

## 丝状真菌 *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108 产纽莫康定 B<sub>0</sub> 发酵条件的研究

杨渊 孟慧云 王欣荣\* 詹良静 张新宜

(成都大学 四川抗菌素工业研究所 四川 成都 610052)

**摘要:**【目的】采用响应面法优化丝状真菌 *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108 发酵生产纽莫康定 B<sub>0</sub> 培养基, 提高发酵产量; 通过氮源优化, 降低发酵液菌体浓度, 改善发酵过程的溶氧水平。【方法】采用 Plackett-Burman 设计和响应面法进行培养基优化, 筛选出对纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量具有显著影响的因素; 通过最陡爬坡实验及 Box-Behnken 设计, 并利用 Design-Expert 软件对实验数据进行回归分析, 得到优化的发酵培养基配方; 通过对优化培养基中氮源组分进行全因子实验, 最终得到高产量和低菌体浓度发酵培养基。【结果】实验数据表明: 甘露醇、脯氨酸和葡萄糖对纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量影响最大; 最佳浓度分别为甘露醇 167.3 g/L、脯氨酸 26.1 g/L、葡萄糖 28.5 g/L。采用优化后的培养基进行摇瓶发酵, 纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量达到了 1 840 mg/L, 较优化前提高了 42%, 与预测结果一致。用硫酸铵部分替换棉籽饼粉后, 发酵液菌体浓度降低, 在 100 L 发酵罐上对优化后的结果做了进一步的验证, 纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量达到 1 980 mg/L。【结论】模型预测值与实验值有较高吻合度, 具备较高可信度和显著性, 发酵产量提高了 42%, 响应面实验设计和分析方法能够有效地用于丝状真菌 *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108 产纽莫康定 B<sub>0</sub> 发酵培养基进行优化。通过调整培养基中的氮源组成, 降低了发酵液菌体浓度, 改善了发酵过程的溶氧水平。

**关键词:** 响应面法, *Glarea lozoyensis*, 发酵培养基, 纽莫康定 B<sub>0</sub>

## Optimization of pneumocandin B<sub>0</sub> production by filamentous fungus *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108

YANG Yuan MENG Hui-Yun WANG Xin-Rong\* ZHAN Liang-Jing  
ZHANG Xin-Yi

(Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610052, China)

**Abstract:** [Objective] The culture media for the production of pneumocandin B<sub>0</sub> by the filamentous fungus *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108 were optimized using the response surface methodology (RSM). The nitrogen source of the culture was optimized to reduce the volume concentration of mycelium and improve the level of dissolved oxygen in fermentation process. [Methods] Through

**Foundation item:** National Major New Drug Innovation Program (No. 2014ZX09201001)

\*Corresponding author: Tel/Fax: 86-28-84216020; E-mail: Wang1593@sina.com

Received: October 14, 2015; Accepted: February 25, 2016; Published online (www.cnki.net): March 07, 2016

基金项目: 国家重大新药创制项目(No. 2014ZX09201001)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-28-84216020; E-mail: Wang1593@sina.com

收稿日期: 2015-10-14; 接受日期: 2016-02-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-07

Plackett-Burman design and RSM, the factors that had significant effects on the production of pneumocandin B<sub>0</sub> were screened. Afterwards, the path of steepest ascent and the Box-Behnken design were adopted for further optimization, and the optimal concentration levels and the relationships among these factors was found out by quadratic regression model equation with Design-Expert statistic methods. The high-yield and low-viscosity of fermentation medium was obtained by carrying out the whole factor experiment with nitrogen source components. **[Results]** Mannitol, proline and glucose were found to have greatest influence on the production of pneumocandin B<sub>0</sub>, and the optimal concentrations were 167.3, 26.1 and 28.5 g/L, respectively. Under the optimal conditions, the production of pneumocandin B<sub>0</sub> reached 1 840 mg/L in three batches of shake flask experiments, with an increase of 42% compared with the ordinary culture. The pneumocandin B<sub>0</sub> production of 100 L fermentor achieved 1 980 mg/L under the optimal conditions. The viscosity of the fermentation broth was reduced by partly replacing the cottonseed meal with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. **[Conclusion]** The production of pneumocandin B<sub>0</sub>, which was in agreement with the prediction, was increased by 42% compared with the previous condition. The RSM method was effective for optimizing the composition of medium for the production of pneumocandin B<sub>0</sub> by filamentous fungus *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108. After replacing the cottonseed meal with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the viscosity of the fermentation broth was reduced and the level of dissolved oxygen was improved in fermentation process.

**Keywords:** Response surface methodology, *Glarea lozoyensis*, Fermentation, Pneumocandin B<sub>0</sub>

近年来,临床上真菌感染病例剧增,发病后死亡率增大,对安全、新型抗真菌药物需求也随之增加<sup>[1]</sup>。纽莫康定 B<sub>0</sub> (Pneumocandin B<sub>0</sub>)是一种脂肽类化合物,由丝状真菌 *Glarea lozoyensis* 发酵产生,用于合成一类全新的棘白菌素类(Echinocandins)抗真菌药物——醋酸卡泊芬净(Caspofungin acetate)<sup>[2-3]</sup>。棘白菌素类药物的作用机制是在真菌细胞壁主要骨架成分 β-1,3-葡聚糖合成过程中对其合成酶活性非竞争性地抑制,真菌细胞壁破裂失去完整性以及细胞内外渗透压发生变化,最终将真菌细胞杀死。它对包括唑类和两性霉素B等耐药菌株在内的大多数念珠菌具有杀灭作用,对烟曲霉有抑菌作用<sup>[4-5]</sup>,而对隐球菌无抑制作用。

Masurekar 等<sup>[6]</sup>通过诱变野生型菌株获得突变株 ATCC20957,发酵液中纽莫康定 B<sub>0</sub> 与 A<sub>0</sub> 产量之比为 3:1,而野生型菌株发酵液中比例为 1:7。为了使 *Glarea lozoyensis* 产 B<sub>0</sub> 而不产 A<sub>0</sub>, Masurekar 等采用 NMU (N-亚硝基-N-甲基脲)和 NTG (N-甲基-N'-硝基-IV-亚硝基胍)对 A<sub>0</sub> 生产菌 ATCC20868 进行复合诱变,最终得到了 B<sub>0</sub> 高产菌 ATCC74030,其产量达到 241 mg/L。在丝状真菌

*Glarea lozoyensis* SIIA-F1108 产纽莫康定 B<sub>0</sub> 的发酵过程中,发酵培养基以及发酵条件对其产量有很大影响。Tkacz 等<sup>[7]</sup>研究发现在 100 g/L 甘露醇作为碳源的情况下,发酵 21 d 时 B<sub>0</sub> 产量达到 800 mg/L。为了提高纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量,本文主要利用响应面分析法(Response surface method, RSM)对纽莫康定发酵培养基进行优化研究,对显著影响发酵产量的因子水平及因子间相互作用进行系统优化和评价,并通过发酵培养基各组分与产量之间的回归线性关系确定最优发酵培养基。丝状真菌在其发酵过程中丝状细胞的不断累积导致菌体浓度不断升高,并且该发酵液表现为非牛顿流体,发酵过程中营养物质、溶解氧、pH 和二氧化碳很难充分与菌丝体接触而达到良好的传质及传热效果,最终影响产量<sup>[8-9]</sup>。通过进一步氮源优化,降低发酵液菌体浓度,改善发酵过程的溶氧水平,实现提高产量的目标,为进一步研究和最后工业化生产奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: 纽莫康定 B<sub>0</sub> 产生菌丝状真菌 *Glarea lozoyensis* SIIA-F1108,由四川抗菌素工业研究所菌

种保藏中心提供。

**1.1.2 培养基:** (1) 种子培养基(g/L): 甘露醇 30.0, 棉籽饼粉 15.0, 葡萄糖 10.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0, pH 6.5。

(2) 发酵培养基(g/L): 甘露醇 70.0, 棉籽饼粉 18.0, 葡萄糖 8.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.0, 脯氨酸 5.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6, pH 6.0。

**1.1.3 主要试剂:** 甘露醇和棉籽饼粉, 青岛科瑞培养基生产有限公司; 脯氨酸、葡萄糖、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 中国医药(集团)上海试剂公司; 色谱级乙腈, 美国 Fisher 公司; 分析级甲醇, 中国金山化工厂(上海); 纯化水由本实验室自制。

**1.1.4 主要仪器:** 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 1260 Agilent 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 反相 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm), 大连依利特分析仪器有限公司。

## 1.2 培养方法

**种子培养:** 包括两个阶段, 第一阶段将在-80 °C 下保存于 5% (体积比)甘油的菌丝体接种于装有 40 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 24 °C、220 r/min 培养 5 d; 第二阶段是取 4 mL 第一阶段培养的种子同样接种于装有 40 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 相同的条件下培养 2 d。

**发酵培养:** 取第二阶段种子 4 mL 接种到装液量为 40 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶, 在 24 °C、220 r/min 的条件下培养 17 d。在发酵罐的放大培养中, 100 L 的发酵罐装量为 60 L, 将第二阶段培养所得的种子以5%的接种量接种于发酵罐, 发酵温度为 24 °C, 搅拌转速 220 r/min, 通气量 2.8 m<sup>3</sup>/h, 压力 0.5 kg/cm<sup>2</sup>。*Glarea lozoyensis* 菌丝累积使发酵液变稠, 在发酵过程中需间断性补水<sup>[10]</sup>, 第 7 天开始, 每 72 h 补加 4 L 无菌水以维持发酵罐中发酵液体积不变。发酵结束后测菌丝中的纽莫康定产量。

## 1.3 分析方法

采用高效液相色谱法<sup>[11]</sup>。准确量取 50 mL 纽莫康定 B<sub>0</sub> 发酵液, 过滤, 得菌丝滤饼, 然后向菌丝中加入 100 mL 的 100% 甲醇稀释, 置于振荡器 1 500 r/min 振荡提取 10 min 后过滤, 重复 2 次,

合并滤液, 最后用 0.45 μm 的过滤膜过滤即得到待测液。采用反相色谱柱 C<sub>18</sub> 柱(依利特)(4.6 mm×250 mm×5 μm), 以乙腈:水=44:56 作为流动相, 流速 1 mL/min, 柱温为 40 °C, 在波长 210 nm 下检测。

## 1.4 响应面法(Response surface methodology, RSM)的实验设计

**1.4.1 Plackett-Burman 设计实验:** 利用 Design-Expert (Version 8.0.6)统计软件对实验结果分析出各因素的显著性, 通过多元线性回归模型中的逐步回归法<sup>[12-13]</sup>拟合各显著因素与效价之间的线性方程。实验选取 N=12 的 Plackett-Burman 设计, 对 6 个因素:甘露醇(X<sub>1</sub>), 棉籽饼粉(X<sub>2</sub>), 葡萄糖(X<sub>3</sub>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (X<sub>4</sub>), 脯氨酸(X<sub>5</sub>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (X<sub>6</sub>)进行效价考察。每个因素选择高、低两个水平(表 1)。

**1.4.2 最陡爬坡实验设计:** 根据 Plackett-Burman 设计试验结果得出显著因素, 对显著因子浓度做最陡爬坡实验设计, 根据拟合线性回归系数的符号以及大小来对显著因素进行步长和变化方向设计<sup>[14]</sup>。

**1.4.3 Box-Behnken 法实验设计:** 根据最陡爬坡实验结果确定出最大逼近响应值区域, 利用响应面中心组合设计对 PB 试验筛出的显著因子做进一步优化, 获得发酵产纽莫康定 B<sub>0</sub> 最优培养基配方。通过最陡爬坡试验结果分析, 确定出显著因子的高、中、低三水平, 分别表征为 1、0、-1, 用 Design-Expert (Version 8.0.6)分析实验结果回归性, 采用 F 检验来对该模型方程的显著性进行评价, 用 t 检验对回归系数的显著性进行验证, 最后通过决定系数 R<sup>2</sup> 确定方程的拟合性。

## 1.5 响应面验证实验

对响应面优化实验结果确定的各显著因素的最佳浓度及分析软件预测结果进行摇瓶验证实验, 对模型可靠性进行分析, 得到优化结果。

## 1.6 发酵液菌体浓度优化实验

在响应面法优化实验基础上, 为了通过减小发酵液菌体浓度达到改善发酵过程溶氧水平和简易代谢过程调控的目的, 开展了发酵液菌体浓度优化实

验。对响应面优化后的发酵培养基中两氮源进行 3 水平全因子实验(表 2)，其他组分与优化后一致；发酵过程中对发酵液菌体浓度、菌丝形态及 pH 进行监测，然后通过 HPLC 检测纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量，最后根据发酵液菌体浓度与纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量之间的关系得到高产量、低菌体浓度的发酵培养基组成。发酵液菌体浓度采用离心法测定：准确量取 10 mL 发酵液于 10 mL 离心管中，置于离心机中 3 000 r/min 离心 10 min，用量筒测量上清液体积并算出菌体沉淀量所占体积，菌体沉淀量体积占离心液的百分比即为发酵液菌体浓度。

表 1 Plackett-Burman 设计实验因素水平  
Table 1 Factors and levels for Plackett-Burman

Variables	Level (g/L)	
	-1	1
Mannitol X <sub>1</sub>	70.0	130.0
Cottonseed meal X <sub>2</sub>	18.0	40.0
Glucose X <sub>3</sub>	8.0	15.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> X <sub>4</sub>	5.0	10.0
Proline X <sub>5</sub>	5.0	13.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> X <sub>6</sub>	0.6	1.8

表 2 全因子试验因素及其水平取值  
Table 2 Factors and levels of total factor test

Factor	Level (g/L)		
	1.0	2.0	3.0
Cottonseed meal X <sub>2</sub>	8.0	14.0	18.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> X <sub>6</sub>	0.6	1.2	1.8

## 1.7 100 L 发酵罐放大验证实验

对响应面优化结果及发酵液菌体浓度优化实验结果所确定的最优发酵培养基组成进行 100 L 发酵罐验证，得到最后结论。

## 2 结果与分析

### 2.1 筛选影响纽莫康定 B<sub>0</sub> 摇瓶发酵产量的显著因素

Plackett-Burman 实验设计与结果(重复 3 次取平均值)见表 3。使用软件 Design-Expert 8.0.6 对试验结果进行回归分析以及各因素的效应分析，结果见表 4。

表 3 Plackett-Burman 实验设计及响应值  
Table 3 Plackett-Burman test design and results

Number	Factor						Pneumocandin B <sub>0</sub> (mg/L)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	
1	1	1	-1	-1	1	-1	1 732
2	-1	-1	1	-1	1	-1	1 597
3	1	1	1	1	-1	-1	1 812
4	1	-1	1	-1	1	1	1 757
5	-1	1	1	-1	-1	1	1 675
6	-1	1	1	1	1	1	1 521
7	-1	1	-1	1	1	-1	1 636
8	1	-1	-1	1	1	1	1 690
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1 487
10	1	-1	1	1	-1	-1	1 748
11	-1	-1	-1	1	-1	1	1 433
12	1	1	-1	-1	-1	1	1 635

表 4 各影响因子的方差分析和偏回归系数  
Table 4 ANOVA results for the significance

Source	Sum of squares	D <sub>f</sub>	Mean square	Regression coefficient	F value	P value
Model	144 400	6	24 067.42	643.58	24.68	0.001 4
Mannitol	87 552.08	1	87 552.08	85.42	89.77	0.000 2
Cottonseed meal	7 450.08	1	7 450.08	24.92	7.64	0.039 7
Glucose	14 630.08	1	14 630.08	34.92	15.00	0.011 7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 852.08	1	5 852.08	22.08	6.00	0.058 0
Proline	16 950.08	1	16 950.08	37.58	17.38	0.008 7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11 970.08	1	11 970.08	-31.58	12.27	0.017 2
Residual	4 876.42	5	975.28			
Cor Total	149 300	11				

表 4 显示, 培养基各组分对纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量的影响显著性顺序为: 甘露醇>脯氨酸>葡萄糖>硫酸铵>棉籽饼粉>磷酸二氢钾。其中, 对纽莫康定产量影响最显著的 3 个因素为 X<sub>1</sub> (甘露醇)、X<sub>5</sub> (脯氨酸)、X<sub>3</sub> (葡萄糖), 利用多元线性回归模型中的逐步回归法<sup>[13,15]</sup> 拟合得到的线性方程为:  $Y=1\ 801.7+102.58X_1+57.08X_5+47.25X_3$ , 决定系数 R<sup>2</sup> 值为 0.978 0, 说明该回归方程拟合良好。方程式可知 3 个显著因素均为正效应, 所以应将三者的质量浓度适当增大, 然后进行进一步的优化考察。因此后续研究中, 除甘露醇、脯氨酸和葡萄糖 3 个显著因素外, 其他各因素的取值分别为: 棉籽饼粉 18 g/L、磷酸二氢钾 5 g/L、硫酸铵 0.6 g/L。

2.2 最陡爬坡实验研究最大响应值及响应区域

根据 Plackett-Burman 实验结果选出的显著因子为甘露醇、脯氨酸和葡萄糖, 对三者浓度的步长及变化方向进行最陡爬坡实验设计, 实验设计方案及结果见表 5。表 5 表明在第 4 次实验周围纽莫康定 B<sub>0</sub> 发酵产量最大, 因此选取第 4 次试验水平作为响应面实验设计的中心点进行实验。

2.3 Box-Behnken 法确定显著因素的最优水平

根据最陡爬坡实验确定的响应面实验中心点, 利用 Box-Behnken 的中心组合设计, 3 因素各取 3 水平列表(表 6), 3 因素 3 水平共需 15 次试验, 中心组合设计及结果见表 7, 通过软件 Design-Expert 8.0.6 对试验结果进行二次回归分析。回归方程表达式为:  $Y=1\ 842.20+14.13X_1+4.50X_5+6.38X_3+1.50X_1X_5+15.25X_1X_3+21.5X_3X_5-70.23X_1^2-71.98X_5^2-74.72X_3^2$ , 其方差分析结果如表 8 所示。

从表 8 看出模型的 P 值为 0.000 1, 说明该模型是非常显著的。模型失拟项是用来表示所用模型预测值与实验实际值拟合的程度<sup>[16]</sup>。模型失拟项 P 值为 0.858 4>0.05, 因此失拟项不显著, 模型选择合适。决定系数 R<sup>2</sup>=0.975 5, 大于 0.9, 表示模型与实际情况拟合良好。因此, 能使用该模型来对发酵过程中纽莫康定 B<sub>0</sub> 的产量进行分析与预测。经软件计算分析可知纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量预测值最大时培养基

表 5 最陡爬坡实验设计与结果  
Table 5 The design and corresponding results of steepest ascent

Number	Mannitol (g/L)	Proline (g/L)	Glucose (g/L)	Pneumocandin B <sub>0</sub> (mg/L)
1	130	13	15	1 805
2	140	18	20	1 812
3	150	23	25	1 827
4	160	28	30	1 834
5	170	33	35	1 816
6	180	38	40	1 801

表 6 响应面分析实验因素水平表  
Table 6 Factors and level value of response surface analysis

Variables	Level (g/L)		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> Mannitol	135	160	185
X <sub>3</sub> Glucose	15	30	45
X <sub>5</sub> Proline	22	28	34

表 7 Box-Behnken 响应面设计及实验结果  
Table 7 Response surface Box-Behnken design and corresponding response

Number	X <sub>1</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>3</sub>	Pneumocandin B <sub>0</sub> (mg/L)
1	-1	-1	0	1 682
2	1	-1	0	1 714
3	-1	1	0	1 683
4	1	1	0	1 721
5	-1	0	-1	1 700
6	1	0	-1	1 691
7	-1	0	1	1 673
8	1	0	1	1 725
9	0	-1	-1	1 699
10	0	1	-1	1 670
11	0	1	1	1 688
12	0	-1	1	1 746
13	0	0	0	1 824
14	0	0	0	1 856
15	0	0	0	1 861
16	0	0	0	1 830
17	0	0	0	1 859

表 8 回归模型及方差分析  
Table 8 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic polynomial model

Source	Sum of squares	$D_f$	Mean square	$F$ value	$P$ value
$X_1$	1 596.13	1	1 596.13	5.640	0.049 30
$X_5$	162.00	1	162.00	0.570	0.047 40
$X_3$	325.13	1	325.13	1.150	0.031 94
$X_1X_5$	9.00	1	9.00	0.032	0.863 50
$X_1X_5$	930.25	1	930.25	3.290	0.112 70
$X_3X_5$	1 849.00	1	1 849.00	6.530	0.037 80
$X_1^2$	20 764.42	1	20 764.42	73.370	<0.000 1
$X_5^2$	21 812.21	1	21 812.21	77.070	<0.000 1
$X_3^2$	23 510.84	1	23 510.84	83.080	<0.000 1
Model	78 726.71	9	8 747.41	30.910	0.000 1
Residual	1 981.05	7	283.01		
Lack of fit	312.25	3	104.08	0.250	0.858 40
Pure error	1 668.80	4	417.20		
Cor total	80 707.76	16			

成分浓度为：甘露醇 167.3 g/L，葡萄糖 28.5 g/L，脯氨酸 26.1 g/L，产量预测值为 1 846 mg/L。

#### 2.4 响应面验证实验

为检验设计模型对实际情况预测的准确性，采用优化后的发酵培养基进行 5 组摇瓶发酵实验，纽莫康定  $B_0$  的产量分别为 1 857、1 843、1 831、1 841、1 826 mg/L，产量均值为 1 839.6 mg/L，与设计模型所预测值很接近，说明设计模型能较准确地预测发酵情况。相较于优化前摇瓶发酵产量 1 294 mg/L，提高了 42%。

#### 2.5 氮源影响发酵液菌体浓度

响应面优化实验可知，2 种氮源为非显著因素，因此能在不影响产量前提下通过改变两者浓度来研究氮源对发酵液菌体浓度影响。2 氮源 3 水平全因子实验结果如表 9 所示，从表 9 中可以看到两氮源变化对产量没有显著影响，同时硫酸铵含量增加到 1.8 g/L，棉籽饼粉减少到 8 g/L 时菌丝体浓度最小。发酵过程中监测结果显示 pH 值保持在 6.0–6.5 之间；菌丝形态无显著变化，仅较替换前更粗壮且发酵液中无团状菌丝小球。

表 9 全因子试验设计及结果  
Table 9 The design and results of the full factorial experimental

Serial number	Factor		Cell concentration (%)	Pneumocandin $B_0$ (mg/L)
	$X_2$	$X_6$		
1	1	1	50	1 829
2	2	1	56	1 833
3	3	1	65	1 802
4	1	2	45	1 840
5	2	2	51	1 843
6	3	2	57	1 824
7	1	3	40	1 797
8	2	3	43	1 804
9	3	3	49	1 835

#### 2.6 100 L 发酵罐验证

采用两步优化后获得的摇瓶发酵培养组分浓度进行 100 L 发酵罐放大发酵实验，3 次发酵罐发酵实验结果显示纽莫康定  $B_0$  平均产量为 1 980 mg/L，与摇瓶发酵产量为 1 839.6 mg/L 相比较提高了 7.6%；3 次发酵罐发酵实验中，发酵液菌体浓度平均值为 40%，与摇瓶发酵菌体浓度平均值 45% 相比减少了 12.5%。发酵罐较摇瓶发酵培养产量提高及菌体浓度减小，其可能原因是发酵罐培养过程中，轴向剪切力搅拌叶轮搅拌使菌体与氧气更充分接触，通过调节通气量和搅拌速率维持微生物代谢所需溶氧水平；搅拌使发酵液更好地传热、传质和充分接触氧气达到菌丝最适生长环境，避免出现团状菌丝小球。

### 3 结论与讨论

采用两步优化所得发酵培养基，摇瓶及发酵罐产量显著提高，表明响应面法优化发酵培养基是提高纽莫康定  $B_0$  产量的有效途径之一。优化所得发酵培养基中甘露醇浓度较优化前明显增大，其与 Tkacz 等<sup>[7]</sup>研究结果相吻合，甘露醇能促进纽莫康定的合成，同时能在发酵稳定期为次级代谢产物的生产提供充足的能量。优化后的发酵培养基中脯氨酸增加量接近 2 倍，相对于发酵产量其转化效率较低，除了供应纽莫康定  $B_0$  母核生物合成所需外，可

能其中一部分脯氨酸用于菌丝生长, 下一步考虑发酵中间过程补入脯氨酸, 减少其用量和提高转化率。同时, Tkacz 等<sup>[7]</sup>研究中提到无机氮源(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>在发酵过程中有调节 pH 的作用, 而研究中发现用(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 部分替换有机氮源棉籽饼粉能降低发酵液菌体浓度。发酵罐搅拌叶轮类型也会影响发酵液菌体浓度, 其两者间具体关系需进一步研究。Connors 等<sup>[17]</sup>研究表明, 当发酵培养基中果糖浓度很高时, 或向果糖浓度很低的培养基中添加高浓度盐后, 纽莫康定 B<sub>0</sub> 和 C<sub>0</sub> 总产量升高且 C<sub>0</sub> 的比例降低。因此, 有针对性的向发酵培养基中添加或替换组分来实现降低发酵液菌体浓度、减小副产物产量, 以及通过优化上罐条件、控制发酵过程溶氧水平和采用补料发酵等手段来提高纽莫康定 B<sub>0</sub> 产量正在深入研究中。

## 参 考 文 献

- [1] Liu ZY, Wang AX. Advances in antifungal agents[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(2): 69-71 (in Chinese)  
刘正印, 王爱霞. 抗真菌药物的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(2): 69-71
- [2] Letscher-Bru V, Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 51(3): 513-521
- [3] Kartsonis NA, Nielsen J, Douglas CM. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents[J]. Drug Resistance Updates, 2003, 6(4): 197-218
- [4] Cappelletty D, Eiselstein-McKittrick K. The echinocandins[J]. Pharmacotherapy: the Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2007, 27(3): 369-388
- [5] Wang DH, Qian XP, Chen DJ. Advances in new antifungal drugs echinocandins and pneumocandins[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2004, 29(7): 439-442, S4 (in Chinese)  
王栋海, 钱秀萍, 陈代杰. 抗真菌药物 Echinocandins 和 Pneumocandins 类的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(7): 439-442, S4
- [6] Masurekar PS, Fountoulakis JM, Hallada TC, et al. Pneumocandins from *Zalerion arboricola* II. Modification of product spectrum by mutation and medium manipulation[J]. The Journal of Antibiotics, 1992, 45(12): 1867-1874
- [7] Tkacz JS, Giacobbe RA, Monaghan RL. Improvement in the titer of echinocandin-type antibiotics: a magnesium-limited medium supporting the biphasic production of pneumocandins A<sub>0</sub> and B<sub>0</sub>[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1993, 11(2): 95-103
- [8] Karsheva M, Hristov J, Penchev I, et al. Rheological behavior of fermentation broths in antibiotic industry[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 68(3): 187-206
- [9] Pollard D, Hunt G, Kirschner T, et al. Rheological characterization of a fungal fermentation for the production of pneumocandins[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2002, 24(6): 373-383
- [10] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes[J]. Biotechnology Advances, 2004, 22(3): 189-259
- [11] Schwartz RE, Sesin DF, Joshua H, et al. Pneumocandins from *Zalerion arboricola* I. Discovery and isolation[J]. The Journal of Antibiotics, 1992, 45(12): 1853-1866
- [12] Sun ZG, Liu Y, Yao JM. Fermentation optimization by response surface methodology for enhanced yield of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* LS1057[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 258-263 (in Chinese)  
孙中贵, 刘咏, 姚建铭. 响应面法优化隐甲藻 LS1057 产二十二碳六烯酸发酵条件[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 258-263
- [13] Ling HZ, Ge JP, Ping WX, et al. Fermentation optimization by response surface methodology for enhanced production of β-glucosidase of *Aspergillus niger* HDF05[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(3): 419-426 (in Chinese)  
凌宏志, 葛菁萍, 平文祥, 等. 响应面法优化黑曲霉 HDF05 产 β-葡萄糖苷酶过程参数[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 419-426
- [14] Sun ZG. Screening and breeding of a high-yield docosahexaenoic acid strain of *Cryptocodinium cohnii* and study on fermentative character[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2012 (in Chinese)  
孙中贵. 高产二十二碳六烯酸隐甲藻的选育及发酵特性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学学位论文, 2012
- [15] Jia B, Jin ZH, Mei LH. Medium optimization based on statistical methodologies for pristnamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 144(2): 133-143
- [16] Rastogi NK, Rashmi KR. Optimisation of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology[J]. European Food Research and Technology, 1999, 209(1): 57-62
- [17] Connors N, Petersen L, Hughes R, et al. Residual fructose and osmolality affect the levels of pneumocandins B<sub>0</sub> and C<sub>0</sub> produced by *Glarea lozoyensis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(6): 814-818