利用放线菌固态发酵生产农用抗生素的初步研究*

李增波, 薛泉宏, 梁军锋
(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘　要]　采用杯碟法研究了 4 株拮抗性放线菌固态和液态发酵产物对辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)及青霉(*Penicillium*)4 株供试靶标菌的抑菌活性。结果表明, 利用放线菌固态发酵生产农用抗生素的思路是可行的。供试的 04, 07 和 08 号 3 株放线菌大米固态发酵产物与黄豆粉液态发酵产物对靶标菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的相对抑菌环宽度分别为 4.0 mm/g 与 0.7 mm/mL, 对埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)的相对抑菌环宽度分别为 5.2 mm/g 与 1.1 mm/mL, 供试菌固态发酵抗生素活性远大于液态发酵, 表明通过固态发酵提高抗生素得率的设想在微生物合成阶段是可以实现的。同时还发现, 固态与液态两种发酵模式对某些抗生素的合成有极显著影响。

[关键词]　放线菌; 固态发酵; 农用抗生素; 抑菌活性
[中图分类号]　S482.2+8　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1671-9387(2005)08-0117-05

农用抗生素以用量少、防效好、使用方便及对环境污染小等优点, 日益受到世界各国的重视和关注。我国农用抗生素的研究是继医用抗生素之后发展起来的, 现已成功用于农作物病害防治的农用抗生素主要有阿维菌素、井岗霉素等[1~3]。医用抗生素一般采用液态发酵, 该方法技术成熟, 但能耗高, 废液处理难。由于抗生素在农作物病害防治时用量较大, 单位面积上的防治费用较高, 限制了抗生素在农业生产中的推广使用。固态发酵具有对发酵设备要求较低、环境污染小及产物得率高等优点, 因此, 已有利用红曲霉固态发酵生产洛伐他汀[4], 以及用顶头孢霉固态发酵生产头孢菌素[5~8]等的研究报道, 证明利用固态发酵生产上述药物是可行的。农用抗生素主要用于农作物病害防治, 对产品的纯度要求不如医用抗生素高, 如果能够利用固态发酵生产农用抗生素, 则可以提高抗生素得率, 降低成本, 为农用抗生素的大规模生产及广泛应用提供新的途径。本研究对几株拮抗放线菌在固态培养中所产拮抗性物质的抑菌活性进行了初步探索, 旨在为放线菌固态发酵生产农用抗生素的可行性提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　材　料

1.1.1　供试靶标菌　辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*, 代号为 P3)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, 代号为 X)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 代号为 M)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 代号为 A)、埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*, 代号为 E)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, 代号为 H)、青霉(*Penicillium*, 代号为 P), 以上供试靶标菌由西北农林科技大学微生物资源研究室提供。

1.1.2　供试拮抗菌　供试的 10 株拮抗放线菌, 由西北农林科技大学微生物资源研究室从青藏高原土壤分离纯化的 4 500 余株放线菌中, 通过平皿体外试验筛选得到。供试菌对 7 种靶标菌的皿内抑菌环宽度见表 1[9]。

1.1.3　培养基　牛肉膏蛋白胨培养基[10]、PDA 培养基[10]、改良 PDA 培养基[11]、改良黄豆粉琼脂培养基[12]。

* [收稿日期]　2004-12-17
[基金项目]　陕西省科技攻关项目"生物农药研究与产业化开发"(2003K03-G2)
[作者简介]　李增波(1981-　), 男, 陕西安康人, 在读硕士, 主要从事微生物资源研究。E-mail: only-lizengbo@163.com
[通讯作者]　薛泉宏(1957-　), 男, 陕西白水人, 教授, 主要从事微生物资源研究。E-mail: xuequanhong@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 10 株放线菌对 7 种靶标菌的皿内抑菌环宽度

Table 1 Width of antimicrobial cycle of 10 actinomycetes against 7 kinds of bacteria and fungi mm

菌号 No.	靶标菌 Bacteria and fungi						
	P3	X	M	A	E	H	P
01	6.0	-	15.0	15.0	-	10.0	-
02	6.0	-	5.5	8.5	-	8.5	-
03	5.5	3.5	5.0	11.0	4.0	6.0	4.5
04	8.5	-	8.5	11.5	3.5	9.5	-
05	5.5	-	7.0	13.0	-	6.5	-
06	3.5	6.5	6.5	6.0	4.0	5.0	-
07	11.0	-	7.0	9.5	8.0	-	-
08	7.5	-	-	4.5	9.5	7.0	-
09	7.0	5.0	-	-	-	8.5	-
10	10.5	-	10.0	11.5	10.0	-	-

1.2 方 法

1.2.1 靶标菌平板制备 采用涂抹法将靶标菌接种至牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基和改良 PDA 培养基平板上, 备用。

1.2.2 改良黄豆粉液体培养基制备 去改良黄豆粉琼脂培养基中的琼脂, 即得改良黄豆粉液体培养基; 量取改良黄豆粉液体培养基 40.0 mL, 装于 250 mL 三角瓶中, 121 ℃灭菌 30 min, 即可用于供试菌的液态发酵。

1.2.3 固态发酵培养基制备 共制备 A, B 两种固态培养基。A 为大米+ 改良黄豆粉液体培养基, 取大米 30 g, 按大米∶改良黄豆粉液体培养基质量比 10∶7, 加黄豆粉液体培养基, 装于 250 mL 三角瓶中, 摇匀后静置 5 h, 121 ℃灭菌 30 min, 即得大米固态培养基; B 为小米+ 改良黄豆粉液体培养基, 制备方法同上。

1.2.4 孢子悬浮液的制备 将液体石蜡保存的菌种活化 3 次, 接种于改良黄豆粉琼脂斜面上, 28 ℃培养 3 d 后吸取 2 mL 无菌水加入试管中, 并刮洗斜面, 然后将刮洗液倒入装有 30 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 振荡 5 min 后备用。

1.2.5 液态和固态发酵 将孢子悬浮液按体积比 10% 的接种量接种于液体和固体培养基中, 搅拌均匀, 28 ℃静止培养 7 d, 其间每天摇瓶 2 次; 重复 2 次。

1.2.6 发酵物的预处理 将 40.0 mL 液态发酵液用 2 层无菌纱布过滤, 所有滤液 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液用旋转蒸发仪在 50 ℃下减压蒸馏得浓缩液约 3 mL; 称取固态发酵物 3 份, 每份 10.0 g, 分别加蒸馏水、无水乙醇和乙酸乙酯各 30 mL, 搅拌混匀, 4 ℃冰箱过夜, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 50 ℃下减压蒸馏得浓缩液约 3 mL。将上述两种发酵浓缩液于 4 ℃冷藏备用。

1.2.7 发酵浓缩液抑菌活性皿内检测[13, 14] 将灭菌牛津杯放在供试靶标菌平板上(3 个/皿), 向每个牛津杯加 100 μL 发酵浓缩液, 28 ℃培养 4 d 后检测抑菌活性。抑菌活性用相对抑菌环宽度表示: 相对抑菌环宽度(mm/mL 或 mm/g) = (抑菌圈直径- 牛津杯直径)/发酵产物量。

1.2.8 平板(CK)抑菌活性皿内检测 将供试放线菌采用涂抹法接种至改良黄豆粉琼脂平板上, 28 ℃培养 7 d, 用打孔器切成 7 mm 的琼脂饼, 将该琼脂饼正向放置于供试靶标菌平板上(3 块/皿), 28 ℃培养 4 d 后检测抑菌活性, 抑菌活性用抑菌环宽度表示: 抑菌环宽度(mm) = 抑菌圈直径- 琼脂块直径。

2 结果与分析

2.1 固态发酵菌株筛选

从表 2 可以看出, 在固态基质上, 经过 4 d 培养, 供试的 10 株放线菌中仅有 04、07、08 及 10 号 4 株放线菌在两种基质上生长良好, 表面布满菌体; 其余 6 株放线菌菌体数量少, 生长缓慢, 不适于固态发酵, 故选定 04、07、08 及 10 号 4 株放线菌作为固态发酵试验用菌株。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　10 株放线菌在固态发酵培养基上的生长状况

Table 2　Growth of 10 actinomycetes in solid-state fermentation

菌号 No.	培养基 Medium	生长情况 Growth 2 d	4 d	6 d	菌号 No.	培养基 Medium	生长情况 Growth 2 d	4 d	6 d
01	大米 Rice	-	+	+	06	大米 Rice	-	-	-
	小米 Millet	-	-	-		小米 Millet	-	-	-
02	大米 Rice	-	-	+	07	大米 Rice	+	+ +	+ + +
	小米 Millet	-	-	-		小米 Millet	+	+ +	+ +
03	大米 Rice	-	+	+	08	大米 Rice	+	+ +	+ + +
	小米 Millet	-	-	-		小米 Millet	+	+ +	+ +
04	大米 Rice	+	+ +	+ + +	09	大米 Rice	-	-	-
	小米 Millet	+	+ +	+ + +		小米 Millet	-	-	-
05	大米 Rice	-	-	-	10	大米 Rice	+	+ +	+ + +
	小米 Millet	-	-	-		小米 Millet	+	+ +	+ +

注: "+ + +"、"+ +"、"+"及"-"分别表示生长情况良好(菌落完全布满培养基表面)、一般(菌落未完全布满培养基表面)、较差(培养基表面菌落稀疏)及未生长(培养基表面无菌落生长)。

Note: "+ + +"、"+ +"、"+"and "-"means that growth of actinomycetes is good- colony cover the medium completely, ordinary- colony cannot cover the medium completely, bad- the colony on the medium is quite rare, no growth- there is no colony on the medium respectively.

2.2　液态发酵和固态发酵产物的抑菌活性

放线菌在固态发酵中能否合成有抑菌活性的次级代谢产物, 是利用放线菌固态发酵生产农用抗生素的关键。由表 3 可知, 供试的 04、07 及 08 号 3 株放线菌大米固态发酵产物与黄豆粉液态发酵产物对靶标菌埃希氏大肠杆菌(E)的相对抑菌环宽度分别为 2.0～6.0 mm/g 与 0.4～1.0 mm/mL, 平均为 4.0 mm/g 与 0.7 mm/mL, 前者是后者的 5.7 倍; 这 3 株放线菌固态发酵与液态发酵产物对靶标菌金黄色葡萄球菌(A)的情况与埃希氏大肠杆菌(E)相似, 其相对抑菌环宽度分别为 3.0～8.5 mm/g 与 0.9～1.6 mm/mL, 平均为 5.2 mm/g 与 1.1 mm/mL, 前者为后者的 4.7 倍; 小米固态发酵产物抑菌活性检测结果与大米相似。由此可见, 放线菌固态发酵生产抗生素是可行的。在固态发酵条件下, 发酵产物的抑菌活性远高于液态发酵, 由此可知固态发酵中抗生素的合成量多于液态发酵, 这为提高固态发酵抗生素得率提供了生物合成阶段的保证。

表 3　供试菌在 2 种发酵模式下的相对抑菌环宽度

Table 3　Relative width of antimicrobial cycle of 4 actinomycetes against 4 kinds of bacteria and fungi under 2 kinds of fermentation

靶标菌 Bacteria and fungi	相对抑菌环宽度 Relative width of antimicrobial cycle: 04 液态/(mm·L⁻¹) Liquid	04 固态/(mm·g⁻¹) Solid 大米 Rice	04 固态/(mm·g⁻¹) Solid 小米 Millet	07 液态/(mm·L⁻¹) Liquid	07 固态/(mm·g⁻¹) Solid 大米 Rice	07 固态/(mm·g⁻¹) Solid 小米 Millet
E	0.5	2.0	2.0	1.0	6.0	2.0
A	0.9	3.0	3.0	1.6	4.0	3.0
P3	1.5	-	-	1.2	-	-
P	-	-	-	-	-	-

靶标菌 Bacteria and fungi	相对抑菌环宽度 Relative width of antimicrobial cycle: 08 液态/(mm·L⁻¹) Liquid	08 固态/(mm·g⁻¹) Solid 大米 Rice	08 固态/(mm·g⁻¹) Solid 小米 Millet	10 液态/(mm·L⁻¹) Liquid	10 固态/(mm·g⁻¹) Solid 大米 Rice	10 固态/(mm·g⁻¹) Solid 小米 Millet
E	0.4	2.5	-	0.9	-	-
A	0.9	8.5	7.0	2.1	-	-
P3	1.1	-	-	3.0	-	-
P	-	-	-	-	-	-

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由表 3 还可以看出, 对某些菌株或某些活性物质合成而言, 液态与固态发酵存在显著差异。如 04、07 及 08 号 3 株放线菌液态发酵时对 P3 有抑菌活性, 但在固态发酵时, 发酵产物对 P3 的活性消失, 表明在液态发酵条件下可以合成的某些活性物质在固态发酵条件下停止合成; 10 号放线菌液态发酵产物对靶标菌 E, A 及 P3 均有抑菌活性, 而固态发酵产物对 E, A 及 P3 的抑菌活性同时消失, 其原因有待进一步研究。

2.3 固态发酵不同溶剂提取液的抑菌活性

放线菌在固态发酵中可以合成有抑菌活性的次级代谢产物, 活性物质的提取效果是决定能否利用放线菌固态发酵生产农用抗生素的另一关键问题。由表 4 可知, 供试 04、07 及 08 号放线菌大米固态培养基发酵产物中蒸馏水及无水乙醇提取物对靶标菌 E 的相对抑菌环宽度分别为 2.0～6.0 mm/g 及 2.0～5.0 mm/g, 平均为 3.5 mm/g 及 3.8 mm/g, 二者差异不大; 乙酸乙酯提取物无抑菌活性。即固态发酵产物中的活性物质可能是一些极性较强的组分, 可以通过适当的溶剂提取并进一步提纯, 达到防治作物病害的程度。04、07 号放线菌蒸馏水及无水乙醇提取物对靶标菌 A 的抑制效果与靶标菌 E 类似。但 08 号放线菌大米及小米固态发酵产物中活性成分与其他菌株不同, 该菌株在两种固态培养基上的发酵产物在 3 种提取溶剂中均表现出较强的抑菌活性, 其大米发酵产物蒸馏水、无水乙醇及乙酸乙酯提取物对靶标菌 A 的相对抑菌环宽度分别为 8.5, 2.5 及 8.5 mm/g, 即该固态发酵产物中的活性物质中可能具有不同的化学结构, 可溶于极性不同的 3 种溶剂。以上结果表明, 放线菌在固态发酵中合成的拮抗性物质是可以用不同溶剂提取的。

表 4 供试菌固态发酵产物不同溶剂提取液的相对抑菌环宽度

Table 4 Relative width of antimicrobial cycle of extracts from different solvents in 4 actinomycetes under solid-state fermentation

mm/g

靶标菌 Bacteria and fungi	溶剂 Solvent	相对抑菌环宽度 Relative width of antimicrobial cycle							
		04		07		08		10	
		大米 Rice	小米 Millet	大米 Rice	小米 Millet	大米 Rice	小米 Millet	大米 Rice	小米 Millet
E	蒸馏水 Water	2.0	2.0	6.0	2.0	2.5	-	-	-
	无水乙醇 Ethanol	2.0	3.5	4.5	2.5	5.0	2.0	4.0	2.5
	乙酸乙酯 Ethyl acetoacetate	-	-	-	-	-	-	-	-
A	蒸馏水 Water	1.5	3.0	4.0	3.0	8.5	7.0	-	-
	无水乙醇 Ethanol	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0
	乙酸乙酯 Ethyl acetoacetate	-	-	-	-	8.5	3.5	-	-
P3	蒸馏水 Water	-	-	-	-	-	-	-	-
	无水乙醇 Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	乙酸乙酯 Ethyl acetoacetate	-	-	-	-	-	-	-	-
P	蒸馏水 Water	-	-	-	-	-	-	-	-
	无水乙醇 Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	乙酸乙酯 Ethyl acetoacetate	-	-	-	-	-	-	-	-

比较表 3 和表 4 可知, 4 株供试菌的液态发酵产物对辣椒疫霉病菌(P3)均有抗性, 但在固态发酵中, 4 株放线菌的发酵产物经 3 种提取剂处理均未得到抗辣椒疫霉病菌的活性物质, 反映了液态与固态发酵对某些活性物质合成的影响。

3 结论与讨论

1) 利用放线菌固态发酵生产农用抗生素的思路是可行的。在固态发酵条件下, 供试菌的抗生素活性远大于液态发酵, 表明通过固态发酵提高抗生素得率的设想在生物合成阶段是可以实现的。提取工艺的研究改进是提高固态发酵抗生素得率的另一重要环节。

2) 固态与液态两种发酵模式对某些抗生素的合成有极显著影响。供试的 4 株放线菌在液态发酵中能合成抑制辣椒疫霉病菌的活性物质, 但在固态发酵中, 4 株放线菌的发酵产物中抑制辣椒疫霉病菌的活性物质同时消失, 表明在固态与液态条件下不同次生代谢产物合成过程有着本质的差异; 固态发酵模式的选用因不同菌种及发酵产物而异。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[参考文献]

[1] 喻子牛. 微生物农药及其产业化[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

[2] 朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药的研究进展及未来进展[J]. 农药快讯, 2003, 332(19): 18- 20.

[3] 朱昌雄, 陈守文, 刘　放, 等. 我国发酵微生物农药的发展概况与趋势[J]. 生物加工过程, 2003, 1(1): 37- 41.

[4] 王立新, 莫海涛, 石　红. 红曲霉固态发酵生产洛伐他汀的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(2): 96- 98.

[5] Jermini M, Demain A. 利用顶头孢霉固态发酵生产头孢菌素[J]. 国外医药——抗生素分册, 1991, 12(3): 178- 191.

[6] Jermini M, Demain A. Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Dephalosporium acremonium* [J]. Experientia, 1989, 45(11): 1061- 1065.

[7] Martin N, Souza S, Silva R, et al. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct[J]. Brazilian Archives Of biology And Technology, 2004, 47(5): 813- 819.

[8] Holker U, Hofer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(2): 175- 186.

[9] 涂　璇. 辣椒疫霉生防菌筛选及生防菌应用研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.

[10] 程丽娟, 薛泉宏, 来航线, 等. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版社, 1988.

[11] 颜　霞, 朱铭莪, 薛泉宏, 等. 西藏亚高山草原土壤放线菌研究[J]. 西北农业学报, 1999, 8(2): 97- 101.

[12] 蔡　艳, 薛泉宏, 陈占全, 等. 青海省保护地辣椒根际土壤和根表放线菌研究[J]. 应用与环境工程学报, 2003, 9(1): 92- 96.

[13] 刘　秋, 于基成, 刘长建. 龟裂链霉菌菌株MY02 发酵液中抗菌物质的稳定性测定[J]. 湖北农业科学, 2004, 1(1): 51- 53.

[14] 谌晓曦, 陈卫良, 李德葆, 等. 357 细菌拮抗物质的提取和生物活性检测[J]. 浙江大学学报, 2000, 26(5): 489- 492.

A preliminary exploration of producing farm-antibiotics by solid-state fermentation with actinomycetes

LI Zeng-bo, XUE Quan-hong, LIANG Jun-feng

(*College of Resourcres and Environmental, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In this experiment, the antimicrobial activity of solid-state fermentation (SSF) and liquid-state fermentation (LSF) products of 4 strains antagonism actinomycetes, against *Staphylococcus aureaus*, *Escherichia coli*, *Penicillium* and *Phytophthora capsici* were investigated by cylinder-plate method. The result showed that the intention that actinomycetes could produce agricultural antibiotic by SSF was feasible. Relative width of antimicrobial cycle of 3 strains, No. 04, No. 07 and No. 08 against *Staphylococcus aureaus* and *Escherichia coli* of extracts from rice in 3 strains under SSF were 4.0 mm/g and 5.2 mm/g. Meanwile, relative width of antimicrobial cycle against *Staphylococcus aureaus* and *Escherichia coli* of extracts from soybean meal in 3 strains under LSF were 0.7 mm/mL and 1.1 mm/mL. Hence, in the process of SSF, the antimicrobial activity of the strains above was far bigger than that of LSF. It suggested that, at the stage of biosynthesis, it was possible to increase unit yield of antibiotics by SSF. Also there was significant effect on the biosynthesis of certain antibiotics between the mode of SSF and LSF.

Key words: actinomycetes; solid-state fermentation; agricultural antibiotic; antimicrobial activity

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net