

添加 CTAB 促进吸水链霉菌产谷氨酰胺转胺酶

Improvement on the Activity of Microbial Transglutaminase with *Streptomyces hygroscopicus* by the Addition of Surfactant CTAB

程 力, 张东旭[†], 堵国成, 陈 坚*

CHENG Li, ZHANG Dong-Xu[†], DU Guo-Cheng and CHEN Jian*

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 生物工程学院环境生物技术研究室, 无锡 214036

Key Laboratory Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Laboratory Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

摘 要 研究了添加十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)对吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)合成谷氨酰胺转胺酶的影响。结果表明,添加 CTAB 可以提高发酵过程中谷氨酰胺转胺酶的酶活,摇瓶培养中,CTAB 的最佳添加时间和添加量分别为 32h 和 1%,发酵终了时,谷氨酰胺转胺酶酶活最高达 5.04u/mL,比对照提高了 21.8%。初步研究表明,CTAB 的主要作用是促使谷氨酰胺转胺酶的酶原转化为成熟酶,因此在发酵过程中添加适当浓度的 CTAB,可使酶原快速、完全地转化为成熟的 MTG,解除酶原的产物抑制作用,促进了细胞产酶。

关键词 谷氨酰胺转胺酶(MTG), *Streptomyces hygroscopicus*, 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 酶原

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0497-05

Abstract Effect of CTAB addition on the accumulation of microbial transglutaminase(MTG) with *Streptomyces hygroscopicus* was investigated. The results showed that the addition of CTAB enhanced MTG accumulation, and the optimal addition time and concentration of CTAB were 32 h and 1%. The maximum MTG activity in the culture broth was 5.04u/mL and increased by 21.8% compared with the control. With the addition of CTAB, pro-MTG was activated to become MTG. CTAB could enhance the production of pro-MTG by relieving the product inhibition, and the accumulation of MTG was improved.

Key words microbial transglutaminase, *Streptomyces hygroscopicus*, CTAB, pro-MTG

微生物谷氨酰胺转胺酶(蛋白质-谷氨酸-谷氨酰胺转胺酶, Microbial Transglutaminase, EC 2.3.2.13 简称 MTG)是一种催化酰基转移反应的转移酶。它能催化蛋白质分子内、分子间发生交联、蛋白质和氨基酸之间的连接以及蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解反应,从而直接改变蛋白质本身

以及蛋白质所附着的细胞、组织等的结构与功能性的特性,提高蛋白质的营养价值。因此,MTG 在食品、纺织、生物制药等领域有着广泛的应用前景^[1-3]。

近年来,商业化谷氨酰胺转胺酶主要从动物组织中提取,价格昂贵^[4]。目前,人们开始转向于研究

Received: November 1, 2006; Accepted: December 7, 2006.

This work was supported by the grants from Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0532) and the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85888301, E-mail: jchen@sytu.edu.cn

[†] 第二作者对本文亦有相同的贡献。

长江学者和创新团队发展计划资助 (No. IRT0532), 教育部留学回国人员科研启动基金资助。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

利用微生物发酵来生产谷氨酰胺转氨酶,以满足市场对低成本高产量的谷氨酰胺转氨酶的迫切需求。Ando 等^[2]首先报道了利用微生物发酵生产谷氨酰胺转氨酶的方法。Zhu 等^[5-6]人通过化学计算法对培养基进行分析和设计,得到了产酶的最佳培养基组合,提高了发酵水平。Zheng 等^[7-9]利用一株 *Streptovercillium mobaransense* 菌株,通过控制发酵过程中的温度、pH 等参数,有效地提高了发酵产酶的酶活。Zotzel 等^[11,12]初步探讨了 *Streptovercillium mobaransense* 中谷氨酰胺转氨酶由酶原到成熟酶的活化机制,提出通过解除金属蛋白酶抑制剂对蛋白酶的抑制作用,从而使蛋白酶切割酶原形成成熟酶的理论。作者所在实验室筛选出一株新的产谷氨酰胺转氨酶的菌株 *Streptomyces hygroscopicus* 柏映国等^[10]对其发酵条件进行了优化。

本文中,首次研究了在发酵过程中添加 CTAB 对谷氨酰胺转氨酶合成的影响并初步探讨了 CTAB 促进 *Streptomyces hygroscopicus* 合成谷氨酰胺转氨酶的机理。

1 材料与方法

1.1 菌种

吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) CCTCC M203062,系本实验室从土壤中筛选得到。

1.2 培养基和培养条件

培养基和培养条件参照文献^[10],发酵培养在 500mL 三角瓶中进行。

1.3 CTAB 添加实验

在发酵 18、24、28、32 和 38h 分别添加 CTAB,使其终浓度分别达到 0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1% 和 1.5%。

1.4 无细胞体系中 CTAB 添加实验

在发酵 24h 取样,离心去除细胞,取上清液,添加 1% 浓度的 CTAB,30℃ 保温 24h。

1.5 主要试剂

α -N-Carbobenzoyloxy-Glutamine-Glycine (α -N-CBZ-GLN-GLY) 和 L-谷氨酸- γ -单羟胺酸(HCA)由 Sigma 公司提供,三羟基氨基甲烷(Tris)由上海化学试剂厂提供,谷胱甘肽(还原型)由华美生物工程公司提供。其余试剂均为国产分析纯。

1.6 主要仪器

垂直板电泳仪及生物电泳图像分析系统均为美国 BIORAD 公司产品。

1.7 分析方法

1.7.1 细胞生长量测定:取发酵液 4mL,10000r/min 离心 10min,用 0.2mol/L 的稀盐酸水洗 2 次,再用蒸馏水洗 2 次,离心,105℃ 干燥至恒重后称重。

1.7.2 谷氨酰胺转氨酶酶活测定:比色法测定酶活^[13],以 α -N-CBZ-GLN-GLY 为作用底物,L-谷氨酸- γ 单羟胺酸做标准曲线。1 个单位谷氨酰胺转氨酶酶活定义为 37℃ 时每分钟催化形成 1 μ mol L-谷氨酸- γ 单羟胺酸的酶量(u/mL)。

2 结果与讨论

2.1 CTAB 的添加时间与添加量

发酵起始时,在培养基中添加不同浓度的 CTAB (0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1% 和 1.5%),发现 CTAB 对菌体生长有明显的抑制作用,菌体均没有生长,也没有产酶(数据未列出)。此结果表明,在发酵初期添加 CTAB,会对细胞生长产生严重的抑制作用。

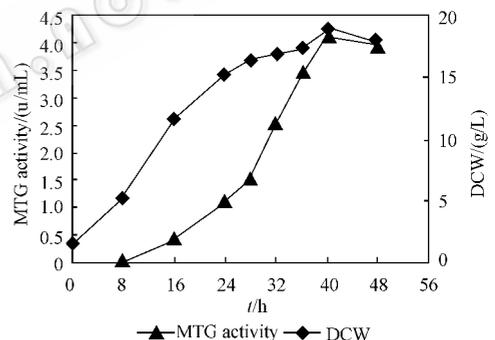


图1 MTG 发酵过程曲线

Fig.1 Profiles of MTG fermentation

图 1 所示为谷氨酰胺转氨酶发酵过程曲线。从图中可知,菌体在 24 h 左右进入生长的稳定期,谷氨酰胺转氨酶的合成在 32 至 40h 比较旺盛,在 40h 时细胞干重(DCW)和酶活均达到最大值。

为了研究在发酵过程的不同时期添加不同浓度的 CTAB 对菌体生长及产酶的影响,分别在发酵 18、24、28、32 和 36 h 添加 CTAB,CTAB 的浓度分别为 0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1% 和 1.5%,对照为不添加 CTAB 的发酵结果。实验结果显示,在发酵 28 h 前添加不同浓度的 CTAB,谷氨酰胺转氨酶酶活与对照相比有较明显的下降(数据未列出),而分别在 28、32 及 36h 添加 CTAB 时,酶活与对照相比有所提高,结果如表 1 所示。从表中可以看出,在 28、32 及 36h 添加 1% 的 CTAB,发酵 42h 后,酶活均可以达到最高的水平,其中在 32h 添加 1% 的 CTAB 时,谷氨酰胺转氨酶酶活可达到最大值 5.04 u/mL,比对照

样提高 21.8%。在这三组实验中,菌体的生长量都受到 CTAB 的影响,细胞干重为 15g/L 左右,而对照组的细胞干重达 20g/L 左右。

表 1 CTAB 的添加时间和浓度对 MTG 酶活的影响

Table 1 Effects of different CTAB addition time and concentrations on MTG activity

CTAB addition time/h	CTAB concentrations/ %						
	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	1.5
	MTG activity/(u/mL)						
28	4.13	4.25	4.34	4.26	4.64	4.88	4.74
32	4.11	4.23	4.29	4.38	4.87	5.04	4.92
36	4.22	4.31	4.25	4.33	4.76	4.82	4.72

2.2 CTAB 的作用机理

2.2.1 *Streptomyces hygroscopicus* 合成的酶原的活化过程:谷氨酰胺转胺酶是一种胞外酶,其产生过程是首先合成没有活性的酶原,在胞外再被切割形成有活性的成熟酶 MTG。Zotzel 等人^[11,12]提出的 *Streptovercillium mobaransense* 合成的酶原(pro-MTG) 到 MTG 的活化途径如图 2 所示, P₁₄ 是一种分子量约为 14kD 的蛋白酶抑制剂,当其失活解除其对金属蛋白酶 TAMEP 的抑制作用时,酶原(分子量约为 43kD)即被切割形成中间体 FRAP-TGase,再被蛋白酶 TAP 切割形成成熟酶 MTG(分子量约为 38kD)。

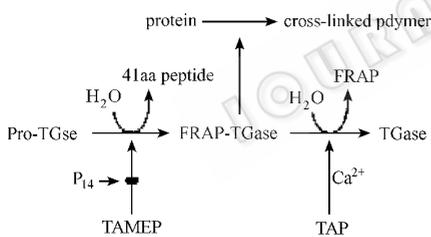


图 2 MTG 酶原的活化过程

Fig.2 Activation process of pro-MTG to MTG

在本研究中发现, *Streptomyces hygroscopicus* 产生的酶原的活化过程与 Zotzel 等人^[11,12]的研究结果相似。图 3 是一张 MTG 发酵过程中发酵上清液的 SDS-PAGE 分析图,结果表明,在 MTG 发酵过程中, *Streptomyces hygroscopicus* 首先产生了酶原,酶原再逐渐转化 MTG,发酵至 42h 时,酶原基本都转化为 MTG。

2.2.2 在无细胞体系中添加 CTAB 对酶原活化的影响:取 24h 的发酵液 4mL,离心去除细胞。分别加入浓度为 1% 的表面活性剂 Triton X, SDS 和 CTAB,处理一段时间后分别测定酶活,以不添加表面活性剂的样品为对照,结果如图 4 所示。图中结果表明,在无细胞体系中,酶原无法转化为有活性的成熟酶,而用浓度为 1% 的阳离子表面活性剂 CTAB 处理产

酶初期的发酵上清液,可以提高谷氨酰胺转胺酶的酶活,用 TritonX 处理的发酵上清液中的谷氨酰胺转胺酶的酶活与对照相比无明显变化,而用 SDS 处理的发酵上清液酶活与对照相比有所降低,可能是由于 SDS 是一种表面活性剂,参与了酶蛋白分子空间结构的改变从而导致了酶活性的降低。

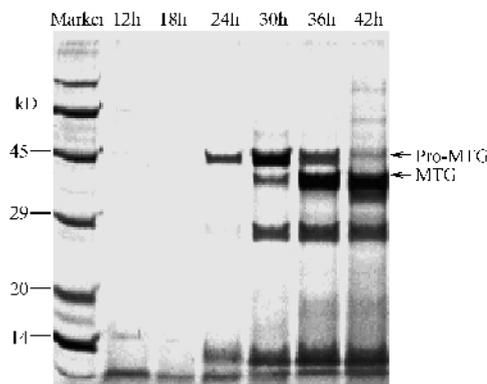


图 3 发酵过程中发酵上清液的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE of centrifuged fermentation broth at different fermentation stage

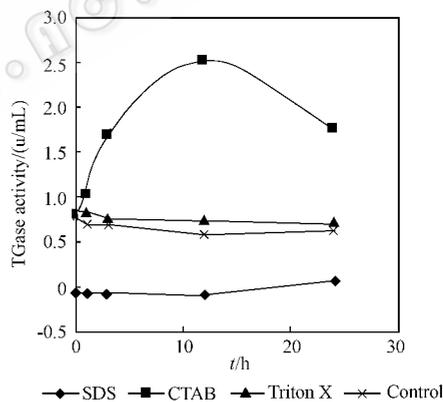


图 4 添加不同种类表面活性剂对无细胞体系酶原活化的影响

Fig.4 Effects of different surfactants on the activation of pro-MTG in cell-free culture system

取对照和添加 1% CTAB 的样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 5a 所示,图中 43kD 左右处的条带为酶原,38kD 左右处的条带为成熟酶^[11,12]。结果显示,与对照相比,添加 1% CTAB 处理过的发酵液,随着时间的推移,酶原条带逐渐变淡,而 MTG 的条带逐渐变亮,说明酶原逐渐被切割,转化为成熟酶。该结果表明 CTAB 可以促使发酵过程中酶原向成熟酶的转化。图 5b 显示,在分子量约 14kD 处,有白色沉淀产生,说明 CTAB 能与分子量为 14kD 的蛋白相结合,使其变性沉淀,而 Zotzel 等人^[11,12]报道的金属蛋白酶抑制剂的分子量也约为 14kD,因此 CTAB 提高无细胞体系中谷氨酰胺转胺酶酶活的原因可能是 CTAB 与金属蛋白酶抑制剂相结合,使其变性失活。

从而解除其对蛋白酶的抑制作用,使蛋白酶能切割酶原,从而使酶原转化为有活性的成熟酶。

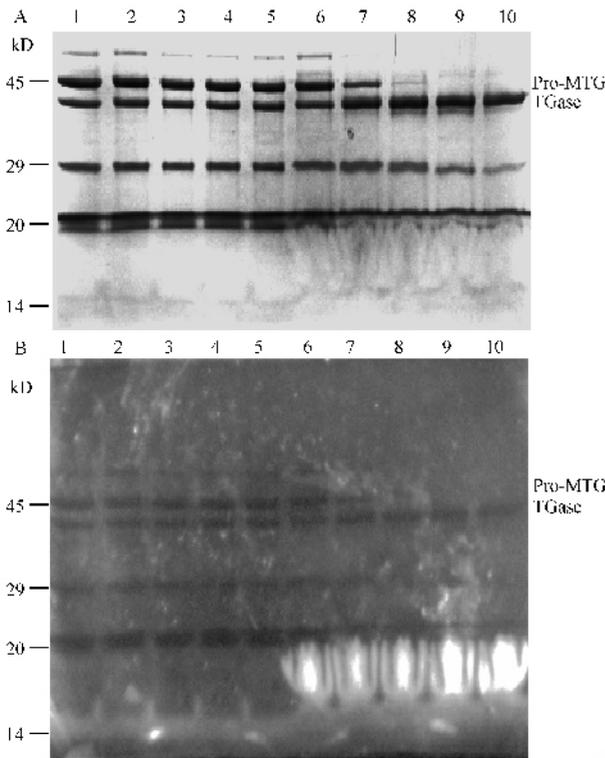


图5 无细胞体系的 SDS-PAGE 分析(A:以白色背景拍摄, B:以黑色背景拍摄)

Fig.5 SDS-PAGE of the cell-free culture system

A: against a white background; B: against a black background
Lines from 1 to 5, controls were incubated at 30°C for 0, 3, 6, 12 and 24 h; Lines from 6 to 10, samples containing 1% CTAB was incubated at 30°C for 0, 3, 6, 12 and 24h.

2.2.3 在有细胞体系中添加 CTAB 对 MTG 酶活的影响:发酵 32h 时补加 1% CTAB,发酵至 42h 时取用上清液进行 SDS-PAGE,以未添加 CTAB 的、培养相同时间的发酵上清液作对照,结果如图 6 所示。在有细胞的体系中,未添加 CTAB 的发酵液在发酵 42h 时也能将酶原完全转化为成熟酶,这说明 CTAB 的作用并不是将发酵终了时未能转化为成熟酶的酶原切割成成熟酶,而是在发酵过程中起了一定的作用,最终提高了谷氨酰胺转胺酶的酶活。

在发酵培养 32h 时补加 1% CTAB 的发酵液继续培养至 34h、36h、38h、40h 时分别取样测定 MTG 酶活,并对发酵上清液进行 SDS-PAGE 处理,结果如图 8 所示。结果表明,在 32h 添加 1% CTAB 的发酵液中,基本没有酶原的条带出现,而 MTG 酶活却不断增加(如图 7 所示),说明酶原一产生就被立即切割转化为成熟酶。而未添加 CTAB 的发酵上清液中,酶原是逐渐地被切割转化为成熟酶的(如图 3 所示)。

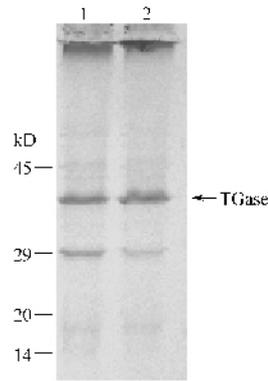


图6 有细胞体系的 SDS-PAGE 图谱

Fig.6 SDS-PAGE of the supernatant of culture broth
1: control; 2: sample containing 1% CTAB.

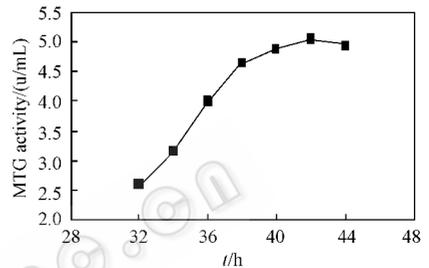


图7 32 h 时添加 1% CTAB 时发酵过程中 MTG 酶活的变化

Fig.7 Changes of MTG activity in fermentation process with addition of 1% CTAB at 32h

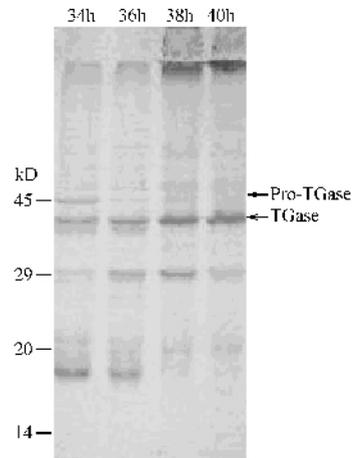


图8 含 1% CTAB 发酵上清液的 SDS-PAGE 图谱

Fig.8 SDS-PAGE of fermentation broth with addition of 1% CTAB

因此,CTAB 提高谷氨酰胺转胺酶的酶活的原因可能是由于 CTAB 的存在,使蛋白酶抑制剂变性失活,完全解除了其对蛋白酶的抑制作用,从而使在发酵过程中产生的酶原能够快速完全的转化为成熟酶,解除了酶原的产物抑制作用,产生了更多的酶原,最终提高了谷氨酰胺转胺酶产量。但是,在测定添加 CTAB 及未添加 CTAB 的发酵液中的蛋白酶的酶活时发现两者并无明显差别,且蛋白酶酶活均极低(数据未列出)。可能是由于采用的普通的测蛋白酶的方法是测定酪蛋白酶一类的蛋白酶的方法,无

法测出 *Streptomyces hygroscopicus* 中用来切割酶原的特异性的蛋白酶, 还有待进一步研究。

3 结论

(1) CTAB 的最适添加时间在发酵后期(32h), CTAB 可以促进酶原转化为成熟酶, CTAB 的作用机理有待进一步研究。

(2) 添加 CTAB 可以使发酵过程中产生的酶原被快速转化为成熟酶, 解除了酶原的产物抑制作用, 产生更多的酶原, 从而促进了产酶。CTAB 价格较低, 且添加量不大, 在实际发酵过程中也易于操作, 因此添加 CTAB 的策略有利于降低成本, 提高酶活, 有较好的实际应用前景。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J. Microbial transglutaminase a review of its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **44**: 277 - 282.
- [2] Ando H, Adadi M, Umeda K, et al. Purification and Characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. *Agric Biol Chem*, 1989, **53**: 2613 - 2617.
- [3] Seguro K, Nio N, Motoki M. Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: transglutaminase. *ACS Symp Ser*, 1996, **650**: 271 - 280.
- [4] Folk J E. Transglutaminase. *Ann Rev Biochem*, 1980, **49**: 517 - 531.
- [5] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J. Medium design based on

stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobararense*. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50**: 291 - 298.

- [6] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobararense*. *Appl Microb Biotechnol*, 1998, **49**: 251 - 257.
- [7] Zheng MY, Du GC, Chen J, et al. A Temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochem*, 2001, **36**: 525 - 530.
- [8] Zheng MY, Du GC, Chen J, et al. Modeling of temperature effects on Batch microbial transglutaminase fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 2002, **18**: 767 - 771.
- [9] Zheng MY, Du GC, Chen J, et al. pH control strategy of batch microbial transglutaminase fermentation with *Streptovorticillium mobararense*. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**(4): 447 - 481.
- [10] Bai YC(柏映国), Du GC(堵国成), Chen J(陈坚), et al. Transglutaminase (MTG) Fermentation with *Streptovorticillium mobararense* in Shaking Flask. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2004, **30**(2): 27 - 32.
- [11] Zotzel J, Pasternack R, Pelzer C, et al. Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *Eur J Biochem*, 2003, **270**: 4149 - 4155.
- [12] Zotzel J, Keller P, Fuchsbaue HL. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *Eur J Biochem*, 2003, **270**: 3214 - 3222.
- [13] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J Biol Chem*, 1950, **187**: 111 - 125.