

# 添加氧载体提高泰乐菌素发酵的得率\*

贾士儒

冈部满康

(天津轻工业学院发酵教研室, 天津 300222)

(日本国静冈大学农学部)

**摘要** 通过添加氧载体(如正十二烷、全氟化碳等),提高了发酵系统中的氧传递速度,从而促进了泰乐菌素的生物合成。当加入5%的正十二烷或全氟化碳,泰乐菌素的生成量分别提高14%和8%;在加入正十二烷和全氟化碳的同时,再加入载体 Aid-Plus ML-50D,可使泰乐菌素的生成量分别提高19%和20%。

**关键词** 泰乐菌素,氧载体,氧传递

泰乐菌素(Tylosin)是一种禽、畜专用的大环内酯类抗生素。它不仅对鸡的败血症、猪的流行性肺炎和赤痢等疾病有独特的疗效,而且对畜、禽的生长有明显的促进作用。泰乐菌素发酵是以油脂类作碳源<sup>[1]</sup>,因此要供给更多的氧,以满足其代谢所需。另外,发酵液中固形物含量高,粘度大,致使发酵系统的溶氧速率较低,虽然提高搅拌转速能有效地提高溶氧速率,但由于高搅拌转速形成的高剪切力,使菌体受损,导致泰乐菌素的生成量减小,而单纯加大通风,效果欠佳。为此,有必要探讨新的强化供氧途径。

氧载体是一种与水不互溶,对微生物无毒,具有较高溶解氧能力的有机体。液态烷烃、正十二烷、全氟化碳等均可作为氧载体<sup>[2~4]</sup>。发酵系统中加入氧载体,可提高该系统的供氧能力。添加氧载体可提高青霉素生成能力<sup>[2]</sup>,酵母培养中加入烷烃类可提高酵母得率30%<sup>[4]</sup>。为此,本文报道,通过加入氧载体,改善泰乐菌素发酵系统的供氧能力,以提高菌体的产率能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)TG42为日本国静冈大学农学部保藏菌株。

### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面培养基(g/L):**可溶性淀粉 10,酪蛋白 1,酵母粉 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,琼脂 20, pH7.0。

**1.2.2 种子培养基(g/L):**可溶性淀粉 20,豆饼粉 20,酵母粉 3,  $\text{CaCO}_3$  3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1。

**1.2.3 发酵培养基(g/L)**

菜籽油 100,淀粉 5,豆饼粉 15,卵磷脂 20,  $\text{CaCO}_3$  3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1, KCl 1。

### 1.3 氧载体

**1.3.1 正十二烷:**日本和光纯药工业株式会社产品,其沸点 $216^\circ\text{C}$ ,熔点 $-10^\circ\text{C}$ ,密度( $20^\circ\text{C}$ )  $0.749\text{kg/L}$ ,表面张力  $24.6 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,与水的界面张力  $32.9 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,铺展系数  $13.7 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,溶解氧能力  $54.9\text{mg/L}$ 。

**1.3.2 全氟化碳:**购自和光纯药工业株式会社,其沸点 $160^\circ\text{C}$ ,密度  $1.97\text{kg/L}$ ,表面张力  $17.8 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,与水的界面张力  $25.8 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,铺展系数  $27.6 \times 10^{-3}\text{N/m}$ ,溶解氧能力  $118\text{mg/L}$ 。

**1.3.3 载体 Aid-Plus ML-50D:**购自日本水泽化学工业株式会社,其外观为白色,纤维状,分子式为  $(\text{OH}_2)_4(\text{OH})_4\text{Mg}_8\text{Si}_{12}\text{O}_{30} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,比

\* 本文内容系作者于1994~1995年在日本静冈大学农学部完成的部分工作

1996-01-08 收稿

表面积 300m<sup>2</sup> / g, 吸油量 180ml / 100g。

1.4 培养方法

由活化斜面接一环种子至 500ml 三角瓶, 装有 50ml 种子培养基中, 30℃, 170r / min 摇床培养 3d 后, 接种量 10%, 转接至 500ml 三角瓶, 装有 100ml 发酵培养基中, 30℃, 220r / min, 摇床培养 10d。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度: 按文献[5]的方法进行。

1.5.2 底物量即菜籽油浓度的测定: 按文献[5]的方法进行。

1.5.3 泰乐菌素的测定: 采用高压液相色谱法测定。高压液相色谱仪为日本岛津株式会社产品, 型号 SPD-6A, 色谱柱: CLC-ODS(M), 流动相: 0.85mol / L 高氯酸钠: 甲基氰 = 18 : 13, 流速: 1.0ml / min, 检出波长: 280nm。

样品处理: 取 0.5g 醪液, 加 10ml 甲醇后, 充分混合, 3000r / min 离心 15min 后取上清液, 再次离心 15000r / min 3min, 取清液为待测样。

1.5.4 体积溶氧系数 k<sub>La</sub> 的测定: 采用亚硫酸盐法。

2 结果与讨论

2.1 氧载体对 k<sub>La</sub> 的影响

以正十二烷为例, 分别加入 5% 和 20%, 测定 k<sub>La</sub> 值的结果如表 1 所示。装液量较少 (25ml) 时, 氧载体的加入对 k<sub>La</sub> 无影响, 装液量加大, 可明显提高 k<sub>La</sub> 值, 其原因是增加了气液间的传质面积<sup>[2]</sup>。

| 表 1 加入正十二烷对 k <sub>La</sub> 值的影响(h <sup>-1</sup> ) |          |     |     |     |      |      |
|----------------------------------------------------|----------|-----|-----|-----|------|------|
| 正十二烷<br>加入量(%)                                     | 溶液体积(ml) |     |     |     |      |      |
|                                                    | 25       | 50  | 100 | 150 | 200  | 250  |
| 0                                                  | 462      | 271 | 161 | 115 | 97.6 | 85.4 |
| 5                                                  | 461      | 310 | 176 | 142 | 132  | 117  |
| 20                                                 | 461      | 366 | 209 | 170 | 156  | 126  |

测定条件: 0.25mol / L 亚硫酸钠溶液, 500ml 三角瓶, 37℃, 旋转摇床 170r / min

2.2 菌体对氧载体的可利用性

培养皿中倒入无碳源的含菌培养基<sup>[6]</sup>, 以无菌的滤纸片分别浸入已灭菌的 20g / L 淀粉溶液和氧载体后, 再放入培养皿中, 30℃ 培养 7d, 观察是否生长。弗氏链霉菌 T1558 不能利用正十二烷或全氟化碳作为碳源。

2.3 底物浓度的影响

泰乐菌素发酵是以菜籽油为碳源。虽然油脂类为底物时, 需消耗较多的氧。但当供氧能力提高后, 底物浓度是否可进一步提高, 以提高产素能力。为此, 探讨了加入正十二烷后, 底物浓度对泰乐菌素生成的影响。结果表明 (表 2), 不加正十二烷, 油浓度 6% 时的菌体的产素能力最高 (7.78g / g); 加入正十二烷后, 油浓度为 10% 时菌体的产素能力最高 (8.89g / g)。其原因是氧载体的加入增大了油水间的界面积, 提高了溶解氧与底物的传递速度, 进而提高了菌体的产素能力。

| 表 2 油浓度对产素的影响 |            |               |                 |                  |
|---------------|------------|---------------|-----------------|------------------|
| 正十二烷<br>浓度(%) | 油浓度<br>(%) | 菌体<br>(g / L) | 泰乐菌素<br>(g / L) | 产率 <sup>1)</sup> |
| 0             | 4          | 0.939         | 5.35            | 5.70             |
| 0             | 6          | 0.784         | 6.08            | 7.78             |
| 0             | 8          | 0.808         | 5.76            | 7.13             |
| 0             | 10         | 0.856         | 5.37            | 6.27             |
| 0             | 12         | 0.795         | 4.94            | 6.21             |
| 5             | 4          | 0.788         | 4.20            | 5.33             |
| 5             | 6          | 0.817         | 5.71            | 6.99             |
| 5             | 8          | 0.709         | 5.68            | 8.01             |
| 5             | 10         | 0.691         | 6.14            | 8.89             |
| 5             | 12         | 0.681         | 4.47            | 6.56             |

实验条件: 500ml 三角瓶装液量 50ml

1) 产率: g 泰乐菌素 / g 菌体

2.4 装液量对产素的影响

装液量对产素的影响见表 3, 对照以装液量 50ml 为宜, 加入正十二烷后, 以 100ml 为好。50ml 时, 虽然能提高溶氧能力, 但由于失水较多, 影响产素。由表 1 可知, 25ml 装液量时, 氧载体对于 k<sub>La</sub> 值无影响, 因此, 在低装液量时, 加与不加氧载体, 产素水平相当 (表 3)。

随装液量增大,由于供氧能力减弱,故加入氧载体起到了强化供氧的作用,促进了产素。

表3 装液量对产素的影响

| 装液量<br>(ml) | 正十二烷加入量<br>(%) | 泰乐菌素生成量<br>(g/L) |
|-------------|----------------|------------------|
| 25          | 0              | 6.35             |
| 50          | 0              | 6.92             |
| 100         | 0              | 5.41             |
| 200         | 0              | 2.35             |
| 25          | 5              | 6.31             |
| 50          | 5              | 7.33             |
| 100         | 5              | 7.91             |
| 200         | 5              | 3.46             |

底物菜籽油浓度为10%

## 2.5 氧载体对产素的影响

泰乐菌素发酵中,除加入氧载体外,还添加了载体 ML-50D,结果见表4。与对照相比,加入正十二烷后,产素能力提高14%;加入全氟化碳后,产素能力提高7.8%。当在加入氧载体的同时,再加入 ML-50D,产素水平分别提高19%和20%。其原因是 ML-50D 具有很强的亲油、水的性能,加入其后,进一步加大了油水两相间的界面积,提高了氧传递速度。

表4 氧载体(载体)对产素的影响

| ML-50D<br>(g/100ml) | 氧载体 A 或 B <sup>1)</sup><br>(%) | 菌体量<br>(g/L) | 泰乐菌素<br>(g/L) | 产率 <sup>2)</sup> |
|---------------------|--------------------------------|--------------|---------------|------------------|
| 0                   | 0                              | 0.956        | 6.92          | 7.24             |
| 0.5                 | 0                              | 0.898        | 7.61          | 8.47             |
| 0.5                 | A = 5                          | 0.989        | 7.99          | 8.08             |
| 0.5                 | A = 10                         | 0.862        | 8.30          | 9.63             |
| 0.5                 | B = 5                          | 1.01         | 8.28          | 8.20             |
| 0                   | A = 10                         | 1.04         | 7.46          | 7.17             |

1) A 表示全氟化碳; B 表示正十二烷

2) g 泰乐菌素 / g 菌体; 底物菜籽油浓度为10%

由上可知,以油脂类为底物的发酵生产中,通过扩大油水两相间的界面积,同时增加供氧能力,可提高产物的生成能力。

## 参 考 文 献

- [1] 陈礼仁, 陈惠勤. 微生物学通报, 1992, 19(5): 298~294.
- [2] 贾士儒, 李小明, 包志泉等. 天津轻工业学院学报, 1994, 1: 7~12.
- [3] 贾士儒, 袁玉华, 包志泉. 天津轻工业学院学报, 1995, 1: 1~7.
- [4] 贾士儒, 李 波, 袁玉华等. 天津青年学术精粹. 天津: 天津大学出版社, 1995. 908~911.
- [5] Park Y S, Momose I, Tsunodo K, et al. Applied Microbiology Biotechnology, 1994, 40(4): 773~779.
- [6] 杜连祥. 工业微生物实验技术. 天津: 天津科技出版社, 1992. 282.

# ENHANCEMENT OF TYLOSIN FERMENTATION BY ADDITION OF OXYGEN-VECTORS

Jia Shiru

(Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin, 300222)

Mitsuyasu Okade

(Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422, Japan)

**Abstract** Addition of the n-dodecane, or perfluoromethy-decalin to fermentation medium has been recognized as a means of enhancing oxygen transfer. However, the mechanism involved has not been clarified. It was investigated that tylosin fermentation use *Streptomyces fradiae* in the presence of n-dodecane and perfluoromethy-decalin. The n-dodecane and perfluoromethy-decalin had positive influences on the formation of tylosin. The production of tylosin were increased than the contral, by addition of 5% n-dodecane and perfluoromethy-decalin respectively. When addition of vector Aid-Plus ML-50D, tylosin production can increase further.

**Key words** Tylosin, Oxygen-vectors, Oxygen transfer