

文章编号 :0253-9721(2006)03-0027-03

# 苕麻酶脱胶用菌株的筛选及性能

储长流<sup>1</sup>, 郑皆德<sup>2</sup>

(1. 安徽工程科技学院 纺织服装系, 安徽 芜湖 241000; 2. 宁波维科集团, 浙江 宁波 315000)

**摘要** 以枯草芽孢杆菌 BI3 为出发菌株, 利用基于基因突变的紫外线诱变育种法, 筛选出产高活性果胶酶和半纤维素酶的菌株 S2 和 S11, 并对其生长特性、产酶情况及底物亲和性进行分析研究, 发现 S2 合成酶液与底物具有更好的亲和性, 活性更高, 世代时间缩短, 分裂增长能力增强, 酶液性质明显优于菌株 BI3 和 S11, 更适合苕麻脱胶生产要求。

**关键词** 苕麻; 酶脱胶; 菌株; 筛选

中图分类号: TS192.552 文献标识码: A

## Selection and characterization of bacillus for enzymatic degumming of ramie fiber

CHU Chang-liu<sup>1</sup>, ZHENG Jie-de<sup>2</sup>

(1. Textile and Apparel Department, Anhui University of Technology and Science, Wuhu, Anhui 241000, China;  
2. Ningbo Weike Group, Ningbo, Zhejiang 315000, China)

**Abstract** With a new type basophil original bacillus BI3 as starting raw material, the genetic mutation breeding induced by the ultraviolet radiation was used, and two excellent bacilli S2 and S11 were selected, which were utilized for synthesizing more active pectinase and hemicellulase. Their development properties, rough enzyme mixture and appetency were analyzed. It is found that the enzyme mixture of S2 shows better appetency, more active, shorter generation time, and stronger fissility than BI3 and S11, and is more suitable for degumming of ramie fiber.

**Key words** ramie fiber; enzymatic degumming; bacillus; selection

为了保护环境, 节约生产成本, 追求苕麻脱胶的环保加工, 近年来出现了新型酶法脱胶工艺, 企业自主完成细菌的培养、酶液制备到脱胶的整个生产过程。生产成本低, 酶液安全无毒, 操作简单灵活, 脱胶质量稳定, 得到企业的认可<sup>[1]</sup>。而菌株品质好坏直接关系着能否产生高质量的酶液, 优秀的菌株不仅能提高酶制剂的品质、产量以及发酵原料的利用率, 而且还能增加品种, 缩短发酵生产周期, 改进发酵和提炼工艺条件等。筛选优秀的产酶菌株是提高酶法脱胶质量的首要工作<sup>[2]</sup>。本文以枯草芽孢杆菌 BI3 为出发菌株, 利用基于基因突变的紫外线诱变育种法, 筛选出产高活性果胶酶和半纤维素酶的菌株, 并对其生长特性、产酶情况及底物亲和性进行分析研究, 以选取最优菌株, 为苕麻的酶脱胶作准备。

## 1 原生质体紫外线诱变

### 1.1 原生质体的制备

选用编号为 BI3 的实验室保藏枯草芽孢杆菌, 其细菌特性: 在陈旧培养基上形成芽孢, 在新鲜培养基中菌体呈杆状, 培养条件粗放, 繁殖速度快, 产酶体系比较完善, 除了产生高活性果胶酶外, 还产生木聚糖酶、甘露聚糖酶等半纤维素酶, 但不产生纤维素酶<sup>[1]</sup>。

取一环于 30 mL 肉汤培养基中, 34 °C 恒温水浴摇床培养 5 h, 再加入青霉素 0.9 mL, 使其最终浓度为 0.3 U/mL, 继续培养 2 h。并进行细胞收集、总菌数测定和脱壁。

收稿日期: 2004-06-24 修回日期: 2005-08-17

基金项目: 安徽工程科技学院青年基金项目(2003YQ001)

作者简介: 储长流(1978-), 男, 讲师, 硕士。主要研究领域为纺织新材料及新产品。

## 1.2 紫外线诱变

取原生质体悬浮液于平面皿中,紫外灯(30 W, 间隔 30 cm)下诱变 90 s,取稀释度分别为 1%, 0.1%, 0.01% 的溶液各 0.2 mL,再生平板涂布记数, 34 °C 摇床培养 48 h 记数,测其果胶酶、木聚糖酶及甘露聚糖酶活性。

## 2 初筛与复选

出发菌株 B13 共 140 株,经紫外线诱变后,测试其产酶活性变化情况,如表 1 所示。在初筛菌株时,依据表 1 中结果,首先选出木聚糖酶及甘露聚糖酶升高的菌株,并结合果胶酶活性升高的菌株,共计 39 株,在土豆培养基中培养,然后接麸皮培养基上摇床 34 °C 培养 48 h,进行复筛,测试 39 株复选菌株产酶活性变化情况,结果如表 2 所示。在此基础上进一步筛选菌株,最后得到含果胶酶活性高,含木聚糖酶及甘露聚糖酶活性也较高的 2 株菌株 S11 和 S2。

表 1 初筛菌株产酶活性变化 株

酶活性变化	果胶酶	木聚糖酶	甘露聚糖酶
升高	31	26	16
平行	60	73	22
降低	49	41	36

表 2 复选菌株产酶活性变化 株

酶活性变化	果胶酶	木聚糖酶	甘露聚糖酶
升高	14	13	11
平行	14	16	13
降低	11	10	15

从脱胶菌株筛选过程中看出,紫外线照射后,果胶酶活性升高的菌株最多,其次为木聚糖酶及甘露聚糖酶活性升高菌株,诱导产高活性半纤维素酶细菌比产高活性果胶酶细菌的难度要大得多,这是由细菌的 DNA 排列所决定的。在同一紫外线源的照射下,不同细菌产生的诱变效果不同,这可以认为紫外线对不同细菌的 DNA 链段作用效果是不相同的,不同的 DNA 链段抗紫外线辐射能力是不同的。诱变育种的方向性比较差,筛选工作量繁琐。现代基因工程技术必将改变这种被动状况,在苧麻生物脱胶的菌株培育中引入基因工程,通过分析细菌的 DNA 片段排列,利用各种限制性内切酶对 DNA 链段进行切割,然后利用连接酶把不同 DNA 片段相互连接起来,筛选出特异性脱胶细菌,必将成为苧麻生物

脱胶的革新工程<sup>[3]</sup>。

## 3 脱胶菌株的性能分析

### 3.1 诱变菌株的生长特性

细菌细胞的生长是一个十分复杂的生命过程,一般可分为延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段。果胶酶和半纤维素酶属于诱导酶,诱导物解除了阻遏物对 DNA 的阻遏作用,从而使得 DNA 上的基因片段启动其“命令”程序,细胞开始合成果胶酶和半纤维素酶。合成这类诱导酶存在一定的时间延迟,为细菌的增长做准备<sup>[4,5]</sup>。图 1 反映的是 3 株菌的培养时间  $t$  与透光度 O.D 的变化曲线。从生长曲线可以看出,在细菌进入对数增长期前曲线几乎是平直的,细胞数量没有增长,与 B13 相比,诱变细菌 S11 和 S2 的延迟期变短了,这说明诱变细菌对环境的适应能力增强,有利于在发酵生产中,细菌较快地进入产酶阶段,可以缩短发酵时间。由对数期生长曲线的斜率可计算出 S2, S11, B13 的世代时间 (generation time, 指每个细胞分裂一次所需要的时间),分别为 30.520, 31.308, 33.372 min。诱变菌 S2 与出发菌相比,缩短了世代时间,这说明诱变菌 S2 具有更强的分裂增长能力,可以更早地进入大量产酶阶段。此外,与出发菌相比,诱变菌 S2 和 S11 由于对数期增长速度快,营养物质消耗快,细菌增长更早进入稳定期。衰亡期是由于营养物质的消耗,而有毒物质的积累,杀死大量的细菌细胞,表现为细胞数量的急剧减少,本文没有测试和画出衰亡期的生长曲线变化情况。

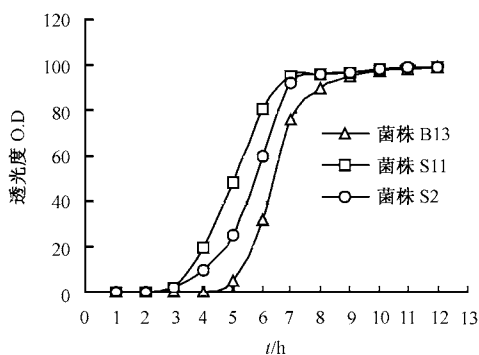


图 1 诱变菌株生长曲线

### 3.2 诱变菌株的产酶曲线变化

图 2 反映的是 3 株菌的培养时间  $t$  与消光度 O.D 的变化曲线。3 株菌培养 48 h 后,出现果胶酶

产酶高峰, 见图 2(a), 诱变菌株 S2 果胶酶产酶高峰最高, 并维持一个比较高的稳定产酶水平, 而出发菌株 B13 最高产酶水平低于 S2 和 S11, 并且下降的较快。继续培养, 在 96 h 出现第 2 次小高峰, 这可能是发生了另外一种果胶酶合成, 导致产酶曲线变化。与第 1 次高峰相比, 酶活性已经下降了许多, 在实际生产中, 需主要关注第一产酶高峰。在培养 48 h 左右, 3 株菌出现合成木聚糖酶及甘露聚糖酶高峰, 见图 2(b), 2(c)。出发菌株 B13 产酶活性明显低于诱变菌株 S2 和 S11, 这是由于紫外线诱变导致细胞 DNA 片段发生变化, 直接影响到合成酶的操纵子发生改变, 半纤维素酶的合成发生变化, 导致产酶曲线的改变。

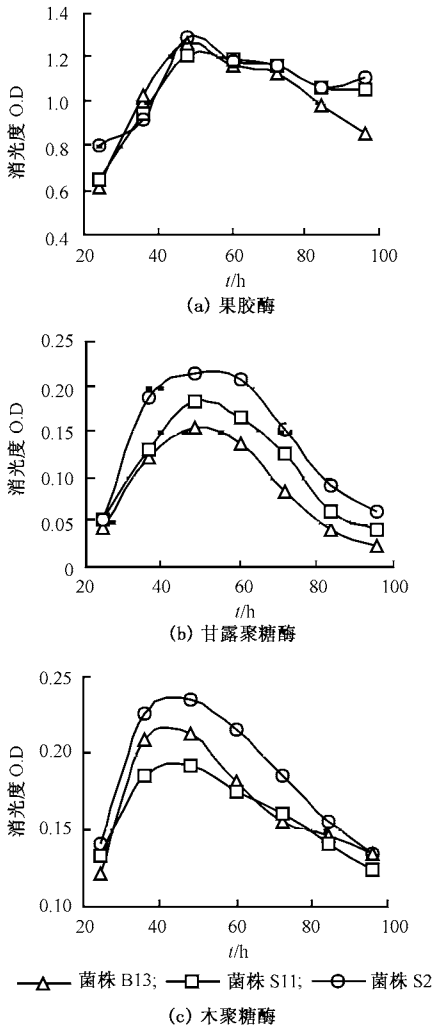


图 2 3 菌株的产酶曲线

### 3.3 诱变菌株的底物亲和性变化

取 3 株菌合成的酶液做离心处理, 将浓度稀释

500 倍, 分别以 Sigma 果胶、聚半乳糖醛酸和天然果胶为底物, 620 nm 处测试吸光度 O. D. 3 株菌产生的酶液对聚半乳糖醛酸产生的催化效果最显著, 见表 3, 产物最多, 表现为吸光度最高, 这说明该类细菌合成酶液主要为聚半乳糖醛裂解酶。与出发菌株 B13 相比, S11 和 S2 催化吸光度更高一些, 说明诱变细菌产生酶液对底物的亲和性要好一些, 更能促进胶质水解, 这对脱胶效率大有好处。

表 3 底物亲和性(吸光度)变化

菌株	Sigma 果胶	聚半乳糖醛酸	天然果胶
S2	0.134	1.856	1.022
S11	0.102	1.742	1.155
B13	0.108	1.633	1.141

## 4 结 语

综上所述, 筛选菌株 S2 合成酶液与底物具有更好的亲和性, 合成半纤维素酶的活性更高。诱变菌 S2 与出发菌相比, 缩短了世代时间, 这说明诱变菌 S2 具有更强的分裂增长能力, 可以更早地进入大量产酶阶段, 并维持一个比较高的稳定产酶水平, 酶液性质明显优于菌株 B13 和 S11, 更适合苕麻脱胶生产要求。苕麻脱胶过程比较粗放, 在此选取 S2 菌株, 培养合成酶液进行脱胶研究是比较合理的。

筛选优良菌株是一个长期的繁琐过程, 需要菌株选育人员在生产中细心观察, 并且作大量细致的工作, 需要长期筛选, 不断分离, 才能得到理想的产酶菌株。选取 S2 菌株, 为随后的合成酶液性质的进一步分析, 苕麻酶脱胶工艺的最优化设计以及酶脱胶机理的分析探讨打下基础。

FZXB

### 参考文献:

[ 1 ] 刘自容. 芽孢杆菌大麻脱胶酶系的研究[ J ]. 微生物学, 1991, (1) : 48 - 53 .  
 [ 2 ] 郑皆德, 刘让同. 苕麻酶脱胶新工艺的应用研究[ J ]. 纺织学报, 2002, 23(4) : 66 - 67 .  
 [ 3 ] 张玉展. 基因工程概论[ M ]. 第 2 版. 上海: 华东理工大学出版社, 2001. 1 - 3 .  
 [ 4 ] 施来杰 H G. 普通微生物学[ M ]. 陆卫平, 译. 上海: 复旦大学出版社, 1996. 1 - 6 .  
 [ 5 ] 贺延龄, 陈爱侠. 环境微生物学[ M ]. 第 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2001. 4 - 10 .