

溶氧浓度对微生物谷氨酰胺转氨酶发酵的影响^{*}

吉国栋¹, 周 波¹, 高红亮¹, 常忠义^{1,2}, 杨 俊²

(1 华东师范大学 生命科学院, 上海 200062;

2 江苏雨润食品产业集团有限公司, 江苏 南京 200041)

[摘 要] 研究了不同溶氧(DO)浓度对微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)发酵的影响。结果表明, 当溶氧浓度为2.88 mg/L时, MTG活性和菌体干重最高, 分别达到4.32 U/mL和23.5 g/L, 底物利用率为81.6%; 当溶氧浓度继续升高时, 发酵后期MTG活性下降显著。为此采用了分阶段溶氧控制策略, 即在0~34 h控制溶氧浓度为2.88 mg/L, 34 h后控制溶氧浓度为0.96 mg/L, 最终MTG活性达到4.72 U/mL, 菌体干重达到27.32 g/L, 较恒定2.88 mg/L溶氧浓度时分别提高了9.26%和16.26%, 其底物利用率达83.2%。

[关键词] 谷氨酰胺转氨酶; 溶氧浓度; 分段控制策略; 酶活性; 底物利用率

[中图分类号] TS201.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)01-0075-04

微生物谷氨酰胺转氨酶(Microbial Transglutaminase, EC2.3.2.13, 简称MTG)是一种催化酰基转移反应的转移酶: (1)其可催化蛋白质以及肽键中谷氨酰胺残基的 γ 酰胺基和伯胺之间的酰胺基转移反应, 利用该反应可以将赖氨酸引入蛋白质以改善蛋白质的营养特性。(2)当蛋白质中赖氨酸残基的 γ 氨基作为酰基受体时, 蛋白质在分子内或分子间形成 ϵ -(γ -glutamyl)Lys共价键, 通过该反应蛋白质分子发生交联, 使得食品及其他制品产生质构变化, 从而赋予产品特有的质构特性和粘合性能。(3)当不存在伯胺时, 水会成为酰基的受体, 谷氨酰胺残基脱去氨基, 该反应可以用于改变蛋白质的等电点及溶解度^[1-3]。由于谷氨酰胺转氨酶催化作用机理的特殊性, 使其在食品、化妆品、制药和医疗保健等领域具有广泛的应用前景, 并日益引起人们的极大兴趣^[4]。目前, 国外对发酵法生产MTG的研究^[2,3,5-7]较多, 并已应用到了食品工业, 而国内主要有江南大学生物工程学院开展了该方面的研究^[1,4,8-10]工作。

微生物谷氨酰胺转氨酶发酵生产属于好氧发酵, 发酵过程中菌体的新陈代谢与氧气呼吸有关, 调节通气和搅拌, 可影响发酵周期时间的长短和代谢产物生成量的高低^[11]。而了解了菌体生长阶段和代谢产物形成阶段的最适需氧量, 就有可能实现合理供氧。因此, 进行溶氧浓度的控制是极其重要的。本研究以茂原链轮丝菌(*Streptomyces*

baraense)为出发菌株, 以提高酶活为研究目标, 研究了10 L罐中不同溶氧浓度对MTG发酵过程的影响, 并得出了最适的溶氧浓度控制策略, 旨在为MTG的进一步工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 茂原链轮丝菌(*Streptomyces toverticillium m. obaraense*)由华东师范大学生命科学学院微生物实验室保存。

1.1.2 培养基 (1)孢子培养基。高氏一号培养基^[12]。(2)种子培养基。甘油20 g/L, 蛋白胨25 g/L, 酵母膏5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, pH 7.4。(3)发酵培养基。淀粉10 g/L, 葡萄糖20 g/L, 鱼粉水解物25 g/L, 酵母膏5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, pH 7.4。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 (1)种子培养法。接1环孢子培养基中生长良好的茂原链轮丝菌, 移至装有100 mL种子培养基的500 mL三角瓶中, 210 r/min 30℃恒温培养40 h左右。(2)分批发酵培养。发酵罐为上海高机生物工程有限公司生产的BDF-6010S罐, 10 L罐的装料量为6 L, 接种量为10%, 发酵过程中pH自然, 温度控制在30℃, 搅拌转速为200~450

* [收稿日期] 2005-04-27

[作者简介] 吉国栋(1982-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士, 主要从事微生物发酵工程研究。

r/min。

1.2.2 菌体干重测定 取发酵液 5 mL, 3 000 r/min 离心 30 min, 蒸馏水水洗 2 次, 105 °C 干燥至恒重后称重。

1.2.3 MTG 酶活性测定 采用比色法测定^[13]。

1.2.4 残糖测定 采用 DNS 法^[14]。

1.2.5 MTG 比合成速率、细胞比生长速率、产物得率系数和细胞得率系数的计算 参考文献[11]和[15]的方法进行。

2 结果与分析

本试验分别考察了 0.96, 1.92, 2.88 和 3.84 mg/L 的溶氧浓度对 MTG 发酵过程的影响。

2.1 不同溶氧浓度对产酶过程的影响

图 1 为不同溶氧浓度下 MTG 活性随时间的变化曲线。从图 1 可以看出, 发酵 16 h 后茂原链轮丝菌开始产出 MTG, 当溶氧浓度大于 0.96 mg/L 时, 34 h 以内的 MTG 活性迅速增加; 此后, 2.88 mg/L 溶氧浓度的 MTG 活性继续缓慢增加, 在 44 h 达到最大值 4.32 U/mL, 而 1.92 和 3.84 mg/L 溶氧浓度的 MTG 活性在发酵 34 h 后开始下降, 特别是

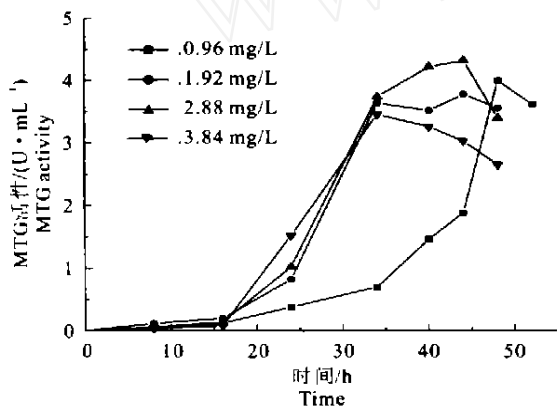


图 1 不同溶氧浓度对 MTG 活性的影响

Fig. 1 Effect of DO concentrations on MTG activity

2.3 不同溶氧浓度对底物利用的影响

图 3 为不同溶氧浓度下底物利用随时间的变化曲线。由图 3 可以看出, 不论溶氧浓度大小, 底物利用趋势都是一致的, 即在 0~8 h 底物几乎未被利用, 在 8~24 h 底物被迅速利用, 之后底物利用速度减缓, 34 h 以后底物浓度已降到很低。

从图 3 还可以看出, 在 1.92 mg/L 的溶氧浓度时, 底物利用率最高, 其次是 2.88 和 0.96 mg/L 的溶氧浓度处理, 最差的是 3.84 mg/L, 但在前 16 h

3.84 mg/L 溶氧浓度处理的 MTG 活性下降比较迅速。在 0.96 mg/L 溶氧浓度时, 酶活在 34 h 前增加缓慢, 34 h 后才以较快的速度增加, 直到 48 h 达到最大值 4.00 U/mL。这说明较高的溶氧浓度有利于 MTG 的合成, 但过高的溶氧浓度又加速了 MTG 的失活, 可能是因为 MTG 活性中心的 Cys 具有 -SH 基, 而 -SH 基在高溶氧浓度下易被氧化^[8]。因此, 理论上存在 1 个既有利于产 MTG 又不会使 MTG 活性迅速降低的最适溶氧浓度。

2.2 不同溶氧浓度对菌体干重的影响

图 2 为不同溶氧浓度下茂原链轮丝菌菌体干重随时间的变化曲线。由图 2 可知, 在 0.96 mg/L 溶氧浓度时, 24 h 前菌体干重变化与其他溶氧浓度差别不大, 24 h 后增加速度减慢, 菌体干重在 40 h 达到最大值; 随着溶氧浓度的增大, 菌体干重也增加, 且达到最大菌体干重的时间提前到 34 h。当溶氧浓度为 2.88 mg/L 时, 菌体干重达到最大值 23.5 g/L; 当溶氧浓度继续升高至 3.84 mg/L 时, 菌体干重有所下降。说明适当增高溶氧浓度有利于该微生物的生长。

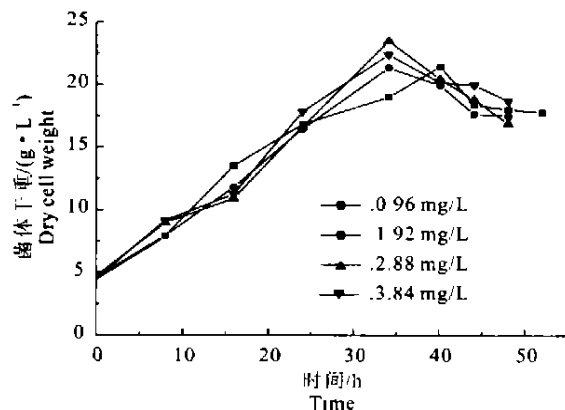


图 2 不同溶氧浓度对菌体干重的影响

Fig. 2 Effect of DO concentrations on dry cell weight

的发酵中, 溶氧浓度越大, 底物利用速度越快。底物的利用情况说明, 在发酵开始后的前 16 h 中, 较高的溶氧浓度有利于底物的利用, 而在这之后, 适当低的溶氧浓度有利于底物的利用。出现这种现象的可能解释是高溶氧浓度促使微生物细胞过早的自溶。在实际试验中, 通过显微镜观察也发现, 发酵后期微生物菌丝体在高溶氧浓度下出现了大量断裂现象。

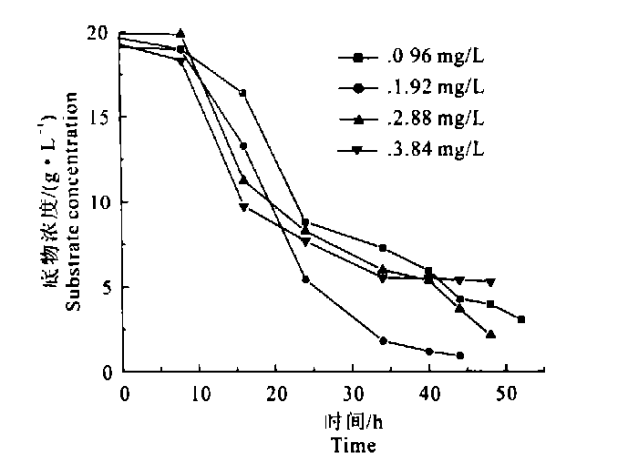


图 3 不同溶氧浓度对底物利用的影响

Fig 3 Effect of DO concentrations on substrate utilization

2 4 分阶段溶氧浓度控制对MTG 发酵的影响

由图 1, 2 可知, 溶氧浓度维持在 2.88 mg/L 时, 所得的菌体干重及MTG 活性均优于其他溶氧浓度, 但过高的溶氧浓度会造成发酵后期(34 h 后) MTG 活性下降较快. 因此本试验采用了如下策略: 在发酵前期(0~ 34 h)维持 2.88 mg/L 的溶氧浓度, 发酵后期(34 h 后)维持 0.96 mg/L 的溶氧浓度.

图 4 为分阶段溶氧控制下的MTG 分批发酵曲线. 由图 4 可以看出, 发酵 48 h 后MTG 活性达到最高, 为 4.72 U/mL, 菌体干重达 27.32 g/L, 较恒定 2.88 mg/L 溶氧浓度分别提高了 9.26% 和 16.26%, 底物利用率达 83.2%, 也略高于 2.88 mg/L 溶氧浓度时的 81.6%. 这说明分阶段溶氧控制不仅可以得到较高的菌体干重, 而且也有利于维

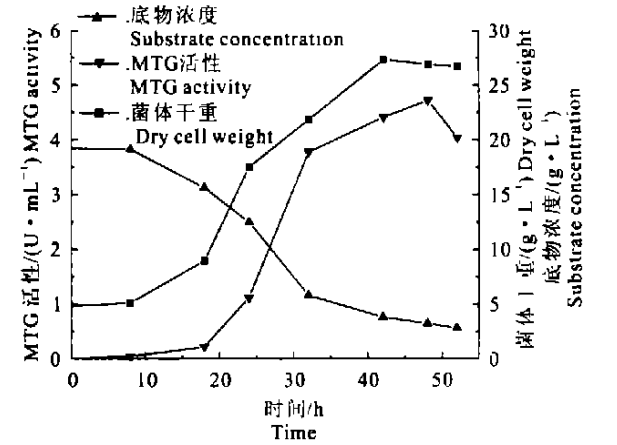


图 4 分阶段溶氧控制分批发酵过程曲线

Fig 4 Curve of two-stage DO control MTG batch fermentation process

持较高的MTG 合成速率, 有利于MTG 的合成与积累, 并且减少了MTG 的失活, 提高了整个MTG 发酵过程的生产水平.

表 1 为单一溶氧浓度与分阶段溶氧浓度控制时的MTG 发酵过程各参数值的计算结果. 由表 1 可以看出, 分阶段溶氧浓度控制的MTG 比合成速率略高于 0.96, 1.92 和 2.88 mg/L 时的MTG 比合成速率, 其产物得率系数和细胞得率系数分别为295.2 U/g 和 1.46 g/g, 较单一溶氧浓度的最高水平2.88 mg/L 分别高出 10.89% 和 8.15%. 另外, 分阶段溶氧控制的细胞比合成速率仅大于 0.96 mg/L 溶氧浓度处理, 而较其他溶氧浓度处理小, 这是由于 34 h 后溶氧浓度维持在 0.96 mg/L 时, 使得茂原链轮丝菌菌体细胞生长期延长, 菌体干重达到最大值的时间较长造成的.

表 1 单一溶氧浓度与分阶段溶氧浓度控制对MTG 发酵过程的影响

Table 1 Effects of single DO concentration and two-stage DO concentration control on MTG batch fermentation				
溶氧浓度/ (mg · L ⁻¹) DO concentrations	MTG 比合成速率/h ⁻¹ Specific MTG formation rate	细胞比生长速率/h ⁻¹ Specific cell growth rate	产物得率系数/(U · g ⁻¹) MTG yield coefficient	细胞得率系数/(g · g ⁻¹) Cell yield coefficient
0.96	0.029	0.038	254.3	1.22
1.92	0.030	0.046	253.9	1.33
2.88	0.031	0.047	266.2	1.35
3.84	0.037	0.047	250.2	1.29
2.88~ 0.96	0.032	0.042	295.2	1.46

3 结 论

分阶段溶氧浓度控制提高了微生物谷氨酰胺转氨酶分批发酵的MTG 产量, MTG 得率系数和细胞得率系数, 这表明在发酵过程中可以根据目的产物

合成不同阶段的不同特性进行合理控制, 从而提高目的产物的产量. 例如, 文献[9-10]对微生物谷氨酰胺转氨酶分批发酵 pH 值和温度的分阶段控制试验表明, 分阶段控制结果优于单一 pH 值或单一的温度控制. 如果能将这些因素综合起来考虑进行发酵,

可能会进一步提高MTG产量,但同时也加大了控制过程的复杂性,故有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 江波. 谷氨酰胺转氨酶的性质及在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2001(4): 34-36
- [2] Zhu Y, Rinzena A, Tramper J, et al. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 277-282
- [3] Noriho Kamiya, Takeshi Takazawa, Tsutomu Tanaka, et al. Site-specific cross-linking of functional proteins by transglutamination[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 492-496
- [4] 郑美英, 堵国成, 燕国梁, 等. 谷氨酰胺转氨酶(MTG)的中试生产条件[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(6): 613-616
- [5] Pietrasik Z, Jamoluk A. Effect of sodium caseinate and κ -carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition[J]. Food Research International, 2003, 36: 285-294
- [6] Zhu Y, Rinzena A, Tramper J, et al. Microbial transglutaminase production by *S. treptovorticillium m. obaraense*: A analysis of amino acid metabolism using mass balances [J]. Enzyme Microb Technol, 1998, 23: 216-226
- [7] Zhu Y, Rinzena A, Tramper J, et al. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *S. treptovorticillium m. obaraense*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 251-257.
- [8] Yan Guo-liang, Du Guo-cheng, Li Yin, et al. Enhancement of microbial transglutaminase production by *S. treptovorticillium m. obaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 963-968
- [9] Zheng Mei-ying, Du Guo-cheng, Chen Jian. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *S. treptovorticillium m. obaraense*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 477-481.
- [10] 郑美英, 堵国成, 陈坚, 等. 分批发酵生产谷氨酰胺转氨酶的温度控制策略[J]. 生物工程学报, 2002, 16(6): 759-762
- [11] 姚汝华. 微生物工程工艺原理[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001: 170-172
- [12] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学试验[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1989: 90-91
- [13] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagines[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 111-125
- [14] Miller G L, Cased C. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31: 426-428
- [15] 陈坚. 发酵工程实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 276-277.

Effects of DO concentrations on Microbial Transglutaminase Fermentation

J I Guo-Dong¹, ZHOU Bo¹, GAO Hong-Liang¹, CHANG Zhong-Yi^{1, 2}, YANG Jun²

(1 School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2 Jiangsu Yurun Food Group Co Ltd, Jiangsu, Nanjing 210041, China)

Abstract: The effects of DO concentrations on MTG batch fermentation were studied. The results showed, when DO concentration was 2.88 mg/L, MTG activity and dry cell weight reached the highest, which were 4.32 U/mL and 23.5 g/L respectively, and substrate utilization ratio was 81.6%. However, the higher DO concentration could remarkably reduce the MTG activity at later phase. Therefore, the strategy of stepwise DO concentration control MTG batch fermentation was introduced: at 0~34 h, DO concentration were controlled at 2.88 mg/L, and after 34 h, it went down from 2.88 mg/L to 0.96 mg/L. And finally, MTG activity reached 4.72 U/mL and dry cell weight reached 27.32 g/L, 9.26% and 16.26% higher than when DO concentration was 2.88 mg/L respectively, and substrate utilization ratio was 83.2%.

Key words: Microbial Transglutaminase; DO concentration; the strategy of stepwise control; enzyme activity; substrate utilization