

芒 麻 酶 法 脱 胶

刘荣忠 张盛冠 赵玉林 吴惠如

(湖南轻工研究所,长沙)

郝利民

(株洲亚麻纺织研究所,株洲)

利用细菌酶脱胶是亚麻纺织工业的一项新技术。本文报道脱胶细菌的选育和脱胶条件试验的结果。

材 料 和 方 法

一、菌株

从麻园土壤中分离的野生型菌株、筛选出脱胶活性(纤维分散率高)的芽孢杆菌 D173-22 菌株。以此菌株为出发菌株,经多次物理化学因子诱变处理,得突变菌株 Nf-9,用这株菌进行脱胶条件试验。

二、培养基

1. 斜面培养基(%): 豆饼粉 2, 葡萄糖 2, 磷酸氢二铵 0.3, 琼脂 2, 自然 pH, 37℃ 培养 48 小时。

2. 摇瓶发酵基础培养基(%): 豆饼粉 2, 磷酸二氢钾 0.05, 硫酸镁 0.05, 自然 pH, 250 毫升三角瓶装液量 40 毫升。

三、培养方法

用菌体的悬液接种于三角瓶培养基中,每瓶接种 1 毫升。于旋转式摇床(240 转/分,偏心距 2.5 厘米),37℃ 培养 24 小时,以基础培养基作对照。条件试验采用单因子试验法。

四、酶活力测定

1. 纤维分散率测定: 用于菌株的筛选。方法是: 称 1 厘米长的原麻 0.50 克,置 50 毫升比色管中,加发酵液 5 毫升,放入 55℃ 水浴 35 分

钟,取出加水少许,振荡后再加水至刻度。与标准管比较,以纤维分散率表示脱胶酶活力。

2. 果胶酶测定: 用于菌株选育。采用次亚碘酸法,缓冲液 pH 9.0,反应时间 60 分钟。以每小时酶促催化果胶分解生成 1 毫克当量游离半乳糖醛酸的酶量定为一个酶活力单位(单位/毫升)。

五、标准管制备

将 1 厘米长完全脱胶的原纤维和没有脱胶的原纤维按总重量 0.50 克,比例是 10:0、9:1、8:2、……1:9 的称量放入 50 毫升比色管中,加 0.1% 升汞溶液至刻度摇匀,即成纤维分散率为 100%、90%……10% 的标准管。

实 验 结 果

一、菌株选育

用不同理化因子对 D173-22 菌株进行处理和二次自然分离。从 7784 株诱变菌株中选出 Nf-9。试验表明,变异株 Nf-9 比出发菌株纤维分散率提高 13—17%,果胶酶活力提高 38.9%。该菌转接十次,产酶活力稳定,纤维分散率仍达 92% 左右。Nf-9 菌株的选育过程见图 1。

二、培养基组成

1. 碳源: 基础培养基中加入不同碳源的实验结果(见表 1)表明以基础培养基最好。

2. 氮源: 基础培养基中加入不同氮源的实

诱变过程	纤维分散率 (%)	果胶酶活力 (单位)
D173-22 uv 2 分 高能电子 20 万 rad DES 1% + uv 1 分 ⁶⁰ Co 20 万伦琴 uv 2 分 + NTG 2 毫克/毫升, 1 小时	80	0.0305
H-438 5-FU 1000 微克/ 毫升 + uv 1 分	80	—
I-59 EMS 0.05 M 20 分 HA 10% 45 分 + uv 1 分 + DES 1% 30 分	88	0.0338
M-8; M-111 快中子 6 K rad	91	—
Nf-9	93-97	0.0423

图 1. Nf-9 菌株的选育过程*

表 1 不同碳源对产酶活力的影响

结果 / 项目 碳源名称	碳源添加量 (%)	纤维分散率 (%)
糖饼	1 3	62 67
麦麸	1 3	64 57
红薯淀粉	1 3	62 60
基础培养基	—	67

表 2 不同氮源对产酶活力的影响

结果 / 项目 氮源名称	添加量(%)	纤维分散率(%)
花生粉	2	52
鱼粉	2	49
棉子粉	3	51
蚕蛹粉	3	49
酵母粉	0.8	51
尿素	0.1	42
	0.5	40
硫酸铵	0.1	40
	0.5	44
对照(豆饼粉)	2	50

验结果见表 2。

表 2 说明, 用 2% 花生粉、3% 棉子粉和 0.8% 酵母粉做氮源其分散率与对照接近, 而硫酸铵和尿素明显低于对照。

3. 无机元素: 添加各种无机元素的实验结果见表 3。

表 3 无机元素对产酶活力的影响

无机元素	镁离子	钙离子	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	对照
结果 / 项目					
添加量(%)	0 0.2	0.05 0.1	0.3	0.3	—
纤维分散率(%)	47 38	35 22	57	68	47

表 3 说明, 无机磷对产酶活力有促进作用, 钙离子有抑制作用, 不添加镁离子的结果与对照相同。

4. 微量元素和表面活性剂: 将铜、锌、铁、钴、锰等离子加入发酵培养基中, 使最终浓度分别为 5×10^{-4} 和 5×10^{-5} 。结果表明对产酶活力均无促进作用。

用表面活性剂平平加、十二烷基苯磺酸钠、1631、十二烷基苯磺酸、209 洗涤剂、6501、吐温 80 等 7 种, 各按 0.05% 和 0.1% (体积/体积) 的量实验前加入发酵培养基中, 结果表明对产酶活力没有促进作用。

5. 转接试验: 诱变菌株 M-111 用 0.3% 的磷酸氢二铵发酵培养后, 在其最适 pH 9.0 条件下酶活力反应结果见表 4。该菌转接 6 次, 产酶活力稳定。

表 4 菌株的转接试验

菌株	诱变株 M-111						对照 (D173-22)
转接次数	1	2	3	4	5	6	—
纤维分散率(%)	90	91	92	91	91	93	59

三、培养条件

1. 培养温度和产酶高峰: 分别在三种温度下进行摇瓶发酵(见图 2)。

图 1 说明, 三种温度下培养 24 小时, 产酶活力达同一水平。该菌株能耐较高温度。

* DES 为硫酸二乙酯; 5-FU 为 5-氟尿嘧啶; NTG 为 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; EMS 为甲基磺酸乙酯; HA 为盐酸羟胺; uv 为紫外线 (15 瓦, 距离 30 厘米)。发酵培养基组成 (%): 豆饼粉 2, 磷酸氢二铵 0.3, 自然 pH。

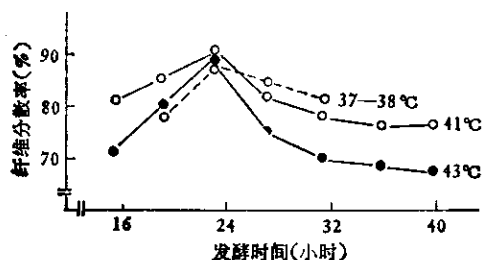


图2 培养温度、时间与产酶活力的关系
培养基组成: 豆粕粉 2%, 磷酸氢二铵 0.3% 自然 pH。图中温度为培养温度。

2. 通气量: 在 500 毫升三角瓶中, 装液量分别为 40, 80, 120 毫升, 其纤维分散率分别为 (%): 85, 89, 88, 说明在此范围内, 通气量对产酶影响不大。

四、酶活力的特性

1. 热稳定性: 发酵液在不同温度下处理 10 分钟后, 测其纤维分散率(见图 3)。

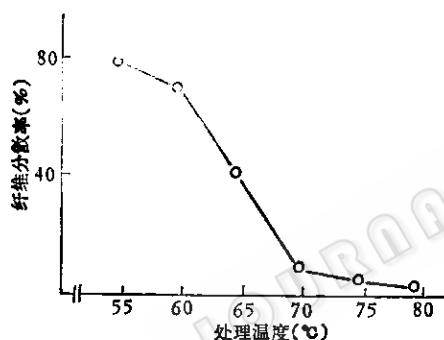


图3 不同温度处理对酶活力的影响

图 3 说明, 酶活力在 55—60°C 时基本稳定。

2. 反应最适 pH: 用磷酸缓冲液将发酵液

调成不同 pH 液, 测其纤维分散率, 结果见图 4。

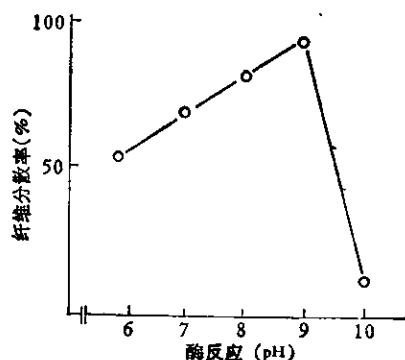


图4 pH 对酶反应的影响

结果说明, pH 9.0 时酶活力最高。pH 大于 9, 酶活力急剧下降。

3. 反应最适温度: 发酵液在不同温度下处理苧麻, 测其纤维分散率, 结果见图 5。

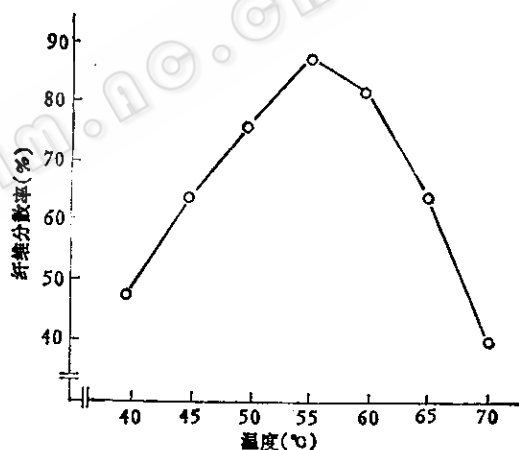


图5 酶反应的最适温度

图 5 说明反应温度在 55°C 时酶活力最高。

表 5 酶的应用试验结果

结果		编号			质量限定要求(%)
测定项目		1	2	3	
酶解时间 (分)		35	60	60	
残胶分析	残果胶 (%)	0.31	0.31	0.31	<0.5
	残半纤维 (%)	3.17	3.46	2.27	<1.5
	残木质素 (%)	0.26	0.07	0.25	<0.5
质量鉴定	单纤支数 (支)	2027	1417	1886	>1600
	强力 (克)	33.11	39.44	31.29	>32
	断长 (千米)	69.1	69.0	59.0	>50

注: 原麻含果胶 5.13%、半纤维素 15.61%、木质素 0.66%, 原麻试量每次 450 克。

五、应用试验

用发酵液以不同的时间处理苧麻，后处理方法同化学法脱胶，结果见表5。

表5说明试样的残果胶、残木质素、纤维支数、强力、断长等各项指标都基本达到生产中规定的要求，但残半纤维素含量偏高。

讨 论

梶明^[1]等报道了聚半乳糖醛酸反式消去酶 (polygalacturonic acid transeliminase) 在 pH 9—9.5 时酶活力最高。Gardner 和 Kado^[2,3] 等指出这种酶能被钙离子激活，并在植物组织浸解中起重要作用。本文结果表明，反应最适 pH

与文献报道接近。但钙离子对酶活力呈明显抑制作用，这与文献报道不同，而无机磷对酶活力的刺激作用，未见文献报道。因此本试验中芽孢杆菌产生的苧麻脱胶酶可能不同于聚半乳糖醛酸反式消去酶。供试菌株采用多种理化因子处理，但诱变效果并不显著，要探索更有效的方法。

参 考 文 献

- [1] 梶明等：日本農芸化学会誌，46：509，1972。
- [2] Gardner, J. M. and C. I. kado: *J. Bacteriol.* 127: 451, 1976.
- [3] Fogarty, W. M. et al.: *Process Biochem.* 9(6): 11, 1974.