用石油酵母发酵产生多氧菌素

王大珍 苏起恒 陈延钟 毛维颖 官家发
（中国科学院微生物研究所，北京）

多氧菌素（Polyoxin）是低毒广谱的农用抗菌素。它的生产原料以粮食为主。为节约工业用粮，我们开展了以石油酵母代替粮食发酵生产多氧菌素的研究。本研究采用二步发酵法，先将正烷烃利用微生物生成酵母菌体和发酵液，然后用生成物作为碳氮源发酵产生多氧菌素，现报道如下。

材料和方法

一、菌株

① 解脂假丝酵母（*Candida lipolytica*）AS 2.1207 由我所石油蛋白组提供。乙-26号菌，用 ^{60}Co 照射 AS 2.1207 菌后得到的变异株。

② 多氧菌素产生菌：金色产色链霉菌（*S. aureochromogenes*）181# 和 7403#，由我所农用抗菌素组提供。它们是 AS 4.896 菌的变异株。

二、液体石蜡（简称液蜡）

以 C_{16} 为主的正构烷烃，其各碳数烷烃所占百分比如下（%）：$C_{10}H_{22}$ 微量，$C_{11}H_{24}$ 0.35，$C_{12}H_{26}$ 1.23，$C_{13}H_{28}$ 5.85，$C_{14}H_{30}$ 13.46，$C_{15}H_{32}$ 18.15，$C_{16}H_{34}$ 19.84，$C_{17}H_{36}$ 19.46，$C_{18}H_{38}$ 14.10，$C_{19}H_{40}$ 微量。其中 C_{13-18} 占 90.9%。

三、石油酵母培养基及培养条件

① 种子培养基（%）：$(NH_4)_2SO_4$ 0.90，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05，KH_2PO_4 0.05，$CaCO_3$ 1.0，玉米浆 0.2，液蜡 8.0，pH6.5。

② 发酵培养基（%）：$(NH_4)_2SO_4$ 试验量，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08，KH_2PO_4 0.08，$CaCO_3$ 试验量，Na_2HPO_4 0.05，NaCl 0.3，玉米浆 0.4，液蜡试验量，pH 6.5—7.0。

③ 种子和发酵的条件：温度 28℃。摇床转速 180—200 转/分。发酵周期 96 小时。

四、多氧菌素发酵培养基（%）及培养条件

1. 石油发酵高脂酵母全液加少量黄豆饼粉，麦芽糖蜜（含糖 50% 左右），$CaCO_3$，调 pH 6.5—7.0，培养温度 28℃。

2. 麦芽糖蜜 2，玉米浆 2，黄豆饼粉 3，酵母膏 0.4，鱼粉 0.5，NaCl 0.1，$CaCO_3$ 0.3，培养温度 28℃，发酵周期 72—120 小时（用于对照试验）。

五、多氧菌素测定菌及其测定方法

用烟草赤星病菌（*Alternaria longipes*）作为测定菌。抗菌素效价测定采用杯碟法。

六、其它测定项目

脂类物用氯仿-甲醇（2:1）混合溶剂抽提，去溶剂，干燥，称重。糖的测定用蒽酮法。粗蛋白的定量用半微量凯氏定氮法。水份用干燥法测定。灰分用减量法测定。用甲醇法测定氨基氮。用 pH 试纸和 pH 计测定 pH。

试验结果

一、基本条件试验

试验结果表明，培养基的碳、氮比为 52.1 时，得到的酵母组分干基重为（%）：脂类物 47.2，糖 6.1，粗蛋白 40.5，灰分 6.7。

将酵母发酵全液灭菌后分别接入多氧菌素产生菌 1.81# 及 7403#，培养条件与粮食培养基相同，并以粮食培养基为对照。发酵终止后，发酵液 pH 值，氨基氮均偏高，酵母菌体未被充分利用，多氧菌素效价分别为 2400r/ml 和 2000 r/ml。

二、发酵条件试验

1. 第一次正交试验：选用 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交表。除方法中述及的发酵条件外，变动的因

大田试验由山东省烟草研究所，黑龙江省甜菜研究所，山东省烟台地区林业科学技术站协助进行，一并致谢。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1　第一次正交试验的因素及水平

因素＼水平＼序号		1	2	3	4
酵母培养基的碳氮比		39	45.7	52.1	59.4
多氧菌素发酵接种量(%)		6	4	8	10
多氧菌素发酵周期(小时)		72	60	84	96
酵母菌株		AS2.1207	乙-26		
多氧菌素菌株		181#	7403#		
多氧菌素发酵培养基	加糖量(%)	0.5	0		
	加黄豆饼粉量(%)	0	0.5		
	初 pH	7.0	6.5		
	加$CaCO_3$量(%)	0	0.3		

素及水平见表 1。

试验后经计算，得到各因素对产多氧菌素效价影响的最优条件见表 2。

表 2　第一次正交试验得出的最优条件

因素			最优条件
酵母发酵	菌株		AS2.1207
	培养基 C/N		52.1
多氧菌素发酵	菌株		181#
	接种量 (%)		8
	培养基	加糖(%)	0.5
		加黄豆饼粉(%)	0.5
		加 $CaCO_3$ (%)	0.3
		初 pH	6.5
	发酵周期(小时)		72

按表 2 最优条件进行试验，发酵液中多氧菌素效价为 6000r/ml。用一般较好的条件为 4000—5000r/ml。

2. 第二次正交试验：为了再度提高多氧菌素效价，选用了 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 正交表进行试验。变动的因素及水平见表 3。其它因素选用第一次正交试验获得的最优条件。结果见表 4。

按表 4 的最优条件进行试验，发酵液中多氧菌素效价达 8000r/ml。用一般较优条件为 6000—6500r/ml。按平均效价 6250r/ml 计算，

表 3　第二次正交试验的因素及水平

因素＼水平＼序号	1	2	3	4
石油酵母种龄(小时)	42	48	36	24
多氧菌素菌种龄(小时)	36	42	24	48
多氧菌素发酵培养基中黄豆饼粉量(%)	0.5	0.25	0	0.75
多氧菌素发酵周期(小时)	60	72	84	96
酵母培养基的 C/N	52.1	45.7	—	—
多氧菌素发酵菌接种量(%)	6	8	—	—
多氧菌素发酵培养基中加糖量(%)	0.5	0	—	—

表 4　第二次正交试验得出的最优条件

因素			最优条件
酵母发酵	培养基 C/N		45.7
	种龄 (小时)		44
多氧菌素发酵	培养基	黄豆饼粉量(%)	0.75
		糖量 (%)	0.5
	种龄 (小时)		42
	接种量 (%)		8
	发酵周期(小时)		84—96

比粮食发酵的产量高 20%。

3. 第三次正交试验：根据以上最优条件，再次选用 $L_8(4\times2^4)$ 正交表，按表 5 中的因素及水平进行试验，结果见表 6。

表 5　第三次正交试验的因素及水平

因素＼水平＼序号	1	2	3	4
多氧菌素发酵周期(小时)	60	72	84	96
酵母培养基 C/N	45.7	52.1	—	—
多氧菌素发酵接种量(%)	6	8	—	—
多氧菌素发酵培养基初 pH*	+	负	—	—

* "+"为调 pH（指接种后调 pH6.5）"负"为不调。培养基中加入的 $CaCO_3$ 量均为 0.7%。

按最优条件试验，发酵液中多氧菌素效价达 6500—6800r/ml，最高达 8600r/ml。最适初 pH 值与上述结果相同。仅 $CaCO_3$ 量由 0.3% 增至 0.7%，其它条件验证重复出以前试验结果。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 6 第三次正交试验的最优条件

因 素	最优条件
酵母培养基 C/N	52.1
多氧菌素发酵培养基初 pH	+
多氧菌素发酵接种量(%)	8
多氧菌素发酵周期(小时)	84—96

上述结果表明发酵的最适条件为：

酵母发酵：菌号为 AS2.1207。石油发酵基础培养基中加液蜡 13%（V/V），$(NH_4)_2SO_4$ 0.8%，$CaCO_3$ 1%。种龄 44 小时。接种量 15%。28℃培养 96—120 小时。

多氧菌素发酵：181#。培养基为酵母发酵全液加黄豆饼粉 0.5%，麦芽糖蜜 0.5%，$CaCO_3$ 0.7%，初 pH6.5。种龄 42 小时。接种量 8%。28℃发酵 84—96 小时。

讨 论

试验表明：石油酵母发酵时需要较高的碳氮比，所得的酵母含脂类物在 45% 以上；而多氧菌素发酵时需补加少量黄豆饼粉，发酵过程中氨基氮始终在 20—30mg/100ml 水平，可提高多氧菌素效价。这可能由于在产抗生素过程中既需要有足够的氮量又要求瞬息可利用性氮处于亚适量，才有利于抗生素积累。氮含量与发酵液pH值关系密切，pH 值偏高影响多氧菌素积累。在多氧菌素发酵过程中，发酵液呈碱性时，抗生素效价因产物的分解而下降，所以要严格地控制发酵液的初 pH 值。用二步发酵法产生多氧菌素时，影响因素较多，但通过三次正交试验就取得了较好结果，证明这种试验方法简捷易行。

试验证明，发酵清液用 HCl 调pH至 3.0，在室温可(15—20℃)保存 15 天，效价不下降。发酵浓缩液经动物急性毒性试验和施药部份残留量试验表明安全无毒。大田药效试验表明，发酵液对烟草赤星病，甜菜褐斑病，苹果灰斑病的防治效果与粮食发酵的产品相同。但二步发酵法生产周期较长，有待今后改进。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn