

# 大肠杆菌产 $\beta$ -内酰胺酶发酵条件研究

付欣, 鲁明, 吴兴壮, 张晓黎 (辽宁省农业科学院食品与加工研究所, 辽宁沈阳 110161)

**摘要** [目的]优化大肠杆菌(*Escherichia coli*)产  $\beta$ -内酰胺酶发酵条件。[方法]选用大肠杆菌为供试菌株获得  $\beta$ -内酰胺酶, 通过对该菌种发酵条件进行优化, 提高  $\beta$ -内酰胺酶活力。[结果]确定大肠杆菌产  $\beta$ -内酰胺酶的最佳发酵条件为: 温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 、初始 pH 7.8、接种量 2.0%、装液量 65 ml/250ml 发酵瓶。使用最佳发酵条件对大肠杆菌进行培养, 最终得到的  $\beta$ -内酰胺酶活力为 178.54 U/ml, 比优化前提高了 33%。[结论]研究可为分离纯化  $\beta$ -内酰胺酶及其降解产物提供一定的参考依据。

**关键词**  $\beta$ -内酰胺酶; 大肠杆菌; 发酵; 优化

中图分类号 S188+.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)17-05642-03

## Study on $\beta$ -lactamase Fermentation Technology of *Escherichia coli*

FU Xin et al (Food and Processing Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** [Objective] To optimize fermentation conditions of  $\beta$ -lactamase produced by *Escherichia coli*. [Method] *E. coli* was selected as tested bacteria to obtain  $\beta$ -lactamase, through optimization of the fermentation conditions, the activity of  $\beta$ -lactamase was improved. [Result] The optimum fermentation conditions were: 37  $^{\circ}\text{C}$  fermentation temperature, pH 7.8, 2.0% inoculum volume, 170 r/min rotation speed, 65 ml/250 ml medium volume. The final yield of  $\beta$ -lactamase activity is 178.54 U/ml, which is increased to 33% in comparison with that of the initial training. [Conclusion] The study can provide a certain reference basis for isolation and purification of  $\beta$ -lactamase and its degradable products.

**Key words**  $\beta$ -lactamase; *Escherichia coli*; Fermentation; Optimization

$\beta$ -内酰胺酶最早是 1940 年在大肠埃希氏菌中被确定<sup>[1]</sup>, 在《中国药典》中定义为: 能裂解青霉素和头孢菌素类抗生素的  $\beta$ -内酰胺环, 使它们灭活的水解酶称为  $\beta$ -内酰胺酶<sup>[2]</sup>。19 世纪 40 年代,  $\beta$ -内酰胺类抗生素——青霉素首次被发现并广泛使用以来, 刺激了细菌产生  $\beta$ -内酰胺酶的能力, 现已报道的  $\beta$ -内酰胺酶已达到 300 多种。因为  $\beta$ -内酰胺酶种类多、性质复杂, 而且在来源、结构、底物、抑制剂等方面存在许多不同, 因而使得  $\beta$ -内酰胺酶的系统分类较为复杂。

抗生素在用于治疗 and 减轻人类和动物的疾病方面作用显著, 是 20 世纪最伟大发明之一<sup>[3]</sup>。在奶牛饲养过程中, 采用抗生素药物在提高牛奶产量和治疗疾病方面做出了相当大的贡献。但是抗生素残留会对人类健康产生危害, 同时也降低牛奶的品质, 给牛奶经营者造成了经济损失<sup>[4]</sup>。微生物法检测是检测乳中抗生素的传统方法, 也是当前乳中抗生素的最常用检测手段<sup>[5]</sup>。但是由于牛奶中添加  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂导致牛奶抗生素检测出现假阴性, 使乳及乳制品的安全问题依然存在。因此, 对分离纯化  $\beta$ -内酰胺酶及其降解产物的研究具有十分重要的意义。笔者选用大肠杆菌为供试菌株获得  $\beta$ -内酰胺酶, 通过对该菌种发酵条件进行优化, 提高  $\beta$ -内酰胺酶活力。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种。**大肠杆菌(*Escherichia coli*), 沈阳农业大学食品学院实验室保存。

**1.1.2 培养基。**斜面保藏培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂 18 g/L、蒸馏水 1 L, pH 7.4。液体种

子培养基: 酵母浸粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L、蒸馏水 1 L, pH 7.5。摇瓶发酵培养基: 混合碳源 20 g/L(葡萄糖 16 g/L、可溶性淀粉 4 g/L)、混合氮源 30 g/L(蛋白胨 20 g/L、酵母浸粉 10 g/L)、氯化钠 6 g/L、 $\text{Zn}^{2+}$  浓度 0.9 mg/L、蒸馏水 1 L, pH 7.5。

**1.1.3 仪器与设备。**PB-10 普及型 pH 计, Sartorius CO. Ltd; CT14RD 台式高速冷冻离心机, 上海天美科学仪器有限公司; UVC/T-AR 紫外无菌操作台, 上海凌初科学仪器有限公司; HZQ-Q 全温空气恒温摇床, 哈尔滨东联电子仪器有限公司; KQ-C 型全自控蒸汽灭菌锅 TH-3560, 上海奉贤协新机电厂; 电子分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司。

**1.2 菌种培养方法** 斜面培养: 将大肠杆菌种至斜面培养基上, 放于 37  $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱, 培养时间 24 ~ 36 h, 依菌落生长情况而定。液体种子培养: 将活化的斜面菌种挑取一环接种于液体培养基中, 250 ml 三角瓶装培养基 100 ml, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 24 h。摇瓶发酵培养: 二级摇瓶, 250 ml 三角瓶装液量 80 ml, 液体菌种接种体积分数 3%, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 培养 40 h。

### 1.3 试验方法

**1.3.1  $\beta$ -内酰胺酶粗酶的制备及活力测定。**参照文献[6]方法。1 个酶活力单位定义为: 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 1 ml 发酵酶液 1 h 分解青霉素活性单位的量。

**1.3.2 温度对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。**将种子液以 3% 的接种量接入发酵瓶中, 发酵瓶装液量为 80 ml/250 ml 三角瓶, 摇床转速 170 r/min, 分别在 28、31、34、37、40、43  $^{\circ}\text{C}$  下振荡培养, 培养时间为 40 h。比较温度对摇瓶发酵的影响。

**1.3.3 初始 pH 对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。**将种子液按 3% 的接种量接入发酵瓶中, 将种子液的初始 pH 分别控制在 7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 和 8.2。发酵瓶装液量为 80 ml/250 ml 三角瓶, 摇床转速 170 r/min, 温度 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 40

h. 考察初始 pH 对菌体生长和酶活力的影响。

**1.3.4 接种量对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。**将种子液分别按 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的接种量接入发酵瓶中,250 ml 三角瓶装液量为 80 ml,置于 37 °C、转速为 170 r/min 摇床中振荡培养,培养时间 40 h。观察接种量对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。

**1.3.5 装液量对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。**通过改变 250 ml 三角瓶中的装液量来改变溶氧浓度。将种子液按 3% 的接种量接入发酵三角瓶中,发酵瓶装液量依次为 20、30、40、50、60、70、80 ml,培养温度为 37 °C,摇床转速 170 r/min,培养 40 h。考察装液量对摇瓶发酵的影响。

**1.3.6 摇床转速对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。**将种子液按 3% 的接种量接入发酵瓶中,发酵瓶装液量为 80 ml/250 ml 三角瓶,摇床转速分别设为 140、150、160、170、180、190 r/min,在 37 °C 下,培养 40 h。考察不同转速对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响。

**1.3.7 正交试验筛选最优摇瓶发酵条件。**根据单因素试验结果,选定温度、初始 pH、接种量、装液量 4 个因素的 3 个水平进行正交试验,因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	温度(A)//°C	初始 pH(B)	接种量(C)//%	装液量(D)//ml
1	34	7.7	1.5	55
2	37	7.8	2.0	60
3	40	7.9	2.5	65

## 2 结果与分析

**2.1 温度对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响** 由图 1 看出,当温度在不大于 37 °C 范围内增长时,菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力均逐渐增加,在 37 °C 菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力均达到最大值 1.88 g/L 和 158.07 U/ml。因此确定发酵最适宜温度为 37 °C。

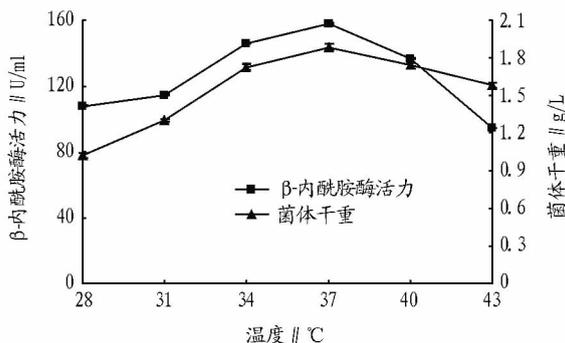


图 1 温度对菌体干重及  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响

**2.2 初始 pH 对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响** 培养基的 pH 将影响培养基中某些物质的解离和中间代谢物的解离,从而影响微生物对营养成分的吸收和代谢<sup>[7]</sup>。因此,在发酵过程中控制适当的 pH 是非常重要的,它对于细胞的正常生长和外来基因的高效表达都有影响<sup>[8]</sup>。该试验采用的 pH 在 7.0 ~ 8.2,考察对菌体干重和酶活力的影响。

从图 2 中可以发现,初始 pH 为 7.8 时  $\beta$ -内酰胺酶活力最高,为 160.99 U/ml;而菌体干重在 pH 8.0 时达到最大值。考虑到该试验的目的是提高  $\beta$ -内酰胺酶活力,因此确定发酵最适宜初始 pH 为 7.8。

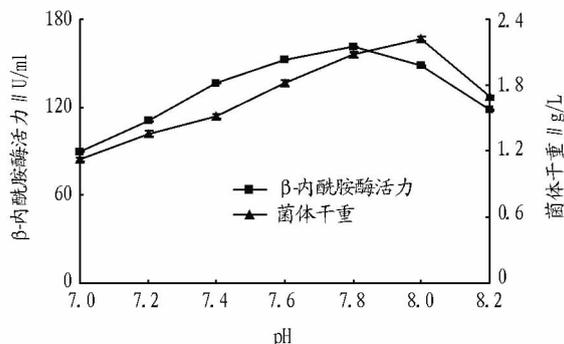


图 2 pH 对菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响

**2.3 接种量对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响** 由图 3 可以看出,1% 的接种量过小,菌体干重较低,导致  $\beta$ -内酰胺酶活力很低;3% ~ 5% 接种量时,虽然菌体大量增殖,但抑制了  $\beta$ -内酰胺酶活力;6% 的接种量过大,使发酵液黏稠从而抑制  $\beta$ -内酰胺酶活力;当接种量为 2% 时,既可产生适量的菌体数量,又不会造成营养的过度消耗, $\beta$ -内酰胺酶活力较高,因此最适宜。

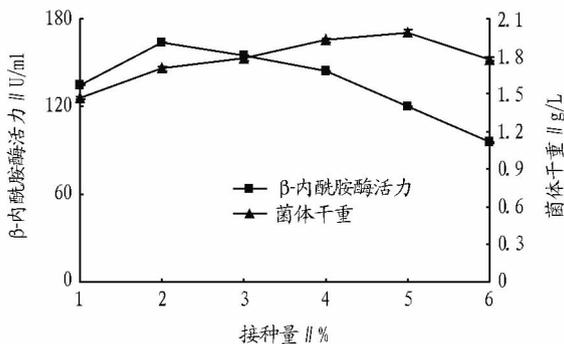


图 3 接种量对菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响

**2.4 装液量对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响** 由图 4 可知,当装液量超过 60 ml 时, $\beta$ -内酰胺酶活力和菌体干重均呈下降趋势。因此,最终确定装液量为 60 ml/250 ml。

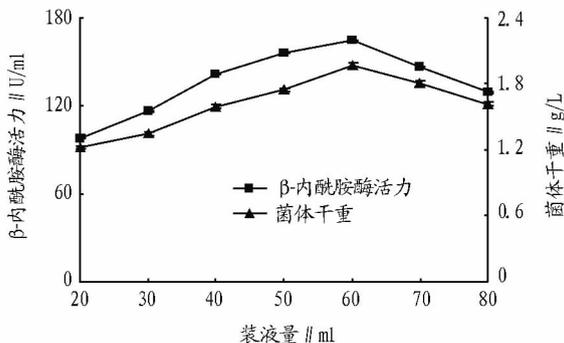


图 4 不同装液量对菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响

**2.5 摇床转速对  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响** 如图 5 所示,当摇床转速为小于 150 r/min 时,菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力

略低;而当摇床转速大于 170 r/min 时,菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力相差无几。由此可知,在装液量一定的情况下,摇床转速的大小对发酵的影响不大。考虑到仪器的使用寿命等因素,最终确定摇床转速为 170 r/min。

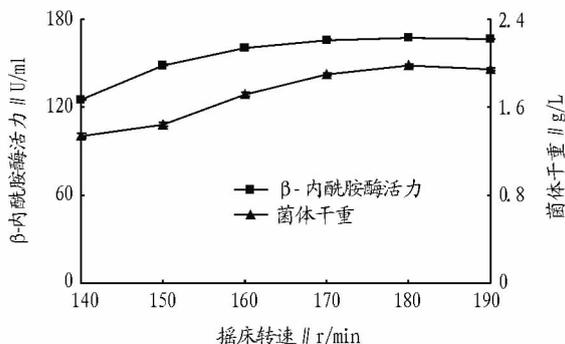


图5 摇床转速对菌体干重和  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响

2.6 正交试验筛选最优摇瓶发酵条件 正交试验结果如表 2 所示,试验所选发酵条件对摇瓶产  $\beta$ -内酰胺酶活力的影响

表2 发酵条件  $L_9(3^4)$  正交试验方案及结果

试验号	因素				
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	164.47
2	1	2	2	2	169.92
3	1	3	3	3	166.35
4	2	1	2	3	175.16
5	2	2	3	1	177.51
6	2	3	1	2	171.25
7	3	1	3	2	168.01
8	3	2	1	3	172.43
9	3	3	2	1	167.75
$k_1$	166.913	169.213	169.383	169.910	
$k_2$	174.640	173.287	170.943	169.727	
$k_3$	169.397	168.450	170.623	171.313	
R	7.727	4.837	1.560	1.586	
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	

顺序依次为 A > B > D > C,即温度 > 初始 pH > 装液量 > 接种量;最适宜培养条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。因此根据以上分析,得出最佳摇瓶发酵条件如下:温度 37 °C、初始 pH 7.8、接种量 2.0%、装液量 65 ml/250 ml 发酵瓶。使用最佳发酵条件对大肠杆菌进行培养,最终得到的  $\beta$ -内酰胺酶活力为 178.54 U/ml,比优化前提高了 33%。

### 3 结论

通过试验筛选和正交试验得出大肠杆菌产  $\beta$ -内酰胺酶的最佳发酵条件:温度 37 °C,初始 pH 7.8,接种量 2%,装液量 65 ml/250 ml 发酵瓶。使用最佳发酵条件对大肠杆菌进行培养,最终得到的  $\beta$ -内酰胺酶活力为 178.54 U/ml,比优化前提高了 33%。但该研究  $\beta$ -内酰胺酶的产量相对于工业化生产的需求还有一定的差距,下一步还要针对该菌株的发酵条件、 $\beta$ -内酰胺酶的分离纯化进行进一步的研究,从而更大程度地提高  $\beta$ -内酰胺酶的产量。

### 参考文献

- [1] ABRAHAM E P.  $\beta$ -内酰胺酶回顾[J]. 国外医药·抗生素分册,1992,13(6):418-424.
- [2] 胡功政,张春辉.  $\beta$ -内酰胺酶的分类与检测[J]. 中国兽药杂志,2003,37(12):42-46.
- [3] 刘玉强. 新型抗生素 AGPM 的分离纯化和过程优化[D]. 天津:天津大学,2004.
- [4] 顾欣. 牛奶中青霉素残留的微生物学检测技术研究及应用[D]. 南京:南京农业大学,2005.
- [5] 李延华,张兰威,王伟君. 微生物法检测乳中抗生素残留及假阳性产生的原因[J]. 食品与发酵工业,2005,31(8):93.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2005年版(二部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录 84.
- [7] 姚汝华. 微生物工程工艺原理[M]. 广东:华南理工大学出版社,1996:237.
- [8] 丁兰宝. 重组大肠杆菌高密度发酵研究[D]. 无锡:江南大学,2008.

(上接第 5572 页)

辽阳市农业秸秆资源较为丰富,而且分布比较集中。秸秆总量的 70% 分布在辽阳县、灯塔市、太子河区、宏伟区、白塔区 20 多个乡镇(街),13 个山区乡镇秸秆产量只占全市秸秆总量的 30% 左右。

4.2 秸秆综合利用情况 辽阳市秸秆利用主要有以下几个途径:一是秸秆还田。全市年推广秸秆还田面积 2.13 万  $\text{hm}^2$  左右。玉米秸秆还田量 10 万 t 左右,占玉米秸秆总量的 11%;水稻主要推广了高留茬技术,全市年稻草还田量为 6 万 t 左右,占稻草总量的 14%。二是家庭直接燃烧利用。目前,全市农村,特别是平原地区以秸秆作为燃料做饭取暖的农户还有较大的比例,主要消耗玉米秸秆和稻草。年消耗玉米秸秆 26 万 t 左右,占玉米秸秆总量的 31%;年消耗稻草 7 万 t 左右,占稻草总量的 17%。三是秸秆直接养畜。主要是将玉米秸秆、稻草、大豆秸秆、薯类秸秆等直接喂大牲畜及猪

羊等,年消耗秸秆近 8 万多 t,约占总量的 6%。四是用于青储饲料。主要是玉米秸秆青储,用于喂养牛、鹿等,年估算消耗秸秆 2 万多 t,约占玉米秸秆总量的 2%。五是用于秸秆编织及造纸。主要指稻草编织及造纸,年消耗稻草近 6 万多 t,占稻草总量的 14%。六是秸秆致密成型(固化)燃料和饲料,年消耗秸秆 4 万 t。

目前,全市秸秆综合利用总量为 69 万 t 左右,综合利用率约为 48%,有 52% 的秸秆尚未得到合理利用。因此,加快推进秸秆综合利用,实现秸秆的资源化、商品化,促进资源节约、环境保护和农民增收,提高农民生活质量,是建设新农村的重要任务和必然要求。

### 参考文献

- [1] 张培栋,杨艳丽,李光全,等. 中国农作物秸秆能源化潜力估算[J]. 可再生能源,2007,25(6):80-83.
- [2] 张晓文,赵改宾,杨仁全,等. 农作物秸秆在循环经济中的综合利用[J]. 农业工程学报,2006,22(S1):107-109.