

文章编号 :1009-038X(2002)05-0472-05

# 米曲霉腺苷酸脱氨酶的产酶条件

段作营, 刘军昌, 毛忠贵

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**通过实验获得了米曲霉 3.800 固态发酵产腺苷酸(AMP)脱氨酶的适宜培养基,麸皮为主要原料,成分质量分数为蔗糖 2%,鱼粉 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%,吐温-80 0.1%,含水量 50%。最佳的培养条件为 250 mL 的三角瓶装 20 g 培养基,在 28~30 °C 培养 60 h。发酵结束称取一定量的麸曲加 10 倍质量的蒸馏水,调节 pH 6.0,在 35 °C 条件振荡水浴 2 h。酶的浸提液经盐析、透析、DEAE 柱层析分离后,可收集到较单一的活性峰酶。

**关键词:**AMP 脱氨酶;米曲霉;固态发酵;浸提

中图分类号:Q 815

文献标识码:A

## Conditions of Preparing AMP Deaminase from *Aspergillus oryzae*

DUAN Zuo-ying, LIU Jun-chang, MAO Zhong-gui

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** *Aspergillus oryzae* 3.800 was selected for producing AMP deaminase, and optimal composition of culture medium for enzyme secretion was: wheat bran as main material, sucrose 2%, fish meal 2%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%, polysorbate-80 0.1%, water hold 50%. The best cultivating conditions were as follows: 20 g medium in 250 mL flask, the fungus was incubated at 28~30 °C for 60 h. The enzyme was extracted by adding water to moldy bran after fermentation to a ratio of 1:10, pH 6.0, and shaking for 2 hours under 35 °C. AMP deaminase was preliminary purified through precipitation by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dialysis and DEAE-Spherical Agarose chromatography, the single enzyme active peak was acquired.

**Key words:** AMP deaminase; *Aspergillus oryzae*; solid-state fermentation; extraction

腺苷酸脱氨酶(AMP deaminase, EC 3.5.4.6)是一种氨基水解酶,它能够定量脱去腺苷酸嘌呤碱基上的氨基,生成 IMP 和  $\text{NH}_3$ <sup>[1]</sup>。IMP 可用于生产药品和强力味精,而  $\text{NH}_3$  可作为细胞的  $\text{H}^+$  缓冲液。AMP 脱氨酶是构成嘌呤核苷酸代谢循环的 3 种主要酶类之一,它对维持体内腺苷酸能荷<sup>[2]</sup>和机体免疫力有重要作用<sup>[3]</sup>。此外,它还是核酸酶解法生产呈味核苷酸的重要酶类之一<sup>[4]</sup>。Schmidt 最早从

兔骨骼肌肉中制备 AMP 脱氨酶<sup>[5]</sup>,后来 Mitchell 等在制备高峰淀粉酶时发现微生物也能分泌此酶<sup>[6]</sup>。现在工业生产中使用的酶大多由酵母、青霉、曲霉及毛霉等微生物发酵制备,但有关生产工艺的报道却比较少。国内虽在 20 世纪 80 和 90 年代对曲霉 AMP 脱氨酶进行了研究,但目前尚未工业化生产<sup>[7,8]</sup>。采用微生物固态发酵法生产 AMP 脱氨酶,操作简便,生产成本低,酶液经硫酸铵沉淀后活力

收稿日期 2002-04-05; 修订日期 2002-06-28.

作者简介:段作营(1965-)男,山东菏泽人,理学硕士,助理研究员。

万方数据

较高,可直接用于呈味核苷酸的生产.作者以米曲霉 3.800 进行固态发酵产酶实验,对产酶的培养基成分和培养条件进行了优化,并确定了麸曲中 AMP 脱氨酶的浸提条件,对其进行了初步纯化,以期工业化生产提供依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

米曲霉 3.800,从中科院微生物研究所购买.

### 1.2 培养基及培养方法

**1.2.1 培养基** 斜面培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,加水至 1 000 mL,自然 pH. 固态发酵基本培养基:麸皮与水等量混合均匀.

**1.2.2 培养方法** 于新鲜斜面上挑取生长良好的菌种,配制成悬浮液(孢子数约为  $10^{10}$  mL<sup>-1</sup>),移取 2 mL 菌悬液至装有 20 g 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中,28℃ 恒温静置培养,定期翻曲.

### 1.3 酶液制备

称取一定量麸曲加入 10 倍蒸馏水,35℃ 振荡浸提 2 h,滤去残渣后即得粗酶液.

### 1.4 酶活测定方法

按改良的 Nikiforuk 法<sup>[9]</sup>.取经适当稀释的酶液 0.1 mL 加入到 3 mL  $0.1 \times 10^{-3}$  mol/L 的 AMP 底物中,37℃ 振荡反应 15 min 后终止反应.于 265 nm 处测定吸光值,以每分钟吸光值改变 0.001 定义为酶的一个活力单位.每克鲜曲中的酶活以 U/g 表示.

## 2 结果与讨论

### 2.1 固态培养产 AMP 脱氨酶条件的确定

**2.1.1 培养时间对固体发酵产酶的影响** 米曲霉 3.800 经斜面培养 3 d 后接入发酵培养基,控制培养温度为 28~30℃. 固体发酵产酶过程曲线如图 1 所示.

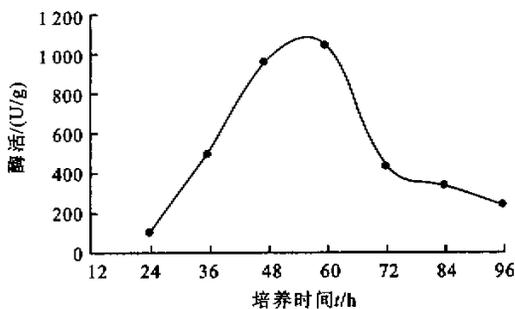


图 1 培养时间对产酶的影响

Fig. 1 Effect of culture time on deaminase production  
万方数据

培养 24 h,菌体生长处于延迟期,产酶能力较低.培养 24~60 h,菌体处于快速生长期,酶活也随时间呈近线性增加.培养至 60 h 时,产脱氨酶酶活力达到最高.在 48~60 h 之间,酶活相对稳定在较高水平.继续延长培养时间,酶活急剧下降.72 h 后白色菌丝表面长满孢子,酶活下降了 65% 左右,因此选取培养时间为 60 h.

**2.1.2 培养温度对固体发酵产酶的影响** 在不同温度下进行发酵产酶试验,结果如图 2 所示.可见,米曲霉 3.800 产酶的适宜温度范围为 28~30℃,28℃ 时酶活力最高.低于 20℃ 时,仅有少量菌丝生长,因而产酶能力较差.而高于 35℃ 时,菌丝生长迅速,产生大量的孢子,亦不利于产酶.已有的实验结果表明,当菌丝长满刚要产孢子时,产酶能力最强,所得到的 AMP 脱氨酶酶活亦最高.在适宜的温度下培养 2.5 d 后菌丝生长旺盛,有极少量的孢子,产酶活力稳定在较高水平.因此,确定培养温度范围为 28~30℃.

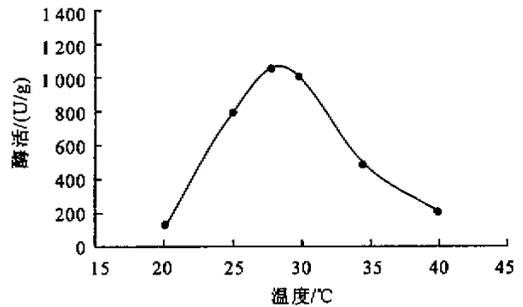


图 2 培养温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on deaminase production

### 2.1.3 通气状况对产酶的影响

通气状况对固体麸曲生长状态有直接的影响,从而影响产酶活力的高低.在固态发酵中影响通气状况的因素主要有培养基装量、纱布层数、三角瓶的容量及翻曲情况等.实验中选用 250 mL 的三角瓶,着重考察了培养基装量对产酶的影响,结果如表 1 所示.

表 1 培养基装量对产酶的影响

Tab. 1 Effect of medium volume on deaminase production

培养基装量/g	酶活/(U/g)
20	1 137.07
30	870.15
40	791.83

表 1 表明,米曲霉 3.800 产 AMP 脱氨酶对通气量的要求较高,培养基装量为 20 g 时,菌丝生长

快且均匀,产酶最高.随着培养基装量增加,麸曲层增厚,通气能力降低,菌丝生长减弱,产酶活力不高.因此在进一步研究中,250 mL 的三角瓶的培养基装量采用 20 g.

## 2.2 培养基成分对固态发酵产 AMP 脱氨酶的影响

基本培养基中的麸皮营养成分虽较丰富,但不利于被微生物迅速吸收利用.因此,仍需外加一定的易被利用的营养源来满足菌体的生长和产酶.为此考察了外加碳源、氮源、表面活性剂及含水量对产酶的影响.

### 2.2.1 碳源对产酶的影响

麸皮中粗淀粉质量分数在 55% 左右,考虑到碳源的易利用性和对酶生物合成的调控,分别添加了 5 种易于利用的碳源,实验结果如表 2 所示.

表 2 不同外加碳源对产酶的影响

Tab.2 Effects of various carbon source on AMP deaminase production

碳源	质量分数/%	酶活/(U/g)	碳源	质量分数/%	酶活/(U/g)
未加碳源		821.24	糊精	0.5	733.1
				1	1011.68
				2	951.0
蔗糖	0.5	773.64	淀粉	0.5	742.35
	1	1029.28		1	846.2
	2	1204.78		2	981.3
麦芽糖	0.5	800.0	葡萄糖	0.5	718.78
	1	972.76		1	776.76
	2	1248.53		2	1057.74

试验结果说明,添加蔗糖和麦芽糖时固体发酵产酶酶活力较高,添加淀粉和葡萄糖时酶活相对较低.麦芽糖质量分数为 2% 时,AMP 脱氨酶的酶活最高可达到 1 248.53 U/g.蔗糖和麦芽糖对产酶的促进能力接近,为节约成本,在以后的试验中均添加 2% 的蔗糖促进产酶.

### 2.2.2 氮源对产酶的影响

培养基中的氮源对微生物的生长和产酶有一定的影响,在主要原料麸皮中添加不同的氮源进行发酵产酶实验,无机氮源添加的质量分数为 0.3%,有机氮源添加质量分数为 0.5%,结果见表 3.

表 3 结果说明,使用有机氮源普遍比无机氮源的效果好.在无机氮源中添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时酶活最高,在有机氮源中添加鱼粉时酶活最高.原因可能是,鱼粉中含有丰富的蛋白质、维生素、无机盐、生长因子等菌体生长所需的营养.因此进一步考察了

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和鱼粉不同添加量对产酶的影响,实验结果如表 4 所示.

表 3 不同氮源对产酶的影响

Tab.3 Effects of various nitrogen source on AMP deaminase production

氮源	酶活/(U/g)	氮源	酶活/(U/g)
未加	853.97	玉米浆	1233.7
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1060.95	鱼粉	1362.10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1098.80	酵母膏	1226.54
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	885.22	米糠	1130.37
蛋白胨	1216.04	豆饼粉	1063.03

表 4 不同加量的硫酸铵和鱼粉对产酶的影响

Tab.4 Effects of various concentration of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and fish meal on AMP deaminase production

硫酸铵质量分数/%	酶活/(U/g)	鱼粉质量分数/%	酶活/(U/g)
0.3	1347.5	0.5	1226.7
1.0	920.7	1.0	1225.0
2.0	895.3	2.0	1475.5
4.0	348.3	4.0	1273.0
6.0	284.1	6.0	1315.7

表 4 结果说明,0.3% 的硫酸铵和 2.0% 的鱼粉都能使酶活较大幅度提高.为了使菌体快速生长,进一步提高产酶量,又考察了有机氮源和无机氮源的协同作用对产酶的影响,实验结果如表 5 所示.

表 5 有机氮源和无机氮源对产酶的协同作用

Tab.5 Synergic Effects of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and fish meal on AMP deaminase production

硫酸铵质量分数/%	鱼粉质量分数/%	酶活/(U/g)
0	2.0	1355.4
0.1	2.0	1518.4
0.3	2.0	1194.2
0.6	2.0	844.8
1.0	2.0	849.3

实验结果表明,2% 的鱼粉和 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  协同效果显著,酶活最高可达到 1 518.37 U/g.可见,同时添加有机氮和无机氮能够有效促进米曲霉固态发酵产 AMP 脱氨酶的能力.

### 2.2.3 培养基水分质量分数对产酶的影响

在固态发酵培养中,培养基的水分质量分数对

菌体生长和产酶很重要,培养基水分质量分数对产酶的影响结果如图 3 所示。

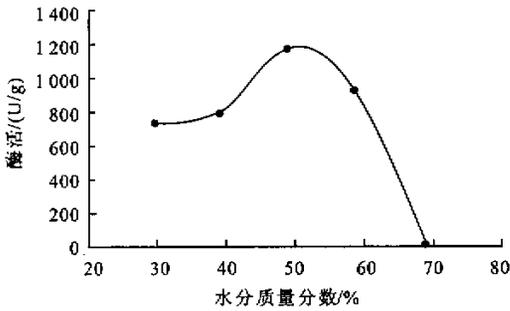


图 3 培养基水分质量分数对产酶的影响

Fig.3 Effects of medium moisture on AMP deaminase production

从图 3 中知,培养基水分质量分数在 50% 左右时产酶活力较高,培养基水分质量分数过高,灭菌后培养基易结块成团,通气状况差,不利于产酶;培养基水分质量分数过低,一方面灭菌时麸皮中淀粉不易糊化,另一方面水分不足,对菌体生长和产酶也造成不利影响。

**2.2.4 表面活性剂对产酶的影响** 吐温-80 是经常用于促进酶制剂生产的表面活性剂之一。图 4 的结果说明,添加吐温-80 后,菌株发酵产酶水平有所增加,当其质量分数为 0.1% 时,固体发酵 60 h 后酶活达 1 560.30 U/g,比未添加的对照组提高 50% 左右。增大吐温-80 的添加量酶活反而下降,原因可能是过量的表面活性剂对细胞有毒害作用,影响微生物的正常代谢活动及产酶。

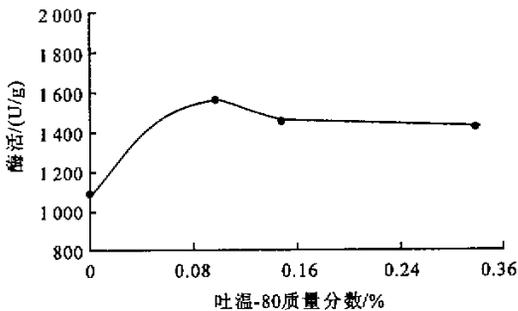


图 4 表面活性剂对产酶的影响

Fig.4 Effect of surfactant on AMP deaminase production

### 2.3 粗酶的制备及纯化

**2.3.1 麸曲浸提液体积的确定** 图 5 结果显示,随着加水比的增大,AMP 脱氨酶的活力逐渐增加,加水比到达 1:10 时,AMP 脱氨酶的活力达到最高,为 1 535.6 U/g,此时酶活的收率也达到最大,再增大加水比,AMP 脱氨酶的活力有所降低,酶活的收率也随之下降。因此,确定所加浸提液的体积为所

取麸曲量的 10 倍。

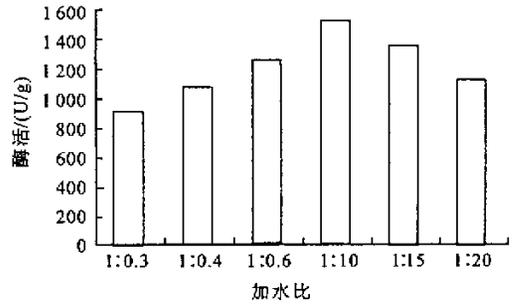


图 5 加水比对 AMP 脱氨酶活力的影响

Fig.5 Effect of water addition on deaminase extraction

### 2.3.2 浸提温度对酶活的影响

温度是影响酶产物从培养物中的溶出速率以及酶活性的重要因素之一,浸提温度对浸提液酶活力的影响见图 6。

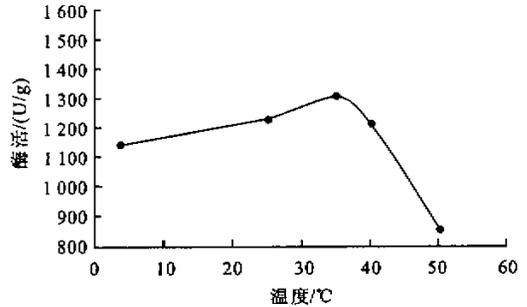


图 6 浸提温度对 AMP 脱氨酶活力的影响

Fig.6 Effect of temperature on deaminase extraction

图 6 结果表明,在 35 °C 条件下浸提,AMP 脱氨酶的活力达到最高。35 °C 以下,酶活随温度升高而提高,继续提高温度,酶活呈下降趋势,在 40 °C 条件下酶活下降了 20% 左右。较高的温度促使分子的自由能增大,运动加剧,被抽提物质溶出速率加快,达到平衡所需时间缩短,同时溶解度增大,酶活力较高。在 35 °C 以下浸提,AMP 脱氨酶的溶出表现出上述趋势;继续升高抽提温度,酶蛋白开始变性而失活,如在 50 °C 条件下浸提,抽提酶液中 AMP 脱氨酶的活力损失过半。因此,选定浸提温度为 35 °C。

**2.3.3 浸提时间对酶活的影响** 麸曲中及表面的 AMP 脱氨酶分散到溶液中需要一定的时间。图 7 结果表明,这一溶出过程在 2 h 后达到平衡,此时所得到的 AMP 脱氨酶活性最高。在 0~2 h 之间,随着抽提时间的延长,抽提酶液中 AMP 脱氨酶的活力逐渐增加,其酶活最高达到 1 527.09 U/g。继续延长抽提时间,抽提酶液中 AMP 脱氨酶活力反而下降。出现上述结果的原因可能是:物质的抽提过程本质上是目的物和其它物质从细胞或组织中溶出的过程,这

一过程要达到平衡需要一定时间,在开始的一段时间内,目的物不断溶出,在抽提液中的质量浓度不断增加,即 AMP 脱氨酶活力不断提高;时间再延长,提取液中目的物的质量浓度逐渐达到最大值。此后,随着抽提时间的延长,不仅提取液中目的物的质量浓度不再增加,而杂质的溶出会增加,给后续的处理带来不便,而且其它副反应占据了主导地位,特别是对生物活性物质的提取,其活性常常会因为长时间处于某一环境中而失活。因此,确定浸提时间为 2 h。

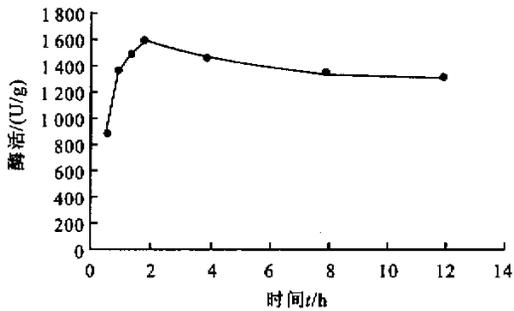


图7 浸提时间对酶活的影响

Fig.7 Effect of extracting time on deaminase extraction

2.3.4 浸提液 pH 对酶活的影响 浸提液的 pH 影响酶在体系中的扩散过程,又影响抽提液中酶的活性。从图 8 可以看出,当抽提液的 pH 为 6.0 时,AMP 脱氨酶的活力达到最高,pH 在 5.0 至 7.0 之间,酶活稳定在相对较高的水平,过低或过高的 pH 皆不利于高活性的酶的提取。

2.3.5 AMP 脱氨酶的初步纯化 选择  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为盐析剂,当其饱和度为 40% 时(见图 9),AMP 脱氨酶主要分布在上清液中,应弃去沉淀;当

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和度达 70% 时,上清液中的酶活很低,AMP 脱氨酶主要分布在沉淀中。将沉淀溶于少量的蒸馏水,透析过夜。DEAE-Spherical agarose 柱层析分离,以  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  配制 0.02 mol/L 的缓冲液(pH 7.0),0~2.0 mol/L 的 KCl 梯度洗脱,当 KCl 浓度为 0.2 mol/L 左右时收集到 AMP 脱氨酶的活性峰,其与另一较小的杂质峰能够较好的分离。

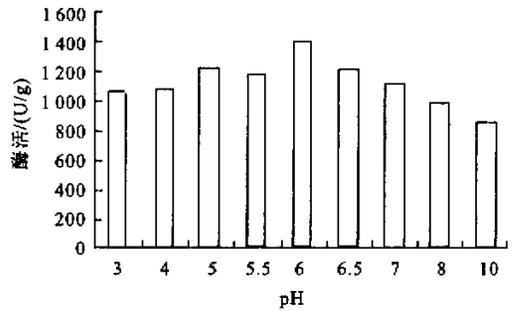


图8 浸提液 pH 对酶活的影响

Fig.8 Effect of pH on deaminase extraction

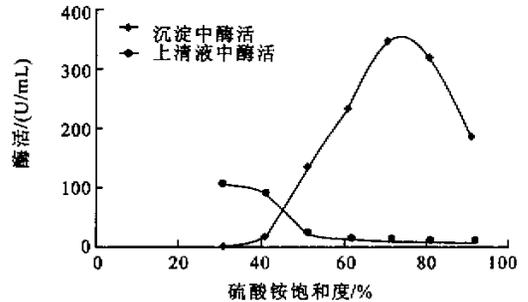


图9 AMP 脱氨酶的盐析曲线

Fig.9 The salting-out curve of AMP deaminase

## 参考文献:

- [1] DAVID J MERKLER, ANUPAM S WALI. AMP deaminase from yeast[J]. *J Biol Chem*, 1989, 35: 21422-21430.
- [2] Astrid G Chapman, Daniel E Atkinso. Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction[J]. *J Biol Chem*, 1973, 23: 8309-8312.
- [3] RAINER MARQUETANT, RICHARD L SABINA, et al. Identification of a noncatalytic domain in AMP deaminase that influences binding to myosin[J]. *Biochemistry*, 1989, 28: 8744-8749.
- [4] 张克旭. 核酸发酰 M]. 杜连祥译. 北京: 中国轻工业出版社, 1987. 31-138.
- [5] SIDNEY P COLOWICK, NATHAN O KAPLAN. Methods in enzymology II[M]. Maryland, 1955: 469-473.
- [6] 王程, 严自正. 米曲霉在产脱氨酶过程中超微结构动态[J]. *微生物学通报*, 1989, 16(4): 227-230.
- [7] 张树政. 工业微生物学成就 M]. 北京: 科学出版社, 1988. 107-110.
- [8] 普为民, 丁骅孙, 陶元器. 5'-腺苷酸脱氨酶产生菌选育及发酵生态学研究[J]. *云南大学学报*, 1994, 16(2): 184-188.
- [9] 刘军昌, 段作营, 毛忠贵. AMP 脱氨酶活性测定的一种改进方法[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(7): 30-33.