

# 利用响应面法优化红谷霉素发酵培养基\*

熊智强 徐 平 涂国全\*\*

(江西农业大学生物工程系 南昌 330045)

**摘要:** 在摇瓶条件下, 对链霉菌 702 发酵过程中的主要培养基组成对产红谷霉素影响进行的研究。试验采用响应面法优化摇瓶发酵培养基, 利用全因子实验设计筛选出对链霉菌 702 产红谷霉素重要影响因子黄豆饼粉和工业蛋白胨, 应用最陡爬坡实验法接近重要因子的最优水平, 然后应用中心复合设计确定重要因子的最优水平。优化后的培养基组成为: 玉米淀粉 20g, 玉米粉 20g, 葡萄糖 20g, 磷酸二氢钾 0.3g, 蛋白胨 9g, 黄豆饼粉 23g, 硝酸钾 2.5g, 硫酸铵 2.5g, 豆油 5mL, 氯化钠 3g, 碳酸钙 6g, 定容至 1L。实验结果表明, 采用优化后的培养基, 其发酵液红谷霉素效价达到 1,500 $\mu$ g/mL, 比优化前提高了 3.08 倍。

**关键词:** 链霉菌 702, 红谷霉素, 发酵, 响应面法

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0005-05

## Optimization of Fermentation Medium for Honggumycin Using Response Surface Methodology\*

XIONG Zhi-Qiang XU Ping TU Guo-Quan\*\*

(Department of Bioengineering, JAU, Nanchang 330045)

**Abstract:** Under the shaking-flask culture, fermentation medium of honggumycin produced by *Streptomyces* 702 were studied. The experiment was used response surface methodology to optimize the shaking-flask fermentation medium. Firstly, we applied full factorial design to screen important factors soybean meal and industrial peptone which affected honggumycin produced by *Streptomyces* 702. Furthermore, we designed experiment to obtain the steepest ascent path and optimal level by the central composite design. The optimum medium consisted of (g/L): maize starch 20, maize meal 20, glucose 20, soybean meal 23, industrial peptone 9,  $\text{KNO}_3$  2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3,  $\text{NaCl}$  3,  $\text{CaCO}_3$  6, bean oil 5mL/L. Under the optimal medium, the yield of honggumycin was up to 1,500 g/mL, which was increased by 308% than the original medium.

**Key words:** *Streptomyces* 702, Honggumycin, Fermentation, Response surface methodology

江西农业大学生物工程系应用微生物研究室从土壤中分离筛选到一株链霉菌, 简称链霉菌 702, 其所产生物活性物质对棉花枯萎病菌有较强的抑菌活性, 进一步测定它的抗菌谱, 发现其所产生物活性物质能抑制革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌, 同时还能抑制霉菌和酵母菌<sup>[1]</sup>。稳定性的研究测定表明其对热和紫外线稳定, 在 pH3 ~ 12 条件下稳定, 从该菌的发酵产物分离提取和纯化其抗细菌活性物质, 经紫外、质谱和核磁共振谱和 X 衍射等测定结果表明, 该活性物质与国外报道的放线菌素 X2<sup>[2,3]</sup> 为同质, 命名为红谷霉素。但要作为药物应用于市场, 首先要提高其产量, 因此优化发

\* 教育部重点项目 (No. 2003 - 03072)

江西省自然科学基金项目 (No. 050010)

\*\* 通讯作者 Tel: 0791-3813466, E-mail: tuguoquan@263.net

收稿日期: 2005-09-22, 修回日期: 2005-11-23

醇培养基是其中的关键环节之一。采用响应面法<sup>[4-6]</sup>优化链霉菌 702 产红谷霉素发酵培养基, 为该菌的产业化开发提供现实依据, 本文报道了这一研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:**链霉菌 (*Streptomyces*) 702: 由江西农业大学生物工程系应用微生物实验室分离筛选获得, 甘油管保存; 抑菌测定指示菌为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* sp.): 由江西农业大学生物工程系应用微生物实验室保藏。

**1.1.2 培养基:**供试菌斜面、平板和茄子瓶培养基: 高氏一号培养基; 种子培养基: 玉米淀粉 10 g、玉米粉 30 g、黄豆粉 10 g、硫酸铵 0.5 g、碳酸钙 6 g、豆油 2mL, 定容至 1L; 发酵培养基: 玉米淀粉 20 g、玉米粉 20 g、葡萄糖 20 g、黄豆粉 15 g、硝酸钾 2.5 g、蛋白胨 5 g、硫酸铵 2.5 g、磷酸二氢钾 0.3 g、氯化钠 3 g、碳酸钙 5 g, 豆油 10mL, 定容至 1L; 指示菌斜面、平板培养基: 药典 II 号培养基。

**1.1.3 红谷霉素 (含量 99.47%):**由本实验室提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 链霉菌 702 种子培养:**取链霉菌 702 试管斜面制成孢子悬液, 取适量体积接种于装有 30mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 30℃, 200r/min 回转式摇床振荡培养 48h。

**1.2.2 链霉菌 702 摇瓶发酵培养:**取适量链霉菌 702 种子培养基接种于装有 20mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中, 30℃, 200r/min 回转式摇床振荡培养 96h。

**1.2.3 链霉菌 702 发酵液生物效价测定<sup>[7]</sup>:**发酵液效价的测定采用一剂量法, 在金黄色葡萄球菌指示菌平板上进行抑菌测定, 以红谷霉素标准品浓度为纵坐标, 以校正后的抑菌圈直径为横坐标, 得到红谷霉素的标准曲线和线性回归方程。链霉菌 702 发酵液用无水乙醇稀释浸提 (1:9), 离心。上清液稀释到 80 倍后, 作为抑菌测定液。按照红谷霉素标准曲线的制备方法求得发酵液的抑菌圈直径平均值的校正值, 再根据相应标准曲线和发酵液样品的稀释倍数, 求得每毫升样品所含的红谷霉素的单位数。

**1.2.4 实验结果统计分析<sup>[8,9]</sup>:**采用 SAS Version 6. 12 软件对实验数据进行拟合和方差分析, 采用 MATLAB 6. 5 软件进行偏导求模型极值。

## 2 结果与分析

### 2.1 应用全因子实验设计筛选重要因素

选用四因素二水平全因子实验设计筛选影响链霉菌 702 产红谷霉素的重要因素, 需要 16 次实验, 中心点做 4 次重复实验, 共需 20 次实验。每个实验做 3 个重复, 本文实验结果中的生物效价均取 3 个重复的平均值。实验设计及实验结果见表 1 和表 2。

表 1 全因子实验设计表

变量	水平		
	-1	0	+1
X1 玉米淀粉 (g/L)	10	20	30
X2 黄豆饼粉 (g/L)	5	10	15

续表 1

X3 工业蛋白胨 (g/L)	0	5	10
X4 豆油 (mL/L)	0	5	10

表 2 全因子实验设计实验结果

实验号	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	生物效价 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	-1	-1	-1	-1	209.85
2	1	-1	-1	-1	154.11
3	-1	1	-1	-1	362.81
4	1	1	-1	-1	327.03
5	-1	-1	1	-1	379.60
6	1	-1	1	-1	317.53
7	-1	1	1	-1	481.89
8	1	1	1	-1	451.78
9	-1	-1	-1	1	284.59
10	1	-1	-1	1	208.84
11	-1	1	-1	1	316.26
12	1	1	-1	1	295.75
13	-1	-1	1	1	323.23
14	1	-1	1	1	344.05
15	-1	1	1	1	470.81
16	1	1	1	1	471.12
17	0	0	0	0	374.21
18	0	0	0	0	352.68
19	0	0	0	0	348.25
20	0	0	0	0	393.22

注: 各因子代码中心化  $x_1 = (X_1 - 20) / 10$ ,  $x_2 = (X_2 - 10) / 5$ ,  $x_3 = (X_3 - 5) / 5$ ,  $x_4 = (X_4 - 5) / 5$

由实验结果可以看出, 红谷霉素生物效价随实验条件的改变差异很大 (表 3), 通过回归分析可以得到一次拟合回归方程:  $Y = 186.85 - 1.621X_1 + 11.95 X_2 + 13.51 X_3 + 0.38X_4$ ,

由表 4 可知,  $F$  检验非常显著, 用方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其因变量与全体自变量之间的线性关系显著。

表 3 全因子实验方差分析表

变异来源	自由度	离差平方和	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	4	134326.67	33581.67	36.09	0.0001 **
误差	15	13955.76	930.38		
总和	19	148282.42			

表 4 全因子实验参数估计表

变量	自由度	参数估计	标准误	$T$ 值	$P$ 值
INTERCEP	1	186.85	25.06	7.46	0.0001 **
X1	1	-1.62	0.76	-2.12	0.051
X2	1	11.95	1.53	7.83	0.0001 **

续表 4

X3	1	13.51	1.53	8.86	0.0001 **
X4	1	0.38	1.53	0.25	0.81

注:  $R^2 = 0.9059$

2.2 应用最陡爬坡实验法接近重要因素的最优水平

最陡爬坡的方向可由上述方程及回归分析确定, X2 因素(黄豆饼粉)和 X3 因素(工业蛋白胨)在 99% 的概率水平上差异显著, 且系数都为正。这说明, 适当增加黄豆饼粉和工业蛋白胨的用量, 对红谷霉素的产量提高有促进作用。实验设计及实验结果见表 5, 从表 5 中可以看出, 第 5 组实验中红谷霉素生物效价最高, 这说明, 最优点在第 5 组实验附近。

表 5 最陡爬坡实验设计及实验结果

实验组数	X2 黄豆饼粉 (g/L)	X3 工业蛋白胨 (g/L)	生物效价 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	12	2.5	722.13
2	14	5.0	795.76
3	16	7.5	824.26
4	18	10.0	899.32
5	20	12.5	980.65
6	22	15.0	850.07
7	24	17.5	809.54

2.3 应用中心复合设计确定重要因素的最优水平

采用响应面分析方法, 以黄豆饼粉、工业蛋白胨二因素为自变量, 以红谷霉素生物效价为响应值。对链霉菌 702 的发酵培养基组成进行优化。采用中心复合设计, 以表 5 的第 5 组实验为中心点, 实验设计及实验结果见 6。

表 6 中心组合实验设计及实验结果

实验组数	$x_2$	$x_3$	生物效价 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	-1	-1	1189.43
2	-1	1	650.11
3	1	-1	1402.68
4	1	1	700.85
5	-1.414	0	749.73
6	1.414	0	1099.29
7	0	-1.414	1343.26
8	0	1.414	580.21
9	0	0	998.16
10	0	0	980.57
11	0	0	971.78
12	0	0	1024.54
13	0	0	1015.75

注: 各因子代码中心化  $x_2 = (X_2 - 20) / 2$ ,  $x_3 = (X_3 - 12.5) / 2.5$

通过 SAS Version 6. 12 软件对实验数据进行多项式回归分析, 拟合的二次方程模型为:  $Y = 998. 15 + 94. 80x_2 - 290. 06x_3 - 26. 16x_{22} - 7. 551x_{32} - 40. 63x_2x_3$ 。对方程用 MATLAB 6. 5 软件进行求导, 可以得到模型的极值点, 即黄豆饼粉 23g/L ( $x_2 = 1. 414$ )、工业蛋白胨 9g/L ( $x_3 = -1. 414$ ) 时生物效价为 1, 556 $\mu$ g/mL。但此仅为模型预测值, 因此在该模型处做 4 次试验验证, 得出响应量为 1, 556  $\pm$  100 $\mu$ g/mL, 此结果证实了模型有效性及存在着极大值点, 模型验证及与优化前的培养基比较见表 7。数学回归模型的方差分析见表 8, 由表 8 可知, 回归模型在  $\alpha = 0. 01$  水平上  $F$  检验极显著。

表 7 链霉菌 702 产红谷霉素的培养基优化后与优化前的比较

对比	1	2	3	4	平均生物效价 ( $\mu$ g/mL)	提高率 (%)
优化前	370	350	356	391	367	
优化后	1456	1481	1553	1510	1500	308

表 8 中心组合实验结果方差分析

变异来源	自由度	离差平方和	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	5	756327. 18	151265. 43	68. 05	0. 0001 **
误差	7	15561	2223		
总和	12	771888. 19			

注:  $R^2 = 0. 9798$

3 小结与讨论

通过响应面法优化发酵培养基配方, 筛选出对链霉菌 702 产红谷霉素的重要因子黄豆饼粉和工业蛋白胨, 并确定了其最佳发酵配比, 即黄豆饼粉 23g/L、工业蛋白胨 9g/L。经优化的培养基组成后, 链霉菌 702 摇瓶发酵产红谷霉素的产量提高到 1, 500 $\mu$ g/mL, 较培养基组分优化前的 367 $\mu$ g/mL 提高了 3. 08 倍。因此采用响应面法优化发酵培养基是一种行之有效的实验方法, 但此研究仅限于摇瓶发酵, 仍需上罐分批发酵进一步验证。

参 考 文 献

[1] 李昆太, 黎循航, 涂国全. 江西农业大学学报, 2002, 24 (5): 599 ~ 602.  
[2] Masafumi S, Yasuhiro I J Gen Plant Pathol, 2004, 70: 66 ~ 68.  
[3] Mirau P A, Shafer R H. Biochemistry, 1982, 21: 2622 ~ 2626.  
[4] Souza M C O, Roberto I C, Milagres A M F. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 768 ~ 772.  
[5] Bing L L, Yew M T. Bioprocess Engineering, 1998, 18: 413 ~ 418.  
[6] 王允祥, 陆兆新. 微生物学通报, 2004, 31 (6): 42 ~ 47.  
[7] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005. 二部: 附录 80.  
[8] 徐子钧, 李 剑, 梁凤来, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (3): 85 ~ 87.  
[9] 郑阿奇, 曹 弋, 赵 阳. MATLAB 实用教程. 北京: 电子工业出版社, 2004. 63 ~ 64.