

文章编号: 1009-038X(2001)01-0051-04

培养基组成对轮枝链霉菌合成 谷氨酰胺转胺酶的影响

常中义, 江波, 王璋

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 对产谷氨酰胺转胺酶菌种轮枝链霉菌 (*Streptovercillium*) SK-1 的摇瓶条件进行了研究, 结果表明当起始 pH 值为 6.5 ~ 8.0, 氮源、碳源为蛋白胨与甘油, 培养时间为 110 h 时, 酶活最高可达 $1.8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。

关键词: 轮枝链霉菌 谷氨酰胺转胺酶 发酵

中图分类号: Q 753

文献标识码: A

Effect of Culture Medium Composition on the Production of Transglutaminase by *Streptovercillium*

CHANG Zhong-yi, JIANG Bo, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: The culture conditions, including various nitrogen and carbon sources, were investigated for the production of transglutaminase (TGase) by *Streptovercillium* SK-1. The results showed that the activity of $1.8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ was obtained at 110 hrs after inoculation when the initial pH of the culture medium was 6.5 ~ 8.0. Peptone and glycerol served as favorable nitrogen and carbon sources for the strain.

Key words: *Streptovercillium*; Transglutaminase; Fermentation

谷氨酰胺转胺酶 (Transglutaminase, EC 2.3.2.13) 是一种催化酰基转移反应的转移酶, 它可使酪蛋白、肌球蛋白和乳球蛋白等蛋白质分子之间产生交联, 从而改变食品蛋白质的功能性质^[1,2]。1989 年, 日本味之素公司从 6 000 多株轮枝链霉菌中筛选到一株名为 *Streptovercillium* S-1182 的谷氨酰胺转胺酶产生菌, 其酶活达 $2.5 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。谷氨酰胺转胺酶作为一种新型酶制剂, 可用于食品加工以及化妆品等领域。食品经谷氨酰胺转胺酶处理后, 其口感、外观及质构均有提高, 而且谷氨酰胺转胺酶还能延长食品的货架期, 减少食品的致敏性^[1~3]。

工业化规模生产谷氨酰胺转胺酶, 除筛选产酶活力高的菌种外, 研究菌种产酶的最佳培养基和培养条件也是非常重要的。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

轮枝链霉菌: *Streptovercillium* SK-1 作者所在实验室保藏 斜面培养基: 高氏一号培养基, 发酵基础培养基 碳源 20 g/L, 酵母膏 2 g/L, 氮源 60 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L; pH 7.0 培

收稿日期: 2000-05-12 修订日期: 2000-11-22.

作者简介: 常中义 (1968-), 男, 河南洛阳人, 食品科学博士研究生。

万方数据

养条件 :取一环培养 8 d 的斜面孢子,接入装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶,30℃,210 r/min 条件下,培养 5 d,分别测定培养液中谷氨酰胺转氨酶活性、最终 pH 值及菌体干重.

1.2 谷氨酰胺转氨酶活性的测定方法

酶活测定按 Folk 等^[4]所报道的方法进行.以 CBZ-Gln-Gly、羟胺为底物,37℃ 每分钟形成 1 μmol 氧肟酸所需酶量定义为一个酶活单位.

1.3 菌体量的测定

取一定体积的发酵液,用烘干且已称重的滤纸过滤,将滤纸及菌体置于烘箱中,100℃ 烘至恒重,在干燥器中降至室温后称重,然后扣除滤纸质量即为菌体干重^[2].

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基的组成

2.1.1 碳源种类对发酵的影响

不同微生物对碳源的利用情况不同,表 1 列出了常见碳源对菌体生产谷氨酰胺转氨酶和生长的影响.

表 1 各种碳源对菌体产谷氨酰胺转氨酶的影响

Tab.1 Effect of carbon sources on TGase production

碳源	酶活/ (μmol/(min·mL))	生物量/ (g/dL)	最终 pH 值
甘油	1.50	1.883	6.82
果糖	0.40	1.504	6.38
葡萄糖	1.02	1.666	6.89
麦芽糖	0.50	0.900	7.68
蔗糖	0.69	1.201	7.62
糊精	0.44	0.964	7.66
可溶性淀粉	0.43	1.006	8.51

在所测试的碳源中,以甘油为碳源时,菌体生长最好,所产谷氨酰胺转氨酶活性最高,为 1.50 μmol/(min·mL). 单糖类中以葡萄糖所得的谷氨酰胺转氨酶活性最高,为 1.02 μmol/(min·mL). 果糖则不佳,为 0.40 μmol/(min·mL),这与文献^[2,9]报道的结果相同.但也有研究认为轮枝链霉菌发酵产谷氨酰胺转氨酶时,淀粉和葡萄糖为最适碳源^[5~7].

2.1.2 碳源用量对发酵的影响

以甘油为碳源,比较了不同初始甘油质量浓度对菌体生长和产酶的影响,结果见表 2.

表 2 初始甘油质量浓度对产酶的影响

Tab.2 Effect of glycerol concentration on TGase production

甘油质量浓度/ (g/dL)	酶活/ (μmol/(min·mL))	生物量/ (g/dL)	最终 pH 值
1	0.59	1.664	6.75
2	1.50	1.883	6.82
3	1.03	1.908	6.14
4	0.45	1.982	6.00

从表 2 可以看出,随着甘油质量浓度的增加,细胞干重不断增加,酶活随着甘油质量浓度的增加而增加,当甘油质量浓度为 2 g/dL 时酶活达到最大值,为 1.50 μmol/(min·mL). 然后,随着甘油质量浓度的继续增大,酶活却逐渐下降,这说明谷氨酰胺转氨酶的合成可能受碳源分解代谢物阻遏效应^[8].

2.1.3 氮源种类对发酵的影响

作者对几种常见的氮源对菌体产酶的影响进行了研究,结果见表 3.

表 3 培养基的不同氮源组成对产酶的影响

Tab.3 Effect of nitrogen sources on TGase production

氮源*	酶活/ (μmol/(min·mL))	生物量/ (g/dL)	最终 pH 值
酵母膏	1.01	1.608	6.52
牛肉膏	0.75	1.588	7.24
鱼蛋白胨	1.50	1.842	6.71
玉米浆	0.54	1.388	6.41
豆饼粉	0.97	未测	6.42
酪蛋白	0.73	1.378	5.93
硫酸铵	0	0.202	6.20
硝酸钾	0	0.368	6.81

注 硫酸铵、硝酸钾用量均为 1%,其余均为 6%.

当采用蛋白胨作为氮源时,酶活较高,为 1.50 μmol/(min·mL) 其次是酵母膏,为 1.01 μmol/(min·mL) 蛋白胨和酵母膏的混合氮源产酶最高,为 1.56 μmol/(min·mL). 当采用无机氮源硫酸铵或硝酸钾时,菌体不产酶,且影响菌体的生长.但来源不同的菌株,产酶的最适氮源可能有所差异,对于肉桂轮枝链霉菌,酪蛋白是最好的氮源^[9].

2.1.4 氮源用量对发酵的影响 在发酵基础培养基上添加不同量的蛋白胨进行实验,结果见表 4. 随着蛋白胨质量浓度的增加,其酶活逐渐增加,生物量亦逐渐增大;当蛋白胨质量浓度为 5 g/dL 时,酶活最高,为 1.52 μmol/(min·mL). 其后,随着蛋白胨质量浓度的增加,酶活有所下降.

表 4 蛋白胨用量对发酵结果的影响

Tab.4 Effect of peptone concentration on TGase production

蛋白胨/ (g/dL)	酶活/ ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)	生物量/ (g/dL)	最终 pH 值
1	0	1.041	6.20
2	0.15	1.464	6.28
3	1.27	1.603	6.42
4	1.31	1.784	6.53
5	1.52	1.809	6.71
6	1.47	1.904	6.68

2.2 谷氨酰胺转氨酶摇瓶发酵条件

2.2.1 装液量对谷氨酰胺转氨酶发酵的影响

供氧状况会直接影响菌体生长代谢及调控方式,从而影响其产酶.作者采用不同装液量来考察供氧状况对产酶的影响,结果如表 5.

表 5 装液量对发酵的影响

Tab.5 Effect of liquid volume in flask on TGase production

装液量*/ mL	酶活/ ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)	生物量/ (g/dL)	最终 pH 值
25	1.58	1.861	6.73
50	1.25	1.784	7.02
75	0.68	1.282	6.60

注 所用摇瓶均为 250 mL 三角瓶,酶活测定之前,均恢复到原体积.

实验结果表明,装液量越大,生物量越小,酶活越低,说明该菌产酶受通风影响较大,这与文献[2]报道的结果相同.

2.2.2 初始 pH 值对谷氨酰胺转氨酶发酵的影响

不同初始 pH 值培养基对谷氨酰胺转氨酶产量的影响见图 1. 初始 pH 值为 7 的培养液,最终谷氨酰胺转氨酶活性及菌体量均最高. pH 值低于 7 时, pH 值愈低,菌体生长愈差,产酶量也越少;尤其在 pH 值低于 5 时,菌体量明显减少.反之,在 pH 值高于 7 时,随着 pH 值的增加,其最终菌体量及谷氨酰胺转氨酶活性减少程度比酸性状况的变化缓和.实验显

示在起始 pH 值为 6.5~8.0 的培养液中,菌体生长及酶活均良好.

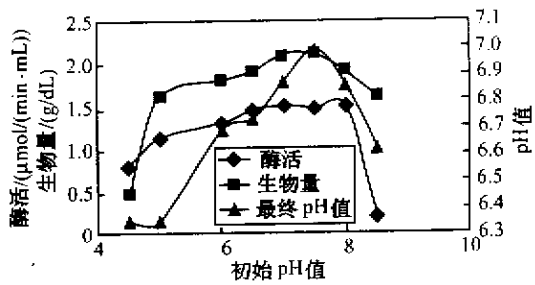


图 1 培养液初始 pH 对轮枝链霉菌 SK-1 产酶的影响

Fig.1 Effect of medium pH on TGase production

2.3 谷氨酰胺转氨酶摇瓶发酵过程曲线

图 2 为轮枝链霉菌的摇瓶发酵过程曲线.菌体生长与酶的产生呈正相关性,培养液中酶的活性在培养 110 h 达最高峰,为 $1.8 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$.此时菌体生长从指数生长末期进入静止期,培养液的 pH 值先下降,随后上升,酶活也随之上升,这与 Ando^[2]等所得结果不同. Ando 等发现菌体进入静止期之后,才产生谷氨酰胺转氨酶,故认为和菌体生长无关.

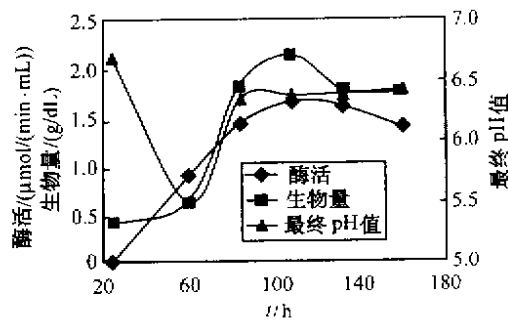


图 2 轮枝链霉菌 SK-1 的产酶进程曲线

Fig.2 Time course of batch culture

作者报道的轮枝链霉菌 SK-1 产酶的最高酶活达 $1.8 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,与 Ando^[5]等所用菌株的谷氨酰胺转氨酶产量($2.5 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)相近.希望通过诱变等提高谷氨酰胺转氨酶的产量.

参考文献：

[1] ZHU Y, RINZEMA A. Microbial transglutaminase – a review of its production and application to food processing[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44 :277 ~ 282.

[2] 吴介文,蔡国珍,江善宗. 谷氨酰胺转氨酶生产菌株之筛选及影响产量之因子之探讨[J]. 中国农业化学会志(台湾), 1996, 34 :228 ~ 240.

[3] 王建新编著.天然活性化妆品[M].北京:中国轻工业出版社,1997.

- [4] FOLK J E, COLE P W. Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase[J]. **J Biol Chem**, 1966, 241 :5518 ~ 5525.
- [5] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, *et al*. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. **Agric Biol Chem**, 1989, 53 :2613 ~ 2617.
- [6] ANDO H, MATSURA A, SUSUMU H. Manufacture of transglutaminase with Streptomyces [P]. **日本专利**:JP 02286031,
- [7] MASAO M, ATSUSHI O, *et al*. Transglutaminase[P]. **美国专利**:US 5156956, 1992-10-20.
- [8] 张树政主编. 酶制剂工业上册[M]. 北京 科学技术出版社, 1989.
- [9] JUNQUA M, DURAN R, GANCET C. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1997, 48 :730 ~ 734.

(责任编辑 朱 明)