

文章编号 :1009-038X(2004)04-0078-04

Zn^{2+} 对轮枝链霉菌 SK4.001 生长及 转谷氨酰胺酶合成的影响

曾 新 , 江 波^{*} , 王 璋

(江南大学 食品学院 江苏 无锡 214036)

摘 要 :研究了 Zn^{2+} 在 SK4.001 发酵生产转谷氨酰胺酶中的作用. 在发酵培养基中加入不同质量浓度的 Zn^{2+} ,检测菌体量、pH、残余甘油及转谷氨酰胺酶(TGase)酶活的变化,发现 Zn^{2+} 在 SK4.001 发酵生产转谷氨酰胺酶中除满足菌体生长需要外,还具有提高转谷氨酰胺酶酶活的作用. 发酵培养基中含有 $3.15\ \mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} 时,菌体生长正常,菌体量较高;当 Zn^{2+} 质量浓度增加到 $8.15\ \mu\text{g/mL}$ 时,菌体量改变不明显,但转谷氨酰胺酶酶活迅速上升,达到 $4.723\ \text{U/mL}$,是 Zn^{2+} 质量浓度为 $3.15\ \mu\text{g/mL}$ 时的 2.06 倍.

关键词 :轮枝链霉菌 ; 转谷氨酰胺酶 ; Zn^{2+}

中图分类号 :Q 556.2

文献标识码 :A

The Effects of Zn^{2+} on Transglutaminase Production from *Streptoverticillium* SK4.001

ZENG Xin , Jiang Bo^{*} , WANG Zhang

(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : The effects of Zinc ion on SK4.001 growth and microbial Transglutaminase (TGase) production were investigated. The changes of biomass , pH values and residual glycerol concentration at different initial Zinc ion concentration in the process of TGase fermentation were discussed. The results showed that Zinc ion had significant effects on the TGase production. $8.15\ \mu\text{g/mL}$ initial Zinc ion concentration was appropriate for TGase fermentation. The dry cell weight (DCW) and TGase activity reached $17.11\ \text{mg/mL}$ and $4.723\ \text{U/mL}$ respectively. When the zinc ion concentration in fermentation broth increased from $3.15\ \mu\text{g/mL}$ to $8.15\ \mu\text{g/mL}$. The TGase activity increased 2.06 times.

Key words : *Streptoverticillium* SK4.001 ; transglutaminase(TGase) ; zinc ion

转谷氨酰胺酶(Transglutaminase ,EC 2.3.2.13 ,简称 TGase)是一种催化酰基转移反应的转移酶^[1] ,它能使酪蛋白、乳球蛋白、肌球蛋白、面筋蛋白等蛋白质之间产生交联,从而改变蛋白质的功能

性质^[2,3] ,因而在食品工业中有良好的应用前景.但动物和植物组织来源的转谷氨酰胺酶成本较高,阻碍了它在食品工业中的进一步推广^[1].

1989 年日本味之素公司和天野制药公司从

收稿日期 2003-07-29 ; 修回日期 2003-11-06.

作者简介:曾新(1976-)男,湖北黄冈人,食品科学与工程硕士研究生; * 通讯作者.

万方数据

5 000多株放线菌中筛选出产转谷氨酰胺酶活力较高的轮枝链霉菌,开创了微生物 TGase 的发酵法生产^[4]。随后许多学者致力于微生物 TGase 的发酵生产研究:1996 年 Zhu 等^[5]运用黑箱模型设计优化了 *Streptovercillium* 的产酶培养基;1997 年 Junqua 等^[6]运用试验设计方法优化了培养基;1996 年吴介文^[7]提出蛋氨酸或甘氨酸有利于 TGase 的产生;1998 年 Zhu 等^[8,9]运用质量平衡理论分析了 *Streptovercillium* 发酵中氨基酸的代谢情况,提出流加硫酸铵促进产酶的方法;2001 年常中义等^[10]提出人造沸石可解除铵离子的阻遏作用,从而提高产酶;2002 年郑美英等^[11]研究了 pH 值控制在微生物 TGase 发酵生产中的应用。

在对 SK4.001 发酵生产转谷氨酰胺酶的研究中,发现存在酶活不稳定的问题。在分别研究了菌种(包括菌种的传接代数、保存方式、接种量等)、氮源、水质等对转谷氨酰胺酶合成的影响后发现:发酵培养基中金属离子的质量浓度是影响转谷氨酰胺酶合成的一个主要因素。作者重点研究了 Zn^{2+} 对菌株 SK4.001 发酵生长及转谷氨酰胺酶合成的影响,并运用螯合剂 EDTA 对酶液进行透析的方法初步研究了 Zn^{2+} 的作用机理。

1 材料与方法

1.1 菌种

轮枝链霉菌(*Streptovercillium*)SK4.001,由江南大学食品科学教研室保存。

1.2 培养基

- 1) 斜面培养基:高氏一号培养基。
- 2) 种子培养基(组分 g/L):甘油 20,蛋白胨 20,酵母浸膏 2,硫酸镁 2,磷酸氢二钾 2。
- 3) 发酵培养基(组分 g/L):甘油 20,蛋白胨 25,酵母浸膏 2,硫酸镁 2,磷酸氢二钾 2,人造沸石 10。

1.3 实验方法

1.3.1 培养方法 以上各培养基均于 121 ℃ 灭菌 20 min 后使用。取一环新鲜斜面菌种,接入装有 25 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中,在 30 ℃ 210 r/min 的条件下培养 24 h。以体积分数 4% 的接种量接入 25 mL 发酵培养液中,在 30 ℃ 210 r/min 的条件下连续培养 60 h。

发酵培养基用去离子水配制,加入不同量的 ZnSO_4 使发酵培养基中 Zn^{2+} 含量达到目的添加量,然后进行连续发酵培养。

1.3.2 EDTA 透析 根据文献[13],针对转谷氨

酰胺酶作一些改动。室温下,25 mL 酶液于 10 mmol/L EDTA, pH 7.0 的 0.05 mol/L Tris-HCL 缓冲液中透析 2 h,置于含 1 mmol/L EDTA 缓冲液中于 4 ℃ 透析过夜,再用不含 EDTA 的缓冲液反复透析,脱去多余的 EDTA 和 EDTA 的螯合物。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体量的测定 取定量体积的发酵液,离心,将沉淀部分加入 30 倍水和 6 mL 1 mol/L 盐酸,激烈搅拌后,加 4 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液,2 500 r/min 离心 10 min,用水洗沉淀,用已恒重的滤纸过滤,置于 100 ℃ 烘箱中加热至恒重。在干燥器中降至室温后称重,减去滤纸质量即为菌体干重^[10],以 mg/mL 计。

1.4.2 TGase 酶活测定 采用比色法测定。以苯甲基氧化碳酸酯-L-谷氨酰胺甘氨酸(CBZ-Gln-Gly)为作用底物,以 L-谷氨酸-γ-单羟氨酸作标准曲线^[4]。定义 37 ℃ 时 1 min 生成 1 μmol L-谷氨酸-γ-单羟氨酸的量为一个酶活单位。

1.4.3 残余甘油测定 改进的多元醇比色法^[14]。

1.4.4 Zn^{2+} 质量浓度的测定 原子吸收分光光度法^[12]。

2 实验结果

2.1 Zn^{2+} 对轮枝链霉菌 SK4.001 生长的影响

2.1.1 Zn^{2+} 对生物量的影响 由表 1 可以看出: Zn^{2+} 质量浓度由 0 μg/mL 增加到 1 μg/mL 时,生物量增加很快;从 10.23 mg/mL 增加到 15.60 mg/mL,生物量增加超过 50%;当质量浓度增加到 3 μg/mL 时,生物量略有增长,达到 16.99 mg/mL。再进一步增加 Zn^{2+} 质量浓度,生物量的改变不明显。

表 1 不同 Zn^{2+} 添加量下生物量的变化

Tab.1 Effect of Zn^{2+} concentration on the biomass	
Zn^{2+} 添加量/(μg/mL)	细胞干重/(mg/mL)
0	10.23
1	15.60
3	16.99
6	16.95
8	17.11
9	17.09

2.1.2 Zn^{2+} 对甘油消耗量的影响 Zn^{2+} 对甘油消耗量的影响见图 1。当 Zn^{2+} 缺乏时,甘油的利用并不十分完全。发酵 60 h 后,残余甘油的质量浓度为

2.56 mg/mL. 在起始培养基中加入 Zn^{2+} 后,甘油的代谢利用率明显增加. 当 Zn^{2+} 质量浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 时,发酵 36 h 后残余甘油的质量浓度为 0.076 mg/mL. 之后发酵液中残余甘油质量浓度相对稳定,维持在 0.078 mg/mL 左右. Zn^{2+} 质量浓度为 3, 6, 8, 9 $\mu\text{g/mL}$ 时,底物甘油代谢没有明显的区别,

均在 32 h 达到最低,发酵液中残余甘油的最低质量浓度维持在 0.045 mg/mL 左右.

2.1.3 Zn^{2+} 对 pH 值的影响 Zn^{2+} 对 pH 值的影响见图 2. 当 Zn^{2+} 缺乏时, pH 值呈下降趋势,改变幅度不大. 含有 Zn^{2+} 时,发酵液的 pH 值先下降后上升,不同质量浓度 Zn^{2+} 的区别并不明显.

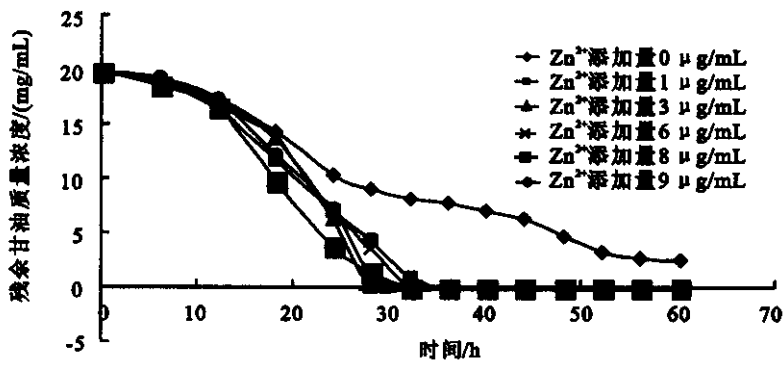


图 1 残余甘油含量 - 时间曲线

Fig.1 Time course of residual glycerol concentration

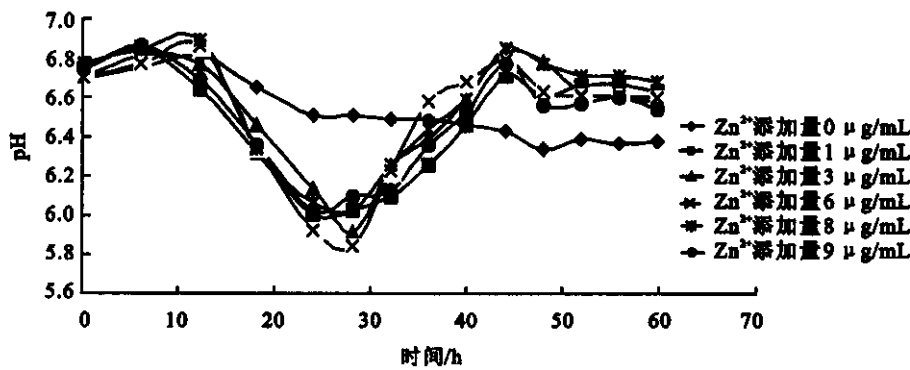


图 2 pH - 时间曲线

Fig.2 Time course of pH value

2.2 Zn^{2+} 对轮枝链霉菌 SK4.001 产转谷氨酰胺酶的影响

当 Zn^{2+} 缺乏时,菌株 SK4.001 对甘油的利用不完全, pH 值的变化与含有 Zn^{2+} 的区别明显,发酵液中转谷氨酰胺酶的酶活极低,检测不出. Zn^{2+} 质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时,转谷氨酰胺酶酶活仍较低,随着 Zn^{2+} 质量浓度的增加,酶活增加. 当 Zn^{2+} 质量浓度达到 8 $\mu\text{g/mL}$ 时,酶活最高. 再增加 Zn^{2+} 质量浓度,酶活的改变并不很明显(见图 3). 考虑到毒理因素及 Zn^{2+} 对转谷氨酰胺酶活性的抑制作用,不再进一步增加 Zn^{2+} 的质量浓度.

2.3 发酵培养基中 Zn^{2+} 最佳质量浓度的确定

发酵培养基中的 Zn^{2+} 除了来源于添加的锌盐,培养基成分(蛋白胨、酵母浸膏等)也会带入一部分 Zn^{2+} ,故采用下述方法确定发酵培养基中 Zn^{2+} 的最佳质量浓度.

万方数据

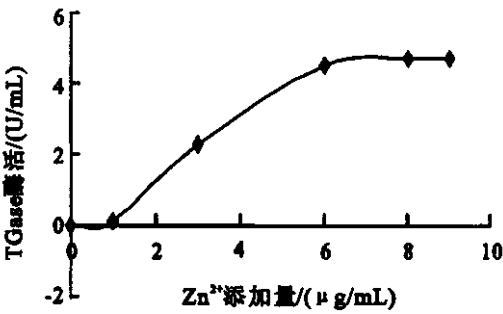


图 3 Zn^{2+} 对 TGase 酶活的影响曲线

Fig.3 TGase activities at different Zn^{2+} concentrations

用去离子水配制发酵培养基,取 2 g 先在电炉上炭化至无烟,然后放入马福炉中高温灼烧(500 ~ 550 $^{\circ}\text{C}$),溶于去离子水,定容至 25 mL,制得检测样.检测其中 Zn^{2+} 质量浓度为 0.152 $\mu\text{g/mL}$,此为其它来源的 Zn^{2+} 质量浓度,即保证 SK4.001 生长正常并获得较高 TGase 酶活的 Zn^{2+} 最佳质量浓度应为 8.15 $\mu\text{g/mL}$.

2.4 螯合剂 EDTA 对转谷氨酰胺酶酶活的影响

表 2 表明 ,EDTA 对酶活并无明显负面影响 ,酶活的稍许下降可能与发酵液的不同保存环境及检测时的误差有关.

表 2 EDTA 对酶活的影响

Tab.2 Effect of EDTA on TGase activity

发酵液	TGase 酶活/(U/mL)
原发酵液	4.776
经 EDTA 透析处理后的发酵液	4.563

3 结 论

1) 欲保证 SK4.001 的正常生长 ,并获得较高的生物量 ,发酵培养基中 Zn^{2+} 的起始质量浓度不应低于 $3.15\text{ }\mu\text{g/mL}$. 进一步增加 Zn^{2+} 的质量浓度可提高 TGase 的酶活. $8.15\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 Zn^{2+} 可使 SK4.001 的发酵获得最高的 TGase 酶活 ,达到 4.723 U/mL .

参考文献 :

[1] Zhu Y , Rinzema A , Tramper J. Microbial transglutaminase-a review of its production and application to food processing[J]. **Appl Microbial Biotech** ,1995 44 :277 -282.

[2] De Jong G A H , Koppelman S J. Transglutaminase catalyzed reaction :impact on food applications[J]. **J Food Science** ,2002 , (2) 2798 -2806.

[3] Nonaka M , Tanaka H , Okiyama A. *et al.* Polymerization of several proteins by Ca^{2+} independent transglutaminase derived from microorganism[J]. **Agric Biol Chem** ,1989 53 :2619 -2623.

[4] Ando H , Adachi M , Umeda K. *et al.* Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganism [J]. **Agric Biol Chem** ,1989 53 :2613 -2617.

[5] Zhu Y , Rinzema A , Tramper J , *et al.* Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*[J]. **Biotechnol Bioeng** ,1996 ,50 :291 -298.

[6] Junqua M , Duran R , Gancet C. *et al.* Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs[J]. **Appl Microbial Biotech** ,1997 48 :730 -734.

[7] 吴介文 ,蔡国珍 ,江善宗. 谷氨酰胺转胺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(2) :228 -240.

[8] Zhu Y , Rinzema A , Tramper J , *et al.* Microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense* :analysis of amino acid metabolism using mass balances[J]. **Enzyme and Microbial Technology** ,1998 23 :216 -226.

[9] Zhu Y , Rinzema A , Tramper J , *et al.* Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*[J]. **Appl Microbio Biotechlo** ,1998 49 :251 -257.

[10] 常中义. 轮枝链霉菌谷氨酰胺转胺酶的生物合成及其对草鱼鱼糜制品品质构的影响 [D]. 无锡 :江南大学 ,2001.

[11] Zheng Meiyang , Du Guocheng , Chen Jian. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovorticillium mobaraense*[J]. **Enzyme and Microbial Technology** ,2002 31 :477 -481.

[12] 张正奇. 分析化学 [M]. 北京 :科学出版社 ,2001.

[13] Eckhard K , Loffler H G. Studies on the $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ exchange with aminoacylase from pig kidney[J]. **Z Natureforsch** ,1981 ,30C :951 -955.

[14] Song H B , Arnold L D. An improved colorimetric assay for polyols[J]. **Anal Biochem** ,1977 81 :18 -20.

[15] 杨频 ,高飞. 生物无机化学原理 [M]. 北京 :科学出版社 ,2002.

2) 金属离子常在酶蛋白中起到稳定结构和作为活性中心的作用 ,或兼而有之^[15]. Zn^{2+} 在生物大分子中与肽链作用形成稳定的共价化合物十分常见. 但发酵液的 EDTA 透析表明 ,TGase 的酶活并没有明显受到 EDTA 影响 ,即 Zn^{2+} 并不是 TGase 的构成部分或活性中心 ,这一结论与 Ando 等^[4]人的研究结果是一致的.

3) Zn^{2+} 在 SK4.001 发酵生产转谷氨酰胺酶的发酵培养基中质量浓度为 $3.15\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时 ,即可获得较高菌体量 ,为 17.11 mg/mL . 进一步提高 Zn^{2+} 的质量浓度 ,菌体量增加不明显 ,但转谷氨酰胺酶的酶活迅速提高. 发酵培养基中 Zn^{2+} 的质量浓度为 $8.15\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时 ,转谷氨酰胺酶的酶活可达到 4.723 U/mL ,是 Zn^{2+} 质量浓度为 $3.15\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时的 2.06 倍. 因此可以确定 Zn^{2+} 不是 TGase 的组成部分或活性中心 ,有关 SK4.001 发酵生产 TGase 中 Zn^{2+} 提高酶活的作用机理仍有待进一步研究.