

# 空气负离子对阿维链霉菌发酵周期及产量的影响

杨倩 许永建 郑之明

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

**摘要** 为了研究低浓度空气离子对微生物的效应,利用低浓度空气离子对固体培养基上 *Streptomyces avermitilis* 作用,分析了其次生代谢产物产生时间早晚,各组分含量变化,并且初步研究有效成分含量提高的机理。用浓度为  $5 \times 10^3/\text{cm}^3$  的空气负离子连续十天处理固体培养基上的阿维链霉菌,经过高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)检测后发现:经过处理,该菌株提早四天到达阿维菌素(Avermectins, AVM)产素平台期,有效成分 B1a 和 B1b 提高约 20%,而无效成分含量无显著提高。经过分析,低浓度空气负离子可有效缩短该菌种的发酵周期,提高有效成分含量,刺激次生代谢过程。

**关键词** 负离子,阿维链霉菌,阿维菌素

**中图分类号** O64, Q67, Q691

空气负离子的发现和应用源于 19 世纪末。100 多年来,空气负离子生物效应研究在与生理、动物、微生物、植物等学科交叉研究中取得了丰硕成果。但是,这些研究主要集中于其增进人体健康作用和高浓度空气负离子杀菌<sup>[1-7]</sup>。据了解,至今尚无关于低浓度离子对微生物作用、促进微生物次生代谢、增加次生代谢产物方面的报道。

阿维菌素(Avermectins, AVM)是由格兰氏阳性菌阿维链霉菌产生的一类十六元环大环内脂类抗生素<sup>[8]</sup>,具有高效、安全、农畜两用等特点,在常用剂量下,对人畜安全,不伤害天敌,不破坏生态,具有广泛的抗寄生虫的活性,是最有效的昆虫、螨虫和寄生虫杀虫剂之一。天然的阿维链霉素有八种组分: A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a 和 B2b,其中 B1 最具有活性,尤其是 B1a。B1a 和 B1b 具有相同的生物和毒理学性质<sup>[9]</sup>。

目前,基因水平的 AVM 生物合成研究已取得突破性进展,其生物合成途径已基本阐明<sup>[10,11]</sup>,有关生物合成基因簇已被克隆,多数基因的功能已明确<sup>[12,13]</sup>。Ikeda 等<sup>[14]</sup>完成了阿维链霉菌全基因组的测序工作。我国的此领域研究则更多地采用经典的改造菌种的手段,由发酵培养条件的优化<sup>[15,16]</sup>和诱变育种筛选高产菌、提高发酵效价<sup>[17-21]</sup>。但通过优化外界条件提高产量存在不少缺点。对于一株确定的菌株,当其碳源、氮源、无机盐、生长因子和水

等营养因素和温度、通气量等外界因素已达最优组合时,就难以继续提高产量。阿维链霉素是一种十六元环大环内脂类抗生素,其抗生素生成步骤繁多,次生代谢过程复杂,用传统的诱变育种方式提高产量比较困难,负突变概率大,筛选出的高产菌株易退化,筛选工作量大,并且缺乏成熟而简便的筛选方法。并且,上述方法均不能有效缩短发酵周期。放线菌属微生物生长缓慢、发酵周期长的特点使单位时间发酵轮数低,产量提高受限制,是该工业发展的一个瓶颈问题。

本文提出低浓度空气负离子的微生物作用,用空气负离子对阿维链霉菌固体培养过程进行处理,发现空气负离子能有效缩短阿维链霉菌发酵周期,并提高阿维菌素产量。经检测,空气负离子处理后的阿维链霉菌的发酵周期大大缩短,产量有很大提高,并提高了有效成分 B 组分的比例,后处理分离也方便。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

阿维链霉菌,本实验室保存。

### 1.2 培养基及培养条件

培养条件:培养基 0.1MPa, 121℃灭菌 30min,

中国科学院创新项目支持(KSCX2-SW-324)

第一作者:杨倩,女,1981年12月出生,2004年毕业于西北大学生命科学学院,现为中国科学院等离子体物理研究所读硕士研究生

通讯联系人:郑之明

收稿日期:初稿 2006-09-26,修回 2006-11-15

培养温度 28℃。固体培养基: 酵母提取物 4.0g/L, 麦芽提取物 10g/L, 葡萄糖 4.0g/L, 琼脂 15.0g/L。

### 1.3 实验方法

处理方法: 实验在体积为 0.5m<sup>3</sup> 的密闭容器中进行。一个容器中放置负离子发生器 (见图 1), 另一为对照。尖端和培养基之间的距离为 10cm。氧气通过八层纱布进入密闭容器。负离子浓度为 5×10<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>。

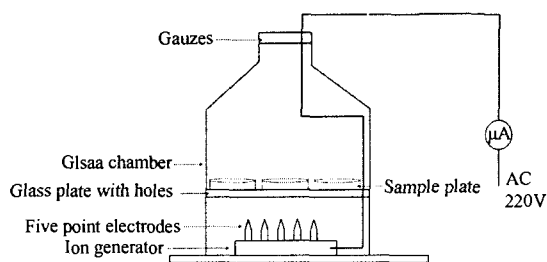


Fig.1 Experiment set-up for negative air ions on the *Streptomyces avermitilis*

### 1.4 操作方法

(1) 将斜面培养基上培育 10d、已长出丰富灰色孢子的斜面, 用 10mL 无菌水洗下, 迅速倒入盛有 90mL 无菌水、带有玻璃珠的 250mL 三角瓶中, 沿顺时针转动三角瓶 10min。

(2) 吸取菌液 0.1mL 于盛有 4mL 固体培养基的细胞培养皿 (规格 35mm×10mm style Treated Polystyrene 20/Sleeve Non-Pyrogenic, Sterile corning Incorporated Corning, NY14831) 上, 用玻璃涂棒将菌液涂抹均匀。

(3) 将涂好的平皿敞口放置于灭菌封闭容器中, 接通电源, 产生 5×10<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> 的空气负离子, 持续通入 12d, 在通电后第三天取样, 以后每天同时取出对照组和负离子处理组的样品, 进行处理, 等待检测。

(4) 平皿菌苔检测法: 铲取 28℃ 培养的菌苔, 置于 -20℃ 预冷研钵中, 迅速研磨破碎, 再加入 10mL 分析级无水乙醇, 倒入 50mL 离心管中, 旋涡式混合震荡器混匀, 3000r/min 离心 5min。吸取上清液, 用 0.22μm 的滤膜过滤, 进行 HPLC 检测。

### 1.5 阿维菌素含量检测方法

HPLC 法: 色谱柱: HYPERSIL C18 150×4.6mm; 流动相: CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O = 90:10, 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 246nm, 柱温: 25℃, 进样量: 20μL。

## 2 实验结果

实验样品的 HPLC 峰值、出峰时间和组分见图 2。

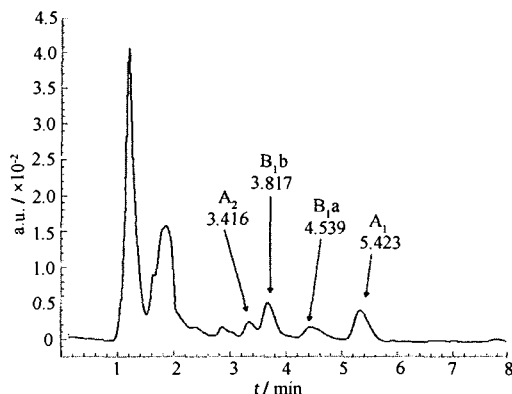


Fig.2 Chromatogram of the Avermectins samples

各峰的含量分析如下: (a) 峰一, 出峰时间 3.416min, 为 AVM A2 成分。由图 3 可见, 负离子处理样品与对照组的峰面积与总变化趋势一致, 说明负离子处理对 A2 组分含量无显著影响。

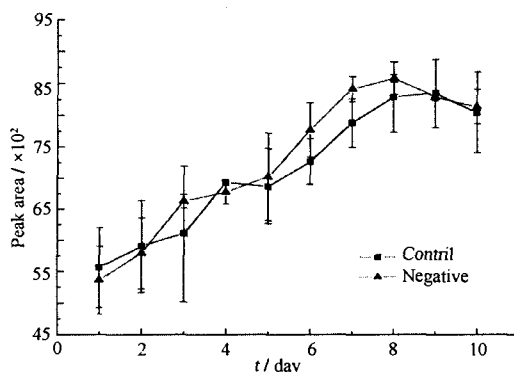


Fig.3 The A2 content of Avermectins produced via negative ion treatment and the control

(b) 峰二, 出峰时间 3.817min, 为 AVM B1b 成分, AVM 有效成分之一, 由图 4 可见, 从第四天开始, 该组分含量开始显著升高, 当达到产量平台期时, 负离子处理样比对照组样品含量增加了 27.9%。

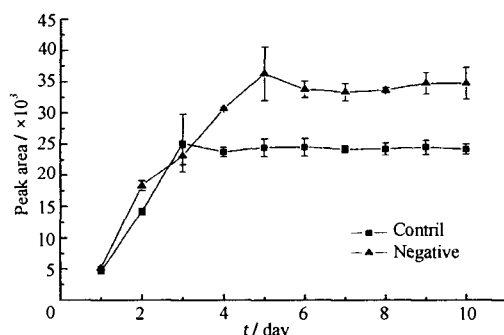


Fig.4 The B1b content of Avermectins produced via negative ion treatment and the control

(c) 峰三, 出峰时间 4.539min, 为 AVM B1a 成分, 即最具活性组分, 由图 5 可见, 在负离子处理的第三天(取样第一天), 对照样峰面积和处理组峰面积无显著性差异。而处理第四天, 处理组的峰面积为 24411, 而对照组为 11685。处理组第三天和第四天的产量增长率达到 78.6%, 而对照组仅为 55.9%。更为显著的是, 处理组在第四天即达产量平台期, 而对照组则为第八天; 处理组在第四天的产量比同期对照组产量提高 73.5%, 峰值产量高 20.4%。

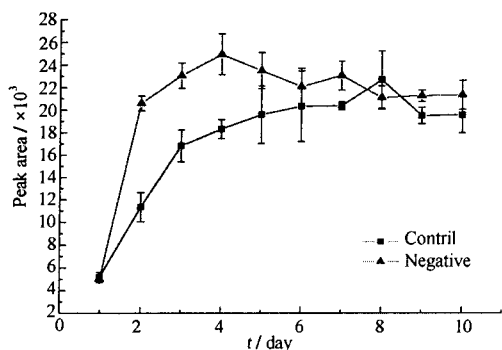


Fig.5 The B1a content of Avermectins produced via negative ion treatment and the control

(d) 峰四, 出峰时间 5.423min, 为 AVM A1 成分, 由图 6 可见, 负离子处理样品与对照组样品每天测定的峰面积与总变化趋势一致, 说明负离子处理对于样品 A1 组分含量无显著影响。

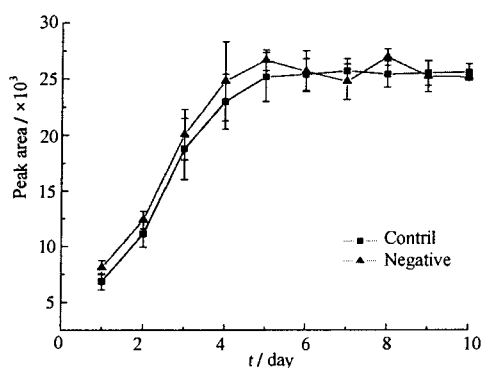


Fig.6 The A1 content of Avermectins produced via negative ion treatment and the control

### 3 讨论

#### 3.1 低浓度负离子引起次生代谢水平改变

由图 3—图 6 的阿维链霉菌组分分析结果, A1、A2 组分的实际峰面积与对照组保持持平状态, 而 B1a、B1b 的含量显著升高, 且平台期增值水平一

致。可见负离子处理对 a 组分和 b 组分的产量提高起同样的作用, 即负离子处理增加了进入产生阿维链霉菌的代谢流, 但未影响进入代谢通路中的 L-Ile 和 L-Val 的比例, L-Ile 与 L-Val 分别是 a 组分和 b 组分的前体物<sup>[22,23]</sup>。A2 的含量与对照样保持相同水平, 表明由 B2a 到 A2a 和 B2b 到 A2b 的产量并未增加。A1 的含量与对照样的水平保持一致, 表明由 B1a 到 A1a 和 B1b 到 A1b 的产量并未增加。由 B1a 与 B1b 的产量有显著的增加反映了进入整个次生代谢的流量增加; 而 A1a 组分和 A1b 组分未显著增加, 反映由 B1a 到 A1a 和由 B1b 到 A1b 的途径的产量未增加。B 组分到 A 组分的途径是 B-0-5-甲基转移酶 (B-5-O-M ethyltransferase) 直接催化<sup>[24,25]</sup>。以上结果说明, 阿维链霉菌的次生代谢途径被激活, 而最后一步由 B 组分转甲基到 A 组分的步骤并未受到激活, 而保持原水平。AVM 生物合成途径研究表明, AVM A 组分 C<sub>5</sub> 位甲氧基来源于 S-腺苷甲硫氨酸, 此甲基化反应由依赖于 SAM 的 B-O 甲基转移酶催化<sup>[26]</sup>。SAM 由 ATP 与甲硫氨酸在甲硫氨酸腺苷转移酶的催化下合成, 甲硫氨酸的合成需要 5-甲基四氢叶酸提供甲基。现在该酶的含量没有提高, 说明可能是由于促使合成 SAM 的甲基供体的过程并没有受到负离子激活, 从而保持原有水平参与到 SAM 的合成中。

总之, 负离子处理过的样品的 HPLC 图谱显示, 通过处理, 样品的次生代谢水平提高, 进入整个次生代谢途径的 L-Ile 和 L-Val 按原有比例增多, 从而使得整个代谢途径 B 产物增加, 而由于受另一个代谢途径控制的一碳单位转移过程没有受到激发, 从而 B-5-O-甲基转移酶保持原有水平, 则 B 组分不能以同样的水平转化到 A 组分, 最终导致有效成分 B 组分的大量增加。

#### 3.2 低浓度负离子促进次生代谢原因的讨论

由于缺乏先前的研究基础, 该实验中空气负离子促进次生代谢的真实机理还不明了, 真实机制的阐明还要依赖以后更加深入的研究。从以上结果可推测促进次生代谢的效应可能由以下两种原因引起:

(1) 空气负离子可以调节细胞呼吸率, 提高菌体的整个代谢过程。文献[27]—[29]的研究表明, 空气离子有着很显著的正生物效应, 这些离子与组织细胞线粒体的能量依赖性分化过程有着显著的关系。Staurouskain<sup>[27]</sup>研究大鼠吸入空气负离子后肝脏

心匀浆中线粒体赖能过程, 发现负离子可改善线粒体的呼吸率, 摧毁  $\text{Ca}^{2+}$  在线粒体内积累, 提高 ADP/O 值。空气离子在加强线粒体氧化磷酸化, 调节呼吸率时, 主要是保存和维护线粒体三分子体结构的完整性。并且, 经过空气负离子处理过的动物, 其红细胞中 SOD 活性增强, 催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  转化为  $\text{H}_2\text{O}$ , 清除了  $\text{H}_2\text{O}_2$  毒害作用——脂质过氧化。而这些研究表明适当浓度下空气负离子对细胞活力增强, 延缓衰老有着显著的作用。由于细胞活力增强, 导致细胞的代谢途径包括次生代谢途径受到了刺激作用, 控制次生代谢物的酶的活性提高, 使得其次生代谢物产量提高, 提早进入产素高峰期, 这就是为什么处理后的菌体可以缩短发酵时间提高产量的原因。

(2) 空气离子中的某些成分可能消除了代谢过程中的产物抑制作用。微生物在生长过程中机体内的复杂代谢过程是相互协调和高度有序的, 并对外界环境的改变能够迅速作出反映。在实际生产中, 往往需要高浓度地积累某一种代谢产物, 而这个浓度又常常超过细胞正常生长和代谢所需的范围。因此要达到超量积累这种产物, 提高生产效率, 必须打破微生物原有的代谢调控系统, 在适当的条件下, 让微生物建立新的代谢方式, 高浓度地积累人们所期望的产物, 而空气负离子中的某种或混合成分协助促进微生物建立新的代谢方式。

总之, 造成阿维链霉菌产生抗生素提前的效应有可能是上面提到的一种或者几种效应的综合, 要清楚阐述该机理, 还有待深入研究。

#### 4 结论

在生长过程中, 向固体培养基上 *Streptomyces avermitilis* 通入空气负离子确实是一种行之有效显著缩短发酵周期, 提高发酵效价的方法。由于缺乏低浓度空气负离子对微生物的研究基础, 该方法缩短周期和提高发酵效价的真实原因和具体的机理的阐明还需要以后大量而深入的研究。并且, 将来通过大量摇瓶水平和发酵罐水平的实验, 摸索出最为合适的作用浓度和作用方式, 则可以在未来的工业化生产抗生素中显著缩短发酵时间, 以达到降低生产成本, 降低能耗的目的。

#### 参考文献

- 1 Krueger A P, Wesley Hicks W, Beckett J C. *Int J Biometeorol*, 1957, **1**(1): 61-70
- 2 Krueger A P, Hicks W W, Beckett J C. *J Franklin Inst*, 1958, **26**(6): 9-19

- 3 Krueger A P, Kotaka S, Reed E J, *et al.* *Int J Biometeorol*, 1970, **14**(3): 247-260
- 4 Krueger A P, Reed E J, Brook K B, *et al.* *Int J Biometeorol*, 1975, **19**(1): 65-71
- 5 Kellogg III E W, Yost M G, Barthakur, *et al.* *Nature*, 1979, **381**(11): 400-401
- 6 Noyce J O, Hughes J F. *J Electrostat*, 2002, **54**(2): 179-187
- 7 Noyce J O, Hughes J F. *J Electrostat*, 2003, **57**(1): 49-58
- 8 Burg R W, Miller B M, Baker E E, *et al.* *Chemother*, 1979, **15**(3): 361-367
- 9 Egerton J R, Ostlind D A, Blair L S, *et al.* *Antimicrob Agents Ch*, 1979, **15**(3): 372-378
- 10 Ikeda H, Smura S. *Chem Rev*, 1997, **97**(7): 2591-2610
- 11 Yon Y J, Kim E S, Hwang Y S, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**(6): 626-634
- 12 Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**(17): 9509-9514
- 13 Ikeda H, Nonomiya T, Smura S. *J Ind Microbiol Biotech*, 2001, **27**(1): 70-176
- 14 Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, *et al.* *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(5): 526-531
- 15 宋渊, 李季伦, 王得明, 等. *中国抗生素杂志*, 2005, **26**(3): 176-193  
SONG Yuan, LI Jilun, WANG Deming, *et al.* *Chinese J Antibiotics*, 2005, **26**(3): 176-193
- 16 宋渊. *精细与专用化学品*. 2002, **10**(21): 57-59  
SONG Yuan. *Fine and Specialty Chemicals*, 2002, **10**(21): 57-59
- 17 宋渊, 曹贵明, 陈芝, 等. *中国生物技术杂志*, 2000, **16**(1): 31-35  
SONG Yuan, CAO Guiming, CHEN Zhi, *et al.* *Chinese J Biotechnol*, 2000, **16**(1): 31-35
- 18 阎浩林, 何汉洲, 梁丽丽. *生物技术*, 2002, **12**(4): 16-17  
YAN Haolin, HE Hanzhou, LIANG Lili. *Biotechnology*. 2002, **12**(4): 16-17
- 19 冯军, 赵文杰, 程晴华, 等. *中国医药工业杂志*, 2003, **34**(3): 118-121  
FENG Jun, ZHAO Wenjie, CHENG Qinghua, *et al.* *Chinese J Pharm*, 2003, **34**(3): 118-121
- 20 于秀莲, 何建勇, 白秀峰, 等. *沈阳药科大学学报*, 2004, **21**(3): 222-225  
YU Xiulian, HE Jianyong, BAI Xiufeng, *et al.* *J Shenyang Pharm Univ*, 2004, **21**(3): 222-225
- 21 攸德伟, 谌颀, 储炬, 等. *中国抗生素杂志*, 2005, **30**(3): 143-158

- YOU Dewei, CHEN Jie, CHU Ju, *et al.* Chinese J Antibiotics, 2005, **30**(3): 143-158
- 22 Cane D E, Liang T C, Kaplan L, *et al.* J Amm Chem Soc, 1983, **105**(12): 4110-4112
- 23 Schulman M D, Valentino D, Hensens O, *et al.* J Antibiot, 1986, **44**(4): 541-549
- 24 Schulamn M D, Valentino D, Hensens O D. J Antibiot (Tokyo), 1985, **38**(11): 1494-1498
- 25 Rodriguez L, Rodriguez D, Olano C, *et al.* J Bacteriol, 2001, **183**(18): 5358-5363
- 26 Chiang P K, Gordon R K, Tal J, *et al.* Faseb J, 1996, **10**(4): 471-480
- 27 Staurouskain I G. Biofizika, 1998, **43**(5): 766-771
- 28 Temnor A V, Siroat T V. Biochemistry Mosc, 1997, **62**(10): 1089-95
- 29 Argo P, Franz R, Green J, *et al.* 11th International Conference on Atmospheric Electricity, Guntersville, AL, 1999

## The influence of air ions on the fermentation cycle and antibiotic output of *streptomyces avermitilis*

YANG Qian   XU Yongjian   ZHENG Zhiming

(Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

**ABSTRACT** Effect of low concentration negative air ions on *Streptomyces avermitilis* on solid culture medium was studied. The microorganism was treated consecutively with negative air ions of  $5 \times 10^3/\text{cm}^3$  in 10 days. It was found that under the treatment, *Streptomyces avermitilis* reached the plat-stage production 4 days earlier than the control. Moreover, quantities of both effective contents of B1a and B1b increased by about 20%, while no remarkable changes in the ineffective contents were observed. Repeated experiments prove that the negative ion treatment is a useful way to shorten long fermentation cycle and to increase antibiotic production.

**KEYWORDS** Negative ions, *Streptomyces avermitilis*, Avermectin

**CLC** O64, Q67, Q691