

张 欢,赵赞鑫,李昭莹,等. 红豆杉内生真菌产紫杉醇的发酵条件优化研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):306–309.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.21.075

红豆杉内生真菌产紫杉醇的发酵条件优化研究

张 欢¹, 赵赞鑫², 李昭莹¹, 田 露¹, 邓百万^{3,4}

(1. 陕西省汉中市环境监测中心站, 陕西汉中 723000; 2. 汉中植物研究所, 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. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000)

摘要:采用高效液相色谱法(HPLC)检测方法,对内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 发酵产紫杉醇的工艺条件进行了研究。在单因素试验的基础上,进一步采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,优化了发酵过程中的最佳组合: $A_2B_2C_3$,即温度 27 ℃,pH 值 7.0,接种量 5%,其紫杉醇平均含量达到 949.6 μg/L。同时,制作了菌体生长曲线和代谢产紫杉醇含量变化曲线,选取发酵时间为 14 d 并在第 10 d 处于对数生长末期加入调节物质为最优条件。

关键词:红豆杉;紫杉醇;内生真菌;发酵条件

中图分类号: S182;S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)21–0306–04

以植物内生真菌作为药源,其来源不会枯竭。从可持续发展的角度来看,采用微生物发酵法生产紫杉醇可望解决市场价格昂贵、供不应求的现状,并且对于研究植物来源天然药物的新生产途径以及濒危药用植物的保护,具有十分重要的意义^[1]。

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。因为通过内生真菌发酵产紫杉醇达到工业化生产至少需要达到毫克级,但目前该方法产量一般只有几百微克,主要是由于缺乏高产、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^[2]。

pH 值除了直接影响发酵过程中的各种反应速率外,还能够改变发酵液的化学性质,间接影响目的产物的生物合成和菌体的生长。郭晓恒等对 SPH-4 诱变后菌株 SPH-W2 的生理特性进行考察,初始 pH 值为 7.0 时,代谢液中紫杉醇检出量较高^[3]。

温度是保证酶活性的重要条件,温度升高,生长代谢加快,反应速率加大,生产期提前,但温度越高,酶失活越快,发酵周期缩短,菌体易于衰老,从而影响目的产物的最终产量。刘君对 4 株菌进行生理特性考察,发现菌株 1015 和菌株 1006 在 30 ℃ 和 25 ℃ 时生长较好,而菌株 1002 和菌株 1025 在 25 ℃ 和 20 ℃ 时生长较好,当温度为 35 ℃ 和 10 ℃ 时,4 株菌菌丝生长都很缓慢,有的几乎停止生长^[4]。

此外,接种量的大小、培养时间的长短与菌种特性、发酵条件等有关,不同的微生物其发酵的接种量和培养时间是不

同的。孟永宏对植物内生真菌 Y3 菌株的发酵条件进行了研究,结果表明以培养 30 h 为接种龄和 2% 的接种量时紫杉醇产量最高^[5]。

本研究采用笔者所在课题组自行分离的紫杉醇高产菌株 *Metarhizium anisopliae* LB-10^[6],在优化碳源、氮源、微量元素组成、浓度及其配比的基础上^[7],对其发酵条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 红豆杉内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10,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;发酵液(g/L):葡萄糖 50.0 g/L,NH₄NO₃ 6.0 g/L,无水 MgSO₄ 0.3 g/L,KH₂PO₄ 0.5 g/L,维生素 B₁ 5.0×10⁻² g/L。

1.1.3 药品与试剂 紫杉醇标准品(≥98%)、乙酸乙酯、甲醇、葡萄糖、NH₄NO₃、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O。

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 ℃、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% 的接种量接种到装有 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 ℃、180 r/min 摇床上培养 10 d。

1.2.2 紫杉醇样品的提取 对培养 10 d 的发酵液进行抽滤,使其分离为菌液和菌丝体 2 个部分,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:2018–01–19

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:张 欢(1984—),女,陕西汉中中人,硕士,工程师,主要从事环境与资源保护研究。

通信作者:赵赞鑫,硕士,助理研究员,主要从事微生物次生代谢产物物质研究。E-mail:alvin071625@hotmail.com。

40 ℃ 旋转蒸发至干,样品用甲醇溶解并且定容至 10.0 mL 待测。

1.2.3 紫杉醇的高效液相色谱 (HPLC) 检测 紫杉醇标准品用甲醇定容至 10.0 mL,配制成 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 $y = 6.0878 + 3589.3913x$, $r = 0.999222$ 。建立标准曲线 (图 1),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的含量。

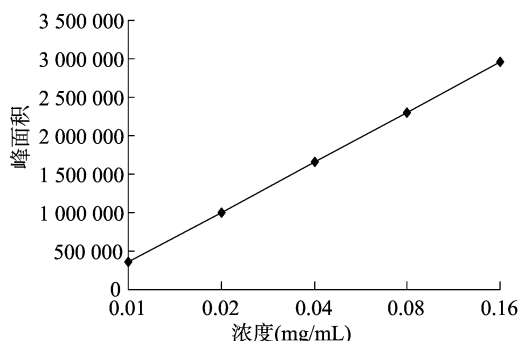


图1 紫杉醇的标准曲线

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:室温,色谱柱: C_{18} (4.6 mm \times 150 mm)。

紫杉醇含量的计算公式: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) $\times 10^6 \div$ 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离心 (4 800 r/min) 20 min,菌丝体用蒸馏水洗涤 2 次,收集菌丝体,置于 80 ℃ 烘箱中烘干至恒质量,称量,计算菌丝体生物量。

1.2.5 发酵条件的优化

1.2.5.1 单因素试验 采用优化后的发酵液培养, pH 值 7.0,接种量 3%,选取不同温度 24、26、27、28、30 ℃,以紫杉醇产量为指标,测定不同温度对 LB-10 菌体紫杉醇生物合成产量的影响。

采用优化后的发酵液培养,温度 28 ℃,接种量 3%,选用不同的 pH 值 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,以紫杉醇产量为指标,测定不同初始 pH 值条件对 LB-10 菌体紫杉醇生物合成产量的影响。

采用优化后的发酵液培养,温度 28 ℃,pH 值 7.0,以紫杉醇产量为指标,采用不同接种量 1%、3%、5%、7%、9%,考察不同接种量对 LB-10 菌体紫杉醇生物合成产量的影响。

1.2.5.2 正交试验及验证性试验 选取对紫杉醇积累有一定影响的温度、pH 值和接种量,各取 3 个水平,以紫杉醇产量为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验及验证性试验。

1.2.5.3 培养时间的研究 采用优化后的发酵液培养,以紫杉醇产量和生物量为指标,在发酵培养 LB-10 菌体的第 4 ~

20 d,每隔 1 d 对 LB-10 的菌丝体生物量和紫杉醇产量进行详细的检测和记录,研究不同培养时间对菌体生长量和代谢产物紫杉醇含量的影响。同时,寻找 LB-10 菌体发酵培养的对数生长末期,从而确定代谢调控物质的最佳添加时间。

2 结果与分析

2.1 最适培养温度

为了提高菌体的生长速度和代谢产物的生产速率,在发酵过程中必须选择最合适的温度。由图 2 可知,随着温度的升高,紫杉醇生物合成量显著增加,当发酵温度在 27 ℃ 时,紫杉醇产量最高,在发酵温度高于 28 ℃ 时,随着温度的继续升高,紫杉醇产量急剧下降。

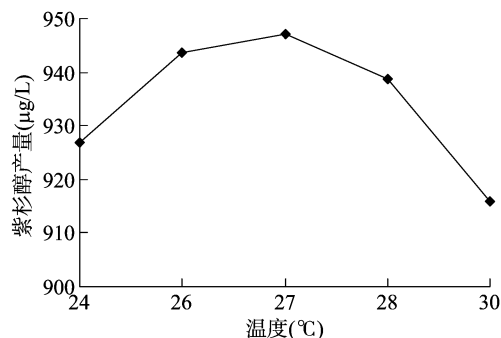


图2 发酵温度对紫杉醇产量的影响

试验结果表明,温度对紫杉醇积累有较大影响。温度过高,会使参与紫杉醇合成的酶活性受到抑制,或者改变菌体代谢产紫杉醇的合成方向,所以选用 27 ℃ 为最适发酵温度。

2.2 初始 pH 值的选择

不同种类的微生物对 pH 值的要求不同,即使是同一种微生物,在不同 pH 值环境下,代谢产物的合成量也不同。由图 3 可知,在起始 pH 值为 3.0 时,发酵液中的菌丝体几乎不生长,紫杉醇也未能检测到,随着 pH 值的升高,紫杉醇生物合成量逐渐增加,在 pH 值为 7.0 时,紫杉醇产量达到了最大值。继续提高 pH 值,紫杉醇产量有所下降。

试验表明,pH 值对紫杉醇生物合成有较大影响,由于 pH 值的不同,菌体代谢合成途径也不同。同时还发现,起始 pH 值在中性条件下对菌丝体大量合成积累紫杉醇有利,所以最佳起始 pH 值控制在 7.0 左右,可以使菌株发酵产紫杉醇的量达到最高。

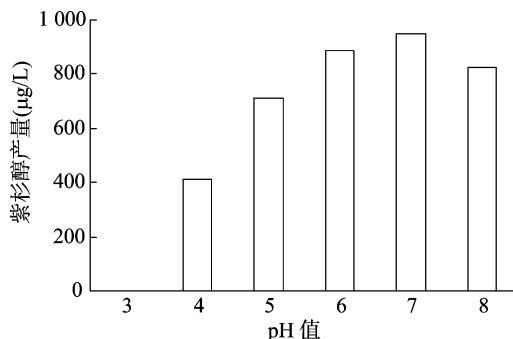


图3 发酵初始 pH 值对紫杉醇产量的影响

2.3 接种量对紫杉醇产量的影响

接种量的多少与菌种特性、发酵条件等因素有关。由图

4 可知,当接种量在 3%~5% 时,紫杉醇的产量达到了最大值;而当接种量在 1%、7%、9% 时,均不同程度地限制了紫杉醇的生物合成。

试验结果表明,接种量对紫杉醇的生物合成具有明显的影响。当接种量较小时,菌丝体生长缓慢,而菌丝体增殖消耗了大量培养基的营养物质,限制了后期紫杉醇的生物合成;当接种量过大,会导致菌丝体生长速度过快,使发酵培养基过于稠厚,导致发酵瓶内溶氧量不足,菌丝体过早地衰老,进而影响紫杉醇的生物合成。

同时,在试验过程中还发现,接种量的大小对菌丝体生物量的影响不大。因此,接种量在 3%~5% 时有利于紫杉醇的生物合成,由于在适当范围内,采用较大接种量能够使发酵时间缩短,所以选择 5% 的接种量作为最佳接种量。

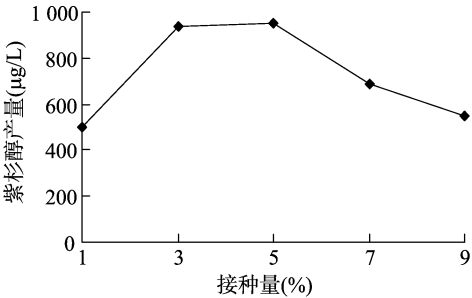


图4 接种量对紫杉醇产量的影响

2.4 发酵条件正交优化试验

以上分析了发酵条件各组分及其不同水平对发酵的单因素影响,由于各试验批次间差别较大,需要对各因素进行综合考察,才能确定较优的工艺条件。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关系,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体生长有一定影响的温度、pH 值和接种量,各取 3 个水平,以紫杉醇产量为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验设计见表 1,结果如表 2、表 3 所示。

表 1 发酵条件优化正交试验因素水平

水平	因素			
	A:温度(℃)	B:pH 值	C:接种量(%)	D:空白
1	26	6.0	3.0	
2	27	7.0	4.0	
3	28	8.0	5.0	

由表 2 可以看出,根据极差 R 值的大小,得到各因素对试验结果影响次序为 $B>A>C$,即 pH 值对产量影响最大,其次是温度,最后是接种量。

由表 3 方差分析可知,温度对紫杉醇产量的影响显著 [$F_{0.01(2,2)} > F > F_{0.05(2,2)}$],pH 值对紫杉醇产量的影响极显著 [$F > F_{0.01(2,2)}$],接种量对紫杉醇产量的影响极显著 ($F > F_{0.01(2,2)}$),因此所选取 3 个因素对紫杉醇产量影响均显著。

以各因素不同水平下的均值对各水平作图(图 5),对于因素 A 和因素 B,其均值水平变化是先上升,后下降,因素 C 的均值水平变化呈上升趋势,试验结果表明,最佳组合为 $A_2B_2C_3$,即温度 27℃,pH 值 7.0,接种量 5%。因此,根据正交试验结果分析选出的最优发酵条件是温度 27℃,pH 值 7.0,接种量 5%。

表 2 发酵条件优化试验设计及试验数据

编号	A:温度	B:pH 值	C:接种量	D:空白	紫杉醇产量(μg/L)
1	1	1	1	1	923.8
2	1	2	2	2	945.2
3	1	3	3	3	907.3
4	2	1	2	3	925.5
5	2	2	3	1	948.7
6	2	3	1	2	903.2
7	3	1	3	2	926.1
8	3	2	1	3	942.9
9	3	3	2	1	902.6
T_1	2 776.299	2 775.399	2 769.900	2 775.009	
T_2	2 777.400	2 836.800	2 773.299	2 774.499	
T_3	2 771.601	2 713.101	2 782.101	2 775.699	
k_1	925.433	925.133	923.300	925.033	
k_2	925.800	945.600	924.433	924.833	
k_3	923.867	904.367	927.367	925.233	
R	1.9	41.2	1.1	0.2	

表 3 发酵条件优化试验方差分析

方差来源	SS	df	MS	F 值	$F_{0.05(2,2)}$	$F_{0.01(2,2)}$
A	6.327	2	3.164	26.367*	19.00	99.00
B	2 550.327	2	1 275.164	10 626.363**	19.00	99.00
C	26.427	2	13.214	110.113**	19.00	99.00
误差	0.240	2	0.12			
总变异	2 583.32	8				

注:*表示差异显著($P<0.05$);**表示差异极显著($P<0.01$)。

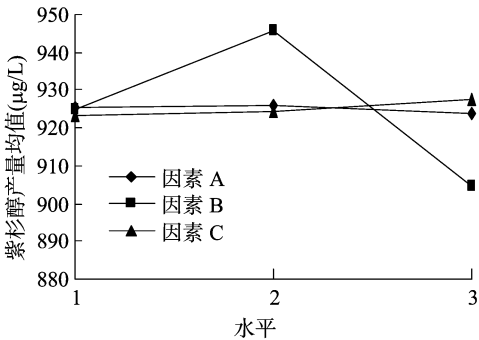


图5 发酵条件优化各因素在不同水平下的均值变化

2.5 验证性试验

采用优化后发酵条件培养,即温度 27℃,pH 值 7.0,接种量 5%。以紫杉醇产量为指标,对 LB-10 菌株进行摇瓶发酵验证试验,分别提取 5 次紫杉醇样品进行 HPLC 检测,试验结果如表 4 所示。

表 4 发酵条件优化验证性试验结果

LB-10 紫杉醇含量(μg/L)						RSD (%)
重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均值	
950.7	948.1	948.9	950.8	949.5	949.6	0.13

结果表明,LB-10 紫杉醇含量的 RSD 为 0.13%,说明测定方法重现性好,紫杉醇含量平均值达到 949.6 μg/L,产量比优化后发酵液提高了 11.0 μg/L。

2.6 培养时间对紫杉醇产量的影响

发酵培养时间与菌种种类、特性和发酵条件等因素存在着必然的联系。本试验研究不同培养时间对 LB-10 菌丝体生长量和代谢产紫杉醇含量的影响,结果如表 5 所示。

表 5 培养时间对紫杉醇产量的影响

发酵培养时间 (d)	紫杉醇 ($\mu\text{g/L}$)	生物量 (g/L)
4	245.7	10.9
6	421.4	17.5
8	712.2	27.2
10	862.8	33.1
12	935.6	34.8
14	952.7	35.2
16	922.3	33.7
18	747.7	30.3
20	514.8	26.6

由表 5 可知,发酵时间在 12~16 d 时,紫杉醇的产量较高,在发酵 14 d 时,紫杉醇合成量达到最大值,继续延长发酵时间对目标代谢产物紫杉醇的合成积累不利,而且菌丝体开始分泌色素,对后续紫杉醇的提取也不利,所以选取最佳发酵时间为 14 d,比原来的发酵时间延长 4 d。

当微生物处于一个密闭系统中培养时,可以根据微生物生长速率的变化,将微生物的生长分为 4 个不同的阶段。根据表 5 绘制了 LB-10 的菌体生长曲线和代谢产紫杉醇产量变化曲线,由图 6 所示的 LB-10 的菌体生长曲线看出,1~3 d 时处于迟缓期,4~10 d 时处于对数期,11~16 d 时处于稳定期,17~20 d 时处于衰亡期。

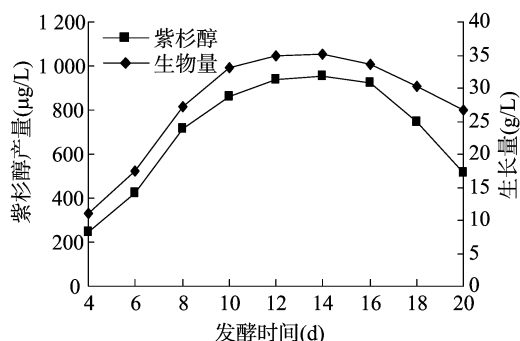


图6 培养时间对紫杉醇产量和菌体生物量的影响

当微生物生长到一定阶段后,微生物的生长速率达到最大,此时进入了对数期,大量研究表明,由于在对数生长末期细胞已得到较好的增殖,同时,植物细胞接受代谢调控物质的信号能力最强,从而使细胞得到较好的增殖,因此在对数生长末期加入代谢调控物质的效果最好^[8-11]。

结果表明,LB-10 在发酵培养 10 d 时处于对数生长末期,在此时添加前体物质、诱导子及抑制剂会得到较好的效果,这为后续的代谢调控研究提供了生长调节剂的最佳添加时间。

3 讨论与结论

在自行筛选的高产紫杉醇内生真菌 *Metarhizium anisopliae* LB-10 的基础上,对其发酵产紫杉醇的工艺条件进行了研究。通过单因素试验分析,确定了温度、pH 值、接种

量的最适条件分别为 27 ℃、7.0、5%。进一步采用 $L_9(3^4)$ 正交试验分析,得到了三者培养基中的最佳组合: $A_2B_2C_3$,即温度 27 ℃,pH 值 7.0,接种量 5%,其紫杉醇平均含量达到 949.6 $\mu\text{g/L}$ 。

其次制作了高产紫杉醇内生真菌 LB-10 的菌体生长曲线和代谢产紫杉醇产量变化曲线,选取发酵时间为 14 d,确定 LB-10 在培养 10 d 时处于对数生长末期,在此时添加前体物质、诱导子及抑制剂会得到较好的效果。

在发酵条件的研究中,发现温度、pH 值和接种量对紫杉醇的生物合成具有显著的影响。温度是保证酶活性的重要条件,温度升高,生长代谢加快,反应速率加大,生产期提前,但温度越高,酶失活越快,发酵周期缩短,菌体易于衰老,影响目的产物的最终产量;pH 值除了直接影响发酵过程中各种反应速率外,还可以通过改变发酵液的化学性质,间接影响菌体的生长和代谢产物的生物合成;接种量是通过改变菌体在发酵液中的初始浓度,从而改变菌体的生长速率,进而影响了紫杉醇的生物合成。因此,为了提高菌体的生长速度和代谢产物的生产速率,在发酵过程中必须选择最合适的温度、pH 值和接种量。

经过研究不同培养时间对菌体生长量和代谢产紫杉醇含量的影响,得到了 LB-10 的对数生长期,由于在对数生长末期细胞已得到较好的增殖,同时,这一时期植物细胞接受代谢调控物质的信号能力最强,从而使细胞得到较好的增殖,因此在对数生长末期加入代谢调控物质的效果最好,为后续的代谢调控研究提供了最佳添加时间。

参考文献:

- [1] 张欢,赵赞鑫,高文,等. 紫杉醇生产现状的分析与对策[J]. 中国现代中药,2016,18(1):126-130.
- [2] 赵赞鑫,高文,张欢,等. 提高红豆杉内生真菌及紫杉醇含量的途经分析[J]. 陕西农业科学,2015,61(10):13-17.
- [3] 郭晓恒. 产紫杉醇活性菌的选育及发酵条件研究[D]. 成都:成都中医药大学,2007:32-33.
- [4] 刘君. 长线拟泡茎点等六株东北红豆杉内生真菌及其代谢产物的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2004:32-35.
- [5] 孟永宏. 促进植物内生真菌 Y3 菌株过量产生紫杉醇的研究[D]. 西安:西北大学,2003:32-36.
- [6] 耿直,刘开辉,赵赞鑫,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.
- [7] 赵赞鑫,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.
- [8] Ketchum R E B, Gibson D M, Croteau R B, et al. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of taxus following elicitation with methyl jasmonate[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 62(1):97-105.
- [9] 梅兴国,吴奇君,江振然,等. 东北红豆杉细胞培养生产紫杉醇的调控研究 II:交互作用对东北红豆杉细胞培养生产紫杉醇的影响分析[J]. 生命科学研究,2002,6(2):152-155.
- [10] 周忠强,梅兴国,吴奇君. 前体、诱导子及抑制剂对细胞培养生产紫杉醇的调节作用[J]. 天然产物研究与开发,2002,14(2):19-21.
- [11] 汪爱顺. 前体、诱导子及抑制剂对紫杉醇生物合成的促进作用研究[J]. 生命科学研究,2003,7(1):48-52.