

# 大肠杆菌 ATCC 15224 胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶生成的动力学研究

龚建华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

Lars Strandberg Sven-Olof Enfors

(瑞典皇家理工学院生物化学与生物工程系)

本文报道了用补料分批培养方法控制限制生长底物的补料速率, 获得一个限制生长底物浓度由10K, 缓慢地渐降的可控培养过程, 以保证获得足够数量的准确的 ( $S_i, \mu_i$ ), 从而得到K, 值。用该法测定了E.coli ATCC 15224在葡萄糖限制生长培养中的K, 值及Monod方程表达式。通过该菌胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶生成与细胞比生长速率相互关系的研究, 导出描述该酶生成与培养液中限制生长底物浓度相互关系的曲线方程。它很好地表明了菌体生长的环境因子与胞内酶生成的相互关系及影响, 并提示可获得最多胞内酶的培养途径。

**关键词** 胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶; 补料分批培养; 限制生长底物; 莫诺方程; 数学方程

$\beta$ -半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23) 广泛分布在自然界, 不仅存在于一些动植物的组织内<sup>[1-6]</sup>, 也作为胞内酶或胞外酶存在于不同种类的微生物体内外<sup>[7-17]</sup>, 它催化乳糖水解为葡萄糖和半乳糖。该酶制剂在国外主要用作乳制品的助消化处理剂, 以防“乳糖不耐症”, 也用作改善乳制品的外观和口感的处理剂, 以避免乳糖在乳制品中结晶并增加了甜度<sup>[18]</sup>。另外,  $\beta$ -半乳糖苷酶用于酶免疫分析, 与荧光底物结合可作超微量荧光酶联分析<sup>[19]</sup>。国外已有许多文献报道了细菌<sup>[7-11]</sup>、酵母<sup>[11,12]</sup>和霉菌<sup>[13]</sup>产生 $\beta$ -半乳糖苷酶的研究工作<sup>[8,9,15,21-23]</sup>, 国内的有关报道不多, 仅涉及菌株的筛选及该酶的纯化<sup>[18-20]</sup>。本文则报道作者在自控发酵罐上进行E.coli ATCC 15224菌株产胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶发酵动力学方面的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 菌种

胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶产生菌株大肠杆菌 (E.coli) ATCC 15224。

### (二) 培养基

1. 种液培养基 (g/L): 葡萄糖 20.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.6,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6.6,  $(\text{NH}_4)_2\text{-H-Citrate}$  0.5, 1 mol/L  $\text{MgSO}_4$  2.5ml, 微量元素溶液\* 2.5ml, 无离子水定容,

本文于1988年12月19日收到。

本文在1989年“第二届全国生化过程模型化与控制学术报告会”上宣读。

本工作承蒙中科院微生物研究所徐浩、陈琦、黄和容和毛维颖同志的帮助, 特此致谢。

\* 微量元素溶液 (g/L):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  16.7,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.16,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.15,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.18,  $\text{Na-EDTA}$  20.1,

pH 7.0;

2. 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 3.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  9.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.6,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6.6,  $(\text{NH}_4)_2\text{-H-Citrate}$  0.5, 1 mol/L  $\text{MgSO}_4$  10ml, 微量元素溶液\* 1.0ml, 无离子水定容, pH 7.0.

### (三) 摇瓶种液

1000ml 的摇瓶内装入 100ml 种液培养基。每瓶接斜面培养物悬浊液 0.3ml, 置旋转摇床 30°C 培养 17h。

### (四) 发酵设备及过程控制的基本参数

瑞士 Chemap 公司的 8 L 自控发酵罐, 工作体积 5 L, 接种量 2%, 培养温度自控 37°C, pH 自控 7.0。搅拌转速 400rpm, 通气比 0.2vvm (后期可适当提高)。pH 调整液 (4 mol/L NaOH) 及葡萄糖补料液 (4%) 由蠕动泵加入罐内。有关变量在线分析。

### (五) 分析方法

1. 菌体生长: 发酵液稀释至合适倍数, 用分光光度计 (Perkin-Elmer Double Bean Spectr. 124) 测定光密度 (波长 580nm, 光程 10mm)。并作出光密度与菌体干重浓度曲线, 以查得的菌体干重浓度作为菌体生长的计量。

2. 葡萄糖浓度: 用 GLOX-酶反应法在分光光度计上 (Perkin-Elmer, Lambda 3) 测定培养液中葡萄糖浓度<sup>[24]</sup>。

3.  $\beta$ -半乳糖苷酶: 细胞经高压匀浆器 (French Press FA 073 Aminco., U.S.A.) 完全破碎后用 ONPG 法<sup>[34]</sup>在分光光度计上 (同上型号) 测定单位干重菌体所含  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。

## (一) 用补料分批培养法获得 *E. coli* ATCC 15224 菌体生长的饱和常数 $K_s$ 值及其莫诺方程表达式

为了建立描述菌体生长和限制生长底物相互关系的莫诺方程<sup>[25]</sup>表达式, 必须测定饱和常数  $K_s$  值。国外许多文献报道了采用恒化器连续培养或分批培养方法<sup>[26-30]</sup>测定菌体培养过程中的 ( $S_i$ ,  $\mu_i$ ) 值, 而求得  $K_s$  值。 $S$  即限制生长底物浓度,  $\mu$  即菌体比生长速率。用恒化连续培养方法逐级改变不同稳态时的稀释率  $D$  (此时,  $D = \mu$ ), 可以得到一系列 ( $S_i$ ,  $\mu_i$ ) 值, 但该法对反应器及其控制方法有较高的技术要求, 否则不易达到真正的稳态 (Steady state) 而影响  $K_s$  的测定, 且测试周期较长。分批培养则是处于连续变化的非稳态过程, 通常在  $K_s$  测定的关键部分, 即限制生长底物浓度很低时 ( $0 < S < 10K_s$ ),  $S$  及  $\mu$  的变化非常迅速, 而不易连续测得一系列不同时间的 ( $S_i$ ,  $\mu_i$ ) 值, 有关研究人员只能测定不同批的不同低底物浓度时分批培养的菌体生长初始速率, 或测定不同批的分批培养的发醇终时底物的不同浓度及相应的菌体生长速率, 每批只能获得一对 ( $S$ ,  $\mu$ ) 值, 所以, 这一方法也很麻烦且很难获得准确的  $K_s$  值。

我们采用限制生长底物连续流加的“补料分批培养”方法测定了 *E. coli* ATCC 15224 对葡萄糖底物的莫诺方程  $K_s$  值。在葡萄糖限制生长条件下, 在以  $F$  (ml/min) 流速、补加葡萄糖液浓度为  $C$  (mg/L) 的补料分批培养体系中, 若控制补料体积与总体积相比很小, 补料液的糖浓度远大于体系中的糖浓度, 则培养体系中糖浓度  $S$  (mg/L) 的变化可表示如下:

## 结果与讨论

\* 同前页注。

$$dS/dt = (F \cdot C/V) - (1/y_s)(dX/dt) \quad (1)$$

其中,  $V$ : 培养液体积 (L),  $t$ : 流加糖液时间 (h),  $X$ : 培养液中菌体浓度 (mg/L),  $y_s$ : 葡萄糖对菌体的转化率 ( $g \cdot$  干重菌体/ $g \cdot$  葡萄糖)。在试验中,  $y_s$  约为 0.5 ( $g/g$ )。在实验条件下, 式 (1) 中的  $(dX/dt)$  项大于零。对于分批培养,  $F=0$ , 即式 (1) 中  $(F \cdot C/V) = 0$ , 则式 (1)  $(dS/dt) = -(1/y_s) \cdot (dX/dt)$ ,  $(dS/dt)$  值不易控制。但在补料分批培养中, 可选择合适的  $(F \cdot C)$  值, 而调整式 (1) 中  $(F \cdot C/V)$  项的大小。这样, 由于  $(F \cdot C/V)$  是正值, 使式 (1) 的  $(dS/dt)$  绝对值下降, 即培养体系中葡萄糖浓度的下降速率减慢, 而且它的减慢程度可取决于所选择的补料速率, 即  $(F \cdot C)$ , 从而获得一个理想的、培养液中限制生长底物浓度逐渐下降 (特别是  $S < 10K_s$  时) 的培养过程。所以, 补料分批培养体系的特殊性保证了可连续而简便地测得一系列足够数量的较准确的  $(S_i, \mu_i)$  值。而与连续培养比较, 该法易于控制且只需较短的测试周期。

作者用上法测定了大肠杆菌 ATCC 15224 生长对葡萄糖的  $K_s$  值。在试验中, 选择一合适的  $(F \cdot C)$  值, 连续测定一系列  $(S_i, \mu_i)$  值。对莫诺方程下列形式

$$(S/\mu) = (K_s/\mu_{max}) + (1/\mu_{max})(S) \quad (2)$$

的  $(S/\mu)$  及  $(S)$  测定值进行线性回归后, 获得回归直线方程如下:

$$(S/\mu) = 12.90 + 1.01(S) \quad (3)$$

它的“相关系数”  $|r| = 0.999$ 。取信度 0.01,  $r_{0.01} = 0.874$ ,  $|r| > r_{0.01}$ ; 取信度 0.05,  $r_{0.05} = 0.754$ ,  $|r|$  更大于  $r_{0.05}$ 。方程 (3) 为“显性相关”。结合方程 (2) 和 (3), 得到试验条件下:  $K_s = 12.77$

(mg/L),  $\mu_{max} = 0.99$  ( $h^{-1}$ )。同时, 回归直线方程 (3) 的明确显性相关性, 也表明了所得莫诺方程表达式

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} = \frac{0.99(S)}{12.77 + S} \quad (4)$$

描述大肠杆菌 ATCC 15224 生长过程的合理性。

## (二) 大肠杆菌 ATCC 15224 胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶生成与胞外限制生长底物相互关系的数学模型

1. 胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶与比生长速率 ( $\mu$ ) 相互关系: 大肠杆菌 ATCC 15224 是一株产胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶菌株<sup>[34]</sup>。Dean<sup>[31]</sup>、Matin<sup>[32]</sup> 和 Harder<sup>[33]</sup> 等人曾采用恒化培养方法研究了某些微生物胞内酶与  $\mu$  的相互关系, 并概括为 5 种类型, 有的表现为随  $\mu$  的降低而酶活性加强。我们发现在试验条件下该菌的该酶活性  $A$  ( $u/mg$ , 单位干重菌体的酶活) 与  $\mu$  也表现为上述这种关系: 当  $\mu$  由  $0.853(h^{-1})$  降至  $0.170(h^{-1})$  时, 该酶活性由  $4.93$  ( $u/mg$ ) 逐渐增至  $7.13$  ( $u/mg$ )。试验数据经回归法处理后, 显示该酶活性与  $\mu$  在足够大的测试范围内 (即  $\mu$  由接近最大值  $\mu_{max}$  一直低至  $\mu = 0.170h^{-1}$ , 而  $\mu$  等于  $0.170h^{-1}$  时葡萄糖浓度已很低为  $2.64$  mg/L, 仅相当于  $(1/5)K_s$  值, 所以,  $\mu = 0.170h^{-1}$  已足够小了) 有明显的线性关系。“线性相关系数”  $|r|$  可达  $0.881$ 。取信度  $0.05$ ,  $r_{0.05} = 0.878$ ,  $|r| > r_{0.05}$ , 为显性相关 (图 1)。计算结果允许我们把 *E. coli* ATCC 15224 在葡萄糖限制生长条件下该胞内酶活性  $A$  与  $\mu$  的关系归纳为下式:

$$A = A_{max} + k \cdot \mu \quad (5)$$

$$(A_{max}: 7.302u/mg,$$

$$k: -2.663u/mg \cdot h)$$

式中,  $A_{max}$  为常数, 其值在理论上等于  $A$

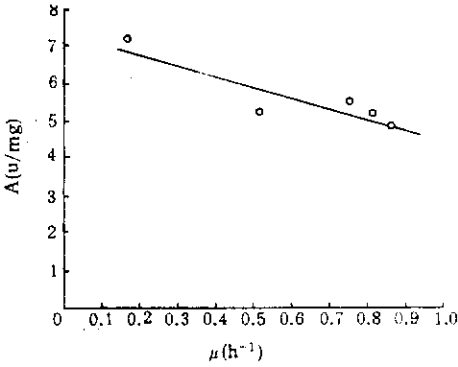


图 1 大肠杆菌 ATCC 15224 在葡萄糖限制生长条件下胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶活性 $A$ 与 $\mu$ 的相互关系

Fig.1 The relationship between the activity of  $\beta$ -galactosidase,  $A$ , and the specific growth rate,  $\mu$ , in fed batch culture of *E. coli* ATCC 15224 with glucose feed

的最大极限值;  $k$  也为一常数, 是负值, 它的绝对值大小表示了  $\mu$  的变化对酶活性的影响程度, 可作为说明该酶与菌体合成代谢关系的特征值。由于该菌的胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶为组成酶<sup>[34]</sup>, 所以表现出上述关系, 这种特性在有关文献中已有讨论<sup>[13-15]</sup>。

2. 胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶活性与胞外限制生长底物的相互关系: 合并式(2)与式(5), 得到了定量描述 *E. coli* ATCC 15224 在葡萄糖限制生长条件下胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶活性 $A$ 与胞外限制生长底物浓度 $S$ 相互关系的函数式:

$$A = A_{max} + \frac{k \cdot \mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (k < 0) \quad (6)$$

试验条件下  $A_{max} = 7.302$  (u/mg),  $k = -2.663$  (u/mg · h),  $\mu_{max} = 0.99$  (h<sup>-1</sup>),  $K_s = 12.77$  (mg/L)。由于式(3)与式(5)回归方程的明显线性相关(取信度至少 0.05), 保证了最终导出方程(6)的可靠性。该方程构成了与莫诺方程相似的面坐标轴移动了的曲线图象<sup>[35]</sup>(图

2)。它反映了细胞内活性物质生成与胞外环境间存在的函数关系。这一关系式是试验数据的归纳和总结。它的意义在于建立了 $A$ 、 $\mu$ 两变量间的定量关系, 由此揭示了这种关系变化的规律性, 同时也得到了如何获取最多胞内酶活性的启示:

(1) 随胞外限制生长底物浓度的减少, 该菌胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶活性相应地增加;

(2) 当胞外限制生长底物浓度小于莫诺方程的 $K_s$ 值时, 胞内该酶活性随胞外限制生长底物浓度的减少而趋于直线地迅速增加;

(3) 当胞外限制生长底物浓度大于 $10K_s$ 值而继续增加, 该酶活性趋于一极小值 ( $A_{min} = A_{max} - |k| \cdot \mu_{max}$ );

(4) 当胞外限制生长底物浓度逐渐接近最小时(趋于零, 图2的曲线不包含M点), 该酶活性理论上将趋于一极大值 ( $A_{max}$ );

(5) 当胞外限制生长底物浓度等于 $K_s$ 值时, 该酶活性为酶活极大值与极小值的平均值;

就以上关系的生物化学意义而言, 式

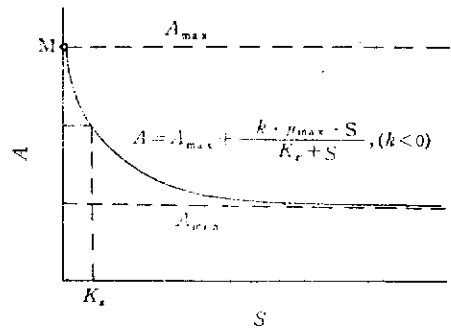


图 2 所导出的 *E. coli* ATCC 15224 胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶活性 $A$ 与胞外限制生长底物浓度 $S$ 的函数关系

Fig.2 The derived mathematical relationship between the activity of  $\beta$ -galactosidase,  $A$ , in cells of *E. coli* ATCC 15224 and the conc. of the growth-limiting substrate,  $S$ , in the broth

(6) 反映了大肠杆菌 ATCC 15224 胞内参与分解代谢的 $\beta$ -半乳糖苷酶的“可阻遏组成酶”的特征,胞外限制生长底物浓度的增加导致底物在胞内代谢速率的改变,使菌体合成代谢速率增加,导致胞内代谢库内“组成酶” $\beta$ -半乳糖苷酶合成物质浓度增加,这种物质的增加可能在酶合成水平上阻遏该酶的生成;而当环境中限制生长底物浓度降低时,细胞将加速参与分解代谢的 $\beta$ -半乳糖苷酶的合成,以加强底物的利用,满足细胞生命活动的基本需要<sup>[8,13,21]</sup>。遗传基因学的研究可进一步揭示上述关系的生物学本质。

(6) 该酶活性受底物浓度的这种影响与莫诺方程的两个常数 $K_s$ 、 $\mu_{max}$ 关系密切。限制生长底物对菌体生长的影响以及对该酶活性的影响都具有饱和函数的数学特征,而且这两条曲线有数值上完全相等的一个特征值,即 $K_s$ ;

(7) 为利用该菌发酵培养获取尽量

多的胞内 $\beta$ -半乳糖苷酶的总酶活 $E(u)$ ;  
 $E = A \cdot X \cdot V$  ( $A$ : 单位干重菌体酶活,  
 $X$ : 培养液菌体干重浓度,  $V$ : 培养液体积), 不仅要提高有效菌体量而且必须控制培养液中较低的限制生长底物浓度而得到较高的酶活。因而,用补料分批培养或连续培养方法不仅能控制底物的低浓度且保持较多的有效菌体量,可实现上述目的;若采用分批培养,限制生长底物浓度仅在培养末期才很低但又下降迅速而难以维持,且部分菌体可能开始衰亡自溶,该法不可取。

本文导出的数学关系式(6),涉及很大的 $S$ 值区间范围( $1/5K_s \leq S \leq 156.6K_s$ ),已具有足够的应用价值和相当的理论意义。对于 $S$ 极小时( $S < 1/5K_s$ ),是否仍保持该函数关系式或可能产生另一适用于极小 $S$ 区间的第二函数式,将另行研究和报道。

## 参 考 文 献

- [1] Gatt, S. et.al.; *Biochim.Biophys.Acta*, 206:125—135, 1970.
- [2] Jungalwala, F.B. et.al.; *J.Biol.Chem.*, 234:4258—4266, 1968.
- [3] Gray, G.M.et.al.; *J.Clin.Invest.*, 48:716—728, 1969.
- [4] Gray, G.M.et.al.; *J.Clin.Invest.*, 48:729—735, 1969.
- [5] Asp, N.G.; *Biochem.J.*, 121:299—308, 1971.
- [6] Sato, M.et.al.; *J.Biochem.*, 70:683—692, 1971.
- [7] Macffters, G.A. et.al.; *J.Bacteriol.*, 93:914—919, 1967.
- [8] Hu, A.S.L. et.al.; *Arch.Biochem.Biophys.*, 81:500—507, 1959.
- [9] Craven, G.R. et.al.; *J.Biol.Chem.*, 24:2468—2477, 1965.
- [10] Hughes, R.C. et.al.; *Biochemistry*, 3:1535—1543, 1964.
- [11] Biermam, L. et.al.; *Biophys.Acta.*, 167:373—377, 1968.
- [12] Uwajima, T. et.al.; *Agr.Biol.Chem*, 36:570—577, 1972.
- [13] Bahi, I.P. et.al.; *J.Biol.Chem.*, 244:2970—2978, 1969.
- [14] Corp, P.C. et.al.; *J.Bacteriol.*, 107(1):162—167, 1971.
- [15] Kuby, S.A. et.al.; *J.Am.Chem.Soc.*, 75:890—896, 1954.
- [16] Tanaka, Y. et.al. *J.Biochem.*, 77:241—247, 1975.
- [17] Rohlfing, S.R. et.al.; *J.Bacteriol.*, 91:1085—1097, 1966.
- [18] Vitale, C.J.; *Treds in Enzymology-Industrial and Clinical Enzymology*, p.45, 1976.
- [19] 郑铁曾等; *微生物学通报*, 8(6):258, 1981.
- [20] 曾贞元等; *微生物学通报*, 14(1):10, 1987.
- [21] Monod, J. et.al.; *Compt.Rend.*, 227:315, 1948.
- [22] Cohn, M. et.al.; *Biochim.Biophys.Acta.*, 7:153, 1951.
- [23] Wallenfels, K. et.al.; *Biochem.Z.*, 331:459, 1969.

- [24] Cheland, N. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18:141—147, 1983.  
 [25] Monod, J., *Ann. Rev. Microbiol.*, 3:371, 1949.  
 [26] Johnson, M. T., *J. Bact.*, 94:101, 1967.  
 [27] Monod, J., *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes* 2nd edn, Hermann, Paris.  
 [28] Dean, A. C. R. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 148:267, 1977.  
 [29] Button, D. K., *J. Gen. Microbiol.*, 58:15, 1969.  
 [30] Pirt, S. J., *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, p.10—12, 1975.  
 [31] Dean, A. C. R., *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 22:245—259, 1972.  
 [32] Marin, A., In *Continuous Culture of Cells*, ed. P. H. Callcott, pp.69—97, Nest Palm Beach: CRC  
 [33] Harder, W. et al., *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, 297:259—480, 1982.  
 [34] Veide, A. et al., *Biotech. Bioeng.*, 25:1789—1800, 1983.  
 [35] Wang, D. I. C. et al., *Fermentation and Enzyme Technology*, John Wiley and Sons, p.74, 1979.

## A KINETIC STUDY ON THE PRODUCTION OF $\beta$ -GALACTOSIDASE BY *ESCHERICHIA COLI* ATCC 15224

Gong Jianhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Standberg, L. Enfors, S. O.

(Department of Biochemistry and Biotechnology, Royal  
Institute of Technology, Stockholm, Sweden)

A comparison of the fed-batch-culture method with the batch-culture and the continuous culture methods which are used so far to determine the saturation constant of Monod model,  $K_s$ , is made. The fed-batch-culture method used here is better, because by means of fed batch culture one can get the desired cultivation-course where the conc. of growth-limiting substrate in the broth was so slowly decreasing specially from  $10 K_s$  to zero of the substrate conc., if controlling the feed rate at some designed values, that the exact and enough points ( $S_i, \mu_i$ ) for the calculation of the  $K_s$  of Monod model were gotten. And the  $K_s$  of the intracellular  $\beta$ -galactosidase-producing fermentation by *E. coli* ATCC 15224 growing in the glucose-medium was rationally and exactly determined, using the fed-batch-culture method above. Furthermore, based on the experiments carried out in this study, the mathematical model of the relationship between the activity of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli* ATCC cells and the conc. of the growth-limiting substrate in the broth was derived.

### Key words

Intracellular  $\beta$ -galactosidase; fed batch culture; growth-limiting substrate, Monod model; mathematical model