

摘 要

通过将两个原始菌株芽孢杆菌 (*Bacillus sp*) 和欧文氏菌 (*Erwinia sp*) 对 33 种抗生素进行抗性筛选, 用梯度平板法得到带有链霉素标记的芽孢杆菌 B₁₂₋₁₃₋₂ 和带有红霉素标记的欧文氏菌 E₂₆₋₂₋₃。

将上述两株菌作为原始菌株, 进行原生质体融合, 采用选择性及非选择性培养基对融合子进行十几次的重复性传代试验后, 获得稳定的融合子 284 株, 经重复性苧麻脱胶试验, 从中获得 9 株脱胶效果较好的融合子, 其中有两个脱胶效果比原菌株好。原菌株欧文氏菌含有纤维素酶, 因此对纤维素有一定的损伤, 而融合子却没有。从融合子与原菌株脱胶纤维三个纺织主要指标来看, 融合子脱胶数均好于原株 E₂₆₋₂₋₃。有 2 株融合子的脱胶纺织性能比原株 B₁₂₋₁₃₋₂ 要好一些。原菌株欧文氏菌的纤维支数只有 794Nm, 单纤维断裂强度为 4.01 cN/dtex, 单纤维断裂伸长率为 3.0%; 原菌株芽孢杆菌的纤维支数为 1173Nm, 单纤维断裂强度为 5.85cN/dtex, 单纤维断裂伸长率 3.76%, 融合子 142 的纤维支数为 1276Nm, 单纤维断裂强度为 6.53cN/dtex, 单纤维断裂伸长率 3.36%, 融合子 229 的纤维支数为 1195Nm, 单纤维断裂强度为 7.15cN/dtex, 单纤维断裂伸长率 3.40%; 有一株融合子 256, 其脱胶效果与芽孢杆菌接近, 其纤维支数为 1075Nm, 单纤维断裂强度为 5.30cN/dtex, 单纤维断裂伸长率 3.10%。同时菌种的培养时间只用 4 小时即可, 菌液的用量很少, 苧麻与菌液的比率为 1:1, 脱胶的条

件为 34 ℃静置即可,而原始的芽孢杆菌的培养时间为 48-72 小时,脱胶的在 50 ℃水浴中进行。因此,融合子 142、229、256 含有欧文氏菌的脱胶特点和芽孢杆菌的脱胶效果的优点。所以采用融合子脱胶又可能较大幅度的降低工业生产的成本、减少能源的消耗和水的使用量,很有工业应用的发展前景。同时本文也对其它脱胶效果较好的几株融合子的菌落形态、色泽、融合子单细胞的革兰氏染色反应及其形态、融合子对低温的忍受程度、石蕊牛奶反应、葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖、CMC、果胶的利用等生理生化特征进行了比较和研究。发现融合子在上述特性的表现上呈现了多样性,最后在研究脱胶效率的同时对欧文氏菌脱胶机理进行了初步的探讨。

关键词: 芽孢杆菌; 欧文氏菌; 融合子; 苎麻脱胶; 果胶酶

ABSTRACT

Through 33 antibiotics' selecting for two original bacterial *Bacillus* sp. and *Erwinia* sp, streptomycin resistance strain *Bacillus* sp. 12-13-2 and erythrocin resistance strain *Erwinia* sp 26-2-3 were gotten by gradient plate method.

These two protoplasts were fused. After more than 10 generations on the selective and non-selective culture medium, 284 strain constant fusants were gotten, 9 strain fusants were good on ramie degumming. Two of them are more effective than original *Bacillus* sp. and *Erwinia* sp on ramie degumming. *Erwinia* sp. has cellulase which break fibres, but Fusants haven't. Comparing three textile parameters of fusants and two original bacterial, the effect of ramie degumming of fusants are better than E₂₆₋₂₋₃, two of them are better than original B₁₂₋₁₃₋₂. The fibre's count degummed by original E₂₆₋₂₋₃ is 794Nm, the fibre's strength is 4.01 cN/dtex, the fibre's elongation is 3.0%; The fibre's count degummed by original B₁₂₋₁₃₋₂ is 1173Nm, the fibre's strength is 5.85 cN/dtex, the fibre's elongation is 3.76%; The fibre's count degummed by Fusant 142 is 1276Nm, the fibre's strength is 6.53 cN/dtex, the fibre's elongation is 3.36%; The fibre's count degummed by fusant 229 is 1195Nm, the fibre's strength is 7.15 cN/dtex, the fibre's elongation is 3.40%; The effect of fusant 256 is close to that of original B₁₂₋₁₃₋₂, its fibre's count is 1075Nm, the

fibre's strength is 5.30 cN/dtex, the fibre's elongation is 3.10%. At the same time, the time of fusants growth is about four hours, the dosage is less than original *Bacillus* sp and is equal to *Erwinia* sp. The ratio of remie and the fermenting liquor is 1:1. The degumming process is at 34°C. But for original *Bacillus* sp, the time of fusants growth is 48-72 hours, the temperature is in the 50°C. So fusants 142,229,256 have the *Erwinia* and *Bacillus* advantages. So the degumming by fusants can reduce the production cost, reduce the usage of water and energy sources. At the same time, the paper researches and compares the configuration of cell and colony, the fusants physiological and biochemical qualities such as litmus creamery reaction, the usage of glucose, lactose, sucrose, mannose, maltose, CMC, pectin and so on. We found the fusants exhibit the diversity. At last, this paper has primary researched the mechanism of the remie degumming.

Key words: *Bacillus* sp, *Erwinia* sp, Fusants, Remie degumming
Pectinase

目 录

□摘要

□ABSTRACT

□第一章、前言

□1. 我国主要的麻类资源及其分布情况

□2. 韧皮纤维的结构

□3. 果胶酶(pectinase)的基本概况

□3.1 果胶酶的来源

□3.2 果胶酶的分类

□3.3 果胶酶的用途

□4. 麻类脱胶的研究进展

□4.1 苧麻化学脱胶的研究

□4.2 苧麻生物脱胶的研究

□5. 原生质体融合技术的发展

□第二章、标记菌株的获得

□1. 材料与方法

□1.1 材料

□1.2 方法

□2. 试验结果与讨论

□2.1 药敏试纸初步确定两个菌株得抗性

□2.2 梯度平板法获得抗性菌株

□第三章、原生质体的制备及融合

□1. 材料与方法

□1.1 材料

□1.2 方法

□2. 实验结果与讨论

□2.1 影响芽孢杆菌原生质体形成的因素

□2.2 影响欧文氏菌原生质体形成的因素

□2.3 影响融合的因素

□2.4 融合子的检出

□第四章融合子形态及生理生化特性的比较

□1. 材料与方法

□1.1 材料

□1.2 方法

□2. 实验结果与讨论

□2.1 菌体和菌落形态的观察

□2.2 革兰氏染色

□2.3 对温度的敏感性

□2.4 链霉素和红霉素的抗性分析

□2.5 葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖的利用

□2.6 石蕊牛奶反应

□2.7CMC、葵花盘果胶的利用

第五章融合子脱胶的比较

1. 材料与方法

1.1 材料

1.2 方法

2. 实验结果与讨论

2.1 融合子的初筛

2.2 融合子的复筛

2.3 脱胶效果比较

第六章、欧文氏菌的脱胶机理的初步研究

1. 材料与方法

1.1 材料

1.2 方法

2. 结果与分析

2.1 不同的脱胶方案的效果比较

2.2 超声波破碎细胞中的问题

2.3 半乳糖醛酸标准曲线的测定

2.4 总蛋白浓度的标准曲线的测定

2.5 胞外酶和胞内酶的果胶酶活和比酶活的比较

2.6 脱胶效果比较

第七章讨论

参考文献

致谢

前 言

1. 我国主要的麻类资源及其分布情况

我国是全球麻类生产的主要国家，约占全球的 80%以上。在我国主要生产的麻类有苧麻、亚麻、大麻、红麻、罗布麻、剑麻、黄麻、白麻等，其中苧麻栽培和织布在我国已有几千年的历史，其产量主要集中在我国（约占 95%以上），有“中国草”之美誉。苧麻 (*Boehmeria nivea* L.) 为荨麻科 (Urticaceae) 苧麻属 (*Boehmeria*) 多年生宿根性草本植物，苧麻纤维长，洁白优美而光泽好、热传导率高。吸水分多而散发快，故苧麻及其混纺产品具有挺括、滑爽、通风透气、吸湿排汗、易洗快干等优点。所以苧麻是一种优良的纺织原料。苧麻作物的栽培品种有两个：白叶种，原产我国，为我国和其他一些国家的栽培品种；绿叶种，为白叶种的变种，主要分布在东南亚等少数地区。在两个品种中，白叶种苧麻的纤维品质较好。

苧麻适宜种植在温带及亚热带。我国的苧麻产地分布在北纬 19-30° 之间的广大地方，南起海南岛，北到陕西省，均有种植，有长江流域麻区（主要为湖南、四川、江西、安徽等省）、华南麻区（主要为广西、广东、福建、云南、台湾等省、自治区）、黄河流域麻区（主要为陕西、河南等省及山东的南部）。其中长江流域麻区为我国的主要苧麻产区，其栽培面积及产量占全国总栽培面积及总产量的 90%以上。湖南省的苧麻产地分布在 86 个县，以益阳、常德、郴州三个地区为主要产区，著名的品种有芦竹青、白

脚麻等。湖北省的苧麻种植遍及 55 个县，属长江沿岸的平原、丘陵等地区，主要品种为细叶绿、大叶绿等。江西省的苧麻产区主要在宜春和九江地区，当家的品种是铜皮青、细叶芦、大叶芦等。安徽省的苧麻产区主要是清阳、贵池、黄山等地区，当家品种为小叶芦，大叶芦等。苧麻适宜种植在温暖多雨、土层深厚、肥分充足、排水良好且背风向阳的地方。⁽¹⁾

中国是世界上第二大亚麻(*Linum usitatissimum* L.)⁽²⁾生产国，亚麻属于亚麻科(Linaceae)亚麻属(Linum)草本韧皮作物，是天然纤维和工业拥有重要资料。⁽³⁾我国亚麻原来主要生产地是在黑龙江，目前已发展至东北、华北、西北等的大部分省市，约占了全国的大部分地区。⁽⁴⁾

大麻(*Cannabis sativa* L.)为大麻科(cannabaceae)大麻属(cannabis)，是雌雄异株一年生的草本植物，品种多达 150 多个。大麻自热带至温带北部都可以种植，种植区域甚广。大麻原产于我国，在宁夏、山西、内蒙、河南、河北、辽宁、山东、安徽等均有过大量种植。⁽⁵⁾

我国是世界上第三个红麻、黄麻生产国，黄麻(*Corchorus capsularis* L.)属于椴树科(Tiliaceae)黄麻属(Corchorus)。⁽⁶⁾红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)又称为洋麻、太阳麻，锦葵科(Malvaceae)木槿属(Hibiscus)，一年生草本植物，适于在热带和亚热带气候生长，具有实用性强、生产周期短、单位面积产量高等特点，是一种重要的天然优质资源。⁽⁷⁻⁸⁾剑麻又名西沙尔麻，是一种多年生的经济作物。我国广东、海南和福建等地均有种植，

尤其广东湛江地区种植面积很大,产量很高。对剑麻的研究比较少。⁽⁹⁾

罗布麻(*Apocynum venetum* L.)属于夹竹桃科(apocynaceae),罗布麻属(apocynum)。⁽¹⁰⁾它是一种生长在盐碱沙荒地区的抗逆性很强的多年生宿根草本植物,经济价值很高。分布在降水量均在100mm以下,所以它具有极高的耐旱性。因此,罗布麻生长在新疆、青海等地。罗布麻本身耐盐性很强,其根能穿过表土的重盐层,吸取下层含盐较轻的土层中的水分和养分。只要在30cm以下的土层含盐量不超过1%左右,罗布麻就能生长。罗布麻具有极强的耐严寒,耐高温和耐大风的性能。在寒冷的阿尔泰,酷热的吐鲁番和多风的安西皆有分布。⁽¹¹⁾

总之,由于我国位于亚洲东部,太平洋西岸,地域辽阔、气候类型众多、地貌类型复杂,因而麻类作物种类繁多,已经开发和正待开发的资源是极其丰富的。

2. 韧皮纤维的结构

麻类纤维除了少数(如龙舌兰麻、蕉麻)来自叶片外,大多数均取自茎的韧皮部,关于它们的形态学、解剖学、形成和性质应用等已有很详细的研究。⁽¹²⁻¹⁵⁾韧皮纤维主要是由纤维素、半纤维素、木质素、果胶等物质组成,对于不同麻的韧皮纤维来说,其组成成分的百分比是有所不同的,例如:对苧麻的韧皮纤维来说,纤维素的含量约为70-75%,半纤维素含量约为12-15%,木质素的含量约占1%,苧麻韧皮中果胶物质的含量约占4-5.4%,它随着植

物的生长而逐步降低的,在植物生长的末期又稍有回升。同时,在苧麻韧皮纤维的表面分布着 1%左右的脂肪蜡质成分, 2.0-2.5% 的灰分成分⁽¹⁾;在大麻韧皮纤维中,纤维素含量约为 48-65%,半纤维素含量约为 13-22%,木质素的含量约占 4.5-11%,果胶约占 9.8-17%,脂肪蜡质约占 0.6-1.6%;⁽¹⁶⁾ 在亚麻的韧皮部,纤维素约占 63-76%,半纤维素含量约为 14.7-16.7%,木质素的含量约占 0.65-1.52%,果胶约占 2.46-6.25%,脂蜡质约占 0.5-2.6%;⁽¹⁷⁾ 在红麻韧皮部中,纤维素约占 52.36%,果胶约占 10.04%,半纤维素约占 14.6%,木质素约占 11.11%。⁽¹⁸⁾ 因此只有先去除韧皮部的果胶物质,麻类纤维才能应用于纺织工业。果胶在植物细胞壁中的位置见图 1

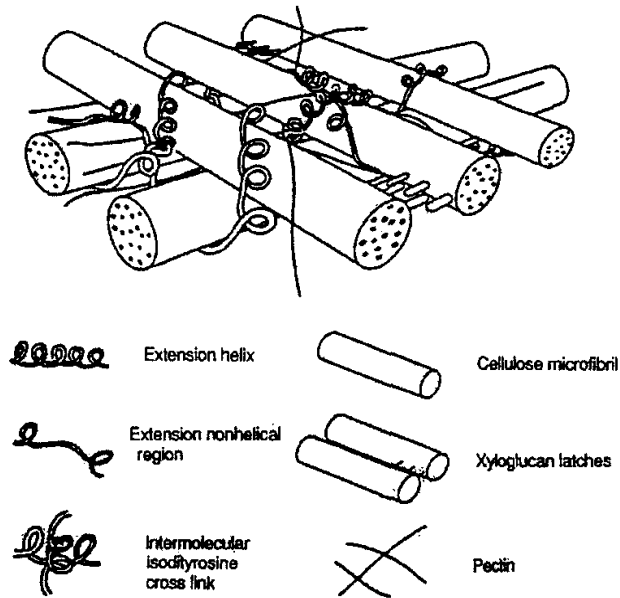


图 1 在植物细胞壁中的聚合物分布的三维结构图

(录自 Wilson and Fry 1986)

果胶是一种含有酸性、高聚合度、胶状碳水化合物的复合体，化学成分复杂，是由 α -1, 4-D 半乳糖醛酸残基和一些鼠李糖分子组成的杂多糖类，天然的果胶在半乳糖醛酸上的羧基可为甲醇高度的酯化形成甲酯（从 40 到 65%）。其分子结构见图 2。它的分子量随不同的来源有很大的差别，从 10000—400000 不等。在植物组织中以水不溶的原果胶状态存在，和纤维素、半纤维素、木质素等相互网络在一起。在麻纺工业上，必须将纤维素以外的其它物质（又统称为胶质物质）去除，制备成工艺纤维方能用于纺织。在工业生产上，去除胶质物质的工艺又叫脱胶工艺。半个多世纪以来，均采用化学方法脱胶，而生物脱胶方法仍然处在研究和中试阶段。

220

TAKUO SAKAI ET AL.

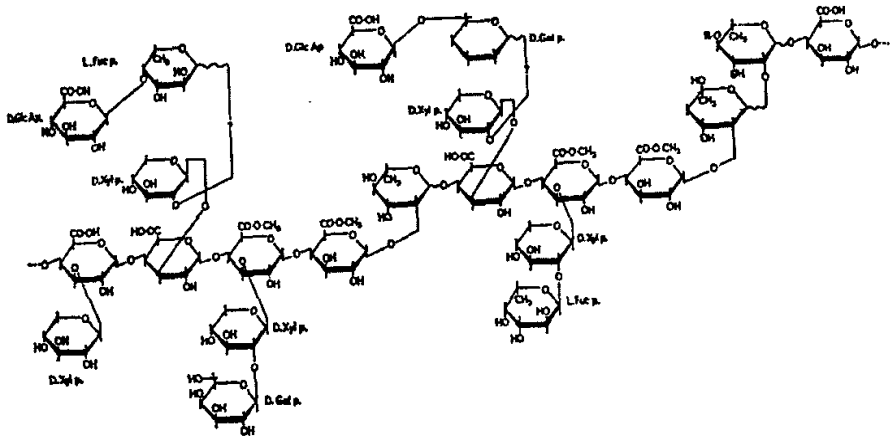


图 2 果胶的分子结构

3.果胶酶(pectinase)的基本概况

3.1 果胶酶的来源

果胶酶研究起始于 20 世纪 30 年代, 业已查明它广泛存在于植物果实和微生物中。目前在微生物中主要研究的有浙江农业科学院微生物研究所研究的黑曲霉、⁽¹⁹⁾ 本实验室和东北农业大学研究的芽孢杆菌、⁽²⁰⁻²¹⁾ 信阳农学院用的多粘芽孢菌 A4、⁽²²⁾ 本实验室所研究的放线菌⁽²³⁾ 以及 *Arthrobacter* sp, *Aerobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus vulgatus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Penicillium frequentans*, *Mucor* sp, *Sclerotium rolfsii*, *Mycelia sterilia*, *Macrophom inaphaseceoli* 等。

⁽²⁴⁻²⁶⁾

3.2 果胶酶的分类

果胶酶主要作用 $\alpha-1, 4$ 糖苷键, 水解得到半乳糖醛酸。果胶酶是指分解果胶质的多种酶的总称, 可以根据它们优先作用的底物是果胶还是多聚半乳糖醛酸 (PGA) 来划分; 也可以根据它们不同的反应机制 (β - 消除或水解作用) 来进行分类。⁽²⁷⁾

果胶酶包含有果胶甲酯酶 (*Pectin Methylesterases*)、内切多聚半乳糖醛酸酶 (*Endopolygalacturonases*)、外切多聚半乳糖醛酸酶 (*Exopolygalacturonases*)、果胶裂解酶 (*Pectin lyase*)、原果胶酶 (*Protopectin*) 等多种组分。⁽²⁸⁾ 果胶甲酯酶 (EC3.1.1.11) 能移去果胶上的甲基而产生 PGA 和甲醇, 该酶是一种羧酸酯酶, 是属于水解酶中的一种, 它能加快果胶酸裂解酶的活性。它催化的反应是:

果胶甲酯酶

果胶 + H₂O ----- 多聚半乳糖酸盐 + 甲醇 + H⁺

果胶裂解酶 (EC4.2.2.10) 是 Albersheim 等人在 1960 年首先在商品酶制剂 PectonIR-10 中发现的, 1962 年他又和 Killias 分离纯化该商品酶制剂的到了果胶裂解酶纯酶, 发现该酶最适 pH5.1-5.3, PI 为 PH3-4, 可对酯化度为 65% 的柑桔果胶作用, 能够通过 β-消除分解天然的果胶和高度 (98%) 甲酯化的多聚半乳糖醛酸, 但对多聚半乳糖酸没有活性, 为磷酸根和柠檬酸根离子所激活, 为 Ca²⁺ 及过量底物所抑制。⁽²⁹⁻³¹⁾ 内切多聚半乳糖醛酸酶 (EC3.2.1.15) 能水解多聚半乳糖醛酸内部的糖苷键, 在无果胶甲酯酶的作用下, 该酶对高度的甲基化的果胶是没有活性的。外切果胶酸甲酯酶 (EC3.2.1.67) 主要作用于果胶酸, 作用的专一性决定于底物是果胶酸或者是完全甲酯化的果胶。

3.3 果胶酶的用途

由于果胶酶作用于果胶质中的 D-半乳糖醛酸残基之间的糖苷键, 使高分子的聚半乳糖醛酸降解为小分子物质。因此, 它在食品工业 (特别是水果加工业)、麻类脱胶、木材防腐等方面有重要的应用价值。例如, 在橄榄汁中加入了果胶酶处理, 可使果汁得率提高 25-30%, 出汁率达 65-70%, 而制成的橄榄汁仍保持优良的滋、气味, 而且, 经过果胶酶处理, 橄榄汁处理过滤速度明显提高, 有利于提高生产效率。⁽³²⁾ 在草莓汁加入果胶酶 0.4%, 调整其 pH 值为酶的适宜作用值, 在 50℃ 条件下保温 2 小时, 可得到澄清、透明、保持原色的澄清草莓汁。⁽³³⁾ 这是由于果胶酶降

解了果胶物质破坏了胶体的粘附稳定悬浮颗粒的特性,使果胶粘度降低,悬浮颗粒沉降,澄清度提高。⁽³⁴⁾果胶酶对葡萄汁的非酶褐变也有一定的影响,它可以有效地提高水果的出汁率,改变果汁的过滤效率,减速和增强果汁的澄清作用。⁽³⁵⁾在对猕猴桃汁的澄清中,由于果胶酶分解了果胶质,使形成混浊的果胶质、蛋白质等胶体物质分解被破坏而形成絮状物。最终达到果汁澄清的目的。⁽³⁶⁾通过果胶酶对茶叶汁酶解作用的研究,发现绿茶、乌龙茶、红茶的浸出液经过果胶酶酶解后,其超滤通量的变化不同程度的提高,因此果胶酶在茶浸出液膜的分离中非常有前景。⁽³⁷⁾在苹果汁的加工过程,加入果胶酶也能起澄清的作用,而且酶澄清剂的效果更优于化学澄清剂。因为酶澄清剂的作用条件温和,用量少,实用性强,安全可靠,澄清彻底,而化学澄清剂是无法与之相比的。⁽³⁸⁾同时,用果胶酶处理果蔬原料可提高其液化率,从而增加了出汁率,提高了原料的利用率,可降低生产成本。⁽³⁹⁾在高浓度的酒精发酵过程中,加入果胶酶可以降低醪液的粘度,曾强糖化酶的能力。⁽⁴⁰⁾另外,果胶酶在澄清余甘果汁⁽⁴¹⁾、山楂饮料的加工⁽⁴²⁾,油桃果汁饮料的加工中也可以加入一定量的果胶酶⁽⁴³⁾。随着果胶酶应用范围的扩大,它也能够作为一种新型的饲料添加剂,与纤维素酶、半纤维素酶一起破解植物饲料细胞壁,使细胞中营养物质释放出来,提高饲料中能量和蛋白质的利用率。⁽⁴⁴⁾作为古老的麻类脱胶工艺,微生物果胶酶还在广泛使用,而且,随着人们的环境意识的不断提高,微生物果胶酶对麻类的脱胶将越来越广泛被使用。⁽⁴⁵⁾

4.麻类脱胶的研究进展

大麻纤维长而坚固、耐久和耐腐蚀性强，可织高档装饰布、地毯、凉席、工业用布、汽车内衬、服装、拖鞋、线绳等。大麻纤维具有良好的防霉防臭、防腐蚀的功能。大麻纺织品作贴身衣物，软、舒适、无刺痒感，且能吸汗降温。大麻还具有良好的防紫外线及耐热性能，而且遇到雨天，大麻纤维吸水膨胀可把织物的孔隙堵死，起到防水的作用。天晴则散湿较快，纤维收缩孔隙增加，能很好的调节温度、湿度，是帐篷、车船篷盖布的理想材料。⁽⁵⁾我国的亚麻产量仅次于前苏联，位于世界第二，亚麻制品具有抗菌、抗紫外线、防静电的功能，其独特的卫生性能和凉爽特点适应着世界环境的变化和地球气候的温室效应。由于亚麻服装被认为是生态流行服装，因此仅占世界纺织品产量1%的亚麻产品倍受喜爱。⁽⁴⁶⁾另外，红麻、黄等其它麻类也可以作为优质的天然纤维资源。

麻类韧皮部，主要化学成分是纤维素、半纤维素、果胶、木质素等，成分复杂，不具可纺性；只有除去包裹在麻纤维外的胶质物质，该纤维才具有可纺性，才能用于纺织工业。除去麻类纤维外的胶质物质的工艺叫脱胶工艺。我国对于麻类脱胶有着非常悠久的历史，从最初的天然沤麻到化学脱胶，直至现在的生物脱胶。但是目前麻类的最主要的和最广泛的脱胶方式仍然是天然沤麻和化学脱胶。天然沤麻法是指将收获的麻或麻皮浸泡于沟渠、池塘、湖泊、河汊或天然水域中进行发酵脱胶，在通过剥洗获得用于纺织的纤维。化学脱胶法是指用酸碱处理的手段来去除麻类

韧皮部的果胶质。但是传统的沤麻方法由于其脱胶周期长、脱胶效率低，占居水面大，纤维质量难以控制等诸多弊端，已不适应现代工业的需要。所以从五十年代以来化学脱胶取得了很大的进展，采用化学脱胶能够很容易的除去麻类纤维上紧密结合的胶质。有时为了弥补化学脱胶的不足，补以物理方法处理，已达到工业上脱胶质量的要求。

4.1 苧麻化学脱胶的研究

苧麻是我国的特产，开发利用已有 4000 多年的历史，产量占世界总量的 93% 左右，种植面积、产量、纺织加工能力均居世界之首，素有苧麻之乡的称号，所以苧麻又称为“中国草”。苧麻纺织品具有质地细薄、色牢固高、⁽⁴⁷⁾ 吸湿透气、凉爽舒适、高档挺括不贴身的服用性能和抑菌防霉等卫生保健功能。长期以来，我国 90% 以上的苧麻制品被销往 80 多个国家和地区，为我国出口创汇作出了很大的贡献。

脱胶是苧麻纺织的重点，目前我国还存在用化学方法对苧麻进行脱胶。用于制成麻条纺纱的精干麻是原麻脱胶后的产物。原麻仅含 70-75% 左右的纤维素，其余为半纤维素、果胶质、木质素、脂腊质，灰分、色素等非纤维素物质，习惯上统称为胶质。这些非纤维素物质不仅含量高，而且以各种复杂的高分子聚合体方式与纤维紧密结合，包裹在纤维的表面。苧麻化学脱胶是利用酸、碱和氧化剂的水解氧化作用，破坏胶质大分子使之变成能溶入溶液的小分子，从而将胶质与苧麻纤维分离的过程。由于酸对纤维素纤维，尤其是在高温条件下容易使之产生脆损，故苧麻脱胶主

要还是通过碱的水解作用完成。实际上苧麻的碱煮脱胶是整个脱胶工艺的核心。苧麻脱胶化学反应是多相化学反应过程。^[48]传统的苧麻脱胶工艺过程有如下几种：1、一煮法工艺：原麻拆包扎把—(浸酸—水洗—)碱液煮练—水洗—打纤及水洗—酸洗—水洗—脱水—给油—脱水—烘干。2、二煮法工艺：原麻拆包扎把—浸酸—水洗—一次煮练—水洗—二次煮练—打纤及水洗—酸洗—水洗—脱水—给油—脱水—烘干。3、二煮一练法工艺：原麻拆包扎把—浸酸—水洗—一次煮练—水洗—二次煮练—打纤及水洗—酸洗—水洗—脱水—精炼—水洗—给油—脱水—烘干。4、二煮一漂法工艺：原麻拆包扎把—浸酸—水洗—一次煮练—水洗—二次煮练—打纤及水洗—漂白—酸洗—水洗—脱水—给油—脱水—烘干。5、原麻拆包扎把—浸酸—水洗—一次煮练—水洗—二次煮练—打纤及冲洗—漂白—酸洗—水洗—精炼—水洗—脱水—给油—脱水—烘干。^[4]

近年来,化学脱胶法在此基础上有了很大的改进,主要表现在以下几个方面:1.在练液中加入表面活性物质,使练液与苧麻纤维束的液-固界面间保持较低的表面张力。这样,原麻一旦进入练液就能迅速地被润湿、渗透,也更易溶胀,碱或其他成分能够与苧麻纤维充分地接触,确保水解作用的快速进行;2.加强对胶质的水解作用,由于苧麻胶质成分大多数以高分子聚集体的形式相互交叉、包裹、紧密粘结在苧麻纤维表面,从化学反应性质来看,只有低分子量的半纤维素、果胶质易被稀酸、碱水解溶入水中,而以高分子聚合体形式存在的半纤维素、果胶质则要在高温条件下才能发

生水解反应。木质素对酸碱有一定的稳定性，但对氧化剂敏感。色素等杂质也易被氧化剂作用。这些化学反应性质的不同增加了脱胶的难度。所以在近年来的苧麻快速脱胶工艺中，利用了水解和氧化的协同作用。即在保持酸或碱水解的主要作用下，借助氧化剂对胶质高聚物的敏感性而产生氧化降解；加强对胶质聚合物表层的破坏，同时又促进了水解作用；3.在脱胶过程的后期，练液中存在大量由水解氧化而产生的胶质杂质。这些果胶质、半纤维素等非纤维素杂质，如未及时被分散、络合生成可溶性的物质，将会重新被吸附在苧麻纤维表面，因此阻碍了脱胶作用的完成，降低了脱胶效率。为了防止这种现象的发生，加入具有很强的扩散、络合能力的化学物质，使生成的胶质杂质能及时的被螯合，吸附于表面活性剂的胶束中，形成稳定的分散体系，实现胶质杂质与纤维素纤维的完全分离。在研究高效煮练剂的同时，也开发制造了先进的设备。目前我国苧麻的化学脱胶技术占居脱胶工艺的主导地位。^[48]

4.2 苧麻生物脱胶的研究

天然的沤麻存在着脱胶周期长、纤维质量不稳定、占地面积大等问题，难以实现工业化生产，因此，该方法不是理想的脱胶方法。自五十年代以来主要采用的化学脱胶工艺，即采用酸碱的处理，会对纤维造成一定程度的损伤，且煮练后的废液污水含有较高浓度的碱，增加废水处理的开支和难度。随着人们对生活质量要求的提高、对环保的日益重视，目前各国都在寻求通过生物的方法进行脱胶。改善化学脱胶工艺所带来的弊端，这是麻类纤

维脱胶工艺发展的必由之路。

与化学脱胶相比,生物脱胶完全、彻底,减低了拷麻工作量,从而减少了纤维流失;更主要的可能是生物脱胶工艺没有强酸、强碱和高温、高压下的水解作用,以至于纤维固有的形态和结构得到了完整的保留;生物脱胶的精干麻更松散、柔软、光泽也柔和得多。由于微生物产生的脱胶酶能“定向爆破”苧麻胶质的关键部位,使得其结构彻底崩溃,达到完全分散纤维的目的,同时保留苧麻纤维固有的形态和结构。此外,精干麻的纤维分散、麻条几乎没有硬条并丝,因此强度不会降低。而化学脱胶有可能在水解胶质的同时对纤维起到“淬火”作用,使纤维变硬,可纺性能变差。这就是说,生物脱胶可以大幅度改善苧麻纤维的纺织性能;用生物脱胶苧麻条纺纱的制成率也有所提高,脱出来的麻球手感较好,成纱韧性较好,各工序断头较常规化学降低;降低能耗,节省水和煤炭资源;节省工艺辅料投入;基本消除对环境的污染;降低劳动强度、改善工作环境、提高人身安全保障系数,所以,目前,生物脱胶已经收到了很大的重视。⁽⁴⁹⁾

由于生物脱胶与化学脱胶相比具有上述所说的优点,所以它受到了很大的重视,自从本世纪五十年代以来,生物脱胶作为苧麻纤维深加工的技术,已经引起了学者的关注。1953年,我国科学院林业土壤研究所(现为生态所)的刘期松等,对苧麻脱胶微生物区系进行了研究。Chaudhurg. S. D 曾报导某些细菌和真菌在发酵过程中可以分解果胶物质而释放纤维。⁽⁵⁰⁾ 1958年, Ali. M. M 提出利用果胶酶进行麻类(如黄麻、亚麻等)纤维的脱胶⁽⁵¹⁾。1972

年 Fogatrg. W. M 和 Ward. O. D 报导产生果胶酶的微生物或果胶酶制剂在脱胶工艺中加以利用的可能性。八十年代后, 采用纯种微生物进行苧麻脱胶的研究, 获得了很积极的结果。1986 年 H. Tanabe 等认为脱胶是由于菌产生一种浸软因子, 实际是一种内切果胶裂解酶 (endo-pectin lyase PNTE)。⁽²⁰⁾ 进入九十年代, 生物脱胶取得了更大的发展。

对苧麻的生物脱胶是麻类脱胶中研究得较多的一种。苧麻的生物脱胶归纳起来有微生物脱胶、酶脱胶及微生物与化学联合脱胶等三种。⁽⁵²⁾ 微生物脱胶是利用某种细菌施加在生苧麻上, 以生苧麻上的胶质为营养源, 让脱胶菌在生苧麻上大量繁殖, 在脱胶菌繁殖过程中, 分泌出一种酶物质来分解胶质, 使高分子量的果胶及半纤维素等分解成低分子物质而溶于水中。酶脱胶是将能脱胶的细菌培养到细菌的衰老期后, 利用其所产生大量的粗酶液, 浸渍生苧麻; 或将粗酶液提纯、浓缩为液剂, 或将浓缩液干燥成为粉剂, 将这液剂稀释或将粉剂溶于水, 把生苧麻浸渍在该稀释液中进行酶解脱胶。早在 1970 年我国株洲麻纺厂和中国农业科学院麻类研究所进行了脱胶细菌的大量筛选和脱胶试验。1978 年以来, 湖南轻工研究所与株洲麻纺厂合作, 选出一株脱胶能力强的芽孢杆菌。1989 年武汉大学的曹军卫等人申请了《苧麻快速生物脱胶新技术》的专利, 该项专利包括了果胶酶产生菌的培养、苧麻快速生物脱胶及脱胶苧麻后处理 3 个环节。1989 年湖南师范大学潘祖楷等人通过了酶法脱胶的研究鉴定。⁽⁵³⁾ 尽管生物脱胶受到越来越多的重视, 但是目前生物脱胶在生产上没有得到实际的应

用,究其原因主要有以下几个方面:(1)获得的一些微生物是真菌,它产生果胶酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶,但也产生纤维素酶,同时果胶酶的最适 PH 为酸性,因此对纤维有一定的损伤,无法利用。(2)我国相继公开了几个专利,如 CN85104285、CN85104284、CN89104529、97109044 等,由于酶活低或脱胶作用时间长(10—16h)难于在工业上应用。(3)欧文氏菌是一种植物致病菌,虽有较强的脱胶能力,但它能损伤纤维,且具有“潜在污染”的可能性。(4)脱胶不仅依赖于果胶酶一种酶的作用,同时还要依赖于其他多糖降解酶的协同作用。

1989 年本实验室从济南近郊土壤中分离筛选到一株芽孢杆菌,对大麻、苧麻均有良好的脱胶作用,并以通过《九五》攻关工作,将原产果胶酶 500u/ml 提高到 2000u/ml 左右,同时,该菌株还产生木聚糖酶、甘露聚糖酶等多种水解酶,但并不产纤维素酶,经在泰安泰山大麻集团有限公司日处吨原麻的试验和在湖南沅江二苧麻纺织厂建立了一条生物脱胶生产线试生产了一年,证明该菌酶液脱胶条件温和,节能节碱,脱胶时间较短,脱胶精干麻质量优于或相当于化学脱胶麻的质量;成本低于化学脱胶;废水排放基本无污染,初步显示了生物脱胶的巨大优越性。得到了国内一些知名专家的高度评价。认为是我国苧麻脱胶行业的一场技术革命,解决了半个世纪以来没有解决的问题。其技术居国际、国内领先水平。

在上述工作的基础上,本实验室又和湖南益阳益鑫泰服装有限公司签订苧麻生物脱胶技术的合作,这是湖南麻纺行业龙头企

业之一，拥有 4000 多职工、具有自己的品牌产品，目前已安装可运行的有 100 升，1000 升和 10m^3 发酵罐各一个，在 1000 升的发酵罐中进行了近一年的试验，在 10m^3 发酵罐的批量试产已于 2002 年 3 月开始，并准备安装年产千吨精干麻的生物脱胶生产线，使生物脱胶代替化学脱胶实现产业化。

经过众多努力，生物脱胶工作已由中试走向生产线，代替化学脱胶工艺已经是必然的趋势，但目前仍然存在不少问题需尽快解决：（1）菌种的脱胶能力尚待进一步提高，这样就有可能将脱胶酶或菌制剂制备成高效率低成本的脱胶制剂，集中由酶制剂厂或一、二个脱胶大厂进行生产，供应一些中小厂；（2）生物脱胶的设备不能简单套用化学脱胶的设备，应根据生物脱胶的特性，重新设计和改型，使生物脱胶效率得到充分发挥；（3）生物脱胶工艺有待继续研究和完善以便更有针对性的指导生产。鉴于上述考虑，我们认为提高菌种脱胶能力是极其关键的，原菌株 B₁₂₋₁₃ 果胶酶活已达 2000IU/ml，且具有较好的脱胶能力，平均 1.2-1.5 吨发酵初酶可处理 1 吨原麻的脱胶，控制得当则脱胶成本可与化学脱胶持平或稍低于它，如果条件控制不好，脱胶成本就会上升，如果能进一步提高菌种的脱胶能力，减少用发酵粗酶的量，那么在中小脱胶纺织厂使用就不会有“成本提高”之虑。

5. 原生质体融合技术的发展

原生质体融合(protoplast fusion)技术的研究起源于 60 年代,1960 年法国的 Barski 研究小组在两种不同类型的动物细胞中发

现了自发融合现象,在1972年匈牙利学者 Ferenzy 率先进行了微生物原生质体融合的研究,⁽⁵⁴⁾在1976年匈牙利学者 Folder 和 Alfold 则首次报道了用聚乙二醇或新生磷酸钙诱导巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 种内株间原生质体融合;⁽⁵⁵⁾同年法国的 Schaeffer 等也用聚乙二醇诱导枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 进行种内株间原生质体融合获得成功;⁽⁵⁶⁾1979年匈牙利的 Pesti 首先提出了融合育种提高青霉素产量的报告,从而开创了原生质体融合在实际工作中的应用。⁽⁵⁷⁾在1980年 Zimmermann 等报道了电场诱导细胞融合的新技术,进一步提高了融合频率。在1988年张闻迪等又报道了激光诱导动物细胞融合。在融合子的筛选方法上有利用抗药性标记、利用营养缺陷型作为遗传标记、利用灭活的原生质体、毒力差异以及利用目的融合子的优良性状等来进行筛选。⁽⁵⁸⁾同时,原生质体技术融合具有以下几个优点:1,微生物的几种基因重组方法,如接合、转化、转导和溶源性转变等受到了不同程度的种属或基因重组条件的限制,而原生质体融合的基因重组方式,则基本上不受上述限制,无供体受体之分,不需更多的附加条件,可以在更广泛的种属与种系之间进行更随机的重组。2,利用原生质体融合技术可以打破微生物的种属界限,实现远源菌株的基因重组。3,原生质体融合可使遗传物质传替更为完整,可以获得更大的重组机率,有利于提高育种速度。4,所需仪器设备、工具酶等条件相当简单。只需显微镜、离心机、摇床、溶菌酶、聚乙二醇等就可展开工作。⁽⁵⁹⁾本论文就是利用该技术将芽孢杆菌和欧文氏菌融合,以便得到一株酶活高、酶系全、脱胶能力强的菌

株。以便解决目前生物脱胶中存在的重要问题，减低生产成本。

第二章 标记菌株的获得

为了简单、快速的筛选出芽孢杆菌和欧文氏菌原生质体融合后的融合子，我们选用两个原始菌株抗性标记进行筛选。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

Bacillus sp 12-13 (本实验室研究用菌株)

Erwinia sp 26-2 (院菌种保藏室赠)

1.1.2 试剂与药品

1.1.2.1 33 种抗生素药敏试纸

1.1.2.2 25 万单位乳糖酸红霉素，100 万单位硫酸链霉素

牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、NaCl、琼脂

1.1.2.3 固体完全培养基：

牛肉膏 0.5% 蛋白胨 0.5% 葡萄糖 0.5% NaCl 0.5%

琼脂 2% pH7.2

1. 2 方法

1.2.1 药敏试纸初步确定两个菌株得抗性

用 33 种药敏试纸放入培养皿中，观察和比较两个菌株的抗药性的异同。

1.2.2 梯度平板法获得抗性菌株的方法⁽⁶⁰⁾

在培养皿中放入 10 毫升的培养基，将培养皿斜放，待其凝固后，使培养皿表面成一斜面。在制好的平皿内加入 10 毫升含有一

定浓度药物的培养基（浓度大小要预测），平放，待其凝固后，药物就以一定的连续梯度分布于平皿内。在梯度平皿上涂布大量的对数生长期的芽孢杆菌或欧文氏菌，置 34℃ 培养。

将获得的抗性菌株在浓度分别为 100u/ml、150u/ml、200u/ml、250u/ml、300u/ml、350u/ml 对应的抗生素上培养。

2. 试验结果与讨论

2.1 药敏试纸初步确定两个菌株得抗性:见表 1

表 1 芽孢杆菌和欧文氏菌对不同抗生素的敏感性

	芽孢杆菌 12-13	欧文氏菌 26-2-3
红霉素	+++	—
氯霉素	++++	++++
复方新诺明	++++	++
红 E15	++++	++
妥布霉素	+++	+++
四环素	++++	+++
丁胺卡那霉素	+++	+++
新生霉素	++++	—
卡那霉素	++++	++++
呋喃妥因	++++	++++
痢特灵	++++	++++
链霉素	—	+++
庆大霉素	+++	+++

苯唑青霉素	++++	—
先锋霉素	—	—
头孢唑啉	++++	++++
青霉素 G	++++	++
呋唑酮	++++	+++
新霉素	+++	++
多粘菌素	—	+
奈定酸	++++	++++
新霉素 N30	++++	++
多粘菌素 PB300	+	+
万古霉素	+++	—
磺胺药+TMP	++++	—
磺胺药	++++	+
羧苄青霉素	++++	++++
氧哌嗪青霉素	++++	++++
萘定酸	++++	+++
氯林可霉素	+	—

— 表示具有抗性， + 表示对抗生素敏感

由上表可以看出：

对欧文氏菌 26-2-3 来说： 对红霉素、新生霉素、苯唑青霉素、先锋霉素、磺胺药+TMP、万古霉素、氯林可霉素具有抗性

芽孢杆菌 12-13-2 来说：链霉素、先锋霉素、多粘菌素具有抗性

所以我们选择具有红霉素抗性的欧文氏菌和具有链霉素抗性的芽孢杆菌作为原始菌株。

2.2 梯度平板法获得抗性菌株

发现对芽孢杆菌来说最大的生长的链霉素的浓度为:250u/l

对欧文氏菌来说最大的生长的红霉素的浓度为: 300u/l

第三章 原生质体的制备与融合

芽孢杆菌能产生多种脱胶酶^[1]，且其生物脱胶效果在大麻、苧麻脱胶工艺上的运用已具吨级规模，具工业化生产的规模。为进一步提高脱胶能力，降低脱胶成本，使生物脱胶的产业化更加完善，更能为生产方接受，采用已有 20 余年研究历史的微生物原生质体融合技术来选育菌种，其优点是打破微生物种属界限，实现远缘菌株的基因重组，且所需设备简单，已成为工业微生物育种的重要手段之一。本文利用这项技术对 G⁺的链霉素抗性红霉素敏感的芽孢杆菌 B₁₂₋₁₃₋₂ 和 G⁻的红霉素抗性链霉素敏感的欧文氏菌 E₂₆₋₂₋₃ 进行多批次原生质体融合，从稳定的 284 株融合子筛选到 9 株脱胶能力强的融合菌株。下面就是我们在这方面的部分实验总结。

1. 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 菌株

Bacillus sp 12-13-2

Erwinia sp 26-2-3

1. 1. 2 试剂和缓冲液

1. 1. 2. 1 红霉素溶液：用无水乙醇溶解后进行稀释至 50000u/ml.

1. 1. 2. 2 链霉素溶液：用生理盐水溶解稀释至 50000u/ml

1. 1. 2. 3 缓冲液：0.1mol/l pH6.0 磷酸缓冲液

1. 1. 2. 4 高渗缓冲液：于上述缓冲液中加入 0.8mol/l 甘露醇

1.1.2.5 原生质体稳定液 (SMM): 0.5mol/l 蔗糖, 20mmol/l 顺丁烯二酸 pH6.5

1.1.2.6 溶菌酶液: 用 SMM 液配制, 终浓度为 4mg/ml, 过滤除菌

1.1.2.7 青霉素液: 生理盐水配制, 终浓度为 10u/ml, 过滤除菌

1.1.2.8 融合液: 40%PEG6000, 5mmol/l EDTA, 用 SMM 液配制

1.1.2.9 新生磷酸钙: K_2HPO_4 0.54g $CaCl_2 \cdot H_2O$ 29.4g 分别溶于 100ml 水中, 灭菌后等体积混合

1.1.3 培养基

1.1.3.1 液体完全培养基

牛肉膏 0.5% 蛋白胨 0.5% 葡萄糖 0.5% NaCl 0.5% pH7.2

1.1.3.2 固体完全培养基:

在 1.1.3.1 培养基中加入琼脂 2%

1.1.3.3 液体高渗再生培养基:

在 1.1.3.1 中加入 0.5mol/l 的蔗糖

1.1.3.4 固体高渗再生培养基:

在 1.1.3.3 培养基中加入 2%的琼脂

1.1.3.5 融合子选择培养基:

在 1.1.3.4 培养基中加入红霉素和链霉素至终浓度各为 100u/ml

1.1.3.6 传代培养基:

在 1.1.3.2 培养基中加入红霉素和链霉素至终浓度各为 100u/ml.

1.1.4 主要仪器

1.1.4.1 HHB11 恒温培养箱 (天津实验仪器厂生产)

1.1.4.2 HY-X3 恒温摇瓶机 (山东大学制造)

1.1.4.3 OLYMPUS 光学显微镜

1.1.4.4 LG10-2.4A 离心机（北京医用离心机厂）

1.1.4.5 JA-1003 电子精密天平（上海天平厂）

1.1.4.6 PHS-3C 数显精密酸度计（上海雷磁仪器厂）

1.1.4.7 H-I 微型混合器（上海沪西生化仪器厂）

1.2 方法

1.2.1 芽孢杆菌原生质体的制备

从新鲜斜面接入 3ml 的种子试管中 34℃ 培养过夜，按 10% 接种量接种，摇床培养 5 小时后，加入青霉素液至终浓度为 0.3u/ml，继续培养 2 小时，4000r/min 离心，收集菌体，用磷酸缓冲液洗涤 2 次后，用 SMM 液悬浮，加入溶菌酶至终浓度为 0.5mg/ml，34℃，酶解 30min 后离心，用高渗缓冲液洗涤，得芽孢杆菌原生质体。

1.2.2 欧文氏菌原生质体的制备

从新鲜斜面接入 3ml 的种子试管中 34℃ 培养过夜，按 10% 接种量接种，摇床培养 3 小时后到对数期，离心，收集菌体，用磷酸缓冲液洗涤 2 次后，用 SMM 液悬浮，加入溶菌酶至终浓度为 1.2mg/ml，37℃，酶解 10min 后加入 EDTA 至终浓度为 60mmol/l。继续酶解 20 分钟后，3500r/min 离心 20 分钟，收集原生质体用 SMM 悬浮。

1.2.3 融合及融合子的检出

取 1ml 芽孢杆菌和 1ml 欧文氏菌的原生质体悬液，3500r/min，离心 20 分钟后，用 0.2ml 液体高渗再生培养基轻轻混匀，再加入融合液 1.8ml，新生磷酸钙 0.2ml，混匀，37℃，静置 10min

后, 3500r/min, 20 分钟离心, 收集融合子, 用液体再生培养基悬浮, 涂在融合子选择培养基上, 34℃培养, 再生 3 天。

1.2.4 检出和鉴定

用无菌牙签挑取在含有链霉素和红霉素两种抗生素的选择培养基上生长的菌落到传代 5 次后, 在完全培养基和传代培养基上反复传代, 至不出现有回复亲本的现象, 以此菌为材料进行鉴定。

2. 实验结果与讨论

2.1 影响芽孢杆菌原生质体形成的因素

在对数前期加入了青霉素进行预处理, 可以降低细胞表面的肽聚糖结构之间的交联程度, 使溶菌酶易作用, 增加脱壁效果。溶菌酶浓度分别选择 0.25, 0.5, 1.0, 2.0mg/ml. 发现随酶浓度的增加, 原生质体形成率增加, 但其再生率下降, 本文选择了 0.5mg/ml 的酶量, 34℃, 30min 的酶解条件, 原生质体的形成率为 99.78%. 再生率为 23.5%。

2.2 影响欧文氏菌原生质体形成的因素

由于该菌是 G⁻, 在其粘肽层的外侧有由蛋白质, 脂质核聚糖组成的外膜, 因此, 需要加入 EDTA, 因为它能螯合细胞壁上稳定的二价阳离子, 使溶菌酶便于作用, 在培养基中加入 0.25%的多聚磷酸钠, 使菌体分散均匀, 酶能与菌体充分接触。

酶浓度分别选择 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0mg/ml, 发现随酶浓度增加, 原生质体形成率增加, 但再生率下降: 分别选择酶解 20 分钟, 30 分钟, 40 分钟, 发现随酶解时间加长, 原生质体形成

率增加,但再生率下降,本文选择的是酶浓度为 1.2mg/ml, 37℃酶解时间 30 分钟,该条件下原生质体的形成率为 94.5%,再生率为 25.6%。

2.3 影响融合的因素

融合时间对融合频率有着重要的影响,随着融合时间的延长,融合频率不见提高,本文采用的是 37℃,静置 10 分钟,融合频率为 4.92×10^{-6} 。

2.4 融合子的检出

在原代融合平板上加入 2 种抗生素,可以保证生长的菌或者是形成杂合双倍体或单倍重组体的真正融合,或者是形成异核体的暂时融合,因此,对这些菌在进行连续传代十次后,不回复的可以认为是真正的融合子。

第四章 融合子的形态及生理生化特性的比较

本章对融合子的形态及其生理生化特性进行了分析,以便确定融合子与原始菌株的异同,同时融合子与原始菌株相比有何优越性。

1.材料与方法

1. 1 材料

1.1.1 菌种

原始菌株同上

融合子 52, 142, 220, 256, 2-9, 150, 173, 227, 229

1.1.2 主要试剂与药品

0.5% 刚果红、1mol/l 的 NaCl、链霉素、红霉素、2.5%石蕊溶液、100%纯牛奶等

1.1.3 培养基

1.1.3.1 液体完全培养基: 同上

1.1.3.2 固体完全培养基: 同上

1.1.3.3 糖发酵培养基

蛋白胨 0.2%、NaCl 0.5%、磷酸氢二钠 0.03% 所试糖 1%、
溴百里香酚蓝 0.003% PH7.0-7.4

1.1.3.4 石蕊牛奶培养基

2.5%石蕊牛奶溶液 4ml、脱脂牛奶 100ml

1.1.3.5 CMC 利用培养基

CMC10 克、K₂HPO₄ 0.3g 、MgCO₃ 1.0g 、NaCl 0.5g 、

KNO₃ 1.0g 、琼脂 1.2g 蒸馏水 1000ml

1.1.3.6 果胶利用培养基

酵母浸粉 5g、10%氯化钙 (CaCl₂ · 2H₂O) 水溶液 5ml、0.1%

溴百里酚蓝 12.5ml、果胶 30g、琼脂 约 10g、 水 1000ml

Ph7.1-7.5

1. 2 方法

1.2.1 形态和产色素的情况

分别将 11 株脱胶效果较好的融合子接种在土豆和肉汤培养基上，观察其菌落形态、产色素情况及细菌的形态。

1.2.2 革兰氏染色⁽⁶¹⁾

1.2.3 对温度的敏感性

将菌种放入 4℃ 的温度下三个月后观察其生长情况。

1.2.4 链霉素和红霉素的抗性分析

在培养基中加入浓度分别 150u/ml 链霉素和红霉素

1.2.5 葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖的利用

将各个细菌分别接入含有杜氏小管的糖发酵培养基中，

34℃ 培养 3 天。如果颜色变黄，说明产酸，如果变蓝，说明产碱，如果杜氏小管中有气泡，测产气。

1.2.6 石牛奶反应⁽⁶²⁾

见《微生物分类实验》

1.2.7 多糖的利用

观察 11 株菌对以下五种多糖的利用：CMC、国产葵花盘胶。

将活化好的菌种接入对应的培养基后，观看各自的生长情况。

观察它们的生长情况，同时用 0.5% 的刚果红染色 4—5 分钟后，再用 1mol/l 的 NaCl 洗去刚果红，观察有无透明圈。

2. 实验结果与讨论

2.1 菌体和菌落形态的观察

2.1.1 细胞形态:见图 3-13

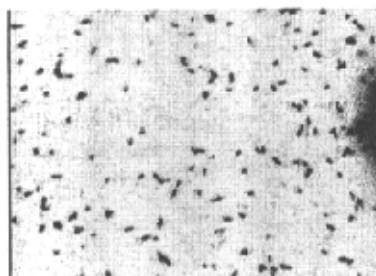


图 3:欧文氏菌 26-2-3



图 4:芽孢杆菌 12-13-2



图 5: 52

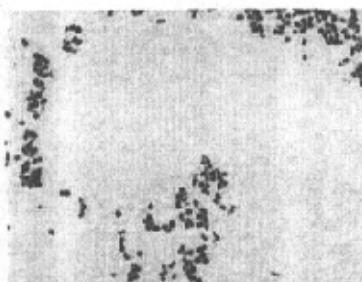


图 6: 142

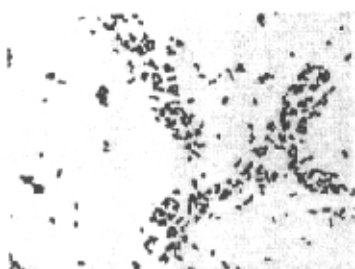


图 7:220

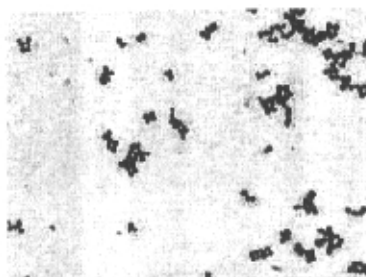


图 8:256

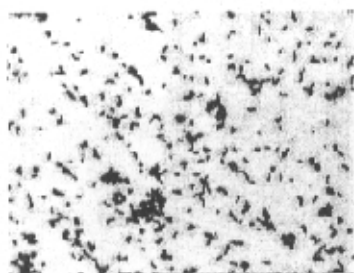


图 9:2-9

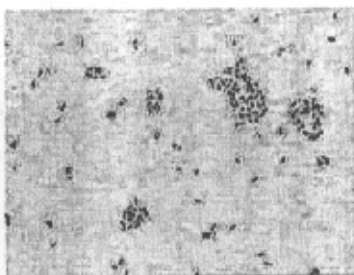


图 10:150

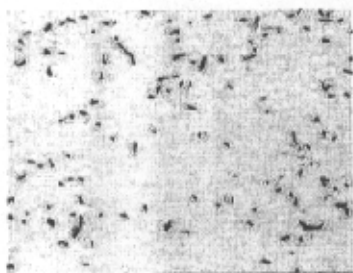


图 11:173

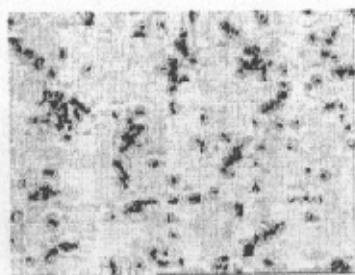


图 12:227

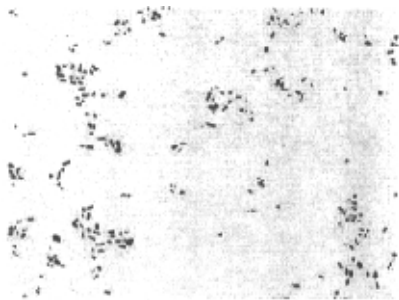


图 13:229

2.1.2 菌落形态见表 2

表 2 原始菌株与融合子菌落特征的比较

B ₁₂₋₁₃₋₂	粗糙、白色、边缘不整齐、多褶
E ₂₆₋₂₋₃	乳白色、边缘不整齐、较湿润
227	黄色、培养基上有棕色色素、边缘不整齐、较湿润
220	乳白色、边缘不整齐、较湿润
2-9	白色小菌落、边缘整齐、较湿润
256	黄色、边缘不整齐、较湿润
52	乳白色、边缘不整齐
173	黄色、培养基上有棕色色素边缘不整齐
150	乳白色、光滑、边缘不整齐、较湿润
229	白色、边缘不整齐、多褶
142	乳白色、边缘不整齐、较湿润

通过对融合子的细胞和菌落形态观察，可以发现，在细胞形态上融合子是多种多样的，有类似于原始菌株的，也有两亲本基因重组后产生的新性状，成为单个或成对排列的球形。

2.2 革兰氏染色:见表 3

表 3 原始菌株与融合子革兰氏染色反应的比较

芽孢杆菌 12-13-2	欧文氏菌 26-2-3	52	142	220	150
G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁺
227	173	2-9	229	256	
G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁻	

由上表可以看出: 9 株融合子中有 7 株是 G⁺, 只有 142 和 256 是 G⁻。

2.3 对温度的敏感性:见表 4

表 4 原始菌株与融合子温度敏感的比较

B ₁₂₋₁₃₋₂	E ₂₆₋₂₋₃	52	142	220	150	227	173	2-9	229	256
—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—

— 表示对低温不敏感, + 表示对低温敏感

由上表可以看出: 融合子中只有 220 对低温敏感, 其余的均可在 4℃ 的温度下保存。

2.4 链霉素和红霉素的抗性分析

所有的融合子都是对红霉素和链霉素具有抗性的

2.5 葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖的利用:见表 5

由表 5 可以看出, 融合子在这五种糖的利用上都保留了两亲本的产酸的特点。

2.6 石蕊牛奶反应:见表 6

表 6 原始菌株与融合子的石蕊牛奶反应的比较

菌号	B ₁₂₋₁₃₋₂	E ₂₀₋₂₋₃	52	142	220	150
利用情况	还原	酸凝固	还原	还原	还原	产碱
菌号	256	173	2-9	227	229	
利用情况	还原	还原	还原	产碱	还原	

由表 6 可以看出:在石蕊牛奶反应中,绝大部分融合子都类似于芽孢杆菌,也有两亲本基因重组后产生的新性状,成为产碱。

2.7 CMC、葵花盘果胶的利用:见表 7

表 5 葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖的利用

	蔗糖	乳糖	麦芽糖	葡萄糖	甘露糖
B ₁₂₋₁₃₋₂	产酸、不产气	不产酸、不产碱、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气
E ₂₆₋₂₋₃	产酸、产气	产酸、产气	产酸、产气	产酸、产气	产酸、产气
52	产酸、不产气	不产酸、不产碱、不产气	微产酸、不产气	微产酸、不产气	产酸、不产气
142	微产酸、不产气	微产碱、不产气	微产酸、不产气	微产酸、不产气	微产酸、不产气
220	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气
150	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气
227	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气
173	微产酸、不产气	不产酸、不产碱、不产气	产酸、不产气	微产酸、不产气	产酸、不产气
2-9	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气
229	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气
256	不产酸、不产碱、不产气	产碱、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气	产酸、不产气

表 7 原始菌株和融合子 CMC、葵花盘果胶利用的比较

		CMC	国产葵花盘果胶
E ₂₆₋₂₋₃	细菌生长	菌落小	菌落大，较湿润
	有无透明圈	有透明圈	无
B ₁₂₋₁₃₋₂	细菌生长	不生长	菌落大，呈放射状
	有无透明圈	—	有透明圈
220	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿整齐
	有无透明圈	—	有透明圈
52	细菌生长	不生长	菌落较大
	有无透明圈	—	有透明圈
150	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿光滑
	有无透明圈	—	无
229	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿光滑
	有无透明圈	—	无
2-9	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿光滑
	有无透明圈	—	无
227	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿光滑
	有无透明圈	—	无
173	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿光滑
	有无透明圈	—	无
142	细菌生长	不生长	菌落湿润，边沿光滑
	有无透明圈	—	无

由表 7 可以看出，只有欧文氏菌产纤维素酶。

第五章 融合子脱胶能力的比较

原生质体融合的主要目的就是要获得酶活高、酶系全、脱胶能力强的菌株，所以我们通过融合子对苧麻的脱胶能力来进行初筛和复筛。

1.材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

原始菌株（同上）以及融合子

1.1.2 主要材料：苧麻

1.1.3 液体完全培养基：同上

1.2 方法

1.2.1 融合子的初筛

将检出的 284 株融合子分别接入含有 5ml 毫升液体完全培养基的试管中，34 ℃摇床培养 4 小时后，加入 0.5g 苧麻在 34 ℃恒温箱中静置 24 小时后，观察脱胶效果。

1.2.2 融合子的复筛

将经初筛后的融合子分别加入含有 5ml 毫升液体完全培养基的试管中，34 ℃摇床培养 4 小时后，倒入含有 95ml 的自来水中，混匀后，加入 5g 苧麻在 34 ℃恒温箱中静置 24 小时后，洗麻，烘干。样品送至山东省纤维检验局测定。

2.实验结果与讨论

2.1 融合子的初筛:

经过对 284 株融合子对苧麻脱胶能力筛选试验,脱胶效果低于原始株 E_{26-2-3} 的有 174 株,约占 61%,相似于原始株的有 51 株,约占 19.3%,高于原始株的有 56 株,约占 19.7%。见图 14

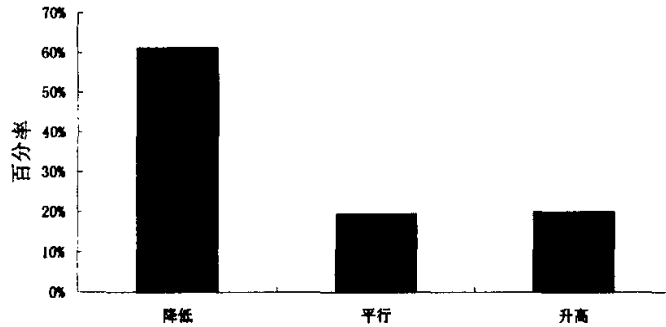


图14 284株融合子脱胶的初筛结果

2.2 融合子的复筛:

对 59 株进行复筛,低于原始株的有 50 株,约占 85%,与原始株平行的有 6 株,约占 10%,高于原株的有 2 株,约占 3.4%。结果见图 15,从复筛中观察到融合子的脱胶能力能稳定的仅仅是少数。

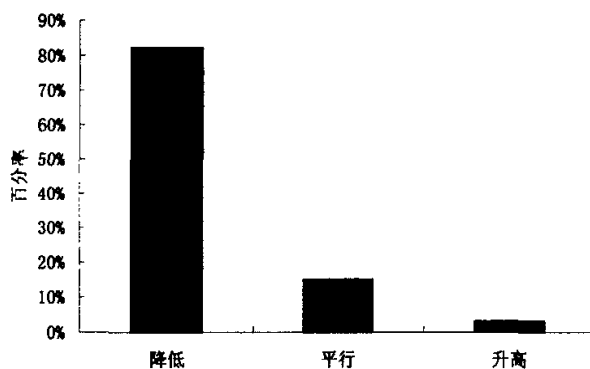


图15 59融合子的复筛结果

2.3 脱胶效果比较:见表 8

表 8 融合子脱胶效果的比较

样品	线 密 度 (dtex)	纤维支数 (Nm)	单纤维断裂 强度(cN/dtex)	单纤维断裂伸 长率 (%)
E ₂₆₋₂₋₃	12.6	794	4.01	3.0
B ₁₂₋₁₃₋₂	8.52	1173	5.85	3.76
173	11.92	839	4.35	3.05
229	8.37	1195	7.15	3.40
142	7.84	1276	6.53	3.36
256	9.30	1075	5.30	3.10
52	10.69	935	4.28	3.04

由表 8 可以看出：融合子与原菌株 E₂₆₋₂₋₃ 和 B₁₂₋₁₃₋₂ 相比，在相同的培养和脱胶条件下，纤维强度上有了很大的提高，融合子 229 单

纤维强度达到了 7.15，融合子 142 的单纤维强度达到了 6.53，就线密度指标而言，均好于原始株 E_{26-2-3} ，但好于 $B_{12-13-2}$ 的仅有 229 和 142 两株。纤维支数融合子均高于原菌株 E_{26-2-3} ，但好于 $B_{12-13-2}$ 的仅有 229 和 142 两株。断裂伸长率所有融合子均高于原株 E_{26-2-3} ，稍差于 $B_{12-13-2}$ 株。从分析对比中可以看出融合子 142、229、256 具有优越性，如果改进脱胶条件，则实现实用化是有一定的前景的。

第六章 欧文氏菌脱胶机理的初步探讨

关于欧文氏菌脱胶机理 1986 年, H.Tanabe 研究证实是由于该菌产生一种内切果胶裂解酶所致, 芽孢杆菌的脱胶机理本实验室已进行过探索。⁽¹²⁻¹³⁾ 本实验室对欧文氏菌脱胶机制作以下初步的探索, 将有关内容总结如下。

1. 材料与方法

1. 1 材料

1.1.1 菌种

欧文氏菌 *Erwinia* sp 26-2 (院菌种保藏室赠)

1.1.2 试剂与药品

主要试剂与第一部分相同,

0. 25%果胶溶液: 用 pH9.6 巴比妥钠缓冲液

0. 015%半乳糖醛酸溶液: 用 pH9.6 巴比妥钠缓冲液

Somogyi 试剂 ⁽⁶³⁾

A 液 (铜试剂): 称取酒石酸甲钠 12 克, 无水碳酸钠 24 克, 再称取碳酸氢钠 16 克, 三者分别溶于三份 200 毫升蒸馏水中, 然后将这三分溶液混匀, 另称取硫酸铜 4 克, 溶于 200 毫升蒸馏水中, 溶解后, 将此液慢慢的边加边搅地加到混合液中。然后再称取 180 克无水硫酸钠溶于其中。最后将上述混合液放在沸水浴中加热 20 分钟。冷却后若出现沉淀, 应过滤除去。最后稀释至 1000 毫升。此液易出现结晶, 应保存于 20℃ 以上。

B 液（砷钼酸试剂）：称取 25 克钼酸铵，溶于 450 毫升蒸馏水中，再加入 22 毫升浓盐酸，充分混匀，另取 3 克砷酸氢二钠溶于 25 毫升蒸馏水中。将此溶液与上述酸性钼酸铵溶液混合均匀。将这份最终的混合液于 37℃处 24-48 小时后，可用于测定，此试剂应放在棕色瓶中保存。

1.1.3 培养基

肉汤培养基与第一部分相似

1.1.4 仪器与器皿

冷冻离心机

细胞破碎仪（JY92-II）

1.2 方法

1.2.1 不同的脱胶方案的效果比较

1.2.1.1 材料的准备

将活化好的欧文氏菌接入装有 5 毫升肉汤培养基的试管中，34℃摇床培养 4 小时。用此发酵液进行脱胶。

1.2.1.2 方法一

将此发酵液倒入含有 95 毫升自来水的三角瓶中，混匀后，加入 5 克苕麻，放入 34℃恒温箱中脱胶。

1.2.1.3 方法二

将此发酵液倒入含有 95 毫升自来水的三角瓶中，混匀后，加入 5 克苕麻，放入 34℃恒温箱中脱胶。在脱胶 3 小时后，倒

掉约 70 毫升的液体，只留下残存在麻上的菌液进行脱胶。

1.2.2 不同材料的酶活和发酵液的比较

1.2.2.1 材料的准备

将活化好的欧文氏菌接入 6 个装有 100 毫升肉汤培养基的 500 毫升的三角瓶中，34℃摇床培养 4 小时后，9000r/min，15℃离心 15 分钟后，用生理盐水洗涤一次后，溶于 60 毫升的 pH9.6 巴比妥钠缓冲液中。分装入三个 50 毫升的离心管中。2 个用于超声波破碎。

1.2.2.2 破碎细胞的方法

将装有 20 毫升菌体的离心管放入含有冰水混合物的烧杯中，用超声波破碎仪破碎细胞。

1.2.2.3 果胶酶酶活的测定

取一定稀释倍数的被测液 0.2ml,加入 0.5ml 0.25%的果胶溶液。置 50℃水浴保温 30 分钟,取出冷却加 1 毫升铜试剂后,置沸水浴中 10 分钟.冷却,加砷钼酸试剂 1 毫升,剧烈震荡至反应结束,加蒸馏水定容至 10 毫升,620nm 测 OD 值。以煮沸加热灭活酶液为空白对照。酶活单位为在上述条件下，每分钟由底物释放 1 μ mol 的半乳糖醛酸所需酶量，即 1 个国际单位。以 IU/ml 表示。

1.2.2.4 蛋白含量的测定

取一定稀释倍数的被测液 0.05ml，加入 0.05ml 0.15mol/L NaCl 溶液，再加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5 毫升，摇匀后 1 小时内在 595nm 处比色。对照为加入 0.1ml 的 0.15mol/L NaCl 溶液，其余同上。单位为 mg/ml。

1.2.2.5 半乳糖醛酸标准曲线的测定

取六支比色管，分别加入 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 毫升的半乳糖醛酸溶液，用巴比妥缓冲液补充至 1.00 毫升，加 1.00 毫升铜试剂，沸水浴 10 分钟后将其冷却，再加入 1.00 毫升砷钼酸溶液，震荡，定容至 10 毫升，摇匀后，620nm 比色。

1.2.2.6 总蛋白浓度的标准曲线的测定⁽⁶⁴⁾

取 14 支试管分两组，按表 9 操作

表 9 标准法制定标准曲线

试管编号	0	1	2	3	4	5	6
1mg/ml 标准蛋白 溶液/ml	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
0.15ml/L NaCl/ml	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.06
考马斯亮 蓝试剂/ml	5ml						
摇匀，1 小时内 0 号试管为空白对照，在 595 纳米处比色							

1.2.2.7 果胶酶活性测定

将被测液稀释至合适的浓度后，取 0.20 毫升加入比色管中，再加入 0.50 毫升的 0.25%果胶溶液。50℃保温 30 分钟后，加入加 1.00 毫升铜试剂，沸水浴 10 分钟后将其冷却，再加入 1.00 毫升砷钼酸溶液，振荡，定容至 10 毫升，摇匀后，620nm 比色。

1.2.2.8 总蛋白含量的测定

取要测的样品 0.05ml，加入 0.05ml0.15mlo/L NaCl/ml 溶液，混匀后在加入 5 毫升的考马斯亮蓝 5 毫升。混匀后在 595 纳米处

比色。

1.2.2.9 苎麻脱胶实验

在离心后的上清液、经生理盐水洗涤后的菌体、经超声波破碎后的菌体以及上清液和经超声波破碎后的菌体重分别加入 5 克的苎麻，34℃进行脱胶。

2 结果与讨论

2. 1 不同的脱胶方案的效果比较

在脱胶 16 小时后的比较发现，方法二的效果比方法一的效果好。可能是由于在倒掉了部分液体后，剩下的菌体能够充分的与苎麻进行接触，菌体的生长状况较好。

2. 2 超声波破碎细胞中的问题

在破碎细胞的过程中，同时进行镜检，发现在累计约 5 分钟时细胞便已基本破碎。当破碎时间加长，果胶酶活性便损失的越大。所以这一步是整个实验的关键步骤。

2. 3 半乳糖醛酸标准曲线的测定:见图 16

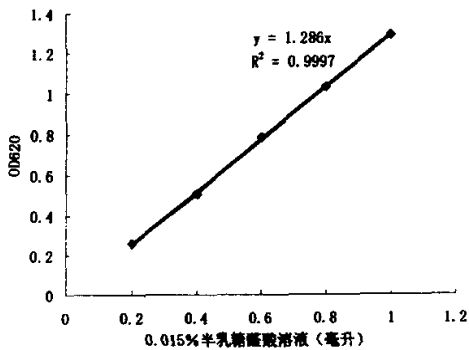


图16 半乳糖醛酸标准曲线

2.4 总蛋白浓度的标准曲线的测定:见图 17

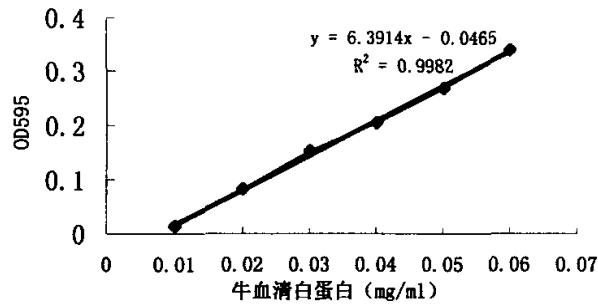


图17蛋白质浓度的标准曲线

2.5 胞外酶和胞内酶的果胶酶活和比酶活的比较:见表 10

表 10 胞外酶和胞内酶的果胶酶活和比酶活的比较

	胞外酶	胞内酶
果胶酶 (IU/ml)	1.02	0.01
比酶活 (IU/mg)	905.45	0.512

2.6 脱胶效果比较

实验结果说明:第一,就脱胶效果而言,采用新培养的菌液比用破碎细胞的酶液要好,说明脱胶可能是一些因子的综合利用;第二,破碎细胞的酶液对于脱胶是有作用的,应该说是具有重要作用的,这与 H.Tanabe 的观点一致,假如菌株丧失形成酶的能力,则脱胶作用也会失去;第三,该菌产生的果胶酶分泌到胞外的很

少，因此无法单纯用该菌产生的酶进行脱胶。菌在生长的过程中为保自身所需边生长繁殖边分解相关物质，因而脱胶是一个漫长的过程，这与单纯的酶促反应是有区别的。

第七章 讨论

对芽孢杆菌原生质体的制备来说,最合适的条件是 0.5mg/ml 的酶量, 34℃, 30min 的酶解条件, 对于欧文氏菌原生质体的制备来说,最合适的条件是酶浓度为 1.2mg/ml, 37℃酶解时间 30 分钟, 后者由于是 G^- , 其粘肽层的外侧有由蛋白质, 脂质核聚糖组成的外膜, 因此, 需要加入 EDTA, 因为它能螯合细胞壁上稳定的二价阳离子, 使溶菌酶便于作用, 因此其原生质体的制备率低于芽孢杆菌。

从融合子的形态及其生理生化特征来看, 融合子的绝大部分特征都与两亲本的特征类似, 融合子的菌落形态均与原菌株没有多大的区别; 有些融合子其形态特征类似于欧文氏菌, 但其革兰氏染色却类似于芽孢杆菌, 例如: 融合子 220、150、227 等; 但也有的融合子表现出与两亲本绝然不同的特点, 例如融合子 256, 它的细胞形态是以成对的球形排列; 在石蕊牛奶反应中, 绝大部分的融合子都与芽孢杆菌是相类似的, 是还原反应, 但是融合子 150、227 表现出了与两亲本不同的产碱的性状, 这些与亲本绝然不同的性状可能是由于两亲本的基因重组之后所表现出来的。在单糖和双糖的利用实验中, 所有的融合子都保留原菌株的产酸的特点, 在产气方面都是与原菌株芽孢杆菌相似, 即不产气。

在低温敏感性试验中, 只有融合子 220 与欧文氏菌相同, 对低温敏感, 因此融合子解决了原菌株欧文氏菌的菌种保藏问题。在以 CMC 为唯一碳源的培养基上, 只有欧文氏菌能够生长, 且有

透明圈，其余均不生长，说明只有欧文氏菌才含有纤维素酶，因此，融合子解决了原菌株欧文氏菌的由于纤维素酶的存在而导致的纤维强度的下降，这与苧麻脱胶效果中测定的结果是相一致的，所有的融合子及原始菌株芽孢杆菌的单纤维强度均比欧文氏菌的要强。但在平板果胶水解全测定试验的结果与苧麻脱胶效果中测定的结果是不完全吻合的。说明采用此法判断菌株的产酶能力具有的客观性较差。

从融合子的初筛来看，融合子的脱胶效果比欧文氏菌的脱胶效果较好的占有约 19%，但是在复筛的实验中，却只占有约 3.4%。一个可能的原因是由于在复筛时，菌株已经经过了多次传代，有些融合子由于不稳定，脱胶能力已经退化了。另一个可能的原因是实验设计上的改变，在初筛的实验中，菌液的量较大，菌体浓度较高，因此脱胶效果较好。所以与原菌株脱胶效果平行及高于它的比例有可能会偏高。从五株融合子和原株的脱胶实验中，可以看出在相同的培养和脱胶条件下，脱胶纤维三个纺织主要指标融合子脱胶数均好于原株 E₂₆₋₂₋₃，但与原株 B₁₂₋₁₃₋₂ 相比，则仅有 2 株融合子其脱胶纺织性能更好一些，另外 2 株则不及原株。有一株接近原株。纤维支数越高说明脱胶的深度越大，其中 142、229、256 和原株 B₁₂₋₁₃₋₂ 纤维支数均高于 1000Nm，单纤维断裂强度也在 5.0cN/tex 以上，断裂伸长率的提高，说明纤维的弹性增加。从脱胶纤维的可纺性能的改善说明融合子 142、229、256 有比原株更大的潜力。假如改进脱胶条件则有可能使其经济效益更能提高。同时，对欧文氏菌的脱胶机理进行了初步的研究。

参考文献

1. 苧麻纺纱学 纺织工业出版社 1989.6:1-5
2. 中国种子科属辞典 科学出版社 1958.11:74
3. 毛国杰 刘建华 任勇 亚麻抗锈病的分子基础 植物病理学报
2000, 8 Vol.30 NO.3 : 200-206
4. 李淑华、黄晶等 浅谈我国亚麻纺织工业的基本现状与发展趋势 纺织科学研究 1997, 4:1-5
5. 周景辉 杨汝男 张高华 纤维用大麻的开发利用 中国造纸
2001, 5:63-65
6. 潘其辉等 江西黄、红麻种质资源研究与评价 江西农业学报
1997, 9 (4) : 82-86
7. 杨礼富、刘正初等 红麻微生物发酵过程中脱胶酶的特性研究
热带作物学报 2001, 6 Vol. 22 NO. 2:76-81
8. 高东范 试论优质造纸原料红麻 河南科学 1998, 3 Vol 16 NO. 1:
119-122
9. 杨之礼等 剑麻纤维形态结构的特征 纤维素科学与技术 1993,
Vol. 1 NO. 1:38-43
10. 高铁生等 用罗布麻恢复污染地区盐碱土地植被的研究 内蒙
古环境保护 1999, 9 :9-15
11. 周笃珺等 柴达尔盆地的罗布麻植物资源与开发利用 青海科
技 1998, 6 Vol 5 NO. 2:47-48
12. 刘自镨 程海 任建平 大麻酶法脱胶机理初探 纺织学报

2001 Vol 22 NO.3 52-53

13. 刘自镭 冯瑞良 任建平等 芽孢杆菌 (*Bacillus sp* NO.74)
大麻脱胶酶系的研究 微生物学杂志 2000 Vol.20 NO.2 5-6
14. 吕忠 刘自镭 任建平等 红麻堆仓处理微生物区系分析
山东农业科学 2000 年增刊 P 107-108
15. 吴琼 刘自镭 放线菌果胶酶产酶条件及酶促反应条件的研
究 工业微生物 1996 Vol 26 NO.4 28-32
16. 《大麻脱胶工业用酶制剂》专题研究汇报材料 山东省纤维检
验局 山东大学 2000, 11:31
17. 龙德树 杨传强 曾宪庆等 亚麻和胡麻纤维的性能研究 纺
织学报 1999,6:136-139
18. 祝彦忠 王颀 何红岩等 果胶酶对草莓汁澄清效果的研究 河
北林果研究 2000, 9 Vol. 15 NO. 3: 262-264
19. 钱玉英、李孝辉、沙恩泳等 果胶酶高产菌株 *Aspergillus*
*niger*6034 的生理生化特征 浙江农业大学 1997 9 (4): 181
—184
20. 刘自镭 任建平 冯瑞良等 大麻酶法脱胶研究 纺织学报、
1999, 10 : 286—288
21. 王立群 亚麻微生物脱胶技术的研究 III 脱胶菌株适宜生长
繁殖条件的测试 东北农业大学学报 1998, 6 29 (2): 183—
188
22. 范西玉等 红麻细菌脱胶研究初报 (一) (二) 河南农业科学,
1991 (2): 11—12, 1991 (3): 8—10

23. 吴琼 放线菌果胶裂解酶的研究 山东大学研究生学位论文
1991,5
24. AliMM et al Effort of Vrea on the bacterial flora, acidity and
total nitrogen on retting water. Nuclear Sci Appli 1972(6):85-87
25. AliMM et al Influence of leaf, Vrea and quality of water on the
retting of juice. B.J. Jute Fib Res.1978(3):69-72
- 26 杨礼富 红麻微生物脱胶研究进展 中国麻作
2000, 22(3):34-37
- 27 Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat, Guy Condemine et al.
Regulation of Pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*
Annu. Rev. Microbial. 1996, 50:213-57
28. 管映亨 苧麻酶法脱胶的研究 上海纺织技术—纤维生产
1999 8 27 (4): 4—6
29. Microbio Pectolytic Enzymes John R. Whitaker 133-176
30. P. Albersheim, et al:Helv.Chim.Acta.43:1422(1960)
31. P. Albersheim, et al: Arch. Biochem. Biophys. 97:107, (1962)
32. 黄占育, 肖贵平等 橄榄汁饮料的研制 食品工业科技 1998
NO.6 : 46
33. 祝彦忠 王颀 何红岩等 果胶酶对草莓汁澄清效果的研究 河
北林果研究 2000, 9 Vol.15 NO.3: 262-264
34. 靳烨 果胶水解酶在果品加工中的应用 食品科技, 1994, (11):
25—29
35. 蔡志宁, 林炳芳 果胶酶对葡萄汁的非酶褐变也有一定的影响

- 佛山科学技术学院学报 (自然科学版) 2000, 9 Vol.18
NO.3: 66-69
36. 王鸿飞、师俊玲等 果胶酶和壳聚糖对猕猴桃果汁澄清作用的研究 饮料科技 梁灵 : 33-36
37. 尹军峰、钱晓军、罗龙新等 果胶酶提高茶汁膜分离性能的研究 饮料工业 2000, 6 Vol.3 NO. 6 : 30-33
38. 杨军、赵学慧等 果胶酶在苹果汁加工过程中的应用 中国酿造 1998, 2: 15-17
39. 林奇、杨振生等 果蔬型果肉饮料的生产及稳定性试验 云南农业大学学报 1999 3 Vol.14 NO.1: 76-79
40. 王晓霞、章克昌等 酒精高浓度发酵过程中果胶酶应用的研究 食品与发酵工业 Vol.27 NO.3: 44-47
41. 王森林 酶法澄清余甘果汁的研究 食品工业科技 1998 NO.1: 8-9
42. 陈炼红 田淑琴等 山楂饮料的加工工艺研究 西南民族学院学报 自然科学版 1999, 8 25 (3): 298-300
43. 郑海燕, 尹云龙等 油桃果汁饮料的加工技术 饮料工业 2001.4 Vol.4 NO.4: 33-34
44. 陈静 王淑军 杨从发 果胶酶产生菌的选育 淮海工学院学报 1999, 9 Vol.8 NO.3: 63-65
45. 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 齐齐哈尔大学学报 1998.3 Vol.14 NO.1: 63-66
46. 高正刚 甘肃省亚麻生产的现状及发展对策 甘肃轻纺科技

- 1998, 4:47-48
47. 刘自镭 王娜等 苧麻酶法脱胶研究 微生物学杂志 1991 5
Vol.11 NO.1: 48-53
48. 李振华 董颀 苧麻快速化学脱胶技术的研究 成都纺织高等
专科学校学报 2000, 10 Vol.17 NO.4: 5-8
49. 刘正初 彭元德 冯湘沅等 苧麻生物脱胶工艺技术与设备生产
应用研究 中国农业科学 2000, 33 (4): 68-74
50. Chaudhury S.D, Park. J. Sci , 1953.5: 11-18
51. Ali M.M Appl. Microbial, 1958.6: 87-89
52. 宋箭 沈司勤 陆广新等 苧麻微生物脱胶菌株初筛 生物学
杂志 1998, 10 Vol.15 NO. 5: 15-16
53. 汪测生 苧麻生物脱胶工艺技术的创新 四川纺织科学
2001,1: 4-6
54. Ferency, L., Kevei, F., Szegedi, M., et al . Factors affecting
high-frequency fungal protoplast fusion. Experimentia. 1972, 32:
1156-1158
55. Folder,K. and Alföldi,L. Fusion of protoplasts of *Bacillus*
megaterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .1976,73(6):2147-2150
56. Schaeffer, P., Cami, B., Hotchkiss, R. D. Fusion of bacterial
protoplasts. Proc. Natl Acad. Sci. USA.1976, 73(6)
2151-2155
57. Pesti M, Ferenxzy L. Formation and Regeneration of protoplast
from *phytophthora infestans* [J]. Acta phytopathol Acad. Sci

Hung, 1979 14(1-2):1-5

58. 陈劲春 尉渤 周代福 原生质体技术在工业微生物育种中的应用 工业微生物 1997 27 (4): 34—36
59. 陈劲春 尉渤 周代福 原生质体技术在工业微生物育种中的应用 工业微生物 1997 27 (4): 34—36
60. 微生物遗传生理实验技术 山东大学微生物系 1995.1 :69-71
61. 郭秀君 微生物学 山东大学出版社 1993.6:293
62. 微生物分类实验 山东大学微生物系 1996, 5
63. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19~23.
64. 李健武等 生物化学实验原理和方法 北京大学出版社 1997. 12:174-176

致 谢

首先,感谢我的导师刘自镕教授、任建平副教授!我能顺利的完成学业和论文工作同他们的悉心的指导是分不开的!他们勤勤恳恳的工作作风,严谨扎实的治学态度,宽厚谦逊的处世风格,都值得我去学习,他们所给与的谆谆教诲将使我受益终生。

感谢张桂珍老师,在学习和工作中给与我的支持和帮助。

在实验的过程中,陶菊红同学作了大量的工作,在此表示感谢。

同时也感谢本实验室的鲍明东、邢新苗、周豪、陈卓等同学。

最后感谢我的家人给我的帮助!