

嗜热链霉菌突变株 M1033-9 产葡萄糖异构酶的研究*

1. 菌种分离、诱变及产酶条件

贺家明 付光胜 侯永勤 袁建国 刘建军 阎孟安 王巧兰 张明华

(山东省食品发酵工业研究设计院, 济南 250013)

自 1965 年以来,我国对产气杆菌、乳酸菌、玫瑰暗黄链霉菌、玫瑰红链霉菌及游动放线菌葡萄糖异构酶(ECS.3.1.5)的生产条件、诱变育种和固定化作了很多研究^[1],用戊二醛交联游动放线菌细胞制成的固定化酶已批量生产。嗜热菌有许多优点,如高温培养周期短、杂菌污染少、节省冷却水、多数酶热稳定性强、耐化学试剂而有利于固定化等。近来,国内外关于嗜热菌资源的研究日益增多^[2]。为向工业提供新的优良菌种,我们从全国 14 个省市采集 2874 份样品,对产葡萄糖异构酶嗜热链霉菌进行了分离、诱变和产酶条件的研究。

材 料 和 方 法

(一) 样品采集

以土壤为主,从我国 14 个省市共采集样品 2847 个。

(二) 培养基

平皿分离培养基: 淀粉琼脂、葡萄糖琼脂、营养琼脂、自己设计的聚木糖琼脂和麸皮豆饼粉浸液琼脂。菌种斜面用淀粉琼脂培养基。摇瓶及种子发酵罐培养基(%)为麸皮 4—5, 豆饼粉 1—1.2, MgSO₄·7H₂O 0.1, K₂HPO₄·3H₂O 0.1, CoCl₂·6H₂O 0.02, pH6.7。

(三) 培养条件

平皿及斜面置恒温恒湿箱中于 50℃、相对湿度 80—90% 下培养 5 天。摇瓶: 回转式摇床(偏心距 25cm, 转速 220r/min), 41±1℃(自然湿度)培养 60 小时。上罐: MSJ-U₁-50L 自动标准发酵罐、500L 和 5000L 六弯叶涡轮搅拌式标准种子罐和发酵罐; 种龄 18 小时, 接种量 8%, 41±1℃, 通气量 1:0.2—0.3, 发酵 60—70 小时。

(四) 葡萄糖异构酶活力测定

按高渗法^[3],以被测酶液在特定反应系统中于 75℃ 异构化 1 小时,用旋光法测定果糖。生成 1mg 果糖的酶量定为一个酶活力单位。

结 果

(一) 菌种选育系谱(见图 1)

M1033 通过慢性毒理、致畸、致变和抗菌试验^[4],被鉴定为淀粉酶链霉菌 M1033 菌株 (*Sarcro-mycetes diastaticus* No.7, strain M1033)^[5]。

(二) 产酶条件

1. 发酵温度对产酶的影响: 分别在 37℃、41℃、46℃ 摇瓶培养 72 小时,测定酶活力。图 2 表明,

本文于 1991 年 5 月 27 日收到。

* “六五”、“七五”攻关项目。

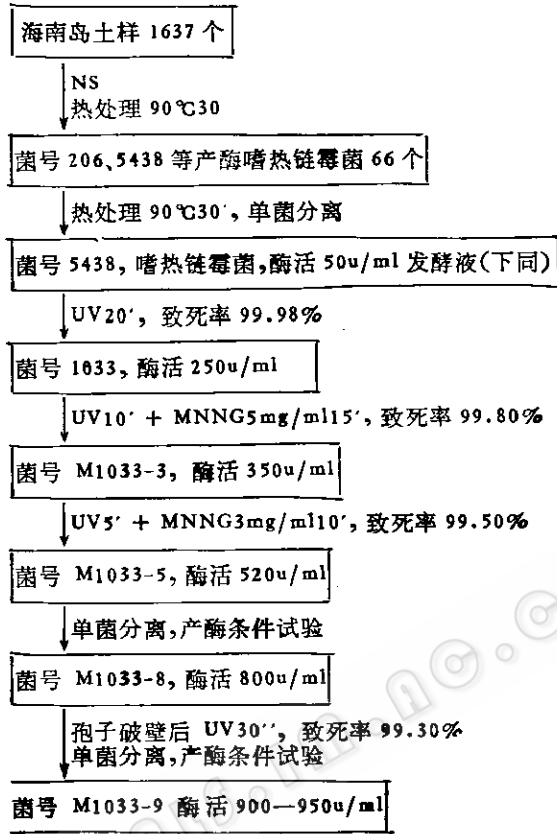


图1 菌种选育系谱图

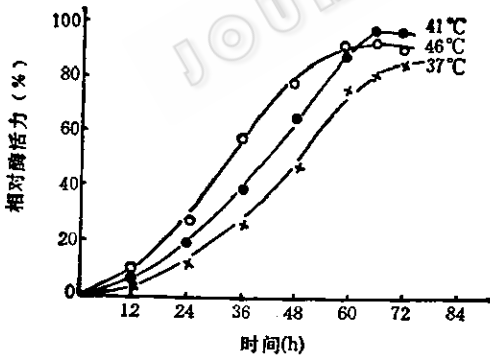
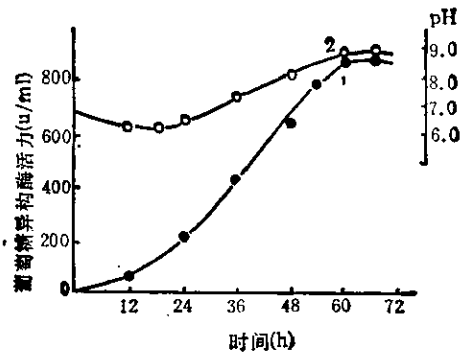


图2 培养温度对产酶的影响

图3 发酵产酶曲线
1. 酶活力; 2. pH

本菌适宜温度较广,但 41℃ 酶活最高,菌丝断裂少,易收集。

2. pH 对产酶的影响: 其他条件不变,将摇瓶培养基灭菌后 pH 为 6—8,培养 60 小时测活力。产酶适宜 pH 为 6.7—7.5。

3. 铁离子对产酶的影响: 其它条件不变,分别加入 10—40μg/ml Fe^{2+} 和 Fe^{3+} ,摇瓶培养 60 小时,结果对产酶无影响。

4. 溶解氧对产酶的影响: 在发酵罐结构、麸皮豆饼粉发酵液非牛顿型流体性质一定时,影响溶氧速

率的因素主要有搅拌转速和通气量。经试验, 转速 180r/min、通气比 0.2—0.3 时, 相对酶活力 95—100%。故该菌对溶解氧的要求较低。

5. 发酵产酶曲线: 50L 自动发酵罐产酶曲线如图 3 所示, 发酵液 pH 从 6.7 下降至 6.2 后随发酵时间延长逐渐上升, 60 小时后稳定在 8.5—8.8。酶活在 24 小时开始直线上升, 60 小时达高峰。此时, 菌丝粗壮, 发酵液易过滤分离(在生产上, 3500L 醪液用 40m² 板框过滤机过滤仅需 2—3 小时)。

讨 论

嗜热菌的 DNA 中, G + C 含量大于 A + T 含量, 前者三氢键难断裂, 其它遗传物质 RNA 等也与常温菌有一定差异^[4], 认为其遗传性较难动摇。故我们采用强烈诱变高致死率为主的诱变方法, 并为嗜热菌诱变育种提供了成功的例证。

参 考 文 献

- [1] 胡学智: 酶制剂工业(下册)(张树政主编), 第 559 页, 科学出版社, 北京, 1984 年。
- [2] 周一等: 微生物学报, 30(3): 223—227, 1990。
- [3] 江苏省化工设计研究所: 江苏发酵, 2: 1—11, 1976。
- [4] 贺家明等: 山东轻工科技, 2: 1—7, 1982。
- [5] 崔涛等: 微生物学报, 31(4): 329—331, 1991。
- [6] Л. Г. Логинова И. Т. Д. Микробиология, 45(3): 569—574. 1976.

STUDIES ON D-GLUCOSE ISOMERASE OF THERMOPHILIC *STREPTOMYCES* MUTANT STRAIN M1033-9

I. ISOLATION, MUTAGENESIS AND THE CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION

He Jiaming Fu Guangsheng Hou Yongqin Yuan Jianguo

Liu Jianjun Yan Mengnan Wang Qiaolan Zhang Minghua

(Shandong Food and Fermentation Industry Research and Design Institute, Jinan 250013)

In screening high producer of glucose-isomerase(GI), thermophilic *Streptomyces* strain 5438(activity of GI, 50u/ml broth) was chosen as an original strain, which was isolated from 1637 soil samples in Hainan Island of China.

After repeated treatment with UV, MNNG and natural selection, the mutant strain M1033-9 was selected. Its activity of GI reached 939u/ml broth which as finally composed contains: wheat bran 5%(w/v), soybean cake powder 1.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.1%, CoCl₂ · 3H₂O 0.024%, initial pH 6.7 (producing condition of GI, pH6.7—7.5), on 5000L fermentor at 40±1°C (producing condition of GI, 37—46°C) and aerating rate 1:0.2—0.3 (producing condition of GI, 1:0.1—0.8) for 60 hours.

Key words Thermophilic *streptomyces*; D-glucose isomerase