文章编号：1001-8689(2018)04-0429-08

遗传育种与生物合成

微生物来源的缩肽类化合物enopeptin A的研究(I)：菌种选育及发酵工艺研究

高芳霞[1] 田敏[1,*] 雷叶明[1] 王昆蓉[1] 曹燕茹[2]
(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室，四川抗菌素工业研究所，成都大学，成都 610052；
2 成都雅途生物技术有限公司，成都 610041)

摘要：Enopeptin A是一种缩酚酸肽类化合物，具有抗菌、抗病毒等生物活性。以本实验室保藏的链霉菌SIIA-H7264为出发菌，通过紫外(UV)照射、甲基磺酸乙酯(EMS)诱变、亚硝基胍(NTG)诱变以及常压室温等离子体(ARTP)诱变，获得1株高产突变株A-21，其发酵产物Enopeptin A的产量较出发菌株提高了3倍。对发酵条件、发酵培养基组分进行单因素及响应面优化试验，最终Enopeptin A的产量达到1750μg/mL，较初始工艺提高了2.98倍。

关键词：缩酚酸肽化合物；Enopeptin A；菌种选育；发酵工艺
中图分类号：R978.1 **文献标志码**：A

Study on depsipeptide compound enopeptin A derived from microorganisms: its breeding and fermentation technology (I)

Gao Fang-xia[1], Tian Min[1], Lei Ye-ming[1], Wang Kun-rong[1] and Cao Yan-ru[2]
(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 Chengdu Yacht Bio-Tech Co. Ltd., Chengdu 610041)

Abstract Enopeptin A is a depsipeptide with antibacterial, antiviral and a variety of biological activities. The original strain SIIA-H7264 was mutated by UV, NTG, EMS and atmospheric temperature plasma. A high yield and good genetic stability strain A-21 was obtained with a titer of three folds higher than the original strain. The fermentation conditions and fermentation medium were studied by the Plackett-Burmen experiment, the climbing tests and the Box-Behnken method. Under the optimum medium and conditions, the yield of enopeptin A was 1750μg/mL and 2.98 folds higher than that with the initial conditions.

Key words Depsipeptide; Enopeptin A; Breeding; Fermentation technology

细菌耐药性已经成为全球性问题，人类面临“后抗生素时代”威胁[1]。缩酚酸肽化合物是一类包含酯键的多肽，是由羟基酸和氨基酸由酯键和酰胺键连接构成的一类寡聚物。具有抗菌、抗病毒、抗血栓、抗虫以及抗肿瘤等多种生物活性[2]。2003年，缩酚酸肽化合物plitidepsin被欧洲药典列为治疗急性白细胞淋巴瘤的罕见药物，由西班牙PharmaMar公司以Aplidine为商品名批准上市。而Celgen公司的组蛋

收稿日期：2017-07-14
基金项目：抗生素研究与再评价四川省重点实验室开放基金项目(No. 201408)
本文参加第十三届全国抗生素学术会议征文。
作者简介：高芳霞，女，生于1991年，在读硕士研究生，研究方向为微生物药物的研究，E-mail: 1562351969@qq.com
*通讯作者，E-mail: tm65tm@aliyun.com

白去乙酰化酶抑制剂药物罗米地辛也因其理想的临床抗肿瘤活性，2009年由美国食品药品监督管理局批准上市。最新研究发现，缩酚酸肽化合物能够通过干扰细胞的蛋白水解机制来杀灭包括MRSA在内的革兰阳性和革兰阴性菌。因此，缩酚酸肽类化合物可能会为感染性疾病的治疗提供一个新方向。

Enopeptin是由日本学者Osada等[3]在1991年进行抗病毒药物筛选时从土壤链霉菌RK-1051的发酵液中获得的一种缩酚酸肽化合物，包含enopeptin A和B两个结构。它们结构中的缩酚酸肽环由丙氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、*N*-甲基丙氨酸和4-甲基脯氨酸6个氨基酸缩合而成，此外，苯丙氨酸连接有一个长尾链部分，包括一个1,3,5,7,9-十碳五烯基-1,10-二羧酸和2-氨基-3-羟基-环戊-2-烯酮结构。其化学结构如图1所示。Enopeptin B的化学结构与enopeptin A相似，只是B中的脯氨酸取代了A中的甲基-脯氨酸[4]。

Enopeptin A的抗菌活性研究表明其能够抑制噬菌体噬菌斑的形成，具有抗包括耐甲氧西林-金黄色葡萄球菌在内的革兰阳性菌以及细胞膜缺陷的革兰阴性突变体的抗菌活性，对鼠的急性毒性低，LD_{50}约为200mg/kg。近年来，有科学家通过化学合成的方法对enopeptin进行结构修饰研究，期望筛选到抗菌活性强、稳定性高的缩酚酸肽类药物[5]。

本试验通过对化合物enopeptin A的产生菌株进行诱变育种以及对其发酵工艺进行优化研究，提高菌株生物合成enopeptin A的能力，为enopeptin A样品的大量制备，实现新衍生物的研究奠定基础。

1　仪器与材料

1.1　仪器与试剂

立式蒸气压灭菌锅，上海申安医疗器械厂；温控回旋台式振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；ARTP诱变育种仪，无锡源清天木生物科技有限公司；可见分光光度计，上海菁华科技仪器有限公司；甲基磺酸乙酯，aladdin；亚硝基胍，TCI；Enopeptin A工作对照品为本实验室自制。

1.2　菌种与培养基

1.2.1　菌种

SIIA-H7264，由成都大学四川抗菌素工业研究所菌种保藏中心保藏。

1.2.2　培养基

(1)斜面和平板培养基：ISP7培养基，pH7.2~7.4。

(2)种子培养基：可溶性淀粉2.5%，蛋白胨0.5%，葡萄糖1%，酵母粉0.2%，棉籽粉0.3%，$CaCO_3$ 0.2%，pH7.0。

(3)基础发酵培养基：葡萄糖1%；玉米淀粉1%；冷榨黄豆粉1.5%；蛋白胨0.5%；玉米浆粉0.4%；pH7.0。

2　试验方法

2.1　培养方法

固体平板及斜面培养：接种后的固体平板及斜面于28℃培养箱中培养10~14d。

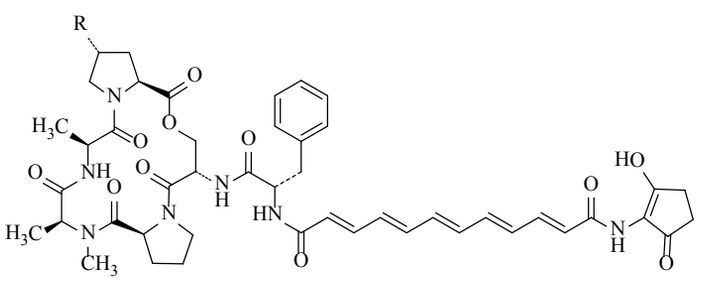
种子培养：取新鲜斜面挖块接入装有30mL种子培养基的250mL三角瓶中，于28℃，220r/min旋转式摇床培养72h。

发酵培养：按5%的接种量将种子培养液接入装有20mL发酵培养基的250mL三角瓶中，于28℃，220r/min旋转式摇床培养120h。

2.2　发酵产物的样品制备方法

(1)取2mL发酵液，加入2倍体积的乙酸乙酯，震荡萃取30min，于1000r/min离心3min，取乙酸乙酯相溶液加入无水乙醇稀释15倍后，进行紫外-可见分光光度法检测。

(2)取2mL发酵液，加入2倍体积的乙酸乙酯，震荡萃取30min，于1000r/min离心3min，取乙酸乙酯相溶液加入无水乙醇稀释6倍，0.45μm的微孔滤膜过滤



Enopeptin A R=CH_3; Enopeptin B R=H

图1　Enopeptin A和Enopeptin B的结构式

Fig. 1　The structure of Enopeptin A and Enopeptin B

后，进行HPLC法检测。

2.3 Enopeptin A的含量测定

初测：采用紫外-可见分光光度法，检测波长375nm；复测：采用HPLC分析检测方法，分析条件为：色谱柱：Hypersil ODS(250㎜×4.6mm, 5μm)，流动相为乙腈-1‰甲酸水(50:50)，流速：1.0mL/min、检测波长：375nm，柱温：40℃，进样量20μL。

2.4 菌种选育

2.4.1 单孢子悬液制备

取生长成熟的斜面，加入20mL无菌去离子水或磷酸缓冲液洗下斜面孢子，将孢子液置入装有玻璃珠的三角瓶中，于220r/min摇床上充分震荡20min，过滤，收集单孢子悬液。

2.4.2 UV诱变

取5mL制备好的出发菌株的单孢子悬液于无菌培养皿中，紫外线照射10、20、30、40、50和60s，将诱变后的菌悬液稀释并涂布到ISP7固体平板培养基上，避光处理2h，置于28℃培养10d，计算致死率，并挑选单菌落进行产物效价分析。

2.4.3 EMS 诱变

取1mL制备好的经上级诱变筛得菌株的单孢子悬液，加入EMS原液，使终浓度为2%和4%，振荡处理时间为10、20、30和50min，加入硫代硫酸钠终止反应，将经诱变处理的菌悬液稀释并涂布到ISP7固体平板培养基上，置于28℃培养10d，计算致死率，并挑选单菌落进行产物效价分析。

2.4.4 NTG诱变

NTG用丙酮溶解，配制成浓度为10mg/mL的母液。取1mL制备好经上级诱变筛得菌株的的单孢子悬液，加入NTG母液，使终浓度为0.1和0.2mg/mL，震荡处理时间为20、40和60min，加入硫代硫酸钠终止反应，将经诱变处理的菌悬液稀释并涂布到ISP7固体平板培养基上，于28℃培养10d，计算致死率，并挑选单菌落进行产物效价分析。

2.4.5 ARTP诱变

将经上级诱变筛得菌株的单孢子悬液涂布于待照射载片上，按照ARTP生物诱变育种机的操作流程，以氦气为工作气体，点样量为10μL，风干时间20s，设定功率为120W，通气量为10SLM，等离子体发射源与样品间距离为2mm。处理时间为10、20、30、60、90、120和180s，将诱变处理后的孢子洗下，稀释并涂布到ISP7固体平板培养基上，置于28℃培养10d，计算致死率，并挑选单菌落进行产物效价分析。

2.5 发酵工艺研究

2.5.1 发酵条件的筛选

以诱变筛选得到的高产菌株链霉菌A-21为试验菌株，使用初始发酵培养基，在其他发酵条件一定的情况下，分别考察不同的接种量、培养温度、培养基装量、摇床转速以及发酵培养基初始pH对目标产物enopeptin A效价的影响，选择最适发酵条件。

2.5.2 发酵培养基优化

(1)单因素试验：以葡萄糖1%；玉米淀粉1%；冷榨黄豆粉1.5%；蛋白胨0.5%；玉米浆粉0.4%；pH7.5为基础对照培养基，采用替换的方式分别考察不同的碳源、有机氮源、无机氮源、无机盐、磷酸盐、碳酸盐以及氨基酸对发酵的影响。

(2)响应面法优化试验

①Plackett-Burman试验：试验选用N=12的Plackett-Burman设计方法，对7个因素：葡萄糖($X1$)、糊精(X_2)、黄豆粉(X_3)、硝酸钾(X_4)、氯化钠(X_5)、脯氨酸(X_6)和棉籽粉(X_7)进行考察，以目标产物enopeptin A的产量为响应值，每个因素选择高低两个水平。设计方案如表1所示。使用Design-Expert 8.0.5统计软件对实验结果数据进行回归分析，根据回归方程确定主要影响enopeptin A产量的关键因素及对产量响应值影响的显著性顺序。

②爬坡试验：依据Plackett-Burman设计得到的试验结果，找出影响enopeptin A产量的显著因素，以试验值变化的效应方向作为爬坡方向，根据各因素效应值的大小确定变化步长，对显著因子浓度做最陡爬坡实验设计。

③Box-Behnken法试验：最陡爬坡实验结果确定出逼近极值的取值点，通过响应面Box-Behnken

表1 Plackett-Burman 设计实验因素水平

Tab. 1 Factors and levels for Plackett-Burman

因素	水平/%	
	-1	1
葡萄糖(X_1)	1	4
糊精(X_2)	1	6
黄豆粉(X_3)	1	6
硝酸钾(X_4)	1	6
氯化钠(X_5)	0.1	0.4
脯氨酸(X_6)	0.05	0.2
棉籽粉(X_7)	0	3

设计原理做进一步培养基组分配比优化试验，采用Design-Expert 8.0.5统计软件进行实验结果回归分析并对获得的模型方程进行评价。

3　结果与分析

3.1　菌种选育结果

3.1.1　UV诱变

如图所示，紫外线的照射时间与菌株的致死率在一定范围内呈正相关的剂量关系，随着处理时间延长，致死率随之增加(图2)。经诱变处理后挑取的单菌落经初筛，紫外处理30s，正突变率最高为

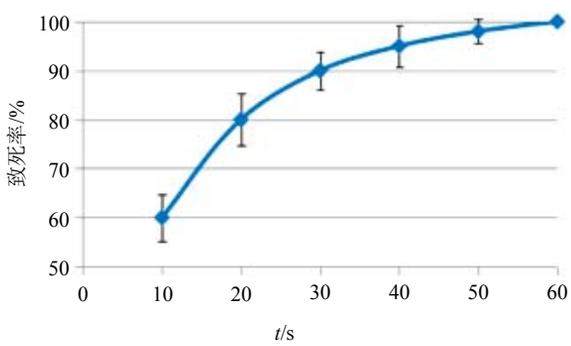


图2　紫外线诱变剂量与致死率曲线图

Fig. 2　The mortality rate curve of UV radiation

20%，经复筛后得到突变菌株U-33，其发酵效价达到190μg/mL，较出发菌株SIIA-H7264 110μg/mL提高80%。

3.1.2　EMS诱变

菌悬液在2%和4%的诱变剂量下，累计处理30min，致死率均达到80%以上(表2)。经诱变处理后挑取的单菌落经初筛，4% EMS诱变30min，正突变率最高为26%，经复筛后得到突变菌株E-23，其发酵效价达到225μg/mL，较U-33提高了18%。

3.1.3　NTG诱变

在0.1和0.2mg/mL的诱变剂量下，累计处理60min，致死率均达到80%以上(表3)。经诱变处理后挑取的单菌落经初筛，0.2mg/mL NTG诱变60min，正突变率最高为38%，经复筛后得到突变菌株N-51，其发酵效价达到290μg/mL，较E-23提高了22%。

3.1.4　ARTP诱变

菌株的致死率与等离子照射的时间呈正相关，ARTP处理100s，致死率为90%左右，处理时间为120s时，致死率达到100%(图3)。经诱变处理后挑取的单菌落经初筛，ARTP处理90s，正突变率最高为

表2　EMS诱变致死率结果

Tab.2　The mutation mortality rate results of EMS

EMS浓度	EMS处理时间/min			
	10	20	30	50
2%	20%	65%	80%	90%
4%	30%	70%	88%	100%

表3　NTG诱变致死率结果

Tab. 3　The mutation mortality rate results of NTG

NTG浓度	NTG处理时间/min		
	20	40	60
0.1mg/mL	56%	73%	80%
0.2mg/mL	60%	82%	88%

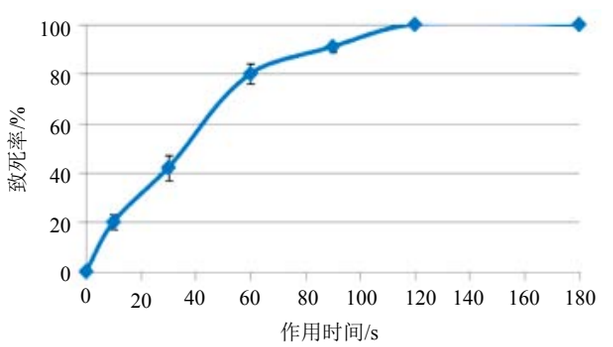


图3　ARTP诱变剂量与致死率曲线图

Fig. 3　The mortality rate curve of ARTP

40%，经复筛后得到突变菌株A-21，其发酵效价达到440μg/mL，较N-51提高了51%。

最终得到的高产菌株A-21，按“2.1”项方法进行培养，Enopeptin A的产量由最初的110μg/mL提升至440μg/mL，提高了3倍。

3.1.5　菌株A-21的传代稳定性考察

将菌株A-21连续进行斜面传代至第5代，结果表明该突变菌株至少在5代斜面以内，产物效价水平相对稳定。

3.2　发酵工艺研究结果

3.2.1　发酵条件的筛选

在初始发酵培养基和其他发酵条件一定的基础上，对温度、pH、接种量、摇瓶装量以及摇床转速等因素进行研究，综合分析各个因素对发酵的影响，确定了有利于发酵的最佳培养条件：接种量3%，培养温度28℃，250mL摇瓶培养基装量为20mL，初始pH7.5，摇床转速220r/min。

3.2.2　发酵培养基成分优化研究结果

(1)单因素试验结果：首先固定基础培养基中

的氮源不变，分别考察葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、甘油、甘露醇、玉米油、葵花油、玉米淀粉、燕麦淀粉和糊精等12种碳源，从中获得最优碳源为葡萄糖1%、糊精1%；然后以葡萄糖和糊精为碳源，对牛肉膏、蛋白胨、胰胨、酵母粉、酵母浸粉、酵母浸膏、麦芽提取粉、冷轧黄豆粉、玉米浆粉、棉籽粉、尿素和热轧黄豆粉等12种有机氮源进行考察，从中获得最佳有机氮源为冷轧黄豆粉2.5%，进一步确定无机氮源为硝酸钾0.2%、无机盐为氯化钠0.2%、碳酸钙0.2%、磷酸二氢钾0.1%以及添加0.1%脯氨酸。

(2)响应面优化法试验设计结果

①Plackett-Burman实验设计与试验结果：试验结果见表4，使用分析软件Design-Expert 8.0.5，对试验结果进行回归分析以及各因素的效应分析，结果见表5。由表可知，模型*P*值为0.0004，小于0.05，说明该模型显著。由回归系数(regression coefficient)可知培养基成分对Enopeptin A产量的影响显著性顺序为：脯氨酸>糊精>棉籽粉>硝酸钾>氯化钠>葡萄糖>黄豆粉。其中，对enopeptin A产量影响最为显著的4个因素为脯氨酸(X_6)、糊精(X_2)、棉籽粉(X_7)、硝酸钾(X_4)，利用多元线性回归模型中的逐步回归法拟合得到的线性方程为：Y=390.92+36.92X_1+147.92X_2+17.58X_3+104.58X_4-42.42X_5-159.08X_6-119.42X_7，决定系数R^2值为0.9929，说明该回归方程拟合良好。

表4 Plackett-Burman 实验设计及响应值

Tab. 4 Plackett-Burman test design and results

Number	Factor							Enopeptin A/ (μg/mL)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	554
2	-1	1	1	-1	1	1	1	81
3	1	-1	1	1	-1	1	1	186
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	601
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	50
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	37
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	185
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	483
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	539
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	975
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	620
12	-1	-	-1	-1	-1	-1	-1	380

②最陡爬坡试验结果：由Plackett-Burman实验结果筛选出显著因素，除糊精、硝酸钾和脯氨酸3个显著因素外，其他各因素的取值分别为：葡萄糖2%，黄豆粉3%，氯化钠0.2%，磷酸二氢钾0.1%，碳酸钙0.2%。最陡爬坡实验设计方案及试验结果见表6。结果表明第4次试验enopeptin A发酵产量最大，因此选取第4次试验水平作为中心点进行响应面的试验设计。

③Box-Behnken试验结果：最陡爬坡试验结果确定出了最大逼近响应值区域，根据Box-Behnken的试验设计原理，进一步对糊精、硝酸钾、脯氨酸3个显著因素进行三因素三水平的响应面分析试验(表7)，采用软件Design-Expert8.0.5对试验结果进行二次回归分析，*F*检验对该模型方程的显著性进行评价，*t*检验验证回归系数的显著性，最后通过决定系数R^2评判方程的拟合性。

Box-Behnken设计及试验结果见表8，经拟合回归方程表达式为：Y=1711.00+20.70X_2+153.16X_4+51.60X_6+49.61X_2X_4-108.46X_2X_6-10.97X_4X_6-183.50X_2^2-180.42X_4^2-62.11X_6^2。其方差分析结果如表9所示。

模型的P<0.0001，说明该模型是非常显著的。模型失拟项P值为0.2239>0.05，因此失拟项不显著，模型选择合适。决定系数R^2=0.9945，表示数

表5 各影响因子的方差分析和偏回归系数

Tab. 5 ANOVA results for the significance

Source	Sum of squares	df	Mean squares	Regression coefficient	*F*-value	*P*-value
Model	910300	7	1.30000	390.92	79.53	0.0004
X_1	16354.08	1	16354.08	36.92	10.00	0.0341
X_2	262600	1	2.62600	147.92	160.57	0.0002
X_3	3710.08	1	3710.08	17.58	2.27	0.2064
X_4	131300	1	1.31300	104.58	80.27	0.0009
X_5	21590.08	1	21590.08	-42.42	13.20	0.0221
X_6	303700	1	3.03700	-159.08	185.73	0.0002
X_7	171100	1	1.71100	-119.42	104.66	0.0005
Residual	6540.33	4	1635.08			
Cor total	916800	1				

学模型有极好的拟合性，模型可信度高，可使用对enopeptin A的发酵水平进行分析与预测。为了更直观地反映3个变量间的交互作用以及对响应值的影响对以enopeptin A产量为响应值的趋势图(图4~6)进行可视化分析，三维曲面图弯曲向下表示响应值存在最大值，曲面等高线图形象地表征两两变量交互效应的强弱。经软件计算分析可知enopeptin A产量预测值最大时培养基成分浓度为：糊精8.85%，硝酸钾0.74%，脯氨酸0，产量预测值为1765μg/mL。

(3)验证试验结果：采用优化后的发酵培养基进行3组摇瓶发酵实验，enopeptin A的产量分别为1762、1770和1718μg/mL，产量均值为1750μg/mL与设计模型预测值1765μg/mL很接近，说明设计模型能较准确地预测发酵情况。相较于优化前摇瓶发酵产量440μg/mL，提高了3倍。

3.2.3　摇瓶发酵生长代谢曲线

在经上述各研究试验结果条件下，菌株A-21摇瓶发酵生长代谢曲线见图7。结果显示：0~48h为菌体生长停滞期，此时，菌丝生物量基本无积累，糖

表6　最陡爬坡试验设计与结果

Tab. 6　The design and corresponding results of steepest ascent

Number	Dextrin/(g/100mL)	nitrate/(g/100mL)	Proline/(g/100mL)	Enopeptin A/(μg/mL)
1	5	0.15	0.2	157
2	6	0.3	0.15	1504
3	7	0.45	0.1	1217
4	8	0.6	0.05	1607
5	9	0.75	0	1409

表7　响应面分析实验因素水平表

Tab. 7　Factors and level value of response surface analysis

因素	水平/%		
	-1	0	1
糊精(X_2)	6	8	10
硝酸钾(X_4)	0.4	0.6	0.8
脯氨酸(X_6)	0	0.05	0.1

表8　Box-Behnken 响应面设计及实验结果

Tab. 8　Response surface Box-Behnken design and corresponding response

Number	X_2	X_4	X_6	Enopeptin A/(μg/mL)
1	-1	-1	0	1204
2	1	-1	0	1162
3	-1	1	0	1432
4	1	1	0	1588
5	-1	0	-1	1386
6	1	0	-1	1628
7	-1	0	1	1518
8	1	0	1	1327
9	0	-1	-1	1375
10	0	1	-1	1683
11	0	-1	1	1275
12	0	1	1	1539
13	0	0	0	1710
14	0	0	0	1690
15	0	0	0	1710
16	0	0	0	1699
17	0	0	0	1733

表9　回归模型及方差分析

Tab. 9　Analysis of variance (ANOVA) of quadratic polynomial model

Source	Sum of Squares	df	Mean square	*F*-value	*P*-value	
Model	592800	9	65867.03	141.04	<0.0001	significant
X_2	3426.69	1	3426.69	7.34	0.0303	
X_4	187700	1	187700	401.87	<0.0001	
X_6	21299.21	1	21299.21	45.61	0.0003	
X_2X_4	9844.66	1	9844.66	21.08	0.0025	
X_2X_6	47051.26	1	47051.26	100.75	<0.0001	
X_4X_6	481.59	1	481.59	1.03	0.3437	
X_2^2	141800	1	141800	303.57	<0.0001	
$X4^2$	137100	1	137100	293.48	<0.0001	
X_6^2	16244.54	1	16244.54	34.78	0.0006	
Residual	3269.03	7	467.00			
Lack of fit	2055.03	3	685.01	2.26	0.2239	not significant
Pure Error	1214.00	4	303.50			
Cor Total	596100	16				

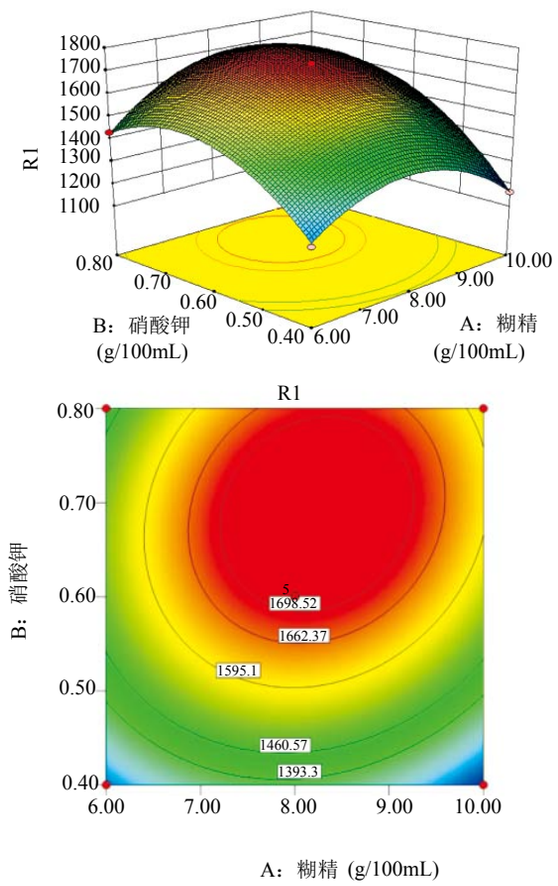


图4 糊精与硝酸钾交互影响enopeptin a产量的曲面图和等高线图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot for the effects of dextrin and nitrate on the enopeptin A production

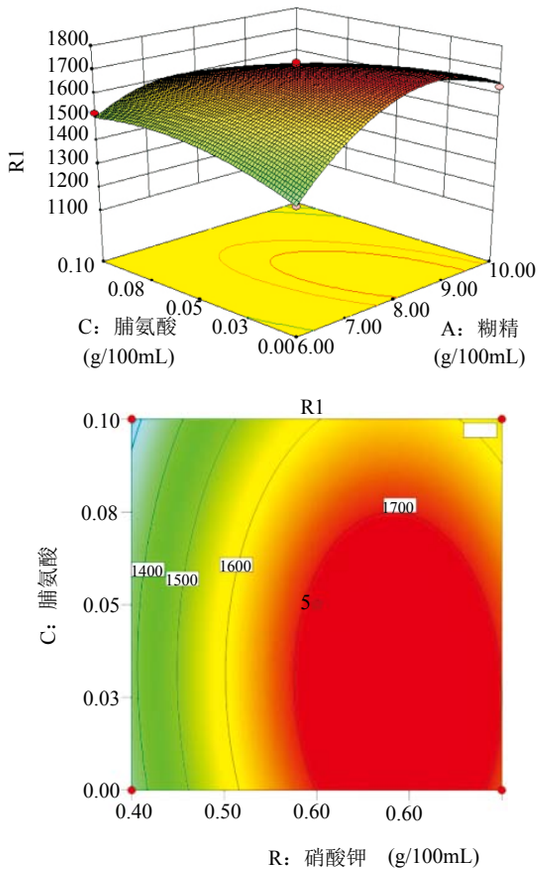


图5 糊精与脯氨酸交互影响enopeptin A产量的曲面图和等高线图

Fig. 5 Response surface plot and contour plot for the effects of dextrin and proline on the enopeptin A production

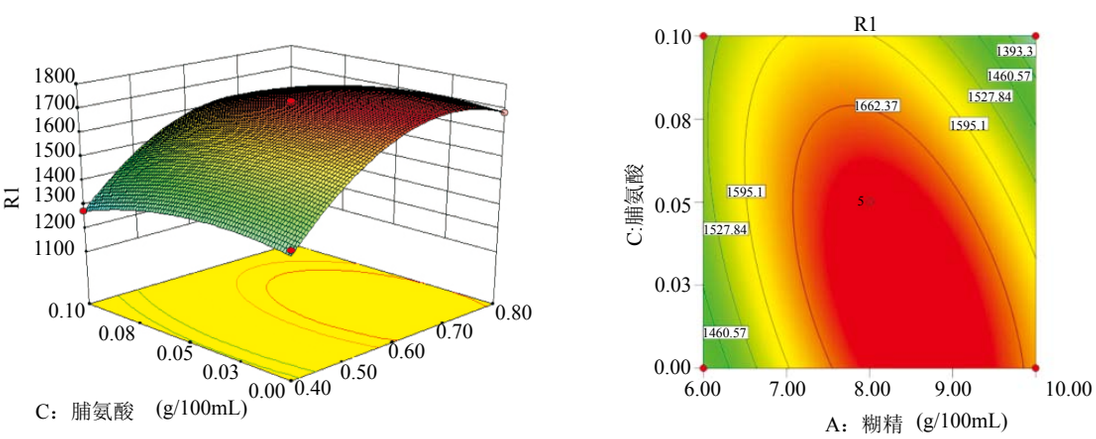


图6 脯氨酸与硝酸钾交互影响enopeptin A产量的曲面图和等高线图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot for the effects of nitrate and proline on the enopeptin A production

基本无消耗；48~138h为对数生长期，此时菌体生物量快速持续增多，菌体浓度达到58%，糖耗加快，与此同时，enopeptin A的合成速率也加大，到138h，enopeptin A的产量达到峰值，为1750μg/mL，138h之后，enopeptin A的产量略有下降，随之，菌体生物量也有所下降。整个发酵过程中pH变化幅度不大，因此将发酵周期定为138h。

4 结论

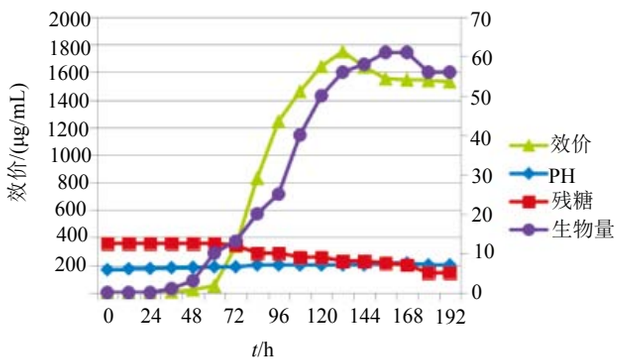


图7　enopeptin A的摇瓶发酵曲线

Fig. 7　Time courses of enopeptin A fermentation in shake flasks

采用物理诱变、化学诱变以及新型常压室温等离子体诱变手段对enopeptin A产生菌SIIA-H7264进行了遗传选育研究，得到高产且遗传稳定的突变菌株A-21，enopeptin A效价水平较出发菌株提高了3倍；通过对温度、接种量、摇瓶装量以及摇床转速等因素的考察，确定了发酵的最佳培养条件：250mL摇瓶培养基装量为20mL，接种量3%，培养温度28℃，摇床转速220r/min，发酵周期138h；通过单因素和响应面法试验对发酵培养基组分配比进行优化研究，获得培养基中各组分的最佳浓度为：葡萄糖2%，糊精8.85%，黄豆粉3%，硝酸钾0.74%，氯化钠0.2%，磷酸二氢钾0.1%，碳酸钙0.2%，pH7.5。

通过菌种选育筛得高产菌株，单因素和响应面法试验对发酵培养基组分配比进行优化研究，获得培养基中各组分的最佳浓度，有效提高了Enopeptin A的发酵水平，使Enopeptin A产量达到1750μg/mL，相较于优化前提高了2.98倍，比文献报道的Enopeptin A的产量提高了10.67倍。为该品种进行后续新衍生物研究工作的开展奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

[1] CMT. 2015感染病领域全球年度十大进展[J/OL]. 中国医学论报, 2016, 4, 1. http://infect.cmt.com.cn/detail/1166635.html.

[2] Sivanathan S, Scherkenbeck J. Cyclodepsipeptides: A rich source of biologically active compounds for drug research[J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12368-420.

[3] Osada H, Yano T, Koshino H, *et al*. Enopeptin A, a novel depsipeptide antibiotic with antibacteriophage activity[J]. *J Antibiot*, 1991, 44: 1463-1466.

[4] Koshino H, Osada H, Yano T, *et al*. The structure of enopeptins A and B, novel depsipeptide antibiotics[J]. *Tetrahed Lett*, 1991, 32(52): 7707-7710.

[5] 田敏, 刘瑜, 俞朵, 等. 微生物来源的黑色素生物合成抑制剂H7264的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2002 , 27(2): 84-86.