

海洋真菌 LD8 岩藻多糖酶的固态发酵条件研究

吴茜茜¹, 蔡敬民¹, 吴克¹, 秦松²

(1. 合肥学院, 安徽 合肥 230022 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 对海洋真菌 LD8 岩藻多糖酶的固态发酵条件进行了研究, 主要内容包括氮源、诱导物、起始 pH、人工海水盐浓度及温度等。固态发酵最佳培养基组成: 麸皮 7.5 g, 葡萄糖 0.1 g, 海带粉 0.5 g, NaNO₃ 为 0.04 g, 最佳培养条件为培养温度 28 °C, 起始 pH 6.0。在 28 °C 培养 48 h, 酶活力可达 13.6 IU/g 干培养基, 比活力为 0.93 IU/mg 蛋白质。另外对岩藻多糖酶学性质进行了研究。

关键词: 岩藻多糖酶, 固态发酵, 酶学性质, 海洋真菌

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)06-0023-05

岩藻多糖广泛分布于褐藻中, 该多糖属于含硫多糖, 通常在 4-O 基发生硫酸化作用, 也可在其他位点上^[1]。岩藻多糖和低分子量岩藻多糖具有特殊的生理功能, 主要表现为具有抗病毒作用, 可以阻止 HIV 病毒寄主细胞侵入^[2,3], 具有抗肿瘤、消炎作用^[4], 在抗凝血和抗血栓方面具有肝素的功能^[5-8], 作为含硫多糖或低聚糖, 可以作为肝素类似物在临床上应用。此外, 低分子量岩藻多糖的生物学活性与相对分子质量大小有关, 相对分子质量在 8 000 ~ 100 000u 范围内有明显的生理作用; 还与含硫量及含硫基团位点有关, 硫酸化程度高其生理作用强。岩藻多糖可以通过海洋微生物产生的岩藻多糖酶水解产生低分子量的岩藻多糖, 还可以进一步经岩藻糖苷酶水解为岩藻糖。其含硫基团可以用硫酸酯酶水解作用而失去^[9]。目前低分子量岩藻糖聚合物主要是通过岩藻多糖化学水解方法来获得, 而利用酶法降解岩藻多糖生产低分子量的岩藻糖聚合物, 是生产该低聚糖的一条有效的途径, 目前作者已成功利用岩藻多糖酶水解作用生产低分子量的岩藻糖聚合物, 并申请了专利^[10]。岩藻多糖酶可以从鲍鱼肝胰腺^[11]中提取, 也可以由海洋微生物^[9,12,13]发酵生产。作者就海洋真菌 LD8 岩藻多糖酶固态发酵条件和部分酶学性质报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

菌种 LD8, LD25, LD35 均由本课题组分离得到。

1.2 培养基和培养条件

斜面培养基: PDA, 以人造海水配制。

基础培养基: 在 250 mL 三角瓶中加入 7.5 g 麸皮

和 7.5 mL 人造海水, 灭菌后备用并以此作为对照。

发酵培养基 I: 在 250 mL 三角瓶中加入 7.5 g 麸皮, 0.04 g 硝酸钠, 0.1 g 葡萄糖和 7 mL 人工海水 (pH 6.0) 灭菌后备用。

发酵培养基 II: 在 250 mL 三角瓶中加入 7.5 g 麸皮, 0.04 g 硝酸钠, 0.1 g 葡萄糖, 0.5 g 海带粉和 7 mL 人工海水 (pH 6.0) 灭菌后备用。

按 3% 接种量接种, 放置在 28 °C 的培养箱中恒温培养, 定时取样测定岩藻多糖酶的酶活力。

1.3 试剂

岩藻多糖, 岩藻糖和考马斯亮兰 G-250 均为 Sigma 公司产品, 其余试剂均为国产商品试剂, 分析纯。

1.4 酶液制备

将培养后的曲用 0.02 mol/L pH 6.0 柠檬酸-磷酸盐缓冲液浸提 1.5 h, 过滤, 收集酶液备用。

1.5 测定方法

1.5.1 岩藻多糖酶活力的测定^[11]

收稿日期: 2003-06-27, 修回日期: 2003-12-20

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金; 安徽省优秀青年科技基金资助 (04043051); 安徽省自然科学基金项目 (03043104), 中国科学院实验海洋生物学开放研究室研究报告第 305 号, 合肥学院科学研究发展基金

作者简介: 吴茜茜 (1974-), 女, 皖黟县人, 讲师, 硕士, 研究方向为酶工程、发酵工程, E-mail: hfuuwuqq@yahoo.com.cn; 蔡敬民, 通讯作者, 教授, 博士, E-mail: caijingmin@hfuu.edu.cn

在 1 mL 1.0% 岩藻多糖中加入 0.1 mL 酶液(以灭活酶液为对照),在 50 °C 水浴振荡器中反应 10 min,加入 3 mL DNS 试剂终止反应。摇匀,100 °C 水浴煮沸 10 min,在 721 型分光光度计,波长为 550 nm 处比色,测定还原糖量 [14]。

酶活力定义为:在本实验条件下,每分钟释放 1 μmol 还原糖所需酶量为一个酶活力单位(IU)。

1.5.2 蛋白质含量测定

按 Bradford 考马斯亮兰 G-250 比色法测定 [15]。

2 结果和分析

2.1 菌种的筛选

将供试的菌株分别接种于前述发酵培养基中,在 28 °C 下恒温培养,每天取样测定供试菌株的岩藻多糖酶活力,并以此作为菌种发酵能力强弱的判定依据。从图 1 可知在 48 h 时 LD8 菌分泌的岩藻多糖酶活力最高,因此确定以 LD8 菌株作为下面研究的对象。

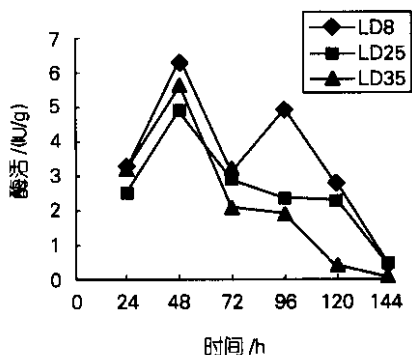


图 1 LD8、LD25、LD35 3 个菌株产岩藻多糖酶的时间曲线
Fig. 1 Time course of LD8, LD25, LD35 fucoidanase

2.2 海带粉对 LD8 产岩藻多糖酶的影响

在发酵培养基中添加海带粉,海带粉的添加量分别为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 g。实验结果(图 2)表明在培养基中添加 0.5 g 时,酶活力最高,与对照相比酶活力提高 57%,酶活力为 8.2 IU/g 干培养基。故最适海带粉添加量是 0.5 g。

2.3 不同海水浓度对 LD8 产岩藻多糖酶的影响

为了研究不同浓度的人工海水对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响,人工海水盐浓度分别设为 0, 0.74%, 1.48%, 2.12%, 2.95%, 3.69%, 4.43%, 5.16%, 5.90%。将 LD8 菌种分别接于含有不同浓度人造海水

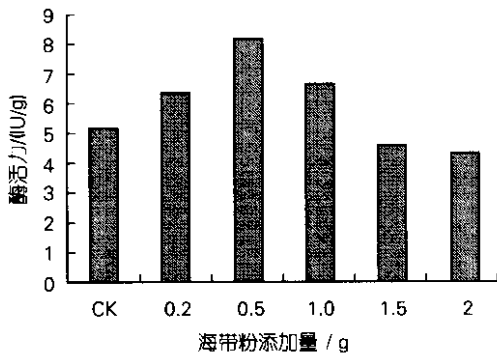


图 2 不同海带粉添加量对 LD8 菌株产岩藻多糖酶的影响

Fig. 2 Effects of kelp concentrations on LD8 fucoidanase

的发酵培养基 II 上,置于 28 °C 下恒温培养,实验结果见图 2。

从图 2 可知,随着人工海水浓度的增加,酶活力逐步上升,人工海水浓度为 4.43% 时最高,此时岩藻多糖酶活力为 9.5 IU/g 干培养基,而后随着人工海水浓度继续上升,岩藻多糖酶活力出现下降趋势。

2.4 氮源的选择

氮源在培养基中添加量根据各自含氮量相对于 0.5 g 酵母膏的全氮量折算而成。

以蛋白胨、硝酸钠、酵母膏、硫酸铵、硝酸铵、黄豆粉和尿素为氮源,实验结果(图 3)可以看出,LD8 菌株在发酵培养时,对不同氮源的利用能力不同。以岩藻多糖酶活力为指标时,该菌株最适合的氮源依次为:硫酸铵 > 蛋白胨 > 黄豆粉 > 尿素 > 酵母膏 > 硝酸钠 > 硝酸铵;当氮源为硫酸铵时,此时岩藻多糖酶活力为 13.4 IU/g 干培养基。

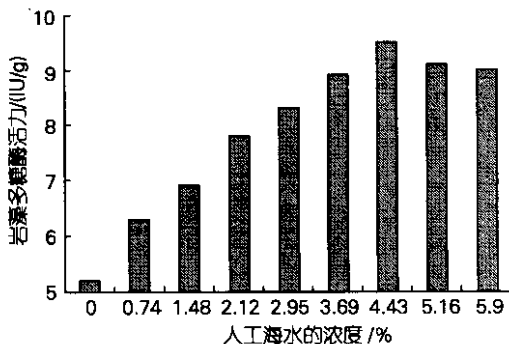


图 3 不同人工海水盐浓度对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响
Fig. 3 Effects of salt concentrations on LD8 fucoidanase

2.5 培养温度对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响

本实验共设置了 4 个温度梯度,分别为 18, 20, 25, 28, 32 °C。在不同温度下培养,测定该酶的酶活力,结果见表 1。由表 1 可知,在 28 °C 培养时,岩藻多糖酶活力最大,随着温度的上升,岩藻多糖酶活力

下降。因此,温度对酶的合成有明显的控制作用。温度低有利于岩藻多糖酶的分泌,但温度过低菌体生长缓慢,代谢慢,生长周期长;高温培养有利于菌丝体生长,但降低了酶的产酶量。

2.6 pH 对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响

表 1 不同的培养温度对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响

Tab.1 Effects of temperature on fucoidanase production

培养温度(°C)	18	20	25	28	32
岩藻多糖酶活力(IU/g)	10.18	10.72	12.73	13.4	10.99

环境的 pH 可影响微生物的生长、生理过程和生化代谢过程中基质的利用和代谢产物的释放,不同的培养基起始 pH 对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响结果

见表 2,当起始 pH 为 6 时,岩藻多糖酶活力最高达到 13.4 IU/g,起始 pH5~7 之间均有利于 LD8 菌的岩藻多糖酶生产。

表 2 pH 培养基起始对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响

Tab.2 Effects of initial pH on fucoidanase production

pH	4	5	6	7	8	9
岩藻多糖酶活力(IU/g)	6.16	11.88	13.40	12.87	9.51	8.10

2.7 LD8 菌产岩藻多糖酶时间曲线

由图 4 可知,在固态发酵过程中,LD8 菌生长情况为:36 h 已有菌丝产生,达到 48 h 后培养基中充满菌丝。伴随着菌丝生长过程,LD8 菌岩藻多糖酶活力先开始上升,于 48 h 达到最大,酶活力为 13.6 IU/g 干培养基,此时水抽提液中岩藻多糖酶的比活力为 0.93 IU/mg 蛋白质,此后酶活力下降。

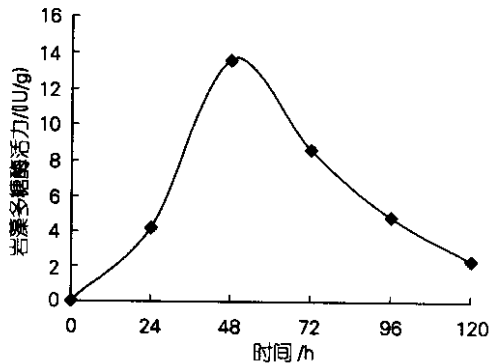


图 5 LD8 岩藻多糖酶的产酶曲线

Fig.5 Time course of LD8 fucoidanase

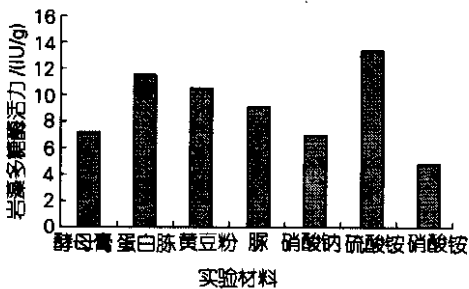


图 4 不同的氮源对 LD8 菌产岩藻多糖酶的影响

Fig.4 Effects of nitrogen sources on LD8 fucoidanase

2.8 酶学性质

2.8.1 反应温度对酶活力的影响

反应温度分别设置为 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70

°C,在不同温度条件下测定岩藻多糖酶活力,结果如图 6A 所示,最适反应温度为 50 °C。

图 6B 表示的酶热稳定性,将酶液分别置于 30~80 °C 保温 1 h 后,立即冰浴,然后测定剩余岩藻多糖酶活力,并将活力对温度作图,以剩余活力为 50% 时的温度作为半失活温度。

2.8.2 反应 pH 对酶活力的影响

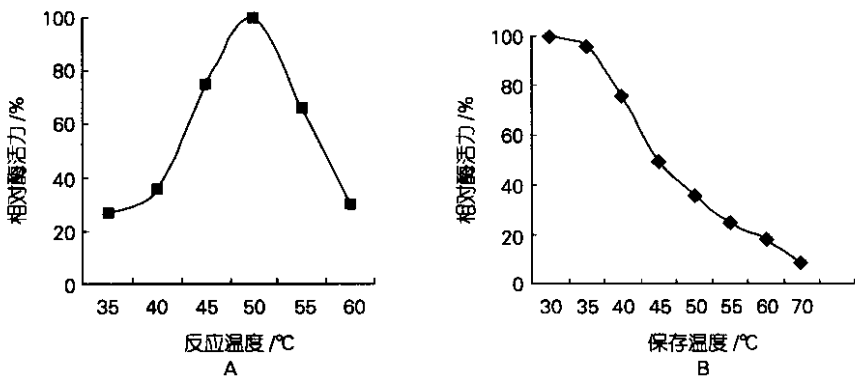


图 6 温度对岩藻多糖酶活力的影响
Fig.6 Effect of temperature on activity of fucoidanase

分别配置了不同 pH 值的 0.02 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液组成的 1% 的岩藻多糖液, 在 50 °C 下测定不同 pH 值对岩藻多糖粗酶活力的影响。从图 7 可以看到岩藻多糖粗酶在弱酸 (pH 值 6.5) 时酶活力最高。

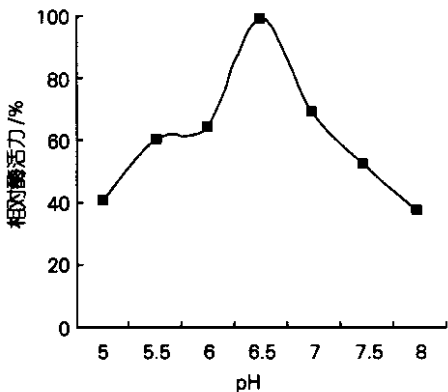


图 7 pH 对岩藻多糖酶活力的影响
Fig.7 Effect of pH on activity of fucoidanase

3 讨论

目前获得岩藻多糖酶的途径主要有 2 种: 一是来源于从取食褐藻的贝类、鲍鱼的肝胰腺, 如 *Haliotis speciest* 和 *Patinopecten yessoensis* 的肝胰腺; 二是来源于海洋微生物, 如 *Vibrio* sp. N-5, *Fusarium oxysporum* 等。本研究中的 LD8 是从德国 Jade 海滩分离得到, 在用海水配制的 PDA 培养基中菌丝呈白色, 并分泌紫红色的色素, 经鉴定为镰刀菌属。

海带中含有岩藻多糖, 作者通过添加海带粉发现能促进 LD8 分泌岩藻多糖酶, 这说明岩藻多糖酶是诱导酶, 可以在含有岩藻多糖的培养基中形成。 *Vibrio* sp. N-5 和 *Fusarium oxysporum* 分泌的都是胞内酶, LD8 分泌的是胞外酶, 无论是胞内还是胞外, 均可以通过添加诱导物来提高酶量。海水盐浓度对岩藻多糖酶的形成也有影响, 当盐浓度为 0~4.43% 时, 随着海水浓度的提高对 LD8 岩藻多糖酶分泌有一定的促进作用, 当盐浓度大于 4.43% 时, 表现出对 LD8 产岩藻多糖酶的抑制作用, 这种抑制作用随盐浓度的上升而增强, 主要原因可能是高浓度的海水对 LD8 菌株生长和代谢有影响。另外培养温度对该菌的岩藻多糖酶也有一定的影响。

与 *Vibrio* sp. N-5 产的岩藻多糖酶酶学性质相比, LD8 岩藻多糖酶具有较高的最适反应温度 (50 °C) 和 pH (6.5), 半失活温度为 45 °C。

岩藻低聚糖具有较好的生理活性, 因此可以利用岩藻多糖酶降解获得。无论是利用胞内还是胞外的岩藻多糖酶来降解, 均可以将分子量大的岩藻多糖降解成小分子量的岩藻低聚糖。不同来源的微生物, 其分泌的岩藻多糖酶降解岩藻多糖能力不同, 可以获得不同相对分子质量的片段。通过筛选不同的来源的微生物, 可以获得不同降解能力的岩藻多糖酶, 这对将来生产可用于临床的岩藻低聚糖有一定的作用。

参考文献:

[1] Kloareg B, Quatrano R. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides [J]. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 1980, 26: 259-315.
[2] Baba M, Snoeck R, Pauwels R, et al. Sulfated polysac-

- chardes are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus [J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 1988, 1: 742 – 1 745.
- [3] Lynch G, Low L, Li S, *et al.* Sulfated polyanions prevent HIV infection of lymphocytes by disruption of the CD4 – gp120 interaction, but do not inhibit monocyte infection [J]. **J Leukoc Biol**, 1994, 56(3) :266 – 272.
- [4] Ellouali M, Boisson – Vidal C, Durand P, *et al.* Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J]. **Anticancer Res**, 1993, 13: 2 011 – 2 020.
- [5] Alain N, Frederic C, Catherine B V. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J]. **Carbohydrate Research**, 1991, 289: 201 – 208.
- [6] Chevolut L, Foucault A, Chaubet F, *et al.* Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity [J]. **Carbohydr Res**, 1999, 319: 154 – 165.
- [7] Millet J, Jouault SC, Mauray S, *et al.* Antithrombotic and anticoagulant activities of a low molecular weight fucoidan by the subcutaneous route [J]. **Thromb Haemost**, 1999, 8(3) :391 – 395.
- [8] Mauray S, de Raucourt E. Mechanism of factor IXa inhibition by antithrombin in the presence of unfractionated and low molecular weight heparins and fucoidan [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1998, 1387: 184 – 194.
- [9] Furukawa S, Fujikawa T, Koga D, *et al.* Production of fucoidan – degrading enzymes, fucoidanase, and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N – 5 [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1992, 58(8) :1 499 – 1 503.
- [10] 蔡敬民, 秦松, 吴克, 等. 微生物酶法制备低分子量岩藻多糖工艺 [P]. 中国发明专利, 2003, 申请号: 03112609. X.
- [11] Fujikawa F, Koyabu K, Wada M. Enzymes in hepatopancreas of abalone active on fucoidan(1), crude enzyme and unabsorbed fraction on CM – cellulose [J]. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, 1979, 53: 87 – 95.
- [12] 吴克, 刘斌, 吴茜茜, 等. 海洋真菌 *Dendryphiella arenaria* TM94 产岩藻多糖酶发酵及酶学性质 [J]. 生物学杂志, 2003, 20(4) :14 – 16.
- [13] 吴茜茜, 吴克, 蔡敬民, 等. 海洋真菌岩藻多糖酶的固态发酵条件研究 [J]. 菌物系统, 2003, 22(3) :441 – 444.
- [14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars [J]. **Anal Chem**, 1959, 31(3) :426 – 428.
- [15] Bradford M M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding [J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248 – 254.

Solid state fermentation of fucoidanase of marine fungus LD8

WU Qian – qian¹, CAI Jing – min¹, Wu Ke¹, QIN Song²

(1. Institute of Biotechnology, Hefei Union University, Hefei 230022, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Jan., 27, 2003

Key words: fucoidanase; solid state fermentation; properties; marine fungi

Abstract: Solid state fermentation conditions of LD8 fucoidanase were studied. The optimal medium contained wheat bran 7.5 g, glucose 0.1 g, kelp 0.5 g and NaNO₃ 0.04 g. The optimal initial pH and temperature were 6.0 and 28 °C respectively. Under the above conditions, fucoidanase activity reached 13.6 IU/g dry medium after 48 h, and its specific activity was as high as 0.93 IU/mg. The fucoidanase properties of LD8 were also investigated.

(本文编辑: 刘珊珊)