

研究报告

微粒添加对棘白菌素 B 发酵过程的影响

牛坤, 胡逸博, 毛健, 邹树平, 郑裕国

浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310014

牛坤, 胡逸博, 毛健, 等. 微粒添加对棘白菌素 B 发酵过程的影响. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1082–1088.

Niu K, Hu YB, Mao J, et al. Effect of microparticles on echinocandin B production by *Aspergillus nidulans*. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1082–1088.

摘要: 阿尼芬净是一种新型的抗真菌药物, 能够抑制各种致病念珠菌在活体内外的活性。棘白菌素 B (Echinocandin B, ECB) 是合成阿尼芬净的关键前体, 其发酵单位的高低直接关系到阿尼芬净的价格及市场前景。文中考察了构巢曲霉在摇瓶发酵生产 ECB 的过程中, 添加滑石粉、 Al_2O_3 、玻璃珠等微粒对其发酵单位的影响。发现微粒的粒径和添加浓度是菌体形态和 ECB 产量的关键影响因素, 添加 20 g/L 滑石粉 ($d_{50} = 14.2 \mu\text{m}$) 和 7 颗玻璃珠 ($d = 6 \text{ mm}$) 可使 ECB 发酵产量分别比对照提高 33.2% 和 41.7%, 达到 1 262.9 mg/L 和 1 344.1 mg/L。结果表明微粒的添加可以显著地改善丝状微生物发酵过程中的菌丝形态, 提高其产物的发酵产量, 为丝状微生物发酵过程的优化提供了一种重要手段。

关键词: 棘白菌素 B, 构巢曲霉, 微粒, 发酵

Effect of microparticles on echinocandin B production by *Aspergillus nidulans*

Kun Niu, Yibo Hu, Jian Mao, Shuping Zou, and Yuguo Zheng

College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Anidulafungin is an effective antifungal medicine, which can inhibit activities of candida *in vitro* and *in vivo*. Echinocandin B (ECB) is the key precursor of Anidulafungin, thus the price and market prospect of Anidulafungin is directly due to the fermentation titer of ECB. In this study, *Aspergillus nidulans* was used for ECB fermentation, and the influence of adding microparticles on ECB fermentation was studied, such as talcum powder, Al_2O_3 , and glass beads. The particle size and concentration were the key factors for mycelium morphology and ECB production, and ECB production

Received: November 24, 2014; **Accepted:** January 4, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710800).

Corresponding author: Yuguo Zheng. Tel/Fax: +86-571-88320630; E-mail: zhengyg@zjut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No.2011CB710800) 资助。

could reach 1 262.9 mg/L and 1 344.1 mg/L by adding talcum powder of 20 g/L ($d_{50} = 14.2 \mu\text{m}$) and 7 glass beads (6 mm), an increase by 33.2% and 41.7%, respectively. The results indicated that the mycelium morphology of filamentous microorganisms and the product yield of fermentation could be improved by adding microparticles remarkably, and it provide an important method for the fermentative optimization of filamentous microorganisms.

Keywords: Echinocandin B, *Aspergillus nidulans*, microparticles, fermentation

棘白菌素类抗生素是 20 世纪 70 年代发现的一组天然产物, 具有类似的环状多肽核心和不同的脂肪酸侧链, 能够非竞争性地抑制真菌细胞壁 β -1,3-葡聚糖合成酶的活性, 从而达到抗真菌的目的^[1-3]。FDA 已批准上市的这类药物包括卡泊芬净 (Caspofungin)、米卡芬净 (Micafungin) 和阿尼芬净 (Anidulafungin), 其中前两者已在国内上市, 阿尼芬净已在国内临床中^[4-6]。

阿尼芬净是由前体化合物棘白菌素 B (Echinocandin B, ECB) 经犹他游动放线菌产生的酰化酶作用脱去侧链亚油酰基, 然后在 DMF 中与活性中间体 4'-戊氧基-[1,1',4',1'']三苯基-4-甲酸-2,4,5-三氯-苯基酯反应制得, 其化学结构如图 1A 所示^[7]。目前, ECB 的化学结构已经确定, 它的六肽支架是由 6 个氨基酸组成, 包括: 4R,5R-二羟基-L-鸟氨酸、L-苏氨酸、4R-羟基-L-

脯氨酸、3S,4S-二羟基-L-高酪氨酸、L-苏氨酸和 3S-羟基-4S-甲基-L-脯氨酸 (图 1B)^[8]。

ECB 是合成阿尼芬净的关键前体化合物, 其发酵单位的高低将直接影响阿尼芬净的市场前景。根据文献和专利报道, 目前国内外 ECB 均是利用微生物发酵法进行制备, 其中主要是以构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 进行发酵^[9-12]。但是在该类微生物发酵过程中会碰到一些难以克服的技术问题, 如发酵液粘度高、供氧不足以及传质受阻等, 这些问题都会导致菌种代谢合成产物的能力下降, 因此 ECB 的发酵仍然处于实验室研究阶段。要解决上述问题, 常用的方法有菌种诱变、培养基优化、气升式发酵罐培养、细胞固定化以及工艺操作条件调控等^[13-15]。近年来, 研究学者提出了通过添加无机微粒来改变丝状微生物菌体形态的新技术, 发现无机微粒的应用可以显著影响丝状微生物

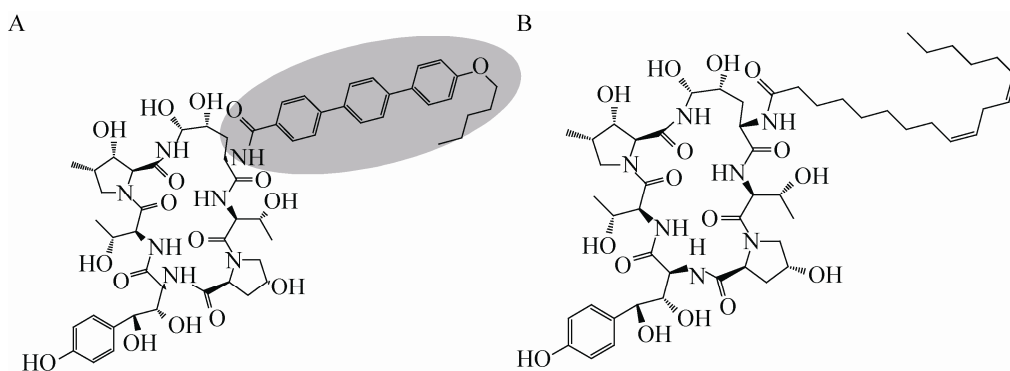


图 1 阿尼芬净 (A) 和 ECB (B) 的化学结构式^[7-8]

Fig. 1 Chemical structure of anidulafungin (A) and echinocandin B (B)^[7-8].

生长过程中的菌体形态, 并进一步影响产物产量及酶的活性, 目前应用比较广泛的无机微粒包括硅酸盐、钛酸盐、滑石粉、 Al_2O_3 等^[16-20]。

本文以构巢曲霉发酵合成 ECB, 希望通过添加不同种类及不同浓度的微粒来改善菌体生长形态, 调控培养过程中的传质过程, 最终提高 ECB 的发酵产量。

1 材料与方 法

1.1 菌种

构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* ZJB09223, 由本实验室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基: PDA 培养基。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 甘油 10, 棉籽粉 25, pH 6.8-7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

初始发酵培养基 (g/L): 花生油 20, 甘油 10, 蛋白胨 10, L-脯氨酸 1, 甘露醇 90, 豆粕粉 40, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCl_2 0.3, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 主要仪器与设备

恒温调速摇床 (上海杜科自动化设备有限公司 DKY-1); 高效液相色谱 (日本 SHIMADZU); 高压蒸汽灭菌锅 (日本 SANYO, MLS-3780); 电子分析天平 (上海精密仪器仪表有限公司 FA2004); 高速冷冻离心机 (美国 Bechman Coulter, X-22); 光学显微镜 (美国 leica, DM3000)。

1.4 培养方法

1.4.1 斜面培养

将传好种的斜面置于 25 °C 培养箱中培养

8-16 d, 菌落表面呈现墨绿色后取出置于 15-20 °C 继续培养, 一般 5-20 d 都可接种用于种子培养。

1.4.2 种子液培养

接种后的种子培养基在 220 r/min、25 °C 条件下培养 2 d。

1.4.3 发酵培养

按照 10% 接种量进行接种, 然后将接种后发酵培养基在 220 r/min、25 °C 条件下培养 12 d, 第 6 天起定时取样测定 ECB 产量。每个条件做 3 个平行样, 最终结果取平均值。

1.5 分析方法

生物量 (g/L) 的测定: 采用称重法, 取 1 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 放入 90 °C 烘箱烘干至恒重, 计算得到生物量。

待测样品预处理: 取 1 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 8 min, 弃上清; 所得菌体加入 1 mL 甲醇, 25 °C 振荡萃取 30 min, 12 000 r/min 离心 8 min, 留上清液备用; 残留菌体中再加入 1 mL 甲醇进行二次萃取, 25 °C 振荡摇匀 30 min, 12 000 r/min 离心 8 min, 所得上清液与前一步上清液合并, 12 000 r/min 离心 2 min, 上清液用 0.45 μm 水膜过滤, 进行检测。

产物的测定: 产物 ECB 采用高效液相色谱 (HPLC) 进行检测, 色谱柱为 ODS-C18 柱 (大连伊力特 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈: 甲醇: 水 = 2: 7: 1, 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 222 nm, 进样量 20 μL, 柱温 40 °C。

2 结果与分析

2.1 微粒种类对 ECB 发酵过程的影响

本实验选用了文献报道较多的滑石粉、 Al_2O_3 以及玻璃珠作为无机微粒, 考察了其

ECB 发酵过程的影响。在发酵过程中, 由于培养基中含有可作为微粒的豆粕粉 ($d_{50} = 8.8 \mu\text{m}$), 为了消除其对结果的影响, 本实验首先比较了采用蒸煮过滤后的豆粕粉滤液作为有机氮源与未过滤的豆粕粉培养基进行发酵的结果 (图 2), 发现采用蒸煮过后的豆粕粉滤液作为氮源发酵时, 其产量由原来的 $1\ 025.6 \text{ mg/L}$ 降为 935.9 mg/L , 下降了近 10%, 而下降的原因可能是由于氮源的损失造成的, 也可能是由于作为微粒的豆粕粉颗粒被过滤除去造成的。

在后续实验中, 以蒸煮过滤后的豆粕粉培养基作为对照, 考察了在其中加入不同微粒后对发酵过程的影响。发现对照组菌体在发酵过程中会自我缠绕, 呈较大直径的球状生长, 而添加滑石粉及玻璃珠后均可以改善发酵过程中微生物的菌丝形态, 使 ECB 的发酵单位有所提高。当添加 20 g/L 600 目 ($d_{50} = 5.7 \mu\text{m}$) 滑石粉时, ECB 产量由 935.9 mg/L 提高到 $1\ 054.4 \text{ mg/L}$; 当加入 3 颗直径为 4 mm 玻璃珠后, ECB 产量提高到 967.6 mg/L 。而加入 Al_2O_3 后对 ECB 的产量反而有所抑制, 推测可能是由于 Al_2O_3 粒径过小 ($d_{50} = 4.7 \mu\text{m}$) 引起的。

2.2 滑石粉粒径及浓度对 ECB 发酵单位的影响

在上述实验的基础上, 进一步考察了滑石粉的粒径及其添加浓度对 ECB 发酵单位的影响。图 3 为添加 10 g/L 不同粒径滑石粉的结果, 表明当滑石粉粒径小于 600 目 ($d_{50} > 5.7 \mu\text{m}$) 时, 添加微粒可以提高 ECB 产量, 而当其粒径大于 800 目 ($d_{50} < 4.6 \mu\text{m}$) 时, ECB 产量反而会下降, 并且微粒的添加对菌体浓度影响较小。而当添加粒径大于 800 目的滑石粉时, 虽然菌体浓度基本未受影响, 但由于添加的粒径较小,

使得发酵过程中菌丝体包裹微粒后会在发酵液中形成致密的菌丝小球并充满整个摇瓶, 导致发酵液黏度增大, 营养物质和氧气的传递效果下降, 从而使产物 ECB 发酵产量降低, 这与上述实验中添加 Al_2O_3 的结果是一致的。

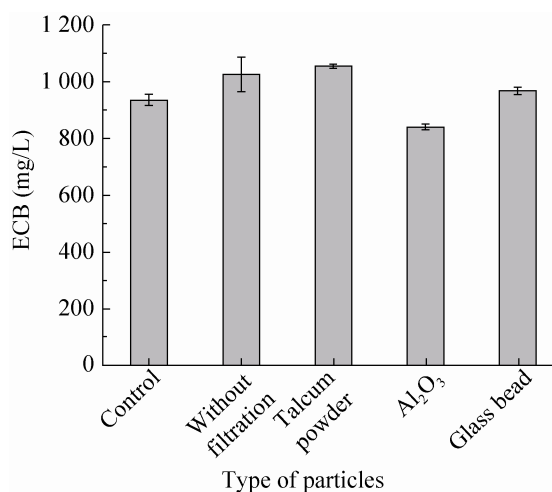


图 2 微粒种类对棘白菌素 B 发酵产量的影响
Fig. 2 Effect of microparticles types on the production of ECB.

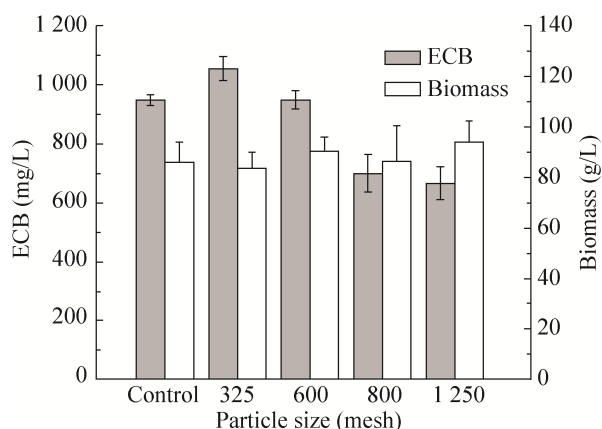


图 3 滑石粉粒径对 ECB 发酵产量的影响
Fig. 3 Effect of particle size of talcum powder on the production of ECB.

表 1 为不同浓度的滑石粉 (325 目, $d_{50} = 14.2 \mu\text{m}$) 对 ECB 发酵过程的影响, 发现 ECB 的产量随滑石粉添加浓度的增加呈现先升高后降低的趋势, 添加 20 g/L 滑石粉可以使 ECB 的产量提高 33.2%至 1 262.9 mg/L; 而添加 30 g/L 600 目滑石粉 ($d_{50} = 5.7 \mu\text{m}$) 时可以使 ECB 产量达到最高值 1 144.7 mg/L (结果未列出)。由结果可知, 在添加粒径较小的微粒时, 其添加浓度应适度增加, 才能达到最佳的优化效果, 而这与文献中的报道是相反的, 推测可能是由于发酵菌种的不同引起的^[20]。

同时在培养过程中发现, 当添加滑石粉时可以显著改善发酵过程中菌丝体的状态, 使菌体形成以微粒为核心的菌丝团, 且培养基中菌丝球的直径与对照相比明显减小 (图 4), 从而提高了发酵液的传质效果和溶氧量, 使 ECB 产量明显增加。而当添加的滑石粉浓度过高时, 发酵液内微粒与菌丝球之间相互碰撞、摩擦的几率大大提高, 因此可能会切断菌丝体, 使菌体以分散状菌丝的形态生长, 增加了发酵液粘度, 最终导致 ECB 发酵产量降低 (图 4, 40 g/L)。

表 1 滑石粉浓度对 ECB 发酵产量的影响

Table 1 Effect of talcum powder ($d_{50} = 14.2 \mu\text{m}$) concentration on the production of ECB

Concentration of talcum powder (g/L)	ECB production (mg/L)	Biomass (g/L)
Control	948.5±18.3	86.3±7.8
10	1 054.9±39.9	83.8±6.3
20	1 262.9±74.1	85.1±4.3
30	1 229.2±23.5	91.6±4.2
40	1 202.5±36.8	89.3±0.9

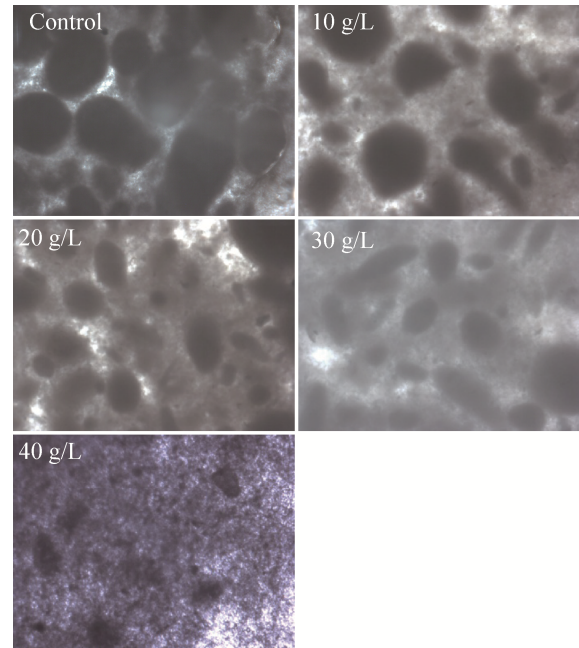


图 4 滑石粉浓度对微生物菌丝体形态的影响
Fig. 4 Effect of talcum powder on the morphology of *Aspergillus nidulans*.

2.3 玻璃珠的数目对 ECB 发酵单位的影响

表 2 为添加不同数量的玻璃珠对 ECB 发酵产量的影响, 由结果可以看出添加玻璃珠也可以促使 ECB 发酵单位提高。当玻璃珠直径为 4 mm、添加个数为 5 颗和 7 颗时, 发酵液中 ECB 含量分别为 1 117.4 mg/L 和 1 160.9 mg/L, 分别比对照组分别提高了 17.7%和 22.4%。当玻璃珠直径为 6 mm、添加个数为 5 颗和 7 颗时, ECB 产量会大幅提高, 最高产量达到 1 344.1 mg/L, 比对照提高了 41.7%。

观察发酵液状态可以看出, 当培养基中添加适当浓度的玻璃珠时, 玻璃珠产生的剪切力会切断菌丝, 使菌丝球直径减小 (图 5B、5C), 氧气分子和营养物质传递效果增强, ECB 发酵产量提高, 而当过量添加玻璃珠时 (9 颗), 玻璃珠与菌丝体之间的碰撞和摩擦作用占主导地

表 2 玻璃珠的添加对 ECB 发酵产量的影响

Table 2 Effect of glass beads numbers (d = 4 mm, 6 mm) on the production of ECB

Numbers of glass beads	ECB production (mg/L)	
	Diameter of 4 mm	Diameter of 6 mm
Control	948.5±18.3	948.5±18.3
5	1 117.4±23.5	1 037.6±24.8
7	1 160.9±42.5	1 344.1±29.9
9	882±6.3	1 249.1±24.9

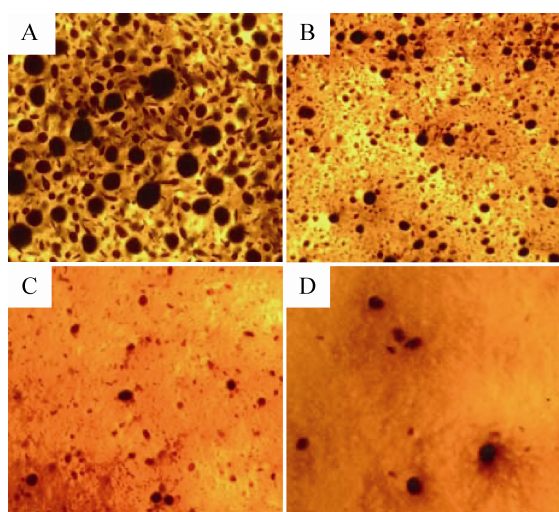


图 5 玻璃珠 (d = 4 mm) 数量对微生物菌丝体形态的影响

Fig. 5 Effect of glass bead (d = 4 mm) numbers on the morphology of *Aspergillus nidulans*. (A) Control. (B) 5. (C) 7. (D) 9.

位, 过高的剪切力会使培养基发生剪切稀化现象, 从而导致了菌丝体的断裂, 培养基粘度降低, ECB 产量下降 (图 5D)。

3 讨论

目前, ECB 主要通过曲霉菌属发酵法制备, 但由于丝状微生物发酵过程中会以菌丝球或分散状菌丝的形态生长, 从而导致发酵液粘度增

加, 溶氧量急剧下降, 发酵水平降低。而通过添加无机微粒来改善菌体生长形态, 调控培养过程中的传质过程是近几年来发展的新技术, 该技术的应用可以优化丝状微生物的发酵过程, 进而提高关键酶活性及发酵产物的产量。

本文初步考察了滑石粉、 Al_2O_3 以及玻璃珠对构巢曲霉发酵过程中 ECB 产量的影响, 研究表明在摇瓶发酵生产 ECB 的培养基中, 微粒的添加可以改善发酵过程中菌丝的生长形态, 提高氧气和营养物质的传递效率, 增加 ECB 的发酵产量。微粒的浓度和粒径是影响该过程的主要因素, 随着微粒浓度的提高, 其对菌丝体产生的剪切力也不断提高, 使菌丝球直径减小, 氧气和营养物质的传递效果得以改善; 而当剪切力过高时, 会使菌丝体大量断裂, 微生物的生长形态由菌丝球状变为分散状菌丝, 同时 ECB 产量降低。研究表明微粒的粒径对 ECB 的发酵产量也有较大影响, 添加适当粒径的微粒可以使菌体包裹微粒形成粒径较小的菌丝球, 提高传质效果; 而粒径过小则无法产生此作用。因此, 在实际发酵过程中应根据不同的发酵菌株选择不同的微粒浓度及粒径, 以提高发酵效果。该技术的应用为丝状微生物发酵过程的优化提供了一定的思路与借鉴, 为解决丝状微生物发酵过程遇到的高粘度、低溶氧等问题提供了重要的方法, 然而现今主要研究工作多集中于国外, 国内对此研究尚无报道, 后续还需要在新型微粒发掘、影响机制考察等方面开展进一步的研究工作。

REFERENCES

- [1] Vazquez JA. Anidulafungin: A new echinocandin with a novel profile. *Clin Ther*, 2005, 27(6): 657-673.

- [2] Ghannoum M, D'Angelo M. Anidulafungin: a potent antifungal that targets *Candida* and *Aspergillus*. *Infect Dis Clin Practice*, 2005, 13(4): 165–178.
- [3] Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49(6): 889–891.
- [4] Chen SCA, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections a comparison. *Drugs*, 2011, 71(1): 11–41.
- [5] Perlin DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol*, 2011, 6(4): 441–457.
- [6] Chandrasekar PH, Sobel JD. Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(8): 1171–1178.
- [7] Nyfeler R, Keller SW. Metabolites of microorganisms. 143: echinocandin B, a novel polypeptide antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolation and structural components. *Helv Chim Acta*, 1974, 57(8): 2459–2477.
- [8] Emri T, Majoros L, Tóth V, et al. Echinocandins: production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(8): 3267–3284.
- [9] Cockshott A, Sullivan GR. Improving the fermentation medium for Echinocandin B production. Part I: sequential statistical experimental design. *Process Biochem*, 2001, 36(7): 647–660.
- [10] Cockshott A, Hartman B. Improving the fermentation medium for Echinocandin B production part II: particle swarm optimization. *Process Biochem*, 2001, 36(7): 661–669.
- [11] Toth V, Nagy CT, Poci I, et al. The echinocandin B producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(1): 113–122.
- [12] Toth V, Nagy CT, Miskei M, et al. Polyphasic characterization of "*Aspergillus nidulans* var. *roseus*" ATCC 58397. *Folia Microbiol*, 2011, 56(5): 381–388.
- [13] Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol*, 2000, 20(1): 17–48.
- [14] Xia JY, Wang YH, Zhang SL, et al. Fluid dynamics investigation of variant impeller combinations by simulation and fermentation experiment. *Biochem Eng J*, 2009, 43(3): 252–260.
- [15] Rainer K, Thomas W, Manely EE, et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol*, 2013, 163(2): 112–123.
- [16] Kaup BA, Ehrlich K, Pescheck M, et al. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(3): 491–498.
- [17] Driouch H, Hänsch R, Thomas W, et al. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(2): 462–471.
- [18] Driouch H, Roth A, Dersch P, et al. Filamentous fungi in good shape: microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioeng Bugs*, 2011, 2(2): 100–104.
- [19] Walisko R, Krull R, Schrader J, et al. Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production. *Biotech Lett*, 2012, 34(11): 1975–1982.
- [20] Driouch H, Sommer B, Wittmann C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 105(6): 1058–1068.

(本文责编 郝丽芳)