

文章编号: 1673-1689(2010)04-0589-06

粘细菌 AHB103-1 发酵生产抗肿瘤活性物质

徐 凤¹, 陶文沂^{* 1, 2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 研究了培养基成分和发酵工艺条件对 AHB103-1 产生抗肿瘤活性物质的影响。结果表明, 较优培养基为: 碳源为玉米淀粉; 氮源为酵母粉; 碳氮比为 12: 6; 培养基中添加 5 mg/L 的 Gly、Glu 和 Ala; 10 mg/L 的 Try 和 Tyr; 1.0 mg/L 的 LiSO₄、MnCl₂、Na₂MoO₄ 和 NaH₂PO₄ 对抗肿瘤活性物质的生成有明显的促进作用。优化后的发酵工艺条件为: 发酵周期 7 d, 起始 pH 7.4, 发酵温度 30 ℃; 接种种龄 4 d; 500 mL 摇瓶装液量 125 mL; 摇床转速 150 r/min。

关键词: 培养基; 发酵工艺条件; 抗肿瘤活性物质

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Study on the Production of Antitumor Metabolite by Myxobacteria AHB 103-1

XU Feng¹, TAO Wen-yi^{* 1, 2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study investigated the effect of medium compositions and the environmental conditions on the production of antitumor metabolite and listed as follows: carbon source, corn starch, nitrogen source, yeast extract; the ratio of carbon and nitrogen, 12: 6; If 5 mg/L Gly, Glu, Ala, 10 mg/L Try, Tyr, 1.0 mg/L LiSO₄, MnCl₂, Na₂MoO₄, NaH₂PO₄ were supplemented to the culture broth, the yield of antitumor secondary metabolite would be significant improved. The optimum fermentation conditions were as follows: fermentation term, 7 d; initiative pH 7.4; fermentation temperature, 30 ℃; seed culture term, 4 d; the volume of culture liquid contained in 500 mL conical tank, 125 mL; rotor speed, 150 r/min.

Key words: medium, fermentation conditions, antitumor secondary metabolite

粘细菌是一类具有复杂多细胞形态的革兰氏阴性菌, 它能产生丰富的活性次级代谢物, 这些物质不但结构新颖, 而且具有其他微生物的代谢物所不具备的活性作用机制^[1], 尤其是其中的纤维堆囊

菌属活性物质的产率更高, 达 96%。1987 年, 在纤维堆囊菌中发现与紫杉醇具有相同作用机制的 epothilones 之后, 它更激起人们广泛的研究兴趣^[2]。AHB103-1 也是一种纤维堆囊菌, 作者重点

收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA021501)。

* 通信作者: 陶文沂(1946-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物工程和生物制药方面的研究。Email: wyt_ao1946@163.com

研究了它发酵生产抗癌活性物质的工艺条件和培养基组成,并对它的形态和理化特征也进行了初步的研究。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 纤维堆囊菌 AHB103-1,作者所在实验室保藏菌株。

1.1.2 培养基

1) 种子培养基^[3-4] (组分 g/L): 土豆淀粉 10.0,葡萄糖 2.0,酵母粉 2.0,脱脂奶粉 4.0。

2) 发酵培养基: 氮源优化培养基(组分 g/L): 玉米淀粉 12.0,各种氮源 6.0,甘油 5.0,XAD-16 大孔树脂 20.0。

3) 碳源优化培养基(组分 g/L): 各种碳源 12.0,酵母粉 6.0,甘油 5.0,XAD-16 大孔树脂 20.0。

4) 碳氮比优化培养基(组分 g/L): 玉米淀粉 12.0,酵母粉 7 个水平(2、4、6、8、10、12、15),甘油 5.0,XAD-16 大孔树脂 20.0。

5) α-CEVY/4 平皿培养基(组分 g/L): α纤维素 1.0,安琪活性干酵母 2.5,CaCl₂ 1.0,琼脂 15.0。

6) 各种碳源平皿培养基(组分 g/L): 碳源(蔗糖、麦芽糖、木糖、纤维二糖、半乳糖、马铃薯淀粉、山梨糖、果糖、α纤维素、甘露糖) 10.0,KNO₃ 5.0,琼脂 15.0。

7) 葡萄糖平皿培养基(组分 g/L): 葡萄糖分别为 10.0、8.0、6.0、4.0、2.0、1.0,KNO₃ 5.0,琼脂 15.0。

8) 硫铵平皿培养基(组分 g/L): 马铃薯淀粉 10.0,硫铵 5.0,琼脂 15.0。

除α-CEVY/4 平皿培养基外,以上所有培养基均额外添加以下无机物质(组分 g/L): CaCl₂ 1.0,MgSO₄·7H₂O 1.0,Fe(Ⅱ)-Na-EDTA 0.008。

以上各种培养基均用 10%KOH 调 pH 至 7.2,121℃灭菌 20 min。

1.1.3 活性物质筛选培养基 10%小牛血清,90% RPMI1640,2 mmol/L L-谷氨酰胺,100 U 青霉素和 100 U 的链霉素。

1.1.4 肿瘤细胞株 人肝癌细胞 HepG 2,江南大学生物制药系分子药理实验室惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 待测活性样品的制备 取树脂的甲醇提取液 200 μL 置于恒重的离心管中,于 45℃真空干燥

至恒重,用 20 μL DMSO 溶解样品。

1.2.2 细胞毒活性测定 采用 MTT 法。取对数生长期的 HepG2 癌细胞,配制成单细胞悬液,每孔 8 000 个接种于 96 孔细胞培养板。37℃培养 24 h 后加样,每种样品取 5 μL,用培养液稀释到 1 mL 后加入 96 孔板,每孔加 200 μL 含样品的培养液,设 4 个平行孔。继续培养 48 h 后,各孔再加入 20 μL 5 mg/mL MTT 液,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加 200 μL DMSO,振荡 10~20 min,570 nm 波长测定 A 值,重复 3 次,计算药物对细胞的抑制率^[5-6]。

1.2.3 细胞毒作用的显微拍照 取对数生长期的 HepG2 癌细胞,调细胞浓度 1×10⁵ 个/mL,加入细胞培养瓶中。饥饿培养 24 h 后,换正常培养基再培养 24 h,然后分别加入样品,37℃培养 24、48 h 后显微拍照^[7-8]。

1.2.4 发酵工艺条件的优化 根据单因素实验的结果,利用 L₁₈(3⁶) 正交表对发酵时间、起始 pH 值、发酵温度、接种种龄、摇瓶装液量、摇床转速等影响比较显著的发酵工艺条件进行优化,结果见表 1。

表 1 发酵条件的正交实验因素和水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal experiment for fermentation conditions

水平	A 发酵 时间/ d	B 起始 pH 值	C 发酵 温度/ ℃	D 接种 种龄/ d	E 500 mL 摇瓶 装液量/ mL	摇床 转速/ (r/min)
1	7	7.0	28	3	75	125
2	8	7.2	30	4	100	150
3	9	7.4	32	5	125	175

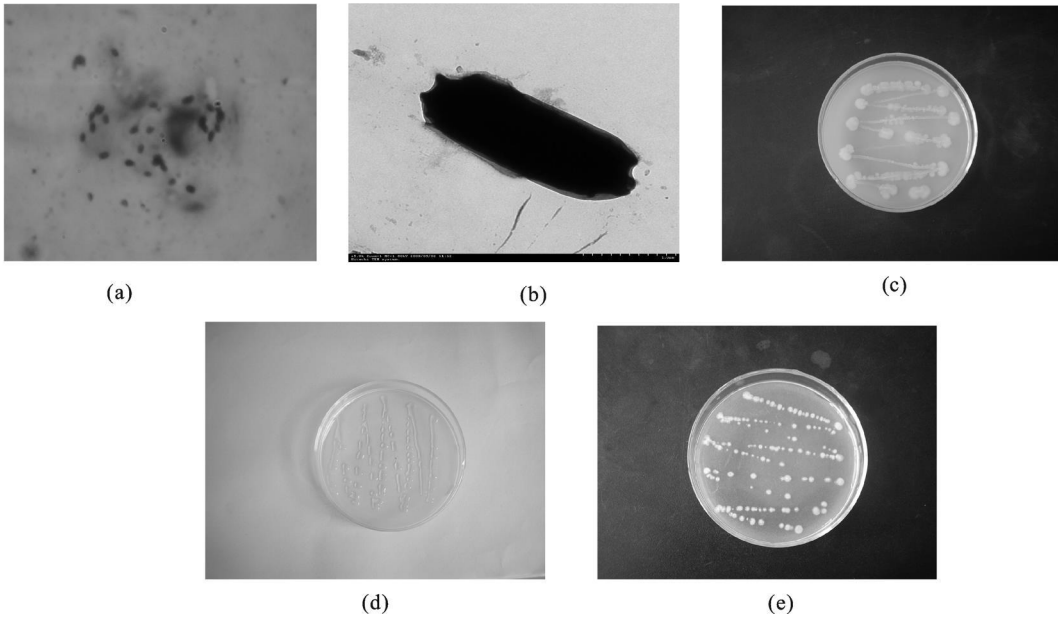
2 结果与分析

2.1 粘细菌的形态及生理生化特征

粘细菌 AHB103-1 为末端钝圆的杆状菌,外有一层黏液状荚膜包裹,无鞭毛,见图 1。透射电镜下营养细胞大小为 0.8~1.0 μm×2.5~3.0 μm。在 α-CEVY/4 平皿培养基上菌落为灰白色,呈放射状生长,菌落直径达 5~7 mm,有少量黏液产生。这种菌在不同培养基上生长形态差异很大,在各种糖类较丰富的培养基上均发育为乳白晶莹的菌落,上有一层透明的黏液,发育至 5~6 d 时,甘露糖、马铃薯淀粉培养基上黏液明显变黄,菌开始聚集,标志着开始形成子实体。其他几种糖类培养基上未观察到聚集现象。而在碳源匮乏的培养基(葡萄糖≤0.2 g/dL)或者难利用的培养基(α纤维素)上,菌落皆米白,不透明,没有黏液产生,菌不聚集。由此可

知, 虽然 AHB103-1 的子实体是在营养快耗竭时产生, 但那些本来就营养匮乏的培养基也不容易形成子实体。那些透明的黏液可能是菌聚集的必要条

件, 粘细菌可能是通过这些黏液来运动的, 而黏液的形成与基质中糖的质量浓度密切相关。粘细菌 AHB103-1 的生理生化特征见表 2。



注: a) 普通光学显微镜下营养细胞的形态(1600×); b) 透射电镜下营养细胞的形态(40000×); c) α-CEVY/4 平皿培养基上培养 6 d 的平板菌落形态; d) 纤维二糖平皿培养基上培养 6 d 的平板菌落形态; e) 0.2 g/dL 葡萄糖平皿培养基上培养 6 d 的菌落形态

图 1 粘细菌 AHB103-1 的不同形态特征

Fig. 1 Different morphological features of myxobacteria AHB103-1

表 2 粘细菌 AHB103-1 的生理生化特征
Tab. 2 Physiological and biochemical features of myxobacteria AHB103-1

生理生化特征	结 果
生长温度	10~ 35 ℃(琼脂平板测定)
生长 pH	4. 5~ 10. 0
过氧化氢酶	+
革兰氏染色	-
D-果糖	-
蔗糖	+
D-半乳糖	+
α-纤维素	+
麦芽糖	+
L-山梨糖	-
D-甘露糖	+
D-木糖	-
纤维二糖	+
硫酸铵	+
马铃薯淀粉	+
葡萄糖	+

注: + 为利用; - 为不利用。各种糖类利用情况均在平皿

中测定。

2.2 粘细菌 AHB103-1 发酵条件的研究

2.2.1 碳氮源的优化 图 2 比较了不同氮源对总活性的影响。以酵母粉为惟一氮源时, 总抑制率最高, 2 mL 发酵液所含的活性物对肿瘤细胞的抑制率达 84. 52%, 花生饼粉次之, 总抑制率为 76. 85%。无机氮源氯化铵、硫酸铵、KNO₃ 为惟一氮源时总抑制率明显低于各种有机氮源, 其中硫酸铵的总抑制率仅为 6. 07%。以 KNO₃ 为惟一氮源时, 菌 AHB103-1 可以良好生长, 但其总活性却比各种有机氮源低得多。可能是因为各种有机氮源含有活性物质的前体或促进因子。

图 3 比较了不同碳源对总活性的影响。以玉米淀粉为惟一碳源时, 总抑制率最高, 2 mL 发酵液所含的活性物质对肿瘤细胞的抑制率达 74. 68%。α-纤维素次之, 总抑制率为 73. 72%。而葡萄糖为惟一碳源时, 活性物含量最低, 仅为 38. 13%。由此可知, 缓慢利用的碳源更适合用来生产抗肿瘤活性物质。

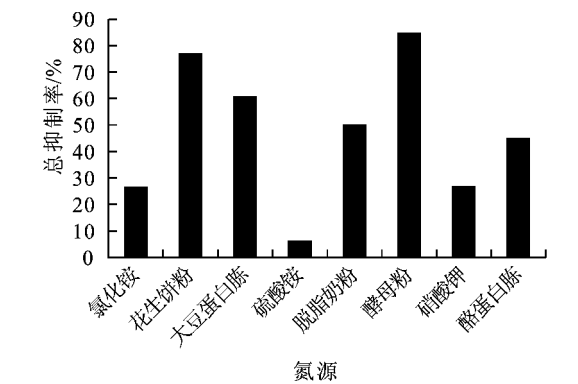


图 2 氮源对总抑制率的影响

Fig. 2 Influence of carbon sources on the total inhibition

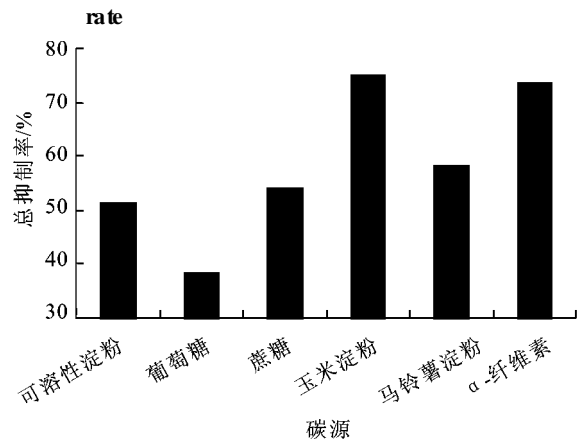


图 3 碳源对总抑制率的影响

Fig. 3 Influence of carbon sources on the total inhibition

图 4 比较了不同碳氮比对总活性的影响。当氮源质量浓度由 2 g/L 升高至 6 g/L 时,总抑制率也相应由 47.55% 迅速增加至 85.07%,但氮源质量浓度由 6 g/L 继续增至 15 g/L 时,总抑制率变化很小。

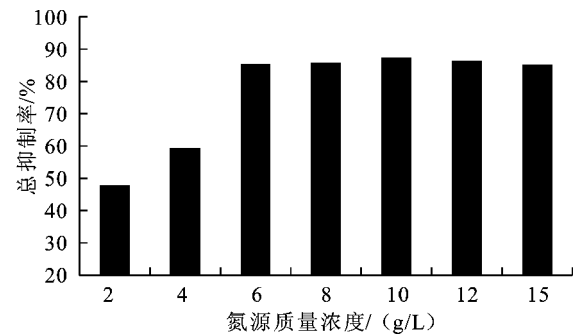


图 4 碳氮比对总抑制率的影响

Fig. 4 Influence of C/N on the total inhibition rate

因此,氮源选择酵母粉,碳源选择玉米淀粉,碳氮比选择 12:6 时较有利于抗肿瘤活性物质的产生。

2.2.2 发酵工艺条件的优化

化见表 3。

表 3 发酵条件优化正交实验结果及极差分析

Tab.3 Results and range analysis of orthogonal experiment for fermentation conditions

实验号	A	B	C	D	E	F	总抑制率/%
1	1	1	1	1	1	1	72
2	1	2	2	2	2	2	85
3	1	3	3	3	3	3	55
4	2	1	1	2	2	3	70
5	2	2	2	3	3	1	63
6	2	3	3	1	1	2	66
7	3	1	2	1	3	2	64
8	3	2	3	2	1	3	35
9	3	3	1	3	2	1	26
10	1	1	3	3	2	2	31
11	1	2	1	1	3	3	70
12	1	3	2	2	1	1	78
13	2	1	2	3	1	3	32
14	2	2	3	1	2	1	58
15	2	3	1	2	3	2	85
16	3	1	3	2	3	1	35
17	3	2	1	3	1	2	28
18	3	3	2	1	2	3	46
K ₁	391	304	351	376	311	332	
K ₂	374	339	368	388	316	359	
K ₃	234	356	280	235	372	308	
k ₁	65.17	50.67	58.50	62.67	51.83	55.33	
k ₂	62.33	56.50	61.33	64.67	52.67	59.83	
k ₃	39	59.33	46.67	39.17	62	51.33	
R	26.17	8.66	14.66	25.5	10.17	8.5	

根据极差 R 的大小排出各因素作用的主次顺序为 A>D>C>E>B>F,即发酵时间>接种种龄>发酵温度>500 mL 摇瓶装液量>起始 pH 值>摇床转速,发酵时间和接种种龄对总活性的影响最为显著。优化后的发酵工艺条件为 A₁B₃C₂D₂E₃F₂,即发酵时间 7 d,起始 pH 7.4,发酵温度 30℃,接种种龄 4 d,500 mL 摇瓶装液量 125 mL,摇床转速 150 r/min。

2.2.3 前体物质和微量元素的影响 氨基酸作为菌体蛋白质合成的底物,影响着菌的生长和次级代谢产物的合成。图 5 研究了不同质量浓度的氨基酸对总活性的影响。当添加量为 5 mg/L 时,Ala(丙氨酸)、Glu(谷氨酸)、Gly(甘氨酸)相对空白组

均对总活性有大幅度的提高,其中 Ala 对总抑制率提高幅度最大,达 34 63%。而添加 5 mg/L 的 Trp (色氨酸)、Phe(苯丙氨酸)、Tyr(酪氨酸)时,总活性反而下降,添加 Trp 总活性下降最明显,达 89 80%,可能低质量浓度的 Trp、Phe、Tyr 对活性物的产生有抑制作用。当添加量升至 10 mg/L 时, Gly、Glu、Ala、Thr 组的总活性均有下降,其中 Gly 组下降的幅度最大,当质量浓度由 5 mg/L 提高到 10 mg/L 时,总抑制率下降了 59 05%,比空白组低 48 37%;而 Ala 组相对空白组对总活性仍有明显的促进作用。当质量浓度由 5 mg/L 提高到 10 mg/L 时,Trp 组的总抑制率提高了 10 84 倍,相对空白总活性提高了 27 65%;Tyr 组的总抑制率提高了 1 68 倍,相对空白总活性提高了 38 17%。因此,培养基中添加 5 mg/L Gly、Glu、Ala、10 mg/L Trp、Tyr 对活性物的产生会有明显的促进作用。

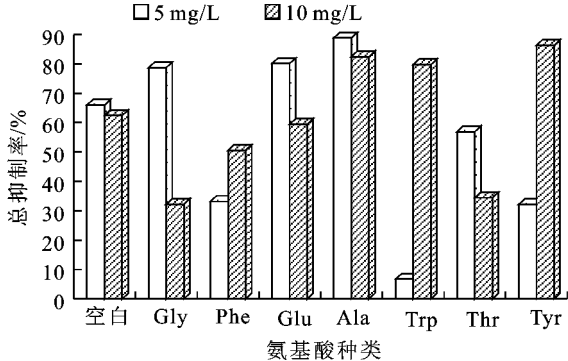


图 5 氨基酸对总抑制率的影响

Fig. 5 Influence of amino acid on the total inhibition rate

无机盐和微量元素可能影响菌体酶系的作用从而对菌体内的许多生物合成途径,因而可能对

活性物质的产生有一定的影响,结果见图 6。LiSO₄、MnCl₂、Na₂MoO₄、NaH₂PO₄对总活性均有明显的提高,其中 NaH₂PO₄ 提高的幅度最大,达 38 34%。而 K₂HPO₄、CuSO₄、ZnSO₄均对总活性有强烈的抑制,总活性分别下降了 97 66%、96 48%、96 84%。因此,在培养基中添加 1 0 mg/L 的 LiSO₄、MnCl₂、Na₂MoO₄和 NaH₂PO₄有利于总活性的提高。

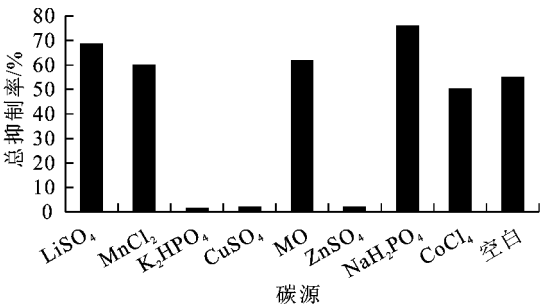


图 6 氨基酸对总抑制率的影响

Fig. 6 Influence of inorganic salts on the total inhibition rate

2 3 活性物质对肿瘤细胞形态的影响

进一步研究了 AHB103-1 的代谢产物对 HepG2 形态的影响,结果见图 7。加药 24 h 后,加药组相对空白组的细胞数目明显减少,活性物对细胞的生长表现出明显的抑制作用,有少量细胞开始凋亡,悬浮在培养液中,但相对未加药时活细胞总数基本没变。继续培养至 48 h 时,培养液中大量细胞开始凋亡,活细胞很少,少量存活的细胞形态也有明显的改变,细胞变得肿胀,明显拉长。而对照组细胞饱满,贴壁生长良好,细胞数量相对 0、24 h 明显增加。

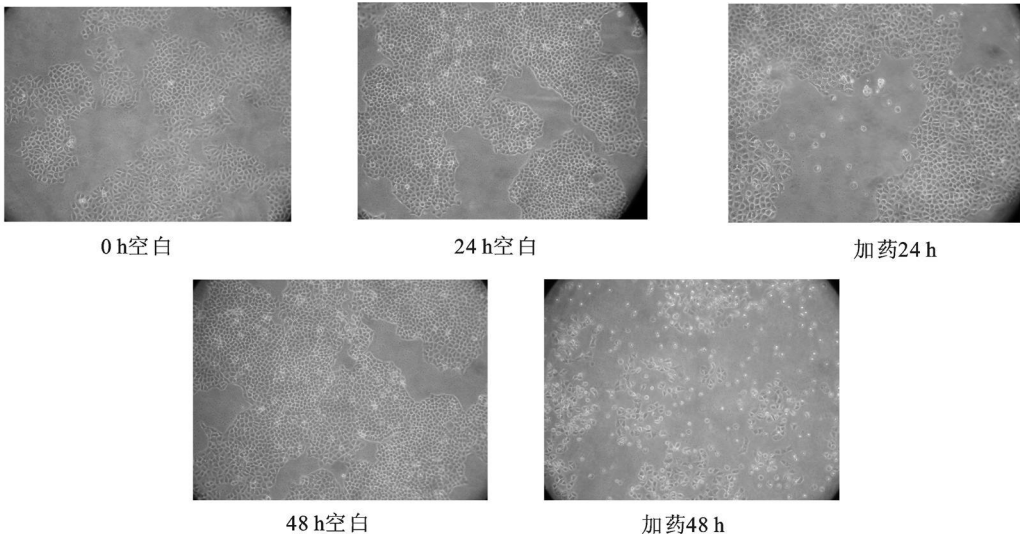


图 7 加样前后肿瘤细胞形态的变化

3 结 语

粘细菌 AHB103-1 可以利用蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖,不能利用 D-果糖、L-山梨糖、D-木糖。能在以硫酸铵和 KN_3 为唯一氮源的琼脂平皿上发育为菌落。在不同的固体培养基上形态差别较大,在各种糖类较丰富的培养基上均发育为乳白晶莹的菌落,上有一层透明的黏液,而在碳源匮乏(葡萄糖 $\leq 0.2\%$)或者难利用(α -纤维素)时,菌落皆米白,不透明,没有黏液产生,菌

不聚集。

以对人肝癌细胞 HepG2 的总抑制率为选择指标时,碳源选择玉米淀粉,氮源选择酵母粉,碳氮比选择 12:6,培养基中添加 5 mg/L Gly、Glu 和 Ala, 10 mg/L Trp 和 Tyr, 1.0 mg/L 的 LiSO_4 、 MnCl_2 、 Na_2MoO_4 和 NaH_2PO_4 对活性物质的产生有明显的促进作用。优化后的发酵工艺条件为:发酵时间 7 d,起始 pH 7.4,发酵温度 30 $^\circ\text{C}$,接种龄 4 d, 500 mL 摇瓶装液量 125 mL,摇床转速 150 r/min。

参考文献(References):

- [1] Reichenbach H, Gerth K, Irschik H, et al. Myxobacteria: A source of new antibiotics[J]. **Trends Biotechnol**, 1988, 6: 115-121.
- [2] Bollag D M, Mcquaney P A, Zhu J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol like mechanism of action[J]. **Cancer Res**, 1995, 55: 2325-2333.
- [3] Gerth K, Bedorf N, Hofle G, et al. Epothilones A and B: antifungal and cytotoxic compounds from sorangium cellulosum (*Myxobacteria*) [J]. **J Antibiot**, 1996, 49: 560-563.
- [4] 郭文杰,陶文沂,毕芳,等.粘细菌 AHB125 代谢产物的理化特征及其体外抗癌活性[J].吉首大学学报:自然科学版, 2007, 28(2): 82-86.
GUO Wen-jie, TAO Wen-yi, BI Fang, et al. Physical chemical characters of metabolites of myxobacterium AHB125 and bioactivities of antitumor in vitro[J]. **Journal of Jishou University: Natural Science Edition**, 2007, 28(2): 82-86. (in Chinese)
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. **J Immunol Methods**, 1983, 65: 552-631.
- [6] 张炜.白花蛇舌草对肿瘤细胞信号传导通路的抑制[J].食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 50-53.
ZHANG Wei. The inhibition of hedyotis diffusa to the signal transduction pathway of tumor cells[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2006, 25(1): 50-53. (in Chinese)
- [7] Koyama S, Tanaka S, Haniu H, et al. Yoshinol TR inhibits B16 melanoma cell growth in vivo and induces apoptosis-like (quantum thermodynamic) cell death[J]. **Gen Pharmacol**, 1999, 33: 161-172.
- [8] Ikeda K, Nagase H. Magnolol has the ability to induce apoptosis in tumor cells[J]. **Biol Pharm Bull**, 2002, 25(12): 1546-1549.

(责任编辑:李春丽)