

# 埃博霉素 B 高产菌株的选育及发酵工艺优化

龚国利, 王娜, 刘丽丽

(陕西科技大学 生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:** 以纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)SoF5-76 为诱变出发菌株,经紫外(UV)和亚硝基胍(NTG)复合诱变和筛选,获得一株高产突变菌株 SoF5-H23,其发酵产埃博霉素 B 的量可达 79.83 mg/L,比出发菌株提高了 1.27 倍。通过 Plackett-Burman 实验和响应面分析法对纤维堆囊菌产埃博霉素 B 的发酵工艺进行优化。得到最佳发酵工艺为:马铃薯淀粉 4.8 g/L,葡萄糖 0.5 g/L,脱脂奶粉 2.3 g/L,豆饼粉 2 g/L,七水硫酸镁 2 g/L,无水氯化钙 2 g/L,EDTA-Fe<sup>3+</sup> 2 mL/L,微量元素(TE)0.5 mL/L,吸附树脂 2%,培养基初始 pH 7.4,装液量 50 mL,接种体积分数 8%,温度 30 ℃。在此最优条件下埃博霉素 B 产量为 108.67 mg/L,比优化前提高了 36.13%,此产量是国内外报道的埃博霉素最高产量。

**关键词:** 纤维堆囊菌;埃博霉素 B;菌株诱变;发酵工艺优化;响应面法

中图分类号:Q 93-335 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2014)11-1196-08

## Breeding of High Epothilone B Producing Strain and Optimization of the Fermentation Conditions

GONG Guoli, WANG Na, LIU Lili

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** A high epothilone B producing mutant SoF5-H23 was screened from *Sorangium cellulosum* SoF5-76 by combination treatment with UV and NTG. This mutant has good stability of producing epothilone B and production was 79.83 mg/L, which was 1.27 times higher than that of original strain. Plackett-Burman design and the response surface methodology (RSM) were applied to optimize medium for fermentation and conditions. The obtained optimal fermentation conditions were potato starch 4.8 g/L, skim milk powder 2.3 g/L, glucose 0.5 g/L, soybean powder 2 g/L, magnesium sulfate 2 g/L, chlorine calcium 2 g/L, EDTA-Fe<sup>3+</sup> 2 mL/L, trace elements 0.5 mL/L, absorbent resin 2%, pH 7.4, liquid volume 50 mL/250 mL, inoculum size 8%, temperature 30 ℃. Under this optimal conditions, epothilone B production reached up to 108.67 mg/L which is the highest yield of epothilone B on home and overseas and was 36.13% higher than preliminary conditions.

**Keywords:** *Sorangium cellulosum*, epothilone B, strain mutation, optimization, response surface methodology

收稿日期: 2013-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(20906058);陕西省教育厅自然科学专项项目(12JK1023)。

作者简介: 龚国利(1976—),男,内蒙古丰镇人,理学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物制药技术方面的研究。

E-mail: gongguoli@sust.edu.cn

埃博霉素(Epothilones)是粘细菌纤维堆囊菌产生的大环内酯类次级代谢产物<sup>[1-2]</sup>,是一种新型的抗肿瘤药物。其作用机制与紫杉醇相同,通过促微管聚合作用从而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[3-4]</sup>,并且与紫杉醇相比,埃博霉素具有毒性更小,水溶性更好<sup>[5]</sup>,对耐药性细胞作用更强,抗肿瘤谱更广等优点,因此埃博霉素被誉为最具有潜力的抗肿瘤新药之一。

然而埃博霉素发酵产量很低造成埃博霉素类药物生产成本很高。为了提高埃博霉素的产量,可进行产物的异源表达以及生产菌株的选育。已有文献<sup>[6-8]</sup>报道埃博霉素的异源表达已获得成功,但是由于其对宿主细胞的毒害作用,使得产量并没有提高,反而大幅度下降,所以通过天然产生菌株选育来获得埃博霉素高产菌株仍然是最有效的方法。

Plackett-Burman设计和响应面分析法是20世纪中后期发展起来的优化试验条件的统计学方法,目前已经广泛应用于微生物发酵工艺的优化<sup>[9-11]</sup>。作者以纤维堆囊菌SoF5-76为出发菌株,经过紫外线与亚硝基胍复合诱变,成功获得一株埃博霉素B高产菌株SoF5-H23,并进一步通过统计学方法对其发酵工艺进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌种** 纤维堆囊菌 SoF5-76 (*Sorangium cellulosum* So F5-76):作者所在实验室保存菌。由作者所在实验室从土壤中筛选,经过基因组重组技术选育获得。经过后期发酵工艺优化埃博霉素B产量可达到35.24 mg/L。

### 1.1.2 培养基

1)CNST培养基:KNO<sub>3</sub> 0.05 g/dL,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.025 g/dL,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/dL,FeCl<sub>3</sub> 0.001 g/dL,琼脂2 g/dL,微量元素液1 ml/L,pH 7.2。121℃高压蒸汽灭菌20 min。

2)M26培养基:土豆淀粉8.0 g/L,大豆蛋白胨2.0 g/L,葡萄糖2.0 g/L,酵母粉2.0 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g/L,CaCl<sub>2</sub> 1.0g/L,EDTA-Fe<sup>3+</sup> 1 mL/L,微量元素1 mL/L,以KOH调节pH值为7.2。

3)发酵培养基:马铃薯淀粉3.9 g/L,脱脂奶粉2.2 g/L,无水氯化钙1.3 g/L,葡萄糖1 g/L,豆饼粉1.5 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 g/L,EDTA-Fe<sup>3+</sup> 3 mL/L,微量元素0.5 mL/L,pH 7.4,树脂XAD-16 2%。115℃高压

蒸汽灭菌30 min。

**1.1.3 主要仪器与设备** Waters-2487-2420-1525高效液相色谱仪:美国waters公司;YXJ-2高速电动离心机:金坛市精达仪器制造厂;高压蒸汽灭菌锅:上海申安仪器设备有限公司;HWS型恒温恒湿箱:金坛市精达仪器制造厂;SHZ-82型气浴恒温振荡器,金坛市精达仪器制造厂;DZF-6050型真空干燥箱:上海一恒科技有限公司;磁力搅拌器:北京医用离心机;UV手提式杀菌灯:苏净集团安泰公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 诱变处理

1)紫外诱变:取培养了36~48 h的M26培养物,离心,收集菌体,用生理盐水洗涤菌体2~3次,转入带玻璃珠的三角瓶中打散,得到菌悬液,细胞浓度控制在10<sup>6</sup>个/mL左右。取上述菌悬液5 mL于平皿中,将其放在磁力搅拌器上,置于15 W紫外灯下30 cm处,照射一定时间(30、60、90、120、150 s)后转接入M26种子培养基中避光培养2~4 h。取出后培养液按梯度稀释并涂布VY/2平板,30℃恒温培养5 d。以未经过照射的菌悬液作为对照,观察生长情况并绘制致死率曲线。

2)亚硝基胍(NTG)诱变:取培养了36~48 h的M26培养物,离心,收集菌体,菌体用0.1 mol/L、pH 6.0的磷酸缓冲液洗涤两次,转入带玻璃珠的三角瓶中打散,得到菌悬液,细胞浓度控制在10<sup>6</sup>个/mL左右。取10 mL灭菌离心管,装入4.0 mL菌悬液,加入NTG母液,配置成含200、400、600、800、1 000 μg/mL NTG的菌悬液,进行诱变处理,30℃恒温振荡30 min。结束后立即用冷的生理盐水离心洗涤终止诱变。然后转接入M26种子培养基中避光培养2~4 h。取出后培养液按梯度稀释并涂布VY/2平板,30℃恒温培养5 d。以未经过照射的菌悬液作为对照,观察生长情况并绘制致死率曲线。

#### 1.2.2 培养方法

1)种子培养:将保藏在固体斜面培养基的菌种接入放有已灭菌滤纸片的CNST平板上,倒置于恒温培养箱中,在30℃下培养5~7 d,转接于M26培养基中,装液量为50 mL/250 mL三角瓶,在30℃、170 r/min的条件下摇床培养60 h后,得到作为发酵培养的种子液。

2)发酵培养:以10%接种体积分数将所得种子液接种到发酵培养基中进行摇床培养,发酵体系

为:250 mL三角瓶装液量50 mL,在30℃、200 r/min的条件下摇床培养6 d。

**1.2.3 埃博霉素B产量测定** 发酵结束后,收集树脂,用10倍体积甲醇振荡浸提24 h后,弃去树脂,甲醇浸提液放入真空干燥箱中烘干,再加入500 μL甲醇复溶,转移到离心管中。采用HPLC定量分析,液相色谱条件为:色谱柱YWG,C<sub>18</sub>,10 μm,250 mm×4.6 mm;Waters-2487高效液相色谱仪;UV紫外检测器:检测波长249 nm,流动相为甲醇:水=65:35(体积比),上样体积20 μL,时间30 min,流速1 mL/min。埃博霉素B的定量采用本实验室用的标准曲线,方程如下:

$$Y=0.132X+0.0035$$

采用HPLC检测埃博霉素B所得的峰面积,根据标准曲线换算成埃博霉素B产量。

### 1.3 实验设计

**1.3.1 Plackett-Burman (P-B) 设计** Plackett-Burman设计用来确定对埃博霉素B产量有显著影响作用的因子以及去除一些可有可无的因子。每个因子设置高低两个水平,分别用“+”、“-”表示,用SAS9.2软件设计。

**1.3.2 最陡爬坡实验** 根据Plackett-Burman试验结果,对筛选出的显著因素的变化方向、步长作了相应的设计。

**1.3.3 Box-Behnken 实验** 根据最陡爬坡试验结果,确定显著因子的高、中、低水平,表征为1、0、-1,用SAS9.2软件设计实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 埃博霉素B高产菌株的诱变育种

**2.1.1 紫外诱变** 为了选择合适的诱变处理时间,考察不同的紫外线照射时间对菌株的致死作用,结果见图1。由图1可知,随着紫外线照射时间延长,菌株致死率升高,当紫外照射时间为80 s时,菌株致死率接近100%。由于筛选突变株的最佳致死率应控制在70%~85%,故最佳诱变时间确定为50 s。

**2.1.2 NTG诱变** 在进行NTG诱变时,首先考察了不同诱变剂量对菌株的致死作用,诱变时间固定为30 min。细菌的一般处理质量浓度为100~1 000 μg/mL<sup>[12]</sup>,考察NTG终质量浓度为200、400、600、800、1 000 μg/mL时对菌株的致死作用。实验结果见图2。然后在最佳NTG终质量浓度下,改变处理

时间(10、30、50、70 min),实验结果见图3。

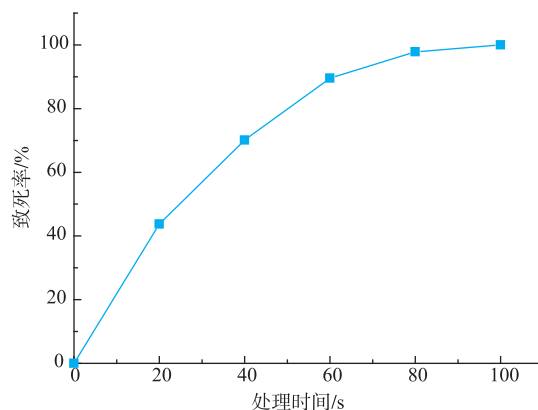


图1 紫外对菌株的致死曲线

Fig. 1 Effect of UV on strain fatality rate

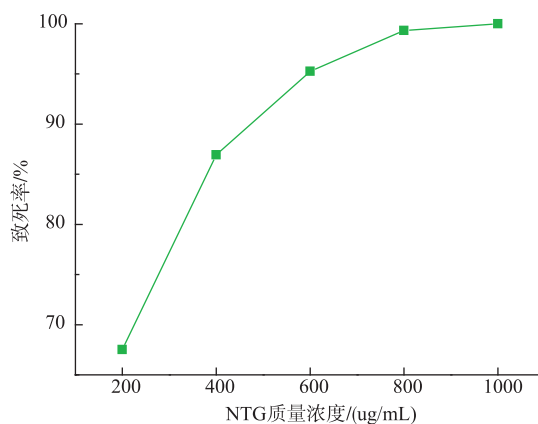


图2 NTG质量浓度对菌株的致死作用

Fig. 2 Effect of concentration of NTG on strain fatality rate

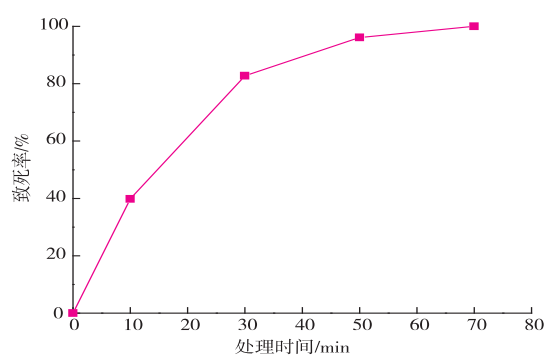


图3 NTG诱变时间对菌株的致死作用

Fig. 3 Effect of mutagenesis time of NTG on strain fatality rate

从图2和图3可以看出,随着NTG终质量浓度的增加和处理时间的延长,菌株的致死率都呈现逐渐增加的趋势,当NTG终质量浓度为800 μg/mL时,菌株致死率接近100%,当NTG终质量浓度为400 μg/mL时,菌株致死率为85%。当NTG作用时

间为 30 min 时,菌株致死率为 80%,为了得到满意的诱变结果,选择致死率为 80%~85%的致死浓度以及处理时间。故确定 NTG 诱变条件为:NTG 终质量浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,处理时间为 30 min。

**2.1.3 复合诱变结果及遗传稳定性试验** 经过紫外-NTG 复合诱变,将诱变后的菌株接种到液体发酵培养基中进行摇瓶培养,HPLC 检测埃博霉素 B 产量,最终获得突变株 SoF5-H23,其埃博霉素 B 产量达到 79.83 mg/L,是出发菌株 SoF5-76(35.24 mg/L)的 2.27 倍。

将筛选出的高产埃博霉素 B 的菌株连续转接传代 5 次后,进行摇瓶发酵试验,HPLC 检测埃博霉素 B 产量,结果见表 1。表明试验筛选出的埃博霉素 B 的高产菌株遗传性较稳定。

表 1 菌株 SoF5-H23 的遗传稳定性

Table 1 Genetic stability of the strain SoF5-H23

| 传代次数 | 埃博霉素 B 产量/(mg/L) |
|------|------------------|
| 1    | 75.23            |
| 2    | 78.12            |
| 3    | 79.13            |
| 4    | 76.87            |
| 5    | 79.35            |

表 2 Plackett-Burman 试验设计结果及响应值

Table 2 Plackett-Burman design variables(in coded levels) with Epothilone B as response

| 试验号 | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | $X_5$ | $X_6$ | $X_7$ | $X_8$ | $X_9$ | $X_{10}$ | $X_{11}$ | $X_{12}$ | $X_{13}$ | $X_{14}$ | $X_{15}$ | $X_{16}$ | 埃博霉素 B 产量(mg/L) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|
| 1   | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | -1    | -1    | -1    | 1     | -1       | 1        | -1       | 1        | 1        | 1        | 1        | 93.71           |
| 2   | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | -1    | -1    | -1    | 1        | -1       | 1        | -1       | 1        | 1        | 1        | 86.29           |
| 3   | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | -1    | -1    | -1       | 1        | -1       | 1        | -1       | 1        | 1        | 45.74           |
| 4   | -1    | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | -1    | -1       | -1       | 1        | -1       | 1        | -1       | 1        | 52.85           |
| 5   | 1     | -1    | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | -1       | -1       | -1       | 1        | -1       | 1        | -1       | 96.36           |
| 6   | 1     | 1     | -1    | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1       | -1       | -1       | -1       | 1        | -1       | 1        | 72.26           |
| 7   | 1     | 1     | 1     | -1    | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | 1        | -1       | -1       | -1       | -1       | 1        | -1       | 75.13           |
| 8   | 1     | 1     | 1     | 1     | -1    | -1    | 1     | 1     | -1    | 1        | 1        | -1       | -1       | -1       | -1       | 1        | 89.47           |
| 9   | -1    | 1     | 1     | 1     | 1     | -1    | -1    | 1     | 1     | -1       | 1        | 1        | -1       | -1       | -1       | -1       | 51.73           |
| 10  | 1     | -1    | 1     | 1     | 1     | 1     | -1    | -1    | 1     | 1        | -1       | 1        | 1        | -1       | -1       | -1       | 80.15           |
| 11  | -1    | 1     | -1    | 1     | 1     | 1     | 1     | -1    | -1    | 1        | 1        | -1       | 1        | 1        | -1       | -1       | 57.13           |
| 12  | 1     | -1    | 1     | -1    | 1     | 1     | 1     | 1     | -1    | -1       | 1        | 1        | -1       | 1        | 1        | -1       | 68.18           |
| 13  | -1    | 1     | -1    | 1     | -1    | 1     | 1     | 1     | 1     | -1       | -1       | 1        | 1        | -1       | 1        | 1        | 54.02           |
| 14  | -1    | -1    | 1     | -1    | 1     | -1    | 1     | 1     | 1     | 1        | -1       | -1       | 1        | 1        | -1       | 1        | 46.58           |
| 15  | -1    | -1    | -1    | 1     | -1    | 1     | -1    | 1     | 1     | 1        | 1        | -1       | -1       | 1        | 1        | -1       | 58.29           |
| 16  | -1    | -1    | -1    | -1    | 1     | -1    | 1     | -1    | 1     | 1        | 1        | 1        | -1       | -1       | 1        | 1        | 43.19           |
| 17  | 1     | -1    | -1    | -1    | -1    | 1     | -1    | 1     | -1    | 1        | 1        | 1        | 1        | -1       | -1       | 1        | 66.52           |
| 18  | 1     | 1     | -1    | -1    | -1    | -1    | 1     | -1    | 1     | -1       | 1        | 1        | 1        | 1        | -1       | -1       | 65.37           |
| 19  | -1    | 1     | 1     | -1    | -1    | -1    | -1    | 1     | -1    | 1        | -1       | 1        | 1        | 1        | 1        | -1       | 42.37           |
| 20  | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1       | -1       | -1       | -1       | -1       | -1       | -1       | 38.56           |

**2.2 突变高产菌株产埃博霉素 B 的发酵条件优化**

**2.2.1 Plackett-Burman 设计筛选重要影响因素**

根据前期实验结果,影响埃博霉素 B 产量的因素有:马铃薯淀粉、葡萄糖、豆饼粉、脱脂奶粉、七水硫酸镁、无水氯化钙、EDTA- $\text{Fe}^{3+}$ 、微量元素、吸附树脂、初始 pH、装液量、接种量、发酵温度。本实验选用 N=20 的 Plackett-Burman 设计,考察上述 13 个因素对埃博霉素 B 产量的影响。另设 3 个因素为虚拟变量,用于估计误差。每个因素分别取两个水平,以埃博霉素 B 产量为响应值。实验设计及结果见表 2,利用 SAS9.2 软件对各因素主效应分析的结果见表 3。

$P < 0.05$  为显著因素,由表 3 可知,马铃薯淀粉( $X_1$ )、脱脂奶粉( $X_4$ )、初始 pH( $X_{12}$ )和温度( $X_{15}$ )为影响埃博霉素 B 产量的显著因素,在做响应面实验时,考察因素超过 3 个会使试验次数显著增加,在 4 个显著因素中温度的影响相对较小,选择马铃薯淀粉( $X_1$ )、脱脂奶粉( $X_4$ )、初始 pH( $X_{12}$ )三个因素进一步做响应面实验。其余不显著的变量的取值结合效应的正负和节约正本的原则,进行调整。

**2.2.2 最陡爬坡实验** 根据 Plackett-Burman 实验分析的结果,结合实验的实际需要,在最陡爬坡试验中对埃博霉素 B 产量影响显著的因素的变化方



向、步长作了相应的设计,具体取值和实验结果见表4。由表4可知,最佳因素的质量浓度条件处于0+2Δ和0+3Δ之间,故以0+3Δ水平为后续实验的中心点。

表3 Plackett-Burman 试验中各因素的效应分析  
Table 3 Levels of variables and analysis of the main effect for Plackett-Burman

| 变量              |                                   | 水平  |     | t 值   | p 值     | 重要性 |
|-----------------|-----------------------------------|-----|-----|-------|---------|-----|
|                 |                                   | -1  | 1   |       |         |     |
| X <sub>1</sub>  | 马铃薯淀粉质量浓度/(g/L)                   | 3   | 4   | 24.82 | 0.000 1 | 1** |
| X <sub>2</sub>  | 葡萄糖质量浓度/(g/L)                     | 0.5 | 1   | -0.40 | 0.716 1 | 11  |
| X <sub>3</sub>  | 豆饼粉质量浓度/(g/L)                     | 1   | 2   | 0.65  | 0.562 7 | 8   |
| X <sub>4</sub>  | 脱脂奶粉质量浓度/(g/L)                    | 1   | 2   | 12.79 | 0.001 0 | 2** |
| X <sub>5</sub>  | 虚拟变量                              | -1  | 1   | 0.93  | 0.422 2 |     |
| X <sub>6</sub>  | 七水硫酸镁质量浓度/(g/L)                   | 2   | 4   | -1.91 | 0.151 6 | 5   |
| X <sub>7</sub>  | 无水氯化钙质量浓度/(g/L)                   | 1   | 2   | 1.04  | 0.376 0 | 6   |
| X <sub>8</sub>  | EDTA-Fe <sup>3+</sup> 体积分数/(mL/L) | 1.5 | 3   | 0.63  | 0.574 9 | 9   |
| X <sub>9</sub>  | 微量元素体积分数/(mL/L)                   | 0.5 | 1   | -0.25 | 0.819 4 | 12  |
| X <sub>10</sub> | 吸附树脂体积分数/%                        | 2%  | 4%  | 0.52  | 0.639 4 | 10  |
| X <sub>11</sub> | 虚拟变量                              | -1  | 1   | -0.43 | 0.696 7 |     |
| X <sub>12</sub> | 初始 pH 值                           | 7   | 9   | -5.12 | 0.014 4 | 3*  |
| X <sub>13</sub> | 装液量/mL                            | 40  | 50  | 0.98  | 0.398 1 | 7   |
| X <sub>14</sub> | 接种量体积分数/%                         | 5%  | 10% | 0.18  | 0.870 8 | 13  |
| X <sub>15</sub> | 温度/℃                              | 24  | 30  | 3.49  | 0.039 6 | 4*  |
| X <sub>16</sub> | 虚拟变量                              | -1  | 1   | 1.42  | 0.250 1 |     |

注:\* 差异显著, P<0.05; \*\* 差异极显著, P<0.01

表4 最陡爬坡实验设计及结果

Table 4 Experimental design and results of steepest ascent

| 步长   | 土豆淀粉质量浓度/(g/L) | 脱脂奶粉质量浓度/(g/L) | 初始 pH 值 | 埃博霉素 B 产量/(mg/L) |
|------|----------------|----------------|---------|------------------|
| 0    | 3              | 1              | 9       | 75.21            |
| 0+1Δ | 3.5            | 1.5            | 8.5     | 84.50            |
| 0+2Δ | 4              | 2              | 8       | 98.13            |
| 0+3Δ | 4.5            | 2.5            | 7.5     | 103.27           |
| 0+4Δ | 5              | 3              | 7       | 94.53            |
| 0+5Δ | 5.5            | 3.5            | 6.5     | 79.76            |

2.2.3 Box-Behnken 实验设计及结果 三个重要因

素的水平取值见表5,实验设计及结果见表6。

表5 Box-Behnken 实验因素水平及编码

Table 5 Experimental variables and levels for Box-Behnken design

| 因素             |                 | 水平 |     |   |
|----------------|-----------------|----|-----|---|
|                |                 | -1 | 0   | 1 |
| X <sub>1</sub> | 马铃薯淀粉质量浓度/(g/L) | 4  | 4.5 | 5 |
| X <sub>2</sub> | 脱脂奶粉质量浓度/(g/L)  | 2  | 2.5 | 3 |
| X <sub>3</sub> | 初始 pH 值         | 7  | 7.5 | 8 |

表6 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken

| 试验号 | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | 埃博霉素 B 产量/(mg/L) |
|-----|----------------|----------------|----------------|------------------|
| 1   | -1             | -1             | 0              | 70.32            |
| 2   | -1             | 1              | 0              | 73.06            |
| 3   | 1              | -1             | 0              | 107.52           |
| 4   | 1              | 1              | 0              | 78.49            |
| 5   | 0              | -1             | -1             | 95.35            |
| 6   | 0              | -1             | 1              | 83.05            |
| 7   | 0              | 1              | -1             | 76.56            |
| 8   | 0              | 1              | 1              | 77.46            |
| 9   | -1             | 0              | -1             | 71.28            |
| 10  | 1              | 0              | -1             | 94.23            |
| 11  | -1             | 0              | 1              | 80.51            |
| 12  | 1              | 0              | 1              | 86.47            |
| 13  | 0              | 0              | 0              | 108.36           |
| 14  | 0              | 0              | 0              | 106.07           |
| 15  | 0              | 0              | 0              | 108.21           |

注: X<sub>1</sub>=(x<sub>1</sub>-4.5)/0.5, X<sub>2</sub>=(x<sub>2</sub>-2.5)/0.5, X<sub>3</sub>=(x<sub>3</sub>-7.5)/0.5

以埃博霉素 B 产量为响应值,根据表6中实验结果,利用 SAS 软件对结果进行二次回归分析,获得的回归方程为:

$$Y = 107.547 + 8.943X_1 - 6.334X_2 - 1.241X_3 - 12.591X_1X_1 - 7.943X_1X_2 - 4.248X_1X_3 - 12.608X_2X_2 + 3.300X_2X_3 - 11.833X_3X_3$$

对该模型进行方差分析,结果见表7,模型系数显著性检验见表8。

表7 回归方程的方差分析

Table 7 ANOVA of regression model

| 类型  | 自由度 | 平方和     | 均方差    | F 值   | P>F    |
|-----|-----|---------|--------|-------|--------|
| 模型  | 9   | 2805.46 | 311.72 | 32.49 | 0.0007 |
| 残差  | 5   | 47.97   | 9.59   |       |        |
| 失拟项 | 3   | 44.69   | 14.90  | 9.08  | 0.1008 |
| 纯误差 | 2   | 3.28    | 1.64   |       |        |
| 总和  | 14  | 2853.43 |        |       |        |

R<sup>2</sup>=98.32% R<sup>2</sup><sub>adj</sub>=95.29% CV=3.53

由表 7 可知,模型极显著( $P > F$  小于 0.01);失拟项在 0.1 水平上不显著( $P=0.1008 > 0.1$ ),说明残差均由随机误差引起,因此模型选择正确。 $R^2=0.9832$ ,说明模型可以解释 98.32% 响应值的变化,表明方程拟合较好,实验结果和预测值之间具有较好的一致性。 $Y$  的变异系数 CV 表示实验的精确度, CV 值越高,实验的可靠性越低,本实验中 CV 值相对较低,说明了实验操作可靠。

由表 8 方程的回归系数显著性检验表明:模型一次项  $X_1$  和  $X_2$  极显著;二次项  $X_1X_1, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_2, X_3X_3$  对响应值有显著的影响,且  $X_1$  (土豆淀粉)和  $X_2$  (脱脂奶粉)有交互作用,交互作用显著,说明发酵过程应该控制好碳氮比。

表 8 回归方程中回归系数的  $T$  值检验

Table 8 Test of significance for regression coefficient

| 模型项      | 回归系数   | 标准误差 | $T$ 值 | $Pr >  t $ |
|----------|--------|------|-------|------------|
| $X_1$    | 8.94   | 1.10 | 8.17  | 0.000 4    |
| $X_2$    | -6.33  | 1.10 | -5.78 | 0.002 2    |
| $X_3$    | -1.24  | 1.10 | -1.13 | 0.308 4    |
| $X_1X_1$ | -12.59 | 1.61 | -7.81 | 0.000 6    |
| $X_1X_2$ | -7.94  | 1.55 | -5.13 | 0.003 7    |
| $X_1X_3$ | -4.25  | 1.55 | -2.74 | 0.040 7    |
| $X_2X_2$ | -12.61 | 1.61 | -7.82 | 0.000 5    |
| $X_2X_3$ | 3.3    | 1.55 | 2.13  | 0.086 3    |
| $X_3X_3$ | -11.83 | 1.61 | -7.34 | 0.000 7    |

**2.2.4 响应面分析及最佳发酵条件确定** 利用 SAS 软件根据回归方程进行响应面分析,绘制响应面分析图及其等高线图,结果见图 4~6。考察所拟合的响应曲面的形状,每个响应面分析图分别代表着两个独立变量之间的相互作用,此时第三个变量保持在中心点水平不变。曲面图的形状可反应出各单因素对埃博霉素 B 的影响,曲面越陡峭,影响越显著。从其等高线图可以直观看出两因素的交互作用,等高线的形状反映出交互作用效应的强弱,圆形表示两因素交互作用不显著,等高线形状越接近椭圆形表示交互作用越强。

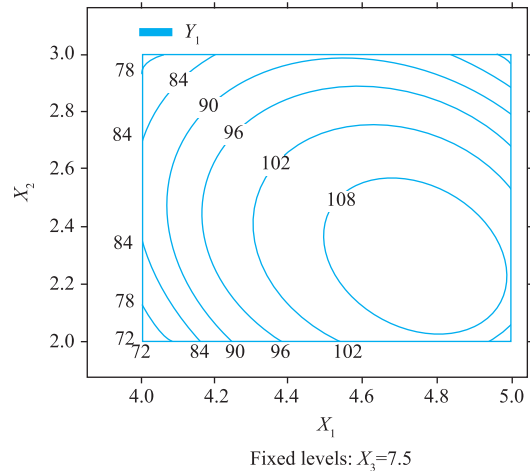
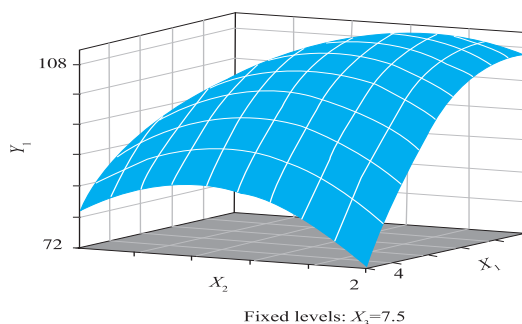


图 4  $Y=f(X_1, X_2)$  响应面立体分析图和相应等高图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot of the function  $Y=f(X_1, X_2)$

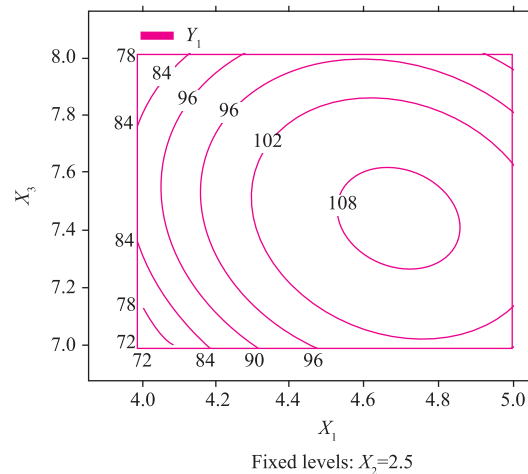
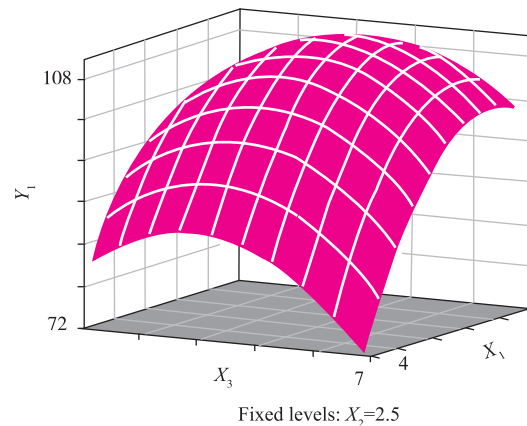


图 5  $Y=f(X_1, X_3)$  响应面立体分析图和相应等高图

Fig. 5 Response surface plot and contour plot of the function  $Y=f(X_1, X_3)$

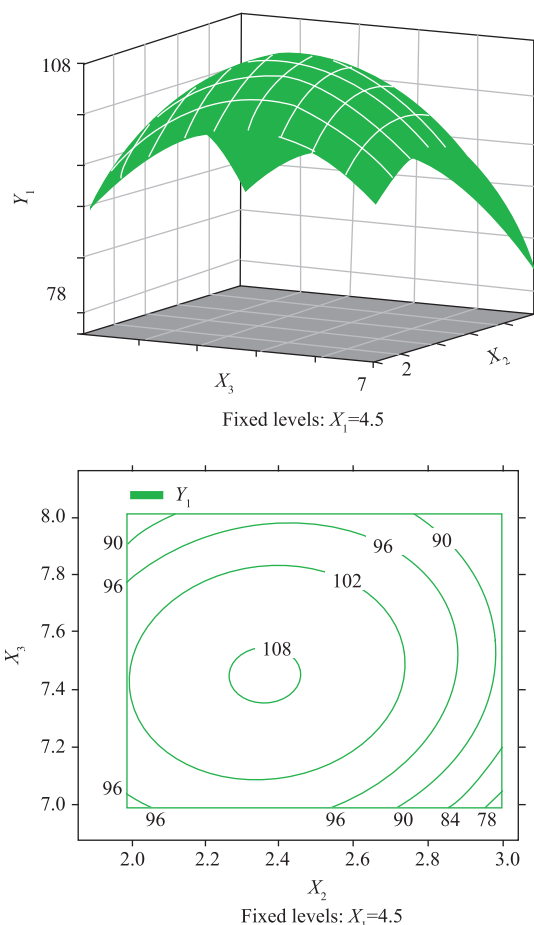


图 6  $Y=f(X_2, X_3)$  响应面立体分析图和相应等高图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot of the function  $Y=f(X_2, X_3)$

从图中及软件分析, 回归方程存在稳定点, 即存在极值点  $(X_1, X_2, X_3)$  使得响应变量  $Y$  取得最大值。通过岭脊分析 (ridge analysis) 得到极大值所对应的各主要因素  $(X_1, X_2, X_3)$  的编码值分别为  $(0.514 228, -0.430 58, -0.200 42)$ , 即马铃薯淀粉、脱脂奶粉、初始 pH 的最佳取值分别为  $4.757 1 \text{ g/L}$ 、 $2.284 7 \text{ g/L}$ 、 $7.399 8$ , 此时埃博霉素 B 产量达到最高为  $111.42 \text{ mg/L}$ 。

### 2.3 模型的验证

为了证明预测结果的可靠性, 在以上确定的最佳发酵条件下进行摇瓶发酵, 验证结果埃博霉素 B 产量为  $108.67 \text{ mg/L}$  与预测结果十分接近, 说明了实验值和预测值之间具有良好的拟合性, 模型的有效性, 证明用响应面法来寻找最佳发酵条件是可行的。

## 3 结语

工业微生物的菌种选育工作在发酵工业中占有重要的地位, 是决定该发酵产品能否具有工业化生产价值及发酵过程成败的关键。已有文献[12]报道, 通过对纤维堆囊菌进行 NTG 化学诱变, 获得两株埃博霉素 A 产量为  $17.3$ 、 $17.4 \text{ mg/L}$  的优良菌株。作者在选育方法上采用物理方法与化学方法相结合对出发菌株进行诱变处理, 以此获得高产菌株的目的。

作者以纤维堆囊菌 SoF5-76 为诱变出发菌株, 经紫外线和亚硝基弧复合诱变处理和选育, 获得一株高产且遗传稳定性较好的突变菌株 SoF5-H23, 其发酵产埃博霉素 B 的量可达  $79.83 \text{ mg/L}$ , 比出发菌株提高了  $1.27$  倍。

通过 Plackett-Burman 实验和响应面分析法对纤维堆囊菌产埃博霉素 B 的发酵工艺进行了优化, 确定最佳发酵工艺为: 马铃薯淀粉  $4.8 \text{ g/L}$ 、脱脂奶粉  $2.3 \text{ g/L}$ 、无水氯化钙  $2 \text{ g/L}$ 、葡萄糖  $0.5 \text{ g/L}$ 、豆饼粉  $2 \text{ g/L}$ 、七水硫酸镁  $2 \text{ g/L}$ 、EDTA- $\text{Fe}^{3+}$   $2 \text{ mL/L}$ 、微量元素 (TE)  $0.5 \text{ mL/L}$ 、吸附树脂  $2\%$ 、培养基初始 pH  $7.4$ 、装液量  $50 \text{ mL}$ 、接种体积分数  $8\%$ 、温度  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在此最优条件下埃博霉素 B 产量为  $108.67 \text{ mg/L}$ , 比优化前提高了  $55.62\%$ 。

为了提高埃博霉素 B 的产量, 作者首先对菌株进行诱变选育, 获得一株高产菌株, 使得埃博霉素 B 产量从  $35.24 \text{ mg/L}$  提高到  $79.83 \text{ mg/L}$  (产量提高了  $1.27$  倍), 然后对发酵工艺优化, 使得埃博霉素 B 产量达到  $108.67 \text{ mg/L}$ , 又提高了  $36.13\%$ , 整个过程中菌株诱变是产量提高的关键, 分析产量提高的原因可能为: 本研究的供试菌株是以四株野生菌为出发菌株通过 Genome shuffling 递归原生质体融合获得的菌株<sup>[13]</sup>, 多株野生菌含有更加多样的遗传信息, 通过递归原生质体融合技术, 累积了大量正突变效应, 通过本研究的理化复合诱变和发酵工艺优化可能会使这种正效应凸显出来, 获得了较高的埃博霉素产量。此产量是国内外报道的埃博霉素最高发酵产量, 表明传统生物工程技术在工业微生物领域仍然具有较高的应用价值。

## 参考文献:

- [1] MENG Fanxin, LI Youxin, GUO Weiliang, et al. Optimization of fermentation medium for epothilones production with sequential statistical approach[J]. **Chem Res Chinese Universities**, 2010, 26(1): 86–91.
- [2] Sang Woo Park, Se Jong Han, Dong-Shik Kimb, et al. Improvement of epothilone B production by in situ removal of ammonium using cation exchange resin in *Sorangium cellulosum* culture[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2007(37): 328–331.
- [3] 罗立新, 汪薇, 陆一鸣, 等. 纤维堆囊菌发酵产生埃博霉素条件的优化[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2006, 34(5): 48–52.  
LUO Lixin, WANG Wei, LU Yiming, et al. Optimized conditions for producing epothilone via fermentation of *Sorangium cellulosum*[J]. **Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition**, 2006, 34(5): 48–52. (in Chinese)
- [4] Robert L Arslanian, Charles D Parker, Peter K, et al. Large-scale isolation and crystallization of epothilone D from *Myxococcus xanthus* cultures[J]. **Journal of Natural Products**, 2002, 65(4): 570–572.
- [5] 韩莉莉, 卢育新, 王赫, 等. 培养基组成对纤维堆壤菌产埃博霉素的影响[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(6): 103–106  
HAN Lili, LU Yuxin, WANG He, et al. Influence of medium ingredients on the production of epothilone by *Sorangium cellulosum* [J]. **Journal of Microbiology**, 2008, 28(6): 103–106. (in Chinese)
- [6] Tang L, Shah S, Chung L, et al. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster [J]. **Science**, 2000, 287: 640–642.
- [7] Julien B, Shah S. Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus* [J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2002, 46: 2772–2778.
- [8] Mutka S C, Carney J R, Liu Y, et al. Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli* [J]. **Biochemistry**, 2006, 45: 1321–1330.
- [9] LI Peiqin, Xu Liang, Mou Yan, et al. Medium optimization for exopolysaccharide production in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2012(13): 11411–11426.
- [10] Puri M, Kaur A, Singh RS, et al. Response surface optimization of medium components for Naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010(162): 181–191.
- [11] ZHANG Yunjian, LI Qiang, ZHANG Yuxiu, et al. Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM)[J]. **Journal of Zhejiang University Science B: Biomed & Biotechnol**, 2012, 13(2): 103–110.
- [12] 罗立新, 陆一鸣, 潘力. NTG 诱变选育埃博霉素高产菌株的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(3): 1–3.  
LUO Lixin, LU Yiming, PAN Li. Screening of high epothilone-producing mutants of *Sorangium cellulosum* by NTG mutation[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2007, 23(3): 1–3. (in Chinese)
- [13] 龚国利, 陈松, 李慧, 等. 基因重组技术选育埃博霉素 B 高产菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(2): 106–110.  
GONG Guoli, CHEN Song, LI Hui, et al. Genome shuffling improving the production of Epothilone B [J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2013, 38(2): 106–110. (in Chinese)