

红树林放线菌 0616167 的生长特性及发酵条件优化*

陈 华^{1,2,3} 洪 葵^{1**} 庄 令¹ 钟秋平²

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)¹
(华南热带农业大学工学院 儋州 571737)² (中国热带农业科学院椰子研究所 文昌 571339)³

摘要: 菌株 0616167 是分离自红树林的具细胞毒活性的放线菌。研究表明, 该菌最适生长的 NaCl 浓度是 6%, 能够耐受最高的 NaCl 浓度为 20%; 当盐度为 0~3% 时, 细胞毒活性最高。通过正交试验法对发酵条件的优化, 得出有利于细胞毒活性的最佳碳源、氮源、通氧量及发酵时间分别为: 葡萄糖 20 g, 硝酸钾 15 g, 装液量为 75 mL/250 mL 三角瓶, 发酵时间 5 d。通过优化, 细胞毒活性提高了 3 倍。

关键词: 红树林, 放线菌, 正交实验法, 细胞毒活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0016-05

Growth Characteristics and Fermentation Condition Optimization of Mangrove Actinomycete Strain 0616167*

CHEN Hua^{1,2,3} HONG Kui^{1**} ZHUANG Ling¹ ZHONG Qiu-Ping²

(Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, CATAS, Haikou 571101)¹

(School of Engineering, SCUTA, Danzhou 571737)²

(Coconut Research Institute, CATAS, Wenchang 571339)³

Abstract: Strain 0616167 was an actinomycete with cytotoxicity isolated from sea mud of mangrove. Optimum concentration of NaCl for this strain is 6%, and the highest tolerance of NaCl is 20%. The highest cytotoxic activity was obtained at 0~3% of NaCl. The optimum condition for cytotoxicity production of strain 0616167 is determined by orthogonal design. Three times higher activity was obtained at the carbon source, nitrogen source, oxygen supply and fermentation time was: 20g of glucose, 15g of KNO₃, 75mL media in 250mL flasks and 5 days of fermentation time, respectively.

Key words: Mangrove, Actinomycete, Orthogonal design, Cytotoxic activity

红树林是指热带海岸潮间带的木本植物群落。由于温暖洋流的影响, 有的可以分布到亚热带, 有的因潮汐的影响, 在最高潮边缘而具有水陆两栖现象, 一般生活在海岸及河口潮间带泥地里, 具有十分独特的生理和生态特征, 水分高、盐分高、氧气缺乏^[1]。由于红树林生境有着不同于海洋和陆地的性质, 其地下部分微生物的生态系统较之其他环境有很大的不同, 赋予了红树林微生物产生不同于其他生态系统的活性物质的潜在可能性。因此, 近年来对红树林生境微生物的研究已引起人们的关注^[2-5]。

菌株 0616167 是从海南省文昌市红树林 1.0 m 深的海泥中分离得到的放线菌, 其发酵菌丝体的丙酮浸提液表现出较强的细胞毒活性^[6]。由于正交试验法可以用较少的实验次数获得较准确的实验结论, 在微生物菌种筛选和发酵条件研究中有广泛的应用。本实验利用正交试验法对菌株 0616167 发酵条件和培养基配比等影响其生物量和活性

* 863 海洋生物技术课题 (No. 2004AA628040)

科技部社会公益项目资助 (No. 2004DIB3J072)

** 通讯作者 Tel: 0898-66984969, E-mail: k1022@163.net

收稿日期: 2005-05-09, 修回日期: 2005-07-07

的因素进行了研究, 获得了优化发酵条件, 使活性提高了 3 倍。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌株 0616167, 中国热带农业科学院热带生物技术研究保藏, 此菌株是从海南省文昌市红树林 1.0m 深的海泥中分离得到的放线菌。经前期实验, 菌株 0616167 的发酵菌丝体的丙酮浸提液具有较强的细胞毒活性。

1.1.2 培养基: 种子培养基: YE 培养基: 麦芽浸膏 10 g, 酵母膏 4.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 琼脂 20g, 50% 陈海水定容至 1,000mL, pH7.2 ~ 7.4; 发酵培养基: SLM 培养基: 可溶性淀粉 20g, 黄豆粉抽提物 15g, 酵母膏 5g, 蛋白胨 2g, CaCO₃ 4g, NaCl 4g, 琼脂 20g, 50 % 陈海水定容至 1,000 mL, pH7.2 ~ 7.4。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒活性检测: MTT (噻唑蓝) 法检测^[7]。测活细胞为小鼠黑色素瘤 B₁₆ 细胞, 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.2.2 生长曲线测定: 取盛有 5mL YE 液体培养基的 25 mL 万用瓶 28 个, 加入 28℃ 振荡 (200 r/min) 培养 48h 的菌株 0616167 培养液 0.2 mL, 28℃ 下, 振荡 (200 r/min) 培养。接种后, 对第 0、4、8、12、16、20、24、36、48、72、96、120、144、168 h 的发酵液测定其生物量。作生长曲线。用称重法测定其生物量^[8]。

1.2.3 耐盐度实验: 将预先于 28℃ 下振荡 (200 r/min) 培养 24 h 的菌株 0616167 菌液, 取 1 mL 加入盛有 50 mL 不同 NaCl 浓度 (NaCl 浓度分别为 0、3、6、9、12、15、20 g/100 mL) 的 SLM 液体培养基 (配方由蒸馏水代替海水) 的 250 mL 三角瓶中, 于 28℃ 下摇床培养 168 h, 测定其生物量。发酵液过滤, 用等体积丙酮浸泡菌丝体过夜, 离心, 收集丙酮滤液, MTT 法测活。

1.2.4 接种量的影响: 种子培养基 50 mL 中接入 2 环孢子, 摇瓶培养 24h 后, 种子培养液分别以 5、10、15、20 mL/100mL 的接种量移到盛有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 试验不同接种量对该菌株生长量及活性的影响。发酵液过滤, 用等体积丙酮浸泡菌丝体过夜, 离心, 收集丙酮滤液, MTT 法测活。

1.2.5 菌株 0616167 发酵条件的优化: 对碳源、氮源、通氧量、发酵时间进行正交实验, 分析其对菌株生长量及活性的影响。因子水平见表 1, 28℃, 200 r/min 摇瓶培养, 发酵液过滤, 用等体积丙酮浸泡菌丝体过夜, 离心, 收集丙酮滤液, MTT 法测活。

碳源分别以可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽浸提物 20g/L 为 4 种不同水平; 氮源实验分别以黄豆粉、蛋白胨、牛肉浸膏、硝酸钾 15 g/L 为 4 种不同水平; 通氧量以不同装液量考察, 分别在 250 mL 的三角瓶中装入 25 mL、50 mL、75 mL、100 mL 的 SLM 液体培养基; 分别于接种后的第 4、5、6、7 d 取出测活, 考察不同发酵时间对菌株 0616167 产抗肿瘤活性物质的影响。

表 1 正交实验因子水平表

水平	碳源 (A)	氮源 (B)	装液量 (C)	发酵时间 (D)
1	可溶性淀粉	黄豆粉	25 mL	4d
2	葡萄糖	蛋白胨	50 mL	5d
3	蔗糖	牛肉浸膏	75 mL	6d
4	麦芽浸提物	硝酸钾	100 mL	7d

2 结果与分析

2.1 生长曲线

菌株 0616167 在接种后 0~4 h 为延滞期, 4~36 h 为指数生长期, 36~96 h 为稳定生长期, 然后为衰亡期, 如图 1 所示。

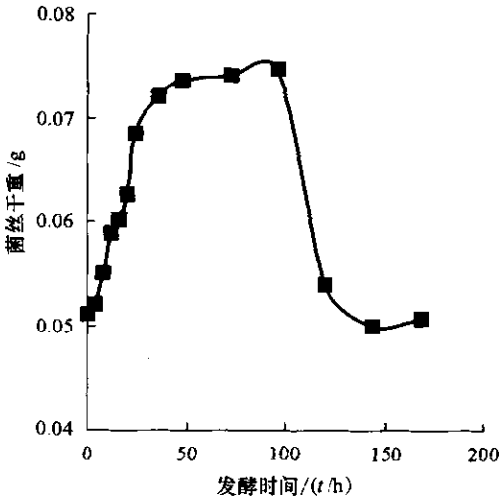


图 1 菌株 0616167 的生长曲线

一般认为, 分离自海洋环境, 其正常生长需要海水, 并可在寡营养、低温条件下生长的微生物可视为严格的海洋微生物。然而, 有些分离自海洋的微生物, 其生长不一定需要海水, 但可产生不同于陆地微生物的代谢物(如溴代化合物抗生素)或拥有某些特殊的生理性质(如盐耐受性、液化琼脂等), 也被视为海洋微生物^[9]。

2.2 耐盐度实验

就菌丝生成量而言, 菌株 0616167 在盐度 0~20% 时均能生长, 且在高盐度时菌丝生成量比低盐度时的高, 说明此菌株 0616167 已适应了海洋的高盐环境, 对盐有一定的依赖性; 盐度为 6% 时, 菌株 0616167 生长最好, 即其正常生长需要海水。就生成抗 B₁₆ 细胞活性物质而言, 当盐度为 0~3% 时, 活性最高, ID₅₀ = 320; 当盐度为 6% 时活性剧降为 ID₅₀ = 80; 但是当盐度大于 9% 时, 菌株 0616167 不产生细胞毒活性物质, 可能是高盐度抑制了细胞毒活性物质的产生, 如图 2 所示。

一般认为, 分离自海洋环境, 其正常生长需要海水, 并可在寡营养、低温条件下生长的微生物可视为严格的海洋微生物。然而, 有些分离自海洋的微生物, 其生长不一定需要海水, 但可产生不同于陆地微生物的代谢物(如溴代化合物抗生素)或拥有某些特殊的生理性质(如盐耐受性、液化琼脂等), 也被视为海洋微生物^[9]。

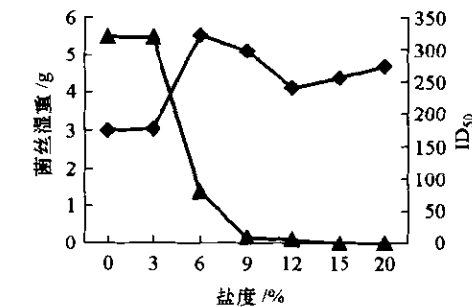


图 2 菌株 0616167 的耐盐度实验

◆ 湿重, ▲ ID₅₀

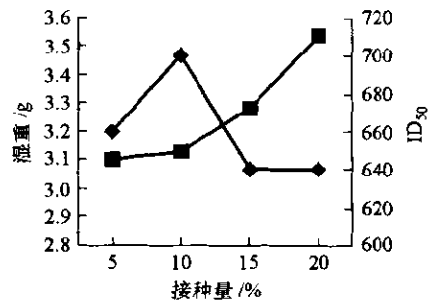


图 3 菌株 0616167 接种量的影响

■ 湿重, ◆ ID₅₀

2.4 发酵条件优化

培养条件的适宜与否直接影响到菌体的生长和活性物质的合成。采用 $L_{16}(4^5)$ 多因素正交实验, 考察了碳源、氮源、装液量和发酵时间 4 个主要因素对菌株 0616167 的生长量和 ID_{50} 的影响, 结果见表 2。

菌株 0616167 菌体生长量分析: 经正交试验 SAS 统计分析, 氮源 (B)、装液量 (C) 各水平之间的差异达极显著, 碳源 (A)、发酵时间 (D) 各水平之间的差异显著。由 F 值可知, 因子主次顺序是 $C > B > D > A$, 最佳组合为 $C_4B_1D_4A_3$, 即培养基为蔗糖 20 g, 黄豆粉 15 g, 酵母粉 5 g, 蛋白胨 2 g, $CaCO_3$ 4 g, NaCl 4 g, 50 % 陈海水 1,000 mL, pH 7.2 ~ 7.4, 装液量为 100 mL/250 mL 三角瓶, 发酵 5d。

菌株 0616167 所产抗 B_{16} 细胞活性物质活性分析: 经正交试验 SAS 统计分析, A、B、C、D 各水平之间的差异均达极显著。由 F 值可知, 因子主次顺序是 $C > B > A > D$, 最佳组合为 $C_3B_4A_2D_2$, 即培养基为葡萄糖 20 g, 硝酸钾 15 g, 酵母粉 5 g, 蛋白胨 2 g, $CaCO_3$ 4 g, NaCl 4 g, 50% 陈海水 1,000 mL, pH 7.2 ~ 7.4, 装液量为 75 mL/250 mL 三角瓶, 发酵 5d。用此优化培养基发酵比用 SLM 培养基发酵的活性提高了 3 倍。

表 2 $L_{16}(4^5)$ 多因素正交实验结果

实验 序号	因 子					指 标			
	A	B	C	D	E	湿重 (g)		活性 ID_{50}	
						重复 1	重复 2	重复 1	重复 2
1	1	1	1	1	1	2.1492	2.5524	400	430
2	1	2	2	2	2	2.7842	2.8308	170	190
3	1	3	3	3	3	3.7012	4.1132	250	250
4	1	4	4	4	4	3.4149	4.3147	110	90
5	2	1	2	3	4	4.1727	4.2132	200	140
6	2	2	1	4	3	4.6267	2.8158	30	65
7	2	3	4	1	2	3.9959	3.8627	58	50
8	2	4	3	2	1	3.8565	3.6551	1320	1320
9	3	1	3	4	2	9.7691	5.5170	230	520
10	3	2	4	3	1	5.2228	5.4849	280	320
11	3	3	1	2	4	2.4771	2.7712	20	58
12	3	4	2	1	3	2.8841	2.6995	160	200
13	4	1	4	2	3	7.2291	7.7893	15	15
14	4	2	3	1	4	3.252	2.5940	52	48
15	4	3	2	4	1	3.1523	3.2520	340	350
16	4	4	1	3	2	2.1492	2.5524	390	160

在碳源方面, 现在普遍认为速效碳源作为生长碳源经常影响次生代谢物的形成, 而淀粉等迟效碳源经常作为发酵次级代谢物的最好碳源。对于菌株 0616167 的生长, 最适碳源为蔗糖, 但蔗糖、麦芽浸提物和葡萄糖之间差异不显著; 对于活性物质的合

成, 则最适碳源为葡萄糖, 葡萄糖显著优于其它3个水平。因此, 可认为菌株 0616167 能够很好地利用速效碳源葡萄糖促进生长繁殖并生成抗 B₁₆ 细胞活性物质。

氮源作为微生物生长所需的营养因子, 在微生物的次级代谢研究中起着很重要的作用。对于菌株 0616167 的生长, 最适氮源为黄豆粉, 其显著优于另外3个水平, 即菌株 0616167 能够很好地利用黄豆粉促进其生长; 对于活性物质的合成, 则最适氮源为硝酸钾, 硝酸钾显著优于其它3个水平, 即在酵母粉和蛋白胨的作用下, 菌株 0616167 的生长和生成活性物质的最适氮源为无机氮源, 这有利于活性物质的进一步分离纯化, 降低生产成本。

在装液量方面, 对于菌株 0616167 的生长, 4 和 3 水平显著优于 2 和 1 水平, 4 和 3 水平差异不显著, 表明装液量为 75 mL 和 100 mL 有利于菌株 0616167 的生长, 该菌株为微好氧菌; 对于活性物质的合成, 则最适装液量为 75 mL, 其显著优于其他3个水平, 而 100 mL 的装液量最不利于生成活性物质。究其原因, 菌株 0616167 可能是在微好氧条件下生长并合成活性物质, 该活性物质的产生需要一定的氧气, 然而氧气充足或缺乏均抑制活性物质的产生。综合考虑菌株 0616167 的生长和活性物质的合成, 则最适装液量为 75 mL。

在发酵时间方面, 对于菌株 0616167 的生长, 最适发酵时间为 7d, 但发酵 5d、6d 和 7d 差异不大; 对于活性物质的合成, 则最适发酵时间为 5 d, 此时生长已进入衰亡期 (图 1), 产生或释放对人体有用的抗生素等次生代谢产物。综合考虑菌株 0616167 的生长和活性物质的合成, 则最适发酵时间为 5 d。

3 结论

菌株 0616167 最适生长的 NaCl 浓度是 6 %, 能够耐受最高的 NaCl 浓度为 20 %, 在无 NaCl 时也能生长; 当盐度为 0 ~ 3 % 时, 细胞毒活性最高, 随着盐度的增加活性下降甚至丧失, 菌株 0616167 属于海洋微生物。

0616167 的最适发酵条件为: 葡萄糖 20 g, 硝酸钾 15 g, 酵母粉 5 g, 蛋白胨 2 g, CaCO₃ 4 g, NaCl 4 g, 50% 陈海水 1,000 mL, pH 7.2 ~ 7.4, 装液量为 75 mL/250 mL 三角瓶, 发酵时间为 5 d。通过优化, 细胞毒活性提高了 3 倍。

致谢 本研究得到林海鹏、高 昊、胡中才、郭 刚等人的帮助, 特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 林 鹏. 厦门大学学报 (自然科学版), 2001, 40 (2): 592 ~ 603.
- [2] Sarma V V, Hyde K D, Vittai B P R. *Hydrobiologia*, 2001, 455: 41 ~ 53.
- [3] Ananda K, Sridhar K R. *Can J Microbiol*, 2002, 48 (10): 871 ~ 878.
- [4] 郑忠辉, 缪 莉, 黄耀坚, 等. 厦门大学学报 (自然科学版), 2003, 4: 513 ~ 516.
- [5] 余志刚, 胡谷平, 吴耀文, 等. 中山大学学报 (自然科学版), 2001, 6: 123 ~ 124.
- [6] 闫莉萍, 洪 葵, 胡申才, 等. 微生物学报, 2005, 45 (2): 185 ~ 190.
- [7] Mosmann F R. *Journal Immunol Methods*, 1983, 65: 55.
- [8] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [9] Okami Y. *Microb Ecol*, 1986, 12: 65 ~ 78.