

万方数据

近年来,由于微生物谷氨酰胺转氨酶(microbial transglutaminase,简称 MTG,EC 2.3.2.13)在食品工业广泛的应用潜力^[1],引起了人们的极大研究兴趣.20 世纪 80 年代末,Ando 和 Motoki 等人^[2]首先报道了利用微生物发酵法生产谷氨酰胺转氨酶的结果,在发酵 72 h 的情况下,酶活水平为 2.5 U/mL.近年来,国外加快了微生物发酵法生产谷氨酰胺转氨酶^[2]的研究,并使之应用于食品工业,但国内这方面的研究还未见报道.

各种微生物需要在一定的 pH 值环境中方能正常生长繁殖.如果 pH 值不适,不但会妨碍微生物菌体的正常生长,而且还会改变微生物的代谢途径和代谢产物的性质.在酶制剂生产中,培养基的 pH 值直接影响到酶的产量和质量,因此,控制发酵过程的 pH 值十分重要.培养基的碳源是微生物生命活动的能量来源,是多种诱导酶的诱导物.培养基中的碳源质量浓度,不仅会直接影响到菌体的生长和产物的形成,而且影响发酵的指标.所以,在 MTG 发酵过程中,确定较适宜的初始淀粉质量浓度,有利于获得较高的 MTG 发酵水平.对于酶制剂的工业应用、高生产强度是极为重要的,要获得较高的细胞质量浓度及生产强度,流加培养是一种简单有效的方法.

本研究以 *Streptoverticillium mobaraense* 为出发菌株,以提高酶活为研究目标,研究了 2.5 L 容积小罐中不同 pH 值对发酵过程的影响,得出了最适 pH 值的控制策略,探讨了最适 pH 值下不同的初始淀粉质量浓度对 MTG 合成的影响,并在此基础上研究了碳源流加对 MTG 发酵的影响.

1 材料与方法

1.1 菌种

茂原链轮丝菌(*Streptoverticillium mobaraense*)WSH-Z2,作者所在研究室保藏.

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 麦汁 10 °Bx,琼脂 2 g/dL, pH 7.0.

1.2.2 种子培养基(g/L) 淀粉 20,蛋白胨 20,酵母膏 2,无水硫酸镁 2,磷酸氢二钾 2,无水磷酸二氢钾 2, pH 7.0.

1.2.3 发酵培养基 初始淀粉质量浓度 2~4 g/dL,其它成分与种子培养基相同.

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养方法 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 的三角瓶

中培养,摇瓶转速为 200 r/min,30 °C 培养 40 h.

1.3.2 分批培养 2.5 L 容积小罐(韩国 KF-2.5 L 台式发酵罐)的装液量为 1.5 L,接种量 10%,初始淀粉质量浓度 2 g/dL,发酵过程中控制 pH 值为 5.5~7.5,温度控制在 30 °C,搅拌转速为 400~500 r/min.

2.5 L 容积小罐(韩国 KF-2.5 L 台式发酵罐)的装液量为 1.5 L,接种量 10%,发酵过程中控制 pH 6.5,淀粉质量浓度 2~4 g/dL,温度控制在 30 °C,搅拌转速为 400~500 r/min.

1.3.3 流加培养 初始淀粉质量浓度为 2 g/dL,发酵过程中控制 pH 值 6.5,温度控制在 30 °C,搅拌转速为 400~500 r/min.19 h 后补加 30 g/dL 的淀粉水解糖溶液,流加的糖量为 2 g/dL,流加过程中控制适宜的流速,维持总糖在 1 g/dL 左右.

1.4 分析方法

1.4.1 菌体细胞生长量 取发酵液 5 mL,6 000 r/min 离心 5 min,蒸馏水洗 2 次,105 °C 干燥至平衡后称重.

1.4.2 MTG 酶活性测定 比色法测定酶活性.

1.4.3 残糖测定 改进的蒽酮法^[4].

2 结果与讨论

2.1 pH 值对 MTG 发酵过程的影响

2.1.1 未控制 pH 值的发酵过程 图 1 为发酵过程中未控制 pH 值的发酵过程曲线.初始 pH 值 6.5,整个发酵过程中 pH 值控制在 6.5~7.0.从图 1 中可见,发酵 30 h 菌体干重达最大值 18.8 g/L,42 h MTG 酶活达最大值 2.0 U/mL,此时残糖为 0.43 g/dL.发酵 10 h 左右时,细胞进入

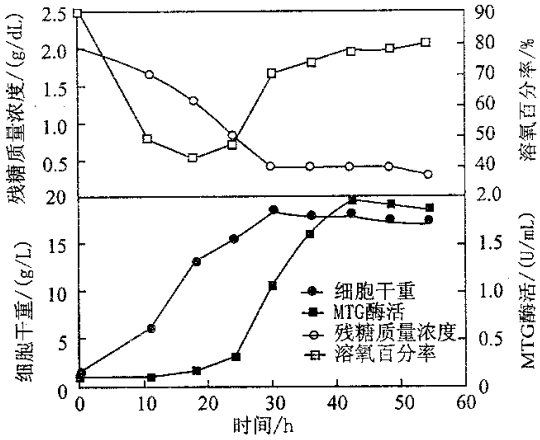


图 1 未控制 pH 值对 MTG 发酵的影响
Fig.1 Effects of natural pH value on MTG fermentation

对数生长期,此时酶开始合成,当培养至 30 h 左右时,细胞的生长进入平衡期,而酶继续合成至 45 h 左右才停止.由此可见,酶的合成伴随着细胞的生长而开始,在细胞生长进入平衡期后,酶还延续合成较长一段时间.表明在此条件下,产物的合成为部分生长偶联型.

2.1.2 控制 pH 值的发酵过程 当 pH 值为 5.5 时,菌体不生长,pH 值为 7.5 时,菌体生长较差(结果未列出).表明 *Streptoverticillium mobaraense* 在酸性环境中不能正常生长繁殖,在微碱性环境中虽然能够繁殖,但妨碍了微生物正常的代谢途径,直接影响了代谢产物的积累.当 pH 值为 6.0 时,菌体干重(DCW)、MTG 酶活、残糖(RSC)及溶氧(DO)的变化如图 2 所示.

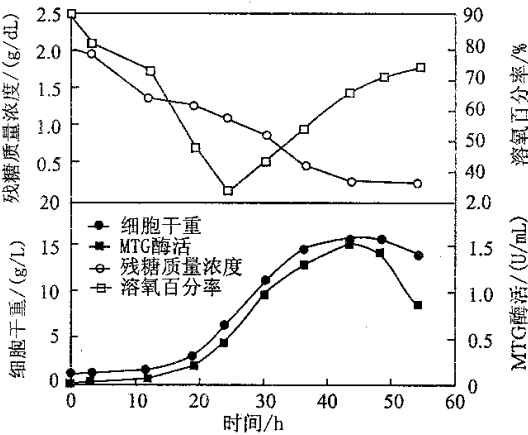


图 2 pH 值为 6.0 对 MTG 发酵的影响
Fig.2 Effects of pH 6.0 on MTG fermentation

从图 2 可以看出,发酵 48 h 菌体干重为 16.1 g/L,MTG 酶活达 1.56 U/mL,残糖质量浓度为 0.30 g/dL,菌体生长和产酶同步进行,表明产物的合成属偶联型.当菌体干重达到最高点时,MTG 酶活也达到最大值.细胞生长停止后,酶的合成也立即停止,表明在此 pH 条件下,合成该酶所对应的 mRNA 是不稳定的.从图 2 还可以看出,20 h 前菌体生长较缓慢,延滞期较长,溶氧百分比下降较慢;20 h 后菌体生长较快,所以最终达到最大 DCW 的时间较长.表明控制 pH 值在 6.0 时,菌体可以生长和产酶,但并不是该菌种最适的生长和产酶的 pH 值.

控制 pH 值为 6.5 的发酵过程见图 3. 30 h 后菌体干重达到最大值,为 19.4 g/L,36 h 时 MTG 酶活达到最大值,为 2.15 U/mL,此时残糖质量浓度为 0.60 g/dL.发酵开始 10 h 后,菌体干重迅速增加,伴随着细胞的生长,酶也开始不断合成.20 h 后

菌体干重的增加速率减慢,至 30 h 达到最大值,而酶则以较快的速率合成,至 36 h 才停止,表明此条件下酶的合成也属于部分偶联型.

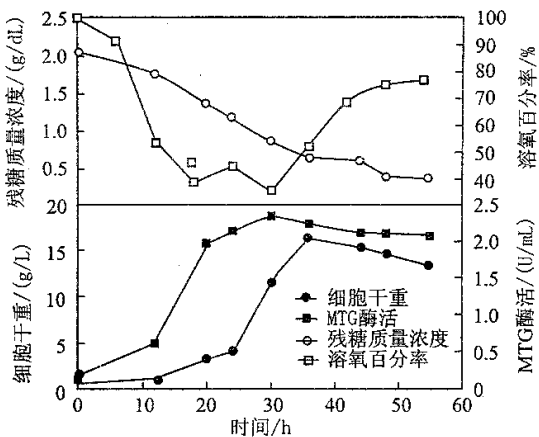


图 3 pH 值为 6.5 对 MTG 发酵的影响
Fig.3 Effect of pH 6.5 on MTG fermentation

图 4 为控制 pH 值为 7.0 时的发酵过程曲线.图 4 中,曲线的变化形态和图 3 基本一致,所不同的是,整个过程中菌体的生长和酶的合成速率较慢,故 DCW 和 MTG 酶活达到最大值的时间也较长.

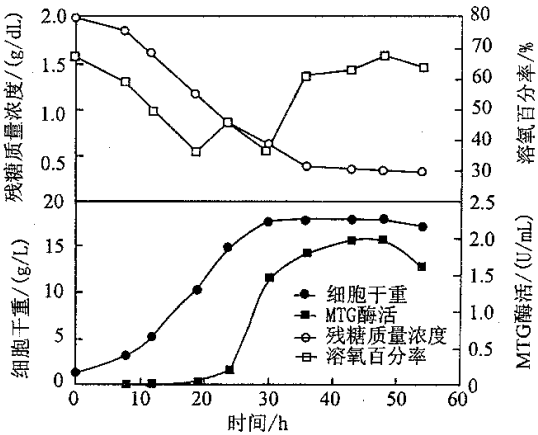


图 4 pH 值为 7.0 对 MTG 发酵的影响
Fig.4 Effect of pH 7.0 on MTG fermentation

综上所述,控制不同的 pH 值,对菌体的生长和产酶模式会产生明显的影响.当控制较低的 pH 值时,会对菌体的生长和产酶产生一定的抑制作用.当发酵过程的 pH 值控制在 6.5 时,最有利于菌体的生长和酶的合成,在此条件下可以得到最大的菌体干重和酶活.

2.1.3 不同 pH 条件下菌体的产率系数、MTG 的产率系数及 MTG 的生产强度的比较 从表 1 可见,当发酵过程中控制 pH 值为 6.5 时,各项指标均较高,表明控制 pH 值 6.5 为最佳.

表 1 不同 pH 值下菌体产率系数、MTG 的产率系数及 MTG 的生产强度

Tab.1 Cell yield coefficient , MTG yield coefficient and MTG productivity under different pH

pH 值的控制	菌体的产率系数/(g/g)	MTG 的产率系数/(U/g)	MTG 生产强度/(U/(L·h))
6.0	0.94	91.5	32.5
6.5	1.67	153.5	59.7
7.0	1.34	120.7	41.3
未控制	1.19	125.4	47.6

由此可见 ,当控制 pH 值为 6.5 时 ,发酵过程中的菌体产率系数、MTG 的产率系数及 MTG 的生产强度都最高 ,MTG 酶活也最高 ,所以发酵中控制 pH 值为 6.5 较佳.

2.2 初始淀粉质量浓度对菌体生长和 MTG 酶活的影响

2.2.1 不同初始淀粉质量浓度下菌体生长和 MTG 酶活随时间的变化 不同初始淀粉质量浓度下 ,发酵过程中细胞生长、产物形成和淀粉消耗的变化关系曲线如图 5~7 所示.从图 5 中可以看出 ,不同初始淀粉质量浓度最终所能达到的菌体干重

dL 时 ,最大 MTG 酶活分别为 2.15 ,2.94 ,2.40 U/mL.当初始淀粉质量浓度为 2 g/dL 时 ,菌体生长较快 ,达到最大菌体干重和酶活所需的时间都较短 ,但由于碳源的缺乏 ,最终菌体干重和酶活较低.从图 7 可以看出 ,发酵 30 h 后 ,残糖质量浓度相对较低 ,随后细胞物质的合成停止 ,可见过低的基质质量浓度不利于细胞和产物的合成 ;当初始淀粉质量浓度为 4 g/dL 时 ,基质质量浓度一直相对较高 ,尽管菌体干重不断增加 ,但菌体生长和产物的合成明显受到了抑制 ;当初始淀粉质量浓度为 3 g/dL 时 ,最有利于细胞生长和酶的合成 ,在相同的时间内 ,菌体干重和产物质量浓度均高于其它淀粉质量浓度下的值.由此可见 ,在菌体生长和产物合成阶段 ,维持较适宜的淀粉质量浓度显得尤为重要.

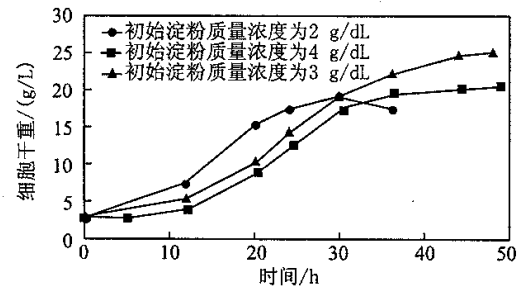


图 5 不同初始淀粉质量浓度下 DCW 随时间的变化

Fig.5 Time course of DCW under different initial starch concentrations

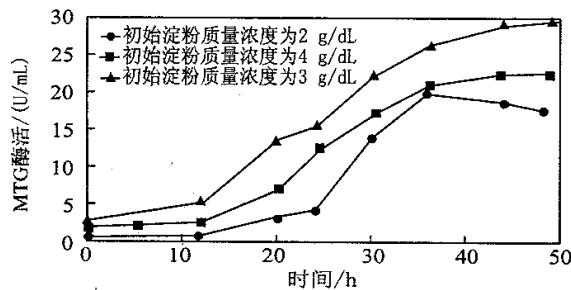


图 6 不同初始淀粉质量浓度下 MTG 酶活随时间的变化

Fig.6 Time course of MTG activity under different starch concentrations

(DCW)不同 ,当初始淀粉质量浓度为 2 3 4 g/dL 时 ,最大细胞干重分别达到 19.4 25.1 20.8 g/L.从图 6 可以看出 ,当初始淀粉质量浓度为 2 3 4 g/

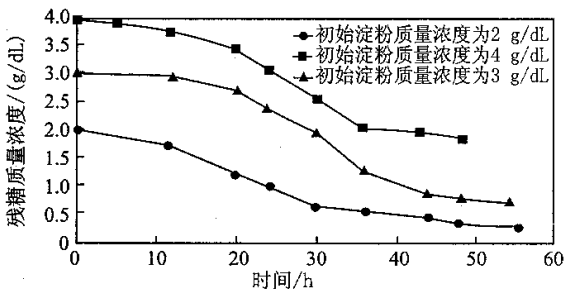


图 7 不同初始淀粉质量浓度下残糖随时间的变化

Fig.7 Time course of RSC under different initial starch concentration

2.2.2 初始淀粉质量浓度与 DCW 对淀粉产率系数及 MTG 生产强度和 MTG 对淀粉产率系数的关系 图 8 为不同初始淀粉质量浓度下 ,MTG 生产强度和 MTG 对淀粉产率系数及 DCW 对淀粉的产率系数的变化关系.从图 8 可以看出 :1)随着初始淀粉质量浓度的提高 ,DCW 对淀粉的产率系数不断下降 ,其值由初始淀粉浓度为 2 g/dL 时的 1.67 g/g 下降至初始淀粉质量浓度为 4 g/dL 时的 1.06 g/g ;2)初始淀粉质量浓度从 2 g/dL 增大到 4 g/dL 时 ,MTG 对淀粉的产率系数从 153.5 U/g 降低到 118.8 U/g ,降低较快 ;3)当初始淀粉质量浓度从 2 g/dL 增至 3 g/dL 时 ,MTG 的生产强度从 59.7

U/(L·h)增至 61.3 U/(L·h) 随着初始淀粉质量浓度的继续增大,MTG 的生产强度反而下降.所以,在 MTG 的发酵生产中,要获得较高的 MTG 产量,初始淀粉的质量浓度必须适宜.过高的初始淀粉质量浓度,不但使 DCW 及 MTG 酶活较低,菌体生长阶段的时间延长,其它发酵指标也较低;若淀粉质量浓度过低,会使得菌体干重和 MTG 酶活都很低.因此初始阶段采用较低的淀粉质量浓度,而中后期采用碳源流加的措施,以缩短发酵时间,提高 MTG 发酵的各项指标.

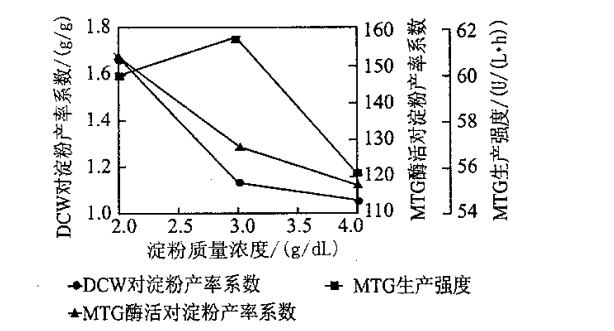


图 8 不同初始淀粉质量浓度下 DCW 和 MTG 对淀粉的产率系数及 MTG 的生产强度的变化关系

Fig.8 Yield coefficient of DCW and MTG activity to starch and productivity of MTG yield coefficient of MTG activity to starch under different initial starch concentration

2.3 碳源流加对 MTG 发酵过程的影响

通过上面的研究发现,高质量浓度的糖抑制了菌体的生长及产物的合成,因此将整个发酵过程中总糖质量浓度维持在一定的水平.对分批发酵数据进行研究得到不同淀粉质量浓度下菌体最大比生长速率及合成期 MTG 最大合成速率,见表 2.当初始淀粉质量浓度为 2 g/dL 时,菌体的比生长速率和产物合成速率均最快,此时总糖质量浓度为 0.85~

1.2 g/dL,故确定初始淀粉质量浓度为 2 g/dL,在发酵过程中控制总糖质量浓度在 1 g/dL 左右.

表 2 不同淀粉质量浓度下菌体比生长速率及合成期 MTG 最大合成速率

Tab.2 Maximal specific cell growth rate and maximum of specific MTG formation rate under different starch concentration		
淀粉质量浓度/(g/dL)	菌体最大比生长速率/h ⁻¹	MTG 最大合成速率/(U/h)
2	0.294	0.126
3	0.157	0.123
4	0.148	0.117

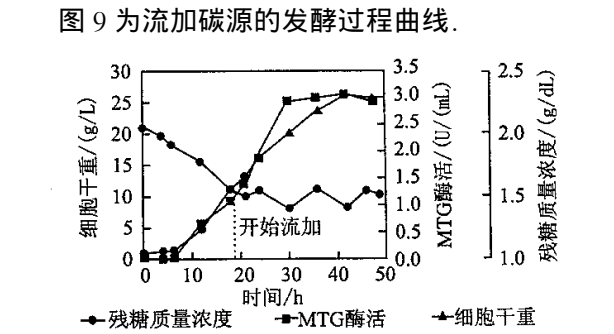


图 9 为流加碳源的发酵过程曲线.

图 9 流加碳源的发酵过程曲线

Fig.9 Time course of fed-batch carbon source culture

从图 9 可以看出,36 h 时 MTG 酶活已基本接近最大值 3.05 U/mL,高于分批发酵的最好结果,且酶活达到最大值的时间缩短了 12 h 左右.另外,在流加发酵过程中,MTG 最大合成速率为 0.158 U/h,高于分批发酵的最高水平 0.127 U/h,其它各项指标较分批发酵过程均有所提高,最终 MTG 及菌体干重对淀粉的产率分别为 127.1 U/g 和 1.1 g/g,MTG 的生产强度为 72.6 U/(L·h).由此可见,在发酵中后期适当补加碳源有利于提高 MTG 发酵水平.

参考文献

[1] STEINKNAUS K H. Nutritional significance of fermented food[J]. Food Res International, 1994, 27: 259~267.

[2] 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.

[3] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagin[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 111~125.

[4] 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,1990.235~236.

(责任编辑:李春丽)