

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.04.07

氮源、碳源影响红色糖多胞菌发酵的研究

张 萍, 师文飞, 黄文福, 牛 春*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司, 银川 750100)

[收稿日期] 2017-10-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 04-0037-09 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 为进一步提高红色糖多胞菌发酵水平, 采用 Plackett-Burman 法、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 设计, 针对不同氮源、碳源进行摇瓶发酵研究, 并利用 Minitab 15 软件进行二次回归分析。结果表明, 淀粉、糊精、玉米浆和黄豆饼粉对红霉素发酵效价影响较大, 通过响应面法得到优化发酵培养基最佳组成为: 淀粉 52.3 g/L、糊精 14.0 g/L、黄豆饼粉 45.3 g/L、玉米浆 14.6 g/L。在最优培养基下, 红霉素的产量达到 7764 U/mL, 比优化前提高了 12%。

[关键词] 红色糖多胞菌; 发酵培养基; 响应面法

Effects of Carbon Sources and Nitrogen Sources on Fermentation Titer of the *Saccharopolyspora erythraea*

ZHANG Ping, SHI Wen-fei, HUANG Wen-fu, NIU Chun*

(NingXia TaiRui Pharmaceutical Company Co Ltd, Yinchuan 750100, China)

Corresponding author: NIU Chun, E-mail: niuchun1974@163.com

Abstract: In order to improve the productive ferment level of the *Streptomyces erythraea*, Plackett-Burman, design, Steepest ascent design and Box-Behnken design were conducted to study the effects of different carbon sources and nitrogen sources on ferment titer based on shaking flask for fermentation. Minitab-15 software was used for a quadratic regression analysis. The results showed that starch, dextrin, corn steep liquor and soybean meal have great influences on the fermentation titer of erythromycin. optimum levels of starch, dextrin, soybean

作者简介: 张 萍, 兽医师, 从事微生物发酵研究。

通讯作者: 牛 春. E-mail: niuchun1974@163.com

Hu B Z, Cai H J, Song W H, et al. Determination of eight pesticide residues in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its uncertainty evaluation[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30 (9): 889-895.

[7] 朱凤连, 马友华, 周 静, 等. 我国畜禽粪便污染和利用现状 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(13): 48-50.

Zhu F L, Ma Y H, Zhou J, et al. Analysis on present situation of pollution of animal excrement in china [J]. Anhui Agri.Sci.

Bull, 2008, 14(13): 48-50.

[8] 孙恩玲. 药物分析中紫外光谱的定性定量方法及应用[J]. 光谱仪器与分析, 1991, 1: 5-8.

Sun E L. Analysis of qualitative and quantitative methods and applications of UV spectrum [J]. Spectronic Instrumentation and Analysis, 1991, 1: 5-8.

(编辑: 侯向辉)

meal and corn steep liquor predicted by response surface methodology (RSM) were 52.3, 14.0, 45.3 and 14.6 g/L respectively. The production of erythromycin was 7764 U/mL with this optimized medium. About 12% increase in erythromycin production was observed at optimum levels of four variables envisaged by RSM.

Key words: *Saccharopolyspora erythraea*; fermentation medium; response surface methodology

红霉素(Erythromycin, Er)是由红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)合成的 14 元大环内酯类抗生素,又被称为 robimycin 或 e-mycin,包括 ErA~ErF^[1],其中 ErA 的抑菌活性最高。红霉素具有广谱抗菌作用,其抗菌谱与青霉素相似^[2],对革兰阳性菌尤其敏感,对葡萄球菌、化脓性链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、梭状芽孢杆菌、白喉杆菌等有较强的抑制作用,是治疗耐药性金黄色葡萄球菌和溶血性链球菌感染而引起疾病的首选药物,临床上可用于治疗对青霉素过敏的患者。近几年红霉素衍生物的兴起,大大刺激了母体红霉素的需求^[3-4]。

我国红霉素发酵水平属低水平重复操作,与发达国家相比差距较大。目前国外发酵单位已达 8000~12000 U/mL,而国内大多企业红霉素发酵水平却一直在 4000~5000 U/mL^[5]。红霉素发酵水平主要受工作菌种、培养基组成、发酵条件控制以及后期的分离提纯条件等多方面因素的影响,国内很多科技工作者从红霉素发酵相关参数和调控入手,希望提高红霉素发酵水平。对前期选育的一株高产红霉素红色糖多孢菌菌株培养基进行了响应面法优化,以使其更好的发挥菌株的生长特性,进一步提高发酵液中红霉素产量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 红色糖多孢菌,由宁夏泰瑞制药股份有限公司技术研发中心菌种研究室选育、保藏的高产菌株 EM15-15。

1.1.2 培养基及培养条件^[6] 种子培养基:含淀粉、糊精、蛋白胨、葡萄糖、黄豆饼粉、NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 CaCO_3 和油, pH7.00。250 mL 摇瓶装种子培养基 30 mL, 28 ℃,

200 r/min 培养 48~52 h。发酵培养基:含正丙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 、淀粉、糊精、黄豆饼粉、棉籽饼粉、玉米浆、葡萄糖和油, pH7.00。250 mL 摇瓶装发酵培养基 30 mL, 接种量 10%, 28 ℃, 220 r/min 培养 7 d。

1.1.3 主要试剂及原料 玉米浆购自华北制药康欣股份有限公司; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、糊精、蛋白胨和葡萄糖等,均为分析纯;红霉素对照品,中国兽医药品监察所,批号:130307,含量:883 U/mg。

1.2 方法

1.2.1 发酵液化学效价检测方法 硫酸水解法^[7],发酵液经离心后,根据确定好的倍数吸取一定量的滤液,用 0.35% 碳酸钾液稀释。然后,取稀释液 20 mL 于分液漏斗中,加入醋酸丁酯 20 mL,振摇 30 min,放置分层,弃去下层水液,于丁酯液中加入无水硫酸钠 1g 左右(可酌量多加使丁酯液澄清),振荡至透明。准确吸取其上层脱水液 10 mL 于另一干燥的分液漏斗中,精确加入盐酸(0.1 mol/L) 10 mL,振荡 30 min,放置分层,把下层盐酸水液放入试管中,从中吸取 5 mL 放入另一试管中,加入硫酸(8 mol/L) 5 mL,摇匀,放入 50 ℃水浴中,保温 30 min 取出冷却,于 483 nm 测定吸光度值,以红霉素标准品绘制标准曲线,计算发酵液红霉素的化学效价。

1.2.2 Plackett - Burman 实验设计 选取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 CaCO_3 、淀粉、糊精、黄豆饼粉、棉籽饼粉、玉米浆、葡萄糖和正丙醇 11 个因素,应用 Minitab 15 进行 Plackett-Burman 设计,从而筛选出影响红霉素效价的主要因素。

1.2.3 最陡爬坡实验(steepest ascent design) 根据 Plackett-Burman 实验结果中各显著影响因素效

合度失拟(Lack of Fit)以 $P>0.05$ 判定为失拟不显著,说明回归模型与数据拟合较好。最后在一定的水平范围内求取各因素的最佳值。

2 结果与分析

2.1 红霉素发酵效价主要氮源、碳源影响因子的确定 在前期单因素试验的基础上选用 N=20 的 Plackett-Burman 实验设计,对淀粉(A)、糊精(B)、玉米浆(C)、棉籽饼粉(D)、黄豆饼粉(E)、葡萄糖(F)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (G)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (H)、 CaCO_3 (J)、油(K)和正丙醇(L)11 个因素进行了考察,每个因素取高(+)、低(-)两水平,高水平约为低水平的 1.25 倍,响应值为红霉素的效价(Y),试验设计及结果见表 1,因素水平取值、效应及显著性分析见表 2。

Tab 1 N = 20 Plackett–Burman experimental design and results

[illegible]

表 2 Plackett-Burman 试验因素水平及其主效应分析

Tab 2 Plackett-Burman test factor level and its main effect analysis

试验因素		水平/(g · L ⁻¹)		<i>t</i> 检验	<i>P</i>	显著性
		-1	1			
A	淀粉	50.0	62.5	-3.02	0.017	显著
B	糊精	13.0	16.25	-4.17	0.003	极显著
C	玉米浆	14.0	17.5	-2.32	0.049	显著
D	棉籽饼粉	20.0	25.0	1.48	0.177	不显著
E	黄豆饼粉	44.0	55.0	-3.44	0.009	极显著
F	葡萄糖	20.0	25.0	0.41	0.689	不显著
G	(NH ₄) ₂ SO ₄	8.0	10.0	-0.87	0.410	不显著
H	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	1.25	-1.33	0.220	不显著
J	CaCO ₃	5.4	6.75	1.90	0.094	不显著
K	油	20.0	25.0	-0.91	0.387	不显著
L	正丙醇	10.0	12.5	1.42	0.193	不显著

由表 2 可知淀粉、糊精、黄豆饼粉、玉米浆发酵液中红霉素的效价有显著性影响,其中糊精和黄豆饼粉影响极显著。选出具有显著性影响的 4 个因素做最陡爬坡试验,这 4 个因素都有显著负效应,因此在以后的实验中应减少加量。

2.2 最陡爬坡实验 接近最大响应面区域,响应面拟合方程只在考察的紧相邻域里才充分近似真

实情形,要先逼近最佳值区域后才能建立有效的响应面拟合方程。根据 Plackett-Burman 实验结果,确定不显著因素的水平,表现为正效应的因素取高水平,表现为负效应的因素取低水平。显著因素的变化步长及方向的实验设计及结果表明(表 3),第 3 组效价最高,因此以第 3 组的水平作为响应面实验的中心点。

表 3 最陡爬坡试验设计及结果

Tab 3 The steepest slope test design and results

试验号	淀粉(A)	糊精(B)	黄豆饼粉(E)	玉米浆(C)	效价/(U · mL ⁻¹)
1	56.0	15.0	52.0	16.0	6637
2	54.0	14.5	50.0	15.5	7038
3	52.0	14.0	48.0	15.0	7584
4	50.0	13.5	46.0	14.5	7396
5	48.0	13.0	44.0	14.0	6874
6	46.0	12.5	42.0	13.5	6539
7	44.0	12.0	40.0	13.0	6095
8	42.0	11.5	38.0	12.5	5548

2.3 Box-Behnken 设计及分析结果 根据 Plackett-Burman 实验和最陡爬坡实验得出淀粉 52.0 g/L,糊精14.0 g/L,黄豆饼粉 48.0 g/L,玉米浆 15.0 g/L

作为中心点,以红霉素效价为响应值(Y),利用 Minitab 15 响应面分析中的 Box-Behnken 设计,设计4 因素 3 水平的实验,各因素水平见表 4,

Box-Behnken实验设计及结果见表 5。通过对数据进行二次多元回归拟合,得到二次多项式方程:

$$Y = -306806 + 5167.81A + 6777.17B - 352.250E + 19088.6C - 44.3984A^2 - 310.375B^2 - 16.1719E^2 - 495.250C^2 + 52.6250AB + 21.5000AE - 152.625AC - 23.6250BE + 17.0000BC + 69.9375CE$$

表 4 因素水平编码表

Tab 4 Factor level coding table

水平	因素			
	A 淀粉/(g·L ⁻¹)	B 糊精/(g·L ⁻¹)	E 黄豆饼粉/(g·L ⁻¹)	C 玉米浆/(g·L ⁻¹)
1	56.0	15.0	52.0	16.0
0	52.0	14.0	48.0	15.0
-1	48.0	13.0	44.0	14.0

表 5 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab 5 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A 淀粉/(g·L ⁻¹)	B 糊精/(g·L ⁻¹)	E 黄豆饼粉/(g·L ⁻¹)	C 玉米浆/(g·L ⁻¹)	效价/(U·mL ⁻¹)
1	52	15	44	15	7430
2	56	14	48	16	5676
3	52	14	44	16	6794
4	52	14	48	15	7499
5	52	13	48	16	6794
6	52	13	44	15	7430
7	52	14	52	14	6570
8	52	13	52	15	6794
9	56	13	48	15	6639
10	52	15	48	14	6674
11	48	14	44	15	6983
12	48	14	48	16	6742
13	52	15	48	16	6656
14	52	15	52	15	6416
15	48	13	48	15	6725
16	56	15	48	15	7086
17	48	15	48	15	6330
18	52	14	52	16	6863
19	52	14	48	15	7878
20	52	14	44	14	7620
21	56	14	52	15	6880
22	52	13	48	14	6880
23	56	14	44	15	6519
24	56	14	48	14	7241
25	48	14	52	15	5968
26	52	14	48	15	7482
27	48	14	48	14	5865

通过 Minitab 15 软件对试验数据和模型进行分析,采用置信度为 95% ,结果见表 6。可以看出,该二次回归模型极为显著($P=0.000$),失拟项不显著($P=0.1731$),说明模型与试验拟合良好,可以用于红霉素效价的分析和预测。方程的决定系数

$R-Sq=94.04\%$,说明模型可以解释 94.04% 试验所得发酵效价的变化,进一步说明该模型拟合程度良好。

依据回归方程,利用 Minitab 15 软件绘出响应曲面图和等高线图,结果见图 1 和图 2。

表 6 二次多项式的方差分析

Tab 6 Variance analysis of quadratic polynomials						
方差来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
回归	14	6850120	6850120	489294	13.52	0.000
线性	4	1252911	1252911	313228	8.65	0.002
平方	4	3105865	3105865	776466	21.45	0.000
交互作用	6	2491343	2491343	415224	11.47	0.000
残差误差	12	434335	434335	36195		
失拟	10	334086	334086	33409	0.67	0.731
纯误差	2	100249	100249	50124		
合计	26	7284455				

$R-Sq=94.04\%$

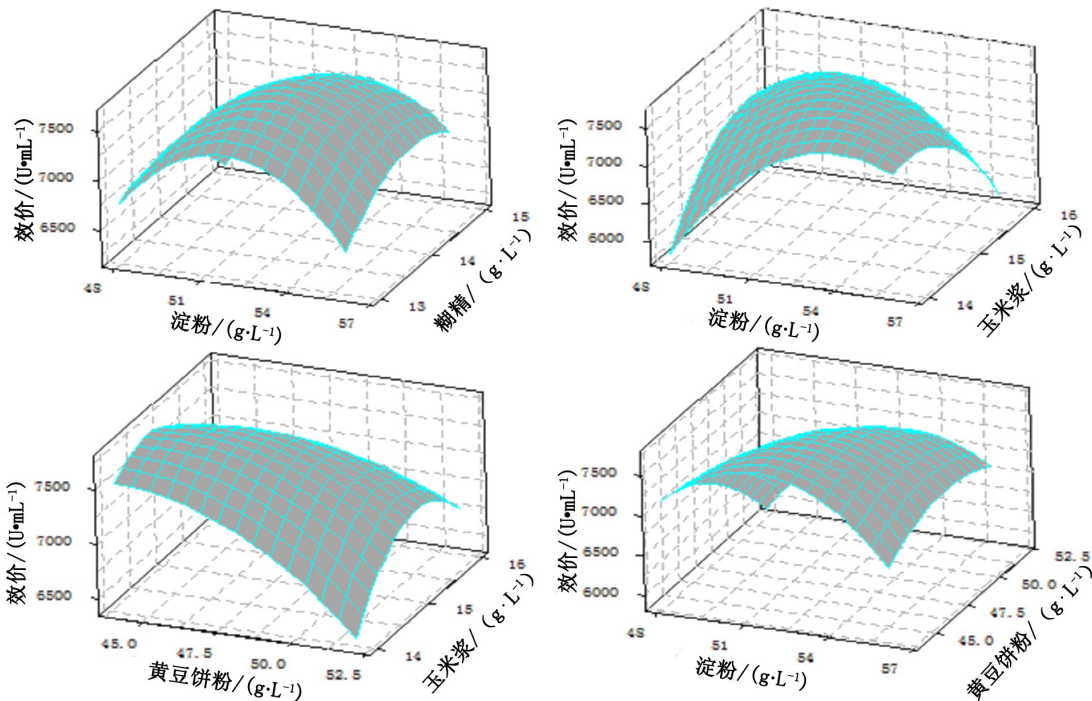


图 1 淀粉、糊精、黄豆饼粉和玉米浆对红霉素效价交互影响的曲面图

Fig 1 Curve of interaction of starch, dextrin, soybean meal and corn steep liquor on erythromycin titers

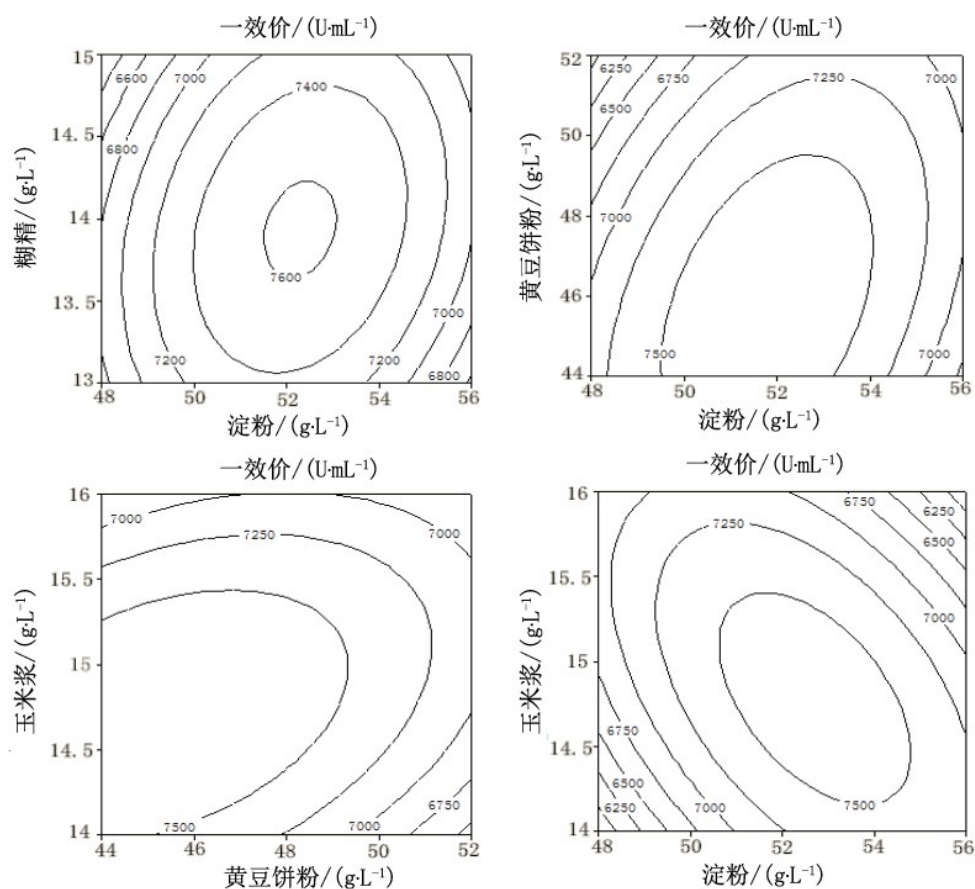


图 2 淀粉、糊精、黄豆饼粉和玉米浆对红霉素效价交互影响的等高线图

Fig 2 Contours of starch, dextrin, soybean meal and corn steep liquor on erythromycin titer interaction

等高线的形状可以反映因素间交互作用的强弱大小,圆形表示交互作用不显著,椭圆形表示交互作用显著^[8]。淀粉-糊精的交互作用、淀粉-黄豆饼粉的交互作用、淀粉-玉米浆的交互作用以及黄豆饼粉-玉米浆的交互作用的等高线均呈椭圆形,表明淀粉-糊精、淀粉-黄豆饼粉、淀粉-玉米浆以及黄豆饼粉-玉米浆的交互作用均对红霉素的效价有显著性影响。利用 Minitab 15 软件中的响应优化器对试验模型进行分析,得到淀粉含量为 52.3 g/L、糊精含量为 14.0 g/L、黄豆饼粉含量为 45.3 g/L 和玉米浆含量为 14.6 g/L 时,红霉素效价(Y)预测最大值为 7734 U/mL。

2.4 响应面优化结果的验证 根据最优化结果配制发酵培养基,分批次(3 次)发酵,红霉素发酵效价分别为 7821、7709 和 7762 U/mL,均值 7764 U/mL,

与预测值 7734 U/mL 十分接近。同时,与原发酵培养基比较,红霉素效价提高了 12%。

3 讨论与结论

在红霉素的发酵生产中常采用的菌种为红色糖多胞菌 *S.erythraea*。1952 年从具有不同抗生素活性的菌种中分离出 *S.erythraea* NRRL2338。起初该菌种的红霉素产量仅为 0.25 ~ 1.0 g/L。但在 2005 年有报道其产量已经达到 10 ~ 13 g/L^[9]。在红霉素产量提升的过程中,菌种选育和发酵工艺优化起着重要作用。目前,传统的紫外诱变、氯化锂诱变、离子注入等方法仍被生产企业用来提高红霉素产量^[10-11]。工业生产菌株多为经过多次诱变后的高产菌株,但“诱变疲劳”效应使传统诱变方法很难在提高产物产量方面再有较大突破。因此,代谢工程手段渐渐成为企业提高红霉素产量的突破口,

红霉素发酵工艺优化已作为企业研究的重中之重。

红霉素发酵培养基的主要成份为淀粉和黄豆饼粉^[12]。在红霉素工业生产中,降低原料成本是提高企业效益的有效手段,所以在国内出现了较多的采用廉价氮源替代昂贵氮源的报道。王晓磊等采用玉米粉水解物作为碳源在 30 吨发酵罐规模上使发酵单位提高了 5.8%,综合成本降低了 26.0%^[13]。张金国等采用廉价 A 粉和 B 粉替代淀粉、葡萄糖和黄豆饼粉后在 10 吨罐规模下产量提高了 6.11%^[14]。Zou 等在初始培养基中添加玉米浆促进了菌体的前期生长,最终红霉素效价提高了 22.2%^[15]。El-Enshasy 等采用甘蔗糖蜜替代葡萄糖后结合补加正丙醇工艺使红霉素产量提高了 33.0%^[16]。

研究采用响应面法对红霉素发酵培养基中氮源和碳源进行了优化。首先,用 Plackett-Burman 试验设计法选出了对红霉素效价有显著性影响的 4 个因素,分别是淀粉、糊精、玉米浆和黄豆饼粉;然后用最陡爬坡试验逼近最佳响应面区域;最后通过 Factors=4,Run=27 的 Box-Behnken 设计进行优化,得出红霉素最佳发酵培养基配方:淀粉 52.3 g/L、糊精 14.0 g/L、黄豆饼粉 45.3 g/L、玉米浆 14.6 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L、 CaCO_3 5.4 g/L、棉籽饼粉 20.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L、正丙醇 10.0 mL/L、油 20 mL/L,与华承伟等^[6]做的优化结果基本一致。优化后的配方经过发酵之后测得红霉素效价为 7764 U/mL,比原配方提高了 12%。

参考文献:

- [1] Stassi D, Donadio S, Staver M J, *et al.* Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis [J]. *Bacteriol*, 1993, 175(1): 182-189.
- [2] 陈强,朱才娟. 大环内酯类抗生素的临床评价[J]. *中国药房*, 1995, 6(1): 32-34.
- Chen Q, Zhu C J. The clinical evaluation of large cyclic lactone

antibiotics[J]. *Chinese Pharmacy*, 1995, 6(1): 32-34.

- [3] 施敏敏. 红霉素发酵过程的控制技术[J]. *工业控制与应用*, 2009, 28(7): 18-22.
- Shi M M. The control erythromycin Fed-Batch fermentation process[J]. *Industrial Control and Applications*, 2009, 28(7): 18-22.
- [4] 李啸,陈长华,李友元. 红霉素 A 发酵条件的优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(6): 381-383.
- Li X, Chen C H, Li Y Y. Erythromycin A optimization of fermentation conditions [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2006, 37(6): 381-383.
- [5] 刘峰,陈浦云,陈祥明. 红霉素高产突变株 F1-57 的选育及发酵工艺研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 19(2): 61-64.
- Liu F, Chen P Y, Chen X M. Screening and culturing of erythromycin productive strain F1-57 and its fermentation[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2003, 19(2): 61-64.
- [6] 华承伟,于江傲,谢凤珍. 红色链霉菌发酵产红霉素培养基的响应面优化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(6): 728-736.
- Hua C W, Yu J A, Xie F Z. Optimization of fermentation medium for erythromycin production of *Streptomyces erythraeus* by response surface methodology [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2011, 24(6): 728-736.
- [7] 范代娣,党政,孙晓红,等. 红霉素摇瓶发酵实验工艺条件[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2000, 30(1): 43-44.
- Fan D D, Dang Z, Sun X H, *et al.* The experimental study on technical and engineering parameters during shake flask fermentation for erythromycin production [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2000, 30(1): 43-44.
- [8] Thompson D D. Response surface experimentation [J]. *Food Processing Preservation*, 1982, 6(3): 155-188.
- [9] Minas W. Production of erythromycin with *Saccharopolyspora erythraea*, in: Bartedo, J. L. (Eds.) [M]. *Microbial Process and Products*. Hnmana Process Inc., Totowa, NJ, 2005: 65-90.
- [10] 孟祥学,工凤山. 糖多孢红霉菌红霉素高产菌种的诱变选育[J]. *食品与药品*, 2009, 11(4): 35-36.
- Meng X X, Gong F S. Breeding of erythromycin high-yielding *Saccharopolyspora erythraea* strain [J]. *Food and Drug*, 2009, 11(4): 35-36.

- [11] 虞 龙, 张 宇, 龚文静, 等. 氯化锂—紫外—离子束复合诱变红霉素高出菌株研究[J]. 原子能科学技术, 2011, 45(7): 780-784.
Yu L, Zhang Y, Gong W J, *et al.* Screening of erythromycin high-yielding strain by compound mutation of LiCl, UV and ion beam[J]. Atomic Energy Science and Technology, 2011, 45(7): 780-784.
- [12] 邹美云, 朱卫民, 于学琴. 红霉素链霉菌 1-25 菌株的特性研究[J]. 中国抗生素杂志, 1989, 14(3): 187-191.
Zou M Y, Zhu W M, Yu X Q. Cultural characteridtic studies and selection of high erythromycin producing mutant of *Streptomyces erythreus* 1-25 [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 1989, 14(3): 187-191.
- [13] 王晓磊, 刘建周, 廖志忠, 等. 玉米粉水解物作为红霉素发酵培养基的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(4): 167-169.
Wang X L, Liu J Z, Liao Z Z, *et al.* Maize meal hydrolysate as culture medium for erythromycin fermentation [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2003, 34(4): 167-169.
- [14] 张金国, 刘 翔. 红霉素发酵培养基优化研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(7): 406-416.
Zhang J G, Liu X. A Research on the improvement of medium composition for erythromycin fermentation[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(7): 406-416.
- [15] Zou X, Hang H F, Chu J, *et al.* Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m³ scale[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 1406-1412.
- [16] EI-Enshasy H A, Mohamed N A, Farid M A, *et al.* Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivator medium optimization [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4263-4268.

(编 辑:李文平)