

基因工程和发酵工程在植物源和微生物农药中的应用

黄银久^{1,2}, 黄荣茂^{*}, 金林红, 陈卓, 许瑞卿 (1. 贵州大学精细化工研究开发中心、“绿色农药与生物工程”教育部重点实验室, 贵州贵阳550025; 2. 蚌埠医学院生物科学系, 安徽蚌埠233000)

摘要 介绍了利用基因工程技术对农药源植物和微生物进行遗传改造, 从而优化产品质量提高产量。同时阐述了发酵工程在微生物农药产业化生产方面的巨大作用。简述了在植物源和微生物农药生产中应用基因工程和发酵工程的基本流程。

关键词 基因工程; 发酵工程; 植物源农药; 微生物农药

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)19-05801-03

Application of Gene Engineering and Fermentation Engineering in Plant Pesticide and Microbial Pesticide

HUANG Yinjiu et al (Key Laboratory of Green Pesticide and Bioengineering, Ministry of Education, Research and Development Centre for Fine Chemicals, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract The genetic improvement of pesticidal plant and microbe for the purpose of promoting quality and output were analyzed. Great motivation of fermentation engineering on the industrialization of the microbial pesticide was introduced. Furthermore, the basic process of gene engineering and fermentation engineering in the production of botanical pesticide and microbial pesticide was summarized.

Key words Gene engineering; Fermentation engineering; Botanical pesticide; Microbial pesticide

大量化学农药的长期使用导致抗药性害虫大量增加, 增加农产品中农药残留量, 严重污染环境, 危及人类健康^[1-3]。而且化学农药新药开发越来越难, 研制高效低毒的化学农药更是难上加难, 因此人们的目光转向一种新型农药——生物农药^[4]。生物农药是指具有农药特性的, 用来防治病、虫、草等有害生物的生物活体及其产生的生理活性物质和转基因产物^[5]。生物农药具有副作用小、对环境兼容性好、病虫害不易产生抗性等优点, 日益成为全球农药研究发展的一种趋势和方向^[5-8]。同时, 筛选化学农药的机率只有二万分之一, 而生物农药的成功率是五千分之一。与生物农药相比, 化学农药的开发周期3倍于生物农药, 开发费用40倍于生物农药, 注册费则是生物农药的100倍。因此, 寻求新的发展途径, 用更多的投入来开发生物农药, 大力发展生物农药已成为必然的趋势。

众所周知, 生物农药相对化学农药而言还是个新兴的产业, 在技术支持方面还有待进一步发展, 生物农药研究开发及产业化技术成为生物农药发展的瓶颈。而生物工程技术则是这些技术中的核心技术。生物技术不仅能帮助开发生物农药, 提高产量和质量, 而且能改进生物农药。笔者阐述了基因工程和发酵工程生物技术在植物源和微生物农药生产中的应用。

1 基因工程为农药源植物和微生物遗传改造提供技术支持

1.1 基因工程 基因工程, 又称为重组DNA技术, 是按照人们的科研或生产需要, 在分子水平上, 用人工方法提取或合成不同生物的遗传物质, 在生物体外切割, 拼接形成重组DNA, 然后将重组DNA与载体的遗传物质重新组合, 再将其引入到没有该DNA的受体细胞中, 进行复制和表达, 生产出符合人类需要的产品或创造出生物的新性状, 并使之稳定地遗传给下一代。按目的基因的克隆和表达系统, 分为原核生物基因工程, 酵母基因工程, 植物基因工程和动物基因工程。基因工程具有广泛的应用价值, 为工农业生产和医药卫生事

业开辟了新的应用途径^[9]。

1.2 基因工程技术的应用 (1) 应用基因工程对药用植物源进行基因改造可以增加产量^[10-11]。利用转基因技术已经实现了可以使很多基因转入植物细胞并且得以表达, 如轮状病毒衣壳蛋白^[12], 生长激素^[13], 各种抗体^[14]以及各种抗性基因^[15-19], 同样利用基因工程技术可以使目标基因在宿主体内得以高效表达^[20-23]。

(2) 应用基因工程对微生物农药进行基因重组^[5,19,24-26]可提高其生物活性、提高发酵水平和质量, 或将某种控制杀虫活性基因转移到安全易培养的细菌中即遗传工程菌, 使工厂化生产成为可能。如利用基因工程生物加工技术通过基因改造获得了产链霉菌素^[27]、南昌霉素^[28-29]、井冈霉素^[29]等高产菌株。这充分显示基因工程生物加工技术在农用抗生素方面有着广阔的利用空间^[30-36]。

1.3 以基因工程为核心的生物农药研究进展 目前, 在新型杀虫微生物农药方面, 国内外主要以苏云金杆菌(Bt)为主, 广泛采用高效广谱的工程菌株^[25]。采用基因工程技术构建药效稳定, 防治面较广的Bt工程菌, 是当前Bt生物农药发展的新趋势^[37]。微生物农药的研究工作在前苏联起步很早, 且处于世界领先水平, 这为俄罗斯微生物农药的发展奠定了基础^[9]。据俄《消息报》报道, 科学家曾发现, 苏云金芽孢杆菌有多种菌株, 能分别合成一些彼此不同的晶状蛋白质。这些蛋白质都属于内毒素, 但其中能杀死蛾类的内毒素往往对甲虫无效, 反之亦然。为解决这种问题, 俄工业微生物遗传育种国立研究所等机构的专家, 选到了两种苏云金芽孢杆菌菌株, 其合成内毒素的杀虫范围互不相同。科研人员利用现代生物技术对这两种杆菌的遗传物质进行加工改造, 最终培育出了一株杆菌新品种, 它的独特DNA能同时指导合成其“父母”特有的两种内毒素。实验室测试显示, 新型杆菌的孢囊和内毒素对马铃薯甲虫的杀灭能力是该杆菌“父母”的数倍, 能使危害果树的舞毒蛾幼虫的死亡率达到58%。我国微生物资源极其丰富, 分离有自主知识产权和重要应用价值的新的抗虫和抗病蛋白基因; 通过杀虫蛋白基因组合, 分子进化、不同结构域中氨基酸定点诱变、融合、互换等分子设计手段进一步提高杀虫毒力, 扩大杀虫谱研制工作刻不容缓。

作者简介 黄银久(1974-), 男, 安徽蚌埠人, 在读硕士, 讲师, 从事农药学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-26

未来生物农药的主要发展趋势为:以基因重组为核心的战略高技术竞争日趋激烈,关键技术创新显著加快,最新分子生物学手段越来越多地被应用到生物农药研发中去,转基因生物农药新品种不断涌现;其研发和应用向更安全和更环保方向发展;产品更新换代速度加快,生物农药产业已成为涉农工业最具前景的发展领域。

2 发酵工程是微生物源农药产业化生产的理想途径

2.1 发酵工程及其在生物农药生产中的应用

发酵工程一般是指利用微生物的特定性状,通过现代化工程技术,在生物反应器中生产有用物质的一种技术系统。目前医用抗生素、农用抗生素等已有近200个品种,绝大部分都是发酵的产品,如B^[38]、南昌霉素^[28]、井冈霉素^[39]和梅岭霉素^[40]等。国内外B^[38]发酵工艺多采用液体深层发酵,我国也有通过固体浅层发酵方式大规模开放式生产^[25]。除抗生素外,发酵工程产品还包括氨基酸、酶等。在生物农药生产中发酵技术可以大大提高生物农药的产量、质量和效益。利用发酵工程技术研究农用抗生素发酵代谢规律,可望获得大幅度提高发酵水平的新型工艺。

2.2 用于微生物源农药产业化生产的发酵工程研究进展

自20世纪30年代发现木霉菌对植物病害的防治作用以来,它是研究最多,应用面积最大的真菌杀菌剂,目前产品主要是采用液固两相发酵生产分生孢子^[41]。20世纪90年代末期,美国研究出的液体发酵产厚垣孢子工艺有望为木霉菌产业化提供新途径。开展木霉菌产厚垣孢子调控机制研究,进行担子拟青霉等高效菌株筛选和工程菌株的构建,为真菌发酵工艺突破提供技术支持。液体发酵工艺主要采用批式发酵技术,后提取技术采用离心浓缩工艺,导致发酵液中增效因子等有效成分大量损失。此外,我国目前的喷雾干燥设备也制约了产品回收率的提高。现代发酵工业以微生物纯种培养与大规模工业化生产为条件,至今只有液体深层发酵技术能满足此要求。固态发酵法则长期被隔离在外。经过15年的努力,我国科学院生化工程国家重点实验室创建了以压力脉动固态发酵反应器为核心的,包括真空冷凝干燥,超音速气流粉碎及固态培养基输送无菌操作的现代固态发酵技术体系,摆脱了传统化工3传1反理论的束缚,提出了4传1反非线性作用机理,推演出外界周期刺激强化生物反应及细胞内外传递的生物反应器设计新原理,从而诞生了压力脉动固态发酵反应器。与现行的液体深层发酵路线比较,压力脉动固态发酵新路线的优点是:投资少;生产效率高;原料来源广、价格便宜;无三废排放;生产成本低。该技术以生物农药B^[38]生产为应用对象,于1999年1月建成并投产200吨/年B^[38]可湿性粉剂示范生产厂。经7个月连续生产(包括夏天),发酵水平稳定在10 000 IU ng以上,获得16 000 IU ng批量产品。发酵工程的技术进步为生物农药的产业化生产提供了有力保障。

3 基因工程和发酵工程应用于植物源和微生物农药生产的基本流程

3.1 基因工程改造农药源植物遗传性状的基本流程

植物遗传转化方法大致可分两类^[42]:载体介导的转化^[43-45],即利用另一种生物实现基因的转入与整合。目前这种载体有

质粒载体和病毒载体两种。相应地有两种转化方法。即通过机械接种感染植物的病毒载体转化方法和通过农杆菌质粒介导的基因转化方法。农杆菌质粒介导的基因转化方法稳定性、重复性好,设备简单,操作方便,应用较广泛。基因直接转化^[43-44]。由于农杆菌载体转化系统对单子叶植物的局限性,同时试验表明:转化DNA整合植物基因组不一定需要特殊的T-DNA序列或结构。根据该事实发展了一系列将DNA导入植物的技术。所谓DNA直接导入转化就是不依赖农杆菌载体和其他生物媒体,将特殊处理的裸露DNA直接导入植物细胞实现基因转化的技术,因此也称为无载体DNA介导转化。其中基因枪法最常用,而且操作简便、快速,甚至可克服无菌的困难;但缺点是转化频率低。目前大多数只报道转化后的瞬时表达,而稳定遗传的比例很低,有待于进一步发展完善^[46]。另外,对目的基因的理解可以是广义的,它们也可通过定向诱变等其他途径获得^[28],主要有编码基因和调节基因等^[47-48]。图1为利用基因工程改造农药源植物遗传性状的基本流程。

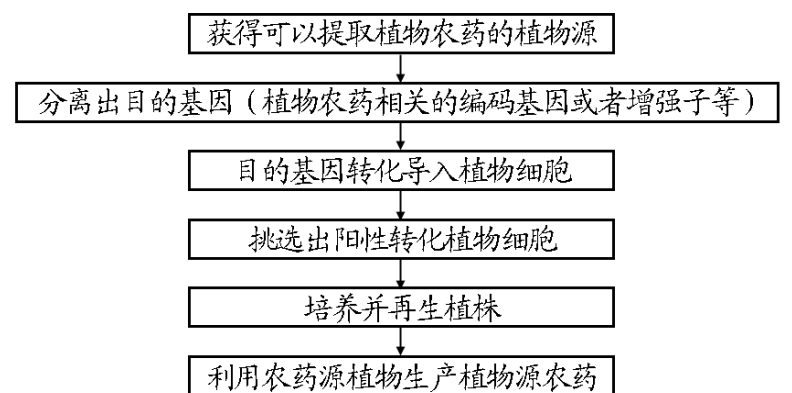


图1 基因工程改造农药源植物遗传性状的基本流程

3.2 微生物农药生产中应用基因工程和发酵工程的基本流程

发酵工程涉及培养基的配制、菌种选育、灭菌、扩大培养和接种、发酵过程和产品的分离提纯。其中菌种选育方法一般有:从自然界存在的菌种中分离;人工诱变;用细胞工程和基因工程的方法对菌种的遗传特性进行定向改造。这里未提及人工诱变和自然界存在的菌种中分离得到高产菌株直接进入发酵工艺,只是强调了利用基因工程技术,通过发酵培养基因工程菌,得到所需要的高附加值产品。在发酵过程,要充分注意发酵过程的检测、发酵条件的控制,包括发酵条件对菌种代谢途径的影响。在发酵罐中,菌种利用培养基中的营养物质,不断地生长繁殖,而通过发酵条件的控制,可以使微生物的代谢朝着对人类有利的方向进行。因此,控制发酵条件是人工控制微生物代谢的一个重要方面^[38,42,49-52]。再之,收获微生物细胞和从细胞或培养液中分离纯化所需要的代谢产物方法常有:浓缩、吸附、过滤、离心、萃取、干燥、重结晶等。图2为微生物农药生产中应用基因工程和发酵工程的基本流程。

4 展望

鉴于环境保护、农业可持续发展以及绿色食品生产的需要,生物农药的发展无疑是一个热点。基因工程技术和发酵工程技术将对生物农药的研究开发和工业生产起突破性的作用。先进高效的发酵技术将大大提高生物农药的产量、质量和效益;应用基因工程对农药源微生物进行基因重组,提高其生物活性、提高发酵水平和质量;或将某种控制杀虫活性基因转移到安全易培养的细菌中即遗传工程农药,以使生

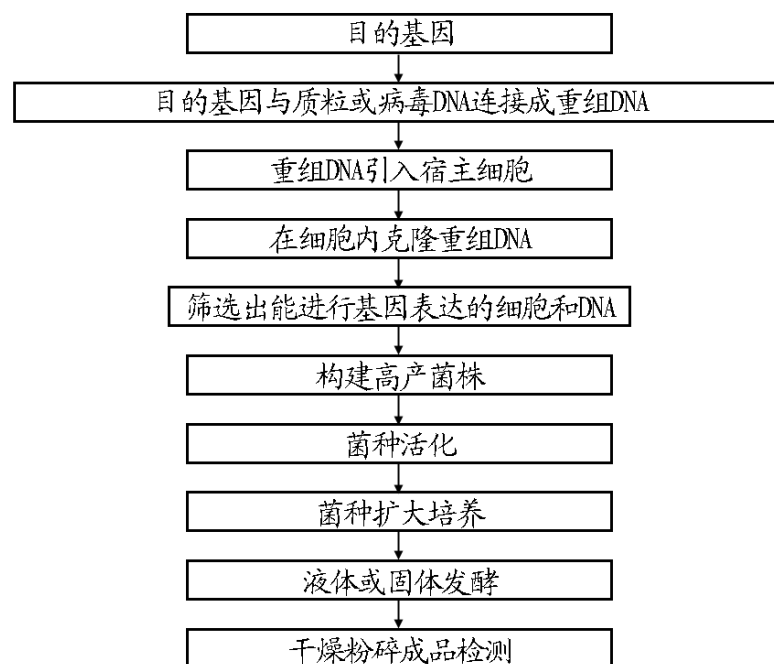


图2 微生物农药生产中应用基因工程和发酵工程的基本流程

产更加容易;应用基因工程对农药源植物进行基因重组,将使生物农药的产量大幅度提高。未来的生物农药无论是产量还是质量都将有质的飞跃。

参考文献

- [1] 牛军玲, 贾素云, 张正国. 生物农药发展趋势的研究[J]. 山西化工, 2005,25(3):5-7.
- [2] 周育, 庾琴, 侯慧锋, 等. 新型烟碱类杀虫剂 虫脒研究进展植物保护[J]. 植物保护, 2006,32(3):16-20.
- [3] 李静. 无公害蔬菜生产的影响因素及防治对策[J]. 中国瓜菜, 2006(5):54-56.
- [4] 张晶东. 生物农药的现状与发展前景[J]. 甘肃农业, 2003(6):51.
- [5] 纪明山, 谷祖敏, 张杨. 生物农药研究与应用现状及发展前景[J]. 沈阳农业大学学报, 2006,37(4):545-550.
- [6] 赵岩, 石明杰. 浅谈微生物农药的发展前景[J]. 科技咨询导报, 2006(9):246.
- [7] 佚名. 生物农药,正在兴起的农业新技术[EB/OL]. (2006-07-11) [2006-12-25] <http://info.jas.ac.cn>.
- [8] 罗敏, 林永贤, 杨玉旺, 等. 生物农药——21世纪农药的生力军[J]. 河北工业科技, 2003,20(5):54-59.
- [9] 雷肇祖, 钱志良, 章健. 工业菌种改良述评[J]. 工业微生物, 2004,34(1):39-51.
- [10] 侯学文, 谢建军, 曾鑫年, 等. 生物技术在植物性杀虫剂研究开发中的应用[J]. 植物保护学报, 2001,28(1):77-82.
- [11] 史秀娟, 王学海. 植物源农药研究现状与展望[J]. 现代农业科技, 2006(3):34-36.
- [12] YUJ, LANGRIDGE W. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice[J]. Transgenic Research, 2003,12(2):163-169.
- [13] LITE A, KEMPER E L, DA SILVA M J, et al. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants[J]. Molecular Breeding, 2000,3(1):47-53.
- [14] TEI NP, TIMKO MP. Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004,79:125-145.
- [15] 叶兴国, 王艳丽, 丁文静. 主要农作物转基因研究现状和展望[J]. 中国生物工程杂志, 2006,26(5):93-100.
- [16] HILDER V A, GATEHOUSE A M R, SHEERMANS E, et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco[J]. Nature, 1987,330(6144):160-163.
- [17] 赵洪银, 李启云, 董英山. 转基因作物产业化现状及研究进展[J]. 中国农学通报, 2006,22(4):57-60.
- [18] 袁龙刚, 张军林. 微生物资源在现代农业中的应用[J]. 陕西农业科学, 2006(5):84-86.
- [19] 付蕾, 叶非. 微生物农药在俄罗斯的应用进展[J]. 农药科学与管理, 2006,25(9):42-45.
- [20] BANERJEE A K, PRAT S, HANNAPEL D J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Plant Science, 2006,170:732-738.
- [21] LEE D E, KANG K, SEONG G E L, et al. Enhanced synthesis of feruloyltyranine and 4-coumaroyltyranine is associated with tyranine availability in transgenic rice expressing pepper tyranine N-hydroxycinnamoyltransferase[J]. Plant Science, 2007,172:57-63.
- [22] HERRERO S, DAUB M E. Genetic manipulation of Vitamin B6 biosynthesis in tobacco and fungi uncovers limitations to up-regulation of the pathway[J]. Plant Science, 2007,172:609-620.
- [23] 任羽, 张杰. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白定点突变与新型生物农药的研发[J]. 中国农业科技导报, 2006,8(4):14-18.
- [24] 陈杰林, 韩群鑫. 转基因技术在IPM中的应用[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2006,19(2):56-60.
- [25] 范瑛阁, 曹远银. 微生物源农药的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005,33(7):1266-1268.
- [26] FEBERDY J F. Fungi without coats protoplasts as tools for mycological research[J]. Mycological Research, 1988,93(1):1-20.
- [27] YANG D J, CHEN G Q, CHEN W, et al. Streptomycin resistance mutation study on the breeding of lincomycin producing strain[J]. Microbiology, 2003,4:29-35.
- [28] 涂国全, 魏赛金, 刘妹, 等. 南昌霉素高产菌株的链霉素抗性基因突变诱变筛选研究[J]. 微生物学通报, 2002,29(5):10-13.
- [29] 白林泉, 邓子新. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇与药物创新[J]. 中国抗生素杂志, 2006,31(2):80-99.
- [30] 薛禹谷. 我国链霉菌遗传学研究的回顾和展望[J]. 中国抗生素杂志, 1990,15(3):225-230.
- [31] 戴四发, 黎观红, 吴石金. 现代工业微生物育种技术研究进展[J]. 微生物学杂志, 2000,20(2):48-53.
- [32] 黄健强, 陆雍涛, 姜卫红, 等. 丝裂霉素C抗性基因的克隆及其高效表达[J]. 微生物学报, 1999,39(6):495-501.
- [33] 董平, 季青, 龙涛, 等. 用于防治棉花土传病害微生物菌株Gy-1的遗传改造[J]. 农业生物技术学报, 1999,7(3):210.
- [34] CRAMERT R D, HALLAMS E, KIESER H M, et al. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes[J]. Antibiotics, 1986,39:128.
- [35] KELLER N P, HOHNT M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 1997,21:17-29.
- [36] 余健秀, 庞义, 邓日强. 高毒广谱杀虫B工程菌TNY[J]. 杀虫微生物专刊, 2000,1(5):242-246.
- [37] 张少斌, 刘慧. 农作物抗虫蛋白质工程及其应用[J]. 安徽农业科学, 2006,34(8):1617-1618, 1662.
- [38] 高家合. 苏云金杆菌B33发酵条件优化及应用烟草粉虱防治的研究[J]. 工业微生物, 2006,36(3):18-23.
- [39] 郭文灿, 钟世华, 黄叶菊. 井冈霉素生产工艺优化研究[J]. 精细化工中间体, 2006,36(2):40-42.
- [40] 陈斌. 微生物发酵法制备梅岭霉素[J]. 精细与专用化学品, 2003(1):17-19.
- [41] 赵蕾. 液固两相法制备木霉菌高孢粉[J]. 中国生物防治, 1999,15(3):144.
- [42] 任永霞, 季静, 王罡, 等. 植物遗传转化方法概述[J]. 河北北方学院学报, 2005,12(6):38-42.
- [43] 黄勇, 张林, 潘一乐. 植物基因工程在桑树上的应用现状[J]. 江苏蚕业, 2006(3):1-3.
- [44] 周兴龙, 杨青川, 王凭青, 等. 苜蓿转基因研究进展[J]. 重庆大学学报, 2005,28(4):126-130.
- [45] 龚学臣, 季静, 王罡, 等. 应用农杆菌介导法进行菊花的遗传转化[J]. 北方园艺, 2005(2):66-67.
- [46] 吴建祥, 周继勇, 于翠. 转基因植物生产基因工程疫苗技术[J]. 中国预防兽医学报, 2001,23(2):157-159.
- [47] MALPARIIDA F, HOPWOOD D A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host[J]. Nature, 1984,309:462-464.
- [48] 赵立平, 张丽, 李艳琴, 等. 利用RK2的parDE片段提高重组质粒在生防菌成团泛菌中的稳定性[J]. 中国生物防治, 1999,15(2):45-53.
- [49] 刘秋, 闫建芳, 艾勇, 等. 菌株M02发酵培养基的优化设计[J]. 吉林农业大学学报, 2006,28(4):361-364.
- [50] 石金舟, 陈丽园, 张明. 植物乳杆菌R260产细菌素发酵条件的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2006,18(5):341-342.
- [51] 吴琼, 吕红线, 王锦, 等. 乳链球菌肽高产菌株发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2000,30(1):36-39.
- [52] 吴继星, 陈在俱. 苏云金杆菌“79007”菌株发酵工艺的研究[J]. 微生物学杂志, 2006,26(3):5-8.