

# 固定化5'-磷酸二酯酶及其在核苷酸生产中的应用

宋荣钊 王春林 梁锋

(中国科学院广州化学研究所)

**摘要** 钛氯活化纤维素固定5'-磷酸二酯酶,使酶活回收率达到70%以上。用这种固定化酶在75℃、pH5.2的条件下降解0.5%浓度的酵母核酸(RNA),用酶量可减少到1.75u/ml底物,酶活利用率可提高6倍以上。核酸降解率可达70%以上。

**关键词** 钛氯纤维素;5'-磷酸二酯酶;固定化;核苷酸

5'-磷酸二酯酶是核苷酸工业生产中应用最普遍的一种酶。由于该酶产生菌的培养、发酵及酶的提取、纯化、保存和应用都存在一些困难,近年来有关该酶的固定化研究较多<sup>[1-5]</sup>。但因固定化后酶的活力回收率都在28%以下<sup>[4,5]</sup>,而且载体成本较高,至今未能获得工业应用。Kyuji等人通过多种方法的选择,指出最有效的方法是钛氯纤维素络合物固定化纯酶,可使酶的相对活力回收率提高到83%<sup>[4]</sup>。但它对未经纯化的粗酶的固定化效果却极低。我们在前人的研究基础上,应用钛氯(TiCl<sub>4</sub>或TiCl<sub>3</sub>)活化剂使纤维素基质活化成具有固酶功能的载体,成功地固定了发酵后未经纯化的5'-磷酸二酯酶原酶,使其活力回收达70%以上。并且这种方法简单易行,载体成本低廉,用于降解酵母

RNA,其核苷酸转化率可达70%以上,符合产业标准。

## 材料与amp;方法

### (一) 原料和试剂

1. 5'-磷酸二酯酶溶液:经深层发酵的桔青霉(*Penicillium citrinum*)原酶液,活力为250—300u/ml。
2. 纤维素:漂白甘蔗渣浆粕,扣解度25—30°SR。
3. 核糖核酸:含纯RNA70—80%的酵母核酸。以上三种材料均由广东江门甘蔗化工厂提供。
4. 钛氯及其他试剂均为化学纯。

### (二) 分析方法

1. 酶的活力测定：采用紫外分光光度法。

2. 核苷酸转化率的测定：采用过碘酸氧化定磷法。

### (三) 固定化 5'-磷酸二酯酶的制备

在 150 升容量的不锈钢桶内加 60 升无离子水,再加入预先配制好的浓度为 5% 的  $TiCl_4$  溶液 2 升。搅拌均匀后,用直接蒸汽加热到 65—70℃。加入 20 公斤含水 85% 左右的经漂白、脱氯、洗涤、滤干的甘蔗渣散浆(含干纤维约 3 公斤),保温在 65℃ 左右活化反应 90 分钟。滤出纤维,用无离子水洗至 pH6 左右,再用 0.02mol/L, pH4.5 的 NaAc-HAc 缓冲液(68 克结晶 NaAc 加 50ml 36% 的 HAc 液和 70 升无离子水配制)浸泡使 pH 值稳定在 4.5,滤干,即为钛氯活化纤维素(此功能纤维素保持现有湿度和 pH 值,存放半年之内其固酶效果不减)。将上述制得的钛氯纤维素投入到 85 升酶液中(活力为 250—300u/ml),搅拌均匀后,置于 10—15℃ 下挂酶 16 小时以上,即得固定化酶。

## 结果与讨论

### (一) 固定化 5'-磷酸二酯酶的性质

1. 溶液酶用量对固定化酶活力的影响：在相对稳定其他固酶条件(温度、pH 值、时间)下,加入不同用量的溶液酶,挂酶后测定其固定化酶的活力。从图 1 可知,随着溶液酶用量的

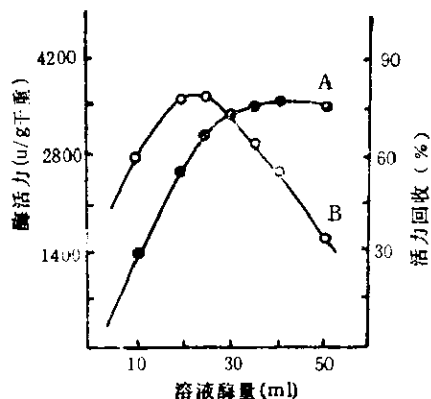


图 1 溶液酶用量对固定化酶活力的影响  
A: 酶活力, B: 活力回收

增加,固定化酶的活力也增加。当酶用量超过 30ml,活力增加不明显,活力回收率反而下降。因此,每克干重活化纤维素用 30ml 溶液酶较为适合。

2. 酶活力与 pH 值的关系: 酶对 pH 较为敏感,各种不同的酶都有其最适合的 pH 范围。5'-磷酸二酯酶在不同的 pH 缓冲液(用不同量的 0.1mol/L 柠檬酸和 0.2mol/L 磷酸氢二钠配制)中酶对 pH 值的适应关系表明(图 2),其相对活力在固定化前后大致相近。溶液酶的最适 pH 为 4.8,而固定化酶为 5.2。

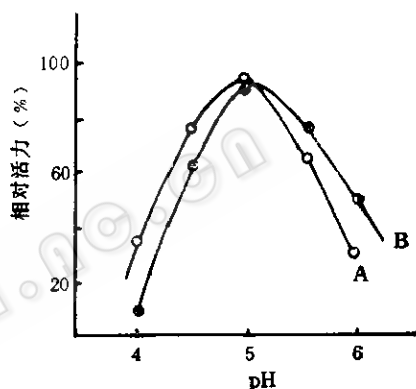


图 2 酶的相对活力与 pH 的关系

A: 溶液酶, B: 固定化酶

实验条件: 67℃,底物(RNA)浓度 2%,反应 15 分钟

3. 酶活力与温度的关系: 在不同温度下测定溶液酶和固定化酶的活力。图 3 表明,溶液酶的最适温度为 75℃,而固定化酶为 82℃。

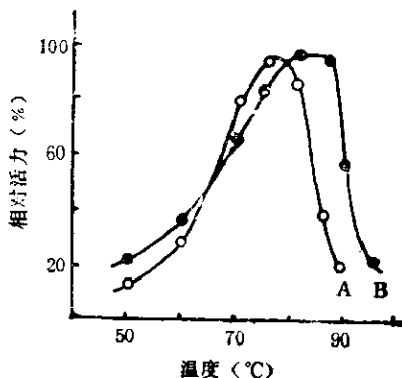


图 3 酶的相对活力与温度关系

A: 溶液酶, B: 固定化酶

实验条件: pH5.1,底物(RNA)浓度 2%,反应 15 分钟

4. 酶在反应时的热稳定性: 将固定化酶按 30u/ml 底物, 溶液酶按 200u/ml 底物, 在 pH 为 5.2 而不同温度下降解 0.5% 浓度的 RNA, 在不同时间里酶的失活速率可用下式表证:  $\log A = -K \cdot t$ , (式中 A: 剩余活力; K: 失活速率; t: 反应时间)。从图 4 看出, 无论是固定化酶还是溶液酶, 在反应中酶的热失活百分比是相同的。即酶活力变化与时间关系符合一级反应。酶失活的速率 K 值随温度的升高而增大, 是较典型的热失活。同时也显示出固定化酶比溶液酶的热稳定性有所提高。

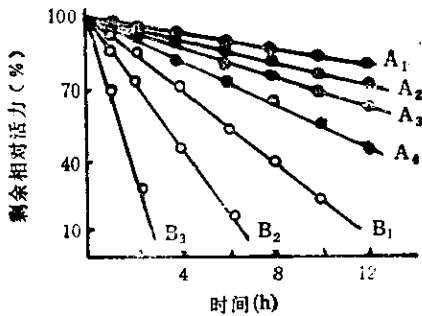


图 4 酶在反应中的热稳定性

A: 固定化酶(A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, 分别为 55, 60, 65, 75°C)  
B: 溶液酶(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, 分别为 55, 65, 75°C)

5. 酶活力保存稳定性: 将固定化酶(浸泡在挂酶后的残渣中)和溶液酶同时密封保存在 pH4.5, 0—4°C 条件下, 每隔 1 月测定一次活力。结果表明固定化酶的冷存稳定性比溶液酶更好。2 个月内无明显失活, 存放一年仍保持 60% 以上的活力。稳定性提高的原因可能是酶经固定化后, 酶蛋白中的赖氨酸 ε-氨基得到保护, 从而难以引起所谓蛋白自溶作用<sup>[4]</sup>。酶经固定化后其活力稳定性的差异, 是与酶和载体的种类及固定化方法有关。

(二) 生产应用试验

1. 应用固定化酶降解核酸: 核酸经 5'-磷酸二酯酶降解后生成四种核苷酸: 腺苷酸(AMP)、鸟苷酸(GMP)、胞苷酸(CMP)、尿苷酸(UMP)。根据工艺要求, 核苷酸的总转化率要在 70% 以上。我们在原用溶液酶降解核酸的工艺条件下, 适当改变反应参数, 启用固定化酶降解生产, 结果表明, 用固定化酶降解 RNA 时,

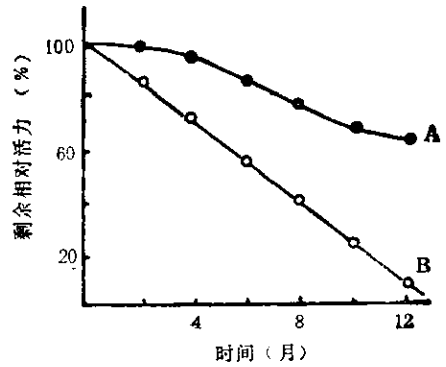


图 5 酶的贮存稳定性

A: 固定化酶, B: 溶液酶

降解率均能达到要求(表 1)。

表 1 固定化酶降解核酸

批号	RNA 用量 (kg/批)	RNA 浓度 (g/L)	固定化酶用量 (干纤维 kg/批)	降解率 (%)
402	11.21	5.34	1.5	70.3
403	11.20	5.35	1.5	73.2
404	11.03	5.26	1.5	84.3
405	11.30	5.25	1.5	74.5
406	10.04	5.38	1.5	72.5
407	11.50	5.26	1.5	75.0
408	11.05	5.37	1.5	75.1
409	11.39	5.00	1.5	70.3
410	11.26	5.36	1.5	73.7
411	11.10	5.29	1.5	77.2
平均	11.11	5.29	1.5	74.6

(降解条件: pH = 5.1—5.2, 75—78°C、反应 2 小时)

2. 固定化酶与溶液酶降解核酸的效果比较: 将固定化酶与溶液酶降解核酸时的用酶量、降解率及产品产量作比较, 结果见表 2 表 3。

结果表明固定化酶的平均降解率为 74.6%, 而溶液酶为 71.6%; 产品收得率(除 UMP)从 42.06% 提高到 43.13%; 用酶量由溶液酶的 20—30u/ml 底物减少到 1.5—2.0u/ml 底物。

结果表明使用固定化酶降解时, 产品产量和质量均有所提高。

综上所述, 以甘蔗渣纤维浆粕作基质, 通过钛氯活化固酶载体, 用于固定化 5'-磷酸二酯酶粗酶, 工艺路线简单可行, 载体成本低廉, 酶

表2 固定化酶与溶液酶降解核酸降解率比较

酶	批数	降解率 (%)	投酶量 (u/ml 底物)	耗溶液酶量 (l/批)	酶液利用率 (倍)	降解时间 (h)	产品总收率 (除 UMP)(%)
溶液酶	69	71.6	20—30	200	1	1.5	42.06
固定化酶	22	74.6	1.5—2.0	31	6.56	2.0	43.13

表3 固定化酶与溶液酶降解核酸的产量及质量比较

酶	加 RNA 量 (kg/批)	总收率 (除 UMP) (%)	总产量(除 UMP) (kg)				质量(纯含量) (%)			
			总量	AMP	GMP	CMP	总量	AMP	GMP	CMP
溶液酶 (69 批平均)	11.55	42.10	4.711	1.440	2.280	1.095	95.84	97.40	95.42	94.69
固定化酶 (22 批平均)	11.26	45.01	5.065	1.495	2.423	1.152	96.83	96.45	97.34	96.69

活力回收率可达 70% 以上。酶活力利用率提高 6 倍以上,核酸降解率达 70% 以上。载体制备用的原材料和化工原料都立足国内,反应过程无三废污染,有利于工业应用。

## 参 考 文 献

1. 千畑一郎编: 固定化酵素, 株式会社讲谈社, 东京, 1975。

2. Messing et al.: USP, 4149937, 1979.  
 5. Chibata et al.: USP, 4138292, 1979.  
 4. Rokugawa K et al.: *Ferment. Technol.*, 58(6):583, 1980.  
 5. 袁中一等: 科学通报, 14: 564, 1980.  
 6. 梁锋等: 工业微生物, 2: 1, 1985。