

南海红树林真菌 No.1403 产生灰黄霉素的 发酵条件初步优化^{*}

夏雪奎¹, 黄晓聪¹, 张捷¹, 梁智斌¹, 谢丽娜¹,
余志刚¹, 林永成¹, L. L. P. VRIJMOED²

(1 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2 香港城市大学生物及化学系, 香港)

摘要: 利用 SAS 软件的 Plackett-Burman 设计法, 对影响南海红树林真菌 1403 的菌体生长和灰黄霉素生产的培养基进行筛选, 所选取的 8 个相关因素为: pH 值、葡萄糖浓度、蛋白胨浓度、酵母膏浓度、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度、NaCl 浓度、 K_2HPO_4 浓度、 ZnSO_4 浓度。结果表明: 对菌体生长最显著影响的因素是: 葡萄糖浓度 ($P = 0.0013$) 和 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度 ($P = 0.0015$)。对培养液中灰黄霉素的代谢量最显著影响的因素是: 葡萄糖浓度 ($P = 0.0030$), NaCl 浓度 ($P = 0.0026$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度 ($P = 0.0110$), K_2HPO_4 浓度 ($P = 0.0107$), ZnSO_4 浓度 ($P = 0.0121$)。此筛选结果为工业发酵提供了条件。

关键词: 海洋红树林真菌; 灰黄霉素; 优化; Plackett-Burman 方法

中图分类号: O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 05-0032-04

众所周知, 抗生素在人们生活中应用越来越广泛, 在维护人类健康, 防治各种感染性疾病方面做出了巨大贡献。灰黄霉素 (Griseofulvin) 作为非多烯类抗真菌抗生素, 临床用于头癣、迭瓦癣、皮肤癣及手足甲癣等体表真菌感染, 特别对头癣的疗效显著。此外, 灰黄霉素目前还广泛应用于森林、牧场的大面积灭菌。

1403 号真菌采自红树的树叶内部, 为典型的植物内源性真菌。初步的菌种鉴定表明 1403 号菌不属于半知菌类的丛梗孢目, 对采集该菌的红树林的微生物生态调查发现与 1403 号菌共生的红树没有烟草疫霉 (*Parasiticae tabacina* Adam) 的感染, 这是在红树林中首次发现的。该菌与灰黄青霉菌没有亲缘关系, 对 1403 号真菌进行发酵培养, 发现该菌能产生大量的灰黄霉素, 可以为灰黄霉素新的产生菌^[1]。

作为产生灰黄霉素的新海洋内生真菌, 为了达到工业发酵生产的目的, 本文运用 Plackett-Burman 设计法对影响 1403 号真菌的菌体生长和培养液中灰黄霉素代谢的培养条件进行了优化, 分别确定了最重要因素, 并进行了比较分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和保存条件

内生真菌 1403 号由香港城市大学 Vrijmoed 和 Jones 教授提供。菌种分别保存在香港城市大学和中山大学。

1.2 培养基

1.2.1 菌种保存用斜面培养基 葡萄糖 10 g 酵母膏 1 g 蛋白胨 2 g pH 7.5 人工海水 (ASW) 1 000 mL 琼脂 15~20 g

1.2.2 基础实验培养基 葡萄糖, 蛋白胨, 酵母浸膏, NaCl, MgSO_4 , K_2HPO_4 , pH, 浓度都按需要而定。

1.3 培养条件

从斜面培养基上挑取生长良好的菌体, 接入经 121 °C (0.1 mPa) 高温灭菌 20 min 的种子培养基, 培养 7 d 后接入同样经高温灭菌的基础试验培养基, 接种量 5%。将 500 mL 锥形瓶放在摇床上, 转速 120 r/min 培养温度 28 °C。

1.4 试剂与实验仪器

葡萄糖 CP, 蛋白胨 BR, 酵母膏 BR, 粗海盐 (微生物养殖用), 其他实验用试剂均为市售 AR 试剂。

* 收稿日期: 2006-10-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20572136); 广东省自然科学基金资助项目 (05003268); 广州市科技计划资助项目 (2004 J1-C0061)

作者简介: 夏雪奎 (1980 年生), 博士研究生; 通讯联系人: 余志刚, 林永成; E-mail: ceshzhg@sysu.edu.cn

Agilent 1100 型高效液相色谱仪；Waters 515 HPLC 泵；Waters 2487 双波长检测器；浙江大学 N-2000 双通道色谱工作站，大连依利特 Hypersil BDS 苯基柱。

1.5 分析测定方法

在不同的培养基中培养一定时间后，菌体经过滤，洗涤，于 105℃烘至恒质量后，准确称量。根据菌体干质量判断菌体生长状况。

发酵液用体积比为 1:1 的乙酸乙酯萃取 3 次，合并萃取液，蒸去溶剂，用 10 mL 甲醇溶解并过滤，滤液送高效液相分析。用 HPLC 来检验培养液中灰黄霉素的含量。

2 实验结果与讨论

前期的实验研究发现 1403 号菌对单糖的利用都非常好，优于低聚糖，对有机氮源的利用都优于无机氮源，1403 号菌的培养条件偏碱，pH=8 时，生长情况良好，葡萄糖和蛋白胨最有利于 1403 号菌的生长^[2]。在此基础上，运用 Plackett-Burman 法对 1403 号真菌的发酵培养条件进行了深入研究。

Plackett-Burman 法是优化实验条件统计学方

法，在生物培养条件优化中已有广泛应用^[3-7]，该方法是一种以不完全平衡块（balanced incomplete block）为原理的实验设计方法，它能够从众多的过程变量中快速、有效的筛选出最为重要的几个因素，以便做下一步的研究。该方法容易处理实验数据，适用于任意多个实验因子，能有效和准确的筛选出影响实验结果的重要因子。

本试验以 X_1 （pH）、 X_2 （葡萄糖浓度）、 X_3 （蛋白胨浓度）、 X_4 （酵母膏浓度）、 X_5 （ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 浓度）、 X_6 （NaCl 浓度）、 X_7 （ K_2HPO_4 浓度）、 X_8 （ $ZnSO_4$ 浓度）为自变量，以 1403 号菌菌体干质量为响应值，根据 Plackett-Burman 设计原理，设计实验次数 $N=12$ 对以上 8 个因素进行考察，分别对应于表中的 8 列，每个因素取低水平“-1”和高水平“1”，高水平分别取低水平的 1.25 倍，响应值为菌体干质量（ Y_1 ）和培养液中灰黄霉素浓度（ Y_2 ）。实验设计及实验结果见表 1，各因素主效应分析结果见表 2，各个因素的主要效果图见图 1。利用上述软件对表 2 中菌体干质量和灰黄霉素的代谢量数据进行方差分析，方差分析结果见表 3 和 4。

表 1 $N=12$ 的 Plackett-Burman 实验设计及响应值表

Tab. 1 Experimental design and response of Plackett-Burman ($N=12$)

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	Y_1 /g	Y_2 ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.6354	2.1156
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.2563	3.3654
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3.4612	3.0500
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.4556	1.2246
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	4.2563	5.5560
6	1	1	-1	1	1	1	-1	1	4.0636	7.5664
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	2.1130	6.1130
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1.2365	3.8489
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1.3564	5.8406
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	2.8102	5.3094
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	2.3564	8.2651
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.1034	0.4937

表 2 Plackett-Burman 实验回归方程系数显著性检验

Tab. 2 Examination for some parameters of Plackett-Burman experimental equation

代码	参数	低水平	高水平	回归系数 1	t_1 值	$Pr_1 > F_1$	回归系数 2	t_2 值	$Pr_2 > F_2$
常数项				2.00869	26.45	0.0001	4.39573	31.09	<0.0001
X_1	pH	7.5	9.4	0.23754	3.13	0.0521	-0.20616	-1.46	0.2409
X_2	葡萄糖	10	12.5	0.90911	11.97	0.0013	1.25693	8.89	0.0030
X_3	蛋白胨	2	2.5	-0.01447	-0.19	0.8610	-0.40931	-2.89	0.0628
X_4	酵母浸膏	1	1.25	-0.22968	-3.02	0.0566	-0.07097	-0.50	0.6502
X_5	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5.0	6.25	0.85534	11.26	0.0015	0.79949	5.65	0.011
X_6	NaCl	25	31	0.18384	2.42	0.0941	1.32413	9.36	0.0026
X_7	K_2HPO_4	1	1.25	0.22594	2.98	0.0588	0.80561	5.70	0.0107
X_8	$ZnSO_4$	1	1.25	-0.19126	-2.52	0.08663	0.77128	5.45	0.0121

利用 Plackett Burman 法, 对表一中的数据通过逐步回归分析获得最优多元一次回归方程为:

$$Y_1 = 2.008692 + 0.909108 * X_2 + 0.855342 * X_5$$
$$Y_2 = 4.395725 + 1.256925 * X_2 + 0.799492 * X_5 + 1.324125 * X_6 + 0.805608 * X_7 + 0.771275 * X_8$$

方差分析 (表 3) 表明, 所得菌丝体回归方程达到极显著 ($P = 0.0001$), 说明该回归模型在整个回归区域有很好的拟合效果, 决定系数 $R_2 = 0.8626$ 表明 86.26% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释。偏回归系数及显著性检验如表 2 所示, 结果显示影响菌丝体的主要影响因子为: 葡萄糖 ($P = 0.0013$) 和 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ($P = 0.0015$)。而影响灰黄霉素代谢量的关键因素是: 葡萄糖, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaCl$, K_2HPO_4 和 $ZnSO_4$, 该回归方程显著, 且拟合程度比菌丝体干质量的回归方程高 ($R_2 = 0.9499$)。

表 3 菌丝体回归方程的方差分析

Tab. 3 Analysis of mean square deviation for the regression equation of mycelial

变异源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F
模型	2	18.69705	9.34852	28.26	0.0001
误差	9	2.97734	0.33082		
总和	11	21.67439		$R^2 = 0.8626$	

表 4 培养液灰黄霉素代谢量回归方程的方差分析

Tab. 4 Analysis of mean square deviation for the regression equation of Griseofulvin in the broth

变异源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F
模型	5	62.59469	12.51894	22.76	0.0008
误差	6	3.30065	0.55011		
总和	11	65.89535		$R^2 = 0.9499$	

图 1 和 2 更直观的看到各因素斜率的大小和正负, 分析结果如下: ① 葡萄糖浓度对菌体的生长影响最大, 其次是 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 的浓度。葡萄糖作为碳源, 在一定范围内产生正影响。 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 作为生长因子, 对该菌生长在一定浓度范围内起促进作用。② 通过高效液相检测得出, 影响培养液中灰黄霉素的代谢产量的五个重要因素: 葡萄糖浓度, $NaCl$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, K_2HPO_4 , $ZnSO_4$, 并且增加这些因素浓度, 都能促进培养液中灰黄霉素的代谢。

总之, 葡萄糖作为碳源, 对菌体生长和灰黄霉素的代谢起到了显著促进作用, 由于灰黄霉素中含有氯元素, 因此培养基中氯化物无机盐对该化合物的代谢有较重要的影响, 氮源对菌体生长和灰黄霉素代谢的影响均不显著。

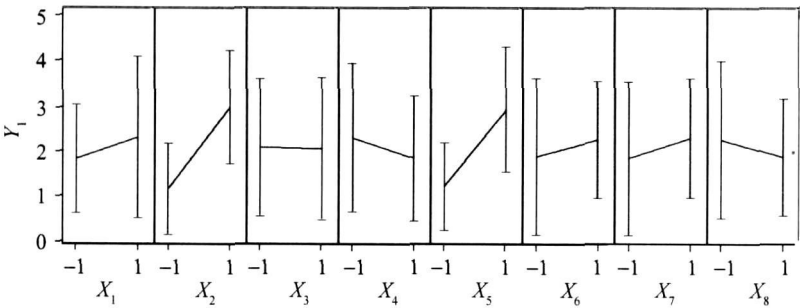


图 1 对菌丝体各因素主要效应图

Fig. 1 The main effective factors for mycelial

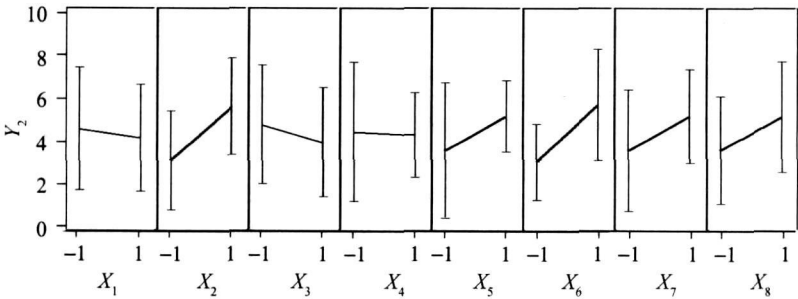


图 2 对培养液中灰黄霉素各因素主要效应图

Fig. 2 The main effective factors for griseofulvin in the broth

参考文献:

[1] 姜广策, 林永成, 周世宁, 等. 中国南海红树林内生真菌 No. 1403 次级代谢物研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000 39(6): 119.

[2] 姜广策. 海洋真菌 *Ha brosellinia oceanicum* #323 和内生性真菌 No. 1403 的发酵生理研究[D]. 广州: 中山大学, 2000

[3] GAWAMDE B N PATKAR A Y. Application of factorial designs for optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsilla pneumoniae* A S 22[J]. Bio technology and Bioengineering 1999 64(2): 168 – 173

[4] SUN Y Y, HAN B Q, LIU W S et al Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Micobacterium* sp. OU01[J]. Bioresource Technology 2007 98(8): 1548 – 1553

[5] CHAUHAN K, TROVEDI U, PATEL K C. Statistical screening of medium components by Plackett Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice[J]. Bioresource Technology 2007 98 98 – 103.

[6] ZENG X B, WANG H Y, HE L Y, et al Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from *Xylaria* sp. 2508 using response surface methodology[J]. Progress Biochemistry 2006 41 293 – 298

[7] PLACKETT R L, BURMAN J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. Biometrika 1946 33 305 – 325.

Preliminary Optimization of Fermentation Medium for the Production of Griseofulvin from Mangrove Fungus No. 1403 Using Plackett Burman Design

XIA Xue kui¹, HUANG Xiao-wang¹, ZHANG Jie¹, LIANG Zhi-bin¹,
XIE Lina¹, SHE Zhi-gang¹, LIN Yong-deng¹, L. L. P. W. IMOED²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering Sun Yat sen University Guangzhou 510275 China
(2. Department of Biology and Chemistry City University of Hong Kong China)

Abstract Two level factorial designs of Plackett Burman were constructed to select culture medium components of the mycelial growth and griseofulvin in broth. Firstly, Plackett – Burman design was employed to evaluate the effects of the eight components in the medium, including pH, the contents of glucose, peptone, yeast extract, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaCl$, K_2HPO_4 and $ZnSO_4$. It was confirmed that two important components which most affected the mycelial growth were glucose ($P = 0.0013$) and $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ($P = 0.0015$). Meanwhile, glucose ($P = 0.0013$), $NaCl$ ($P = 0.0026$), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ($P = 0.0110$), K_2HPO_4 ($P = 0.0107$) and $ZnSO_4$ ($P = 0.0121$) determined the metabolism of Griseofulvin in the broth. The result is useful for further study of the industrial fermentation.

Key words mangrove fungus, griseofulvin, optimization, Plackett Burman design