

文章编号:1673-1689(2009)05-0682-06

接种方式对阿维菌素发酵过程的影响

姚小员¹, 储消和², 庄英萍^{*1}, 梁剑光¹, 王永红¹, 储炬¹, 张嗣良¹

(1. 生物反应器工程国家重点实验室, 华东理工大学, 上海 200237; 2. 浙江省升华拜克生物股份公司, 浙江 湖州 313200)

摘要: 在摇瓶发酵中对除虫链霉菌的孢子接种工艺进行了初步研究, 同时比较了孢子接种、常规的挖块接种和菌丝接种3种不同接种方式对除虫链霉菌菌体生长和细胞代谢参数的影响。实验结果表明: 孢子接种的最适孢子接种量在 $4\sim 6\times 10^6$ 个/mL 范围内, 而不同接种方式导致了发酵过程除虫链霉菌营养物质消耗、pH 值变化、菌丝形态以及效价等方面差异。孢子接种方式在摇瓶发酵中表现出明显优势, 采用孢子接种方式获得最终阿维菌素的效价比常规的挖块接种方式提高10%以上, 比菌丝接种方式提高了20%以上。

关键词: 除虫链霉菌; 阿维菌素; 孢子接种; 接种方式

中图分类号: TQ 920. 6

文献标识码: A

Effect of Inoculation Methods on Avermectin Fermentation by *Streptomyces avermitilis*

YAO Xiao-yuan¹, CHU Xiao-he², ZHUANG Ying-ping^{*1}, LIANG Jian-guang¹,
WANG Yong-hong¹, CHU Ju¹, ZHANG Si-liang¹

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shenghua Biok Biology Co. Ltd., Zhejiang Province, Huzhou 313220, China)

Abstract: The spore inoculation technology of *S. avermitilis* was examined in shake flask culture and the effect of three inoculation methods, spore inoculation, block dug inoculation and mycelia inoculation, on the growth and metabolism of *S. avermitilis* were investigated. The results showed that the optimum spore inoculum level was ranging between 4×10^6 and 6×10^6 spores/mL, the nutrition consumption, pH, the morphology of *S. avermitilis* and the yield of avermectin during fermentation process were different. By the spore inoculation, the yield of avermectin increased by 10% and 20% as compared with that of the block dug inoculation and mycelia inoculation, respectively. In conclusion, the method of spore inoculation has obvious effect on *S. avermitilis* growth and metabolites production.

Key words: *Streptomyces avermitilis*, avermectin, spore inoculation, inoculation type

收稿日期: 2008-10-28

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI63B01)。

* 通讯作者: 庄英萍(1962-), 女, 上海人, 工学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事发酵过程优化方面的研究。

Email: ypzhuang@ecust.edu.cn

阿维菌素(Avermectins)是1976年美国Merck公司从日本北里研究所提供的一株名为除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)的新放线菌种发酵中获得的一簇结构相似的新型化合物^[1]。它是一类具有杀虫、杀螨、杀线虫活性的十六元大环内酯化合物,并具有作用机制独特、剂量低、安全性高、农畜两用等特点,是目前最为有效的杀虫、杀螨剂,其衍生物也可用于治疗人类由于螨虫或线虫引起的疾病^[1-3]。随着几种有害化学农药在中国的禁用,阿维菌素及其衍生物逐渐成为我国农药市场中非常重要的生物农药,2005年阿维菌素在我国生物农药市场占有率就已达54%以上^[4-5]。因而如何实现高效大规模生产阿维菌素是这一产品产业化进程中的重要一环,已成为人们关注的热点。

很多文献报道表明,接种方式和接种量对微生物菌体生长代谢和产物合成有较大影响。M. elibol等在天蓝霉素发酵中发现采用孢子接种其细胞量和放线菌紫素浓度以及最大比生长速率均比菌丝接种高,但采用菌丝接种时菌体合成放线菌紫素的产率($Y_{P/X}$)更高^[6];崔丽霞发现不同接种方式会影响青霉PT95菌株的菌核分化和类胡萝卜素产率^[7];戴传超等在进行一株高产 γ -亚麻酸丝状真菌菌株发酵时发现:采用孢子接种时最终细胞干重、亚麻酸以及油脂含量均比菌丝接种的高^[8]。而在黑曲霉和产青黄霉素等丝状微生物发酵时发现孢子接种量对丝状微生物的菌形具有较大影响,孢子接种量逐渐增加时,发酵液中的菌形也逐渐由光滑结实的球状为主变为粗糙松散的团状甚至以散状的菌丝为主^[9-10]。目前关于接种量与接种方式对阿维菌素发酵过程影响的文献尚不多见。作者从优化生产工艺的角度出发,在摇瓶实验中对阿维菌素的孢子接种工艺进行了初步的研究,优化了孢子接种量,并着重探讨了不同接种方式对阿维菌素发酵过程营养物质消耗、pH值变化、菌丝形态以及效价增幅上的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

1.1.1 菌种 除虫链霉菌(*S. avermitilis*)由浙江升华拜克生物股份有限公司提供。

1.1.2 种子培养基(组分 g/L) 玉米淀粉 30,玉米浆 5,酵母膏 15, KH_2PO_4 4, pH 7.0~7.2。

1.1.3 发酵培养基(组分 g/L) 玉米淀粉 120,酵母粉 15,豆粕粉 5,花生饼粉 5, KH_2PO_4 5, pH 7.0~7.2。

1.2 培养方法

1.2.1 挖块接种 从成熟孢子斜面上直接挖块接种,即挖取的菌落中含有孢子和菌丝。

1.2.2 孢子接种 用一定量无菌水洗涤成熟孢子斜面制备孢子悬浮液,并采用血球计数板计算孢子数量,采用一定量的孢子悬浮液接种。

1.2.3 菌丝接种 水洗后的孢子斜面上的孢子绝大部分被洗掉,挖取此中只含基内菌丝的菌块接种。

1.2.4 摇瓶培养 菌种按上述3种不同方式接种于发酵种瓶中,种瓶装液量为40 mL/250 mL,于28℃、250 r/min 旋转式摇床上培养40~48 h左右。发酵摇瓶接种体积分数为5%,装液量为30 mL/250 mL,于28℃、250 r/min 旋转式摇床上培养240~260 h左右。

1.3 相关参数的测定

1.3.1 总糖和还原糖的测定 菲林法^[12]。

1.3.2 氨基氮 甲醛法^[13]。

2 结果与分析

2.1 孢子接种量以及接种方式对阿维菌素发酵的影响

阿维菌素发酵生产中多采用挖块接种的二级发酵,即经过一级种瓶再进发酵摇瓶,挖块接种与菌丝接种的一级种瓶接种量均难以控制,多依赖于经验,从而导致批重复实验不太稳定。而孢子接种可以保持一个较为稳定的接种量,同时又由于孢子接种时孢子分散性好、悬浮液较为均匀,所以批实验重复性相对较好。因此作者尝试在阿维菌素的摇瓶发酵中采用孢子接种,对其孢子接种工艺进行了初步的研究。

孢子接种的一级发酵与二级发酵实验表明:利用孢子接种的发酵必须经过一级种子瓶的培养,不经过一级种子瓶的直接发酵延迟期太长,效价增幅太慢,240 h放瓶效价平均仅为2 500 $\mu\text{g/mL}$ 左右,所以孢子悬浮液直接进发酵瓶的方式不可取,后面所讨论的孢子接种均采用二级发酵。在保持一级种瓶进发酵摇瓶的接种体积分数5%不变的情况下,对一级种瓶的孢子接种量进行了量化实验,240、264 h效价测定结果见图1。从图1可知,当每毫升种子培养基的孢子接种数量在 4×10^6 个和 6×10^6 个范围内,效价变化幅度不大,均处于4 500 $\mu\text{g/mL}$ 以上,但是随着孢子接种量高于 10^7 或低于 10^6 时效价下降的趋势较为明显,最适孢子接种体积分数处于 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 和 6×10^6 个/mL左右。对不

同接种体积分数的每组摇瓶的取样进行菌丝形态镜检发现:接种量越大,菌丝形态愈趋向于形成较松散的团状,这与文献报道的相吻合^[9-10];适中的接种量有利于阿维链霉菌菌丝结球,较小的接种量可能会导致延迟期过长,因而需要延长接种龄。若在相同的种龄情况下,会因种子过于年轻而不利于产物的合成。

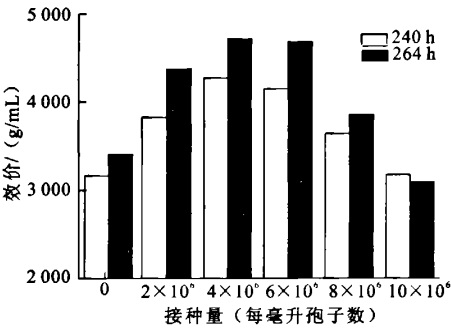


图 1 不同孢子接种量对阿维菌素效价的影响
Fig. 1 Effect of different inoculum size on avermectin production

在上述最适孢子接种体积分数下进行发酵,并与挖块接种和菌丝挖块接种对照,比较起始效价与发酵后期效价差异。表 1 显示,在发酵前期与挖块接种和菌丝接种对比,孢子接种的起步效价低,在 48 h 时效价单位仍为 0 $\mu\text{g/mL}$,但在后期其效价增幅明显高于其它两种接种方式,说明孢子接种前期的适应时间较长,然而发酵后期的细胞代谢强度和生物合成能力较强。孢子接种在效价上的优势推测一方面可能跟孢子本身的优势有关,孢子一般是单核的,发酵过程中易保持纯种和不退化,孢子的生理代谢特性可能决定了其在后期能维持较强的生物合成能力;另一方面可能还与其它两种接种方式不易保持稳定的接种量有关。如前所述,接种体积分数影响了菌体的生长速度和菌丝形态^[9-10],可能最终影响了整个菌体的代谢与产素。

表 1 不同接种方式对阿维菌素发酵过程中效价的影响
Tab. 1 Effect of inoculation methods on avermectin titer during fermentation process

发酵时间/h	阿维菌素效价/($\mu\text{g/mL}$)		
	挖块接种	菌丝接种	孢子接种
48	86	34	0
240	3 927	3 127	4 172
264	3 827	3 638	4 615

2.2 接种方式对除虫链霉菌生长代谢过程的影响
为挖掘孢子接种效价优势存在的内因,进一步比较了 3 种不同接种方式的阿维链霉菌发酵过程

中生长代谢以及阿维菌素合成的差异,具体比较了阿维链霉菌生长与代谢过程中的营养物质消耗、过程 pH 值变化、效价增长以及菌丝形态的差异。

2.2.1 接种方式对种子培养过程的影响 由图 2 所示,挖块接种的摇瓶种子生长较快,孢子接种与菌丝接种在 26 h 镜检时发现:在视野范围内均只有少量菌丝,而挖块接种已有大量菌丝繁殖。这是因为挖块接种的菌块中含有孢子和菌丝,生长较快;孢子接种由于孢子要经过吸水膨胀、萌芽到生长成菌丝的过程,菌丝接成网状到成团时间明显晚于挖块接种;菌丝接种所用菌丝属于水洗后的不带孢子的菌落,接种量相对较少,少量的菌丝要繁殖成大量菌丝并接成网状结构的过程晚于挖块接种,但早于孢子接种。根据不同接种条件下实际菌丝的生长情况,最终确定的移种时间也是有差异的:挖块接种 41 h、菌丝接种 44 h、孢子接种 48 h。

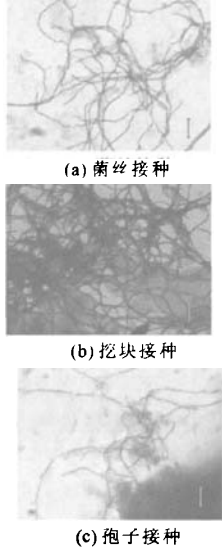


图 2 种瓶中 26 h 时不同接种方式的菌丝形态差异比较 ($\times 100$)
Fig. 2 Morphology comparison during seed growing process at 26 hours with different inoculation types ($\times 100$)

种子瓶 pH 值的变化状况见图 3。3 种接种方式对 pH 值的整个变化趋势并无大的影响。一般来说,除虫链霉菌种子培养前期 pH 值是稳定的,然后慢慢上升,再下降再上升再缓慢下降,最佳的移种时机可能是第二次上升的最高点,一般此时处于种子的对数生长期^[16]。3 种不同的接种方式的种子生长过程中 pH 值的变化规律都是遵行这种先升后降再升再缓慢下降的过程。但是具体的变化范围有所区别,挖块接种 pH 值变化的峰值最高,变化的

幅度最大,菌丝接种的pH值变化的峰值最低,变化幅度最小,孢子接种介于两者之间,这可能与整个种子生长过程中不同的菌体生长速率和底物代谢速率有关,很显然挖块接种达到指数生长期早于其他两种接种方式。

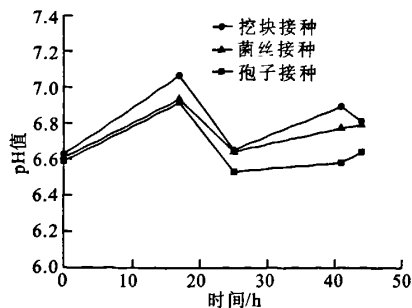


图3 不同接种方式的种子生长过程中pH值变化趋势

Fig. 3 Profile of pH with different inoculation type during culture process

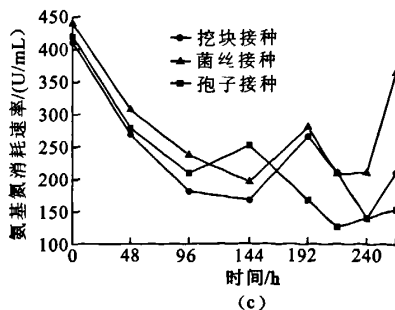
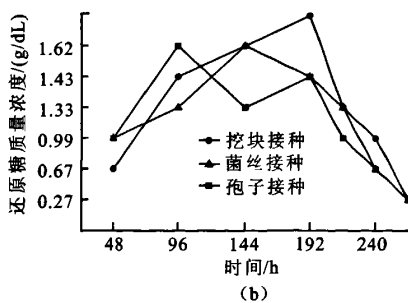
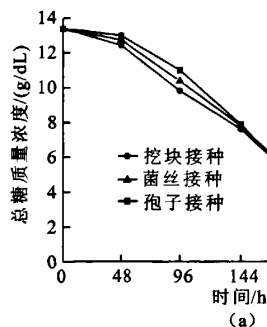
2.2.2 接种方式对阿维链霉菌发酵过程的影响

不同接种方式的阿维链霉菌发酵过程中的营养物质消耗、过程pH值变化以及菌丝形态均有差异,如图4a、c所示。在发酵前期,因延迟期较短,菌体生长很快,挖块接种总糖和氨基氮前中期消耗速率均比其它两种接种方式快,孢子接种因延迟期较长发酵前期总糖的消耗速率最慢,发酵中后期挖块接种与菌丝接种的糖耗速率相当,而孢子接种的糖耗速率最快;并且约200h左右挖块接种与菌丝接种的发酵液中的氨基氮质量浓度已开始回升,孢子接种的氨基氮质量浓度仍处于下降期。

挖块接种在前中期还原糖质量浓度均处于上升时期,且峰值最高;孢子接种在前期上升,中期(约100h后)的早期开始缓慢下降,中间经短暂的平稳期后再上升;菌丝接种在前期还原糖质量浓度上升最慢,峰值与孢子接种相当,但上升期比孢子接种长;在发酵的后期还原糖质量浓度均较快下降(见图4b)。还原糖质量浓度变化趋势的不同可能导致菌体分泌不同量的淀粉酶,这可能会影响到糖代谢途径中相关的酶活,甚至也可能会影响某些与阿维菌素合成相关酶的酶活,从而导致不同的阿维菌素合成能力。发酵过程中3种方式的pH值变化趋势基本相同,但变化幅度各有差异,这与菌体的不同的碳氮源代谢水平相对应(见图4d)。在220h左右,pH值均大幅度开始回升,菌丝接种的pH值回升最快,推测菌丝接种方式在后期最先开始自溶。

中后期的糖耗速率与氨基氮消耗速率均说明

发酵中后期挖块接种与菌丝接种代谢变缓,相对而言,孢子接种则在中后期的代谢活性开始逐渐强于其它两种方式。发酵前期菌体初级代谢相对较快,同时会影响到中后期的次级代谢,前期过高的总糖消耗速率可能导致中后期可利用的糖质量浓度不够甚至使后期总糖的利用率降低;挖块接种在中后期的耗糖速率明显变缓,特别是后期耗糖速率远低于孢子接种,这也可能是由于菌体活力下降、菌体自溶所致;而用孢子接种时,虽然延迟期相对较长,生长达到高峰时间推迟,但孢子接种在发酵中、后期较强的代谢活性使得糖的利用率相对更高,因发酵后期糖可能主要用于菌体的维持和产物的合成,有利于后期的产素,最终孢子接种的效价后来居上,发酵终点时比对照挖块接种提高了10%以上,比菌丝接种提高了20%以上(见图4e)。菌丝接种在生长快慢上介于挖块接种与孢子接种之间,效价增长最慢,糖的利用率最低,到发酵终点时效价也最低。



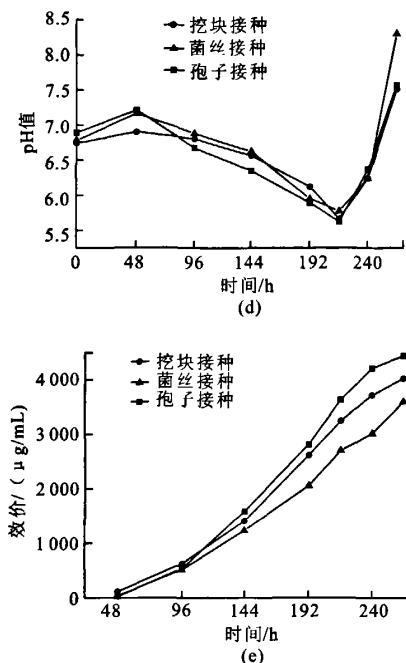


图4 采用不同接种方式的发酵过程中总糖、还原糖、氨基酸代谢、pH值变化以及效价增幅趋势

Fig.4 Profiles of the total sugar, reduced sugar, amino nitrogen, pH, avermectin titer with different inoculation types during fermentation process

研究过程中还发现,不仅接种量会影响菌丝形态,不同接种方式也会影响阿维链霉菌发酵过程中的菌丝形态。由于孢子接种的延迟期较长,菌丝繁殖速度在前期最慢,菌丝收缩的时间要稍晚于其它两种接种方式。另外,相对挖块接种来说,因孢子容易保持单核和纯种,生长过程比较同步,孢子接种的菌形较为均一,并且趋向于收缩成球形菌团。挖块接种与菌丝接种则因接入摇瓶中的菌龄不易保持同步,所以表现为菌形多样性且散菌丝相对较多。因丝状微生物的菌丝形态会影响发酵液的流变特性从而也影响了培养体系的传质和传热,最终影响到产物的合成^[11]。在阿维菌素的发酵过程中菌丝形态的好坏会直接预示阿维菌素的生物合成水平的高低。如图5所示,孢子接种在168 h时菌形是光滑和结实的球状,挖块接种的是较为粗糙和结实的球状,菌丝接种的是较为粗糙和发散的团状。菌丝接种和挖块接种因菌丝形态的差异导致其发酵料液的粘度大于孢子接种,使得营养物质和氧的传递受到一定程度的阻碍,从而影响菌体代谢,最终导致产素能力比孢子接种的稍低。

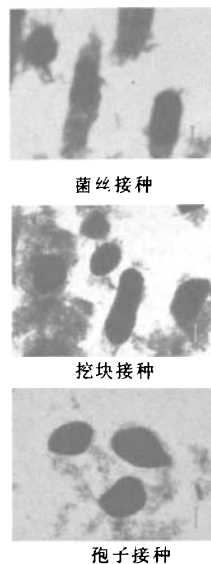


图5 不同接种方式阿维菌素发酵168 h菌丝形态差异比较(×100)

Fig.5 Morphology comparison during fermentation process at 168 hours with different inoculation types(×100)

3 结 语

近年来国内外主要着重从基因工程改造、培养基优化、中间补料等方面寻找突破以提高阿维菌素产量尤其是提高B1a组分产量,特别是集中在基因工程改造方面^[14]。目前已经完成除虫链霉菌的全基因组测序,阿维菌素生物合成基因簇中的各基因功能也正在研究中^[15-16]。目前而言,在基因水平上加以改造是提高除虫链霉菌合成阿维菌素能力的最为有效的方法,而在发酵水平上进一步优化生产工艺以改善菌体生长和产物合成培养条件,使菌种产素能力得到较充分发挥,也可较显著提高阿维菌素的发酵水平。作者除确定孢子接种的最适孢子接种量外还对比了不同的接种方式对阿维链霉菌生长代谢和发酵产素过程参数的影响:在摇瓶发酵过程中,接种方式对阿维菌素发酵过程中的碳氮消耗以及菌丝形态具有较大影响,从而导致不同接种方式影响阿维链霉菌的生长代谢和阿维菌素的合成能力。孢子接种与挖块接种和菌丝接种相比,体现出接种量上易控制、发酵结果较稳定、最终发酵效价高等优势;但孢子接种的好坏与斜面孢子的生长好坏密切相关,且孢子接种方式存在延迟期较长、发酵周期较长以及接种操作过程较为繁琐等不足,在实际的工业规模生产中孢子接种的优势是否明显以及是否采用孢子接种,还需进行相关的研究

后视具体情况而定。

参考文献(References):

- [1] Burg R W, Miller B M, Baker E E, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; producing organism and fermentation[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15 (3):361-367.
- [2] 程金生, 韦国锋, 黄徽. 阿维菌素 B1a 衍生物合成研究[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 3(20):341-343.
CHENG Jin-sheng, WEI Guo-feng, HUANG Wei. Synthesis of avermectin B1a derivatives[J]. *Journal of Youjiang Medical College for Nationalities*, 2008, 3(20):341-343. (in Chinese)
- [3] Egerton J R, Ostlind D A, Blair L S, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; efficacy of the B1a component[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15 (3):372-378.
- [4] 张毅, 胡西洲. 阿维菌素及其衍生物的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(5):845-848.
ZHANG Yi, HU Xi-zhou. Progresses on avermectins and its ramifications[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2007, 46(5):845-848. (in Chinese)
- [5] 郑冬梅, 朱昌雄. 我国生物农药产业发展趋势预测及战略对策探讨[J]. 现代化工, 2006, 26(10):14-19.
ZHENG Dong-mei, ZHU Chang-xiong. Studies on development trend and strategy of bio-pesticide industry in China[J]. *Modern Chemical Industry*, 2006, 26(10):14-19. (in Chinese)
- [6] M Elibol, K Ulgen, K Kamaruddin, et al. Effect of inoculum type on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(3):579-582.
- [7] 崔丽霞. 不同接种方式对青霉 PT95 菌株生长的影响[J]. 山西化工, 2007, 27(2):20-21.
CUI Li-xia. The effect of inocula types on growth of the penicillium PT95[J]. *Shanxi Chemical Industry*, 2007, 27(2):20-21. (in Chinese)
- [8] 戴传超. 一株高产 γ -亚麻酸丝状真菌菌株的发酵接种方式研究[J]. 食品科学, 2005, 26(4):55-58.
DAI Chuan-chao. Studies on inoculation types of γ -linolenic acid fermentation by a high-producing filamentous fungus strain[J]. *Food Science*, 2005, 26(4):55-58. (in Chinese)
- [9] Maria Papagianni, Michael Matthey. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level, application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology[J]. *Microbial Cell Factories*, 2006, 5:3.
- [10] Keith G Tucker, Colin R Thomas. Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level[J]. *Biotechnology Letters*, 1992, 14(11):1071-1074.
- [11] 陈凝. 培养基成分和补料对阿维菌素发酵过程中除虫链霉菌菌丝形态的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(4):496-501.
CHEN Ning. Effect of medium composition and feeding strategy on morphology of *Streptomyces avermitilis* in avermectin fermentation[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(4):496-501. (in Chinese)
- [12] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社, 1982.
- [13] 北大生化系生化教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 1995.
- [14] 巫延斌. 阿维菌素发酵补糖工艺及发酵动力学研究[D]. 上海:华东理工大学硕士论文, 2007.
- [15] Yoon Y J, Kim E S, Hwang Y S, et al. Avermectin; biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6):26-34.
- [16] 陈凝. 阿维菌素发酵过程及菌丝形态的研究[D]. 上海:华东理工大学, 2007.

(责任编辑:李春丽)