

葡萄糖异构酶产生菌筛选培养基和测定方法的比较试验

王熾芝

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 在本实验室条件下, 经试验证明: 2% 玉米浆, 1% 玉米粉, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 是筛选产葡萄糖异构酶 (EC 5, 3, 1.5) 放线菌较适宜的培养基。酶反应时使用顺丁烯二酸钠缓冲溶液较好。显色法是测定葡萄糖异构酶比较简便准确的方法。

关键词 葡萄糖异构酶; 显色法; 咔唑法

葡萄糖异构酶测定方法很多, 如显色法^[1,2] 咔唑法^[3,4] 旋光法^[5] 等, 但目前尚未有统一的测定方法。在本实验室条件下, 为选择较简便易行的方法, 进行了显色法和咔唑法的比较和产葡萄糖异构酶菌种培养基的选择试验。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

玫瑰暗黄链霉菌 (*Streptomyces roseofulvus*)。

(二) 培养基

- 1. 斜面培养基: 高氏培养基。
- 2. 发酵培养基: 表 1 中 9 种培养基成份是用麸皮水解液 (30g 麸皮加 300ml 蒸馏水, 1kg/cm² 灭菌 30min 制得) 配制, pH 均为 7。

表 1 9 种培养基配方

培养基组成成分	培养基配方及用量 (%)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX
玉米浆	3					2	2	1
pH7 玉米浆		3						
黄豆饼粉			3					
可溶性淀粉				3		1		1
玉米粉					3	1		1
酵母粉							1	

各培养基中分别加入 0.1% K_2HPO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

(三) 培养方法

- 1. 菌悬液的制备: 一支斜面菌种加入 10ml 无菌水洗下菌体, 制成菌悬液。
- 2. 20ml 培养基装入 100ml 三角瓶中, 1kg/cm² 灭菌 30min, 接入 0.5ml 菌悬液,

28 °C 旋转式摇床培养 5 天, 取 5ml 发酵液离心 (4000r/min) 30min, 弃去上清液, 菌体加入 5ml 蒸馏水混匀备用。

(四) 测定方法

70% 葡萄糖液 1.5ml, pH7.8 0.2mol/L 磷酸缓冲液 1.5ml (或 pH6.8 0.2mol/L 顺丁烯二酸钠缓冲液 1.5ml), 0.1mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5ml, 酶液 1.5ml (对照为 1.5ml 蒸馏水)。此系统在 70 °C 反应 1 小时后加入 0.5mol/L 高氯酸 5ml 终止酶活, 过滤, 滤液稀释 100 倍, 分别用显色法^[2]、咔唑法^[3] 测定果糖含量, 以 1 小时内生成 1mg 果糖所需的酶量为一个酶活单位。

结 果 与 讨 论

(一) 产异构酶培养基的筛选

为筛选葡萄糖异构酶产生菌, 我们选择了 9 种不同成份的培养基培养玫瑰暗黄链霉菌。

从表 2 中看出, 玉米浆和玉米粉配合使用效果最好, 如 VI 号培养基, 酶活可提高 2-3 倍 (与 I 号培养基相比)。玉米浆和酵母膏混合使用效果次之, 如 VIII 号培养基, 可提高酶活力 1.5-2 倍。经碱调 pH7 的玉米浆培养基如 II 号培养基, 提高酶活 1.5 倍左右。而分别单独使用玉米浆、玉米粉、黄豆饼粉、可溶性淀粉者效果不理想, 如 I-V 号培养基。据报道^[6], 玉米浆能够诱导产生葡萄糖异构酶。玉米浆是木聚糖的原料, 木聚糖的降解物木二糖对产酶诱导力很强^[7], 但由于玉米浆含有大量的植酸质妨碍异构酶的产生, 因此经调 pH7 后, 滤去沉淀, 酶

活提高很多。但玉米浆和玉米粉或玉米浆与酵母膏的配合使用均比经碱调 pH7 的玉米浆更为理想, 原因尚不清, 有待今后研究。因此, 本试

验初步选定表 2 中 VI 号培养基作为筛选产葡萄糖异构酶放线菌较好的培养基。

表 2 不同成份培养基, 不同缓冲溶液
不同方法测定葡萄糖异构酶活力的比较

培养基 编号	磷酸盐缓冲溶液		顺丁烯二酸钠缓冲溶液	
	显色法	咋啞法	显色法	咋啞法
	果糖 (mg/ml)	果糖 (mg/ml)	果糖 (mg/ml)	果糖 (mg/ml)
I	1.15	1.30	1.70	1.80
II	1.95	2.35	2.80	2.85
III	1.45	2.00	2.50	2.45
IV	0.40	0.45	0.85	0.65
V	0.85	0.90	1.00	1.25
VI	3.45	3.60	4.00	4.05
VII	1.40	1.50	2.00	2.25
VIII	2.25	2.50	3.50	3.50
IX	1.85	2.10	2.60	2.55

(二) 标准样品和酶反应液的测定

1. 标准样品的测定: 不同含量的果糖溶液用显色法测定, 其结果为, 当果糖浓度为 0-100 μ g/ml 之间呈直线关系 (图 1)。

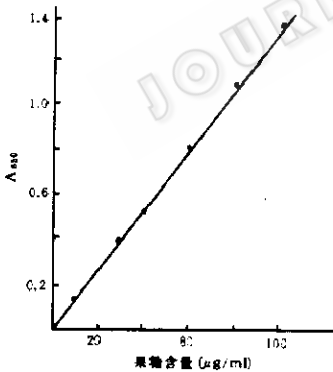


图 1 显色法测定果糖溶液的标准曲线

另配制 0.33% 果糖溶液, 分别用显色法、咋啞法测定 5 个样品, 结果列于表 3。

从表 3 中看出当采用显色法和咋啞法测定标准果糖溶液时, 两种测定方法的误差都较小, 其中显色法测定平均值的绝对误差为 0.012, 相对误差为 3.6%(测定值略低于实际含量), 咋啞法的平均值绝对误差为 0.033, 相对误差为 10%(测

定值略高于实际含量), 证明了咋啞法和显色法测定果糖溶液的准确性。

表 3 显色法和咋啞法测定标准样品的比较

样品编号	果糖 测定值 (%)	绝对误差	相对误差 [10](%)
显色法			
1	0.325	0.005	1.5
2	0.320	0.010	3.0
3	0.315	0.015	4.5
4	0.320	0.010	3.0
5	0.310	0.02	6.0
平均值	0.318	0.012	3.6
咋啞法			
1	0.350	0.020	6.0
2	0.355	0.025	7.5
3	0.350	0.020	6.0
4	0.370	0.040	12.1
5	0.390	0.060	18.1
平均值	0.363	0.033	10.0

2. 酶反应液的测定: 在 9 种培养基上培养玫瑰暗黄链霉菌, 用磷酸缓冲液和顺丁烯二酸钠缓冲液进行酶反应, 来比较显色法和咋啞法测定葡萄糖异构酶活力 (表 2), 同样证明这种方法是可靠的。

标准果糖溶液样品及反应液测得结果表明咋啞法和显色法都是比较准确的。但咋啞法操作比较麻烦, 如连续加三种不同试剂且硫酸浓

度较高,具有腐蚀性。相反,显色法只要严格控制温度,较前法操作简便,只加一种试剂,容易掌握。

国内外学者已报道,缓冲溶液对该酶有不同程度的影响,如 Vakeri^[8] 和 Danno^[9] 等报道磷酸缓冲液和 Tris 缓冲液对葡萄糖异构酶有抑制作用。胡学智等^[5] 用顺丁烯二酸钠缓冲液测定酶活高于上述两种缓冲液。本试验用磷酸缓冲液及 pH6.8 顺丁烯二酸钠缓冲液进行酶反应试验,两种测定方法的测定结果与胡学智等的结果是一致的,表明采用顺丁烯二酸钠缓冲液较为理想(表 2)。

参 考 文 献

1. Bassett B et al.: *Can. J. Microbiol.*, **23**:573-582, 1977.
2. 中山大学生物系生化微生物学教研室编:生化技术导论. 人民教育出版社. 北京, 59-60 页, 1978 年。
3. Zacharias D et al.: *J. Biol. chem.*, **192**:583, 1951.
4. 张树政等:工业酶制剂. 科学出版社, 北京, 第 586 页, 1984。
5. 胡学智等:微生物学通报, **9**(1):41, 1980.
6. Wenpin C: *Process Biochemistry*, **15**(5):30-35 1980.
7. 高崎义幸:日本特许公报, 37276, 1976。
8. Vakeri M et al.: *Process. Biochem.*, **6**:5, 1977.
9. Danno G: *Agr. Biol. Chem.*, **34**:1805, 1970.
10. 中南矿冶学院分析化学教研室等编著:化学分析手册, 科学出版社, 北京, 第 81-82 页, 1982 年。

(1992-6-5 收稿)