

影响内疗素发酵产量提高的原因探讨

——发酵过程中反馈调节机制的初步证实

高昭远 温庆英 陈锦明

左雪梅 吴玉兰 刘玉媛

(中国农业科学院土壤肥料研究所微生物室,北京)

内疗素是由刺孢吸水链霉菌 (*Streptomyces hygrospinosum* Yen et al.) 产生的农用抗菌素,对多种植物真菌病害有一定的防治效果。几年来,通过发酵工艺和菌种诱变选育等方面的研究,内疗素的产量已经获得一定程度的提高。但是与其它农用抗菌素相比,发酵产量的提高速度缓慢,至今仍停留在较低的水平。为了探讨影响内疗素发酵产量提高的原因,我们根据发酵过程中存在的一些现象,进行了如下试验。

一、现象

1973年我们曾在本室试验车间,采用 SF-104 和 C-277 菌株,在 2,000 升发酵罐上,进行了 16 批生产研制[采用二级发酵:克氏瓶培养物制成孢子悬液,接入种子罐,培养 25 小时后,以 5% 的种子量接入发酵罐,发酵 72 小时。种子罐培养基(%):葡萄糖 0.5,淀粉 1,玉米浆 1,NaCl 0.3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3, CaCO_3 0.3, KH_2PO_4 0.05,豆油 0.3。pH 6.5—7.0。发酵培养基(%):淀粉 2,葡萄糖 1,花生饼粉 1,玉米浆 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3, NaCl 0.3, CaCO_3 0.3, KH_2PO_4 0.05,豆油 0.3。pH 6.5—7.0]。根据对发酵过程的观察以及样品测定结果,发现在发酵早期,产量可迅速上升到一定水平,但随后增长速度趋于缓慢,在菌体尚未衰老的情况下,延长培养时间,发酵产量无明显增长(图 1)。

这种现象,不仅在发酵罐深层通气发酵中,而且在历年的摇瓶发酵试验中也都明显存在。此外,在山东省五莲县酿酒厂、文登县酿酒厂的

内疗素发酵罐深层通气发酵生产中也同样存在这种现象。仅因发酵条件和采用菌种不同,因而产量水平以及达到稳定产量的时间略有差异外,其基本规律一致。

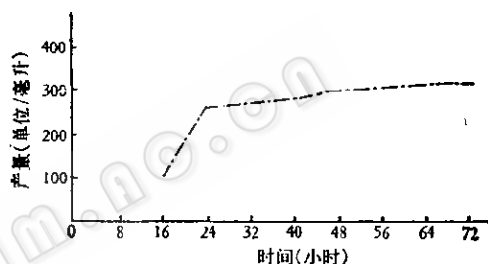


图 1 内疗素发酵过程中的产量增长变化

二、假设

上述现象的出现,是不是培养、发酵条件不合适所致?为此,我们曾在摇瓶中进行了各种培养基的比较选择、发酵过程中的中间补料和通气量等方面的试验,但结果都未见到明显的变化。进而,我们考虑到在许多次生代谢产物合成过程中曾发现存在着反馈调节的事实。即在发酵过程中,当培养基内的产物达到一定浓度时,会反过来影响该产物合成途径中酶的形成或酶的活性,因而使产物的合成受到抑制。在内疗素发酵过程中是否也存在着明显的反馈调节,因而限制了发酵产量的增长和整个发酵水平的提高?

三、试验和结果

为了证实上述假设的可能性,我们进行了

如下试验:

(一) 降低发酵产物浓度

在发酵过程中,通过降低培养基中产物的浓度,观察内疗素产量的增长变化。

试验选用 1283 号菌株,种子培养基与上述种子罐培养基相同(不加豆油)。500 毫升三角瓶中装 100 毫升培养基,28℃ 振荡培养 24—26 小时。发酵用摇瓶为 250 毫升三角瓶,装液量为 50 毫升。培养基组成(%):花生饼粉 2,葡萄糖 2,玉米面 2,淀粉 1,(NH₄)₂SO₄ 0.3,NaCl 0.3;CaCO₃ 0.3,KH₂PO₄ 0.02,MgSO₄ 0.05。pH 6.5—7.0。

试验共分五组,每组三瓶重复,同时接种(用同一瓶液体种子),进行振荡培养。

第一组为对照,进行正常培养,发酵过程中不改变摇瓶中的内疗素浓度。

第二组是在正常发酵至 45 小时时,在无菌条件下取出 20% 的发酵液(10 毫升),同时补入等体积的发酵培养基,即降低摇瓶中培养基的内疗素浓度 20%。然后继续培养至 72 小时。

第三组,取样和降低摇瓶中内疗素浓度的时间、方法同上,但补入摇瓶中等量的无菌水。

第四组为正常发酵至 55 小时时,按照上述方法补入等量的发酵培养基。

第五组,取样时间和方法同第四组,补入等量的无菌水。

上述摇瓶试验,全部发酵至 72 小时,分别过滤,测定产量。先后三批试验结果,内疗素产量增长趋势一致,平均结果如图 2 所示。

在本试验条件下,对照组摇瓶发酵至 45 小时,内疗素产量达 381 单位/毫升,55 小时产量达 403.8 单位/毫升,72 小时为 416.2 单位/毫

升。

第二、三组在补液后继续培养则合成内疗素的速度大大提高,经过后 27 个小时的发酵培

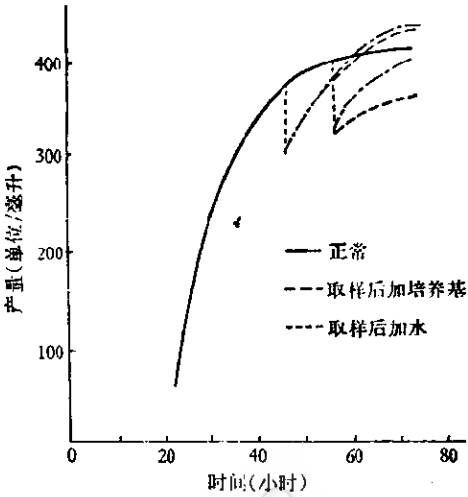


图 2 降低培养基中产物浓度后的内疗素增长变化

养,产量分别增加 137.2 单位/毫升和 129.4 单位/毫升,而同期内对照组仅增加 35.2 单位/毫升。

第四、五组补液后继续培养 17 个小时,产量分别达到 407.5 单位/毫升和 365.0 单位/毫升,即后 17 小时内分别增加 54.5 单位/毫升和 42 单位/毫升,而对照组同期仅增加 13.2 单位/毫升。

上述试验表明,内疗素发酵产量达到一定水平后,降低培养基中内疗素的浓度,即可解除抑制,继续合成内疗素。

(二) 放线酮对发酵产量的影响

为了进一步证实反馈抑制作用,补充了下述试验:在发酵培养基中于接种前定量加入无菌的浓放线酮溶液(内疗素系以正放线酮为主

表 1 培养基中加入放线酮的发酵结果

处 理		培养基含放线酮 (单位/毫升)	发酵产量 (单位/毫升)	增 加 量 (单位/毫升)
不 接 种	发酵培养基	0	0	0
	发酵培养基+放线酮	250	260	10
接 种	发酵培养基	0	420	420
	发酵培养基+放线酮	500	595	95

的物质),使摇瓶培养基中含有 500 单位/毫升的放线酮。不加放线酮的作为对照。各重复三瓶。此外还配有约含 250 单位/毫升放线酮的发酵培养基为不接种对照。振荡培养 72 小时。两批试验的平均结果见表 1。

试验结果表明: 在含有 500 单位/毫升放线酮的发酵培养基中,接种内疗素产生菌后,菌体虽然可以正常生长,但内疗素合成缓慢,发酵 72 小时仅增加 95 单位/毫升,合成明显受到抑制。而正常发酵摇瓶同时间内增长可达 420 微克/毫升。

四、讨论

通过降低产物浓度和在含有一定产物浓度的培养基中进行发酵的初步试验,可以认为,在内疗素发酵过程中,明显地存在着反馈调节的

机制,从而限制了内疗素的合成和最终产量的提高。引起反馈的主要因素是内疗素本身,而不是发酵过程中的中间产物。至于其作用为抑制酶的形成还是抑制酶的活性,即反馈阻遏还是反馈抑制,以及影响反馈的其它条件,尚需进行深入研究。

由于内疗素发酵过程中存在着明显的反馈调节机制,这就为确定经济有效的发酵时间提供了依据。在目前工艺条件下,试图通过延长发酵时间来增加内疗素的产量是徒劳无益的。为了提高内疗素的产量,必须重视和解决在发酵过程中限制内疗素发酵产量提高的反馈调节问题,除了从改进工艺等方面着手以外,应该找出解除或推迟反馈出现的条件和措施,同时着眼抗反馈突变株的选育,加强遗传育种工作。