

具抗肿瘤活性海洋细菌 HY108 的发酵优化

张卫, 田树红, 张云波, 马瑞莲

摘要:目的 对海洋细菌 HY108 进行发酵工艺的优化,以提高菌株发酵液的抗肿瘤活性。方法 采用 MTT 检测法检测菌株发酵液对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制率,对该菌株的培养基组成和发酵条件进行了确定。结果 通过对该菌株产抗肿瘤活性物质的发酵培养基和发酵条件的优化,菌株发酵液对肿瘤细胞的抑制率提高了近 20%,为提高抗肿瘤先导化合物的产率提供了理论依据。结论 通过优化,获得最佳发酵培养基为:玉米粉 3%、葡萄糖 0.5%、蛋白胨 0.2%和酵母粉 1.2%,pH6.5~7.0;最佳发酵条件为:种龄 24h,以 2%的接种量接种,28℃的条件下 150r/min 振荡培养 3d。

关键词: 海洋细菌;MTT 法;抗肿瘤;发酵优化

中图分类号:R117 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)2-179-04

Fermentation optimization of a marine bacteria strain HY108 with anti-tumor activity. ZHANG Wei, TIAN Shu-hong, ZHANG Yun-bo et al. (The People's Hospital of Sanya, Sanya 572000, Hainan P. R. China)

Abstract: Objective To advance the antitumor activity of fermentation broth by the fermentation optimization of strain HY108. Methods By MTT method, the inhibit rate of fermentation against human liver cell SMMC-7721 was researched. And the compounds of culture medium and fermentation condition was studied. Results By study of fermentation technology, its inhibit rate against human liver cancer cell SMMC-7721 raised 20% to provide the theory basis for enhancing production rate of antitumor forerunner compounds. Conclusion By study of fermentation technology, the optimized medium consisted of 3% maizena, 0.5% glucose, 0.2% peptone, 1.2% yeast powder, pH6.5~7.0. The optimum culture condition was seed cultural time 24h, 2% inoculation amount, 28℃, 150r/min for 3d.

Key words: Marine bacterium; MTT; Antitumor; Fermentation optimization

海洋微生物作为抗肿瘤药物及其先导化合物筛选和开发的重要资源之一已越来越受到人们的重视。哥伦比亚大学的 Burkholder^[1]于 1966 年从加勒比海海藻 *Thalassia* 表面分离出的细菌 *Pseudomonas bromoutil* 中首次获得了具有抗肿瘤活性和其它抗菌活性的五溴化合物 pentabromopseudili;1970 年, Pettit 等从 100kg 海兔 *Dolabella auricularia* 提取液中获得不到 1mg 抗肿瘤活性物质 Dolastatin 10;2001 年, Luesch H^[2]证实了 Dolastatin 10 来源于藻青菌 *Symploca*;2006 年, T. Luke Simmons^[3]和 Han B^[4]分别从海洋藻青菌 *Symploca* sp. 和 *Lyngbya majuscula* 中分离到抗肿瘤化合物 Belamide A 和 Aurilides B 和 C。Belamide A 能有效抑制 HCT-116, $IC_{50}=0.74\mu g/mL$, Aurilides B 和 C 对人类肺癌细胞株 NCI-H460 和鼠成神经原瘤细胞株 neuro-2a 的 IC_{50} 均在 0.01~0.13 $\mu g/mL$ 之间。至今,已从海洋细菌中分离出了许多结构新颖的抗肿瘤天然产物。

菌株 HY108 是一株具有抗肿瘤活性的海洋细菌,分离自海南东寨干红树林的海泥中,初步鉴定为 *Coralloccoccus* sp.。该菌的发酵产物能诱导 SMMC-7721 凋亡且抗肿瘤活性稳定,具有开发抗肿瘤先导化合物

的价值。本文对该菌株产抗肿瘤活性物质进行了发酵优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及肿瘤细胞 海洋细菌 HY108,人肝癌细胞 SMMC-7721(购于中国科学院上海细胞库)。

1.1.2 培养基 种子液培养基:酵母粉 2.0g,牛肉膏 2.0g,蛋白胨 5.0g,葡萄糖 10.0g,1 000ml 陈海水配制,pH=7.0~7.5。基础发酵培养基:同种子液培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌体的培养 用接种环从划线平板上取一环 HY108 菌体接种到 20ml 的种子培养液中,28℃ 150r/min 振荡培养 24h。再取上述种子培养液按 2%的接种量接种到 100ml 的发酵培养基中,28℃ 150r/min 振荡培养 3d。

1.2.2 菌体生物量的测定 采用细胞干重法,发酵液经 12 000r/min 离心 10min 收集沉淀物,蒸馏水洗涤 2 次,收集沉淀物于 105℃烘干至恒重后称重。

1.2.3 抗肿瘤活性检测 参照 MTT 检测法。

1.2.4 发酵培养基和发酵条件中碳、氮源及其浓度的确定 保持基础培养基中其它氮源和浓度不变,以

1%的碳源浓度依次改变培养基的碳源,1%的接种量接种制备好的 HY108 种子液(种龄为 24h),装液量为 30ml/150ml 三角瓶,于 28℃、200r/min 摇床培养 3d,离心收集上清液,MTT 法测定抗肿瘤活性。以不同浓度的最佳碳源依次作为发酵培养基,相同培养条件下培养,离心收集上清液,MTT 法检测抗肿瘤活性。以类似的方法确定最佳氮源及其浓度(各种氮源的浓度都取 0.5%)。

1.2.5 均匀设计法优化最佳碳、氮源 根据单因素实验结果,采用均匀设计法^[5]对最佳碳、氮源进行发酵优化。初始 pH 值为 6.5~7.0,种龄为 24h,接种量为 1%,于 28℃、200r/min 振荡培养 3d。离心收集上清液,MTT 法检测抗肿瘤活性。

1.2.6 最适 pH 值、培养温度的确定 调节培养基的 pH 值为 3.0~9.0,并向不同 pH 值的培养基中以 1%的接种量接种制备好的 HY108 种子液(种龄为 24h),装液量为 30ml/150ml 三角瓶,于 28℃、200r/min 摇床培养 3d,离心收集上清液,MTT 法检测抗肿瘤活性。单一地改变培养温度,并以同样的方法确定最适培养温度,MTT 法测定抗肿瘤活性。

1.2.7 种龄和接种量对 HY108 合成抗肿瘤活性物质的影响 以种子液培养基配制种子培养液,分别培养 12h、24h、36h、48h、60h、72h 后以 1%的接种量接入最适发酵培养基中,其它发酵条件同上,MTT 法测定发酵液上清液的抗肿瘤活性。单一地改变接种量,并以同样的方法确定最适接种量,MTT 法测定发酵液上清液的抗肿瘤活性。

1.2.8 转速对 HY108 合成抗肿瘤活性物质的影响 选择最佳发酵培养基和最佳其它发酵条件,将转速分别设为 90、120、150、180、210、240r/min,MTT 法测定发酵液上清液的抗肿瘤活性。

1.2.9 培养时间对 HY108 合成抗肿瘤活性物质的影响 按已确定的最适发酵培养基组成和浓度配制培养基,调 pH 至最适值,以最适接种量接种制备好的 HY108 种子液(种龄为 24h),于最适培养温度下进行培养。每隔 1d 离心收集发酵液上清液,MTT 法检测抗肿瘤活性。

2 结果

2.1 最佳碳源及其浓度的确定 在以葡萄糖(Glucose)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、淀粉(starch)、甘油

(glycerin)、果糖(fructose)、玉米粉(maizena)为碳源时发现,以葡萄糖为碳源时菌体生长最旺盛,玉米粉作为碳源时产生的活性物质的活性最高,葡萄糖次之,见图 1。以不同浓度的葡萄糖和玉米粉进行发酵实验时发现,当葡萄糖和玉米粉的浓度分别为 1.5%和 2.5%时,活性物质的积累量最大,见图 2。

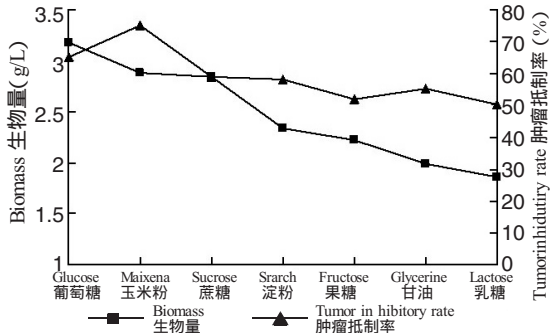


图 1 碳源对 HY108 发酵液生物量和抗肿瘤活性的影响
Fig 1 Effect of carbon sources on biomass and antitumor activity of HY108 fermentable extract

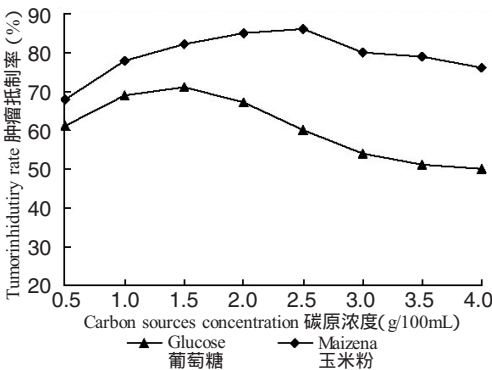


图 2 不同浓度的碳源对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响
Fig 2 Effect of carbon sources concentration on antitumor activity of HY108 fermentable extract

2.2 最佳氮源及其浓度的确定 在以酵母粉(Yeast powder)、牛肉膏(Beef extract)、蛋白胨(Peptone)、黄豆粉(Soybean powder)、NaNO₃、NH₄NO₃、(NH₄)₂SO₄ 为氮源时发现,以酵母粉为氮源时菌体生长最旺盛,以蛋白胨作为氮源时产生的活性物质的活性最高,酵母粉次之,而无机氮源则对菌体生长和抗肿瘤活性物质的产生都不利,见表 1。以不同浓度的蛋白胨和酵母粉进行发酵实验时发现,蛋白胨和酵母粉的浓度分别为 0.8%和 1.0%时最有利于菌体合成抗肿瘤活性物质,见图 3。

2.3 采用均匀设计法优化最佳碳、氮源 通过碳源和氮源的单因素实验获得菌株 HY108 抗肿瘤活性的最

表 1 氮源对 HY108 发酵液生物量和抗肿瘤活性的影响

Table 1 Effect of nitrogen sources on biomass and antitumor activity of HY108 fermentable extract

氮源 Nitroge sources	酵母粉 Yeast powder	牛肉膏 Beef extract	蛋白胨 Peptone	换豆粉 Soybean powder	硝酸钠 NaNO ₃	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄
生物量(g/L)Biomass	3.08	1.64	2.15	1.74	0.85	0.72	0.70
肿瘤抑制率(%)Tumor inhibitory rate	63	56	65	53	46	34	37

佳碳、氮源为玉米粉、葡萄糖、蛋白胨和酵母粉,然后采用均匀设计法对最佳发酵碳、氮源进行优化,见表 2。通过统计分析软件 SAS 的 reg 过程(selection=backward, sls=0.05)对试验结果进行二次回归分析,得到回归方程 $y=90.79072-6.79976x_3+2.79274x_1x_4-0.57084x_2^2$,再用 lingo 软件优化所得的回归方程,得到最佳发酵培养基:玉米粉(x_1)3%,葡萄糖(x_2)0.5%,蛋白胨(x_3)0.2%,酵母粉(x_4)1.2%,目标预测值(y)为 99.34192,总回归模型 $Pr>F=0.0089<0.01$,方程达极显著。最后,在最优发酵条件的基础上对 lingo 分析所得的最优发酵培养基配方进行实验验证,得到发酵液的抗肿瘤活性为 94%。这说明所得回归模型较好地反映了实际情况,对实验具有较好的指导意义。

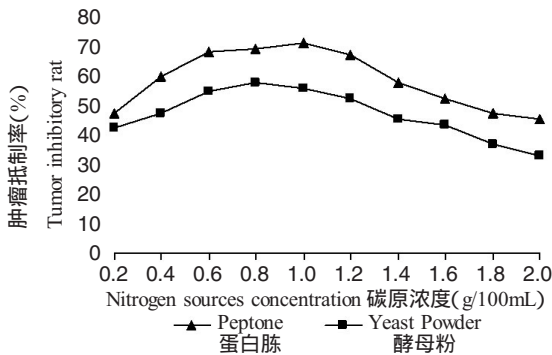


图 3 不同浓度的氮源对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响
Fig 3 Effect of nitrogen sources concentration on antitumor activity of HY108 fermentable extract

表 2 碳源和氮源均匀设计表

Table 2 Homogeneous design of carbon sources and nitrogen sources					
水平	玉米粉	葡萄糖	蛋白胨	酵母粉	肿瘤抑制率(%)
Level	Maizena	Glucose	Peptone	Yeast powder	Tumor inhibitory rate
	(g/100ml)				
1	0.5(1)	0.7(2)	0.6(3)	1.2(6)	88.0
2	1.0(2)	1.1(4)	1.2(6)	1.0(5)	85.0
3	1.5(3)	1.5(6)	0.4(2)	0.8(4)	90.0
4	2.0(4)	0.5(1)	1.0(5)	0.6(3)	87.0
5	2.5(5)	0.9(3)	0.2(1)	0.4(2)	92.0
6	3.0(6)	1.3(5)	0.8(4)	0.2(1)	86.0

2.4 发酵条件中初始 pH 值的确定 HY108 对环境酸碱度有较强的适应能力,在 pH3.0~9.0 的范围内均能生长,而在 pH5.0~8.0 范围内生长能力较强且产生较多的抗肿瘤活性物质,其最适培养 pH 值为 6.5~7.0。

2.5 发酵条件中最适培养温度的确定 HY108 对温度也有较强的适应能力,在 4.0℃~45℃ 的范围内均能生长,在温度 28℃ 时抗肿瘤活性最强。

2.6 发酵条件中最适种龄的确定 当种龄为 12h 时,发酵液抗肿瘤活性最低,当种龄为 24h 时最强,其余种龄接种的发酵液对肿瘤细胞的抑制率随着种龄的增加而逐渐降低,见图 4。

2.7 最适接种量的确定 实验结果表明,当 HY108 种子液种龄为 24h 时,以 2% 的接种量接种所得发酵液的抗肿瘤活性最强,而低于或高于 2% 时,发酵液的抗肿瘤活性都较低,见图 5。

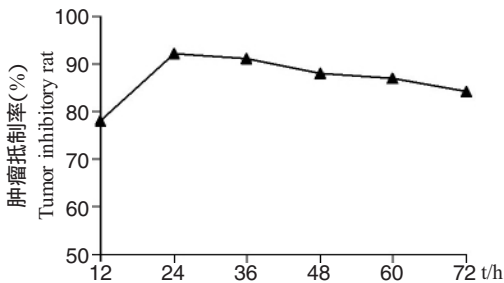


图 4 种龄对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响
Fig 4 Effect of seed cultural time on antitumor activity of HY108 fermentable extract

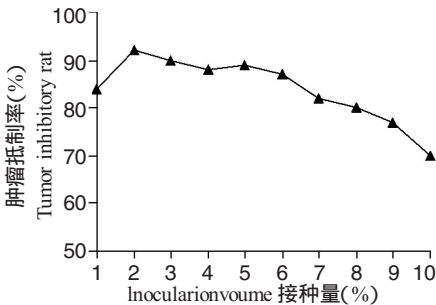


图 5 接种量对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响
Fig 5 Effect of inoculation volume on antitumor activity of HY108 fermentable extract

2.8 转速对 HY108 抗肿瘤活性的影响 菌株 HY108 发酵是需氧性发酵过程,通过改变摇床转速可调节通气量,通气量的大小会影响菌体合成抗肿瘤活性物质的量。当转速为 150r/min 时,发酵液的抗肿瘤活性最强。在转速为 120~150r/min 时,发酵液的抗肿瘤活性变化不大,见图 6。

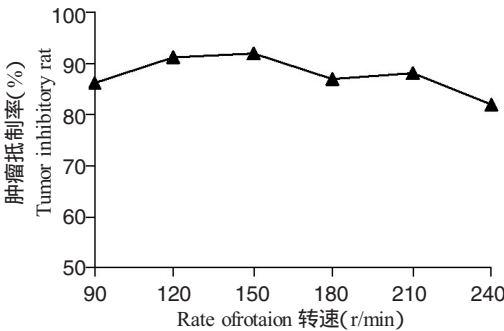


图 6 接种量对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响
Fig 6 Effect of rotation speed on antitumor activity of HY108 fermentable extract

2.9 发酵时间对 HY108 抗肿瘤活性的影响 在确定最适发酵培养基组成及其他培养条件的基础上,测定了 HY108 的最适培养时间。该菌培养 1d 后抗肿瘤活性较低,培养 2d 后抗肿瘤活性明显增强 (下转第 184 页)

对的抗原位点是分析抗体免疫活性的重要环节,我们在制备了 9 株抗体后分别对其中的 5 株抗体进行了位点测定,经过反复的测定、筛选,确定 5 株 McAb 针对两个不同的抗原位点。对于 CD28 单抗及其生物活性的初步研究为深入探讨 T 淋巴细胞的表位形态和增殖将提供重要的依据。另外,我们就单抗对 CD28 激发效应及活化 T 淋巴细胞的表型进行了分析,该研究将另文报道。

参考文献:

- [1] Tao Y, Ying X, Yucheng L et al. Clinical study of co-treatment with DC-CIK cells for advanced solid carcinomas [J]. Chinese-German J Clin Oncol 2011, 10(6): 354-359.
- [2] Chi XW, Liu J. The research summary of the effect of costimulatory molecule in the solid carcinomas [J]. Guide of China Medicine, 2010, 8(19): 71-73. (In Chinese)
- (迟小伟, 刘杰. 共刺激分子在实体性肿瘤中的研究综述[J]. 中国

医药指南 2010, 8(19): 71-73.)

- [3] He H, Song WG. The cross talk between the regulatory dendritic cells and the regulatory T cells [J]. Immunological Journal 2010, 26(6): 551-555. (In Chinese)
- (何浩, 宋文刚. 调节性 DC 与调节性 T 细胞的相互作用[J]. 免疫学杂志 2010, 26(6): 551-556.)
- [4] Tuosto L. NF- κ B family of transcription factors: Biochemical players of CD28 co-stimulation [J]. Immunology Letters 2011, 135(1): 1-9.
- [5] Björge E, Tasken K. Novel mechanism of signaling by CD28 [J]. Immunology Letters 2010, 129(1): 1-6.
- [6] Watts TH. Staying alive: T cell costimulation, CD28, and Bcl-XL [J]. J Immunol 2010, 185(7): 3785-3787.
- [7] Sun ZW, Tao R, Lu YH et al. Preparation of five monoclonal antibodies against human CD28 and analysis of their biological effects [J]. Chinese Journal of Immunology 2005, 21(6): 406-411. (In Chinese)
- (孙中文, 陶然, 陆艳红, 等. 5 株鼠抗人 CD28 单克隆抗体的研制及生物学特性的研究 [J]. 中国免疫学杂志 2005, 21(6): 406-411.)

收稿日期: 2011-10-17 编辑: 谢永慧

(上接第 181 页)

培养 3d 后对肿瘤细胞的抑制率达最大值,在培养 3~6d 内对肿瘤细胞的抑制率变化不大,培养到第 7d 时对肿瘤抑制率明显下降,见图 7。

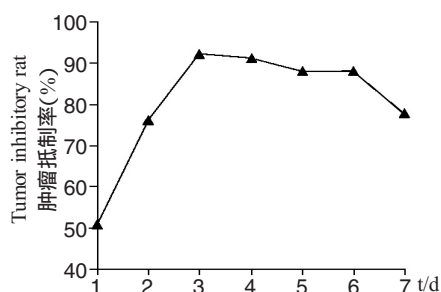


图 7 发酵时间对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响

Fig 7 Effect of cultivation time on antitumor activity of HY108 fermentable extract

3 讨论

通过对菌株 HY108 发酵优化的研究,发现该菌在较宽的 pH 值和温度范围内都能较好地生长。碳源的选择对菌体合成抗肿瘤活性物质的量起主要作用,实验发现,玉米粉对提高菌株 HY108 抗肿瘤活性物质的产量是非常必要的。

此外,发酵时间也是影响菌株 HY108 合成抗肿瘤活性物质的重要因素,发酵 3d 时产生的抗肿瘤活

性物质最多。与基础发酵培养基相比,优化后的发酵培养基能使菌株 HY108 产生更多的抗肿瘤活性物质,肿瘤抑制率提高了近 20%。

参考文献:

- [1] Li DZ, Han BQ. Study of Active metabolite of marine bacteria [J]. Chin J Mar Drugs 2006, 25(5): 51. (In Chinese)
- (李大志, 韩宝芹. 海洋细菌活性代谢产物的研究进展[J]. 中国海洋药物 2006, 25(5): 51.)
- [2] T. Luke Simmons, Eric Andrianasolo, Kerry McPhail et al. Marine natural products as anticancer drugs [J]. Molecular Cancer Therapeutics 2005, 4(2): 333.
- [3] T. Luke Simmons, Kerry L. McPhail, William H. Gerwick et al. Belamide A, a new antimitotic tetrapeptide from a Panamanian marine cyanobacterium [J]. Tetrahedron Letters 2006, 47: 3387.
- [4] Han B, Gross H, Goecker DE et al. Aurilides B and C, cancer cell toxins from a Papua New Guinea collection of the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula [J]. J Nat Prod 2006, 69(4): 572.
- [5] Fang KT. Uniform design and uniform design table [M]. Bei Jing: Science Press, 1994, 13. (In Chinese)
- (方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994, 13.)

收稿日期: 2011-12-20 编辑: 符式刚