



研究报告 提高灰黄霉素固体发酵单位的研究

梁宗琦 何照范 陈月碧 王迺亮

(贵州农学院, 贵阳)

为了扩大灰黄霉素固体发酵原料的来源, 大搞综合利用, 我们以玉米酒糟和麦麸为主要原料, 对适合固体发酵生产用的培养基进行了筛选。在发酵工艺上应用了“灌水湿润”法以提高瓷盘开放式发酵灰黄霉素的效价。对表面活性剂在提高灰黄霉素单位的效果上也进行了研究。现将这些结果介绍于后。

材料和方法

1. 菌种: 青霉菌 33N-70, 由上海第三制药厂提供。

2. 斜面: 将砂管原种接于下列平板培养基上(重量/体积): 蔗糖 5%, NaNO_3 0.2%, 玉米粉 1%, FeSO_4 0.01%, MgSO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.4%, KCl 0.05%, 琼脂 2%。28℃ 培养 10 天左右, 挑取基质菌丝色素较深、孢子灰绿色的菌落移于试管斜面备用。

3. 米饭曲: 将大米与上述培养液按照 1:0.7—0.8 的重量比配合, 焖成米饭。分装于玻璃瓶后高压灭菌。接入从斜面洗下的孢子液, 28℃ 培养 10 天左右备用。

4. 发酵培养基及培养方法: 固体发酵用各种培养基组成详见表 1。无特殊说明时, 其它试验所用培养基组成(按重量比, 下同)均为酒糟粉: 麦麸: 菜油 = 1:1:0.1。料: 水 = 1:1.2 (水中加有 NaCl 0.5%, KH_2PO_4 0.05%)。

5. 常规发酵法: 用 250 毫升或 300 毫升三角瓶, 每瓶装料(湿重)70 克, 灭菌接种后于 28℃ 温箱中培养。开放式发酵用 350 × 25.0 × 2.5 厘米的瓷盘于发酵室中进行培养。

6. “灌水湿润”发酵法: 培养基灭菌接种后平摊于瓷盘中, 厚约 3 厘米, 表面不覆盖, 24℃ 保温培养。在 48 小时左右菌丝大量生长品温上升时, 打开培养室门窗降温排湿, 培养基失水干

表 1 不同培养基发酵灰黄霉素的结果*

培养基编号	培养基成份(重量比例)							料:水	最终 pH	每克干产品单位数
	酒糟粉	麦麸	菜油	米糠	油枯粉	谷壳	玉米粉			
①	1	2	0.05					1:1.2	7.0	6,410
②	1	2	0.1					1:1.2	7.0	8,710
③	1	2	0.5					1:0.9	6.0	9,430
④	1	2	1.0					1:0.7	5.0	5,380
⑤	1	1	0.15	1.0		0.4		1:0.9	6.5	9,430
⑥	4		0.25	1.0				1:1.0	6.0	5,530
⑦	4	1	0.25					1:1.0	6.0	5,530
⑧	4		0.25		1.0			1:0.9	6.0	3,330
⑨	1	1	0.1					1:1.1	7.5	11,700
⑩	1	1	0.1					1:1.1	7.5	8,700
⑪	1	1	0.1					1:1.2	7.5	10,500
⑫	1	1					0.5	1:1.2	7.5	11,800
⑬	1	1					0.7	1:1.2	7.5	13,500
⑭	1	1					1.0	1:1.2	7.5	20,300

* 培养基⑩的酒糟粉中的玉米胚粉是通过 0.25 毫米目径筛子过筛的细粉, 其余各组为目径 1 毫米的筛子过筛。产品单位数皆为三次重复的平均值。

缩。此时沿瓷盘四壁按培养物湿重加入1:0.4—0.6的24—26℃冷开水,让培养物充分吸水至表面湿润。保持培养室温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度85—90%,发酵周期7天。

7. 表面活性剂:

- (1) 洗衣粉(海河牌-20型),天津产。
- (2) 洗涤剂(海鸥牌),上海产。
- (3) 吐温-80(化学纯)。

配制培养基时,洗衣粉按重量比加入,洗涤剂和吐温-80按体积比溶于水后加入培养基中共同灭菌。

表面活性剂试验用固体培养基为表1中所列的⑩和⑪号培养基。液体培养基是(重量/体积):葡萄糖7%,KCl 0.1%, NH_4NO_3 0.06%, CaCO_3 0.8%, KH_2PO_4 0.4%,pH 5.0。

取样及测定:发酵结束时,将全部培养物取出烘干(不超过 80°C)研细。瓷盘发酵则随机取样混合,每样品湿重不少于30克。用72型分光光度计进行比色测定*。

结果和讨论

一、酒糟培养基的组成

将鲜酒糟烘干粉碎,与磨细至1毫米以下的玉米胚粉混合而制成酒糟粉。再将酒糟粉按8:2,7:3……2:8的比例与麦麸拌合进行发酵试验,结果表明,用量比为7:3,6:4和5:5时,它们的发酵单位较高,分别为6530,6830和5830。在这些配方中加入总量约6%左右的菜油时,对提高发酵单位有显著作用。

上述较优的培养基当增加其它成分,或改变相互比例,或者用米糠、油枯粉代替麦麸时,发酵单位均有明显下降。而在加有玉米粉较多的一种培养基中(表1,⑩),则单位有大幅度的提高。在此种培养基上菌丝的生长粗壮,灰绿色孢子出现较晚。此外,培养基中含水量大小和胚粉的细度对单位的提高亦有显著作用。

在一定范围内增加菜油用量,发酵单位也有所增加(见表1,①②③),但超过一定数量时则单位明显下降(表1,④)。从表1中看出这是

由于培养基中含水量减少、pH值降低和C:N变得不适当所致。

二、固体发酵的“灌水湿润”法

在灰黄霉素生产中,容器发酵一般都比开放式发酵易于成功并获得高产。其原因主要是开放式发酵前期水分大量损失,致使中后期含水量不足所造成。我们采用“灌水湿润”法后,基本上解决了这一问题。从表2明显看到,常

表2 不同发酵工艺对效价的影响

处 理	培养基量(克)	最终含水量(%)	每克干产品单位数*
灌水湿润	4,000	50—59	13,500
表面喷水	2,000	38	9,700
三角瓶发酵	70	60	13,650

* 表内数据为不同批次(三个重复)测定的平均值。

规喷水法由于水分下渗和吸收困难,在发酵终止时培养物含水量只有38%,发酵单位也较低。而“灌水湿润”法由于吸收充分,含水量仍保持了50—60%,这和三角瓶培养物的含水量基本一致,其效价可达到三角瓶发酵的水平。

三、表面活性剂的使用效果

在预备试验中我们将1%洗衣粉、洗涤剂和吐温-80分别加入⑩和⑪号培养基进行发酵试验,结果初步表明,加入洗涤剂的⑩号培养基发酵单位下降了17%,其余各处理皆不同程度地提高了发酵单位。

用0.005—1.0%洗衣粉对两种培养基作进一步试验的结果见表3。在这个浓度范围内,⑩和⑪号培养基的发酵单位随洗衣粉浓度的增高而上升。当浓度达1%时,⑩号培养基平均发酵单位为28,600,比对照提高了约42%。其中效价最高的一次为29,600单位,提高的幅度已近50%。

过去认为表面活性剂的作用是和它降低了液体的表面张力,促进化学反应和影响了微生物细胞的透过性有关。我们试验的最适浓度是

* 制作标准曲线所用纯品为扬州第二制药厂赠。

表 3 不同洗衣粉浓度对不同培养基发酵单位的影响*

培养基编号	洗 衣 粉 浓 度 (%)								
	对照	0.005	0.01	0.03	0.06	0.1	0.3	0.6	1.0
⑬	9,000		10,000			12,500			12,000
⑭	20,200	20,200	18,800	20,300	24,800	24,300	27,600	26,400	28,600

* 表内单位数为三次重复之平均值。

1%，这已接近了一般合成培养基中碳源的用量，但用洗衣粉作唯一碳源时 33N-70 不生长。在这样的培养液中即使加入葡萄糖重新接种孢子也同样不生长。镜检观察孢子的萌发受到了抑制。此时若加入 0.5% 菜油，虽乳化不好，但在一定程度上却促进了孢子的萌发和菌的生长。

在表 3 的两种天然固体培养基上则相反，

洗衣粉浓度高达 3% 时，33N-70 亦能正常生长，在一定浓度下并能提高单位。测定⑭号培养基的残留粗脂肪表明，对照为 3.40%，加有 1% 洗衣粉的为 2.70%。这说明洗衣粉提高单位的作用不是增加了碳源，而是与促进了 33N-70 对脂肪的代谢有关。至于洗衣粉在合成和天然固体培养基中对 33N-70 不同作用的原因，尚需进一步研究。