

## 摘 要

本文采用一株多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*, 编号 T1163) 对红麻干皮、鲜皮和鲜茎在振荡、静置两种脱胶体系中酶和酶解产物的动态变化规律进行了研究。结果表明: (1) T1163 至少产 9 种脱胶酶, 分子量分别为 70800、61600、60000、56300、51200、43000、41700、33500 和 28800。这些酶在脱胶过程中产生的时间、速度和数量随红麻材料和发酵方式不同存在不同程度差别。在这些酶作用下, 红麻干皮、鲜皮和鲜茎在振荡、静置两种发酵体系中完成脱胶的时间分别为 36h、54h、84h 和 60h、48h、72h。 (2) 采用 Somogyi-Nelson 法测得混合酶系中果胶酶和半纤维素酶作用的最适温度均为 50°C, 最适 pH 分别为 8.0、4.4。同一材料在发酵对应时段酶活均是振荡系较静置系高; 干皮和鲜皮脱胶过程中果胶酶活峰值早于半纤维素酶活峰值, 鲜茎则相反, 峰值过后活性变化相对恒定。 (3) 鲜皮和鲜茎脱胶过程中的外切酶活性很低, 推测其脱胶主要依靠内切酶活性的发挥, 并使大部分非纤维素物质发生块状崩溃, 因此脱胶酶高产菌株的筛选不能以酶活测定为唯一依据。 (4) 发酵液中胞外可溶性蛋白大多呈“M”型变化趋势, 这一变化源于麻皮中蛋白溶出速率、溶出量多少、微生物胞外酶分泌量及其对胞外蛋白的利用率。 (5) 用铜碘试剂法测得红麻鲜皮脱胶过程中静置系还原糖浓度高于振荡系; 在鲜茎中, 前 48h 是静置系还原糖果高于振荡系, 48h 以后则相反, 且均呈“M”型变化趋势。 (6) 用中和滴定法测得振荡系中有机酸均较静置系低, 静置系有机酸呈不断升高趋势, 振荡系变化则相对稳定, 鲜皮中的有机酸值远高于鲜茎, pH 的变化趋势与有机酸相反。 (7) 用高锰酸钾法测定的可溶性有机物总量数据同样表明静置系较振荡系高, 且鲜皮高于鲜茎, 在鲜皮中, 可溶性有机物变化总趋势是先增多后减少, 在鲜茎中的总趋势是不断升高; 不溶性有机物的量在各种材料中均呈不断增多趋势。以上研究结果迄今未见国内外报道。

关键词: 红麻 脱胶酶 酶解产物

---

国家自然科学基金资助项目 (N0.29576267)

# 目 录

## □ 中文摘要

## □ 引言

## □ 材料和方法

### □ 一、材料

#### □ (一) 菌种

#### □ (二) 供试麻样

#### □ (三) 培养基

#### □ (四) 供试试剂

### □ 二、方法

#### □ (一) 菌种培养和菌悬液配制

#### □ (二) 麻样接种与脱胶

#### □ (三) 取样与处理

#### □ (四) 胞外蛋白浓度测定

#### □ (五) 胞外蛋白粗分离

#### □ (六) 脱胶酶活测定

#### □ (七) 脱胶酶种类和分子量测定

#### □ (八) 酶解产物测定

## □ 结果和分析

### □ 一、韧皮脱胶过程中酶和酶解产物的动态变化

#### □ (一) 酶的动态变化

#### □ (二) 酶解产物的动态变化

### □ 二、鲜茎脱胶过程中酶和酶解产物的动态变化

#### □ (一) 酶的动态变化

#### □ (二) 酶解产物的动态变化

### □ 三、T1163 分泌脱胶酶的种类和最适作用条件

#### □ (一) 脱胶酶种类的鉴别

#### □ (二) 酶作用的最适 pH 和最适温度

#### □ (三) 脱胶实效试验

## □ 问题和讨论

### □ 一、高效脱胶菌株选育中的酶活测定

### □ 二、杂菌对红麻脱胶进程的影响

### □ 三、预处理对脱胶进程的影响

### □ 四、三种红麻材料脱胶时间长短原因剖析

## □ 小结

## □ 致谢

## □ 英文摘要

## □ 主要参考文献

## □ 附录

## 引 言

红麻 (*H. cannabinus*) 又名洋麻、太阳麻, 锦葵科一年生草本植物, 具有适应性强、生长周期短、单位面积产量高等特点, 我国在本世纪初引入后开始种植, 作为一种重要的优质天然纤维资源, 主要用于纺织工业和作为木材替代资源<sup>[1]</sup>。我国发展红麻产业有既成的更具潜在优势, 其中脱胶是红麻加工的第一道工序, 脱胶效果的好坏直接影响到纤维的产量和品质进而影响深加工。所谓微生物脱胶即借助微生物胞外酶的作用除去包裹、包被于韧皮纤维内外或镶嵌于细胞壁纤维素分子之间的胶杂质以获得纯净束纤维, 从而实现红麻的使用价值, 并产生相应的经济效益和社会效益。分析测定表明: 红麻韧皮部的主要成分及所占比例为: 纤维素 52.36%、果胶 10.04%、半纤维素 14.60%、木质素 11.11%, 另有部分蜡腊质及水溶物<sup>[2]</sup>。胶杂质是非纤维素成分的统称, 其中果胶由半乳糖醛酸聚合而成, 半纤维素主要由多缩戊糖、多缩己糖和多缩糖醛酸构成 (其中木糖占 80.18%, 葡萄糖占 12.19%, 另有少量甘露糖、鼠李糖和阿拉伯糖<sup>[3]</sup>), 半纤维素的主链由 D-吡喃木糖通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键相互连接, 其葡萄糖醛酸侧链残基借酯键与木质素 (天然高分子复杂聚合物) 牢固结合<sup>[4, 5]</sup>。红麻中这些复杂紧密的分子结构决定了脱胶彻底的艰巨性。

就脱胶方法而言, 有传统的天然水浸法、陆地湿润脱胶、人工加菌脱胶和酶制剂脱胶, 目前国内外普遍采用的仍系沿袭数千年之久的天然水浸沤麻法, 该方法存在脱胶时间长、占用水面大、水体污染严重、纤维品质难以控制等诸多弊端, 危及麻区人民的生活和健康, 影响水产养殖业的发展<sup>[6-10]</sup>, 妨碍了红麻的深加工品质和生产的发展。为了提高脱胶效果, 国内外相继发展了其它一些脱胶方法, 如印度、前苏联使用专门的脱胶池, 我国的全杆一次水浸脱胶、两浸一洗、稻田/麻田高埂脱胶等<sup>[7, 10]</sup>。这些方法均未摆脱水的束缚。

七十年代初, 中国农业科学院麻类研究所在国内外首次提出黄红麻陆地湿润脱胶技术, 这是一种区别于传统天然沤麻的全新脱胶方法, 麻完全

脱离水体在陆地上堆积进行湿润发酵，在控制堆温 35°C-40°C 条件下，可使脱胶时间较水沤法缩短一半，对水的污染程度降低 90% 左右，且大大缓解了水资源缺乏地区麻类脱胶的矛盾，从根本上解决了传统方法带来的诸多弊端<sup>[11, 12]</sup>，因此得到迅速推广并产生了巨大的经济效益和生态效益。

为了增强对脱胶的人为控制能力，本世纪初（1902）开始对参与麻类脱胶的微生物进行研究并从沤麻等环境中不断分离到一些脱胶酶产生菌<sup>[13-18]</sup>，已被确认参与红麻脱胶的主要需氧细菌涉及 *Arthrobacter* sp, *Pseudomonas*. sp, *Aerobacter*. sp, *Bacillus*. vulgatus, *B. cereus*, *B. macerans*, *B. polymyxa* 和 *B. subtilis* 等种，同时孟加拉等国也分离到一些脱胶真菌，包括 *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Mucor* sp, *Sclerotium rawalfsii*, *mycelia sterilia*, *Macrophomina Phaseoli* 和 *Phoma* sp<sup>[8-9]</sup>。其中印度用一种曲霉形成的过培养物与固相载体混合配制成脱胶菌剂在生产上已获得一定规模的应用。从麻纤维生产的目的出发，脱胶酶产生菌应具较高的果胶和半纤维素（主要是木聚糖）酶活而纤维素酶活低或无。中国农业科学院麻类研究所用多粘芽孢杆菌 T1163 进行红麻干皮湿润脱胶试验，结果表明：35°C 搅拌培养 6 h 后的菌悬液可在 76 h 内完成脱胶，与陆地湿润脱胶相比，时间减少 3 天，精洗率提高 1.8%<sup>[12]</sup>；进行干皮振荡（浴比 1: 15、接种量 2-3ml/10 g 干皮，35°C、120rpm）可在 36 h 完成并获得优质纤维<sup>[19-20]</sup>。河南信阳师范学院用从田泥筛选的多粘芽孢杆菌 A4 试验，在适宜条件下（pH 7.3、34°C-38°C）完成红麻脱胶时间较天然水浸法减少 7 天<sup>[21]</sup>。

上述三种方法的共同之处在于：均经历了胶养菌、菌产酶、酶脱胶三个阶段。为了进一步缩短脱胶时间，又对酶制剂脱胶进行了研究。国外研究微生物酶制剂脱胶已有 50 多年历史，并且做了不少小样试验<sup>[22-23]</sup>，我国也开展了这方面的有关工作。华中农业大学用黑曲霉（*Aspergillus Niger*）分泌的胞外酶制剂可使经预处理的红麻干皮在 16 h 完成脱胶，该制剂包含高活性的组成型果胶酶和诱导型木聚糖酶，且其作用条件基本一致，在 pH 4.5、50°C 按 40 U 果胶酶/克预处理的干皮、浴比 1: 15 加酶液可使果胶除去率达 87.04%、半纤维素减少 40.25%<sup>[24]</sup>，显示了酶制剂脱胶

的潜在优势。

微生物脱胶过程可概括为：胶养菌、菌产酶、酶脱胶。以水浸脱胶为例，其过程依次为：（1）麻吸水的同时伴随一部分碳水化合物、蛋白、单宁、矿物质等水溶物的渗出；（2）需氧微生物在繁殖过程中不断消耗发酵系统的 $O_2$ 、分泌胞外酶水解水溶物并产生乙酸、丁酸和乳酸等酸性物质，使pH降低；（3）厌氧微生物在厌氧环境建立后利用水溶物和胶质大量繁殖，一方面将部分酸性物质转化或分解为乙醇等使水体酸度降低（pH回升），另一方面分泌胞外酶降解非纤维素物质，最终使脱胶完成<sup>[13, 25-27]</sup>。在参与脱胶的酶系中，起主要作用的是果胶酶和半纤维素酶。已知微生物产生的果胶酶至少有八种，参与红麻脱胶的有三种<sup>[28-29]</sup>：果胶酶、果胶~~酶~~和果胶甲基酯酶，它们分别作用于果胶分子的不同位点，从而使之分解成半乳糖醛酸；半纤维素酶（主要是木聚糖酶）以随机方式内切水解 $\beta$ -1, 4-糖苷键，产物主要为木二糖与木二糖以上的木寡糖，亦有少量木糖、阿拉伯糖和甘露糖，该酶与底物的结合部位存在多个亚位点，其大小、数量、亲合力等决定该酶的专一性和作用方式<sup>[30-38]</sup>。

中国农业科学院麻类研究所对影响脱胶的水质、温度、浴比、辅剂、起始pH值和原料特性（品种、收获时期、鲜干程度、剥皮与否）等因素进行了全面研究<sup>[39-43]</sup>，结果表明：（1）天然水体中塘水和缓流软水沤麻所需时间最短；（2）在17-38℃范围内，水温愈高，发酵周期愈短；（3）添加适量尿素或磷酸盐助剂利于脱胶，其中尿素能维持对微生物生长有利的pH值并提供部分氮源，可使脱胶周期缩短40%左右，而硝酸盐则延迟脱胶进程；（4）浴比以1:15-1:30最好；（5）理想初始pH为5.0；（6）沤麻水经适当稀释后再次沤麻可缩短时间；（7）从原料品质上看，收获太早纤维不成熟，影响产量和品质；收获过晚则韧皮纤维木素含量高，加大脱胶难度，在生产实践中，麻农总结了许多确定最佳收获时期的标准<sup>[40-43]</sup>。这些影响因素归根到底关系到相应酶的种类、数量和活性。为了从分子水平充分探讨胶杂质的酶促降解机制，山东大学微生物所正在利用质谱、色谱、电泳和克隆等方法对果胶酶、木质素酶、半纤维素酶及酶的结合与催化区域进行研究<sup>[44]</sup>，吉林大学用色谱、电泳、层析等方法研究了从一种黑

曲霉产生的果胶酶粗品中分离出的两种聚半乳糖醛酸酶的结构和性质<sup>[45]</sup>，中科院微生物所等对不同来源的木聚糖酶系进行了分离和酶学性质研究<sup>[46-48]</sup>，国外亦有不少有关方面的报道<sup>[49-51]</sup>。所有这些研究均以微生物纯培养产生的酶为对象，而微生物发酵过程中产生酶的种类及特性要远为复杂。中国农业科学院麻类研究所用红麻干皮加菌振荡发酵和静止发酵的对比实验表明：①振荡发酵完成脱胶时间为36h，静止发酵为60h；②两种脱胶方式中脱落物、总残渣和发酵液可溶性有机物总量值均呈慢—快—慢的增长趋势；③振荡发酵系碱性酶作用，在此过程中发酵液内有机酸的量不断降低，相应地，pH值不断上升，由脱胶起始的中性达到脱胶完成时的最高值7.8；静止发酵则系酸性酶作用，在此过程中有机酸的量呈迅速上升—缓慢回落变化趋势，最大值达2200mg/L，相应地，pH值呈“U”型变化，最低点为pH4.5；④脱胶过程中纤维的形态结构变化只与脱胶时间的长短有关<sup>[52-53]</sup>。由此可见，振荡发酵较静止发酵时间缩短近一半，发酵液中pH值和有机酸呈相反的变化趋势，这说明T1163菌株在两种体系中的代谢机制存在差异，但国内外迄今尚无有关微生物脱胶的复杂发酵体系中酶的种类、数量、特性、作用机制及酶解产物的系统报道。

本文通过系统研究红麻微生物脱胶过程中酶及酶解产物的动态变化规律，揭示微生物脱胶酶与胶质的作用机理，为加速高效脱胶菌株的选育、酶制剂的生产及发酵条件的改良提供科学依据，以便早日形成新型的微生物脱胶方法，最终达到降低生产成本和劳动强度、提高纤维产量和品质、缓解优质天然纤维供不应求的矛盾和充分发挥我国麻类纤维资源优势的目的。

## 材 料 和 方 法

### 一、材料

(一) 菌种：麻类研究所选育的红麻脱胶专用菌株 *Bacillus polymyxa* (代号T1163)

(二) 供试麻样：红麻干皮、鲜皮、鲜茎

### (三) 培养基

- 1、菌种活化用马铃薯葡萄糖(PG)培养基(%)：去皮马铃薯20.0、 $C_6H_{12}O_6$ 2.0、加琼脂2.0则可做试管斜面和平板培养基(PGA)；
- 2、扩培用豆饼粉培养基(%)：豆饼粉2.0、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $(NH_4)_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 各0.05；
- 3、无机氮素培养基(%)：果胶2.0、木聚糖1.0、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05、 $(NH_4)_2HPO_4$  0.2、 $C_6H_{12}O_6$  0.5、 $KH_2PO_4$  0.05；
- 4、菌落计数用培养基(%)
  - (1) T1163计数 用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(%)：去皮马铃薯20.0、 $C_6H_{12}O_6$  2.0、琼脂2.0；

(2) 杂菌计数 用葡萄糖营养琼脂培养基(%)： $C_6H_{12}O_6$  0.5、营养琼脂3.5。

(四) 供试试剂 果胶、木聚糖均为美国Sigma公司产品，丙烯酰胺(Acr)为Fluka进口分装，十二烷基硫酸钠(SDS)用甲醇、丙酮经进一步纯化，其余均为市售分析纯或化学纯。

## 二、方法

### (一) 菌种培养和菌悬液配制

取沙土管保藏菌株分离活化，挑取典型菌落一环接种于5ml PG液，35℃静止培养8h后吸2ml转接于盛100ml 2号培养基的500ml三角瓶中，35℃、120rpm振荡培养8h。

在 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $(NH_4)_2HPO_4$ 两种助剂各含0.05%的水溶液中按2%的量加入豆饼粉菌原液，配成脱胶用菌悬液。

### (二) 麻样接种与脱胶

将红麻鲜皮和鲜茎经适度剥青并除去基部30-40cm、梢部60-80cm后，剪成约5cm长的小段后混匀。每三角瓶盛麻样 $20 \pm 0.1g$ ，按浴比1:8加菌悬液160ml，35℃振荡(120rpm)、静置分别发酵至脱胶完成；将红麻干皮除去基、梢部各30cm，剪成约5cm长的小段后混匀。每三角瓶盛麻样 $10 \pm 0.1g$ ，按浴比1:15加菌悬液150ml(或加水150ml、0.1MPa/cm<sup>2</sup>灭菌15min成无菌干皮)振荡、静置分别发酵至脱胶完成。

### (三) 取样与处理

上述过程中，干皮静置和鲜茎发酵液每12h取样一次，干皮振荡和鲜皮发酵液每6h取样一次，每处理3个麻瓶，分别混合后①用pH计测pH值；②各取1ml经适当稀释后测微生物活菌量；③各取250ml经3000rpm离心20min所得上清液供以下4-7用。

#### (四) 胞外蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法<sup>[54]</sup>在595nm处测定，其中标准方程的建立以牛血清白蛋白(BSA)为标准。

#### (五) 胞外蛋白粗分离

采用分级离心法。3000rpm离心所得上清液依次经8000rpm、16000rpm离心，所得沉淀用双蒸水分别溶解、转入Eppendorf管并定容，然后加等体积的样品溶解液，沸水浴5min后-20℃保存。

样品溶解液成分(%)：SDS 1.0，巯基乙醇1.0，溴酚兰0.02，甘油20.0，0.05M pH8.0 Tris-HCl缓冲液20.0。

#### (六) 脱胶酶活测定

3000rpm离心所得上清液作为粗酶液，采用Somogyi-Nelson法<sup>[55]</sup>和脱胶实效法测酶活。

1、果胶酶活力：取适当稀释的粗酶液1ml加入用0.1M pH8.0 Tris-HCl缓冲液配制的1%果胶溶液1ml，50℃酶解30min后测还原糖量，以半乳糖醛酸为标准。

2、木聚糖酶活力：取适当稀释的酶液1ml加入0.1M、pH4.4醋酸缓冲液配制的1%木聚糖溶液1ml，酶解产物以木聚糖为标准，反应条件、产物测定同1。

3、CMC酶活力：取适当稀释的酶液1ml，加入1%羧甲基纤维素钠(CMCNa)，1ml酶解产物以葡萄糖为标准，反应条件、产物测定同1。

以上1、2、3均以煮沸灭活酶液为空白对照。

4、酶活单位：在上述条件下，每分钟产生1μg还原糖的酶量定义为一个活力单位(U)；

5、蛋白水解酶活力：取粗酶液1.0ml，分别加入用pH3.0、7.5、10.5的缓冲液配制的10mg/ml酪素底物溶液1.0ml40℃反应10min并经其余处理

后于680nm处测酶解产物（以L-酪氨酸为标准）。在此条件下每分钟产生1 $\mu$ g酪氨酸定义为一个活力单位（U）。

6、脱胶实效法：粗酶液来自培养不同时间的豆饼粉菌液，根据脱胶完成时间确定酶的整体活性。

#### （七）胞外酶种类和分子量测定

采用十二烷基硫酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）<sup>[57]</sup>，电极缓冲液为pH8.3Tris-甘氨酸，凝胶浓度10%。根据标准蛋白的R<sub>m</sub>值（R<sub>m</sub>=蛋白质迁移距离/指示剂迁移距离）绘制标准曲线并据此由待测样品的R<sub>m</sub>求其分子量。

#### （八）酶解产物的测定

1、可溶性有机物 用高锰酸钾法<sup>[58]</sup>，其数值计算公式为：

$$\text{可溶性有机物 (mg/L)} = [K (V_1 + V_2) - 10] \times N \times 8 \times 1000 / V$$

K——0.01N KMnO<sub>4</sub>溶液的标准系数

V<sub>1</sub>——加入水样中的KMnO<sub>4</sub>溶液体积（ml）

V<sub>2</sub>——滴定时消耗的KMnO<sub>4</sub>溶液体积（ml）

V——水样量（ml）

N——草酸钠标准溶液的当量浓度

2、还原糖 用铜碘试剂法<sup>[58]</sup>，标准曲线的绘制以C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>为标准；

3、有机酸 用中和滴定法<sup>[59]</sup>，其数值计算公式为：

$$\text{有机酸 (以乳酸计, mg/L)} = (N \cdot V)_{\text{NaOH}} \times 0.09 \times 0.05 \times 1000 \times 1000$$

N——NaOH溶液当量浓度

V——滴定消耗NaOH溶液的体积（ml）

4、不溶性有机物 发酵液经3000rpm、20min离心所得沉淀烘干后由称重测得。

## 结果与分析

### 一、韧皮脱胶过程中酶和酶解产物的动态变化

#### （一）酶的动态变化

## 1、胞外可溶性蛋白

干皮、鲜皮脱胶过程中胞外可溶蛋白的测定结果如图1、2所示。

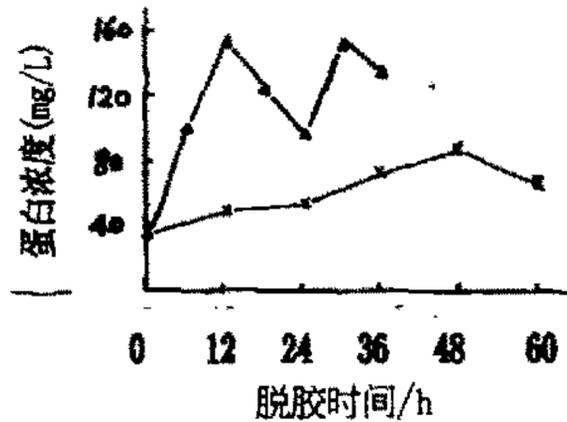


图1 干皮脱胶过程中可溶性蛋白

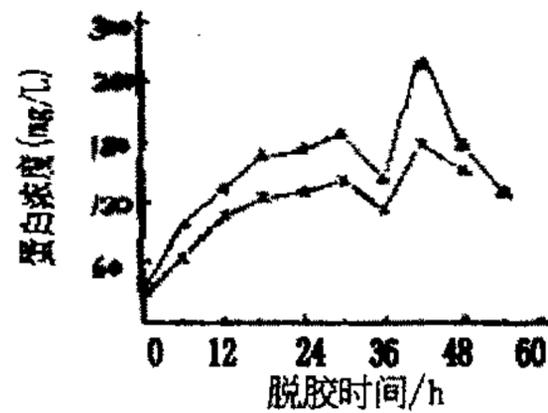


图2 鲜皮脱胶过程中可溶性蛋白

△—△振荡系

×—×静置系

图1表明：振荡系在前12h蛋白量迅速增加，从32mg/L增到峰值148mg/L；在整个脱胶过程中呈“M”型变化趋势。这种变化可能是：前期由于麻中可溶性蛋白快速溶出，导致测定值迅速上升；随后，由于可溶性蛋白溶出量渐少、加之微生物大量繁殖对已有蛋白不断分解利用，因此总的结果是不断减少；到了后期，由于纤维束与束之间柔膜组织的破坏及部分微生物解体使蛋白浓度再次上升；脱胶快完成（30h）时，同样由于消耗大于溶出，因此又开始下降。静置系在48h前一直增加，这可能是由于镶嵌或包埋于韧皮中的蛋白没有受到振荡冲击作用而溶出较慢的缘故。

鲜皮在两体系中胞外蛋白的浓度变化（图2）均呈“M”型趋势，振荡系较静置系含量高。其最高峰值分别为265mg/L和177mg/L。与干皮相比，鲜皮中可溶蛋白含量最高。结合脱胶过程中微生物变化（图3）亦不难看出：振荡、静置两体系中的蛋白在前30h来自麻溶出和菌体分泌两条途径，前期虽然微生物（T1163和杂菌）在不断增多，但其对可溶蛋白的分解利用速率低于产生速率，故呈不断上升趋势；随后，微生物量相对稳定，蛋白被利用的速率不再增加，但由于麻溶出蛋白减少，故含量开始下降；蛋白量第二次增多主要是由于胶质的不断分解使麻中可溶蛋白进一步较大量溶出，脱胶快结束之前则开始下降。

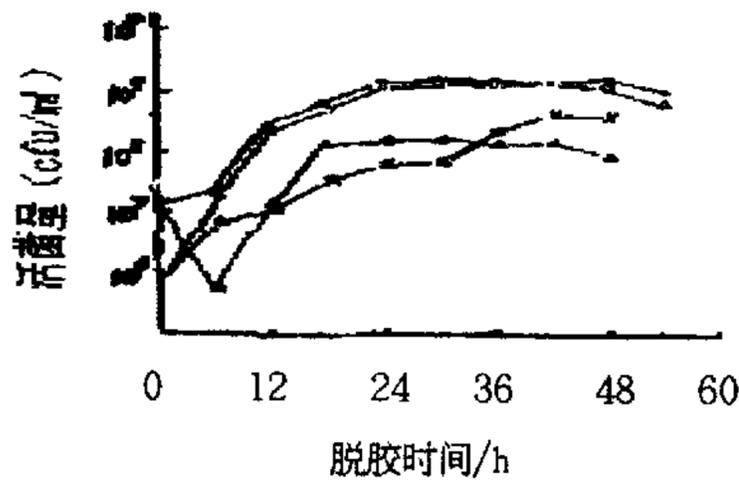


图 3 鲜皮脱胶过程中微生物变化

△-△静置系 T1163    ×-×静置系杂菌    ●-●振荡系 T1163    ○-○振荡系杂菌

## 2、脱胶过程中酶蛋白电泳图谱

### (1) 干皮脱胶过程中酶蛋白电泳图谱

经 SDS-PAGE 分析所得结果如图 4-7、图版 1-3 所示。

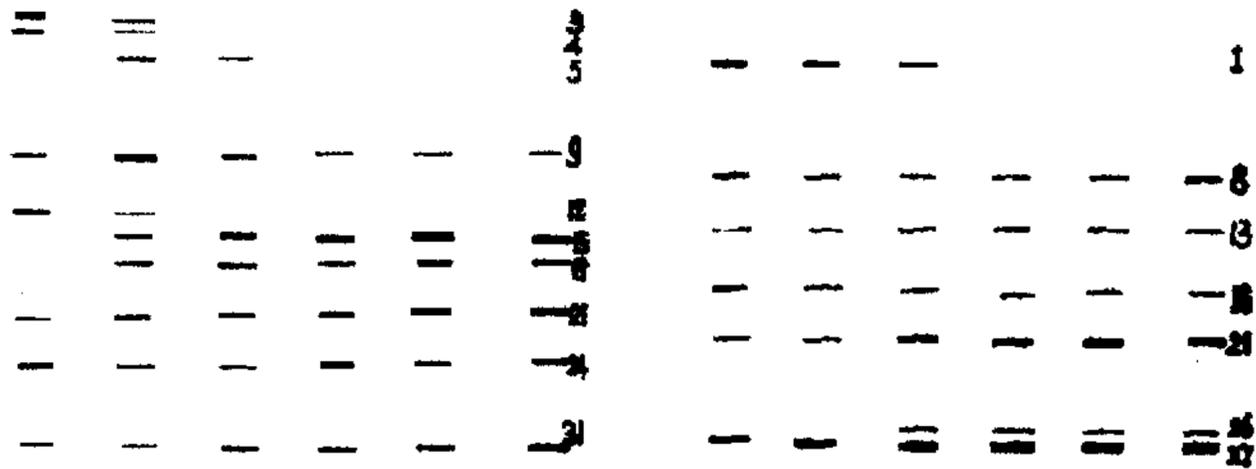


图 4 干皮振荡脱胶酶谱 (8000RPM)    图 5 干皮振荡脱胶酶谱 (16000RPM)  
(从左至右依次为 6h-36h 样)

由图 4-7 可以看出：①两体系中 1、3、4、12 号带可能是麻中游离态蛋白，因为它们在接种后 6 小时内开始出现（遇水即溶出），随后不断减少，而且振荡系中溶出的量较静置系多、溶出速度快，如果来自培养基的话就不应该有量和时间上的区别。②振荡系中 5、9 等条带可能是麻中结合态蛋白或溶出蛋白的降解产物，也可能是发酵体系中的微生物（包括 T1163 和杂菌）受溶液中特定物质的刺激而产生的应激酶，其中一些成分由于被微生物利用而从溶液中消失，在后续阶段不再存在；静置系中只有 5 带可能是麻中结合态蛋白或者麻中溶出蛋白质的降解产物或者微生物产

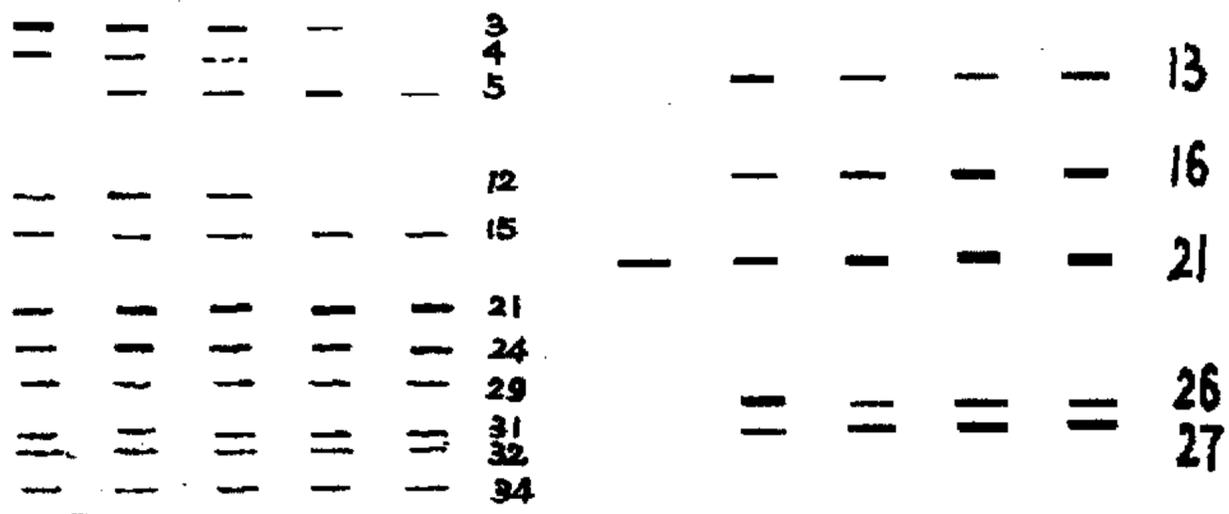


图6 干皮静置脱胶酶谱 (8000RPM) 图7 干皮静置脱胶酶谱 (16000RPM)  
(从左至右依此为12h-60h样)

生的应激酶。③对振荡系干皮脱胶起作用的可能是8、13、15、16、19、21、24、26、27、31号酶带，它们多在12h以前开始合成并有增加趋势；对静置系干皮脱胶起作用的可能是13、15、16、21、24、26、27、29、31、32、34号酶带，其合成大多始于24h以前。两体系中15、16、21、27带明显粗些且振荡系在量上更多。

上述所有可能具脱胶活性的胞外酶（亚基）产生的时间、速度和量的多少受溶液中 pH、有机酸、还原糖等多种因素影响，因而存在不同程度差别，其中一些分泌到一定量后不再继续增加，另有一些则随时间推移呈不断增多的趋势（如15、16、21、27、31），说明其合成未受阻遏。

#### (2) 鲜皮脱胶过程中酶蛋白电泳图谱

鲜皮脱胶过程中脱胶酶经 SDS-PAGE 分析所得结果如图8-11、图版4-7所示。

由图8-11可知：①两体系中有2、4、28带可能是麻中游离态蛋白，因振荡系较静置系溶出快。②振荡系中3、5、6、11、14、17、18、33、35-39带可能是麻中结合态蛋白或者溶出蛋白的降解产物，也可能是由多种微生物产生的应激酶，在静置系中有3、6、8、12、22、35、37-39带属类似情况；③振荡系中起脱胶作用的可能是7、9、10、13、15、16、19、21、24、26、27、30、31等带，静置系中则是5、7、12-16、21、26、27、29、31、34等带。这些酶多在12h以前合成且有随时间延长而增加的趋势。

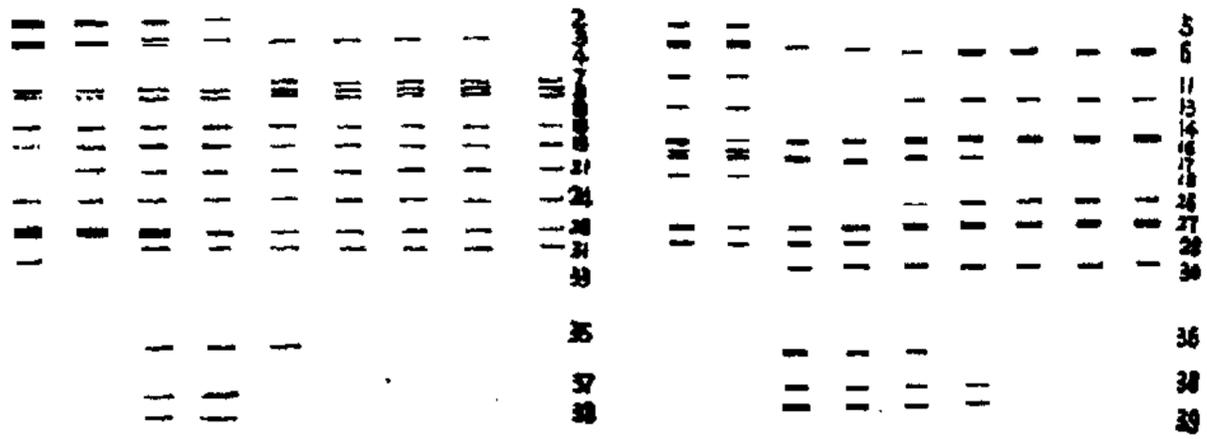


图8 鲜皮振荡脱胶酶谱 (8000RPM) 图9 鲜皮振荡脱胶酶谱 (16000RPM)  
(从左至右依次为6h-54h样)

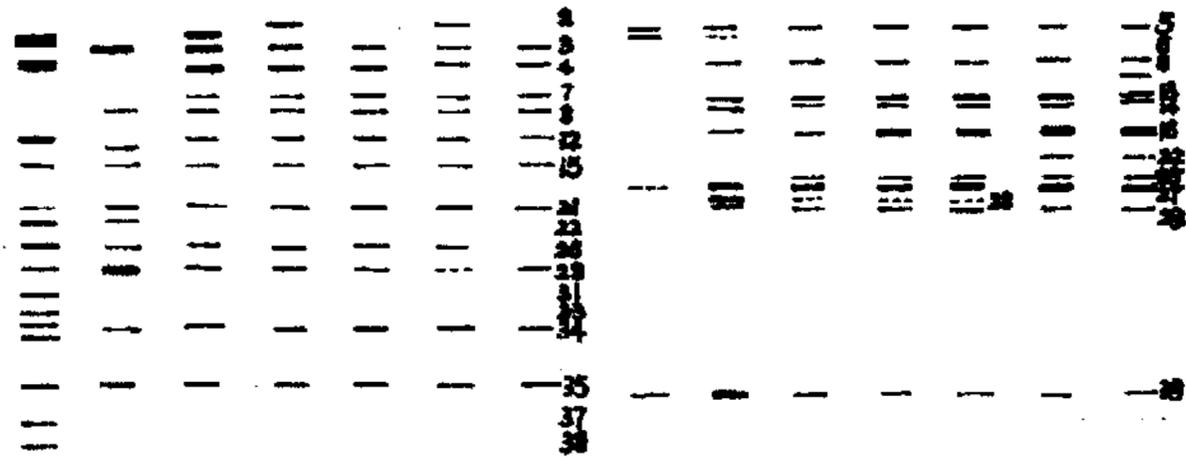


图10 鲜皮静置脱胶酶谱 (8000RPM) 图11 鲜皮静置脱胶酶谱 (16000RPM)  
(从左至右依次为6h-42h样)

经比较, 在可能属脱胶酶的谱带中, 鲜皮振荡与干皮振荡的共同带有13、15、16、19、21、24、26、27、31九条, 编号为7、9、10、30的是鲜皮振荡系特有的带, 而8可能是干皮振荡系特有的带; 鲜皮静置与干皮静置的共同带有13、15、16、21、24、26、27、29、31、34十条, 5、7、12则可能是与干皮静置系相区别的酶带, 32是干皮静置系中特有的。这些相同的酶可能对韧皮中的非纤维素物质起类似的作用。不同材料、同一材料不同体系之间酶的差异很可能是由于一些特定物质种类和浓度对T1163和杂菌控制相应酶合成的基因定向诱导所致。例如, 编号为7的带很可能是鲜皮脱胶与干皮之间的差别所在。这些相异酶带很可能是影响脱胶周期、造成酶解产物差异的根本原因。

### 3、酶的活性测定

干皮、鲜皮脱胶过程中发酵液的果胶和半纤维素酶活测定结果如图12、图13所示。

图12表明：(1) 振荡系较静置系酶活高，其中果胶酶活峰值872.9u/ml、611.0u/ml分别在12h、24h出现 半纤维素酶活峰值166.2u/ml

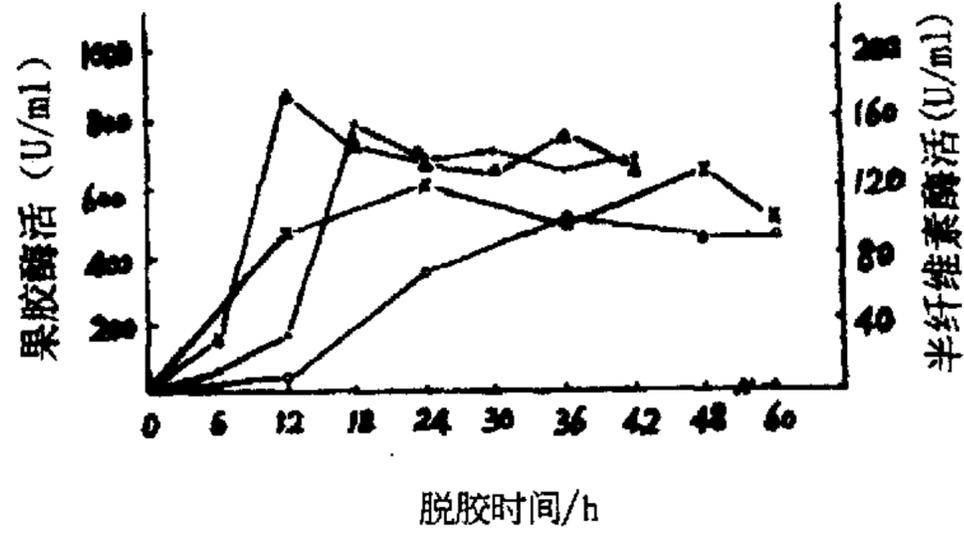


图12 干皮脱胶过程中酶活变化

△—△振荡系果胶酶活 ●—●振荡系半纤维素酶活  
 ×—×静置系果胶酶活 ○—○静置系半纤维素酶活

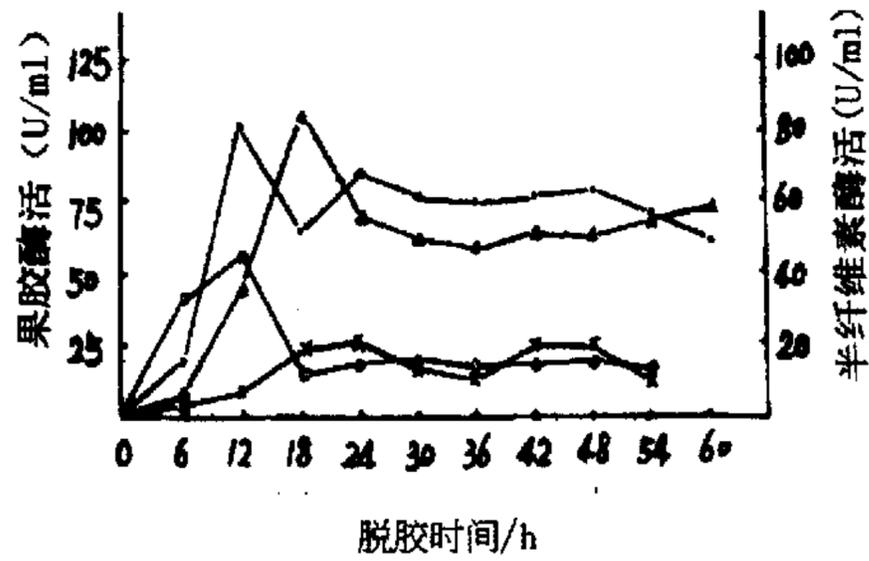


图13 鲜皮脱胶过程中酶活变化

△—△振荡系果胶酶活 ●—●振荡系半纤维素酶活  
 ×—×静置系果胶酶活 ○—○静置系半纤维素酶活

和 99.7u/ml 分别出现于 18h、36h; (2) 脱胶完成后, 两体系中果胶酶活降低, 半纤维素酶活有上升趋势, 这可能与果胶酶构象改变、降低了与底物分子间亲和力而半纤维素充分暴露有关; (3) 同一体系中果胶酶活峰值出现于半纤维素酶活峰值之前, 峰值过后酶活变化总幅度不大; (4) 结合酶活测定结果分析, 31、34 两谱带很可能属半纤维素酶, 并且大多数微生物来源的木聚糖酶分子量均较小<sup>[60-64]</sup>。

鲜皮 (图 13) 与干皮相比, 酶的活性相似之处: (1) 振荡系高于静置系; (2) 同一体系中果胶酶活峰值早于半纤维素酶活峰值出现, 峰值后酶活变化幅度较小; (3) 脱胶完成后果胶酶活降低而半纤维素酶活升高。不同之处在于前者: (1) 果胶、半纤维素酶活峰值在振荡系中分别出现于 12h、18h, 在静置系中峰值 87.3u/ml、16.6u/ml 分别在 12h、24h 出现, 从平均水平看, 两类酶在静置系中的活性不及振荡系的 1/3; (2) 两体系酶活较在干皮中要低得多, 大约仅其 1/10 左右水平, 说明外切酶活性低。

## (二) 酶解产物的动态变化

### 1、可溶性有机物

鲜皮脱胶过程中可溶性有机物测定结果 (图 14) 表明: (1) 静置系始终高于振荡系, 二者峰值分别为 1779mg/L 和 958mg/L; (2) 振荡、静置系分别从 6h、12h 始一直呈下降趋势。这就是说, 鲜皮中含有一定量的可溶性有机物, 脱胶前迅速溶出导致溶液中测定值快速增高, 而后, 微生物大量繁殖, 消耗大于产生; (3) 每一对应时段的可溶性有机物量, 静置系为振荡系的 2 倍以上。这主要是因为有氧条件下微生物繁殖速度快,

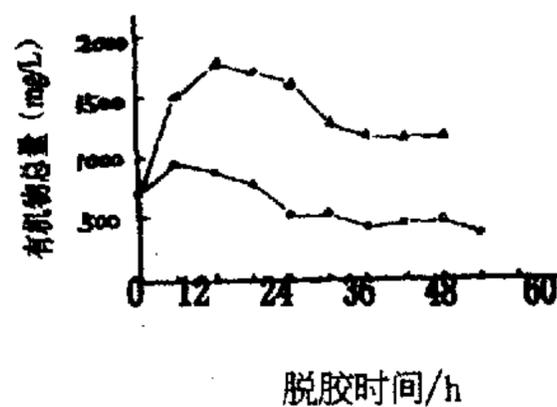


图 14 鲜皮脱胶过程中可溶性有机物变化

△—△静置系    〇—〇振荡系

消耗有机物多于缺氧条件的缘故。这些可溶性有机物几乎都是来自于韧皮，在微生物酶的作用下逐步降解为还原糖和有机酸。它们是脱胶过程中形成的主要酶解产物。它们的变化情形分述如下：

### (1) 还原糖

鲜皮发酵液中还原糖测定结果（图 15）表明：（1）振荡系在前 24h 一直下降，24 h 以后基本平稳；静置系在 0-6h、18-24 h 有两次升高，峰值为 900mg/L，30 h 以后趋于平稳。（2）整个脱胶过程中，虽然静置系酶活较振荡系低，但由于前者所含微生物少，体系中糖的消耗量低，故能积累于溶液中的糖较振荡系还是要多。这与干皮中的测定结果明显不同，在干皮的两体系中还原糖总趋势是不断增加，静置系浓度始终高于振荡系，峰值分别为 1267mg/L 和 979mg/L<sup>[52-53]</sup>。

### (2) pH和有机酸

pH 虽不属酶解产物，但它是反映发酵体系中复杂多样生化过程的一个综合指标，而且与有机酸的含量变化密切相关。鲜皮发酵液中 pH 和有

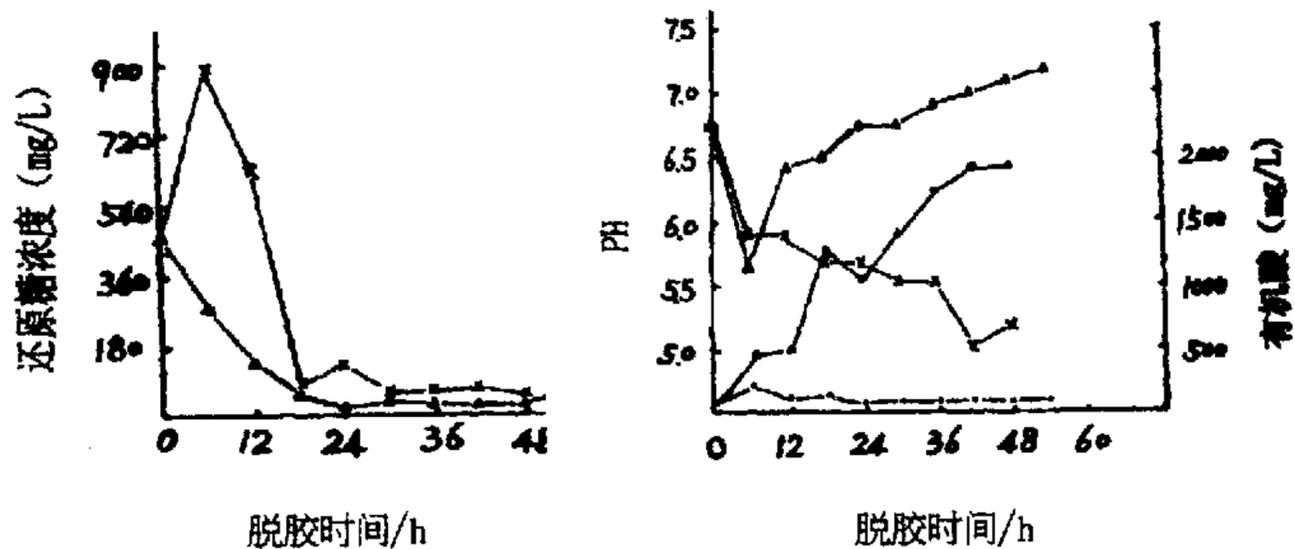


图 15 鲜皮脱胶过程中还原糖变化图 16 鲜皮脱胶过程中 pH 和有机酸变化

△-△ 振荡系    x-x 静置系    △-△ 振荡系 pH    x-x 静置系 pH  
o-o 静置系有机酸    ●-● 振荡系有机酸

机酸的测定结果（图 16）表明：（1）振荡系 pH 在经过短时间回落后逐渐上升，终 pH 7.2；静置系 pH 一直呈下降趋势，终 pH 为 5.15，脱胶完成后回升。出现这种现象的原因是由于在静置系中除了胶质降解产生半乳糖醛酸等酸性糖类物质外，微生物利用葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖醛

酸主要以无氧呼吸方式获取能量的同时产生大量的乙酸、丙酸、丁酸、乳酸及一些酸性中间代谢产物积累于溶液，故酸浓度高、pH 逐渐降低。在振荡系中，虽然酶系在对胶质分解的过程中同样产生一些酸性水溶物，但由于微生物分解代谢的主渠道是有氧呼吸，避免了大量酸性发酵产物的积累，同时 T1163 分泌的碱性果胶酶量多于静置系，有一定的中和酸性物质的作用，故其 pH 逐渐上升。pH 的这种变化趋势与干皮发酵液有相似之处差别在于后者的 pH 在振荡系中始终维持在碱性条件下 (pH6.8-7.8)，一直到脱胶完成后才开始下降；(2) 有机酸的总变化趋势与 pH 相反，二者呈负相关，静置系的酸量远高于振荡系，峰值分别为 2370mg/L 和 236mg/L。

### 2、不溶性有机物

鲜皮脱胶过程中不溶性有机物测定结果(表 1)表明：两体系均呈不断升高趋势。这些不溶性有机物主要是由脱落的表皮组织和内切酶作用使非纤维素物质发生“块状崩溃”形成的，其量的不断增多可能是由于外切酶对其分解程度低而内切酶活性不断升高的缘故。36 h 以后振荡系增幅明显大于静止系则是由于游离块状物在振荡力作用下更易从纤维间冲洗脱落。

表 1 鲜皮脱胶过程中不溶性有机物变化

脱胶时间/h		6	12	18	24	30	36	42	48	54
不溶性有机物重量/mg	O	78	161	174	208	249	251	433	506	542
	S	98	128	197	211	284	301	368	426	—
占鲜皮重 (%)	O	0.39	0.80	0.86	1.03	1.23	1.25	2.15	2.50	2.74
	S	0.49	0.64	0.98	1.04	1.41	1.50	1.82	2.11	—

注：O—振荡系 S—静置系，表 3 同。

在整个脱胶过程中，各种酶解产物与微生物之间的关系相辅相成、错综复杂。微生物在利用发酵体系所提供的碳/氮源等营养成分的同时数量不断增多并分泌多种胞外酶，而胞外酶的出现及活性大小反过来又影响酶解产物的形成速率和量的多少。到一定时期后，当营养成分成为微生物进一步扩大繁殖的限制因子时，其数量不再大幅度增加、对有机物的耗用速率亦不再升高。鲜皮振荡系中 T1163 数量为静置系对应时段的 10 倍以上但酶分子数相差并不悬殊，表明静置系中酶的分泌速率更高；静置系中

酶活测定值低却先于振荡系完成脱胶，这除了由于静置系与振荡系中微生物种类和数量存在差异外，可能还与酶的种类及其酶解机制密切相关。据推测，内切酶活性高低很可能是鲜皮两种脱胶体系的本质差异所在。

## 二、鲜茎脱胶过程中酶和酶解产物的动态变化

### (一) 酶的动态变化

#### 1、胞外可溶性蛋白

测定结果（图17）显示：鲜茎脱胶过程中胞外蛋白浓度水平在三种实验材料中最低（与图1、图2比较）。这一方面是由于麻量相对少（相当于浴比大）、溶出蛋白量少（电泳时的点样量是韧皮的2倍）；另一方面则是由于微生物分泌的胞外蛋白酶量亦较另两种材料中的要少。振荡系在72h之前一直呈上升趋势，静置系在前24h略有增多，24h-48h减少，48h-72h再次增多，脱胶完成后下降，总趋势是呈现“M”型，与鲜皮发酵液中蛋白变化趋势一致，结合微生物变化（图18）分析，导致这种趋势的原因亦与鲜皮类似。

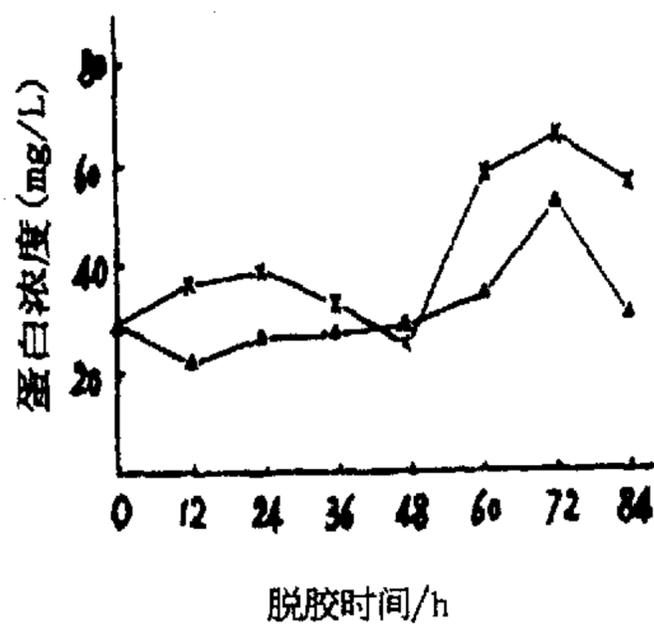


图17 鲜茎发酵过程中蛋白浓度

△-△振荡系    ×-×静置系

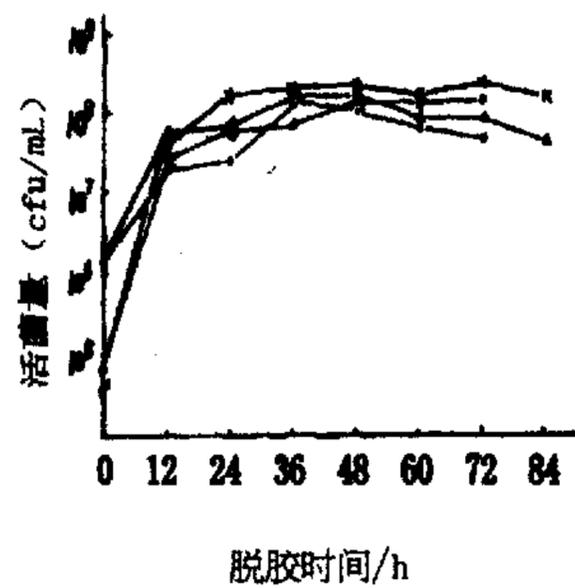


图18 鲜茎脱胶过程中微生物变化

△-△振荡系 T1163    ×-×振荡系杂菌  
●-●静置系 T1163    ○-○静置系杂菌

#### 2、脱胶过程中酶蛋白电泳图谱

鲜茎脱胶过程中脱胶酶经 SDS-PAGE 分析所得结果如图 19-22 所示。

由图17-20可知:①有4号带属麻中游离蛋白。②振荡系中6、18、23、25、28、30和静置系中22、23、29、30、33、35带可能是麻中结合蛋白及溶出蛋白的降解产物,也可能是由多种微生物产生的应激酶(干皮、鲜皮中的第二类情形)。③振荡系中可能具脱胶作用的有13-16、19、21、24、26、27、30、31号带;静置系中则是13-16、21、24、26-28、31、34、36、38、39等谱带,比韧皮静置系共同带多出28、36、38、39四条带。14、28号带在鲜皮和茎两个系统中都有,可能是鲜皮和茎与干皮的本质区别

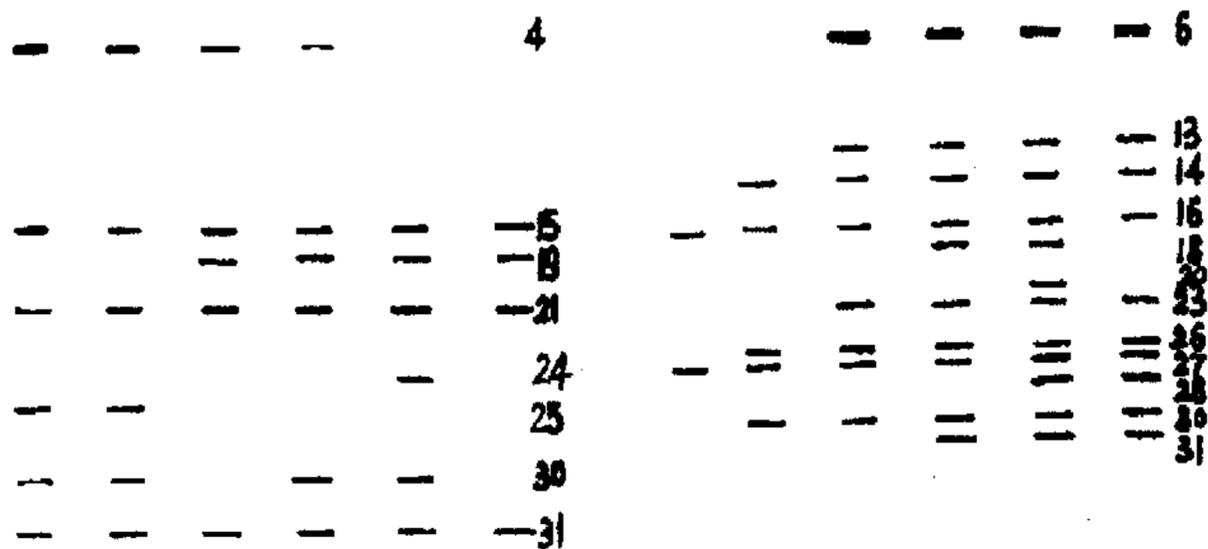


图19 鲜茎振荡脱胶酶谱(8000RPM) 图20 鲜茎振荡脱胶酶谱(16000RPM)  
(从左至右依次为12h-84h样)

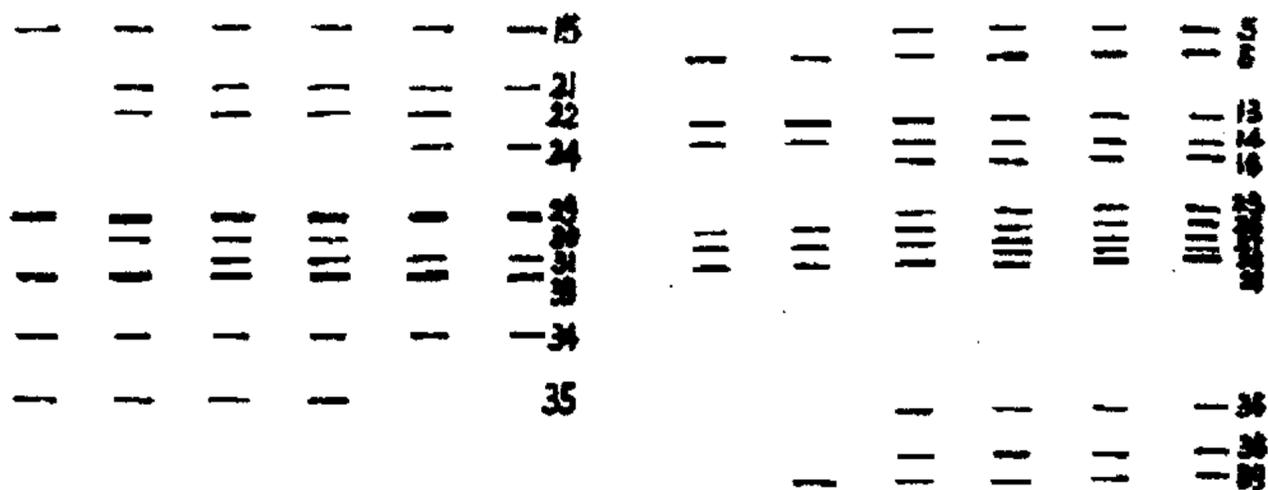


图21 鲜茎静置脱胶酶谱(8000RPM) 图22 鲜茎静置脱胶酶谱(16000RPM)  
(从左至右依次为12h-72h样)

所在。这些酶有相当一部分在12h以前即开始合成。

综上所述：三种红麻材料在振荡系中共同的脱胶带是13、15、16、19、21、24、26、27、31九条，在静置系中则是13、15、16、21、24、26、27、31、34九条，有八条相同，一条有别；两体系的主带都是15、21、27、31四带。此外，鲜茎和鲜皮的振荡系特有18带，静置系特有29带；鲜皮与干皮比，前者多7号带。由此可见，参与红麻脱胶的酶至少有九种，其中七种在两类系统中共同存在，体现了脱胶的共性；19、34号带及其它一些酶带则体现不同体系和不同材料之间的个性。

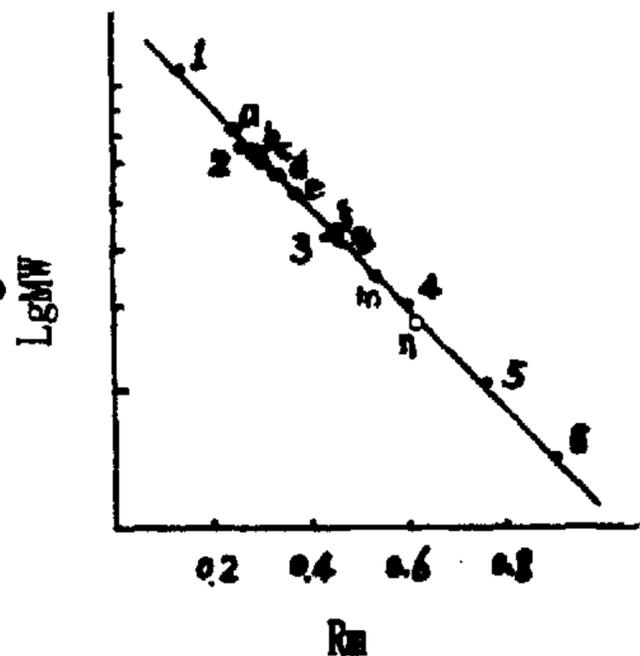
用 SDS-PAGE 法测定谱带中所有蛋白及其中 9 种脱胶酶的分子量如表 2、图 23 所示。

表2 各谱带对应蛋白及酶的分子量

													KDa
No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MW	220	200	173	141	120	107	104	97.4	91.2	88	80.2	73.4	70.8
No.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
MW	64.5	61.6	60	58.5	57.5	56.3	53.8	51.2	47	46.5	45	44	43
No.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
MW	41.7	39.8	37.1	35.4	33.5	32.2	31	28.8	24.5	23.2	21.7	20.5	18.6

图23 SDS-PAGE法测定9种脱胶酶分子量

- 1、兔磷酸化酶B (97400)    2、牛血清白蛋白
- 3、兔肌动蛋白 (43000)    4、牛胰凝乳蛋白酶 (31000)
- 5、胰蛋白酶抑制剂 (20100)    6、鸡蛋清溶菌酶 (14400)
- 分别代表分子量为70800-28800的脱胶酶



### 3、酶的活性测定

定时取样测定鲜茎脱胶过程中的酶活，结果（图 24）表明：果胶、

半纤维素酶活均是振荡系较静置系高，二者在振荡系中的峰值分别出现于60h、48h，在静置系中的峰值则分别出现于72h、48h，果胶酶活峰值均迟于半纤维素酶活峰值出现，与干皮、鲜皮中的情形相反，并且振荡系果胶酶活在48h增加幅度大，推测可能是由于麻骨中溶出的某些小分子有机物的激活作用，使其外切酶活性增加，也可能是由于此时新产生的19号酶的作用。

如果将干皮振荡系中果胶、半纤维素酶活的峰值分别视为100，则其它各材料中酶活的相对值列于表3。

表3 三种红麻材料在两种发酵体系中的相对酶活

材料	体系	酶活	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	72	84
DR	O	P	17	100	83	74	73	86						
		X	7	20	100	80	85	77						
	S	P	50		70		57		73		58			
		X	5		42		60		54		54			
FR	O	P	2	12	8	9	9	9	9	9	8			
		X	36	22	53	33	30	28	33	31	34			
	S	P	4	6	2	2	3	2	2	2				
		X	2	4	10	10	8	6	10	10				
FS	O	P	2		2		1		1		2		2	2
		X	3		4		6		9		7		6	6
	S	P	0.6		2		1.6		1		1.6		2	
		X	1		3		5		7		7		7	

DR——干皮 FR——鲜皮 FS——鲜茎 O——振荡

S——静置 P——果胶酶 X——半纤维素酶

同一栏内对应应有2个时段者，酶活为第二个时段值。

该表十分直观地反映了红麻干皮、鲜皮、鲜茎三种材料在不同发酵体系中的果胶和半纤维素酶活差别，其中鲜皮和鲜茎中的酶活远低于干皮，有些情形下不及后者的十分之一，结合脱胶完成所需时间分析，只能理解为鲜材料的脱胶主要依靠内切酶活性的作用。

(二) 酶解产物的动态变化

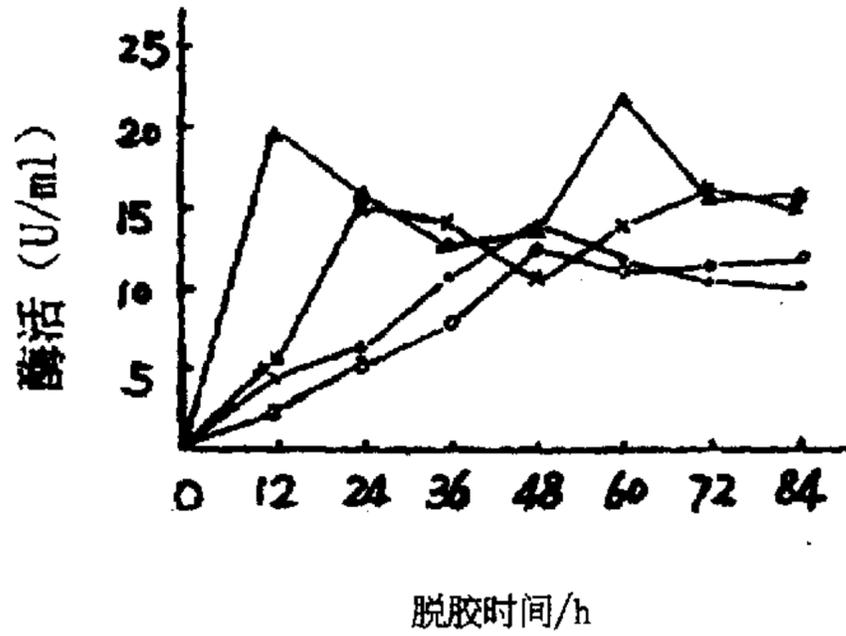


图24 鲜茎脱胶过程酶活测定

△-△振荡系果胶酶活 ●-●振荡系半纤维素酶活  
x-x静置系果胶酶活 o-o静置系半纤维素酶活

1、可溶性有机物

由图25可知：两体系总变化趋势是逐渐上升的，静置系绝对值始终高于振荡系，鲜茎脱胶过程中可溶性有机物的释放量较韧皮要低。这可能是试验材料中可溶物（贮存于韧皮中）相对较少；脱胶前期主要依靠茎段端口溶出；酶解产物吸附于麻骨软组织上；振荡系微生物生长快、消耗多。

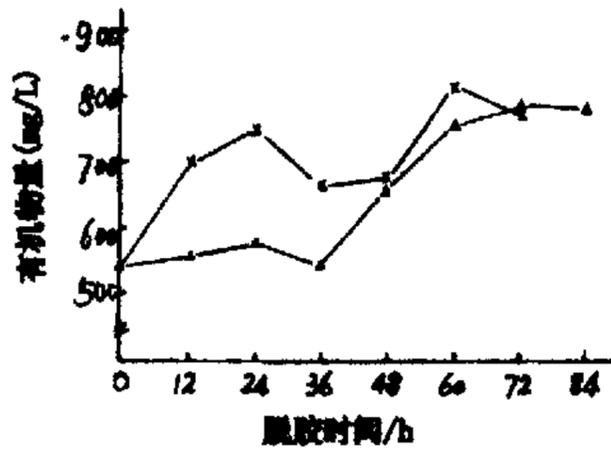


图25 鲜茎发酵过程中可溶性有机物的变化

△-△ 振荡发酵

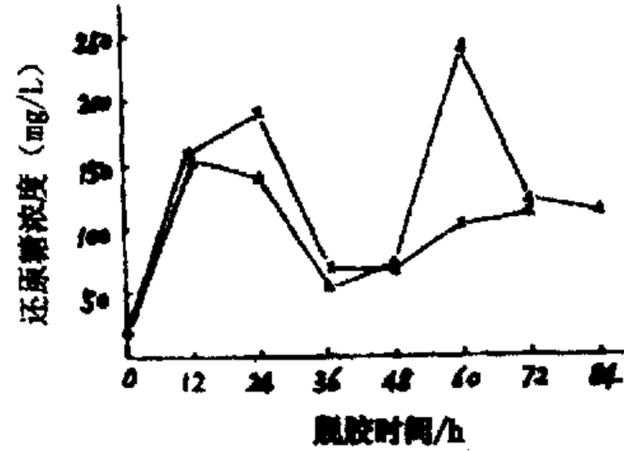


图26 鲜茎发过程中还原糖变化

x-x 静置发酵

(1)、还原糖

从还原糖的测定曲线（图26）可以看出：①两体系变化趋势均呈“M”型即两次升高两次降低，且与酶活测定结果密切相关。②振荡系、静置系峰值分别为24.5mg/L和19mg/L，在三种材料中最低，这与外切酶活性低直接相关。③48h以前静置系较振荡系略高，48h以后则相反。

(2)、pH和有机酸

从pH和有机酸的测定结果（图27）可以看出：静置系有机酸较振荡系高得多且逐渐上升，脱胶快结束时才开始下降，振荡系变化不规则。这

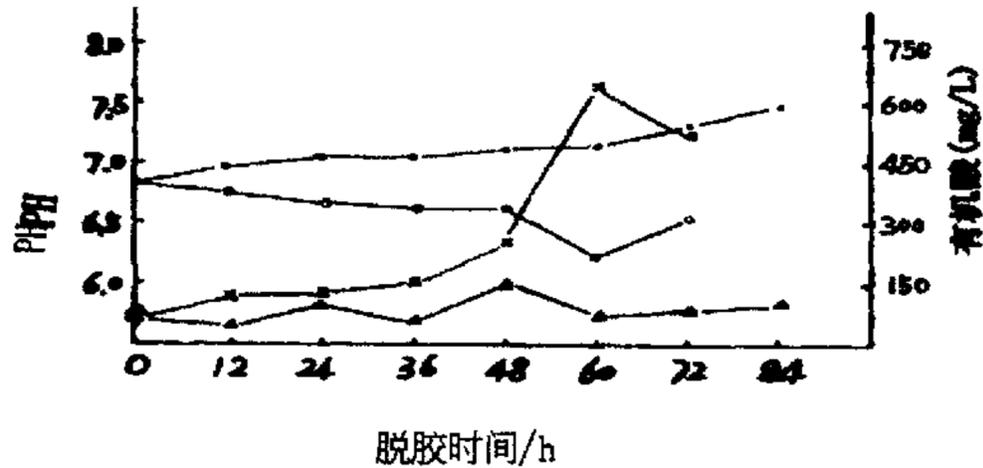


图27 鲜茎发酵过程中pH和有机酸的变化

●—●振荡系 pH    △—△振荡系有机酸    ○—○静置系 pH    ×—×静置系有机酸

可能与微生物代谢强度和酸性物质的积累有关，也可能与酶的作用机制发生联系，有待进一步研究。另外，pH变化幅度较干皮、鲜皮要小。

2、不溶性有机物

测定结果（表4）表明：两体系均呈不断增多的趋势。其中振荡系在12h-24h增幅大，静止系则在48h以后才大幅度增加。由于表皮组织角质

表4 鲜茎脱胶过程中不溶性有机物变化

脱胶时间/h		12	24	36	48	60	72	84
不溶性有 有机物重/mg	0	65	153	105	122	141	147	158
	S	85	52	70	82	159	184	—
占鲜茎重 (%)	0	0.53	1.26	0.87	1.01	1.17	1.20	1.32
	S	0.70	0.43	0.58	0.69	1.29	1.53	—

化程度高，脱胶微生物对它们不起直接作用，但在水的张力作用下而与皮层组织分离，振荡条件下易于脱落，故前期振荡系的形成量高于静置系。结合脱胶进程分析，后期静止系内切酶的活性高于振荡系，纤维束之间的非纤维素物质发生“块状崩溃”的量相对较大，因而静置系高于振荡系。完成脱胶所需时间的差异能支持这一推断的正确性。

### 三、T1163分泌脱胶酶的种类和最适作用条件

#### (一) 脱胶酶种类的鉴别

为了进一步确定上述推断的可靠性，还做了如下试验：

#### 1、T1163以无机氮为唯一氮源分泌脱胶酶试验。

将多粘芽孢杆菌 T1163 接种于以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为唯一氮源的 3 号培养基中，振荡、静置分别培养，定时取样处理后测定 T1163 数量、酶活（表 5）以及用 SDS-PAGE 法分析胞外酶的种类。结果表明：该菌在振荡、静置两体系中先后均产生 13、15、16、21、27、31 等 6 种胞外酶，分子量分别为 70800、61600、60000、51200、41700 和 33500。可能受培养条件的限制胞外酶谱带均较浅，编号为 15 和 31 的带相对粗些。具有上述 6 种酶的培养液兼有果胶和半纤维素酶活性，且振荡系较静置系高，无纤维素和蛋白水解酶活，说明不含纤维素酶和蛋白水解酶。因未引入外源蛋白，消除了外在蛋白对 T1163 产酶种类分析的干扰。这 6 种胞外酶均属前述三种红麻材料脱胶过程所测定的脱胶酶组分。

表 5 T1163 在无机氮中产酶分析

	振荡系	静置系
T1163 数量 (cfu/ml)	$3.5 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$
果胶酶活 (u/ml)	231.7	176.4
半纤维素酶活 (u/ml)	46.6	29.1
纤维素/蛋白水解酶活 (u/ml)	0	0

#### 2、T1163 在豆饼粉培养基中产酶分析

T1163 在豆饼粉培养基振荡、静置培养过程中，定时取样测定微生物活菌量、诱导产酶种类和酶活，结果（表 6、图版 8）表明：振荡培养 18h 或静置培养 24h 达果胶酶产生高峰，两体系中木聚糖酶产生高峰均在 24h

T1163 数量峰值早于酶活峰值出现。电泳结果显示：在无机氮素培养基中产生的 6 种酶同样存在于豆饼粉培养基的培养液中；酶活测定结果显示，T1163 在此培养基中还产生蛋白水解酶。

表6 T1163在豆饼粉培养基中产酶分析

发酵体系	振荡系			静置系			
	取样时段 (h)	T1163数量 (cfu/ml)	果胶酶活 (u/ml)	半纤维素酶活 (u/ml)	T1163数量 (cfu/ml)	果胶酶活 (u/ml)	半纤维素酶活 (u/ml)
	6	$6.47 \times 10^7$	346.1	45.0	$4.85 \times 10^7$	167.2	12.6
	12	$8.0 \times 10^8$	717.9	78.7	$6.90 \times 10^8$	324.4	52.9
	18	$7.55 \times 10^8$	924.1	94.0	$7.12 \times 10^8$	746.0	88.7
	24	$7.4 \times 10^8$	843.0	171.9	$6.85 \times 10^8$	872.5	126.9
	30	$7.21 \times 10^8$	731.4	145.0	$6.76 \times 10^8$	795.0	97.4

### 3、有菌/灭菌干皮脱胶对比试验

为了确定 T1163 在以麻皮为底物时是否还诱导产生其它种类的脱胶酶，并排除麻皮、容器、水体及空气携带杂菌对判别脱胶酶种类的影响，将灭菌与未经灭菌处理的干麻皮接入 T1163 后进行振荡、静置脱胶对比试验，定时随机取样分析发酵液中脱胶酶种类。结果表明：与纯培养试验结果比较，无论是灭菌还是有菌干皮脱胶过程中均存在编号为 13、15、16、21、27、31 这 6 条带；同时，振荡系还多出 19、26 两条带（分子量分别为 56300、43000），静置系多出 26 和 34 两带（分子量为 43000 和 28800）。对比前述三种红麻材料试验结果，这里多出的三条带恰好是 T1163 在两种脱胶体系中受麻的影响而定向诱导产生的脱胶酶。

#### （二）酶作用的最适 pH 和最适温度

##### 1、最适 pH

用不同 pH 的 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液和 Tris-Hcl 缓冲液配制一系列 1% 的果胶和木聚糖溶液，以静置培养 24 h 的豆饼粉菌液作粗酶液来源进行酶促反应，结果表明（图 28）：T1163 来源的果胶酶系在 pH6.0-9.0 间具较高活性，最适 pH 为 8.0；半纤维素酶在 pH3.0-6.5 间具较高活性，最适 pH 为 4.4，在 pH4.4 到 pH8.0 之间，随着 pH 升高，半纤维素酶活逐渐

降低而果胶酶活逐渐升高。

根据 T1163 在豆饼粉培养基中所产酶的特性看，在上述三种材料的不同体系脱胶过程中，若其它条件完全相同，pH 增加逐渐升高，半纤维素酶活则降低；在不同体系之间，振荡系中的果胶酶活应高于静置系、半纤维素酶活应低于静置系，但上述酶活测定结果不完全符合这一推断。这一方面是由于在不同材料或同一材料不同体系中除了存在 T1163 所产相同脱胶酶外，还存在不同种类和数量及象征体系之间本质差别的其它酶；另一方面则是由于酶的活性除受溶液 pH 值影响外，还受底物结构与数量、产物浓度、金属离子种类和浓度、酶分子数及各种酶分子之间适宜配比等多种因素影响。此外，通气与否同样对酶的分泌和活性有较大影响，在一定条件下，充足的供氧更利于产酶。

## 2、最适温度

设置 30°C-70°C 的不同温度（温差为 5°C），使酶与底物在最适 pH 和

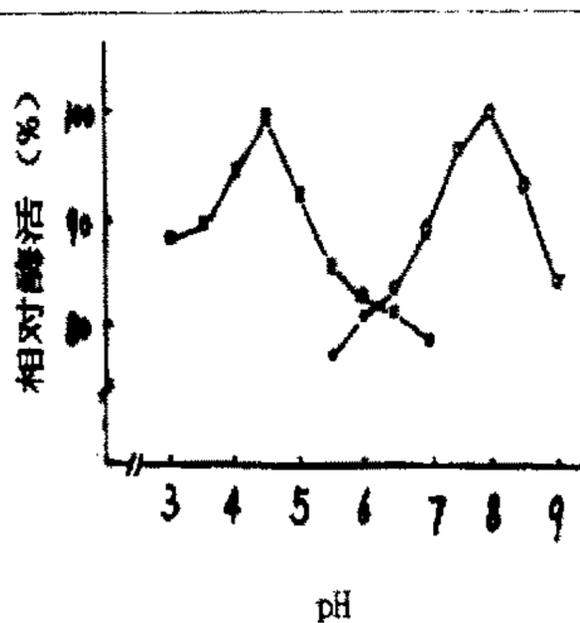


图 28 pH 对酶活力的影响

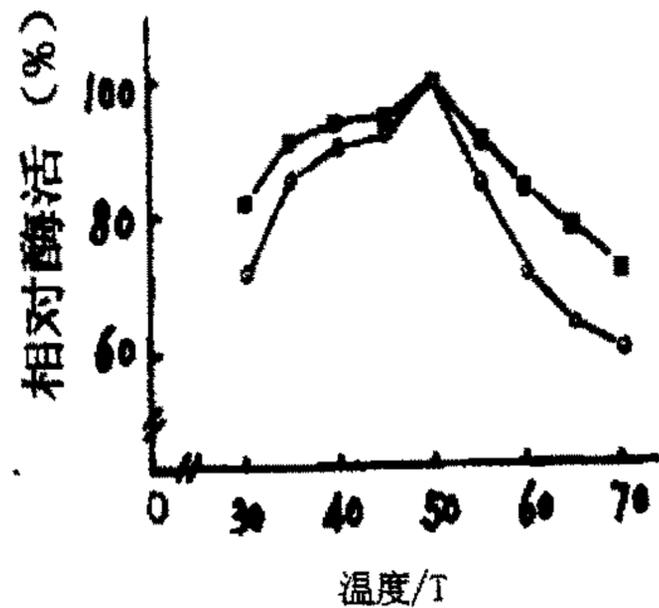


图 29 温度对酶活力的影响

○—○ 果胶酶活      □—□ 半纤维素酶活

不同温度下进行酶促反应，结果（图 29）表明：果胶和木聚糖酶的最适作用温度均为 50°C；而根据前人研究结果设计的最适温度 35°C 时，其相对酶活仅为 89、83。

### （三）脱胶实效试验

用上述各取样时段的粗酶液做脱胶试验，每三角瓶盛干皮 10±0.1g、

浴比 1:15、酶液 2.0ml、自然 pH、50°C,结果以来自振荡 18h 和静置 24h 的粗酶液脱胶效果最好,与相应体系的酶活测定结果一致。

为了弄清酶液的接入量对脱胶效果的影响,分别取粗酶液 2.0、4.0、6.0ml,其余实验条件同上,开始每 12h 观察一次,以后每 6h 观察一次,检测脱胶效果,结果如表 7 所示。

表 7 粗酶液用量与脱胶时间的关系

粗酶液来源	振荡 18h			静置 24h		
酶量 (ml)	2.0	4.0	6.0	2.0	4.0	6.0
脱胶时间 (h)	72	42	66	54	30	42

以上结果可得如下结论:①酶法脱胶对酶液用量的要求并非越多越好,就本实验而言,二种来源的粗酶液均以 4.0ml 为最佳,超过 4.0ml 脱胶时间反而延长。②对比酶活测定数据(表 6)可以看出:在每一 T1163 纯培养体系内,果胶酶活愈高脱胶时间愈短,两体系之间,虽然静置系 24h 果胶酶活较振荡系 18h 低,但完成脱胶所需时间要短,似乎有悖常理,其原因有待进一步研究,很可能与内切酶活性的发挥程度及不同酶之间的分子数配比有一定联系。③酶制剂和粗酶液脱胶时不一定必需对干皮进行预处理,这一点与有关文献的报道不一致,本研究证明:只要产酶时间和酶液用量选择合适,同样可使未经任何预处理的麻获得满意脱胶效果。

## 问题与讨论

### 一、高效脱胶菌株选育中的酶活测定

目前,选育高产果胶/半纤维素酶菌株,主要是以测定菌株所产胞外酶分解相应底物产生还原糖的能力为标准。迄今尚无一个十全十美的测定方法。本研究发现, T1163 是一株红麻专用脱胶菌,但其对鲜皮、鲜茎脱胶时测得的酶活值偏低;脱胶周期短者其脱胶酶活测定值未必一定高。这是由于果胶/半纤维素酶均属复合酶系,各种酶与底物间的作用可以相互发生影响,有些脱胶酶主要依靠其内切酶活性发挥对胶质的降解作用,而外切酶活可能不是影响脱胶效果的决定因素。由于酶的高度专一性很强,

对市售果胶、半纤维素分解力强的酶对麻中的果胶和半纤维素不一定能进行很好降解，因为麻中的果胶、半纤维素的构造错综复杂，不象市售商品那样单一；反之，对市售果胶和半纤维素降解力差（即酶活测定值小）的菌种却有可能对麻中的胶质有很强的分解能力。这可以解释脱胶进程与酶活不成正相关、酶活数值高但完成脱胶所需时间长等实验事实<sup>[24]</sup>。如果要选育优良脱胶菌株或其它高产果胶/半纤维素酶菌株的话，有必要根据育种目标制备特定的果胶/半纤维素作酶活测定底物。在没有彻底弄清底物的分子结构及其空间构象之前，采用脱胶实效法鉴定菌株的脱胶性能虽带有一定主观性，但测试条件要求不高且能真正反映菌株脱胶酶的综合脱胶能力，仍然是有效的。

## 二、杂菌对红麻脱胶进程的影响

本研究是在杂菌存在的前提下进行的，由于麻皮、容器、水体及空气均携带有一定种类和数量的杂菌，它们在脱胶过程中与 T1163 一样得以增殖并且能或多或少地分泌某些酶。一方面，杂菌的存在对 T1163 的增殖和产酶有抑制作用，限制了脱胶优势菌株作用的发挥；另一方面，杂菌消耗酶解产物，可解除过多产物对酶的部分抑制作用，有助于酶促反应向胶质降解的方向进行。总的说来，杂菌对脱胶的促进作用是较次要的，T1163 起着主导作用，其依据是：（1）与接种 T1163 的相比，不接种 T1163、仅依靠杂菌虽也能完成脱胶，但所需时间要长得多。以干皮静置为例，在上述条件下需 168h。（2）从脱胶酶电泳图谱中谱带强弱看，T1163 产多数脱胶酶作为主带存在，其余带则相对要弱些。（3）给灭菌干皮接种 T1163 后能加速脱胶进程（提早 6h—10h 完成脱胶），说明 T1163 产脱胶酶种类齐全，尤其是包括脱胶关键酶。

## 三、预处理对脱胶进程的影响

本研究采用 T1163 对灭菌干皮进行脱胶的时间相对较短。这一实验事实似乎是对混种脱胶优越性的否认。其实不然，经灭菌处理的干皮，提前完成吸水溶胀过程、组织固有结构遭到破坏，加之 T1163 的优势在没有杂菌的影响和干扰下得以更充分体现，才使得脱胶完成时间缩短。当然，在生产实践中，对红麻材料进行灭菌处理显然是不经济的，如果采取一定措

施适当破坏红麻材料固有的结构、调节发酵工艺条件以便微生物侵入并充分发挥各种酶之间的协同作用显然是有效的。

#### 四、三种红麻脱胶时间长短原因剖析

脱胶是一个渐次进行的过程，具有累加效应，红麻干皮、鲜皮和鲜茎在振荡、静置两种体系中完成脱胶所需时间分别为36h、54h、84h和60h、48h、72h，以干皮振荡最快，鲜茎振荡最慢，至少可从以下几方面分析脱胶周期长短的原因：

##### 1、酶的诱导和活性

受产物浓度、特定诱导剂浓度、微生物生长速度和 pH 等多种因素的影响，每种酶在不同材料、同一材料不同体系中诱导与否、诱导出现时间的早晚及诱导量的多少存在不同程度差别，其中一些酶诱导到一定时间和量后不再产生，另有一些酶则一直呈不断增多的趋势，所有酶在溶液中随时间推移必然会有部分产生抑制甚至丧失活性。总的说来，干皮中酶的诱导最快、酶量最多，鲜茎中最慢、酶量最少，鲜皮介乎其中，酶活测定结果也显示出类似差别（图 12、13、24）。在有些体系，虽然部分酶在整个脱胶过程中一直被诱导，但新产生的酶并未使体系中酶的外切活性提高，其作用可能有三：其一是随着酶量的增多，酶的内切活性得到加强，其二是补偿了受抑制酶的活性，其三则是改变了不同酶分子之间的活性配比。由于发酵体系中存在多种微生物及其分泌的胞外酶，进行着复杂多样的生理生化反应，要更深入研究酶的产生和活性与溶液中各有机物之间的交互影响，需通过凝胶过滤和离子交换等层析手段对各种酶一一分离并进行属性归类，同时借助 HPLC 分析发酵液中糖、酸、醇等多种有机物的浓度，才能从根本上揭示脱胶过程中多种酶与酶解产物之间错综复杂的变化关系。

##### 2、材料本身的差别

对干皮和鲜皮而言，由于机械剥离使组织的固有结构遭到一定程度的破坏，同时其接触水体和酶液的表面积较鲜茎大，酶与胶质之间可得到更为充分的接触，对鲜茎来说，未经剥离、麻皮保持固有状态和结构，增大了脱胶难度。理论上讲，由于振荡能促进酶与底物之间的亲合，因此若其

它条件完全一致，则振荡较静置完成脱胶所需时间要短，但对鲜皮和鲜茎而言，一方面由于绿色表皮组织在振荡力的作用下较静置系更易悬浮于水体使溶液变得混浊，影响了氧气的溶解；另一方面，某些生物活性物质大大提高了内切酶的活性（虽然有些酶对胶质是随机切割，但随机性亦会受到限制，同时也不排除同种酶在不同条件下可在内切酶活性优势与外切酶活性优势之间相互转变的可能），这些酶以简便快捷的方式即主要瓦解纤维与非纤维之间的化学连接完成脱胶。因此，虽然鲜皮、鲜茎发酵液中外切酶活较干皮低，且鲜皮、鲜茎静置系酶活较振荡系低却不一定后完成脱胶，脱胶周期的长短受多种内外因素综合影响。

## 小 结

利用红麻专用脱胶菌株 T1163 (*Bacillus polymyxa*) 对红麻干皮、鲜皮、鲜茎在振荡、静置两种脱胶体系微生物脱胶过程中酶和酶解产物的系统研究得出如下结论：

1、红麻专用脱胶菌株 T1163 在脱胶过程中至少产生 9 种脱胶酶，其中分子量为 70800、61600、60000、51200、43000、41700、33500 的七种酶在两发酵体系共同存在，分子量为 56300、28800 的两种酶分别只存在于振荡、静置系。

这些酶在脱胶过程中产生的时间、速度和数量随红麻材料和发酵方式不同存在不同程度差别。在这一混合酶系中，果胶/半纤维素酶作用的最适温度均为 50℃，最适 pH 分别为 8.0 和 4.4，在这些酶及其它辅助酶的共同作用下，红麻干皮、鲜皮和鲜茎在振荡、静置两种发酵体系中完成脱胶时间分别为 36h、54h、84h 和 60h、48h、72h。电镜观察结果表明：脱胶过程中韧皮纤维形态与超微结构不变，说明这些酶优先作用于复合胞间胶质。

2、跟踪测定红麻在不同发酵方式中的酶活，结果表明：干皮、鲜皮脱胶过程中果胶酶活高峰早于半纤维素酶活高峰出现，鲜茎则相反；峰值过后酶活性变化保持相对恒定；不同材料的发酵液中果胶、半纤维素酶活均是

振荡系较静置系高，说明通气有助于酶的产生和活性发挥；脱胶完成后果胶酶活降低，半纤维素酶活有升高趋势。

3、干皮脱胶过程中外切酶活性高，而鲜皮和鲜茎脱胶过程中脱胶酶系的外切活性较低，主要通过内切酶作用形成多聚糖且这些多聚糖产生后可能在发酵液中多种酸、醇和金属离子等的作用下大多吸附于纤维表面或形成沉淀。

4、发酵过程中胞外可溶性蛋白大多呈“M”型变化趋势，这些蛋白的浓度改变源于麻皮中可溶性蛋白溶出的速率、溶出量的多少、微生物胞外酶的分泌量及其对胞外蛋白的利用率。

5、用铜碘试剂法测得红麻鲜皮脱胶过程中静置系还原糖浓度高于振荡系；在鲜茎中，前48h是静置系还原糖果高于振荡系，48h以后则相反，且均呈“M”型变化趋势；鲜皮、鲜茎发酵液中糖含量远低于干皮。

6、用中和滴定法测得振荡系中有机酸均较静置系低，静置系有机酸呈不断升高趋势，振荡系变化则相对稳定。鲜皮中的有机酸值远高于鲜茎，pH的变化趋势与有机酸相反。

7、用高锰酸钾法测定的可溶性有机物总量数据同样表明静置系较振荡系高，且鲜皮高于鲜茎。在鲜皮中，可溶性有机物总量变化趋势是增多→减少→平稳，在鲜茎中的总趋势是不断升高；不溶性有机物量在各种材料发酵过程中均呈不断增多的趋势。

上述研究结果均未见前人报道。这一研究揭示了 T1163 所产脱胶酶及酶解产物在不同材料和不同发酵方式中的动态变化规律，在理论上为酶学基础研究、高效脱胶菌株的选育和基因工程菌的建立奠定了基础，在实践上对形成新型脱胶方法、改良现行脱胶工艺、设计脱胶治废方案、减轻脱胶造成的环境污染具有指导意义。

## 致 谢

本研究自始至终得到导师刘正初研究员的周详安排和悉心指导，从文献查阅、实验设计到论文写作无一不倾注着导师的心血，导师兢兢业业、谦虚务实、一丝不苟的工作作风以及给予我学习和生活上无微不至的关爱和帮助时时激励和鞭策我去珍惜时间、奋力拼搏，同时，从熟练基本实验操作开始就一直得到彭源德、冯湘沅二位老师的具体指导、通力协作和鼎力帮助，使论文得以如期顺利完成。这三位老师是良师更是挚友，体现在他们身上的许多可贵品质足以让我受用终生；此外，还得到所领导、科研处、办公室和课题组其他成员的支持和关心，谨此一并致以最诚挚的感谢。

# Studies on Enzymes from Bacillus Polymyxa and Its Products in Kenaf Retting Process

Yang lifu

The graduate school of CAAS

## Abstract

Enzymes and its products in static and oscillatory retting systems of dry ribbon, fresh ribbon/stem have been studied with strain Bacillus polymyxa(T1163), and the results are showed as follows: (1) At least 9 kinds of enzymes produced by T1163 are available in kenaf retting process and their molecular weights are 97400, 70800, 61600, 60000, 51200, 43000, 41700, 33500 and 28800 as estimated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE. Each of them is an only single strand protein. The time, ratio and number of the enzymes secreted from T1163 are varied with the materials and fermentation methods in oscillatory and static systems. The retting time of dry ribbon, fresh ribbon/stem is 36h, 54h, 84h under the oscillatory system and 60h, 48h, 72h under the static one respectively. (2) Pectinase and hemilosease activities are determined with Somogyi-Nelson method. The enzymes show optimal activity at pH 8.0, 4.4 respectively and all at 50°C. To the same material at the same fermentation time. The activity of enzymes in oscillatory system is higher than in static one. (3) in the course of fresh ribbon/stem retting, the activity of exoases is lower than

---

The Project Supported by Chinese National Natural Science Fund

that of endoases. (4) As for reducing sugar concentration, static system is higher than in oscillatory one to fresh ribbon/stem and they are all much less than in dry ribbon. "M" shape trends are showed in both fresh ribbon/stem retting systems. (5) Volatile acid produced in static system is much more and becoming more and more with the time prolonged but stable in the other system. The trend of pH is reverse to that of volatile acid. (6) As for the total of dissolve materials, the trend is almost the same to volatile acid.

All above hasn't been reported till now.

Key words: kenaf (H. Cannabinus)      retting enzymes  
hydrolytic products

## 主要参考文献

- [1] 张木祥等.麻类作物副产物综合利用概述, 中国麻作, 1990, 12 (4) : 36-39.
- [2] Neto C.P,et al.Chemical Composition Structural Features of the Macromolecular Components of H.cannabivus Grown in Portugal.Industrial Crops and Products,1996(5):189-196.
- [3] Xie L.S,et al.Sugar Components in Hemicellulose of Cotton Stalk and Kenaf.Cell.Chem Technol,1988,22:399-403.
- [4] DAS N.N,et al.lignin-Xylan Ester Linkage in Mesta Fiber(Hibiscus cannabivus).Carbohydrate Research,1984,29:197-207.
- [5] 江均平.木聚糖酶的研究进展及应用前景.生物化学与分子生物学动向,1995,1(1):45-47.
- [6] 彭源德等.红麻天然水浸过程中微生物群体、可溶性有机物总量和PH值测定.中国麻作,1996,18(4):33-35.
- [7] 胡立勇.中国的黄麻红麻沤洗现状及技术改进.华中农业大学学报,1995,14(2):198-206.
- [8] 何绍江等.红麻脱胶废水水质分析.华中农业大学学报,1989,8(2):186-188.
- [9] 何绍江等.红麻沤制对水质污染的研究.农业环境保护,9(3):27-29.
- [10] 杨性坤.红麻脱胶研究概述.信阳师范学院学报,1996,9(1):106-108.
- [11] 刘正初等.黄麻红麻陆地湿润技术的推广应用.中国麻作,1995,4:24-26.
- [12] 彭源德等.黄麻红麻陆地湿润技术的污染分析.中国麻作,1994,16(4):25-28.
- [13] 孙庆祥.麻类作物的微生物脱胶(综述).中国麻作,1981(1):38-41,26.
- [14] 凌代文.厌氧微生物中重要类群研究的新进展.微生物科技信息,1994,21(4):9-11.
- [15] Ali M.M et al.Effect of Vrea on the bacterial flora,acidity and total nitrogen on retting water.Nuclear Sci Appli,1972,6:85-87.
- [16] Ali M.M et al.Influence of leaf,vrea and quality of water on the retting of jute.B.J. Jute Fib.Res,1978(3):69-72.
- [17] Report of the seminar on Development of Retting Practices fou Quality

Improvement of Jute and Kenaf IJO, Dhaka, Bangladesh.

[18] Bashiruzzaman M. et al. The Chemical constituents and molecular weights of cellulose in different parts of Jute. *Fibre J. Textile Res*, 1964(34): 910-911.

[19] 孙庆祥等. 黄麻和红麻微生物脱胶研究III. *中国麻作*, 1991(2): 29-32.

[20] 孙庆祥等. 黄麻和红麻微生物脱胶研究I. *中国麻作*, 1988(3): 1-6.

[21] 范西玉等. 红麻细菌脱胶研究初报(一)(二). *河南农业科学*. 1991(2): 11-12; 1991(3): 8-10.

[22] Baruah P.K et al. Retting by Hiparol and bacteria. *Science and Culture*, 1946(11): 369-373.

[23] Choudhury. S.D. et. al. Pectic enzymes in jute retting. *PAK. J. Sci. Indus. Res*, 1962(5): 272-273.

[24] 杨瑞鹏等. 红麻微生物酶法快速脱胶研究II. *中国麻作*, 1991(4): 38-40, 37.

[25] Ali M.M., 1958. Aerobic bacteria involved in retting of jute *Appli Microbial*, 6: 87-89.

[26] Ali M.M and Rahman A. 1966. Acceleration of jute retting by *Bacillus Cercus*, Certain Chemicals and straw water. *Microbial*, 1: 65-69.

[27] Choudhury S.D and Ali MM. 1962. Pectic enzymes in jute retting *Pak J Sci Indus Res* 5: 272-273.

[28] Hosne Ara et al. Production of biogas from jute retting and retting effluent. *Bangladesh J. Jute and Fib Res*. 1988(13): 65-68.

[29] Report on International Conference on Biogas, Ministry of Energy, DNES, New Delhi VNDARP, PVNE, Republic of India, PP593.

[30] 王宜磊等. 木素生物降解研究进展. *微生物学杂志*, 1998, 18(1) 48-51.

[31] DUCKART L, et al. The Structure of A"Xylan" from Kenaf. *Cellulose Chem, Technol*, 1988, 22: 29-37.

[32] Kirk I.K, et al. Production of Multiple Ligninase by *Phanerochaete Chrysosporium*: Effect of Selected Growth Conditions and use of a Mutant Strain. *Enzyme Microb Technol*, 1986, 8: 27-32.

[33] REID I.D, SEIFERT K.A, Effect of an Atmosphere of Oxygen on

Growth, Respiration, and Lignin Degradation by White-Rot Fungi, CAN. J. BOT, 1982, 60: 252-260.

[34] DAS N.N, et al, Lignin-Xylan Ester Linkage in Mesta Fiber (Hibiscus cannabinus). Carbohydrate Research, 1984, 29: 197-207.

[35] 李云龙等. 微生物技术在农业和环保中的应用. 东北农业大学学报, 1996 (27): 406-413.

[36] 江均平. 木聚糖酶的研究进展及应用前景. 生物化学与分子生物学动向, 1995, 1(1): 45-47.

[37] 江均平等. 海枣曲霉木聚糖酶的纯化及末端序列研究. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(2): 159-163.

[38] 江均平等. 海枣曲霉木聚糖酶降解寡聚木糖的特性. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(3): 287-291.

[39] 刘正初等. 黄麻和红麻脱胶的影响因素研究. 中国农业科学, 1995, 28(3): 28-34.

[40] 任兰. 如何提高红麻沤洗质量. 农林科学试验, 1991(9): 40-41.

[41] 江西麻类科技四十年. 本书编委会, 北京: 中国农业科技出版社.

[42] 李宗道. 麻作的理论与技术, 上海: 上海科技出版社, 1980.

[43] 刘正初等. 黄红麻陆地湿润技术的推广应用. 中国麻作, 1995(4): 24-26.

[44] 国家自然科学基金委员会. 微生物学, 北京: 北京出版社, 1996, 109.

[45] 王红梅等. 两种类型聚半乳糖醛酸酶的提纯及性质. 微生物学报, 1995, 33(5): 346-352.

[46] 张应玖等. 乙醇对聚半乳糖醛酸酶的活力及荧光光谱、CD 光谱的影响. 微生物学通报, 1998, 25(2): 85-87.

[47] 陈惠忠等. 黑曲霉 An-76 木聚糖酶系的酶学研究. 微生物学报, 1991, 31(2): 100-107.

[48] 曾宇成等. 海枣曲霉木聚糖酶的提纯和性质. 微生物学报, 1987, 27(4): 343-349.

[49] Deshpande, V. et al. Biotech. Bioeng, 28: 1832-1837, 1986.

[50] John M. et al. Can. J. Biochem, 1979(57): 125-134.

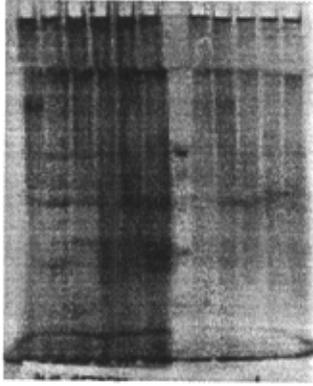
[51] Fourmier, A. et al. Biotechnol. Bioeng, 1985, 27: 539-546.

[52] 彭源德等. 红麻干皮加菌脱胶过程中静置发酵液成分分析. 中国麻作, 1997(3): 34-

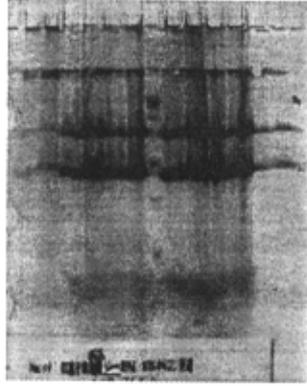
37.

- [53] 冯湘沅等. 红麻干皮加菌振荡脱胶过程中发酵液成分的变化规律. 中国麻作, 1997(4): 39-42.
- [54] 李建武等. 生物化学实验原理和方法. 北京大学出版社, 1997, 174-176.
- [55] 刘德生. 生物化学实验技术和应用(第二版). 武汉大学出版社, 1993, 51-52.
- [56] Somogyi, M. J. *Biol Chem*, 195(1): 19-23, 1952.
- [57] Weber K. and M. Osborn. *J. Biol. Chem*, 244: 4406-4412, 1969.
- [58] 陈尚芹. 环境污染监测. 冶金工业出版社, 1988, 118-120.
- [59] 天津轻工业学院等. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1986. 34.
- [60] Dekker, R. F. H. and G. N. Richards *Adv Carbohydrate Chem. Biochem*, 32: 277-352, 1976
- [61] Woodward, J. *Topics in Enzyme and Fermentation Technology*, 8: 9-30, 1984.
- [62] Hoebler, C and J-M Brillovet. *Carbohydr. Res*, 128: 141-155, 1984.
- [63] Panbargred, W et al. *Agr. Biol Chem*, 47: 957-963, 1983.
- [64] Esteban, R et al. *Can J Microbiol*, 28: 733-739, 1982.
- [65] Rombouts, F. M and W. Pilnik. *Economic Microbiology, Microbial Enzyme and Bioconversions*. (ed. Hose, A. H.), London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 5: 228-272, 1980.

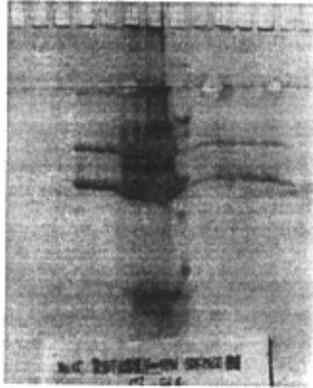
附 录



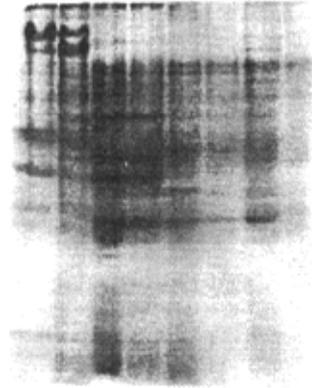
图版1



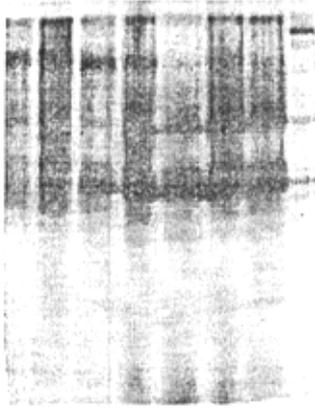
图版2



图版3



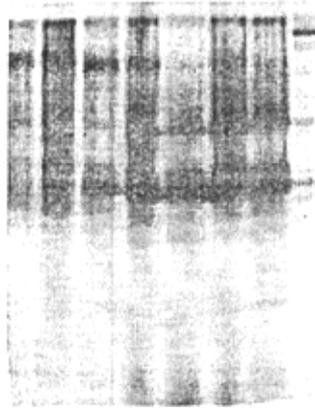
图版4



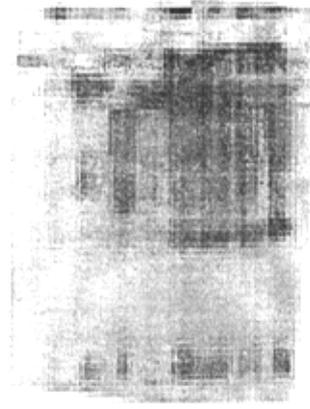
图版5



图版6



图版7



图版8

### 论文评阅人

姓名	工作单位	专业	技术职务
温琼英	湖南农业大学	微生物学	教授
刘伟杰	中国农业科学院麻类研究所	植保	研究员

### 答辩委员会名单

姓名	工作单位	专业	技术职务
罗泽民	湖南农业大学	生理生化	教授、博导
温琼英	湖南农业大学	微生物学	教授
彭克勤	湖南农业大学	生理生化	副教授
熊和平	中国农业科学院麻类研究所	农学	研究员
吴家琴	中国农业科学院麻类研究所	植物病理	研究员