

# 桔青霉高产核酸酶 P1 的固态发酵条件研究

庞宗文<sup>1</sup>, 李才<sup>1</sup>, 丁猛<sup>1</sup>, 冯旒<sup>2</sup>, 徐勇<sup>2</sup>, 梁静娟<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005) (2. 南宁麦柯欣生物科技有限公司, 广西南宁 530007)

**摘要:** 以本实验室从土壤中分离筛选到的一株高产核酸酶 P1 的桔青霉 GX-K 为生产菌种, 研究了该菌固体发酵产核酸酶 P1 的发酵条件。结果表明其最佳产酶条件为: 以麸皮作为固态发酵基料, 添加 4% 的蔗糖, 料水比为 1:0.9, 30 °C 培养 72 h。该条件下核酸酶 P1 产量达 5783.41 U/g 干基。

**关键词:** 固态发酵; 桔青霉; 核酸酶 P1

**文章编号:** 1673-9078(2012)7-806-809

## Optimization of the Nuclease P1 Production Conditions by *Penicillium citrinum* in Solid State Fermentation

PANG Zong-wen<sup>1</sup>, LI Cai<sup>1</sup>, DING Meng<sup>1</sup>, FENG Mao<sup>2</sup>, XU Yong<sup>2</sup>, LIANG Jing-juan<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

(2. Nanning Microzyme Biotechnology Co., Ltd., Nanning 530007, China)

**Abstract:** The conditions for solid fermentation of a strain of *Pecillum citrinum* GX-K with high yield of nuclease P1 were studied. Wheat bran was used as the substrate of solid fermentation and the other optimum fermentation conditions were: 4% of sucrose, substrate-water ratio 1:0.9, fermentation temperature 30 °C and fermentation time 72 h. The activity of nuclease P1 under the optimum fermentation conditions reached 5783.41 U/g.

**Key words:** nuclease P1; solid state fermentation; *Pecillum citrinum*

核酸酶 P1 (EC 3.1.30.1) 是一种磷酸二酯酶, 能水解 RNA 或 DNA 单链中的 3',5'-磷酸二酯键生成 5'-核苷酸, 其中的鸟苷酸 (5'-GMP) 有独特的美味, 腺苷酸可以进一步转化为同样具有独特美味的肌苷酸 (5'-IMP)。在食品工业中, GMP 和 IMP 有增鲜作用, 添加到其它食品中可以增加这些食品的鲜味<sup>[1]</sup>。5'-核苷酸及其衍生物在医药、农业及科研等领域也有很好的应用前景<sup>[2,3]</sup>。酶解法生产 5'-核苷酸具有收率比较高, 操作工艺简单, 成本低廉等特点<sup>[1,3]</sup>。目前国内生产 5'-核苷酸所用的核酸酶 P1 主要从日本进口, 因此寻找产酶能力高的生产菌株, 开发发酵成本低的生产方法, 对于摆脱依赖进口的局面是很重要的。

目前核酸酶 P1 的生产方法主要有 3 种, 即固态发酵法、深层液态发酵法和固定化液体发酵法<sup>[2]</sup>。对液态发酵法研究得比较多, 发酵过程容易控制, 但产酶都不太高, 酶活大都为 700~1300 U/mL<sup>[4-6]</sup>。对固态法的研究则较少, 固态发酵的发酵基料主要是麸皮等

农作物废料, 其生产成本较低, 设备投资少, 通过发酵、浸提可以得到较高酶活的酶液<sup>[7,8]</sup>。本课题组前期获得了 1 株高产核酸酶 P1 的桔青霉, 本文利用固态发酵法研究该菌株产生核酸酶 P1 的条件, 以期探索出一条低成本的核酸酶 P1 的生产工艺, 为工业化生产核酸酶 P1 打下理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

桔青霉 (*Penicillium citrinum*) GX-K, 由本课题组从广西各地采集的土样中分离筛选并鉴定, 保藏在本实验室。

#### 1.2 材料与试剂

甘蔗渣取自甘蔗糖厂, 经干燥粉碎后备用; 玉米芯、麸皮和米糠为市售产品; 木薯渣取自木薯淀粉厂废渣。RNA (纯度 99.0%) 购于湖北兴银河化工有限公司, 其他试剂为国产分析纯。

#### 1.3 主要培养基

PDA 平板培养基: 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1000 mL, pH 自然。

固体发酵培养基: 称取 10 g 基料于 250 mL 三角瓶

收稿日期: 2012-03-31

作者简介: 庞宗文 (1964-), 男, 博士, 副教授, 从事微生物酶学及生物质能源研究

通讯作者: 梁静娟, 教授, 从事微生物酶学的研究

中,加入 10 mL 水, pH 自然, 搅拌均匀后 121 °C 灭菌 30 min。

#### 1.4 固态发酵和粗酶液的制备

将保存的桔青霉 GX-K 孢子接种到 PDA 斜面培养基中, 置 30 °C 培养箱培养 7 d, 此时斜面为灰绿色, 长满孢子。取培养好的斜面, 加入 20 mL 灭菌的 0.2% NaCl 溶液, 震荡洗脱斜面孢子, 将洗脱的孢子液转入带有玻璃珠的无菌小三角瓶中, 于 200 r/min、30 °C 摇床振荡 30 min 制成孢子悬液。将孢子悬液接种到固体发酵培养基中, 每个三角瓶接种 1 mL, 搅拌均匀, 30 °C 培养 24 h 后翻曲, 继续培养 48 h。称取 5 g 湿曲置干燥的三角瓶中, 加入 50 mL pH 5.0 的醋酸缓冲液, 置 200 r/min、30 °C 摇床上振荡浸提 1 h。用四层纱布过滤, 滤液于 12000 r/min、4 °C 离心 10 min, 上清液即为核酸酶 P1 粗酶液。同时称取 5 g 湿曲置干燥的培养皿中, 放入 100 °C 烘箱中烘干至恒重。

#### 1.5 核酸酶 P1 活力的测定

核酸酶 P1 活力的测定参考文献<sup>[9]</sup>。

酶活力定义: 在 68 °C、pH 5.0 条件下, 每分钟生成的核苷酸量使得在 260 nm 的 OD 值为 1.0 时所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

#### 1.6 固态发酵产酶条件的优化

在 250 mL 三角瓶中分别考察不同的基料、碳源、氮源、含水量、发酵温度、发酵时间、装料量等因素对产酶的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基成分对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

#### 2.1.1 不同基料对产酶的影响

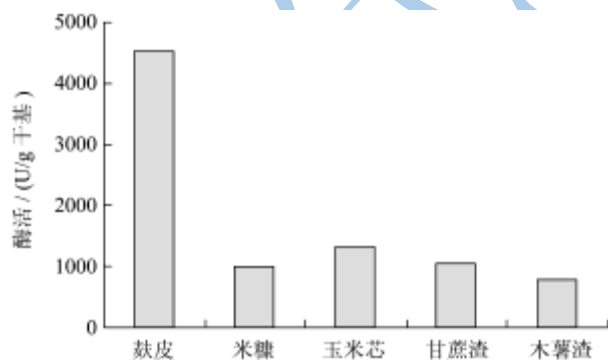


图 1 不同基料对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

Fig.1 Effect of base substrate on nuclease P1 production of GX-K

分别选取麸皮、米糠、玉米芯、甘蔗渣和木薯渣作为基料, 每个 250 mL 三角瓶装 10 g 基料、10 mL 水, 混匀、灭菌、冷却后接入 1 mL 孢子悬液, 30 °C 培养 72 h, 测定固体曲酶活, 结果见图 1。从图 1 结

果看出, 以麸皮作为基质的干曲酶活最高, 达到 4500 U/g, 玉米芯和甘蔗渣的干曲酶活只有 1000 U/g 多, 米糠和木薯渣的干曲酶活低于 1000 U/g。从这些结果可以看出, 以不同物质作为基料所产生的酶活差异很大, 这可能与基料的主要成分不同有关。麸皮和木薯渣含有较多的淀粉, 可为桔青霉的生长和产酶提供碳源, 而米糠、玉米芯、甘蔗渣的主要成分为纤维素, 桔青霉难于利用。另外不同基质的物理特性也不一样, 这就造成氧在基质内的传递不同, 木薯渣粘度较大, 氧传递较差, 而麸皮较疏松, 氧传递较好。在本实验核酸酶 P1 固态发酵中, 含有较多淀粉和疏松度较好的麸皮是最好的基料。

#### 2.1.2 补加碳源对产酶的影响

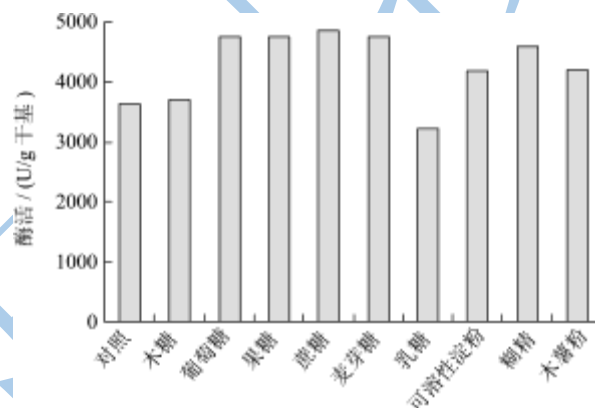


图 2 不同碳源对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

Fig.2 Effect of carbon source on nuclease P1 production of GX-K

利用麸皮作为基料, 试验不同碳源对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响。每个 250 mL 三角瓶装 10 g 麸皮, 添加 6% 的碳源(相对麸皮的重量而言)、10 mL 水, 接种 1 mL 孢子悬液, 30 °C 培养 72 h, 测定固体曲酶活, 实验结果见图 2。结果发现, 添加葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 有明显的促进作用, 添加这些糖类产生的核酸酶 P1 的酶活都高于对照 25% 以上, 这些糖类都是该菌的快速利用碳源, 这些快速利用碳源有利于该菌的孢子萌发和早期的菌体的生长。其中蔗糖的促进作用最好, 而且又廉价易得, 将它选为进一步实验的碳源。糊精、可溶性淀粉和木薯粉对产酶也有促进作用, 这可能与该菌能分泌淀粉酶有关。木糖对产酶没影响, 乳糖对产酶有一定的抑制作用。

#### 2.1.3 不同蔗糖浓度对产酶的影响

在培养基中分别添加 0、2、4、6、8 和 10% (相对麸皮的重量而言) 的蔗糖, 考察不同蔗糖浓度对产酶的影响, 结果如图 3。在蔗糖浓度低于 4% 时, 随着蔗糖浓度的增加, 产酶量逐渐增加, 在蔗糖浓度为 4%

时产酶量达到最大值,当蔗糖浓度超过 4%时,随着浓度的增加产酶量逐渐下降。说明快速利用碳源与慢速利用碳源的比例对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 有一定的影响。该实验的结果表明蔗糖的最适浓度为 4%。

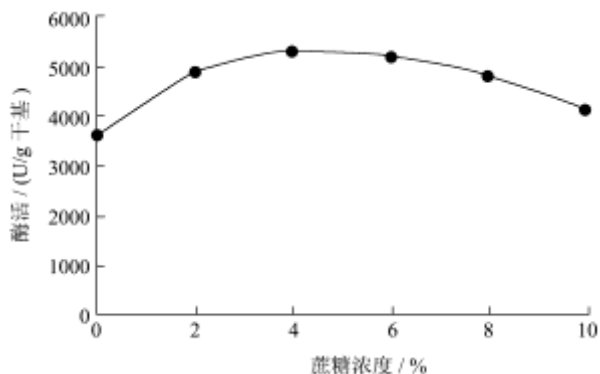


图 3 不同蔗糖浓度对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

Fig.3 Effect of sucrose concentration on nuclease P1 production of GX-K

2.1.4 补加氮源对产酶的影响

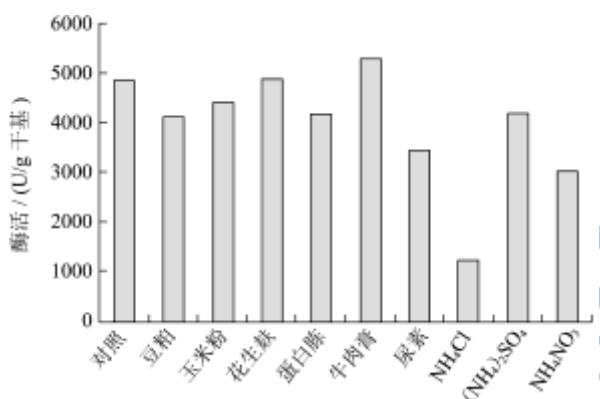


图 4 不同氮源对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

Fig.4 Effect of carbon source on nuclease P1 production of GX-K

氮源对微生物产酶是一个至关重要的因素。在以麸皮为基料,添加 4%的蔗糖(相对麸皮的重量而言)的基础上,试验了补加 2%(相对麸皮的重量而言)的有机氮源和无机氮源对产酶的影响,实验结果见图 4。结果发现,花生麸和牛肉膏对产酶有一定的促进作用但效果不明显,试验的其它有机氮源对产酶无促进作用,而试验的无机氮源对产酶有抑制作用,其中 NH<sub>4</sub>Cl 的抑制作用最明显。麸皮含有 15%左右的蛋白质和丰富的氨基酸及维生素<sup>[10]</sup>,其本身所含的氮源已能满足桔青霉 GX-K 菌体的生长和产酶的需求,因此,麸皮是桔青霉 GX-K 核酸酶 P1 固态发酵的优良原料,不需要另外添加其它的氮源。

2.1.5 无机盐对产酶的影响

核酸酶 P1 是一个含 Zn 的酶,培养基中的 Zn<sup>2+</sup>对核酸酶 P1 的合成有重要的影响, Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>是酶

分泌的良好促进剂,本实验对这三种离子对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响进行研究。选取不同浓度的 MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 和 CaCl<sub>2</sub>,考察它们对该菌产核酸酶 P1 的影响,实验结果见图 5。从图 5 可以看出, MgSO<sub>4</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 在低浓度下对产酶有促进作用,但作用不明显。随着 MgSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 浓度的增加,这些无机盐对该菌产酶有抑制作用。基料麸皮本身含有丰富的无机盐离子<sup>[10]</sup>,实验结果表明,麸皮中所含的无机盐已能满足桔青霉 GX-K 生长和产酶的需求,因此在以麸皮为基料的核酸酶 P1 固态发酵中不需要另外添加无机盐离子。

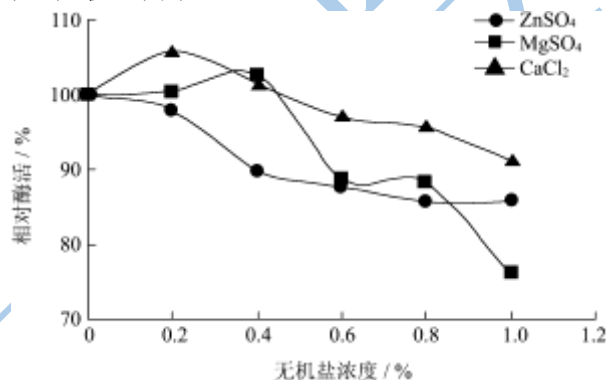


图 5 不同无机盐对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

Fig.5 Effect of inorganic salt on nuclease P1 production of GX-K

2.1.6 含水量对产酶的影响

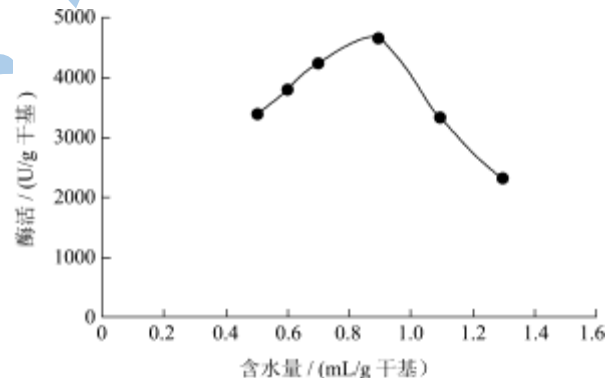


图 6 不同含水量对桔青霉 GX-K 产核酸酶 P1 的影响

Fig.6 Effect of the water content on nuclease P1 production of GX-K

培养基的含水量是决定固态发酵成功与否的关键因素之一,本研究试验了培养基的含水量对 GX-K 菌株产核酸酶的影响。每 10 g 麸皮分别加入 5、6、7、9、11 和 13 mL 水,30 °C 培养 72 h,测定固体曲酶活,实验结果见图 6。从结果可知,含水量低或高都不利于产酶的积累,这是由于培养基的含水量高会导致基质多孔性降低,减少了基质内气体交换,难以通风降温,使基质内部菌体生长不良,因此产酶不高。在含水量太低的条件下,基质膨胀程度低,菌体不能很好

的利用营养物质,长势不好。本实验当培养基的料水比为1:0.9时最有利于桔青霉GX-K积累核酸酶P1。

## 2.2 发酵条件对桔青霉GX-K产核酸酶P1的影响

### 2.2.1 发酵时间对产酶的影响

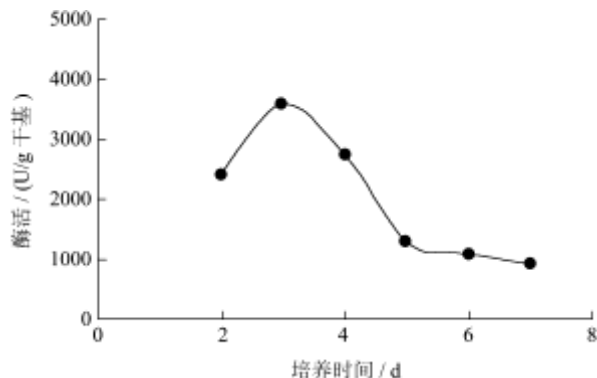


图7 发酵时间对桔青霉GX-K产核酸酶P1的影响

Fig.7 Effect of fermentation time on nuclease P1 production of GX-K

发酵时间选择2、3、4、5、6和7d,实验结果见图7。从图7可知,发酵初期,随着发酵时间的延长,酶活逐渐增高,当发酵时间为3d时酶活达到最高值。发酵时间超过3d时,随着发酵时间的延长酶活快速下降,到第5d时干曲酶活只有1000U/g。发酵初期酶活升高得很快可能与培养基的营养成分充足和菌体的快速增长有关,发酵后期随着营养物质的消耗和菌体的增多,营养物质不能满足生长和代谢的需求,核酸酶P1会被降解,从而导致酶活迅速降低。因此GX-K产核酸酶P1的最佳培养时间为3d。

### 2.2.2 发酵温度对产酶的影响

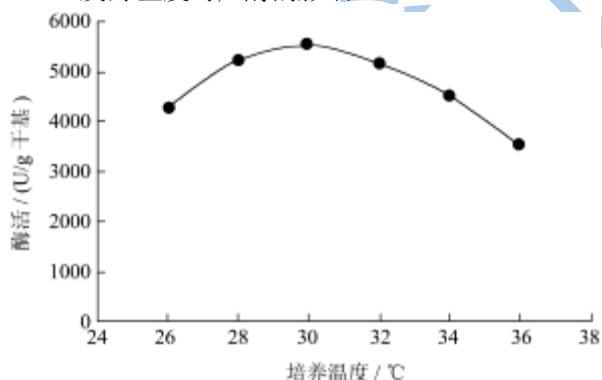


图8 发酵温度对桔青霉GX-K产核酸酶P1的影响

Fig.8 Effect of fermentation temperature on nuclease P1 production of GX-K

发酵温度选择26℃、28℃、30℃、32℃、34℃和36℃,实验结果见图8。从图8可以看出,GX-K菌株的最适发酵温度在28℃~32℃之间,其中30℃时发酵的酶活最高。当发酵温度低于28℃时,菌体生长缓慢,不利于产酶,而高于32℃时虽然菌体生长很快,但温度过高菌体容易衰老,水分蒸发也大,培

养基含水量下降,不利于酶的积累。该菌体较适合的培养条件为28~32℃。

### 2.2.3 装量对产酶的影响

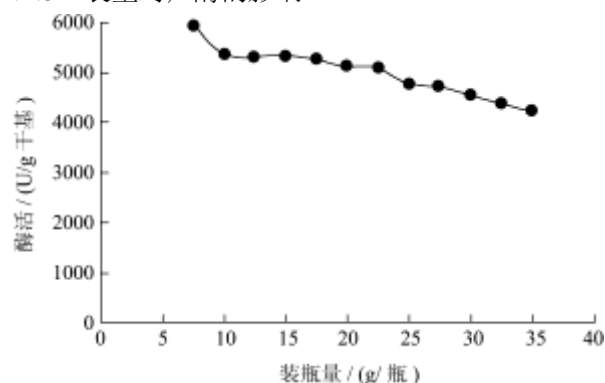


图9 装量对桔青霉GX-K产核酸酶P1的影响

Fig.9 Effect of loading content on nuclease P1 production of GX-K

250mL三角瓶装量从7.5g到35g,间隔2.5g,实验结果见图9。装瓶量越少所得的干曲酶活产量越高,随着装瓶量的增加产酶逐渐下降。当装量为7.5g时干曲的酶活达到6000U/g,装量为35g时干曲的酶活只有4200U/g。产酶随着装量的增加而降低,这和固态发酵获取氧气的方式有关,固态发酵主要从空气获取氧气。随着装瓶量的增加,曲料的厚度增加,微生物获取氧气的比例减少,微生物得不到充足的氧气,而不利于产酶的积累。装量少时,菌体获取氧气多,产酶高。从产酶情况和发酵成本综合考虑,本实验选择250mL三角瓶装量为18g。

### 2.3 优化条件验证

250mL三角瓶装麸皮18g,蔗糖0.72g、水16.2mL,接种1.8mL孢子悬液,30℃培养72h,进行桔青霉GX-K产核酸酶P1的固态发酵,得到的干曲核酸酶P1酶活为5783.41U/g。

## 3 结论

从本实验结果可知麸皮是桔青霉GX-K产核酸酶P1很好的固态发酵基料,麸皮的营养成分基本能够满足要求,不需要补加氮源和无机盐离子,只需补加少量的快速利用碳源就能得到较高的酶量。桔青霉GX-K菌的最佳培养条件为:以麸皮作为固态发酵基料,添加4%的蔗糖(相对麸皮的重量而言),料水比为1:0.9,30℃培养72h,核酸酶P1产量达5783.41U/g干基。本实验得到数据为桔青霉GX-K工业化生产核酸酶P1奠定了一定的基础。

## 参考文献

- [1] Ying G, Shi L, Yu Y, et al. Production, purification and

- characterization of nuclease P1 from *Penicillium citrinum* [J]. *Process Biochem*, 2006, 41(6): 1276-1281
- [2] 喻晨,赵劫,张亚雄,等.桔青霉发酵制备核酸酶 P1 研究进展 [J].*食品工业科技*,2010,31(11):416-419
- [3] Shi L, Ying G, Tang Z, et al. Continuous enzymatic production of 5'-nucleotides using free nuclease P1 in ultrafiltration membrane reactor [J]. *J Membrane Sci*, 2009, 345(1-2): 217-222
- [4] 莫晓燕,宋威,张芹,等.桔青霉生产核酸酶 P1 发酵条件优化研究[J].*西安交通大学学报*,2003,37(10):1083-1085
- [5] 王端好,周河治,张小里.桔青霉生产核酸酶的发酵条件研究[J].*生物加工过程*,2008,6(2):33-37
- [6] 喻晨,张亚雄,赵劫,等.响应面法优化桔青霉产核酸酶 P1 培养基[J].*食品科学*,2011,32(17):283-286
- [7] Zhu Y, Knol W, Smits JP, et al. Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18(2): 108-112
- [8] 苏庆辉,马兴胜,袁艳玲,等.5'-磷酸二酯酶的提取[J].*酿酒*,2004,1(1):88-89
- [9] 胡丹东,崔玉娟.一株高产核酸酶 P1 菌株的诱变选育[J].*西北师范大学学报(自然科学版)*,2008,44(6):79-81
- [10] 朱小乔,刘通讯.小麦麸皮的功能组分及其在食品中的开发应用[J].*粮油食品科技*,2000,8(6):18-21