

庆丰霉素的“土坑发酵”生产

四川省生物研究所农抗组

四川省崇庆县菌肥厂

庆丰霉素“土坑发酵”生产法是用固体种子代替二级液体种子，用土坑发酵代替温室瓶罐发酵或曲盘发酵，从而能有效地扩大生产规模，节约设备、投资、燃料和劳力。产品抗菌素效价7000单位左右。此法也适用于春雷霉素、灰黄霉素等的土法生产。

为了满足广大农村对庆丰霉素的需
要，及时防治作物病害，确保农业丰收，我们进行了庆丰霉素“土坑发酵”的研究。

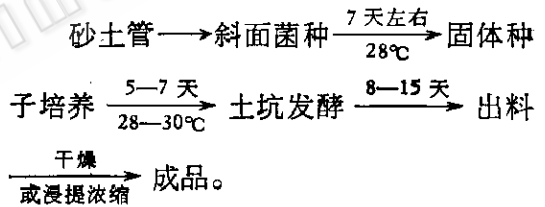
1971年四川省生物研究所的科技人员到崇庆县菌肥厂和工人一起土法试制春雷霉素(730)。在生产实践中，科技人员和工人同志一起认真学习了在发展国民经济中实行大中小并举、土洋并举等一整套两条腿走路的方针，提高了认识，决心自力更生，艰苦奋斗，反复实践，大胆革新，努力闯出一条适于广大农村生产农用抗菌素的路子。

在工人同志的倡议下，把二级菌种摇瓶培养改为固体培养。随后又大胆试验用露天“土坑发酵”代替温室曲盘发酵，1972年3月初步获得成功。经过不断改进，从土坑里成批生产出了质量较好的春雷霉素产品，用此法生产灰黄霉素也获得成功。

1972年8月开始用庆丰链霉菌 (*Streptomyces qingfengmyceticus*) 进行庆丰霉素^[1,2]的土坑发酵生产试验，逐步完善了工艺程序。现省内不少基层单位应用此法都能较顺利地生产。如峨眉县胜利公社菌肥厂，1974年与“5406”菌肥穿插生产，获得产品80000余斤，含量4000—7000单位，有的达9000单位，并实现了常年生产。

由于设备简单，操作管理方便，节省燃料，生产量大，产品质量不断提高，成本低，很受农村欢迎。

工艺流程



生产条件和培养管理

一、砂土管

选纯度高、菌苔厚、孢子丰满、无杂菌的新鲜斜面菌种，按常规方法制备。

二、斜面菌种

常用培养基(%):

1. 黄豆(饼)粉1, 甘油或葡萄糖1, 蛋白胨0.3, 氯化钠0.2, 碳酸钙0.2, 琼脂2—2.5, pH7.2—7.4。

2. 用10—40的豆浆原液代替上述黄豆(饼)粉,其余同上。

本文于1975年6月4日收到。

3. 高氏二号培养基：蛋白胨 0.5, 氯化钠 0.5, 葡萄糖 1, 琼脂 2—2.5, pH 7.2—7.4。

配方 1 的制法是将黄豆(饼)粉加水煮沸 20 分钟过滤, 与溶化的琼脂滤液混合, 再加入其余成分搅匀, 加水至总量, 调 pH。配方 2, 3 则是在琼脂滤液中加入其余成分, 加水至总量, 调 pH。将上述配好的液体趁热分装试管, 高压灭菌(15 磅半小时)后冷至 60℃ 左右搁成斜面, 置 37℃ 下至冷凝水消失, 无杂菌产生, 即可按无菌操作接种, 28℃ 培养至孢子成熟, 即成一级菌种, 置冰箱中(或冷凉处)保存。

三、二级固体种子培养

庆丰链霉菌可以利用淀粉等多种碳源而不必用油脂, 对黄豆(饼)粉、蚕蛹粉、油枯, 玉米粉、麦麸、米糠、豆渣、糖糟等农副产品都能较好的利用, 配方中加入适量肥土有利于菌体生长。配方中各成分大体按谷壳 20—30%, 肥土 30—20%, 其它原料占 40—60% 左右的比例较为适合, 因为是作种子用, 所以二级培养基配方不要求抗菌素含量高, 而要求菌体生长快, 孢子量多。

常用培养基如表 1。其酸碱度在

表 1 二级固体种子培养基

配方号	原料							
	黄豆(饼)粉	蚕蛹粉	油 枯	玉米粉	麦 麸	米 糠	谷 壳	肥 土
1	5—10			10—15	30		20	30
2		5—10		10—15	30		20	30
3			5—10	10	30		20—25	30
4			20	20			40	20
5				20	30	30	10	10

pH 7—8.5, 加水量因不同配料而异, 一般为料重的 70—90%, 以手捏成团, 落地能散, 用力捏时, 指缝中可见少量水液为度。每瓶装量 1/3 左右。高压灭菌(20 磅 1 小时)后趁热摇散, 冷后接种, 500—1000 毫升三角瓶接种半支至一支斜面, 28—30℃ 培养, 待长满灰色孢子后即可使用, 也可接入另外的种瓶扩大培养。

三级菌种要求纯度高, 长势旺, 菌体丰满无杂菌。染有少量杂菌和生长较差的种瓶也可培养至适当时间后直接出料作为成品。

此外, 用米饭(或碎米)曲作二级种子亦可。米饭加入 1% 白糖(或红糖), 0.5% 食盐和 2% 钙镁磷肥, 这种配方生长很快, 4 天即可成熟, 且孢子量多, 污染少, 用米

或碎米加入 50—80% 的粗玉米粉(或适量的米糠、麦麸), 只用 6 天左右就能长好。

米饭曲的制法是将米用其重量 80% 的水浸泡 20 分钟, 捞出用甑蒸, 上气后分次将余水加完, 蒸至米心不白为度(或米不经浸泡直接在沸水中大火煮 3—4 分钟亦可), 晾冷后加入白糖、食盐、钙镁磷肥, 混匀, 分装灭菌, 接种培养。如加玉米粉、麦麸等应与米饭分别蒸过再混合。

四、土坑发酵

(一) 特点

1. 料温较稳, 随气温而变化的幅度小, 当坑面温度昼夜相差 20℃ 时, 料温变化幅度 3—5℃, 坑面温度因阳光直射高达 40℃ 时, 正常发酵温度也不超过 30℃。

2. 土坑内湿度也比较稳定, 在整个培养过程中, 一般不需另外加水, 或在中后期加 1—2 次水(每次 10% 左右)。

3. 通气条件优越。

由于有上述优点, 所以较易获得成功。

土坑发酵在措施上, 因季节、气候等情况不同而有相应的变化。下面重点谈春季土坑发酵的作法, 对其它季节在操作上的特点, 也予以简述。

(二) 培养基的配制与接种

配方原则与固体二级同。要求既要生长快, 又要含量高。一般适宜作固体二级的配方, 多数也适宜作三级大床配方。在土坑发酵培养基中, 必须有适量的肥土。谷壳的用量可以因谷壳质量、配方的不同和季节的变化而酌量增减。经比较配方试验, 较好的配方列表 2。

酸碱度与二级固体配料同, 水分可比

表 2 土坑发酵培养基

配方编号	原 料 配 量 (斤)									土坑发酵效价 (微克/克)	
	黄豆饼粉	蚕蛹粉	黄豆粉	油枯	玉米粉	麦麸	米糠	磷肥	谷壳		肥土
1	10				10	30			20	30	7000
2	16				16	48			10	10	7500
3	5	5		5	25	30	5		20	15	8000
4				5	10	30			25	30	6000
5			5	5	10	30		5	20	25	7000
6				5	10	35		5	20	25	7000
7				5		40	5	5	20	25	6000

二级稍多一点, 一般为料重的 80—90%, 以用力捏指缝有水而不滴为度, 但要因季节和当时当地气候环境条件而灵活掌握。

将配好的料分装于布袋中, 每袋装量不超过布袋容量的一半。布袋长约 2.5 尺, 宽约 1.3 尺, 过大过小都不宜。每袋装料 5—6 斤(以干料计), 高压灭菌(20 磅 1 小时)后置接种箱(室)内或清洁的桌子上, 冷至 40℃ 以下即可接种。

将严格选好的二级固体种瓶用酒精等进行表面消毒(特别是瓶口), 摇散瓶中菌体, 稍开料袋口, 按 8% 左右的接种量迅速倒入袋内, 扎口揉匀, 倒入土坑内培养。

(三) 土坑制作与培养管理

1. 土坑形式与规格: 坑内各部的发酵情况并不是均匀一致的, 中部由于散热慢, 温度高, 透气性差, 容易污染; 边缘四周 5—6 寸散热快, 透气性好, 适于菌体生长

发育, 极少污染。因此土坑制作采用几种形式:

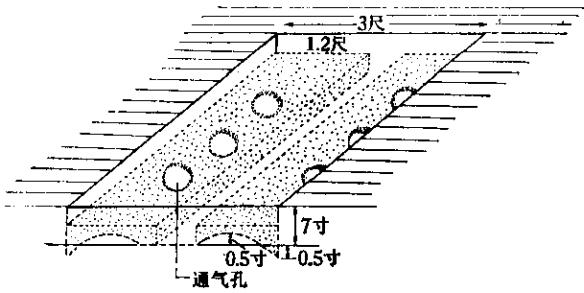
双行坑: 3 尺宽, 4 尺长或长度不定, 靠壁铺料两行, 每行料宽 1.2 尺左右。

单行坑: 宽 1—1.2 尺, 铺料一行。

蹄形或回形坑: 3—3.5 尺宽, 4 尺长, 三方或四方铺料, 只把中心空出来。

以上各种坑的深度约 7 寸, 四壁可深半寸左右, 距壁 4—8 寸的地带应拱起半寸左右呈瓦背形为好(见示意图)。其共同特点是: 料堆中心部位狭窄, 且边厚中薄, 改善了中心部位的通气条件, 使发酵较均匀, 从而减少或避免污染; 固定堆料宽度, 长度不定, 便于加大投料量; 坑形不变, 只调整铺料厚度就可适应一般的季节变化; 坑的深浅, 大小适中, 便于操作管理。

为进一步改善料堆中心部位的通气条件, 必要时还可在投料上坑时于中心部位



双行坑示意图

留几个通气孔。

2. 铺料厚度,与气温有密切关系,是土坑发酵的关键环节之一。太厚通气不良,品温太高,易污染杂菌;太薄品温升不起来或失水太快,不能正常发酵,冬季(12月—2月)一般平均气温 10°C 以下时,厚度4—5寸; $5-6^{\circ}\text{C}$ 以下时除增加厚度外,还应增加保温措施。3—5月及9—11月,平均气温在 $10-15^{\circ}\text{C}$,厚度约2—3寸; $15-20^{\circ}\text{C}$ 1.5—2寸。夏季6—8月温度高,厚度以一寸左右为宜。总之,要使发酵温度在 20°C 以上,最高品温不超过 35°C ,发酵速度平稳为好。

3. 上坑与管理(以双行坑为例):

消毒与装料: 土坑使用前用5—10%石炭酸或来苏尔喷雾消毒,铺一层消毒报纸,即将上述接种好的料倒入坑内,靠壁铺成两行,迅速摊平,上面再盖上消毒纸,酌情加盖草帘或干草,然后用薄膜封住即可。

培养管理: 上坑后开始可不揭膜,待品温回升至 20°C 左右,则揭膜换气或日揭夜盖,控制品温在 35°C 以下,同时又要注

意遮荫减少蒸发失水。表面如有污染,及时除去或用石炭酸等控制。培养10—15天便可出料浸提浓缩或阴干保存,并做好土坑清洁,以便下次使用。

4. 其它季节土坑发酵需要采取的措施: 夏季高温高湿,空气杂菌多,易污染,应注意生产场地的排水,遮荫;配方中不用或少用易污染霉菌的原料(如玉米粉等);接种宜在清晨进行,并严格无菌操作;铺料要薄并加强检查管理,及时控制杂菌蔓延。

秋季可根据气温情况,参照春夏季措施进行。

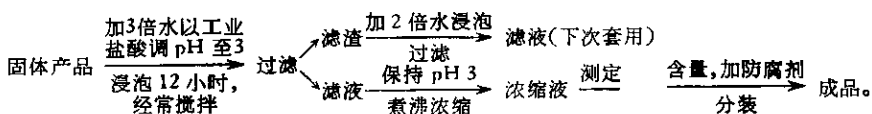
冬季气温低,菌体生长慢,提高品温,促进发酵速度是重要环节。要注意提高坑温(用草烧坑或坑底铺草);培养基高温灭菌后,于 40°C 左右抢温接种和上坑;适当加大接种量;适当减少培养基配水量和增加谷壳的比例;增加铺料厚度和覆盖物。

为了适于常年生产,应选择地势较高,排水方便,空气通畅的地点作坑,并设置简易的敞篷,以避免日晒雨淋,便于操作管理。

产品处理

1. 固体产品经充分干燥后,用塑料袋包装保藏,只要保持阴凉干燥,对效价影响不大。

2. 将固体产品加以浸提,制成浓缩液,更便于保藏和使用。浸提浓缩的程序是:



固体产品出料后不经干燥即行浸提,可提高收得率。浸提浓缩过程中,必须保持酸性(pH3左右)。滤渣可反复浸提2—3

次套用。滤液置耐酸器皿中,直接加热煮沸或用薄膜浓缩法,浓缩至原体积的1/10左右,测定含量,加0.3%苯甲酸钠作防腐

剂,分装即为成品。

3. 若使用固体产品,则按其效价和使用浓度计算好稀释倍数和用药量,如上法浸提,将全部浸提液合并,用水稀释至预定浓度,使用时加入 0.1% 洗衣粉等做粘着剂。

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。

PRODUCTION OF QINGFENGMYCIN BY "FERMENTATION WITH EARTHEN PITS"

SECTION OF AGRICULTURAL ANTIBIOTICS, SICHUAN INSTITUTE OF BIOLOGY,
CHUNGQING COUNTY'S BACTERIAL FERTILIZERS PLANT, SICHUAN

This method utilizes seed-bottles with solid medium to prepare inoculum instead of secondary shaken-flasks with liquid medium and fermentation with earthen pits outdoors instead of fermentation with bottles and tanks or fermentation with koji pans in warm-house. This method enables us to increase production on

large scale and economize expenses on equipment fuel, labour, and investment. The potency of the product is 7000 u/g. This method can also be used in the production of other agricultural antibiotics such as Kasugamycin, griseofulvin, and others.