

葡萄糖氧化酶产生菌Z-I-C的分批发酵与恒化培养

王 普

(浙江工学院, 杭州)

李友荣

(华东化工学院, 上海)

本文对葡萄糖氧化酶产生菌Z-I-C的分批发酵与恒化培养进行了研究。实验发现, 在以葡萄糖为生长限制性基质的恒化培养中, 该产生菌的维持系数为 0.04 g 葡萄糖/g 菌体·h, 生长得率系数 $Y_G^{m \cdot x} = 0.714$ g 菌体/g 葡萄糖, 最大比生长速率 $\mu_{max} = 0.385h^{-1}$, 饱和常数 $K_s = 4.76$ g/L, 理论最适稀释度 $D_m = 0.260h^{-1}$, 最大酶比活 $(E/X)_{max}$ 为 2.16×10^3 u/mg, 其值较分批发酵的最大酶比活(1.51×10^3 u/mg)提高43%。当向恒化培养的补料培养基中添加0.02%的 α -甲基-D-葡萄糖时, 由于该葡萄糖结构类似物的诱导作用, 可使 $(E/X)_{max}$ 达 3.11×10^3 u/mg, 较分批发酵之值提高106%。

关键词 葡萄糖氧化酶; 分批发酵; 恒化培养

恒化培养可通过生长环境的操纵(稀释速率及限制性基质的种类和浓度)灵活地控制细胞的生理状况, 因而为一广泛使用且非常有效的实验手段。1976年, Toda曾采用恒化器, 对 *S. carlsbergensis* 转化酶的生物合成进行了研究, 并与分批发酵结果进行了比较^[1]。1979年, 他们又研究了 α -淀粉酶、 β -半乳糖苷酶、酸性磷酸酶和 β -果糖苷酶在恒化培养时酶的合成与生长速率的关系^[2]。Davies认为, 在酶的连续生产中, 通过使用适当的碳源限制, 有可能克服分解代谢物阻遏^[3]。此外, 通过恒化培养, 还可获得一些于分批培养过程中所不可能得到的发酵菌株的生理学参数, 从而可以为发酵过程的控制, 小罐试验数据的放大以及从分批培养过渡到半连续和连续发酵提供理论依据。本实验采用葡萄糖限制的恒化器, 对青霉属葡萄糖氧化酶(GOD)产生菌Z-I-C的有关发酵特性进行了研究, 并将所得结果与分批发酵值进行了比较。

材料与方 法

(一)实验菌株

青霉属GOD产生菌Z-I-C, 系华东化工学院发酵调控研究室保藏株。斜面保藏采用蔡氏培养基。

(二)摇瓶种子培养

种子培养基(g/L)为葡萄糖 40, 大豆粉 5, KH_2PO_4 1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $NaNO_3$ 2, KCl 0.5, pH6.0。培养温度为 28 ± 1 °C, 于旋转式摇床(200r/min)振荡培养48h。

(三)发酵培养

1. 分批发酵: 发酵培养基(g/L)为葡萄糖80, 蛋白胨3, KH_2PO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7, $NaNO_3$ 8, KCl 0.5, pH 7.7。采用MD-250型玻璃发酵罐(B. E. MARUBISHI Co., Ltd.)发酵温度控制 $28^\circ C$, 通气量为1:1 vvm, 接种量为5% (v/v), 周期约48 h。

2. 恒化培养: 其装置见图1。开始恒化培养前, 先进行分批发酵, 待发酵液中菌浓达一定值且培养基中养分大部分被消耗掉后(本实验采用葡萄糖限制, 控制罐内残糖 $\leq 0.5\%$), 开始进行恒化培养。

本文于1990年9月29日收到。

通过控制限制性基质——葡萄糖的浓度来控制罐内细胞的生理状况。

研制)测定。

结果和讨论

(一) GOD 产生菌的分批发酵

分批发酵采用 MD-250 型玻璃发酵罐。装量为 1500ml, 搅拌转速为 500r/min, 其他条件同“材料与方法”所述。试验结果见图 2。在发酵前 16h, 菌体生长缓慢, 16—40h 为对数期, 此期间菌量逐渐增加, 糖耗加快, 溶氧迅速下降。40h 后, 逐渐进入稳定期, 菌浓度趋于维持恒定, 糖耗速率减缓, 溶氧亦维持在一较低水平(约为饱和浓度的 10%)。

由分批发酵过程中酶比活随时间变化曲线(图 3)可知, 在发酵前期, 酶比活(E/X)随时间增加而升高, 到 28h 达最大值($1.51 \times 10^3 \text{u/mg}$)。28h 后, 比活力略微下降并基本维持恒定(约为 $1.31 \times 10^3 \text{u/mg}$)。

(二) GOD 产生菌的恒化培养

1. 基础培养基中葡萄糖浓度的确定: 经摇瓶试验, 考查了基础培养基中糖浓度与菌体干重的关系。发现随着初糖浓度的增加, 菌体浓度呈线性增加(见图 4)。

另外, 还考查了不同初糖浓度时发酵残糖降至一定值所需的时间。由表 1 可知, 采用 2% 初糖浓度发酵 20h 后, 即可使罐内残糖降至 0.51%, 从而可以较快进入恒化培养。

由图 4 及表 1 结果, 确定基础培养基的葡萄糖浓度为 2%。

2. 补料培养基中葡萄糖浓度的确定: 恒化培养时, 菌体生长和实验的稀释度范围取决于补料中的葡萄糖浓度。由图 5 可知, 补入糖浓度较高时, 在较低稀释度下罐内残糖便超出菌体生长所需, 不再成为生长限制性因素。反之, 补入糖浓度

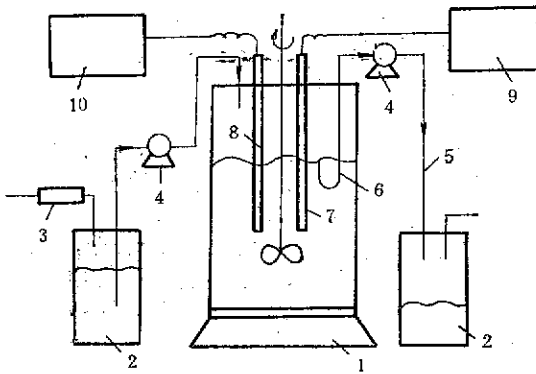


图 1 恒化培养实验装置

Fig. 1 Experimental apparatus of chemostat culture

1. MD-250 型玻璃发酵罐 Jar fermentor type MD-250, 2. 贮瓶 Reservoir, 3. 空气过滤器 Air filter, 4. 蠕动泵 Peristaltic pump type LDB-M, 5. 硅胶管 Silicone tube, 6. 溢流管 Overflow tube, 7. FCY-IV 型溶氧电极 DO electrode model FCY-IV 8. pH 电极 pH electrode, 9. XWC-100 型自动平衡记录仪 Potential difference recorder model XWC-100, 10. 数字显示器 Digital display

恒化培养所用基础培养基和补料培养基的组分同分批发酵(葡萄糖除外)。另外, 培养过程中要求新鲜培养基加入后, 应与罐内培养液迅速混合均匀。为此, 本实验的发酵罐工作体积取 1200ml, 搅拌转速为 700r/min, 其他培养条件同前述分批发酵。

(四) 分析方法

1. 还原糖的测定: 费林法。
2. $\text{NH}_2\text{-N}$ 的定量测定: 甲醛法。
3. 葡萄糖氧化酶酶活力测定: 动态比色法^[4]。
4. 细胞干重测定: 恒重法。
5. pH 测定: pH 电极(东亚电波公司复合电极)测定。
6. 溶氧测定: FCY-IV 型溶氧电极(华东化工学院生化工程教研组

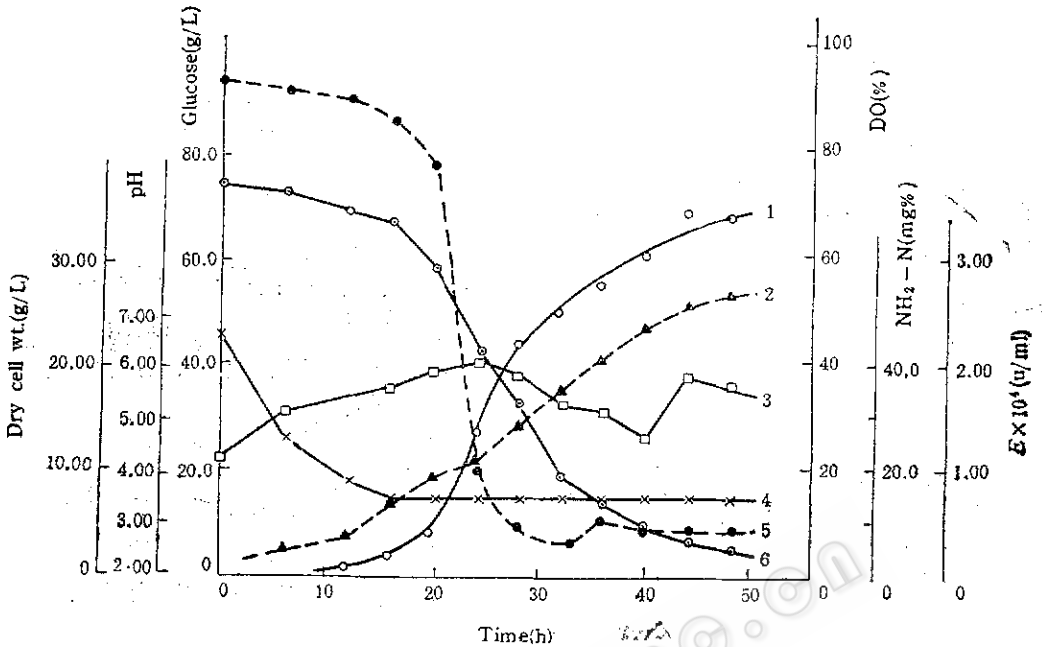


图 2 GOD产生菌Z-I-C分批发酵代谢曲线

Fig.2 Metabolic curve of GOD producing strain Z-I-C in batch culture

1. 酶活Enzyme activity, 2. 细胞干重Dry cell weight, 3. 氨基氮NH₂-N, 4.pH值 pH value, 5. 溶氧Dissolved oxygen, 6. 还原糖浓度Concn.of reduced sugar

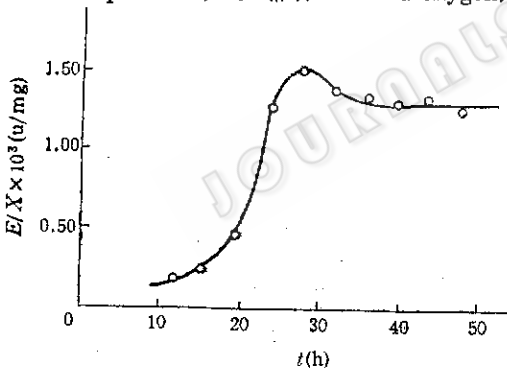


图 3 分批发酵中酶比活变化曲线

Fig.3 Time course of GOD specific activity in batch culture

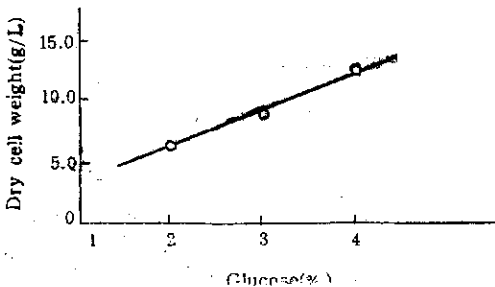


图 4 葡萄糖浓度对菌体生长的影响

Fig.4 Effect of glucose concentration on cell growth

表 1 初糖浓度对恒化培养开始时间的影响

Table 1 Effect of initial glucose concentration on the time shifted to chemostat culture

初糖浓度 Concn. of initial glucose (%)	2	3	4
残糖量 Conc. of residual glucose (%)	0.51	0.50	1.14
发酵时间 Fermentation time(h)	20	34	24

较低时，则实验的稀释度范围较宽。本实验中补料培养基的葡萄糖浓度采用1.5%。

3. 恒化培养稳态的判断：从分批培养过渡到恒化培养，须经一动态响应过程。图 6 为此响应过程的过渡曲线。由此图可知，该过渡态约需4h。此外，从一稳态过渡到另一稳态，亦经过一动态响应过程，同样存在稳态的判断问题。本实验通过间隔为 1h 的连续取样测定，待三次测定结果一致时，即认为已达到稳态。

4. 恒化培养：实验中以葡萄糖为生

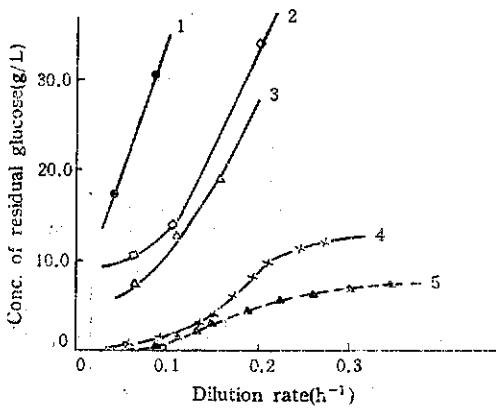


图5 不同补糖浓度时残糖与稀释度的关系
 Fig.5 Relationship between conc. of residual glucose and dilution rate with various amount of glucose addition
 1. 10%, 2. 8%, 3. 6%, 4. 2%, 5. 1.5%

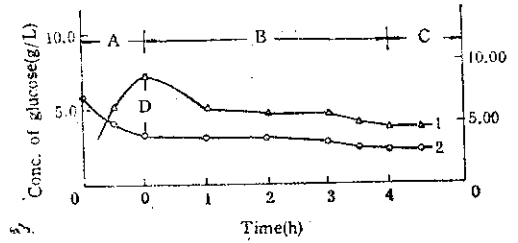


图6 分批培养到恒化培养的过渡态
 Fig.6 Transient state from batch to chemostat culture

A. 分批培养 Batch culture, B. 过渡态 Transient state, C. 稳态 Steady state, D. 开始恒化 Starting point
 1. 细胞干重 Dry cell wt., 2. 葡萄糖浓度 Conc. of glucose

长限制性基质, 测得稳态时各参数与稀释度的关系(见图7)。实验结果表明, 该菌株恒化培养时的最大酶活力出现在 D 为

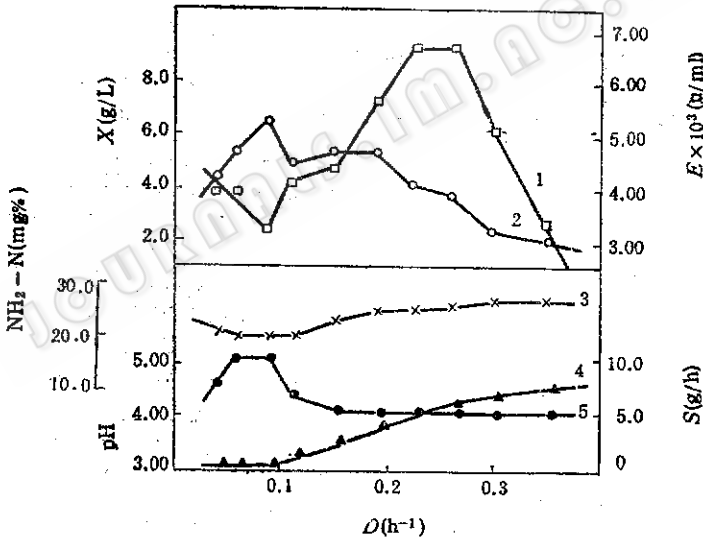


图7 恒化培养中稀释速率对各状态变量的影响
 Fig.7 Effect of dilution rate on various state variables in chemostat culture
 基础料和补料中的葡萄糖浓度分别为 2% 和 1.5%
 Conc. of glucose used in basal and supplementary media are 2% and 1.5%, respectively

1. 酶活 Enzyme activity, 2. 细胞干重 Dry cell wt., 3. 氨基氮 $\text{NH}_2\text{-N}$, 4. 残糖浓度 Conc. of residual sugar, 5. pH 值 pH value

$0.224\text{--}0.260\text{h}^{-1}$ 处。在低稀释度下酶活的降低, 是由于作为酶的生物合成基质——葡萄糖的不足引起的, 而高稀释度下酶活的降低, 则是由于稳态时菌体量的减少所造成。

由图8可知, 该产生菌的最大酶生产速率为 $1.76 \times 10^3 \text{u/ml}\cdot\text{h}$ (D 为 0.260h^{-1} 处), 最大酶比活为 $2.16 \times 10^3 \text{u/mg}$ (D 为 0.301h^{-1}), 后者较分批发酵提高 43%。菌体生长速率 $D \cdot X$ 随稀释度的变化呈典

型的钟罩形，理论最适稀释度($D \cdot X$ 达最大值时的 D) D_m 为 $0.260h^{-1}$ 。将 $D \cdot X$ 曲线外推至 $D \cdot X = 0$ 处，得临界稀释度 $D_c = 0.395h^{-1} = \mu_{max}$ 。当 $D \geq D_c$ 时，培养液中的微生物将全部被“洗出”^[5]。

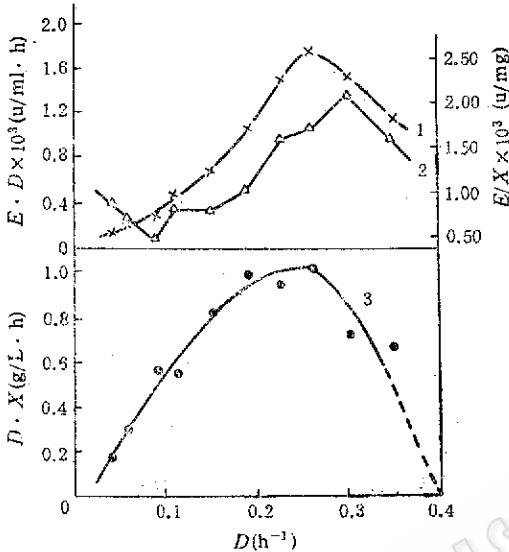


图8 菌体生长速率、酶生产速率及酶比活随稀释度的变化

Fig.8 Changes of biomass productivity, enzyme productivity and specific activity with dilution rate

1. 酶生产速率 Enzyme productivity, 2. 酶比活 Specific activity, 3. 菌体生长速率 Biomass productivity

稳态时，经物料衡算得方程式(1)、

(2)、(3)^[6]：

$$\mu = D \tag{1}$$

$$Y_G = \frac{X}{S_0 - S} \tag{2}$$

$$Q_G = \frac{D(S_0 - S)}{X} \tag{3}$$

式中 μ ：比生长速率， h^{-1} ； D ：稀释速率， h^{-1} ； Y_G ：生长得率系数，g菌体/g基质； X ：罐内菌体浓度，g/L； S_0, S ：补入基质浓度和罐内基质浓度，g/L； Q_G ：基质比消耗速率，g基质/g菌体·h。

$$又, Q_G = \frac{1}{X} \left[- \frac{ds}{dt} \right] =$$

$$\frac{\mu}{Y_G^{m+1}} + m \tag{4}$$

式中 m 为维持系数，g基质/g菌体·h； Y_G^{m+1} 为 $m = 0$ 时的生长得率系数，g菌体/g基质。

在不同稀释度下，经实验测得 X, S 等值后，由方程式(2)，(3)可求得相应的 Q_G 及 Y_G 值。另外，通过 Q_G 对 μ 作图还可得到实验株的 m 值及 Y_G^{m+1} 值。

由图9可知，该菌株的生长得率系数随 μ 不同而改变。 Q_G 对 μ 作图得一直线，由直线的斜率及截矩，求得其 Y_G^{m+1} 为 0.714 g菌体/g葡萄糖，维持系数 m 为 0.04 g葡萄糖/g菌体·h。从经济观点考虑，生产中所用菌株以具有较低的维持系数为好，因为用于维持的碳源为非生产性消耗。对一确定的发酵菌株， m 值随环境因素而改变，因而其值的大小，亦可作为评价菌株生产环境优劣的指标之一。

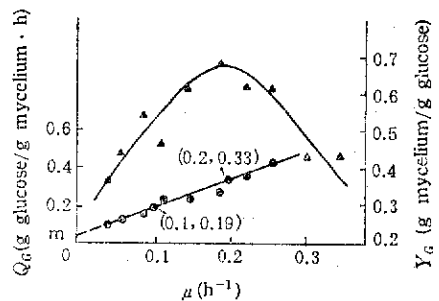


图9 Q_G, Y_G 与 μ 的关系

Fig.9 Relationships between Q_G, Y_G and μ

1. 生长得率系数 Yield factor of growth (Y_G)
2. 基质比消耗速率 Specific rate of glucose consumption (Q_G)

由于该连续过程能够用 Monod 方程描述^[6]：

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \tag{5}$$

式中 μ_{max} 为最大比生长速率, h^{-1} ; K_s 为饱和常数, g/L ; μ 、 S 含义同前述。

因而通过 $\frac{1}{\mu} \sim \frac{1}{S}$ 双倒数作图, 还可求得实验株的饱和常数 K_s 为 $4.76g/L$, μ_{max} 为 $0.385h^{-1}$, 此值与图8 $D \cdot X$ 曲线外推值 $D_c = \mu_{max} = 0.395h^{-1}$ 相接近。

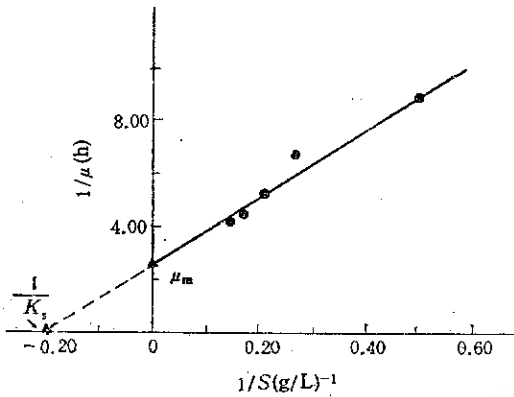


图10 $\frac{1}{\mu}$ 对 $\frac{1}{S}$ 双倒数图

Fig.10 Lineweaver-Burk plot between $1/\mu$ and $1/S$

$$-\frac{1}{K_s} = -2.1 \times 10^{-1}, K_s = 4.76g/L, \mu_m = \frac{1}{2.6} = 0.385h^{-1}$$

5. 补料培养基中添加诱导物 α -甲基-D-葡萄糖: 本实验株在以葡萄糖为碳源时, 存在低浓度下的诱导作用及高浓度下的阻遏作用双重效应。摇瓶培养时, 培养基中加入少量的葡萄糖结构类似物(如 α -甲基-D-葡萄糖和2-脱氧-D-葡萄糖), 可产生较强的诱导作用。为此, 本实验在补料培养基中添加0.02%的诱导物- α -甲基-D-葡萄糖, 其他培养条件同前述恒化培养。由图11可知, 添加葡萄糖结构类似物后, 引起 $D \cdot X$ 曲线的较大变化。一方面 $D \cdot X$ 达最大值时的 D 值由对照恒化培养的 $0.260h^{-1}$ 左移至 $0.148h^{-1}$ 处, 另一方面曲线形状已不再呈钟罩形, 而是在达最大值后, 维持一较最大值略低的水平 (D 为

$0.189-0.347h^{-1}$ 处)。同时, 由于诱导物的加入, E/X 在较宽的稀释度范围内 ($0.173-0.301h^{-1}$) 保持较高水平 ($\geq 2.40 \times 10^3 u/mg$), 这样, 就使得酶的连续生产可在较宽稀释度范围内进行操作, 具有较大的选择性, 而且最大酶比活 ($3.11 \times 10^3 u/mg$) 较对照恒化培养之值提高了44%。

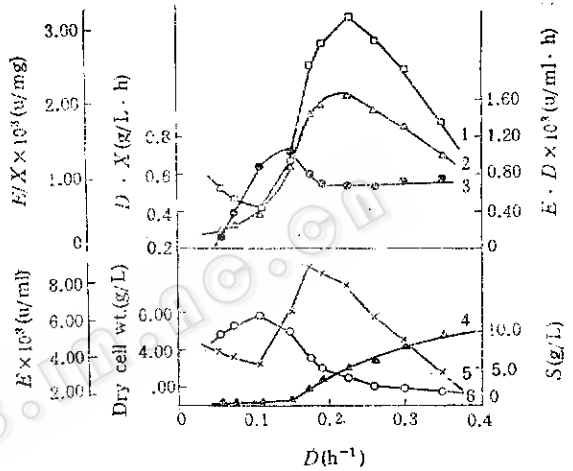


图11 添加诱导物之恒化培养的稳态数据
Fig.11 Steady state data in chemostat culture supplementing with inducer

1. 酶比活 Specific activity, 2. 酶生产速率 Enzyme productivity, 3. 菌体生长速率 Biomass productivity, 4. 残糖浓度 Residual glucose concentration, 5. 酶活 Enzyme activity, 6. 细胞干重 Dry cell weight.

(三) 恒化培养与分批培养的比较

由上述实验结果, 将分批培养与恒化培养在相同发酵周期(48h)内进行一些参数的比较(表2)。

由表2可知, 对照及添加诱导物的恒化培养, 其发酵总酶活分别较批发酵提高13.0%和17.9%, 从基质转化能力比较, 也不低于分批值。由于连续过程中稳态的存在, 可使微生物产酶长时间保持在较佳状态, 而不像分批过程中只可维持较短时间, 因而, 倘若延长发酵周期, 则由于开始的分批培养阶段不需再重复进行,

表 2 分批培养与恒化培养的比较

Table 2 Comparison between batch and chemostat culture

培养方式 Pattern of fermentation	分批培养 Batch culture	对照恒化培养 Chemostat culture	添加诱导物的恒化培养 Chemostat culture with supplement inducer
培养条件 Fermentation conditions	初糖浓度 8 % Initial conc. of glucose 8 % 放罐单位 35000u/ml Enzyme activity 35000u/ml 体积 1500ml (不考虑损失) Volume 1500ml (loss was ignored)	先进行 20h 分批培养 Batch culture 20h 初糖浓度 2 % Initial conc of glucose 2 % 后进行 28h 恒化培养 Chemostat culture 28h $D = 0.224h^{-1}$ $E = 6800u/ml$ $V = 1200ml$	$D = 0.189h^{-1}$ $E = 8200u/ml$ 其他条件同对照 Other conditions were similar to the control
发酵总酶活(u) Total enzyme activity(u)	5.25×10^7	5.93×10^7	6.19×10^7
提高率(%) Enhanced ratio(%)	—	13.0%	17.9%
总耗糖量(g) Total glucose consumption	120.0	136.9	118.2
基质转化力(u/g) Conversion capacity of substrate(u/g)	4.38×10^5	4.33×10^5	5.19×10^5

恒化培养的优越性将更加明显。

从最大酶活量看, 分批培养时酶活可达 35000u/ml 左右, 而恒化培养中, 一般为 6800—8500u/ml。造成这种差别的原因, 是由于连续反应器中名义停留时间比分批过程小得多。再者, 连续过程中菌浓太低也为一影响因素, 因分批过程放罐

时, 菌浓约达 27g/L, 而连续培养中菌浓最大值亦不过为 6g/L 左右。发酵液中酶活较低, 增加了产物提取工段的负担, 因此欲进一步提高产酶, 则须设法提高连续过程中的菌体浓度, 而采用带有部分细胞再循环装置的恒化器则不失为一有效措施。此方面内容有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Toda, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18:1103—1115, 1976.
- [2] Toda, K. et al.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 29(12):747—755, 1979.
- [3] Davies, A.: *J. Gen. Microbiol.*, 14:109, 1956.
- [4] Keston, A. S.: Abstract of American chemical Society, 129th meeting, 31c, 1956.
- [5] 郎行彦等: 抗生素生产工艺学, 化学工业出版社, 北京, 1982.
- [6] 合叶修一, 永井史郎: (胡章助等译) 生物化学工程——反应动力学, 化学工业出版社, 北京, 1984.
- [7] Pirt, S. J.: *Proc. Roy. Soc., Ser. B., Biol. Sci.*, 163:224, 1965.

Biosynthesis of Glucose Oxidase in Batch and Chemostat Culture

Wang Pu Li Yourong*

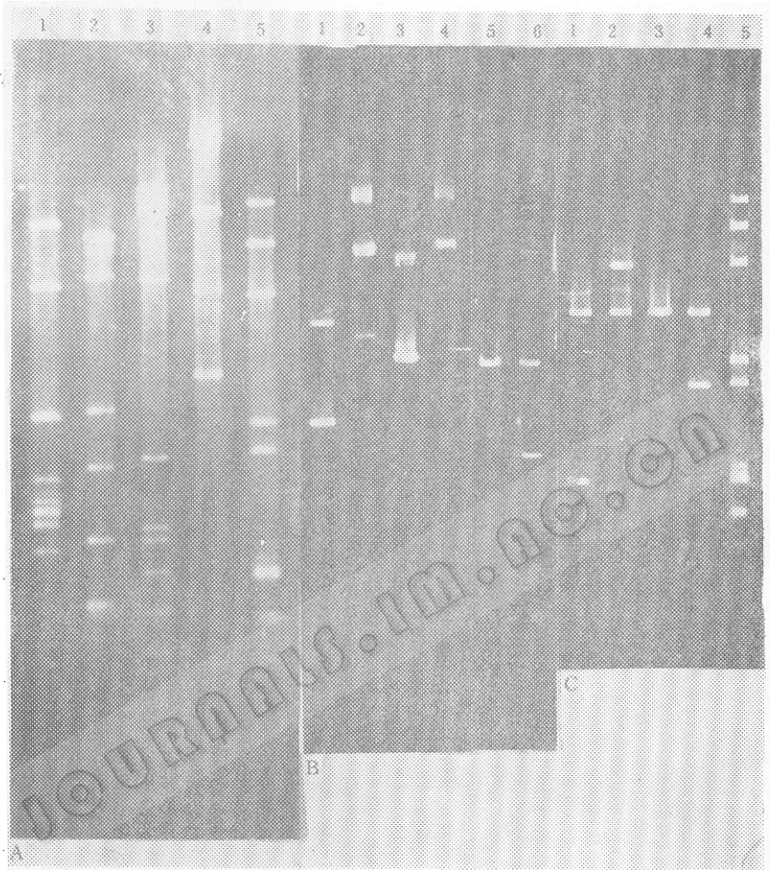
(Zhejiang Institute of Technology, Hangzhou)

(East China University of Chemical Technology, Shanghai)*

The biosynthesis of glucose oxidase(GOD) by an unidentified Penicillium strain Z-I-C in batch and chemostat culture was studied. In a glucose-limited chemostat culture, the experimental results showed that the maintenance coefficient of this strain was 0.04g glucose/g dry cell wt·h; yield factor of growth was 0.714 g dry cell wt./g glucose; maximum value of specific growth rate was 0.385h^{-1} and K_s was 4.76g/L. Optimum dilution rate in theory was 0.260h^{-1} . $(E/X)_{max}$ was increased from $1.51 \times 10^3 \text{u/mg}$ in batch culture to $2.16 \times 10^3 \text{u/mg}$ in chemostat culture and to $3.11 \times 10^3 \text{u/mg}$ in chemostat culture supplemented with 0.02% inducer, α -methyl-D-glucose, an increase of 43% or 106% compared with that of batch culture, respectively.

Key words

Glucose oxidase; batch culture; chemostat culture



A. 噬菌体 α DNA的不同内切酶酶切电泳图

1. Acc I; 2. Ava I; 3. EcoR I; 4. Hae III; 5. Hind III

B. 重组质粒电泳图

1. 重组质粒 I (含 α DNA Hind III-7); 2. 重组质粒 II (含 α DNA Hind III-3)
3. 转化子中提取的 pBR322; 4. 重组质粒 III (含 α DNA Hind III-5)
5. pBR322 Hind III 酶切; 6. pBR322 质粒

C. 重组质粒的 Hind III 酶切电泳图

1. 重组质粒 I (含 α DNA Hind III-7); 2. 重组质粒 II (含 α DNA Hind III-3)
3. pBR322; 4. 重组质粒 III (含 α DNA Hind III-5); 5. α DNA Hind III 酶切