View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

产胞外布雷菲德菌素 A青霉发酵条件的研究

刘万云[1] 方美娟[1] 许鹏翔[1*] 黄耀坚[3] 赵玉芬[1,2*]

(厦门大学化学化工学院化学系 福建省化学生物学重点实验室 厦门 361005)[1]
(清华大学生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室 北京 100084)[2]
(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)[3]

摘要: 通过正交设计试验, 优化了青霉 (*Penicillium*) 属真菌 SHZK-15产胞外布雷菲德菌素 (Brefeldin-A, 简称 BFA) 的液体发酵条件。最佳的 BFA 发酵条件为: 培养基含马铃薯 200g (煮汁), 葡萄糖 20g $(NH_4)_2SO_4$ 4.0g KH_2PO_4 1.0g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0g $CaCO_3$ 5.0g pH 自然, 瓶装量为 100mL/250mL, 培养温度为 28℃, 转速为 120r/min, 培养时间为 7d BFA 的最高产量可达 151.6mg/L。

关键词: 布雷菲德菌素, 青霉, 发酵, 正交试验
中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2005) 06-0052-06

An Orthogonal Experiment in the Brefeldin a Fermentation of *Penicillium*

LIU Wan-Yun[1] FANG Mei-Juan[1] XU Peng-Xiang[1*] HUANG Yao-Jian[3] ZHAO Yu-Fen[1,2*]

(Department of Chemistry and The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)[1]
(The key laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry, Ministry of Education, Department of Chemistry School of Life Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)[2]
(School of life science, Xiamen University, Xiamen 361005)[3]

Abstact Through orthogonal experiment, the optimal conditions were given for producing extracellular BFA of *Penicillium*. Its optimal conditions were as follows (g/L): potato 200, glucose 20, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0, KH_2PO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, $CaCO_3$ 5.0, the pH was natural, culture medium volume 100mL/250mL, culture temperature 28℃, revolutions 120r/min and culture time 7 days The biggest production of BFA was 151.6mg/L.

Key words Brefeldin-A, *Penicillium*, Fermentation, Orthogonal experiment

布雷菲德菌素 A (Brefeldin A, 简称 BFA), 是一种大环内酯类抗生素, 1958年分离自 *Penicillium brefeldianum*。它具有多种生物活性, 如抗真菌[1], 抗病毒[2], 抗肿瘤[1,2], 抗线虫[3]等。BFA 的主要功能是能诱导高尔基体的分解, 抑制蛋白从内质网 (ER) 中转移为高尔基体的复合物 (小分子 BFA 能非竞争性的抑制蛋白), 目前被作为一种重要的分子工具而广泛应用于哺乳动物信号传导途径的研究[4]。最近, 国际肿瘤协会在抗肿瘤体外筛选中发现 BFA 作为血疗法试剂有很大的应用前景[5]。鉴于 BFA 具有多种生物活性及潜在的药用价值[6], 故开发和研究布雷菲德菌素的工作已受到人们的广泛重视, 是目前国际上抗癌药物研究的一个热点。国外在 BFA 的生物活性方面做了大量工作, 但是国内对该化合物的研究甚少, 特别在微生物发酵生产 BFA 方面尚属空白。本文采用正交试验对青霉 (*Penicillium*) 属真菌 SHZK-15液体发酵产生布雷

* 通讯作者 Tel 0592-2185780, E-mail xpengxiang@sina.com.cn
收稿日期: 2005-03-08, 修回日期: 2005-06-21

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnk

菲▒▒菌素 A的培养条件进行了研究，并对多个因素进行优化处理，确定了最佳培养基和发酵条件，为布雷菲▒▒菌素 A的研制提供了科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株：菌株 SHZK－15为青霉（*Penicillium*）属真菌，分离自福建沙溪土壤，并经初步鉴定和命名，为本实验室所保藏菌种。

1.1.2 培养基：固体培养基：PDA斜面培养用于菌种保藏。液体培养基：不同温度试验的培养基为 PDA培养基：马铃薯（煮汁）200g 葡萄糖 20.0g pH自然。正交试验培养基：马铃薯（煮汁）其他成分采用本文优化后条件，pH自然。

1.1.3 主要试剂：甲醇（色谱纯 Sigma），三蒸水。主要仪器：Agilent 1100高效液相色谱仪，Varian Prostar 210高效液相色谱仪，Bruker Esquire 3000 Plus离子阱质谱仪。

1.2 方法

1.2.1 发酵方法：采用摇瓶发酵法，在 250mL三角瓶中加入 100mL的培养液，并接种一定量的菌丝块，置于往复式恒温水浴振荡器中培养（28℃，120r/min）7d。

1.2.2 布雷菲▒▒菌素 A的鉴定和测定方法：按方美娟等[7]报道的方法，用 HPLC-MS/MS联用技术对样品进行 BFA的鉴定，再用 HPLC内标工作曲线法定量分析样品中的 BFA含量。

1.2.3 工作曲线的制定：配制不同浓度的 BFA标样溶液，在 HPLC上分别测定它们的峰面积，绘制内标工作曲线（图 1）。

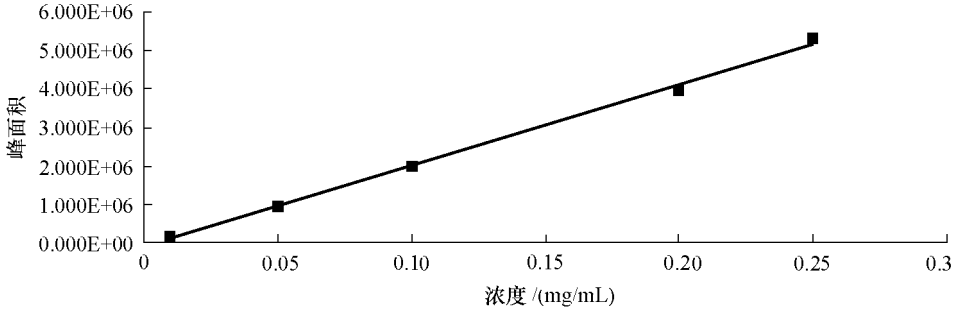

图 1　BFA标样的工作曲线

$y = 2E+07x - 106997$，$R^2 = 0.9968$

1.2.4 色谱分离条件：色谱柱：Rascil C18反相柱（250mm × 4.6mm）；流动相为：70%甲醇和 30%的水，流速 0.6mL/min，进样量为 5μL，柱后流出物依次经 UV和 MSD检测。UV检测波长为 230nm，经 UV检测器流出的流份进入电喷雾离子化（ESI）喷雾室。

1.2.5 质谱检测参数：m/z扫描范围 50.00～800.00，干燥气温度 320℃，干燥气流速 15.0L/min，雾化气压力 40Pa，电喷雾电压 4,000V，离子化方式：ESI，质谱扫描间隔 0.20 Da。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk

2 结果与讨论

2.1 预备试验

2.1.1 温度的选择：温度会影响布雷菲德菌素 A 的产量，为便于分析比较不同温度对布雷菲德菌素 A 的产量的影响程度，固定 PDA 培养基为液体发酵培养基，在不同温度下振荡培养 (120 r/min) 7d，测定布雷菲德菌素 A 的产量，结果见表 1。

表 1 发酵温度对青霉 (*Penicillium*) 属真菌 SHZK-15产胞外布雷菲德菌素 A 的影响

温度	22℃	24℃	26℃	28℃	30℃	32℃	34℃
BFA 产量 (mg/L)	95.7	106.4	111.5	116.3	84.2	51.5	7.9

从表 1可以看出，发酵温度对布雷菲德菌素 A 的产量影响较大，其中以 28℃时产量最高，为发酵培养的最佳温度。本实验中以 28℃作为正交试验的固定温度。

2.1.2 因素水平的确定：根据其它一些预备试验，选定 7 个重要影响因素，设计一个 7因素 3水平的正交试验 (见表 2)。

表 2 7因素 3水平表

水平	A 碳源 (%)	B 氮源 (%)	C $CaCO_3$ (%)	D $MgSO_4$ + $ZnSO_4$ (%)	E 通气量 (mL)	F KH_2PO_4 (%)	G 发酵天数 (d)
1	葡萄糖 2.0	NH_4Cl 0.4	0	0.2 + 0	50	0	5
2	乳糖 2.0	$(NH_4)_2SO_4$ 0.4	0.25	0.1 + 0.1	100	0.1	6
3	麦芽糖 2.0	NH_4NO_3 0.4	0.50	0 + 0.2	150	0.2	7

2.2 样品的 HPLC测试结果分析

用 HPLC对样品进行定性分析，发现在相同的条件下样品的 HPLC色谱图 (图 2) 中的 BFA 的保留时间和标样 BFA 色谱图的保留时间一致 (均为 8.45min)，重现性好。根据液相色谱图中 BFA标准品的峰位和峰的保留时间以及被测样品内、外标吸收峰的

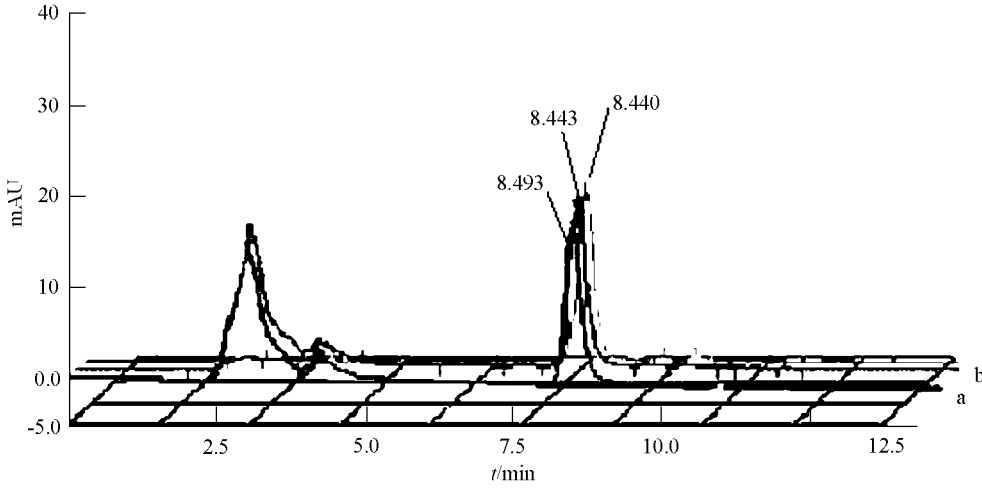

图 2 HPLC内标法测定 SHZK-15的发酵液

a 2.5μL BFA + 2.5μL PDA-26样品 HPLC色谱图，b 5μL PDA-26样品的 HPLC色谱图，c 5μL BFA (0.10mg/mL) 标样 HPLC色谱图

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnk

增减和叠合情况，说明样品中保留时间为 8.45min的峰位可能是 BFA。

2.3 样品 **TIC**总离子流图和质谱图分析

图 3为 TIC总离子流图，相对于色谱图，总离子流的质谱图更能给出混合样品中物质的信息。不同于色谱只能依靠 230nm下的吸收峰判断是否有物质流出，总离子流的质谱图可以根据不同时间的总离子强度变化来判断是否有物质流出，总离子流质谱图给出的信息更全面。根据 TIC 总离子图可以获得菌株发酵产物中可能存在的几种主要物质。实验发现，在相同分析条件下，取 BFA 保留时间作分析时，样品和 BFA 标样具有同样的质谱图。图 4是样品 (lwy-10-02) 在采用 HPLC-MS联用技术时，保留时间 t_R = 10.0min时的质谱图，图中显示了 BFA 的几种准分子离子峰 280.7 $[M+H]^+$，298.2 $[M+NH_4]^+$，319.1 $[M+K]^+$) 和自身二聚的特征离子峰 560.7 $[2M+H]^+$，582.4 $[2M+Na]^+$，598.6 $[2M+K]^+$)，并且在 10.0min时只发现了 BFA。为了进一步探讨 280.7的正离子峰为 BFA，实验中对该目标离子峰进行了 CID-MS/MS谱的测定，发现与 BFA 标样的 CID-MS/MS谱完全一致。综合上述结果，可以判定样品在保留时间 8.45min所出的是 BFA 的峰，因此，可以运用 HPLC内标工作曲线法定量测试样

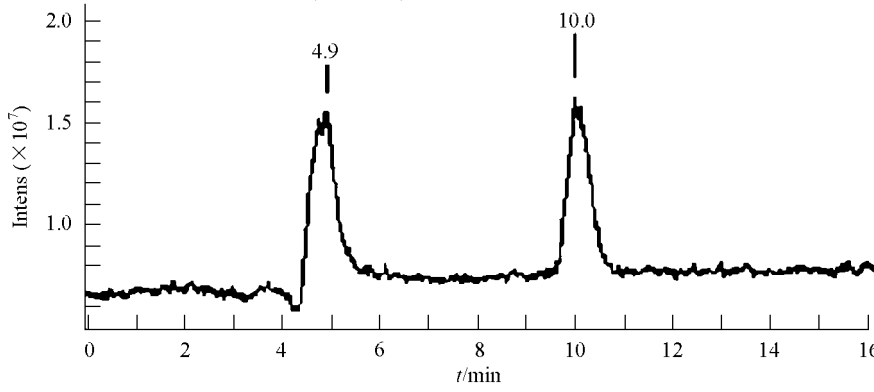

图 3 样品 (lwy-10-02) 的 TIC总离子流图

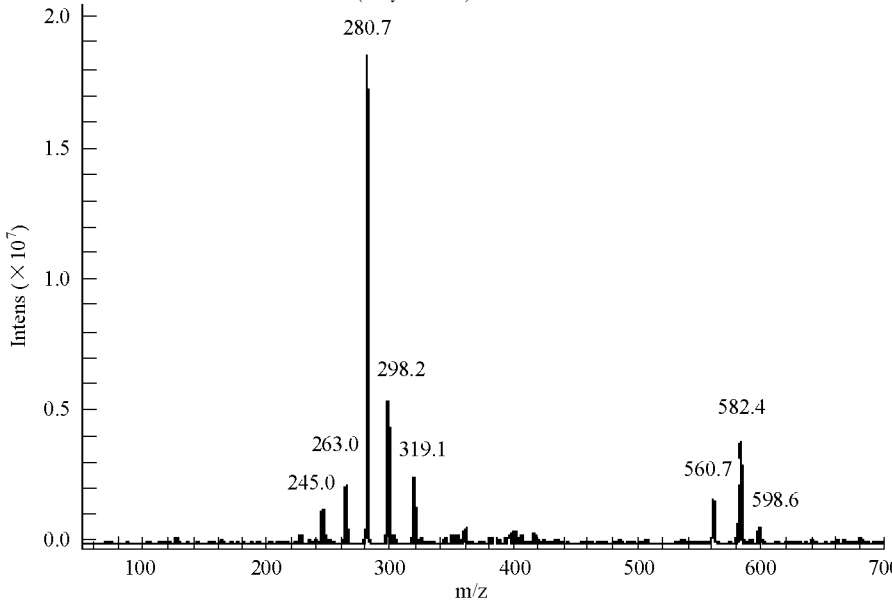

图 4 样品 (lwy-10-02) 在保留时间 t_R = 10.0min时的质谱图

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk

品中的布雷菲霉菌素 A 含量。

2.4 实验结果分析

影响产布雷菲霉菌素 A 能力的因素分析: 由正交试验结果 (表 3) 的极差 R 值可以看出, 影响青霉产胞外布雷菲霉菌素 A 产量的 7种因素的主次顺序为 C > G > A > E> B > D> F, 其中, 因素 C即 $CaCO_3$含量的影响最大。在不加 $CaCO_3$情况下, 产量很低, 说明霉 SHZK-15发酵过程中产生大量酸性物质, 且在酸性环境下产 BFA 的能力急剧下降。其次是因素 G, 由图 5可以看出, 随着时间的延长, BFA 产量不断增加, 但增加的趋势越来越小, 在 7d时才达到最大值。因素 A, 即碳源的影响也较明显, 在本试验条件下, 葡萄糖是产 BFA的最佳碳源。通氧量对 BFA 产量的影响也比较明显, 从表 3中可以看出, 在 250mL的三角瓶中装入 100mL培养基时产量最高。实验发现, 培养基中添加 0.4% 的氮源可能偏高, 含氮量越高, BFA 的产量越低, 且加入 $(NH_4)_2SO_4$ 最好。培养基中添加 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.1% KH_2PO_4, 对 BFA 的产量影响不大, 不过可以适当提高 BFA的产量。

表 **3** **7**因素 **3**水平正交试验结果

实验序号	列号							BFA 产量 (mg/L)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	14.83
2	1	2	2	2	2	2	2	115.20
3	1	3	3	3	3	3	3	95.89
4	2	1	1	3	2	3	2	21.04
5	2	2	2	1	3	1	3	82.82
6	2	3	3	2	1	2	1	33.43
7	3	1	2	3	3	2	1	65.90
8	3	2	3	1	1	3	2	97.17
9	3	3	1	2	2	1	3	30.51
10	1	1	3	1	2	2	3	146.70
11	1	2	1	2	3	3	1	13.97
12	1	3	2	3	1	1	2	92.36
13	2	1	2	2	1	3	3	70.32
14	2	2	3	3	2	1	1	78.52
15	2	3	1	1	3	2	2	16.14
16	3	1	3	2	3	1	2	71.93
17	3	2	1	3	1	2	3	15.54
18	3	3	2	1	2	3	1	43.85
K1	478.9	390.7	112.0	401.4	323.7	371.0	250.5	Σ = 1106.12
K2	302.3	403.2	470.5	335.4	435.8	392.5	413.8	
K3	324.9	312.2	523.6	369.3	346.6	342.2	441.8	
k1	79.82	65.12	18.67	66.90	53.95	61.83	41.75	
k2	50.38	67.20	78.42	55.90	72.63	65.42	68.97	
k3	54.19	52.03	87.27	61.55	57.77	57.03	73.63	
R	29.44	15.17	68.60	11.00	18.68	8.39	31.88	

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnk

2.5 培养条件的优化处理

由表 3可知，$A_1B_2C_3D_1E_2F_2G_3$为优势组合，在 18次试验中，10号试验 $A_1B_1C_3D_1E_2F_2G_3$产 BFA的能力最强，产量高达 146.7mg/L，与优势组合基本吻合。从各列因素各位级相应的 K值来看，通过趋势图 (图 5) 分析：可以得知 A、B、D、E、F均已取得最佳值，C和 G似乎任有潜力可挖。按照优势组合进行试验，测得其 BFA的产量为 151.6mg/L，进一步验证了优势组合。综合考虑培养基成本与产 BFA能力提高程度等诸多因素，最终确定搭配为：$A_1B_2C_3D_1E_2F_2G_3$。因此，最佳的 BFA发酵条件为：培养基含马铃薯 200g (煮汁)，葡萄糖 20g，$(NH_4)_2SO_4$ 4.0g，KH_2PO_4 1.0g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0g，$CaCO_3$ 5.0g，pH自然，瓶装量为 100mL/250mL，培养温度为 28℃，转速为 120r/min，培养时间为 7d，BFA的最高产量可达 151.6mg/L。

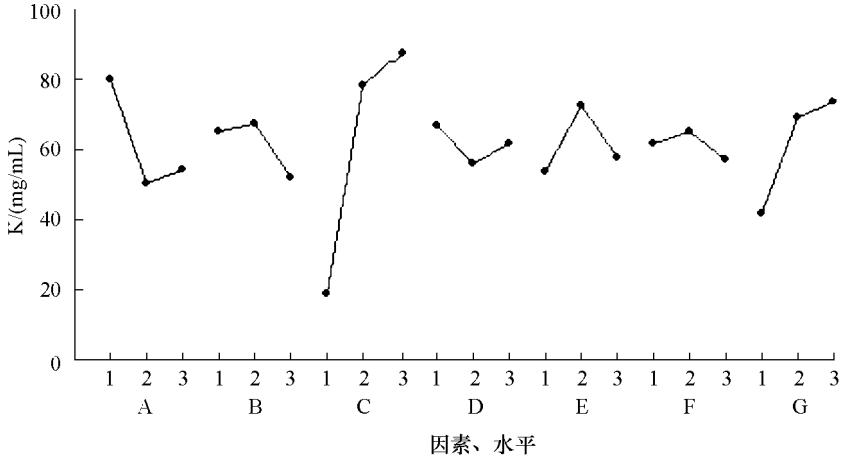

图 5 因素、水平与 k值的关系 (趋势图)

实验同时对胞内样品也进行了检测，发现胞内也有少量的 BFA产生，估计此菌株产 BFA的总量至少可以达到 160mg/L以上。并且从该菌株发酵液的 HPLC图谱和 TIC总离子图上也可以看出，发酵产物大部分是 BFA，非常容易从发酵液中分离提纯出来。该菌株产 BFA的能力很强，又因为 BFA具有多种生物活性，拥有很大的潜在药用价值，是目前国际上抗癌药物研究的一个热点，因此，获得大量的高品质 BFA是至关重要的。本菌株具有广阔的应用价值和开发前景，并且发酵所用的原料价格低廉易得，条件简单，必将为 BFA的研究带来无可估量的推进作用。

参 考 文 献

[1] Phillips L R, Wolf T L. J Pharm Biomed Anal, 1998, **16**: 1301~1309.
[2] Kazuhiro O, Robert JM, Dennis R V, *et al*. Biophysica Acta, 2001, **1531**: 222~229.
[3] Bacikova D, Betina V P. Antinematode Activity of the Antibiotic Cyancin. Naturwissenschaften, 1964, **51**: 445.
[4] Takuya F, Akiko F, Kiyotaka H, *et al*. FEBS Letters, 1998, **435**: 237~240.
[5] Sausville E A, Duncan K L K. Cancer J Sci Amer, 1996, **2**: 52~58.
[6] Demain A L, Hunt N A, Malik V, *et al*. Microbiology, 1976, **31**: 38~40.
[7] 方美娟，王建锋，赵玉芬，等. 分析测试快报，2205, **24** (1): 21~24.
[8] 刘月英，潘丽娉，何国荣，等. 微生物学通报，1999, **26** (3): 195~198.
[9] 林文楚，叶 晴，乔春红，等. 微生物学通报，2002, **29** (4): 34~41.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnk