



重组大肠杆菌摇瓶发酵 产环糊精葡基转移酶条件的优化

张兴芳¹,王荫榆²,郭本恒^{2,*},吴正钧²

(1.上海海洋大学食品学院,上海 200090;

2.光明乳业股份有限公司技术中心,上海 200072)

摘要:对一株表达环糊精葡基转移酶基因工程菌 *E.coli* BL21 (DE3) 产环糊精葡基转移酶的发酵条件进行了研究。利用单因素实验和正交实验获得该菌株产环糊精葡基转移酶的最佳条件为:种子培养时间 14h,接种量 3%,培养温度 37℃,培养基初始 pH8.0,发酵培养基的组成为玉米粉 1.5%、玉米浆 6%、蛋白胨 1.0%,500mL 三角瓶装液量为 50mL,210r/min 振荡培养,其发酵液酶活可达 5010U/mL。

关键词:重组大肠杆菌,环糊精葡基转移酶,发酵条件

Study on optimization of production conditions of cyclodextrin glucanotransferase by Recombinant *E.coli*

ZHANG Xing-fang¹, WANG Yin-yu², GUO Ben-hen^{2,*}, WU Zheng-jun²

(1.College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2.Technology Center, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200072, China)

Abstract: Production conditions of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) by Recombinant *E.coli* were studied. The optimal fermentation conditions for cyclodextrin glucanotransferase production were determined by a single-factorial experiment and orthogonal experiment. The results showed that the optimal conditions were as follows: inoculation time and inoculation amount was 14h and 3% respectively, incubation temperature 37℃, pH 8.0. The compositions of fermentation medium were maize powder 1.5%, corn steep liquor 6% and peptone 1.0%. The load of 500mL-flask was 50mL and the shaking incubation took 24h at 210r/min and the enzyme activity could reach to 5010U/mL.

Key words: Recombinant *E.coli*; cyclodextrin glucanotransferase; fermentation conditions

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2009)05-0188-04

环糊精葡基转移酶 (CGTase, E.C.2.4.1.19) 属于 α -淀粉酶家族,能够催化淀粉及相关基质进行分子间转糖基反应合成环糊精 (Cyclodextrin, CDs)。CDs 有三种主要的类型,分别是由 6、7 和 8 个 α -(1 $\rightarrow$ 4) 糖苷键连接的 α -CD、 β -CD、 γ -CD。环糊精具有内疏水外亲水的筒形结构,能与许多疏水客体化合物或功能基团形成包合物^[1],从而改变其物理或化学性质。环糊精这种独特的性质使其在食品、医药、农业、化妆品、化学、环保等领域有广泛的应用^[2-6],这使得 CGTase 的生产研究具有重大意义。但是因为菌种产酶量不高导致其应用受到限制,因而寻找利用淀粉产生大量环糊精的微生物菌株非常重要。目前,CGTase 的基因已可以从 30 多种微生物中分离、提纯和鉴定,通过基因修饰和改造等手段将该酶基因整合到适当表达载体中以提高酶产量的研究方

法日益得到广泛应用^[7,8]。本实验在前期研究的基础上,对产环糊精葡基转移酶的基因工程菌 *E.coli* BL21 (DE3) CGTase 的摇瓶发酵条件进行了研究,并优化了发酵条件,得到了高酶活产量的发酵工艺,为大规模生产发酵提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

E.coli BL21 (DE3) CGTase 包含有来源于嗜碱性芽孢杆菌 N-227 β -环状糊精葡基转移酶基因,表达载体为 PET28b,卡那霉素 (Kan) 抗性,由光明乳业技术中心构建保存;LB 液体培养基^[9,10] 胰蛋白胨 10g/L,酵母粉 5g/L,NaCl 10g/L,pH 7.0~7.2,高压蒸汽灭菌 118℃,15min;LB 固体培养基 LB 液体培养基添加 1.5% 琼脂糖;发酵培养基 LB 液体培养基为基础,添加相应的需要物质;上述培养基有抗性的为添加卡那霉素,添加量为 10 μ g/mL 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 酶液的制备 活化后的菌体以 1% 的接种量

收稿日期:2008-09-17 * 通讯联系人

作者简介:张兴芳 (1984-),女,硕士,研究方向:食品生物技术。

接到 LB 液体培养基中,37℃,200r/min 摇床过夜培养后,加入一定量 Triton-X 和甘氨酸^[1],终浓度分别为 0.5% 和 1%,37℃ 摇床继续培养 8h 后,7000 × g、4℃ 离心 10min,除去菌体,所得上清液即为粗酶液。

1.2.2 生物量的测定 吸取 1mL 培养液,加水至 10mL,于 600nm 波长处测定吸光值。

1.2.3 酶活的测定 取 10μL 适当稀释的酶液,加入 0.2mol/L 甘氨酸 - NaOH - NaCl 缓冲液 (pH8.55) 0.2mL,再加入 0.2% 马铃薯淀粉液 0.2mL,振荡,于 40℃ 水浴 10min,立即加入 0.5mol/mL 醋酸 0.5mL 终止反应,然后加入 0.005% 的碘液显色,同时以蒸馏水为空白,不加酶液为对照,在 700nm 波长下测吸光度 (OD)。一个酶活单位定义为使吸光度下降 10% 的酶量,按下式计算:

$$\text{一个酶活单位 (U/mL)} = \frac{a-b}{a} \times 1000 \times \text{酶液稀释倍数}$$

释倍数

式中:a 为对照组的吸光度,b 为样品的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 种子培养时间的确定

种子培养时间即种龄,对大肠杆菌发酵过程的影响较大。适宜的种龄应是菌种对数生长的后期,此时的种子具有较强的生长活力,而且菌体浓度相对较高,有利于大肠杆菌的迅速积累。由图 1 所示的菌种的生长曲线可知,14h 时菌种正处于对数生长期末,因此选择种子培养时间为 14h。

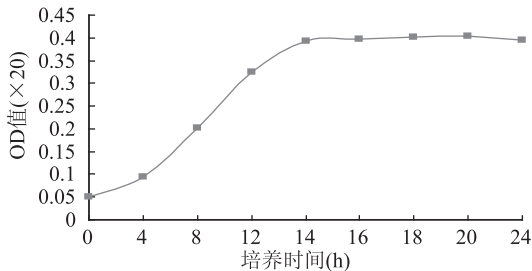


图 1 大肠杆菌 *E.coli* BL21 (DE3) CGTase 的生长曲线

2.2 种子接种量的确定

种子接种量的大小对发酵周期的长短和发酵水平的高低有一定的影响。接种量太小,菌种增殖缓慢,培养时间延长,会造成菌丝结块等发酵异常,不利于菌体生长和产酶;而接种量过大,会使菌种生长过快,培养基黏度增加,导致基质消耗过快,溶氧不足,菌种容易衰老,也不利于产酶。因此,应采用适合的接种量,在合理地缩短发酵周期的同时,又能得到较高的发酵水平。

将培养 14h 的新鲜种子按 1%、3%、5%、8%、10% 的接种量分别接入基础发酵培养基中,37℃,200r/min 摇床过夜培养后,加入一定量 Triton-X 和甘氨酸,继续培养 10h 后,测发酵液生物量和酶活。由图 2 可以看出,接种量以 3% 为好,此时菌种的生物量和产酶量最高;接种量超过 3%,对菌体生长和产酶都有一定的抑制。

2.3 发酵培养基的优化

2.3.1 不同碳源对菌株产 CGTase 的影响 在前期

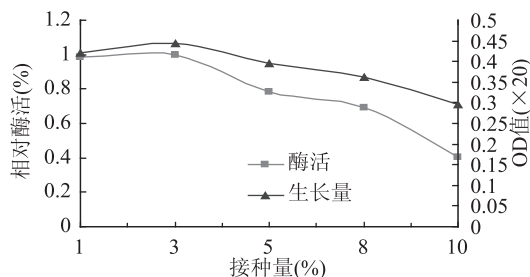


图 2 接种量对发酵的影响

的研究中,确定了葡萄糖作为初始碳源的最佳产酶浓度为 0.2%。在 CGTase 的生产中,淀粉基质是一个非常重要的培养基组成成分。淀粉不仅是产 CGTase 微生物生长的碳和能量来源,同时也是 CGTase 生产的诱导物,所以淀粉是发酵生产 CGTase 的重要因素。在基础培养基中改用不同的碳源培养发酵后的产酶情况见表 1。

表 1 不同碳源对菌株产 CGTase 的影响

碳源	酶活力 (U/mL)
1% 可溶性淀粉	4700
1% 马铃薯淀粉	4396
1% 玉米粉	4527
1% 糊精	960
0.2% 葡萄糖	467
无碳源	94.2

由表 1 可以看出,菌株以可溶性淀粉为碳源时最有利于菌株产酶。当用可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米粉作碳源时,发酵产酶活力远远高于以糊精、葡萄糖为碳源时的产酶活力,这是因为这些淀粉类物质可能含有 CGTase 生成的诱导因子;而不同的淀粉类物质诱导产酶活性的差异可能和它们自身的理化性质有关。由于玉米粉价格便宜,来源广,处理方便,因此我们选择玉米粉为碳源。

2.3.2 不同氮源对菌株产 CGTase 的影响 以等量氮源替换基础氮源,考察不同氮源对菌株产酶能力的影响。如表 2 所示,菌株能够利用无机氮源,但在这些含有无机氮源的培养基中 CGTase 酶活力很低;相比较所用的几种有机氮源,玉米浆最佳,由于玉米浆中含有 4% 的氮,其中包括许多微生物生长代谢所必需的氨基酸,如赖氨酸、蛋氨酸等,玉米浆一方面满足了菌株对氮源的需要,同时也满足了对生长因子的要求,从而有助于合成 CGTase。因此,我们选用玉米浆和蛋白胨作为菌株发酵的复合氮源。

表 2 不同氮源对菌株产 CGTase 的影响

氮源	酶活力 (U/mL)	氮源	酶活力 (U/mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	165	酵母膏	3740
NH ₄ NO ₃	138	玉米浆	4952
蛋白胨	4671	无氮源	85.7

2.3.3 产酶培养基的配方优化 将培养基的主要成分玉米粉、蛋白胨和玉米浆三个因素作三水平的正交实验,因素水平见表 3,结果见表 4。

由极差分析可知,各因素对结果影响的主次顺序为:B(蛋白胨) > A(玉米粉) > C(玉米浆),蛋白胨是影响酶活的最主要因素;实验得到最优水平为 A₂B₂C₃。

表3 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 玉米粉(%)	B 蛋白胨(%)	C 玉米浆(%)
1	1.0	0.5	4
2	1.5	1.0	5
3	2.0	1.5	6

表4 正交实验结果表

实验号	A	B	C	酶活 ($\times 10^3$ U/mL)
1	1	1	1	3.8
2	1	2	2	4.89
3	1	3	3	4.81
4	2	1	2	4.22
5	2	2	3	4.74
6	2	3	1	4.57
7	3	1	3	4.02
8	3	2	1	4.77
9	3	3	2	4.13
K ₁	13.50	12.03	12.67	
K ₂	13.53	13.6	13.8	
K ₃	12.92	14.4	13.481	
k ₁	4.50	4.01	4.382	
k ₂	4.51	4.80	4.413	
k ₃	4.31	4.50	4.52	
R	0.20	0.79	0.14	

2.4 发酵工艺条件对产酶的影响

2.4.1 培养基初始 pH 对菌株产 CGTase 的影响 pH 的变化会引起菌体细胞膜透性和各种酶活力的改变,影响菌体对基质的利用速率和细胞结构,以至影响菌体的生长和产物的形成。实验考察了灭菌前培养基初始 pH 为 7.0、7.2、7.5、8.0、8.5、9.0 对菌株产 CGTase 的影响,结果如图 3 所示。

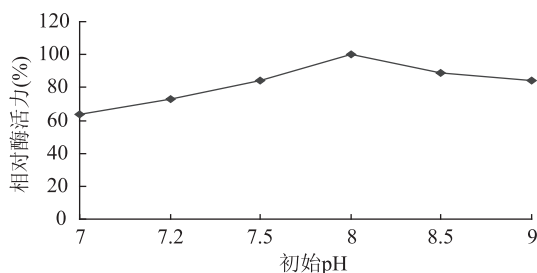


图3 初始 pH 对菌株产 CGTase 的影响

由图 3 可看出,培养基灭菌前初始 pH 为 8.0 时,菌株所产酶活力最高,因此培养基灭菌前的初始 pH 应控制在 8.0 左右。

2.4.2 培养温度对产 CGTase 的影响 在不同温度下进行发酵,测定酶活,结果见图 4 所示。结果显示,温度为 37℃ 时,更有利于产酶,这与大肠杆菌的最适生长温度相一致。

2.4.3 装液量和转速对产 CGTase 的影响 在 500mL 三角瓶中装入不同量的发酵培养基,在其它条件相同的情况下进行产酶实验,发现装液量对产酶的影响较大,结果见图 5。

在 500mL 三角瓶中装入 50mL 的发酵培养基,其它条件相同的情况下以不同转速进行产酶实验,结果见图 6。

大肠杆菌属于兼性厌氧微生物,培养基中的溶

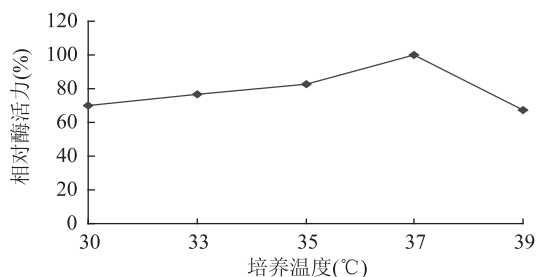


图4 培养温度对产 CGTase 的影响

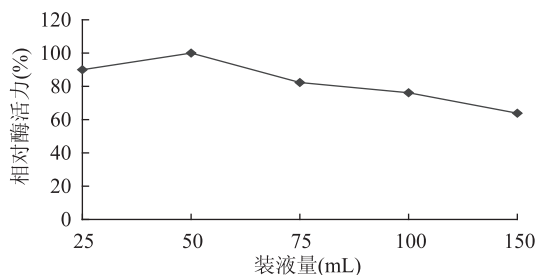


图5 装液量对产 CGTase 的影响

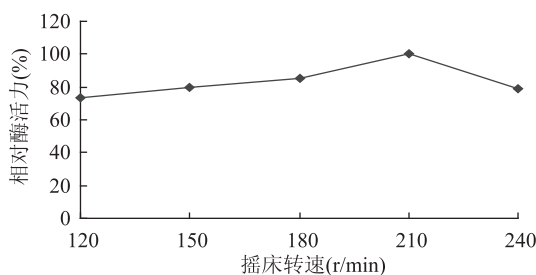


图6 摇床转速对产 CGTase 的影响

氧过高或过低均不利于产酶。由图 5、图 6 可知,摇床转速过高或装液量过小,发酵液翻滚过于强烈,培养基中所含溶解氧浓度过高,对发酵结果有负面影响;而摇床转速过低或装液量过大,培养基中溶解氧浓度不能满足菌体生长和产酶的需求,会对其产生抑制,因此选择摇床转速为 210r/min,装液量为 50mL/500mL。

3 结论

本实验结果表明,蛋白胨是培养基主要组成成分中影响产酶的最主要因素。通过单因素实验和正交实验确定了该菌株产环糊精葡基转移酶的最佳条件为:种子培养时间为 14h,接种量 3%;发酵培养基的组成为蛋白胨 1.0%,玉米粉 1.5%,玉米浆 6%;培养基初始 pH8.0,培养温度 37℃;500mL 三角瓶装液量为 50mL,摇床转速为 210r/min。在该条件下发酵产酶,酶活可达 5010U/mL。

参考文献:

- [1] Bender H. Production, characterization and application of cyclodextrin[J]. Adv Biotechnol Processes, 1986(6): 31~37.
- [2] Hedge AR. Cyclodextrin: Production, properties and application, Starch hydrolysis products [M]. New York: VCH Publishers, 1992. 319~390.
- [3] Szejtli J. Industrial application of cyclodextrin[J]. Inclusion Compounds, 1984(3): 331~390.
- [4] Pramila Rao, C Suresh, D Narasimha Rao, et al. Digestion of

(下转第 193 页)

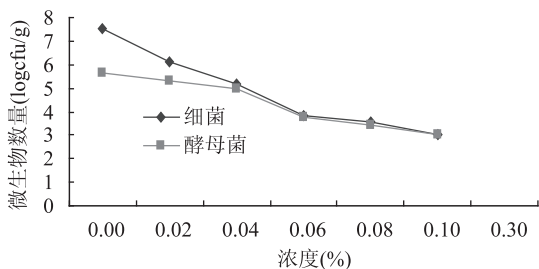


图4 过氧乙酸减菌效果

霉菌均受到较大抑制而不生长。复合抑菌剂的效果与脱氢醋酸钠和过氧乙酸的配制比例有关,过氧乙酸所占的比例越大,抑菌效果就越好。

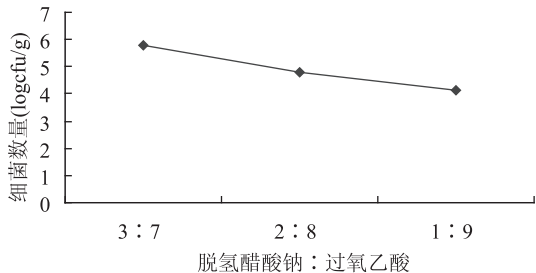


图5 脱氢醋酸钠和过氧乙酸复合减菌效果

3 结论

3.1 新鲜辣椒表面的微生物主要有细菌、酵母菌和霉菌,其中优势菌相是细菌,达 3.40×10^7 cfu/g,酵母菌数量为 4.50×10^5 cfu/g,霉菌数量为 2.80×10^3 cfu/g。

3.2 脱氢醋酸钠抑菌能力较强,能有效地降低辣椒表面的微生物,其最佳的抑菌浓度为 1.0%。

3.3 过氧乙酸降低辣椒表面微生物数量的最佳浓度为 0.10%,过氧乙酸的减菌效果比脱氢醋酸钠好。

3.4 复合防腐剂减菌效果较好,脱氢醋酸钠 0.01% 和过氧乙酸 0.09% 组合时,可以有效地降低辣椒表面的微生物数量。

3.5 采用带菌量低的辣椒原料加工的辣椒产品质量更为安全可靠。用脱氢醋酸钠和过氧乙酸处理后的

辣椒再进行加工,能有效防止在生产过程中出现“生花”、软化等现象,提高产品品质,减小生产损失,降低生产成本,促进辣椒工业发展。

参考文献:

- [1] 胡嘉鹏. 3 种辛辣型椒类调味品史料(下)[J]. 江苏调味品副食品, 2006(2):38~40.
- [2] 刘文明,安志信,井立军. 辣椒的种类、起源和传播[J]. 辣椒杂志, 2005(4):22~25.
- [3] 何青,安狄. 辣椒与中国辣椒文化[J]. 辣椒杂志, 2004(2):12~16.
- [4] 吕承永. 浅谈蔬菜腌制过程中有害微生物的作用及防治措施[J]. 中国调味品, 1995(6):26.
- [5] 熊善柏,赵山. 酸辣辣椒的泡制与保鲜研究[J]. 中国酿造, 1999(2):26~28.
- [6] 钟敏,宁正祥. 发酵辣椒组织软化的抑制初探[J]. 食品科学, 2001(3):33~35.
- [7] 施安辉. 蔬菜传统腌制发酵工艺过程中微生物生态学的意义[J]. 中国调味品, 2002(5):11~15.
- [8] 钟敏. 天然防腐物质对发酵辣椒质量控制作用初探[J]. 食品工业科技, 2002(1):32~33.
- [9] 陈文韬. 杀菌剂在果蔬清洗中的应用[J]. 福建轻纺, 2003(10~11):65~68.
- [10] 黎婉园,夏枫耿. 脱氢醋酸钠在生食蔬菜上的应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2004(5):89~91.
- [11] 叶银枝. 新型防霉防腐食品保鲜剂—脱氢醋酸钠[J]. 中国食品工业, 1999(11):20.
- [12] 叶银枝. 脱氢醋酸钠在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2002(3):64~66.
- [13] 刘兴莉,吴玉杰. 使用过氧乙酸应注意的几个问题[J]. 黑河科技, 1997(4):33~34.
- [14] 李平兰,贺雅非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 中国农业出版社, 2005.30~44.
- [15] GB4789.2-2003, GB4789.15-2003. 食品卫生微生物学检验霉菌和酵母计数 72~74[S].

(上接第 190 页)

residual β -cyclodextrin in treated egg using glucoamylase from a mutant strain of *Aspergillus niger*[J]. Food Chemistry, 1999, 65: 297~301.

[5] Wang Xiaojing, Brussau M L. Solubilization of some lowpolarity organic compounds by hydroxypropyl β -cyclodextrin [J]. Environ Sci Technol, 1993, 27:281.

[6] 双少敏,郭远,等. 相溶解法测定 β -环糊精-芦丁包合物的形成常数[J]. 分析化学, 1998, 26(5):564~567.

[7] 唐上华,冯喆,黄蕊新,等. 嗜碱性芽孢杆菌 N-227 β -环状糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 工业微生物, 1990, 20:1~5.

[8] 唐上华,王磊,周新宇,等. 嗜碱性芽孢杆菌 N-227 β -环状糊精葡萄糖基转移酶基因在枯草杆菌中的整合表达[J]. 工业微生物, 1995, 25(1):1~4.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual (分子克隆实验指南)[M]. Beijing: Science Press House, 2002. 1595~1597, 1713~1722.

[10] 盛小禹. 基因工程实验技术教程[M]. 上海:复旦大学出版社, 1996. 21.

[11] 王媛,王荫榆,郭本恒等. 表达环糊精葡萄糖基转移酶基因的重组大肠杆菌发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(3):10~14.

《食品工业科技》愿为企业铺路搭桥!