

## 摘 要

木质素酶是通过细胞分泌的胞外氧化酶—木质素降解酶，降解木质素。其中木质素过氧化物酶 (Lip)、锰过氧化物酶 (Mnp) 和漆酶 (Laccase) 是木质素降解酶系的主要组成成分，这些酶类在自然界碳素循环中占有重要地位。由于漆酶在有碳或氮的条件下，由菌体分泌，具有 780mv 氧化还原电位，能把分子氧直接还原为水，在没有  $H_2O_2$  和其他次级代谢产物存在下，可直接催化大量酚类化合物和芳香胺的氧化。据漆酶这特性，我们创造性的试用于苧麻生物脱胶。其方法和结论如下：

研究方案 (本课题分为三大部分)：第一部分高产漆酶菌株的筛选及发酵产酶条件的优化。由于菌株产漆酶条件苛刻，目前国内外没有商品化的漆酶出售。本课题首先采用初筛 (木质素酶平板显色法) 和复筛 (液体发酵培养酶活测试法) 两次筛出最佳产酶菌株—糙皮侧耳菌。然后对该菌进行产酶条件的优化：通过碳源、氮源、温度、pH、溶氧量等单因子实验和相互作用的多因子正交试验，得出了糙皮侧耳菌高效产漆酶的最佳发酵培养条件。第二部分：对粗酶液中漆酶进行分离纯化及其理化性质的研究。本部分采用四步法：超滤浓缩→DEAE-Cellulose 柱层析→SephadexA-50 柱层析→冷冻干燥→PAGE 电泳检测的技术路线，纯化出 PAGE 单一条带的漆酶。并对该酶的理化性质进行研究，以便掌握该酶的性质，使其在苧麻生物脱胶中，显示出更好的脱胶效果。第三部分：应用纯化漆酶对苧麻进行生物脱胶的研究。通过四步法工艺流程：麻样预处理→麻样 60℃ 水浴→麻样 60℃ 硫酸浴→麻样 50℃ 酶液处理，就取得了较好的脱胶效果—木质素去除率达 82%，残胶率降低了 62%。

本课题方案的实施结果：①优化出了糙皮侧耳菌最佳产漆酶的发 酵培养条件 (1L)：麦草粉 20g，酒石酸铵 5.0g，吐温-80 0.1%，藜芦醇 600  $\mu$  l；摇床转速为 128 转/min，温度 30℃，微量元素液 70ml (成分见 p10) ②得出了漆酶分离纯化工艺流程：超滤浓缩→

70ml, pH5.0. ② 得出了漆酶分离纯化工艺流程：超滤浓缩 → DEAE-Cellulose 柱层析 → SephadexA-50 柱层析 → 冷冻干燥，得到纯化 18.1 倍，得率 36% 的漆酶。用 PAGE 检测为单一条带。③ 测出了糙皮侧耳菌漆酶的理化性质：该酶分子量 60.5KD (HPLC)，最适温度为 40℃，最适 pH 为 5.0，金属离子  $K^+$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对酶活有明显促进作用， $Hg^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Ba^{2+}$  等对酶活有明显的抑制作用。④ 漆酶对苧麻生物脱胶四步法工艺：苧麻预处理 → 60℃ 水浴 → 60℃ 酸浴 → 50℃ 酶液处理。结果苧麻木质素去除率达 82%，残胶率降低了 62%。这是首次提出漆酶制剂，在苧麻生物脱胶上的工艺流程，并取得了满意的结果。

本课题的目的和意义：通过我们自己筛选菌株 → 优化该菌高产漆酶的培养条件 → 对培养液（粗酶液中漆酶）的分离纯化，得到纯化漆酶 → 应用于苧麻生物脱胶。这一设计方案实施的成功，产生了两个现实意义：第一为漆酶大量工业化生产提供了现实可行的技术路线，使得大量的、商品化的、低廉漆酶成为可能，为漆酶在工业、农业、医药、食品、卫生等方面的应用奠定了基础；第二纯化漆酶对苧麻进行生物脱胶，探索出了漆酶对苧麻生物脱胶的可行性和技术路线。这与传统化学脱胶中采用对原麻进行强酸浸泡和强碱氢氧化钠高温高压煮练，然后，用强机械打洗除去剩余杂质的原始方法相比：不仅克服了强酸强碱带来的严重环境污染，而且节省了长时间煮练的能源耗费，还减少了强机械打洗带来的纤维表面性能的严重损害，增强了了麻纤维的梳纺加工性能。这对我们苧麻的开发利用和减少环境污染将产生巨大的实用价值和深远意义。

关键词：糙皮侧耳菌 漆酶 分离纯化 木质素 苧麻

## ABSTRACT

Abstract:Ligninase are extracellular enzyme oxide produced by cell,which decomounds lignin. Main components of ligninase include lignin peroxidase、mangnase peroxidase、laccase.These enzymes play important role in circulation of carbon in nature.on the condition of the carbon or nitrogen,the laccase is exudated by fungus and can provide 780mv redox potential and deoxidize oxygen into water.Without being of  $H_2O_2$  and other metabolizations,the laccase catalyses immediately oxidation of lots of phenolic compounds and balmy amic.According as peculiarity of laccase,we creationarily apply it to remove pectin of the nettle.The detailed means and conclusions are as follows:

Studying scheme(including three sections):The first section: selecting the fungus of the most efficient exudated laccase and optimizing condition of producing laccase. Because conditions of fungus producing enzyme are rigorous,at present,sales of laccase aren't real-life at home and overseas.At first,we adopted the first sifting(flat) and the second sifting(testing activity of enzyme).The experiments show pleurotus ostreatus is a fungus of the most efficient produced laccase. Then we optimized condition of eudated laccase by pleurotus ostreatus.Their contents include selecting best of all growth factors.such as:carbon fountain、nitrogen fountain、temperature、pH etc.In order to check further reciprocity of these factors,we tested many factors'effects on activity of ligninase by using orthogonal experimental design.The second section:purification and properties of laccase produced from pleurotus ostreatus.we used the technic process:ultrafiltration → DEAE-Cellulose52 coloum → SephadexA-50 chromatography → freezing and dryness → PAGE electrophoresis.Single ribbon was

obtained by PAGE. After then, we study some properties of the purified laccase, so that the laccase plays better decomposed role in the nettle. Third section: study of biologic coming unglued of the nettle by the purified laccase. The process is following as: preparation of the nettle sample → 60 °C water dipping in the nettle → 60 °C vitriol dipping in the nettle → ligninase decomposing the nettle. The good result of the process was obtained: the lignin of the nettle was decomposed by 82%, then remainder pectin was removed from 39% to 15%.

Result of the experiment: Firstly, optimal condition of producing laccase from *Pleurotus ostreatus* was drawn out: (1L culture) wheat powder 20g, tartaric acid ammonium 5.0g, Tween-80 0.1%, veratric alcohol 600 μl, 128r/min, 30 °C, pH 5.0. Secondly, technical process of purification laccase: ultrafiltration → DEAE-Cellulose 52 → Sephadex A-50 chromatography → freezing and dryness → PAGE electrophoresis. Purification of about 18.1 fold was obtained by PAGE. Thirdly, properties of *Pleurotus ostreatus*: the molecular weight of the purified laccase was determined as about 61.4KD by SDS-PAGE, but the molecular weight of the laccase purified by high performance liquid chromatography was tested for 60.5KD by mass spectrometer. Its optimum pH and temperature for laccase activity were 5 °C, respectively. Various metal ions have different effects on its activity: the activity was enhanced by  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and was strongly limited by  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Ba^{2+}$  etc. The laccase mingling with pectinase in optimum proportion play important role in decomposing nettle. Fourthly, the process of laccase decomposing the nettle: preparation of the nettle sample → 60 °C water dipping → 60 °C vitriol dipping → ligninase decomposing the nettle. 82% lignin was

decomposed by purified laccase and remainder pectins decreased by 62%. We at first brought forward these technic process of purified laccase preparations decomposing the pectin of nettle and achieved satisfactoried result.

The aim and signification of papers:we carried out the technic process(sifting fungus → optimizing condition of fungus producing laccase → separation and purification the laccase → applying the purified laccase to decompose lignin of the nettle) and drew out two important results. Firstly: A great deal of laccase of industrial producing has practical technic process and establish Base of application to industry, agriculture, medication, food stuff and sanitation. Secondly: we explored out technic process that the purified laccase disassemble lignin of the nettle. The old method of removal of pectin with chemistry: The strong vitriol dipping in original hemp → the strong sodium hydroxide cooking hemp with high temperature and high pressure → the instrument beating strongly the hemp in order to remove residual impurity .we compare biological method of removal pectin with traditional removal pectin in chemistry. The latter has many demerits: such as several environmental pollution by the strong vitriol and sodium hydroxide, wasting energy sources, impairing serviously performance of fibre with machine beating. The former boosts up spinning performance of hemp and keep yarns in good state. The laccase decomposing the lignin of the nettle benefits from exploiting application of the nettle and reducing pollution of surroundings, this will produce great value and meaning. Keywords: pleurotus, ostreatus, laccase, separation and purification, lignin, nettle.

## 目 录

### □ 文摘

### □ 英文文摘

### □ 第一章绪论

#### □ 1.1 木质素酶的发展历史及其研究现状

#### □ 1.2 木质素酶对麻生物脱胶的现状及其存在的问题

#### □ 1.3 本课题研究内容（共三部分）

#### □ 1.4 本课题研究的意义及解决的问题

### □ 第二章高产漆酶菌株的筛选和发酵产酶条件优化

#### □ 引言

#### □ 第一节实验材料与仪器

##### □ 1.1 菌种

##### □ 1.2 培养基

##### □ 1.3 试剂

##### □ 1.4 仪器

#### □ 第二节实验方法

##### □ 2.1 初筛菌种

##### □ 2.2 菌种单因子实验

##### □ 2.3 因子 L9(34) 得出最佳发酵产漆酶条件

#### □ 第三节结果与讨论

##### □ 3.1 木质素酶活性的平板实验

##### □ 3.2 标准蛋白曲线的制作和粗酶液蛋白浓度的测定

□ 3.3 木质素酶(包括漆酶、木质素过氧化物酶、赖锰木质素过氧化物酶)酶活测试如下表 2-4 所示

### □ 第三章 糙皮侧耳菌漆酶的分离纯化及部分性质研究

#### □ 引言

#### □ 第一节材料与方方法

##### □ 1.1 菌种与仪器

##### □ 1.2 试剂

##### □ 1.3 培养基

##### □ 1.4 漆酶活性测定

##### □ 1.5 蛋白浓度的测定

##### □ 1.6 粗酶液的制备

##### □ 1.7 漆酶的纯化

##### □ 1.8 电泳

##### □ 1.9 酶学性质的检测

#### □ 2 结果

##### □ 2.1 粗酶液酶活测试

##### □ 2.2 漆酶的分离和纯化

##### □ 2.3 漆酶的酶学性质

□	2.4 讨论	
□	第四章漆酶在荨麻生物脱胶上的应用	
□	引言	
□	第一节材料与方法	
□	1.1 材料与药品	
□	1.2 试验仪器	
□	1.3 荨麻的结构及各化学成分的测试	
□	1.4 漆酶的结构及其降解木质素的机理	
□	1.5 漆酶对荨麻的生物脱胶	
□	1.6 果胶酶对荨麻的处理	
□	第二节结果与讨论	
□	2.1 酶液处理前的荨麻各成分含量的测试结果如下表 4-1	
□	2.2 漆酶对荨麻的降解结果如下表 4-2	
□	2.3 果胶酶对荨麻的降解结果如下	
□	2.4 电镜扫描结果	
□	讨论	
□	第五章结论	
□	致谢	
□	参考文献	
□	附录	
□	学位论文知识产权声明	
□	学位论文独创性声明	

## 第一章 绪 论

### 1.1 木质素酶的发展历史及其研究现状

自然界中,木质素是仅次于纤维素的最为丰富的碳素资源,是一种组成结构复杂的、无规则的、植物生物物质<sup>[1,2]</sup>。这种结构的复杂性和无规则性决定了木质素的难降解性,使得木质素生物降解的研究,成为当今世界生物物质利用和环境污染治理的研究热点。70年代前,木质素的降解主要靠强酸强碱等化学药品来处理,或者通过大量焚烧的方式直接烧掉木质素。这不仅带来严重的环境污染,而且浪费了大量宝贵资源。70年代后,研究木质素生物降解的突破来自于美国的两个独立研究小组,他们分别从黄孢原毛平革菌(*phanerochaete chrysosporium*)中分离纯化出两种依赖  $H_2O_2$  的木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase,简称 Lip)和锰过氧化物酶(mangnase peroxidase,简称 Mnp)<sup>[3]</sup>,它们是木质素降解的关键酶类。从而使木质素酶对木质素生物降解研究掀起了新高潮。*P.chrysosporium* 已成为研究木质素生物降解系统的模式菌<sup>[4]</sup>,其降解系统的形成、降解机制、代谢调控、木质素酶的结构与功能、理化性质、分子生物学等方面都进行了广泛深入的研究,取得了一些成果。但因为 Lip 和 Mnp 两种酶都必须依赖  $H_2O_2$ ,才能启动木质素的降解反应,可  $H_2O_2$  见光极易分解,并且该两种酶的菌株发酵生产效率极低,使得他们的应用受到了限制。

随着八十年代末九十年代初,在日本紫胶漆树(*Rhusvernificera*)的渗出液中,发现了漆酶<sup>[5]</sup>。尤其随着 1976年 Ander 和 Eriksson<sup>[6]</sup>比较了能产生漆酶菌株和不能产生漆酶的黄孢原毛平革菌株(产 Mnp 和 Lip 两种酶)对桦木木质素降解能力的差异,发现了能产生漆酶的菌株比黄孢原毛平革菌株降解木质素的能力强很多,进一步证实了漆酶在木质素降解中的重要作用。漆酶的发现,引起国内外极端关注。漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,广泛分布于自然界,已在植物,真菌、昆虫以及细菌体内发现,可在

碳或氮存在条件下由菌体分泌<sup>[7,8,9]</sup>，同时，更重要的是漆酶具有780mv氧化还原电位，能把分子氧直接还原为水，在没有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和其他次级代谢产物存在下，可直接氧化底物<sup>[10]</sup>。因此，漆酶与其他两种主要木质素降解酶相比，降解木质素工艺流程简单，不需要H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和其他次级代谢产物的参与。克服了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>极易分解的难题，具有更大的实际应用价值。并且漆酶可催化大量酚类化合物和芳香胺的氧化，而且在还原介体物质存在下，漆酶的底物可进一步扩大<sup>[11,12]</sup>。由于这一特点，目前漆酶已尝试地用于造纸木质素的处理、含酚工业废水的处理、纺织染料废水的处理、环境中PAHS的降解、杀虫剂和农药的降解等。近年来，国内外约有20种不同来源的漆酶得到纯化<sup>[13]</sup>，并对其理化性质进行研究，越来越多的漆酶基因被克隆和表达<sup>[14,15]</sup>，使得漆酶应用也取得一些突破性成果和显著的成就。但由于不同菌体产酶的条件和所产漆酶的性质各不相同。比如肖亚中，施蕴渝等人研究的蜜环菌胞外漆酶分子量为58KD, PI为4.0, 最适pH为5.6; 而朱启忠，王宜磊等人研究的毛栓菌胞外漆酶分子量为65KD, 最适pH为6.0。并且各种菌容易受碳源、氮源、温度、pH、溶氧量等菌体生长因素影响<sup>[16]</sup>，所以产酶的种类和数量差异非常大。目前国内外正在进行大量的研究：筛选出最佳产漆酶菌株，以及从固态发酵培养菌株出发，研究其最佳产酶条件；或者对纯化的某种漆酶基因进行克隆和表达，还处在实验室的科研研究阶段。不能得到大量的漆酶制剂，这严重制约着漆酶的应用。这是国内外急需解决的问题之一。尤其我们麻植物的生物脱胶，更是翘日以待应用漆酶和果胶复合酶来降解麻中胶质，以便开发出更多优良的麻纤维，缓解我们麻资源的不足，同时减少化学脱胶带来的对环境和麻纤维的严重危害，为绿色环保和资源充分利用作出贡献。

## 1.2 木质素酶对麻生物脱胶的现状及其存在的问题

据漆酶具有降解木质素这一特性，国内外有相应报道应用微生物脱胶法，处理麻纤维中的木质素、果胶、半纤维素等三种主要胶

质。微生物脱胶可以分为细菌脱胶和粗酶法脱胶两大类<sup>[17]</sup>。细菌脱胶是把细菌进行迅速繁殖培养，然后将其接种在生的麻植物上，在适宜的环境条件下，让细菌大量繁殖，在细菌繁殖生长过程中，细菌为了获取能量物质，分泌酶液来分解胶质，将果胶和半纤维素等大分子分解为小分子而溶于水中，最后实现纤维的相互分离，这就是通常所说的“以胶养菌，以菌脱胶”的方法。与细菌脱胶处理方式极为相似的还有真菌脱胶，主要使用霉菌，将霉菌接种在生的麻植物上，让其繁殖，分解胶质<sup>[18, 19, 20, 21]</sup>。

另一种粗酶液脱胶：是把主要产果胶酶、半纤维素酶和木质素酶的微生物，在培养基溶液下发酵培养一段时间，用微生物产生的粗酶液，来浸渍生麻植物，催化水解胶质，实现纤维的分离。

细菌脱胶与粗酶法脱胶，均存在一个明显的不足：细菌脱胶是直接培养好的细菌接种在麻植物上，让细菌在生的麻植物上繁殖，分解胶质；粗酶液脱胶法是用真菌培养后的代谢产物，即粗酶液来浸渍生的麻植物，让生物酶来催化水解胶质。这两种脱胶方式中，均会有纤维素酶和其他杂蛋白酶产生，这不仅会加速降解纤维素，而且各种混活酶及杂蛋白的存在也将影响木质素酶降解木质素的酶活性<sup>[22]</sup>。这种负面影响不可忽视。目前国内进行的生物脱胶主要按以上两种方法开展的。如刘晓兰，周春霞等人《亚麻脱胶新工艺的初步研究》及孙刚，张健飞等人的《亚麻粗纱及植物生物酶精炼探讨》等文章都是让麻随着菌株一起发酵，让菌分泌漆酶、果胶酶、半纤维素酶等混活酶液降解麻中胶质。这不仅无法控制纤维素酶对纤维素的催化降解，而且无法消除其他酶对漆酶等木质素酶的抑制作用，使得脱胶效率极低。况且这与工业化大生产应用菌株对麻进行生物脱胶有相当长的距离。

### 1.3 本课题研究内容（共三部分）

第一部分 研究高产漆酶菌株的筛选及发酵产酶条件的优化。本课题首先采用初筛（木质素酶平板显色法）和复筛（液体发酵培

养酶活测试法) 两次筛出最佳产酶菌株—糙皮侧耳菌。然后对该菌进行产酶条件的优化: 通过碳源、氮源、温度、pH、溶氧量等单因子实验和相互作用的多因子正交实验, 得出了糙皮侧耳菌高效产漆酶的最佳发酵培养条件: 麦草粉 20g, 酒石酸铵 5.0g, 吐温-80 0.1%, 藜芦醇 600  $\mu$ l; 摇床转速为 128 转/min, 温度 30 $^{\circ}$ C, 微量元素液 70ml, 再加蒸馏水至 1 升, 调 pH5.0.

第二部分: 对粗酶液中漆酶进行分离纯化及其理化性质的研究。本部分采用四步法: 超滤浓缩  $\rightarrow$  DEAE-Cellulose 柱层析  $\rightarrow$  SephadexA-50 柱层析  $\rightarrow$  冷冻干燥  $\rightarrow$  PAGE 电泳检测的技术路线, 纯化出 PAGE 单一条带的漆酶。并对该酶的理化性质进行研究, 以便掌握该酶的性质, 使其在苧麻生物脱胶中, 显示出更好的酶活脱胶效果。

第三部分: 应用纯化漆酶对苧麻进行生物脱胶的研究。通过四步法工艺流程: 麻样预处理  $\rightarrow$  麻样 60 $^{\circ}$ C 水浴  $\rightarrow$  麻样 60 $^{\circ}$ C 硫酸浴  $\rightarrow$  麻样 50 $^{\circ}$ C 酶液处理, 就取得了较好的脱胶效果—木质素去除率达 82%, 残胶率降低了 62% 好成绩。

#### 1.4 本课题研究的意义及解决的问题

通过这次课题设计的完成, 一方面不仅筛出了高效产漆酶的菌株——糙皮侧耳菌, 而且优化出了该菌株高效产酶的最佳发酵条件及其分离纯化的工艺条件, 并获得了色谱纯的漆酶蛋白粉末。这为漆酶大量化、商品化的生产提供了可行的技术基础和现实条件。解决了由于买不到漆酶, 而使漆酶在工业、农业、食品、卫生等方面的应用受到限制的难题; 另一方面: 此课题为麻类摆脱传统的化学脱胶而实现低廉的、环保的、生物脱胶创造了现实基础。此课题据漆酶和果胶酶理化性质的相近性, 把纯化的漆酶和果胶酶按 1: 1 比例混活降解野生苧麻的胶质。实验表明, 温和条件下一次复合酶液浸解, 能够取代常规加温硫酸浸泡和一次高温高压碱煮对木质素的去除, 并且纤维损伤减小。这种酶粉剂脱胶工艺灵活, 可以添加多重有意的理化性质相近的辅助酶制剂, 并可多次酶液浸渍, 实现

全酶法脱胶。并且脱胶后麻植物纤维的质量包括纤维品质、脱胶后的制成率、精干麻和精梳麻条的档次都有较大的提高。既克服了前面微生物脱胶法对麻纤维的损失和大量生产的不现实性。也克服了传统化学脱胶需要耗费大量化工原料，在高温高压条件下，保持比较长的煮练时间，能源消耗大，脱胶废液严重污染环境，脱胶生产成本高，工艺流程长，煮练劳动强度大，劳动条件差等缺点，化学煮练过程，对麻纤维的性能和结构，尤其是纤维的表面性能造成了严重损害的缺点。通过漆酶对野生麻——苧麻的生物脱胶显示：胶质脱除彻底，均匀，精干麻制成率高，纤维抱合力好，大大提高了纤维的梳纺加工性能，成纱质量比较好，织物手感柔软，服用无刺痒，保持了麻天然植物纤维的自然风格和特性<sup>[23, 24, 25]</sup>。这不仅有利于野生麻的开发利用，缓解麻资源的严重不足，提高了麻纤维的利用率，创造了国民经济价值；同时为生物脱胶取代传统化学脱胶的实现，创造了现实基础，也为环境保护作出了杰出贡献。

## 第二章

### 高产漆酶菌株的筛选和发酵产酶条件优化

引言：本部分通过对 30 种菌株进行 GU-PDA 平板显色和木材降解试验，初筛选出 3 个高效降解木质素的菌株（4# 糙皮侧耳菌、21# 彩绒革盖菌、27# 凤尾平菇），以及不产漆酶的 28# 黄孢原毛平革菌对照菌株；然后对 4 个菌株进行液体发酵复筛，通过酶活测试选出最佳产木质素酶（木质素酶包括漆酶、赖锰木质素过氧化物酶、木质素过氧化物酶）的菌株糙皮侧耳菌。再优化糙皮侧耳菌发酵产漆酶的条件，得出该菌株产漆酶的最佳产酶条件。

#### 第一节 实验材料与仪器

##### 1.1 菌种

黄孢原毛平革菌(5.776), 凤尾平菇(5.185), 彩绒革盖菌(5.48), 糙皮侧耳菌(5.42) 等三十种, 购于中国科学院微生物所菌种保藏中心。

##### 1.2 培养基

###### 1.2.1 (PDA) 马铃薯培养基 (培养真菌用)

马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 15-20g, 水 1000ml, pH 自然。(马铃薯去皮后, 切成块煮沸 30min, 然后用四层纱布过滤, 再加葡萄糖及琼脂, 融化后补足水至 1000ml, 在 121℃ 灭菌 30min。)

###### 1.2.2 (CPDA) 综合马铃薯固体培养基 (1L)

马铃薯 200g, 葡萄糖 20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4$  1.5g,  $\text{VB}_1$  2mg, 琼脂 15g.

###### 1.2.3 液体培养基

马铃薯 200g, 葡萄糖 20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4$  1.5g,  $\text{VB}_1$  2mg, 加入 0.5% 的酵母膏, 70ml 微量元素溶液, 调 pH4.8。每升微量元素液含氨基乙酸 0.6g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{NaCl}$  1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.56g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1g,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{HBO}_3$  10mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01g, 调 pH4.5。

### 1.3 试剂

美国 Sigma 公司的藜芦醇 (HV)、ABTS(2,2'-连氮-3-乙苯-二噻唑-6 硫酸盐), 华美生物公司的牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250, 上海生化试剂公司的愈疮木酚等, 及国产生化试剂和国产分析纯化学试剂。

### 1.4 仪器

隔水式电热恒温培养箱 PYX-DHS-40\*50 400W (上海跃进医疗器械厂生产); CRDX-280 不锈钢电热手提式灭菌消毒器 (上海申安医疗器械厂生产); YJ-1450 医用净化工作台 (苏州净化设备厂生产); 恒温摇床; 美国 BECKMAN J2-MC 高速冷冻离心机; BECKMAN DU640 紫外分光光度计; 匡华快速混匀器 (中外合资深圳天南海北有限公司生产); 电动植物粉碎机 DWF-100 (黄骅市科研器械厂生产); 精密分析电子天平 (感量万分之一克); 长岭冰箱 BCD-228B 型; LSY 型电热恒温水浴锅 (北京医疗设备厂生产); PHS-25 型数显酸度计 (上海精密科学仪器有限公司生产)。CS101-2 型电热鼓风干燥箱, 中华人民共和国重庆实验设备厂生产。

## 第二节 实验方法

### 2.1 初筛菌种

#### 2.1.1 木质素酶活性的平板试验

0.01% 愈创木酚 (GU), 加到土豆培养基 (PDA) 中, 分别接上述不同菌株, 于 28℃ 培养六天, 比较其变色圈的大小。

#### 2.1.2 Klason 木质素和酸溶木质素分析

分别按国际造纸原料木质素含量的测定 (GB2677.8-81) 及国际造纸原料和纸浆中酸溶木质素的测定法 (GB10337-89) 进行测定。

#### 2.1.3 木材降解试验和选择性指数分析<sup>[27]</sup>

取 1g 绝干脱脂杨木粉和 2.5ml 蒸馏水, 加入 50ml 三角瓶中, 在 0.1Mpa 压力下灭菌 30min 后, 分别接种上述菌株, 经 28℃ 下培养 30 天后测其失重、klason 木质素、酸溶木素, 分析其降解能力。

不同菌株的选择性指数 (SI) 由下列公式求得:  $SI = \frac{\text{综纤维素}}{\text{木质素}}$

含量 / klason 木质素含量 (其中综纤维素含量 = 样品的绝干重 - (klason 木质素 + 酸溶木质素含量))。

#### 2.1.4 用液体培养基复筛出优良菌种<sup>[28]</sup>

对初筛出的高效菌株, 再用液体培养基进一步复筛: 把高效菌无菌操作接种到上述综合培养基 CPDA 中, 在 28℃ 培养箱里培养六天, 取三块直径 10mm 左右的菌塞, 接种到液体培养基里发酵培养。培养条件为: 摇床转速为 130 转/min, 30℃ 发酵培养 6-7 天, 进行酶活测试。

#### 2.1.5 酶活测试

将摇床培养 6-7 天的发酵液, 用四层纱布过滤, 再将滤液在 0℃, 6000 转/min 的 Beckman 离心机上离心 30min, 上清液便为粗酶液。

漆酶酶活测试: 按照 Robert Bourbonnais<sup>[29]</sup> 等人方法略有改动。根据该酶氧化 ABTS 的速度决定的, 反应在 25℃ 下进行。在总反应 3ml 中, 2ml 含有 0.5mmol/l ABTS 的 0.1mol/l 醋酸钠缓冲液 (pH5.0), 添加 1ml 酶液启动反应, 在 420nm 下测定吸光值的变化, 酶的单位定义为每分钟内催化 1 $\mu$ mol ABTS 氧化所需的酶液 ( $\epsilon = 63000\text{L/mol}\cdot\text{cm}$ )。

赖锰木质素过氧化物酶酶活测试: 按 Michael H Gold<sup>[30]</sup> 等人方法进行。根据该酶在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下, 把  $\text{Mn}^{2+}$  氧化为  $\text{Mn}^{3+}$  的速度来决定。在总反应体积 1ml 中, 含有 0.85ml 0.11mol/l 的乳酸钠缓冲液 (pH4.5), 0.025ml 40mmol/l 的硫酸锰和 0.1ml 的酶液。反应在 37℃ 下进行, 预热至 37℃ 后, 添加 0.025ml, 1.6mmol/l 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应, 在 240nm 下测定吸光值的变化率。酶的单位定义为每分钟吸光值增加 0.1 的酶量。

木质素过氧化物酶的测定<sup>[31]</sup>: 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下测定藜芦醇氧化形成的藜芦醛含量。在 2.7ml 反应液 (pH3.0, 80mmol/l 的酒石酸钠缓冲液, 5mmol/l 藜芦醇) 中, 加入 0.3ml 适当稀释酶液 37℃ 反应, 添加 20mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应, 测定 310nm 下  $\Delta D$  (藜芦醛消光系数

$\varepsilon = 9.5 \times 10^3 / \text{m} \cdot \text{cm}$ , 酶单位定义为每分钟氧化形成  $1 \mu \text{mol/l}$  藜芦醛的酶量)。

### 2.1.6 蛋白浓度测试：考马斯亮蓝染色法<sup>[32]</sup>

原理：这一方法基于考马斯亮蓝 G-250 有红、蓝两种不同颜色的形式。在一定浓度的乙醇及酸性条件下，可配成淡红色的溶液，当与蛋白质结合后，产生蓝色化合物，反应迅速而稳定。反应化合物在 465—595nm 处有最大的光吸收值，化合物颜色的深浅与蛋白浓度的高低成正比关系，因此可检测 595nm 的光吸收值的大小计算蛋白的含量。

## 2.2 菌种单因子实验<sup>[33]</sup>

### 2.2.1 碳源试验

用淀粉、麸皮、麦芽糖、木质素、麦草和羧甲基纤维素钠(CMCNa)分别取代液体培养基中的葡萄糖，测试不同碳源在不同时间对发酵产木质素酶的影响。

### 2.2.2 氮源试验

在选定最佳碳源麦草粉的基础上，用酒石酸铵、硫酸铵、硝酸铵、大豆粉、牛肉膏、干酪素，分别取代液体培养基中酵母膏进行发酵培养，测试不同氮源在不同时间对产木质素酶酶活影响。

### 2.2.3 诱导剂

由藜芦醇，ABTS、愈创木酚和吐温-80 等四种不同类型和不同浓度的诱导剂，对产漆酶和赖锰木质素过氧化物酶的酶活影响。

### 2.2.4 温度、pH，溶氧量等

把接种好的液体培养基分别放在不同温度的摇床上发酵培养：26℃，28℃，30℃，32℃，34℃，36℃，测试其酶活；液体培养基的 pH 分别为 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 等测其酶活。因为该菌种的代谢是需氧代谢，溶氧量的多少通过摇床转速调节：110 转/min、115 转/min、120 转/min、125 转/min、130 转/min、135 转/min、140 转/min。

## 2.3 因子 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 得出最佳发酵产漆酶条件<sup>[34]</sup>

我们综合考虑四个主要因素最佳碳源、氮源、温度、pH，在三个不同水平下对产漆酶的影响。设计方案如下表 2-1 所示。

因素 位级	麦草粉 (克)1	酒石酸铵 (克)2	温度℃ 3	PH 4
1	22	7.0	37	4.0
2	18	5.0	30	4.5
3	20	3.5	室温	5.0

### 第三节 结果与讨论

#### 3.1 木质素酶活性的平板实验

一般把 Bavendamm 方法产生的颜色反应，看成主要是微生物分泌的酚氧化酶有关，是筛选木质素分解菌的有效手段。白腐菌变色圈的形式有两种：一种是变色圈在菌丝的外圈形成 ( $mycel/col < 1$ )；另一种是变色圈在菌丝的内圈形成 ( $mycel/col > 1$ )。Pual ander 等试验显示出， $mycel/col$  的比值，可作为判定该圈是否选择性降解木质素的依据。如果比值小于 1，则选择性降解木质素；如果比值大于 1，则纤维素被首先降解。

从我们平板实验中可以看出，28# 黄孢原毛平革菌在平板中无显色现象，说明此菌不分泌酚氧化酶。而其余 29 株菌均有显色现象，但各个菌株分泌的漆酶数量不同，显色的时间也各不相同，菌丝生长旺盛程度也不同。其中糙皮侧耳菌的平板显色效果最好。如图 2-1，图 2-2，图 2-3 所示。

从表 2-2 可以看出 4#、21#、27#、28# 四株菌的选择性指数较高， $mycel/col$  值接近 1，除 28# 菌外（28# 为黄孢原毛平革菌），其余三株菌均是木质素降解率较高，纤维素降解较低。28# 菌无变色圈，说明无漆酶产生，为了进一步筛出高效产酶菌，再对四株菌进行液体发酵培养和酶活测试，复筛出高产漆酶菌株。

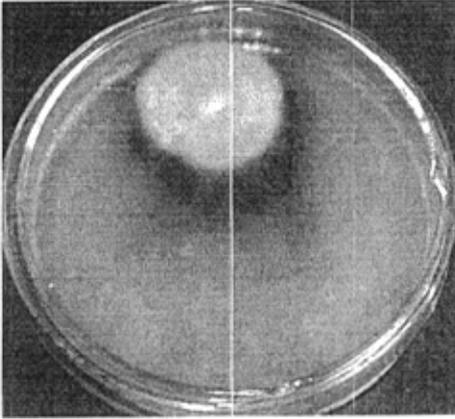


图 2-1 糙皮侧耳菌生长第 3 天

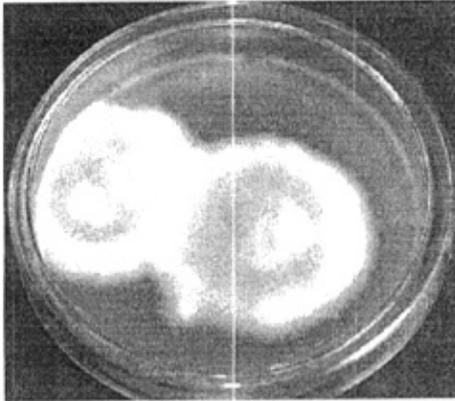


图 2-2 糙皮侧耳菌生长第 5 天

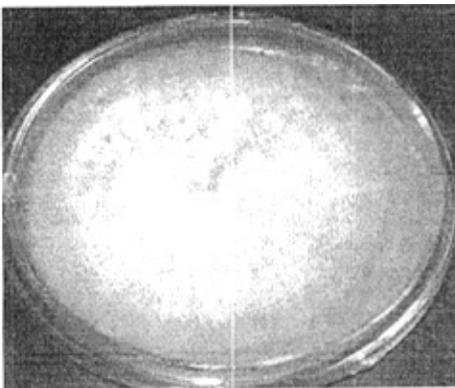


图 2-3 糙皮侧耳菌生长第 7 天

从本实验中还可知，糙皮侧耳菌生长第三天时，显色外圈远远大于菌丝圈，因为此时的菌丝生长不旺盛；但在糙皮侧耳菌生长到第 5 天时，菌丝生长较旺盛，并且菌丝圈中心的显色尤为突出，可能此时菌丝圈中部的酚氧化酶比其边缘多；在生长到第 7 天时，显色圈与菌丝圈的直径比值几乎为 1，而且此时的菌丝生长最旺盛，产酶效果也最佳，显色最明显。具体生长情况如图 2-1，图 2-2，图 2-3 所示。

但从我们试验中得知，变色圈的大小与木质素降解率不是完全的一一对应关系。可能的原因是：菌株中除了酚氧化酶类外，还有某些还原酶，这二种酶相互作用影响变色圈的大小。

表 2-2 不同菌株在 GU-PDA 平板变色反应与杨木粉培养基中降解情况

菌株号	失重 %	平板试验			木质素含量		综纤 纤维素含量 %	Klas on 木质素降解率	综纤 纤维素降解率 %	选择性系数
		菌丝圈 cm	变色圈 cm	Mycel /col	Klason 木质素 %	酸溶木质素 %				
1	19.45	4.2	5.2	0.80	15.30	2.58	63.3	35.0	15.3	4.1
2	19.55	4.5	4.7	0.95	14.62	2.60	65.2	38.1	13.6	4.4
3	17.80	4.1	4.3	0.95	15.13	2.78	64.4	37.8	13.4	4.2
4	19.60	4.5	4.6	0.98	13.25	2.77	66.1	38.2	11.7	4.9
5	18.85	4.4	5.0	0.88	14.55	2.68	65.5	37.5	14.0	4.5
6	13.55	4.3	4.8	0.89	15.20	2.75	63.3	36.5	14.4	4.1
7	15.50	4.4	4.9	0.90	15.50	2.65	65.2	36.6	14.2	4.2
8	14.45	4.2	4.7	0.89	15.60	2.70	64.0	37.0	14.3	4.1
9	13.20	3.9	4.2	0.93	15.60	2.89	63.5	34.0	14.2	4.0
10	14.50	4.2	4.4	0.95	16.5	2.75	64.5	36.0	14.6	3.9
11	15.50	4.2	4.6	0.91	15.30	2.85	64.5	35.6	15.0	4.2
12	15.20	4.3	4.7	0.91	15.00	2.65	63.8	36.4	14.2	4.2
13	16.13	4.6	4.9	0.94	13.50	3.00	57.0	34.0	12.5	4.2
14	14.9	4.3	4.6	0.93	13.20	3.30	53.5	32.0	11.5	4.0
15	15.5	4.3	4.6	0.93	13.80	2.80	55.2	31.0	12.3	4.0
16	13.8	4.2	4.5	0.93	12.80	2.57	52.5	33.0	12.5	4.1
17	12.3	4.1	4.4	0.93	11.90	2.45	50.5	37.0	11.3	4.2
18	14.7	4.3	4.7	0.91	14.20	2.45	60.0	36.9	12.3	4.2
19	15.3	4.5	4.9	0.92	13.59	2.13	57.0	32.3	13.1	4.1
20	16.4	4.7	5.2	0.90	13.30	2.45	57.0	33.5	13.3	4.2
21	17.8	4.5	4.9	0.92	14.50	2.67	68.5	37.7	11.0	4.7
22	13.5	3.8	4.4	0.86	14.00	2.65	53.6	31.9	12.8	3.8

23	12.8	3.3	4.0	0.82	14.58	2.85	56.8	35.6	13.8	3.9
24	15.2	3.9	4.3	0.91	14.45	2.65	59.2	37.2	13.4	4.1
25	16.0	4.0	4.3	0.93	13.80	2.32	61.4	36.5	12.8	4.4
26	15.5	4.3	4.7	0.91	13.60	2.55	55.4	34.5	11.9	4.0
27	18.50	4.7	4.9	0.96	12.90	2.76	59.3	37.0	11.5	4.6
28	18.25	4.6	无	无	13.50	2.31	61.4	26.3	16.9	4.5
29	17.32	4.5	4.7	0.96	14.50	1.98	65.1	37.1	13.3	4.4
30	13.56	3.5	4.0	0.88	13.40	1.99	52.0	30.2	10.0	3.8

### 3.2 标准蛋白曲线的制作和粗酶液蛋白浓度的测定

用微量法定制标准曲线(每组测 3 次), 再据标准曲线确定粗酶液的蛋白浓度。具体做法如下表 2-3 所示。

表 2-3 标准蛋白曲线的制定

试管编号	0	1	2	3	4	5
0. 1mg/ml 标准 1. 蛋白溶液 (ml)	0	0.01	0.03	0.05	0.07	0.09
0.15mol/lNacl	0.10	0.09	0.07	0.05	0.03	0.01
考马斯亮蓝试剂	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
标准蛋白溶液	0.000	0.119	0.280	0.292	0.270	0.345
A595nm 吸收值	0.000	0.185	0.290	0.306	0.352	0.410
	0.000	0.179	0.206	0.220	0.408	0.305
平均吸收值	0.000	0.161	0.258	0.272	0.343	0.353
待测酶	/	0.145	0.217	0.222	0.336	0.497
液的 A595nm	/	0.211	0.207	0.231	0.250	0.522
吸收值	/	0.185	0.197	0.173	0.325	0.485
平均吸收值	/	0.180	0.207	0.218	0.303	0.501

按以上方案, 绘制出标准曲线, 并依据如下步骤确定粗酶液的蛋白浓度。①依据标准曲线, 推断出酶液的蛋白质含量(以酶液吸收值为水平线与标准曲线相交所对应的蛋白量); ②根据酶液各自

的体积计算样品的浓度；③低于标准曲线线性范围的平均值应忽略不计，溶液最终的平均浓度为该酶液的蛋白浓度。蛋白标准曲线和待测酶液的蛋白浓度确定如下图 2-4 其中 A、B、C 三点为待测糙皮侧耳菌酶液在标线上的对应点，其对应蛋白分别为 0.0022mg, 0.00300mg, 0.006130mg 最终蛋白浓度为： $(0.006130/0.07+0.00300/0.05+0.0022/0.03)/3=0.0736(\text{mg/ml})$ 。其余三种菌的蛋白浓度均低于 4# 糙皮侧耳菌的蛋白浓度，分别是 21# 0.0563(mg/ml), 27# 0.0637(mg/ml), 28# 0.0718(mg/ml)。

### 3.3 木质素酶（包括漆酶、木质素过氧化物酶、赖锰木质素过氧化物酶）酶活测试如下表 2-4 所示：

漆酶(Laccase)酶活计算公式为： $10^6 \times V_{\text{总}} \times (\Delta A / \Delta t) / V_{\text{酶}} \times \epsilon = B(\mu / \text{ml})$

木质素过氧化物酶(Lip)酶活计算式： $10^6 \times V_{\text{总}} \times \Delta A / \Delta t / V_{\text{酶}} \times \epsilon = B(\mu / \text{ml})$

赖锰木质素过氧化物酶(MnP)： $10 \Delta A / \Delta t \times \text{酶液稀释倍数} = B(\mu / \text{ml})$

从表 2-4 可以看出，用液体培养基发酵培养四株高效产酶菌株，结果是 4# 菌株（糙皮侧耳菌）产酶效果最好。这与初筛结果 4# 的选择性指数最高吻合。28#（黄孢原毛平革菌）几乎不产生漆酶，与初筛中无变色圈产生一致，并且木质素降解较低，说明漆酶对木质素降解起着重要的促进作用。其中我们可以看出，3 种菌株主要产漆酶，MnP、Lip 两类酶产量甚少。尽管 28# 产 MnP 酶酶活较高，但是从初筛降解情况看，28# 菌对纤维素降解较高，对木质素的降解较低，这与我们的期望相违背。故我们选出产酶最好的 4# 菌株，对它进行产酶条件优化。

2003-12-19 17:55:48

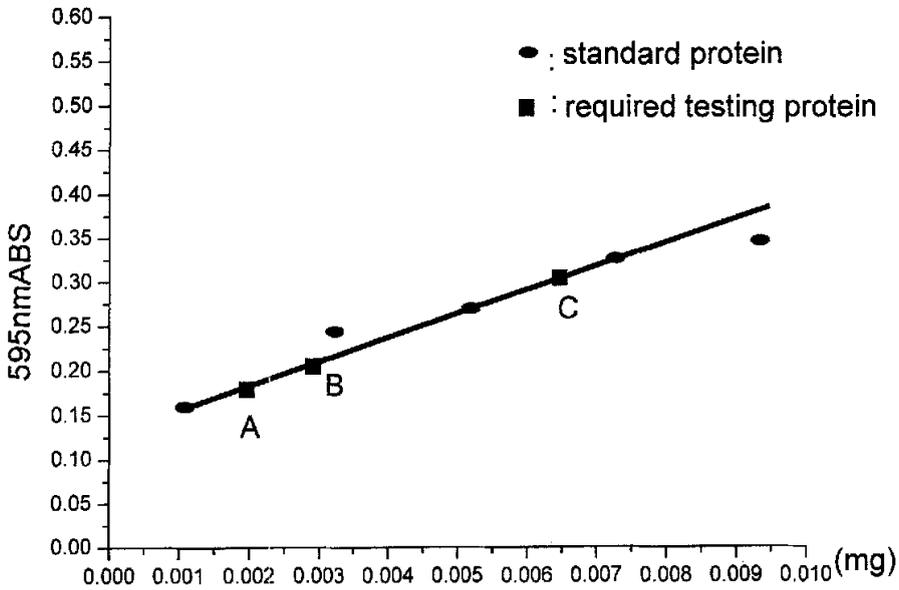


图 2-4 标准蛋白和待测蛋白曲线示意图

表 2-4 四种高效菌株酶活测试结果

酶活 ( $\mu$ /ml)	4#	21#	27#	28#
MnP	0.68	0.50	0.50	1.25
Laccase	2.74	2.36	2.67	0.00
Lip	0.06	0.04	0.05	0.06

### 3.3.1 单因子试验结果

#### 3.3.1.1 不同碳源对 4#菌株产三种木质素酶的影响

从图 2-5 可以看出，各种碳源取代葡萄糖作为碳源，在摇床发酵培养第 7 天，产漆酶酶活达到最高的是麦草粉，并且在连续的两三天里，酶活下降较缓慢，这有利于该酶的应用。其次是木质素、麸皮作碳源，产的漆酶酶活也较高。最低漆酶酶活的碳源是麦芽糖，这与木质素酶是菌种的次级代谢产物有关，该酶在碳源、氮源充足时，几乎不产生。麦芽糖含碳量丰富，产酶少；而天然麦草降解缓慢，使得菌种在饥饿状态下，发生次级代谢，产生大量的漆酶，反

过来也促进了麦草的降解。

不同碳源不同时间对产赖锰木质素过氧化物酶 (MnP) 酶活影响如图 2-6 所示: MnP 酶活最高的是麦草在发酵培养第 7 天左右达高峰, 随后酶活开始降低。其中淀粉为碳源时, 产 MnP 较快, 在第 5 天酶活达最大值, 但酶活下降很快, 不利于酶的应用和保存。其次是麸皮和羧甲基纤维素钠为碳源时, 产 MnP 酶也较好, 但成本均高于麦草粉。

在不同的碳源取代葡萄糖后, 4# (糙皮侧耳菌) 在液体发酵培养中, 产生的木质素过氧化物酶 (Lip) 很少, 几乎为零。这说明该菌主要产漆酶 (Laccase), 其次是少量的赖锰木质素过氧化物酶 (MnP)。

### 3.3.1.2 不同氮源对产木质素酶酶活的影响

以酒石酸铵、硫酸铵、硝酸铵、大豆粉、牛肉膏、干酪素分别取代液体培养基中酵母膏, 作为氮源。从表 2-5 中可以看出, 大豆粉在发酵培养第 5 天漆酶酶活达最高值, 次后在第 9 天酶活降到最低, 然后酶活又开始上升, 至第 11 天达最高值; 酒石酸铵在第 7 天漆酶酶活达最高值, 随后酶活下降较慢。我们从表中明显得出糙皮侧耳菌最佳氮源为酒石酸铵。

以上各种氮源对赖锰木质素酶 (MnP) 酶活影响如表 2-6 所示, 大多数氮源的赖锰木质素过氧化物酶在第 7 天达最高酶活。其中

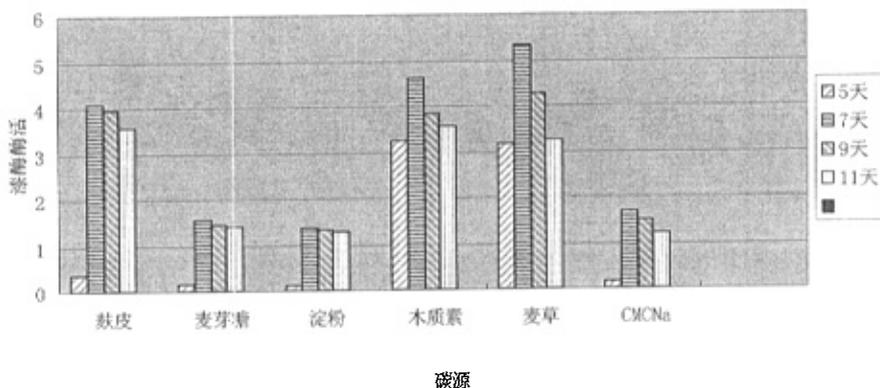


图 2-5 不同碳源对漆酶 (Laccase) 酶活的影响

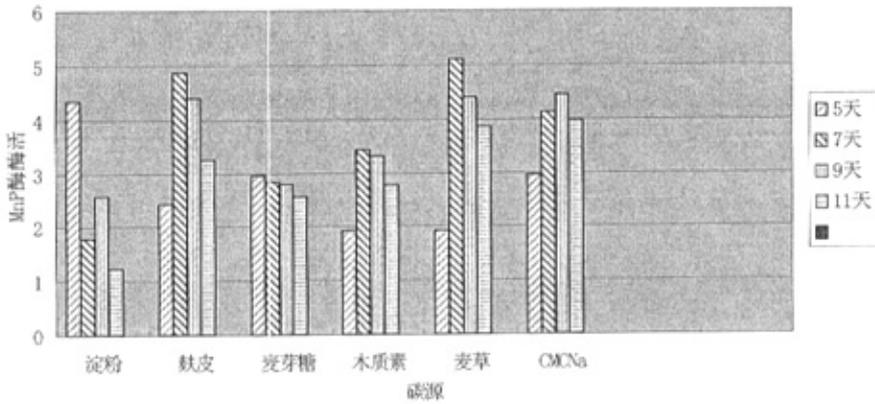


图 2-6 碳源对赖锰木质素过氧化物酶 (MnP) 酶活的影响

表 2-5 不同氮源对漆酶酶活的影响 (酶活单位:  $\mu / ml$ )

氮源	5 天	7 天	9 天	11 天	13 天
酒石酸铵	2.36	6.78	4.28	3.64	2.58
硫酸铵	1.44	2.42	4.76	1.74	1.70
硝酸铵	1.58	2.24	2.43	1.30	1.32
大豆粉	4.54	3.56	0.68	3.06	2.85
牛肉膏	1.72	6.00	2.98	4.38	3.50
干酪素	4.04	2.19	2.68	1.94	1.90

酒石酸铵为氮源的 MnP 酶活最高, 达到  $6.68 \mu / ml$ , 在第 9 天酶活下降较少, 该酶酶活稳定; 大豆粉、硫酸铵在第 7 天 MnP 酶活也较高, 但第 9 天、11 天酶活下降较多, 不利于酶液储存和应用。

表 2-6 不同氮源对赖锰木质素过氧化物酶酶活影响 (酶活单位:  $\mu / ml$ )。

氮源	5 天	7 天	9 天	11 天	13 天
酒石酸铵	3.52	6.68	6.02	5.87	2.68
硫酸铵	0.08	6.12	3.38	2.65	2.55
硝酸铵	0.14	3.71	2.65	1.66	1.59
大豆粉	0.35	6.50	5.50	5.13	4.53
牛肉膏	1.63	5.36	1.63	0.72	1.64
干酪素	0.12	0.34	0.88	1.68	1.55

## 3.3.1.3 不同浓度诱导剂对木质素酶酶活的影响

表 2-7 不同种类诱导剂对产漆酶酶活的影响 (酶活:  $\mu$ /ml)

诱导剂	5 天	7 天	9 天	11 天
空白组	1.58	4.58	4.14	1.35
愈创木酚 0.15%	0.05	0.55	0.50	0.45
愈创木酚 0.2%	0.06	0.65	1.30	0.62
愈创木酚 0.3%	无	无	无	无
藜芦醇 0.2mmol/l	1.55	7.78	4.50	1.65
藜芦醇 0.6mmol/l	0.08	0.65	2.56	0.86
藜芦醇 1.0mmol/l	0.09	0.55	0.67	0.56
藜芦醇 5.0mmol/l	无	0.05	0.08	无
吐温-80 0.1%	1.30	6.65	2.89	2.50
吐温-80 0.15%	1.25	1.98	0.56	0.52
吐温-80 0.25%	0.56	2.05	0.87	0.56
ABTS0.5mmol/l	0.55	0.66	0.52	0.23
ABTS0.7mmol/l	0.54	1.98	0.85	0.45
ABTS1.0mmol/l	无	0.56	0.44	0.35

由表 2-7 可知愈创木酚、ABTS 对产漆酶酶活有抑制作用, 藜芦醇 0.2mmol/l 和吐温-80 0.1% 对漆酶酶活有明显的促进作用。藜芦醇 0.2mmol/l 使酶活提高 1.70 倍, 吐温-80 0.1% 使酶活提高 1.5 倍。

由表 2-8 可以看出愈创木酚、藜芦醇、吐温-80、ABTS 四种类型诱导剂, 在不同浓度和不同含量的情况下, 均使赖锰木质素过氧化物酶的酶活提前达最高峰。但不同诱导剂使赖锰木质素过氧化物酶酶活提高的倍数不同: 愈创木酚 0.2% 使酶活提高了 1.06 倍; 藜芦醇 0.2mmol/l 使赖锰木质素过氧化物酶酶活提高了 1.32 倍, ABTS0.7mmol/l 使酶活提高 1.24 倍。但因为糙皮侧耳菌主要产漆酶和小部分赖锰木质素过氧化物酶, 而愈创木酚和 ABTS 对漆酶有明

显的抑制作用，故综合诱导剂对主要酶漆酶和赖锰木质素酶的促进作用考虑出发，我们选定吐温-80 0.1%和藜芦醇 0.2mmol/l 作为产此两种酶的诱导剂。

表 2-8 不同诱导剂对产赖锰木质素过氧化物酶酶活影响 (酶活:  $\mu$ /ml)

诱导剂	5 天	7 天	9 天	11 天
空白组	1.38	3.16	1.85	1.68
愈创木酚 0.15%	3.26	3.10	2.86	2.67
愈创木酚 0.2%	3.35	3.15	3.10	2.65
愈创木酚 0.3%	2.56	2.24	1.86	1.70
藜芦醇 0.2mmol/l	4.16	2.84	1.15	0.84
藜芦醇 0.6mmol/l	2.26	3.60	2.85	1.52
藜芦醇 1.0mmol/l	2.18	3.36	2.85	1.32
藜芦醇 5.0mmol/l	1.00	1.19	2.15	0.85
吐温-80 0.1%	3.55	2.54	1.98	1.10
吐温-80 0.15%	2.88	2.95	2.32	1.78
吐温-80 0.25%	2.32	2.53	2.33	1.53
ABTS0.5mmol/l	2.76	2.90	2.60	1.23
ABTS0.7mmol/l	3.92	2.10	1.32	1.20
ABTS1.0mmol/l	2.78	2.94	1.35	1.21

#### 3.3.1.4 温度和 pH 及摇床转数对产酶的影响

从图 2-7 中可以看出，在 30℃ 时，漆酶和赖锰木质素过氧化物酶酶活均达最高。

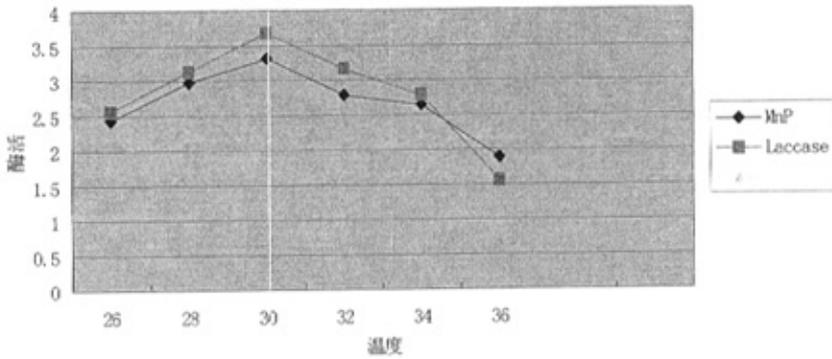


图 2-7 不同发酵温度对两种酶酶活影响

在图 2-8 中不同 pH 的液体培养基，对两种酶活影响很明显。其中 pH4.5 时，MnP 酶酶活最高；pH5.0 时漆酶酶活最高。

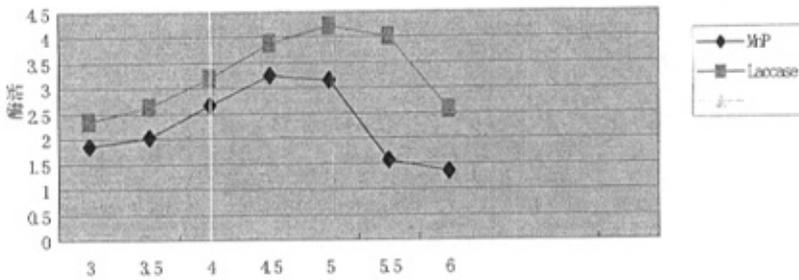


图 2-8 不同 pH 对漆酶和赖锰木质素过氧化物酶的影响

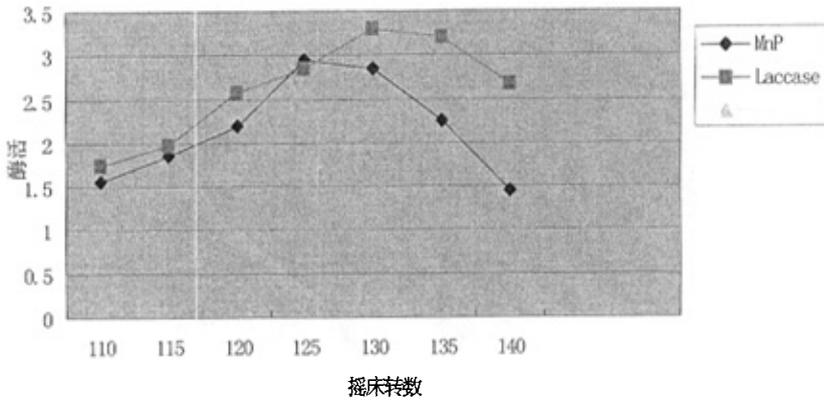


图 2-9 摇床转数（溶氧量）对酶活的影响

由图 2-9 中可知，赖锰木质素酶酶活最高转数为 125 转/min，而漆酶最佳酶活在 130 转/min 测得，综合考虑两种酶酶活的影响，

最佳转速设定为 128 转/min 较佳。

### 3.3.2 多因子正交试验

表 2-9 麦草粉，酒石酸铵，温度，pH 四因素  $L_9(3^4)$  结果如下

因素 列号	麦草 粉 (g)	酒石 酸铵 (g)	温度 ℃	PH	实验结果 酶活 $\mu$ /ml
试验号					
1	22	7.0	室温	4.5	3.28
2	18	7.0	37	4.0	2.85
3	20	7.0	30	5.0	7.45
4	22	5.0	30	4.0	3.45
5	18	5.0	室温	5.0	4.25
6	20	5.0	37	4.5	4.45
7	22	3.5	37	5.0	2.89
8	18	3.5	30	4.5	2.86
9	20	3.5	室温	4.0	2.65
I = 位级 1 之 和	9.62	13.58	10.19	8.95	42.34
II = 位级 2 之 和	9.96	12.15	13.76	10.59	46.46
III = 位级 3 之 和	14.55	8.40	10.18	14.59	47.72
IV = I、II、 III 中最大一 最小	4.93	5.18	3.58	5.64	5.38
效应 D = IV /3	1.64	1.72	1.20	1.88	/

由于考虑到四种主要因素（碳源、氮源、温度、pH 等）对糙皮侧耳菌产漆酶的交互作用，我们采用三因素四水平的设计方案进行

试验，详细结果如表 2-9 所示。从表 2-9 中可知：对漆酶酶活影响最大的是 pH，其次是酒石酸铵和麦草粉，影响最小的是温度。由此可知糙皮侧耳菌产漆酶的最优化条件是麦草粉 20g，酒石酸铵 5.0g，温度 30℃，pH5.0。

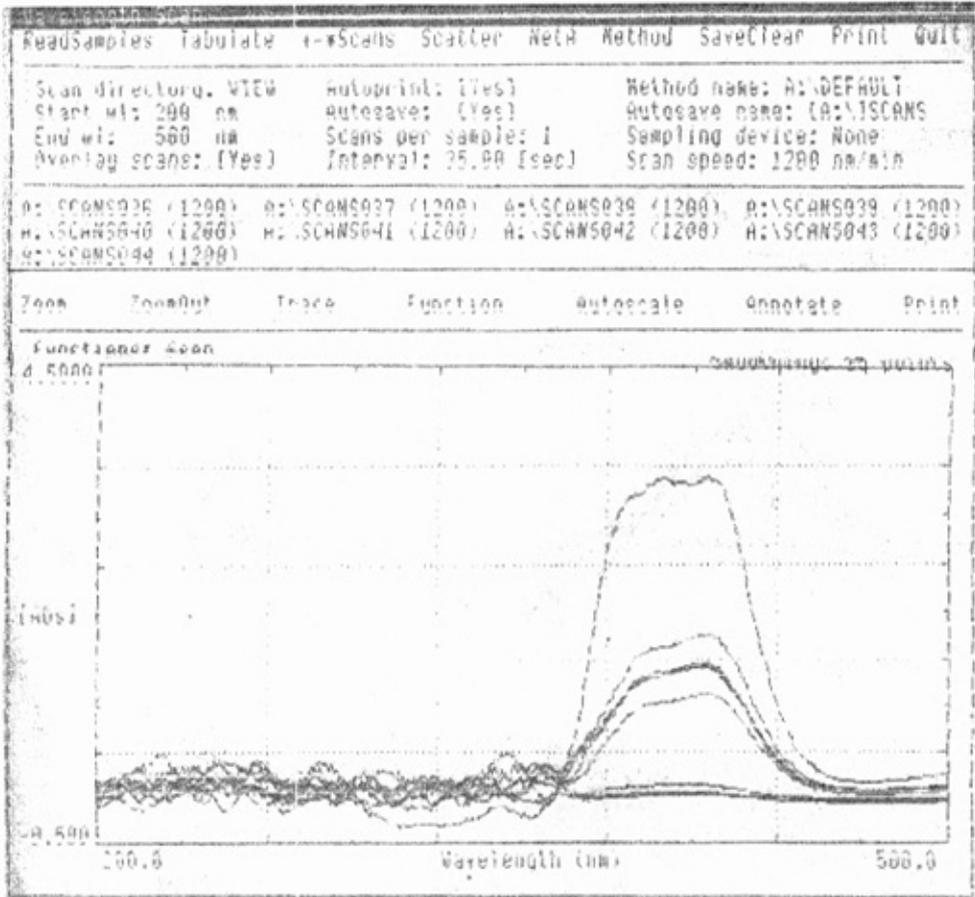


图 2-10 正交实验酶活测试扫描结果

我们再对 9 种试验的粗酶液进行 200nm-500nm 的可见光波长扫描。从图 2-10 扫描的结果可以看出，九种酶液的最大吸收均在 420nm 左右（略有偏差是因为 pH 的影响，导致曲线的漂移），在 310nm 处几乎没有吸收，说明没有 Lip 酶产生；在 240nm 处有很少的吸收，这与前面的酶活测试相一致，该菌主要产漆酶和少量的赖锰木质素过氧化物酶。图中曲线按从上到下的顺序与实验号顺序是：第 3、6、

5、4、1、7、8、2、9相对应。从图 2-10 可以看出，第 3、6、5 三组在 420nm 下有相当高的吸收值，其相应漆酶酶活也达最高。这直观的反应出四种主要因素对漆酶酶活的不同影响。

讨论：①通过 30 个菌株的 GU-PDA 平板显色和木材降解试验，得出糙皮侧耳菌（4#），彩绒革盖菌（21#）和凤尾平菇（27#）等 3 个菌株的 mycel/col 比值接近 1，选择性指数高，首先高效降解木质素，低效降解纤维素，是我们所要的理想菌种；然而黄孢原毛平革菌是对照菌，不产漆酶，无显色圈，并且纤维素首先高效降解，木质素低效降解，说明漆酶对木质素降解起着重要作用。

②对初筛出的四个菌株进行液体发酵培养，酶活测试结果与初筛结果基本一致。其中，4#，21#，27#三个高效菌株主要产漆酶和少量的赖锰木质素过氧化物酶，几乎不产木质素过氧化物酶。28#不产漆酶，主要产赖锰木质素过氧化物酶。

③复筛酶活结果显示出 4# 菌株为最佳产酶菌株。再对该菌进行产酶条件优化（包括产酶单因子和多因子因素的优化）。优化出糙皮侧耳菌高产漆酶培养条件：麦草粉 20g，酒石酸铵 5.0g，pH5.0，吐温-80 0.1%，藜芦醇 600  $\mu$ l；摇床转速为 128 转/min，温度 30℃。

## 第三章

### 糙皮侧耳菌漆酶的分离纯化及部分性质研究

**引言:** 对我们筛选出的最佳产漆酶菌株—糙皮侧耳菌, 产生的漆酶粗酶液, 通过超滤浓缩、DEAE-Cellulose 和 SephadexA-50 纯化, 得到纯化 18.1 倍漆酶, 得率 36%, 用 PAGE 检测为单一条带, 用 SDS-PAGE 证明漆酶的分子量为 61.4KD, 用经过高效液相色谱分离的酶液进行质谱检测漆酶分子量为 60.5KD。该酶最适温度为 40℃, 最适 pH 为 5.0,

金属离子对酶活有很大的影响, 其中  $K^+$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  有明显促进作用,  $Hg^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Ba^{2+}$  等对酶活有明显的抑制作用。

#### 第一节 材料与方 法

##### 1.1 菌种与仪器

糙皮侧耳菌 (购于北京中科院); 主要仪器见附录图 1、2、3。

##### 1.2 试剂

2, 2' - 连氮 - 二 (3 - 乙基苯并噻唑 - 6 - 磺酸) 简称 ABTS、藜芦醇为 Sigma 产品, DEAE-Cellulose 和 SephadexA-50 为 whatman 产品, 牛血清白蛋白, 低分子量标准蛋白为国产, SDS 为进口产品, 其它试剂均为国产分析纯。

##### 1.3 培养基

###### 1.3.1 马铃薯综合培养基 (CPDA)

马铃薯: 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 15g,  $KH_2PO_4$  3g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.1g, VB<sub>1</sub> 2mg. 在 121℃ 灭菌 30 分钟。将此灭菌好的 CPDA 培养基平板接种, 在 28℃ 培养箱里, 培养 6—7 天, 选择生长最好的菌块 (直径 10mm 左右) 三块, 接到灭菌后的液体培养基中, 摇床发酵培养。

###### 1.3.2 液体培养基 (PDY)

马铃薯 (剥皮后) 200g,  $KH_2PO_4$  3g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.1g, VB<sub>1</sub> 0.01g, 酒石酸铵 5g, 麦草粉 20g, 藜芦醇 600 $\mu$ l, 吐温 80 1ml, 70ml 微量元素 (pH5.0)。用 250ml 的三角瓶做 13 个, 每瓶装液 70ml (麦

草粉分装在每个瓶中 1.4g)。121℃ 湿热灭菌 30 分钟。

#### 1.4 漆酶活性测定

按照 Robert Bourbonnais 等人稍作改动方法进行, 是根据该酶氧化 ABTS 的速度决定。反应在 25℃ 下进行, 在总反应 3ml 中, 含有等体积的 0.5mmol/l ABTS 的 0.1mol/l 醋酸钠缓冲液 (pH5.0), 再添加 1ml 酶液启动反应。在 420nm 下测定吸光值的变化。酶的单位定义为每分钟氧化  $1\mu\text{mol}$  ABTS 的酶量。(  $\epsilon = 36000\text{M}^{-1}/\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  )。

#### 1.5 蛋白浓度的测定

用牛血清白蛋白坐标准, 按参考文献进行<sup>[8]</sup>, 用考马斯亮蓝染色法测蛋白浓度。

#### 1.6 粗酶液的制备

接种好菌的液体培养基放在 30℃, 128 转/min 的恒温摇床上培养六天。再将发酵液用四层纱布过滤后, 将滤液在 0℃, 8000r/min 的 Beckman 冷冻离心机上离心 15 分钟, 取其上清液便得粗酶液。(转头型号: J14)

#### 1.7 漆酶的纯化

##### 1.7.1 漆酶的超滤浓缩

将酶液在 4℃ 超滤膜 (Amincon) 上截留 ( $M 1.0 \times 10^4$ ) 浓缩。

##### 1.7.2 DEAE-Cellulose 阴离子柱层析<sup>[35]</sup>

将浓缩后的酶液加到已经平衡好的 DEAE-纤维素柱上 (1.5cmx3.0cm)。先用超纯净水浸泡 DEAE-纤维素 24 小时, 温度为 4℃, 然后用平衡液磷酸钠 0.01M、pH7.1 平衡 DEAE-Cellulose, 4℃, 24 小时, 上柱前用平衡液反复洗柱, 等平衡好后, 先用磷酸钠 (0.01M, PH7.1) 洗脱几分钟后, 再用 0—0.5M NaCl 与磷酸钠溶液进行梯度洗脱。洗脱速度为 18ml/h, 每十分钟收集一管, 测 A280 值, 并测试酶活, 合并有活力的组分。

##### 1.7.3 SephadexA-50 柱层析<sup>[36]</sup>

用上述同样的平衡液平衡层析柱 (1.0cmx2.0cm), 由上述的活力组分经硫酸铵沉淀处理后, 悬浮在 0.01M 磷酸盐缓冲液中, 充分

透析 24 小时，再上柱，用上述磷酸钠平衡液洗脱，合并有活力的组分。

#### 1.7.4 高效液相色谱柱层析（分析型）<sup>[37]</sup>

先用 100% 乙腈冲洗柱（C18 填料粒径为 5 $\mu$ m）1 小时，然后用 50% 乙腈 + 50% 超纯水冲洗 1 小时，最后用水 + 乙腈比为：20：80 平衡 30 分钟。开始加样，泵流速 10.00 $\mu$ l/min，每针一次加样 0.5 $\mu$ l，洗脱液 A 瓶为超纯水 + 1% 醋酸，B 瓶为 1% 醋酸 + 甲醇，混合液中甲醇浓度设置为 40% - 100% 进行梯度洗脱，梯度洗脱时间设置为 25min，收集有峰处进行质谱分子量的测试。

### 1.8 电泳

采用垂直型 PAGE 和 SDS-PAGE 凝胶电泳，前者分离胶浓度为 10%，浓缩胶 3.75% 不连续体系；后者分离胶浓度为 10%，浓缩胶为 3% 不连续体系。电极缓冲液为 pH8.3，配胶比例按照资料进行<sup>[38]</sup>。并用美国 uvp 公司凝胶成像分析系统 GDS-7500 进行分析。

### 1.9 酶学性质的检测

#### 1.9.1 分子量的测定<sup>[39]</sup>

将样品及已知分子量的标准蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，然后以相对迁移率作图，求出漆酶分子量。

#### 1.9.2 温度对漆酶活性及热稳定性的影响<sup>[40]</sup>

在不同温度下按前面酶活测试法测其活力；酶液在不同温度下保温 30 分钟，测其剩余酶活。

#### 1.9.3 pH 对漆酶活性的影响

分别采用不同 pH 值的缓冲液配制底物和稀释酶液，按上述酶活测试法进行。

#### 1.9.4 金属离子对酶活的影响<sup>[41]</sup>

在酶活测试的缓冲液中，加入不同的金属离子，其终浓度为 5mmol/l，然后按上述酶活测试法测试酶活。

## 2 结果

### 2.1 粗酶液酶活测试

以在沸水中煮沸 5 分钟的酶液作对照，当未煮沸的酶液加入到 ABTS 和醋酸钠的缓冲液中，其液体颜色立刻由无色变成浅绿到墨绿色，其颜色变化的快慢是 ABTS 氧化速率的直接反应（也是酶活高低的反应），而对照组始终无颜色变化，始终为无色液体。如图 3-1 为 420nm 酶活测试吸光值的变化图线（由 BACKMAN DU-600 紫外分光光度计测试，按每 0.5 秒记录一个数值）。图 3-2 对粗酶液进行 300nm—500nm 的可见光的波长扫描，420nm 处具有最大吸收值（在 BACKMAN-DU600 上完成）

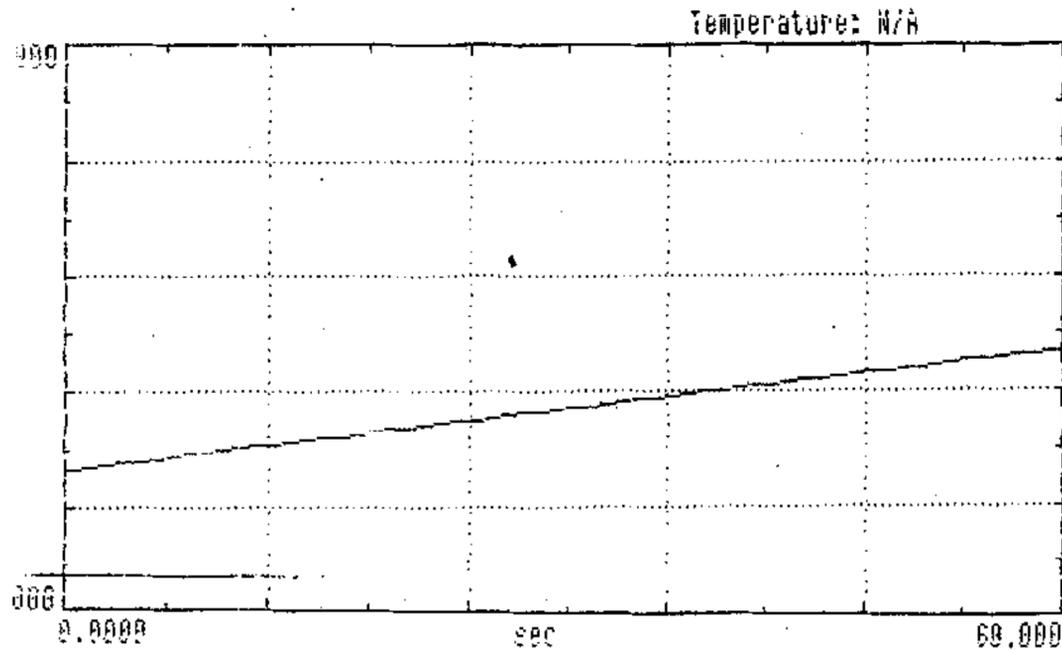


图 3-1 漆酶吸收值的变化曲线 ( $\Delta D/\Delta t$ )

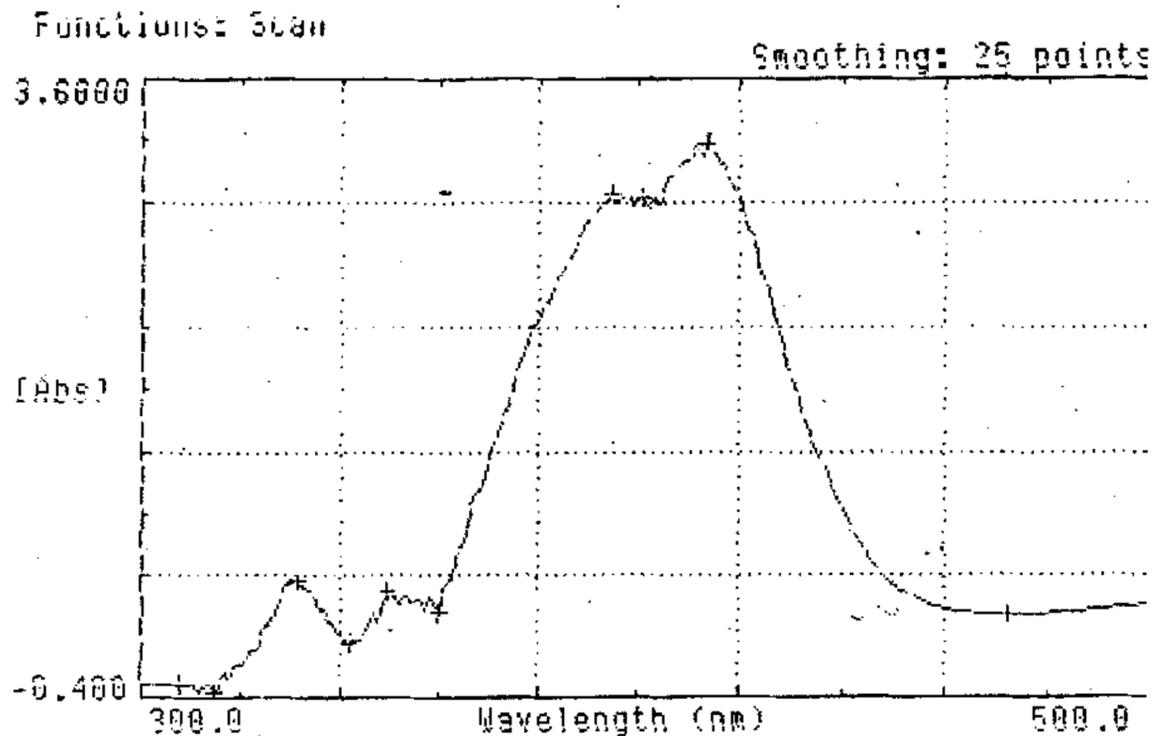


图 3-2 漆酶的波长扫描图

## 2.2 漆酶的分离和纯化

漆酶粗酶液经过超滤浓缩和离子交换层析后，绝大部分杂质已

被除去，整个分离结果见下表 3-1。图 3-3 和图 3-4 分别为 DEAE-纤维素和葡聚糖 A-50 的洗脱曲线。从图 3-3 中可知，尽管蛋白曲线在第 12、第 56 支试管处均有较强的蛋白吸收峰，但第二个峰没有漆酶活性，可能是一些杂蛋白。在图 3-4 中也可见，漆酶很快与其他杂志分离开来，并且聚中在第 12 管左右。在蛋白最大吸收值处，便对应漆酶酶活最大值。再经过 SephdaxeA-50 柱层析后的活性组分被 PAGE 检测为单一条带，表明纯化漆酶为单一组分了。图 3-5 为 PAGE 电泳单一条带图。把纯化到能得单一条带的漆酶液在 -20℃ 冷冻成固态，再放进冷冻真空干燥器干燥，便得到纯化了的漆酶蛋白粉末。分离纯化的结果如表 3-1 所示。

表 3-1 漆酶的纯化结果

Purificat ion process	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (unit/ml )	Special activity (unit/g)	Recovery activity (%)	Purifi cation
Crude extract	430	33.62	3.33	42.5	100	-
Ultrafilt ration	50	28.8	28.5	49.4	99	1.16
DEAE-Cell ulose	24	1.20	25.0	500	41.8	11.7
Sephadex -50 chromatog raphy	24	0.65	22.0	812.3	36.0	18.1

## 2.3 漆酶的酶学性质

### 2.3.1 漆酶分子量的测定

如 SDS-PAGE 图 3-6 所示，得到相对迁移率与漆酶分子量(Mr)

的关系,从而可以得到漆酶分子量(Mr)大约为 61.4KD(在图中从上往下的六条带分子量(Mr)分别为 97.4KD,66.2KD,43KD,31KD,20KD,14.4KD)。但该酶液经高效液相色谱分离后,再进行质谱测试其分子量为 60.5KD.这与其他作者报道的分子量不一致。这可能因为不同的菌产生的漆酶,其性能也不同。图 3-7 为高效液相色谱洗脱曲线图。

### 2.3.2 温度对漆酶酶活的影响

从图 3-8 可以看出,25-40℃之间,随着温度上升,酶活也在升高,40℃达最高,到 75℃酶完全失活。在 50℃保温半小时,酶活仍为原来 75%,说明它是一种比较耐高温的酶,对酶液的保存和降解木质素等应用非常有利。

### 2.3.3 pH 对漆酶酶活的影响

从图 3-9 可以看出 pH4.5-5.0 这一区间,酶活较高,而最适 pH 为 5.0,当 pH 超过 6.0 时,酶活下降非常快,可以得知该酶为弱酸性酶。

### 2.3.4 金属离子对酶活的影响

从表 3-2 中得知金属离子对漆酶酶活起着重要作用,其中  $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $K^{+}$  等具有明显的促进作用, $Hg^{2+}$ 、 $Ag^{+}$ 、 $Ba^{2+}$  等具有抑制作用。这与漆酶活性中心含有铜离子有关,外加铜离子也能促进漆酶的活性。

## 2.4 讨论

白腐菌 *Pleurotus ostreatus*(糙皮侧耳菌)是自然界中最重要木质素降解菌,通过分泌胞外氧化酶-木质素降解酶,降解木质素<sup>[42]</sup>。其中木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶是白腐菌木质素降解酶系的主要组成成分,这些酶类在自然界碳素循环中占有重要地位。由于漆酶可在有碳或氮的情况下由菌体分泌,同时,更重要的是漆酶具有 780mv 氧化还原电位,能把分子氧直接还原为水,在没有  $H_2O_2$  和其他次级代谢产物存在下,可直接氧化底物。因此,漆酶与其他木质素降解酶相比,具有更大的实际应用价值。本试验利用

三步法：DEAE-纤维素柱层析、SephdaexA-50 柱层析便得电泳纯的漆酶，并且该酶纯化倍数和收率均较高。该酶的分子量、最适温度、最适 pH 与其他报道有不同之处，可能因为不同的菌株，产酶性质

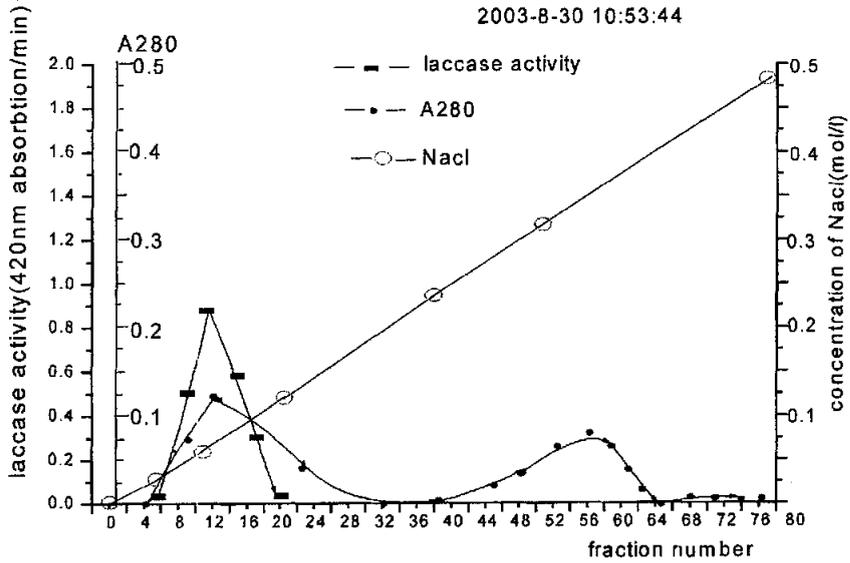


图 3-3 DEAE-纤维素 52 对漆酶的洗脱曲线

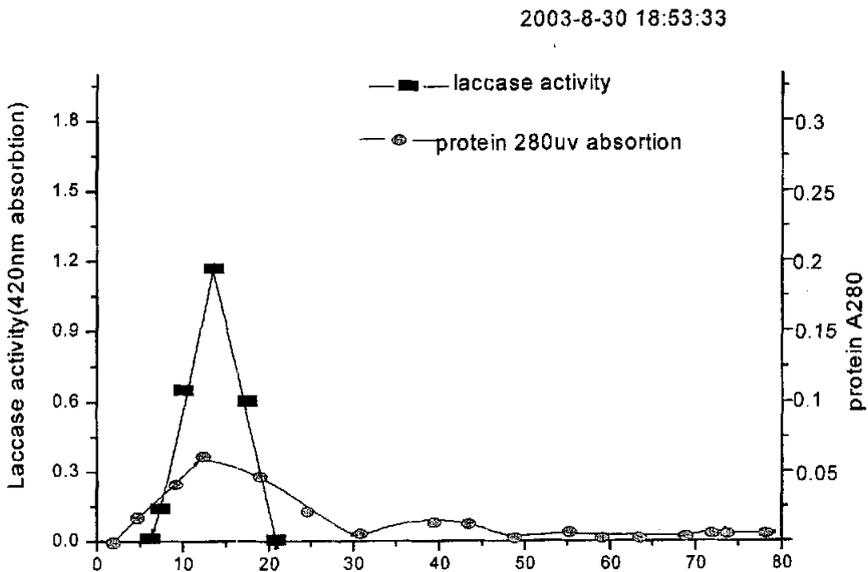
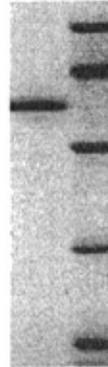


图 3-4 SephdaxeA-50 对漆酶的洗脱曲线



1 纯化漆酶

图 3-5 纯化漆酶 PAGE 电泳

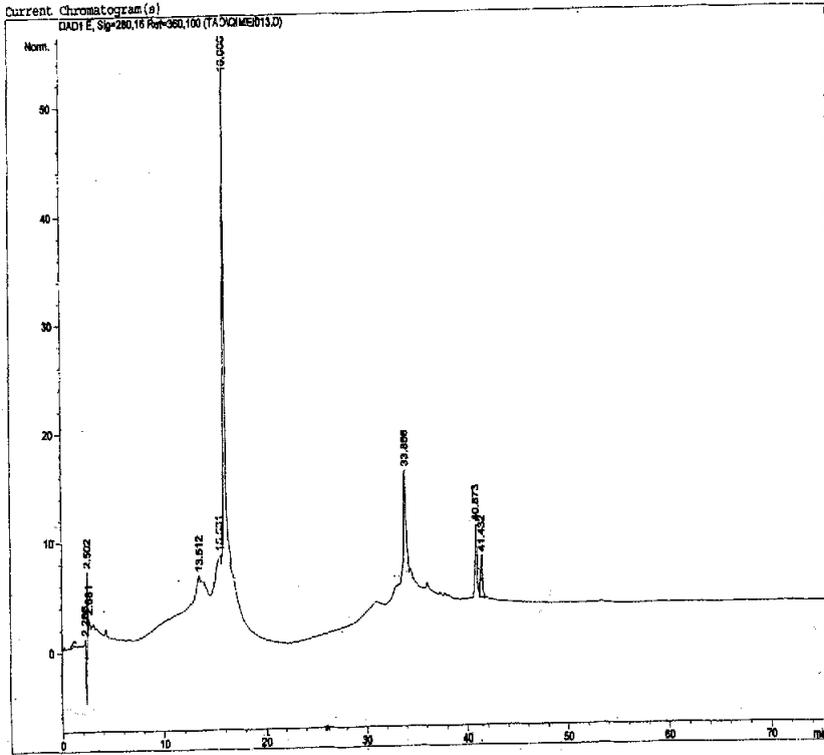


2 漆酶

1 标准蛋白

图 3-6 漆酶的 SDS-PAGE

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



Instrument 2 7/30/2003 9:23:28 PM

Page 1 of 1

图 3-7 漆酶高效液相色谱洗脱曲线图

2003-12-19 11:36:24

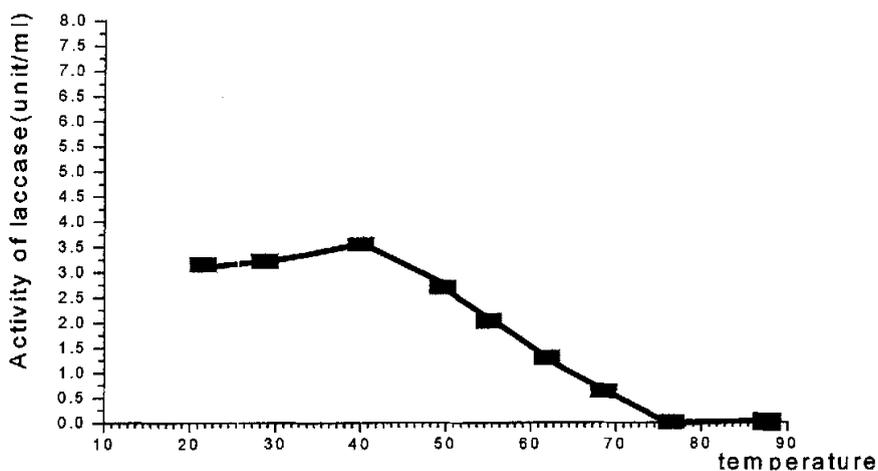


图 3-8 温度对漆酶活力的影响

2003-12-19 11:09:11

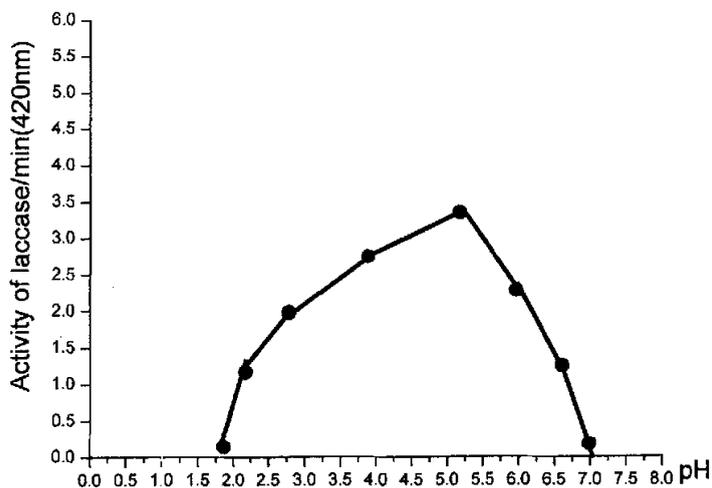


图 3-9 pH 对漆酶活力的影响

不同。通过对漆酶的分离纯化,为该酶在荨麻生物脱胶、造纸木质素的处理、含酚工业废水的处理、纺织染料废水的处理、环境中 PAHS 的降解、杀虫剂和农药的降解等工业应用和进一步的克隆和表达该酶基因的基础研究奠定了坚实的基础。

表 3-2 金属离子对漆酶酶活的影响

Metal ions (5mmol/)	Relativity activity
Control	100
Cu <sup>2+</sup>	112
Mn <sup>2+</sup>	105
K <sup>+</sup>	108.5
Fe <sup>2+</sup>	92.5
Hg <sup>2+</sup>	5
Ag <sup>+</sup>	30
Co <sup>2+</sup>	70
Zn <sup>2+</sup>	85
Na <sup>+</sup>	99
Ba <sup>2+</sup>	50

## 第四章

### 漆酶在苧麻生物脱胶上的应用

引言：本章应用漆酶具有降解木质素的这个性能，对苧麻进行生物脱胶的探索。优化出了简单可行的脱胶工艺条件，取得了较好的脱胶效果—木质素的去除率到达了82%。与化学脱胶相比，不仅残胶率低，而且保持了麻纤维的天然性能，纤维强力损伤较少。

#### 第一节 材料与 方法

##### 1.1 材料与 药品

苧麻购于新疆，漆酶（由我们实验室自己发酵生产、分离纯化所得），果胶酶购于（丹麦），其于药品均为国产分析纯和化学纯。

##### 1.2 试验仪器

脂肪提取器；三角烧瓶；球型冷凝管；有塞三角烧瓶；抽滤瓶；玻璃砂心漏斗；真空干燥器；量筒；精密分析天平（感量千分之一克）；分析天平（感量百分之一克）；电炉（0—1000w）；电热恒温干燥箱；家用电冰箱；电动植物粉碎机 DWF-100，旋转蒸发器；电镜。

##### 1.3 苧麻的结构及各化学成分的测试

###### 1.3.1 苧麻的化学结构<sup>[43,44]</sup>

苧麻 (nettle) 为一种正在开发利用的野生麻。其纤维素含量高达50%左右，具有可纺性和服用性。从化学组成结构上分，大致可以分为脂腊质、水溶物、果胶、半纤维素、纤维素和木质素等组成结构。在麻类作物的韧皮中，除含有纤维素外，还含有一些胶杂质，主要是半纤维素、果胶质和木质素等。这些胶质大都包围在纤维的外表，使纤维胶结在一起而呈坚固的片条状物质，阻碍了纤维素的利用。我们要得到纤维素，首先对苧麻进行脱胶，除去果胶、半纤维素、木质素的网状束缚，才能得到具有实用价值的纤维素。

对于果胶和半纤维素的降解，都有商品化的果胶酶和半纤维素酶促其降解。但至今为止，由于漆酶的发酵条件苛刻，酶的分离纯

化条件不成熟，还处于探索研究的过程。本实验由我们自己优化糙皮侧耳菌发酵产酶的条件，高效产出漆酶并且对该酶进行分离纯化，再将该酶用于降解去除荨麻木质素。

### 1.3.1.1 木质素的结构<sup>[45, 46]</sup>

木质素(lignin)是一种自然界中含量极丰富、结构极复杂的天然芳香高聚物,它的主要功能是通过它的凝聚力把植物纤维粘结起来,给植物组织以强度和硬度,防止过多水分和有害菌类渗入细胞壁。它是由占优势的 $\beta$ -羟基肉桂醇及其两种甲氧基取代物组成的3种结构单元如图4-1所示。重复单元间缺乏规则性和有序性,不同植物中木质素的含量和成分各不相同。木质素的结构单元间通过醚键和碳-碳键连接,连接方式主要有 $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5, 5-5,  $\alpha$ -O-4及 $\beta$ -1等方式,构成了如图4-2所示的木质素结构。

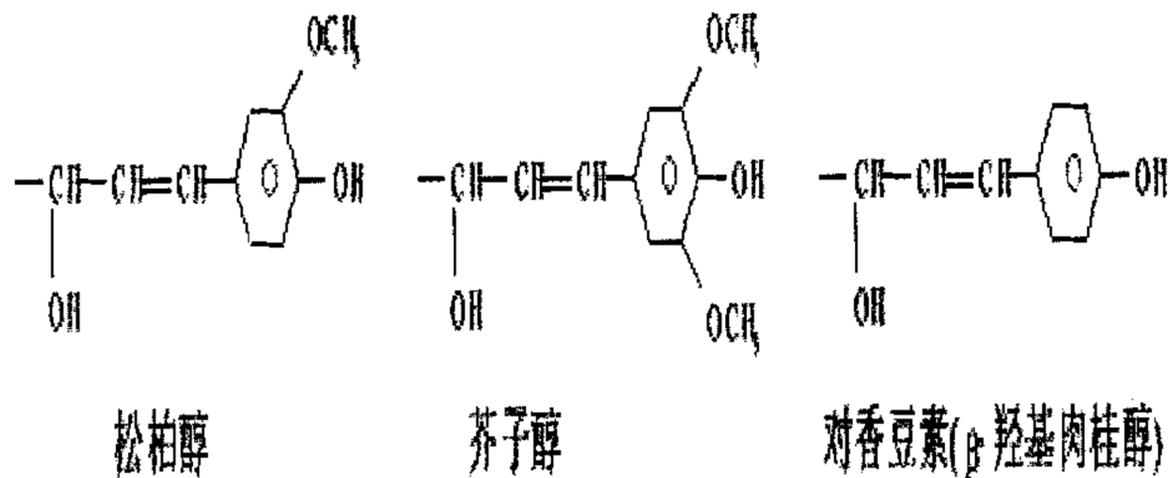


图 4-1 木质素的三种基本结构单元

### 1.3.1.2 果胶的结构<sup>[47]</sup>

果胶存在与荨麻纤维细胞的胞间层和初生壁中,其中胞间层基本上是由果胶物质组成。果胶在苎麻纤维细胞组织中起着粘合的作用,果胶的分解会引起纤维细胞的离散,在化学结构上,果胶质主要是由D-半乳糖醛酸以 $\alpha$ -1,4糖苷键链接形成的支链状的聚合物。在纤维细胞成熟之前,果胶是以原果胶态(水溶性果胶酸)的形式存在,纤维细胞成熟之后,在酶的催化作用下,水溶性果胶酸逐渐变为果胶脂酸且部分呈溶解状态而存在于细胞液中。果胶脂酸

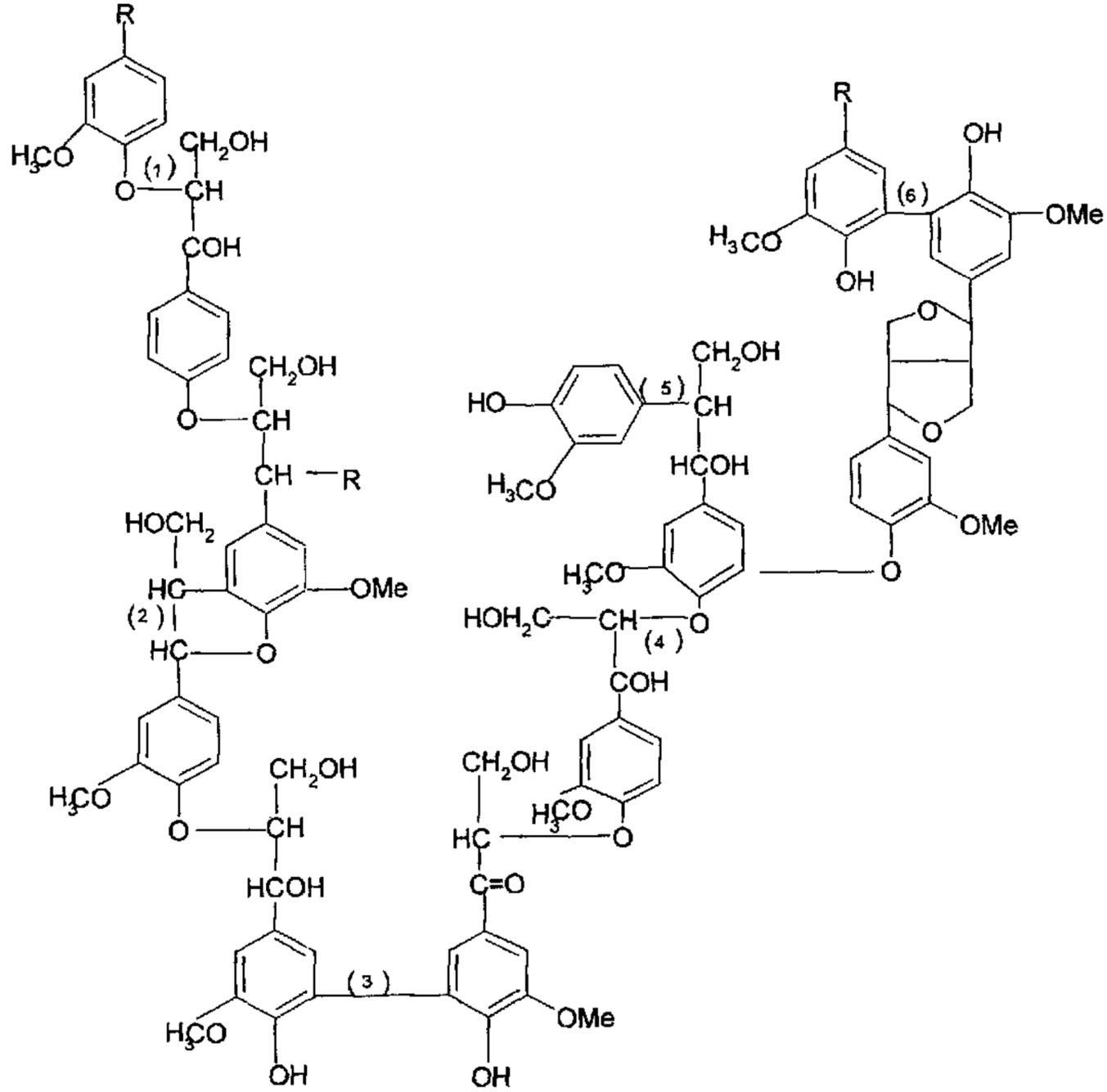


图 4-2 一段木质素结构示意图

是甲基化的多聚半乳糖醛酸，甲氧基含量为 1%的叫果胶酸。在植物生长过程中果胶酸与钙、镁结合形成不溶于水的果胶酸钙、镁盐，这种盐类与果胶脂酸以部分单独、部分混联的形式组合在一起，形成具有网状结构的复合物。去除果胶物质，需要破坏这种网状结构。

### 1.3.1.3 半纤维素的结构<sup>[48,49]</sup>

植物细胞壁的组分除纤维素外，还有大量结构性多糖。其中包括半纤维素 hemicellulose。比较公认的半纤维素的定义由 Whister 提出：高等植物细胞壁中非纤维素也非果胶类物质的多糖。但仍有许多学者主张将与纤维素密切相联系的碱性细胞多糖称为半纤维素的组分。除同质多糖 D 半乳聚糖、D 木聚糖和 D 甘露聚糖之外，多数是由 26 种异质多糖基组成：L 阿拉伯、D 木聚糖、D 葡萄糖醛

酸、D 木聚糖、D 葡萄糖、D 甘露聚糖等。

半纤维素是植物细胞壁中的一种重要的基质多糖，他们与伸展蛋白，其他结构蛋白，壁酶，纤维素和果胶等构成具有一定硬度和弹性的细胞壁，界定细胞的形状，影响细胞，从而最终决定影响整个植物的生长和发育。果胶结构示意图如图 4-3 所示。

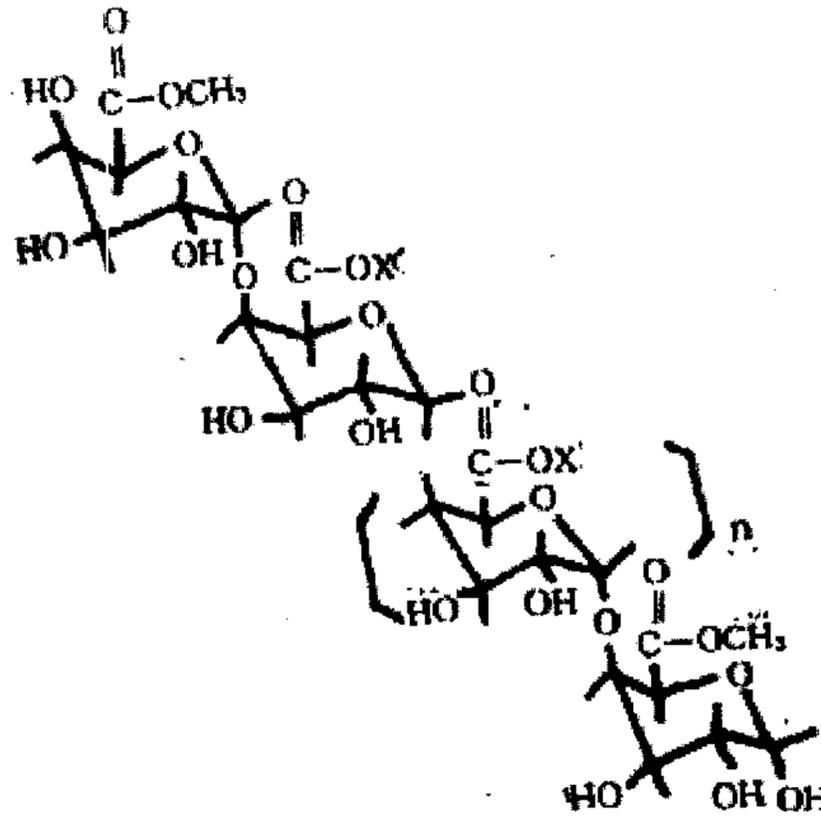


图 4-3 果胶结构示意图

### 1.3.2 苧麻各化学成分的测试<sup>[50,51]</sup>

本次实验中，苧麻的各化学成分测定，完全严格参照《中华人民共和国国家标准·苧麻回潮率、含水率试验方法》GB 5883-86 以及《中华人民共和国国家标准·苧麻化学成分定量分析方法》GB 5889-86 来测试。

#### 1.3.2.1 试样准备及苧麻含水率的测定

将麻样随机分取，作成每个约重 5g 的试样，共 3 个。将试样分别放于已知重量的称量瓶中，并在精密分析天平上精确称重，置于 105℃—110℃ 的电热恒温干燥箱中烘至恒重，取出迅速放入干燥器中冷却 30±5 分钟，分别精确称取试样与称量瓶总重量并记录。按式 (1) 计算：

$$W_0 = (G - G_0) / G * 100\% \quad (1)$$

式中： $W_0$ ----试样的含水率；

$G$ ----试样湿重(克)；

$G_0$ ----试样干重(克)。

### 1.3.2.2 脂蜡质含量

将测过含水率的试样，分别放入脂肪提取器内，试样高度低于溢流口约 10-15mm。烧瓶中加入 150ml 苯乙醇（体积比 2：1）溶液，在恒温下进行提取，控制回流速度为 4-6 次/小时。从提取液开始滴落起计时，提取 3 小时。取出试样，在通风橱内风干。然后放入已知重量的称量瓶中，在 105-110℃ 下烘至恒重（先后两次称量不超过后一次重量的 0.02%。下同）。取出迅速放入干燥器中冷却 30±5 分钟，分别精确称取试样与称量瓶总重量并记录。按式（2）计算：

$$W_1 = G_0 - G_1 / G_0 * 100\% \quad (2)$$

式中  $W_1$ ----试样的脂蜡质含量；

$G_0$ ----试样抽取脂蜡质前（或测含水率后）的干重(克)；

$G_1$ ----试样抽取脂蜡质后的干重(克)。

### 1.3.2.3 水溶物含量

将提取脂蜡质后的试样，分别放入加有 150ml 蒸馏水的三角烧瓶中，装好球型冷凝管，煮沸 1 小时，更换新蒸馏水，重新煮沸 2 小时，取出试样，用布氏漏斗反复抽滤，洗净，直至滤液中颜色无明显变化。放入已知重量的称量瓶中，烘至恒重。取出，迅速放于干燥器中冷却，称重并记录。按式（3）计算：

$$W_2 = G_1 - G_2 / G_0 * 100\% \quad (3)$$

式中： $W_2$ ----试样的水溶物含量；

$G_2$ ----试样提取水溶物之后的干重(克)。

### 1.3.2.4 果胶物质含量

将提取水溶物后的试样，分别放入加有 150ml，浓度为 5g/l 的草酸铵溶液的三角烧瓶中，装好球型冷凝管，煮沸 3 小时。取出，在布氏漏斗中反复抽滤，并用 10% 的氯化钡溶液检测滤液，直至滤液中没有白色雾状沉淀产生。去除滤液，将试样放入已知重量的称

量瓶中，烘至恒重。取出迅速放于干燥器中冷却，称重并记录。按式(4)计算：

$$W_3 = G_2 - G_3 / G_0 * 100\% \quad (4)$$

式中： $W_3$ ----试样的果胶物质含量；

$G_3$ ----试样提取果胶物质之后的干重（克）。

### 1.3.2.5 半纤维素含量

将提取果胶物质后的试样，分别放入加有 150ml，浓度为 20g/l 的氢氧化钠溶液的三角烧瓶中，装好球型冷凝管，煮沸 3.5 小时。取出，在布氏漏斗中反复抽滤，并用 pH 试纸检测，直至滤液的 pH 值为中性。去除滤液，将试样放入已知重量的称量瓶中，烘至恒重。取出迅速放于干燥器中冷却，称重并记录。按式(5)计算：

$$W_4 = G_3 - G_4 / G_0 * 100\% \quad (5)$$

式中： $W_4$ ----试样的半纤维素含量；

$G_4$ ----试样提取半纤维素之后的干重（克）。

### 1.3.2.6 木质素含量

从麻样中，随机选 4-6 个点，取重约 5g 的样品，提取脂蜡质后风干剪碎（长度不超过 1.5mm），称取每个约 1 克的试样，共三个。分别放入已知重量的有塞三角烧瓶中，烘至恒重取出迅速放于干燥器中冷却，称重，记录。而后缓缓加入 30ml 72% 的硫酸溶液。在 8-15℃ 下放置 24 小时。然后，移至三角烧瓶中，用蒸馏水稀释至 300ml，装好球型冷凝管煮沸 1 小时，稍冷，用已知重量的玻璃砂心漏斗反复抽滤，洗涤，直至滤液中不含硫酸根离子为止（用 10% 的氯化钡溶液检测）。取下玻璃砂心漏斗烘至恒重，取出迅速放于冷凝器中冷却，称重并记录。按式(6)计算：

$$W_5 = (G' - G'') / (G_0' - G_0'') * 100\% \quad (6)$$

式中： $W_5$ ----试样的木质素含量（%）；

$G'$ ----试样的木质素与玻璃砂心漏斗总干重（克）；

$G''$ ----玻璃砂心漏斗干重（克）；

$G_0'$ ----试样与有塞三角烧瓶总干重（克）；

$G_0$ -----有塞三角烧瓶干重(克)。

### 1.3.2.7 纤维素含量

根据以上各成分含量的测定值,按式(7)计算

$$W_6 = 100\% - (W_1 + W_2 + W_3 + W_4 + W_5) \quad (7)$$

式中:  $W_3$ -----原麻纤维素含量。

### 1.3.2.8 生苧麻含胶率的定量分析方法

将麻样随机分取,作成每个约重 5g 的试样,共 3 个。分别放入已知重量的称量瓶中,烘至恒重。取出,迅速放于干燥器中冷却,称重并记录。

分别放入加有 150ml,浓度为 20g/l 的氢氧化钠溶液的三角烧瓶中,装好球型冷凝管,煮沸 1 小时,更换新氢氧化钠溶液,重新煮沸 2 小时,取出试样,用布氏漏斗反复抽滤,洗净,并用 pH 试纸检测,直至滤液的 pH 值为中性。去除滤液,将试样放入已知重量的称量瓶中,烘至恒重。取出迅速放于干燥器中冷却,称重并记录。按式(8)计算:

$$W_7 = (G_0 - G') / G_0 * 100\% \quad (8)$$

式中:  $W_7$ -----试样的含胶率, 100%;

$G_0$ -----试样的干重(克);

$G'$ -----测定含胶率之后的试样干重(克)。

## 1.4 漆酶的结构及其降解木质素的机理

### 1.4.1 漆酶的结构

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,广泛分布于自然界,已在植物、真菌、昆虫以及细菌体内发现,其中最主要的产漆酶者是担子菌中的白腐菌类。除柄孢漆酶 1 是四聚体外,其他漆酶一般是由约 500 个氨基酸单一多肽组成,其中含 19 种氨基酸: Asp, Thr, Glu, Ser, Pro, Gly, Ala, Val, Cys, Met, Ile, Leu, Tyr, Gln, Phe, Lys, His, Arg, Try. 在漆树漆酶中碱性氨基酸比酸性氨基酸多 38 个,因而等电点较高 ( $pI = 8.55$ )。漆酶含糖量和种类因来源不同而有所差别。漆树漆酶含氨基己糖,果糖,甘露糖,半乳糖,葡萄糖和

阿拉伯糖，变色多孔菌漆酶含乙酰胺基葡萄糖，甘露糖，半乳糖，木糖，严藻糖等。

漆酶是一类含铜的酶，因为其分子中含糖量很高，故未能生长出适于 X 射线结构分析的晶体。漆酶含有 3 种类型的 Cu (II)，根据光谱和磁学性质可将它分为 3 类：I 型和 II 型各含有一个  $Cu^{2+}$ ，ESR 可探测；III 型为两个 Cu 的反铁磁性偶合体，ESR 探测不出来，能与氧键合。I 型呈蓝色，在 614 nm 处有特征吸收峰，它是电子传递体；II 型非蓝色，无特征吸收峰，既是电子传递体又是催化活性中心；III 型是偶合的离子对，在 330 nm 处有宽的吸收峰。

#### 1.4.2 漆酶对木质素的降解机理<sup>[52]</sup>

漆酶可催化大量酚类化合物和芳香胺的氧化，而且在还原介体物质存在下，漆酶的底物范围还可进一步地扩大。漆酶在氧气的存在下，它能催化苯酚经单电子氧化生成苯氧自由基，最后将四个电子传给  $O_2$ 。图 4-4 中表示的是漆酶催化木质素氧化的典型途径。这些反应包括脱甲氧基，脱羟基，C-C 键断裂等。由于漆酶的催化过程不需要过氧化氢参与，因此它在催化木质素降解时有一定的优越性。经过降解的木质素碎片，溶于水及其他有机溶剂，最终矿化为二氧化碳和水。

#### 1.5 漆酶对苧麻的生物脱胶<sup>[53, 54]</sup>

实验共分四组八份进行，每组两份平行样，四组分别标号为第一组、第二组、第三组及第四组。

第一步麻样的预处理：取生苧麻，手工撕成细丝精确称取 3 克，并装入 8 个干净的 300 毫升锥形瓶中。

第二步麻样的水浴处理：将第一组、第二组和第三组的锥形瓶中各装入 150 毫升蒸馏水，60℃ 水浴保温 2 小时后，洗净，烘干。

第三步麻样的酸浴处理：水浴处理后，将第一组、第二组和第三组的锥形瓶中各装入 30 毫升（浴比为 1:10）浓度为 1g/l 的硫酸，60℃ 水浴保温 1 小时后，洗净，烘干。

第四步麻样的酶液处理：酸浴处理后，将第一组、第二组和第

四组麻样锥形瓶中各装入 90 毫升(浴比为 1:30)的混合酶液(1g/1 漆酶液:1g/1 的果胶酶:醋酸缓冲液=1:1:1),50℃ 水浴保温 3 小时。

处理过后,将四组麻样洗净,烘干,按照前面讲述的方法测麻样的化学成分组成。再分别测第一、二、三、四组的各成分含量。

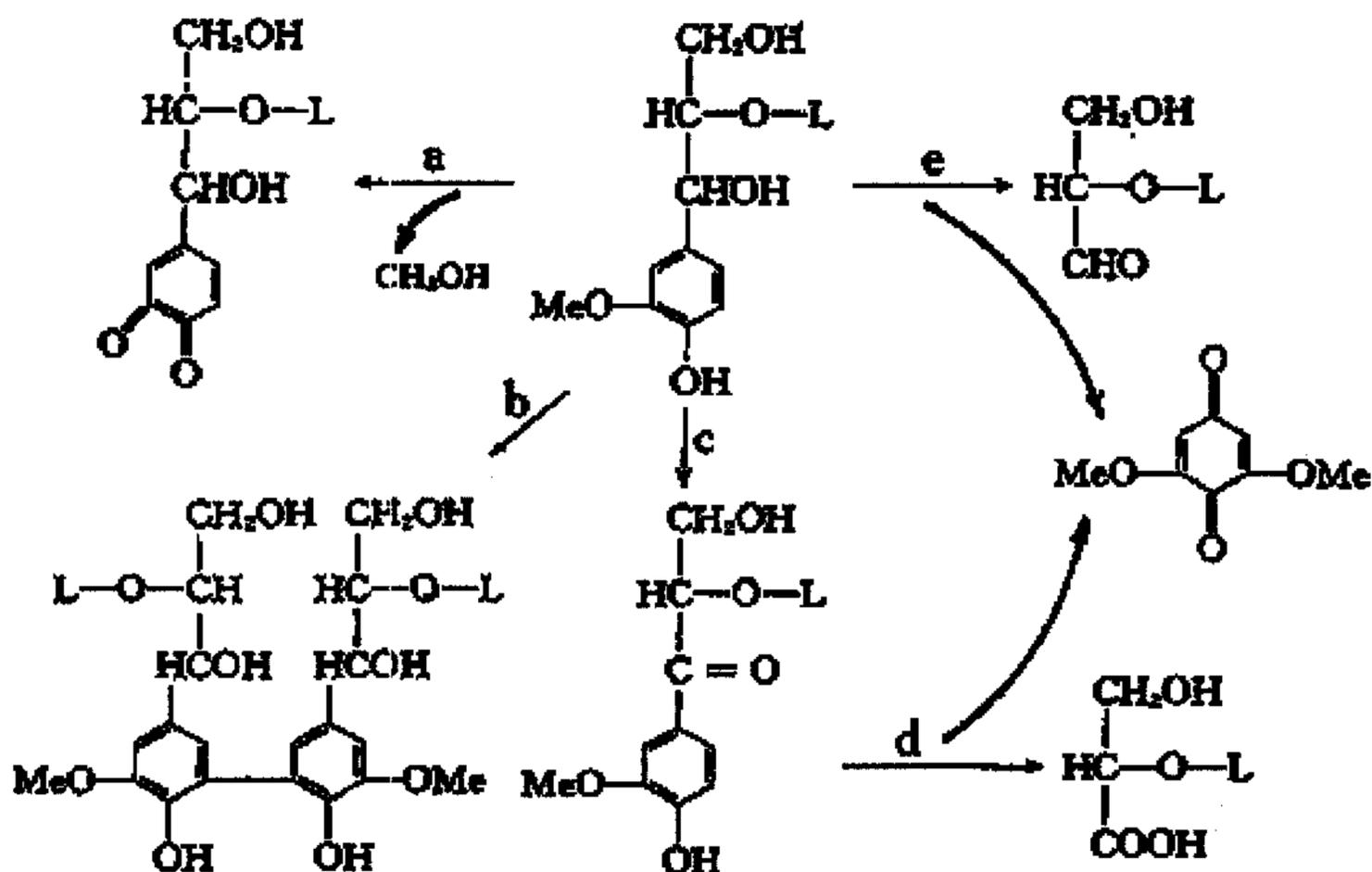


图 4-4 漆酶降解木质素的示意图

### 1.6 果胶酶对苧麻的处理<sup>[55,56]</sup>

果胶酶对苧麻处理与漆酶相似,只是在第四步中,混合酶液改为果胶酶液与醋酸缓冲液(浴比 1:30),其余方法与漆酶对苧麻处理相同。

## 第二节 结果与讨论

### 2.1 酶液处理前的苧麻各成分含量的测试结果如下表 4-1

表 4-1 酶液处理前苧麻各成分含量如下

酶液处理前	脂 腊 质	半 纤 维 素	水 溶 物	果 胶	木 质 素	残 胶 率	纤 维 素
	1.8%	18%	13%	9%	14%	39%	44.2%

从表 4-1 可以看出该野生麻的木质素和含胶率的含量非常高,这

意味着漆酶降解木质素的重要性；其次纤维素含量也非常高，用作制衣和造纸都是理想的材料，这充分显示出该麻的潜在实用价值。当然，木质素、半纤维素、果胶等胶质的去除质量，成为该麻应用的关键步骤。

## 2.2 漆酶对苧麻的降解结果如下表 4-2

表 4-2 漆酶与果胶酶混活酶液对苧麻脱胶结果如下

酶液处 理后	水溶物	果胶	半纤 维素	木质素	残胶率	纤维素
第一组	1.5%	5.5%	7.0%	3.0%	17%	40.5%
第二组	1.5%	5.0%	6.0%	2.5%	15%	42.0%
第三组	1.5%	5.5%	7.5%	13.5%	30%	41.5%
第四组	1.5%	5.5%	6.5%	11.5%	28%	40.5%

表 4-2 中第一、二组，均进行了水浴和酸浴之后，再进行漆酶和果胶酶液的处理，木质素的去除率达 82%，残胶率降低了 62%，这是比较理想的脱胶效果。表 4-2 中的第三、四组是对照组，第三组进行了水浴和酸浴，但未进行酶液处理步骤，其残胶率非常高，木质素几乎未去除，可见酸浴和水浴无法降解木质素；然而第四组未进行酸浴和水浴，直接进行酶液处理，其脱胶效果同样很差。这充分说明酸浴和水浴步骤为酶液对苧麻木质素的催化降解起着重要作用。在实验中可以很清楚的看到这样一个现象：经过了水浴和酸浴处理后，再用混合酶液处理，经过 3 小时之后混合酶液从浅暗红色变为无色透明的液体；而直接用混合酶液处理的第四组，经过 3 小时之后混合酶液依然为浅暗红色，没有任何颜色变色。

## 2.3 果胶酶对苧麻的降解结果如下

从表 4-3 中不难看出，单独作用的果胶酶明显没有漆酶与果胶酶混活酶液的降解效果好。大概因为果胶酶与漆酶的最适温度、最适 pH 值等理化性质非常接近，两种酶混活作用，产生了协同效应。

同效应。

表 4-3 果胶酶对苧麻脱胶结果如下

果胶酶 处理后	水溶 物	果胶	半纤 维素	木质素	胶率率	纤维素
第一组	1.48%	3%	6.5%	12.5%	24%	38.5%
第二组	1.50%	3.5%	6.0%	12%	23.5%	40.5%
第三组	1.45%	6%	7.0%	14.5%	30.0%	35.5%
第四组	1.49%	5.5%	7.5%	13.5%	28.0%	38.5%

## 2.4 电镜扫描结果

在经过水浴和酸浴原麻扫描电镜照片（附录图 4）中可以看到纤维分散的情况，纤维之间被胶质粘连，难以分开形成整块状，看不到单根纤维。酶液浸渍处理后，纤维之间大部分胶质已经去除，纤维相互分离，可以看到单纤维状态，同时可以看出还有一些胶质附着在纤维表面（附录图 5）。当再次酶液处理后，进行扫描看纤维分散情况如附录图 6 所示，纤维有良好的分散状态。因胶质去除比较温和彻底，表现为纤维手感柔软，色泽温和，纺纱性能大为改善，成纱质量好。

再对未经任何处理的原麻和经过酶液浸渍的苧麻进行电镜（放大 2000 倍）扫描分别见附录图 7 和图 8。没有经过任何处理的苧麻，纤维外面包裹着一层壳状胶质，纤维之间相互粘连在一起。胶质与纤维分离间隙处，能够看到苧麻纤维表面的天然纹理结构，细长小沟槽。然而对经过酸浴和水浴以及酶液处理的苧麻扫描图片附录图 8。保留了纤维细胞表面的天然纹理特征，纤维损害少。同时还对以前化学脱胶处理过的精干麻进行扫描如附录图 9 所示：看不到纤维表面的天然纹理结构，强烈化学脱胶对纤维表面剥蚀比较厉害，一些细微的纤维从纤维细胞壁表面分离出来，并且可以看到，纤维表面有化学脱胶处理留下的刻痕。这是强酸强碱煮练作用对纤维细胞壁原纤层之间的连接物质产生了渗透溶解，即发生了“剥皮效

个掉下来，直到产生纤维素末端基转化为偏变糖酸基的稳定反应为止，掉下来的葡萄糖基在溶液中最后转化为异变糖酸，并以钠盐的形式存在于煮练液中。这种作用表现为脱胶制成率低，纤维表面手感粗糙，摩擦系数增加，纺纱性能下降。

#### 讨论：

(1)本章应用前面分离纯化的漆酶蛋白，配成 1g/l 的漆酶液与 1g/l 果胶酶液，按 1:1 比例混活，对苧麻降解产生了协同效应，取得了良好的脱胶效果。木质素去除率达 82%，残胶率降低了 62%。

(2)本实验漆酶液对苧麻木质素的去除，采用简短的工艺流程（四步法）：麻样预处理—麻样水浴—麻样酸浴—麻样的酶液处理，就可去除绝大部分的木质素等胶质。这是传统的化学脱胶无法取得的结果。因为化学脱胶对纤维损伤严重（包括纤维素降解、纤维强力和弹性损失、纤维手感和悬垂性变差），而且工艺流程长，耗费人力和物力，还因大量化学药品的带入，带来严重的环境污染。

(3)当然本实验也可看出，半纤维素的去除较差，致使最后的残胶率还较高，没有达到完全依靠生物技术就可以彻底脱去苧麻的胶质。这有待于我们生物技术进一步的发展。

## 第五章 结论

本课题通过对 30 种菌株的筛选，筛出了最佳产木质素酶（主要漆酶）的糙皮侧耳菌，再对该菌进行发酵生产漆酶的单因子和多因子正交实验的最优化设计，得出了该菌高产漆酶的发酵条件。并对该菌发酵粗酶液中的漆酶，进行分离纯化及其理化性质的研究。再用纯化了的漆酶对苧麻进行生物脱胶，首次提出了漆酶对苧麻生物脱胶的工艺条件，并取得了良好的脱胶效果。木质素去除率达 82%，残胶率降低了 62%。这一结果肯定了我们本次课题的成功性和创新性。传统化学脱胶对原麻进行强酸浸泡和强碱氢氧化钠高温高压煮练，然后，用机械打洗除去剩余杂质的方法。我们克服了这方法需要耗费大量化工原料；在高温高压条件下，保持比较长的煮练时间，能源消耗大；脱胶废液污染严重；脱胶生产成本低，工艺流程长，劳动强度大，劳动条件差；化学煮练过程，对麻纤维的性能和结构，尤其是纤维的表面性能造成了严重损害，胶质脱除不彻底，不均匀，精干麻制成率低，纤维抱合力差，大大降低了纤维的梳纺加工性能。本课题主要结论如下：

① 我们优化出糙皮侧耳菌产漆酶的最佳发酵培养条件(1L)：麦草粉 20g, 酒石酸铵 5.0g, 吐温-80 0.1%, 藜芦醇 600  $\mu$ l; 摇床转速为 128 转/min, 温度 30℃, pH5.0。

② 我们对糙皮侧耳菌发酵粗酶液中漆酶进行分离纯化，采用四步法：超滤浓缩 → DEAE-Cellulose 柱层析 → SephadexA-50 柱层析 → 冷冻干燥，经 PAGE 电泳检测为单一漆酶条带。再对纯化漆酶进行理化性质的研究得出：糙皮侧耳菌漆酶经质谱测试分子量为 60.5KD，最适温度 40℃，最适 pH 为 5.0，金属离子对酶活有很大的影响，其中  $K^+$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  有明显促进作用， $Hg^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Ba^{2+}$  等对酶活有明显的抑制作用。

③ 将纯化的漆酶，配制成 1g/l 的酶液与所购买的果胶酶 (1g/l) 按 1:1 比例混活成混合酶液，再与缓冲液按 1:1 比例混活，对苧麻

进行酶液脱胶处理。其具体做法如下：第一步麻样的预处理→第二步麻样的水浴处理：60℃水浴保温 2 小时洗净，烘干→第三步麻样的酸浴处理：按浴比 1:10 比例，加 1g/l 的硫酸 60℃水浴保温 1 小时后，洗净烘干→第四步麻样的粗酶液处理：浴比为 1:30 的混合酶液 50℃水浴保温 3 小时后，洗净烘干。测试结果为：木质素去除率为 82%，残胶率降低了 62%。这样的脱胶效果证明了本课题设计方案的成功性。

## 致 谢

我衷心感谢我的导师西安工程科技学院管映亭副教授和西安交大生命学院席丹副教授。在我三年研究生学习和生活中，两位导师给予了热情帮助。尤其课题中大量的生物实验都是在席丹老师的大力帮助下完成的。在西安交大生命学院两年的课题研究中，得到了席丹老师无微不至的关怀，没有席老师大量经费的资助，我不可能完成此次课题。即教书又育人的两位导师，将激励着我不断前进，争取做又红又专的人才。我无限感激我的两位导师！

## 参 考 文 献

- [1] Sachs I.B, Clark I.T. and Pew J.C. J. Polym. SCI. Pt. c., 1973, (2):203.
- [2] Lange P.W.. Svensk Papperstidn. 1974, 59:525.
- [3] Kawahara M, Glenn J K. FEBSlett, 1984, 169:247-250.
- [4] 刘尚旭, 赖寒. 木质素降解酶的分子生物学研究进展. 重庆教育学院学报. 2001, 9, 3(14):64-67.
- [5] Hou Hongman, Zhou Jiti, Chen Li. Characteristics of laccase in white-rot fungi and degradation of aromatic xenobiotic compounds. Chemistry and industry of forest products. 2003, 3, 23:89-94.
- [6] Ander P. Eriksson KE. Archives of Microbiology. 1976, 109:1-8.
- [7] THURSTON C F. The structure and function of fungal laccase[J]. Microbiol. 1994, 140:19-26.
- [8] GIANFREDA L. Laccase: a useful group of oxidoreductive enzymes[J]. Biore M J, 1999, 3:1-25.
- [9] PICKARD M A, ROMAN R, TINOCO R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coeiopsis gallica* UAMH8260 laccase[J]. Appl Environ Microbiol. 1999, 65:3805-3809.
- [10] MUNOZ C, GUZLEN F, MARTINEI A T, et al. Laccase isoenzymes of *pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and  $Mn^{2+}$  oxidation[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:2166-2174.
- [11] JOHANNES C, MAJCHERCZYK A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 66:524-527
- [12] JUNG H, XU F, LI K. Purification and characterization of

laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LK Y-7[J]. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, 30:161-168.

[13] 钞亚鹏, 叶军, 钱世钧. 担子菌组成型漆酶产生特性的研究. *微生物学报*. 2000, 40(6):628-632.

[14] COLLINS P J, CANNIO R, SANNIA G, et al. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:3444-3450

[15] SMITH N, HATTORI T. Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*[J]. *Microbiology*, 1998, 144:1063-1069.

[16] Ming Tien, CRC. *Critical Reviews in Microbiology*. 1987, vol 115: issue 2.

[17] 张健飞, 江蕾等. 亚麻粗纱及织物生物酶精练探讨. *染整技术*. 2002, 4, 24:12-16

[18] 王德骥. 苧麻纤维化学与工艺学——脱胶与改性. 科学出版社. 2001, 2.

[19] 寻传民. 苧麻脱胶技术发展的趋势. *苧麻纺织科技*. 1994, 17:4-7.

[20] 李桂珍. 生物技术在麻纺织领域的开发与应用. *麻纺织技术*. 1998, 21:27-30. 郭湘军译. 韧皮纤维剥制后的脱胶方法. *苧麻纺织科技*. 1988, 11: 46-49.

[21] K. Gurucharanam, K. S. Deshpande. 黑曲霉 SS 多糖对苧麻脱胶的作用. *苧麻纺织科技*. 1999, 11:50-52.

[22] 刘自容等. 大麻酶法脱胶机理初探. *纺织学报*. 2001, 22:52-53.

[23] 熊耀辉. 丹麦苧麻酶脱胶工艺研究. *苧麻纺织科技*. 1989, 12:33-36.

[24] 谢卓荣, 欧阳曙等. 100 吨苧麻生物脱胶生产性试验. *苧麻*

纺织科技. 1992, 15:30-32.

[25] 蒋国华. 苎麻微生物脱胶研究. 纺织学报. 2001, 22:63-64.

[26] 蔡磊, 尹峻峰, 杨丽萍等. 几种简便的木质素降解真菌定性筛选方法. 微生物学通报. 2002, 29(1):67-69.

[27] Nishida T, et al. Mokuzaishi, 1988, 34(6):530-536

[28] 丁少军, 王传槐, 叶汉玲等. 云芝高木质素降解活性菌株筛选的研究. 纤维素科学与技术. 1994, 2(1): 32-38.

[29] 康从宝, 赵建, 李清心等. 层孔菌产漆酶的摇瓶最适培养条件研究. 微生物学通报. 2002, 29(3):42-45.

[30] Youn H, Hah Y, Kang S, Role of Laccase in Lignin degradation by white-rot fungi [J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 1332:183-188.

[31] Tien M, Kirk T K. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in Enzymology. 1988, 161:238-249

[32] Tien M, Kirk T K. Appl Environ Microbiol. 1984, 54:466.

[33] Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 1976, 162:248-254.

[34] Read, S. M. D. H. Northcote. Minimization of Variation in the Response to Different Protein of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protein. Anal. Biochem. 1981, 116:53-64.

[35] 王宜磊. 碳源和氮源对彩绒革盖菌木质纤维素酶和木质素酶分泌的影响. 微生物学杂志. 2000, 3, 20(1):29-31.

[36] 王宜磊. 漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究. 生态学杂志. 2002, 21(2):27-29.

[37] 王宜磊. 碳素和氮素对 *Coriolus versicolor* 胞外酶分泌的影响. 生物技术. 2003, 2, 13(1):9-10.

[38] 罗宇焯, 张甲耀等. 嗜碱细菌降解木质素的复合碳源共代谢

研究 II. 城市环境与城市生态. 2000, 12, 13(6):57-59.

[39] 李建武, 袁明秀等. 生物化学实验原理和方法. 北京大学出版社. 北京. 2000, 4.

[40] 王重庆, 李云兰等. 高级生物化学试验教程. 北京大学出版社. 北京. 2001.

[41] Kang Congbao, Liu Qiao, Li Qingxin, QU Yinbo. Purification and properties of laccase produced from a white rot Fungus. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biolog. 2002, 18(5):638-642.

[42] 郭晓君编著. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001. 128-140

[43] 汪家政等编著. 蛋白质技术手册. 科学出版社. 2001.

[44] 龚为民, 张敏等. 野生革耳菌组成型漆酶的生成条件及性质研究. 中国科学技术大学学报. 2002, 8, 32(4):462-469.

[45] Liu shuzhen, Qian Shijun. Purification and Properties of Laccase from Basidio mycete. Acta Microbiologica Sinica. 2003, (1), vol43:73-77

[46] 候红漫, 蒋姣姣. 白腐菌 pleurotus ostreatus 漆酶的生产及其最佳诱导条件. 大连轻工业学院学报. 2003, 3, 22(1):28-31.

[47] F. Kifani-Sahban, A. Kifani et al. A Physical approach in the understanding of the phenomena accompanying the thermal treatment of lignin. Thermochemica Acta 298, 1997:199-204.

[48] Abd-Alla M. A. Nada, M. A. Yousef. Infrared Spectro Scopy of some treated Lignins. Polymer Degradation and Stability 62. 1998, 157-163.

[49] 吴昌斌等. 亚麻韧皮部的化学组成及果胶的结构中国麻作. 1997, 19(3):38-40.

[50] 郭义明主编. 植物纤维化学. 中国轻工业出版社. 1997, 7.

[51] 杨树惠主编. 植物纤维化学. 中国轻工业出版社. 2001, 1.

[52] 中华人民共和国国家标准·苧麻回潮率、含水率试验方法  
GB 5883-86.1986, 1.

[53] 中华人民共和国国家标准·苧麻化学成分定量分析方法  
GB 5889-86.1986, 1.

[54] 张建军, 罗勤慧. 木质素酶及其化学模拟的研究进展. 化学  
通报. 2001, 8: 470-477.

[55] 卢雪梅. 木质素生物降解的化学反应机制. 林产化学与工  
业. 1996, 7, 16(2):42-48.

[56] M. S. Haddain, R. AL-Natour et al. Bio-degradation of  
lignin in olive Pomace by freshly - isolated species of  
Basidiomycete. Bioresource Technology. 2002, 82:131-137.

[57] Zhang R. P. Enzymatic Scouring of Cotton. Journal of  
Nantong Institute of Technology. 2002, 9, 1(2):41-43.

[58] 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.

[59] 刘晓兰, 郑喜群等. 生物法亚麻原茎脱胶过程及新工艺. 应  
用与环境生物学报. 2001, 7(4):14-17.

[60] 闵洁. 宽温酶和 Bioprep 果胶酶在前处理中的应用. 丝  
绸. 2002, 4:18-20.

附 录

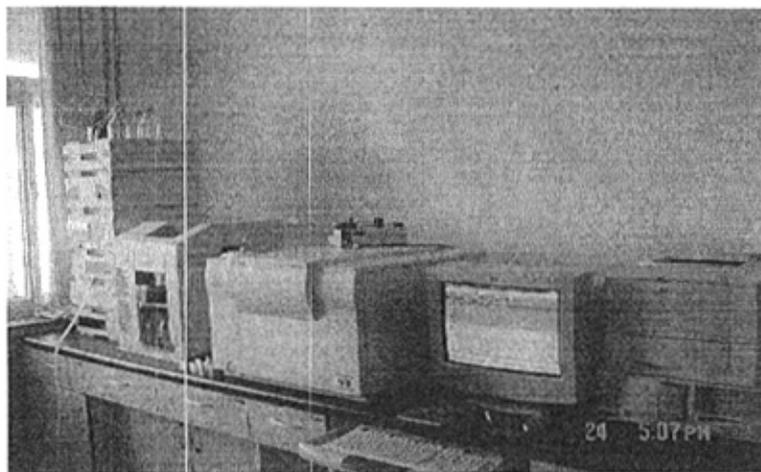


图 1 高效液相色谱仪



图 2 液相色谱与质谱仪联用

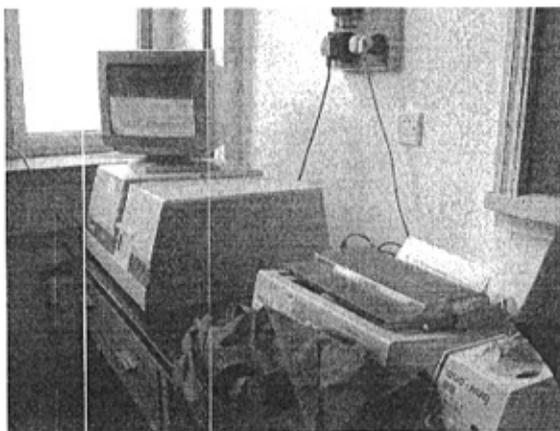


图 3 BACKMAN DU600 紫外分光光度计

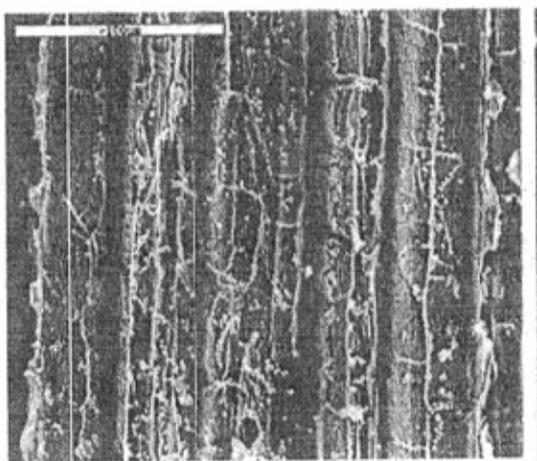


图 4 经水浴和酸浴处理的苧麻纤维

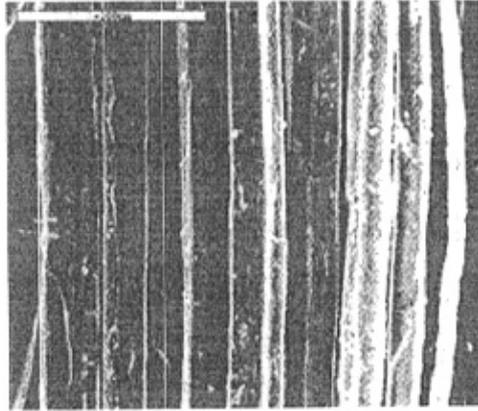


图 5 经第一次漆酶处理的苧麻纤维

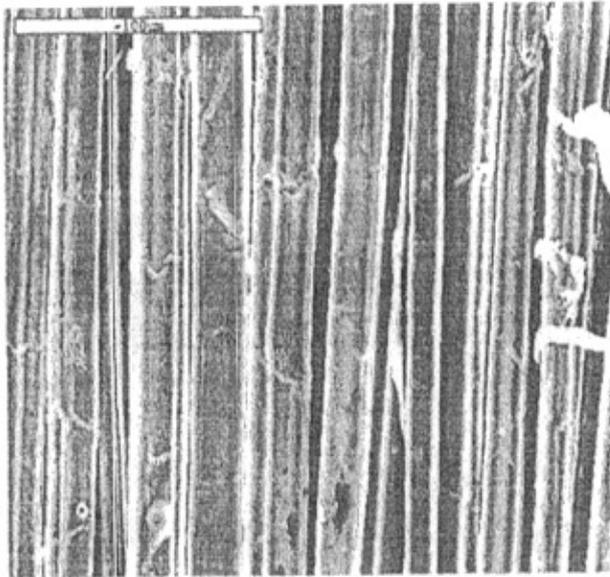


图 6 经第二次漆酶处理的苧麻纤维



图 7 未经任何处理的苧麻纤维

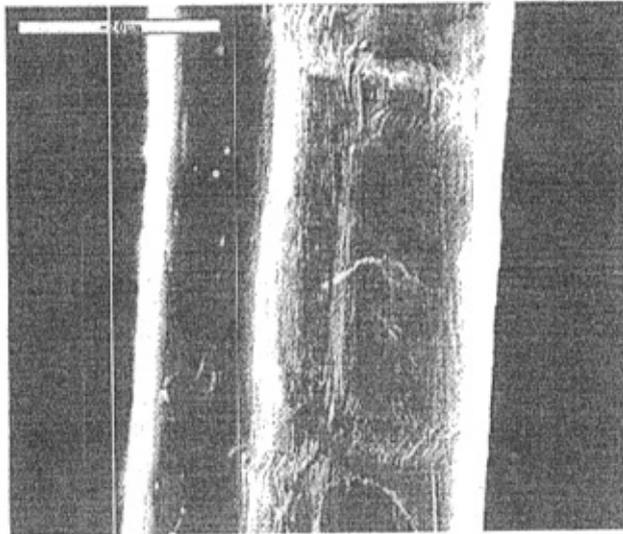


图 8 经水浴、酸浴及漆酶处理的苧麻纤维

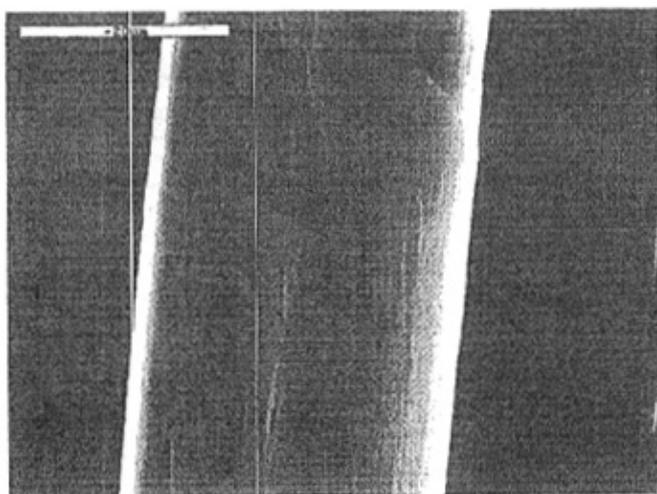


图 9 经化学脱胶处理的苧麻纤维

## 学位论文知识产权声明

本人完全了解西安工程科技学院有关知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间学位论文工作的知识产权归属西安工程科技学院。本人保证毕业离校后，使用学位论文工作成果或用学位论文工作成果发表论文时署名单位仍然为西安工程科技学院。学院有权保留送交的学位论文的复印件，允许学位论文被查阅或借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存学位论文。

（保密的学位论文在解密后应遵守此规定）

学位论文作者签名：陶用珍  
指导教师签名：管映亭  
日期：2004年3月30日

（排版按论文格式要求进行，并将本页附在参考文献之后）

## 学位论文独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，学位论文中不包含其它人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人已申请学位或他人已申请学位或其它用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名：陶周珍  
指导教师签名：管映亭  
日期：2004.3.30

(排版按论文格式要求进行，并将本页附在参考文献之后)