b	20.5a	0.0a	28.0a	31.0a	43.0b	0.0a
H0212	11.0b	27.0c	31.0c	9.0b	36.0d	36.0b	44.0b	0.0a
<i>Verticillium lecanii</i>								
35548	1.00a	3.00d	3.70e	15.5d	30.0b	39.0c	49.0d	22.0c
35556	0.90a	3.00d	3.50d	16.5d	34.0c	40.0c	47.0c	19.0b

¹⁾ Means within a column followed by the same letter do not significantly differ at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

高活性之蛋白酶(表一)。就菌種而言，蠟蚧輪枝菌的二個菌株所產生之蛋白酶皆高於白殭菌的三個菌株。就溫度效應，於 20~30°C 間二種真菌之測試菌株，其蛋白酶之產生量隨溫度之上升而增加。

而脂解酶檢測方面，發現五個菌株菌落在 20、25 及 30°C 下培養，菌落周圍皆會產生沉澱物，但在 35°C 條件下培養的白殭菌三個菌株皆無法產生脂解酶，只有蠟蚧輪枝菌二個菌株在 35°C 周圍會產生沉澱物。在四種培養溫度中，以蠟蚧輪枝菌 35548 及 35556 菌株在 30°C 所呈現的沉澱環直徑最大，分別為 4.70 及 4.90 cm，明顯地比其他培養溫度下產生的沉澱環直徑來的大。整體上，五個菌株在四種溫度培養下產生沉澱物數量，以在 30°C 培養下所產生的沉澱環直徑最大，表示白殭菌及蠟蚧輪枝菌的測試菌株，在 30°C 溫度下培養產生的脂解酶活性為最高(表一)。就菌種而言，蠟蚧輪枝菌二個菌株所產生的脂解酶(lipase)皆高於白殭菌的三個菌株。就溫度效應而言，於 20~30°C 之間培養，脂解酶之產量隨溫度上升而增加。

2. API ZYM 系統測試

五種供試菌株對十九種酵素受質(表二)呈

現不同程度的反應級數，五種供試菌株均檢測出與固體培養基分析結果相同的脂解酶活性，但蛋白酶活性卻不明顯；其他 acid phosphatase 除白殭菌 35517 外，皆大量產生，alkaline phosphatase 活性僅以白殭菌 35502 及蠟蚧輪枝菌 35556 產生較多；五種供試菌株中，皆產生高 β -glucosaminidase 活性，但白殭菌 β -glucosaminidase 活性明顯的比蠟蚧輪枝菌為高，而 β -glucosidase 活性級數皆較 β -glucosaminidase 稍弱；至於分解 α -linked 多醣基質酵素活性遠較分解 β -linked 多醣基質酵素活性為低，至於對帶負電的多醣基質水解活性幾乎沒有(表二)。

針對白殭菌 35502 單一菌株進行不同時間培養觀察，其胞外酶活性在兩天培養後即達最高值，acid phosphatase、phosphoamidase、 β -glucosidase、 β -glucosaminidase、alkaline phosphatase、esterase、esterase lipase 及 β -galactosidase 的活性級數依序為 4、4、3、3、2、2、1、1；培養至第四天除上述酶活性增強外， α -fucosidase 活性開始產生(級數 2)，培養至第六天 α -fucosidase 活性增強至活性級數 3(表三)。

表二 利用 API ZYM 系統測試供試蟲生真菌之酶活性

Table 2. Enzymatic activities of the two entomopathogenic fungi analyzed by the API ZYM system

No.	Substrate	Enzyme	Isolates				
			<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Verticillium lecanii</i>	
			35517	35502	H0212	35548	35556
1.	Control		0	0	0	0	0
2.	2-Naphtyl-phosphate	Alkaline phosphatase	0	4	< 1	2	4
3.	2-Naphtyl-butyrate	Esterase (C ₄)	2	2	2	< 1	< 1
4.	2-Naphtyl-caprylate	Esterase lipase (C ₈)	2	3	3	1	1
5.	2-Naphtyl-myristate	Lipase (C ₁₄)	2	2	1	< 1	< 1
6.	L-Leucyl-2-naphtylamide	Leucine aminopeptidase	0	1	0	2	< 1
7.	L-Valyl-2-naphtylamide	Valine aminopeptidase	0	< 1	< 1	< 1	0
8.	L-Cystyl-2-naphtylamide	Cystine aminopeptidase	< 1	1	< 1	1	< 1
9.	N-Benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	Trypsin	0	< 1	0	< 1	0
10.	N-Glutaryl-phenylalanine-2-naphtylamide	Chymotrypsin	0	1	< 1	1	2
11.	2-Naphtyl-phosphate	Acid phosphatase	2	5	3	5	5
12.	Naphtol-AS-BI-phosphate	Phosphoamidase	2	5	1	3	3
13.	6-Br-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	α -Galactosidase	0	0	0	0	1
14.	2-Naphtyl- β D-galactopyranoside	β -Galactosidase	1	3	1	3	1
15.	Naphtol-AS-BI- β D-glucuronide	β -Glucuronidase	0	0	0	0	0
16.	2-Naphtyl- α D-glucopyranoside	α -Glucosidase	0	0	0	1	< 1
17.	6-Br-2-naphtyl- β D-glucopyranoside	β -Glucosidase	3	4	2	4	4
18.	1-Naphtyl-N-acetyl- β D-glucosaminide	β -Glucosaminidase	4	4	4	4	2
19.	6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranoside	α -Mannosidase	0	0	0	< 1	< 1
20.	2-Naphtyl- α L-fucopyranoside	α -Fucosidase	0	4	0	2	2

討 論

蟲生真菌感染蟲體以貫穿寄主體表為主要方式，而昆蟲體表主要由蛋白質、脂質、酚類化合物和幾丁質等成分所組成，因此蟲生真菌感染昆蟲寄主時，主要靠發芽管或附著器來產生水解酶，用以破壞寄主表皮，達到貫穿感染之目的(Ferron, 1978)，因此水解酶之分泌產生在蟲生真菌侵入寄主蟲體過程中扮演極重要之角色。根據 Gupta (1991)等人和 Urtz and Rice (2000)研究報告指出分離自不同區域且不同寄主之黑殭菌(*M. anisopliae* var. *anisopliae*)，均可在含有 gelatin 成分固體培養基培養產生具有 chymoelastase 活性之 Pr1 絲胺酸蛋白酶，並證實 Pr1 能夠分解昆蟲表皮

之蛋白質組成，在貫穿昆蟲體表過程中扮演重要角色。本實驗採用 Gupta (1991)等人設計之固體培養基測試法來分析白殭菌及蠟蚧輪枝菌蛋白酶活性，亦得到同樣蛋白酶活性結果，五個菌株皆能在 25~30°C 溫度培養下產生最高蛋白酶活性。但在 API ZYM 系統測試結果卻發現五個菌株僅產生極少量蛋白酶之活性，在 Paterson *et al.* (1994)研究報告中指出黑殭菌在含有昆蟲體壁之培養基產生大量 Pr1 蛋白酶，但在含有 gelatin 之固體培養基則完全不會產生，認為蟲生真菌蛋白酶的分泌產生須經昆蟲體壁特定成分誘發。而 API ZYM 系統的培養基中無添加 gelatin 及昆蟲體壁成份，所以無法誘導及偵測大量蛋白酶活性。

表三 利用 API ZYM 系統測試 35502 蟲生真菌之酶活性

Table 3. Enzymatic activities of *B. bassiana* 35502 analyzed by the API ZYM system

No.	Substrate	Enzyme	Activity (d)		
			2	4	6
1.	Control		0	0	0
2.	2-Naphtyl-phosphate	Alkaline phosphatase	2	2	2
3.	2-Naphtyl-butyrate	Esterase (C ₄)	2	2	2
4.	2-Naphtyl-caprylate	Esterase lipase (C ₈)	1	2	2
5.	2-Naphtyl-myristate	Lipase (C ₁₄)	0	0	1
6.	L-Leucyl-2-naphtylamide	Leucine aminopeptidase	< 1	< 1	< 1
7.	L-Valyl-2-naphtylamide	Valine aminopeptidase	0	< 1	< 1
8.	L-Cystyl-2-naphtylamide	Cystine aminopeptidase	0	< 1	< 1
9.	N-Benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	Trypsin	0	< 1	< 1
10.	N-Glutaryl-phenylalanine-2-naphtylamide	Chymotrypsin	< 1	< 1	< 1
11.	2-Naphtyl-phosphate	Acid phosphatase	4	5	4
12.	Naphtol-AS-BI-phosphate	Phosphoamidase	4	5	4
13.	6-Br-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	α -Galactosidase	0	0	0
14.	2-Naphtyl- β D-galactopyranoside	β -Galactosidase	1	2	2
15.	Naphtol-AS-BI- β D-glucuronide	β -Glucuronidase	0	0	0
16.	2-Naphtyl- α D-glucopyranoside	α -Glucosidase	0	0	0
17.	6-Br-2-naphtyl- β D-glucopyranoside	β -Glucosidase	3	3	3
18.	1-Naphtyl-N-acetyl- β D-glucosaminide	β -Glucosaminidase	3	4	4
19.	6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranoside	α -Mannosidase	0	0	0
20.	2-Naphtyl- α L-fucopyranoside	α -Fucosidase	0	2	3

附錄 五個供試蟲生真菌菌株之學名及來源

Appendix. List of entomopathogenic fungi isolates used in this study

Isolate	Scientific name	Host insect	Source	Contributor
35517	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Plutella xylostella</i>	Taichung	Bioresource Collection and Research Center
35502	<i>Beauveria bassiana</i>	Elephant beetle	Kaohsiung	Bioresource Collection and Research Center
H0212	<i>Beauveria bassiana</i>	Homoptera	Taipei	National Taiwan University
35548	<i>Verticillium lecanii</i>	Homoptera	Hualien	Bioresource Collection and Research Center
35556	<i>Verticillium lecanii</i>	Homoptera	Ilan	Bioresource Collection and Research Center

Tzean *et al.* (1997) 報告指出將蟲生真菌發芽之分生孢子及發芽管做組織化學研究，已證實有 endoprotease、aminopeptidases、lipase、esterase 和 N-acetyl-glucosaminidase 酵素存在，與本實驗 API ZYM 系統分析結果相符合，五個供試蟲生真菌皆有分解脂質之能力，而在溫度培養測試上，得知在 25~30°C 內培養可產生最佳脂解酶活性。經由其他研究報告結果證實，分泌脂解酶是用以溶解昆蟲上

表皮之臘質 (Hankin and Anagnostakis, 1975)。另外本實驗雖未使用固體培養基測試 β -glucosaminidase 與果膠酶活性，但 Valadares-Inglis and Peberdy (1997) 指出黑殭菌可產生幾丁質酶，來分解昆蟲表皮，並證實不同菌株間產生不同量的幾丁質酶；另外 El-Sayed *et al.* (1993) 指出綠殭菌 (*Nomuraea rileyi*) 須經特定幾丁質才能誘導產生幾丁質酶；本實驗中 API ZYM 分析系統培養基雖未

加入幾丁質，五種蟲生真菌菌株仍大量產生 β -glucosaminidase。

利用 API ZYM 系統可快速偵測不同蟲生真菌菌株產生水解酶種類及活性，雖此方法無法精確測定水解酶絕對含量 (Hsiao and Khachatourians, 1997; St. Leger *et al.*, 1986)，卻提供相對含量，所以可應用此分析系統測量不同酵素在不同培養時間後活性上相對變化量。實驗中發現白殭菌 35517、35502、H0212 菌株產生之 esterase 及 lipase 活性較蠟蚧輪枝菌 35548、35556 之菌株為高，而五個菌株皆大量產生 alkaline phosphatase、acid phosphatase、phosphoamidase、 β -glucosidase 及 β -glucosaminidase，但各酵素相對活性在不同菌株表現各自不同，其中 β -glucosaminidase 在五個菌株中皆大量產生，所以幾丁質水解在感染過程是必須進行過程，與 Samson *et al.* (1988) 之報告指出蠟蚧輪枝菌產生細胞外幾丁質酶活性較高相符。然而磷酸水解所需酵素在不同菌株雖大量產生但有差異性，與蛋白質磷酸水解在不同蟲生真菌感染過程中應扮演特殊角色，可能與五個菌株辨識特定昆蟲寄主能力有關，因此推測這些酶活性的差異度在菌絲侵入感染寄主昆蟲時扮演某些重要之角色，但仍需作進一步之探討。

另由 API ZYM 系統分析實驗結果發現，蟲生真菌培養至第二天已大量產生 β -glucosidase、 β -glucosaminidase、acid phosphatase、phosphoamidase 及 esterase lipase 等胞外酶。然而培養至第四天開始產生 α -fucosidase 酵素，推測可能與蟲生真菌感染寄主昆蟲發病時程有相對的關聯性，但仍需作進一步之探討。

本文以 API ZYM 檢驗技術為主，固體培養基檢測為輔，來分析蟲生真菌產生水解酶種

類、相對活性與培養時間之關聯性，以提供進一步了解蟲生真菌感染昆蟲致病作用機制上所需胞外酶分泌種類及順序資料。未來可以配合昆蟲切片技術和 API ZYM 系統同時進行測試，充分了解昆蟲受感染後蟲體內真菌胞外酶的分泌順序及作用位置，這有利於確認蟲生真菌之致病作用機制中各步驟的關鍵性酵素，也就是致病性因子，藉助生物技術發展量產、製劑及施用方法以供作生物防治商業化之技術基礎。

誌 謝

本研究承行政院農委會 93 動植物防疫檢疫局救助調整-檢-01 經費補助，謹誌謝忱。

引用文獻

- Deacon, J. W. 1983. Microbial control of pests: use of fungi. pp. 31-42. *In: Microbial Control of Plant and Diseases. Aspects of Microbiology Series 7.* American Society of Microbiology, 87pp.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple *F* tests. *Biometrika* 42: 1-42.
- El-sayed, G. N., C. M. Ignoffo, T. D. Leathers, and S. C. Gupta. 1993. Effect of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzyme by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia* 122: 149-152.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. El-Sayed, and C. G. Ignoffo. 1991. Production of

- degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle. *Exp. Mycol.* 15: 310-315.
- Hajek, A. E., and R. J. St. Leger.** 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hankin, L., and S. L. Anagnostakis.** 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 590-607.
- Hsiao, W. F.** 1998. Enzymatic characterization of three entomopathogenic fungi with the API ZYM system. *Chinese J. Entomol.* 18: 203-206.
- Hsiao, W. F., and G. G. Khachatourians.** 1997. The role of extracellular enzymes in the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecaii*, to oat-bird cherry aphid, *Ropalosiphum padi* (Homoptera:Aphididae). *Chinese J. Entomol.* 17: 227-236.
- Kaya, H. K., and R. Gaugler.** 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kao, S. S., and Y. S. Tsai.** 2003. Interaction between entomopathogenic fungi and natural enemies. *Special Topics* 68: 2-24. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung, Taiwan.
- Lin, S. F.** 2002. Control of aphid by entomopathogenic fungi in the greenhouse. Master's thesis, Graduate School of Plant Protection, National Pintung Technology University, Pintung, Taiwan. 120 pp.
- Paterson, I. C., A. K. Charnley, R. M. Cooper, and J. M. Clarkson.** 1994. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 185-189.
- Peng, B. C.** 1985. Pathological studies of an entomogenous fungus, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in aphids. Master's thesis, Graduate School of Entomology, National Chung-Shing University, Taichung, Taiwan. 29 pp.
- Samson, R. A., H. C. Evans, and J. P. Latge.** 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Berlin. 187 pp.
- Show, F. L.** 2002. Control of aphid by entomopathogenic fungi in the greenhouse. Master's thesis, Graduate School of Plant Protection, National Pintung University of Science and Technology. 6 pp.
- St. Leger, R. J., A. K. Charnley, and R. M. Cooper.** 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with the API ZYM system. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 375-376.
- St. Leger, R. J., P. K. Durrands, A. K. Charnley, and R. M. Cooper.** 1988. Role of extracellular chymoelestatase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 285-293.
- Tzean, S. S., L. S. Hsieh, and W. J. Wu.**

1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. Council of Agriculture Executive Yuan, Taipei, Taiwan. 214 pp.
- Urtz, B. E., and W. C. Rice.** 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. Mycol. Res. 104: 180-186.
- Valadares-Inglis, M. C., and J. F. Peberdy.** 1997. Location of chitinolytic enzymes in protoplasts and whole cells of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 101: 1393-1396.
- 收件日期：2005年10月21日
接受日期：2006年8月14日

Enzymatic Characterization of Two Entomopathogenic Fungi with the API ZYM System and Their Secretion Time Series

Chiao-Chih Chien, and Wen-Feng Hsiao Department of Bioresources and Plant Protection, National Chiayi University, Chiayi 600, Taiwan, ROC

Ping-Lin Ong* Department of Molecular Biology and Biochemistry, National Chiayi University, Chiayi 600, Taiwan, ROC

ABSTRACT

The enzymatic profiles and enzyme secretion time series of protease and lipase of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* were studied using an API ZYM system and culture media. The diameter of the hydrolytic zone when both fungi were cultured with two media below 30°C was larger than these of fungi cultured at the remaining temperatures 7 days later. In the *in vitro* test, these two fungi were able to produce protease and lipase at the tested temperatures, except at 35°C. None of the isolates showed any reaction to substrates with β -glucuronidase. All isolates showed little activity or were completely without activity to substrates with valine aminopeptidase, cysteine aminopeptidase, trypsin, α -galactosidase, α -glucosidase, and α -mannosidase. Three isolates of *B. bassiana* (35502, 35517, and HO212) showed moderate activity to substrates of esterase, esterase lipase, lipase, acid phosphatase, phosphoamidase, β -glucosidase, and β -glucosaminidase. Two isolates of *V. lecanii* (35548 and 35556) showed moderate activity to substrates of alkaline phosphatase, acid phosphatase, phosphoamidase, β -glucosidase, and α -fucosidase. Among them, *B. bassiana* isolate 35502 showed stronger reactions to the substrates of alkaline phosphatase, acid phosphatase, phosphoamidase, β -glucosidase and α -fucosidase than did the other two *B. bassiana* isolates that reached a category of four. Results suggest that these two entomopathogenic fungi produce extracellular enzymes, e.g., esterase, lipase, acid phosphatase, phosphoamidase, and chitinase, during their spore germination period. In the enzyme secretion series conducted with *B. bassiana*, glucosidase and glucosaminidase appeared on day 2 to digest the carbohydrate. Meanwhile, phosphatase and phosphoamidase appeared on day 2 to digest the protein. The results of these studies indicate that the API ZYM technique provides a rapid and reproducible semiquantitative method for revealing the enzymatic activity and secretion time series.

Key words: enzymes, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, API ZYM