

# 嗜热链霉菌变株 M1033-9 葡萄糖异构酶的研究\*

## II. 酶的性能与工业应用

贺家明 袁建国 侯永勤 刘建军 刘德谦 董玉意 王巧兰 张明华

(山东省食品发酵工业研究设计院, 济南 250013)

嗜热链霉菌变株 (*Streptomyces diastaticus* No.7 mutant strain) M1033-9 菌的胞外葡萄糖异构酶作用最适温度为 80—85 °C, 最适 pH 为 8—9, pH 大于 7.8 时有较强的热稳定性,  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对酶有激活作用,  $\text{Co}^{2+}$  对酶的热稳定性有保护作用。

5000L 发酵罐经板框过滤的清发酵液含胞外酶 885u/ml, 占总酶活 94%, 可直接作酶源吸附于大孔阴离子交换树脂上制成固定化葡萄糖异构酶 (酶活 13000u/g(干)) 工艺简便。年产 2000 吨 42 型果葡糖浆规模下每公斤干固定化酶可生产果葡糖浆 4.59 吨。M1033-9 是产胞外葡萄糖异构酶的优良菌种。

**关键词** 胞外葡萄糖异构酶; 固定化葡萄糖异构酶; 果葡糖浆

本文继前报的研究结果<sup>[1]</sup>, 探讨 M1033-9 菌产胞外葡萄糖异构酶及该酶的基本性质和应用, 以求更好地应用于生产实践。

## 材 料 和 方 法

### (一) 仪器及设备

1. DL302-1 型调温调湿箱 (上海吴淞五金厂产品), 72 型分光光度计 (上海分析仪器厂产品), Nr.323 747 大型显微镜 (奥地利 REICHERT 公司产品), 501 型超级恒温水浴锅 (上海实验仪器厂产品), UV-120-02 型紫外分光光度计 (上海光学仪器厂产品), POLAMAT-S 型自动旋光仪 (德国 CAR LZEISS 分公司产品), MISTRAL-6L 型冷冻高速离心机 (英国 MSE 公司产品)。

2. MSJ-U<sub>3</sub> 50L 型自动发酵罐 (日本 B.E.MARUBISHI 公司产品), 500L 和 5000L 六弯叶涡轮搅拌式标准种子罐和发酵罐 (镇江发酵设备厂产品), 实验室用恒温水浴异构化玻璃管柱 ( $\phi 40 \times 600\text{mm}$ ) 2 根。车间用不锈钢夹套异构化柱 ( $\phi 600 \times 1100\text{mm}$ ) 4 根, 其它从略。

### (二) 斜面、种子和发酵培养基及发酵液酶活测定方法

同前报<sup>[1]</sup>。

### (三) 固定化葡萄糖异构酶的制备

M1033-9 菌高产胞外葡萄糖异构酶, 这种游离酶是等电点较低的蛋白质, 故用吸附法制备固定化酶比较经济。试验过多种吸附载体, 最后选用苯乙烯系大孔强碱性阴离子交

本文于 1991 年 5 月 27 日收到。

\* “六五”、“七五”攻关项目。

换树脂 NS-43(南开大学化工厂研制)。树脂经常规处理、转型。取上述 M1033-9 的板框过滤清发酵液直接作酶液,按树脂:酶液=1:20-30 投入挂酶罐,同时加入 0.005mol/L  $MgSO_4$ 、0.01mol/L  $CoCl_2$ ,在 50-60 °C 下挂酶,经洗涤后贮存备用。

#### (四) 固定化葡萄糖异构酶活力测定方法

精确称取 1g( $\pm 0.001$ ) 干固定化酶放入 100ml 三角瓶中,加入 45.0ml 45.5% (w/w, 比重 1.21) 的葡萄糖溶液(用 pH7.8 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液配制),再加入 5ml 0.05mol/L 的  $MgSO_4$  溶液,于 70 $\pm 0.5$  °C 水浴中保温 1 小时,立即加入 5ml 0.5mol/L 的高氯酸终止反应,用旋光法测定果糖生成量。在此特定条件下,每生成 1mg 果糖的酶量为 1 个酶活力单位 (u)。

#### (五) 葡萄糖异构化底物

小试用济南第二药厂产的口服葡萄糖。生产用山东省费县酒厂生产的甘薯淀粉双酶法葡萄糖糖浆, DE> 95%, 透光率 > 90%(560nm), 电阻率 > 8000 $\Omega$ cm。

#### (六) 葡萄糖异构化条件

三根柱并联下行式进料。底物浓度 40-42%(折光), 其中  $MgSO_4$  0.005mol/L,  $NaHSO_3$  0.004mol/L。pH7.5 $\pm 0.5$ , 温度 60 $\pm 1$  °C。最终异构化率 42%。

## 结 果

### (一) 葡萄糖异构酶 (GI) 的性能

1. 发酵时间与产酶的关系: 50L 自动发酵罐, 41 $\pm 1$  °C, 搅拌速度为 180r/min, 通气量 1:0.2-0.3, 每 6-12 小时取样测定

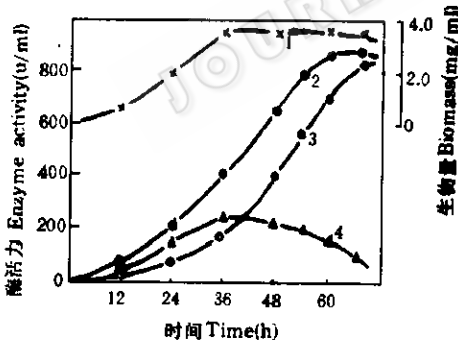


图 1 发酵时间与产酶的关系

Fig. 1 The relations between time and liberation of GI

- |          |                       |
|----------|-----------------------|
| 1. 生物量   | Biomass;              |
| 2. 总酶活力  | Total activity of GI; |
| 3. 胞外酶活力 | Activity of extra-GI; |
| 4. 胞内酶活力 | Activity of intra-GI  |

细胞酶活力(发酵液离心后用生理盐水洗涤作成每毫升含干菌体 10mg 悬液,用日本 5202PEI 型超声波细胞破碎器处理, 20KHz, 100W, 20 分钟, 离心, 取上清液测酶活)、胞内酶活力(细胞酶活力 $\times$ 每毫升发酵液中干菌体量毫克数)、胞外酶活力 (u/ml 清发酵液) 和总酶活力(胞内 + 胞外), 对发酵时间作图(图 1)。表明 16 小时菌体开始旺盛繁殖, 直线生长至 36 小时左右达最高值。胞外酶 30 小时后开始直线上升, 至 40 小时前后超过胞内酶, 在衰老期超过更大, 可占总酶活 94%, 平均达 827u/ml(5000L 发酵罐清发酵液酶活达 885u/ml)。

2. 清发酵液胞外酶的某些性质\*\*:

\*\* 固定化酶载体 NS-43 树脂对 M1033 菌系的胞外酶选择性吸附力较强。经比较, 直接用清发酵液比较经济实用, 故作本项研究。

(1) 温度对酶活力的影响: 按前报方法<sup>[1]</sup>, 分别以不同的温度测酶活力(图 2)。结果该菌胞外酶最适温度范围为 80—85 °C, 超过 85 °C 时, 酶活急剧下降。

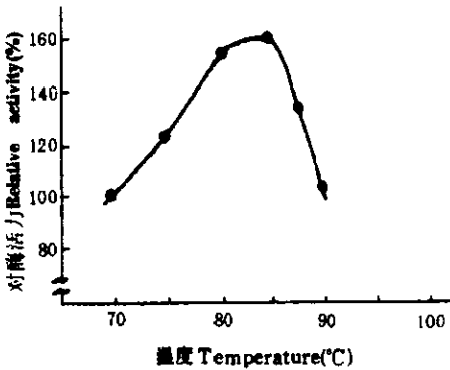


图 2 温度对酶活力的影响

Fig. 2 The effect of temperature on activity

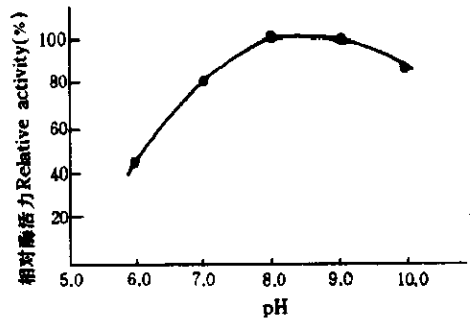


图 3 pH 对酶活力的影响

Fig. 3 The effect pH on activity of GI

(2) pH 对酶活力的影响: 其它条件不变, 分别按图 3 所列 pH 值 (Tris 缓冲液) 测酶活力(图 3)。此酶最适 pH 为 8—9。

(3) 金属离子对酶活力的影响: 其它条件不变, 分别外加  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 浓度的  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  金属离子盐溶液于酶反应系统中, 测酶活力, 与不加金属离子盐的进行对照比较。说明  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对酶有较大的激活作用,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等有显著抑制作用。

(4) 金属离子对酶热稳定性的影响: 将酶液与含有  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的金属盐的磷酸缓冲液混合, 在 70 °C 下保温 1 小时, 然后测其剩余酶活力, 并以未加金属离子同时保温的作为对照。结果如表 1 所示,  $\text{Co}^{2+}$  对酶的热稳定性起着保护作用。

表 1 金属离子对酶热稳定性的影响

Table 1 The effect of metal ions on thermostability of GI

| 金属离子 ( $1 \times 10^{-4}$ mol/L) | 相对酶活力 (%)         | 金属离子 ( $1 \times 10^{-4}$ mol/L) | 相对酶活力 (%)         |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| Metal ion                        | Relative activity | Metal ion                        | Relative activity |
| 对照 Control                       | 100.0             | $\text{Na}^{+}$                  | 58.7              |
| $\text{Co}^{2+}$                 | 139.3             | $\text{Zn}^{2+}$                 | 46.5              |
| $\text{Ba}^{2+}$                 | 82.6              | $\text{Ni}^{2+}$                 | 20.1              |
| $\text{Mn}^{2+}$                 | 78.0              | $\text{Ca}^{2+}$                 | 8.6               |
| $\text{K}^{+}$                   | 72.4              | $\text{Cu}^{2+}$                 | 0                 |

(5) 酶的热稳定性: 将 20ml 酶液与 4ml pH7.8 Tris 缓冲液混合, 不加底物和任何保护剂, 分别在不同温度下保温 60 小时, 每隔 12 小时取样测定残余活力(图 4)。在 60 °C 酶活力基本不变, 90 °C 几乎全部失活。说明该酶在微碱性条件下具有较强的热稳定性, 能满足 60 °C 下挂酶和异构化的工艺要求。

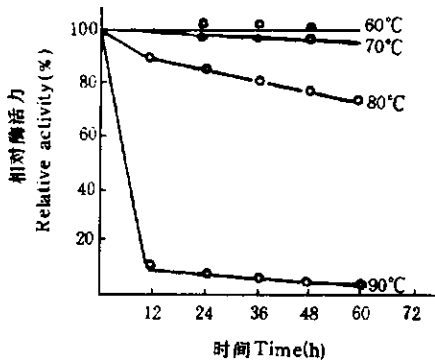


图 4 酶的热稳定性

Fig. 4 The thermostability of GI

表 2 M1033-9 葡萄糖异构酶的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of GI from M1033-9

| 氨基酸  | Amino acid | (%)   | 氨基酸  | Amino acid | (%)  |
|------|------------|-------|------|------------|------|
| 谷氨酸  | Glu        | 13.81 | 缬氨酸  | Val        | 4.00 |
| 门冬氨酸 | Asp        | 10.89 | 赖氨酸  | Lys        | 3.42 |
| 丙氨酸  | Ala        | 10.19 | 异亮氨酸 | Ile        | 3.41 |
| 亮氨酸  | Leu        | 10.15 | 组氨酸  | His        | 3.06 |
| 精氨酸  | Arg        | 9.42  | 酪氨酸  | Tyr        | 2.72 |
| 甘氨酸  | Gly        | 7.70  | 丝氨酸  | Ser        | 2.38 |
| 苯丙氨酸 | Phe        | 6.69  | 蛋氨酸  | Met        | 2.06 |
| 脯氨酸  | Pro        | 4.52  | 色氨酸  | Try        | 1.35 |
| 苏氨酸  | Thr        | 4.11  | 半胱氨酸 | Cys        | 0.22 |

表中数据为氨基酸残基数相对百分比

The data of amino composition are mol percents

用 Sephadex G-200 柱过滤法测得酶的分子量为 91000。

由 751 型紫外分光光度计测得酶的紫外最大吸收 ( $\lambda$  最大值) 在 278nm。用 0.5mm 超薄层 PAGE 等电聚焦电泳<sup>[5]</sup>, 两性载体为 pH3-6 的 Ampholine(瑞典 LKB 公司产品), 测得等电点 (pI) 为 4.3。以葡萄糖为底物, 用双倒数作图法测得米氏常数  $K_m$  为 0.56mol/L, 最大反应速度  $V_{max}=95.0\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

最适 pH 在 8.0-9.0, 最适温度 80 °C, 需  $\text{Co}^{2+}$  的保护。与清发酵液测定值基本一致。

## (二) 固定化葡萄糖异构酶的工业应用

在小试装酶量为 20g(干), 固定化酶平均活力 12000-15000u/g(干), 平均异构化能力为每克固定化酶制得 42 型果葡糖浆 9030g 的基础上, 在费县酒厂完成与年产两千吨果葡糖浆配套的发酵和固定化酶生产线, 固定化酶活力达 12000-14000u/g(干)。异构化柱三个月连续运转, 每公斤固定化酶(干)可产 42 型果葡糖浆 4.59 吨。

## 讨 论

1. 胞外酶比较易于收集纯化, 可避免细胞破碎的烦琐和杂质干扰。如图 1 所示, M1033-9 发酵 30-36 小时胞外酶迅速增加, 在对数生长期 40 小时左右酶活力超过胞内。因

此认为 M1033-9 葡萄糖异构酶是在胞内完成翻译后分泌的胞外酶, 分泌高峰在静止期 (55-60 小时) 之前, 而自溶发生在静止期和衰老期, 胞外 / 胞内的骤增早于自溶, 所以 M1033-9 菌与一般报道 (包括日本的产葡萄糖异构酶嗜热链霉菌 *Streptomyces* YN No.6<sup>[6]</sup>) 不同, 是一株较为少见的产胞外葡萄糖异构酶的工业优良菌株。

2. M1033-9 固定化酶在生产上的异构化率仅为小试的 1/2, 主要原因是生产条件所限酶法葡萄糖浆纯度较差。

### 参 考 文 献

- [1] 贺家明等: 微生物学报, 32(5):380-382, 1992。
- [2] 刘自箴等: 发酵学报, 1:12-18, 1982。
- [3] 黄婉治等: 中国科技大学学报, 22(3):283-289, 1992。
- [4] 徐秀璋: 蛋白质顺序分析技术, 第 33-43 页, 科学出版社, 北京, 1988 年。
- [5] Laboratory Manual, LKB 2117 Multiphor II Electrophoresis System, 1986。
- [6] 日本特许: 74-42555;75-14560。

## STUDIES ON D-GLUCOSE ISOMERASE OF THERMOPHILIC *STREPTOMYCES* MUTANT STRAIN M1033-9 II. ENZYME PROPERTIES AND INDUSTRIAL APPLICATION

He Jiaming Yuan Jianguo Hou Yongqin Liu Jianjun  
Liu Deqian Dong Yuyi Wang Qiaolan Zhang Minghua

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

The optimum temperature of the extracellular D-glucose isomerase(GI) of mutant strain M1033-9 was 80-85 °C, optimum pH was 8-9. In condition of pH7.8, the enzyme had better thermostability, both Co<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> enhanced activity of enzyme, Co<sup>2+</sup> had a protection effect on enzyme thermostability. The clear broth of 5000L fermentor, which was filtered by plate and frame filter, included 885u/ml of extracellular GI which took up 94% of total activity of GI. The clear broth was able to produce the immobilized GI (13000u/gdry) which was adsorpted in the large pore anion exchange resin. This technique was simplified. 1 kg of immobilized GI(dry) could isomerizate glucose syrup(8000Ωcm) to produce 4.59 tons of fructose glucose syrup.

**Key words** Extracellular D-glucose isomerase; Immobilized D-glucose isomerase; Fructose glucose syrup