

葡萄糖异构酶高产菌株的诱变选育

安志法

(河南省科学院生物研究所, 郑州)

摘要 葡萄糖异构酶产生菌链霉菌 B6 经紫外线、亚硝基胍等诱变处理, 经反复筛选获得 T208 变异株。测定了该菌产酶的适宜生长条件。该菌株比出发菌株酶活力提高 2.75 倍, 可达 550u/ml。该菌菌丝粗壮, 易培养, 有利于工业化生产。

关键词 葡萄糖异构酶; 链霉菌; 诱变

葡萄糖异构酶的产生菌种类很多, 已发现 100 多种^[1], 但用于生产的菌株仅 8—9 种。目前国内尚未工业化生产。我们采用筛选出的链霉菌 B6 菌株进行多因素诱变处理和单细胞分离, 经多次诱变选育, 获得变异株 T208, 产酶活力较高。对该株的发酵条件及产酶性质进行了初步研究。

材料和方法

(一) 出发菌株: 链霉菌 B6 (*Streptomyces* sp.), 分离自土壤。

(二) 培养基

1. 菌种斜面培养基: 高氏一号培养基。
2. 摇瓶发酵培养基(%): 麸皮 5、豆饼粉 1.4、玉米粉 1.2、硫酸镁 0.1、磷酸氢二钾 0.1、氯化钴 0.02、pH7.2—7.4。

(三) 摇瓶发酵条件

500ml 三角瓶装液量 50ml, 置于 110r/min、冲程 7cm 往复式摇床上 30℃ 培养 48 小时或 64 小时。

(四) 诱变选育

1. 诱变程序: 出发菌株 → 斜面活化 →

单孢子悬浮液制备 → 诱变处理 → 单菌落分离 → 斜面传代 → 初筛 (每菌落 1—2 瓶) → 5 次复筛 (依次为 3、9、15、30、45 瓶) → 单菌落分离 → 稳定性复筛 (单菌落对比) → 生理特性试验 → 发酵工艺设计。

2. 诱变剂和诱变方法: 我们相继采用紫外线 (UV)、亚硝基胍 (NTG)^[2]、氮芥、亚硝酸、氯化锂等多种物理和化学诱变剂的各种不同剂量以及复合处理, 共 20 余种常规诱变方法。

(五) 酶活分析方法

旋光法: 52.5% 葡萄糖溶液 (用 0.2M pH7.6 磷酸缓冲液配制) 8ml, 0.1M 硫酸镁 1ml, 酶液 1ml, 70℃ 水浴转化 1 小时, 以 0.5M 高氯酸 10ml 终止反应, 过滤, 用 W₂-1 型自动旋光仪测定旋光度^[2]。

$$\text{酶活 (u/ml)} = \frac{\alpha_0 - \alpha_+}{145} \times 20 \times 1000$$

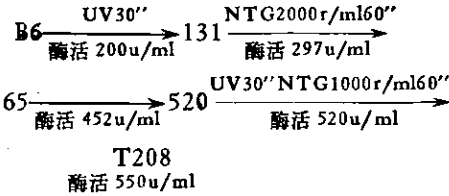
α_0 : 空白旋光度

α_+ : 样品旋光度

翟丽莉同志参加部分工作。

结果和讨论

(一) 208 菌株的诱变谱系



(二) T208 菌株生长及产酶条件

1. 不同碳源对产酶的影响: 基本培养基(%) : 麸皮 5、豆饼粉 1.4、碳源 1.2、硫酸镁 0.1、磷酸氢二钾 0.1, 氯化钴 0.02。

表 1 不同碳源的培养基对产酶的影响

碳源类别	玉米粉	淀粉	糊精	蔗糖	葡萄糖
相对酶活(%)	100.00	96.62	93.62	90.15	64.44

不同碳源对产酶有明显的差异, 以玉米粉为最佳, 葡萄糖为最低(表 1)。

2. 不同浓度麸皮水解液对产酶的影响: 为了获得 T208 菌株产酶最适的碳氮比, 进行了不同浓度麸皮水解液和玉米浆的配比试验, 其结果表明, 当玉米浆为 3%, 麸皮水解液 5 度(B_x) 酶活为最高, 5、6、7、度时酶活几乎无差异(表 2), 故发酵最佳麸皮水解液浓度为 5—5.5 度。

表 2 不同碳氮配比试验

麸皮水解液浓度(B _x)	3	4	5	6	7
平均酶活(u/ml)	377.86	428.00	458.00	450.60	444.96

玉米浆浓度为 3%

3. 不同氮源对产酶的影响: 基本培养基(%) : 麸皮 5、玉米粉 1.2、氮源 1.4、无机盐同上。

表 3 不同氮源对产酶的影响

氮源类别	酵母膏	玉米浆	蛋白胨	豆饼粉	尿素
相对酶活(%)	100.00	91.46	58.68	84.93	3.79

从表 3 可看出, 无机氮源几乎不产酶, 而有

机氮源以酵母膏产酶为最高。

4. 不同来源玉米浆对 T208 生长及产酶的影响:

表 4 玉米浆质量对 T208 生长及产酶的影响

玉米浆来源	华北	肖县	内江	郑州	朝阳	六安
酶活(u/ml)	400	362	320	300	363	400
菌丝形态	菌丝网状	菌丝网状	菌丝断裂	菌丝断裂	菌丝断裂	菌丝断裂

培养基中玉米浆成份组成对诱变株 T208 生长及产酶活力有明显的影响, 如表 4 以华北制药厂生产的玉米浆为培养基, 菌丝生长快、粗壮, 50 小时菌丝成网状, 产酶活力高, 而质量较差的玉米浆对其生理影响, 大致可分为三种不正常类型: ①菌丝生长缓慢, 纤细不断裂, 产酶活力低; ②很少有长菌丝, 丝细、长短参差不齐, 酶活力最低。③另一类型(六安)与优质玉米浆的差异是菌丝边生长边断裂, 但酶活力较高。由此可知, 菌丝生长快慢粗细与产酶活力高低似呈正相关, 而菌丝断裂与否和产酶活力无关。其作用机理, 有待进一步试验证明。

菌丝易断裂, 不易收集, 得率低, 在固定化工序中难以处理, 因此这种玉米浆在生产中不宜采用。

5. 钴的不同用量对产酶的影响: 采用摇瓶发酵培养基加钴量为试验量。

表 5 钴离子对产酶活性的影响

钴量(%)	0.01	0.013	0.02	0.025	0.03
平均酶活(u/ml)	470.77	495.29	542.67	525.79	509.99

发酵时间为 64 小时

钴对链霉菌产酶有明显的促进作用, 由表 5 可以看出氯化钴用量以 0.02—0.025% 对产酶促进作用为最强, 以 0.02% 为最适宜。

6. pH 对产酶活力的影响: 用同 1 种培养基以 5% NaOH 调节不同 pH 值发酵结果表明(图 1), 该菌株的发酵培养基初始 pH 以 7.0—7.5 为最适宜。

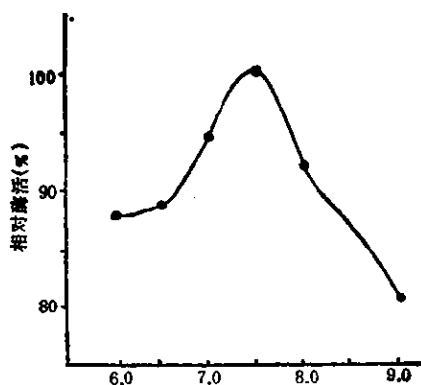


图1 pH 值对产酶的影响

(三) 链霉菌 T208 菌株所产酶的性质

1. 该酶作用的最适温度: T208 菌株发酵酶液分别于 60、70、80、85、95℃ 在相同底物条件下作用一小时测酶活, 每个温度均用蒸馏水代替酶液作空白对照, 结果表明该酶的作用最适温度为 80℃ (图 2)。

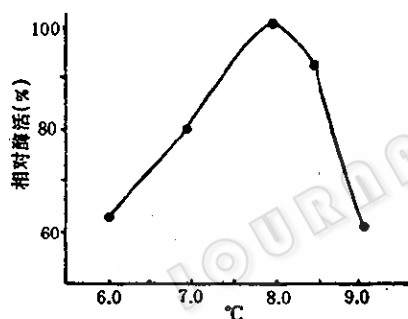


图2 酶作用最适温度

2. T208 菌株酶的热稳定性: 将 T208 菌株的酶液与磷酸缓冲液混合, 分别置于 65、75、80、90、95℃ 等不同温度水浴中保温 30 分钟, 冷却后加入反应系统中的其他试剂于 70℃ 转化 30 分钟, 比较在不同温度下的残余酶活, 结果表明, 此酶在 75℃ 以上很不稳定 (图 3)。

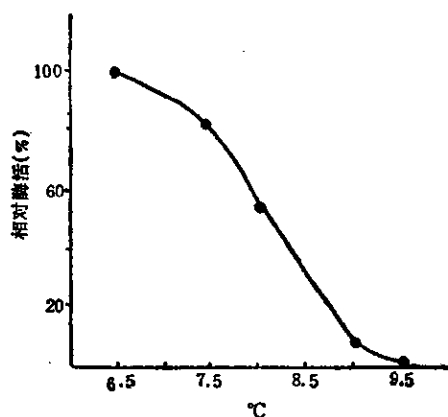


图3 酶的热稳定性

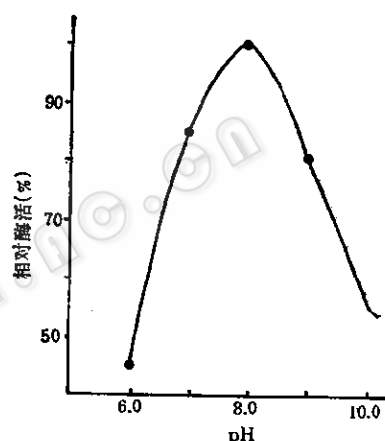


图4 酶作用最适 pH

3. 酶作用的最适 pH: T208 酶液分别于 6、7、8、9、10 等不同 pH 值, 相同底物条件下, 反应一小时测定酶活力。由图 4 可知, 该菌株产酶作用最适 pH 为 8。

4. 不同金属离子对该酶作用的影响: 将不同金属离子与 T208 菌株所产生的酶 (发酵液)

表6 金属离子对酶活的影响

离子浓度 ($5 \times 10^{-3} M$)	相对酶活
CK	100
Mg ⁺⁺	110.30
Co ⁺	96.59
K ⁺	95.0
Ca ⁺⁺	93.10
Fe ⁺⁺⁺	83.10
Ni ⁺⁺	59.05
Al ⁺⁺	95.36
Mn ⁺⁺	97.91
Cu ⁺⁺	92.33
Zn ⁺⁺	81.76

混合, 加葡萄糖与磷酸缓冲液, 于 70℃ 反应一小时, 测定其酶活力, 以不加金属离子作空白对照。

由表 6 可以看出在本试验条件下, 镁离子对该酶稍有激活作用, 而镍离子有较强的抑制作用, 铁和锌也有相当的抑制作用。

链霉菌 T208 变异株经反复试验证明, 其生物学性状稳定, 易培养, 生长快, 菌丝粗壮, 酶活收得率高, 便于固定化, 抗污染能力强。有利

于工业化生产应用。

参 考 文 献

- [1] 张树政等: 工业酶制剂, 科学出版社, 北京, 1984 年, 第 558—586 页。
- [2] 俞炜等: 微生物学杂志, 2: 31—34, 1981。