

文章编号:1673-1689(2010)02-0307-05

# 堀越氏芽孢杆菌 S184 产河豚毒素的发酵条件优化

陆燕, 易瑞灶, 陈伟珠

(国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 采用快速有效的数学统计方法对堀越氏芽孢杆菌 (*Bacillus horikoshii*) S184 产河豚毒素的发酵条件进行了优化。利用 Plackett-Burman 设计, 从众多影响产河豚毒素的因素中筛选出影响较大的 3 个因素: 蛋白胨、磷酸盐质量浓度和接种体积分数。在此基础上, 再利用响应面法中的杂合设计进行优化, 通过拟合得到响应曲面函数, 并获得了最佳的实验条件。在该实验条件下, 河豚毒素产量从 666.65 ng/L 提高到 1 900.60 ng/L。

**关键词:** 优化; 河豚毒素; Plackett-Burman 设计; 杂合设计

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

## Enhancement Tetrodotoxin Production from *Bacillus horikoshii* S184 by Optimizing Nutrient and Environmental Conditions

LU Yan, YI Rui-zao, CHEN Wei-zhu

(Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** In this manuscript, factorial design and response surface techniques were used to design and optimize the nutrient and environmental conditions for tetrodotoxin production from *Bacillus horikoshii* S184. The content of peptone and phosphate, inoculum has been identified as three significant parameters for tetrodotoxin production by Plackett-Burman design. Based on those results, the optimum conditions were achieved by response surface techniques. With the optimum conditions, the yield of tetrodotoxin was increased to 1 900.60 ng/L from 666.65 ng/L.

**Key words:** optimization, tetrodotoxin, Plackett-Burman design, hybrid design

河豚毒素 (TTX) 是一种毒性很强的海洋生物活性物质, 为非蛋白质类神经毒素, 其分子中胍氨基是活性部位, 胍氨基在生理条件下通过质子化形成正电活性区域, 与神经和肌肉细胞膜表面的  $\text{Na}^+$  通道上的专一性受体蛋白质的负电性羟基结合, 其周围羟基以氢键形式与受体结合, 这样  $\text{Na}^+$  通道被阻滞, 从而影响神经肌肉间兴奋性的传导<sup>[1-3]</sup>。它

是神经生物学和生理学研究不可替代的工具药, 并已投入临床使用。除此之外, TTX 还具有降血压、抗心律失常、缓解痉挛、镇痛、局部麻醉等多种疗效。尤为重要的是, 它在用于抑制癌症剧痛和戒毒时, 具有用量少、持效时间长且用后不成瘾的优点, 因而具有很大的开发利用价值。

目前, 国内外所用的 TTX 大多是从河豚鱼内

收稿日期: 2009-07-01

基金项目: 福建省青年人才基金项目 (2007F3059); 国家海洋局第三海洋研究所专项资金项目 (海三科 2007014)。

作者简介: 陆燕 (1978 - ), 女, 江苏江阴人, 工学博士, 助理研究员, 主要从事生物化工与发酵工程方面的研究。

Email: hyss.yanlu@163.com

脏中提取的,这使得河豚鱼资源日益稀少,药源供应受到限制。而多种产 TTX 微生物的发现<sup>[4-6]</sup>,为 TTX 的生产提供了一个很好的潜在替代资源。作者所在实验室在前期研究中筛选到了一株堀越氏芽孢杆菌 S184<sup>[7]</sup>。针对 TTX 产量低的问题,作者先用 Plackett-Burman 设计对影响菌株 S184 产 TTX 的诸多因素进行考察,从中筛选出最为重要的因素,再用杂合设计对此进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

菌株堀越氏芽孢杆菌 (*Bacillus horikoshii*) S184,为作者在前期研究中筛选得到<sup>[7]</sup>。

### 1.2 初始培养基和培养条件

种子培养基和发酵培养基均为 Zobell 2216E 液体培养基,初始 pH 值为 7.5。由平板挑取单菌落接入种子培养基,200 r/min 培养 24 h。将种子液按体积分数 5% 接入发酵培养基,28 ℃、200 r/min 培养 24 h。以装液量 20% 为基准,进行培养基组成和培养条件的优化实验。

### 1.3 发酵液中 TTX 的分离纯化

发酵结束后,8 000 r/min 离心 15 min,上清液用醋酸调 pH 4.0,旋转蒸发浓缩约 10 倍,沸水浴 10 min,8 000 r/min 离心 30 min,去除沉淀。上清液过活性炭柱,用 1% 醋酸(20% 乙醇配制)洗脱,收集洗脱液,40 ℃ 减压浓缩,去除乙醇,留下浓缩

液少许,过 SEP PAK C18 小柱,用适量 0.03% 醋酸洗脱,洗脱液冷冻干燥,溶于少量 0.03% 醋酸,用于检测。

### 1.4 TTX 含量测定

仪器: Waters 2695,配有 Waters 2475 荧光检测器;柱子: ZORBAX SB-C<sub>8</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent);流动相: 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠;流速 0.3 mL/min;柱后衍生试剂为 4 mol/L NaOH;衍生化温度 110 ℃;检测波长: 激发波长 365 nm,发射波长 510 nm。

### 1.5 实验设计

作者以 TTX 产量为响应目标,采用两步法进行优化。首先利用 Plackett-Burman 设计筛选出对响应影响较大的因素,然后用响应面法进行优化,通过实验数据拟合,最终确定最优实验条件。

**1.5.1 筛选实验—Plackett-Burman 设计** Plackett-Burman 设计由 Plackett 和 Burman 于 1946 年提出,它建立在不完全平衡板块原理的基础上,通过  $N$  个实验至多可以研究  $(N-1)$  个变量( $N$  一般为 4 的倍数)<sup>[8]</sup>。每个变量有高、低两个水平,分别以 +、- 标记。

作者考察 8 个因素,选用  $N = 12$  的 Plackett-Burman 设计,实验安排见表 1。每一行代表一次实验,每一列表示一个考察的因素。各参数代表的变量及高低水平对应的真实值见表 2。

表 1  $N = 12$  的 Plackett-Burman 实验设计与结果

Tab. 1 Experimental design of Plackett-Burman with TTX concentration as response

$N$	$A$	$B$	$C$	$D$	$E$	$F$	$G$	$H$	TTX 质量浓度/ (ng/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1 811.66
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	979.47
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	219.69
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1 414.14
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1 754.66
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	295.47
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1 491.04
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	2 168.04
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	871.12
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	357.20
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1 959.20
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	854.48

表 2 Plackett-Burman 设计的因素和水平

Tab. 2 The values of variables chosen for study versus the coded values of Plackett-Burman

代码	因素	水平	
		- 1	+ 1
A	温度/	20	28
B	NaCl 质量浓度/ (g/ dL)	1	3
C	起始 pH 值	5.5	7.5
D	磷酸盐质量浓度/ (g/ dL)	0	0.01
E	接种体积分数/ %	5	10
F	装液量/ (mL/ mL)	20	30
G	蛋白胨质量浓度/ (g/ dL)	0.2	0.5
H	酵母提取物质量浓度/ (g/ dL)	0.05	0.1

方法相结合的产物,它充分考虑了各个变量的交互作用,因此可以用来对人们感兴趣的受多个变量影响的响应问题进行建模与分析,并将该响应进行优化。杂合设计是由 Roquemore<sup>[9]</sup>于 1976 年提出的,这种设计可以通过最少的实验来拟合二阶的响应面模型,前几个因素具有 5 个水平,最后一个因素具有 4 个水平。

作者采用的杂合设计是 Roquemore 提出的 R310 型的设计,具体设计方案见表 3,各水平对应的变量真实值见表 4。

**1.5.3 验证实验** 通过对优化实验部分得到的多元函数进行性状分析,在有效范围内得到其极值点,再按照该参数进行实验,以验证模型的可靠性,并确定优化结果。

### 1.5.2 优化实验 响应曲面法是数学方法和统计

表 3 杂合实验设计矩阵及 TTX 质量浓度的实验值和预测值

Tab. 3 Matrix for hybrid design with experimental and predicted values of TTX concentration

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	实验值/ (ng/L)	预测值/ (ng/L)
1	0	0	1.2906	1 046.67	1 046.67
2	0	0	- 0.136	411.32	411.32
3	- 1	- 1	0.6386	388.84	388.84
4	1	- 1	0.6386	249.26	249.26
5	- 1	1	0.6386	579.82	579.82
6	1	1	0.6386	683.84	683.84
7	1.736	0	- 0.9273	1 900.55	1 900.55
8	- 1.736	0	- 0.9273	41.00	41.00
9	0	1.736	- 0.9273	41.00	41.00
10	0	- 1.736	- 0.9273	598.44	598.44

表 4 杂合设计各变量的高低水平对应的真实值

Tab. 4 Actual values of variables versus coded values of hybrid design

水平 编码值	X <sub>1</sub> 蛋白胨 质量浓度/ (g/ dL)	X <sub>2</sub> 磷酸盐 质量浓度/ (g/ dL)	X <sub>3</sub> 接种 体积分数/ %
- 1.736	0.0528	0.0025	
- 1	0.2	0.004	1
- 0.9273			1.1454
- 0.136			2.728
0	0.4	0.006	3
0.6386			4.2772
1	0.6	0.008	5
1.2906			5.5812
1.736	0.7472	0.0095	

## 2 结果与分析

### 2.1 影响菌株 S184 产 TTX 能力的重要因素的筛选

影响菌株 S184 发酵产 TTX 能力的因素有很多,主要有培养基的组成、pH 值、NaCl 质量浓度、磷酸盐质量浓度、接种体积分数、装液量、发酵温度等,其中,培养基的组成和 pH 值可直接影响细菌的生长和代谢;磷酸盐的存在可影响细菌产 TTX 的能力,高质量浓度的磷酸盐抑制 TTX 的产生;由于菌株来源于海洋中的河豚鱼,盐质量浓度会影响 TTX 的产生;接种量对菌体的生长有一定的影响;摇瓶中的供氧能力与装液量密切相关,而不同的溶氧条件会影响菌株的代谢途径,从而影响 TTX 的产量。鉴于以上分析,作者确定了包括蛋白胨、酵

母提取物、pH 值、NaCl 质量浓度、磷酸盐质量浓度、接种量、装液体积分数、发酵温度等 8 个影响因素,选用  $N = 12$  的 Plackett-Burman 设计。按 Plackett-Burman 设计进行二轮实验,发酵结束后对发酵液中 TTX 进行分离纯化,测定 TTX 质量浓度,取二次测量值的平均值。分别计算各因素效应,结果见表 5。

表 5 数据显示:蛋白胨质量浓度、磷酸盐质量浓度和接种体积分数对菌株 S184 产 TTX 能力影响较明显。因此,在后面的优化实验中,将对这 3 个因素进行进一步优化。

根据效应的正负,其它因素确定为:NaCl 1 g/dL,酵母提取物 0.1 g/dL,起始 pH 7.5,装液量 20%,发酵温度 20。

表 5 Plackett-Burman 设计的效应

Tab. 5 Effect estimates on TTX concentration from results of Plackett-Burman design

	因素	效应	t 检验	$P_r >  t $	重要性
A	温度	- 158.495	- 0.498 25	0.652 543	6
B	NaCl	- 129.518	- 0.407 16	0.711 200	7
C	起始 pH 值	103.985	0.326 893	0.765 229	8
D	磷酸盐	530.128 3	1.666 539	0.194 197	2
E	接种量	- 473.968	- 1.489 99	0.233 000	3
F	装液量	- 233.305	- 0.733 43	0.516 413	5
G	蛋白胨	817.905	2.571 209	0.082 406	1
H	酵母提取物	332.291 7	1.044 609	0.372 965	4

### 2.2 响应面的拟合以及最佳产 TTX 条件的确定

在筛选实验中,选出了 3 个待优化的参数,采用杂合设计的实验方法仅需要 10 次实验即可完成优化实验,并可对响应曲面函数进行拟合。

由 SAS 数据统计软件进行拟合,得到二次响应曲面函数为:

$$Y = 401.4665 + 213.1578X_1 + 27.13556X_2 - 17.91806X_3 + 68.9085X_1^2 + 60.90129X_1X_2 - 347.7056X_1X_3 - 147.1241X_2^2 + 202.4029X_2X_3 + 401.2452X_3^2 \quad (1)$$

其中: $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分别代表蛋白胨质量浓度、磷酸盐质量浓度和接种量的编码值。对模型的方差分析结果见表 6。模型对实际情况拟合很好,因此可以用方程(1)对菌株 S184 发酵产 TTX 的能力进行分析和预测。

表 6 菌株 S184 发酵产 TTX 量的方差分析和回归分析

Tab. 6 ANOVA and regression analysis for TTX production by S184

变异来源	自由度	平方和	均方	$P_r > F$
模型项	9	2 726 210	302 912.2	0.000 1
残差	0	- 894E-12		
总变异	9	2 726 210		
$R^2$	0.999			

用 SAS 软件优化条件组合,得到  $Y_{\max} = (1.736, -2.2E-16, -0.9273) = 1900.55$ 。与此对应的真实值是:蛋白胨质量浓度 0.747 2 g/dL,磷酸盐质量浓度 0.006 g/dL,接种体积分数 1.145 4%,可使 TTX 产量达到最高。

### 2.3 拟合优化的验证

根据筛选实验中确定的参数条件以及拟合优化得到关键参数的最佳实验条件,确定了菌株 S184 产 TTX 的最佳条件为:蛋白胨 0.747 2 g/dL, NaCl 1 g/dL, 酵母提取物 0.1 g/dL, 磷酸盐 0.006 g/dL, 起始 pH 7.5, 装液量 20%, 接种体积分数 1.145 4%, 发酵温度 20。在该条件下,模型预测 TTX 产量为 1 900.55 ng/L, 实际测得为 1 900.60 ng/L。

而初始条件下  $Y(0.5, 2, 1)$ , 即蛋白胨 0.5 g/dL, 磷酸盐 0.01 g/dL, 接种体积分数 5% 时, 模型预测 TTX 产量为 666.23 ng/L, 实际测得 666.65 ng/L。可见该模型能较好地预测菌株 S184 产 TTX 的实际情况。优化后的 TTX 产量比初始条件下提高了 1.85 倍。

## 3 结 语

常用的优化手段(如单因素优化法), 往往忽略

了各影响因素的交互作用, 难以得到理想的优化结果<sup>[10]</sup>。而当考察因素较多时, 实验次数也会随之大增。作者采用的 Plackett-Burman 设计, 是建立在不完全平衡板块原理的基础上, 可以从众多因素中快速、有效地筛选出最为重要的因素。近年来, 该方法已被广泛应用于发酵条件的优化<sup>[11-13]</sup>。而响应面法中的杂合设计能以最经济的方式, 以最少的实验对实验条件进行全面研究, 使优化后的 TTX 产量比初始条件下提高了 1.85 倍, 达到了预期目标。但是, 要实现 TTX 的规模化发酵生产, 其产量还有待进一步提高。因此, 在今后的工作中, 必须对菌种进行合理的高产育种, 并深入研究 TTX 的生物合成机理, 以便通过改变代谢途径中各种酶的活性来提高 TTX 的产量。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] Kirsch G E, Shieh C C, Drewe J A, et al. Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of  $K^+$  pores [J]. *Neuron*, 1993, 11: 503 - 512.
- [ 2 ] Scholz A, Vogel W. Tetrodotoxin-resistant action potential in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics [J]. *Pain*, 2000, 89: 47 - 52.
- [ 3 ] Narahashi T. Pharmacology of tetrodotoxin[J]. *J Toxicol-Toxin Rev*, 2001, 20: 67 - 84.
- [ 4 ] Lee M, Jeong D, Kim W, et al. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (4): 1698 - 1701.
- [ 5 ] Yu C F, Yu P H F, Chan P L, et al. Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes[J]. *Toxicon*, 2004, 44: 641 - 647.
- [ 6 ] Wang X J, Yu R C, Luo X, et al. Toxin screening and identification of bacteria isolated from highly toxic marine gastropod *Nassarius semiplicatus*[J]. *Toxicon*, 2008, 52: 55 - 61.
- [ 7 ] 陆燕, 易瑞灶. 河豚鱼体内产河豚毒素海洋细菌菌株的筛选 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2008, 24 (Sup): 179 - 181.  
LU Yan, YI Rui-zao. Screening of tetrodotoxin-producing marine bacteria isolated from puffer-fish [J]. *Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition*, 2008, 24 (Sup): 179 - 181. (in Chinese)
- [ 8 ] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. *Biometrika*, 1946, 37: 305 - 325.
- [ 9 ] Roquemore K G. Hybrid designs for quadratic response surfaces[J]. *Technometrics*, 1976, 18 (4): 419 - 423.
- [ 10 ] Haaland P D. Statistical problem solving[M]. New York: Marcel Dekker, 1989: 1 - 18.
- [ 11 ] 白东栋, 吴坚平, 徐刚, 等. 响应面法优化烯丙醇酮乙酸酯水解酶的产酶条件[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26 (1): 71 - 76.  
BAI Dong-dong, WU Jian-ping, XU Gang, et al. Optimization of the production conditions of HMPC hydrolase employing response surface methodology[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26 (1): 71 - 76. (in Chinese)
- [ 12 ] Reddy L V A, Wee Y J, Yun J S, et al. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 2242 - 2249.
- [ 13 ] Lu Y, Mei L H. Optimization of fermentation conditions for P450 BM-3 monooxygenase production by hybrid design methodology[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2007, 8 (1): 27 - 32.

(责任编辑:李春雨)