

核酸酶 P1 摇瓶发酵工艺初步研究

摘 要

主要探索了本实验室提供的产核酸酶 P1 桔青霉的种子液生长曲线，研究在何种发酵工艺下酶活能够达到更高。根据不同的单因素探索与对比，最终培养基组成成分（质量体积分数）为：蔗糖 1.5%，蛋白胨 0.6%，胰蛋白胨 0.05%，磷酸氢二钾 0.05%，磷酸二氢钾 0.05%，0.08% 氯化钙，0.01%硫酸锌，0.01%硫酸镁，初始 pH6.4，菌种接种量 15%，28℃，培养 72h 达酶活最高值，最高酶液酶活为 788 U/ml。在新发酵方案下酶活比初始的核酸酶 P1 酶活有了 23.1%的增长，有望成为更适宜的发酵条件。

关键词：桔青霉 核酸酶 P1 发酵 摇瓶 酶活

A preliminary study on the process of shaking flask fermentation of nuclease

P1

Abstract

The growth curve of the nuclease P1, *Penicillium citrinum*, which was supplied by our laboratory, was mainly explored. According to different single factor exploration and comparison, the final components (mass fraction) are: Sucrose 1.5%, peptone 0.6%, tryptone 0.05%, hydrogen phosphate two potassium 0.05%, potassium dihydrogen phosphate 0.05%, 0.08% calcium chloride, 0.01% zinc sulfate, 0.01% Magnesium Sulfate, initial pH6.4, inoculation of bacteria 15%, 28, and culture. 72h was the highest enzyme activity, and the highest enzyme activity was 788U/ml. Under the new fermentation schedule, the enzyme activity increased by 23.1% compared with the initial nuclease P1 enzyme activity, It is expected to be a new Fermentation conditions.

Keywords: *Penicillium citrinum*; nuclease P1; fermentation ;shake flask ;enzyme activity

目 录

1. 引言	1
1.1 桔青霉	1
1.2 核酸酶 P1 的国内外生产情况	1
1.3 核酸酶 P1 的组成结构以及生产原理	2
1.4 核酸酶 P1 的用途	3
1.5 研究提高核酸酶 P1 酶活的意义	3
2. 实验材料	5
2.1 药品	5
2.2 实验仪器	5
2.3 实验菌株	5
3. 试验方法	6
3.1 斜面以及平板的活化培养	6
3.2 种子培养基的配置	6
3.3 产酶基础培养基	6
3.4 培养基成分对酶活的影响	6
3.5 核酸酶 P1 酶活的测定方法	7
4. 实验分析	9
4.1 种子液生长曲线的观测	9
4.2 核酸酶 P1 发酵培养基成分对酶活的影响	8
4.3 外部培养条件对发酵酶活的影响	12
4.4 发酵工艺研究	13
5. 分析总结	15
6. 引用文献	16
7. 致谢	17

1. 引言

1.1 桔青霉

核酸酶 P1 的生产工艺到现在可以总结为两种：桔青霉发酵产核酸酶 P1 和直接从麦芽根中提取目标产物，试验采纳了产核酸酶 P1 的霉菌来发酵, 这种霉菌就是桔青霉。桔青霉的种属是半知菌类，串珠霉目的一属，表观与曲霉临近，多核多细胞是其菌丝的根本组成单元。青霉菌在平板上看下来，平板正面深绿色，背面灰白色菌，菌落的中央有白色成长为深灰绿色。菌丝体的组成为横隔的菌丝，一般情况下以产生分生孢子的方法来进行无性繁殖，当产生孢子时，多细胞的分生孢子梗会在菌丝体顶端出现，梗的顶端分枝两三次，成串的分生孢子会分裂在每枝的末端细胞^[16]。桔青霉在平板上成长模样以下图 1 所示



图 1 本实验室培养的桔青霉（28℃，培养时长 5 天）

常见的生态分布:腐烂的桔子、蔬菜、肉类以及衣服上面。多呈灰绿色。其可以或许导致常见的青霉菌病。现实中桔青霉是生产抗生素中无可或缺的菌种，另外还有生产有机酸，如葡萄糖酸、柠檬酸的功能^[16]。

1.2 核酸酶 P1 的国内外生产研究现状

早在 50 年月以前, 从海外科研就能有了从蛇毒或小肠粘膜中提取核酸酶 P1 用于出产核苷酸的手艺，一些外国的科学家就可以够用微生物发酵的方式出产核酸酶 P1，而且跟着晶体学和蛋白质提纯手艺的成长在生物学中的普遍被利用，越来越多的人逐渐对该酶蛋白的分子结构和活性中心有了更多的钻研与希望，在此同时人们也进一步扩大了核酸酶

P1 在医药、食物、和分子生物学等方面的利用远景^[6]。核酸酶 P1 的结构和酶学特性的研究，对于发展我国核苷酸工业有着重要的理论和现实意义。

我国的现状是具有很充足的先进的 RNA 生产工艺以及核糖核酸 RNA 的资源，常大量应用于核苷酸工业生产当中^[14]。可是因为当今的生产环境有限，导致桔青霉发酵液中核酸酶 P1 的活性较低，国内利用深层发酵法出产获得大量核酸酶 P1 的厂家少之又少，直接影响着核苷酸的出产。根据现在已有的情况，我们对桔青霉摇瓶发酵生产核酸酶 P1 的适宜条件进行了不同方向的因素实验，目的在于为以后进行的工业化生产核酸酶 P1 的产量提高打下良好的基础。

1.3 核酸酶 P1 的组成结构以及生产原理

核苷酸作为核酸的构成成份，其重要性是不成疏忽的。在这些年来各类核酸保健品日渐增多，这些产物的一个根基特色便是将核酸水解为核苷酸再与别的成份加在一起。核酸酶 P1 的分子结构、催化特性及影响因素、应用等方面综述如下^[10]。

桔青霉会生产的一种名叫核酸酶 P1 核酸的水解酶，核酸酶 P1 化学名叫做 5'-磷酸二酯酶。其布局是一种含有 3 个锌原子的糖蛋白，分子质量约为 36000 u，碳水化合物含量约莫占 17%，酶蛋白部分由 270 个氨基酸残基构成，富含疏水氨基酸，提纯后的酶蛋白分子质量约为 29227u。我们由当下的研究资料可以证实核酸酶 P1 的活性中心存在一个三锌布局，Zn1~Zn3 约莫相距 0.32nm，Zn2~Zn1 相距 0.58nm，Zn2~Zn3 相距 0.47nm；两个水分子(W2 和 W3)吸附在 Zn2 上，一个水分子(W1)搭桥于 Zn1 和 Zn3 之间^[19]。其结构如下图 2 所示。

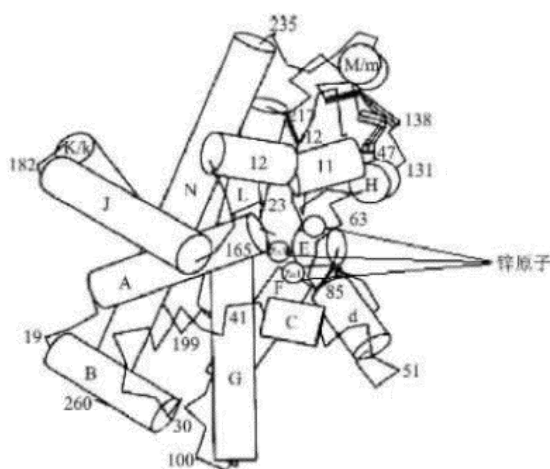


图 2 核酸酶 P1 结构简图

核酸酶 P1 能够水解 RNA 与热变形后形成的 DNA，从而得到 5'-核苷酸，作用的原理

是它主要作用于用来连接核糖分子中 3' -碳原子上羟基与磷酸的二酯键, 它的产物为 5' -单核苷酸^[8]。其产物广泛的运用在生物工程、科研、医药、化妆、食品等各个领域之中, 并且具有很高的经济市场价值, 因此如何使核酸酶 P1 的产量提高成为了现在主要研究对象。

1.4 核酸酶 P1 的用途

核酸酶 P1 分解核酸所产生的 5' -核苷酸在农工业、医药以及食品、化妆、研究等方面上都具有不错的登场率, 其涉猎范围极广, 其最显著的运用是在食品和医药方面, 可用于食品调味剂(呈味核苷酸)和核苷酸医药工业, 具有广泛的实用价值, 在核苷酸工业生产中起到的重要作用^[4]。其所来带的商业价值和科学价值无可替代, 在婴儿食物范畴中, 在婴儿的食物中添加进 5' -核苷酸后可以很高的进步婴儿自己的免疫能力, 而且仍是增进婴儿的肠道成熟, 增添脂蛋白和多不饱和脂肪酸两种婴儿所必需物资的合成速度, 另外多服用还能有用削减婴儿伤风和腹泻的产生, 对婴儿的正常发展和发育有着极大的帮忙^[9]。

5' -核苷酸作为医药中间体, 许多的抗病毒就是由其合成组成, 在中枢神经、循环、泌尿系统等方面疾病其衍生物也在发挥着巨大的作用^[12]。海内外能进行四种核苷酸出产的仅为个体厂家, 而且其产物浓度也不怎么高, 而且产物产量不大, 核苷酸衍生物的开辟钻研这个大需求以此刻的产量产率并不能填补。其出产供不应求的这一处境紧张制约了我国核酸类药物和衍生物行业的开辟发展。除在医药行业应用外, 核酸类物质在精细化工中也在发挥着其强大的作用, 其在化妆领域内作为化妆品的成分之一, 具有有护肤、防皱等功效。其无毒、无刺激性的外部物理特性在平常人们的生活中有利于人体的健康。

1.5 研究提高核酸酶 P1 酶活的意义

在国内外, 核酸酶 P1 的运用范围极其广泛, 被大量的运用在医药, 化妆, 研究, 分子生物学等各个重要领域之中, 但是在现在的国内外发酵工艺开来, 核酸酶的生产速度还是赶不上需求速度, 所以解决核酸酶 P1 生产中遇到的问题和寻找方法提高核酸酶 P1 的产量酶活成了当下的紧要之急^[13]。寻求桔青霉生产核酸酶 P1 的适宜条件, 研发出低成本高产率的新型发酵条件, 提高所生产的核酸酶的产量, 能够极大的提高核酸酶 P1 产品在市场上的竞争力, 并且能为企业带来巨大的利润和市场效应。在现在这个核酸酶 P1 供不应求的现状来看, 谁能有效的做出符合质量并且酶活高的核酸酶 P1, 谁就会引领这个行业的发展, 使人们的生活更加丰富多彩。

2. 实验材料

2.1 药品

具体药品由下表 1 示。

表 1 本实验药品及其提供厂商

药品	提供厂家
葡萄糖	江苏强盛功能化学股份有限公司
磷酸二氢钾	江苏强盛功能化学股份有限公司
硫酸镁	江苏强盛功能化学股份有限公司
氯化钙	江苏强盛化工有限公司
硫酸锌	国药集团化学试剂有限公司
蔗糖	国药集团化学试剂有限公司
琼脂粉	国药集团化学试剂有限公司
吐温 80	国药集团化学试剂有限公司
醋酸钠	江苏强盛功能化学股份有限公司
钼酸铵	合肥工业大学化学试剂厂
高氯酸	江苏强盛化工有限公司
麸皮	由本实验室提供

2.2 实验仪器

具体仪器厂商由下表 2。

表 2 实验用仪器及其生产厂商

本次实验仪器	提供厂商
电子天平	上海精科天美科学仪器有限公司
无菌操作台	苏州佳宝净化工程设备有限公司
台式酸度计	上海仪电科学仪器股份有限公司
蒸汽灭菌锅	上海中安医疗器械
霉菌培养箱	上海申贤恒温设备厂
MP-160B 型 恒温培养摇床	上海世平实验设备有限公司
水浴锅	上海新苗医疗器械制造有限公司
低温冷冻多管离心机	上海安亭科学仪器厂
紫外可见分光光度计	尤尼柯(上海)仪器有限公司

2.3 实验菌株

菌种 RNAp-209 学院微生物与分离实验室

3. 实验方法

3.1 斜面以及平板的活化

采取 PDA 培养基来培育：土豆 20% ， 葡萄糖 2% ， 琼脂粉 2% ， 天然 pH。

接种操作：用 10ml 移液管吸取样品瓶中的一个菌球，分别均匀点三点菌球于倒好培养基的平板之上，放置于 28℃ 霉菌培养箱中培养 4-5 天。（观察平板上面的菌落的生长情况，在 24h 之后开始出现小白微型菌落，在 4 天的时候点的三点菌落都基本长成了青色菌落，并且生长情况良好，根据情况可以用来接种。）

3.2 种子培养基的配置

研究种子发酵的方法：

种子培养基：碳源葡萄糖 3% ， 牛肉膏粉 0.15%， 磷酸二氢钾 0.15% 、 磷酸氢二钾 0.15% ， 硫酸镁 0.24% ， 氯化钙 0.15% ， pH 6.5

操作方法：从活化好的平板上挖取 1cm² 的菌苔接种于 250ml 的三角瓶中（装液量 40ml）的液体种子培养基中，培养条件为 28℃，摇床转速 250r/min。在摇床中培养 24~26 小时。测定其生长曲线后，在种子液达到生长曲线斜率最高，即是其生长最旺盛的时候接入发酵培养瓶之中，接种量为 10%，进行菌种的培养^[5]。

3.3 产酶基础培养基（质量分数）

具体培养工艺手段：使用蔗糖 1.5%，蛋白胨 0.6%，K₂HPO₄ 0.05%、0.05% KH₂PO₄，硫酸镁 0.04%，氯化钙 0.08%，硫酸锌 0.02%，吐温-80 含量 0.05%，pH 6.5 作为初始培养基。

从液体培养基中移取 3ml 种子液到 250ml 三角瓶中（装液量 30ml）的产酶培养基中，摇床温度设置 28℃，摇床转速 250r/min，摇床培育 72h，测定各发酵瓶的核酸酶 P1 酶活。

根据检测结果数据表示初始发酵工艺能够达到的最大平均酶活为 591.8U/ml.

3.4 研究培养基成分对酶活的影响

3.4.1. 培养基成分对酶活的影响

根据不同碳源对酶活的影响，研究核酸酶 P1 对不同供碳物质的吸收效率和速度。分别选取 1.5%葡萄糖、1.5%果糖、1.5%蔗糖、1.5%淀粉、1.5%麸皮浸出汁（质量体积分

数) 来作为发酵培养基中的碳源, 发酵瓶中保持液体培养基的其他成分不变, 环境一律处于 28 °C 恒温 250r/min 摇床发酵培养约 72 小时, 引用文献^[4]。

氮源对酶活的影响. 氮源分别为 0.6%酵母膏、0.6%硝酸铵、0.6%胰蛋白胨; 培养基其他培养成分参照最初培养基, 外部影响处于稳定不改状态。发酵环境处于 28°C、250r/min 的摇床上面培养 72 小时^[7]。

无机盐与酶活高低之间的关系: 先研究磷盐含量在发酵核酸酶 P1 过程的作用, 各加入 0.05% 磷酸二氢钾和 0.05% 磷酸氢二钾后, 发现磷盐的含量的多少基本对酶活的影响不大, 在高浓度的磷盐和低浓度的并没有提升或者降低酶活的功能, 因此我们在本次实验忽略磷盐含量所能给发酵酶活带来的影响, 统一加入 0.05%的磷盐到发酵瓶中。

与此同时我还针对其他元素对核酸酶 P1 酶活的影响进行了探索研究, 从文献以及其他的资料中查阅了影响桔青霉生产核酸酶 P1 较高的元素的种类, 我最后决定分别选取了 Zn、Mg、Ca 这三种元素来设计不同的含量梯度来做单因子实验。我分别的取了 0.01%、0.02%、0.04%、0.06%以及 0.08%质量体积分数的 Zn、Mg、Ca 来作为本次实验对象。

3.4.2 培养条件对桔青霉酶活的影响

初始 pH 因素: 采用 5.5, 5.8, 6.1, 6.4, 6.7 的 pH; 蔗糖 1.5%, 0.05%的吐温-80, 硫酸锌 0.02%, 氯化钙 0.08%, 硫酸镁 0.04%, 胰蛋白胨 0.6%, 磷盐各 0.05% (质量体积分数)。

针对接种量对酶活的因素, 在碳源氮源保持不变下, 固定基础培养基的各离子成分不变, 对接种量改变为 5%、8%、10%、15%、20%。培养 72 小时后测定摇瓶的发酵酶活^[15]。

3.5 核酸酶 P1 酶活的测定方法

引用文献^[2], 在试管中先加入 1.9ml 的底物溶液 RNA (3%酵母核糖核酸, 煮沸差不多 20 min 后, 调节 pH 到 5.0, 用 pH 为 5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液定容), 将试管置于 68 °C 水浴锅保温 10 min 后, 加入预处理好的发酵液 0.1mL, 继续保温 15 min 后, 置于准备的冰水中冷却, 迅速加入 2.0mL 核酸沉淀剂(0.25% 钼酸铵-2.5% 酸)后, 在准备好的冰水中连续冷却 10 min, 于 3500 r/min 离心 15 min, 取 0.2mL 上清液加双蒸水稀释定容至 50mL。

空白样本: 在试管中加入 1.9 ml 3%RNA 溶液, 在 68 °C 水浴锅保温 25 min, 迅速的加入核酸沉淀剂 2.0 ml, 加入酶液 0.1 ml, 在冰水中冷却 10 分钟后, 将样品加入离心管中, 4°C, 3500r/min, 离心 15min, 取 0.2mL 上清液定容至 50mL, 定容使用实验室准备

的双蒸水。

两个样品完成后，将空白对照与样品在 260nm 的分光光度计下面丈量 OD。在提供的测酶活的情况下，每分钟所产出的核苷酸量在 260nm 光密度为 1.0 时，为一个酶活单位。

$$\text{酶活 (U/ml)} = A \times 4 \times 50 / 0.1 \times 0.2 \times 15$$

A 一指的是在 260nm 处测定的吸光值

4 一指的是反应容易总体积为 4ml

50 一指的是在 50ml 容量瓶定容

0.1 一指的是酶液体积的 0.1ml

0.2 一指的是吸取 0.2ml 离心酶液

15 一指的是反应总时间为 15 分钟

$$\text{相对酶活 (U/ml)} = \frac{\text{发酵后的酶活} - \text{对照菌株酶活}}{\text{对照菌株酶活}} \times 100\%$$

本文所有的酶活测定均为平行样的平均值。

在宏观的上面可以通过生长菌球的大小来估测预计酶活的大小，球越小则说明酶越多，因此本次实验宏观上要求菌球小且菌球多为好。

4. 实验分析

4.1 种子液生长曲线的观测

培养液：葡萄糖 3% ， 蛋白胨 0.15% ， 磷酸二氢钾 0.15%、磷酸氢二钾 0.15%，硫酸镁 0.24%，氯化钙 0.15%，pH6.5。相同的样本 15 个，摇床设置为 28℃、转速是 250r/分钟。

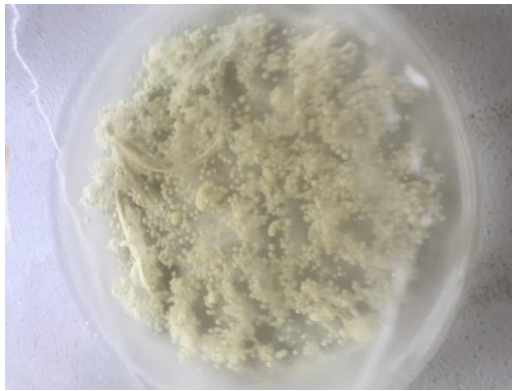


图 3 种子液（培养 24h）

接入菌株后摇床培养，在 0~8h 内菌球数目少；20h~24 小时观测此时的发酵摇瓶菌种形态，数目较多且球小，可以用于接种发酵产酶摇瓶。

4.2 核酸酶 P1 发酵培养基成分对酶活的影响

4.2.1 不同碳源对发酵酶活的影响

根据不同的五种碳源，各取平行样本五瓶，分别加入 1.5%质量体积分数的碳源，测量其在 28℃，250r/min 的摇床上面培养 72h 后，测定酶活数据如下表 4 所示。

表 4 碳源对酶活的影响

碳源	样品 1 (U/ml)	样品 2 (U/ml)	样品 3 (U/ml)	样品 4 (U/ml)	样品 5 (U/ml)	平均值(U/ml)
葡萄糖	720	745	801	808	752	765
蔗糖	852	750	921	822	798	828.6
淀粉	604	628	547	609	643	606.2
麸皮汁	802	728	889	804	748	794.2
果糖	678	714	688	659	520	651.8

根据图标给出来的示意，可以看出在这些碳源的影响下，酶活也千差万别，从图

看来在相同的质量分数下，各个碳源的浓度对酶活的影响最高的为蔗糖，能够得到试验中居高酶活样品。大部分的微生物操纵糖类作为其出产的碳源养分，本试验的桔青霉是吸收有机碳类的微生物，为异养型微生物。

4.2.2 氮源浓度对发酵酶活的影响

推测氮源的选择对发酵酶活的关系，选取三种氮源保持含量都为 0.6%（质量体积分数）。保持碳源的不变，使用 1.6% 的蔗糖。发酵产酶培养基相同，各氮源因素配制平行样本五瓶，其在 28℃，250r/min 的摇床上面培养 72h 后，测定最终酶活数据如下表 5 所示。

表 5 不同氮源对发酵酶活的影响

氮源	1	2	3	4	5	平均值(U/ml)
酵母膏	836	750	630	560	765	708.2
硝酸铵	200	150	90	153	196	157.8
胰蛋白胨	850	799	904	806	769	825.6

由图分析出来平均值最高酶活的氮源是胰蛋白胨作为氮源，在实验室里面酵母膏其作为普遍的氮源也能够成功的作为发酵的不二选择。微生物普遍的使用铵盐作为其的生长因子，而本实验的铵盐作为氮源却使得酶活很低，原因是异养型的桔青霉菌它如果氮源使用的是有机氮，那么它将比无机氮更能够快速的吸收，酵母膏和胰蛋白胨都属于有机氮源，而硝酸铵属于无机盐，因此桔青霉发酵产酶使用硝酸铵作为氮源在这里是为效果最差^[15]。我们选择 1.6% 含量胰蛋白胨的摇瓶作为验证培养基的成份。

4.2.3 金属离子含量对于发酵酶活的影响

根据不同的三种金属离子，各取平行样本五瓶，测量其在 28℃，250r/min 的摇床上面培养 72h 后，测定酶活数据各如下表 6，7，8 所示。

表 6 Mg²⁺对发酵酶活的影响

Mg 质量分数	1(U/ml)	2(U/ml)	3(U/ml)	4(U/ml)	5(U/ml)	平均值(U/ml)
0.01%	956	961	899	960	1001	955.4
0.02%	825	864	851	901	921	872.4
0.04%	805	799	806	756	750	783.2
0.06%	760	753	749	695	763	744
0.08%	563	536	498	354	362	462.6

表 7 Zn²⁺浓度对发酵酶活的影响

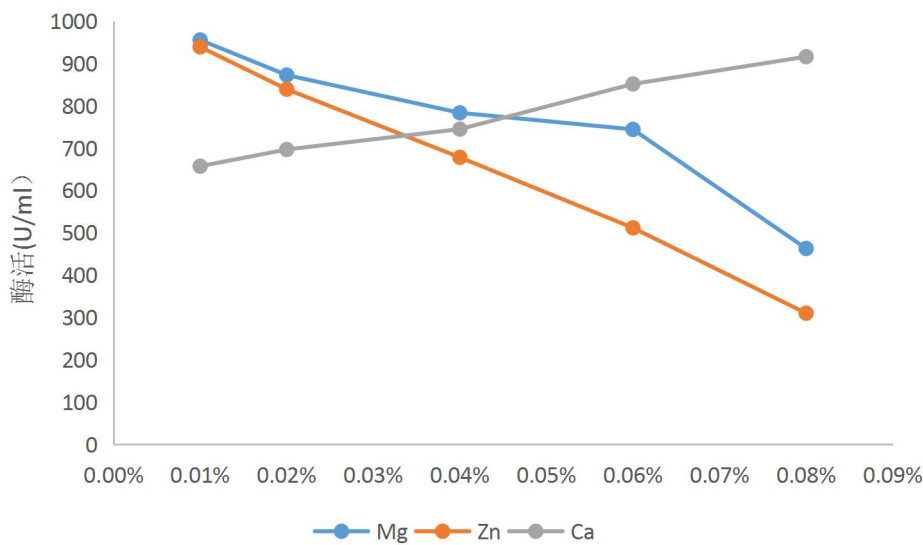
Zn 质量分数	1	2	3	4	5	平均值
	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)
0.01%	973	963	869	954	936	939
0.02%	836	834	824	864	837	839
0.04%	765	692	683	615	635	678
0.06%	462	438	534	562	561	511.4
0.08%	230	233	354	345	387	309.8

表 8 Ca²⁺浓度对于发酵酶活的影响

Ca 质量分数	1	2	3	4	5	平均值
	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)
0.01%	650	645	638	698	654	657
0.02%	698	706	718	756	605	696.6
0.04%	758	769	698	786	712	744.6
0.06%	867	835	864	896	795	851.4
0.08%	903	925	967	860	934	917.8

根据这三种的金属离子平均值来做折线图，如下图所示：

表 9 Mg²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺浓度对酶活影响折线图



从表九折线图可以看出 Mg、Zn 两种金属离子和发酵酶活成反比关系，但如果培养基之中无这两种盐，酶活反而会降低，因此在培养基中添加少量的这两种金属盐后，可以有效地提高摇瓶的最终发酵酶活；而 Ca²⁺ 离子的浓度与产核酸酶 P1 的酶活呈正比关系，随着 Ca 离子含量的提高，最终的测定酶活随着提升较高，在 0.08% 质量体积分数的时候能够使得发酵酶活达到这个梯度里面的最高^[15]。

4.3 外部培养条件对发酵酶活的影响

4.3.1 初始 pH 对酶活的影响

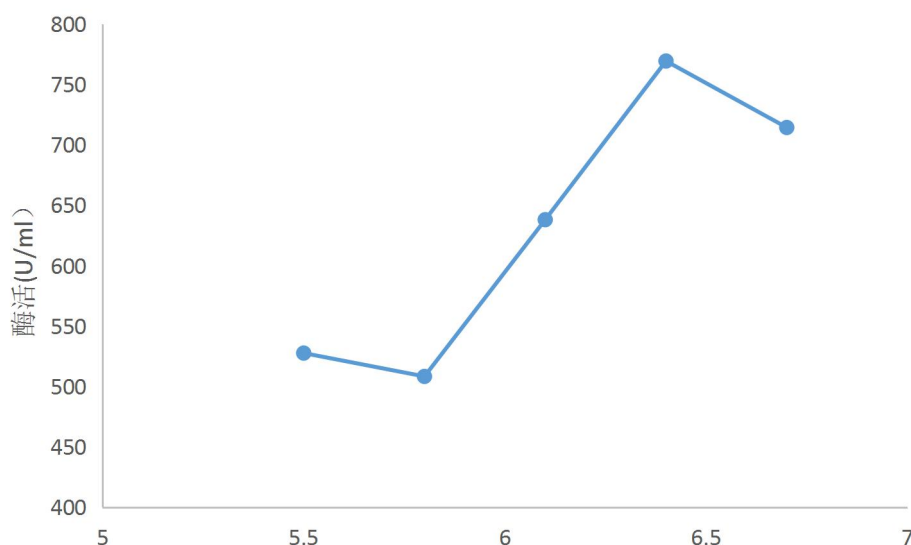
选取 pH: 5.5、5.8、6.1、6.4、6.7, 在接种种子液后的 72 小时后依照酶活测定方式测出各发酵瓶酶活, 成果如表 10 所示。

表 10 初始 pH 对发酵酶活的影响

序号	1(U/ml)	2(U/ml)	3(U/ml)	平均值(U/ml)
pH				
5.5	506	423	654	527.6
5.8	538	572	415	508.3
6.1	654	562	698	638
6.4	751	851	706	769.3
6.7	801	710	632	714.3

取平均值做曲线图, 如表 11 所示,

表 11 不同初始 pH 发酵酶活曲线



从表十一的折线图可以看出结果, 上面显示起始 pH 值为 6.4 时, 发酵酶活是顶峰, 并且 pH 值为 5.7 为液体培养基的自然 pH 值, 因此配制后的培养基 pH 需加入氢氧化钠等溶液提高溶液的初始 pH 到 6.4 左右, 这里使用的稀释后的百分之二十的氢氧化钠来调 pH, 可以达到一个较高的酶活。液体发酵培养基中主要的成分为碳氮源, 所以发酵的过程中 pH 逐渐的降低, 因此这里的 pH 仅指摇瓶的发酵初始酶活, 最终发酵 pH 会比初始发酵低^[1]。据图推测酶活在初始 pH6.4 左右, 摇瓶的最终发酵酶活最高, 因此在下面的发酵验证里面

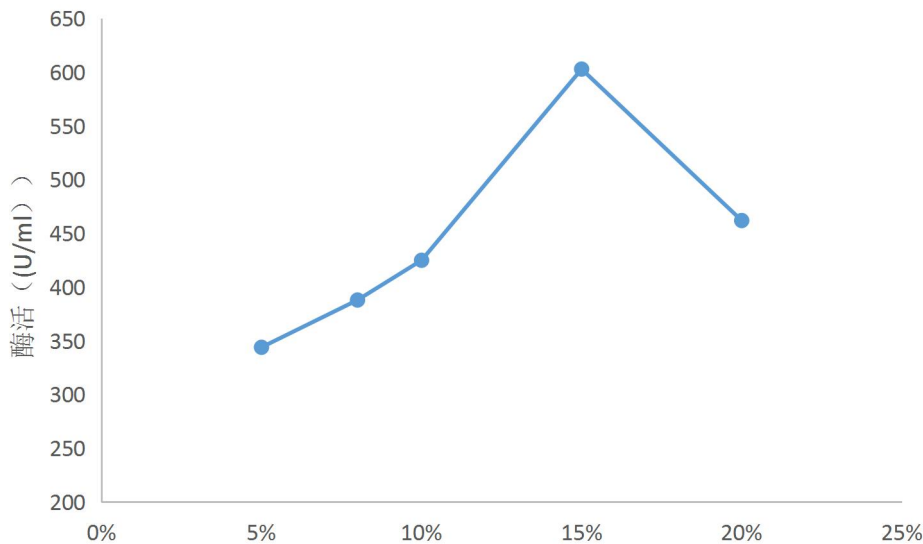
我们选取初始 pH6.4。

4.3.2 接种量对发酵酶活的影响

计划的 5%、8%、10%、15%、20% 三种分歧的接种量，接入发酵瓶中后，放入 28℃、250r/min 摇床举行 72 小时的发酵培育。（平行样 3 各）如下图表 12 所示

表 12 不同发酵量对发酵酶活的影响

	平行样 1(U/ml)	平行样 2(U/ml)	平行样 3(U/ml)	平均值(U/ml)
接种量				
5%	346	361	325	344
8%	401	368	397	388
10%	406	415	456	425
15%	602	576	633	603
20%	465	533	388	462



分析：从表 12 可以看出，接种量对摇瓶最终的发酵酶活有不可忽视的影响，当接种量很少的时候，酶活不会很高，并且菌球大且数量少，菌丝球生长速度缓慢，发酵周期变长，产酶的量会大大减少；随着接种量的提升，发酵最终酶活渐渐变高，在 15% 左右的接种量达到顶峰；随后继续加大接种量的数值，酶活开始降低，其原因是接种的种子液变多导致溶液菌体变多，这样会缩短产酶速率高峰的到来的时间，但是因为营养被大量的桔青霉消耗殆尽，导致发酵周期内营养被过早的消耗完引起发酵酶活的降低^[3]。因此在下面的发酵验证里面选取 15% 的种子液来接种。

4.4 发酵工艺研究

根据前面的培养基成分及外部条件来确定新的发酵流程

种子培养基：葡萄糖 3% ，蛋白胨 0.15% ，磷酸二氢钾 0.15% 、磷酸氢二钾

0.15% ， 硫酸镁 0.24% ， 氯化钙 0.15% ， pH 6.5。种子培养基中的桔青霉在 24h 的时候能够达到最大生长速率，在摇瓶培养 24h 的时候接入菌种到发酵产酶培养基中，根据接种量对其最终发酵酶活的影响，以上数据现实 15%的接种量可以达到较高的酶活，验证实验选取 15%作为接种量。

发酵的培养基： 1.5% 蔗糖， 0.6% 胰蛋白胨，各 0.05%磷盐，0.01%硫酸锌， 0.01% 硫酸镁，0.08%氯化钙，0.05%的吐温-80，pH6.4。接完种之后将摇瓶放入设置 28℃的摇床，250r/min 转速培养 72h。我测定完所有的数据后，列出了下表以所示。（5 个对照样品）

发酵的原先工艺图如下图 3，图 4 所示

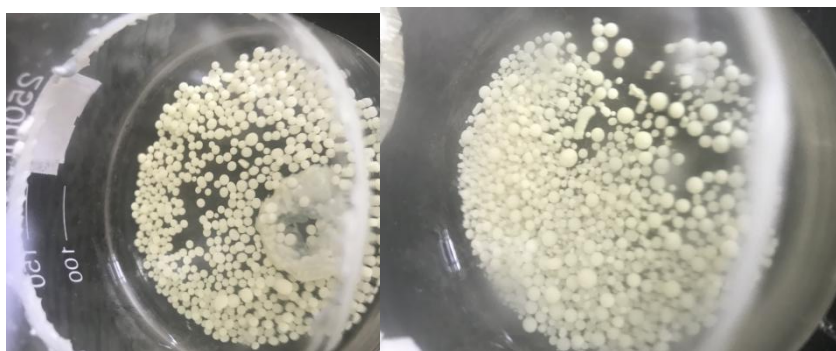


图 3 旧工艺发酵摇瓶

图 4 研究工艺发酵摇瓶

表 13 原发酵流程与新发酵的酶活对比

样品编号	原样发酵酶活(U/ml)	平均(U/ml)	新工艺发酵酶活(U/ml)	平均值(U/ml)	相对酶活 (%)
1	530		665		
2	625		769		
3	760	591.8	788	729	123.1
4	625		665		
5	419		762		

从表 13 中最终结果显示，以产核酸酶 P1 菌桔青霉 RNAp-209 作为实验菌株菌株，在经过多方面单因素的实验中，得到的新发酵工艺条件，经发酵实验验证，新的核酸酶 P1 酶活最高能提高到 788 U/mL，总均值相较原始发酵环境提高了 23.1% ，这表明了试验所探究的发酵工艺对酶活的提升有实在的作用，显示了新的发酵环境较原先的发酵环境提高了发酵酶活的数值。

5. 分析总结

实验取实验室提供的桔青霉菌种作为实验菌种，在完成菌种活化之后，进行种子液培养，之后进行摇瓶的发酵。在原先的发酵内外条件基础以及发酵工艺上面做出不同因素的修改，以来探究实验室桔青霉的初步适合的生产工艺手段，通过单因子多样本的多次实验，误差大大减少。得出来如下发酵工艺：种子液使用 PDA 培养基进行活化培养，培养时间为 4~5 天。挖取 1cm³ 的菌苔进入种子培养液，种子培养液成分为葡萄糖 3%，蛋白胨 0.15%，磷酸二氢钾 0.15%、磷酸氢二钾 0.15%，硫酸镁 0.24%，氯化钙 0.15%，pH6.5。在 28℃，250r/min 的摇床里面培养 24h 时达到接种需要的最高菌株浓度，可以作为发酵培养的种子液。使用 1.5%蔗糖是碳源，倒入胰蛋白胨粉含量 0.6%，摇瓶 0.05% 磷盐；0.01%硫酸锌，0.01%硫酸镁，0.08%氯化钙的金属离子，0.05%含量的吐温-80（皆为质量体积分数），pH 6.4 的条件来发酵产酶。接种量为接入发酵摇瓶的 15%的种子液，接完种之后将摇瓶放入 28℃，250r/min 的摇床中培养，在 72h 的时候达到酶的最高产峰。探索出来的新发酵条件较之前的发酵条件，能够提升发酵的核酸酶 P1 酶活，为更高效的生产核酸酶 P1 提供了新的途径。

6. 引用文献

- [1] 南京医学院.生物化学, 北京: 人民卫生出版社, 1979, 128
- [2] 徐正军, 肖林平, 吕洁等. 实验设计法优化核酸酶 P1 的发酵培养基[J].过程工程学报,2003,3(5): 433-437
- [3] 大连轻工业学院.生物化学, 北京: 轻工业出版社, 1980, 201-208
- [4] 李科德, 韩木兰, 柏建玲, 等. 5' -磷酸二酯酶高产菌株的选育和发酵培养条件的优化 [J] . 微生物学杂志, 2001, 21(3): 28—33
- [5] 梁剑光, 黄鹏, 徐正军. 桔青霉发酵法生产核酸酶 P1 工艺条件及影响因素 [J] . 中国酿造, 2007, 11:27—30.
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广武.微生物学实验 [M] .北京:高等教育出版社, 2000. 214~ 215
- [7] 娄永江, 吴汉民, 王海洪.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(3): 21~ 28
- [8] 山根恒夫. 生化反应工程 [M] . 西安:西北大学出版社, 1991. 222~ 223.
- [9] 庆辉, 马兴胜, 袁艳玲, 等 磷酸二酯酶的提取 [J] . 酿酒, 2004, 31(1): 88- 90
- [10] 邓义熹, 赵劫, 张亚雄, 等. 麦芽根提取 5'-磷酸二酯酶对 RNA 酶解工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010 (1) : 207- 209.
- [11] 陈珊珊, 曹剑红. Zn²⁺对 5'-磷酸二酯酶活性的影响[J]. 福建医药杂志, 1994, 16(3): 49
- [12] 娄永江, 吴汉民, 王海洪. 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, 20(3): 21-27
- [13] 夏黎明. 固定化桔青霉产生核酸酶 P1 的研究 [J] . 微生物学报, 1998, 28(6): 449-453
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 吴永宏. 酶法水解 DNA 制备 5'-脱氧核苷酸的研究 [D] . 南京工业大学, 2005.
- [18] 吕浩, 应汉杰. 核酸酶 P1 的纯化和酶学性质研究 [J] . 南京工业大学, 2004, 24(6): 66- 99
- [19] 廖红东, 莫晓燕, 宋威. 核酸酶 P1 的分离纯化及部分酶学性质研究[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(9): 536-538