

铵离子对必特螺旋霉素组分生物合成的调控作用

陆 原, 李桢林, 王永红, 储 炬*, 庄英萍

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要 通过考察铵离子浓度对必特螺旋霉素组分的影响,证实低浓度铵离子的培养条件可以有效提高必特螺旋霉素中异戊酰螺旋霉素Ⅲ的比例。在此基础上进一步测定了高铵(62.5mmol/L)和低铵(2.5mmol/L)培养条件下的糖、铵离子、相关有机酸、缬氨酸脱氢酶活等中间代谢数据,结果表明高浓度铵离子培养条件下,必特螺旋霉素产生菌中亮氨酸分解代谢途径的关键酶——缬氨酸脱氢酶的活性低于低铵对照试验,造成异戊酰螺旋霉素合成过程中酰基转移反应的底物——异戊酰 CoA 的相对不足,从而导致异戊酰螺旋霉素组分的降低。大幅度降低铵离子浓度至 2.5mmol/L,使异戊酰螺旋霉素Ⅲ的比例从 5.43% 提高至 28.59%。但氮源的不足影响了必特螺旋霉素的产量,低铵条件下的效价为 107 μ g/mL,相对高铵条件下降了 14.4%。在低铵培养条件的基础上添加亮氨酸,可以进一步改善必特螺旋霉素的组分,异戊酰螺旋霉素Ⅲ的比例增至 37.84%。

关键词: 必特螺旋霉素; 铵离子; 亮氨酸; 组分; 缬氨酸脱氢酶

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)06-0928-06

必特螺旋霉素是一种新型大环内酯类抗生素。它是在螺旋霉素的基础上,通过 4'-O-异戊酰基转移酶的催化在 4'-O 位置上接入一系列酰基形成的一族多组分酰化螺旋霉素。其生产菌株是通过同源重组技术将碳霉素产生菌中 4'位异戊酰基转移酶基因(*ist*)克隆至螺旋霉素链霉菌(*Streptomyces spiramyceticus* F21)的染色体所得的基因工程菌^[1]。

因为 4'-O-异戊酰基转移酶对底物的非专一性,发酵所得的必特螺旋霉素是一族多组分的杂合抗生素,其组分包括螺旋霉素 I、II、III,乙酰螺旋霉素 II、III,丙酰螺旋霉素 II、III,异丁酰螺旋霉素 II 和异戊酰螺旋霉素 I、II、III^[2]。由于 4'-O 位上的酰基的作用,必特螺旋霉素中的酰化螺旋霉素在酸性环境下具有更好的稳定性,而且酰基碳链越长,稳定性越好^[3]。药典对必特螺旋霉素的组分进行了严格的规定:异戊酰螺旋霉素 III 不低于 30%,异戊酰螺旋霉素 I、II、III 的总含量不低于 65%。目前用于临床的医用必特螺旋霉素是发酵产品通过分离纯化后得到的以异戊酰螺旋霉素为主的杂合抗生素,因此如何提高异戊酰螺旋霉素尤其是异戊酰螺旋霉素 III 的含量是必特螺旋霉素发酵调控中面临的主要问题。

作为微生物的速效利用氮源,铵离子一直被认为是影响大环内酯类抗生素生物合成的重要因素。多篇文献报道了铵离子对螺旋霉素生物合成效价的影响,并对其作用机理进行了研究。Lebrihi 等在研究铵离子对螺旋霉素生物合成的影响时发现,5mmol/L 的胞内铵离子浓度即可显著抑制缬氨酸脱氢酶(VDH)活性,从而限制了缬氨酸、异亮氨酸代谢产生短链脂肪酸,使螺旋霉素合成所需的前体量减少,导致螺旋霉素产量的大幅下降。向培养基中添加异丁酸、 α -酮异戊酸等氨基酸中间代谢产物可以弥补铵离子对螺旋霉素合成的负面作用^[4]。此外,铵离子还会作用于大环内酯合成中活化短链脂肪酸前体所需的相关酶。Knaoua 等发现在高浓度铵离子(150mmol/L)存在的条件下,酰基激酶,酰基磷酸转移酶等活化大环合成前体酸的酶系统的生物合成受到阻遏,导致大环合成所需的活化前体酸的供应不足^[5]。

通过多因素筛选,我们发现铵离子也是调控必特螺旋霉素组分的重要因子。降低培养基中的铵离子浓度,可以有效提高异戊酰螺旋霉素 III 的比例,同时铵浓度的降低还提高了单位菌体的产素能力。本文测定了发酵过程生物效价、组分、VDH 酶活、相

基金项目: 国家 863 计划(2002AA217021),国家重大科技专项(2002AA2Z3451)

* 通讯作者。Tel 86-21-64253021; Fax 86-21-64253702; E-mail: juchu@ecust.edu.cn

作者简介: 陆 原(1981-),男,江苏宝应人,硕士研究生,主要从事微生物代谢调控。E-mail: 12sslu@163.com

其他作者: 张嗣良

收稿日期: 2006-01-14; 接受日期: 2006-03-02; 修回日期: 2006-03-28

关有机酸等中间代谢数据,围绕必特螺旋霉素组分和效价两个方面,分析发酵过程代谢变化,初步探讨铵离子改变必特螺旋霉素组分和效价的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:必特螺旋霉素基因工程菌 WSJ-1-195 由同联集团提供。

1.1.2 培养基和培养条件:斜面培养基、种子培养基、生物检定培养基均按文献 4 配制。全合成发酵培养基(g/L):糊精 50, KH_2PO_4 0.65, CoCl_2 0.0005, MgSO_4 5.5, NaCl 10, CaCO_3 5, NH_4NO_3 的浓度按照文中的要求配制。培养条件:将 1mL 甘油接种于一级摇瓶, 28℃ 培养 48~56h 后,按 10% 接种量接种于二级种子摇瓶中, 28℃ 培养 24~26h。按 8% 接种量接种于发酵摇瓶(装液量 50mL/500mL)中, 220r/min, 28℃ 旋转式摇床培养 96h。每天定时取样测定各种发酵代谢参数,测定结果为 3 个样的平均值。

1.1.3 试剂和仪器:本研究所用试剂均是国产或进口的化学纯或分析纯试剂。乙酸、丙酸、丙酮酸、丁酸、异戊酸均为分析纯,亮氨酸、 α -酮戊二酸、牛血清白蛋白为生化试剂;色谱仪为 Agilent HP 1100(检测器:G1314A 紫外可见波长检测器,进样器:G1328A);酶标仪为 Thermo MK3(Electron Corporation)

1.2 亮氨酸母液的配制

1.5g 亮氨酸溶于 100mL 去离子水中,过滤除菌后保存备用。

1.3 生物量测量

采用测量菌丝干重法(Dry cell weight, DCW)吸 5mL 发酵液,过滤后用蒸馏水洗菌体,连同滤纸于 80℃ 烘至衡重后称量。

1.4 总糖、还原糖测定

采用斐林试剂法^[7]。

1.5 铵离子浓度测量

采用 Berthelot 比色法^[8]。

1.6 效价生物检定

以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为检定菌,按文献 6 进行。

1.7 HPLC 法测定必特螺旋霉素组分

1.7.1 样品制备:取 10mL 发酵液与等体积乙酸乙酯混合,静置 3min 后取上层有机相 5mL 于平皿中晾干。用 2mL 流动相洗涤平皿,洗出液经 0.2 μm 微孔滤膜过滤, -20℃ 下冷藏备用。

1.7.2 高效液相色谱条件:色谱柱:Shim-pack VP-

ODS, Particle Size 5 μm , 150mm \times 4.6mm, 流动相: 0.083mol/L 磷酸水溶液: 甲醇 = 47:53, 流速为 1mL/min, 进样量 20 μL , 检测器波长 210nm, 柱温 30℃。

1.8 HPLC 法测定有机酸

1.8.1 高效液相色谱条件:乙酸、丙酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸:色谱柱:AquaSep, Particle Size 5 μm , 250mm \times 4.6mm, 流动相 0.01mol/L 磷酸水溶液(用 NaH_2PO_4 调节 pH 至 2.3 \pm 0.1): 甲醇 = 98.5:1.5, 流速 1mL/min, 进样量 20 μL , 检测器波长 210nm, 柱温 30℃。丁酸, 异戊酸:色谱柱:Shim-pack VP-ODS, Particle Size 5 μm , 150mm \times 4.6mm, 流动相 0.01mol/L 磷酸水溶液(用 NaH_2PO_4 调节 pH 至 2.3 \pm 0.1): 甲醇 = 60:40, 流速 1mL/min, 进样量 20 μL , 检测器波长 210nm, 柱温 30℃。

1.8.2 样品的制备和分析:取必特螺旋霉素发酵液于 1000 \times g 离心 10min 后,取上清液于 -20℃ 冷冻保存备用。分析时取 1mL 上清液 11000 \times g 离心 10min, 上清液用 0.45 μm 合成纤维素酯膜进行真空过滤后,取 20 μL 进样。按照文献 9, 10 对发酵液中的有机酸定性,并对照有机酸标准曲线对有机酸进行定量。

1.9 缬氨酸脱氢酶(VDH)活力测定

1.9.1 无细胞粗提液的制备:4℃ 冷冻离心后, (1800 \times g 5min) 收集菌体,用 10%(M/V) 的蔗糖溶液清洗两次后,悬浮于 5mL 的含 20% 甘油的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)中,用高压破碎仪(JG-1A)破碎,操作压力 200Mpa。破碎液在 4℃、16000 \times g 下离心 30min,取上清液进行酶活测定。

1.9.2 酶活测定:VDH 测定按文献[11]的方法进行,一个酶活单位定义为 1 分钟内转化 1 μmol NAD^+ 所需的酶量,比活力用每毫克蛋白中所含酶活单位表示。采用酶标仪实时跟踪检测。蛋白质测定用考马斯亮蓝 G-250 法^[12],以牛血清白蛋白作标准曲线。

1.10 异戊酰基 CoA 的测定

具体操作采用 HPLC 法^[13]。

2 结果

2.1 铵离子浓度对必特螺旋霉素组分的影响

在发酵培养基中分别加入不同量的硝酸铵,使其终浓度分别为 2.50、6.25、10.00、12.50、25.00、37.50、50.00、62.50mmol/L,培养 96h 后测定必特螺旋霉素的组分(图 1)。

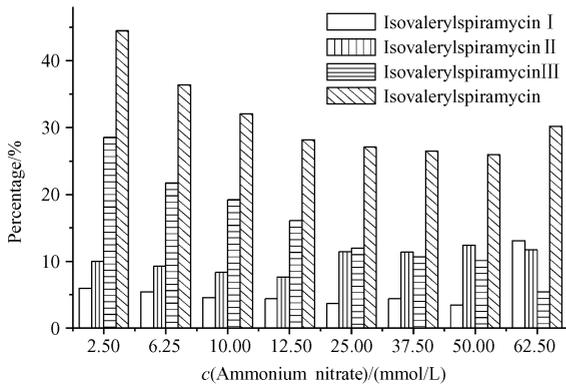


图1 铵离子浓度对必特螺旋霉素异戊酰组分的影响

Fig. 1 Effect of ammonium ion concentration on components of biotechspiramycin.

结果显示,在试验范围内异戊酰基螺旋霉素Ⅲ的比例与铵离子浓度成反比关系。当铵离子浓度为62.5mmol/L时,异戊酰基螺旋霉素Ⅲ的比例仅为5.43%。随着铵离子浓度的降低,异戊酰基螺旋霉素Ⅲ的比例逐步升高。当铵离子浓度降低到25mmol/L时,异戊酰基螺旋霉素Ⅲ的比例达11.98%。当铵离子浓度进一步降低时,异戊酰基螺

旋霉素Ⅲ的比例的改善尤为明显。在2.5mmol/L的铵浓度下,异戊酰基螺旋霉素Ⅲ的比例提高到28.59%,是62.5mmol/L铵离子条件下的5.3倍。异戊酰基螺旋霉素Ⅰ、Ⅱ的比例在各铵离子浓度下变化不大。因此,总异戊酰基螺旋霉素的总比例与铵离子浓度大体上亦成反比关系。必特螺旋霉素其他的酰化组分的比例无明显变化。

2.2 铵离子浓度对菌体生长和代谢的影响

为进一步研究铵离子浓度对必特螺旋霉素发酵的影响,我们选取了铵离子浓度单因素试验的两个端点(2.5mmol/L和62.5mmol/L)分别代表低铵条件和高铵条件进行对照试验。每隔12h取样测定总糖、还原糖、铵离子浓度、DCW、胞外有机酸、VDH活性、效价和组分(图2)。

在两种铵离子浓度下,两组试验的菌浓出现较大差异。当对数生长期结束时,高铵浓度下的DCW是低铵浓度下的1.78倍。在以后的培养过程中菌体量基本保持稳定,发酵末期两组菌体均出现自溶现象,菌体量略有下降。

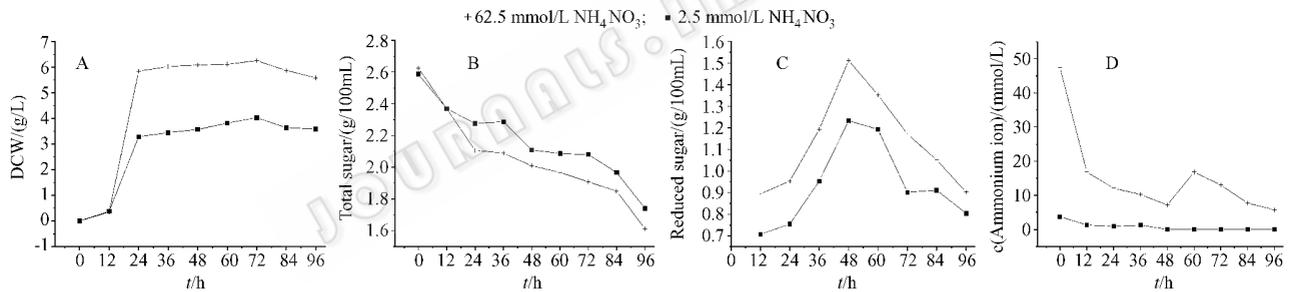


图2 两种铵离子浓度下DCW(A)、总糖(B)、还原糖(C)、铵离子(D)的变化趋势

Fig. 2 Profile of DCW (A), total sugar (B), reduced sugar (C) ammonium ion concentration (D) in biotechspiramycin fermentation with medium containing 2.5mmol/L or 62.5mmol/L ammonium nitrate, respectively.

与生物量的差异相对应,两组试验在碳、氮源代谢上也存在差异。在生长期,高铵条件下总糖的消耗高于低铵。在整个发酵过程中,高铵试验的还原糖浓度均在低铵试验之上。作为培养基中的唯一氮源,在生长期两组试验的铵离子浓度均迅速下降。48h后低铵试验的发酵液中即无法检测到铵离子的存在。而高铵条件下除60h左右铵离子浓度略有上升外,生产期的铵离子浓度一直维持在5mmol/L~7mmol/L。

在合成培养基中,铵离子的同化是氨基酸中氮元素的唯一来源,而丙酮酸、 α -酮戊二酸是参与铵离子代谢生成氨基酸的重要有机酸。由于低铵条件下铵离子的缺乏,丙酮酸、 α -酮戊二酸等参与铵同化途

径的有机酸不能被利用,被分泌到胞外,这两种有机酸的浓度在低铵条件下远高于高铵条件(图3)。

从以上试验结果可以发现,低浓度的铵离子限制了菌体的生长,进而对菌体的初级代谢产生不利影响,即明显限制了菌体对碳源的利用,使得低铵条件下的残余总糖浓度和丙酮酸、 α -酮戊二酸等氨基酸合成的重要前体酸浓度高于高铵条件。

2.3 铵浓度对必特螺旋霉素效价的影响

必特螺旋霉素的产素高峰期在60h以后,即发酵中后期。发酵结束时,低铵和高铵条件下单位菌体的效价分别为107 μ g/mL和125 μ g/mL,后者是前者的1.17倍,这说明高铵条件下单位发酵体积的必特螺旋霉素产量高于低铵条件。

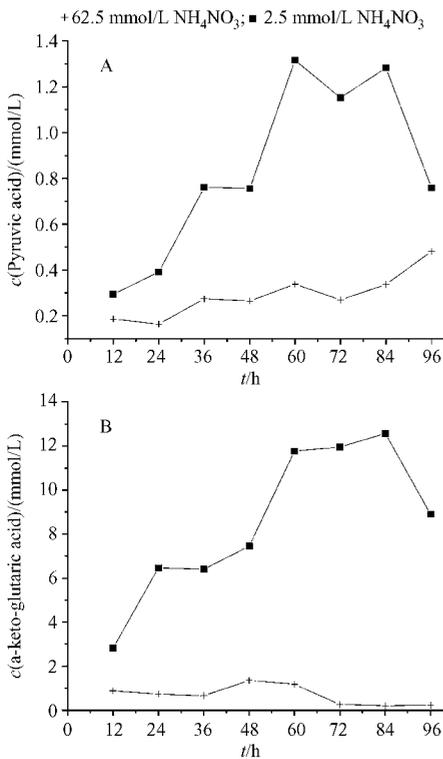


图 3 两种硝酸铵浓度下胞外丙酮酸 (A)、 α -酮戊二酸 (B) 变化趋势

Fig.3 Profile of pyruvic acid(A), α -keto-glutaric acid(B) in the broth of biotechspiramycin fermentation with medium containing 2.5mmol/L or 62.5mmol/L ammonium nitrate, respectively.

每 12h 的取样检测发酵液中乙酸、丙酸、丁酸的浓度。72h 前高铵浓度下乙酸的浓度是低铵浓度的两倍左右,之后高铵浓度下乙酸的浓度迅速上升,发酵末期与对照组相差 10 倍左右。两组试验过程中,丙酸浓度的差异主要存在于发酵中期和后期。在 24h~36h 之间,高铵浓度的丙酸浓度明显高于低铵。从 60h 到发酵结束,高铵条件下丙酸的浓度一直处于上升趋势,而对照的丙酸浓度在 2mmol/L~4mmol/L 之间波动,未检测到丁酸(图 4)。

2.4 铵离子浓度对缬氨酸脱氢酶活性的影响

如前所述,异戊酰螺旋霉素是以螺旋霉素为基础在 4'-O 位置上接入异戊酰基所得,其酰基前体是异戊酰基 CoA。在必特螺旋霉素的合成过程中,异戊酰基 CoA 主要由亮氨酸代谢产生。而作为亮氨酸分解代谢途径中的第一个酶,VDH 是亮氨酸分解代谢途径的关键酶,因此 VDH 活性是调控异戊酰基前体生成和必特螺旋霉素组分的重要位点。

由 VDH 酶活变化趋势可知(图 5),在低铵条件下,VDH 的活性有两个高峰期:前期和中后期。由于发酵前期是生长期,菌体代谢旺盛,故 VDH 活性较高。而中后期是产素高峰期,对异戊酰 CoA 的需

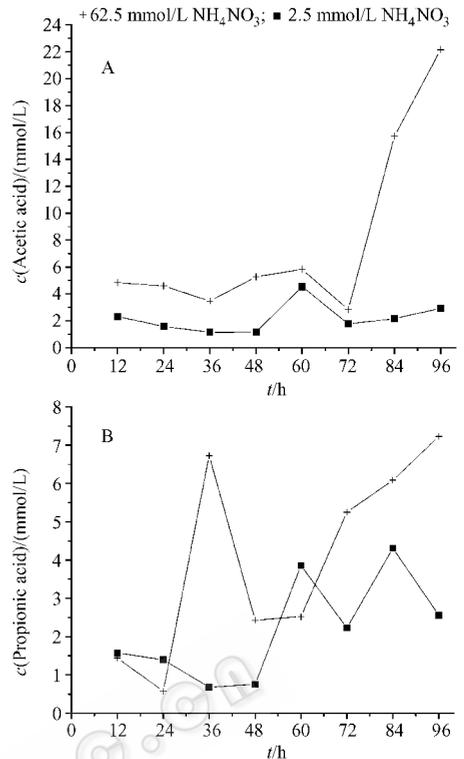


图 4 两种硝酸铵浓度下胞外乙酸 (A)、丙酸 (B) 变化趋势

Fig.4 Profile of acetic acid(A), propionic acid(B) in the broth of biotechspiramycin fermentation with medium containing 2.5mmol/L or 62.5mmol/L ammonium nitrate, respectively.

求诱导了 VDH 活性。相比之下高铵浓度下 VDH 的活性一直处于较低水平。

对照发酵过程中铵离子的浓度可以得出结论: VDH 在低铵条件下具有较高活性。在高铵条件下,较低的 VDH 酶活限制了由亮氨酸代谢生成异戊酰基 CoA 这一途径的通量,从而使异戊酰螺旋霉素合成的酰基前体供应相对不足。降低铵离子的浓度,

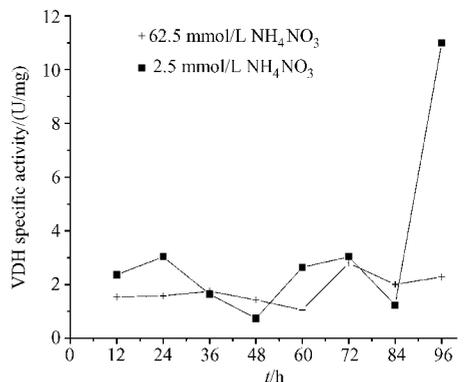


图 5 两种硝酸铵浓度下 VDH 活性的变化趋势

Fig.5 Profile of VDH activity in biotechspiramycin fermentation with medium containing 2.5mmol/L or 62.5mmol/L ammonium nitrate, respectively.

可以提高VDH的活性,增加酰基前体的供应,从而增加异戊酰螺旋霉素的含量。

2.5 在低铵条件下添加亮氨酸

在两组试验中,整个发酵过程中无法检测到异戊酸和异戊酰基 CoA 的存在。因此推断异戊酰基前体的缺乏可能仍然是提高异戊酰螺旋霉素比例的限制性因素。为了进一步提高异戊酰螺旋霉素的含量,在低铵条件下(2.5mmol/L),在发酵36h即菌体开始合成抗生素时向培养基中添加亮氨酸,使其终浓度达到0.3mg/mL。测定结果显示异戊酰螺旋霉素的含量有了进一步的提高:异戊酰螺旋霉素Ⅲ的比例提高到37.84%,相对低铵条件提高了32%。

同时,亮氨酸的添加对菌体的生长和抗生素的合成均产生了一定程度的影响。由于部分亮氨酸被作为氮源被利用和代谢产生大环合成的前体,添加亮氨酸后菌体量和单位菌体的产素能力均获得有限的增长,都较对照实验提高4.2%。

3 讨论

实验结果证明铵离子是影响必特螺旋霉素组分的重要因素,缬氨酸脱氢酶可能是一个主要的作用位点。在高浓度铵离子的培养环境中,VDH的活性较低,从而阻碍了亮氨酸代谢生成异戊酰基 CoA 的代谢途径。异戊酰基前体的不足导致酰基转移反应底物的缺乏,致使异戊酰螺旋霉素的比比例难以得到提高。当铵离子的浓度降低到2.5mmol/L时,生产期的发酵液中铵离子浓度低于检测下限。低浓度铵离子的培养环境使VDH具有较高的活性,保证了亮氨酸分解代谢途径的畅通,使异戊酰基 CoA 供应量增大,从而使异戊酰螺旋霉素的比比例得以提高。而在低铵的基础上添加亮氨酸,由于VDH活性较高,异戊酰螺旋霉素Ⅲ在低铵的基础上又获得大幅度提高。

与其它大环内酯类抗生素相似,必特螺旋霉素也是由短链脂肪酸单体经聚酮合成酶头尾缩合而成。必特螺旋霉素内酯环的生物合成需要8个前体5个乙酸,1个丙酸,1个丁酸和1个未知前体(二碳单位)^[4]。由于内酯环的形成是整个合成过程的关键步骤,所以前体有机酸单元的供应显得十分关键。低铵条件下氮源的不足,使乙酸、丙酸等大环合成的前体酸的量大大幅度降低,致使低铵条件下单位发酵体积的产量低于高铵条件。虽然据文献报道,低铵条件下可以解除铵离子对酰基激酶、酰基转移酶等活化前体有机酸的酶的抑制^[4,5],但从实验结

果看大环合成所需的前体酸的严重不足依然会对产素的负面影响。所以在解除了铵离子对异戊酰基 CoA 生成的抑制后,需要通过适当提高铵浓度来提高必特螺旋霉素的效价。下一步我们计划在低铵培养基的基础上,采用流加补料的方法避免氮源不足对产素的影响。

据对细菌的研究报道:异戊酰基 CoA 是一种不稳定的中间产物,易生成异戊酸^[15]。在所有试验过程中,均未检测到异戊酰基 CoA 和异戊酸的存在。所以可以推断,前体供应仍然是改善必特螺旋霉素组分的限制性因素,可以通过保证酰基前体供应来进一步提高异戊酰螺旋霉素的含量。在提高了VDH的活性后,我们计划对亮氨酸代谢途径的另一个酶——异戊酰基 CoA 脱氢酶进行调控。由于异戊酰基 CoA 脱氢酶控制异戊酰基 CoA 的降解,所以抑制该酶的活性可以从另一方面提高菌体中酰基前体的量。

参 考 文 献

- [1] 尚广东,戴剑澹,王以光.生枝霉素稳定型基因工程菌的构建.生物工程学报,1999,15(2):171-175.
- [2] 金文藻,孙启航,姜威,等.生枝霉素的组分研究.中国抗生素杂志,2002,27(2):705-708.
- [3] Shi Xiangguo, Zhang Shuqiu, Fawcett JP, et al. Acid catalysed degradation of some spiramycin derivatives found in the antibiotic bitespiramycin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 36: 593-600.
- [4] Lebrhi A, Lamsaif D, Lefebvre G, et al. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37: 382-387.
- [5] Khaoua S, Lebrhi A, Klakel M, et al. Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 36: 763-767.
- [6] 王以光,金莲姑,金文藻,等.麦迪霉素4'酰化酶基因的克隆及在螺旋霉素产生菌中的表达.生物工程学报,1992,8(1):1-14.
- [7] 北大生化系生化教研室.生物化学实验指导.北京:高等教育出版社,1986:92.
- [8] 徐晨东,易蕴玉,全文海.利用苯酚一次氯酸盐反应测定铵离子方法的探讨.无锡轻工大学学报,1998,17(1):34-38.
- [9] 李友元,陈长华,陶萍.高效液相色谱法测定螺旋霉素发酵液中的有机酸.色谱,2002,20(1):46-48.
- [10] 金海如,诸葛健.产甘油假丝酵母在丙三醇发酵过程中的有机酸种类及其变化.无锡轻工大学学报,2000,19(3):205-208.
- [11] Vancura A, Vancurová I, Volc J, et al. Valine Dehydrogenase from *Streptomyces fradiae*: Purification and Properties. *Journal of General Microbiology*, 1988, 134: 3213-3219.

- [12] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册). 北京 : 高等教育出版社, 2001, 34.
- [13] Tajima G, Sakura N, Yofune H, *et al.* Establishment of a practical enzymatic assay method for determination of isovaleryl-CoA dehydrogenase activity using high-performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 2005, **353** : 193 – 199.
- [14] Omura S, Takeshima H, Nakagawa A, *et al.* Studies on biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics using carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. *J Biochemistry*, 1977, **16** : 2860 – 2866.
- [15] Mahmud T, Wenzel SC, Wan E, *et al.* A biosynthetic pathway to isovaleryl-CoA in Myxobacteria : The involvement of the Mevalonate Pathway. *Chem Bio Chem*, 2005, **6** : 322 – 330.

Effects of ammonium on components of biotechspiramycin

LU Yuan, LI Zhen-lin, WANG Yong-hong, CHU Ju*, ZHUANG Ying-ping

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract : The effects of ammonium ion on the synthesis of biotechspiramycin were investigated. It was proved that the percentage of isovalerylsiramycin III was greatly enhanced in the medium with low concentration of ammonium ion. By greatly reducing ammonium ion concentration in the medium from 62.5mmol/L to 2.5mmol/L, the percentage of isovalerylsiramycin III increased from 5.43% to 28.59%. However, the titer of biotechspiramycin decreased to 107 μ g/mL in the medium with low concentration of ammonium ion, which was 14.4% lower than that in the medium with high concentration of ammonium ion, due to lack of nitrogen source. The results also showed that the activity of valine dehydrogenase, the key enzyme of leucine catabolic pathway, in the fermentation with high concentration of ammonium ion was lower than that with low ammonium ion concentration. This would lead to the limitation of isovaleryl-CoA, which is the substrate of isovaleryl transfer reaction, and then the decline of percentage of isovalerylsiramycin. The percentage of isovalerylsiramycin III further increased to 37.84% by addition of 0.3mg/mL leucine to the fermentation broth at 36h cultivation.

Keywords : Biotechspiramycin ; Ammonium ion ; Leucine ; Component ; Valine dehydrogenase

Foundation item : Chinese National Program for High Technology Research and Development (2002AA217021); Key Technologies R&D Program (2002AA2Z3451)

* Corresponding author. Tel 86-21-64253021 ; Fax 86-21-64253702 ; E-mail : juchu@ecust.edu.cn

Other author ZHANG Si-liang

Received : 14 January 2006 / Accepted : 2 March 2006 / Revised : 28 March 2006