

## 响应面法优化泰妙菌素生产菌株原生质体再生培养基

孙金刚, 杨智, 牛春, 张萍\* (宁夏泰瑞制药股份有限公司, 宁夏银川 750101)

**摘要** [目的]采用响应面对泰妙菌素生产菌株原生质体的再生培养基进行优化。[方法]利用 Minitab 统计软件,采用中心复合响应面设计对泰妙菌素生产菌株原生质体再生培养基的琼脂浓度和蔗糖浓度进行了优化。[结果]泰妙菌素生产菌株原生质体的再生培养基优化为马铃薯 20.00% (浸提液) + 葡萄糖 2.00% + 蔗糖 2.70% + 琼脂 1.56%, pH = 6.5。优化后的再生培养基的单菌落复苏率由 0.7% 提高到 3.5%。[结论]该研究可为泰妙菌素的研发奠定基础。

**关键词** 响应面法; 泰妙菌素; 原生质体; 再生培养基

**中图分类号** S859.79+6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)36-0149-02

### Optimization of Protoplast Regeneration Medium for the Producing Bacteria of Tiamulin by Using Response Surface Methodology

SUN Jin-gang, YANG Zhi, NIU Chun, ZHANG Ping\* (Ningxia Tairui Pharmaceutical Co., Ltd., Yinchuan, Ningxia 750101)

**Abstract** [Objective] To optimize the regeneration medium of protoplast for the producing bacteria of tiamulin by using response surface methodology. [Method] The concentrations of agar and sucrose in the regeneration medium of protoplast for the producing bacteria of tiamulin were optimized by using central composite response surface design and Minitab software. [Result] The regeneration medium of protoplast for the producing bacteria of tiamulin was optimized as 20.00% potato extract + 2.00% glucose + 2.70% sucrose + 1.56% agar, pH = 6.5. The regeneration rate of recovered colony increased from 0.7% to 3.5%. [Conclusion] The research can lay the foundation for the development and research of tiamulin.

**Key words** Response surface methodology; Tiamulin; Protoplast; Regeneration medium

延胡索酸泰妙菌素是新型兽用抗生素,抗菌谱广,对支原体、金黄色葡萄球菌、螺旋体等病原体具有抑制作用<sup>[1-5]</sup>,主要用于防治猪支原体肺炎和鸡慢性呼吸道疾病<sup>[2]</sup>。该药物是截短侧耳素的衍生物<sup>[6-7]</sup>。截短侧耳素由担子菌纲伞菌目斜盖伞属真菌产生,由于遗传背景资料少,目前常采用诱变育种的方式进行菌种选育研究<sup>[2,8]</sup>。原生质体是诱变育种的良好材料,之前已经建立泰妙菌素生产菌株原生质体的制备方法,但再生率偏低。笔者采用响应面法对泰妙菌素生产菌株原生质体再生培养基进行了优化,以期对泰妙菌素的研发提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种。**泰妙菌素生产菌 (*Clitopilus prunulus*), 批号 TM114-28, 由宁夏泰瑞制药股份有限公司菌种研究室保藏。

**1.1.2 仪器与设备。**LDZX-75KBS 立式蒸汽压力灭菌器 (上海申安医疗器械厂)、YT-CJ-2N 双人双面净化工作台 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司)、HZQ-F280 全温振荡培养箱 (太仓市华美生化仪器厂)、PSX 智能型恒温恒湿培养箱 (宁波莱福科技有限公司)。

**1.1.3 培养基。**种瓶培养基为马铃薯 20% (浸提液)、葡萄糖 2%, pH = 6.5。初始原生质体再生培养基为马铃薯 20% (浸提液)、葡萄糖 2%、琼脂 2%, pH = 6.5。

### 1.2 方法

**1.2.1 原生质体的制备。**取培养 3 d 的种子液 20 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 后收集菌丝。将过滤除菌的酶液 20 mL 加入到上述菌丝中, 25 °C 条件下酶解 3.0~3.5 h, 每隔 0.5 h

振荡混匀 1 次。最后, 用 G2 砂芯漏斗过滤, 收集滤液。用缓冲液将滤液稀释 10 倍后, 每个培养皿均匀涂布 200 μL。

**1.2.2 原生质体计数。**原生质体采用血球计数板计数。

**1.2.3 响应面法优化试验。**在前期单因素试验结果的基础上, 确定蔗糖、琼脂为关键因素。以蔗糖浓度、琼脂浓度和葡萄糖浓度为自变量, 以复苏的单菌落数量为响应值, 进行响应面法优化试验设计。响应面法试验因素与水平见表 1。

表 1 响应面法试验因素与水平

Table 1 The design of factors and levels for response surface test

水平 Levels	因素 Factors		
	蔗糖浓度(A) Sucrose concentration // %	琼脂浓度(B) Agar conc- entration // %	葡萄糖浓度(C) Glucose concentration // %
-1	2.5	1.6	1.6
0	3.1	1.8	2.0
1	3.7	2.0	2.4

## 2 结果与分析

响应面法试验结果见表 2。对表 2 中复苏的单菌落数量进行多元回归拟合, 得到二次回归方程:  $Y = -2.45 + 1.88 \times A + 0.92 \times B + 5.34 \times C - 0.78 \times AB + 0.23AC + 10.23BC - 0.12 \times A^2 + 1.89 \times B^2 - 18.45 \times C^2$ 。二次多项式模型中复苏的单菌落数量与蔗糖浓度、琼脂浓度和葡萄糖浓度具有极显著相关 ( $P < 0.01$ ), 拟合检验非常显著。其中, 蔗糖浓度对复苏的单菌落数量有极显著影响 ( $P < 0.001$ ), 琼脂浓度对复苏的单菌落数量有极显著影响 ( $P < 0.001$ ), 其校正决定系数为 0.878 5, 说明此模型拟合度良好。

利用 Minitab 统计软件, 采用中心复合响应面法制定试验方案, 对原生质体再生培养基的琼脂浓度和蔗糖浓度进行了优化, 优化结果见表 3。方差分析表明,  $R^2 = 0.99996$ ,

**作者简介** 孙金刚 (1988 - ), 男, 宁夏德隆人, 从事菌种选育研究。

\* 通讯作者, 高级工程师, 从事菌种及微生物发酵研究。

**收稿日期** 2016-10-26

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 The design and results of response surface test

试验号 Test No.	蔗糖浓度(A) Sucrose concentration//%	琼脂浓度(B) Agar concentration//%	葡萄糖浓度(C) Glucose concentration %	复苏的单菌落数量 Amount of recovered colonies 个/mL
1	2.5	1.8	2.4	12
2	3.1	1.8	2.0	32
3	2.5	1.6	2.0	23
4	3.7	1.8	1.6	89
5	2.5	2.0	2.0	98
6	3.1	2.0	2.0	86
7	3.7	1.6	2.0	77
8	3.7	1.8	2.4	87
9	2.5	1.8	1.6	49
10	3.1	2.0	1.6	65
11	3.7	2.0	2.0	44
12	3.1	1.8	2.0	65
13	3.1	1.8	2.0	78
14	3.1	1.6	1.6	85
15	3.1	1.6	2.4	66

表明该二次回归方程模型与试验结果的符合度达 99.99%，说明二次回归方程与模型有很高的可信度。

从图1可以看出,复苏的单菌落数量随着蔗糖浓度的增加而降低,而复苏的单菌落数量随着琼脂浓度的增加呈先升高后降低的趋势,当蔗糖浓度为 1.5% 时复苏的单菌落数量达到最大,说明蔗糖浓度与琼脂浓度对复苏的单菌落数量影响显著,与前期单因素试验结果相一致。

由图2可知,预测的最优琼脂浓度与蔗糖浓度分别为 1.56% 和 2.70%。根据优化后的配方进行回归模型试验验证,结果表明优化后的再生培养基单菌落复苏率由 0.7‰ 提高到 3.5‰,提高了 5 倍。

3 讨论与结论

在再生培养基中添加一定浓度的蔗糖可以提高泰妙菌素生产菌株的原生质体再生率,其原因可能是添加蔗糖有助于原生质体维持渗透平衡,防止细胞死亡。琼脂浓度会影响

表3 原生质体再生培养基中琼脂浓度和蔗糖浓度的优化

Table 3 The optimization of agar concentration and sucrose concentration in the regeneration medium of protoplast

标准序 Standard No.	运行序 Running No.	水平 Levels	琼脂浓度 Agar concentration//%	蔗糖浓度 Sucrose concentration//%	复苏的单菌落数量 Amount of recovered colonies//个/mL
8	1	-1	1.40	20.66	0.00
1	2	1	0.80	0.00	86.00
10	3	0	1.40	8.56	96.00
3	4	1	0.80	17.12	0.00
11	5	0	1.40	8.56	97.00
6	6	-1	2.25	8.56	80.00
13	7	0	1.40	8.56	96.00
9	8	0	1.40	8.56	95.50
2	9	1	2.00	0.00	109.00
7	10	-1	1.40	3.54	99.67
12	11	0	1.40	8.56	96.00
5	12	-1	0.55	8.56	82.00
4	13	1	2.00	17.12	12.33

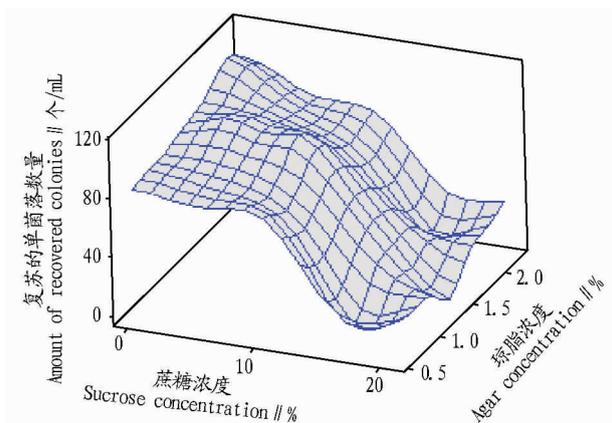


图1 响应面试验结果

Table 1 The results of response surface test

营养物质的利用速率,通过优化再生培养基的琼脂浓度也能够提高再生率<sup>[9-10]</sup>。

笔者采用响应面法对泰妙菌素生产菌株原生质的再生培养基中的琼脂浓度和蔗糖浓度进行了优化,确定泰妙原生质体再生培养基为马铃薯20.00% (浸提液) + 葡萄糖

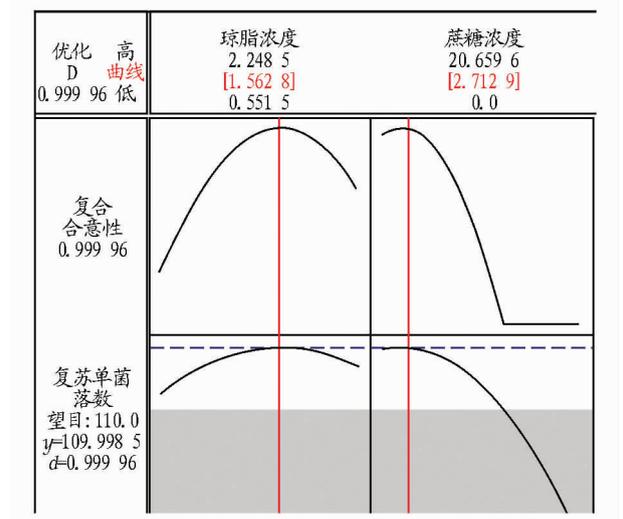


图2 响应面优化器预测

Table 2 The prediction of response surface test

(下转第 155 页)

$\delta$ :197.0, 168.3, 165.5, 164.9, 159.0, 131.0, 129.0, 116.3, 103.3, 97.0, 96.1, 80.4, 44.0。从该化合物的核磁氢谱数据可以看到,在高场区( $\delta$  2.66 ppm)只有一个吸收峰,而其他的吸收峰主要集中在苯环区,所以初步判断此化合物属于黄酮类化合物。结合核磁碳谱数据可知,在化合物中应该有一个羰基结构( $\delta$  197.0 ppm),另外在 $\delta$  160 ppm左右有4个吸收峰,可以判断应属于连有吸电子结构或元素的C,这也符合黄酮类化合物的化学位移规律。以上数据与文献[8]一致,故鉴定为柚皮素(Naringenin)。

**2.3 化合物 3** 黄色粉末。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ :12.36 (s, 1H), 8.01 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J=8.4$ , 2.0 Hz, 1H), 6.93 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.50 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.27 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 5.42 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 3.74 (dd,  $J=11.8$ , 2.3 Hz, 1H), 3.57 (dd,  $J=11.8$ , 5.2 Hz, 1H), 3.46~3.20 (m, 4H)。 $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ :180.1, 165.9, 163.9, 159.8, 158.9, 149.9, 145.8, 134.2, 123.7, 117.1, 116.8, 105.6, 99.2, 94.2, 78.7, 77.9, 75.9, 70.8, 62.9。从该化合物的核磁氢谱数据可以看到,在 $\delta$  3.8~3.2 ppm有明显的吸收峰存在,且其峰型具有糖苷吸收峰的特点。结合核磁碳谱数据可知,在 $\delta$  180~140 ppm的吸收峰具有典型的黄酮类化合物特征。以上数据与文献[9]基本符合,故鉴定为槲皮素-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(Quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside)。

**2.4 化合物 4** 黄色粉末。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 400 MHz)  $\delta$ :8.31 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 8.21 (dd,  $J=8.4$ , 1.9 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 6.76 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H)。 $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 100 MHz)  $\delta$ :177.4, 165.6, 162.5, 157.5, 149.4, 148.5, 147.5, 137.9, 123.1, 122.8, 116.6, 112.6, 104.5, 99.3, 94.4, 56.0。从该化合物的核磁氢谱数据可以看到,在 $\delta$  3.87 ppm处有一个明显的单吸收峰出现,可以判断此化合物结构中可能含有甲氧基结构。结合核磁氢谱与碳谱数据可以推断此化合物应属于典型的黄酮类化合物。以上数据与文献[10]一致,故鉴定为异鼠李素(Isorhamnetin)。

**2.5 化合物 5** 浅黄色粉末。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400

MHz)  $\delta$ :12.95 (s, 1H), 7.91 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.44 (d,  $J=1.6$  Hz, 1H), 6.15 (d,  $J=1.6$  Hz, 1H)。 $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ :181.73, 165.2, 163.8, 161.9, 161.4, 157.5, 128.7, 121.3, 116.1, 103.5, 102.9, 99.2, 94.3。从该化合物的核磁氢谱数据可以看到,除在低场区有一个吸收峰外,其他吸收峰均集中在苯环区,与核磁碳谱数据相符合。但从核磁碳谱数据可以发现,在较为低场的 $\delta$  160 ppm处有5个吸收峰,说明相应C原子上应该连有吸电子基团,再结合化合物颜色可以初步推断应属于黄酮类化合物。以上波谱数据与文献[11]基本一致,故鉴定为芹菜素(Apigenin)。

### 3 结论

采用柱层层析、制备薄层层析等分离手段,利用MS、 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 等技术,结合文献数据和理化数据对所分离出的化合物进行结构鉴定,研究报春花属植物甘青报春的化学成分。结果表明,从甘青报春中共分离并鉴定了5个化合物,分别为2-苯基色原酮、柚皮素、槲皮素-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、异鼠李素、芹菜素,这些化合物均属于黄酮类化合物。

### 参考文献

- [1] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:377.
  - [2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1980:320.
  - [3] 杨念云,段金殿,李萍,等. 金钱草中黄酮类化合物的分离与结构鉴定[J]. 中国药学杂志,2006,41(21):1621-1624.
  - [4] 田景奎,邹忠梅,徐丽珍,等. 细梗香草化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(3):171-173.
  - [5] 张雅媛. 金钱草抗炎利胆有效部位研究及机理探讨[D]. 南京:中国药科大学,2004.
  - [6] 王祎茜,唐丽华,梁中琴,等. 珍珠菜提取物 ZEF 对宫颈癌抑制作用的初步研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(7):925-929.
  - [7] 田菁,赵毅民,栾新慧. 马鞭草的化学成分研究(II)[J]. 天然产物研究与开发,2009(19):247-249.
  - [8] 邹海艳,屠鹏飞. 珍珠菜化学成分的研究[J]. 中草药,2009,40(5):704-708.
  - [9] KAZUMA K, NODA N, SUZUKI M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*[J]. Phytochemistry, 2003, 62(2):229-237.
  - [10] BOUKTAIB M, LEBRUN S, ATMANI A, et al. Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions[J]. Tetrahedron, 2002, 58(50):10001-10009.
  - [11] 彭腾,邱建平,邓赞,等. 钟花报春花的化学成分研究(II)[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(10):1385-1386.
- (上接第150页)
- 2.00% + 蔗糖 2.70% + 琼脂 1.56%, pH = 6.5。优化后的再生培养基单菌落复苏率由0.7%提高到3.5%,提高了5倍。
- 参考文献**
- [1] 王学红,梁剑平,赵晓彬,等. 高产截短侧耳素产生菌高通量筛选方法的建立[J]. 中国兽医学报,2013,33(10):1590-1594.
  - [2] 黄贺贤,曾振灵,黄显会. 截短侧耳素类抗生素——秦妙菌素的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2010,44(6):42-45.
  - [3] KAVANAGH F, HERVEY A, ROBBINS W J. Antibiotic substances from basidiomycetes; VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1951, 37(9):570-574.
  - [4] LABER G. Activity of various compounds against a pathogenic strain of *Trichomonas vaginalis*[J]. Zentralbl Bakteriol Orig A, 1976, 236(1):127-130.
  - [5] DAUM R S, KAR S, KIRKPATRICK P. Fresh from the pipeline: Retapamulin[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(11):865-866.
  - [6] 杨冠洲,尚若锋. 截短侧耳素类化合物的研究进展[J]. 南方农业学报, 2015, 46(8):1527-1532.
  - [7] 汤有志,远立国,刘雅红. 截短侧耳素类抗生素的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2012, 48(5):65-68.
  - [8] 冉茜. 基于响应面方法优化截短侧耳素发酵产量[D]. 重庆:西南大学, 2009.
  - [9] 刘卫东,苏浩,虞星炬. 培养基琼脂浓度及抗生素对3种海洋微藻生长的影响[J]. 生物技术, 2006, 16(6):75-77.
  - [10] 梅传生,张金渝,汤日圣,等. 琼脂浓度对水稻愈伤组织植株再生率和内源激素含量的影响[J]. 中国水稻科学, 1993, 7(3):148-152.