

红树林内生镰刀菌 732 代谢产物 Enniatin 发酵条件研究^{*}

游剑岚¹, 毛 巍^{2,3}, 周世宁¹, 王 军², 林永成⁴, 吴思扬¹

(1 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275;
2 中山大学药学院, 广东 广州 510080;
3 中北大学化学工程系, 山西 太原 030051;
4 中山大学化学化工学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 红树林内生真菌 732 可产生具有抗癌活性的新化合物 enniatin G。出于对 enniatin G 的兴趣, 通过 ITS 法测序分析, 对 732 种属进行了鉴定, 得出 732 属于 *Fusarium* 属真菌。为了增加 732 的代谢产物量, 以菌丝质量浓度 (干质量) 和 enniatin 质量浓度为检测指标, 用正交法确定了适合 732 生长的最佳碳源、氮源及温度, 再用单因素变换法对 732 培养条件进行了优化, 得出, 在含 $w=2.5\%$ 葡萄糖, $w=0.8\%$ 蛋白胨, 起始值为 pH 6 20% 人工海水的 GTY 培养基中发酵 10 d 菌丝质量浓度 (干质量) 和 enniatin 质量浓度可达最大值。

关键词: enniatin G; 发酵条件; 海洋内生真菌

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0529 6579 (2006) 04 0075 04

enniatin 是一类由 3 个 D-2 羟异戊酸 (Hylv) 和 3 个 N-甲基氨基酸交替排列组成的环 6 缩酚肽类化合物, 分子中含有十八员环肽骨架; 迄今为止人们在陆地 *Fusarium* 属真菌中找到了十几种 enniatin 类化合物, 结构通式如图 1 所示^[1-3]:

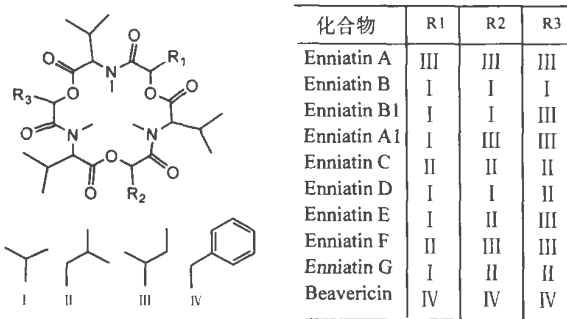


图 1 Enniatins 的结构
Fig. 1 The structures of enniatins

enniatin 类化合物具有抗菌、杀虫, 抗 HIV 活性^[4]; 是优良离子载体, 能形成一价阳离子的“Sandwich”络合物, 穿过细胞膜, 并对膜电位产生影响^[5-9]; enniatin 类化合物还是胆甾醇乙酰基转移酶 (ACAT) 抑制剂, 在体内可减少甘油三酸酯合成; 近年还发现这类化合物能够抑制 ATP 能

量依赖型的多药物载体 (ABC transporters), 特别是对多效耐药调控蛋白 5 (Pdr5p) 有高抑制活性^[7]。它们的生物活性不仅与分子中大环结构有关, 还与环上取代结构有关。

enniatin G 是我们在来自南中国海红树林内生真 732 的发酵液中首次发现的新化合物, 初步药理活性研究表明 enniatin G 有抗肝癌活性, $ED_{50} = 12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[8]。基于对 enniatin 类化合物广泛生理活性的兴趣, 本研究对 732 海洋真菌的种属进行了鉴定, 并探讨了发酵过程中物理、生理及营养条件对 732 代谢 enniatin 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

海洋真菌 732 是从泰国红树林树叶中分离得到的内生真菌。

1.2 基础培养基

- 1.2.1 PDA 培养基 ($w\%$) 马铃薯汁 20 葡萄糖 2 琼脂 2
- 1.2.2 GTY 培养基 ($w\%$) 葡萄糖 1 蛋白胨 0.2 酵母浸膏 0.1 人工海水 20
- 1.2.3 添加的微量成分 ($w\%$) KH_2PO_4 0.3 K_2HPO_4 0.7 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01

^{*} 收稿日期: 2005 10 08
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370030); 广东省自然科学基金资助项目 (031572); 广东省博士启动基金资助项目 (04300309)
作者简介: 游剑岚 (1978 年生), 女, 博士; 通讯联系人: 王军; E-mail: zwangjun@21cn.com
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- 1.2.4 多种碳源 葡萄糖, 麦芽糖, 甘油。
- 1.2.5 多种氮源 蛋白胨, 牛肉浸膏, 尿素, NH_4NO_3 。
- 1.3 试剂

enniatin G 标准物质: 前期研究中获得, 纯度 $90\%^{[8]}$ 。

乙酸乙酯、氯仿、甲醇、正己烷等均为市售分析纯试剂。

1.4 种属鉴定

将 732 真菌接种在含 PDA 培养基的培养皿上培养, 从培养基平面刮取菌丝, 用苯酚-氯仿提取菌丝体中 DNA, 用 ITS4 和 ITS5 作引物对核糖体 DNA 上 ITS 区域进行 PCR 扩增, 以 ITS871r (5'-GCT TAA GTT CAG CGG GTA -3') 和 ITS5 作为测序引物^[9-10], 用 ABI 377XL 自动测序仪进行测序, 然后在 AutoAssembler Version 1.4 上进行组装。

1.5 发酵方法

从斜面培养基上挑取生长良好菌体, 接入经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.1 mPa) 高温灭菌 25 min 的 PDA 培养基, 培养 7 d 后接入经高温灭菌的试验培养基。

试验发酵方式采用悬浮培养, 在 500 mL 三角烧瓶中装入 200 mL 培养基, 接种后置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 以 120 r/min 振摇孵化 10 d

1.6 菌体生长量测定

终止发酵后, 用布氏漏斗抽滤, 将菌体和发酵液分离, 用 500 mL 蒸馏水分数次洗涤菌体, 冻干, 干菌丝称量。

1.7 Enniatin 质量浓度分析

(1) 干菌丝称量后用乙酸乙酯萃取, 浓缩至干, 得到含 enniatin 的菌丝体提取物。

(2) 发酵液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 减压蒸馏至干, 得到含 enniatin 的发酵液提取物。

(3) 将提取物定容到 0.5 mL 乙酸乙酯中, 准确移取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 样品溶液, 用硅胶薄层层析技术 (TLC) 分离, 展开剂采用氯仿: 甲醇 (9:1) 溶液, 计算位移值 R_f , 刮取与 enniatin G R_f 值相同的斑点, 用正己烷提取, 定容至 2.0 mL, 用 1 cm 比色池在 240 nm 波长下测定吸光度; 用 enniatin G 标准物质作工作曲线, 计算 enniatin 的质量浓度。

1.8 培养条件优化方法

最佳碳源、氮源、温度确定用正交法, 其它培养条件优化用单因素变化试验。

2 数据与结果

2.1 海洋真菌 732 种属特征

经测定 732 的 ITS 区含 503 个碱基对, 通过检索基因库和 Paup 法分析, 表明该序列与库中 *Fusarium polyphialidiam*, *F. concolor* 和 *F. sporotrichoides* 基因序列相似性最高。但由于该 DNA 序列中仍有至少 15 个碱基对与这三株镰刀菌的序列不同, 差异为 3%, 因此推测 732 可能是镰刀菌属的一个新种, 命名为 *Fusarium* 732[‡]

2.2 温度、碳源、氮源对 732 生长影响

以碳源 ($w=0.5\%$)、氮源 ($w=0.1\%$)、温度为主要影响因子, 设计 3 因子 3 水平正交试验, 在 120 r/min 振摇培养 5 d 以菌丝质量浓度 (干质量) 为检测指标, 研究碳源、氮源、温度对 732 生长的影响。

表 1 因素水平表
Tab. 1 The factors and levels

水平	因素		
	碳源	氮源	温度 / $^{\circ}\text{C}$
1	葡萄糖	蛋白胨	15
2	麦芽糖	尿 素	25
3	甘 油	硝酸铵	30

表 2 正交实验结果

Tab. 2 The results of orthogonal experiment ($L_9 3^4$)

实验号	碳源	氮源	温度	4	菌丝体质量浓度 (干质量) (g /250 mL)
1	1	1	1	1	0.172
2	1	2	2	2	0.054
3	1	3	3	3	0.090
4	2	1	2	3	0.253
5	2	2	3	1	0.013
6	2	3	1	2	0.041
7	3	1	3	2	0.149
8	3	2	1	3	0.049
9	3	3	2	1	0.041
K1	0.316	0.574	0.262		
K2	0.307	0.116	0.348		
K3	0.239	0.172	0.252		
R	0.077	0.458	0.096		

从表 2 中 K 值和极差 R 值得出如下结论: 732[‡] 的生长主要受氮源影响, 其次是温度, 碳源影响较小, 实验给出的最佳氮源是蛋白胨, 最佳发酵温度是 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最佳碳源是葡萄糖。

2.3 732 生长速率实验

将 *Fusarium* 732 接种在 GTY 培养基中培养, 从第 2 天开始检测 enniatin 质量浓度及菌丝质量浓度 (干质量) 结果, 从发酵第 2 天起便检测到有 enniatin 产生, 第 2 天至第 6 天 enniatin 质量浓度出现指数增长, 第 8 天后达最大值 (图 2)。

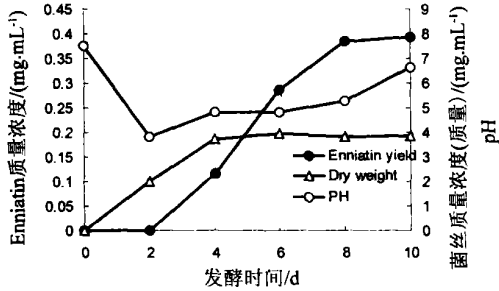


图 2 *Fusarium* 732 生长速度
Fig. 2 The effect of culture time

2.4 pH 对 enniatin 代谢和真菌生长发育影响

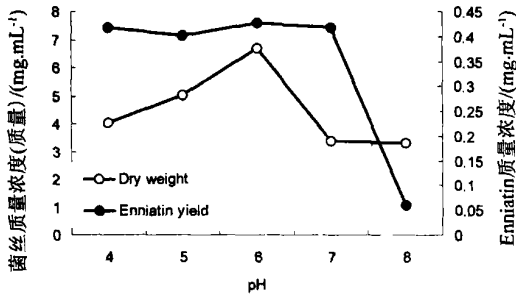


图 3 pH 影响
Fig. 3 The effect of pH

在 GTY 培养基中用 HCl 和 NaOH 调节发酵液的初始 pH 值为 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 加入磷酸氢钠缓冲溶液维持发酵过程中 pH 值不变, 研究 pH 对 *Fusarium* 732 发酵的影响, 结果发现, 在 pH 6.0 时发酵 10 d 可获最大菌丝质量浓度 (干质量) 和最大 enniatin 产率 (图 3)。

2.5 盐分对 enniatin 代谢和真菌生长发育影响

在 GTY 培养基添加不同盐浓度的人工海水, 进行 *Fusarium* 732 的发酵培养, 结果在体积分数为 20% 的人工海水 -GTY 培养基中发酵 10 d 得到最大菌丝质量浓度 (干质量) 和最大 enniatin 产率 (图 4)。

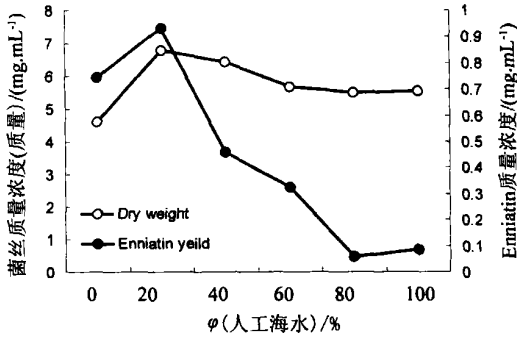


图 4 人工海水影响
Fig. 4 The effect of artificial seawater

2.5 葡萄糖和蛋白胨质量分数影响

用不同质量分数葡萄糖的 GTY 培养基进行 *Fusarium* 732 发酵培养, 结果, 在葡萄糖质量分数为 2.5% 时, 获大菌丝质量浓度 (干质量) 和 enniatin 最大产率 (图 5)。

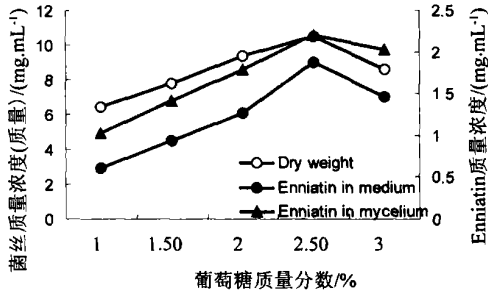


图 5 葡萄糖影响
Fig. 5 The effect of glucose

用 $w=2.5\%$ 葡萄糖配比不同浓度的蛋白胨为培养基进行 *Fusarium* 732 发酵培养, 在蛋白胨质量分数为 0.8% 时, 获 enniatin 最大产率, 在蛋白胨为 0.2% ~ 0.4% 时, 获最大菌丝质量浓度 (干质量) (图 6); enniatin 在菌丝体和发酵液中的比例为 6.5 3.5。

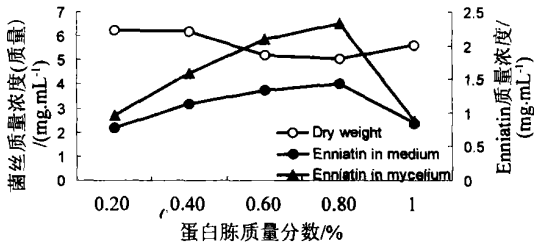


图 6 蛋白胨影响
Fig. 6 The effect of tryptone

4 问题与讨论

通过正交试验和单因素变化试验, 得到 *Fusarium* 732# 代谢 enniatin 的最佳发酵条件 (w) 是 2.5% 葡萄糖、0.8% 蛋白胨、20% 人工海水, 起始 pH 为 6.0。在此培养条件下 enniatin 产率是 $3.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在给定的发酵条件下, 菌体中 w (enniatin) 约为 65%, 培养液中 w 大约为 35%; 从代谢量来看, *Fusarium* 732# 产生 enniatin 的量比其它 enniatin 产生菌株约高 0.8 ~ 1.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 因此 *Fusarium* 732# 是一个高产 enniatin 的菌株。

从实验结果来看, *Fusarium* 732# 的生长受氮源影响较大, Büllich 等曾研究过 enniatin 的代谢量与 enniatin 合成酶的活性线性相关^[11], 富含多种氨基酸的蛋白胨培养基可为 enniatin 合成酶的合成提供更多种类的氨基酸, 因此也利于 enniatin 的合成。

感谢: 感谢英国哥伦比亚大学 Patrik Indebetzin 博士为海洋真菌 732# 做了测序鉴定。

参考文献:

- [1] TOMODA H. New cyclodepsipeptides enniatins D, E and F produced by *Fusarium* sp. FO-1305 [J]. J Antibiot 1992 45: 1207-1215.
- [2] HERRMANN M. Effect of disruption of the enniatin synthetase gene on the virulence of *Fusarium avenaceum* Mol [J]. Plant Microbe Interact 1996 9: 226-232.
- [3] LOGRIECO A. Occurrence of beauvericin and enniatins

- in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight [J]. Appl Environ Microbiol 2002 68: 82-85.
- [4] CHONGDEE N. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hamipterigenum*: isolation and studies on precursor-directed biosynthesis [J]. Tetrahedron, 2003, 59: 1015-1020.
- [5] GRIGORIEV P. Interaction of panosialins with planar lipid bilayers [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1998 46: 151-154.
- [6] KAMYAR M. Investigation of the electrophysiological properties of enniatins [J]. Arch Biochem Biophys 2004 429(2): 215-223.
- [7] HIRAGA K. Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochem Biophys Res Commun 2005 328: 1119-1125.
- [8] LIN Y C. A novel compound enniatin G from the mangrove fungus *Halosarpheia* sp. from the South China Sea [J]. Aust J Chem 2002 55: 225-227.
- [9] LEE S B. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores [M]. San Diego: Academic Press, Inc 1990: 282-287.
- [10] WHITE T J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego: Academic Press, Inc 1990: 315-322.
- [11] BILLICH A. Constitutive expression of Enniatin synthetase during fermentative growth of *Fusarium scirpi* [J]. Applied and Environmental Microbiology 1988 54: 2504-2509.

Fermentation Conditions and Characterization of Endophytic Fungus #732 Producing Novel Enniatin G from South China Sea

YOU Jia-kan¹, MAO Wei^{2,3}, ZHOU Shu-ning¹, WANG Jun², LIN Yong-cheng⁴, WU Si-ying¹

(1. School of Life sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Department of Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China;

4. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The endophytic fungus 732#, isolated from the mangrove in the South China Sea with anticancer novel Enniatin G, was characterized by IIS sequence analysis and phylogenetic analysis, which showed that the 732# belongs to the genus of *Fusarium* sp. To increase the content of the metabolites of the 732#, orthogonal test was used to select the optimum carbon sources and nitrogen sources with dry mycelium weight as observed objects. The incubation conditions for the growth and enniatin production of the *Fusarium* 732# were studied through changing the concentrations of the carbon sources and nitrogen sources, salt concentrations, and the initial pH values with enniatins and dry mycelium weight as observed objects. Under the optimal fermentation conditions in GTY medium containing 25.0% glucose, 0.8% tryptone, pH 6, 20% artificial seawater and 10 days incubation, the maximal dry weight and enniatin yield were obtained.

Key words enniatin G; fermentation conditions; marine endophytic fungus