

培养基影响大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的研究

范志华, 张爱琳, 何庆峰, 张涛, 陈一江

(天津农学院生物工程教研室, 天津 300384)

摘要: 研究培养基的成分及添加量对大肠杆菌产生抗癌药物—L-天冬酰胺酶的影响。通过对大肠杆菌培养基中碳源、氮源以及微量元素的讨论, 得知该菌株以蔗糖为碳源, 添加量为 0.7%, 以 0.5%牛肉膏+1.0%蛋白胨为氮源, 添加 0.01%的硫酸亚铁为微量元素, 所产 L-天冬酰胺酶的比酶活达到 352.54 U/g, 相比基本培养基培养提高了 31%。

关键词: 培养基; L-天冬酰胺酶; 大肠杆菌

中图分类号: TQ925; 文献标识码: A; 文章篇号:1673-9078(2008)06-0552-03

Effect of Culture Medium on L-asparaginase Production by *E.coli*

FAN Zhi-hua, ZHANG Ai-lin, HE Qing-feng, ZHANG Tao, CHEN Yi-jiang

(Laboratory of Biology Engineering, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

Abstract: The effects of the components of culture medium on the production of L-asparaginase, an anti-cancer drug fermented by *E.coli*, were studied. Results showed that the highest specific activity of L-asparaginase (352.54 U/g) was achieved under such conditions: 0.7% of sucrose as carbon source, 0.5% of beef extract and 1.0% of peptone as nitrogen source and 0.01% of FeSO₄ as trace element. The yield of L-asparaginase was 31% higher than that by basic medium fermentation.

Key words: medium culture; L-asparaginase; *E.coli*

研究发现, L-天冬酰胺是某些癌细胞生长的营养源, 但癌细胞自身不能合成 L-天冬酰胺, 因此 L-天冬酰胺酶通过对 L-天冬酰胺的水解作用能有效抑制癌细胞的生长^[1-2]。临床试验证明, L-天冬酰胺酶尤其对急性白血病和恶性淋巴瘤母细胞肿瘤有效^[3,4]。近年来由于其应用范围的不断扩大, 采用大肠杆菌发酵生产 L-天冬酰胺酶受到很多学者的重视, 培养基的选择对于上述问题的研究仍具有重要意义, 因此本文从培养基成分和添加比例两方面对这一问题加以讨论。

1 材料与方 法

1.1 菌株

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。

1.2 培养基

菌种采用基本培养基进行斜面移种和保藏。发酵培养基按照不同影响因素配制。

1.3 培养条件

在 250 mL 三角瓶中进行摇瓶培养, 装液量 50 mL, 摇床转速 300 r/min, 培养温度 37 °C, 发酵时间

16~20 h。

1.4 测定方法

L-天冬酰胺酶活性测定参照 Nessler 试剂法^[5]。37 °C下, 1 min 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。

菌体浓度测定采用分光光度法测定。试剂均为国产分析纯。

2 结果与讨论

2.1 碳源对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

2.1.1 碳源种类对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

相同的培养条件下, 分别选取葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、柠檬酸三钠、乳糖作为碳源, 按 1.0%的比例添加到液体基本培养基中, 以基本培养基为对照, 经发酵产酶后测定其生物量、产氨量和比酶活。所得碳源种类对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响如图 1 所示。

从图 1 中可以看出以蔗糖为碳源时, 其比酶活最高, 约为 322 U/g, 产氨量约为 2.45 μg/mL, 生物量较为适中。与对照实验相比, 除了葡萄糖和柠檬酸三钠作为碳源时所得比酶活减弱外, 其他都有所提高。分析原因可能是柠檬酸三钠一般作为某种特定菌种的碳

收稿日期: 2008-03-04

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

源,生物量增加较多但比酶活不高,因而不是该菌株产酶最适宜的碳源;葡萄糖作为碳源抑制产酶可能与葡萄糖效应有关,葡萄糖的添加不仅改变了培养基的渗透压使水活度减小,最主要的是葡萄糖的代谢致使发酵后期大量有机酸的积累,降低了 pH 从而使产酶明显受到抑制。

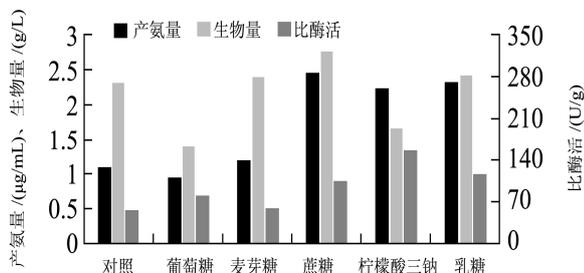


图1 碳源种类对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

Fig.1 Effect of carbon source on the yield of L-asparaginase

2.1.2 碳源添加量对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

从上述实验可知蔗糖为碳源时,其酶活力最大,但是蔗糖的添加量也会影响到该菌株的产酶能力。据此分别按 0.3%、0.5%、0.7%、1%以及 1.5%的比例添加蔗糖作为碳源,在其它相同的条件下进行实验,测定相应的比酶活和产氨率。结果如图 2 所示。

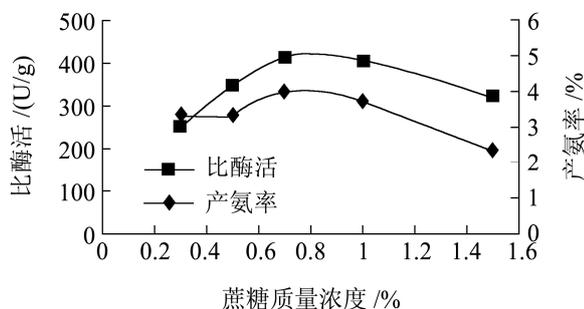


图2 蔗糖添加量对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

Fig.2 Effect of adding amount of sucrose on the yield of L-asparaginase

由图 2 可以看出,0.3%~0.7%范围内,随着蔗糖添加量增大,其比酶活也相应地增大,最大值达到 332.5 U/g。当添加量继续增大时,其比酶活减小。产氨率也具有相似的趋势。故选取蔗糖的添加量为 0.7% 作为碳源的添加比例。

2.2 氮源对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

2.2.1 氮源种类对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

以基本培养基中添加量 1.0%的蛋白胨为固定氮源,然后分别以添加量 0.3%的牛肉膏和酵母膏作为辅助氮源进行比较,以添加量 0.7%的蔗糖为碳源,其余的条件相同进行实验,测定其相应的参数。结果如表

1 所示。

表 1 辅助氮源种类对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

Table 1 Effect of adding amount of nitrogen source on the yield of L-asparaginase

氮源	比酶活 (U/g)	产氨量 (µg/mL)	生物量 (g/L)	产氨率 (%)
0.3%牛肉膏+1.0%蛋白胨	310.86	2.345	0.888	5.28
0.3%酵母膏+1.0%蛋白胨	284.15	1.885	0.751	4.83

由表 1 可看出选择 0.3%牛肉膏+1.0%蛋白胨作为该菌株的氮源时,其比酶活为 310.86 U/g,相对于 0.3%酵母膏+1.0%蛋白胨作为氮源比酶活提高了约 9.4%。分析原因可能是在同等条件之下,牛肉膏中所含有的某些特殊成分比酵母膏更适于菌体的生长,从而为菌体细胞积累 L-天冬酰胺酶提供更加丰富的氮源。

2.2.2 氮源添加量对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

辅助氮源添加量的大小也会影响到菌株的产酶能力。在其它相同的条件下蛋白胨的添加量不变仍为 1%,改变牛肉膏的添加量,分别为 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%以及 1%进行实验。结果如图 3 所示。

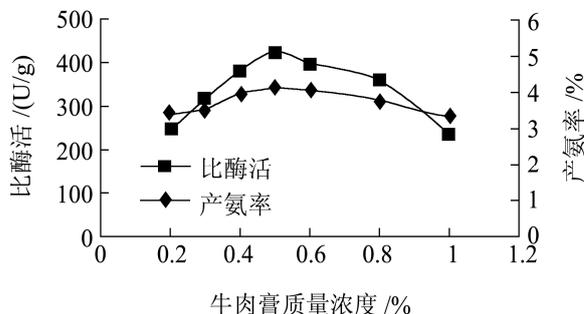


图3 牛肉膏添加量对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

Fig.3 Effect of adding amount of beef extract on the yield of L-asparaginase

由图 3 看出,当牛肉膏添加量为 0.5%时,该菌株所产 L-天冬酰胺酶的比酶活力最高达到 345.68 U/g,产氨率也达到最高 5.12%。因而培养该菌株时选择 0.5%牛肉膏+1.0%蛋白胨作为最适宜的氮源。

2.3 微量元素对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

2.3.1 微量元素种类对大肠杆菌产 L-天冬酰胺酶的影响

按添加量均为 0.05%分别选用硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌以及碳酸钙等微量元素添加到培养基中进行实验,以不添加微量元素作为对照。其它实验条件相同,结果如图 4 所示。

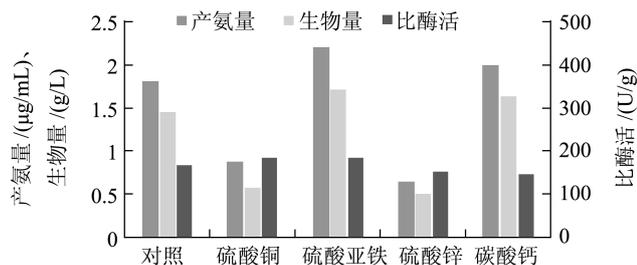


图4 微量元素对大肠杆菌产L-天冬酰胺酶的影响

Fig.4 Effect of trace elements on the yield of L-asparaginase

从图4中可以看出,添加0.05%的硫酸铜和硫酸锌对大肠杆菌产L-天冬酰胺酶都会有一定的抑制作用,碳酸钙的加入基本无影响,而硫酸亚铁的添加对大肠杆菌L-天冬酰胺的产生有促进作用,比酶活最高为341.92 U/g,相对于对照提高了17.6%。原因在于铁是微生物细胞内过氧化氢酶、过氧化物酶、细胞色素与细胞氧化酶的组成元素,缺铁会使机体内的某些代谢活性降低或丧失。大肠杆菌在铁含量不足的培养基里培养时,不能合成足够的甲酸脱氢酶,而使其生长和代谢受到影响。铜和锌两种微量元素抑制了酶活,原因可能是作为诱导酶的抑制剂,使得产酶受阻。

2.3.2 硫酸亚铁添加量对大肠杆菌产L-天冬酰胺酶的影响

按照上述实验结论,以硫酸亚铁作为微量元素,添加量分别为0.005%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%,以不添加硫酸亚铁作为对照,在摇床上进行发酵,取样测定相应参数,结果如图5所示。

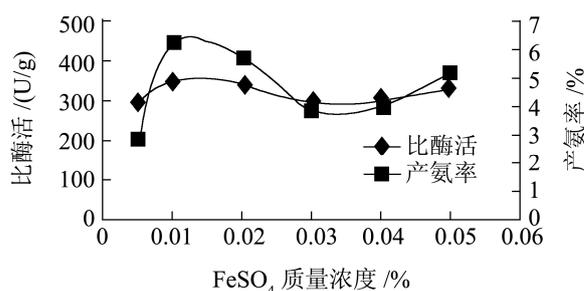


图5 硫酸亚铁添加量对大肠杆菌产L-天冬酰胺酶的影响

Fig.5 Effect of FeSO₄ content on the yield of L-asparaginase

结果显示当硫酸亚铁的添加量为0.01%~0.02%的时候该菌株所产酶的比酶活力较高,最高为352.54 U/g,产率也达到最高。因此选择硫酸亚铁0.01%为最适宜添加量。

参考文献

- [1] 刘红,潘红春.抗癌药物 L-天冬酰胺酶及其研究进展[J].四川轻化工学院学报,2000,13(2):31-36
- [2] 潘红春,刘红,吴华昌.抗癌药物 L-天冬酰胺酶摇瓶发酵研究[J].四川轻化工学院学报,1999,12(3):60-64
- [3] Weatherbum MW. Phenol-hypoChlorite reaction for determination of ammonia[J]. analytic Chem, 1967,39(8): 971-974
- [4] 刘红,魏东芝.氧载体对L-天冬酰胺酶发酵过程影响的研究[J].生物工程学报,1998,14(3):298-301
- [5] 中华人民共和国药典二部,2000

(上接第560页)

试验结果表明:添加变性淀粉比添加淀粉可明显改善样品口感,添加三聚磷酸钠未能提高样品感官评分,添加九棍鱼可显著改善样品口感弹性,以添加20%九棍鱼(占鱼肉)时,样品获得的综合感官评分较高,当添加量为30%,样品虽弹性好,但综合感官评分下降。

3 结论

3.1 制作罐藏鱼饼的几个关键工艺条件为:鱼肉在3~10℃的5倍清水漂洗1次;经漂洗脱水的鱼肉放入擂溃机内擂溃,空擂5 min、盐擂20 min、拌擂3 min;擂溃成型后的鱼糜于40℃放置3 h进行凝胶化;装罐后的罐头经12 min~20 min~12 min/118℃杀菌可使制品获得较好的综合感官评分。

3.2 罐头中鱼饼的配比(质量比, %): 鲮鱼肉 80、九棍鱼肉 20(经漂洗脱水后的鱼肉), 白砂糖 0.5,

盐 2, 香葱 1, 变性淀粉 5。

参考文献

- [1] 曾王旻,陈力巨.鱼饼加工工艺的研究与探索[J].中国水产, 2006,(6):65-67
- [2] 杨贤庆,李来,周婉君,等.提高鲮鱼鱼糜弹性的方法[J].湛江海洋大学学报,2003,(8):26
- [3] 中华人民共和国国家标准,肉类罐头卫生标准[S], GB13100-2005
- [4] 吴光红,车文毅,费至良,等.水产品加工工艺与配方[M], 北京:科学出版社,2001:218-220
- [5] 黄国宏,沈要林,鱼糜加工过程中凝胶性能的影响因素研究进展[J].现代食品科技,2007,(1)107-109
- [6] 杨邦英.罐头工业手册(新版)[M], 北京:轻工业出版社, 2002:556-557