

摘 要

本研究运用 SDS-PAGE 电泳图谱法, 系统研究了苎麻脱胶高效菌株 T85-260 及其它两株脱胶菌 T66 和 T1163 的脱胶酶系。结论如下: ①T85-260 的胞外蛋白(含胞外酶)种类多且为组成型表达。(在肉汤、果胶、葡萄甘露聚糖、木聚糖和数种以己糖或戊糖为唯一碳源培养基发酵及灭菌与不灭菌苎麻脱胶过程中, T85-260 都能分泌 41 种胞外蛋白(含胞外酶), 分子量范围 10.0KD~120.3KD。这 41 种胞外蛋白(含胞外酶)组成型表达。存在分子量为 110.2KD、81.7KD、72.9KD、66.8KD、52.1KD、42.2KD、39.8KD、35.5KD、31.6KD、28.6KD、19.9KD、16.0KD 的 12 种表达相对其他 29 种胞外蛋白(含胞外酶)较强的蛋白(含胞外酶)带。这些蛋白(含胞外酶)带可以用作进行菌种鉴定和酶谱分析的基本带。T66 及 T1163 在肉汤培养基中出现的蛋白(含胞外酶)带少, 而且表达强度较弱。这两种菌的酶系以诱导型为主。)②T85-260 至少高产 6 种苎麻脱胶关键酶。(T85-260 对葡萄甘露聚糖发酵时产生 4 种甘露聚糖酶, 分子量分别为 60.3KD、49.5KD、33.5KD、29.5KD; 对果胶发酵时, 至少分泌出 1 种果胶酶(需要较高浓度的镁离子激活), 分子量为 28.6KD; 对木聚糖发酵时, 表达出 1 种木聚糖酶, 分子量是 55.6KD。这 6 种关键酶在两种处理的苎麻脱胶过程中均有高强度表达。)③T85-260 还分泌对苎麻脱胶起重要促进作用的酶类。(T85-260 肉汤发酵液蛋白(含胞外酶)电泳图谱中分子量分别为 72.9KD、35.5KD、31.6KD、19.9KD 的 4 条带比其它处理电泳图谱相应带强, 可能是蛋白酶, 它们对加快苎麻脱胶有促进作用。T85-260 嗜好甘露糖。甘露糖的快速而彻底的分解有助于葡萄甘露聚糖的降解。)④T85-260 完成苎麻脱胶可能还有其他重要酶类。(T85-260 在脱胶过程中, 还有分子量为 110.2KD、81.7KD、66.8KD、52.1KD、42.2KD、39.8KD、16.0KD 的 7 条表达较强的蛋白(含胞外酶)带。分子量分别为 52.1KD、42.1KD、39.8KD 的 3 条带在 T66 及 T1163 灭菌和不灭菌苎麻脱胶过程中都较强表达。它们可能也是对苎麻脱胶起重要作用的酶。)⑤T66 和 T1163 的脱胶能力相对较弱。(T66 和 T1163 苎麻脱胶进程明显比 T85-260 慢, 脱胶过程中出现的蛋白(含胞外酶)带比纯培养的多, 但表达较强的带少且强度比 T85-260 的带弱得多, 灭菌和不灭菌脱胶液谱带存在明显差别。这两种菌的脱胶酶多属诱导型酶。)

本研究未见报导, 对麻类生物脱胶理论研究与生产实践有一定指导意义。

关键词: 苎麻 脱胶菌 酶系

目 录

摘要

引言

材料与amp;方法

一、材料

（一）菌种

（二）培养基

（三）化学试剂

二、方法

（一）菌种的培养

（二）处理与取样

（三）胞外酶种类及分子量测定

结果与分析

一、纯培养过程中脱胶菌的蛋白质(含胞外酶)电泳图谱

（一）T85-260 肉汤培养基(LB)发酵液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（二）T66 肉汤培养基发酵液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（三）T1163 肉汤培养基发酵液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（四）T85-260 果胶培养基发酵液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（五）T85-260 甘露聚糖发酵的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（六）T85-260 甘露糖及葡萄糖发酵液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

二、苧麻脱胶过程中脱胶菌的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（一）T66 苧麻脱胶液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（二）T1163 苧麻脱胶液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

（三）T85-260 苧麻脱胶液的蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱

问题与amp;讨论

一、关于培养基(浸出液)蛋白带

二、组成型酶与诱导型酶

三、苧麻菌制剂脱胶与酶制剂脱胶

小 结

一、T85-260 在纯培养过程中所分泌的胞外酶属于组成型表达且具广谱性

二、T85-260 在果胶培养基中产果胶酶并需要镁离子激活

三、T85-260 在葡萄糖-甘露聚糖培养基中产甘露聚糖酶

四、T85-260 在肉汤培养基中产蛋白酶

五、T85-260 嗜好甘露糖

六、T85-260 完成苧麻脱胶依赖于组成型酶

七、T85-260 对苧麻脱胶的高效性在于有关键酶的作用

参考文献

英文摘要

致谢

附：电泳谱带照片

引 言

苧麻 (*Bohemeri nivea*) 又名“中国草”(China grass), 为多年生宿根性草本植物, 是我国传统的优质纤维作物, 也是我国比较重要的出口产品。其纤维产品具有吸湿散热快、透气性好、不沾身、抗菌、挺括美观的特点, 是高档天然纤维产品, 具有广阔的发展前景^{[1] [50]}。

苧麻的生产加工程序为: 收割→刮制→脱胶→梳理→纺纱→织布→漂整→印染。其中脱胶、漂整和印染都是十分复杂的化学反应过程, 但脱胶是最基础而又非常关键的加工环节, 在整个麻纺工业中起着至关重要的作用, 脱胶的好坏直接关系到其经济价值和其产品的深度开发, 也与降低生产成本, 保护生态环境休戚相关。

苧麻脱胶就是依靠化学药品(化学法), 微生物或其酶制剂(生物法), 或者化学法和生物法相结合, 降解掉包埋、包裹或镶嵌在生苧麻纤维中约 23~30% 的非纤维素物质(统称胶质), 使生苧麻变成松散、柔软、洁白, 适用于纺织的单纤维^[3]。因此, 苧麻脱胶可以粗略地分为化学脱胶、生物—化学联合脱胶、生物脱胶。据历史记载, 我国 4700 多年前即开始沤麻, 这是一种原始的生物脱胶。20 世纪前页, 在人类对微生物知识的认识达到一定程度后, 人们才逐步认识到微生物对脱胶的重要作用, 于是提出了“微生物脱胶”。之后, 由于生物化学、分子生物学, 特别是基因工程技术取得突飞猛进的发展, 人们在脱胶酶的研究, 脱胶酶基因工程等方面的认识越来越深入, “酶法脱胶”便应运而生。苧麻脱胶经历了自然漂晒(沤)、化学脱胶、细菌—化学联合脱胶、细菌法脱胶、酶法脱胶阶段^{[1] [3] [56] [57]}。但是, 目前国内外的苧麻脱胶仍以烧碱蒸煮为中心的化学脱胶工艺为主。由于化学法脱胶要消耗掉大量的化工原料、能源, 既给环境造成严重污染、生产成本居高不下, 又使产品质量受到严重影响, 因此, 现在通行的化学法脱胶必须逐步淘汰, 其出路只能是生物脱胶, 即微生物脱胶或酶法脱胶^{[4] [5]}。

麻类生物脱胶研究的历史只有不到 80 年, 苧麻生物脱胶在最近 20 年才取得一些进步。据研究, 具有脱胶能力的微生物广泛存在于自然界, 细菌中以好氧和兼性厌氧的芽孢杆菌为主, 如鼓槌状芽孢杆菌 (*Plectridium pectinovorum*)、费地梭状芽孢杆菌 (*Clostridium felsineum*)、淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amylobacter*)、多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*)、柯氏芽孢杆菌 (*B. cosmesii*), 其它杆菌, 如假单孢杆菌 (*Pseudomonas*)、欧文氏杆菌

(*Erwinia*), 也有较好的脱胶性能。真菌中也普遍存在具有脱胶性能的菌, 如镰刀菌、根霉菌、曲霉以及一些担子菌类等^{[1] [5]}。但是, 到目前为止, 具有生产应用潜力的菌株极少。造成这一现象的原因可能有方面。一是由于苧麻胶质成份十分复杂, 根据酶的专一性原理^[60], 需要相应复杂的酶系。而自然界存在的菌类往往只具有一种或少数几种相关的酶类, 或者缺少脱胶关键酶, 故一种菌在较短的时间内难以将苧麻胶质降解以达到脱胶的目的。第二个原因可能是由于人们对苧麻生物脱胶的机理尚不清楚, 例如, 苧麻生物脱胶到底是只需要少数几种关键酶, 破坏胶质与纤维素的(非)共价联系, 改变生纤维的空间构象, 以利胶质溶出或破坏胶质的特殊共价键, 从而达到“块状崩溃”, 还是需要很多种酶“协同作用”, 彻底降解胶质, 人们对这些都知之甚少。因此, 缺少一种快速筛选能分泌脱胶关键酶微生物的方法, 也难以达到能动性、自如地运用微生物或酶脱胶的目的。如果能从不同的苧麻脱胶菌着手, 以某种高效脱胶菌为重点来研究, 就有可能在苧麻生物脱胶机理上取得突破。中国农业科学院麻类研究所自 1970 年代来以来开始进行苧麻生物脱胶研究工作, 20 多年来, 取得了突破性的进展。1970 年代, 选育的菌种 T66 及与之配套的苧麻细菌—化学联合脱胶工艺技术曾在生产上发挥过重要作用^[1], 1990 年代选育的菌种 T85-260 则可以在 8hrs 左右, 将品种、产地、季别及刮制质量不同的生苧麻加工成松散、柔软、纯净且纺织性能大大提高的单纤维, 由这种菌形成的配套苧麻细菌脱胶工艺流程与技术具有极好的应用前景^{[5][7]}。因此, 该菌是研究苧麻生物脱胶机理、包括所需酶种类、酶动力学以及酶作用机理的较好材料。由此获得的知识不仅可以用来能动地改良现有菌种, 从而最终实现酶法脱胶, 而且能将由此形成的成熟理论和技术推广应用到类似领域, 如其它麻类生物脱胶、生物制浆等。

据分析, 生苧麻含蜡质 0.38%、水溶物 6.46%、果胶 4.92%、半纤维素 12.45%、木质素 1.31%^[4]。这些物质统称为胶质, 都必须在脱胶过程中去除。蜡质和水溶物在脱胶过程中易溶解, 毋需采取特殊的处理措施。胶质中的果胶、半纤维素、木质素则较难去除。果胶主要由多聚半乳糖醛酸组成, 降解产物为半乳糖醛酸^{[6] [31] [32]}。半纤维素则是一类结构和成份十分复杂的物质, 主要包括木聚糖、甘露聚糖及多聚半乳糖等^{[9] [10]}。与其它麻类的半纤维素相比, 苧麻半纤维素组成成份特殊, 主要由葡萄甘露聚糖和甘露聚糖组成^{[9] [11] [13]}, 这是一种在高温高压低浓度碱液中稳定的多糖类物质, 常规化学法脱胶工艺不易将其降解^{[9][10]}。因此, 苧麻脱胶的关键点和难点就是这些物质的降

解。木聚糖主链由 β -1,4-糖苷键相连的 β -D-吡喃型木糖残基聚合而成，其主链上有由甘露糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖等残基组成的侧链，主链和侧链上有多种取代基团，主要是乙酰基、葡萄糖醛酰基和阿拉伯酰基（可进一步与香豆酸、阿魏酸等酚酸相连）等。木聚糖可分为针叶木木聚糖和阔叶木木聚糖两种。针叶木木聚糖高度乙酰化，由0-乙酰-4-O-甲基葡萄糖醛酰木糖聚合而成，含70个以上的吡喃型木糖残基，DP150~200。阔叶木木聚糖非乙酰化，由阿拉伯-4-O-甲基葡萄糖醛酰木糖聚合而成，DP70~130，分枝少，4-O-甲基葡萄糖醛酸的含量较针叶木木聚糖的高^[9]。木质素是一类由多聚苯丙烷等组成的杂环类物质，组成极为复杂，降解也最为困难^{[8][10][11][14]}，但生芷麻木质素含量低。

芷麻生物脱胶可以粗略地分为芷麻微生物脱胶和芷麻酶法脱胶。但芷麻微生物脱胶也是依靠微生物分泌关键的脱胶酶降解胶质实现的，即通常所说的胶养菌—菌泌酶—酶脱胶过程。一般而言，胶质的降解主要依靠脱胶菌分泌的胞外酶^{[42][43]}。芷麻生物脱胶至少需要二大类酶，即果胶酶和半纤维素酶，脱木素酶可能不起多大作用。根据果胶降解的三个阶段，芷麻果胶酶至少需要以下三类，即：①将不溶性原果胶转化为果胶质的原果胶酶（Protopectinase），②脱果胶质甲基成果胶酸的果胶质甲基氧化酶（Pectinmethoxyase, PM）或果胶分解酶（Pectase, PE），和③水解各半乳糖醛酸单体间的1,4—糖苷键，使果胶酸降解成半乳糖醛酸的果胶多聚半乳糖醛酸分解酶或果胶酶（Pectinase, PG）^{[6][42]}，通常果胶酶仅指后者。木聚糖多为异聚多糖，主链和侧链上具有多种取代基团，它的降解需要许多酶的参与，主要有 β -1,4-内切木聚糖酶（ β -1,4-endoxylanase）、 β -木糖苷酶（ β -xylosidase）、 α -葡萄糖醛酸苷酶（ α -glucuronidase）、乙酰木聚糖酯酶（acetylxylan esterase）、酚酸酯酶（phenol acid esterase）等。这些酶通过特定的协同机制作用于木聚糖^{[9][45][46]}，使木聚糖得以降解。脱木素酶主要由三大类组成，即木素过氧化氢酶（Lips），二价锰过氧化物酶（Mnps）和漆酶（Lac）。但迄今为止，人们尚未获得高效降解木质素的基因资源^{[4][15]}。根据研究，产果胶酶和半纤维素酶的微生物种类很多，既有真菌，如黑曲霉、根霉、酵母类，又有细菌，以芽孢杆菌为主，每种菌产生的酶的种类不同，多以某一、二种酶为主，而且每一种类的酶存在多种多分子体，这就使得脱胶酶系统变得更加复杂。通常情况下，果胶降解酶组成型表达，而木聚糖酶和脱木素酶则为诱导型表达^[40]。

苕麻半纤维素以葡萄甘露聚糖和甘露聚糖为主，因此，苕麻生物脱胶离不开甘露聚糖酶的作用。 β -1,4-D-甘露聚糖酶(β -1,4-D-mannan mannanohydrolase)是一种能水解含 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖(包括甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘聚糖等)的水解内切酶，属半纤维素酶类。大部分甘露聚糖酶以胞外诱导酶的形式存在于生物体中，只有很少一部分以结构酶的形式存在。在培养基中加甘露多糖或木聚糖等，该酶高水平分泌。微生物产该酶为多分子型，如里氏木霉(*Trichoderma reessi*) QM9414产2种同功酶，嗜碱芽孢杆菌 AM-001产3种同功酶。已报导产 β -甘露聚糖酶的菌有芽孢杆菌、假单孢杆菌、弧菌，曲霉、木霉、酵母、青霉、梭孢菌、多孔菌和链霉菌等。分子量为22KD~162KD^{[10][23][27][44][52][54]}。

近10多年来，世界各国对果胶酶、半纤维素酶、木质素酶的研究越来越重视，特别是木聚糖酶、甘露聚糖酶和脱木质素酶，对各种相应微生物进行了广泛的筛选，筛选出了一些颇有应用价值的微生物资源，探索和提出了一些快速筛选方法，提取和纯化了一些酶，并对其进行了较详细、深入的分子生物学研究，对其AA序列、空间结构、作用机理进行了研究，现在通过基因工程的手段，克隆了一些相关基因，显示出了较好的应用前景^{[9][31][34][37][38]}。

现已明了，多聚半乳糖醛酸酶(PG)分子量在20KD~90KD之间，多为单链，多为组成型表达，草酸盐类、黄嘌呤类能诱导PG大量分泌，有多种同功酶，如黑曲霉 AS3.3883能分泌PG1、PG2^{[17][21]}。 β -木聚糖酶又分内切木聚糖酶和外切木聚糖酶。多数 β -内切木聚糖酶为单亚基蛋白，分子量为8.5~80KD，PI3.6~10.3，外泌，以诱导型表达为主。 β -木糖苷酶有单体、二聚体或四聚体等组成形式，分子量26~360KD，PI3.3~7.3，在细菌和酵母中， β -木糖苷酶主要存在于胞内，其底物为寡聚木糖，属外切酶，能降解多种底物，如酶切 α -阿拉伯糖苷键、 β -半乳糖苷键、 β -葡萄糖苷键等，为木聚糖降解的主要酶。 α -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶(α -L-Arabompfurannosidase)以内切型为主，分子量53~495KD，PI2.5~9.3，多以单体存在，也有二聚体、四聚体、六聚体和八聚体。 α -葡萄糖醛酸苷酶(α -glucuronidase)分子量在100KD以上。乙酰木聚糖酯酶(acetylxyln esterases)和酚酸酯酶目前报导的均为单亚基蛋白，分子量20KD~70KD^{[9][28][35]}。

苕麻生物脱胶的机理目前尚不明了。考虑到苕麻胶质成份的复杂性及酶的专一性原理，要降解苕麻胶质应该需要多种酶协同作用，这种协同作用

已在木聚糖降解系统中得到证实^[36]，但是，脱胶速度的快慢则很可能决定于链式反应中的关键酶或限速酶^{[42] [43]}。苧麻的脱胶亦区别于获取初生或次生代谢产物的化学反应，也许只需要少数几种关键酶，能改变半纤维素分子的结构和空间构型（包括去除部分侧链或内切半纤维素分子），破坏其与纤维素分子的（非）共价联系，有利于半纤维素从纤维素中溶解出来，从而达到脱胶的目的。但无论何种情况，要达到快速脱胶的目的，都离不开脱胶关键酶。

从不同脱胶性能脱胶菌酶谱的差异及在脱胶过程中的变化进行科学研究，有利于了解苧麻生物脱胶的机理，从而可以推进酶法脱胶的研究和应用工作，这是一项十分有意义的工作。曾经试验过的酶法脱胶所采用的酶基本都是个别具有一定脱胶能力微生物（曲霉、芽孢杆菌）的过培养物^{[55] [56]}，具体成份不详，可能不具备关键脱胶酶，故脱胶时间长、效果不理想。这种酶法脱胶不仅不能达到真正意义的生物脱胶，与微生物脱胶相比，成本更高，生产工序更复杂。这也从一个侧面证明，开展苧麻生物脱胶机理的研究是促进酶法脱胶研究和应用的前提和保障。

材料与方法

一、材料

（一）菌种

T66 (*Bacillus subtilis*): 苧麻脱胶菌; T1163 (*Bacillus polymyxa*): 红麻脱胶菌; T85-260 (*Erwinia*): 苧麻高效脱胶菌。以上菌种均由中国农业科学院麻类研究所选育并保存。

（二）培养基

上述三种菌活化培养基为肉汤培养基(%)：NaCl 0.5，蛋白胨 1.0，牛肉膏 0.5，pH: 7.2~7.4。

上述三种菌活化平板为营养琼脂培养基(%)：营养琼脂 3.5，葡萄糖 0.5。

果胶培养基(PM)、葡萄甘露聚糖(魔芋粉)培养基(PMM)、葡萄糖培养基(GM)、甘露糖(MM)培养基均是在 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.10%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% KH_2PO_4 0.05%，酵母汁 0.01%的基础上，加相应物质 1%而成。

（三）供试试剂

柠檬果胶为 sigma 公司产品；丙烯酰胺(Acr)为 Purum 公司进口分装；

Bis 为 Fluke 产品；十二烷基硫酸钠 (SDS) 经无水乙醇进一步纯化一次后使用；低分子量标准蛋白为上海东风生化试剂厂产品；其它试剂均为市售商品。

二、方法

(一) 菌种的培养

1、T1163

取沙土管保藏菌株活化，挑取活化菌之典型菌落一环接种于 LB 培养基 (100ml)，35℃ 培养 10~12hrs，400g 离心 5min，去上清，用无菌水洗菌体 2 次，每次 400g 离心 5min，所得菌体加 25ml 无菌水稀释待用

2、T66

取真空去湿保藏菌种，活化，挑取典型菌落 1 环，接种于 LB 培养基 (100ml) 中，其它处理同 T1163。

3、T85-260

取真空保藏菌种，活化，挑取典型菌落 1 环，接种于 LB 培养基 (400ml)，35℃ 培养 12hrs，400g 离心 5min，去上清，用无菌水清洗 2 次，每次 400g 离心 5min，所得沉淀加 100ml 无菌水稀释待用。

(二) 处理与取样

1、试验处理

LB+T85-260，LB+T66，LB+T1163，GM+T85-260，PM+T85-260，PMM+T85-260，MM+T85-260，带菌苎麻(R)+T85-260，灭菌苎麻(RS)+T85-260，带菌苎麻(R)+T1163，灭菌苎麻(RS)+T1163，灭菌苎麻(RS)+T66，带菌苎麻(R)+T66，共 13 处理。接种量 2%，培养条件：35℃，100rpm 振荡发酵。

2、取样与样品处理

所有接种 T85-260 的处理，于接种后 0，2，4，6，8 小时各取样一次，T66、T1163 在 LB 中于接种后 0，3，6，9，12 小时各取样一次，T66、T1163 苎麻脱胶处理于接种后 0，4，8，12，16 小时各取样一次。取样量为 5ml。

样品处理过程如下：5ml 样品，在 4℃ 下 400g 离心 10min 后，取上清液，再在 4℃ 下 25800g 离心 15min，所得沉淀用灭菌双蒸水洗涤一次，再在 4℃ 下 25800g 离心 15min，弃上清，用滤纸吸干，所得样品加 200ul 样品溶解液，震荡 5min 溶解后转入 eppendorf 管，沸水煮 5min 后转入 -20℃ 保存。

样品溶解液成份 (%)：SDS 1.0，巯基乙醇 1.0，溴酚蓝 0.02，甘油 20.0，PI8.0Tris-HCl 20.0。

(三) 胞外酶种类和分子量测定

采用垂直板非连续 SDS-PAGE 凝胶电泳法^{[62]、[63]}，加样量 10~35ul，电极缓冲液 PH8.3Tris-甘氨酸，浓缩胶胶浓 3%，分离胶胶浓 10%，浓缩电流 10mA，分离电流 20mA，根据标准蛋白的 Rm 值绘制标准曲线，并据此由待测样品的 Rm 值求分子量。

结果与分析

一、纯培养过程中脱胶菌的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

（一）T85-260 肉汤培养基发酵液的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

T85-260 是中国农业科学院麻类研究所选育的苧麻生物脱胶高效菌种。它能在浸泡并微量通气条件下 8hrs 以内完成刮制质量不同的生苧麻脱胶。其适宜培养基之一是营养肉汤。因此，可以把 T85-260 在肉汤培养基中的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱作为基本谱予以研究。

T85-260 在肉汤培养基中发酵非常快，33℃条件下 6hrs 左右即变得很浑浊。从图 1 和照片 1 可以清楚地看出：0 hr 的样品中没有发现培养基中的蛋白带，可能是营养肉汤中的蛋白质分子量不在本实验设计的测定范围之内。T85-260 在 LB 培养基中至少可以分泌 41 种蛋白质(含亚基)，分子量在 10.0KD 至 120.3KD 之间，属于常见细菌胞外蛋白质（含亚基）分子量范围。这 41 种蛋白质（含亚基）在上述分子量范围内分布较均匀，而且都随着发酵时间的延长，蛋白带的颜色越来越深。这说明 T85-260 分泌的上述 41 种蛋白质（含亚基）可能都是组成型表达。分子量分别为 110.2KD, 81.7KD, 72.9KD, 66.8KD, 52.1KD, 42.2KD, 39.8KD, 35.5KD, 31.6KD, 28.6KD, 19.9KD, 16.0KD，显示出较强的组成型表达，可以作为 T85-260 的基本特征带，用来鉴别菌种和分析其它酶类。

一般来说，细菌摄取营养物质分泌一种或几种甚至十几种胞外酶即可。此处发现 T85-260 分泌的蛋白质（包括胞外酶及亚基）达 41 种之多，其中的胞外酶可能是组成型表达。这种现象不多见。如果真是这样的话，就可以作出如下推断：T85-260 对营养具有广谱性，在苧麻脱胶方面可能表现出“全能性”——能够降解不同组成和结构的非纤维素物质，即完成不同品种、产地、季别和等级的苧麻脱胶；同时还因为是组成型表达而表现出“高效性”——短时间内完成苧麻脱胶。事实上，在以往的研究和生产应用实验中，T85-260 确实表现出了这些特性。

(二) T66 肉汤培养基发酵液的蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

T66 是一种苧麻细菌——化学联合脱胶菌种, 具有较强的脱胶能力。T66 在肉汤培养基中发酵较慢, 其胞外蛋白 (含胞外酶) 电泳图谱比较特殊, 从图 2 及照片 2 可以看出, 其胞外蛋白 (含胞外酶) 的浓度很低, 反应在 SDS-PAGE 上即蛋白 (含亚基) 带极少, 带弱, 在发酵 6hrs 时只出现 3 条带, 分子量分别为 110.2KD, 82.6KD,

34.3KD, 而发酵 9hrs 和 12hrs 则只出现 1 条分子量为 34.3KD 的带。马铃薯-葡萄糖是 T66 菌最常用的培养基之一。为了验证 T66 菌的产酶特性, 以此进行了对比实验。结果表明: T66 在马铃薯-葡萄糖培养基中也出现类似的情况 (照片 9), 即发酵 12hrs 只有 3 条主带 (分子量为 35.0KD, 31.6KD, 21.6KD)。由此可见, T66 所分泌的组成型胞外蛋白 (含胞外酶) 种类不多。这就暗示着 T66 所分泌的对苧麻脱胶起作用的酶类可能以诱导型为主, 组成型为辅。

(三) T1163 肉汤培养基发酵液的蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

T1163 是中国农业科学院麻类研究所于 1970 年代末选育出来的一株较红的麻脱胶菌。由于苧麻的胶质成份与红麻的不一样 (如红麻的半纤维素

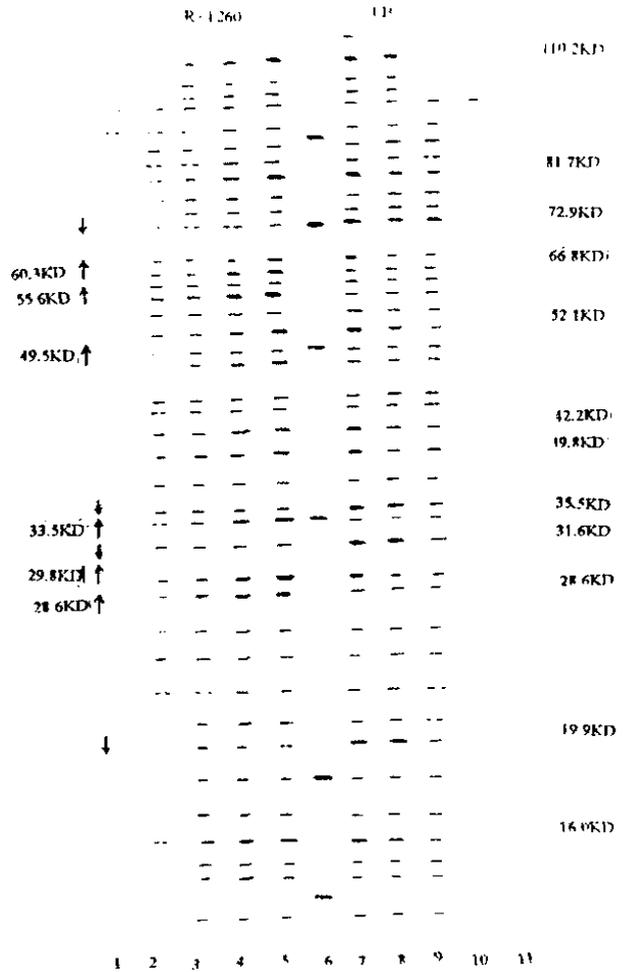


图 1 T85-260 在肉汤培养基及带菌苧麻发酵液 SDS-PAGE 蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱
从左至右, 泳道 1, 2, 3, 4, 5 为带菌苧麻发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hrs 的样品, 泳道 6 为低分子标准蛋白, 泳道 7, 8, 9, 10, 11 为 LB 发酵液 8, 6, 4, 2, 0 hrs 的样品

以木聚糖为主), 故 T1163 对苧麻脱胶的效果可能并不理想, 可以作为研究 T85-260 脱胶酶系的对照材料。

T1163 在肉汤培养基中发酵也较慢, 而且常呈团絮状。从电泳图谱看, 其谱带表现与 T66 相似 (见照片 2 和图 2), 即蛋白质 (酶) 的种类和数量都少, 如发酵 9hrs 只有 12 条带, 分子量 18.6KD 至 110.2KD 之间, 分布不太均匀, 多数集中于 60.2KD 至 110.2KD 之间, 强度很弱, 且随时间推移, 酶带又减少, 如发酵 12 hrs 后, 只有 4 条带。其中, 表达较强的是分子量为 110.2KD, 82.6KD 两条带。在葡萄糖-马铃薯培养基中分泌 17 种左右蛋白质 (含胞外酶), 分子量范围 10.0KD~97.0KD 之间, 表现较强的带为 97.0KD, 43.0KD, 22.3KD 的 3 条带 (照片 9)。因此, T1163 的脱胶酶类主要也是诱导酶。

(四) T85-260 果胶培养基发酵液的蛋白质 (含胞外酶) 的电泳图谱

生苧麻中含有 5%左右的果胶。果胶是人们研究生物脱胶方法的主攻对象之一。T85-260 是在微生物分类学中被确认为产果胶酶的菌种。为了研究 T85-260 所分泌的果胶酶, 采用市售柠檬果胶

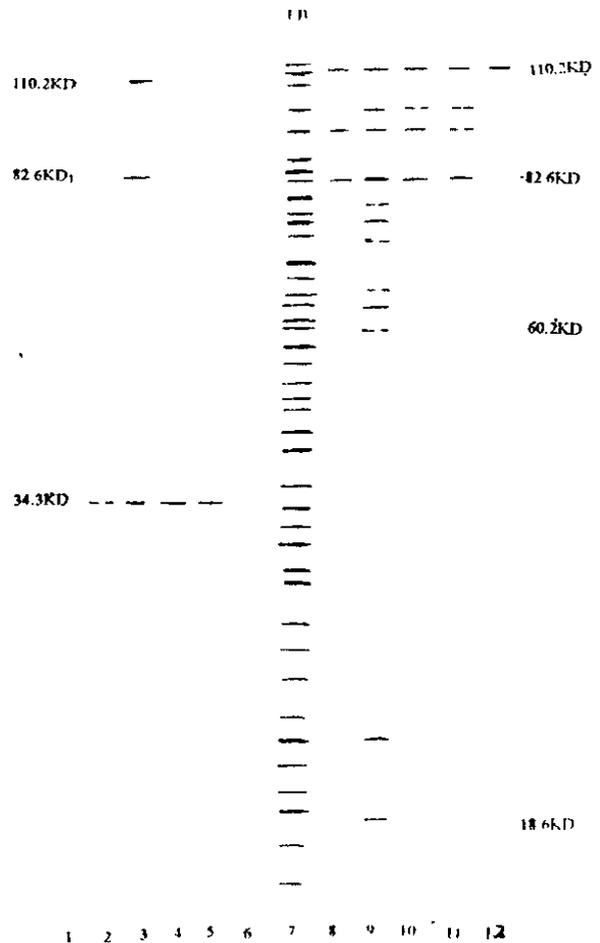


图 2 T66 和 T1163 在肉汤培养基发酵液中的 SDS-PAGE 蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

从左至右, 泳道 1, 2, 3, 4, 5 为 T66 肉汤发酵液 0, 3, 6, 9, 12 hr 的样品, 泳道 7 为 T85-260 肉汤发酵液 8 hr 的样品, 泳道 8, 9, 10, 11, 12 为 T1163 肉汤发酵液 12, 9, 6, 3, 0 hr 的样品。

为底物进行了发酵实验。结果（照片 9 泳道 8）显示，T85-260 在以柠檬果胶作唯一碳源的培养基中发酵速度接近肉汤培养基。其分泌的蛋白质（含胞外酶）的种类及其浓度差异与肉汤培养差不多，但有分子量为 28.6KD 的带表达特强，可能就是果胶酶；分子量为 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD 的 4 条带表达相对较弱（在肉汤

中表达很强），可能是蛋白酶。通过降低果胶培养基中的镁离子浓度（0.02%）进行试验，尽管发酵速度相对较慢，各种胞外蛋白质（胞外酶）的表达量相对较低（见图 3 和照片 3），但是，胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱的整体趋势没有明显差异。由此可以初步确定，T85-260 分泌的果胶酶类也属组成型。这与其它微生物果胶酶的属性是一致的。至于 T85-260 在降低无机盐比例时发酵柠檬果胶的速度较慢，其原因可能是 T85-260 分泌果胶酶时需要较高浓度的金属离子来促进。

（五）T85-260 葡萄-甘露聚糖发酵液的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

据化学脱胶机理研究，生苧麻中半纤维素以葡萄甘露聚糖和甘露聚糖为主。其结构最牢，只有用 17%的浓碱液（含有 4%的硼酸）沸煮才可以溶出。在苧麻脱胶过程中，T85-260 应该产生某种或几种甘露聚糖

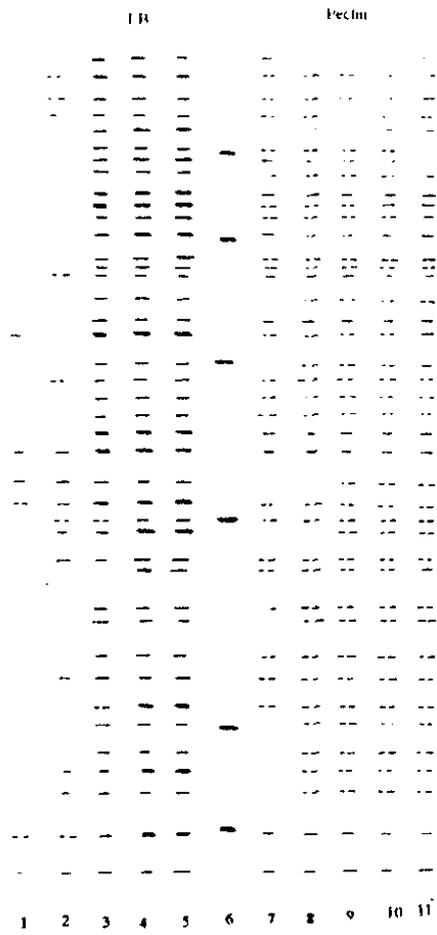


图 3 T85-260 在果胶培养基发酵液中的 SDS-PAGE 蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

从左至右，泳道 1, 2, 3, 4, 5 为 T85-260 肉汤发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品，泳道 6 为低分子标准蛋白，泳道 7, 8, 9, 10, 11 为 T85-260 果胶发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 样品。

酶才能使生苾麻完全脱胶。精制魔芋粉的主要成分为葡萄甘露聚糖，在缺少苾麻半纤维素的情况下，魔芋粉是较好的选择。因此，采用魔芋粉为唯一碳源进行了检测。结果表明，魔芋胶接种 T85-260 后很快就开始液化，2hrs 左右魔芋胶即完全液化。这说明 T85-260 具有某种使魔芋胶液化的关键酶，而且这种酶的活力很高。魔芋胶液化之后，T85-260 在魔芋粉培养基中进行快速发酵，发酵的速度明显比果胶的发酵速度快。这说明 T85-260 确实存在葡萄甘露聚糖酶。从图 4 和照片 4 可以看出，T85-260 在葡萄甘露聚糖发酵液蛋白质（含胞外酶）电泳图谱中存在

16 条表达较强的带，分子量分别为 110.2KD, 81.7KD, 72.9KD, 66.8KD, 60.3KD, 52.1KD, 49.5KD, 42.2KD, 39.8KD, 35.5KD, 33.5KD, 31.6KD, 29.5KD, 28.6KD, 19.9KD, 16.0KD。分子量分别为 60.3KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD, 28.6KD 的 5 条带的强度比 LB 发酵液相应带强度明显要强。其中分子量为 28.6KD 的带恰好是果胶培养基的特征带，此处也可以认为是果胶酶，因为精制魔芋粉中也有些果胶。

其余 4 条强表达的酶带可能就是甘露聚糖酶类。由于这 5 条带都能从 T85-260 肉汤发酵基本蛋白质（含胞外酶）的电泳图谱中找到，说明这 5 种酶均属组成型表达。因为苾麻脱胶的主攻对象之一为半纤维素——主要组分是葡

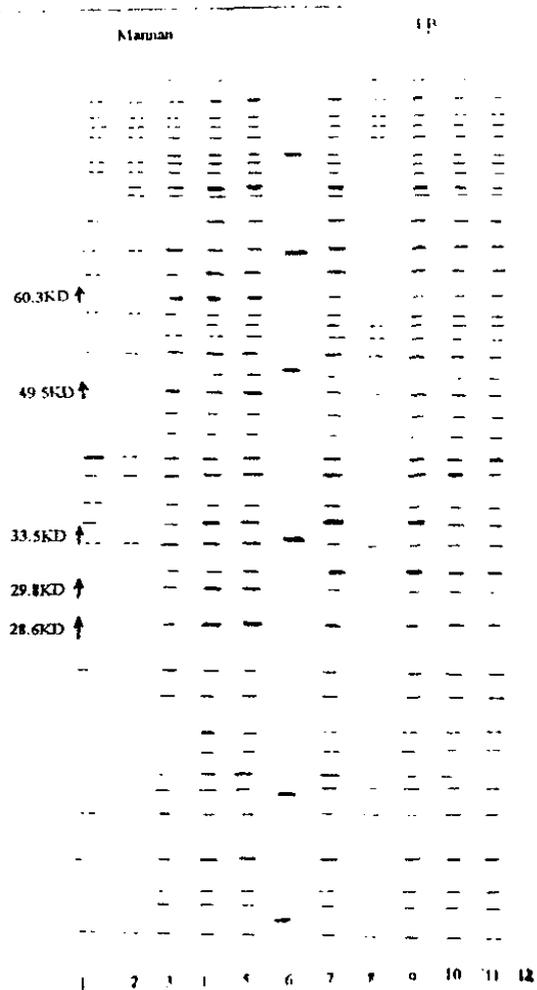


图 4 T85-260 在肉汤、甘露聚糖培养基发酵液中的 SDS-PAGE 蛋白质（含胞外酶）电泳图谱
 从左至右，即泳道 1, 2, 3, 4, 5, 6 分别为甘露聚糖发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品及低分子标准蛋白，泳道 7, 8, 9, 10, 11, 12 分别为肉汤发酵液 8, 2, 8, 6, 4, 0 hr 样品。

萄甘露聚糖及甘露聚糖，如果在脱胶过程中也出现强表达的话，那么，这 5 种酶很可能就是 T85-260 对苧麻脱胶的关键酶。

(六) T85-260 甘露糖与葡萄糖发酵液的蛋白质 (含胞外酶) 的电泳图谱

通常而言，葡萄糖是微生物生长发育的最佳碳源，但以往对 T85-260 分类鉴定的研究结果则是以甘露糖为最佳碳源。苧麻半纤维素的主要成份为甘露聚糖和葡萄甘露聚糖，其最终降解产物主要为甘露糖和葡萄糖。如果 T85-260 能高效利用甘露糖，那么葡萄甘露聚糖的降解就可以得到有效的促进。探讨 T85-260 对这两种单糖的降解能力和其酶谱变化情况，对揭示 T85-260 的快速脱胶能力具有重要意义。

从 T85-260 对这两种单糖的发酵情况来看，它利用这两种单糖发酵的速度都比果胶发酵快，但甘露糖发酵比葡萄糖更快，比肉汤发酵也要快，说明 T85-260 嗜好以甘露糖为碳源。从 T85-260 两种单糖发酵液的蛋白质 (含胞外酶) 的电泳图谱分析

来看 (图 5 和照片 5)，T85-260 在甘露糖中比在葡萄糖和肉汤中显色要深。就这两种单糖发酵体系谱带表现而言，与 T85-260 肉汤发酵液蛋白质 (含胞外酶) 的电泳图谱比较起来并无明显区别，即 LB 中出现的 12 条表现较强的带都能在这两种发酵体系中以类似的强度表达，同时，还可以清楚地看到：分子量为 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD 和 28.6KD 的

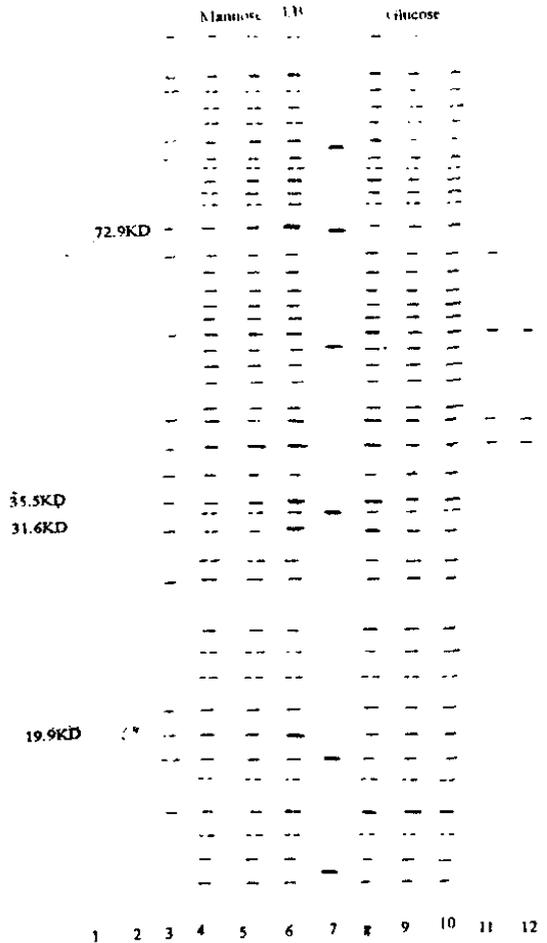


图 5 T85-260 在单糖培养基发酵液中的 SDS-PAGE 蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

从左至右，泳道 1, 2, 3, 4, 5, 6 分别为甘露糖发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品及肉汤发酵液 8 hr 的样品，泳道 7 标准蛋白，泳道 8, 9, 10, 11, 12 为葡萄糖发酵液 4, 6, 8, 20, 20 hr 的样品

带相对较弱（照片 9）。这就进一步证明这些带分别是蛋白酶和果胶酶，因为这两种培养基中不含蛋白质和果胶。此外，还实验过 T85-260 对半乳糖、木糖的发酵情况。结果发现发酵速度也较快，电泳谱带也基本相同（照片 9），说明 T85-260 对戊糖和己糖都能有效利用。因此，可以肯定，T85-260 所分泌的组成型胞外酶种类多，对含有不同非纤维素成分和结构的生苧麻甚至是其他类似纤维作物的脱胶具有广谱性（实践已证明）。

由于苧麻胶质中结构最牢的成分是葡萄甘露聚糖和甘露聚糖，而 T85-260 嗜好以甘露糖为碳源，因此，它在脱胶过程中能充分利用葡萄甘露聚糖、甘露聚糖降解的甘露糖，调节甘露聚糖酶的活性，促进葡萄甘露聚糖和甘露聚糖的降解。这种特性的确是十分难得的。这也许就是 T85-260 被称为“苧麻脱胶高效菌株”的可贵之处。

二、苧麻脱胶过程中脱胶菌的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

（一）T66 苧麻脱胶液的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

1、T66 未灭菌苧麻脱胶液的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

T66 在苧麻脱胶过程中的胞外蛋白质（含胞外酶）电泳图谱与其在肉汤培养基及马铃薯培养基中的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱比较起来有相当明显的变化（见图 6 及照片 6）。一是种类明显增加，达到 25 种之多。二是存在 7 条表现较强的带，分子量分别为 98.3KD, 96.4KD, 52.1KD, 55.6KD, 39.8KD, 28.6KD, 16.0KD，前 3 条带表达最强。与 T85-260 苧麻脱胶液谱带分子量分别为比较起来，T66 所分泌的表达较强的 4 条特征带（52.1KD, 39.8KD, 28.6KD, 16.0KD）可能与 T85-260 相同分子量的带是同源酶，但强度要弱得多。事实上，T66 的脱胶效果也不及 T85-260 的脱胶效果那么理想。

2、T66 灭菌苧麻发酵液的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

从图 6 及照片 6 看出，T66 灭菌苧麻发酵液蛋白质（含胞外酶）电泳图谱与未灭菌苧麻发酵液蛋白质（含胞外酶）电泳图谱存在较大差别。尽管蛋白质（含胞外酶）的种类未见明显变化，但其表达情况却变化很大。一是 T66 带菌苧麻发酵液谱带中表达很强的 98.3KD, 96.4KD 两条带在灭菌苧麻发酵液谱带中表达却非常弱；二是 52.1KD 这条带减弱明显；三是 42.2KD, 39.8KD 这两条带明显加强，成为了灭菌脱胶体系发酵液谱带中最强的带；四是带菌苧麻发酵液谱带中表达较强的 55.6KD, 28.6KD 也变得非常弱；五是 16.0KD 带变化不大。也就是说，T66 在灭菌苧麻脱胶液谱带中只存在分子量分别为 42.2KD, 39.8KD, 52.1KD, 16.0KD 的 4 条表达较强的带，前两条带最强，后两

条带一般强。进一步说明 T66 的脱胶酶类可能以诱导型为主。因为在苎麻灭菌过程中(蒸汽灭菌),苎麻胶质发生了部分水解,造成胶质成份及结构变化,其中某种水解产物可能是 42.2KD, 39.8KD 带的良好诱导物,故该酶表达很强。可能还由于其它几种酶的天然诱导物已发生了变化,从而导致这些酶分泌减少。其实,52.1KD、39.8KD 等带都是 T85-260 组成型强表达的带,它们可能具有很强的同源性,也许就是重要脱胶酶。

(二) T1163 苎麻脱胶液的蛋白质 (含胞外酶) 的电泳图谱

1、T1163 未灭菌苎麻脱胶的蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱与 T1163 肉汤发酵液及马铃薯发酵液 SDS-PAGE 电泳图谱相比, T1163 在苎麻脱胶过程中脱胶液蛋白 (含胞外酶) 带数量明显增多, 达 30 种以上 (见图 7 及照片 7); 存在 7 条表达较强的带, 分子量分别为 118.50 KD, 98.3KD, 97.9 KD, 96.4KD, 55.6KD, 52.1KD, 35.9.5 KD。这些强带的强度都较 T66 脱胶液强带的强度弱。T1163 在脱胶过程中的表达较强的带数量比 T85-260 苎麻脱胶时表达较强的带的数量要少得多, 强度也要弱得多。比较起来, T1163 和 T66 两种菌在脱胶过程中诱导产生的分子量为 98.9KD, 96.4KD, 52.1KD 的三条带表现基本一致。因此, 这几种分子量的蛋白质可能就是 T1163 及 T66 的重要脱胶酶。这些说明, T1163 较低的苎麻脱胶能力是与其苎麻脱胶

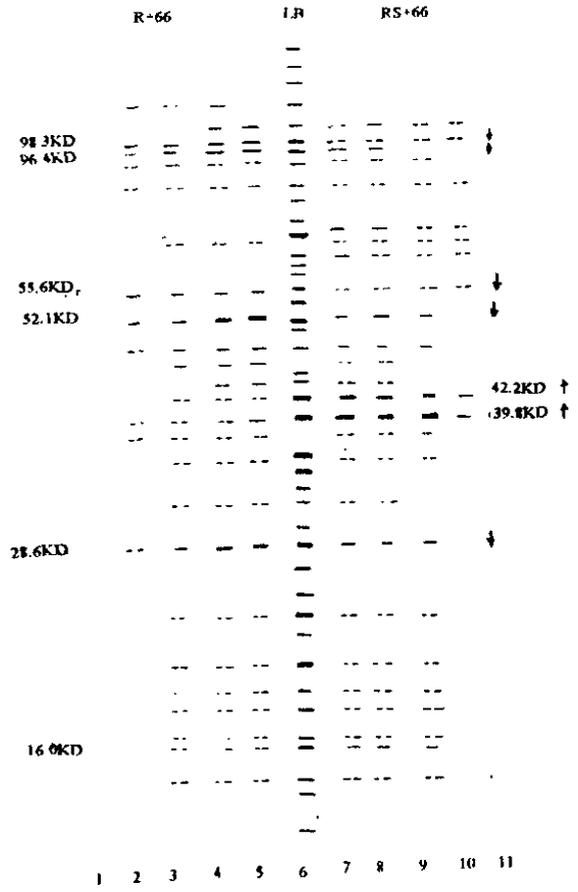


图 6 T66 苎麻脱胶液 SDS-PAGE 蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

从左至右, 泳道 1, 2, 3, 4, 5 为 T66 在发酵未灭菌苎麻过程中的 0, 4, 8, 12, 16hr 样品, 泳道 6 为 T85-260 肉汤发酵液 6 小时样品, 7, 8, 9, 10, 11 泳道为 T66 发酵灭菌苎麻过程中 8, 12, 16, 4, 0hr 样品。

过程中分泌的关键酶种类较少、强度较弱有一定关系的。T1163 在纯培养过程中仅出现 3~12 种胞外蛋白（含胞外酶），而在苕麻脱胶过程中出现 30 种以上胞外蛋白（含胞外酶），因此可以初步确定 T1163 的脱胶酶类多属诱导型。

2、T1163 灭菌苕麻脱胶液的蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

灭菌苕麻与未灭菌苕麻接种 T1163 以后，其脱胶速度基本相同——都较慢，但是胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱变化却非常大。从图 7 及照片 7 可以看出，灭菌苕麻接种 T1163 后其脱胶液胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱明显不同于未灭菌苕麻接种 T1163 后的脱胶液胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱。未灭菌苕麻脱胶液中明显强表达的 7 条带在灭菌苕麻脱胶液中表现却不完全一样。分子量 118.50KD, 98.3KD, 97.9KD, 96.4KD 的 4 条在带菌苕麻脱胶液谱带中表达较强的带在灭菌苕麻脱胶液谱带中表达却非常弱，55.6KD, 52.1KD, 35.9KD 的 3 条带在两种发酵体系中表现基本一致，但分子量为 42.2KD, 39.8KD 和 28.6KD 的 3 条却随时间延长而明显地表达越来越强，以前两条带为最强。也就是说，T1163 在灭菌苕麻脱胶液中存在 6 条表达较强的蛋白（含胞外酶）带。这种变化与 T66 在灭菌苕麻脱胶过程中其脱胶液蛋白（含胞外酶）带的表现相同。因此，可以进一步说明 T1163 脱胶酶可能属诱导型，而且

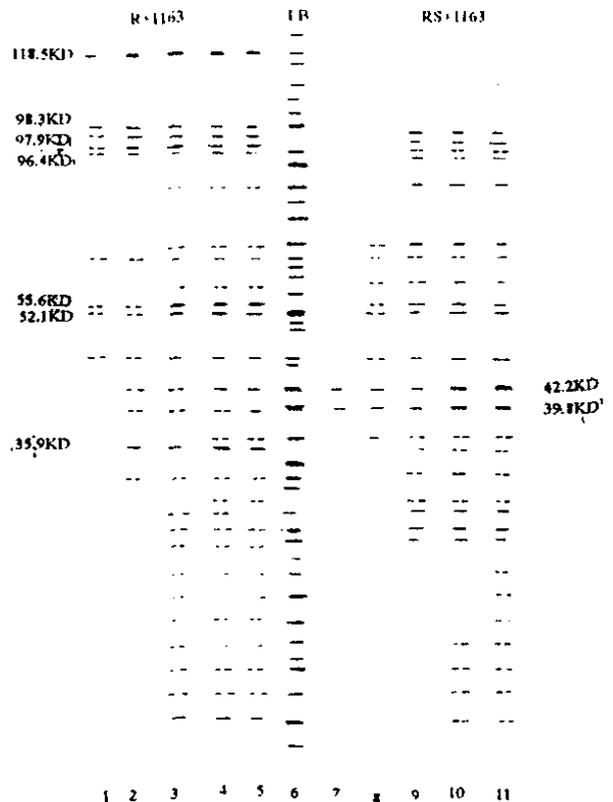


图 7 T1163 苕麻脱胶发酵液蛋白质（含胞外酶）电泳图谱

从左至右，泳道 1, 2, 3, 4, 5 为 T1163 未灭菌苕麻 0, 4, 8, 12, 16hr 样品，泳道 6 为 T85-260 肉汤培养发酵 6hr 样品，泳道 7, 8, 9, 10, 11 为灭菌苕麻 0, 4, 8, 12, 16hr 的样品

也进一步说明, T1163 在未灭菌和灭菌苕麻脱胶过程中较强表达的酶可能就是其重要脱胶酶。

(三) T85-260 苕麻脱胶液的蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

1、T85-260 未灭菌苕麻发酵液的蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

T85-260 能在 8hrs 以内快速完成苕麻脱胶, 必然有其独特的脱胶机制和脱胶酶类。从图 1、图 8 照片 1、照片 8 可以较清楚地看出, T85-260 在苕麻脱胶过程中, 其发酵液电泳图谱依然存在 41 条带, 分子量范围为 10KD ~120KD, 分布比较均匀, 有 17 条左右的带显色较浓。与 T85-260 肉汤培养基发酵液电泳图谱比较起来, 存在 10 条表现不同的带。分子量分别为 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD 的 4 条带比 LB 发酵液电泳图谱相应带强度减弱, 这 4 条带可能与蛋白质降解有关, 属蛋白酶类。蛋白酶不是苕麻脱胶的关键酶, 因为刮制后的生苕麻中的蛋白质含量比较低而且不是脱胶的主攻对象, 所以蛋白酶的表达与分泌也较弱, 但他们可能对 T85-260 利用生苕麻中少量蛋白为营养进行大量生长繁殖起重要作用。分子量分别

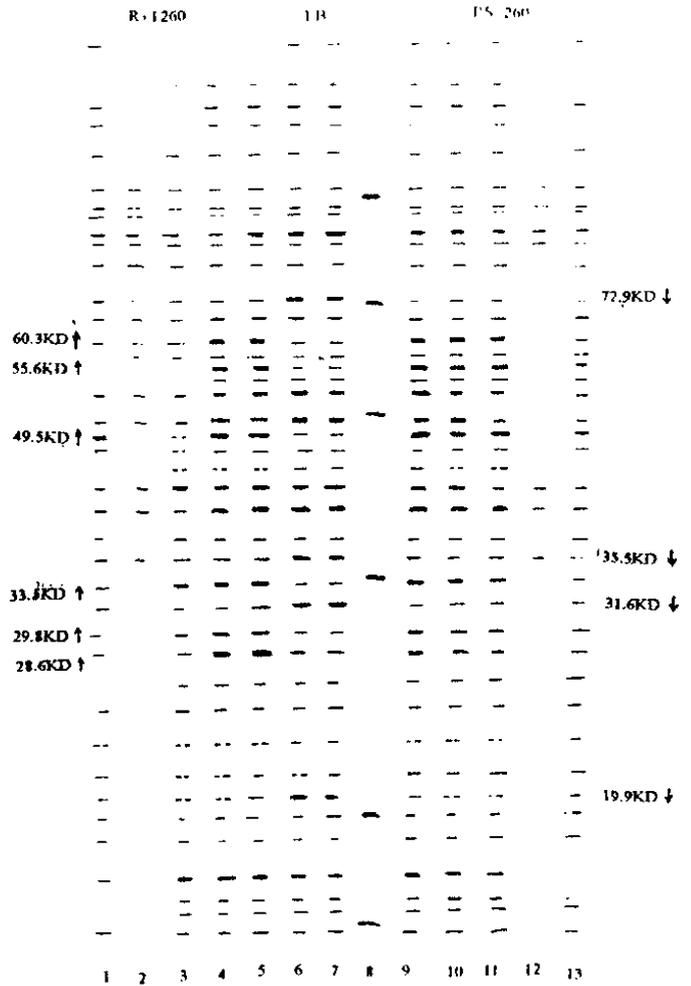


图 8 T85-260 苕麻脱胶液 SDS-PAGE 蛋白质 (含胞外酶) 电泳图谱

从左至右, 泳道 1, 2, 3, 4, 5 为未灭菌苕麻 T85-260 发酵 0, 2, 4, 6, 8hr 样品, 6, 7 泳道为 T85-260 肉汤发酵液 6hr、8hr 样品, 泳道 9, 10, 11, 12, 13 为灭菌苕麻 T85-260 发酵 8, 6, 4, 2, 0hr 样品。

为 60.3KD, 55.6KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.6KD, 28.6KD 的 6 条带比 LB 发酵液电泳谱相应带强度明显加强, 且有随时间推移, 强度越来越大的趋势。因此, 可以初步认为这 6 条带可能是苧麻脱胶的关键酶, 而且是组成型表达。其变化趋势是随细菌数量的不断增加, 酶的分泌量也随之增加, 在发酵 6hrs 后, 酶的分泌达到高峰。这与 T85-260 的实际脱胶效果是基本吻合的。T85-260 在葡萄甘露聚糖发酵液中也出现了 60.3KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD, 28.6KD 的 5 条强表达带。因此, 可以基本肯定, 这 5 条(前 4 条带为甘露聚糖酶, 最后一条带为果胶酶)带确实是 T85-260 苧麻脱胶过程中起关键作用的酶。至于分子量为 55.6KD 的在脱胶过程中表现出来的相对其他处理表达较强的带起哪一方面的关键作用, 从照片 9 可以发现, 它在木聚糖发酵液电泳谱中表现比较突出; 同时, 它在 T66 和 T1163 脱胶过程中都有较强的表达, 其中 T1163 是红麻脱胶专用菌, 而红麻的半纤维素的主要成分是木聚糖, 杨礼富在做红麻脱胶酶学研究时发现 T1163 在红麻脱胶过程中有一条分子量相当接近(56.3KD)的脱胶酶主带。因此, 可以认为它就是木聚糖酶。此外, 分子量分别为 110.2KD, 81.7KD, 52.1KD, 42.2KD, 39.8KD, 66.8KD, 16.0KD 的 7 条带的强度跟肉汤培养基发酵液电泳谱相应带的强度基本相同。这 7 条带在苧麻脱胶过程中可能也发挥了比较重要的作用。事实上, 分子量为 52.1KD, 42.2KD, 39.8KD, 35.5KD, 16.0KD 的这些带在 T66 和 T1163 脱胶过程中都是比较重要的蛋白(含脱胶酶)带, 而这些带很可能就是 T85-260 的相关酶的同源酶。所以, T85-260 对苧麻脱胶的高效性可能与其具备脱胶关键酶和酶的组分较齐全密切相关。

2、T85-260 灭菌苧麻脱胶液的蛋白质(含胞外酶)电泳图谱

T85-260 的脱胶效果从试验和生产实践中已得到充分证明: 接种了 T85-260 的生苧麻只需 6-8 小时就能完成脱胶进程。但生苧麻本身携带的杂菌会不会给脱胶带来很大的积极影响? T85-260 的脱胶关键酶在灭菌和未灭菌两种脱胶体系中有什么不同的表现? 灭菌苧麻脱胶速度和脱胶液蛋白质(含胞外酶)的电泳图谱分析可以回答这一问题。从图 8 和照片 8 可以看出, 灭菌苧麻接种 T85-260 后的脱胶液蛋白质(含胞外酶)电泳图谱与未灭菌麻接种 T85-260 后的脱胶液蛋白质(含胞外酶)电泳图谱基本相同, 共有 41 条蛋白质(含胞外酶)带, 分子量范围 10KD~120KD, 分布较均匀, 除分子量 21.4KD 的带显色较深(可能是苧麻灭菌过程中其胶质的成分和结构发生某些变化造成的)外, 其它带的种类及其表达量没有明显区别, 都是组成型

表达。这充分说明，T85-260 在脱胶过程中所起的脱胶作用是绝对的。这从灭菌苧麻的脱胶速度与未灭菌苧麻脱胶速度基本相同可以得到进一步印证。造成这一现象的原因可能是由于 T85-260 生长繁殖速度特别快，其脱胶关键酶也随之大量分泌，苧麻胶质降解也特别快，而这么短的时间内其它杂菌尚未“形成气候”（未发现灭菌与不灭菌苧麻脱胶过程中在电泳图谱上的差别），脱胶就已完成，故杂菌对脱胶根本不起多大作用。

同时，从图 8 和照片 8 还可以看出：T85-260 确实存在上述 6 种脱胶关键酶，包括甘露聚糖酶 4 种（分子量为 60.3KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD），木聚糖酶 1 种（分子量为 55.6KD）和果胶酶 1 种（分子量为 28.6KD）。

至此，通过对比和分析 T85-260 与 T66、T1163 在不同发酵（脱胶）体系中的发酵（脱胶）速度和 SDS-PAGE 胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱特征，一方面，明确了 T85-260 在所有处理中稳定分泌 41 种组成型表达蛋白质（含胞外酶或亚基，其中有 6 种脱胶关键酶）及其在这两种脱胶体系中表现出基本相同功能的特性。这些特性是 T66 及 T1163 明显不及的。另一方面，明确了 T85-260 的高效脱胶机理，即①具备脱胶关键酶，即具有甘露聚糖酶、果胶酶和木聚糖酶，而且胶质降解酶系比较齐全，它们的表达和分泌受外界因素影响较少，伴随 T85-260 的快速生长和繁殖，这些酶能快速分泌和表达，故能快速降解苧麻胶质并彻底地分解一部分有机物；②T85-260 利用脱胶过程中的酶解产物尤其是甘露糖为碳源和能源进行快速生长和繁殖来促进脱胶关键酶的产生。T85-260 在苧麻脱胶机理上表现出的“高效性”和“全能性”也是 T66 及 T1163 所不具备的。

问题与讨论

一、关于培养基（浸出液）蛋白带

一般而言，含蛋白质培养基（浸出液）中的蛋白质都应该对其发酵液蛋白（含胞外酶）带产生一定的影响，但是，本研究中发现，0 小时样品（即接种后立即取样）并未出现所期待的蛋白带，隐约出现的蛋白（含胞外酶）带均是 T85-260 固有的表达较强的特征带。造成这种现象的原因可能是：LB 培养基中的牛肉膏、蛋白胨蛋白质均系蛋白酶水解后的产物，分子量可能很小，不在本研究凝胶分析分子量范围之内。事实上，0 小时样品经 25800g 高速离心后，离心管中几乎看不到蛋白质沉淀，这也证明牛肉膏、蛋白胨蛋白

质分子量确实很小。苕麻发酵液蛋白（含胞外酶）电泳谱带也看不到 0 小时表现很强而以后逐步减弱的带，所出现的均是 T85-260 固有的表达较强的特征带。其原因除了苕麻浸出蛋白分子量超出本研究凝胶分析分子量范围之外，还有一种可能就是苕麻浸出蛋白的分子量与 T85-260 固有的表达较强的特征带分子量一样，故会与 T85-260 的蛋白（含胞外酶）电泳谱带产生重叠。

二、组成型酶与诱导型酶

一般而言，酶可以粗略地分为组成型酶与诱导型酶两类^{[60][61]}。组成型酶不需诱导物，即能实现高水平表达。脱胶过程中伴随微生物的繁殖大量分泌组成型脱胶酶，能在较短的时间里达到较高的生化反应速度，表现为脱胶速度很快，所以，组成型酶对加速生化反应，特别是麻类生物脱胶是很有意义的。诱导酶必需诱导物以解除某种阻遏物对某种酶基因转录的抑制，只有存在合适的诱导物，其它条件具备，解除基因抑制后，基因才能实现有真正生理意义的表达。所以诱导酶往往可能不能在某些条件下大量表达，从而影响这种酶的生产 and 利用。

苕麻生物脱胶是非常复杂的生化过程。由于胶质成份复杂、结构牢固，要除去这些胶质，必然需要一系列复杂的酶系或多酶体系。从苕麻胶质成份看，其生物降解必需甘露聚糖酶起主导作用，其它酶系统，如果胶酶降解系统、木聚糖酶降解系统（包括聚糖酶、木糖苷酶、葡糖醛酸酶、乙酰木聚糖脂酶、阿拉伯糖苷酶、酚酸脂酶等）^{[61][91][10]}可能也起重要作用。缺少其中的某几种甚至某一种脱胶关键酶，或者关键酶的量少、活性低，胶质就可能难以从生苕麻中释放出来或被降解。如果这种关键性酶是组成型表达，那么，胶质就能伴随微生物的生长繁殖而快速有效地从生苕麻中释放出来或彻底降解，从而达到脱胶的目的。

T85-260 是一种高效苕麻脱胶菌，从已确定的其分子量分别为 60.3KD, 55.6KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD, 28.6KD 的 6 种关键性脱胶酶的分泌特性看，这些酶带都能从纯培养和苕麻脱胶发酵液电泳图谱中找到，同时，都呈现出“由少到多”的变化规律，因此，可以肯定，T85-260 所分泌的脱胶酶均属组成型表达，而且随发酵时间的延长，显色越来越深，即随细菌的生长与繁殖分泌量越来越多。还有三种在肉汤培养基中高水平表达的蛋白质或胞外酶（分子量为 39.8KD, 42.2KD, 52.1KD），在 T1163、T66 脱胶过程中也大量表达，可能也是十分重要的脱胶酶，与 T1163 及 T66 不同的是，它们也是组成型表达的。对比 T66 及 T1163 的胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱，特

别是其在苧麻脱胶过程中的胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱，不难看出，这两种菌在肉汤培养基及马铃薯培养发酵液中胞外蛋白（含胞外酶）数量少（分别只有 3 种和 10 种），而在其发酵苧麻的过程中，会产生许多新的蛋白质（含胞外酶），这些酶应该都是诱导酶。从脱胶结果来看，T85-260 只需 8 小时即可完全脱胶，而 T66 及 T1163 分别发酵 12 小时和 16 小时才基本完成脱胶（实践证明，要达到完全脱胶的目的，还需要稀碱精练予以补充）。因此，可以得出结论，T85-260 用于麻类脱胶的高效性很有可能与其关键性脱胶酶是组成型酶有关。

三、苧麻菌制剂脱胶与酶制剂脱胶

苧麻菌制剂脱胶与酶制剂脱胶（统称为“生物脱胶”）在本质上都是利用微生物分泌的酶催化分解或降解生苧麻中的非纤维素物质，以提取纯净苧麻单纤维用于纺织高档衣物。国内外有关苧麻生物脱胶的研究已经进行了近 80 年^[6]，自从发现酶的独特生化功能后，人们对酶制剂脱胶寄予了厚望。人们希望从微生物中提取、分离、纯化某种、某些脱胶酶，直接依靠酶的水解作用彻底脱胶，以便应用于生产，达到提高生产效率，改进产品品质，减轻环境污染的目的。国内开展苧麻微生物脱胶的研究也有 40 多年，先后有江西轻工业厅、上海工业微生物研究所、中国农业科学院麻类研究所、华中农大、湖南师大、山东大学和中国科学院遗传研究所开展过这方面的研究工作。这些研究除了中国农业科学院麻类研究所发明的第一代和第二代菌制剂脱胶技术获得生产应用成功以外，其余都未能取得大面积生产应用的理想结果。本研究结果可以阐明部分原因：

一是产酶菌种不理想。现行酶制剂除了中国科学院遗传研究所配制的果胶酶粉剂（价格昂贵）以外，其余都是一种具有某些脱胶作用的微生物培养物，最多是沉淀的粗提取物^{[6] [41]}。从目前报导的苧麻脱胶菌种来看，至今尚未有一株其脱胶能力超过 T85-260。现行酶制剂生产菌本身的脱胶能力就不很强，用其纯培养菌液处理生苧麻需要十几小时甚至几十小时才能基本完成脱胶。根据完成脱胶的时间判断，这些菌株所分泌的脱胶酶很可能是诱导型的，而且缺少脱胶关键酶，或者说其脱胶酶的种类和数量都非常有限。因此，采用这样的菌株来生产脱胶酶制剂，自然也就无法达到预期的目标。

二是苧麻生物脱胶的机理还不很明了。人们对苧麻胶质的分子结构、胶质之间及其与纤维素分子相互作用、脱胶的概念和机制、脱胶酶的种类及其动力学、多酶体系的协同作用等知之甚少，所以限制了现行酶制剂脱胶研

究的深入和推广应用。有人认为“脱胶”就是脱去生苧麻中的果胶，采用市面上的苹果或橘子果胶为底物测定菌株果胶酶活即以为是。其实不然，果胶是生苧麻胶质中较易脱去的成分（化学脱胶一煮麻中的果胶就所剩无几了）之一。因此，以果胶为主攻方向的酶制剂脱胶技术，一接触生产实践就“不行了”。有人曾试图用基因工程的方法改进某些菌降解胶质成份的能力，但也难以达到预期的目的^{[37]-[39]}。T85-260 菌株的选育者即“苧麻生物脱胶工艺技术与设备”的第一发明人刘正初研究员，根据 T85-260 菌株脱胶的特点提出了“块状崩溃”的假说，在理论是成立的，实践上也得到了部分证实：本研究通过胞外蛋白（含胞外酶）电泳图谱分析确实发现了脱胶关键酶的存在；以往的研究也表明，脱胶废液中的可溶性单糖几乎为零。至于 T85-260 苧麻脱胶高效性的生化反应机制，还有待于进一步研究。

苧麻酶法脱胶是苧麻加工的较好选择之一，一般而言，酶法脱胶工作效率高，如果酶液理想，其生产时间至少可以减少一半左右，设备利用率大大提高，产品质量有可能更稳定。但是，迄今为止所开发的酶法脱胶仅仅是某种脱胶能力并不很高的脱胶菌过培养物。由于这些菌或缺少脱胶关键酶，或某种（些）关键酶为诱导型（T66 及 T1163 就是），由于缺少恰当的诱导物，或产酶条件不具备，其过培养物可能不具备苧麻脱胶的关键性酶，自然脱胶速度慢，达不到生产应用的目的。T85-260 由于产脱胶关键酶，其酶多属组成型表达（苧麻胶质的降解产物也促进其表达），因此，它可能是进行酶法脱胶研究的好材料。但是，由于 T85-260 繁殖速度快，脱胶迅速，生产工艺简单，生产成本低，在目前的情况下，采用 T85-260 进行微生物脱胶仍然是比较现实和可靠的。

小 结

T85-260 是一种苧麻脱胶高效菌。它在 8 小时以内完成苧麻脱胶的独特的快速脱胶性能和机理可以从其胞外酶酶学特征上得到一些解释。通过上述试验结果分析和讨论，可以得出如下结论：

一、T85-260 在纯培养过程中所分泌的胞外酶属于组成型表达且具广谱性

T85-260 在肉汤、果胶、葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、葡萄-甘露聚糖、木聚糖等培养基中生长迅速，能快速分泌 41 种蛋白质及胞外酶组分。其分子量在 10.0KD~120KD 间，分布比较均匀。有 12 条相对于其它 29 条表

达较强的带，分子量分别为：110.2KD, 81.7KD, 72.9KD, 66.8KD, 52.1KD, 42.2KD, 39.8KD, 35.5KD, 31.6KD, 28.6KD, 19.9KD, 16.0KD。这些谱带可以作为进行菌种鉴定和酶谱分析的基本谱带。其中有一部分带已在本研究不同处理中证明有特殊形状。这 41 条蛋白质带（含胞外酶）在培养过程中均不消失，可以认为都是 T85-260 菌的组成型表达。一般来说，微生物摄取某种营养物质分泌一种或几种胞外酶即可。但此处发现 T85-260 在各种培养基的纯培养过程中均组成型表达 41 种蛋白质（含胞外酶）电泳谱带，说明它对碳源具有广谱性。因此，可以认为，T85-260 胞外酶的组成型表达及其对碳源的广谱性决定了它对非纤维素降解的高效性和全能性。

T66 菌在肉汤中培养只表达出分子量为 110.2KD, 82.6KD, 34.3KD 的 3 条带，在马铃薯-葡萄糖培养基中也只表达出分子量为 35.0KD, 31.6KD, 21.6KD 的 3 条带。T1163 在肉汤培养基中分泌 12 种蛋白质（含胞外酶），分子量范围 18.6KD-110.2KD，而在马铃薯-葡萄糖培养基中却分泌 17 种蛋白质（含胞外酶）。因此，这两种菌的胞外酶多属诱导酶。

二、T85-260 在果胶培养基中产果胶酶并需要镁离子激活

在较高镁离子浓度下 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为 0.05%)，T85-260 在柠檬果胶培养基中生长繁殖较快，几乎与肉汤发酵的速度基本一致。其发酵液 SDS-PAGE 图谱与肉汤发酵液 SDS-PAGE 图谱基本相同，也出现了 12 条表达较强的带，但出现了分子量为 28.6KD 的比 LB 相应带明显增强的带，分子量为 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD 的 4 条带比 LB 的相应带表达要弱。分子量为 28.6KD 的带可能就是果胶酶。当 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度降为 0.02% 时，果胶的降解速度明显减慢，电泳图谱颜色明显淡一些，不过，谱带特征基本未变。这说明其果胶酶的分泌与活性受镁离子浓度的调节。

三、T85-260 在葡萄甘露聚糖培养基中产甘露聚糖酶

T85-260 能快速液化并发酵葡糖甘露聚糖。它在葡萄甘露聚糖培养基发酵液中出现 16 条表达较强的带。其分子量分别为 110.2KD, 81.7KD, 72.9KD, 66.8KD, 60.3KD, 52.1KD, 49.5KD, 42.2KD, 39.8KD, 35.5KD, 33.5KD, 31.6KD, 29.5KD, 28.6KD, 19.9KD, 16.0KD。其中 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD 的 4 条带比 LB 的相应带表达要弱；60.3KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD, 28.6KD 的 5 条带比 LB 的相应带表达更强，分子量较大的 4 条带可能属甘露聚糖酶（分子量较小的被初步确定为果胶酶带）。

四、T85-260 在肉汤培养基中产蛋白酶

对比 T85-260 在 LB、果胶、葡萄糖、甘露糖、葡萄甘露聚糖（甚至还包括半乳糖、木糖）发酵液电泳图谱，可以发现：在 T85-260 所分泌的 41 条组成型表达谱带中，分子量为 72.9 KD, 35.5 KD, 31.6 KD, 19.9 KD 的 4 条谱带在 LB 中表达较强，而在其他培养基的发酵液中几乎都表达较弱。因为除了肉汤以外其他培养基都不含或很少有蛋白质，所以，可认为这 4 种胞外酶就是蛋白酶。T85-260 的蛋白酶肯定不是脱胶关键酶，因为通过刮制的生苕麻蛋白质含量不是很多，而且生苕麻中的蛋白质也不是脱胶的主攻对象，但可能对 T85-260 利用生苕麻中的蛋白质为营养而大量繁殖起重要作用。

五、T85-260 嗜好甘露糖

横向比较 T85-260 在果胶、葡萄甘露聚糖及各种单糖培养基中的发酵速度，可以发现：T85-260 在甘露糖中发酵速度最快（这与以往对它进行分类鉴定时测定的结果是一致的）。从葡萄糖和甘露糖发酵的对比实验的电泳图谱也可以观察到：T85-260 在甘露糖中的谱带颜色明显比葡萄糖中的颜色深。这就说明 T85-260 虽然对碳源具有广谱性，但更嗜好甘露糖。这一特性对苕麻脱胶具有十分重要的意义。因为甘露糖的快速而彻底的分解将有助于葡萄-甘露聚糖的降解。

六、T85-260 完成苕麻脱胶依赖于组成型酶

从带菌和灭菌苕麻脱胶过程中发酵液的谱带可以看出：生苕麻接种 T85-260 后发酵 4 小时即出现 41 条带。这 41 条带都是在 T85-260 纯培养过程中出现过的组成型表达带，并没有出现新的带。按照较强与较弱的概念来划分，脱胶过程中表达较强的是分子量为 110.2KD, 81.7KD, 72.9KD, 66.8KD, 60.3KD, 55.6KD, 52.1KD, 49.5KD, 42.2KD, 39.8KD, 35.5KD, 33.5KD, 31.6KD, 29.5KD, 28.6KD, 19.9KD, 16.0KD 的 17 条带。与葡萄甘露聚糖纯培养过程中的 SDS—PAGE 电泳谱带比较，在表达较强的 17 条带中，分子量为 66.8KD 的带相对较弱，55.6KD 的带是脱胶过程中表现出来的相对其他处理表达较强的带，除此以外，其他带没有明显差异。这说明 T85-260 的快速生长繁殖需要大量胞外酶降解外界结构复杂的营养源，以获得生长繁殖所需要的营养物质。伴随 T85-260 的快速生长繁殖，组成型酶能比较顺畅地大量表达与分泌，有力地促进了胶质的降解。因为 T66 及 T1163 在灭菌脱胶过程中都较强表达（最强）分子量分别为 42.2KD, 39.8KD 的两条带，在灭菌和不灭菌苕麻脱胶过程中都较强表达 52.1KD 带，这 3 条带是 T66 及 T1163 的重要脱胶酶类，同时也是 T85-260 强表达基本带，它们可能具有同源性。由此可见，分子量

为 110.2KD, 81.7KD, 66.8KD, 52.1KD, 42.2KD, 39.8KD, 16.0KD 的 7 条表达比较明显的蛋白(含胞外酶)带可能也是对苧麻脱胶起重要作用的酶。因此,可以肯定, T85-260 完成苧麻脱胶是依赖于其组成型表达胞外酶的。

T66 与 T1163 则不然。这两种菌的脱胶酶是诱导型的。

七、T85-260 对苧麻脱胶的高效性在于有关键酶的作用

苧麻脱胶的主攻对象是果胶和半纤维素——以葡萄甘露聚糖、甘露聚糖为主以及木聚糖。T85-260 能快速完成苧麻脱胶,必然与其能分泌甘露聚糖酶、果胶酶和木聚糖酶有关。试验中发现, T85-260 在带菌和灭菌苧麻脱胶发酵液中都能较高强度地表达分子量为 60.3 KD, 55.6 KD, 49.5 KD, 33.5 KD, 29.5 KD, 28.6KD 的 6 条带。其中有 1 条带恰好是果胶发酵中表现出来的特征带——果胶酶(28.6KD); 4 条带是葡萄甘露聚糖发酵中表现出来的特征带——甘露聚糖酶(60.3 KD, 49.5 KD, 33.5 KD, 29.5 KD); 另 1 条带则是木聚糖发酵和红麻脱胶酶学研究所证实的木聚糖酶(55.6 KD)。这 6 种酶都是脱胶关键酶。正因为 T85-260 能大量分泌这么多脱胶关键酶,所以它能快速完成脱胶。T66 和 T1163 在苧麻脱胶过程中除出现 28.6KD 这条较强表达的带外,均未出现 T85-260 的上述几条特征带,而且较高强度表达的带很少。这就说明 T66 和 T1163 缺少脱胶关键酶或酶系不全。在灭菌苧麻脱胶液中 T66 和 T1163 均能较高强度地表达与分泌 42.2KD, 39.8KD 两种胞外酶,这两条带也是 T85-260 的组成型表达较强带,所以,这两条带可能也是重要的脱胶酶。

主要参考文献

- [1] 李宗道, 麻作的理论与技术, 上海科技出版社, 1980
- [2] 刘正初等, 苧麻生物脱胶技术应用研究, 纺织学报, 1991 (10), PP8-12
- [3] 孙庆祥等, 苧麻微生物脱胶, 中国农业科学, 1997 (专辑), PP130-134
- [4] 刘正初等, 苧麻细菌化学联合脱胶废水的污染机理研究, 中国环境科学, 1994 (12)
- [5] 刘正初等, 苧麻细菌化学联合脱胶废水综合治理探讨, 苧麻纺织科技, 1990 (3)
- [6] 邝利民, 国内外苧麻微生物脱胶研究概述, 中国麻作, 1983 (3)
- [7] 冯湘沅等, 苧麻脱胶菌种的特性研究, 中国麻作, 1995 (2), PP32-35
- [8] 张宏书, 广州化学, 1988 (18), PP35-39
- [9] 邹永龙等, 木聚糖降解酶系统, 植物生理学通讯, 1999 (5), PP404-410
- [10] 吴襟, 微生物 β -甘露聚糖酶, 微生物学通报, 1999 (2)

- [11] Das P.C., cellulose chem Technol, 1984 (18), PP79-82
- [12] Xie Laisu, Sugar Components in hemicellulose of cotton stalk and kenaf, Cellulose Chem. Technol. 1988(22): PP399-403
- [13] Duckart, etc., The structure of a "xylan" from kenaf, cellulose. Technol. 1988(22), PP29-37
- [14] 陈嘉翔, 生物技术在制浆造纸工业的应用前景, 中国造纸, 1993 (6)
- [15] 张厚民, 生物技术与制浆造纸工业, 中国造纸, 1994 (4)
- [16] 张厚民, 生物技术与制浆造纸工业, 中国造纸, 1994 (5)
- [17] 王红梅, 两种类型聚半乳糖醛酸的提纯及性质, 微生物学报, 1995 (5), PP346-352
- [18] Huang.L.K., Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*, J. of Appl.microbio. Vol. 86. №1, PP145-148
- [19] Caval, S.F., Qualification of Pectin-releasing activity of protopectinase SE from *Geotrichum klebahnii*, Biotech. Techniques, Vol. 11. №5 (1997), PP331-334
- [20] Pericin. D., Separation of endo- I and endo- II polygalacturonase produced by *A. niger* in eubmerge culture. Acta Biologica Lugos Lavica, Series B: Mikrobiologijca, Vol.33, №2 (1996), PP93-100
- [21] Maldonate, M.C., J.of qndus, Microbio, to Biotech, Vol.20, №1, PP34-36
- [22] Minussi, R.C. Letters in Applied Microbio, Vol.24, №6, PP369-372
- [23] Kremnický, L., β -mannanolytic system of *Aureobasidium pullulans*, Archives of Microbio, Vol.167, № 6 (1997), PP350-355
- [24] Slavikova, E., Production of extracellular β -mannanase by yeast and yeast-like microorganisms, Folia Microbiologica, Vol.41, №1 (1996), PP43-47
- [25] EL-helow, E.R., Production of β -mannanase by *B. subtilis* from agro-industrial by-products, Antonie van Leeuwenhoek, Vol.71, №3, PP189-193
- [26] 吴襟, 微生物 β -甘露聚糖酶, 微生物学通报, 1999 (2), 134-136
- [27] 崔福绵, 枯草芽孢杆菌中性 β -甘露聚糖酶的产生及性质, 微生物学报, Vol. 39 (1)
- [28] Khanongnuch, C., β -mannanase and xylanase of *B. subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp, J. of Fermentation and Bioengineering, Vol.86, №5, PP461-466
- [29] Utten R. L., Xylan degradation: A glimpse of microbial diversity, J. Of Indus. Microbio and Biotech: Vol. 19, №1 (1997), PP1-6
- [30] Bing, G. Xylanases from the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*, Physiological and Molecular Plant Pathology, Vol. 49, №3, PP159-175
- [31] Gerber, P.J., Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*, Bioresource tech, Vol.61, №2 (1997), PP127-140

- [32] Guebitz, G.M., Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to the ability to bleach wood pulp, *Applied Microbio and Biotech*, Vol. 47, №6, PP658-662
- [33] Chauhary, P., *Biotech and Applied Biotech*, Vol. 25, №2(1997), PP127-133
- [34] 刘瑞田. 假单孢菌碱性木聚糖酶的纯化及性质, *微生物学报*, Vol. 39(2)
- [35] Ratanakhanokehal, K., purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from *Alkaliphilic Bacillus* AP k-1. *Applied and Environmental Microbio*, Vol. 65, №2, PP694-697
- [36] Myburgh, J. of *Biotech* Vol. 55, №1(1997), PP22-29
- [37] 汪天虹等, 瑞氏木霉木糖关键酶基因在不同碳源条件下的表达, *微生物学报*, Vol. 39(6)
- [38] 刘瑞田, 木聚糖酶基因克隆表达及序列分析研究, *微生物学通报*, 24 (5), 1997
- [39] Chen, C.C., *Engyme and Microbiol Tech*, Vol. 20, №1(1997), PP39-45
- [40] 杨礼富, 红麻微生物脱胶过程中酶及酶解产物的研究, 硕士论文, 1999
- [41] 杨瑞鹏, 红麻微生物酶法快速脱胶 II, *中国麻作*, 1991 (4), 38-40
- [42] 李季伦等, *微生物生理学*, 北京农大出版社, 1993年, PP104-109
- [43] 陶文沂等, *工业微生物生理与遗传育种学*, 中国轻工业出版社, 1997
- [44] 杨文博等, β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用, *微生物学报*, 22 (4), 1995
- [45] Petev Biely, *Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases*, London, Potland press, 1993, PP29-51
- [46] 朱静等, 微生物产生的木聚糖酶的功能和应用, *生物工程学报*, 12 (4), 1996, PP375-378
- [47] Joseleau JP, etc, chemistry structure of xylans and their interaction in the plant cell wall, Amsterdam, Elsevier, 1992, PP1-15
- [48] Puls J, etc., *Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enymes required for hydrolysis*, London, Portland Press, 1993, PP1-27
- [49] 中国农业科学院麻类研究所, *中国麻类作物栽培学*, 农业出版社, 1993
- [50] 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*, 35 (5), 1995, 346-352
- [51] Lim J., etc., *Agric Biol Chem*, 44(3), 1980:473-480
- [52] 田新玉等, 嗜碱芽孢杆菌 N16-5 β -甘露聚糖酶的纯化与性质, *微生物学报*, 33(2), 1993, 115-121
- [53] 陈一平等, 芽孢杆菌 M50 产生甘露聚糖酶的条件研究, *微生物学报*, 40 (1), 2000, 62-68
- [54] 吴襟等, 诺卡氏菌形放线菌 β -甘露聚糖酶的纯化和性质, *微生物学报*, 40 (1), 2000, 69-73
- [55] 刘荣忠等, 苎麻酶法脱胶, *微生物学通报*, 1981 (5), PP209-0212
- [56] 寻民权, 苎麻脱胶技术发展的趋势, *苎麻纺织科技*, 1989 (2), 9-11

- [57] 湖南师大生物系, 苧麻酶法脱胶的研究, 湖南师大学报, (自然科学版) 增刊, 1993
- [58] 李宗道, 麻类作物生物技术研究进展, 农业出版社, 1999
- [60] 沈同, 生物化学, 高等教育出版社, 1990
- [61] 孙乃恩, 分子遗传学, 南京大学出版社, 1996
- [62] 李建武等, 生物化学实验原理和方法, 北京大学出版社, 1997
- [63] 刘德生, 生物化学实验技术和应用, 武汉大学出版社, 1993

**Studies on Extracellular Enzymes
from Efficiently Degumming Bacteria for Ramie
(Zhang Yunxiong)**

ABSTRACT

After systematically studied the extracellular proteins (enzymes) from an efficiently degumming bacterium strain T85-260 (*Erwinia* sp.) vs. another two degumming bacteria strains T260 (*B. subtilis*) and T1163 (*B. polymyxa*) by SDS-PAGE under different cultural conditions, we draw the following conclusion:

1. T85-260 would secrete at least 41 kinds of proteins (enzymes or sub-unit) ranging from 10.0KD to 120.3KD in LB ,mannose, xylose, glucose, pectin ,mannan, xylan, galactose medium and ramie degumming. There exist 12 more strongly expressed proteins (enzymes) with MW 110. 2KD、 81. 7KD、 72. 9KD、 66. 8KD、 52. 1KD、 42. 2KD、 39. 8KD、 35. 5KD、 31. 6KD、 28. 6KD、 19. 9KD、 16. 0KD, which are constitutively expressed and can be regarded as reference bands. But T66 and T1163 only weakly secrete 3 and 12 proteins (enzymes or sub-unit) after 6 and 9 hrs fermentation respectively, and they are induced.

2. T85-260 can ferment glucose, mannose, galactose, xylose, pectin, xylan , mannan and LB almost at the same speed. The band of 28.6KD enhanced by pectin may be specified as pectinase. The 4 distinctive bands of MW 63.0KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD appeared in mannan(konjak) medium may be classified as mannanase with the left distinctive band of 28.6KD as pectinase. The stronger band of 55.6KD appeared in xylan fermentation should be xylanase. The 4 comparatively stronger bands of 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD appeared in LB should be proteinase.

3 . The 6 distinctive bands (enzymes) of MW 60.3KD, 55.6KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD, 28.6KD featured in ramie degumming by T85-260 can be regarded as key degumming enzymes and can be identified as pectinase(28.6KD), xylanase (55.6KD) and mannanase (60.3KD, 49.5KD, 33.5KD, 29.5KD). The 4 weaker bands of 72.9KD, 35.5KD, 31.6KD, 19.9KD compared with those of LB could be regarded as proteinase which are beneficial to multiplication and degumming.

4. The mechanism of fast degumming for T85-260 may be fast growing, key

degumming enzymes(mannanase,pectinase,xylanase) constitutively secreting
KEYWORDS: ramie (*Boehmeria nivea*) ; degumming strains; enzymes

致 谢

当本文终于付梓的时候，我才感到由衷的欣慰——勤勉和奋斗是终有所获的，和些许放松，但麻类生物脱胶深入研究和开发的曙光和潜力又给我鼓舞了斗志，使我不敢有丝毫懈怠。我衷心感谢麻类研究所的领导和同事们的支持、关心，特别要感谢我的导师刘正初研究员的悉心指导，我还要感谢麻类研究所加工与环保研究室的冯湘沅、彭源德、邓硕苹、张琼虎等同志的帮助，当然，我更不会忘记我的夫人高迎初及儿子张泰然的理解和支持。在这里，我一并致谢了——鞠躬，同时，我恳请诸位能给我更多的支持和鞭策，使我的研究工作能更趋深入与完善。

张运雄

2000年5月

degumming enzymes(mannanase,pectinase,xylanase) constitutively secreting
KEYWORDS: ramie (*Boehmeria nivea*) ; degumming strains; enzymes

致 谢

当本文终于付梓的时候，我才感到由衷的欣慰——勤勉和奋斗是终有所获的，和些许放松，但麻类生物脱胶深入研究和开发的曙光和潜力又给我鼓舞了斗志，使我不敢有丝毫懈怠。我衷心感谢麻类研究所的领导和同事们的支持、关心，特别要感谢我的导师刘正初研究员的悉心指导，我还要感谢麻类研究所加工与环保研究室的冯湘沅、彭源德、邓硕苹、张琼虎等同志的帮助，当然，我更不会忘记我的夫人高迎初及儿子张泰然的理解和支持。在这里，我一并致谢了——鞠躬，同时，我恳请诸位能给我更多的支持和鞭策，使我的研究工作能更趋深入与完善。

张运雄

2000年5月

附件：照片

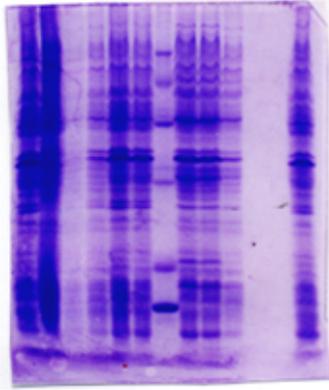


图 1 T85-260 在肉汤培养基及带菌
苕麻发酵液中的 SDS-PAGE 图谱

从左至右，泳道 2, 3, 4, 5, 6 为带菌苕麻
发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品，泳道 7 为
低分子标准蛋白，泳道 8, 9, 10, 11, 12 为
LB 发酵液 8, 6, 4, 2, 0 hr 的样品。

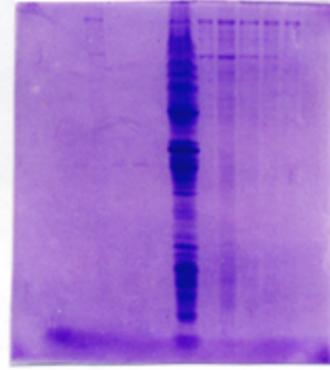


图 2 T66 和 T1163 在肉汤培养基
发酵液中的 SDS-PAGE 图谱

从左至右，泳道 1, 2, 3, 4, 5 为 T66 肉
汤发酵液 0, 3, 6, 9, 12 hr 的样品，泳道
7 为 T85-260 肉汤发酵液 8 hr 的样品，
泳道 8, 9, 10, 11, 12 为 T1163 肉汤发酵
液 12, 9, 6, 3, 0 hr 的样品。

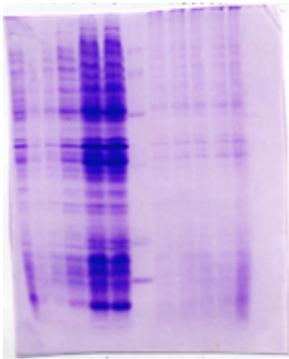


图 3 T85-260 在果胶培养基发酵液
中的 SDS-PAGE 图谱

从左至右，泳道 2, 3, 4, 5, 6 为 T85-260
肉汤发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品，泳道 7
为低分子标准蛋白，泳道 8, 9, 10, 11, 12 为
T85-260 果胶发酵液 0, 2, 4, 6, 8 样品。

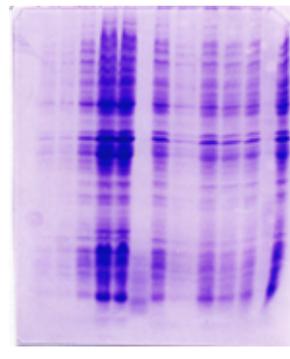


图 4 T85-260 在肉汤、甘露聚糖培
培养基发酵液中的 SDS-PAGE 图谱

从左至右，即泳道 1, 2, 3, 4, 5, 6 分别为
甘露聚糖发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品及
低分子标准蛋白，泳道 7, 8, 9, 10, 11, 12
分别为肉汤发酵液 8, 2, 8, 6, 4, 0 hr 样品。

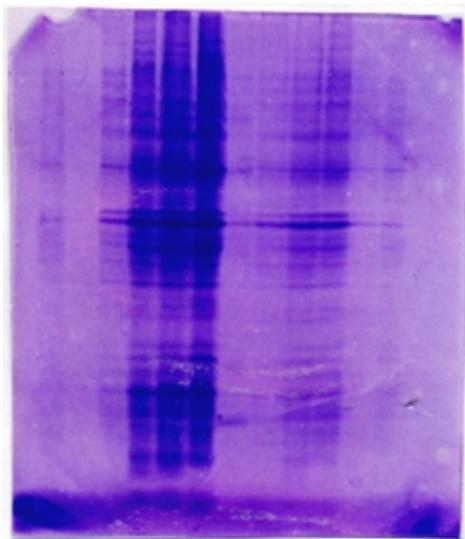


图 5 T85-260 在单糖培养基发酵液中的 SDS-PAGE 图谱

从左至右, 泳道 1, 2, 3, 4, 5, 6 分别为甘露糖发酵液 0, 2, 4, 6, 8 hr 的样品及肉汤发酵液 8 hr 的样品, 泳道 7 标准蛋白, 泳道 8, 9, 10, 11, 12 为葡萄糖发酵液 4, 6, 8, 2, 0 hr 的样品。

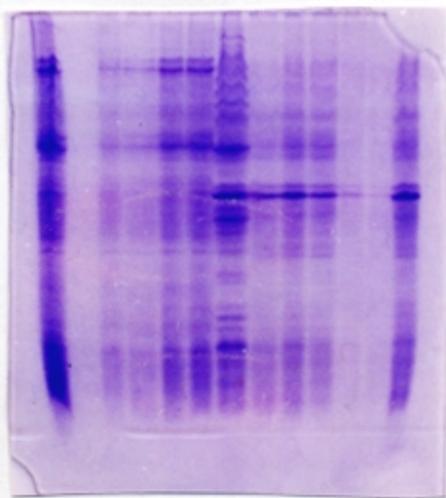


图 6 T66 在苕麻脱胶过程中发酵液 SDS-PAGE 图谱

从左至右, 泳道 2, 3, 4, 5, 6 为 T66 在发酵未灭菌苕麻过程中 0, 4, 8, 12, 16hr 样品, 7 泳道为 T85-260 肉汤发酵液 6hr 样品, 8, 9, 10, 11, 12 泳道为 T66 发酵灭菌苕麻过程中, 8, 12, 16, 4, 0hr 样品。

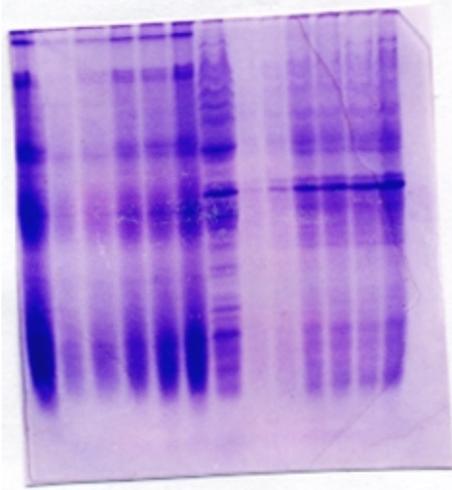


图 7 T1163 在苕麻脱胶过程中发酵液 SDS-PAGE 图谱

从左至右, 泳道 2, 3, 4, 5, 6 为 T1163 未灭菌苕麻发酵液 0, 4, 8, 12, 16hr 的样品, 泳道 7 为 T85-260 于肉汤培养发酵 6hr 样品, 泳道 8, 9, 10, 11, 12 为灭菌苕麻 0, 4, 8, 12, 16hr 样品。

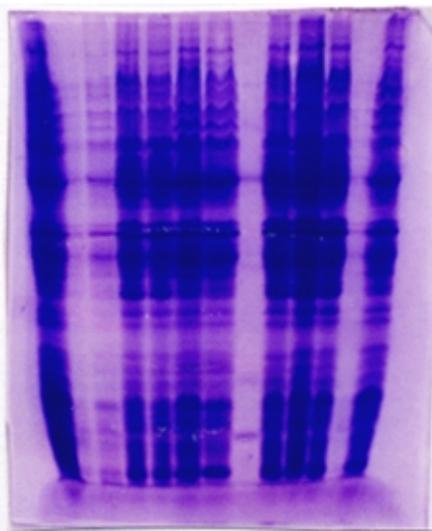


图 8 T85-260 在苕麻脱胶过程中发酵液 SDS-PAGE 图谱

从左至右, 泳道 1, 2, 3, 4, 5 为未灭菌苕麻 T85-260 发酵 0, 2, 4, 6, 8hr 样品, 6, 7 泳道为 T85-260 于肉汤发酵液 6hr、8hr 样品, 泳道 9, 10, 11, 12, 13 为灭菌苕麻 T85-260 发酵 8, 6, 4, 2, 0 hr 样品。

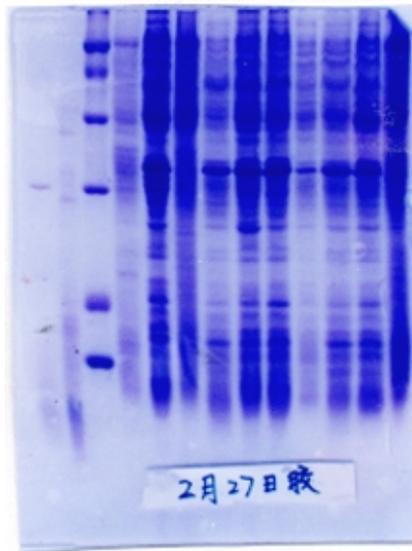


图 9. T66 和 T1163 在马铃薯-葡萄糖培养基及 T85-260
在不同培养基发酵液 SDS-PAGE 图谱

从左至右, 泳道 1、2、5、6、7、8、9、10、11、12 分别为 T66、T1163 在马铃薯-葡萄糖培养基及 T85-260 在 LB、带菌麻、葡萄糖、果胶、半乳糖、木聚糖、甘露糖、木糖中发酵 12 小时样品, 泳道 3 为低分子标准蛋白, 泳道 4 为 T1163 苜蓿脱胶液 12 小时样品