

文章编号: 1000-5013(2010)02-0192-04

海洋烟曲霉菌代谢活性物质的萃取

陈培钦, 黄惠莉, 李丽辉

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 以海洋烟曲霉菌为出发菌, 在适宜的发酵条件下进行培养, 提取代谢产物并检测其对白色念珠菌抑菌性. 分别以硫酸铵、石油醚、乙酸乙酯为萃取剂, 研究硫酸铵质量分数和有机溶剂的 pH 值对海洋烟曲霉菌代谢活性物质萃取效果的影响. 结果表明, 粗酶液的适宜萃取条件: 萃取剂为石油醚, pH 值为 6, 粗酶液与有机溶剂的体积比为 1: 1. 采用质量分数为 70% 的硫酸铵沉淀, 萃取活性物质的酶活性最大为 $16.0 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比原粗酶液的酶活($7.9 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$) 提高 1 倍; 而采用石油醚为萃取剂, 所萃取活性物质的酶活性最大为 $20.5 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比原粗酶液的酶活提高 2.58 倍, 且抑菌性能最好, 抑菌率达 60% 左右.

关键词: 烟曲霉菌; 脱乙酰酶; 活性物质; 萃取; 抑菌性

中图分类号: Q 949.327.1

文献标识码: A

据估计, 海洋真菌至少有 1 500 种^[1], 但被描述过的种属为数极少, 以青霉菌和曲霉菌居多. 目前, 在海洋曲霉菌中发现了许多重要的代谢产物, 如新的神经营养聚合物、酶及其抑制剂, 以及抗肿瘤和抗菌的活性物质^[2-5] 等. 近年来, 中国科学院海洋研究所和山东大学微生物技术国家重点实验室开展对海洋真菌^[6-11] 的研究, 主要是对海洋真菌的分离、培养, 以及对其代谢产物的筛选等, 并已从深海海底沉积物样品中分离出若干株海洋真菌. 通过对菌株的生长特性与低温水解酶学性质等的研究, 从其代谢产物中分离到若干新颖的、有价值的抗生素与生物活性物质. 深入开展对海洋真菌的研究, 了解海洋真菌的多样性, 无论从基础理论研究本身, 或从应用前景考虑, 都具有重要意义. 本文以海洋烟曲霉菌^[12] 为出发菌, 以适宜的发酵条件进行培养, 对其代谢产物进行提取, 并检测代谢产物对白色念珠菌抑菌性, 以期获得新的抗菌活性物质.

1 材料与方法

1.1 实验菌株

海洋烟曲霉菌, 从福建崇武海域的生物共生及附生微生物中筛选出, 并经纯化分离.

1.2 培养基

1.2.1 查氏(斜面)培养基 2 g NaNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g KCl , 0.5 g MgSO_4 , 0.01 g FeSO_4 , 30 g 蔗糖, 15~20 g 琼脂, 1 L 海水, pH 值自然.

1.2.2 发酵培养基 (1) 种子培养基: 200 g 马铃薯, 5 g 蛋白胨, 1 g 酵母浸出液, 5 g 葡萄糖, 1 L 海水, pH=3.6; (2) 发酵培养基: 200 g 马铃薯, 5 g 硫酸铵, 1 g 酵母浸出液, 5 g 蔗糖, 1 L 海水, pH=3.6.

1.3 测定方法

1.3.1 粗酶液制备 将菌种接入种子培养基, 于 30 °C 培养 2 d 后, 转接于发酵培养基, 并于 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的旋转式摇床 30 °C 培养 5 d. 然后, 于 4 °C, 转速 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的冷冻离心机中离心 15 min, 取上清液即为粗酶液, 在冰箱(4 °C)中保存.

1.3.2 部分乙酰化壳聚糖底物的制备 准确称量 1.00 g 自制的部分乙酰化壳聚糖(脱乙酰度约

收稿日期: 2008-06-12

通信作者: 黄惠莉(1962-), 女, 教授, 主要从事生物活性物质分离与提纯的研究. E-mail: hlhuang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2007T0010); 福建省自然科学基金资助项目(E0640003)

49%), 悬浮于 40 mL 的蒸馏水中, 加入 9 mL, $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的冰醋酸, 充分搅拌 12 h. 然后, 添加 $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸钠溶液, 调节 pH 值至 6.0 最后, 用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸缓冲溶液定容至 100 mL, 置具塞试剂瓶中于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存.

1.3.3 酶活性的测定 测定方法跟据文[7]的方法并进行适当改进. 取 1 mL 粗酶液, 加入 1 mL 质量体积比为 0.5% 的部分乙酰化壳聚糖底物溶液, 于 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min. 然后, 置于沸水浴中加热 5 min 以终止反应. 同时, 取 1 mL 经沸水浴加热 5 min 灭活的粗酶液作为酶液的对照. 反应后, 于离心机 ($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 10 min. 取上清液, 用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定其光密度值 $D(520)$, 并计算相对应的酶活力 z . 即

$$z = \frac{D(520) \times 1000 \times A}{D \times 198.17 \times V \times t} \times n \quad (1)$$

式(1)中: $D(520)$ 为样品在 520 nm 处的光密度值; D 为 1 mg 葡萄糖的光密度值(即标准曲线的斜率); V 为参加反应的酶液用量; n 为稀释倍数; t 为酶促反应时间. 测定时取反应液的体积为 1 mL, 这仅为酶反应系统中 A^{-1} 体积, 故应乘以 A .

1.4 提纯方法

(1) 硫酸铵沉淀法. 取 20 mL 的发酵液于三角瓶中, 以此体积为基准计算不同质量分数硫酸铵的加入量. 硫酸铵的质量分数(w)以 10% 为递进, 范围为 20%~100%. 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 加入硫酸铵后持续搅拌 15~20 min, 再置于离心机 ($8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 15 min. 以沉淀最多所对应的硫酸铵质量分数为中心, 并以 5% 的间隔, 同上步骤进行操作. 然后, 分离沉淀相和非沉淀相, 分别测其酶活, 并确定最佳硫酸铵质量分数.

(2) 有机溶剂萃取法. 将等体积(20 mL)的有机溶剂加入不同 pH 值的粗酶液中, 混匀, 转入分液漏斗中. 静置过夜后, 分离有机相和非有机相, 分别测其酶活. 将分液后得到的液体烘干至恒重, 分别测其萃取得到的活性物质的质量.

1.5 抑菌实验

将一定稀释度 (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) 的白色念珠菌与稀释一定倍数的提取物质按体积比为 1:1 的比例混合, 并以相应稀释度的白色念珠菌和相应稀释度的灭活提取物的混合液做空白对照. 于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 采用浊度仪检测其培养后混合液的浊度, 计算抑菌率(η). 即

$$\eta = \frac{D_{\text{con}} - D_{\text{exp}}}{D_{\text{con}}} \times 100\% \quad (2)$$

其中: D_{exp} , D_{con} 分别为实验组与对照组的光密度值; 抑菌率(η)反映了提取活性物质的抑菌效果.

2 结果与讨论

2.1 活性物质的提取

2.1.1 硫酸铵沉淀法 硫酸铵沉淀法可用于从大量粗制剂中浓缩和部分纯化蛋白质. 高浓度的盐离子在蛋白质溶液中可与蛋白质竞争水分子, 它们在溶解于水的同时, 从蛋白质分子周围的水化层中夺走水分子, 破坏蛋白质分子的水膜, 降低其溶解度, 因而会发生沉淀作用. 硫酸铵沉淀酶对其活性损伤小, 沉淀可长时间保存. 各种蛋白结构的不同, 硫酸铵与其作用的起始沉淀质量分数和完全沉淀后的质量分数也各不相同, 从而可对粗提液中的酶进行预提纯, 除去大部分杂蛋白.

硫酸铵沉淀法实验结果表明, 硫酸铵的质量分数在 40% 以内, 均没有沉淀产生; 当硫酸铵的质量分数为 70% 时, 所产生的沉淀最多; 其他硫酸铵的质量分数产生的沉淀量大小顺序: $70\% > 60\% > 80\% > 90\% > 100\% > 50\%$.

以硫酸铵的质量分数为 70% 为中心, 而以 60%, 65%, 70%, 75% 的硫酸铵提取活性物质, 考察硫酸铵的质量分数与酶活的关系, 结果如图 1 所示.

从图 1 中可看出, 沉淀相的酶活大于非沉淀相(上清液)的酶活. 当硫酸铵的质量分数为 70% 时, 萃取物的活性物质的酶活最大为 $16.0 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比原粗酶液的酶活 ($7.9 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)^[12] 提高 1 倍.

2.1.2 有机溶剂法 分别选用有机溶剂石油醚、乙酸乙酯作为萃取剂, 对粗酶液进行提取, 考察 pH 值

与活性物质酶活和质量浓度(ρ)的关系,结果如图2,3所示.

从图2,3可知,以石油醚为萃取剂进行海洋真菌活性物质萃取,当粗酶液的pH值为6时,萃取后的活性物质在有机相中的酶活最高达到 $7.9 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$,比原粗酶液的酶活($20.5 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)提高2.58倍;而采用乙酸乙酯进行萃取,其活性物质的酶活无论在水相或有机相中均较低.这说明乙酸乙酯在萃取中对该酶的活性有一定的抑制作用,不适用于该菌代谢活性物质的提取与分离.

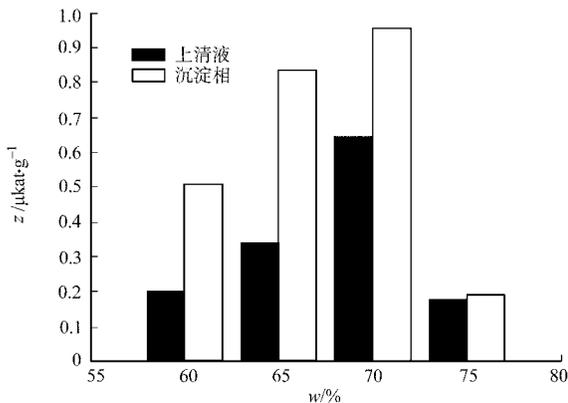


图1 硫酸铵质量分数与酶活的关系

Fig.1 Relation between enzyme active with the concentration of ammonium sulfate

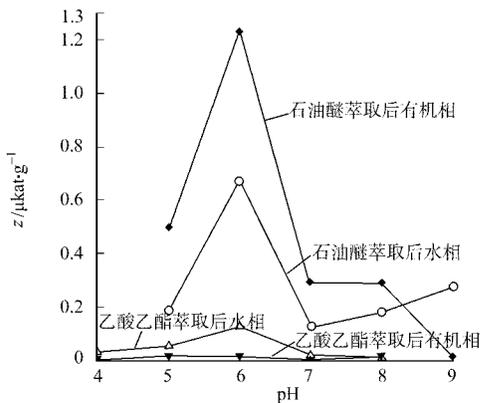


图2 pH值与活性物质酶活的关系

Fig.2 Relation between substance active with pH value

2.2 活性物质的抑菌性

实验考察海洋烟曲霉菌代谢活性物质对白色念珠菌的抑菌性,结果如图4所示.从图4中可以看出,石油醚、乙酸乙酯及硫酸铵所提取出来的海洋真菌活性物质对白色念珠菌均有抑菌性,其中石油醚萃取物的抑菌性最高,其次是乙酸乙酯的萃取物,硫酸铵沉淀物的抑菌性最低.

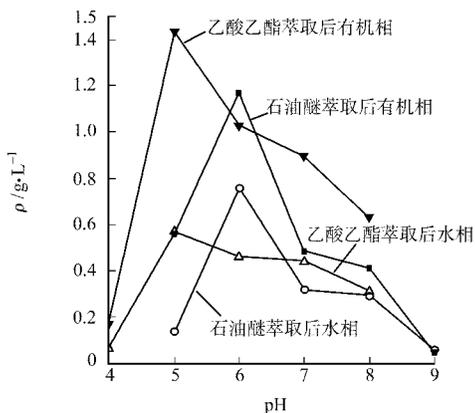


图3 pH值与活性物质质量浓度的关系

Fig.3 Relation between substance quality with pH

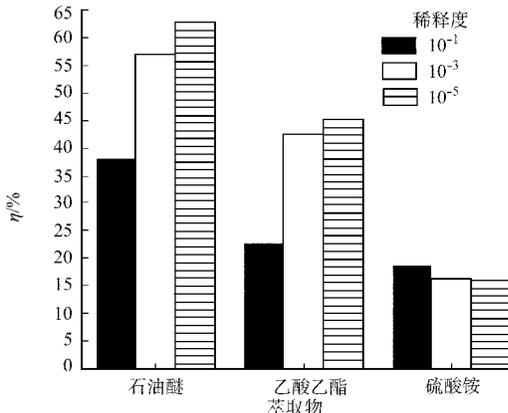


图4 各萃取物对白色念珠菌的抑菌性

Fig.4 Extraction Inhibiting to *Candida albicans*

海洋烟曲霉菌的代谢活性物质对白色念珠菌具有一定的抑菌作用.主要是因为真菌的细胞壁含有甲壳素(几丁质),活性物质是脱乙酰酶.在适宜条件下,脱乙酰酶对真菌白色念珠菌细胞壁内的甲壳素具有一定脱乙酰作用,从而抑制细胞的生长,起到抑菌的作用,其抑菌率达60%左右.

3 结论

从图2酶活实验结果来看,以乙酸乙酯萃取物质的酶活较低,但萃取物的质量较大(图3).图4的抑菌性实验表明,乙酸乙酯萃取的活性物质酶活很低,但对白色念珠菌具有一定的抑菌性,该抑菌作用主要不是由于脱乙酰酶的作用.这说明,该海洋烟曲霉菌的代谢活性物质中,不仅有脱乙酰酶能对白色念珠菌起到抑制作用,而且还存在着另外的活性物质对白色念珠菌具有抑制作用.

海洋烟曲霉菌的代谢活性物质的提取实验表明,在硫酸铵沉淀,石油醚、乙酸乙酯作为萃取剂的提取实验中,以石油醚为萃取剂的萃取活性物质,其酶活性最大且具有一定抑菌性能.海洋烟曲霉菌的代

谢活性物质的分离纯化及其组成结构, 有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 224-225.
- [2] SACHIKO T, HIROSHI H, MISAKO I. Himeic acid A: A new ubiquitous activating enzyme inhibitor isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(1): 191-194.
- [3] SACHIKO T, SHUNSUKE M, YUKO Y, et al. *Aspermytin A*: A new neurotrophic polyketide isolated from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, 14(2): 417-420.
- [4] FROLOVA G M, SILCHEKO A S, PIVKIN M V, et al. Amylases of the fungus *Aspergillus flavipes* associated with *Fucus evanescens*[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2002, 38(2): 134-138.
- [5] AFIYATULLOV S S, KALINOVSKII A I, PIVKIN M V, et al. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2004, 40(6): 615-617.
- [6] 任文彬, 蒋桂芳, 张世清, 等. 发酵条件对拟青霉 E7 菌株产脱乙酰几丁质酶的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(3): 812-816.
- [7] 蒋霞云, 周培根, 李燕, 等. 几种霉菌产甲壳素脱乙酰酶活力比较及部分酶学性质[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 211-215.
- [8] 蔡俊, 杜予民, 杨建红, 等. 甲壳素脱乙酰酶产生菌的筛选及产酶条件[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51(4): 485-488.
- [9] 周桂, 何子平, 裨金彩. 烟曲霉产壳聚糖酶液体发酵条件研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(2): 34-37.
- [10] 逢玉娟, 韩宝芹, 刘万顺, 等. 高产壳聚糖酶菌株的筛选和发酵产酶条件研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(2): 287-292.
- [11] 蔡婀娜, 黄惠莉. 一株(海洋) 头孢菌的培养条件及抑菌活性实验[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(4): 567-570.
- [12] 黄惠莉, 欧阳明安, 刘金金. 海洋烟曲霉菌产脱乙酰酶发酵条件优化[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(3): 324-328.

Marine *Aspergillus fumigatus* Metabolic Active Substance Extraction Method

CHEN Pei-qin, HUANG Hui-li, LI Li-hui

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Marine *Aspergillus fumigatus* were cultured under a condition suitable for fermentation, and metabolic active substances were then extracted to test their inhibiting to *Candida albicans*. Using ammonium sulfate, petroleum ether, ethyl acetate as extractant respectively, the influence to extraction active substance of marine *Aspergillus fumigatus* with organic solvent and different pH were studied, and extraction condition were investigated. The experimental results indicate that the suitable condition of crude enzyme was petroleum ether as extractant, pH = 6, the volume rate of crude fermented liquors with organic solvent is 1: 1. The enzyme active of extracting substance is about 16.0 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ when using 70% ammonium sulfate extractant, one times higher than the activity of crude fermented liquors (about 7.9 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$). While, the enzyme active of extracting substance is about 20.5 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ when using petroleum ether extractant, it increase 2.58 times to the activity of crude fermented liquors and having the best inhibiting, the inhibiting is about 60% to *Candida albicans*.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; deacetylase; active substance; extraction; inhibiting

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 陈国华)