果胶酶在麻类脱胶中的应用及其作用机理

郑科, 刘正初, 段盛文, 成莉凤, 郑霞, 冯湘沅

中国农业科学院麻类研究所, 长沙 410205

摘要: 脱胶是麻类产业链中的难题。生物脱胶则是解决麻类加工技术难题的发展方向。果胶酶在生物脱胶中的应用一直是研究的重点。本文通过分析国内外有关果胶酶和产酶微生物在选育、发酵、酶学性质、基因工程与脱胶工艺等方面的研究进展, 阐明了果胶酶在麻类脱胶中的作用机理。果胶酶是麻类生物脱胶不能缺少的关键酶之一, 但不能独立完成麻类脱胶; 根据麻类纤维原料特性, 采用基因操作等技术构建复合酶高产菌株是未来的重点研究方向。

关键词: 果胶酶; 麻类; 生物脱胶; 作用机理

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2012.06.04

Mechanism of the Pectinases Used for Bast Fibre Bio-degumming

ZHENG Ke, LIU Zheng-chu, DUAN Sheng-wen, CHENG Li-feng, ZHENG Xia, FENG Xiang-yuan

Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China

Abstract: Degumming is a key problem in bast fibre industry while biological method is the development trend of fibre extraction, and pectinases application in biological degumming is the hotspot of the research. In this paper, the mechanism of the pectinases used for bast fibre degumming has been expounded according to many studies on the pectinases and the pectinase-producing strains. Pectinase is considered as an essential enzyme for bast fibre bio-degumming, but it can not complete degumming independently. The research in the future will focus on constructing efficient strains, which secrete the whole indispensable enzymes by genetic manipulation methods.

Key words: pectinases; bast fibre; bio-degumming; mechanism

麻类作物种类很多, 常见的有苧麻、亚麻、大麻、红麻、黄麻和剑麻等。麻类纤维在纺织、造纸、环保材料和纤维质能源等传统和新兴产业上均有广泛用途, 受到各行各业的关注。但麻类初加工问题一直困扰行业发展, 主要由于传统的沤麻不适宜工业化生产、产品质量不稳定、资源耗费大, 常规化学法存在污染重、能耗高、效率低、产品质量差、劳动强度大等弊端^[1]。英国牛津大学Thayson等出版《纤维素半纤维素果胶及胶质的微生物学》之后, 国内外广泛开展了利用微生物发酵及有关酶降解麻类原料中非纤维素物质而提取纤维的研究^[2]。研究表明, 现代生物脱胶技术

不仅能够实现清洁生产、节能降耗, 而且可以提高纤维产品的产量和品质^[1,3]。

果胶酶(pectinase)因有着广泛的用途而受到关注。作为麻类生物脱胶过程中的关键作用物之一, 果胶酶是该领域研究的一项主要指标^[3,4]。这些研究主要包括微生物和酶的降解机理研究、微生物育种和发酵工艺研究、生物加工过程的工艺技术研究等。果胶酶在广义的麻类脱胶上的应用, 涉及原麻脱胶、纤维或织物精炼整理和造纸制浆等工艺环节。本文在初步分析果胶酶生物脱胶机理的基础上, 对果胶酶及其相关微生物的研究和应用进展进行总结和分析。

收稿日期: 2012-10-16; 接受日期: 2012-11-13

基金项目: 国家麻类产业技术体系项目(nycyt-19-E21)资助。

作者简介: 郑科, 助理研究员, 从事农产品加工微生物学研究。E-mail: baggio@caas.net.cn。* 通讯作者: 刘正初, 研究员, 博士生导师, 主要从事草本纤维生物提取科学与工程研究。Tel: 0731-88998535; E-mail: ibfclzc@189.cn

1 果胶酶生物脱胶作用机理

1.1 麻类原料中的胶质

麻类纤维原料中含有占总质量 22% ~ 45% 的非纤维素物质,其中,键合型非纤维素主要包括果胶 4% ~ 8%、半纤维素 12% ~ 18%、木质素 2% ~ 5% 等,通常将它们统称为胶质,都是高分子聚合物,大多数带有侧链;另外还有少量脂肪蜡质、无机盐、色素、鞣质等。这些非纤维素物质的含量随作物和品种的种类、栽培条件、收割时间和取样部位等不同而有一定差异^[1,5]。不同的胶质成分填充、黏结、镶嵌于细胞之间及细胞壁中,与纤维素组成结构十分复杂的韧皮、叶和茎秆等组织,这就决定了提取出纯净纤维的过程是一个复杂的过程^[6,7]。管映亭等^[8]认为,在果胶、半纤维素和木质素中包含有游离的羟基和羧基,它们在纤维细胞间进行物理结合、氢键连接或化学键合;其中,果胶物质与半纤维素组分之间主要呈共价键连接,木质素与果胶和半纤维素之间以醚键为主连接;这样胶质三类主要成分连接形成了更为复杂的胶质复合体。

胶质中的果胶类物质可分为四类:原果胶以非水溶性存在于植物组织中,细胞壁中的原果胶是由同型半乳糖醛酸区以及带有中性糖侧链的鼠李糖半乳糖醛酸骨架组成,经过限制酶水解可形成果胶和果胶酸;果胶酸是极少量甲酯化的多聚半乳糖醛酸,可溶于水;果胶酯酸由 0 ~ 75% 甲酯化的多聚半乳糖醛酸链组成;果胶由至少 75% 的羧基被甲酯化的多聚半乳糖醛酸链组成,可溶于水^[9]。

1.2 果胶酶

果胶酶是一个多酶复合体系,是所有能够不同程度地分解果胶类物质酶的总称。广泛存在于高等植物和微生物中,在某些原生动物和昆虫中也有发现。在微生物中,细菌、放线菌、酵母和霉菌都能合成果胶酶。截至目前,在 GenBank 上注册的已克隆的编码果胶酶基因有 562 个,其中有 469 个来源于微生物。

果胶酶常分为原果胶酶(protopectinases)、果胶酯酶(pectinesterases, PE)、果胶水解酶(pectin hydrolases)和果胶裂解酶(pectin lyases, PL)。果胶水解酶又可分为聚半乳糖醛酸酶(polygalactu-

ronases, PG)和聚甲基半乳糖醛酸酶(polymethylgalacturonases, PMG);果胶裂解酶也可分为聚半乳糖醛酸裂解酶(polygalacturonate lyases, PGL)和聚甲基半乳糖醛酸裂解酶(polymethylgalacturonate lyases, PMGL)。

1.3 胶质降解的机理

1.3.1 果胶类物质的降解 果胶酶降解麻类中的果胶类物质是一个连续作用过程,也是不同类型果胶酶的协同作用过程。首先,原果胶酶将不可溶性果胶主链上的鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和木糖等侧链组成的分支分解,转化为可溶性果胶;然后,由果胶酯酶作用于半乳糖醛酸单体的末端甲氧基,将可溶性果胶脱甲基形成果胶酸;最后,果胶水解酶水解各半乳糖醛酸单体间的糖苷键,使大分子降解^[10]。

脱胶试验表明,在上述过程中,将不可溶性果胶转化为可溶性果胶,进而脱甲基成为果胶酸所需的时间在脱胶最初几小时内即可完成,而水解各半乳糖醛酸单体间的糖苷键,是多次反复的反应过程,需要较长时间,是脱胶过程的主要阶段^[10]。

1.3.2 微生物和酶的脱胶机理 果胶酶对果胶类物质的降解作用使胶质成分在结构上发生了较大的变化,胶质复合体的稳定性受到很大的破坏。当部分果胶物质被降解后,其原有的胶粘作用就大大减少,使其他非纤维素物质之间有较大空隙,增大了这些大分子的生物或化学反应性能,提高了这些大分子对其他酶类或碱的敏感性,以利于进一步的脱胶^[8]。Pakarinen 等^[11]研究了果胶酶对大麻脱胶的影响,发现添加果胶酶的大麻水解产物与未处理和酸碱处理的材料相比,糖类物质的产量分别提高了 26%、54% 和 64%,说明大麻韧皮纤维束中的单纤维细胞的去除是由于果胶部分移除,增加了细胞壁表面基质水解酶的可及度。果胶酶降解果胶类物质而去除麻类韧皮中的部分胶质,但不能直接去除其他半纤维素、木质素等胶质。研究表明,脱胶时单独增加果胶酶并不能持续增强脱胶效果,半纤维素酶类对果胶酶有脱胶增效作用^[4,12]。大多数麻类脱胶过程还需要甘露聚糖酶(mannanase)和木聚糖酶(xylanase)等半纤维素酶的作用。

微生物脱胶的本质是利用微生物分泌的酶来

催化胶质降解,且起脱胶作用的主要是胞外酶^[4,13]。细菌通过 II 型分泌系统分泌胞外酶,破坏植物组织、降解细胞壁或细胞内含物,这些酶包括纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、木聚糖酶、淀粉酶和磷酸脂酶等^[14]。一般来说,脱胶微生物先分泌果胶酶,随后或同时分泌半纤维素酶,但不分泌纤维素酶^[4,7,15]。在有果胶存在的环境,微生物可以产生少量基础水平的胞外果胶酶并使之释放出少量的半乳糖醛酸单体或寡聚体。这些分子被微生物吸收后,可作为提高果胶酶类合成和分解的诱导剂从而进一步增加单体的量。单体可被微生物快速吸收,但在较高浓度时,又起着抑制相同酶类合成的作用,从而减少这些酶的产生,也减少随后半乳糖醛酸类单体的释放量^[16]。

孙庆祥研究团队提出了“胶养菌、菌产酶、酶脱胶”的观点,简洁地阐明了微生物脱胶的基本过程^[17]。郑来久等^[18]描述了全酶法脱胶的微观作用过程:首先,酶分子向底物原料扩散,韧皮表面的可溶性物质向脱胶液中扩散,水分子向韧皮内部渗透使之溶胀;然后,酶分子吸附在韧皮表面,其活性中心与底物结合后,形成不稳定中间产物;随后,中间络合物迅速分解释放出酶和产物;可溶性产物生成后,向脱胶液中扩散,有些产物继续被酶作用生成更小分子的糖类;由于产物抑制等原因,酶活力下降,产物的生成减缓,脱胶速度就降低了。

刘正初等^[19]通过研究苧麻、亚麻、龙须草等纤维原料生物脱胶或生物制浆过程中各类物质的变化规律,发现生物脱胶污染物 90% 来自原料中的大分子颗粒或块状有机物脱落物;通过对比分析生物脱胶和化学脱胶机制,证实了其提出的“脱胶关键酶‘定向爆破’非纤维素物质使之发生‘块状崩溃’而脱落”的观点^[20]。

2 果胶酶生物脱胶应用研究现状

2.1 产果胶酶微生物的选育

自开展生物脱胶研究以来,研究者已经筛选出大量的产果胶酶微生物用于麻类生物脱胶。传统的筛选方法是以麻原料为主要培养基,对从腐烂植株、土壤、传统沤麻水和泥土等取得的样品进行多次富集培养,以纤维分散程度等脱胶指标来筛选菌株^[21]。现在多采用配制含有果胶、甘露聚

糖等成分的专用培养基富集培养,然后通过平板透明圈法筛选产果胶酶等特性理想的微生物;有时还需进行酶活测定进一步复筛。通过透明圈法或纤维素分解实验可以筛除产纤维素酶的菌株。中国农业科学院麻类研究所通过常规筛选、物理和化学诱变以及基因工程等方法,选育得到与生物脱胶有关的微生物资源 3 000 余份,菌种隶属 22 属 38 种,其中不乏高产果胶酶的菌株^[1,21]。

由于细胞壁结构的稳定性是植物在环境中长期进化的结果,所以天然微生物中能高效降解麻类胶质的数量与种类非常有限。利用紫外线、激光、电离辐射等物理诱变方法和烷化剂等化学诱变剂对原始菌株进行诱变处理,能够显著提高脱胶微生物的突变率,进而筛选出脱胶性能更好或酶活更高的菌株。如采用硫酸二乙酯和紫外线诱变,已获得稳定的红麻脱胶专用菌株,并应用于工厂化生产^[1]。谭晓明^[22]用氮离子束注入的方法诱变芽胞杆菌,突变菌株产生的胞外酶系中果胶酶活性高,还有微量半纤维素酶,无纤维素酶,对大麻脱胶的效果更佳。原生质体融合方法是构建能同时分泌果胶酶和半纤维素酶的高效脱胶菌株的一条途径。金玉娟等^[23]将芽胞杆菌和欧文氏菌进行了原生质体融合,获得稳定的融合子菌株,其苧麻脱胶能力强于原始菌株。

2.2 果胶酶基因工程菌

利用基因工程手段选育高产果胶酶脱胶菌株,克服了传统方法的盲目性,提高了育种效率和产酶效果。克隆果胶酶基因,构建质粒表达载体,转化大肠杆菌或毕赤酵母,高效表达果胶酶基因,是获得高效重组果胶酶菌株的有效途径。国内外这方面研究较多(表 1)。多数已克隆的脱胶果胶酶基因是 PL 基因。

将不同类型的果胶酶基因融合在一起,在微生物宿主中表达,可以获得复合型的重组果胶酶菌株,不仅可提高果胶酶产量,而且可增加酶解功能特性,能够适应不同麻类脱胶的需求。Xiao 等^[31]对黄单胞菌和链霉菌的基因组进行生物信息学分析,发掘了 5 个 PL 和 2 个 PG 基因,并使其在大肠杆菌中表达,发现重组菌株中有 3 个果胶酶活性最高,其中 2 个 PL 重组酶应用于大麻和亚麻脱胶取得了很好的效果。

为发掘未培养微生物的基因资源,运用宏基

表 1 一些脱胶微生物来源的果胶酶基因和性质

Table 1 Some pectinase genes and enzymatic properties from degumming microorganism.

来源	应用对象	基因	GenBank 登录号	果胶酶类型	最适温度	最适 pH	文献
<i>Bacillus pumilus</i> DKS1	黄麻、苧麻	<i>pelB</i>	EU652988	PL	75℃	8.5	[24]
<i>Bacillus subtilis</i> T66	苧麻等	<i>pel</i>	GU644446	PL	50℃	8.0	[25]
<i>Erwinia carotovora</i> CXJZ166	苧麻、红麻,等	<i>pel</i>	EU597234	PL	50℃	5.2	[26]
<i>Erwinia chrysanthemi</i> BTC105	菠萝麻	<i>pelC</i>	DQ486987	PL	45℃	5.0	[27]
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> PB94A	亚麻	-	-	PL	60℃	8.0	[28]
<i>Oidiodendron echinulatum</i> MTCC1356	菽麻、大麻,等	-	-	PL	50℃	7.0	[29]
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 29086	亚麻	<i>RoPG</i>	EU432156	PG	-	-	[30]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	亚麻、大麻	<i>peh-1</i>	NP638805	PG	50℃	5.4	[31]
<i>Xanthomonas campestris</i>	亚麻、大麻	<i>pelB</i>	NP638163	PL	50℃	8.5	[31]

基因组技术,从土壤、植物腐殖或沤麻系统的宏基因组中分离出果胶酶基因,使其高效表达,是获得高效果胶酶和产酶微生物的新途径。Singh 等^[32]从土壤宏基因组中分离出果胶酶基因,与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的糖苷水解酶基因同源性达 93%,在大肠杆菌中表达该基因并通过 His 标签纯化获得热稳定中性重组酶,酶活半衰期达 5 h。

为了使脱胶菌株具备同时分泌果胶酶、甘露聚糖酶和木聚糖酶的能力,研究者尝试将果胶酶和半纤维素酶类两种或三种单质酶载体整合到同一宿主中进行表达,以期获得的融合表达体系同时分泌两种或几种酶。高秋芳等^[33]将木聚糖酶和果胶裂解酶基因分别构建质粒表达载体,同时转化毕赤酵母,获得高表达木聚糖酶和果胶裂解酶的重组菌株,重组酶酶学性质和双价工程菌脱胶分析表明,果胶裂解酶和木聚糖酶同时作用,在传统单纯果胶酶脱胶的基础上,减少了半纤维素酶后处理,降低了成本。王溪森^[26]将果胶酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶三种单质酶载体分别整合到同一宿主,构建复合表达体系同时分泌这三种酶。结果表明,果胶酶活力没有显著改变,而半纤维素酶活力均大幅提高,但该融合表达体系应用于苧麻脱胶的效果并不理想,原因可能与宿主菌营养特性和底物有关。

2.3 微生物生长与发酵

为提高脱胶微生物数量、产酶能力或脱胶效果,需要对选育出的微生物生长和发酵条件进行优化。通过单因子、正交或响应面等试验设计方法,对培养基、温度、氧、pH 等条件因子的优化,在

实验室和生产应用中已经取得了一定的成效。种子扩培和发酵时,种子质量、培养基质量、水质、空气质量、灌压和泡沫等这些工艺条件是对罐培稳定性影响较大的因素;生物脱胶系统中,水质、温度、溶氧、pH、无机盐、浴比和麻的特性等因素通过影响微生物生长与发酵而影响脱胶效果。我国从 20 世纪 50 年代便开始了苧麻的工厂化生物脱胶试验,经过各项工艺条件的逐步优化,近年来已取得稳定的生产^[1,2]。蔡柏岩等^[34]通过响应面法优化大麻果胶酶产生菌发酵培养基,果胶酶活由初始的 602 U/mL 提高到优化后的 8 100 U/mL。

采用固态发酵方法生产果胶酶具有酶活高、能耗低、污染少的优势^[35]。Sharma 等^[36]对短小芽孢杆菌固态发酵产热稳定碱性果胶酶的培养基、温度等条件进行优化,优化后产酶量相比液态发酵产酶量提高了 14.2 倍;酶处理苧麻纤维的抗拉强度、脆性、色度等指标都得到了显著的改善。Basu 等^[37]研究了海藻酸钙固定化短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)细胞高产果胶酶的反应条件及其在苧麻脱胶中的作用效率,发现经过固定的细胞产酶量明显高于游离的细胞,而且利用固定细胞脱胶后的纤维质量也有所提高;该方法成本低,可应用于生物制浆与生物脱胶。

微生物脱胶过程既有菌体生长的过程,也伴随酶解反应的过程,由于两者所需温度不同,在产酶高峰之前采用菌体生长最适温度,之后将温度升至最适酶活温度,这样既利于菌种的生长与发酵,又能充分利用酶的脱胶作用。薛卫巍等^[38]对罗布麻采用升温生物脱胶流程,先利用细菌在 37℃ 脱胶 18 h,再升温至 45℃ 脱胶 0.5 h,与无升

温工艺相比,残胶率降低 4.95%。

2.4 酶法脱胶

虽然微生物脱胶与直接用酶制剂脱胶本质上区别不大,但两种方法脱胶在工艺条件、优化手段等方面仍有很多差别。提高酶的稳定性和优化酶促反应条件是酶法脱胶工艺研究的重点。酶制剂应用于脱胶,其稳定性主要受温度、pH、激活剂、抑制剂和表面活性剂等因素的影响。在酶法脱胶过程中添加适当的螯合剂会改善酶和底物的结合,提高脱胶效率。田英华等^[39]用果胶酶制剂对大麻进行脱胶时,在酶液中添加 5 mmol/L 草酸,大麻纤维残胶率比相同条件下不添加草酸降低了 31.8%。Adamsen 等^[40]在研究复合果胶酶系进行亚麻脱胶时,发现螯合剂中只有 EDTA 能显著促进脱胶,且在 pH 5 时效果最好。其原因可能是 EDTA、草酸等螯合剂与纤维表层的 Hg^{2+} 等金属离子结合,破坏了金属离子与未甲酯化的果胶酸的连接,既直接破坏果胶质结构,也能减少金属离子和丹宁对果胶酶活性的影响,有助于脱胶^[41]。研究表明,一定浓度的 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对果胶酶起激活作用,而 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 等离子是果胶酶的抑制剂^[30,32,42]。

固定化酶技术可以提高酶的稳定性,使酶反复使用。李丰硕等^[43]在罗布麻脱胶菌枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)产果胶酶发酵时,采用交联酶聚集技术制备固定化酶,所形成的交联果胶酶聚集体的活回收率达 61.5%,热稳定性和有机溶剂稳定性均高于游离酶。

一般认为,果胶酶在复合脱胶酶中起主要作用。研究者用不同的酶对亚麻进行处理的效果为:果胶酶 > 木聚糖酶 = 半乳甘露聚糖酶 > 蛋白酶 > 脂肪酶 $\geq$ 漆酶^[44]。但半纤维素酶类等脱胶作用的协同效应仍很重要^[4,12,15]。Kaur 等^[45]报道了红麻生物制浆中有效利用同一短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)菌种产生的木聚糖酶和果胶酶协同作用的结果,复合酶系制浆显著提高了纸浆性能,降低了能耗。

酶法脱胶中碱性果胶酶应用较多。一方面,与采用酸性果胶酶脱胶相比,碱性果胶酶有利于节省后续化学处理环节中 NaOH 的用量,且有利于酶-化学法脱胶的进行;另一方面,偏碱性的环境可抑制其他杂菌的生长,有效防止脱胶过程中的污染,此外碱性条件下纤维素降解也会不同程

度地受到抑制^[46]。

通过热水预处理使麻纤维溶胀,部分水溶性果胶质溶解,会促使单纤维间松解,有利于果胶酶扩散进入纤维束,对果胶质进行分解,提高脱胶效果^[42]。例如,采用果胶酶和半纤维素酶复合酶制剂进行红麻脱胶,沸煮预处理 30 ~ 35 min 时脱胶程度的提高速率最大^[18]。

3 展望

果胶酶是麻类生物脱胶不能缺少的关键酶之一,但由于胶质成分和结构的复杂性,大多数麻类纤维的脱胶过程还需要半纤维素酶等酶类的共同作用。

生物脱胶技术在中应用,既是一个复杂的生物转化过程,也伴随了物理或机械作用的过程。果胶酶等脱胶酶类,并不能也不必要将胶质全部彻底降解为单糖或寡糖分子;洗涤或者敲打等脱胶辅助工艺,能使部分胶质以块状混合物的形式脱除,以达到提取纤维的工艺要求。“块状崩溃”的观点既阐明了生物脱胶与化学脱胶在作用机制上的区别,也指出了依据生物脱胶的原理实现生物脱胶清洁生产需要的工艺技术。对于大多数麻类纤维原料,作为成分复杂的初级农产品,直接采用果胶酶或其他单酶不能完全除去其胶质,有些复合酶脱胶取得了较好的效果,但因为酶制剂价格高等原因导致应用成本较高;而提高酶制剂生产效率和酶的重复利用率等降低成本的途径,其技术应用还不理想。所以,从产品加工质量、生产成本和污染等角度考虑,采用微生物发酵的工艺比用酶(或与化学联合)加工的工艺更实用,因为经过脱胶加工获得的产品只是一类工业原料,本身的附加值不高。但要取得好的应用效果,微生物脱胶技术对菌株的性能要求极高。

运用基因操作、蛋白表达技术,构建不同类型果胶酶基因的复合酶表达体系,或构建两种甚至多种脱胶酶基因工程菌株,能够提高脱胶菌株的选育效率和产酶性能。

麻类作物种类繁多,而且越来越多的传统麻类作物以外的草本纤维植物也开始应用生物脱胶技术进行加工;另外,生产应用中还要根据纤维可纺性、用途等要求来不同程度地去除胶质,有时,少量果胶、木质素和脂肪蜡质需要一定的保留,以

赋予纤维产品的某些性能。这就要求,需要针对不同原料的加工特性和不同产品的要求,来施以不同的生物脱胶工艺,包括不同菌种或酶的选择、浸泡或湿润发酵方式等。

酶制剂脱胶要应用于生产,需要结合脱胶工艺改造,继续研究低成本、适应工艺要求、稳定性强、耐保藏的果胶酶制剂,特别是开发麻类脱胶专用复合酶制剂。

果胶酶除应用于麻类等纤维原料的纺织、造纸外,还在食品、药品、饲料、生物质能源、作物抗病等行业有着广泛和重要的用途,利用麻类脱胶微生物及其果胶酶基因的资源和研究基础,进行果胶酶研究和开发,其应用前景广阔。

参 考 文 献

- [1] 刘正初. 麻类纤维提取工程微生物研究回顾与展望[J]. 中国农业科学, 2007, 40(增刊1):363-367.
- [2] Liu Z C, Peng Y D, Feng X Y, et al.. A rapid process of ramie bio-degumming by *Pectobacterium* sp. CXJZU-120[J]. Textile Res. J., 2012, 82(15):1553-1559.
- [3] 孙庆祥. 麻类作物的微生物脱胶[J]. 中国麻作, 1981, 3(1):38-41.
- [4] 张运雄, 王朝云. 麻类生物脱胶与生物制浆酶系[J]. 中国麻作, 2002, 24(2):14-17.
- [5] 李宗道. 麻作的理论与技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1980, 181-224.
- [6] Young R A, Akhtar M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998, 309-340.
- [7] Lagaert S, Belin T, Volckaert G. Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes[J]. Semin. Cell Dev. Biol., 2009, 20(9):1064-1073.
- [8] 管映亭, 孙小寅. 韧皮纤维胶质的研究[J]. 陕西纺织, 2001, 50(2):13-16.
- [9] Jayani R S, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review[J]. Process Biochem., 2005, 40(9):2931-2944.
- [10] 郑来久. 红麻韧皮纤维生物酶脱胶改性研究[D]. 上海: 东华大学, 博士学位论文, 2007:71.
- [11] Pakarinen A, Zhang J, Brock T, et al.. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin[J]. Bioresour. Technol., 2012, 107:275-281.
- [12] 苏静. *Bacillus subtilis* 16A 苧麻脱胶关键酶-半纤维素酶纯化及协同脱胶效果的研究[D]. 济南: 山东大学, 硕士学位论文, 2008.
- [13] 刘正初, 周裔彬. 罗布麻韧皮非纤维素生物降解的工艺基础[J]. 中国麻业, 2002, 24(1):30-33.
- [14] 冯洁, 徐进, 徐景升, 等. II型分泌系统与植物病原细菌致病性的关系[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(3):365-370.
- [15] 杨礼富, 刘正初, 彭源德, 等. 红麻微生物发酵过程中脱胶酶的特性研究[J]. 热带作物学报, 2001, 22(2):76-81.
- [16] Agrios G N 著, 陈永宣, 陆家云, 许志刚译. 植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995, 40-43.
- [17] 刘正初. 麻类纤维生物提取与工程研究进展[J]. 中国麻业科学, 2009, 31(z1):93-97.
- [18] 郑来久, 刘剑宇. 红麻全酶法脱胶工艺及机理研究[J]. 纺织学报, 2004, 25(1):46-47.
- [19] 刘正初, 张运雄, 冯湘沅, 等. 清洁型草本纤维生物提取工艺的污染机理研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2):546-551.
- [20] Liu Z C, Peng Y D. Study on techniques of bio-pulping based on kenaf bark/*Eulaliopsis binala* [A]. In: International Development of Kenaf and Allied Fibers [C]. Minneapolis: CCG International, 2004, 311-315.
- [21] 段盛文, 刘正初, 冯湘沅, 等. 草本纤维提取菌种资源多样性研究[J]. 中国麻业科学, 2007, 29(6):330-333.
- [22] 谭晓明. 大麻微生物脱胶菌种选育及脱胶工艺研究[D]. 济南: 山东大学, 硕士学位论文, 2010.
- [23] 金玉娟, 陶菊红, 刘自镛, 等. 融合子菌株苧麻脱胶研究[J]. 纺织学报, 2004, 25(2):30-31.
- [24] Basu S, Roy A, Ghosh A, et al.. Arg²³⁵ is an essential catalytic residue of *Bacillus pumilus* DKSI pectate lyase to degum ramie fibre [J]. Biodegradation, 2011, 22(1):153-161.
- [25] 宋立立, 顿宝庆, 奚亚军, 等. 果胶裂解酶基因的克隆与原核表达[J]. 食品科技, 2010, 35(9):2-7.
- [26] 王溪森. 草本纤维生物提取关键酶基因克隆与表达研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 博士学位论文, 2009.
- [27] 邓伟科, 郭安平, 刘恩平, 等. 果胶裂解酶基因 *PeIc* 表达载体的构建及原核表达分析[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(5):44-48.
- [28] Valladares J A G, Rost G, Heitmann U, et al.. Development of a biotechnological process for the production of high quality linen fibers[J]. Bioprocess Biosyst. Eng., 2011, 34(8):913-921.
- [29] Yadav S, Dubey A K, Anand G, et al.. Characterization of a neutral pectin lyase produced by *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 in solid state fermentation [J]. J. Basic Microbiol., 2012, 52:1-8.
- [30] Xiao Z, Wang S, Bergeron H, et al.. A flax-retting endopolygalacturonase-encoding gene from *Rhizopus oryzae* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 94(4):563-571.
- [31] Xiao Z, Boyd J, Grosse S, et al.. Mining Xanthomonas and Streptomyces genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 78(6):973-981.
- [32] Singh R, Dhawan S, Singh K, et al.. Cloning, expression and characterization of a metagenome derived thermoactive/thermostable pectinase [J]. Mol. Biol. Rep., 2012, 39(8):8353-8361.
- [33] 高秋芳, 郭安平, 孔华, 等. 果胶裂解酶木聚糖酶及果胶裂解酶木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. 广东农业科学, 2010, 37(8):1-5.

- [34] 蔡柏岩, 王贵宾, 葛菁萍, 等. 响应面法优化大麻果胶酶产生菌发酵培养基[J]. 中国麻业科学, 2009, 31(4):242-247.
- [35] Yadav S, Dubey A K, Anand G, *et al.*. Characterization of a neutral pectin lyase produced by *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 in solid state fermentation [J]. J. Basic Microbiol., 2012, 52:1-8.
- [36] Sharma D C, Sat T. Biotechnological potential of agro residues for economical production of thermoalkali-stable pectinase by *Bacillus pumilus dcsr1* by SSF and its efficacy in the treatment of ramie fibres[J]. Enzyme Res., 2012, 2012: 281384.
- [37] Basu S, Saha M N, Chattopadhyay D, *et al.*. Degumming and characterization of ramie fibre using pectate lyase from immobilized *Bacillus pumilus* DKS1 [J]. Lett. Appl. Microbiol., 2009, 48(5):593-597.
- [38] 薛卫巍, 翟秋梅, 薛永常, 等. 罗布麻微生物脱胶工艺优化[J]. 纺织学报, 2009, 30(4):80-84.
- [39] 田英华, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 碱性果胶酶对大麻脱胶工艺的影响[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(5):187-189.
- [40] Adamsen A P S, Akin D E, Rigsby L L. Chelating agents and enzyme retting of flax[J]. Textile Res. J., 2002, 72(4):296-302.
- [41] Akin D E, Condon B, Sohn M, *et al.*. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase [J]. Indust. Crops Prod., 2007, 25:136-146.
- [42] Kozłowski R, Batog J, Konczewicz W, *et al.*. Enzymes in bast fibrous plant processing[J]. Biotechnol. Lett., 2006, 28:761-765.
- [43] 李丰硕, 张灿, 薛永常, 等. 枯草芽孢杆菌 FM208849 产果胶酶的固定化及酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2012(6):141-146.
- [44] Ossola M, Galante Y M. Scouring of flax rove with the aid of enzymes[J]. Enzyme Microb. Technol., 2004, 34(2):177-186.
- [45] Kaur A, Mahajan R, Singh A, *et al.*. Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp[J]. Bioresour. Technol., 2010, 101(23):9150-9155.
- [46] 白延坤, 刘秉钺, 何连芳. 韧皮纤维生物脱胶的研究进展[J]. 造纸科学与技术, 2006, 25(2):34-38.