

海洋细菌 B3B 产河豚毒素特性的鉴定 及其发酵培养基优化*

范延辉^{1,2} 胡江春^{1**} 王书锦¹

(¹中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110016)

(²中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 从我国渤海红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)的卵巢中分离到了一株海洋细菌 B3B,对其发酵产物进行了分离和精制,通过小鼠试验、高效液相色谱试验及质谱分析,认定其发酵产物中含有河豚毒素(tetrodotoxin, TTX).采用均匀设计回归分析及优化系统对其培养基组分做了优化,获得了较理想的发酵培养基,使 TTX 的产量提高了 128.7%. 图 2 表 2 参 21

关键词 河豚毒素;红鳍东方鲀;均匀设计;小鼠单位

CLC Q936

Optimization of Culture Medium for a New Tetrodotoxin-producing Marine Bacterium B3B by Uniform Design*

FAN Yanhui^{1,2}, HU Jiangchun^{1**} & WANG Shujin¹

(¹Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract A new tetrodotoxin-producing marine bacterium, B3B was isolated from the ovary of puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea, and the tetrodotoxin (TTX) was identified by high-performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS) and mouse toxicity assay. UROS software was used to choose the optimum medium constituents. The TTX yield from the optimized medium was increased by 128.7%, compared to the original medium. Fig 2, Tab 2, Ref 21

Keywords tetrodotoxin; *Fugu rubripes*; uniform design; mouse unit

CLC Q936

河豚毒素(TTX)又称原毒素(Spheroidine)、东方鲀毒素(Fugu poison)、蝾螈毒素(Tarichatoxin),是一种剧毒无比的天然神经毒素,广泛分布于河豚、章鱼、海星、蝾螈等多种生物体内^[1~10]. TTX 的起源问题一直是人们争论的热点.有学者认为 TTX 是由生物体自身合成的;一些学者则支持 TTX 的微生物起源学说^[11],即 TTX 是由共生于生物体内的微生物代谢产生的.1986 年^[12],日本科学家 Noguchi 等首次从毒蟹(*Atergatis floridus*)的内脏中分离到了产 TTX 的弧菌.此后,其它产 TTX 的微生物陆续被国外的试验小组所发现^[13~19],初步证实了 TTX 的微生物起源学说.

TTX 的中毒机制是选择性地阻断钠离子通道,阻断神经兴奋的传导,使神经系统成麻痹状态^[20].其毒性是氰化钠的 1 250 倍^[21],1 g 足以致 500 人死亡. TTX 虽剧毒无比,但药用价值异常珍贵,具有降血压、抗心率失常、抑制癌症剧痛、局麻、戒毒等多种功能;另外,在生理学研究上,TTX 是神经细胞膜研究所必不可少的工具性药物.目前,TTX 都是从河豚鱼的内脏中提取的,每制备 1 g TTX 需要成千上万只河豚鱼;产 TTX

微生物的发现,为 TTX 的提取提供了一种更具潜力的资源.本文从我国渤海红鳍东方鲀的卵巢中分离到了一株海洋细菌 B3B,生物检测法、高效液相色谱(HPLC)及质谱检测(ESI/MS)的结果表明,其发酵产物中含有 TTX,对发酵培养基进行了优化试验,报道结果如下.

1 材料与方法

1.1 实验材料

海洋细菌 B3B,从我国渤海红鳍东方鲀卵巢中分离所得.

TTX 标准品购于 Sigma 公司.

改良伊莫松培养基($\rho/\text{g L}^{-1}$):蔗糖 20,酵母浸出粉 10,酪蛋白胨 6, NaCl 2,琼脂 20, pH 值自然;发酵培养基组成($\rho/\text{g L}^{-1}$):蔗糖 20,酵母膏 3,酪蛋白胨 6, NaCl 1, KH_2PO_4 2.5, pH = 6.5. 以上培养基 121 °C 灭菌 30 min.

1.2 实验方法

1.2.1 海洋细菌 B3B 的发酵培养及其 TTX 的分离与提取

挑取 2 环已活化好的 B3B 菌株,接种于含有 25 mL 发酵培养基、容量为 250 mL 的三角瓶中,28 °C、170 r/min 振荡培养 24 h. 然后将其作为种子液接种于含有 100 mL 发酵培养基、容量为 500 mL 的三角瓶中,30 °C、180 r/min 振荡培养 50 h. TTX 的提取方法参照文献^[23, 24]中的方法进行,酵产物经提取

收稿日期:2005-12-21 接受日期:2006-03-28

* 国家高科技研究发展计划(863 计划, No. 2002AA625020) Supported by the State High-tech R & D Program of China (863 Program, No. 2002AA625020)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: huje@iae.ac.cn)

精制后,采用小鼠法、高效液相色谱法(HPLC)及其质谱法(MS)进行检测。

1.2.2 发酵液中 TTX 含量的测定 采用日本法定检测 TTX 的方法——小鼠法进行测定。TTX 的含量用小鼠单位表示(MU or 220 ng),一个小鼠单位是指体重为 20 g 的小鼠,腹腔注射后 30 min 死亡所需 TTX 的量。

表 1 培养基组分
Table 1 Contents of medium

成分 Contents (w/%)	水平数 Levels								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蔗糖 Sucrose	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
酵母膏 Yeast extract	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
酪蛋白胨 Casein peptone	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
KH ₂ PO ₄	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8

2 结果与分析

2.1 海洋细菌 B3B 发酵产物中 TTX 的测定

2.1.1 生物检测法 腹腔注射发酵精制物后,小鼠均呈现中毒症状:刚开始时小鼠很平静,稍后便兴奋不安,并伴有步态失常、后肢无力、呼吸困难,最后惊厥蹬腿而死,与文献[18]报道的 TTX 中毒症状吻合。

2.1.2 高效液相色谱法(HPLC) HPLC 具有效率高、速度快、灵敏度高、易于自动化等优点,在十到几十分钟即可完成多

组分的分析。在 TTX 检测中,多采用液相色谱-荧光检测法,即在柱后加强碱,在沸水或油浴中使 TTX 衍生成荧光物质(C₉-碱基),通过荧光检测器来间接地检测 TTX。该法比较繁琐,对实验设备也有较高的要求。实验中发现 TTX 在 200~220 nm 处有紫外吸收。因此,本实验中用紫外检测器在 210 nm 下对提纯后的组分进行检测。

从图 1 中可以看出,在洗脱时间为 4.96 min 处,海洋细菌 B3B 与 TTX 标准品都有一洗脱峰。

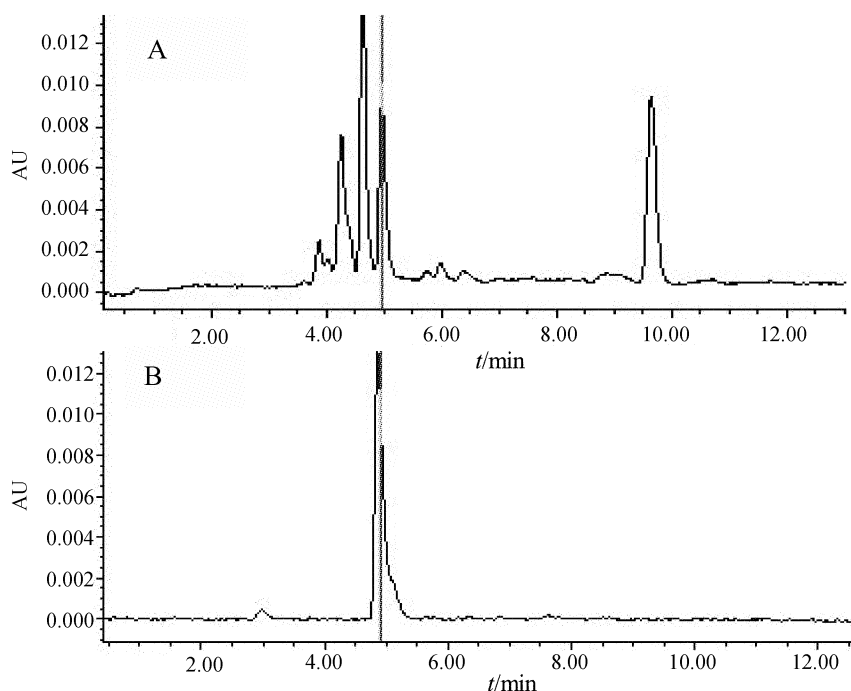


图 1 海洋细菌 B3B 精制物(A)及其标准 TTX (B)的高效液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of the extract from B3B (A) and authentic TTX (B)

2.1.3 质谱检测法 从生物检测和 HPLC 的结果来看,海洋细菌 B3B 的发酵产物中很可能含有 TTX,为了进一步验证,我们又对发酵精制产物进行了质谱检测。

从图 2 可知, B3B 的发酵产物中含有加 H 后核质比(m/z)为 320.1 的物质,它与 TTX 的分子量($M_r = 319$)相同。

以上试验结果表明,海洋细菌 B3B 能够合成 TTX。

2.2 发酵液中 TTX 含量的测定

用小鼠法对各组试验中 TTX 的含量做了测定,一共有 9 组实验,各组的培养基组成及 TTX 含量如表 2 所示。

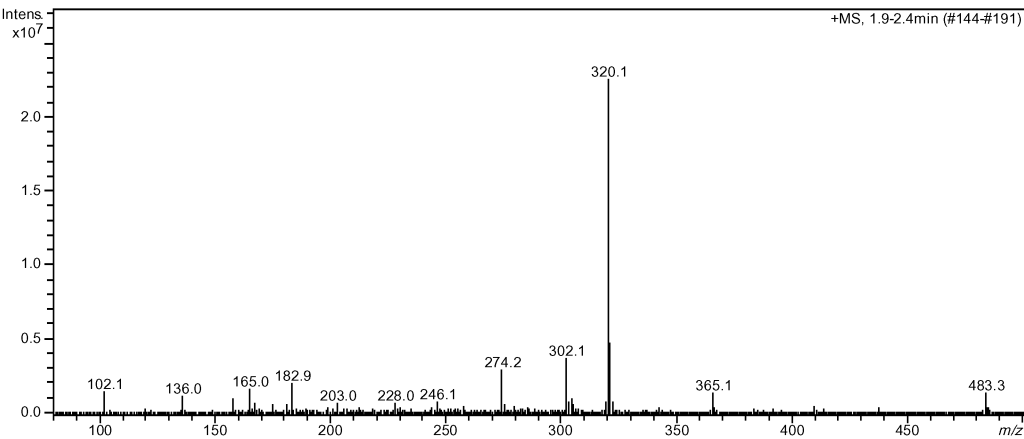


图2 样品的质谱图
Fig. 2 Mass spectrography of sample

表2 各实验中 TTX 的含量
Table 2 TTX contents in experiments

试验号 No.	试验因素 Factor (w/%)				试验结果 Result (MU/20 mL)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	0.00	0.05	0.30	0.60	5.39
2	0.2	0.15	0.70	0.40	5.28
3	0.4	0.25	0.20	0.20	3.01
4	0.6	0.35	0.60	0.00	0.31
5	0.8	0.00	0.10	0.70	5.10
6	1.0	0.10	0.50	0.50	3.62
7	1.2	0.20	0.00	0.30	1.21
8	1.4	0.30	0.40	0.10	0.90
9	1.6	0.40	0.80	0.80	3.66

X₁: 蔗糖; X₂: 酵母膏; X₃: 酪蛋白胨; X₄: KH₂PO₄ X₁: Sucrose; X₂: Yeast extract; X₃: Casein peptone; X₄: KH₂PO₄

2.3 回归分析

将所得实验结果输入均匀设计软件进行回归分析后得到:
 $y = b(0) + b(1) * X_1 + b(2) * X_3 + b(3) * X_4 + b(4) * X_2 * X_3 * X_4 + b(5) * X_1 * X_2 * X_4$
 F 检验临界值: $F.1(1,3) = 5.3092$
回归系数(b_i):
 $b(0) = 2.54e^{+0}$
 $b(1) = -8.19e^{-1}$
 $b(2) = -1.18e^{+0}$
 $b(3) = 4.80e^{+0}$
 $b(4) = 4.93e^{+1}$
 $b(5) = -2.55e^{+1}$
 F 检验值: $F = 379.74$
显著性: 显著
复相关系数: $R = 0.9992$

上式中, Y 代表 TTX 含量,从回归方程中可以看出 TTX 含量与蔗糖浓度成负相关,因此将蔗糖(X_1)作为少量添加成分,将其加入量($w/\%$)定为 0.2; TTX 含量与酵母膏(X_2)、酪蛋白胨(X_3)及 KH₂PO₄(X_4)既有正相关又有负相关,表明其加入量应适中,为此将它们加入量($w/\%$)分别定为 0.3、0.5、0.6. 最后获得优化发酵培养基($w/\%$):蔗糖 0.2、酵母膏 0.3、酪蛋白胨 0.5、KH₂PO₄ 0.6.

将优化设计后的培养基与实验室原来的发酵培养基分别

接种海洋细菌 B3B,摇瓶发酵后,用小鼠法对发酵液中 TTX 的含量进行测定. 结果显示,采用优化培养基时,海洋细菌 B3B 的 TTX 产量达 5.42 MU/20 mL,而采用原发酵培养基时,海洋细菌 B3B TTX 的产量为 2.38 MU/20 mL. 优化后, TTX 的产量提高了 128.7%.

3 讨论

河豚毒素(TTX)是一种具有重要药理作用的海洋活性物质. 目前 TTX 都是从河豚鱼的内脏中提取的,制取 1 gTTX 纯品需要 1 t 河豚鱼内脏. 原料的不足大大限制了 TTX 的生产,无法满足市场需要,而且导致其价格极其昂贵. 产 TTX 微生物的发现,不仅为 TTX 的生产提供了一条更具潜力的途径,而且对于保护河豚鱼资源也具有重要意义. 本文从我国渤海红鳍东方鲀体内分离到的海洋细菌 B3B,多种分析检测结果表明发酵产物中含有河豚毒素(TTX). 这为进行微生物源 TTX 的研发提供了科学依据. 运用均匀设计对 TTX 的发酵培养基进行的优化,使 TTX 的产量提高了 128.7%,达到 5.42 MU/20 mL. 尽管如此,菌株 B3B 河豚毒素的产量仍然偏低,离 TTX 的大规模发酵生产还有相当的距离. 今后将从以下两方面进行研究:一是对菌株 B3B 进行诱变育种,筛选获得 TTX 的高产变异菌株;其次是对 TTX 的生物合成与代谢途径进行研究,通过调控代谢途径中各种酶的活性来提高 TTX 的产量.

References

- 1 Tsai YH, Hwang DF, Chai TJ, Jeng SS. Occurrence of paralytic toxin in Taiwanese crab. *Atergatopsis Germaini* *Toxicon*, 1996, **34** (4): 467 ~ 474
- 2 Tanu MB, Mahmud Y, Tsuruda K, Arakawa O, Noguchi. Occurrence of tetrodotoxin in the skin of a rhacophoridid frog *Polypedates* sp. from Bangladesh. *Toxicon*, 2001, **39**: 937 ~ 941
- 3 Kazumi T, Osamu A, Kentaro K. Secretory glands of tetrodotoxin in the skin of Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*. *Toxicon*, 2002, **40**: 131 ~ 136
- 4 Yamashita MY, Yuki Y, Yasumoto T. 5,6,11-trideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu poecilonotus*. *Tetrahedron Lett*, 1995, **36** (51): 9329 ~ 9332
- 5 Tsai YH, Hwang DF, Chai TJ, Jeng SS. Toxicity and toxic components of two xanthid crabs, *Atergatis floridus* and *Demania reynaudi* in Taiwan. *Toxicon*, 1997, **35** (8): 1327 ~ 1335
- 6 Nunezvazquez EJ, Yamashita MY, Sierrabeltran AP. Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissue of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Toxicon*, 2000, **38**: 729 ~ 734
- 7 Asakawa M, Toyoshima T, Shida Y, Noguchi T, Miyazawa K. Paralytic toxins in a ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertean) adherent to cultured oysters in Hiroshima bay, Hiroshima prefecture, Japan. *Toxicon*, 2000, **38**: 763 ~ 773
- 8 Sato S, Ogata T, Borja V, Gonzales C, Fukuyo Y, Kodama M. Frequent occurrence of paralytic shellfish poisoning toxins as dominant toxins in marine puffer from tropic water. *Toxicon*, 2000, **38**: 1101 ~ 1109
- 9 Lin SJ, Hwang DF. Possible source of tetrodotoxin in the starfish *Astropecten scoparius*. *Toxicon*, 2001, **39**: 573 ~ 579
- 10 Hwang PA, Tsai YH, Lu Y, Hwang DF. Paralytic toxins in three new gastropod (Olividae) species implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Toxicon*, 2003, **41**: 529 ~ 533
- 11 Mosher HS, Fuhrman FA. Occurrence and origin of tetrodotoxin. In: Ragelis EP ed. Seafoodtoxins. Washington, DC: American Chemical Society, 1984. 333 ~ 334
- 12 Noguchi T, Jeon JK, Arakawa O, Sugita H, Deguchi Y, Shida Y, Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridas*. *J Biochem*, 1986, **99**: 311 ~ 314
- 13 Gallacher S, Birkberk TH. Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 3981 ~ 3983
- 14 Hwang DF, Cheng CA, Chen HC, Jeng, SS, Noguchi T, Ohawada K, Hashimoto K. Microflora and tetrodotoxin producing bacteria in the lined moon shell *Natica lineata*. *Fish Sci*, 1994, **60**: 567 ~ 571
- 15 Lee MJ, Jeong DY, Kim WS, Kim HD, Kim CH, Park WW, Park YH, Kim KS, Kim HM, Kim DS. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1 from the puffer fish *Fugu Vermicularis radiatus*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (4): 1698 ~ 1701
- 16 Matsui T, Taketsugu S, Kodama K, Ishii A, Yamamori k, Shimizu C. Studies on the toxification of puffer fish. Production of tetraodotoxin by the intestinal bacteria of a pufferfish, *Takifugu niphobles*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, **55**: 2199 ~ 2203
- 17 Narita H, Matsubara S, Miwa N, Akahane M, Murakami T, Goto M, Nara T, Noguchi T, Saito Y, Shida HT. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, **53**: 617 ~ 621
- 18 Simidu U, Noguchi T, Hwang DF, Shida Y, Hashimoto K. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 1714 ~ 1715
- 19 Yu CF, Yu PH, Chan PL, Yan Q, Wong PK. Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes. *Toxicon*, 2004, **44**: 641 ~ 647
- 20 Gaffaney S, Fujimoto E, Brodie ED, Brodie ED, Jr Ruben PC. Evolutionary diversification of TTX – resistant sodium channels in a predator-prey interaction. *Nature*, 2005, **437**: 759 ~ 763
- 21 Yang C (杨春), Su XR (苏秀榕). Extraction and determination of tetrodotoxin from low toxicity pufferfish. *Nat Prod R & D* (天然产物研究与开发), 2003, **15** (5): 398 ~ 400