

雪白白僵菌红色素的初步鉴定及其与 环孢菌素 A 对底物缬氨酸的竞争

董惠钧* 张彤鑫 昌大莉

(聊城大学 药学院 山东 聊城 252000)

摘要:【目的】分离鉴定雪白白僵菌红色素, 分析红色素与环孢菌素 A 对底物缬氨酸的竞争和相互影响。【方法】对红色素进行分离纯化, 利用 UV、IR 和 ESI-MS 对红色素进行初步鉴定。采用缬氨酸分批补料培养, 通过控制溶氧水平, 以及添加红色素, 分析红色素与环孢菌素 A 合成之间的竞争关联及相互影响。【结果】经鉴定, 雪白白僵菌红色素分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 推测为含有芳环结构的蒽醌类化合物。在补加缬氨酸和高 DO 条件下, 环孢菌素的产量高于低 DO 水平, 相反红色素在低 DO 条件下合成量大于高 DO 水平。在不补加缬氨酸条件下, 实验结果与补加缬氨酸培养一致, 但是红色素和环孢菌素 A 的产量都显著降低。进一步添加外源纯化的红色素时, 随着添加量的增加出现了环孢菌素 A 合成先减弱后增加的变化。【结论】发现并证实了雪白白僵菌红色素与环孢菌素 A 合成都以缬氨酸为共同底物, 但两者的途径又相互独立。

关键词: 雪白白僵菌, 红色素, 环孢菌素 A, 缬氨酸

Identification of red pigment and it's biosynthesis depending on co-substrate valine in cyclosporine A production

DONG Hui-Jun* ZHANG Tong-Xin CHANG Da-Li

(College of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: [Objective] To identify red pigment produced by *Beauveria nivea* and further research the relationship between red pigment and cyclosporine A (CysA). [Methods] The red pigment was separated and identified by spectrum analysis including UV, IR and ESI-MS. The yield of red pigment and CysA was measured at different cultivation conditions, respectively. The internal relationship between the biosynthesis of red pigment and CysA was examined by adding the purified red pigment. [Results] The molecular formula of red pigment was confirmed as $C_{15}H_{10}O_5$ which contains benzene ring and aromatic ring ketone structure and belongs to anthraquinones. The further experiments revealed that the negative relationship dominated in the biosynthesis between CysA and red pigment. The case with higher productivity of CysA due to valine feeding and high DO must be lower red pigment yield. Especially, the foreign red pigment added during the cultivation would result in down first and then up for CysA production. [Conclusion] The red pigment produced by

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2007BAI29B01)

*通讯作者: Tel: 86-635-8239683; ✉: donghuijun_747@163.com

收稿日期: 2014-01-09; 接受日期: 2014-06-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-16

Beauveria nivea was firstly separated and identified. Importantly, the research results verified that the red pigment and CysA had independent biosynthesis pathways which shared with the same substrate valine.

Keywords: *Beauveria nivea*, Red pigment, Cyclosporine A, Valine

微生物能产生种类繁多的天然色素,如类胡萝卜素、黑色素、靛蓝、红曲色素和醌类色素等^[1]。不同的色素遵循不同的合成途径,例如类胡萝卜素是通过类异戊二烯途径合成^[2];黑色素的合成始于L-酪氨酸,经催化氧化生成多巴醌,再经歧化、异构化和氧化形成^[3];红曲色素则是通过聚酮途径合成^[4]。微生物色素的生物合成途径通常都比较复杂,合成基因成簇分布在基因组中,而且大多数为次级代谢产物^[5]。

丝状真菌雪白白僵菌(*Beauveria nivea*)是临床上广泛应用的环孢菌素 A (Cyclosporine A, CysA) 生产菌, CysA 是十一环肽的次级代谢产物,已被广泛用于器官移植和自身免疫疾病,例如糖尿病、系统性红斑狼疮、艾滋病以及银屑病等^[6]。我们培养雪白白僵菌时发现,在次级代谢阶段能够大量合成并分泌红色素,而且发酵液颜色的深浅与 CysA 的产量成负相关关系。因此,本文首先对红色素进行了初步分离鉴定,并定量分析了红色素与 CysA 在不同培养条件下生物合成的相互关系,揭示了两者的生物合成途径之间的相互关联。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 葡萄糖、果糖、L-缬氨酸、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 NaNO_3 、 KH_2PO_4 、KCl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等试剂购自国药集团化学试剂公司。无水甲醇、丙酮、石油醚、乙酸乙酯等有机溶剂购自汕头西陇化工股份有限公司。色谱级乙腈、甲醇购自天津康科德科技有限公司。土豆、豆粕粉等为市售。

460 型红外光谱仪,美国尼高力;UV3600 型紫外可见分光光度计,日本岛津;1100LC/MSD 型质谱仪,美国安捷伦;Mercury Plus 400 型核磁共

振波谱仪,美国瓦里安,PE2400 II 型元素分析仪,美国铂金埃尔默;P270 型制备型高效液相色谱仪,大连依利特;PrepHT 制备型色谱柱(21.5 mm×150 mm),美国安捷伦。

1.1.2 菌种: 雪白白僵菌 *Beauveria nivea* DL6,聊城大学药学院生物制药实验室保藏。

1.1.3 培养基(g/L): (1) 斜面培养基: 土豆 200, 葡萄糖 20, pH 自然。(2) 种子培养基: 葡萄糖 12, 豆粕粉 30, 果糖 5, 玉米浆 10, pH 6.0。(3) 发酵培养基: 果糖 60, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 20, L-缬氨酸 10, NaNO_3 5, KH_2PO_4 3, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, pH 6.5。

1.2 发酵方法

从保藏斜面接种摇瓶种子,在 27 °C 条件下培养 48 h,待菌体生长至对数中后期时,按照 2%接种量接种 10 L 种子罐(装液系数 0.75),在 27 °C、DO 不低于 30%条件下培养 40 h,待 pH 上升至 6.8 左右时,按照 10%接种量接种 30 L 发酵罐,发酵罐控制参数为:培养温度为 26 °C,通气量 0.3–1.2 L/(L·min),DO 控制在 30%以上,pH 自然变化,不控制,发酵时间约为 240 h,连续流加果糖控制碳源在适宜水平,果糖的流加量根据测定发酵液中残糖的数值进行调节,浓度控制在 20 g/L 左右。在补加缬氨酸分批发酵中,缬氨酸的补加量控制在 0.5 g/L 左右(残留量)。

1.3 分析方法

1.3.1 环孢菌素 A 含量^[7]: 取 5 mL 发酵液离心收集菌体,用 5 倍体积甲醇 30 °C 振荡提取 2 h,离心取上清测定环孢菌素 A 含量。高效液相色谱系统为 Agilent 1100,色谱柱为 C_{18} 反相柱(5 μm , 4.6 mm×250 mm),柱温 70 °C,流动相为甲醇:0.2 mol/L 磷酸(80:20,体积比),检测波长 210 nm,流速 1.4 mL/min,进样量为 20 μL 。

1.3.2 红色素含量^[8]: 分别吸取 1 mL 发酵液和 1 mL 相应空白液体培养基加入装有 9 mL 70% 甲醇溶液的具塞试管中, 振荡 15 min 后, 静置过滤得滤液, 用 1 cm 比色皿测其在 430 nm 处的吸光值 A_1 和 A_2 。以 70% 甲醇作为空白, 按下式计算不同发酵液的颜色。发酵液红色素色价 (U/mL) = $(A_1 - A_2) \times$ 稀释倍数。

1.4 色素提取分离^[9-10]

培养结束后取 2 500 mL 发酵液加入 3 倍体积丙酮搅拌浸提 30 min, 离心收集菌丝体, 用丙酮洗涤 3 次后, 合并离心上清液。向丙酮上清液中加入蒸馏水, 调节丙酮浓度低于 50%, 然后上样弱极性大孔吸附树脂 X-5 层析柱, 收集流出液。减压浓缩除去丙酮, 用低沸点石油醚 (70–90 °C) 萃取 3 次, 合并萃取相并经减压浓缩至干。用乙酸乙酯和石油醚混合流动相 (46:54, 体积比) 溶解上述浓缩物, 过滤除去不溶性杂质, 上柱 200–300 目层析硅胶柱, 观测红色素层析带的位移并收集红色素部分。将收集的红色素溶液减压浓缩至干, 再经制备型高效液相色谱分离纯度大于 98% 的红色素。制备高效液相色谱流动相为甲醇: 乙腈: 水 = 42:33:35 (体积比), 流速 5 mL/min, 检测波长为 237 nm, 收集高纯度流出液, 低温结晶, 过滤、减压干燥获得色素纯品 35 mg, 色素的纯度由 HPLC 检测分析, 由归一化法计算纯度为 98.6%, 然后对制得红色素粉末进行结构鉴定。

1.5 结构鉴定

1.5.1 紫外可见吸收光谱分析: 称取 10 mg 纯化红色素配制成浓度为 1 g/L 的甲醇溶液, 从 200–600 nm 波长范围进行紫外可见光谱扫描, 记录吸收值, 绘制紫外可见吸收光谱。

1.5.2 红外吸收光谱分析: 压制红色素 BrK 片, 从 0–4 000 cm^{-1} 进行波数扫描, 得红外吸收光谱图。

1.5.3 质谱分析: 配制红色素的 70% 甲醇水溶液, 直接进样进行质谱分析。质谱条件: ESI-MS 锥孔电压 60 V, 毛细管电压 3.88 kV, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂温度 300 °C。

1.5.4 元素分析: 元素分析条件: 燃烧温度 950 °C, 还原温度 500 °C, 检测温度 80 °C, 载气为氩气。

2 结果与分析

2.1 吸收光谱性质

红色素甲醇溶液经紫外可见光谱扫描, 分别在 226、258、290 和 427 nm 处有强吸收 (图 1)。参考文献判断 226 和 258 nm 是芳环的特征吸收峰, 290 nm 为芳酮基的特征吸收峰, 427 nm 为酚羟基的特征吸收峰^[8]。进一步对红色素进行了红外光谱分析 (图 2), 结果显示从波数 1 700–1 900 cm^{-1} 没有明显的吸收峰, 可推断该色素不含羧酸、酯、醛等结构。波数 3 400 cm^{-1} 处为多羟基伸缩振动峰, 波数 2 900 cm^{-1} 处为 CH_3 与 $-\text{CH}_2$ 的不对称伸缩振动峰, 波数 1 600 处常为芳杂环特征吸收峰, 波数 1 500 和 1 400 cm^{-1} 应为甲基弯曲振动峰, 波数 1 300 cm^{-1} 处为羰基峰, 波数 800 和 700 cm^{-1} 处为单取代苯的特征吸收。综合 UV 和 IR 光谱数据分析推断, 该红色素可能为具有芳环结构的蒽醌类物质。

2.2 质谱和元素分析

经 EMI-MS 分析, 红色素在 m/z 269 处有强吸收的分子离子峰, 可得红色素的分子量为 270。进一步经元素分析仪测定, C 元素为 66.4%, H 元素为 3.5%, O 元素为 29.6%, 没有 N、S 和 P 元素。综合上述分析, 推断红色素分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ 。

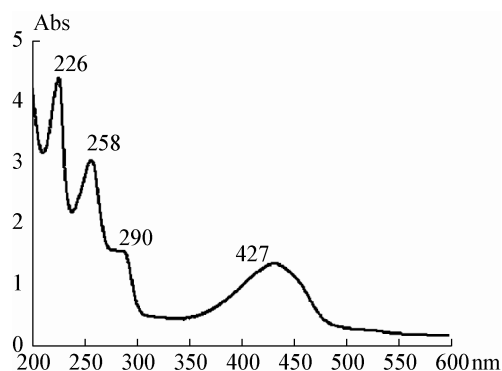


图 1 红色素紫外可见扫描图谱

Figure 1 Ultraviolet and visible spectrum of red pigment

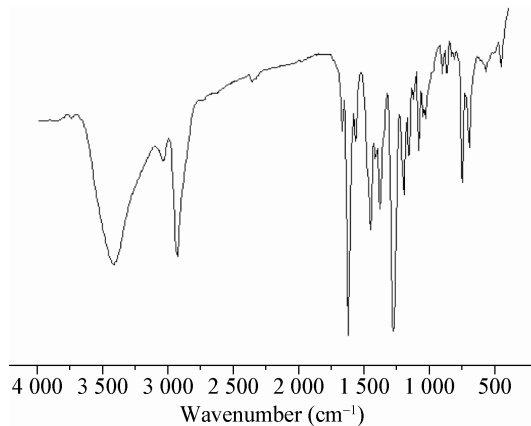


图2 红色素红外图谱

Figure 2 Infrared spectrum of red pigment

2.3 红色素与环孢菌素生物合成的相互影响

研究发现,环孢菌素 A 的合成对溶氧的要求较高^[11],我们也在培养雪白白僵菌过程中发现,当溶氧水平控制在 30%以上时,环孢菌素 A 的产量较高;而当溶氧低于 5%时,环孢菌素 A 的产量较低,相差 80%~90% (图 3A、B)。另外发现,当

发酵过程控制溶氧水平较高时,发酵液颜色浅红;相反溶氧较低时,发酵液颜色深红。

基于上述现象,为了研究环孢菌素 A 与红色素生物合成之间的相互影响,并探究缬氨酸是否是它们的共同合成底物,本部分实验定量分析了不同溶氧和缬氨酸补料条件下环孢菌素 A 和红色素的产量变化。结果显示,在补加缬氨酸和高溶氧条件下,环孢菌素的合成旺盛,产量达到 5.6 g/L (图 3A),红色素色价约为 51 U/mL (图 3C);而当缬氨酸补料条件不变,控制低溶氧水平时,环孢菌素 A 产量只有 3.1 g/L,相反,红色素的色价明显高于高溶氧控制时,约为 71 U/mL (图 3C)。

进一步在不补加缬氨酸的条件下,分别控制不同溶氧水平(DO>30 和 DO<5%)测定了环孢菌素 A 和红色素产量。结果显示,与补加缬氨酸培养相比,无论是高溶氧还是低溶氧培养,环孢菌素 A 和红色素的产量显著降低(图 3B、D),其中环孢菌素 A

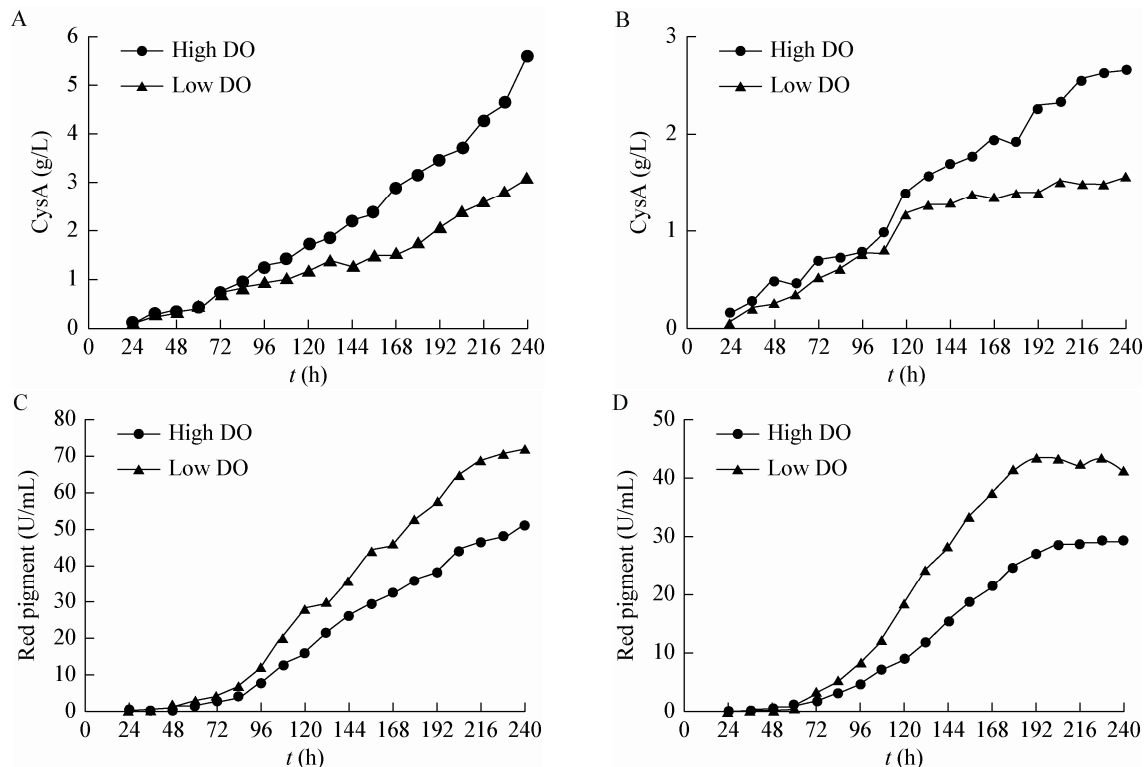


图3 不同培养条件下红色素对环孢菌素 A 合成的拮抗作用

Figure 3 Red pigment's antagonism effect on cyclosporine A biosynthesis

注: A、C: 补加缬氨酸实验; B、D: 不补加缬氨酸实验。

Note: A, C: Valine-feeding experiment; B, D: Non-feeding experiment.

产量分别为 2.56 g/L (高 DO)和 1.46 g/L (低 DO), 红色素色价分别为 41 U/mL (低 DO)和 27 U/mL (高 DO)。而在不同溶氧条件下两者合成的相互影响同缬氨酸补料培养的结果一致。

上述结果表明,补加底物缬氨酸能显著提高环孢菌素 A 和红色素的产量,推测缬氨酸应当是红色素和环孢菌素 A 的共同底物,并且环孢菌素 A 和红色素之间存在互相抑制的关系。

2.4 添加红色素对环孢菌素 A 合成的影响

为了进一步分析红色素对环孢菌素 A 合成的影响,在保证高溶氧(DO>30%)和补加缬氨酸条件下,在雪白白僵菌培养 48 h 时分别添加 0.05、0.10、0.20、0.40 和 0.60 g/L 红色素,考察对环孢菌素 A 合成的影响。结果如图 4 所示,当添加量为 0.05 和 0.10 g/L 时,环孢菌素 A 的合成受到抑制,产量均低于对照(不添加红色素),而且抑制作用随添加量增加而增强。但是,当红色素添加量为 0.20 g/L 时,对环孢菌素 A 合成的抑制作用显著减弱,与对照相比,产量略有下降;当红色素添加量大于 0.40 g/L,这种抑制作用发生逆转,特别是当添加量为 0.60 g/L 时,环孢菌素 A 的产量高于对照组。图 4 所示的实验结果中,高浓度红色素并没有抑制环孢菌素 A 的合成,反而促进 CysA 的合成,这一现象与图 3A 所示的两者相互抑制结果并不一致,有待于进一步研究。从本实验的结果分析,在红色

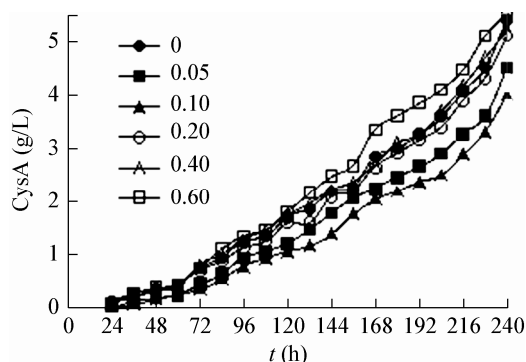


图 4 添加不同量红色素对环孢菌素 A 合成的影响
Figure 4 Effects of feeding red pigment on the biosynthesis of CysA

素的合成途径中同时存在着产物诱导和反馈抑制机制。当红色素浓度低时,会产生产物诱导效应,促使红色素合成相关酶系大量表达,底物缬氨酸消耗加快,导致环孢菌素 A 合成缺乏底物氨基酸,从而使环孢菌素 A 产量降低。当红色素超过一定浓度后,产物的反馈抑制机制启动,抑制合成酶系的表达,底物氨基酸消耗减慢,代谢流转向环孢菌素 A 的合成。

3 结论

许多微生物在次级代谢阶段,不但能合成重要的生物活性物质,而且还会分泌色素。一般来说,生物活性物质与色素的合成途径不同,且没有关联,但在雪白白僵菌中我们发现红色素与 CysA 的合成相互关联。在正常的高氧和补加缬氨酸培养中,CysA 的合成启动时间早于色素合成时间,当 CysA 大量合成时,红色素合成减弱,色价降低。相反,当通过抑制呼吸代谢降低 CysA 的合成强度时,红色素的合成就会加强。但当添加外源纯化的红色素时,随着添加量的增加出现了对 CysA 合成先减弱后增加的变化,推测可能的机理是红色素对自身合成途径的诱导和反馈抑制作用,在下一步的研究中我们将从分子和酶学水平解析红色素与 CysA 之间的途径关联作用。在本文中首次分离并初步鉴定了这种红色素,分子量大小为 270,分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$,初步判断为含有芳环结构蒽醌类化合物,在下一步研究中我们将通过多维核磁共振确定红色素的化学结构。

参考文献

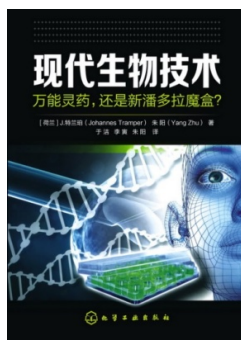
- [1] Dufossé L, Galaup P, Yaron A, et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005(16): 389-406.
- [2] Norihiko M, Hiroshi S. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 59(3): 169-181.
- [3] Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, et al. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour[J]. Molecular Pathology, 2001, 54(6): 414-418.

- [4] Hassan H, Alain K, Marie OL, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *monascus ruber* as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance[J]. Applied Environment Microbiology, 1999, 65(1): 311-314.
- [5] Royo JL, Moreno-Ruiz E, Cebolla A, et al. Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 116(2): 113-124.
- [6] Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review[J]. Journal Transplantation, 2012: 1-7.
- [7] May L, Argyrios M. Effect of temperature on the extraction kinetics and diffusivity of cyclosporin A in the fungus *Tolypocladium inflatum*[J]. Biotechnology Bioengineering, 2007, 96(5): 945-955.
- [8] 崔堂兵, 刘清香. 尖孢镰刀菌生产蒽醌色素的液体发酵条件研究[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(9): 56-61.
- [9] 王学新, 王小董, 耿广青, 等. 一株珊瑚虫草菌丝培养物中天然色素的分离和高分辨质谱分析[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(4): 596-599.
- [10] 张梁, 楼志华, 陶冠军, 等. 一种蒽醌类色素的提取分离和结构分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1645-1646.
- [11] 郑孝贤, 邱观荣, 唐信东, 等. 环孢菌素 A 高产菌株摇瓶发酵及菌丝体的形态变化[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 97-99.

~~~~~

## 书 讯

### 现代生物技术——万能灵药，还是新潘多拉魔盒？



作者：(荷兰) Johannes Tramper & Yang Zhu;

于洁, 李寅, 朱阳(译)

出版：化学工业出版社

ISBN: 978-7-122-17499-4

定价：49 元

开本：16

装帧：平装

页码：248

现代生物技术在解决人类社会面临的人口、健康、资源和环境等重大问题上表现出了巨大的应用潜力。然而，与历史上任何新兴技术面世的时候一样，广大民众对现代生物技术这样一种新兴高技术的内涵并不清楚，因此容易产生怀疑、误解，甚至恐惧，阻碍了现代生物技术的正常发展和应用。

为了更好地认识现代生物技术的科技内涵，本书以现代生物技术 in 食品和医疗领域的发展和应用为主线，希望以事实为依据，为读者提供一个丰富且可靠的信息来源，从而消除偏见，正确判断现代生物技术对人类带来的福音还是灾难。

本书共分四部分。第一部分是引言，重点介绍了现代生物技术的双面性。第二部分“日常饮食”，分别从奶酪、烘烤食品、葡萄酒、生物技术肉制品和所谓“妖魔食品”等入手，阐述生物技术和各种日常饮食之间的渊源。第三部分“健康也有极限”，则从抗生素、荷尔蒙、基因治疗、异种器官移植、人类基因组计划和干细胞治疗等六个与健康与医学相关的方面，分析现代生物技术与人类的密切关系。最后一部分是“尾声”，希望给读者留下一个印象和认识：“生物技术不一定是有害的！”

本书主要选材于日常生活中与现代生物技术密切相关的实例，所参考的文献多来自《自然》、《科学》等国际知名期刊或杂志，将专业的理解和大众的视角结合起来，向人们介绍现代生物技术的基本原理及其利弊；语言通俗易懂，大量使用简明易懂的插图和插页，深入浅出地解释生物技术的热门话题。

本书适合于生物类专业及其他拟了解现代生物技术的人士阅读参考。

订购方式：各大网站

化学工业出版社：<http://shop.cip.com.cn/product/20131001/283979787122174994.html>