

阿维菌素生产工艺研究进展

严可以,弓爱君,孙翠霞,邱丽娜
(北京科技大学化学系,北京 100083)

摘要:阿维菌素是目前最有效的杀灭动植物寄生虫的抗生素之一。对阿维菌素高产菌株的培育、发酵培养基的优化以及产品的分离纯化进行了综述,指出阿维菌素是很有前景的一类低毒害生物农药。

关键词:阿维菌素;诱变育种;培养基;分离;结晶

中图分类号:TQ453.5;TQ458

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2006)S1-0037-03

Advances in technology for the production of Avermectins

YAN Ke-yi, GONG Ai-jun, SUN Cui-xia, QIU Li-na

(Department of Chemistry, Beijing University of Science and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: Avermectins are one of the most effective antibiotic pesticides for animals and plants. Mutagenesis strain-improving of *Streptomyces avermitilis*, culture medium optimization and crystallization in the process for producing Avermectins are reviewed, and it is thought as a kind of promising bio-pesticide with low poison.

Key words: Avermectins; mutagenesis strain-improving; culture medium; separation; crystallization

阿维菌素(Avermectins)属大环内酯抗生素类杀虫杀螨剂,是土壤微生物灰色链霉菌素(*Streptomyces avermitilis*)的发酵代谢产物。1975年,日本北里研究所(Kitasato Institute)从日本静冈川奈市的一个土壤样品中分离得到该菌株,研究初期即发现该菌株的发酵液具有很高的驱肠道寄生虫活性。它能有效地防治双翅目、同翅目、鞘翅目和鳞翅目害虫及多种害螨,特别是对常用农药有抗药性的害螨和害虫具有优异效果。近来研究表明,阿维菌素可以提高肿瘤细胞对药物的灵敏度^[1],具有显著的抗癌功能^[2]。

阿维菌素作为农药于1985年投入市场,巨大的发展潜力使之成为研究的热点。阿维菌素制剂的年产量已达到万吨,是我国微生物农药中年产值最大的品种^[3]。国外主要侧重于遗传学的研究,国内的研究主要集中在阿维菌素的菌种改造和发酵方面^[4]。本文对阿维菌素生产过程中菌种改造、发酵培养基的优化及产品分离纯化方面进行综述。

1 菌种改造

在工业生产中,阿维菌素菌株的优劣对生产有很重要的影响。阿维菌素原始菌株发酵单位非常低,最先发现的菌株 MA-4680 的发酵单位只有 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经改变发酵条件后有较大的提高,但也仅为 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$,不适合进行大规模发酵生产。该菌株

经过紫外诱变,从中选出一株突变株,发酵单位可达到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相比原始菌株有了长足的提高。

冯军等^[5]通过对原始菌株进行紫外诱变,得到一株耐链霉素的突变株,发酵单位提高了 1.6 倍,另一突变株发酵单位提高了 2.5 倍;再采用亚硝基胍进行诱变,发酵效价提高 1.6 倍,并且发酵产物中的 B1a 和 B1b 的比值由原来的 8 提高到 20。于秀莲等^[6]在亚硝基胍诱变过程中加入质量浓度为 1 g/L 的阿维菌素时,取得最佳诱变效果,正变率达到 13.3%;增加阿维菌素质量浓度则孢子的死亡率增加,正变率降低,负变率增加;当质量浓度达到 3 g/L 时,正变率为零;以含甲硫氨酸质量浓度为 1 g/L 的分离培养基作为定向筛选的分离平板,得到的突变菌株产 B 组分含量显著提高。阎浩林等^[7]对原始菌种进行紫外诱变,得到一株突变株,发酵单位较原始菌株提高 10 倍;对此菌株再进行亚硝酸诱变和亚硝基胍诱变,在含有 L-异亮氨酸的平板培养基上进一步连续筛选,得到的突变菌株较原始菌株发酵单位提高 100 倍以上。通过比较,从诱变后的正变率看:亚硝酸的诱变效果最好,亚硝基胍和紫外线次之。攸德伟等^[8]在对菌株进行紫外诱变过程中发现,当紫外线照射使菌株致死率为 90% 时,能取得较好诱变效果的几率比较大;在用亚硝基胍诱变时,缓冲体系 pH 为 6.0 时效果最好;将孢子在亚硝基胍

收稿日期:2006-02-17

作者简介:严可以(1979-),男,硕士生,yankeyee@vip.sina.com;弓爱君(1965-),男,副教授,硕士生导师,主要研究领域为苏云金芽孢杆菌、阿维菌素生物农药的菌种改良、生产工艺创新及新剂型开发,010-82388592, gongaijun2468@sohu.com。

溶液中进行紫外线照射,效果要好于单一的诱变剂。任超等^[9]采用紫外线、诱变剂氯化锂、亚硝基胍并结合甲硫氨酸诱导等手段对出发菌株诱变处理进行了比较,得出采用紫外线及亚硝基胍诱变的方法,结合甲硫氨酸诱导筛选,与出发菌株相比可以获得阿维菌素总效价及 B1a 组分显著提高的菌株。金志华等^[10]利用紫外线诱变,并在平板培养基上用异亮氨酸诱导变种,有效提高 B1a 的含量。

采用紫外诱变与化学诱变能使菌株的发酵单位提高,但由于一些因素如紫外诱变可能使很多菌株被杀死、B1 组分的含量不高或 B1a 与 B1b 的比值偏低等,故在原来的基础上又提出了一些改进和一些新的方法。宋渊等^[11]采用高频电子流诱变,得到发酵单位高于原始菌株的突变菌株,主要分布在致死率为 99.6% ~ 99.7% 的范围内。王海彬^[12]在对初始菌株进行⁶⁰Co 诱变处理后,发现回复突变株高产的频率和幅度均高于常规的突变菌株,筛出缬氨酸缺陷型回复突变株,其效价比出发菌株提高 33%,且 B1b 组分质量分数降低了 21.3%,有效地提高了产品的质量。

诱变育种作为一种经常采用的育种手段存在很多不足,其中最大困难在于菌株筛选工作量大。徐志南等^[13]提出一种循环筛选的方法,大大减少了诱变育种中目标菌株筛选的工作量,提高了诱变育种的工作效率。目前通过诱变育种以及培养基的优化,我国阿维菌素的发酵水平又有很大提高,发酵单位已接近 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2 发酵培养基的研究

发酵培养基是一个发酵产品工业化中非常重要的一环,其组分直接影响阿维菌素的产量和生产成本。目前用于工业发酵的培养基种类很多,由于各种培养基成分产地不同,特别是天然组分对发酵产量的影响很大,因此选择一种较好的培养基组合及培养条件是非常必要的。

2.1 碳源选择

碳源是组成培养基的主要成分之一,常用的碳源有糖类、油脂、有机酸和低碳醇等。汪嵘等^[14]在对阿维菌素培养基的选择上,在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母粉、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、番茄浆、pH 7.0 ~ 7.2 为基础培养基的条件下,分别以葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、小麦粉、黄玉米粉、马铃薯浆作碳源进行发酵培养。当培养基的成分适于菌丝生长时,并不一定同时适合目标产物合成。以葡萄糖作碳源时,虽然能得到最高

的发酵产量,菌丝生长量也最大,可以作为最佳碳源,但所得干丝量小于以小麦粉作碳源时的干丝量,因此小麦粉是较理想的碳源。发酵前期葡萄糖会明显抑制阿维菌素的生成,后期加入则能提高菌丝的产量。宋渊等^[11]在培养基优化时选择了 170 多种不同配比的发酵培养基进行发酵实验,选择了淀粉为阿维菌素的最合适碳源物质。

2.2 氮源选择

常用的氮源分为两大类:有机氮源和无机氮源。有机氮源有花生饼粉、黄豆饼粉、玉米浆、玉米蛋白粉、蛋白胨、鱼粉、酒糟等。汪嵘等^[14]在对氮源进行选择时,分别以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蛋白胨、酵母粉、黄豆粉、牛肉膏、酒糟作为惟一氮源测定产物生成量来选择最佳氮源,认为黄豆粉作为氮源最为合适。

2.3 氨基酸的影响

Burg 等研究了 18 种氨基酸对阿维菌素产量的影响,结果表明仅 DL-色氨酸具有刺激作用,DL-甲硫氨酸可能有刺激作用,其他氨基酸则无作用。

2.4 盐类的影响

微生物在生长时需要某些无机盐类和微量元素,以作为其生理活性物质的组成或生理活性作用的调节物。这些物质一般在低浓度时对微生物生长和产物合成有促进作用,在高浓度时常表现出明显的抑制作用,而各种不同的微生物及同种微生物在不同的生长阶段对这些物质的浓度要求均不相同。宋渊等^[11]在研究中发现, CaCO_3 是在发酵培养基中必须加入的成分,如果在发酵培养基中不加入 CaCO_3 ,则阿维菌素合成产率非常低。一般而言,磷酸盐抑制次级代谢产物的合成,但实验中发现,在发酵液中即使加入质量浓度为 2.0 g/L 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,也不会抑制阿维菌素的合成。Burg 研究表明,在培养基中加入 KH_2PO_4 (质量浓度 0.5 mg/mL) 及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (质量浓度 2.5 mg/mL),对阿维菌素的生成具有抑制作用,加入 NaCl (质量浓度 1 mg/mL) 则无影响,某些微量元素则可能具有刺激产量作用。王琳慧^[15]研究了金属离子在阿维菌素生产中对菌丝的生长及代谢产物的积累作用,研究表明, K^+ 对菌丝生长无影响, Zn^{2+} 刺激菌丝的生长, Cu^{2+} 抑制菌丝的生长; K^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对发酵单位无明显提高,且随离子浓度的升高,抑制发酵单位的作用越明显。微量元素钴作为生长因子对阿维菌素的菌丝生长及代谢产物的积累起着双向调节作用:添加质量浓度为 0.02 mg/mL 的 Co^{2+} 起最大促进作用,质量浓度过高则起抑制作用。

2.5 其他因素的影响

酵母膏对于阿维菌素的产生是必不可少的。维生素、酵母核苷酸、味精及微量元素都不能代替其作用,而聚乙二醇——P200 可明显刺激阿维菌素的生成,使产量有所提高。

3 分离提纯

阿维菌素的发酵单位虽然有了较大的提高,但其产物浓度相对而言仍然较低。现在常用的分离方法一般为浓缩结晶法,但其耗能大,回收率较低,是降低其价格的一个瓶颈。

阿维菌素是一种胞内产物,它的提取一般是首先通过发酵得到菌丝,再用萃取剂萃提后浓缩结晶得到^[16]。工业上常用质量分数为95%的乙醇溶液、甲苯溶液、乙酸已酯等作为萃取剂浸提干菌丝。结晶是阿维菌素精制工艺的关键。Bagner Oarl 等介绍了一种直接用甲苯提取发酵液中阿维菌素的方法,即发酵液不需过滤,直接用硫酸调节到 pH 为 2.5,再用 $V(\text{甲苯}):V(\text{发酵液})=2:1$ 的混合溶液在加热条件下提取。收集甲苯提取液,经浓缩即得阿维菌素粗品,然后再进行精制。宋渊等建立了一种直接结晶法,可使总浸提率达到 97.3%;经二次结晶,纯度为 95%的 B1 提取率达到 61.5%。田益民等^[17]将一次粗产品在 95%热乙醇溶液于 4℃下静置结晶需 96 h;室温补水工艺[常温常压下搅拌,按 $V(\text{溶液}):V(\text{水})=3:1$ 比例连续流加补水]结晶需 18 h;真空流加补水[恒温水浴,真空条件下,隙漏搅拌,按 $V(\text{溶液}):V(\text{水})=3:1$ 连续流加补水]结晶需 8 h;常温(20~25℃)、常压下静置结晶需 24 h。从实验结果可以看到,流加补水结晶法的收率明显高于静置结晶法,但 B1a 含量以 4℃静置结晶法最高。谢智等^[18]通过程序降温结晶,晶格内杂质含量降低,并且在相对过饱和度为 1.2~1.4 时加入晶种,则结晶产品中的 B1 含量最高。除了使用结晶的方法提取阿维菌素以外,蒋琳等^[19]采用层析法分离制备阿维菌素,以 $V(\text{石油醚}):V(\text{异丙醇})=7:1$ 的混合溶液为洗脱液,以硅胶柱为固定相对阿维菌素 B1 具有良好的分离性能。这种方法成本很高,不适合工业生产。

4 结语

21 世纪是一个环保生态世纪,农药发展要服

从于可持续发展的战略目标,生物源农药必然是杀虫剂研究的热点。阿维菌素作为一种具有独特杀虫机制的低毒害生物农药,势必会引起越来越多的关注。

参考文献

- [1] Korystov Y N, Ermakova N V. Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 493: 57 - 64.
- [2] Drinyaev V A, Mosin V A. Antitumor effect of avermectins[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 501: 19 - 23.
- [3] 朱昌雄, 孙东园, 蒋细良. 我国微生物农药产业化标准及产业化对策建议[J]. *现代化工*, 2004, 24(3): 6 - 11.
- [4] 宋渊. 阿维菌素的工业化生产研究[J]. *精细与专用化学品*, 2002, 21: 57 - 60.
- [5] 冯军, 赵文杰, 程晴华, 等. 阿弗菌素产生菌 SIPI-AV-99081 的选育[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 34(3): 118 - 121.
- [6] 于秀莲, 何建勇, 白秀峰, 等. 阿维菌素产生菌的诱变育种[J]. *沈阳医药大学学报*, 2004, 21(3): 222 - 225.
- [7] 阎浩林, 何汉洲, 梁丽丽, 等. 阿维菌素高产菌株的选育 I[J]. *生物技术*, 2002, 12(4): 16 - 17.
- [8] 攸德伟, 谌颀, 储炬, 等. 复合诱变筛选 avermectins 高产菌株[J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(3): 143 - 147.
- [9] 任超, 马响玻. 阿维菌素 B1a 组分高产菌株的诱变育种[J]. *生物技术通报*, 2005, 4: 59 - 63.
- [10] 金志华, 金一平, 宋友礼, 等. Avermectin 产生菌异亮氨酸诱导变种的选育[J]. *中国抗生素杂志*, 1997, 22(2): 84 - 86.
- [11] 宋渊, 曹贵明, 陈芝, 等. 阿维菌素高产菌株的选育及阿维菌素 B1 的鉴定[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 31 - 35.
- [12] 王海彬. 阿维菌素 B1a 组分高产菌株的选育 I[J]. *中国医药工业杂志*, 2001, 32(7): 295 - 297.
- [13] 徐志南, 刘刚, 柯世省, 等. 循环筛选法在除虫链霉菌诱变育种中的应用[J]. *中国抗生素杂志*, 1999, 24(3): 175 - 178.
- [14] 汪嵘, 赵颖怡, 梁红玉, 等. Avermectins 产生菌的最佳培养条件[J]. *广西师范学院学报: 自然科学版*, 2002, 19(2): 4 - 8.
- [15] 王琳慧. 微量元素钴对抗生素 AVM 生产的影响[J]. *河北省科学院学报*, 2003, 20(3): 183 - 186.
- [16] Wohlert S-E, Lomovskaya N, Kulowski K, et al. Insights about the biosynthesis of the avermectin deoxysugar L-oleandrose through heterologous expression of streptomycetes deoxysugar genes in streptomycetes lividans[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8: 681 - 700.
- [17] 田益民, 杨红, 李艳芳. 阿维菌素结晶工艺的改进[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(9): 432 - 434.
- [18] 谢智, 常志东, 孙兴华, 等. Avermectin 冷却结晶工艺的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(1): 58 - 61.
- [19] 蒋琳, 马承铸, 王少鸥, 等. 硅胶柱层析分离制备阿维菌素 B2 的效果[J]. *上海农业学报*, 2002, 18(1): 81 - 83. ■