

L-天冬酰胺酶的补料分批发酵

王云龙^{1,2}, 刘松^{1,2}, 冯岳^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: L-天冬酰胺酶(L-Asparaginase, EC 3.5.1.1, L-ASNase)广泛应用于食品和医药领域。为实现重组 L-ASNase 的高产, 在 3 L 罐水平研究了搅拌转速与补料分批发酵条件对 *Bacillus subtilis*/ASNΔ25/B2 菌株生长与产酶的影响。通过优化确定补料分批发酵条件如下: 发酵 0~8 h 搅拌转速: 700 r/min; 发酵 8 h 后搅拌转速: 900 r/min; 发酵 16~28 h: 恒速流加 (18.75 mL/h) 蔗糖 (800 g/L), 恒速流加 (32 mL/h) 酵母蛋白胨 (200 g/L) 和玉米浆 (80 g/L) 混合氮源。基于以上发酵条件, L-ASNase 酶活在 48 h 可达到 1 413.6 U/mL, 较分批发酵提高了 66.2%, 生产强度提高了 24.6%。研究结果为重组 L-ASNase 工业化生产提供了基础数据。

关键词: 枯草芽孢杆菌; L-天冬酰胺酶; 发酵优化; 分批发酵; 补料分批发酵

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2020)03-0001-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.001

Fed-Batch Fermentation of L-Asparaginase

WANG Yunlong^{1,2}, LIU Song^{1,2}, FENG Yue^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: L-asparaginase (EC 3.5.1.1, L-ASNase) has been widely used in the fields of food and medicine. In order to achieve the efficient production of L-ASNase, the effects of stirring speed and fed-batch fermentation conditions on the cell growth and enzyme production of *Bacillus subtilis*/ASNΔ 25/B2 were investigated in 3 L fermenter. After the optimization, conditions used for fed-batch fermentation were determined as follows: the stirring speed was set at 700 r/min for the first 8 h and shifted to 900 r/min till the end of the fermentation; for fermentation at 16~28 h, sucrose solution (800 g/L) and nitrogen sources (yeast peptone: 200 g/L; corn syrup: 80 g/L) were fed at 18.75 mL/h and 32 mL/h, respectively. Based on this fermentation condition, the L-ASNase yield reached 1 413.6 U/mL at 48 h, which was 66.2% higher than that of batch fermentation. The final production intensity obtained here was 24.6% higher than that of the latter. The results provide the basic data for the industrial production of the recombinant L-ASNase.

Keywords: *Bacillus subtilis*, L-asparaginase, fermentation optimization, batch fermentation, fed-batch fermentation

收稿日期: 2018-01-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31771913); 江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2016629)。

* 通信作者: 陈坚(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术及生化工程方面的研究。E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

L-天冬酰胺酶 (L-Asparaginase, EC 3.5.1.1, L-ASNase) 是一种酰胺基水解酶, 可以将天冬酰胺脱氨基生成天冬氨酸和氨^[1]。该酶具有抗肿瘤活性, 已用于治疗淋巴系统恶性肿瘤、儿童急性淋巴细胞白血病、网状细胞肉瘤及霍金森病等疾病^[2]。最新报道中显示该酶也可用于油炸食品中以减少丙烯酰胺的生成^[3-4]。由于 L-ASNase 在食品与医药领域中的重要应用, 已引起国内外广大学者的极大兴趣。

L-ASNase 广泛存在于动植物及微生物中^[5]。但是由于动植物中 L-ASNase 含量少, 分离提取操作困难, 而微生物发酵法具有培养简单、提取纯化简便以及易于大规模生产等优点, 已成为商品化 L-ASNase 的主要来源^[6]。由于野生菌发酵 L-ASNase 产量往往较低^[7-8], 国内外学者开始构建 L-ASNase 酶重组菌并对其发酵条件进行优化。Khushoo 等人通过指数流加策略控制重组菌 *E.coli* BLR(DE3) 比生长速率并优化诱导剂添加时间, 使 L-ASNase 酶活达到 870 U/mL^[9]。龙水清通过双阶段控制溶氧策略促进 *B. subtilis* 168/pMA5-ansz 产酶, 总酶活达到 112.61 U/mL^[10]。Chityala 等人在 *B.subtilis* WB800N 中表达 *P.carotovorum* MTCC 1428 来源的 L-ASNase 基因, 通过统计学方法及持续诱导策略使 L-ASNase 的产量达到 525.98 U/mL^[11]。

本研究以研究室前期构建的菌株 *Bacillus subtilis*/ASNΔ25/B2 为生产菌株^[12], 拟在优化搅拌转速的基础上对其补料分批发酵条件进行研究, 考察了补料时间、补料培养基组成、补料量以及流加方式对菌体生长和产酶的影响, 建立了 3 L 发酵罐发酵工艺, 为 L-ASNase 工业化生产提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株: *Bacillus subtilis*/ASNΔ25/B2^[12], 由江南大学生物系统与生物加工工程研究室构建并保藏。

XWY-240 恒温摇床: 上海智诚仪器有限公司产品; 3 L 发酵罐: 迪必尔生物工程(上海)有限公司产品; Agilent 1260 System 高效液相色谱仪: 美国 Agilent 公司产品; 台式高速离心机: 德国 eppendorf 公司产品; UV-2450 型紫外-可见分光光度计: 日本 Shimadzu 公司产品; pH 计: 瑞士 Mettler 公司产品。

1.2 培养基

1.2.1 卡那平板培养基(g/L) 胰蛋白胨 10, 酵母粉

5, 氯化钠 10, 琼脂 20, 硫酸卡那霉素 0.05。

1.2.2 种子培养基(g/L) 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 硫酸卡那霉素 0.05。

1.2.3 发酵培养基(g/L) 酵母蛋白胨 28.0, 硫酸铵 4.0, 玉米浆 11.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 22.5, KH_2PO_4 11.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, NaCl 3.3, L-天冬酰胺 2, 蔗糖 65.0, 硫酸卡那霉素 0.05; 初始 pH 7.5。

1.2.4 补料培养基(g/L) 碳源: 蔗糖 800; 混合氮源: 酵母蛋白胨 200, 玉米浆 80。

1.3 培养方法

1.3.1 种子活化 取适量保存在冷冻甘油管中的菌液涂布至卡那平板上, 37 °C 培养过夜。

1.3.2 种子培养 将活化好的种子接种至装有 60 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 添加 60 μL 的 50 mg/mL 硫酸卡那霉素, 摇床温度 37 °C, 转速 220 r/min, 培养 8~10 h。

1.3.3 摇瓶发酵培养 按体积分数 4% 的接种量将种子培养基接入装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 温度 37 °C, 转速 220 r/min。

1.3.4 发酵罐发酵培养 按体积分数 4% 的接种量将种子培养基接入装有 1.5 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中, 通气量 2 vvm, 温度 37 °C, 初始 pH 7.5。本研究所有实验重复 3 次取其平均值。

1.3.5 补料分批发酵 0~8 h 搅拌转速为 700 r/min, 8 h 以后搅拌转速为 900 r/min。16~28 h 以 32 mL/h 平均流速进行恒速流加酵母蛋白胨和玉米浆混合氮源。

间歇性流加: 16 h 开始每隔 2 h 补加 37.5 mL 蔗糖。

恒速流加: 16~28 h 以平均流速 18.75 mL/h 恒速流加蔗糖。

指数流加: 蔗糖流加速率按如下公式计算:

$$F(t) = \frac{\mu_{set} X_0 V_0 \exp(\mu_{set} t)}{(S_f - S_0) Y_{XS}} \quad (1)$$

式中 $F(t)$ 为蔗糖流加速率 (L/h), μ_{set} 为设定的比生长速率 (0.2 h^{-1}), X_0 代表初始菌体干质量浓度 (g/L), V_0 为初始发酵液体积 (L), t 为指数流加的时间 (h), S_f 为补加的蔗糖质量浓度 (800 g/L), S_0 为指数流加开始时的残留蔗糖质量浓度 (g/L), Y_{XS} 为菌体对底物的得率系数 (0.29 g/g)。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度的测定 采用浊度法测定。取适量

发酵液稀释到适当倍数后使用紫外分光光度计于波长 600 nm 下测定吸光度,即 OD_{600} 。

1.4.2 L-ASNase 粗酶液制备 取一定量的发酵液 12 000 r/min 离心 10 min,上清液即为 L-ASNase 粗酶液。

1.4.3 L-ASNase 酶活测定 采用奈氏试剂法^[13]。取 900 μ L 磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液,pH 7.5)加入 200 μ L 底物(L-天冬酰胺,0.15 mol/L)于 37 $^{\circ}$ C 保温 10~20 min 后,加入 100 μ L 稀释到适当倍数的 L-ASNase 粗酶液,37 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后加入 100 μ L 终止剂 (三氯乙酸,1.5 mol/L)终止反应,对照组在保温前即加入终止剂。反应结束后 12 000 r/min 离心 2 min,取 100 μ L 上清液,加入 3 400 μ L 去离子水和 500 μ L 奈氏试剂,混匀后在波长 436 nm 下测定吸光度。

酶活力单位定义:37 $^{\circ}$ C 每分钟水解 L-天冬酰胺生成 1 μ mol 氨所需要的酶量定义为一个 L-ASNase 活力单位。

1.4.4 蔗糖质量浓度测定 采用高效液相色谱法^[12]。液相仪:Agilent 1 260;检测器:RID;色谱柱:Aminex HPX-87H,300 mm $\times$ 7.8 mm 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:5 mmol/L 硫酸;流速:0.6 mL/min;柱温:40 $^{\circ}$ C,进样体积为 10 μ L。

1.4.5 比速率的计算 使用 Origin 软件处理^[14]。

2 结果与讨论

2.1 搅拌转速对 L-ASNase 分批发酵过程的影响

在发酵过程中搅拌转速一方面会影响到环境中溶氧(DO)的变化,另一方面过大的转速产生剪切力也会影响到细胞的生长^[15],发酵液中的溶氧水平对 L-ASNase 的合成影响较大^[16-17]。故在 3 L 发酵罐水平进行分批发酵,考察搅拌转速对 *B.subtilis*/ASN Δ 25/B2 菌体生长和产酶的影响,共选取了 600、700、800、900 r/min 4 个转速进行研究。不同搅拌转速发酵过程中溶氧的变化情况如图 1(a)所示,在整个发酵过程中溶氧呈先下降后上升的趋势。在 0~20 h,由于菌体生长代谢作用需要消耗大量溶解氧,溶氧水平一直呈下降趋势,而后期需氧量明显下降。不同的搅拌转速所能提供的溶氧水平差异较大,600 r/min 在 8 h 时 DO 只有 10.9%,8~24 h DO 一直处于很低的水平,接近于 0;700 r/min 在 12 h 之后溶氧迅速下降到 0.9%;800 r/min 能维持 DO 在

20%以上;900 r/min 能维持 DO 在 30%以上。

不同搅拌转速下 OD_{600} 随时间变化情况如图 1(b)所示。与搅拌转速 600 r/min 相比,700、800、900 r/min 条件下 OD_{600} 分别提高了 4.9%、14.5%、14.9%。这是因为枯草芽孢杆菌是好氧微生物^[10],而 600 r/min 和 700 r/min 溶氧均在 16~24 h 处于较低水平,影响了菌体生长。

不同搅拌转速下菌体比生长速率变化情况如图 1(c)所示,比生长速率均呈现先增大后减小的趋势,600、700、800、900 r/min 比生长速率分别在 6.5、5、5、5.5 h 达到最大。在 8 h 前由于溶氧充足,而 700 r/min 剪切力小,故其比生长速率高于其他转速。在 8 h 以后,菌体已经进入对数生长期,对溶氧要求较高,而高转速能提供更高的溶解氧,更适合菌体生长,故 900 r/min 比生长速率高于 700 r/min。

结合图 1(b)和图 1(d)可知 *B.subtilis*/ASN Δ 25/B2 产 L-ASNase 属于延续合成型。在 0~24 h,随着菌体的生长 L-ASNase 酶活也逐渐增加,当菌体进入稳定期后产酶依然继续,且酶活和生物量呈正相关。与搅拌转速 600 r/min 相比,700、800 r/min 和 900 r/min 条件下酶活分别提高 9.4%、25.4%和 25.9%。发酵前期,不同搅拌转速下 L-ASNase 的比产酶速率接近,8 h 之后 900 r/min 的比产酶速率要明显高于其他转速。这说明较高的溶氧不仅对菌体生长有利,也可促进菌体产酶。

根据上述结果,为了进一步提高 L-ASNase 产量,提出两阶段控制搅拌转速策略即 0~8 h 将搅拌转速控制在 700 r/min,8 h 之后将搅拌转速控制在 900 r/min。发酵过程曲线如图 1(f)所示,溶氧水平能维持在 30%以上,可以满足菌体对溶氧的要求,发酵周期由 40 h 提前到 36 h,最大酶活也进一步提高,达到 850.6 U/mL。不同搅拌转速下发酵过程参数见表 1,与恒定转速 600 r/min 相比,两阶段控制转速条件下菌体 OD_{600} 、酶活和生产强度分别提高了 18.8%、31.9%、46.6%。

2.2 补料时间对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响

两阶段控制搅拌转速分批发酵过程中蔗糖消耗情况如图 2(a)所示,随着发酵过程的进行,蔗糖不断消耗,在 20 h 即将耗尽。如果增加蔗糖供应,可能会进一步提高菌体量和酶产量。在分批发酵过程中,发酵液中残留蔗糖质量浓度一直在减小,菌体对蔗糖的消耗速度也在不断发生变化,在不同时间

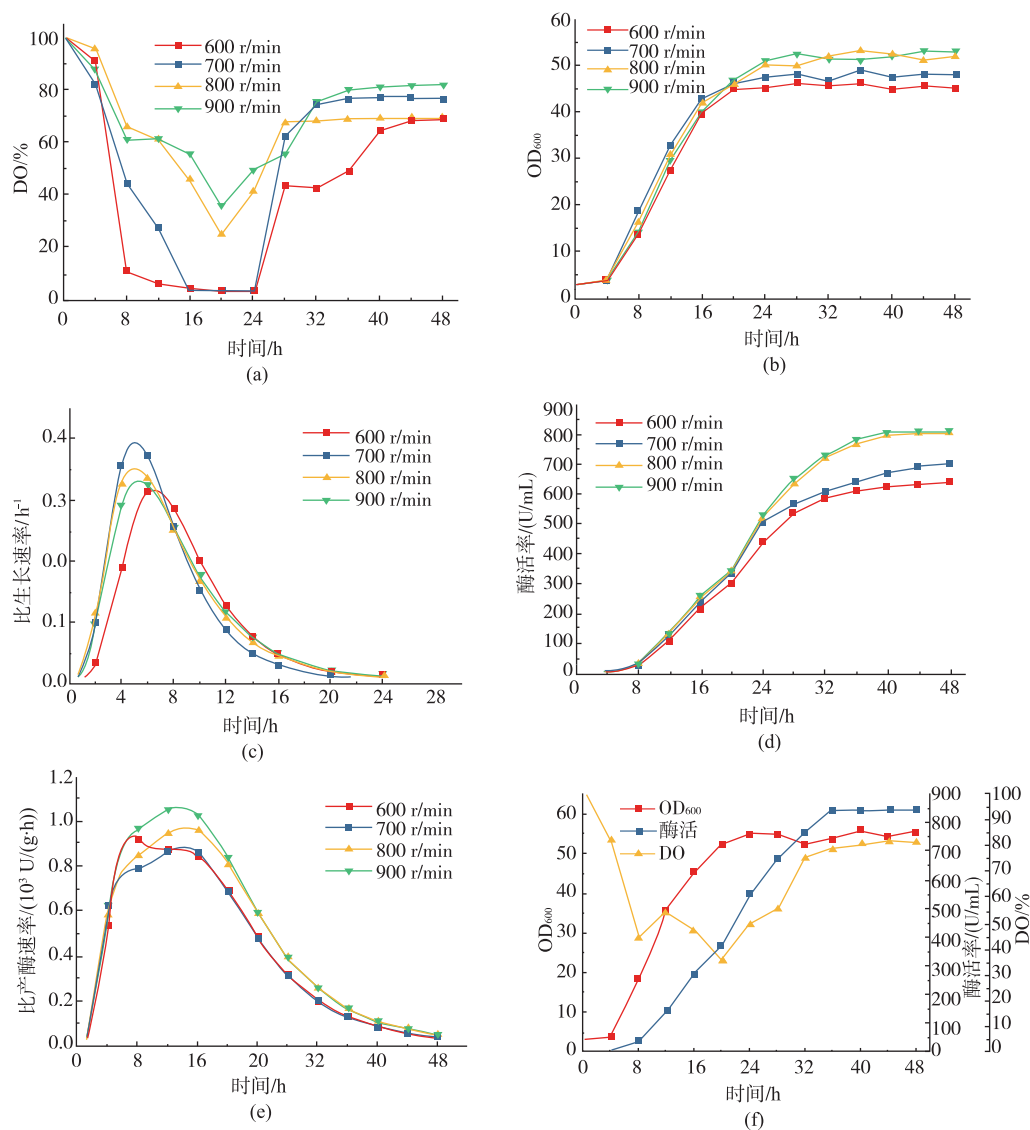


图1 搅拌转速对 L-ASNase 分批发酵过程的影响

Fig. 1 Influence of stirring speed on the production of L-asparaginase in batch fermentation

表1 不同搅拌转速下 L-ASNase 分批发酵过程参数比较

Table 1 Comparison of fermentation parameters among batches with different stirring speed conditions

发酵参数	搅拌转速/(r/min)				两阶段
	600	700	800	900	
OD ₆₀₀ 最大值	45.30	47.50	51.90	52.10	53.80
菌体最大比生长速率/h ⁻¹	0.32	0.39	0.35	0.33	0.39
L-ASNase 酶活最大值/(U/mL)	644.90	705.60	808.70	826.40	850.60
发酵周期/h	40.00	40.00	40.00	40.00	36.00
L-ASNase 生产强度/(U/(mL·h))	16.12	17.64	20.22	20.66	23.63
L-ASNase 对蔗糖的得率系数/(kU/g)	9.92	10.86	12.44	12.71	13.09
菌体对蔗糖的得率系数/(g/g)	0.24	0.26	0.28	0.28	0.29
L-ASNase 对细胞的得率系数/(kU/g)	40.67	42.44	44.52	45.32	45.17

开始补加蔗糖,对菌体生长可能会产生不同的影响。因此,为了确定蔗糖的最佳补料时机,分别研究了在发酵过程进行到 16、18、20 h 开始每隔 2 小时间歇性流加蔗糖,补糖总量为 80 g/L,分 4 次补加到发酵罐中,结果如图 2 所示。

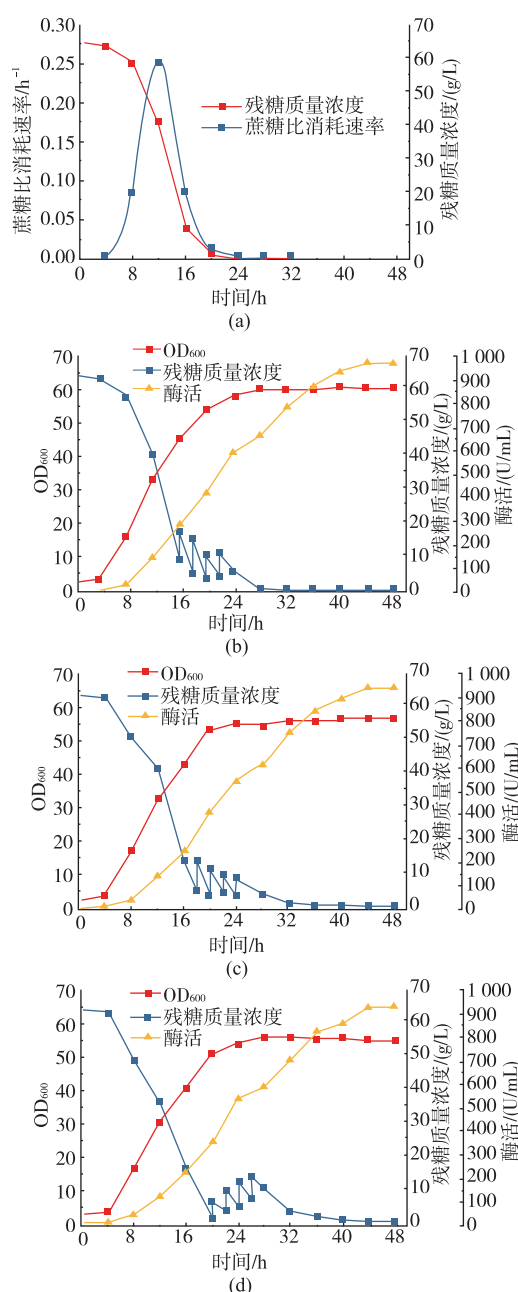


图 2 补料时间对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响
Fig. 2 Influence of feeding time on the production of L-asparaginase in fed-batch fermentation

当发酵过程进行到 16 h 时发酵液中的蔗糖质量浓度减少到 10 g/L 左右,此时溶氧还没反弹,菌

体正处于对数生长期,对蔗糖的消耗速度较快。由图 2(b)可知,在此时补加蔗糖能很好的满足菌体对蔗糖的需求,菌体 OD₆₀₀ 进一步提高,在 28 h 达到 60.3,和分批发酵相比提高了 12.1%,酶活在 44 h 达到 972.1 U/mL,和分批发酵相比提高了 14.3%。当发酵过程进行到 18 h 时发酵液中的蔗糖质量浓度减少到 4 g/L 左右,菌体对蔗糖的消耗速度和 16 h 相比减小很多。在此时开始补加蔗糖(图 2(c)),和分批发酵相比,OD₆₀₀ 和酶活分别提高了 5.1%、11.8%。当发酵过程进行到 20 h 时发酵液中的蔗糖质量浓度仅剩 1 g/L 左右,菌体开始进入稳定期,在此时开始补加蔗糖(图 2(d)),由于补料太迟,菌体所需的能量不能及时供给,OD₆₀₀ 无明显提高,酶活仅提高了 9.9%。故选择在 16 h 开始补加蔗糖。

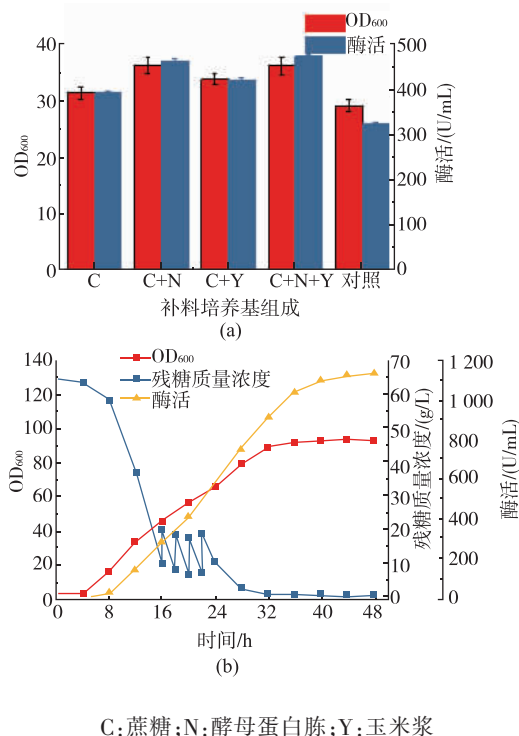
2.3 补料培养基组成对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响

由补料时间结果可知,在 16 h 单一补加蔗糖,菌体量虽然有所提高,但提高幅度不大。菌体生长还需要其他营养物质,仅仅补加碳源对提高菌体量和酶产量作用有限^[14]。故进一步研究了补料培养基组成对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响。

首先在摇瓶水平上通过蔗糖、酵母蛋白胨和玉米浆的不同组合研究补料培养基组成对 *B.subtilis*/ASNΔ25/B2 产 L-ASNase 的影响,以此作为在发酵罐上进一步放大的基础,结果如图 3(a)所示。和对照组相比,实验组的 OD₆₀₀ 和酶活均有提高,说明补加培养基对菌体生长和产酶有利。比较实验组可知,补加蔗糖的同时再补加酵母蛋白胨或玉米浆效果都比单一补加蔗糖更好,三者一起补加时效果最好,这可能是因为酵母蛋白胨和玉米浆中除了含有菌体生长需要的营养物质外还含有产酶的前体物质^[18]。和对照组相比,三者一起补加使 OD₆₀₀ 提高了 45.5%,酶活提高了 43.8%。故在 3 L 发酵罐上选择同时补加蔗糖、酵母蛋白胨和玉米浆进行补料分批发酵,发酵过程曲线如图 3(b)所示。OD₆₀₀ 在 32 h 达到 91.1,酶活在 48 h 达到 1 136.9 U/mL,和 16 h 单一补加蔗糖相比,分别提高了 51.1%、17%。

2.4 补料量对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响

由上述结果可知,同时补加蔗糖、酵母蛋白胨和玉米浆,OD₆₀₀ 和酶活都有较大的提高,如果延长补料时间,继续补加新鲜培养基,OD₆₀₀ 和酶活可能会进一步提高,故有必要对培养基补加量进行研究。



C:蔗糖;N:酵母蛋白胨;Y:玉米浆

图3 补料培养基组成对 L-ASNase 补料分批发酵过程影响
Fig. 3 Influence of composition of feed medium on the production of L-asparaginase in fed-batch fermentation

在发酵过程进行到 16 h 时开始每隔 2 小时补加一次蔗糖,分别补加 4、6、8 次,蔗糖补加总量分别为 80、120、160 g/L。在补加蔗糖的同时,按发酵培养基中的蔗糖、酵母蛋白胨和玉米浆的比例,以 32 mL/h 恒速补加酵母蛋白胨和玉米浆混合氮源,实验结果如图 4 所示。当蔗糖补加量为 80 g/L 时,在消耗蔗糖的同时 OD₆₀₀ 逐渐增加,发酵 32 h 时蔗糖耗尽,OD₆₀₀ 在 32 h 达到最大值 91.1, L-ASNase 酶活在 48 h 达到最大为 1 136.9 U/mL。当蔗糖补加量为 120 g/L 时,发酵 40 h 蔗糖耗尽,在细胞耗糖的同时 OD₆₀₀ 逐渐平稳增加,在 40 h 达到最大值 119.7,酶活也随着菌体生长不断增加,在 48 h 达到最大值 1 279.6 U/mL。当蔗糖补加量增加到 160 g/L 时,蔗糖在 44 h 才消耗完全,OD₆₀₀ 在 40 h 达到最大为 121.6,和补糖总量 120 g/L 时所能达到的 OD₆₀₀ 接近, L-ASNase 酶活在 48 h 达到最大值 1 294.6 U/mL。虽然酶活最大值比补糖总量 120 g/L 时有少量增加,但不是很显著,且消耗了更多的原料。故为了节约成本,选择蔗糖补加量为 120 g/L。

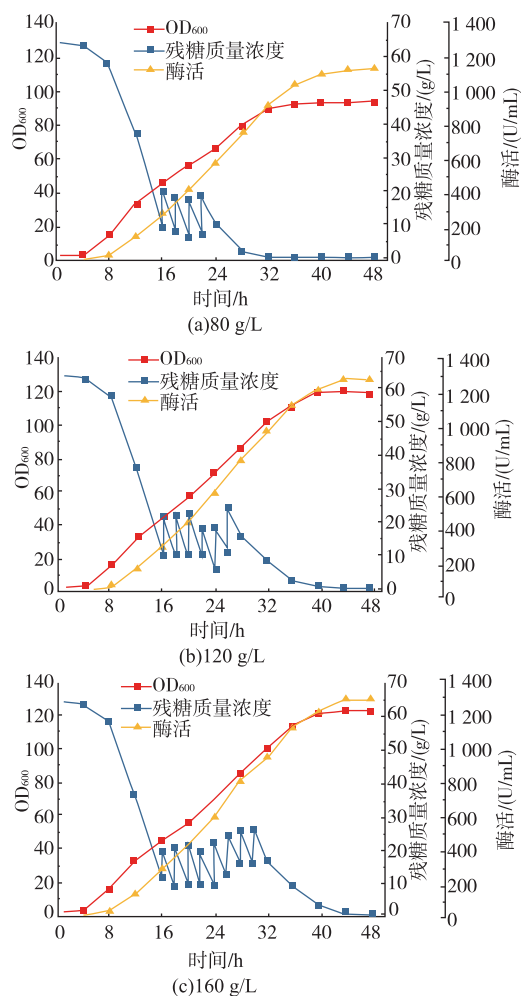


图4 补料量对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响
Fig. 4 Influence of feeding quantity on the production of L-asparaginase in fed-batch fermentation

2.5 流加方式对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响

碳源的流加方式对补料分批发酵过程有着重要影响。非反馈式流加主要包括脉冲式流加、恒速流加、指数流加和间歇性流加等^[19],不同的产物、不同的菌体适合不同的补料策略。为了进一步研究蔗糖流加方式对补料分批发酵的影响,在间歇性流加的结果之上采用恒速流加和指数流加进行发酵培养,发酵过程曲线如图 5 所示。

由图 5(b)可知,当在 16~28 h 以 18.75 mL/h 平均流速恒速流加蔗糖时,细胞 OD₆₀₀ 一直平稳增加,在 44 h 达到最大值 128.6, L-ASNase 酶活在 48 h 达到最大值 1 413.6 U/mL,和间歇性流加(图 5(a))相比,酶活进一步提高。由图 5(c)可知,当发酵 16 h

时开始指数流加蔗糖时, 菌体 OD_{600} 在 32 h 达到最大值 81.2, L-ASNase 酶活在 44 h 达到最大值 1 048.9 U/mL, 和间歇性流加相比酶活下降。这可能是因为蔗糖并非发酵培养基中的唯一碳源, 且流加速率是通过理论计算得到的^[20], 导致蔗糖没能及时消耗, 使菌体浓度减小, 干扰了菌体的生长代谢, 故最终没有达到较好的效果。不同流加方式发酵过程参数如表 2 所示, 和间歇性流加相比, 恒速流加

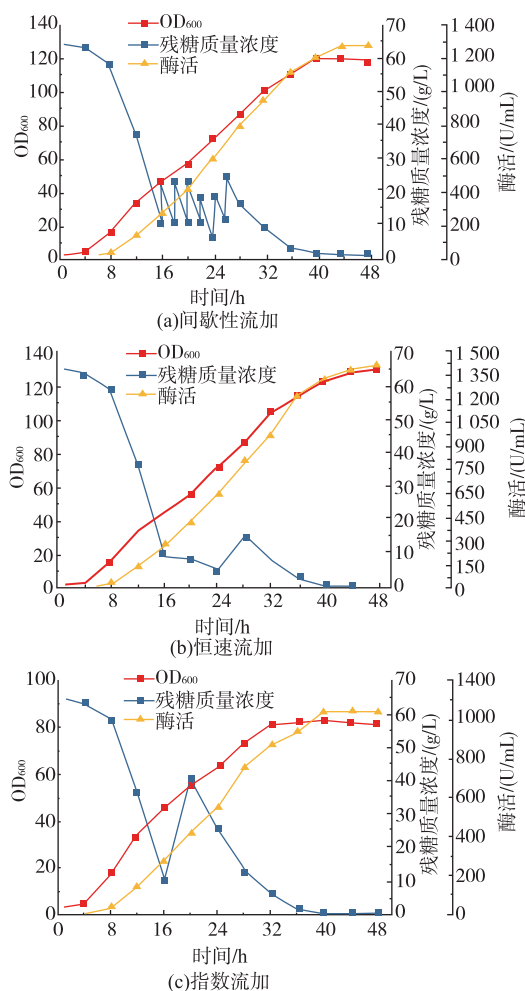


图 5 流加方式对 L-ASNase 补料分批发酵过程的影响
Fig. 5 Influence of feeding mode on the production of L-asparaginase in fed-batch fermentation

表 2 不同流加方式 L-ASNase 补料分批发酵过程参数比较
Table 2 Comparison of fermentation parameters among batches on different feeding mode

发酵参数	补料方式		
	间歇性	恒速	指数
总蔗糖质量浓度/(g/L)	185	185	185
OD_{600} 最大值	119.7	128.6	81.2
菌体最大比生长速率/h	0.39	0.39	0.39
L-ASNase 活最大值/(U/mL)	1 279.6	1 413.6	1 048.9
最大比产酶速率/(kU/g/h)	0.91	0.91	0.9
发酵周期/h	48	48	44
L-ASNase 生产强度/(U/mL/h)	26.66	29.45	23.84
L-ASNase 对蔗糖的得率/(kU/g)	6.92	7.64	5.67
菌体对蔗糖的得率/(g/g)	0.23	0.24	0.15
L-ASNase 对细胞的得率/(kU/g)	30.54	31.41	36.91

OD_{600} 、酶活、生产强度都进一步提高。指数流加虽然发酵周期较短, 但是蔗糖转化率、 OD_{600} 和酶活较低, 导致其生产强度也较低。在补料量相同的情况下, 恒速流加蔗糖能取得更高的产酶量、底物转化率和生产强度, 故最终采用恒速流加。

3 结 语

在 *B. subtilis*/ASN Δ 25/B2 产 L-ASNase 发酵过程中, 通过两阶段控制搅拌转速的培养策略即 0 ~ 8 h 控制搅拌转速 700 r/min, 8 h 以后搅拌转速恒定在 900 r/min, 使菌体 OD_{600} 、酶活和生产强度与恒定转速 600 r/min 相比, 分别提高了 18.8%、31.9%、46.6%。通过对补料时间、补料培养基组成、补料量、蔗糖流加方式的研究, 得出: 当在 16~28 h 以平均流速 18.75 mL/h 恒速流加蔗糖、以平均流速 32 mL/h 恒速流加酵母蛋白胨和玉米浆混合氮源时效果最好, OD_{600} 最高达到 128.6, L-ASNase 酶活在 48 h 达到最大 1 413.6 U/mL。和分批发酵相比, 提高幅度高达 66.2%。和 Khushoo^[9] (870 U/mL)、龙水清^[10] (112.61 U/mL)、Chityala^[11] (525.98 U/mL) 等人报道的 L-ASNase 产量相比, 本研究的 L-ASNase 最终产量高于目前报道的水平, 为实现国内 L-ASNase 工业化生产提供了数据支撑。

参考文献:

- [1] FERRARA M A, SEVERINO N M B, MANSURE J J, et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1457-1463.
- [2] KISLITSYN Y A, KRAVCHENKO O V, NIKONOV S V, et al. Three-dimensional structure of *Erwinia carotovora* L-asparaginase

- [J]. **Crystallography Reports**, 2006, 51(5):811-816.
- [3] KORNBRUST B A, STRINGER M A, LANGE N E K, et al. Asparaginase-an enzyme for acrylamide reduction in food products [OB/OL]. (2009-09-22)[2018-01-10]. <https://doi.org/10.1002/9781444309935.ch4>.
- [4] HENDRIKSEN H V, KORNBRUST B A, QSTERGAARD P R, et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae* [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2009, 57(10):4168-4176.
- [5] VERMA N, KUMAR K, KAUR G, et al. L-asparaginase : a promising chemotherapeutic agent[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2007, 27(1):45-62.
- [6] SAVITRI, ASTHANA N, AZMI W. Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme[J]. **Indian Journal of Biotechnology**, 2003, 2:184-194.
- [7] FENG Y, LIU S, JIAO Y, et al. Gene cloning and expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2019, 127(4):418-424.
- [8] MAHAJAN R V, SARAN S, KAMESWARAN K, et al. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity; optimization, scale up and acrylamide degradation studies[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 125:11-16.
- [9] KHUSHOO A, PAL Y, MUKHERJEE K J. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2005, 68(2):189-197.
- [10] 龙水清. 枯草芽孢杆菌 L- 天冬酰胺酶的分子改造及发酵优化[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [11] SUSHMA C, ANAND A P, VEERANKI V D. Enhanced production of glutaminase free L-asparaginase II by *Bacillus subtilis* WB800N through media optimization[J]. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 2017, 34(11):2901-2915.
- [12] FENG Y, LIU S, JIAO Y, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2017, 101(4):1509-1520.
- [13] DEOKAR V D, VETAL M D, RODRIGUES L. Production of intracellular L-asparaginase from *Erwinia carotovora* and its statistical optimization using response surface methodology(RSM)[J]. **International Journal of Chemical Sciences and Applications**, 2010, 1(1):25-36.
- [14] TANG Qunfang, LI Jianghua, LIU Long, et al. Enhanced production of solvent-stable alpha glycosidase from *Bacillus licheniformis* JXC-1 by an optimal feeding strategy[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(1):12-18. (in Chinese)
- [15] LI Jiawei, LIU Long, LI Jianghua, et al. Strategy of two-stage agitation rate for citric acid production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(2):131-136. (in Chinese)
- [16] SINGH Y, SRIVASTAVA S K. Performance improvement of *Bacillus aryabhattai* ITBHU02 for high-throughput production of a tumor-inhibitory L-asparaginase using a kinetic model-based approach[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2014, 89(1):117-127.
- [17] LIU Hong, CAI Shaoxi, PAN Hongchun. Influence of dissolved oxygen on the fermentation of L-asparaginase and control[J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2003, 16(6):345-347. (in Chinese)
- [18] 吴敬, 殷幼平. 酶工程[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [19] OZTURK S, CALIK P, OZDAMAR T H. Fed-batch biomolecule production by *Bacillus subtilis*: a state of the art review[J]. **Trends in Biotechnology**, 2016, 34(4):329-345.
- [20] ZHU YQ, LIU YF, LI JH, et al. An optimal glucose feeding strategy integrated with step-wise regulation of the dissolved oxygen level improves N-acetylglucosamine production in recombinant *Bacillus subtilis*[J]. **Bioresource Technology**, 2015, 177:387-392.