

静息细胞培养系统中葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的生物合成^{*}

刘建忠 杨惠英 翁丽萍 计亮年^{* *}

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

关键词 葡萄糖氧化酶, 过氧化氢酶, 黑曲霉, 静息细胞培养

分类号 Q 558

黑曲霉发酵生产葡萄糖氧化酶 (GOD) 及过氧化氢酶 (CAT) 受许多因素的影响^[1]. 弄清楚这些因素究竟是直接对酶的生物合成起作用, 还是通过影响细胞的生长, 间接对酶合成起作用, 用发酵法是难以判断的; 但是研究清楚这些因素的可能机制, 对指导该酶的发酵生产及研究该酶的生物学作用都有重要意义. 用静息细胞培养来研究酶的生物合成的影响因素有几个优点: ① 克服了生长本身引起的干扰; ② 克服了由生长引起的调控作用的干扰; ③ 静息细胞培养的成分比较简单, 便于对实验结果进行分析. 因此, 我们设计和筛选了一种专门用于研究葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的生物合成的影响因素的静息细胞培养系统, 并利用其对各种因素进行了详细的研究.

黑曲霉 ZBY-7 菌种按文献 [1] 的方法进行发酵产酶培养, 发酵结束后在无菌条件下, 过滤并用无菌生理盐水洗涤 3 次, 收集菌体; 最后将菌体悬浮在无菌水中, 使菌体浓度为 10 mg / mL; 以此菌悬液作为静息细胞培养的种子液. 静息细胞培养在 500 mL 摇瓶 (装液量为 100 mL) 中, 于 250 r / min 30℃ 下培养 26 h 左右. 静息细胞培养结束后, 过滤收集菌体, 将菌体用玻璃细胞匀浆器进行破壁, 然后在 4 000 r / min 下离心 10 min, 取上清液作为酶液, 供酶活测定之用. 葡萄糖氧化酶活力采用苯醌氧化法^[2]进行测定. 过氧化氢酶活力采用紫外分光光度法^[3]进行测定. 菌体干质量采用文献 [4] 方法进行测定.

表 1 列出了不同培养基对产葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的影响. 静息细胞培养前后单位体积菌体干重变化较小, 说明菌体没有生长, 处于静息培养状态. 因此, 1 号培养基为最佳. 对各种培养条件优化发现, 在接种量为每 mL 10 mg 湿菌体培养 26 h 左右, 葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的产量最高. 同时还发现, 葡萄糖氧化酶的最适合成 pH 为 6.0, 而过氧化氢酶的最适合成 pH 为 5.7.

葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶可被 CaCO_3 所诱导而被 CaCl_2 抑制, 这与 Hatzinikolaou 等^[4]报道的结果相似, 这种诱导作用主要是由于糖的代谢途径的改变 (即由酵解途径转向为磷酸戊糖途径) 所引起的.

将前文^[5]报道的葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的不同浓度的激活剂 Vc 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 SHCH_2COOH 添加于静息细胞培养基中进行培养, 结果表明, Vc 及 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 由于其还原性而消耗静息培养系统中的溶氧, 引起菌体缺氧, 从而导致酶合成受抑制. SHCH_2COOH 对葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的生物合成有促进作用.

^{*} 广东省自然科学基金 (970840) 资助项目 ^{* *} 通讯联系人

收稿日期: 1998-10-12 刘建忠, 男, 32岁, 讲师

表 1 静息细胞培养系统合适培养基的筛选

Tab. 1 Screening of appropriate medium for resting cell culture

编号	$\frac{d(\text{葡萄糖})}{(g^{\circ} L^{-1})}$	$\frac{d(KCl)}{(g^{\circ} L^{-1})}$	$\frac{d(KH_2PO_4)}{(g^{\circ} L^{-1})}$	$\frac{d(\text{尿素})}{(g^{\circ} L^{-1})}$	$\frac{d(MgSO_4)}{(g^{\circ} L^{-1})}$	$\frac{d(\text{细胞})}{(mg^{\circ} L^{-1})}$	$\lambda(GOD)^1$	$\lambda(CAT)^1$	$\Delta\lambda(GOD)^{1,2}$	$\Delta\lambda(CAT)^{1,3}$
1	0.80	0.07	0.30	0.60	0.07	2.37	1.45	42.94	0.79	16.53
2	1.00	0.07	0.30	0.60	0.07	2.45	1.24	40.50	0.58	14.09
3	2.00	0.07	0.30	0.60	0.07	3.13	1.51	35.48	0.85	9.07
4	0.80	0.05	0.30	0.60	0.07	2.84	1.00	29.44	0.34	3.03
5	0.80	0.09	0.30	0.60	0.07	3.22	1.32	37.44	0.66	11.03
6	0.80	0.07	0.15	0.60	0.07	2.80	1.48	31.85	0.82	5.44
7	0.80	0.07	0.45	0.60	0.07	3.12	0.96	28.68	0.30	2.27
8	0.80	0.07	0.30	0.30	0.07	3.09	1.31	30.10	0.65	3.69
9	0.80	0.07	0.30	0.90	0.07	2.79	1.22	17.78	0.56	-8.63
10	0.80	0.07	0.30	0.06	0.05	3.06	0.99	30.96	0.33	4.55
11	0.80	0.07	0.30	0.06	0.09	3.31	0.85	31.27	0.19	4.86
12	1.00	0.20	0.30	0.70	0.20	3.42	1.29	28.73	0.63	2.32
13	1.00	0.20	0.45	0.70	0.20	3.50	1.29	28.73	0.63	2.32
14	0.80	0.20	0.45	0.70	0.20	3.52	0.95	31.18	0.29	4.78
15 ⁴⁾						3.17	0.66	26.41		
16 ⁵⁾						2.41				

1) 单位为 $\mu\text{mol}^{\circ} \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$; 2) $\Delta\lambda(GOD)$ = 试验样品 GOD活力 - 对照样 GOD活力; 3) $\Delta\lambda(CAT)$ = 试验样品 CAT活力 - 对照样 CAT活力; 4) 以生理盐水取代培养基, 在相同条件下进行静息培养, 作为对照; 5) 为菌悬液, 即静息培养的种子液, 经 3 次洗涤后测定其干质量, 以此作为生长的对照

参 考 文 献

1 刘建忠, 杨惠英, 赵继伦, 等. 葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶的生物合成. 中山大学学报 (自然科学版), 1998, 37(1): 68~ 72

2 Ciucu A, Patroescu C. Fast spectrometric method of determining the activity of glucose oxidase. Analytical Letters, 1984, 17: 1417~ 1427

3 Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P. Distribution and typology of glucose oxidase activity in the genus *Penicillium*. Letters in Applied Microbiology, 1993, 17: 285~ 288

4 Hatzinikolaou D G, Hansen O C, Macris B J, et al. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* using genetic- and process-engineering techniques. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 43: 978

5 刘建忠, 杨惠英, 赵继伦, 等. 模拟酶轴向配体激活过氧化氢酶的研究研究——提高天然酶活性的新方法. 中山大学学报 (自然科学版), 1998, 37(2): 125~ 127

Biosynthesis of Glucose Oxidase and Catalase in Resting Cell Culture System

Liu Jianzhong* Yang Huiying Weng Liping Ji Liangnian

Abstract A resting cell culture system that supported the enzyme synthesis but not the growth was established to investigate the factors regulating biosynthesis of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger*. Various culture conditions have been optimized. The optimal pH of the biosynthesis of glucose oxidase and catalase was 6.0 and 5.7 respectively. Calcium carbonate was an inducer of the biosynthesis of the enzymes. The biosynthesis of glucose oxidase and catalase can be promoted by SHCH_2COOH

Keywords glucose oxidase, catalase, *Aspergillus niger*, resting cell culture system

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China