

# 响应面法优化海洋微生物发酵产生纤溶化合物的培养条件

苏同伟<sup>1</sup>, 包斌<sup>1,2</sup>, 严婷<sup>1</sup>, 张朝燕<sup>1,3</sup>, 卜永士<sup>1</sup>, 吴文惠<sup>2,3</sup>

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2 上海水产品加工与贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

3 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306

苏同伟, 包斌, 严婷, 等. 响应面法优化海洋微生物发酵产生纤溶化合物的培养条件. 生物工程学报, 2013, 29(6): 857-861.  
Su TW, Bao B, Yan T, et al. Response surface methodology to optimize marine microbe culture for producing fungi fibrinolytic compound. Chin J Biotech, 2013, 29(6): 857-861.

**摘要:** 采用响应面法对海洋微生物长孢葡萄穗霉菌 FG216 发酵产生纤溶化合物 FGFC1 (Fungi fibrinolytic compound 1) 培养条件进行优化。在单因素试验结果的基础上通过 Design-Expert 软件对培养时间、诱导物添加量、培养温度进行 3 因素响应面设计, 以 FGFC1 产出量为响应值优化菌株 FG216 的培养条件, 并验证响应面预测值与实测值的一致性。结果表明, 在培养时间为 9 d、诱导物添加量为 0.5%、培养温度为 28 °C 的最优培养条件下 FGFC1 产量可达 1 978.33 mg/L, 实测值与响应面预测值拟合良好, 说明通过响应面设计对 FG216 培养条件的优化是有效的。

**关键词:** 培养时间, 培养温度, 诱导物质, 响应面设计

## Response surface methodology to optimize marine microbe culture for producing fungi fibrinolytic compound

Tongwei Su<sup>1</sup>, Bin Bao<sup>1,2</sup>, Ting Yan<sup>1</sup>, Chaoyan Zhang<sup>1,3</sup>, Yongshi Bu<sup>1</sup>, and Wenhui Wu<sup>2,3</sup>

1 College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China

3 Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Response surface methodology was applied to optimize the fermentation conditions of FGFC1 (Fungi

**Received:** December 17, 2012; **Accepted:** February, 6 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA09070109).

**Corresponding author:** Bin Bao. Tel: +86-21-61900388; E-mail: bbao@shou.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA09070109) 资助。

网络出版时间: 2013-05-15

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130515.1613.004.html>

fibrinolytic compound 1). On the basis of single factor tests, response surface analysis was designed by Design-Expert, and the effects of culture time, ornithine hydrochloride addition and culture temperature on the yield of FGFC1 were studied, the predicted value and measured value were also contrasted. The results show the optimal culture conditions as follows: the culture time is 7 d, ornithine hydrochloride addition is 0.5% (*M/V*), culture temperature is 28 °C. Under these conditions, the yield of FGFC1 is 1 978.33mg/L, which is consistent with the predicted value. It shows that the experiment is effective.

**Keywords:** culture time, culture temperature, inducer, response surface methodology

海洋微生物因其种类多样性及所处的高压、低温、缺氧等独特的生态环境,常常能够产生优良生物活性且结构新颖的天然化合物<sup>[1]</sup>,海洋微生物代谢产物已经成为创新药物发现的重要来源<sup>[2-3]</sup>。

海洋微生物长孢葡萄穗霉菌 FG216 (*Stachybotrys longispora* FG216) 是分离自东海海域的海洋真菌<sup>[4]</sup>,其代谢产物 FGFC1 (Fungi fibrinolytic compound 1) 是具有溶血栓作用<sup>[5]</sup>的小分子生物活性化合物,FGFC1 特异作用于纤溶酶原和单链尿激酶型纤溶酶原激活剂,可使生理的纤溶反应平稳进行,避免机体广泛出血风险及过敏反应,有可能成为安全而高效的溶血栓新药。

本实验通过 Box-Behnken 模型<sup>[6-7]</sup>分析发酵温度、发酵时间、诱导物(鸟氨酸盐酸盐)添加量对 FGFC1 产量的影响,从而得出 FG216 发酵生产 FGFC1 的最佳培养条件。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

长孢葡萄穗霉菌 FG216 (*Stachybotrys longispora* FG216) 为本实验室筛选获得。保藏号: CCTCC M 2012227, 中国典型培养物保藏中心。

### 1.2 培养基

种子培养基: 葡萄糖 35 g, 可溶性淀粉 10 g, 脱脂大豆粉 20 g, 细菌学蛋白胨 5 g, 牛肉膏蛋白胨 5 g, 酵母提取物 3 g, 氯化钠 2 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 硫酸镁 0.05 g, 加蒸馏水 1 000 mL, 调 pH 至 5.8, 灭菌。

发酵培养基: 蔗糖 50 g, 硝酸钠 3 g, 磷酸氢

二钾 0.1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 酵母提取物 1 g, 氯化钴 0.0025 g, 硫酸亚铁 0.015 g, 氯化钙 0.0065 g, 鸟氨酸盐酸盐, 加蒸馏水 1 000 mL, 调 pH 至 5.8, 灭菌。

### 1.3 FGFC1 标准曲线及线性关系

精确称取 FGFC1 配制成甲醇标准液, 并梯度稀释为 1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL、0.01 mg/mL、0.005 mg/mL 的标准样品, 用 HPLC 进行检测, 平行 3 次, 以峰面积值为 Y 轴, 样品浓度为 X 轴作图, 得到 FGFC1 标准曲线方程为  $Y=9000000X$ ,  $R^2=0.9998$ 。

### 1.4 单因素试验设计

#### 1.4.1 诱导物添加量对 FGFC1 产量的影响

基础发酵培养基为除去诱导物的发酵培养基, 分别添加 0.5%、1%、1.5%、3%、5% 的诱导物。取活化的种子液按 1% 接种到发酵培养基, 考虑到海洋微生物大多为嗜冷微生物, 其最适温度在 20 °C 以下, 因此设定培养温度为 19 °C, 摇床转速为 180 r/min, 连续检测 3~9 d 发酵液中的 FGFC1 产量, 诱导剂添加量各水平组中 FGFC1 产量均在第 8 天达到最高, 以该培养时间的 FGFC1 产量确定最优的诱导物添加量。

#### 1.4.2 培养时间对 FGFC1 产量的影响

取活化的种子液按 1% 比例接种到最优诱导物添加量的发酵培养基中, 因 19 °C 时 FGFC1 产量较低, 并初步探索 FGFC1 产量与培养温度之间的关系, 尝试将培养温度升高为 22 °C, 摇床转速为 180 r/min, 3~9 d 取发酵液进行 FGFC1 产量检测以确定最优发酵时间。

### 1.4.3 培养温度对 FGFC1 产量的影响

取活化的种子液按 1% 比例接种到最优诱导物添加量的发酵培养基, 比较 1.4.1 与 1.4.2 试验中升高温度后 FGFC1 产量的变化趋势, 将培养温度设定为 19 °C、22 °C、25 °C、28 °C, 摇床转速 180 r/min, 在最优的培养时间取发酵液对 FGFC1 产量检测以确定最优的培养温度。

### 1.5 响应面最优试验设计

根据单因素试验结果, 通过 Box-Behnken 模型以培养时间、诱导物添加量、培养温度为自变量, 以 FGFC1 产量为响应值设计响应面拟合自变量与响应值之间的函数关系<sup>[8-9]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

单因素实验结果表明, 最优的培养时间为 8 d, 最优的诱导物添加量为 1.5%, 最优的培养温度为 25 °C。但各个单因素最优条件简单的组合并不一定是发酵的最优条件<sup>[10-11]</sup>, 需要在单因素基础上进行响应面试验来确定最优的发酵培养条件。选择培养时间为 7~9 d, 诱导物添加量为 0.5%~2.5%, 培养温度为 22 °C~28 °C 作为响应面试验水平范围, FGFC1 产量为响应值进行响应面试验。

### 2.2 三因素响应面试验分析

#### 2.2.1 模型的建立及分析

以培养时间、诱导物添加量、培养温度为试验因素, FGFC1 产出量为评价指标, 按照二次项回归方程进行试验。试验设计及结果见表 1。

针对表 1 应用 Design-Expert V8.0.6 软件进行多元回归拟合<sup>[12-13]</sup>, 可得培养时间 ( $A$ )、诱导物添加量 ( $B$ )、培养温度 ( $C$ ) 与响应值 FGFC1 产量 ( $Y$ ) 的关系, 其方程式:  $Y=1251.96+71.17A-393.62B+472.83C-45.54AB+65.53AC-371.54BC-93.60A^2-119.98B^2-380.91C^2$ 。

根据响应面试验结果, 回归模型的方差分析列入表 2。

表 1 培养时间、诱导物添加量、培养温度的响应面试验设计及各试验的 FGFC1 产出量

Table 1 The design of response surface methodology concerning fermentation time, ornithine hydrochloride quantity and fermentation temperature and the volume of production of FGFC1 from every experiment

No.	A-time (d)	B-inducer (%)	C-temperature (°C)	Y-production (mg/L)
1	9	1.5	22	309.63
2	7	1.5	28	1114.21
3	7	1.5	22	238.14
4	9	0.5	25	1525.40
5	7	0.5	25	1352.20
6	8	2.5	28	434.80
7	8	1.5	25	1339.97
8	8	2.5	22	293.71
9	7	2.5	25	642.44
10	9	1.5	28	1447.83
11	8	0.5	28	1951.52
12	8	1.5	25	1312.99
13	8	1.5	25	1142.52
14	8	1.5	25	1222.26
15	8	1.5	25	1242.08
16	8	0.5	22	324.24
17	9	2.5	25	633.47

表 2 回归模型方差分析

Table 2 ANOVA of response surface model

Source	SS	df	MS	F	P (Prob>F)
Model	4.40×10 <sup>6</sup>	9	4.90×10 <sup>5</sup>	86.44	<0.0001
BC	5.52×10 <sup>5</sup>	1	5.52×10 <sup>5</sup>	97.58	<0.0001
Residual	3.96×10 <sup>4</sup>	7	5.66×10 <sup>3</sup>		
Lack of fit	1.52×10 <sup>4</sup>	3	5.06×10 <sup>3</sup>	0.83	0.5432
Pure error	2.44×10 <sup>4</sup>	4	6.11×10 <sup>3</sup>		
Total	4.44×10 <sup>6</sup>	16			

SS: sum of squares; df: degree of freedom; MS: mean square. Prob>F: less than 0.05 indicate model terms are significant.

根据表 2 可以看出, 试验模型的  $P$  值小于 0.0001, 模型极显著, 失拟项  $P$  值为 0.5432, 大于 0.05, 这表示试验数据与模型拟合良好。通过对  $P$  值检验可以看出, 培养时间、诱导物添加量、培养

温度以及它们的二次项对 FGFC1 产量的影响都是显著的,且诱导物与温度的交互作用对 FGFC1 产量的影响同样显著。同时,模型的复相关系数  $R^2=0.9911$ ,调整后  $R^2=0.9796$ 。从上述数据可以看出,此模型可以很好地反映 FGFC1 产量与培养时间、诱导物添加量、培养温度之间的关系,可以用来对 FGFC1 产量进行优化分析与预测。

### 2.2.2 培养条件优化及验证

在培养时间为 8 d 时,诱导物添加量与培养温度对 FGFC1 产量的影响见图 1。

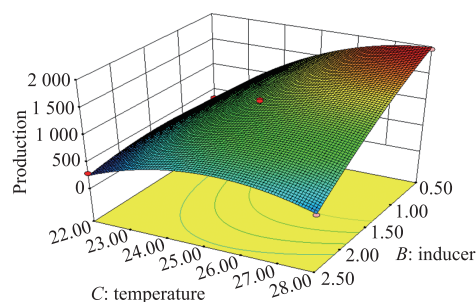


图 1 诱导物添加量与培养温度对 FGFC1 产量的影响  
Fig. 1 Effect of ornithine hydrochloride addition and culture temperature on FGFC1 production.

通过响应面结果分析,仅培养温度与诱导物添加量之间交互作用显著。培养温度接近 28 °C 时 FGFC1 产量最大,当温度达到 28 °C 时其产量有所下降。而诱导物添加量为 0.5% 时,FGFC1 的产量最大,随后 FGFC1 的产量随着诱导物添加量的增加而减少。

利用 Design-Expert V8.0.6 软件对培养条件进行优化,得出最优培养条件为培养时间 8.97 d,诱导物添加量 0.5%,培养温度 27.8 °C,FGFC1 产量理论值为 2 077.77 mg/L。根据实际情况将最优条件调整为培养时间 9 d,诱导物添加量 0.5%,培养温度 28 °C。通过多次验证实验得到 FGFC1 产量均值为 1 978.33 mg/L,相对偏差为 4.8%,表明 Box-Behnken 模型用于 FG216 发酵条件的优化是有效可靠的。

效可靠的。

## 3 结论与讨论

本试验利用 Box-Behnken 模型对 FG216 发酵产生 FGFC1 的培养条件进行优化,方差分析表明模型拟合度良好。最优的培养条件为培养时间 9 d,诱导物添加量 0.5%,培养温度 28 °C,通过培养条件优化,FGFC1 产量由优化前的约 700 mg/L 提高到 1 978.33 mg/L。结果表明,通过对培养时间、诱导物添加量和培养温度的响应面优化是成功有效的,为提高 FGFC1 的产量提供了技术支持,对保证后续的临床前试验需求及加快 FGFC1 作为新型溶栓药物出现具有重要意义。

长袍葡萄穗霉菌 FG216 是一种稀有真菌,自 1975 年被发现以来鲜有研究报道,其生物学特性尚未完全明确。相关研究<sup>[14-16]</sup>提示我们,可以从更多方面进一步提高 FGFC1 的产量。

## REFERENCES

- [1] Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, et al. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(1): 69–85.
- [2] Wang X, Wu WH, Chen ZH, et al. Research progress on bioactive metabolites from marine microorganism and their structures. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(4): 309–320 (in Chinese).  
王幸, 吴文惠, 陈志华, 等. 海洋微生物次生代谢产物的结构特征和生物活性的研究进展. *中国天然药物*, 2010, 8(4): 309–320.
- [3] Wang KM, Zhang YN, Zhang ZG, et al. Strategies for increasing the diversity of microbial secondary metabolites. *Hubei Agri Sci*, 2010, 49(12): 3207–3210 (in Chinese).  
王开梅, 张亚妮, 张志刚, 等. 提高微生物次生代谢产物多样性的策略. *湖北农业科学*, 2010, 49(12): 3207–3210.
- [4] Zhang Y, Wu WH, Zhou PG, et al. Screening and isolation of fibrinolytic active compound from marine microorganism. *Chin J Mar Drugs*, 2008, 27(6): 39–43 (in Chinese).  
张艳, 吴文惠, 周培根, 等. 海洋微生物来源纤溶活性化合物的筛选及其分离. *中国海洋药物杂志*, 2008, 27(6): 39–43.
- [5] Wang X, Wu WH, Sun LC, et al. Isolation of fibrinolytic

- active compound from marine fungi and initial identification of the strain. *Nat Prod Res Dev*, 2012, 24: 57-61 (in Chinese).
- 王幸, 吴文惠, 孙立春, 等. 具有纤溶活性作用的海洋真菌代谢产物的分离与菌株鉴定. *天然产物研究与开发*, 2012, 24: 57-64.
- [6] Wang H, Zhang L, Li JL. Response surface optimization of tannase production by *Aspergillus niger*. *J Cent South Univ Technol*, 2011, 31(10): 122-126 (in Chinese).
- 王挥, 张蕾, 黎继烈, 等. 响应面法优化黑曲霉发酵产单宁酶条件. *中南林业科技大学学报*, 2011, 31(10): 122-126.
- [7] Dong CH, Xie XQ, Wang XL, et al. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Bioprod Process*, 2009, 87(2): 139-144.
- [8] Zhang TR, Yu CQ. Optimization of mortierella isabellina culture conditions in fermentation of arachidonic acid by response surface methodology. *Acad Period Farm Products Processing*, 2012(2): 27-38 (in Chinese).
- 张天然, 于长青. 响应面法优化深黄被孢霉发酵生产花生四烯酸的培养条件. *农产品加工学刊*, 2012(2): 27-38.
- [9] Niu GC, Yan BD, Zhu D, et al. Optimization of fermentation conditions for black currant fruit vinegar by response surface methodology. *Food Sci*, 2012, 33(1): 157-160 (in Chinese).
- 牛广财, 严宝冬, 朱丹, 等. 响应面法优化黑加仑果醋的发酵条件. *食品科学*, 2012, 33(1): 157-160.
- [10] Tong ZY, Zhou LP, Chen XF. Enhance of Monacolin K production by response surface methodology of *Monascus purpureus* WX. *J Zhejiang Univ Technol*, 2007, 35(1): 35-40 (in Chinese).
- 童振宇, 周立平, 陈旭峰. 响应面法优化红曲霉菌株 *Monascus purpureus* WX 液态发酵产 Monacolin K 工艺条件. *浙江工业大学学报*, 2007, 35(1): 35-40.
- [11] Zhao C, Ye LJ. Optimization of fermentation medium for spinosad production through response surface methodology. *Chin J Antibiot*, 2010, 35(12): 945-950 (in Chinese).
- 赵晨, 叶丽娟. 利用响应面方法优化多杀菌素发酵培养基. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(12): 945-950.
- [12] Shen NK, Wang QY, Lu Y, et al. Enhancing ethanol production using thermophilic yeast by response surface methodology. *Chin J Biotech*, 2010, 26(1): 42-47 (in Chinese).
- 申乃坤, 王青艳, 陆雁, 等. 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇. *生物工程学报*, 2010, 26(1): 42-47.
- [13] Zuo AL, Zhang WG. Medium optimization of SHMT formation by response surface analysis. *Biotechnology*, 2008, 18 (3): 45-49 (in Chinese).
- 左爱连, 张伟国. 利用 Design-Expert 软件优化丝氨酸羟甲基转移酶产酶培养基. *生物技术*, 2008, 18(3): 45-49.
- [14] Li XY, Liu ZQ, Chi ZM. Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: optimization by response surface methodology. *Biores Technol*, 2008, 99(14): 6386-6390.
- [15] Wang HM, Zu GR, Yin L, et al. Optimization of chitinase production conditons of a marine bacterium by response surface methodology. *China Brewing*, 2012, 31(2): 103-106 (in Chinese).
- 王慧敏, 祖国仁, 尹璐, 等. 响应面法优化海洋细菌产几丁质酶培养条件. *中国酿造*, 2012, 31(2): 103-106.
- [16] Hong M, Diao QY, Yan GL, et al. Optimization of culture conditions for silage lactic acid bacteria via a response surface technique. *Chin J Animal Nutrition*, 2010, 22(5): 1307-1313 (in Chinese).
- 洪梅, 刁其玉, 闫贵龙, 等. 响应面法优化青贮饲料乳酸菌的培养条件. *动物营养学报*, 2010, 22(5): 1307-1313.

(本文责编 郝丽芳)