

生物活性物

海洋真菌 *Phomopsis* sp. 产抗肿瘤药物 南强菌素发酵培养基的优化

陈劲平¹, 黄耀坚², 沈月毛², 敬科举¹, 卢英华¹

(1. 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 从海洋真菌 *Phomopsis* sp. 分离得到的南强菌素是新发现的高抗肿瘤活性化合物, 为新颖罕见的去乙酰真菌环氧二烯类化合物(Deacety Mycoepoxydiene)。以 *Phomopsis* sp. A123 经诱变后获得的 818 菌株为出发菌株, 对其进行液体发酵培养。考察了几种常见培养基对南强菌素发酵生产的影响, 确定出较适的培养基。同时以该培养基为基础培养基, 探讨了碳源、氮源以及几种维生素对南强菌素积累的影响。培养条件的初步优化结果表明: 最佳的培养基为 PD 培养基; 最适碳源和氮源分别为麦芽糖及马铃薯煮汁; 生物素的添加有利于南强菌素的积累, 产量提高了 25%。

关键词: 海洋真菌; 抗肿瘤化合物; 南强菌素; 培养基优化

中图分类号: TQ464

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)S2-0275-03

Optimization of medium components for production of antitumor agent Deacety Mycoepoxydiene by marine endophytic fungi *Phomopsis* sp.

CHEN Jin-ping¹, HUANG Yao-jian², SHEN Yue-mao², JING Ke-ju¹, LU Ying-hua¹

(1. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Deacety Mycoepoxydiene is a novel antitumor agent extracted from a marine endophytic fungi *Phomopsis* sp. A123. In order to improve the yield of Deacety Mycoepoxydiene, the liquid fermentation medium composition is optimized by a one-factor-at-a-time method for a mutant No. 818, which is derived from *Phomopsis* sp. A123. Potato dextrose (PD) culture medium is selected as the preliminary culture medium, and the optimal carbon and nitrogen sources for liquid fermentation are investigated. The effect of several vitamins, including lipoic acid, VB₁₂, VB₁ and biotin on the accumulation of Deacety Mycoepoxydiene is also studied. The results show that the optimal carbon and nitrogen source is maltose and potato steep liquor, respectively. The yield of Deacety Mycoepoxydiene is increased by 25% while the biotin is added.

Key words: marine endophytic fungi; antitumor agent; Deacety Mycoepoxydiene; medium optimization

1 前言

世界范围的重大疾病中, 恶性肿瘤仍是人类的常见病和多发病。据世界卫生组织报告, 每年死于恶性肿瘤的人数高达 700 万人, 恶性肿瘤成为严重影响人类生存的疾病之一^[1]。为此, 寻找新型、低毒、高效的抗肿瘤药物是当前新药研究的重点。

南强菌素(Deacety Mycoepoxydiene)是由厦门大学生命科学学院细胞生物与肿瘤细胞工程教育部重点实验室于红树植物内生真菌 *Phomopsis* sp. A123 的发酵液中分离获得的。该化合物属环氧二烯聚酮类, 为骨架全新的化合物(结构见图 1)。南强菌素与该实验室之前发现的真菌环氧二烯^[2](Mycoepoxy-

diene)具有相似的结构。研究发现, 南强菌素同真菌环氧二烯一样具有良好的抗肿瘤活性, 而且其急性毒性相较于其他抗肿瘤药物属于低毒性。虽然利用突变菌 *Phomopsis* sp. A818 发酵生产南强菌素, 在固体培养基上的产量能够达到 100 mg/L, 但是在液体培养基中的产量仅为 30 mg/L 左右。因此, 需要进一步优化其培养基, 提高其产量。

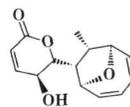


图 1 南强菌素的化学结构

本文初步寻求了较适 *Phomopsis* sp. A818 发酵生

收稿日期: 2008-09-04

基金项目: 国家高技术研究发展(“863”)计划海洋技术领域海洋微生物产品中试研究重点项目资助

作者简介: 陈劲平(1984-), 男, 硕士生; 卢英华(1970-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为生物化工, 通讯联系人, 0592-2186038 ylu@xmu.edu.cn.

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

产南强菌素的培养基,并在此基础上采用了单次单因素实验法对培养基成分进行了初步优化,使南强菌素的产量获得了提高。

2 材料与方 法

2.1 材 料

(1)菌种。本研究中使用的菌种为突变株 *Phomopsis sp.* A818,由厦 门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室提供。

(2)试剂。南强菌素标准品(95%)由厦 门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室提供。高效液相色谱用甲醇为色谱纯,蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、玉米浆为生化试剂,其余试剂为分析纯。

(3)主要培养基。斜面保藏培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,加 20%海水至 1 L, pH 6.8。种子培养基(PD):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,加 20%海水至 1 L, pH 6.8。发酵培养基(改良 PD 培养基):马铃薯 200 g,葡萄糖 100 g,加 20%海水至 1 L, pH 6.8。

(4)主要仪器设备。薄层硅胶 GF254(青 岛海洋化工厂);Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪。

2.2 方 法

2.2.1 摇瓶发酵和南强菌素的提取

吸取 0.075 mL 种子发酵液至装有 50 mL 发酵培养基的 150 mL 三角瓶中,28℃,150 r/min 振荡培养 18 天。

发酵结束后,加等体积乙酸乙酯于发酵摇瓶中,过夜。隔天对菌丝体进行过滤,分离出菌丝体。滤液先用分液漏斗将乙酸乙酯萃取液与水相分离,所得水相继续用等体积的乙酸乙酯萃取 2 遍。合并有机相减压浓缩至干,定溶于 20 mL 甲醇。

2.2.2 南强菌素的分析方法

定性分析(TLC):以南强菌素标准品为对照,展开系统为氯仿-甲醇(体积比 10:1),利用 5%硫酸显色。若提取物中有与南强菌素标准品 Rf 值相同的蓝绿色斑点,则表明该发酵产物中含有南强菌素。

定量分析(HPLC):利用外标法进行定量分析。色谱条件为:层析柱 Sunfire-C₁₈(4.6×250 mm, Agilent 1100 Series LN MP 055203),紫外检测为波长 220 nm,流动相为 V(甲醇):V(水)=2:3,流速 1.0 mL/min,每次进样 20 μL,间隔时间为 30~60 min。南强菌素的保留时间为 6.7 min,通过产量-峰面积的标准曲线计算产量。

标准曲线制作:将配置好的 10、20、40、60、80、100 mg/L 的南强菌素标准品,在上述高效液相色谱条件下,测定各个浓度时在 220 nm 下的吸收峰面积。

2.2.3 菌丝生长量的测定

取干燥的培养皿准确称重(G_1),将过滤所得菌体置于培养皿内,将菌体连同培养皿置于烘箱中,100℃干燥至恒重,在干燥器中冷却至室温,准确称重(G_2),根据 G_1 与 G_2 算出菌体干重 $W(g/mL)$ 。

2.2.4 葡萄糖的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)方法测定葡萄糖浓度。

2.2.5 培养基的筛选

分别利用几种真菌培养基如 PD 培养基、裂殖壶菌基础发酵培养基^[3],裂殖壶菌基础合成培养基^[3]、GYT 培养基、Ty 发酵用完全合成培养基^[4](即模拟 PD 培养基)、SIH 培养基^[3]对 *Phomopsis sp.* A818 进行培养,筛选出较适南强菌素生产的培养基,培养条件与 1.2.1 小节发酵条件相同。

2.2.6 培养基的初步优化

以筛选所得发酵培养基为基础,考察几种常用的碳源如葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等和不同氮源如酵母粉、蛋白胨、牛肉膏、马铃薯煮汁等对 *Phomopsis sp.* A818 发酵生产南强菌素产量的影响。在发酵培养基分别加入 VB1、VB12、硫辛酸和生物素考察不同维生素对南强菌素产量的影响。

2.2.7 *Phomopsis sp.* A818 发酵生长曲线的确定

发酵开始后每隔 24 h 取样,测定菌丝体干重、南强菌素积累量、pH 以及葡萄糖浓度等发酵参数。

3 结果与分析

3.1 培养基的筛选

分别考察 SIH、GYT 等 6 种不同真菌培养基对 *Phomopsis sp.* A818 发酵生产南强菌素的影响,其结果如图 2 所示。

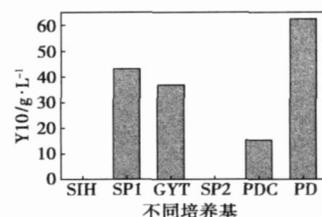


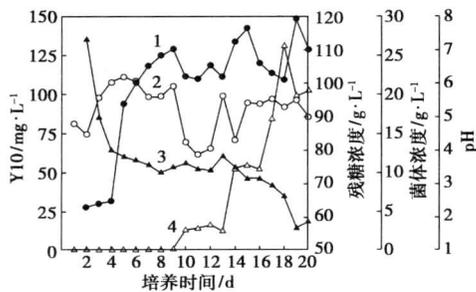
图 2 不同培养基中南强菌素的含量

注:图中 Y10 代表南强菌素,下同;图中 SPI 代表裂殖壶菌基础发酵培养基;SP2 代表裂殖壶菌基础合成培养基;PDC 代表模拟 PD 培养基。

由图2可以看出,不同培养基对南强菌素产量的影响差别较大。6种培养基的优势次序为PD培养基、裂殖壶菌基础发酵培养基、GYT培养基、模拟PD培养基、SIH培养基和裂殖壶菌基础合成培养基。其中SIH培养基和复合培养基中几乎不产南强菌素,可能是由于其缺乏了南强菌素生成的必要物质。由于PD培养基中南强菌素的产量显著高于其他培养基,因此下面的研究便选定以改良后的PD培养基为基础。

3.2 *Phomopsis sp.* A818 发酵生长曲线的确定

为了进一步优化培养条件,在发酵培养基的基础上,考察了 *Phomopsis sp.* A818 在生长周期内 pH、菌体干重、残糖以及南强菌素含量的变化。结果如图3所示。



1—菌体干重;2—pH,3—残糖含量,4—Y10

图3 *Phomopsis sp.* A818 发酵生长曲线

从图3的残糖曲线可以看出,葡萄糖的消耗趋势与细胞生长基本相对应。当初始葡萄糖质量浓度为100 g/L时,从第6天开始培养基中的葡萄糖浓度就基本不再降低,直到第13天后才又开始迅速降低。到发酵末期,约有50%的葡萄糖被消耗,说明细胞对底物葡萄糖的利用并不充分。

残糖曲线的趋势与细胞干重的趋势正好对应。随着残糖的减少,菌体干重也迅速增加。当葡萄糖浓度维持在80 g/L时,菌体干重也基本维持在20 g/L左右。直到第13天后才又开始显著上升。

发酵过程中培养液的pH是微生物在一定环境条件下代谢活动的综合指标。在生长允许的pH范围之内,pH对微生物菌体的生长特别是次生代谢产物的积累有很大的影响。pH超出产物合成的适合范围,就可能引起产物稳定性下降,半衰期缩短,发酵单位也下降。此外还影响到菌丝体的通透性、对微量元素的吸收以及各种酶的活性。*Phomopsis sp.* A818 发酵液中的pH基本是维持在4~6。

前8天南强菌素的产量基本为零,这说明此时细胞不合成次级代谢产物。而第8天开始,南强菌

素含量快速增长。第18天,南强菌素质量浓度高达127 mg/L,此后南强菌素的含量略有降低。

3.3 培养基中碳源的初步确定

以发酵培养基(改良PD培养基)为基础,分别用麦芽糖、木糖、蔗糖等11种代替葡萄糖进行摇瓶发酵培养,考察不同碳源对南强菌素积累的影响。

从实验结果中可知,除了甘油、柠檬酸钠、大麦粉外,D-木糖、D-麦芽糖等做为碳源时均能满足微生物的生长,并使南强菌素产量达到较高值。特别是D-木糖、糊精、麦芽糖、蔗糖4种碳源能够使南强菌素的产量高于葡萄糖作为碳源。其中D-木糖的成本过于昂贵,较难用作为工业生产。糊精、麦芽糖和蔗糖相比较而言价格相差不大,麦芽糖作为碳源时南强菌素的产量能达到90 mg/L,蔗糖50 mg/L,糊精只有40 mg/L。因此,选择麦芽糖作为 *Phomopsis sp.* A818 发酵生产南强菌素的最适碳源。

3.4 培养基中氮源的初步确定

氮源是生命有机体生长发育必需的主要营养,主要提供合成原生质和细胞其他结构的原料。在PD改良培养基中分别加入1 mg/L 月示蛋白胨、酪蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉、玉米浆、牛肉膏、鱼粉、尿素等有机氮以及(NH₄)₂SO₄、KNO₃等无机氮,考察不同氮源的添加对南强菌素生产的影响。

由实验结果可以得知,其他氮源的添加不仅不利于南强菌素的生产,而且有些氮源例如酪蛋白胨等甚至还会抑制南强菌素的合成。由此可见,相较于其他已尝试的氮源,马铃薯煮汁是 *Phomopsis sp.* A818 发酵生产南强菌素的必需氮源。但由于马铃薯煮汁的前处理较为繁琐,不利于工业生长,因此可以考虑用马铃薯浸出粉来代替。

3.5 不同维生素的添加对南强菌素生产的影响

在微生物发酵过程中,利用添加合适维生素通常都能对微生物的生长和产物量的增加有很大的帮助。本次实验以发酵培养基为基础,分别往发酵培养基中添加相同浓度(4.8 mg/L)的VB12、VB1、硫辛酸和生物素。以南强菌素的积累量为考察标准,分别对各种维生素添加的影响进行考察。

由实验结果得知,各种维生素添加对南强菌素积累的影响稍有不同,其中VB12、VB1和硫辛酸的添加对南强菌素的积累具有抑制作用,其抑制强度由大到小依次为VB1、硫辛酸、VB12。而生物素的添加则有利于南强菌素的积累,在添加生物素的情况下,

(下转第279页)

1.1 精馏法

对松节油品质要求不高时,可采用一次常压精馏的方法,分别可以收集馏出温度为 120°C 前的头馏分、 $120\sim 160^{\circ}\text{C}$ 的中间馏分和 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ 的松节油产品,蒸馏釜残液可为浮选油。该方法所得到的松节油仍有臭味,等级不高。如果采用常压蒸馏与真空精馏并辅以活性炭脱色等可提高精馏松节油的品质,操作时应在蒸出头馏分后进行真空精馏,最后再采用活性炭处理^[1]。精馏法是最基本的处理CST的方法,其他化学法通常都要与精馏法结合使用才能达到较好的精制效果。

1.2 重金属法

向粗硫酸盐松节油中加入重金属离子,使其与硫醇化合,形成不溶于水的硫醇盐,然后蒸馏。该方法效果好,效率较高,但处理成本高,较少被采用。

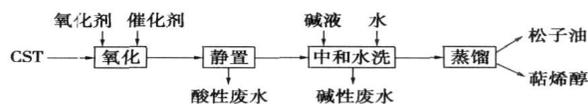
1.3 碱洗法

多数碱溶液容易与硫醇等发生反应,借此可以除去大部分含硫化合物。20世纪40年代有美国公司^[4]提出用12份50 mL 4%的氢氧化钠的乙醇溶液处理500 mL粗松节油,然后用500 mL水洗去乙醇,蒸馏后得到低硫含量的松节油。20世纪90年代有俄罗斯专利^[5]提出同时用1%~5%水溶性碱溶液、羰基化合物(含 RCOH 或 RCOR 结构)处理粗硫酸盐松节油的方法,粗硫酸盐松节油、水溶性碱溶液、羰基化合物之间的比例为 $1:(0.1\sim 0.5):(0.1\sim 0.5)$,反应时间40 min,最后进行精馏处理。也有用糠醛^[6]处理碱液洗过后的硫酸盐松节油,效果较好,得到硫质量分数为0.001%~0.004%的松节油。

1.4 氧化法

氧化法也是去除硫醇等最常用的方法。由于硫

醇中硫的给电子能力很强,很容易被氧化,很多物质包括空气、强酸、次氯酸钠等都是很好的氧化剂。氧化法一般与碱洗、精馏等方法结合使用,主要流程^[7]为:



1.4.1 空气氧化

空气作为氧化剂^[8-9]实际上是利用空气中的氧气将CST中的含硫化合物氧化,一般氧化温度在 100°C ,空气的通入速度既要保持空气的流动又要尽可能少地造成松节油成分的损失,在气体接触面积 $30\text{ dm}^2/\text{L}$ 、气体交换距离为400 mm条件下,最终得到硫质量分数为0.008%的松节油。但空气氧化一般会造部分松节油一起发生氧化而损失,且在精馏时会生成较多的釜残物。

也有用臭氧加到空气中作为氧化剂的报道^[9],空气中臭氧的质量分数为0.5%~3.0%。氧化后用水蒸气蒸馏得到较纯净的萜烯化合物。

1.4.2 酸氧化

强酸如硫酸、硝酸等均可作为氧化剂使用,这些强酸可将粗硫酸盐松节油中的硫化物一次性地氧化成可溶于水的磺酸化合物及砷^[10],同时利用硫醚中硫原子的给电子能力较醚中氧原子的给电子能力强的特点,用浓硫酸、磷酸处理粗硫酸盐松节油,使硫醚与酸形成稳定的铈盐并及时分离弃去形成的铈盐,从而去除甲硫醚的臭味^[12]。刘雁等^[13]根据以上机理设计了2种方案,方案一:用硝酸、硫酸、磷酸和过氧化氢作为精制试剂,经反应后分离,再水洗,最后将处理好的粗硫酸盐松节油用水蒸气蒸馏,

(上接第277页)

南强菌素的积累量达到了 75 mg/L ,相较于同批次的空白对比样的 60 mg/L ,产率提高了25%。这可能是由于生物素的添加既影响细胞的通透性,同时也影响细胞该代谢途径的流量。

4 结论

通过实验基本确定了*Phomopsis sp.* A818发酵生产南强菌素的较适培养基为PD培养基,并在此培养基的基础上,确定了*Phomopsis sp.* A818发酵生产南强菌素的最适碳源和氮源分别为麦芽糖和马铃薯煮汁。考察了不同维生素的添加对南强菌素积累的影响,发现VB12、VB1和硫辛酸的添加对南强菌素

的积累具有抑制作用,而生物素的添加则具有促进作用。

参考文献

- [1] World Health Organization. Revised global burden of disease (GBD) 2002 estimates [/odgbddealthdalyestimates/xls]. <http://www.who.int/healthinfo/bodgbd2002/en/index.html>. 2008-08-13.
- [2] 王若宇,黄耀坚,郑忠辉,等.海洋真菌 *Diaporthe sp.* 产真菌环氧化二烯发酵条件的优化[J].微生物通报,2006,33(5):6-11.
- [3] 周林.高密度培养裂殖壶菌生产DHA[D].厦门:厦门大学,2007.
- [4] 张琨.一株产鬼臼毒素内生真菌发酵条件的研究[D].西安:西北大学,2006.
- [5] Han S I, Friehs K, Flaschel E. Improvement of a synthetic medium for *Dicystosium discoidum* [J]. Process Biochem, 2004, 39: 585-589. ■