

卑霉素摇瓶发酵工艺研究^{*}

童应凯¹, 靳亮², 杨永涛¹, 韦东胜¹

(1 天津农学院 农学系, 天津 300384;

2 山东农业大学 生命科学院, 山东 泰安 271018)

[摘 要] 根据代谢发酵控制原理, 采用二次回归正交旋转组合设计, 对卑霉素摇瓶发酵培养基组分及其接种量、装量和初始pH 摇瓶发酵条件进行了优化。结果表明, 卑霉素摇瓶发酵培养基的最优配方为: 豆饼粉 45 g/L, 可溶性淀粉 5 g/L, 甘露醇 24 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 硫酸铵 2 g/L, 硫酸镁 0.05 g/L; 最优发酵条件为: 摇瓶装量 100 mL/L, 接种量 8%, CaCO₃ 5 g/L (调节pH 值), 在温度 28℃、发酵周期 40 h 的优化条件下, 得到卑霉素的效价值为 77.12 μg/mL, 较对照 (64.11 μg/mL) 提高了 20.29%。

[关键词] 卑霉素; 摇瓶发酵; 绿色产色链霉菌; 发酵工艺

[中图分类号] TQ 920.6; TQ 465.92

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)10-0032-05

卑霉素 (avilamycin) 又称阿维拉霉素、阿美拉霉素、阿维霉素、肥拉霉素, 是一种新型消化促进剂和代谢调节剂。它是绿色产色链霉菌发酵产生的二氯异扁枝衣酸酯, 属于正糖霉素族的寡糖类抗生素^[1-3]。卑霉素对抑制禽畜肠道内革兰氏阳性菌、促进动物生长效果显著^[4-5], 但目前国内尚无有关卑霉素发酵生产的相关报道。本研究以通过诱变选育的 1 株卑霉素高产菌株——绿色产色链霉菌 TN-29 为材料, 采用二次回归正交旋转组合设计, 对卑霉素发酵培养基组成进行了优化, 并在此基础上对接种量、装量和初始pH 3 个重要的摇瓶发酵条件进行了研究, 以期提高卑霉素产量, 为实现我国饲料工业的高效、优质和低耗生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) TN-29, 由天津农学院生物技术实验室保藏。

1.1.2 培养基 (1) 斜面和平板培养基: 高氏一号培养基 (可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 20 g, 定容 1 L, pH 7.4); (2) 液体种子培养基: 高氏二号培养基 (蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, NaCl 5 g, 定容 1 L, pH 7.2~7.4); (3) 发酵培养基: 甘露醇 30 g, 豆

饼粉 36 g, 可溶性淀粉 6 g, 硫酸铵 6 g, 葡萄糖 5 g, 硫酸镁 0.05 g, CaCO₃ 5 g, 定容 1 L, pH 7.2~7.4。

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养 将 1 环生长良好的试管斜面种子接于装有 50 mL 液体种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 置于旋转式摇床上 (200 r/min) 28℃ 震荡培养 24 h。

1.2.2 发酵培养 取上述种子培养液, 以 5% 接种量接至含有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 置于旋转式摇床上 (200 r/min) 28℃ 震荡培养 40 h。

1.3 测定方法

1.3.1 菌体生长的测定 培养基中不含碳酸钙时, 用蒸馏水稀释 30 倍; 培养基中含碳酸钙时, 用 2 mol/L HCl 溶液稀释 30 倍, 在 620 nm 波长下测定吸光度。

1.3.2 卑霉素生物效价的测定 采用高效液相色谱法测定^[6]。色谱条件为: 填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶; 流动相为乙腈-0.2% 磷酸二氢铵溶液 (V (乙腈) : V (0.2% NH₄H₂PO₄) = 51 : 49, 用磷酸调节 pH 值为 3.0), 检测波长为 214 nm。

标准品溶液中卑霉素 A 和 B 生物效价的计算公式为^[6]:

卑霉素 A 生物效价 / (mg/mL) = 标准品溶液质量浓度 (mg/mL) × 标准品中卑霉素 A 含量 × 卑霉

* [收稿日期] 2006-04-06

[作者简介] 童应凯 (1964-), 男, 青海贵德人, 副教授, 主要从事微生物制药与发酵工程研究。E-mail: yingkaitong@sina.com.cn

素A 的理论生物效价 $(1\,451\,\text{mg/g}) \times 10^{-3}$ 。

卑霉素B 生物效价 $(\text{mg/mL}) = \text{标准品溶液浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{标准品中卑霉素B 含量} \times \text{卑霉素B 的理论生物效价}(908\,\text{mg/g}) \times 10^{-3}$ 。

根据求得的标准品溶液中卑霉素A 和B 的生物效价, 按外标法以峰面积计算出供试样品中卑霉素A 和B 的产量, 两者相加即为供试品中卑霉素的产量。

1.4 发酵培养基优化试验

选用豆饼粉、可溶性淀粉、甘露醇、葡萄糖和硫酸铵为参试因子, 变量设计及编码见表1。发酵培养基中其他组分为 $\text{MgSO}_4 \cdot 0.05\,\text{g/L}$, $\text{CaCO}_3 \cdot 5\,\text{g/L}$ 。试验以随机次序进行, 采用二次回归正交旋转组合设计, 重复3 次。试验数据用DPS 数据处理系统^[7]进行分析。

表1 发酵培养基优化试验的因子水平编码表

Table 1 Factor coding of avilamycin shake-flask fermentation g/L

水平 Level	因素 Factors				
	豆饼粉 Bean cake power X_1	可溶性淀粉 Soluble starch X_2	甘露醇 Mannite X_3	葡萄糖 Glucose X_4	硫酸铵 Ammonium sulfate X_5
- 2	28	5	18	1	2
- 1	32	7	24	3	4
0	36	9	30	5	6
1	40	11	36	7	8
2	44	13	42	9	10
变化间距 Changing space	4	2	6	2	2

注(Notes): $X_1 = (X_1 - 36)/4$, $X_2 = (X_2 - 9)/2$, $X_3 = (X_3 - 30)/6$, $X_4 = (X_4 - 5)/2$, $X_5 = (X_5 - 6)/2$ 。

2 结果与分析

2.1 卑霉素发酵培养基优化试验结果

卑霉素摇瓶发酵培养基优化试验各组合的卑霉素生物效价见表2。经运算求得其二次回归模型为:

$Y = 64.34 + 1.91X_1 - 0.89X_2 + 0.42X_3 - 1.85X_4 - 2.15X_5 - 1.80X_1^2 - 0.61X_2^2 - 4.48X_3^2 - 4.75X_4^2$

$- 0.14X_5^2 - 2.84X_1X_2 - 0.33X_1X_3 - 1.17X_1X_4 - 1.33X_1X_5 + 2.24X_2X_3 + 0.35X_2X_4 + 0.75X_2X_5 - 1.36X_3X_4 + 1.53X_3X_5 - 2.28X_4X_5$ 。对回归模型进行方差分析, $F_1 = 152.108$, 负相关系数 $R = 0.884$, 均达到极显著水平, 表明该二次回归模型与实际情况拟合较好, 模型有效, 可据此进行下一步分析。

表2 卑霉素摇瓶发酵培养基优化试验结构矩阵及生物效价

Table 2 Structural matrix and titer of avilamycin shake-flask fermentation

试验 编号 Number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	生物效价/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Titer	试验 编号 Number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	生物效价/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Titer
1	1	1	1	1	1	46.44	19	0	2	0	0	0	73.25
2	1	1	1	- 1	- 1	56.98	20	0	- 2	0	0	0	52.82
3	1	1	- 1	1	- 1	52.76	21	0	0	2	0	0	46.83
4	1	1	- 1	- 1	1	50.35	22	0	0	- 2	0	0	48.28
5	1	- 1	1	1	- 1	53.35	23	0	0	0	2	0	46.66
6	1	- 1	1	- 1	1	56.70	24	0	0	0	- 2	0	46.33
7	1	- 1	- 1	1	1	44.83	25	0	0	0	0	2	68.48
8	1	- 1	- 1	- 1	- 1	64.63	26	0	0	0	0	- 2	61.39
9	- 1	1	1	1	- 1	55.18	27	0	0	0	0	0	64.62
10	- 1	1	1	- 1	1	64.94	28	0	0	0	0	0	63.78
11	- 1	1	- 1	1	1	48.89	29	0	0	0	0	0	64.35
12	- 1	1	- 1	- 1	- 1	50.07	30	0	0	0	0	0	64.35
13	- 1	- 1	1	1	1	38.35	31	0	0	0	0	0	64.62
14	- 1	- 1	1	- 1	- 1	47.45	32	0	0	0	0	0	63.78
15	- 1	- 1	- 1	1	- 1	54.18	33	0	0	0	0	0	62.85
16	- 1	- 1	- 1	- 1	1	46.62	34	0	0	0	0	0	64.35
17	2	0	0	0	0	51.90	35	0	0	0	0	0	64.62
18	- 2	0	0	0	0	64.66	36	0	0	0	0	0	63.78

以回归模型为基础, 经计算机模拟寻优, 生物效价在 $56.48\,\mu\text{g/mL}$ 以上的培养基组合有 589 套, 对

培养基各因素 $X_i(i=1,2,3,4,5)$ 取值频率分布进行统计分析,其结果见表3。

表3 卑霉素摇瓶发酵培养基配方中 $X_i(i=1,2,3,4,5)$ 取值频率的分布

Table 3 Frenquency distribution of agronom ic measures $X_i(i=1,2,3,4,5)$ for high yield

因子 Factor	频率分布 Frequency distribution					Σ	加权平均数 Weighted average	标准误 Standard error	95%的分布区间 D istribution interval
	- 2	- 1	0	1	2				
X_1	0 074 7 (44)	0 161 3 (95)	0 266 6 (157)	0 285 2 (168)	0 212 2 (125)	1 (589)	0 399	0 049	0 302~ 0 496
X_2	0 271 6 (160)	0 195 3 (115)	0 180 0 (106)	0 163 0 (96)	0 190 2 (112)	1 (589)	- 0 195	0 061	- 0 314~ - 0 076
X_3	0 050 9 (30)	0 242 8 (143)	0 409 2 (241)	0 280 1 (165)	0 017 0 (10)	1 (589)	- 0 031	0 037	- 0 103~ 0 041
X_4	0 018 7 (11)	0 317 5 (187)	0 424 5 (250)	0 225 8 (133)	0 013 6 (8)	1 (589)	- 0 102	0 034	- 0 168~ - 0 036
X_5	0 298 8 (176)	0 239 4 (141)	0 186 8 (110)	0 147 7 (87)	0 127 3 (75)	1 (589)	- 0 435	0 057	- 0 546~ - 0 323

注: 括号内数字表示次数。

Notes: The number in brackets shows number of time

从表3可以看出,生物效价大于56.48 $\mu\text{g/mL}$ 的各成分95%区间的大体分布为:豆饼粉36~44 g/L,可溶性淀粉5~9 g/L,甘露醇24~36 g/L,葡萄糖3~7 g/L,硫酸铵2~6 g/L(根据表1注中公式换算得到)。

经计算机模拟寻优,得到理论最高生物效价为76.63 $\mu\text{g/mL}$,其对应组合为豆饼粉45 g/L,可溶性淀粉5 g/L,甘露醇24 g/L,葡萄糖5 g/L,硫酸铵2 g/L。绿色产色链霉菌TN-29以此培养基连续发酵3次,发酵时间均为40 h,摇瓶发酵液经丙酮萃取后的生物效价分别为72.35、75.37和74.56 $\mu\text{g/mL}$,平均为74.36 $\mu\text{g/mL}$,与表2中的对照培养基64.11 $\mu\text{g/mL}$ 的生物效价相比提高了16%,说明优化结果良

好。

2.2 卑霉素发酵条件的优化

为使高产菌株在最佳发酵培养基中充分表现其高产性能,必须优化菌体的生长以及中、后期产卑霉素所必需的最适条件。

2.2.1 溶氧对卑霉素产量的影响 溶氧是卑霉素发酵过程中最重要的因素。本研究为操作方便,采用固定摇床转速(200 r/min),28 $^{\circ}\text{C}$ 发酵40 h,接种量5%,初始pH 7.2,在500 mL三角瓶中分别装入20,30,40,50,70,90,110 mL发酵培养基,研究装液量分别为40,60,80,100,140,180和220 mL/L时溶氧对卑霉素发酵的影响,其结果如图1所示。

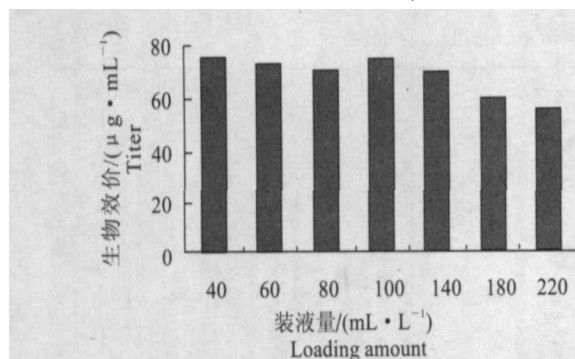


图1 装液量对卑霉素产量的影响

Fig.1 Effect of medium volume on avilamycin fermentation

从图1可以看出,随着发酵液体积的增加,卑霉素效价值略有下降,说明绿色产色链霉菌TN-29发酵过程中对通气量的要求非常严格,高通气量条件更有利于卑霉素产量的提高。因此,为了便于分装和称量,在摇瓶发酵过程中,以500 mL三角瓶中装50 mL的TN-29发酵液为宜。

2.2.2 接种量对卑霉素产量的影响 接种量的大

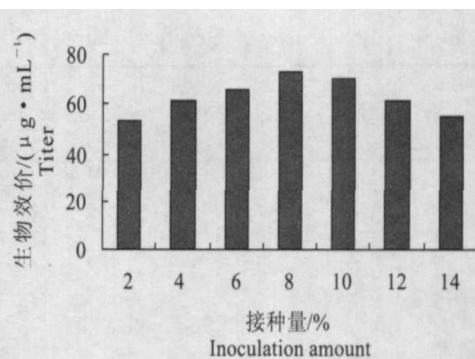


图2 接种量对卑霉素产量的影响

Fig.2 Effect of seed volume on avilamycin fermentation

小对卑霉素发酵影响也较大。接种量过小,菌体生长缓慢,培养时间长,同时会降低菌种活力,不利于卑霉素的高产;接种量过大,菌种生长快速,但易老化,也不利于产卑霉素。选择适宜的接种量,既能合理缩短发酵周期,又能得到较高的卑霉素产量。本研究在摇床转速200 r/min,28 $^{\circ}\text{C}$ 发酵40 h,初始pH 7.2,装液量为100 mL/L液体发酵培养基条件下,研究了

接种量分别为2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%和14%时其对卑霉素产量的影响(图2)。从图2可以看出, 接种量为8%时卑霉素产量最高, 接种量太大或太小均不利于发酵产酸。

2.2.3 pH对卑霉素产量的影响 发酵过程中, 随着菌体对培养基中碳、氮源的利用, 其不断吸收、同化营养物而排出代谢物, 使有机酸和氨基酸不断积累, 导致发酵液的pH值持续变化, 不利于菌体的生产。因此需尽量将发酵过程中的pH值控制在7.0~7.2。在摇床转速为200 r/min, 28℃发酵40 h, 装液量为100 mL/瓶, 接种量为8%的条件下, 以不加碳酸钙为对照, 灭菌前在发酵液中分别加入0, 2.5, 5.0, 7.5和10.0 g/L的碳酸钙, 研究发酵培养基初始pH对卑霉素生物合成的影响, 结果见图3。

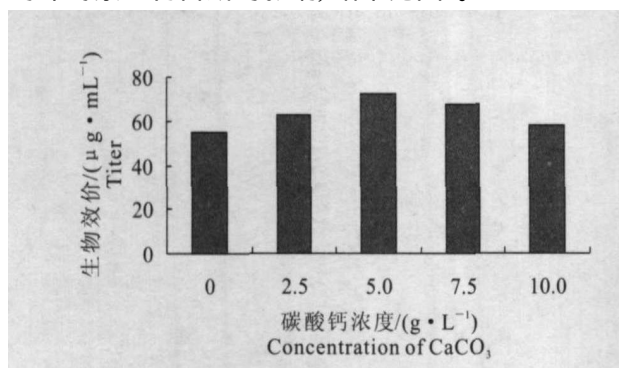


图3 不同碳酸钙含量对卑霉素产量的影响

Fig 3 Effect of CaCO₃ on avilamycin fermentation

从图3可以看出, 发酵培养基中碳酸钙含量为5 g/L时, 卑霉素产量最高。

在最优培养基中, 将TN-29分别在初始发酵条件与优化发酵条件下进行发酵, 比较连续3次发酵的结果可以发现, 初始发酵条件下, TN-29的卑霉素平均生物效价为64.11 μg/mL, 而在最优发酵条件下为77.12 μg/mL, 卑霉素产量较对照增加了20.29%。

3 结论与讨论

本研究确定的卑霉素生产的最优培养基配方为: 豆饼粉45 g/L, 可溶性淀粉5 g/L, 甘露醇24 g/L, 葡萄糖5 g/L, 硫酸铵2 g/L, 硫酸镁0.05 g/L; 最优发酵条件为: 摇瓶装量为100 mL/瓶, 接种量为8%, CaCO₃ 5 g/L (调节pH值)。在此优化条件下, 得到卑霉素的生物效价为77.12 μg/mL。

通过对培养基配方和发酵条件的研究, 卑霉素产生菌TN-29的产量有所提高, 这为下一步发酵罐生产卑霉素提供了重要的参数和依据。尽管菌株TN-29的卑霉素产量较出发菌株有较大提高, 但离卑霉素工业化生产还有一定距离。因此, 卑霉素高产菌株的选育工作还有待进一步深入, 除利用传统方法进行菌种筛选和发酵工艺优化外, 还要加快卑霉素生物合成的分子生物学机制研究, 及卑霉素下游分离提纯方法的完善。

[参考文献]

- [1] Weitnauer G, Mühlenweg A, Trefzer A, et al. Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the avibiosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tu57 and production of new antibiotics[J]. *Chem Biol*, 2001, 8(6): 569-581.
- [2] Nenad Ban, Poul Nissen, Jeffrey Hansen, et al. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution[J]. *Science*, 2000, 289: 905-920.
- [3] 徐积恩. 饲料添加剂卑霉素[J]. *食品饲料添加剂信息*, 1993, 5(3): 22-22.
- [4] 吴正达. 新饲料添加剂卑霉素[J]. *粮食与饲料工业*, 1995(11): 27-30.
- [5] Frank Møller Aarestrup, Anne Mette Seyfarth, Hanne Dorthe Emborg, et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(7): 2054-2059.
- [6] 张秀英. 阿维霉素预混剂的含量测定[J]. *中国兽药杂志*, 2000, 35(3): 21-23.
- [7] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

Studies on the fermentation conditions of Avilamycin

TONG Ying-kai¹, JIN Liang², YANG Yong-tao¹, WEI Dong-sheng¹

(1 Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2 College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract Based on the theory of metabolic control fermentation, the influence of several major components in fermentation medium on the avilamycin fermentation was studied by means of rotation composite design of quadratic regression. Using DPS software package the optimal fermentation medium proportions were obtained. The optimal medium contained 45 g/L of bean cake powder, 24 g/L of mannite, 5 g/L of glucose, 5 g/L of soluble starch, 2 g/L of ammonium sulfate, 0.05 g/L of MgSO₄, 5 g/L of CaCO₃. The optimum fermentation conditions were 100 mL/L loading amount, 8% of inoculation amount, fermentation time 40 hours at 28 °C, by experiments of one factor. The titer was increased by 20.29% from 64.11 μg/mL to 77.12 μg/mL when the strain was cultivated under the optimum conditions as compared with the control.

Key words: Avilamycin; shake-flask fermentation; *Streptomyces viridochromogenes*; fermentation technology

《江西农业大学学报》(社会科学版)2007年征订启事

《江西农业大学学报》是江西农业大学主办的综合性农业学术刊物,双月刊,国内统一刊号为CN 36-1028。主要刊载农学、植保、园艺、林业、畜牧、兽医、生态、生物技术、农业工程及相关学科的学术论文。2001年入选《中国期刊方阵》(双百期刊),2003年荣获第二届全国国家期刊奖百种重点期刊,系全国中文核心期刊、中国科技核心期刊,多次荣获省部级奖励,被国内外20多种权威检索刊物或数据库收录。《江西农业大学学报》为邮局发行,每期定价8.00元,年订价48.00元。

《江西农业大学学报》(社会科学版)是江西省教育厅主管、江西农业大学主办的综合性人文社会科学学术刊物,季刊,国内统一刊号为CN 1671-6523。主要栏目有:农林经济、经济理论与政策、管理科学、社会与法律、思政工作研究、教育理论、语言学等。该刊已被中国人民大学《报刊复印资料》等多种检索刊物或数据库收录。《江西农业大学学报》(社会科学版)为自办发行,每期定价8.00元,年订价32.00元。

地址:南昌市经济技术开发区 邮政编码:330045 电话:0791-3813246;3846191

网址: <http://www.jxau.edu.cn/xuebao/index.asp>

电子信箱:自然科学版Email: ndxb7775@sina.com; 社科版Email: jxndsk@sina.com