茄病镰刀菌产环孢素 A 的发酵培养基优化

王子璠，李继安，林惠敏 *

（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203）

摘要：为提高茄病镰刀菌产环孢素 A（**1**）的产量，该研究通过单因素试验和 Box-Behnken 设计结合响应面法优化了 **1** 发酵培养基中的关键成分，包括碳源、有机氮源和氨基酸的种类及含量。优化配方为：葡萄糖 31.3 g/L，麦芽糊精 62.7 g/L，酪蛋白 17.3 g/L，酵母浸膏 LM801 8.7 g/L，L- 缬氨酸 7.15 g/L。在此条件下，**1** 摇瓶产量提高至 4 283 mg/L。继而考察不同补料工艺对 **1** 产量的影响。最终，采用流加补料的方式使 25 L 发酵罐中 **1** 的产量达到 5 247 mg/L，相较于原始配方提高了 72.49%，为 **1** 的工业化生产提供了一定参考。

关键词：环孢素 A；免疫抑制剂；剂茄病镰刀菌；自身免疫病；单因素试验；响应面法；发酵

中图分类号：TQ465　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)01-0058-08

引用：王子璠 , 李继安 , 林惠敏 . 茄病镰刀菌产环孢素 A 的发酵培养基优化 [J]. 中国医药工业杂志 , 2025, 56(1): 58-65.

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.01.006

Optimization of Fermentation Medium for Cyclosporin A Production by *Fusarium solani*

WANG Zifan, LI Ji'an, LIN Huimin*

(*National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: To improve the yield of cyclosporin A (**1**) produced by *Fusarium solani*, this study optimized the types and amounts of the key components in the fermentation medium for **1** production, including the carbon source, organic nitrogen source, and amino acid by single factor experiment and Box-Behnken design coupled with response surface methodology. The optimized formulation was as follows: glucose 31.3 g/L, maltodextrin 62.7 g/L, casein 17.3 g/L, yeast extract LM801 8.7 g/L, L-valine 7.15 g/L. Under these conditions, the yield of **1** by shake flask culture was increased to 4 283 mg/L. Then, the effects of different supplementation processes on the yield of **1** were investigated. Finally, the yield of **1** reached to 5 247 mg/L in a 25 L fermentor using fluid-feeding, which was 72.49% higher than that of the original formulation. This study provided some references for the industrial production of **1**.

Key Words: cyclosporin A; immunosuppressant; *Fusarium solani*; autoimmune disease; single factor experiment; response surface methodology; fermentation

环孢素 A（cyclosporin A，**1**）是好氧丝状真菌代谢过程中产生的一种由 11 个氨基酸组成的环状多肽，具有高度亲脂性 [1]。**1** 于 1983 年首次获得 FDA 批准上市，作为器官移植患者的治疗药物；目前也被用于治疗其他 T 细胞相关的自身免疫病，如类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮 [2]。

1 的生物合成是由其前体氨基酸的单一多功能酶，即环孢素合成酶催化完成 [3]。但由于酶催化反应较为复杂，**1** 的工业生产中并未采取生物合成方式，而是通过微生物菌种发酵进行生产 [4]。常用的 **1** 生产菌包括茄病镰刀菌（*Fusarium solani*）和雪白白僵

收稿日期：2024-04-03

作者简介：王子璠（1999—），女，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：林惠敏（1982—），女，副研究员，从事微生物与生化药学的研究。

E-mail：hmlin1127@163.com

菌（*Beauveria nivea*）[5]。有研究[6]报道采用茄病镰刀菌发酵生产 **1** 的产量约为 3 000 mg/L，仍有进一步提升的空间。本研究以茄病镰刀菌为生产菌，采用单因素试验和 Box-Behnken 设计结合响应面法对 **1** 发酵培养基进行优化，探索培养基组分的适宜添加量，随后考察了补料工艺对 **1** 产量的影响，以期为工业化发酵生产 **1** 提供一定的参考依据。

1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；LRH-150 型恒温培养箱（上海索谱仪器有限公司）；ZHWY-1112B 型摇床（上海智诚分析仪器制造有限公司）；BMR-B 型机械搅拌式发酵罐（上海敖中生物工程设备有限公司）。

1 对照品（上海泰坦科技股份有限公司，批号 P1586075）；酪蛋白（甘肃华羚乳品股份有限公司）；乙腈为色谱纯，其他材料均购自国药集团化学试剂有限公司（均为分析纯）。

茄病镰刀菌 ATCC36031（未经改造的野生型菌株，由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供）。

2 方法与结果

2.1 培养方法

斜面培养基 /（$g\cdot L^{-1}$）：土豆汁 200，葡萄糖 20，胰蛋白胨 4，琼脂粉 18；超纯水配制，pH 自然，121 ℃灭菌 25 min。

种子培养基 /（$g\cdot L^{-1}$）：玉米粉 30，葡萄糖 30，KH_2PO_4 2，KCl 0.5，$NaNO_3$ 3，$MgSO_4$ 0.05；自来水配制，121 ℃灭菌 25 min。

基础发酵培养基 /（$g\cdot L^{-1}$）：葡萄糖 60，酪蛋白 30，$NaNO_3$ 1.5，KCl 0.5，$MgSO_4$ 0.05，$CaCO_3$ 3，L- 缬氨酸 5，豆油 2，烟酰胺 0.08；自来水配制，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 6.8，121 ℃灭菌 25 min。

蘸取茄病镰刀菌甘油保藏菌的菌悬液，均匀涂抹至斜面培养基表面，在 27.5 ℃条件下培养 120 h。挖取约 1 cm×2 cm×1 mm 大小的成熟孢子块，接种到 500 mL 锥形瓶中，种子培养基装量为 80 mL，于 27.5 ℃、250 r/min 摇床振荡培养 48 h。随后以 10% 的接种量接种到 250 mL 锥形瓶中，发酵培养基装量为 30 mL，在 27.5 ℃、250 r/min 条件下振荡培养 120 h，放瓶检测 **1** 产量。

取培养好的摇瓶种子液 80 mL，转接至 10 L 种子罐中，培养基装液量为 4 L，设置转速（0—18 h，300 r/min；18—30 h，350 r/min；30—36 h，400 r/min；36—48 h，450 r/min）、通气量（4 L/min）、罐压（0.05 MPa），于 27.5 ℃培养 48 h。将培养好的 4 L 种子液转接至 25 L 发酵罐中，培养基装量为 14 L，设置转速（0—2 h，250 r/min；2—4 h，300 r/min；4—6 h，350 r/min；6—120 h，400 r/min）、通气量（14 L/min）、罐压（0.05 MPa），于 27.5 ℃发酵培养 120 h。

2.2 检测方法

采用 HPLC 法检测 **1** 产量。

样品处理：取发酵液 1.5 mL，加至 5 倍体积甲醇中，超声破碎 1 h，离心（13 000×*g*）10 min，取上清液，待用。

色谱条件：色谱柱 Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.05% 磷酸水溶液和乙腈（体积比 20 ∶ 80），等度洗脱；检测波长 210 nm；流速 1 mL/min；柱温 60 ℃；进样量 20 μL。

标准曲线：配制质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的 **1** 对照品溶液，按上述色谱条件进样检测。以峰面积（*A*）为纵坐标、**1** 质量浓度（*c*）为横坐标绘制标准曲线，所得回归方程为 $A=0.171\ 9c+10.5$（$R^2=1.000\ 0$）。方法学考察结果表明，本法精密度及准确度良好，**1** 对照品溶液在 72 h 内稳定性良好，可满足样品的测定要求。

将待测发酵液置于有刻度的 EP 管内，体积记为 *V*，离心（13 000×*g*）10 min 后，测量上清液体积，记为 V_1，按式①计算 **1** 菌体生物量（packed mycelium volume，PMV）。

$$PMV=(V-V_1)/V\times100\% \quad ①$$

总糖及还原糖检测采用斐林试剂滴定法[7]；氨基氮检测采用甲醛滴定法[8]；pH 值及溶氧采用电极法在线检测。

2.3 单因素试验

2.3.1 碳源种类对 1 产量的影响

在基础发酵培养基中，葡萄糖为唯一碳源，添加量为 60 g/L。为探究碳源种类对发酵的影响，

将葡萄糖减为 20 g/L，再分别加入 40 g/L 的淀粉、玉米粉、麦芽糊精、面粉、蔗糖、乳糖，其他条件同“**2.1**”项，发酵培养 120 h 后放瓶检测 **1** 产量。结果（图 1）显示，与基础发酵培养基（对照）相比，麦芽糊精作为替代碳源更有利于 **1** 产量的提高，因此选择葡萄糖和麦芽糊精作为 **1** 发酵培养基的复合碳源。

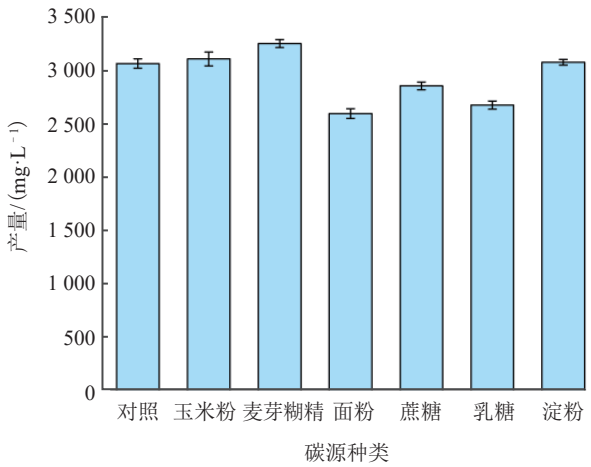


图 1　碳源种类对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.1　Effect of Carbon Source Type on the Yield of **1** (*n*=3)

2.3.2　碳源添加量对 **1** 产量的影响

以葡萄糖和麦芽糊精为复合碳源，保持葡萄糖和麦芽糊精用量比为 1 ∶ 2，将碳源总添加量调整至 50 ～ 100 g/L，其他条件同“**2.1**”项，以 **1** 产量作为评价指标，确定碳源添加量的适宜范围。结果如图 2 所示，**1** 产量随着碳源添加量的增加呈现先上升后下降的趋势，当碳源添加量为 90 g/L 时，**1** 产量较高。由此选取碳源添加量为 80、90、100 g/L 进行后续响应面试验。

2.3.3　有机氮源种类对 **1** 产量的影响

在基础发酵培养基中，酪蛋白为唯一的有机氮源，添加量为 30 g/L。将酪蛋白用量减为 20 g/L，另分别加入 10 g/L 的冷豆粉、棉籽粉、酵母浸膏 LM801、鱼粉、花生粉、蛋白胨 FP318 和 FP320，其他条件同“**2.1**”项，发酵培养 120 h 后放瓶检测 **1** 产量。结果（图 3）显示，冷豆粉、棉籽粉、鱼粉、

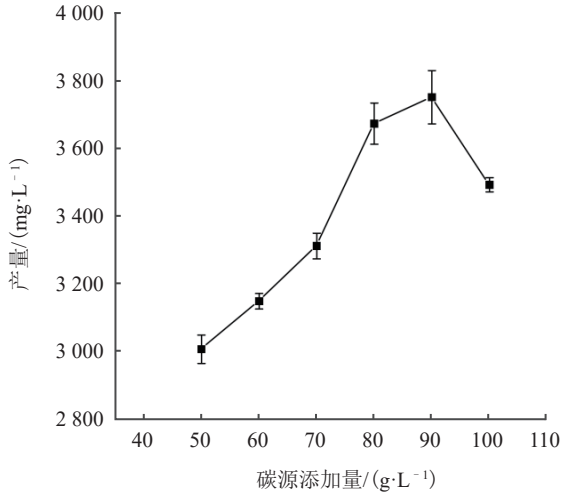


图 2　碳源添加量对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.2　Effect of Carbon Source Amount on the Yield of **1** (*n*=3)

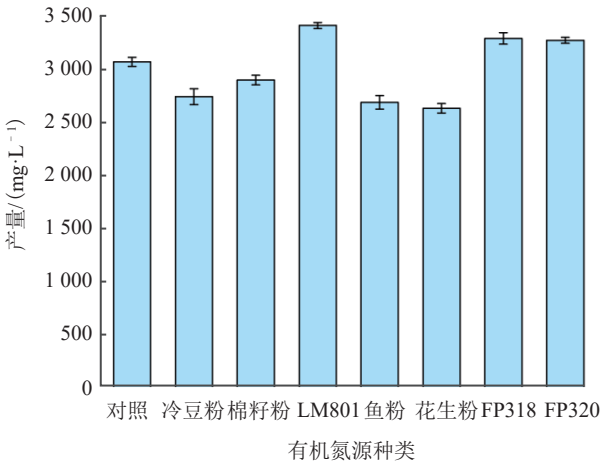


图 3　有机氮源种类对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.3　Effect of Organic Nitrogen Source Type on the Yield of **1** (*n*=3)

花生粉对 **1** 的发酵均有一定抑制作用，而酵母浸膏 LM801、蛋白胨 FP318 和 FP320 能促进 **1** 的合成。其中，酵母浸膏 LM801 的替代效果较好，因此选择酪蛋白和酵母浸膏 LM801 作为 **1** 发酵培养基的复合有机氮源。

2.3.4　有机氮源添加量对 **1** 产量的影响

以质量比为 2 ∶ 1 的酪蛋白和酵母浸膏 LM801 作为复合有机氮源，将有机氮源总添加量分别调整

至 20 ～ 40 g/L，其他条件同“**2.1**”项，以 **1** 产量作为评价指标，确定有机氮源添加量的适宜范围。结果如图 4 所示，**1** 产量随着有机氮源添加量的增加呈现先升后降的趋势，当有机氮源添加量为 25 g/L 时，**1** 产量较高。由此选取有机氮源添加量为 20、25、30 g/L 进行后续响应面试验。

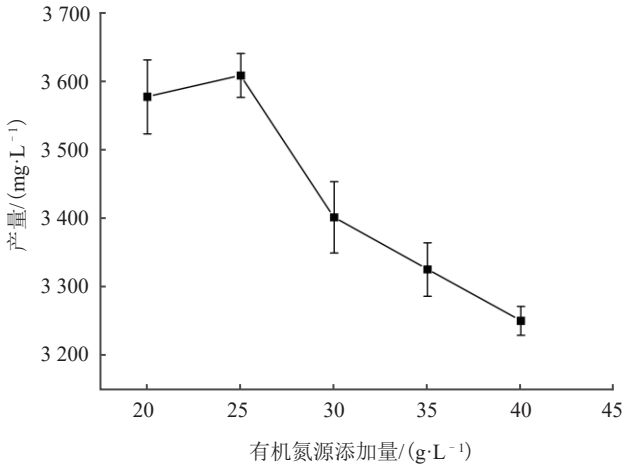


图 4 有机氮源添加量对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.4 Effect of Organic Nitrogen Source Amount on the Yield of **1** (*n*=3)

2.3.5 氨基酸种类对 **1** 产量的影响

将基础发酵培养基中的 L- 缬氨酸分别用等量的 L- 亮氨酸、L- 甘氨酸、L- 精氨酸、DL- 丙氨酸、L- 谷氨酸代替，其他条件同“**2.1**”项，发酵培养 120 h 后放瓶检测 **1** 产量。结果如图 5 所示，相比其他氨基酸组，采用 L- 缬氨酸的基础发酵培养基更利于 **1** 的发酵生产，因此仍选择 L- 缬氨酸作为发酵培养基的氨基酸。

2.3.6 L- 缬氨酸添加量对 **1** 产量的影响

设置 L- 缬氨酸添加量为 3 ～ 12 g/L，其他条件同“**2.1**”项，以 **1** 产量作为评价指标，确定 L- 缬氨酸添加量的适宜范围。结果如图 6 所示，当 L- 缬氨酸添加量为 3 ～ 9 g/L 时，**1** 产量随着 L- 缬氨酸添加量的增加而逐渐上升；之后，随着 L- 缬氨酸添加量的升高，**1** 产量下降。由此选取 L- 缬氨酸添加量为 6、9、12 g/L 进行后续响应面试验。

2.4 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化

2.4.1 试验方案与结果

根据“**2.3**”项下结果，选取复合碳源添加量（*A*）、

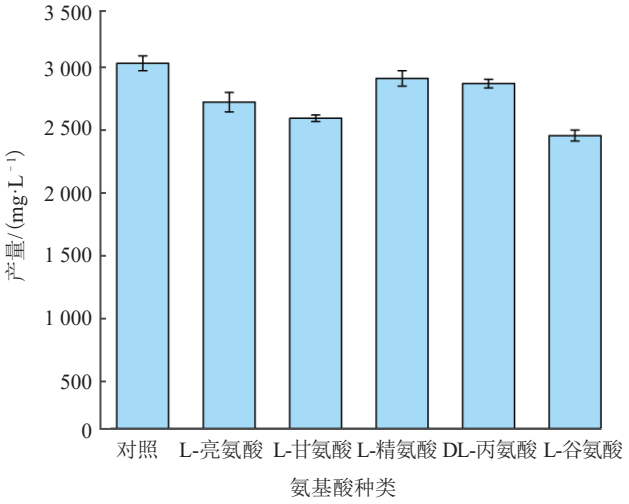


图 5 氨基酸种类对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.5 Effect of Amino Acid Type on the Yield of **1** (*n*=3)

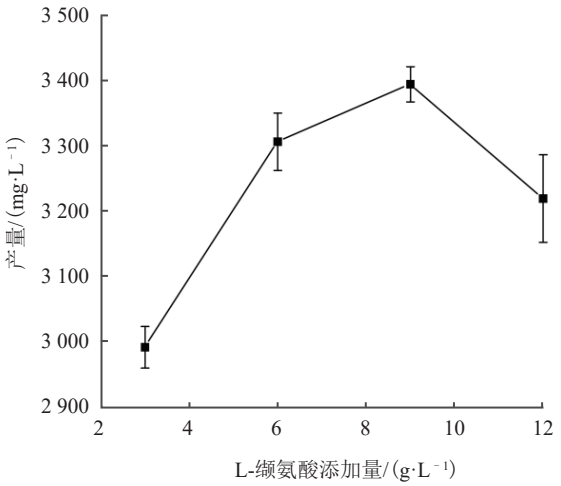


图 6 L- 缬氨酸添加量对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.6 Effect of L-Valine Amount on the Yield of **1** (*n*=3)

有机氮源添加量（*B*）、L- 缬氨酸添加量（*C*）为影响因素，各因素水平如表 1 所示。以 **1** 产量（*Y*）为响应值，进行三因素三水平试验，使用 Design Expert V8.0 软件对试验数据进行处理，从而获得发酵培养基的优化配方。试验方案与结果如表 2 所示。

2.4.2 拟合模型的建立及方差分析结果

使用 Design Expert V8.0 软件对数据进行统计分析，得到的复合碳源添加量、有机氮源添加量和 L- 缬氨酸添加量对 **1** 产量的拟合方程为：Y= 4 221.6+149.13A+40.25B – 49.13C – 34.75AB – 150AC –

表 1　Box-Behnken 设计的因素与水平

Tab.1　Factors and Levels of Box-Behnken Design

水平	因素		
	A/(g·L^{-1})	*B*/(g·L^{-1})	*C*/(g·L^{-1})
－1	80	20	6
0	90	25	9
1	100	30	12

表 2　Box-Behnken 设计的试验方案与结果

Tab.2　Experimental Scheme and Results of Box-Behnken Design

编号	*A*/(g·L^{-1})	*B*/(g·L^{-1})	*C*/(g·L^{-1})	**1** 产量 /(mg·L^{-1})
1	0	0	0	4 284
2	0	1	1	3 832
3	－1	－1	0	3 531
4	1	1	0	3 913
5	0	0	0	4 200
6	0	－1	1	3 947
7	0	0	0	4 172
8	0	1	－1	4 095
9	－1	0	－1	3 552
10	1	－1	0	3 858
11	0	0	0	4 254
12	－1	1	0	3 725
13	1	0	－1	4 191
14	－1	0	1	3 767
15	0	－1	－1	3 907
16	1	0	1	3 806
17	0	0	0	4 198

$75.75BC－290.55A^2－174.3B^2－102.05C^2$。对该方程进行方差分析。结果显示，该模型 $P<0.000\ 1$，说明模型拟合精度高，可用于后续工艺优化；失拟项 $P \geqslant 0.05$，确定系数 $R^2=0.982\ 6$，$R^2_{Adj}=0.960\ 3$，说明模型精确，回归效果显著。该模型的一次项 *A*，交互项 *AC*，二次项 A^2、B^2、C^2 对 **1** 产量有极显著影响（$P<0.01$）；一次项 *B*、*C*，交互项 *BC* 有显著影响（$P<0.05$）；交互项 *AB* 的影响不显著（$P>0.05$）。此外，根据 *F* 值可知，3 个因素对 **1** 产量的影响顺序为：碳源添加量（*A*）≥ L- 缬氨酸添加量（*C*）≥有机氮源添加量（*B*）。

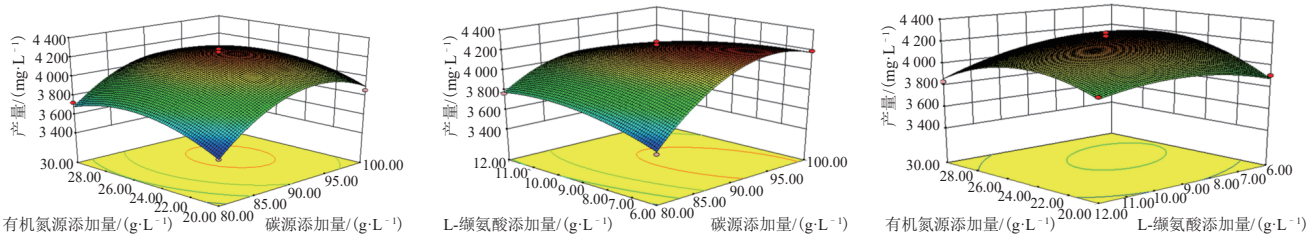
2.4.3　响应面分析

对拟合模型中复合碳源添加量、有机氮源添加量及 L- 缬氨酸添加量间的交互项作响应面图及等高线图，可见各因素间交互项的三维立体响应面图均为凸曲面，响应值随各因素值的增长均呈现先上升后下降的趋势。如图 7 所示，交互项 *AC*、*BC* 对应的响应曲面陡峭，等高线密集，且等高线呈椭圆形，显示交互项 *AC*、*BC* 对 **1** 产量的影响显著；交互项 *AB* 对应的等高线近似圆形，显示交互项 *AB* 对 **1** 产量的影响不显著。综上所述，响应面法分析结果与模型方差分析结果相一致。

2.4.4　模型验证

利用上述拟合模型对 **1** 发酵培养基进行优化，所得优化配方为：碳源 94 g/L（其中葡萄糖 31.3 g/L，麦芽糊精 62.7 g/L），有机氮源 26 g/L（其中酪蛋白 17.3 g/L、酵母浸膏 LM801 8.7 g/L），L- 缬氨酸 7.15 g/L，$NaNO_3$ 1.5 g/L，KCl 0.5 g/L，$MgSO_4$ 0.05 g/L，$CaCO_3$ 3 g/L，豆油 2 g/L，烟酰胺 0.08 g/L。

在此配方下，**1** 产量的预测值为 4 270.91 mg/L。采用上述优化配方进行 3 次平行试验，验证结果显示 **1** 平均产量为 4 283 mg/L，与预测值的相对误差



A　　B　　C

A—因素 *A* 和 *B* 对 **1** 产量的影响；B—因素 *A* 和 *C* 对 **1** 产量的影响；C—因素 *B* 和 *C* 对 **1** 产量的影响。

图 7　各因素交互作用的响应面图

Fig.7　Response Surface Diagrams of Interactions of Factors

为 3.26%，较优化前（3 042 mg/L）提高了 40.8%。

2.5 25 L 发酵罐规模的验证及补料工艺优化

2.5.1 25 L 发酵罐产量验证

根据“**2.4.4**”项下结果，对优化后的培养基配方进行 25 L 发酵罐产量验证，并考察 **1** 发酵过程中各参数的变化趋势。结果如图 8 所示，在发酵前期，菌体生长较慢，起始产量较低，可能是由于培养基中初始碳源的浓度高，而过高的糖浓度对菌体生长和 **1** 合成都有一定的阻遏效应；且发酵期间糖、氮水平波动较大，溶氧水平较低，整体产量增长缓慢，**1** 产量在发酵末期达到最大值 4 508 mg/L。

2.5.2 分批补糖对 **1** 产量的影响

为进一步提高 **1** 产量，采取分批补糖的培养方法，以避免高碳源浓度导致的阻遏效应。

稀碳培养基配方 /(g·L^{-1})：葡萄糖 10，麦芽糊精 20，酪蛋白 17.3、酵母浸膏 LM801 8.7，L- 缬氨酸 7.15，$NaNO_3$ 1.5，KCl 0.5，$MgSO_4$ 0.05，$CaCO_3$ 3，豆油 2，烟酰胺 0.08。

50% 混合糖溶液配方 /(g·L^{-1})：葡萄糖 166.67，麦芽糊精 333.33。

采用稀碳培养基配方进行 25 L 发酵罐培养，待发酵液中总糖降至 1.0%后，每 12 h 补充 1 次 50%混合糖溶液，每次 240 mL，其他条件同“**2.1**”项。结果如图 9 所示，**1** 在稀碳培养基中的起始产量较原始发酵工艺更高，且整个发酵过程中的糖、氮及溶氧等参数的波动幅度较小，有效促进了菌体的生长及 **1** 的生物合成。在此工艺下，**1** 产量达到了 4 925 mg/L，较无补料发酵方式提高了 9.26%。

2.5.3 流加补糖对 **1** 产量的影响

采用稀碳培养基配方进行 25 L 发酵罐培养，待发酵液中总糖降至 1.0%后，流加 50%混合糖溶液，流加速度维持在 15 ～ 25 g/h，使发酵液中总糖含量维持在 1.0%左右，其他条件同“**2.1**”项，考察流加补糖对 **1** 产量的影响。结果如图 10 所示，在其他发酵条件不变的情况下，流加补糖工艺的起始产量与分批补糖相差不大，但流加补糖的方式能显著提高发酵过程的溶氧水平，糖、氮等其他发酵参数也能维持在合适的水平。流加补糖的方式能更大程度地促进 **1** 的生物合成，产量达到 5 247 mg/L，较无补料发酵方式提高了 16.39%。

3 讨论

目前，发酵生产 **1** 大多选择雪白白僵菌和茄病镰刀菌。国内研究[9]利用雪白白僵菌进行 200 L 发酵生产时 **1** 的产量最高可达到 15.414 mg/mL。而茄病镰刀菌的产量普遍较低，约为 3 000 mg/L[6]。但雪白白僵菌发酵周期较长（10 ～ 15 d），茄病镰刀菌

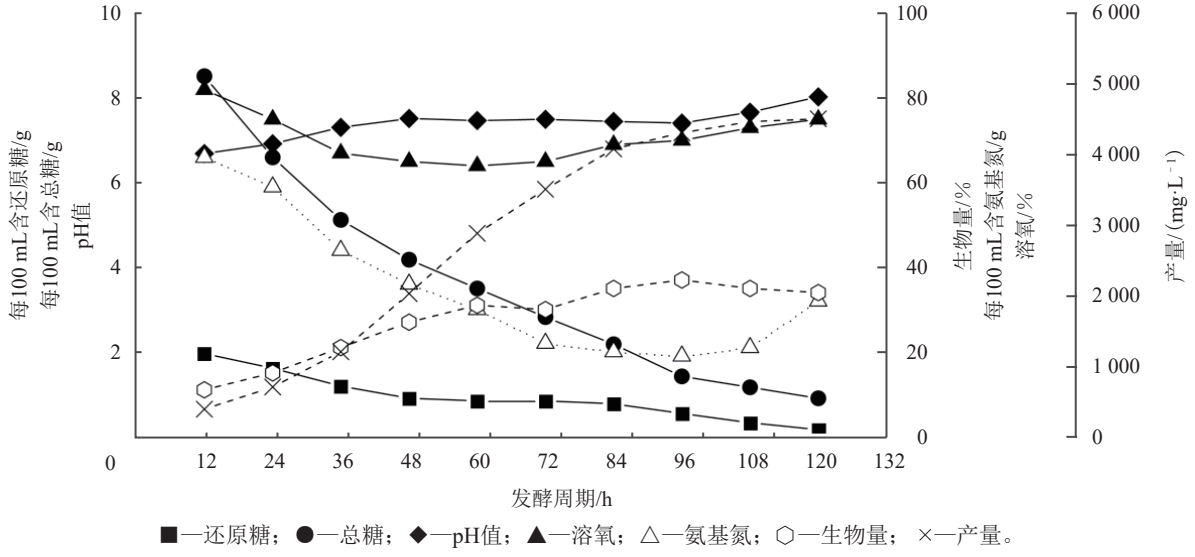


图 8 1 发酵过程中各参数的变化曲线

Fig.8 The Change Curves of Various Parameters during the Fermentation Process of **1**

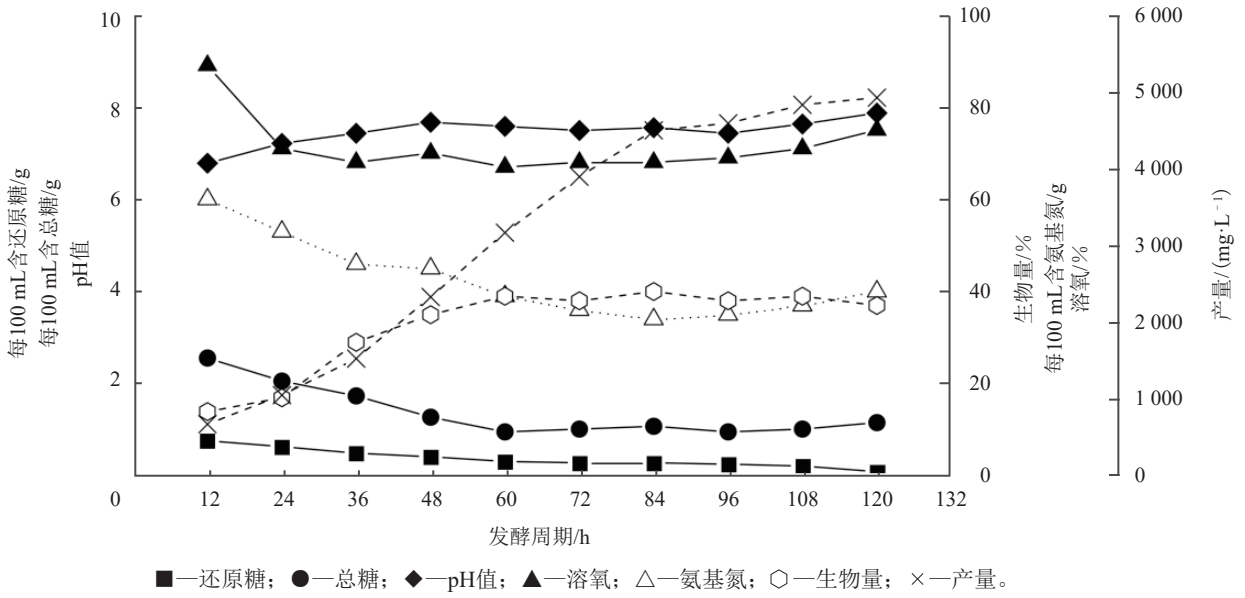


图 9　分批补糖对 1 产量的影响

Fig.9　Effect of Carbon Batch Feeding on the Yield of **1**

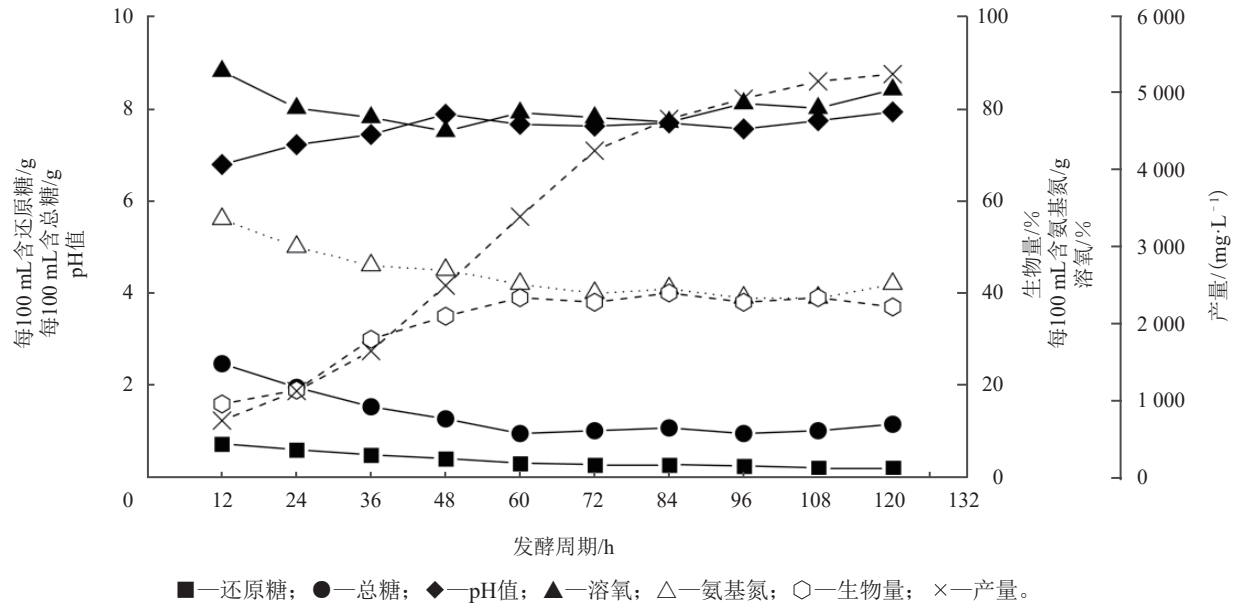


图 10　流加补糖对 1 产量的影响

Fig.10　Effect of Carbon Fluid-feeding on the Yield of **1**

则生长快、发酵周期短 (5 ～ 7 d)，可大幅降低工业规模生产的时间成本。若能提高茄病镰刀菌生产 **1** 的产量，这类菌株作为 **1** 的研究和生产菌将具有进一步开发的价值。本研究选取产 **1** 发酵培养基中的碳源、有机氮源、氨基酸作为影响 **1** 产量的因素进行研究。在单因素试验中对影响因素的种类进行部分或完全替代，避免了单一营养成分对 **1** 发酵产生的抑制作用，并对影响因素的适宜范围进行考察。

随后在单因素试验所得结果的基础上，以 **1** 产量为响应值设计三因素三水平试验，同时建立回归模型并进行方差分析，最终得到 **1** 发酵培养基的优化配方，使 **1** 摇瓶产量达到 4 283 mg/L。最后，以优化后的发酵培养基为基础，在 25 L 发酵罐中进行产量验证，并考察了不同补料工艺对 **1** 产量的影响。结果表明，选取稀碳培养基结合流加补料的方式，能有效缓解发酵前期因碳源浓度过高而引起的阻遏效应，进一步提高茄病镰刀菌生产 **1** 的水平，使 **1** 产量达到 5 247 mg/L，对规模化生产 **1** 具有一定的参考价值。

参考文献：

[1] ZOCHER R, MADRY N, PEETER H, *et al*. Biosynthesis of cyclosporin A [J]. *Phytochemistry*, 1984, **23**: 549-551.

[2] LIDDICOAT A M, LAVELLE E C. Modulation of innate immunity by cyclosporine A [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, **163**: 472-480.

[3] LAWEN A, ZOCHER R. Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described [J]. *J Biol Chem*, 1990, **256**(19): 11355-11360.

[4] 刘 阳, 肖庚富. 环孢菌素 A 的研究进展及应用 [J]. 生物技术通报, 2006, (2): 21-24.

[5] SURVASE S A, KAGLIWAL L D, ANNAPURE U S, *et al*. Cyclosporin A--a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, **29**(4): 418-435.

[6] 吴 晖. 环孢菌素 A 菌株选育及生产工艺研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2004.

[7] 易晓虹. 有机分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 189-198.

[8] 浙江省卫生厅. 浙江省药品标准 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1983.

[9] 刘 雨, 王会会, 赵建辉, 等. 雪白白僵菌高产环孢菌素 A 发酵条件优化 [J]. 发酵科技通讯, 2021, **50**(4): 198-201.

