

中文摘要

本研究从温水沤麻液中分离、选育了两株甘露聚糖酶产生细菌,进行了鉴定及发酵产酶条件的优化,同时对其中一株的产酶性能进行了初步研究并将其应用于实验室加菌沤麻试验。

两株甘露聚糖酶产生细菌分别编号为 HDYM-03、HDYM-04。采用形态观察、生理生化试验及 16S rDNA 系统发育分析手段进行鉴定,确定两株菌均为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。通过单因素试验及分批正交试验优化,两株菌最优发酵产甘露聚糖酶条件基本相同,均为 6%魔芋粉, 3%蛋白胨,初始 pH 值 8.0,装液量 100mL/250mL 三角瓶,37℃培养 48h。HDYM-03 的接种量为 2%,HDYM-04 为 1%。两株菌在研究条件下的最高甘露聚糖酶活力分别为 5122U/mL 和 5168U/mL,为现在已报道的同类酶中最高水平。产酶性能及实验室加菌沤麻试验研究表明,菌株 HDYM-03 同时具有较强的甘露聚糖酶及果胶酶产酶活性,不产生纤维素酶,在亚麻沤制的过程中,可相继快速降解胶质中的果胶和半纤维素,不损伤原茎纤维,与不加菌沤麻相比,沤麻时间由 90h 缩短到 60h,缩短幅度为 33%。

本研究为甘露聚糖酶的分离、提纯,及甘露聚糖酶产生菌株应用于加菌沤麻的工厂实践奠定了基础,在甘露聚糖酶的粗酶生产、亚麻生物脱胶工艺的完善、沤麻效率的提高等方面都具有重要的价值。

关键词: 亚麻 生物脱胶 甘露聚糖酶 16S rDNA 优化

Abstract

Flax fiber is an important textile industrial material. Degumming is the key step in flax production because it effects the production cycle and fiber quality directly. The component of flax colloid is extremely complicated, mainly including pectin, hemicellulose and lignin. It has been widely researched on pectin and pectinase-producing microorganisms in biological-degumming field but the study on hemicellulose degradation is even rare. Mannan is main component in flax hemicellulose so mannanase is key degummase. Mannanase is an enzyme capable of hydrolyzing β -1,4-D-manno-pyranosyl linkages of mannan whose main product is manna-oligosaccharide. It has been widely used in nutritive, medical, textile, dyeing, oil extraction fields and so on.

Two mannanase-producing bacterial strains, HDYM-03 and HDYM-04, were isolated from the fermentation liquid of flax retting. After identification of the two strains the fermentation conditions of them were optimized according to single factor and orthogonal tests. HDYM-03 was also applied to flax retting test. The results showed that:

1. Both of the two strains were identified as *Bacillus licheniformis* according to the morphological, physiological, biochemical characteristics and the sequencing of 16S rDNA.

2. The two strains grew best when cultured at 37°C with 6% konjac powder as carbon, 3% peptone as nitrogen source, pH 8.0, 100mL medium per 250mL flask, inoculum volume for HDYM-03 was 2% and that for HDYM-04 was 1%. After 48 hours cultured, the two strains could respectively show the highest mannanase activity as 5122U/mL(HDYM-03) and 5168U/mL (HDYM-04) which were the highest values as far as now.

3. HDYM-03 can also produce high activity of pectinase but can't produce cellulase so it does no harm to flax fiber. The retting test with

Abstract

HDYM-03 needed 60 hours and reduced by 33% compared to the test without adding bacteria.

This research made a foundation for separation and purification of mannanase and also offered a strain source to enzyme production. HDYM-03 had advantages such as abundant enzymatic system, high enzyme activity and had a wide applied future in biological-degumming field.

Key words: flax biological-degumming mannanase 16S rDNA optimize

目 录

└─┬─┐ 文摘

└─┬─┐ 英文文摘

└─┬─┐ 第 1 章绪论

└─┬─┐ 1.1 亚麻的脱胶制纤

└─┬─┐ 1.1.1 亚麻纤维的细胞特点与化学组成

└─┬─┐ 1.1.2 亚麻的制纤工艺

└─┬─┐ 1.1.3 亚麻的脱胶

└─┬─┐ 1.1.4 亚麻生物脱胶的研究与应用

└─┬─┐ 1.1.5 亚麻生物脱胶的应用前景

└─┬─┐ 1.2 甘露聚糖酶和甘露聚糖酶产生菌的研究

└─┬─┐ 1.2.1 甘露聚糖

└─┬─┐ 1.2.2 甘露聚糖酶的研究

└─┬─┐ 1.2.3 甘露聚糖酶的应用

└─┬─┐ 1.3 本研究的的目的、意义和内容

└─┬─┐ 1.3.1 本研究的的目的和意义

└─┬─┐ 1.3.2 本研究的主要内容

└─┬─┐ 第 2 章材料与amp;方法

└─┬─┐ 2.1 材料

└─┬─┐ 2.1.1 沤麻材料

└─┬─┐ 2.1.2 菌种

└─┬─┐ 2.1.3 培养基

└─┬─┐ 2.1.4 主要试剂及药品

└─┬─┐ 2.1.5 试剂盒

└─┬─┐ 2.1.6 主要仪器设备

└─┬─┐ 2.2 实验方法

└─┬─┐ 2.2.1 实验室沤麻方法

└─┬─┐ 2.2.2 甘露聚糖酶产生菌株的分离、纯化与保藏

└─┬─┐ 2.2.3 甘露聚糖酶产生菌株的筛选

└─┬─┐ 2.2.4 菌株的鉴定

└─┬─┐ 2.2.5 菌株生长及产甘露聚糖酶动态变化过程的研究

└─┬─┐ 2.2.6 菌株产甘露聚糖酶条件的优化

└─┬─┐ 2.2.7 甘露聚糖酶产生菌株与果胶酶产生菌株生长

└─┬─┐ 及产酶相互作用的研究

└─┬─┐ 2.2.8 实验室加菌沤麻试验

└─┬─┐ 第 3 章结果与amp;讨论

└─┬─┐ 3.1 甘露聚糖酶产生菌株的分离、筛选

└─┬─┐ 3.1.1 菌株的分离、纯化

└─┬─┐ 3.1.2 甘露糖标准曲线的绘制

└─┬─┐ 3.1.3 魔芋粉中还原糖的检测

□3.1.4	甘露聚糖酶产生菌株的筛选
□3.2	菌株 HDYM-03、HDYM-04 产纤维素酶能力的判定
□3.3	菌株 HDYM-03、HDYM-04 的鉴定
□3.3.1	形态及生理生化鉴定
□3.3.2	16S rDNA 系统发育分析
□3.4	菌株 HDYM-03、HDYM-04 生长及产甘露聚糖酶
□	动态变化过程的研究
□3.5	菌株 HDYM-03、HDYM-04 产甘露聚糖酶条件的优化
□3.5.1	单因素试验结果
□3.5.2	正交试验结果
□3.6	菌株 HDYM-03 产果胶酶能力的判定
□3.6.1	葡萄糖标准曲线的绘制
□3.6.2	菌株 HDYM-02、HDYM-03 产酶酶系的初步判定
□3.7	菌株 HDYM-03 与果胶酶产生菌株 HDYM
□	生长及产酶动态变化过程的相互作用
□3.8	实验室加菌沤麻试验
□3.8.1	沤麻终点的判定
□3.8.2	沤麻液中各类细菌数量变化
□	结论
□	致谢
□	参考文献
□	攻读学位期间发表的学术论文
□	附录
□	独创性声明及学位论文版权使用授权书

第1章 绪论

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)为亚麻科(Linaceae)亚麻属(*Linum*)的一年生草本植物。根据生物学、形态学 and 经济学特性,可将亚麻分为纤维用亚麻、中间型亚麻、油用亚麻、大粒种亚麻、半冬性匍匐茎亚麻等五类^[1]。纤维用亚麻是重要的纺织原料作物,其纤维织品因吸湿性好、透气性强、挺括而被誉为纺织品中的“皇后”^[2]。

世界上亚麻种植区主要分布在北半球,多数集中在北纬 N48-55° 之间的东欧诸国和我国的东北地区。世界上生产纤维用亚麻的国家有俄罗斯、西班牙、白俄罗斯、法国、比利时、荷兰和中国等^[3]。我国自 1906 年起在东北地区试种纤维用亚麻,是亚麻栽培历史较早的国家之一。目前我国纤维用亚麻主要产于黑龙江、内蒙古、新疆、宁夏、云南、湖南、浙江等省区^[4]。

黑龙江省是我国纤维用亚麻主要生产基地,种植面积和产量约占全国 80%,亚麻纺锭约占全国 70%,产品远销美国、法国、意大利、日本等 80 多个国家,年平均出口创汇一亿美元左右。随着科学技术进步、生产水平提高和市场经济的不断发展,近几年来亚麻加工企业逐渐发展壮大,基本形成生产、推广、加工、销售、科研产业链,成为我省颇具发展潜力的经济支柱产业之一^[3,4]。

亚麻原料生产是亚麻行业发展的关键环节和基础,目前黑龙江省亚麻原料生产中存在着亚麻单产水平低、长麻出麻率低、亚麻纤维质量差等问题。开展亚麻微生物脱胶技术研究,建立亚麻新型高效的脱胶技术体系,对于降低亚麻脱胶的能耗与成本,提高亚麻长麻率和纤维品质有重要的意义。

1.1 亚麻的脱胶制纤

1.1.1 亚麻纤维的细胞特点与化学组成

亚麻纤维存在于亚麻原茎的韧皮部内，亚麻纤维细胞靠果胶轴向搭接或侧向转接形成纤维束，纤维束之间分布着大量的韧皮薄壁细胞与筛管、伴胞等胶杂成分。亚麻纤维细胞长度多为 10-26mm，单纤维长度小于纺针的间距，达不到纺织工艺的要求，只能利用束纤维进行纺纱。亚麻纤维属韧皮类纤维素纤维，除纤维素外，还含有半纤维素(主要包括甘露聚糖、木聚糖及多聚半乳糖^[5])、木质素、果胶、水溶物、脂肪、腊质等伴生物，是一种非纯净的纤维素纤维。有关研究表明，亚麻韧皮中纤维素含量 70-80%，半纤维素 12-15%，木质素 2.5-5%，果胶 1.4-5.7%，蜡质 1.2-1.8%，灰分 0.8-1.3%，含氮物质 0.3-1.6%^[6]。

1.1.2 亚麻的制纤工艺

亚麻制纤是指由亚麻干茎通过养生(回潮)、碎茎、打麻、脱麻等，获取亚麻工艺纤维(含长麻和短麻)的工艺技术(工艺流程见图 1.1)^[7]。

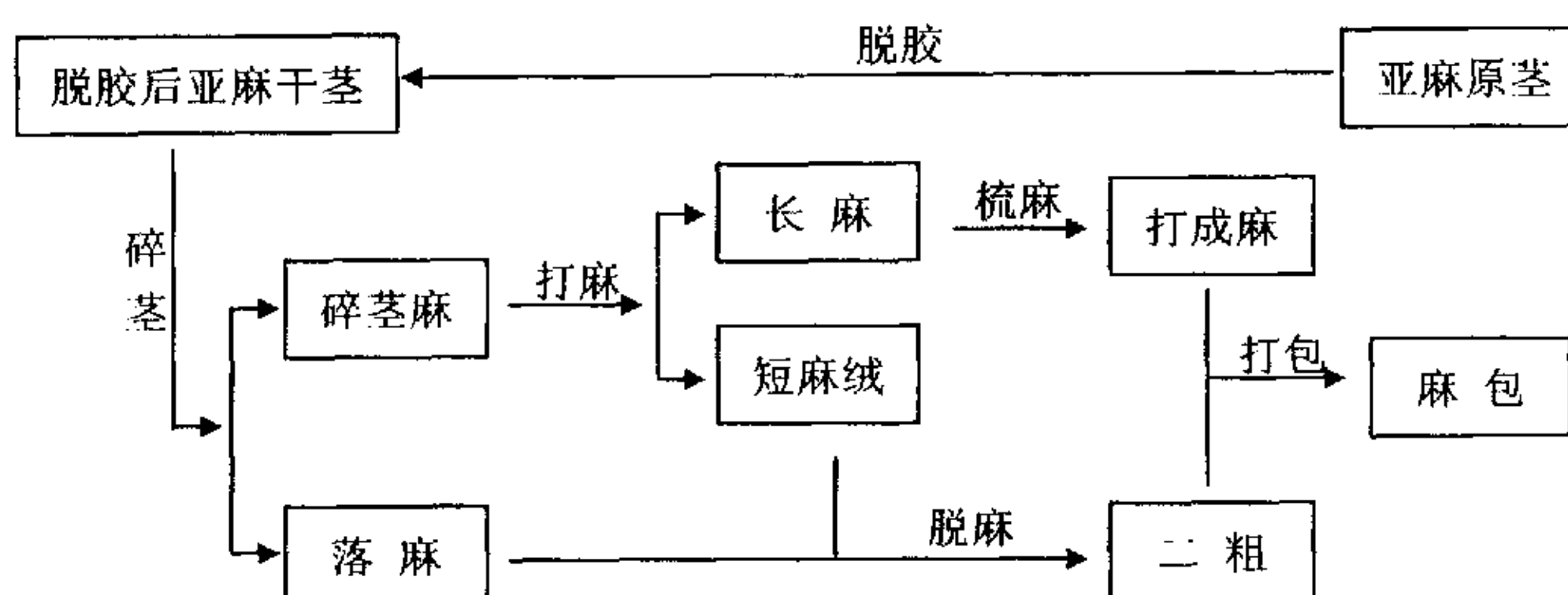


图 1.1 亚麻脱胶制纤的工艺流程

亚麻茎秆纤细，无法通过逐株剥皮、刮青、脱胶的方法制取韧皮纤维，只能先脱胶，再利用纤维与麻骨韧性的差异，采取机械方法制取工艺纤维。亚麻脱胶是由亚麻原茎去除表皮、皮层、韧皮薄壁组织等胶杂成分，获得亚麻干茎的工艺过程。亚麻制纤效率和纤维品质与脱胶质量密切相关，脱胶偏生皮骨难以分离，打成麻上含麻骨(麻茎木质部)过多，无法达到梳纺的要求；脱胶偏熟，纤维束间结构被破坏，纤维品质(主要是纤维强力)和长麻率明显下降；脱胶过度使长麻变为短麻，甚至变成单纤维细胞，完全失去纺织价值。

1.1.3 亚麻的脱胶

亚麻脱胶的实质是采取化学的、物理的、生物的、综合的方法，破坏纤维束与周围组织、韧皮部与表皮、韧皮部与木质部之间的连接程度，在尽可能除去胶质的同时，减少对纤维细胞间胶质的破坏，维持纤维束内部纤维细胞间的固有形态与结构^[8]。

化学法和物理化学法是利用化学药剂或物理方法(如汽蒸)来达到水解胶质的目的^[9]。这两种方法工艺过程最短，可实现连续化生产，但由于耗能高污染重，近年难见到其应用报道。

生物脱胶是把筛选得到的脱胶菌株应用于亚麻原茎脱胶，在脱胶菌株大量繁殖的过程中，分泌出的酶物质将胶质中的果胶及半纤维素等大分子分解为低分子的物质而溶入水中，在缓和的环境下进行的一系列“胶养菌，菌产酶，酶脱胶”的生化反应，从而提取纯净纤维^[2]。

1.1.4 亚麻生物脱胶的研究与应用

1.1.4.1 亚麻生物脱胶的基本原理

亚麻的生物脱胶是一个复杂的发酵过程，大致分为三个阶段:物理阶段、前生物阶段和主生物阶段。

(1) 物理阶段:注水之后,亚麻原茎被浸湿,继而膨胀,麻茎体积增大,麻茎中的可溶性有机物质和矿物质从麻茎内部扩散到水中,使沤麻水颜色加深,该阶段基本上没有微生物的生长。

(2) 前生物阶段:紧接着物理阶段,沤麻水中的可溶性有机物质被微生物分解,产生酸类、氢气及 CO_2 , 使沤麻水酸度下降。

(3) 主生物阶段:从前生物阶段结束至沤麻结束,麻茎中的果胶及半纤维素等大分子被微生物分泌的胞外酶分解为低分子的物质而溶入水中,使韧皮和木质部易于分离,达到脱胶的目的^[10]。

1.1.4.2 天然生物脱胶

国内外利用天然存在的微生物进行麻类脱胶的方法主要有以下几种:

(1) 雨露沤麻是利用自然温湿度条件,通过真菌作用来分解胶质^[11]。这种方法的特点是沤麻过程长,对环境的温湿度条件要求较高,沤麻质量依赖于自然条件,人为控制困难,但具有用工少,对自然环境破坏少,环保性能好,打成麻具有特殊的色泽和光泽等优点。目前,在欧洲一些经济发达、劳动成本高、环保要求苛刻的国家被广泛采用。

雪水沤麻与雨露沤麻的实质并无多大差别,不同之处仅在于季节、条件和发酵过程的长短。前苏联个别地区由于亚麻收获期气象条件不良,有时早霜降临,使大量原茎未来得及露浸即已进入冬季。亚麻冬季发酵时胶质的分解,即由原茎转变为干茎的过程,也是在夏季参与发酵的那些微生物的生命活动所引起的,但发酵期间微生物的数量显著减少。

(2) 温水沤麻,即将亚麻原茎浸入 $31-35^{\circ}\text{C}$ 左右的温水中,利用水中的微生物来分解原茎中的胶质。这种方法的特点是沤麻过程较短,不受外界气候条件的限制,沤麻质量稳定,易控制,打成麻产量和质量较高,纺纱性能好。但它具有用工多、劳动强度大、污染严重的缺点。我国目

前普遍采用温水沤麻，这与我国的经济水平和发展水平和劳动力资源丰富密切相关^[12]。

在缺乏雨露沤麻场地和有便利水池的情况下，可采用冷水沤麻法。根据沤麻方式的不同，又把冷水沤麻分为一次沤麻法(原茎在水中一直到完全转变成干茎为止)、水浸后露法(原茎在水中完全沤好之前取出，铺在草地上完成果胶质分解的后步过程)和两次沤麻法(原茎在池中浸 5-6 天后，取出在草地上成伞型干燥 2-3 天，然后重新浸入水中直至沤好为止)。两次沤麻法所得纤维的质量好，但由于耗费加倍的劳动，而未被广泛采用^[8]。

1.1.4.3 亚麻加菌脱胶

为了解决亚麻传统脱胶方法存在的诸多问题，缩短脱胶周期、提高纤维质量和产量、降低环境污染，国内外学者从脱胶微生物的筛选入手，广泛开展了“亚麻加菌脱胶方法”的研究。

法国、德国、意大利、前苏联等国家用费地芽孢梭菌进行亚麻脱胶，不但缩短了脱胶周期，还提高了纤维产量。我国于 50 年代初开始亚麻加菌脱胶试验，厌氧芽孢杆菌的加菌脱胶周期平均比对照减少 44%，出麻率提高了 2.16%^[13]。

目前，人们已经分离到了多种微生物用于生物脱胶方面的研究。江洁、刘晓兰等^[14]从沤麻主生物期分离果胶酶产生菌费新尼亚梭菌(*Clostridium felsineum*)，应用后沤麻时间缩短 30%，麻纤维质量有所提高。Gunnar H 等^[15]报道了微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)在亚麻沤制过程中快速降解果胶质的应用。王立群、关凤芝等^[16-19]的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Ke34 和 Le10 沤麻试验结果表明，加菌脱胶使亚麻果胶含量降至 4.0-4.5%，出麻率提高 30%。黄小龙，孙焕良等^[20-24]的研究表明，环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)A₆，同时具有较高的果胶酶和木聚糖酶产生活

性，且不产纤维素酶，摇瓶脱胶试验表明胶质脱除率比天然水脱胶高出 11%。葛菁萍等^[25]将沤麻液中分离筛选到的果胶酶产生菌 MHZP-01、MHZP-02 用于加菌沤麻，脱胶周期缩短了 20%，出麻率平均提高 1%。何连芳等^[26]报道了亚麻种植土壤中分离筛选到的果胶酶高产菌株，应用于沤麻试验缩短脱胶周期约 50%。彭源德等^[27-29]对快速脱胶菌株 Ym68' 发酵条件优化后，在实验室条件下 16h 内可完成亚麻脱胶，较传统工艺缩短周期 70%。此外，有研究表明从雨露沤制麻茎上筛选出一些真菌用于加菌脱胶也取得良好的效果^[30]。

国内外在亚麻生物脱胶领域的研究集中在果胶的降解和果胶酶产生菌的选育上。亚麻胶质主要含果胶、半纤维素、木质素等，成分十分复杂，这些菌株对除果胶外的其他胶杂成分的降解几乎不起作用。目前我国温水沤麻多在露天进行，条件简陋工艺粗放，沤麻系统中天然微生物种类繁多，是一个十分复杂的体系。脱胶菌株和酶系组分单一、酶活力不高、脱胶酶生产工艺落后是制约亚麻加菌生物脱胶和酶法脱胶应用的瓶颈。因此目前生物脱胶的研究还集中在实验室阶段，难以在生产实践中应用。开发自然界中尤其是沤麻系统中丰富的具有脱胶活性的微生物资源，选育具有多种脱胶酶产生活性、酶活性高且稳定，适宜在亚麻沤制系统中稳定繁殖、产酶脱胶的微生物，必将称为生物脱胶领域的研究热点。

1.1.4.4 亚麻酶法脱胶

随着生物技术的发展，亚麻脱胶研究已经深入到分子水平，即酶法脱胶。酶法脱胶就是将脱胶菌培养到菌液酶活力最高时进行过滤或离心等处理，再用得到的粗酶液浸渍亚麻原茎，或者将粗酶液提纯、浓缩为液剂，也可将该浓缩液干燥成为粉剂，使用时将液剂稀释或将粉剂溶于水中，把亚麻原茎浸渍在酶稀释液中进行酶解脱胶^[2]。

张丽珠等^[31]引进苏联酶制剂及丹麦诺沃亚麻酶，用于规模 90kg 的亚麻脱胶试验，可缩短沤麻时间 1/4-2/3，提高出麻率 3-4%。刘晓兰等^[32]以温水浸渍亚麻脱胶工艺为基础，研究了酶在亚麻脱胶中的应用，试验表明与温水浸渍沤麻工艺相比，酶法沤麻可缩短沤制时间 75%。Jing Zhang 等^[33]的研究表明多聚半乳糖醛酸酶是亚麻脱胶过程中的关键酶，Jeff D 等^[34]报道了该酶在酶法脱胶过程中对亚麻纤维品质的影响。美国的 Foulk JA 等^[35]也进行了亚麻酶法脱胶的条件研究。Caitriona M 等^[36]分析了酶法-化学法联合使用与普通沤麻得到的亚麻纤维品质的不同。刘唤明等^[37]用果胶酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶进行苧麻酶法脱胶，结果表明苧麻脱胶需要多种酶的协调作用。

酶法亚麻脱胶技术具有酶作用条件温和，不需要高温加压，因而设备投资少，易于工业化生产；不需要强酸强碱条件，工业生产污染轻，废水易处理，无空气污染；对纤维损伤小，脱胶麻手感柔软，色泽洁白有光泽，粉尘少，成品回收率高等特点，从根本上消除了亚麻脱胶带来的环境污染。但亚麻胶质成分复杂，所需酶的种类也随之不同。酶制剂成本高，作用专一性强，因此酶法脱胶很难在实践中推广应用。

1.1.5 亚麻生物脱胶的应用前景

亚麻生物脱胶(无论是加菌脱胶还是酶法脱胶)，具有专一性强、作用条件温和、纤维产量高、加工质量好、环境污染轻和工艺简单易行等特点，其广阔开发前景是无庸置疑的。但从现有的情况看，因为亚麻胶质成分多、组成复杂，单一的酶法脱胶还无法应用于工业生产，而加菌产酶脱胶的生产成本低廉，比酶法脱胶更接近生产应用水平。

要有效解决亚麻脱胶生产中存在的诸多问题，需加强以下两方面的工作：

(1) 进一步分离筛选高效亚麻脱胶菌株。应用物理或化学诱变、基因克隆、细胞融合等技术,对现有脱胶菌加强改造,提高脱胶菌的竞争产酶能力与酶活性,完善酶系组分,同时确保酶液中酶的活性稳定;

(2) 开展亚麻生物脱胶机理研究,揭示麻茎的形态结构、化学成分、微生物和非纤维素物质降解酶类、发酵产物的种类、数量等在亚麻生物脱胶中的动态变化规律,为进一步选育亚麻快速脱胶菌株、生产酶制剂或改良发酵条件研究,提供科学依据。

1.2 甘露聚糖酶和甘露聚糖酶产生菌的研究

1.2.1 甘露聚糖

甘露聚糖是以 1,4- β -D-吡喃甘露糖苷键连结而成的线状多糖,如果主链某些残基被葡萄糖取代,或半乳糖通过 1,6- α -糖苷键与甘露糖残基相连形成分枝,则称之为异甘露聚糖,主要有半乳甘露聚糖(galactomannan)、葡萄甘露聚糖(glucomannan)、半乳葡萄甘露聚糖(galactoglucomannan)。甘露聚糖的降解主要依靠的酶是 β -甘露聚糖酶,完全降解还需要 β -甘露糖苷酶(β -mannosidase)、外切- β -D-甘露聚糖酶(Exo- β -D-mannanase)、半乳糖苷酶(galactosidase)、葡萄糖苷酶(glucosidase)和脱乙酰酯化酶(deacytle esterase)等支链酶的协同作用,酶解产物主要是寡聚糖。

1.2.2 甘露聚糖酶的研究

1.2.2.1 甘露聚糖酶

β -甘露聚糖酶(β -mannanase;endo-1,4- β -D-mannan mannohydrolase;EC3.2.1.78,简称甘露聚糖酶)是水解 1,4- β -D-吡喃甘露糖主链的内切水解酶,属于半纤维素酶类,作用底物主要是半乳甘露聚

糖、葡萄糖甘露聚糖、半乳糖甘露聚糖以及甘露聚糖。酶解植物甘露聚糖的最早报道在本世纪初，但用微生物合成甘露聚糖酶的研究则是近一二十年的事。

1.2.2.2 甘露聚糖酶的来源

甘露聚糖酶广泛存在于自然界中，在一些低等动物，如海洋软体动物肠道分泌液中，某些豆类植物萌发的种子中，以及天南星科植物魔芋萌发的球茎中都发现了酶活性的存在。而对于微生物，更是产生甘露聚糖酶的主要来源。已报道的如细菌中的芽孢杆菌、假单胞菌、弧菌，真菌里的曲霉、木霉、酵母，放线菌中的链霉菌等都是产甘露聚糖酶的常见类群。

大量研究资料表明，除在个别微生物体内以结构酶形式存在外，甘露聚糖酶一般以胞外诱导酶的形式存在于生物体中。对于大部分产甘露聚糖酶的微生物，在培养基中添加少量的甘露聚糖或甘露寡糖，如魔芋粉、角豆胶或其水解物等，就能极大提高产酶水平^[38]。魔芋属于天南星科，多年生草本植物，是由葡萄糖和甘露糖以 2:3 摩尔分子比例相结合起来的多糖类物质。魔芋精粉中含有 40-70%的葡甘聚糖，由于其来源广泛价格便宜，是目前微生物发酵产酶生产中使用最为广泛的碳源^[39]。

1.2.2.3 国内外对甘露聚糖酶及其产生菌的研究

对甘露聚糖酶的研究始于上世纪 50 年代末 60 年代初，是人们在研究甘露聚糖及其水解时发现的。最早是 Courtois JE 等 1958 年^[40]在对苜蓿的半乳糖甘露聚糖的研究中发现了甘露聚糖酶的存在。随后在短短的五年时间里便有许多关于生产甘露聚糖酶的真菌、细菌、高等植物，如刺槐，杏树及杏仁等，动物，如哺乳动物、蜗牛等方面的报道^[41,42]。

由于微生物来源的甘露聚糖酶具有活力高、成本低、来源稳定、提

取方便以及比动植物更广泛的作用 pH 值、温度范围和底物专一性等显著特点, 已经在工业化生产中得到广泛应用^[38]。80 年代日本、法国、前苏联、美国等国家先后报道了嗜水气单孢菌(*Aeromonas Hydrophola*)F-25、卡塞尔黄肠道球菌(*Streptomyces sp.*)FL-2121、嗜碱芽孢杆菌 AM001^[38,41-43]产生甘露聚糖酶, 至此, 甘露聚糖酶作为微生物的酶制剂开发向应用研究和产业化发展^[41]。目前国内外报道, 常用于甘露聚糖酶工业生产的主要微生物, 有细菌中的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 真菌中的黑曲霉(*Aspergillus niger*), 木霉(*Trichoderma*)等^[38]。

在产甘露聚糖酶的极端环境微生物中, 以嗜热细菌报道的较多。Tallbot G 报道了嗜热脂肪芽孢杆菌, 随后 Luthi 在有关基因克隆的报道中提到了甘露聚糖酶基因的来源细菌为极端嗜热菌——解糖热解纤维素菌^[41]。Kataoka N 等^[44]报道的一株产甘露聚糖酶的厌氧细菌——梭状芽孢杆菌(*Bacillaceae clostridium*)KT-5A, 来自于池塘底部沉积的淤泥。Waine M 等^[45]研究了一株同时产甘露聚糖酶和甘露糖苷酶的耐盐菌株。这些微生物产酶的应用报道使得甘露聚糖酶的应用范围更为广泛, 同时也更大限度的造福人类。

国内外对于甘露聚糖酶及其产生菌的研究开始于上世纪 70 年代末, 主要集中在枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、黑曲霉和诺卡氏菌形放线菌等产酶菌株的研究上, 内容主要包括菌株的选育、复合诱变、酶的分离纯化及特性等。

Rihei Takahashi 等^[46]报道了通过平板透明圈筛选法从土壤中寻找甘露聚糖酶微生物的试验方法。1988 年 Akino T^[43]首次报道由嗜碱性微生物——嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)AM001 来生产甘露聚糖酶, 该酶有

三个组分的胞外酶。杨文博等^[47]对产甘露聚糖酶的地衣芽孢杆菌的发酵条件进行了优化,结果表明以魔芋粉为碳源的发酵产酶效果最好。Charles W 等^[48]提出了一种新的培养基配方进行对产半纤维素酶的微生物筛选,并筛选到了有较高甘露聚糖酶产酶活性的菌株。Julio Xandro H 等^[49]对木聚糖酶及甘露聚糖酶产生菌,环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)BL53 的固体培养条件进行了优化。柴萍萍等^[41]对产甘露聚糖酶的枯草芽孢杆菌的发酵条件进行优化,并最终得到 SDS-PAGE 电泳所确认的电泳纯酶。

不同微生物所产的甘露聚糖酶的组分数、分子量、pH 值和温度作用范围、等电点、底物专一性都有一定差异。真菌产生的酶一般组分较多,酶作用的 pH 值偏酸性,细菌和放线菌的却一般为中性或偏碱性,有较好的稳定性,绝大多数酶的等电点都在 2.5-6.5 之间,对重金属离子和巯基修饰物比较敏感^[50]。目前,对枯草芽孢杆菌^[51]、嗜碱芽孢杆菌^[52]、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[53]、哈茨木霉(*Trichoderma hazianum*)^[54]、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)^[55]和诺卡氏菌形放线菌^[56]的甘露聚糖酶特性都有较为详细的研究。

随着分子生物学技术的飞速发展及与微生物学学科交叉的不断深入,不同微生物来源的甘露聚糖酶基因已经在多种表达系统中获得了表达,分子水平的研究成为热点。M Evodia Setati 等^[57]报道了一种曲霉(*Aspergillus aculeatus*)甘露聚糖酶基因在酿酒酵母中的表达及重组酶的特性研究情况。张学文等^[58]以能水解魔芋葡甘聚糖的枯草杆菌 A33 为材料,得到其基因组中的甘露聚糖酶基因核心区段,并在大肠杆菌表达系统 BL21DE3(pLysS)中得到了高效表达。王和平等^[59]将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)RutC-30 甘露聚糖酶的大肠杆菌外泌型表达体系在猪肠道中获得了表达。

1.2.3 甘露聚糖酶的应用

在甘露聚糖酶基础研究取得重要成果的同时，它的应用研究也进入一个高潮，现已在食品、医药、造纸、纺织印染、石油开采及生物研究技术等多方面得到广泛应用^[38]。

在造纸工业中，甘露聚糖酶和 β -木聚糖酶等半纤维素酶类协同使用，处理纸浆，能明显改善纸质；用于纺织印染方面，能有效地去除产品上粘附的多余染料，降低了能耗和对环境的污染。甘露聚糖酶是油井石油压裂液的优良生物破胶剂，具有效率高、成本低、适用范围广、对地层伤害小等特点。此外，甘露聚糖酶作为一种工具酶类，在糖工程、糖结构分析、植物基因工程等生物基础研究中有着重要的用途^[38]。甘露聚糖酶水解甘露多糖，获得的甘露寡糖有很好的生物调节功能，能有效降低人体胆固醇水平，减轻便秘、降低血糖、促进肠道中双歧杆菌的生长，是良好的食品添加剂，国外现已广泛用于保健食品中^[60]。

植物是自然界主要的可再生有机资源，半纤维素占植物干重的35%，在自然界中仅次于纤维素。近年来，随着对半纤维素资源的开发及甘露寡糖药用价值的发现，其研究更加令人瞩目，微生物甘露聚糖酶的开发和利用正在进入一个崭新的时代。

1.3 本研究的目、意义和内容

1.3.1 本研究的目和意义

- (1) 分离筛选甘露聚糖酶产生菌用于亚麻的生物脱胶；
- (2) 优化甘露聚糖酶产生菌产甘露聚糖酶的发酵条件，为酶法脱胶的粗酶生产奠定基础。

本研究的意义在于丰富了亚麻生物脱胶的菌株和酶系组分，提高亚麻生物脱胶的效率，缩短脱胶周期，提高出麻率和纤维品质。同时，本

研究对于甘露聚糖酶产酶发酵条件的研究不论是对亚麻酶法脱胶粗酶生产的生产实践，还是对甘露聚糖酶在食品、医药、造纸、纺织印染、石油开采及生物研究技术等方面的应用都有积极的作用。

1.3.2 本研究的主要内容

本研究的主要内容包括以下几个部分：

- (1) 甘露聚糖酶产生菌株的分离和筛选；
- (2) 通过形态学、生理生化反应和分子生物学手段对所分离的甘露聚糖酶产生菌株进行鉴定；
- (3) 甘露聚糖酶产生菌株产酶发酵条件的优化；
- (4) 甘露聚糖酶产生菌株与果胶酶产生菌株 HDYM-02 生长及产酶的相互作用研究；
- (5) 甘露聚糖酶产生菌株应用于实验室加菌沤麻实践的研究。

第 2 章 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 沤麻材料

试验用亚麻原茎由黑龙江省巴彦亚麻有限公司提供, 实验室沤麻用水为自来水。

2.1.2 菌种

- (1) 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 菌株;
- (2) 大肠杆菌(*Escherichia coli*);
- (3) 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);
- (4) 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);
- (5) 果胶酶产生菌株 HDYM-02。

上述菌株由微生物黑龙江省高校重点实验室(黑龙江大学)保藏。

(6) 甘露聚糖酶产生菌株 HDYM-03、HDYM-04, 由温水沤麻液中自行分离选育。

2.1.3 培养基

2.1.3.1 分离、纯化、保藏用培养基

- (1) 牛肉膏蛋白胨培养基^[61]

牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 15-20g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.0-7.2, 121℃灭菌 15min

- (2) 魔芋粉分离培养基^[62]

魔芋粉 5g, 蛋白胨 10g, 酵母膏 2g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.2, 121℃灭菌 15min。

(3) 富集培养基^[62]

魔芋粉 5g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.2, 121℃灭菌 15min。

(4) 纤维素培养基

魔芋粉分离培养基中的魔芋粉以等量的羧甲基纤维素钠代替。

(5) 果胶分离培养基^[63]

果胶 20g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 20g, pH 值 7.0, 蒸馏水 1000mL, 115℃灭菌 20min。

2.1.3.2 发酵培养基

(1) 魔芋粉发酵产酶培养基^[64]

魔芋粉 20g, 酵母膏 5g, NaNO_3 5g, K_2HPO_4 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 蒸馏水 1000mL, 121℃灭菌 20min。

(2) 果胶发酵产酶培养基^[63]

果胶 10g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, pH 值 7.0, 蒸馏水 1000mL, 115℃灭菌 20min。

2.1.3.3 菌株鉴定用培养基

培养基的配制及灭菌参照沈萍^[61]和东秀珠^[65]的方法。

(1) V-P 测定用培养基

蛋白胨 5g, 葡萄糖 5g, NaCl 5g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.0-7.2, 115℃灭菌 30min。

(2) 休和利夫森二氏培养基

蛋白胨 2g, NaCl 5g, K_2HPO_4 0.2g, 葡萄糖 10g, 蒸馏水 1000mL,

1%溴百里酚蓝水溶液 3mL, pH 值 7.0-7.2, 112℃灭菌 30min。

进行其它糖、醇发酵试验时, 葡萄糖相应由 1%的其它糖醇替代。

(3) 明胶液化试验用培养基

蛋白胨 5g, 明胶 100-150g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.2-7.4, 115℃灭菌 20min。

(4) LB(Luria-Bertani)培养基

蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.0-7.2, 121℃灭菌 15min。

(5) 淀粉水解试验用培养基

在牛肉膏蛋白胨固体培养基中加 0.2%可溶性淀粉, 121℃灭菌 20min。

(6) 西蒙斯(Simmons)氏柠檬酸盐培养基

NaCl 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g, 柠檬酸钠 2g, 水洗琼脂 12g, 蒸馏水 990mL, 溴百里酚蓝 1%水溶液 10mL, 121℃灭菌 15min。

(7) 丙酸盐利用试验

酵母膏 1.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g, K_2HPO_4 0.6g, KH_2PO_4 0.4g, NaCl 2.0g, 丙二酸钠 3.0g, 溴百里酚蓝 0.025g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 7.0-7.4, 121℃灭菌 20min。

(8) 硝酸盐还原试验用培养基

牛肉膏蛋白胨液体培养基 1000mL, KNO_3 1g, pH 值 7.0-7.6, 121℃灭菌 20min。

(9) 吲哚试验用培养基

1%胰胨水溶液, pH 值 7.2-7.6, 115℃灭菌 30min。

(10) 生长温度和耐热性试验用培养基

牛肉膏蛋白胨液体培养基。

(11) 耐盐性和需盐性试验用培养基

牛肉膏蛋白胨液体培养基。

2.1.4 主要试剂及药品

2.1.4.1 酶活力测定用试剂

(1) DNS 试剂

DNS 试剂的配制参照孔雷^[66]的方法。

a. 称取苯酚 6.9g，溶于 15.2mL 10% NaOH 溶液中，用蒸馏水稀释至 69mL，然后加入 6.9g 亚硫酸氢钠；

b. 称取 DNS 8.8g，充分溶解于 880mL 蒸馏水中；

c. 称取酒石酸钾钠 225g，充分溶解于 300mL 10% NaOH 溶液后，加入至 2 溶液中；

d. 将 1 与 3 溶液混合，即为黄色 DNS 试剂，贮存于小口棕色瓶中，在室温下放置 7-10 天后使用，有效期一年。

(2) 1g/L 刚果红水溶液

准确称取刚果红 0.1g，溶于少量蒸馏水中，转移至 100mL 容量瓶中，定容至刻度。

(3) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液^[67]，pH 值 4.0。

(4) 磷酸盐缓冲液^[67]，pH 值 6.8。

(5) 0.2%甘露糖标准溶液

准确称取甘露糖 0.2g，溶于少量双蒸水中，转移至 100mL 容量瓶中，定容至刻度。

(6) 0.1%葡萄糖标准溶液

准确称取已 105℃烘干 1-2h 至恒重的无水葡萄糖 0.1g，溶于少量双

蒸水中，转移至 100mL 容量瓶中，定容至刻度。

(7) Fehling 氏试剂

Fehling 氏试剂的配制参照李健武^[67]的方法。

试剂 A:将 34.5g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶于 500mL 蒸馏水中。

试剂 B:将 125g 氢氧化钠和 137g 酒石酸钾钠溶于 500mL 蒸馏水中，
储于带橡皮塞瓶中。临用时，将试剂 A 和 B 等量混合。

(8) 魔芋粉

购自成都新星魔芋粉厂。

(9) 果胶

购自 Sigma 公司。

(10) 角豆胶

购自 Sigma 公司。

2.1.4.2 常规鉴定用试剂

试剂的配制参照沈萍^[61]和东秀珠^[65]的方法。

(1) 革兰氏(Gram)染色液

A 液:结晶紫 (crystal violet) 2g, 95%乙醇 20mL;

B 液:草酸铵 (ammonium oxalate)0.8g, 蒸馏水 80mL。

混合 A、B 二液，静置 48h 后使用。

(2) 1%溴百里酚蓝水溶液

先用少量 95%乙醇溶解溴百里酚蓝，再加水配成 1%水溶液。

(3) 3-10%过氧化氢

(4) 0.04%溴甲酚紫

(5) 吲哚试剂

对二甲基氨基苯甲醛 8g, 乙醇(95%)760mL, 浓 HCL 160mL。

(6) V-P 试剂

5% α -萘酚无水乙醇溶液, 40%KOH 溶液。

(7) 0.3%肌酸

(8) 40%NaOH

(9) 格里斯氏(Griess)试剂

A 液:对氨基苯磺酸 0.5g, 稀醋酸(10%左右) 150mL;

B 液: α -萘胺 0.1g, 蒸馏水 20mL, 稀醋酸(10%左右)150mL。

2.1.4.3 16S rDNA 序列分析用试剂

(1) TaKaRa Ex Taq

购自宝生物工程(大连)有限公司, 包括:

A. TaKaRa Ex Taq(5U/ μ L);

B. 10 $\times$ Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Free);

C. MgCl₂(25mM)。

(2) 2.5mM dNTP 混合液

购自宝生物工程(大连)有限公司

(3) Tris-醋酸-EDTA(TAE)缓冲液

242g Tris 碱, 57.1mL 冰醋酸, 100mL 0.5 mol/L EDTA (pH 值 8.0)。

(4) 溴化乙锭溶液(10mg/mL)

(5) 6 $\times$ Loading buffer

购自宝生物工程(大连)有限公司

(6) 10 $\times$ Loading buffer

购自宝生物工程(大连)有限公司

(7) DNA Marker DL2000 + DL15000

购自宝生物工程(大连)有限公司

分子量标准为 15000bp、10000bp、7500bp、5000bp、2500bp、2000bp、
1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp

(8) DNA Marker DL2000

购自宝生物工程(大连)有限公司

分子量标准为 2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp

(9) 0.1mol/L CaCl_2

使用双蒸水配制，过滤除菌。

(10) 100 μg /mL 氨苄青霉素

使用双蒸水配制，过滤除菌。

(11) X-gal

20mg/mL 5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷的二甲基甲酰胺溶液，过滤除菌。

(12) IPTG

50mg/mL 异丙基 β -D 硫代半乳糖苷，使用双蒸水配制，过滤除菌。

(13) 无菌生理盐水

0.9% NaCl 溶液，121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15min。

其余试剂及药品均为国产分析纯。

2.1.5 试剂盒

(1) 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(II)(离心柱型)，DP302-01

购自北京天为时代科技有限公司

A. 缓冲液 GA; B. 缓冲液 GB; C. 去蛋白液 GD; D. 漂洗液 GW;
E. 洗脱缓冲液 TE; F. 蛋白酶 K(20mg/mL); G. 吸附柱 CB。

(2) 胶回收试剂盒 Gel Extraction Mini Kit(50)

购自上海华舜生物工程有限公司

A. 溶液 S1; B. 溶液 W1; C. 溶液 T1。

(3) pGM-T Easy PCR 产物克隆试剂盒

购自北京天为时代科技有限公司

A. pGM-T Easy Vector ; B. Control insert DNA; C. T₄DNA ligase;
D. 10×ligation Buffer; E. 无菌去离子水; F. SOC 液体培养基。

(4) 质粒小量提取试剂盒(离心柱型), DP-103-02

购自北京天为时代科技有限公司

A. 溶液 P1; B. RnaseA(10mg/mL); C. 溶液 P2; D. 溶液 P3; E. 去蛋白液 PD; F. 漂洗液 PW; G. 洗脱缓冲液 EB; H. 吸附柱 CB3; I. 收集管(2mL)。

2.1.6 主要仪器设备

- (1) PCR 仪(Eppendorf GA Germany);
- (2) DYY-8B 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);
- (3) DYY-III-3A 水平电泳槽(北京六一仪器厂);
- (4) UVP 凝胶成像系统(Upland, CA, U.S.A.);
- (5) UV-2000 II 紫外分析仪(上海天能科技有限公司);
- (6) Allegra 21R Centrifuge(Beckman coulter, INC.);
- (7) TGL-16B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);
- (8) LD5-2A 低速离心机(北京医用离心机厂);
- (9) 752 紫外可见光分光光度计(上海光谱仪器有限公司);
- (10) DK-S26 电热恒温水浴锅(上海精密试验设备有限公司);
- (11) HH·II 420-S 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);
- (12) HQL300A 柜式恒温冷冻摇床(中国科学院武汉科学仪器厂);
- (13) Motic Digital Microscope(麦克奥迪数码显微镜);
- (14) Air TECH 超净工作台(苏净集团安泰公司);
- (15) Millipore 纯水仪(Millipore S.A. FRANCE);

- (16) Mettler AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);
- (17) Mettler pH Mettler(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);
- (18) SANYO 全自动灭菌锅(SANYO Electric Co., Ltd.);
- (19) 电热鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

2.2 试验方法

2.2.1 实验室沤麻方法

将亚麻原茎去土、去杂处理,放入六孔水浴锅中,按照麻:水=1:10的比例,加自来水到水浴锅中,在 30℃ 条件下浸渍 1h,然后将水倒出,再次加入等量的自来水,在 35℃ 条件下开始沤麻^[63]。

2.2.2 甘露聚糖酶产生菌株的分离、纯化与保藏

在沤麻主生物阶段,间隔 12h 取 5mL 沤麻液,无菌操作接种于 50mL 富集培养基中,37℃ 160r/min 振荡过夜,取此培养液接入 50mL 富集培养基中,37℃ 160r/min 振荡过夜。转接三次后,将培养液适当稀释,涂布于魔芋粉分离培养基平板上,37℃ 倒置培养。待分离培养基平板上长出单菌落,逐个在牛肉膏蛋白胨平板培养基上经三区划线纯化^[61],镜检,接种在牛肉膏蛋白胨斜面上,4℃ 保藏备用。菌株使用前,应转接至新鲜牛肉膏蛋白胨斜面或液体培养基中,37℃ 活化 24h。

2.2.3 甘露聚糖酶产生菌株的筛选

2.2.3.1 刚果红染色法初筛

将牛肉膏蛋白胨斜面上保藏的纯化菌种点种在魔芋粉分离培养基平板上。37℃ 倒置培养 2 天后,在平板上倒一层刚果红水溶液(1g/L),静置 5min,然后将刚果红溶液弃掉,用自来水缓慢冲洗平板,检测是

否产生黄色透明圈及其大小，作为菌株产甘露聚糖酶能力的初步检测^[68,69]。

2.2.3.2 种子液及粗酶液的制备

在 250mL 三角瓶中装入 100mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基，接入菌种，37℃ 160r/min 振荡培养 12h，5000r/min 离心 10min 收集菌体。用无菌生理盐水洗涤菌体三次，调整细胞浓度 10^8 个/mL，制备成种子液。在 500mL 三角瓶中装入 300mL 魔芋粉发酵产酶培养基，按照接种量 1%接入种子液，37℃ 160r/min 振荡培养，发酵液经 5000r/min 离心 10min，上清即为粗酶液。

2.2.3.3 魔芋粉中还原糖的去除

用浓度为 70-75%的乙醇按 5:1(v/w)的配比浸提魔芋粉 5 次，每次浸提 24h。65℃烘干备用^[70]。

2.2.3.4 DNS 法测定甘露聚糖酶活力复筛

甘露聚糖酶活力测定参照邓立红^[70]的方法。

(1) 甘露糖标准曲线的绘制

a.分别取 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0mL 甘露糖标准溶液，加入 25mL 具塞比色管中，编号 1-11。加入双蒸水补足至 1.0mL。

b.加入 3.0mL DNS 试剂，沸水中显色 5min，冷却至室温后，加水定容至 25mL。充分混匀。

c.于 550nm 处用 752 型分光光度计测定吸光值 OD_{550} 。以 1 号比色管为空白参比。以甘露糖质量(mg)为横坐标 X，以吸光值(OD_{550})为纵坐标 Y，绘制标准曲线。

(2) 甘露聚糖酶活力测定

a.在 25mL 具塞比色管中, 加入 0.1mL 适当稀释的酶液和 0.9mL 0.5%(w/v)去除了还原糖的魔芋粉溶液(用 pH 值 4.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制)。

b.在 55℃下保温 30min。

c.加入 3mLDNS 试剂, 在沸水中煮沸 5min, 冷却后加水定容至 25mL。混匀后在波长 550nm 下测出还原糖含量(mg/mL, 以甘露糖计)。每次做有底物无酶的空白试验。

d.按照下式计算甘露聚糖酶活力:

$$\beta\text{-甘露聚糖酶活力} = \frac{\text{生成甘露糖的量}(\mu\text{g})}{30\text{min} \times 0.18(\text{mg}/\mu\text{mol}) \times \text{所用的酶量}(\text{mL})} (\text{U/mL})$$

在上述条件下, 一个酶活力单位定义为每分钟产生相当于 1 μmol D-甘露糖的酶量。

选取复筛中甘露聚糖酶活力最高的两株菌, 进行后续研究。

2.2.3.5 菌株产纤维素酶能力的判定

将复筛得到的甘露聚糖酶产生菌株点种在纤维素培养基平板上, 37℃倒置培养 24h, 待长出菌落后, 按 2.2.3.1 中的方法进行染色, 观察是否产生透明圈。

2.2.4 菌株的鉴定

2.2.4.1 甘露聚糖酶产生菌株的常规鉴定

(1) 培养特征及菌体形态特征的观察

将复筛得到的菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上 37℃倒置培养两天后, 参照沈萍^[61]的方法观察菌落的形状、大小、颜色、边缘、光泽、粘度、透明度等外观特征, 测量菌株细胞大小, 同时进行革兰氏染色、芽孢染色, 半固体穿刺培养研究菌株运动性。

(2) 生理生化特性的研究

参照沈萍^[61]、东秀珠^[65]的方法, 进行需盐性、需氧性及耐热性试验, 接触酶试验, V-P 及终产物 pH 值测定, 利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇产酸试验, 利用葡萄糖产气试验, 水解明胶、淀粉试验, 利用柠檬酸盐、丙酸盐生长试验, 硝酸盐还原试验, 吲哚试验, 甲基红试验, H₂S 试验等。

2.2.4.2 16S rDNA 系统发育分析

细菌 16S rDNA 序列分析流程见图 2.1。

(1) 提取细菌基因组 DNA

使用天为时代细菌基因组 DNA 提取试剂盒(II)(离心柱型), DP302-01。

- a. 24h 细菌培养液 1-5mL, 10000r/min 离心 1min, 尽量倒尽上清, 留沉淀;
- b. 加 200μL 缓冲液 GA, 震荡至彻底悬浮;
- c. 加入 20μL 蛋白酶 K(20mg/mL)溶液, 混匀;
- d. 加 220μL 缓冲液 GB, 充分混匀, 70℃放置 10 min, 溶液应变清亮;
- e. 加 220μL 无水乙醇, 充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀;
- f. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中(吸附柱放入废液收集管中), 12000r/min 离心 30sec, 弃掉废液;
- g. 加入 500μL 去蛋白液 GD, 12000r/min 离心 30sec, 弃掉废液;
- h. 加入 700μL 漂洗液 GW, 12000r/min 离心 30sec, 弃掉废液;
- i. 加入 500μL 漂洗液 GW, 12000r/min 离心 30sec, 弃掉废液;
- j. 将吸附柱 CB 放回废液收集管中, 12000r/min 离心 2min, 尽量除去漂洗液;

k. 将吸附柱转入一个干净的离心管中, 加入 100 μ L 经 70 $^{\circ}$ C 预热的洗脱缓冲液 TE, 混匀, 室温放置 3 min, 12000 离心 30sec;

l. 离心得到的溶液再加入吸附柱中, 室温放置 2min, 12000r/min 离心 2min。离心得到的溶液即为基因组 DNA 溶液。

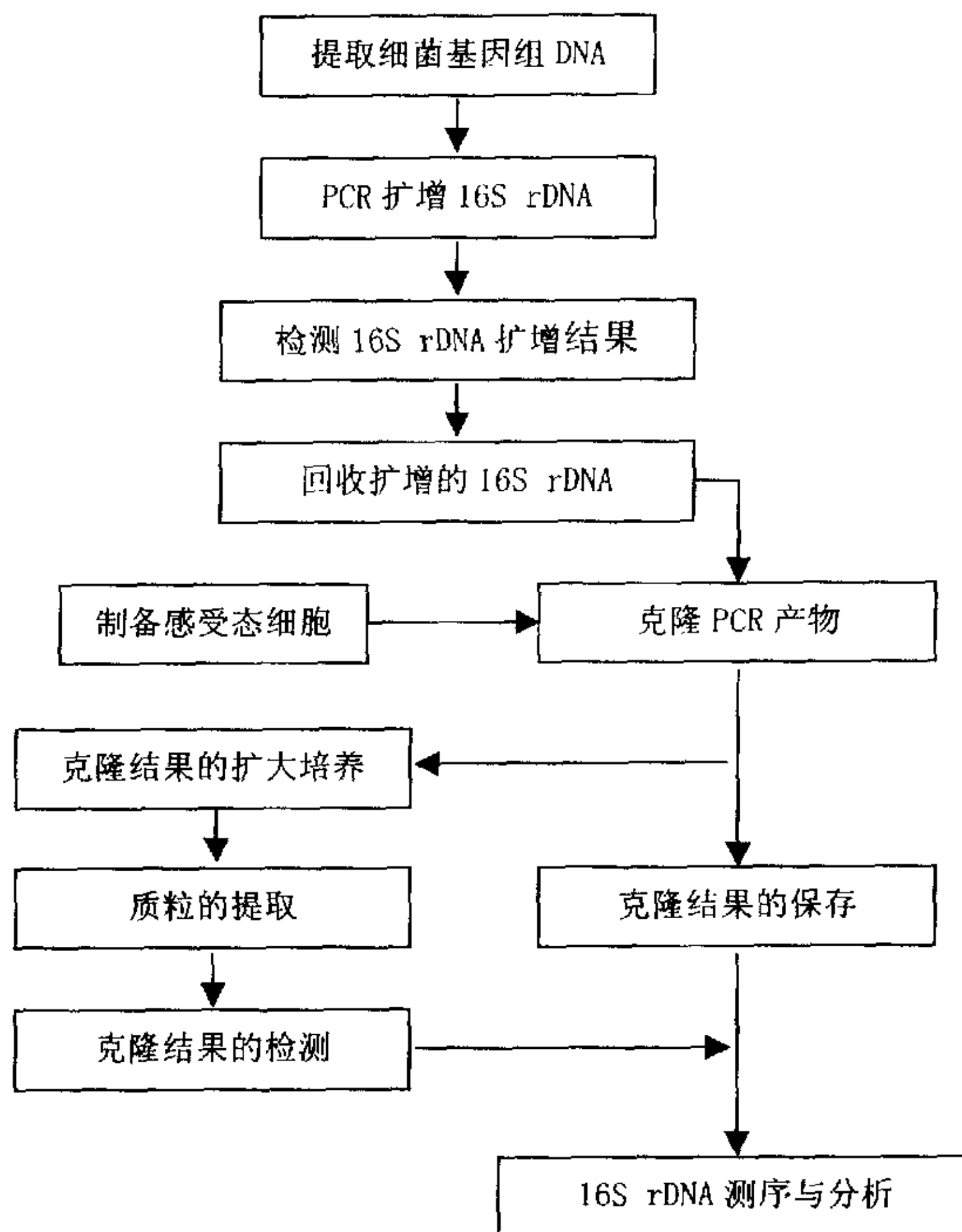


图 2.1 细菌 16S rDNA 系统发育分析流程

(2) PCR 扩增 16S rDNA 序列

上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

下游引物:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

上述细菌通用引物^[71]由上海博亚生物技术有限公司合成, 保存浓度 100 μ M, 保存于-78℃冰箱; 使用浓度 1pmol/ μ L, 保存于-20℃冰箱。

以(1)中得到的基因组 DNA 为模板, 以上述引物扩增菌株 HDYM-03、HDYM-04 16S rDNA 序列片段, 反应体系见表 2.1, 反应程序见表 2.2。

表 2.1 50 μ L PCR 扩增 16S rDNA 序列反应体系

体系组分	体积	终浓度
10 $\times$ Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ Free)	5 μ L	1 $\times$
2.5m mol/L dNTP Mixture	4 μ L	0.2m mol/L
1p mol/ μ L 上游引物	5 μ L	0.1p mol/ μ L
1p mol/ μ L 下游引物	5 μ L	0.1p mol/ μ L
25m mol/L MgCl ₂	4 μ L	2m mol/L
Ex Taq(5U/ μ L)	0.2 μ L	0.02U/ μ L
模板 DNA	10 μ L	
无菌双蒸水	16.8 μ L	
总体积	50 μ L	

表 2.2 PCR 扩增 16S rDNA 序列反应程序

预变性	94℃	5min	} 35 cycles
变 性	94℃	30sec	
退 火	57℃	30sec	
延 伸	72℃	1min	
延 伸	72℃	7min	
保 存	4℃		

(3) 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增结果

a. 称取 0.2g 琼脂糖, 用 20mL 电泳缓冲液(1 $\times$ TAE)配成 1.0%的琼脂

糖胶。置微波炉中加热，直至琼脂糖完全溶解。

b. 当凝胶溶液冷却至 50℃ 左右，加入 5 μ L 溴化乙锭溶液(10mg/mL)，倒入插好梳子的电泳胶盘，避免出现气泡，室温放置至胶凝固，小心拔出梳子，将胶盘放到有 1 $\times$ TAE 缓冲液的水平电泳槽中。

c. 取 45 μ L PCR 扩增产物，与 5 μ L 10 $\times$ loading buffer 混匀后，用移液器小心加到点样孔中。最左侧点样孔中加入 5 μ L DNA Marker。

d. 80V 恒压电泳约 30min。

e. 电泳结束后将胶板置于凝胶成像系统中检测。

(4) PCR 扩增产物的回收

使用上海华舜生物工程有限公司胶回收(小量)试剂盒，Gel Extraction Mini Kit(50)。

a. 在紫外光下切下含目标 DNA(约 1500dp)的琼脂糖块，使它尽可能小，放入 1.5mL 离心管中；

b. 按每 100mg 凝胶加入 300 μ L S1 液的比例加入 S1 液，置 50℃ 水浴 10min，使琼脂糖块溶化，每 2min 颠倒混匀一次。

c. 将溶化后的琼脂糖液移入吸附柱，离心 30sec，倒掉收集管中的液体，再将吸附柱放入同一个收集管中。

d. 在吸附柱中加入 500 μ L W1 液，离心 15sec(离心前静置 1min)。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。

e. 在吸附柱中加入 500 μ L W1 液，静置 1min 后，离心 15sec。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。

f. 离心 1min，尽量去除液体。

g. 将吸附柱放入一个干净的 1.5mL 的离心管中，在吸附膜中央加入 30 μ L T1 液，静置 1min 后，离心 1min。

h. 将 1.5mL 离心管(含回收的 DNA)贮存于-20℃ 冰箱中。

(5) 感受态细胞的制备

感受态细胞的制备参照周俊怡^[72]的方法进行。

a. 从新活化的 *E. coli* DH5 α 菌株平板上挑取一单菌落, 接种于 3-5mL LB 液体培养基中, 于 37℃ 160r/min 振荡培养过夜。

b. 将过夜培养所得菌液以 1:25 接种于 50mL LB 液体培养基中, 37℃ 160r/min 振荡扩大培养。当培养液出现混浊后(通常在培养后 2h 左右), 每隔 20-30min 用分光光度计在 600nm 下测定一次吸光值 OD₆₀₀, 以未接菌的 LB 液体培养基做空白对照。至 OD₆₀₀ 约 0.3, 停止培养。

c. 细菌培养液在冰浴中冷却 10min, 转入 50mL 离心管中, 于 4℃ 4000r/min 离心 10min。

d. 弃去上清液, 用 10mL 已在冰浴中预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 溶液轻轻混悬细胞后, 置于冰浴 30min, 然后于 4℃ 4000r/min 离心 10min。

e. 弃去上清液, 加入 2mL 已在冰浴中预冷的 0.1mol/L CaCl₂(如果感受态细胞不立即用于转化, 加入 50%的甘油, 使其终浓度为 10%, 小心悬浮细胞, 贮于-70℃冰箱中, 一般可保存半年至一年)。

f. 以 200 μ L/管分装于 1.5mL 离心管, 置于冰浴中, 24h 内感受态细胞可直接用于转化试验。

(6) 克隆 PCR 产物

将 PCR 扩增得到的 16S rDNA 片段连接在 pGM-T Easy 载体上, 而后转化进 *E. coli* DH5 α 菌株(不携带任何质粒)感受态细胞中。

使用天为时代 pGM-T Easy PCR 产物克隆试剂盒。

pGM-T Easy 载体结构见图 2.2。

a. 短暂离心装有载体的离心管, 以免液体挂在管壁上。

b. 将反应体系加入 0.5mL 离心管。

c. 混合均匀, 室温静置 1h 以上。

- d. 取一管感受态细胞，置于冰浴中，待溶化后用冰预冷的枪头加入连接产物 5 μ L，轻轻旋转以混合内容物，在冰中放置 20-30min。
- e. 将管放在室温 10min 左右，或者放到 42 $^{\circ}$ C 水浴中热击 60-90sec，注意不要摇动。
- f. 快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却 1-2min。
- g. 每管加 500 μ L SOC 培养基或 LB 培养基，置 37 $^{\circ}$ C 160r/min 摇床振荡培养，温育 45min 使细菌复苏。
- h. 准备含 50-100 μ g /mL Amp 的 LB 琼脂培养基平板，加 40 μ L X-Gal、16 μ L IPTG，用一无菌弯头玻璃棒涂布均匀。
- i. 将 100-300 μ L 已转化的感受态细胞转移到上述平板上，轻轻将细胞均匀涂开，将平板置于室温直至液体被吸收。
- j. 37 $^{\circ}$ C 倒置平板培养 12-16h。

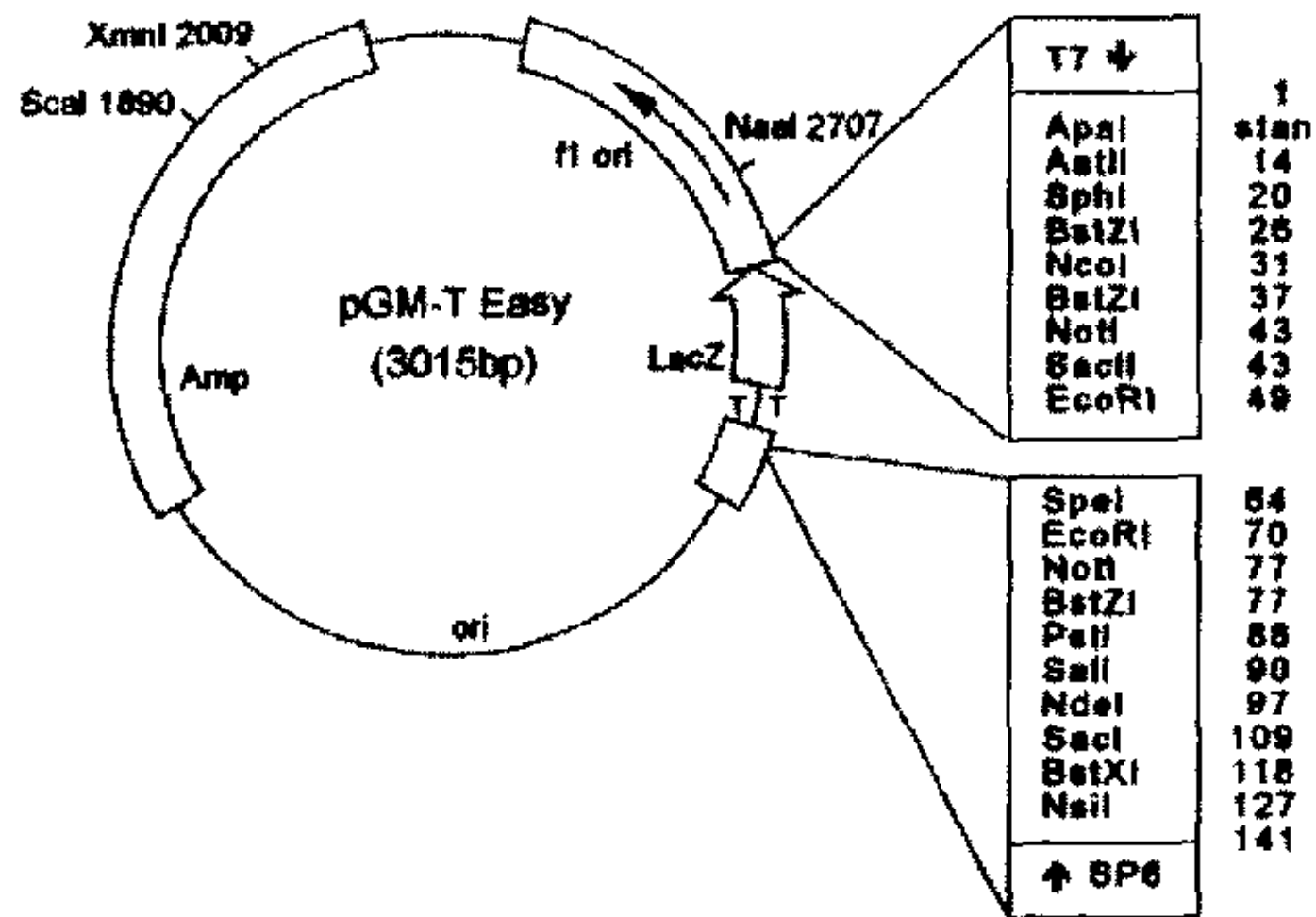


图 2.2 pGM-T Easy 载体图谱

(7) 克隆结果的保存与扩大培养

- a. 在(6)中得到的每个平板上, 挑取若干白色菌落。
- b. 每个菌落分别接种至含 100 μ g/mL Amp 的 LB 琼脂培养基平板和含 100 μ g /mL Amp 的 LB 液体培养基(50mL 三角瓶装入 20mL 培养基)。
- c. 接种后的平板置 37 $^{\circ}$ C 倒置培养至长出菌落, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
- d. 接种后的液体培养基 37 $^{\circ}$ C 160r/min 振荡培养过夜。

(8) 质粒的提取

使用天为时代质粒小量提取试剂盒(离心柱型), DP-103-02。

- a. 将(7)中获得的细菌培养液 1-5mL, 10000r/min 离心 1min, 尽量倒尽上清, 留沉淀。
- b. 用 250 μ L 溶液 P1 重悬细菌细胞沉淀, 振荡至彻底悬浮。如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。
- c. 加 250 μ L 溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。温和地混合, 不要剧烈振荡, 以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮黏稠。所用时间不应超过 5min, 以免质粒受到破坏。
- d. 加 350 μ L 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时会出现白色絮状沉淀, 13000r/min 离心 10min, 取上清。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心取上清。
- e. 将上一步所得上清液加入吸附柱 CB3 中(吸附柱放入收集管中), 13000r/min 离心 30-60sec, 倒掉收集管中的废液。
- f. 加入 700 μ L 漂洗液 PW, 13000r/min 离心 30-60sec, 弃掉废液。
- g. 加入 500 μ L 漂洗液 PW, 13000r/min 离心 30-60sec, 弃掉废液。
- h. 将吸附柱 CB3 放回空收集管中, 13000r/min 离心 2min, 尽量除去漂洗液。
- i. 取出吸附柱 CB3, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部

位加 50-100 μ L 预先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热的洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2min, 13000r/min 离心 1min。如果需要较多量质粒, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 离心 1min。

j. 离心管中所得液体即为质粒 DNA, 贮于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

(9) 检测克隆结果

a. 以(8)中获得的质粒为模板, 按照表 3.3 反应体系及表 3.2 中的反应程序 PCR 扩增 16S rDNA 序列片段。

b. 用(3)中的方法检测质粒上是否已携带目的 DNA 片段, 以及 PCR 产物片段大小是否与最初 PCR 获得的片段大小一致。

c. 将克隆结果保藏平板上挑取阳性克隆的相应菌落, 按照(7)中的方法扩大培养。

表 2.3 10 μ LPCR 扩增 16S rDNA 序列反应体系

体系组分	体积	终浓度
10 $\times$ Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ Free)	1 μ L	1 $\times$
2.5m mol/L dNTP Mixture	0.8 μ L	0.2m mol/L
1p mol/ μ L 上游引物	1 μ L	0.1p mol/ μ L
1p mol/ μ L 下游引物	1 μ L	0.1p mol/ μ L
25m mol/L MgCl ₂	0.8 μ L	2m mol/L
Ex Taq(5U/ μ L)	0.1 μ L	0.05U/ μ L
模板 DNA	2 μ L	
无菌双蒸水	3.3 μ L	
总体积	10 μ L	

(10) 16S rDNA 的测序与系统发育分析

a. 将(9)中扩培得到的菌液送交上海博亚生物技术有限公司测序。

b. 将测序结果提交到 GenBank, 并用 Blastn 进行同源性和相似性比对分析。

2.2.5 菌株生长及产甘露聚糖酶动态变化过程的研究

将已鉴定的两株甘露聚糖酶产生菌株按照 2.2.3.2 中的方法制备种子液。在 500mL 三角瓶中装入 300mL 魔芋粉发酵产酶培养基, 按照 1% 的接种量接入种子液, 37℃ 振荡培养 72h。按照 2.2.3.2 中的方法制备粗酶液, 间隔 6h 按照 2.2.3.4 的方法测定发酵液甘露聚糖酶活力及 pH 值。同时以粗酶液为空白, 在 600nm 下测定发酵液吸光值 OD_{600} 。

2.2.6 菌株产甘露聚糖酶条件的优化

2.2.6.1 产酶条件优化单因素试验

按照 2.2.3.2 中的方法制备种子液。根据 2.2.5 中的试验结果, 选取发酵过程中酶活力最高的时间, 以魔芋粉发酵产酶培养基为基础, 装液量 100mL/250mL 三角瓶。按照 2.2.3.2 中的方法制备粗酶液, 2.2.3.4 的方法测定甘露聚糖酶活力。测定下列因素对两株菌发酵产酶的影响。

(1) 碳源对酶活力的影响

在魔芋粉发酵产酶培养基的基础上, 改变碳源种类, 浓度 2%, 测定碳源对产酶的影响。碳源包括单糖和多糖(魔芋粉、角豆胶、果胶、甘露糖、葡萄糖)共五种。

(2) 不同碳源浓度对酶活力的影响

最佳碳源确定后, 用其作为唯一碳源并改变其浓度(1-8%, 每 1% 为 1 个梯度, 共 9 个梯度), 测定不同碳源浓度对产酶的影响。

(3) 氮源对酶活力的影响

上述两条件确定后, 用不同的有机氮源或无机氮源作为唯一氮源, 浓度 0.5%, 测定氮源对产酶的影响。共选用酵母提取物、蛋白胨、尿素、 NH_4NO_3 、 $NaNO_3$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 等 6 种氮源。

(4) 初始 pH 值对酶活力的影响

在魔芋粉发酵产酶培养基的基础上,以 0.1mol/mL 的柠檬酸或 NaOH 溶液调节培养基初始 pH 值,梯度为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。

(5) 无机盐含量对酶活力的影响

在魔芋粉发酵产酶培养基的基础上,测定 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度分别为 0.01%、0.02%、0.03% 时的产酶情况以及 K_2HPO_4 浓度分别为 0.2%、0.5%、0.8% 时的产酶情况。

(6) 接种量对酶活力的影响

在魔芋粉发酵产酶培养基的基础上,测定不同接种量(1-5%, 每 1% 为一个梯度,共 5 个梯度)对产酶的影响。

(7) 装液量对酶活力的影响

在魔芋粉发酵产酶培养基的基础上,测定不同装液量(10mL、30mL、50mL、80mL、100mL/250mL 三角瓶)对产酶的影响。

(8) 培养温度对酶活力的影响

在魔芋粉发酵产酶培养基的基础上,采用不同的温度(31℃、33℃、35℃、37℃)发酵培养菌株,测定温度对产酶的影响。

2.2.6.2 产酶条件优化正交试验

考虑菌种、碳源、氮源、培养液初始 pH 值、装液量、接种量、培养温度和时间对培养液甘露聚糖酶活力的综合影响比较复杂,本试验以分批正交试验的方式,对上述培养条件的组合进行进一步的优化。试验过程中种子液和粗酶液的制备按照 2.2.3.2 的方法,甘露聚糖酶活力的测定按照 2.2.3.4 的方法。

(1) 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验

本阶段的目的是主要是选取合适的碳源、氮源种类,同时研究碳源、氮源及初始 pH 值对发酵液甘露聚糖酶活力的影响。

根据 2.2.6.1 的结果选取本阶段的试验因子与水平,见表 2.4。按表

2.5 的试验方案配制培养基,培养基的其他成分与魔芋粉发酵产酶培养基相同,接种量 2%。根据 2.2.5 中的试验结果,选取发酵过程中酶活力最高的时间,测定发酵液甘露聚糖酶活力。两株菌各做两次重复。

表 2.4 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验因素及水平表

因素	水平 1	水平 2
A:碳源(2%)	魔芋粉	角豆胶
B:氮源(1%)	酶母膏	蛋白胨
C:pH 值	7.5	8.0

表 2.5 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验方案表 $L_8(2^7)$

试验号	因素及水平						
	A	B	A×B	C	A×C	B×C	空白
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

(2) 碳、氮源用量正交试验

本阶段研究的目的是摸索碳源与氮源的最佳用量与配比。

根据 2.2.6.1 的结果和碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验结果选取本阶段的试验因子与水平,见表 2.6,试验方案见表 2.7,培养基初始 pH 值为 8.0。培养基的其他组成及培养条件与碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验相同。两株菌各做两次重复。

表 2.6 碳、氮源用量正交试验因素及水平表

因 素	水平 1	水平 2	水平 3
A:碳源(魔芋粉)	2%	4%	6%
B:氮源(蛋白胨)	1%	2%	3%

表 2.7 碳、氮源用量正交试验方案表 $L_9(3^4)$

试验号	因素及水平			
	A	B	(A×B) ₁	(A×B) ₂
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

(3) 菌株及其他培养条件正交试验

本阶段研究的目的是考察菌株及其他培养条件对酶活力的影响，从而得出最优发酵条件。

根据 2.2.5、2.2.6.1 的结果确定本阶段试验因素和水平，见表 2.8，试验方案见表 2.9，培养基组成及其他培养条件依据碳、氮源用量正交试验的结果。本试验进行两次重复。

表 2.8 菌株及其他培养条件正交试验因素及水平表

因 素	水平 1	水平 2
A:菌种	HDYM-03	HDYM-04
B:装液量	30mL	100mL
C:接种量	1%	2%
D:培养温度	35℃	37℃
E:发酵时间	42h	48h

表 2.9 菌株及其他培养条件正交试验方案表 $L_{16}(2^{15})$

试验号	A	B	A×B	C	A×C	B×C	C×E	D	A×D	B×D	C×E	C×D	B×E	A×E	E
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1

2.2.7 甘露聚糖酶产生菌株与果胶酶产生菌株生长及产酶

相互作用的研究

2.2.7.1 DNS 法测定果胶酶活力

果胶酶活力测定参照江洁^[73]的方法。

(I) 葡萄糖标准曲线的绘制

分别取 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0mL 葡萄糖标准溶液, 加入 25mL 具塞比色管中, 编号 1-11。加入双蒸水补足至 1.0mL。加入 0.75mL DNS 试剂, 沸水中显色 5min, 冷却至室温后, 加水定容至 25mL。充分混匀, 于 540nm 处用 752 型分光光度计测定吸

光值 OD_{540} 。以 1 号比色管为空白参比。以葡萄糖质量(mg)为横坐标 X, 以吸光值(OD_{540})为纵坐标 Y, 绘制标准曲线。

(2) 果胶酶活力测定

a. 在 25mL 具塞比色管中, 加入 0.5mL 适当稀释的酶液和 0.5mL 0.25%(w/v) 果胶溶液(用 pH 值 6.8 磷酸缓冲液配制), 然后加入 pH 值 6.8 磷酸缓冲液 1mL。

b. 在 50℃下保温 30min。

c. 加入 2mLDNS 试剂, 在沸水中煮沸 5min, 冷却后加水定容至 20mL。混匀后在波长 540nm 下测出还原糖含量(mg/mL, 以半乳糖醛酸计)。每次作有底物无酶的空白试验。

在上述条件下, 每 h 内每毫升果胶酶酶促转化果胶生成 1μg 当量还原糖(以半乳糖醛酸计)所需的酶量定义为一个酶活单位。

由上面所得回归方程及葡萄糖和半乳糖醛酸之间的换算关系, 可以得到计算发酵液中还原糖的含量的公式及发酵液酶活力公式:

$$\text{半乳糖醛酸的量}(\mu\text{g/mL}) = X \times 1000 \times 194 / 180$$

$$\text{酶活(U/mL)} = X \times 1000 \times 194 \times 2 / 180$$

2.2.7.2 菌株产酶酶系的初步判定

在果胶分离培养基平板和魔芋粉分离培养基平板上, 分别点种果胶酶产生菌株 HDYM-02 及甘露聚糖酶产生菌株, 37℃倒置培养 24h。待长出菌落后, 按 2.2.3.1 中方法进行染色, 对比观察是否产生透明圈及其大小。

2.2.7.3 菌株生长及产酶的相互作用

将果胶酶产生菌株 HDYM-02 和甘露聚糖酶产生菌株按照 2.2.3.2 中的方法制备种子液。配果胶发酵产酶培养基和魔芋粉发酵产酶培养基各

三瓶，在 500mL 三角瓶中装液量 300mL，灭菌后分别以接种量 1%接入两株菌以及二者等比例混合的种子液。37℃，160r/min 振荡培养 72h。间隔 12h 分别按照 2.2.7.1 的方法测定发酵液果胶酶活力、2.2.3.4 的方法测定甘露聚糖酶活力，2.2.5 的方法测定 OD₆₀₀。

2.2.8 实验室加菌沤麻试验

2.2.8.1 加菌沤麻试验

按照 2.2.1 中的方法在四个水浴锅中进行沤麻试验，标号 1#、2#、3#、4#。按照 2.2.3.2 中的方法制备种子液，在 1#中加入甘露聚糖酶产生菌株种子液 20mL，在 2#中加入果胶酶产生菌株 HDYM-02 种子液 20mL，在 3#中加入两株菌种子液各 20mL，4#为不加菌空白对照。

2.2.8.2 沤麻终点的判定

感官法判定沤麻终点^[74]。即麻把软化，在水中摆洗纤维分散，沤麻液变成橙汁样(黄色混浊)。

2.2.8.3 沤麻液中各类细菌变化的研究

间隔 12h 取上述四种沤麻液，经适当梯度稀释后，分别在牛肉膏蛋白胨培养基平板、果胶分离培养基平板和魔芋粉分离培养基平板上进行平板菌落计数^[61]，直至沤麻 72h。

第3章 结果与讨论

3.1 甘露聚糖酶产生菌株的分离、筛选结果

3.1.1 菌株的分离、纯化结果

亚麻沤制是一个极其复杂的过程，具有其特定的生境特征。沤麻液中的微生物主要来自亚麻原茎及沤麻用水，种类繁多。沤麻液在魔芋粉为唯一碳源的培养基中多次富集后，才能将数量很少的具有半纤维素酶产生活性的细菌有针对性的分离出来。主生物阶段沤麻液富集后适当稀释，在魔芋粉分离培养基上涂布培养，将单菌落逐一挑入牛肉膏蛋白胨斜面保藏。镜检后，在牛肉膏蛋白胨平板培养基上三区划线直至获得纯培养。共分离到 20 株细菌，革兰氏染色均为阳性，其中 17 株为杆菌，中生或端生芽孢，3 株为球菌。

3.1.2 甘露糖标准曲线的绘制结果

甘露糖标准曲线见图 3.1。

曲线回归方程： $y=1.399x$ ，回归系数 $R^2=0.996$ 。

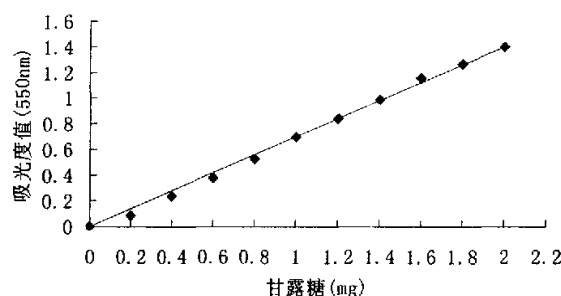


图 3.1 甘露糖标准曲线

3.1.3 魔芋粉中还原糖的检测结果

参照李健武^[67]的方法, 0.5%(w/v)去除了还原糖的魔芋粉溶液(用 pH 值 4.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制)与 Fehling 试剂反应, 无红色沉淀生成, 表明上述溶液中无还原糖, 对酶活力测定无干扰。

3.1.4 甘露聚糖酶产生菌株的筛选结果

3.1.4.1 刚果红染色初筛结果

刚果红能将大分子多糖类物质染成红色, 而对多糖降解后的小分子低聚糖类物质无染色作用, 因此在产生降解相应多糖的酶的菌落周围会形成清晰的透明圈^[68,69]。初筛中以魔芋粉分离培养基平板上菌株的 H/C 比值(即透明圈直径与菌落直径之比)大小初步判定菌株降解甘露聚糖产酶的能力。将从沤麻液中分离纯化得到的 20 株甘露聚糖酶产生细菌, 按照 2.2.3.1 中的方法染色后, 测量并计算 H/C, 得到 8 株比值较大的菌株。

3.1.4.2 DNS 法测定甘露聚糖酶活力复筛结果

甘露聚糖酶本身具有多分子型, 以及降解底物甘露聚糖结构和组成的复杂多样性, 甘露聚糖酶实际是一类降解甘露多糖的酶的总称。测定甘露聚糖酶活力的方法比较多, 但主要是依据甘露聚糖在甘露聚糖酶的作用下, 生成低聚糖和还原糖后的理化特性来间接反映酶催化的能力。测定还原糖的方法有 Somogyi-Nelson 法、地衣酚-硫酸法、DNS 法、染色法等。需要指出, 由于测定酶活力采用不同的底物、不同的方法, 而导致文献中甘露聚糖酶活力的表述有很大差别^[51,70]。本研究中以魔芋粉为酶活力测定底物。魔芋属于天南星科多年生草本植物, 是由葡萄糖和甘露糖以 2:3 摩尔分子比例相结合起来的多糖类物质。魔芋粉中含有 40-70% 的葡甘聚糖, 由于其来源广泛价格便宜, 是目前微生物甘露聚糖

酶发酵生产中使用最为广泛的碳源。按照 2.2.3.4 中的方法,测定初筛菌株 24h 发酵液甘露聚糖酶活力,最终得到两株酶活最高的菌株,酶活力分别为 1640U/mL 和 1170U/mL,编号 HDYM-03、HDYM-04。

图 3.2 所示为 HDYM-03、HDYM-04 在魔芋粉分离培养基平板上经刚果红染色后的透明圈。



图 3.2 HDYM-03、HDYM-04 魔芋粉分离培养基平板刚果红染色结果



图 3.3 HDYM-03、HDYM-04 纤维素培养基平板刚果红染色结果

3.2 菌株 HDYM-03、HDYM-04 产纤维素酶能力的判定

本研究的目的之一是将筛选到的甘露聚糖酶产生菌株应用于加菌沤麻的生产实践。脱胶菌种除需具有较高脱胶酶产生活性外，其代谢产物必须对亚麻纤维无损害，不影响纤维质量。将菌株 HDYM-03、HDYM-04 点种在纤维素培养基平板上，待长出菌落后用 2.2.3.1 中的方法染色。如图 3.3 所示，菌落很小，无透明圈，表明两株菌几乎不能被纤维素诱导产生纤维素酶，这为菌株在亚麻纤维生产实践中的应用提供了保障。

3.3 菌株 HDYM-03、HDYM-04 的鉴定

3.3.1 形态及生理生化鉴定

菌株 HDYM-03、HDYM-04 的菌落形态、细胞特征和生理生化鉴定结果见表 3.1、表 3.2 和表 3.3。两株菌的菌落形态和细胞特征差别不大，菌落形态均为圆形，乳白色，边缘不整齐，且表面粗糙不透明。菌体呈杆状，介于 $0.5-0.8 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ 之间，中生椭圆形芽孢，革兰氏染色阳性。生理生化试验以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌为阳性对照。从表 3.3 中可以看到，两株菌的生理生化特征基本相同。参考细菌鉴定手册^[65]，可初步判定两株菌均为芽孢杆菌属。

表 3.1 菌株 HDYM-03、HDYM-04 的菌落形态(37℃培养 24h)

特征	HDYM-03	HDYM-04
形状	圆形	圆形
隆起	扁平	扁平
边缘	不整齐	不整齐
表面	粗糙	粗糙
光泽	无光泽	无光泽
颜色	乳白	乳白

表 3.2 菌株 HDYM-03、HDYM-04 的细胞特征(37℃培养 24h)

特征	HDYM-03	HDYM-04
大小(μm)	0.5-0.8×1.5-2.0	0.5-0.8×1.5-2.0
形状	杆菌	杆菌
革兰氏染色	G ⁺	G ⁺
芽孢	有	有
孢囊膨大	无	无
伴孢晶体	无	无

表 3.3 菌株 HDYM-03、HDYM-04 的生理生化特征

特征	HDYM-03	HDYM-04
接触酶	+	+
厌氧生长	+	+
V-P 测定	+	+
V-P 培养物终 pH 值<6	+	+
V-P 培养物终 pH 值>7	—	—
D-葡萄糖产酸	+	+
L-阿拉伯糖产酸	+	+
D-木糖产酸	+	+
D-甘露醇产酸	+	+
葡萄糖产气	—	—
水解明胶	+	+
水解淀粉	+	+
利用柠檬酸盐	+	+
利用丙酸盐	+	+
酪氨酸水解	—	—
硝酸盐还原	+	+
吲哚试验	—	—
生长 pH 值 6.8	+	+
生长 pH 值 5.7	+	+
生长 NaCl 2%	+	+
生长 NaCl 5%	+	+
生长 NaCl 7%	+	+
生长 NaCl 10%	+	+

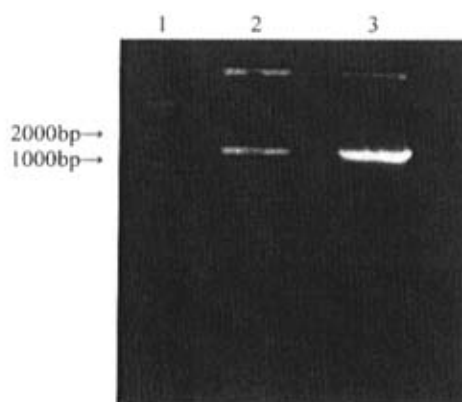
续表 3.3 菌株 HDYM-03、HDYM-04 的生理生化特征

特征	HDYM-03	HDYM-04
生长温度 5℃	—	—
生长温度 10℃	—	—
生长温度 30℃	+	+
生长温度 40℃	+	+
生长温度 50℃	+	+
生长温度 55℃	+	+
生长温度 65℃	—	—

3.3.2 16S rDNA 系统发育分析

3.3.2.1 PCR 扩增 16S rDNA 片段

以菌株 HDYM-03、HDYM-04 基因组 DNA 为模板，利用细菌通用引物 PCR 扩增其 16S rDNA 片段，图 3.4 扩增得到 1600bp 左右的条带。



1:DNA marker DL15000+DL2000

2:HDYM-03 16S rDNA 片段 3:HDYM-04 16S rDNA 片段

图 3.4 琼脂糖凝胶电泳检测 16S rDNA PCR 扩增产物

3.3.2.2 PCR 扩增产物的克隆结果的检测

按表 2.1 中的 50 μ L 体系进行 PCR 扩增，将产物回收纯化后连接到 pGM-T Easy 载体上，并转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞，进行蓝白筛选，结果见图 3.5。

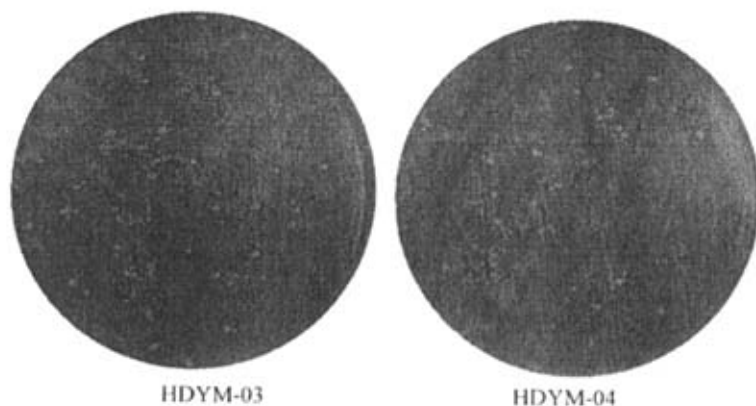
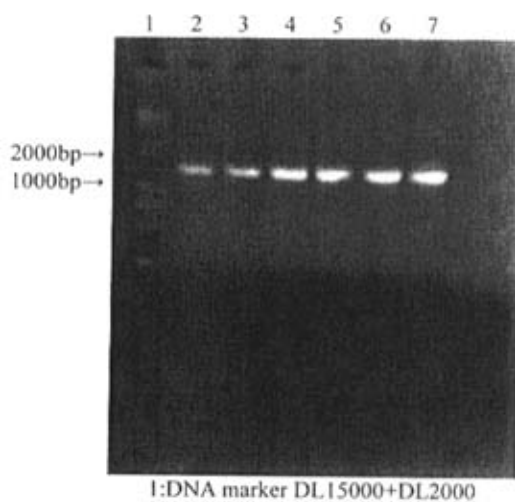


图 3.5 蓝白筛选结果



2-4:来自 HDYM-03 白色菌落 5-7:来自 HDYM-04 白色菌落

图 3.6 重组质粒的 PCR 验证

3.3.2.3 测序及系统发育分析

原核生物核糖体的 RNA 有三种类型:23S rRNA, 16S rRNA 和 5S rRNA, 它们的大小分别为 2900, 1540 和 120 个碱基。5S rRNA 最易分析, 但由于核苷酸少, 没有足够的遗传信息用于分类研究。而 23S rRNA 含有的核苷酸数几乎是 16S rRNA 的两倍, 分析较困难。60 年代末, Woese 开始采用寡核苷酸编目法对生物进行分类。他通过比较各类生物细胞的核糖体 RNA(rRNA)特征序列, 认为 16S rDNA 及其类似的 rDNA 序列作为生物系统发育指标最为合适。这是因为 16S rDNA 由 1540 个核苷酸组成, 能提供足够的遗传信息, 且其序列变化速度与进化距离相适应, 在结构与功能上具有高度的保守性。目前, 16S rDNA 测序已成为现代微生物分子鉴定手段之一, 被广泛应用于微生物学的研究中。通过对 16S rDNA 序列的分析, 可以判定不同菌种、菌属间遗传关系的远近^[75]。

菌株 HDYM-03、HDYM-04 的 16S rDNA 部分序列长度分别为 1631bp 和 1605bp, 测序结果见附录。将两株菌的 16S rDNA 序列提交至 GenBank(序列接受号分别为 DQ345289, AY971527)。用 Blastn 进行比对后, 利用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 程序绘制两株菌的 16S rDNA 序列系统发育树, 见图 3.7。

通过分析可知, 菌株 HDYM-03、HDYM-04 与芽孢杆菌属的很多菌种的 16S rDNA 序列有同源性, 且相似性较高。菌株 HDYM-03 与地衣芽孢杆菌(DQ167473)的相似性达到 100%, 与地衣芽孢杆菌(DQ020262)的相似性达 99.9%。菌株 HDYM-04 与地衣芽孢杆菌(DQ020262)的相似性达 99.8%。而且菌株 HDYM-03 和 HDYM-04 与地衣芽孢杆菌处于同一分支, 表明其具有很好的亲缘关系。

根据上述分析结果, 并结合菌株的形态特征、生理生化试验结果,

得出鉴定结论，菌株 HDYM-03、HDYM-04 均为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

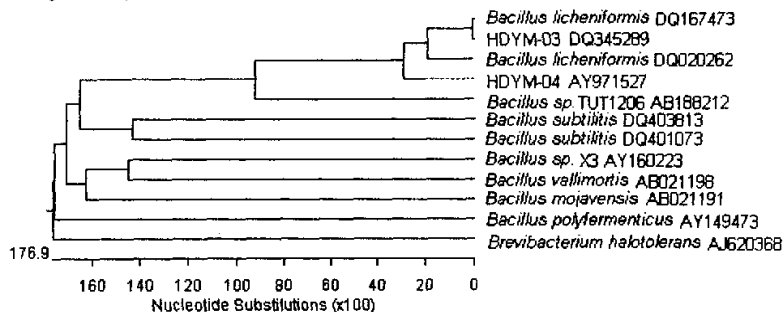


图 3.7 菌株 HDYM-03、HDYM-04 16S rDNA 序列系统发育树

3.4 菌株 HDYM-03、HDYM-04 生长及产甘露聚糖酶动态变化过程的研究

本试验的目的是初步了解菌株 HDYM-03、HDYM-04 在 72h 连续发酵过程中生长、产酶及发酵液 pH 值动态变化过程，为后续产酶条件研究奠定基础。如图 3.8、图 3.9、图 3.10 和图 3.11 所示，两菌株在发酵过程中上述参数的变化趋势基本一致。

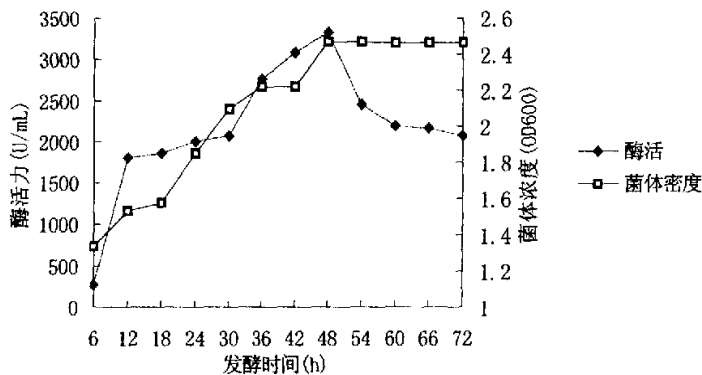


图 3.8 HDYM-03 产酶动态变化过程酶活及菌体密度曲线

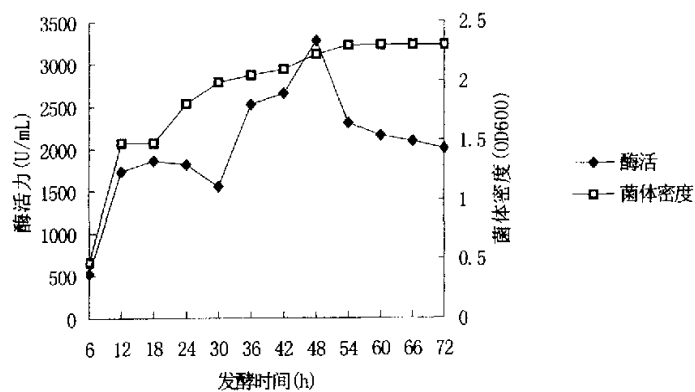


图 3.9 HDYM-04 产酶动态变化过程酶活及菌体密度曲线

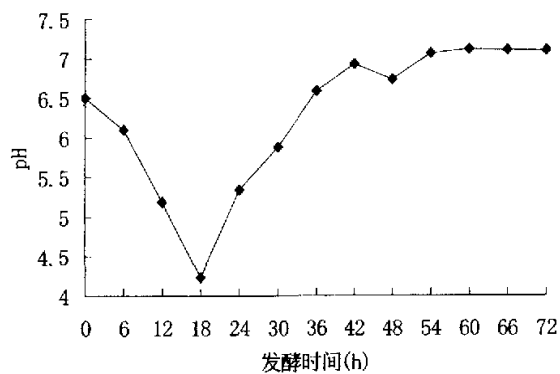


图 3.10 HDYM-03 产酶动态变化过程 pH 值曲线

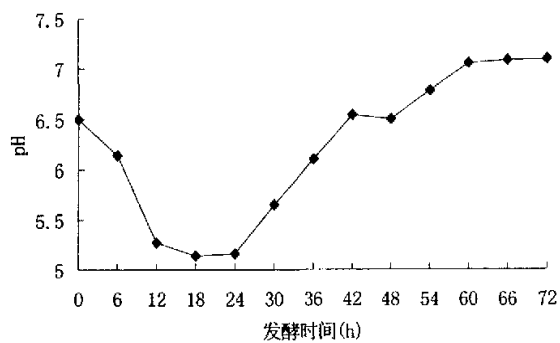


图 3.11 HDYM-04 产酶动态变化过程 pH 值曲线

在发酵的最初 6h, 发酵液酶活力及菌体密度都在最低点, 此时菌体生长极弱, 魔芋粉中的葡甘聚糖在水中会明显膨润而产生粘性^[76], 因此培养基呈半固体状态。经过短时间的延迟, 菌体生长进入对数期, 持续 6h 左右, 菌体生长进入平稳上升阶段, 直至发酵 48h, 菌体开始自溶, 生长基本停止, 菌体密度不再增加。

在发酵初期, 培养基粘度很大, 酶活力极低, 只有 500U/mL 左右。菌体生长对数期结束后自 12h, 发酵液中酶活力保持较低的稳定水平, 约 1600U/mL 左右。这可能是因为菌株优先利用了培养基魔芋粉中的少量单糖和低聚糖, 生长旺盛, 但被诱导产酶的水平很低。自发酵 30h 起, 培养基中的营养成分只有魔芋粉中的多聚糖, 菌株生长缓慢但被诱导产酶, 发酵液酶活力持续快速上升, 至 48h 达最大值, HDYM-03 为 3278U/mL, HDYM-04 为 3323U/mL。此后, 随着菌体自溶和生长的停止, 发酵液酶活力逐渐下降。在此阶段, 发酵液粘度和 pH 值迅速下降。

培养基初始自然 pH 值 6.5 的情况下, 在发酵初期, 菌株利用培养基中的单糖和低聚糖快速生长, 生成小分子的有机酸, 发酵液 pH 值逐渐下降。两株菌均在发酵 18h 达最低点, HDYM-03 为 4.23, HDYM-04 为 5.14。随着菌株生长平稳期的到来, 在发酵产酶阶段, 菌株主要分解多聚糖生成低聚糖和单糖并利用有机氮源, 发酵液 pH 值缓慢上升, 直至 48h 产酶高峰, 接近中性左右。此后, 随着菌体的自溶, 发酵液 pH 值略有上升。

在发酵 48h 时, 发酵液中菌体密度最大, 酶活力也达最高值。因此后续单因素试验及正交试验, 均选取发酵 48h 作为取样测定时间。这与国内有关地衣芽孢杆菌产甘露聚糖酶的研究结果一致^[47]。有报道, 嗜碱芽孢杆菌发酵产酶最高峰出现在 36h^[52], 可见不同细菌的产酶动态变化过程有较大差别。

3.5 菌株 HDYM-03、HDYM-04 产甘露聚糖酶条件的优化

3.5.1 单因素试验结果

3.5.1.1 不同碳源对酶活力的影响

不同碳源对产酶及菌体生长的影响结果见表 3.4、表 3.5。除果胶外，两株菌在其他四种碳源中的生长情况都比较好。魔芋粉是菌株最好的产甘露聚糖酶的诱导物，酶活力 HDYM-03 为 2381U/mL，HDYM-04 为 2353 U/mL，菌体密度 HDYM-03 为 2.045，HDYM-04 为 1.958。在果胶为碳源的培养基中，菌体密度及产酶水平比较低。在甘露糖和葡萄糖培养基中，菌株容易利用单糖碳源生长，但产酶水平却很低，可能是产物阻遏作用的结果。

表 3.4 不同碳源对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

碳源	HDYM-03	
	酶活力(U/mL)	菌体密度(OD ₆₀₀)
魔芋粉	2381	2.045
角豆胶	1790	2.096
果胶	378	0.493
甘露糖	137	2.125
葡萄糖	115	2.250

表 3.5 不同碳源对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

碳源	HDYM-04	
	酶活力(U/mL)	菌体密度(OD ₆₀₀)
魔芋粉	2353	1.958
角豆胶	2030	1.986
果胶	238	0.597
甘露糖	125	2.045
葡萄糖	98	2.085

一般认为,碳源的性质和类型是决定产酶成败的关键之一。碳源一般为碳水化合物,它除了供给微生物生长所需的能量外,往往对产酶还有阻遏或诱导作用。李宝坤报道菌株 CXJZ95-198 甘露糖、葡萄糖等单质碳源中培养时酶活性较高^[77]。Reese 等发现所有微生物生长于单一糖分如甘露糖、葡萄糖或淀粉上时,都能产生少量的甘露聚糖酶,而生长于含甘露聚糖的培养基上时,其产酶量增长了 10-100 倍。这表明,甘露聚糖是合成甘露聚糖酶很好的诱导物^[78]。甘露聚糖酶属于诱导酶,在嗜碱芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、黑曲霉等菌株的发酵优化中都有魔芋粉是最优的诱导产酶底物的报道,与本试验的结果一致,可见魔芋粉是一种在产甘露聚糖酶菌株液体发酵中普遍最佳的碳源。考虑到角豆胶的成本比魔芋粉高出几十倍,因此选择魔芋粉为碳源比较实际。

3.5.1.2 魔芋粉碳源浓度对酶活力的影响

培养基中魔芋粉浓度对菌株的产酶和生长都有很大的影响。如图 3.12、图 3.13 所示,魔芋粉浓度在 4-6% 范围内时,菌株的产酶和生长处于较高的水平。5% 的魔芋粉浓度下酶活最高,HDYM-03 为 4091U/mL,HDYM-04 为 4185U/mL。5% 的魔芋粉浓度下菌体密度也最大,两株菌均为 2.045。

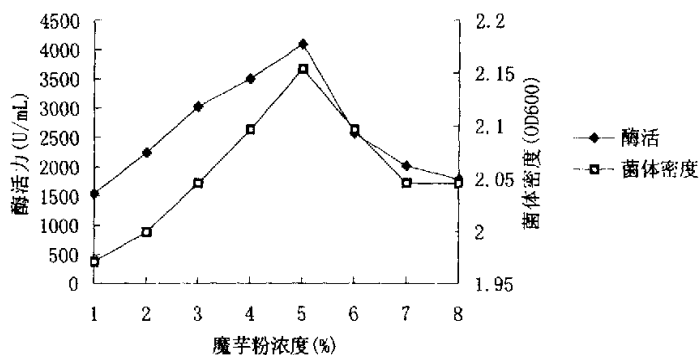


图 3.12 魔芋粉浓度对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

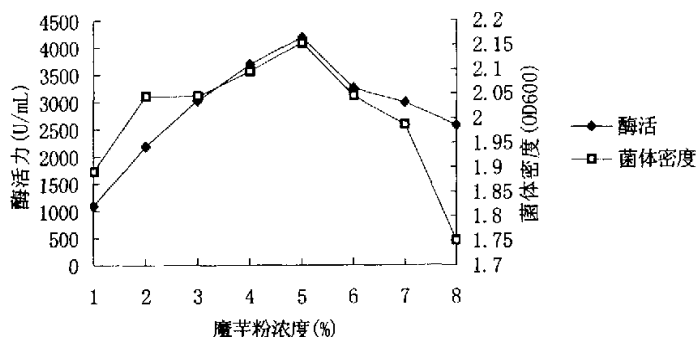


图 3.13 魔芋粉浓度对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

魔芋粉不仅是甘露聚糖酶的极好的诱导物, 同时还是菌株赖以生长的优良碳源。较高的碳源有利于菌株的生长, 也使产酶的稳定性增加, 但浓度过高时, 培养基过于粘稠甚至成凝胶状, 使得透气性下降导致供氧不足而抑制了菌株的生长和产酶。

3.5.1.3 不同氮源对酶活力的影响

不同氮源对产酶的影响很大。结果如表 3.6、表 3.7 所示, 两株菌在有机氮源中酵母膏培养的生长最旺盛, 产酶活力最高, 蛋白胨次之。无机氮源中 NH_4NO_3 最佳。

氮源是构成细胞原生质和酶蛋白的主要原料, 常用的氮源分为有机氮和无机氮两大类。在微生物生长过程中, 含有有机氮源的培养基常表现菌株生长旺盛的特点, 这可能是微生物直接利用氨基酸和其他有机氮化合物中的各种不同结构的碳架, 来合成生命所需要的蛋白质和其他细胞物质, 从而无需从糖代谢的分解产物来合成所需物质的原因。而无机氮源利用较快, 可用作速效性氮源。菌株生长过程中, 有机氮源的利用使培养基的 pH 值有所升高, 但并没有影响酶的合成和分泌, 而无机氮源中的铵盐被分解利用后, 培养基的 pH 值下降, 酶的合成分泌量明显

下降。芽孢杆菌的发酵优化中,有机氮源几乎都优于无机氮源,多数以蛋白胨和酵母膏为最优^[41],与本试验结果一致。

表 3.6 不同氮源对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

氮源	HDYM-03	
	酶活力(U/mL)	菌体密度(OD ₆₀₀)
酵母膏	2099	1.992
蛋白胨	1970	1.769
尿素	1354	0.779
NH ₄ NO ₃	1356	0.823
NaNO ₃	1257	0.561
(NH ₄) ₂ SO ₄	1312	0.652

表 3.7 不同氮源对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

氮源	HDYM-04	
	酶活力(U/mL)	菌体密度(OD ₆₀₀)
酵母膏	2271	2.045
蛋白胨	1467	1.655
尿素	1400	0.809
NH ₄ NO ₃	1412	1.044
NaNO ₃	1392	0.725
(NH ₄) ₂ SO ₄	1243	0.641

3.5.1.4 不同初始 pH 值对酶活力的影响

初始 pH 值对菌株产酶的影响较大(见图 3.14、图 3.15)。试验结果表明,微碱性环境下有利于菌株 HDYM-03、HDYM-04 的产酶。在 pH 值 8.0 时达最大值, HDYM-03 为 2420U/mL, HDYM-04 为 2356U/mL。初始 pH 值在 6.0-9.0 的范围升高时,发酵 48h 菌体密度逐渐增大, HDYM-03 增加幅度大, HDYM-04 增大平缓。

环境的酸碱度对发酵的影响不仅在于改变基质代谢速率，有时甚至可以改变代谢途径及细胞结构。不同菌株的发酵最佳初始 pH 值相差较大，地衣芽孢杆菌多在初始 pH 值 7.0-8.0 的范围内最有利于生长和产酶，而枯草芽孢杆菌多在略偏酸性的初始 pH 值下生长更为旺盛^[41]。

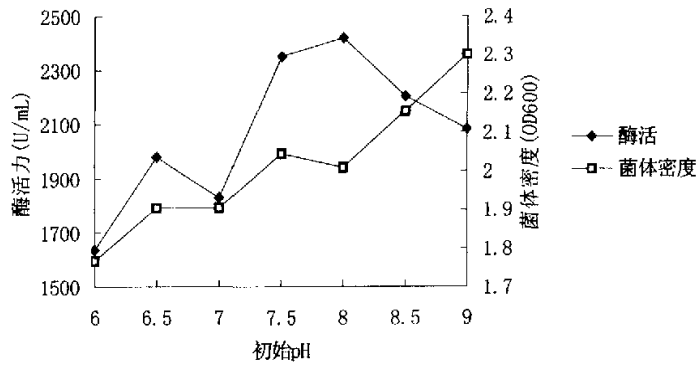


图 3.14 初始 pH 值对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

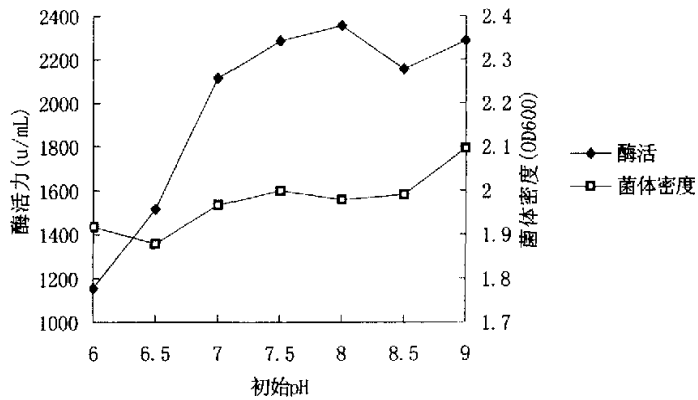


图 3.15 初始 pH 值对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

3.5.1.5 不同无机盐浓度对酶活力的影响

MgSO₄·7H₂O 主要是为菌体生长提供无机盐 Mg²⁺ 离子, K₂HPO₄ 的作用是缓冲发酵液的 pH 值变化, 缺少上述二种成分会影响菌株的产酶。如表 3.8、表 3.9 所示, 二者对菌株产酶及生长的影响不大, 对于 HDYM-03 和 HDYM-04, MgSO₄·7H₂O 的最佳浓度为均为 0.02%, K₂HPO₄ 最佳浓度均为 0.5%。

表 3.8 不同无机盐浓度对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

无机盐	浓度(%)	HDYM-03	
		酶活力(U/mL)	菌体密度(OD ₆₀₀)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	1588	1.934
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	1942	1.876
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	1588	1.840
K ₂ HPO ₄	0.2	1547	1.889
K ₂ HPO ₄	0.5	1986	1.903
K ₂ HPO ₄	0.8	1685	1.843

表 3.9 不同无机盐浓度对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

无机盐	浓度(%)	HDYM-04	
		酶活力(U/mL)	菌体密度(OD ₆₀₀)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	1677	1.881
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	2381	1.883
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	1754	1.901
K ₂ HPO ₄	0.2	1771	1.880
K ₂ HPO ₄	0.5	1986	1.913
K ₂ HPO ₄	0.8	1641	1.863

3.5.1.6 接种量对酶活力的影响

接种量主要影响发酵周期。接种量太大, 会使产酶拖后。发酵周期

越长, 则产酶率越低, 且越容易感染杂菌, 对生产不利。试验结果如图 3.16、图 3.17 所示, 2% 为 HDYM-03、HDYM-04 的最佳接种量, 可测得最大酶活分别为 2911U/mL, 3077U/mL。

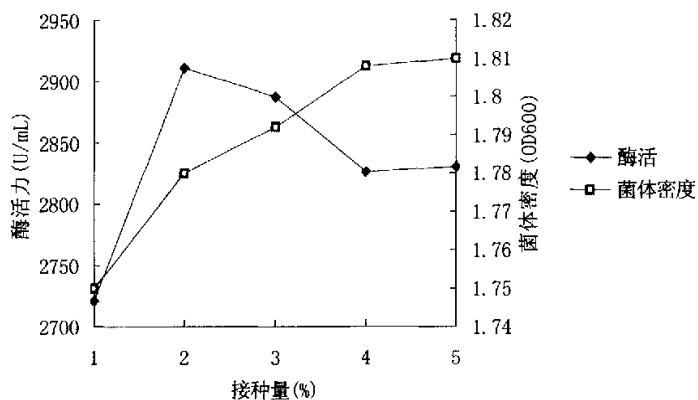


图 3.16 接种量对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

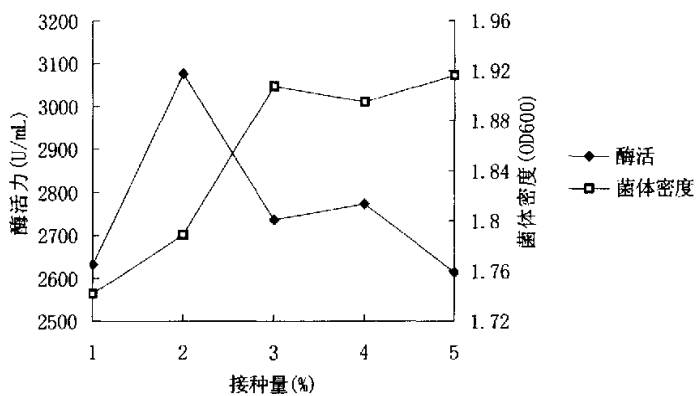


图 3.17 接种量对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

3.5.1.7 装液量对酶活力的影响

装液量的大小主要影响发酵过程中的通气及溶氧情况。由图 3.18、图 3.19 可知, 菌株的生长与产酶随装液量不同的变化趋势大致一致, 即装液量太大或太小都不利于菌株的生长及产酶, 这与两株菌均为兼性厌氧菌的结果一致。装液量为 30mL 时最适合菌株 HDYM-03 的产酶, 酶活力为 2815U/mL, 菌株 HDYM-04 在装液量为 50mL 时达到最大酶活力 2613U/mL。

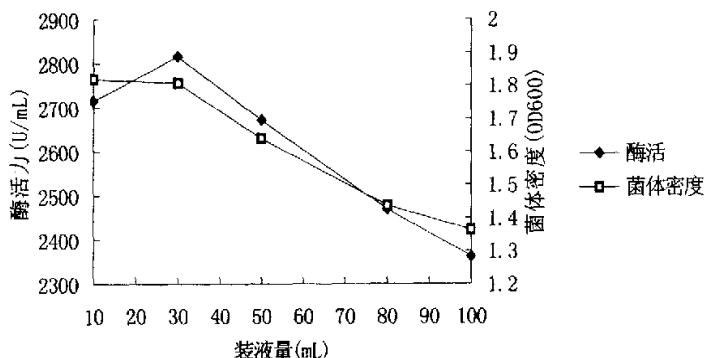


图 3.18 装液量对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

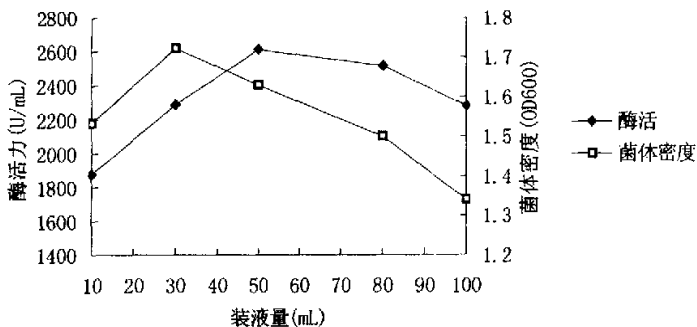


图 3.19 装液量对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

3.5.1.8 培养温度对酶活力的影响

温度对酶活力的影响，一方面表现在影响产物生成的量，另一方面表现在影响产物合成方向。某一菌株可能合成多种酶和代谢产物，要较多的得到目的产物-甘露聚糖酶，必须控制好发酵温度，使代谢向产酶的方向进行。如图 3.20、图 3.21 所示，HDYM-03、HDYM-04 产酶及菌体生长的变化趋势基本一致，即随着温度的升高而上升。两株菌产酶的最佳培养温度均为 37℃。

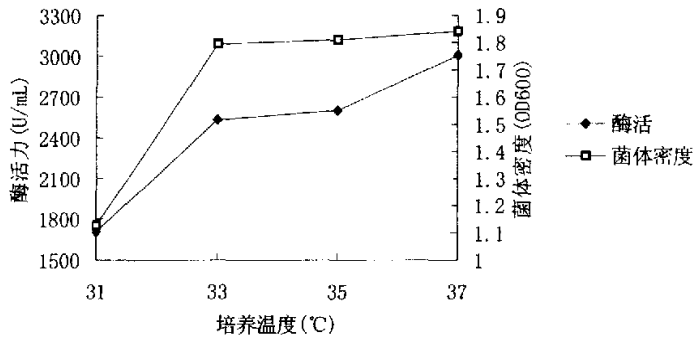


图 3.20 培养温度对 HDYM-03 发酵产酶及生长的影响

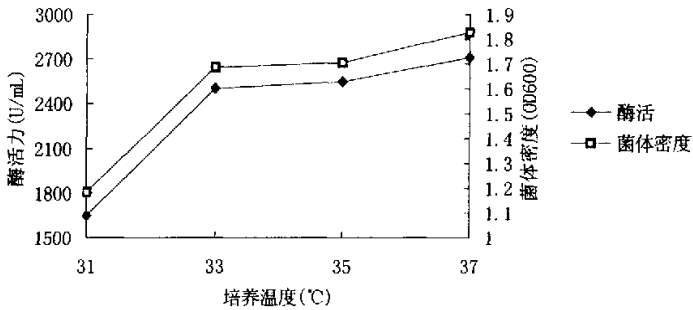


图 3.21 培养温度对 HDYM-04 发酵产酶及生长的影响

3.5.2 正交试验结果

3.5.2.1 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验

碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验测定结果见表 3.10、表 3.11，极差分析结果见表 3.12，方差分析结果见表 3.13、表 3.14。

表 3.10 菌株 HDYM-03 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验测定结果

试验号	酶活力(U/mL)	
	重复 I	重复 II
1	1928	1865
2	2384	2298
3	2403	2237
4	2657	2690
5	2494	2555
6	2458	2519
7	2416	2210
8	2116	1939

表 3.11 菌株 HDYM-04 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验测定结果

试验号	酶活力(U/mL)	
	重复 I	重复 II
1	2243	2190
2	2052	2119
3	2116	2188
4	2528	2492
5	2475	2376
6	2522	2431
7	2400	2409
8	2011	2072

(1) 对于菌株 HDYM-03, 碳源、氮源种类在所选浓度下对培养液甘露聚糖酶活性没有显著影响, 但二者之间的交互作用对培养液甘露聚糖酶活性有极显著的影响。培养液初始 pH 值对于 HDYM-03 菌株培养液甘露聚糖酶活性有显著影响, 同时碳源种类与初始 pH 值的交互作用对培养液甘露聚糖酶活性有极显著的影响。

表 3.12 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验极差分析表

影响因子	水平均值及极差(U/mL)					
	菌株 HDYM-03			菌株 HDYM-04		
	$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	R	$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	R
碳源	2308	2338	-30	2241	2337	-96
氮源	2313	2334	-21	2301	2277	24
碳源×氮源	2145	2502	-357	2187	2391	-204
pH 值	2264	2383	-119	2300	2278	22
碳源×pH	2183	2463	-280	2222	2356	-134
氮源×pH	2281	2366	-85	2298	2280	18
空白	2343	2303	40	2402	2176	226

表 3.13 菌株 HDYM-03 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验方差分析表

变异来源	SS	df	S ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
单位组间	18428	1	18428	3.04	5.32	11.26
碳源	3752	1	3752	0.62	5.32	11.26
氮源	1743	1	1743	0.29	5.32	11.26
碳源×氮源	510153	1	510153	84.22**	5.32	11.26
pH 值	56763	1	56763	9.37*	5.32	11.26
碳源×pH 值	313320	1	313320	51.72**	5.32	11.26
氮源×pH 值	28985	1	28985	4.78	5.32	11.26
模型误差	6281	1	6281			
试验误差	42180	7	6026			
合并误差	48461	8	6058			
总计	981605	15				

(2) 对于菌株 HDYM-04, 氮源种类在所选浓度下对培养液甘露聚糖酶活性没有显著影响。碳源种类及其与氮源之间的交互作用、碳源种类与初始 pH 值的交互作用都对培养液甘露聚糖酶活性有极显著的影响。在不考虑其它因素的情况下, 角豆胶和酵母膏的组合更有利于提高 HDYM-04 菌株培养液甘露聚糖酶活性。

表 3.14 菌株 HDYM-04 碳、氮源种类及初始 pH 值正交试验结果方差分析表

变异来源	SS	df	S ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
单位组间	298	1	298	0.12	5.59	12.25
碳源	36768	1	36768	14.76**	5.59	12.25
氮源	2280	1	2280	0.92	5.59	12.25
碳源×氮源	166260	1	166260	66.75**	5.59	12.25
pH 值	1785	1	1785	0.72	5.59	12.25
碳源×pH 值	72496	1	72496	29.11**	5.59	12.25
氮源×pH 值	1388	1	1388	0.56	5.59	12.25
模型误差	204078	1	204078	81.94**	5.59	12.25
试验误差	17435	7	2491			
总计	502787	15				

(3) 碳源与其它培养条件之间对两株菌培养液甘露聚糖酶活性有着复杂的相互作用。这可能是因为魔芋粉中的多聚糖吸水溶胀具有很强的粘性, 较难被微生物利用, 而且影响培养基的粘稠度, 因此与其他因素之间作用复杂有关。结合多重分析结果, 当培养基组成为魔芋粉、蛋白胨、pH 值 8.0 时两株菌发酵液甘露聚糖酶活性最高。

3.5.2.2 碳、氮源用量正交试验

碳、氮源用量正交试验测定结果见表 3.15、表 3.16, 极差分析结果见表 3.17, 方差分析结果见表 3.18、表 3.19。

(1) 对于菌株 HDYM-03, 碳源、氮源浓度及二者之间的交互作用

对培养液甘露聚糖酶活性均有极显著影响。

(2) 对于菌株 HDYM-04, 碳源浓度对培养液甘露聚糖酶活性有极显著影响, 其余因子及因子间交互作用对培养液甘露聚糖酶活性没有影响。

(3) 多重分析结果表明, 对两株菌而言, 培养基中含 6%魔芋粉、3%蛋白胨时, 发酵液甘露聚糖酶活力最高。

表 3.15 菌株 HDYM-03 碳、氮源用量正交试验测定结果

试验号	酶活力(U/mL)	
	重复 I	重复 II
1	3944	3840
2	2812	2688
3	3091	2743
4	3746	3516
5	3994	3574
6	3754	3472
7	4765	4798
8	4627	4765
9	4828	4890

表 3.16 菌株 HDYM-04 碳、氮源用量正交试验测定结果

试验号	酶活力(U/mL)	
	重复 I	重复 II
1	2494	3323
2	2961	3108
3	2765	2442
4	3992	4074
5	4027	3801
6	3911	4489
7	4724	4964
8	4884	4381
9	4732	5047

表 3.17 碳、氮源用量正交试验极差分析表

影响因子	水平均值及极差(U/mL)							
	菌株 HDYM-03				菌株 HDYM-04			
	$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_3$	R	$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	$\bar{x}_3$	R
碳源	3186	3676	4779	-1593	2849	4049	4789	-1940
氮源	4102	3743	3796	359	3929	3860	3898	69
空白 1	4067	3747	3828	320	3914	3986	3787	199
空白 2	4178	3715	3748	463	3904	4026	3756	270

表 3.18 菌株 HDYM-03 碳、氮源用量正交试验方差分析表

变异来源	SS	df	S ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
碳源	7984142	2	3992071	213.29**	4.46	8.65
氮源	448438	2	224219	11.98**	4.46	8.65
A×B	1135254	4	283813	15.16**	3.84	7.01
单位组间	90313	1	90313	4.83	5.32	11.26
误差	149736	8	149736			
总计	9807882	17				

表 3.19 菌株 HDYM-04 碳、氮源用量正交试验结果方差分析表

变异来源	SS	df	S ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
碳源	11500920	2	5750460	62.56**	4.46	8.65
氮源	13982	2	6991	0.08	4.46	8.65
A×B	340257	4	85064	0.93	3.84	7.01
单位组间	72073	1	72073	0.78	5.32	11.26
误差	735375	8	91922			
总计	11500920	17				

3.5.2.3 菌株及其他培养条件正交试验

菌株及其他培养条件正交试验测定结果见表 3.20，极差分析结果见表 3.21，方差分析结果见表 3.22。

(1) 菌种、装液量、接种量、培养温度、发酵时间对发酵液甘露聚糖酶活性均有极显著影响。HDYM-03 的产酶能力极显著强于 HDYM-04。除菌种外，其余四个因素对发酵液甘露聚糖酶活性影响强度依次为:装液

量、培养温度、发酵时间、接种量。

(2) 因素间的交互作用对培养液甘露聚糖酶活性均有极显著影响。交互作用中影响最大的是菌种与发酵时间的关系。结果表明发酵时间为 48h 时，发酵液甘露聚糖酶活性最大。

(3) 多重分析结果表明，两株菌发酵产甘露聚糖酶最适培养条件是，6%魔芋粉，3%蛋白胨，初始 pH 值 8.0，100mL/250mL 三角瓶，37℃培养 48h。HDYM-03 接种量 2%，HDYM-04 接种量 1%。

表 3.20 菌株及其他培养条件正交试验测定结果

试验号	酶活力(U/mL)		试验号	酶活力(U/mL)	
	重复 I	重复 II		重复 I	重复 II
1	3770	3795	9	4000	4075
2	4538	4588	10	4226	4298
3	4287	4324	11	4195	4157
4	4002	3900	12	4375	4320
5	4751	4800	13	4281	4325
6	4503	4525	14	5168	5110
7	4259	4298	15	4022	4078
8	5063	5122	16	4511	4500

甘露聚糖酶发酵的研究主要集中在黑曲霉(*Aspergillus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)，而芽孢杆菌中研究最多的是枯草芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌三种。其中又以枯草芽孢杆菌的发酵产酶活力最高，但目前所见报道中其酶活力最大值也仅为 3362U/mL^[79]。发酵条件既影响菌体的生长繁殖，也影响酶的形成。提高酶产量最直接的办法就是对培养基以及培养条件进行优化。

经本试验优化后，菌株 HDYM-03、HDYM-04 产酶的酶活分别从初

始的 1640U/mL 和 1170U/mL 提高到 5122U/mL 和 5168U/mL, 分别提高了 3.1 倍和 4.4 倍, 优化效果明显, 且该酶活水平为现在已报道的同类酶中的最高水平。

由 3.5.2.3 中的结果可知, 菌株 HDYM-03 的产酶能力显著强于 HDYM-04, 后续研究以 HDYM-03 作为供试菌株。

表 3.21 菌株及其他培养条件正交试验极差分析表

影响因子	水平均值及极差(U/mL)		
	$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$	R
菌种	4408	4353	55
装液量	4178	4582	-404
菌种×装液量	4325	4435	-110
接种量	4422	4338	84
菌种×接种量	4339	4421	-82
装液量×接种量	4321	4439	-118
培养温度×发酵时间	4460	4300	160
培养温度	4214	4547	-333
菌种×培养温度	4425	4336	89
装液量×培养温度	4444	4316	128
接种量×发酵时间	4332	4428	-96
接种量×培养温度	4349	4411	-62
装液量×发酵时间	4404	4357	47
菌种×发酵时间	4263	4498	-235
发酵时间	4222	4539	-317

表 3.22 菌株及其他培养条件正交试验方差分析表

变异来源	SS	df	S^2	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
菌种	24421	1	24421	17.33**	4.54	8.68
装液量	1306536	1	1306536	927.41**	4.54	8.68
菌种×装液量	97682	1	97682	69.34**	4.54	8.68
接种量	56113	1	56113	39.83**	4.54	8.68
菌种×接种量	53628	1	53628	38.07**	4.54	8.68

表 3.22 菌株及其他培养条件正交试验方差分析表

变异来源	SS	df	S ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
装液量×接种量	110450	1	110450	78.40**	4.54	8.68
培养温度×发酵时间	205120	1	205120	145.60**	4.54	8.68
培养温度	888445	1	888445	630.64**	4.54	8.68
菌种×培养温度	62835	1	62835	44.60**	4.54	8.68
装液量×培养温度	130561	1	130561	92.67**	4.54	8.68
接种量×发酵时间	73920	1	73920	52.47**	4.54	8.68
接种量×培养温度	30381	1	30381	21.57**	4.54	8.68
装液量×发酵时间	17485	1	17485	12.41**	4.54	8.68
菌种×发酵时间	443211	1	443211	314.60**	4.54	8.68
发酵时间	805181	1	805181	571.54**	4.54	8.68
单位组间	2178	1	2178	1.55	4.54	8.68
试验误差	21132	15	1409			
总计	4329277	31				

3.6 菌株 HDYM-03 产果胶酶能力的判定

3.6.1 葡萄糖标准曲线的绘制

葡萄糖标准曲线见图 3.22。

曲线回归方程: $Y=0.4958X$, 回归系数 $R^2=0.9944$ 。

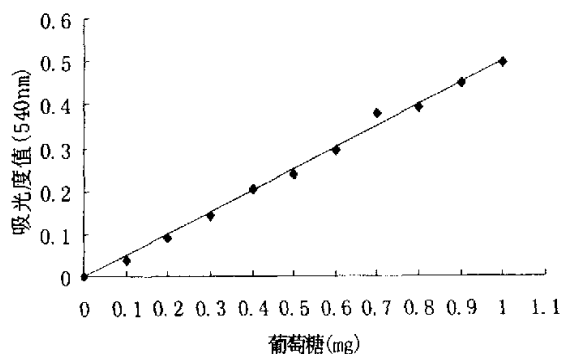


图 3.22 葡萄糖标准曲线

3.6.2 菌株 HDYM-02、HDYM-03 产酶酶系的初步判定

HDYM-02、HDYM-03 刚果红染色结果见图 3.23、图 3.24。

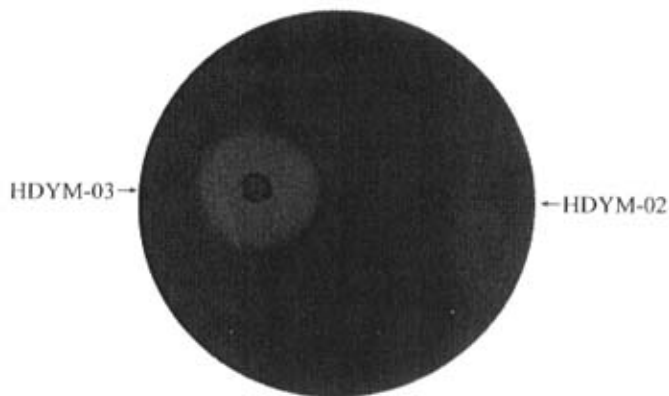


图 3.23 魔芋粉分离培养基平板刚果红染色结果



图 3.24 果胶分离培养基平板刚果红染色结果

果胶酶产生菌株 HDYM-02 在果胶分离培养基平板上 H/C 为 3.6, 在魔芋粉分离培养基上可以生长, 但染色后不产生透明圈, 可能是利用了培养基中的蛋白胨、酵母膏等营养成分, 该菌株只能由果胶诱导产生果胶酶, 不能由魔芋粉诱导产生甘露聚糖酶。甘露聚糖酶产生菌株 HDYM-03 在果胶分离培养基平板上 H/C 为 4.6, 在魔芋粉分离培养基平板上 H/C 为 3.4, 表明该菌株同时具有果胶酶及甘露聚糖酶产生活性。

3.7 菌株 HDYM-03 与果胶酶产生菌株 HDYM-02 生长及产酶动态变化过程的相互作用

魔芋粉发酵培养基十分粘稠, 接菌发酵前呈固体状态。菌株 HDYM-03 可利用魔芋粉中的多聚糖生成易溶的低聚糖和单糖, 因此随着发酵的深入, 培养基逐渐变半固体、液体状态, 可对其进行酶活力及菌体密度的测定。而接入菌株 HDYM-02 的摇瓶, 振荡培养至 60h, 培养基仍呈固体状态, 表明该菌株不能利用魔芋粉中的多聚糖, 发酵液中无甘露聚糖酶活性, 与 3.6.2 中的结果一致。

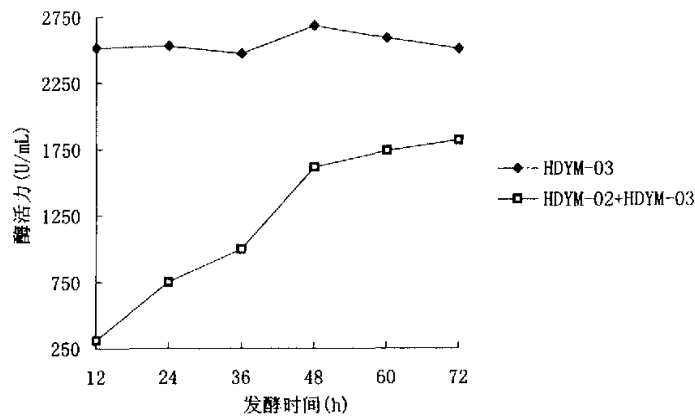


图 3.25 菌株在魔芋粉发酵培养基中甘露聚糖酶产酶动态变化过程曲线

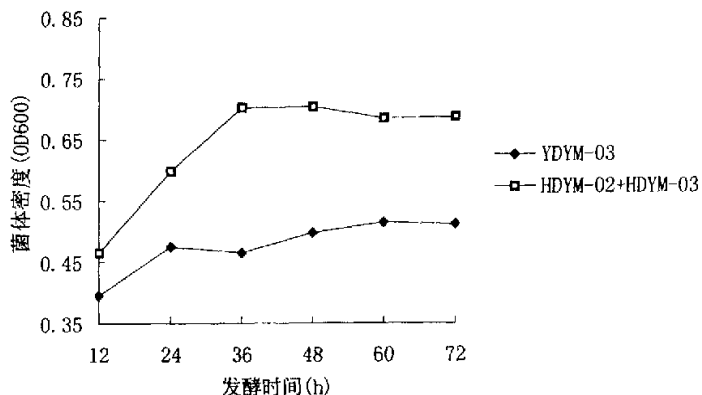


图 3.26 菌株在魔芋粉发酵培养基中的生长情况曲线

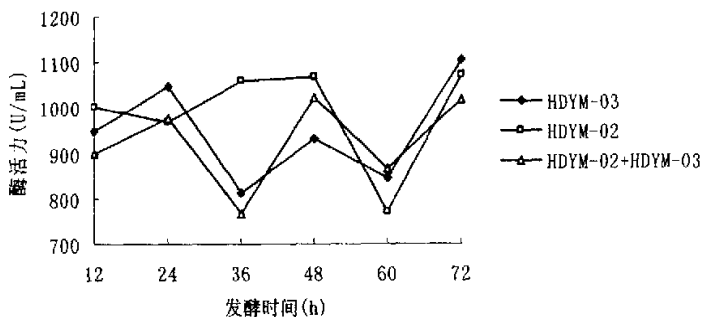


图 3.27 菌株在果胶发酵培养基中果胶酶产酶动态变化过程曲线

如图 3.25 所示, HDYM-03 在魔芋粉发酵产酶培养基中 48h 达到酶活力最高值, 比混合接菌提前了 24h, 且整个发酵过程中酶活力的平均值及最大值, 都明显优于混合接菌。这可能是由于菌株 HDYM-02 的生长利用了培养基中除魔芋粉外的其他营养成分, 从而延迟了菌株 HDYM-03 的生长及产酶, 导致发酵过程中产酶的整体延后和下降。

如图 3.26 所示, 在魔芋粉发酵产酶培养基中, 两株菌混合培养时的

菌体密度始终大于 HDYM-03 单独培养。这可能是因为, HDYM-02 虽然不能利用魔芋粉中的多聚糖产酶, 但它直接利用了培养基中的少量的低聚糖、单糖、有机氮源酵母膏中的氨基酸和各种不同结构的碳架, 来合成生命所需的蛋白质和其他细胞物质进行生长。

如图 3.27 所示, 在果胶发酵产酶培养基中, 菌株 HDYM-02、HDYM-03 单独发酵及二者混合接菌的产酶动态变化过程基本一致, 在发酵过程中呈波浪形变化, 酶活力水平相差不大。有研究表明, HDYM-02 在以果胶为碳源生长产酶时, 可能是一个交替利用碳源的过程。即在发酵过程中首先是以果胶作为生长碳源, 这时果胶被降解为半乳糖醛酸, 由于半乳糖醛酸是一种小分子还原糖, 当在发酵液中的量达到一定浓度时, 果胶酶产生菌会优先利用半乳糖醛酸作为碳源, 而这时果胶酶产生菌就不需要产生果胶酶来降解果胶, 果胶酶浓度就处于一个较低的水平, 相反半乳糖醛酸的量应处于一个较高的水平, 这就造成了半乳糖醛酸和酶活之间的一种反比关系, 果胶酶活力呈波浪形变化^[63]。

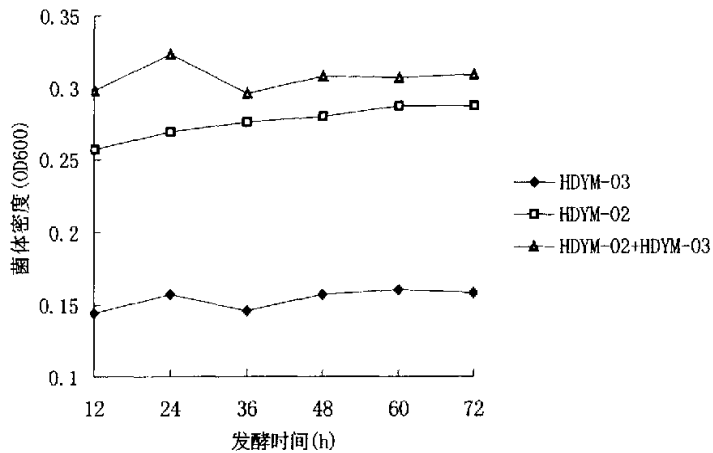


图 3.28 菌株在果胶发酵培养基中的生长情况曲线

如图 3.28 所示, 两株菌单独及混合接种于果胶发酵产酶培养基中, 菌体的生长情况总的来说长势比较平缓, 没有出现明显的对数期。由于混合接种是单独接种接菌量的二倍, 且两株菌均可利用果胶生长, 因此菌体密度始终最大。在两株菌单独培养的发酵液中, 整个 72h 发酵过程中果胶酶产生菌 HDYM-02 的菌体密度始终大于 HDYM-03。

由于亚麻纤维细胞靠果胶质轴向搭接或侧向转接形成纤维束, 果胶质被降解后, 分布在纤维束之间的胶杂成分才容易被降解, 因此目前生物脱胶的研究多集中在果胶质和果胶酶产生菌上。半纤维素是亚麻原茎胶质中的最大组分, 甘露聚糖是亚麻胶质中半纤维素的主要成分^[9], 目前尚无甘露聚糖酶产生菌株在亚麻脱胶方面的应用报道。本试验结果表明, 菌株 HDYM-03 同时具有果胶酶和甘露聚糖酶产生活性, 具有脱胶酶系丰富, 酶活力高的优势, 在亚麻生物脱胶领域有很大的应用潜力。

3.8 实验室加菌沤麻试验结果

3.8.1 沤麻终点的判定

实验室加菌沤麻的沤制终点结果见表 3.23。

表 3.23 加菌沤麻试验沤麻终点时间

试验号	1# HDYM-03	2# HDYM-02	3# HDYM-02+HDYM-03	4# 空白
沤麻时间(h)	60	80	72	90

不加菌的 4#空白试验沤麻时间最长, 为 90h。甘露聚糖酶产生菌株 HDYM-03 单独加菌沤麻仅需 60h, 比空白试验提前了 30h, 效果最好。果胶酶产生菌株 HDYM-02 加菌沤麻所需时间为 80h, 两株菌混合加菌沤

麻为 72h。由 3.7 中的结果可知,HDYM-03 的果胶酶产生活性与 HDYM-02 相当,且单独培养时,甘露聚糖酶活力明显高于与菌株混合培养的情况。可以推知,HDYM-03 单独加菌沤麻时,成为沤麻体系中唯一的优势菌群,相继快速降解胶质中的果胶质和半纤维素,所以沤麻时间最短。

3.8.2 沤麻液中各类细菌数量变化

在牛肉膏蛋白胨培养基平板、魔芋粉分离培养基平板和果胶分离培养基平板上得到的计数结果,即为加菌沤麻试验中细菌总数、甘露聚糖酶产生菌数、果胶酶产生菌数的变化情况,如图 3.29、图 3.30、图 3.31 及图 3.32 所示。可通过沤麻体系中各类细菌数量的变化情况,推知沤麻过程中亚麻原茎脱胶进程,即果胶质和半纤维素的降解情况。

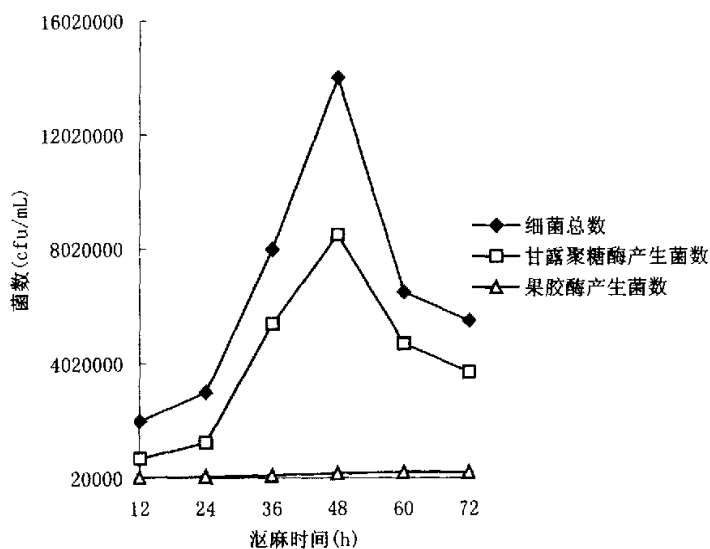


图 3.29 HDYM-03 加菌沤麻各类细菌数量变化

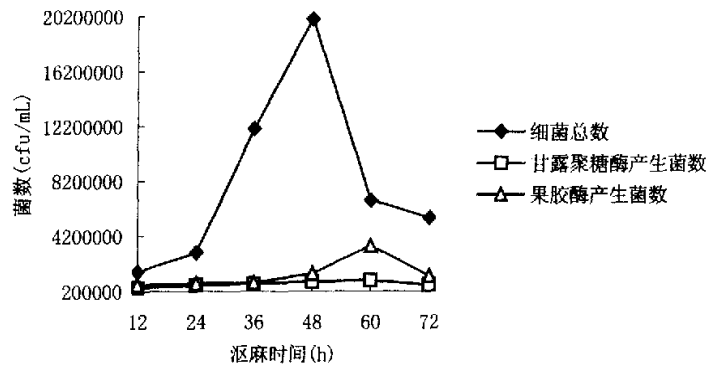


图 3.30 HDYM-02 加菌沤麻各类细菌数量变化

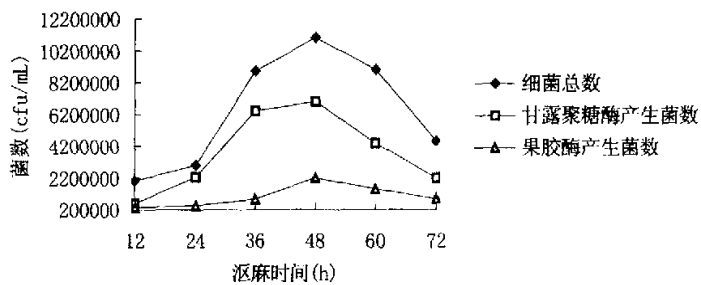


图 3.31 HDYM-02+HDYM-03 加菌沤麻各类细菌数量变化

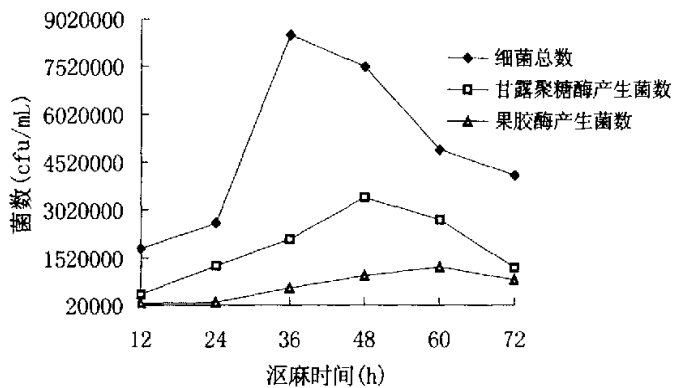


图 3.32 不加菌沤麻各类细菌数量变化

表 3.24 加菌沤麻试验菌数最大值及取样时间

	1# HDYM-03	2# HDYM-02	3# HDYM-02+HDYM-03	4# 空白
总菌数 (cfu/mL)	1.4×10^7 48h	2.0×10^7 48h	1.1×10^7 48h	8.5×10^6 36h
甘露聚糖酶 产生菌数 (cfu/mL)	8.5×10^6 48h	1.0×10^6 60h	7.0×10^6 48h	3.4×10^6 48h
果胶酶 产生菌数 (cfu/mL)	2.2×10^5 60h	3.5×10^6 60h	2.2×10^6 48h	1.2×10^6 60h

表 3.24 所示的为加菌沤麻试验中细菌总数、甘露聚糖酶产生菌数、果胶酶产生菌数的最大值及取样时间。

由图 3.29、图 3.30、图 3.31、图 3.32 及表 3.24 可知，在沤麻体系中，甘露聚糖酶产生细菌一般在 24h 开始大量繁殖，数量远远大于果胶酶产生细菌，48h 左右时达到生长高峰，而果胶酶产生细菌则要延迟 12h 左右。HDYM-03 单独加菌沤麻试验中，甘露聚糖酶产生细菌在沤麻 48h 接近 10^7 数量级，成为沤麻体系中的主体菌群。可以推知，HDYM-03 首先降解了纤维束间轴向搭接或侧向转接的果胶质后，迅速降解胶杂成分中的最大组分一半纤维素。两株菌混合加菌沤麻试验中，可能是果胶酶产生菌的加入在一定程度上延迟了甘露聚糖酶产生菌的生长及产酶，而 HDYM-02 又不具有半纤维素酶活性，因此混合加菌试验的沤麻时间比 HDYM-03 单独加菌时稍长。上述结果表明，在沤麻环境中加入脱胶微生物，可以增加沤麻系统中的细菌总数，改变沤麻系统原有的天然细菌菌群构成。具有脱胶活性的细菌的大量繁殖，可以将胶质的降解阶段提前并缩短。

结 论

本研究从温水沤麻液中分离、筛选了两株甘露聚糖酶产生细菌,编号 HDYM-03、HDYM-04,对两株菌进行鉴定及产酶条件的优化,并研究了 HDYM-03 与果胶酶产生菌株 HDYM-02 生长及产酶的相互作用,结合实验室加菌沤麻试验,得出以下结论:

(1) 菌株 HDYM-03、HDYM-04 均为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

(2) 两株菌最适发酵产甘露聚糖酶条件基本相同,均为 6%魔芋粉,3%蛋白胨,初始 pH 值 8.0,装液量 100mL/250mL 三角瓶,37℃培养 48h。HDYM-03 接种量 2%,HDYM-04 接种量 1%。

(3) 在研究条件下,HDYM-03、HDYM-04 最大甘露聚糖酶活力分别为 5122U/mL 和 5168U/mL,为已报道的同类酶最高水平。

(4) 菌株 HDYM-03 同时具有较高的果胶酶及甘露聚糖酶产生活性,无纤维素酶产生活性,实验室加菌沤麻时间为 60h,比不加菌沤麻提前 30h,沤麻时间缩短 33%。具有果胶酶及甘露聚糖酶两种脱胶酶活性的菌株在加菌沤麻方面的应用,国内外尚无报道。

致 谢

在本文最后，对在这三年求学期间所有曾经给予我指导、帮助和鼓励的人们表达我最衷心的感谢！

本研究是在黑龙江大学生命科学学院院长平文祥教授的细心指导下完成的。从选题、设计、试验操作直到论文的撰写、修改，每一个环节都倾注了恩师的心血。他渊博的学识、严谨的治学态度、孜孜以求的敬业精神以及高尚的人格，时刻激励着我不断前进。在此谨向恩师表示崇高敬意和诚挚地感谢。

在过往的三年中，我得到了实验室主任葛菁萍教授的悉心指导以及生活上无微不至的关怀，使我无论在学习、科研方面都大有长进。她严谨的科研态度将使我受益终身。此外，杜春梅、宋刚、凌宏志三位老师为我的试验顺利完成提供了很多切实帮助及宝贵意见，对他们深表感谢。黑龙江大学微生物学重点实验室是一个团结勤奋、创新进取的集体，对这里每一个给予我帮助与关怀的同学表示感谢。

本研究中正交试验的设计部分，得到了呼伦贝尔学院戎可老师的无私指导，深表谢意。

特别感谢我的爸爸妈妈，他们的爱是我生命的源泉和希望。

参考文献

- [1] Akin D E, Gamble G R, Morrison W H. Chemical and structural analysis of fiber and core tissues from flax. *J Sci Food Agric*, 1996, (72): 155-165
- [2] 彭源德.亚麻生物脱胶研究综述.中国麻业,2004,26(6):293-295
- [3] 许益存, 韩树明, 张立明.实施亚麻战略-加快黑龙江省种植业结构调整.中国农机化,2003,(4):9-10
- [4] 吕江南, 贺德意, 王朝云等.全国麻类生产调查报告(V).中国麻业, 2004,26(6):296-301
- [5] 张运雄, 王朝云.麻类生物脱胶与生物制浆酶系.中国麻业,2002, 24(2):14-17
- [6] 张宝胜, 鲁文良.浅析亚麻纤维脱胶与亚麻粗纱煮练漂白工艺.黑龙江纺织, 1999,(4):1-2
- [7] 黄小龙.南方亚麻微生物脱胶技术及其机理研究.湖南农业大学硕士学位论文.2004:6-6
- [8] 卫德林.亚麻温水沤麻机理与新技术.哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 1988:1-64
- [9] Henriksson G, Eriksson K E L, Kimmel L. Chemical,physical retting of flax using detergent and oxalic acid at high pH. *Tex Res J*, 1998, (23): 234-241
- [10] 郑喜群, 刘晓兰, 江洁.亚麻生物脱胶新方法及其比较.纺织学报, 2001, 22(4):231-233
- [11] Sharma H S S, Faughey G, Lyons G. Comparison of physical, chemical, and thermal characteristics of water-, dew-, and enzyme-retted flax fibers. *J Appl Polym Sci*,1999,(74):139-143

- [12] 王根石.亚麻原料加工业发展思路的探讨.黑龙江纺织,2000,(1):1-2
- [13] 孙庆祥.麻类作物微生物脱胶综述.中国麻作,1981,(1):38-41
- [14] 江洁, 刘晓兰.亚麻脱胶菌种的选育及脱胶过程的初步研究.微生物学报, 1998,25(3):150-153
- [15] Gunnar Henriksson, Danny E Akin, David Slomczynski, Karl-Erik L Eriksson. Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. Journal of Biotechnology,1999,(68):115-123
- [16] 王立群, 关凤芝, 张福修等.亚麻微生物脱胶技术的研究 I 脱胶菌株的筛选.东北农业大学学报, 1994, 25(2):182-185
- [17] 王立群, 宣世纬, 关凤芝等.亚麻微生物脱胶技术的研究 II 脱胶菌株的鉴定.中国麻作, 1995, 17(1):34-36
- [18] 王立群, 关凤芝, 王玉富等.亚麻微生物脱胶技术的研究 III 脱胶菌株适宜生长繁殖条件的测试.东北农业大学学报, 1998, 29 (2):183-188
- [19] 关凤芝, 王立群, 王玉富等.亚麻微生物脱胶技术的研究 IV 脱胶条件测试及脱胶试验.中国麻作,1999,21(1):41-42
- [20] 黄小龙, 孙焕良, 李建军等.南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 I 亚麻天然水沤法脱胶动态过程的观测.中国麻业, 2003, 25 (2): 38 - 41
- [21] 黄小龙, 孙焕良, 谢达平等.南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 II 主要外界因子对果胶酶及亚麻脱胶效果的影响.中国麻业, 2003, 25(4):193-195
- [22] 黄小龙, 孙焕良, 孟桂元等.南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 III 麻茎特性对亚麻脱胶效果的影响.中国麻业,2003, 25 (5): 239-241
- [23] 黄小龙, 孙焕良, 谢达平等.南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 IV 酶法脱胶菌种的分离与鉴定.湖南农业大学学报,2004, 30 (1):14-15

- [24] 黄小龙, 孙焕良, 谢达平等. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 V 环状芽孢杆菌 A6 的产酶条件. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, 30(3): 227-228
- [25] 葛菁萍, 凌宏志, 宋刚等. 果胶酶产生菌的分离及培养条件研究. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8): 93-95
- [26] 何连芳, 孙玉梅, 刘茵等. 亚麻微生物脱胶优势菌的选育及其应用. 工业微生物, 2005, 35(4): 25-28
- [27] 彭源德, 刘正初, 冯湘沅等. 亚麻快速生物脱胶技术研究 I 亚麻快速脱胶菌株的选育. 中国麻业, 2003, 25 (3): 135-138
- [28] 郑科, 彭源德, 刘正初等. 亚麻快速生物脱胶技术研究 II 亚麻快速生物脱胶过程中发酵液成分变化规律. 中国麻业, 2004, 26 (1): 31-34
- [29] 彭源德, 刘正初, 郑科等. 亚麻快速生物脱胶发酵条件研究. 中国麻业, 2005, 27(2): 77-80
- [30] Filag M, Caputo F. Invitro evaluation of dew-retting of flax by fungi from southern Europe Ann appl biol, 2001, (8): 343-351
- [31] 张丽珠, 王奉喜. 亚麻脱胶新工艺的研究. 中国麻业, 1988(2): 34-36
- [32] 刘晓兰. 亚麻酶法脱胶工艺的研究. 齐齐哈尔大学学报, 1998, 14 (2): 11-14
- [33] Jing Zhang, Gunnar Henriksson, Gunnar Johansson. Polygalacturonase is the key component in enzymatic retting of flax. Journal of Biotechnology, 2000, (81): 85-89
- [34] Jeff D Evans, Danny E Akin, Jonn A Foulk. Flax-retting by polygalacturonase containing enzyme mixtures and effects on fiber properties. Journal of Biotechnology, 2002, (3): 223-231
- [35] Foulk J A, Akin D E, Dodd R B. Processing techniques for

improving enzyme retting of flax. *Industrial Crops and Products*, 2001, 13 (3): 14-16

[36] Caitriona Mooney, Trinette Stolle-Smits, Henk Schols. Analysis of retted and non retted flax by chemical and enzymatic means. *Journal of Biotechnology*, 2001, (89): 205-216

[37] 刘唤明,梁运祥,彭定祥.苧麻酶法脱胶的研究. *中国麻业*, 2006, 28 (2): 87-90

[38] 吴襟,何秉旺.微生物 β -甘露聚糖酶. *微生物学通报*, 1999, 26 (2): 134-136

[39] 胡敏,李波,龙荫等.魔芋葡甘聚糖的提纯方法比较. *食品科技*, 1999, (1): 31-33

[40] Courtios J E, Petek F, Kada T. Research on galactomannans II Action of takadiastase on the galactomannan of luceren. *Bull Soc Chem Biol*, 1958, (40): 2031 – 2037

[41] 柴萍萍.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)WY45 产 β -甘露聚糖酶的纯化与性质研究. *中国农业大学大硕士学位论文*, 2005: 2-45

[42] 邬敏辰. β -甘露聚糖酶及其水解产物的应用研究. *江苏调味副食品*, 2001, (69): 5-9

[43] Akino T, Nakamura N, Horiroschi K. Characterization of three β -mannanases from an *Bacillus alcalophilus*. *Agric Biol Chem*, 1988, 55 (3): 773-779

[44] Kataoka N et al. Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. *Appl Microbial Biotechnol*, 1997, (47): 658-662

[45] Waine M, Ingvorsen K. Production of β -mannanase and β -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium. *Appl Microbial Biotechnical*, 1999, (52): 675-680

- [46] Rihei T, Isao K, Hideyuki K. Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces sp.* Agric Biol Chem, 1984, 48(9): 2189-2195
- [47] 杨文博, 沈庆, 佟树敏. 产 β -甘露聚糖酶地衣芽孢杆菌的分离筛选及发酵条件. 微生物学通报, 1995, 22(3): 60-63
- [48] Charles W Hendricks, Jack K Doyle, Bonnie Hugley. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing. Applied and environmental microbiology, 1995, (5): 2016-2019
- [49] Julio Xandro Heck et al. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. Enzyme and Microbial Technology, 2005, (37): 417-423
- [50] 李剑芳, 邬敏辰, 夏文水. 微生物 β -甘露聚糖酶的研究进展. 调研综述, 2004, (3): 5-9
- [51] 马建华, 高扬, 牛秀田等. 枯草芽孢杆菌中性甘露聚糖酶的纯化及性质研究. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(1): 79-82
- [52] 杨清香, 李学梅, 李用芳. 嗜碱芽孢杆菌 33 β -甘露聚糖酶的特性研究. 河南师范大学学报(自然科学版), 1999, 8(27): 70-74
- [53] 熊郃, 干信. β -甘露聚糖酶产生菌 R10 的产酶特性研究. 工业微生物, 2005, 35(2): 29-33
- [54] Humnerto Malheiros Ferreira. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma hazianum* strain T4. Carbohydrate Polymers, 2004, (57): 23-29
- [55] Vladimir Puchart. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708. Biochimica et Acta, 2004, (1674): 239-250
- [56] 吴襟, 何秉旺. 诺卡氏菌形放线菌 β -甘露聚糖酶的纯化和性质. 微生物学通报, 2000, 40(1): 69-74

- [57] M Evodia Setati. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo- β -1,4-mannanase encoding Gene (man1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification*, 2001, (21):105-114
- [58] 张学文, 田志坚, 吴永尧等. β -甘露聚糖酶基因克隆与在大肠杆菌中的表达. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, (12):605-608
- [59] 王和平, 王龙, 文静等. 转 β -甘露聚糖酶基因大肠杆菌在猪肠道内的外泌型表达. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2006, (1):58-64
- [60] 杨文博, 修树敏, 沈庆. β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用. *微生物学通报*, 1995, 22(8):338-342
- [61] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学试验*. 北京:高等教育出版社, 1999:210-227
- [62] 陈一平, 龙健儿, 廖连华等. 芽孢杆菌 M50 产生 β -甘露聚糖酶的条件研究. *微生物学报*, 2000, 2(40):1-6
- [63] 凌宏志. 亚麻微生物多样性及果胶酶产生菌酶学基础的研究. 黑龙江大学硕士学位论文, 2005:43-58
- [64] 余红英, 杨幼慧, 杨跃生等. 枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶补料发酵及其特性研究. *微生物学通报*, 2002, 29(5):25-29
- [65] 东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*. 北京:科学出版社, 2001:253 - 298
- [66] 孔雷, 赵鸣镝, 吴永红. 滤纸糖-DNS 比色法测定纤维素酶活力. *印染*, 1999, (1):36-38
- [67] 李健武, 余瑞元, 袁明秀等. *生物化学试验原理和方法*. 北京:京大学出版社, 1997:128-130
- [68] Downie B, Hilhorst H W M, Bewley J D. A new assay for quantifying endo- β -D-mannanase activity using congored dye. *Phyto-*

chemistry,1994,36(4):829-835

[69] 杨幼慧, Mc Alan. β -甘露聚糖酶的产酶菌种、条件及部分性质研究. 华南农业大学学报,2001,22(2):86-88

[70] 邓立红.黑曲霉合成 β -甘露聚糖酶及制备功能性甘露低聚糖的研究.中南林学院工业学院硕士论文,2002:12-25

[71] William G W, Susan M B, Dale A P.16S ribosomal DNA amplication for phylogenetic study. Journal of Bacteriology,1991,(1):697-703

[72] 周俊怡.分子生物学基本技能和策略.北京:科学出版社,2003:125-126

[73] 江洁, 刘晓兰.果胶酶活性分光光度测定方法的研究. 齐齐哈尔大学学报,1998,14(1):63-66

[74] 刘正初, 彭源德, 冯湘沅等.苧麻生物脱胶新技术工业化生产应用研究. 纺织学报, 2001,22(2):91-93

[75] 张彤, 方汉平.微生物分子生态技术:16S rRNA/DNA 方法.微生物学通报,2003,30(2):97-101

[76] 黄龙.魔芋葡甘聚糖的凝胶化特性.食品科技,2003,6:37-40

[77] 李宝坤.CXJZ95-198 菌株在不同碳源中产 β -甘露聚糖酶的规律研究.中国麻业, 2005,27(1):37-40

[78] 李文玉.枯草芽孢杆菌中性内切 β -甘露聚糖酶的纯化及性质.微生物学报, 2000,40(4):420-423

[79] 李剑芳, 邬敏辰, 夏文水. β -甘露聚糖酶高产菌株选育及产酶条件的研究.食品与发酵工业,2005,31(9):9-13

攻读学位期间发表的学术论文

科研成果:

成果名称 亚麻脱胶菌种选育及在沤麻中的应用

完成单位 黑龙江大学

完成人 赵丹

证书号 2006-003-13

哈尔滨市科学技术局 2005 年 11 月

申请专利:

1.专利名称 亚麻微生物快速脱胶温水沤麻方法

申请人 平文祥,葛菁萍,凌宏志,贾树彪,宋刚,赵丹等.

申请号 200410043720.2

2.专利名称 加菌沤麻液回用在温水沤麻中的方法

申请人 平文祥,葛菁萍,凌宏志,贾树彪,宋刚,赵丹等.

申请号 200410043721.7

(该发明专利已入选“全国重点专利招商引资项目扶助计划”批准号:M0316163)

附 录

1.菌株 HDYM-03 16S rDNA 部分序列(1631bp)

GCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCG
GCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACG
CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGGGTCTTCGGA
CCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGT
GAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGG
TTTTGCTTCGCCTGAAGCGAAACGGAAAGATGGCGCAAGCTATCA
CTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAA
CGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGT
TAGGGAAGAAACAGTGCTATTTAAATAAGGTAGCACCTTGACGGT
ACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGATGTTAAAGCCCGAGGCTC
AACCTCGGTTCGCATTGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGGAGA
GGAAAGTGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCCTGTAACCTGAC
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTC
AATACCCTTAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA

GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACCGCTCTAGAGATAG
AGCTTCCCTTCGGGGCAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGA
CTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCA
TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGT
ACAACGGGATGCTACTTCGCGAGAAGATGCTAATCTCTTAAACC
AATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCTTGTATACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTTGCAAC
ACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGTAAGGAGCCAGCCGCCGAAGG
TGGGGTAGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAATC
ACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGC
TCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT

2. 菌株 HDYM-04 16S rDNA 部分序列(1605bp)

GCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTT
TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC
AAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGTG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCA
TGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGA
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT

GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGGTTTCCGCCCCCTTAG
TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGG
GGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAG
CGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTC
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTC
GGTGAGGTAAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCGGAAGGTGGGACAGA
TGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAATCACTAGTGAA
TTCGCGGCCCGCCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAAC

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得黑龙江大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。

论文作者签名: 赵丹

签字日期: 06年 6月 19日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解黑龙江大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构交送论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权黑龙江大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

学位论文作者签名: 赵丹

导师签名: 王 伟

签字日期: 06年 6月 19日

签字日期: 06年 6月 19日

学位论文作者毕业后去向:

工作单位:

电话: 0451-86609764

通讯地址:

邮编: 150080