

固定化桔青霉产生核酸酶 P₁ 的研究

夏黎明

(浙江大学化工系 杭州 310027)

摘要 利用吸附固定多孔聚醚载体上的桔青霉(*Penicillium citrinum*)菌丝细胞,在摇瓶中以分批发酵方式合成核酸酶 P₁。试验结果表明:在固定化细胞产酶的条件下,培养液中葡萄糖和蛋白胨的最适浓度分别为 10g/L 和 1g/L,摇瓶转速以 180~200r/min 为宜。固定化细胞经过 48 h 的产酶周期,培养液中的核酸酶 P₁活力可高达 513.3U/ml,其产酶效率是游离菌丝的 3.6 倍,而葡萄糖和蛋白胨的用量仅为游离菌丝产酶的五分之一。在重复分批发酵试验中,固定化菌丝细胞形状稳定,连续 28 批(共 56d)的产酶结果基本一致,每批的平均酶活力为 507.4U/ml,在经济上和工艺上均显示了明显的优越性。

关键词 固定化细胞,桔青霉,核酸酶 P₁

分类号 TQ920.1

桔青霉(*Penicillium citrinum*)产生的核酸酶 P₁ 是具有重要应用价值的酶制剂^[1]。该酶可将 RNA 水解成 5'-单核苷酸,它们可广泛应用于食品工业和生化制药工业^[2,3]。核酸酶 P₁ 还能水解 DNA,形成的 5'-单核苷酸也是一类临床有效的药物。近年,核酸酶 P₁ 常用于 DNA 碱基组成分析及序列测定等^[4]。核酸酶 P₁ 的生产通常采用固体发酵或深层发酵。固体发酵简便、成本低,但占地面积大、生产效率低,而且产生的分生孢子易污染环境。深层发酵虽然避免了上述缺点,但成本偏高。我们采用固定化桔青霉菌丝细胞生产核酸酶 P₁ 取得良好成效。固定化菌丝可以重复使用,简化了产酶工艺,降低了生产成本。

1 材料和方法

1.1 菌种

桔青霉(*Penicillium citrinum*)由南京林业大学陆宪辉教授提供,是一个优良突变株。培养初期菌落无色,后呈灰绿色。分生孢子梗发达、呈帚状分枝。分生孢子单细胞、串生。将菌种移植到斜面培养基上,于 28℃ 恒温培养箱中培养数天,待分生孢子成熟后,置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L): NaNO₃ 3.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄ 0.5, KCl 0.5, FeSO₄ 0.01, 蔗糖 30, 琼脂 20。液体培养基(g/L): K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.4, CaCl₂ · 2H₂O 0.4, ZnSO₄ · 7H₂O 0.2, 葡萄糖与蛋白胨的用量依实验而定。起始 pH 为 6.0。

1.3 菌丝细胞固定化

采用多孔聚脂载体(普通海绵)吸附固定桔青霉菌丝细胞,载体的孔隙率约为 92%,按

收稿日期: 1997-01-22

实验要求切成一定大小。使用前在沸水中煮 30 min,再用蒸馏水清洗两遍。菌丝固定在 500 ml 三角瓶中进行,将 0.8g 载体加入 120 ml 液体培养基中,121℃ 灭菌 30min,冷却后接入培养好的 10ml 液体菌种,在 28℃ 培养 3d,依靠吸附生长将菌丝细胞固定在载体网络中。

1.4 固定化桔青霉扫描电镜样品的制备

先将选定的材料用蒸馏水清洗两遍。4℃ 下用 4% 的戊二醛预固定,1% 饿酸后固定,再经过酒精系列脱水。CO₂ 临界点干燥及真空喷镀仪镀膜等步骤,制成了扫描电镜样品^[5]。

1.5 核酸酶 P₁ 的制备

1.5.1 游离菌丝产酶^[1]:在 500ml 摇瓶中装入液体培养基 100 ml,接种量 10%,在 28℃、摇床 150r / min 培养,当酶活力达到高峰时,离心收取酶液。

1.5.2 固定化菌丝细胞产酶:在 500 ml 摇瓶中装入 120 ml 液体培养基,固定化菌丝用量(干重)10g / L,在 28℃、180 r / min 摇床(特别指明者例外)培养。定时取样测酶活力和 pH 值。产酶结束后,收取酶液,换新鲜培养基,利用固定化菌丝进行新一轮产酶,如此重复进行。

1.6 分析测定方法

1.6.1 还原糖的测定:采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法测定。

1.6.2 菌丝细胞干重的测定:将已知重量的载体材料和吸附固定的菌丝一同置于 105℃ 烘箱中烘干至恒重,扣除载体重量,即为固定化菌丝干重。

1.6.3 核酸酶 P₁ 活力测定^[1]:将含 1%RNA、0.125mol / L 醋酸缓冲液 (pH5.1) 和 1×10^{-3} mol / L ZnSO₄ 的反应底物 1.9ml 加入试管,在 67℃ 预热 10 min,再加入酶液 0.1 ml,反应 15 min 后,取出试管在冰浴中晃动数秒钟,迅速加入 2.0 ml 预冷的核酸沉淀剂 (0.02mol / L La(NO₃)₃-0.2mol / L HCl)。在冰浴中保持 20 min 后,于 3000 r / min 离心 5 min。将上清液稀释 50 倍后,测定 260 nm 处的光密度 OD 值。同时做对照调零。底物在 67℃ 保温 25min,加入预冷的核酸沉淀剂,再加入酶液,其他按上述方法进行。一个酶活力单位定义为:在上述测定条件下,每分钟催化形成具有 OD 值为 1 的 5'-核苷酸的酶量,以 U / ml 表示。

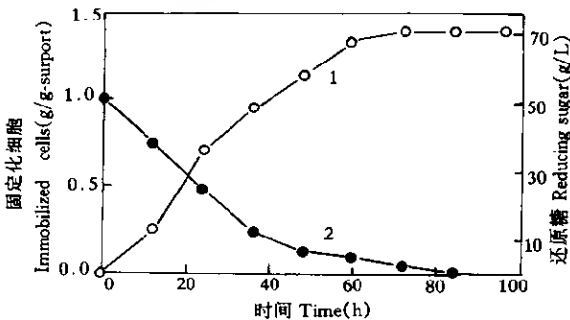


图1 桔青霉菌丝的吸附固定进程

Fig.1 The immobilization course of *Penicillium citrinum* cells

1. Immobilized cell dry weight per gram support;
2. Reducing sugar in medium.

2 结果和讨论

2.1 桔青霉的固定化

菌种接入后,菌丝很快吸附到载体上。吸附的菌丝进一步在网络间生长,扩展。培养初期,载体上的固定化菌量增长迅速;随着时间延长,培养液中的营养逐渐消耗,载体上菌丝的增加渐趋缓慢。从图 1 中可以看出,培养 72 h 后,还原糖已基本耗尽,固定化菌量不再有变化。此时每克载体上的固定化菌丝干重平均可达 1.4g。载体内外菌丝密布,菌

丝与载体网络之间紧紧纠缠在一起(图 2)。而培养液中游离菌丝极小。

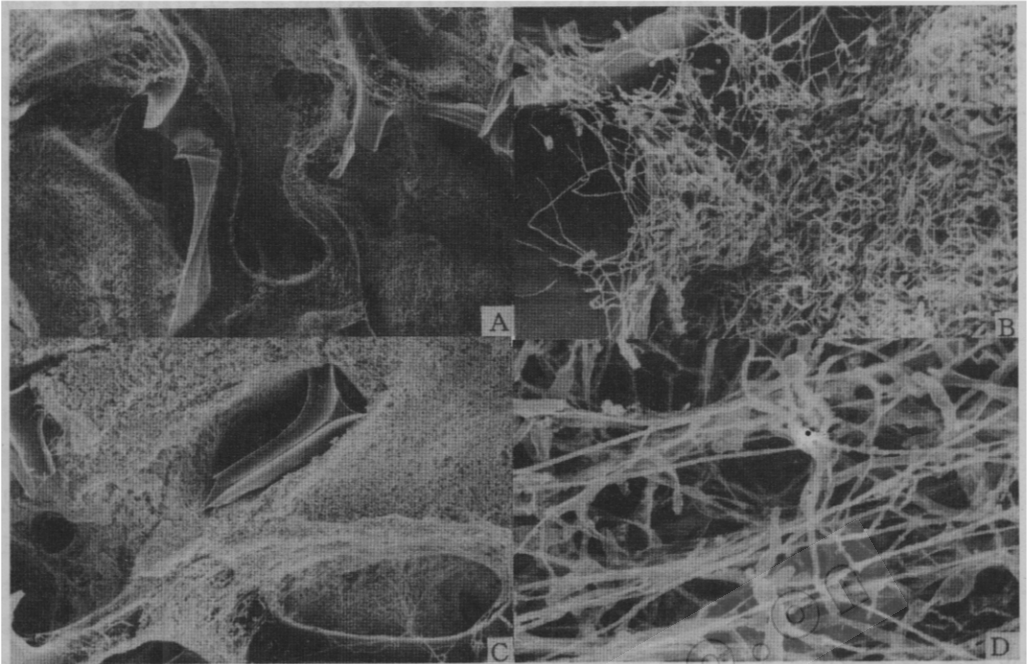


图2 固定化桔青霉的扫描电镜照片

Fig.2 SEM photographs of immobilized *Penicillium citrinum* cells

A($\times 85$) and B($\times 503$): Adsorbed and immobilized hyphae on the porous supporter; C($\times 89$) and D($\times 1490$): The immobilized hyphae used for 56 days continuously.

2.2 固定化菌丝与游离菌丝产酶的比较

分别采用固定化菌丝与游离菌丝进行了产酶试验。固定化菌丝的培养基含葡萄糖 10g / L, 蛋白胨 1g / L。而游离菌丝培养基中葡萄糖和蛋白胨的浓度分别为 50g / L 和 5g / L。

从图 3 看出, 游离菌丝的产酶进程较为缓慢。酶活力高峰出现在第 5d (357.3u / ml)。固定化菌丝的产酶进程明显快, 酶活力在培养初期便迅速提高, 培养 48 h 即可达到 513.3 U / ml。固定化菌丝产酶所需的葡萄糖和蛋白胨用量缩减到游离菌丝产酶的 1 / 5。由于固定化菌丝可重复利用, 所以可省去菌种培养等步骤。发酵液中游离菌丝很少, 经过滤便可得到澄清酶液。因此, 固定化菌丝产酶具有周期短、酶活力高、成本低、操作简便和易于连续化等优点。若开发出适宜的生物反应器, 应用潜力很大。

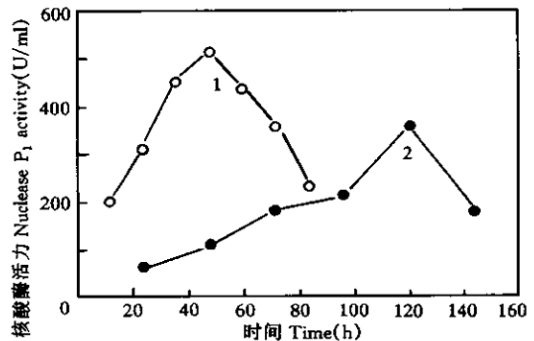


图3 游离菌丝与固定化菌丝产酶情况的比较
Fig.3 The time course of nuclease P₁ Production by free and immobilized *Penicillium citrinum* cells

1. Immobilized cells; 2. Free cells.

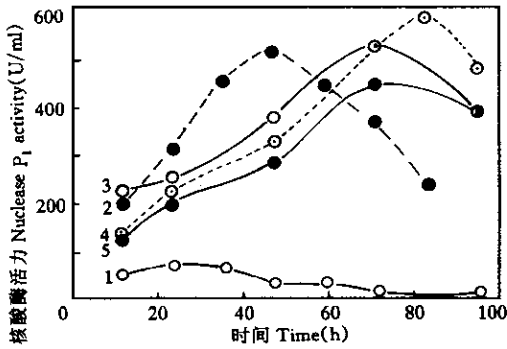


图4 不同营养条件对固定化桔青霉产酶的影响

Fig.4 Effects of glucose and peptone contents in medium on nuclease P_1 production by immobilized *Penicillium citrinum* cells

1. Glucose 5g/L, peptone 0.5g/L;
2. Glucose 10g/L, peptone 1g/L;
3. Glucose 20g/L, peptone 2g/L;
4. Glucose 30g/L, peptone 3g/L;
5. Glucose 50g/L, peptone 5g/L.

要求较高,培养液中葡萄糖和蛋白胨的浓度通常为 50 g/L 和 5 g/L^[1]。在固定化菌丝产酶条件下,因为大量菌丝已被吸附固定,无需再通过增殖生长阶段,故营养成分可大大缩减。根据实验结果,综合考虑生产成本和效率,葡萄糖和蛋白胨用量分别以 10g/L 和 1g/L 为宜。

2.4 摇瓶转速对产酶的影响

桔青霉是好氧菌种,当采用固定化菌丝生产核酸酶 P_1 时,选择适宜的摇瓶转速,对于提高必需的溶氧条件、加速酶蛋白的合成与分泌都是至关重要的。本实验采用分批式发酵(培养液含葡萄糖 10g/L,蛋白胨 1g/L),对比了四个不同转速对固定化桔青霉产酶的影响。实验结果表明:在转速为 150r/min 的条件下,达到最大酶活力的时间明显拉长,酶活力和产率均较低。这可能主要是由于转速较低时,培养液中的溶氧较差所致。然而,当转速提高到 250r/min 时,溶氧条件虽已不成为限制因子,但酶活力和产率仍不满意,也许是过高的剪切力和过高溶氧对固定化菌丝产酶造成不良影响所致。当转速在 180~200r/min 时,酶活力和产率明显较高。

2.5 重复分批发酵试验

固定化桔青霉进行反复分批发酵试验(repeated batch processes),培养液中含葡萄糖和蛋白胨分别为 10 g/L 和 1 g/L,每批培养周期为 2d。重复进行 28 批,共 56d,结果如表 1 所示。

固定化桔青霉的产酶性能很稳定。28 批产酶率为 $10570.8U \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$,是游离菌丝平均产酶率($2977.5U \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)的 3.6 倍。后者培养液的 pH 值变化较大。一般培养初期迅速下降,最低可降至 pH3.5 左右。随后又逐渐上升。在培养后期菌丝大量裂解,pH 值迅速升到 6.0 以上。而在固定化菌丝细胞产酶的条件下,每批的 pH 值较稳定,均保持在 4.0~4.5 之间,这一结果说明固定化菌丝细胞很稳定。采用扫描电镜进行观察研究,发现

2.3 不同营养条件对核酸酶 P_1 形成的影响

图 4 显示了在不同浓度的葡萄糖和蛋白胨条件下,固定化桔青霉菌丝合成核酸酶 P_1 的情况。当培养液中葡萄糖和蛋白胨的浓度分别为 5g/L 和 0.5g/L 时,酶活力很低,这显然是营养不足所致。当葡萄糖和蛋白胨的用量提高时,最终酶活力随之提高,但产酶进程也随之逐渐放慢,产酶周期拉长。当葡萄糖和蛋白胨的用量分别提高到 50g/L 和 5g/L 时,酶活力下降,而且培养液中游离菌丝增多。此现象说明营养成分过高对产酶不利。在游离菌丝产酶条件下,培养前期一部分营养用于菌丝的增殖生长,所以对营养的

表1 固定化桔青霉重复分批发酵结果

Table 1 The results of repeated batch fermentation using immobilized *Penicillium citrinum* cells

批次 Batch	最终pH值 End pH	酶活力(U/ml) P_1 activity	批次 Batch	最终pH值 End pH	酶活力(U/ml) P_1 activity
1	4.1	510.0	15	4.4	504.5
2	4.1	504.7	16	4.2	518.5
3	4.1	513.3	17	4.1	509.2
4	4.0	498.6	18	4.2	502.6
5	4.2	491.4	19	4.2	495.0
6	4.2	512.0	20	4.4	499.7
7	4.1	521.5	21	4.5	486.8
8	4.3	515.4	22	4.5	484.0
9	4.2	508.5	23	4.2	488.6
10	4.3	518.8	24	4.2	502.5
11	4.2	500.6	25	4.2	511.4
12	4.2	527.0	26	4.4	519.2
13	4.3	522.4	27	4.3	511.3
14	4.1	517.0	28	4.5	516.0

连续使用 56 d后, 载体上的固定化菌丝密集如初, 菌丝细胞形态正常(图 1: C, D), 这进一步表明重复利用固定化桔青霉菌丝细胞高效生产核酸酶 P_1 是可行的。

参 考 文 献

- [1] 刘树煌. 5'-磷酸二酯酶(核酸酶 P_1). 见: 张树政主编. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 748~766.
- [2] Benais M D, Lopez S J, Sola C. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12:86~89.
- [3] Yamada Y, Ishikura H. *FEBS Letters*, 1975, 54:155~158.
- [4] 国中明. 发酵と工业, 1985, 43(2):1~68.
- [5] 田中敬一, 水谷隆编(李文镇译). 图解扫描电子显微镜—生物样品制备. 北京: 科学出版社, 1984. 126.

NUCLEASE P_1 PRODUCTION BY IMMOBILIZED *PENICILLIUM CITRINUM* CELLS

Xia Liming

(Department of Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Mycelia of *Penicillium citrinum* were adsorbed and immobilized efficiently within porous polyurethane. Nuclease P_1 produced by the immobilized cells were studied in shaking flasks. The suitable glucose and peptone contents in medium were 10 g/L and 1 g/L, respectively. And the shaking speed was 180~200 r/min. After 48h fermentation, the nuclease P_1 activity reached 513.3 U/ml, the productivity was 3.6 times higher than that of the free cells. The production cost is obviously reduced. In repeated batch fermentation, the immobilized cells kept the capacity after 28 batches for 56 days with an average nuclease P_1 activity of 507.4 U/ml.

Key words Immobilized cells, *Penicillium citrinum*, Nuclease P_1