

营养因子对大肠杆菌发酵产转氨酶的影响*

周 华 潘自皓 高 振 韦 萍 万红贵

(南京工业大学制药与生命科学学院,南京,210009)

摘 要 运用“单一组分缺失法”研究了18种氨基酸,11种维生素,8种微量元素,4种嘌呤与嘧啶对大肠杆菌A5发酵产转氨酶的影响。结果表明,L-甲硫氨酸是菌体生长与产酶所必需的物质,L-缬氨酸、L-异亮氨酸和L-谷氨酸分别对菌体生长和酶转化得率的提高有显著的促进作用。在此基础上构建了一个改良的合成培养基,其组成为(g/L):葡萄糖 20,(NH₄)₂SO₄ 5,MgSO₄ 0.5,NaCl 0.5,K₂HPO₄ 0.5,KH₂PO₄ 0.5,氨基酸混合液(包括 L-Met、L-Val、L-Ile、L-Glu) 0.6,pH 7.2,所产转氨酶的转化得率达到 72.4%。

关键词 转氨酶,合成培养基,单一组分缺失法

转氨酶广泛存在于动植物和微生物体内,能够以氨基酸为氨基供体、 α -酮酸为氨基受体,专一性地制备系列氨基酸,是酶法制备氨基酸的重要酶源^[1]。在制备 L-苯丙氨酸的过程中^[2],转氨酶作为转氨反应的高效催化剂,可以使苯丙酮酸(Phenylpyruvate,简称为 PPA)接受 L-天冬氨酸的氨基生成 L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine,简称为 L-Phe),因此研究营养因子对大肠杆菌发酵产转氨酶的影响具有重要的理论和应用价值。

合成培养基(Chemically defined medium,简称为 CDM),是一类按微生物的营养要求精确设计,由多种化学试剂配制成的培养基,其成分含量都是已知的,常用于培养基优化改进的研究。彭玉麟等^[3]通过正交实验确定了合成培养基中对运动发酵单孢菌(*Zymomonas mobilis*)产乙醇影响较大的因素,由此优化了现有的发酵培养基。Sibel 等^[4]报道了合成培养基在白腐真菌(white-rot fungi)发酵产漆酶(laccase)研究中的应用,确定了棉絮中的某些成分可以大大提高酶的活性,并由此对产酶培养基进行了优化。San 等人^[5]对合成培养基中的氨基酸对菌种生长的影响进行了分析,改良了培养基的配方,增加菌体 *Dictyostelium discoideum* 的积累浓度达 70% 以上。

1990 年代以来,合成培养基在工业生产中的使用正逐渐受到重视。在许多方面,合成培养基已经展示出区别于复合培养基(Complex medium,简称为

CM)的优良特性^[6]。与复合培养基相比,合成培养基具有过程稳定性高,容易监控,产物易于分离提纯等优势^[7],国外已经有不少将其应用到实际生产中的报道^[6]。合成培养基是目前发酵领域内研究的热点之一,具有广阔的发展前景。

本文在合成培养基中,采用“单一组分缺失法”研究了 18 种常见氨基酸,11 种维生素,8 种微量元素和 4 种嘌呤与嘧啶对大肠杆菌 A5 发酵产转氨酶的影响,从中筛选出具有较显著正效应的营养因子,并在此基础上构建了一个改良的合成培养基(Modified chemically defined medium,简称为 MCDM)用于结果的验证。

1 实验材料与方法

1.1 菌 种

大肠杆菌(*Escherichia coli*) A5,由本实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面与平板培养基(g/L)

蛋白胨 10,牛肉膏 5,NaCl 5, pH 7.2。

1.2.2 种子培养基(g/L 或 mL/L)

葡萄糖 15,蛋白胨 6,玉米浆 20,牛肉膏 1.5, MgSO₄ 0.5,NaCl 0.5,pH 7.2。

1.2.3 发酵培养基

1.2.3.1 复合培养基(g/L 或 mL/L)

葡萄糖 20,蛋白胨 6,玉米浆 20,牛肉膏 1.5, MgSO₄ 0.5,NaCl 0.5,pH 7.2。

1.2.3.2 合成培养基

培养基中的所有试剂均为化学纯,其中包括 4 类营养因子:18 种常见氨基酸、11 种维生素、8 种微量

第一作者:博士,副教授。

* 国家 973 项目(No. 2003CB716004),国家自然科学基金重点项目(No. 20336010)

收稿日期:2006-03-22,改回日期:2006-05-24

元素、4种嘌呤与嘧啶,购自 Amresco Inc.,其余各组分购自中国惠兴生化试剂有限公司。

全合成培养基(Complete chemically defined medium, 简称为 CCDM, 组分与浓度见表1)按照参考文献[5]、[7]、[8]中所述方法构建。先将不同组分分别配制成高浓度溶液,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 的膜过滤除菌后, 4°C 保存,再由各类高浓度溶液按一定的比例混合配制成全合成培养基, pH 7.2, 配制各类溶液与合成培养基所用的水均为高纯度去离子水。

表1 全合成培养基(CCDM)的组成

组成	浓度	组成	浓度
氨基酸/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		泛酸	0.2
L-丙氨酸	0.2	烟酸	0.2
L-精氨酸	0.2	磷酸吡哆醛	0.2
L-天冬酰胺	0.2	肌醇	0.2
L-天冬氨酸	0.2	对氨基苯甲酸	0.2
L-谷氨酰胺	0.2	微量元素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
L-谷氨酸	0.2	$\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	5
甘氨酸	0.2	H_3BO_3	5
L-组氨酸	0.2	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5
L-异亮氨酸	0.2	$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
L-亮氨酸	0.2	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5
L-赖氨酸	0.2	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
L-甲硫氨酸	0.2	$\text{CrCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
L-苯丙氨酸	0.2	Na_2EDTA	5
L-脯氨酸	0.2	嘌呤与嘧啶/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
L-丝氨酸	0.2	腺嘌呤	10
L-苏氨酸	0.2	鸟嘌呤	10
L-色氨酸	0.2	尿嘧啶	10
L-缬氨酸	0.2	胸腺嘧啶	10
维生素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		其他组分/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
D-生物素	0.2	葡萄糖	20
钴胺素	0.2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
叶酸	0.2	MgSO_4	0.5
硫辛酸	0.2	NaCl	0.5
硫胺素	0.2	K_2HPO_4	0.5
核黄素	0.2	KH_2PO_4	0.5

1.3 摇瓶培养条件

将培养皿上的菌株接种至合成培养基中(55 mL / 500 mL 三角摇瓶), 37°C , 180 r/min, 培养 16 h。

1.4 酶法转化条件

在一定浓度的 PPA 溶液中,加入适量的 L-天冬氨酸,搅拌至溶解后,调 pH 8.5~9.0,再稀释至 PPA 浓度为 30 g/L,按体积比(发酵液:底物溶液)=1:2 加入含转氨酶的发酵液,通入氮气后, 37°C , 120 r/min, 反应 16 h 左右。

1.5 采用单一组分缺失法研究营养因子对菌体发酵产酶的影响

先在包含所有营养因子的全合成培养基(CCDM)中一次缺失一类营养因子(包括氨基酸类、

维生素类、微量元素类、嘌呤与嘧啶类),以全合成培养基作为参比,检验各类营养因子对菌体生长与酶转化得率的影响,再选取缺失后有显著负面影响的营养因子进一步筛选考察,即在全合成培养基中一次缺失一种该类因子,最终找到对菌体生长与酶转化得率影响较大的营养因子。

1.6 测定方法

1.6.1 菌体生物量的测定

用紫外可见分光光度计在波长 640 nm 处测定其吸光值,以接种前的培养液作参比。

1.6.2 苯丙酮酸浓度的测定

采用 Fe^{3+} 显色法测定,具体方法见文献[9]。

1.6.3 L-苯丙氨酸浓度的测定

采用高效毛细管电泳法测定,具体方法见文献[10]。

1.7 酶转化得率的计算方法

$$\text{酶转化得率}/\% = \frac{\text{L-Phe 的质量浓度}}{\text{L-Phe 的理论浓度}} \times 100$$

2 实验结果与讨论

2.1 全合成培养基(CCDM)的优化

前期研究表明,大肠杆菌 A5 能够适应在全合成培养基(CCDM)中生长并产酶,但菌体生物量与酶转化得率始终处于较低的水平,不能满足营养因子筛选的需要。考虑到氨基酸与菌体的生长量、产酶量密切相关,故研究了 18 种常见氨基酸浓度对菌体生长与酶转化得率的影响。从图 1 中可以看出,当培养基中氨基酸浓度为 0.3 g/L 时,菌体的生物量和酶转化得率均已达到较高的水平,因此氨基酸浓度可以取 0.3 g/L。下面就以优化得到的全合成培养基(CCDM)作为参照,进行营养因子的筛选实验。

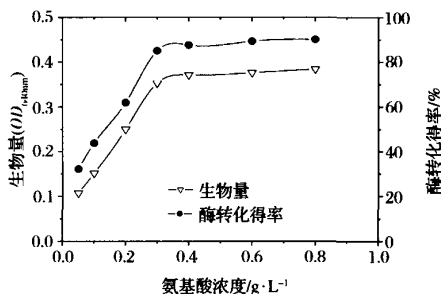


图1 全合成培养基(CCDM)的优化

2.2 各类营养因子缺失对发酵产酶的影响

首先将待筛选的营养因子分为氨基酸、维生素、微量元素和嘌呤与嘧啶 4 类,然后在全合成培养基

(CCDM)中1次缺失一类营养因子,以全合成培养基(CCDM)作为参照,比较各类营养因子对菌体生长与酶转化得率的影响。图2的实验结果显示氨基酸类的缺失有明显的负面效应,而其他3类均影响很小,这说明氨基酸类对于菌体发酵产酶是必要的,需要进行进一步的筛选。

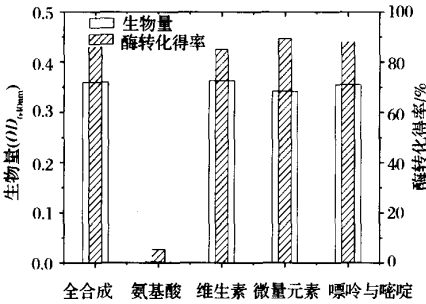


图2 各类营养因子缺失对发酵产酶的影响

2.3 各类氨基酸缺失对发酵产酶的影响

根据2.2的实验结果,氨基酸类对菌体生长与产酶是必需的,接下来对氨基酸也进行分类,共分5类:即中性脂肪族氨基酸、酸性脂肪族氨基酸、碱性脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸和杂环族氨基酸,然后在全合成培养基(CCDM)中1次缺失一类氨基酸,比较各类氨基酸对菌体生长与酶转化的率的影响。由图3可以发现,中性氨基酸缺失后,菌体几乎不能生长和产酶,酸性、碱性、杂环族氨基酸缺失后菌体的生物量和酶转化得率均下降,这4类氨基酸都需要进行进一步的筛选。而芳香族氨基酸缺失后,菌体的生物量与酶转化得率均升高,说明芳香族氨基酸对菌体生长与酶转化得率有一定的抑制作用。

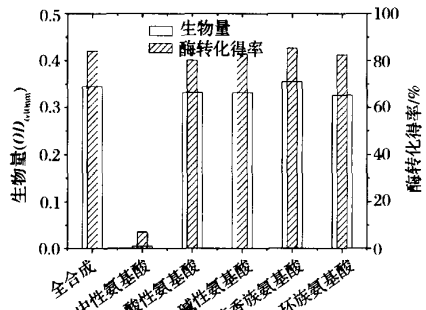


图3 各类氨基酸缺失对发酵产酶的影响

2.4 各种氨基酸缺失对发酵产酶的影响

由图4和图5可以看出,中性氨基酸中的L-甲硫氨酸是大肠杆菌A5生长与产酶所需的关键因子,是必不可少的,L-缬氨酸和L-异亮氨酸对菌体生长

有较显著的促进作用,而酸性氨基酸中的L-谷氨酸则有利于酶转化得率的提高,而其它各种氨基酸对菌体生长与酶转化得率或影响不明显,或有抑制作用。

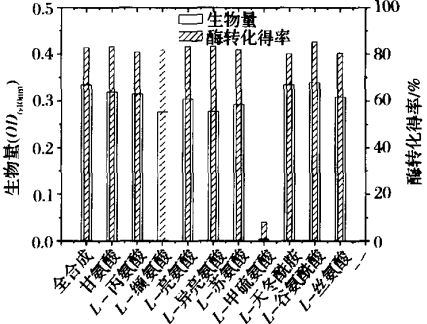


图4 各种中性氨基酸缺失对发酵产酶的影响

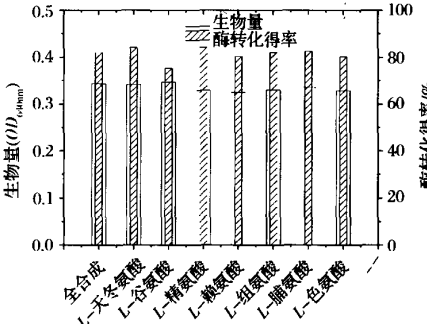


图5 各种酸性、碱性、杂环族氨基酸缺失对发酵产酶的影响

2.5 筛选结果的验证

为检验上述实验结果,通过去除全合成培养基(CCDM)中对菌体生长与酶转化的率影响较小或有抑制作用的各组分,并适当提高氨基酸的浓度,最终构建了1个改良的合成培养基(MCDM)用于大肠杆菌A5发酵产酶,其组成为(g/L):葡萄糖20,(NH₄)₂SO₄5,MgSO₄0.5,NaCl0.5,K₂HPO₄0.5,KH₂PO₄0.5,氨基酸混合液(包括L-Met、L-Val、L-Ile、L-Glu)0.6,pH7.2。

由表2的实验结果看出,改良的合成培养基(MCDM)基本能够适合大肠杆菌发酵产酶,转氨酶的转化得率已达到了较高水平,这表明筛选实验的结果是正确的。

表2 改良的合成培养基与全合成培养基、复合培养基的对照实验

培养基	培养时间/h	酶转化得率/%
MCDM	18	72.4
CCDM	18	84.2
CM	16	87.4

3 结 论

经过多次筛选实验发现,在各类营养因子中,氨基酸的影响最为显著,中性氨基酸中的 *L*-甲硫氨酸是大肠杆菌 A5 生长与产酶所必需的,*L*-缬氨酸、*L*-异亮氨酸能够较显著的促进菌体生长,酸性氨基酸中 *L*-谷氨酸则可以提高酶转化得率,而除此以外的其它各种营养因子对菌体生长与酶转化得率或影响不明显、或有抑制作用。在此基础上,去除全合成培养基(CCDM)中对菌生长与酶转化得率影响较小或有抑制作用的各组分,构建了一个改良的合成培养基(MCDM)用于大肠杆菌发酵产酶,所产酶的转化得率已达到较高水平,说明以上的研究结果是正确的。

营养因子对大肠杆菌发酵产转氨酶的影响研究对于揭示大肠杆菌发酵产转氨酶机理,进而实现转氨酶在大肠杆菌发酵中的高活性、高密度表达具有十分重要的意义。在今后的实验中,将通过继续优化改良的合成培养基(MCDM),可以将其应用于酶法制备 *L*-苯丙氨酸的生产中,以替代现有的复合培养基,这将能够有效的简化下游提取的工艺,从而增强由苯丙酮酸酶法制备 *L*-苯丙氨酸的市场竞争力。

参 考 文 献

1 卫功元,韦 萍,周 华. 天冬氨酸转氨酶及其酶学性质[J]. 南京化工大学学报, 2000, 22(3): 19~22

2 Puppo J, Forja J M, Blasco J. Biochemically characteristic of aspartate aminotransferase from gills and digestive gland of the manila clam[J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 247(8): 2 486~2 492

3 彭玉麟,薛晓梅,史延茂,等. 用正交试验法选择运动发酵单孢菌的最佳发酵合成培养基[J]. 河北省科学院学报, 1991: 58~68

4 Sibel S Kahraman, Ismail H Gurdal. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi [J]. Bioresource Technology, 2002, 82: 215~217

5 Sang-In Han, Karl Friebs, Erwin Flaschel. Improvement of a synthetic medium for *Dictyostelium discoideum* [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 925~930

6 Zhang J, Gresham R. Chemically defined media for commercial fermentation[J]. Appl Microbiol, 1999, 51: 407~421

7 Hong-Joo Son, Hee-Goo Kim, Keun-Ki Kim, et al. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions [J]. Bioresource Technology, 2003, 86: 215~219

8 Morishita T, Deguchi Y, Yajima M, et al. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways[J]. J Bacteriol, 1981, 148: 64~71

9 钱 明,范伟平,欧阳平凯. 苯丙酮酸及其盐的理化性质比较 [J]. 南京化工大学学报, 1997, 19(63): 24~28

10 蔡 升,屠春燕,邹家庆. 高效毛细管电泳法分析苯丙氨酸苯丙酮酸和亚苄基海因 [J]. 南京化工大学学报, 1999, 21(3): 39~43

Study on Nutritional Requirements for the Growth and Aspartate Aminotransferase Production by *Escherichia coli* A5

Zhou Hua Pan Zihao Gao Zhen Wei Ping Wan Honggui

(College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT Aminotransferase was a key enzyme for the enzymatic preparation of *L*-phenylalanine. In this paper, using the complete chemically defined medium, the single-omission technique was applied to investigate the effects of 18 kinds of amino acid, 11 kinds of vitamin, 8 kinds of trace element and 4 kinds of purine and pyrimidine on fermentation of aminotransferase. As a conclusion, *L*-Methionine was the only essential compound for both the growth of *Escherichia coli* A5 and production of aminotransferase, *L*-Valine, *L*-Isoleucine and *L*-Glutamic acid was sufficiently useful for growth of the strain and preparation of the enzyme respectively. Based on the nutritional requirements, a modified chemically defined medium was formulated to testify the validity of the results, contained (g/L) glucose 20, (NH₄)₂SO₄ 5, MgSO₄ 0.5, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, *L*-Met 0.6, *L*-Val 0.6, *L*-Ile 0.6, *L*-Glu 0.6, pH 7.2, the yield of *L*-Phenylalanine in MCDM was 72.4%.

Key words aminotransferase, chemically defined medium, the single-omission technique