多黏菌素 B 生产菌多黏芽孢杆菌的选育和发酵过程优化

李聪慧[1]，李振鑫[1]，张正玉[1,2]，杨松柏[1]，奕　栋[1]，陈少欣[1*]

（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203；2. 复旦大学药学院，上海 201203）

摘要：多黏菌素 B（**1**）是由多黏芽孢杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）产生的一类碱性多肽类抗菌药，主要成分包括 B1、B2、B3 和 B1-I，对耐药菌感染的治疗效果显著。为了提高 **1** 产量，该研究以多黏芽孢杆菌 SIPI PB-1［发酵单位（837±50）mg/L］为出发菌株，采用传统诱变法选育，获得了突变菌株 SIPI PB-N14［发酵单位（1 297±60）mg/L］。随后优化了 SIPI PB-N14 的发酵培养基和发酵工艺。在优化发酵条件下，**1** 在 5 L 发酵罐中的发酵产量可达（1 681±25）mg/L，其中 B1、B2、B3、B1-I 的比例分别为（74.5±1.1）%、（20.4±0.8）%、（1.3±0.3）%、（3.0±0.1）%，符合原料药组分的要求，为工业化生产提供了试验数据。

关键词：多黏芽孢杆菌；多黏菌素 B；诱变育种；培养基优化；发酵

中图分类号：Q815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2023）08-1208-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.08.010

Strain Breeding and Fermentation Process Optimization for Production of Polymyxin B by *Paenibacillus polymyxa*

LI Conghui[1], LI Zhenxin[1], ZHANG Zhengyu[1,2], YANG Songbai[1], YI Dong[1], CHEN Shaoxin[1*]

（*1. State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203*）

ABSTRACT: Polymyxin B（**1**）, a basic polypeptide antibacterial drug, was mainly produced by *Paenibacillus polymyxa* and showed significant effects on treatment of drug-resistant bacterial infections. The main components of **1** include B1, B2, B3, and B1-I. To increase the yield of **1**, this study with *P. polymyxa* SIPI PB-1［fermentation unit:（837±50）mg/L］as the starting strain, obtained the mutant strain SIPI PB-N14［fermentation unit:（1 297±60）mg/L］through traditional mutagenesis and selection. Then, the fermentation medium and fermentation process of SIPI PB-N14 were optimized. Under the optimized fermentation conditions, the fermentation yield of **1** in a 5 L fermenter could reach（1 681±25）mg/L, of which the proportions of B1, B2, B3, and B1-I were（74.5±1.1）%,（20.4±0.8）%,（1.3±0.3）%, and（3.0±0.1）%, which met the requirements of API components and provided test data for industrial production.

Key Words: *Paenibacillus polymyxa*; polymyxin B; mutation breeding; medium optimization; fermentation

多黏菌素 B（Polymyxin B，**1**）是由多黏芽孢杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）产生的一类碱性多肽类抗菌药，主要用于治疗由革兰阴性菌引发的感染[1]，尤其对于铜绿假单胞菌引起的烧伤创面感染、鲍曼不动杆菌等引起的感染等具有良好的疗效。然而，由于 **1** 存在一定的肾毒性和神经毒性，20 世纪 70 年代后被逐渐停止使用[2]。

如图 1 所示，**1** 由脂肪酸侧链和环肽（L-2,4- 二氨基丁酸、苏氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸）构成，包含 4 个组分（B1、B2、B3 和 B1-I），带有 5 个正电荷，可与革兰阴性菌细胞膜上的磷酸根相互作用，通过增加通透性而使细胞裂解死亡。近年

收稿日期：2023-04-19

基金项目：科技部重点研发计划“绿色生物制造”项目（2021YFC2102100）、“上海市浦江人才计划”项目（21PJ1423200）

作者简介：李聪慧（1997—），女，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：陈少欣（1972—），男，研究员，博士生导师，从事微生物药物的研究与开发。

E-mail：sxzlb@263.net

来，由于多重耐药（multi-drug resistance，MDR）菌，如肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌等的不断出现，**1** 作为临床治疗耐药菌的“最后一道防线”，又重新受到人们重视[3—4]。通过对 **1** 进行结构改造，开发了抗菌作用良好且毒性低的衍生物，如 NAB739[5—7] 和八肽菌素（octapeptin）[6—8] 等，应用前景良好。

2007 年，国外 **1** 的产量已达到 2.8 g/L，而国内目前的最高产量约为 2 g/L，且杂质和组分比例难以控制，远低于原料药要求，导致目前 **1** 原料药主要依赖进口的状况。因此，生产符合原料药要求的 **1** 具有重要意义。目前，国内对 **1** 发酵的研究主要集中在培养基优化方面[9—10]。近年来，也有研究利用基因工程的方法改造菌种，如 YUAN 等[11] 通过 **1** 合成基因簇的结构域交换，将 B1 的含量增加至 62.96%、B3 和 B1-I 的比例下降至 6.7%和 3.3%，但仍达不到原料药的要求。本研究筛选了诱变育种和培养基优化条件，以期获得高产量的突变菌种和组分符合原料药要求的 **1** 发酵工艺，为工业化生产提供基础数据参考。

1 仪器与试药

BIOTECH-5BG 型 5 L 发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；H1650 型台式高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；SBA-40E 型生物传感分析仪（山东省科学院生物研究所）；E200 型光学显微镜（上海千欣仪器有限公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）。

1 工作对照样品（浙江瑞邦药业股份有限公司，含量 92%，批号 160601）；亚硝基胍（NTG，日本东京化成工业株式会社）；葡萄糖（上海源聚生物科技有限公司）；小麦面粉（益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司）；大豆蛋白胨、鱼粉蛋白胨、碳酸钙、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸二乙酯（DES）均购自国药集团化学试剂有限公司。

多黏芽孢杆菌 *P. polymyxa* SIPI PB-1 为本实验室保存。

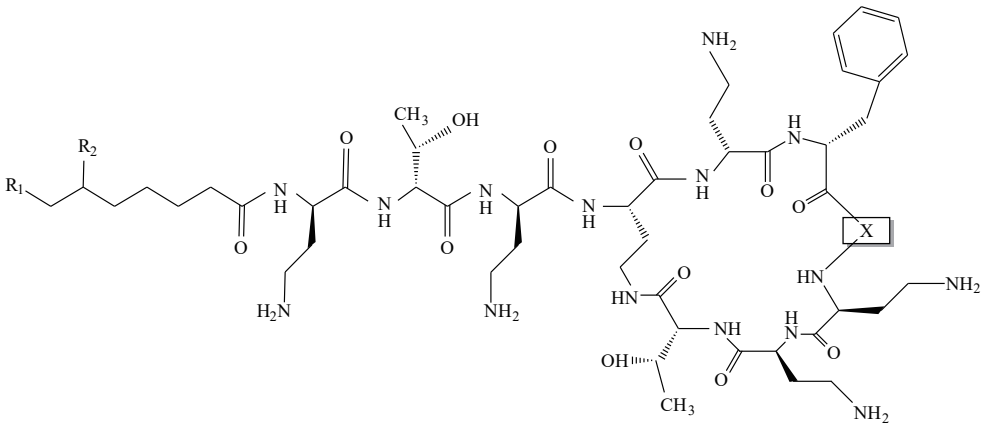
2 方法与结果

2.1 培养基及培养方法

固体培养基（平板、斜面）/（g·L^{-1}）：葡萄糖 10，胰蛋白胨 15，牛肉膏 10，酵母提取物 2，氯化钠 3，琼脂粉 20。调至 pH 6.8 ～ 7.0。

种子培养基 /（g·L^{-1}）：葡萄糖 20，鱼粉蛋白胨 5，氯化钠 3，大豆蛋白胨 8，轻质碳酸钙 2。调至 pH 6.5。

发酵培养基① /（g·L^{-1}）：葡萄糖 15，小麦面粉 80，热炸黄豆饼粉 5，谷氨酸钠 5，氯化钠 3，鱼粉蛋白胨 5，大豆油 12。调至 pH 8.5。



组分	取代基		
	R_1	R_2	X
B1	CH_3	CH_3	Leu
B2	H	CH_3	Leu
B3	CH_3	H	Leu
B1-I	CH_3	CH_3	Ile

图 1 1 的化学结构

Fig.1 Chemical Structure of **1**

发酵培养基②/(g·L^{-1})：小麦面粉 80，酵母粉 4，硫酸铵 4.5，磷酸氢二钾 0.15，轻质碳酸钙 3。调至 pH 6.8 ～ 7.2。

发酵培养基③/(g·L^{-1})：小麦面粉 100，淀粉酶 0.05，棉籽饼粉 10，玉米浆干粉 2.5，磷酸氢二钾 0.15，硫酸铵 4，碳酸钙 3。调至 pH 8.5。

发酵培养基④/(g·L^{-1})：小麦面粉 100，热榨黄豆饼粉 2.5，玉米浆干粉 5，硫酸镁 5，磷酸二氢钾 5，硫酸铵 3，碳酸钙 5。调至 pH 8.5。

发酵培养基⑤/(g·L^{-1})：小麦面粉 120，淀粉酶 0.06，酵母粉 8，磷酸氢二钠 0.15，硫酸铵 4.5，L- 苏氨酸 0.8，碳酸钙 3。调至 pH 8.5。

以上培养基均在 121 ℃灭菌 30 min 后使用。

固体培养：将保存在甘油管内的菌株用无菌水稀释后，涂布于固体培养基上，置 28 ℃培养箱中培养 2 d。

种子培养：用接种铲从固体培养基上铲取丰厚的菌体，转接到种子瓶（250 mL）中，其中种子培养基装量为 25 mL，然后置 28 ℃、220 r/min 的摇床上培养 22 h，得种子液。

发酵培养：将种子液以 10%的接种量转接到发酵培养基装量为 25 mL 的种子瓶（250 mL）中，置 30 ℃、200 r/min 的摇床上培养 38 ～ 42 h。

发酵罐培养：将种子液以 2%接种量接种到 5 L 发酵罐中，发酵培养基①为装量 2.5 L，设置温度为 30 ℃、初始搅拌速度为 200 r/min、通气量为 1 m^3/(m^3·min)，发酵过程通过控制转速保持溶氧为 30%。发酵过程中定时取样，采用 HPLC 法检测产物发酵单位。

2.2 分析方法

2.2.1 发酵液菌体生物量（PMV）测定方法

取 1.5 mL EP 管，称定，记为 m_0，加入 1 mL 发酵液后称定，记为 m_1，离心（12 000×g）10 min，弃去上清液后称定，记为 m_2，按下式计算 PMV。

$$PMV=(m_2-m_0)/(m_1-m_0)\times100\%$$

2.2.2 HPLC 法

采用 3 mol/L 硫酸调节发酵液 pH 值为 3.0 ～ 4.0，取发酵液 700 μL，加入等体积的纯化水充分混匀，超声振荡 15 min，离心（12 000×g）10 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后采用 HPLC 法检测。

色谱条件：色谱柱 Eclipse XDB-C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 0.03 mol/L 硫酸钠水溶液（pH 2.3）和乙腈（体积比 78 ∶ 22）；流速 1.0 mL/min；检测波长 215 nm；柱温 40 ℃；进样量 10 μL。

采用外标法计算样品含量。计算公式如下。

$$c_X=A_{样}/A_{标}\times c_{标}\times(A_X/A_{样})\times2$$

式中：c_X、$c_{标}$为某组分和对照品的质量浓度；A_X、$A_{样}$、$A_{标}$为某组分、对照品和样品的总峰面积（即 $A_{B1}+A_{B2}+A_{B3}+A_{B1\text{-}I}$）；2 为稀释倍数。

计算得 **1** 工作对照品中组分 B1、B2、B3 和 B1-I 的比例分别为 71.4%、9.1%、2.0%和 7.5%。

2.3 **1** 高产菌的诱变选育

NTG 诱变方法：将平板上培养 2 d 的 *P. polymyxa* 用铲子刮至研磨器中，加入 PBS（100 mmol/L）研磨，制成 OD_{600} 为 1.08 左右的菌悬液。取菌悬液 10 mL，加入 NTG 溶液（称取 NTG 粉末 0.24 g，溶于丙酮，并定容至 5 mL），使 NTG 终质量浓度为 1 mg/mL，于 28 ℃振荡（200 r/min）培养 10 min。取菌悬液 0.5 mL 置 EP 管中，加入等量的无菌水洗涤，离心（12 000×g）3 min，所得沉淀加水洗涤 3 次后，加入无菌水 0.5 mL 吹打均匀，稀释后涂布于平板培养基上。

DES 诱变方法：将平板上培养 2 d 的 *P. polymyxa* 用铲子刮至研磨器中，加入 PBS 研磨，制成 OD_{600} 为 1.73 左右的菌悬液。取菌悬液 1 mL 置 5 mL 的 EP 管中，分别加入 25%的 DES 贮备液（称取 DES 粉末 2.5 g，溶于无水乙醇，定容至 10 mL），使 DES 终浓度为 0.1%，于 28 ℃振荡（200 r/min）培养 5 min，取菌悬液 0.5 mL 置 EP 管中，加入 5%的连二亚硫酸钠溶液 0.5 mL，充分吹打均匀以终止反应，稀释后涂布于平板培养基上。

抑菌圈筛选法：将过夜培养的大肠埃希菌 DH-5α（OD_{600} 为 1.7 ～ 1.8）涂布到 LB 固体培养基上，再用打孔器将 *P. polymyxa* 单菌落所在的琼脂块打下，置前述 LB 固体培养基上，37 ℃过夜培养，然

后用游标卡尺测量并统计抑菌圈直径，据此初步筛选抑菌效果较好的菌株，再进行摇瓶复筛。

当 **1** 产量达到 1 100 mg/L 以上时，其与抑菌圈直径大小不再呈正相关性。而 **1** 对菌体自身生长有反馈抑制作用，因而在 **1** 抗性板上反复筛选，可逐步提高菌体对自身产物的耐受性，提高产量。因此，进一步建立了自身产物耐受法。

自身产物耐受法：将经过诱变的菌悬液稀释后涂布于含有 0.2 g/L **1** 的固体培养基上，28 ℃培养，2 d 后统计致死率，并挑取分离较好的单菌落，按“**2.1**”项下方法发酵培养后采用 HPLC 法检测其发酵单位。

菌种选育过程如图 2 所示。先对经自然分离得到的较稳定菌株进行 NTG 诱变，随机挑选突变落株，以抑菌圈法初筛、摇瓶法复筛。所得突变菌株 SIPI PB-N50 产量可达 1 132 mg/L。然后采用 DES 诱变，经过初筛和复筛，获得 **1** 产量为 1 251 mg/L 的突变株。再次进行 NTG 诱变后，获得产量达 (1 297±60) mg/L 的 SIPI PB-N14，**1** 产量比出发菌株提高了 55%。为了验证突变株的遗传稳定性，将该菌株连续传代 6 次（所得菌株记作 F1 ～ F6），并测定其 **1** 产量和 **1** 中各组分比例，结果如图 3 所示。**1** 工作对照品溶液和 SIPI PB-N14 发酵产物的 HPLC 图谱如图 4 所示。

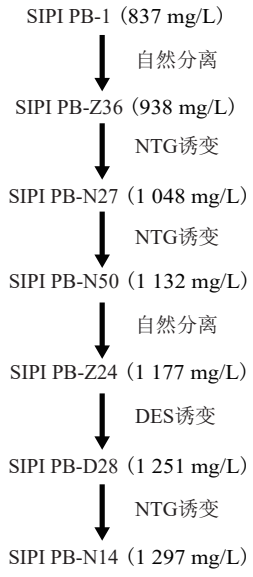


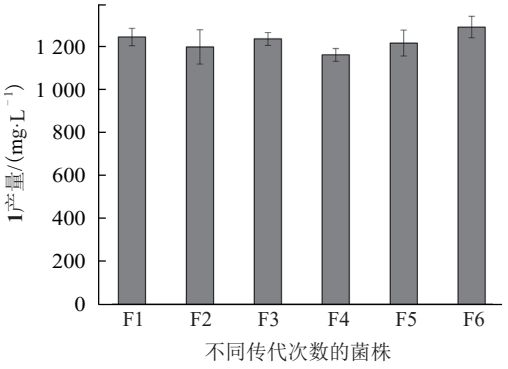
图 2 *P. polymyxa* SIPI PB-N14 菌种的选育过程

Fig.2 Breeding Process of *P. polymyxa* SIPI PB-N14

2.4 发酵培养基优化

2.4.1 发酵培养基对发酵的影响

分别采用“**2.1**”项下 5 种适合生产 **1** 的发酵培养基[12]，发酵培养高产菌株 SIPI PB-N14，经过 3 次平行试验，结果如表 1 所示。可见，采用发酵培养基④时 **1** 产量较高，但其成分比例与工作对照品



组分	F1	F2	F3	F4	F5	F6
B1/%	74.8±1.7	76.8±1.5	74.6±3.2	76.2±2.7	76.1±1.5	77.1±1.1
B2/%	18.5±2.0	18.3±1.8	19.6±2.1	16.8±0.9	18.8±1.7	17.3±1.3
B3/%	2.5±0.5	1.3±0.2	1.8±0.6	1.9±0.5	1.8±0.3	1.6±0.4
B1-I/%	3.0±0.6	3.5±0.6	3.8±0.8	2.9±0.2	3.2±0.5	3.5±0.1

图 3 *P. polymyxa* SIPI PB-N14 连续传代次数对遗传稳定性的影响

Fig.3 Effect of Successive Passage Times of *P. polymyxa* SIPI PB-N14 on Genetic Stability

相比差异较大。采用培养基①时 **1** 产量也较高，并且其中各组分比例与工作对照品较为一致。因此，选择培养基①作为生产 **1** 的发酵培养基，继续进行优化。

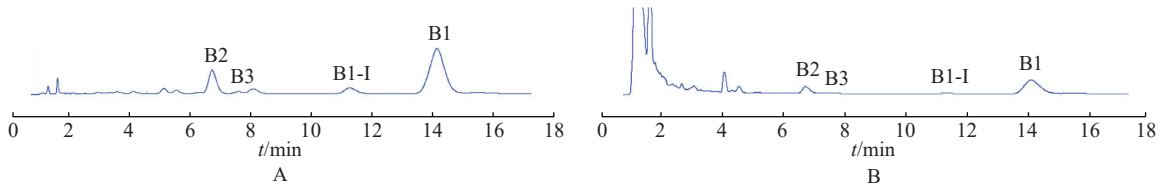
2.4.2 添加前体氨基酸

亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和 L-2,4- 二氨基丁酸是 **1** 生物合成途径中的重要前体，而天冬氨酸半醛是合成 L-2,4- 二氨基丁酸的重要前体[13]。因此，以发酵培养基①为基础，分别添加 0.05％亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸以及苏氨酸，探究其对 **1** 合成的影响。结果如表 2 所示，添加亮氨酸、异亮氨酸和苏氨酸以及天冬氨酸均使 **1** 总产量下降，且 4 种氨基酸对 4 种组分比例的影响较为显著。其中，添加异亮氨酸时，B1-I 和 B3 的含量增加，而 B2 的含量减少，可能是因为添加异亮氨酸后，B1-I 和 B2 竞争合成所需的脂肪酸。外部添加天冬氨酸可促进 B3 合成，使其与其他组分竞争合成所需的脂肪酸，导致其他组分含量下降。添加亮氨酸和苏氨酸均可使 B1 组分含量增加至 80％以上。

2.4.3 添加无机盐

培养基一般含有多种无机盐，以维持细胞渗透压平衡、提供微量元素、供给细胞代谢，以及维持某些酶的稳定等[14]。以发酵培养基①为基础，分别添加 0.5％ 碳酸钙、0.1％氯化钙、0.5％硫酸镁及 0.1％磷酸氢二钾，探究其对 **1** 发酵产量的影响。

结果如表 3 所示。添加无机盐后，总产量均有所下降，可能是添加的无机离子影响了某些酶和转运蛋白的活性，从而抑制了 **1** 的合成。添加碳酸钙、氯化钙和硫酸镁后，均出现 B1 含量下降、B2 含量上升的现象；而添加磷酸氢二钾则会使 B1 含量上升、B2 含量下降；总体而言，组分 B3 和 B1-I 含



A—**1** 工作对照品溶液；B—SIPI PB-N14 发酵产物。

图 4　典型 HPLC 分析图谱

Fig.4　Typical HPLC Chromatograms

表 1　发酵培养基对发酵产物产量及组分的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1　Effect of Fermentation Medium on Yield and Compositions of the Fermentation Product ($\bar{x}\pm s$, n=3)

发酵培养基编号	**1**产量/(mg·L^{-1})	B1/%	B2/%	B3/%	B1-I/%
①	1 104±50	73.8±3.2	18.5±2.5	2.8±0.7	3.0±0.5
②	690±20	42.8±2.2	48.8±2.6	3.2±0.5	3.6±0.3
③	828±50	66.9±1.9	27.5±0.3	4.2±0.2	3.2±0.1
④	1 334±30	61.1±3.9	32.4±3.5	2.7±1.2	3.0±0.3
⑤	1 090±20	68.5±1.5	19.0±1.1	2.2±0.2	10.2±1.1

表 2　添加的氨基酸对发酵产物产量及组分的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2　Effect of the Added Amino Acid on Yield and Compositions of the Fermentation Product ($\bar{x}\pm s$, n=3)

氨基酸种类	**1**产量/(mg·L^{-1})	B1/%	B2/%	B3/%	B1-I/%
无添加	1 214±30	72.8±2.3	20.8±2.2	2.3±1.4	3.7±0.3
亮氨酸	754±50	81.3±0.8	11.6±0.4	4.9±0.3	2.1±0.2
异亮氨酸	993±10	74.9±2.0	7.5±0.3	4.3±0.4	12.9±1.9
苏氨酸	1 067±40	82.7±1.8	9.5±1.3	1.6±0.2	5.1±0.4
天冬氨酸	966±60	58.3±1.5	29.7±2.1	8.6±0.9	3.5±0.4

量受无机盐的影响较小。

2.5 发酵罐分批培养

发酵罐培养与摇瓶培养的工艺差异较大，发酵罐培养可通过调控溶氧、补料等进一步提升发酵产量。因此，采用 5 L 发酵罐进行了 **1** 发酵工艺优化。

SIPI PB-N14 在发酵罐中的生长曲线如图 5A 所示，葡萄糖在 15 ～ 20 h 迅速消耗，此时开始快速合成 **1**；发酵中期，即 24 h 时，葡萄糖几乎耗尽；**1** 的合成于 32 h 逐渐停止，镜检结果显示，此时菌体变得细长，逐渐老化，由于葡萄糖代谢产生的酸性代谢产物，此时发酵液的 pH 值迅速下降至 5.5 左右；而自 48 h 起，菌体开始自溶，此时 **1** 产量达到最大值［(1 334±25) mg/L］。综上所述，造成中后期产物合成停止的原因可能是前期葡萄糖的快速消耗导致残糖量较少，不足以供给细胞代谢，且 pH 值下降也可能对细胞产生有害作用，加速菌体老化。因此，下面对补糖和 pH 值调控进行优化。

2.5.1 流加葡萄糖

由于发酵中后期葡萄糖不足，于 12 ～ 24 h 流加葡萄糖，分别考察了补加量为 1.0%、2.0%的影响。

补加 1.0%葡萄糖的发酵曲线如图 5B 所示。结束补糖时葡萄糖含量为 8 g/L；28 h 时，葡萄糖又迅速被消耗，此后 pH 值回升至 6.05，**1** 快速积累；36 h 时，**1** 的产量达到峰值，即 (1 444±40) mg/L；52 h 左右菌体开始自溶。

补加 2.0%葡萄糖的发酵曲线如图 5C 所示。葡萄糖的消耗速率与补糖 1%时类似，均在 24 h 结束补糖时被快速消耗。但补糖 2%对 pH 值的影响更显著，且 12 h 时菌体开始缓慢合成产物，28 h 时达到 (846±20) mg/L，随后进入稳定期，产量增加缓慢；直到 36 h，pH 值上升到 6.0 左右，菌体合成 **1** 的速率加快，此时生物量也快速增加；**1** 产量在 60 h 达到峰值 (1 407±35) mg/L。

与无补料相比，补糖时的镜检结果显示，菌体短粗，生长旺盛，表明葡萄糖促进了菌体代谢。与无补料和补糖 1%相比，补糖 2%时，发酵周期延长、**1** 产量反而下降。推测是因为葡萄糖含量过高不利于 **1** 的合成。可能是由于葡萄糖效应，葡萄糖过多时对菌体利用其他能源物质产生阻遏作用，导致产物合成受阻、产量下降。综上所述，补糖量为 1% 较佳，可有效改善菌体由于葡萄糖不足而导致产物合成受阻的问题，产量比摇瓶产量提高了 11%。

2.5.2 控制 pH 值

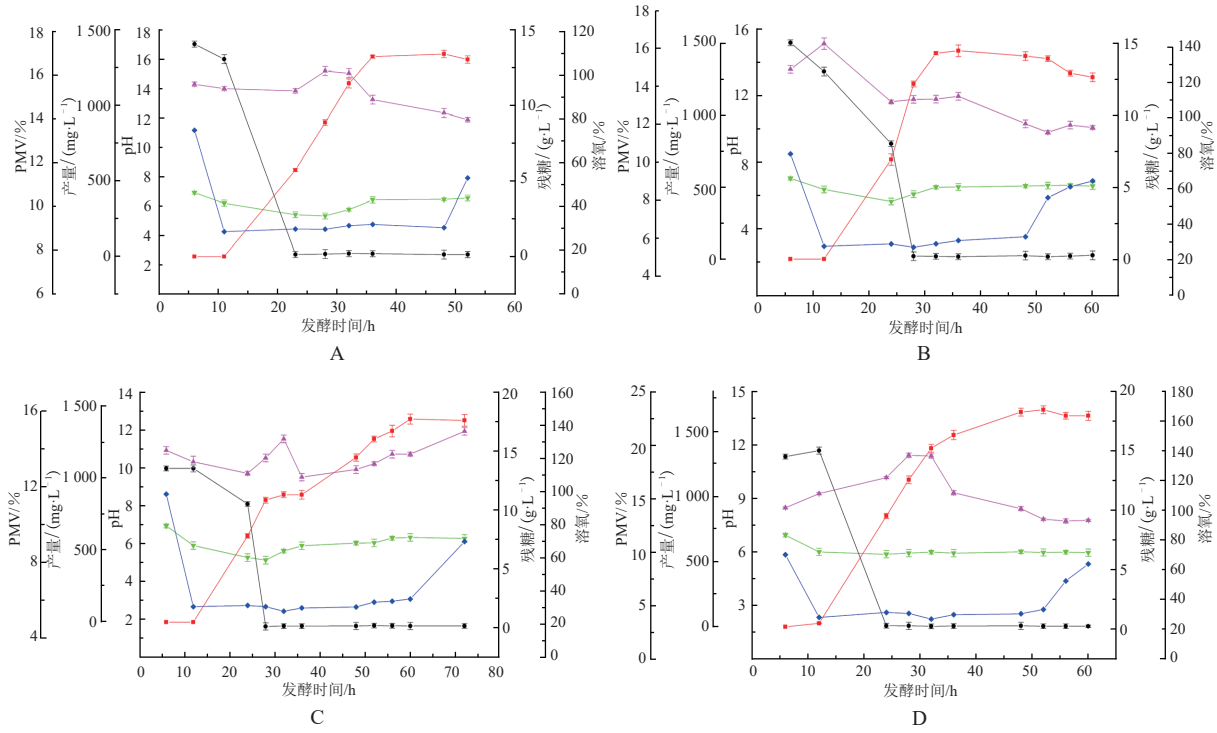
pH 值对于发酵过程至关重要。对于大部分细菌，pH 值过低或过高都会影响酶的活性，从而影响菌体生长和代谢。为了探索 pH 值对发酵的影响，当 pH 值下降到 6.0 以下时，流加 1 mol/L 氢氧化钠溶液，当 pH 值上升至 6.0 以上时，则流加 1 mol/L 硫酸，控制 pH 值为 5.9 ～ 6.0。如图 5D 所示，10 h 时发酵液 pH 值降至 5.9 以下，此时开始流加 1 mol/L 氢氧化钠溶液。23.5 h 时 pH 值上升至 6.15，开始流加 1 mol/L 硫酸。在此期间，生物量积累，**1** 快速合成，溶氧维持在 30%左右。52 h 时 **1** 合成达到峰值，即 (1 681±25) mg/L，比无补料发酵提升了 26%，组分 B1、B2、B3、B1-I 的比例分别为 (74.5±1.1) %、(20.4±0.8) %、(1.3±0.3) %、(3.0±0.1) %，符合原料药中各组分的比例要求。并且在 58 h 时菌体开始自溶，有效延长了发酵周期。

为了验证同时补糖和控制 pH 值对产量的影响，同时调控这 2 个参数。发酵后 12 h 开始控制残糖量为 1 ～ 3 g/L，控制 pH 值为 5.9 ～ 6.0，最终 48 h 发酵产量达到 (1 360±10) mg/L，与调控单个因素相

表 3 添加的无机盐对发酵产物产量及组分的影响 ($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab.3 Effect of the Added Inorganic Salt on Yield and Compositions of the Fermentation Product ($\bar{x}\pm s$, n=3)

无机盐种类	**1**产量/(mg·L^{-1})	B1/%	B2/%	B3/%	B1-I/%
无添加	1 224±30	74.4±3.1	20.2±2.4	2.8±0.9	3.1±0.5
碳酸钙	874±20	58.9±0.8	32.1±0.3	2.3±0.2	6.9±0.2
氯化钙	1 177±10	62.7±0.2	31.4±0.1	3.2±0.2	2.6±0.1
硫酸镁	1 039±10	64.0±0.1	31.0±0.1	1.6±0.1	3.2±0.2
磷酸氢二钾	1 113±10	80.6±2.6	15.2±0.6	2.3±0.3	3.2±0.1



A—无补料；B—流加 1%葡萄糖；C—流加 2%葡萄糖；D—控制 pH 值 6.0。

◆—溶氧；▲—PMV；●—残糖；■—**1**产量；▼—pH值。

图 5　*P. polymyxa* SIPI PB-N14 在 5 L 发酵罐中的生长代谢曲线（*n*=2）

Fig.5　Growth and Metabolic Curves of *P. polymyxa* SIPI PB-N14 in a 5 L Fermenter (*n*=2)

比，产量明显下降。可能是补充葡萄糖过多产生了葡萄糖效应，阻碍产物合成，而控制 pH 值为菌体内各种代谢酶提供了较为 pH 值温和的环境，使代谢更为旺盛。推测 pH 值可能是限制菌体生长和合成 **1** 的关键因素。

3　结论

本研究以 *P. polymyxa* SIPI PB-1[(837±50) mg/L]为出发菌株，经过 NTG、DES 等传统方式诱变选育，筛选得到一株 **1** 高产菌株 SIPI PB-N14。通过对该菌发酵时的培养基进行优化，确定 **1** 发酵培养基为发酵培养基①，其摇瓶产量（1 297±60) mg/L，比出发菌株提高了 55%。对培养基中添加前体氨基酸和无机盐的探索结果显示，二者均会抑制 **1** 的合成，且对组分比例的影响较大。其中，添加亮氨酸、天冬氨酸以及磷酸氢二钾会使 B1 含量达到 80%以上。随后在 5 L 发酵罐上进行工艺优化，确定全程控制 pH 值为 6.0 可使罐上发酵单位达（1 681±25) mg/L，比摇瓶发酵的最高产量提高了 30%，有效延长了发酵周期，且发酵产物中 4 种组分的比例符合原料药要求，产量较为稳定，为工业化生产提供了依据。

参考文献：

[1]　VELKOV T, ROBERTS K D, THOMPSON P E, *et al*. Polymyxins: a new hope in combating Gram-negative superbugs? [J]. *Future Med Chem*, 2016, **8**(10): 1017-1025.

[2]　GALLARDO-GODOY A, MULDOON C, BECKER B, *et al*. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B [J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(3): 1068-1077.

[3]　蔡家安, 蒋露芳, 姜庆五. 多黏菌素耐药及其机制的研究进展[J]. 上海预防医学, 2022, **34**(3): 283-287.

[4]　王雨豪, 胡　蓉, 史家欣. 多黏菌素B治疗碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌感染的研究进展[J]. 重庆医学, 2022, **51**(15): 2673-2677.

[5]　TYRRELL J M, ABOKLAISH A F, WALSH T R, *et al*. The

polymyxin derivative NAB739 is synergistic with several antibiotics against polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* [J]. *Peptides*, 2019, **112**: 149-153.

[6] VAARA M. Polymyxins and their novel derivatives [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**(5): 574-581.

[7] VAARA M, VAARA T, VINGSBO LUNDBERG C. Polymyxin derivatives NAB739 and NAB815 are more effective than polymyxin B in murine *Escherichia coli* pyelonephritis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, **73**(2): 452-455.

[8] VELKOV T, ROBERTS K D, LI J. Rediscovering the octapeptins [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, **34**(3): 295-309.

[9] 姜明星, 随子华, 周 鑫. 多黏菌素B发酵培养基研究[J]. 发酵科技通讯, 2022, **51**(2): 69-72.

[10] 田 东, 袁其朋, 孙新晓, 等. 响应面法优化多粘菌素B的发酵条件[J]. 中国农学通报, 2010, **26**(15): 53-57.

[11] YUAN Y, XU Q M, YU S C, *et al*. Control of the polymyxin analog ratio by domain swapping in the nonribosomal peptide synthetase of *Paenibacillus polymyxa* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, **47**(6/7): 551-562.

[12] 李 猛, 徐 珍, 王绘砖, 等. 一种提高多粘菌素B发酵水平的方法: 中国, 113755548A [P]. 2021-12-07.

[13] CHOI S K, PARK S Y, KIM R, *et al*. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 2009, **191**(10): 3350-3358.

[14] 张由恒, 刘红雪, 陈 宏, 等. 无机盐对多杀菌素发酵产量影响[J]. 中国抗菌药杂志, 2016, **41**(9): 658-665.

