

各种氮源物质对阿维链霉菌 GB-156 发酵 生产阿维菌素的影响

毕 然

(中国农业大学生物学院, 北京, 100094)

摘 要 以阿维链霉菌 GB-156 突变菌株, 研究了各种有机和无机氮源物质对阿维菌素生物合成的影响作用。实验结果表明, 花生蛋白粉为最有利于阿维菌素发酵生产的有机氮源, 在发酵培养基中添加花生蛋白粉和花生饼粉使阿维菌素 B1 产量分别提高了 334.7% 和 308.9%; 而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为有效的无机氮源, 在 1.0% 的添加浓度下, 可以提高阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量的水平, 并且得到了较为适合的阿维菌素生产用氮源优化发酵培养基, 其组成为可溶性淀粉 7%, 花生蛋白粉 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, KCl 0.4%, CaCO_3 0.2%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 微量, pH 7.0~7.2。

关键词 阿维链霉菌, 阿维菌素, 发酵培养基, 氮源

阿维菌素属大环内酯抗生素类杀虫杀螨剂, 它含有 8 个不同结构的组分: A1a、A2a、B1a、B2a、A1b、A2b、B1b 和 B2b^[1]。其中, A1a、A2a、B1a 和 B2a 为大量组分, 含量在 80% 以上, 而 A1b、A2b、B1b 和 B2b 4 个组分含量少, 在 20% 以下^[2]。作为生物农药的代表之一, 阿维菌素由于具有高效、杀虫谱广、低毒、高选择性以及无残留、与环境相容性好等特点, 深受农药行业的高度重视, 并广泛用于兽用驱虫^[3]。

阿维菌素属于微生物发酵产品, 而对于微生物发酵生产抗生素而言, 一个稳定高产阿维菌素的菌株对工业化生产十分重要^[3,4]。前期工作已经对阿维菌素生产菌种的优化进行了较为深刻的研究, 利用分子生物学育种手段得到了可以高产阿维菌素而且遗传性能稳定的突变株^[5-7]。但阿维菌素主要存在于菌丝体中, 很多因素影响其生物合成, 如碳源、氮源、无机盐、维生素、微量元素、通气量、温度和 pH 值等。如何提高阿维菌素的发酵单位, 降低生产成本, 是实现阿维菌素产业化生产的关键问题。本研究根据突变菌株发酵生产阿维菌素的特殊生长需要^[7-8], 重点分析不同发酵培养基中氮源组分对阿维菌素发酵生产的影响。

1 材料和方法

1.1 菌 种

阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) GB-156, 发酵实验室保存, 由 *S. avermitilis* UA-G 菌株^[5]经 *aveD* 基因修饰的遗传突变菌株。

1.2 主要材料

酵母浸粉(蛋白质含量 > 60%) 购自北京奥星生物技术公司, 花生饼粉(蛋白质含量 > 50%) 和花生蛋白粉(蛋白质含量 > 70%) 购自河南开封花生集团公司, 棉籽蛋白粉(蛋白质含量 > 60%) 购自北京中棉紫光生物技术公司, 小麦胚芽蛋白粉

(蛋白质含量 > 60%) 购自北京华康希望生物科技有限公司, 大豆蛋白粉(蛋白质含量 > 60%) 购自北京康明威培养基技术公司, 豆粕粉和黄豆粉购自北京农贸市场, 其他试剂均为生化试剂或分析纯以上的药品。

1.3 培养基

(1) YMS 培养基

可溶性淀粉 4 g, 酵母浸粉 4 g, 麦芽膏 10 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, 琼脂 20 g, 加蒸馏水调至 1 L, pH 7.2。

(2) 种子培养基

可溶性淀粉 30 g, 麦芽膏 2 g, 大豆蛋白粉 2 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, 加蒸馏水调至 1 L, pH 7.0~7.2。

(3) 发酵培养基

可溶性淀粉 70 g, 酵母浸粉 20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 4 g, CaCO_3 2 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, 加蒸馏水调至 1 L, pH 7.0~7.2。

1.4 阿维菌素的摇瓶发酵

挑取单菌落接种与 YMS 平板上, 28℃ 培养 7 d, 长出丰满孢子后接种于种子培养基中, 28℃ 培养 24 h (转速 180 r/min, 偏心距 4.0 cm), 按 5% 的接种量接种于发酵培养基, 28℃ 培养 11 d (转速 180 r/min, 偏心距 4.0 cm), 放瓶测定。

1.5 测定方法

1.5.1 发酵液生物量的测定

将 50 mL 发酵液过滤, 菌体用蒸馏水洗净后, 105℃ 烘干至恒重, 称量并以菌体干重(DCW, g/L)表示。

1.5.2 阿维菌素发酵单位的测定

采用 HPLC 分析方法进行测定, 取 1.0 mL 发酵液, 加入 4.0 mL 甲醇, 浸泡 30 min, 期间每隔 10 min 震荡一次, 离心, 取上清液进行 HPLC 色谱分析。每个分析样品平行进行 3 次取平均值。

HPLC 的分析条件^[9]: C18 反向柱, 柱长 15 cm, 内径 4.6 mm。流动相: 甲醇/水 = 85/15, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 246 nm, 进样体积 10 μL 。

第一作者: 学士。

收稿日期: 2006-08-02

1.5.3 蛋白浓度测定^[10]

按 Brandford 法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 实验结果与分析

2.1 不同有机氮源对阿维菌素发酵生产的影响

表 1 各种有机氮源对阿维菌素发酵生产的影响

序号	氮源	添加量 /g·L ⁻¹	DCW /g·L ⁻¹	阿维菌素 B1 /mg·L ⁻¹	阿维菌素总产量 /mg·L ⁻¹
1	酵母浸粉(对照)	20	6.72	175.91±25.18 b	343.98±31.32 b
2	豆饼粉	20	7.71	* * 330.95±30.12 cd	* * 634.48±58.57 d
3	花生饼粉	20	7.34	* * 718.59±59.45 f	* * 1 374.76±80.93 f
4	花生蛋白粉	20	7.13	* * 764.63±65.23 f	* * 1 415.96±97.45 f
5	棉籽蛋白粉	20	6.34	* * 416.74±37.76 e	* * 832.79±54.34 e
6	大豆蛋白粉	20	6.01	* 237.99±34.56 c	* 434.92±38.22 c
7	小麦胚芽蛋白粉	20	5.68	# 84.98±11.32 a	# 161.24±20.14 a

注:同一列右侧如标有同样小写字母,表示二者之间为差异不显著,反之为差异显著;同一列左侧标有 * 或 # 的表示与原配方对照相比较差异显著(p<0.05)或极显著(p<0.01)。

值(|d_x|=|x₁-x₂|)的差异程度采用 t 检验法进行显著性

检验分析,即当 |d_x|>t_{0.05}√ $\frac{2MS_e}{n}$ 时,差异显著,其中 t_{0.05}

√ $\frac{2MS_e}{n}$ 称为最小显著差数,以 LSD 表示。每一对平均数的差

|d_x|与 LSD 比较,当 |d_x|>LSD 时,差异显著,以 * 或 # 标注(# 表示结果与作为出发对照的酵母浸粉相比要差),否则差异不显著。从表 1 可以看出,与作为最初发酵培养基中有有机氮源使用的酵母浸粉相比较,除小麦胚芽蛋白粉以外,对于阿维菌素的发酵生产,豆饼粉等 5 种有机氮源都有明显的促进作用,阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量显著提高。其中,尤其是花生蛋白粉和花生饼粉,阿维菌素 B1 产量比酵母浸粉分别提高了 334.7% 和 308.9%,而阿维菌素总产量也比使用酵

母浸粉分别提高了 311.6% 和 299.7%,推测花生蛋白粉以及花生饼粉中的蛋白质组成存在着可以对阿维链霉菌 GB-156 菌株生物合成阿维菌素进行有效诱导的功能性氮源组分,而在花生蛋白粉中这种组分相对含量较高,所以阿维菌素发酵生产的总产量高。因此,以下的发酵试验选择花生蛋白粉作为发酵培养基的主要氮源。

对于表 1 中阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量的各平均值数据,采用 LSD(最小显著差数)计算方法^[11]进行样品间差异显著性多重分析比较,并对任意 2 组数据平均值的差数绝对

2.2 有机复合氮源对阿维菌素发酵生产的影响

由于所选用的花生蛋白粉价格相对比较贵,为了降低发酵培养基成本,减少原材料的费用支出,实验以上述几种价格比较便宜的有机氮源作为花生蛋白粉的部分替代品,同样以 20 g/L 的添加量,以 1:1 替代花生蛋白粉,配制发酵培养基,探讨复合有机复合氮源对阿维菌素发酵生产的影响效果,结果如表 2 所示。

表 2 复合有机氮源对阿维菌素发酵生产的影响

序号	辅加氮源	辅加氮源/ 花生蛋白粉	阿维菌素 B1 /mg·L ⁻¹	阿维菌素总产量 /mg·L ⁻¹
1	花生蛋白粉(对照)	20 g/L	728.35±50.28 d	1378.26±72.74 d
2	酵母浸粉	1/1	# # 272.81±23.51 b	# # 546.87±43.32 ab
3	豆饼粉	1/1	# # 238.74±18.88 ab	# # 487.69±31.09 ab
4	花生饼粉	1/1	# 460.29±37.65 c	# # 941.30±56.62 c
5	黄豆粉	1/1	# 437.83±32.20 c	# # 893.65±50.45 c
6	棉籽蛋白粉	1/1	# 483.58±37.67 c	# # 985.95±41.09 c
7	大豆蛋白粉	1/1	# # 191.11±25.33 a	# # 398.03±20.97 a
8	小麦胚芽蛋白粉	1/1	# # 488.59±40.16 c	# # 983.16±82.10 c

从表 2 的结果总体可以看出,在培养基中作为花生蛋白粉的部分替代品加入其他种类的有机氮源后,所发酵生产阿维菌素的产量都不如单独使用花生蛋白粉的效果好,在阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量上都存在着显著性差异。然而,如果与表 1 相比较,可以看出,表 2 中的酵母浸粉等有机氮源中,以花生蛋白粉替代了其中一半的蛋白质含量成为复合有机氮源,其阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量基本上都得到提高,除了大豆蛋白粉反而下降以外。这也从另一方面印证了

上面的推测,花生蛋白粉中的阿维菌素生物合成诱导成分及其含量对于阿维菌素的发酵生产起着重要的作用,而大豆蛋白粉可能是因为这其中存在有某些不利于阿维菌素生物合成的蛋白质组分。另外,此次以花生饼粉和花生蛋白粉配制成的复合有机氮源培养基未能得到预期的阿维菌素发酵生产效果,具体原因尚未清楚,但估计可能是由于所使用的花生饼粉的制造厂家生产批次不同的缘故所造成的。

2.3 无机氮源对阿维菌素发酵生产的影响

为了了解无机氮源对阿维菌素发酵生产的影响作用,在上述以花生蛋白粉为主要氮源的发酵培养基中,将花生蛋白粉的添加量减少一半成为 10 g/L,再分别加入相同浓度的

KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 , 进行这 3 种无机氮源对阿维菌素生产影响的测试试验,结果见表 3。

表 3 无机氮源对阿维菌素发酵生产的影响

序号	无机氮源	添加量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	阿维菌素 B1/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	阿维菌素总产量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	不添加(对照)	—	423.75 ± 35.28 a	805.32 ± 54.47 a
2	KNO_3	0.5	467.69 ± 40.35 a	915.21 ± 60.13 ab
3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	* 540.20 ± 37.78 b	* 1 056.13 ± 71.23 b
4	NH_4NO_3	0.5	488.59 ± 51.26 a	* 953.98 ± 67.68 b

从表 3 的结果可以看出,由于花生蛋白粉的添加量减半,阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量都有明显的下降,分别只有花生蛋白粉全量添加(20 g/L)的 55%~60% 左右;而在这一发酵培养基中补充无机氮源,则有利于阿维菌素的发酵生产。其中, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为效果最好,更能够促进阿维菌素产量的增加。

实验中进一步分析了不同添加浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对阿维菌素生产的促进作用,实验结果如表 4 所示。

表 4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对阿维菌素发酵生产的影响

添加量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	阿维菌素 B1/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	阿维菌素总产量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
0.5(对照)	540.20 ± 43.53 b	1056.13 ± 55.15 b
1.0	596.11 ± 31.29 b	1103.95 ± 47.12 b
1.5	544.87 ± 44.08 b	1081.19 ± 43.09 b
2.0	519.23 ± 51.56 b	1016.12 ± 60.12 b
4.0	# 395.57 ± 38.79 a	# 788.17 ± 38.89 a

从表 4 中可以看出,不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为无机氮源加入发酵培养基中对阿维菌素的发酵生产有一定的影响作用,在 1.0 g/L 的添加浓度下促进了阿维菌素的生物合成,阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量都达到了最大值。但是,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的添加浓度继续增加时,阿维菌素的产量反而降低,特别是当添加了较高浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.0 g/L) 时,过量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 无机氮源对阿维菌素的合成有抑制作用,阿维菌素 B1 和阿维菌素总产量都明显下降。

3 结 论

通过不同有机和无机氮源对于阿维链霉菌 GB-156 菌

株发酵生产阿维菌素影响作用的分析测试实验结果,并从产业化生产的实际应用中节省费用、降低成本、提高产品的市场竞争优势的基本原则作为根本性出发点考虑,可以得到优化的阿维菌素发酵培养基组成,即可溶性淀粉 7%,花生蛋白粉 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.4%, CaCO_3 0.2%, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 微量, pH 7.0~7.2。在这优化的发酵培养条件下,可以稳定地获得 1 100 mg/L 以上的阿维菌素总产量的发酵生产水平,为今后大规模的工业化生产新型生物农药—阿维菌素制剂,打下了扎实基础。

参 考 文 献

- 1 苏建亚,沈晋良. 阿维菌素的生物合成与途径工程[J]. 生物技术通报,2003(6):18~23
- 2 宋 渊. 阿维菌素的工业化生产研究[J]. 精细与专用化学品,2002,21:57~59
- 3 刘婷婷,蔡苏兰,阎浩林. 阿维菌素产生菌的生物技术改造研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(6):463~467
- 4 王玉荣. 国内阿维菌素的生产与消费[J]. 化工科技市场,2005(6):20~23
- 5 宋 渊,曹贵明,陈芝,等. 阿维菌素高产菌株的选育和阿维菌素 B1 的鉴定[J]. 生物工程学报,2000,16:31~35
- 6 陈芝,宋 渊,文 莹,等. 阿维链霉菌中 aveD 基因阻断对阿维菌素合成的影响[J]. 微生物学报,2001,41(4):440~446
- 7 陈芝,文 莹,宋 渊,等. 阿维链霉菌中 aveD 基因缺失对阿维菌素合成的影响[J]. 微生物学报,2002,42(5):534~538
- 8 蔡玉娟. 产绿孢子阿维链霉菌的遗传改造和发酵条件的研究[D]. 中国农业大学硕士学位论文,2006
- 9 陈金辉. 阿维菌素高产菌株的选育和发酵条件的研究[D]. 北京:中国农业大学硕士学位论文,2004
- 10 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000. 77~198
- 11 杜荣寿. 生物统计学[M]. 北京:高等教育出版社,1999

The Analysis of the Effect of Different Nitrogen Sources on the Yield of Avermectins of the GB-156 Strain of *Streptomyces Avermitilis*

Bi Ran

(China Agricultural University, College of Biological Science, Beijing 100094, China)

ABSTRACT The research used the strain GB-156 of the *Streptomyces avermitilis* and had studied the effect on biosynthesis of avermectins by different organic and inorganic nitrogen sources. The result of research shows that the protein powder of peanut is the best organic nitrogen source and the yield of avermectins has been heightened to 334.7% and 308.9% after adding protein powder of peanut to the fermentation medium. The $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acting as an effective inorganic nitrogen source, can improve the total yield and the yield of B1 avermectins by adding 1% to the fermentation medium. By this research, we have found the proper nitrogen sources optimized fermentation medium for producing avermectins.

Key words *Streptomyces avermitilis*, avermectins, fermentation medium, nitrogen sources