

外源添加物对泰万菌素发酵的影响

朱涛 郭佳 (宁夏泰益欣生物科技有限公司, 宁夏 银川 750205)

摘要: 为提升泰万菌素发酵组分的含量, 本文对泰万菌素生物合成途径中的一些组成物质进行研究, 考察泰万菌素合成过程中具有积极影响的小分子物质, 主要包括醋酸丁酯和异戊酸异戊酯。本研究主要对外源添加物的种类, 添加比例, 添加时间和添加浓度进行探究。结果显示: 异戊酸异戊酯和醋酸丁酯均可以促进泰万菌素的合成; 添加比例均为发酵液总体积的 0.75%; 添加浓度为 0.8mmol/L; 异戊酸异戊酯的添加时间为 56h, 醋酸丁酯的添加时间为 84h。与原工艺相比, 此方法对泰万菌素组分优化具有重要作用。

关键词: 泰万菌素; 外源添加; 发酵

Abstract: In order to improve the content of fermentation components of Tavancin, this paper studied some components in the biosynthesis pathway of Tavancin, and investigated the small molecular substances with positive effects in the synthesis process of Tavancin, mainly including butyl acetate and isoamyl isovalerate. This study mainly explores the types, proportion, time and concentration of external additives. The results showed that both isoamyl isovalerate and butyl acetate could promote the synthesis of Tavancin; The addition ratio was 0.75% of the total volume of fermentation broth; The addition concentration is 0.8mmol/l; The addition time of Isoamyl isovalerate and butyl acetate was 56 h and 84 h respectively. Compared with the original process, this method plays an important role in the optimization of Tavancin components.

Key words: Tavancin; Exogenous addition; Fermentation

泰万菌素是泰乐菌素的衍生物, 化学名为 3-O-乙酰 4"-O-异戊酰泰乐菌素。其化学结构如图 1。

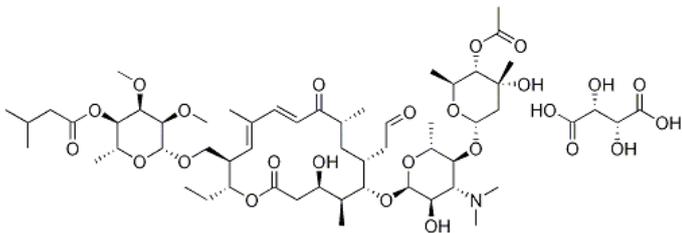


图 1 泰万菌素的化学结构

泰万菌素的生物转化是通过耐热链霉菌的作用将泰乐菌素的 3-OH 和 4"-OH 位置进行选择性的酰化修饰而得到。在泰万菌素的发酵过程中, 需要流加泰乐菌素和不同的酰基供体。

泰万菌素在耐热链霉菌中的生物转化过程如图 2。



图 2 泰万菌素的生物转化过程

泰万菌素的生物合成过程有两个反应, 这两个反应是同时进行的, 其中一个反应是泰乐菌素在耐热链霉菌细胞内的乙酰化酶基因 (AcyA) 的催化下, 以乙酰辅酶 A 为诱导物, 首先合成乙酰泰乐菌素, 乙酰泰乐菌素在异戊酰化酶 (AcyB) 的催化下, 以异戊酰辅酶 A 为诱导物, 转化生成泰万菌素。另一个反应是泰乐菌素在耐热

链霉菌细胞内的异戊酰化酶 (AcyB) 的催化下, 以异戊酰辅酶 A 为诱导物, 首先合成异戊酰泰乐菌素, 异戊酰泰乐菌素在乙酰化酶基因 (AcyA) 的催化下, 以乙酰辅酶 A 为诱导物, 转化生成泰万菌素。

泰万菌素不仅被称为乙酰异戊酰泰乐菌素, 同时, 也被称为超级泰乐菌素, 是一种大环内酯类抗生素, 最初是由英国伊科动物保健品有限公司发现的。近年来, 我国养殖业、畜牧业在世界上占据重要地位, 但畜禽类动物易感染细菌引发动物疾病, 且死亡率极高。而泰万菌素作为泰乐菌素的衍生物, 对细菌具有较好的抑制作用。因此, 对泰万菌素的生物合成工艺进行研究, 其生物合成途径是以泰乐菌素酒石酸盐为原料经耐热链霉菌发酵转化, 首先有醋酸丁酯参与反应合成 2'-O-乙酰基泰乐菌素、2', 4'''-O-二乙酰基泰乐菌素、2', 4'', 4'''-O-三乙酰基泰乐菌素, 再由异戊酸异戊酯参与反应合成 2', 4'''-O-二乙酰基-4''-O-异戊酰基泰乐菌素、3, 2', 4'''-O-三乙酰基-4''-O-异戊酰基泰乐菌素, 最终获得了 3-O-乙酰基-4''-O-异戊酰基泰乐菌素 (泰万菌素)。本研究主要通过外源添加前体物质, 从而改变其生物合成过程中前体物质浓度, 促进反应向合成乙酰异戊酰泰乐菌素的方向发展, 结合外源添加过程中生物条件的控制优化达到提升泰万菌素纯度的目的。优化后工艺与原工艺相比, 操作简单, 少量的外源添加物质可以有效提升产品纯度质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

YP4002 电子天平 (上海越平科学仪器有限公司); Agilent 1200 液相色谱仪; HK-3C 型酸度计 (北京海富达科技有限公司); Draqon 移液器; UV-2450 紫外仪。

1.2 试剂

棉籽饼粉、玉米蛋白粉、玉米浆购自宁夏伊品生物科技有限公司；

豆饼粉、玉米淀粉为宁夏泰益欣生物科技有限公司自产；

轻质碳酸钙、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二铵、硫酸镍、氯化钴硫酸铵、碳酸钙、氯化钴均为化学纯，购自天津市凯通化学试剂有限公司；

醋酸丁酯和异戊酸异戊酯为分析纯。

2 材料与方法

2.1 材料

泰万菌素菌种由泰益欣生物科技有限公司提供。

2.2 方法

采用单因素分析方法探究各因素对泰万菌素放罐十亿和含量的影响，并建立了 HPLC 法测定泰万菌素含量。色谱条件：Puresil 5 C₁₈ 柱（150*4.6mmID），流动相为 0.025M 磷酸缓冲液 - 乙腈梯度系统（pH=2.5），检测波长为 287nm；流速 1.0mL/min，波长为 280nm。

3 结果与分析

3.1 添加物的种类

乙酰异戊酰泰乐菌素的生物合成主要是通过将发酵培养基中的原材料物质进行分解后获得生物合成的前体物质，再通过微生物体内的各类反应，合成所需要的目标产物，但在此过程中会造成前体物质的供应不足，限制了生物合成过程的推进，导致耐热链霉菌的生产能力没有完全发挥，乙酰泰乐菌素、异戊酰泰乐菌素等中间产物无法顺利转化为乙酰异戊酰泰乐菌素。因此，在发酵前期添加醋酸丁酯和异戊酸异戊酯等小分子的前体物质，均对耐热链霉菌的发酵效价及有效成分的含量具有一定的影响。

其结果见表 1：

表 1 不同外源添加物对泰万菌素发酵的影响

序号	名称	放罐十亿	纯度	相比对照
1	异戊酸异戊酯	1617	87.3%	+5.38
2	醋酸丁酯	1653	87.5%	+7.44
3	对照	1540	85.0%	-

由表 1 可知，对照组放罐十亿为 1540 μ，添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯后对乙酰异戊酰泰乐菌素合成具有促进作用，放罐十亿均较对照组高，原因可能为异戊酸异戊酯和醋酸丁酯是乙酰异戊酰泰乐菌素生物合成的前体物质，有助于促进生物合成反应的发生。放罐十亿分别高于对照 5.38% 和 7.44%，因此，外源添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯均有助于乙酰异戊酰泰乐菌素。

3.2 添加比例

以异戊酸异戊酯和醋酸丁酯为外源添加物质，不同的添加浓度对乙酰异戊酰泰乐菌素的合成具有不同的影

响，发酵过程中生物合成所需物质的添加对泰万菌素的生物合成反应具有一定的促进作用，若发酵过程中添加浓度过大，可能导致其生物合成反应向相反的方向进行，可能对泰万菌素的合成有抑制作用，若发酵过程中添加比例偏低，则可能导致泰万菌素的生物合成反应进行不彻底，造成原料的浪费，导致生产成本的投入增加，因此，以发酵液总体积的 0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.25%、1.5% 为添加比例进行试验，培养周期均确定为 84h，考察不同浓度的添加对泰万菌素放罐十亿的影响，以未添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯的发酵罐为对照进行实验。具体试验结果见图 3：

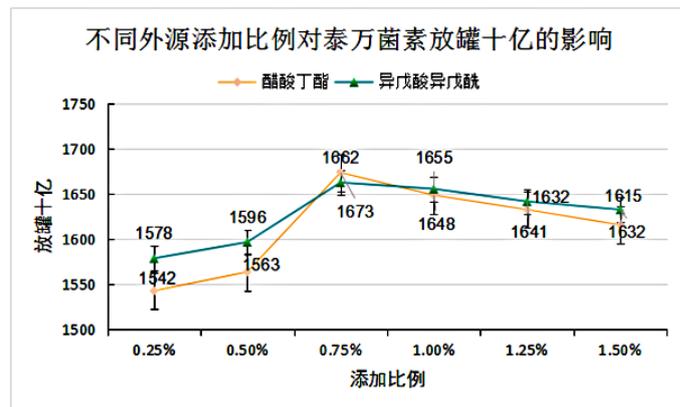


图 3 不同外源添加比例对泰万菌素放罐十亿的影响

由图 3 可知，通过外源添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯，对泰万菌素的放罐十亿均具有一定的影响，整体的变化趋势为随着外源添加比例的增加放罐十亿也在随之增加，当添加比例为 0.75% 时，放罐十亿达到了峰值，分别为 1648 μ 和 1675 μ。随着添加比例的增大，其放罐十亿成下降趋势。

外源异戊酸异戊酯和醋酸丁酯是泰万菌素合成过程中的重要组成部分，将其添加至泰万菌素的发酵培养基中，对泰万菌素的发酵生物合成具有重要的促进作用，且不同的添加浓度可能对泰万菌素的合成具有不同程度的影响作用。此部分实验主要是在已确定添加物的基础上，进一步实验筛选出醋酸丁酯和异戊酸异戊酯的添加比例，为后续实验提供相应的支撑，分别考察不同的添加比例对泰万菌素纯度的影响。实验结果见图 4：

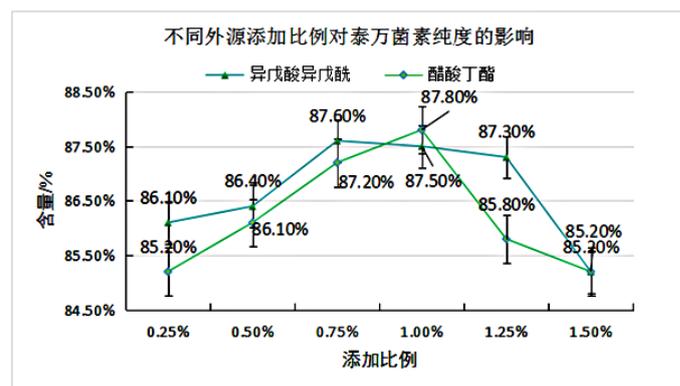


图 4 不同外源添加比例对泰万菌素纯度的影响

由图4可知,外源添加物经不同比例补加时对泰万菌素纯度具有一定的积极影响,随着外源添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯比例的增加,泰万菌素纯度呈现先上升后下降的趋势,但峰值出现的比例不同。外源添加异戊酸异戊酯时,添加比例为0.75%时纯度出现峰值;外源添加醋酸丁酯时,添加比例为1.0%时纯度出现峰值。两种外源添加物峰值出现在不同添加比例条件下,可能是因为乙酰异戊酰泰乐菌素生物合成过程中异戊酸异戊酯和醋酸丁酯参与反应的时间不同造成的。

3.3 添加时间

微生物的发酵是提供给微生物较为适宜的环境,有利于微生物的生长和繁殖,在发酵过程中,培养基中的物质时刻发生着变化,物料及外源物质的添加时间则会影响微生物的生命活动,已确定的外源添加物质异戊酸异戊酯的补加比例为0.75%和醋酸丁酯补加比例为1.0%,将发酵罐进行至0h、24h、56h、84h、96h和120h等6个发酵周期进行验证,考察外源补加物质对乙酰异戊酰泰乐菌素放罐十亿和纯度的影响。

验证结果见表2:

表2 不同周期外源添加对泰万菌素放罐十亿和纯度的影响

序号	周期	异戊酸异戊酯		醋酸丁酯	
		放罐十亿	纯度	放罐十亿	纯度
1	0h	1502	86.1%	1498	86.5%
2	24h	1671	86.7%	1563	86.7%
3	56h	1692	87.8%	1589	86.9%
4	72h	1598	86.8%	1673	87.5%
5	86h	1562	85.8%	1694	87.9%
6	120h	1546	85.3%	1643	86.5%
对照	—	1540	85%	1540	85%

由表2可知,随着添加周期的延长外源添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯后放罐十亿和纯度均呈现出规律性的变化,只能问题添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯的纯度均高于对照,在个别周期添加异戊酸异戊酯和醋酸丁酯的放罐十亿略低于对照,整体的变化趋势为先上升后下降,但出现峰值的时期不同,在56h时外源添加异戊酸异戊酯后,放罐十亿达到了峰值,其放罐十亿为1692 μ ,纯度达到了87.8%;在84h时外源添加醋酸丁酯后,其放罐十亿达到了最大值为1694 μ ,纯度为87.9%。这两种外源添加物质对泰万菌素的生物合成具有一定的影响。

3.4 添加浓度

外源添加物对泰万菌素的生物和成具有影响,但在

添加过程中需配制成一定浓度的溶液进行添加,若添加浓度较小的溶液,则需添加的体积较大,会稀释培养基的浓度,造成菌体在生长过程中营养不足,若前期加入的浓度较大,造成培养基中异戊酸异戊酯和醋酸丁酯在培养基中浓度较大,影响耐热链霉菌的正常生长。以0mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L为试验浓度。考察浓度对放罐十亿和纯度的影响。

具体结果如表3:

表3 不同添加浓度对泰万菌素放罐十亿和纯度的影响

序号	浓度 (mmol/L)	放罐十亿	纯度	相比对照
1	0.2	1563	85.0%	0
2	0.4	1645	85.7%	+1.1
3	0.6	1672	86.1%	+1.2
4	0.8	1698	86.5%	+1.7
5	1.0	1623	85.8%	+0.94
6	0	1540	85%	—

由表3可知,浓度对耐热链霉菌的发酵具有积极影响,除外源添加浓度为0.2mmol/L时,纯度与对照持平,其余浓度下均高于对照组的纯度;在各实验浓度的条件下,放罐十亿均高于对照组。其中当外源添加浓度为0.8mmol/L时,放罐十亿和纯度均达到最大值。

4 结论

通过对泰万菌素发酵工艺进行优化,改善了现有发酵工艺条件下的发酵十亿和泰万菌素含量第的现状,本研究主要是在泰万菌素发酵过程中筛选合适添加工艺对泰万菌素生物合成的影响,其以异戊酸异戊酯和醋酸丁酯为外源添加试剂,添加比例分别为发酵总体积的0.75%和1.0%,添加浓度为0.8mmol/L,异戊酸异戊酯添加周期为56h,醋酸丁酯添加周期为84h。此方法可提升泰万菌素含量5%。

参考文献:

- [1] 袁军. 酒石酸乙酰异戊酰泰乐菌素的合成与表征 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [2] 王金玲, 袁军, 乔中明, 等. 乙酰异戊酰泰乐菌素的合成 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(22): 4614-4616.
- [3] 刘鹏, 曾淑云, 郭佳, 刘研. 泰万菌素发酵液预处理工艺研究 [J]. 科技经济导刊, 2020, 28(29): 90-91.
- [4] 王丽霞, 李生龙, 陈砾桐, 等. 泰乐菌素高效液相色谱检测方法的建立 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(20): 206-209.

作者简介:

朱涛 (1992-), 男, 汉族, 宁夏银川人, 大专, 研究方向: 生物制药, 微生物发酵。