

抗肿瘤银杏内生真菌 *Aspergillus oryzae* YX-5 发酵培养基的优化

周惠茹 栾海彬 王慧 董昆明 缪莉*

(扬州大学 环境科学与工程学院 江苏 扬州 225127)

摘要:【目的】对一株具有抗肿瘤活性的银杏内生真菌 *Aspergillus oryzae* YX-5 的发酵培养基进行优化。【方法】以发酵后的菌体干重、粗提物质量和粗提物抗肿瘤活性为指标,通过单因素实验选出合适的碳源和氮源,再以选出的碳源、氮源以及 K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、KCl 共 5 个因素进行正交实验,确定出最适宜的发酵培养基配方。【结果】YX-5 的最佳发酵培养基配方为葡萄糖 45 g/L,蛋白胨 8 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, KCl 1 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L。优化后菌体干重、代谢物的产量和抗肿瘤活性分别提高了 41.88%、226.52%和 19.31%。【结论】通过对米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*) YX-5 的发酵培养基进行优化,明显提高了粗提物产量和抗肿瘤活性,这对后期规模化发酵中减小发酵规模和降低工作量十分有利。

关键词: 植物内生真菌, 抗肿瘤活性, 培养基优化

Optimization of the fermentation medium of an antitumor endophytic fungus *Aspergillus oryzae* YX-5 isolated from Ginkgo biloba

ZHOU Hui-Ru LUAN Hai-Bin WANG Hui DONG Kun-Ming MIAO Li*

(School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

Abstract: [Objective] To optimize the fermentation medium of an antitumor endophytic fungus isolated from Ginkgo biloba. [Methods] In this study, the dry weight of mycelia, weight and antitumor activity of crude extract were used as standards to screen out the best carbon source and nitrogen source through single factor experiment. Then the culture medium recipe was optimized by the orthogonal test in five factors and four levels. [Results] The best culture medium recipe was: glucose 45 g/L, peptone 8 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, KCl 1 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L. After optimization, the dry weight of mycelia, weight and antitumor activity of crude extract were increased by 41.88%, 226.52% and 19.31% respectively. [Conclusion] The production and antitumor activity of crude extract was significantly increased after optimization, which might be beneficial to reduce the fermentation scale and workload in scale up fermentation later.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41006097); 扬州大学科技创新培育基金项目(No. 2013CXJ042); 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室开放基金项目(No. KLMD(OUC)201203); 江苏省研究生科研创新计划(No. CXLX12_0918)

*通讯作者: Tel: 86-514-89795882; Fax: 86-514-87978626; ✉: miaoli@yzu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-28; 接受日期: 2013-09-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

Keywords: Plant endophytic fungi, Antitumor activity, Medium optimization

内生真菌是指某一阶段生活在植物体内,对植物并不引起明显病害症状的真菌^[1-2]。植物内生真菌包括专性寄生真菌、营表面腐生的腐生真菌、潜伏性病原真菌和菌根真菌。内生真菌与宿主之间互惠互利,宿主为它们提供相对稳定的环境,而内生真菌则产生生长激素和其他化合物,促进宿主植物的生长,提高宿主对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力^[3]。

自 1898 年 Vogl 从黑麦草 *Lolium temulentum* 的种子内分离出第一株内生真菌至今,关于植物内生真菌的研究已经有一百多年的历史。据报道,许多内生真菌能产生对植物生长发育有影响的代谢产物(如抗生素、激素、酶抑制剂等活性物质),或胁迫宿主产生一些有用的化学物质。1993 年,Stierle 等^[4]首次从短叶红豆杉的树皮中分离出一株产紫杉醇的内生真菌,引起了从植物内生菌中寻找抗肿瘤及其他活性物质的研究热潮。此后,研究人员从植物内生真菌中发现了大量抗肿瘤活性物质,如长春新碱类似物、紫杉醇或紫杉烷类似物、鬼臼毒素类似物等^[5-8]。由于植物内生真菌可通过发酵生产大量获得产物,是抗肿瘤天然活性物质的丰富来源,对它的研究目前已成为微生物学研究的热点,植物内生真菌的开发利用对农业、医药等领域都具有重要的现实意义。

发酵培养基配方是影响微生物发酵的重要因素,其中,碳源和氮源的影响尤为重大。一般而言,不同的微生物对碳源和氮源的需求不同,如黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)在以葡萄糖为碳源的条件下生长最好,球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)在以乳糖为碳源的条件下生长最好^[9],杜凯等^[10]对发酵性丝孢酵母(*Trichosporon fermentans*)产油脂的碳源和氮源进行研究,发现最合适的碳源为葡萄糖,最合适的氮源为硫酸铵。由此可见,在微生物发酵生产过程中,选择合适的碳源和氮源以及适宜的发酵培养基配方,可以显著提高发酵效率。

我们在前期研究中,从银杏树皮组织中分离得到一株内生真菌 YX-5,在初筛中发现该菌株具有显著的抗肿瘤活性^[11],经扫描电镜观察和 rDNA ITS 序列分析,鉴定为米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*)^[12]。本研究旨在对 YX-5 的发酵培养基进行优化,为后续的大规模发酵节约成本和减少工作量。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株:本文中所采用的菌株为本实验室保存的米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*) YX-5,该菌株分离自银杏树皮组织,银杏采自安徽阜阳师范学院校园,取材部位为距地 1.5 m 左右的主干树皮,厚度约 3–8 mm,银杏树龄 30–40 年,树干直径 50–60 cm。

1.1.2 指示肿瘤细胞:本文中采用的指示肿瘤细胞为人宫颈癌 HeLa 细胞,购自深圳百恩维生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂:二甲基亚砜(DMSO),购自北京鼎国生物技术有限公司。

PBS 缓冲溶液:NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.40 g, KH₂PO₄ 0.20 g,溶于 1 L 蒸馏水中,1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

胰酶消化液:称取 0.25 g 胰酶溶于 100 mL 蒸馏水中,经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌。

二抗母液:将一万单位青霉素和一万单位链霉素溶于 1 mL PBS 溶液中。

MTT 溶液:称取 MTT 0.5 g,溶于 100 mL PBS 溶液中,则其浓度为 5 g/L,用 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌,分装于小管,–20 °C 避光保存。

1.1.4 培养基:细胞培养基(g/L): RPMI-1640 细胞培养基 10.4, NaHCO₃ 2.4, HEPES 2.0,溶于 1 L 无菌蒸馏水中,加入 10%灭活的新生牛血清和 1%二抗母液,并调节 pH 至 7.1–7.3,经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌,于 4 °C 保存。

察氏培养基(g/L): NaNO₃ 3.0, K₂HPO₄ 1.0,

MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, FeSO₄ 0.01, 蔗糖 30, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化: 将-80 °C 冻存的真菌 YX-5 于室温下解冻, 用镊子将含菌丝的菌块夹出, 贴放于固体察氏培养基上, 于 25 °C 培养 3-5 d。

1.2.2 抗肿瘤活性测定: 将处于对数生长期的 HeLa 细胞消化后稀释成 6×10⁴ 个/mL 细胞悬液, 每孔 80 μL 接种于 96 孔板中, 以 80 μL 纯细胞培养基作为空白对照, 在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。将待测样品溶于 DMSO, 使样品浓度为 20 g/L, 再用培养基稀释到 250 mg/L, 每孔加入 20 μL, 则测试样品终浓度为 50 mg/L。设添加 20 μL 含 0.5% DMSO 培养基作为阴性对照。每个处理设 3 个重复。继续培养 48 h 后, 在倒置生物显微镜下观察细胞的形态, 判断细胞的生长情况和凋亡情况, 采用 MTT 法终止并计算抑制率。

MTT 法^[13]: 每孔添加 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL, 37 °C 培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 低速振荡, 待颜色均匀后用酶标仪于 490 nm 波长处测定 OD 值, 并计算抑制率。

抑制率(%)=(阴性对照组 OD 值-测试组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100

1.2.3 单因素实验: 碳源优化: 以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉、玉米粉和麸皮分别作为察氏培养基中的碳源, 质量浓度分别为 15 g/L 和 35 g/L, 配制液体培养基, 调 pH 到 7.0, 40 mL 分装于 150 mL 锥形瓶中, 接种活化菌株, 于 25 °C、110 r/min 振荡培养, 每个处理设置 3 个重复。在前期工作中对 YX-5 的生长曲线进行了研究, 发现从第 7 天开始, YX-5 的生长和代谢都进入平台期, 此时代谢物的抗肿瘤活性也达到最高, 因此确定发酵时间为 7 d。发酵结束后用滤纸过滤菌体, 烘干称重, 滤液经乙酸乙酯萃取, 蒸干后称取粗提物质量, 并测定粗提物的抗肿瘤活性。综合考虑菌体干重、粗提物质量和粗提物抗肿瘤活

性, 选出比较好的两种碳源, 将其质量浓度设置为 10、15、20、30、35、40、50 g/L, 振荡培养, 确定最佳碳源。

氮源优化: 以蛋白胨、酵母膏、黄豆粉、牛肉膏、尿素、硝酸钠、氯化铵、硫酸铵、硝酸铵分别作为察氏培养基中的氮源, 质量浓度分别为 2 g/L 和 6 g/L, 选出比较好的两种氮源, 将其质量浓度设置为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 g/L, 振荡培养, 确定最佳氮源。

1.2.4 正交实验: 在单因素实验的基础上, 选择碳源、氮源、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、KCl 5 个因素进行正交实验, 测定菌体干重、粗提物质量和粗提物抗肿瘤活性, 确定最佳发酵培养基配方, 并以此配方进行发酵培养, 与正交实验的结果进行对比验证。正交实验因素水平见表 1。

2 结果与分析

2.1 碳源

2.1.1 碳源种类筛选: 以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉、玉米粉和麸皮替代察氏培养基中的蔗糖作为碳源, 质量浓度分别为 15 g/L 和 35 g/L, 振荡培养后测定其菌体干重、粗提物质量和粗提物抗肿瘤活性。结果表明: 乳糖和麸皮难以被 YX-5 利用, 其菌体干重和粗提物质量都很低(表 2)。最适宜 YX-5 菌体生长的碳源为蔗糖, 在 15 g/L 和 35 g/L 时其菌体生长都十分旺盛, 菌体干重分别为 0.234 g 和 0.425 g, 其次是葡萄糖和淀粉(表 2)。葡萄糖和蔗糖也较有利于代谢产物的产生, 当碳源浓度较低时, 葡萄糖组粗提物质量最高, 为 10.0 mg; 而碳源浓度较高时, 蔗糖组粗提物质量高达 17.9 mg, 远远超过其他组(表 2)。同时, 代谢产物抗肿瘤活性最好的组别也是葡萄糖组和蔗糖组, 在 15 g/L 时这两种碳源的发酵液提取物对 HeLa 细胞的抑制率分别为 84.7%和 82.0%, 在 35 g/L 时分别为 84.8%和 74.8%(图 1)。因此选择葡萄糖和蔗糖进一步进行浓度优化。

表 1 因素水平表						
Table 1 Table of factors and levels						
水平 Levels	因素 Factors					
	碳源 Carbon source (g/L)	氮源 Nitrogen source (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	KCl (g/L)	
	A	B	C	D	E	
1	15	1	0.5	0.2	0.2	
2	30	3	1.0	0.5	0.5	
3	45	5	2.0	1.0	1.0	
4	60	8	4.0	2.0	2.0	

表 2 不同种类碳源对生长和代谢的影响				
Table 2 Effect of different carbon sources on the growth and metabolism (n=3, x±s)				
碳源 Carbon source	15 g/L		35 g/L	
	菌体干重 Dry weight of mycelia (g)	粗提物质量 Weight of crude extract (mg)	菌体干重 Dry weight of mycelia (g)	粗提物质量 Weight of crude extract (mg)
葡萄糖 Glucose	0.221±0.038	10.00±1.32	0.351±0.037	7.90±1.41
蔗糖 Sucrose	0.234±0.026	6.60±0.38	0.425±0.033	17.90±1.00
麦芽糖 Maltose	0.214±0.015	7.70±1.61	0.292±0.051	12.70±0.87
乳糖 Lactose	0.031±0.002	3.40±0.32	0.062±0.019	6.20±0.45
淀粉 Starch	0.202±0.026	5.60±0.91	0.381±0.018	14.40±0.61
玉米粉 Cornmeal	0.124±0.004	7.60±1.01	0.165±0.008	3.80±0.06
麸皮 Wheat bran	0.071±0.003	8.40±0.93	0.040±0.012	5.70±0.47

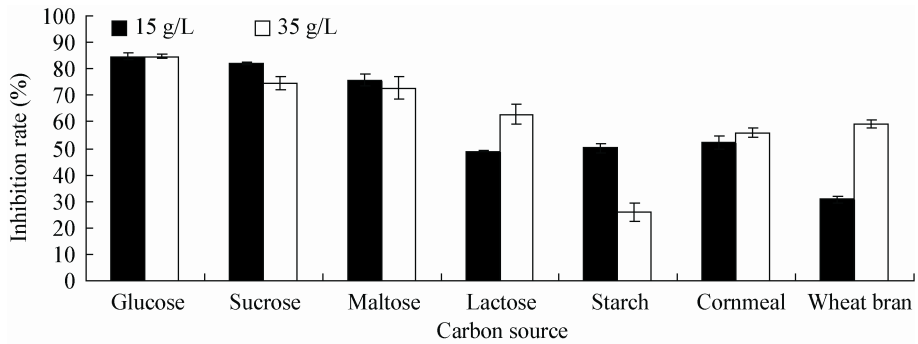


图 1 不同种类碳源对代谢产物抗肿瘤活性的影响

Figure 1 Effect of different carbon sources on the antitumor activity of fungal metabolites

2.1.2 碳源浓度优化:以葡萄糖和蔗糖作为碳源,质量浓度设置为10、15、20、30、35、40、50 g/L,振荡培养后测定其菌体干重、粗提物质量和粗提物抗肿瘤活性。结果表明:葡萄糖和蔗糖对 YX-5 菌体生长的影响差别不大,葡萄糖浓度为 30 g/L 时所得的菌体干重最高,为 0.414 g,蔗糖浓度为 50 g/L 时菌体干重达到 0.479 g (图 2A);蔗糖较有利于代谢产物的产生,其粗提物质量随着蔗糖浓度的升高呈上升趋势,在 50 g/L 时达到最大值 29.3 mg (图 2B),但粗提物的抗肿瘤活性相对较低 (图 2C),因此不考虑蔗糖作为最终碳源。葡萄糖浓度为 50 g/L 时粗提物质量最大,为 11.6 mg,其次是浓度 30 g/L 时,为 11.0 mg,此时粗提物对肿

瘤细胞抑制率为 85.93%,仅次于 20 g/L 时的 89.71% (图 2C)。综合考虑三方面因素,确定葡萄糖为最佳碳源,其浓度为 30 g/L。

2.2 氮源

2.2.1 氮源种类筛选:采用蛋白胨、酵母膏、黄豆粉、牛肉膏、尿素、硝酸钠、氯化铵、硫酸铵、硝酸铵作为察氏培养基中的氮源,质量浓度分别为 2 g/L 和 6 g/L,110 r/min 振荡培养 7 d 后测定其菌体干重、粗提物质量和粗提物抗肿瘤活性。结果表明:氮源浓度低(2 g/L)时,尿素比较适合 YX-5 的生长,菌体干重为 0.368 g,氮源浓度高(6 g/L)时,蛋白胨组的菌株生长情况最佳,菌体干重为 0.426 g (表 3)。总体而言,各氮源组的粗提物质量

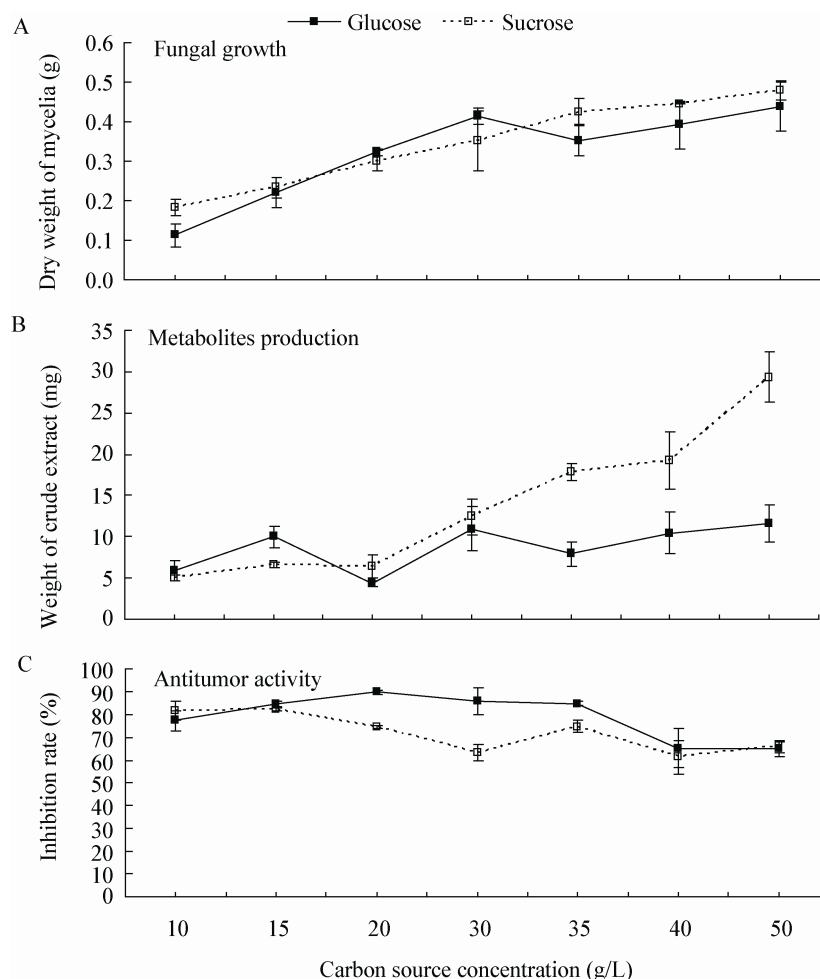


图 2 不同浓度碳源对生长(A)、代谢(B)及代谢产物活性(C)的影响

Figure 2 Effect of different carbon sources concentrations on the fungal growth (A), metabolites production (B) and antitumor activity (C)

都比较高，其中最高达到 94.2 mg (表 3)，因此选择氮源时主要考虑抗肿瘤活性这项参数。粗提物对 Hela 细胞抑制率最高的组中采用的氮源为尿素，在 2 g/L 和 6 g/L 时分别为 71.55%和 76.19% ,其次为蛋白胨(图 3)。因此选择尿素和蛋白胨进行进一步浓度优化。

2.2.2 氮源浓度优化：采用蛋白胨和尿素作为氮源，质量浓度设置为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 g/L，振荡培养后测定其菌体干重、粗提物质量

和粗提物抗肿瘤活性。结果表明：蛋白胨浓度低于 3 g/L 时，不利于菌体的生长而有利于代谢产物的产生，而浓度高于 3 g/L 时则与之相反，浓度为 3 g/L 时，菌体干重和粗提物质量均比较适中，分别为 0.375 g 和 47.3 mg (图 4A 和图 4B) ,此时其粗提物对肿瘤细胞抑制率为 74.70%，虽然低于 4 g/L 时的 82.46%和 5 g/L 时的 78.82%，但仍处于较高水平(图 4C)。采用尿素作为氮源时，粗提物对肿瘤细胞的抑制率都高

表3 不同种类氮源对生长和代谢的影响				
Table 3 Effect of different nitrogen sources on the growth and metabolism (n=3, x±s)				
氮源 Nitrogen source	2 g/L		6 g/L	
	菌体干重	粗提物质量	菌体干重	粗提物质量
	Dry weight of mycelia (g)	Weight of crude extract (mg)	Dry weight of mycelia (g)	Weight of crude extract (mg)
蛋白胨	0.165±0.020	60.40±3.42	0.426±0.034	26.60±8.42
Peptone				
酵母膏	0.143±0.007	61.50±11.17	0.332±0.035	40.10±2.95
Yeast extract				
黄豆粉	0.095±0.009	74.70±9.06	0.196±0.020	82.80±5.38
Soybean flour				
牛肉膏	0.145±0.016	94.20±19.16	0.380±0.044	43.40±5.26
Beef extract				
尿素	0.368±0.053	14.70±3.58	0.404±0.076	25.00±4.24
Urea				
硝酸钠	0.240±0.036	38.80±2.91	0.310±0.011	11.90±3.91
Sodium nitrate				
氯化铵	0.230±0.017	15.30±3.78	0.160±0.023	15.40±1.96
Ammonium chloride				
硫酸铵	0.205±0.010	27.40±7.50	0.193±0.010	37.60±3.57
Ammonium sulfate				
硝酸铵	0.362±0.010	10.10±4.34	0.292±0.041	6.30±1.68
Ammonium nitrate				

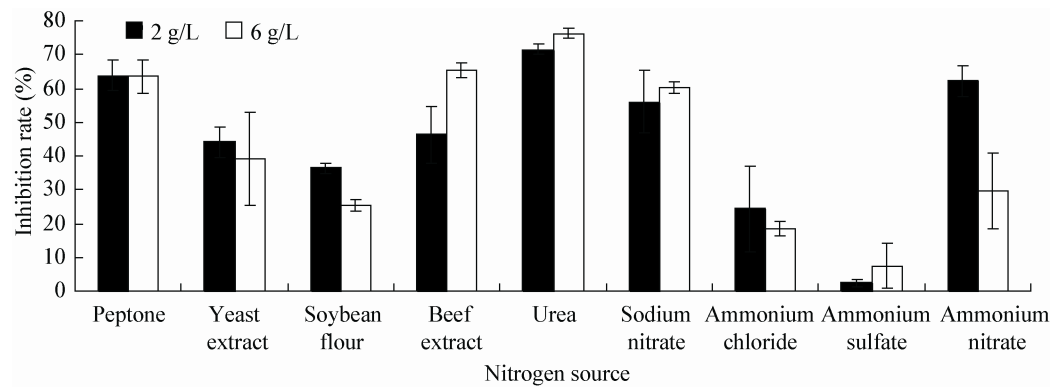


图 3 不同种类氮源对代谢产物抗肿瘤活性的影响

Figure 3 Effect of different nitrogen sources on the antitumor activity of fungal metabolites

于 50% (图 4C), 但是除了 0.5 g/L 时粗提物质量较高为 52.0 mg, 其他情况下粗提物质量都偏低(图 4B), 因此不考虑尿素作为最终氮源。综合考虑 3 种因素, 最终选定蛋白胨为最佳氮源, 浓度为 3 g/L。

2.3 正交实验

蛋白胨不同水平对菌体生长的影响较大, 菌体干重随着蛋白胨浓度的增加而增加, 在 8 g/L 时达到最大值 0.402 g, 极差为 0.296; 葡萄糖浓度对菌体生长也有一定影响, 在葡萄糖浓度低(15 g/L)时, 菌体生长受限制, 而当葡萄糖浓度高于 15 g/L 时,

菌体生长情况显著改善, 且随着浓度的升高而基本保持不变; 3 种无机盐对菌体生长没有显著影响, 极差均低于 0.1 (表 4)。

对 YX-5 代谢物质的产生影响最大的因素是碳源, 当葡萄糖浓度为 45 g/L 时粗提物质量最高, 为 43.4 mg, 而在葡萄糖浓度为 15 g/L 时, 粗提物质量仅为 11.0 mg, 极差高达 32.4; 高浓度的 K_2HPO_4 对 YX-5 的代谢过程有抑制作用, K_2HPO_4 浓度为 2 g/L 和 4 g/L 时粗提物质量均低于 20 mg (表 4)。

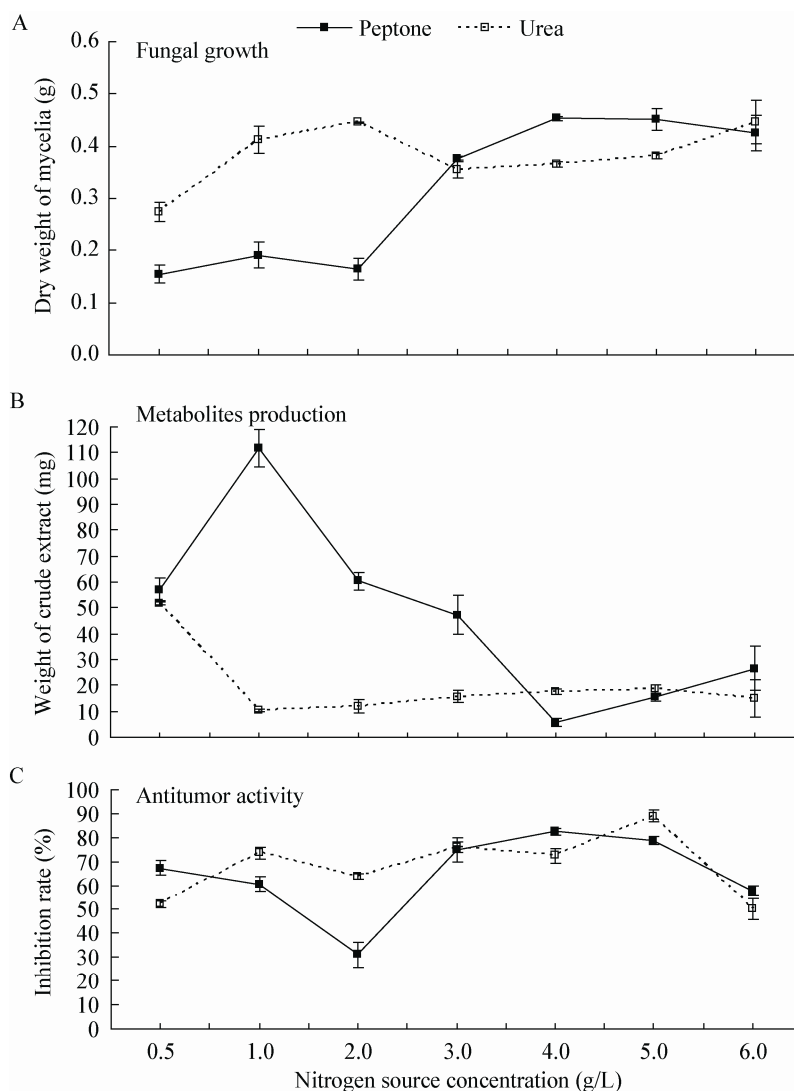


图 4 不同浓度氮源对生长(A)、代谢(B)及代谢产物活性(C)的影响

Figure 4 Effect of different nitrogen sources concentrations on fungal growth (A), metabolites production (B) and antitumor activity (C)

表 4 正交实验结果与分析 Table 4 Results and analysis of orthogonal test									
实验号 Test number		因素 Factors					结果 Results ($n=3, \bar{x} \pm s$)		
		A	B	C	D	E	菌体干重 Dry weight of mycelia (g)	粗提物质量 Weight of crude extract (mg)	抑制率 Inhibition rate (%)
1		1	1	1	1	1	0.109±0.001	24.300±2.052	41.620±5.142
2		1	2	2	2	2	0.211±0.012	6.100±0.141	77.690±4.392
3		1	3	3	3	3	0.234±0.022	6.300±0.850	81.250±2.075
4		1	4	4	4	4	0.239±0.014	7.200±0.173	35.930±3.803
5		2	1	2	3	4	0.111±0.007	19.900±0.354	17.730±1.933
6		2	2	1	4	3	0.276±0.026	25.500±3.831	59.380±2.013
7		2	3	4	1	2	0.390±0.024	5.500±1.344	58.930±0.924
8		2	4	3	2	1	0.456±0.016	11.200±1.514	54.040±1.707
9		3	1	3	4	2	0.123±0.015	27.900±1.320	11.990±2.771
10		3	2	4	3	1	0.263±0.028	33.200±4.325	32.160±2.801
11		3	3	1	2	4	0.406±0.024	37.600±6.841	72.760±1.147
12		3	4	2	1	3	0.422±0.041	75.000±10.394	53.940±3.016
13		4	1	4	2	3	0.085±0.004	14.400±3.302	46.720±2.739
14		4	2	3	1	4	0.298±0.032	27.500±3.614	47.420±2.065
15		4	3	2	4	1	0.424±0.011	28.600±2.013	52.430±1.292
16		4	4	1	3	2	0.493±0.014	55.800±5.091	73.130±9.547
菌体干重 Dry weight of mycelia (g)	k_1	0.199	0.107	0.321	0.305	0.313			
	k_2	0.308	0.262	0.292	0.289	0.304			
	k_3	0.303	0.364	0.278	0.275	0.254			
	k_4	0.325	0.402	0.244	0.266	0.263			
	R	0.126	0.296	0.077	0.039	0.059			
粗提物质量 Weight of crude extract (mg)	k_1	11.0	21.6	35.8	33.0	24.3			
	k_2	15.5	23.1	32.4	17.3	23.8			
	k_3	43.4	19.5	18.2	28.8	30.3			
	k_4	31.6	37.3	15.1	22.3	23.0			
	R	32.4	17.8	20.7	15.7	7.3			
抑制率 Inhibition rate (%)	k_1	59.12	29.52	61.72	50.48	45.06			
	k_2	47.52	54.16	50.45	62.80	55.44			
	k_3	42.71	66.34	48.68	51.07	60.32			
	k_4	54.93	54.26	43.44	39.93	43.46			
	R	16.41	36.83	18.29	22.87	16.86			
粗提物质量×抑制率 Weight of crude extract × Inhibition rate	k'_1	649	637	2 209	1 668	1 097			
	k'_2	736	1 250	1 634	1 086	1 320			
	k'_3	1 854	1 293	886	1 471	1 827			
	k'_4	1 734	2 023	654	890	1 000			
	R	1 205	1 385	1 555	777	827			

正交实验结果的 3 个参数中,粗提物对 HeLa 细胞的抑制率是最为重要的一个。5 个因素对抑制率的影响大小为:蛋白胨 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ > K_2HPO_4 > KCl > 葡萄糖。当蛋白胨浓度为 5 g/L 时,抑制率最高,蛋白胨浓度为 1 g/L 时,抑制率最低,极差为 36.83 (表 4)。只以抑制率作为评价发酵效果的参数时,最优培养基配方为:葡萄糖 15 g/L,蛋白胨 5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, KCl 1 g/L, FeSO_4 0.01 g/L。

为了在得到高活性粗提物的同时尽量提高其产量,引进了一个新的评价参数:粗提物质量×抑制率。对此影响最大的因素是 K_2HPO_4 ,随着 K_2HPO_4 浓度的升高,这个参数的值不断降低,在 4 g/L 时只有 654,不到 0.5 g/L 时的 1/3;蛋白胨的影响力仅次于 K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的影响最小(表 4)。最后选定的最优培养基配方为:葡萄糖 45 g/L,蛋白胨 8 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KCl 1 g/L, FeSO_4 0.01 g/L。

2.4 优化前后对比

在上述正交实验中,以粗提物质量×抑制率作为评价参数时,第 16 组的值最高,此时的菌体干重、粗提物质量和抑制率分别为 0.493 g、55.8 mg 和 73.13% (表 4)。对最优培养基配方进行验证,结果表明:优化后 3 种参数的值均高于正交实验中第 16 组的值,与优化前相比,优化后菌体干重增加了 41.88%,代谢物产量提高了 226.52%,在测试浓度为 50 mg/L 时代谢物的抗肿瘤活性提高了 19.31% (表 5),优化效果十分显著。

3 讨论

本文中对银杏内生真菌米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*) YX-5 的发酵培养基进行优化,确定最佳培养基配方为(g/L):葡萄糖 45,蛋白胨 8, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, KCl 1, FeSO_4 0.01。优化后,YX-5 的菌体生长、代谢情况及产物活性均有很大幅度的提高,尤其是代谢物的产量提高十分显著,这有利于后期的规模化发酵与活性物质的分离提取,可减少发酵规模、降低工作量。

碳源筛选的结果表明,以葡萄糖或蔗糖作为碳源时,菌株的生长和代谢活动都十分旺盛,代谢产物的抗肿瘤活性也较高,是比较合适的碳源,而乳糖和麸皮则不太能被 YX-5 很好地利用。葡萄糖和蔗糖是微生物普遍能利用的碳源,但浓度也不宜过高,否则会使发酵环境中渗透压过高,影响菌株的生长和代谢。

在进行氮源种类筛选时发现,采用有机氮源的组别,所得到的粗提物质量普遍高于采用无机氮源的组别,原因可能是有机氮源为速效氮源,在实验周期(7 d)内能够充分被利用,而无机氮源为迟效氮源,来不及被全部利用时实验已终止。有研究显示,过量的氮源会促使菌株向合成菌体的方向发展,而合成活性物质的能力衰退^[14],这可以解释 YX-5 在高浓度的有机氮源中菌体生长旺盛,但代谢产物的量却偏低的现象。

此外,氮源优化部分的粗提物质量虽然在碳源优化部分的基础上有了很大的提高,但粗提物的抗肿瘤活性却变低了,鉴于这两个部分的实验不是同

表 5 优化前后结果对比			
Table 5 Comparison of results before and after optimization (n=3, x±s)			
处理	菌体干重	粗提物质量	抑制率
Treatments	Dry weight of mycelia (g)	Weight of crude extract (mg)	Inhibition rate (%)
优化前	0.425±0.016	23.000±5.303	64.170±3.157
Before optimization			
优化后	0.603±0.013	75.100±6.647	76.560±6.834
After optimization			

时进行,且有较长的时间间隔,因此推断 YX-5 菌株可能在这段时间内有所退化,代谢情况发生了改变。

从正交实验的结果中我们得知,氮源对菌体生长和粗提物活性均有十分显著的影响,碳源对代谢物的产生影响比较大,而高浓度的 K_2HPO_4 不仅会抑制代谢物的产生,还会使其抗肿瘤活性降低;另外两种无机盐 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 KCl 则对发酵过程影响不大。

对于不同的菌株来说,适宜的碳、氮源不尽相同。本文所研究的米曲霉 YX-5 在以麸皮、乳糖和麦芽糖为碳源时生长代谢十分缓慢,对硝酸铵和硫酸铵的利用率也很低,而米曲霉 UV-2 和黑曲霉 n1-1 则能很好地利用麸皮,米曲霉 CCUG33812 和烟曲霉 WHSW-01 的最佳碳源都是麦芽糖,黑曲霉 n1-1 对硫酸铵的利用率也很高,烟曲霉 WHSW-01 的最佳氮源为硝酸铵^[15-18]。微生物生长良好所允许的磷酸盐浓度最高为 300 mmol/L,但对次级代谢合成良好所允许的最高浓度仅为 1.0 mmol/L,因此,在发酵过程中要注意控制磷酸盐浓度,避免对次级代谢物的产生造成抑制。

参 考 文 献

- [1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [2] Kloepper JW, Schipper B, Bakker HM. Proposed elimination of the tern endorhizosphere[J]. Phytopathol, 1992, 82: 726-727.
- [3] 任安芝, 高玉葆. 植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 90-93.
- [4] Stierie A, Strobel G, Stierie D, et al. Taxol and taxane production by *Taxomycetes andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [5] 郭波, 李海燕, 张玲琪. 一种产长春碱真菌的分离[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1998, 20(3): 214-215.
- [6] Wang J, Li G, Lu H, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus from *Taxus mairei*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193(2): 249-253.
- [7] Li C, Johnson RP, Porco JA. Total synthesis of the quinone epoxide dimer (+)-torreyanic acid: application of a biomimetic oxidation/electrocyclization/diels-alder dimerization cascade[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(17): 5059-5106.
- [8] 李海燕, 王志军, 张玲琪, 等. 一种桃儿七内生真菌的分离初报[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1999, 21(3): 243.
- [9] 王美琴, 陈俊美, 李新风. 不同碳、氮源对番茄两种内生真菌菌丝生长的影响研究[J]. 山西农业科学, 2008, 36(11): 75-77.
- [10] 杜凯, 孙晓璐, 孙玉梅, 等. 发酵性丝孢酵母发酵产油脂的碳源和氮源选择[J]. 中国油脂, 2010(7): 40-43.
- [11] 缪莉, 王元元, 朱磊, 等. 四种植物内生真菌的分离及其抗肿瘤活性的筛选[J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 865-869.
- [12] 马君千, 王雪玲, 缪莉, 等. 共附生微生物抗肿瘤活性菌的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报, 2012(9): 137-142.
- [13] 黄银久, 宋宝安, 金林红, 等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 13-16.
- [14] 孟蕾, 汪海塘. 讨论氮源对青霉素发酵的影响[J]. 黑龙江科技信息, 2010(6): 187.
- [15] 孙春华, 燕磊, 常维山. 不同碳源和氮源对米曲霉产酶影响的研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(5): 986-990.
- [16] 赵林果, 游丽金, 倪浩, 等. 碳源和氮源对黑曲霉分泌 β -葡萄糖苷酶的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008(6): 1-4.
- [17] 王小花, 洪枫, 朱利民, 等. 米曲霉产胞外脂肪酶培养条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 25-28.
- [18] 韩晓红, 阎贺静. 烟曲霉 WHSW-01 产壳聚糖酶基本培养条件及发酵过程分析[J]. 贵州农业科学, 2013(3): 88-91.