独 创 性 声 明

本人声明所呈交的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，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我工作过的同志对本研究所做的任何贡献均在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：黄小龙　　时间：2004年6月16日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解湖南农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等手段保存、汇编学位论文。同意湖南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

研究生签名：黄小龙　　时间：2004年6月16日

导师签名：谢达平　　时间：2004年6月16日

摘　要

亚麻是我国重要的纺织工业原料。亚麻原茎脱胶是亚麻初加工的第一道工序，对亚麻的纤维产量、长麻率及经济效益产生重大影响。为了建立南方亚麻新型高效脱胶技术体系，进一步推动南方亚麻产业的稳步发展，研究了南方亚麻天然水沤法脱胶过程微生物种类与数量、脱胶酶等各参数的动态变化规律，外界因子、麻茎特性等影响因子与亚麻脱胶的相互关系，并从麻茎上筛选高效脱胶菌种进行了亚麻酶法脱胶的初步研究，试验结果如下：

(1) 果胶分解菌是亚麻天然水沤麻中的重要脱胶菌群,果胶酶与亚麻脱胶效果密切相关。水源水质、浴比、起始 pH、温度、添加剂等对脱胶液中的果胶分解菌数量、果胶酶活性与脱胶速度产生重要影响。果胶分解菌含量丰富的塘水有利于亚麻脱胶，浴比 1:20~25、pH 7.0~7.5、温度 30~35℃有利于果胶分解菌的生长繁殖；加入适量（1.5~2.0%）的含氮物质（如尿素）作为脱胶助剂，能够改善亚麻的沤麻环境，提高果胶酶的活性，加快亚麻的沤麻速度。麻茎的部位、粗细、麻龄不同，其纤维及胶质的组成和分布亦不同，对亚麻的脱胶速度均产生不同程度的影响；选茎关系到脱胶速度的快慢与脱胶质量的优劣，是亚麻脱胶工艺中必不可少的重要环节。

(2) 从亚麻茎上筛选得到了一株产果胶酶和木聚糖酶活性较高的脱胶菌株 A_6，初步鉴定为环状芽孢杆菌。在摇瓶发酵条件下，A_6 菌的最佳产酶条件为：亚麻茎粉 7%，硫酸铵 1%，磷酸氢二钾 0.15%，pH 7.5，温度 35℃，菌龄 24h，接种量 5%，250 mL 三角瓶装液量 70 mL，摇瓶转速 200r/min，产酶时间为 20~24h，果胶酶酶活高达 7800 U/mL。

(3) 在摇瓶发酵条件下，A_6 菌 12h 即能完成亚麻脱胶，比天然水沤法缩短脱胶时间 84h；A_6 菌以亚麻茎粉为碳源产生的酶制剂主要为胞外酶，包含果胶酶、木聚糖酶、CMC 酶、淀粉酶和蛋白酶等组分。浴比 1：15~20，1g 麻茎添加 5mL 酶液，脱胶 24h，纤维分散良好，脱胶后的纤维色泽、亮度和强力均优于水沤麻。

关键词：中国南方，亚麻，脱胶，果胶酶

Abstract

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is the important raw material for textile fiber in China. The initial step for converting flax to linen is called retting, which is the major problem in processing flax. After introduction of flax to southern China, in order to establish the technical system of new pattern retting of flax in south China, major factors of natural water retting of flax, such as the type and number of retting bacteria, retting-enzymes, external retting conditions and stem characteristics were all studied deeply in the paper. And throuth screening from flax, a bacteria strain with high retting ability was obtained.

The main results are as follows:

(1)The pectinolytic bacteria played an important role in the retting. The activity of pectinase in retting water had an osculatory correlation with the retting. Water quality, ratio of flax stem to water, pH, water temperature and so on had an important effect on the growth of pectinolytic bacteria and the activity of pectinase in retting water. The optimum external retting conditions were as follows : pond water abundant in pectinolytic bacteria, water temperature 30℃-35℃, ratio of flax stem to water 1:20-25 and pH 7.0-7.5, Urea added into retting water by 2% of flax stem'mass. The different part, diameter and ripeness of flax had a different effect on flax retting. Therefore, it is necessary that the flax stems in same characeristic are selected together to ret in processing flax.

(2)A bacteria strain with high activity of pectinase and xylanase was screened from flax stem. It was preliminarily identified and named *Bacillus circulans* A_6. Pectinase producing conditions by *Bacillus circulans* A_6 were studied in shake flask culture. The result showed that the optimum pectinase producing conditions were as follows: flax stem power 7 %, $(NH_4)_2SO_4$ 1 %, K_2HPO_4 0.15 %, pH 7.5, inoculum age 24 hours, inoculum amount 5 %, aeration 70 mL medium / 250 mL flask, agitation speed 200r/min. After cultivating for 20-24 hours, the highest pectinase activity was 7 800 U / mL.

(3) Under the optimum growth condition, retting time of flax by *Bacillus circulans* A_6 was 12 hours, which was shorter 84 hours than that of nature

water retting. Pectinase, xylanase, CMCase, proteinase and amylase were produced by *Bacillus circulans* A_6 cultured with medium containing flax stem power as the sole source of Carbon. The culture filtrate of *Bacillus circulans* A_6 at 25% (v/v) and ratios 1:15~20, were able to produce the flax fiber in 24 hours. The color, gloss and strength of fiber were better than that of nature water retting.

Keywords: South China, flax, retting, pectinase

目 录

独创性声明和关于论文使用授权的说明
中文摘要
英文摘要
前言
第一章亚麻天然水沤法脱胶过程的动态观测
1 材料与方法
2 结果与分析
3 小结
第二章外界因子对天然水沤法脱胶的影响
1 材料与方法
2 结果与分析
3 小结
第三章麻茎特性对天然水沤法脱胶的影响
1 材料与方法
2 结果与分析
3 小结
第四章南方亚麻酶法脱胶菌种的分离与鉴定
1 材料与方法
2 结果与分析
3 小结
第五章环状芽孢杆菌 A6 产酶的条件
1 材料与方法
2 结果与分析
3 小结
第六章酶学特性及脱胶试验
1 材料与方法
2 结果与分析
3 小结
第七章讨论与结论
主要参考文献
致谢
作者简介

前　言

亚麻（*Linum usitatissimum* L.）为亚麻科（*Linaceae*）亚麻属（*Linum*）的一年生草本纤维植物，它既是当今世界的第三大纤维作物，又是五大油料作物之一。亚麻栽培种有纤用型、油用型和兼用型三种生态类型，油用和兼用亚麻通称为胡麻，纤用亚麻简称为亚麻。世界亚麻主要分布在西欧平原的温带夏季温凉湿润的气候区与东欧平原的温带海洋性气候区，常年种植面积 $1.33\times10^6 hm^2$ 以上，主产国有俄罗斯、中国、法国、比利时、波兰、罗马尼亚、捷克、斯洛伐克、匈牙利等。我国北方亚麻栽培始于 20 世纪初，现已形成以黑龙江为中心的集原料生产、脱胶制纤、纺织加工、内外贸易、科学研究于一体的亚麻产业体系，亚麻纤维制品已成为我国出口创汇的重要纺织品之一，年创汇一亿美元左右，利税 3.0 亿元以上。近年来，我国亚麻纺织工业迅速发展，纺织加工能力全面超过苎麻，纺锭增至 50 万枚，使我国成为继俄罗斯之后的第二大亚麻纺织大国。

我国北方亚麻生产因单产低、品质差、效益低而处于种麻难、卖麻更难的困境，年均播种面积 $1.5\times10^5 hm^2$ 左右，纤维产量 $8.0\times10^4 t$，只相当于亚麻需求量（$20.0\times10^4 t$）的 40%左右[1-2]。南方冬季亚麻引种栽培成功与产业化开发[3-4]，使亚麻由局限于三北地区的区域性作物，一跃成为继棉花、红麻之后的又一种全国性纤维作物。实践证明，南方亚麻产业化开发具有东北地区无可比拟的土地资源、产量品质、脱胶制纤、梳纺贸易优势，有利于优化农业产业结构，进一步推动冬季农业开发，促进农民增产增收和农村经济的发展；有利于促进乡镇企业的发展，吸纳大量的农村剩余劳力，促进农村经济发展和社会稳定；南方亚麻纺织工业的发展，有利于纺织工业结构优化，培育新的经济增长点，减少我国亚麻原料进口，提高亚麻行业的整体效益[5-6]。然而，南方亚麻产业刚刚起步，产业规模和科技水平明显落后于北方，更落后于欧洲。因此，要促进南方亚麻产业的健康发展，必须在不断提高亚麻原茎产量、纤维品质与种植效益的前提下，利用南方亚麻收获后正值夏季，水源充足和水温较高的有利条件，开展亚麻微生物脱胶技术研究，建立适合南方自然、社会、经济条件的亚麻新型高效的脱胶技术体系，进一步降低亚麻脱胶的能耗与成本，提高亚麻长麻率、纤维品质与脱胶效益。

1　亚麻脱胶制纤研究概况

1.1 亚麻纤维的化学组成

亚麻纤维属韧皮类纤维素纤维，除纤维素外，还含有半纤维素、木质素、果胶、水溶物、脂肪、腊质等伴生物，是一种非纯净的纤维素纤维。有关研究表明，亚麻韧皮中纤维素含量70%~80%，半纤维素12%~15%，木质素2.5%~5%，果胶1.4%~5.7%，蜡质1.2%~1.8%，灰分0.8%~1.3%，含氮物质0.3%~1.6%[7]。

1.2 亚麻纤维脱胶的基本原理

亚麻纤维存在亚麻原茎的韧皮部内，亚麻纤维细胞靠果胶质轴向搭接或侧向转接形成纤维束，纤维束之间分布着大量的韧皮薄壁细胞与筛管、伴胞等胶杂成分。亚麻纤维细胞长度多为10~26mm，单纤维长度小于纺针的间距，达不到纺织工艺的要求，只能利用束纤维进行纺纱。因此，亚麻脱胶实质上采取化学的、物理的、生物的、综合的方法，破坏纤维束与周围组织、韧皮部与表皮、韧皮部与木质部之间的连接程度，在尽可能地除去胶杂物质的同时，减少对纤维细胞间胶质的破坏，维持纤维束内部纤维细胞间的固有形态与结构。由亚麻原茎去除表皮、皮层、韧皮薄壁组织等胶杂成分，获得亚麻干茎的工艺过程称为亚麻脱胶。

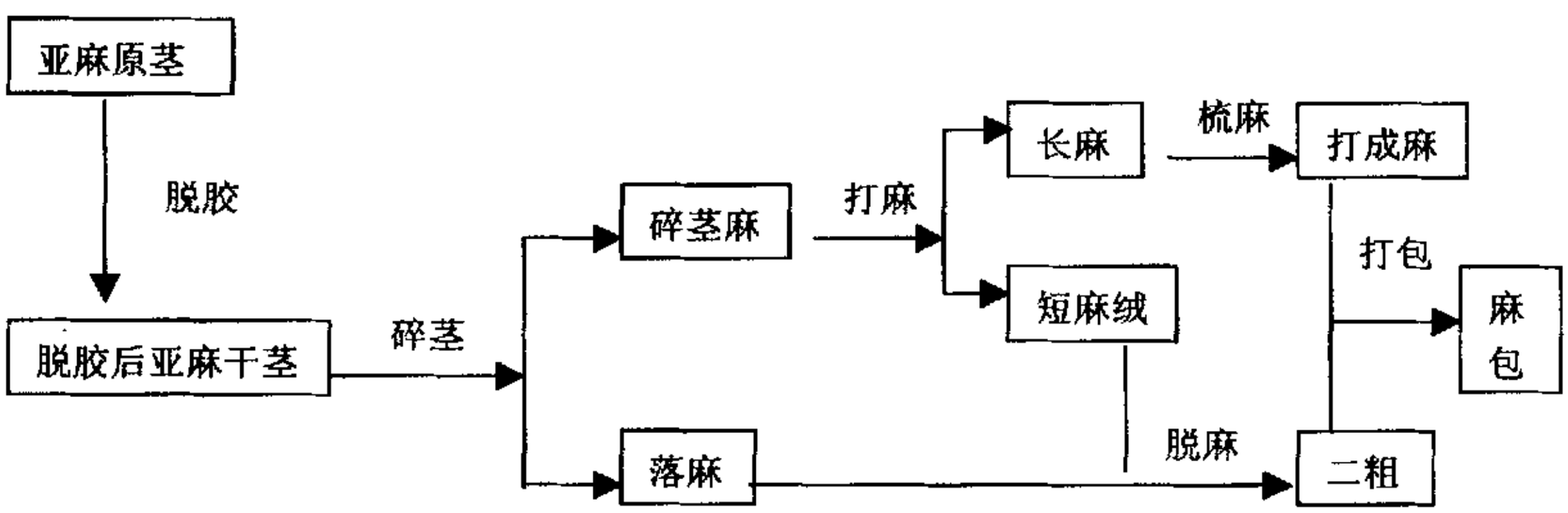
亚麻脱胶方法有微生物脱胶、化学脱胶、机械脱胶三种。亚麻微生物脱胶就是利用某些脱胶微生物分泌的生物酶水解亚麻韧皮纤维中的果胶、半纤维素等胶杂质，使亚麻表皮、皮层、韧皮薄壁细胞、筛管与伴胞等杂细胞离析剥落而实现脱胶，它具有操作简便、成本低廉、简单易行等优点，是国内外亚麻脱胶的主要方法。亚麻微生物脱胶按其脱胶形式可为三种：一是在适宜的条件下，利用水体及麻茎上存在的天然微生物，以果胶物质、半纤维素等胶杂质为碳素营养，将其转化为水溶性的低分子物质实现脱胶；二是从自然界人工分离纯化脱胶菌种，利用脱胶菌的纯培养进行加菌脱胶；三是培养脱胶菌制取脱胶酶制剂，进行酶法脱胶。

1.3 亚麻纤维制纤的工艺原理

亚麻茎杆纤细，无法象苎麻那样逐株剥皮、刮青、脱胶的方法制取韧皮纤维，只能先脱胶，再利用纤维与麻骨韧性的差异，采取机械方法制取工艺纤维。亚麻制纤是指由亚麻干茎通过养生（回潮）、碎茎、打麻、梳麻、脱麻等，获取亚麻工艺纤维（含长麻和短麻）的工艺技术。亚麻制纤效率与纤维品质与脱胶质量密切相关，脱胶偏生皮骨难以分离，工艺纤维，即打成麻上含麻骨（麻茎木质部）过多，无法达到梳纺的

要求：脱胶偏熟，纤维束间结构被破坏，纤维品质（主要是纤维强力）和长麻率明显下降；脱胶过度使长麻变为短麻，甚至变成单纤维细胞，完全失去纺织价值，只能用于造纸。

亚麻脱胶制纤的工艺流程如下：



2 亚麻微生物脱胶研究进展

2.1 天然微生物脱胶

利用天然存在的微生物进行麻类脱胶，古已有之，我国《诗经·陈风》中就有“东门之池，可以沤麻”的记载。目前，亚麻天然微生物脱胶方法主要有水沤法和雨露法两种，水沤法又可分为温水沤麻法和天然水沤法。亚麻温水沤麻法是在天然水沤法的基础上通过人工控制水温，使麻茎在适宜的温水中沤制，利用温水中存在的天然微生物对亚麻进行脱胶，它是我国北方亚麻脱胶最主要的方法。亚麻天然水沤法是将收割后的亚麻浸渍在池塘、湖泊或水沟中，利用麻茎及水源中天然微生物的发酵作用分解麻茎内的胶质，致使韧皮纤维部与木质部分离。因国内外亚麻主产区分布于高纬度地区，亚麻收获后气温和水温下降迅速，天然水沤法脱胶的研究与应用极少。

据研究，参与水沤法脱胶的微生物主要是一些具有脱胶能力的芽孢杆菌，但起主导作用的是厌氧细菌，还是好氧菌一直是争论的焦点。Ruschmann 和 Stuzer 认为厌氧细菌是脱胶的真正执行者，而好氧菌只不过是辅助菌系。Ahmad 则持不同的观点，在他得到的需氧菌中 5~7 天即能使黄麻脱胶，而厌氧细菌往往要 12 天以上[8]。水沤法是一个复杂的微生物发酵过程，微生物种群和数量、水体条件、麻茎特性直接或间接地影响到亚麻脱胶速度。彭源德等[9]报道，水质、水温、pH 、浴比、无机盐等因素通过影响沤麻水中微生物的生长繁殖，从而影响亚麻脱胶的速度。陈灿等[10]研究表明，麻茎特性与脱胶周期密切相关。江洁等[11]研究发现化学助剂的种类、添加量和添

加时间，对亚麻脱胶的速度和质量产生重要影响。

亚麻雨露沤麻是利用空气中的阳光、降雨和露水维持沤麻所需的温度和湿度，通过麻茎上固有的霉菌使细胞壁多糖部分降解，使亚麻韧皮部与木质部分离而脱胶。雨露沤麻因具有节能、高效又不污染环境等优点而成为西欧国家沤麻的主要方法，但该法受到地理区域、气候条件的限制，沤制的亚麻纤维较粗、质量也不稳定。我国北方地区气候少雨干燥，适于沤麻的时间短，温湿度往往不够平衡，雨露沤麻常导致出麻率低和纤维品质劣；我国南方麻区因夏季、秋季高温干旱，麻茎保湿困难，同样难以推广。

2.2 亚麻加菌脱胶

亚麻天然微生物脱胶因脱胶菌种类和数量、外界条件的频繁变化，导致脱胶工艺不稳定，重复性差，并因天然微生物生长缓慢，脱胶周期长，增加了亚麻脱胶的成本。人工筛选微生物，加菌脱胶则是解决上述问题的有效途径。50 年代初，中国科学院长春综合研究所的李鸣时等筛选出厌氧芽孢杆菌 19 号进行了加菌脱胶实验，加菌脱胶周期平均为 61.5h，比对照减少 44%，出麻率提高了 2.16%[8]。1960 年，延边医学微生物教研组利用同一菌株进行脱胶实验，试用了 878kg 亚麻，加入脱胶菌液进行浸渍，脱胶周期比对照不加菌缩短了 52h，出麻率提高 1.0%[12]。法国、德国、意大利、前苏联等国家用费地芽孢梭菌进行亚麻脱胶，不但缩短了脱胶周期，还提高了纤维产量[8]。1994 年，东北农业大学生物系的王立群等[13]筛选出两株优良的枯草芽孢杆菌 Kc34 和 Lc10 用于亚麻脱胶，结果表明，加菌脱胶使亚麻果胶含量降至 4.0%~4.5%，出麻率提高到 30%，增加纤维抗拉强力，并改善了纤维外观质量。1998 年，江洁等[14]从沤麻主生物期的水中分离到一株产果胶酶的费氏芽孢杆菌，确定了人工加菌沤麻的最适工艺条件：加菌量 2%，加菌时间为主生物期零时，沤麻时间缩短 30%，麻纤维质量有所提高。2001 年，G Fila 等[15]人从雨露沤制麻茎上筛选出一些真菌用于加菌脱胶取得良好的效果。为了彻底变革传统脱胶工艺，2003 年，彭源德等[16]通过初筛、复筛和诱变育种，获得了 1 株编号为 Ym68 的亚麻快速脱胶菌种，在实验室条件下该菌种能在 16h 内完成亚麻脱胶；与传统工艺相比，缩短脱胶周期 79%以上，综合出麻率提高 7.3 个百分点、纤维强力和长度提高 50%和 3.3%，显示出亚麻加菌脱胶的广泛应用前景。总之，自 20 世纪 90 年代以来，尽管在亚麻脱胶菌种选育方面取得了一些成果，但最终因脱胶菌种性能较差，脱胶工艺不完善，脱胶成本高，且加菌脱胶仍

然无法消除脱胶废水对环境带来的污染，脱胶后废水的 COD 含量仍然相当高[16]，无法应用于工厂化生产。

2.3 亚麻酶法脱胶

为进一步提高亚麻脱胶效率，从根本上消除亚麻脱胶带来的环境污染，20 世纪 80 年代，国外对亚麻的酶法脱胶进行了广泛研究。丹麦的诺沃公司与根特大学的合作，成功开发出了沤麻专用酶制剂—Flaxzyme，它是由 *Aspergillus japonicus* 或 *A. aculeatus* 的菌株生产的液体混合酶制剂，主要由果胶酶、木聚糖酶、CMC 酶、甘露聚糖酶等组成[17]。之后，Ultrazym、EPM 及 Viscozyme L 等一批沤麻酶制剂相继研制成功，并申请了专利保护。1997 年，Akin. DE 等[17]比较了 Flaxzyme、Ultrazym 和 EPM 三种酶制剂的脱胶效果，结果表明，这三种酶制剂均能在 24h 内完成亚麻脱胶，但 Flaxzyme 能更有效地从纤维上去除非纤维组分和从木质部去除韧皮。同时，Akin. DE 研究了沤麻酶对亚麻细胞壁的结构及组成的影响，发现麻茎结构的完整性对沤麻酶的活度产生重要影响，麻茎表皮层和次表皮层处的钙—桥接的果胶分子具有阻止聚半乳糖醛酸酶，防止皮质充分分离，降低沤麻效率的能力，他预测利用螯合剂预处理或者机械预处理麻茎，破坏其表面结构，可能对提高沤麻酶的活度具有重要作用。同年，Henriksson 等[18]研究了螯合剂和机械预处理对亚麻酶沤麻的影响。结果显示，加入 50 毫摩尔的草酸或 15 毫摩尔的 EDTA 能够显著提高 Flaxzyme 的沤麻效率，节约沤麻的时间，降低沤麻的成本；将麻茎在六角形铅笔上缠绕一周做机械预处理，破坏角质化的结构，促进沤麻酶进入内部细胞，提高了 Flaxzyme 沤麻的活度。2001 年，Akin. DE 进一步研究了亚麻的酶法脱胶及加工纤维的特性，他将不同沤麻方法生产的亚麻纤维，与棉纤维混纺生产亚麻棉混纺纱，发现 0.3%(v/v)的 Viscozyme L+25m M EDTA 组成的脱胶体系所生产的亚麻纤维，与棉纤维混纺纱品质优良，从工业应用方面证实了亚麻酶法脱胶的应用价值[19]。

尽管国内外已经开发出了一批沤麻酶制剂，但酶法脱胶的高额成本限制了沤麻酶制剂在工业上的应用。其中一个重要的原因是酶法脱胶机理的研究进展缓慢，已有的沤麻酶制剂都是成分复杂的复合酶，不利于脱胶机理的研究。一般认为果胶酶在脱胶中起主导作用，半纤维素酶和少量的纤维素酶也发挥着一定的作用（Van Sumere,1992）[20]。但近来的研究表明，半纤维素酶和纤维素酶在脱胶中不一定是必需的。1999 年，Henriksson 从雨露沤麻茎上分离得一株真菌 *Rhizomucor pusillus*，利用该菌株产生的

酶制剂对亚麻脱胶取得很好的效果。SDS-PAGE 分析酶制剂的蛋白质组分，发现此酶制剂仅含有几种蛋白质。酶活分析表明，该酶制剂含有丰富的内切多聚半乳糖醛酸酶，不含果胶甲基水解酶、果胶裂解酶、木聚糖酶，但含有极其微量的纤维素酶。因此推测内切多聚半乳糖醛酸酶可能是沤麻的关键酶[21]。2002 年，Evans, J.D 研究了四种不同来源的内切多聚半乳糖醛酸酶对亚麻酶法脱胶的影响，他将四种内切多聚半乳糖醛酸酶分别加入同一来源的酶制剂中组成沤麻体系。结果表明，加入内切多聚半乳糖醛酸酶的沤麻体系均比对照提高了纤维的产量，但黑曲霉的内切多聚半乳糖醛酸酶组成的沤麻体系效果最好，纤维产量比对照不加内切多聚半乳糖醛酸酶的沤麻体系提高了 62%[22]。因此，如果能利用基因克隆技术，大批量的生产内切多聚半乳糖醛酸酶，将有望大幅度地降低亚麻酶法脱胶的成本，使酶法脱胶真正走向工业化的道路。

2.4 亚麻脱胶程度的评判

亚麻脱胶程度的把握直接关系到脱胶效率与纤维的生产应用价值。目前，工厂上主要是凭经验感官对原茎脱胶进行初步评价，打成麻后，测定长麻率、纤维强度、细度等指标对整个初加工过程做进一步评价。在实验室中，由于处理的样品少，对脱胶程度的评判一直是一个难点。1984 年，Seaby 和 Mercer 推荐使用根据纤维从木质部分离的难易程度评判亚麻脱胶[23]；1988 年，Fisher 和 Topf 分析脱胶后麻茎的坚韧性评判亚麻脱胶[24]；也有人通过一些化学参数进行评价，如：麻茎纤维的重量损失率（Brown, Sharma & Black, 1986）[25]、阳离子交换能力（Morvan, Jauneau&Demarty, 1985）[26]以及果胶残余量（Meijer et al., 1995）[27]等；而 Henriksson （1997）采用 Dujardin (1942)及 Van Sumere (1992)使用过的 Fried test 评分法对亚麻脱胶进行评判，并根据沤麻剂增加水平的评分证实了该种方法的有效性[28-29]。在沤麻酶制剂的专利申请中，此方法也被采纳用于评价沤麻酶制剂的作用效果。Fried test 评分法主要是根据韧皮和木质部分离、以及束纤维分离为较小的束和单纤维的程度进行目测评分，具体做法为：将沤制好的麻茎倒入试管，加入 8mL 沸水，再将试管立刻在已设定最大速度的 Thermodyne 的混合器上搅拌 10 秒钟，然后将试管用手工在垂直方向激烈摇动 4 次。根据标准图象目测评定纤维分离的程度，记分分 0（不分散）、1（部分分散）、2（基本分散）、3（分散良好）四个等级。在这个试验中，相同的评分员并不知道处理前的情况。2001 年，G Fila 等[15]模仿工厂加工亚麻纤维的方法设计了一台在实验室使用的碎茎机，该机器由两辐手动圆周滚动的凹形滚筒组成，当麻茎穿过滚筒时，木

髓和皮质被压成 2~3mm 的碎片，而纤维仍然保持完整，然后用一把木制的梳子手工刮掉麻屑，得到纯净的纤维。收集脱落的麻屑，计算麻屑的去除率评价沤麻的程度，去除率越高，说明沤制效果越好；得到的纯净纤维用来测定纤维的产量和长度供进一步评判。这种方法本身是对沤麻的直接评判，具有很强的可操作性，同时能在短时间内处理大量样品，因此具有其他方法无可比拟的优点，缺点是缺少一定的线性关系。

3 南方亚麻微生物脱胶技术研究的意义

南方冬季亚麻收获的季节为 5 月上旬，正值初夏，水源充足，浅层水温高达 30℃左右，接近亚麻脱胶的理想温度，具备进行天然水沤法脱胶、大幅度降低亚麻脱胶能耗和成本的基本条件。本项目拟在前人的研究基础上，从亚麻天然水沤法脱胶的动态过程出发，对影响脱胶速度与脱胶质量的诸多因子，如脱胶微生物种群及其数量、脱胶酶种类及活性、水源水质、沤麻水温、起始 pH、麻水比值（浴比）、化学助剂种类与用量，以及麻茎老嫩、粗细、干鲜等因子进行了系统深入的比较研究，进而进行高效脱胶菌种筛选与加菌、酶法脱胶技术的研究。旨在进一步揭示亚麻天然水沤麻的机理，建立适合南方亚麻实加工的新型高效脱胶技术体系，为南方冬季亚麻产业化开发提供理论依据和技术支撑，填充南方亚麻酶法脱胶研究的空白，这对于完善亚麻科学技术体系，推动南方亚麻产业的健康发展，促进农民增产、增收和增效具有十分重要的意义。

第一章 亚麻天然水沤法脱胶过程的动态观测

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试原茎为产自湖南祁阳的冬季亚麻（品种为“范妮”）；沤麻水为取自湖南农业大学校园的池塘。果胶与半乳糖醛酸：Sigma 公司产品，其它试剂均为分析试剂或生化试剂；奥立龙 818 型酸度计，7230 型可见光分光光度计

1.2 沤麻方法

将亚麻原茎剪成 6～8cm 长的茎段，扎成约 15 g 的小捆，放入 500mL 三角瓶中，浴比 1：25，加水 375mL，34～35℃条件下静止发酵至脱胶完成。每隔 12h 取样一次测定微生物数量、相关酶活性、水体性质等。

1.3 脱胶酶活性测定

果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶用 DNS 比色法测定，酶活性测定底物分别是 0.5%的果胶溶液、木聚糖和 CMC 溶液（用 pH4.4 的柠檬酸缓冲液配制）。酶活性测定条件：①取 25mL 比色管，先加底物 1mL，再取经 3800r/min 离心的沤麻上清液 1mL，加塞摇匀，50℃水浴保温 60min，取出；②加 1.5mlDNS 显色液并摇匀，立即置沸水中显色 5 分钟，取出自来水冲冷，加蒸馏水稀释至刻度，摇匀；③以灭活酶液（100℃灭活 10min）作对照，用 7230 型分光光度计在波长 520nm 处比色测定酶活性。酶活性单位：在上述条件下，以每分钟水解底物生成 1 μ mol 还原糖所需酶量定义为一个酶活性单位[30]。

1.4 细菌类群与数量测定

细菌总数用葡萄糖营养琼脂培养基（葡萄糖 0.1g、蛋白胨 1.0g、牛肉膏 0.3g、氯化钠 0.5g、琼脂 1.5g、蒸馏水 100mL ，pH7.2～7.4）；果胶分解菌用果胶琼脂培养基（ Na_2HPO_4 0.1g、$MgSO_4$ 0.05g、KNO_3 0.3g、 $FeSO_4$ 0.001g、果胶 1g、琼脂 1.5g、

蒸馏水 100 mL、pH 自然）；厌氧培养用真空干燥器（盛焦性没食子酸溶液）充氮气于恒温培养箱中培养；活菌数用平皿菌落计数。

1.5 水体性质测定

酸度用奥立龙 818 型酸度计测定；含氮量用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法测定[31]，COD 用酸性重铬酸钾法测定[31]，还原糖用 DNS 定糖法测定[32]。

2 结果与分析

2.1 微生物数量与种类的动态变化

从图 1-1 可以看出，沤麻前期好氧细菌占主体，随着时间的推移，好氧和厌氧细菌数量逐渐增加，但好氧细菌增长速度高于厌氧细菌。脱胶 36h 时好氧细菌总数达到高峰，逐步形成了对自身生长不利的嫌气条件，促进了厌氧细菌的生长繁殖，厌氧细菌在 36h 后快速增长，48 h 厌氧细菌数量超过好氧细菌，并于 60h 达到最高峰，之后所有细菌总数逐渐下降直至沤麻结束，但厌氧细菌总数仍然高于好氧细菌，说明天然水沤麻过程中厌氧菌起着主导作用，好氧菌起辅助作用，这与 Ruschmann 和 Stuzer 的结论基本相符。此外，好氧、厌氧果胶分解菌的变化曲线与好氧、厌氧细菌的变化曲线基本一致，表明果胶分解菌在亚麻天然水沤麻过程中发挥着重要的作用。

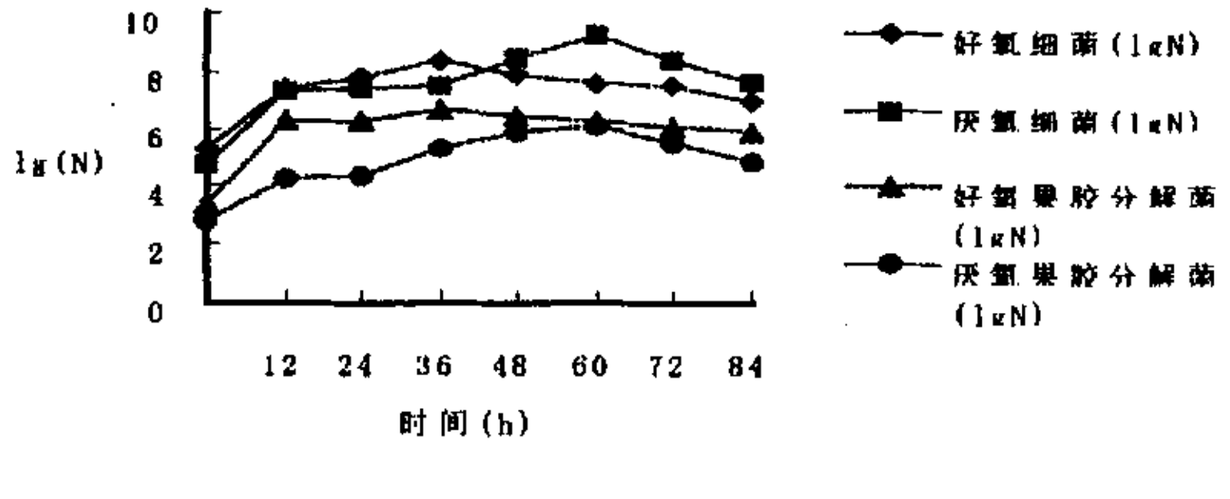


图 1-1 亚麻天然水沤法脱胶过程中细菌数量的变化

Fig1-1.Bacteria number change under natural water

2.2 脱胶酶的动态变化

果胶和半纤维素是亚麻胶质的主要成分，沤麻液中果胶酶、木聚糖酶活性的高低直接影响到亚麻脱胶的速度和质量。由图 1-2 可以得知，沤麻液中果胶酶的活性明显

高于木聚糖酶和纤维素酶，并呈现出由低到高再逐渐降低的变化趋势，脱胶 60h 时达最高值，然后缓慢下降，其变化规律与微生物数量变化相类似；木聚糖酶和纤维素酶活性明显低于果胶酶，且其变化趋势不同于果胶酶，在脱胶过程中呈逐渐增长的规律性变化。这是由于麻茎韧皮部中果胶物质分解，半纤维素和纤维素逐渐暴露出来，诱导微生物产生木聚糖酶和纤维素酶，导致其酶活逐步增强，而半纤维素、纤维素的降解反过来增加了果胶酶与果胶类胶质的接触面积，促进了果胶物质的分解，使果胶酶活性维持在较高水平。三者共同作用最后麻茎胶质被逐渐脱除。

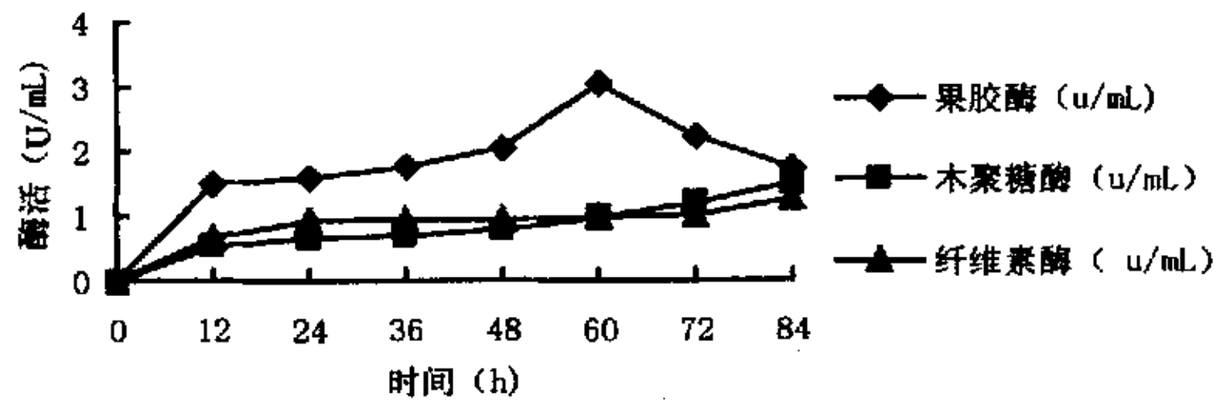


图 1-2 亚麻天然水沤法脱胶过程中相关酶活性的变化

Fig1- 2. Enzymatic activity change under natural water retting

2.3 还原糖与含氮量的变化规律

亚麻脱胶过程中，沤麻液中还原糖的含量在 0~12 h 之间迅速增加，其原因是沤麻前期麻茎中的可溶糖溶于水中，使还原糖含量快速上升，12h 后微生物分泌的果胶酶等酶类分解果胶类胶杂质使还原糖进一步升高，60h 时果胶酶和还原糖同时达到最高，随后果胶酶逐渐下降，还原糖含量也随着下降，72h 后木聚糖酶和纤维素酶活性升高使还原糖含量略有回升(图 1-3)。

从图 1-4 可以看出，亚麻脱胶初期的 24h，麻茎中的含氮物质溶于水中，使水中的含氮量快速上升；随后的 24h，微生物消耗氮源形成菌体，含氮量呈现缓慢下降趋势；此后因微生物分泌大量酶蛋白，以及微生物细胞发生自溶现象，释放出含氮有机物，水体中含氮量又开始回升。

2.4 水体 pH、COD 的测定

在沤麻前期（0-36h），麻茎中的可溶性物质溶解于沤麻水中，引起好气性细菌（典型为乳酸杆菌）大量繁殖，微生物分解可溶性物质产生酸类、CO_2 等积累于沤麻水中，

使其 pH 快速下降；沤麻中期（36～72h）厌氧细菌迅速生长繁殖，果胶分解菌大量产酶，使果胶类物质分解成小分子糖类，使 pH 下降缓慢；沤麻末期，微生物逐渐衰亡，细胞自溶释放出大量菌体蛋白，微生物以菌体蛋白为氮源释放出氨气，pH 又逐渐上升(图 1-5)。

图 1-6 表明，亚麻脱胶的前 72h，COD 成比例地快速上升，之后趋于缓慢。其原因可能是随着沤麻的进程，麻茎中的有机物等还原性物质不断溶于水中，使得水中 COD 逐渐上升；沤麻末期，麻茎的脱落物逐渐减少，结果 COD 增长趋于缓慢。本实验 COD 的测定，包含沤麻液中所有还原性有机物，如麻茎剥落物、菌体、酶类等，沤麻过程中的 COD 一直呈现上升趋势，与其他报道有所差别[33]。

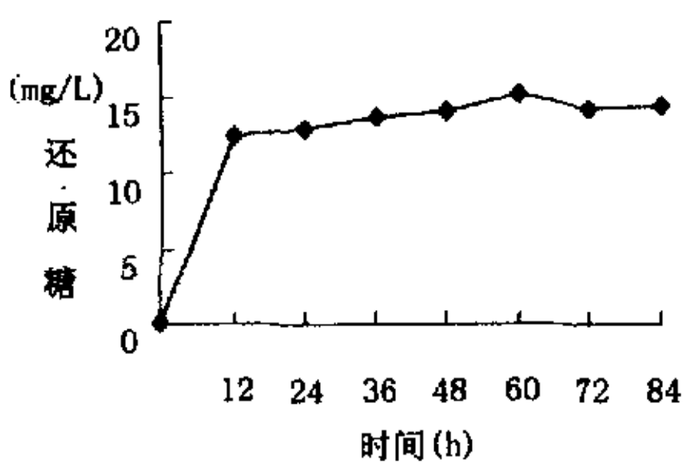


图 1-3 天然水脱胶液中还原糖的变化

Fig1-3. Reducing sugar content under natural retting

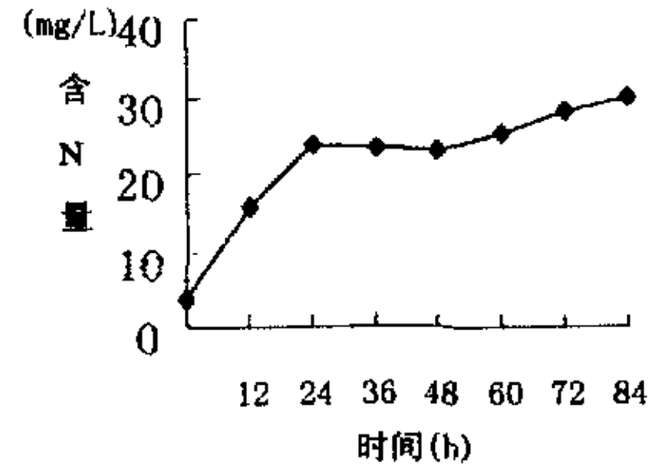


图 1-4 天然水脱胶液中含 N 量

Fig1-4 Nitrogen content under natural water retting

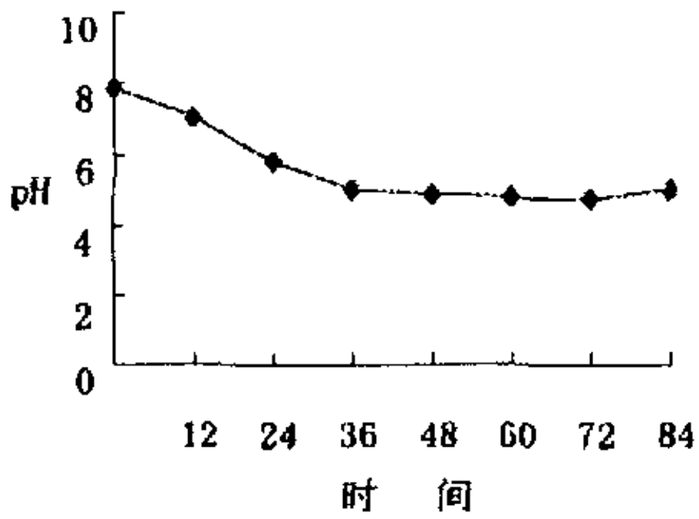


图 1-5 天然水脱胶液中 pH

Fig1-5 pH change under natural water retting

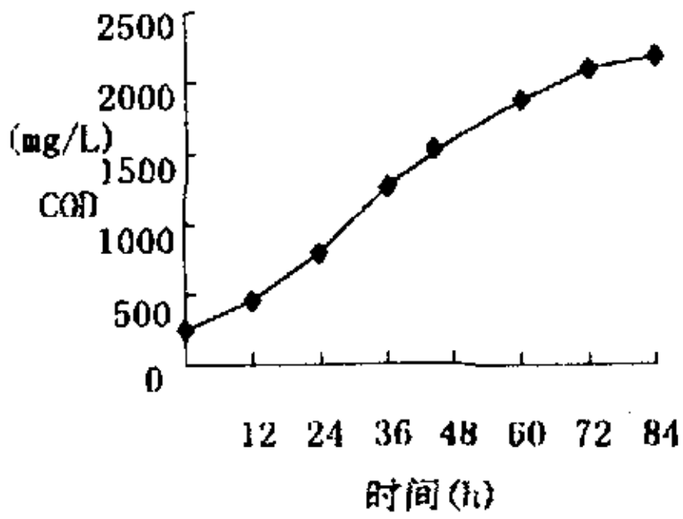


图 1-6 天然水脱胶液中含 COD

Fig 1-6 COD under natural water retting

3 小结

本实验结果表明，亚麻脱胶过程中，微生物活菌量在脱胶前期迅速增加，后期有所下降，脱胶过程中，厌氧细菌起主导作用，好氧细菌起辅助作用；果胶酶、还原糖随着脱胶的进程逐渐上升，60h 后缓慢下降，木聚糖酶、纤维素酶在整个脱胶过程中一直呈上升趋势；pH 在脱胶前期快速下降，随后基本稳定，至末期又有所回升；含氮量在脱胶前期增长迅速，中期有所下降，后期又快速回升；COD 随着脱胶过程的延长不断增加，前期增长迅速，后期增幅减缓。

第二章 外界因子对天然水沤法脱胶的影响

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试原茎为产自湖南祁阳的冬季亚麻（品种为“范妮”）；沤麻水为取自湖南农业大学校园的池塘水、井水、自来水和浏阳河水。

1.2 沤麻方法

根据试验要求，选取亚麻原茎，剪成 6~8cm 长的茎段，扎成约 15g 的小捆，放入 500mL 三角瓶中，除浴比、pH、温度、添加剂等试验的特定条件外，以浴比 1:25 加池塘水，pH 自然，35℃条件下静止发酵至脱胶完成。

1.3 外界因素脱胶试验设计

1.3.1 水源试验： 四种水源分别为池塘水、井水、自来水和河水。

1.3.2 浴比试验： 麻（W）:水(V)比为 1:15，1:20，1:25，1:35 和 1:45。

1.3.3 起始 pH： 以 HCl 和 NaOH 调节沤麻水起始 pH 至 6.0，6.5，7.0，7.5 和 8.0。

1.3.4 沤麻水温： 分别为室温（20℃），30℃，35℃和 40℃。

1.3.5 化学助剂： 选取尿素、硝酸铵、碳酸铵、磷酸铵 4 种无机盐作为沤麻的化学助剂，用量为原茎重量的 2%，沤麻后 24h 加入。

1.4 项目观测与方法

1.4.1 细菌数量及果胶酶活性测定： 果胶分解菌用果胶琼脂培养基平皿菌落计数，果胶酶活性测定参考本文第一章的方法，以 pH4.4，50℃条件下，每小时生成 1μ mol 还原糖所需酶量定义为一个酶活单位。

1.4.2 Fried 试验评分方法： 将沤制过的麻茎倒入试管中，加入等量、能淹没麻茎的沸水，加盖橡皮或玻璃软塞后，轻摇 10s，再激烈地垂直摇动四次，用纤维分散好的标准管做对照，目测评定纤维分离的记分从 0（不分散）、1（部分分散）、2（基本分散）、到 3（分散良好）。在这个试验中，相同的评分员并不知道处理前的情况。同一评分员对同一样品三次评分的平均值即为 Fried 试验评分的结果[28]。

2 结果与分析

2.1 水源对亚麻天然水沤麻的影响

亚麻天然水沤麻是利用麻茎和天然水存在的微生物产生各种脱胶酶破坏纤维束与其周围组织连结的过程。一般认为果胶分解菌是天然水沤麻过程中起重要作用的微生物菌群，而果胶酶是一种重要的脱胶酶，其活性大小可做为评判麻类微生物脱胶的一个重要指标[34]。试验表明，不同水源中的起始果胶分解菌数量呈明显差异：塘水的果胶分解菌数量最多，为350cfu/ml，是河水的7.5倍，比井水和自来水多35倍以上。沤麻84小时的Fried试验评分，塘水明显高于其他三种水源。由此说明，天然水中果胶分解菌的数量与亚麻脱胶速度及质量密切相关(表2-1)。

表2-1 水源对亚麻天然水沤法脱胶效果的影响

Table2-1.Effect of different waters on natural water retting of flax

脱胶水源	起始果胶分解菌数量（cfu/ml）	Fried 试验评分*
塘水	350	3
河水	20	2
井水	<10	1
自来水	<10	1.3

注：*为同一样品同一评分员三次评分的平均值，下同。

图 2-1 是四种水源沤麻过程中果胶酶的动态变化规律，从图 2-1 可以得知，四种水源沤麻过程中果胶酶的变化基本一致，都呈现由低到高再下降的变化趋势，但均以塘水的果胶酶活性一直最高，其次是河水，井水最低。这说明沤麻液中果胶酶活与亚麻的脱胶程度密切相关，果胶酶可以作为评价沤麻水源优劣的一个重要指标。

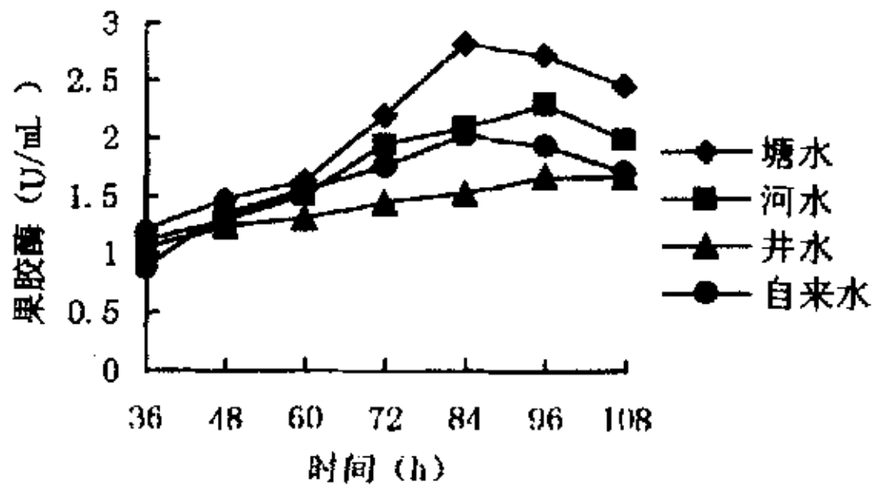


图2-1 不同水源沤麻过程中果胶酶的变化规律

Fig2-1.Variances of pectinase under natural water retting from different waters

2.2 浴比对亚麻天然水沤麻的影响

浴比不同，沤麻液中果胶酶活不同，脱胶效果也存在明显差异。浴比为 1:20~25 时，果胶酶活(72h 测得结果)明显高于其它处理。Fried 试验评分结果亦以浴比 1:20~25 为最佳。浴比过大，沤麻液中营养物质不足，脱胶菌生长不良，果胶酶浓度低，脱胶

效果差；浴比过小，沤麻液中有机质含量高，影响脱胶酶酶促反应平衡，加之空气与水体氧气交换快，不利于沤麻水中厌氧环境的形成，影响沤麻水中厌氧果胶菌的生长繁殖，脱胶效果亦差(表 2-2)。

表2-2 浴比对亚麻沤麻液中果胶酶(72h)的影响

Table2-2.Effect of different ratios on pectinase in retting water

浴比	果胶酶（U/mL）	Fried试验评分
1：15	1.186	1.5
1：20	2.191	2.3
1：25	1.907	2
1：35	1.173	1.3
1：45	0.876	1

2.3 pH 值对亚麻天然水沤麻的影响

pH 值是影响微生物生长与脱胶酶活的一个重要外界因子。微生物种类不同，生长的最适 pH 亦不同，一般细菌在中性偏碱的环境下生长良好。由表 2-3 可知，沤麻水起始 pH 值为 7.0~7.5 时，果胶酶酶活性高，脱胶效果好。pH 值过低（6.0）或过高（8.0）不利于果胶分解菌生长，果胶酶活相对较低，脱胶效果也较差。

表2-3 起始pH对亚麻沤麻液中果胶酶(72h)的影响

Table2-3.Effect of different primary pH on pectinase in retting water

起始pH	果胶酶（U/mL）	Fried试验评分
6.0	1.418	1.3
6.5	1.546	1.5
7.0	1.637	1.5
7.5	1.817	2
8.0	1.276	1

2.4 温度对亚麻天然水沤麻的影响

温度是影响微生物生长繁殖与果胶酶活的又一个重要外界因子。表 2-4 表明，沤麻水温 30~35℃时，果胶分解菌繁殖快，果胶酶活高，脱胶效果好；温度过高，不利于果胶分解菌的生长，果胶酶酶活低，脱胶效果较差；温度为室温（20℃）时，沤麻 72 小时未检测到果胶酶活，脱胶效果最差。因此，天然水沤麻的最适温度为 30~35℃。

表 2-4 温度对亚麻沤麻液中果胶酶(72h)的影响

Table2- 4. Effect of water temperature on pectinase in retting water

温度(℃)	果胶酶（U/mL）	Fried试验评分
20(室温)	未检测到	0
30	1.959	1.6
35	2.010	3
40	1.340	1.5

2.5 化学助剂对亚麻天然水沤麻的影响

2.5.1 化学助剂对沤麻水中果胶酶的影响

沤麻水中加入一定量的含氮物质，可补充微生物的氮源，促进果胶分解菌的生长繁殖，提高果胶酶的活性。本实验选用尿素、硝酸铵、碳酸铵和磷酸铵 4 种常见的含氮物作为脱胶助剂。由表 2-5 可知，加入适量的尿素、硝酸铵和碳酸铵，明显改善了沤麻的环境条件，沤麻至 48h，果胶酶酶活比对照（未加化学助剂）增加 1 倍左右，其中，尿素的脱胶效果最佳，其次是碳酸铵和硝酸铵，而磷酸铵处理的果胶酶酶活反而有所下降，其原因有待进一步研究。

表2-5 化学助剂对亚麻沤麻液中果胶酶(48h)的影响

Table2-5. Effect of chemistry reagent on pectinase in retting water

化学助剂	果胶酶（U/mL）	Fried试验评分
CK	1.250	1
尿素	2.977	2
硝酸铵	2.216	1.5
碳酸铵	2.345	1.5
磷酸铵	1.082	1

2.5.2 化学助剂对沤麻水 pH 的影响

从图 2-2 可知，沤麻初期（0~24 小时），pH 值下降迅速，主要原因是麻茎吸水膨胀，可溶性物质溶入水中，引起水中好气性细菌的大量繁殖，产生许多酸性物质；随后因麻茎中的胶质被果胶分解菌产生的果胶酶分解成小分子糖类，pH 下降缓慢；72h 时，沤麻水中营养物质匮乏，微生物逐渐衰亡，pH 又开始回升。加入尿素（24 小时加入）后，微生物利用尿素作为氮源，生长繁殖速度加快，同时释放出氨气使 pH 值在 24 小时内快速回

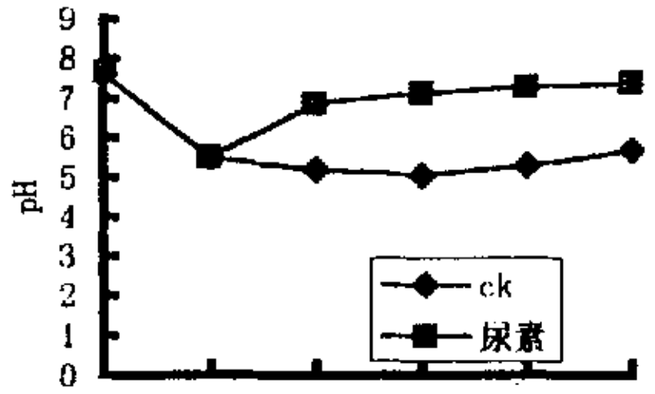


图2-2化学助剂对沤麻液中pH的影响

Fig2-2 Effect of chemistry reagent on pH in retting water

升，48 小时后，果胶分解菌大量产酶，分解果胶类物质为半乳糖醛酸、丁酸等有机酸使 pH 上升缓慢。

2.5.3 化学助剂浓度对沤麻水中果胶酶的影响

从表2-6看出，加入尿素均提高了沤麻液中果胶酶的活性。浓度为1.5~2%时，果胶酶酶活明显高于其他浓度，过高过低均不利于果胶酶酶活的提高。Fried试验评分同样以1.5%~2%的尿素浓度为最高。可见，亚麻天然水沤麻的尿素用量以1.5%~2.0%为最佳。

表 2-6 尿素浓度对沤麻液中果胶酶(48h)的影响

Table2-6 Effect of urea's density on pectinasein retting water

尿素（%）	果胶酶（U/mL）	Fried试验评分
0	0.992	0.5
1.0	1.649	1
1.5	2.436	1.5
2.0	2.693	2
2.5	1.688	1
3.0	1.598	1

3 小结

本实验结果表明，果胶分解菌是亚麻天然水沤麻中的重要脱胶菌群，果胶酶与亚麻脱胶效果密切相关；水源水质、浴比、起始 pH、温度、添加剂等对脱胶液中的果胶分解菌数量、果胶酶活性与脱胶速度产生重要影响。果胶分解菌含量丰富的塘水有利于亚麻脱胶，浴比 1:20~25、pH 7.0~7.5、温度 30~35℃有利于果胶分解菌的生长繁殖；加入适量（1.5~2.0%）的含氮物质（如尿素）作为脱胶助剂，能够改善亚麻的沤麻环境，提高果胶酶的活性，加快亚麻的沤麻速度。

第三章 麻茎特性对天然水沤法脱胶的影响

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试原茎为产自湖南祁阳的冬季亚麻（品种为“范妮”）；沤麻水为取自湖南农业大学校园的池塘水、井水、自来水和浏阳河水。

1.2 脱胶试验设计

1.2.1 灭菌处理对脱胶的影响：设麻茎未灭菌+塘水未灭菌(A)、麻茎未灭菌+塘水灭菌(B)、麻茎灭菌+塘水不灭菌(C)、麻茎灭菌+塘水灭菌(D) 4 处理。

1.2.2 麻茎粗细对脱胶的影响：在同一捆原茎中，先目测分成粗细差异明显的 3 组，再分别测定其茎中部的直径，各组平均值为 1.01mm、1.55mm、2.56mm，上述 3 组原茎用于脱胶。

1.2.3 麻茎老嫩对脱胶的影响：试验选取开花当天的麻茎、开花后 10 天的麻茎、开花后 20 天的麻茎用于脱胶测试。

1.2.4 麻茎部位对脱胶的影响：将粗细均匀的亚麻原茎分成基部、中部、梢部三等分用于脱胶测试。

1.2.5 机械破损对脱胶的影响：将亚麻原茎沿 A 型铅笔缠绕一遍，使原茎表皮部分破损，再用于脱胶测试。

1.3 观测项目与方法

称取试样麻茎剪成 6~8cm 长的茎段，扎成约 15 克的小捆，放入 500mL 三角瓶中，以浴比 1:20 加塘水 300mL，35℃条件下静止发酵，64h 时取脱胶液(麻龄脱胶试验除外，84h 取样测定)，采用 DNS 法测定果胶酶活性、称重法测定麻茎失重率、Fried 试验评分法测定脱胶效果。

麻茎失重率是指亚麻原茎脱胶过程中的重量损失率，是麻茎胶质去除程度的重要间接指标，麻茎失重部分来自离散剥落的麻茎表皮与皮层组织、韧皮薄壁细胞及一些可溶性物质。具体测定方法为：沤制前准确称量原茎干重，沤制后小心清洗麻茎(注意勿流失纤维)并烘干称重。计算式为：失重率(%) = [(原茎干重—沤制后干茎重)

/原茎干重）×100。

2 结果与分析

2.1 灭菌处理对亚麻脱胶的影响

亚麻天然水沤麻的实质就是利用天然微生物产生各种脱胶酶侵袭麻茎韧皮中的胶质，释放出韧皮纤维的生物化学过程。商品麻茎在生长、收获、凉晒、贮运的过程中所携带大量的天然微生物，其中部分可能具有一定脱胶能力，它们与水中的微生物一同构成了亚麻天然水沤法脱胶的微生物群体。从表 3-1 可知，果胶酶活性和麻茎失重率表现为 A>B>C>D，Fried 试验评分以麻茎未灭菌+水未灭菌(A)处理最佳，水灭菌+麻茎未灭菌(B)、水未灭菌+麻茎灭菌(C)次之，麻茎与塘水全灭菌的处理(D)几乎没有脱胶作用。这就说明亚麻天然水沤麻仅利用麻茎携带的微生物就能完成脱胶(B)，且脱胶效果好于塘水中的微生物(C)，但二者共同作用的脱胶效果最佳(A)。

表 3-1 麻茎上的微生物对亚麻脱胶的影响

Tab3-1. Effect of bacteria on flax stems on flax retting

不同处理	果胶酶（U/mL）	麻茎失重率(%)	Fried 试验评分
麻茎未灭菌+水未灭菌(A)	2.04	13.69	2.3
水灭菌+麻茎未灭菌(B)	1.86	11.43	2
水未灭菌+麻茎灭菌(C)	1.65	8.70	1.3
麻茎灭菌+水灭菌(D)	0.00	4.83	0

2.2 麻茎粗细对亚麻脱胶的影响

亚麻原茎直径因遗传及栽培条件的不同，呈现出相应的变化。从表 3-2 可知，原茎粗细程度对脱胶效果影响较大，麻茎越细脱胶速度越快。这是由于较细的麻茎（平均直径 1.01mm），纤维发育不良，胶质含量较高，但其与纤维及木质部的联结程度较低，可溶性胶质含量相对较高，果胶酶活较高，加之在质量相同的情况下，麻茎比表面较大，有利于脱胶酶与麻茎的充分接触，有利于加速脱胶，麻茎失重率高，脱胶效果较好；稍粗的麻茎（平均直径 1.55mm）纤维含量高，组织结构致密，纤维与其周围的胶质成分紧密交联，脱胶速度相对较慢，麻茎失重率低，脱胶效果较差；直径较粗（平均直径 2.56mm）的麻茎，果胶酶活较低，比表面积相对较小，不利于脱胶酶的侵袭胶质，导致亚麻脱胶速度变慢，麻茎失重率降低，脱胶效果更差。

表 3-2 麻茎粗细对亚麻脱胶的影响

Tab3-2. Effect of flax stems' diameter on flax retting

麻茎直径(平均值)	果胶酶（U/mL）	麻茎失重率(%)	Fried 试验评分
1.01 mm	2.05	11.97	2
1.55 mm	1.86	9.92	1.7
2.56 mm	1.81	8.12	1.5

2.3 麻茎老嫩对亚麻脱胶的影响

亚麻的生育期不同，麻茎的纤维含量及组织结构亦不同，脱胶的效果也呈现差异。从表 3-3 可以得知，开花当天的麻茎组织娇嫩，麻茎水溶物及胶质的较快脱落为微生物的生长繁殖提供了丰富的营养物质，促进了果胶酶的大量分泌，果胶酶浓度明显高于其它处理，脱胶速度快，脱胶效果最好，麻茎失重率高；开花后 10 天和 20 天的麻茎，麻茎组织逐渐老化，脱胶速度变慢，麻茎失重率低。由此说明，亚麻生育期越长，麻茎越老熟，脱胶速度越慢。

表 3-3 麻龄对亚麻脱胶的影响

Tab3-3. Effect of flax stems' ripeness on flax retting

麻龄	果胶酶 （U/mL）	麻茎失重率(%)	Fried 试验评分
开花当天的麻茎	4.61	23.1	3
开花后 10 天的麻茎	1.85	17.1	2.7
开花后 20 天的麻茎	1.80	12.7	2.4

注：表中数据为脱胶到 84h 时测定的结果。

2.4 麻茎部位对亚麻脱胶的影响

从表 3-4 得知，麻茎基部、中部和稍部三个处理的果胶酶浓度以梢部稍高，但差别不大，而其脱胶效果与麻茎失重率呈现出明显的差异：麻茎稍部较细，组织结构较松驰，可溶性果胶质含量较高，酶促反应速度较快，麻茎失重率高，脱胶效果最好；麻茎中部次之；而麻茎基部较粗，组织老熟致密，果胶质与钙、镁等离子结合形成难溶性的复合物，脱胶困难，麻茎失重率低，脱胶效果最差。这进一步说明了麻茎粗细、老嫩是影响亚麻脱胶效果的重要因素。

2.5 麻茎机械破损对亚麻脱胶的影响

从表 3-5 可知，机械破损的麻茎脱胶效果好于对照（未破损），麻茎失重率亦高于对照，这就说明完整致密的麻茎组织结构是抵挡脱胶酶侵袭胶质的主要屏障，麻茎

机械破损后，扩大了脱胶酶与麻茎的接触面积，有利于亚麻胶质的去除。

表 3-4 麻茎的部位对亚麻脱胶的影响

Tab3-4. Effect of flax stems' part on flax retting

麻茎部位	果胶酶（U/mL）	麻茎失重率(%)	Fried 试验评分
基部	2.32	8.31	1.3
中部	2.31	9.32	2
梢部	2.55	10.34	2.5

表 3-5 麻茎机械破损对亚麻脱胶的影响(64h)

Tab3-5. Effect of flax stems' Mechanical- breaking on flax retting

麻茎前处理	果胶酶（U/mL）	麻茎失重率(%)	Fried 试验评分
机械破损	1.72	7.71	2
未破损	1.80	6.78	1.6

注：表中数据为脱胶到 64h 时测定的结果。

3 小结

3.1 本实验结果表明，麻茎上存在具有脱胶能力的微生物，仅利用麻茎上的微生物就能完成亚麻脱胶。亚麻原茎所携带的脱胶微生物的种类、数量和脱胶能力的强弱，是影响亚麻脱胶进程的一个重要因素。

3.2 麻茎部位、粗细、老嫩对脱胶效果均有不同程度的影响：麻茎梢部脱胶速度较快，中下部较慢；细茎脱胶速度较快，粗茎较慢；幼嫩麻茎脱胶较快，老熟麻茎较慢。由此说明，选茎关系到脱胶速度的快慢与脱胶质量的优劣，是亚麻脱胶工艺中必不可少的重要环节。

3.3 破损麻茎脱胶较快，完整麻茎较慢。亚麻原茎，特别是麻茎中下部茎段适度的机械破损，能加快亚麻的脱胶速度，提高不同茎段的脱胶均匀度，是亚麻脱胶新工艺研究中应重点考虑的一个方面。

第四章 南方亚麻酶法脱胶菌种的分离与鉴定

1 材料与方法

1.1 试验材料

亚麻原茎产自湖南祁阳的亚麻（品种为“范妮”），果胶与半乳糖醛酸：Sigma 公司产品，其它试剂均为分析试剂或生化试剂；沉淀染色液（0.5g 碘和 1g 碘化钾溶于 100mL 蒸馏水）。

1.2 分离培养基

（1）$(NH_4)_2SO_4$ 0.05%, KNO_3 0.05%, $CaCl_2$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, K_2SO_4 0.01%, NaCl 0.02%, 琼脂 2%。

（2）亚麻粉（原茎粉碎）0.1%，水，琼脂 0.5%。

双层平板制备：在直径为 9cm 的平皿中倒双层平板，下层为 10mL 分离培养基（1），上层为 5mL 分离培养基（2）。

水解圈测定培养基与斜面培养基：果胶 0.5%，牛肉膏 0.3%，蛋白胨 1%，NaCl0.5%，琼脂 2%，pH7.5。

脱胶培养基：亚麻原茎（剪成 2cm 长）5%，K_2HPO_4 0.05%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，pH 自然。

1.3 水解圈测定

取待测菌株点种到水解圈测定平板上，每株点 3 个重复，35℃好氧培养 48h 后，加入 2mL 沉淀染色液，观察并测量菌落周围的水解圈和菌落的大小。

1.4 分离方法

1.4.1 富集培养：称取亚麻原茎 15g，以浴比 1:20 加无菌水 300mL 于 500mL 三角瓶中，35℃静止发酵直至纤维分散。

1.4.2 分离纯化：取富集培养液 1mL，通过适当稀释至 10^{-5}～10^{-7}，分别取 10^{-5}～10^{-7}

的稀释液 0.1mL 涂布于分离培养基中，35℃好氧培养 2～3d，选取数量优势的单个菌落，经划线分纯后，接入斜面培养基，编号，35℃好氧培养 2～3d 用于复筛。

1.4.3 复筛：将初筛所得的菌株点种于水解圈测定培养基，挑选菌落周围水解圈较大的菌株接种于脱胶培养基，恒温摇床上 35℃，120r/min，振荡培养 24h，取样观测脱胶效果及测定脱胶酶活。

1.5 脱胶酶活性测定方法

果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶用 DNS 比色法测定，酶活测定底物分别是 0.5%的果胶，1%木聚糖和 1%CMC 溶液（均用 pH7.6 的磷酸缓冲液配制）。酶活性测定条件：①取 25mL 比色管，先加底物 1mL，再取经 3800r/min 离心后的脱胶上清液 0.1mL，加塞摇匀，50℃水浴保温 15min，取出；②加 1.5mLDNS 显色液并摇匀，立即置沸水中显色 5 分钟，取出自来水冲冷，加蒸馏水稀释至刻度，摇匀；③以灭活酶液（100℃灭活 10min）作对照，用 7230 型分光光度计测定酶活性，在波长 520nm 处比色，测定果胶酶，木聚糖酶和纤维素酶的活性。酶活性单位：在上述条件下，以每分钟水解底物生成 1μg 还原糖所需酶量定义为一个酶活性单位。

1.6 脱胶松散度及残胶率测定

脱胶松散度是指麻茎韧皮纤维从木质部及外表皮脱落分散的程度。其大小是评价亚麻脱胶快慢及脱胶酶酶活高低的一个直观指标。计算公式为脱胶松散度（%）= （韧皮纤维完全脱落的根数/总根数）×100。

纤维残胶率测定[35]：亚麻原茎脱胶后，收集亚麻纤维，水洗，80℃恒温干燥，称重（W_1）后，与 2%NaOH 在 98kPa 压力下作用 30min，水洗至 pH6.5～7.0，恒温干燥，称恒重（W_2）。残胶率（%）= （W_1- W_2）/ W_2×100

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

的稀释液0.1mL涂布于分离培养基中，35℃好氧培养2～3d，选取数量优势的单个菌落，经划线分纯后，接入斜面培养基，编号，35℃好氧培养2～3d用于复筛。

1.4.3 复筛：将初筛所得的菌株点种于水解圈测定培养基，挑选菌落周围水解圈较大的菌株接种于脱胶培养基，恒温摇床上 35℃，120r/min，振荡培养 24h，取样观测脱胶效果及测定脱胶酶活。

1.5 脱胶酶活性测定方法

果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶用 DNS 比色法测定，酶活测定底物分别是 0.5%的果胶，1%木聚糖和 1%CMC 溶液（均用 pH7.6 的磷酸缓冲液配制）。酶活性测定条件：①取 25mL 比色管，先加底物 1mL，再取经 3800r/min 离心后的脱胶上清液 0.1mL，加塞摇匀，50℃水浴保温 15min，取出；②加 1.5mLDNS 显色液并摇匀，立即置沸水中显色 5 分钟，取出自来水冲冷，加蒸馏水稀释至刻度，摇匀；③以灭活酶液（100℃灭活 10min）作对照，用 7230 型分光光度计测定酶活性，在波长 520nm 处比色，测定果胶酶，木聚糖酶和纤维素酶的活性。酶活性单位：在上述条件下，以每分钟水解底物生成 1μg 还原糖所需酶量定义为一个酶活性单位。

1.6 脱胶松散度及残胶率测定

脱胶松散度是指麻茎韧皮纤维从木质部及外表皮脱落分散的程度。其大小是评价亚麻脱胶快慢及脱胶酶酶活高低的一个直观指标。计算公式为脱胶松散度（%）= （韧皮纤维完全脱落的根数/总根数）×100。

纤维残胶率测定[35]：亚麻原茎脱胶后，收集亚麻纤维，水洗，80℃恒温干燥，称重（W_1）后，与 2%NaOH 在 98kPa 压力下作用 30min，水洗至 pH6.5～7.0，恒温干燥，称恒重（W_2）。残胶率（%）= （W_1- W_2）/ W_2×100

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

麻类生物脱胶的基本原理是利用微生物产生的各种脱胶酶侵袭韧皮纤维之外的非纤维素成分，包括果胶、半纤维素、木质素等，而果胶酶被认为是起主导作用的脱胶酶，果胶分解菌一直是许多研究者筛选脱胶菌株的主要对象。果胶分解菌是一类存在十分普遍的微生物，广泛分布在各种水源、土壤，及植物的根茎叶上，各种来源的果胶分解菌产生不同的果胶酶系，对亚麻韧皮胶质的分解能力必然会存在一定的差异。因此，在筛选亚麻酶法脱胶菌株时，脱胶菌种的来源是必须考虑的关键因素。笔者在研究麻茎对天然水沤麻的影响时，发现麻茎表面上存在许多具有脱胶能力的微生物，仅利用麻茎上的微生物就能对亚麻进行脱胶。本实验以麻茎为筛选脱胶菌种的来源，在以亚麻茎粉为唯一碳源的分离培养基上，根据菌落形态和数量优势筛选出 9 株脱胶菌做进一步复筛。将初筛出的 9 株脱胶菌分别点种于水解圈测定平板，培养 48h 后测定水解圈，发现有 7 株能产生较大的水解圈，其中 A_6 菌的水解圈最大（如图 4-1）。将 7 株菌种分别接种一环于脱胶培养基，摇瓶发酵 24h，发现 A_6 能够在 24h 内使亚麻韧皮纤维从木质部完全脱离（如表 4-1 和图 4-2）。因此，以 A_6 做为下一步研究的对象。

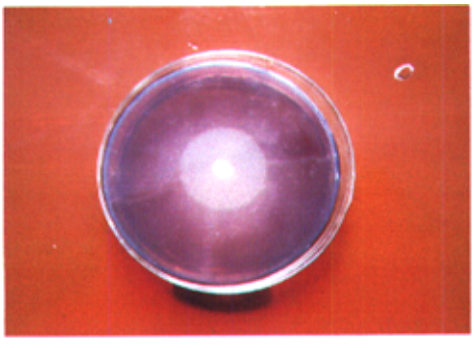


图 4-1 A_6 菌水解圈

Fig4-1 Transparent cycle area plate of Strain A_6

图 4-2 A_6 摇瓶脱胶

Fig 4-2 Retting with Strain A_6 in shake flask culture

4-1 菌种筛选结果

Table4-1 Results of screening strains

菌种代号	A_1	B_1	A_6	B_5	B_7	B_8	B_9
脱胶松散度 (%)	51.06	38.46	100	30.95	16.91	13.58	42.50

2.2 脱胶纤维残胶率分析

以 A_6 为脱胶菌，收集摇瓶脱胶后的纤维做纤维残胶率测定。表 4-2 表明，A_6 菌单独培养脱胶 24h 能完成亚麻脱胶，比天然水脱胶缩短脱胶时间 72h。脱胶后纤维残胶率下降到 20.63%，胶质脱胶率为 38.80%，比天然水脱胶高出 11 个百分点。

表 4-2 脱胶纤维残胶率

Table4-2 Residual gum rate of retted fiber

处理*	脱胶时间（h）	残胶率（%）	胶质脱除率（%）
CK		33.71	
A6 菌脱胶	24	20.63	38.80
天然水脱胶	96	27.74	27.74

注：*以上结果为三次实验的平均值

2.3 A_6 菌种脱胶酶性能测定

取 24h 的 A_6 菌脱胶液做酶活分析。结果表明，A_6 菌具有较高的果胶酶与木聚糖酶活性，分别高达 433.33 U/mL 和 400.00 U/mL；同时 A_6 菌脱胶液中未检测到纤维素酶，说明纤维素不会受到损害或者损害极少。这些特征对于亚麻酶法脱胶研究具有重要意义。

2.4 菌种鉴定

对 A_6 菌进行形态观察，A_6 生长在果胶蛋白胨琼脂平板上，菌落近圆形，边沿整齐，有光泽，不透明，中部略凹陷；对其多项生理、生化指标进行了分析研究，结果如下表 4-3. A_6 菌明胶液化阴性，在 5%和 7%的 NaCl 上生长排除坚强芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌；V-P 实验阴性排除枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌；利用木糖产酸排除蜡样芽孢杆菌、苏芸金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、蜂房芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、短芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌、缓病芽孢杆菌；利用葡萄糖产酸不产气排除多粘芽孢杆菌、浸麻芽孢杆菌；水解淀粉排除短小芽孢杆菌；根据《常见细菌系统鉴定手册》[36]及文献[37]方法初步确定 A_6 菌为环状芽孢杆

菌（*Bacillus circulans*）

3 小结

亚麻酶法脱胶的关键是筛选脱胶酶活高，酶系全的菌种。在菌种的筛选过程中，选择合适的菌种来源是一个必需考虑的关键因素。我们认为以麻茎作为脱胶菌种的筛选来源具有两方面的优势：〈1〉麻茎本身存在许多具有脱胶能力的微生物，以麻茎为筛选菌种的来源，可以减少菌种筛选的盲目性，节约菌种筛选的时间；〈2〉麻茎上的微生物能较快地适应沤麻的环境条件，能产生酶系全，对麻茎的胶质更具侵袭能力的脱胶酶。亚麻韧皮纤维的胶质主要是果胶与半纤维素（其主要成分是木聚糖）。因此，筛选果胶酶与木聚糖酶活性高，纤维素酶活性低或不产纤维素酶的菌株将有利于亚麻脱胶。本实验筛选的脱胶菌 A_6 以亚麻茎为唯一碳源时，能产生高活性的果胶酶与木聚糖酶，不产纤维素酶，这些特性将有利于亚麻脱胶酶制剂的研制，具有很大的应用前景。

表 4-3 A_6 菌株的菌种鉴定

Table4-3 Identification of Strain A_6

测定项目	A_6 菌
1 菌体大小和形态	<1.0μm杆状
2 革兰氏染色	不定
3 芽孢和形态	椭圆状，中生，略膨胀
4 明胶液化	-
5 V-P	-
6 柠檬酸盐利用	-
7 淀粉水解	+
8 酪素水解	+
9 利用葡萄糖产酸	+
利用木糖产酸	+
利用甘露醇产酸	+
利用阿拉伯糖产酸	+
利用葡萄糖产气	-
10 酪氨酸的降解	-
11 过氧化氢酶	+
12 生长在 NaCl(7%)上	-
生长在 NaCl(5%)上	-
生长在 NaCl(2%)上	+
13 55℃生长	-
14 50℃生长	-
15 厌氧生长	+

第五章　环状芽孢杆菌 A_6 产酶的条件

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 A_6 由本实验室筛选保存；果胶与半乳糖醛酸为 Sigma 公司产品，其他试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 培养基

斜面培养基：果胶 0.5%，牛肉膏 0.3%，蛋白胨 1%，NaCl 0.5%，琼脂 2%，pH7.5。

种子培养基：斜面培养基去掉琼脂。

基本培养基：亚麻原茎粉 5%，K_2HPO_4 0.05%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.5%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，每 250mL 三角瓶装 50mL 培养基，200 r / min，菌龄 24h，接种量 2%，35℃，发酵 24h。

1.3 方　法

在基本培养基的基础上,选择不同的理化因子(包括碳源、氮源种类及浓度，无机盐、温度、pH 、通风量等)做 A_6 菌产果胶酶条件的试验，并挑选最佳影响因子做正交试验确定最佳培养基。具体试验设计如下：

（1）碳源及浓度：以 5%不同种类的碳源（黄豆粉、玉米粉、麸皮、亚麻茎粉）更换基本培养基中的亚麻茎粉做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活，筛选最佳碳源。取最佳碳源的不同浓度（1%，2%，3%，4%、5%，6%，7%）培养基，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活，筛选最佳碳源浓度。

（2）氮源及浓度：固定氮源浓度不变，在基本培养基中，选择硝酸铵、氯化铵、磷酸三铵、硫酸铵、尿素、磷酸二氢铵六种无机氮源替换基本培养基中的硫酸铵做产酶试验，发酵 24h 测定果胶酶活，筛选最佳氮源。取最佳氮源的不同浓度（0.5%，1%，1.5%，2%，2.5%）培养基，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活，筛选最佳氮源浓度。

（3）外加无机盐及小分子物质：在基本培养基中固定亚麻原茎粉 5%，

$(NH_4)_2SO_4$ 0.5%，每 250mL 三角瓶装 50mL 培养基，200r / min，菌龄 24h，接种量 2%，35℃不变，添加 0.05%的不同无机盐或小分子诱导物（硫酸镁，氯化钙，硫酸锰，硫酸亚铁，硫酸锌，磷酸氢二钾及吐温 80，洗衣粉，抗坏血酸，乳糖，果胶）做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活。

（4）pH 值：以氢氧化钠和盐酸调基本培养基于不同的起始 pH（6，6.5，7，7.5，8），其他条件不变做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活。

（5）温度：在基本培养基中，变更不同的发酵温度（30，35，40，45℃），其他条件不变做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活。

（6）装液量：在基本培养基中，变更不同的装液量（50，70，100，150，200mL），其他条件不变做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活。

（7）菌龄：在基本培养基中，变更不同的菌龄（16，20，24，28h），其他条件不变做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活。

（8）接种量：在基本培养基中，变更不同的接种量（1%，2%，3%，4%，5%，6%），其他条件不变做产酶试验，发酵 24h 测定发酵液中果胶酶活。

1.3 项目测定

果胶酶活性测定参考第四章，在 pH7.5，温度 50℃下，以每分钟水解底物生成 1μg 还原糖所需酶量定义为一个酶活性单位。细菌 OD 值测定：每隔 2h 取样，空白与菌液同时稀释 4 倍，在 620nm 处测定光吸收值。

2 结果与分析

2.1 A_6 菌的生长曲线

接种 A_6 菌于种子培养基，每隔 2h 测定细菌的光密度值。结果如图 5-1，A_6 菌的对数生长期为 12-22h。

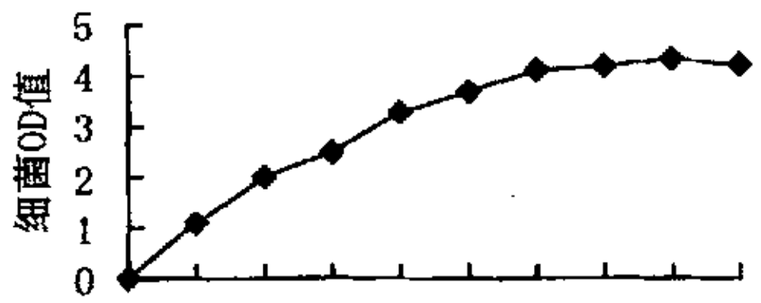


图5-1 细菌A_6的生长曲线
Fig.5-1 Growth course of srain A_6

2.2 碳源对 A_6 菌产酶的影响

在基本培养基中，更换不同碳源做产酶试验，发酵 24h，测定果胶酶活，结果如图 5-2，碳源以 D（亚麻茎粉）为最佳，其他碳源不利于产酶；分析原因可能是亚麻茎中存在某种诱导因子，能够诱导 A_6 菌产生大量的果胶酶，果胶酶反过来分

解麻茎中的胶质为 A_6 菌提供了丰富的碳源，亚麻粉浸出液和亚麻茎浸出液中虽然也存在诱导因子，但碳源相对贫乏，因此果胶酶活均低于亚麻粉；外加 0.2%的果胶反而对 A_6 菌产酶具有抑制作用，其原因尚有待进一步研究。选择不同质量浓度的亚麻茎粉做为碳源，结果显示，亚麻茎粉浓度以 5%-7%为适宜。

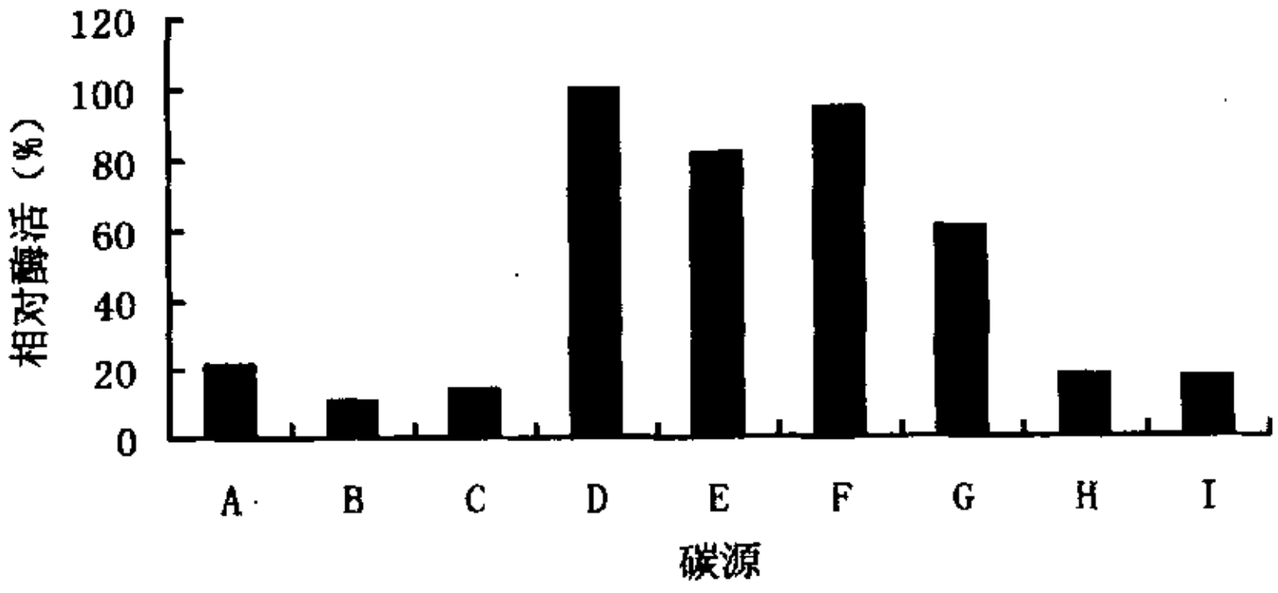


图5-2碳源对A6产果胶酶的影响

Fig.5-2 Effect of carbon sources on pectinase production

注：A：黄豆粉；B：玉米粉；C：麸皮；D：亚麻茎粉；E：亚麻粉浸出液；F：亚麻茎杆；G：亚麻茎浸出液；H：亚麻粉浸出液+0.2%果胶；I：亚麻茎浸出液+0.2%果胶

2.3 氮源对 A_6 菌产酶的影响

选择不同种类的氮源替换基本培养基中的硫酸铵做产酶试验，结果表明硫酸铵为产酶的最佳氮源，尿素最差（如图 5-3）。试验了不同质量浓度的硫酸铵对产酶的影响，图 5-4 说明 1%-2%的硫酸铵有利于产酶。

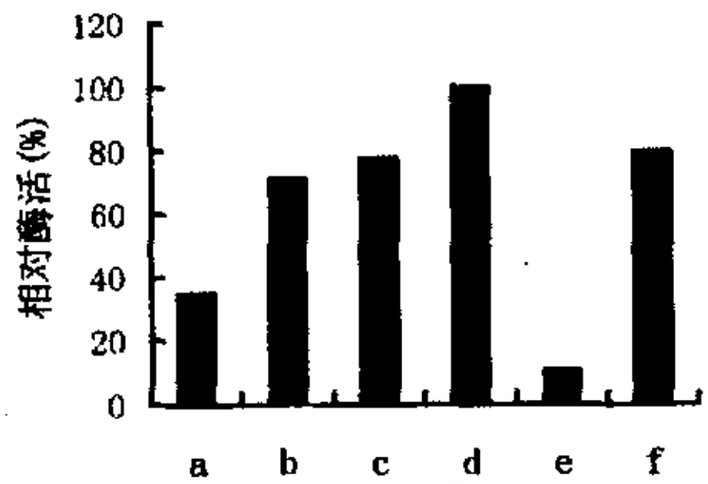


图5-3 氮源对产酶的影响

Fig5-3 Effect of nitrogen sources on pectinase production

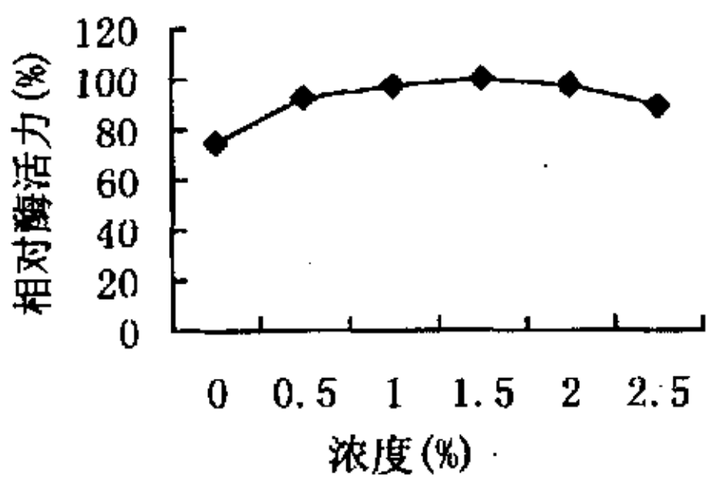


图5-4 硫酸铵质量浓度对产酶的影响

Fig.5-4 Effect of $(NH_4)_2SO_4$ concetration on pectinase production

注：a:硝酸铵，b:氯化铵，c:磷酸三铵，d:硫酸铵，e:尿素，f:磷酸二氢铵

2.4 无机盐及小分子物质对 A_6 菌产酶的影响

试验了硫酸镁、氯化钙、硫酸锰、硫酸亚铁、硫酸锌、磷酸氢二钾及吐温 80、洗衣粉、抗坏血酸、乳糖、果胶对 A_6 产酶的影响，结果发现硫酸镁、硫酸锰、吐温 80、洗衣粉、抗坏血酸、乳糖、果胶对 A_6 产酶均有少许抑制作用，氯化钙、硫酸亚铁、硫酸锌有激活作用，而磷酸氢二钾对 A_6 产酶具有重要影响。如图 5-5 所示，加入磷酸氢二钾能够显著提高果胶酶的产量，并且以 1%的浓度最好。

2.5 温度、pH 对 A_6 菌产酶的影响

不同的培养温度试验表明，A_6 产酶的最适温度为 35℃；40℃以上产酶急剧下降（如图 5-6），说明 A_6 产酶对温度特别敏感。以氢氧化钠和盐酸调基本培养基于不同的起始 pH ,然后做产酶试验。从图 5-7 可以看出，A_6 适宜产酶的 pH 较广，但以起始 pH 7.5 为最佳。

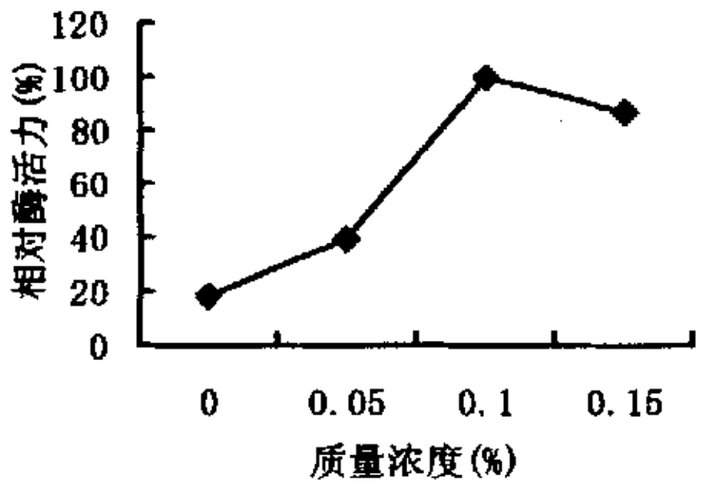


图 5-5 磷酸氢二钾对产酶的影响
Fig.5-5 Effect of K_2HPO_4 on pectinase production

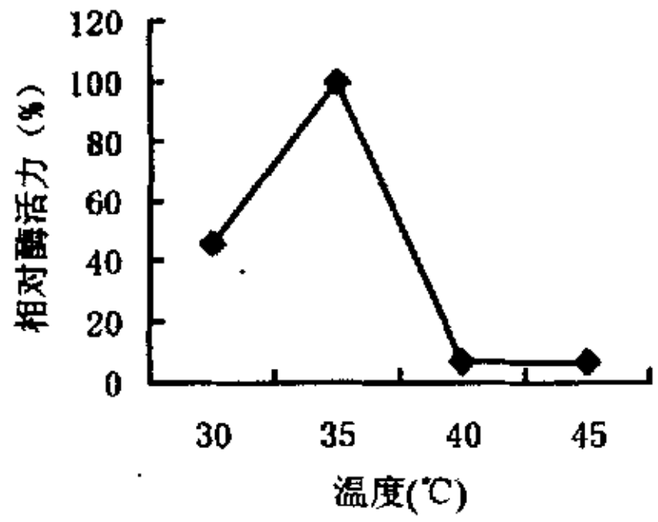


图 5-6 温度对产酶的影响
Fig. 5-6 Effect of temperature on pectinase production

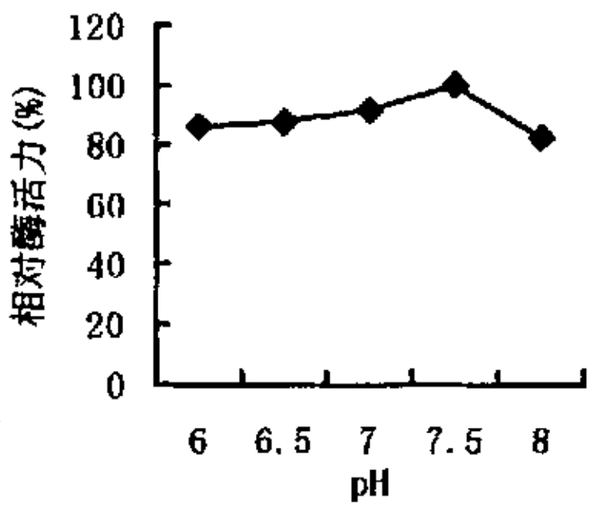


图 5-7 pH对产酶的影响
Fig. 5-7 Effect of pH on pectinase production

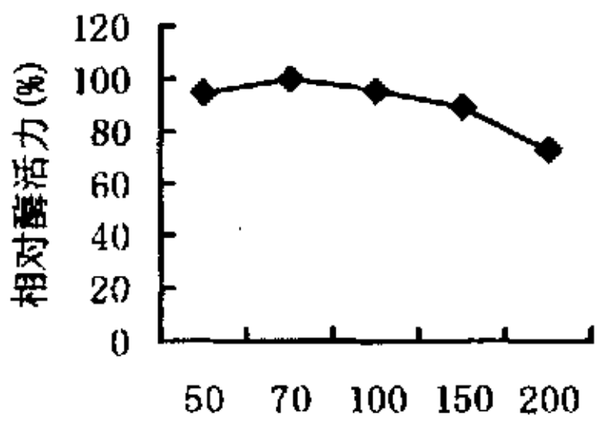


图 5-8 通风量对产酶的影响
Fig.5-8 Effect of airation on pectinase production

2.6 装液量对 A_6 菌产酶的影响

以摇床转速 200 r/min , 250 mL 三角瓶试验不同的装液量对 A_6 产酶的影响。结果如图 5-8，250 mL 三角瓶装液量以 50-100 mL 为适宜。装液量过高，影响通风量，产酶下降。

2.7 菌龄、接种量对 A_6 菌产酶的影响

以不同菌龄的种子接入基本培养基做产酶试验，图 5-9 表明，菌龄以 24h 为最好，此时种子成熟，数量多，有利于产酶。以菌龄 24h 的种子为基础，做不同接种量试验。从图 5-10 可以得知，接种量越大，产酶越高；接种量达到 5%时，产酶量增长趋缓。因此以 5%的接种量为适宜。

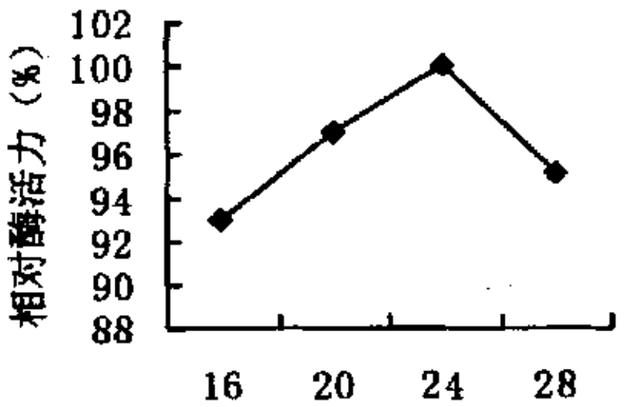


图 5-9 菌龄对产酶的影响
Fig.5-9 Effect of inoculum age on pectinase production

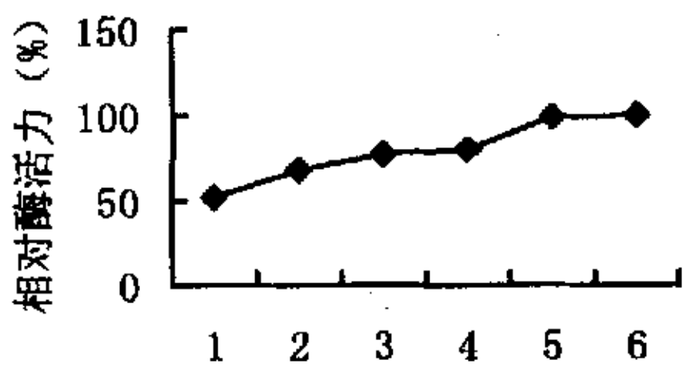


图 5-10 接种量对产酶的影响
Fig.5-10 Effect of inoculum amount on pectinase production

2.8 培养基优化试验

选取影响产酶较大的亚麻茎粉、硫酸铵、磷酸氢二钾三因子做 $L_9(3^3)$ 正交试验。结果如表 5-1，从极差 R 可以看出，三因子的影响顺序为：A > B > C。培养基的最优配方为 $A_3B_1C_3$ ： 亚麻茎粉 7%， 硫酸铵 1%， 磷酸氢二钾 0.15%。

2.9 A_6 菌的产酶曲线

选取 A_6 菌的最优产酶条件：亚麻茎粉 7%，硫酸铵 1%，磷酸氢二钾 0.15%，pH 7.5，菌龄 24h，接种量 5%，温度 35℃，250 mL 三角瓶装液量 70 mL，摇瓶转速 200 r/min 做产酶曲线，结果如图 5-11，A_6 菌培养 20h 达产酶高峰，酶活高达 7800 U/mL。

3 小结

本试验结果表明，环状芽孢杆菌 A_6 是一株嗜亚麻茎粉为碳源的优良脱胶菌种，在最佳产酶条件： 亚麻茎粉 7%， 硫酸铵 1%， 磷酸氢二钾 0.15%，

pH 7.5，菌龄 24h，接种量 5%，温度 35℃，250 mL 三角瓶装液量 70 mL，摇瓶转速 200 r/min，培养 20h 果胶酶活高达 7800 U / mL，适合于沤麻酶制剂的开发研究。

迄今为止，已开发的沤麻酶制剂都来自沤麻真菌，利用细菌生产酶制剂对亚麻进行酶法脱胶，国内外未见报道。本研究筛选的高效脱胶菌种 A_6 是一株具有培养条件粗放、培养时间短、产酶活性高等特点的环状芽孢杆菌，这些特征均有利于降低酶制剂生产的成本，相比沤麻真菌来说具有一定的优势。

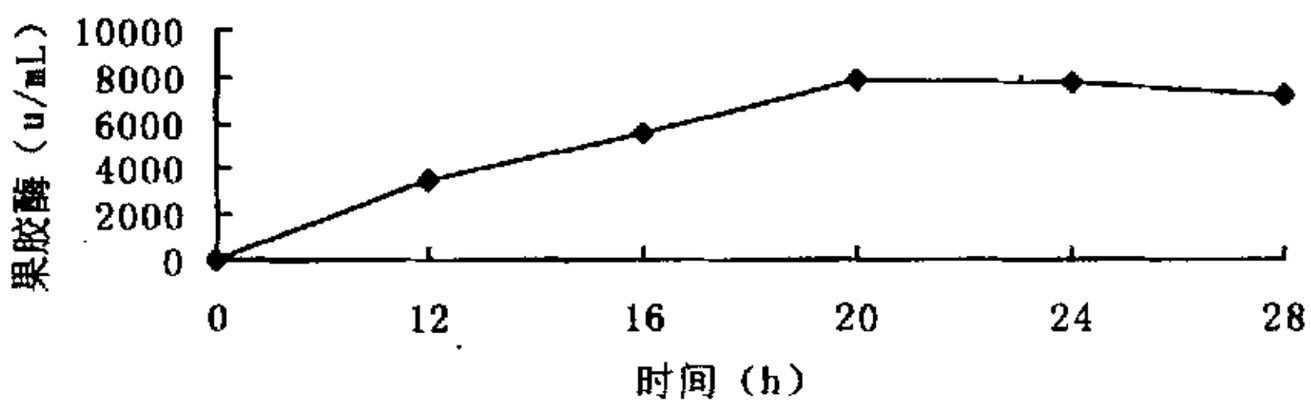


图5-11 A_6菌产酶时间曲线

Fig.5-11 Time course of pectinase production by stain A_6

表 5-1 L_9（3^3）正交试验

Table 5-1 L_9（3^3）Orthogonal test

试验号	三种因子不同水平			
	亚麻茎粉 A（%）	硫酸铵 B（%）	磷酸氢二钾 C(%)	果胶酶活（U/mL）
1	5	1	0.05	5080
2	5	1.5	0.1	4070
3	5	2	0.15	4800
4	6	1	0.1	5530
5	6	1.5	0.15	5270
6	6	2	0.05	4710
7	7	1	0.15	5590
8	7	1.5	0.05	5520
9	7	2	0.1	5090
K_1	13950	16200	15310	
K_2	15510	14860	14690	
K_3	16200	14600	15660	
$\overline{k}_1$	4650	5400	5103.33	
$\overline{k}_2$	5170	4953.33	4896.67	
$\overline{k}_3$	5400	4866.67	5220	
R	750	533.33	323.33	

第六章　酶学特性及脱胶试验

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 A_6 由本实验室筛选保存；果胶与半乳糖醛酸为 Sigma 公司产品，其他试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 培养基

斜面培养基：果胶 0.5%，牛肉膏 0.3%，蛋白胨 1%，NaCl 0.5%，琼脂 2%，pH7.5。

种子培养基：斜面培养基去掉琼脂。

发酵培养基：亚麻茎粉 7%，K_2HPO_4 0.15%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%, pH7.5.

脱胶培养基：亚麻茎 7%，K_2HPO_4 0.15%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%.

1.3 脱胶用酶制备

接种 A_6 菌于发酵培养基，35℃恒温振荡发酵 20h 后，发酵液经 3800r/min 离心后的上清液即为粗酶液。

1.4 摇瓶加菌脱胶试验

将亚麻原茎剪成 3～4cm 长的茎段,然后按照脱胶培养基的配方做成脱胶用培养基，250mL 三角瓶装 50mL 培养基，35℃恒温摇床做脱胶试验。接种量试验设计为：取菌龄 24h 的新鲜种子，按培养基的体积设置接种量分别 1%、2%、3%、4%、5%，摇瓶转速 200 r/min，发酵 12h 检测脱胶效果；通风量试验设计为：接种量固定为 5%，摇瓶转速设置为 50、100、150、200 r/min，发酵 12h 检测脱胶效果。

1.5 酶法脱胶试验

将亚麻原茎剪成 6～8cm 长的茎段，称取 1g 麻茎装入刻度为 20mL 的试管，然后按浴比（V：W）1：20 加入 pH9.0 的甘氨酸- NaOH 缓冲液与

粗酶液的混合物，酶液添加量试验设置为：4、5、10、20mL，50℃恒温脱胶 24h 检测脱胶效果；浴比试验设置为：酶液添加量固定为 5 mL，浴比分别为：1：15、1：20、1：25、1：30，50℃恒温脱胶 24h 检测脱胶效果。脱胶效果检测参照 Fried 试验方法。

1.6 酶活性分析

（1）果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶用 DNS 比色法测定，酶活测定底物分别是 0.5%的果胶，1%木聚糖和 1%CMC 溶液（均用 pH9.0 的甘氨酸- NaOH 缓冲液配制）。酶活性测定条件：①取 25mL 比色管，先加底物 1mL，再取经 3800r/min 离心后的发酵液上清液 0.1mL，加塞摇匀，50℃水浴保温 15min，取出；②加 1.5mL DNS 显色液并摇匀，立即置沸水中显色 5 分钟，取出自来水冲冷，加蒸馏水稀释至刻度，摇匀；③以灭活酶液（100℃灭活 10min）作对照，用 7230 型分光光度计测定酶活性，在波长 520nm 处比色，测定果胶酶，木聚糖酶和纤维素酶的活性。酶活性单位：在上述条件下，以每分钟水解底物生成 1μmol 还原糖所需酶量定义为一个酶活单位。

（2）聚半乳糖醛酸反式消去酶（Polygalacturonate trans-elimnase 即 PATE）：由于聚半乳糖醛酸反式消去酶作用于果胶或聚半乳糖醛酸产生 4，5-不饱和半乳糖醛酸（酯）的双键在 235nm 处有最大光吸收值，因此可通过测定 235nm 处吸收值确定聚半乳糖醛酸反式消去酶的活力。取稀释的酶液 0.1mL+1mL0.5%的果胶溶液+0.9mLpH 9.0 的甘氨酸- NaOH 缓冲液充分混合后，在 30℃下反应 10min。反应结束后立即加入 2 mLpH3.8 醋酸钠-醋酸缓冲液终止酶反应。混匀后，用 UV-751 紫外分光光度计从 190～300 nm 全波段扫描。测定在 235nm 处有无吸收值，以加热灭活的酶液作对照。酶活单位：在上述反应条件下，每分钟内所释放 1μmol 不饱和半乳糖醛酸所需酶量定义为一个酶活力单位。PATE 酶活（U/mL）$=A_{235}\times N\times 4\times 10^3/b\cdot \varepsilon_{235}$，其中：$A_{235}$ 为溶液的吸光值，b 为比色皿厚度（cm），ε_{235} 为不饱和半乳糖醛酸在 235nm 处的摩尔吸光系数（在上述条件下，$\varepsilon_{235}=4600 cm^{-1}\cdot M^{-1}$），N 为酶液的稀释倍数[38]。

（3）淀粉酶和蛋白酶：将 A_6 菌点种在淀粉琼脂和酪素琼脂平板上，35℃培养 1～2 天，观察菌落周围有无水解圈。

2 结果与分析

2.1 脱胶用酶性能分析

取 A_6 菌发酵制备的粗酶液做酶活性性能分析，结果表明，A_6 菌以亚麻茎粉为惟一碳源制得的酶液中，含有大量的果胶酶，并且主要是聚半乳糖醛酸反式消去酶；同时还存在木聚糖酶、CMC 酶，以及微量的淀粉酶和蛋白酶（如表 6-1）。

表 6-1 脱胶酶性能分析

Table6-1 Analysis of retting enzymes by Strain A_6

脱胶酶种类	酶活性（U/mL）
果胶酶	93.47
聚半乳糖醛酸反式消去酶	54.29
木聚糖酶	3.58
CMC 酶	0.85
淀粉酶	微量
蛋白酶	微量

2.2 果胶酶粗酶性质

2.2.1pH 对果胶酶的影响

将用不同 pH 的缓冲溶液（pH5～7 用柠檬酸缓冲液，pH8～12 用甘氨酸- NaOH 缓冲液）配制底物溶液，然后加入酶液反应做酶反应最适 pH 试验。结果如图 6-1 所示，果胶酶的最适 pH 值为 9.0，表明 A_6 菌产生的果胶酶是碱性果胶酶，这种特征有利于亚麻脱胶。将粗酶液置于不同 pH 的缓冲溶液中保持 2h，然后测定残余的果胶酶活，做果胶酶 pH 稳定性试验。从图 6-2 可以看出，果胶酶的pH 稳定性在中性偏碱最好。

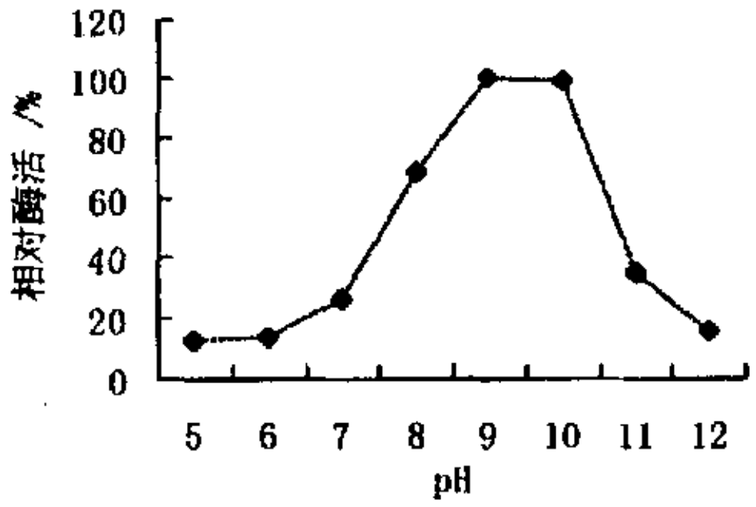


图6-1 pH 对果胶酶活性的影响

Fig 6-1 Effect of pH on the pectinase activity

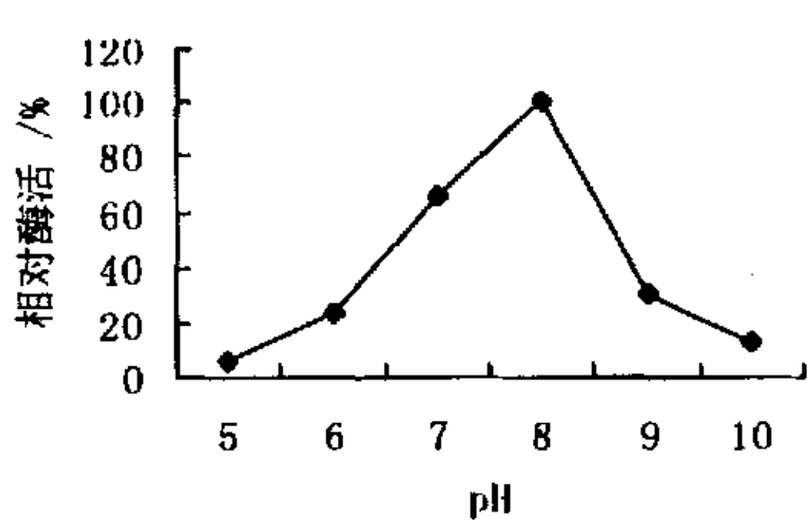


图6-2 果胶酶 pH的稳定性

Fig 6-2 The Stability of pH of the pectinase

2.2.2 温度对果胶酶的影响

将果胶酶反应体系置于不同的温度下做酶反应最适温度试验。图 6-3 结果说明，果胶酶的最适反应温度 50～60℃左右，温度过高过低均不利于酶反应进行。将酶液放入不同的温度环境下保持 1h，然后测定残留的果胶酶活。结果表明果胶酶在低温是相当稳定，温度越高越容易失活（如图 6-4）。

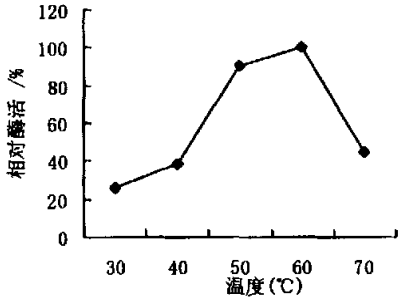


图6-3 温度对果胶酶活性的影响
Fig 6-3 Effect of temperature on the pectinase activity

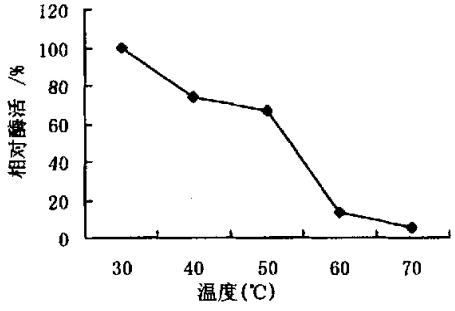


图6-4 果胶酶的热稳定性
Fig 6-4 Thermostability of the pectinase

2.2.3 无机离子及螯合剂对果胶酶的影响

用 1×10^{-3}mol/L 的 $CaCL_2$、$MgSO_4$、$ZnSO_4$、$MnSO_4$、$EDTANa_2$溶液分别混合粗酶液，于 50℃保温 30min，然后按常规方法测定酶活力，以未加如入金属离子和 $EDTANa_2$的酶活力为 100%。结果如表 6-2 所示，Mg^{2+}对酶有一定的激活作用，Ca^{2+}、$EDTANa_2$、Zn^{2+}对酶有一定的抑制作用，Mn^{2+}对酶有较强的抑制作用。

表 6-2 不同金属离子和 $EDTANa_2$对酶活力的影响

Table6-2 Effect of metal ions and $EDTANa_2$ on enzyme activity

离子种类	相对酶活（%）
CK	100
Ca^{2+}	95.27
Mg^{2+}	101.48
Zn^{2+}	44.67
Mn^{2+}	36.09
$EDTANa_2$	84.62

1. 3 脱胶试验

2.3.1 摇瓶加菌脱胶试验

研究表明 A_6 菌是一株嗜亚麻茎为碳源的优良脱胶菌种，仅利用亚麻茎作为碳源即能完成亚麻脱胶。试验 A_6 菌不同接种量及通风量对摇瓶脱胶的影响，表 6-3 说明，接种量大于 2%时，摇瓶脱胶 12h 即能完成亚麻

脱胶；摇瓶转速大于 100 r/min，脱胶 12h，亚麻纤维分散良好，摇瓶转速过小（小于 50 r/min），脱胶效果略差。图 6-5 是 A_6 菌摇瓶脱胶 12h，24h 的效果图，从图 6-5B，图 6-5C 可以看出，脱胶 12h，亚麻纤维已从麻茎分散开来，脱胶 24h，纤维已彻底脱离麻茎木质部。这说明 A_6 菌用于亚麻加菌脱胶研究具有较强的优势。

表 6-3 接种量及摇瓶转速对脱胶的影响

Tble6-3 Effect of inoculum amount and agitation speed on retting

接种量（%）	Fried 试验评分	摇瓶转速（rpm）	Fried 试验评分
1	2（基本分散）	50	2（基本分散）
2	3（分散良好）	100	3（分散良好）
3	3（分散良好）	150	3（分散良好）
4	3（分散良好）	200	3（分散良好）
5	3（分散良好）		

A　　B

C

图 6-5 A_6 菌摇瓶脱胶

Fig 6-5　Retting with Strain A_6 in shake flask culture

2.3.2 酶法脱胶试验

用A_6菌以亚麻茎粉为惟一碳源发酵产生的粗酶液做脱胶试验，表 6-4 说明，浴比 1：20，1g 麻茎酶液添加量大于 5mL，脱胶 24h，纤维分散良好；酶液添加量固定为 5mL，浴比小于 1：20，能取得很好的脱胶效果，浴比过大（大于 1：25），酶液浓度下降，脱胶效果不理想。图 6-6 是水沤法脱胶纤维与酶法脱胶纤维对比图。从图中可以看出，水沤法制取的纤维光泽暗淡，呈灰黄色，纤维表面残留着许多胶杂质；而酶法脱胶的纤维光泽明亮，颜色呈黄白色，纤维表面残留物少，手拉纤维强度好于水沤法。这表明适当控制脱胶酶液的用量及浴比，利用A_6菌生产酶制剂对亚麻进行脱胶，能够生产出比水沤麻更好的亚麻纤维。

表 6-4 酶液添加量及浴比对脱胶的影响

Table6-4 Effect of enzyme amunt and ratios on emzyme-retting

酶液量（mL）	Fried 试验评分	浴比	Fried 试验评分
4	2（基本分散）	1：15	3（分散良好）
5	3（分散良好）	1：20	3（分散良好）
10	3（分散良好）	1：25	2（基本分散）
20	3（分散良好）	1：30	2（基本分散）

图 6-6 亚麻酶法脱胶

Fig6-6 Enzyme-retting of flax

3 小结

A_6 菌以亚麻茎粉为碳源产生的酶制剂主要为胞外酶，包含果胶酶、木聚糖酶、CMC 酶、淀粉酶和蛋白酶等组分。用 UV-751 紫外分光光度计测定 A_{235} 的吸收峰，证明聚半乳糖醛酸反式消去酶是果胶酶的主要成分；酶的 pH 试验说明 A_6 菌产生的果胶酶是一种碱性果胶酶，其作用的最适 pH 是 9.0，这对于麻类脱胶是十分有利的；此酶在中性偏碱的环境中保持稳定，说明酶的最适作用 pH 环境与保持酶活稳定性所需 pH 不一致；酶的温度性试验表明，A_6 菌产生的果胶酶在低温下保持稳定，在高温下易失活，其最适作用温度环境与与保持酶活稳定性所需温度也不一致。

A_6 菌以亚麻茎为碳源（无需外加碳源），摇瓶振荡加菌脱胶，12h 即能完成亚麻脱胶，表明 A_6 菌是一株高效的脱胶菌种。但通风量成为 A_6 菌加菌脱胶的限制因子，因此，维持好氧的脱胶环境是应用 A_6 菌做加菌脱胶取得成功的关键。酶法脱胶试验说明，A_6 菌生产的酶制剂能够用来进行亚麻脱胶，并且制得的亚麻纤维好于水沤麻（如图 6-6 所示），但酶液中各组分在脱胶中所发挥的作用还需在以后的工作中做进一步的探索。

第七章　讨论与结论

1 天然水沤法脱胶过程中各参数与脱胶关系密切

南方水域，特别是池塘水中存在许多具有脱胶能力的微生物，南方亚麻天然水沤麻过程中，厌氧细菌起主导作用，好氧细菌起辅助作用，因此维持一个有利于厌氧菌生长的厌氧环境将有助于亚麻脱胶。

果胶分解菌是脱胶中的重要作用菌群。果胶酶在脱胶液中含量丰富，变化趋势与果胶分解菌基本保持一致，木聚糖酶和纤维素酶含量甚微，在脱胶过程中一直呈上升趋势，果胶酶在脱胶中发挥主要作用，而木聚糖酶和纤维素酶只起辅助作用，但把握好脱胶的时间至关重要，脱胶时间过长，纤维素将遭受纤维素酶的伤害，造成亚麻沤制过度，使纤维失去利用价值。

还原糖随着脱胶的进程逐渐上升，60h 后才缓慢下降，表明微生物能够充分利用麻茎本身作为碳源生长繁殖产生脱胶酶，脱胶酶分解胶质释放还原糖又补充了微生物消耗的碳源，形成了“菌产酶，酶脱胶，胶养菌”的良性循环；含氮量在脱胶 24h 后，有明显下降的趋势，原因是微生物的快速繁殖消耗了水中大量的氮源，造成水中氮源匮乏，因此及时补充水中的氮源，将有利于微生物的快速生长，从而加快亚麻脱胶的速度。

COD 随着脱胶过程的延长不断呈现增加的态势，并且一直维持在较高的水平，脱胶后沤麻液中 COD 含量远远超过了生活饮用水排放的标准，如果不处理而直接排放，将会对环境造成严重的污染，因此如何对脱胶废水进行处理，降低脱胶废水 COD 的含量，将是一个值得十分关注的问题；pH 在脱胶过程中呈现规律性的变化，在脱胶前期快速下降，随后基本稳定，至末期又有所回升，pH 与脱胶的程度可能存在某种一一对应的关系，因此能否利用 pH 作为一种指示信号来控制亚麻脱胶的程度，将是一个值得研究的课题。

2 外界因子及麻茎特性对天然水沤法脱胶产生重要影响

不同水源中的果胶分解菌数量呈现明显的差异，脱胶效果也各不相同，果胶分解菌含量丰富的水源（如塘水）有利于亚麻脱胶，因此在进行

水沤法脱胶时，选择合适的水源值得认真考虑；沤麻水温影响微生物的生长繁殖，进而影响亚麻脱胶的效果，沤麻水温以 30-40℃为适宜，南方亚麻收获的季节为 5 月上旬左右，浅层水温刚好接近沤麻理想水温，正值天然水沤麻的最佳时机，因此，在生产上如能抓住这个时机，将亚麻原茎集中起来进行天然水沤法脱胶，将有望大幅度降低亚麻脱胶的成本。沤麻水起始 pH 不同，亚麻脱胶的效果也呈现差异，但以中性偏碱为好，因此在脱胶前，有必要检测一下沤麻用水的起始 pH，如果在酸性范围，可用石灰调节 pH 至中性偏碱的范围；浴比对亚麻脱胶也产生重要影响，浴比一般以 1：20-25 为最佳，在生产上，设计脱胶水池时，浴比是一个值得考虑的重要参数；向沤麻液中添加一定的化学助剂（如尿素），能够补充微生物的氮源，加快亚麻脱胶的速度，但化学助剂的种类、浓度及加入的时间值得认真考虑。

麻茎上存在具有脱胶能力的微生物，仅利用麻茎上的微生物就足以完成亚麻脱胶。麻茎上的微生物可能与亚麻脱胶存在重要的内在联系，因此麻茎可以作为筛选脱胶微生物的重要来源；麻茎部位、粗细、老嫩对脱胶效果均有不同程度的影响，由此说明，选茎关系到脱胶速度的快慢与脱胶质量的优劣，是亚麻脱胶工艺中必不可少的重要环节；破损麻茎脱胶较快，完整麻茎较慢。亚麻原茎，特别是麻茎中下部茎段适度的机械破损，能加快亚麻的脱胶速度，提高不同茎段的脱胶均匀度，是亚麻脱胶新工艺研究中应重点考虑的一个方面。

3 亚麻脱胶菌种的筛选及加菌脱胶

筛选高效脱胶菌种对亚麻进行脱胶一直以来是亚麻脱胶研究的热点。尽管各种水源、土壤，及植物的根茎叶上都可能存在具有脱胶能力的微生物，但要筛选出一株适合亚麻脱胶的高效菌种却并不是一件容易的事。国外筛选的酶法脱胶菌种几乎都来自麻茎，因此麻茎可能是筛选脱胶菌种理想的来源。确定了菌种筛选的来源，还必须建立一套行之有效的筛选方法。本试验认为，以亚麻茎粉作为惟一碳源的培养基，再结合平板透明圈法，可有效地分离出具有一定脱胶能力的菌株，通过观察透明圈大小和摇瓶直接脱胶，可进一步判断菌株的产酶能力及脱胶效果，此法是一种较为快捷、简便的分离方法。本试验筛选的环状芽孢杆菌 A_6 不仅能产高活性的果胶

酶和木聚糖酶，而且具有较强的脱胶能力，说明 A_6 是一株优良的高效脱胶菌种。

A_6 菌摇瓶脱胶 12h 即能完成亚麻脱胶，比天然水沤法缩短脱胶时间 84h，这说明 A_6 菌做亚麻加菌脱胶具有极大的应用价值，然而 A_6 菌是一株好氧性细菌，静止的沤麻工艺不利于 A_6 菌的生长繁殖，因此研究一种好气性的脱胶工艺将是 A_6 菌做亚麻加菌脱胶取得成功的关键。

4 亚麻酶法脱胶

采用摇瓶发酵试验研究了 A_6 菌产果胶酶的条件，A_6 菌偏爱亚麻茎粉为碳源，并且具有培养条件粗放，培养时间短，产酶活性高等特征；利用 A_6 菌生产的酶制剂进行亚麻酶法脱胶，取得了较好的脱胶效果。脱胶后的纤维色泽、亮度和强力均优于水沤麻（如图 6-6）。但如何扩大培养，提高酶制剂的产量，以及降低酶法脱胶的成本值得进一步研究。

已有的沤麻酶制剂都是成分复杂的复合酶，但果胶酶一直在复合酶中占主体地位。有研究表明内切聚半乳糖醛酸酶在亚麻脱胶中起主导作用。本试验筛选的 A_6 菌产生的酶制剂包含果胶酶、木聚糖酶、CMC 酶、淀粉酶和蛋白酶等组分，但果胶酶占主要成分。用 UV-751 紫外分光光度计测定 A_{235} 的吸收峰，证明聚半乳糖醛酸反式消去酶是果胶酶的主体组分。很显然，聚半乳糖醛酸反式消去酶在酶法脱胶中发挥重要作用，但木聚糖酶和 CMC 酶等其它酶类在脱胶中是否发挥作用，仍然需要进一步的研究证实。

5 本研究的创新点及下一步的工作设想

本研究的创新点：（1）从水沤法的动态脱胶机理出发，系统全面地研究了影响南方亚麻天然水沤脱胶的各外界因子和麻茎特性与亚麻脱胶效果的相互关系，为南方亚麻天然水沤脱胶技术体系的建立提供了重要的理论依据；（2）建立了一套行之有效的菌种筛选方法；筛选出一株极具前途的高效脱胶菌种；首次利用细菌生产酶制剂对亚麻酶法脱胶取得成功。

下一步的工作设想：（1）研究一种适合 A_6 菌加菌脱胶的好气性沤麻工艺，开展 A_6 菌加菌脱胶研究；（2）开展 A_6 菌的扩大培养研究，提高

A_6 菌的产酶能力；同时分离纯化酶制剂中各酶类组分，研究各组分在亚麻脱胶中的作用。

主要参考文献

[1] 任鸿桥, 关宏梅, 徐蓬, 等. 浅谈亚麻纺织产品的开发与应用[J]. 黑龙江纺织, 2003, (3):10-11.

[2] 许益存, 韩树明, 张立明, 等. 实施亚麻战略加快黑龙江省种植业结构调整[J]. 中国农机化, 2003, (4):9-11.

[3] 孙焕良, 王冬毛. 湖南春季亚麻引种栽培的初步研究[J]. 中国麻作, 1995, 17(3): 12-15.

[4] 刘东鑫, 赵介仁、孙焕良等. 关于发展我国南方亚麻产业化问题的初步探讨[J]. 中国麻业, 1998, 20(1):42-45.

[5] 吕江南, 胡镇修. 我国南方亚麻开发的几点思考[J]. 农牧产品开发, 1999, (7):34-35.

[6] 周文新, 孙焕良, 郭清泉, 等. 我国南方亚麻产业化发展刍论[J]. 农业现代研究, 2001, 22(1):7-10.

[7] 张宝胜, 鲁文良. 浅析亚麻纤维脱胶与亚麻粗纱煮练漂白工艺[J]. 黑龙江纺织, 1999, (4): 1-2.

[8] 孙庆祥. 麻类作物微生物脱胶综述[J]. 中国麻作, 1981, (1): 38-41.

[9] 彭源德, 刘正初, 孙焕良等. 南方亚麻微生物脱胶技术研究, Ⅰ外界因子对亚麻天然水浸沤麻的影响[J].中国麻作, 1997, 19 (2): 37-40 .

[10] 陈灿, 孙焕良, 彭源德等. 南方亚麻微生物脱胶技术研究 Ⅱ. 麻茎特性对亚麻脱胶的影响[J]. 中国麻作, 2000, 22(2): 34-37.

[11] 江洁,刘晓兰,等.化学助剂法亚麻微生物脱胶新技术研究的[J].纺织学报, 2003, 24(1): 46-48.

[12] 李宗道,等著. 麻类生物工程进展(M). 中国农业出版社,1999,267-268.

[13] 王立群, 关凤芝, 张福修等. 亚麻微生物脱胶技术的研究Ⅰ.脱胶菌种的筛选[J]. 东北农业大学学报, 1994, 25 (2): 182-185.

[14] 江洁,刘晓兰,等. 亚麻脱胶菌种的选育及脱胶过程的初步研究[J]. 微生物学报,1998,25(3): 150-153.

[15] G FILA ,L M MANICI and F Caputo. In vitro evaluation of dew-retting of flax by fungi from southern Europe[J].Ann.appl.Biol, 2001, 138: 343-351.

[16] 彭源德，刘正初，冯湘沅等. 亚麻快速生物技术研究 I 亚麻快速脱胶菌株的选育[J]，中国麻业，2003, 25(3)：135-138.

[17] Akin , D.E., Morrison, W.H. III, Gamble, G.R., etal., Effect of retting enzymes on the structure and composition of flax cell wall[J]. Textile Res.J. 1997, 67：279-287.

[18] Henriksson, G.,Akin , D.E., Rigsby, L.L., etal. Influence of chelating agents and mechanical pretreatment on enzymatic retting of flax[J]. Textile Res.J,1997, 67：829-836.

[19] Danny E . Akin, Jonn A. Foulk, Roy B. Dodd, David D. McAlister III, Enzyme-retting of flax and characterization of processed fibers[J], Journal of Biotechnology, 2001, 89：193-203.

[20] Van Sumere,C.F., Retting of Flax with special reference to enzyme retting .In:Sharma, H.S.S.,Van Sumere ,C.F.(Eds.),The Biology and Processing of Flax. M Publications,Belfast ,Northem Ireland ,1992, pp.157-198.

[21] Henriksson, G.,Akin , D.E., Slomczynski, D., etal. Poduction of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucar pusillus*[J].J.Biotechnol. 1999, 68：115-123.

[22] J.D.Evans, D.E.Akin ,etal Flax-retting by polygalacuronase-containing enzyme mixtures and effects on fiber properties[J]. Journal of Biotechnology, 2002.

[23] Seaby D A, Mercer P c. Development of a hand tool to test the degree of retting of flax-straw[J]. Annals of Applied Biology ,1984,104：567-573.

[24] Fischer K , Topf W. Entwicklung objektiver Qualitatskriterien fur Flachs. Teil2:TextiltechnologischUntersuchungen[J].MellianTextilberichte,1988, 12：858-861.

[25] Brown A E ,Sharma H S S , Black D L R. Relationship between pectin content of stems of flax cultivars,fungal cell wall-degrading enzymes and pre-harvest retting[J]. Annals of Applied Biology,1986, 109：345-351.

[26] Morvan C, Morvan O, Januneau A, Demarty M. Capacite d'echange cationique des fibres de lin[J].Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France,1985, 71：837-841

[27] Meijer W J M, Vertregt N, Rutgers B, van de Waart M. The pectin content as a measure of the retting and tettability of flax[J]. Industrial Crops and Products,1995, 4：273-284.

[28] Henriksson G,Akin D E, Hanlin R T, Rodriguez C, Archibald D D ,Rigsby L L,

Eriksson K-E L. Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the United States and Europe[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 3950-3956.

[29] Dujardin, A.Vias-roten .De Westvlaamsche bokhandel s.v. Groeninghe drukkeij, Kortrijk, Belgium,1942.

[30] 江洁，刘晓兰，李彩芹等. 果胶酶活性分光光度测定方法的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报，1998，14（1）：62-66.

[31] 湖南农业大学资源学院农业资源系编. 农业环境分析实验指导书.2001

[32] 李如亮主编. 生物化学实验. 武汉大学出版社出版,1998.

[33] 彭源德,刘正初,冯湘沅,等. 红麻天然水浸脱胶过程中微生物群体、COD 和 pH 值测定. 中国麻作，1996，18（4）：33-35。

[34] 刘自熔，程海，任建平等. 大麻酶法脱胶机理初探[J]. 纺织学报，2001，22(3)：52-53.

[35] 李志恩，徐力平. “快速测定苎麻残胶率”方法的研究[J]. 纺织科学研究，1994，（4）：5-7.

[36] 东秀珠，蔡妙英，等编. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 科学出版社，2001.

[37] 檀建新，陈忠义. 产几丁质酶菌的分离坚定及其抑菌作用的初步研究[J].植物保护，2001，27（2）：1-3.

[38] 丁凤平，张秀芝. 碱性性果胶酶 PATE 及其测定方法[J]. 中国生化药物杂志，1993，（2）：42-43.

致　谢

本研究是在谢达平教授和孙焕良教授两位恩师地细心指导下完成的，论文从选题、设计、试验操作直到论文的撰写、修改等每一个环节都倾注了两位恩师大量的心血。自从投入恩师门下，两位恩师渊博的学识、严谨的治学态度、孜孜以求的敬业精神以及高尚的人格时刻激励着我不断前进，使我无论在学习、科研方面，还是在为人处世方面都大有长进；在生活方面，每当我遇到困难时，总能得到他们无私的帮助，在此谨向两位恩师表示崇高地敬意和诚挚地感谢。

在学习和论文的研究过程中，得到了理学院邓林伟老师、戴小阳老师、李立恒老师、胡超老师等多位老师的帮助以及理学院各位领导的关心和支持；在实验的实施阶段，得到了苎麻所李罗先老师、易冬梅老师以及胡平建、王孔俭、孟桂元、李煊星、李旭烽等师弟师妹的帮助；也得到了理学院李双祁、张剑英、姜发军、田云、黄成江、刘宇锋、赵丹、张君、唐升斌、项伟、吴锋、粟敏等师兄师弟师妹的帮助；学友李建军、李小勇、严明理、曾小珊、戴高兴、彭杰等也给予过大力支持。在此谨向他们表示谢意。

也要感谢我的家人和亲人许多年来一直对我的帮助和支持。特别是我的爱人周双清，没有你无私的支持、帮助和鼓励，就没有我今天的学业和成绩，在此允许我深深地向你说声----谢谢！

三年转瞬即逝，蓦然回首，感慨万千。今天既是昨天的终点，又是明天的起点。站在新的起跑点上，对未来充满了希望和期待，也准备了随时面对困难和挫折的勇气和信心。

谨以此文向关心过我，支持过我的人们表示由衷的谢意！

黄小龙

2004 年 6 月

作者简介

姓　　名：黄小龙

性　　别：男

籍　　贯：湖南武冈

民　　族：汉

出生年月：1977.2

主要经历：

1996.9—2000.6 湖南农业大学园艺系，获学士学位。

2001.9—2004.6 湖南农业大学理学院攻读硕士学位。

论文发表：

1. 植物代谢工程的研究现状. 生物学杂志，2003，第二期。第 1 作者

2. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 I 亚麻天然水沤法脱胶的动态观测. 中国麻业，2003，第 1 期。 第 1 作者

3. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 II 主要外界因子对亚麻天然水沤法脱胶效果的影响. 中国麻业，2003，第 4 期。 第 1 作者

4. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究III 麻茎特性对对亚麻天然水沤法脱胶效果的影响. 中国麻业，2003，第 5 期。第 1 作者

5. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究IV 酶法脱胶菌种的分离与鉴定. 湖南农业大学学报，2004，第 1 期。第 1 作者

6. 南方亚麻天然水沤法脱胶影响因子的研究. 湖南农业大学学报，2003，第 4 期。第 1 作者

7. 亚麻微生物脱胶菌种的筛选与鉴定. 生物学杂志，2004，第 1 期。第 1 作者

8. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究V 脱胶菌种 A6 产酶的条件. 湖南农业大学学报，2004，第 3 期。第 1 作者

奖励情况：2003 年度湖南农业大学第二届研究生学术活动节论文获奖

南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 荣获二等奖

南方亚麻天然水沤法脱胶影响因子的研究 荣获三等奖

植物代谢工程的研究现状. 荣获纪念奖