

芦竹内生真菌 F0238 细胞生长及其代谢调控*

纪丽莲

(淮阴工学院生物工程系 淮安 223001)

摘要: 对芦竹内生真菌 F0238 的细胞生长和代谢产曲酸量进行了代谢调控。结果表明, F0238 生长及产曲酸的营养和环境条件为: PDA 培养基, 8% 淀粉为碳源, 0.2% 蛋白胨为 N 源, 发酵温度 28℃, 初始 pH 值为 6.5, 发酵时间 5d/(120h), 装液量 80mL/500mL 三角瓶。在摇瓶试验的基础上, 对该菌发酵过程作了初步放大试验 (10L 全自动发酵罐), 得到 F0238 发酵过程的动态曲线。动态曲线反映了在一个发酵周期内, 发酵液的 pH 值、DO 值及残糖的降低趋势和生物量与抗菌产物量的上升趋势。

关键词: 芦竹, 内生真菌, 细胞生长, 曲酸, 代谢调控

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0051-05

Metabolic Regulation of Cell Growth and Antimicrobial Metabolite of the F0238*

Ji Li-Lian

(Department of Bioengineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001)

Abstract: Metabolic regulation of cell growth and antimicrobial metabolite of the F0238 was carried out in this study. The proper compositions of the culture medium and technological conditions for its fermentation were investigated. The results showed that the optimum conditions for the growth of the strain and its production of kojic acid were PDA medium with starch 2% as C source, peptone 0.2% as N source, and temperature 28℃, culture time 5 day (144 h), culture volume 80mL/500mL Erlenmeyer flask. Under above conditions, the dynamic curve of fermentation was obtained by an automatic mini-bioreactor of 10L and indicated a trend of decreasing pH, DO and residual sugar and increasing biomass and kojic acid production by F0238.

Key words: *Arundo donax* L., Endophytic fungi, Cell growth, Kojic acid, Metabolic regulation

植物内生真菌 (endophyticfungus) 是生长在宿主体内不引起植物发病的一类特殊微生物。它们与宿主植物之间存在着一定的“互惠共生”关系, 宿主植物为内生菌提供营养需求, 内生菌则通过产生次生代谢产物调节并增强宿生植物的环境适应能力, 如固氮, 抗菌、抗虫和抗病等; 内生真菌还能参与植物活性成分的合成, 或者对植物次生代谢产物进行转化^[1]。

植物内生真菌中广泛分布着抗菌活性菌株, 它们在进化过程中形成了丰富的代谢系统, 能产生众多的抗菌产物, 并在一定条件下成为植物病原菌的拮抗菌却不会引起宿主植物明显的病症。我们课题组从黄海岸低盐芦竹中分离到一株木霉属的内生菌 (编号为 F0238), 并已研究证实此菌有很强的拮抗植物病原菌的活性, 其拮抗机制为抗生作用、营养竞争及重寄生作用^[2]。在进一步的研究中, 我们从 F0238 活性次生代谢产物中分离到一无色棱柱晶体, 后经波谱鉴定为曲酸 (kojic acid) (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone)。文献报道曲酸广泛用于杀虫抗菌剂^[3,4]。我们对 F0238 菌发酵

* 江苏省高校自然科学基金项目 (No. 02KJD180010)

收稿日期: 2004-10-11, 修回日期: 2004-11-28

生产的曲酸进行了抗菌谱的测定,发现其在2% (w/v) 的浓度下对受试植物病原菌^[2]的抑菌圈均在15mm以上(强活性)。为此,我们分别以F0238菌体干重和发酵液中曲酸产量为指标,对内生真菌F0238进行了细胞生长和产曲酸的代谢调控,旨在探索F0238生长和代谢的营养与环境条件,为其在工业规模上生产果蔬生防制剂和/或防腐杀菌剂提供理论与实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 内生真菌F0238:分离自黄海海岸浅水滩海岸低盐芦竹(*Arundo donax* L.)。

1.1.2 培养基:PDA、PDM、查氏和MMN培养基。

1.1.3 曲酸标准品:购于南京生物制品有限公司,AR级。

1.2 方法

1.2.1 曲酸含量的测定:用高相液相色谱法测定样品中曲酸的含量^[5]。检测仪器为美国Waters公司的高效液相色谱仪;流动相为甲醇-水(50+50);柱温:室温;流速:0.8mL/min;进样量:10 μ L;检测器:二极管阵列检测器,提取波长200nm;数据处理:威玛色谱数据工作站。

1.2.2 曲酸及发酵产物的抗菌活性的测定:采用抑菌圈法,即将苹果链格孢霉菌的细胞或孢子稀释到5mL无菌水中,制成10⁶cfu/mL的菌悬液。另制备PDA固体培养基,微热时与苹果链格孢菌的菌悬液混合均匀并倒平板(150 μ L菌悬液/平板)制成Bt板。再将微热的已灭菌的牛津杯轻放于Bt板上,滴加过滤除菌后的曲酸或发酵清液100 μ L,28 $^{\circ}$ C培养,3d/后观察,测抑菌圈的直径^[2]。

1.2.3 F0238菌发酵的生物量测定:取各发酵液100mL,离心收集湿菌体,蒸馏水冲洗两次,然后在60 $^{\circ}$ C恒温干燥至恒重,用电子天平称重。

1.2.4 F0238菌发酵的营养因子筛选:在其它条件一致的情况下(即发酵温度28 $^{\circ}$ C,初始pH值6.5,装液量100mL/500mL三角瓶,发酵周期7d,接种量10%),通过分别改变培养基种类、培养基中的C源、N源来考察F0238菌发酵过程的生物量、活性代谢产物量(曲酸)等的变化,以确定其生长与代谢的营养条件^[6,7]。

1.2.5 F0238菌发酵的环境条件:在固定其它条件的情况下(即PDA培养基,发酵周期7d,接种量10%),以发酵过程的生物量、曲酸产量为考察指标,追踪在不同培养温度、初始pH值和供氧量下F0238菌的发酵情况,以确定其发酵的环境条件^[6,7]。

1.2.6 F0238发酵过程的动态分析:为揭示在放大模型下F0238菌发酵全过程中各个因素之间的动态变化规律和相互关系,以及确定发酵周期,按前面单因素实验所确定的优化条件,一次配料接种上10L全自动发酵罐发酵,每天定时取样进行分析测定。测定指标为F0238菌的生物量和曲酸产量,发酵的最终pH值和残糖,溶氧情况等。其中残糖的测定采用SBA-40多功能生物传感分析仪测定^[8,9]。

1.2.7 统计分析:所有实验均设置3次重复,以Duncan的多重分析法进行各数据的方差检验^[10]。

2 结果与讨论

2.1 培养基种类对 F0238 菌生长与代谢的影响

F0238 菌的生长代谢范围很宽,在不同的培养基中均可生长,并产生抗菌物质(如曲酸)。但选用不同的培养基,其发酵过程中菌体的生长量和曲酸量各有不同。从图 1 可以看出, F0238 菌在实验提供的 4 种培养基上的发酵情况呈有规律的变化趋势,其中在 PDM 培养基上的生物量增加的最为显著,在 PDA 上次之,再次是在查氏培养基上,最小的是在 MMN 培养基上。在 4 种实验培养基上,最大生物量均出现在发酵的第 3~4d。

但从培养基对曲酸产量的影响曲线可看出(图 2),在 PDA 培养基上 F0238 菌发酵产生曲酸量最大,其次是 PDM、MMN 和查氏培养基。因此,有利于菌体生长的培养基并不一定有利于其活性代谢产物的产生。

鉴于我们的目标是追踪 F0238 菌的抗菌活性,考虑到 PDA 培养基对 F0238 菌代谢产物及菌体生长均有利,由此确定其最适培养基为 PDA 培养基。

图 2 还表明了 F0238 菌最大次生代谢产物量出现在发酵的第 5d,说明其菌体生长的对数期与产次生代谢产物不同步。在发酵的对数期生长菌体,而在对数后期分泌次生代谢产物。为得到最大次生代谢产物量,我们确定发酵时间为 5d。

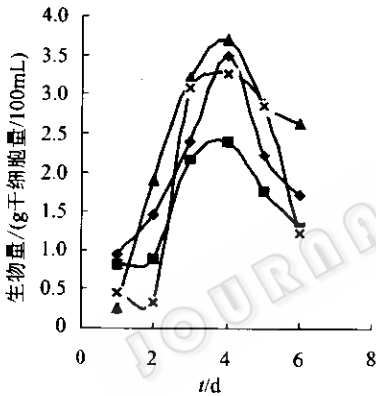


图 1 培养基种类对 F0238 菌生物量的影响

◆ PDA, ■ MMN,
▲ PDM, × 查氏

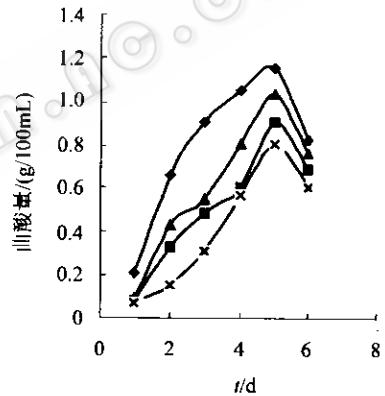


图 2 培养基种类对 F0238 菌产曲酸的影响

◆ PDA, ■ MMN,
▲ PDM, × 查氏

2.2 C 源对 F0238 菌生长与代谢的影响

分别用 8%、10%、12% 及 14% 的淀粉代替 PDA 液体培养基中的葡萄糖作为碳源,进行 F0238 菌的发酵。实验结果表明 F0238 菌能够利用淀粉作为能源生长繁殖和合成抗菌活性物质,但不同浓度的淀粉对其细胞生长和产曲酸的影响差异显著。在淀粉浓度为 10% 时,可得到最大的菌体生长量,淀粉浓度为 8% 时次之;但在淀粉浓度为 8% 时,可得到最大的曲酸量。综合考虑,选取 8% 的淀粉作为培养基的碳源浓度。

2.3 N 源对 F0238 菌生长与代谢的影响

在优选出碳源的基础上,分别选用蛋白胨、牛肉膏、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为发酵培养基的氮源,各种氮源的加入量分别折算成 PDA 液体培养基中的 N 含量 (0.2%)。由图 3 可以看出,以有机氮为氮源时,有利于 F0238 菌体的生长,生物量的最大值出现在发酵的第 4d,其中以牛肉膏为 N 源时的生物量最大;无机氮源

的生物量偏低。由图 4 可知，曲酸的最大值仍然出现在发酵的第 5d，且以蛋白胨为氮源时最大，其次是以牛肉膏为 N 源；无机氮源对产次生代谢物不利。可见与蛋白胨相比，牛肉膏对细胞生长的促进作用要强，但对活性产物代谢的促进作用却弱。综合考虑，选择蛋白胨为 F0238 菌发酵的氮源。

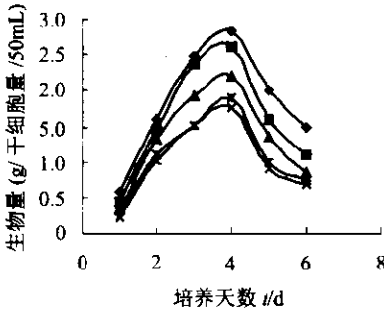


图 3 不同 N 源对 F0238 菌生物量
 —●— 牛肉膏, —■— 蛋白胨, —▲— KNO_3 ,
 —×— $NH_4_2HP_4$, —*— $NH_4_2SO_4$

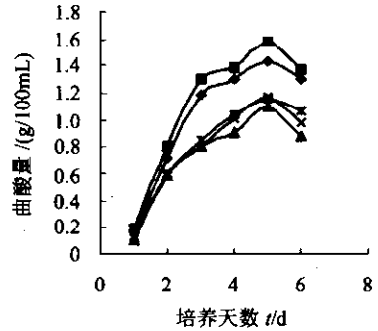


图 4 不同 N 源对 F0238 菌产曲酸的影响
 —●— 牛肉膏, —■— 蛋白胨, —▲— KNO_3 ,
 —×— $NH_4_2HP_4$, —*— $NH_4_2SO_4$

2.4 发酵温度对 F0238 菌生长与代谢的影响

由图 5 可看出，在实验温度范围内，菌体均可生长，但温度的变化对菌体生长及曲酸的产生影响很大。在低于 28℃ 时，温度的升高对菌体的生长有利，生物量逐渐增加，在 28℃ 达到最大生物量；当培养温度从 20℃ 升至 28℃，曲酸产量随着温度升高而增加到最大值，其抗菌活性也增加到最大值。当温度升至 32℃ 时生物量与曲酸产量均降低，因此适于 F0238 菌生长与合成抗菌产物的温度为 24℃ ~ 28℃。

2.5 供氧量对 F0238 菌生长与代谢的影响

F0238 菌代谢产抗菌物质属好气性发酵，溶解氧对发酵有着重要的影响。本实验通过在 500mL 三角瓶中装入不同体积的发酵培养基的方法来探讨供氧量对菌体生长及曲酸产量的影响。由图 6 可看出，不同的装液量对菌体的生长影响较大，随着装液量的减少，菌体的生物量呈增大趋势。其中装液量为 80mL 时，菌体的生物量达最大。装液量过大不利于菌体的生长，装液量越多，有效氧的供应越少，越不利于菌体的生长。同样，在较少的装液量下，有较多氧的供给，F0238 菌代谢产曲酸量增多。

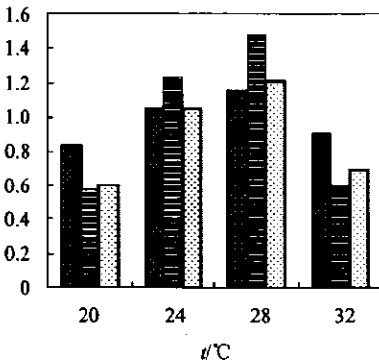


图 5 发酵温度对 F0238 菌生长与代谢的影响

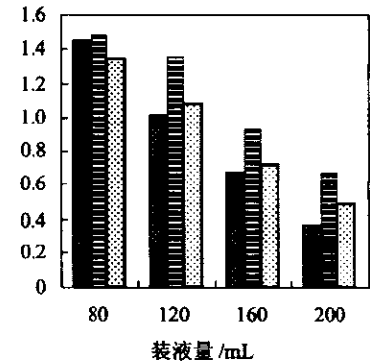


图 6 装液量对 F0238 菌生长与代谢的影响

2.6 初始 pH 值对 F0238 菌生长与代谢的影响

用 1mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液将 PDA 液体培养基的起始 pH 分别调为 4.5、5.5、6.5、7.5 和 8.5, 研究培养基起始 pH 对菌体生长及代谢产物量的影响, 结果发现, 在实验的 pH 范围内, 细胞均可生长, 但 pH 值的变化对生物量及代谢产物量的影响显著。其中初始 pH 为 5.5~6.5 时, 菌体的生物量最大, 曲酸产量最多, 活性最强。碱性环境对菌体生长不利。因此取培养基初始 pH 为 6.5。

2.7 F0238 菌发酵过程的动态曲线

由 F0238 菌在 10L 全自动发酵罐的发酵过程动态曲线 (图 7) 可看出, 在发酵的对数期, 随着发酵的进行, 菌体的生物量、曲酸的产量均呈增加趋势, 并分别在 96h 和 120h 达到最高值, 同时 F0238 对糖的利用在 96h 基本结束。

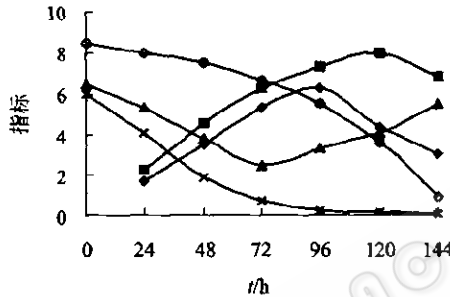


图 7 F0238 菌发酵过程动态曲线

◆ 生物量 / (g/200mL), ■ 曲酸量 / (g/500mL), ▲ pH,
→ 残糖 / (g/500mL), ⊖ 溶氧量 / (DO/%)

发酵过程中发酵液的 pH 也呈有规律的趋势, 即先下降后上升。在发酵前期, F0238 发酵产大量酸, 使培养基酸化, pH 值降低; 此外, 培养基在灭菌过程中高温会导致基质中部分物质的分解, 而使培养基酸化。发酵后期, 当菌体进入菌丝自溶阶段, 随着营养基质的耗尽, 菌体蛋白酶的活跃, 培养液中氨基氮增加, 使基质的 pH 值又上升。在实验过程中我们也发现, 只要是培养基初始 pH 值维持不变 (6.5), 在发酵一个周期后 (约 6d), 发酵终了的基质的 pH 值几乎都恒定在 6 左右。

从扩大培养的溶氧曲线可看出, 通气量恒定的情况下, 随着培养时间的延长, 基质中的溶氧量 (DO) 趋于变小, 培养至 144h 时, 维持在 10% 左右不再变化。这表明在菌体生长时, 随着菌丝体生长量的不断增加, 对氧的需求量也不断增加, 当培养至后期, 菌体开始自溶时, 对氧的需求量渐少, 溶氧量下降的趋势变缓慢, 最终恒定。

3 讨论

以 F0238 菌为出发菌株, 通过单因素实验在摇瓶条件下对出发菌株的发酵培养基种类和组成 (碳源、氮源等) 及工艺条件 (发酵温度、供氧量等) 进行了摸索。结果表明, 菌体生长和发酵产曲酸的培养基为 PDA 培养基, 碳源为淀粉 8%, 氮源为蛋白胨 0.2%; 发酵温度 28℃, 发酵时间 5d, 初始 pH 值为 6.5, 装液量 80mL/500mL 三角瓶。在摇瓶试验的基础上, 对该菌发酵过程作了初步放大试验 (10L 全自动发酵罐), 得到 F0238 发酵过程的动态曲线。动态曲线反映了在一个发酵周期内, 发酵液的 pH 值、DO

值、残糖的降低趋势及生物量和抗菌产物量的上升趋势。

在微生物农药的工业化生产中,提高发酵液效价是降低成本,提高经济效益的重要途径,其根本措施是探索各发酵因子的组合,优化微生物代谢产活性成分的发酵条件。李淑彬等对一株海洋青霉产抗生素的发酵进行了调控研究^[8];卫军等人对一株产抗真菌抗生素的海洋微生物进行了发酵条件研究^[4]。本研究首次以药用植物芦竹内生真菌 F0238 为出发菌株,对其产抗植物病原真菌物质(曲酸)进行了代谢调控,并在 10L 全自动发酵罐进行了放大,得到了该菌发酵过程的动态曲线,从而为开发新型防霉剂、微生物农药等奠定了应用基础。

参 考 文 献

- [1] Tan R X, Zou W X. *Natural Product Reports*, 2001, **18**: 448 ~ 459.
- [2] 纪丽莲, 张强华, 崔桂友. *微生物学通报*, 2004, **31** (2): 82 ~ 86.
- [3] 孙 徽, 许正宏. *食品与发酵工业*, 1997, **23** (1): 11 ~ 14.
- [4] 卫 军, 刘凤珠, 马歌丽, 等. *食品与发酵工业*, 2003, **24** (4): 17 ~ 19.
- [5] 胡俊明, 段鹤君, 赵月朝. *卫生研究*, 2003, **32** (5): 499 ~ 500.
- [6] Nel H A, Bauer R, Vandamme E J, *et al.* *Journal of Applied Microbiology*, 2001, **91**: 1131 ~ 1138.
- [7] Degeest B, De-Vuyst L. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 2863 ~ 2870.
- [8] 李淑彬, 杨劲松, 刘 阳, 等. *中山大学学报*, 2001, **40** (4): 13 ~ 16.
- [9] 蔡德华, 董洪新, 肖长生, 等. *湖北农业科学*, 2003, **3**: 78 ~ 80.
- [10] Snedecor G W, Cochran W G. *Statistical methods*. 6th edn. New York: Oxford and IBH Publishing Co. Calcutta, 1968.