

海洋红酵母多糖提取及其对日本蟬血清中部分免疫活性因子的影响

王洪斌^{1,2} 李士虎¹ 阎斌伦^{2*} 焦豫良¹ 王艳敏¹

(1. 淮海工学院海洋学院 江苏 连云港 222005)

(2. 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222005)

摘要: 以海洋红酵母为材料, 通过化学抽提法得到多糖, 用经典的 Sevag 法进行脱蛋白处理, 经多级沉淀得到纯糖并采用硫酸-蒽酮法测得其中葡萄糖含量; 考马斯亮蓝法分析蛋白质含量。以定量海洋红酵母多糖人工注射日本蟬, 注射等量生理盐水为对照, 定时测定其血清中部分免疫活性因子的活性; 实验表明: 提取多糖为蛋白多糖, 其中葡萄糖含量为 3.6%, 蛋白质含量 1.9%, 含有多种氨基酸, 其中天冬氨酸含量最多; 注射后 12 h 日本蟬血清中总超氧化物歧化酶(T-SOD) 活力达到最高, 酸性磷酸酶(ACP) 活力在注射后 24 h 达到最高, 碱性磷酸酶(AKP) 48 h 达到最高, 过氧化氢酶(CAT) 48 h 达到最高, 溶菌酶(LZM) 12 h 即达到最高, 最高点分别高于对照组 24%、43%、25%、35%、95%; 72 h 后都恢复至对照组水平。结论: 海洋红酵母多糖注射 48 h 内日本蟬体内免疫活性因子均有不同程度的提高, 对日本蟬有较强免疫刺激作用。

关键词: 红酵母, 日本蟬, 多糖提取, 免疫活性

Extraction of polysaccharide of oceanic red yeast and the study of it's influence upon immunological activite enzymes of *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards)

WANG Hong-Bin^{1,2} LI Shi-Hu¹ YAN Bin-Lun^{2*} JIAO Yu-Liang¹
WANG Yan-Min¹

(1. College of Marine Sciences, HuaiHai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract: The polysaccharide from oceanic red yeast were purified using chemical extraction method. The classical Sevag mothed was carried out in order to deprotein and the pure sugar was obtained

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大项目(No. 2006BAD09A01); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放基金项目(No. 2007HS016)

* 通讯作者: Tel: 86-518-85895251; ✉ yanbinlun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-08-20; 接受日期: 2010-10-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

through multi stage precipitation. The content of glucose was determined by sulfuric acid anthrone method, and the content of protein was analysis by coomassie brilliant blue staining. After artificial infection by the quantitative polysaccharide of oceanic red yeast, the activities of the immunological activate enzymes in the serum of the *Charybdis japonica* were measured periodically. Meanwhile, infection by the equivalent normal saline was served as control. Experiment show: The purified polysaccharide was proteoglycan. Including 3.6% of glucose and 1.9% of protein. It also contained many kinds of amino acids and the content of aspartate was the highest. After artificial infection, Total SOD (T-SOD) in the serum of the *Charybdis japonica* had maximum enzyme activity in 12 hours and acid phosphatases (ACP) in 24 hours, alkaline phosphatase (AKP) in 48 hours, catalase (CAT) in 48 hours, lysozyme (LZM) in 12 hours. The highest point was higher than those in the control group (24%, 43%, 25%, 35%, 95%). And the enzyme activities recovered to the corresponding control levels. Conclusion: The activities of the immunity active factors in the serum of the *Charybdis japonica* have different degrees of the enhancement in 48 hours after infected with the polysaccharide of oceanic red yeast. The polysaccharide has stronger immune stimulation.

Keywords: Red yeast, Purification of polysaccharide, *Charybdis Japonica* (A. Milne-Edwards), Immune activity

酵母多糖是酵母细胞壁的重要组成部分^[1], 其主要成分为大分子的甘露聚糖及糖蛋白复合物^[2-4], 这些大分子含有 100-300 甘露糖分子。酵母多糖占酵母细胞壁干重的 40%^[5-6]。李臣等研究表明酵母甘露聚糖主要由 α -D-甘露糖组成, 分子量为 220 kD^[7]。目前人们对酵母多糖认识和功能研究已取得了较大的进展, 研究发现酵母多糖具有免疫活性和抑制肿瘤生长等作用^[7-8]。最近, 国内一些报道也证明, 酵母多糖对断奶仔猪具有抗病效果^[9], 对大肠杆菌攻毒条件下的仔鸡的小肠粘膜也具有保护作用^[10]。另外, 对小鼠和仔鸡的免疫功能也有一定促进作用^[11-12]。

研究和提高日本蠅的自身抗病能力对防治日本蠅的病害具有重要意义。有文献表明口服免疫药物对甲壳动物血清中一些免疫相关酶类的影响, 证明某些与免疫相关的酶类可以因免疫药物的影响而使活性增加^[13]; 通过中药制剂也可调节甲壳动物血清的免疫活性, 表现在溶菌活力和凝集活力的提高^[14]。目前, 国内在贝类感染菌体方面已有所研究, 但有关酵母多糖感染日本蠅对免疫活性因子的影响还未见报道。本文选用日本蠅为实验材料, 在注射海洋红酵母多糖后, 测定了其血清中部分免疫活性因子变化, 探讨多糖与日本蠅免疫系统间的相互作

用关系, 以期为本蠅病害的免疫防治提供科学依据, 从而提高水产动物机体免疫力, 减少病害发生的频率及强度, 为绿色水产品生产及无公害健康养殖提供保障。

1 材料与方法

1.1 样品

健康日本蠅于 2009 年 10 月取自连云港市赣榆东方水产养殖公司, 个体规格均匀(150 g 左右), 暂养于玻璃水族箱(0.6 m×0.4 m×0.3 m) 中, 室温 24 h 通气, 每日换水 1 次。

1.2 菌株

海洋红酵母, 淮海工学院海洋学院实验室保存。

1.3 多糖提取纯化及成分分析

海洋红酵母菌种接种到 500 mL 三角瓶(PDA 培养基 50 mL)中, 28 °C、200 r/min 下摇床振荡培养 36 h 制备种子液, 将种子液按 10%接种量接种到 5 L 全自动发酵罐(Biostat 5, B. Braun, Germany, 工作体积为 3 L)中于 28 °C、搅拌速度 200 r/min、通气量为 0.36 vvm 下进行培养 80 h。酵母多糖提取流程^[15]: 冻融 3 次-超声破壁-离心-上清液浓缩-醇沉-干燥-稀释后测含量。Sevag 法除蛋白, 纯化多糖。采用硫酸-蒽酮法测得其中葡萄糖含量; 考马斯亮蓝法

分析蛋白质含量。用生理盐水配制浓度为 2.0% 的免疫多糖溶液, 灭菌后备用。

1.4 人工注射感染

选择健康、规格均匀的日本鳎, 设实验组和对照组。实验组 10 只, 每只日本鳎用无菌微量注射器从腹腔注入 200 μL 酵母多糖溶液, 对照组 10 只按同样方法注射等量生理盐水。

1.5 取样

注射后每只日本鳎在 5、12、24、48、72 h 分别用无菌兰芯注射器从第三步足基部采血 500 μL , 置于 1.5 mL 无菌 Eppendorf 离心管中(加 EDTA 抗凝剂 300 μL), 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 24 h, 将血浆以 5 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 去沉淀, 上层血清保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.6 免疫指标的测定

AKP、ACP、SOD 和 CAT 的活性测定均采用江苏省南京建成生物研究所生产的试剂盒及其测定方法。

1.6.1 SOD 活性: 采用黄嘌呤氧化酶法测定, SOD 活性定义: 每毫升反应液中抑制率达 50.0% 时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位(U)。

1.6.2 ACP 和 AKP 活性的测定: 采用磷酸苯二钠法, 酶活力的计算采用金氏单位(每 100 mL 待测样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 与基质液作用 15 min, 产生 1 mg 酚者为 1 个金氏单位)。

1.6.3 CAT 活性: CAT 分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速终止, 剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的化合物, 于波长 405 nm 处测定其生成量, 计算其活力。

2 结果与分析

2.1 多糖提取纯化及成分分析结果

从海洋红酵母中提取的免疫多糖(酵母细胞壁)含有葡萄糖 3.6%, 蛋白质 1.9%, 为蛋白多糖, 含有多种氨基酸, 其中天冬氨酸含量最多。

2.2 注射酵母多糖后日本鳎外观症状

实验日本鳎在注射酵母多糖后 72 h 内, 外观上看不出任何变化, 行走有力、运动正常, 对外界的刺激反应敏感, 在整个实验周期内, 对照组的日本鳎

外观、活力均正常, 120 h 后死亡一只。

2.3 血清中免疫活性酶活性检测

2.3.1 SOD 活性测定: 用酵母多糖溶液注射日本鳎后, 其血清中的 SOD 自 5 h 逐渐上升, 至 12 h 达到最高点, 高出对照组 24%, 然后逐渐下降; 48 h 与对照组平行; 而注射生理盐水组, 其 SOD 值至 12 h 略有上升, 24 h 下降至正常水平, 基本没有变化。经分析显示: 5、12、24 h 实验组(图中以“*”标记, 下同)与对照组相比具显著性差异($P < 0.05$), 48、72 h 差异不显著。结果见图 1。

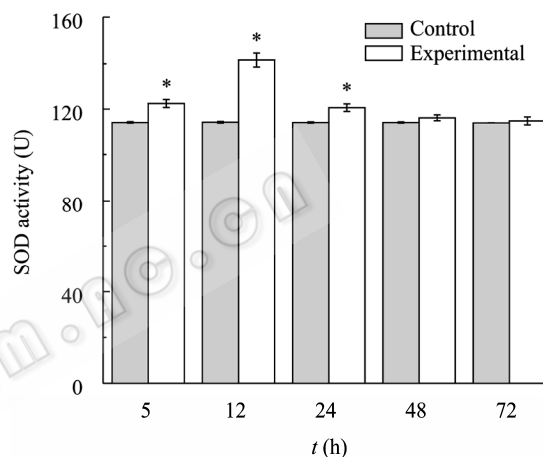


图 1 海洋红酵母多糖对日本鳎总超氧化物歧化酶活力影响

Fig. 1 Marine red yeast polysaccharides on the Japanese sturgeon total superoxide dismutase influence

2.3.2 ACP 活性测定: 据图 2 可知, 海洋红酵母多糖注射日本鳎后, 酸性磷酸酶(ACP)活力自 12 h 开始有升高, 在 24、48 h 达到最高, 与生理盐水对照组相比高出 43%, 之后开始降低, 到 72 h 恢复至对照组水平。12、24、48 h 3 组结果, 实验组与对照组相比具显著性差异($P < 0.05$), 其它两组差异性均不显著。

2.3.3 AKP 活性的测定: 海洋红酵母多糖注射日本鳎后, 碱性磷酸酶(AKP)活力自 5 h 即有明显上升趋势, 12、24、48 h 均高于对照组, 至 48 h 达到最高, 高出对照组 25%, 之后开始降低, 到 72 h 恢复至对照组水平。5、12、24、48 h 4 组结果, 实验组与对照组相比具显著性差异($P < 0.05$), 72 h 差异性不显著。结果见图 3。

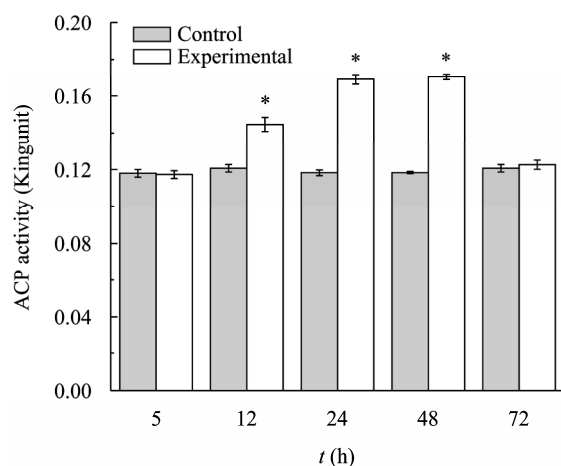


图2 海洋红酵母多糖对日本鳎酸性磷酸酶活力影响
Fig. 2 Marine red yeast polysaccharides on acid phosphatase activity in Japan sturgeon influence

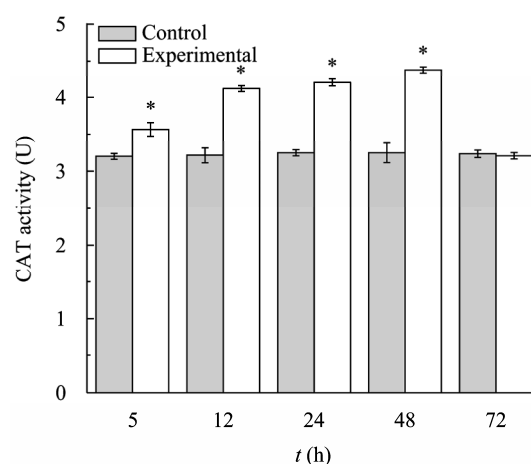


图4 海洋红酵母多糖对日本鳎过氧化氢酶活力影响
Fig. 4 Marine red yeast polysaccharides on the Japanese sturgeon catalase activity influence

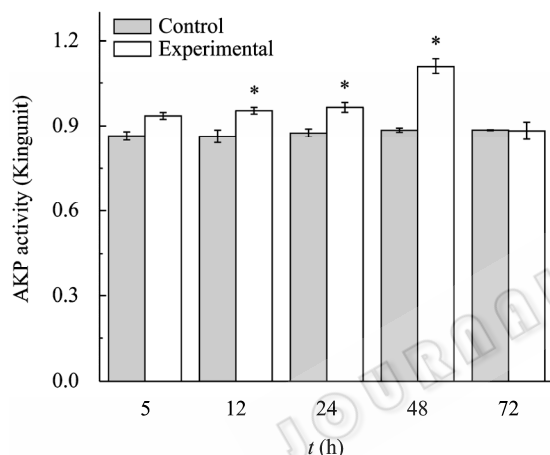


图3 海洋红酵母多糖对日本鳎碱性磷酸酶活力影响
Fig. 3 Marine red yeast polysaccharides on alkaline phosphatase activity in Japan sturgeon influence

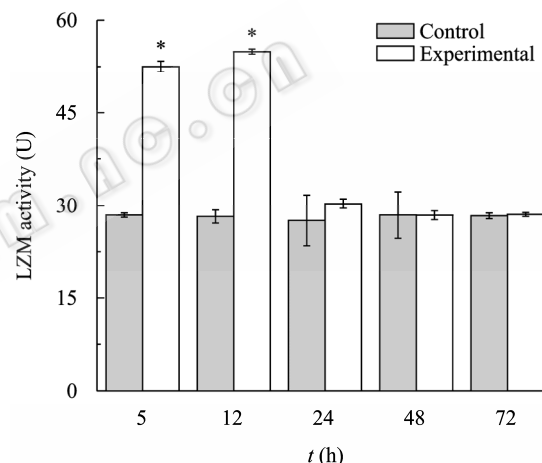


图5 海洋红酵母多糖对日本鳎溶菌酶活力影响
Fig. 5 Marine red yeast polysaccharides on the Japanese sturgeon lysozyme influence

2.3.4 CAT 活性的测定: 据图 4 可知, 海洋红酵母多糖注射后, 过氧化氢酶活力在 5、12、24、48 h 均高于对照组, 至 48 h 达到最高, 高出生理盐水对照组 35%, 之后开始降低, 至 72 h 恢复至对照组水平。5、12、24、48 h 4 组结果, 实验组与对照组相比具显著性差异($P < 0.05$), 72 h 无差异性。结果见图 4。

2.3.5 LZM 活性测定: 据图 5 可知, 海洋红酵母多糖注射日本鳎后, 溶菌酶活性变化较为明显, 5 h 即有明显上升, 溶菌酶活力 12 h 达到最高, 与生理盐水对照组相比高出 95%, 之后开始降低, 到 72 h 恢复至对照组水平。5、12 h 实验组与对照组相比具显著性差异($P < 0.05$), 其它各组均无显著差异。

3 讨论

免疫系统都存在着宿主对外来入侵者的防御和修复自身组织损伤的机制。然而在无脊椎动物的成员中表现出来的这种机制是属于自然免疫性, 对各种外来的侵染物反应没有特异性, 反应的类型大多类似于吞噬作用, 如软体动物(Molluscs)和节肢动物(Arthropods)的血细胞都担负着对外来抗原吞噬功能。节肢动物的免疫系统能识别范围广泛的外来物质并对其产生积极地应答, 当然这种应答与脊椎动物免疫应答相距甚远, 甲壳类血细胞杀死被吞噬的病原菌等异物的主要机制之一是伴随吞噬引起的呼吸爆

发产生的氧自由基等活性氧,包括超氧阴离子、羟自由基、单线态氧和过氧化氢。ACP 是动物巨噬细胞内溶酶体的标志酶,是溶酶体的重要组成部分,已有研究证实,在甲壳动物血细胞进行吞噬和包围化的免疫反应中,会伴随有 ACP 的释放^[16]。而 ALP 是生物体内的一种重要代谢调控酶,不仅可以直接参与磷酸基团的转移,还可参与机体蛋白质的合成,也是溶酶体酶的重要组成部分。LZM 和 CAT 广泛存在于动物、植物及微生物体内,是生物体内重要的酶类之一,参与多种生理代谢反应^[17]。

王淑红等^[18]利用弧菌感染杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)也发现 SOD 活性显著降低。本实验中,日本鳎在注射红酵母多糖溶液后, SOD 活性于 12 h 升至最高(高出对照组 24%),然后逐渐降低,至 72 h 降至最低。SOD 活性在自由基的诱导下随之升高,以清除过量的自由基,因此在注射后出现了酶活性逐渐升高,但日本鳎在清除异物的过程中产生大量的自由基,清除自由基对 SOD 的消耗超过了日本鳎的生产能力,酶活性会很快下降。如图 1 所示, SOD 活性 12 h 后迅速下降, 48 h 就恢复至对照组水平。本实验与王淑红等得出的结果不同,这可能是贝类和甲壳类对不同免疫原的反应不同,具体原因有待进一步研究。

本实验证实,日本鳎注射红酵母多糖溶液后血清中 ACP、AKP、LZM 和 CAT 活性均有不同程度升高,说明红酵母多糖溶液对日本鳎部分免疫活性酶的活性有明显的刺激作用,激发了日本鳎的免疫反应,特别是 LZM、CAT, LZM 活性变化较为明显, 5 h 即有明显上升,在短短 12 h 达到最高,高于生理盐水对照组 95%; CAT 活力 5、12、24、48 h 均高于对照组,一直持续至 48 h 达到最高,高于生理盐水对照组 35%。本研究结果表明红酵母多糖能激活日本鳎的免疫系统,但是,注射给予激活剂的方法在实际生产中应用是困难的,因此在水产动物免疫防治中,进一步研究口服或者浸泡的方式施加免疫激活剂,在调节水产动物免疫系统、增强免疫力、降低病害发生的频率及强度方面具有诱人的应用前景。

参考文献

- [1] 王森,丁霄霖. 葡聚糖生物活性与结构的关系[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2): 90-94.
- [2] Hofer M, Pospíšil M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results[J]. Int J Immunopharmac, 1997, 19(9/10): 607-609.
- [3] 李花霞,杨文鸽. 啤酒酵母中 β -(1 \rightarrow 3)-D 葡聚糖的研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(5): 54-56.
- [4] 胡晓忠,冯万祥. 酵母葡聚糖的制备及理化性质[J]. 华东理工大学学报, 1999, 25(5): 477-479.
- [5] 赵季,任俊琦,卢彩霞,等. 酵母细胞壁多糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2009(1): 81-85.
- [6] 金淑英,李斯华,黄挺进. 酵母多糖对断奶仔猪抗病促长作用的实验研究[J]. 浙江畜牧兽医, 2001, 3(1): 3-4.
- [7] 李臣,阮榕生,林向阳,等. 红酵母的性质及其应用研究[J]. 农产品加工, 2006, 3(5): 30-31.
- [8] 李凡,李毅. 啤酒酵母多糖对小鼠免疫细胞功能的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1998, 24(2): 124-126.
- [9] 高仕英,吴纪经,吴英华. 酵母多糖对肉用仔鸡免疫系统的影响[J]. 中国实验动物学报, 2000, 8(3): 189-199.
- [10] 江萍,王义华. 三种酵母胞壁多糖的化学组成及血清学试验[J]. 食品科学, 1999, 20(9): 48-51.
- [11] 李磊,王卫国. 真菌多糖药理作用及其提取、纯化研究进展[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2008, 29(2): 19-25.
- [12] 欧阳天赞,李小定,荣建华. 真菌多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006(18): 524-528.
- [13] 王雷,李光友,毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 34-41.
- [14] 罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 573-577.
- [15] 吴小刚,吴周和,吴传茂. 啤酒酵母多糖提取工艺条件的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(9): 27-29.
- [16] Kawakami H, Shinohara N, Sakai M. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail[J]. Fish Path, 1998, 33(3): 283-292.
- [17] Hashimoto T, Ohno N, Yadomae T. Subgrouping immunomodulating β -glucans by monitoring IFN- γ and NO syntheses[J]. Drug Develop Res, 1997, 42(1): 35-40.
- [18] 王淑红,王艺磊,张朝霞,等. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 37-40.