

固定化原生质体生产葡萄糖氧化酶*

刁惠敏 彭志英 郭勇

(华南理工大学生物工程研究所, 广州)

摘要 用溶壁酶处理对数生长前期的黑曲霉 GP 024 细胞, 分离得到原生质体, 再用光交联树脂包埋制备固定化原生质体, 用于生产葡萄糖氧化酶。其胞外葡萄糖氧化酶的比产率几乎达到相应的游离细胞生产的胞内和胞外全部葡萄糖氧化酶的比产率。用光交联树脂制备的固定化黑曲霉细胞的产酶特性与游离细胞相似, 而用溶壁酶处理过的固定化细胞的产酶特性与固定化原生质体相似。

关键词 固定化原生质体; 葡萄糖氧化酶; 黑曲霉 GP024

葡萄糖氧化酶 [EC. 1.2.3.4] 在食品保鲜、葡萄糖酸生产及金属防腐等方面有着重要用途。尤其是用葡萄糖氧化酶制成的酶电极、酶试纸, 在葡萄糖的检测、糖尿病的诊断等方面起重要作用^[1,2]。国内外对该酶的应用日趋广泛。

葡萄糖氧化酶是一种胞内酶。该酶的生产一直沿用传统的提取方法, 工艺较繁杂, 产量和质量都难以满足需要。1982 年日本 Ishimori 等人报道^[3], 在低功率(15W)的超声波作用下, 黑曲霉细胞不被破坏, 但胞内的葡萄糖氧化酶可不断地分泌到发酵液中, 表明该酶的分泌与细胞外层结构有密切关系。为了探讨葡萄糖氧化酶生产的新途径, 我们用固定化原生质体技术, 进行了葡萄糖氧化酶的生产与分泌规律的研究。

固定化原生质体是最近几年才发展起来的一种新型固定化技术。由于去除了细胞壁的障碍, 此技术对胞内酶及一些生命大分子物质的生产非常有利, 因而逐步得到广泛的应用^[4]。1985 年 I. Karube 用固定化黄色短杆菌原生质体生产 L-谷氨酸^[5], R. Kome 用固定化麦角菌原生质体生产麦角碱都已取得一定的成效。1986 年本所张毅等用固定化原生质体生产碱性磷酸酯酶的研究亦取得了可喜的进展^[6]。本文对采用此技术生产葡萄糖氧化酶作初步的研究报道。

材料与方法

(一) 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) GP 024, 广东制药厂提供。

(二) 培养基

1. 固体斜面培养基(%) : 蔗糖 5, 蛋白胨 1.5, CaCO_3 1.0, 琼脂 2。

2. 液体种子培养基(%) : 蔗糖 4, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, CaCO_3 0.2, NaNO_3 1.2, 蛋白胨 0.05。

3. 发酵产酶培养基(%) : 蔗糖 6, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 0.5, NaNO_3 1.0, 蛋白胨 0.05, NaCl 0.3mol/L。

各培养基均为自然 pH。

(三) 原生质体制备

黑曲霉活化细胞接种于液体种子培养基中, 30℃ 振荡培养; 过滤收集对数生长前期的细胞。取 1 克细胞于高渗溶液 (1.0mol/L NaCl 溶液), 加入一定量的溶壁酶, 于 32℃ 作用 6 小时, 经离心分离制成原生质体悬浮液。

(四) 细胞与原生质体固定化

取 6 克光交联树脂预聚体(华南理工大学高分子系研制), 用蒸馏水溶解至 15ml, 加入 60 毫克安息香乙醚和细胞悬浮液(1 克细胞配成 5

* 国家自然科学基金资助项目。

ml 悬浮液)或原生质体悬浮液(1 克细胞制成的原生质体溶于 5ml 高渗溶液中),混合均匀后,摊成薄片(厚度约 0.8mm)。经紫外线照射 2 分钟,聚合后切成 5 × 5mm 小块,即制得 20 克固定化细胞或固定化原生质体。

(五) 产酶试验

取 20 克固定化原生质体、1 克游离细胞、20 克固定化细胞分别接入 50ml 产酶培养基中,30℃ 振荡培养,定时取样测定酶活。

(六) 葡萄糖氧化酶活力测定^[1]

取 250ml 三角瓶,加入 2% 葡萄糖磷酸缓冲液 (0.06mol/L、pH5.6) 25ml,加入样品酶液 2.5ml,于 30℃ 反应 1 小时,然后加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 20ml,用 0.1 mol/L HCl 滴定剩余的 NaOH,记录所消耗的 HCl 毫升数(A);对照样系在加酶之前先加入 20ml 0.1 mol/L NaOH 溶液,其他操作相同,记录所消耗的 HCl 毫升数(B)。在上述实验条件下,每分钟催化 1 微摩尔葡萄糖氧化生成葡萄糖酸的酶量定义为 1 个酶活力单位。

每毫升样品酶活力 (u) = (B - A)

× N × f ÷ 60 ÷ 2.5 × 1000

N: HCl 浓度 (mol/L),

f: 酶液稀释倍数

(七) 细胞内葡萄糖氧化酶测定

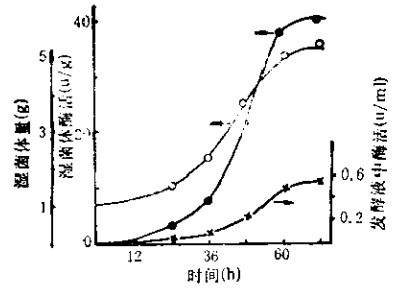
称取一定量湿菌丝体,磨碎,加入 10ml 蒸馏水。取 2.5ml 测酶活力,然后计算每克细胞内酶活力。

结果与讨论

(一) 游离细胞产酶特性

黑曲霉 GP024 在培养过程中,随着细胞的生长,开始生成葡萄糖氧化酶。从图 1 看到,葡萄糖氧化酶的生成属于生长偶联型。在对数生长期(24—36 小时),细胞内大量生成葡萄糖氧化酶。但在 48 小时内,几乎不渗出细胞外;达到平衡期后,有 10% 的酶分泌到发酵液中。游离细胞的产酶速率可用下式表示:

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_t = \left(\frac{dE}{dt}\right)_i + \left(\frac{dE}{dt}\right)_o$$



●——菌丝体内酶活 ×——发酵液中酶活
○——湿菌体重量

图 1 游离细胞产酶曲线

$$= \alpha \cdot \mu \cdot X_t = \varepsilon_f \cdot X_t$$

其中:

$\left(\frac{dE}{dt}\right)_i$: 胞内酶生产速率 (u/g 细胞 · h)

$\left(\frac{dE}{dt}\right)_o$: 胞外酶生产速率 (u/g 细胞 · h)

α : 细胞产酶系数 (u/g 细胞)

μ : 细胞比生长速率 (1/h)

X_t : 细胞量 (g)

根据实验结果,游离细胞比产酶速率为:

$$\varepsilon_f = \left(\frac{dE}{dt}\right)_i \cdot \frac{1}{X_t}$$

$$= 1.45 \text{ u/g 细胞} \cdot \text{h}$$

(二) 固定化原生质体产酶特性

从固定化原生质体的产酶曲线(图 2)中看到,固定化原生质体由于解除了细胞壁的扩散作用,使在细胞内合成的葡萄糖氧化酶可以源源不断地分泌到胞外,其产胞外酶速率方程

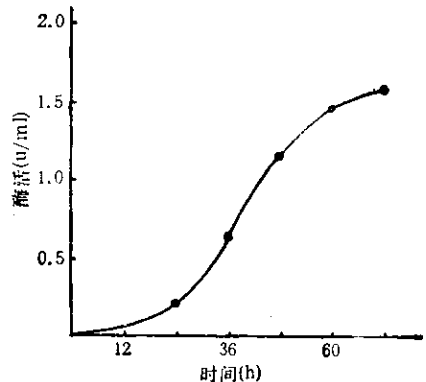


图 2 固定化原生质体产酶曲线

可表达如下:

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_t = \varepsilon_f \cdot X_f$$

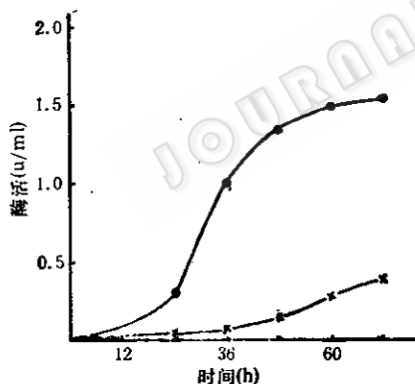
其中: X_f : 固定化原生质体重量(g) 根据实验结果, 计算得到固定化原生质体的比产酶速率:

$$\begin{aligned} \varepsilon_f &= \left(\frac{dE}{dt}\right)_t \cdot \frac{1}{X_f} \\ &= 1.33 \text{ u/20g 固定化原生质体} \cdot \text{h} \end{aligned}$$

由于1克细胞可得到20克固定化原生质体(见材料与方法), 因此固定化原生质体生产胞外酶的比产酶速率几乎达到游离细胞生产胞内胞外全部酶的比产酶速率, 它生成的葡萄糖氧化酶几乎全分泌到了发酵液中。

(三) 固定化细胞产酶

从图3可以看到, 固定化细胞的产酶特性与游离细胞相似; 经溶壁酶处理后, 包埋在光交联树脂内的细胞变成了原生质体(图4A、B), 其产酶特性与固定化原生质体相似。这一结果进一步证明细胞壁阻碍了葡萄糖氧化酶的分泌。



×——固定化细胞 ●——经溶壁酶处理的固定化细胞

图3 固定化细胞产酶曲线

(四) 固定化原生质体稳定性

固定化原生质体置于高渗溶液中, 经过20天的低温(4℃)保藏后, 产酶能力暂时受到抑制, 经过一段时间适应后, 可恢复原有的发酵水平, 具有较高稳定性(图5)。

上述结果表明, 固定化原生质体技术是生产葡萄糖氧化酶的有效途径。关于其机理和半连续性、连续性生产等问题尚在研究中。

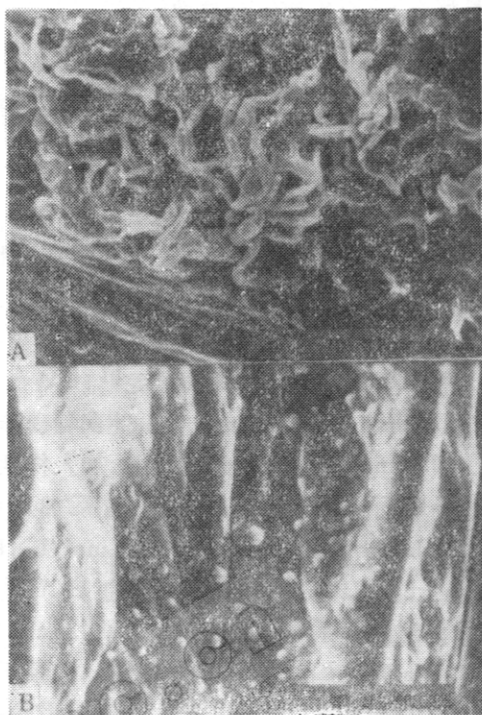
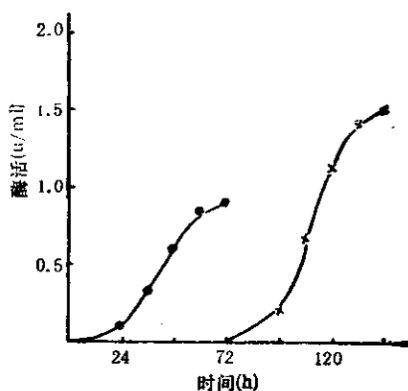


图4 溶壁酶处理前后的固定化细胞

A. 固定化细胞, 细胞呈菌丝状(扫描电镜 750×)
B. 经1.0%溶壁酶处理6小时的固定化细胞, 细胞由菌丝体变成球状体(扫描电镜1000×)



●——第一批发酵 ×——第二批发酵

图5 产酶能力恢复情况

参考文献

1. 张树政主编: 酶制剂工业, 科学出版社, 北京, P. 671—692, 1984.
2. 布林顿·麦·米勒、沃伦·科茨基: 工业微生物学, 轻工业出版社, 北京, p185—187, 1986.
3. Yoshio Ishimori et al.: *Enzyme Microb. Technol.* 4(3):85—88, 1982.
4. 郭勇: 广东生化通讯, 5(1,2): 16—18, 1988.
5. Isao Karube et al.: *Appl. Microb. Biotech.*, 21:270—272, 1985.
6. 张毅等: 广东生化通讯, 6(3,4): 95—97, 1990.