

文章编号: 1001-8689(2020)11-1121-12

遗传育种与生物合成

培养基优化设计提升多拉菌素生物发酵水平

赵明霞^{1,2} 栗波^{1,2} 蔡子豪³ 薛佳韵³ 王泽建³ 梁剑光^{1,4,*}

(1 常熟理工学院生物与食品工程学院, 常熟 215500; 2 苏州大学医学部药学院, 苏州 215123;

3 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 4 常州大学制药与生命科学学院, 常州 213164)

摘要: 运用响应面法优化了多拉菌素生产菌的发酵培养基。首先通过单因素实验发现正效应因子; 接着采用Plackett-Burman(P-B)设计确定了黄豆饼粉、麦芽糊精和MgSO₄是影响多拉菌素产量的显著因素; 然后利用最陡爬坡试验分别找到3个因素的合理浓度范围; 并进一步利用中心组合设计优化了黄豆饼粉、麦芽糊精和MgSO₄的最佳浓度配比。筛选并优化得到了最适的培养基浓度为黄豆饼粉17.30g/L, 麦芽糊精77.30g/L, MgSO₄ 1.50g/L, 基于此, 效价达到了589.43mg/L, 验证实验结果与模型预测基本吻合, 优化后的培养基工艺能够提升多拉菌素发酵单位20.37%。5L反应罐上发酵过程生理代谢参数变化表明: 优化的培养基能够加促菌体的比生长速率, 维持较高的氧消耗速率和产物合成速率, 大幅度提升了多拉菌素的发酵生产效率。

关键词: 响应面; 多拉菌素; 培养基优化; 发酵

中图分类号: R978.1 文献标志码: A

Improving the biosynthesis of doramectin production by mutant strain *Streptomyces avermitilis* 3D-5 by optimizing fermentation medium

Zhao Ming-xia^{1,2}, Li Bo^{1,2}, Cai Zi-hao³, Xue Jia-yun³, Wang Ze-jian³ and Liang Jian-guang^{1,4}

(1 School of Biological and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500; 2 College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123; 3 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai Institute of Biomanufacturing Technology & Collaborative Innovation Center, Shanghai 200237; 4 College of Pharmaceutical and Life Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164)

Abstract Objective The fermentation medium compositions for doramectin production by mutant strain *Streptomyces avermitilis* 3D-5 was optimized through response surface methodology (RSM). **Methods** Firstly, positive effect factors on doramectin production were found by the one-factor-at-a-time method, and then, soybean cake powder, maltodextrin and MgSO₄ were screened as the significant factors for doramectin biosynthesis with the Plackett-Burman (P-B) design. Furthermore, the steepest ascent path was applied to investigate the optimal range of the medium composition. Finally, the optimal combination ratio of soybean cake powder, maltodextrin and MgSO₄ was determined by the Central composite design (CCD). **Results** Results showed that the doramectin yield rose up to 589.43mg/L, under the achieved compositions of soybean cake powder 17.30g/L, maltodextrin 77.30g/L, and MgSO₄ 1.50g/L. The verification experiment showed the doramectin yield was consistent with the model prediction (589.43mg/L), which was 20.37% higher than that of the original medium condition. **Conclusion** The fermentation process physiological

收稿日期: 2019-12-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2017ZX07402003)

作者简介: 赵明霞, 女, 生于1990年, 在读硕士研究生, 主要研究方向为微生物制药, E-mail: zmx691050370@163.com

*通讯作者, E-mail: liang4523@126.com

parameters obtained for the strain *S. avermitilis* 3D-5 in the 5L bioreactor showed that the specific growth rate was significantly enhanced under the optimized medium, and the higher oxygen uptake rate accompanied with higher specific production rate. The specific dormadetin production rate was markedly enhanced in the optimized medium.

Key words Response surface; Doramectin; Medium optimization; Fermentation

多拉菌素(doramectin)是新一代大环内酯类抗寄生虫药,由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)突变株在含有前体(环己甲酸(cyclohexanec arboxylic acid, CHC))的条件下合成的抗生素^[1]。多拉菌素是阿维菌素的第三代衍生物,具有更好的药动学特性,更广泛的抗虫谱^[2-3]。与阿维菌素相比,多拉菌素引入环己烷结构(图1加粗部分),体内代谢周期延长,可维持较长时间的血药浓度;相关药理研究表明多拉菌素在治疗牛、羊、猪等家畜胃肠道线虫、眼部寄生虫病方面有良好的效果^[4-5]。

多拉菌素作为动物体内外杀虫抗生素,应用市场广泛,需求量大。近年来,研究者通过基因工程技术、原生质体融合、物理化学诱变等方法从菌种源头上选育多拉菌素高产菌株^[6-9]。菌种的产能直接影响多拉菌素产量,但在适宜环境下培养对微生物生长代谢也尤为重要。诸多研究表明培养条件优化能够明显提高微生物发酵水平。杨世红等^[10]通过响应面优化设计将多拉菌素产量提高了1.80倍,多拉菌素效价由36.93 $\mu\text{g/mL}$ 提高至103.54 $\mu\text{g/mL}$ 。扶教龙等^[11]通过紫外诱变结合响应面设计优化设计使得多杀菌素产量提高了54.55%,产量达83.00 mg/L 。薛佳韵等^[12]研究发现在尼莫菌素的生产过程中添加豆油,能明显提高菌体生物量和尼莫克汀产量。适宜的培养环境是菌株发挥最佳生产能力的前体条件,筛选适合菌株生长代谢的培养配方十分必要。

本研究以多拉菌素产生菌3D-5为研究对象,通过单因素设计和P-B设计确定显著因素,然后使用响应面法获得显著因素的最佳浓度配比,接着分别在

500mL摇瓶和5L反应罐上进行验证,并尝试分析了优化培养基条件下菌体的生长代谢特性,以期筛到一种多拉菌素的高产培养基配方,为工业化生产多拉菌素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

多拉菌素产生菌出发株,江苏凌云药业股份有限公司提供,经常压室温等离子体诱变处理筛选得到一株高产菌株3D-5。

1.1.2 试剂

葡萄糖,麦芽糖,麦芽糊精,麸皮,酵母抽提物,黄豆饼粉,棉籽饼粉,蛋白胨,大豆油,碳酸钙,硫酸铵,硫酸镁,磷酸氢二钾,磷酸氢二钠,硝酸铵,氯化钠,硝酸钾,硫酸镁,硫酸锌,硫酸锰,硫酸铜,三氯化铁,氯化钴,钼酸钠,琼脂粉,色谱甲醇,纯化水,20%环己甲酸钠,多拉菌素标品。

1.1.3 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 4.0,麦芽糖1.3,酵母抽提物4.0,硫酸镁0.5,磷酸氢二钾0.5,氯化钠0.5,硝酸钾1.0,琼脂粉15.0。微量元素:硫酸锌2.0,硫酸锰2.0,硫酸铜0.5,三氯化铁6.0,氯化钴0.4。pH7.0,116 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌30min。

种子培养基(g/L):葡萄糖5.0,淀粉20.0,黄豆饼粉10.0,棉籽饼粉10.0,氯化钠1.0,磷酸氢二钾1,碳酸钙2.0。pH7.0,116 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌30min。

发酵培养基(g/L):麦芽糊精50.0,葡萄糖40.0,棉籽饼粉5.0,黄豆饼粉10.0,硫酸铵0.5,磷酸氢二钾1.0,碳酸钙5.0,微量元素(硫酸铜0.02、氯化钴0.02、硫酸锌0.002、硫酸锰0.1)1mL/100mL,钼酸钠0.002。pH7.4,116 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌30min。

1.1.4 仪器设备

5L反应器,中国上海国强生化工程装备有限公司;尾气质谱仪,美国Extrel公司MAX300-LG;高效液相色谱,美国Agilent Technologies Inc. Agilent 1100 series;发酵控制系统,国家化工工程中心NCBbiostar发酵控制系统;ZHWY-3212恒温摇床;SA-

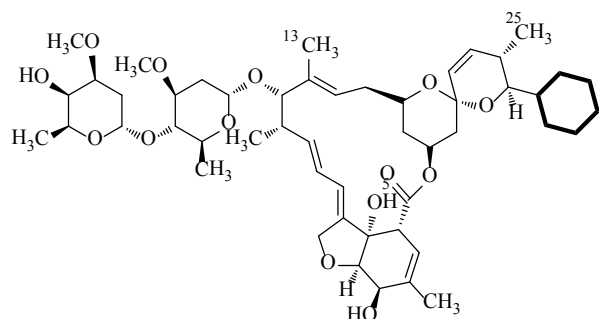


图1 多拉菌素结构式

Fig.1 The structure of doramectin

960-2水平层流洁净工作台; TGL-16A台式高速离心机; YP2001电子天平; FE20 pH计; 高压灭菌锅。

1.2 培养方法

1.2.1 菌悬液制备

将多拉菌素产生菌3D-5接种于斜面培养基, 28℃培养4d, 待菌落成熟时用0.9%氯化钠溶液将菌体从斜面上刮洗下来, 转至装有玻璃珠的250mL三角瓶中, 220r/min下震荡3min以打碎菌丝体, 于无菌保菌管中备用。

1.2.2 种子培养

500mL三角摇瓶装液量为50mL, 8层纱布封口。将1mL菌悬液加到种子培养基, 28℃, 240r/min培养40h, 当离心压缩体积PMV(packed mycelia volume)达20%时, 方可接发酵培养。

1.2.3 发酵培养

500mL三角摇瓶或是5L反应罐进行发酵培养。500mL摇瓶装液量50mL, 使用8层纱布封口, 5L反应器装液量为3L。按8%(V:V)的比例将种子液转接至摇瓶发酵培养基中或反应罐发酵培养基中, 240r/min, 28℃下培养240h(500mL摇瓶和5L反应罐)。

1.3 测试方法

1.3.1 菌浓测定

通过PMV法测定发酵液中菌体浓度。取发酵液10mL, 3000r/min离心10min, 将上清与沉淀分离, 沉淀物体积在10mL体积中所占百分比即为菌体PMV。

将沉淀用去离子水清洗, 重悬, 用已知质量的滤纸抽滤, 然后烘干至恒重, 再次称量滤纸和沉淀物的重量, 沉淀物的重量除以取样体积, 结果即为干重。

1.3.2 pH测定

使用Mettler Toledo F120测定发酵液pH。

1.3.3 总糖测定

发酵液总糖采用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitro-salicylic acid, DNS)法测定^[13]。

1.3.4 多拉菌素含量测定

1mL发酵液与4mL甲醇混合后经超声波处理30min, 将混合物经4000r/min离心10min, 取上清液过滤, 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶填充色谱柱(5μm, 150mm×4.6mm), 流动相: 甲醇:水=90:10(V:V), 流速1mL/min, 柱温: 30℃, 波长: 245nm, 进样量20μL。

1.3.5 碳氮比的计算方法

碳氮比(C:N)是指发酵培养基中碳元素与氮元素的摩尔比, 即 $C:N=n_C/n_N$ 。碳摩尔量是葡萄糖、麦芽糊精(含量91%)中碳元素的总摩尔量。碳源的摩尔量根据摩尔量的定义来计算, 即糖的质量与相对分子质量之比。氮摩尔量是黄豆饼粉、棉籽饼粉、蛋白胨和硫酸铵中氮元素的总摩尔量。氮源的摩尔量也是根据摩尔量的定义得到, 即含氮量与氮的相对原子质量之比。

$n_C=m_1 \times 6/180+m_2 \times 91\% \times 6/162$, 其中 m_1 是葡萄糖的质量, m_2 是麦芽糊精的质量, 6是碳原子个数。

用凯氏定氮法检测复合氮源中蛋白质的含量^[14]。黄豆饼粉检测得到蛋白质含量43.01%±0.10%(氮含量7.53%)、棉籽饼粉检测得到蛋白质含量57.12%±0.15%(氮含量9.14%)。

蛋白质含量的计算公式:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times C \times 0.0140 \times F}{m \times \frac{10}{100}} \times 100\%$$

式中: X: 样品中蛋白质的含量, %; V_1 : 样品消耗盐酸标准滴定液的体积, mL; V_0 : 试剂空白消耗盐酸标准滴定液的体积, mL; C: 盐酸标准滴定液的浓度, mol/L; m: 样品的质量, g; F: 氮换算为蛋白质的系数(即蛋白质系数), 即一份氮素相当于蛋白质的份数。一般食物为6.25, 大豆及其制品为5.71。0.0140~1.00mL 1.000mol/L盐酸标准溶液相当于氮的克数, g。

蛋白胨含氮量为12.7%, 所以氮源中氮元素摩尔量计算公式为:

$$n_N=(m_3 \times 7.53\%)/14+(m_4 \times 9.14\%)/14+(m_5 \times 12.7\%)/14+m_6 \times 2/132.4$$

其中, m_3 是黄豆饼粉的质量, m_4 是棉籽饼粉的质量, m_5 是蛋白胨的质量, m_6 是硫酸铵的质量。

1.4 实验方法

1.4.1 单因素试验

本次单因素试验分别对速效氮源: 蛋白胨、酵母抽提物; 迟效氮源: 麸皮; 速效碳源: 豆油; 无机盐: 硝酸铵以及磷酸氢二钠进行研究。

1.4.2 Plackett-Burman设计

该试验设计是一种以不完全平衡块(balanced incomplete blocks)为原理的部分因子设计法^[15]。P-B设计12次实验, 理论上可以安排11个因子, 但实际

上需要至少1个空白项估算误差^[16]。根据单因素试验的结果,结合原培养基成分,从中选取8个因素进行P-B试验,留出3个空白项用于软件估算系统误差。每个因素设定两个水平,表示为1和-1,各个浓度设计见表1。

1.4.3 响应面设计

基于P-B试验设计和最陡爬坡试验的结果,采用中心组合设计来分析3个因素之间的关系,得到最优的培养基配方配比。以P-B试验结果得到的3个显著因子为设计因素,以最陡爬坡试验得到的浓度作为中心点,每个因素设有-1.68、-1、0、+1、+1.68 5个水平(表2)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 豆油对多拉菌素产生菌的影响

通过在不同时间添加不同浓度豆油考察其对多拉菌素产生菌的影响情况。结果如图2b所示,在0h和36h分别添加豆油,随着豆油浓度的增加,菌浓也增加。与对照相比0h添加1.0%条件下和36h添加1.0%条件下PMV提高最为明显,分别提高了37.25%和28.83%。豆油对多拉菌素积累量的影响却与对菌浓的影响相反由图2a可以看出,0h和36h两个添加时间下随着豆油含量的增加(从0.1%到1.0%),多拉菌素积累量降低,这两个不同补加时机(0h和36h)中豆油添加量最低(0.1%)时效价最高,较对照分别提高了10.73%和15.40%。推测豆油浓度过高刺激菌体持续生长,菌体一直处在初级代谢,所以多拉菌素合成的次级代谢阶段收到抑制,多拉菌素合成量较低。

表1 Plackett-Burman设计培养组分和水平
Tab. 1 The culture components and levels in Plackett-Burman design

| 因素 | 代码 | 水平 | |
|---------|----------|-------|------|
| | | 低(-1) | 高(1) |
| 蛋白胨/% | X_1 | 0.3 | 0.5 |
| 酵母抽提物/% | X_2 | 0.2 | 0.6 |
| 棉籽饼粉/% | X_3 | 0.3 | 0.7 |
| 黄豆饼粉/% | X_4 | 1.2 | 2.3 |
| 豆油/% | X_5 | 0.06 | 0.14 |
| 麦芽糊精/% | X_6 | 6.0 | 10.0 |
| 硫酸镁/% | X_7 | 0.3 | 0.6 |
| 微量元素/% | X_8 | 0.7 | 1.3 |
| 空白项 | X_9 | -1 | 1 |
| 空白项 | X_{10} | -1 | 1 |
| 空白项 | X_{11} | -1 | 1 |

注:微量元素见1.1.3培养基;空白项:没有安排考察因素

2.1.2 速效氮源对多拉菌素产生菌的影响

在初始培养中分别添加不同浓度的酵母抽提物、蛋白胨,考察两种速效氮源对菌浓和菌体产素的影响。结果如图2b和2c所示,与对照相比,酵母抽提物0.4%的添加量下菌浓较对照提高了47.19%,远高于拉菌素积累量的3.55%的提升幅度;而添加量为0.8%的酵母抽提物对菌浓和多拉菌素的影响不明显。蛋白胨组,0.3%的添加量下菌浓较对照提高了28.08%,多拉菌素积累量仅提高了9.28%,而0.5%的添加量下菌浓较对照提高了23.59%,但多拉菌素积累量没有明显提高。添加量较高(0.8%)的酵母抽提物与添加量较高(0.5%)的蛋白胨均没能提高多拉菌素积累量,与0.8%添加量的酵母抽提物不同的是0.5%添加量的蛋白胨可以促进菌体生长,提高菌浓。

2.1.3 麸皮、磷酸氢二钠对多拉菌产生菌的影响

在初始培养基中分别添加不同浓度的麸皮、磷酸氢二钠,探究其对菌体生长和产素的影响。结果如图2b和2c所示,其中麸皮在0.3%和0.5%两个添加量下对菌体的生长和产素均没有明显的影响,麸皮属于粗纤维类营养物质还含有一些维生素,这可能与菌株对麸皮的水解利用度较低有关。磷酸氢二钠按0.2%和0.4%的量添加能促进菌体生长,与对照相比菌浓分别提高了39.30%和42.67%,但是对多拉菌素积累量的提高效果不明显,原培养基中含有磷酸氢二钾,磷酸盐浓度过高,抑制了菌体进入次级代谢,与文献中说的磷酸盐受限时开始合成产物的说法相一致^[17]。

单因素实验结果表明,蛋白胨、酵母抽提物、豆油能够明显影响菌体生长和多拉菌素的合成。但能够促进菌体生长提高菌浓的碳源、氮源或磷酸盐并不一定能够同时提高菌体的产素能力,如:0h添加0.5%和1.0%的豆油,0.4%的酵母抽提物,0.2%和0.4%的磷酸氢二钠。推测该结果可能与选取的浓度范围有关,在后续的P-B实验中进行了浓度调整。该结论及实验设计思路可能会对该菌株以及其他菌株的培养条件优化等相关研究有一定参考作

表2 Central-Composite因素水平设计
Tab. 2 The factors and levels in Central-Composite design

| 因素 | 水平 | | | | |
|--------|-------|------|-----|------|-------|
| | -1.68 | -1 | 0 | +1 | +1.68 |
| 黄豆饼粉/% | 1.29 | 1.7 | 2.3 | 2.9 | 3.31 |
| 麦芽糊精/% | 4.64 | 6.0 | 8.0 | 10.0 | 11.36 |
| 硫酸镁/% | 0.12 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.28 |

用。另外，硝酸铵实验组 $\text{pH}(8.97 \pm 0.2)$ 过高，菌浓 $(20.11\% \pm 3.5\%)$ 低于对照组 $(29.67\% \pm 2.8\%)$ ，没有检测到多拉菌素的合成。

2.2 Plackett-Burman设计

以单位体积发酵液中多拉菌素产量为评价指标。P-B试验结果如表3所示，使用Design-Expert软件对数据进行分析，得到P-B试验设计方差分析结果(表4)，该模型 $P=0.0013 < 0.05$ ，表示该模型显著。实验结果表明，参与P-B实验设计的8个因子(X_1 : 蛋白胨, X_2 : 酵母抽提物, X_3 : 棉籽饼粉, X_4 : 黄豆饼粉, X_5 : 豆油, X_6 : 麦芽糊精, X_7 : 硫酸镁, X_8 : 微量元素)不是每一个都有显著影响，在进行分析时将最不显著的 X_2 : 酵母抽提物, X_3 : 棉籽饼粉和 X_5 : 豆油合并进空白项，以提高空白项的自由度，提高分析效率。 X_1 : 蛋白胨、 X_4 : 黄豆饼粉、 X_6 : 麦芽糊精、 X_7 : 硫酸镁、 X_8 : 微量元素为显著因素，因素影响排序：黄豆饼粉>麦芽糊精>硫酸镁>微量元素>蛋白胨。选择黄豆饼粉(X_4)、麦芽糊精(X_6)、硫酸镁(X_7)3个因子进行最陡爬坡试验。

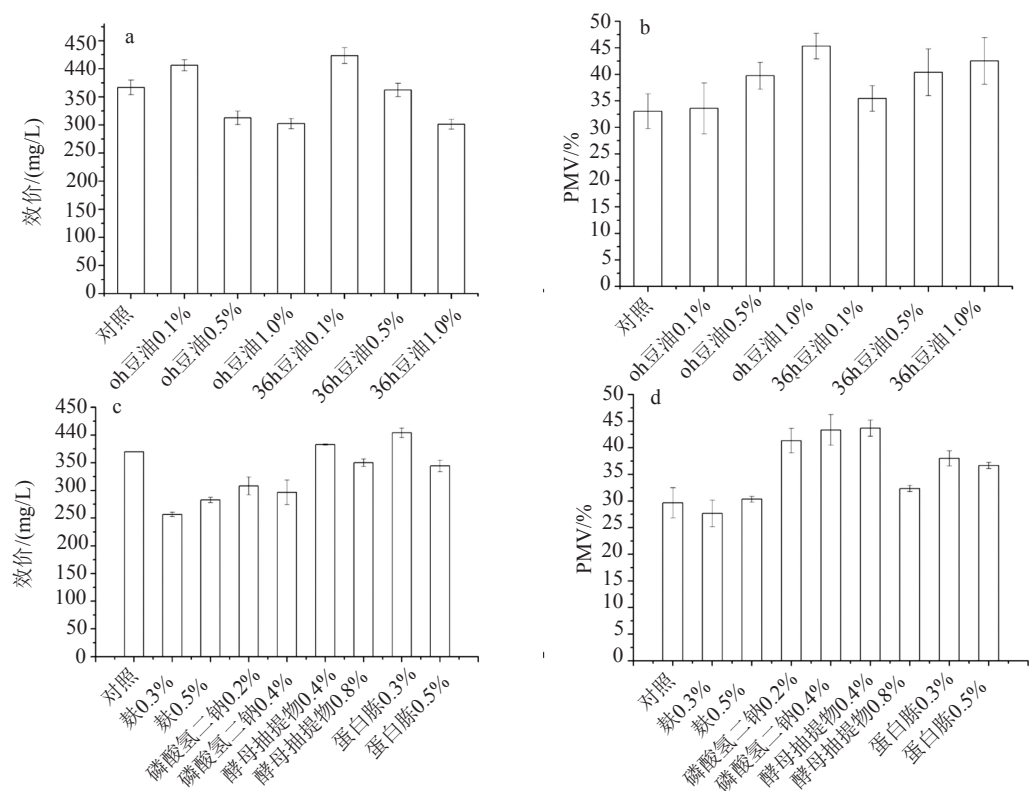
2.3 最陡爬坡试验

在P-B试验的基础上对3个显著因素做浓度爬坡，找出最佳的浓度组合。试验结果：黄豆饼粉2.3g/100mL，麦芽糊精8.0g/100mL，硫酸镁0.2g/100mL(表5)时，多拉菌素的积累量最高，选取该组作为中心组合试验的中心点。

2.4 Central-Composite设计

根据中心组合设计实验，用二次项统计计算拟合得到线性回归方程和各显著因子两两之间的三维响应面。根据最陡爬坡试验选定的中心点，进行3因素5水平的响应面试验设计，试验设计及结果见表6。建立以多拉菌素浓度为目标函数的二次回归方程，并对得到的方程做方差分析和显著性检验(表7)。

使用Design Expert 8.0软件进行数据分析，得到三元二次回归方程： $Y=529.29-142.09A+119.95B-22.78C+39.49AB+2.12AC+7.44BC-79.87A^2-84.93B^2-9.69C^2$ 。该方程的决定系 $R^2=0.9706$ ，即信任度为97.06%，表明模型能说明97.06%的多拉菌素积累量的变化，线性拟合程度良好。模型的ANOVA结果



a: 豆油对菌体产素的影响; b: 豆油对菌体生长的影响; c: 麸皮、磷酸氢二钠、酵母抽提物、蛋白胨对菌体产素的影响; d: 麸皮、磷酸氢二钠、酵母抽提物、蛋白胨对菌体生长的影响

图2 单因素实验

Fig. 2 Single factor experiments

表3 Plachett-Burman设计实验结果
Tab. 3 The experiment results in Plackett-Burman design

| 运行 | 变 量 水 平 | | | | | | | | | | 效价/(mg/L) | |
|----|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-----------|----------|
| | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | X_5 | X_6 | X_7 | X_8 | X_9 | X_{10} | | X_{11} |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 334.99 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 280.51 |
| 3 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 385.28 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 404.00 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 393.52 |
| 6 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 410.59 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 81.44 |
| 8 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 290.15 |
| 9 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 394.64 |
| 10 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 47.29 |
| 11 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 407.97 |
| 12 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 12.06 |
| 13 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 463.10 |

注: X_1 蛋白胨; X_2 酵母抽提物; X_3 棉籽饼粉; X_4 黄豆饼粉; X_5 豆油; X_6 麦芽糊精 X_7 $MgSO_4$; X_8 微量元素; X_9 空白项; X_{10} 空白项; X_{11} 空白项

表4 Plachett-Burman设计各因数效应分析
Tab. 4 The regression results for the Plackett-Burman design

| 因素 | 均方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | Prob> F | 显著性 | 重要性排序 |
|--------|----------|-----|----------|-------|-----------|-----|-------|
| 模型 | 279871.3 | 5 | 55955.8 | 18.94 | 0.0013 | 显著 | - |
| A-蛋白胨 | 27785.6 | 1 | 27785.6 | 9.40 | 0.0220 | | 5 |
| D-黄豆饼粉 | 102221.6 | 1 | 102221.6 | 34.60 | 0.0011 | | 1 |
| F-麦芽糊精 | 85028.1 | 1 | 85028.1 | 28.78 | 0.0017 | | 2 |
| G-硫酸镁 | 34550.4 | 1 | 34550.4 | 11.69 | 0.0141 | | 3 |
| H-微量元素 | 30193.3 | 1 | 30193.3 | 10.22 | 0.0187 | | 4 |

表5 最陡爬坡试验设计及结果
Tab. 5 Design and results in steepest ascent path

| 实验号 | 黄豆饼粉/% | 麦芽糊精/% | 硫酸镁/% | 效价/(mg/L) |
|-----|--------|--------|-------|-----------|
| 1 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 505.40 |
| 2 | 2.1 | 9.2 | 0.35 | 474.70 |
| 3 | 1.9 | 10.4 | 0.65 | 337.59 |
| 4 | 1.7 | 11.6 | 0.8 | 367.42 |
| 5 | 1.5 | 12.8 | 1.1 | 357.03 |
| 6 | 1.3 | 8.6 | 1.25 | 85.48 |
| 7 | 1.1 | 9.8 | 0.5 | 233.84 |
| 8 | 0.9 | 11.0 | 0.95 | 131.69 |
| 9 | 0.7 | 12.2 | 1.4 | 0 |
| 10 | 0.5 | 13.4 | 1.5 | 0 |

如表7所示, $P<0.0001$, 说明该模型十分显著而有效。其中黄豆饼粉和麦芽糊精在模型中最为显著。

图3分别表示了黄豆饼粉和麦芽糊精、黄豆饼粉

和硫酸镁、麦芽糊精和硫酸镁的等高线图和3D图, 对得到的二次方程进行偏导微分处理得到以下系数矩阵方程:

$$\begin{pmatrix} -15.974 & 39.49 & 2.12 \\ 39.49 & -169.86 & 7.44 \\ 2.12 & 7.44 & -19.38 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 142.09 \\ -119.95 \\ 22.78 \end{pmatrix}$$

求解得到黄豆饼粉、麦芽糊精和硫酸镁的最优化浓度分别为: 17.30, 77.30和1.50g/L。根据得到的最优化浓度配比进行验证3次平行, 500mL摇瓶结果为(584.91±19.85)mg/L, 与预测值(589.43mg/L)基本一致, 进一步验证了优化结果模型的可行性。

2.5 碳氮比与菌体生长代谢的关联

碳源和氮源是菌体生长的营养物质, 同时碳源也是多拉菌素合成的原料。培养基中碳源氮源的含量直接影响菌体的生长情况进而影响多拉菌素的合

表6 CCD响应面设计及结果

Tab. 6 The design and results of the central composite experiment

| 分组 | 黄豆饼粉/% | 麦芽糊精/% | 硫酸镁/% | 效价/(mg/L) |
|----|--------|--------|-------|-----------|
| | A | B | C | Y |
| 1 | 1.7 | 6.0 | 0.15 | 512.70 |
| 2 | 2.9 | 6.0 | 0.15 | 67.10 |
| 3 | 1.7 | 10.0 | 0.15 | 569.25 |
| 4 | 2.9 | 10.0 | 0.15 | 375.40 |
| 5 | 1.7 | 6.0 | 0.25 | 386.95 |
| 6 | 2.9 | 6.0 | 0.25 | 43.62 |
| 7 | 1.7 | 10.0 | 0.25 | 567.07 |
| 8 | 2.9 | 10.0 | 0.25 | 287.89 |
| 9 | 1.29 | 8.0 | 0.2 | 487.17 |
| 10 | 3.31 | 8.0 | 0.2 | 83.74 |
| 11 | 2.3 | 4.64 | 0.2 | 18.74 |
| 12 | 2.3 | 11.36 | 0.2 | 523.52 |
| 13 | 2.3 | 8.0 | 0.12 | 505.44 |
| 14 | 2.3 | 8.0 | 0.28 | 462.53 |
| 15 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 545.17 |
| 16 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 524.29 |
| 17 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 523.87 |
| 18 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 550.87 |
| 19 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 511.57 |
| 20 | 2.3 | 8.0 | 0.2 | 522.99 |

表7 CCD试验方差分析

Tab. 7 The variance analysis of central-composite design

| 来源 | 平方和 | 均方 | F值 | Prob > F | 显著性 |
|----------------|----------|----------|--------|----------|-----|
| 模型 | 6.85E+05 | 76096.01 | 36.67 | < 0.0001 | 显著 |
| A(黄豆饼粉) | 2.76E+05 | 2.76E+05 | 132.86 | < 0.0001 | |
| B(麦芽糊精) | 1.97E+05 | 1.97E+05 | 94.68 | < 0.0001 | |
| C(硫酸镁) | 7084.91 | 7084.91 | 3.41 | 0.0944 | |
| AB | 12473.20 | 12473.20 | 6.01 | 0.0342 | |
| AC | 35.86 | 35.86 | 0.017 | 0.898 | |
| BC | 443.14 | 443.14 | 0.21 | 0.6539 | |
| A ² | 99568.29 | 99568.29 | 47.98 | < 0.0001 | |
| B ² | 1.12E+05 | 1.12E+05 | 53.99 | < 0.0001 | |
| C ² | 2408.87 | 2408.87 | 1.16 | 0.3066 | |
| 残差 | 20752.2 | 20752.2 | | | |
| Lack of Fit | 19627.64 | 3925.53 | 17.45 | 0.0035 | 显著 |
| Pure Error | 1124.56 | 224.91 | | | |
| Cor Total | 7.06E+05 | | | | |

R²= 0.9706 , Adj R²=0.9441

成。因此，培养基中碳源氮源的恰当配比对多拉菌素产生菌的生长和产素至关重要。

通过分析P-B试验，最陡爬坡试验以及中心响应面试验的结果，总结发现：C:N在1.0~2.0范围时，发酵液放瓶时pH在6.8~7.2之间，菌体PMV在

32%~44%，效价在300~600mg/L。当C:N在0.5~1.0时，比值过低，培养基中碳源含量低氮源含量高，菌体快速生长期将氮源用作碳源，氮源中氨基释放，pH升高，pH过高会抑制菌体生长，所以菌体PMV减小，多拉菌素合成减少。当C:N在2.0~3.5时，比值偏高，此时培养基中氮源含量低，不能维持菌体生长的氮量，所以菌体PMV低，没有充足的氮源，菌体会死亡，导致pH回升，效价也不高(表8)。

2.6 优化培养基组分随发酵过程代谢参数变化的影响

优化后培养基首先在500mL摇瓶上进行验证，为了为进一步分析优化培养基对菌体生长和合成代谢的影响，在5L反应罐系统中进行了全过程动态数据采集，并结合离线参数：菌浓、多拉菌素产量以及残糖和在线参数：溶氧(dissolved oxygen, DO)、氧摄取率(oxygen uptake rate, OUR)、二氧化碳释放率(carbon dioxide escape rate, CER)、pH等分析优化培养基对生产菌代谢的影响。

2.6.1 摇瓶结果

500mL三角摇瓶实验重复3次，验证结果如表9所示，优化培养基摇瓶发酵验证多拉菌素积累量(584.91±19.85)mg/L，与模型预测值接近。优化培养基与原培养相比菌浓由35%提高至38%，多拉菌素合成由485.91mg/L提高到584.91mg/L。单位菌体效价提高了10.89%，效价提高20.37%(表9)。分析发现优化后培养基中迟效碳源含量增加，氮源在原有量增加的基础上新增了速效氮源，多拉菌素合成时所需的碳源足够，多拉菌素积累量得到提高。

2.6.2 优化培养基对生物量的影响

生物量方面，由图4可以看出发酵过程中对照组和优化组的菌浓变化趋势基本一致。菌体生长期在0~48h(对照组)或0~72h(优化组)，然后进入稳定期，随着菌浓的下降菌体进入次级代谢合成期，发酵中期菌浓会有小幅度回升，最后趋于稳定。对比发现，在初级代谢阶段优化组菌体生长迅速，生长期比对照组缩短了24h，生物量较对照组稍有增加(图4a)。比生长速率分别能达到0.55/h和0.35/h。进入产物合成阶段，优化组和对对照组菌浓均能维持较高的水平(38.50%左右)。表明优化培养基条件下菌体在生长阶段能够快速繁殖菌体，在次级代谢阶段维持了较高的菌体浓度。

另一方面，糖耗情况(图5a和b)显示在菌体生长阶段(0~48h)培养基优化组菌体对糖的消耗速率达

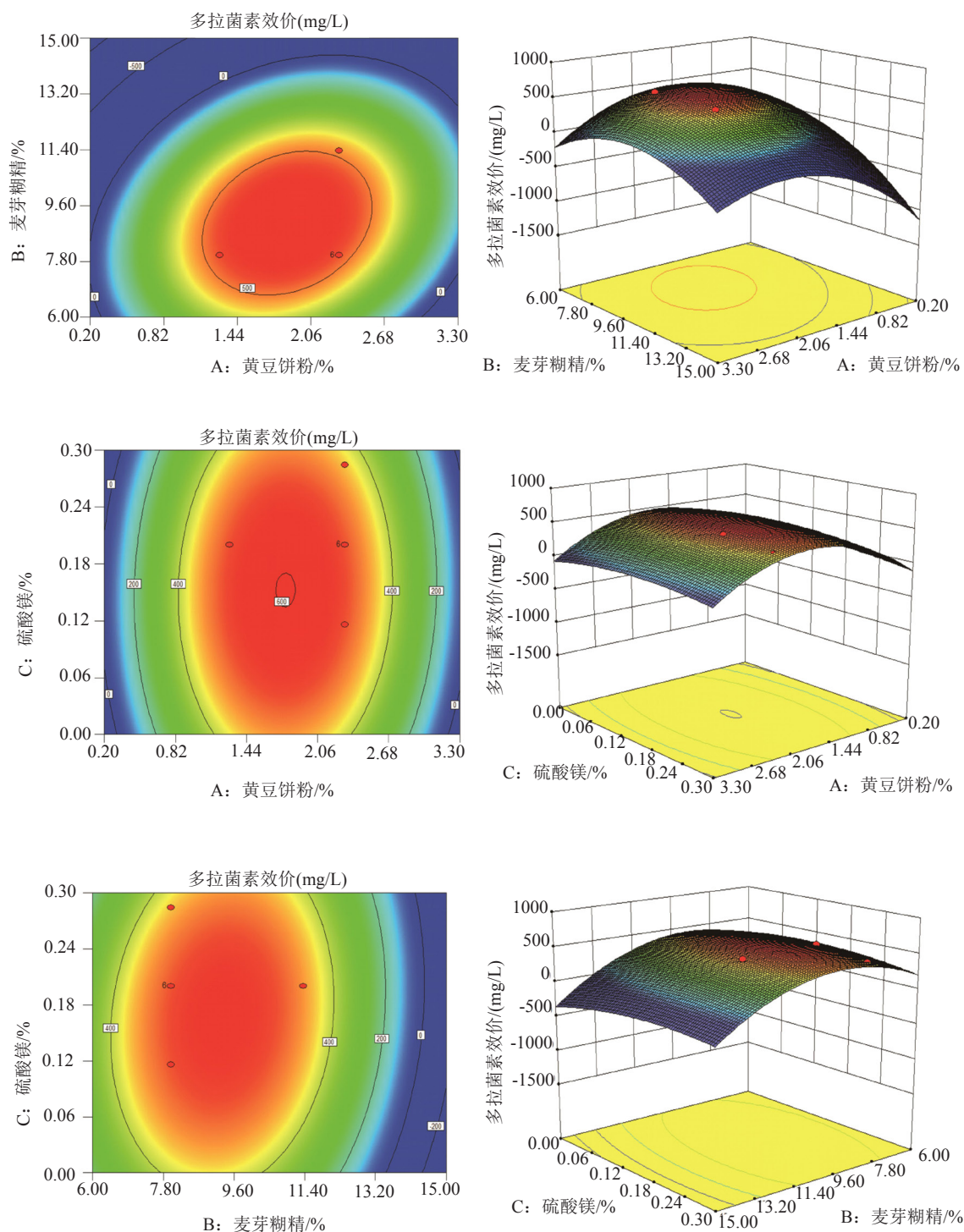


图3 黄豆饼粉、麦芽糊精和硫酸镁含量交互作用对多拉菌素合成影响的响应面和等高线
Fig. 3 Response surface and contour line of the interaction of soybean cake powder, maltodextrin and magnesium sulfate on the synthesis of doramectin

0.57g/(L·h)高于对照组[0.25g/(L·h)], 并且培养基优化组残糖含量明显低于对照组。以上均能够说明优化后培养基能够明显提高菌体初级代谢活性, 并且有利于菌体生长和菌浓维持。

2.6.3 优化培养基对多拉菌素合成的影响

产物合成方面, 与对照组相比, 培养基优化组放罐时多拉菌素效价为671.64mg/L(图6a和b), 相对于对照组(509.32mg/L)提高了31.87%。发酵过程中优

表8 实验中碳氮比与pH、PMV以及效价之间的关系

Tab. 8 Relationship between carbon to nitrogen ratio and pH, PMV and potency in the experiment

| C:N | pH | PMV/% | 效价(mg/L) |
|---------|-----------|-------|----------|
| 0.5~1.0 | 8.50~9.00 | 20~35 | ≤100 |
| 1.0~2.0 | 6.80~7.20 | 32~44 | 300~600 |
| 2.0~3.5 | 8.00~8.50 | 18~20 | 0~300 |

表9 培养基优化前后参数对比

Tab. 9 Comparison of parameters before and after medium optimization

| 培养基 | PMV/% | 多拉菌素(mg/L) | 单位菌体效价(mg/L) | 百分比/% |
|-------|---------|--------------|--------------|--------|
| 原始培养基 | 35±1.41 | 485.91±14.64 | 13.88 | 100 |
| 优化培养基 | 38±1.20 | 584.91±19.85 | 15.39 | 120.37 |

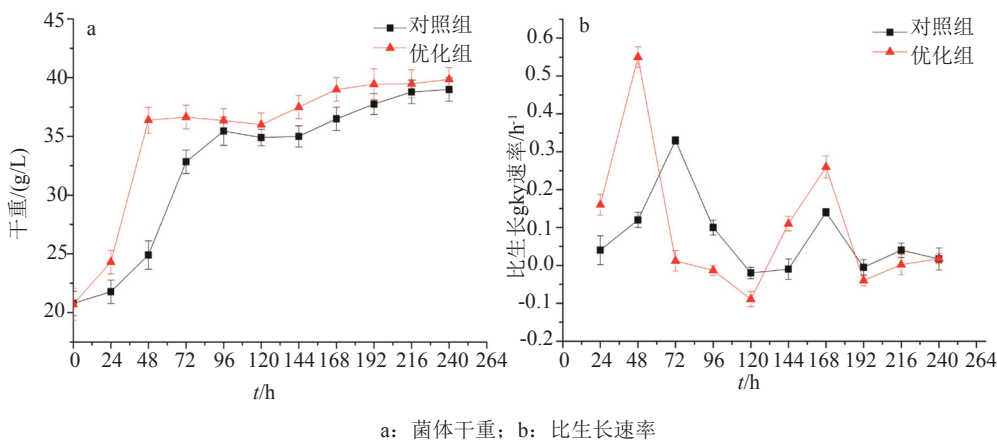


图4 5L反应罐中培养基优化前后菌体生长相关参数变化

Fig. 4 Effects of the optimized medium on the growth of strain 3D-5 during the 5L fermentation process

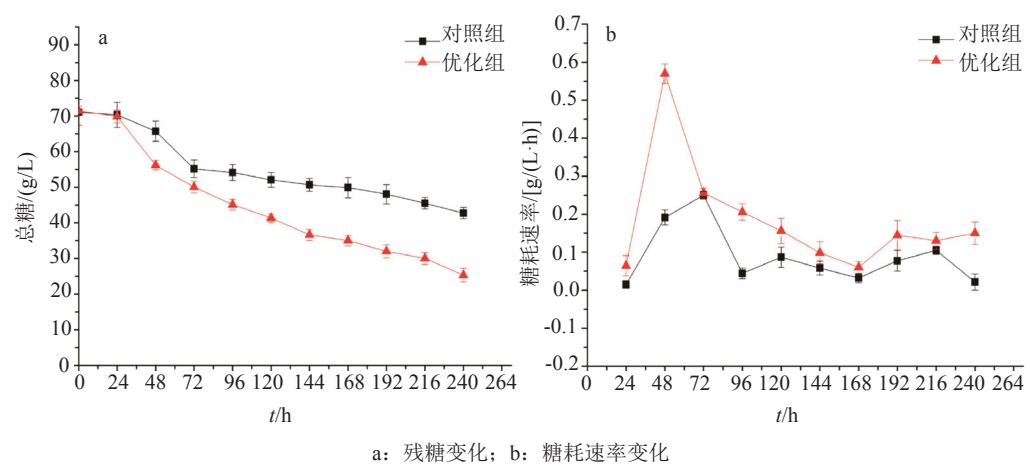


图5 5L反应罐中培养基优化前后总糖变化

Fig. 5 Effects of the optimized medium on the sugar consumption during the 5L fermentation process

化组的最大比合成速率为7.98mg/(L·h)相比于对照组5.46mg/(L·h)提高了46.15%，此外，优化组比产率明显高于比对照组。效价结果表明优化后培养基能有效维持次级代谢时期的菌体活性，有利于多拉菌素合成。

2.6.4 优化培养基对细胞呼吸代谢的影响

为了更全面的了解优化培养基对菌体生长代谢的影响，除以上离线参数外，下面将对多拉菌素合成相关的在线参数进行分析。实验过程中通气量、

转速、罐压均保持一致，在线采集的DO参数变化曲线(图7a)中两组的溶氧变化规律一致，优化组溶氧明显低于对照组，所以可以判断出优化组对氧的需求量大于对照组，进一步说明优化组菌体生长代谢状态优于对照组。

此外，OUR(图7b)在线计算参数变化曲线可以直接反应细胞的代谢活性，优化组和对照组的OUR走势基本一致。初级代谢阶段，优化组OUR最大值为49.52mmol/(L·h)，比对照组[20.17mmol/(L·h)]提高了

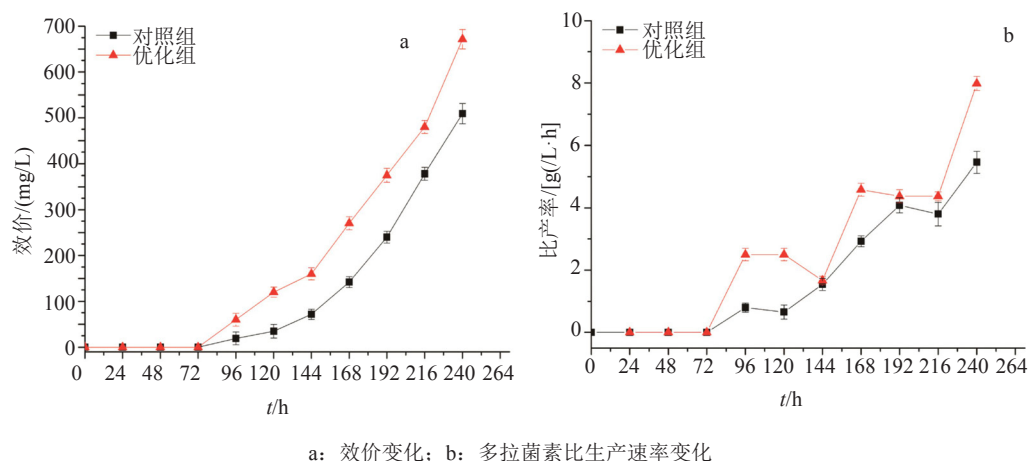


图6 5L反应罐中培养基优化前后多拉菌素合成变化

Fig. 6 Effects of the optimized medium on the doramectin production during the 5L fermentation process

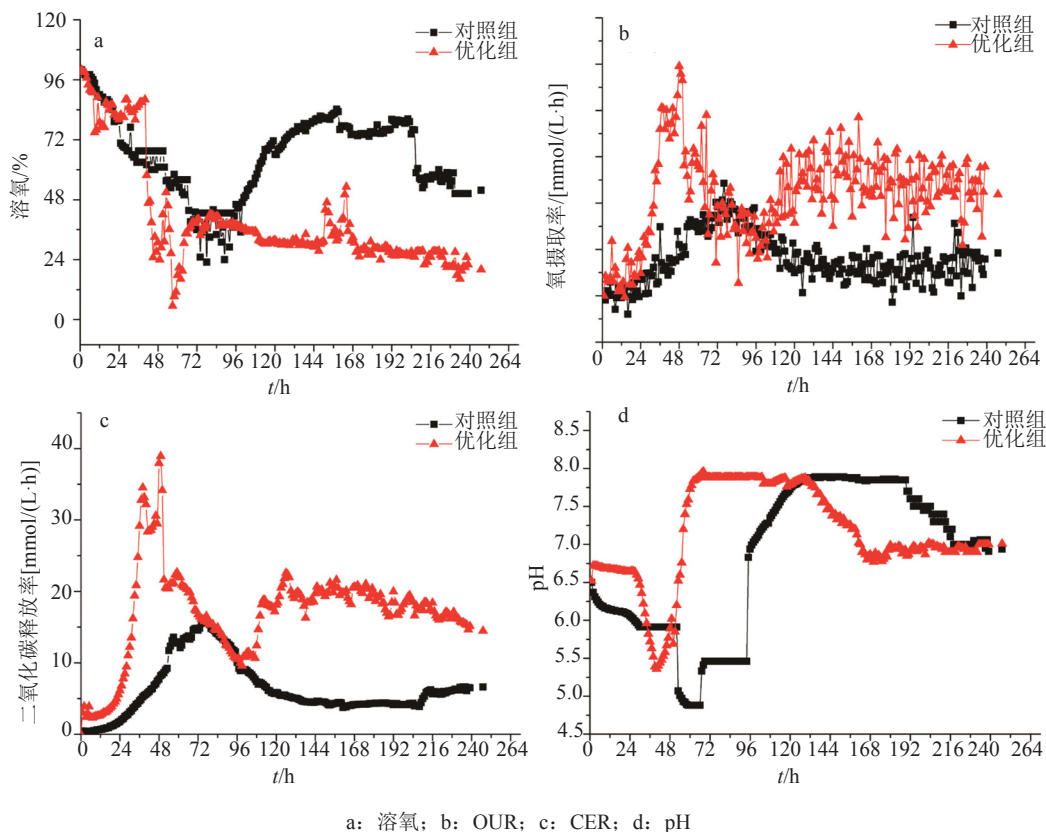


图7 5L反应罐中培养基优化前后多拉菌素合成相关的代谢参数变化

Fig. 7 Effects of the optimized medium on physiological parameters during 5L fermentation process

145.51%，说明优化培养基能够显著提高菌体的初级代谢活力，促进菌体生长。120~240h阶段，优化组的OUR能维持在26.49mmol/(L·h)左右，而对照组OUR仅维持在9.72mmol/(L·h)左右，由此可见，优化培养基可以较好的维持菌体活性，以利于后期产物的合成。

CER(图7c)在线计算参数的过程曲线是表征菌

体代谢活力的另一个重要参数。与OUR发酵过程变化曲线图类似，优化组和对照组的CER曲线变化比较一致。菌体生长期，优化组的CER明显高于对照组，而且在发酵后期仍处在较高的水平，更加充分地表明优化组菌体的代谢活性高于对照组，且菌体活性在发酵后期仍能维持在较高的水平。结合生长

速率变化(图4a和b)和残糖变化(图5a和b),印证了优化培养基条件下菌体代谢活性始终优于对照组,次级代谢阶段仍能维持较高的水平,有利于维持多拉菌素产物的合成。

另一方面,在线实时采集参数pH变化曲线(图7d)可以反应菌体代谢和生长的情况。优化组与对照组的发酵过程pH曲线的变化趋势基本相同。初级代谢阶段,菌体生长需要大量代谢糖,糖被利用后会产酸,所以pH下降。此后,菌体进入次级代谢阶段,糖耗减弱,pH回升。优化组pH最低降至5.36,对照组pH最低降至4.88,两组pH均由最低点急速回升,最后在外部条件的调控下pH稳定在7.00。可以明显发现的是,优化组pH开始下降的时间在24h左右,而对照组pH开始下降的时间在54h左右比优化组滞后30 h,再次印证优化组菌体生长延滞期短。

3 结论

本文通过统计学试验设计方法优化了多拉菌素产生菌培养基成分,结果如下:

(1)得到的优化培养基组成为(g/L):葡萄糖40.0,麦芽糊精77.3,棉籽饼粉5.0,黄豆饼粉17.3,蛋白胨5.0,硫酸镁1.5,硫酸铵0.5,磷酸氢二钾1.0,碳酸钙5.0,微量元素(硫酸铜0.02,氯化钴0.02,硫酸锌0.002,硫酸锰0.1)0.7mL/100mL,钼酸钠0.002。在此条件下500mL摇瓶中多拉菌素产量为 (584.91 ± 19.85) mg/L,与预测值吻合。本研究在原始培养基的基础上加入速效氮源(蛋白胨),并增大了迟效碳源(麦芽糊精)、氮源(黄豆饼粉)的量,既促进菌体快速生长,又能供给发酵后期菌体的能量需求,多拉菌素产量提高20.37%。

(2)在5L反应罐上,完成了优化培养基与初始培养基的过程参数采集;结合离线参数和在线实时采集参数,通过分析表明:生物量方面,优化培养基组菌体能够快速生长,最高菌浓达39.87g/L,且对数生长期由72h缩短至24h;糖耗方面,优化培养基组糖耗速率始终高于对照组,菌体生长时期优化组的糖耗速率提高了128.00%;此外发酵过程中,优化培养基组多拉菌素比合成速率高于对照组,放罐时效价达到671.64mg/L,比优化前培养基工艺提高了31.87%,说明优化后的培养基能够提高多拉菌素产量。另一方面,在线分析的细胞呼吸相关的参数表明,整个发酵过程中优化组保持较高的氧摄取率,优化后培养基能够增强菌体初级代谢,持续供给能

量维持较高的菌体活性。

综上所述,优化后培养基能够促进菌体生长,提高菌体活性,增进产物合成。目前,多拉菌素因其优良的抗虫特性、具有肿瘤多药耐药逆转剂特性被畜牧业、养殖业和生物医药等领域广泛关注^[18-20]。而国内外研究者对多拉菌素的研究主要在药理、毒理、动物试验等方面^[18, 21-23],目前为止,有关多拉菌素培养条件的研究报道相对较少,因此本文为多拉菌素工业化生产奠定了基础,同时也为其他菌种培养优化提供一定的参考价值。

参考文献

- [1] Dutton C J, Gibson S P, Goudie A C, *et al.* Novel avermectins produced by mutational biosynthesis[J]. *J Antibiot*, 1991, 44(3): 357-365.
- [2] Ikeda H, Kazuo S Y, Omura S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(2): 233-250.
- [3] Thuan N H, Pandey R P, Sohng J K. Recent advances in biochemistry and biotechnological synthesis of avermectins and their derivatives[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(18): 7747-7759.
- [4] Demain A L, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. *J Antibiot*, 2009, 62(1): 5-16.
- [5] Goudie A C. Doramectin-A potent novel endectocide[J]. *Veter Parasitol*, 1993, 49(1): 5-15.
- [6] 刁金娜. 多拉菌素产生菌基因组重排育种[D]. 东北农业大学, 2011.
- [7] 王洁颖, 甘邱锋, 张晓琳, 等. 多拉菌素产生菌*aveD*基因缺失突变株的构建[J]. 中国生物工程杂志, 2010, (3): 46-51.
- [8] 杨世红. 多拉菌素高产菌株氮离子注入诱变育种和发酵工艺研究[D]. 武汉工业学院, 2011.
- [9] Qi Z, Ping B, Cheng Z, *et al.* Design, synthesis, insecticidal activity and molecular docking of doramectin derivatives[J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(12): 2387-2396.
- [10] 杨世红, 韩伟, 张晓琳. 响应面法优化阿维链霉菌生产多拉菌素的培养基[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(9): 1041-1047.
- [11] 扶教龙, 徐敏强, 张松, 等. 多杀菌素产生菌复合诱变选育及发酵培养基优化[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(7): 824-830.
- [12] 薛佳韵, 赵明霞, 王泽建, 等. 豆油添加对尼莫克汀发酵的影响[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2019: 1-10.

- [13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Biochem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] 俞一夫. 食品分析技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 133-137.
- [15] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 894-903.
- [16] 郑杰. 试验设计与数据分析: 基于R语言应用[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2016: 188-192.
- [17] 朱娟娟. 阿维链霉菌孢子色素生物合成及PhoR-PhoP双组分信号系统对阿维菌素产量的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [18] Lobetti R. Successful resolution of oesophageal spirocercosis in 20 dogs following daily treatment with oral doramectin[J]. *Veter J*, 2012, 193(1): 277-278.
- [19] 高爱丽, 梁洪生, 史国军, 等. 多拉菌素对人乳腺癌细胞阿霉素多药耐药性的体外逆转作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(4): 266-269.
- [20] Reina D, Anderson L, Habela M, *et al*. Efficacy of doramectin against naturally acquired nematode infection in Iberian swine[J]. *Veter Parasitol*, 2000, 89(1-2): 139-147.
- [21] Anchordoquy J M, Anchordoquy J P, Nikoloff N, *et al*. Doramectin induced cytotoxic and genotoxic effects on bovine peripheral lymphocytes and cumulus cells *in vitro*[J]. *J Environm Sci Health, Part B*, 2019, 54(2): 147-154.
- [22] Cirak V Y, Gulegen E, Yildirim F, *et al*. A field study on the efficacy of doramectin against strongyles and its egg reappearance period in horses[J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 2007, 114(2): 64-66.
- [23] Elhawary N M, Sorour Sh S G H, El-Abasy M A, *et al*. A trial of doramectin injection and ivermectin spot-on for treatment of rabbits artificially infested with the ear mite “*Psoroptes cuniculi*” [J]. *Polish J Veter Sci*, 2017, 20(3): 521-525.