

培养条件影响 大肠杆菌产L-天冬酰胺酶的研究

范志华, 梁 鹏, 樊秀花, 张爱琳, 陈一江

(天津农学院食品科学系生物工程教研室, 天津 300384)

摘要:研究了培养温度、培养时间、初始 pH 和摇床转速等培养条件对所选大肠杆菌(*E. coli* No TN1.5885)产 L-天冬酰胺酶的影响。实验结果表明,该菌株进行摇瓶培养最为适宜的培养条件为:培养温度 37℃,培养时间为 16h,初始 pH 为 7.0~7.5,摇床转速约为 300r/min,其比酶活力达到约 406U/g,相比较优化前提高了约 20%。

关键词:培养条件, L-天冬酰胺酶, 大肠杆菌

Study on the effects of incubating conditions on *E. coli* accumulating L-asparaginase

FAN Zhi-hua, LIANG Peng, FAN Xiu-hua, ZHANG Ai-lin, CHEN Yi-jiang

(Laboratory of Biology Engineering, Faculty of Food Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: The effects of incubating conditions including incubating temperature, incubating time, initial pH and rotate speed of shake bed on *E. coli* (No TN1.5885) accumulating the anti-cancer drug were studied, as that was L-asparaginase. The results showed that the specific activity of L-asparaginase reached 406U/g under the optimum incubating conditions of incubating temperature 37℃, incubating time 16h, initial pH between 7.0~7.5 and rotate speed of shake bed 300r/min. The yield of L-asparaginase increased by 20% compared with that of before optimization.

Key words: incubating conditions; L-asparaginase; *E. coli*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)01-0167-03

临床实验证明, L-天冬酰胺酶能够治疗某些癌症, 尤其对急性白血病和恶性淋巴瘤母细胞肿瘤十分有效^[1]。与普通化疗抗癌药相比, L-天冬酰胺酶不但可以抑制癌细胞增殖, 同时又不伤害正常细胞, 有效地实现了酶的特异抗癌作用, 因而倍受关注^[2-4]。目前国内临床上注射所用的 L-天冬酰胺酶多数从国外进口, 因此如何进一步提高该菌株的产酶水平尤为重要。作者在获得优良菌种进行培养基优化后, 所产 L-天冬酰胺酶的比酶活力比基本培养基培养提高了 31%^[5]。本文从培养时间、初始 pH、培养温度和摇床转速等培养条件方面对这一问题加以探讨, 以提高其产酶水平。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌(*E. coli* No TN1.5885) 由本教研室生物工程中心实验室提供; 试剂 均为国产分析纯。

1.2 实验方法

收稿日期: 2008-05-09

作者简介: 范志华(1973-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事食品科学和生物工程方面的教学和科研工作。

基金项目: 天津农学院科学研究发展基金项目(100093)。

1.2.1 培养基 菌种采用基本培养基进行斜面移种和保藏, 发酵采用优化后的培养基进行培养^[5]。

1.2.2 培养方法 从菌种保藏斜面接种 2~3 环至液体培养基中进行活化, 而后进行扩大培养, 按接种量 10% 的比例平行接种发酵, 定时取样测定。

1.2.3 测定方法 L-天冬酰胺酶活性测定参照 Nessler 试剂法^[6], 37℃下, 每分钟催化 L-天冬酰胺水解生成 1 μmol 氨的酶量为一个酶活力单位, 再由生物量得出单位菌体的酶活, 即比酶活力(U/g); 产氨率(%) 为单位菌体的产氨量; 采用分光光度法和干重法相结合测定生物量。

2 结果与讨论

2.1 培养温度对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

将菌种接种到 6 个装有 100mL 培养液的 500mL 三角摇瓶中, 置于转速为 200r/min 的摇床上培养, 控制 30、33、37、40、43、45℃ 等不同培养温度发酵 15h, 分别取样测定其酶活力(用产氨量表示)、终 pH 和生物量, 而后计算出相应的比酶活力和产氨率, 结果如图 1、图 2 所示。

由图 1、图 2 可知, 30~37℃ 均适于菌体生长, 生物量呈增长趋势, 产氨量表示的酶活力逐渐增加, 37℃ 时比酶活力最高, 约为 368U/g, 生物量和产氨率

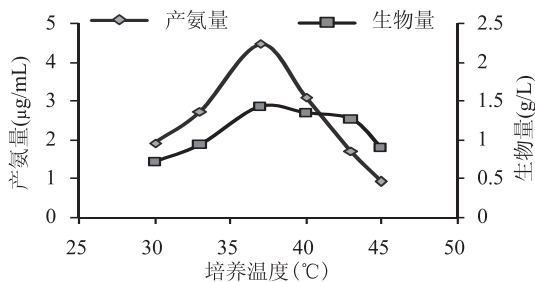


图1 培养温度对产氨量和生物量的影响

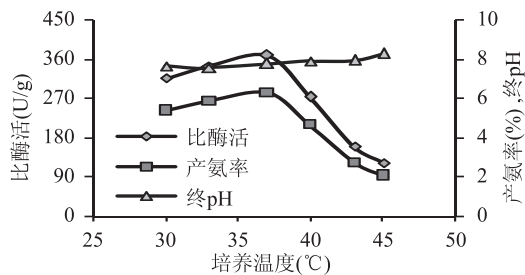


图2 培养温度对比酶活力、产氨率和终 pH 的影响

均达到最大值。当培养温度高于37℃时,菌体生长和产酶能力均受到严重影响,迅速降低。温度越高,则终 pH 越大,可能与菌体细胞自溶或某些代谢产物有关。因此,该菌株积累 L-天冬酰胺酶的最适宜培养温度为 37℃。

2.2 培养时间对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

将菌种平行接种到 8 个三角摇瓶中,置于转速为 200r/min 的摇床上培养,培养温度为 37℃,培养时间为 8~24h,每隔 2h 分别取样测定其相应的参数,结果如图 3、图 4 所示。

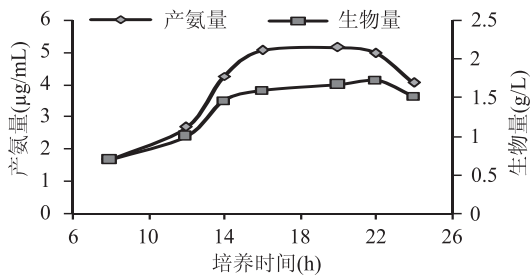


图3 培养时间对产氨量和生物量的影响

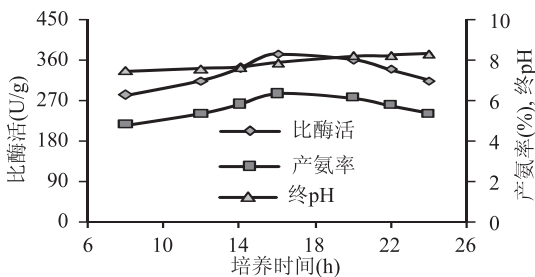


图4 培养时间对比酶活力、产氨率和终 pH 的影响

由图 3、图 4 可知,当培养时间从 8h 增加到 16h 时,大肠杆菌的生物量呈上升趋势,酶活力明显呈上升趋势;培养时间超过 16h 后,生物量基本保持不变;20h 后稍微有下降的趋势,说明在此期间菌体生长处于稳定期;22h 后菌体开始自溶,生物量减少。因而说明培养 16~20h,菌体处于最佳的生长时期。培养过程中其产氨率和比酶活力具有相同的变化趋势,终 pH 稳中有升。另一方面,培养 16h 时,比酶活

力达到最高点 374.32U/g,菌体进入了产酶旺盛期,说明此时细胞产酶能力最强,所以培养时间确定在 16h。

2.3 初始 pH 对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

培养基质的初始 pH 对所选大肠杆菌的生长及其产酶能力有很大的影响。选取培养液的初始 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 进行实验,接种 6 个三角摇瓶,置于转速为 200r/min 的摇床中培养,控制发酵温度 37℃,发酵 16h,分别测定相应的各项参数,结果如图 5、图 6 所示。

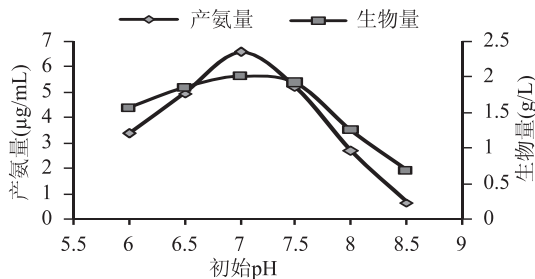


图5 初始 pH 对产氨量和生物量的影响

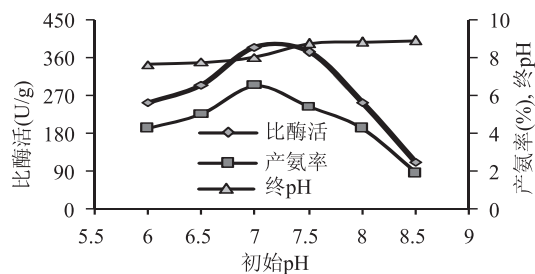


图6 初始 pH 对比酶活力、产氨率和终 pH 的影响

由图 5、图 6 可知,初始 pH 为 6.0 时,该菌株的产氨量、生物量、产氨率和比酶活力相对较低;pH 高于 7.5 时,产氨量、生物量也呈现迅速下降的趋势,也不利于 L-天冬酰胺酶的合成,比酶活力和产率也急剧下降;pH 在 7.0~7.5 时,酶活力较高,最高为 384.46U/g。终 pH 均有不同程度的上升,但与初始 pH 的差值逐渐减小,说明 pH 在 7.0~7.5 范围内该菌株发酵产酶的能力较强。

2.4 转速对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

研究摇床转速这一因素实质上是考虑溶氧量对大肠杆菌产酶的影响,培养液中溶氧水平与摇床转速呈正相关的关系。分别选取摇床的转速为 150、200、250、300、350r/min,接种 5 个三角摇瓶,调整初始 pH7.0~7.5 范围内,控制发酵温度 37℃,发酵 16h,分别取样测定相应的各项参数,结果如图 7、图 8 所示。

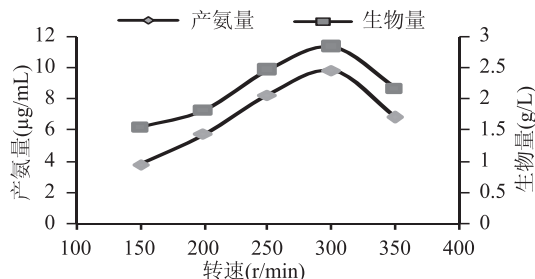


图7 转速对产氨量和生物量的影响

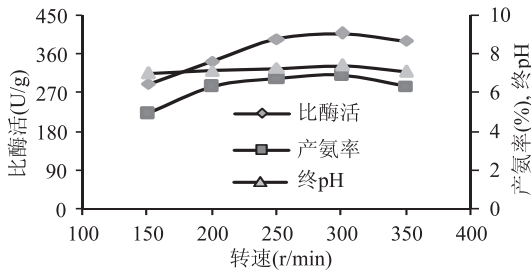


图8 转速对比酶活力、产氨率和终 pH 的影响

由图7、图8可知,摇床转速在150~300r/min之间,随着摇床转速的加快,培养液中的溶氧量增大,有利于该菌株生物量的增加,产氨量表示的酶活力也随之增加,且比酶活力也随转速增加而增加,转速为300r/min时达到最高值,约为406U/g,相比较转速200r/min时提高了约20%;摇床转速在300~350r/min之间时,生物量增大到最大时已发生自溶,开始减小,而比酶活力下降不明显。整个过程的终pH变化并不明显,这说明大肠杆菌积累L-天冬酰胺酶的发酵过程需要很大耗氧量。所以摇床转速相比较其他因素对所选大肠杆菌产L-天冬酰胺酶的影响最为重要。

3 结论

从培养温度、培养时间、初始pH和摇床转速四个方面探讨了所选大肠杆菌(*E. coli* No TN1.5885)产L-天冬酰胺酶的影响,分别取样测定其酶活力(用产氨量表示)、终pH和生物量,而后计算出相应

(上接第166页)

8d时,桑黄进入了缓慢生长阶段,这期间溶氧缓慢下降,pH迅速下降,还原糖维持在较低水平,菌丝体量达到14.58g/L。

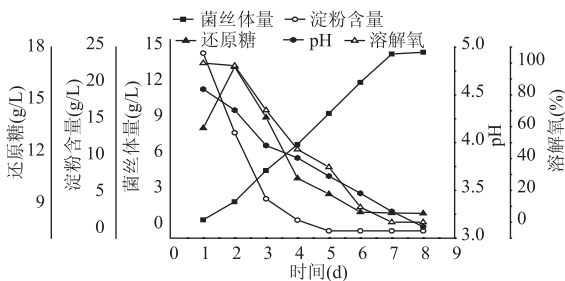


图6 桑黄菌丝体在20L罐上的发酵曲线

3 讨论

本文考察了不同营养因子对桑黄液体深层发酵的影响,结合工业化生产实践,筛选出了最佳的培养基和培养条件组合,最终确定桑黄深层培养的适宜培养基组成为:玉米粉20g/L,葡萄糖10g/L,豆饼粉10g/L,玉米浆5g/L, KH₂PO₄ 1.5g/L;培养条件为:25℃,160r/min,培养基起始pH5.0,接种量10%,装液量120mL/500mL,摇瓶培养10d,菌体生物量达到15.82±1.36g/L。最后在20L发酵罐上放大实验成功,在装量16L,发酵温度25℃,通气量0.8vvm,搅拌速度160r/min的条件下,培养8d后菌丝体量可达14.58±1.21g/L。

的比酶活力和产氨率。实验结果表明,该菌株进行摇瓶培养最为适宜的培养条件为:培养温度37℃,培养时间为16h,初始pH为7.0~7.5间,摇床转速约为300r/min,其比酶活力达到约406U/g,相比较优化前提高了约20%。

参考文献:

[1] Stubba M, Amarresh S, Ramkrishma S, et al. Purification characterization and antitumour activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas Stutzeri* MB-405 [J]. *Current Microbiology*, 1995, 30(5):291~296.
 [2] 王颖达,钱世钧,叶军,孟广震,张树政. L-天冬酰胺酶工程菌株培养条件及稳定性[J]. *微生物学报*, 1999, 39(6):546~550.
 [3] 刘红,蔡绍哲,潘红春. 溶氧对L-天冬酰胺酶发酵的影响及其控制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2003, 16(6):345~347.
 [4] 乐薇,孙小梅,李步海. 大肠杆菌的培养及L-天冬酰胺酶活力的测定[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2003, 21(3):14~17.
 [5] 范志华,张爱琳,何庆峰,张涛,陈一江. 培养基影响大肠杆菌产L-天冬酰胺酶的研究[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(6):552~554.
 [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005版二部)[M]. 化学工业出版社, 2005, 1.

参考文献:

[1] Sang-Bae Han, Chang Woo Lee, Young Jin Jeon, et al. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis [J]. *Immuno Pharmacology*, 1999, 41(2):157~164.
 [2] 温克,陈劲,李红,等. 桑黄等四种抗癌药物活性比较[J]. *吉林大学学报*, 2002, 28(3):247~249.
 [3] Hwan Mook Kim, Sang Bae Han, Goo Taeg Oh, et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*[J]. *International Journal of Immunopharmacology*, 1996, 18(5):295~303.
 [4] 张万国,胡晋红,蔡琴. 桑黄调节细胞因子及其在抗纤维化中的意义[J]. *中国新药杂志*, 2003, 2(6):19~20.
 [5] Yun Seon Song, Sun Hyoung Kim, Jae Hoon Sa, et al. Antiangiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 88(1):113~116.
 [6] Dong Hyun Kim, Byung Keun Yang, Sang Chul Jeong, et al. Production of a hypoglycemic extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus* [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(7):513~517.
 [7] 李国俊,吴国用,崔基成,等. 裂蹄目层孔菌菌丝培养及其应用研究[J]. *中国食用菌*, 1998, 17(5):11.