

# 一株海洋解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)生产 Macrolactin B 的发酵条件优化\*

王洪强 何山 杨锐 朱鹏 严小军

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

**摘要** 从浙江台州近海上层海水中分离到一株可产 Macrolactin 类大环内酯抗生素的海洋细菌, 经形态特征分析及 16S rRNA 测序比对, 鉴定并将其命名为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)ESB-2。运用 Minitab 软件, 通过 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 实验及响应面分析对该菌生产 Macrolactin B 的发酵条件进行优化, 得到该菌生产 Macrolactin B 的最佳发酵条件为: 葡萄糖 17.0mg/L, 蛋白胨 5mg/L, 酵母粉 1mg/L, FePO<sub>4</sub> 0.01mg/L, 初始 pH 6.0, 培养温度 27.2℃, 接种量 5%, 装液量 57.6%, 培养时间 4d, 在优化发酵条件下, Macrolactin B 的最高产量达到 13.6μg/mL, 为目前已报道的最高产量, 为该活性物质药源问题的解决打下了良好基础。

**关键词** 海洋解淀粉芽孢杆菌; Macrolactin B; 发酵优化; 响应面法

**中图分类号** Q936

先导化合物的寻找和发现是构建全新药物分子结构的前提, 是研制新药的关键第一步。结构新颖, 作用独特的天然产物一直是新药及新药先导化合物的重要来源(Tulp *et al.*, 2004; Newman *et al.*, 2003)。由于对陆生生物资源的长期研究开发, 从中发现结构新颖、功能独特的活性代谢产物的几率越来越低。因此, 从 20 世纪 60 年代初, 人们开始从海洋生物中寻找新的活性代谢产物(王长云等, 2005; 杨雨等, 2005)。

Macrolactin 是一类 24 元环大环内酯类化合物, 最早由 Gustafson 等(1989)从北太平洋 980m 深海洋分离到的一株海洋细菌中发现, Macrolactin 家族成员普遍具有抑菌、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性(Kim *et al.*, 1997)。目前该家族共有 19 个成员(Jaruchokta-weechai *et al.*, 2000; Nagao *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 2008; Mondol *et al.*, 2011), 其中

Macrolactin B 是较早被发现的一员, 但现有菌株发酵生产 Macrolactin B 的产量都很低(Shan He *et al.*, 2012), 使其没能得到进一步研究, 也为其进行药物开发形成阻碍。

本研究从浙江台州海水中筛选到一株可稳定产 Macrolactin 类化合物的海洋细菌, 经鉴定为海洋解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 为了提高该菌生产 Macrolactin B 的产量, 本文尝试使用 Minitab 软件对其发酵条件进行优化。Minitab 作为一种数据分析软件, 具有强大的实验设计和统计分析等功能(Basem, 2002), 已被广泛应用于微生物发酵条件的优化。本文进行了 Plackett-Burman 实验和 Box-Behnken 实验及响应面分析(Montgomery, 2000; Ferreira *et al.*, 2007), 首次对生产 Macrolactin B 的发酵条件进行了优化, 使 Macrolactin B 的产量提高了 8 倍, 达到 13.6μg/mL, 为目前已报道的最高产量。

\* 浙江省海洋生物技术产业科技创新团队资助项目, 2012R10029-2 号。王洪强, 硕士研究生, E-mail: whq.8685136@163.com

通讯作者: 何山, 博士, 讲师, E-mail: heshan@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-09-14, 收修改稿日期: 2013-01-26

## 1 材料与方方法

### 1.1 菌种及其鉴定

菌种由本实验室于浙江台州海水中分离得到, 经形态特征分析(布坎南等, 1984)及 16S rRNA 测序比对(Zhou *et al.*, 2008), 鉴定并将其命名为海洋解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)ESB-2。

### 1.2 培养基

平板培养基: 海水 1L、蛋白胨 5g、酵母粉 1g、FePO<sub>4</sub> 0.01g、琼脂 15g;

种子培养基: 海水 1L、蛋白胨 5g、酵母粉 1g、FePO<sub>4</sub> 0.01g。

### 1.3 培养方法

**1.3.1 菌种活化和种子培养** 将 4℃ 保藏的菌种转接到新鲜的平板培养基上, 30℃ 生化培养箱中培养 24h; 取一环平板活化菌种接入 100mL 种子培养基, 在 30℃ 温度下 150r/min 摇床中振荡培养 48h。

**1.3.2 发酵培养** 取种子培养液以 5% 的接种量接入发酵培养基, 150r/min 摇床中振荡培养 4d, 具体发酵条件按实验设计进行。

### 1.4 产物检测方法

取出发酵液, 加入等体积的乙酸乙酯充分萃取两次, 合并提取液, 旋转蒸发至干, 溶于 1mL 甲醇, 12000r/min 离心 15min, 取上清。进行高效液相色谱分析(HPLC)。色谱柱为 waters C18 反相柱(18.4μm, 4.6 × 150mm), 检测波长为 265nm, 流动相为甲醇水, 梯度洗脱, 60min 内, 甲醇由 10% 升至 90%, 流速 0.8mL/min, 进样量 10μL。

### 1.5 实验设计

运用 Minitab 软件设计实验和对实验结果进行分析。设计 Plackett-Burman (PB) 实验, 从发酵培养基和工艺条件的一些因素中筛选出对 Macrolactin B 产量有重要影响的因素; 通过 Box-Behnken 实验及响应面分析, 对 PB 筛选实验中确定的显著性影响因素做进一步的优化, 得到 Macrolactin B 产量达到最大时的发酵条件。

**1.5.1 Plackett-Burman 实验设计** 根据单因素的实验结果和文献报道, 选取发酵培养基组分和工艺条件中的 8 个因素作为考察对象。每个变量均设定一高(+1)一低(-1)两个水平。用 Minitab 生成 8 因素 12 次的 Plackett-Burman 实验(Plackett *et al.*, 1946; Kali *et al.*, 2000), 以 Macrolactin B 在 265nm 下的色谱峰面积作为响应值(Y), 通过 Minitab 软件分析各因素的效应值, 选择影响效应比较高的因素作进一步考察。

**1.5.2 Box-Behnken 中心组合实验设计** 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 对由二水平设计的实验结果所确定的 3 因子各取 3 个水平, 进行了 15 个实验点的响应面分析, 对显著影响因素进行进一步的优化, 对于其它非主要因素, 均取低水平值(Box *et al.*, 1960; Bingham, 2001; Gilmour, 2006)。以 Macrolactin B 在 265nm 下的色谱峰面积作为响应值(Y), 采用软件 Minitab 对实验数据进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Plackett-Burman 筛选实验

按照 1.5.1 的实验方法考察蛋白胨(X<sub>1</sub>)、酵母粉(X<sub>2</sub>)、牛肉膏(X<sub>3</sub>)、葡萄糖(X<sub>4</sub>)、磷酸亚铁(X<sub>5</sub>)、装液量(X<sub>6</sub>)、温度(X<sub>7</sub>)、初始 pH(X<sub>8</sub>) 8 个因素对响应值 Y(即 Macrolactin B 产量)的影响, 各因素的水平见表 1, 实验设计和结果见表 2, 对实验数据进行分析, 得到各

表 1 Plackett-Burman 实验设计中各因素的水平  
Tab.1 Levels of the factors chosen for the Plackett-Burman design

因素	Code	低水平(-)	高水平(+)
蛋白胨(g/L)	X <sub>1</sub>	5	10
酵母粉(g/L)	X <sub>2</sub>	1	2
牛肉膏(g/L)	X <sub>3</sub>	0	1
葡萄糖(g/L)	X <sub>4</sub>	0	10
FePO <sub>4</sub> (g/L)	X <sub>5</sub>	0.01	0.02
装液量(g/L)	X <sub>6</sub>	40%	60%
温度(°C)	X <sub>7</sub>	30	35
初始 pH 值	X <sub>8</sub>	6	7

表 2 Plackett-Burman 实验设计及结果  
Tab.2 The Plackett-Burman design along with macrolactin B production as response

运行序	因素								Macrolactin B 峰面积 (微伏*秒)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	6145287
2	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	7586995
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	3554961
4	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	4832314
5	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	5580359
6	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1703376
7	1	1	1	-1	1	1	-1	1	3506533
8	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	4268007
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	5757530
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1571196
11	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	6602291
12	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	6174572

因素对响应值的影响效应如表 3 所示。

由表 3 可知, 对 Macrolactin B 产量影响较大( $P < 0.05$ )是葡萄糖( $X_4$ )、装液量( $X_6$ )、温度( $X_7$ )。

**2.2 Box-Behnken 实验及响应面分析**

按照 1.5.2 的实验方法进行实验, 各因素水平见表 4, 实验设计和结果见表 5, 实验结果分析见表 6。

表 3 Plackett-Burman 实验结果分析

Tab.3 Analysis of variance (ANOVA) for the Plackett-Burman design

因素	效应	系数	系统标准 误差	T 值	P 值
常量		4773618	72918	65.47	0.000
$X_1$	66750	33375	72918	0.46	0.678
$X_2$	-189971	-94986	72918	-1.30	0.284
$X_3$	-35732	-17866	72918	-0.25	0.822
$X_4$	2571933	1285967	72918	17.64	0.000
$X_5$	415960	207980	72918	2.85	0.065
$X_6$	1589102	794551	72918	10.90	0.002
$X_7$	1955651	977825	72918	13.41	0.001
$X_8$	89228	44614	72918	0.61	0.584

表 4 Box-Behnken 设计中各变量的水平

Tab.4 The level of variables for the Box-Behnken design

因素	Code	水平		
		-1	0	1
葡萄糖(g/L)	$X_4$	0	10	20
装液量(mL)	$X_6$	40%	60%	80%
温度(°C)	$X_7$	25	30	35

表 5 Box-Behnken 实验设计及结果

Tab.5 Box-Behnken design along with the macrolatin B Production as response

运行序	因素			Y(Macrolactin B) 峰面积(微伏*秒)
	$X_4$	$X_6$	$X_7$	
1	0	0	0	7533673
2	0	-1	1	1689517
3	0	1	1	1773030
4	-1	1	0	4403484
5	1	0	1	2096647
6	0	-1	-1	5054933
7	1	0	-1	7882513
8	-1	-1	0	2493253
9	1	-1	0	7006878
10	-1	0	1	2211310
11	0	0	0	7549877
12	-1	0	-1	3086016
13	1	1	0	7527950
14	0	0	0	7570214
15	0	1	-1	4516376

表 6 Box-Behnken 实验结果分析

Tab.6 Regression results of the Box-Behnken design

因素	系数	系数标准误差	F 值	Prob > F
常量	7551255	380573	19.842	0.000
$X_4$	1539991	233053	6.608	0.001
$X_6$	247032	233053	1.060	0.338
$X_7$	-1596167	233053	-6.849	0.001
$X_4 * X_4$	-816353	343044	-2.380	0.063
$X_6 * X_6$	-1377010	343044	-4.014	0.010
$X_7 * X_7$	-2915780	343044	-8.500	0.000
$X_4 * X_6$	-347290	329586	-1.054	0.340
$X_4 * X_7$	-1227790	329586	-3.725	0.014
$X_6 * X_7$	155518	329586	0.472	0.657

$R^2 = 97.47\%, R^2_{adj} = 92.92\%$

由表 6 可得本次实验的  $R^2 = 0.9747$ , 说明本次实验结果中有 97.47% 是可信的, 而当  $R^2$  大于 0.9 时, 实验模型就被认为是可靠的。因此, 本次实验的  $R^2$  值说明该实验模型具有较高的可信度。

根据实验分析结果得到的各因素效应系数, 建立 Macrolactin B 的峰面积对三个显著影响因素的多元二次方程, 如下所示:

$$Y = 7551255 + 1539991X_4 + 247032X_6 - 1596167X_7 - 816353X_4X_4 - 1377010X_6X_6 - 2915780X_7X_7 - 347290X_4X_6 - 1227790X_4X_7 + 155518X_6X_7$$

式中,  $Y$  为预测响应值,  $X_4$ 、 $X_6$ 、 $X_7$  分别为各变量的编码值。

根据上述回归方程绘出响应面分析图, 以确认葡萄糖( $X_4$ )、装液量( $X_6$ )、温度( $X_7$ )3 个因素对 Macrolactin B 产量的影响, 响应面图和等高见图 1、图 2、图 3。

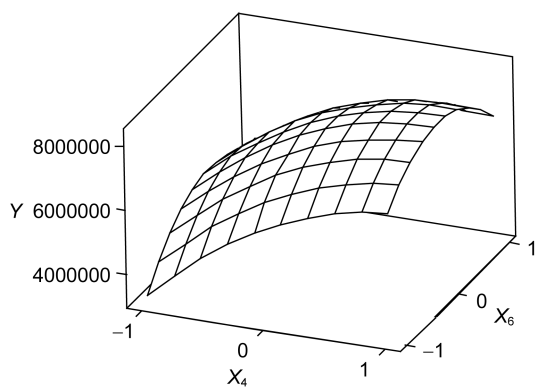
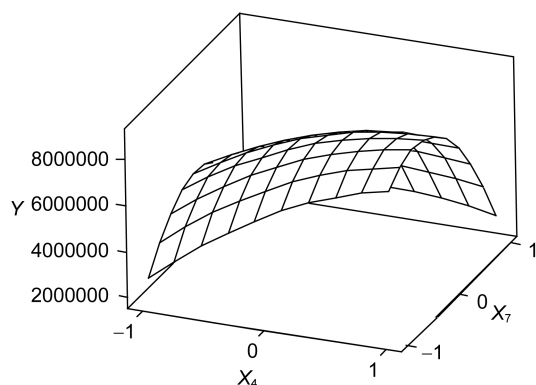
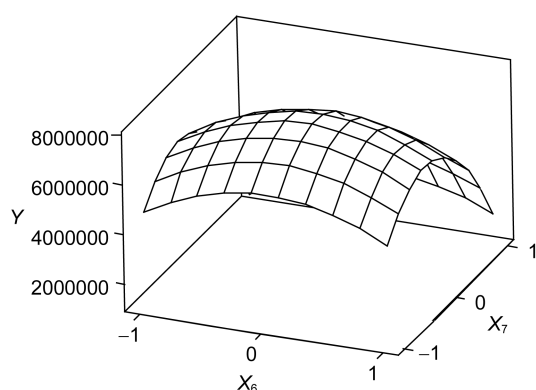


图 1 Y 与  $X_4$ 、 $X_6$  的曲面图

Fig.1 Response surface showing the effect of  $X_4$  and  $X_6$  concentration

图 2  $Y$  与  $X_4$ 、 $X_6$  的曲面图Fig.2 Response surface showing the effect of  $X_4$  and  $X_7$  concentration图 3  $Y$  与  $X_6$ 、 $X_7$  的曲面图Fig.3 Response surface showing the effect of  $X_4$  and  $X_7$  concentration

从图 1、图 2、图 3 中可看出, 两两因素间存在比较明显的交互作用, 最佳点落在实验考察的区域内。为了更进一步求证最佳点的值, 对所得的回归方程分别求三个变量的一阶偏导数, 并令其为 0, 得到三元一次方程组, 求解得:  $X_4=1.40$ ,  $X_6=-0.12$ ,  $X_7=-0.57$ 。即可得 Macrolactin B 产量取得最大值时的最佳培养条件: 装液量 62.3%, 蛋白胨 15.7mg/L, 酵母粉 1mg/L, 磷酸亚铁 0.01mg/L, 初始 pH 6.0, 培养温度 28.4℃。此时代谢产物 Macrolactin B 的峰面积为 9068966 微伏\*秒。根据之前测定的 Macrolactin B 浓度与色谱峰面积曲线, 可求得此时 Macrolactin B 的产量是 13.6μg/mL。为确定所建立的实验模型与实际结果的相符性, 在优化的发酵条件下重复实验 3 次, 得到 Macrolactin B 的平均产量为 13.2μg/mL, 实验值与理论值相比仅相差 2%, 说明该模型比较可靠。

### 3 结论

用 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 实验及响应

面分析, 对海洋解淀粉芽孢杆菌产 Macrolactin B 的发酵培养基进行优化, 确定最佳的发酵条件为: 装液量 62.3%, 蛋白胨 15.7mg/L, 酵母粉 1mg/L, 磷酸亚铁 0.01mg/L, 初始 pH 6.0, 培养温度 28.4℃, 在优化发酵培养条件下, 产生的 Macrolactin B 含量达到 13.6μg/mL, 比优化前提高了近 8 倍, 也是目前报道的最高产量。本次优化大大提高了 Macrolactin B 的发酵效率, 为 Macrolactin B 的后期产业化开发打下了良好基础。

### 参 考 文 献

- 王长云, 耿美玉, 管华诗, 2005. 海洋药物研究进展与发展趋势. 中国新药杂志, 4(3): 278—282
- 杨 雨, 秦 松, 2005. 海洋生物制药现状及展望. 中国生物工程杂志, 25(4): 190—193
- 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 1984. 伯杰氏细菌鉴定手册(第 8 版). 北京: 科学出版社, 729
- Basem S, 2002. Manufacturing and Design for Six Sigma (X-FSS). Michigan: University of Michigan: 15—20
- Bingham D, 2001. Comment on factor screening and response surface exploration. Stat Sinica, 11: 580—583
- Box G, Behnken D, 1960. Some new three level designs for the study of quantitative factors. Technometrics, 2: 455—475
- Ferreira S L C, Bruns R E, Ferreira H S *et al*, 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Analytica Chimica Acta, 597(2): 179—186
- Gilmour S, 2006. Response surface designs for experiments in bioprocessing. Biometrics, 62: 323—331
- Gustafson K, Roman M, Fenical W, 1989. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. J Am Chem Soc, 111: 7519
- He S, Wang H, Yan X *et al*, 2012. Preparative isolation and purification of macrolactin antibiotics from marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode. Journal of Chromatography A, 11: 15—19
- Jaruchoktaweechai C, Suwanborirux K, Tanasupawatt S *et al*, 2000. New macrolactins from a marine *Bacillus* sp. Sc026. J Nat Prod, 63: 984
- Kali S J, Maugeri F, Rodrigues M I, 2000. Response surface analysis and stimulation as a tool for bioprocess design and optimization. Process Biochem, 35: 539—550
- Kim H H, Kim W G, Ryoo I J *et al*, 1997. Neuronal cell protection activity of Macrolactin A produced by a *Ctinomadura* sp. J Microbiol Biotechnol, 7: 429
- Mondol M A, Kim J H, Lee H S *et al*, 2011. Macrolactin W, a new antibacterial macrolide from a marine *Bacillus* sp. Bio-org Med Chem Lett, 21: 3832—3835

- Montgomery D C, 2000. Design and Analysis of Experiments. 5<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons: 46—51
- Nagao T, Adachi K, Sakai M, 2001. Novel macrolactins as antibiotic lactones from a marine bacterium. J Antibiot, 54: 333—339
- Newman D J, Cragg G M, Snader K M, 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981—2002. J Nat Prod, 66: 1022—1037
- Plackett R L, Burman J P, 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, 33: 305—325
- Romero T M, Jansen R, Sylla M *et al*, 2006. 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. Antimicrob Agents Ch, 50: 1701—1709
- Sohn M J, Zheng C J, Kim W G, 2008. Macrolactin S, a new antibacterial agent with FabG-inhibitory activity from *Bacillus* sp. AT28. J Antibiot, 61: 687—691
- Tulp M, Bohlin L, 2004. Unconventional natural sources for future drug discovery. Drug Discovery Today, 9(10): 450—458
- Zhou G L, Luo X S, Tang Y L *et al*, 2008. *Kocuria flava* sp. nov. and *Kocuria turfanensis* sp. Nov. airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China. Int J Syst Evol Microbiol, 58: 1304

## OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION OF MACROLACTIN B BY A MARINE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

WANG Hong-Qiang, HE Shan, YANG Rui, ZHU Peng, YAN Xiao-Jun

(Ningbo University, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo, 315211)

**Abstract** A macrolactins-producing marine bacteria were isolated from seawater in Taizhou, Zhejiang Province. This strain was identified and named as *Bacillus amyloliquefaciens* ESB-2 based on phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequencing. Minitab statistical software was applied to optimize the fermentation conditions for the production of macrolactin B fermented by ESB-2 strain in Plackett-Burman and Box-Behnken design. The optimal fermentation conditions for maximum macrolactin B production were Peptone 5mg/mL, yeast extract 1mg/mL, glucose 17.0mg/L, FePO<sub>4</sub> 0.01mg/mL, temperature 27.2°C, initial pH value 6.0, medium volume 57.6%, rotation speed 150r/min, inoculation 5% and fermented for 4 days. Under the optimization conditions, the concentration of macrolactin B was increased eight-folds and reached 13.6μg/mL.

**Key words** *Bacillus amyloliquefaciens*; Macrolactin B; optimization; response surfaces