

庆丰霉素的 研 究

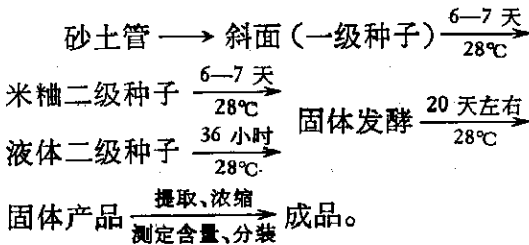
III. 庆丰霉素的固体发酵生产

上海植物生理研究所微生物室农抗组
上海市嘉定县南翔公社微生物组
上海市上海县马桥公社俞塘大队新农药组
上海市南汇县大团公社农药厂

为适应我国广大农村生产和应用庆丰霉素的需要，我们研究了庆丰霉素的固体发酵生产法。本文报道固体发酵的生产流程、发酵条件及产品处理等。以米糠、麸皮、玉米粉和薯糠为原料，利用蘑菇瓶发酵，产量一般在1万单位/克干料。此外，还对生产中常出现的问题进行了讨论。

庆丰霉素是由庆丰链霉菌所产生的核苷类抗菌素^[1,2]，它对稻瘟病及麦类白粉病有较好的防治效果。为了适应广大农村生产和应用的要求，我们研究了庆丰霉素的固体发酵生产法。1974 年仅上海郊县人民公社就有 40 多个工厂在搞庆丰霉素的土法生产和大田应用。

生 产 流 程



一级种子的培养 (斜面菌种)

(一) 培养基

* 黄豆饼粉 1 克 蛋白胨 0.3 克 葡萄糖 1 克 食盐 0.5 克 碳酸钙 0.2 克 琼脂 2.5 克 自来水 100 毫升。灭菌前 pH 7.0—7.2。

(二) 培养结果

按无菌操作将庆丰链霉菌的砂土种子移到灭菌的斜面培养基上，置 28°C 培养。庆丰链霉菌在该培养基上生长迅速。培养 3 天气生菌丝即生长丰茂，呈白色，4—5 天开始转灰，6—7 天孢子成熟呈深灰色，菌苔厚，背面呈淡黄色。

在土法生产中常出现一级斜面菌种生长不良的现象，这个现象在实验室基本上没有。遵照毛主席关于“无论何人要认识什么事物，除了同那个事物接触，即生活于（实践于）那个事物的环境中，是没有法子解决的”教导（《毛泽东选集》第一卷，实践论），我们在上海县马桥公社俞塘大队新农药组进行现场分析试验，寻找原因。经过试验观察，一级斜面菌种生长不良的原因主要有二点：第一，菌种变异。斜面传代次数太多，引起菌种退化；第二，环境因素的影响，如水质不同也可能影响菌种生

本文于 1975 年 5 月 24 日收到。

* 黄豆饼粉用前先加 10 倍量的水，煮沸 10 分钟，用 4 层纱布过滤，滤去渣滓，滤液用作配培养基。

长。我们在俞塘大队以不同水质配制斜面培养基,比较对庆丰链霉菌生长的影响,证明庆丰链霉菌在用井水配制的斜面上生长显著不良,而用马桥公社自来水及上海自来水配制的培养基生长较为正常(表1)。这可能是由于不同地区水源(井水或河水)或同一地区不同季节的水源杂质含量不同,因此对菌种的生长产生一定的影响。我们认为,培养基的酸碱度以灭菌前 pH 7.2—7.5 为宜。

表 1 用不同水源配制培养基对庆丰链霉菌斜面生长的影响

pH	斜面生长情况		
	俞塘井水	马桥自来水	上海自来水
6.5	白,菌苔薄	白,菌苔薄	灰白
7.0	白,菌苔薄	灰白,菌苔薄	灰,间或有白点
7.2	灰白相间	灰	灰
7.5	灰白相间	灰,菌苔厚	灰,菌苔厚

二级种子的培养

(一) 米糠二级种子

取籼米(或碎籼米)一斤,加水浸泡 3—4 小时,滤去多余的水并蒸熟成饭,趁热将饭揉散,使不结团,然后分装蘑菇瓶,每瓶装一两左右。

高压蒸汽灭菌 30 分钟,冷却后即可接种。每瓶接种斜面孢子约 4 平方厘米,充分摇匀,于 28°C 培养。庆丰链霉菌在米饭培养基上生长良好,迅速。一般接种后 3 天,米饭表面气生菌丝生长丰茂,呈白色,4—5 天开始转灰,培养基中有水份渗出,色微黄,清澈透明。至 6—7 天孢子大量形成,米粒干松呈深灰色,即可作为三级固体发酵的种子。若米粒湿、糊,水份混浊则表明有污染。米糠种子与液体摇瓶二级种子比较,最大的优点是不需动力设备,适合农村生产,缺点是培养时间长。目前土法生

产均采用米糠二级种子代替原来的液体二级种子。

(二) 液体二级种子

培养基:淀粉(或豆油)1克,磷酸二氢钾 0.1 克,黄豆饼粉 1.5 克,硫酸镁 0.05 克,氯化钠 0.3 克,自来水 100 毫升。灭菌前 pH 7.0。

种子培养基配成后,取 100 毫升装入 750 毫升蘑菇瓶中,塞上棉塞,高压蒸汽灭菌 30 分钟,冷却后接种斜面孢子,然后置往复式摇床振荡培养(100—120 次/分钟),一般于 28°C 培养 36 小时即可使用。接种三级以前应涂片用显微镜检查菌丝的生长情况,好的液体种子,应具备以下条件:菌丝量多,美蓝染色均匀,菌丝错综交叉成网状,有少量短分枝。培养液体种子生长周期短,但种子质量的好坏不易用肉眼观察来判断,手续比较烦琐,容易污染。

在土法生产中可采用不同的二级种子接种三级发酵培养基。如米糠二级种子,液体二级种子,一级斜面种子作二级种用,三级固体发酵产品作二级种用等。为了寻求行之有效而又便于操作的方法,我们观察了不同的二级种子接种三级固体发酵培养基与庆丰霉素产量的关系。结果(表 2)指出,用液体二级种子,米糠二级种子,斜

表 2 不同二级种子接种三级发酵培养基对庆丰霉素产量的影响

发酵培养基成分 (%)	二级种子	出料时 pH	效价 (单位/克干重)*
亚麻仁油下脚 8	液体摇瓶种子	6.7	10727
黄豆饼粉 10	米糠种子	7.0	8645
蚕蛹粉 5	斜面种子	7.0	9680
者糠 77	三级固体发酵产品	7.0	6500

* 发酵周期 2 星期。

面种子作为二级种子, 对抗菌素产量没有显著的影响, 三级固体作二级种子再接种三级发酵培养基产量较低。

固体发酵

(一) 普遍使用的培养基(%)

米糠 30, 麸皮 30, 玉米粉 20—30, 苕糠(谷壳) 10—20。

每 100 克固体培养基加入等量的水拌匀, 再加入 1.5—2.0 克的生石灰粉(将生石灰研成粉状, 密闭保存)充分拌匀以调节培养基的 pH。然后分装入瓶, 每瓶装一两(以干料计)左右, 高压蒸汽灭菌 1 小时, 冷却后即可接种。

用石灰调节 pH 是贫下中农在庆丰霉素土法生产实践中创造出来的, 实际使用效果很好, 完全可以代替氢氧化钠(表 3)。

表 3 不同用量石灰调节 pH 对庆丰霉素产量的影响

培养基成分 (%)	加入石灰量 (%)	灭菌前 pH	灭菌后 pH	产量效价 (单位/克干重)
米糠 30	1.0	6.7	6.2	13580
麸皮 30	1.5	7.7	6.5	15477
玉米粉 30	2.0	8.5	7.0	17666
苕糠 10	2.5	11.0	7.0	11400
	不加	5.5	5.4	9520

(二) 原料选择

我们和许多工厂、试验站做了不少三级固体培养基配方的试验, 结果见表 4、5。

表 4、5 的结果说明, 庆丰链霉菌对固体发酵原料的适应性很广, 而以麸皮, 米糠为主要原料时, 抗菌素的效价较高。表 4 还指出, 固体发酵的周期以 3—4 周为宜, 周期太短则抗菌素未达最高效价, 周期太长则效价降低。

表 4 不同固体培养基对庆丰霉素产量的影响

培养基成分 (%)	抗菌素效价(单位/克干重)			
	9 天	18 天	27 天	33 天
麸皮 50 米糠 30 苕糠 20	4980	13500	14000	12000
麸皮 40 米糠 30 蚕蛹粉 10 苕糠 20	9850	14450	15700	12600
麸皮 30 米糠 30 玉米粉 30 苕糠 10	7500	20900	24400	12000
麸皮 30 米糠 30 石油酵母 30 苕糠 10	7850	10950	12000	9600
麸皮 60 米糠 20 玉米粉 10 苕糠 10	5005	16400	12400	12000
黄豆饼粉 10 油脚 8 苕糠 82	3675	17350	11400	9700

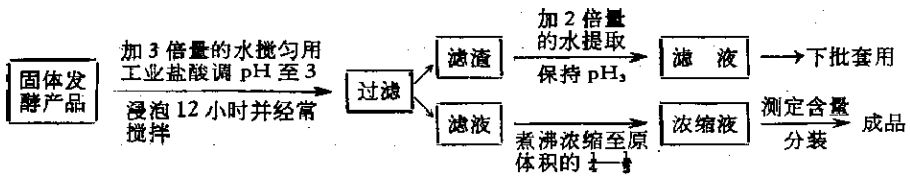
表 5 不同固体培养基对庆丰霉素产量的影响

培养基成分 (%)	加水量/原料重	效价 (单位/克干重)
亚麻仁油下脚 8 黄豆饼粉 10 蚕蛹粉 5 苕糠 77	1:3	6500—10000*
豆渣(湿) 70 苕糠 30	不加	6600—8600*
豆渣(湿) 60 糖糟 10 苕糠 20	不加	6500*
米糠 25 蚕蛹粉 25 鱼粉 5 玉米粉 20 苕糠 25	1:1	5000*
蚕蛹粉 20 苕糠 80	1:1	4000*
麸皮 30 谷子粉 15 米糠 20 鱼粉 5 苕糠 30	1:1	12000
麸皮 30 米糠 30 玉米粉 20 苕糠 20	1:1	20445
豆饼粉 20 麸皮 30 米糠 30 苕糠 20	1:1	10000

* 发酵周期为 2 星期。

产品的处理

固体发酵产品的处理可按下列步骤进行:



在产品处理过程中,应注意以下几个环节:第一,过滤。过滤是否彻底直接影响产品得率。第二,在提取和浓缩阶段必须保持酸性(pH3),因为只有在此酸性条件下才能使庆丰霉素不致因加热而失活。调节pH采用工业盐酸,不能用硫酸或

硝酸,否则在加热过程中使庆丰霉素失活。第三,固体发酵物出料后立即浸泡提取,其得率高于晒干后再浸提的得率,前者可达80%,而后者只有60—70%。庆丰霉素土法产品直接煮沸浓缩的得率如表6。

表6 庆丰霉素土法产品提取浓缩试验

提取液体积 (升)	含量 (单位/毫升)	总单位	浓缩液体积 (毫升)	含量 (单位/毫升)	总单位	得率 (%)
22.5	165	3712500	2500	1570	3925000	105
42.0	250	10500000	4500	2300	10465000	91.3
1.5	1965	2947500	500	5730	2865000	97.2

庆丰霉素的测定

庆丰霉素的效价测定,采用双层管碟法,以春雷霉素作为相对标准,以枯草杆菌AS1.140作为指示菌。测定方法和培养基均与春雷霉素生物测定法相同^[3]。

问题和讨论

近几年来,土法生产庆丰霉素的群众性科学实验活动广泛地开展。通过不断实践,互相交流,土法生产工艺已不断完善。使得土法生产更适合于在广大农村推广应用。但是本工艺仍然存在一些问题。

1. 庆丰链霉菌虽然具有生长快,土法生产方便,产量高的特点,但菌种容易退化,这是土法生产中反映得较多的一个问题。辩证唯物论认为,任何事物都是在发展变化中,菌种当然也是如此。我们要依据客观规律的变化,充分发挥主观能动性,创造条件,促使事物向有利的方面转化。

我们认为要解决菌种的退化问题,除了重视菌种保藏工作适当控制菌种传代的次数以外,同时还要不断进行分离,复壮,从而选育更高产的菌种。

2. 庆丰霉素的效价测定目前仍然采用管碟法。这个方法操作和计算较烦琐。各单位测定不免误差较大。这给药效试验和大田应用带来困难。安徽白湖农场试验站研究成功的光电比色法^[4],简化了测定步骤。更简便的测定方法,有待进一步研究。

3. 本工艺二级种子的制备,需要米和摇床等材料设备。用瓶子固体发酵,生产量不易扩大,为使土法生产在农村巩固下来,生根开花,需进一步改进发酵方法。

4. 庆丰霉素土法生产的产品处理,工序虽然简单,但需用工业盐酸,这给偏僻的山区带来一些困难。因此产品的处理方法及剂型也是需要进一步加以研究。

参 考 资 料

- [1] 上海植物生理研究所微生物室农抗组：微生物学报, 14(1): 42—46, 1974。
 [2] 上海植物生理研究所微生物室农抗组：微生物

- 学报, 15(2): 101—109, 1975。
 [3] 上海植物生理研究所农抗组：春雷霉素土法生产和应用。上海人民出版社, 1971年。
 [4] 安徽白湖农场试验站：微生物学通报, 2(1): 32—36, 1975。

STUDIES ON QINGFENGYMCIN

III. SOLID MEDIA FERMENTATION

SECTION OF AGRICULTURAL ANTIBIOTICS, LABORATORY OF MICROBIOLOGY,
 SHANGHAI INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY

GROUP OF MICROBIOLOGY, NANXIANG PEOPLE'S COMMUNE, JIADING COUNTY

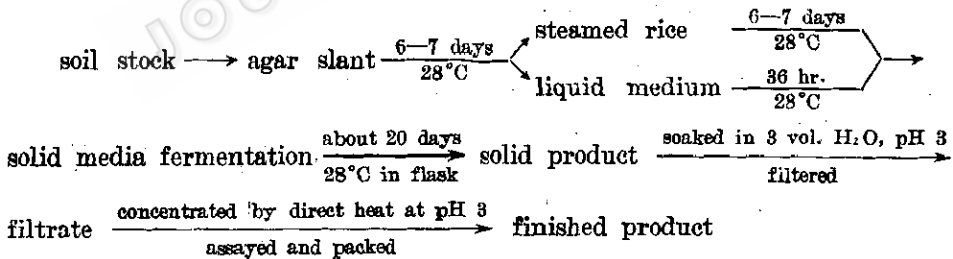
GROUP OF NEW AGRICULTURAL CHEMICALS, YUTANG BRIGADE,

MAQIAO PEOPLE'S COMMUNE, SHANGHAI COUNTY

FACTORY OF AGRICULTURAL CHEMICALS, DATUAN PEOPLE'S COMMUNE, NANHUI
 COUNTY

(Shanghai)

The Qingfengmycin producing process suitable for rural application is as follows:



Various raw materials abundant in countryside such as wheat bran, rice bran and corn meal can be utilized. A

rather high yield of about 10000 u./gram dry material can be obtained by this simple method.