

固定化桔青霉发酵核酸酶 P_1 的研究

王克明¹,王宇光²

(1.浙江科技学院 生物与化学工程学系,浙江 杭州 310012;2.烟台大学 生物与化学理工学院,山东 烟台 264005)

摘 要:以玉米芯颗粒吸附桔青霉(*Penicillium citrinum*)孢子,再用1.5%的海藻酸钠包埋吸附固定化细胞玉米芯颗粒,于摇瓶中进行分批培养。实验结果表明:在固定化细胞产酶的条件下,培养基中淀粉水解糖浓度为9 g/L,蛋白胨浓度为1 g/L,摇瓶转速为180 r/min,产酶发酵周期为50 h,发酵液中核酸 P_1 的活力高达503 U/mL。双载体固定化细胞经30批次连续重复发酵产酶稳定在较高水平,固定化细胞粒子机械强度高。

关键词:桔青霉;固定化细胞;核酸酶 P_1 ;玉米芯;海藻酸钠

中图分类号:TS201.25

文献标识码:A

文章编号:1671-8798(2003)02-0090-04

桔青霉(*Penicillium citrinum*)产生的核酸酶 P_1 是具有重要应用价值的酶制剂^[1]。核酸酶 P_1 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 P_1 可将DNA水解成5'-单核苷酸,也可制作药物^[4,5]。核酸酶 P_1 的生产通常采用固体或液体发酵。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。深层发酵避免了上述缺点,但成本高。

固定化细胞具有菌体密度高、反应速率快、稳定性好、使用寿命长、可重复利用、便于产物的分离等优点,因此,固定化细胞技术有利于提高细胞的利用率、生物反应速率及连续化生产。桔青霉为丝状真菌,其菌体为丝状,体积远大于细菌和酵母细胞,专性好氧。研究表明,吸附固定化法操作简便,传质性能好,机械强度高,但菌体与载体结合力弱,菌丝易脱落。玉米芯是玉米种植加工中的副产物,由于其多孔性和无毒性,已被用作醋酸发酵吸附固定化细胞的载体^[6]。本研究采用玉米芯吸附和稀薄海藻酸钠胶体包埋固定化的桔青霉,对进行间歇重复发酵生产核酸酶 P_1 开展了试验。采用玉米芯和海藻酸钠吸附、包埋固定化桔青霉生产核酸酶 P_1 的研究,国内外未见报道。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

桔青霉(*Penicillium citrinum*)由烟台大学生物与化学理工学院微生物教研室提供,玉米芯及淀粉由烟台淀粉糖厂提供, α -淀粉酶及糖化酶由烟台星达生物工程有限公司提供,海藻酸钠由上海化学试剂采购供应站分装厂生产,其他试剂均为实验级用品。

桔青霉斜面培养基:NaNO₃ 3.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 20 g/L。

桔青霉固定化细胞增殖培养基:NaNO₃ 3.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L。

收稿日期:2002-12-06

作者简介:王克明(1949—),男,辽宁大连人,教授,博士生导师,主要从事微生物及海洋生物工程的教学与研究。

桔青霉发酵培养基: KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, 葡萄糖与蛋白胨的用量依实验而定, 起始 pH6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 桔青霉细胞固定化

将玉米芯烘干后粉碎成 $3 \sim 5 \text{ mm}^3$ 的均匀小颗粒, $1 \times 10^6 \text{ MPa}$ 灭菌, 同时, 将于 28°C 培养成熟的桔青霉制成孢子悬液(孢子浓度为 $\times 10^6$ 个/mL)。将经高压灭菌的玉米芯小颗粒与桔青霉孢子悬液按 1:2 的比例混合进行吸附固定。将已吸附桔青霉孢子的玉米芯颗粒浸入 1.5% 海藻酸钠凝胶中进行包埋后, 转于 5% 的 CaCl_2 溶液中浸泡钙化 30 min, 用无菌生理盐水洗涤 2~3 次经钙化的固定化粒子。4 $^\circ\text{C}$ 储藏备用。

1.2.2 核酸酶 P₁ 的制备

游离菌丝产酶: 在 500 mL 三角瓶中装入液体培养基 100 mL, 接种量为 10%, 于 28°C 摇床(转速 160 r/min)发酵培养, 酶活力达到高峰时, 离心收取酶液。

固定化细胞产酶: 在 500 mL 三角瓶中装入 100 mL 液体培养基, 接入一定量的固定化细胞粒子, 于 28°C 摇床(转速 180 r/min)发酵培养, 酶活力达到高峰时离心收取酶液, 更换新鲜培养基, 以固定化桔青霉进行重复发酵。

1.2.3 分析测定方法

还原糖的测定: 采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定。

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°C 烘干至恒重, 扣除载体重量, 即为固定化菌丝的干重。

核酸酶 P₁ 活力的测定^[1]: 将含 1% RNA、0.125 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.1)和 1×10^{-3} mol/L ZnSO_4 的反应底物 1.9 mL 加入试管, 在 67°C 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(0.02 mol $\text{Li}(\text{NO}_3)_2$, 0.2 mol/L HCl)。在冰浴中保持 20 min 后, 于 3 000 r/min 离心 5 min。将上清稀释 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°C 保温 25 min, 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。

2 结果与讨论

2.1 桔青霉固定化细胞的增殖

桔青霉孢子经吸附包埋后, 接入增殖培养基中 28°C 培养, 孢子很快萌发形成菌丝体。桔青霉固定化细胞增殖过程示于图 1。

由图 1 可以看出, 菌丝在玉米芯载体网络间生长、扩展。培养初期, 载体上的固定化菌量增长迅速; 随着时间的推移和发酵液中的营养成分的消耗, 载体中菌体增加趋于缓慢。在 80 h 左右, 还原糖已基本耗尽, 固定化菌量不再增加。显微镜观察, 发现菌丝主要分布于载体内及外表面, 而发酵液中游离菌丝极少。

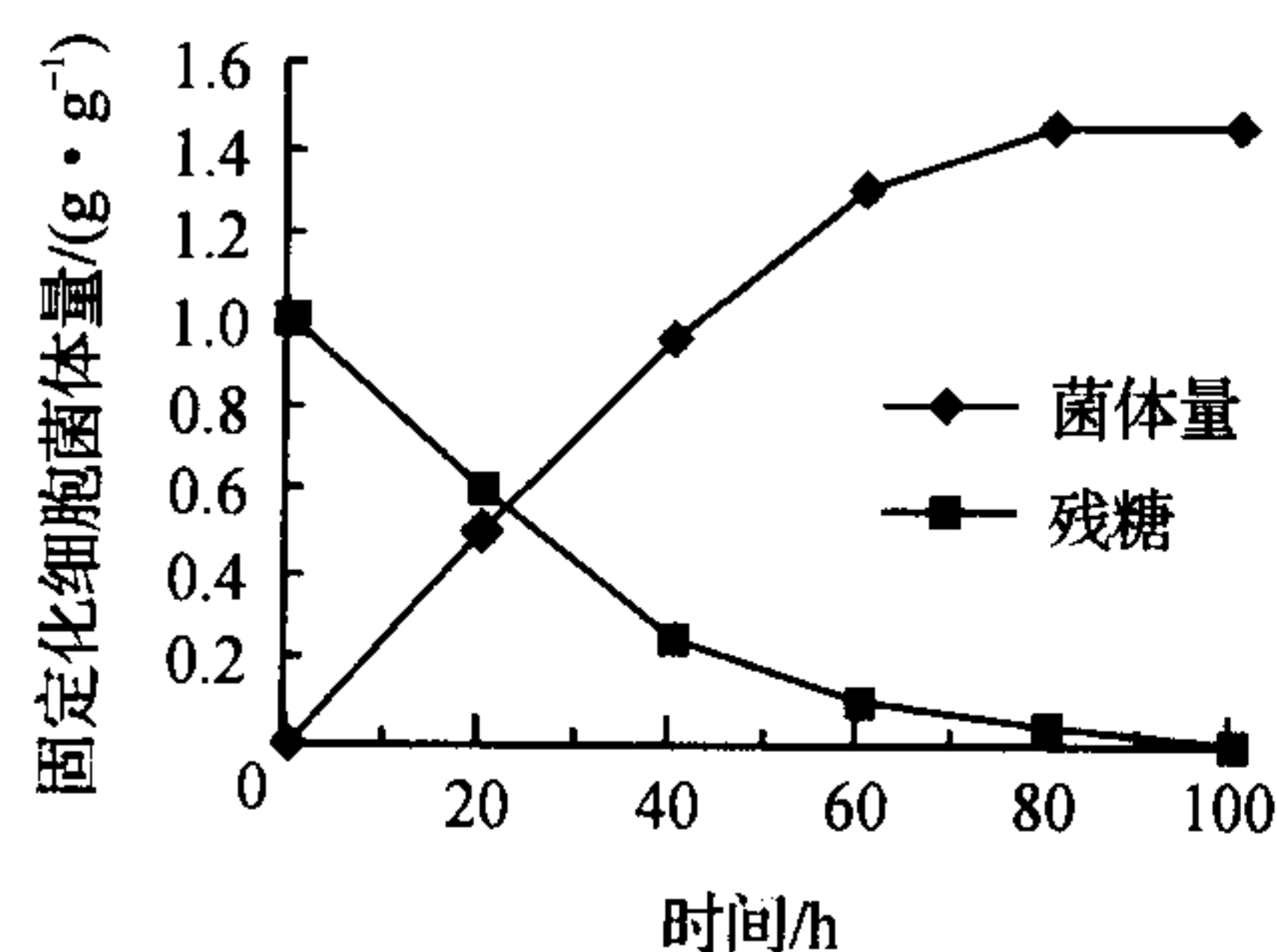


图1 固定化桔青霉细胞增殖过程

2.2 固定化细胞与游离细胞产酶发酵的比较

为了考察桔青霉固定化细胞发酵产酶情况, 分别采用固定化细胞和游离细胞(接种量相等于固定化细胞的菌量)进行产酶发酵对比试验, 结果如图 2 所示。

从图 2 看出, 游离细胞的产酶进程缓慢, 其酶活力高峰在发酵进行到大约第 5 天才出现。而桔青霉固定化细胞产酶快, 当发酵培养至后 50 h 左右即出现产酶高峰。由此可见, 固定细胞产酶周期短, 酶活力高, 明显优于游离细胞发酵产酶情况; 固定化细

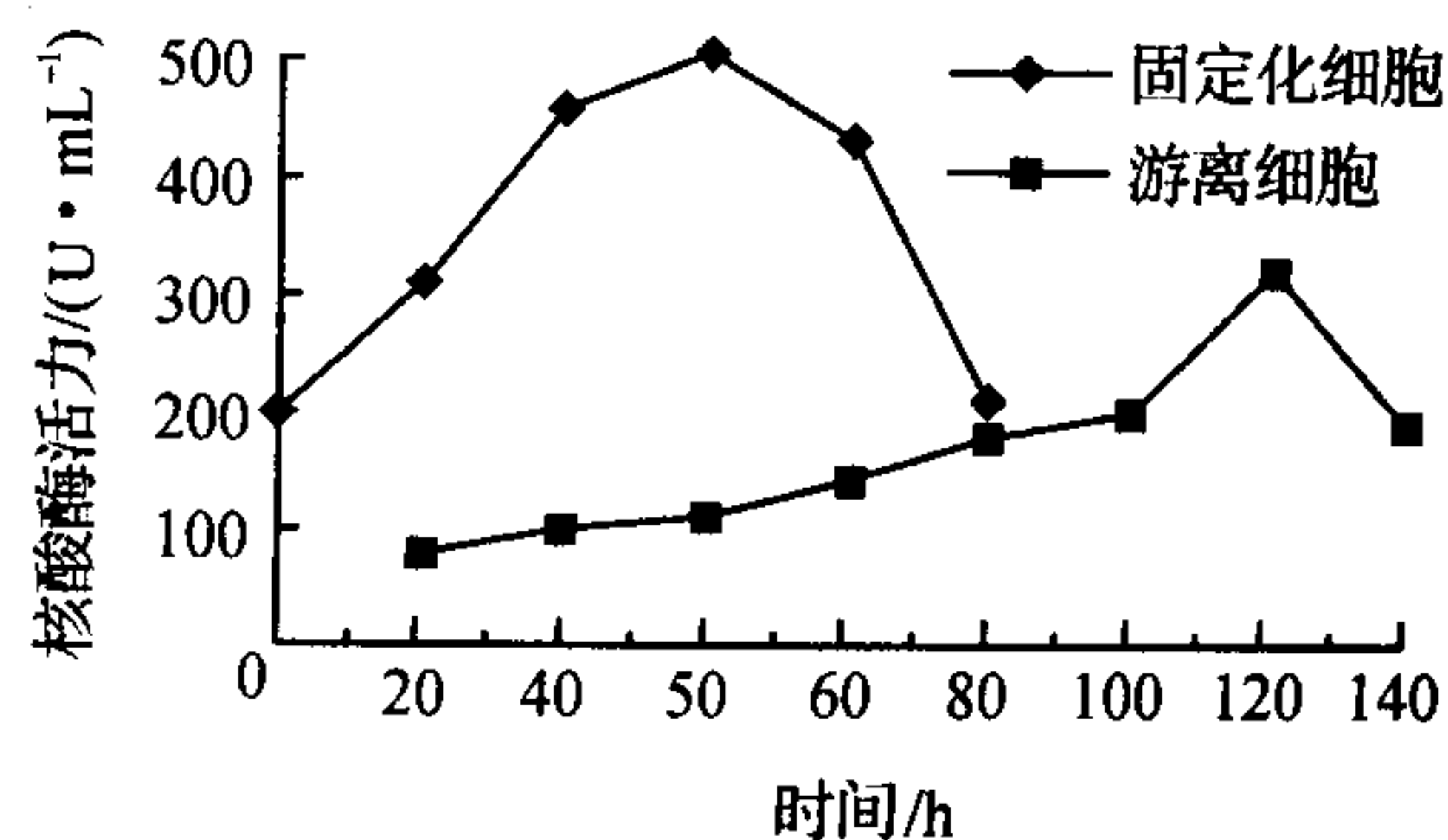


图2 固定化细胞与游离细胞产酶情况的比较

胞可重复使用,从而省略了菌种制备的工序。

2.3 通气搅拌转速对固定化细胞产酶的影响

桔青霉为好气性菌,溶解氧对其生长、产酶及酶的分泌有着重要的影响,所以,采用固定化桔青霉生产核酸酶 P_1 ,通气搅拌条件的选择对提高必要的溶解氧是至关重要的。在摇瓶培养中,影响溶氧的主要因素有三角瓶的容量、培养基装量、接种量及纱布层厚度等。为了考察通气量对产酶的影响,在固定了三角瓶的容量、固定化细胞粒子充填量及纱布层厚度的条件下,进行了不同装液量的对比发酵试验,即在 500 mL 三角瓶中分别装入发酵液 50、100、150、200 mL,在固定摇瓶转速为 180 r/min、固定化细胞粒子接入量 10% (v/v) 的条件下,28℃ 培养,结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出,通气量对固定化桔青霉产酶影响很大,当发酵液装液量为 200 mL/500 mL 时,酶活力很低,这可能是由于装液量多,造成发酵液中的溶解氧低而影响酶的产生和分泌。然而,当装液量为 50 mL/500 mL 时,固定化细胞产酶活力并不十分理想,分析原因,认为是过高的溶解氧对固定化细胞产酶有一定的不良影响。实验表明,装液量为 100 mL/500 mL 时,固定化细胞产酶活力最高。

2.4 固定化细胞粒子填充量对发酵的影响

为考察固定化细胞粒子填充量对发酵的影响,以 100 mL 培养液中分别加入固定化细胞粒子 5%、10%、15%、20%、25% 进行发酵实验,结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出,随着接种量的加大,产酶量和产酶周期缩短。但当固定化细胞粒子充填量大于 25% 时,产酶量的增加和产酶周期的缩短不如固定化细胞充填量为 15% ~ 20% 的情况。所以,在以后的发酵实验中固定化细胞粒子的充填量采用 15%。

2.5 固定化细胞发酵稳定性试验

固定化细胞技术的主要优点之一是可重复使用菌种。为了考察固定化桔青霉细胞在重复发酵中的产酶的稳性,以发酵周期 50 h,重复更换培养液发酵 30 批次进行试验,结果如表 3 所示。

表 3 固定化桔青霉细胞粒子重复使用发酵产酶情况

						U/mL	
批次	酶活力	批次	酶活力	批次	酶活力	批次	酶活力
1	489	7	500	13	497	19	500
2	491	8	498	14	501	20	504
3	492	9	503	15	502	21	502
4	488	10	495	16	496	22	492
5	501	11	498	17	503	23	505
6	499	12	506	18	499	24	501
						25	498
						26	505
						27	497
						28	502
						29	499
						30	506

从表 3 可以看出,固定化桔青霉在间歇重复发酵时产酶很稳定。30 批次的重复发酵中其产酶活力始终保持在 495 ~ 510 U/mL 的较高水平,而且固定化细胞粒子机械强度很高,发酵液中只有极少的游离桔青霉的菌丝体。由此说明,采用玉米芯吸附桔青霉并以海藻酸钠包埋固定化细胞发酵生产核酸酶 P_1 是十分适宜的。

3 讨 论

从以上实验可知,首先利用玉米芯这种天然有机质多孔材料吸附,然后以低浓度海藻酸钠胶体进行包埋固定化桔青霉菌丝体发酵生产核酸酶 P_1 。该方法具有产酶活力高,固定化细胞粒子机械强度好,反复重复发酵稳定性好,操作简便,材料无毒,易得,固定化材料及生产成本低;而且采用玉米芯和海藻酸钠双载体吸附、包埋固定桔青霉菌丝体,玉米芯为细胞的固定提供了良好的网架空间,使吸附效果好。以低浓度海藻酸钠对已吸附了桔青霉的玉米芯颗粒进行包裹固定,有效地减少被固定细胞的泄漏,降低了发酵液粘度,有利于氧气及营养物质的传递,同时便于产物的分离提取等后处理加工。

参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 748 - 766.
- [2] Benaigs M D L, Opez S J, Sola C. Fermentation of nuclease P_1 with *Penicillium Citrinum*[J]. Enzym Microb Technol, 1990, (12): 86 - 89.
- [3] Yamada Y, Ishikura H. Study on the nuclease P_1 with the solid culture medium[J]. FEBS Letters, 1975, (54): 155 - 158.
- [4] 国中明. 核酸 P_1 の発酵[J]. 发酵と工业, 1985, 43(2): 83 - 91.
- [5] 普为民, 丁骅孙, 陶元器. 5'-腺苷酸脱氢产生菌选育及发酵生态学研究[J]. 云南大学学报, 1994, 16(2): 184 - 188.
- [6] 调味品情报中心. 调味品生产技术(中册)[M]. 北京: 科学技术出版社, 1984.

Study on nuclease P_1 produced by immobilized *Penicillium citrinum* cell

WANG Ke-ming¹, WANG Yu-guang²

(1. Dept. of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China;

2. Institute of Chem. and Biol, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: Mycelia of *Penicillium citrinum* were absorbed with stone of maize and then wrapped up with 1.5% sodium alginate. The nuclease P_1 produced by the immobilized cells were studied in shaking flasks. The experiment shows that the shaking speed is 180 r/min, the glucose and peptone contents in medium are 9 g/L and 1 g/L, respectively. After 50 h culture, the nuclease P_1 activity reached 510 U/mL. In repeated batch culture, the immobilized cells kept the high capacity and machinery strength after 30 batches.

Key words: penicillium citritum; immobilized cell; nuclease P_1 ; stone of maize; sodium alginate

(上接第 85 页)

Study of office automation system based on workflow and B/S structure

SHAO Lei¹, LI Yu-wei²

(1. Dept. of Mechanical and Electrical, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China;

2. Hangzhou Shengwei Network Co. Hangzhou 310011, China)

Abstract: This paper puts forward the model of OA system based on workflow management. The workflow of examining and approving for document is described with Petri net. Predominance of B/S structure system is discussed. At last, the exploitation and application of OA system is realized.

Key words: workflow; petri net; B/S structure; office automation system