

# 土霉素产生菌 S232 的选育及其初步应用

乌 裁 新

(湖南衡阳抗菌素厂)

土霉素自五十年代生产以来,生产量已大幅度提高。目前国内各厂生产菌种采用龟裂链丝菌,其碳源以玉米淀粉为主,辅以糊精或饴糖等,耗粮甚多。

早在土霉素生产的初期,就有人在摇瓶试验中用大米糠等全部或部分代替玉米淀粉,其中有些产土霉素能力接近对照,但未能应用于生产。为了落实毛主席关于“深挖洞、广积粮、不称霸”的伟大方针,本厂决心改变土霉素发酵的碳源,以降低耗粮。

“唯物辩证法认为外因是变化的条件,内因是变化的根据,外因通过内因而起作用。”要改变土霉素生产中碳源这个外因,从菌种这个内因着手是一条重要的途径。我们从 1973 年 6 月开始,用人工诱变和驯化相结合的办法,从 9 号菌株出发,选育得到 S232 菌株,此菌株能利用本地区易得的劣等原料粗质红薯粉为碳源,有降低耗粮而保持高产的特性。

## 实 验 方 法

### 一、菌种

采用的出发菌株菌号为: 9, 1615, 1622, 3, 50, 53。

### 二、培养基组成

#### (一) 斜面培养基

麦片 5%, 琼脂 2%。

#### (二) 分离培养基

玉米淀粉和粗质红薯粉总量\* 3%, 酵母粉 0.4%, 硫酸铵 0.4%, 碳酸钙 0.4%, 氯化钠 0.5%。

#### (三) 发酵培养基

玉米淀粉和粗质红薯粉总量\* 8%, 豆饼粉 2.2%, 酵母粉 0.2%, 硫酸铵 0.85%, 碳酸钙 0.8%, 氯化钠 0.3%, 磷酸二氢钾 0.03%。

#### (四) 种子培养基

玉米淀粉和粗质红薯粉总量\* 3%, 酵母粉 0.7%, 硫酸铵 0.4%, 碳酸钙 0.4%, 氯化钠 0.4%, 磷酸二氢钾 0.035%。

### 三、诱变方法

0.1M 亚硝酸: 在成熟的茄瓶斜面中加入 30 毫升无菌水, 刮下孢子制成孢子悬液。取 2 毫升孢子悬液, 0.4M 亚硝酸钠溶液 1 毫升, 1M pH4.4 的醋酸缓冲液 1 毫升加入无菌空瓶, 塞紧瓶塞, 在 27℃ 水浴中保温 10 分钟。取出 2 毫升, 加入到 10 毫升 0.07M 的磷酸氢二钠溶液中以中止反应。用无菌水将处理液稀释至一定浓度, 涂平板, 控制每个平板菌落为 10—20 个。

0.5% 氯化锂: 将氯化锂混入分离培养基内, 使成 0.5% 浓度, 灭菌后倒平板。将上述孢子悬液稀释至一定浓度, 涂平板, 控制每个培养皿菌落为 10—20 个。

自然分离: 一般分离法。

### 四、发酵培养方法

经诱变分离出的菌株于 37℃ 培养 3 天半至 4 天, 挖一块培养物接入种子摇瓶, 置于旋转式摇床(转速: 200 转/分, 偏心: 2.5 厘米), 30℃ 培养 26 小时, 按 10% 种量接入发酵瓶, 摇床培养 7 天测定发酵单位。

### 五、发酵液中土霉素发酵单位的测定

采用比色法定量测定。

## 实 验 结 果

### 一、挑选出发菌株

出发菌株应具备原生产能力(用玉米淀粉为碳源)强, 且较能适应粗质红薯粉为碳源的发酵条件。为此将 5 株生产能力强的菌株在摇瓶中用二种配比试验, 其一碳源为玉米淀粉, 即原生产配比; 其二碳源为玉米淀粉与粗质红薯粉按 1:1 混合, 碳源总量不变。其余配比二者均一样(表 1)。

从表 1 可以看出, 原碳源要求为玉米淀粉的菌株, 混入一半粗质红薯粉后发酵单位普遍降低。其中 9 降低幅度较小, 在混入一半粗质红薯粉的条件下发酵单

\* 此项按原配方为玉米淀粉, 本实验为达到驯化和筛选加入一定比例的粗质红薯粉。

表 1 5 株土霉菌产生菌在二种配比中比较

菌株号	碳 源	平均发酵单位 (微克/毫升)	碳 源	平均发酵单位 (微克/毫升)
9	玉米淀粉	11388	玉米淀粉:粗 质红薯粉 1:1	10542
1615	同 上	11311	同 上	9867
3	同 上	11249	同 上	10073
50	同 上	11697	同 上	10102
53	同 上	11669	同 上	10556

位较高,宜作为出发菌株。

## 二、第一次诱变和驯化

用亚硝酸、氯化锂分别诱变菌株 9, 同时进行自然分离。在平皿中加入碳源为玉米淀粉和粗质红薯粉按 1:1 混合的分离培养基进行培养, 得到亚硝酸诱变株 S137, 比出发株适应粗质红薯粉的能力有提高, 在混入一半粗质红薯粉后发酵单位相似于出发株全部用玉米淀粉为碳源的发酵单位(表 2)。

表 2 S137 和菌株 9 发酵单位比较

菌株号	碳 源	平均发酵单位 (微克/毫升)
S137	玉米淀粉:粗 质红薯粉 1:1	10789
9	同 上	9724
9	玉米淀粉	10719

但随着粗质红薯粉比例的上升, S137 株发酵单位也有所下降。全部用粗质红薯粉时, 四次摇瓶平均发酵单位为 9211 微克/毫升。因此 S137 还不是能投入生产的理想菌株, 宜作出发株进一步诱变和驯化。

## 三、第二次诱变和驯化

以 S137 为出发菌株, 继续用亚硝酸、氯化锂分别诱变, 同时进行自然分离。在分离培养基中以 1 份玉米淀粉和 3 份粗质红薯粉混合作碳源, 得到亚硝酸诱变株 S232。该菌株用单一粗质红薯粉为碳源, 其发酵单位不比 9 以玉米淀粉为碳源的对照组低(表 3)。

表 3 S232 和 9 号菌株不同碳源比较

菌株号	碳 源	平均发酵单位 (微克/毫升)
S232	粗质红薯粉	11686
9	玉米淀粉	11357

从表 3 看, S232 株已达到保持高产性能而改变了

碳源以降低耗粮的目的。

## 四、S232 菌株发酵试验

今年 6 月, S232 以粗质红薯粉代替原配方中全部玉米淀粉为试验组, 以生产菌株 1622 用原配方为对照组, 在 15 吨发酵罐中进行对比试验, 前者共 4 罐和后者共三罐生产能力相似(表 4)。

表 4 15 吨大罐二菌株生产情况

菌株 和碳源	发酵单位 (微克/ 毫升)	罐 次				平均
		第一罐	第二罐	第三罐	第四罐	
S232 粗质红薯粉		19520+	21700+	20000	21800+	20755
1622 玉米淀粉		22800	22800	18400	—	21333

注: 有“+”者为中后期污染罐。

由于 S232 4 罐中有 3 罐中后期污染, 而 1622 3 罐都正常, 故前者的平均发酵周期(164 小时)比后者短些, 平均发酵单位也略小。以平均发酵水平(微克/毫升/小时)比较, S232 较 1622 为高。平均 164 小时达到 20755 微克/毫升的水平, 也不亚于以玉米淀粉为碳源的菌株在我厂的生产能力。

总之, S232 菌株保持了高产的特性, 但由于用了劣等碳源, 此项耗粮仅为原来的 60%。在今年 6 月的试验生产中, 平均每罐较 1622 株节约粮食 1.069 吨, 其原料成本也相应降低。

## 讨 论

1. 从以上研究和初步应用看, 人工诱变和驯化相结合在一定范围内改变土霉菌的碳源是成功的。此方法是否能在其他菌种(如四环素生产菌), 其他培养基(如有机氮源), 或其他条件(如发酵温度)中应用, 值得研究。

2. S232 菌株不但在碳源要求方面有所改变, 而且在其他生理和形态方面也引起一些明显改变。在斜面生长成熟后, 活孢子数为其他以玉米淀粉为碳源的菌株 2—3 倍。菌丝与培养基结合较其他菌株更紧密, 难于刮下。在大罐生长至 30 小时左右, 有一个菌丝着色变浅, 然后重又转深的过程。

3. S232 在应用碳源上发生变化, 究竟是由于驯化引起的还是挑选了在诱变株中能适应红薯粉生长的变株, 尚待进一步工作中探讨。