

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.1.8

不同氨基酸对泰万菌素发酵影响的研究

刘 杨,张 萍,石彦鹏,牛 春*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司技术中心,银川 750101)

[收稿日期] 2020-07-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 01-0047-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 通过单因素试验考察了泰万菌素发酵培养基中不同氨基酸种类对其发酵过程的影响,并利用正交试验对发酵培养基中 3 种主要氨基酸的用量配比进行了优化,结果表明发酵培养基加入 0.2% 亮氨酸、0.1% 色氨酸、0.1% 甘氨酸对泰万菌素发酵转化率影响显著,发酵摇瓶效价从 14000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高到 18000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,效价提高了 28.5%,完成了对泰万菌素提高发酵转化率和发酵单位的目的,并为大规模商业化生产泰万菌素奠定了良好的基础。

[关键词] 泰万菌素;转化率;正交试验;发酵单位

Effects of Different Amino Acids on the Fermentation of Tyvanectin

LIU Yang, ZHANG Ping, SHI Yan-peng, NIU Chun*

(Ningxia Tere Pharmaceutical Co., LTD. jishuzhongxin, Yinchuan 750101, China)

Corresponding author: NIU Chun, E-mail: chun.niu@tairuiWorld.com

Abstract: The influence of different types of amino acids in the tyvanectin fermentation medium on the fermentation process was investigated through a single factor experiment, and the ratio of the three main amino acids in the fermentation medium was optimized by orthogonal experiment. The results showed that the fermentation The addition of 0.2% leucine, 0.1% tryptophan, and 0.1% glycine to the culture medium has a significant effect on the fermentation conversion rate of tyvanectin. The titer of the fermentation shake flask is increased from 14000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 18000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which increases the titer 28.5%, completed the purpose of improving the fermentation conversion rate and fermentation unit of tyvans, and laid a good foundation for large-scale commercial production of tyvans.

Key words: Tawanthin; conversion; orthogonal test; the fermentation unit

泰万菌素又称乙酰异戊酰泰乐菌素,是由英国伊科动物保健品有限公司研发的新型大环内酯类抗生素。2004 年 9 月 9 日经欧盟批准用于预防和治疗由猪肺炎支原体引起的猪气喘病、由猪痢疾短

螺旋体引起的猪痢疾、由胞内劳森氏菌引起的猪增生性肠炎和由鸡毒支原体引起的鸡支气管感染^[1]; 2012 年 7 月 6 日经由 FDA 批准用于预防由胞内劳森氏菌引起的猪增生性肠炎^[2]。目前国内已批准

作者简介: 刘 杨,助理工程师,从事抗生素生产菌种的制备、保藏和菌种选育工作。

通讯作者: 牛 春。E-mail: chun.niu@tairuiWorld.com

酒石酸泰万菌素预混剂和可溶性粉用于预防和治理猪、鸡支原体感染和猪血痢短螺旋体以及其他敏感细菌感染^[3]。具有低毒、高效、低残留等优点,并不产生大环内酯类抗生素之间的交叉感染,是一类较好的治疗呼吸道和消化道感染的大环内酯类抗生素^[3]。该产品目前尚属国际专利保护期,该专利属于日本美露香公司,2002 年英国依科公司买断。现英国依科公司委托山东鲁抗委托加工。

抗生素发酵单位是标志生产水平的重要指标,研究表明,在泰万菌素发酵培养基中加入氨基酸对发酵转化率和发酵单位都具有显著影响^[3-5]。为此,本研究对泰万菌素发酵培养基中的氨基酸种类进行了研究,获得对其发酵过程影响最大的氨基酸为亮氨酸,赖氨酸和甘氨酸。在此基础上用正交试验设计对氨基酸比例进行了优化,明显提高了泰万菌素的转化率。

1 材料与方法

1.1 菌种 耐热链霉菌 16-926 菌种由本公司实验室保藏。

1.2 原材料 葡萄糖(天津市凯通化学试剂有限公司);玉米浆(华北制药康欣有限公司);胰蛋白酶大豆肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司);可溶性淀粉(国药集团化学试剂有限公司);棉籽饼粉(大荔伟恒生物科技有限公司);玉米蛋白粉(内蒙阜丰生物科技有限公司);聚醚消沫剂(宜新市江山生物科技有限公司);亮氨酸、赖氨酸、色氨酸、甘氨酸(天津市光复精细化工研究所)。

1.3 仪器设备 Waters 600 高效液相色谱仪(美国 Waters);UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津);TDL-5-A 型台式离心机(上海安亭科技有限公司);BSA2202S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);CX₃₁ 型显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社)。

1.4 菌种培养基^[6] 斜面培养基:胰酶豆汤培养

基:胰酶豆汤粉 30 g,蒸馏水 1000 mL。

种子瓶培养基:可溶性淀粉 20 g,大豆粉 20 g,磷酸氢二钾 0.5 g,七水硫酸镁 0.5 g,Yeast extract 1.0 g。

发酵瓶培养基:可溶性淀粉 60 g,大豆粉 20 g,酵母粉 4 g,七水硫酸镁 5 g,棉籽粉 7 g,Yeast extract 1.0 g。

1.5 方法

1.5.1 氨基酸的选择

1.5.1.1 单因素

表 1 发酵培养基中几种氨基酸的单因素水平表

Tab 1 Single factor level table of several amino acids in fermentation medium

组别	因素			
	亮氨酸	赖氨酸	色氨酸	甘氨酸
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1

1.5.1.2 多因素

表 2 发酵培养基中几种氨基酸的组合水平表

Tab 2 Combination level table of several amino acids in fermentation medium

组别	因素			
	亮氨酸	赖氨酸	色氨酸	甘氨酸
1	1	1	0	0
2	1	0	1	0
3	1	0	0	1
4	0	1	1	0
5	0	1	0	1
6	0	0	1	1
7	1	1	1	0
8	1	1	0	1
9	1	0	1	1
10	0	1	1	1

1.5.1.3 氨基酸比例

表 3 发酵培养基中几种氨基酸的不同比例水平表

Tab 3 Different ratio levels of several amino acids

in fermentation medium				
水平	因素			
	亮氨酸	赖氨酸	色氨酸	甘氨酸
1	0	0	0	0
2	0	0.1	0.1	0.1
3	0	0.2	0.2	0.2
4	0.2	0	0.1	0.2
5	0.2	0.1	0.2	0
6	0.2	0.2	0	0.1
7	0.5	0	0.2	0.1
8	0.5	0.1	0	0.2
9	0.5	0.2	0.1	0

1.5.2 发酵瓶的培养 用无菌的不锈钢铲在无菌条件下铲取 1.5 ~ 2 cm² 左右的菌丝体接种于种子瓶, 置温度 29 ℃, 湿度 30 ~ 50%, 转速为 220 r/min 的摇瓶机上振荡培养 48 h, 补入底物继续转速为 220 r/min 的摇瓶机上振荡培养 144 h 发酵培养。

1.5.3 发酵瓶 T₂i₅ 含量测定方法 称取发酵液 1 mL 溶于无水甲醇溶液 5 mL, 超声振荡器振荡 2 ~ 3 min, 充分混匀后用 0.22 μm 有机滤膜过滤后备用。高效液相色谱条件 Agilent Extend - C 18 色谱柱, 柱温: 40 ℃。流动相: A 相为 0.1% 甲醇水溶液, B 相为乙腈; 流速为 0.4 mL/min。进样体积为 5 μL^[7]。

1.5.4 核酸检测方法 称取发酵液 2 mL 于 10 mL 离心管中高速离心机离心, 弃去上清液, 加入 10% 三氯乙酸溶液旋涡振荡 1 ~ 2 min, 高速离心机离心, 弃去上清液, 加入 5% 三氯乙酸溶液旋涡振荡 1 ~ 2 min, 沸水浴 30 min, 冷却后高速离心机离心, 取上清液加入纯化水中充分混摇, 紫外分光光度计 290 nm 处比色。

2 结果与分析

2.1 不同氨基酸(单因素)对发酵过程的影响

由图 1 可知, 发酵培养基中补入亮氨酸或甘氨酸 PH 值在工艺范围之内, 赖氨酸与色氨酸的 PH

值或高于工艺范围、或低于工艺范围。

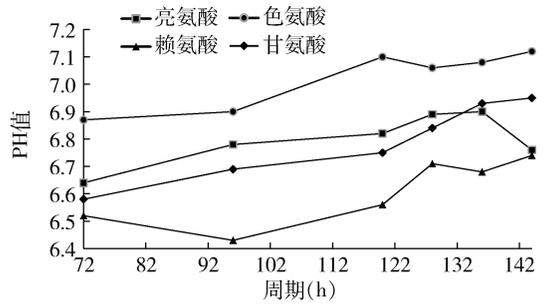


图 1 不同氨基酸(单因素)对发酵培养基中 PH 值的影响

Fig 1 The influence of different amino acids (single factor) on the PH value of fermentation medium

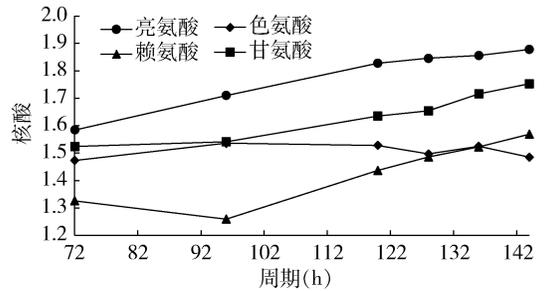


图 2 不同氨基酸(单因素)对发酵培养基中核酸的影响

Fig 2 The influence of different amino acids (single factor) on nucleic acid in fermentation medium

由图 2 可知, 发酵培养基中补入亮氨酸或甘氨酸核酸含量明显大于赖氨酸与色氨酸。

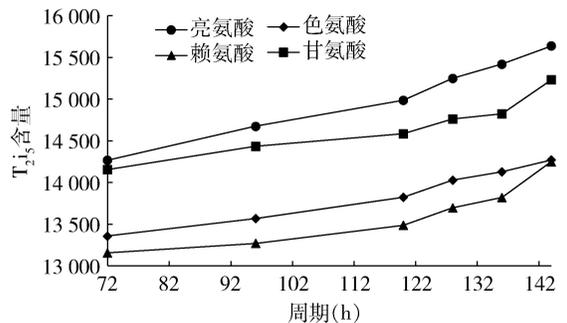


图 3 不同氨基酸(单因素)对发酵过程中 T₂i₅ 含量的影响

Fig 3 The influence of different amino acids (single factor) on T₂i₅ content during fermentation

由图 3 可知, 发酵培养基中补入亮氨酸或甘氨酸 T₂i₅ 含量明显大于赖氨酸与色氨酸。

2.2 不同氨基酸(多因素)对发酵过程的影响

表 4 不同氨基酸(多因素)对发酵过程中的影响

Tab 4 The influence of different amino acids (multiple factors) on the fermentation process

组别	因素			
	PH 值	菌浓	核酸	T ₂ i ₅ 含量
1	6.52	34	1.356	13268
2	6.82	41	1.638	14295
3	6.76	36	1.597	13886
4	6.60	33	1.469	13549
5	6.56	35	1.421	13683
6	6.85	43	1.632	16359
7	6.78	39	1.614	16255
8	6.77	42	1.599	15997
9	6.80	45	1.758	16806
10	6.74	36	1.575	15453

由表 4 可知,发酵培养基中补入亮氨酸、色氨酸和甘氨酸在 PH 值、核酸含量和 T₂i₅ 含量方面明显优于其他组合,对其比例再次进行正交实验。

2.3 氨基酸正交试验设计 对氨基酸作了四因素三水平(L₉3⁴)的正交实验设计其它不变,其试验设计和结果如表 5 ~ 表 6。

表 5 摇瓶发酵正交结果

Tab 5 Orthogonal results of shake flask fermentation

组别	因素				T ₂ i ₅ 含量			
	A	B	C	D	1	2	3	平均
1	0	0	0	0	13249	13561	13449	13420
2	0	0.1	0.1	0.1	13427	13528	13533	13496
3	0	0.2	0.2	0.2	13660	13628	13738	13675
4	0.2	0	0.1	0.2	16802	16932	17207	16980
5	0.2	0.1	0.2	0	16051	15988	15768	15935
6	0.2	0.2	0	0.1	15472	15215	15100	15262
7	0.5	0	0.2	0.1	14779	15104	14661	14848
8	0.5	0.1	0	0.2	14450	14565	14838	14617
9	0.5	0.2	0.1	0	13874	13837	13800	13887
K1	13530	15083	14433	14414	-	-	-	-
K2	16059	14683	14788	14534	-	-	-	-
K3	14451	14275	14819	15091	-	-	-	-
R	2529	808	386	677	-	-	-	-

表 6 正交实验结果方差分析

Tab 6 Analysis of variance of orthogonal experiment results

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	9827904.667	2	3.313	4.460	*
B	979328.000	2	0.330	4.460	
C	276044.667	2	0.093	4.460	
D	780994.667	2	0.263	4.460	
e	11864272.00	8			

注:F(2,2)_{0.05} = 19.000; * 表示该因子为显著因子。

从表 5、表 6 可以看出,4 号实验摇瓶效价最高,平均达到 16980 μ/mL,再通过直观分析和方差分析发现,亮氨酸对摇瓶效价的影响比较大,为主要影响因子。根据结果选 4 号配方和 A_{0.2}B_{0.2}C₀D_{0.1} 配方作进一步验证,同时用原配方作为对照,验证结果如表 7。

表 7 与原配方对比结果

Tab 7 Results of comparison with the original formula

组别	因素				T ₂ i ₅ 含量			
	A	B	C	D	1	2	3	平均
1	0	0	0	0	13672	13538	13721	13643
2	0.2	0	0.1	0.2	16976	17524	17628	17736
3	0.2	0.2	0	0.1	16024	16259	16458	16247

3 结果与讨论

大环内酯类抗生素内酯环的形成需要乙酸、丙酸和丁酸作为前体物质,而这些物质来源于三羧酸循环和氨基酸代谢等途径。主要考察了亮氨酸、赖氨酸、色氨酸和甘氨酸作为泰万菌素生物合成前体物质对发酵培养基的影响。根据实验数据表明亮氨酸、赖氨酸、甘氨酸对泰万菌素发酵的转化率和发酵单位具有显著影响。研究发现,单一加入亮氨酸的发酵培养基 PH 值一直维持在工艺范围之内,核酸含量和 T₂i₅ 含量均为最高;单一加入赖氨酸的发酵培养基 PH 值最低超过工艺范围,核酸含量和 T₂i₅ 含量均为最低;单一加入色氨酸的发酵培养基 PH 值最高超过工艺范围,进而影响核酸含量和

T₂i₅ 含量只高于赖氨酸;单一加入甘氨酸的发酵培养基 PH 值在工艺范围之内,核酸含量和 T₂i₅ 含量均稍低于亮氨酸,而高于色氨酸和赖氨酸。因此说明氨基酸单因素因子中亮氨酸、色氨酸、甘氨酸起显著作用。

由于考虑到不同氨基酸种类之间对发酵培养基的影响,再次对发酵培养基中氨基酸种类进行组合实验发现发酵培养基中同时加入亮氨酸、色氨酸、甘氨酸三种氨基酸的 PH 值、核酸含量和 T₂i₅ 含量最优,同时对亮氨酸、色氨酸、甘氨酸三种氨基酸进行了正交实验优化出其最优比例为亮氨酸 0.2%、色氨酸 0.1%、甘氨酸 0.2%。因此确定亮氨酸、色氨酸、甘氨酸为泰万菌素发酵影响显著因子。在原培养基配方中按照亮氨酸 0.2%、色氨酸 0.1%、甘氨酸 0.2% 比例加入三种氨基酸,使得摇瓶效价从 14000 μ/mL 提高到 18000 μ/mL,效价提高了 28.5%

结果表明亮氨酸、色氨酸、甘氨酸加入到发酵培养基对泰万菌素发酵转化率影响显著。目前世界范围内氨基酸种类具有 36 种,实验只对实验室常见的几种氨基酸进行了试验,不同氨基酸对泰万菌素发酵影响还可以进一步扩大研究范围。

参考文献:

- [1] EM A. Aivlosin Scientific discussion[Z]. 2009. 11.
- [2] FDA FO IAN ADA 141-336 Aivlosin Tyvalosin Tartrate, Water Soluble Granules, Swine[Z]. 2012. 07. 06.
- [3] Veterinary Drug Evaluation Center of the Ministry of Agriculture. Compilation of Veterinary Drug Quality Standards (2006-2011) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012.
- [4] Liu L. Preliminary study on factors affecting the oral bioavailability of Tyvantin tartrate[D]. Nanjing Agricultural University. 2015.
- [5] Research on the breeding and fermentation process of high-yielding tyvancin. Patent [Z]. Ningxia Terui Pharmaceutical Co., Ltd. 2018.
- [6] He Q X. Modification of molecular breeding to improve the ability of thermotolerant Streptomyces to transform tylosin. Master's degree thesis[D]. Huazhong Agricultural University, 20080601.
- [7] Wang Sh Sh. Detection of Tylosin, Tylosin and Tilmicosin Residues in Animal Foods [D]. Huazhong Agricultural University, 2012.
- [8] Production process for improving the conversion rate of tylosin during the fermentation of tylosin. Patent [Z]. Inner Mongolia Zhongmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd. 2017.

(编辑:陈希)