

红霉素工程菌发酵过程中不同磷源的作用分析

袁彬青 蔡黎明 努尔买买提·库达巴尔地 (伊犁川宁生物技术有限公司, 新疆 伊犁 835000)

摘要: 探讨不同磷源对红霉素培养发酵阶段 pH、菌体浓度以及效价形成的影响, 以期确定培养基内不同组分的最优配比。统计结果后发现, 和初始工艺作比较, 将适量的磷酸氢二钾添加至红霉素发酵液内, 对红霉素产量增加过程起到一定促进作用, 使红霉素效价有 20.5% 的提升幅度, 抵达 7562U/mL; 利用正交法优化发酵液培养基内的组分, 红霉素效价提升至 7912U/mL, 和没有经优化处理、没有添加磷源相比分别提升了 4.7%、25.8%。

关键词: 红霉素; 发酵培养基; 磷酸二氢钾; 磷酸氢二钾

红霉素 (Er) 是临床上常见的一种广谱抗生素, 药效主要是抑制由革兰氏阳性菌引发的呼吸道感染疾病^[1]。鉴于红霉素在结构上存在着很多可进行化学修饰位点这一特征, 故而科学使用化学修饰法能较顺利地获得多种红霉素衍生物, 这些物质的生物活性多样性及明显的临床疗效驱动了红霉素原料药需求不断增长的过程, 在这样的背景下, 红霉素发酵阶段合理增加红霉素产量成为了业内研究的热点之一。

磷源是很多抗生素发酵培养基内一种重要营养物质, 其参与抗生素菌体生长繁殖及抗生素合成过程, 并发挥着重要作用。类型不同的磷源对抗生素的产量形成的影响有一定差异。考虑到在次级代谢产物中磷源发挥的作用, 本课题研究通过将磷酸二氢钾、磷酸氢二钾添加至培养基内, 科学调整磷源的配比, 达到适宜的浓度, 确保菌体生长阶段营养供应的有效性。

1 材料和方法

1.1 材料

选择红色糖多孢菌 SPH001 作为试验菌株; 培养基的类型及构成有: 斜面: 淀粉氯化钠、硫酸铵、碳酸钙、玉米浆、琼脂粉各 15、4、3、3、12、2.6g/L, pH 范围 6.94~7.06; 种子: 蔗糖、硫酸铵、玉米浆、碳酸钙依次为 35、4、20、5.5g/L, pH6.44~6.66; 发酵: 淀粉、黄豆饼粉、糊精、硫酸铵、葡萄糖碳酸钙、豆油分别是 25、30、35、0.25、20、5、8g/L, pH 自然不做调节。

试验中使用到的仪器有高效液相色谱仪、分光光度计、电子天平、pH 计等。

1.2 培养方法

1.2.1 斜面孢子培养

利用铲子刮下原始菌株孢子, 利用适量蒸馏水对其进行稀释处理后, 精确量取 0.2g/L, 并将其均匀的涂擦在茄瓶斜面表层, 安置的环境条件是: 温度 32~35℃, 相对湿度 30~50%, 持续培养 7d, 4℃留存待用。

1.2.2 种子培养

取以上过程留存下的茄瓶斜面, 取尺寸 1cm×1cm 斜面孢子, 将其整体接进 30mL 种子培养基内, 稳妥的安放在摇瓶机上持续培养 42h, 培养时的温度、相对湿度及摇瓶机运转速度依次为 30~32℃, 30~50%、215r/min^[2]。

1.2.3 发酵培养

用培养合格的 1mL 种子液 1mL, 将其整体接进发酵培

养基, 摇瓶机上培养 145h, 仪器转速 215r/min, 培养温度、相对湿度范围分别是 30~32℃, 30~50%。

1.3 分析方法

首先, 在红霉素发酵培养周期以后, 利用 pH 计检测发酵液的 pH 值。

其次, 称量 10mL 离心管自重, 而后取 10g 发酵培养液并将其装入离心管内, 4800r/min 转速下离心处理 12min, 弃用上清液, 测量沉淀物重量, 沉淀物自重和离心管重的差值即菌体浓度。

再者, 采用硫酸水解法检测化学效价, 具体操作是按发酵时间估计发酵单位, 确定稀释倍数, 按相应的倍数精确加入 9mL K₂CO₃ 溶液和试样液于 125mL 分液漏斗中, 再精确加入醋酸丁酯 10mL, 充分振荡, 静置, 分去下层水溶液, 加入无水 Na₂SO₄ 大约 1g, 振荡, 吸取 10mL 于试管中, 加入 10mL 0.1mol/L⁻¹ HCl 溶液, 充分振荡, 静置, 吸下层 HCl 水溶液 5mL, 于另一只试管中, 并准确加入 H₂SO₄ 溶液 5mL, 摇匀, 于 50±0.5℃水浴 30min, 取出冷却, 用蒸馏水作参比液, 在 483nm 处测定吸光度, 利用光度在计 483nm 位置检出液体的吸光度值, 参照标准曲线测算出溶液的化学效价^[3]。

最后, 利用色谱仪检测发酵液内各组分含量, 在该过程中需添加甲醇溶液进行 5 倍稀释处理, 设计进样量 40μL, 根据标准品测出各组分的峰面积至算出其效价。

2 统计和分析结果

2.1 不同磷源对种子液形成的影响

依次把浓度是 4、8、10、14g/L 的磷酸氢二钾与磷酸二氢钾添加至种子培养基内, 开展单因素试验进行验证。种子液持续培养 42h 后, 监测其 pH 值与菌体浓度, 统计结果后发现, 以上两种磷源浓度 4~g/L 范围中均不会对种子液 pH 值形成较大影响, 但其菌体浓度值却出现一定变化。磷酸氢二钾浓度是 4g/L 与 8g/L 时, 菌体浓度显著上升, 提示浓度适宜的磷酸氢二钾对红霉素菌体代谢过程能起到一定促进作用。

2.2 不同磷源对发酵液的影响

为了能更好的检测验证本文所采用的两种磷源对红霉素工程菌发酵过程形成的影响, 现决定把磷酸氢二钾与磷酸二氢钾依照 4、8、10、14g/L 的配比分别加入发酵培养基内, 而后对单因素试验进行考察分析。各种配方均进行 3 组平行试验, 依次检测到发酵液的 pH 值、菌体浓度和

效价,取平均值。统计结果后发现,将配比分别是 4g/L 与 8g/L 磷酸氢二钾加入红霉素发酵液以后,对菌体浓度的提升过程能起到明显的促进作用,摇瓶培养后验证得发酵液的效价也由最初的 6292U/mL 提升至 7562U/mL^[3]。而加入配比为 4g/L 磷酸二氢钾时,发酵液的菌体浓度与效价均没有出现显著改变,当添加这种磷源的配比是 8g/L 时,发酵液的菌体浓度和效价检出值与对照相比均偏低。若以上两种磷源的浓度,则菌体浓度表现出降低趋势,效价的也呈现出降低的变化特征。既往有很多研究证实^[4],加入适量无机磷对抗生素菌体代谢过程能起到一定促进作用,说明提升代谢速度,对菌体生长增殖过程能起到一定促进作用。但如磷源的浓度过高或者添加大量磷源时,将会造成发酵液内氮磷两者比重失调,扰乱菌体的正常代谢活动,在这样的情况下,菌体代谢过程延缓,发酵单位也呈逐渐跌落趋势。添加磷酸二氢钾后,红霉素发酵液显酸性,而发酵液 pH < 7 时不利于红霉素菌体的代谢及快速生长,这也是摇瓶发酵后红霉素产量持续走低的主因。

2.3 确定含磷源培养基的配比

表 1 正交试验结果统计

试验编号	A	B	C	D	效价 (U/mL)
1	1	1	1	1	6822
2	2	2	2	2	7041
3	1	3	3	3	6632
4	2	1	2	3	6725
K1	6832	7122	7034	7230	
K2	7010	6984	7224	7404	
R	726	315	188	469	

基于单因素试验对培养基内磷源的添加情况展开研究分析,确定将 4~8g/L 磷酸二氢钾添至培养基内,探究淀粉、黄豆饼粉、糊精和磷酸氢二钾各组分最佳配比的,获得一个更为适宜的培养基配比,利用 L4 开展正交试验,结果见表 1。分析表内的数据统计情况,可见以上四种组分对发

（上接第 222 页）L,水型为 MgCl₂ 型,青西区块采出水矿化度为 90412mg/L,水型为 NaHCO₃ 型;

②鸭儿峡区块采出水与青西区块采出水混合后易结垢;

③随着温度的升高,结垢量增加,当大于 40℃时结垢量增加幅度变小。当鸭儿峡区块和青西区块采出水比例为 6:4 时,结垢量最大;采出水比例为 3:7 时,结垢量较小;

④两种采出水不过滤直接混合比过滤后再混合的结垢量较大。

建议两种水混合后加入絮凝剂,除去固体悬浮物,然后添加阻垢剂,可有效缓解注水井结垢的问题。

参考文献:

[1] 付美龙,唐善法,黄俊英.油田化学应用[M].第一版.武汉:

醇水平形成的影响程度可以做出如下排序^[5]: A > D > B > C,认为最优的培养基配方构成:淀粉、黄豆饼粉、糊精和磷酸氢二钾依次是 30、30、30、8g/L。

3 结束语

综合本文的研究结果,可以认为添加浓度适宜的磷酸氢二钾对菌丝的生长过程有促进作用,但其浓度为 8g/L 时,不管是种子液,还是发酵液内菌体浓度均显著升高,但当磷源浓度持续增加至 10、14g/L 时,对菌体生长过程形成抑制,代谢减慢,菌体浓度下滑,效价降低。为了能使发酵液培养基内不同组分配比实现最佳,本文基于正交试验过程进行优化,结果发现当淀粉、黄豆饼粉、糊精和磷酸氢二钾依次是 30、30、30、8g/L 时,效价提升到 7912U/m,和未经优化处理相比较提升了 4.7%。

参考文献:

- [1] 李文,戴玲,王陶,等.不动杆菌 JL-1 菌株的解磷机理[J].微生物学通报,2020,v.47(05):62-72.
- [2] 何迪,耿丽平,郭佳,等.草酸青霉菌 HB1 溶磷能力及作用机制[J].农业工程学报,2020,v.36;No.378(02):263-273.
- [3] 孟健,陆丽霞,熊晓辉.不同 Ca²⁺源、Mg²⁺源对固态发酵产纳豆激酶的影响[J].生物加工过程,2019,017(006):651-656.
- [4] 杨仁琴,徐广新,周炜,等.不同生物保护菌种对低温发酵酸乳品质的影响[J].食品安全质量检测学报,2020,v.11(17):122-128.
- [5] 赵静丽,刘远远,马美湖.不同载体固定化蒙氏肠球菌发酵蛋壳制备乳酸钙[J].食品科学,2020,v.41;No.615(02):89-95.

作者简介:

袁彬青(1986-),女,民族:汉,籍贯:四川,学历:硕士,职称:中级工程师,研究方向:抗生素发酵及应用研究。
蔡黎明(1973-),男,民族:汉,籍贯:山东莱州,学历:本科,职称:工程师,研究方向:抗生素及中间体的提取与合成。

努尔买买提·库达巴尔地(1982-),男,民族:维吾尔族,籍贯:新疆伊宁,学历:硕士,职称:中级工程师,研究方向:抗生素药物合成及应用研究。

武汉大学出版社,2005:202-211.

[2] 于涛,丁伟,曲广森.油田化学剂[M].第二版.北京:石油工业出版社,2008:129-140.

[3] 陈大钧,陈毅.油气田应用化学[M].第一版.北京:石油工业出版社,2006:377-392.

[4] 陆柱等.油气水处理技术[M].第一版.北京:石油工业出版社,1992:106-112.

[5] 殷艳玲.结垢对储层渗透能力的影响[J].油田化学,2002:30(4):594-596.

作者简介:

李世文(1971-),男,汉族,甘肃武威人,玉门油田分公司工程技术研究院,中国石油大学(华东)石油工程本科专业毕业,现从事油田化学技术工作。