

雪白弯颈霉产环孢菌素发酵条件的优化

周方元, 苏丹*, 吕国忠, 姜娃, 李琳琳 (大连民族大学环境与资源学院, 辽宁大连 116600)

摘要 [目的]探讨雪白弯颈霉(*Tolypocladium inflatum*)产环孢菌素的最适发酵条件。[方法]采用正交试验,研究不同培养时间、培养基种类、装瓶量、菌种接种量(以菌片计)对雪白弯颈霉产环孢菌素的影响。[结果]在培养时间为4 d,发酵培养基为马铃薯200.00 g、甘露醇40.00 g、蛋白胨6.00 g,装瓶量为100 mL,菌片投放为9片时雪白弯颈霉产环孢菌素的发酵条件为最优。[结论]试验结果为提高雪白弯颈霉产环孢菌素的产量提供了理论依据。

关键词 雪白弯颈霉;环孢菌素;正交试验;发酵条件

中图分类号 R927.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)19-008-02

Optimization of Fermentation Conditions for Production of Cyclosporin from *Tolypocladium inflatum*

ZHOU Fang-yuan, SU Dan*, LU Guo-zhong et al (College of Environment and Resources, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract [Objective] To discuss the optimum fermentation conditions for the production of cyclosporin from *Tolypocladium inflatum*. [Method] Through an orthogonal experiment, the effects of culture time, culture medium, bottling capacity, and inoculation amount (in slice) of *T. inflatum* on the production of cyclosporin were analyzed. [Result] The optimum fermentation conditions for the production of cyclosporin from *T. inflatum* were shown as follows: the culture time was 4 d; the fermentation culture medium was composed of potato 200.00 g, mannitol 40.00 g, and peptone 6.00 g; bottling capacity was 100 mL; inoculation amount was 9 slices. [Conclusion] The study can provide theoretical foundation for the improvement of yield of cyclosporin produced from *T. inflatum*.

Key words *Tolypocladium inflatum*; Cyclosporin; Orthogonal experiment; Fermentation conditions

弯颈霉属真菌是 Gams 基于 3 个土壤丝状真菌建立的属^[1]。按传统分类系统,弯颈霉属真菌被划归于子囊菌门粪壳纲肉座菌目虫草科^[2-3]。Sung 等^[3]将麦角菌科分成麦角菌科、虫草科和蛇形虫草科 3 个科,并将弯颈霉属划归于蛇形虫草科。目前,已知某些弯颈霉是团囊虫草属(*Elaphocordyceps*)的无性型,例如,雪白弯颈霉(*Tolypocladium inflatum*)是冬虫夏草(*E. subsessilis*)的无性型^[4]; Quandt 等^[4-5]将虫草属及相近属的 26 个种添加到弯颈霉属中,因此,目前已知的弯颈霉属真菌有 41 个分类单元。

环孢菌素 A (CYA) 最初是由瑞士科学家 Ruegger 等^[6]从挪威哈当厄尔高原土壤中分离的雪白弯颈霉的发酵产物中分离得到的。环孢菌素 A 是一种重要的选择性免疫抑制剂,临床上作为器官移植的抗排斥药物,在组织器官移植过程中排异反应治疗中有广泛应用,多用于角膜移植、肾移植等的治疗,另外,对其他疾病如再生障碍性贫血等的治疗也有研究^[7]。环孢菌素 A 的制备、剂型及功效一直是研究的重要内容,环孢菌素 A 产量的提高也是研究热点^[8]。鉴于此,笔者采用正交试验研究了雪白弯颈霉产环孢菌素的最佳发酵条件,以期为提高雪白弯颈霉产环孢菌素产量提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。71 株雪白弯颈霉为大连民族大学真菌资源与利用研究室保藏并提供。

1.1.2 培养基。活化培养基(PDA):马铃薯200.00 g,葡萄

糖 20.00 g,琼脂 20.00 g,加水定容至 1 L。发酵培养基:(a)马铃薯 200.00 g,葡萄糖 20.00 g,加水定容至 1 L;(b)固体玉米浆粉 30.00 g,糊精 60.00 g,葡萄糖 1.50 g,尿素 0.15 g,加水定容至 1 L,pH 4.5;(c)马铃薯 200.00 g,甘露醇 40.00 g,蛋白胨 6.00 g,加水定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化。从 4℃ 冰箱中取出保存的菌种,恢复到室温,然后将菌株分别转接到 90 mm PDA 平皿上,25℃ 恒温培养 2 d,挑取菌落边缘的菌丝接种到新培养基上,继续培养 5 d 后,用直径 6 mm 打孔器沿边缘取相同菌龄的菌块备用。

1.2.2 产环孢菌素菌株初步筛选。将已经活化的菌株分别与黑曲霉菌进行对峙培养,每个试验重复 3 次,3 d 后观察,采用十字交叉法测量抑菌圈平均直径^[9],比较菌株抑菌圈直径大小,筛选出有明显抑菌效果的菌株,进行发酵培养。

1.2.3 发酵培养。采用正交设计法^[10-12]研究 4 个因素,即发酵时间、发酵培养基种类、装瓶量以及菌片投放量对发酵效果,即抑菌效果的影响^[13]。每个因素 3 个水平,所列因素与水平见表 1。选取 L₉(3⁴) 正交试验表。用 250 mL 三角瓶装发酵培养基,发酵培养物在 26℃、200 r/min 的摇床振荡培养。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平 Level	培养时间 Culture time (A)//d	培养基 Culture medium (B)	装瓶量 Bottling capacity (C)//mL	菌片数 Inoculation amount (D)//片
1	4	a	100	3
2	6	b	150	6
3	8	c	200	9

1.2.4 抑菌活性检测。采用生物检测方法,从雪白弯颈霉发酵液对黑曲霉有无抑制作用和抑制程度来确定其中环孢菌素的有无^[14]。按照正交试验设计,分别于 4、6、8 d 取出三

基金项目 大连民族大学人才引进科研项目启动基金项目(0701-110048);中央高校自主科研基金项目(DC201502070402);大学生创新创业训练项目(XA201612317, XA201612315)。

作者简介 周方元(1992-),女,河北沧州人,本科生,专业:生物技术。
* 通讯作者,讲师,博士,从事真菌多样性研究。

收稿日期 2016-05-30

角瓶中的发酵培养物,将其于 12 000 r/min 离心 15 min 后,去除沉淀,留下上清液备用。将灭菌的 PDA 培养基加热融化,待培养基冷却至 40 ~ 50 ℃,将上清液与 PDA 培养基按 1:10 比例混合均匀,再倒入平板中,每个处理 3 次重复。对照组采用等量的无菌水替换发酵液与 PDA 混合,静置,冷却。将培养 2 d,未产孢的黑曲霉用 6 mm 的打孔器打出菌块,将菌块接种到发酵液与 PDA 混合的平板上,25 ℃ 培养 24 h 后,观察并记录黑曲霉菌落平均直径。

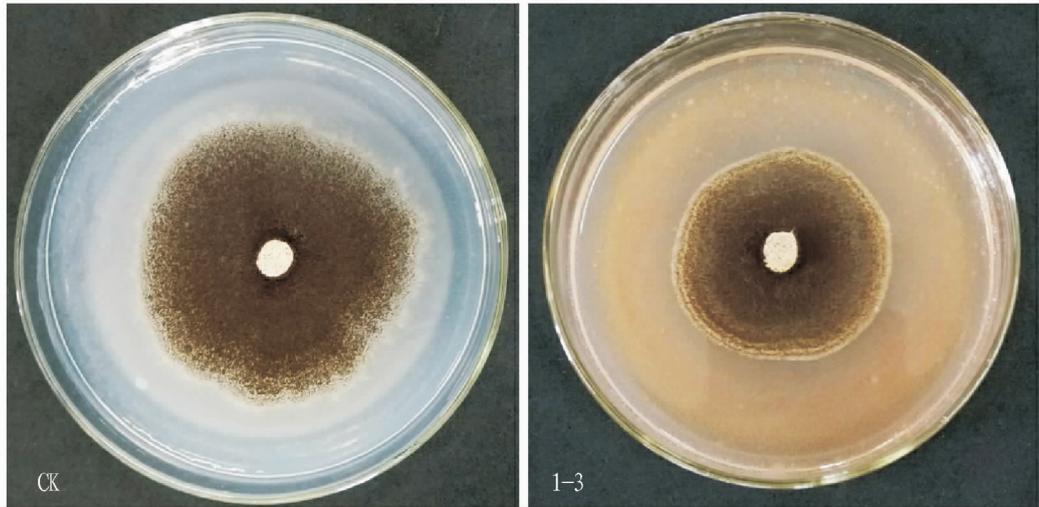


图 1 对照组与试验组黑曲霉菌落生长情况

Fig. 1 Growth situation of *Aspergillus niger* colonies in the CK and experimental group

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment

试验号 Test number	因素 Factor				黑曲霉菌落平均直径 Average diameter of <i>A. niger</i> colonies//cm
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.350
2	1	2	2	2	1.330
3	1	3	3	3	1.400
4	2	1	2	3	1.250
5	2	2	3	1	1.200
6	2	3	1	2	1.300
7	3	1	3	2	1.267
8	3	2	1	3	1.250
9	3	3	2	1	1.233
K_1	4.08	3.876	3.900	3.783	
K_2	3.75	3.780	3.813	3.897	
K_3	3.75	3.933	3.867	3.900	
R	0.11	0.051	0.029	0.039	

发酵条件为 $A_1B_3C_1D_3$,即发酵天数为 4 d,培养基为 c,装瓶量为 100 mL,菌片投放量为 9 片。

3 结论与讨论

环孢菌素是一种有效的免疫抑制剂,随着环孢菌素在国内外临床移植手术中的广泛应用,雪白弯颈霉作为环孢菌素高产菌株的一员,其发酵条件的研究也成为热点。该研究采用正交试验法得出,发酵时间是影响雪白弯颈霉产环孢菌素的最重要因素,在发酵时间为 4 d 时环孢菌素的产量最大,与梁建描述发酵时间不一致。梁建采用种子液发酵,培养基中加入 0.1% 的磷酸二氢钾,由于发酵菌种添加形式和培养基的不同,导致雪白弯颈霉产环孢菌素最佳发酵条件不同。

2 结果与分析

由图 1 可知,试验组的黑曲霉菌落直径不相同,但是全部小于对照组的黑曲霉菌落直径,说明雪白弯颈霉发酵液全部产生了环孢菌素,并且不同因素下产生环孢菌素的量也不相同。由表 2 可知,极差大小为 $R_A > R_B > R_D > R_C$,因此,以抑菌效果为考察指标,4 个因素对弯颈霉产环孢菌素发酵的影响程度大小依次为培养时间(A)、培养基种类(B)、菌片量(D)、装瓶量(C)。同时,可以得到正交试验范围内的最佳发

参考文献

- [1] GAMS W. *Tolypocladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden[J]. Persoonia, 1971, 6: 185 - 191.
- [2] GAZIS R, SKALTSAS D, CHAVERRI P. Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of *Cordyceps*-like fungi[J]. Mycologia, 2014, 106(6): 1090 - 1105.
- [3] SUNG G H, HYWEL-JONES N L, SUNG J M, et al. A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach[J]. Elsevier, 2007, 44: 1204 - 1223.
- [4] HODGE K T, KRASNNOFF S B, HUMBER R A. *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis* [J]. Mycologia, 1996, 88(5): 715 - 719.
- [5] QUANDT C A, KEPLER R M, GAMS W, et al. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in *Tolypocladium* [J]. IMA Fungus, 2014, 5(1): 121 - 134.
- [6] 张之萌. 新型免疫抑制剂: 环孢菌素 A [J]. 抗生素, 1986, 11(5): 448 - 460.
- [7] 王维, 蔡银燕, 陈耀. 环孢菌素 a 的作用机制及临床应用[J]. 海峡药学, 2007(10): 103 - 105.
- [8] 廖福荣. 环孢菌素 A 高产的 *Tolypocladium inflatum* 融合株的选育[J]. 国外医药(抗生素分册), 1998, 19(1): 25 - 26.
- [9] 范秀芝, 陈丽冰, 史德芳, 等. 黑木耳液体发酵菌株筛选及发酵特性分析[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(20): 5117 - 5120.
- [10] 罗宇焯, 张甲耀, 龚利萍, 等. 正交实验选择嗜碱细菌降解木质素的最优综合培养条件[J]. 环境科学, 2001, 22(5): 95 - 98.
- [11] 王晖, 张丽艳, 杨卫平, 等. 正交实验法优化疏毛吴茱萸提取工艺[J]. 药物研究, 2010, 25(8): 52 - 53.
- [12] 朱良, 张青, 王一飞, 等. 正交实验法优选紫萁蜈蚣藻粗多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 151 - 154.
- [13] 梁建. 雪白弯颈霉液体发酵最佳培养条件的研究[J]. 大连民族学院学报, 2005, 7(9): 7.
- [14] 金铤. 环孢菌素的提取与菌株选育[J]. 铁道师院学报, 1991(S1): 44 - 50.