



Box-Behnken 响应面法优化司替霉素 B 产生菌发酵条件

李泰明^{1,2}, 方伟¹, 张亚妮¹, 黄泽楷^{2,3}, 王丽玮⁴, 贾丰莲⁵, 万中义^{1*}

- 1 湖北省生物农药工程研究中心, 湖北 武汉 430064
- 2 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070
- 3 广东省农科院植物保护研究所, 广东 广州 510640
- 4 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 内蒙古 呼和浩特 010019
- 5 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193

李泰明, 方伟, 张亚妮, 黄泽楷, 王丽玮, 贾丰莲, 万中义. Box-Behnken 响应面法优化司替霉素 B 产生菌发酵条件. 微生物学报, 2022, 62(10): 3844–3857.

Li Taiming, Fang Wei, Zhang Yani, Huang Zekai, Wang Liwei, Jia Fenglian, Wan Zhongyi. Optimization of fermentation medium for steffimycin B production by Box-Behnken response surface methodology. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3844–3857.

摘要:【背景】粗糙链霉菌(*Streptomyces scabrisporus*) HBERC-53204 是本中心自主分离的一株链霉菌, 经鉴定, 其产生一种活性化合物司替霉素 B (steffimycin B, SMB), 对多种动植物重要病原菌具有良好生物活性。【目的】提高 SMB 发酵水平, 拓宽放线菌活性天然产物在农牧业领域的研究及应用。【方法】以本实验室筛选出的一株产 SMB 的粗糙链霉菌 HBERC-53204 为研究对象, 运用单因素试验筛选培养基的主效碳源、氮源、无机盐及各营养成分最适浓度, 并基于单因素试验结果, 通过 Plackett-Burman (PB) 试验设计筛选出显著影响因素, 再结合最陡爬坡试验、Box-Behnken (BB) 响应面法拟合显著因子与产量的非线性方程求解, 进一步优化菌株产 SMB 的最佳发酵培养基配方。【结果】优化后最佳培养基配方为: 葡萄糖 36.22 g/L, 蛋白胨 8.00 g/L, 酵母粉 8.51 g/L, 酸水解酪蛋白 1.50 g/L, MgSO₄ 0.68 g/L, KNO₃ 1.00 g/L。经摇瓶验证, 优化后 SMB 效价达到 477.26 mg/L, 比初始配方产量提高 1 773.08%。在 20 L 发酵罐培养 120 h, 目标化合物产量达到 214.48 mg/L。【结论】通过对菌株 HBERC-53204 发酵培养基优化, 显著提高了 SMB 产量, 并在 20 L 发酵罐中得到验证, 在此基础上获得了克级纯品。

基金项目: 湖北省中央引导地方科技发展专项(2019ZYD061); 国家重点研发计划(2017YFD0201107)

Supported by the Special Projects Funded by the Central Government to Guide Local Scientific and Technological Development (2019ZYD061) and by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201107)

*Corresponding author. Tel: +86-13971062176; Fax: +86-27-59101911; E-mail: wanzhongyi1964@126.com

Received: 18 February 2022; Revised: 20 June 2022; Published online: 15 July 2022

关键词: 司替霉素 B; 粗糙链霉菌 HBERC-53204; 响应面法; 发酵优化

Optimization of fermentation medium for steffimycin B production by Box-Behnken response surface methodology

LI Taiming^{1,2}, FANG Wei¹, ZHANG Yani¹, HUANG Zekai^{2,3}, WANG Liwei⁴, JIA Fenglian⁵, WAN Zhongyi^{1*}

1 Hubei Biopesticide Engineering Research Centre, Wuhan 430064, Hubei, China

2 College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

4 College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia, China

5 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: **[Background]** *Streptomyces scabrissporus* HBERC-53204 is an actinomycete strain isolated from a soil sample collected in Hunan province. It produces an active compound steffimycin B (SMB) with strong biological activity against a variety of animal and plant pathogens. **[Objective]** To improve the productivity of the strain for SMB and broaden the research and application of SMB in agriculture and animal husbandry. **[Methods]** We determined the optimum concentrations of main components including carbon-, nitrogen-containing nutrients and inorganic salts in the fermentation medium to increase the production of SMB by *S. scabrissporus* HBERC-53204 through single factor experiments. On the basis of the results of single factor experiments, the factors significantly affecting the production of SMB were screened out through Plackett-Burman (PB) design. On the basis of the steepest ascent design and Box-Behnken (BB) design, the medium for the production of SMB was optimized by response surface methodology through fitting the nonlinear equation of significant factors with the yield of SMB. **[Results]** The composition of the medium for the production of SMB by HBERC-53204 was optimized as follows: glucose 36.22 g/L, peptone 8.00 g/L, yeast powder 8.51 g/L, acid hydrolyzed casein 1.50 g/L, MgSO₄ 0.68 g/L, and KNO₃ 1.00 g/L. The yield of SMB produced in the optimized medium reached 477.26 mg/L in shake flask fermentation, which was 1 773.08% higher than that of the original medium. At the time point of 120 h of fermentation in a 20 L fermenter, the yield of SMB reached a maximum of 214.48 mg/L. **[Conclusion]** After optimization of the fermentation medium of strain HBERC-53204, the yield of SMB was significantly increased, which was scaled up in a 20 L fermenter. Based on this study, grams of purified SMB compound were obtained.

Keywords: steffimycin B; *Streptomyces scabrissporus* HBERC-53204; response surface methodology; fermentation optimization

为满足人类生活的需要, 农业生产中广泛使用农药来控制病虫草害, 以提高农产品产量。传统化学农药存在着易残留、易产生抗性、选

择性低和作用位点单一等问题, 严重制约了农业的可持续发展^[1-2]。生物农药是一类源于自然的生物活体或代谢产物, 具有对非靶标生物安

全、高效和易降解等特点, 契合未来绿色农业的发展方向, 受到全球的推崇。其中源于微生物的活性天然产物具有结构新颖、多样性高、来源广泛与易于生产等优点, 是生物农药的重要组成部分^[3]。

放线菌是高 GC 含量的革兰氏阳性细菌, 富含次级代谢产物基因簇和各类调控元件, 能够合成多种结构复杂、功能多样的次级代谢产物。目前发现约有 40% 微生物来源的生物活性物质均由放线菌产生。链霉菌是放线菌最大的活性化合物产生属, 从链霉菌属中分离得到的活性次级代谢产物占放线菌的 80%^[4-5], 放线菌源活性化合物广泛应用于农业、生物医药和食品等领域。

司替霉素 B (steffimycin B, SMB) 是一个糖取代的蒽环类化合物, 其化学结构式见图 1。1967 年 Bergy 等在斯特菲斯堡链霉菌 (*Streptomyces steffisburgensis*) 中首次发现 steffimycin^[6], 1974 年 Brodasky 等发现第二个 steffimycin 类化合物 SMB^[7], 并报道其毒性较低。迄今为止, 已发现 6 种 steffimycin 类似物, 分别命名为 steffimycin A-F, 各 steffimycin 之间化学与生物学特性相似, 均表现出良好抗菌活性和较低毒性, 其最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值可达 1-8 mg/L, 小鼠腹腔和皮下注射毒性半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 值为 500-600 mg/kg^[7-9]。

目前, 蒽环类化合物在医学上广泛应用于治疗各类癌症, 如柔红霉素和多柔比星常用于临床上治疗白血病、乳腺癌、膀胱癌等血液和实体肿瘤^[10]。steffimycin 的作用机制主要是与 tRNA 结合从而影响氨基酸的掺入^[11], SMB 发现可以与双链 DNA 结合, 从而损害 DNA 的复制和转录模板功能^[12]。已有研究发现 steffimycin E 对感染家蚕的脓疱分枝杆菌

(*Mycobacteroides abscessus*) 表现出良好活性^[10]。

目前, 国内未见 steffimycin 类化合物相关研究, 国外关于 steffimycin 类化合物的研究则仅限于化合物的分离、鉴定和生物活性测定, 未见发酵优化及应用, 亦无相关产量报道。本课题组从湖南怀化采集的土壤中分离到一株链霉菌 HBERC-53204, 其发酵提取物表现出良好的抗菌活性。经制备及活性测定, 确定了该提取物中活性成分的部位。纯化该物质后, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 分析后鉴定为 SMB。纯品生物活性测定结果表明, SMB 对马铃薯疮痂病菌 (*Streptomyces scabies*)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*)、猪丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等具有较强活性 (将另文发表), 表现出良好的应用前景。

同其他微生物天然产物相似, HBERC-53204 是分离于自然环境的原始菌株, 其发酵水平低, 一般产量仅 10-30 mg/L。在天然产物研发的前期, 需要制备足够的化合物纯品供毒性、盆栽及田间评价试验, 因而急需提高其发酵水平^[13]。

响应面法是为克服正交试验的缺陷而产生的新的优化方法, 广泛应用于环境、化工、生物、材料、车辆工程和食品等领域^[14]。该方法考虑输入因素的变异及误差, 把各影响因素在

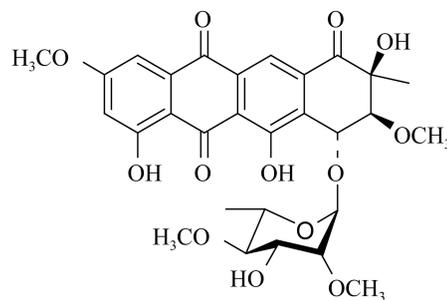


图 1 司替霉素 B 化学结构

Figure 1 Structure of steffimycin B.

一定范围内通过一次或二次多项式模型拟合起来, 通过所得关系式可求出各因素最优解及对响应值的预测, 能够较为简便、快速地优化响应值, 因而得到广泛应用。如王琳等^[15]应用响应面法优化红色诺卡菌的固体培养基, 优化后培养基中细胞生物量比原配方提高了 104%。

本文以土壤中分离出一株产 SMB 的粗糙链霉菌(*Streptomyces scabrisporus* HBERC-53204)为研究对象, 基于单因素实验筛选出 HBERC-53204 产 SMB 的最适碳源、氮源、无机盐种类, 应用响应面法优化发酵培养基与培养条件, 采用超高效液相色谱质谱联用法(ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS)检测优化前后 SMB 的含量, 确定最优发酵培养基配方, 为 SMB 的研究应用提供支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株 HBERC-53204 由本实验室于 2013 年 3 月 11 日从湖南省怀化市中坡国家森林公园采集的竹林根际土壤样品中分离得到, 其 16S rRNA 序列分析结果已上至 NCBI 数据库, 登录号为 OM638426。经 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库比对, 结合其生理生化特性, 该菌株鉴定为粗糙链霉菌(*Streptomyces scabrisporus*), 现保存于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO. M 2022087。

1.2 培养基与 SMB 标准化合物

ISP-2 固体培养基(g/L): 葡萄糖 4.0, 酵母浸粉 4.0, 麦芽浸粉 10.0, 琼脂粉 16.0。种子培养基(g/L): 甘露醇 10.0, 葡萄糖 10.0, 麦芽浸粉 10.0, 酵母浸粉 5.0, 碳酸钙 5.0, 玉米浆 1.0, 大豆油 2 滴/100 mL。基础发酵培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 马铃薯浸粉 7.5, 酵母粉 5.0, 酸水

解酪蛋白 2.5。培养基初始 pH 值用 1 mol/L 的氢氧化钠或盐酸溶液调至 6.8–7.2。

SMB 标准化合物: 由菌株 HBERC-53204 经发酵、分离及制备获得, 经 ¹³C-NMR 及 ¹H-NMR 谱验证其结构。经 UPLC-MS 分析, SMB 含量在 95%以上。

1.3 仪器与设备

超高效液相-质谱联用仪(Xevo-TQD), Waters 公司生产; 旋转式摇床(SPH-3222), 上海世平实验设备有限公司生产; 高压灭菌锅(3870J), 山东新华医疗股份有限公司生产; 生物安全柜(BSC-1360 II A2), 北京东联哈尔仪器制造有限公司生产; OLYMPUS CX41 型显微镜, 奥林巴斯株式会社生产; 离心机(5418), Eppendorf 生产; 霉菌培养箱(ML-250AG), 施都凯仪器设备有限公司生产; 高精度电子天平(AX-205, $d=0.01$ mg), Mettler Toledo 生产; pH 计(FiveEasy Plus FE28), Mettler Toledo 生产; 20 L 不锈钢自动发酵罐, 上海保兴生物设备有限公司生产, 配 Mettler Toledo 可灭菌式 pH 及溶氧电极。发酵过程的 pH、溶氧、搅拌和温度等由软件记录和控制。

1.4 菌株培养方法

摇瓶发酵: 将实验室保存的 HBERC-53204 菌株用 ISP-2 平板活化, 在 28 °C 培养箱里培养 7 d; 挑取活化好的 HBERC-53204 菌株接种到种子培养基内, 装液量 100 mL/500 mL 三角摇瓶, 在摇床上 28 °C、150 r/min 条件下培养 4 d; 将培养好的一级种子液以 10%的接种量移种至发酵摇瓶中, 装液量 50 mL/500 mL 三角摇瓶, 在摇床上 28 °C、150 r/min 条件下发酵培养 4 d。

小罐发酵: 活化的一级种子液以 10%接种量移种至二级种子培养基扩大培养, 在摇床上 28 °C、150 r/min 条件下培养 3 d; 二级种子液以 10% (V/V)接种量接入发酵罐, 发酵罐装液量

12/20 L。发酵罐加入 0.2% (V/V)聚醚作为消泡剂，在 28 °C 下培养 6 d。

1.5 单因素实验

1.5.1 碳源优化

分别研究碳源用量为 40 g/L 时，葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、甘油和可溶性淀粉作为发酵培养基主要碳源时，对发酵的影响。根据 SMB 的产量作为指标，选出最适的发酵培养基碳源。

1.5.2 氮源优化

分别研究氮源用量为 7.5 g/L 时，有机氮源对发酵的影响。使用氮源为鱼粉、蛋白胨、马铃薯、马铃薯浸粉、玉米浆和酵母浸粉。根据 SMB 的产量作为指标，确定最适的发酵培养基氮源。

1.5.3 培养基浓度的优化

根据已确定的最优培养基种类，分别设置不同浓度梯度进行试验。以当前最优浓度结果作为另一营养物质单因素浓度优化的基础，得出单因素试验中最优的主效碳源、氮源的浓度组合。

1.5.4 无机盐的优化

以 1.5.3 方法试验得出的配方为对照组，在该发酵培养基配方基础上分别添加浓度为 0.25、0.50 和 0.75 g/L 的 $MgSO_4$ 和 KNO_3 ，研究加入无机盐对 SMB 发酵的影响。

1.6 响应面法优化

1.6.1 Plackett-Burman (PB)试验设计

PB 试验设计具有实验次数少，可反应一阶与部分二阶的相互偶联关系。根据单因素实验结果，进行 PB 试验设计，确定影响 SMB 产量的显著因素，每个因素设置高和低 2 个水平，分别以“+1”和“-1”代表，以 SMB 产量为响应值，建立关系式初步确定优化发酵条件，基于显著因子进行 Box-Behnken 实验设计^[16]。拟合方程见方程式(1)。

$$y = \beta_0 + \beta_i \sum x_i \quad \text{方程式(1)}$$

式中 y 为响应值，即 SMB 效价(mg/L)； β_0 为常量； β_i 为线性系数； x_i 为各影响因素。

1.6.2 最陡爬坡实验

根据 PB 实验所拟合方程结果，以各显著因子为中心起点，确定最陡爬坡实验的方向与步长，通过最速上升实验（即爬坡实验）来快速逼近中心点，以建立最佳的响应面拟合方程^[17]。

1.6.3 Box-Behnken (BB)试验设计

每个因素设置高、中和低 3 个水平，分别以“+1”、“0”和“-1”代表，以 SMB 效价为响应值，应用响应面设计软件(Design Expert 11)拟合二次函数^[18]，以方差分析(ANOVA)评估模型拟合效果，确定最优发酵条件方程(2)。

$$y = \beta_0 + \beta_i \sum x_i + \beta_{ii} \sum x_i^2 + \beta_{ij} \sum x_i x_j \quad \text{方程式(2)}$$

式中 β_{ii} 为二次系数； β_{ij} 为交互系数。

1.7 SMB 产量测定

1.7.1 SMB 标准曲线绘制

精确称取 10 mg 的 SMB 标准品，用无水甲醇定容至 10 mL 并充分溶解，制成浓度为 1 000 mg/L 的标准液，分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mL 标准溶液至 10 mL 容量瓶中，加入无水甲醇定容至 10 mL 混匀，进样量 1.0 μ L，每个处理 3 次重复，测定其在 442 nm 处(SMB 紫外吸收峰波长)吸收峰单峰面积，绘制标准曲线。

1.7.2 发酵液中 SMB 含量测定

取 1 mL 发酵液至 10 mL 离心管中，以 1:3 比例加入无水甲醇并充分振荡(5 min)，吸取混合液至 1.5 mL 离心管内，12 000 r/min 离心 3 min。离心结束后吸取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后转移至样品瓶中，自动进样。

色谱分析条件：ACQUITY UPLC BEH C_{18} 反相色谱柱(1.7 μ m, 2.1×100 mm)，柱温 40 °C，流速 0.45 mL/min，进样量 1.0 μ L，流动相为超

纯水(A)和色谱纯乙腈(B), 流动相均加入 0.2%的无水乙酸以改善分离效果, 样品分析时间 13 min, 溶剂洗脱梯度见表 1。根据 442 nm 单一波长下峰面积及标准曲线计算 SMB 含量。

2 结果与分析

2.1 SMB 标准曲线

以化合物 SMB 浓度为横坐标, 以 442 nm 波长下峰面积为纵坐标绘制 SMB 标准曲线。

SMB 浓度 (y) 与峰面积 (x) 关系式: $y=42.328x-158.64$ ($R^2=0.9942$), 可见数据线性拟合良好。

2.2 碳源种类优化结果

以蛋白胨为主要氮源, 在 5 种不同碳源处理的实验结果里, 甘油处理组高于对照组中的葡萄糖处理组, 但结果相近。推测葡萄糖在高温灭菌后分解产生的 5-羟甲基糠醛不利于菌株的发酵培养^[19], 且葡萄糖浓度过高导致培养基中高渗透压、溶氧量降低等不利因素而影响发酵产量^[20], 同时甘油可通过一系列酶的磷酸化与异构催化进入糖酵解途径, 保证菌株碳源需求而不影响其生长代谢。甘油处理组相比葡萄糖处理组 SMB 效价提升 8.5%, 考虑到葡萄糖成本更低, 更适合大规模的发酵生产, 且后续可通过优化培养基灭菌条件改善不利影响, 综合考虑选择使用葡萄糖作为后续主要碳源使用, 碳源种类优化结果见图 2。

表 1 溶剂洗脱梯度

Table 1 Solvent gradient for UPLC analysis

Time/min	A/%	B/%
Initial	95.0	5.0
0.20	95.0	5.0
8.20	0.0	100.0
9.70	0.0	100.0
11.30	95.0	5.0
13.00	95.0	5.0

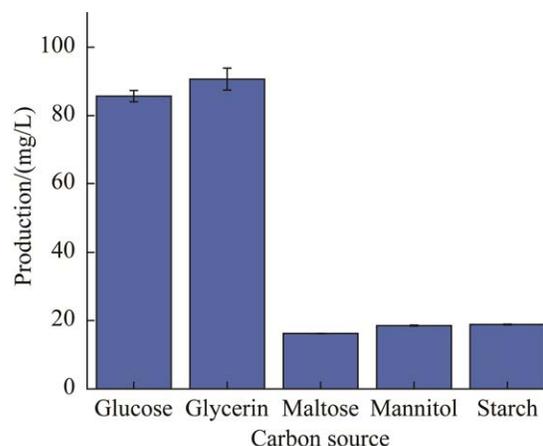


图 2 不同碳源成分对 SMB 产量的影响

Figure 2 Effects of different carbon-containing components on the production of SMB. Standard deviations indicate the data differences between the different replicates of the same treatment, the same below.

2.3 氮源种类优化结果

氮源种类优化结果见图 3。在 5 种不同氮源实验结果中, 鱼粉、蛋白胨、玉米浆和酵母浸粉发酵水平均高于对照组的马铃薯浸粉, 其中以蛋白胨为主要氮源的处理组发酵水平最高, 因为蛋白胨中含有多种微生物生长所必须的氨基酸和多肽, 更利于吸收利用, 确定蛋白胨为发酵培养基最优主要氮源。

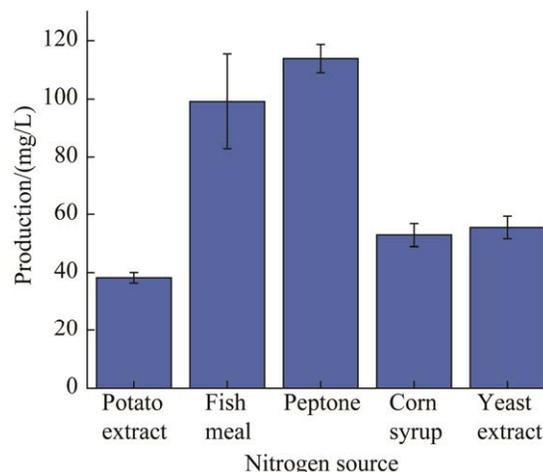


图 3 不同氮源成分对 SMB 产量的影响

Figure 3 Effects of different nitrogen-containing components on the production of SMB.

2.4 不同浓度的碳氮源单因素优化结果

充足的氮源可保证菌株正常生长代谢, 添加过多氮源物质可能会使菌株生长过快而降低溶氧量, 阻碍次级代谢产物的产生。碳源浓度不足会使菌株后期生长乏力, 从而导致发酵提前结束, 影响最终发酵产量^[21]。以蛋白胨作为主要氮源的浓度梯度实验里, 蛋白胨 12.0 g/L 添加量下 SMB 产量最高, 达到 193.40 mg/L (图 4A)。葡萄糖 50g/L 浓度时 SMB 产量最高, 达到 155.12 mg/L (图 4B)。酵母粉作为发酵培养基中的速效氮源, 含有多种菌株生长所需的氨基酸, 添加过多酵母会使菌株生长前期激增导致溶氧下降, 从而影响后续发酵产量, 培养基中酵母粉 7.0 g/L 时 SMB 产量最高, 达到

182.03 mg/L (图 4C)。酸水解酪蛋白的各添加浓度经方差分析 F 检验, 各处理之间无显著差异, 因此选取最低浓度进行后续试验, 酸水解酪蛋白添加浓度试验结果见图 4D。

2.5 无机盐优化实验结果

添加二价金属阳离子可提高 G⁺细菌细胞膜上一些合成酶的活力, 在对照组(CK)配方(葡萄糖 50.0 g/L, 蛋白胨 12.0 g/L, 酵母粉 7.0 g/L, 酸水解酪蛋白 1.5 g/L)中添加 MgSO₄ 与 KNO₃ 对 SMB 产量提升影响显著, MgSO₄ 与 KNO₃ 添加量为 0.50 g/L 和 0.75 g/L 时 SMB 产量最高分别达到了 260.45 mg/L 和 183.79 mg/L (图 5), 判断 Mg²⁺、K⁺ 对菌株生长具有促进作用, KNO₃ 的 NO₃⁻ 可作为速效氮源被菌株吸收利用。

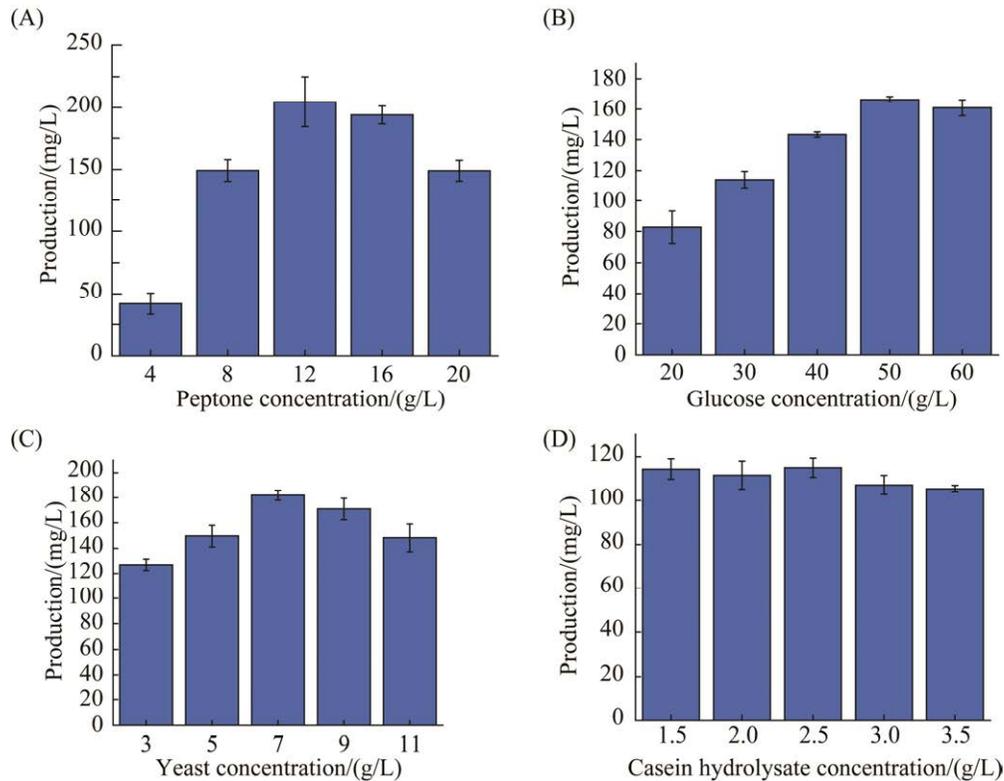


图 4 不同浓度的单一碳氮源对 SMB 产量的影响

Figure 4 Effects of different concentration of single carbon and nitrogen-containing components on the production of SMB. A: peptone; B: glucose; C: yeast powder; D: acid-hydrolyzed casein.

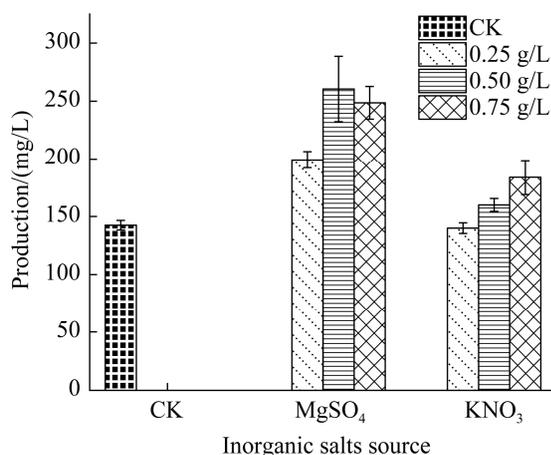


图5 不同无机盐对 SMB 产量的影响

Figure 5 Effects of different inorganic salts on the production of SMB

2.6 Plackett-Burman (PB)试验结果与分析

基于上述碳氮源的筛选与浓度优化的单因素实验,以葡萄糖(A)、蛋白胨(B)、酵母粉(C)、酸水解酪蛋白(D)、MgSO₄(E)和KNO₃(F)为营养因子,设计6因素2水平的PB试验因素水平表,如表2所示。

使用Design Expert 11.0设计Plackett-Burman

表2 PB试验因素水平表

Table 2 Factor level of PB design

Levels	Factors					
	A/(g/L)	B/(g/L)	C/(g/L)	D/(g/L)	E/(g/L)	F/(g/L)
-1	40	8	5	1.5	0.25	0.5
+1	60	16	8	2.5	0.75	1.0

表4 PB试验方差分析结果

Table 4 ANOVA for Plackett-Burman design

Items	Sum of squares	df	Mean square	F	P	
Model	81 346.38	6	13 557.73	8.59	0.016 1	*
A	36 569.52	1	36 569.52	23.17	0.004 8	**
B	4 666.08	1	4 666.08	2.96	0.146 2	
C	11 435.51	1	11 435.51	7.25	0.043 2	*
D	342.09	1	342.09	0.22	0.661 1	
E	27 419.57	1	27 419.57	17.37	0.008 8	**
F	913.61	1	913.61	0.58	0.481 1	
Residual	7 890.73	5	1 578.15			
Cor total	89 237.11	11				
Adeq precision=10.124 5						
R ² =0.911 6		Adj R ² =0.805 5				

*: significant difference ($P < 0.05$), **: extremely significant difference ($P < 0.01$).

实验寻找出对 SMB 效价提高具有显著作用的营养因子,以 SMB 效价(mg/L)为响应值,各因子试验方案和结果如表3所示。

PB试验方差分析结果见表4,各营养因素与 SMB 效价(Y)的一次回归方程为:
 $Y = 212.58 - 55.2A - 19.72B + 30.87C - 5.34D + 47.8E + 8.73F$ 。培养基配方中葡萄糖(A)、酵母粉(C)和MgSO₄(E)为显著影响因素,模型信噪比 $Adeq\ precision = 10.124 5$ 大于4,模型可用于实验预测。决定系数 $R^2 = 0.911 6$,说明模型线性方程能够解释91.16%的原因,修正决定系数 $Adj\ R^2 = 0.805 5$,代表方程可解释80.55%的变异。将筛选出的3个显著影响因素进行爬坡实验^[22]。

表3 六因素PB设计表

Table 3 Plackett-Burman design with six independent variables

Run	A	B	C	D	E	F	Production/(mg/L)
1	1	1	1	-1	1	1	201.06
2	-1	1	-1	-1	-1	1	158.54
3	1	-1	1	-1	-1	-1	143.42
4	-1	-1	-1	1	1	1	300.29
5	-1	-1	1	1	1	-1	342.81
6	1	1	-1	1	1	-1	106.56
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	192.94
8	-1	1	1	1	-1	1	253.61
9	-1	1	1	-1	1	-1	358.50
10	1	-1	-1	-1	1	1	253.04
11	1	-1	1	1	-1	1	161.28
12	1	1	-1	1	-1	-1	78.88

2.7 最陡爬坡试验优化结果

根据 PB 试验结果,以葡萄糖、酵母粉和 MgSO_4 三个显著影响因素进行最陡爬坡实验,葡萄糖系数为负数与 SMB 产量呈负相关,酵母粉与 MgSO_4 呈正相关。以葡萄糖 50.0 g/L,酵母粉 7.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L 为初始起点,试验设计及结果见表 5。

2.8 Box-Behnken (BB)试验结果与分析

以最陡爬坡实验结果设计 3 因素 3 水平的 BB 试验,设计及水平见表 6, SMB 的 BB 试验设计及结果见表 7,以 SMB 效价(Y)为因变量,葡萄糖(A)、酵母粉(B)和 MgSO_4 (C)添加浓度为自变量拟合得到非线性回归方程:
 $Y=473.68+7.17A+4.16B+9.6C-7.61AB+24.22AC-3.16BC-45.03A^2-4.89B^2-12.34C^2$ 。

BB 试验方差分析见表 8,模型 $p=0.006$ 3 显著性较高, R^2 为 0.910 1,其越接近 1 说明模型相关性越好,信噪比 $Adeq\ precision=7.895$ 8 (>4),表明模型受外部因素干扰较小; $C.V\%=3.12\%$,说明模型离散程度极小,失拟项不显著 $Lack\ of\ Fit=0.104$ 5 (>0.05)。综合情况表明模型可信度高,可用于发酵试验结果的模拟预测。

等高线与曲面模型如图 6 所示。在图 6A 中,酵母粉浓度恒定时,当葡萄糖浓度为 34–38 g/L,在该区间内 SMB 产量最高,最高效价达到 482.49 mg/L;当葡萄糖浓度低于该浓度区间,产量随着葡萄糖浓度的减小而降低。在图 6B 中,葡萄糖浓度为 35–40 g/L 时, SMB 效价与 MgSO_4 浓度大致呈正相关关系,在葡萄糖浓度恒定 40 g/L, MgSO_4 添加浓度由 0.6 g/L 提升到 0.7 g/L 后, SMB 效价由 388.93 mg/L 提升到 447.05 mg/L。在图 6C 中,酵母粉浓度为 8.2–9.0 g/L, MgSO_4 浓度为 0.64–0.70 g/L 时,目标化合物产量最高。在各因子在 BBD 试验区间内,对拟合的非线性方程求最优解,得出各营养因子

在发酵培养基中最佳浓度为:葡萄糖 36.22 g/L,酵母粉 8.51 g/L, MgSO_4 0.68 g/L,理论 SMB 最高效价可达到 477.62 mg/L。

表 5 最陡爬坡设计结果

Table 5 Design and results of steepest ascent

Run	Glucose/(g/L)	Yeast/(g/L)	MgSO_4 /(g/L)	Production/(mg/L)
1	50	7.0	0.50	343.51
2	45	7.5	0.55	386.76
3	40	8.0	0.60	428.34
4	35	8.5	0.65	439.58
5	30	9.0	0.70	397.18
6	25	9.5	0.75	359.82

表 6 BB 试验因素水平表

Table 6 Factor level of Box-Behnken design

Levels	Factors		
	A/(g/L)	B/(g/L)	C/(g/L)
-1	30	8.0	0.60
0	35	8.5	0.65
+1	40	9.0	0.70

表 7 3 因素 BB 试验设计表

Table 7 Box-Behnken design with three independent variables

Run	A	B	C	Production/(mg/L)
1	-1	0	1	395.26
2	0	-1	-1	426.16
3	0	0	0	481.35
4	0	0	0	465.38
5	1	0	1	447.05
6	0	1	-1	458.01
7	0	-1	1	461.22
8	-1	0	-1	434.01
9	0	0	0	462.73
10	-1	-1	0	407.92
11	-1	1	0	414.26
12	1	0	-1	388.93
13	0	1	1	480.41
14	0	0	0	482.49
15	0	0	0	476.44
16	1	-1	0	448.47
17	1	1	0	424.37

表 8 BB 试验方差分析结果

Table 8 ANOVA for Box-Behnken design test

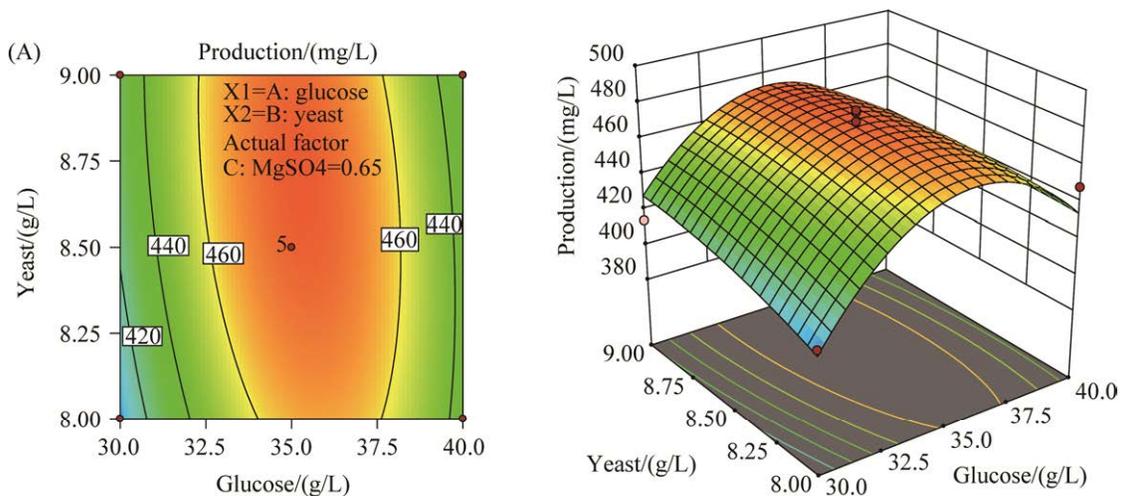
Items	Sum of squares	df	Mean square	F	P	
Model	1 3632.69	9	1 514.74	7.87	0.006 3	**
A	411.41	1	411.41	2.14	0.187 1	
B	138.44	1	138.44	0.72	0.424 4	
C	737.86	1	737.86	3.83	0.091 1	
AB	231.65	1	231.65	1.20	0.308 9	
AC	2 345.95	1	2 345.95	12.19	0.010 1	*
BC	40.07	1	40.07	0.21	0.662 0	
A ²	8 537.78	1	8 537.78	44.36	0.000 3	**
B ²	100.80	1	100.8	0.52	0.492 7	
C ²	640.67	1	640.67	3.33	0.110 8	
Residual	1 347.34	7	192.48			
Lack of fit	1 014.49	3	338.16	4.06	0.104 5	
Pure error	332.86	4	83.21			
Adeq precision=7.895 8			C.V%=3.12			
R ² =0.910 1		Adj R ² =0.794 4				

*: significant difference ($P < 0.05$), **: extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.9 验证优化结果

为检验结果的可靠性, 根据最佳发酵培养基配方: 葡萄糖 36.22 g/L, 蛋白胨 8.00 g/L, 酵母粉 8.51 g/L, 酸水解酪蛋白 1.50 g/L, MgSO₄ 0.68 g/L, KNO₃ 1.00 g/L 进行验证试验, 在最优发酵培养基

配方下使用摇瓶发酵, 进行 3 次平行试验, SMB 平均效价达到了 477.26 mg/L, 与曲面模型预测值基本一致, 模型预测结果可信度高。同原培养基配方 SMB 效价 25.48 mg/L 相比, 优化后培养基配方产量提升了 1 773.08%, 实验结果见图 7。



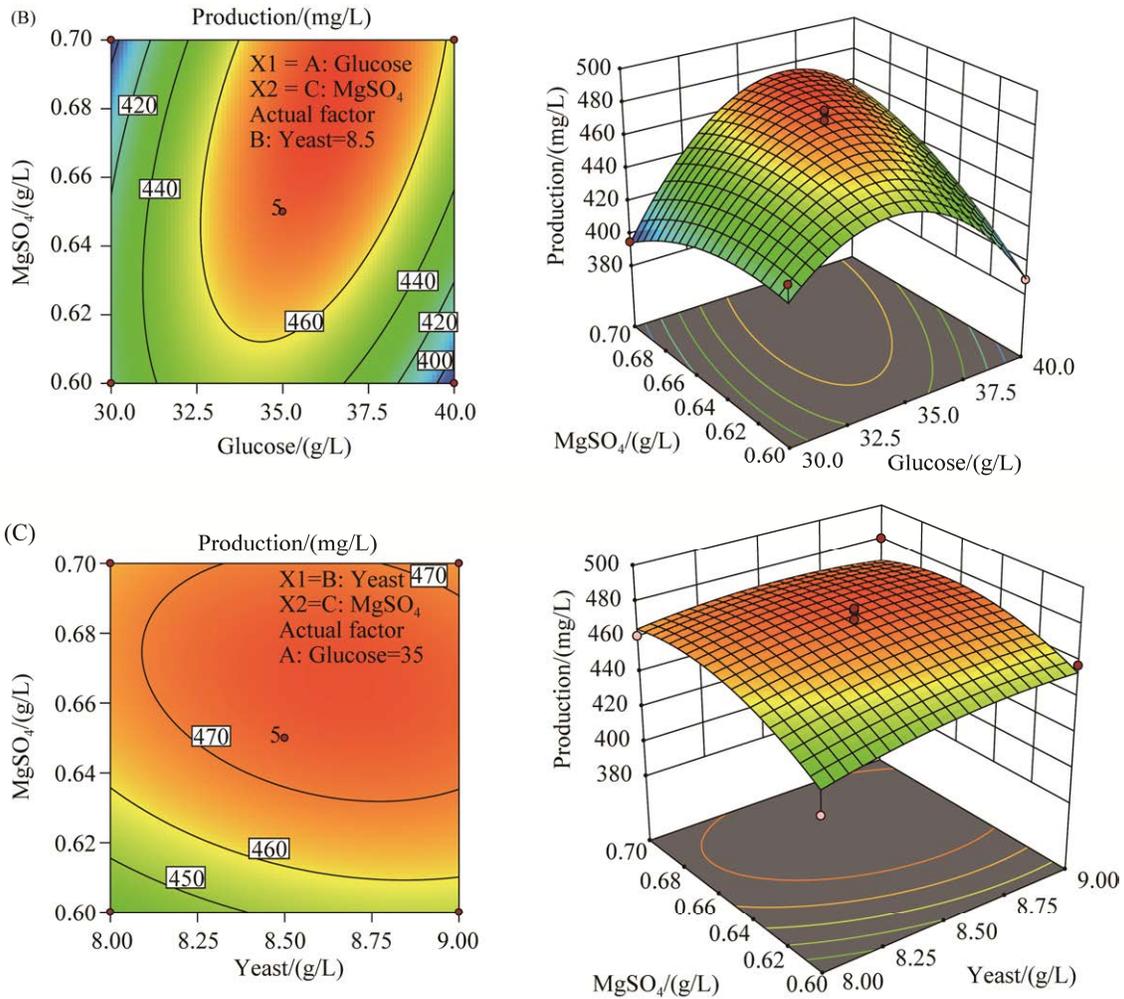


图 6 SMB 产量与不同营养成分的响应面优化

Figure 6 Response surface optimization of SMB production with different nutrients. A: glucose and yeast powder; B: glucose and MgSO_4 ; C: yeast and MgSO_4 .

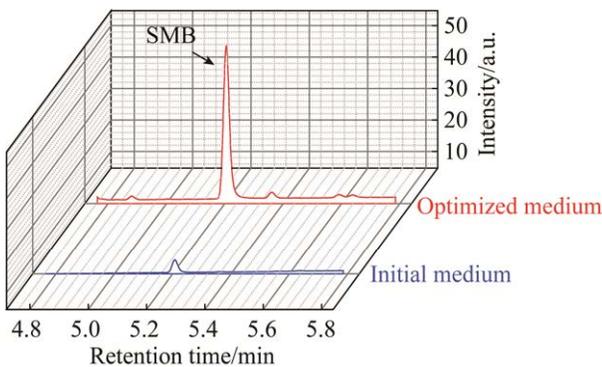


图 7 优化配方与初始配方 SMB 产量比较(波长 442 nm)

Figure 7 Comparison of SMB yield in optimized and initial medium (wavelength 442 nm).

通过优化后摇瓶发酵培养基指导菌株在 20 L 发酵罐中的规模发酵, 发酵罐装液量 12/20 L, 每 12 h 取样检测, SMB 在发酵罐中各时间产量如图 8 所示。36 h 时菌株开始产生次级代谢产物, 在 0–144 h 的发酵周期内, SMB 产量与发酵时间呈正相关, 108–120 h 内 SMB 产量迅速提升, 发酵液 pH 值停滞升高, 稳定在 8.16 ± 0.11 , 同时 SMB 效价提升 140.53% 并在 120 h 时 SMB 效价达到最高的 214.48 mg/L, 推断稳定的发酵环境有利于链霉菌次级代谢产物的产生。

基于培养基优化结果, 我们成功地发酵并制备出了克级 SMB 样品, 经 UPLC-MS 检测, 其纯度在 95% 以上。SMB 外观为橙黄色固体粉末, 在显微镜下呈橙黄色薄片状结晶(图 9)。

3 结论与展望

本研究以产 SMB 的菌株 HBERC-53204 为

实验对象, 以 SMB 效价为评价指标, 通过单因素试验和 Plackett-Burman 试验, 拟合得到线性方程并筛选出 3 个显著影响菌株 SMB 产量的因素, 分别为葡萄糖、酵母粉和 $MgSO_4$; 然后利用最陡爬坡试验设计逼近 SMB 效价最高区域, 确定中心组合试验的中心位点, 应用 Box-Behnken 响应面法拟合非线性方程建立曲

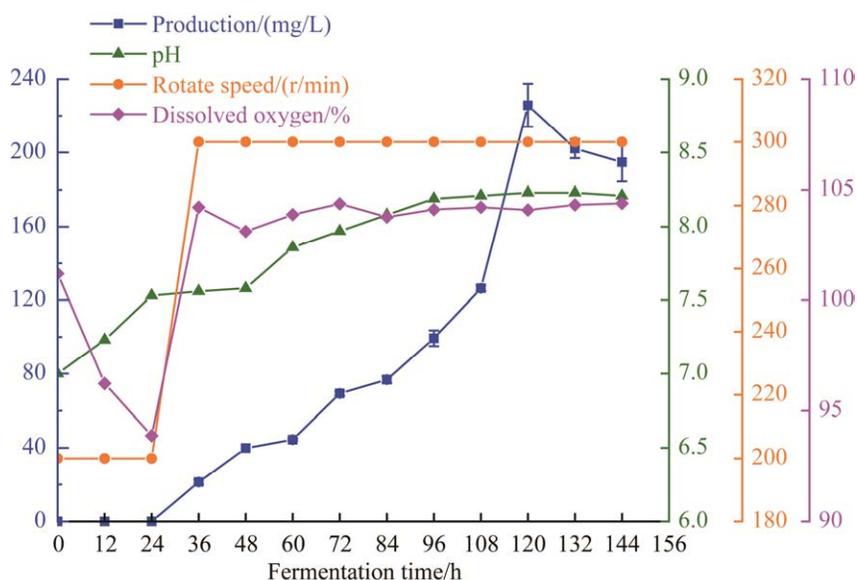


图 8 HBERC-53204 在 20L 发酵罐上的代谢曲线

Figure 8 HBERC-53204 metabolic curve in 20 L fermentor.

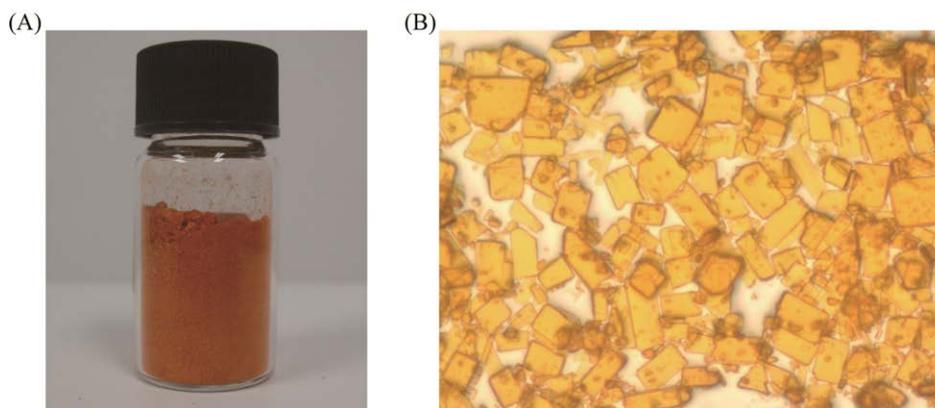


图 9 获得的 SMB 纯品

Figure 9 Pure compound of SMB. A: pure SMB; B: crystallized SMB showing plate, orange-yellow crystals under microscope (10 \times).

面模型进一步优化 SMB 的摇瓶发酵培养基配方, 方差分析和显著性测试表明, 所拟合模型拟合程度较高, 对方程求解得出最优培养基配方为: 葡萄糖 36.22 g/L, 蛋白胨 8.00 g/L, 酵母粉 8.51 g/L, 酸水解酪蛋白 1.50 g/L, MgSO_4 0.68 g/L, KNO_3 1.00 g/L。在该发酵培养基配方中, 摇瓶发酵 4 d 后 SMB 效价达到了 477.26 mg/L, 较优化前目标化合物产量提高了 1 773.08%。摇瓶发酵的优化结果在 20 L 发酵罐中进行了发酵验证, 最佳发酵时间为 120 h, SMB 效价达到 214.48 mg/L。该优化培养基配方显著提高了目标化合物 SMB 的产量。

基于配方优化结果, SMB 发酵水平大幅度提高。结合 SMB 本身的理化特性, 我们独创了纯品制备方法, 轻松地实现了纯品的克级制备(图 9), 为进一步的研究如毒理学、盆栽及田间试验打下了良好基础。

SMB 对多种重要动植病原菌具有良好生物活性, 且毒性低, 具有良好应用前景。本研究应用响应面法优化 SMB 产生菌 HBERC-53204 的发酵培养基, 大大提高了 SMB 产量。后期可通过育种及代谢工程等方法对菌株进行改良与选育, 并与发酵培养基配方、外部培养条件的优化、发酵工艺过程控制等相结合进一步提高 SMB 的发酵水平。

参考文献

- [1] Thakore Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2006, 2(3): 194–208.
- [2] 吕亮, 陈娇, 郭志敏, 吕为, 陶佩文, 吕惠红, 潘哲群, 常向前, 万鹏, 张舒. 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫的杀虫活性及生防效果. *华中农业大学学报*, 2021, 40(5): 46–53.
Lyu L, Chen J, Guo ZM, Lü W, Tao PW, Lü HH, Pan ZQ, Chang XQ, Wan P, Zhang S. Insecticidal activity and bio-control effect of autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus on larvae of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(5): 46–53. (in Chinese)
- [3] Sala A, Barrena R, Sánchez A, Artola A. Fungal biopesticide production: process scale-up and sequential batch mode operation with *Trichoderma harzianum* using agro-industrial solid wastes of different biodegradability. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 425: 131620.
- [4] 薛正莲, 王珊, 孙俊峰, 王芳, 周健. 链霉菌形态分化与次级代谢产物合成的研究进展. *微生物学报*, 2021, 61(12): 3870–3886.
Xue ZL, Wang S, Sun JF, Wang F, Zhou J. Research progress on morphological differentiation and secondary metabolite biosynthesis of *Streptomyces*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3870–3886. (in Chinese)
- [5] Guo YH, Tang XK, Hu SR, Zhou ML, Gao J. *Streptomyces liangshanensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of *Fagopyrum tataricum*. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(6): 3055–3059.
- [6] Bergy ME, Reusser F. A new antibacterial agent (U-20, 661) isolated from a *Streptomyces* strain. *Experientia*, 1967, 23(4): 254–255.
- [7] Brodasky TF, Reusser F. Steffimycin B, a new member of the steffimycin family: isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 1974, 27(11): 809–813.
- [8] Liu CY, Li YL, Lu JH, Qian LL, Xu K, Wang NN, Chang WQ, Lou HX. Steffimycin F, a new steffimycin-type derivative from the lichen-derived actinomycetes *Streptomyces* sp. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1227: 129352.
- [9] Koyama N, Shigeno S, Kanamoto A, Tomoda H. Steffimycin E, a new anti-mycobacterial agent against *Mycobacterium avium* complex, produced by *Streptomyces* sp. OPMA02852. *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73(8): 581–584.
- [10] Gullón S, Olano C, Abdelfattah MS, Braña AF, Rohr J, Méndez C, Salas JA. Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4172–4183.
- [11] Reusser F. Effect of steffimycin on cell-free polypeptide synthesis. *Biochemical Pharmacology*, 1969, 18(2): 287–294.

- [12] Reusser F. Steffimycin B, a DNA binding agent. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, 383(3): 266–273.
- [13] 梁春浩, 臧超群, 安福涛, 刘长远, 白元俊, 于舒怡, 刘丽. 葡萄霜霉病菌拮抗放线菌 PY-1 发酵条件优化. *中国生物防治学报*, 2015, 31(6): 921–929.
Liang CH, Zang CQ, An FT, Liu CY, Bai YJ, Yu SY, Liu L. Optimization of fermentation conditions for antagonistic actinomycete PY-1 against *Plasmopara viticola*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(6): 921–929. (in Chinese)
- [14] 王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2005, 14(3): 236–240.
Wang YF, Wang CG. The application of response surface methodology. *Journal of the Central University for Nationalities: Natural Science Edition*, 2005, 14(3): 236–240. (in Chinese)
- [15] 王琳, 章朦玥, 薛金艳, 南宁, 王丹, 张怡轩. 红色诺卡菌固体培养基配方的优化. *微生物学杂志*, 2021, 41(2): 46–52.
Wang L, Zhang MY, Xue JY, Nan N, Wang D, Zhang YX. Optimization of *Nocardia rubra* solid medium formulation. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(2): 46–52. (in Chinese)
- [16] Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, 33(4): 305–325.
- [17] 阮文兵, 陈必钦, 陈素华, 陈秉梅, 许小平. 响应面分析法优化(R)-扁桃酸发酵培养基. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(8): 112–117.
Ruan WB, Chen BQ, Chen SH, Chen BM, Xu XP. Optimization of (R)-mandelic acid fermentation medium by using response surface methodology. *China Biotechnology*, 2010, 30(8): 112–117. (in Chinese)
- [18] Premjit Y, Mitra J. Optimization of electrospray-assisted microencapsulation of probiotics (*Leuconostoc lactis*) in soy protein isolate-oil particles using box-behken experimental design. *Food and Bioprocess Technology*, 2021, 14(9): 1712–1729.
- [19] 张阳, 陆强, 廖航涛, 董长青, 杨勇平. 葡萄糖热解生成 5-羟甲基糠醛机理. *燃烧科学与技术*, 2015, 21(1): 89–95.
Zhang Y, Lu Q, Liao HT, Dong CQ, Yang YP. Mechanism study on formation of 5-hydroxymethyl furfural from pyrolysis of glucose. *Journal of Combustion Science and Technology*, 2015, 21(1): 89–95. (in Chinese)
- [20] Brückner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 209(2): 141–148.
- [21] 许睿, 高萍, 闵涛玲, 陈昌发, 胡海峰. 高产非达霉素工程菌的构建及其发酵优化. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(2): 204–210.
Xu R, Gao P, Min TL, Chen CF, Hu HF. Construction of recombinant engineering strain over-producing fidaxomicin and optimization of fermentation. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2020, 51(2): 204–210. (in Chinese)
- [22] 贺晓凌, 张先楠, 孟红艳, 邓时煜, 宋浩德, 魏东盛, 韩馨. 响应面法优化产细菌纤维素菌发酵条件. *天津工业大学学报*, 2020, 39(3): 54–60.
He XL, Zhang XN, Meng HY, Deng SY, Song HD, Wei DS, Han X. Optimization of fermentation conditions for enhanced bacterial cellulose production by using response surface method. *Journal of Tiangong University*, 2020, 39(3): 54–60. (in Chinese)