

灰黄霉素高产菌株特性的研究

吴松刚 鲍运森

(山西省生物研究所,太原)

灰黄霉素产生菌(*Penicillium patulum* 4541)经耐前体的抗性选育,获得白色突变株 B-53 和 D-756。D-756 菌与国内外所报道的灰黄霉素产生菌有明显不同^[1,2]。本文报道该变株的生物学特性和生物合成灰黄霉素的关系。

材料与方 法

一、菌株

产灰黄霉素的耐前体白色突变株 D-756。

二、培养基和培养条件

1. 氯离子: 用 NaCl + KCl

2. 种子培养基(%): 大米粉 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, NaNO_3 0.1, NaCl 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KCl 0.1, KH_2PO_4 0.4, CaCO_3 0.8。自然 pH。

3. 发酵培养基(%): 大米粉 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, NaNO_3 0.1, NaCl 0.8, KCl 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KH_2PO_4 0.6, CaCO_3 0.8。自然 pH。

4. 温度: 种子和发酵培养均为 29℃。

5. 通气量: 摇床转速为 220—230 rpm; 种子罐和发酵罐通气量均为 1:1(V/V)。

三、测定方法

1. 糖的测定: 采用常规的非林法。

2. 氮氮的测定: 甲醛法^[3]。

3. 淀粉酶活力测定: Wohlogemuth 法^[4]。

4. 灰黄霉素效价测定: 菌丝体用乙醇提取, 重氮盐显色, 72 型分光光度计测定。

结果与讨论

一、耐前体-氯离子的特性

采用不断提高发酵培养基中的氯离子浓度 (NaCl + KCl) 的方法。结果表明, 从 4541 野生型菌株的培养基中 0.3% 的氯离子, 逐步提高到 1.1%。而 D-756 菌培养基中氯离子浓度达 1.5%, 试验结果见表 1。

表 1 说明, KCl 的 K 值以 K_1 大, NaCl 以 K_3 为大, 故其较适浓度为 $\text{KCl} + \text{NaCl} = 0.7\% + 0.8\% = 1.5\%$ 。而主要影响因素为 NaCl。

在此基础上, 进行 D-756 菌耐氯极限试验, 说明其极限浓度为 3.0%, 具体见图 1。

本工作承宋友礼同志指导, 特此致谢。

表 1 不同氯离子浓度的正交试验

结 果 项 目	设 计	K ₁	K ₂	K ₃	R 值
浓度(%)	KCl	0.7	0.9	1.1	—
	NaCl	0.4	0.6	0.8	—
结果(K 值)	KCl	48128	47651	47986	477
	NaCl	47193	48139	48487	1348

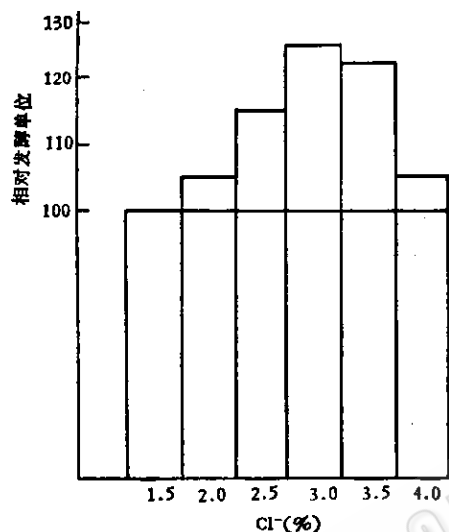


图 1 氯离子浓度与产灰黄霉素关系

二、D-756 菌产淀粉酶的能力

在种子培养基中,其酶活力可达 320mg/ml

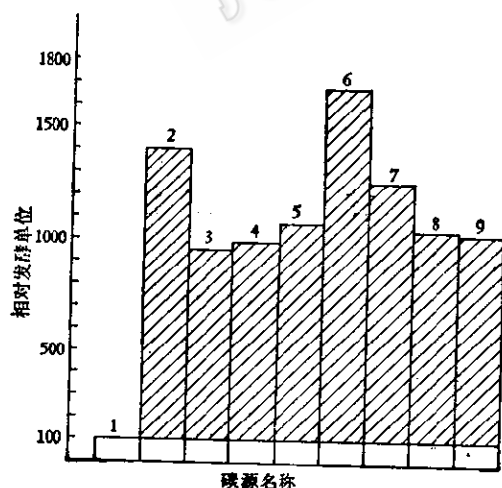


图 2 不同碳源与合成灰黄霉素的关系

图中 1 乳糖, 2 大米粉, 3 玉米粉, 4 高粱粉, 5 葡萄糖, 6 蔗糖, 7 糊精, 8 果糖, 9 淀粉

·h。它能直接利用大米粉等淀粉原料做碳源。在发酵培养基中,开始发酵 1 小时左右即可将淀粉全部液化。各种不同碳源与合成灰黄霉素的关系见图 2。

三、具有高糖发酵的特性

以大米粉为碳源的发酵中,发酵培养基中大米粉为 11%,其发酵单位以 100 计。当大米粉量提高到 15%时,其发酵单位可达 203,增加了 1.03 倍。我们进行了以大米粉量为 15% 做基础的正交试验,结果表明: K 值以 19% 较 17% 和 15% 为好。其发酵单位提高了 24.5%。

四、D-756 菌具有低氮发酵的特征

在发酵过程中,以大米粉为碳源,不需另加其他有机氮源。加入花生饼粉或黄豆饼粉,反而不利于灰黄霉素的合成,见图 3。

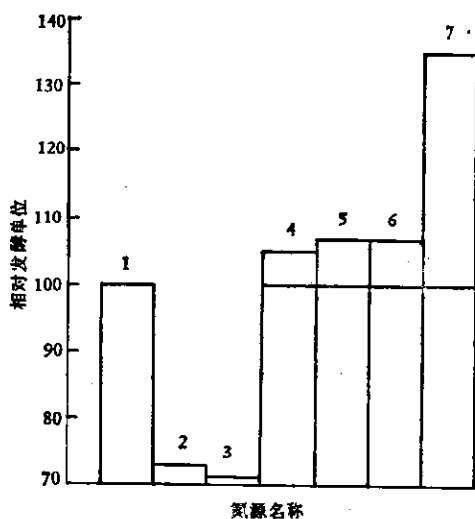


图 3 不同氮源与灰黄霉素合成的关系

图中 1 对照, 2 花生饼粉, 3 黄豆饼粉, 4 玉米浆, 5 酵母粉, 6 麸皮, 7 米糠

试验说明, 发酵初氮应控制在 100r/ml 以下, 整个发酵过程氮氮应维持在 120r/ml 以下。无机氮源过多反而不利于灰黄霉素的合成。发酵培养基中不加无机氮源, 其效价为对照的 96%。而当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaNO}_3 = 0.5\% + 0.5\%$ 时, 其效价为对照的 45%。

五、D-756 菌具有低 pH 发酵的特性

近 200 个罐批的生产实践说明, 该菌在发酵过程中 pH 应控制在 4.8—5.2 之间。这与国外报道灰黄霉素产生菌理想发酵 pH 6.8—7.2 不同。试验还表明, 在低糖(<8%)高氮(>120 r/ml)发酵条件下, pH 明显上升, 一般在 6.0 以上。此时消耗糖速度缓慢, 补料困难, 不利于灰黄霉素合成, 放罐时发酵单位为正常发酵的 10%。

六、D-756 菌具有耐泡敌的特性

在发酵过程中, 可用泡敌代替豆油进行消泡, 而且 0.05—0.07% 的浓度, 还能促进灰黄霉素的合成, 见表 2。

表 2 不同泡敌用量与灰黄霉素合成的关系

消泡剂名称	用量(%)	相对效价
豆 油	0.1	86
	0.2	100
	0.5	97
泡 敌	0.015	97
	0.03	103
	0.05	120
	0.07	120
无消泡剂(对照)	0	100

表 2 表明, 可用泡敌代替豆油进行灰黄霉素发酵生产。

参 考 文 献

- [1] Barnes, M. J. et al.: *Biochem. J.*, **78**:41, 1961.
- [2] 宋友礼等: 微生物育种学术讨论会文集, 科学出版社, 28—41, 1975, 北京。
- [3] 中山大学生物系生物化学微生物教研室: 生物化学技术导论, **35**: 1978, 人民教育出版社, 北京。
- [4] 陈驹声: 酒精发酵研究, 38 页, 科学出版社, 北京, 1959。