

文章编号: 1001-7453(1999)03-0037-05

发酵生产谷氨酰胺转胺酶的摇瓶条件

郑美英, 堵国成, 陈 坚

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 在摇瓶条件下, 以淀粉为碳源, 蛋白胨及酵母膏为氮源, 对 *Streptoverticillium mobaraense* 生产谷氨酰胺转胺酶 (MTG) 的摇瓶发酵条件进行了探索. 研究表明, 发酵法生产谷氨酰胺转胺酶的适宜初始 pH 值、淀粉质量浓度、接种量分别为 6.1, 2 g/dL, 10%; MTG 酶活最高可达 1.83 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$. 初始加入硫酸铵对菌体生长影响不大, 但对 MTG 的合成却产生抑制作用; 初始加入纯氨基酸及胱氨酸母液不利于 MTG 酶活的提高.

关键词: 茂原链轮丝菌; 谷氨酰胺转胺酶; 摇瓶发酵

中图分类号: TQ920.1 文献标识码: A

微生物谷氨酰胺转胺酶 (microbial transglutaminase, EC 2.3.2.13, 简称 MTG) 由于能催化许多食品中蛋白质的交联反应, 改善各种蛋白质的功能性质, 因而在食品工业领域具有广泛的应用潜力^[1], 引起了人们的极大兴趣. 目前, 商业化的谷氨酰胺转胺酶主要从动物组织中获取^[2], 但其价格昂贵. 20世纪80年代末, Ando 和 Motoki 等人首先报道了利用微生物发酵法生产谷氨酰胺转胺酶^[3,4], 其中 Ando 等人从筛选的 5 000 多菌株中发现 *Streptoverticillium mobaraense* 等能够生产这种酶. 近年来, 国外加快了微生物发酵法生产谷氨酰胺转胺酶的研究, 并使之应用于食品工业. 国内有关这方面的研究目前尚未见报道.

作者以 *Streptoverticillium mobaraense* 为出发菌株, 以提高酶活为研究目标, 对 MTG 的摇瓶发酵条件, 包括 pH 值、初始淀粉质量浓度、接种量等进行了研究, 并对氨基酸的影响及发酵过程进行分析.

1 材料与方法

1.1 菌种

茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) WSH-Z2 (本研究室保藏号)

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 麦汁 (10 B⁰), 琼脂 (2 g/dL); pH 7.0

1.2.2 氨基酸液 见文献 [5].

1.2.3 胱氨酸母液中氨基酸含量 用氨基酸分析仪测得 (g/L): 天冬氨酸 (Asp) 1.54, 苏氨

收稿日期: 1998-11-15; 修订日期: 1999-05-21

作者简介: 郑美英 (1976年1月生), 女, 江苏泰州人, 博士研究生.

酸 (Thr) 2.26, 丝氨酸 (Ser) 4.23, 谷氨酸 (Glu) 1.60, 甘氨酸 (Gly) 3.69, 丙氨酸 (Ala) 4.05, 缬氨酸 (Val) 2.05, 甲硫氨酸 (Met) 1.46, 异亮氨酸 (Ile) 1.62, 亮氨酸 (Leu) 4.91, 酪氨酸 (Tyr) 1.64, 苯丙氨酸 (Phe) 2.32, 赖氨酸 (Lys) 2.21, 组氨酸 (His) 1.45, 精氨酸 (Arg) 4.06, 脯氨酸 (Pro) 2.62.

1.2.4 种子培养基 组成 (g/L): 淀粉 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 2, 硫酸镁 1, 磷酸二氢钾 1; pH 7.0.

1.2.5 发酵培养基 同种子培养基.

1.3 培养方法

摇瓶培养: 接一环生长良好的斜面培养物至装有 75 mL 种子培养基的 500 mL 容积三角瓶中培养, 摇瓶转速 200 r/min, 温度 30°C. 培养 40 h 后, 按 10% 的接种量接入发酵瓶中, 500 mL 的三角瓶装液量为 50 mL, 摇瓶转速 200 r/min, 温度 30°C.

1.4 分析方法

1.4.1 菌体细胞生长量测定 取发酵液 5 mL, 6 000 r/min 离心 5 min, 蒸馏水水洗 2 次, 105°C 干燥至衡重后称重.

1.4.2 MTG 酶活性测定 比色法^[6].

1.4.3 残糖测定 改进蒽酮法^[7].

1.4.4 氨基酸测定 氨基酸分析仪测定.

2 结果与讨论

2.1 MTG 合成的摇瓶发酵条件

2.1.1 种子培养 为了获得数量较多、活力强盛的菌体细胞以缩短发酵延滞期, 在发酵前期对种子进行预培养, 以提高生产强度, 获得生产菌生长优势, 减少杂菌污染的可能性. 适宜的种龄应是菌体处于生长的旺盛期, 这时将种子培养物接入发酵液, 可使细胞活力较高, 又可在同等接种量的情况下获得较多的细胞数目.

笔者考察了茂原链轮丝菌 WSH-Z 在加入和不加入氨基酸情况下的生长情况, 从图中可以看出, 培养基中未加入纯氨基酸和胱氨酸母液的种子在 20 h 后生长速率明显高于培养基中加入纯氨基酸或胱氨酸母液的种子, 在 44 h 后菌体干重 (DCW) 开始下降. 显微镜观察培养 30~44 h 后的种子发现, 这时种子菌丝呈网状, 且菌丝粗壮, 细胞处于生长旺盛期. 所以, 以后的研究均取培养 30~44 h 后的种子进行发酵.

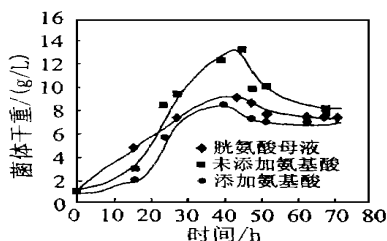


图 1 茂原链轮丝菌 WSH-Z 的菌丝生长曲线

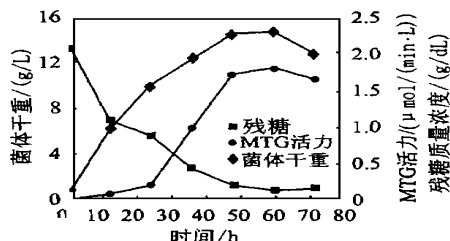


图 2 MTG 摇瓶发酵过程曲线

2.1.2 pH 值对菌体生长和 MTG 合成的影响 通过采用不同初始 pH 值的培养基, 比较

其对菌体生长和 MTG 合成的影响, 结果见表 1. 在 pH 值 6.1~7.3 范围内, 菌体生长和产物的合成均受 pH 值的影响, 并且在自然 pH 值 6.1 时, 细胞干重和 MTG 的酶活达到了最大值. 由此可见, 在上罐发酵过程中应控制较佳的 pH 值, 使 DCW 和 MTG 的酶活都达到较高水平.

表 1 pH 对菌体生长和 MTG 酶活的影响

pH 值	DCW / (g/L)	残糖 %	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$)
6.1	14.6	0.24	1.86
6.3	11.3	0.15	1.47
6.5	12.0	0.19	1.55
6.7	11.6	0.18	1.50
7.0	12.3	0.20	1.60
7.3	11.0	0.17	1.43

2.1.3 接种量对菌体生长和 MTG 合成的影响 接种量对菌体生长和 MTG 合成的影响见表 2. 随着接种量的增大, 菌体生长量和 MTG 酶活均增加, 残糖变化并不显著. 当接种量

表 2 接种量对菌体生长和 MTG 酶活的影响

接种量 %	DCW / (g/L)	残糖 %	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$)
7	10.2	0.25	0.82
10	11.6	0.18	1.54
13	12.0	0.17	1.59
16	12.8	0.15	1.66
20	13.3	0.13	1.78

从 7% 增大到 10%, 酶活增加近一倍; 但当接种量从 10% 增大到 20%, 酶活及菌体干重增加并不显著. 在实际上罐发酵时, 过高的接种量, 使实际操作较为困难, 也增加了染菌的可能性, 并且对设备的要求

更高. 接种量过低, DCW 和 MTG 酶活均较低, 因此从表 2 可以看出, 在实际上罐发酵时, 较适宜的接种量为 10% 左右.

2.1.4 淀粉初始质量浓度对菌体生长及 MTG 酶活的影响 在未添加氨基酸液的情况下, 比较了摇瓶发酵中不同初始淀粉质量浓度对 MTG 酶活的影响, 从表 3 可见, 初始淀粉质量

表 3 初始淀粉质量浓度对菌体生长和 MTG 酶活的影响

淀粉 / (g/dL)	DCW / (g/L)	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$)	残糖 %
1	6.2	0.8	0
2	12.3	1.65	0.19
3	11.9	1.58	1.23
4	10.8	1.23	2.14
5	10.0	0.98	3.17
6	9.3	0.75	4.30

浓度为 1 g/dL 时, DCW 和 MTG 酶活均较低. 随着淀粉质量浓度的增高, DCW 增加到 12.3 g/L 后逐渐降低, MTG 酶活达到 1.65 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 后也逐渐降低. 由此说明过高的淀粉质量浓度, 对菌体生长产生了一定的抑制作用,

也不利于 MTG 的合成, 故淀粉质量浓度以 2 g/dL 较为适宜.

2.1.5 硫酸铵初始质量浓度对菌体生长及 MTG 酶活的影响 以淀粉为碳源, 硫酸铵为无机氮源, 比较了不同起始硫酸铵质量浓度对菌体生长和 MTG 合成的

表 4 初始碳酸铵质量浓度对 MTG 酶活的影响

硫酸铵 / (g/dL)	DCW / (g/L)	残糖 %	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$)
0	12.3	0.31	1.60
0.2	12.6	0.131	0.82
0.3	13.4	0.125	1.03
0.4	12.8	0.150	1.29
0.5	13.3	0.137	0.93
0.6	12.9	0.160	0.60

影响, 从表 4 可以看出, 在发酵初始加入硫酸铵, 细胞的生长量并未增加, 但 MTG 的合成受到抑制, 并且随着加入硫酸铵质量浓度的增加, MTG 的酶活逐步下降; 在发酵初

始未加入硫酸铵, 酶活明显高于其它加入硫酸铵的发酵结果, 达到 1.60 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$.

2.2 氨基酸对菌体生长及 MTG 酶活的影响

MTG 是由 331 个氨基酸残基构成的单多肽链, 各氨基酸组成见文献 [8], 其中 Asp, Glu, Ser, Pro 等 8 种氨基酸的序列达到 20 个以上, Thr, Gln, Val 等 7 种氨基酸的序列在 10~

20之间,剩下5种氨基酸的在10个以下,可见氨基酸在MTG的合成过程中起着重要的作用。因此为了确定在摇瓶过程中补加氨基酸能否提高酶活,作者采用了文献[5]报道的外加入纯氨基酸溶液以及富含氨基酸的胱氨酸母液的发酵培养基进行摇瓶培养。结果如表5所示。

从表5可以看出,发酵培养基中未添加氨基酸液时,MTG酶活高于添加氨基酸液或胱氨酸母液的情况,达到 $1.65 \mu\text{mol}/(\text{min mL})$,DCW亦最高,达 12.5 g/L 。其中原因之一是

表5 氨基酸对菌体生长及MTG酶活的影响

氮源	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min mL})$)	DCW / (g/L)
未添加氨基酸	1.65	12.5
纯氨基酸液	0.99	12.0
胱氨酸母液	1%	7.3
	2%	8.7
	3%	7.1

在发酵最后阶段,发酵液中除了Ser、Met外,其它游离氨基酸量均较少,如表6表7所示,尽管添加了一定组成的氨基酸,但发酵液中Thr、Glu、Pro等在MTG序列中占有重要比例的氨基酸仍然缺乏;对胱氨酸母液,由于缺

乏Trp,表6表显示36h后也无Trp,而Trp在MTG中占有重要的比例,正是由于某些氨基酸的缺乏,阻碍了微生物的生长和MTG的合成。原因之二是由于MTG的交联性质,添加的游离氨基酸与蛋白质及水解蛋白质和多肽的酶之间发生交联的机会增多,所以阻碍了微生物对这些蛋白质的进一步利用,并且水解蛋白质及多肽的酶被交联后,不能继续将蛋白质和多肽水解成游离氨基酸(从表6表可以看出,发酵液中结合氨基酸较多,游离氨基酸较少,菌体不能利用这些结合氨基酸),所以添加了游离氨基酸后,菌体原有对蛋白质及多肽的利用率降低,影响了微生物的生长,阻碍了MTG的合成,所以酶活较低。

表6 摇瓶发酵过程结合氨基酸质量浓度的变化 (mg/L)

氨基酸	发酵时间 /h						
	0	12	24	36	48	60	72
Asp	1306	1143	1264	1294	1284	1265	1273
Thr	620	530	464	450	423	403	410
Ser	565	406	416	457	389	417	480
Glu	2614	2044	1940	1550	1351	1250	1278
Gly	1290	1112	1115	1071	965	872	885
Ala	1258	-	776	738	649	591	604
Val	751	567	439	420	380	335	331
Met	464	381	275	208	171	167	179
Ile	556	427	312	303	274	239	234
Leu	1142	778	423	399	339	314	323
Tyr	402	341	283	139	137	132	134
Phe	525	425	340	223	201	180	180
Lys	1121	932	702	629	576	526	522
His	273	218	178	167	152	150	157
Arg	842	407	395	350	322	300	313
Pro	822	630	656	641	572	518	538
Cys	-	97	62	67	73	71	74

表7 摇瓶发酵过程游离氨基酸质量浓度的变化 (mg/L)

氨基酸	发酵时间 /h						
	0	12	24	36	48	60	72
Asp	36	7	8	8	9	19	20
Thr	61	55	12	5	2	-	-
Ser	66	37	37	24	20	25	28
Glu	78	-	-	5	-	-	-
Gly	39	21	6	4	2	2	1
Ala	161	31	10	4	2	1	2
Val	140	116	28	18	7	12	11
Met	94	85	47	20	13	17	16
Ile	116	89	16	22	5	12	6
Leu	320	206	33	9	4	-	5
Tyr	142	135	99	11	9	12	11
Phe	137	114	55	21	3	-	-
Lys	190	164	42	12	6	6	7
His	20	16	5	19	1	-	-
Trp	25	21	15	18	-	-	-
Arg	207	30	13	4	1	-	1
Pro	22	3	8	8	6	9	8
Cys	-	-	12	18	26	36	37

2.3 MTG合成的发酵过程曲线分析

为了对MTG摇瓶过程中基质的消耗、菌体的生长、产物的形成等各参数的变化进行较全面了解,以便对发酵过程进行较好的分析,实验时在摇瓶过程中不断取样,得到发酵过程曲线,见图2,氨基酸的变化情况见表6表7。可以看出:1)在发酵前期(0~24h),淀粉质量浓度降低较快,菌体生长迅速,细胞合成需要大量的氨基酸,结合氨基酸质量浓度降低较快,氨基酸消耗的速度也很快(用于菌体的生长),因此游离氨基酸的质量浓度降低较快,MTG酶

活很低. 2)第二阶段(24~ 48 h),菌体生长速度趋于缓慢,淀粉质量浓度继续降低;此阶段大量进行 MTG的合成,故 MTG酶活增加迅速. 3)第三阶段(48~ 60 h),菌体生长停止,酶活继续增高但增加缓慢,至60 h达到最大值 $1.83 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$,发酵液中游离氨基酸、结合氨基酸以及淀粉消耗基本保持不变. 4)第四阶段(60~ 72 h),菌体生长量稍微降低,和前一阶段比较,MTG酶活不再增加,并有所降低,发酵结束.

参考文献:

- [1] STEINKNAUS K H. Nutritional significance of fermented foods[J]. Food Res International, 1994, 27: 259~ 267
- [2] Folk J E. Transglutaminase[J]. Ann Rev Biochem, 1980, 49: 517~ 531
- [3] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 2613~ 2617
- [4] MOTOKI M, KIYAMA A, NONAKA M, et al. Novel transglutaminase manufacture for preparation of protein gelling comornds[P].日本专利: JP 0217471, 1989.
- [5] ZHU Y, RINAEMA A, TRAMPER J, et al. Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *streptovercillium mobarense* [J]. Biotechnol Bioeng, 1996, 50: 291~ 298
- [6] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 111~ 125
- [7] 二国二郎主编. 淀粉科学手册 [M]. 王微青,高寿青,任可达译.北京:中国轻工业出版社,1990.
- [8] KANAJI T, OZAKI H, TAKAO T, et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *streptovercillium* sp. strain s-8112[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 11565~ 11572

Shaking- Flask Conditions for the Production of Microbial Transglutaminase with *Streptovercillium morbarraense*

ZHENG Mei-ying, DU Guo-cheng, CHEN Jian

(School of biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract The conditions of shaking - flask culture for the MTG production were investigated with *Streptovercillium morbarraense* with starch as carbon source, peptone and yeast extract as nitrogen source. The results indicated that the proper pH, the initial starch concentration and the size of inoculum were 6.05, 2%, and 10% respectively. The effect of the initial concentration of ammonium sulfate on cell dry weight was not obvious, but the addition of ammonium sulfate inhibited the production of MTG. The initial addition of free amino acids and liquids of cystamine had a bad effect on the production of MTG. The highest enzyme activity reached $1.83 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$.

Key words *Streptovercillium morbarraense*; transglutaminase; shake- flask culture.