

黑曲霉产胞外核糖核酸酶的发酵条件的初步优化^{*}

熊亚红, 刘建忠, 王腾利, 计亮年

(中山大学生物工程研究中心 // 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 研究了几种因素对黑曲霉突变株 SA-13-20 产胞外核糖核酸酶的影响。单次单因子优化, 产酶水平提高了 170%, 最高酶活达 1 244 U/mL。研究发现磷酸盐抑制核糖核酸酶的生物合成, 但促进菌体的生长, 并且该菌产胞外核糖核酸酶不受外源核糖核酸的诱导。确定了最佳碳源, 氮源及金属离子源分别为复合碳源 (葡萄糖+玉米粉), NH_4NO_3 及 K_2SO_4 , 最佳菌龄为 24 h。

关键词: 黑曲霉; 核糖核酸酶; 单次单因子法; 优化

中图分类号: TQ 925.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) S2-0191-04

核糖核酸酶是一类重要的分析用酶, 广泛存在于生物体内。微生物核糖核酸酶广泛应用于分子生物学研究, 食品及药物工业。利用核糖核酸酶能分析和确定 RNA 的结构, 去除单细胞蛋白产品中的 RNA, 水解 RNA 来生产医用和食品级的核苷酸^[1-3]。另外, 许多核糖核酸酶本身具有抗病毒、抗肿瘤的功效^[4,5], 已成功应用于抑制流感病毒及疱疹, 治疗急性胰腺炎及流行性脑炎^[9]。微生物核糖核酸酶的这种细胞毒性与其水解活性、稳定性、躲避核糖核酸酶抑制剂的能力和分子表面的正电荷有关, 利用定点突变或化学修饰技术能够提高其对核糖核酸酶抑制剂的抗性和增加其表面正电荷。因此, 微生物核糖核酸酶极有可能成为一种新型的抗病毒、抗肿瘤药物^[5]。

人们已分离纯化到许多真菌核糖核酸酶并对其性质进行了详细研究, 但有关发酵条件的优化的研究却很少^[7,8]。我们利用紫外和亚硝基胍联合诱变技术, 以黑曲霉 ATCC 26550 为出发菌, 利用代谢抑制法筛选到一株抗叠氮化钠的高产突变株黑曲霉 SA 13 20。在此利用单次单因子法研究了各种因素对黑曲霉突变株 SA-13-20 产酶的影响, 初步确定了该突变株高产胞外核糖核酸酶的发酵条件, 为发酵工艺的进一步优化以提高其产酶水平打下了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

本实验用的黑曲霉 SA-13-20 是由黑曲霉 ATCC

26550 经紫外和亚硝基胍同时诱变获得的一株抗叠氮化钠的胞外核糖核酸酶高产突变株 (数据未报道), 在 4 °C 下保藏于麦芽汁琼脂斜面上, 每隔 2 个月转种一次。

1.2 培养基

斜面培养基 (g/L): 麦芽汁, 130; 蛋白胨, 10; 葡萄糖, 20; 琼脂, 20。种子培养基除不含琼脂外, 其他成分与斜面培养基相同。用于优化实验的初始发酵培养基 (g/L): 蔗糖, 150; NH_4NO_3 , 2.0; KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH, 2.2。所有培养基都在 121 °C 下灭菌 30 min。

1.3 培养条件

将 1 mL 孢子悬浮液 (约 10^7 个孢子) 接种至装有 40 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C, 180 r/min 转速下培养 36 h 后, 按 10% 体积比接种量转入 40 mL 发酵培养基中于相同条件下培养 5 d。

1.4 酶活的测定

核糖核酸酶活力的分析采用 Horitsu 等提出的方法^[7]。往 2 支 10 mL 塑料离心试管中均加入 1.2 mL 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3.5), 0.25 mL 由该缓冲液配制的 $w=0.5\%$ 酵母 RNA, 30 °C 下预热 5 min。往其中一支试管中加入 50 μL 适当稀释过的酶液, 于 30 °C 下反应 20 min, 加入 0.25 mL 用 $\varphi=25\%$ 高氯酸溶液配制的 $w=0.75\%$ 醋酸铀溶液终止反应, 另一支试管中则先加终止剂, 后加酶液。静置 30 min 后, 于 4 000 g 下离心 10 min, 分别取 0.10 mL 上清液, 用蒸馏水稀释至 5.00 mL, 分别

* 收稿日期: 2003-08-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (021684)

作者简介: 熊亚红 (1976 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 计亮年; E-mail: jlslij@zsu.edu.cn

作为待测溶液和空白液, 测定 260 nm 下的吸光度值。将在上述条件下吸光度上升 1.00 定义为一个酶活力单位。

1.5 菌体干质量的测定

取 10 mL 发酵液, 菌体经过滤, 洗涤, 于 105℃烘至恒质量后, 准却称量。滤液用于酶活的测定。所有结果都是两次实验数据的平均值, 且相对误差不超过±5%。

2 结果与分析

2.1 碳源的影响

碳源种类对黑曲霉 SA-13-20 生长和产酶有不同影响, 结果列于表 1。所有碳源都能很好地支持菌体的生长, 但是麦芽汁, 果糖, 米粉或复合碳源(葡萄糖+米粉)为碳源时, 胞外核糖核酸酶活力明显很低。与蔗糖相比, 可溶性淀粉和复合碳源(葡萄糖+玉米粉)都能较大地提高产酶水平。考虑到碳源的成本, 我们在下面实验中采用复合碳源(葡萄糖+玉米粉)。

表 1 碳源种类对黑曲霉生长和产酶的影响¹⁾

Tah 1 Effect of carbon sources on growth of *Aspergillus niger* SA-13-20 and RNase production

碳源	菌质量浓度 (g·L ⁻¹)	酶活 (U·mL ⁻¹)
葡萄糖	25.7	355.2
蔗糖	27.9	462.0
麦芽汁	34.3	175.0
果糖	25.9	210.0
可溶性淀粉	25.6	523.2
玉米粉	27.8	505.8
米粉	28.0	250.2
葡萄糖+可溶性淀粉	28.0	437.5
葡萄糖+玉米粉	28.8	546.0
葡萄糖+米粉	30.5	260.8

1) 碳源质量浓度为 150 g/L, 葡萄糖与其他碳源的质量比为 1:4, 培养时间为 5 d

固定葡萄糖与玉米粉的质量比例为 1:4, 碳源总质量浓度从 50 g/L 增加至 180 g/L。从图 1 中, 可以看出, 随着碳源质量浓度增大, 酶活先上升, 后下降; 碳源质量浓度为 150 g/L 时, 酶活达到最大值。因此, 在后面实验中采用复合碳源(30 g/L 葡萄糖+120 g/L 玉米粉)。

2.2 氮源的影响

黑曲霉 SA-13-20 在不同氮源中的生长和产酶情况见表 2。结果表明菌体生长和产酶都需要氮源, 有机氮源中, 蛋白胨最利于产酶, 也能较好地支

持菌体生长, 尿素虽然最利于菌体的生长, 但最不利于产酶; 无机氮源中, NaNO₃ 和 NH₄NO₃ 明显比其他铵盐利于产酶, 说明 NO₃⁻ 作为氮源时的效果比 NH₄⁺ 好; 在实验用到的氮源中, NH₄NO₃ 最利于产酶, 与 Horitsu 等^[7] 的结果一致; 而在匍枝根霉 *Rhizopus stolonifer* 核糖核酸酶发酵中, 无机氮源作为唯一氮源时, 细胞根本不生长, 其最佳氮源是蛋白胨^[8]。

2.3 磷酸盐和核酸的影响

Chacko 等^[8] 报道了无机磷酸盐抑制葡枝根霉产核糖核酸酶。在此我们研究了磷酸盐对黑曲霉 SA-13-20 产胞外核糖核酸酶的影响, 发现培养基中不添加 KH₂PO₄ 时, 菌体量明显减少, 但酶活增加了 20%。许多核糖核酸酶是可诱导的酶, 在培养基中添加外源 RNA 能诱导核糖核酸酶的合成^[9]。我们往发酵培养基中添加 RNA 后, 核糖核酸酶活力却下降了 30%, 菌体量明显增加, 与上述 KH₂PO₄ 的效果相似, 说明外源 RNA 不能诱导黑曲霉 SA-13-20 大量生产胞外核糖核酸酶, 它只是利于细胞的生长, 可能只是作为一种磷源被该菌利用。结果与 Chacko 等报道的葡枝根霉核糖核酸酶^[8] 的情况相似。

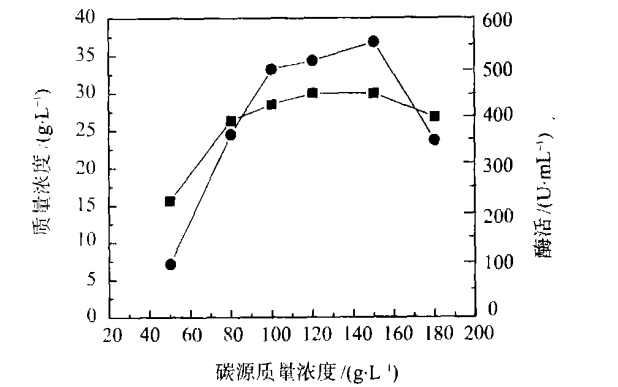


图 1 碳源浓度对黑曲霉 SA-13-20 生长和产酶的影响
Fig. 1 Effect of carbon source concentration on growth of *Aspergillus niger* SA-13-20 and RNase production
■ 菌质量浓度, ● 酶活

2.4 金属离子的影响

通常, 金属离子不仅是维持细胞生长的必需成分, 而且对于微生物合成目的产物也非常重要。我们研究了不同金属离子对黑曲霉 SA-13-20 产胞外核糖核酸酶的影响, 从表 3 中可以看出, Ba²⁺ 严重抑制菌体的生长和产酶, 其他金属对离子菌体的生长影响不大。Co²⁺、Al³⁺、Fe³⁺、Cd²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺ 对产酶有抑制作用, 且其抑制作用依此顺序而增强。Na⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、K⁺ 对菌体产酶具有促进作用, 且其促进作用依此顺序而增强。K⁺ 为最佳

金属离子, 提高产酶水平达 36.0%。由此可见, 对于突变株黑曲霉 SA-13-20 产酶而言, 适合于出发株黑曲霉 ATCC 26550 产酶的 Mg^{2+} 并非最佳金属离子源。

表 2 氮源种类对黑曲霉生长和产酶的影响¹⁾

Tah 2 Effect of nitrogen sources on growth of *A. niger* SA-13-20 and RNase production

氮源	菌质量浓度 (g·L ⁻¹)	酶活 (U·mL ⁻¹)
空白 ²⁾	13.8	88.6
蛋白胨	22.3	284.8
酵母浸膏	20.3	189.8
牛肉浸膏	21.6	223.6
酪蛋白	24.5	164.5
尿素	36.4	210.9
NaNO ₃	23.5	485.0
NH ₄ NO ₃	28.6	540.0
NH ₄ Cl	29.0	301.6
(NH ₄) ₂ HPO ₄	26.3	274.2
(NH ₄) ₂ CO ₃	13.3	147.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	26.1	289.0

1) 碳源为葡萄糖(30 g/L) + 玉米粉(120 g/L), 氮源质量浓度为 2 g/L, 培养时间为 5 d;
2) 空白实验中未加氮源

表 3 金属离子对黑曲霉生长和产酶的影响¹⁾

Tah 3 Effect of metal ions on growth of *A. niger* SA-13-20 and RNase production

金属离子	菌质量浓度 (g·L ⁻¹)	酶活 (U·mL ⁻¹)
空白 ²⁾	19.0	689.5
Na ⁺	16.8	731.5
Al ³⁺	22.1	654.5
K ⁺	21.6	938.0
Fe ³⁺	19.3	651.0
Ca ²⁺	20.1	826.0
Co ²⁺	19.4	687.8
Mg ²⁺	19.3	808.5
Ni ²⁺	20.1	561.8
Mn ²⁺	18.7	740.2
Zn ²⁺	21.6	399.0
Cu ²⁺	19.9	857.5
Cd ²⁺	16.9	605.5
Ba ²⁺	9.1	78.8

1) 化合物都为金属氯化物, 且各金属离子的浓度为 10⁻³ mol/L;
2) 空白实验中不添加金属离子

由于阴离子种类同样会影响菌体生长和产酶, 分别比较了 4 种钾盐和镁盐的效果(表 4)。结果表明, 在这两组盐中, 都是硫酸盐最利于产酶, 同类的

钾盐比镁盐更利于菌体生长和产酶。因此, K₂SO₄ 为黑曲霉 SA-13-20 产胞外核糖核酸酶的最佳无机盐。

表 4 阴离子对黑曲霉生长和产酶的影响¹⁾

Tah 4 Effect of anion on growth of *A. niger* SA-13-20 and RNase production

阴离子	K ⁺		Mg ²⁺	
	菌质量浓度 (g·L ⁻¹)	酶活 (U·mL ⁻¹)	菌质量浓度 (g·L ⁻¹)	酶活 (U·mL ⁻¹)
Cl ⁻	20.7	917.0	18.2	798.5
NO ₃ ⁻	21.1	986.5	15.9	855.8
ClO ₄ ⁻	21.9	880.9	17.7	777.0
SO ₄ ²⁻	21.7	1056.6	21.2	868.0

1) 化合物都为金属氯化物, 且各金属离子的浓度为 10⁻³ mol/L
2.5 种龄的影响

种龄从 16~36 h 分别按 φ=10% 的接种量转入上述优化后的培养基中进行发酵, 测定第 5 天的酶活。从图 2 中可以看出, 随着种子培养时间的延长, 种子液中菌体浓度增大, 在第 20~32 h 增长迅速, 处于对数生长期。种龄为 24 h 时, 即对数生长期初期, 发酵产酶水平最高, 达 1 244 U/mL。

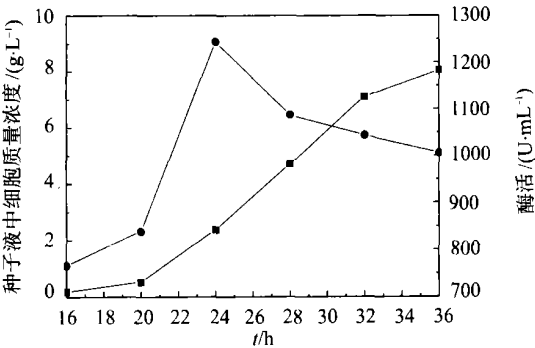


图 2 种龄对黑曲霉 SA-13-20 生长和产酶的影响

Fig. 2 Effect of inoculum age on RNase production by *A. niger* SA-13-20

■种子液中菌体质量浓度; ● 发酵产酶水平

3 结 论

本实验所使用的抗性突变株(黑曲霉 SA-13-20)的发酵产酶条件不同于母株(黑曲霉 ATCC 26550)。该突变株产酶受无机磷酸盐的抑制, 并不被外源 RNA 诱导。采用单次单因子优化方法, 我们得到了一个廉价而高效的发酵培养基(g/L): 葡萄糖, 30; 玉米粉, 120; NH₄NO₃, 2.0; K₂SO₄, 0.087; pH, 2.2。最佳菌龄为 24 h。通过优化发酵条件, 突变株的产酶水平从 462.0 U/mL 提高到 1244 U/mL, 提高了 170%。

参考文献:

- [1] TAKAHASHI K, MOORE S. The enzymes, nucleic acids [M]. New York-London: Academic Press, 1982: 435—468.
- [2] REDDY G L, SHANKAR V. Immobilized nucleases [J]. Crit Rev Biotechnol, 1993, 13: 255—273.
- [3] LINDBLOM M, MORGEN H. Enzymatic RNA reduction in disintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol Bioeng, 1974, 16: 1123—1133.
- [4] SAXAENA S K, GRAVELL M, WU Y-N, et al. Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease [J]. J Bio Chem, 1996, 271: 20783—20788.
- [5] MAKAROV A A, ILINKAYA O N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets [J]. FEBS Lett, 2003, 540: 15—20.
- [6] 欧阳平凯. 生物化工产品(第三版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 103.
- [7] HORITSU H, HIGASHI Y, TOMOYEDA M. Production, purification and properties of ribonuclease from *Aspergillus niger* [J]. Agr Biol Chem, 1974, 38: 933—940.
- [8] CHACKO R, DESHPANDE M, SHANKAR V. Extracellular ribonuclease production by *Rhizopus stolonifer*: Influence of metal ions [J]. Cur Microbiol, 1996, 32: 246—251.
- [9] GLITZ D G, DEKKER A. Studies on a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena* I. Purification and properties of the enzyme [J]. Biochem, 1964, 3: 1391—1399.

Preliminary Optimization of Culture Condition for the Production of Extracellular Ribonuclease from *Aspergillus niger* Using One factor at a time Methodology

XIONG Ya hong, LIU Jian zhong, WANG Teng li, JI Liang nian

(Biotechnology Research Center // School of Chemistry and Chemical Engineering,
Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Effects of culture conditions on extracellular ribonuclease production in flask fermentation by *Aspergillus niger* SA 13-20 were investigated. A one factor at a time methodology was employed to optimize the culture conditions for the ribonuclease production. Compared with that under unoptimized conditions, the ribonuclease production increased 170% under the optimized conditions. The maximal ribonuclease production reached to 1244 U/mL. Inorganic phosphate supported cell growth, but repressed enzyme production. The ribonuclease was not inducible when RNA was added to the medium. The optimal carbon and nitrogen source, inorganic salt and inoculum age were complex carbon source (glucose + corn powder), NH_4NO_3 , K_2SO_4 , and 24 h, respectively.

Key words: ribonuclease; *Aspergillus niger*; one factor at a time methodology; optimization