

文章编号:1000-582X(2004)06-0048-03

# 苧麻脱胶过程中木聚糖酶最佳作用条件探讨\*

肖丽,王贵学,陈国娟

(1.重庆大学生物工程学院,重庆 400030; 2.重庆大学应用生物技术研究中心,重庆 400030)

**摘要:**采用均匀试验设计方法,讨论了木聚糖酶在苧麻脱胶过程中,温度、pH值和酶浓度对其酶活力的影响。通过回归分析,得到回归方程和最适酶作用条件:当pH=9.0,酶液=51 mL(即生苧麻/g:酶液/mL=1:17),温度=50℃时,Y即残胶率是17.629%。经过微量稀碱处理后,残胶率下降到2%左右,达到纺织工业的要求。

**关键词:**木聚糖酶;苧麻;脱胶

**中图分类号:**Q556

**文献标识码:**A

木聚糖是植物细胞壁的主要成分之一,也是半纤维素的主要成分。除纤维素外,它是自然界中最为丰富的多糖。木聚糖的基本结构单元是由 $\beta$ -1,4或 $\beta$ -1,3糖苷键连接的多聚木糖链,在D-木糖的第二位氧上连接有D-葡萄糖醛酸或4-O-甲基葡萄糖醛酸或在第三位氧上连接有L-阿拉伯呋喃糖。有些木聚糖还在第二或第三位氧上发生乙酰化<sup>[1]</sup>。通常情况下,木聚糖以异质多糖形式存在并与纤维素结合在一起。木聚糖酶是木聚糖的专一降解酶,属于水解酶类,包括内切木聚糖酶、外切木聚糖酶和木糖苷酶三种,对降解自然界大量存在的半纤维素起着重要作用<sup>[2]</sup>。它们不但可以降解木聚糖生成木糖,而且能以农作物残渣中的半纤维素为原料生产经济价值较高的产品。

苧麻微生物脱胶的原理是利用筛选的脱胶菌发酵产生脱胶酶(其主要酶系是果胶酶系和木聚糖酶系),作用于苧麻,酶降解苧麻中的胶质,分解为可溶于水的小分子物质,获得分离的纤维束。由于木聚糖是苧麻纤维胶质半纤维素中的主要成分之一,木聚糖酶是苧麻酶脱胶的关键酶之一。笔者从苧麻脱胶角度,确定筛选的脱胶菌株芽孢杆菌B-11-3产生的木聚糖酶的酶作用的最佳条件并对条件进行优化。该菌株产生的木聚糖酶酶活高达1'622.506 U/mL,超过已报道的用于苧麻脱胶的半纤维素类酶酶活力的10余倍<sup>[3-7]</sup>,在苧麻酶脱胶过程中有较好的应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

本实验室从土壤中筛选得到的木聚糖酶高产脱胶菌株。

### 1.2 木聚糖酶活的测定

按DNS方法测定<sup>[8]</sup>。3.0 mL反应液中含有1.0 mL1.0%的木聚糖溶液,0.2 mL适当稀释的木聚糖酶酶液及1.8 mL磷酸缓冲溶液(pH7.0),50℃反应15 min,然后加入2 mL DNS,煮沸10 min,冷却后定容至10 mL,测定550 nm处试样的吸光度 $A_x$ 。以木糖为标准,在上述条件下,每分钟产生1  $\mu$ mol还原糖所需酶量定义为1个酶活力单位。

### 1.3 培养基和培养方法

1) 菌种活化。将3株菌种接种于LB固体培养基,35℃倒置培养。48 h后,挑取单菌落于LB液体培养基中,35℃静置培养36 h。LB液体培养基:蛋白胨1%;酵母膏0.5%;氯化钠1%;pH7。LB固体培养基是在液体培养基中加入2%琼脂。

2) 摇瓶培养。于250 mL三角瓶中装入150 mL发酵培养基,在1.05 kg/cm<sup>2</sup>,121.3℃条件下灭菌20 min,冷却,在超净工作台上按5%的接种量接种,置于摇床中,35℃,170 rpm,振荡培养30 h。

发酵培养基:甘薯粉4%,面粉4%,魔芋粉和豆粕(4:1)4%,尿素0.05%,硫酸铵0.5%,硝酸铵0.5%,

\* 收稿日期:2004-03-22

基金项目:重庆市科委应用基础研究基金资助项目(7975);重庆江津市锦丰麻业有限公司资助项目

作者简介:肖丽(1977-),女,四川成都人,重庆大学硕士研究生,主要从事生物工程领域的研究。

氯化钾 1.0%，磷酸二氢钾 0.4%，自然 pH。

3) 酶促反应。按照实验设计,在装有苕麻的锥形瓶加入发酵产物,进行苕麻酶脱胶实验。各条件下反应 8 h 后,停止反应,倒出酶液,往锥形瓶中放入清水,置于 50 °C 水中保温 3 h,取出苕麻,清洗,烘干,测残胶率。

苕麻的预处理:将生苕麻放入 100 °C 水中煮 30 min,取出,滤去大部分的水,再放入烘箱中 24 h 备用。

### 1.4 残胶率的测定方法

根据国家标准 GB5889 - 86 测定苕麻的残胶率。所谓残胶率是指生苕麻在脱胶后,剩余胶质占生苕麻总胶质含量的比率。

### 1.5 均匀设计和优化

#### 1) 制定因素水平表。

考虑了温度、pH 值、酶浓度 3 个因素对酶作用过程的影响,如表 1。

表 1 因素、水平表

水平	温度/°C	pH	酶的浓度(浴比) 苕麻(g):酶液(mL)
1	25	3.5	1:5
2	30	4.0	1:8
3	35	4.5	1:11
4	40	5.0	1:14
5	45	5.5	1:17
6	50	6.0	1:20
7		6.5	1:23
8		7.0	1:26
9		7.5	1:29
10		8.0	1:32
11		8.5	1:35
12		9.0	1:38

#### 2) 选择均匀设计表 $U_{12}(12^2 \times 6)$ , 安排实验, 如表 2。

表 2  $U_{12}(12^2 \times 6)$  均匀设计表与残胶率测定结果

处理号	pH 值	酶的浓度(浴比) 生苕麻(g):酶液(mL)	温度 /°C	残胶率 /%
1	1(3.5)	6(3:60)	4(40)	20.640 ± 0.210
2	2(4.0)	12(3:114)	2(30)	20.880 ± 0.980
3	3(4.5)	5(3:51)	6(50)	20.945 ± 0.075
4	4(5.0)	11(3:105)	3(35)	20.240 ± 0.470
5	5(5.5)	4(3:42)	1(25)	20.510 ± 0.690
6	6(6.0)	10(3:96)	5(45)	19.806 ± 0.776
7	7(6.5)	3(3:33)	2(30)	20.465 ± 0.635
8	8(7.0)	9(3:87)	6(50)	19.470 ± 0.460
9	9(7.5)	2(3:24)	4(40)	19.895 ± 0.425
10	10(8.0)	8(3:78)	1(25)	20.715 ± 0.355
11	11(8.5)	1(3:15)	5(45)	18.625 ± 0.835
12	12(9.0)	7(3:69)	3(35)	19.360 ± 0.670

## 2 试验结果

### 2.1 温度对酶作用的影响

图 1 表示了温度对酶作用的影响:随着温度的升高,残胶率在下降。在 45 °C 时,残胶率达到最低值 19.216%。

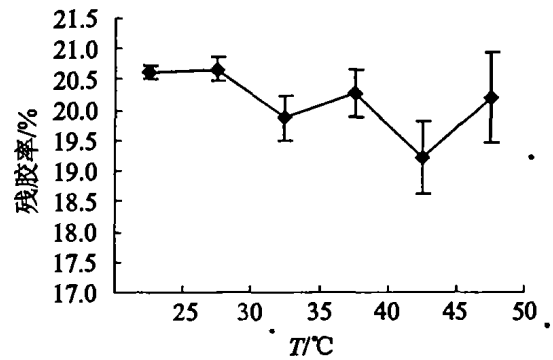


图 1 温度对酶作用的影响

### 2.2 pH 值对酶作用过程的影响

图 2 表示的是酶作用过程中,不同 pH 值与残胶率的关系。从图的趋势可以看出:酶在碱性条件下,作用能力较强。当 pH 值为 8.5 时,残胶率达到最低值 18.625%。

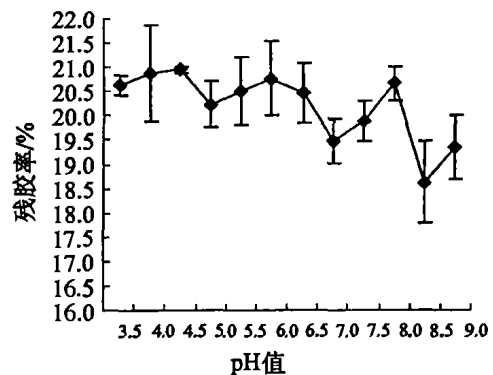


图 2 pH 对酶作用的影响

### 2.3 酶浓度对酶作用的影响

图 3 表示的是木聚糖酶酶浓度对酶作用能力的影响。在实验过程中,酶浓度是用生苕麻和酶液的浴比来表示的。从图上可以看到:浴比是 1:5 时,残胶率最低是 18.625%;随着浴比的增加,残胶率有上升趋势但在 1:23 和 1:29 时又出现低点。

## 3 讨论和分析

#### 1) 温度对酶作用的影响。

随着温度的升高,酶活力增加,结果是残胶率下降。在 45 °C 时,残胶率最低是 19.216%。当温度继续上升时,残胶率不再下降,相反有上升趋势。这说明温度升高时会降低酶活力,木聚糖酶有个最佳作用温度。

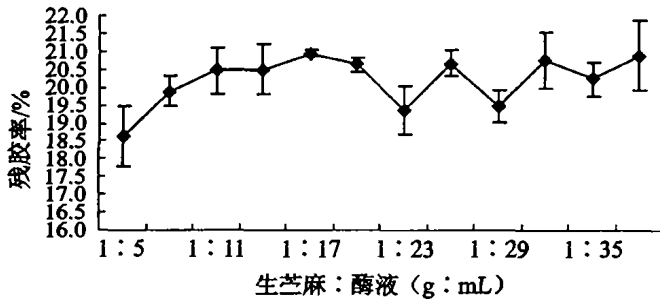


图3 酶浓度对酶作用的影响

#### 2) pH 值对酶作用的影响。

酶在碱性条件下,活力较高,表现为残胶率低。当 pH 值为 8.5 时,残胶率达到最低值 18.625%。而该点的温度是 45℃,浴比是 1:5。当 pH 值再增加时,残胶率又上升,这可能是酶活力随 pH 值的升高而降低。

#### 3) 酶浓度对酶作用能力的影响。

在实验过程中,酶浓度是用生苧麻和酶液的浴比来表示的。在较低浴比时,残胶率低。随着浴比的增加,残胶率有上升趋势,但在 1:23 和 1:29 时又出现低点,残胶率分别是 19.36 和 19.47。但是,在这两种情况下,前者的温度是 50℃,而后者的 pH 值是 9.0。因此这两点的残胶率低也可能是由于温度和 pH 值的缘故。

#### 4) 均匀设计试验的结果分析。

对表 2 中的实验结果,用 DPS 生物统计软件对其进行逐步回归分析,依次引入一次项、二次项和交互项,比较得到适当的回归方程,如下:

$$Y = 13.1840 + 1.7506X_1 - 0.0137X_2 + 0.1715X_3 - 0.0677X_1^2 + 0.0001X_2^2 - 0.0314X_1 * X_3$$

$Y$  为残胶率(%),  $X_1$  为 pH 值,  $X_2$  为酶液量(mL),  $X_3$  为温度(℃)

该回归方程的相关系数均为 0.952,回归方程达到极显著水平。

由该回归方程可得到预测极值点: pH = 9.0, 酶液 = 51 (即浴比是 1:17), 温度 = 50℃。在该条件下,  $Y$  即残胶率是 17.629%。

#### 参考文献:

- [1] 怀文辉,何秀萍,郭文杰,等. 微生物木聚糖酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报, 2000, 27(2): 137-139.
- [2] 石军,陈安国. 木聚糖酶生产与应用研究进展[J]. 饲料工业, 2001, 22(9): 40-43.
- [3] BRUHLMANN F, LEUPIN M, ERISMANN K H, et al. Enzymatic degumming of ramie bast fibers[J]. Journal of biotechnology, 2000, 76(1): 43-50.
- [4] CAO JUNWEI, ZHENG LIANSHUANG, CHEN SHUYUN. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie[J]. Enzyme & Microbial Technology, 1992, 14(12): 1013-1016.
- [5] KAPOOR M, BEG Q K, BHUSHAN B, et al. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MC-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres[J]. Process biochemistry, 2001, 36(8/9): 803-807.
- [6] 罗强,孙启玲,张兴宇,等. 甘露聚糖酶菌株的复合诱变选育及发酵条件的优化[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(1): 131-134.
- [7] 陈一平,龙健儿,廖连华,等. 芽孢杆菌 M50 产生  $\beta$ -甘露聚糖酶的条件研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(1): 62-68.
- [8] 李彩霞,房桂干,刘书钗. 木聚糖酶活测定方法[J]. 造纸, 2001, 1: 60-61.

## Preliminary Study of the Optimum Working Conditions on Xylanase During Process of Ramie Degumming

XIAO Li, WANG Gui-xue, CHEN Guo-juan

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Research Center of Applied Biotechnology, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Effects of temperature, pH and concentration of the xylanase on the enzyme activity of the strain of B-11-3 by with the uniform experimental design. Through stepwise regression, a regression equation and the optimum working conditions of the enzyme are obtained pH is 9.0; the volume of the enzyme is 51 mL (ramie/g: enzyme/mL = 1:17); the temperature is 50℃; and the residual gum rate of the ramie fibers after degumming is 17.63%. The residual gum rate of the ramie fibers after degumming with low concentration NaOH solution is over 2%, which is be up to the require of spinning industry.

**Key words:** xylanase; ramie; degumming