

响应面法优化TNF- α 抑制剂桥南霉素的固态发酵培养

马于雷 高俊 胡志钰 郑忠辉 徐庆妍*

(厦门大学生命科学学院,天然产物源靶向药物国家地方联合工程实验室,厦门 361102)

摘要：目的 利用响应面法对潜在的TNF- α 抑制剂桥南霉素固态发酵培养基进行优化。方法 用HPLC做检测方法,以桥南霉素的洗脱峰面积为指标,先通过Plackett-Burman(P-B)实验筛选出影响固态发酵产量的主要因素,进而进行单因素优化实验和响应面中心组合设计实验,确定主要影响因素的最佳浓度,得到最优的固体发酵培养基组成。结果 优化后的发酵培养基组成:土豆400g/L、葡萄糖35g/L、蛋白胨10.5g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6g/L。按此配方固态发酵10L,对得到的粗提物进行HPLC检测,桥南霉素的实际产量为4.3mg/L,与模型的理论值基本相符,较优化前的产量1.5mg/L提高了186.7%。结论 响应面方法是一种有效的培养基优化方法,经此优化方法桥南霉素的产量得到了较大的提高。

关键词：固态发酵;响应面法;桥南霉素

中图分类号:R978.1 文献标志码:A

DOI:10.13461/j.cnki.cja.005585

Optimization of solid culture conditions for TNF- α inhibitor qiaonanmycin via response surface methodology

Ma Yu-lei, Gao Jun, Hu Zhi-yu, Zheng Zhong-hui and Xu Qing-yan

(School of Life Science of Xiamen University, State-Province Joint Engineering Laboratory of Targeted Drugs from Natural Products, Xiamen 361102)

Abstract Objective The solid fermentation culture conditions of compound qiaonanmycin were optimized via response surface methodology. **Methods** Based on quantitative detection method of qiaonanmycin by HPLC, the key fermentation factors were determined via P-B test, then their optimized concentrations were confirmed through response face method. **Results** The optimum solid fermentation culture medium compositions of qiaonanmycin were: potato 400g/L, dextrose 35g/L, peptone 10.5g/L, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6g/L. Under this condition, the yield of qiaonanmycin was 4.3mg/L, resulting in a 186.7% increase comparing with original production yield, and the optimized yield was consistent well with theoretical value predicted by response face method. **Conclusion** The optimized solid fermentation culture conditions were reliable and repeatable, it was warranted for large-scale fermentation process.

Key words Solid fermentation; Response surface method; Qiaonanmycin

桥南霉素是本实验室首次从云南粗榧的内生真菌次级代谢产物中分离得到的Chaetominine类型的新结构化合物,它在前期的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的

抑制剂筛选实验中显示出较好的抑制活性,是一个有潜力的TNF- α 抑制剂,但在马铃薯-葡萄糖固态表面培养基上的产量仅为1.5mg/L,难以满足后续的作用

收稿日期:2014-10-28

基金项目:中央高校基本业务费(No. 2010121092)和厦门市科技计划项目(No. 3502Z20123010)

作者简介:马于雷,男,生于1988年,在读硕士研究生,主要从事微生物药物研究, E-mail: keslei@163.com

*通讯作者, E-mail: xuqingyan@xmu.edu.cn

用机理及动物实验研究的需要。

培养基为微生物生长和代谢产物的产生提供必需的营养物质和能量,是影响发酵水平的重要因素之一,所以对培养基进行优化是提高微生物发酵水平的重要方式。本研究以代谢物中目标产物的产量作为评价指标,采用Plackett-burman(P-B)实验、单因素优化实验和响应面^[1]的中心组合设计(central composite design, CCD)实验,得到最优发酵培养基组成,实现化合物产量的提高^[2-5]。

1 材料和方法

1.1 材料

1200系列高效液相色谱仪(G1315D检测器, G1311A泵, Agilent 公司); N-1001旋转蒸发器(EYELA公司); LS-B50L蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司); 微孔滤膜(上海新亚净化器件厂); Sartorius BA 210电子分析天平(瑞典Sartorius公司); SW-CJ-1FD超净工作台(上海博讯公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯(美国Sigma公司),其他试剂均为国产分析纯。

桥南霉素的生产菌株*Aspergillus fumigatus* CM9a是分离自云南地区药用植物粗榧枝条的内生真菌,为本实验室保藏菌株。

1.2 方法

1.2.1 发酵及发酵产物处理过程

取4 冰箱保藏的斜面菌种1支,接入PD(马铃薯200g,葡萄糖20g,蒸馏水1000mL)种子培养基(30mL/200mL三角瓶),于28、220r/min摇床培养4d。种子液按每个培养皿100 μ L接种到固态培养基平板上,涂布均匀,28 倒置培养。发酵结束后将培养基切块,用适量的乙酸乙酯/甲醇/乙酸(80/15/5)混合酸萃取4遍,合并提取液,40 旋转蒸发器浓缩至干,用甲醇重新溶解并配成合适浓度,0.22 μ m微孔滤膜过滤样品,用于高效液相色谱分析。

1.2.2 标准曲线绘制

取10mg标准桥南霉素,溶于10mL色谱纯甲醇,于190~400nm波长范围内扫描,选择具有最大吸收的220nm作为目标化合物的HPLC检测波长。在该检测波长下,使用Eclipse XDB-C₁₈(4.6mm \times 250mm, 5 μ m)色谱柱,甲醇/水(45/55)为流动相,流速1mL/min,目标化合物桥南霉素的保留时间为22.4min。

分别配制桥南霉素标准品0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0和16.0mg/mL 7个浓度,以色谱纯甲醇为0,固定进样量为5 μ L,每个浓度进行3次平行测定,以

标准品信号峰的面积(mAUs)的3次平均值对标准品的质量(μ g)作图,得到HPLC检测的标准曲线。

2 结果和分析

2.1 基本培养基的确定

CM9a菌株的种子液接种到6种固态培养基(PDA培养基、MJ培养基^[6]、查氏培养基、Martin培养基、CM培养基、GPY培养基)的表面,28 倒置发酵,分别检测6个不同时间段(10、12、14、16、18和20d)的目标产物的产量。结果显示仅在PDA培养基上CM9a菌株能产生桥南霉素,且从第10d开始产量的变化不大,故确定基本培养基为PDA(土豆200g,葡萄糖20g,琼脂15g,水1000mL),发酵时间为10d。

2.2 单因素分析

2.2.1 Plackett-Burman (P-B)实验^[7]

根据相关文献的查阅和经验的积累,选择影响发酵培养基的11个因素: X1(马铃薯)、X2(葡萄糖)、X3(蔗糖)、X4(乳糖)、X5(D-色氨酸)、X6(L-丙氨酸)、X7(蛋白胨)、X8((NH₄)₂SO₄)、X9(CuSO₄)、X10(甘露醇)、X11(维生素b1)进行考察(X5, X6, X11的单位为mg/L,其他因素的单位为g/L),每个因素设2个水平(-1, 1),高水平为低水平的1.25倍(表1),利用Design-expert 8.1.3 软件进行实验设计(表2),并对结果进行分析(表3)。

此回归模型的F值是238.61,表明这个模型是显著性的。模型中P值小于0.001、属于差异极显著的因子共有6个: X1(马铃薯), X2(葡萄糖), X3(蔗糖), X7(蛋白胨), X8((NH₄)₂SO₄)和X11(维生素b1)。综合实验的结果并考虑实验因素的重要性以及其经济成本和得到的难易程度,最终选择马铃薯、葡萄

表1 P-B实验各因素水平
Tab. 1 The factors and levels of P-B design

变量	各因素水平	
	-1	1
X1(马铃薯)	280	350
X2(葡萄糖)	20	25
X3(蔗糖)	16	20
X4(乳糖)	28	35
X5(D-色氨酸)	100	125
X6(L-丙氨酸)	100	125
X7(蛋白胨)	20	25
X8[(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.8	1
X9(CuSO ₄)	1	1.25
X10(甘露醇)	2	2.5
X11(维生素b1)	1	1.25

表2 P-B实验设计
Tab. 2 The design of P-B experiment

序号	因素										
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
5	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
6	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
9	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
14	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
15	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1

表3 P-B实验结果分析及方差分析
Tab. 3 Results and variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	258.50	11	23.50	238.61	0.0004	***
X1(马铃薯)	49.49	1	49.49	502.50	0.0002	***
X2(葡萄糖)	88.40	1	88.40	897.56	<0.0001	***
X3(蔗糖)	30.50	1	30.50	309.64	0.0004	***
X4(乳糖)	0.83	1	0.83	8.40	0.626	
X5(D-色氨酸)	2.35	1	2.35	23.86	0.0164	
X6(L-丙氨酸)	0.32	1	0.32	3.28	0.1676	
X7(蛋白胨)	30.88	1	30.88	313.54	0.0004	***
X8[(NH ₄) ₂ SO ₄]	20.67	1	20.67	209.89	0.0007	***
X9(CuSO ₄)	10.34	1	10.34	105.95	0.0020	
X10(甘露醇)	3.80	1	3.80	38.55	0.0084	
X11(维生素b1)	20.83	1	20.83	211.49	0.0007	***
净残差	0.30	3	0.098			
总和	258.80	14				

注：***为P < 0.001(差异极显著)

糖、蛋白胨和(NH₄)₂SO₄ 4个因素进行后续实验。

2.2.2 单因素优化实验

(1)葡萄糖含量对桥南霉素产量的影响

在PDA固态培养基中单一改变葡萄糖的含量，设浓度梯度分别为5、15、25和35g/L，每个浓度设3个重复，考查不同葡萄糖浓度对目标产物产量的影响。由图1可知，葡萄糖含量为25g/L时桥南霉素的产量最高，若再增加培养基中葡萄糖的含量，桥南霉素的产量反而降低。

(2)马铃薯含量对桥南霉素产量的影响

以PDA培养基作为基本培养基，单一改变培养基中马铃薯的含量，设置浓度梯度分别为100、200、300和400g/L，每个浓度设3个重复。发酵培养后粗提物经HPLC检测，结果(图2)显示马铃薯在300g/L时最适宜桥南霉素的产生。

(3)蛋白胨含量对桥南霉素产量的影响

以PDA培养基作为基本培养基，单一改变培养基中蛋白胨的含量，浓度分别设为2、6、10和14g/L，每个浓度设3个重复，HPLC检测的结果(图3)显示10g/L为最适宜产生桥南霉素的蛋白胨浓度。

(4)(NH₄)₂SO₄含量对桥南霉素产量的影响

以PDA作为基本培养基，单一改变培养基中(NH₄)₂SO₄的含量，浓度分别为0.6、1.0、1.4和1.8g/L，每个浓度设3个重复。对得到的发酵粗提物用HPLC检测，结果(图4)显示(NH₄)₂SO₄在浓度为1g/L时最能促进桥南霉素的产生，随着浓度的增大，抑制作用增强。

2.3 响应面中心组合设计(CCD)优化

2.3.1 CCD实验设计^[8]

中心组合设计(CCD)是一种常用的响应面优化方法，可以在有限的实验次数下得出影响过程的最佳因素。根据之前P-B实验和单因素分析的结果，按

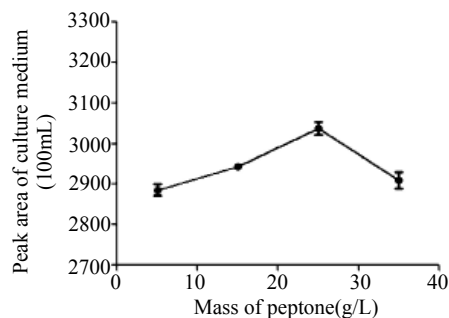


图1 葡萄糖含量对桥南霉素产量的影响
Fig. 1 Effects of dextrose on the production of qiaonanmycin

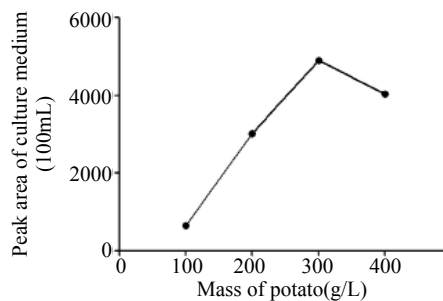


图2 马铃薯含量对桥南霉素产量的影响
Fig. 2 Effects of potato on the production of qiaonanmycin

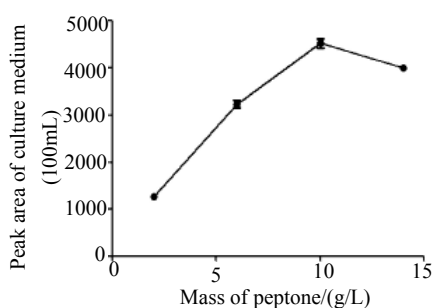


图3 蛋白胨含量对桥南霉素产量的影响

Fig. 3 Effects of peptone on the production of qiaonanmycin

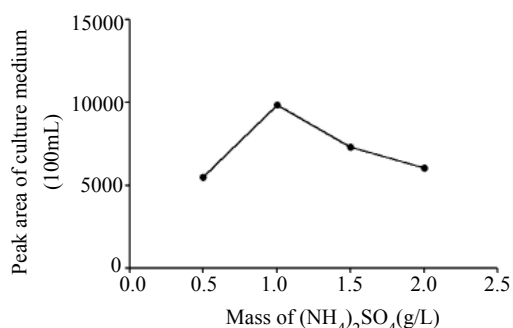


图4 (NH₄)₂SO₄含量对桥南霉素产量的影响

Fig. 4 Effects of (NH₄)₂SO₄ on the production of qiaonanmycin

CCD设计原理，选择单因素分析的结果为中心点，设计3个水平的实验(表4)。

2.3.2 CCD实验设计及结果

通过Design-expert 8.1.3中心组合设计，共设计了30组实验，每组设5个重复，以PDA作为基本培养基进行培养，每组随机抽取3个，提取发酵产物后使用HPLC检测桥南霉素的产量。中心组合设计及结果如表5所示。

2.3.3 二次多项回归方程及方差分析

按照CCD实验要求，以马铃薯(A)、葡萄糖(B)、蛋白胨(C)和(NH₄)₂SO₄(D)为自变量，以桥南霉素的产量(Y)为因变量，利用Design-expert 8.1.3软件对实验数据进行回归拟合分析，建立二次回归方程为：

$$Y = 2.54 + 0.41 \times A + 0.67 \times B + 0.028 \times C - 0.47 \times D - 0.13 \times A \times B + 0.057 \times A \times C - 0.41 \times A \times D - 0.097 \times B \times C +$$

表4 CCD试验设计的各因素及其水平值

Tab. 4 The selected factor ranges for CCD optimization

变量/(g/L)	水平值/(g/L)		
	-1	0	1
A (马铃薯)	200	300	400
B (葡萄糖)	15	25	35
C (蛋白胨)	6	10	14
D [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0.6	1	1.4

表5 CCD试验设计及实验结果

Tab. 5 The design and results of CCD experiments

实验号	变量A	变量B	变量C	变量D	桥南霉素/(mg/L)
1	-1	-1	-1	1	0.37
2	0	0	0	0	2.43
3	1	1	-1	1	2.15
4	0	-2	0	0	0.69
5	0	0	0	0	2.43
6	-1	-1	1	-1	0.28
7	0	0	0	0	2.42
8	0	0	0	0	2.42
9	1	-1	-1	1	0.36
10	1	-1	1	-1	3.11
11	1	-1	1	1	0.82
12	0	0	0	-2	3.06
13	-1	-1	1	1	0.41
14	-1	1	-1	1	2.58
15	-2	0	0	0	0.68
16	0	0	0	0	3.09
17	1	1	-1	-1	3.62
18	-1	1	1	1	1.49
19	0	0	-2	0	0.66
20	1	1	1	1	1.89
21	-1	-1	-1	-1	0.64
22	-1	1	-1	-1	1.44
23	1	1	1	-1	3.24
24	2	0	0	0	1.99
25	-1	1	1	-1	2.76
26	0	0	2	0	0.63
27	0	0	0	2	0.95
28	0	2	0	0	3.25
29	0	0	0	0	2.42
30	1	-1	-1	-1	2.11

$$0.077 \times B \times D - 0.15 \times C \times D - 0.26 \times A^2 - 0.11 \times B^2 - 0.44 \times C^2 - 0.097 \times D^2$$

回归方程的方差分析如表6所示。模型的 $P < 0.0001$ ，说明所建立的二次多项回归方差具有极显著性，方程具有很高的可靠性；失拟项 $P = 0.1268 > 0.05$ ，说明模型失拟不显著，即未考虑的其他因素所引起的差异不显著，回归方程具有很好的拟合度，多元相关系数 $R^2 = 0.9240$ ，说明方程有较好的回归效果。

表6的显著性分析结果显示，在各因素的一次项中，马铃薯(A)、葡萄糖(B)和(NH₄)₂SO₄(D)均为极显著，各因素的二次项中蛋白胨(C)为极显著，各因素的交互项中，马铃薯和(NH₄)₂SO₄交互作用(AD)为高度显著，说明以上各项的变化对桥南霉素的产量均

表6 回归方程的方差分析和显著性分析
Tab.6 Variance analysis and saliency analysis for regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	30.46	14	2.18	13.03	<0.0001	***
A	4.13	1	4.13	24.71	0.0002	***
B	10.92	1	10.92	65.43	<0.0001	***
C	0.019	1	0.019	0.11	0.7424	
D	5.37	1	5.37	32.16	<0.0001	***
AB	0.27	1	0.27	1.60	0.2246	
AC	0.052	1	0.052	0.31	0.5858	
AD	2.71	1	2.71	16.26	0.0011	**
BC	0.15	1	0.15	0.90	0.3579	
BD	0.095	1	0.095	0.57	0.4633	
CD	0.37	1	0.37	2.21	0.1577	
A ²	1.91	1	1.91	11.46	0.0041	*
B ²	0.30	1	0.30	1.82	0.1970	
C ²	5.23	1	5.23	31.23	<0.0001	***
D ²	0.26	1	0.26	1.53	0.2348	
残差	2.50	15	0.17			
失拟	2.13	10	0.21	2.89	0.1268	
净误差	0.37	5	0.074			
总和	32.96	29				

注：***为P < 0.001(差异极显著)，**为P < 0.01(差异高度显著)，*为P < 0.05(差异显著)

有显著影响。A、B、C、D4个因素交互作用对目标产物产量的响应面分析图如图5(a~f)所示。

2.3.4 方程求解和验证

通过软件Design-expert 8.1.3求解方程组，利用模型以及回归方程求解计算出响应面的最高点，得到了最优固态培养基组成和桥南霉素的最佳理论产量值。桥南霉素固态发酵培养基的最优配方为：土豆400g/L、葡萄糖35g/L、蛋白胨10.63g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.6g/L，在此条件下，桥南霉素的理论最佳产量为3.85mg/L。考虑到实际操作的方便性，将培养基最优组成进一步优化成：土豆400g/L、葡萄糖35g/L、蛋白胨10.5g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.6g/L。按此配方固态发酵10L，对得到的粗提物进行HPLC检测，实际产量为4.3mg/L，符合模型的理论值，较优化前的产量(1.5mg/L)提高了186.7%。

3 结论

本实验中，作者确定了潜在的TNF-α抑制剂桥南霉素固态发酵培养基的最优化组成为土豆400g/L、葡萄糖35g/L、蛋白胨10.5g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.6g/L。对此配方进行验证，证明在此配方下桥南霉素的产量

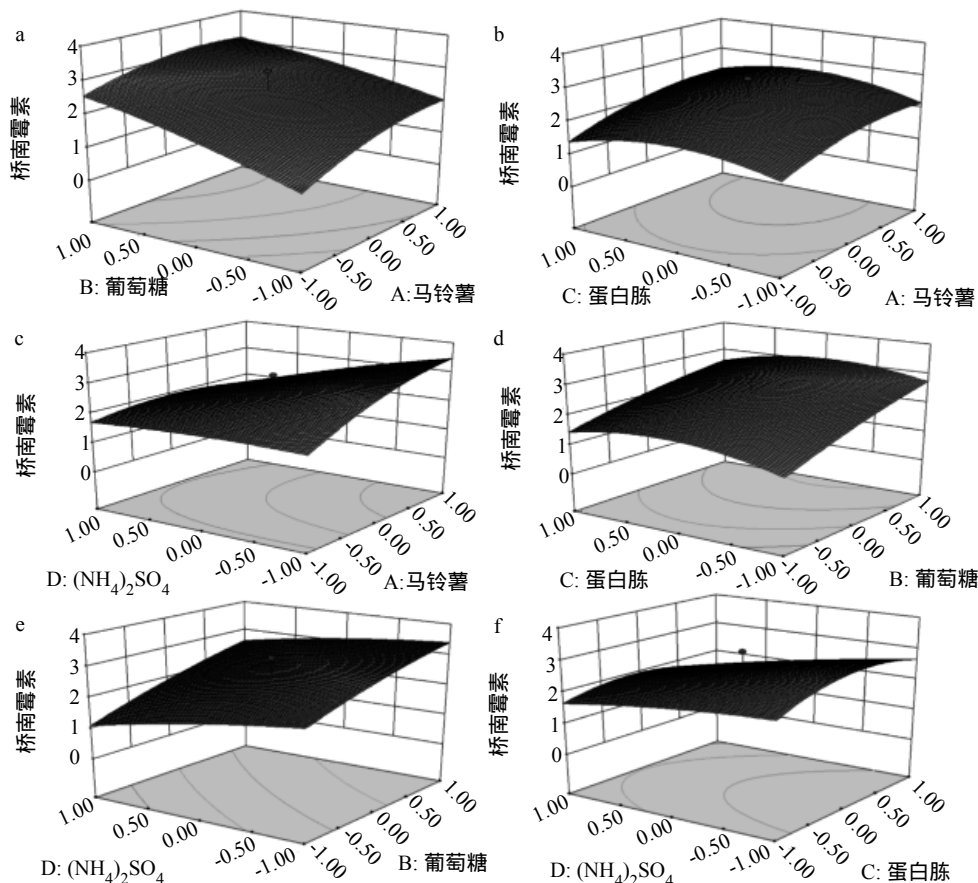


图5 四因素交互作用的响应面分析图

Fig. 5 The response surface analysis charts of four factors

与预测值接近, 平均提高186.7%, 为获得足够量的桥南霉素, 开展后续桥南霉素的机理研究提供了有力保证。本实验结果表明通过响应面设计优化, 目标产物的产量得到较明显的提高, 再次证明响应面法是一种有效的优化方法。

参考文献

- [1] Box G E P, Wilson K B. On the experimental attainment of optimum conditions[J]. *J Roy Stat Soc, B(Methodological)*, 1951, 13(1): 1-45.
- [2] Branchu S, Forbes R T, York P, *et al.* A central composite design to investigate the thermal stabilization of lysozyme[J]. *Pharmaceutical R*, 1999, 16(5): 702-708.
- [3] Hansen R R, Sikes H D, Bowman C N. Visual detection of labeled oligonucleotides using visible-light-polymerization-based amplification[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 9(1): 355-362.
- [4] Montgomery D C. Experimental design for product and process design and development[J]. *J Roy Stat Soc, D(The Statistician)*, 1999, 48(2): 159-173.
- [5] Rezaei B, Mokhtari A. Flow-injection chemiluminescence determination of enrofloxacin using the Ru(phen) 32^+ -Ce(IV) system and central composite design for the optimization of chemical variables[J]. *Luminescence*, 2008, 23(6): 357-364.
- [6] Furtado N A J C, Fonseca M J V, Bastos J K. The potential of an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites[J]. *Braz J Microbiol*, 2005, 36(4): 357-362.
- [7] 杨承剑, 黄兴国, 李伟. Plackett-Burman设计在益生菌生长主要影响因子筛选中的应用[J]. *饲料工业*, 2007, 28(16): 31-33.
- [8] Liu J C, Miao S, Wen X C, *et al.* Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill using response surface methodology (RSM)[J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(4): 704-709.

(上接第583页)

- [3] 高明. 维生素C二步发酵新菌系产酸机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012.
- [4] 宋文新, 邵庆均. 维生素C二步发酵合成法的研究进展[J]. *中国饲料*, 2008, 19: 9-12.
- [5] 黄兵, 刘宁, 黄英, 等. 放线菌与枯草芽孢杆菌的共培养及其对活性次生代谢产物的影响[J]. *生物工程学报*, 2009, 6, 25, 25(6): 932-940.
- [6] 高学文, 齐放军, 姚仕义, 等. 枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的共培养及其对生物活性物质产生的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(3): 32-35.
- [7] 刘宏伟. *Acidithiobacillus ferrooxidans*与*Acidiphilium acidophilum*共培养体系的协作用及其生物浸出研究[D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [8] 赵斌, 何绍江. *微生物学实验*[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 251.
- [9] Niu W, Geng H F, Niu Y, *et al.* Stability of Antimicrobial Active Ingredients of *Bacillus subtilis* B26[J]. *Plant Prot Agr Sci Technol*, 2010, 11(8): 120-124.
- [10] 郭鹏飞, 靳艳, 张海涛, 等. 共培养海绵微生物诱导抗菌活性物质的研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 33-37.