



研究报告

应用响应面法优化发酵培养基提高达托霉素产量

张昊月¹ 郭正彦² 吕志堂^{*1} 陈义华^{*2}

1 河北大学生命科学学院 生命科学与绿色发展研究院 河北省微生物多样性研究与应用实验室

河北 保定 071002

2 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

摘要:【背景】达托霉素来自玫瑰孢链霉菌 NRRL 11379 的发酵产物,是重要的临床用抗生素。其原始产生菌发酵周期长,影响达托霉素的生产效率。本实验室前期在天蓝色链霉菌中重构了达托霉素的生物合成途径,有效地缩短了发酵周期,但重组菌株 K10 中达托霉素发酵产量很低,制约了后续的研究和开发。【目的】利用响应面法优化产达托霉素的重组菌天蓝色链霉菌 K10 的发酵培养基组分,获得达托霉素高产的发酵培养基配方。【方法】采用单因素实验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面法设计优化达托霉素发酵培养基,使用 Design Expert 8.0 对实验数据进行分析。【结果】培养基各成分中影响达托霉素产量的 3 个主要因素是糊精、酵母提取物和酪蛋白,其最佳浓度分别为 25.11、2.20 和 2.00 g/L。在此条件下,达托霉素产量达到 15.30 mg/L,较原始培养基产量提高了 2.17 倍。【结论】实验获得了达托霉素产量明显提高的天蓝色链霉菌 K10 发酵培养基配方,为达托霉素的后续研究提供可靠支撑。

关键词: 达托霉素, Plackett-Burman 试验, 最陡爬坡试验, 响应面法

Medium optimization with the response surface methodology to improve daptomycin production

ZHANG Haoyue¹ GUO Zhengyan² LYU Zhitang^{*1} CHEN Yihua^{*2}

1 College of Life Sciences, Institute of Life Science and Green Development, Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Daptomycin is an important antibiotic isolated from *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 and is clinically used to treat infections. The long fermentation period of the daptomycin producer restricts its productivity. Hence, a daptomycin heterologous expression strain *Streptomyces coelicolor* K10 that can significantly shorten the fermentation period, was constructed in our previous work. Unfortunately, the very low titer of daptomycin in *S. coelicolor* K10 hampers its use in further studies. [Objective] The fermentation medium of *S. coelicolor* K10 was optimized by response surface

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901900)

***Corresponding authors:** E-mail: LYU Zhitang: lzt325@126.com; CHEN Yihua: cheniyihua@im.ac.cn

Received: 04-08-2020; **Accepted:** 05-09-2020; **Published online:** 06-11-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901900)

***通信作者:** E-mail: 吕志堂: lzt325@126.com; 陈义华: cheniyihua@im.ac.cn

收稿日期: 2020-08-04; **接受日期:** 2020-09-05; **网络首发日期:** 2020-11-06

methodology to improve daptomycin production. [Methods] Plackett-Burman experiment, the steepest ascent method, and response surface methodology were used to optimize the fermentation medium of *S. coelicolor* K10; and the experiment data were analyzed using Design Expert 8.0. [Results] The main influential factors were dextrin, yeast extract, and casein; and their optimal concentrations were 25.11, 2.20, and 2.00 g/L, respectively. Under the optimal condition, the production of daptomycin could reach 15.30 mg/L, about 2.17 times higher than that in the original medium. [Conclusion] This study increases the daptomycin titer of *S. coelicolor* K10 considerably and provides a reliable basis for the follow-up studies of daptomycin.

Keywords: daptomycin, Plackett-Burman experiment, the steepest ascent method, response surface method

达托霉素(Daptomycin, DAP)是一种含有13个氨基酸的环脂肽类抗生素,最初由美国的礼来公司从玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*) NRRL 11379 发酵液中分离得到^[1]。已于2003年被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗革兰氏阳性菌引起的复杂皮肤感染和结构性皮肤感染的临床药物;于2006年又被批准用于治疗由金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)引起的心内膜炎和菌血症的临床药物^[2-3]。达托霉素因其独特的作用机制和抑菌效果,应用市场前景广阔^[4]。达托霉素主要通过微生物发酵法生产获得^[5],其复杂结构决定了很难通过化学全合成制备这类化合物^[6-8]。目前,达托霉素生产菌最高发酵产量接近2 g/L^[9-10],仍然有进一步提升的空间。另外,玫瑰孢链霉菌的生长周期较长,导致生产成本上升,如果能够有效缩短发酵周期对于达托霉素的生产具有重要意义。前期已经有不同的研究工作通过多种途径来提高达托霉素生产效率,如缩短发酵时间、优化发酵条件和优化工艺等^[5,10]。

通过异源表达来生产达托霉素是避免野生菌种的限制、有效提高产量的另一种思路。已有研究报道在变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)中成功进行了达托霉素的异源表达,其异源表达质粒包含了128 kb完整基因簇,但达托霉素的产量很低^[11]。本实验室通过CATCH方法^[12]构建了包含达托霉素54 kb核心基因簇的质粒,导入天蓝色链霉菌

(*Streptomyces coelicolor*)中,利用文献报道的玫瑰孢链霉菌NRRL 11379产达托霉素的A346培养基进行发酵^[1],发现重组菌株天蓝色链霉菌K10获得了产生达托霉素的能力,产量很低,约为4.82 mg/L;但是天蓝色链霉菌K10生长快,摇瓶发酵周期只需要6 d左右;用玫瑰孢链霉菌NRRL 11379来生产达托霉素,摇瓶发酵周期需要10 d左右^[13-14]。如果能够提高天蓝色链霉菌K10中达托霉素的产量,这一菌株作为达托霉素的研究和生产菌种将具有进一步开发的價值。

发酵培养基组分的比例直接影响发酵产物的产量。培养基组分的优化方法主要有正交试验、均匀设计、神经网络和响应面法(Response Surface Methodology, RSM)等,其中最常用的统计优化方法为响应面法^[15]。该方法是利用合理性试验设计,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,分析回归方程来寻求最优的工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[15]。其最大优势是用尽可能少的实验次数优化发酵培养基的多个变量,即Plackett-Burman设计筛选发酵培养基中的显著影响因子,然后通过最陡爬坡试验使显著影响因子逼近最大响应区域,最后运用响应面法的中心组合设计(Central Composite Design, CCD)进行实验^[5]。目前已有多个工作利用响应面法成功优化发酵培养基来提高达托霉素的产量,如:2010年,祝宇松等^[16]通过响应面法得到发酵培养基使达托霉素产量由13.12 mg/L提高到37.16 mg/L;2012年,何美儒等^[5]采用响应

面法优化达托霉素发酵培养基,使其产量提高了2.25倍;宇光海等^[17]通过响应面优化使达托霉素的产量较优化之前提高了73.7%。

本研究通过单因素实验、Plackett-Burman设计、最陡爬坡试验和响应面设计相结合的方法对天蓝色链霉菌K10产达托霉素的发酵培养基进行优化,以期为后续的菌种优化、组合生物合成等进一步研究工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

产达托霉素的重组菌株——天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) K10由本实验室构建保存。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

葡萄糖、蔗糖和硝酸钾,北京化工厂;碳酸钙、硫酸钾、甘露醇、可溶性淀粉、3-(N-吗啉)丙磺酸(MOPS)、麦芽糖、糊精和L-天冬酰胺,国药集团化学试剂有限公司;酵母提取物、酪蛋白和TSB培养基,赛默飞世尔科技公司;安普霉素和卡那霉素,北京江晨生物技术公司;癸酸钠,上海源叶生物科技有限公司。高效液相色谱仪,岛津公司;恒温生化培养箱,上海博迅医疗设备厂。

MS培养基的配制参考文献[18];发酵培养基A346的配制参考文献[1];TSB培养基的配制参考文献[19]。

1.2 培养条件

将天蓝色链霉菌K10菌种接种在MS培养基^[18]上,在28℃条件下培养10d左右。在TSB培养基中添加终浓度为25 μg/mL的卡那霉素和安普霉素,取适量新鲜孢子接种到装液量为50 mL的250 mL三角瓶中,在28℃、220 r/min条件下振荡培养48 h。然后按4%接种量接种到发酵培养基A346^[1]中,培养36 h后第一次添加0.1%的癸酸钠(200 mg/mL),之后每隔12 h添加0.1%癸酸钠,在相同条件下培养5 d。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

用蒸馏水溶解达托霉素标准品,分别配制成浓度为3.13、6.25、25、50、100、200 mg/L的标准溶液,用来绘制达托霉素标准曲线。

1.3.2 单因素试验

A346培养基中的碳源为可溶性淀粉和葡萄糖,含碳总量为1.04 mol/L。以A346培养基为对照,分别选用糊精、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉作为唯一碳源,初始浓度与原始碳源的含碳量保持一致,发酵培养5 d后检测达托霉素产量。

A346中的氮源为酵母提取物和酪蛋白,含氮总量为0.062 mol/L,选用蛋白胨、酵母提取物、KNO₃、酪蛋白、黄豆粉作为单一氮源,初始浓度与原始氮源保持一致,发酵培养5 d后检测达托霉素产量。

参考段然等报道的方法^[20],在A346培养基中添加适当浓度的CaCO₃、K₂SO₄、L-天冬酰胺,同时以不添加MOPS的A346培养基作为对照,发酵培养5 d后检测达托霉素产量。

1.3.3 Plackett-Burman 试验设计

根据天蓝色链霉菌的发酵特点和单因素实验结果,以影响达托霉素发酵的7个因素(糊精、麦芽糖、酵母提取物、酪蛋白、L-天冬酰胺、MOPS、pH值)作为PB设计的7个因子(A、B、C、D、E、F、G),每个因素选取2个水平,以初始发酵培养基的添加浓度作为低水平(-1),取低水平浓度的1.5倍作为高水平(+1)。实验选用N=11的PB设计,预留4个虚拟项(H、J、K、L)做误差分析,试验重复3次取平均值,试验因素水平设计见表1。

1.3.4 最陡爬坡试验设计

根据Plackett-Burman试验结果,设计显著影响因子合适的步长和爬坡方向,其他因子的浓度为初始添加浓度,试验重复3次取平均值,以此找到响应面试验的中心点。

表 1 PB 设计实验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of PB design experiment

因子 Factor	水平 Level (g/L)	
	-1	1
A	16.0	24.0
B	16.0	24.0
C	5.0	7.5
D	5.0	7.5
E	1.0	1.5
F	10.0	15.0
G	6.5	7.5

1.3.5 响应面设计

根据最陡爬坡实验确定的中心点,通过中心组合设计针对显著影响因子设计3因素5水平的响应面分析试验,其他次要因素均取初始浓度进行实验,重复3次取平均值。

1.4 分析方法

达托霉素含量的测定:采用高效液相色谱法(HPLC)进行测定,色谱柱为 Apollo C₁₈ 柱;洗脱方式为乙腈/水混合溶剂梯度洗脱,在0–22 min内乙腈浓度由10%变化到100%;流速1 mL/min;进样量25 μL;检测波长为224 nm。发酵结束后取1 mL发酵液以12 000 r/min离心10 min,吸取上清液并用0.22 μm的微孔滤膜过滤后直接用HPLC检测,根据达托霉素标准曲线计算达托霉素的产量。

1.5 数据处理

采用 Design Expert 8.0 软件进行 Plackett-Burman 试验和 CCD 响应面优化的实验设计和数据处理。

2 结果与分析

2.1 达托霉素标准曲线的建立

将配制的不同浓度的达托霉素标准溶液进行HPLC分析,以达托霉素浓度为横坐标、以峰面积为纵坐标绘制达托霉素标准曲线,如图1所示。由图1数据可得峰面积(y)=达托霉素浓度(x)×45 905+36 666,确定系数 $R^2=0.9978$,说明达托霉素浓度

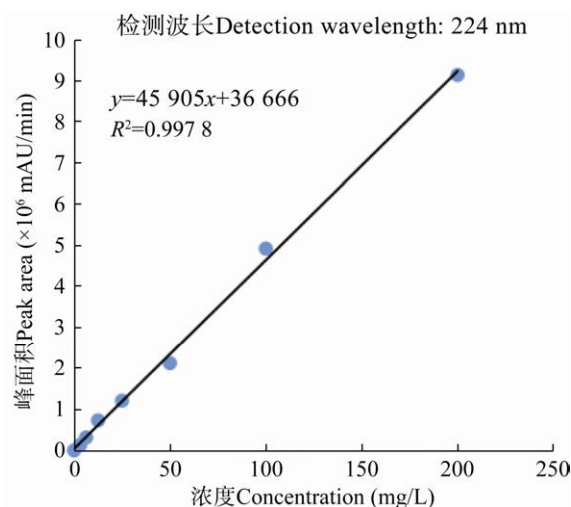


图 1 HPLC 法测定达托霉素标准曲线

Figure 1 Determination of daptomycin standard curve by HPLC

在0–200 mg/L之间时具有良好的线性关系,可以用于定量分析。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 碳源对达托霉素产量的影响

碳源可以为微生物提供生命活动所需要的能量,有助于其合成代谢产物。碳源分为速效碳源和迟效碳源,常用的速效碳源一般为葡萄糖、麦芽糖等单糖或二糖,可以在微生物发酵初期为其提供能量;常用的迟效碳源为糊精、淀粉等,经菌体产生的胞外水解酶将其分解为单糖后再被吸收利用,可以有效解决单糖代谢过快的问题^[21]。对照A346培养基中的碳源成分和含量,分别选用糊精、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉作为唯一碳源,初始浓度与原始碳源的含碳量保持一致,发酵培养5 d后检测达托霉素产量。

碳源优化结果如图2所示,当糊精作为唯一碳源时达托霉素产量最高为 7.98 ± 0.14 mg/L,是A346培养基的1.89倍;当麦芽糖作为唯一碳源时达托霉素产量为 5.09 ± 0.11 mg/L,是A346培养基的1.20倍。本实验发现葡萄糖作为碳源时会降低达托霉素的产量且重复性较差,可能原因为高浓度的葡萄糖加速菌体的糖酵解作用,造成培养基

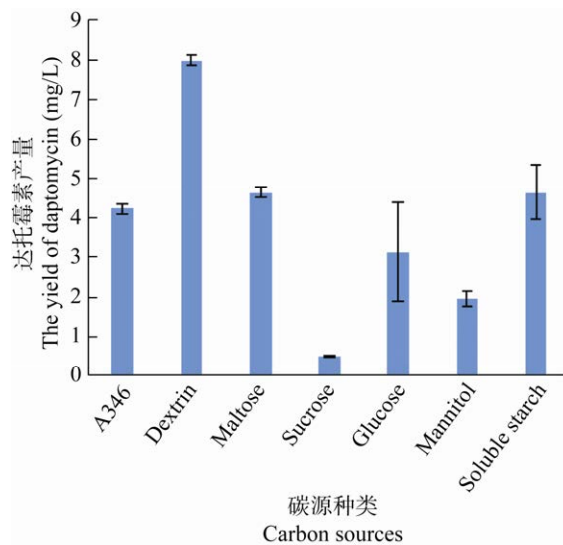


图2 碳源种类对达托霉素产量的影响

Figure 2 Effects of different carbon sources on the yield of daptomycin

内乳酸等物质积累,影响了达托霉素合成^[21]。根据天蓝色链霉菌的生长特点和达托霉素的合成特点,复合碳源更利于天蓝色链霉菌的生长以及达托霉素的合成。发酵前期,速效碳源有利于菌体快速利用,加速微生物生长;迟效碳源在达托霉素发酵后期能加强达托霉素的持续合成^[21]。糊精和麦芽糖分别作为迟效碳源和速效碳源效果最好,所以选择糊精和麦芽糖作为达托霉素发酵培养基的复合碳源。

2.2.2 氮源对达托霉素产量的影响

氮源主要用来构成菌体细胞物质和含氮代谢物。氮源分为有机氮源和无机氮源,有机氮源可以为菌体提供丰富的蛋白质、氨基酸等;无机氮源如尿素、铵盐和硝酸盐等可以使培养基的pH值发生变化,必要时可以作为有机氮源的辅助^[21]。对照A346中的氮源,选用蛋白胨、酵母提取物、KNO₃、酪蛋白、黄豆粉作为单一氮源,初始浓度与原始氮源保持一致,发酵培养5 d后检测达托霉素产量。

氮源优化结果如图3所示,原始发酵培养基A346的达托霉素产量最高,为4.23±0.11 mg/L。

A346中的氮源为酵母提取物和酪蛋白,而且两者分别作为单一氮源时达托霉素产量分别为2.93±0.17 mg/L和2.83±0.14 mg/L,与其他单一氮源相比也是最高,所以氮源依然选择初始培养基A346的氮源酵母提取物和酪蛋白。

2.2.3 无机盐对达托霉素产量的影响

无机盐对微生物的生长发育和次级代谢产物的合成具有重要作用,例如镁、钾、钙等。氨基酸作为一种生长因子,如天冬酰胺对达托霉素的合成具有显著的促进作用^[20-21]。在A346培养基中分别添加了CaCO₃、K₂SO₄和L-天冬酰胺,同时以不添加MOPS的A346培养基作为对照,发酵培养5 d后检测达托霉素产量。

由图4可知,添加L-天冬酰胺后达托霉素产量最高,为5.74±0.24 mg/L,是A346培养基的1.36倍,与文献[20]报道相符。培养基中添加CaCO₃后达托霉素产量急剧降低,可能因为较高浓度的钙离子会抑制达托霉素的合成^[20-21]。培养基不添加MOPS后达托霉素产量会减少,所以在达托霉素发酵培养基中添加L-天冬酰胺和MOPS进行下一步优化。

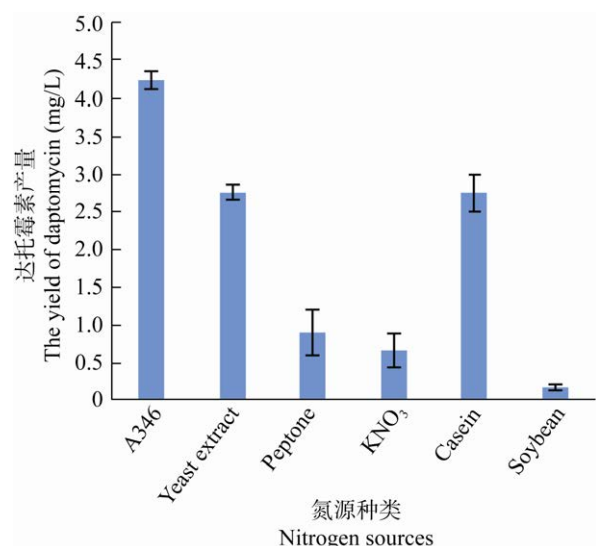


图3 氮源种类对达托霉素产量的影响

Figure 3 Effects of different nitrogen sources on the yield of daptomycin

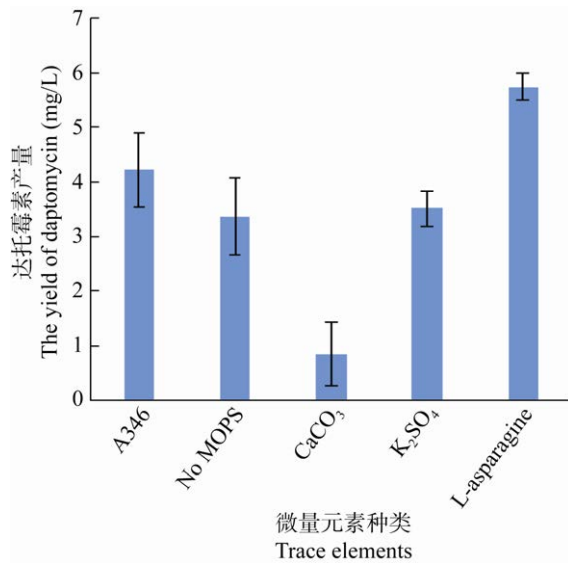


图4 微量元素种类对达托霉素产量的影响

Figure 4 Effects of different trace elements on the yield of daptomycin

通过单因素实验改进初始培养基配方为糊精 16 g/L、麦芽糖 16 g/L、酵母提取物 5 g/L、酪蛋白 5 g/L、L-天冬酰胺 1 g/L、MOPS 10 g/L。以下优化实验在此培养基基础上进行。

2.3 Plackett-Burman 设计

Plackett-Burman 试验结果见表 2，以达托霉素产量(R , mg/L)作为响应值，对数据进行回归分

析得到关于响应值的多元一次回归方程：

$R_1 = +5.55 + 1.26A - 0.03B - 1.06C - 2.06D + 0.96E - 0.27F - 0.28G$ ，决定系数 $R^2 = 0.9323$ 。对表 2 数据进行方差分析，结果见表 3。方差分析表明：因素 A、C、D 均显著($Prob > F$ 值而小于 0.05)，表明变量 A、C、D 是构建模型的主要影响因子。

2.4 最陡爬坡试验结果

根据 Plackett-Burman 试验得到的多元一次方程可知，因素 A 在方程中的系数为正值，表明其在模型中为正效应，最陡爬坡试验需增加其实际浓度；因素 C、D 在方程中的系数为负值，表明其在模型中为负效应，最陡爬坡试验需减少其实际浓度。最陡爬坡试验的设计结果见表 4。由表 4 可知，实验 5 的达托霉素产量最高，因此以实验 5 的培养基配方作为响应面设计的中心点。

2.5 响应面设计

CCD 实验设计的因素与水平见表 5，实验设计及结果见表 6，使用 Design Expert 8.0 软件对实验结果进行二次回归，得到的响应值拟合方程为 $R_1 = -358.02 + 27.36A + 22.02B + 3.82C - 0.73AB - 0.15AC + 0.75BC - 0.51A^2 - 1.19B^2 - 0.51C^2$ ，决定系数 $R^2 = 0.9655$ 。

表2 Plackett-Burman 设计实验结果

Table 2 Results of Plackett-Burman design experiment

No.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	R (mg/L)
1	16.00	24.00	7.50	5.00	15.00	1.50	7.50	-1	-1	-1	1	7.35±0.11
2	16.00	16.00	5.00	7.50	10.00	1.50	7.50	-1	1	1	1	2.50±0.09
3	24.00	24.00	7.50	5.00	10.00	1.00	7.50	-1	1	1	-1	5.91±0.52
4	24.00	16.00	7.50	7.50	15.00	1.00	6.50	-1	1	-1	1	3.36±0.10
5	24.00	24.00	5.00	7.50	15.00	1.50	6.50	-1	-1	1	-1	7.11±0.35
6	24.00	16.00	5.00	5.00	15.00	1.00	7.50	1	-1	1	1	12.24±0.09
7	16.00	24.00	5.00	7.50	15.00	1.00	7.50	1	1	-1	-1	3.66±0.37
8	16.00	16.00	7.50	5.00	15.00	1.50	6.50	1	1	1	-1	5.67±0.52
9	24.00	24.00	5.00	5.00	10.00	1.50	6.50	1	1	-1	1	8.63±0.73
10	24.00	16.00	7.50	7.50	10.00	1.50	7.50	1	-1	-1	1	3.66±0.37
11	16.00	24.00	7.50	7.50	10.00	1.50	7.50	1	-1	1	1	1.01±0.66
12	16.00	16.00	5.00	5.00	10.00	1.00	6.50	-1	-1	-1	-1	5.86±0.28

表 3 Plackett-Burman 设计方差分析
Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for Plackett-Burman design experiment

因子	低水平	高水平	<i>F</i>	<i>P</i>
Factor	Low level (-1)	High level (+1)		
A	16.00	24.00	7.93	0.029 6
B	16.00	24.00	0.46	0.988 5
C	5.00	7.500	9.63	0.049 7
D	5.00	7.500	8.26	0.005 8
E	10.00	15.00	1.61	0.065 6
F	1.00	1.50	0.76	0.524 7
G	6.50	7.50	0.29	0.500 5

表 4 最陡爬坡设计实验结果
Table 4 Results of the steepest ascent design experiment

No.	A	C	D	DAP (mg/L)
1	16.00	5.00	5.00	9.40±0.38
2	18.00	4.50	4.50	11.53±0.47
3	20.00	4.00	4.00	13.14±0.23
4	22.00	3.50	3.50	13.44±0.57
5	24.00	3.00	3.00	14.09±0.29
6	26.00	2.50	2.50	10.56±1.48

表 5 CCD 设计实验的因素与水平
Table 5 Factors and levels of CCD design experiment

因子	水平 Level (g/L)				
Factor	-1.681	-1	0	1	1.682
A	20.63	22.00	24.00	26.00	27.36
C	1.32	2.00	3.00	4.00	4.68
D	1.32	2.00	3.00	4.00	4.68

对表 6 数据进行方差分析, 结果见表 7。由表 7 可知, 模型的 P 值 $<0.000\ 1$, 表明自变量和因变量之间的线性关系极显著, 所建立的回归方程和曲面有较好的拟合。模型的决定系数 $R^2=0.965\ 5$, 表明模型拟合度高、可信性高, 可以利用此模型分析达托霉素产量的变化。

回归使用 3-D Surface 绘制响应面三维曲线, 如图 5 所示, 可直观表现各因子对响应值的影响趋势, 此响应面的最高点在模型的设计范围之内, 说明此响应面的变量设计较好, 可以进行后续分析以求得响应值最高点。

表 6 CCD 实验设计及结果
Table 6 Design and results of CCD design experiment

No.	A	C	D	DAP (mg/L)
1	22.00	4.00	4.00	9.54±0.25
2	24.00	3.00	3.00	12.12±0.31
3	24.00	3.00	1.32	11.23±0.64
4	26.00	4.00	2.00	7.54±0.10
5	26.00	4.00	4.00	7.08±0.77
6	22.00	2.00	2.00	8.05±0.62
7	26.00	2.00	4.00	8.73±1.01
8	20.64	3.00	3.00	3.94±0.92
9	24.00	4.68	3.00	7.53±0.37
10	27.36	3.00	3.00	8.24±0.32
11	22.00	2.00	4.00	5.83±0.57
12	26.00	2.00	2.00	12.64±0.83
13	24.00	1.32	3.00	9.37±0.99
14	24.00	3.00	3.00	12.12±0.31
15	24.00	3.00	3.00	12.12±0.31
16	24.00	3.00	4.68	9.52±0.11
17	24.00	3.00	3.00	12.12±0.31
18	24.00	3.00	3.00	12.12±0.31
19	24.00	3.00	3.00	12.12±0.31
20	22.00	4.00	2.00	9.24±0.08

表 7 响应面二次模型的方差分析
Table 7 Analysis of variance (ANOVA) for response surface second-order polynomial equation

来源	平方和	均方	<i>F</i>	<i>P</i> (Prob> <i>F</i>)
Source	Sum of squares	Mean square		
Model	112.29	12.48	31.11	<0.000 1
A	8.16	8.16	20.35	0.001 1
B	1.79	1.79	4.46	0.060 8
C	6.15	6.15	15.34	0.002 9
AB	16.97	16.97	42.30	<0.000 1
AC	0.75	0.75	1.87	0.201 3
BC	4.46	4.46	11.11	0.007 6
A ²	59.03	59.03	147.19	<0.000 1
B ²	20.38	20.38	50.80	<0.000 1
C ²	3.72	3.72	9.28	0.012 3

图 5A 为酵母提取物处于中心水平即 3 g/L 时酪蛋白和糊精之间的交互作用, 表明达托霉素随着酪蛋白和糊精浓度的提高先增加后降低。图 5B 为糊精处于中心水平即 24 g/L 时酪蛋白和酵母提

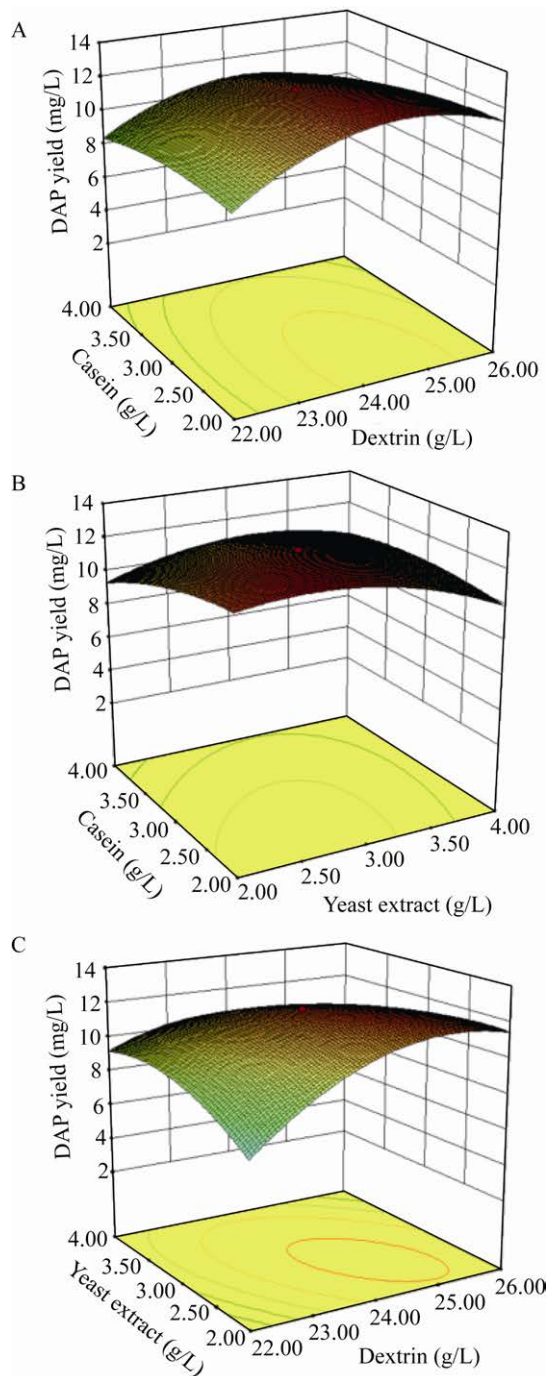


图5 各因素对达托霉素产量交互影响的三维曲面图

Figure 5 Surface of mutual-influence for different factors on the yield of daptomycin

注: A: 糊精和酪蛋白之间的交互影响; B: 酵母提取物和酪蛋白之间的交互影响; C: 酵母提取物和糊精之间的交互影响
Notes: A: Mutual-influence for dextrin and casein; B: Mutual-influence for yeast extract and casein; C: Mutual-influence for yeast extract and dextrin

取物之间的交互作用,表明达托霉素随着酪蛋白和酵母提取物浓度的提高先增加后降低。图5C为酪蛋白处于中心水平即3 g/L时糊精和酵母提取物之间的交互作用,结果表明达托霉素随着酪蛋白和酵母提取物浓度的提高先增加后降低。

利用软件预测响应值最大值,模型各因素组合为糊精 25.11 g/L、酵母粉 2.20 g/L、酪蛋白 2.00 g/L,达托霉素预测产量最大值为 13.01 mg/L。

2.6 验证试验

为了验证响应面设计结果的可靠性,以响应面实验确定的主要因素的最优组合配制培养基进行摇瓶发酵,重复3次。同时以原始培养基发酵结果作为对照,结果显示在最优条件下达托霉素的产量为 15.30 ± 1.23 mg/L,比优化前的 4.82 ± 1.95 mg/L 提高了 2.17 倍。

3 讨论与结论

本实验采用单因素实验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面设计等方法优化天蓝色链霉菌 K10 产达托霉素的发酵培养基,得到的优化培养基配方为糊精 25.11 g/L、麦芽糖 16 g/L、酵母提取物 2.20 g/L、酪蛋白 2.00 g/L、L-天冬酰胺 1 g/L、MOPS 10 g/L,优化后的培养基其达托霉素产量较原始培养基提高了 2.17 倍。

达托霉素作为一种环脂肽类抗生素,对革兰氏阳性菌尤其是耐药菌具有较好的作用效果,是万古霉素的最佳替代品^[22-23],但是该抗生素较长的发酵周期、较低的产率等问题限制了其在工业上的大规模生产^[24]。本实验中的异源表达菌株天蓝色链霉菌 K10 是通过达托霉素合成基因簇进行截短编辑保留必需基因而构建的异源菌株,其达托霉素的原始产量非常低。本实验采用响应面法对天蓝色链霉菌 K10 的发酵培养基进行了系统性优化,较大程度地提高了达托霉素产量,达到 15.30 mg/L,与原始培养基配方相比产量提高了 2.17 倍。

目前对达托霉素的发酵工艺研究比较深入,其

中国外工业菌株的达托霉素产量已经达到约2 g/L的水平^[9], 而国内摇瓶发酵水平也接近400 mg/L^[5]。但是天蓝色链霉菌 K10 发酵生产达托霉素的周期较短, 在提高发酵效率、避免菌种污染等方面具有优势, 后续我们将通过菌株诱变手段、基因编辑技术等继续改造该菌种, 以大幅提高达托霉素产量。另外, 本实验的结果还为后续基于合成生物学策略丰富达托霉素结构的多样性研究打下了基础。

REFERENCES

- [1] Miao V, Coëffet-LeGal MF, Brian P, Brost R, Penn J, Whiting A, Martin S, Ford R, Parr I, Bouchard M, et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry[J]. Microbiology, 2005, 151(5): 1507-1523
- [2] Robbel L, Marahiel MA. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(36): 27501-27508
- [3] Peng XX, Wang SS, Fu C, Hu CH, Liao GJ. Current status and future perspectives of daptomycin development[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 39(6): 839-844 (in Chinese)
彭希希, 王赛赛, 付琛, 胡昌华, 廖国建. 新型环脂肽抗生素达托霉素研究进展[J]. 药学学报, 2018, 39(6): 839-844
- [4] Liu BN, Shi L, Jiang Q. Advance in cyclo-lipopeptide antibiotics[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2007, 32(9): 520-524 (in Chinese)
刘伯宁, 石磊, 蒋沁. 环脂肽类抗生素研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(9): 520-524
- [5] He MR, Jin ZH, Hu S, Zhang LJ. Optimization of fermentation medium of daptomycin by response surface methodology[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2012, 31(4): 873-877, 937 (in Chinese)
何美儒, 金志华, 胡升, 张丽靖. 响应面法优化达托霉素发酵培养基[J]. 化工进展, 2012, 31(4): 873-877, 937
- [6] Grünewald J, Sieber SA, Mählert C, Linne U, Marahiel MA. Synthesis and derivatization of daptomycin: a chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(51): 17025-17031
- [7] Hill J, Siedlecki J, Parr I, Morytko M, Yu X, Zhang YZ, Silverman J, Controneo N, Laganas V, Li TC, et al. Synthesis and biological activity of N-acylated ornithine analogues of daptomycin[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003, 13(23): 4187-4191
- [8] Lohani CR, Taylor R, Palmer M, Taylor SD. Solid-phase total synthesis of daptomycin and analogs[J]. Organic Letters, 2015, 17(3): 748-751
- [9] Wang L, Zhao Y, Liu Q, Huang Y, Hu C, Liao G. Improvement of A21978C production in *Streptomyces roseosporus* by reporter-guided *rpsL* mutation selection[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(6): 1095-1101
- [10] Wang JP. Study on screening of daptomycin producing strains and fermentation conditions[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2007 (in Chinese)
王建平. 达托霉素菌种诱变及发酵条件研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2007
- [11] Penn J, Li X, Whiting A, Latif M, Gibson T, Silva CJ, Brian P, Davies J, Miao V, Wrigley SK, et al. Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(2): 121-128
- [12] Jiang WJ, Zhao XJ, Gabrieli T, Lou CB, Ebenstein Y, Zhu TF. Cas9-Assisted targeting of chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8101
- [13] Cui YS, Ren HJ, Wang HW, Zhang YH. Method for preparing daptomycin by fermentation: CN, 201810058477.3[P]. 2018-07-31 (in Chinese)
崔亚顺, 任宏杰, 王宏伟, 张云辉. 一种发酵制备达托霉素的方法: 中国, 201810058477.3[P]. 2018-07-31
- [14] Wei W, Ge M, Xia X, Jiang MZ, Jin WX, Jin X, Wu WY. A21978C high-yielding strain and application thereof: CN, 201810856952.1[P]. 2020-02-11 (in Chinese)
魏维, 戈梅, 夏兴, 蒋美珍, 金文翔, 靳旭, 吴伟燕. 一种A21978C 高产菌株及其应用: 中国, 201810856952.1[P]. 2020-02-11
- [15] Zhang GC, Lei H, He X, Shan YY. Modern mathematical statistical methods in optimization of fermentation medium[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(5): 110-113 (in Chinese)
张广臣, 雷虹, 何欣, 单钰毓. 微生物发酵培养基优化中的现代数学统计学方法[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 110-113
- [16] Zhu YS, Chen GS, Wu M, Miao XL, Xu J, Wang M. Optimization of medium for daptomycin fermentation by response surface methodology[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2010, 41(3): 183-186 (in Chinese)
祝宇松, 陈国胜, 吴旻, 缪小亮, 徐健, 王旻. 达托霉素发酵培养基的响应面法优化[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(3): 183-186
- [17] Yu GH, Yin YL, Zhang Y. Optimization of daptomycin fermentation medium by response surface methodology[J]. Chemistry & Bioengineering, 2012, 29(10): 40-44 (in Chinese)
宇光海, 尹艳丽, 张焱. 响应面法优化达托霉素发酵培养

- 基的研究[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(10): 40-44
- [18] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000
- [19] Ma TM. *Streptomyces roseosporus* pleiotropic regulatory gene *whiB4* influences morphogenesis and daptomycin production[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2014 (in Chinese)
马廷梅. 玫瑰孢链霉菌多效调控基因 *whiB4* 对菌体生长发育和达托霉素生物合成的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2014
- [20] Duan R, Ye CM, Wu YX, Lu YH, Jing KJ. Screening of sodium caprate resistance strains for daptomycin production and medium optimization by response surface methodology[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2013, 52(4): 531-538 (in Chinese)
段然, 叶驰名, 吴意珣, 卢英华, 敬科举. 癸酸钠抗性菌株产达托霉素培养条件的响应面优化[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2013, 52(4): 531-538
- [21] Fan JH. Study on the breeding of high daptomycin producing strains and fermentation conditions optimization[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2007 (in Chinese)
范晶华. 达托霉素高产菌株选育及发酵条件优化[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2007
- [22] Xie XM, Wang F, Chen JY, Zhang YK, Mao XM, Li YQ. Advances in daptomycin biosynthesis[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1754-1764 (in Chinese)
谢祥茂, 王凤, 陈俊勇, 张宇锴, 毛旭明, 李永泉. 达托霉素生物合成研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1754-1764
- [23] Yang XL. Optimization of fermentation conditions and breeding of high producing strain for A21978C[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong University of Science and Technology, 2013 (in Chinese)
杨夏露. A21978C 发酵条件优化及高产菌株选育[D]. 武汉: 华中科技大学硕士学位论文, 2013
- [24] Liu X, Zhou SH, Sun K. Study on response surface methodology for doxymycin fermentation[J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition), 2019, 38(1): 76-80 (in Chinese)
刘欣, 周宋汇, 孙科. 达托霉素发酵工艺条件响应面优化研究[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2019, 38(1): 76-80