

新型杀虫剂——Spinosad 发酵工艺的研究

陈晓霞 郭聆讯 张宇锴 朱 亮

(杭州华东医药集团有限公司生物工程研究所 杭州 310011)

摘要: 采用 ^{60}Co 正交设计的方法,选择最优种子培养基配方和发酵培养基配方,在此基础上进行UV、 ^{60}Co 等诱变,得突变株,其发酵水平较原始菌株提高了150%。同时,对菌株的发酵接种量、发酵液处理及发酵曲线也作了研究。

关键词: 杀虫剂, 发酵水平, 正交设计, 诱变

中图分类号: TQ4535 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0021-05

STUDIES ON THE TECHNIQUE OF FERMENTATION TO A NEW GENRE OF INSECTICIDE — SPINOSAD

CHEN Xiao-Xia GUO Ling-Xun ZHANG Yu-Kai ZHU Liang

(Hangzhou Huadong Pharmaceutical Group Co. CTD, Institute Of Biotechnology, Hangzhou 310011)

Abstract: the mutative strain, after excerpted the optima formula of medium for seeds and fermentation with the method of orthogonal design, were mutagenised by UV, ^{60}Co and so on. The production of mutant was enhanced to 150% of the original one.

Key words: Insecticide, Fermentation, Orthogonal design, Mutagenesis

Spinosad 是一种新型的大环内酯类化合物。目前许多昆虫对杀虫剂都有了一定的抗性,而且某些杀虫剂对人畜和环境也有很大的危害性,在日益重视环保和自身安全的今天,高效无污染的绿色杀虫剂的研究越来越被人们所重视^[1]。Spinosad 是一种具有较强杀虫能力且无残留的新型杀虫剂,其主要成分为 spinosynA,可作用于昆虫的中枢神经系统,影响其正常生长发育,并对昆虫有胃毒和触杀作用。该药有效成分是放线菌的发酵提取物。美国陶氏公司对该产品也有研究和生产。而我们得到的 Spinosad 产生菌是一种较为原始的菌株,在原始的种子和发酵培养基中,该菌株的发酵单位很低,对此我们进行了大量的研究。本文采用正交设计^[2]的方法来选择最佳的种子和发酵配方,不仅改善了种子的菌丝形态,还提高了种子质量和发酵水平。又通过多次诱变^[3]挑选出发酵水平高的菌株。另外,我们对它的发酵工艺如:接种量,发酵中糖、氮消耗等方面作了研究,并找到一种合适的发酵液处理方法。

收稿日期: 2001-07-05, 修回日期: 2002-12-18

1 材料与方法

1.1 菌种

Saccharopoly Spora, Spinosad508 (简称 X-S) 由本公司夏洋生物工程研究所提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 酪蛋白水解物 0.25g, 牛肉膏 3.0g, 葡萄糖 5.0g, 琼脂 2.0g, 定容至 100mL。

1.2.2 原始种子培养基: 酪蛋白水解物 0.2g, 酵母浸出粉 0.5g, 葡萄糖 1.5g, 定容至 100mL。

1.2.3 原始发酵培养基: 葡萄糖 2.0g, 植物蛋白水解物 4.0g, 棉籽粉 1.4g, 豆油 1.0g, CaCO_3 0.3g, 定容至 100mL。

1.3 种子、发酵培养基配方的改进

采用正交设计的方法选择最佳培养基配方。

1.4 诱变

1.4.1 UV 诱变: 从成熟的斜面刮下孢子, 制得孢子悬液, 用 15W 紫外线杀菌灯, 波长 253.7nm 照射, 稀释涂平板, 培养后挑单菌落。

1.4.2 LiCl 和 UV 的复合诱变: 制得孢子悬液, 加入适量 LiCl 处理若干小时, 然后同 1.4.1 操作。

1.4.3 ^{60}Co 辐射处理: 孢子悬液置于小试管在 7 万拉德的剂量下处理, 稀释涂平板, 培养后挑单菌落。

1.5 筛选方法

单菌落斜面长好后, 进行发酵培养, 测定发酵单位, 筛选高单位菌株。

1.6 发酵单位的测定

取发酵液若干毫升, 加丙酮浸泡数小时后, 离心, 取上清液, 采用高效液相 (HPLC) 测定其发酵单位。

2 结果与讨论

2.1 种子培养基配方的改进

在原始的种子培养基上, 种子生长不良, 有结球现象, 菌丝量少, 镜检菌丝断裂、染色浅。从配方的组分上分析, 酪蛋白水解物是一种速效氮源, 利用很快, 整个配方中氮源的含量高于碳源的含量, 但在种子培养中发现氮源的利用不多, 而菌丝却老化很快。针对该现象, 本文采用黄豆粉、淀粉、玉米浆等为主要原料, 经过多次正交实验, 得到一个较佳的种子配方, 该配方加大了玉米浆的用量, 同时增添了 CaCO_3 作为培养基中 pH 的缓冲剂。发酵培养基采用原始的配方。实验结果见表 1。

由表 1 的结果可知, K 值越大, 该水平值越好; R 值越大, 该因素越重要。因此, 精氨酸和玉米浆是较为重要的因素。5 号组的培养基的配方最好: 葡萄糖 2.0g、淀粉 1.0g、精氨酸 0.3g、黄豆粉 1.5g、玉米浆 0.8g、酵母浸出粉 0.3g、 CaCO_3 0.4g, 定容 100mL。发酵单位高, 镜检菌丝情况比原配方的好, 菌丝舒展, 成网状, 染色深, 而原配方的老化断裂较多, 结球情况严重, 见图 1 和图 2。

表 1 正交实验结果和分析

组号	因 素 (g/100mL)						CaCO ₃	发酵单位 (%)	镜检情况
	葡萄糖	淀粉	精氨酸	黄豆粉	玉米浆	酵母浸出粉			
1	1.0	1.0	0.6	1.5	1.2	0.3	0.2	35	菌丝量稍多, 舒展, 染色较浅
2	1.0	1.0	0.6	0.3	0.8	0.6	0.4	37	菌丝量稍多, 舒展, 染色较浅
3	1.0	0.5	0.3	1.5	1.2	0.6	0.4	69.9	菌丝量稍多, 舒展, 染色较浅
4	1.0	0.5	0.3	0.3	0.8	0.3	0.2	94.7	菌丝量多, 成网, 染色深
5	2.0	1.0	0.3	1.5	0.8	0.3	0.4	172	菌丝量多, 成网, 染色深
6	2.0	1.0	0.3	0.3	1.2	0.6	0.2	17	菌丝量稍多, 舒展, 染色较深
7	2.0	0.5	0.6	1.5	0.8	0.6	0.2	28	菌丝量少, 断裂, 染色浅
8	2.0	0.5	0.6	0.3	1.2	0.3	0.4	25	菌丝量少, 断裂, 染色浅
k ₁	236.6	261	125	293.9	146.9	326.7	174.7	/	/
k ₂	242	217.6	353.6	173.7	331.7	295.9	303.9	/	/
R×3	5.4	43.4	228.6	120.2	184.8	30.8	129.2	/	/

注: 所有表中的发酵单位百分比都是与对照比较而得的百分数

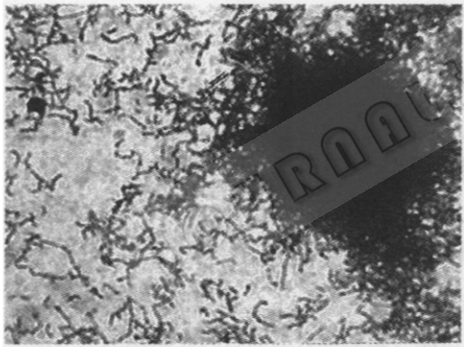


图 1 原种子配方培养 2d 菌丝情况

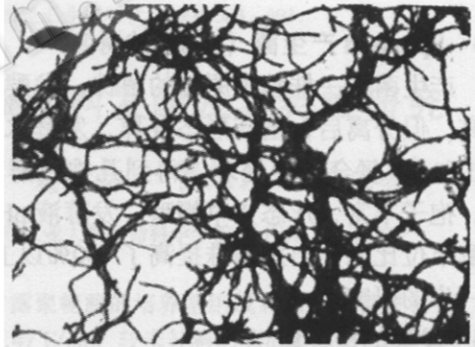


图 2 5号配方培养 2d 菌丝情况

2.2 最佳发酵培养基的选择

发酵培养基中, 植物性蛋白水解物是一种营养丰富、容易利用的氮源, 但其制备过程中会带入大量的无机盐, 不利于 X-S 的发酵, 发酵单位一直较低, 因此, 本文采用黄豆粉来代替它, 同时还增加了迟效碳源, 淀粉和含有微量元素和丰富氨基酸的玉米浆, 通过正交设计来试验, 以取得最佳发酵培养基。在该试验中, 采用前面选择的最佳种子配方。实验设计见表 2。

通过计算 K 值和 R 值可以看出各因素的最佳水平 K 值越大, 该水平越好; R 值越大, 说明它是主要因素。因此, 我们得到了最佳配方。即黄豆粉 1.0g、精氨酸 0.1g、玉米浆 1.5g、淀粉 3.0g、葡萄糖 5g、酵母粉 0.5g、CaCO₃ 0.3g, 定容至 100mL, 调节 pH 为 7.0。后来的发酵实验也证明该配方的发酵单位较原来发酵单位提高 10% ~ 15%。

表 2 正交试验结果与分析

组号	因 素 (g/100mL)							发酵单位 (%)
	CaCO ₃	黄豆粉	玉米浆	精氨酸	淀粉	酵母粉	葡萄糖	
1	0.1	2.5	0.5	0.1	2.0	1.0	2.0	4.4
2	0.1	1.0	3.0	0.2	3.0	0.5	5.0	110.8
3	0.1	5.0	1.5	0.3	1.0	0	4.0	7.6
4	0.3	2.5	0.5	0.2	3.0	0	4.0	36.6
5	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	1.0	2.0	22.3
6	0.3	5.0	1.5	0.1	2.0	0.5	5.0	35.9
7	0.5	2.5	3.0	0.1	1.0	0.5	4.0	67.6
8	0.5	1.0	1.5	0.2	2.0	0	2.0	67
9	0.5	1.0	0.5	0.3	3.0	1.0	5.0	12.7
10	0.1	2.5	1.5	0.3	3.0	0.5	2.0	19.8
11	0.1	1.0	0.5	0.1	1.0	0	5.0	49.6
12	0.1	5.0	3.0	0.2	2.0	1.0	4.0	1.8
13	0.3	2.5	3.0	0.3	2.0	0	5.0	61.8
14	0.3	1.0	1.5	0.1	3.0	1.0	4.0	113.3
15	0.3	5.0	0.5	0.2	1.0	0.5	2.0	3.2
16	0.5	2.5	1.5	0.2	1.0	1.0	5.0	66.1
17	0.5	1.0	0.5	0.3	2.0	0.5	4.0	44.5
18	0.5	5.0	3.0	0.1	3.0	0	2.0	8.2
K ₁	224	286.3	151	279.2	215.4	220.6	154.7	/
K ₂	273.1	407.5	272.5	285.5	331.4	266.5	336.9	/
K ₃	226.1	69.1	339.7	198.5	216.6	230.8	271.4	/
R × 3	49.1	338.4	188.7	87	116	45.9	182.2	/

2.3 Spinosad 产生菌 (X-S) 的诱变

产生菌是一株较为原始的菌株，发酵水平低，虽然培养基改良后，发酵单位有所提高，但分离后，菌落形态各异，发酵水平参差不齐，通过多次 UV 诱变、⁶⁰Co 辐射及 LiCl 和 UV 复合诱变处理，得到几株发酵单位较高的菌株。突变菌株菌落多数是白色的，孢子丰富，形态为草帽型，发酵液 pH 值大多数为 7.2~7.8 左右，突变的菌株最高发酵单位比原始出发菌株提高了 150% 以上。因此，诱变提高该菌株的发酵水平还可作进一步的研究。

2.4 发酵的接种量

采用最佳的种子和发酵培养基进行发酵试验，发现接种量对其发酵单位有所影响。分别以 5%、10%、15% 和 20% (v/v) 接种量接种、发酵，接种量 15% 时发酵单位最高 (160%)。

2.5 发酵液的处理

为了得到较好浸泡效果，分别用丙酮、甲醇、乙醇浸泡等体积的发酵液，3h 后丙酮浸泡液的单位最高。因此，我们在发酵液处理过程中采用丙酮浸泡。

2.6 发酵曲线

在对菌种有了初步认识的基础上，为了能更好的了解它的糖、氮消耗，以利于对发酵工艺的改进，本文对发酵过程进行了研究，结果见图 3。由图可见，在发酵过程中，糖氮消耗较快，尤其是在前期，菌丝生长迅速，在中期，菌体开始进入产抗期，这时糖氮、pH 都维持在较为稳定的水平。在第 7d 发酵单位达到最高值，糖氮已消耗完。之后，菌丝略有自溶现象，氮含量略微上升，pH 也上升了。因此，最佳放瓶时间定在第 7d。

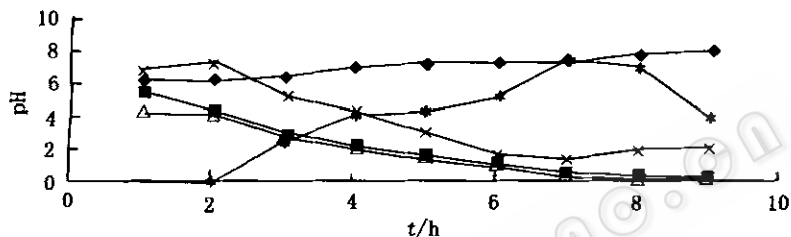


图3 发酵曲线

◆ pH, ■ 总糖 (%), △ 还原糖 (%),
 × 氨基氮 $\times 100$ ($\mu\text{g/mL}$), * 效价 $\times 10$ (%)

2.7 讨论

通过对 Spinosad 的发酵工艺的研究,改进种子、发酵培养基的配方及对产生菌的诱变处理,使原始菌株的生产能力有了较大的提高。我们的目的产物 Spinosad 为胞内产物,如何获得大量的菌丝体并能得到更多的产物,值得我们进一步研究。

参考文献

- [1] 沈寅初. 抗生素. 1981, 6 (3): 57.
- [2] 徐吉民. 正交法在医药科研中的应用. 北京: 中国医药科技出版社 1987. 20 ~ 51.
- [3] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社 1994. 383 ~ 393.