

## 研究报告

## 吸水链霉菌 ATCC 29253 产 Hygrocin A 发酵条件的优化

李全乐<sup>1Δ</sup> 管仁艳<sup>1Δ</sup> 何璟<sup>2</sup> 陈浩<sup>1</sup> 李胜清<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学理学院 湖北 武汉 430070)

(2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

**摘要:**【背景】Hygrocins 是一种萘安莎抗生素,具有良好的新药开发潜能。但在常见培养基及发酵条件下菌体内 Hygrocin A 含量一般很低,甚至难以直接进行准确检测。【目的】提高吸水链霉菌 ATCC 29253 发酵物中 Hygrocin A 的产量。【方法】采用单因素与正交试验设计优化相结合的方法系统考察碳源、氮源、磷酸盐、MgCl<sub>2</sub> 浓度、NaCl 浓度、种子菌龄等因素对吸水链霉菌 ATCC 29253 产 Hygrocin A 能力的影响。【结果】最佳发酵条件为(g/L): 葡萄糖 4.0, 黄豆饼粉 8.0, 麦芽提取物 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, NaCl 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0; 种子最佳活化时间为 48 h; 培养参数: 摇床转速 200 r/min, 初始 pH 为 6.8–7.0, 瓶装量 50 mL/250 mL, 接种量 5%, 30 °C 培养 10 d。在优化条件下, Hygrocin A 产量与其原始培养基 M10 相比提高了 500%, Rapamycin 产量同时下降了 95%。【结论】通过培养基优化,可显著提高吸水链霉菌 ATCC 29253 中 Hygrocin A 产量,为 Hygrocin A 合成应用研究奠定基础,同时可使 Rapamycin 产量明显下降。这说明可通过选择培养条件有目的地调节两种抗生素的代谢通量,进而开展多种抗生素同时表达的代谢调控研究。

**关键词:** 吸水链霉菌, Hygrocin A, Rapamycin, 发酵优化, 正交试验设计

## Optimization of fermentation conditions for Hygrocin A production by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253

LI Quan-Le<sup>1Δ</sup> GUAN Ren-Yan<sup>1Δ</sup> HE Jing<sup>2</sup> CHEN Hao<sup>1</sup> LI Sheng-Qing<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** [Background] Hygrocins, a kind of naphthalene ansa antibiotics, are potential leading compounds for the chemical biosynthesis of novel drugs. However, under the common medium and fermentation conditions, the content of Hygrocin A in the cell is generally very low, and it is difficult to detect it directly. [Objective] In order to improve the yield of Hygrocin A from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. [Methods] Effects of carbon source, nitrogen source, phosphate

**Foundation item:** Fundamental Research Funds for the Central Universities (266-2014PY053)

\*Corresponding author: E-mail: sqingli@mail.hzau.edu.cn

ΔThese authors equally contributed to this work

Received: March 15, 2017; Accepted: May 18, 2017; Published online (www.cnki.net): May 25, 2017

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(266-2014PY053)

\*通信作者: E-mail: sqingli@mail.hzau.edu.cn

Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2017-03-15; 接受日期: 2017-05-18; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-05-25

concentration,  $MgCl_2$  concentration, NaCl concentration and seed age on Hygrocin A production from *S. hygroscopicus* ATCC 29253 were studied by single factor and orthogonal test design. **[Results]** The optimal fermentation conditions were as follows: glucose 4.0 g/L, soybean cake meal 8.0 g/L, malt extract 10.0 g/L,  $K_2HPO_4$  1.5 g/L,  $KH_2PO_4$  1.5 g/L, NaCl 1.5 g/L,  $MgCl_2$  1.0 g/L; seed age 48 h; culture parameters: shaking speed 200 r/min, pH 6.8–7.0, bottled in 50 mL/250 mL, inoculated quantity 5%, incubated at 30 °C for 10 days. Under optimized conditions, the yield of Hygrocin A increased 500%, compared with its original medium M10, whereas at the same time the yield of Rapamycin decreased 95%. **[Conclusion]** The yield of Hygrocin A from *S. hygroscopicus* ATCC 29253 was significantly improved by optimizing the fermentation medium, which lay the foundation for studying the synthesis and application of Hygrocin A. At the same time, the yield of Rapamycin decreased significantly. This suggests that the metabolic flux of the two antibiotics can be adjusted intentionally by selecting the culture conditions, and then the metabolic regulation research for simultaneous expression of multiple antibiotics can be carried out.

**Keywords:** *Streptomyces hygroscopicus*, Hygrocin A, Rapamycin, Fermentation optimization, Orthogonal test design

Hygrocins 是一种萘安莎抗生素, 2005 年首次从吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) ATCC 29253 中被分离出来<sup>[1]</sup>, 研究发现 Hygrocin A 具有抗菌活性<sup>[2]</sup>, 其降解产物 Hygrocin C、D 和 F 对乳腺癌细胞 MDA-MB-431 ( $IC_{50}$ =0.5、3.0、3.3  $\mu$ mol/L) 及前列腺癌细胞 PC3 ( $IC_{50}$ =1.9、5.0、4.5  $\mu$ mol/L) 具有显著的细胞毒性<sup>[3]</sup>。Hygrocin A 是 9 酮萘安莎<sup>[4]</sup>, 与利福霉素(Rifamycin)<sup>[5]</sup>和萘霉素(Naphthomycin)<sup>[6]</sup>等抗菌活性高的萘安莎抗生素相比<sup>[1]</sup>, 它聚酮链较短, 容易对其结构进行生物合成改造<sup>[7]</sup>, 因而可作为先导化合物, 采用化学生物合成方法开发新型药物<sup>[8-9]</sup>, 具有十分重要的研究价值。

Hygrocin A 的产生菌株主要有雷帕霉素(Rapamycin)产生菌 *S. hygroscopicus* ATCC 29253<sup>[10]</sup> 和格尔德霉素(Geldanamycin)产生菌海洋放线菌 *Streptomyces* sp. LZ35<sup>[11]</sup>。在常见培养基及发酵条件下, Hygrocin A 产量一般很低, 不利于开展其合成应用研究。目前, 关于 Hygrocin A 发酵条件优化的文献较少, 其原因之一是菌体内 Hygrocin A 浓度太低, 难以直接进行准确检测。我们曾以测定菌体生物量的方式优化了发酵条件<sup>[12]</sup>, 优化的发酵培养基不仅提高了 Hygrocins 的产量, 同时还较大幅度地提高了 Rapamycin 的产量。由于 Hygrocin A 浓度仍较低, HPLC 无法检测到对应峰, 该研究

并未直接测定 Hygrocin A 的浓度, 而是通过菌丝体量间接估算其产量。

为了进一步提高 *S. hygroscopicus* ATCC 29253 菌株发酵产 Hygrocin A 的水平, 为 Hygrocin A 合成应用研究奠定基础, 本文拟采用单因素和正交试验设计结合的方法, 以 HPLC 及 LC-MS 直接测定 Hygrocin A 浓度, 优化 *S. hygroscopicus* ATCC 29253 的培养基成分和培养条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

*S. hygroscopicus* ATCC 29253 分离自太平洋复活岛的土壤样品, 保藏于华中农业大学农业微生物学国家重点实验室微生物次级代谢基因工程室。

#### 1.1.2 培养基

种子培养基 10.3% YEME (g/L): 酵母提取物 3.0, 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 麦芽提取物 3.0, 蔗糖 103.0, pH 7.0–7.2,  $0.7 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

发酵培养基 M10 (g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0, pH 7.0–7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

#### 1.1.3 主要试剂及仪器

乙酸乙酯(AR)、甲醇(AR、GR)、乙醇(AR)购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(GR)和甲酸(GR)

购自美国 TEDIA 公司。

高效液相色谱仪(HPLC)、液相色谱质谱联用仪(LC/MS, 液相检测器为 Agilent 1260, 质谱检测器为 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF)、色谱柱 (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column, 4.6 mm×150 mm×3.5 μm), 安捷伦科技(中国)有限公司; 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 涡旋振荡器, Scientific Industries 公司; 超级洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养方法

取 10 μL *S. hygrosopicus* ATCC 29253 菌种接种于装有 5 mL 10.3% YEME 培养基的 Polyamide (PA)瓶中, 30 °C、200 r/min 活化 36–40 h 待用; 取 2.5 mL 活化液接种到装有 50 mL M10 培养基的带棱锥形瓶中, 30 °C、200 r/min 发酵 11 d, 在 6–11 d 每天取样测定 Hygrocin A 产量, 绘制产量曲线。

### 1.2.2 Hygrocin A 定量检测

取 50 mL 已发酵完成的发酵液, 4 500 r/min 离心 10 min 收集菌丝体, 用 50 mL 的乙酸乙酯:甲醇:乙酸(80:15:5, 体积比)混合萃取剂 150 r/min 萃取 2 h, 4 500 r/min 离心 10 min 收集萃取液旋转蒸发至干。用 1 mL 色谱纯甲醇复溶, 然后用 0.22 μm 有机系滤膜过滤并收集于自动进样瓶中待测。

HPLC 及 LC-MS 检测条件: 0–5 min 20%–35% A, 5–19 min 35%–55% A, 19–20 min 55%–65% A, 20–23 min 65%–100% A, 23–27 min 保持 100%, 其中 A 为乙腈, B 为 0.1%的甲酸水溶液。色谱柱 4.6 mm×150 mm×3.5 μm, 检测波长 306 nm, 流速 0.5 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。

质谱参数: 正离子模式,  $m/z$  范围 50–1 700, 干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 10 L/min, 雾化器压力 40 psi, 毛细管出口电压 145 V。样品分析及数据处理系统均使用 Agilent Mass Hunter B.05.00 软件。

### 1.2.3 发酵条件设计优化

(1) 种子菌龄的优化: 取 10 μL 菌种接种于装有 5 mL 10.3% YEME 培养基的 PA 瓶中, 30 °C、200 r/min 分别活化 12、24、36、48、60 h 待用; 取 2.5 mL 活化液分别接种到装有 50 mL M10 培养基的带棱锥形瓶中, 30 °C、200 r/min 发酵 10 d。

(2) 碳源的影响: 在 M10 发酵培养基中 10.0 g/L 麦芽提取物不变的前体下, 分别添加 4.0 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、甘油, 选择最佳碳源; 优化最佳碳源浓度为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 g/L。

(3) 氮源的影响: 在 M10 发酵培养基中 10.0 g/L 麦芽提取物不变的前体下, 分别添加 4.0 g/L 的酵母提取物、蛋白胨、黄豆饼粉, 选择最佳氮源; 优化最佳氮源浓度为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 g/L。

(4) 磷酸盐的影响: 分别考察添加不同浓度的复合磷酸盐(表 1)和单独使用  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  作磷酸盐时的影响。添加 4.0、6.0、8.0、1.0、12.0、14.0 g/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  与复合磷酸盐中效果最好的进行对比。

(5) 金属离子的影响: 分别考察添加 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L NaCl, 以及添加 0、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L  $\text{MgCl}_2$  对产 Hygrocin A 的影响。

(6) 正交试验设计: 在单因素优化实验基础上, 应用 SPSS 19.0 统计软件设计葡萄糖、黄豆饼粉、 $\text{K}_2\text{HPO}_4+\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、NaCl 等 5 因素 3 水平  $L_{16}(3^5)$  正交试验, 考察各因素之间的关系。

表 1 优化磷酸盐

Table 1 Optimization of phosphate

编号 No.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (g/L)
1	0.0	0.0
2	1.0	1.0
3	2.0	2.0
4	3.0	3.0
5	4.0	4.0
6	5.0	5.0
7	6.0	6.0
8	7.0	7.0
9	8.0	8.0

## 2 结果与分析

### 2.1 Hygrocin A 产量曲线

如图 1 所示,从发酵第 6–10 天,随着发酵时间的增加,Hygrocin A 的产量处于逐渐增长状态,这是 Hygrocin A 大量合成累积的时期;而在第 11 天时 Hygrocin A 的产量下降,推测可能是由于 Hygrocin A 分解导致,所以在之后的实验中均取发酵 10 d 的发酵液处理并做检测。

### 2.2 种子菌龄对 Hygrocin A 产量的影响

不同生长期的种子生长状态不同,对发酵的效果有显著的影响<sup>[13]</sup>。考察了种子菌龄对 Hygrocin A 产量的影响,结果如图 2 所示,供试菌株种子活化 48 h、发酵 10 d,Hygrocin A 产量最高。因此,选取生长 48 h 的菌株作为种子。

### 2.3 碳源对 Hygrocin A 产量的影响

细胞干重的 50%以上都是碳,而碳源通过直接影响微生物的糖代谢、呼吸、能量、生长及相关代谢影响抗生素等次级代谢产物的合成及分泌,所以碳源对于微生物的次级代谢有重要的影响<sup>[14]</sup>。实验考察了分别添加葡萄糖等 5 种实验室常用碳源对 Hygrocin A 产量的影响,结果如图 3A 所示,葡萄糖(Glucose)作为碳源时,Hygrocin A 的产量最高。考察了葡萄糖作为碳源时的添加量,结果如图 3B 所示,浓度为 4.0 g/L 时,Hygrocin A 产量最高。

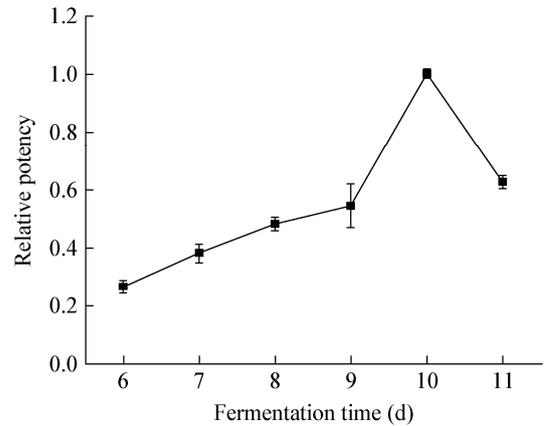


图 1 吸水链霉菌产 Hygrocin A 曲线

Figure 1 Hygrocin A production curve of *S. hygroscopicus* ATCC 29253

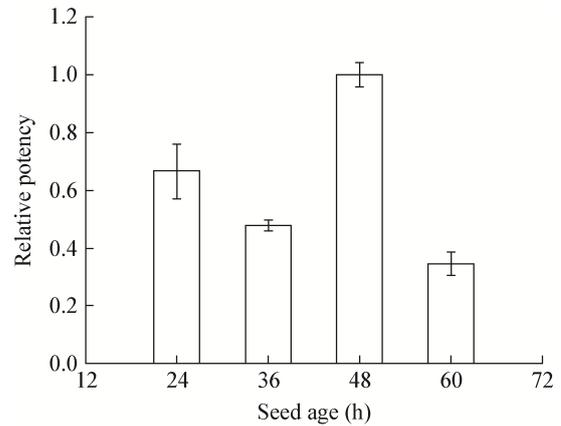


图 2 种子菌龄对 Hygrocin A 产量的影响

Figure 2 Effect of seed age on Hygrocin A production

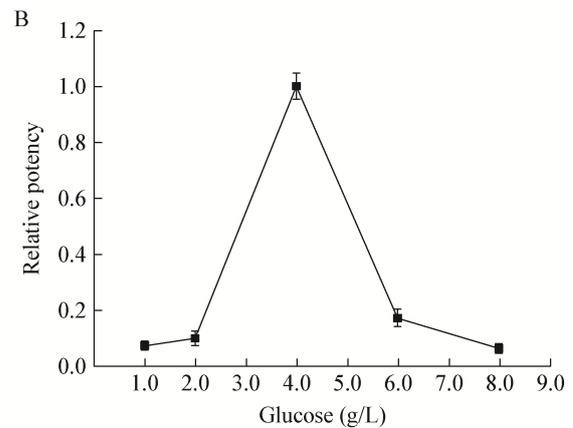
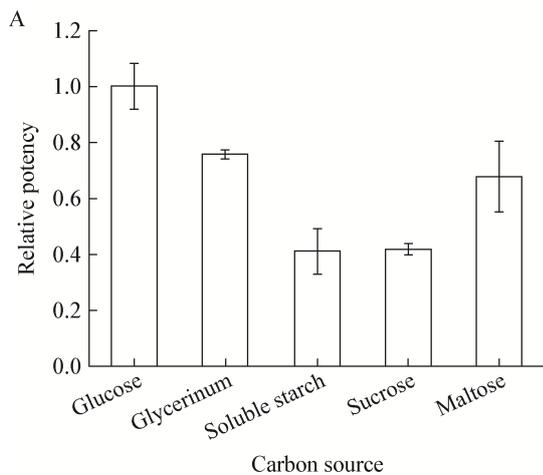


图 3 碳源(A)和葡萄糖浓度(B)对 Hygrocin A 产量的影响

Figure 3 Effect of carbon source (A) and glucose concentration (B) on Hygrocin A production

这是因为作为碳源时,单糖优于双糖和多糖,己糖优于戊糖,葡萄糖可以直接进入糖的代谢途径被降解。然而过多的葡萄糖作为碳源时,由于葡萄糖效应,导致 Hygrocin A 产量下降。

#### 2.4 氮源对 Hygrocin A 产量的影响

氮源作为合成菌体氨基酸、蛋白质、核酸等物质及抗生素骨架的来源,在微生物的生长过程中有着重要的作用<sup>[15]</sup>。实验考察了分别添加黄豆饼粉等3种常用氮源对 Hygrocin A 产量的影响,结果如图4A所示,黄豆饼粉(Soybean cake meal)作为氮源时 Hygrocin A 产量最高。如图4B所示,对于黄豆饼粉添加量的优化方面,在单因素实验中并没有找到最适宜的黄豆饼粉添加量。随着黄豆饼粉添加量的增加,Hygrocin A 的产量增加,但发酵液的黏稠度也会相应增大,通氧量减少。而吸水链

霉菌作为好氧菌,通氧量的减少会抑制其菌体的生长,Hygrocin A 产量也会减少,所以理论上会存在黄豆饼粉的最适宜添加量,将会在之后的正交试验中优化。

#### 2.5 磷酸盐对 Hygrocin A 产量的影响

菌体发酵过程中由于前期产酸会引起 pH 下降,过酸的环境不利于菌体生长,进而不利于次级代谢产物的合成。研究通过加入磷酸盐缓冲液来调节 pH,使菌体正常生长。磷酸钾盐既能为细胞生长提供磷源,又能提供对细胞及其酶活性具有重要功能的钾离子,是发酵液中常用的磷酸盐<sup>[16]</sup>。实验考察了  $K_2HPO_4+KH_2PO_4$  复合磷酸盐及单一磷酸盐  $KH_2PO_4$  的添加量对 Hygrocin A 产量的影响,结果如图5A所示,浓度为 1.0 g/L  $K_2HPO_4+1.0$  g/L  $KH_2PO_4$  时 Hygrocin A 产量最高,这是由

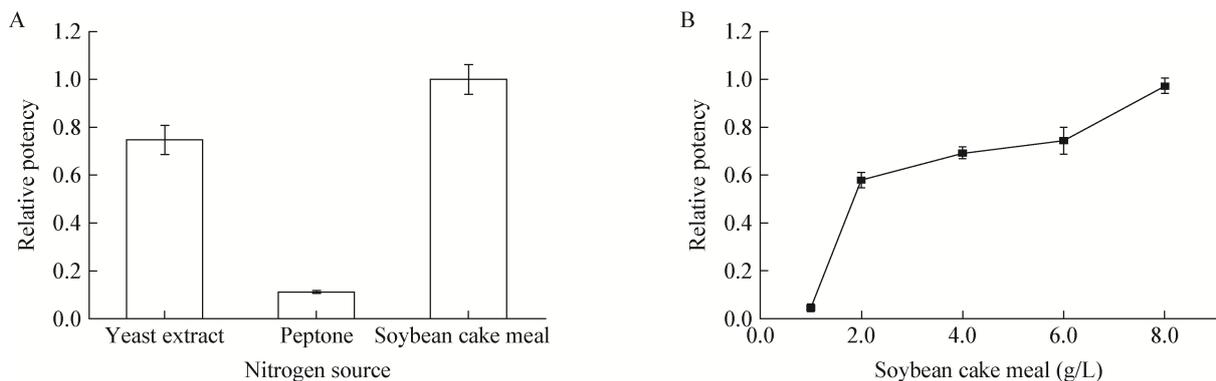


图4 氮源(A)和黄豆饼粉浓度(B)对 Hygrocin A 产量的影响

Figure 4 Effect of nitrogen source (A) and soybean cake meal concentration (B) on Hygrocin A production

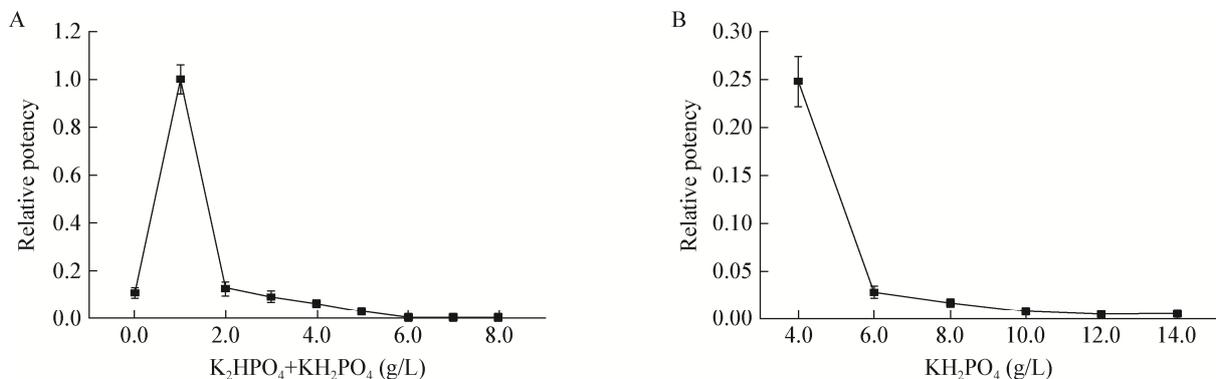


图5  $K_2HPO_4+KH_2PO_4$  浓度(A)和  $KH_2PO_4$  浓度(B)对 Hygrocin A 产量的影响

Figure 5 Effect of  $K_2HPO_4+KH_2PO_4$  (A) and  $KH_2PO_4$  concentration (B) on Hygrocin A production

于磷酸盐浓度过低会影响细胞的正常生长, 细胞密度不能得到提高, 次级代谢产物的合成也相应减少; 而磷酸盐浓度过高则会导致细胞生长太过旺盛, 合成次级代谢途径反而受到抑制减弱。单一添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  时 Hygrocin A 产量明显低于复合磷酸盐, 推测可能由于单一添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  时, 发酵过程 pH 变化过大, 影响菌体的生长, 如图 5B 所示。

## 2.6 NaCl 浓度对 Hygrocin A 产量的影响

钠离子是细胞内非常重要的阳离子之一, 它参与细胞的渗透压调节, 还与营养物质的吸收有关, 协同转运葡萄糖等营养物质, 帮助排泄代谢产物。实验考察了 NaCl 浓度对 Hygrocin A 产量的影响, 结果如图 6 所示, 随着 NaCl 浓度的增加, Hygrocin A 产量降低, 没有添加 NaCl 的样品中 Hygrocin A 产量最高。理论上认为 NaCl 的浓度对 Hygrocin A 产量的影响应该存在一个拐点, 而单因素实验设计时 0–2.0 g/L 梯度太大, 所以在之后的正交试验中优化 NaCl 浓度。

## 2.7 $\text{MgCl}_2$ 浓度对 Hygrocin A 产量的影响

镁是细胞内一些酶(如己糖激酶、羧化酶、异柠檬酸脱氢酶和固氮酶)的激活剂, 影响蛋白质的合成和基质的氧化, 同时还起到稳定核糖体、细胞膜和核酸的作用, 细胞在缺少镁的情况下会停止生长。实验考察了  $\text{MgCl}_2$  浓度对 Hygrocin A 产量的影响, 结果如图 7 所示,  $\text{MgCl}_2$  浓度为 0.5 g/L 时,

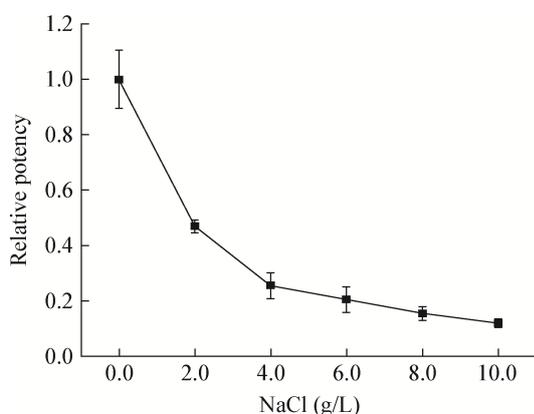


图 6 NaCl 浓度对 Hygrocin A 产量的影响  
Figure 6 Effect of NaCl concentration on Hygrocin A production

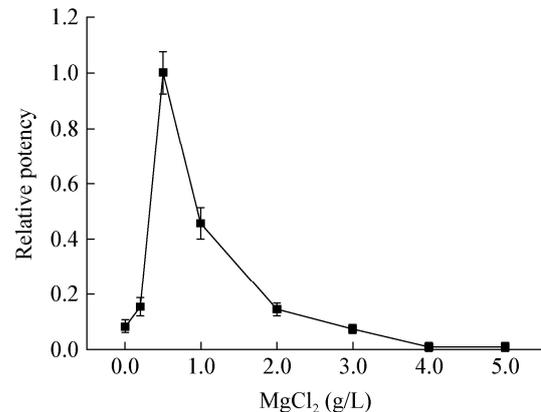


图 7  $\text{MgCl}_2$  浓度对 Hygrocin A 产量的影响  
Figure 7 Effect of  $\text{MgCl}_2$  concentration on Hygrocin A production

Hygrocin A 产量最高; 超过 0.5 g/L 后, 随着  $\text{MgCl}_2$  浓度的增加, Hygrocin A 产量逐渐减少, 可能是由于在  $\text{MgCl}_2$  过多的条件下, 细胞生长旺盛, 次级代谢反而受到抑制。

## 2.8 正交试验设计及结果

为了考察各因素之间的关系及影响, 进一步优化各因素的最佳添加量, 应用 SPSS 19.0 软件, 设计葡萄糖、黄豆饼粉、 $\text{K}_2\text{HPO}_4+\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、NaCl 等 5 因素 3 水平的正交试验, 正交结果如表 2 所示, 方差分析如表 3 所示。

根据正交试验的极差分析(表 1)和方差分析(表 2)结果可知, 各因素对 Hygrocin A 产量的影响程度为  $B>C>A>E>D$ , 即黄豆饼粉 $>\text{K}_2\text{HPO}_4+\text{KH}_2\text{PO}_4>$ 葡萄糖 $>\text{NaCl}>\text{MgCl}_2$ 。同时由  $P$  值可知, 黄豆饼粉和  $\text{K}_2\text{HPO}_4+\text{KH}_2\text{PO}_4$  添加量对 Hygrocin A 产量的影响差异极显著。

综合各因素, 适合吸水链霉菌 ATCC 29253 产 Hygrocin A 的最佳发酵培养基为 M1 (g/L): 葡萄糖 4.0, 黄豆饼粉 8.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgCl}_2$  1.0, NaCl 1.5。除了  $\text{MgCl}_2$  浓度与单因素实验结果不太符合外, 其余 4 个因素的单因素优化结果与正交试验结果都吻合, 而由正交试验方差分析结果可知,  $\text{MgCl}_2$  浓度对 Hygrocin A 产量的影响强度最低, 而且不同浓度对 Hygrocin A 产量的影响差异不显著, 因此以正交试验中  $\text{MgCl}_2$  浓度的结果为准。

表 2 正交试验设计和极差分析

Table 2 The analysis of range and design of orthogonal test

处理号 Treatment number	因素 Factor					F 麦芽提取物 Malt extract (g/L)
	A 葡萄糖 Glucose (g/L)	B 黄豆饼粉 Soybean meal (g/L)	C K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	D MgCl <sub>2</sub> (g/L)	E NaCl (g/L)	
1	3.0	8.0	1.5+1.5	0.5	1.0	10.0
2	5.0	12.0	1.5+1.5	1.0	0.5	10.0
3	4.0	12.0	0.5+0.5	0.3	1.0	10.0
4	5.0	8.0	1.0+1.0	0.3	1.5	10.0
5	4.0	8.0	1.5+1.5	0.3	1.5	10.0
6	3.0	8.0	1.0+1.0	1.0	1.0	10.0
7	3.0	8.0	0.5+0.5	0.3	0.5	10.0
8	3.0	12.0	0.5+0.5	0.5	1.5	10.0
9	4.0	10.0	1.0+1.0	0.5	0.5	10.0
10	3.0	10.0	0.5+0.5	1.0	1.5	10.0
11	3.0	12.0	1.0+1.0	0.3	0.5	10.0
12	3.0	10.0	1.5+1.5	0.3	0.5	10.0
13	4.0	8.0	0.5+0.5	1.0	0.5	10.0
14	5.0	8.0	0.5+0.5	0.5	0.4	10.0
15	3.0	8.0	0.5+0.5	0.3	0.5	10.0
16	5.0	10.0	0.5+0.5	0.3	1.0	10.0
<i>K</i> <sub>1</sub>	17 767.429	31 133.146	14 147.996	19 076.746	16 843.513	
<i>K</i> <sub>2</sub>	23 842.479	17 024.858	16 340.171	18 954.308	19 210.675	
<i>K</i> <sub>3</sub>	17 223.029	10 674.933	28 344.771	20 801.883	22 778.750	
<i>R</i>	6 619.450	20 458.213	14 196.775	1 847.575	5 935.237	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

差异来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> valve	<i>P</i> 值 <i>P</i> -valve
A	1.182E-8	2	59 111 163.014	2.929	0.144
B	1.275E-9	2	6.377E-8	31.604	0.001
C	5.568E-8	2	2.784E-8	13.797	0.009
D	9 395 714.051	2	4 697 857.026	0.233	0.800
E	94 392 164.171	2	47 196 082.086	2.339	0.192

## 2.9 最优发酵条件的验证

为了进一步验证优化结果,分别用初始培养基 M10 和优化后发酵培养基 M1 接种相同浓度的种子,在同一条件下培养。结果如图 8 所示,在

最优发酵条件下 Hygrocin A 产量是原培养基 M10 中的 6 倍,吸水链霉菌中与 Hygrocin A 同时产生的另一抗生素 Rapamycin<sup>[1]</sup>产量是原始培养基中的 5%。

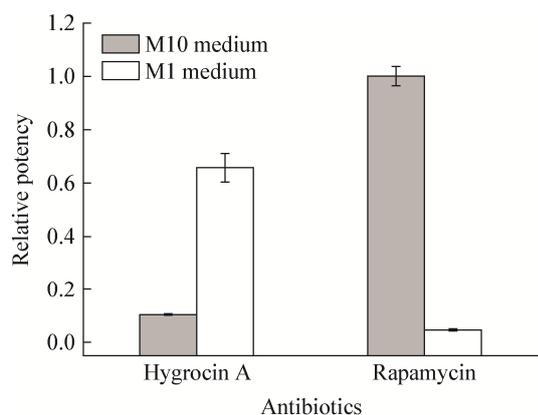


图 8 优化前后抗生素产量的变化

Figure 8 Changes of antibiotics yield before and after medium optimization

### 3 讨论与结论

安莎霉素类抗生素虽然种类不多,但其生理活性广泛、成药率高,是一类值得重视的抗生素。由于安莎类化合物具有独特的化学结构和显著的生物活性,对安莎类抗生素的生物合成研究吸引着国内外研究者的兴趣。Hygrocin A 属于萘安莎霉素并且具有较短聚酮链,对其进行结构改造具有巨大的新药开发潜力。*S. hygroscopicus* ATCC 29253 在一定发酵条件下能同时产生 Hygrocin A 和 Rapamycin 两种抗生素,根据它们的生物合成基因簇以及已经报道的生物合成过程,Hygrocin A 和 Rapamycin 都是由 I 型 PKS 催化合成的大环内酯聚酮化合物,聚酮骨架是由乙二酸盐或丙二酸盐或甲氧基丙二酸等单位缩合而成<sup>[2,17]</sup>。另外,Rapamycin 的前体 4,5-二羟环己-1-烯羧酸(DHCHC)来自莽草酸代谢途径<sup>[17]</sup>,而 Hygrocin A 的前体 3-氨基-5-羟基苯甲酸(AHBA)来自与莽草酸代谢平行的氨基莽草酸代谢途径<sup>[18]</sup>,推测这两种抗生素在合成过程中可能存在竞争关系。然而在优化条件下可能较多前体物质分配到 Hygrocin A 合成通路,Hygrocin A 产量大幅提高,Rapamycin 合成受到抑制,产量明显下降。这说明发酵过程中降低 Rapamycin 的产量可能有利于 Hygrocin A 的合成。通过选择培养条件有目的地调节两种抗生素的代谢通量,进而

可开展多抗生素同时表达的代谢调控研究。

本研究根据链霉菌发酵所需的营养物质,通过单因素和正交试验设计确定了最优发酵培养基 M1 (g/L):葡萄糖 4.0,黄豆饼粉 8.0,  $K_2HPO_4$  1.5,  $KH_2PO_4$  1.5,  $MgCl_2$  1.0,  $NaCl$  1.5。优化后的培养基中 Hygrocin A 产量与其原始培养基 M10 比较提高了 500%, Rapamycin 产量同时下降 95%。本研究的发酵条件优化方法和结果对于后续研究具有良好的指导作用。

### REFERENCES

- [1] Cai P, Kong FM, Ruppen ME, et al. Hygrocin A and B, naphthoquinone macrolides from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Journal of Natural Products, 2005, 68(12): 1736-1742
- [2] Li SR, Wang HX, Li YY, et al. Biosynthesis of hygrocin, antitumor naphthoquinone ansamycins produced by *Streptomyces* sp. LZ35[J]. ChemBioChem, 2014, 15(1): 94-102
- [3] Lu CH, Li YY, Deng JJ, et al. Hygrocin C-G, cytotoxic naphthoquinone ansamycins from *gdmA1*-disrupted *Streptomyces* sp. LZ35[J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(12): 2175-2179
- [4] Rasapalli S, Jarugumilli G, Yarrapothu GR, et al. Studies towards the total synthesis of hygrocin A and B[J]. Tetrahedron Letters, 2014, 55(4): 821-825
- [5] Floss HG, Yu TW. Rifamycin-Mode of action, resistance, and biosynthesis[J]. Chemical Reviews, 2005, 105(2): 621-632
- [6] Williams TH. Naphthomycin, a novel ansa macrocyclic antimetabolite. Proton NMR spectra and structure elucidation using lanthanide shift reagent[J]. The Journal of Antibiotics, 1975, 28(1): 85-86
- [7] Chen DD, Wu JQ, Liu W. Biosynthesis-based production improvement and structure modification of erythromycin A[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(6): 939-954 (in Chinese)  
陈丹丹, 吴杰群, 刘文. 以生物合成为基础的红霉素 A 的产量提高和结构改造[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6): 939-954
- [8] Lin Z, Chen DD, Liu W. Biosynthesis-based artificial evolution of microbial natural products[J]. Science China Chemistry, 2016, 59(9): 1175-1187
- [9] Wang XY, Zhang JX, Cao SH. Progress in studies of rifamycin derivatives[J]. World Notes on Antibiotics, 2015, 29(6): 255-261 (in Chinese)  
王欣瑜, 张静霞, 曹胜华. 利福霉素类衍生物的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2015, 29(6): 255-261
- [10] Lomovskaya N, Fonstein L, Ruan XA, et al. Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253[J]. Microbiology, 1997, 143(3): 875-883
- [11] Shi NN, Wang HX, Lu CH, et al. Ansamycins produced by *Streptomyces* sp. LZ35[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(17): 1317-1320 (in Chinese)

- 石妞妞, 王浩鑫, 鲁春华, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp. LZ35 中的安莎霉素类化合物[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(17): 1317-1320
- [12] Wu ZH, Wang MY, He J. Optimization of the fermentation conditions for Hygrocin production by *Streptomyces hygrosopicus* ATCC 29253[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(22): 4596-4600 (in Chinese)  
吴竹华, 王明艳, 何璟. 吸水链霉菌 ATCC 29253 产 Hygrocin 的条件优化[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(22): 4596-4600
- [13] Qi HS, Zhao SM, Fu H, et al. Coupled cell morphology investigation and metabolomics analysis improves rapamycin production in *Streptomyces hygrosopicus*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 91: 186-195
- [14] Shene C, Mardones M, Zamora P, et al. Kinetics of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 fermentations: effect of the dilution rate and carbon source[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(5): 623-630
- [15] Beltran G, Esteve-Zarzoso B, Rozès N, et al. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 54(3): 996-1002
- [16] Yin SL, Zhang YX, Zhang Q, et al. The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of secondary metabolites in *Streptomyces*[J]. China Biotechnology, 2015, 35(9): 105-113 (in Chinese)  
尹守亮, 张玉秀, 张琪, 等. 无机磷酸盐对链霉菌合成次级代谢产物的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(9): 105-113
- [17] Park SR, Yoo YJ, Ban YH, et al. Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(8): 434-441
- [18] Jung WS, Yoo YJ, Park JW, et al. A combined approach of classical mutagenesis and rational metabolic engineering improves rapamycin biosynthesis and provides insights into methylmalonyl-CoA precursor supply pathway in *Streptomyces hygrosopicus* ATCC 29253[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(5): 1389-1397

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。 (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

### 3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.214)