

微生物谷氨酰胺转胺酶的分批发酵生产

刘新征¹, 王灼维¹, 杨秋明², 郭兴要¹, 韩兆鹏¹, 蔡慧农², 王璋^{1*}

(1.中国食品发酵工业研究院, 北京 100027)

(2.集美大学生物工程学院, 厦门 361201)

摘要: 在首先采用我们自行设计的 2L 小型、便易的生化反应器, 对我们研究室保藏的高产酶菌株链霉菌 (*Streptomyces sp.*)WZFF.L-M168 发酵生产微生物谷氨酰胺转胺酶(MTG)过程中发酵培养基的碳源、氮源和初始 pH 值的影响作用进行研究, 确定培养条件后, 逐级扩大发酵罐规模, 在 20L 和 200L 发酵罐上以在线监控技术手段直接监测分析环境因素对 MTG 发酵生产的作用效果, 确立各级发酵罐分批发酵的生产工艺条件。结果表明: 碳氮源采用葡萄糖、淀粉和多价脲, 初始 pH 值为 7.0, 接种量 5%~10%, 发酵过程中在线控制培养温度、pH、通气量和搅拌速度等各项参数指标分别为 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、6.6~6.9, 0.8~1.1vvm 和 200~400r/min 较为适宜。在这优化技术条件下, 200L 发酵罐可以稳定生产酶活在 2.75U/ml 以上的 MTG。

关键词: 谷氨酰胺转胺酶; 链霉菌; 分批发酵; 在线监控

Abstract: After using a simple but efficient mini-bioreactor (2L) we equipped to study the effects of carbon source, nitrogen source and initial pH of fermentation broth on the production of microbial transglutaminase (MTG) by a new potent strain, *Streptomyces sp.* WZFF.L-M168 isolated from soil and preserved in our laboratories. The incubation conditions were established. The production was scaled up to 20 L and 200 L jar-fermenters through the utilization of on-line control techniques, and then the techniques for batch fermentation of MTG were set up. The experimental results showed that the optimal processing parameters achieved were 1.5% glucose and 1.0% soluble starch for the carbon source, 2.0% multi-peptone for the nitrogen source, initial pH 7.0, inoculum ratios of 5%-10%, that the following conditions were suitable during the MTG production with on-line controlled supervision: temperature $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH 6.6~6.9, aeration rate 0.8~1.1 vvm and agitation speed 300~400r/min. Under these conditions, the L-M168 strain could stably produce MTG higher than 2.75U/ml.

Key words: transglutaminase; *Streptomyces sp.*; batch fermentation; on-line control #; the corresponding author

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)10-0073-05

最近几年来, 有关利用微生物直接发酵生产谷氨酰胺转胺酶的研究受到高度关注^[1]。谷氨酰胺转胺酶也称转谷氨酰胺酶(transglutaminase, EC2.3.2.13, TG), 是催化蛋白质的谷氨酰胺进行酰胺基转移反应的酶, 可以在蛋白质之内或之间形成 ϵ - $(\gamma$ -谷氨酸)赖氨酸的异型肽键, 共价交联聚合, 从而改变蛋白质本身和蛋白质所附着的细胞等的结构与功能。自从日本研究人员^[2]首先在 1989 年发表利用链轮丝菌(*Streptoverticillium*)发酵生产与动物来源 TG 不同的 Ca^{++} 不依赖型的微生物谷氨酰胺转胺酶(MTG), 特别是日本味之素公司于 1993 年成功地将该酶制剂产品推向市场, 并且多年来连续获得巨大的经济效益以来, 该酶的生产和应用引起了国内外研究者的高度重视和兴趣。迄今为止, 国外有关 MTG 在食品加工中的应用研究报道已有 100 多篇, 该酶产品也已经在国外食品工业加工生产等得到广泛的实际应用^[3], 被认为是用于生产各种新型食品蛋白加工

产品的最重要酶制剂。但目前, 国内还不能工业化生产, 也没有 MTG 产品, 虽然有一些关于该酶发酵生产与应用的研究报道^[4,5], 但都处在实验室水平, 酶产品的性能特征上仍有很大差距, 而国外产品正在大举打入我国国内市场。

由于 MTG 所具有的特殊作用性质和极大的开发应用潜力, 以及已经体现出的显著价值回报, 而使得在国内外的研究报道中, 对该酶生产菌种的具体来源和筛选育种技术方案均不公开, 发酵生产工艺更是高度保密。因此, MTG 发酵生产技术开发在面临着迅速适应国内快速发展的迫切需要、填补国内空白并达到国外先进水平, 同时满足广大国内生产厂家的既经济效益明显、又实施方便、快捷有效等各方面的要求难度很大, 还有很多研究开发各种要做, 却又十分重要和意义重大。

通过建立一整套包括从土壤中系统分离 MTG 生

收稿日期: 2003-05-28 * 通讯联系人

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目(2001BA708B03-05);

科技部科研院所技术开发研究专项资金项目(NCSTE-2001-JKZX-006)

作者简介: 刘新征(1978-), 男, 助理工程师, 研究方向为酶制剂的发酵生产。

产菌种的技术路线设计^[6]、确立 MTG 活力的高性能、经济性分析测试方法^[7]、实施产酶菌株的多种诱变试验及高产突变株的快速、有效筛选流程^[8-9]，我们成功地获得一系列链霉菌(*Streptomyces sp.*)WZFF 编号的 MTG 生产菌株^[10-12]。

本研究利用从土壤分离筛选、驯化选育的高产酶菌株 *Streptomyces sp.* WZFF.L-M168，为了使菌体最大限度地产酶，在对以前的摇瓶发酵培养条件研究^[13]进行总结分析的基础之上，首先采用本实验室自行设计的 2L 小型生化反应器^[14]比较了主要培养基成分以及初始 pH 对 MTG 发酵生产的影响，并逐级扩大发酵罐规模，在各种生产水平上，根据菌种生长特性和 MTG 生产特征，进一步选择性地分析培养环境的作用效果，基本确定了的大至 200L 发酵罐的各级生产工艺条件，为中试规模发酵和产业化生产和应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要药品试剂

N α -carbobenzoyl-L-glutaminy-glycine (CBZ-谷氨酰胺-甘氨酸二肽, CBZ-Gln-GLy)和 L-glutamic acid- γ -monohydroxamic acid (谷氨酸单氧肟酸, Glu-MHA)购自美国 Sigma 公司, 其他均为国产分析级药品和生化试剂。

1.2 菌种

我们研究室从土壤中分离、并经过进一步诱变处理、筛选驯化的 MTG 生产菌株链霉菌(*Streptomyces sp.*)WZFF.L-M168^[15,16]。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基

无机盐淀粉培养基(ISP-4)^[17]: 可溶性淀粉 10g, K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0g, NaCl 1.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0g, $CaCO_3$ 2.0g, 微量元素溶液 1.0ml, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml, pH7.0。微量元素溶液配方(g/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0。

1.3.2 种子培养基(%)

淀粉 2.5, 蛋白胨 2.0, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, NaH_2PO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1。pH7.0。

1.3.3 发酵培养基(%)

碳源 2.5, 氮源 2.0, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.4, NaH_2PO_4 0.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 聚甘油醚(消泡剂)0.03。

1.4 培养条件

1.4.1 一级种子培养

将生长良好的 2 环斜面培养物接种至装有 150ml 种子培养基的 500ml 三角瓶中, 转速 200r/min, 温度 30℃, 摇瓶培养 48h 后, 作为种子液, 以 5%~10% 的接种量分别接入我们实验室设计加工的 2L 小型生化反应器^[14]或 20L 立式发酵罐, 进行 MTG 发酵生产试验。

1.4.2 二级种子培养

200L 发酵罐生产时采用二级种子培养。摇瓶培养的一级种子液按 10% 的接种量接入 20L 发酵罐, 30℃, 继续培养 24h 作为二级种子液, 同样以 10% 的接种量接入 200L 发酵罐。

1.4.3 发酵培养

整个 MTG 发酵生产工艺技术流程及其设备和控制系统如图 1 所示, 其中分别采用 2L 小型生化反应器以及 20L 和 200L 发酵罐设备(发酵罐均为镇江东方生物工程有限公司生产, 分别为 GUJS-20 型和 GUJS-200 型)。该套发酵罐设备由蒸汽发生器、蒸汽过滤系统、冷却水循环设备、空气压缩机、空气过滤系统、种子罐、发酵罐、酸-碱-消泡剂-补料流加器件以及在线发酵控制系统等组成, 在线控制系统可以对发酵培养温度、溶氧系数(DO)、pH 值、搅拌速度以及酸、碱、消泡剂和发酵醪补料流加系统进行在线自动监测控制和记录, 便于观察、分析、调整和保证运行的稳定性。发酵过程中的 DO, 采用相对于初始状态溶氧量为 100% 的溶解氧电极所测定的百分数来反映发酵罐中氧含量分布情况。

2L 生化反应器装液量为 1400ml, 接种量 5%, 搅拌速度 200r/min, 通气量为 850~1000ml/min(约 0.6~0.7vvm)。20L 罐装液量为 14L, 接种量 10%, 搅拌速度 300~350r/min, 通气量为 11~14L/min(约

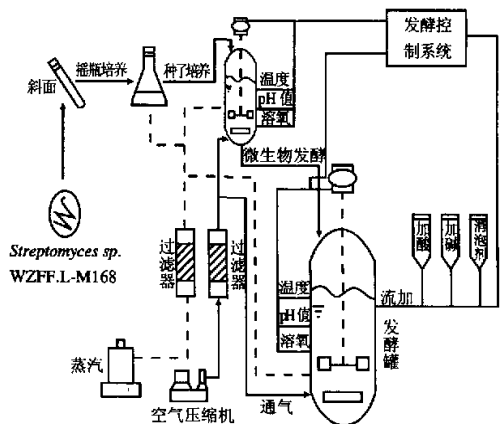


图 1 MTG 发酵生产工艺技术流程及设备 and 控制系统

0.8~1.0vvm)。200L 罐装液量为 140L, 接种量 10%, 搅拌速度 350~400 r/min, 通气量为 140~155L/min (约 1.0~1.1vvm)。初始 pH 均为 7.0, 发酵过程中 pH 和温度分别控制在 6.6~6.9 和 30 ± 0.5℃。

1.5 分析方法

1.5.1 MTG 酶活力测定方法

参照 Folk 的比色法^[18], 以 CBZ-Gln-Gly 和氯化羟胺作为底物。以 Glu-MHA 制作标准曲线。一个 MTG 酶活单位(IU/ml)定义为 37℃下每 min 催化 1μmol 底物 (CBZ-Gln-Gly)生成其单氧脲酸产物所需的酶量。

1.5.2 菌体干重(DCW)的测定

取发酵液 5ml, 4 000r/min 离心 15min, 蒸馏水洗 3 次, 105℃干燥至衡重后称重。

1.5.3 残糖的测定

采用苯酚-硫酸方法^[19]。取一定量发酵液, 离心去菌体后测定。

1.5.4 残留丙三醇的测定

参照文献报道方法^[20]。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基主要成分对 MTG 生产的影响

2.1.1 不同复合碳源的影响

本实验采用 MTG 生产菌株 *Streptomyces sp.* WZFF-L-M168, 在以前摇瓶培养实验^[13]得出使用可溶性淀粉 1%+ 葡萄糖 1.5% 的混合作为碳源时最有利于产酶的基础上, 进一步比较不同复合碳源对菌株发酵生产 MTG 的影响。

实验在摇瓶一级种子培养后, 接入 2L 小型生化反应器进行发酵培养, 在初始 pH7.0 的发酵培养基中分别采用 1.5% 工业葡萄糖、丙三醇(甘油)、玉米淀粉、马铃薯淀粉和红薯淀粉, 并都添加 1.0% 可溶性淀粉作为复合碳源, 以 2.5% 可溶性淀粉作为对照, 氮源为普通蛋白胨产品, 结果如表 1 所示。

从表 1 结果可见, 不同碳源对 MTG 发酵生产的影响差别较大。与吴介文等人^[21]报道的淀粉对酶生产不起促进作用的结果正好相反, 使用淀粉该菌株都可以得到较好的结果, 这与一些有关研究结果^{[21][22]}相似, 但以使用复合碳源时产酶效果更好。实验中使用比较廉价、尚未见报道过的玉米淀粉等 3 种工业生产用淀粉也基本上可以达到同等酶活水平, 这对今后大规模工业化生产中节省原料成本有明显意义。

当碳源使用甘油时, 不像有关论文^{[21][23]}报道的甘油对菌体生长和酶生产具有促进作用的结果那样, 菌体生长有所推迟, 而且 pH 值一直在下降, 产酶效果

表 1 各种碳源对菌体生产 MTG 的影响

碳源(1.5%)	酶活 (U/ml)	DCW (g/L)	残糖 (g/L)	残存丙三醇(g/L)	最终 pH 值
工业葡萄糖	1.78	18.6	2.31		6.32
丙三醇	1.58	16.7	1.12	2.79	6.11
玉米淀粉	1.70	18.1	2.56		6.47
马铃薯淀粉	1.71	17.7	2.78		6.57
红薯淀粉	1.68	17.2	3.04		6.53
可溶性淀粉	1.67	16.9	2.82		6.75

注: 上面碳源 1.5% 中再外加 1.0% 可溶性淀粉。

不明显, 这主要原因可能是因为菌种不同的缘故。当结合采用葡萄糖时, 菌体生长最好, 取得最好的产酶结果, 酶活达 1.78U/ml。以下的发酵生产试验中采用工业葡萄糖和可溶性淀粉作为碳源。

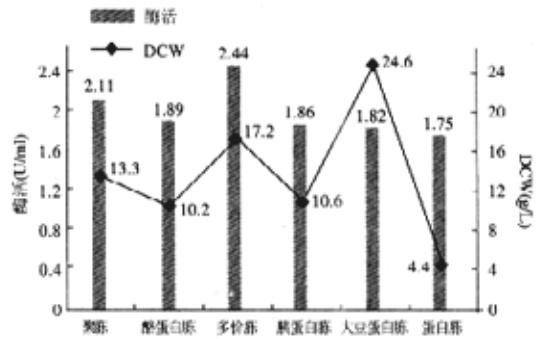


图 2 有机氮源对产酶的影响

从图 2 的结果可以看出, 氮源对菌体生长和酶的生产影响很大。有报道, 采用普通的蛋白胨作为氮源发酵生产 MTG 时, 取得了最好的结果^[24]。本实验使用的几种蛋白胨类产品, 产酶效果都要好于作为对照的普通蛋白胨。而且其中, 多价胨和聚胨两产品对酶的生产具有明显的促进作用, 这可能也部分地说明了一些报道^{[21][25]}在发酵培养基中选择使用 polypeptone(聚胨)作为氮源的原因。尤其是多价胨的效果十分显著, 比普通蛋白胨的酶活性提高了近 40%, 达到了 2.44U/ml。由于 MTG 的作用底物为蛋白质和多肽, 推测这两种产品中可能或者含有较多的一定分子量的蛋白质或多肽, 更容易被实验采用的 L-M168 菌体细胞吸收利用, 也有报道^[26]培养基中作为氮源的酪蛋白水解物的水解度越高, MTG 酶活反而越低; 也可能或者其中还存在着一些小短肽类等的诱导性物质, 直接或间接地诱导和促进 MTG 生物合成。虽然这都有待于今后做进一步的深入分析研究, 但以下的发酵生产试验中采用多价胨产品作为氮源。

另一方面, 虽然具体结果未表示出, 用硝酸

铵、氯化铵、硫酸铵、磷酸二氢铵等几种无机氮盐和尿素、硫脲等有机氮化合物作为氮源时, 这些含氮化合物因为对菌体生长有直接影响作用, MTG 的生产效果都很差。

另外, 从表 1 和图 2 的结果相比较可以看出, 发酵过程中当氮源改变时, 菌体产酶的增加幅度要比碳源大, 也说明氮源对发酵过程中 MTG 合成的影响更为直接。

2.2 最初 pH 值对产酶的影响

发酵培养基的不同初始 pH 值对 L-M168 菌株的菌体生长和 MTG 酶生产的作用结果如图 3 所示。不同的初始 pH 值对菌体生长和产酶都有明显的影响, 较低或较高的初始 pH 值对该链霉菌菌体生长和产酶都有明显的抑制作用, 当控制初始 pH 值控制在 7.0 左右时, 明显有利于菌体生长和产酶, 在此条件下酶活最高: 2.48 U/ml。

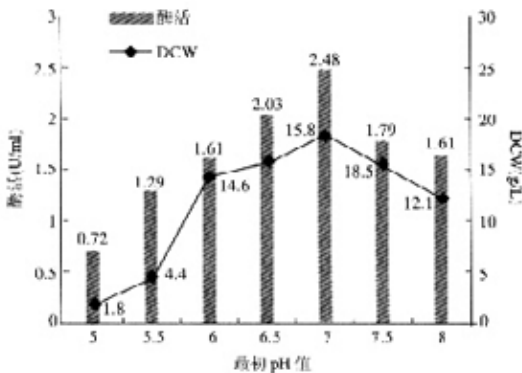


图 3 初始 pH 对产酶的影响

2.3 发酵培养实验

2.3.1 20L 发酵罐产酶试验

通过上面利用小型便利的生化反应器对主要发酵培养基组成的比较分析, 以及结合以前摇瓶试验结果, 可以得出 L-M168 菌株发产酶剂的最优化培养条件为发酵培养基的初始 pH 7.0、碳源为葡萄糖 1.5% 和可溶性淀粉 1.0%、氮源为多价脲 2.0%、外加酵母膏 0.2%, 一级种子培养 48h 后以 5%~10% 接种量接种, 30℃, 通气搅拌培养下发酵生产。接着, 利用这优化工艺条件, 采用 20L 立式发酵罐发酵生产酶制剂, 以发酵过程中控制 pH 在 6.6~6.9、搅拌速度 300~350r/min 和通气量 0.8~1.0vvm 的条件, 连续培养 4d, 结果如图 4 所示。

从图 4 的结果可以看到, MTG 的发酵生产与菌体生长繁殖密切相关, 同步消长, 这与 Ando 等人^[2]所报道的酶的生产与菌体生长之间的关联性不明显的

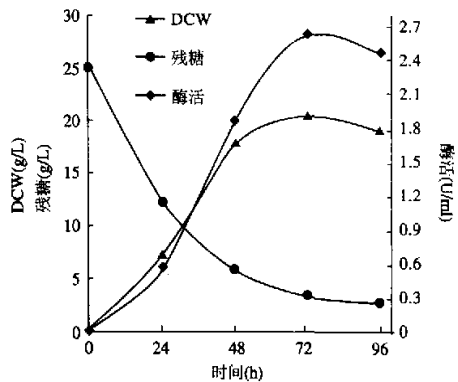


图 4 20L 小型发酵罐产酶及生长曲线

实验结果不一样, 而比较类似于郑美英等人的相应结果^[22]。MTG 酶活力在发酵至 72h 时达到高值, 为 2.63U/ml。

2.3.2 200L 发酵罐产酶试验

按发酵罐放大原则, 对 MTG 的发酵生产继续进行了 200L 发酵罐的发酵放大试验。200L 发酵罐的装液量为 140L, 发酵控制条件与上面 20L 发酵罐基本相似, 但采用两级种子的扩培支持, 即 48h 摇瓶培养的一级种子和 20L 发酵罐 24h 增殖培养的二级种子后按 10% 接种量打入 200L 罐。发酵过程中通过在线控制系统对通气量控制在 1.0~1.1vvm 之间, 罐压保持在 0.05~0.06MPa, 搅拌转速先设定为 350r/min, 24h 后调高为 400 r/min。这样, 在发酵过程中的溶氧参数基本保持在接种前发酵液中氧溶解量的 50% 以上, 确保了该产酶发酵通气培养的菌体生长的好氧要求。

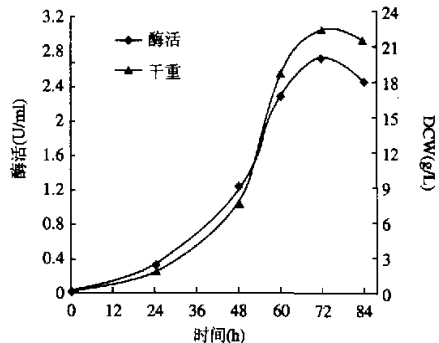


图 5 200L 发酵罐菌体生长及产酶曲线

图 5 为 L-M168 菌株在 200L 发酵罐培养过程中的产酶曲线。从图 5 可看出, 很好地再现了摇瓶和小型发酵罐试验结果, 而且由于该 200L 发酵罐的本身设备以及配套的调控性能要比小型罐及摇瓶条件方便、优异, 虽然发酵罐体积大, 但通气与搅拌等都比小罐容易操控, 多项参数实施在线监控和自动记

录,及时综合分析比较,条件更加充分完善。所以,该菌株在这发酵体系中L-M168菌株生长良好,保持旺盛的增殖势头,菌体细胞干重也明显提高,72h时增加至22.4g/L;随着菌体细胞的快速增殖,发酵液中残存总糖量的分析结果未再具体表示,也从第1d开始迅速地下降,到培养结束时,残糖浓度只有最初使用量的10%左右。同样,产酶结果与菌体生长相偶联,MTG的生产能力得以充分发挥并有所提高,在发酵至第72h时达到产酶峰值,MTG活力为2.75U/ml。

另外,虽然发酵液体系的pH值可以方便地进行调控,但实验观察到,整个发酵过程中变化不大,第1d时逐渐略微下降,但从第2d后始终维持在pH6.8附近,这对于菌体生长与酶产生和保持酶活性稳定都很有利。

本实验重复了两次罐发酵生产试验,结果都表明,L-M168菌株具有高产MTG的发酵生产能力,可以持续稳定地获得2.75U/ml以上的酶产品,而且酶活力稳定性强,发酵生产周期短。这说明该菌株的生长繁殖能力强、产酶性能稳定,具备可以进一步深化挖掘、强化提高,充分发挥其高效生产MTG性能、创造经济价值的巨大潜在能力;也说明本研究探讨总结出的发酵罐生产工艺技术的合理性,可以进一步扩大发酵生产规模,并在具体实践中深入实施、推广,并且不断优化和完善各项实际生产MTG产品的工艺技术,为本实验成果今后进行工业化生产和实际开发应用打下了有益的坚实基础。

参考文献:

- [1] 陈义华,陆兆新,程巧芬.转谷氨酰胺酶在食品中的应用[J].食品工业,2001,(3):20-21.
- [2] Ando H, Adachi M, Umeda K et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(10): 2613-2617.
- [3] 山崎胜利, 添田孝彦. トランスグルタミナーゼの新しい利用[J]. 食品と開発, 1997, 32(12): 11-13.
- [4] Zheng M, Du G, Guo W et al. A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation[J]. Process Biochem, 2001, 36(3): 525-530.
- [5] 江波, 周红霞. 谷氨酰胺转氨酶对火腿肠凝胶性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(4): 1-6.
- [6] 王灼维, 王璋. 土壤分离转谷氨酰胺酶生产菌株[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 5-10.
- [7] 王灼维, 王璋, 刘新征等. 产谷氨酰胺转氨酶菌株筛选方法初步探讨[J]. 精细与专用化学品, 2002, 8(增刊): 425-428.
- [8] 王灼维, 王璋, 郝伟等. 复合诱变选育谷氨酰胺转氨酶高产菌株[C]. 2002年中国酶制剂生产与应用技术交流会论文集, 天津, 2002. 105-111.
- [9] 王璋, 王灼维. 微生物谷氨酰胺转氨酶高产菌株的诱变选育[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 62-67.
- [10] Wang Z. Utilization of a new microbial transglutaminase from *Streptomyces* for the formation of edible soybean protein films[J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2002, 17(Special): 41-50.
- [11] 王璋, 王灼维, 袁辉等. 微生物转谷氨酰胺酶生产菌的“神舟四号”飞船搭载育种研究.I. 搭载前地面育种试验[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 6-12.
- [12] Wang Z, Liu X, Wang Z et al. Influence of *Streptomyces* transglutaminase treatment on the formation of edible soybean protein films[C]. Proceedings of China & International Soybean Conference & Exhibition in 2002, Beijing, 2002. 328.
- [13] 王璋, 王灼维. 微生物转谷氨酰胺酶的生产菌种诱变和发酵生产分析[J]. 生物加工过程, 2003, 1(1): 52-59.
- [14] 刘新征, 王灼维, 王璋. 谷氨酰胺转氨酶的发酵生产及酶纯化技术的研究[C]. 2002年中国酶制剂生产与应用技术交流会论文集, 天津, 2002. 112-119.
- [15] 刘新征, 王灼维, 王璋. 产谷氨酰胺转氨酶菌种的发酵培养及酶纯化的初步探讨[C]. 全国第七届工业生化学会会议论文集, 大连, 2002. 93.
- [16] 王璋, 刘新征, 王灼维等. 新选链霉菌转谷氨酰胺酶的纯化及特性分析[C]. 纪念中国微生物学会成立五十周年暨学术年会论文集摘要集, 北京, 2002. 75.
- [17] Buchana R E, Gibbons N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. (第八版). 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组译, 北京: 科学出版社, 1985. 1161-1180.
- [18] Folk J E. Transglutaminase [M]. Tabor H and Tabor C W. Methods in Enzymology [C]. New York: Academic Press, 1970, 17: 889-894.
- [19] Dubois M, Gills K A, Hamilton J K et al. Determination of sugars with phenol-sulfuric acid reagent [J]. Anal Chem, 1956, 28(2): 350-354.
- [20] 金海如, 方蕙英, 诸葛健. 供氧对产丙三醇假丝酵母产丙三醇发酵研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 203-206.
- [21] 吴介文, 蔡国珍, 江善宗. 转谷氨酰胺酶生产菌株之筛选及影响其产量因子之探讨[J]. 中国农业化学会志, 1996, 34(2): 228-240.
- [22] 郑美英, 堵国成, 陈坚等. pH值和初始淀粉质量浓度对发酵生产谷氨酰胺转氨酶的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(4): 331-335.
- [23] Junqua M, Duran B, Gancet C et al. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48(5): 730-734.
- [24] 常中义, 江波, 王璋. 培养基组成对轮枝链霉菌合成谷氨酰胺转氨酶的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(1): 51-54.
- [25] Gerber U, Juckmischke U, Putzien S et al. A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*[J]. Biocem J, 1994, 299: 825-829.
- [26] 常中义, 江波, 王璋. 酪蛋白水解物对轮枝链霉菌SK-1产谷氨酰胺转氨酶的影响[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(1): 66-68.