

氧载体对 L-天冬酰胺酶发酵过程影响的研究

刘 红¹ 魏东芝²

(华东理工大学生物化学研究所, 生物反应器国家重点实验室² 上海 200237)

(四川轻化工学院轻工系¹ 自贡 643033)

摘 要 以抗癌药物 L-天冬酰胺酶生产为应用背景, 针对发酵过程中存在严重耗氧问题, 研究了氧载体对发酵过程的影响。通过对几种氧载体的筛选, 认为正十二烷最适合于该发酵过程。随后以产物 L-天冬酰胺酶活性、菌体浓度以及溶氧水平为主要指标, 考察了氧载体在发酵过程中的作用, 实验表明, 发酵基质中 5% 正十二烷的添加量为最佳浓度, 这种氧载体的加入, 明显地提高了发酵介质中的溶氧水平, 改善了供氧条件, 增加了菌体浓度, 提高了 L-天冬酰胺酶发酵水平, 在优化条件下, 可使发酵液最终酶活提高 21% 左右。

关键词 氧载体, L-天冬酰胺酶, 发酵过程

学科分类号 Q939.97

氧载体(Oxygen-vectors)是一种与水不互溶, 对微生物无毒, 具有较高溶氧能力的有机体。由于它与发酵液形成的体系具有氧传递速度快、能耗低、气泡生成少、剪切力小等特点, 而越来越受到人们的重视^[1~3]。但是, 有关氧载体在实际发酵体系尤其是胞内产物发酵体系中的应用研究较少。作者在研究抗癌药物 L-天冬酰胺酶发酵的过程中, 发现产酶菌株生长很快, 对溶氧要求较高, 采用增加搅拌转速、通风量等传统方法难以有效提高其供氧能力。为此, 研究了氧载体在大肠杆菌发酵生产 L-天冬酰胺酶过程中的应用。通过添加氧载体, 改善大肠杆菌 L-天冬酰胺酶发酵系统的供氧能力, 提高菌体的产酶能力, 并期望在有关氧载体应用于好氧发酵过程的研究方面做出新的尝试。

1 材料与方 法

1.1 材料

大肠杆菌(*E. coli* 1.1096), 由华东理工大学生物化学研究所基因工程室提供。斜面培养基为牛肉汁琼脂, 用于移种和保藏。摇瓶培养用 LB 培养基再添加一定的无机盐。氧载体有正十二烷(n-dodecane), Fluka 进口分装; 液体烷烃, 国产; 全氟化碳(Perfluoromethyldecalin), 日本和光纯药工业株式会社进口。几种氧载体的性质^[2]如表 1 所示。

1.2 方法

1.2.1 培养条件: 在 250ml 三角瓶中进行摇瓶培养, 装液量 30ml, 摇床转速 250r/min, 培养温度 37℃。

表 1 氧载体的性质

Table 1 The properties of oxygen-vectors

Types of oxygen-vectors	Surface tension $/\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot 10^{-3}$	Surface tension with water $/\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot 10^{-3}$	Capacity of dissolved oxygen $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Spreading coefficient $/\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot 10^{-3}$	Density $/\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$
n-dodecane	27.6	34.9	54.9	8.7	0.749
Perfluocarbon	24.5	32.2	118.0	14.5	1.950
Liquid paraffin	24.7	51.4	39.5	-4.9	0.743
Water	71.2		6.3		

1.2.2 L-天冬酰胺酶活性测定: 参照 Nessler 试剂法^[4]。37℃ 下, 每分钟催化 L-天冬酰胺水解生成 $1\mu\text{mol}$ 氨的酶量为一个酶活力单位。

1.2.3 溶氧浓度测定: 采用自行设计加工配有溶氧电极及记录仪的测定装置。

1.2.4 菌体浓度的测定: 采用 752 紫外光栅分光光度计在 570nm 处测定光密度 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$) 值。

2 结果与讨论

2.1 氧载体的筛选

氧载体可分为负值铺展系数和正值铺展系数两类。根据有关的研究结果^[5,6], 选择正十二烷、全氟化碳和液体烷烃为氧载体, 其性质如表 1 所示。分别以 3% 的添加量进行实验, 以考察对 L-天冬酰胺酶发酵过程的影响, 结果如表 2 所示。3 种氧载体的添加均能不同程度地提高发酵液中 L-天冬酰胺酶的活性, 其中以正十二烷效果最佳, 可提高酶活性 10% 左右, 菌体浓度也明显增加。以下均以正十二烷进行实验。

表 2 氧载体对产酶的影响

Table 2 Effects of different oxygen-vectors on L-asparaginase production

Types of oxygen-vectors	Control	n-dodecane	Perfluocarbon	Liquid paraffin
Terminal pH	8.19	8.25	8.22	8.20
Terminal $\text{OD}_{570\text{nm}}$	5.13	6.42	6.37	6.29
Relative enzyme activity/ %	100.00	110.70	108.30	105.10

2.2 正十二烷浓度的影响

在培养基中分别添加不同浓度的正十二烷进行实验, 结果如图 1 所示。随着正十二烷浓度增加, 发酵液中 L-天冬酰胺酶活性提高, 当添加量大于 5% 后, 酶活性增加幅度逐渐减小, 菌体浓度的逐渐降低和发酵最终 pH 的略微升高。最佳的正十二烷添加量为 5%。Linek 和 Bebes 研究发现^[7], 在发酵体系中, 具有正铺展系数的氧载体(如正十二烷等)含量的增加会使得氧传质系数 k_La 不断增大。因而从氧传递速率的角度来讲, 氧载体浓度的增加应该总是有利的, 但实验表明正十二烷添加量高于 5% 时, 菌体浓度反而有所下降, 同时产酶活力的降低也呈相同的趋势。所以, 高浓度正十二烷对于菌体生长的抑制作用仍是一个值得重视的问题。

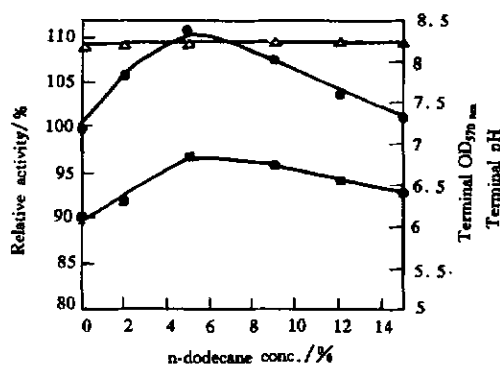


图 1 正十二烷浓度对产酶的影响

Fig. 1 Effects of n-dodecane concentration on L-asparaginase production

△ Terminal pH, ● Relative activity, ■ Terminal OD_{570nm}

The activity of the controlled enzyme as 100%.

2.3 不同装液量体系中氧载体的作用

通过不同装液量对发酵的影响实验,可间接描述微生物对溶氧的要求或体系的溶氧水平。在 250ml 三角瓶中改变装液量的发酵实验结果如图 2 所示。

装液量越多,添加氧载体提高 L-天冬酰胺酶活性的幅度越大,反之较小。从菌体浓度曲线比较可以看出,随着装液量的增加,添加氧载体提高菌体浓度的幅度与提高酶活性有相同的趋势。由此可说明氧载体添加的确改善了溶氧条件,加快了菌体生长,提高了 L-天冬酰胺酶活性。另外,从 L-天冬酰胺酶发酵水平提高结果来看,有理由推测氧载体的加入也有可能影响到菌体的代谢,对此尚需作进一步的实验验证。从实验结果还可以看出,在有无氧载体的两种发酵体系中,发酵液最终 pH 的变化趋势基本一致。

2.4 不同接种量体系中氧载体的作用

当接种量大于 0.3% 时,酶活性会急剧下降。这可能是由于接种量太大,菌体生长过快,溶氧供应不足而导致 L-天冬酰胺酶的合成受到影响。由此考虑到通过添加氧载体来改善溶氧状况,实验结果如图 3 所示。从图 3 可看出,氧载体的添加可大大改善摇瓶发酵中接种量过大带来的影响,能有效地提高产酶能力。在低接种量(0.3%)时,可使产酶水平提高 9.4%,而在高接种量(1.5%)时,提高幅度高达 107.8%。当接种量较大时(1.5%),菌体浓度较高,耗氧速率较快,氧载体能快速地供氧,有效地稳定溶氧水平,以满足菌体生长和产酶的需要。从图中还可以看出,随着接种量的增加,发酵液的最终 pH 会不断降低,说明接种量大时,发酵液中菌体耗氧量增加,导致供氧不足,从而造成发酵中间产物有机酸的大量积累,引起体系 pH 的降低。在有无添加氧载体的 2 种体系中,pH 的变化表现出较大的差异,氧载体明显地抑制了发酵体系 pH 的降低,这从另一个侧面证实

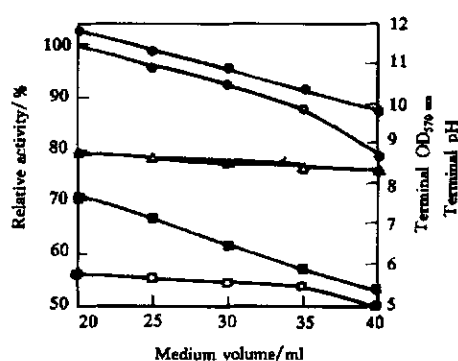


图 2 不同装液量体系中氧载体对产酶的影响

Fig. 2 Effects of medium volume on L-asparaginase production

(●) Relative activity as the n-dodecane test, (○) Relative activity as the control, (▲) Terminal pH as the n-dodecane test, (△) Terminal pH as the control, (□) Terminal O. D_{570nm} as the control. The activity of the controlled enzyme is regarded as 100% while medium volume is 20ml.

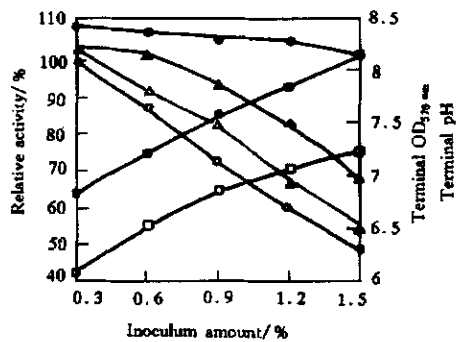


图 3 不同接种量体系中氧载体对产酶的影响
Fig. 3 Effects of inoculum amount on L-asparaginase production
The legends are as the same as Fig. 2

了氧载体对发酵过程的作用。

2.5 氧载体对发酵过程中溶氧的影响

为了更为直观地考察发酵过程中溶氧水平的变化情况,在线测定了研究体系的溶氧水平。实验结果如图 4 所示。从图 4 结果可看出,正十二烷的添加可明显改善和稳定整个发酵体系的溶氧水平。在 10h 以前,溶氧水平基本维持在 80% 以上;不添加氧载体的发酵体系中,溶氧水平从一开始便会急剧下降,最低达 45%。因此,有氧载体存在的整个发酵过程的溶氧水平明显高于对照体系。该实验更进一步证明,氧载体的添加确实提高了发酵体系的传氧效果。

2.6 氧载体对发酵过程相关参数的影响

比较了添加和不添加氧载体的发酵过程,结果如图 5 所示。无论是否添加氧载体,8h 均已达到菌体生长的对数后期,衰亡期到来时产酶才结束。摇瓶发酵的周期以 12h 为宜。添加氧载体的体系中,有关参数的变化趋势基本上与对照相同。添加氧载体可明显增大提高酶活性的幅度,可达 21% 左右。在整个发酵过程中,两个体系的 pH 均随时间呈上升趋势。

综上所述,在 L-天冬酰胺酶的发酵体系中添加 5% 的正十二烷,能有效地改善氧的供应,有利于产酶。这主要取决于氧载体改善氧传递的机理同传统提高溶氧的方法如增加搅拌转速和通风量等的不同^[6,7]。氧载体大都是石油加工产品,来源广泛,加之其与水的互溶性,可以重复利用,这为氧载体的工业化应用提供了可能性。但实际应用过程中,

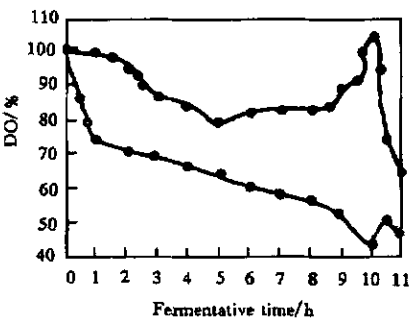


图 4 摇瓶发酵过程溶氧的变化
Fig. 4 Level of dissolved oxygen in the fermentation process
(●) Relative activity as the n-dodecane test,
(○) Relative activity as the control

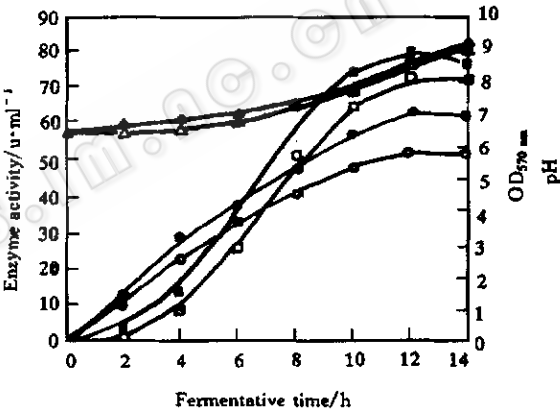


图 5 发酵过程变化曲线
Fig. 5 The curves of the fermentation process
The legends are as the same as Fig. 2

要注意氧载体的纯度和种类,某些氧载体或其中的杂质对体系的微生物有毒害作用。

参 考 文 献

- 1 Rols J L. *Biotech Bioeng*, 1990, 35(4):427-435
- 2 贾士儒. 食品与发酵工业, 1997, 23(1):7-10
- 3 贾士儒. 冈部满康. 微生物学通报, 1996, 23(6):336-338
- 4 Peterson R E, Ciegler A. *Appl Microbiol*, 1969, 17(6):929-930
- 5 贾士儒, 李小明, 包志泉. 天津轻工业学院学报, 1994, 1:7-12
- 6 贾士儒, 袁玉华, 包志泉. 天津轻工业学院学报, 1995, 1:1-7
- 7 Linek V, Benes P. *Biotech Bioeng*, 1976, 31:1037-1046

Effect of Oxygen-vectors on L-asparaginase Fermentation

Liu Hong¹ Wei Dongzhi²

(*Institute of Biochemistry, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,
East China University of Science and Technology, Shanghai² 200237*)

(*Department of Light Industry, Shichuang Institute of Light
and Chemical Industry¹, Zigong 643033*)

Abstract Effect of oxygen-vector on L-asparaginase fermentation was investigated in order to improve oxygen supply. N-dodecane was the most effective to the process among the tested oxygen-vectors. Activity of L-asparaginase, concentration of cells and level of dissolved oxygen were regarded as main indexes for estimating the effectiveness of the oxygen-vector to this fermentation process. It was demonstrated that level of dissolved oxygen and concentration of cells were increased markedly by addition of 5% n-dodecane as oxygen-vector in the fermentation medium. Under the optimal conditions, productivity of L-asparaginase was also improved more than that without oxygen-vector by 21%.

Key words Oxygen-vector, L-asparaginase, fermentation process