

碳源和氮源对玫瑰栗色链霉菌 No. 336 产葡萄糖糖异构酶的影响

潘仁瑞 王元君

(中国科学技术大学生物系,合肥)

玫瑰栗色链霉菌 (*Streptomyces roseocastaneus*) No. 336 变异株对碳源或氮源的利用及其和产葡萄糖异构酶的关系,用半合成培养基进行了摇瓶液体培养试验。测定以 15 种单糖和糖醇、8 种寡糖和 5 种多糖作为碳源,6 种含氮化合物作为氮源对菌的生长和产酶的影响。证明 No. 336 菌株除利用 L-阿拉伯糖和 D-木糖等五碳糖作为碳源外,也能利用 D-葡萄糖等六碳糖作为碳源和能源。糖醇对酶的形成或无明显影响,或有抑制作用。

在供试的氮源中,玉米浆和酵母膏对产酶的影响明显优于蛋白胨,该菌几乎不能以无机氮化合物或乙酸铵作为唯一的氮源。

C/N 比的试验表明,2:1、1:1 或 3:1 的培养基组成有利于葡萄糖异构酶的形成,提高氮素含量虽能促进菌的生长,但对产酶不利。

以麦麸水解液和玉米浆为主要成分的培养基有利于 No. 336 菌株的生长和产酶,每毫升培养液的酶活力在 180 单位以上。

关键词 玫瑰栗色链霉菌 No. 336; 葡萄糖异构酶

链霉菌产生的 D-葡萄糖异构酶 (EC 5.3.1.5) 已在淀粉糖工业上广泛应用,对于菌的生理生化特性和产酶的关系也进行了较多的研究^[1]。徐子渊和沈善炯最早报导,灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 在 D-木糖的诱导下可产生 D-木糖异构酶^[2]。津村等报道暗色产色链霉菌 (*S. phaeochromogenes*) 在含有木糖的培养基中也产生 D-葡萄糖异构酶^[3]。高崎等分离的白色链霉菌 (*S. albus*) 可以利用木糖、木聚糖或含有木聚糖的麦麸、玉米壳和玉米芯产生此酶^[4,5]。以后,陆续报导一些链霉菌的种在含木糖或木聚糖的培养基上产生葡萄糖异构酶。例如,比基尼链霉菌 (*S. bikiniensis*)、包比利氏链霉菌 (*S. bobilliae*)、黄灰链霉菌 (*S. flavogriseus*)、黄微绿链霉菌 (*S. flavovirens*)、弗氏链霉菌 (*S.*

fradiae)、黄色链霉菌 (*S. galbus*)、淡青链霉菌 (*S. glaucescens*)、橄榄产色链霉菌 (*S. olivochromogenes*)、维德摩链霉菌 (*S. wedmorensis*) 和委内瑞拉链霉菌 (*S. venezuelae*) 等^[6-14]。

通常认为链霉菌的葡萄糖异构酶是一种诱导酶,必须在木糖、木聚糖或含有木糖物质的存在下才能产酶。Armbruster 等曾报导一株链霉菌的突变体,能在没有木糖或木糖含有物的培养基中产生葡萄糖异构酶^[15]。

从我国土壤中分离的玫瑰栗色链霉菌,其变异株 No. 336 已应用于工业生产^[16],但对此菌在液体培养条件下对碳源或氮源的利用及其和产酶的关系尚缺乏系统研究,我们对这一课题进行了试验。

本文于 1986 年 12 月 4 日收到。

材料和方法

(一) 菌种

玫瑰栗色链霉菌 No.336 变异株由沈阳市食品发酵研究所赠送。

(二) 主要化学试剂

蛋白胨、L-木糖、D-甘露糖、D-核糖、D-松三糖、木聚糖和核糖醇为进口试剂,其余均为国产试剂。

(三) 培养基

菌种斜面用淀粉琼脂培养基,摇瓶发酵试验采用半合成培养基。碳源试验的基础培养基包括蛋白胨和无机盐,调 pH 至 7.5,分装入 250ml 的锥形瓶中,每瓶总液量为 50ml,瓶口盖 8 层厚纱布,1.05kg/cm² 蒸汽灭菌 25min。接种前在无菌室中加入不同的碳源,单糖、糖醇和寡聚糖溶液预先在 0.55kg/cm² 蒸汽灭菌 25min,多糖则加入基础培养基后一起灭菌。无碳源培养基不加糖类。氮源试验的基础培养基为木糖和无机盐,加入不同的氮源,0.55kg/cm² 灭菌 30min。

麦麸玉米浆培养基:市售麦麸加 10 倍量的水,用细菌淀粉酶或硫酸水解,过滤去渣,滤液波美 5—6°,再加玉米浆和无机盐,调 pH 至 8.0,灭菌后备用。

(四) 培养条件

菌种的琼脂斜面置 28℃ 恒温箱中培养,液体发酵在接种后置 THZ-82 型台式振荡器上培养,恒温 30℃,转速 160—180r/min。

(五) 菌生长和 pH 的测定

取含菌培养液 0.5ml,用蒸馏水稀释 50 倍,摇匀,在 72 型分光光度计波长 500nm 处测光密度。精密 pH 试纸测定 pH。

每次取样时作涂片染色,用高倍显微镜检查是否染有杂菌,如发现染菌,则此处理不再测定。

(六) 葡萄糖异构酶活力的测定

以葡萄糖为底物,酶促反应后用半胱氨酸-吡啶法测果糖含量,以每小时转化 1mg 葡萄糖为果糖所需的酶量定义为 1 个活力单位 (u),测定方法见前文^[17]。

结果和讨论

(一) 木糖和葡萄糖对链霉菌 No.336

生长和产酶过程的影响

斜面菌种制成菌悬液,接入含木糖或葡萄糖的半合成培养基中,在恒温振荡器上培养,逐日取样测定 pH、菌生长和葡萄糖异构酶活力的变化。

从图 1 可见,以 D-木糖为碳源时,发酵液 pH 从 7.5 开始逐渐上升,2—4 天内稳定在 8.2 左右,第五天上升至 8.5。接种后 24h 内菌的生长最快,生长量为最高值的 80%,至第 3 天生长达最高值,以后逐日降低;而酶活力在第 4 天达最高值,以后缓慢下降。

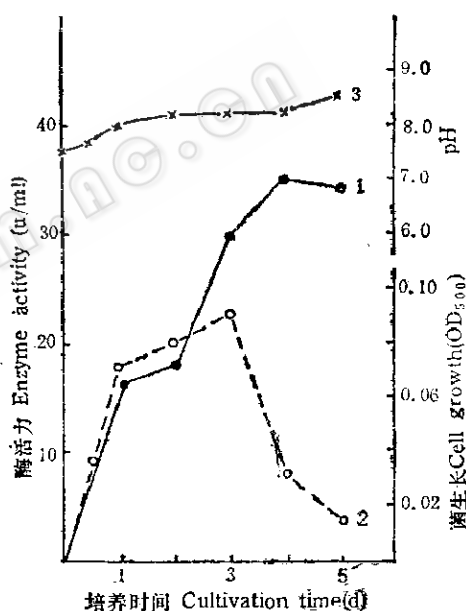


图 1 D-木糖对链霉菌 No. 336 生长和产酶过程的影响

Fig. 1 Time course of the cell growth and D-glucose isomerase yield in D-xylose medium with *Streptomyces* strain No. 336

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 菌生长 Cell growth 3. pH

图 2 示明以 D-葡萄糖为碳源时,接种后 18h pH 值下降至 6.3,以后逐渐上升,3 天后稳定在 8.0—8.5 之间。菌的生长在接种后 24h 内直线上升,生长量为最高值的 90%,至 36h 生长达最高值,以后逐日

表 1 不同碳、氮比对链霉菌 No. 336 生长和产葡萄糖异构酶的影响

Table 1 Effect of various C/N ratio on cell growth and enzyme yield with *Streptomyces* strain No. 336

C/N (W/W)	以 D-葡萄糖为碳源 Carbon source with D-glucose				以 D-木糖为碳源 Carbon source with D-xylose			
	发酵终 pH	菌生长	酶活力 Enzyme activity		发酵终 pH	菌生长	酶活力 Enzyme activity	
	Ending	Growth	u/ml	Relative activity (%)	Ending	Growth	u/ml	Relative activity (%)
	pH	(OD ₅₀₀)			pH	(OD ₅₀₀)		
0:1	8.7	0.038	17.0	47.6	8.5	0.034	13.6	39.0
1:0	6.8	0.008	2.6	7.3	7.2	0.008	1.7	4.9
1:1	8.2	0.080	35.7	100.0	8.2	0.032	34.9	100.0
1:2	8.2	0.150	19.1	53.5	8.2	0.210	27.6	79.1
1:3	5.4	0.282	6.8	19.1	8.2	0.240	10.2	29.2
2:1	8.5	0.058	40.8	114.3	8.2	0.043	40.0	114.6
3:1	8.5	0.056	34.9	97.8	8.2	0.024	33.2	95.1
2:2	8.0	0.240	26.4	74.0	8.4	0.410	16.2	46.4
3:3	5.4	0.250	2.6	7.3	8.2	0.325	10.2	29.2

培养 4 天 Culturing 4 days

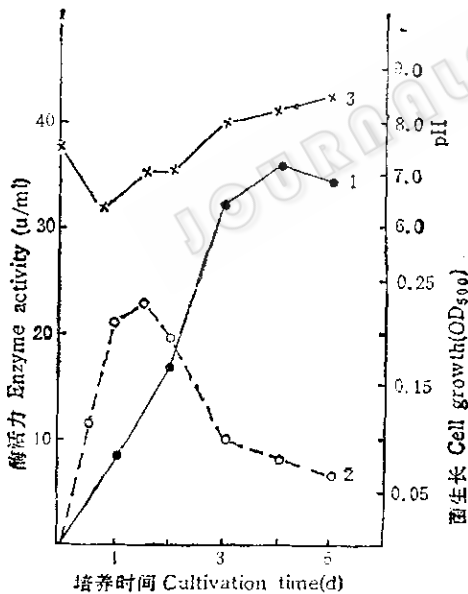


图 2 D-葡萄糖对链霉菌 No. 336 生长和产酶过程的影响

Fig. 2 Time course of the cell growth and enzyme yield in D-glucose medium with *Streptomyces* strain No. 336

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 菌生长 Cell growth 3. pH

降低:酶活力也在第 4 天达最高值。

试验表明,链霉菌 No. 336 变异株除了以木糖为诱导物形成葡萄糖异构酶外,在 D-葡萄糖作为唯一碳源时也能形成此酶。

(二) 碳、氮比对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

采用半合成培养基,碳源和氮源按重量比,排成 9 组。斜面菌种制成菌悬液,直接接入上述培养液中,恒温振荡器培养,按第 4 天酶活力峰值记录,结果见表 1。

无论以 D-木糖或 D-葡萄糖为碳源,葡萄糖异构酶的活力都以 C/N = 2:1 为最高,其次为 1:1,再次为 3:1。提高培养基中氮的浓度,有利于链霉菌的生长,但对酶的形成产生不良影响。同时增加碳和氮的浓度,如 2:2 或 3:3 也有利于菌的生长而对产酶不利。当碳、氮比为 1:3 和 3:3,即氮浓度为 3% 时,发酵终 pH 值为 5.4,明显地抑制酶的形成。

(三) 碳源对链霉菌 No. 336 生长和

表2 单糖或糖醇对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

Table 2 Effect of monosaccharides and sugar alcohols on cell growth and enzyme yield with *Streptomyces* strain No. 336

碳 源 Carbon source	发酵终 pH Ending pH	菌 生 长 Growth (OD ₅₀₀)	酶 活 力 Enzyme activity	
			u/ml	相 对 值 Relative activity (%)
L-阿拉伯糖 L-arabinose	8.3	0.060 0.143(1)	43.8	312.9
D-木糖 D-xylose	8.3	0.112 0.155(3)	35.7	255.0
D-葡萄糖 D-glucose	8.3	0.048 0.235(1)	33.2	237.1
L-鼠李糖 L-rhamnose	8.0	0.075 0.100(3)	31.5	225.0
D-甘露糖 D-mannose	8.5	0.065 0.095(1)	27.6	197.1
L-山梨糖 L-sorbose	8.5	0.040 0.050(1)	27.6	197.1
D-半乳糖 D-galactose	8.3	0.021 0.084(1)	21.7	155.0
L-木糖 L-xylose	8.3	0.025 0.048(5)	21.3	152.1
D-核糖 D-ribose	8.5	0.042 0.048(3)	17.9	127.9
D-来苏糖 D-lyxose	8.7	0.040 0.050(3)	17.9	127.9
甘露醇 Mannitol	8.7	0.046	16.2	115.7
核糖醇 Ribitol	8.7	0.044	16.2	115.7
无碳源 Medium without 培养基 carbon source	8.5	0.044	14.0	100.0
山梨醇 Sorbitol	8.6	0.048	10.6	75.7
木糖醇 Xylitol	8.3	0.030	6.4	45.7
丙三醇 Glycerol	4.8	0.190	3.4	24.3

培养 4 天 Culturing 4 days

括号内数字是菌生长最高值的培养天数 The number in parentheses are culture days of maximum cell growth

产酶的影响

斜面菌种制成菌悬液，接入无碳源的半合成培养液中，恒温振荡培养 24h 作为

液体种子，再转接入含有不同碳源的培养基中，以无碳源培养基作为参比对照，接种量为总液量的 10%，恒温振荡培养 5—6

表 3 寡糖对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

Table 3 Effect of oligosaccharides on cell growth and enzyme yield with *Sstreptomycyes* strain No. 336

碳 源 Carbon source	发酵终 pH Ending pH	菌 生 长 Growth (OD ₅₀₀)	酶 活 力 Enzyme activity	
			u/ml	Relative activity (%)
纤维二糖 Cellobiose	8.4	0.055	40.4	288.6
麦芽糖 Maltose	8.4	0.072	31.5	225.0
蔗糖 Sucrose	8.5	0.052	27.5	197.1
蜜二糖 Melibiose	8.3	0.052	23.8	170.0
棉子糖 Raffinose	8.6	0.054	23.8	170.0
松三糖 Melezitose	8.5	0.044	20.4	145.7
海藻糖 Trehalose	8.6	0.055	19.1	136.4
乳糖 Lactose	8.3	0.023	17.0	121.4
无碳源 Medium without 培养基 carbon source	8.5	0.044	14.0	100.0

培养 4 天 Culturing 4 days

表 4 多糖对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

Table 4 Effect of polysaccharides on cell growth and enzyme yield with *Streptomycyes* strain No. 336

碳 源 Carbon source	发酵终 pH Ending pH	菌 生 长 Growth (OD ₅₀₀)	酶 活 力 Enzyme activity	
			u/ml	Relative activity (%)
菊糖 Inulin	8.6	0.050	27.2	194.3
糊精 Dextrin	8.4	0.064	26.4	188.6
纤维素 Cellulose	8.5	0.042	24.7	176.4
淀粉 Starch	8.5	0.055	21.3	152.1
木聚糖 Xylan	8.5	0.034*	15.3	109.3
无碳源 Medium without 培养基 carbon source	8.5	0.044	14.0	100.0

培养 4 天 Culturing 4 days

* 培养 5 天 Culturing 5 days

天,分别取样测定,大部分处理的酶活力峰值在第 4 天,所以取培养 4 天的数值进行比较。

表 2 示明 15 种单糖和糖醇对菌生长和产酶的影响,其中 L-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖显著促进菌的生长和产酶,L-鼠李糖、D-甘露糖、D-半乳糖和 L-山梨糖也有利于菌的生长和产酶。链霉菌生长的最高值一般在培养的第 1—3 天,而酶

活力的最高值在第 3—4 天,仅加 L-木糖的菌生长和酶活力的最高值延至第 5 天。

曾有报导 L-阿拉伯糖和 L-鼠李糖可以诱导抗生素链霉菌 (*S. antibioticus*) 和天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) 产生木糖异构酶^[2],我们的试验表明,上述两种糖也是链霉菌 No. 336 生长和产酶的良好碳源。

表 3 示明 8 种寡糖对菌生长和产酶的

表 5 不同氮源对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

Table 5 Effect of various nitrogen source on cell growth and enzyme yield with *Streptomyces* strain No. 336

氮 源 Nitrogen source	浓 度 Concentration (%)	发酵终 pH Ending pH	菌生长 Growth (OD ₅₀₀)	酶 活 力 Enzyme activity	
				u/ml	Relative activity (%)
玉米浆 Corn steep liquor (湿重) (Wet wight)	2.0	7.5	0.068	78.6	272.0
	1.0	7.5	0.042	43.4	150.2
酵母膏 Yeast extract (湿重) (Wet wight)	1.0	8.0	0.055	35.7	123.5
蛋白胨 Polypeptone	1.0	8.5	0.028	28.9	100.0
乙酸铵 Ammonium acetate	1.0	6.5	0.006	0.9	3.1
硫酸铵 Ammonium sulfate	1.0	6.5	0.005	0	0
尿素 Urea	1.0	7.2	0.005	0	0

培养 4 天 Culturing 4 days

影响,其中纤维二糖、麦芽糖和蔗糖促进菌的生长,也有利于产酶。此菌也能利用蜜二糖和棉子糖以促进产酶。松三糖和海藻糖对产酶也有一定的影响,但不能利用乳糖作为碳源。

表 4 示明 No. 336 菌株可利用菊糖、糊精和淀粉作为碳源,同时促进酶的形成。对纤维素和木聚糖的利用能力较差,但在含纤维素的基质中培养引起酶活力增加。

(四) 氮源对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

从表 5 可见,玉米浆和酵母膏作为氮源既有利于菌的生长,也促进产酶,明显优于蛋白胨,可能与它们含有微量促进生长的物质有关。此菌不能利用硫酸铵、尿素或乙酸铵作为唯一的碳源。

(五) 麦麸水解液对链霉菌 No. 336 生长和产酶的影响

麦麸经细菌淀粉酶水解,其滤液培养

链霉菌有利于产生葡萄糖异构酶^[16],也有报道植物秸秆的酸水解物是产葡萄糖异构酶的良好碳源^[14]。我们将麦麸分别用酶或酸水解后再稀释 1 倍,加入玉米浆等培养链霉菌 No.336,菌生长的测定是将发酵液稀释 100 倍。图 3 和图 4 表明,在接种后 3 天或 4 天菌的生长量达最高,而在第 4 天发酵液 pH 上升至 7.7 左右,酶活力达最高值,每毫升含菌培养液酶活力为 180 单位以上。如提高培养液中麦麸水解物浓度,酶活力还可增高。

麦麸富含纤维素、半纤维素和淀粉,经淀粉酶作用后,糊精、麦芽糖和葡萄糖的含量增加,如经酸水解还可能产生木糖、阿拉伯糖等五碳糖,玉米浆除含氮素和碳素外,尚有维生素等促进生长的因子。这些组分从上述试验可以证明都有利于链霉菌的生长和葡萄糖异构酶的形成。麦麸和玉米浆生产成本低,来源广,可作为工业生产葡萄

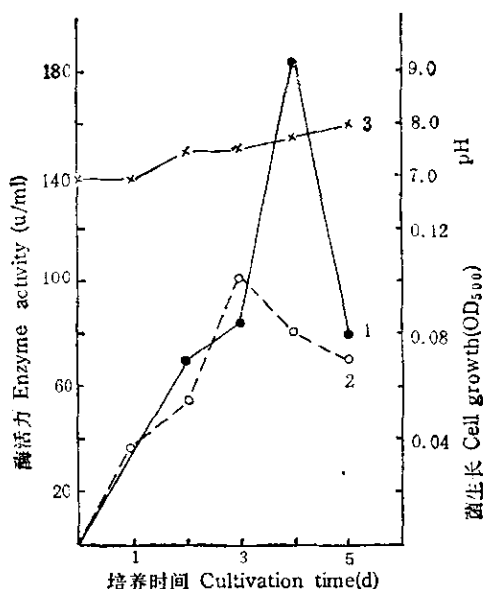


图3 麦麸酶水解液对链霉菌 No. 336 生长和产酶过程的影响

Fig. 3 Time course of the cell growth and enzyme in α -amylase hydrolysed wheat bran medium with *Streptomyces* strain No. 336

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 菌生长 Cell growth 3. pH

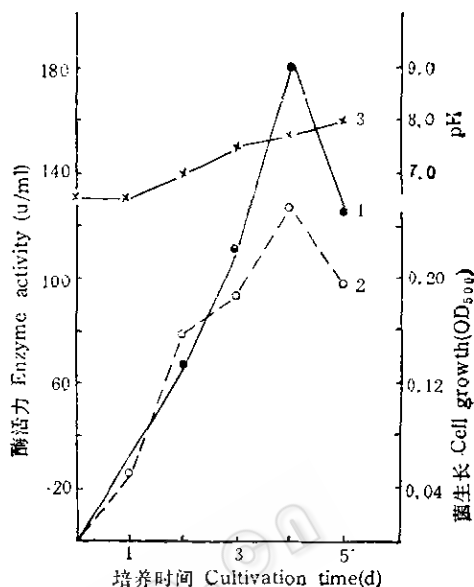


图4 麦麸酸水解液对链霉菌 No. 336 生长和产酶过程的影响

Fig. 4 Time course of the cell growth and enzyme yield in H_2SO_4 -hydrolysed wheat bran medium with *Streptomyces* strain No. 336

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 菌生长 Cell growth 3. pH

糖异构酶的原料。

参 考 文 献

- [1] Chen, W. P.: *Process Biochemistry*, 15(5): 30—35; 15(6): 36—41, 1980.
- [2] 徐子渊, 沈善炯: *生物化学与生物物理学报*, 4(3): 342—350, 1964.
- [3] 津村信藏等: *发酵协会誌*, 23(11): 516—520, 1965.
- [4] Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 30(12): 1247—1253, 1966.
- [5] Takasaki, Y. et al.: *Fermentation Advances* (ed. D. Perlman), Academic Press, p. 561—589, 1969.
- [6] 日本工業技術院: 特許公報, 7428, 7430, 7431, 1966.
- [7] CPC International Inc: France Patent, 2053584,

1971.

- [8] Brownell, C. F.: German Patent, 2018058, 1971.
- [9] Dworschack, R. G. et al.: German Patent, 2017591, 1971.
- [10] Weber, R.: German Patent, 2408708, 1974.
- [11] Park, Y. K. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20(1): 67—69, 1974.
- [12] Buki, K. et al.: Hungarian Patent, 12415, 1976.
- [13] Nand, K. et al.: *Indian J. Exp. Biol.*, 15(8): 668—669, 1977.
- [14] Chen, W. P. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(2): 324—331, 1979.
- [15] Armbruster, F. C. et al.: German Patent, 2245402, 1973.
- [16] 沈阳市食品发酵研究所: *轻工微生物*, 1: 1—9, 1978.
- [17] 潘仁瑞等: *中国酿造*, 3: 28—32, 1984.

EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCE ON THE YIELD OF D-GLUCOSE ISOMERASE IN *STREPTOMYCES ROSEOCASTANEUS* STRAIN No. 336

Pan Renrui Wang Yuanjun

(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei)

The relationship between utilization of carbon or nitrogen source and enzyme formation in *Streptomyces roseocastaneus* strain No. 336 with a hemi-synthetic medium has been studied. The strain No. 336 was inoculated into 50 ml of the medium in Erlenmeyer flask of 250 ml capacity and cultivated at 30°C on a rotary shaker (160—180 r/min).

In the 15 monosaccharides and sugar alcohols tested, L-arabinose, D-xylose and D-glucose are found to be most effective carbon source for the formation of the enzyme. Glycerol, xylitol and sorbitol inhibit the yield of enzyme. In the 8 oligosaccharides, cellobiose, maltose and sucrose accelerate the yield of enzyme obviously. In the 5 polysaccharides, inulin, dextrin and starch are used as carbon source. they also accelerate the yield of enzyme in the strain.

In the 6 nitrogen sources, corn steep li-

quor and yeast hydrolysate is superior to polypeptone on the formation of enzyme. The strain can not utilize inorganic nitrogen compounds or ammonium acetate as sole nitrogen source.

It is shown that ratio of carbon and nitrogen in medium e.g. 2:1, 1:1 or 3:1 is favourable on the formation of enzyme. If the C/N ratio is decreased, they will promote the growth of the microorganism and decrease the yield of enzyme.

The highest activity of D-glucose isomerase (180 u/ml) was obtained in about 4 days by a culture grown with wheat bran hydrolysate-corn steep liquor.

Key words

Streptomyces roseocastaneus strain No. 336; D-glucose isomerase