

文章编号:1000-5862(2013)05-0530-05

# 废弃菌体水解液作氮源发酵产脲水合酶的研究

孙婉菊,王筱兰\*

(江西师范大学生命科学学院,江西 南昌 330022)

**摘要:** 工业生产中微生物细胞在发酵结束后常被作为废弃物丢弃,容易造成环境污染和资源浪费.对废弃细胞进行破壁处理,废弃菌体水解液可替代酵母膏作有机氮源用于发酵产脲水合酶.通过采用超声波、冻融、热碱3种方法破碎细胞,测定水解液中氨基氮含量的高低,确定选择热碱法为最佳细胞破碎方法.通过正交实验选出最优破壁条件为:NaOH加入量 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,水解温度 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,水解时间 $1.5\text{ h}$ .在最佳破壁条件下,细胞破碎液中氨基氮含量为 $24.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .并考察了酵母膏与水解液的不同配比对脲水合酶发酵酶活的影响,确定了酵母膏与废弃菌体水解液的最佳配比为3:2.实验结果表明:利用热碱法处理废弃菌体的水解液作为氮源部分代替酵母膏,发酵酶活为 $1\ 063\text{ 万 U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而完全利用酵母膏作为氮源的发酵酶活为 $1\ 055\text{ 万 U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**关键词:** 废弃菌体;水解液;氮源;脲水合酶

**中图分类号:** TQ 920

**文献标志码:** A

## 0 引言

随着科学技术的迅速发展和人类对环境污染重视程度的提高,微生物法越来越多地取代传统化学方法应用于工业中,生产各种与人类生活息息相关的产品.微生物法与化学法相比,减少了“三废”的排放,对环境的污染小.然而,随着微生物法在工业上的广泛应用,发酵生产废弃细胞常常直接被排放,造成环境污染及资源浪费<sup>[1]</sup>,工业废弃菌体的处理成为发酵行业的又一问题.

废弃菌体中含有丰富的蛋白质、氨基酸和维生素及其他微量元素,是微生物生长代谢所必需的营养物质<sup>[2]</sup>.对丙烯酰胺生产废弃细胞进行破壁处理,可以获得大量可被丙烯酰胺生产菌利用的氮源及生长因子.目前,废弃菌体的水解方法多采用生物法(酶解法、自溶法)、物理法(超声波破碎法)、化学法(酸解、碱解)<sup>[3]</sup>.然而这些方法要实现工业应用存在很多的问题,例如:利用超声波破碎细胞时,超声波产生的化学自由基团能使某些敏感性活性物质变性失活且工业应用成本高;自溶法虽然经济,但存在水解收率低、水解液中残余盐浓度高,高浓度的盐离子对菌体的生长代谢有抑制作用<sup>[4]</sup>;酶解法对温

度控制要求高,且酶具有专一性,一般只能水解一种或一类物质,不利于废弃菌体的其他有机大分子的水解.因而,无论从经济成本、适用范围和使用效果等方面考虑,废弃菌体水解的方法都有待进一步改进.

热碱法水解菌体是一种有效的菌体水解技术,碱的加入降低了微生物细胞对高温的抵抗力,在抑制细胞活性的同时,能溶解脂类物质使细胞破裂,同时加热能加速菌体中有机物的分解.用热碱法水解发酵产脲水合酶废弃菌体,并将菌体水解液作为发酵原料再利用,不仅解决了废弃菌体污染环境的问题,还降低了发酵生产成本,具有巨大的经济效益和显著的社会效益.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种 诺卡氏菌(*Nocardia* sp.),江西师范大学生命科学学院实验室保藏.

1.1.2 培养基 (i) 固体斜面培养基/%:葡萄糖 1.000,酵母膏 0.300,蛋白胨 0.200,氯化钠 0.100,磷酸氢二钾 0.200,无水硫酸镁 0.200,琼脂 2.000.

(ii) 发酵培养基/%:葡萄糖 2.000,酵母膏

收稿日期:2013-06-17

基金项目:江西省科技支撑计划(2009JX00564)资助项目.

通信作者:王筱兰(1965-),女,江西景德镇人,教授,博士,主要从事生物催化工程研究.

0.500 尿素 0.700 谷氨酸钠 0.100 磷酸二氢钾 0.050 磷酸氢二钾 0.050 无水硫酸镁 0.020 氯化钴 0.002 pH 值为 7.5.

(iii) 发酵培养基/%: 葡萄糖 2.000 尿素 0.700 谷氨酸钠 0.100 磷酸二氢钾 0.050 磷酸氢二钾 0.050 无水硫酸镁 0.020 氯化钴 0.002 废弃菌体按 20%、40%、60%、80%、100% 的含量替代酵母膏作氮源 pH 值为 7.5.

1.1.3 实验仪器及设备 GNP-9160 型隔水式恒温培养箱,SCS-24 温控培养摇床,DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱,HVE-50 全自动高压灭菌锅,SW-CJ-IF 双面净化工作台,冰箱,电子分析天平,pH 计.

## 1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 摇瓶发酵培养:将 *Nocardia* sp. 转接于固体培养基,在 28 °C 培养箱中活化 120 h,挑取菌落于 250 mL 三角瓶中进行摇瓶培养,装液量为 30 mL,于 28 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 摇床中培养 96 h 后收集菌体.

1.2.2 细胞的破碎方法 将发酵结束后的发酵液离心,收集菌体.采用超声波法、冻融法和热碱法对菌体细胞进行破碎处理.

(i) 超声波法处理菌体 取 5 g 湿菌体,用蒸馏水洗涤数次,12000 r·min<sup>-1</sup> 离心后,在冰浴条件下超声破碎菌体.细胞破碎程度随超声功率和破碎时间而不同,因此超声破碎条件根据破碎效果而定(最优的破壁条件为超声功率 160 W,工作 5 s,间隙 5 s,总时间 30 min).超声破碎细胞后,冷冻离心(4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup>,20 min),收集上清液为细胞水解液.取样测定水解液中氨基氮含量.

(ii) 冻融法处理菌体 取 5 g 湿菌体在 -18 °C 下冷冻 24 h,取出后解冻.重复上述操作 3 次,加蒸馏水配得菌悬液 20 mL,冷冻离心(4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup>,20 min),收集上清液为细胞水解液.取样测定氨基氮含量.

(iii) 热碱法处理菌体 取湿菌体 5 g,加入质量分数为 1.0% 的 NaOH 溶液配成 20 mL 菌悬液,在 90 °C 水浴下反应 1 h.取样测定水解液中氨基氮含量.

1.2.3 分析方法 (i) 氨基氮测定:甲醛滴定法<sup>[6]</sup>.氨基氮浓度由甲醛滴定法测定.氨基酸具有酸碱两性,由于 -NH<sub>2</sub> 与 -COOH 相互作用,使氨基酸成为中性的内盐,当加入甲醛溶液时,-NH<sub>2</sub> 与甲醛结合,其碱性消失,破坏内盐的存在,用碱来滴定 -COOH.取样品滤液 2 mL 于 50 mL 三角瓶中,加蒸馏水 10 mL,加 0.1% 甲基红指示剂 1~2 滴,加

0.1 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1~2 滴使呈红色,以 0.02 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 滴到橙黄色,加 18% 中性甲醛溶液 5 mL,静置 5 min,加 1% 酚酞指示剂 1~2 滴,再用 0.02 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 滴定至微红色为终点.

(ii) 腈水合酶活力测定方法:腈水合酶(NHase)活力采用国际单位,定义:28 °C 条件下每分钟生成 1 μmol 丙烯酰胺为一个活力单位 U<sup>[7]</sup>.

① 准确移取 1 mL 发酵液和 0.025 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 19 mL 于 150 mL 三角瓶中放入 28 °C 恒温水浴内,加入 1 L 丙烯腈(AN),反应 5 min,加入 4 mol·L<sup>-1</sup> HCl 200 mL 中止反应.反应结束后 150 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min.

② 取上清液 1 mL 于小离心管内,加入 1 mL 乙酰胺内标溶液,用内标法在气相色谱仪上测丙内酰胺(AM)含量<sup>[8]</sup>.

1.2.4 热碱法破壁条件优化 用热碱法水解菌体,水解液中氨基氮含量为主要考察指标,考察 NaOH 用量、作用温度、pH 值、处理时间等对菌体的影响.以 NaOH 用量、作用温度、处理时间为主要影响因素,进行正交实验,优化破壁条件.

1.2.5 酵母浸膏与废弃菌体水解液的不同配比对菌体生长和产腈水合酶的影响 废弃菌体水解液主要是作为氮源再利用,而实验中用于发酵产腈水合酶的诺卡氏菌,发酵原料中有机氮源主要是酵母膏,拟用废弃菌体水解液代替昂贵的酵母膏或部分酵母膏的使用,需要对水解液与酵母膏的配比进行研究.文献[9]报道,在乳酸的发酵生产中,当采用一些廉价的氮源替代酵母膏时通常也难以完全达到酵母膏的发酵特性,只能部分取代酵母膏,因此还必须要添加一定量酵母膏作为氮源用于菌体生长与发酵产酸.所以废弃菌体水解液需要与一定量的酵母膏搭配用于发酵产腈水合酶,废弃菌体水解液与酵母膏的比例成为关键问题.根据热碱法破壁的最优条件处理废弃菌体得水解液,对水解液与酵母膏按不同比例配制发酵培养基,根据发酵液的腈水合酶活力,最终确定废弃菌体水解液与酵母膏的最佳配比.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同破壁方法对废弃菌体水解液中氨基氮含量的影响

分别采用超声波法、冻融法和热碱法 3 种不同方法破碎处理发酵结束后的废弃细胞,根据测定水解液中氨基氮含量的高低,考察 3 种方法的破壁效果.结果见表 1.

表1 3种不同破壁方法的氨基氮含量

破碎方法	超声波法	冻融法	热碱法
氨基氮含量/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	19.6	16.0	21.8

用3种不同的方法处理废弃诺卡氏菌菌体后,用甲醛滴定法测量其氨基氮含量.由表1可知,经热碱法处理的废弃菌体的氨基氮含量最高为21.8 mg · mL<sup>-1</sup>,其次是超声波法和冻融法.而利用超声波破碎细胞时,超声过程产生的化学自由基团易使某些敏感性活性物质变性失活,且工业应用成本高<sup>[10]</sup>;冻融法(物理法)破壁虽然成本低,能完好保存营养成分,但需反复冻融操作,耗时较长且破壁效果差<sup>[11]</sup>.因此,本研究选择用热碱法制备细胞水解液,水解液与酵母膏搭配作氮源用于发酵产胍水合酶.

2.2 热碱法破壁条件优化

选取NaOH加入量、作用温度、处理时间为主要考察因素,选择正交表L<sub>14</sub>(4<sup>3</sup>)来安排实验,并用直观分析法对实验结果进行分析.选取NaOH加入量、作用温度、处理时间作3因素4水平的正交实验,结果见表2~表4.

表2 L<sub>14</sub>(4<sup>3</sup>)正交水平表

水平	因素		
	NaOH加入量/ (g · L <sup>-1</sup> ) A	温度/℃ B	时间/h C
1	0.1	90	1.0
2	0.2	100	1.5
3	0.3	110	2.0
4	0.4	120	2.5

表3 正交试验设计与结果

实验号	因素			氨基氮 含量/ (g · L <sup>-1</sup> )
	NaOH加入量/ (g · L <sup>-1</sup> ) A	温度/℃ B	时间/h C	
1	0.10	90	1.0	16.1
2	0.10	100	1.5	19.6
3	0.10	110	2.0	13.3
4	0.10	120	2.5	14.7
5	0.30	90	1.0	20.3
6	0.30	100	1.5	18.9
7	0.30	110	2.0	15.4
8	0.30	120	2.5	16.1
9	0.50	90	1.0	21.7
10	0.50	100	1.5	24.5
11	0.50	110	2.0	18.2
12	0.50	120	2.5	25.9
13	0.70	90	1.0	23.1
14	0.70	100	1.5	24.5
15	0.70	110	2.0	21.0
16	0.70	120	2.5	21.0

续表3

实验号	因素			氨基氮 含量/ (g · L <sup>-1</sup> )
	NaOH加入量/ (g · L <sup>-1</sup> ) A	温度/℃ B	时间/h C	
K <sub>1</sub>	15.925	20.300	18.550	
K <sub>2</sub>	17.675	21.875	21.700	
K <sub>3</sub>	22.575	16.975	18.900	
K <sub>4</sub>	22.400	19.425	19.425	
R	6.650	4.900	3.150	

表4 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
NaOH加入量/ (g · L <sup>-1</sup> )	135.577	3	59.024	9.280	*
温度/℃	50.317	3	21.906	9.280	*
时间/h	24.102	3	10.493	9.280	*
误差	2.300	3			

由表3可知,以氨基氮含量为指标A>B>C,即碱的加入量>水解温度>水解时间.由表4方差分析可知,碱的加入量、作用温度、处理时间3个因素的影响都具有统计学上显著性意义.所以热碱法破壁的最佳水解条件是:NaOH加入量5 g · L<sup>-1</sup>、水解温度100℃、处理时间1.5 h.

2.3 不同氮源组成对菌体生长和产胍水合酶的影响

废弃菌体破壁条件是:NaOH加入量0.5%,水解温度100℃、水解时间1.5 h.根据水解液的氨基氮含量和酵母膏的氨基氮含量进行对比,得出两者氨基氮含量相同时的当量关系,即确定多少体积的水解液相当于1 g的酵母膏.将水解液以氨基氮的换算关系替代不同比例的酵母膏配制发酵培养基,进行发酵培养测定发酵液的胍水合酶活力.考察酵母浸膏与废弃菌体水解液的不同配比对菌体生长和产胍水合酶的影响,结果见图1.

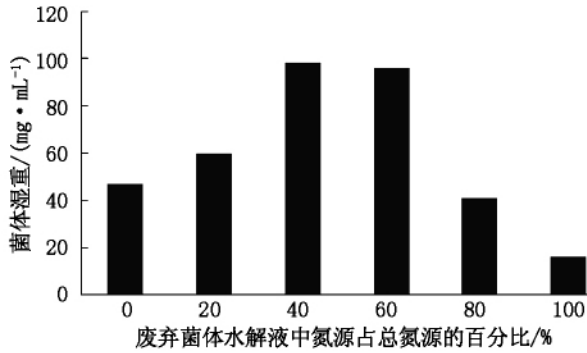


图1 不同氮源组成对菌体生长的影响

从图1可以看出,当废弃菌体水解液中含氮量占培养基中有机氮源含量的0%、20%、40%、60%

时,菌体湿重较大,表明菌体在上述条件下生长良好;当废弃菌体水解液中含氮量占培养基中氮源总含量的100%作为培养基的有机氮源时,菌体湿重大幅减小,表明菌体在上述条件下生长缓慢.因此可以选择废弃菌体水解液中含氮量占培养基中有机氮源含量的0%~80%的配比进行菌体发酵产胍水合酶实验.

在相同总氮添加量条件下,考察酵母膏与水解液的不同配比对胍水合酶产生的影响.使用初始发酵培养基发酵液的酶活是 $1\,055\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,从图2可知酵母膏与水解液的比例是3:2时发酵液酶活明显高于其他比例,也优于初始发酵培养基,胍水合酶活力达到 $1\,063\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;而酵母膏与水解液的配比为1:4时,胍水合酶活力下降.由图2还可以看出,酵母膏与水解液的配比为1:4时,菌体湿重大幅降低,说明此配比对菌体生长和发酵产胍水合酶均不利.尽管菌体水解液可以替代部分酵母膏作氮源,但添加量有限,不能完全替代,可能是水解液中缺少菌体生长和产酶所必须的某些关键因子,相关机理还需进一步研究.经过反复试验验证得出同样的结论,最终确定酵母膏与菌体水解液的最佳配比是3:2.

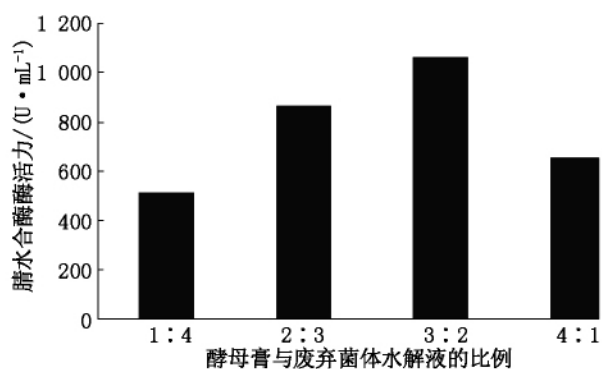


图2 不同氮源组成对菌体产胍水合酶的影响

### 3 结论

分别采用超声破碎、冻融和热碱水解3种方法对废弃菌体进行处理,通过分析测定细胞水解液中氨基氮含量,确定热碱法为最佳破壁方法.通过正交实验对热碱法破壁条件进行优化,得到最佳破壁条件是:NaOH加入量 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,作用温度 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,处理时间 $1.5\text{ h}$ ,水解液中氨基氮含量为 $24.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

用菌体水解液部分替代酵母膏作氮源,考察酵母浸膏与废弃菌体水解液的不同配比对菌体生长和产胍水合酶的影响.研究发现废弃菌体水解液中含氮量占培养基中有机氮源含量的0%~60%,菌体生长良好;酵母膏与水解液的比例是3:2时发酵液酶活明显高于其他比例,也优于初始发酵培养基,胍水合酶活力达到 $1\,063\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而初始发酵培养基为 $1\,055\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,最终确定酵母膏与菌体水解液的最佳配比是3:2.因此,在发酵生产中可以考虑采用废弃菌体水解液部分替代酵母膏作有机氮源用于胍水合酶生产,既可以降低原料成本,又能满足微生物生长代谢的正常需求.

### 4 参考文献

- [1] 白雪飞. 发酵产丁二酸过程中废弃细胞的循环利用[J]. 生物工程学报, 2010, 26(9):1276-1280.
- [2] Tatjana V M, Marica R, Slavica S M. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid protein and carbohydrate recovery [J]. J Serb Chem Soc, 2007, 72(5):451-457.
- [3] 姜岷, 王倩楠, 陈可泉, 等. 啤酒废酵母酶解液作为有机氮源厌氧发酵制备丁二酸的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(10):238-241.
- [4] Lin S K C, Du C, Koutinas A, et al. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *actinobacillus succinogenes* [J]. Biochem Eng J, 2008, 41(2):128-131.
- [5] 王丽娜, 李夏兰. 废弃啤酒酵母细胞提取ADH的研究: 其狭路相逢破碎的研究[J]. 福建化工, 1999(2):9-11.
- [6] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998:119-124.
- [7] 黄伟波. 一株胍水合酶产生菌发酵过程的控制及其酶学性质的研究[D]. 南昌:江西师范大学, 2011.
- [8] 岑沛林, 蔡谨. 工业微生物[M]. 北京:化学工业出版社, 2000.
- [9] 闫宝松, 马凤. 废弃菌渣二次利用及环保处理方法[J]. 中国林副特产, 2005(4):27.
- [10] 修志龙, 姜炜, 苏志国. 细胞破碎技术的研究进展和发展方向[J]. 化工进展, 1994(1):15-21.

## The Research on the Fermentation Production of Nitrile Hydratase by Using Waste Cell Solution as Nitrogen Source

SUN Wan-ju ,WANG Xiao-lan \*

(College of Life Science ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

**Abstract:**The waste cells in fermentative production were often discarded directly ,causing environmental pollution and the waste of resources. Nitrogen source in the waste cell solution can be reused in the production of nitrile hydratase instead of yeast extract when the cell wall was destroyed. Ultrasonic ,freezing and thawing ,and hot alkaline were investigated for cell wall-breaking. The results showed that hot alkaline was more effective for higher amino nitrogen content. The optimum reaction conditions were NaOH  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  , $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  , $1.5 \text{ h}$  ,which is elected by orthogonal experiment ,then the amino nitrogen concentration reached  $24.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The suitable ratio (3:2) was determined through its impact on the nitrile hydratase activity by using waste cell solution replaced a certain amount of yeast extract as nitrogen source. Compared with the original medium's enzyme activity  $1.055 \times 10^7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  whose nitrogen source was complete yeast extract ,the nitrile hydratase activity was  $1.063 \times 10^7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  in the medium containing waste cell solution.

**Key words:**waste cell ;solution ;nitrogen source ;nitrile hydratase

(责任编辑:刘显亮)

(上接第 529 页)

## The Determination for Baicalin in Yinhuang Oral Liquid by HPLC

WEI Guo-bing ,HU Qi-jun ,LIAO Fu-sheng

(Department of Pharmacy ,Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine ,Nanchang Jiangxi 330004 ,China)

**Abstract:**To establish a HPLC method for the determination of baicalin in Yinhuang Oral Solution. The HPLC analysis was carried out on a Kromasil 100-5 ODS2  $\text{C}_{18}$  ( $5 \text{ }\mu\text{m}$   $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ) column with the temperature at the room temperature. The mobile phase was methanol-water-0.1 mol/L phosphoric acid (45.0:55.0:0.2) ,with flow rate of  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ,and the detection wavelength was set at 280 nm for determination of baicalin. The linear range of baicalin was  $0.00272 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.05440 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9991$ ) ,the average recovery this method was 100.07% ,and the RSD was 1.13%. The method is simple ,rapid ,accurate ,and can be used for the quality control of the Yinhuang Oral Solution and its content determination.

**Key words:**HPLC ;Yinhuang Oral Solution ;baicalin ;content

(责任编辑:刘显亮)