

产葡萄糖异构酶工程菌工业发酵条件模拟研究*

贺家明 赵祥颖

崔涛 伍传金

(山东省食品发酵工业研究设计院 济南 250013) (中国科学技术大学生物系 合肥 230026)

摘要 高效表达葡萄糖异构酶的大肠杆菌工程菌 K38 / pGPI-2, pTKD-GI 菌株, 在玉米浆培养基中能高效合成葡萄糖异构酶, 观察了细菌生长的细胞浓度 (OD)、pH 和酶产生的动态变化。玉米浆培养基成本低、制备工艺简单, 在 50L 发酵罐中酶活力为 143u / mL, 比在 LB 培养基中高约 10 倍。用超声波破碎细胞液作酶源吸附于大孔阴离子交换树脂制成固定化葡萄糖异构酶, 其酶活力达到 10200u / g (干)。

关键词 工程菌, 葡萄糖异构酶, 玉米浆

分类号 TQ925.5 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0093-95

STUDIES ON PRODUCTION CONDITIONS OF ENGINEERED STRAIN PRODUCING D-GLUCOSE ISOMERASE

He Jiaming Zhao Xiangying

(Shandong Food and Fermentation Industry Research and Design Institute, Jinan 250013)

Cui Tao Wu Chuanjin

(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Studies indicate that D-glucose isomers (GI) could be synthesized in corn steep liquor by engineered E.coli strain K38 / pGPI-2, pTKD-GI. We have also determined the optical density (OD), pH and activity of GI during fermentation. Corn steep liquor medium has advantages in low cost, simplicity in technological process and high production GI. The production of GI reaches 143u / ml in 50L fermentor which is ten times as large as that of LB medium. The broken cell solution was able to prepare the immobilized GI adsorbed by the large pore anion exchange resin. The activity of the immobilized GI was 10200u / g dry.

Key words Engineered bacteria, D-glucose isomerase, Corn steep liquor

近年来,基因工程菌的工业应用受到了越来越多的关注与支持^[1]。高效表达葡萄糖异构酶 (Glucose Isomerase, EC5.3.1.5) 的大肠杆菌工程菌 K38 / pGPI-2, pTKD-GI 与其出发菌株产葡萄糖异构酶嗜热链霉菌 M1033^[2]相比,具有对培养条件要求低、发酵周期短和不产生色素等优点。为使其最终进入工业化生产创造条件,我们做了以下工业条件模拟研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

1.1.1 大肠杆菌工程菌: K38/pGPI-2,

* 国家高技术研究发展计划项目 ("863"项目)

Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development.

1998-03-26收稿, 1998-09-27修回

pTKD-GI由中国科学技术大学生物系构建。

1.1.2 出发菌株:嗜热链霉菌 M1033(产葡萄糖异构酶)由山东省食品发酵工业研究设计院选育。

1.2 培养基

1.2.1 大肠杆菌 LB 培养基^[3]:蛋白胨 10g、酵母粉 5g、氯化钠 10g, 定容至 1L 水中, pH7.4。

1.2.2 玉米浆培养基:济南长城淀粉厂生产的玉米浆, 配制成 10% 浓度, pH7.4。

1.2.3 M1033 斜面、种子和发酵培养基同文献[2]。

1.3 细胞浓度(OD)测定方法

培养液经适当稀释后, 于 λ 590nm 下测 OD 值。

1.4 葡萄糖异构酶活力测定方法

10mL 发酵液离心收集细胞, 洗涤后再加 10mL Tris 缓冲液 (pH7.2) 制成菌悬液作被测酶液。按高渗法, 以被测酶液在特定反应系统中于 75℃ 异构化 1h, 用旋光法测定果糖。生成 1mg 果糖的酶量定为一个酶活力单位^[2,4]。

1.5 固定化葡萄糖异构酶活力测定方法

同文献 [3]。

1.6 50L 发酵

MSJ—U3—50L 型自动发酵罐, 日本 B. E. MARUBISHI 公司生产。

2 结果与讨论

2.1 产酶培养条件的优选

2.1.1 利福平 (抗生素) 对工程菌产酶的影响:工程菌 K38 / pGPI-2, pTKD-GI 中的 pGPI-2 质粒带有由 pL 启动子调控的 T7RNA 聚合酶基因, pL 启动子是温度敏感启动子, 当温度升至 42℃ 时 T7 聚合酶基因大量转录, 合成有利福平抗性的 T7 聚合酶, 它能识别 pTKD-GI 中的 T7 启动子, 高效表达葡萄糖异构酶基因。在培养前期升温前加入利福平是为了阻断宿主细胞聚合酶的翻译, 减少细胞自身蛋白质的合成, 目的想增加葡萄糖异构酶蛋白的合成。但考虑到工业化生产, 培养基中最好不添加利福平, 所以对于添加利福平对酶活力的影响作了以下摇瓶试

验, 结果见表 1。

表1 利福平对产酶能力的影响

培养基	利福平 (mg/mL)	酶活力 (u/mL)
LB培养基含甘油0.2%	0	11.2
LB培养基含甘油0.2%	20	9.8

结果表明添加利福平, 酶活力不但没有提高, 反而稍有降低, 这可能是因为添加利福平影响细胞生长, 使细胞浓度降低。所以发酵中不需要添加利福平。

2.1.2 氨苄青霉素 (抗生素) 对工程菌产酶的影响:工程菌 K38/ pGPI-2, pTKD-GI 中 pTKD-GI 质粒带有青霉素抗性基因, 为了阻止质粒已丢失细胞的生长, 在培养过程中需添加氨苄青霉素。但从酶的食品安全方面考虑, 进行了不加氨苄青霉素的试验, 发现如种子培养基连续几代不加氨苄青霉素, 产酶能力则很快下降, 原因是质粒丢失细胞比例增加; 如在种子培养阶段加氨苄青霉素, 发酵时不加, 则对产酶能力影响不大。

2.1.3 工业培养基的筛选:参考葡萄糖异构酶和其它生产用发酵培养基, 考虑大肠杆菌的营养特点, 本着工业上经济实用易得的原则, 选择了豆饼粉、麸皮和玉米浆等作基本营养成分进行了产酶实验, 结果见表 2。从表中可以看出玉米浆具有明显的优势, 且处理简单, 因此选择玉米浆继续实验变化。

表2 工业用培养基的筛选

培养基	p (g/L)	酶活力 (u/mL)
豆饼水解液	10	5.8
	20	8.9
	30	14.3
麸皮水解液 + 豆饼水解液	30+6	12.2
	30+9	10.6
	30+24	9.6
玉米浆	20	11.4
	30	32.9
	50	33.7
LB+0.2%甘油		11.0

2.1.4 玉米浆浓度对产酶能力的影响:玉米浆加水稀释至不同浓度, 调 pH7.4 后过滤去除沉淀, 杀菌、发酵、测定酶活力, 结果表明, 玉米浆

浓度 3%~10% 时,随着浓度增加,细胞生长越好,产酶能力也不断增加,到 10% 浓度酶活力达到最高点。

2.1.5 玉米浆添加其它营养物对产酶能力的影响: 为了进一步提高菌种的产酶能力,用玉米浆为基质添加其它营养物甘油、葡萄糖,酶诱导物木糖,酶热稳定性金属离子 Co^{2+} 。结果都不如单独用 10% 玉米浆好。

2.2 发酵罐发酵试验

50L 自动发酵罐,培养基为 10% 的玉米浆, pH7.2, 接种量 5%, $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度 150r/min, 通气量 1:0.2~0.25, 发酵 12h 升温至 42°C , 保持 30~40min, 再冷却至 $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 继续培养 2.5~3h, 观察了发酵过程中 OD、pH 和酶活力的动态变化(见图 1): 工程菌 K38/pGPI-2, pTKD-GI 生长较快, 2h 后即进入对数生长期, 12h 左右达最高峰, 以后进入迟缓期; 发酵液 pH 逐步上升, 14h 后维持在 8.8~8.9 左右; 培养 14~15h 时葡萄糖异构酶大量合成, 细胞生长进入衰退期, 酶量亦达高峰, 平均酶活力 143u/mL。

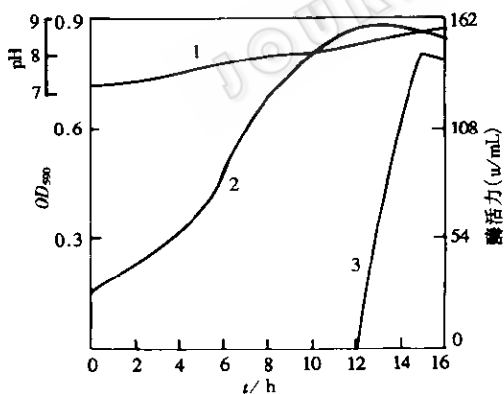


图1 工程菌K38/pGPI-2, pTKD-GI的发酵图

1. pH, 2. OD_{590} , 3. 酶活力(u/mL)

2.3 酶的固定化小试

发酵液处理: 离心收集细胞, 洗涤, 加适量磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH7.8), 打匀, 超声破碎后离心取上清液(酶活力在 250u/mL 以上), 60°C 水浴搅拌保温 2~3h, 离心去沉淀, 上清液作酶源用于固定化。固定化方法同文献[3], 结果见表 3, 平均固定化葡萄糖异构酶活力达 10200u/g(干固定化酶), 略高于出发菌株 M1033 的固定化酶活力(9500u/g 干固定化酶)。

表3 酶的固定化结果

实验批数	固定化酶活力(u/g干)	破壁得率(%)	固定化得率(%)
1	9800	72.3	75
2	10500	76.8	77
3	10200	74.7	78

2.4 结论

高效表达葡萄糖异构酶的工程菌大肠杆菌 K38/pGPI-2, pTKD-GI, 以玉米浆为原料, 在 50L 发酵罐中酶活力为 143u/mL; 发酵产生葡萄糖异构酶发酵时间短, 为出发菌株 M1033 的 1/5; 发酵能耗低, 为 M1033 的 1/6; 发酵原料单一, 处理简单; 由于细胞不产生色素及用细胞作酶源, 固定化葡萄糖异构酶色泽浅, 活力达到 10200u/g(干固定化酶), 高于出发菌株嗜热链酶菌 M1033 的固定化异构酶活力 9500u/g(干)。综合起来, 工业化前途优于 M1033。

参 考 文 献

- [1] 于秀琴, 马清钧. 微生物学报, 1993, 33(3): 177~188.
- [2] 贺家明, 付光胜, 侯永勤等. 微生物学报, 1992, 32(5): 380~382.
- [3] 贺家明, 袁建国, 侯永勤等. 微生物学报, 1993, 33(3): 187~191.