

双酶水解法生产井冈霉素

陈松生 陈哲超 李惠珍 陈惠年

(福建师范大学生物系微生物教研组,福州)

井冈霉素深层发酵需要大量葡萄糖、玉米浆、蛋白胨、酵母粉等^[1],这些原料来源较少,价格昂贵。我们试验利用淀粉酶水解甘薯粉,利用蛋白酶水解黄豆饼粉的双酶水解法生产井冈霉素,在5吨发酵罐中效价稳定在10,000单位/毫升左右,最高可达17,000单位/毫升。用此法生产的几十吨产品,经福州市农业科学研究所、福州城门良种场等单位田间试用,防治效果均达90%以上。现将试验结果简报如下。

一、材料与方法

(一) 菌种

井冈霉素产生菌75,142(上海市农药研究所),955(中国科学院南京土壤研究所),Co-20(浙江桐庐农药厂)。

(二) 原料处理

碳源: 取100克甘薯粉用60℃温水配成300毫升淀粉液,调pH7.2—7.4,加BF-7658细菌淀粉酶0.3%,于80—88℃水解15分钟,用稀碘液测定至无蓝色反应为止。

氮源: 黄豆饼粉加7倍水浸泡后,高压蒸煮(1公斤/厘米²)1小时,冷却至40℃,用1N NaOH调pH7—7.5,加细菌蛋白酶1.5%,40℃保温水解1小时。

(三) 培养条件

500毫升三角瓶中,装液量为50毫升,1公斤/厘米²灭菌30分钟。接菌后振荡培养48小

时。

(四) 测定方法

井冈霉素效价用比色测定法^[1,2]。

糖和总糖用还原糖测定法^[1]。

氨态氮用甲醛滴定法^[1]。

二、结果

(一) 摇瓶试验

菌种为75号。表1及表2中的各种培养基(包括对照),除表中注明成分外尚需加(%): KH₂PO₄ 0.05, NH₄Cl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.025, NaCl 0.2, CaCO₃ 0.4, pH 7.5。

1. 不同原料水解取代葡萄糖试验: 用单纯的甘薯粉和木薯粉水解物,效价最高,菌体生长也好,如表1中的1、2、3号培养基,发酵效价均较对照为高。其中3号培养基淀粉用量一样,但因生长不好,效价稍低。

2. 黄豆饼粉水解试验: 从表2可以看出,5%黄豆饼粉水解(6号培养基)后代替蛋白胨、玉米浆 酵母粉,虽然效价比9、10号培养基稍低,但比对照高,因此在缺少这类原料时仍有使用价值。

3. 原料水解与不水解比较: 从表3中可以看出: 41号培养基中碳、氮源都经过酶解,在摇瓶中菌体生长最好,效价最高。碳、氮源都不经过酶解的44号培养基生长最差,效价最低。

4. 碳氮比值与效价关系: 为了寻找合适的

表 1 不同碳源取代葡萄糖试验

培养基编号	培养基主要成分(%)					培养基 pH	发酵后 pH	生长情况	效价 (单位/毫升)
	甘薯粉	葡萄糖	木薯粉	废糖蜜	黄豆饼粉				
对照	4*	3			1.5*	7.5	6	++	1438
1	7				1.5	7.5	6	+++	2438
2			7		1.5	7.5	7.5	+++	2688
3	4		3		1.5	7.5	6	++	1975
4	4			6	1.5	7.5	6	++	1350

* 未经水解。

表 2 黄豆饼粉水解试验

培养基编号	培养基主要成份(%)						培养基 pH	发酵后 pH	生长情况	效价 (单位/毫升)
	甘薯粉	葡萄糖	黄豆饼粉	蛋白胨	酵母粉	玉米浆				
6	4	3	5				7.5	6	+++	2,000
9	4	3	3	0.5		0.5	7.5	6	+++	2,275
10	4	3	3	0.5	0.5		7.5	6	+++	2,313
11	4	3	3		0.5	0.5	7.5	6	++	1,813
对照(未经水解)	4	3	1.5	0.5	0.5	0.5	7.5	6	++	1,438

表 3 原料酶解对比试验

培养基编号	培养基成份					培养基 pH	发酵后 pH	生长情况	效价 (单位/毫升)
	甘薯粉(%)		黄豆饼粉(%)		KH ₂ PO ₄				
	不酶解	酶解	不酶解	酶解					
41		7		5	0.05	7.5	6.5	+++	2,000
42		7		5	0.05	7.5	6	++	1,000
43	7			5	0.05	7.5	7.5	++	1,100
44	7			5	0.05	7		+	812

表 4 五吨罐发酵试验

罐号	效价(单位/毫升)	发酵时间(小时)							
		22	26	30	34	38	42	44	48
1		6,015	6,790	8,924	8,450	9,140			
2			4,169	7,350	8,950	10,026	9,974	9,800	9,800
3			4,747	6,475	10,202	9,662	11,022	10,412	
4			4,748	6,073	9,406	9,800		14,875	
5			8,190	13,180	13,650		14,524		
6			6,238	7,321	13,580	14,350		17,200	
7					13,000	11,000	10,000	9,324	

碳氮比值,进行了水解甘薯粉、黄豆饼粉的不同配比试验,淀粉: 黄豆饼粉分别为 7:5、8:3、10:3。试验结果: 效价分别为 4952、5640、5110 单位/毫升。以 8:3 效果最好。

(二) 五吨罐发酵试验

在摇瓶试验基础上进行了500升罐中试,后又扩大到5吨发酵罐试产,现简介如下:

1. 菌种: Co-20

2. 培养基(%)：甘薯粉(酶解, 8)黄豆饼、粉(酶解, 3)、 KH_2PO_4 0.1、 NH_4Cl 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03、 NaCl 0.2、 CaCO_3 0.4、花生油 0.2, pH7.5。为防止染菌, 种子罐加 10—15 微克/毫升庆大霉素。

3. 发酵：5 吨罐装量 3,500 公斤, 大叶双层挡板搅拌, 接种量为 10%。发酵至 30 小时进入菌丝旺盛期, 34 小时菌体形成密网状, 34—40 小时效价一般能达到最高峰(表 4)。此时, 还原糖在 0.5 左右, 菌体开始自溶, 效价稳定时即可放罐。

三、小结

利用双酶水解法处理淀粉与黄豆饼粉可代替葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、玉米浆等原料进行井冈霉素发酵。用 5 吨发酵罐试产, 原料经水解后, 效价可稳定在 10,000 单位/毫升左右, 最高可达 17,000 单位/毫升。

参 考 文 献

- [1] 上海市农药研究所农用抗菌素组编：《井冈霉素》，上海人民出版社，上海，1977 年。
- [2] 上海市农药研究所：微生物学通报，4(4):14, 1977 年。