

新农抗万隆霉素发酵工艺的研究^{*}

江学斌, 谢双大, 林璧润

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 研究了新农抗万隆霉素的发酵工艺, 通过单因子试验和多因子正交试验筛选出其发酵培养基是 (w/%): 葡萄糖 3, 玉米淀粉 1, 玉米浆 1.5, 豆饼粉 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, NaCl 0.5, CaCO_3 0.5, MgSO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, pH 7.2。通过 30 L 发酵罐的试验, 确定了其发酵条件: 温度 32 °C, 接种量 10%, 种龄为 28 h, 通气 0~24 h, 1:0.8 V/V_m , 24~48 h, 1:1 V/V_m , 48~84 h, 1:0.6 V/V_m 。并在 500 L 发酵罐中成功地进行了放大试验。

关键词: 万隆霉素; 灰色变异链霉菌 2507; 发酵工艺

中图分类号: S482.3⁺9; TQ920.6 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2004) S1-0097-03

植物卵菌病害是指由卵菌纲藻状真菌感染引起的蔬菜、果树等主要经济作物上的病害。该病害病情发展迅速, 危害很大, 常常造成菜场、果场的大面积毁灭、失收。目前, 用于防治改病害的主要药剂是瑞毒霉、杀毒矾等进口化学农药, 价格昂贵, 防治成本高, 且使用多年, 部分地区已产生抗药性。

万隆霉素是由广东省农科院植保所自行筛选研制的一种新型生物杀菌剂, 它是一个含双硫键的环多肽类化合物, 经试验表明, 该化合物能有效防治植物卵菌病害的发生。本文主要对万隆霉素的发酵工艺进行了研究, 现报导如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

灰色变异链霉菌 *Streptomyces griseovariabilis* 2507, 从印尼万隆采集土样中分离筛选获得, 现由本所保存。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 精氨酸甘油培养基。

1.2.2 碳源筛选培养基 成分 (w/%): 碳源 2.5, 蛋白胨 0.5, 豆饼粉 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, NaCl 0.5, CaCO_3 0.5, MgSO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, pH 7.2。

1.2.3 氮源筛选培养基 成分 (w/%): 氮源 1.5, 葡萄糖 2.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, NaCl 0.5, CaCO_3 0.5, MgSO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, pH 7.2。

1.2.4 种子培养基 成分 (w/%): 葡萄糖 2, 玉米淀粉 0.5, 豆饼粉浸液 1.5, 蛋白胨 0.5,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, NaCl 0.5, CaCO_3 0.5, MgSO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, pH 7.2。

1.2.5 发酵培养基 成分 (w/%): 葡萄糖 3, 玉米淀粉 1, 玉米浆 1.5, 豆饼粉 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, NaCl 0.5, CaCO_3 0.5, MgSO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, 泡敌 0.035, pH 7.2。

1.3 方法

1.3.1 培养基筛选 通过摇瓶培养试验来筛选适宜灰色变异链霉菌 2507 生长和产素的培养基。首先进行单因子试验, 筛选合适的碳、氮源, 再通过正交试验获得最佳配方。摇瓶培养条件是: 500 mL 三角瓶装液 100 mL, 接斜面孢子 2 环, 温度 32 °C, 转速 150 r/min, 培养时间 120 h。

1.3.2 发酵条件试验 在 30 L B. Braun 全自动发酵罐中进行, 主要研究的参数有: 温度、接种量、种龄、通气量。

1.3.3 发酵小试 通过以上试验, 在 500 L 发酵罐中进行小试放大, 其工艺流程为: 斜面孢子→摇瓶种子培养→50 L 罐种子扩大培养→500 L 罐发酵, 培养条件: 温度 32 °C, 转速 300 r/min, 通气 1: 0.6 V/V_m , 罐压 0.5 mPa, 培养时间 80~84 h。

1.3.4 菌丝量测定 体积法, 取 100 mL 发酵液, 4 000 r/min 离心 10 min, 测定菌丝体体积。

1.3.5 还原糖测定 菲林定糖法。

1.3.6 氨基氮测定 甲醛滴定法。

1.3.7 效价测定 取一定量发酵液, 经过滤获得菌丝, 用蒸馏水洗涤至流出液无发酵液颜色, 再用

* 收稿日期: 2004-03-22

基金项目: 国家 863 计划项目资助项目 (2001AA246015)

作者简介: 江学斌 (1969 年生), 男, 助理研究员; E-mail: jiangxb@vip.sina.com

2 倍体积的 $w=80\%$ 丙酮浸泡 2~4 h, 过滤弃去残渣, 获得的滤液挥去丙酮后用管碟法测定其抑菌直径。指示菌株: 枯草芽孢杆菌。

2 结果与讨论

2.1 培养基筛选

2.1.1 碳源选择试验 选用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、糊精和玉米淀粉 5 种碳源作单因子试验。其抑菌直径分别为 24.5, 8.2, 12.9, 18.8, 21.8 mm, 可见, 产素由大到小的碳源依次为: 葡萄糖、玉米淀粉、糊精、麦芽糖和蔗糖。

2.1.2 氮源选择试验 选用蛋白胨、酵母膏、玉米浆和豆饼粉 4 种氮源作单因子试验, 其抑菌直径分别为 22.4, 20.5, 26.2, 23.6 mm, 可见, 产素由大到小的氮源依次为: 玉米浆、豆饼粉、蛋白胨和酵母膏。

2.1.3 发酵培养基优化试验 根据碳、氮源单因子试验结果, 碳源选用葡萄糖、玉米淀粉, 氮源选用豆饼粉、玉米浆进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果见表 1。

表 1 发酵培养基 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Tab 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment result of fermentation medium

试验号	因素及水平 ($\rho/\%$)				抑菌直径/mm
	A 葡萄糖	B 玉米淀粉	C 豆饼粉	D 玉米浆	
1	2	1	1	1	21.8
2	2	2	1.5	1.5	20.7
3	2	3	2	2	20.4
4	3	1	1.5	2	29.1
5	3	2	2	1	26.4
6	3	3	1	1.5	29.5
7	4	1	2	1.5	30.4
8	4	2	1	2	27.3
9	4	3	1.5	1	25.6
K_1	62.9	81.3	78.6	73.8	
K_2	85.0	74.4	75.4	80.6	
K_3	83.3	75.5	76.8	76.8	
k_1	20.97	27.10	26.20	24.60	
k_2	28.33	24.80	25.11	26.87	
k_3	27.77	25.17	25.60	25.60	
R	7.36	2.30	1.09	2.27	

通过对表中数据进行分析, 得出葡萄糖是影响产素的主要因素, 玉米淀粉、玉米浆次之, 豆饼粉对产素影响甚微。正交试验结果表明: 最佳发酵培养基配比为 $A_2B_1C_1D_2$ 。

2.2 发酵条件试验

2.2.1 温度对产素的影响 如图 1 所示, 灰色变

异链霉菌 2507 在低温下产素较低, 适宜的产素温度是 32℃。

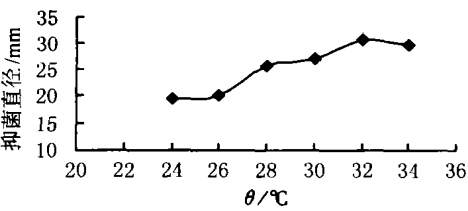


图 1 不同温度对产素的影响

Fig 1 Effect of different temperature on antibiotic produce

2.2.2 接种量对产素的影响 较低的接种量使菌种的迟滞期延长, 也相应的延长了发酵的时间, 并且低接种量易在罐内形成菌球, 造成菌球内部的菌丝缺氧, 从而影响了菌丝体的生长和产素; 高接种量缩短了发酵时间, 但也加快了菌种的老化, 并且带入过多代谢废物也影响了菌丝体的生长, 从而影响了次生代谢产物的分泌。根据图 2 的结果, 接种量宜选择 10%。

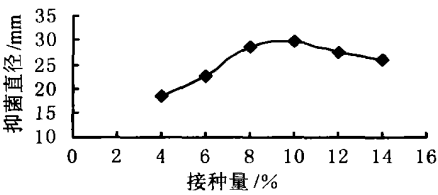


图 2 不同接种量对产素的影响

Fig 2 Effect of different inoculum size on antibiotic produce

2.2.3 种龄对产素的影响 采用不同培养时间的菌丝接种发酵结果 (图 3), 其最佳种龄为 28 h。

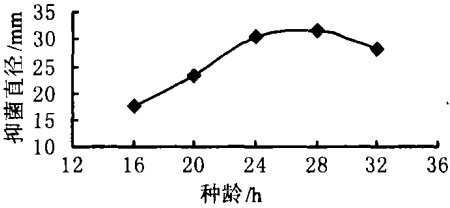


图 3 不同种龄对产素的影响

Fig 3 Effect of different inoculum ages on antibiotic produce

2.2.4 通气量对产素的影响 首先我们观察了灰色变异链霉菌 2507 单罐培养时溶氧的变化, 如图 4 所示。从图 4 的溶氧曲线我们可以看出: 在发酵前期, 由于灰色变异链霉菌 2507 大量繁殖, 需氧量大幅增加, 需氧大于供氧, 溶氧明显下降, 在 24 h 出现低峰, 该低峰期一直持续到 48 h, 这个阶段为菌丝的生长阶段; 过了生长阶段, 需氧量略有减少, 溶氧随之上升, 次生代谢产物开始形成, 直到

88 h 菌丝老化, 该阶段为产素阶段。

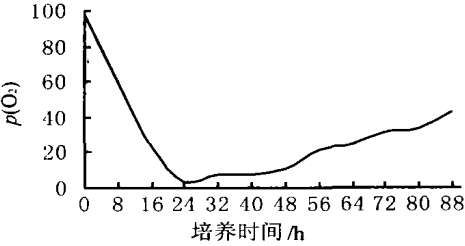


图4 溶氧变化曲线
Fig 4 Dissolved oxygen change curve

根据灰色变异链霉菌 2507 溶氧曲线的变化, 采用了以下几种通气量进行试验比较, 结果如图 5。在发酵过程中, 灰色变异链霉菌 2507 的产素随着通气增大而提高, 当大于 0.8 后, 增加并不显著, 并且随着通气量的增加, 泡沫也增大, 甚至造成从排气管跑液; 而根据菌体生长的各个阶段需氧要求的不同, 采用变化的通气量效果较好, 即可节约能耗, 又有利于泡沫的控制。

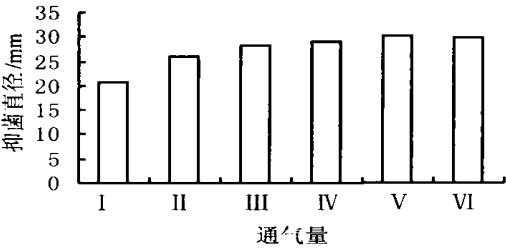


图5 通气量对产素的影响
Fig 5 Effect of ventilation capacity on antibiotic produce
 V/V_m : I 1:0.4; II 1:0.6;
III 1:0.8; IV 1:1; V 1:1.2;
VI 0~24 h, 1:0.8; 24~48 h, 1:1; 48~84 h, 1:0.6

2.3 500 L 发酵罐小试

通过以上对灰色变异链霉菌 2507 发酵的研究, 在 500 L 发酵罐上进行了放大试验, 其生长代谢曲

线如图 6。0~16 h 为调整期, 16~48 h 为生长期, 48~88 h 为平衡期, 之后, 菌丝开始自溶, 进入自溶期。在发酵中前期, 还原糖、氨基氮消耗较快, pH 也一直下降, 至 48 h 后, 菌丝生长开始停滞, pH 也开始缓慢上升, 此时菌丝进入抗生素分泌阶段, 在 80 h 达到高峰。

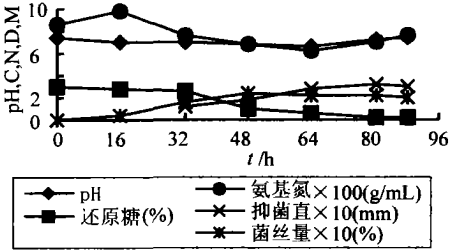


图6 灰色变异链霉菌 2507 生长代谢曲线
Fig 6 Growth metabolism curve of *S. griseovariabilis* 2507

3 结 论

本文研究了新农抗万隆霉素的发酵工艺, 确定了灰色变异链霉菌 2507 的发酵培养基及其工艺参数, 为今后的研究工作打下了良好的基础。新农抗万隆霉素是我国具有自主知识产权的新一代生物杀菌剂, 因对植物卵菌病害有着很好的防治效果使其具有良好的发展前景。但该生产菌尚为原始菌株, 产素水平低, 还不能商业化应用, 今后尚需进一步进行菌种的改良和发酵条件的研究。

参考文献:

[1] 韩斯琴, 徐梅, 白震, 等. 抗番茄灰霉病菌农用抗生素 D2 4 发酵条件研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34 (4): 259—262.
[2] 龟田邦明, 八木泽守正. 抗生素——生产的科学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999.
[3] 席海生, 李东海. 86A-2 真菌杀螨剂发酵工艺研究[J]. 微生物学杂志, 1994, 14(4): 44—46.

Studies on Fermentation Process of New Agricultural Antibiotic Bandungmycin

JIANGXue bin, XIE Shuang da, LIN Bi run

(Plant Protection Research Institute,Guangdong Academy of Agriculture Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Fermentation process of new agricultural antibiotic bandungmycin were studied. By single factor and multi-factor orthogonal experiment, fermentation medium were obtained (w %): glucose 3, maize starch 1, corn slurry 1.5, soybean powder 1, (NH₄)₂SO₄ 0.2, NaCl 0.5, CaCO₃ 0.5, MgSO₄ 0.1, KH₂PO₄ 0.1, pH 7.2; In 30 L fermentator, fermentation condition were obtained: temperature 32 °C, inoculum size 10 %, inoculum ages 28 h, ventilating control 0~24 h; 1:0.8 V/V_m 24~48 h; 1:1 V/V_m 48~84 h; 1:0.6 V/V_m. And the magnification experiment of fermentation process were successfully done in 500 L fermentator.

Key words: bandungmycin; *Streptomyces griseovariabilis* 2507; fermentatin process.