

耐热 β -半乳糖苷酶重组菌 WB600/pMA5-*bgaB* 发酵条件的研究*

陈卫^{1,2}, 陈海琴¹, 田丰伟¹, 赵建新¹, 张源^{1,2}

1(江南大学食品学院, 江苏无锡, 214122)

2(江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122)

摘要 耐热 β -半乳糖苷酶相比酵母来源的中温乳糖酶用于低乳糖牛奶的生产具有潜在的优越性。在已将来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的耐热 β -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)克隆入枯草芽孢杆菌得到重组菌 WB600/pMA5-*bgaB* 后, 对此重组菌的发酵条件进行了研究。重组菌 WB600/pMA5-*bgaB* 在发酵过程中具有良好的遗传稳定性, 可溶性淀粉和胰蛋白胨是重组菌生长和酶活表达的适合碳源和氮源。WB600/pMA5-*bgaB* 适宜的摇瓶培养条件为接种量 3%~5%, 装液量 30~50/250 mL(三角瓶), 起始 pH7.0, 摇床转速 220 r/min。在 7L 反应器中进行分批发酵, 研究表明, pH 调控和溶氧控制对提高工程菌发酵产酶具有明显帮助, pH 控制在 7.0, 溶氧控制在 50% 可提高发酵酶活; 补料培养后菌体密度 OD₆₀₀ 可达到 47, 酶活达到 37.5 U/mL, 比在初始条件下提高了 10 倍。

关键词 耐热 β -半乳糖苷酶, 重组枯草杆菌, 发酵

β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.21)可以催化水解 β -半乳糖苷键, 广泛存在于植物、动物和微生物体内, 在食品工业中具有重要用途, 特别是可以用于牛奶中乳糖的水解以生产低乳糖乳制品, 从而有效缓解乳糖不耐症。耐热 β -半乳糖苷酶相比中温或低温 β -半乳糖苷酶, 由于其较高的催化温度、良好的热稳定性和中性 pH 条件, 将成为一种替代目前低乳糖奶低温水解生产工艺的理想酶制剂。

据文献报道, 嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)能合成耐热 β -半乳糖苷酶, 其中由 *bgaB* 基因编码的 β -半乳糖苷酶耐热性最好, 但该酶的出发菌株较难培养, 且酶活极低。通过基因工程技术改造, 有可能使酶蛋白表达量大幅提升, 而且大大简化菌体培养以及后续的分离提取工作。关于高温菌或嗜热菌来源的 β -半乳糖苷酶重组高效表达的研究报道不多, 而且表达载体以大肠杆菌居多, 不仅不符合食品工业安全性要求, 而且重组酶的热稳定性与出发菌株相比会有所下降。陈少欣等^[1]筛选到 1 株产 β -半乳糖苷酶的嗜热脂肪芽孢杆菌, 通过菌种诱变和培养条件优化, 5L 发酵罐上酶活达到 24 U/mL。Hirata^[2]等将嗜热脂肪芽孢杆菌编码耐热 β -半乳糖苷酶的基因克隆至枯草芽孢杆菌, 重组菌在摇瓶培养条件下表达酶活为 6.5 U/mL^[3]。笔者在前期工作中构建了含目标基因 *bgaB* 的重组质粒 pMA5-*bgaB*, 并以缺失 6 种蛋白酶活的枯草芽孢杆菌

WB600 为宿主细胞, 重组酶得到较高表达并且热稳定性检验表明其与酶源菌没有变化^[4], 酶学性质研究也显示该酶很适合牛奶中乳糖的水解。

相对而言, 对大肠杆菌基因重组菌的培养、代谢及高密度发酵研究较多^[5,6], 而对枯草杆菌重组菌的研究相对较少。文中对实验室构建的带有编码耐热 β -半乳糖苷酶基因的重组菌 WB600/pMA5-*bgaB* 的摇瓶培养和分批发酵条件进行探讨, 为探索枯草杆菌重组菌发酵条件及高温乳糖酶的发酵生产积累经验。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

重组枯草杆菌 WB600/pMA5-*bgaB* 为本实验室构建, 构建过程见文献^[4]。

1.1.2 试剂

蛋白胨、胰蛋白胨、酵母抽提物购自上海化学试剂公司, 卡那霉素购自上海生工生物工程公司, 其他为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨(10 g/L)、酵母抽提物(5 g/L)、NaCl(10 g/L), 按需加卡那霉素 20 μ g/mL。

种子培养基: 胰蛋白胨(10 g/L)、酵母抽提物(5 g/L)、可溶性淀粉(10 g/L)、NaCl(5 g/L), 加入卡那霉素 20 μ g/mL。

发酵培养基: 酵母抽提物(3 g/L)、NaCl(5 g/L), C 源、N 源按实验方案加入, 卡那霉素浓度 20 μ g/mL。

第一作者: 博士, 教授。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30670065)

收稿日期: 2006-10-16, 改回日期: 2007-04-17

上罐培养基:胰蛋白胨(20 g/L)、酵母抽提物(3 g/L)、可溶性淀粉(25 g/L)、NaCl(5 g/L),加入卡那霉素 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

补料培养基:(A)胰蛋白胨(40 g/L)、可溶性淀粉(50 g/L),卡那霉素 20 $\mu\text{g/mL}$;(B)胰蛋白胨(20 g/L)、酵母抽提物(10 g/L),卡那霉素 40 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒稳定性的检验^[7]

将表达质粒转化宿主菌 *B. subtilis* WB600 获得第1代菌株。从LB卡那霉素抗性平板上挑取单菌落,接入3 mL无卡那霉素的LB培养基试管中,37℃、200 r/min 摇瓶培养18 h,取100 μL 用无菌水稀释后涂布平板,其中1组平板含卡那霉素 20 $\mu\text{g/mL}$,另1组为不加抗生素的LB培养基,37℃培养24 h计数,计算质粒丢失率;另取30 μL 转接下1支3 mL试管继续培养。从剩余菌液中取2 mL离心破胞,测定酶活。连续转接10次观察质粒的稳定性。

1.2.2 重组菌 WB600/pMA5-*bgaB* 发酵条件优化

从新鲜平板挑取单菌落接入种子培养基,于37℃、200 r/min 摇床培养12 h得到种子液。以1%接种量接种发酵。培养基和发酵条件优化时根据实验结果逐次改变实验条件。

1.2.3 重组菌 WB600/pMA5-*bgaB* 上罐发酵

根据工作体积配制培养基后连同发酵罐高压灭菌,冷却后加入卡那霉素 20 $\mu\text{g/mL}$,按5%接种量接种后调节溶氧至100%,固定转速400 r/min,通气量4.2 VVM。用1 mol/L NaOH和30% HCl调节pH,通过蠕动泵自动流加补料。发酵过程中根据需要自动通入纯氧,以保持溶氧率的恒定。

1.2.4 淀粉含量的测定

蒽酮-硫酸法。

1.2.5 蛋白质含量的测定

Folin 酚法。

1.2.6 β -半乳糖苷酶酶活的测定

以ONPG为底物,在55℃下(pH7.0)测定 β -半乳糖苷酶酶活。1个酶活单位定义为每分钟分解1 μmol 底物ONPG所需的酶量。

2 结果与讨论

2.1 WB600/pMA5-*bgaB* 质粒表达稳定性和产酶曲线

2.1.1 质粒表达稳定性的测定

将转化所得第1代菌株在无抗生素选择压力下

连续转接培养10次,计算质粒丢失率和表达产物酶活稳定性,结果见表1和图1。可见,重组质粒具有较好的稳定性,表达酶活在80%以上。

表1 工程菌 WB600/pMA5-*bgaB* 质粒稳定性的测定

培养时间/h	LB培养基 cfu (10^9)	含卡那霉素的LB 培养基Cfu (10^9)	质粒丢失率 /%
1	2.85	2.70	5.3
2	2.88	2.66	7.6
3	2.76	2.53	8.8
4	2.75	2.61	5.8
5	2.53	2.45	7.9
6	2.82	2.78	3.1
7	2.83	2.56	9.5
8	3.05	2.64	13.4
9	2.94	2.45	16.8
10	3.02	2.36	21.8

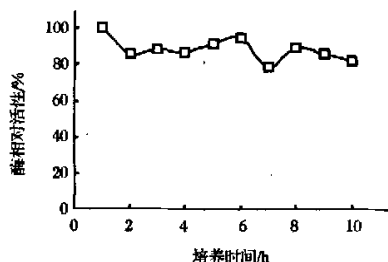


图1 WB600/pMA5-*bgaB* β -半乳糖苷酶表达稳定性

2.1.2 摇瓶培养生长曲线和产酶曲线测定

以LB淀粉(1%)为培养基,测定工程菌 WB600/pMA5-*bgaB*的摇瓶培养生长曲线和产酶曲线,见图2。可以看出,重组菌的生长具有明显的迟滞期、对数生长期和平稳期,随着培养时间的延长,酶表达量逐渐升高,16 h达到最高。在对数生长期呈现2个快速生长阶段,酶活增长更多表现在对数后期的缓慢增长阶段。从pH变化曲线看,在发酵过程中pH值先稍有下降然后逐渐上升,10 h后又缓慢下降。在发酵中期,由于枯草杆菌淀粉酶分泌量增加,培养基中可直接利用的碳源物质增多,使细菌生长又出现较明显的增加,而且这个阶段对酶表达更为显著,pH值也出现回落。这可能与此阶段细菌能量代谢有关,更有利于外源基因的表达。

2.2 营养条件对 WB600/pMA5-*bgaB* 产酶的影响

2.2.1 碳源的选择

碳源物质不仅能促进重组菌的生长,而且对外源基因表达有密切的影响,因为外源基因表达过程中需消耗较多的能量。选用葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉和甘油为碳源进行发酵试验(表2),发现淀粉、蔗糖、乳糖和麦芽糖对重组酶表达有促进作用,其中

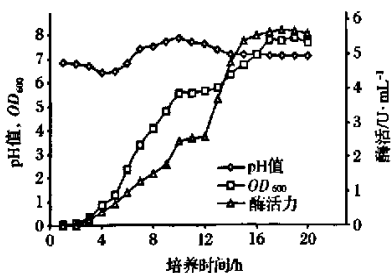


图2 WB600/pMA5-*bgaB*在LB淀粉培养基上的生长和产酶曲线

以淀粉最为明显。而葡萄糖和甘油对重组酶表达不利,葡萄糖的影响可能是由于其被细菌利用后产酸较多,pH下降过快不利于酶的表达和活性保持^[8]。

表2 不同碳源对WB600/pMA5-*bgaB*发酵产酶的影响

碳源	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	pH值	OD_{600}	酶活力/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照	0	8.65	2.13	3.56
葡萄糖	5	5.02	5.58	3.16
	10	4.84	5.42	2.66
乳糖	5	8.37	7.38	5.49
	10	8.21	7.46	5.57
蔗糖	5	6.07	7.28	5.64
	10	5.78	7.36	5.43
麦芽糖	5	7.84	7.42	5.15
	10	7.53	7.52	5.38
淀粉	5	7.67	6.93	5.37
	10	7.10	7.15	5.72
甘油	5	8.36	3.52	2.94
	10	8.78	3.01	2.53

2.2.2 氮源的选择

以1%淀粉为碳源,分别考察蛋白胨、进口胰蛋白胨、国产胰蛋白胨和无机氮源硫酸铵、尿素对酶活的影响(表3)。从实验结果看,无机氮源组的重组菌生长和产酶效果均较差,有机氮更能适合重组菌的生长和产酶,胰蛋白胨的效果比蛋白胨显著,这可能是由于枯草杆菌WB600宿主菌缺失6种蛋白酶,对水解度更高的胰蛋白胨利用更好一些。国产胰蛋白胨与进口产品相比酶活略低,考虑到价格的差距,选择国产胰蛋白胨作为重组菌WB600/pMA5-*bgaB*的发酵氮源是合适的。

表3 不同氮源对WB600/pMA5-*bgaB*发酵产酶的影响

氮源	pH值	OD_{600}	酶活力/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
蛋白胨	7.79	6.10	3.78
国产胰蛋白胨	7.48	6.69	5.63
进口胰蛋白胨	7.55	7.74	5.95
硫酸铵	6.95	3.10	2.62
尿素	8.27	2.03	2.13

2.2.3 碳源和氮源浓度对产酶的影响

固定淀粉浓度1%,改变氮源添加量或固定胰蛋白胨浓度1%,改变碳源添加量,对重组菌生长和产酶进行比较(见表4)。由表4可见,固定碳源增加氮源,或固定氮源增加碳源都能使重组菌酶活的表达增加,其中提高氮源浓度的效果更为显著,2%的胰蛋白胨使酶活提高了近1倍。重组枯草杆菌对氮源的浓度要求比普通微生物高,但过高的氮源会使重组菌生长过于旺盛而导致菌体过早衰老甚至自溶。增加淀粉提高酶活也有一定的限制,超过3%的浓度使酶活不升反降,这可能是随着淀粉浓度的升高发酵液粘度上升,从而影响培养基的溶氧和传质效果。

表4 碳源和氮源浓度对WB600/pMA5-*bgaB*发酵产酶的影响

淀粉 /g · L ⁻¹	胰蛋白胨 /g · L ⁻¹	淀粉 · 胰 蛋白胨	pH	OD ₆₀₀	酶活力 /U · mL ⁻¹
10	5	2 : 1	7.64	3.40	4.73
	10	1 : 1	7.57	6.62	5.43
	15	1 : 1.5	7.86	7.30	5.85
	20	1 : 2	7.69	10.93	8.46
	25	1 : 2.5	8.26	9.64	6.32
5	10	1 : 2	7.89	6.30	5.17
10		1 : 1	7.67	6.74	5.48
15		1.5 : 1	7.70	7.92	5.72
20		2 : 1	7.71	7.43	5.56
25		2.5 : 1	7.62	8.76	6.05
30		3 : 1	7.70	8.61	6.18
35		3.5 : 1	7.96	8.57	5.98

2.3 环境条件对WB600/pMA5-*bgaB*产酶的影响

环境因子也是影响重组菌生长与发酵产酶的重要因素,以上述优化结果配制发酵培养基,对重组菌产酶条件的影响因子进行逐次研究。考察的条件有接种量、摇瓶装液量、起始pH值和摇床转速,实验结果为:接种量在0.5%~10%对酶活没有明显影响,但超过10%,酶活明显降低;装液量为250mL体积的三角瓶装入30~50mL培养基较为适合;起始pH值为6.5~7.0时对酶活表达有利;摇床转速220 r/min时酶活最高,可达到9.8 U/mL,说明此时培养基的溶解氧处于适宜范围。

2.4 7 L反应器分批培养WB600/pMA5-*bgaB*产酶的研究

2.4.1 放大条件下分批培养的产酶曲线测定

在优化得到的适宜的摇瓶培养条件基础上,对重组菌WB600/pMA5-*bgaB*在7 L发酵罐(实际工作体积5 L)上的分批培养和产酶情况进行研究。发酵

罐采用美国 New Brunswick Science 公司的全自控发酵罐 BioFlo 3000。从图 3 可见,工程菌 WB600/pMA5-*bgaB* 在分批培养中具有较明显的延迟期、指数生长期、稳定期和衰亡期,但与摇瓶培养相比,稳定期不太明显且时间提前,这可能是由于发酵罐的通氧量比摇瓶培养高,细菌生长更加旺盛所致。在进入对数生长期后,由于菌体的呼吸作用愈加旺盛,培养基中溶氧量急剧下降。到生长后期溶氧量又急剧增加,表明菌体开始出现自溶。因此在上罐培养中,发酵终点宜控制在 16 h 左右。到发酵结束时,菌体密度可达到 17 OD_{600} ,发酵酶活为 12.6 U/mL,均比摇瓶培养显著提高。发酵结束后发酵液中淀粉含量约 0.42%,残留率为 17%。

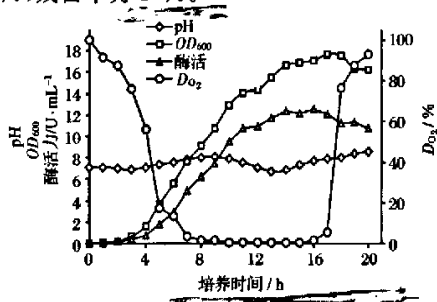


图3 WB600/pMA5-*bgaB* 分批培养生长和产酶曲线

2.4.2 分批培养中 pH 调控对酶活的影响

表 5 结果显示,控制 pH 在 7.0 时酶活最高, pH7.5 与 pH6.5 相比,前者的菌体生长和酶活均高于后者,说明中性偏碱性环境条件有利于重组菌中外源基因的表达式。

表 5 pH 调控对 WB600/pMA5-*bgaB* 产酶的影响

pH 值	终细胞浓度(OD_{600})	酶活力/U · mL ⁻¹
6.5	15.35	11.34
7.0	17.72	13.56
7.5	16.87	13.27

2.4.3 溶氧量对酶活的影响

在发酵过程中通过混入纯氧可以控制溶氧量的恒定。从表 6 可见,控制溶氧在 30%~60% 比不控制溶氧发酵酶活均有所提高,当溶氧量超过 50% 时酶表达量基本不变,因此实际生产中可将溶氧率控制在 50% 左右。

表 6 溶氧量对 WB600/pMA5-*bgaB* 产酶的影响

溶氧量/%	终细胞浓度(OD_{600})	酶活力/U · mL ⁻¹
≈30	17.48	14.09
≈40	18.27	14.45
≈50	20.22	18.42
≈60	20.58	17.68

2.4.4 恒溶氧-补料分批发酵试验结果

根据实验结果,进行补料分批发酵,希望能提高菌体生长密度并提高产酶量。发酵条件为:接种量 5%,温度 37℃,固定转速 400 r/min,通气量 4.2 VVM, pH 控制在 7.0,溶氧率控制 50%。起始培养基体积为 3.5 L,发酵 4 h 后开始以 90 mL/h 的速度恒速流加补料培养基 A 1 L;之后再以相同的速度流加补料培养基 B 500 mL,整个发酵过程在 24 h 内完成。

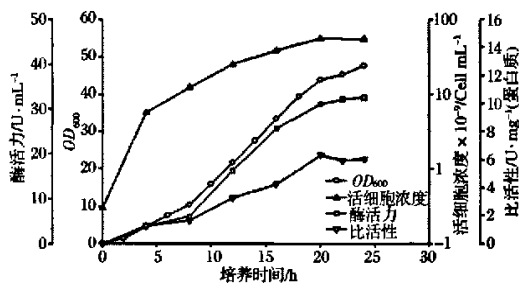


图4 WB600/pMA5-*bgaB* 补料分批培养的生长和产酶情况

由图 4 可见,在发酵过程中细菌的生长符合补料分批培养的生长曲线,具有较明显的延迟期和指数生长期,但稳定期和衰亡期还没有到达。在培养到接近 5h 时由于细菌耗氧过多,开始通入纯氧,使溶氧率维持在 50% 左右。重组菌在 6~20 h 内生长迅速,同时也是重组酶大量表达的时期,β-半乳糖苷酶比酶活也不断升高,20 h 后趋于平稳甚至略有下降。由于在发酵过程中保持了较高的选择压力,酶活增加与菌体密度、活细胞数基本上呈对应关系。

经 24 h 的培养,工程菌 WB600/pMA5-*bgaB* 菌体密度达到 47 OD_{600} ,酶活达到 37.5 U/mL,比不补料时提高近 1 倍。但补料培养后单位菌体的酶活没有升高,说明总酶活增加是依靠菌体密度的增加来实现的,高密度培养时表达下降可能与代谢副产物的积累有关^[9,10],如果要在菌体高密度培养的同时实现高表达,还需对影响外源基因表达的其他各种因素进行深入研究。

3 结论

工程菌 WB600/pMA5-*bgaB* 在发酵过程中具有良好的遗传稳定性,经过连续 10 次转接后酶活力表达仍然保持 80% 以上;在营养条件方面,可溶性淀粉是重组菌生长和酶活表达的最适碳源,而葡萄糖会表现出明显的“葡萄糖效应”;有机氮源比无机氮源更有

利于重组菌生长,胰蛋白胨的添加能显著提高酶活,但淀粉和胰蛋白胨过高也会使重组菌生长过于旺盛或促进自溶,对酶活提高不利;在环境条件中,装液量和摇床转速对酶的表达影响较接种量和起始 pH 值大,WB600/pMA5-*bgaB* 适宜的培养条件为:接种量 3%~5%,装液量 30~50 mL/250 mL 三角瓶,起始 pH 7.0,摇床转速 220 r/min;在 7L 反应器中,工程菌 WB600/pMA5-*bgaB* 分批培养研究表明,pH 调控和溶氧控制对提高工程菌发酵产酶具有明显帮助,pH 控制在 7.0,溶氧控制在 50%可提高发酵酶活,补料培养后菌体密度可达到 47 OD₆₀₀,酶活为 37.5 U/mL。

目前牛奶工业中用于乳糖水解的商品化乳糖酶主要是来源于酵母的中性乳糖酶,但这类酶的最适用温度在 37℃,也是杂菌生长最容易的温度,因此生产中都采用低温水解工艺,一般在 4℃左右水解 15~20 h。采用高温水解(55~65℃)可以利用巴士消毒的余热,控制杂菌污染,节省酶、能耗、时间和设备占用。来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的耐热 β -半乳糖苷酶具有良好的特性,通过基因工程表达和重组菌优化发酵以提高酶活将是今后进一步努力的目标。

参 考 文 献

- 1 陈少欣. 嗜热脂肪芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖的过程工程研究[D]. 华东理工大学博士学位论文,2001
- 2 Hirata H, Negoro S, Okada H. High Production of Thermostable β -Galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 49(6):1 547~1 549
- 3 El-Gindy A. Production, partial purification and some properties of β -galactosidase from *Aspergillus carbonarius* [J]. Folia Microbiol, 2003, 48(5): 581~584
- 4 傅晓燕,陈卫,张源. 耐热 β -半乳糖苷酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆和表达[J]. 中国酿造,2004, 137:16~18
- 5 Jana S, Deb J K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(3):289~298
- 6 Aristidou A A, Bennett G N, San K Y, et al. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source[J]. Biotechnology Progress, 1999(15):140~145
- 7 Yang S, Huang H, Zhang R et al. Expression and purification of extracellular Penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*[J]. Protein Expression and Purification, 2001,21: 60~64
- 8 Park Y S, Kai K, Lijima S, et al. Enhanced β -Galactosidase Production by High Cell-Density Culture of Recombinant *Bacillus subtilis* with Glucose Concentration Control [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992,(40):686~696
- 9 Yazdani S S, Shakri A R, Chitnis C E. A high cell density fermentation strategy to produce recombinant malarial antigen in *E. coli*[J]. Biotechnol Lett, 2004 , 26(24): 1 891~1 895
- 10 Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density-a historical perspective on method development[J]. Biotechnol Adv, 2005, 23(5):345~357

Optimization on Fermentation Conditions of A Recombinant *Bacillus subtilis* WB600/pMA5-*bgaB* for Thermostable β -galactosidase Production

Chen Wei^{1,2}, Chen Haiqin¹, Tian Fengwei¹, Zhao Jianxin¹, Zhang Hao^{1,2}

1(School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(Key Laboratory of Food Science & Safety (SYTU), Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Contrast to mesophilic β -galactosidases, the thermostable ones can hydrolyze lactose into glucose and galactose at higher temperatures and can prevent microbial contaminations to some extent in milk processing. The thermostable β -galactosidase gene *bgaB* from *Bacillus stearothermophilus* was cloned and successfully expressed in *Bacillus subtilis* WB600/pMA5-*bgaB* in our group, and the fermentation conditions were investigated in this study. The results indicated that starch was the best carbon source, tryptone was the best nitrogen source, and the stability of plasmid pMA5-*bgaB* remained well after ten times of sub-cultivation. Then the fermentation conditions in 7L stirred tank fermentor were studied. The initial pH and temperature of the cultures were optimized to 7.0 and 37℃ respectively. The maximum enzyme activity (37.5 U/mL) was achieved at dissolved oxygen of 50% and microbial density of OD₆₀₀=47, which is 10 times higher than the original level.

Key words thermostable β -galactosidase, recombinant *Bacillus subtilis*, fermentation