

氨基多糖生物降解转化模型的建立

王 士 奎

(中国农业工程研究设计院 北京 100026)

摘要 以 *Beauveria bassiana* LB₉₅₀ 菌作为氨基多糖降解菌, 以 *Candida* sp. LB₉₅₀ 菌作为氨基糖转化菌, 建立的氨基多糖生物降解及转化模型, 与纯培养比较, 粘度下降比率提高 23.0%, 可溶性糖含量增加 167.7 μ g /mh。二菌混合生长时呈互生关系。

关键词 转化模型, 氨基多糖, 生物降解

氨基多糖主要以几丁质和脱乙酰几丁质的形式存在于节肢动物外骨骼和真菌细胞壁中, 在自然界中的含量仅次于纤维素, 且是唯一大量存在的碱性多糖。由于它具有生物相容性, 高粘度、富含活性基团($-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$)和来源丰富等一系列特点, 目

前, 国内外对这类生物资源的开发利用日益受到重视。然而, 实际应用量确很少, 日本每年只生产几千吨工业产品, 美国的沿海地区氨基多糖废料已是严重的污染源之一^[1], 我国海产

1996-03-19 收稿

品加工厂排出的虾蟹废料并未有效的开发利用, 且对环境造成了潜在的威胁。

一些微生物可有效地降解这类多糖。在降解过程中, 氨基多糖可形成一种具有强烈生物学功能的活性物质——寡聚糖。对人体而言, 氨基寡聚糖可控制血胆固醇和中性脂肪含量, 改善肠道微生物区系和增强免疫力等生物功能^[2]。所以, 氨基多糖的微生物降解和转化有可能形成一种新型功能性糖蛋白再生资源。本文对氨基多糖生物降解转化模型的建立进行了初步探讨, 为今后进一步开发利用这类生物资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

降解菌: *Beauveria bassiana* LB₉₀ 是 *B. bassiana* 017 菌株(北京师范大学生物系黄秀梨先生赠)的诱变株。

转化菌: *Candida* sp. LB₃₀^[3]。

1.2 底物与试剂

壳聚糖: 河北省黄骅市渔业公司提供。

D-葡萄糖胺: 上海化学试剂厂, 分析纯。

其它试剂均为分析纯。

1.3 培养基

1.3.1 菌体繁殖培养基: PDA 培养基, 麦芽汁培养基。

1.3.2 CTN-1 培养基(%): 壳聚糖 1.0, KH₂PO₄ 0.08, KCl 0.03, NaCl 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, FeSO₄ · 7H₂O 0.001。

CTN-2 培养基: 在 CTN-1 培养基中加入 0.1% 蛋白胨。

1.4 培养条件

将菌株 LB₉₀ 接种于 PDA 培养基斜面上, 28℃ 培养 7d, 用 50ml 无菌生理盐水洗下孢子, 记数。将菌株 LB₃₀ 接种于麦芽汁培养基中, 28℃ 培养 48h, 离心, 用无菌生理盐水洗涤, 制成菌悬液, 上述两株菌液冰箱保存。

将菌株 LB₉₀ 定量接种于含 50ml CTN 培养基的三角瓶中, 28℃ 200r/min 条件下在

旋转式摇床上振荡培养, 定期接入菌株 LB₃₀。

1.5 测定方法

1.5.1 培养基相对粘度的测定: 参照文献[4]。

1.5.2 可溶性氨基糖含量测定: 参照文献[5]。

1.5.3 培养液多糖干重的测定: 将培养液加热灭活, 抽滤除去菌体及不溶物, 滤液用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 值 7.5, 待沉淀完全后, 以 3000r/min 离心 5min, 洗涤, 干燥后称重。

2 结果与讨论

2.1 LB₉₀ 和 LB₃₀ 的培养特征

2.1.1 LB₉₀ 培养特征: 取 0.2ml LB₉₀ 菌液接入装有 CTN-1 培养基 50ml 的三角瓶中, 200r/min, 28℃ 振荡培养 7d, 每天取样, 灭活, 抽滤, 获得降解液, 其粘度变化见表 1。LB₉₀ 可大量分泌胞外壳聚糖酶和蛋白酶^[6], 对壳聚糖的降解效率很高, 发酵产物可获得低分子量壳聚糖和可溶性单糖, 酵解至第三天, 粘度下降率为 58.6%, 说明 LB₉₀ 是一株高效壳聚糖降解菌。

表 1 LB₉₀ 在 CTN-1 培养基中降解多糖粘度的变化

培养基	培养时间 (d)	$\bar{T}_{(t)}$	η_r
CTN-1(CK)	7	1037	1.00
CTN-1+LB ₉₀	1	951	0.92
	2	949	0.92
	3	600	0.58
	4	369	0.35
	5	212	0.20
	6	194	0.18
	7	175	0.17

$\bar{T}_{(t)}$: 降解液在乌氏粘度计毛细管中流出的时间(s)

η_r : 相对粘度

2.1.2 LB₃₀ 的培养特征: 菌株 LB₃₀ 可利用氨基糖(N-乙酰氨基葡萄糖, D-氨基葡萄糖)作为唯一碳氮源完成代谢活动^[3], 但在 CTN

培养基中不生长,说明壳聚糖不仅不能作为LB₉₀的营养物,而且壳聚糖的缓冲性对LB₉₀的生长会产生强烈的抑制作用。在利用LB₉₀菌分别降解1~7d的降解液生长时,其生长状态(表2)表明,只有在LB₉₀将壳聚糖降解到一定程度后,才能解除壳聚糖对LB₉₀生长的抑制作用,而达到旺盛生长的状态。

表2 LB₉₀在壳聚糖降解液中的生长状况

降解天数	CTN-1	CTN-2	麦芽汁平板 [*]	蛋白胨平板 ^{**}
1	-	-	++	++
2	-	-	++	++
3	-	±	++	++
4	+	+	++	++
5	+	+	++	++
6	++	++	++	++
7	++	++	++	++

* 5% 麦芽汁+2% 琼脂, ** 0.1% 蛋白胨+2% 琼脂

+: 表明在斜面培养基上形成菌落, 生长

-: 表明在斜面培养基上不形成菌落不生长

2.2 纯培养和混合培养对壳聚糖降解作用的影响

将含50ml CTN-1培养基的三角瓶分二组, 一组接入0.2ml LB₉₀和0.2ml 无菌水, 另一组接入0.2ml LB₉₀和0.2ml LB₉₀菌液, 28℃, 200r/min 振荡培养, 每组每天各取三

表3 纯培养与混合培养壳聚糖含量的变化

培养时间 (d)	纯培养		混合培养	
	壳聚糖	残留率	壳聚糖	残留率
	(g)	(%)	(g)	(%)
1	0.4897	92.9	0.4794	92.1
2	0.4721	90.9	0.4672	89.8
3	0.4320	83.1	0.4134	79.5
4	0.4180	80.4	0.3980	76.6
5	0.3979	76.7	0.3678	70.7
6	0.3812	73.7	0.3450	66.3
7	0.3671	70.6	0.3215	61.7

注: 起始培养液壳聚糖重量为0.520g

个样品, 抽滤、沉降、干燥、称重, 其壳聚糖残留率见表3。

在混合培养中, 酵母菌受到环境抑制时, 壳聚糖降解呈常规状态, 当酵母菌的抑制被解除后, 壳聚糖的降解效率明显高于纯培养, 这可能是由于产物对酶活反馈抑制所致, 其结果为建立壳聚糖生物降解及转化模型提供了实验依据。初步认为LB₉₀和LB₉₀在同一环境中通过互生关系达到高效降解和转化氨基糖的目的, 设计其模式图如下。

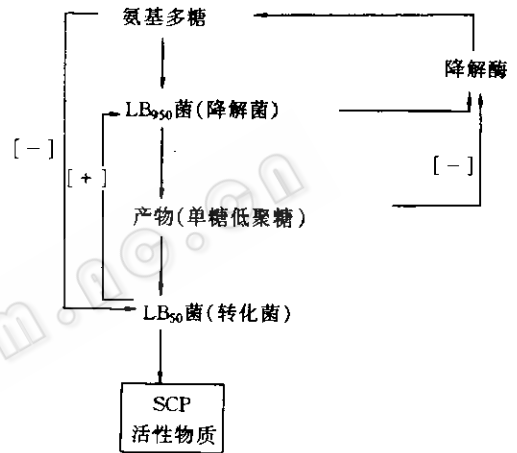


图1 氨基多糖生物降解及转化模型

[-] 抑制作用, [+] 激活作用

2.3 混合培养在不同营养条件下壳聚糖的降解效率

在CTN-1和CTN-2两组培养基中, 分别接入LB₉₀ 1.35×10^6 个和LB₉₀ 5.35×10^6 个, 28℃, 200r/min 振荡培养, 其酵母菌生长状态如表4所示, 培养基中加入定量的蛋白胨(0.1%)后, 首先刺激LB₉₀快速生长, 迅速分泌降解酶, 提前解除环境对酵母菌生长的抑制作用, 增加单细胞蛋白的转化率, 促进壳聚糖的降解作用。

混合培养和纯培养在不同营养环境中, 对降解液的相对粘度(η_r)和可溶性糖含量存在着较大的差异(表5), 在纯培养时, 在CTN-2培养基中, 降解壳聚糖效率明显提高, 粘降比增加34.6%, 可溶性糖含量增加216.82 μ g/ml。混合培养时, 在CTN-2培养

表 4 LB₉₀ 在 CTN 培养基中的生长状态

培养时间 (d)	CTN-1 (n × 10 ⁶)	CTN-2 (n × 10 ⁶)
1	5.35	5.35
2	5.35	5.35
3	5.35	6.24
4	50.00	75.00
5	60.00	140.00
6	100.00	180.00
7	140.00	200.00

n: 酵母菌 LB₉₀ 在培养基中每毫升所含的细胞数

表 5 纯培养与混合培养在不同营养环境中的比较

项目	纯培养		混合培养	
	CTN-1	CTN-2	CTN-1	CTN-2
发酵天数 (d)	7	7	7	7
η_t	0.26	0.17	0.23	0.13
可溶性糖 含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	129.68	346.50	147.94	514.23

基中, 粘降比增加 43.5%, 可溶性糖含量增加 366.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。因此, 在壳聚糖降解模型中, 添加部分有机氮源对提高降解效率和转化效率十分必要。

综上所述, 本文对氨基多糖的生物降解转化模型建立的基本条件进行了初步探讨, 确定了其形成的可行性, 为今后的进一步研究提供了实验依据。

致谢 北京师范大学 93 届毕业生王汉潜参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] Cody R M. Biomass, 1990, 21: 285 ~ 295.
- [2] 王士奎, 王汉潜. 微生物学通报, 1994, 21(3): 180 ~ 183.
- [3] 王士奎, 黄秀梨. 近代微生物学研究进展. 武汉: 武汉大学出版社, 1995, 261 ~ 271.
- [4] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 97 ~ 101.
- [5] Johnson A R. Analytical Biochemistry, 1971, 44: 628 ~ 635.
- [6] 杜声亮, 王士奎等. 河北省科学院学报, 1993. 1: 38 ~ 42.