

海洋真菌 *Diaporthe* sp. 产真菌环氧二烯发酵条件的优化^{*}王若宇 黄耀坚^{**} 郑忠辉 苏文金 沈月毛

(细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

摘要: 从海洋木栖真菌 HLY-2 分离得到的真菌环氧二烯 (Mycoeoxydiene) 是新发现的高抗肿瘤活性化合物。通过正交设计, 改良普通半海水 PD 培养基的配方, 比较固体和液体两种发酵方法, 得到了使该化合物产量大幅提高的最佳培养条件: 在固体发酵条件下土豆 250g/L, 海水 300mL/L, 葡萄糖 30g/L, 乳糖 50g/L, 磷酸二氢钾 0.65mmol/L, 硫酸铵 1g/L, 产量高达 543mg/L, 比普通的 PD 培养基提高了 43 倍, 也比液体发酵的最高产量提高了近 15 倍。同时还对固体发酵和液体发酵造成的产量差异进行了分析, 并检验了发酵产物的抗肿瘤活性。

关键词: 海洋真菌, 抗肿瘤化合物, 真菌环氧二烯, 发酵条件优化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0006-06

Medium Optimization for Antitumor Agent Mycoepoxydiene by Marine Lignicolous Fungi *Diaporthe* sp.^{*}

WANG Ruo-Yu HUANG Yao-Jian^{**} ZHENG Zhong-Hui SU Wen-Jin SHEN Yue-Mao

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Engineering School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Mycoepoxydiene is a novel antitumor agent extracted from marine lignicolous fungi HLY-2 which is *Diaporthe phaseolorum* by molecule identification. The medium optimization for mycoepoxydiene by orthogonal design and the comparison of submerged fermentation and solid state fermentation were studied. The result is that the maximal yield of the compound is 543mg/L, which is 43 times compared to the customary half seawater PD medium and 15 times to the best submerged condition. This optimum culture medium included potato 250g/L, seawater 300mL/L, glucose 30g/L, lactose 50g/L, KH_2PO_4 0.65mmol/L and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L in the solid state condition. Differentiation analysis between submerged and solid state fermentation and antitumor activity of these ferment products were also studied. The antitumor activity of products of the optimum medium approached the pure compound.

Key words Marine lignicolous fungi Antitumor agent Mycoepoxydiene Medium optimization

海洋微生物的次级代谢产物是近年来寻找新型药物的热点, 红树林为自然分布于热带和亚热带海岸潮间带的木本植物群落, 通常生长在港湾河口地区的淤泥滩涂上, 是海滩上特有的森林类型。生活在这类独特植物组织中的内生真菌种类丰富, 次级代谢活跃, 不但能产生许多陆栖微生物中未曾发现过的新次级代谢产物, 而且其活性代谢产物可通过发酵进行大量生产, 无原材料后顾之忧, 不会破坏生态平衡, 易实现产

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (No. 2003AA624010)

福建省科技项目基金 (No. 2004N003)

福建省自然科学基金 (No. C0210001)

^{**} 通讯作者 Tel: 0592 2188236 (O), Fax: 0592 2186392 E-mail: Yjh@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期: 2005 11 10 修回日期: 2006 01 16

业化。因此, 此类真菌是最具药用开发前景的药物资源之一。

菌株 HLY-2 分离自福建漳州九龙江浮宫镇草埔头村红树林生态区采集到的一个浸没的海莲叶样品, 采用分子鉴定技术, 确定该菌株为 *Diaporthe phaseobnum*, 分类学上属于子囊菌亚门核菌纲球壳菌目间座壳科间座壳属, 俗名菜豆间座壳菌。目前已经从该菌株中分离得到的化合物真菌环氧二烯 (Mycoeoxydiene)。该化合物最初是由 Ping 等 (1999) 从稀有真菌 OS-F66617 的发酵液中分离得到, 它是一个以含有氧桥的环二烯为骨架的化合物, 结构十分新颖, 为天然产物中少见的骨架结构 (图 1), 代表了一类新的真菌代谢产物^[2]。本课题组发现其具有较好的抗肿瘤活性 (抗 Raji 细胞的 IC_{50} 为 $8.7 \mu\text{g/mL}$), 有进一步研究的价值^[1]。但在原来的普通半海水 PD 培养基上的产量只有 17mg/L , 需要优化其发酵条件, 以

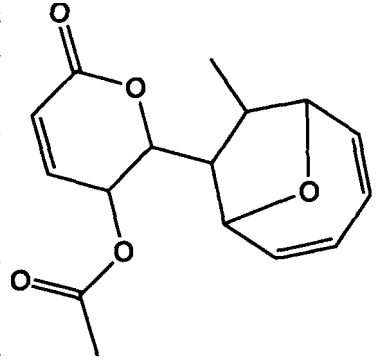


图 1 Mycoepoxydiene 的结构图

做进一步的研究。本实验采用了正交设计的六因素五水平 $L_{25} (5^6)$ 实验进行培养基质的优化。鉴于固体发酵对产量有极大的影响, 进行固液发酵方法的比较, 对固液发酵的影响因素进行了初步的探讨。同时, 还对发酵产物的抗肿瘤的活性进行了检测。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

Diaporthe phaseobnum HLY-2 菌株采集自福建漳州浮宫镇红树林生态区浸没的海莲叶样品。保存培养基为 PDA 培养基 (土豆 20g, 海水 50mL, 葡萄糖 2g, 琼脂 2g 自来水定容至 1L), 4°C 保存。

1.2 正交设计

培养基设计以马铃薯、硫酸铵为氮源; 葡萄糖和乳糖为碳源; 磷酸盐为代谢调节因子。鉴于 HLY-2 是来自潮间带的海洋真菌, 加入了不同比例的海水, 以模仿其生境。通过正交设计的方法, 设计了一个六因素五水平的正交设计表, 进行 25 次实验, 因素水平表见表 1。

表 1 培养基正交设计表

因素水平	土豆 (g/L)	海水 (mL/L)	葡萄糖 (g/L)	乳糖 (g/L)	磷酸二氢钾 (mmol/L)	硫酸铵 ₄ (g/L)
Level 1	100	500	100	50	0.32	0.0
Level 2	150	300	70	40	0.50	0.5
Level 3	200	200	50	30	0.65	1.0
Level 4	250	100	30	20	0.80	1.3
Level 5	300	0	15	10	1.00	1.5

1.3 发酵和提取

1.3.1 液体发酵: 将 HLY-2 在 PDA 平板上活化 4d 接入 500mL 的摇瓶装的 200mL 培养基中, 接种量约为 20cm^3 菌苔, 在 28°C 培养 7d 120r/min 每组做 3 个重复。

发酵结束, 用 4 层纱布过滤菌体, 烘干、称重。滤液用等体积乙酸乙酯抽提 3 次,

将乙酸乙酯相减压浓缩, 得到的浸膏称重, 用甲醇定容到 10mL。

1.3.2 固体发酵: 菌株的活化同液体发酵, 在活化菌株的平板上挑出约 2cm^3 的琼脂块, 接到装有 20mL 固体培养基的平板上, 在 28°C 培养 7d 每组试验 3 个重复。

发酵结束, 将琼脂块切碎, 用乙酸乙酯 甲醇 甲酸 $80:15:5$ 的溶液浸泡 3 次, 每次 1d 将浸泡液过虑、浓缩, 得到的浸膏称重, 用甲醇定容到 10mL。

1.4 分析方法

对化合物 Mycoepoxydiene 的产量, 采用 HPLC 检测, 条件为: 层析柱: Nova-pak Silica $6\mu\text{m}$, $7.8\text{mm} \times 300\text{mm}$; 紫外检测为波长 260nm , 流动相: 环己烷 乙酸乙酯 = 2/1 (v/v), 灵敏度: 0.2Aufs 流速: $2.0\text{mL}/\text{min}$ 每次进样 $20\mu\text{L}$, 间隔时间为 1520min 化合物 Mycoepoxydiene 的保留时间为 9.7min 通过产量-峰面积的标准曲线计算产量。对于发酵提取物在对应时间出的峰是否为所要的化合物, 主要有两种检验方法。(1) 内标法: 将纯样品和发酵提取物按不同的比例混合进样, 看保留时间和峰形是否一致;(2) TLC: 将发酵提取物, 经 HPLC 收集所要化合物, 在多种展层系统上做薄层层析, 观察 R_f 值及是否为单点纯。

标准曲线制作: 将标样配制成 $10\text{mg}/\text{mL}$ 的溶液, 按不同的体积进样, 在 HPLC 上分别测定它们的峰面积。

1.5 统计分析

用 SPSS8.0 软件将得到的结果进行直观分析和方差分析, 得到最佳的培养基配方, 以及各因素的对产量的影响大小。

1.6 抗肿瘤活性的测定

将发酵提取物配成 $10\text{mg}/\text{mL}$ 的溶液, 用 MTT 法^[3] 测定提取物在 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤抑制率, 对抑制率高的样品测定 IC₅₀。供试瘤株为 KB 和 Raji 细胞株。

1.7 发酵动态研究培养基质的测定

残糖用改良苯酚硫酸法^[4], 氨氮用甲醛滴定法, 磷酸盐用磷钼蓝法, pH 用酸度计测定。每个样品做 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 正交实验结果

2.1.1 液体发酵: 正交设计的液体发酵结果的直观分析见表 2、表 3 从中可以看出最佳的培养基配方是: 土豆 $100\text{g}/\text{L}$, 海水 $200\text{mL}/\text{L}$, 葡萄糖 $100\text{g}/\text{L}$, 乳糖 $50\text{g}/\text{L}$, 磷酸二氢钾 $0.5\text{mmol}/\text{L}$, 硫酸铵 $1\text{g}/\text{L}$ 。对产量的影响顺序是: 葡萄糖 > 乳糖 > 土豆 > 磷酸二氢钾 > 硫酸铵 > 海水。通过 HPLC 检测其峰面积的大小, 根据标准曲线可以计算出产量, 最大产量达到了 $36.6\text{mg}/\text{L}$, 与原来的 PD 培养基相比, 产量提高了约 2 倍 (图 2)。

表 2 Mycoepoxydiene 化合物 L₂₅ (5⁶) 正交设计的液体和固体发酵结果

因素	土豆	海水	葡萄糖	乳糖	磷酸二氢钾	硫酸铵	产量 1 (mg/L)	产量 2 (mg/L)
1	1	1	1	1	1	1	36.59	143.16
2	1	2	2	2	2	2	33.26	37.44
3	1	3	3	3	3	3	11.74	27.42
4	1	4	4	4	4	4	16.35	9.08
5	1	5	5	5	5	5	13.98	16.83

续表 2

6	2	1	2	3	4	5	11.57	8.45
7	2	2	3	4	5	1	10.47	133.48
8	2	3	4	5	1	2	13.18	104.56
9	2	4	5	1	2	3	13.78	12.06
10	2	5	1	2	3	4	19.59	19.07
11	3	1	3	5	2	4	17.70	39.13
12	3	2	4	1	3	5	16.55	508.92
13	3	3	5	2	4	1	17.67	158.54
14	3	4	1	3	5	2	19.07	12.25
15	3	5	2	4	1	3	14.27	46.64
16	4	1	4	2	5	3	18.30	7.84
17	4	2	5	3	1	4	9.01	112.16
18	4	3	1	4	2	5	21.10	19.29
19	4	4	2	5	3	1	7.98	521.46
20	4	5	3	1	4	2	18.42	483.12
21	5	1	5	4	3	2	7.84	282.95
22	5	2	1	5	4	3	26.95	20.87
23	5	3	2	1	5	4	31.51	20.72
24	5	4	3	2	1	5	18.84	15.96
25	5	5	4	3	2	1	9.89	431.89
K1	22.38	18.4	24.66	23.37	18.38	16.52	$\Sigma=435.62$	$\Sigma=3193.31$
K2	13.72	19.25	19.72	21.53	19.14	14.67		
K3	17.05	19.04	15.44	12.56	12.74	20.69		
K4	14.96	15.20	14.85	14.01	18.19	18.83		
K5	19.01	15.23	12.45	15.96	18.67	16.41		
R	8.67	4.04	12.21	11.11	6.40	6.02		
K'1	46.79	96.29	42.93	233.60	84.50	277.71		
K'2	55.52	162.57	126.94	47.77	107.96	87.42		
K'3	153.10	66.11	139.82	118.43	271.94	119.59		
K'4	228.77	114.16	212.46	98.29	136.01	40.03		
K'5	154.46	199.51	116.49	140.57	38.22	113.89		
R'	118.99	133.40	169.53	185.83	233.72	237.67		

注: 产量 1和产量 2分别为液体和固体发酵结果; K1K5表示液体发酵中的均值, K'1K'5则表示固体发酵中的均值

为了验证 9.7m in出现的峰就是所要的化合物, 采用内标法, 将 20 μ L发酵液提取物的溶液分别和 2 μ L、4 μ L、6 μ L标准样品混合进样, 发现峰的增高成比例增加 (图 2 3)。经 TLC 检验, 该峰为斑点纯。鉴于 Mycoepoxydiene 化合物的高抗肿瘤活性, 进行了 MTT 法的抗肿瘤测定, 产量最高的 1号培养基的发酵产物对 Raji 细胞的 IC_{50} 为 15 μ g/mL, 接近纯品的抗肿瘤活性。因此可以判断此峰就是化合物 Mycoepoxydiene

表 3 液体发酵正交试验的方差分析表

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性水平
土豆	47.06	4	11.76	6.00	***
海水	16.63	4	4.16	2.12	
葡萄糖	92.88	4	23.22	11.85	***
乳糖	89.76	4	22.44	11.45	***
磷酸二氢钾	27.94	4	6.99	3.57	**
硫酸铵	22.08	4	5.52	2.82	**
误差	47.06	24	1.96		

注: $F_{0.01}(4, 24) = 4.22$ $F_{0.05}(4, 24) = 2.78$ $F_{0.10}(4, 24) = 2.19$ *** $F_{ratio} > F_{0.01}$ ** $F_{ratio} > F_{0.05}$ * $F_{ratio} > F_{0.10}$

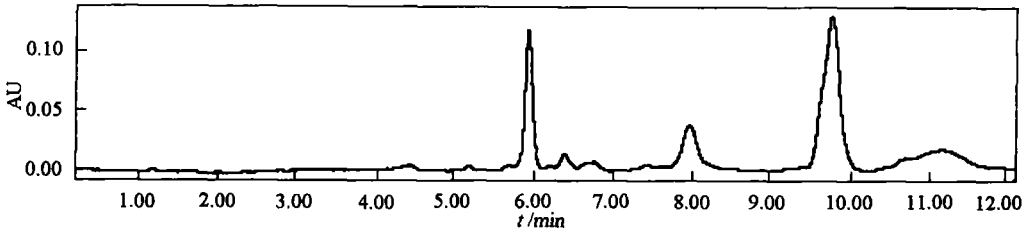
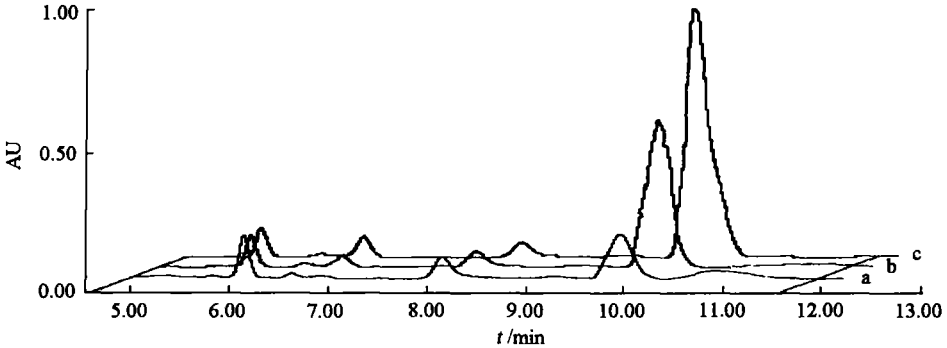
图2 1号培养基发酵产物的HPLC图(进样20 μ L)

图3 HPLC内标法的结果

注: a: 20 μ L 1号样品 HPLC 色谱图, b: 20 μ L 1号样品—2 μ L Mycoepoxydiene (10mg/mL) HPLC 色谱图, c: 20 μ L 1号样品—6 μ L Mycoepoxydiene (10mg/mL) HPLC 色谱图

2.1.2 固体发酵: 固体发酵正交试验方差分析见表4。固体发酵中, Mycoepoxydiene 的产量普遍提高, 最高产量达到了 521mg/L, 是液体发酵的 16倍(见表2)。最佳培养基配方是土豆 250g/L, 海水 300mL/L, 葡萄糖 30g/L, 乳糖 50g/L, 磷酸二氢钾 0.65mmol/L, 硫酸铵 1g/L。对产量的影响顺序是磷酸二氢钾>硫酸铵>乳糖>土豆>海水。验证方法同液体发酵, 产量最高的 19号培养基对 Raji细胞的 IC_{50} 为 10^4 g/mL, 接近于纯化合物的 IC_{50} 。

表4 固体发酵正交试验的方差分析表

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性水平
土豆	36346.96	4	9086.74	5.99	** *
海水	15330.35	4	3832.59	2.53	*
葡萄糖	23982.06	4	5995.51	3.96	**
乳糖	31027.01	4	7756.75	5.12	** *
磷酸二氢钾	61633.14	4	15408.29	10.17	** *
硫酸铵	45932.76	4	11483.19	7.58	** *
误差	36346.96	24	1514.46		

2.2 培养基组分对 Mycoepoxydiene 产量影响

根据正交试验得到了固体和液体发酵的最佳培养基, 分别用这两种培养基发酵, 验证正交试验的结果, 并检测发酵产物中残糖、氨氮、磷酸盐和 pH 值的动态变化。

液体发酵的最佳培养基产量为 37.6mg/L; 固体发酵的最佳培养基产量为 543mg/L, 比液体发酵提高了 16倍。HLY-2在两种发酵方式下, 对碳源、氨氮、磷酸盐的利用也不同。见图4和图5。从化合物的产量曲线, 可以看出, 液体发酵从第2d开始, 固体

发酵从第 3d 开始, 化合物大量产生, 分别在第 7d 和第 6d 达到产量的最大值, 液体发酵的中化合物的增长速度比较慢, 到了第 7d 以后, 在两种发酵培养基中的 Mycoepoxydiene 的浓度趋于平稳, 说明该化合物在发酵液中较稳定, 不易降解。在对碳源的利用上, 液体发酵的残糖量从 35.0% 降到了 5.7%, 利用率为 84%, 而固体发酵从 19.4% 降到了 1.2%, 利用率为 93%, 固体发酵中产量的大幅增加, 可能和碳源的高利用率有很大的关系。在固体发酵中, 磷酸盐的利用率为 88%, 而液体发酵只有 73%, 鉴于磷酸盐和一些酶的生成和转化有关^[5], 固液发酵产量的差别, 也可能与磷酸盐的作用有关。而 pH 值和氨氮的变化在两种发酵条件下区别不大。

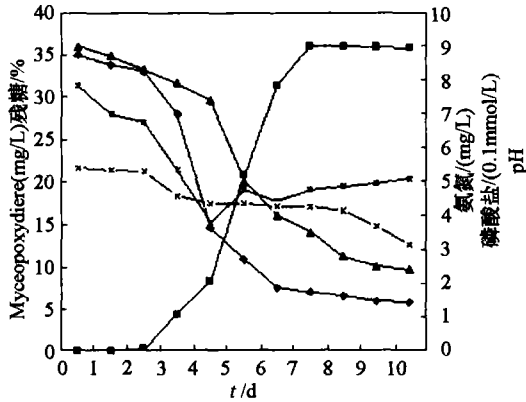


图 4 液体发酵试验的培养基质动态变化图

■ Mycoepoxydiene, ▲ 残糖, * 氨态氮,
◆ 磷酸盐, × pH

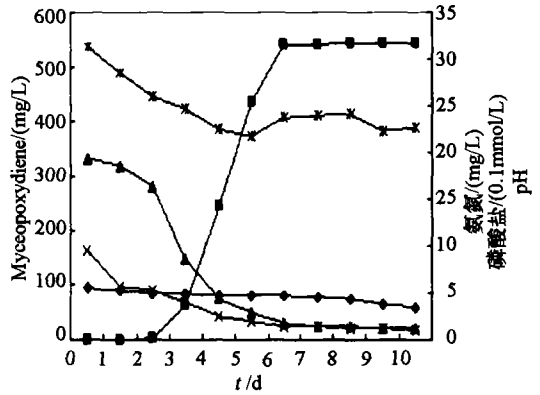


图 5 固体发酵试验的培养基质动态变化图

■ Mycoepoxydiene, ▲ 残糖, * 氨态氮,
× 磷酸盐, ◆ pH

3 小结

通过实验得到了从海洋木栖真菌 HLY - 2 中产生 Mycoepoxydiene 的最佳培养条件, 使产量有了大幅的提高, 达到了 543mg/L, 为该化合物的抗肿瘤机理、毒理学和药理学方面的研究奠定了基础。

初步研究培养基质对发酵产量影响结果显示: 在固体发酵中, 菌体可以更高效地利用培养基中的营养物质, 促进次级代谢产物的产生, 同时, 可能是因为固体发酵更好的模拟了其生活环境, 且当菌株附着与固体基质上生长时, 供氧丰富, 生长密度大, 生存竞争更为激烈, 因此产生的次级代谢产物的量也会提高。固体发酵还有含水量少, 废水、废渣少, 环境污染少等优点^[6]。

参考文献

- [1] Lin X, Huang Y J. Microbiology Letters. 2005, 251: 5358.
- [2] Cai B, Andrew T. Tetrahedron Letters. 1999, 40: 14791482.
- [3] Schenk T. Analytical Biochemistry. 2003, 316: 118126.
- [4] 董群. 中国医药杂志, 1996, 9: 36~42.
- [5] Ashok P. Process Biochemistry. 2000, 35: 11531169.
- [6] 廖春燕, 郑裕国. 微生物学通报, 2005, 32(1): 99103.