

海滨土壤粘细菌次级代谢产物的性质及产量调控的研究*

刘 迎 马中良 王 旻**

(中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009)

摘要: 从黄海边土壤中筛选到具有广谱抑菌活性白色粘细菌 *So ce cpu-1*, 次级代谢物活性组分在 210nm 紫外吸收值最大。研究了不同培养条件对次级代谢产物的产量影响。结果表明, *So ce cpu-1* 在含 10% w/v D312 中性吸附树脂的 M_1 培养基中, 通氧量为总体积的 70%, 添加该粘细菌次级代谢产物的粗提物 5 μ L 作为诱导物, 30℃, 200r/min, 培养 6d, 次级代谢产物产量可达到最大值。

关键词: 粘细菌, 次级代谢产物, 抑菌, 培养条件, 产量

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0042-05

Investigation on Characteristics and the Yield of the Secondary Metabolites of a Myxobacterium Isolated from Beach Soil*

LIU Ying MA Zhong-Liang WANG Min**

(The School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract: A myxobacterial strain, *So ce cpu-1*, was isolated from a soil sample near the Huanghai beach. *So ce cpu-1* had broad antimicrobial activity, active component has maximal absorption at 210 nm. The effects of different culture conditions on the yield of the secondary metabolites were investigated. The results showed that, when cultivating the strain in the M_1 medium (containing 10% w/v D312 neutral absorber resin), the air up to 70% of the whole flask volume, adding 5 μ L the secondary metabolites as the revulsant, at 30℃, 200r/min, for 6 days, the yield of the secondary metabolites achieved the maximum.

Key words: *Myxobacterium*, Secondary metabolites, Antimicrobial activity, Culture conditions, Yield

粘细菌是原核生物中一类具有复杂多细胞行为的革蓝氏阴性菌, 能产生极为丰富的次级代谢产物^[1]。目前已从粘细菌中发现了 400 多种生物活性物质^[2], 绝大多数尚未在其他微生物类群中发现过, 其中抗肿瘤和抗真菌活性物质的所占比例较高^[3, 4], 可见粘细菌是一类具有应用研究开物在发潜力的微生物类群, 有可能成为生物活性物质的新的微生物来源。粘细菌的次级代谢产物在医药工业具有很好的开发潜力^[5, 6]。

本实验室从黄海海边附近农田土壤中自行筛选到一株白色粘细菌 *So ce cpu-1*, 测定了 *So ce cpu-1* 的抑菌谱, 考察了次级代谢物活性组分的紫外吸收图谱, 研究了通氧量、培养基类型、培养天数等培养条件对粘细菌次级代谢产物的产量影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 从黄海海边土壤筛选到白色菌 *So ce cpu-1*。

1.1.2 D312 中性吸附树脂: 由山东鲁抗医药企业有限公司树脂分厂馈赠。

* 江苏省博士后基金资助

** 通讯作者 Tel: 025-83271395, E-mail: wangming@publiel. ppt. js. cn

收稿日期: 2005-07-28, 修回日期: 2005-08-23

- 1.1.3 色谱柱: XTerra® RP₁₈ 5μm, 4.6 × 150mm Column (Waters, Made in Ireland)。
- 1.1.4 待测菌: 菌种由本院微生物教研室提供。
- 1.2 方法
- 1.2.1 So ce cpu-1 的发酵培养: 按 10% 的接种量, 将粘细菌种子培养基接种到含 10% w/v D312 中性吸附树脂的培养基中, 30℃, 200r/min, 培养 6d。
- 1.2.2 次级代谢物提取: 将吸附在树脂上的次级代谢产物用 100 倍体积甲醇抽提 10h。
- 1.2.3 粗提物 HPLC 检测: 洗脱剂为甲醇: 水 = 65: 35 (v: v), 流速 1mL/min, 检测波长 220nm, 上样体积均为 20μL, 操作时间均为 30min。
- 1.2.4 抑菌谱的测定: 滤纸片法^[4]。

2 结果

2.1 So ce cpu-1 次级代谢产物性质的研究

2.1.1 次级代谢产物粗提物的抑菌谱: 按 10% 的接种量, 将 So ce cpu-1 发酵培养, 提取次级代谢产物, 获得的发酵粗提物, 用滤纸片法进行抑菌谱的测定 (见表 1)。

表 1 So ce cpu-1 次生代谢物的抗菌谱

待测菌	抑菌圈直径 (mm)
毛霉	14
根霉	20
曲霉	14
青霉	16
啤酒酵母	10
大肠杆菌	12
金葡萄菌	12
耐药金葡萄菌	11
百日咳杆菌	-
枯草芽孢杆菌	14
伤寒沙门氏菌	-
铜绿假单胞菌	9

注: 所用滤纸片直径为 6 mm, 每个滤纸片上的活性物质的量相当于 10mL 发酵液。

2.1.2 活性组分紫外吸收特征图谱: 将 HPLC 分离的活性组分加入到一定量甲醇中及一定量蒸馏水中, 分别用甲醇及作蒸馏水对照, 测定其在 200 ~ 340nm 处的紫外吸收值。

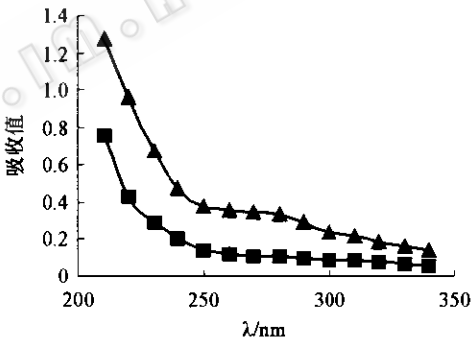


图 1 So ce cpu-1 活性组分的紫外吸收图谱
—▲— 以甲醇为溶剂, —■— 以双蒸水为溶剂

图 1 显示, 活性组分在甲醇和蒸馏水的吸收图谱形状基本相同, 均随波长增加吸收值减小。在 210nm 处有最大吸收值。不同溶剂对吸收值有较大影响, 活性组分在甲醇中的吸收值普遍高于在蒸馏水中的吸收值。

2.2 So ce cpu-1 培养条件的优化

2.2.1 通氧量对粘细菌代谢产物产量的影响: 以相同的接菌量分别加入到 25, 50, 75, 100 及 150mL 培养基中发酵培养, 培养摇瓶体积均为 250mL。次级代谢产物产量以 HPLC 积分面积表示 (面积大小采用科学记数法)。由图 2 可看出, 在通氧量足够大的情况下, 随着培养基体积的增加, 次级代谢产物产量也随之增加; 而培养基体积继续增加, 通氧量逐渐不足, 影响了粘细菌的生长, 因此其代谢产物产量又呈现下降趋势。由此可见, 该粘细菌是一种好氧菌, 在通氧量为 175mL, 培养基体积为 75mL 时, 次级代谢产物产量达到最大值。

2.2.2 不同的培养基对粘细菌代谢产物产量的影响: 比较 MD1 及 M₇ 培养基对粘细菌

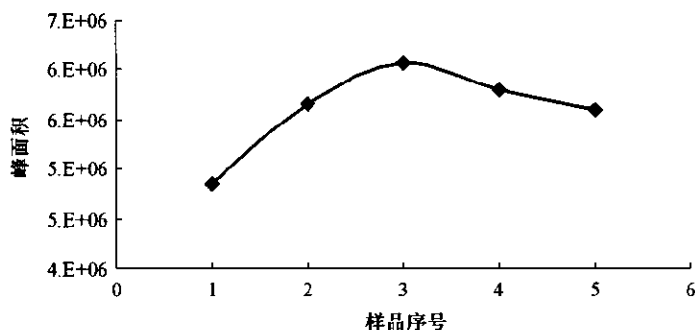


图2 通氧量对 *So ce cpu-1* 次级代谢物产量的影响

1 空气体积 225mL, 2 空气体积 200mL, 3 空气体积 175mL, 4 空气体积 150mL, 5 空气体积 100mL
次级代谢产物产量的影响。MD1 培养基组成如下: Trypone 0.3%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.056%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, VB_{12} 0.5mg/L, pH 7.2。M₇培养基组成如下: Trypone 0.3%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, yeast extract powder 0.1%, HEPES 1%, glucose 0.2%, VB_{12} 0.1mg/L, pH 7.4。

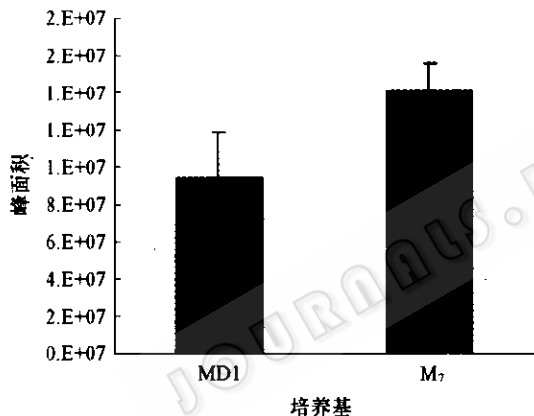


图3 培养基组成对 *So ce cpu-1* 次级代谢物产量的影响

以相同的接菌量分别加入到相同体积的 MD1 及 M₇ 培养基中, 发酵培养。由图 3 可看出, 采用 M₇ 培养基, 次级代谢物产量得到显著提高。M₇ 培养基次级代谢物产量平均为 MD1 培养基产量的 1.37 倍。

2.2.3 培养天数对次级代谢产物产量的影响: 以相同的接菌量进行粘细菌的发酵培养, 分别在 3, 4, 5, 6, 7, 8d 时取样分析。从图 4 可看出, 在培养初期, 粘细菌成对数生长, 其代谢产物产量也随之迅速增加。经过 6d 培养, 粘细菌次级代谢产物产量达到最大值。

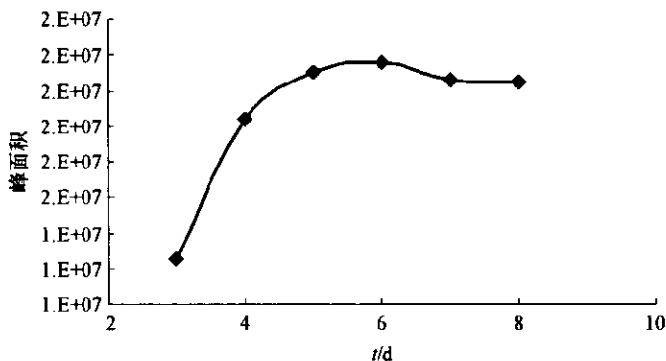


图4 培养时间对 *So ce cpu-1* 次级代谢物产量的影响

2.2.4 D312 中性吸附树脂对代谢产物产量的影响: 以相同的接菌量分别加入到相同体积含 1/10 (W/V) 的 D312 吸附树脂及不含树脂的培养基中, 发酵培养。如图 5 所示, 添加树脂, 代谢产物产量得到很大提高。添加树脂后, 产量提高了 60%。

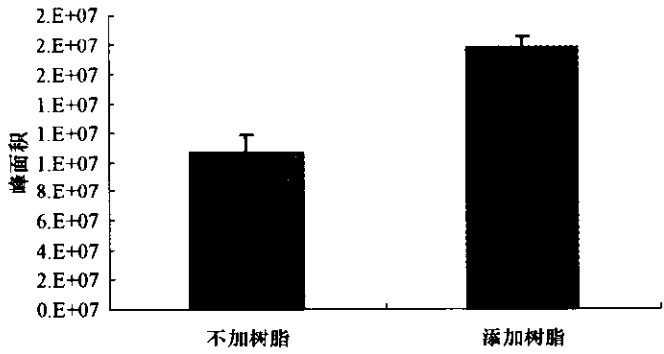


图 5 树脂对 So ce cpu-1 次生代谢物产量的影响

2.2.5 诱导物对次级代谢产物产量的影响：以相同的接菌量分别加入到含相同体积培养基中，向锥形瓶中分别添加 0 μ L、1 μ L 及 5 μ L 诱导物，发酵培养。由图 6 可看出，将诱导物加入培养基，可增加代谢产物产量。加入诱导物 1 μ L 和 5 μ L，代谢物产量分别提高了 4% 和 11%，加入诱导物 5 μ L 对产量的提高效果更为明显。

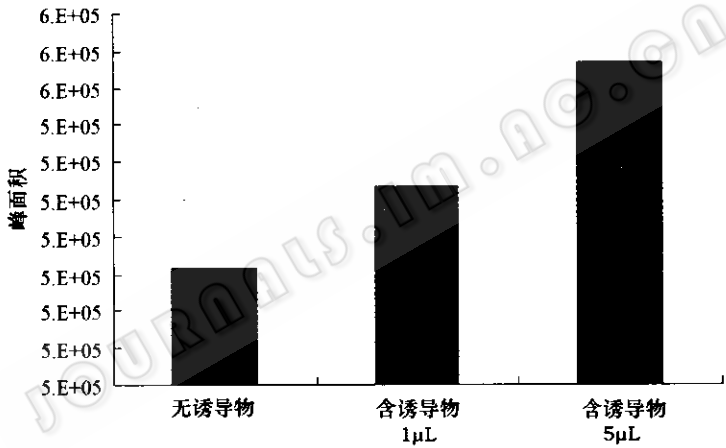


图 6 诱导物对 So ce cpu-1 次生代谢物产量的影响

2.2.6 温度对次级代谢产物产量的影响：以相同的接菌量分别加入到相同体积 M₇ 培养基中，分别在 30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C，发酵培养。粘细菌在 30 $^{\circ}$ C 培养能产生最大量的代谢产物。随着温度的升高，代谢产物产量逐渐降低，在 37 $^{\circ}$ C 产量降低了 20%，42 $^{\circ}$ C 时产量降低了 51%（图 7）。可见，温度对次级代谢产物产量有较大影响，粘细菌的最适生

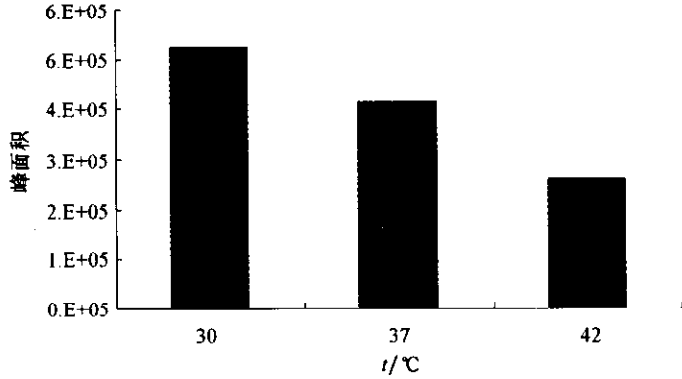


图 7 培养温度对 So ce cpu-1 次生代谢物产量的影响

长温度为 30℃。

3 讨论

本实验室自行筛选的粘细菌 *So ce cpu-1* 次级代谢产物具有广谱的抑菌活性。特别的是次级代谢产物能够很好的抑制大肠杆菌, 在出现抑菌圈 6d 后, 抑菌圈仍未消失, 这在其他文献中均没有报道^[7-9], 代谢产物中可能存在新的活性物质。根霉对该菌的次级代谢产物非常敏感(表 1), 微量的次级代谢物就能抑制根霉生长, 因此可将根霉作为指示菌, 而不是常用的毛霉。

采用 M₁ 培养基次级代谢产物产量获得很大提高。增加的 yeast extract powder 与 tryptone 构成了复合氮源, 增加的 glucose 作为碳源, 为粘细菌的生长提供了更加丰富的营养物质。HEPES 具有较强的缓冲能力, 可将培养基 pH 值维持在粘细菌生长所需的最适状态下。

采用树脂吸附, 一方面可以增加代谢产物产量, 产生的代谢产物可直接吸附到树脂上, 增加了库容, 避免了自身累积而造成的反馈抑制; 另一方面, 用树脂吸附代谢产物可降低污染概率。添加树脂后代代谢产物产量能大幅度提高, 结果表明采用国产的 D312 吸附树脂, 可以达到与进口树脂 SP207 或 XAD-16 同等效果^[10], 这样极大的降低成本。

本实验室所筛选的粘细菌 *So ce cpu-1* 有潜在的开发前景, 我们优化了培养条件, 为今后大规模工业化发酵及生产提供了理论依据。

参考文献

- [1] Dworkin M. Microbiol Revs, 1996, 60: 70 ~ 120.
- [2] Reichenbach H, Hofle G. Drug discovery from nature. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1999. 149 ~ 179.
- [3] Watkins E B, Chittiboyina A G, Jung J C, et al. Curr Pharm Des, 2005, 11: 1615 ~ 1653.
- [4] Sasse F, Steinmetz H, Hofle G, et al. J Antibiot, 2003, 56: 520 ~ 525.
- [5] Wang H, Wang Z, Wang S, et al. Chemother Pharmacol, 2005, 56: 255 ~ 260.
- [6] 王海英, 张利平. 微生物学通报, 2003, 30: 115 ~ 116.
- [7] Irschik H, Jansen R, Gerth K. J Antibiot, 1994, 48: 31 ~ 35.
- [8] Sasse F, Steinmetz H, Hofle G, et al. J Antibiot, 1994, 48: 21 ~ 25.
- [9] Irschik H, Jansen R, Gerth K, et al. J Antibiot, 1995, 48: 962 ~ 966.
- [10] Gerth K, Steinmetz H, Hofle G, et al. J Antibiot, 2002, 55: 41 ~ 45.