

# 分批发酵生产谷氨酰胺转氨酶的温度控制策略

郑美英 堵国成 陈 坚 顾王芳

(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室,无锡 214036)

关键词 茂原链轮丝菌,谷氨酰胺转氨酶,分批发酵,温度控制策略

中图分类号 TQ925 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0759-04

微生物谷氨酰胺转氨酶(Microbial transglutaminase,简称 MTG,EC2.3.2.13)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,在食品工业具有广泛的应用潜力<sup>[1]</sup>,因而引起了人们的极大兴趣。谷氨酰胺转氨酶的生产通常采用从豚鼠肝脏或组织中提取,由于豚鼠肝脏或组织来源稀少,谷氨酰胺转氨酶的分离纯化过程复杂,因而价格昂贵。20 世纪 80 年代末,Ando 和 Motoki 等人<sup>[2,3]</sup>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,近年来 Gerber 等人<sup>[4]</sup>对其下游技术进行改进,Zhu Yang 等人<sup>[5]</sup>通过化学算法对培养基进行分析和设计,提高了发酵水平。国外加快了微生物发酵法生产谷氨酰胺转氨酶的研究,并使之应用于食品工业,国内有关这方面的研究报道极少。

典型的谷氨酰胺转氨酶分批发酵过程是菌体生长和产物合成属部分偶联型,菌体生长和产物合成过程所需控制条件不同<sup>[6]</sup>。为了得到较高的谷氨酰胺转氨酶的产量、产率系数及生产强度,控制不同发酵阶段的较佳环境条件非常重要。温度是影响谷氨酰胺转氨酶发酵过程的重要的环境条件之一。

本文以 *Streptovorticillium mobaraense* 为出发菌株,以提高谷氨酰胺转氨酶酶活及生产强度为研究目标,研究了 2.5L 小罐培养中控制温度为 25℃~35℃ 的情况下,MTG 分批发酵过程的动力学特性,并详细讨论了温度对细胞干重、细胞产率系数、细胞比生长速率以及对 MTG 酶活、酶产率系数及酶的比合成速率的影响。在此基础上得出了 *S. mobaraense* 分批发酵生产谷氨酰胺转氨酶的分阶段温度控制策略,并在小型发酵罐上进行了实验验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

茂原链轮丝菌(*Streptovorticillium 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(10B°),琼脂(20 g/L),pH7.0。

1.2.2 种子和发酵培养基(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,

pH7.0。

### 1.3 培养方法

(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 三角瓶中培养,摇瓶转速为 200 r/min,温度 30℃,培养 40 h。

(2)小罐培养:2.5L 小罐(韩国 KF-2.5L 台式发酵罐)的装液量为 1.5L,接种量 10%,初始淀粉浓度 30 g/L,发酵过程中控制 pH 值 6.5,温度控制在 25℃~35℃,搅拌转速为 400~500 r/min。

### 1.4 分析方法

1.4.1 菌体细胞生长量:取发酵液 5 mL,6000 r/min 离心 5 min,蒸馏水水洗 2 次,105℃ 干燥至衡重后称重。

1.4.2 MTG 酶活性测定:比色法测定酶活性<sup>[7]</sup>。一个 MTG 酶活单位(1 u/mL)定义为:37℃ 时 MTG 每分钟催化底物 N- $\alpha$ -CBZ-Gln-Gly(Sigma 公司)生成 1 $\mu$ mol L-谷氨酸  $\gamma$ -单羟胺(氧肟酸)。

1.4.3 残糖测定:改进的蒽酮法<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同温度下的 MTG 分批发酵过程

图 1 为不同温度下 *S. mobaraense* 发酵生产谷氨酰胺转氨酶的细胞干重(DCW)、MTG 酶活及残糖的时间过程曲线。从图 1 可以发现,当温度控制相对较低时(25℃和 28℃),前期细胞生长的延滞期较长,谷氨酰胺转氨酶的合成与细胞生长同步进行,细胞进入对数细胞生长期,酶大量产生,细胞生长进入平衡期后,酶的合成随即停止;当温度控制较高时(30℃、32℃和 35℃时),细胞生长的延滞期较短,MTG 酶活也随着细胞的生长而增加,细胞干重达到最大值的时间大大缩短,当细胞生长进入平衡期,酶活继续增加 6 h 左右才停止,达到最大酶活的时间也比温度较低时缩短了。

从图 1 中还可以看出:(1)随着发酵控制温度的提高,达到最大菌体浓度和最高酶活的时间都大大缩短了;(2)当发酵控制温度较低时,随着温度的升高,细胞干重和 MTG 酶活不断增加,30℃细胞干重和 MTG 酶活均达到最大值,当温度继续升高时,两者反而都有下降。

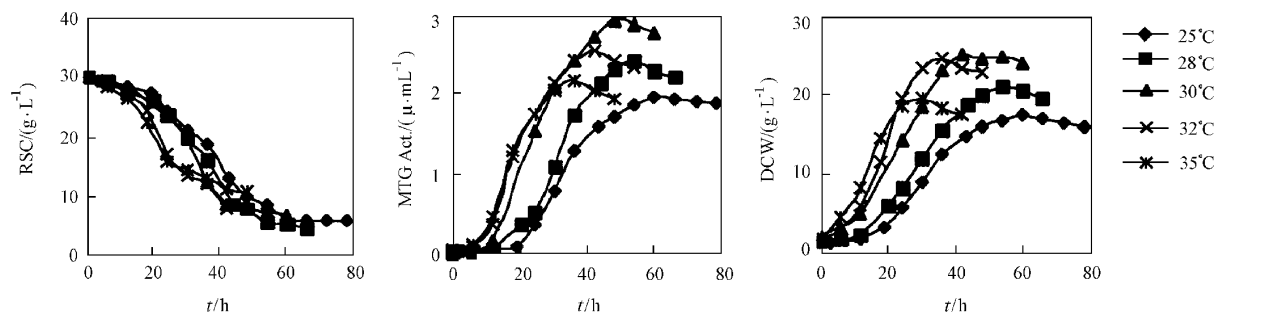


图1 不同温度下 MTG 分批发酵 DCW、MTG 酶活及 RSC 的时间过程曲线

2.2 温度对细胞比生长速率及其产率系数的影响

不同温度下的比生长速率( $\mu_{cell}$ )是由细胞生长数据得到的,即:
$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta x}{\Delta t}$$
用 Grooftool 绘图软件对图 1 中的生长数据进行插值计算(时间间隔为 0.1 h),再用 Excel 软件求解得到不同时刻的  $\mu_{cell}$ ,再经平滑处理,得到不同温度下的  $\mu_{cell}$ -t 关系曲线,如图 2。

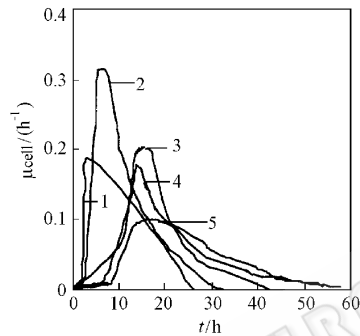


图2 不同温度下的比生长速率随时间的变化关系

1. 35℃ ; 2. 32℃ ; 3. 30℃ ; 4. 28℃ ; 5. 25℃

从图 2 中可以看出 (1)不同温度下  $\mu_{cell}$  随着时间变化趋势相似。(2)当温度相对较高时(35℃、32℃)时,前期细胞以较高的  $\mu_{cell}$  生长,6 h 左右  $\mu_{cell}$  迅速达到最大值,然后  $\mu_{cell}$  迅速降低,30 h 左右降为零。(3)温度较低时, $\mu_{cell}$  达到最大值的时间延迟,其增大和降低的速率均较慢。(4)24 h 后,28℃ 时的  $\mu_{cell}$  高于其它温度下的值。

图 3 为不同温度下的细胞产率系数( $Y_X$ )的变化曲线。从图 3 可以看出,随着温度的升高, $Y_X$  不断增大,当温度增大到 32℃ 时, $Y_X$  达到最大值 1.36 g/g 糖,然后  $Y_X$  下降。

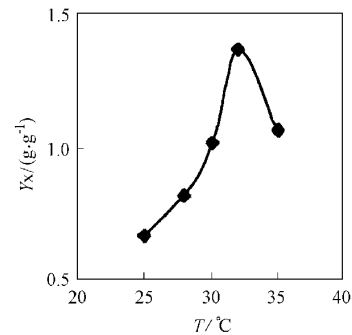


图3 温度对细胞产率系数的影响

由此可见,在发酵前期,宜采用较高的培养温度(如 32℃),这样不仅可以缩短细胞生长的延滞期,减少总的发酵时间,还可以获得高的细胞产率系数  $Y_X$ ,提高糖的利用率。

2.3 温度对 MTG 产率系数及其比合成速率的影响

图 4 为不同温度下 MTG 产率系数( $Y_{MTG}$ )的变化。从图 4 可见,当温度从 25℃ 升高到 32℃ 时, $Y_{MTG}$  不断升高至最大值,然后  $Y_{MTG}$  缓慢下降。当温度从 25℃ 增加到 32℃ 时, $Y_{MTG}$  从 82.5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  增高到 145.8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,增加了 80%,表明适当提高温度有利于产酶。

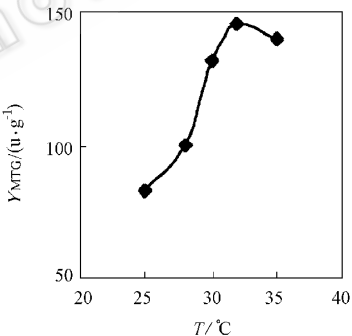


图4 不同温度下 MTG 的产率系数

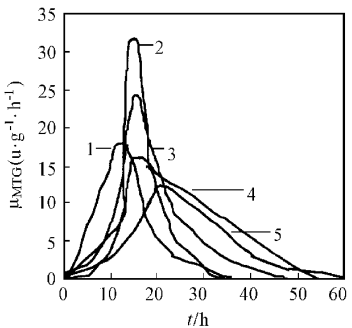


图5 不同温度下 MTG 酶活比合成速率随时间关系

1 35℃ 2 32℃ 3 30℃ 4 28℃ 5 25℃

根据 
$$\mu_{MTG} = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta p}{\Delta t}$$
求得 MTG 比合成速率( $\mu_{MTG}$ )与时间的关系曲线(类似于  $\mu_{cell}$  的求法),如图 5 所示,从图中可以看出 (1)不同温度下  $\mu_{MTG}$  与时间的变化关系都呈现钟罩形 (2)除了 35℃,其它温度下在 12 h 左右的 MTG 比合成速率均迅速增加,32℃ 时增加速率最大 (3)不同温度下  $\mu_{MTG}$  达到最大值时的时间不同,当发酵温度为

35℃、32℃、30℃、28℃和25℃时,  $\mu_{\text{MTG}}$ 达到最大值时的发酵时间分别为22 h、15 h、15 h、15 h和12.5 h(4)32℃时  $\mu_{\text{MTG}}$ 所达到的最大值最大,但其下降速度也最快,温度28℃时,尽管  $\mu_{\text{MTG}}$ 的最大值相对较小,但其下降速度较慢,发酵18 h,28℃时的  $\mu_{\text{MTG}}$ 高于32℃的值,20 h后,28℃的  $\mu_{\text{MTG}}$ 高于其它温度下的  $\mu_{\text{MTG}}$ 。

由此可见,在MTG发酵前期,宜采用相对较高的培养温度(如32℃),使  $\mu_{\text{MTG}}$ 的值较高,在发酵中后期宜采用较低的温度如28℃),这样可以使  $\mu_{\text{MTG}}$ 继续保持相对较高的值,提高MTG发酵水平,获得较高的生产强度。

2.4 MTG分批发酵过程分阶段温度控制策略的确定及验证

从上述单一温度控制的分批发酵过程可以看出,前期适当提高温度后,不仅可缩短细胞生长的延滞期,有利于菌体的生长,而且对酶的合成也有利。在发酵中后期,可适当降低温度以进一步促进菌体的持续生长及产酶,提高整个MTG发酵过程的生产水平。因此,从图2细胞比生长速率及图5的MTG比合成速率随时间的变化关系可以得出,MTG发酵过程中温度控制策略为:0~18 h,控制温度为32℃,18 h后将温度切换到28℃。采用此温度控制策略在2.5 L小罐上进行MTG发酵,其发酵过程曲线如图6所示。

从图6中可见,采用分阶段温度控制策略,发酵前期,细胞生长延滞期短,生长速率较快,整个发酵过程中MTG酶活

不断增加。培养36 h左右,最大细胞干重达到27.2 g/L,42 h左右,MTG酶活达到了3.37 u/mL。

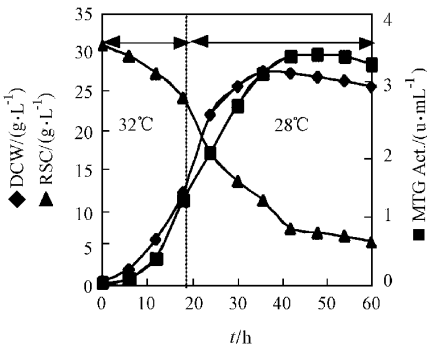


图6 采用分阶段控制温度策略发酵过程曲线

比较单一温度(图1)及分阶段温度控制过程(图6)可以明显看出,当前期温度控制32℃时,细胞生长的延滞期比28℃明显缩短,菌体能以较快的速率生长,而且发酵前期的产酶速率也大大高于温度较低时的情况。18 h将温度切换到28℃后,细胞生长速率及产酶速率均高于单一温度控制时的值,两者继续以较高的速度增加。42 h发酵结束时,MTG酶活比未控制温度时的最好水平提高了14%,发酵时间也缩短了6 h。

表1为不同温度及分阶段控制温度MTG发酵过程各参数数值的比较。

表1 单一温度及分阶段控制温度对MTG发酵过程的影响

发酵指标 \ 温度(℃)	25	28	30	32	35	32到28
MTG生产强度(u/L/h)	33.0	45.0	61.2	60.9	60.6	80.2
细胞生产强度(g/L/h)	0.29	0.37	0.52	0.67	0.55	0.74
MTG平均比合成速率(u/h/g DCW)	1.89	2.28	2.44	2.47	2.88	3.02
细胞平均比生长速率(g/h/g DCW)	0.017	0.019	0.021	0.027	0.033	0.028
MTG产率系数(u/g)	82.5	100.0	131.8	145.8	140.5	142.2
细胞产率系数(g/g)	0.66	0.81	0.99	1.36	1.06	1.33
达到最大酶活的时间(h)	60	54	48	42	36	42

从表1中可以看出,采用分阶段温度控制策略不仅可明显提高酶活,缩短发酵时间,而且生产强度也显著提高,达到80.2 u/L/h,比未控制温度的最好发酵水平提高了34%。MTG酶活平均比合成速率达到3.02 u/h/g菌体干重,高于

其它温度条件下的平均比合成速率。细胞的平均比生长速率达到0.028 g/h/g菌体干重,也高于28℃及32℃下的平均比生长速率。由此可见,采用分阶段温度控制策略确实能够显著提高MTG发酵过程中的各项指标。

参 考 文 献

[ 1 ] Steinknaus K H. *Food Res International*. 1994, **27** 259~267  
[ 2 ] Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H and Motoki M. *Agric Biol Chem*. 1989, **53** 2613~2617  
[ 3 ] Motoki M, Kiyama A, Nonaka M, Tanaka H, Uchio R, Matsura A, Ando H and Umeda K. *Jpn Kokai Kokkyo Koho*. 1989, JP 0217471  
[ 4 ] Geber U, Jucknischke U, Putzien S and Fuchsbauer H L. *Biochem J*. 1994, **299** 825~829  
[ 5 ] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J. *Biotechnol Bioeng*. 1996, **50** 291~298  
[ 6 ] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E and Waelsch H. *J Biol Chem*. 1950, **187** 111~125  
中国科学院长生生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 7 ] 郑美英 堵国成 陈坚. 无锡轻工大学学报. 1999, 18(3): 37~42
- [ 8 ] 二国二郎主编. 王微青 高寿青 任可达译. 淀粉科学手册. 北京 轻工业出版社. 1990. p. 235

## A Strategy of Temperature Control in Batch MTG Fermentation

ZHENG Mei-Ying DU Guo-Cheng Chen Jian GU Wang-Fang

( Lab. of Environ. Biotechnology, School of Biotech, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036 )

**Abstract** Batch fermentation of MTG by *S. mobaraense* WSH-Z2 at various temperatures ranging between 25°C ~ 35°C were studied. At 30°C, MTG activity and cell dry weight were higher than others, reached 2.94 u/mL and 25.1 g/L respectively. At 32°C or higher, lagged time was shorter, specific cell growth rate ( $\mu_{\text{cell}}$ ) and specific MTG production rate ( $\mu_{\text{MTG}}$ ) were higher at earlier stage of culture, while at mid-and last stage  $\mu_{\text{cell}}$  and  $\mu_{\text{MTG}}$  were higher at 28°C. So the following strategy of temperature control was obtained: 0~18 h, culture was performed at 32°C, and after 18 h, the temperature was shifted from 32°C to 28°C. The results of this strategy showed that maximal MTG activity and productivity reached 3.37 u/mL and 80.2 u/L/h respectively, average  $\mu_{\text{cell}}$  and  $\mu_{\text{MTG}}$  obtained 3.02 u/h/g DCW and 0.028 g/h/gD-CW, respectively, higher than all of that at single temperature. It could be seen that MTG production could be improved obviously by this temperature control.

**Key words** *Streptovercillium mobaraense*, transglutaminase, batch fermentation, strategy of temperature control