文章编号：1001-8689(2018)11-1397-06

海洋小单孢菌 FIM02523 产 rakicidin B 发酵工艺研究

周剑 林如 欧阳浩亮 连云阳 林风 江红 *
(福建省微生物研究所，福建省新药 (微生物) 筛选重点实验室，福州 350007)

摘要：目的 提高海洋小单孢菌 FIM02523 发酵液中的生物活性成分 rakicidin B 含量。**方法** 采用单因素实验、正交设计实验等方法优化发酵培养基组成比例及培养条件。**结果** 确定了最优 rakicidin B 发酵培养基：可溶性淀粉 4.0%，蔗糖 1.0%，大豆蛋白胨 1.0%，酵母粉 2.0%，甘氨酸 0.1%，NaCl 0.5%，$MgSO_4$ 0.05%，$CaCO_3$ 0.5%；最优摇瓶发酵条件：发酵周期为 120h，接种量 5.0%，500mL 摇瓶装量 100mL，摇床转速 220r/min，发酵温度 30℃，培养基初始 pH 值为 7.5。**结论** 优化后发酵工艺 rakicidin B 的发酵效价较初始工艺提高了约 7.3 倍。

关键词：发酵；培养基优化；正交设计；Rakicidin B
中图分类号：R979.1 **文献标志码**：A

Research on the fermentation conditions of rakicidin B derived from marine *Micromonospora* FIM02523 strain

Zhou Jian, Lin Ru, Ou-yang Hao-liang, Lian Yun-yang, Lin Feng and Jiang Hong
(Fujian Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007)

Abstract **Objective** To enhance the productivity of rakicidin B by marine *Micromonospora* sp. FIM02523. **Methods** Single-factor experiment and Orthogonal experimental design were applied to optimize the fermentation medium and fermentation conditions. **Results** Components of the optimized medium were soluble starch 4.0%, sucrose 1.0%, soybean peptone 1.0%, yeast powder 2.0%, glycine 0.1%, NaCl 0.5%, $MgSO_4$ 0.05% and $CaCO_3$ 0.5%; The optimum fermentation conditions were ascertained, fermentation time 120 hours, inoculation 5% , 80 mL medium in 500 mL flask, rotation speed 220 r/min, culture temperature 30℃ , pH 7.5 before sterilization. The fermentation titer of rakicidin B could reato approximately 7.3 times higher than that of the original.

Key words Fermentation; Medium optimization; Orthogonal experimental design; Rakicidin B

福建省微生物研究所 2006 年在国内首先报道从微生物代谢产物中分离到 rakicidin A 和 B，并对 rakicidin B(FW523-3) 的有关生物学活性进行了初步研究 [1-4]。我们首次发现 Rakicidins 类化合物具有抗临床致病艰难梭菌等厌氧菌、抗耐万古霉素肠球菌等活性，值的进一步研发 [5]。

目前国内外关于 rakicidins 类化合物的发酵生产工艺研究报道较少，Mcbrien 等 [6]1995 年报道了 rakicidins 类化合物的发酵及分离纯化，但其仅提供基本的摇瓶工艺且发酵周期长达 8d，未提供适合工业化生产的工艺。2016 年 Komaki 等 [7] 对海洋小单孢菌 *Micromonospora* sp. DSW705 进行了基因测序，推测 rakicidins A 和 B 的生物合成途径。本文主要通过优化摇瓶发酵培养基和发酵条件对 rakicidin B 产生菌株发酵工艺进行研究，以期提高 rakicidin B 的发酵效价，为以后该产品的工业化生产提供工艺数

收稿日期：2017-11-29
基金项目：福建省公益类科研院所省重点项目 (No. 2017R1009-14)；国家新药重大专项 (No. 2017ZX09101003-007-007 和 No. 2017ZX09201001-002-005)
作者简介：周剑，男，生于 1980 年，副研究员，主要从事微生物药物研究，E-mail: zjian503@163.com
* 通讯作者，E-mail: jianghong709@163.com

据。

1　材料和方法

1.1　主要仪器设备

S30K 型 pH 仪 (瑞 士 Mettler 公 司)；INNOVA-5000 型双层摇床 (New Brunswick Scientific 公司)；高效液相色谱仪 (Agilent 1260 DAD)(美国 Aglient 公司)。

1.2　实验菌株

海洋小单孢菌 FIM02523 本课题组筛选保藏。

1.3　培养基

斜面培养基：可溶性淀粉 2.0%，L- 天冬酰胺 0.05%，K_2HPO_4 0.05%，$MgSO_4$ 0.05%，NaCl 0.05%，KNO_3 0.1%，$CaCO_3$ 0.1%，$FeSO_4$ 0.001%，琼脂 2.0%，pH7.2~7.4。

种子培养基：可溶性淀粉 1.5%，葡萄糖 0.5%，蛋白胨 0.5%，酵母粉 0.5%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.05%，$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.05%，NaCl 0.05%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%，$CaCO_3$ 0.1%，pH7.2。

初始发酵培养基：可溶性淀粉 2%，蔗糖 0.5%，干酪素 1.0%，玉米浆 0.5%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.04%，$FeSO_4·7H_2O$ 0.005%, $CuSO_4·5H_2O$ 0.005%, $CoCl_2·6H_2O$ 0.0005%，$CaCO_3$ 0.3%，pH7.2。

1.4　培养方法

斜面 30℃培养 12~15d 待生长成熟以后，将新鲜孢子接于种子培养基，置于 30℃、摇床转速为 230r/min，培养 48h 左右；按 5.0% 的接种量转接到发酵培养基，置于 30℃、摇床转速 230r/min，培养 120h。

1.5　分析方法

1.5.1　发酵液中 rakicidin B 效价的测定 [8]

取适量发酵液于离心管中，按 1:3 加入无水乙醇，振荡混均后超声 20min。10000r/min 离心 5min，取上清液，用 0.22μm 滤膜过滤备用。用 HPLC 法测定发酵液中 rakicidin B 的效价，使用 Syncronis C_{18} 分析型色谱柱、检测波长 262nm、柱温 40℃、流速 1.0mL/min、流动性为乙腈 : 水 =75:25。

1.5.2　菌丝浓度 (PMV) 的测定

取发酵液 10mL 于 10mL 刻度试管中，离心沉淀 (5000r/min)15min，记录沉淀物毫升数。依下列计算菌丝浓度：菌丝浓度 =(沉淀物毫升数 /10)×100%。

1.5.3　总糖的测定

发酵液中总糖采用斐林试剂法测定 [9]。

1.6　培养基与培养条件优化

1.6.1　单因素试验

采用单因素试验考察发酵培养基的组成如碳源、氮源、无机盐 (微量元素)、前体氨基酸等对发酵效价的影响。

1.6.2　正交实验设计

正交试验设计 (orthogonal experimental design) 是研究多因素多水平的一种设计方法，它根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验。

采用单因素实验中效价较高的培养基成分做为正交试验的因素进行考察。新的培养基中使用了复合的碳源、氮源以及多种无机盐。水平的设定主要从常用量出发，并在尽可能大的范围内波动。以目标化合物的效价为指标，按下述正交实验设计表 $L9(3^4)$ 进行实验，每组平行实验 3 组，结果取平均值 (表 1)。

1.6.3　摇瓶发酵过程的影响因素考察

采用单因素实验法考察发酵培养条件对效价的影响，主要从以下几方面：培养温度、起始 pH 值、消泡剂使用量、接种量、发酵时间、摇瓶装液量、摇床转速等。

1.7　100L 罐发酵试验

在发酵罐培养过程中，通过通气及搅拌控制发酵液 DO 值在 20%~60% 之间，一般通气为 1:1vvm，搅拌转速在 200~400r/min 之间，一般在发酵 120h 左右，总糖达到 1.0 以下，发酵液的 pH 值开始快速上升，菌丝自溶时放罐。

2　结果与结论

2.1　摇瓶发酵培养基的考察

2.1.1　单因素考察碳氮源对 rakicidin B 发酵效价的影响

采用单一因素试验考察碳氮源对于发酵效价的影响，培养基按照 4.0% 碳源，1.0% 氮源添加量摸索。其中碳源考察了实验室常用的 11 种碳源：葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘油、甘露醇、可溶性淀粉、土豆淀粉、玉米淀粉、糊精、麦芽糊精；氮源考察实验室常用的 13 种有机氮源：蛋白胨、鱼胨、牛肉膏、

表 1　正交实验设计因素水平表 $L_9(3^4)$(%)

Tab. 1　The factors and levels for the orthogonal experimental design (%)

因素	水平		
	1	2	3
可溶性淀粉	2	4	6
蔗糖	1	2	3
大豆蛋白胨	0.5	1	2
酵母粉	0.5	1	2

大豆蛋白胨、酸水解酪蛋白、玉米蛋白、干酪素、玉米浆、酵母粉、冷轧黄豆饼粉、热轧黄豆饼粉、黄豆粉，棉籽粉；均以初始培养基作为对照。

由图 1 碳源实验结果可见使用可溶性淀粉和蔗糖这两种碳源 rakicidin B 发酵效价提高较多。糊精、土豆糊精、土豆淀粉、玉米淀粉具有相近的效价，表明目标菌株具有产生淀粉酶的产生能力。可以选用蔗糖和可溶性淀粉作为下一步的实验碳源。

由图 2 氮源试验结果可见以大豆蛋白胨、玉米蛋白、榴花酵母粉、安琪酵母粉、黄豆粉 5 种氮源时发酵效价较高，动物源性的氮源效价不佳。榴花酵母粉和安琪酵母粉的效价差别较大，主要原因可能是榴花酵母粉采用啤酒酵母，而安琪酵母则是面包酵母。因此在发酵优化过程中，应该注意不同厂家生产的同类氮源可能存在较大差异。综上，选用大豆蛋白胨、安琪酵母粉作为候选氮源进行下一步实验。

2.1.2　无机盐对 rakicidin B 发酵效价的影响

主要考察选择实验室中常用的无机盐和金属离子对发酵产物的影响，含重金属离子的无机盐添加 0.05%(主要有 $MgSO_4$、$FeSO_4$、$CuSO_4$、$MnSO_4$、$ZnSO_4$、$MnCl_2$ 和 $CaCl_2$)，不含重金属离子的添加量为 0.5%[主要有 $(NH_4)_2SO_4$、NaCl、KCl、KH_2PO_4、K_2HPO_4 和 $NH_4H_2PO_4$]。

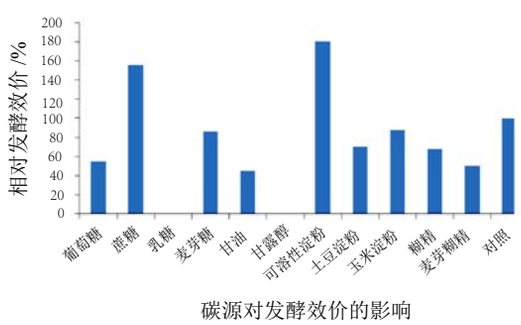


图 1　不同碳源的发酵水平的比较

Fig. 1　Comparison of different carbon sources used for rakicidin B production

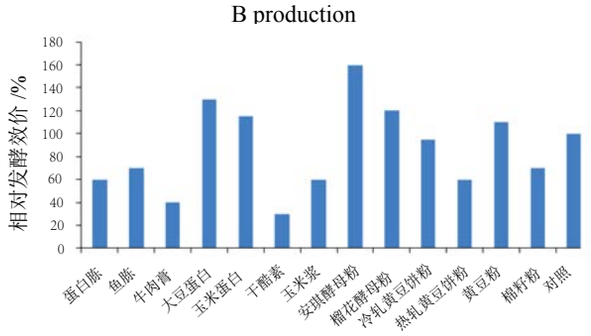


图 2　不同氮源的发酵水平的比较

Fig. 2　Comparison of different nitrogen sources used for rakicidin B production

结果表 2 所示，$MgSO_4$ 对 rakicidin B 的生物合成有促进作用；钴离子对发酵效价有抑制作用；氯盐和硫酸盐比磷酸盐的效果好；添加 0.05% 的 $MgSO_4$、0.5% 的 NaCl 发酵液中相对效价较高，因此确定添加 0.05% 的 $MgSO_4$，0.5% 的 NaCl。另外针对原始配方中的 $CaCO_3$ 主要是起到平衡 pH 值的作用，一般根据碳源的含量进行调节 $CaCO_3$ 的含量为碳源的 10% 即可。

2.1.3　正交试验设计考察碳氮源组合对发酵效价的影响

以单因素优化筛选出的比较好的碳源 (可溶性淀粉、蔗糖)、氮源 (黄豆粉、大豆蛋白) 做四因素三水平正交实验 (表 1)。其他发酵因素无机盐、发酵条件等都保持一致，重复 3 次。以发酵终点时 rakicidin B 的发酵效价为指标，来确定最优的碳氮源配方比例。

从表 3 极差 *R* 值可以看出，影响 rakicidin B 发

表 2　无机盐对 rakicidin B 发酵效价的影响

Tab. 2　Effect of inorganic salt on rakicidin B production

无机盐种类	相对效价 /%	无机盐种类	相对效价 /%
$MgSO_4$	110.6	$(NH_4)_2SO_4$	85.6
$FeSO_4$	98.2	NaCl	113.5
$CuSO_4$	67.6	KCl	102.8
$MnSO_4$	86.7	KH_2PO_4	48.6
$ZnSO_4$	86.3	K_2HPO_4	54.5
$MnCl_2$	67.5	$NH_4H_2PO_4$	65.2
$CoCl_2$	46.8	对照	100

表 3　正交实验设计方案及结果

Tab. 3　Orthogonal experiment design and results

实验号	可溶性淀粉	蔗糖	大豆蛋白胨	酵母粉	实验结果
实验 1	1	1	1	1	58.5
实验 2	1	2	2	2	36.3
实验 3	1	3	3	3	32.9
实验 4	2	1	2	3	94.1
实验 5	2	2	3	1	55.6
实验 6	2	3	1	2	100
实验 7	3	1	3	2	85.2
实验 8	3	2	1	3	81.5
实验 9	3	3	2	1	66.7
均值 1	42.567	79.267	80.000	60.267	
均值 2	83.233	57.800	65.700	73.833	
均值 3	77.800	66.533	57.900	69.500	
极差	40.666	21.467	22.100	13.566	

酵效价的四因素的主次顺序为可溶性淀粉 > 大豆蛋白胨 > 蔗糖 > 酵母粉，因素可溶性淀粉含量对其合成影响最为显著，是最关键的因子，其次是大豆蛋白胨。综上，发酵培养基碳氮源的最佳培养基配方为：可溶性淀粉 4.0%、蔗糖 1.0%、大豆蛋白胨 0.5%、酵母粉 1.0%。

2.2　前体氨基酸对发酵效价的影响

在“2.1”项的基础上考察前体氨基酸对发酵效价的影响，分别添加 0.1% 不同氨基酸进行发酵实验。结果如图 3 所示，添加甘氨酸效果非常明显，发酵效价较对照提高了 2 倍多，可能由于海洋小单孢菌 FIM02523 菌体细胞壁比较厚，添加甘氨酸后会部分抑制细胞壁合成，提高细胞的通透性，有利于营养成分的吸收和代谢产物的外排，从而大大提高发酵效价。亮氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、赖氨酸也会相应的提高 rakicidin B 的发酵效价，这些氨基酸有可能在 rakicidin B 生物合成过程中起到小分子前体物的作用。前体氨基酸的添加量、添加种类、多种氨基酸的复合作用及补料发酵有可能进一步提高发酵效价，后期可以继续开展这方面研究。

2.3　摇瓶发酵过程的影响因素考察

除了发酵培养基对产物合成影响非常大外，发酵培养条件对次级代谢产物的影响也是至关重要的。摇瓶转速和装量主要影响菌株生长和产物合成时期所需的溶氧水平，初始 pH 值和培养温度主要影响菌体生长速率和合成所需的内在环境条件，考察发酵周期可以确定最佳的放瓶时机和发酵产物的代谢情况，考察消泡剂的用量主要是为发酵罐放大生产做准备。

因此，分别对发酵周期、接种量、摇瓶装量、摇床转速、发酵温度、培养基原始 pH 值和消泡剂对发酵效价的影响的进行考察。

由图 4 可以看出，最佳发酵周期为 120h 左右；最佳接种量为 5.0%，接种量太小会导致发酵迟滞期延长，影响效价增长，而接种量太大则会导致菌体大量繁殖，培养基中营养物质消耗过快，另外接入太多的种子培养基也会导致发酵培养基成分变化，最终目标代谢产物减少；摇瓶装液量和摇床转速的参数主要体现为菌体对氧的需求量，由数据显示 500mL 摇瓶装液量 100mL、转速 220r/min 时发酵效价最高；发酵温度对菌体生长和产物合成有较大的相关性，温度太低则生长缓慢发酵效价低，温度太高有可能影响发酵代谢途径从而降低目标产物，由数据显示最适的发酵温度为 30℃；发酵初始

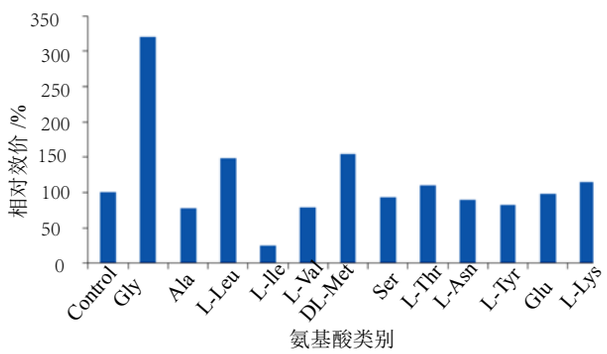


图 3　不同氨基酸对 rakicidin B 发酵产物的影响

Fig. 3　Effect of different amino acids on rakicidin B production

pH 对发酵效价的影响比较大，当 pH 值低于 6.5 时 rakicidin B 的产量急剧下降，可能由于海洋小单孢菌 FIM02523 在低 pH 值的培养基中生长不良，数据显示培养基初始 pH 值为 7.5 时发酵效价最佳。

消泡剂会影响到发酵液氧传递能力，进而影响到菌体的生长。本文采用的 GPE 型聚醚类消泡剂是一种非离子表面活性剂，只含有 C、N、O 和 H 几种元素，有利于菌体生长代谢，一般情况下该消泡剂的用量在 0.03%~0.3% 范围内对发酵影响较小 [10]。数据显示在摇瓶发酵时消泡剂添加量 0.5% 以下对效价影响不明显，其中 0.2% 时发酵效价最高，可以作为后期罐上发酵消泡剂的最适添加量。

综合以上试验结果得出优化后的培养基配方为：可溶性淀粉 4.0%，蔗糖 1.0%，大豆蛋白胨 0.5%，酵母粉 1.0%，甘氨酸 0.1%，NaCl 0.5%，$MgSO_4$ 0.05%，$CaCO_3$ 0.5%；优化后的培养条件为：发酵周期为 120h，接种量 5.0%，500mL 摇瓶装量 100mL，摇床转速 220r/min，发酵温度 30℃，培养基原始 pH 值为 7.5 和消泡剂 0.2%。

将原始发酵工艺和优化后的发酵工艺进行摇瓶发酵实验对比，HPLC 检测发酵液中的 rakicidin B 浓度。结果如图 5~6 所示，优化后 rakicidin B 的峰面积较原始工艺高出约 7.3 倍。

2.4　100L 发酵罐发酵曲线

培养 48h 的摇瓶种子按 1.0% 的接种量接种到 20L 种子罐 (装液量 13L)；在种子罐 pH 先上升再下降后又开始上升至 7.2 左右，约培养 42h 左右镜检菌丝生长良好，菌丝浓度达到 25% 作为移种标准，移种 5%~10% 至 100L 罐发酵罐。发酵过程中随着溶氧参数 DO 变化逐步调整通气和转速，一般通气量控制 0.5~1.2vvm 之间，搅拌转速控制 200~400r/min，以维持发酵罐中 DO 值 20% 以上。

由图 7 发酵曲线可以看出发酵开始后总糖快速消耗，菌丝浓度快速上升在 48~72h 达到顶峰随后缓慢减少，此时目标代谢产物 rakicidin B 的效价增加迅速在 120h 左右达到最高，此时发酵效价与摇瓶最高效价基本一致。

3 结论

本论文对海洋小单孢菌 FIM02523 的摇瓶发酵工艺进行初步研究。首先针对其发酵培养基进行了优化，在利用单因素实验筛选合适的碳氮源种类的基础上，应用正交实验的设计方法，进一步明确了发酵培养基有关成分，确定了各因素的最优势的配方组合。其次从发酵周期、装液量、转速、接种量、消泡剂等方面，

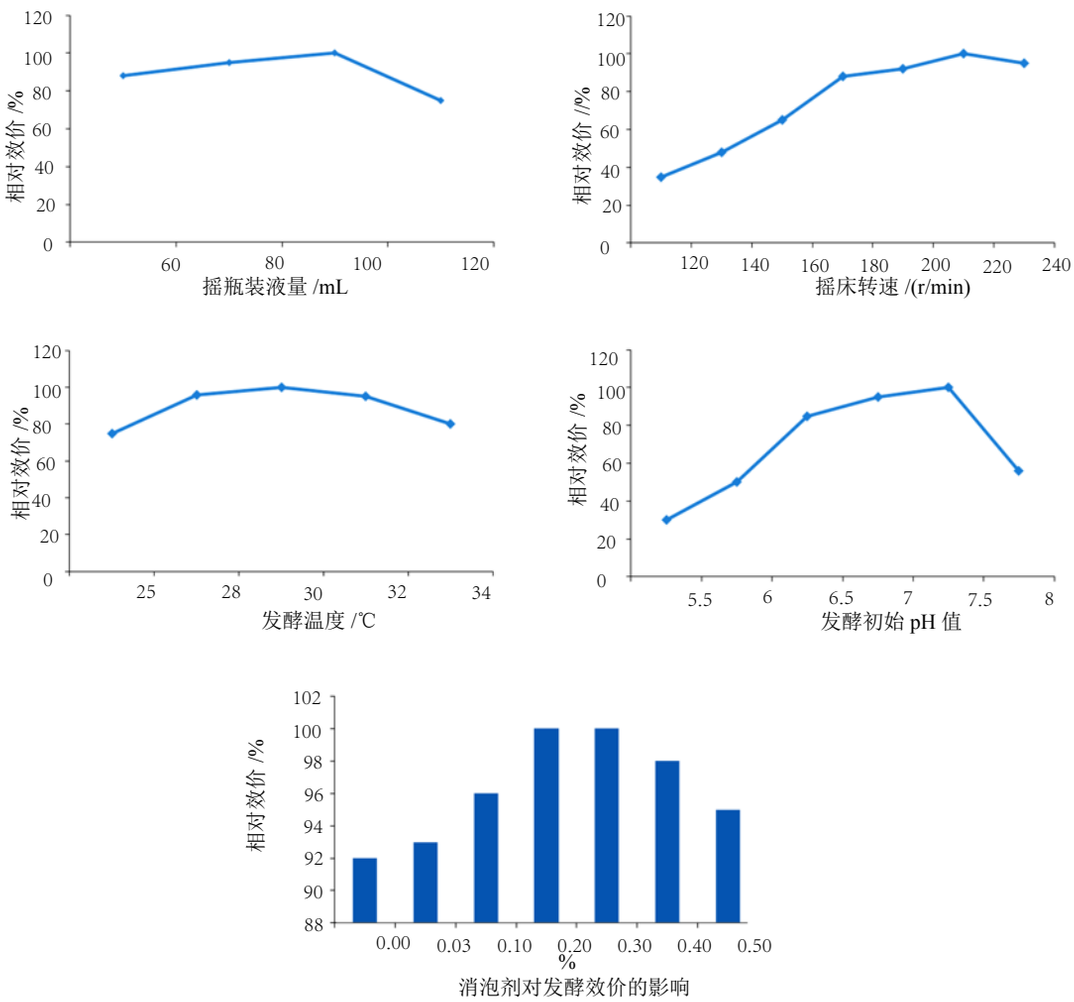


图 4 不同发酵条件对 Rakicidin B 的发酵效价的影响

Fig. 4 Comparison of different fermentation conditions on rakicidin B production

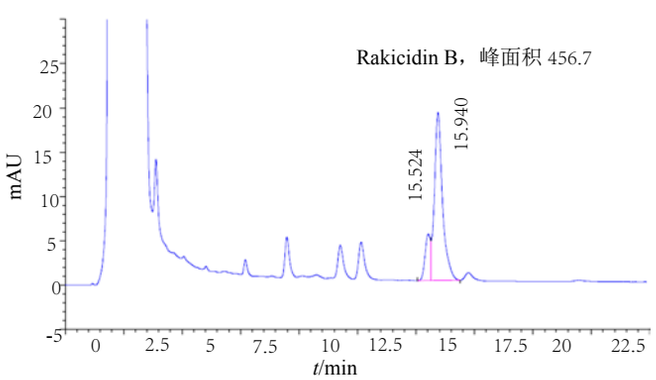


图 5 发酵工艺优化前的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC profiles of Rakicidin produced by FIM02523 cultivated under original conditions

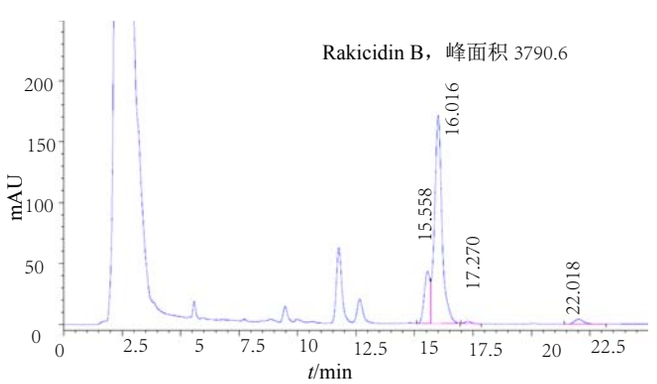


图 6 发酵工艺优化后的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC profiles of Rakicidin produced by FIM02523 cultivated under optimized conditions

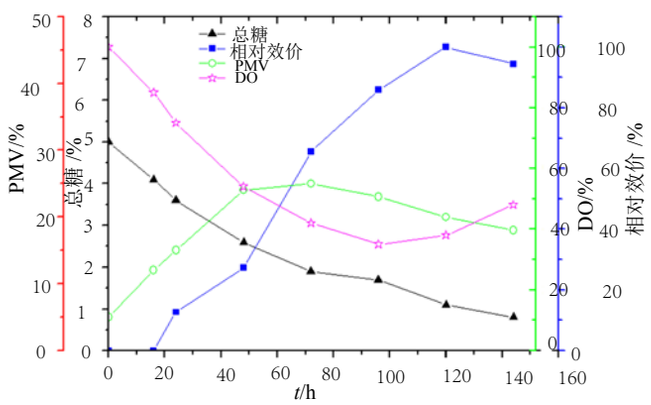


图 7　海洋小单孢菌 FIM02523 发酵曲线

Fig. 7　Fermentation curves of *Micromonospora sp.*FIM02523

对摇瓶的发酵工艺进行了初步优化。

发酵较适配方 (%)：可溶性淀粉 4.0，蔗糖 1.0，大豆蛋白胨 0.5，酵母粉 1.0，甘氨酸 0.1，NaCl 0.5，$MgSO_4$ 0.05，$CaCO_3$ 0.5。发酵工艺优化结果：发酵周期为 120h，500mL 摇瓶装量 100mL，转速 220r/min，接种量为 5.0%，发酵起始 pH 值为 7.5，消泡剂 0.2%。对比优化后的发酵工艺较原始工艺 rakicidin B 的发酵效价提高了约 7.3 倍。以摇瓶工艺为基础在 100L 发酵罐上进行放大试验，在发酵 120h 左右 rakicidin B 发酵效价达到最高与优化后的摇瓶发酵效价基本一致，为以后工业化生产提供基础工艺条件。

参 考 文 献

[1] 江红 , 林如 , 郑卫 , 等 . 海洋青铜小单孢菌 FIM02523 产生的脂肽类化合物 FW523 的分离鉴别和生物学活性 [J]. 中国抗生素杂志 , 2006, 31(5): 267-270.

[2] 江红 , 林如 . 海洋小单孢菌来源的轻快菌素 B FW523-3 的体外抗肿瘤活性 [J]. 中国抗生素杂志 , 2008, 33(9): 531-535.

[3] 林风 , 王传喜 , 江宏磊 , 等 . 海洋小单孢菌产生的抗肿瘤新化合物 rakicidin B1(英文)[J]. 中国抗生素杂志 , 2016, 41(7): 510-515.

[4] 林风 , 陈晓明 , 周剑 , 等 . 海洋小单孢菌产生的缩肽类化合物 rakicidins 抗肿瘤活性研究 [J]. 中国抗生素杂志 , 2016, 41(7): 516-523.

[5] 林风 , 江红 , 连云阳 , 等 . Rakicidins 类似化合物用于抗临床致病厌氧菌的用途 . CN: 105709205A[P].

[6] McBrien K D, Berry R L, Lowe S E, *et a1*. Rakicidins, New cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization[J]. *J Antibiot*, 1995, 48(12): 1446-1452.

[7] Komaki H, Ichikawa N, Hosoyama A, *et a1*. Draft genome sequence of *Micromonospora* sp. DSW705 and distribution of biosynthetic gene clusters for depsipeptides bearing 4-amino-2,4-pentadienoate in actinomycetes[J]. *Stand Genom Sci*, 2016, 11: 84.

[8] 周剑 , 江宏磊 , 赵薇 , 等 . HPLC 测定发酵液中 Rakicidin B 的含量 [J]. 福建分析测试 , 2017, 26(5): 36-40.

[9] 吴国峰 , 李国全 , 马永 . 工业发酵分析 [M]. 北京 : 化学工业出版社 , 2006: 11-12.

[10] 谢举文 . 发酵行业消泡剂的应用 [J]. 辽宁化工 , 2011, 40(1): 96-97.