

实验设计法优化核酸酶 P₁ 的发酵培养基

徐正军, 肖林平, 吕浩, 谢宁昌, 应汉杰

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:采用实验设计法研究了碳源、氮源和磷源等因素对桔青霉(*Penicillium citrinum*)M02 发酵产核酸酶 P₁ 的影响. 实验结果表明, 含有玉米浆的复合氮源可以明显地提高核酸酶 P₁ 的产量. 同时通过两轮实验建立了一个可以较好预测实际发酵的二次模型, 并依据此模型优化了碳源、氮源以及磷源的组成, 优化后的产核酸酶 P₁ 的发酵培养基组成为(g/L): 葡萄糖 38.73, 蛋白胨 1.91, 玉米浆 1.84, KH₂PO₄ 0.6, K₂HPO₄·3H₂O 0.6, MgSO₄ 0.4, CaCl₂ 0.4, ZnSO₄·7H₂O 0.4. 用此培养基进行发酵, 实际产酶水平为 648.3 U/ml, 与优化前的 380 U/ml 相比提高了约 70%. 此外, 还初步探讨了玉米浆促进 P₁ 酶发酵的机理, 这是因为玉米浆与蛋白胨相比含有了较多有利于 P₁ 酶发酵的氨基酸, 如甘氨酸、丙氨酸以及丝氨酸等.

关键词:桔青霉 M02; 核酸酶 P₁; 发酵培养基; 玉米浆; 实验设计; 优化

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)05-0433-05

1 前言

核酸酶 P₁(EC3.1.30.1)是一种含锌金属酶, 分子量 44 000, 可以水解 DNA 和 RNA 的 3', 5'-磷酸二酯键而得到 5'-脱氧核苷酸和 5'-核苷酸^[1-3]. 此酶是 1957 年由日本化学家 Kuninaka 等^[4]于桔青霉的培养液中首先发现的, 而后因其在大规模生产核苷酸工业上的重要用途而受到广泛关注.

有文献^[5]报道, 在液体深层发酵中, 添加玉米浆作为蛋白胨的补充氮源可以提高核酸酶 P₁ 的产酶水平, 用含有玉米浆的复合氮源进行核酸酶 P₁ 发酵, 可以将产酶水平从以前的 300 U/ml 提高到 400 U/ml 左右. 本文运用实验设计法(Experimental Design)在原有的培养基配方的基础上, 对有较大影响的碳源、氮源、磷源进行优化以最大限度地提高核酸酶 P₁ 的发酵水平.

2 材料与amp;方法

2.1 菌种

桔青霉 M02(*Penicillium citrinum*), 本实验室保藏.

2.2 主要药品及仪器

酵母 RNA, 本实验室提纯精制, 纯度高于 95%.

UV-VIS 8500 型紫外可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; HYG-IIa 回转式恒温调速摇瓶柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司.

2.3 培养基

斜面培养基: 麦芽汁培养基; 液体种子培养基(g/L): 葡萄糖 50, 蛋白胨 5, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, MgSO₄ 0.4, CaCl₂ 0.4, pH 6.50; 初始发酵培养基(g/L): 液体种子培养基+ZnSO₄·7H₂O 0.4, pH 6.50.

收稿日期: 2003-02-28, 修回日期: 2003-06-02

基金项目: 江苏省教育厅自然科学研究项目(编号: 00KJB530002); 江苏省新世纪学科带头人培养基金资助项目; 教育部跨世纪优秀人才基金资助项目

作者简介: 徐正军(1979-), 男, 江苏淮安人, 硕士研究生, 生物工程专业; 应汉杰, 通讯联系人, E-mail: yinghanjie@njut.edu.cn.

2.4 培养方法

液体种子液培养 :500 ml 三角瓶装 100 ml 培养基,接入 1 cm² 大小的桔青霉菌块,于 250 r/min 及 29~30°C 温度下培养 24 h. 核酸酶 P₁ 的发酵 :250 ml 三角瓶装 50 ml 培养基,按 10%(φ)的接种量接种,于 28°C 温度下 250 r/min 培养至适合时间.

2.5 分析方法

酶活力测定方法:紫外法^[6,7],将 1.9 ml 的底物溶液(含有浓度为 1%左右的 RNA, 0.2 mol/L pH 5.2 的醋酸缓冲液及 0.0005 mol/L 的 ZnSO₄)于 70°C 恒温水浴 10 min 后,加入 0.1 ml 经适当稀释的酶液,70°C 保温 15 min 后加入 2.0 ml 核酸沉淀剂(0.25%钼酸铵-2.5%过氯酸),冰水浴 20 min 后离心,取上清液用蒸馏水稀释一定倍数,测定其在 260 nm 处的吸光值 A₂₆₀. 以先加沉淀剂者作为对照,其它操作同前. 在上述条件下,每分钟所生成的核苷酸量在 260 nm 处的吸光值的差值为 1.0 时定义为 1 个酶活力单位,其计算公式如下:

$$\text{酶活力(U/ml)} = \frac{4\alpha\beta\Delta A_{260}}{0.1 \times 15} = 2.67\alpha\beta\Delta A_{260}, \quad (1)$$

其中 α 为原酶液的稀释倍数, β 为离心清液的稀释倍数.

生长量测定方法:干重法^[8].

2.6 实验设计及结果分析

用 Statistica 6.0(StatSoft Inc., Tulsa, OK)软件 Experimental Design 进行实验设计与结果分析^[9].

3 结果与讨论

3.1 核酸酶 P₁ 的发酵过程曲线

在初始发酵培养基的条件下,研究了核酸酶 P₁ 的发酵,过程曲线见图 1. 由图可知,菌体的生物量在接种后 4 h 左右进入指数生长期,到 25 h 后生长速率则逐渐降低;pH 值起初随着菌体的生长而迅速降低,但在 25 h 后则趋于平稳;核酸酶 P₁ 的产量在 8 h 左右进入快速增长期,在 25 h 左右其产量达到最大,约为 380 U/ml,而后则逐渐降低. 为此下面的 SEM 优化实验的产酶发酵的取样时间均为 25 h.

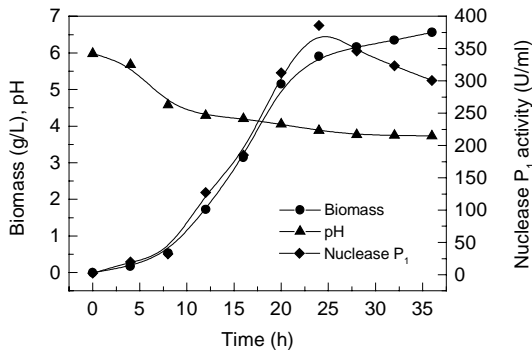


图 1 核酸酶 P₁ 的发酵过程曲线

Fig.1 The curve of fermentation process

3.2 实验设计法优化核酸酶 P₁ 的发酵培养基

3.2.1 碳源、玉米浆等对核酸酶 P₁ 发酵的影响

据文献^[5]报道,添加玉米浆作为蛋白胨的补充氮源可以提高核酸酶 P₁ 的发酵水平,为了考察玉米浆对产酶的促进效应,本文在原有的氮源基础上添加了一定量的玉米浆作为蛋白胨的补充氮源,其它营养物质同初始发酵培养基,并对碳源量(X₁, 葡萄糖)、氮源量(X₂, 蛋白胨或蛋白胨+玉米浆)、玉米浆与蛋白胨的质量比 X₃ 以及磷源量(X₄, 两种磷酸盐)进行四因素两水平的全因子实验设计,其设计及实验结果分析见表 1. 表中增加了 2 个中心点是为了估计实验误差和考察模型的准确程度,表中的最后一行为方差项.

由表 1 可知,几个因素对核酸酶 P₁ 发酵的影响能力次序为: X₃>X₂>X₁>X₄, 并且可以确定添加玉米浆的复合氮源有利于核酸酶 P₁ 的发酵. 几个因素对发酵的影响用 STATISTICA 6.0 软件进行

分析, 用此 18 个数据(包括 2 个中心点)回归的模型为

$$Y_1 = 445.3 - 10.28X_1 - 17.18X_2 + 64.94X_3 + 4.22X_4 - 7.78X_1X_2 - 0.51X_1X_3 + 7.42X_1X_4 - 1.18X_2X_3 - 1.01X_2X_4 + 0.34X_3X_4 \quad (2)$$

此方程对实验数据拟合的 R^2 值为 0.976, 并由方差分析可知该方程较好地反映了在本文的实验条件下的几种因素对核酸酶 P₁ 发酵的影响. 对此方程进行响应面分析可知, 在本次实验的因素水平下, 核酸酶 P₁ 的产量随着碳源和氮源量的增加而减少, 随着磷源量以及玉米浆与蛋白胨比值的增大而增高. 但是几个因素对酶活力的影响大小各异, 其中磷源的影响最小, 为此进行下一轮的中心复合设计(Central Composite Design, CCD)时, 只考虑碳源和氮源量以及两种氮源的质量比 3 种因素对发酵产酶的影响.

表 1 四因素二水平全因子实验设计及实验结果以及拟合模型预测值

Table 1 Experimental design and results of the four-factorial two-level design together with the predicted yields from the model equation

Trial number	Factors				Observed value, Y (U/ml)	Predicted value, Y ₁ (U/ml)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
1	50 (1)	4 (1)	0.50 (2)	0.4 (1)	528.2	533.5
2	70 (2)	4 (1)	0.50 (2)	0.4 (1)	523.7	512.6
3	50 (1)	6 (2)	0.50 (2)	0.4 (1)	520.6	514.4
4	70 (2)	6 (2)	0.50 (2)	0.4 (1)	446.2	462.4
5	50 (1)	4 (1)	0.00 (1)	0.4 (1)	389.2	400.9
6	70 (2)	4 (1)	0.00 (1)	0.4 (1)	383.9	382.1
7	50 (1)	6 (2)	0.00 (1)	0.4 (1)	393.1	386.5
8	70 (2)	6 (2)	0.00 (1)	0.4 (1)	335.7	336.6
9	50 (1)	4 (1)	0.50 (2)	0.6 (2)	532.9	529.8
10	70 (2)	4 (1)	0.50 (2)	0.6 (2)	525.6	538.6
11	50 (1)	6 (2)	0.50 (2)	0.6 (2)	498.5	506.7
12	70 (2)	6 (2)	0.50 (2)	0.6 (2)	498.2	484.3
13	50 (1)	4 (1)	0.00 (1)	0.6 (2)	405.6	395.8
14	70 (2)	4 (1)	0.00 (1)	0.6 (2)	402.7	406.7
15	50 (1)	6 (2)	0.00 (1)	0.6 (2)	368.5	377.4
16	70 (2)	6 (2)	0.00 (1)	0.6 (2)	356.1	357.2
17 ¹⁾	60	5	0.25	0.5	438.8	445.3
18 ¹⁾	60	5	0.25	0.5	468.7	445.3
SS	1691.2	4723.1	67483	284.77		

Note : 1) Center point.

3.2.2 中心复合实验设计(CCD)优化培养基的组成

根据上一轮的实验及统计分析结果, 适当降低碳源(X_1)和氮源(X_2)的水平, 适当提高复合氮源中玉米浆的比率即降低 X_3' (蛋白胨和玉米浆的质量比)的值, 进行新一轮的实验设计即 CCD(Central Composite Design)设计. 因为在四个因素中磷源对产酶的影响最小, 所以磷源浓度固定为有利于产酶的 0.6 g/L, 其它条件同前进行实验设计, 其设计及实验结果见表 2.

对表 2 的实验数据用 STATISTICA 6.0 软件进行分析可以得到如下回归方程:

$$Y_2 = 634.1 - 0.37X_1 - 55.33X_1^2 + 51.03X_2 - 48.97X_2^2 - 16.46X_3' - 17.19X_3'^2 - 12.01X_1X_2 + 4.88X_1X_3' - 21.39X_2X_3' \quad (3)$$

该方程的 R^2 为 0.962, $F=17.245$, $p<0.00125$, 因此认为该方程可以较准确地反映这几个因素对核酸酶 P₁ 的发酵的影响. 对此回归模型进行响应面分析, 可以得到 X_1 , X_2 , X_3' 的最佳值为 38.73, 3.75, 1.04. 因此, 可以计算出最优的碳、氮源组成(g/L): 葡萄糖 38.73, 蛋白胨 1.91, 玉米浆 1.84, 此

时的核酸酶 P_1 的产酶水平最高, 模型预测值可以达到 661.1 U/ml.

表2 中心复合设计的实验结果及模型预测值

Table 2 Experimental design and results of the CCD together with predicted yields from the model equation					
Trial number	Factors			Observed value, Y (U/ml)	Predicted value, Y_2 (U/ml)
	X_1	X_2	X_3'		
1	30 (-1)	2 (-1)	1 (-1)	454.4	449.9
2	30 (-1)	2 (-1)	3 (+1)	441.2	450.0
3	30 (-1)	4 (+1)	1 (-1)	614.4	618.8
4	30 (-1)	4 (+1)	3 (+1)	537.4	533.3
5	50 (+1)	2 (-1)	1 (-1)	441.2	463.4
6	50 (+1)	2 (-1)	3 (+1)	469.2	483.1
7	50 (+1)	4 (+1)	1 (-1)	574.8	584.2
8	50 (+1)	4 (+1)	3 (+1)	495.6	518.3
9	23 ($-\alpha$)	3 (0)	2 (0)	472.2	478.2
10	57 ($+\alpha$)	3 (0)	2 (0)	508.8	477.0
11	40 (0)	1 ($-\alpha$)	2 (0)	425.0	409.8
12	40 (0)	5 ($+\alpha$)	2 (0)	592.0	581.4
13	40 (0)	3 (0)	0 ($-\alpha$)	623.2	613.2
14	40 (0)	3 (0)	4 ($+\alpha$)	573.6	557.8
15 ¹⁾	40 (0)	3 (0)	2 (0)	629.6	634.1
16 ¹⁾	40 (0)	3 (0)	2 (0)	634.2	634.1

Note : 1) Center point.

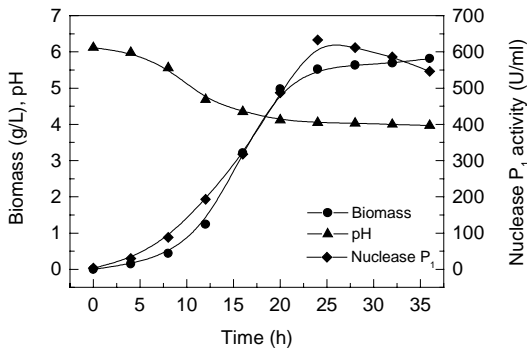


图2 培养基优化后核酸酶 P_1 的发酵过程曲线
Fig.2 The curve of fermentation process with the optimized medium

因此可以得到核酸酶 P_1 发酵的优化后的培养基组成为(g/L): 葡萄糖 38.73, 蛋白胨 1.91, 玉米浆 1.84, KH_2PO_4 0.6, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.6, $MgSO_4$ 0.4, $CaCl_2$ 0.4, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4.

用此培养基配方进行实验, 24 h 时的产酶水平为 648.3 U/ml, 与理论值较为接近, 说明此优化手段可信度较高, 其发酵过程曲线见图 2.

由图 2 和 1 可知, 优化后的培养基产酶速度较优化前加快了许多, 但是菌体的生物量却略有下降. 这说明添加玉米浆虽然有利于 P_1 酶的发酵, 却不利于菌体的生长.

4 玉米浆促进核酸酶 P_1 发酵机理的初步探讨

玉米浆和蛋白胨等都是营养成分比较复杂的有机氮源, 它们都含有丰富的蛋白质及氨基酸等营养物质, 其中蛋白胨的氨基酸含量高于玉米浆, 且它们的氨基酸的组成也差别很大. 蛋白胨中含有较多的谷氨酸、精氨酸等氨基酸, 而小分子量的氨基酸, 如丙氨酸和甘氨酸含量较低. 而玉米浆中则是丙氨酸、甘氨酸等小分子量的氨基酸占有很大的比例^[10,11]. 为此, 本文研究了数种不同氨基酸对于核酸酶 P_1 发酵的影响, 其添加量为每 50 ml 培养基加入 1 mg 氨基酸, 结果见表 3. 由表可知, 除了丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、天冬氨酸以及天冬酰胺外, 绝大多数的氨基酸对于核酸酶 P_1 的发酵都有一定的抑制作用. 而在玉米浆和蛋白胨两种有机氮源中, 玉米浆含有较多的可以促进 P_1 酶发酵的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸等小分子量的氨基酸, 而蛋白胨中含量较大的谷氨酸和精氨酸等都对 P_1 酶的发酵有较强的抑制作用. 因而采用玉米浆作为蛋白胨的补充氮源时可以明显促进核酸酶 P_1 的发酵. 关于这些氨基酸对核酸酶 P_1 发酵的调控机理有待进一步的深入研究.

表3 不同氨基酸对于核酸酶 P₁ 发酵的影响

Types of amino acids	-	L-Asp	L-Asn	L-Pro	L-Cys	L-Lys	L-Glu	L-Phe
Relevant enzyme activities (U/ml)	100	102.4	100.6	95.1	99.1	93.6	85.3	89.4
Types of amino acids	Gly	L-Trp	L-Ser	L-Ala	L-Val	L-Ile	L-Tyr	L-Arg
Relevant enzyme activities (U/ml)	102.2	96.9	108.9	106.5	99.7	97.5	93.4	93.7

5 结论

(1) 含有玉米浆的复合氮源可明显地提高核酸酶 P₁ 的产量, 原因是玉米浆中含有较多的可以促进 P₁ 酶发酵的氨基酸, 如丙氨酸, 甘氨酸等. 与之相反, 蛋白胨含有较多的谷氨酸和精氨酸等对 P₁ 酶发酵有抑制作用的氨基酸.

(2) 实验设计法优化后的桔青霉产核酸酶 P₁ 的培养基组成为(g/L): 葡萄糖 38.73, 蛋白胨 1.91, 玉米浆 1.84, KH₂PO₄ 0.6, K₂HPO₄·3H₂O 0.6, MgSO₄ 0.4, CaCl₂ 0.4, ZnSO₄·7H₂O 0.4, pH 6.50. 用该培养基发酵核酸酶 P₁, 可以将酶活力从优化前的 380 U/ml 提高到 648 U/ml, 提高了约 70%.

参考文献:

- [1] Fujimoto M, Kuninaka A, Yoshino H. Identity of Phosphodiesterase and Phosphomonoesterase Activities with Nuclease P₁ (a Nuclease from *Penicillium citrinum*) [J]. Agri. Biol. Chem., 1974, 38(9): 785-790.
- [2] Fujimoto M, Kuninaka A, Yoshino H. Substrate Specificity of Nuclease P₁ [J]. Agri. Biol. Chem., 1974, 38(9): 1555-1561.
- [3] Fujimoto M, Fujiyama K, Kuninaka A, et al. Mode of Action of Nuclease P₁ on Nucleic Acids and Its Specificity for Synthetic Phosphodiesters [J]. Agri. Biol. Chem., 1974, 38(11): 2141-2147.
- [4] Kuninaka A, Kibi M, Yoshino H, et al. Studies on 5'-Phosphodiesterases in Microorganisms — Part II. Properties and Application of *Penicillium citrinum* 5'-Phosphodiesterases* [J]. Agri. Biol. Chem., 1961, 25(9): 693-701.
- [5] 杨家华, 李爱芬, 李绪青, 等. 桔青霉发酵生产核酸酶 P₁ 的适宜条件 [J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 1997, 10(2): 106-109.
- [6] 袁中一, 刘树煌, 汪静英, 等. 固定化核酸酶 P₁ 应用于 5'-核苷酸生产 [J]. 科学通报, 1980, 25(14): 654-657.
- [7] 娄永江, 吴汉民, 王海洪, 等. 从桔青霉 M71 生产核酸酶 P₁ 及酶活提高途径的研究 [J]. 宁波大学学报, 1997, 10(2): 21-28.
- [8] Li T. The Environmental Control of Nuclease P₁ Synthesis by *Penicillium citrinum* AS 3.2788 in Submerged Fermentation [J]. Process Biochemistry, 1993, 28: 467-473.
- [9] 易丹辉. Statistica 6.0 应用指南 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2002. 163-252.
- [10] 无锡轻工大学. 微生物学, 第二版 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990. 194-198.
- [11] 陈陶声, 胡学智. 酶制剂生产技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1994. 75-79.

Application of Experimental Design to Optimizing the Medium of Nuclease P₁

XU Zheng-jun, XIAO Lin-ping, LU Hao, XIE Ning-chang, YING Han-jie

(Col. Life Sci. & Pharmaceut. Eng., Nanjing Univ. Technol., Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Experimental design was employed to study the effects of several factors on the production of nuclease P₁ by *Penicillium citrinum* M02, such as carbon source, nitrogen source, phosphor source and corn steep liquor which acted as complementary nitrogen source. The results of two experiments showed that corn steep liquor could remarkably promote the production of nuclease P₁. In addition, one model that can describe the fermentation perfectly was gained from these experiments. When nuclease P₁ was produced on the optimized medium calculated from this model, its yield was 648.3 U/ml that is comparable with 661 U/ml from the model. And it is improved by 70% compared with the 380 U/ml, which was gained on the original medium at the same time. The possible reason for corn steep liquor promoting nuclease P₁ fermentation is that corn steep liquor contains more useful amino acids such as glycine, alanine, serine and so on.

Key words: *Penicillium citrinum* M02; nuclease P₁; fermentation medium; corn steep liquor; experimental design; optimization