

不同水解度的豆饼粉对轮枝链霉菌发酵生产谷氨酰胺转胺酶的影响

李赞高, 沐万孟, 江波, 袁士芳

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 谷氨酰胺转胺酶在食品行业应用广泛, 其可用轮枝链霉菌发酵生产。豆饼粉是一种廉价的富含蛋白质的工业原料, 直接用作氮源不能被轮枝链霉菌利用。本文使用 pH-STAT 法, 将豆饼粉水解成 DH 为 3%、5%、7%、9% 和 12% 等一系列的酶解液, 并将其用作轮枝链霉菌的氮源。研究发现, 在培养基中添加质量浓度为 20 g/L、DH=5% 的豆饼粉酶解液可显著提高谷氨酰胺转胺酶的生产, 其酶活为 4.2 U/mL, 具有一定的应用价值。

关键词: pH-STAT 法; 豆饼粉; 谷氨酰胺转胺酶; 轮枝链霉菌

中图分类号: TQ925; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2008)05-0409-03

Effects of the Enzymatic Hydrolyzate of Soybean Cake Powder with Different Degree of Hydrolysis on Transglutaminase Production by *Streptoverticillium*

LI Yun-gao, MU Wan-meng, JIANG Bo, YUAN Shi-fang

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Transglutaminase from *Streptoverticillium* SK4.001 was widely used in food industry, but could not directly digest the soybean cake powder, a cheap industrial raw material with high content of proteins. In this paper, hydrolyzed soybean cake powders with different degree of hydrolysis (3%, 5%, 7%, 9% and 12%) were obtained by pH-STAT method and their effects on the transglutaminase production by *Streptoverticillium* were investigated. The result showed that the yield of transglutaminase was greatly improved by using the hydrolyzate of soybean cake powder as nitrogen source with its content and DH being of 20 g/L and 5%, respectively, and the enzyme activity obviously increased to 4.2 U/mL.

Key words: pH-STAT; soybean cake powder; transglutaminase; *streptoverticillium*

谷氨酰胺转胺酶 (Transglutaminase, 简称 TGase, E.C.2.3.2.13) 是一种催化酰基转移反应的转移酶, 它可使酪蛋白、肌球蛋白和乳球蛋白等蛋白质分子之间产生交联, 从而改变食品蛋白质的功能性质^[1], 因此在食品加工业中有着广泛的应用。1989 年日本味之素公司使用轮枝链霉菌 (*Streptoverticillium*) S-1182 菌株生产谷氨酰胺转胺酶并投放市场, 获得了巨大的经济效益^[2]。

从轮枝链霉菌 S-1182 用于生产 TGase 开始各国学者纷纷开始研究相关课题。1996 年 Zhu^[3]等优化了轮

收稿日期: 2008-01-10

作者简介: 李赞高 (1983-) 男, 江苏无锡人, 在读硕士研究生, 主要从事生物技术领域研究工作

通讯作者: 江波, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术领域研究工作

枝链霉菌的产酶培养基, 使酶活提高了 4 倍, 为 0.9 U/mL。1997 年 Junqua^[4]等优化了 *Streptoverticillium cinnamomeum* 的培养基, 使 TGase 的酶活提高 3 倍。1998 年 Zhu^[5-6]等发现 *Streptoverticillium mobaraense* 在发酵后期, 由于发酵液中的游离氨基酸与蛋白质被 TGase 作用, 影响了菌体的生长和产酶, 因此采用流加硫酸铵的方法使酶活提高了 80%。

氮源对谷氨酰胺转胺酶的生产具有十分重要的作用, 有研究认为蛋白质水解物更适宜作为氮源^[7-8]。

豆饼粉是一种廉价的富含蛋白质的工业原料, 虽然豆饼粉直接用作氮源时不能被轮枝链霉菌利用, 但是豆饼粉用酶、酸、碱水解可获得肽和氨基酸的混合物。常忠义^[9]等探讨了豆饼粉酸水解液对产谷氨酰胺转胺酶的影响, 研究发现可以较大提高酶活。由于高

压酸水解可能会对一些营养成分造成不良影响, 故用酶水解所得的酶解液可能更适合微生物的生长和发酵产酶。本文用 pH-STAT 法将豆饼粉水解成 DH 为 3%、5%、7%、9% 和 12% 等一系列的酶解液, 并将其用作轮枝链霉菌的氮源, 研究其对轮枝链霉菌产谷氨酰胺转氨酶的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

(1) 菌种: 轮枝链霉菌 (*Streptovercillium* SK 4.001), 江南大学应用酶技术实验室保藏。

(2) 主要试剂: CBZ-Gln-Gly、L-谷氨酸- γ -单羟肟酸: Sigma 公司; 还原型谷胱甘肽: 华美生物工程有限公司; 其它试剂均为分析纯。

(3) 培养基 (g/L):

斜面培养基: 高氏 1 号: 淀粉 20, 硝酸钾 1, 氯化钠 0.5, 硫酸镁 0.5, 磷酸氢二钾 0.5, 硫酸亚铁 0.01, 琼脂 20, pH 7.2~7.4。

种子培养基: 甘油 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 5, 硫酸镁 2, 磷酸氢二钾 2, pH 7.0。

发酵培养基: 甘油 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 7.5, 硫酸镁 2, 磷酸氢二钾 2, 人造沸石 1, pH 7.0。

1.2 实验仪器

721 型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 电热恒温水浴锅, 上海医疗器械五厂; PHS-2 型酸度计, 上海第二分析仪器厂; HYG-II 型回转恒温调速摇瓶柜, 上海医药工业研究院。

1.3 实验方法

1.3.1 培养方法

将斜面孢子以 4% 的接种量接入种子培养基培养。培养条件为: 30 °C, 210 r/min, 培养 24 h。然后以 8% 的接种量, 接入发酵培养基。培养条件为: 30 °C, 210 r/min, 培养 48 h。

1.3.2 豆饼粉酶解方法

反应在酶反应器内进行。

称取 30 g 豆饼粉, 在搅拌状态加入到 300 mL 的水中煮沸 10 min, 冷却至 55 °C 时进行恒温水浴, 加入 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.0, 加入蛋白酶液进行酶解并开始计时, 反应时不断滴加 2 mol/L NaOH 保持溶液的 pH 至 8.0, 每隔 5 min 记录碱液的消耗量直到反应达到所需水解度为止。灭酶, 离心, 取其上清液, 并测其蛋白质的含量。

1.3.3 生物量测定方法

取一定体积的发酵液, 离心, 取上清液测定 TGase

酶活、可溶性残余甘油量。将菌体置于 100 °C 烘箱中加热至恒重, 所得即为菌体干重。

1.3.4 酶活测定方法

谷氨酰胺转氨酶酶活测定方法采用比色法^[1]: 以 CBZ-Gln-Gly 为作用底物, L-谷氨酸- γ -单羟肟酸做标准曲线。1 个单位的谷氨酰胺转氨酶酶活定义为 37 °C 时 1 min 催化形成 1 μ mol 的 L-谷氨酸- γ -单羟肟酸的酶量 (U/mL)。

1.3.5 蛋白质含量测定方法

福林酚法^[10]。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源对谷氨酰胺转氨酶产量的影响

表 1 为不同氮源对轮枝链霉菌产谷氨酰胺转氨酶的影响。

表 1 不同氮源对谷氨酰胺转氨酶合成的影响

Table 1 Different nitrogen source effect on transglutaminase

种类	添加量(g/L)	酶活(U/mL)	终 pH
鱼粉蛋白胨	20	3.5	6.88
大豆蛋白胨	20	2.22	6.40
豆饼粉	20	0.25	7.26
酵母膏	20	2.84	6.82
玉米浆	20	2.01	6.80

从表 1 知豆饼粉作为氮源时轮枝链霉菌的谷氨酰胺转氨酶的产量很低; 但当氮源为鱼粉蛋白胨时, 谷氨酰胺转氨酶的酶活为 3.5 U/mL, 可见鱼粉蛋白胨能很好地被轮枝链霉菌利用。

2.2 不同水解度的豆饼粉酶解液对产酶的影响

按发酵培养基的配制方法, 考察 20 g/L 的不同水解度的豆饼粉酶解液和鱼粉蛋白胨对轮枝链霉菌的菌体生长和产酶情况, 结果如表 2。

表 2 豆饼粉不同水解度的酶解液对产酶的影响

Table 2 Different DH effect on transglutaminase

豆饼粉水解度(DH)	菌体量/($\times 10^{-2}$ g/mL)	酶活/(U/mL)
3%	4.4	3.69
5%	4.8	3.95
7%	4.4	2.54
9%	4.0	1.83
12%	3.0	1.23
对照(鱼粉蛋白胨)	4.0	3.50

从表 2 可知, 豆饼粉经酶水解后, 轮枝链霉菌产谷氨酰胺转氨酶的效率大大提高。和未经酶解的豆饼粉相比, 菌体量和酶活大大提高。当水解度为 5% 时, 培养基中的酶活、菌体量和对照 (鱼粉蛋白胨) 相比

都有所增加,酶活从对照的 3.5 U/mL 增加到 3.95 U/mL,而菌体量亦从对照的 4×10^{-2} g/mL 提高到 4.8×10^{-2} g/mL。可见,当豆饼粉中的蛋白质被水解为更小分子量的肽和氨基酸时,其可被轮枝链霉菌更好地吸收和利用。

另从表 2 知,随着水解度的增加,酶活和菌体量反而有一定程度的下降,说明高水解度的豆饼粉水解液对菌体生长和产酶有抑制作用,其抑制机理尚不清楚。

2.3 DH=5 的豆饼粉酶解液对产酶的影响

用 DH=5 的豆饼粉酶解液配制一系列的培养基,使其在培养基中的所含蛋白质的质量浓度分别为 10 g/L、15 g/L、20 g/L、30 g/L 和 38 g/L,分别培养,并测其酶活和菌体量。实验结果如表 3。

表 3 DH=5 的不同浓度的豆饼粉酶解液对产酶的影响

Table 3 The effect of Different concentration of soybean cake powder hydrolyzates (DH=5) on transglutaminase

培养基	蛋白质质量浓度/(g/L)	菌体量/ $(\times 10^{-2}$ g/mL)	酶活/(U/mL)
DH=5 的 豆饼粉	10	4.0	2.81
	15	4.4	3.73
	20	4.8	4.20
	30	4.8	4.02
	38	4.8	3.95
鱼粉蛋白胨 20 g/L		4.0	3.50

从表 3 可看出,当培养基中的 DH=5 的豆饼粉为 20 g/L 时,谷氨酰胺转胺酶的酶活最高,为 4.2 U/mL。

3 小结

在轮枝链霉菌产谷氨酰胺转胺酶的发醇培养基中添加质量浓度为 20 g/L、DH=5%的豆饼粉酶解液可显著提高谷氨酰胺转胺酶的产量,其酶活为 4.2 U/mL。

参考文献

- [1] Folk J E. Transglutaminase [J]. *Annu. Rev. Biochem.*,1980, 49:517-531
- [2] 王璋,王灼维,莫湘筠.微生物谷氨酰胺转胺酶生产菌株的育种研究[J].*中国生物工程杂志*,2003,23(6),1-6
- [3] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*[J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 50: 291-298
- [4] Junqua M, Duran R., Gancet C, et al. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental design [J]. *Appl. Microbiol. Biotech*, 1997, 48:730-734
- [5] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. Microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*: Analysis of amino acid metabolism using mass balance [J]. *Enzyme and Microbial Technology*,1998,23: 216-226
- [6] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1998, 49: 251-257
- [7] 常忠义,江波,王璋.酪蛋白水解物对轮枝链霉菌 SK-1 产谷氨酰胺转胺酶的影响[J].*郑州工程学院院报*,2001,22(1):66-68
- [8] 杨立刚,江波,王璋.氮源对谷氨酰胺转胺酶合成的影响[J].*生物技术*,2002,12(2):11-13
- [9] 常忠义,杨雪霞,庄晓辉,等.氮源水解液对链霉菌转谷氨酰胺酶合成的影响[J].*华东师范大学学报(自然科学版)*,2005, 12(5-6):183-187
- [10] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社, 1998

(上接第 414 页)

- [1] 何子安,戚挺华,曾广信,等.中国蝮蛇毒中舒缓激肽增强肽的研究[J].*生物化学与生物物理学报*,1981,13(5):451-459
- [2] Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase[J]. *Biochem Biophys Acta.*,1979,566: 128-137
- [3] Yamamoto N, Ejiri M, Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use[J]. *Curr Pharm Des.*,2003,9:1345-1355
- [4] Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food

proteins[J]. *J Biopolymers*,1997,43:119-128

- [5] Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases[J]. *Biofactors*,2000,12:143-146
- [6] DONG LIU, et al. High-Level Expression of Milk-Derived Antihypertensive Peptide in *Escherichia coli* and Its Bioactivity[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007,55(13):5109-5112