

改组菌株 F3-7 发酵培养基的优化

吴 越(厦门大学附属第一医院药学部 厦门 361000)

摘要: 目的 为了进一步提高改组菌株 F3-7 中石杉碱甲的产量及保持菌株的稳定性。本研究通过优化高产改组菌株的发酵培养基,进一步提高菌株中石杉碱甲的含量,以期筛选到一株有望实现工业化生产的菌株。方法 采用单因素法和 4 因素 10 水平的均匀设计法优化改组菌株 F3-7 的发酵培养基,以期进一步提高菌株中石杉碱甲的产量。结果 与基础培养基相比石杉碱甲的含量提高了 172.2%,发酵液粗提物经中压液相色谱分离纯化,经核磁共振检测,发现该化合物为石杉碱甲,确定菌株 F3-7 的代谢产物中有石杉碱甲。结论 经过优化将菌株 F3-7 石杉碱甲的含量提高至 $373.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,且经核磁检测,确定菌株代谢产物中确实存在石杉碱甲。

关键词: 石杉碱甲;内生真菌;发酵培养基;均匀设计

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2019)-04-06013-0041-04

Optimization of Fermentation Medium of the Restructuring Strain F3-7

WU Yue(The First Affiliated Hospital of Xiamen University ,Faculty of Medicine ,Xiamen 361000 ,China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To further enhance the restructuring of strain F3-7 Huperzine production and maintain the stability of strain ,by optimizing the restructuring of high-yield strains fermentation medium ,the experimengts aim to further improve the content of Huperzine in the strain ,and get one strain suitable for industrial production. **METHODS** Experiments were arranged using the single factor 4 and factor 10 in uniform design optimization of fermentation medium F3-7 reorganization to further improve the strain huperzine production. **RESULTS** Compared with the basal medium ,the content of Huperzine increased 172.2%. Crude extract was separated and puried by medium pressure liquid chromatography ,tested by nuclear magnetic resonance. The experiments found the compound is Huperzine ,and determine the metabolites of strain F3-7 contain Huperzine. **CONCLUSION** The content of Huperzine in the optimized F3-7 strain increased to $373.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Tested by NMR detection ,the expriments determine the existence of strain metabolites Huperzine.

KEY WORDS: Huperzine; Endophytic fungi; Fermentation medium; Uniform design

石杉碱甲(huperzine A)是从药用植物蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb. Ex Murray) Trev.)中分离到的 1 种石松类倍半萜生物碱⁽¹⁾,具有高效、低毒、可逆性的乙酰胆碱酯酶抑制作用,成为治疗阿尔茨海默病最有效的药物之一⁽²⁾。近年来,对野生蛇足石杉的大规模采掘导致其野生资源趋于灭绝,使得石杉碱甲的药源成为很大的问题。为了进一步提高改组菌株 F3-7 中石杉碱甲的产量及保持菌株的稳定性,本研究通过在 PDB 培养基中添加不同量的 L-赖氨酸、吡啶乙酸、丙酮酸钠、乙酸,以确定各因素对菌株 F3-7 产石杉碱甲能力的影响,确定以上各因素的起始值与终止值,开展 4 因素 10 水平的均匀设计实验,实验结果采用偏最小二乘二次多项式回归分析(PLA)分析,拟合出各因素的最佳组合,开展验证实验,获得适合改组菌株 F3-7 的最优发酵培养基。

1 实验材料

1.1 供试菌株 产石杉碱甲内生真菌: F3-7(实验室保藏)

1.2 培养基 ①马铃薯液体培养基($\text{PDBg} \cdot \text{L}^{-1}$): 马铃薯 200,葡萄糖 20。②马铃薯培养基($\text{PDAg} \cdot \text{L}^{-1}$): 马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 15。所有培养基均在 121°C 高压蒸汽灭菌 20min。

1.3 主要试剂 L-赖氨酸、吡啶乙酸、丙酮酸钠,马铃薯(购于永辉超市),ODS-A(AA12S50 北京慧德易科技有限公司),HupA 标准品(纯度 > 98%,长沙中仁生物技术有限公司,批号: 2012120301),替硝唑对照品(纯度 > 99.9%,中国食品药品检定研究院,批号: 100336-200703)。

1.4 主要仪器 MJP-250 型霉菌培养箱(上海精宏实验设备有限公司),UPLC-MS/MS Waters(USA),恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司),生物安全柜(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司),AR223CN 千分之一天平(奥豪斯),中压液相色谱仪(苏州利穗科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 种子液培养 将保藏在固体斜面培养基的菌种接入已灭菌的 PDA 平板内,在 28°C 恒温培养箱倒置培养 5d,转接于含有 80mL PDB 培养基 250mL 摇瓶中,于 28°C 、 $140\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$

恒温摇床内培养 72h。

2.2 石杉碱甲提取物的制备及含量测定

2.2.1 石杉碱甲的提取: 将种子液以 8% 的接种量接于含有 80mL PDB 培养基 250mL 摇瓶中, 于 28℃、140r·min⁻¹ 恒温摇床内培养 10d, 加入 50mL 2% 酒石酸于培养 10 天的发酵液中、摇匀, 放置过夜, 于 50W 超声机内超声两次, 1 次 40min, 用布氏漏斗过滤菌株发酵液, 滤液加氨水调为 pH 9, 然后加入与滤液 2 倍体积的二氯甲烷, 使用分液漏斗萃取 3 次, 有机相浓缩至干, 用甲醇分 3 次(4mL、3mL、3mL) 加入圆底烧瓶中, 超声溶解, 取出吹干, 加入 0.2% 甲酸 100μL, 经 0.22μm 微孔滤膜过滤。

2.2.2 UPLC-MS/MS 测定石杉碱甲含量: 色谱条件: Waters UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1mm × 100mm, 1.7μm) 色谱柱; 流动相: 甲醇:0.2% 甲酸(50:50); 流速 0.15mL·min⁻¹; 进样量 5μL。

质谱条件: 离子源: 电喷雾电离源(ESI); 检测方式: 正离子检测; 采集方式: 多反应监测(MRM); CE: 3.0kV; cone: 35V; source temp: 110℃; cone temp: 350℃; nebulizer gas (N₂): 650L/h; cone gas: 50L/h; 监测离子对: Huperzine A (m/z 243.33 → m/z 209.98), 替硝唑(IS) (m/z 248.18 → m/z 120.96)。

将含有 0.5μg·mL⁻¹ 替硝唑的不同浓度(5、4、2、5、2、1、0.5 和 0.25μg·mL⁻¹) 石杉碱甲对照品溶液, 按照上述质谱条件分别进样, 横坐标为石杉碱甲浓度(c), 纵坐标为石杉碱甲与替硝唑峰面积比值(R), 得回归方程 R = 0.6032c - 0.0241 r = 0.9982。利用该回归方程计算菌株发酵液中石杉碱甲的含量^[8]。

2.3 L-赖氨酸考察 以 PDB 为基础培养基, 分别添加 L-赖氨酸 0.1g·L⁻¹、0.5g·L⁻¹、1g·L⁻¹、1.5g·L⁻¹、2g·L⁻¹; 种子液以 8% 的接种量接于含有不同浓度 L-赖氨酸的 PDB 培养基 80mL 中(250mL 摇瓶), 于 140r·min⁻¹、28℃ 恒温培养 10d。按照方法“2.2”测定发酵液中石杉碱甲的含量, 阴性对照为以基础培养基(PDB) 培养的发酵液。确定 L-赖氨酸影响石杉碱甲含量的起始值与终止值。

2.4 吡啶乙酸考察 吡啶乙酸为植物的促生长剂, 本研究以 PDB 为基础培养基, 分别添加吡啶乙酸(g·L⁻¹) 0.005、0.01、0.05、0.1 种子液以 8% 的接种量接于含有不同浓度吡啶乙酸的 PDB 培养基 80mL 中(250mL 摇瓶), 于 140r·min⁻¹ 28℃ 恒温培养, d4 ~ 10 的发酵液按照方法“2.2”测定其中石杉碱甲含量, 考察添加吡啶乙酸是否能缩短菌株的发酵周期。

2.5 丙酮酸、乙酸考察 以 PDB 为基础培养基, 分别添加丙酮酸钠(g·L⁻¹) 1、5、10、15、18 及乙酸(mL·L⁻¹) 1、2、5、10、15; 种子液以 8% 的接种量接于含有不同浓度丙酮酸或乙酸的 PDB 培养基 80mL 中(250mL 摇瓶), 于 140r·min⁻¹ 28℃ 恒温培养 10d, 按“2.2”项下方法测定发酵液中石杉碱甲含量, 阴性对照为以基础培养基(PDB) 培养的发酵液。确定丙酮酸钠及乙酸影响石杉碱甲含量的起始值与终止值。

2.6 均匀设计 通过单因素考察确定 L-赖氨酸、吡啶乙酸、丙酮酸钠、乙酸影响菌株石杉碱甲含量的起始值及终止值, 使

用软件 DPS(14.5) 设计 4 因素 10 水平(U₄(10⁴)) 的均匀设计实验方案(见表 1), 开展均匀设计实验, 每个水平平行发酵三个摇瓶, 以菌株产石杉碱甲的含量为考察指标, 利用 PLA 对均匀设计实验结果进行统计分析, 将分析得出的最优实验组合进行实验验证, 优化出适合改组菌株 F3-7 的最优发酵培养基。

表 1 (U₄(10⁴)) 的均匀设计实验方案

因子	x ₁ (g·L ⁻¹)	x ₂ (g·L ⁻¹)	x ₃ (g·L ⁻¹)	x ₄ (mL·L ⁻¹)
N ₁	0.1	0.06	16	6.4
N ₂	0.8	0.02	17	8.2
N ₃	0.5	0.08	18	3.8
N ₄	0.4	0.01	13.5	5.6
N ₅	0.3	0.09	14	9.1
N ₆	0.2	0.03	11	2.9
N ₇	0.6	0.04	12	10
N ₈	1	0.05	15	2
N ₉	0.7	0.1	13	4.7
N ₁₀	0.9	0.07	10	7.3

注: x₁、x₂、x₃、x₄ 分别为 L-赖氨酸、吡啶乙酸、丙酮酸钠、乙酸

2.7 中压液相色谱分离纯化石杉碱甲 以优化后的培养基为发酵液培养基, 种子液以 8% 的接种量接于优化后的培养基 1000mL 中(5000mL 摇瓶), 发酵 12L, 于 140r·min⁻¹ 28℃ 恒温培养 10d, 按“2.2”项下方法处理发酵液得发酵液粗提物。

2.8 薄层层析(TLC)检测 中压液相色谱分离纯化收集到的馏分经 TLC 检测^[9], 用 GF254 的硅胶板, 二氯甲烷: 甲醇(9:1) 作为样品 TLC 展开剂。

2.8.1 点样: 用点样毛细管吸取约 0.5μL 样品点加到距 1cm 的薄层板一端, 点样后可用电风吹点样原点, 使溶剂迅速挥发, 同时样点间距离应保持 0.5cm 以上, 重复点几次。

2.8.2 展开: 将已放置干的薄层板置于展开液中, 使层析板下缘浸入展开液的深度约为 5mm。全部展开过程在密闭玻璃展开室中进行, 在放入层析板前, 先把展开液倒入展开室内, 使展开室内空间以展开液蒸汽预先饱和 20min 以上。整个展开过程在室温下进行。吹干后在 254nm 下荧光检测, 与石杉碱甲标准品的斑点位置比对。

2.9 核磁共振分析 将 TLC 薄层分析检测样品与石杉碱甲标准品斑点位置一样的馏分合并重结晶得到的粉末用氘代氯仿溶解, 经核磁共振检测, 与标准品的核磁图谱进行比对。

3 结果与分析

3.1 L-赖氨酸考察 本研究在 PDB 培养基中添加不同量的 L-赖氨酸考察其对菌株 F3-7 代谢产物中石杉碱甲的含量的影响^[10], 由图 1 可知, L-赖氨酸添加量为 0.1 ~ 1g·L⁻¹ 时菌株中石杉碱甲的含量高于 PDB 培养基中菌株石杉碱甲的含量, 当 L-赖氨酸添加量大于 1g·L⁻¹ 时菌株中石杉碱甲的含量下降。确定 L-赖氨酸影响菌株中石杉碱甲含量的最适添加量为 0.1 ~ 1g·L⁻¹。

3.2 吡啶乙酸考察 本研究通过在 PDB 培养基中添加不同量的吡啶乙酸考察其对菌株中石杉碱甲含量的影响,由图 2 可知,菌株中石杉碱甲的含量随着吡啶乙酸的增加而增大且明显高于基础培养基中石杉碱甲的含量,当吡啶乙酸的添加量大于 $0.15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌株中石杉碱甲的含量下降,通过考察不同发酵时间菌株中石杉碱甲的含量,发现 d8 时菌株中石杉碱甲的含量达到最大,缩短了菌株 F3-7 的发酵周期,提高了发酵效率,确定吡啶乙酸影响石杉碱甲含量的最适浓度为 $0.01\sim 0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,菌株 F3-7 的发酵周期由 10d 缩短至 8d。

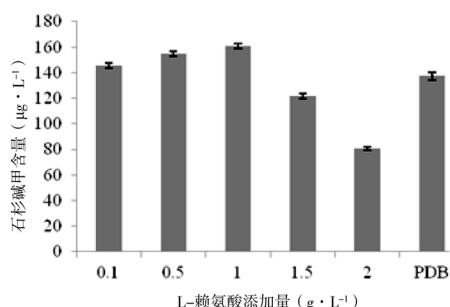


图 1 L-赖氨酸对菌株 F3-7 中石杉碱甲含量的影响

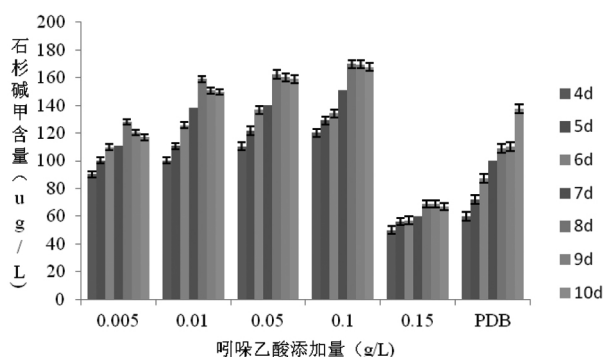


图 2 吡啶乙酸对菌株 F3-7 中石杉碱甲含量及发酵周期的影响

3.3 丙酮酸钠、乙酸考察 本研究在 PDB 培养基中添加不同量的丙酮酸钠、乙酸考察其对菌株中石杉碱甲含量的影响,由图 3 (a) 可知当丙酮酸钠的添加量为 $10\sim 18\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时菌株中石杉碱甲的含量明显高于基础培养基中的菌株石杉碱甲的含量,大于 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或小于 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 石杉碱甲含量均比 PDB 培养基中的含量低,确定丙酮酸钠影响菌株中石杉碱甲含量的最适添加量为 $10\sim 18\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

由图 3 (b) 可知乙酸的添加量为 $2\sim 10\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时菌株中石杉碱甲的含量明显高于 PDB 培养基中菌株的含量,乙酸的添加量大于 $10\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时菌株中石杉碱甲含量无明显变化。因此确定乙酸影响菌株中石杉碱甲含量的最适添加量为 $2\sim 10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.4 均匀设计 单因素考察确定 L-赖氨酸、吡啶乙酸、丙酮酸钠、乙酸影响菌株石杉碱甲含量的极大值及极小值,通过 DPS (14.5) 设计均匀设计表,该均匀设计表的中心化偏差 $CD=0.2226$,每个水平平行发酵三个摇瓶,石杉碱甲的含量为指标,采用 PLA 对均匀设计实验结果进行统计分析,获得回归

方程:

$$Y = 922.959355 - 84.70543674x_3 - 129.25004081x_4 + 324.3135920x_1^2 + 1.8871970929x_3^2 + 0.4972914812x_4^2 - 2853.3268704x_1x_2 + 11.994619970x_1x_3 + 8.635029560x_3x_4。$$

此回归方程相关系数 $R=0.999$,该方程可信度较高,安排验证试验(见表 2)。该回归方程拟合后菌株 F3-7 的发酵培养基为:马铃薯 $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、L-赖氨酸 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、吡啶乙酸 $0.01\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、丙酮酸钠 $18\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乙酸 $9.95\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$,回归方程预测菌株 F3-7 发酵液中石杉碱甲含量的理论最大值为 $396.8\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在该模型最佳点处进行了发酵验证,菌株 F3-7 发酵液中石杉碱甲含量的平均值为 $373.7\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (见表 2)与基础培养基相比石杉碱甲的含量提高了 172.2%。实验值与模型计算值相差 5.8%,实测值与预测值之间无显著差异,表明 DPS 软件寻求 L-赖氨酸、吡啶乙酸、丙酮酸钠、乙酸的最佳浓度是可行的,而且二次数学模型与实际情况拟合较好,即该数学模型是有效的。

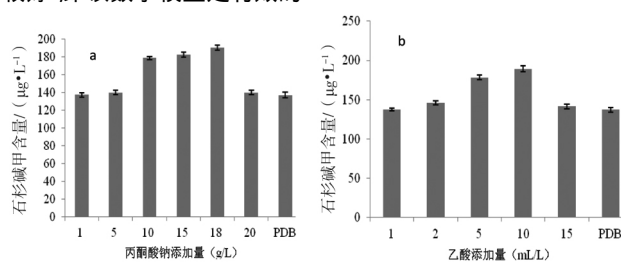


图 3 (a) 丙酮酸钠对菌株 F3-7 中石杉碱甲含量的影响, (b) 乙酸对菌株 F3-7 中石杉碱甲含量的影响

表 2 优化的最优组合菌株 F3-7 发酵液中石杉碱甲含量的预期值和实测值

回归方程	优化推论值 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)				石杉碱甲含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	x_1	x_2	x_3	x_4	预测值	实测值
PLA	1	0.01	18	9.95	396.8	373.7

注: PLA(偏最小二乘二次多项式回归分析) x_1 (L-赖氨酸) x_2 (吡啶乙酸) x_3 (丙酮酸钠) x_4 (乙酸)

3.5 中压液相色谱分离纯化石杉碱甲 发酵液浓缩后以 1:2 的体积与 ODS 拌样,干法上样(填料,ODS-A,流动相: 甲醇-0.2% 甲酸水) 进行梯度洗脱,洗脱比例分别为甲醇:0.2% 甲酸水(1:19 2:23 3:17 1:3 纯甲醇),每 25mL 接一个馏分,收集到的馏分经旋转蒸发仪浓缩后经 TLC 薄层分析,将在薄层板上斑点相似的馏分合并。

3.6 薄层层析(TLC) 将中压液相色谱收集的馏分浓缩后经 TLC 薄层分析,并与石杉碱甲标准品比对,由图 4C 为流动相比例为 2:23 时收集的馏分,与石杉碱甲标准品的斑点位置一致,将该比例收集到的馏分合并。

3.7 核磁共振分析 将 TLC 薄层分析检测样品与石杉碱甲标准品斑点位置一样的馏分合并重结晶得到的粉末经核磁共振检测。如图 4A、B 所示,将石杉碱甲的 NMR 谱图与菌株 F3-7 发酵液的图谱进行对比,可知样品在石杉碱甲标准品各主要官能团化学位移位置均有相应官能团的存在,进一步确定菌株代谢产物中含有石杉碱甲。

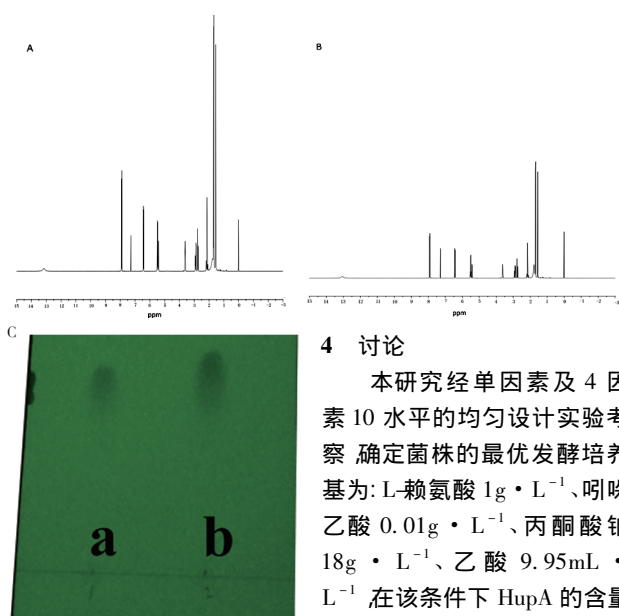


图4 A 石杉碱甲标准品 NMR 谱图 ,B 菌株 F3-7 代谢产物 NMR 谱图 , C 薄层层析图: a 石杉碱甲标准品 b 中压液相色谱收集的馏分

核磁共振检测,发现该化合物中含有石杉碱甲。确定菌株 F3-7 的代谢物含有石杉碱甲。

4 讨论

本研究经单因素及 4 因素 10 水平的均匀设计实验考察,确定菌株的最优发酵培养基为: L-赖氨酸 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、吡啶乙酸 $0.01\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、丙酮酸钠 $18\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、乙酸 $9.95\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 在该条件下 HupA 的含量由 $137.36\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高至 $373.7\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,与基础培养基相比石杉碱甲的含量提高了 172.2%。以优化后的发酵培养基发酵 12L,发酵液粗提物经中压液相色谱分离纯化,经

传统发酵培养基的优化方法如正交实验设计、响应面设计等,试验次数多,工作量大,优化结果不理想⁽³⁾,数据的分析常选用 SAS、SPSS 等专业统计分析软件,这些软件的使用理论性强,非汉化操作难度较大。DPS 是一款兼具试验设计和统计分析的国产统计软件,采用中文平台,操作简便并易于掌握^(4,5)。苏国成⁽⁶⁾等人利用 DPS(Data Processing System) 软件设计均匀设计表开展对 L-赖氨酸高产菌的发酵条件进行优化组合,使菌株产量提高了 20.6%。本实验基于均匀设计⁽⁷⁾和偏最小二乘二次多项式回归分析优化菌株 F3-7 的发酵培养基,仅 2 轮共 33 次试验,高效筛选得一满意组合。

参考文献

- (1) 郑书岩, 郝春辉, 沈征武. 石杉碱甲的合成研究进展 (J). 有机化学 2013, 11: 2261-2270.
- (2) Rafii MS, Walsh S, Little JT, et al. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease (J). Neurology, 2011, 76(16): 1389-1394.
- (3) Zhuang YP, Chen B, Chu J et al. Medium optimization for meilingmycin production by Streptomyces nanchangensis using response surface methodology (J). Process Biochem 2006 41(2): 405-409.
- (4) 甘桂兰, 程新, 李昆太. DPS 数据处理软件在发酵培养基优化中的应用 (J). 中国酿造 2008 21: 69-71.
- (5) 朱海涛, 陈黎, 涂自良, 等. DPS 数据处理系统在药学研究数据处理中的应用 (J). 医药导报 2006 04: 363-365.
- (6) 赵新燕. 制备型液相色谱法分离千层塔中石杉碱甲 (J). 机电信息 2011 29614: 1-3.
- (7) 张国秋, 王文璇. 均匀试验设计方法应用综述 (J). 数理统计与管理 2013, 18301: 89-99.

NTG 诱变选育普伐他汀高产菌株

熊志, 陈继敏, 谭伟 (广东蓝宝制药有限公司 清远 511515)

摘要: 目的 诱变选育普伐他汀高产菌株。方法 采用化学诱变剂亚硝基胍 (NTG) 对出发菌进行诱变处理,以固体培养基初筛、摇瓶培养复筛获得突变株,再对突变株进行遗传稳定性的测定。结果 适宜的 NTG 诱变剂量为浓度 $0.4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、处理时间 30min,获得了一株遗传性状稳定、高产普伐他汀的突变菌株 PN-87,其普伐他汀产率较出发菌株提高 47%。结论 采用亚硝基胍可以诱变选育获得普伐他汀高产菌株。

关键词: 普伐他汀; 亚硝基胍; 诱变选育

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2019)-04-05109-0044-03

Screening of High-producing Strains of Pravastatin by NTG Mutation

XIONG Zhi, CHEN Ji-min, TAN Wei (Guangdong Blue Treasure Pharmaceutical Co., Ltd, Qingyuan 511515, China)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To screen out highly-productive strains of Pravastatin by mutation. **METHODS** The original strain was treated using chemical mutagens-nitroguanidine (NTG), and then screened by solid medium and

作者简介: 熊志, 职称: 制药工程师。联系电话: 0763-3865290, E-mail: xiongz5290@gdbtp.com