

球孢白僵菌对壳聚糖降解作用的研究

王士奎 杜声亮 张友忠 王金环 杨永

(廊坊师范专科学校生物系, 廊坊市 102849)

摘要 在含有 1% 壳聚糖的培养基中, 接种球孢白僵菌 017 菌株, 25℃, 200r/min 振荡培养 3 天后, 壳聚糖发生剧烈的降解作用, 培养至第 7 天时, 培养基的增比粘度 ($\eta_{a.s}$) 由 7.07 下降至 0.76。粘度稀释法测定壳聚糖的粘均分子量 ($\bar{M}_v$) 由 3.5×10^5 下降至 8.8×10^4 , 剩余的可溶性氨基糖含量为 345 $\mu\text{g/ml}$ 。Sephadex G-200 凝胶层析证明, 壳聚糖被球孢白僵菌降解后存在着主要的均一组分。培养基中添加 KNO_3 、牛肉膏、N-乙酰氨基葡萄糖、果糖、乳糖, K^+ 和 Ca^{2+} 对壳聚糖的降解具有明显的促进作用, 而葡萄糖、蔗糖和麦芽糖具有显著的抑制效应。

关键词 球孢白僵菌; 壳聚糖; 降解作用

球孢白僵菌可以分泌大量的几丁质酶降解几丁质^[1-3], 在生物防治中得到了广泛的应用。利用微生物分泌的几丁质酶在环境保护、医药和基础生命科学研究中具有很大的潜在应用价值^[4]。壳聚糖是几丁质部分脱乙酰基的产物, 可作为细胞和酶的固定化载体, 部分降解后的产物具有对细胞分裂促进或抑制作用等生物活性^[5-7]。目前国内外对这一生物资源的开发和利用产生了浓厚的兴趣。本文报道通过研究球孢白僵菌降解壳聚糖的基本特性, 为开拓壳聚糖酶和壳聚糖的应用领域奠定基础, 以便于进一步开发球孢白僵菌的新用途。

材料与方 法

1. 菌种: 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 017, 由北京师范大学生物系黄秀梨副教授赠送。

2. 试剂: 壳聚糖 (河北省黄骅市渔业公司提供, 粘均分子量 ($\bar{M}_v$): 3.5×10^5 , 脱乙酰度 71.4%), N-乙酰氨基葡萄糖 (Sigma 产品), Sephadex G-200 (Sigma 产品), 其它试剂均为分析纯。

3. 培养基

(1) 菌体繁殖培养基: PDA 培养基。

(2) 壳聚糖培养液 (CIL): 1% 壳聚糖的 0.5% HCl 溶液中含有 KCl 、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 (均为 0.075%) 及 0.001% FeSO_4 , 用

1mol/L NaOH 调至 pH5.0, 1kg/cm² 灭菌 20 分钟。

4. 培养条件: 将 017 菌株接种于 PDA 培养基斜面上, 28℃ 培养 7—14 天。用 50ml 无菌生理盐水洗下孢子, 计数, 取 0.2ml 孢子悬液接种于盛有 40ml CIL 的 250ml 摇瓶中, 在 25℃, 200r/min 条件下振荡培养 7 天。

5. 测定方法

(1) 增比粘度 ($\eta_{a.s}$) 和相对粘度 (η_r): 将定量培养液煮沸灭活后, 过滤除去菌体和孢子, 按文献 8 提供的方法测定。

(2) 降解壳聚糖的分子量: 参照文献 9 提供的方法测定。

(3) 降解壳聚糖组分的测定: 参考 Alain Domard 提供的方法^[11,12] 改进后对降解的壳聚糖进行组分分离^[13]。

(4) 可溶性糖含量的测定: 参照 Johnson 提供的方法测定^[10]。

(5) 可溶性糖组分的测定^[14,15]。

(6) 壳聚糖酶活力: 参照 Pelletier 的方法^[14] 测定。1 个酶活力单位为: 37℃ 条件下每分钟水解壳聚糖释放 1 μmol D-氨基葡萄糖所需的酶量。

本研究承蒙北京师范大学生物系黄秀梨副教授指导, 特此致谢

(7) 生长状态的测定：直接计数法记录 017 菌孢子数量变化情况。

结果与讨论

1 白僵菌 017 菌株在 CIL 中的生长状态与 CIL 粘度变化的关系：以 1% 壳聚糖作为唯一的碳氮源培养 017 菌，分生孢子多数以双向出芽形成菌丝，整个培养期（7 天）内主要以片段形式存在，不形成大的网络结构，说明该菌在此培养条件下生长缓慢。在第 3—5 天，培养液的相对粘变 (η_r) 呈迅速下降趋势（图 1）， η_r 值由 0.88 下降至 0.34， $\eta_{a.s}$ 由 7.07 下降至 0.76。影响壳聚糖粘度变化的主要原因有壳聚糖分子断裂、pH 值和温度变化。实验证明，用浓度大于 1% 的壳聚糖时，自身缓冲能力很强，pH 值变化甚微，不致于导致粘度的明显变化（表 1）。在恒温培养时，粘度变化的主要原因可能是该菌分泌了大量的壳聚糖酶，将壳聚糖降解所致。酶活力测定也充分证实了这一结论。

表 1 不同壳聚糖浓度培养 017 菌时 CIL 的 pH 值变化*

壳聚糖浓度 (%)	pH 值 **	η_r
0.05	6.70	/
0.20	6.40	/
0.50	6.00	/
1.00	5.40	0.24
1.50	5.40	0.23
2.00	5.40	0.22

*CIL 起始 pH 为 5.0；** 培养 7 天后的 CILpH 值

要参数，在筛选壳聚糖酶高产菌株中可能成为简单而快速的检测方法。

2. 017 菌对壳聚糖降解产物的利用：017 菌可以利用壳聚糖作为唯一的碳氮源维持其生命代谢活动，但是，壳聚糖的降解产物并不是该菌良好的碳氮源。在培养基中存在过剩的可溶性糖时，菌体生长并未改善。纸层析证明在 CIL 中培养至第 5 天时，可溶性组分主要以大片段寡糖形式存在，而单糖、二糖含量甚微，只有通过邻苯二甲酸-苯胺显色剂显色后^[15]，在紫外检测器下观察荧光斑点时，才显示出微量的单糖和小片段寡糖成份。培养至第 7 天时，层析结果表明，在剩余的可溶性糖（含量 345 μ g/ml）中，除了存在单糖外，还有二糖、三糖、四糖和较大的寡糖成分（图 2），从而说明 017 菌在 CIL 中培养时，向环境分泌大量的胞外酶，具有内切、外切和糖苷酶活性，其酶学特征有待于进一步探讨。

3. 培养时间与壳聚糖分子量变化的关系：在 1% 壳聚糖溶液中培养 017 菌，分子量的变化和培养时间呈倒“S”型关系（图 3），培养至第 7 天时，分子量由 3.5×10^5 下降至 8.8×10^4 ，其中培养至第 4—5 天时，分子量下降迅速， $\overline{M}_{V4} = 2.7 \times 10^5$ ， $\overline{M}_{V5} = 1.22 \times 10^5$ 。因此通过控制培养时间，即可得到不同分子量的壳聚糖降解产物。这对开发壳聚糖的应用可能具有重要意义。

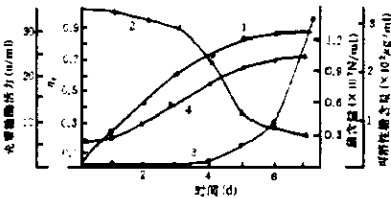


图 1 017 菌在 CIL 中生长及对壳聚糖降解作用曲线

1. 017 菌孢子数量 (10^7 /ml); 2. CIL 的 η_r 值;
3. 可溶性糖含量 (μ g/ml); 4. 壳聚糖酶活力 (u/ml)

由于 η_r , $\eta_{a.s}$ 和 017 菌在 CIL 中分泌壳聚糖酶产量的相关性，通过测定培养液的 η_r 和 $\eta_{a.s}$ 变化，可以作为微生物分泌壳聚糖酶性能的重

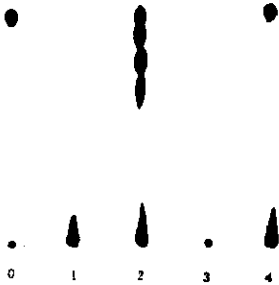


图 2 017 菌降解壳聚糖的可溶性组分的层析
0. NAG; 1. 发酵 5 天的样品; 2. 发酵 7 天的样品; 3. CIL; 4. 含 0.2%NAG 的 CIL 发酵 5 天的样品

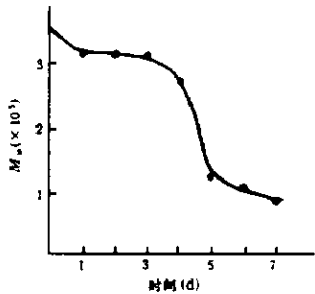


图 3 017 菌降解壳聚糖分子量变化与降解时间的关系曲线

4. 壳聚糖降解产物的组分分析: 标准壳聚糖用 SephadexG-200 凝胶层析证明, 壳聚糖主要成分是分子量为 3.5×10^5 的均一大分子 (a_1), 同时也证明有较小的组分 (a_2, a_3, a_4)。降解 7 天后的壳聚糖, 主峰是分子量为 8.8×10^4 左右的均一大分子 (b_1)(图 4)。

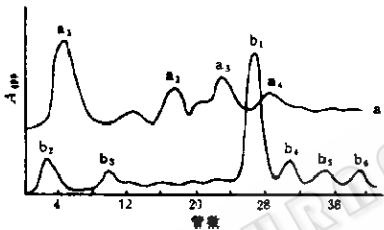


图 4 壳聚糖在 Sephadex G-200 凝胶层析曲线
a. 壳聚糖标准样品 ($M_v 3.5 \times 10^5$)
b. 降解 7 天后的壳聚糖样品 ($M_v 8.8 \times 10^4$)

5. 氮源对 017 菌降解壳聚糖作用的影响: 以壳聚糖作为唯一碳氮源培养球孢白僵菌, 不利于其生长和繁殖, 导致对降解作用产生不利的影响。选择了以 CIL 为基本培养基, 分别添加不同的有机和无机氮源, 培养至第 5 天时测定 CIL 的 η_r 和 $\eta_{a.s}$ 。结果表明, 添加无机氮源 (含氮量为 0.05%) 和有机氮源 (含氮量为 0.2%) 对壳聚糖的降解有不同程度的促进作用。其中 KNO_3 和牛肉膏的促进作用最为明显 (表 2)。

6. 不同碳源对 017 菌降解壳聚糖作用的影响: 添加 0.1% 的葡萄糖、蔗糖和麦芽糖时, 可抑制 017 菌对壳聚糖的降解作用, 与对照比较, 抑制作用大小顺序为蔗糖 > 葡萄糖 > 麦芽糖 > 半乳糖 > 木糖。NAG 和果糖对降解作用有显著的促进作用 (表 3)。

表 2 不同氮源对 017 菌降解壳聚糖作用的影响

试剂	η_r	$\eta_{a.s}$
KNO_3	0.25	0.88
$(NH_4)_2SO_4$	0.40	2.50
$NaNO_3$	0.27	1.04
NH_4Cl	0.28	1.14
NH_4AC	0.41	2.11
脲	0.42	2.19
蛋白胨	0.17	0.31
酵母膏	0.16	0.18
牛肉膏	0.14	0.10
对照 (1)*	0.52	0.96
对照 (2)**	1.00	6.55

*40mlCIL 中接入 017 菌; **40mlCIL 中未接入 017 菌

表 3 不同碳源对 017 菌降解壳聚糖作用的影响

试剂	η_r	$\eta_{a.s}$
葡萄糖	0.79	3.45
果糖	0.34	1.09
木糖	0.60	2.40
半乳糖	0.63	2.54
NAG(a)	0.32	0.78
NAG(b)	0.31	0.75
麦芽糖	0.76	3.33
蔗糖	0.84	3.73
乳糖	0.41	1.30
淀粉	0.49	1.78
对照 (1)	0.49	1.78
对照 (2)	1.00	4.66

a: NAG 0.04g b: NAG 0.08g

表 4 金属离子对 017 菌降解壳聚糖作用的影响

试剂	含量 (g/40ml)	η_r	$\eta_{a.s}$
$CaCl_2$	0.02	0.15	0.32
KCl	0.05	0.15	0.32
NaCl	0.02	0.16	0.44
$MgCl_2$	0.02	0.16	0.44
$ZnCl_2$	0.004	0.15	0.37
$FeCl_3$	0.004	0.16	0.40
对照 (1)	0.00	0.16	0.42
对照 (2)	0.00	1.00	7.84

7. 金属离子对 017 菌降解壳聚糖作用的影响: 在 0.1% 牛肉膏的 CIL 中添加不同的金属氯化物, 结果证实 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 对 017 菌降解壳聚糖有促进作用 (表 4)。

(下转第 133 页)

参 考 文 献

1. 黄秀梨, 荣倩等: 北京师范大学学报, 4: 71—80, 1987.
2. Rebecca J Smith and E A Grula: *Journal of Invertebrate Pathology*, 42:319—326, 1983.
3. 黄秀梨, 项伯衡: 北京师范大学学报, 2: 91—94, 1981.
4. Granham W Gooday: *Biodegradation*, 1:177—190, 1990.
5. Muzzarelli R A A: *Enzyme Microb. Technol.*, 2: 277, 1980.
6. Hirano S: *J. Biomed. Mater. Res.*, 1: 477, 1980.
7. Stanley W L et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 17: 315—326, 1975.
8. 张惟杰: 复合多糖生化研究技术, 上海科学技术出版社, 97—101, 1987.
9. George A F Roberts and Julian G Domszy: *Inter. J. Biol. Macromol.*, 4: 374—377, 1982.
10. Johnson A R: *Analytical Biochemistry*, 44: 628—635, 1971.
11. Alain Domard: *Polymer Communications*, 32 (4): 116—119, 1991.
12. Alain Domard: *Int. J. Biol. Macromol.*, 11: 297—302, 1989.
13. 王士奎等: 中国化学会第一届全国生物分析化学学术讨论会论文集, 江西宁岗, 219, 1992.
14. Pelletier A and J Sygusch: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (4):844—848, 1990.
15. 李梅等: 生物化学与生物物理学报, 56 (4): 285, 1991.

(1992-6-5 收稿)