

抗生素对微生物发酵生产 L- 苹果酸过程中 污染杂菌的抑制效果测定

李 盾¹ 邓穗儿²

(1 华南农业大学资源环境学院,广州 ,510642;

2广东省微生物研究所)

摘要 试验模拟 L- 苹果酸发酵上罐的温度、pH值以及通气等条件,利用振荡培养法测定庆大霉素、链霉素、硫酸核糖霉素、硫酸小诺霉素等 4种抗生素对污染杂菌的最低抑制浓度(MIC),并进行两次加菌试验,结合平板检菌加以验证.结果表明庆大霉素的抑菌作用最强,其次是硫酸小诺霉素.庆大霉素的 MIC为 0.4 mg/L,经两次加菌后,有效浓度为 0.8 mg/L.通过在 240和 1700 L发酵罐上的实际应用,有效地防止了杂菌污染,证明此法是准确可行的.

关键词 发酵;抗生素;抑菌;污染微生物

中图分类号 S 436

工业发酵过程常遇到的麻烦是污染杂菌,发酵染菌将导致产品的产量和质量大为下降,严重时甚至发生“倒罐”,得不到产品.长期以来,如何防止发酵染菌是一个既复杂又困难的课题(鲍竞雄等,1983).在一定条件下,特别是在其它方法难于奏效的情况下,合理使用适量的微生物抑制剂,是有效防止发酵染菌的手段之一.因而,迅速准确地找出微生物抑制剂对杂菌的最低抑制浓度(MIC),以便指导发酵罐上使用最合适的剂量,即使用既对杂菌起抑制作用又对发酵产品安全的浓度,无疑是十分必要的.在 L- 苹果酸发酵过程中,常常会受到一些革兰氏阴性或阳性杆菌、芽孢菌的污染,针对污染菌的情况选择了庆大霉素、链霉素、硫酸核糖霉素和硫酸小诺霉素等 4种抗生素进行抑菌试验,应用振荡培养法,模拟 L- 苹果酸发酵上罐的温度、pH值以及通气等培养条件,测定若干种抗生素对污染杂菌的最低抑制浓度,并通过两次加菌试验,明确抗生素的抑菌时间,为指导上罐合理用药提供准确的和必要的依据.经大罐发酵生产防杂菌的实际应用证明,能有效地防止杂菌污染.同时,此方法亦可为其它类型产品的发酵试验,或为筛选其它微生物抑制剂和化学药剂防止染菌的试验提供良好的借鉴.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试抗生素 庆大霉素: 1 mg= 1 000 μ g(效价),福建省三明制药厂生产;链霉素: 1 mg= 1 000 μ g(效价),华北制药股份有限公司生产;硫酸核糖霉素: 1 mg= 699 μ g(效价);汕头俱滨制药厂生产;硫酸小诺霉素: 1 mg= 602 μ g(效价);无锡第一制药厂生产.

抗生素配制: 将每种抗生素先配成母液, 然后在测定时按系列稀释法用 pH 7. 8, 0. 1 mol 磷酸盐缓冲液配成所需的各种剂量。

1. 1. 2 试验菌 从淀粉糖化液发酵生产 L- 苹果酸的中试罐上的发酵液中取样分离, 得到污染菌为两种细菌, 经初步鉴定两者均属于革兰氏阴性杆菌, 其中一种是肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 另一种是芽孢杆菌 (尚未能确定到种) 将其制备成 10^{11} 个 / L 的混合菌液, 作最低抑制浓度试验和加菌试验用。

1. 1. 3 培养基 细菌液体培养基: 蛋白胨体积分数为 0. 5%, 牛肉浸膏体积分数为 0. 3%, 磷酸氢二钾体积分数为 0. 3%, pH 7. 8~ 8 (与发酵罐的 pH 值一致), 作为振荡培养的培养基。固体培养基: 在细菌液体培养基中加入体积分数为 2% 的琼脂, 作为平板检菌培养基

1. 1. 4 仪器设备 HZQ- C 型空气浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司生产)。

1. 2 方法

1. 2. 1 振荡培养法 (马振瀛, 1981) (1) 在各试管中注入 9 mL 液体细菌培养基, 塞上棉塞, 高压消毒后备用 (2) 在无菌条件下, 吸取 1 mL 各种浓度抗菌素于各试管培养基中。设空白对照。(3) 吸取 0. 2 mL 菌液于各试管培养基中。(4) 在 37°C 下, 置摇床振荡培养。(5) 24 h 后观察菌的生长情况。肉眼检查各试管培养液混浊度。培养液透明, 说明该浓度对菌有抑制作用; 培养液混浊, 该浓度对菌无抑制作用

1. 2. 2 加菌试验法 于振荡培养试管中定期添加 0. 2 mL 混合菌液 (10^{11} 个 / L), 连续数天观察试管混浊度, 明确抗生素在增加菌量的情况下的抑菌效果和抑菌时间

1. 2. 3 平板培养检菌 从振荡培养的试管中吸取 0. 5 mL 菌液于培养皿中, 再注入 20 mL 细菌固体培养基, 混匀, 于 37°C 培养, 24 h 后检查菌落数。

1. 2. 4 发酵罐生产验证 在严重染菌的 24 和 Φ 700 L L- 苹果酸发酵罐上, 使用振荡培养法筛选出抑菌效果最好的抗生素, 并在其有效抑制浓度的基础上适当增大使用倍数, 验证在该浓度下对大罐发酵染菌的防止效果

2 试验结果

2. 1 抗生素对试验菌的最低抑制浓度 (MIC)

2. 1. 1 最低抑制浓度 用振荡培养法测定了庆大霉素、链霉素、硫酸核糖霉素、硫酸小诺霉素对肺炎克雷伯氏菌、芽孢杆菌混合液的最低抑制浓度, 结果见表 1

2. 1. 2 平板菌落检查 为了验证肉眼观察振荡培养试管混浊度的准确性, 对判断模糊的个别浓度试管进行平板检查菌落。结果见表 2

上述振荡培养法和平板检测结果表明: 在试验浓度下, 庆大霉素、链霉素、硫酸小诺霉素对试验菌有不同程度的抑制作用。其中庆大霉素的抑菌效果最好, 其 MIC 为 0. 4 mg / L, 其次是硫酸小诺霉素和链霉素, 硫酸核糖霉素对试验菌无抑制作用

2. 2 加菌试验

2. 2. 1 振荡培养加菌抑制效果 发酵罐上每天都有可能污染产生更多的杂菌, 为了模拟这一情况, 在 MIC 试验的基础上, 选用抑菌效果较好的庆大霉素和硫酸小诺霉素做增加菌量试验。在振荡培养 48 和 96 h, 于各试管中加入 10^{11} 个 / L 的混合菌 0. 2 mL, 继续振荡培养并进行检测 (见表 3)

表1 抗生素对试验菌的最低抑制浓度 (MIC)¹⁾

抗生素名称	抗生素浓度 /mg L ⁻¹					
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
庆大霉素	+	-	-	-	-	-
硫酸小诺霉素	+	+	+	+	-	-
链霉素	+	+	+	+	+	-
硫酸核糖霉素	+	+	+	+	+	+

1)表中“-”表示不长菌,说明抗生素在该浓度下对菌生长有抑制作用;“+”表示长菌,说明抗生素在该浓度下对菌生长无抑制作用

表2 平板检测抗生素对混合菌液的抑制效果

抗生素名称	浓度 /mg L ⁻¹	菌落数目
庆大霉素	0.2	3
	0.4	0
硫酸小诺霉素	0.8	1
	1.0	0

表3 两次加菌试验结果

抗菌素名称	浓度 /mg L ⁻¹	抑菌时间 /h					
		24	48 ⁰⁾	72	96 ¹⁾	120	148
庆大霉素	0.2	+	+	+	+	+	+
	0.4	-	-	+	+	+	+
	0.6	-	-	-	-	+	+
	0.8	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-
	1.2	-	-	-	-	-	-
硫酸小诺霉素	0.2	+	+	+	+	+	+
	0.4	+	+	+	+	+	+
	0.6	+	+	+	+	+	+
	0.8	+	+	+	+	+	+
	1.0	-	-	+	+	+	+
	1.2	-	-	-	-	+	+

1) 在振荡培养后48 96 h分别增加浓度为10¹¹个/L的混合菌0.2 mL

2.2.2 平板检菌结果 平板检查菌落结果与振荡培养法抑菌试验的结果一致

加菌试验结果表明:菌量的增加使抑制浓度增大。庆大霉素在第一次加菌后,有效抑制浓度由原来的0.4 mg/L增至0.6 mg/L,第二次加菌后,有效抑制浓度为0.8 mg/L;硫酸小诺霉素在两次加菌后其有效浓度由原来1.0 mg/L提高至1.2 mg/L以上。这就提示我们,在大罐发酵防杂菌时,应考虑到发酵期长短以及每天可能增加污染菌量的实际情况,在原来有效抑菌浓度的基础上,适当提高剂量,才能保证在实际发酵过程中避免杂菌的污染。

2.3 发酵罐生产验证

在利用微生物菌株 (N₁₋₁₄) 发酵生产 L- 苹果酸过程中, 在 240 L 发酵罐上出现了严重的染菌情况, 至使第一和第二批产品中途“倒罐”报废。经暂停生产进行全面的设备检修后, 染菌问题仍未得到解决。在这种情况下, 我们根据振荡培养法的试验结果, 确定选用抑菌效果最好的庆大霉素作为杂菌抑制剂, 充分地考虑到大罐生产上的复杂性, 根据通常的经验, 其用量在原有效抑菌浓度的基础上扩大 10 倍, 作为 240 L 和 1 700 L 发酵罐上使用的剂量。结果见表 4 和表 5

表 4 N₁₋₁₄ 菌株在 240 L 发酵罐上发酵产酸情况

发酵批次	发酵时间 /h	还原残糖 / (%)	L- 苹果酸含量 / (%)	庆大霉素剂量 /g
1	132	0.800	7.010	1.92
2	129	1.180	7.294	1.92
3	128	1.010	7.344	1.92
4	129	0.870	7.550	1.92
平均	130	0.965	7.300	1.92

表 5 N₁₋₁₄ 菌株在 1 700 L 发酵罐上发酵产酸情况

发酵批次	发酵时间 /h	还原残糖 / (%)	L- 苹果酸含量 / (%)	庆大霉素剂量 /g
1	128	0.850	7.500	13.6
2	132	0.532	7.806	13.6
平均	130	0.691	7.653	13.6

试验结果表明: 在此剂量下庆大霉素能有效地控制杂菌的污染, 发酵生产的各项指标均达到要求, 保证了 L- 苹果酸发酵生产的正常进行。

3 结论与讨论

利用振荡培养法来测定抗生素对发酵罐上污染杂菌的最低抑制浓度 (MIC), 比常规的抗生素效价测定方法——“管碟法”更为接近发酵罐上的实际情况。其原因是不停的振荡培养能使杂菌与抗生素充分接触, 并能很好地模拟发酵过程的温度、pH 值和通气等条件, 同时也很方便地进行加菌试验, 这些方面均比“管碟法”更为优越。

试验结果表明: 庆大霉素、硫酸小诺霉素和链霉素, 在试验条件下均能对肺炎克雷伯氏菌和某些芽孢杆菌的混合菌液起抑制作用, 其中庆大霉素的效果最好。其 MIC 为 0.4 mg/L, 在两次加菌后, 其有效抑制浓度为 0.8 mg/L。因此, 在发酵生产上防杂菌时, 要充分考虑到发酵期长短和每天可能增加污染菌量的因素, 在原 MIC 的基础上, 应适当提高浓度, 才能保证避免杂菌污染。

在庆大霉素对污染菌有效抑菌浓度的基础上, 充分考虑到发酵生产的复杂性, 将其浓度扩大 10 倍后实际应用到 240 和 1 700 L 发酵罐上, 有效地防止了杂菌的污染。实践证明, 此方法是准确可行的。同时可以推论: 此方法不仅可应用于抗生素对微生物发酵生产 L- 苹果酸过程中防止杂菌, 对于筛选其它微生物抑制剂防止酶制剂、抗生素类、或其它类型产品的发

酵染菌的试验,同样也是适用的。

参 考 文 献

- 马振瀛. 1981.用振荡培养法测定防霉剂对微生物的最低抑制浓度.工业微生物,(3): 35~ 36
鲍竞雄,童 村. 1983.防止工业发酵染菌的现状与展望.工业微生物,(1): 11~ 19

EFFECTIVENESS OF AN TIBIOTICS ON POLLUTION MICROBES OF FERMENT PRODUCTION PROCESS OF L- MALIC ACID

Li Dun¹ Deng Sui'er²

(1 College of? Resources and Environment, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Guangdong Institute of Microbiology)

Abstract

A study on the effects of minimal inhibitory concentration of several antibiotics, including Gentamicin, Streptomycin, Ribostamycin Sulfate, and Sagamicin Sulfate, on pollution microbes of L- malic acid was conducted in this paper. The experiment of the simulation ferment process with the same temperature, pH value and ventilation conditions in vibration culture with twice pollution microbes was carried out added and the results were validated by agar plate culture. It was showed that Gentamicin had the strongest inhibitory effectiveness and Sagamicin Sulfate the second. The minimal inhibitory concentration of Gentamicin was 0.4 mg/L, and after twice pollution microbes added, the effective concentration was 0.8 mg/L. The result was used for the ferment processing practically with the fermentation tanks of 240 and 1700 L, and proved to be valid for L- malic acid fermentation.

Key words fermentation; antibiotics; inhibition; pollution microbe