

诱导子对拟茎点霉 139 产去乙酰真菌环氧乙酯的调节作用

袁丽峰, 黄耀坚*, 郑忠辉, 沈月毛

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 去乙酰真菌环氧乙酯 (DAM) 是红树植物秋茄内生真菌拟茎点霉 A123 菌株产生的次级代谢产物, 为了进一步提高 DAM 的产量, 选择和制备了 13 种诱导子, 对具有较强抗肿瘤活性的 139 菌株进行诱导, 考察诱导子对菌株产 DAM 的调节作用. 结果表明, 白色假丝酵母菌 (*Candida albicans*) 细胞壁制备物和壳聚糖具有显著的正调节作用; 采用 CCD 设计响应面实验获得最佳诱导条件为: 发酵 144 h 后加入 100 mg/L 壳聚糖, 通过高效液相色谱仪测定 DAM 最高产量, 其峰面积可达 2 296.38, 比同批空白对照提高 36%.

关键词: 诱导子; 去乙酰真菌环氧乙酯; 壳聚糖

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)01-0101-05

诱导子 (elicitor) 最初是指那些可以诱导植物细胞产生和积累植保素的化学物质, 后来发现诱导子能快速、专一和选择性地诱导多种特定基因的表达, 尤其是激活特定的次级代谢途径, 积累次级代谢产物^[1]. 关于植物次级代谢的生物诱导, 已经有大量的文献报道, 但诱导子用于调节微生物次级代谢的研究较少. 早期 Ariyo 等^[2]报道了有关寡糖诱导子在真菌培养中提高次级代谢物产量的应用, 在该研究中, 分别加入通过酸解海藻酸钠获得的不同聚合度的甘露糖醛酸寡糖和古糖酯寡糖至两种产黄青霉的药瓶中, 使青霉素 G 产量提高了 50% ~ 150%; Asilonu 等^[3]也报道了用酸解海藻酸钠和酶解果胶获得的寡糖诱导提高产黄青霉的黄色素产量; 此外, Zhu 等^[4]还研究了多种真菌制备物在灵芝深层培养中对灵芝酸和灵芝多糖的诱导作用, 结果显示诱导子在其对数生长末期加入效果最佳, 这是首次在大型真菌深层培养中使用生物诱导子. 而最早研究诱导子在细菌中应用的是 Akiyama 等^[5]报道了有关海藻酸钠提高双歧杆菌生物量的研究; Murphy 等^[6]也报道了诱导子对双歧杆菌次级代谢物产量的影响研究. 他们探讨了 3 种寡糖对双歧杆菌产杆菌肽 A 的影响, 并通过响应面法得到了产杆菌肽 A 的最优条件. 可见利用诱导子诱导微生物次级代谢产物是一个值得探索的领域, 具有较重要的理论和应用价值.

去乙酰真菌环氧乙酯 (deacetylmycoepoxydiene,

DAM, 俗称南强菌素), 是红树植物秋茄内生真菌拟茎点霉 A123 菌株产生的次级代谢产物, 是天然产物中具有氧桥的环二烯为骨架的化合物, 结构十分新颖, 且具有较好的抗肿瘤活性^[7], 野生菌株发酵产量极低, PDA 固体发酵产量仅为约 0.8 mg/L, 限制了对 DAM 的进一步研究, 因此采用诱导方式进一步提高 DAM 的产量具有十分重大的意义. 本文选择和制备了 13 种诱导子, 研究了它们在液体培养条件下对 DAM 高产突变株 139 产 DAM 的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

DAM 高产突变株 139 系 A123 菌株经诱变获得; 共选择 4 种微生物用于培养制备诱导子: 枯草芽孢杆菌 CMCC (B) 63501 (*Bacillus subtilis* CMCC (B) 63501)、白色假丝酵母菌 AS2.538 (*Candida albicans* AS2.538)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 以上菌株均为本实验室保存菌株; 糖单孢菌 (*Saccharomonospora* sp.) 为本实验室分离菌株.

1.1.2 实验试剂

D-葡萄糖酸钠、蜜二糖、棉子糖、海藻酸钠均由上海化学试剂站分装; 菊糖由北京化工厂分装; 纤维二糖由上海公私合营新中化学厂分装; 壳聚糖由上海生物工程股份有限公司提供; 低聚壳聚糖由合肥博美生物科技有限公司提供.

收稿日期: 2010-04-02

基金项目: 国家海洋 863 项目 (2007AA091503)

* 通信作者: yjh@xmu.edu.cn

1.1.3 培养基

发酵培养基 1: 马铃薯 150 g/L, 葡萄糖 60 g/L, 体积分数为 20% 的海水; 发酵培养基 2: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 65 g/L, 体积分数为 20% 的海水。

1.2 方法

1.2.1 PDA 平板培养

139 菌株接入 PDA 平板, 28 °C 培养 48~72 h。

1.2.2 种子摇瓶培养

将活化好的平板取 8~10 小块接种于 100 mL 的种子培养基中(250 mL 三角瓶), 置旋转式摇床, 28 °C 150 r/min 振荡培养 72 h。

1.2.3 诱导子的制备

1) 微生物诱导子制备: 将用于制备诱导子的枯草芽孢杆菌、白色假丝酵母菌、黑曲霉和糖单孢菌分别接种到液体培养基中进行摇床振荡培养, 枯草芽孢杆菌在 LB 培养基中 28 °C 培养 3 d, 糖单孢菌在 YMG 培养基中 28 °C 培养 4 d, 白色假丝酵母菌在 PDB 培养基中 28 °C 培养 3 d, 黑曲霉在 PDB 培养基中 28 °C 培养 7 d。5 000 r/min 离心 10 min, 分别收集培养好的菌体细胞, 参照 Ayers 等^[8]方法制备诱导子: 取菌体细胞, 用蒸馏水、300 mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.2) 分别洗涤 3 次, 超声波破碎细胞, 离心收集沉淀, 沉淀再分别用 300 mmol/L PBS(pH 7.2) 缓冲液、蒸馏水离心(5 000 r/min, 5 min) 洗涤 3 次, 重新悬浮于蒸馏水中, 121 °C 灭菌 20 min, 置

-20 °C 冰箱储存备用。

2) 非生物诱导子制备: 海藻酸钠参照 Asilonu 等^[3]方法酸解得到可溶于水的甘露糖醛酸寡糖及溶于乙醇的 SAEF 寡糖; 其他 D-葡萄糖酸钠、菊糖、蜜二糖、低聚壳聚糖、纤维二糖、棉子糖、壳聚糖分别制备成适宜浓度的水溶液, 灭菌后备用。

1.2.4 发酵及诱导培养

种子摇瓶中吸取 2 mL 种子液接种于 30 mL 的发酵培养基中(250 mL 瓶)于 28 °C 220 r/min 振荡培养; 菌体对数生长期末期加诱导子, 无菌水为对照。

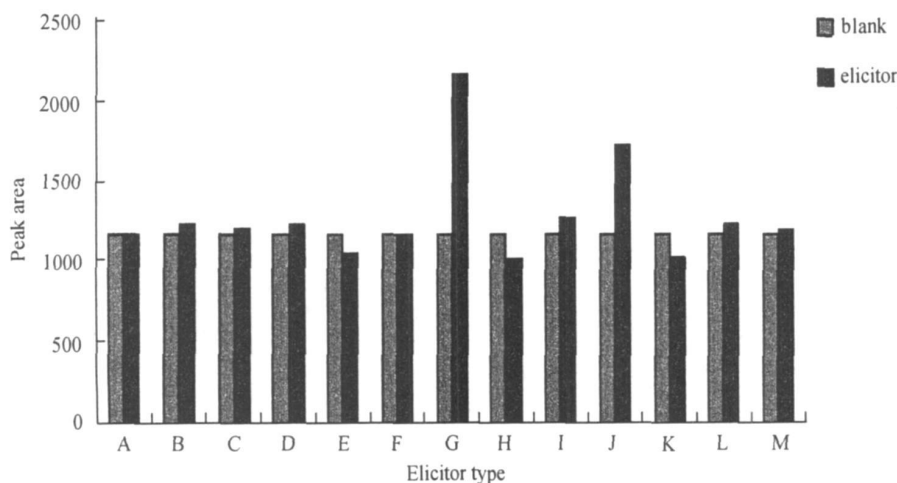
1.2.5 DAM 的 HPLC 定量检测

HPLC 的参数为: 层析柱 RP-18e (4.6 mm × 250 mm, Agilent 1200 Series Lot. OB 556512), 色谱条件: 紫外检测波长为 220 nm, 流动相为 V(甲醇): V(水) = 2: 3, 流速 1 mL/min, 每次进样 20 μL, 间隔时间为 30~60 min。

2 结果与分析

2.1 诱导子的初筛

诱导子根据性质来源可以分为生物诱导子和非生物诱导子, 本文选择和制备了 13 种包括这 2 种类型的诱导子, 并研究分析它们在液体培养条件下对 139 菌株产 DAM 的影响。参照文献[3, 6, 9]等, 选择在发酵第 5 天加入诱导子, 使其终质量浓度为 200 mg/L, 初筛结果见图 1。由图 1 可以看出白色假丝酵母菌细胞



A. D-葡萄糖酸钠; B. 甘露糖醛酸寡糖; C. 枯草芽孢杆菌细胞壁制备物; D. 菊糖; E. 蜜二糖; F. 低聚壳聚糖; G. 白色假丝酵母菌细胞壁制备物; H. 纤维二糖; I. 棉子糖; J. 壳聚糖; K. SAEF; L. 糖单孢菌细胞壁制备物; M. 黑曲霉细胞壁制备物。

图 1 诱导子对 DAM 产量的影响

Fig. 1 Effect of the elicitor on DAM production

壁提取物和壳聚糖能显著地提高 DAM 的峰面积. 虽然白色假丝酵母菌细胞壁提取物的制备方法已较为成熟, 但其包含的多糖种类及多糖聚合度等理化特性未经测定, 且不能保证每批制备得到的提取物成分稳定, 而壳聚糖为上海生工生物工程有限公司提供, 性质较为稳定, 因此考虑到实验的可重复性, 选择壳聚糖做后续实验. 经多次重复数据再现性较好.

2.2 诱导条件的响应面优化

经单因子实验分析, 采用 Design expert 软件, CCD 设计响应面实验以获得在发酵培养基 1 中的最佳诱导条件. 其实验因素水平、实验结果和方差分析见表 1~ 3, 每个数据为 3 个平行实验的平均值.

对表3的分析结果进行回归拟合, 得到回归方程为 $Y = 1\,296.23 + 722.98A - 19.07B - 136.84A - 162.31A^2 + 283.58B^2$ (其中Y为DAM 峰面积, A、B 分别为2个分析因素). 通过模型的回归方程方差分

表 1 诱导子主要影响参数的 CCD 实验因素水平表
Tab. 1 Experimental variables and levels for CCD

因素	水平				
	- 1.5	- 1	0	1	1.5
A: 时间(h)	84	96	120	144	156
B: 质量浓度(mg·L ⁻¹)	75	100	150	200	225

表 2 诱导子主要影响参数 CCD 设计的实验结果
Tab. 2 Design and results of CCD

试验号	A	B	DAM 峰面积
1	0	0	1238.5526
2	0	- 1.5	2159.0584
3	- 1	1	748.9503
4	0	0	1332.3488
5	1	1	2165.2102
6	1.5	0	1900.0289
7	- 1.5	0	56.4100
8	0	1.5	1803.8890
9	- 1	- 1	289.9304
10	1	- 1	2253.5402
11	0	0	1155.4029
12	0	0	1455.9296
13	0	0	1322.5235

表 3 诱导子参数影响的回归方程的方差分析
Tab.3 ANOVA analysis for regression equation

来源	F 值	Prob> F	显著性
模型	28.1342	0.0002	显著
A	112.0261	< 0.0001	显著
B	0.0779	0.7882	
A × B	1.8885	0.2118	
A × A	5.5030	0.0514	
B × B	16.7974	0.0046	显著
失拟项	5.9896	0.0582	不显著

注:“显著”是指 $p < 0.05$;“不显著”是指 $p > 0.05$.

析, 一次项 A 和平方项 B^2 对回归值影响显著; 失拟项 F 值为 5.99, 不显著. 对模型进行可信度分析, $R^2 = 95.26\%$, 结合 $F = 28.134\,21$, 大于 F 值的概率为 $0.000\,2 < 0.05$; 说明模型足够拟合实验数据, 具有显著性, 并且 95% 的实验数据可用此模型解释. 拟合方程存在最大值, 最优方案为: 时间 144 h, 用量 100 mg/L, 预期 DAM 最大峰面积可达 2 296.38, 比同批空白对照的峰面积 1 686.716 提高 36%. 其三维响应面曲面图和响应面等高线见图 2.

2.3 回归方程的实验验证

依照 RSM 获得的最佳诱导条件, 分别在发酵培养基 1 和发酵培养基 2 中进行发酵, 在接种后 144 h 加入质量浓度为 100 mg/L 的壳聚糖, HPLC 测定 DAM 产量, 结果显示诱导子在发酵培养基 1 中能促使 DAM 峰面积达到 3 063.37, 比同批空白对照组 DAM 峰面积 2 149.59 提高 41%, 由此验证了以上模型的可行性; 而发酵培养基 2 为中试发酵培养基方案, 在此培养条件下诱导子能诱导 DAM 峰面积达 2 718.008, 比同批空白对照组 DAM 峰面积 2 071.902提高 32.9%, 由此可见该诱导条件在生产发酵中同样具有一定的应用价值.

3 结果与讨论

1) 从诱导子初筛实验可以看出, 白色假丝酵母菌细胞壁提取物和壳聚糖能显著地提高 DAM 的峰面积. 原因可能是广泛存在于真菌细胞壁的壳聚糖和白色假丝酵母菌细胞壁提取物作为一种异己成分被 139 菌株细胞膜上的受体识别, 从而激发了 139 菌株的自我防御机制, 导致其次级代谢物 DAM 产量增加. 早在

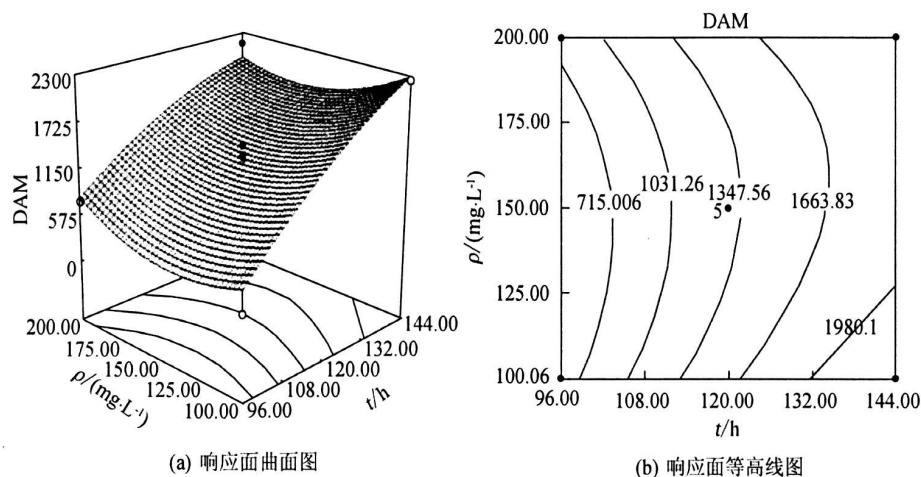


图 2 $Y = f(A, B)$ 三维响应面曲面图和响应面等高线图
Fig. 2 Response surface plot and contour plot of the function $Y = f(A, B)$

1999 年, Petruccioli 等^[9]就指出寡糖的聚合度在诱导子激发次级代谢物产生方面具有重要作用, 这可能是只有特定大小的寡糖才能与细胞膜上特异性受体结合; Nair^[10]同样认为葡萄糖残基具有丰富的羟基群、氧原子和疏水区域的特性, 使寡糖成为能够与识别位点精确作用的配体. 本实验中低聚壳聚糖对 DAM 的产量几乎没有影响, 而壳聚糖却能显著提高 DAM 的产量的现象验证了此设想.

2) 响应面法是一种从多因素系统中找出最优条件的数学统计方法, 已广泛应用于各种领域. 本文采用 RSM 对壳聚糖诱导条件进行优化, 得到最优方案为: 壳聚糖加入时间为发酵 144 h 后加入, 用量 100 mg/L. 在此条件下, DAM 产量可提高 36%. 重复实验验证了实验结果基本符合模型拟合预测的结果. 总体而言, 本实验回归方程较真实的反映出了各因素对 DAM 产量的影响. 而发酵培养基 2 为 DAM 中试发酵的培养基, 在此培养条件下诱导子提高了 32.9% 的 DAM 产量, 进一步验证了结果的可行性, 有一定的实践指导意义.

利用壳聚糖诱导子激活植物细胞中的次生代谢途径已经成为提高植物细胞中目标产物产量的常用策略之一. Linden 等^[11]应用壳聚糖作为诱导子增加了加拿大红豆杉细胞培养中紫杉醇的产量. 作为一种 β 1, 4-氨基葡萄糖聚合物, 壳聚糖具有激活微生物次级代谢途径, 提高次级代谢物产量的巨大的潜力. 虽然诱导子在微生物中的具体作用机制尚不明, 但目前对该领域的研究却非常活跃. 通过各种生物学手段研究诱导子识别、培养基酸化、细胞质碱化、ROS 形成、转录水平调控等过程, 有望使诱导作用机制理论得到进一步的

阐明.

参考文献:

- [1] Hahn M G. Microbial elicitors and their receptors in plants[J]. Annual Reviews of Phytopathology, 1996, 34: 387-412.
- [2] Ariyo B T, Bucke C, Keshavar T. Alginate oligosaccharides as enhancers of penicillin production in cultures of *Penicillium chrysogenum* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 53: 17-20.
- [3] Asilonu E, Bucke C, Keshavarz T. Enhancement of chrysogenum production in cultures of *Penicillium chrysogenum* by uronic acid oligosaccharides [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22: 931-936.
- [4] Zhu Liwen, Zhong Jianjiang, Tang Yejie. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 1359-1370.
- [5] Akiyama H, Endo T, Nakakita R, et al. Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56 (2): 355-356.
- [6] Murphy T, Parra R, Radman R, et al. Novel application of oligosaccharides as elicitors for the enhancement of bacitracin A production in cultures of *Bacillus licheniformis* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 1518-1523.
- [7] 杨丽珊. 红树植物内生真菌生物活性及菌株 A123 次级代谢产物的初步研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2006.
- [8] Ayers A R, Ebel J, Valent B, et al. Host pathogen inter-

- actions: X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Plant Physiology, 1976, 57 (5) : 760-765.
- [9] Petruccioli M, Federici F, Bucke C, et al. Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variable* P16 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24: 397-401.
- [10] Nair R, Murphy T, Roy I, et al. Optimisation studies on multiple elicitor addition in microbial systems: *P. chrysogenum* and *B. licheniformis* [J]. Chemical Engineering Transactions, 2008, 14: 373-380.
- [11] Linden J C, Phisalaphong M. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis* [J]. Plant Science, 2000, 158 (1/2) : 41-51.

Effect of Elicitors on Deacetylmycoepoxydiene Metabolite Produced by *Phomopsis* sp. 139

YUAN Lǐ feng, HUANG Yao jian^{*}, ZHENG Zhong hui, SHEN Yue mao
(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Deacetylmycoepoxydiene (DAM) is a kind of second metabolic products of the endophytic fungus A123, containing an oxygen bridged cyclooctadiene. DAM has high anti-tumor activity. In order to improve the production of DAM, thirteen elicitors were used to treat *Phomopsis* sp. 139, a mutant strain of A123. The results showed that the *Candida albicans* cell wall material and chitosan had a significant influence on DAM production. Then through response surface experiments, the optimal elicitation conditions were obtained. It was that chitosan (100 mg/L) was added after 144 h cultivation. The maximum yield was expected to reach 2 296. 38, which increased 36% compared to the blank.

Key words: elicitor; deacetylmycoepoxydiene; chitosan