

一株产紫杉醇真菌发酵条件的研究

张亚妮,董兆麟

(西北大学 生命科学学院,陕西 西安 710069)

摘要:研究了在一株产紫杉醇真菌的发酵培养中,初始糖浓度、碳源、氮源和前体饲喂对生物量和紫杉醇合成的影响。结果表明,一定氮源和前体饲喂对紫杉醇产量提高有显著促进作用。在发酵过程中补加糖也有一定影响。

关键词:紫杉醇;内生真菌;前体饲喂

中图分类号:Q939.79 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2002)03-0310-03

紫杉醇(taxol)是在20世纪60年代早期从太平洋紫杉中分离出来的一种二萜类生物碱,经对其化学、药理方面的研究,表明其具有广泛的抗癌活性,如对乳腺癌、子宫癌等都具有较好的疗效^[1]。1992年美国FDA正式批准其上市,从此,紫杉醇成为抗癌新药的热点。然而,紫杉醇在红豆杉中含量极低,且资源短缺,根本不能满足市场需求,但人们发现红豆杉内生真菌也能产紫杉醇^[2],这无疑为解决紫杉醇药源危机提供了一种新的途径。但是,真菌生产紫杉醇产量也极其有限,这就需要对培养基组成和培养条件进行优化。本文研究了氮源、碳源和苯丙氨酸对内生真菌产紫杉醇的影响,从而为真菌培养生产紫杉醇的产业化提供了依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

由本实验室提供,以下简称T₁₄菌。

1.2 培养基

PDA 固体培养基;PDB 液体培养基。

1.3 发酵实验

250 mL 三角瓶装入 50 mL 培养基,灭菌,冷却后接入 0.5 cm² 的菌丝块,于 30℃ 下摇床培养,58~64 h 不等。苯丙氨酸在培养基灭菌后冷加入。

1.4 残糖测定

准确取一定量的发酵上清液,放入 250 mL 三

角瓶中,加入 10 mL 6 mol/L HCl 和 15 mL 水,放入沸水浴中 30 min,用 I₂-KI 测试水解终点,NaOH 中和,稀释定容后,用 3,5-二硝基水杨酸法测定。

1.5 蔗糖测定

Roe 比色法^[3]

1.6 生物量测定

取一定体积培养液于 4 000 r/min,离心 20 min,倾去上清液,用蒸馏水洗涤 2 次,收集菌体,80℃ 烘至恒重,再称重。

1.7 紫杉醇的提取

C18 柱;柱长 25 cm×0.5 cm;柱温为室温;柱压 2 300 PSI;流速 1 mL/min;检测波长 225 nm;流动相为甲醇:水=65:35;采用 Sigma 标品,浓度为 0.5 mg/mL,进样量为 2 μL;样品进样量 5 μL。

2 结果和讨论

2.1 T₁₄菌的液体发酵

多次液体发酵表明,菌株在 PDB 液体发酵中生长缓慢,一般需 64 h 左右。在发酵后期发酵液呈紫色,且粘度增大,有色素分泌。

采用 PDB 培养基测定 T₁₄菌的生长情况,结果如图 1,菌体在进入 12 h 后快速生长,稳定期较短,在 40 h 以后进入衰退期,进而菌体开始自溶。

2.2 碳源的影响

以 PDB 作为基本培养基,分别选用葡萄糖、蔗

收稿日期:2001-03-06

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(98SM06)

作者简介:张亚妮(1975-),女,陕西户县人,西北大学教师,硕士,从事微生物学研究。

糖、麦芽糖和乳糖为碳源,观察其对菌体生长和紫杉醇产量的影响。结果表明:蔗糖和麦芽糖为碳源时含量相对较高,分别为 $78.56 \mu\text{g}/\text{L}$ 。在以葡萄糖和蔗糖为碳源时,发酵物分泌色素,以麦芽糖和乳糖为碳源时几乎不分泌色素,但菌体密度较小。

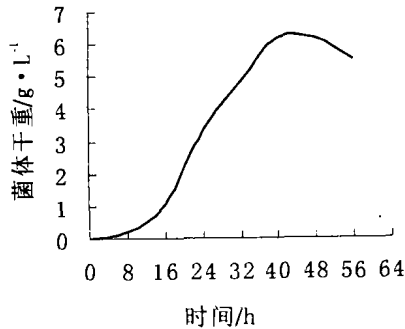


图 1 菌体生长曲线

Fig. 1 Time course of biomass dry weight

2.3 氮源的影响

分别考查氯化铵、硝酸铵、硫酸铵和蛋白胨等氮源对 T_{14} 菌产紫杉醇产量影响(见图 2)。结果表明:不同氮源对紫杉醇的产量影响较大。以氯化铵和硫酸铵为氮源时, T_{14} 生长较好,紫杉醇产量明显比以硝酸铵为氮源时高,而以蛋白胨为氮源时,紫杉醇产量急剧下降,可能是蛋白胨的某些成分抑制了紫杉醇的产生。

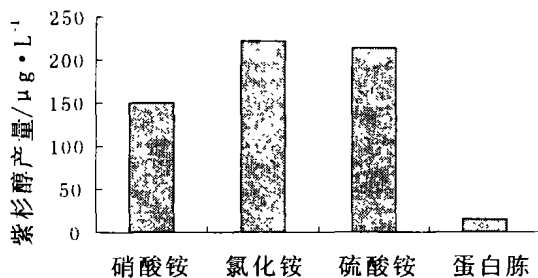


图 2 不同氮源对紫杉醇产量的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen source on taxol production

2.4 补加蔗糖的影响

在 T_{14} 菌发酵培养中,残糖变化如图 3 所示。

进一步研究菌体在 PDB 液体发酵过程中 24 h 时补加蔗糖量对菌体生长和紫杉醇产量的影响(见表 1)。结果表明:在一定范围内,随补加蔗糖量的增加,可以促进菌体的新一轮生长和繁殖,且紫杉醇含量也增加,而当每升补加蔗糖量为 30 g (即蔗糖总浓度 $37 \text{ g}/\text{L}$)时,菌体干重和紫杉醇产量都开始下降。这可能因为糖浓度提高而对应的提高了渗透压,导致膜蛋白部分降解,使菌体通透性增加,而使代谢物

更多地向外释放^[4],促进了产物的合成速率,提高了产量,但过高的糖浓度导致发酵液粘度增加,菌体呼吸困难,进而抑制了紫杉醇的生产。

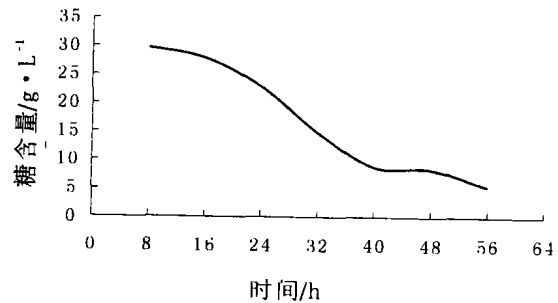


图 3 总糖随时间的变化关系

Fig. 3 Time course of total sugar

表 1 补加蔗糖量对菌体干重和紫杉醇产量的影响

Tab. 1 Effect of adding sucrose content on biomass dry weight and taxol production

补加蔗糖量 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	菌体干重 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	紫杉醇产量 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
对 照	4.539	82.15
10	5.532 5	88.93
20	5.984 5	94.97
30	3.121 5	54.76

2.5 前体饲喂的影响

在内生真菌的发酵过程中,前体对紫杉醇的影响如图 4 所示。结果表明,与对照组相比较,苯丙氨酸的浓度对紫杉醇的产量影响显著,当苯丙氨酸浓度达 $100 \text{ mg}/\text{L}$,紫杉醇量达 $146.4 \mu\text{g}/\text{L}$ 。其原因可认为苯丙氨酸为紫杉醇合成的底物。这与在植物细胞培养中添加苯丙氨酸的结果一致^[5],说明可能内生真菌在与宿主建立联生关系过程中,由于基因转移而导致其与植物某些代谢途径相似。

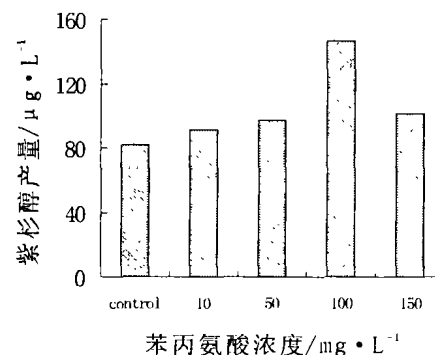


图 4 不同苯丙氨酸浓度对紫杉醇产量的影响

Fig. 4 Effect of different phenylalanine content on taxol production

3 结 论

紫杉醇是具有细胞毒作用的次生代谢产物^[6],在正常条件下不会大量合成,只有在特殊环境胁迫条件下才会大量合成。T₁₄菌在分泌色素以后,开始

停止生长,而紫杉醇又不溶于培养液,因此要提高紫杉醇含量必须提高菌体的生物量以及解决菌体分泌色素问题。我们可以根据其生物合成途径以及其他代谢途径相联系,选择有效的诱导子、前体物、培养条件的优化等条件来提高紫杉醇的产率。

参考文献:

- [1] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, *et al.* Plant antitumor agents VI The isolation and of taxol, a novel tileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2 325-2 327.
- [2] STOBEL G A, STAIERLE A, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces and reanae*, an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214.
- [3] 蔡武成, 袁厚积. 生物物质常用分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [4] DO C B, CORMIER F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions-anthocyanin production in graperino cell culture[J]. Plant Cell Rep, 1990, 9: 143-146.
- [5] ZHONG J J. Effect of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigments in suspended cultures of perlla frutescens cellsplant. suspension cell culture[J]. World J Micro Biotechnol, 1994, 10: 590-592.
- [6] 余龙江, 李 为, 梅兴国, 等. 前体促进紫杉醇生物合成的研究[J]. 生物技术, 1999, 9(1): 4-7.

(编 辑 徐象平)

A study on fermentation condition of endophytic fungus associated with taxol

ZHANG Ya-ni, DONG Zhao-lin

(The life Science institute Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Effects of sugar content, carbon source, nitrogen source and precursor feeding on taxol production of endophytic fungus in liquid fermentation were studied. The results showed: nitrogen source and precursor feeding resulted in significant increase of taxol production. Sugar also have a certain influence.

Key words: taxol; endophytic fungus; precursor feeding

(上接第 298 页)

- [3] 雷孝章. 长江上游防护林体系不同林种的生态经济效益研究[J]. 自然资源学报, 1998, 11(4): 364-371.

(编 辑 徐象平)

Analysis on the deteriorated mountains region of the southern calcareous stone region and its principle of the ecology

CHEN Hai, LIANG Xiao-ying

(Department of Urban and Resources Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Based on the principle of the ecology, the course of the deteriorated mountains region of the southern calcareous stone was discussed in two aspects. First, the ecology property of the deteriorated mountains region is elaborated; next, the ecological mechanism of the deteriorated mountains region is discussed. And then based on the basic ideas, the ecological principle of the resume of the deteriorated mountains region is elaborated.

Key words: the deteriorated mountains region; the complex ecological system of mountains region; the ecological principle