

达托霉素发酵工艺条件响应面优化研究

刘欣¹ 周宋汇^{1*} 孙科²

(1 江苏省肿瘤医院 江苏省肿瘤防治研究所 南京医科大学附属肿瘤医院, 南京 210009;

2 徐州生物职业技术学院 生物工程系 徐州 221006)

摘要 为优化达托霉素发酵条件,通过单因素实验和响应面方法研究了达托霉素发酵条件温度、pH 值、接种量、通风量和搅拌转速.结果表明:优化后的发酵工艺条件为温度 27.74 °C、pH 值 8.36、接种量 8.48%、通风量 6.13 L/min、搅拌转速 242 r/min,在此条件下达托霉素的产量可达 880.48 mg/L,比最新报道的达托霉素发酵效价提高了 132%. 本方法大幅度提高了达托霉素产量,对达托霉素工业化生产提供了可靠的研究基础.

关键词 达托霉素; 发酵工艺条件优化; 单因素实验法; 响应面法; 方差分析

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2019)01-0076-05

DOI 10.12130/znmdzk.20190114

引用格式 刘欣,周宋汇,孙科.达托霉素发酵工艺条件响应面优化研究[J].中南民族大学学报(自然科学版),2019,38(1):76-80

LIU Xin,ZHOU Songhui,SUN Ke.Study on response surface methodology for doxymycin fermentation [J]. Journal of South-Central University for Nationalities(Natural Science Edition),2019,38(1):76-80.

Study on response surface methodology for doxymycin fermentation

LIU Xin¹ ZHOU Songhui¹ SUN Ke²

(1 Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research, the Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China; 2 Department of Bioengineering, Xuzhou Engineering Vocational and Technical College, Xuzhou 221006, China)

Abstract In order to optimize the fermentation conditions of doxymycin, the fermentation conditions of doxymycin, temperature, pH, inoculation, ventilation and stirring speed, were studied by single factor test and response surface method. The results showed that the optimized fermentation process conditions were 27.74 °C, pH 8.36, inoculation 8.48%, ventilation 6.13 L/min, and stirring speed 242 r/min. Under this condition, the yield of doxymycin can reach 880.48 mg/L, which was 132% higher than the newly reported fermentative effective potency of doxymycin. This study has greatly increased the production efficiency of doxymycin and provided a reliable research basis for the industrial production of doxymycin.

Keywords doxymycin; optimization of fermentation conditions; single factor experiment; response surface methodology; variance analysis

达托霉素(doxymycin)是一种环状脂肽类抗生素,可以由玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)发酵得到.达托霉素对绝大多数 G⁺ 菌具有杀灭的功能,更主要的是它可以作用于耐药菌如耐甲氧西林金葡菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)、耐万古霉素金葡菌(VRSA)等^[1,2],近年来成为医药界的研

究热点.

达托霉素结构复杂,化学合成难度较大,通常采用生物发酵方法进行生产.但是发酵法产量较低,一直限制其在我国的规模使用.目前国内提高达托霉素发酵效价的研究多集中在对优良菌种的选育上,如采用联合抗性筛选法、紫外诱变方法、氨氛激

收稿日期 2018-12-27 * 通信作者 周宋汇,研究方向: 抗生素研究, E-mail: 1348114082@qq.com

作者简介 刘欣(1988-),女,主管药师,研究方向: 抗生素研究, E-mail: 13912009992@139.com

基金项目 江苏省高校“青蓝工程”基金资助项目(JS1111)

光辐照-亚甲基胍复合诱变法来筛选优良菌种^[3-5]。最新的文献显示,周剑等^[6]通过流加补料发酵方式最终使达托霉素产量达到 380 mg/L。本研究以本实验室筛选的诱变玫瑰孢链霉菌 FN2015 为发酵菌种,优化各项发酵条件,为大规模发酵生产达托霉素提供可供借鉴的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玫瑰孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*) FN2015, 实验室保藏菌种。

玉米浆试剂级; 酵母浸膏、琼脂粉、葡萄糖、氯化钠、七水硫酸镁、三水磷酸氢二钾、七水硫酸亚铁、糊精等为国产分析纯试剂; 消泡剂食品级。

1.2 培养基

斜面培养基: 葡萄糖 2.0%, 酵母浸膏 1.0%, 氯化钠 0.05%, 七水硫酸镁 0.1%, 三水磷酸氢二钾 0.05%, 七水硫酸亚铁 0.001%, 琼脂粉 1.8%。

种子培养基: 糊精 2.5%, 玉米浆 0.5%, 七水硫酸镁 0.1%, 三水磷酸氢二钾 0.04%。

发酵培养基: 玉米淀粉水解糖 3.5%, 玉米浆 0.5%, 氯化钾 0.05%, 消泡剂 0.01%。

1.3 仪器与设备

SHP-400 智能生化培养箱(苏州威尔); 无菌超净工作台(JB-CJ-1500FX, 苏州佳宝); 多振幅轨道

恒温摇床(ZWY-103B, 上海圣科); 机械搅拌式发酵罐(20 L, 镇江东方); 台式高速冷冻离心机(H1650R, 上海齐闵); 高效液相色谱仪(1260型, 美国安捷伦)。

1.4 方法

1.4.1 玫瑰孢链霉菌 FN2015 的培养

取出保藏在超低温冰箱中的 FN2015 的孢子, 接种到斜面培养基上, 30 °C、35%~55% 的湿度下培养 10~12 d, 制备孢子悬液浓度为 10⁷ 个/mL。取 1 mL 孢子悬液接种到装 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 于恒温摇床中培养, 培养条件为: 28 °C、200 r/min。培养 42 h 后按 9% 的接种量接种到 5 L 小型发酵罐, 发酵条件为: 温度 (28±1) °C、搅拌转速 240~300 r/min、空气流量 6~7 L/min、罐压 0.05 MPa。

1.4.2 发酵条件确定方法

选取对达托霉素发酵影响显著的 5 个因素温度、初始 pH 值、接种量、通风量和搅拌转速进行单因素实验。以某个发酵条件为变量, 其他条件固定不变, 通过实验确定此发酵条件。

1.4.3 发酵条件优化方法

以单因素实验的 5 个因素作为影响因子进行响应面实验, 通过 Box-Behnken 试验水平设计^[7], 具体的实验设计如表 1, 其中温度为影响因子 A、初始 pH 值为影响因子 B、接种量为影响因子 C、通风量为影响因子 D、搅拌转速为影响因子 E。

表 1 Box-Behnken 实验因子水平设计

Tab.1 Level design of Box-Behnken test factor

| 因素水平 | 温度/°C | 初始 pH | 接种量/% | 通风量/(L/min) | 搅拌转速/(r/min) |
|------|-------|-------|-------|-------------|--------------|
| -1 | 26 | 7.5 | 8 | 1.0 | 200 |
| 0 | 28 | 8.0 | 10 | 1.2 | 250 |
| 1 | 30 | 8.5 | 12 | 1.4 | 300 |

1.4.4 达托霉素效价测定方法

达托霉素的效价测定见文献[8]。

2 结果与分析

2.1 单因素实验及结果

2.1.1 发酵温度对达托霉素发酵结果的影响

其他条件不变, 选取不同发酵温度 24、26、28、30 和 32 °C, 测定达托霉素的产量, 从图 1 可以看出当发酵温度为 28 °C 时, 达托霉素的产量最高为 880.18 mg/L, 因此达托霉素发酵的最适温度为 28 °C。

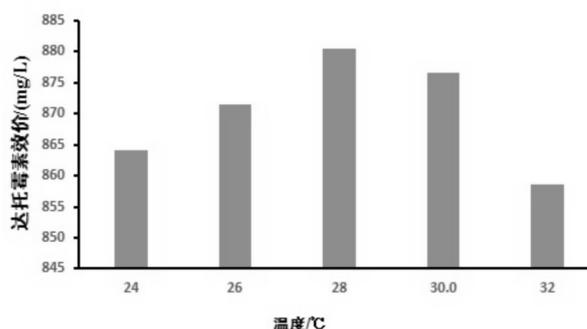


图 1 发酵温度对达托霉素发酵的影响

Fig.1 Effect of fermentation temperature on doxymycin fermentation

2.1.2 初始 pH 值对达托霉素发酵结果的影响

在不同的发酵初始 pH 值条件下,当发酵初始 pH 值为 8.0 时(图 2),达托霉素的产量最高为 879.83 mg/L,所以选定达托霉素发酵初始 pH 值为 8.0.

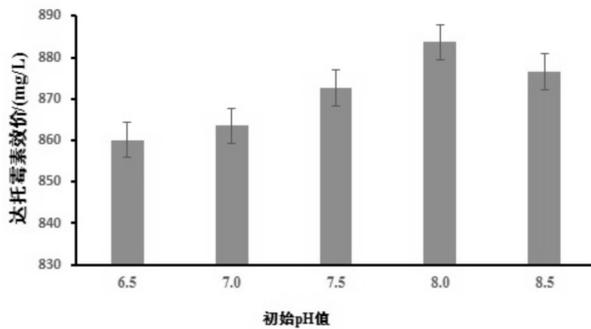


图 2 初始 pH 值对达托霉素发酵的影响

Fig.2 Effect of initial pH value on the fermentation of doxymycin

2.1.3 接种量对达托霉素发酵结果的影响

选择不同的接种量 4%、6%、8%、10% 和 12% 进行发酵,然后测定达托霉素的产量,从图 3 可以看出当接种量为 10% 时,达托霉素的产量最高为 881.52 mg/L,所以达托霉素发酵的最适接种量为 10%.

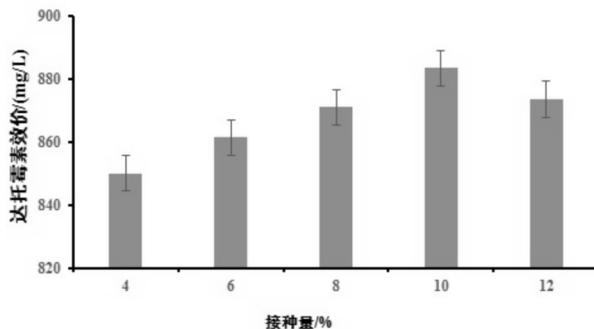


图 3 接种量对达托霉素发酵影响

Fig.3 Effect of inoculation volume on the fermentation of doxymycin

2.1.4 通风量对达托霉素发酵结果的影响

选取不同的通风量 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 L/min,测定达托霉素的产量,当通风量为 6.0 L/min 时(图 4),达托霉素的产量最高为 883.57 mg/L,因此达托霉素发酵最适的通风量设为为 1.2 L/min.

2.1.5 搅拌转速对达托霉素发酵结果的影响

其他条件不变,分别选取不同的搅拌转速 150、200、250、300 和 350 r/min,测定达托霉素的产量,从图 5 可以看出当搅拌转速为 250 r/min 时,达托霉素的产量最高,为 882.69 mg/L,因此选择 250 r/min 作为发酵搅拌速度.

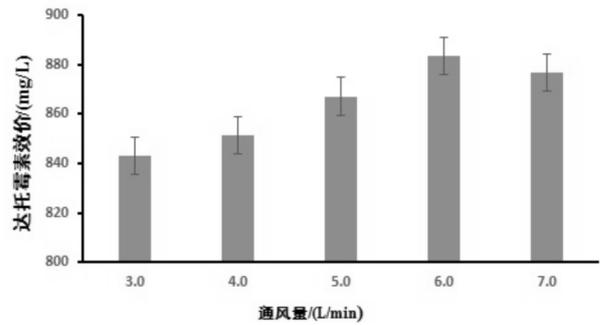


图 4 通风量对达托霉素发酵影响

Fig.4 Effect of ventilation on doxymycin fermentation

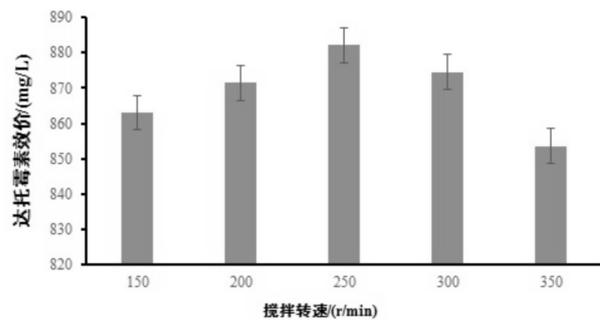


图 5 搅拌转速对达托霉素发酵影响

Fig.5 Effect of stirring speed on the fermentation of doxymycin

2.2 发酵条件的响应面优化

2.2.1 回归模型建立

以达托霉素产量为因变量 Y , 温度 A 、初始 pH 值 B 、接种量 C 、通风量 D 和搅拌转速 E 为自变量,利用 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行回归分析,建立多元回归模型^[9-11]:

$$Y = 100.00 + 5.94A + 16.58B + 15.64C + 8.37D + 10.31E + 10.75AB + 4.69AC - 3.38AD - 5.47AE - 8.05BC + 14.38BD - 3.06BE + 0.93CD + 7.27CE - 12.52DE - 17.49A^2 - 13.51B^2 - 18.94C^2 - 27.28D^2 - 15.27E^2.$$

以单因素结果为依据设计 Box-Behnken 试验的因素水平,响应面的实验结果见表 2.

表 2 Box-Behnken 试验结果

Tab.2 Results of the Box-Behnken test

| 序号 | A | B | C | D | E | 达托霉素产量 / (mg/L) |
|----|----|----|----|----|---|-----------------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0 | 861.79 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0 | 863.63 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 865.59 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 882.58 |
| 5 | 0 | 0 | -1 | -1 | 0 | 878.54 |
| 6 | 0 | 0 | 1 | -1 | 0 | 881.48 |
| 7 | 0 | 0 | -1 | 1 | 0 | 885.38 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 876.69 |

| | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|--------|
| 9 | 0 | -1 | 0 | 0 | -1 | 864.72 |
| 10 | 0 | 1 | 0 | 0 | -1 | 874.82 |
| 11 | 0 | -1 | 0 | 0 | 1 | 873.57 |
| 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 871.73 |
| 13 | -1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 858.95 |
| 14 | 1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 878.15 |
| 15 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 853.69 |
| 16 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 885.28 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | -1 | -1 | 877.63 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 1 | -1 | 879.40 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | -1 | 1 | 875.29 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 877.47 |
| 21 | 0 | -1 | -1 | 0 | 0 | 872.71 |
| 22 | 0 | 1 | -1 | 0 | 0 | 875.74 |
| 23 | 0 | -1 | 1 | 0 | 0 | 868.37 |
| 24 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 882.50 |
| 25 | -1 | 0 | 0 | -1 | 0 | 861.54 |
| 26 | 1 | 0 | 0 | -1 | 0 | 864.92 |
| 27 | -1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 858.29 |
| 28 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 879.48 |
| 29 | 0 | 0 | -1 | 0 | -1 | 872.62 |
| 30 | 0 | 0 | 1 | 0 | -1 | 873.93 |
| 31 | 0 | 0 | -1 | 0 | 1 | 879.37 |
| 32 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 872.70 |
| 33 | -1 | 0 | 0 | 0 | -1 | 862.39 |
| 34 | 1 | 0 | 0 | 0 | -1 | 869.48 |
| 35 | -1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 859.62 |
| 36 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 869.49 |
| 37 | 0 | -1 | 0 | -1 | 0 | 870.56 |
| 38 | 0 | 1 | 0 | -1 | 0 | 874.83 |
| 39 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | 869.04 |
| 40 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 875.68 |
| 41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 872.83 |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 872.83 |
| 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 872.83 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 872.83 |
| 45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 872.83 |
| 46 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 872.83 |

| | | | | | |
|----------------|-----------|----|-----------|-----------|---------|
| DE | 268.4876 | 1 | 268.4876 | 4.586325 | 0.0047 |
| A ² | 3638.7438 | 1 | 3638.7438 | 27.876490 | <0.0001 |
| B ² | 3217.7643 | 1 | 3217.7643 | 24.587253 | <0.0001 |
| C ² | 4831.7382 | 1 | 4831.7382 | 37.849085 | <0.0001 |
| D ² | 2158.4684 | 1 | 2158.4684 | 14.472584 | 0.0003 |
| E ² | 947.3572 | 1 | 947.3572 | 7.463892 | 0.0015 |
| 残差 | 2642.7647 | 25 | 105.7106 | | |
| 失拟 | 2642.7647 | 20 | 132.1382 | | |
| 标准误差 | 0 | 5 | 0 | | |
| $R^2 = 0.9643$ | | | | | |

从表 3 可以看出: 模型的 F 值为 13.33 $P_r > F$ 小于 0.0001, 表明自变量(A、B、C、D、E) 和因变量 Y 之间线性关系极显著, 所建立的回归方程可以对真实曲面模拟; 相关系数 $R^2 = 0.9643$ 表明模型拟合程度高, 置信度高^[7], 可以利用建立的模型分析达托霉素产量的变化.

利用 Design Expert 8.0.6 软件对回归方程进行一阶偏导求解^[12,13], 曲面最大点对应 $A = 0.42$ 、 $B = 1.35$ 、 $C = 0.32$ 、 $D = 0.45$ 、 $E = 0.21$, 所对应的达托霉素发酵的条件分别为: 温度 27.74 °C、pH 值 8.36、接种量 8.48%、通风量 6.13 L/min、搅拌转速 242 r/min.

2.2.3 达托霉素发酵条件实验验证

为了验证响应面结果的可靠性, 采用响应面实验条件(温度 27.74 °C、pH 值 8.36、接种量 8.48%、通风量 6.13 L/min、搅拌转速 242 r/min) 进行小型发酵罐发酵实验 4 个平行, 结果显示, 达托霉素的产量达到 880.48 mg/L.

3 结语

达托霉素是一种新型抗生素, 主要通过发酵法进行生产, 但发酵产量一直不高限制了达托霉素的大规模使用. 本研究在单因素实验的基础上, 采用响应面法对达托霉素发酵工艺条件进行优化, 优化后发酵工艺条件为温度 27.74 °C、pH 值 8.36、接种量 8.48%、通风量 6.13 L/min、搅拌转速 242 r/min, 在此条件下达托霉素的效价可达 880.48 mg/L, 比最新文献^[14-17] 报导的结果高出 50%~132%, 发酵效价大幅度提高, 此次研究对工业化发酵生产达托霉素具有重要的参考价值. 要进一步提高发酵的效价, 在发酵过程中最好筛选出合适的前体, 采用流加方式发酵, 这将是本研究下一步的工作.

参 考 文 献

[1] 何美儒, 金志华, 胡升 等. 补加葡萄糖对玫瑰孢链霉菌

2.2.2 达托霉素产量的方差分析

对回归方程进行方差分析, 分析结果见表 3.

表 3 达托霉素产量回归模型方差分析

Tab.3 Variance analysis of the yield regression model of doxymycin

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | $P_r > F$ |
|------|-----------|-----|-----------|-----------|-----------|
| 模型 | 18436.82 | 20 | 921.841 | 13.32626 | <0.0001 |
| A | 3482.385 | 1 | 3482.385 | 28.49827 | <0.0001 |
| B | 2548.7472 | 1 | 2548.7472 | 26.36289 | <0.0001 |
| C | 1327.6481 | 1 | 1327.6481 | 17.46835 | 0.0126 |
| D | 1208.3868 | 1 | 1208.3868 | 13.65836 | 0.00002 |
| E | 896.4382 | 1 | 896.4382 | 8.3682574 | 0.0013 |
| AB | 368.5836 | 1 | 368.5836 | 6.675421 | 0.0021 |
| AC | 73.8753 | 1 | 73.8753 | 0.586433 | 0.0467 |
| AD | 56.8393 | 1 | 56.8393 | 0.649821 | 0.0864 |
| AE | 264.9845 | 1 | 264.9845 | 4.783290 | 0.0058 |
| BC | 149.6386 | 1 | 149.6386 | 2.907832 | 0.0026 |
| BD | 87.5938 | 1 | 87.5938 | 0.908062 | 0.0012 |
| BE | 272.7432 | 1 | 272.7432 | 4.046836 | 0.0038 |
| CD | 63.0843 | 1 | 63.0843 | 0.706327 | 0.0095 |
| CE | 83.7593 | 1 | 83.7593 | 0.897964 | 0.0012 |

- 发酵产达托霉素的影响[J].中国医药工业杂志,2012,43(8):662-665.
- [2] 周剑,黄建峰,张引,等.低能离子注入诱变达托霉素高产菌株及其发酵的研究[J].中国抗生素杂志,2012,37(8):587-592.
- [3] PARTHIBAN K,VIGNESH V,THIRUMURUGAN R. Characterization and in vitro studies on anticancer activity of exopolymer of *Bacillus thuringiensis* S13 [J]. African Journal of Biotechnology,2014,13(21):37-44.
- [4] 于红,杨文菊,刘波,等.RRLC定性检测食用油中10种抗氧化剂的条件研究与应用[J].新疆医科大学学报,2011,34(2):172-174.
- [5] 余继参,洪葵,林海鹏,等.玫瑰孢链霉菌 NRRL11379 产达托霉素前体物 A21978C 的发酵培养基优化[J].安徽农业科学,2008,36(19):7974-7976.
- [6] 周剑,张引.达托霉素产生菌前体物耐受选育及其流加补料发酵[J].中国抗生素杂志,2018,7(43):817-823.
- [8] 郭朝江,张兰,王成,等.缓释癸酸前体对玫瑰孢链霉菌发酵产达托霉素的影响[J].中国医药工业杂志,2013,44(3):238-241.
- [7] ZHANG X,ZHANG X F,Li H P,et al. Atmospheric room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2014,98(12):5387-5396.
- [9] LU C Y,ZHANG X J,JIANG M,et al. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus* [J]. Metab Eng,2016,38(35):129-137.
- [10] 谷宇锋,王淑歌,郝海红,等.亚抑菌浓度抗生素对细菌耐药性和毒力影响的研究进展[J].中国抗生素杂志,2018,43(11):1321-1331.
- [11] REN J,CUI Y Q,ZHANG F,et al. Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. Microbiol Res,2014,169(7-8):602-608.
- [12] YIN C,ZHANG T,QU X,et al. In vivo excision of HIV1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models [J]. Mol Ther,2017,25(5):1168-1186.
- [13] 王世博,李平兰,张金兰,等.二肽基肽酶-IV抑制活性酵母筛选与鉴别[J].中国酿造,2018,37(9):48-51.
- [14] JIAO Z,WANG X,YIN Y,et al. Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid [J]. J Microencapsul,2018,6(9):1-9.
- [15] SUN H,YAN P,LU P,et al. Effects of exogenous addition of vitamin C on ϵ -poly-L-lysine fermentation by *Streptomyces* [J]. Food and Fermentation Industries,2018,44(9):29-35.
- [16] 薛海萍,高婷婷,杨骏,等.红景天苷磷脂复合物的体外透皮试验[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(9):9-11.
- [17] DAS M K,KALITA B,et al. Design and evaluation of phytophospholipid complexes (phytosomes) of rutin for transdermal application [J]. J Appl Pharm Sci,2014,4(10):51-57.

(责任编辑 姚春娜)