

赵赟鑫, 张 欢, 邓百万, 等. 红豆杉内生真菌产紫杉醇的培养基优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 389–392.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.138

红豆杉内生真菌产紫杉醇的培养基优化

赵赟鑫¹, 张 欢², 邓百万^{3,4}, 谢海彬¹

(1. 汉中植物研究所, 陕西汉中 723000; 2. 陕西省汉中市环境监测中心站, 陕西汉中 723000;

3. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西汉中 723000; 4. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000)

摘要:以红豆杉内生真菌发酵的紫杉醇产量为指标, 利用 HPLC 法进行检测, 筛选确定了发酵产紫杉醇的最佳碳源是葡萄糖, 最佳氮源是硝酸铵。在单因素试验的基础上, 进一步采用 $L_9(3^3)$ 正交试验优化培养基, 培养基最佳组合为 $A_1B_2C_1$, 即葡萄糖 50.0 g/L、硝酸铵 6.0 g/L、无水硫酸镁 0.3 g/L, 从而获得最佳发酵培养基组成: 葡萄糖 50.0 g/L、 NH_4NO_3 6.0 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、无水 $MgSO_4$ 0.3 g/L、维生素 B_1 0.05 g/L, 其紫杉醇平均含量达到 938.6 μ g/L。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 内生真菌; 培养基; 优化

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0389-04

红豆杉通常为红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 (*Taxus* L.) 植物的总称, 全世界有 11 种, 分布于北半球的温带至热带地区^[1]。中国有 4 种 1 变种, 即红豆杉 (*T. chinensis* Rehd.)、东北红豆杉 (*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.)、西藏红豆杉 (*T. wall-ichiana* Zucc.)、云南红豆杉 (*T. yunnanensis* Chang et L. K. Fu)、南方红豆杉 (*T. chinensis* var. *mairei* Chang et L. K. Fu)^[2]。自从美国化学家 Wani 等首次从太平洋紫杉 (短叶红豆杉 *T. brevifolia* Nutt.) 中分离出紫杉醇 (taxol) 并于 1971 年将其化学结构发表^[3], Schiff 等证实紫杉醇具有独特的抗癌机制^[4], 20 世纪 80 年代美国和欧洲的科学家相继揭示出紫杉醇的抗癌疗效^[5]。1993 年, 美国蒙大拿州大学植物病理系的 Stierle 博士等从短叶红豆杉 (*T. brevifolia* Nutt.) 的韧皮部中分离得到 1 种能够产生紫杉醇的内生真菌安德鲁紫杉菌 (*Taxomyces andreanae*)^[6]。

近些年来, 红豆杉产紫杉醇的研究进展很快, 国内外学者利用内生真菌产紫杉醇的研究报道逐渐增多, 其关键问题在于紫杉醇产生菌的分离和发酵液中紫杉醇产量的提高, 要通过内生真菌发酵产紫杉醇达到工业化生产至少是毫克级, 但目前采用该方法的普遍产量只有几百微克, 主要是因为缺乏高产、稳定的适于发酵的工业菌株, 以及发酵条件的不合理而限制了单位发酵液中紫杉醇的含量。

培养基是人工配制的提供微生物生长、代谢、繁殖和合成人们所需目的产物的营养物质原料, 同时, 培养基也为微生物提供了营养物质以外的其他生长所必需的环境条件。培养基的组成和配比是否恰当对微生物的生长、产物的形成、产品的产量和质量都有很大的影响。笔者采用课题组自行分离的紫杉醇高产菌株 *Metarhizium anisopliae* LB-10^[7], 对其培养基组成和配比进行研究, 优化碳源、氮源、微量元素的组成、浓度

及其配比, 以为工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10, 为分离自陕西省留坝县野生红豆杉的高产紫杉醇内生真菌。

1.1.2 培养基 斜面培养基: PDA 培养基; 种子培养基: PDB 培养基, 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20.0 g, 水 1.0 L, pH 值 6.0~8.0; 初始发酵液: 葡萄糖 80.0 g/L, NH_4NO_3 8.0 g/L, 无水 KH_2PO_4 0.5 g/L, 无水 $MgSO_4$ 0.5 g/L, 维生素 B_1 0.05 g/L; 无碳配方发酵液: NH_4NO_3 8.0 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $ZnSO_4$ 1.0 mg/L, 维生素 B_1 0.05 g/L; 无氮配方发酵液: 葡萄糖 80.0 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $ZnSO_4$ 1.0 mg/L, 维生素 B_1 0.05 g/L; 优化后发酵液: 葡萄糖 50.0 g/L, NH_4NO_3 6.0 g/L, 无水 $MgSO_4$ 0.3 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, 维生素 B_1 0.05 g/L。

1.1.3 药品与试剂 紫杉醇标准品 ($\geq 98\%$), 乙酸乙酯, 甲醇, 葡萄糖, 蔗糖, 淀粉, 麦芽糖, NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, 蛋白胨, 酒石酸铵, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。

1.1.4 主要仪器 高效液相色谱仪 (LC 2000), 旋转蒸发仪 (RV-10, IKA), 电子天平 (TB-214), 双层恒温干燥培养振荡器 (ZHWY-2102C), 人工气候箱 (LRH-250-G-S), 数控超声波清洗仪 (KQ-5200-DE)。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 种子液培养方法: 在新鲜斜面上取 5 mm × 5 mm 大小的已纯化的菌块, 接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 25 $^{\circ}C$ 、180 r/min 摇床上培养 3 d。发酵培养: 将培养好的种子液混匀, 按 3% 接种量接种到装有 330 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 每次提取所用发酵液的量为 1 000 mL, 于 28 $^{\circ}C$ 、180 r/min 摇床上培养 10 d。

1.2.2 紫杉醇样品的提取 通过对培养 10 d 的发酵液进行抽滤, 使其分离为菌液和菌丝体两部分, 菌丝用乙酸乙酯在超声条件下萃取, 菌液用乙酸乙酯通过分液漏斗萃取, 分别重复 3 次, 合并收集到的乙酸乙酯相, 并用双层滤纸过滤, 滤液在

收稿日期: 2014-07-24

基金项目: 国家中医药公共卫生专项 (编号: 201207002); 陕西省科学技术研究发展计划 (编号: 2013K12-23-02)。

作者简介: 赵赟鑫 (1985—), 男, 陕西汉中中人, 硕士, 助理研究员, 主要从事微生物次生代谢产活性物质研究。E-mail: alvin071625@hotmail.com。

40 ℃ 旋转蒸发至干,样品用甲醇溶解并定容至 10.0 mL,检测。

1.2.3 紫杉醇的 HPLC 检测 紫杉醇标准品用甲醇定容至 10.0 mL,配置成 0.01 ~ 0.16 mg/mL 的浓度梯度,绘制标准曲线。精确称取紫杉醇标准品 4.0 mg,甲醇定容至 10.0 mL,从而得到母液浓度为 0.4 mg/mL,将母液依次稀释成浓度梯度为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16 mg/mL,取 20.0 μ L 进样 ($n=5$),得到回归方程为 $y = 6.0878 + 3589.3913x$, $r = 0.9992$ 。建立标准曲线,如图 1 所示,采用外标法测定内生真菌发酵产物的乙酸乙酯抽提物中紫杉醇含量。

色谱条件:水-甲醇-乙腈(33:35:32)为流动相,检测波长为 228 nm,流速为 1.0 mL/min,进样量为 20.0 μ L,柱温为室温,色谱柱为 C_{18} (4.6 mm \times 150 mm)。

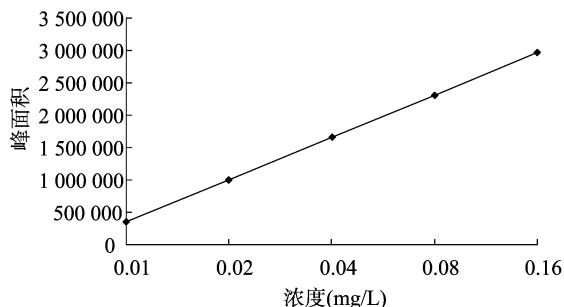


图1 紫杉醇的标准曲线

紫杉醇含量计算公式:发酵液中紫杉醇的含量(μ g/L) = [甲醇中紫杉醇的含量(mg/mL) \times 溶解提取物所用甲醇的体积(mL) $\times 10^6$] / 提取时所取发酵液的体积(mL)。

每次提取的紫杉醇均做 3 个平行样,分别经 HPLC 测定并通过公式计算发酵液中紫杉醇的含量,求其平均值。

1.2.4 生物量的测定 取一定体积的发酵液 4 800 r/min 离心 20 min,菌丝体用蒸馏水洗涤 2 次,收集菌丝体,置于 80 ℃ 烘箱中烘干至恒重,称量,计算菌丝体生物量。

1.2.5 培养基配方的优化方法

1.2.5.1 单因素试验 采取无碳配方发酵液培养,分别选取葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和淀粉为碳源,浓度均为 80.0 g/L,考察单因素碳源对 LB-10 紫杉醇积累和菌丝体生物量的影响,筛选出最适碳源进行初糖浓度的单因素试验。

采取无氮配方发酵液培养,分别选取 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4NO_3 、酒石酸铵和蛋白胨为氮源,浓度均为 8.0 g/L,考察单因素氮源对 LB-10 紫杉醇积累和菌丝体生物量的影响,筛选出最适氮源进行初氮浓度的单因素试验。

采取初始发酵液培养,选取无水 $MgSO_4$ 的不同浓度 4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 g/L,研究无水 $MgSO_4$ 的不同浓度对 LB-10 菌体紫杉醇生物合成产量和菌丝体生物量的单因素影响。

1.2.5.2 正交试验及验证性试验 选取对菌体生长和紫杉醇积累有较大影响的最适碳源、最适氮源和硫酸镁浓度,分别取 3 个水平,以紫杉醇产量为指标,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验以及验证性试验。

2 结果与分析

2.1 不同碳源的影响

生成次级代谢产物是由许多因素来调控的,比如碳源、氮

源及微量元素^[8]。碳源的主要作用是构成各种代谢产物的碳架和细胞物质,以及提供细胞活动所需的能量。

由图 2 可知,生物量以蔗糖最高,葡萄糖次之,麦芽糖最低;在发酵培养过程中,以淀粉为碳源时,菌丝生长相对缓慢,老化快。紫杉醇产量以葡萄糖为碳源的最高,蔗糖次之,麦芽糖产紫杉醇量最低。

试验结果表明,以蔗糖为碳源时对菌体生长比对紫杉醇积累更有利,以麦芽糖为碳源时对紫杉醇积累和菌体生长均不利,以葡萄糖为碳源时对紫杉醇积累比对菌体生长更有利,因此选择葡萄糖为最适碳源。

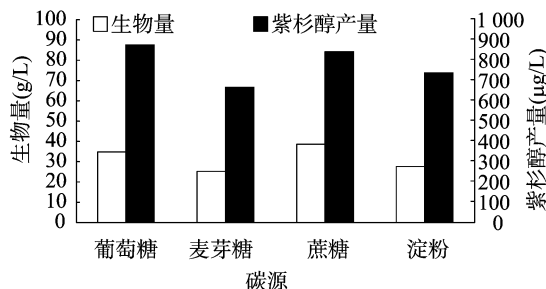


图2 不同碳源对紫杉醇产量和菌丝体生物量的影响

2.2 不同氮源的影响

氮源是生命有机体生长发育所必需的主要营养,主要是合成细胞结构和提供原生质的原料,一般所用的氮源可分为无机氮源和有机氮源 2 类。 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、酒石酸铵和蛋白胨等被国内学者研究时作为氮源使用^[9]。

如图 3 所示,以 NH_4NO_3 为氮源时菌体生物量和紫杉醇产量最高,蛋白胨次之, $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源时紫杉醇产量和菌体生物量均最低。

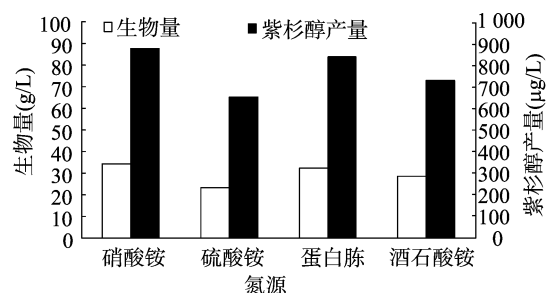


图3 不同氮源对紫杉醇产量和菌丝体生物量的影响

试验结果表明,以蛋白胨、 NH_4NO_3 为氮源时对紫杉醇积累和菌体生长有促进作用,而采用 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源时对菌体的代谢有抑制作用,从而降低了紫杉醇的产量,因此选择 NH_4NO_3 为最适氮源。

2.3 不同初糖浓度的影响

糖类的浓度对紫杉醇的生物合成和内生真菌的生长具有很大影响。本试验采用初始发酵培养基进行发酵,以葡萄糖为碳源,分别按照浓度 50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100.0 g/L 的添加量进行发酵试验,考察不同的碳源质量分数对 LB-10 产量的影响。

由图 4 可知,LB-10 产紫杉醇的含量首先随着葡萄糖浓度升高而增加,当葡萄糖浓度达到 60.0 g/L 时,紫杉醇产量以及菌体生物量达到最大。当碳源浓度为 70.0 g/L 及以上时,

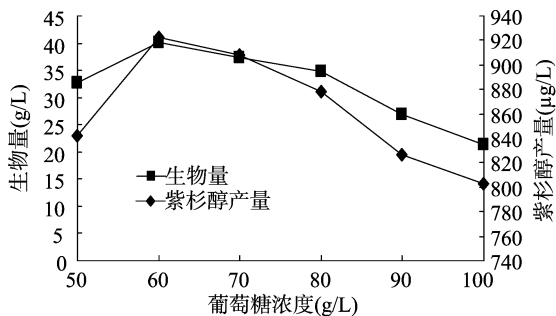


图4 不同葡萄糖浓度对紫杉醇产量和菌丝体生物量的影响

菌体生长受到了抑制,紫杉醇产量及菌体生物量都有所下降。

结果表明,初糖浓度直接影响产物的积累和菌体的生长。当初糖浓度较高时,碳源更多地流向代谢产物的合成,随着发酵时间持续,形成了大量非目的产物,抑制目的代谢产物的积累和菌丝体的生长,导致在初糖浓度较高的条件下,发酵液变得稠厚,使能量传递以及物质转化变得困难,最终导致紫杉醇的产生受到抑制。因此最佳碳源浓度用量的选择为 60.0 g/L。

2.4 不同 NH_4NO_3 浓度的影响

提高培养基中氮源浓度对红豆杉内生真菌的生长以及紫杉醇的生物合成也具有很大的影响。本试验同样采用了初始发酵培养基进行发酵,以 NH_4NO_3 为氮源,选取不同的氮源浓度 4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 g/L 进行试验,不同氮源浓度对 LB-10 发酵产紫杉醇的影响结果如图 5 所示。

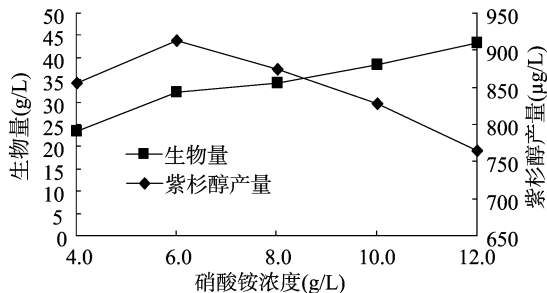


图5 不同硝酸铵浓度对紫杉醇产量和菌丝体生物量的影响

由图 5 可知,当氮源浓度为 6.0 g/L 时,紫杉醇的生物合成量达到最大;当氮源浓度为 12.0 g/L 时,在试验范围内菌丝体生物量达到了最大,而紫杉醇含量最低。结果表明,初始氮源浓度对紫杉醇积累和菌体生长有显著影响。高浓度氮源对红豆杉内生真菌的生长起到促进作用,但是抑制次级代谢产物的形成;随着 NH_4NO_3 浓度升高,发酵液中的营养物质被用来合成大量的菌丝体,导致营养物质消耗过快,从而菌丝体过早地衰老,对后续合成及积累紫杉醇不利。因此为了兼顾紫杉醇含量和菌丝体生长,选择 6.0 g/L NH_4NO_3 为最佳氮源用量。

2.5 不同 MgSO_4 浓度的影响

由于在紫杉醇生物合成过程中,第一步限速反应是 GGPP 在紫杉二烯合成酶 (taxadiene synthase) 的催化下环化为紫杉烷三环二萜骨架,反应产物是 taxa-4(5)、11(12)-diene,该酶是以 Mg^{2+} 为唯一金属催化剂的蛋白单体^[10], Mg^{2+} 的浓度对该酶的活性影响很大,进而影响紫杉醇的生物合成。

由图 6 可以看出,随着无水 MgSO_4 浓度升高,紫杉醇的生物合成量呈上升趋势,在 MgSO_4 浓度为 0.5 g/L 时菌丝体

生物量达到最高,紫杉醇的生物合成量也达到最大值;继续提高浓度,菌丝体生物量和紫杉醇产量都开始下降。结果表明, Mg^{2+} 浓度对菌丝体生长和紫杉醇积累有一定的影响。 Mg^{2+} 浓度过高,使紫杉二烯合成酶活性受到抑制,影响紫杉烷三环二萜骨架的合成,进而会降低紫杉醇产量。因此最佳 MgSO_4 用量为浓度 0.5 g/L。

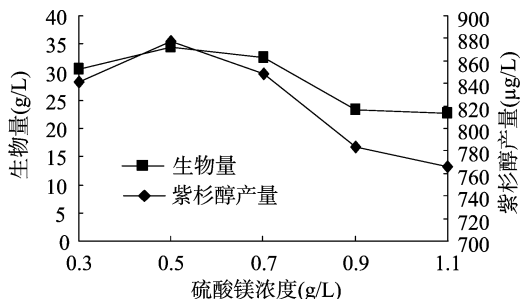


图6 不同无水硫酸镁浓度对紫杉醇产量和菌丝体生物量的影响

2.6 培养基正交试验

以上分析了培养基各组分及其浓度对发酵试验的单因素影响,因为各个试验批次之间往往差别较大,所以需要对各因素进行综合考察,才能筛选出较优的工艺条件。正交试验设计可通过多个因素的分析得到各因素在整体影响中的主次,同时能够获得各因素对试验的影响规律,从而确定较优的工艺条件配比。

本试验选取对紫杉醇积累和菌丝体生长有较大影响的葡萄糖、 NH_4NO_3 和 MgSO_4 ,分别取 3 个水平,以紫杉醇产量为指标,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验。试验设计如表 1 所示,结果如表 2 和表 3 所示。

表1 培养基优化正交试验因素和水平

水平	因素		
	A: 葡萄糖 浓度 (g/L)	B: NH_4NO_3 浓度 (g/L)	C: MgSO_4 浓度 (g/L)
1	50.0	4.0	0.3
2	60.0	6.0	0.5
3	70.0	8.0	0.7

由表 2 可以看出,根据极差 R 值的大小,得到 3 个因素对试验结果的影响次序为 $B > C > A$,即 NH_4NO_3 浓度对产量影响最大,其次是 MgSO_4 浓度,最后是葡萄糖浓度。

由表 3 方差分析结果可知, NH_4NO_3 对紫杉醇产量的影响极显著 [$F > F_{0.01}(2,2)$],葡萄糖对紫杉醇产量的影响显著 [$F_{0.01}(2,2) > F > F_{0.05}(2,2)$], MgSO_4 对紫杉醇产量的影响显著 [$F_{0.01}(2,2) > F > F_{0.05}(2,2)$],因此选取的 3 个因素对紫杉醇产量影响均显著。

以 3 个因素在不同水平下的均值对各水平作图,如图 7 所示,对于因素 A 和因素 C,其均值水平变化呈现下降趋势,因素 B 是先上升后下降,结果表明,最佳组合为 $A_1B_2C_1$,即葡萄糖 50.0 g/L、 NH_4NO_3 6.0 g/L、 MgSO_4 0.3 g/L。

根据正交试验结果筛选出最优发酵培养基组成为葡萄糖 50.0 g/L、 NH_4NO_3 6.0 g/L、无水 MgSO_4 0.3 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、维生素 B_1 0.05 g/L。

2.7 验证性试验

采用优化后发酵液进行培养,即葡萄糖 50.0 g/L,

表 2 培养基优化试验设计及结果

编号	因素			紫杉醇含量 ($\mu\text{g/L}$)
	A:葡萄糖 浓度	B: NH_4NO_3 浓度	C: MgSO_4 浓度	
1	1	1	1	901.2
2	1	2	2	950.1
3	1	3	3	923.4
4	2	1	2	881.8
5	2	2	3	909.4
6	2	3	1	934.6
7	3	1	3	852.1
8	3	2	1	929.3
9	3	3	2	917.3
K_1	2 774.7	2 635.1	2 765.1	
K_2	2 725.8	2 788.8	2 749.2	
K_3	2 698.7	2 775.3	2 684.9	
k_1	924.9	878.4	921.7	
k_2	908.6	929.6	916.4	
k_3	899.6	925.1	895.0	
R	25.3	51.2	26.7	

表 3 培养基优化试验结果方差分析

方差来源	SS	df	MS	F
A	989.069	2	494.535	69.506 *
B	4 829.109	2	2 414.555	339.361 **
C	1 202.149	2	601.075	84.480 *
误差	14.229	2	7.115	
总变异	7 034.560	8		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$; $F_{0.01}(2,2)=99.00$ 。

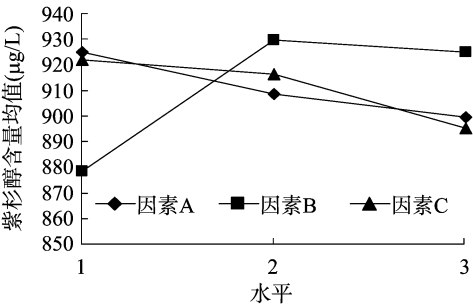


图7 培养基优化各因素在不同水平下的均值变化

NH_4NO_3 6.0 g/L,无水 MgSO_4 0.3 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L,维生素 B_1 0.05 g/L。以紫杉醇产量为指标,对 LB-10 菌株进行摇瓶发酵验证性试验,分别提取 5 次紫杉醇样品进行 HPLC 检测,结果如表 4 所示。结果表明,LB-10 产紫杉醇产量的 RSD 为 0.33%,说明测定方法的重现性较好,紫杉醇含量的平均值达到 938.6 $\mu\text{g/L}$,产量比常规方法提高了 92.5 $\mu\text{g/L}$ 。

3 讨论与结论

在笔者课题组自行筛选的高产紫杉醇内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 的基础上,筛选出最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为 NH_4NO_3 。通过单因素试验分析,确定了葡萄糖、 NH_4NO_3 、无水 MgSO_4 的最适浓度分别为 60.0、6.0、0.5 g/L。

表 4 培养基优化验证性试验结果

重复	LB-10 紫杉醇产量($\mu\text{g/L}$)
1	936.3
2	942.1
3	941.3
4	938.5
5	934.8
平均值	938.6
RSD	0.33%

进一步采取 $L_9(3^4)$ 正交试验分析,获得了三者在培养基中的最佳组合 $A_1B_2C_1$,即葡萄糖 50.0 g/L、 NH_4NO_3 6.0 g/L、无水 MgSO_4 0.3 g/L,从而获得了最佳发酵培养基的组成:葡萄糖 50.0 g/L、 NH_4NO_3 6.0 g/L、无水 MgSO_4 0.3 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、维生素 B_1 0.05 g/L,其紫杉醇平均含量达到了 938.6 $\mu\text{g/L}$ 。

研究发现,浓度适量的碳源和氮源都促进紫杉醇生物合成和菌体生长,但是当两者浓度过高时,发酵液中的营养物质被用来合成大量菌丝体,导致营养消耗过快,大量非目的产物的形成会抑制目的代谢产物的积累和菌体生长,发酵液会变得稠厚,进而菌丝体过早衰老,对后续合成和积累紫杉醇均不利。因此,为了兼顾紫杉醇含量和菌体生长,需要选择适宜的碳氮比。

参考文献:

[1]侯宽昭. 中国种子植物科属词典(修订版)[M]. 北京:科学出版社,1982:481.

[2]中国科学院植物研究所编辑委员会. 中国植物志:第七卷[M]. 北京:科学出版社,1978:438-443.

[3]Wani M C,Taylor H L,Wall M E,et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol,a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Journal of the American Chemical Society,1971,93(9):2325-2327.

[4]Schiff P B,Fant J,Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol[J]. Nature,1979,277(5698):665-667.

[5]梅兴国,鲁明波. 紫杉醇的抗癌作用及治疗其他疾病的潜力[J]. 国外医学. 药学分册,1996,23(3):136-1367,138-140.

[6]Strobel G A,Stierle A,Stierle D,et al. Taxomyces andreanae,a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew[J]. Mycotaxon,1993,47:71-78.

[7]耿直,刘开辉,赵贻鑫,等. 一株产紫杉醇中国红豆杉内生真菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报,2010,37(2):199-203.

[8]Parra R,Aldred D,Magan N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalstatin S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology[J]. Enzyme and Microbial Technology,2005,37(7):704-711.

[9]代文亮. 产紫杉醇菌种的改良及若干种前体物质作用的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.

[10]宣红玉,刘家新,王健刚,等. 紫杉醇生物合成途径及调控研究进展[J]. 天然产物研究与开发,1998,10(3):96-102.