

摘 要

苧麻脱胶是从苧麻韧皮中精制苧麻纤维的重要初加工过程,传统化学脱胶工艺存在严重缺点,生物脱胶技术必将取代化学脱胶方法。新型嗜碱性芽孢杆菌能够合成高活性果胶酶和部分半纤维素酶,可以用来催化分解苧麻韧皮胶质,结合精练后处理,能够得到质量优良苧麻纤维。紫外线照射脱壁细菌细胞,人工培养筛选出一株果胶酶、半纤维素酶活性升高细菌,并分析了细菌合成酶液性质。基于最优化试验设计理论,安排酶法脱胶试验,建立回归方程,并结合最优化理论,借助于计算机,寻找到最佳酶脱胶工艺。初步探讨了酶脱胶机理,酶液浸渍苧麻韧皮,大部分果胶物质发生分解和一小部分半纤维素水解,生成酸性产物,其作用方式与化学脱胶存在差异。酶液浸渍生苧麻为碱液精练打开了屏障,胶质能够比较容易分散在溶液中,胶质去除作用温和,脱胶效果均匀彻底,纤维品质好。扫描电镜照片显示了酶脱胶的优点,纤维分散性好,纤维表面损伤很小,能够保持纤维表面的天然特性。化学脱胶对纤维表面产生了严重的剥蚀效应,纤维表面性能受到严重影响,改变了苧麻纤维的纺织加工性能。

关键字: 苧麻 酶 脱胶 优化 工艺

Process Optimization on Enzymatic Degumming of Ramie Fiber

ABSTRACT

Degumming is the most important pretreatment process to obtain the refined ramie fiber, there are many defects in the traditional chemical-degumming, and it will be replaced by the advanced biological degumming. The neotype basophil-bacillus can synthesize high-activity pectinase and some hemicellulase, which can be used as catalysts for hydrolysis of colloid matter in ramie bast, aided by light chemical refining and the super refined ramie fiber is obtained. The bacillus cells whose cell wall dissolved are treated with ultraviolet radiation, and an excellent bacillus is selected out manually, which can synthesize more high-activity pectinase and hemicellulase, and the rough enzyme mixture properties synthesized by this bacillus are analyzed. Based on optimal experiment design theory, the degummase experiment plan is designed, associated with optimization theory and aided by computer, the optimization process parameters is searched out. The degummase mechanism is preliminarily studied, when the raw ramie bast impregnated in rough enzyme mixture solution, the most pectin and some hemicellus get hydrolytic degradation, the acidic substance come out. The degummase manner is different from the chemical degumming. Ramie bast impregnated in enzyme solution can move away the barriers for alkali refining, and the colloid matter in fibers can be dispersively dissolved in solution easily, a soft degumming, uniformly & thoroughly, the super refined fiber is obtained. SEM reveals the advantages in degummase, excellent fiber separation, a light hurt to fiber, and the natural properties of fiber surface are protected. The chemical degumming give a drastic denudation to the surface of ramie fiber, and the natural surface properties are harmed very much, and the textile processability of ramie fiber is changed.

Zheng Jiede(Textile Material & Textile Product Design)

Directed by Prof. Liu Rongtong

Key words: Ramie, Enzyme, Degumming, Optimization, Process

目 录

└─┬─文摘

└─┬─英文文摘

└─┬─第一章绪论

└─┬─┬─1.1 苧麻纤维脱胶初加工

└─┬─┬─┬─1.1.1 苧麻化学脱胶

└─┬─┬─┬─1.1.2 苧麻微生物脱胶方法

└─┬─┬─1.2 苧麻微生物脱胶技术的发展

└─┬─┬─┬─1.2.1 微生物脱胶方法分类

└─┬─┬─┬─1.2.2 细菌脱胶的发展及研究现状

└─┬─┬─┬─1.2.3 酶法脱胶的发展及研究现状

└─┬─┬─1.3 本课题的研究意义和主要研究内容

└─┬─┬─┬─1.3.1 本课题研究意义

└─┬─┬─┬─1.3.2 本课题主要研究内容

└─┬─第二章基本理论

└─┬─┬─2.1 苧麻主要胶质及其特性

└─┬─┬─┬─2.1.1 果胶

└─┬─┬─┬─2.1.2 半纤维素

└─┬─┬─┬─2.1.3 木质素

└─┬─┬─┬─2.1.4 苧麻主要胶质间的相互联系

└─┬─┬─2.2 酶学基本理论

└─┬─┬─┬─2.2.1 酶的活性中心

└─┬─┬─┬─2.2.2 酶促反应主要影响因素

└─┬─┬─2.3 苧麻胶质的酶降解

└─┬─┬─┬─2.3.1 果胶质的酶降解

└─┬─┬─┬─2.3.2 半纤维素的酶降解

└─┬─┬─┬─2.3.3 木质素的酶降解

└─┬─┬─2.4 酶活性测试

└─┬─第三章实验材料与方法

└─┬─┬─3.1 选取菌株

└─┬─┬─┬─3.1.1 实验材料

└─┬─┬─┬─3.1.2 主要方法

└─┬─┬─3.2 酶法脱胶工艺优化研究

└─┬─┬─┬─3.2.1 实验材料

└─┬─┬─┬─3.2.2 实验仪器

└─┬─┬─┬─3.2.3 实验方法

└─┬─第四章选取菌株

└─┬─┬─4.1 原生质体紫外线诱变

└─┬─┬─┬─4.1.1 紫外线诱变育种原理

└─┬─┬─┬─4.1.2 诱变方法

└─┬─┬─4.2 选取脱胶菌株

4.2.1	细胞紫外线诱变致死率
4.2.2	筛选菌株
4.2.3	诱变菌株的生长特性
4.2.4	细菌产酶曲线变化
4.2.5	酶液最适 pH 变化
4.2.6	酶液最适温度变化
4.2.7	底物亲和性变化
4.2.8	金属离子对酶活性的影响
4.2.9	选取脱胶菌株
4.3	酶液稳定性分析
4.3.1	酶液的 pH 稳定性
4.3.2	酶液的热稳定性
5	第五章酶脱胶工艺优化
5.1	5.1 酶法脱胶工艺优化研究
5.1.1	5.1.1 试验设计
5.1.2	5.1.2 建立回归方程
5.1.3	5.1.3 求解最优化工艺
5.1.4	5.1.4 最优化结果讨论
5.2	5.2 苧麻酶脱胶机理分析
5.2.1	5.2.1 酶法脱胶及其影响因素分析
5.2.2	5.2.2 酶水解产物分析
5.2.3	5.2.3 酶麻化学成分变化
5.2.4	5.2.4 电镜扫描结果
6	第六章结束语
	致谢
	参考文献

第一章 绪 论

在中国古代，衣服面料主要有两种，一种是蚕丝织成的“帛”，另一种是为苧麻纤维织成的“布”。在殷墟出土文物中，能够看到丝和麻的象形文字。苧麻做衣物具有十分悠久的历史，在春秋时期，上层阶级已把苧麻布视为十分珍贵的织物，作为礼品相互馈赠，长沙马王堆一号汉墓出土文物中就有精细苧麻布。在世界上享有盛誉的中国夏布，为民间优良传统纺织品^{[1][2][3][4]}。

苧麻，被外国人称作中国草（China Grass），为荨麻科多年生草本植物，是中国一大特产。苧麻纤维细长，强力高，吸湿性强，散湿导热快，是一种优良的纺织原料。苧麻织物具有挺括、透气、易干、不粘身等优点，具有良好的穿着服用性能，适宜做夏季服装，在回归大自然的时尚追求中，为人们青睐的高级面料。苧麻纤维强力高，玻璃化温度高的特性，使苧麻纤维还广泛应用于产业纺织品和复合材料开发上^{[1][3][4]}。

1.1 苧麻纤维脱胶初加工^{[1][4][5][6]}

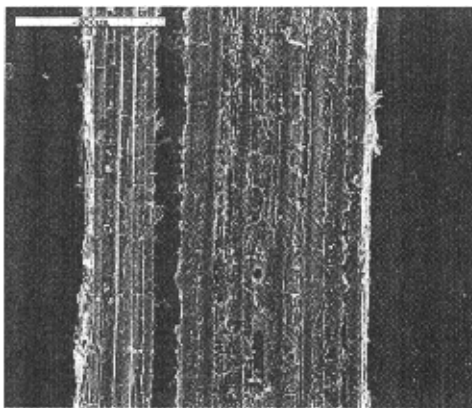


图 1-1 原麻 100 倍扫描照片

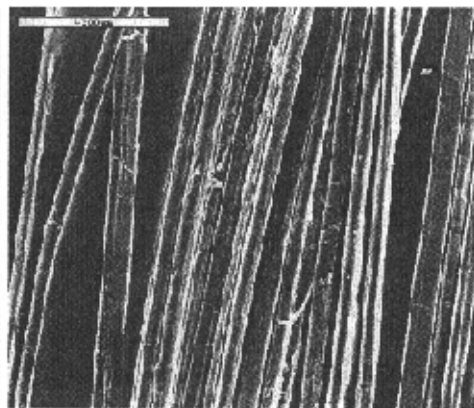


图 1-2 精干麻 200 倍扫描照片

苧麻纤维是一种植物韧皮纤维，是苧麻韧皮经过脱胶加工抽取出来的。天然苧麻茎杆皮层被剥制下来，经过“刮青”，去掉韧皮层外面的表皮，晾干得到原麻^[3]，这是一种纤维被各种胶质粘结在一起的片条状物。在苧麻原麻 100 倍的扫描照片（图 1-1）中，我们可以清晰看到，苧麻纤维被外面的胶质包围着，被粘结在一起形成整块，单纤维无法分散开，显然，这是无法直接用来进

行梳理纺纱的。因此，在纺纱之前必须将原麻中的胶质充分去除掉，让苧麻单纤维相互分散开，使它适合于梳理和纺纱，这一胶质去除过程称之为“脱胶”。在脱胶后的 200 倍精干麻扫描照片（图 1-2）中，胶质已经被去除掉，纤维已经相互分散开来。经过上油、堆仓养生和软麻处理，就能够满足梳理和纺纱加工。

对原麻进行化学成分分析，在原麻中，除大部分的纤维素外，存在的非纤维素成分主要有水溶物、脂蜡质、果胶、半纤维素和木质素（见表 1-1），非纤维素成分大约占到 30%左右。其中，水溶物和脂蜡质能够溶于热水中，在苧麻脱胶中，主要去除果胶、半纤维素和木质素等难溶于水的成分，实现纤维相互分散开。

原麻化学成分分析

表 1-1

品种 成分	湖南 黄壳早	湖南 芦竹青	桃源 湘苧 I 号	湖南 白脚麻	湖北 细叶绿	江西 铜皮青	10 个 平均
脂蜡质	0.58	0.37	0.20	0.67	0.64	0.49	0.52
水溶物	6.29	6.02	6.10	7.55	7.44	7.27	7.03
果胶	3.94	4.03	3.77	4.04	3.59	3.61	3.81
半纤维素	12.57	11.77	13.00	13.06	13.07	12.59	13.14
木质素	1.28	1.08	1.14	1.10	1.90	0.46	1.03
灰分	2.95	3.04	3.62	3.89	2.94	2.85	3.26
纤维素	75.34	76.74	75.78	69.82	73.37	75.46	74.47
总胶质	22.36	21.74	21.70	24.55	22.46	23.11	23.19

脱胶后得到的精细苧麻纤维称为精干麻，精干麻品质的好坏，直接关系到梳纺加工和最后产品质量。原麻胶质的去除，改变了苧麻纤维的浸透性，使纤维产生均匀毛细管渗透作用，有利于苧麻纤维的梳纺加工以及苧麻织物的后整理。脱胶生硬，纤维并结多，纤维粗硬，在后道加工中需要增加软麻用油量，梳理困难，落屑，麻卷重量不均匀率增加，牵伸不匀率升高。脱胶均匀彻底，纤维柔软度高，纤维之间的接触面积大，纤维之间的抱合力和摩擦力也大，成纱强力高，细纱断头降低。同时，成纱毛茸减少，细纱光洁、美观、柔软耐磨、手感改善，能够为后道工序提供更好的纱线产品。脱胶是苧麻纺织加工最基本的，最重要的工序。

1.1.1 苧麻化学脱胶^{[4][5][6]}

目前，国内苧麻纺织生产企业广泛采用以烧碱为主，并辅助于“先浸酸后氯漂”的化学脱胶工艺。这一脱胶工艺沿续了 20 世纪 30 年代，鄞云鹤，钱宝钧等人开创的“先浸酸后碱煮”的苧麻化学脱胶方法。化学脱胶通过对原麻进行强酸浸泡和强碱 NaOH 高温高压煮练，然后，用机械打洗除去剩余杂质，其基本原理是利用苧麻韧皮中纤维素和胶杂质成分对无机酸、碱和氧化剂等的稳定性不同，来去除胶杂质成分。为众多厂家所广泛使用的“二煮一漂法”苧麻脱胶工艺流程如下：

原麻—分级扎把—装笼—浸酸、水洗—I 道煮练—II 道煮练—拷麻—漂白—酸洗—两道水洗—轧干—浸油—离心脱水—抖麻—烘干、分等拣麻—入库

化学脱胶完全依赖于化学试剂对胶质的化学反应，依靠强烈的高温高压煮练来去除胶质，存在的主要缺点是，需要耗费大量化工原料，在高温高压条件下，保持比较长的煮练时间，能源消耗大，脱胶废液严重污染环境，脱胶生产成本低，工艺流程长，劳动强度大，劳动条件差。化学煮练过程对苧麻纤维的性能和结构，尤其是纤维的表面性能造成了严重损害，胶质脱除不彻底，不均匀，精干麻制成率低，纤维抱合力差、大大降低了纤维的梳纺加工性能，成纱质量比较差，织物手感粗硬，服用刺痒，没有保持苧麻天然植物纤维的自然风格和特性，严重损害了苧麻天然植物纤维织物的高贵品质。当今世界对纺织加工提出了比较严格的生态环境要求，除了要求整个加工过程尽量减少对环境的污染外，还要求加工过程本身尽量减少化学品的使用。化学脱胶已经与时代发展很不相符，长期以来，人们就在进行生物脱胶研究。

目前，苧麻化学脱胶的发展趋势是高效、快速、短流程、连续化、机械化和自动化，为了利于后道加工，要求脱胶处理后的纤维呈平直整齐的带状精干麻。目前，日本和台湾在苧麻化学脱胶自动化方面的研究处于世界比较领先的水平。在日本，苧麻脱胶采用锅煮和水理机处理，机械化、连续化生产程度比较高，劳动强度低，劳动条件大大改善，生产的精干麻平直整齐松散柔软。在国内，由于技术进步缓慢，目前，大多数苧麻纺织生产企业，依然沿用多年的

化学脱胶老工艺。关于化学脱胶研究论述比较多，如各种快速脱胶助剂研究，减轻刺痒感的预氧、预氯处理等等^{[6][7][8][9]}。这些研究在一定程度上提高了化学脱胶纤维质量。

1.1.2 苧麻微生物脱胶方法^{[1][2][3][4][6][7][11]}

苧麻微生物脱胶具有十分悠久的历史，诗经·陈风中有“东门之池，可以沤麻”。“沤麻”，就是将麻杆直接置于池塘或河沟中浸泡，在微生物作用下，果胶等杂质被分解掉，最后得到苧麻纤维。目前，在世界各主要亚麻原料产地，还广泛使用的雨露“沤麻”和温水“沤麻”，也是天然微生物脱胶方法。雨露“沤麻”，是将亚麻茎杆直接铺在空旷田野里，曝露 2~10 周，让微生物在麻杆上面繁殖，分解胶质。温水“沤麻”是将麻杆直接浸泡在一定温度的水泥池中，去除胶质。

天然降解胶质的方法，操作简单，应用比较广泛。这种方法存在的主要缺点是脱胶周期长，依赖于合适的微生物生长环境，易受到气候影响，杂菌多，纤维品质差，质量不稳定，不适应工业生产要求^[12]。1958 年，Machammadh 和 Betrabet 分别对多粘芽孢杆菌和假单胞菌的浸解活性进行了研究，开始关注生物脱胶技术的工业生产应用^{[13][14]}。通常所说的生物脱胶是在工业化条件下，把产生脱胶酶的真菌或细菌在实验室中进行分离提纯，通过人工发酵，把产生的大量酶液或者细菌用来作用苧麻韧皮，分解胶质，生物脱胶的优点是发酵快，杂菌少，质量好而且易于控制，随着细菌的提纯优化，可以不断提高脱胶效果。

与天然降解胶质不同，工业化条件下的微生物脱胶实现了人工对脱胶工艺的有效控制，大大缩短脱胶时间，提高了脱胶质量，通过对菌株的诱变和优化，使之不断满足脱胶加工要求。微生物脱胶技术，依赖生物方法去除胶质，能够减少化工原料使用和能源消耗，减少环境污染，顺应时代发展要求，微生物脱胶对纤维损害小，保留了苧麻纤维的天然特性，能够提高纤维品质，真正展现天然植物纤维的高贵品质，受到各苧麻纺织生产厂家的高度关注。人们对工业化条件下的苧麻微生物脱胶的研究已经进行了多年，取得了许多积极的成果。这几年，随着微生物脱胶的研究发展，专家预言，微生物脱胶取代化学脱胶已

成必然趋势。将当今最新生物技术如基因工程，基因重组等应用苧麻脱胶细菌的筛选和诱变上，无疑必将大大促进苧麻生物脱胶的发展，为苧麻微生物脱胶的发展创造新的奇迹。

1.2 苧麻微生物脱胶技术的发展

1.2.1 微生物脱胶方法分类^{[6][7]}

根据微生物脱胶处理工艺的不同，可以把微生物脱胶主要分为细菌脱胶和酶法脱胶两大类。

细菌脱胶是把脱胶细菌进行扩大培养，然后将其接种在生苧麻上，在适宜环境条件下，让细菌大量繁殖，在细菌繁殖生长过程中，细菌为了获取能量物质，分泌酶液来分解胶质，将果胶和半纤维素等大分子，分解为小分子而溶于水中，最后实现纤维的相互分离，这就是通常所说的“以胶养菌，以菌脱胶”。与细菌脱胶处理方式极为相似的还有真菌脱胶，主要使用霉菌，将霉菌接种在生苧麻上，让其繁殖，分解胶质。

酶法脱胶是把主要产果胶酶、半纤维素酶的微生物，在营养基溶液中扩大培养一段时间，用微生物产生的粗酶液，来浸渍生苧麻，来催化水解胶质，实现纤维的分离。也可直接用果胶酶制剂和其他辅助酶制剂的稀释溶液，来浸渍生苧麻，进行脱胶加工。合成脱胶酶液的微生物主要有两种，一种是真菌，另外一种细菌。真菌酶液，多含纤维素酶，酸性作用条件，纤维强力有损害。在国内，对酶法脱胶的研究，多使用嗜碱性芽孢杆菌合成粗酶液进行脱胶研究。

细菌脱胶与酶法脱胶相比，存在一个显著的不同，细菌脱胶是直接将培养好的细菌接种在生苧麻上，让细菌在生苧麻上繁殖，分解胶质，酶法脱胶是用细菌培养后的代谢产物，即酶液来浸渍生苧麻，让生物酶来催化水解胶质，从工艺上讲，与细菌脱胶相比，酶法脱胶操作灵活，可以添加多种辅助酶制剂，并且，细菌培养与脱胶过程分开，质量容易控制，国内对酶法脱胶的研究比较多见。

1.2.2 细菌脱胶的发展及研究现状

国外关于细菌脱胶研究比较少，比较多见的是黑曲霉真菌脱胶研究，直接

将真菌接种在生苧麻上进行脱胶试验。真菌脱胶存在许多缺点，真菌生长速度慢，脱胶周期长，一般需 5~7 天，酸性生长条件，真菌会产生纤维素酶，纤维强力容易受到损害，残胶率高，脱胶效果并不是十分理想，不能满足工业生产要求^{[7][15][16]}。

国内研究比较多的是中性细菌脱胶，1972 年，中国农业科学院麻类研究所开始苧麻细菌脱胶研究，且主要研究中性细菌脱胶，并与多家纺织企业合作进行生产试验。1985 年，中国农业科学院麻类研究所与益阳苧麻纺织印染厂合作，进行了细菌与化学联合脱胶生产试验，其中，细菌脱胶工艺：诱变菌株 T₆₆，浴比 1:10，温度 40℃~46℃，处理时间 12h；精练：NaOH 浓度 5g/L，三聚磷酸钠 1%，浴比 1:12，压力 0.2Mpa，时间 1.5~2h。该工艺与化学脱胶相比，精干麻质量有较大改善，制成率和正品率有较大提高，节约生产成本，大幅度减少化工药品的耗费，降低环境污染，体现了生物脱胶的一些优点。由于苧麻胶质结构的复杂性，单靠细菌实现胶质的全部降解，还存在许多困难。细菌脱胶工艺路线采纳了细菌脱胶预处理，再辅助于碱液精练后处理的细菌化学联合脱胶工艺。早期细菌培养工艺比较复杂，质量难以控制，并未得到生产应用^{[17][18][19][20]}。

进入 90 年代，中国农业科学院麻类研究所对细菌脱胶研究有了新发展，最新研究成果认为能够实现细菌对胶质的全部分解。所用菌株 T85—260，生物特性：革兰氏阴性无芽孢杆菌，兼性好氧，可在 pH5.0~9.0 的范围内生长，最适生长 pH6.5~7.0，适宜生长温度为 27℃~42℃，接种 2~4h 进入对数生长期，葡萄糖营养琼脂平板培养 12~14h，长成皮膜状微透明菌苔。菌种制备工艺，保藏菌种，在温度 35℃左右，不通压缩空气，搅拌培养 8h，然后在菌种罐中扩培 5~7h，完成脱胶菌种制备，将扩培好的菌种接种到生苧麻上，发酵处理 5~8h，完成细菌脱胶，常规脱胶后处理，得到质量优良精干麻^{[22][23][24]}。

从苧麻胶质结构分析和对企业应用情况考察来看，并没有实现细菌对苧麻胶质全部分解。中性细菌脱胶存在的主要缺点，容易污染杂菌，细菌培养工艺复杂，细菌生长与脱胶同时进行，工艺控制难度较大，苧麻纤维强力低，细菌

脱胶废液污染环境^[25]，对人体健康不利，需要对细菌脱胶的生物安全性进行分析。

1.2.3 酶法脱胶的发展及研究现状

1972 年，Fogarty W.M. 和 Ward O.P. 提出在麻类韧皮纤维脱胶中，使用产生果胶酶的微生物和果胶酶制剂，探讨了生物酶脱胶的可行性^[26]。日本研究人员通过研究发现分解韧皮胶质的果胶酶有“内切式”和“外切式”两种，可以调节这两种果胶酶的双重作用，提高脱胶效果^[7]。国外出现了一些真菌果胶酶脱胶研究，日本人腾重升永用 Doricerase 酶制剂处理 30g 苧麻，反应 7h 后再经稀碱液处理，得到纯净苧麻纤维^{[30][31][32]}。美国人 Michael C. Jaskowski 用别黑曲素（取自黑曲霉）酶液脱胶处理经过活性剂洗涤生苧麻^[15]，印度纺织介绍了黑曲霉所产果胶酶的脱胶研究。霉菌合成的果胶酶液中含有纤维素酶，酶水解条件为酸性，纤维强力损害严重，霉菌生长速度慢，处理周期长，脱胶效果不理想，不适应苧麻脱胶生产要求，大多研究停留于试验阶段^{[7][16]}。

国内关于生物酶脱胶研究比较多，主要分为酶制剂脱胶和细菌所产粗酶液脱胶两个方面。直接用果胶酶、半纤维素酶等酶制剂进行脱胶处理，试验表明，温和条件下酶液浸解能够取代常规加温硫酸浸泡和一次高温高压碱煮，纤维损伤减小。酶粉剂脱胶工艺灵活，可以添加多种辅助酶制剂，并可多次酶液浸渍。近年来，汤懋兹教授对全酶法脱胶进行了研究，在苧麻酶法脱胶的基础上，使用半纤维素酶制剂来代替酶法脱胶中的热碱煮练，并完成了全酶法脱胶小试工作。全酶法脱胶，苧麻的质量包括纤维品质、原麻脱胶后的制成率、精干麻和精梳麻条的档次都有较大的提高。全酶法脱胶所得精干麻还有一个显著特点是纤维柔软、蓬松卷曲、手感好。但是，商品酶粉剂价格昂贵，生产成本低，酶活性不稳定，厂家难以接受^{[7][26][27]}。

国内研究最多的是细菌发酵粗酶液脱胶，所用细菌为主要能够合成果胶酶的嗜碱性芽孢杆菌。这是一种生长于碱性环境杆菌，繁殖速度快，产酶活性高，除了合成果胶酶外，还能合成半纤维素酶，但不产生纤维素酶，十分适合于苧麻脱胶研究。从 20 世纪 70 年代初开始，国内不少研究机构对嗜碱性芽孢杆菌

酶脱胶进行了大量研究^{[28][29][30][31][32][33][34][35]}。

苧麻酶法脱胶技术的兴起，需要分析苧麻胶质结构和制定各种测试方法，最重要的是要寻找脱胶工程菌。1989年，株洲苧麻纺织印染厂与中国科学院遗传研究所合作，承担了原纺织部和湖南省计委重点科研项目“苧麻脱胶遗传工程研究”。该项目的研究成果对脱胶菌种的选育提供了准确的目标和方向，开发了多种脱胶酶工程菌，提供了酶脱胶的基因供体，为酶法脱胶技术的发展打下了良好基础^[7]。

野生细菌合成酶液不能满足脱胶要求，需要细菌进行驯化。所谓驯化是指微生物群体在经历数代的繁殖后对剧烈的环境变化或对不适合生存的环境条件所作出的形态和生理适应过程，以便能在新的环境中生存下去。这里的驯化就是诱导野生细菌合成高活性的果胶酶和半纤维素酶。武汉大学曹军卫等人对野生嗜碱性芽孢杆菌进行了驯化研究。将土壤中分离出的嗜碱芽孢杆菌菌株，在含有碳源、氮源和无机盐的培养基中，进一步分离纯化，再把纯化细菌，培养在果胶培养基中，诱导产生高活性果胶酶，再分离出产高活性果胶酶细菌，接种在槐豆胶培养基中驯化诱导产甘露聚糖酶，最后将筛选出产果胶酶和甘露聚糖酶酶活高的菌株，经利福平突变筛选出最后的脱胶产酶细菌。野生细菌经过驯化后，产酶质量高，提高脱胶效率，纤维质量提高，菌株不易被污染，酶液活性稳定^[32]。

除了筛选，诱导培养细菌外，国内对芽孢杆菌合成粗酶液进行了大量生产试验。1991年11月~92年6月，株洲苧麻纺织研究所进行了100吨酶法脱胶生产试验，该试验进行了6个月，中试2个月。酶脱胶工艺：菌种制备—酶脱胶—精练—拷麻—漂酸洗—给油—脱油水—抖麻—烘干，其中酶脱胶工艺参数：浸渍时间8h，温度38℃~44℃；精练工艺：碱液浓度3~5%，浴比1:9，压力0.2MPa，时间2h。该生产试验表明，这种联合脱胶工艺处理精干麻质量能够满足生产要求，纤维柔软、蓬松卷曲，手感好，有利于纺织加工。该试验初步了解了苧麻酶脱胶进入大规模工业化生产的可行性，建立了比较合理的酶脱胶工艺路线，为进一步扩大生产规模积累了资料 and 实践经验^[27]。

苧麻胶质结构的复杂性，细菌合成酶液组分不能分解所有胶质，酶脱胶也采用了酶液预处理和化学精练的联合脱胶工艺。嗜碱性芽孢杆菌主要合成果胶酶，半纤维素酶合成能力比较低，存在于苧麻中的主要去除对象，半纤维素并没有得到有效去除，需要精练来去除剩余胶质。为了提高合成酶液中半纤维素酶含量，中国科学院成都生物研究所陈一平等将合成高活性果胶酶、木聚糖酶、和 β -甘露聚糖酶的三株同种属芽孢杆菌在同一培养基上混合培养，再将三株菌所产混合酶液进行脱胶研究，并未去除全部胶质，仍需经化学精练，但是这种混合工艺一定程度上提高了脱胶效果^[32]。

国内对酶法脱胶研究多年，研究内容比较广泛，但真正生产应用很少。早期酶法脱胶，细菌产酶活性不高，与传统化学脱胶相比，需要变换操作工艺，企业需要投资发酵设备，配置专职生物酶脱胶技术人员，企业粗放的经营方式，使得酶法脱胶未能得到生产应用。20 世纪 70 年代开始，人们对“绿色纺织品”的追求日趋强烈，环境保护的迫切要求，企业为了提高苧麻产品档次，酶法脱胶得到了新的生产应用。经过多年培育，芽孢杆菌合成酶液质量已有很大提高，出现了新的苧麻酶法脱胶工艺，纤维品质有很大提高，得到了生产应用。企业完成酶液制备到脱胶的整个过程，生产成本低，质量稳定，在实际应用中取得了比较好的效果^[35]。碱性芽孢杆菌合成粗酶液脱胶研究已经多年，并未解决苧麻脱胶全生物处理。热碱液能够溶解大量半纤维素，从生产经营角度和目前的研究水平考虑，保留一道比较温和的碱液精练工序，也是很有必要的。实现全酶生物脱胶处理，需要进一步寻找合成高活性半纤维素酶细菌，这有赖于生物技术的进一步发展。

1.3 本课题的研究意义和主要研究内容

1.3.1 本课题研究意义

新的时代，人类越来越多地关心爱护自己，工业时代严重的环境污染给人类带来了巨大忧伤，追求“绿色产品”不仅是一种心理需要，同时，更是人类爱护自己，爱护地球的进步标志。服装，作为与人朝夕相处关系密切的纺织品，更是得到人们的仔细关注^[36]。苧麻服装作为高档天然植物纤维织物，为人们

所青睐。传统化学脱胶需要耗费大量化工原料，能源消耗大，严重污染环境，生产成本低，劳动条件差，与可持续发展战略不符，为环境保护所不能容忍。强烈的化学煮练过程严重损害苧麻纤维性能和结构，尤其是纤维表面性能，胶质脱除不均匀彻底，精干麻制成率低，纤维抱合力差、大大降低了苧麻纤维的梳纺加工性能，成纱质量比较差，织物手感粗硬，服用刺痒，没有保持苧麻天然植物纤维的自然风格和特性，严重损害了苧麻织物的高贵品质^[19]。为了保护环境，节约生产成本，追求苧麻脱胶的“绿色加工”，进一步提升苧麻服装的高贵品质，苧麻纺织企业高度重视生物脱胶技术的生产应用研究。近年来，出现了新的酶法脱胶工艺，企业自主完成细菌培养，酶液制备到脱胶的整个生产过程，无须外购酶制剂，生产成本低，酶液安全无毒，操作简单灵活，工艺质量容易控制，纤维质量优良，脱胶质量稳定，取得了比较好的脱胶效果，得到了生产企业认可。所用高效产酶菌株，产酶体系比较完善，除了合成高活性果胶酶外，还能合成活性较高的半纤维素酶^[35]。新酶法脱胶工艺存在应用比较粗糙，没有对酶脱胶工艺进行最优化设计。本课题基于这一新的酶法脱胶工艺，筛选细菌，分析细菌合成酶液性质，寻找最优化酶脱胶工艺，并对酶脱胶机理进行分析。这些研究为进一步探讨酶脱胶机理，提高酶法脱胶效果，促进苧麻生物酶脱胶发展，具有积极意义。

1.3.2 本课题主要研究内容

本课题基于生物诱变理论，对合成酶液的菌株实施原生质体紫外线诱变，筛选出优秀产酶细菌，并分析了细菌合成粗酶液性质，主要对酶法脱胶工艺进行了最优化设计，初步探讨了酶法脱胶机理。本课题主要研究内容可分为三部分：

1.3.2.1 诱变细菌^{[37][38][39][40]}

运用广泛使用的紫外线原生质体诱变方法，对细菌进行紫外线诱变处理，筛选出产果胶酶活性高，同时，产半纤维素酶活性高的脱胶菌株，分析了细菌在紫外线诱变规律，并对细菌合成酶液性质进行了分析。

1.3.2.2 苧麻酶法脱胶工艺最优化设计^{[41][42][43][44][45][46][47]}

基于最优化回归试验设计方法,运用三因子二次回归旋转组合设计,安排试验,编制计算程序,建立回归方程,结合最优化理论,借助于工具软件,求解最优化脱胶工艺条件,并与优化前的纤维品质作了对比分析。

1.3.2.3 酶法脱胶机理分析^{[26][48][49][50]}

分析酶脱胶过程,对苧麻酶脱胶的影响因素,如酶液浓度、时间、温度、pH值等对脱胶率的影响进行分析,定性分析酶脱胶液性质,分析酶液浸渍后苧麻纤维化学成分变化,对原麻、酶处理麻、酶处理精干麻、纯化学脱胶精干麻进行电镜扫描,对比分析胶质去除情况,纤维分离情况,纤维表面特征变化情况。

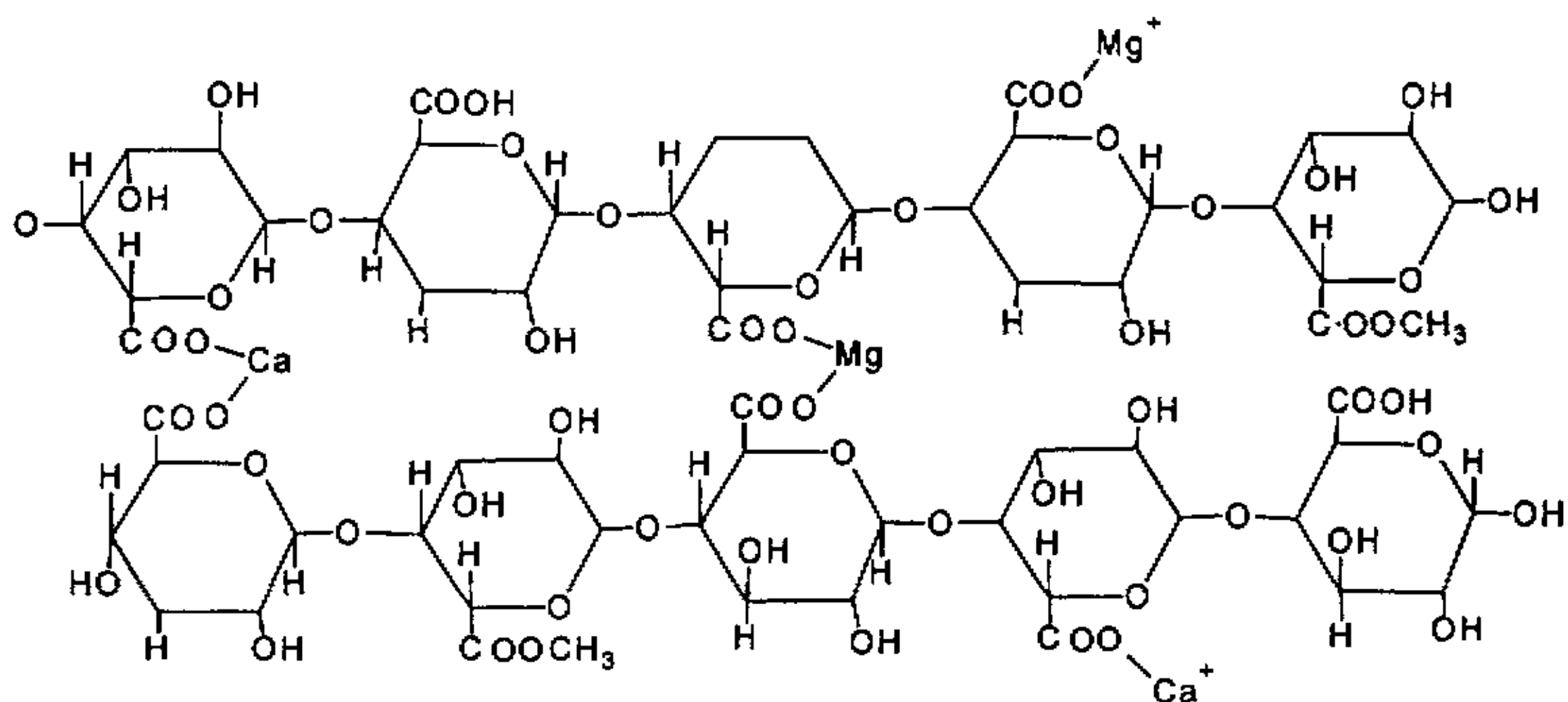
第二章 基本理论

2.1 苧麻主要胶质及其特性^{[1][2][3][4][5][6]}

在苧麻韧皮中，难以去除的胶质主要是果胶、半纤维素和木质素，因为这三种胶质都不是由一种结构的物质组成，具有十分复杂的化学结构，并且胶质之间关系复杂，化学稳定性高。

2.1.1 果胶^{[4][5][6]}

果胶存在于苧麻纤维细胞的胞间层和初生壁中，其中胞间层基本上是由果胶物质组成。果胶在苧麻纤维细胞组织中起着“粘和”的作用，果胶的分解会引起纤维细胞的离散。在化学结构上，果胶质主要是由 D-半乳糖醛酸以 $\alpha-1,4$ 糖苷键连接形成的直链状的聚合物。

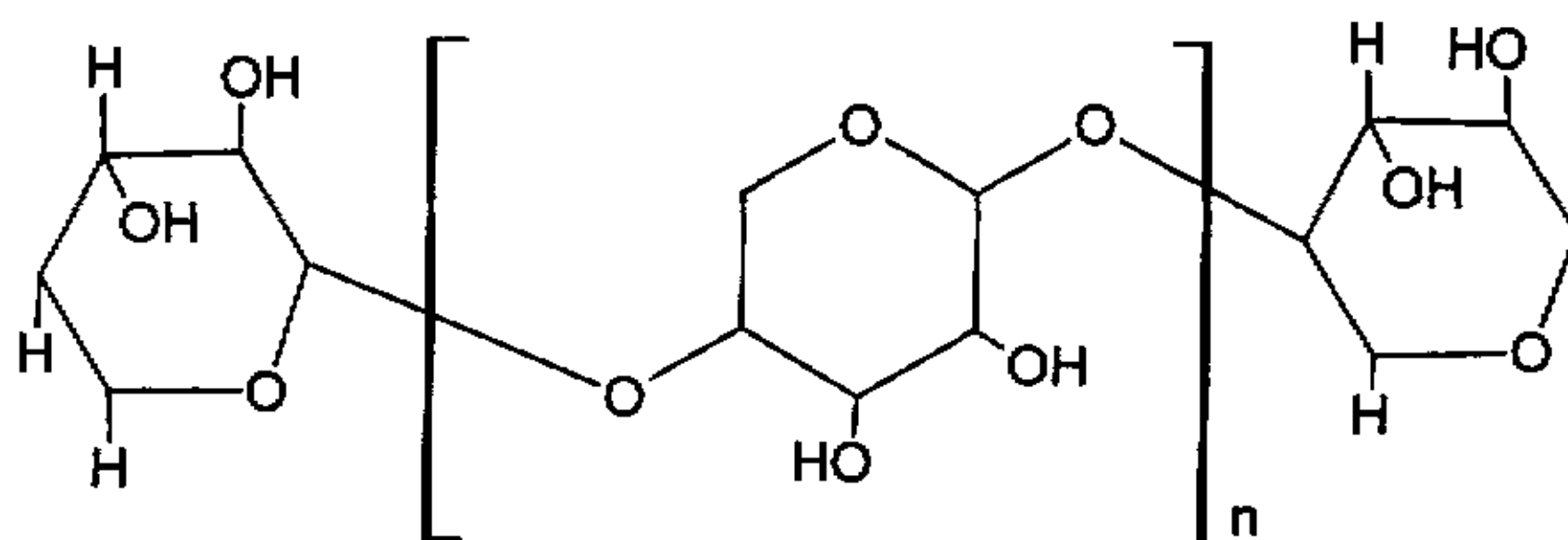


果胶大致结构

在纤维细胞成熟之前，果胶是以原果胶态（水溶性果胶酸）的形式存在，纤维细胞成熟之后，在酶的催化作用下，水溶性果胶酸逐渐变为果胶脂酸且部分呈溶解状态而存在于细胞液中。果胶脂酸是甲基化的多聚半乳糖醛酸，甲氧基含量为 1% 的叫果胶酸。在植物生长过程中果胶酸与钙、镁结合形成不溶于水的果胶酸钙、镁盐，这种盐类与果胶脂酸以部分单独、部分混联的形式组合在一起形成具有网状结构的复合物。这种网状结构究竟是平面的还是立体的，现在还不清楚。去除果胶物质，需要破坏这种网状结构。

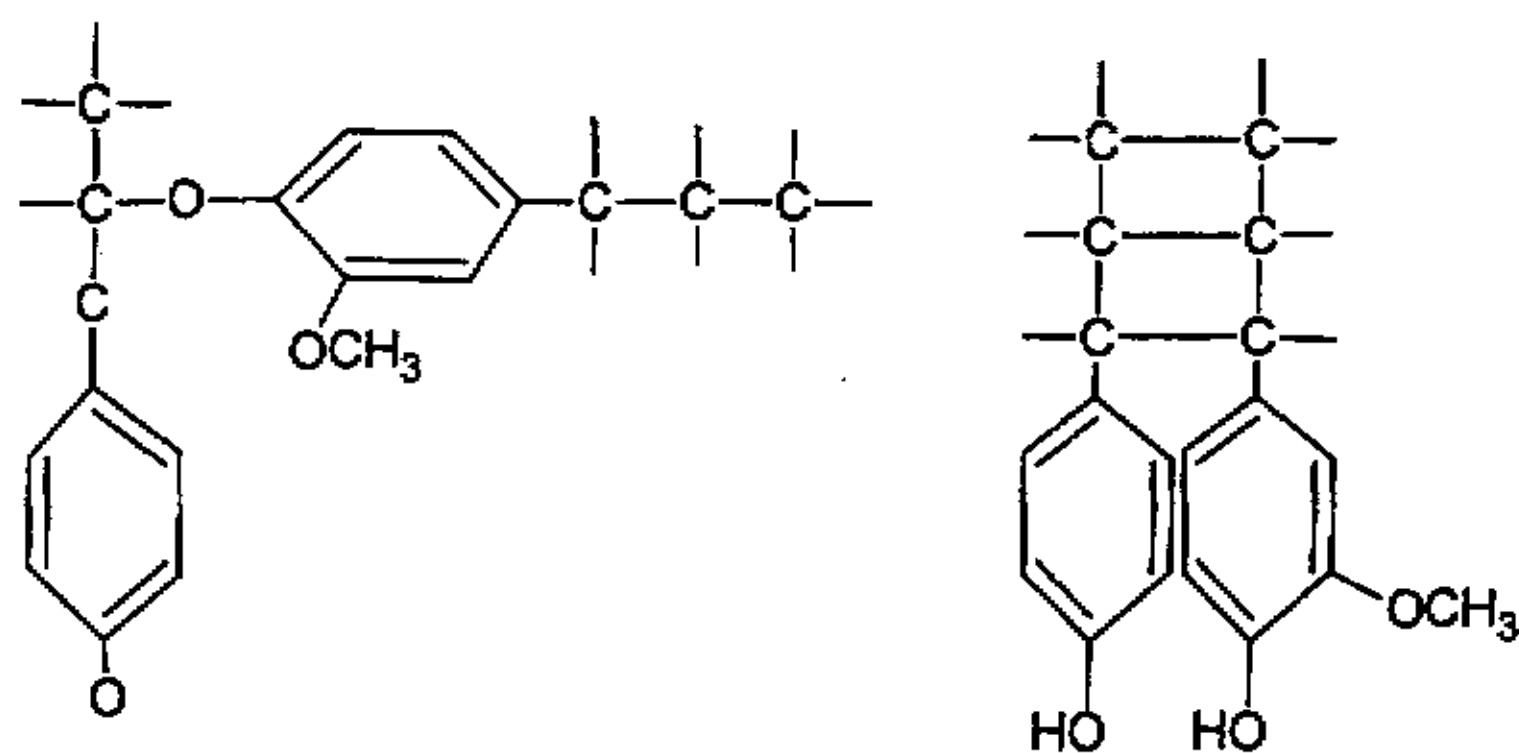
2.1.2 半纤维素^{[51][52]}

苧麻纤维细胞壁中的纤维素和木质素是由一类聚糖混合物紧密地相互贯穿在一起的,这类聚糖混合物被称为半纤维素,半纤维素能够被碱液抽取出来。在苧麻纤维细胞壁中,半纤维素与纤维素紧密结合在一起的,但是半纤维素不是纤维素合成过程中的前驱物质,半纤维素的合成与纤维素的合成无关。与纤



多缩戊糖大致结构

维素不同,半纤维素不是均一聚糖,而是一群复合聚糖的总称。在化学结构上,半纤维素主链由 D-木糖基、D-甘露糖基与 D-葡萄糖基或 D-半乳糖基组成,其他糖基以支链形式连接于主链上。各种糖基在构成半纤维素时,一般不是由一种糖基构成一种均一的聚糖,而是由 2~4 种糖基构成的不均一聚糖,从多缩戊糖大致结构可以看出半纤维素的结构是十分复杂的。

2.1.3 木质素^{[4][5][6]}

木质素大致结构

木质素在植物中的作用主要给植物以一定的机械强度,它是构成植物细胞壁的主要成分之一。木质素是一种无定型的高分子化合物,在化学结构上,一致认为木质素是芳香类化合物,其结构单元为苯环上有三个碳原子侧链,属于苯丙烷的衍生物。在苧麻韧皮中,木质素的结构单元之间是由碳水化合物---

碳水化合物键或醚的任何一种其他的横向键连接起来的。

2.1.4 苧麻主要胶质间的相互联系^{[9][51][52][53]}

苧麻纤维微观结构研究表明, 苧麻纤维是由纤维素、半纤维素、木质素等组成的一种三度空间混合物。苧麻胶质是一种无定形结壳物质, 绝大部分存在于纤维素细胞的胞间层和细胞壁上, 是纤维细胞间填料和粘结物质, 使纤维细胞成为细胞结合体。苧麻纤维的细胞壁从外向内由初生壁和次生壁组成, 初生壁很薄, 主要由半纤维素、脂腊等组成, 次生壁比初生壁厚得多, 经润胀后在电子显微镜下可看到次生壁是由 20~30 个同心轮纹叠成, 这些轮纹即为众多平行排列的原纤所组成的原纤层。各原纤之间以及各原纤层之间的缝隙、孔洞均为半纤维素和木质素等胶质填充。半纤维素和纤维素之间并无化学连接, 仅存在次价结合力, 木质素与纤维素之间也无化学键连接。但是, 半纤维素与木质素之间存在紧密化学键连接, 并渗透到细胞壁微原纤矩阵中, 大大地填充了纤维细胞间的空隙。木质素和半纤维素之间的化学键, 有人认为是一种醚键, 也有人认为除了醚键外, 还同时存在着苯基糖苷键和缩醛键, 这种化学键构成了木质素—碳水化合物复合体, 半纤维素和木质素之间的紧密结合关系, 使得这两种胶质的去除难度很大, 这已经为实际生产所验证。苧麻胶质中其他非纤维素各成分之间, 并无化学连接。

2.2 酶学基本理论

2.2.1 酶的活性中心^{[40][54][55]}

酶是生物活细胞产生的一种生物催化剂, 其本质上是一种蛋白质。酶的分子结构是酶功能的物质基础, 酶蛋白之所以异于非酶蛋白质, 各种酶之所以具有催化性和专一性, 都是由于其分子结构的特殊性。与许多蛋白不同, 酶存在活性中心, 活性中心又称酶的活性部位, 是指酶分子中能同底物结合并起催化反应的空间部位。一个酶的活性部位是由结合部位和催化部位所组成。前者直接与底物结合, 它决定酶的专一性, 也就是说决定同何种底物结合, 后者直接参加催化, 它决定着催化反应的性质。酶的活性部位不是一个点、一条线或一个面, 而是一个三维结构, 组成活性部位的氨基酸残基可能位于同一肽链的不

以相距很远，但通过肽链的盘曲折叠，在空间结构上都处于十分邻近的位置。酶分子构象的完整性是酶活性所必需的，立体构象受到破坏，活性部位即随之破坏，酶就失去活性。

2.2.2 酶促反应主要影响因素^{[40][54][55][56][57]}

2.2.2.1 pH 对酶反应的影响^{[54][55]}

酶对 pH 值的影响十分敏感，每一种酶只能在一定限度 pH 范围内活动，且有一个最适 pH。在最适 pH，酶的反应速率最大，若 pH 稍有改变，酶的反应速率即受到抑制（图 2-1）。不同的酶具有不同的最适 pH，彼此出入很大，例如，胃蛋白酶的最适 pH 为 1.9，而胰蛋白酶的最适 pH 为 8.1。酶的最适 pH 受许多因素影响，如酶的来源、纯度、底物、缓冲剂、盐类、作用时间及温度等皆可以影响酶的最适 pH。

2.2.2.2 温度对酶反应的影响^{[54][55]}

酶的催化作用与温度有密切关系，虽然酶促反应和其他化学反应一样，在一定温度范围内，温度升高，反应速度增快，继续升高温度，酶会因温度过高而丧失活性，结果温度升高，反而导致酶反应速度急剧降低（图 2-2）。酶反应速度在某一温度时存在最大值，通常称这个温度为酶的最适温度。

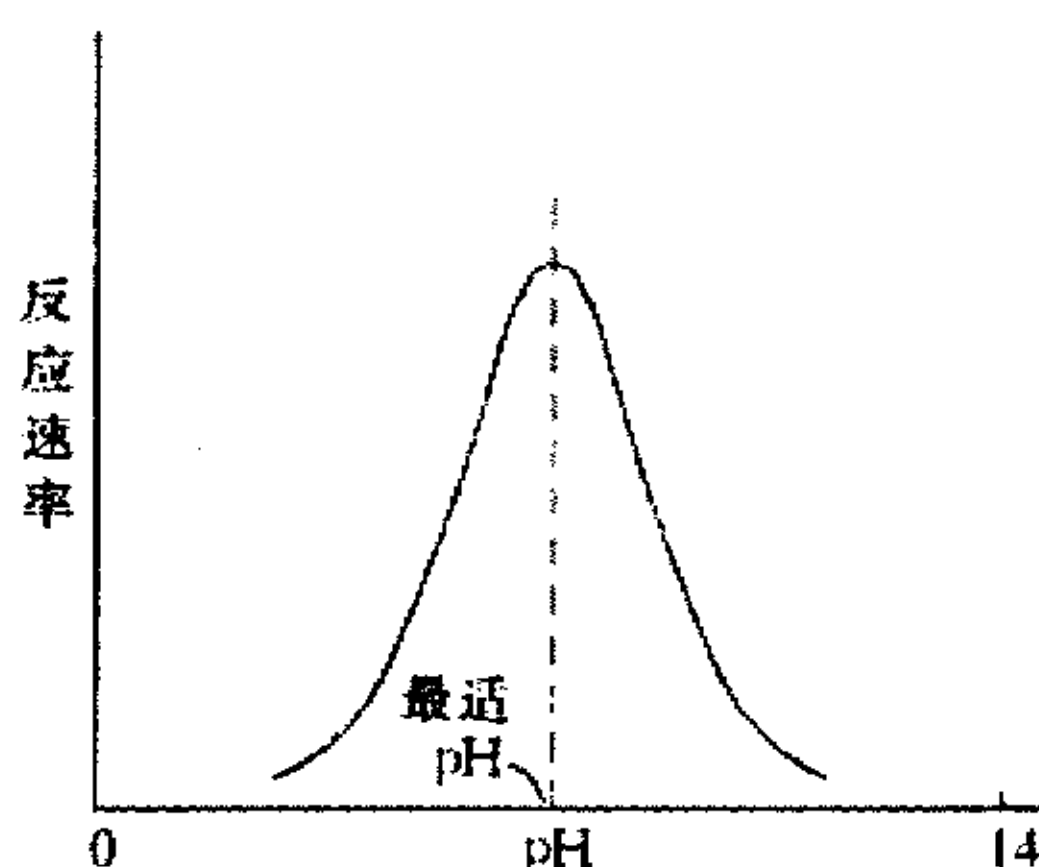


图 2-1 酶在其最适 pH 时活性最高

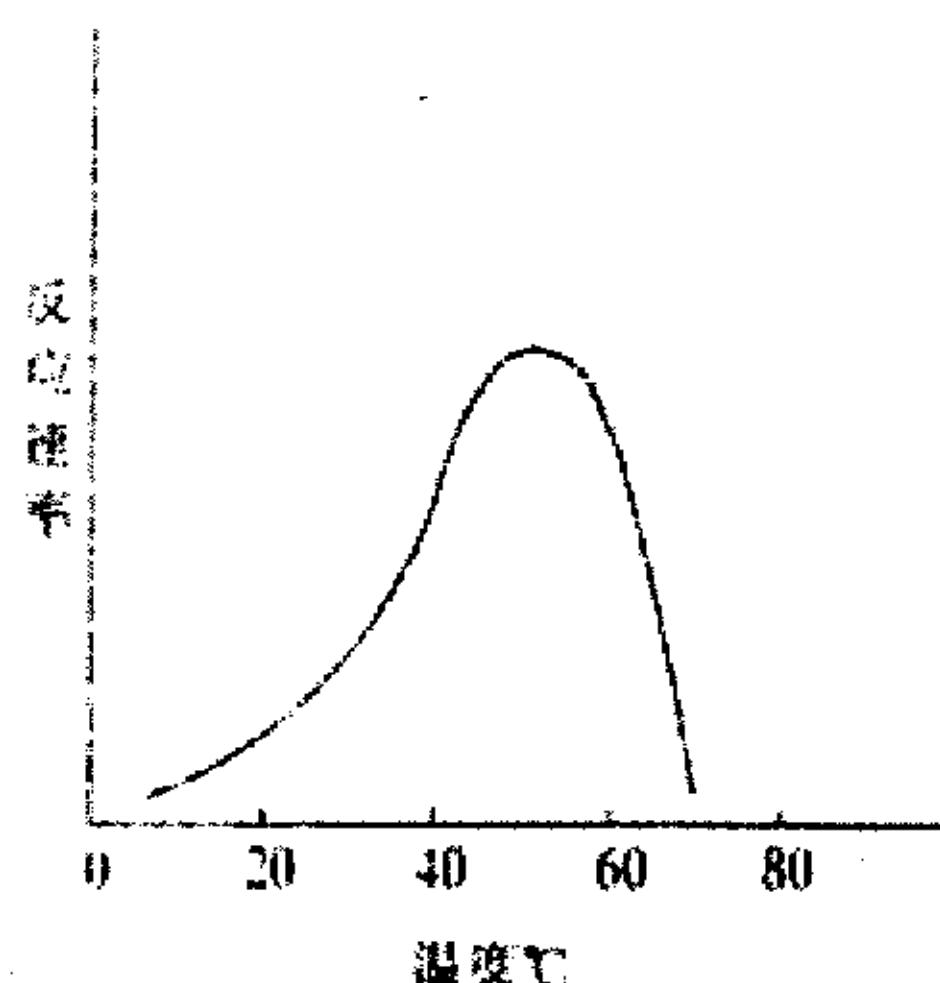


图 2-2 温度对酶促反应的影响

2.2.2.3 金属离子对酶反应的影响^[57]

金属离子对酶的形成、提纯有着密切关系，而且金属离子对酶活性影响很大。在培养产生酶的微生物时需要一定的无机盐，无机盐是微生物繁殖的不可

大。在培养产生酶的微生物时需要一定的无机盐，无机盐是微生物繁殖的不可缺少的营养成分，也是菌体和酶的重要组分。有些金属离子是稳定酶的三维结构的重要因素，有些金属离子则是直接参与催化反应的。金属离子的催化作用往往和酸的催化作用相似，而且催化作用很强。金属离子还可参加氧化还原反应，作用是多方面的。一些辅酶本身就是金属离子，或含金属的有机化合物。外加的金属盐会改变酶的许多性质，例如溶解性，对胶体的性能也很敏感，可以消除胶体微粒的电荷，降低溶解性，甚至会发生沉淀，因此利用中性盐可以使酶沉淀，从而达到提纯的目的。金属离子酶的热稳定性和金属离子的关系也很密切，例如，当酶反应体系中存在钙离子时，酶的热稳定性会得到提高。金属离子的作用机理还不十分清楚，可能和它们影响酶的三级结构和四级结构有关，改变酶的活性部位的结构，也可能会和底物发生作用，例如和底物结合，甚至发生反应，从而也会改变酶的催化反应。

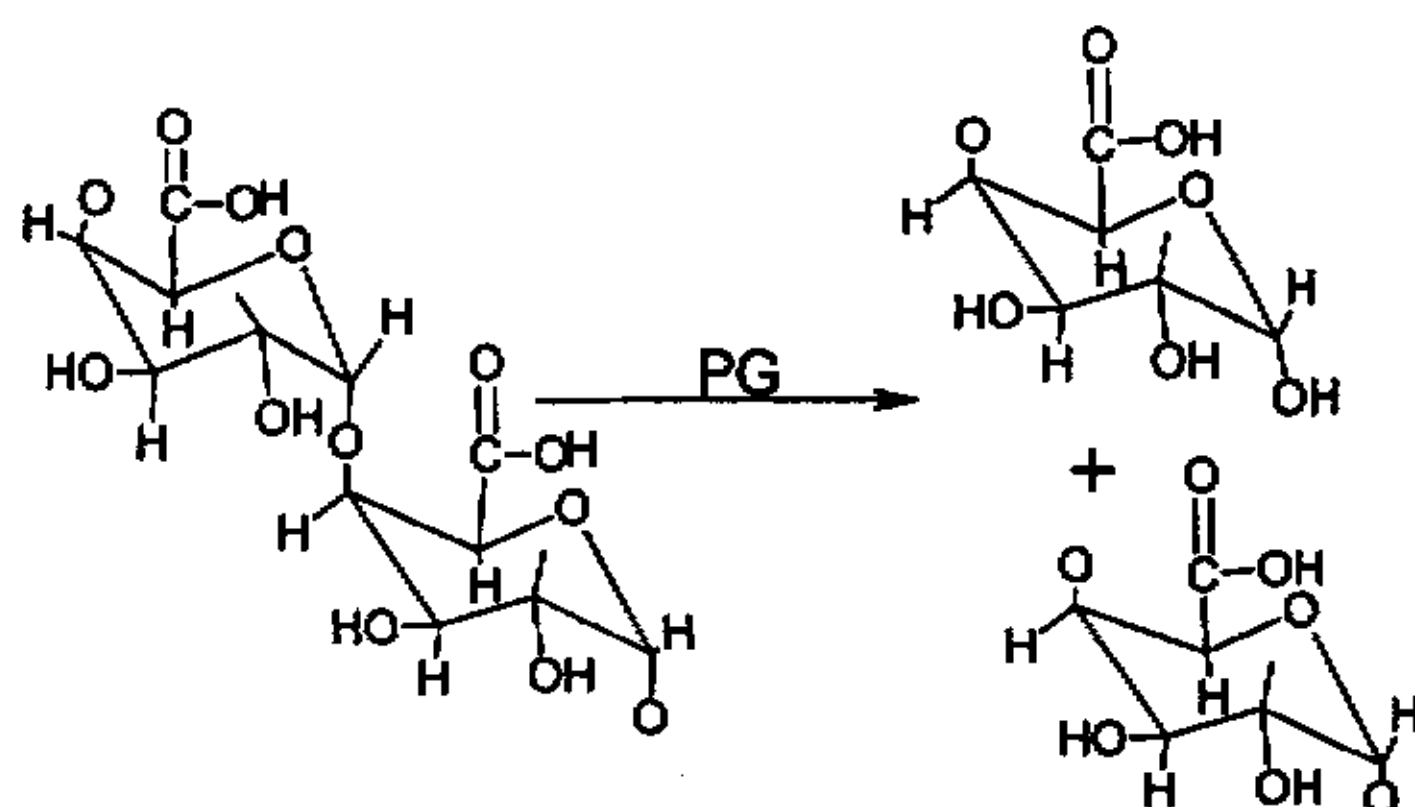
2.3 芒果胶质的酶降解

2.3.1 果胶质的酶降解^[40]

果胶物质的分解在整个脱胶加工中处于十分重要的地位，在酶法脱胶过程中，果胶质的分解主要由果胶酶来完成。果胶并不是单一化学结构的物质，而是结构复杂的一类物质，因此，果胶质的催化水解需要不同的果胶酶来完成，果胶酶是多组分酶体系的总称。不同的果胶酶对果胶质的催化水解方式不同，按照果胶酶对胶质的作用方式不同，主要可分为聚甲基半乳糖醛酸酶（PMG），聚甲基半乳糖醛酸裂解酶（PMGL），聚半乳糖醛酸酶（PG），聚半乳糖醛酸裂解酶（PGL）和果胶酯酶（PE），并且每一种酶都存在内切和外切两种作用方式，内切是无规则地切断果胶分子 $\alpha-1, 4$ 糖苷键主链，外切是顺序切断果胶分子非还原性末端 $\alpha-1, 4$ 糖苷键。

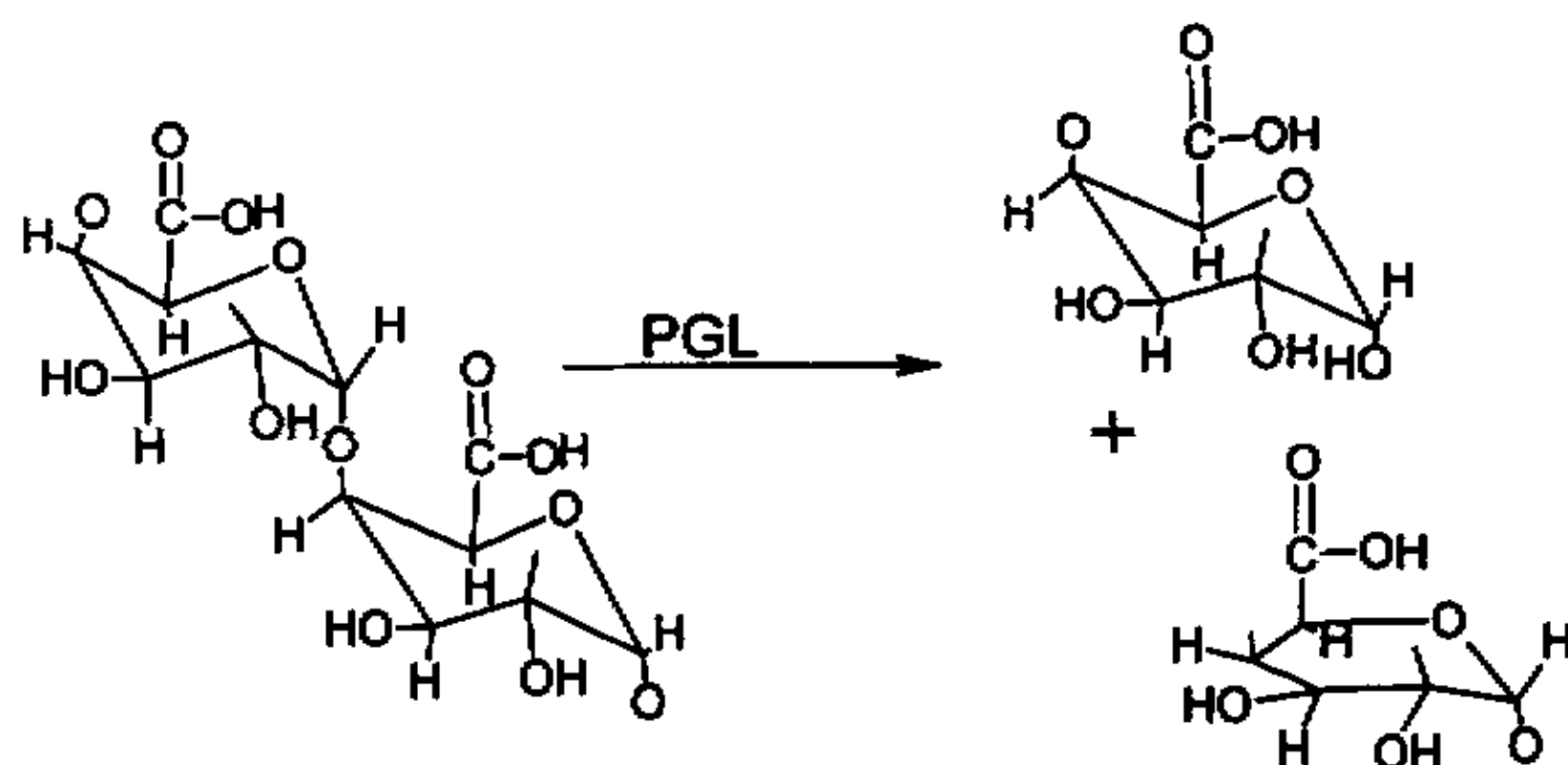
2.3.1.1 聚半乳糖醛酸酶

在果胶酶体系中，聚半乳糖醛酸酶（PG）发现最早，PG 可以催化水解 D-半乳糖醛酸 α -1, 4 糖苷键，其催化作用方式如下：



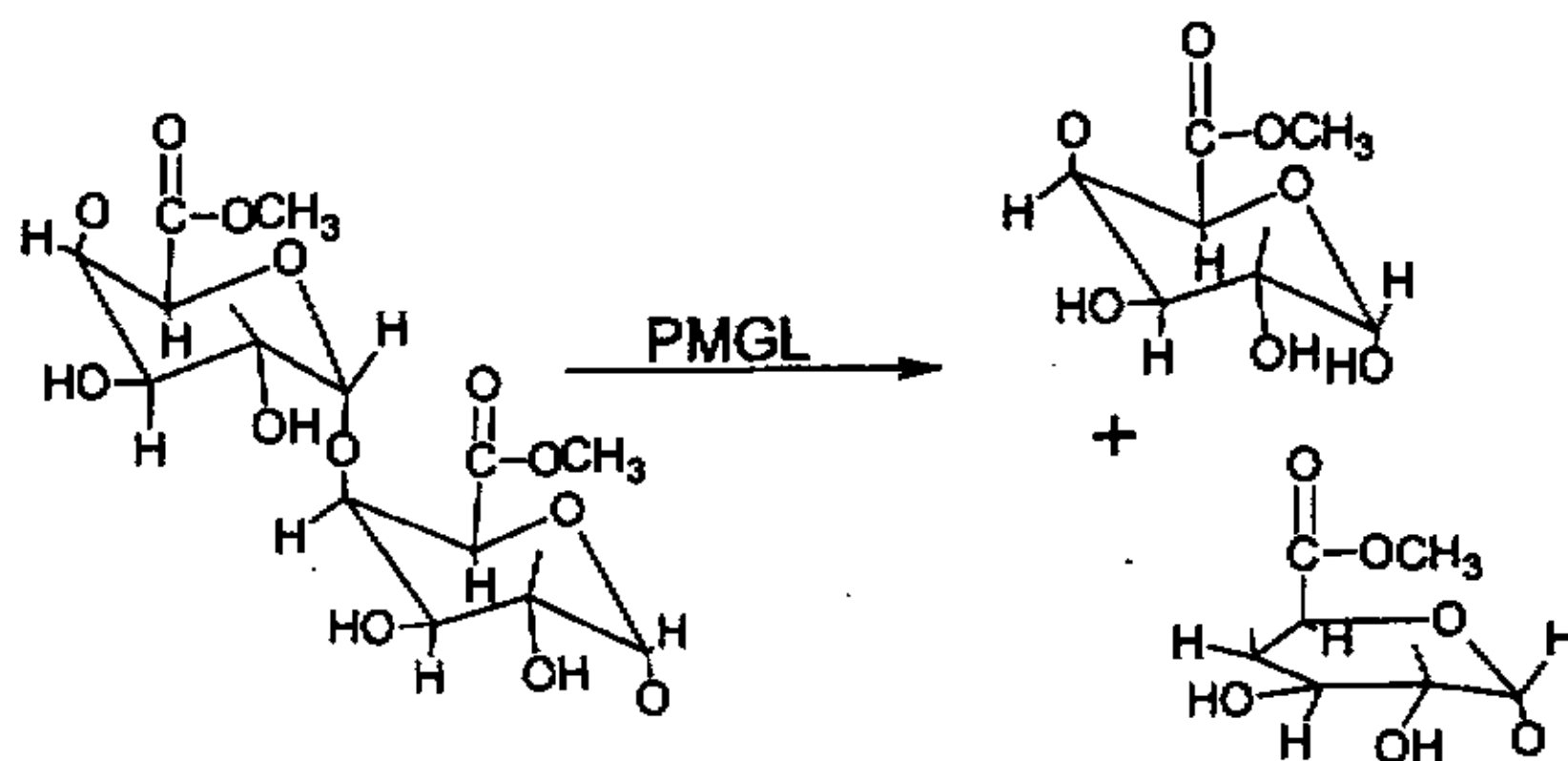
2.3.1.2 聚半乳糖醛酸裂解酶

聚半乳糖醛酸裂解酶（PGL）通过反式消去作用切断果胶酸分子 α -1, 4 糖苷键，生成具有不饱和键的半乳糖醛酸酯。其催化作用方式如下：

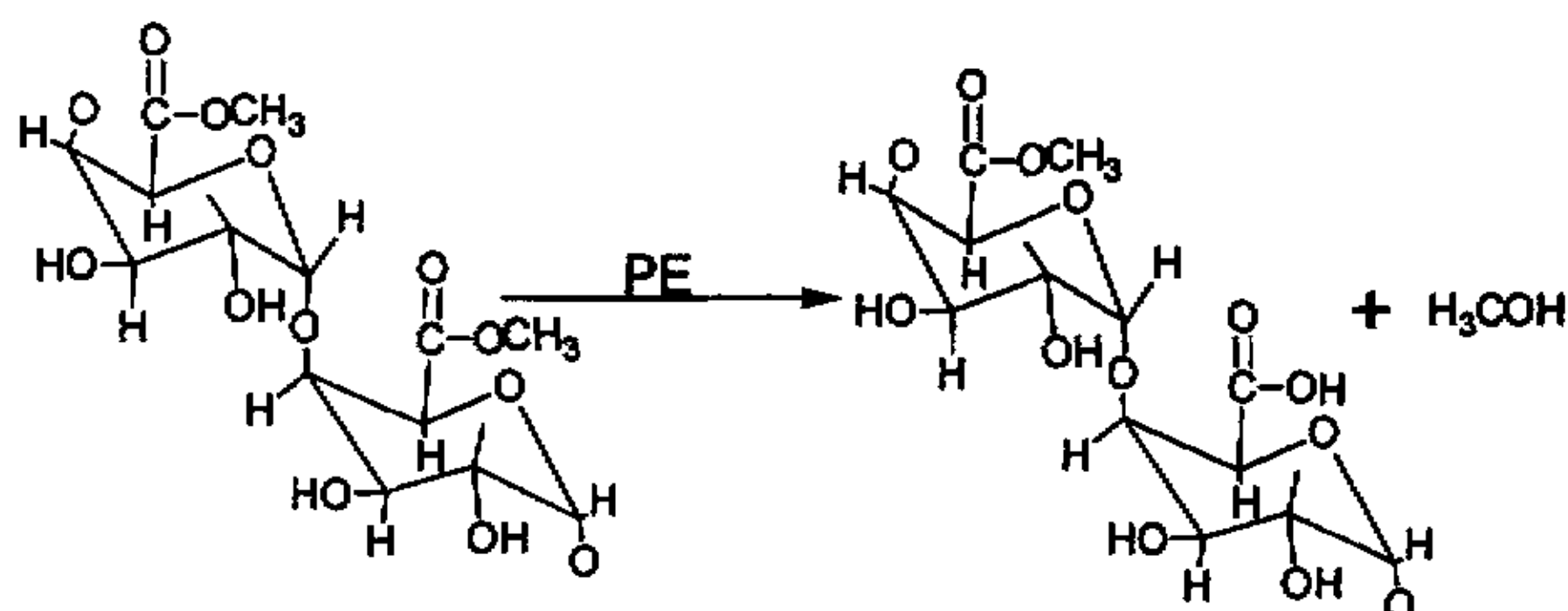


2.3.1.3 聚甲基半乳糖醛酸裂解酶

聚甲基半乳糖醛酸裂解酶（PMGL）可以通过反式消去作用切断果胶酸分子 α -1, 4 糖苷键，其催化作用方式如下：



2.3.1.4 果胶酯酶



果胶酯酶 (PE) 能使果胶中的甲酯水解, 生成果胶酸。

2.3.2 半纤维素的酶降解^{[52][58]}

半纤维素是一群复合聚糖的总称, 它包括聚木糖类, 聚甘露糖类等。半纤维素的复杂结构决定了半纤维素的酶降解需要多种酶的协同作用。

半纤维素酶也分为内切和外切两种作用方式。内切酶使聚糖分子主链的苷键随机断裂, 急速的低分子化。外切酶只能断裂聚糖分子非还原性末端基的苷键, 只有与游离羧基相邻近的糖苷键才会被外切酶所断裂, 游离出单糖或寡糖。

聚木糖要实现完全酶水解需要多种酶协同作用。首先, 由内切 1, 4—D—聚木糖酶随机断裂聚木糖骨架, 产生寡木糖, 降低聚合度, 然后由外切酶木糖苷酶将木寡糖和木二糖分解为木糖, 枝链糖基的存在能阻抑聚木糖酶的作用, 因此, 需要不同的糖苷酶水解木糖基和枝链糖基之间的糖苷键, 如 α —L—阿拉伯糖酶, α —D—葡萄糖醛酸酶、乙酰酯和阿魏酸酯酶等。这些特异性糖苷键酶能以协同方式与内切聚木糖酶和木糖苷酶一起高效降解聚木糖。内切 1, 4— β —D—聚木糖酶也存在酶组分的多样性。另外, 一些聚木糖酶具有双重功能, 可同时有效水解聚木糖和纤维素大分子中的 1, 4— β 糖苷键。半纤维素中的聚甘露糖的降解需要内切 1, 4— β —D—聚聚甘露糖酶和 β —D—甘露糖苷酶协同完成。

2.3.3 木质素的酶降解^[59]

单一木质素酶比较少见, 这是因为木质素的结构复杂, 并且, 木质素酶难以提纯。关于木质素的生物降解研究, 目前比较多见的是使用白腐菌, 这是一种真菌。白腐菌在分解木质素时, 分泌出两种胞外酶, 过氧化氢酶和锰过氧化

氢酶。在酶的催化作用下，木质素结构中的苯环发生单电子氧化反应形成氧自由基，随后发生一系列非酶催化的自由基反应而降解。这些反应包括甲氧基的脱除，侧链上 $C\alpha-C\beta$ 、 $C\rho-C\gamma$ 及烷基芳基醚键的断裂，直至苯环的裂解等。木质素的酶解产物再被菌丝体所吸收，进一步氧化成 CO_2 和 H_2O 。木质素降解过程中，参与作用的过氧化氢则由其他细胞外酶如乙二醛氧化酶、葡萄糖氧化酶和甲醇氧化酶等产生。白腐菌除了产生木质素过氧化氢酶和锰过氧化物酶外，还能产生漆酶，它在分子氧存在时能使羟基脱去质子形成自由基，引起木质素酚型结构单元侧链断裂，它不需要过氧化氢参与。白腐菌的次生代谢产物藜芦醇对木质素降解酶的产生及其活性起着重要作用。它作为木质素降解反应的中介产物，通过酶催化形成阳离子基团，随后攻击木质素单元结构的一定部位，使降解反应可以在酶的直接作用范围之外进行。白腐菌分泌木质素酶是以首先分解纤维素和聚糖类作为能量物质为代价的，对于苎麻胶质木质素的酶降解，无疑是不能轻易使用这类真菌。

2.4 酶活性测试^{[36][40][54][55][60]}

在苎麻酶法脱胶研究中，需要测试酶液活性，广泛使用分光光度计。如，果胶酶活性测试是在一定条件下，果胶酶催化果胶分解，生成半乳糖醛酸，此产物具有还原性醛基，应用 Somogyi 试剂显色，再用分光光度计测定吸光度，并以吸光度表示果胶酶活性的相对高低^{[40][61]}。分光光度计法是一种光吸收测定法，它是根据反应产物或者底物在某一波长或某一波段上，有明显的特征吸收差别而建立起来的连续观测方法。可以利用光吸收法测定那些催化双键饱和化或双键形成的酶反应，和那些催化环状结构变化的酶反应。分子中能吸收紫外和可见光的价电子官能团叫做发色团（或生色团）。在应用光吸收法测定酶反应速度时，如果只需了解酶活性的相对大小，可直接以单位时间内相应波长的光吸收值的改变来表示，但如果要表示成更确切国际单位，则应先通过消光系数算出底物浓度^{[39][55]}。

紫外与可见光谱在溶液中是很容易观测的，比耳-朗伯（Beer-Lambert）定律认为，物质的稀溶液对单色光吸收的程度，与该溶液中物质的浓度及液层

厚度成正比，其数学表达式为：

$$\epsilon = A / (c \cdot L)$$

式中： ϵ —摩尔吸光系数， $l/mol \cdot cm$ ；

c —溶液的摩尔浓度， mol/l ；

L —样品池光路长度（即液层厚度）， cm ；

A —吸光度（Absorbance）（亦称消光度）， $A = \lg I_0 / I$ （ I_0 为入射光强度，
 I 为透射光强度）。

上式也可表述为：

$$\epsilon = 1 / (c \cdot L) \cdot \lg I_0 / I$$

其中， ϵ 表示溶液为单位摩尔浓度，在单位长度（ $1cm$ ）吸收池中测得的吸光度，其单位是 cm^2/mol 或 $l/mol \cdot cm$ ，通常省略。一个有机化合物，在一定波长下，摩尔吸光系数 ϵ 是一个常数。在酶活性测试中，通过测试一定波长下的吸光度 A （通常简写为 OD ），就可比较准确的测试酶活性变化情况。酶活性测试是在零级反应条件下进行的，即测试酶催化反应的初速度。

第三章 实验材料与方法

3.1 选取菌株

3.1.1 实验材料

3.1.1.1 菌种

实验室保藏枯草芽孢杆菌, 编号 B₁₃, 细菌特性: 在陈旧培养基上形成芽孢, 在新鲜培养基中菌体呈杆状, 培养条件粗放, 繁殖速度快, 产酶体系比较完善, 除了产生高活性果胶酶外, 还产生木聚糖酶、甘露聚糖酶等半纤维素酶。

3.1.1.2 试剂

蛋白胨, 牛肉膏, 琼脂, 果胶, 槐豆胶, 木聚糖, 聚半乳糖醛酸, Somogyi 试剂等。

3.1.1.3 主要仪器和设备

紫外灯, 秒表, 生物显微镜, 722 分光光度计, pH 计, 超净工作台, 接种环, 接种针, 生化培养摇床, 高温高压消毒锅, 冰箱, 离心机, 水浴锅等。

3.1.2 主要方法

3.1.2.1 培养基制备^{[39][40][58]}

培养基是指利用人工方法将适合细菌生长繁殖或积累代谢物的各种营养物质混合配制而成的营养基质。主要用于细菌的分离、培养、鉴定以及菌种保藏等。按培养基的物理状态, 可以分为液体培养基, 固体培养基和半固体培养基。液体培养基是指培养基中不加凝固剂, 培养基呈液体状态。固体培养基是指在液体培养基中加入一定量的凝固剂 (通常加入 1.5%~2% 琼脂) 经融化冷凝而成。半固体培养基是指在液体培养基中加入 0.8%~1.5% 左右的琼脂, 经融化冷却而成。培养基一般应含有微生物生长繁殖所需要的碳源、氮源、能量、无机盐、生长因子和水等营养成分。此外, 为了满足微生物生长繁殖或积累代谢产物的要求, 还必须控制培养基的 pH 值, 在配制培养基时, 须将培养基调节在一定 pH 范围内。为了排除各种杂菌干扰, 还需对培养基进行高压气蒸灭菌处理。

3.1.2.1.1 肉汤培养基（液体）

牛肉膏 0.5%，蛋白胨 0.5%，NaCl 0.5%，葡萄糖 0.5%，pH=7.2 100Pa 灭菌 20min

3.1.2.1.2 肉汤培养基（固体）

在 2.1.1 肉汤培养基（液体）加入 2%的琼脂粉，pH=7.2 100Pa 灭菌 20min

3.1.2.1.3 再生培养基

牛肉膏 0.5%，蛋白胨 0.5%，NaCl 0.5%，葡萄糖 0.5%，蔗糖 0.5mol/L，琼脂粉 2%，pH=7.2，100Pa 灭菌 20min

3.1.2.1.4 麸皮培养基

麸皮 5%，玉米面 2%，硫酸铵 1%，硫酸镁 0.05%，磷酸氢二钾 0.1%，pH=8.5，100Pa 灭菌 30min

3.1.2.1.5 土豆培养基

土豆 20%，蔗糖 1%，酵母膏 0.05%，琼脂粉 2%，pH=7.0，100Pa 灭菌 20min

3.1.2.1.6 斜面和平板制作

斜面制作，将已经过灭菌处理装有琼脂培养基的试管，趁热置于木棒上，使成适当斜度，凝固后即成斜面。斜面长度不超过试管长度 1/2 为宜。

平板制作，将装在锥形瓶或试管中已经灭菌的琼脂培养基融化后，待其冷却至 50℃左右，倾入无菌培养皿中。温度过高时，皿盖上冷凝水过多，温度低于 50℃，培养基易于凝固而无法制作平板。平板制作的应该在火旁进行，左手拿培养皿，右手拿锥形瓶的底部或试管，左手同时用小拇指和手掌将棉塞打开，灼烧瓶口，用左手大拇指将培养皿盖打开一缝，至瓶口正好伸入，倾入 10~12mL 的培养基，迅速盖好皿盖，置于桌上，轻轻旋转平皿，使培养基均匀分布于整个平皿中，冷凝后形成平板。

3.1.2.2 制作半乳糖醛酸标准曲线

取 6 支比色管，分别加入 0，0.2，0.4，0.6，0.8 及 1.0 毫升 150ug/mL 的半乳糖醛酸溶液，再加水补充到 1.0mL，第 1 号管为空白对照。然后准确加入 1.0mL 铜试剂，盖上玻璃塞，放入沸水浴中（比色管必须浸入 1/2），自再

沸腾起准确记时，煮沸 10min，然后立即取出，放入冷水中，冷却 5min。分别加入 1.0mL 砷钼酸试剂剧烈振荡，至反应结束，再加入蒸馏水至 10mL 刻度，摇匀于 620nm 比色，以吸光度为纵坐标，半乳糖醛酸浓度为横坐标，绘制标准曲线。

3.1.2.3 细菌生长曲线测试^[39]

取菌种试管斜面，接 2 环菌于 50mL 无菌水中，玻璃珠打碎，取 0.2mL 接入 5mL 肉汤培养基中，34℃ 摇床培养，隔 1h 取样，620nm 测透光率。

3.1.2.4 细菌产酶曲线测试^[39]

取菌株接种皮培养基，34℃ 摇床振荡培养，每隔 12h 取样测酶活。

3.1.2.5 酶活性测试^{[40][61][62][63]}

3.1.2.5.1 果胶酶活性

取 0.2mL 发酵液定容至 100mL (稀释 500 倍)，取 0.2mL 稀释液加入 0.5mL 0.25%天然果胶溶液 (用 pH9.6 巴比妥钠-盐酸缓冲液配制)，50℃ 水浴保温 30min，加 1mL 铜试剂置沸水浴中加热 10min，冷却后加 1mL 砷钼酸溶液，振荡加水至 10mL 混匀，620nm 测 O.D. 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，1 个酶活单位以 IU/mL 表示。

3.1.2.5.2 木聚糖酶活性

取 0.2mL 发酵液定容至 100mL (稀释 50 倍)，取 0.2mL 酶液加 0.3mL 木聚糖溶液，50℃ 保温 20min，540nm 比色，Somogyi 氏法测酶活。

酶活单位为在上述条件下每分钟由底物释放 1 μ mol 的木聚糖所需酶量为 1 个酶活单位以 IU/mL 表示。

3.1.2.5.3 甘露聚糖酶活性

取发酵液稀释 50 倍，取 0.2mL 酶液加 0.5mL 甘露聚糖溶液，50℃ 保温 20min，540nm 比色，Somogyi 氏法测酶活。

酶活单位为在上述条件下每分钟由底物释放 1 μ mol 的甘露聚糖所需酶量为 1 个酶活单位以 IU/mL 表示。

1 个酶活单位以 IU/mL 表示。

3.1.2.5.4 聚半乳糖醛酸裂解酶测定

由于裂解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，可以通过测定 235nm 处吸收值确定裂解酶活性。

取 0.1% 聚半乳糖醛酸 3mL，加入 0.2mL 酶液，30℃，保温 3h，加入 9mL 0.01N HCL，混匀后，用 UV-3000 紫外线分光光度计从 190~300nm 全波段扫描，测定在 235nm 处有无光吸收值，以加热灭活酶液作对照。

3.1.2.6 制备酶液^{[39][40]}

制取脱胶酶液需要将细菌在一定条件下进行发酵培养，这里选用液体发酵培养方法，用三角瓶装适量液体培养基，接种后，在摇床上振荡培养一段时间，这样的发酵条件与发酵罐相似。肉汤培养基，250mL 三角瓶，装 30mL 培养基，接种细菌，于 170 次/分旋转摇床上，34℃ 振荡培养，每隔 12h 测试酶活性。

发酵工艺流程：斜面菌种—锥形瓶摇床—粗酶液

3.2 酶法脱胶工艺优化研究

3.2.1 实验材料

实验室制取发酵粗酶液，原麻：沅江湘兰 1 号。

3.2.2 实验仪器

JMS-5800 型扫描电镜，烘箱，化学分析仪器等，苧麻梳纺生产线

3.2.3 实验方法

3.2.3.1 酶法脱胶工艺流程^{[30][36]}

苧麻胶质化学性质分析表明，在目前的研究水平下，只依赖于酶液浸渍处理，并不能去除全部胶质，实现纤维分散良好。在酶法脱胶工艺路线制定上，结合目前酶法脱胶生产实际，采用先酶液浸渍预处理，再用比较温和的碱液进行精练后处理。脱胶工艺流程如下：

原麻—酶液浸渍（不同工艺条件）—水洗—精练—水洗—烘干—精干麻—测试残胶率

NaOH6g/L, NaSiO₃4%, 助剂 2%, 浴比: 1:12, 时间: 1.5h, 压力: 0.15MPa

3.2.3.2 残胶率测试^[64]

将干重约 5g 的麻样放于已知重量称量瓶中, 烘至恒重。取出迅速放于干燥器中冷却, 称重并记录。再将麻样放入加有 150mL, 浓度为 20g/L 氢氧化钠溶液的三角瓶中, 装好球型冷凝管煮沸 3h。取出麻样, 在分样筛中洗净, 分别放于已知重量的称量瓶中, 烘至恒重。取出迅速放于干燥器中冷却, 称重并记录。

残胶率按照下式计算:

$$W_c = (G_0 - G_1) / G_0 \times 100$$

式中: W_c ——麻样的残胶率, %

G_0 ——麻样干重, g

G_1 ——提取残胶后的麻样干重, g

第四章 选取菌株

在苧麻酶法脱胶过程中，需要用酶液来浸渍原麻，分解胶质，实现纤维相互分离。因此，酶液的成分组成及活性高低是整个酶法脱胶的基础，决定着酶脱胶质量的好坏。菌株品质好坏直接关系到能否产生高质量酶液，优秀的菌株不仅能提高酶制剂的品质、产量、发酵原料的利用效率，而且还能增加品种、缩短发酵生产周期、改进发酵和提炼工艺条件等。筛选优秀的产酶菌株，是提高酶法脱胶质量的首要工作。

筛选细菌广泛使用诱变育种方法，这是基于基因突变的菌种改良。其理论基础是 DNA 结构的改变，包括染色体基因突变和染色体外基因突变，前者指染色体结构改变和染色体数目的改变；后者指质粒等染色体外遗传因子的变化。诱变育种主要通过物理诱变剂（如：紫外线、X-射线、快中子、激光、超声波等）和化学诱变剂（如亚硝酸、硫酸二乙酯、亚硝基等）处理微生物群体细胞，通过合理的筛选程序和方法，从中选出遗传物质分子结构发生改变的少数细胞。诱变育种方法简便，容易掌握，仍是目前行之有效的一种重要育种手段。

4.2 原生质体紫外线诱变

4.1.1 紫外线诱变育种原理^{[39][40]}

在物理诱变剂中以紫外线辐射最为普遍，其他的物理诱变方法则受设备条件限制，难以普及。紫外线的波长在 200~380nm 之间，但对诱变最有效的波长仅仅是在 253~265nm，一般紫外线杀菌灯所发射的紫外线大约有 80% 是 254nm。紫外线诱变的主要生物学效应是由于 DNA 变化而造成的，DNA 对紫外线有强烈的吸收作用，尤其是碱基中的嘧啶，它比嘌呤更为敏感。紫外线引起 DNA 的相邻嘧啶间形成胸腺嘧啶二聚体，阻碍碱基间的正常配对，从而引起微生物的突变和死亡，因此，在紫外线诱变中要严格控制辐射时间和辐射量。经紫外线损伤后的 DNA，能被可见光复活，因此，经诱变处理后的微生物菌种要避免长波紫外线和可见光照射，故经紫外线照射后的样品需要用黑纸或黑布包裹。另外，照射处理的孢子悬浮液不要贮放太久，以免在黑暗中修复。

这里在实施紫外线诱变时，先用溶菌酶溶解细胞壁，再用紫外线照射进行诱变处理，用酶去除细胞壁，能够克服种属间杂交的“不育性”，可以进行远缘杂交，诱变效率高，原生质体之间能够产生融合，能够使两个以上亲株同时参与融合，可形成多种性状的融合子^{[38][39]}。

4.1.2 诱变方法

4.1.2.1 原生质体制备

4.1.2.1.1 细胞培养

取出发菌株 B₁₃ 一环于 30mL 肉汤培养基中，34℃ 恒温水浴摇床培养 5h，再加入青霉素 0.9mL 溶液，使其终浓度为 0.3U/mL，继续培养 2h。

4.1.2.1.2 细胞收集

取菌液 10mL，4000rpm 离心 10min，弃掉上清液，将菌体悬浮于磷酸缓冲液中，洗涤两次后，将菌体悬浮于 SMM 中。

4.1.2.1.3 总菌数测定

取菌液以生理盐水稀释至 10^{-4} ， 10^{-6} ，各取 0.2mL 涂布肉汤培养基平板，34℃ 倒置培养记数。

4.1.2.1.4 脱壁

取 5mL 菌液加 5mL 溶菌酶液，34℃ 保温 40min，4000rpm 离心 10min，弃掉上清液，用高渗缓冲液洗涤除酶，溶于 5mL 高缓冲液中，并进行剩余菌数的测定。

4.1.2.2 紫外线诱变

4.1.2.2.1 再生培养

取 0.5mL 原生质体悬浮液，用高渗缓冲液进行系列稀释，取出 10^{-5} ， 10^{-6} ， 10^{-7} 三个稀释度，各 0.2mL 再生平板涂布，培养记数。

4.1.2.2.2 原生质体诱变

取原生质体悬浮液于小平面皿中，紫外灯（30W，间隔 30cm）下诱变 30s，60s，90s，取 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} 三个稀释度各 0.2mL，再生平板涂布记数，34℃ 倒置培养记数。

4.1.2.3 初筛，复筛

初筛，取诱变后再生平板单菌落，接麸皮培养基（50mL/500mL）三角瓶，34℃摇床培养 48h，测其果胶酶，木聚糖酶及甘露糖酶活性，筛选出酶活高或有特色的菌株。复筛，初筛菌株在土豆培养基传代培养三次后，接麸皮培养基上摇床 34℃培养 48h，测试酶活，最后筛选出满足要求的菌株。

4.1.2.4 诱变细菌培养

250mL 三角瓶加入 30mL 肉汤培养基，接种不同类型的细菌，于 170 次/分旋转摇床上，34℃振荡培养 40h。

4.2 选取脱胶菌株

4.2.1 细胞紫外线诱变致死率

细胞紫外线诱变致死率 表 4-1

照射时间	总菌数/ mL	细胞致死率%
再生	1.35×10^7	
30s	1.25×10^6	99.08
60s	3.8×10^4	99.72
90s	1.5×10^4	99.89

紫外线能够引起 DNA 链段上相邻嘧啶间形成胸腺嘧啶二聚体，阻碍碱基间的正常配对，引起细胞基因发生突变和细菌体死亡^{[39][40]}。从紫外线照射引起的细胞致死率变化（表 4-1）可以看出，经过紫外线照射，大量细菌细胞出现死亡，照射 30s，细胞致死率已经达到 99.08%，照射 60s，致死率达到 99.72%，照射 90s，致死率为 99.89%，绝大部分细胞已经死亡。从紫外线照射后初筛选的高酶活菌株，以诱变 90s 占多数，延长紫外线照射时间，会引起更多的细胞死亡，因此，在实施紫外线照射时，需要严格控制照射时间，在诱变脱胶菌株时，紫外线照射时间应该严格控制在 90s 左右。

4.2.2 筛选菌株

细菌的紫外线诱变是一个基因突变过程，方向性差，需要对经过紫外线诱变后的细胞进行再生培养，人工筛选出满足要求的菌株，继续分离和纯化^[39]。从苕麻胶质成分分析可以看出，需要主要去除的胶质是果胶和半纤维素，其中

半纤维素在胶质中的比重最大，是脱胶主攻对象，^[53]因此，需要筛选出产高活性果胶酶和半纤维素酶的菌株。出发菌株 B₁₃ 共 140 株，经过紫外线诱变处理，在培养基中再生培养，测试菌株产酶活性变化情况。从表 4-2 可以看出，果胶酶活性出现升高的有 31 株，有 60 株活性没有变化，49 株果胶酶活性出现下降；木聚糖酶活性升高的有 26 株，73 株没有变化，41 株出现下降；甘露聚糖酶活性出现升高的有 16 株菌，22 株酶活性没有发生变化，36 株发生活性下降，其对比分析情况（图 4-1）。

初筛菌株产酶活性变化 表 4-2

酶 活性变化	果胶酶	木聚糖酶	甘露聚糖酶
升高	31 株	26 株	16 株
平行	60 株	73 株	22 株
降低	49 株	41 株	36 株

复选菌株产酶活性变化 表 4-3

酶 活性变化	果胶酶	木聚糖酶	甘露聚糖酶
升高	14 株	13 株	11 株
平行	14 株	16 株	13 株
降低	11 株	10 株	15 株

在初筛菌株时，首先选出木聚糖酶，甘露聚糖酶升高的菌株，结合果胶酶活升高的菌株，选出 39 株菌进行培养进一步进行筛选，得到果胶酶活性升高的有 14 株，活性保持平行的有 14 株，活性降低的有 11 株；木聚糖酶活性升高的有 13 株，活性保持平行的有 16 株，活性降低的有 10 株；甘露聚糖酶活性升高的有 11 株，活性保持平行的有 13 株，活性降低的有 15 株，其对比分析情况（图 4-2）。进一步筛选菌株，最后得到两株产果胶酶活性高，产甘露聚糖酶和木聚糖酶活性也比较高的两株菌 S₁₁ 和 S₂，其中 S₂ 产果胶酶活性高，S₁₁ 产甘露聚糖酶活高。

脱胶菌株筛选过程可以看出,紫外线照射后,果胶酶活性升高的菌株最多,其次为木聚糖酶和甘露聚糖酶升高菌株,诱导产高活性半纤维素酶细菌比产高活性果胶酶细菌的难度要大得多,这应该是细菌 DNA 排列所决定的。在同一紫

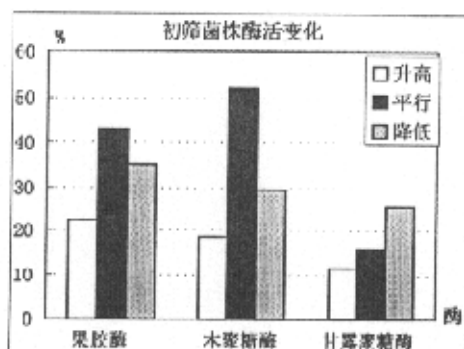


图 4-1 初筛菌株酶活变化情况

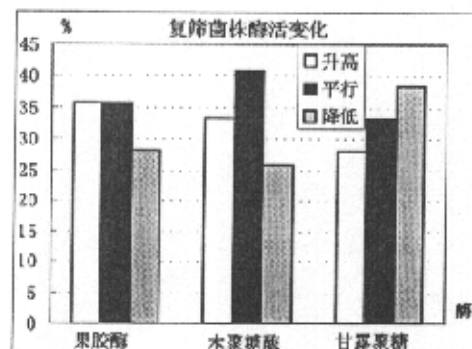


图 4-2 复筛菌株酶活变化情况

外线源照射下,不同细菌产生的诱变效果是不相同的,这可以认为紫外线对不同细菌的 DNA 链段作用效果是不相同的,不同的 DNA 链段抗紫外线辐射能力是不相同的。诱变育种的方向性比较差,需要大量人工筛选工作,才能得到比较理想的菌株。现代基因工程技术必将改变这种被动状况,通过分析细菌的 DNA 片段排列,利用各种限制性内切酶对 DNA 链段进行切割,然后利用连接酶把不同 DNA 片段相互连接起来,已经创造出了各种生物奇迹,如转基因动物,基因重组等。在苎麻生物脱胶的菌株培育中引入基因工程技术,筛选出特异性脱胶细菌,必将为苎麻生物脱胶创造出新奇迹^[65]。

4.2.3 诱变菌株的生长特性^{[40][55][58][66]}

细菌细胞的生长是一个十分复杂的生命过程,细胞从环境中吸收营养,对营养物进行氧化或从光能中得到生命过程所需要的能量,再利用这些由外界获取的能量物质合成新细胞,最终导致细胞总数和细胞物质增加。细菌数量的增长是一个群体增长过程,这一过程能够详细的反映出细菌的整体增长规律和细菌生理特性。极少量细菌一旦接种到合适的新鲜培养基上,在适宜培养条件下,细菌数量就会迅速增加。细菌的增加过程一般可分为延迟期、对数期、稳定期和衰亡期四个阶段。

细菌在完全相同的培养基中培养,而又恰恰处于对数期,则它们在新的培养基中培养时,延迟期可以为零。当接种细菌取自停止生长或休眠状态的培养物或取自不同的培养物时,则会出现明显的延迟期。这是因为细菌不是在任何情况下都合成它能合成的所有酶。实际上,细菌仅仅合成那些在一定环境条件下必需的酶,细菌也遵循着“经济”原则。有一些酶在任何情况下总是必需的(大部分为合成代谢所需的酶),这一类酶细菌总在不断合成,与细菌的生存环境和培养基无关,这样的酶叫组成酶,那些只是在需要时才合成的酶叫诱导酶。对于诱导酶的合成,需要诱导物,诱导物通常是这种酶作用的底物或者在结构上与此底物非常相似的化合物^{[58][66]}。

果胶酶和半纤维素酶属于诱导酶,细胞不是在任何时候都必须合成,它们或者以非常低的浓度水平存在或者仅仅作为信息存在于 DNA 中,只有将细菌接种在诱导细胞合成这类酶的培养基中,诱导物解除了阻遏物对 DNA 的阻遏作用,从而使得 DNA 上的基因片段启动其“命令”程序,细胞开始合成果胶酶和半纤维素酶。合成这类诱导酶存在一定的时间迟延,为细菌的增长作准备^[66]。从绘制的生长曲线(图 4-3)中可以看出,在细菌进入对数增长期以前,曲线几乎是平直的,细胞数量没有增长,与 B₁₃相比,诱变细菌 S₁₁和 S₂延迟期变短了,这说明诱变细菌对环境的适应能力增强,有利于在发酵生产中,细菌较快的进入产酶阶段,可以缩短发酵时间。

细菌数量的大量增长主要存在于对数期,在这个阶段,细菌细胞以恒定分裂速率一分为二、二分为四地以“裂殖”方式繁殖。每个细胞分裂一次所需时间叫做世代时间(generation time)或倍增时间(doubling time),以 t_d 表示,在对数生长期,细菌的世代时间 t_d 是一个常数。^[66]

在任意时间里,每单位体积(例如 ml)内起始时的活细胞数 X 和时间的 t 的关系可表示

$$\ln X = \mu t + c \text{ 或 } X = e^{\mu t + c}$$

其中 c 是开始分裂前,细菌数的自然对数,即当 $t = 0$ 时, $c = \ln X$ 。进一步推导,世代时间 t_d 和比生长速率 μ (常数)存在下面的数学关系:

其中 c 是开始分裂前, 细菌数的自然对数, 即当 $t=0$ 时, $c=\ln X$ 。进一步推导, 世代时间 t_d 和比生长速率 μ (常数) 存在下面的数学关系:

$$\mu = \frac{0.693}{t_d} \text{ 或 } t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

细菌生长速度即可以用 μ 和 t_d 来表示, 当细菌的世代时间较短时, 其比生长速率较高, 在生长曲线上, 对数期的直线斜率即比生长速率 μ 大。

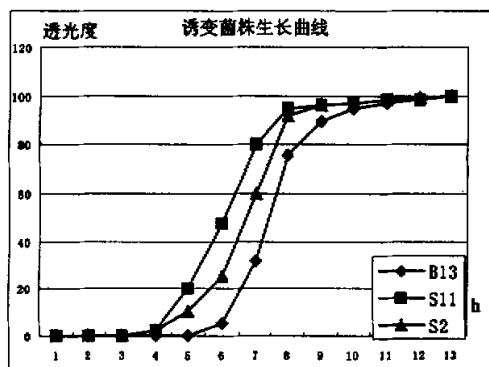


图 4-3 菌株生长曲线对比

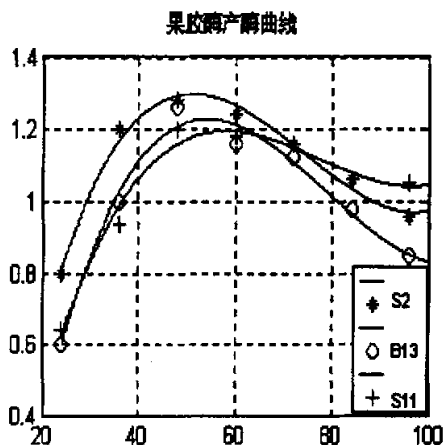


图 4-4 果胶酶产酶曲线对比

对数期生长曲线取斜率, 可以得到 S_2 的 $\mu=1.362$, S_{11} 为 $\mu=1.328$, B_{13} 为 $\mu_{13}=1.246$, 由公式 $t_d = \frac{0.693}{\mu}$ 可知, S_2 , S_{11} , B_{13} 的世代时间分别为 30.52min, 31.308min, 33.372min, 诱变菌 S_2 与出发菌相比, 缩短了世代时间, 这说明诱变菌 S_2 具有更强的分裂增长能力。虽然看起来只是短短的 3min 左右, 但相对于大量细菌细胞, 这可以减少许多发酵时间, 这样诱变菌 S_2 和 S_{11} 可以更早进入大量产酶阶段。

当培养基营养物质即将消耗完毕, 或形成了对细菌生长有毒的代谢产物时, 细菌的比生长速率降低, 此时即意味着对数期结束, 细菌增长进入稳定期。在此期间细胞的生长与死亡同时发生, 表现为细菌数量增长变化缓慢, 并随着时间的延迟, 细胞死亡速度加快, 导致生长速率逐渐下降。对三株菌的生长曲线进行分析 (图 4-3), 可以看出, 与出发菌株相比, 诱变细菌 S_2 和 S_{11} 由于对数期增长速度快, 营养物质消耗快, 细菌增长更早进入了稳定期。

衰亡期是由于营养物质特别是碳源消耗殆尽,而有毒产物进一步积累,杀死大量细菌细胞,表现为细胞数量急剧减少,图中没有测试衰亡期的生长曲线变化。

细菌生长曲线测试 表 4-4

培养时间	1h	2h	3h	4h	5h	6h
B ₁₃	0.012	0.014	0.013	0.216	5.063	32.415
S ₁₁	0.011	0.013	2.145	20.172	48.	80.712
S ₂	0.012	0.013	2.534	10.215	25.314	60.256
培养时间	7h	8h	9h	10h	11h	12h
B ₁₃	76.253	90.268	95.124	97.815	98.217	99.142
S ₁₁	95.183	96.341	97.247	98.113	98.453	99.107
S ₂	92.416	96.275	97.261	98.142	99.712	99.213

注:表中数据为透光度

4.2.4 细菌产酶曲线变化

细菌发酵产酶曲线测试 表 4-5

培养时间		24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h
果 E	B13	0.613	1.024	1.261	1.162	1.122	0.983	0.852
	S11	0.647	0.943	1.204	1.182	1.161	1.062	1.053
	S2	0.805	0.921	1.288	1.175	1.162	1.064	1.107
甘 E	B13	0.045	0.122	0.154	0.137	0.085	0.041	0.024
	S11	0.052	0.131	0.184	0.165	0.126	0.061	0.041
	S2	0.052	0.188	0.215	0.207	0.152	0.091	0.063
木 E	B13	0.122	0.208	0.213	0.182	0.155	0.147	0.135
	S11	0.134	0.185	0.192	0.175	0.161	0.142	0.125
	S2	0.141	0.225	0.235	0.215	0.185	0.155	0.135

注:表中数据为吸光度

三株菌的产酶曲线分析,三株菌培养 48h 后,出现果胶酶产酶高峰(图 4-4),

诱变菌株 S_2 果胶酶产酶高峰最高, 并维持一个比较高的稳定产酶水平, 而出发菌株 B_{13} 最高产酶水平要低一些, 并且, 下降的较快。三株菌继续培养, 在 96h 出现第二次小高峰, 这可能是出现另外一种果胶酶合成, 导致产酶曲线变化。与第一个产酶高峰相比, 酶活性已经下降了许多, 在实际生产中, 需主要关注第一个产酶高峰。在培养 36h 左右, 三株菌出现合成木聚糖酶和甘露聚糖酶高峰(图 4-5, 图 4-6), 出发菌株 B_{13} 产酶活性明显低于诱变菌株 S_2 和 S_{11} 。这是由于紫外线诱变导致细胞 DNA 片段发生改变, 直接影响到合成酶的操纵子发生改变, 半纤维素酶的合成发生变化, 导致产酶曲线改变^{[40][55]}。

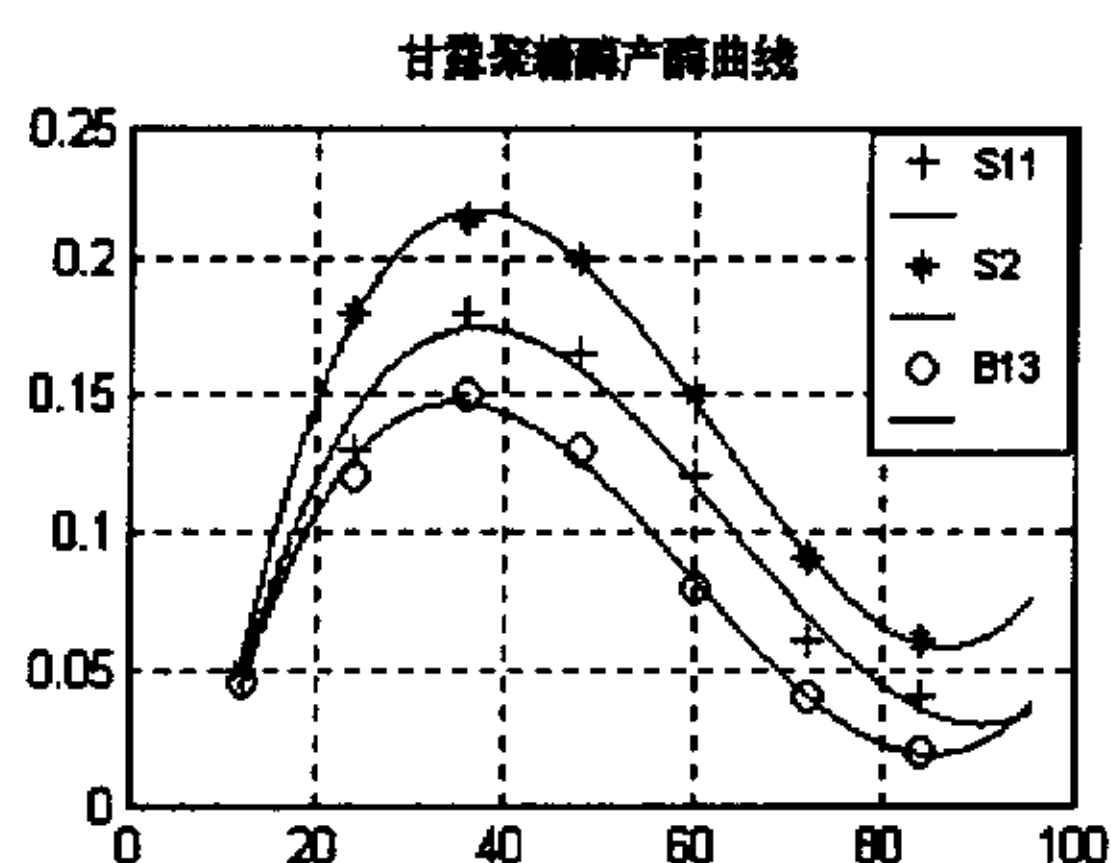


图 4-5 甘露聚糖产酶曲线对比

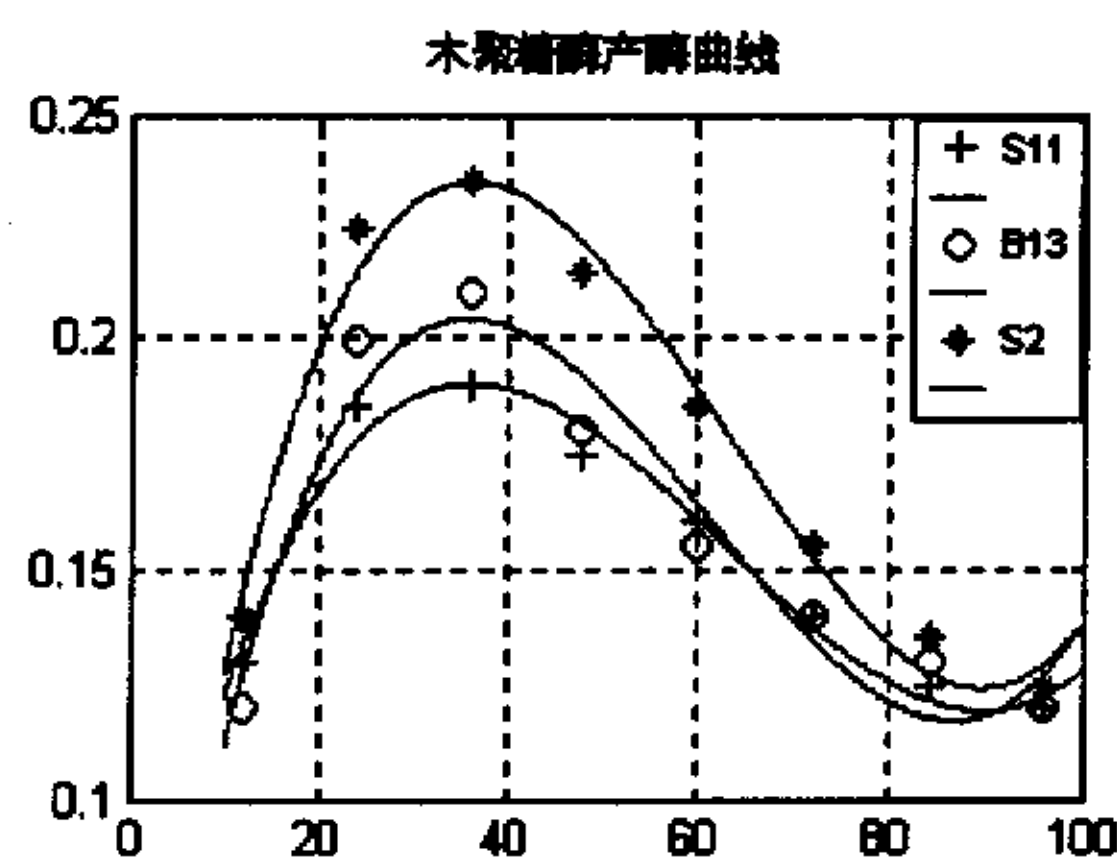


图 4-6 木聚糖产酶曲线对比

4.2.5 酶液最适 pH 变化

取离心酶液稀释 500 倍, 以 0.25% 国产果胶的配制溶液为底物, pH 梯度分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 测试酶活性。从最适 pH 变化情况(图 4-7)可以看出, 三株菌所产酶液的最适 pH 是不同的, S_{11} 、 S_2 为 8.5, 出发菌株为 8.0。

最适 pH 变化

表 4-6

pH \ 菌株	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
B_{13}	0.662	0.863	0.941	0.825	0.511	0.204
S_{11}	0.392	0.706	0.962	1.104	0.903	0.415
S_2	0.843	0.965	1.154	1.253	1.208	0.907

注: 表中数据为吸光度

pH 对酶活性的影响是由于 pH 改变了酶的活性中心与之相关基团的解离状

态。酶要表现活性，它活性部位的有关基团都必须选取一定的解离状态，其中任何一种基团的解离状态发生变化就将使酶从活性状态转入无活性状态，反之亦然，至于活性部位以外的其他基团则无关紧要。如果将处于活性状态的酶概括为 EH ，而由活性状态转入无活性状态时，其酸性解离形式概括为 EH^+ ，碱性解离形式概括为 E^- ，酸碱对酶活性的影响实际上和抑制剂的作用十分相似，这就是说， pH 对酶反应动力学的影响可以简化为酸、碱的抑制影响。最适 pH 变化反应了酶的结构和催化功能基团发生了变化，诱变细菌和出发菌株合成酶液的最适 pH 变化，可以认为它们合成的酶的活性部位是不相同的，即酶的分子构象发生了改变，催化基团也发生了变化，可以这样认为，它们合成的酶液是由不同酶分子组成的。8.5 的 pH 相对来说，容易控制一些^[55]。

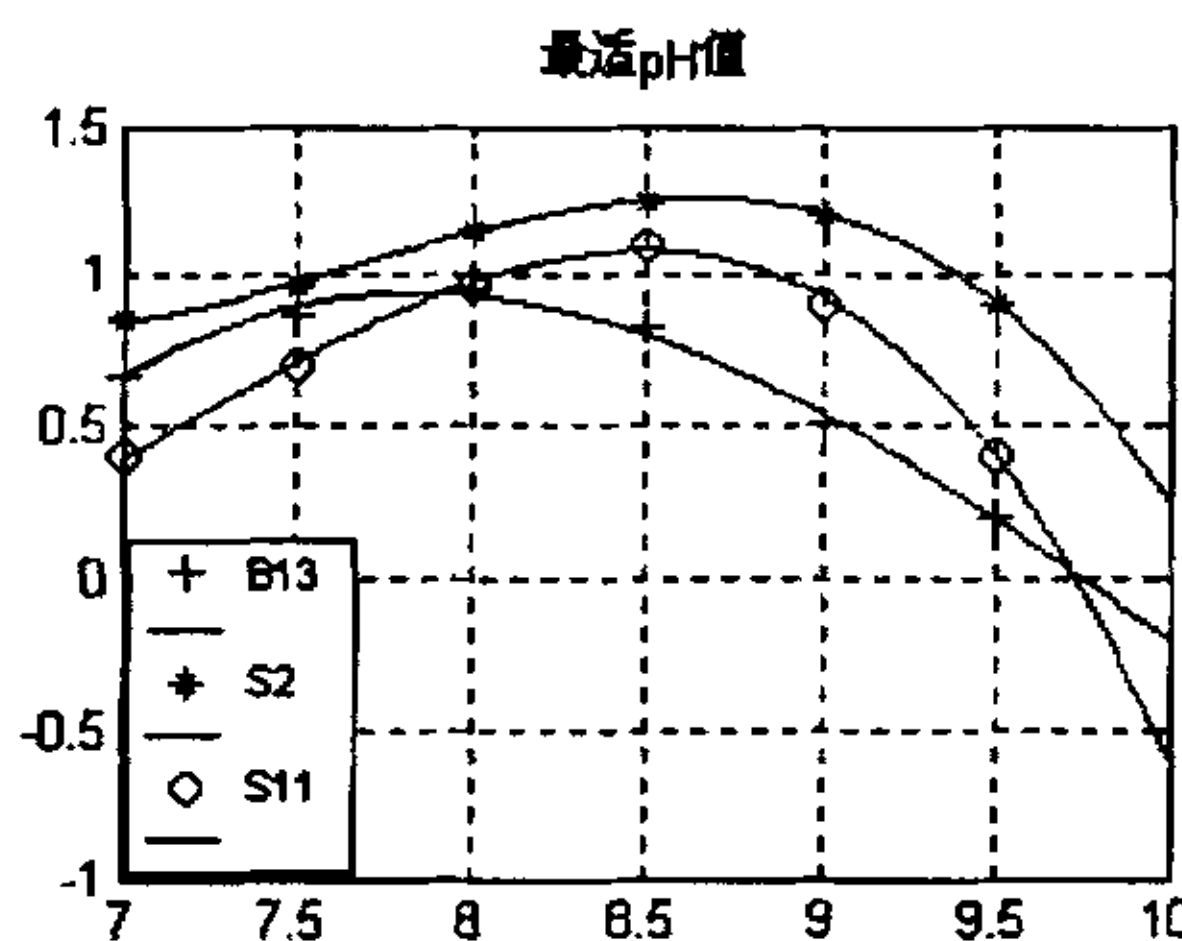
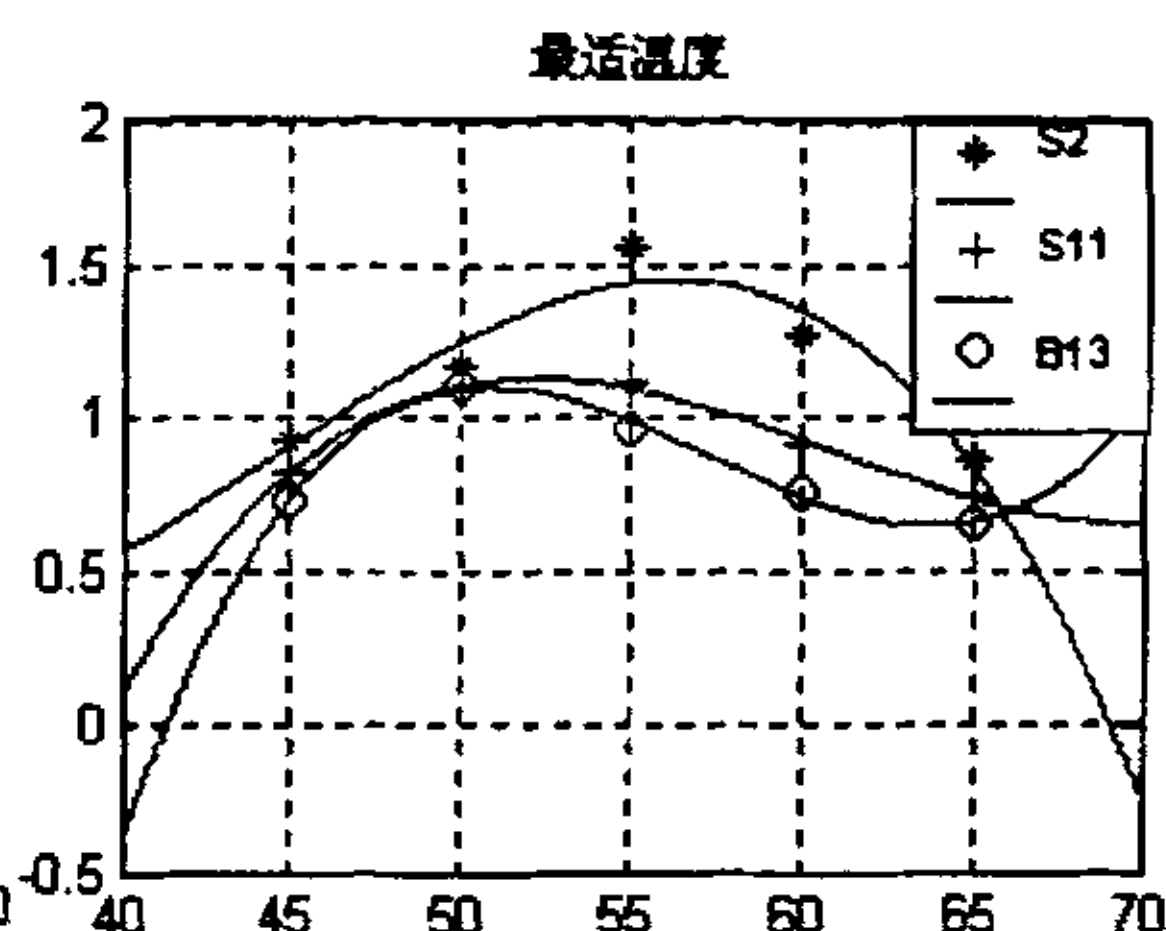
图 4-7 酶液最适 pH 变化

图 4-8 酶液最适温度变化

4.2.6 酶液最适温度变化

最适温度变化

表 4-7

温度 菌株	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃
B ₁₃	0.728	1.109	0.965	0.762	0.653
S ₁₁	0.824	1.087	1.123	0.911	0.741
S ₂	0.927	1.164	1.573	1.274	0.861

注：表中数据为吸光度

取离心酶液稀释 500 倍，分 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃ 五个梯度，测试酶活性。三株菌所产酶液最适温度存在不同：S₂ 和 S₁₁ 最适温度是 55℃，且酶活性比出发菌株 B₁₃ 高，B₁₃ 所产酶液最适温度为 50℃，酶液最适温度保持温

度高一些,对酶脱胶来说有一定好处,可加强酶液对胶质的渗透作用,并且能够加快催化反应速度。

温度升高能够加快酶反应速度,根据绝对反应速度理论,在反应系统中,并不是所有的分子都能进行反应,它们需要获得一定的能量转入瞬时的活化状态,即成为活化分子以后才能反应生成产物。分子一般通过碰撞而传递能量,升高温度一方面可以增加分子的动能,另一方面也能增加分子间的碰撞频率,因此,升高温度可加速反应。但是,温度过高会使酶分子的催化活性部位结构发生改变,导致酶的催化活性降低,甚至出现失活现象。为了瓦解胶质体系,渗透作用在酶脱胶十分重要,因此,还需要重视酶活性稳定情况^[55]。

4.2.7 底物亲和性变化

底物亲和性 表 4-8

菌株	Sigma 果胶	聚半乳糖醛酸	果胶
B ₁₃	0.134	1.856	1.022
S2	0.102	1.742	1.155
S11	0.108	1.633	1.141

注:表中数据为吸光度

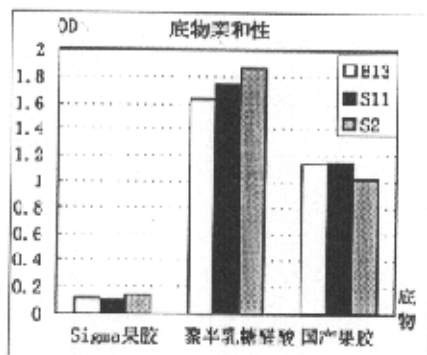


图 4-9 底物亲和性变化

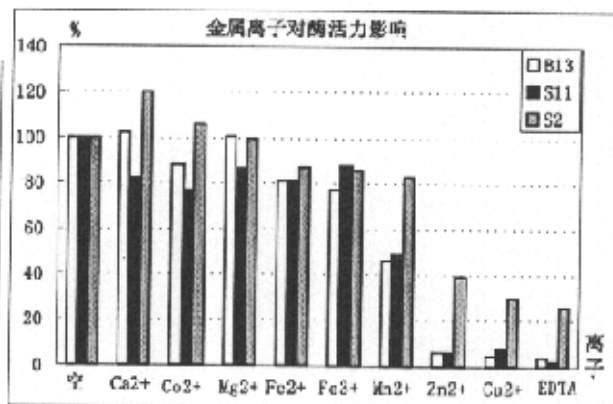


图 4-10 金属离子对酶活力的影响

取三株菌合成的酶液离心处理,将浓度稀释 500 倍,分别以 Sigma 化学果胶、聚半乳糖醛酸和天然果胶为底物,620nm 测试吸光度 OD。三种菌产生的酶液对聚半乳糖醛酸产生的催化效果最显著(图 4-9),产物最多,表现为吸光度最高,这说明该类细菌合成酶液主要为聚半乳糖醛裂解酶。与出发菌株 B₁₃

的亲水性要好一些，更能促进胶质水解，这对提高脱胶效率大有好处。

4.2.8 金属离子对酶活性的影响^{[67][68]}

苎麻植株生长于天然环境中，会与许多金属离子和金属盐结合，分析不同金属离子对酶液活性的影响情况，可以选择更满足脱胶要求的酶液，并可以考虑添加金属离子，提高酶脱胶效果。

不同金属离子及 EDTA 对酶活力的影响 表 4-9

金属离子	酶活力%			金属离子	酶活力%		
	S ₂	S ₁₁	B ₁₃		S ₂	S ₁₁	B ₁₃
—	100	100	100	FeCl ₃	86.32	88.25	77.48
CaCl ₂	119.83	82.66	102.16	MnCl ₂	83.38	48.90	45.57
MgSO ₄	100	86.63	101.98	ZnSO ₄	38.87	6.11	6.22
CoCl ₂	106.19	77.26	88.56	CuSO ₄	29.83	7.01	4.50
FeSO ₄	87.75	81.57	81.26	EDTA	25.93	2.10	3.33

以 5mmol/L 的 CaCl₂、FeCl₃、MnCl₂、CoCl₂、MgSO₄、ZnSO₄、FeSO₄、CuSO₄、EDTA 与酶液混合，55℃保温 30min，620nm 测试果胶酶活力，以空白酶液和 EDTA 酶液为对照。金属离子对三株菌合成的酶液的活性的影响情况是不相同的（图 4-11），S₂ 所产酶液对金属离子的抗性要明显好于 S₁₁ 和 B₁₃，Ca²⁺、Co²⁺ 对 S₂ 所产的酶液具有显著激促作用，对 B₁₃ 所产酶液的影响不明显，对 S₁₁ 所产酶液会产生一定的抑制效应。Cu²⁺、Zn²⁺、EDTA 对三株菌合成的酶液活性都有比较强烈抑制效应，而 Mn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 有一定抑制作用，Mg²⁺ 基本无影响。重金属离子抑制酶的活力，一般认为可能是和酶的某些基团发生反应造成的。金属离子结合了酶的活性部位或者底物与酶的催化位点，并且这种结合不可逆转，阻碍了酶与底物的正常结合，抑制了酶的催化效应^[41]。

在苎麻植株生长过程中，各种胶质会与 Ca²⁺、Mg²⁺ 等结合，如果胶物质 Ca²⁺、Mg²⁺ 结合形成网状结构，Ca²⁺ 对酶液具有显著激活作用十分有利于酶液脱胶处理。

4.2.9 选取脱胶菌株

综合以上分析，筛选菌株 S₂ 合成酶液与底物具有更好的亲和性，并且合成半纤维素酶的活性更高，酶液最适 pH 为 8.5 和最适温度为 55℃，Ca²⁺ 对酶活性提高比较明显，酶液性质明显优于菌株 B₁₃ 和 S₁₁，更适合苎麻脱胶生产要求。

性提高比较明显,酶液性质明显优于菌株 B₁₃ 和 S₁₁,更适合苧麻脱胶生产要求。苧麻脱胶过程比较粗放,用水要求不严格,难以保证金属离子含量,温度, pH 值变化幅度较大,选取 S₂ 菌株,培养合成酶液进行脱胶研究是比较合理的。

筛选优良菌株是一个长期的烦琐过程,需要菌种选育人员在生产中细心观察,并且作大量细致工作,需要长期筛选,不断分离,才能得到理想的产酶菌株,本课题暂时选取 S₂ 菌株来进行酶法脱胶研究。

4.3 酶液稳定性分析^{[40][55]}

苧麻酶脱胶过程是一个酶液在原麻纤维表面不断向胶质内层浸透,同时,胶质不断从纤维表面分散进入溶液的双重作用过程。这个过程需要完成原麻的浸湿,酶由外到里浸透纤维分解胶质,需要消耗时间,这对酶活稳定性提出了比较高的要求。从脱胶均匀性考虑,活性稳定的酶液体能够保证浸透纤维比较充分。酶是一种特殊蛋白质,结构精细,环境温度和 pH 变化对其催化活性十分敏感,温度和 pH 的变化,除了能够影响到酶的活性和催化反应速率,并且在不同温度和 pH 条件下,酶活稳定性差异很大。为了制定比较合理的酶处理工艺,有必要对酶液在不同的温度和 pH 稳定性进行分析。

4.3.1 酶液的 pH 稳定性

将酶液 pH 调节为 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 在最适温度 55℃ 保温 30min, 再将酶液 pH 调至最适 pH 为 8.5 处,测试吸光度 OD。

在 pH=8.5 处,初始酶液活性最高,在 pH 为 8.0 和 9.0 初酶活性也比较高,保温 30min 后, pH 为 8.5 的酶液还能保持 1.025 的高酶活性(图 4-11),这说明在 pH 为 8.5 处,酶液的稳定性比较高。但是, pH 为 9.0 处的酶液活性几乎损失了一半。酶液在 pH 为 7.0 和 9.0 两端,酶活性稳定性是比较差的,保温处理后,酶活性损失比较厉害,尤其是在 pH 为 7.0 处,酶活性损失最厉害,几乎失去了大部分酶活性,只有 0.325。酶液的 pH 稳定性分析,在脱胶时选择 8.0~9.0 之间的 pH 值是比较合理的。枯草芽孢杆菌是一种嗜碱性环境细菌,合成酶液在碱性环境条件下的稳定性高,碱性脱胶环境对苧麻脱胶是比较有利的,苧麻纤维是一种纤维素纤维,酸性条件对纤维强力有损害,碱性脱胶环境

可以最大程度保持纤维强力不受到损害。酶催化分解胶质导致酸性产物生成，酶液 pH 下降，因此，提高酶液范围比较广的 pH 稳定性有重要意义。

pH 稳定性分析 表 4-10

pH	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
初酶活	0.864	0.908	1.117	1.052	0.765
终酶活	0.325	0.864	1.025	0.583	0.471

注：表中数据为吸光度

酶在不同 pH 的稳定性存在不同，是由于 pH 对酶活性部位及其附近解离基团的解离状态产生了影响，妨碍了酶与底物的结合，影响到酶的催化反应，过高或过低 pH，会使整个酶分子变性，导致彻底失去催化活性。

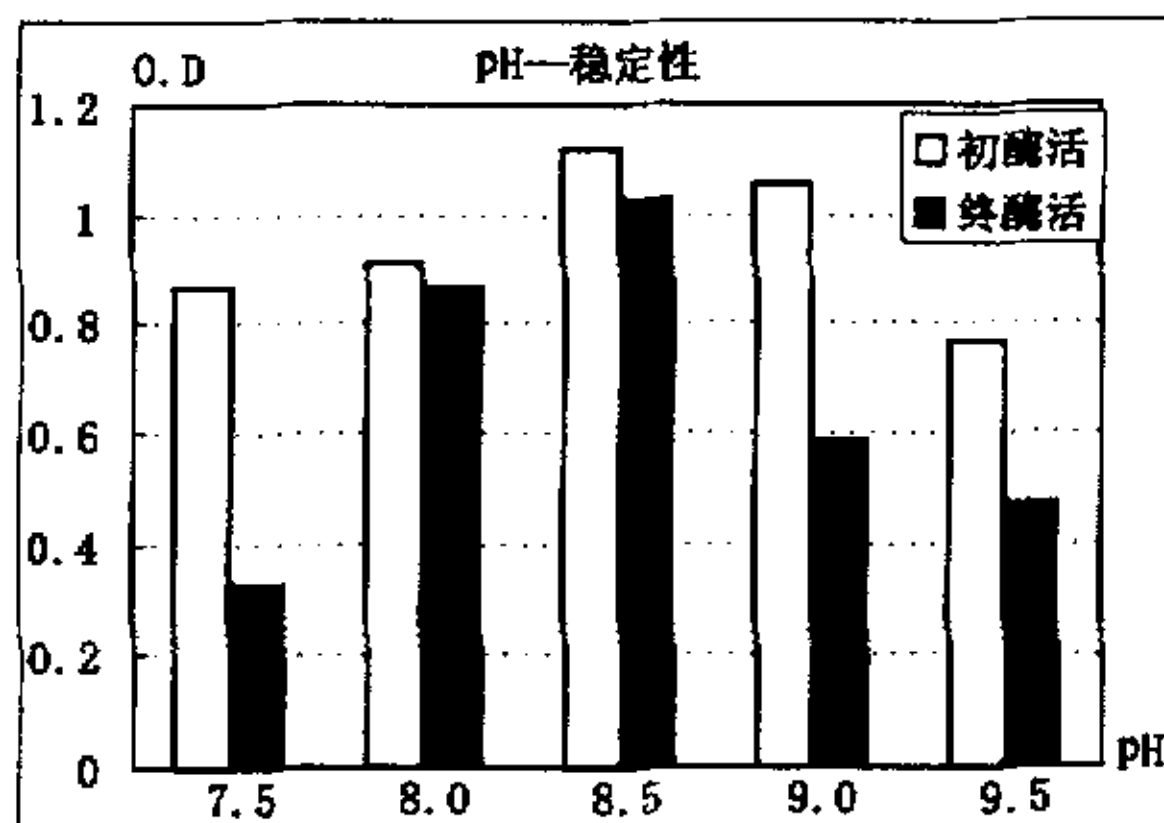


图 4-11 酶液 pH 稳定性

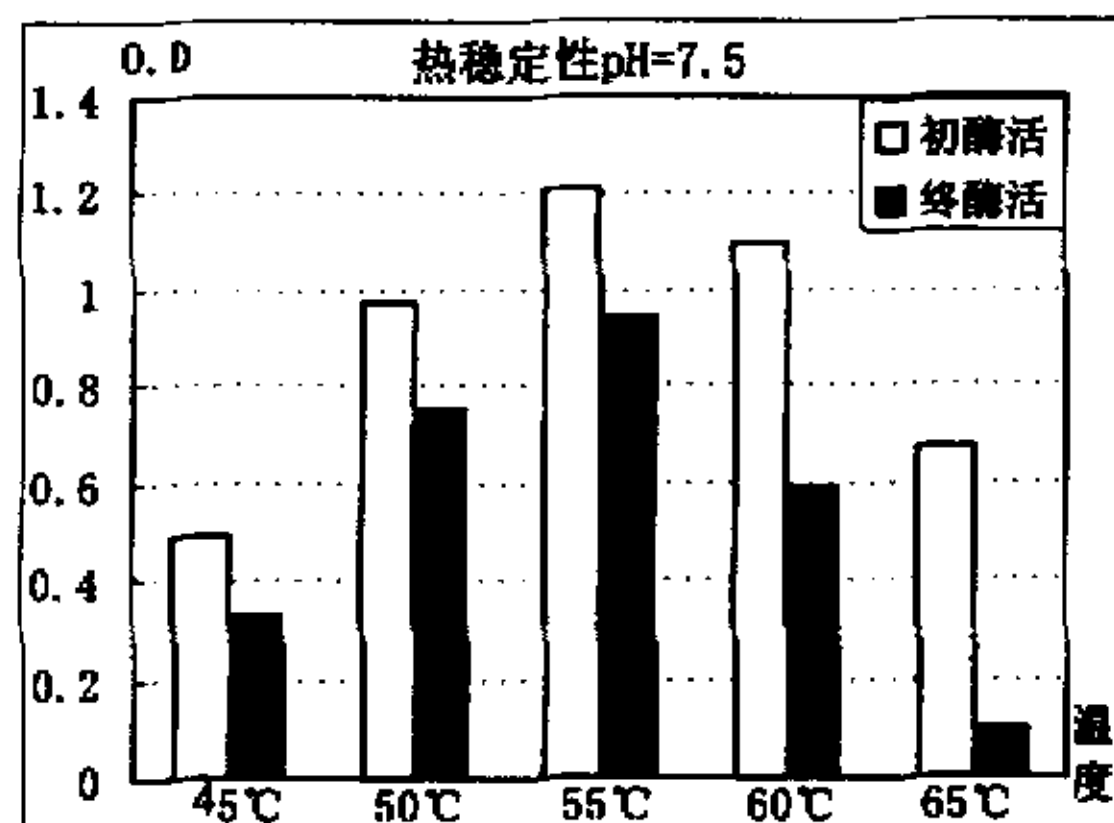


图 4-12 酶液热稳定性 (pH=7.5)

4.3.2 酶液的热稳定性

酶活性在不同温度下的稳定性是不相同的，并且不同 pH 条件下的热稳定性差异很大。取离心酶液，将酶液 pH 分别调至为 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5，在不同温度下水浴保温 30min，再将酶液温度冷却后，调回到最适温度 55℃，测试残存酶活性。

同一 pH 值条件下，酶液在最适温度 55℃ 的热稳定性要高一些，经过保温处理，酶液能够保持比较高的活性（图 4-12，图 4-13，图 4-14，图 4-15，图 4-16）。pH 值对酶的热稳定性存在影响，酶液在最适 pH 下的热稳定性较高（图 4-14）。pH 为 7.5 和 9.5 时，酶液热稳定性比较差，保温 30min 钟后，酶液失活比较严重（图 4-12，图 4-16）。在不同 pH 下，温度较低 45℃，50℃ 的酶液，

活性损失比温度高 60℃, 65℃ 的酶液活性损失小一些, 尤其是当 pH 为 9.5 时, 温度高的酶液活性损失十分严重 (图 4-16)。

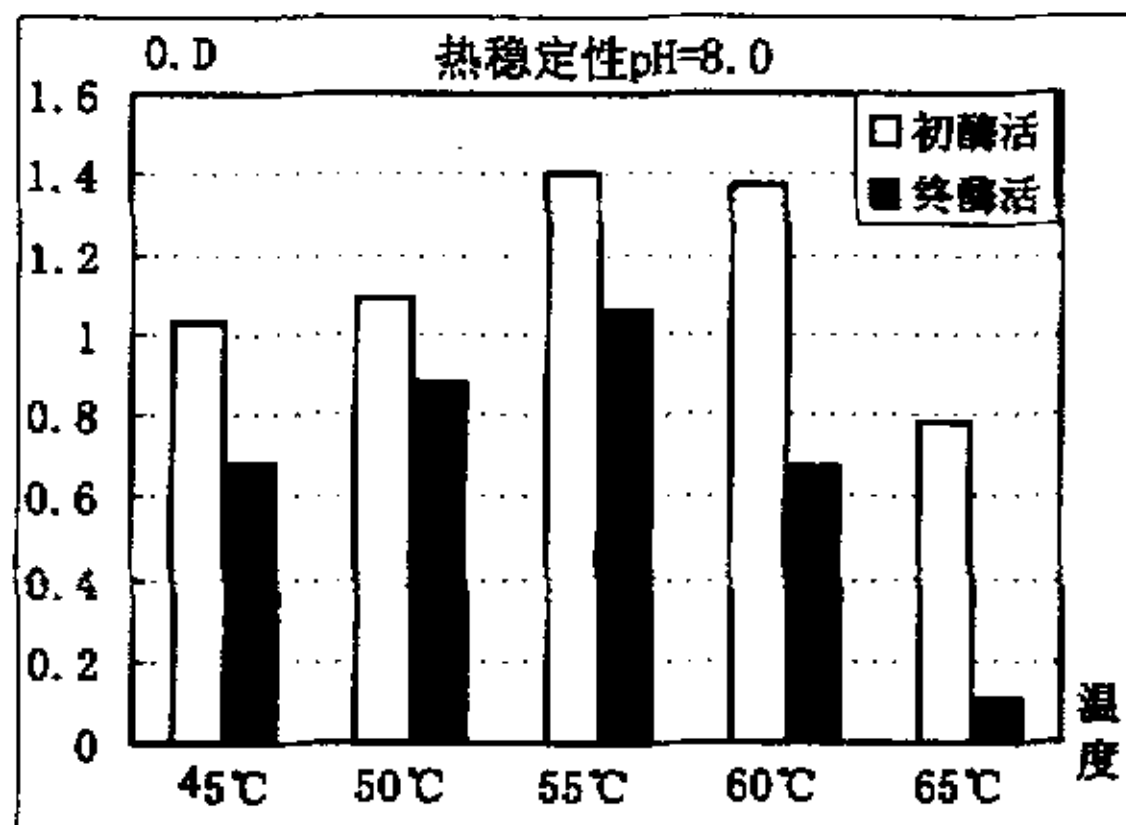


图 4-13 酶液热稳定性 (pH=8.0)

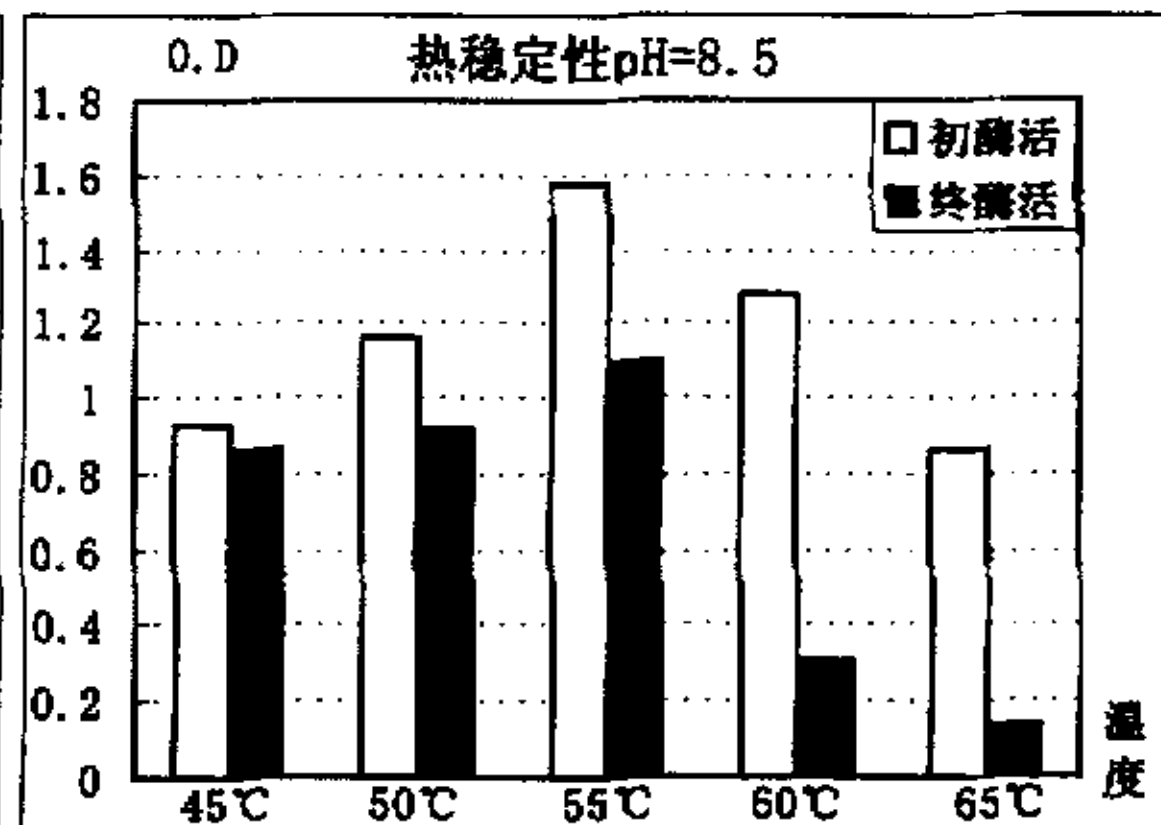


图 4-14 酶液热稳定性 (pH=8.5)

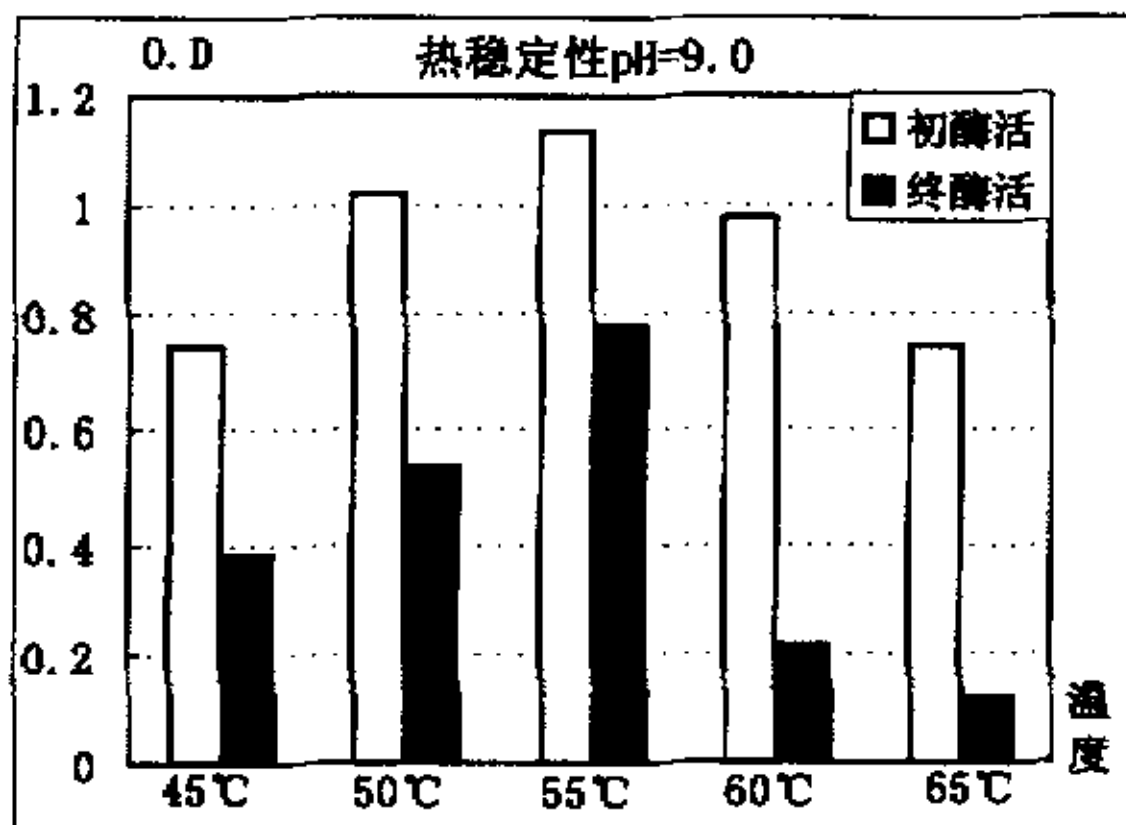


图 4-15 酶液热稳定性 (pH=9.0)

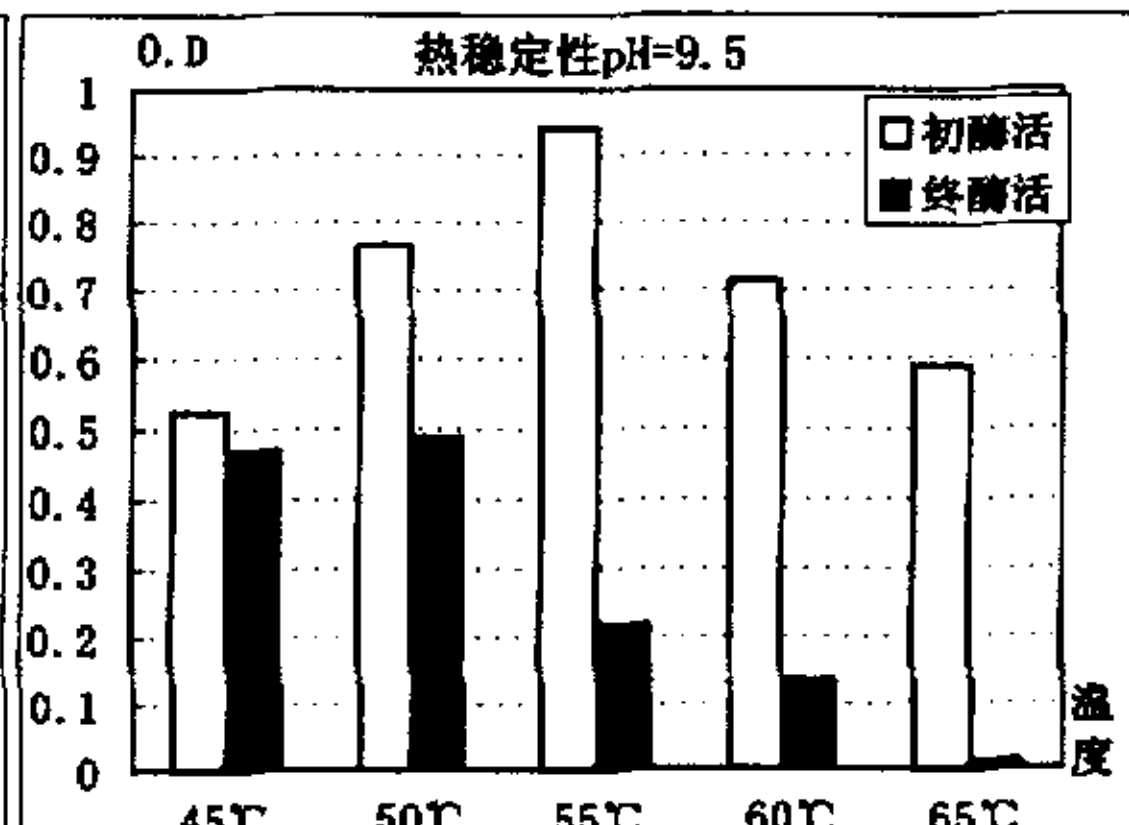


图 4-16 酶液热稳定性 (pH=9.5)

酶催化反应时, 底物分子上的某些功能基团必须具有能使其每一基团同时与酶分子的相应功能团起反应的构象 (主体排列), 以便于酶的相应功能基团发生作用, 这是一种多点结合, 存在空间构象。不同温度条件, 酶的空间构象发生改变, 酶与底物的结合发生改变, 同时, 温度升高, 酶蛋白分子发生变性, 酶的催化能力降低, 表现为酶液活性降低。

热稳定性测试数据

表 4-11

温度 \ pH		45℃	50℃	55℃	60℃	65℃
7.5	初酶活	0.495	0.978	1.212	1.101	0.673
	终酶活	0.325	0.752	0.944	0.589	0.097

8.0	初酶活	1.025	1.088	1.398	1.368	0.783
	终酶活	0.680	0.882	1.052	0.667	0.110
8.5	初酶活	0.927	1.164	1.573	1.274	0.861
	终酶活	0.864	0.918	1.097	0.312	0.141
9.0	初酶活	0.748	1.017	1.133	0.978	0.741
	终酶活	0.383	0.533	0.781	0.218	0.124
9.5	初酶活	0.522	0.765	0.941	0.712	0.588
	终酶活	0.471	0.486	0.219	0.134	0.011

注：表中数据为吸光度

第五章 酶脱胶工艺优化

苧麻酶脱胶过程是一个十分复杂的生物化学反应过程，无法将其脱胶机理分析清楚，建立精确的生化反应模型，因此，要从反应机理本身来解决酶脱胶工艺最优化问题，是比较困难的。基于最优化理论的回归试验设计，为解决酶脱胶工艺最优化，提供了比较可行的方法。在这里，对苧麻酶脱胶工艺的最优化研究，分为三个步骤进行，首先对酶脱胶工艺进行最优化试验设计，然后，建立比较可靠的回归方程，最后，借助于最优化理论和计算机工具软件，求解出最优工艺条件，并对最优化工艺条件下的纤维性能和纺纱性能进行了对比分析^{[41][42][43][44][45][46][47]}。

5.1 酶法脱胶工艺优化研究

5.1.1 试验设计

5.1.1.1 选取实验因子

苧麻酶脱胶过程的影响因素比较多，主要有温度、pH值、酶液浸渍时间、酶液浓度、浴比等，在回归试验设计中，需要固定一些因子，进一步简化问题。

酶液浸渍苧麻脱胶的过程，是一个酶破坏胶质结构的过程，需要重点考虑酶对胶质体系的破坏效应。在酶脱胶过程中，酶分子不断从麻纤维表面向内层纤维胶质进行渗透，胶质不断从内层纤维分离出来溶解于处理液中，这是一个双相过程。在酶液处理苧麻时，需要重点考虑酶与底物胶质的结合和胶质体系的瓦解。米氏方程认为，当底物浓度达到一定限度，所有酶全部与底物结合后，反应速率达最大值，此时，再增加底物也不能使反应速率增加^{[54][55]}。在有足够底物的情况下，而又不受到其他因素的影响，则酶的反应速率与酶的浓度成正比。因此，我们需要把酶浓度和底物都达到充分满足程度，主要考虑影响酶催化反应的其他因素对脱胶效果的影响。参考生产实际情况，固定酶液浓度为酶/水比为1:1，浴比为1:12，主要考虑温度、pH值、酶液浸渍时间对酶脱胶效果的影响。精练残胶率作为刻画酶处理效果的一个综合指标应该比较合适的，这里选取这一指标，建立单目标的最优化数学模型，求解最优化工艺条件。

5.1.1.2 旋转组合试验设计^{[8][41][44][45]}

在建立最优化回归模型方面，回归旋转组合设计得到了比较广泛的应用。旋转组合设计安排 $N=Mc+2p+M_0$ 次试验，其中 $Mc=2p$ 个点分布在半径为 $\rho_c=\sqrt{p}$ 的球面上， $2p$ 个点分布在半径为 $\rho_c=r$ 的球面上， M_0 个点分布在半径为 $\rho_c=0$ 的球面上。旋转组合设计能使二次设计具有旋转性，部分消除了回归系数之间的相关性，克服了回归正交设计中二次回归的预测值方差依赖于实验点在因子空间中的位置这个缺点，并保留了回归正交设计的优点，计算简便，试验次数比较少，这里选用三因子二次回归的旋转组合设计安排实验。为了计算方便，需要对因子水平进行编码（表 5-1）。

因子编码 表 5-1

因子 x_{aj}	温度 (°C) x_1	时间 (h) x_2	pH 值 x_3
+1.682	63	6	9.4
+1	60	5	9
0	55	4	8.5
-1	50	3	8
-1.682	47	2.5	7.7

5.1.2 建立回归方程.

5.1.2.1 计算回归系数

$$b_0 = K \sum_{\alpha} y_{\alpha} + E \sum_{j=1}^p \left(\sum_{\alpha} x_{\alpha j}^2 y_{\alpha} \right)$$

$$b_j = e^{-1} \sum_{\alpha} x_{\alpha j} y_{\alpha}$$

$$b_{ij} = m_c^{-1} \sum_{\alpha} x_{\alpha i} x_{\alpha j} y_{\alpha}$$

$$b_{ij} = (F - G) \sum_{\alpha} x_{\alpha j} y_{\alpha} + G \sum_{j=1}^p \sum_{\alpha} x_{\alpha j} y_{\alpha} + E \sum_{\alpha} y_{\alpha}$$

三因子二次通用旋转组合设计结构矩阵

表 5-2

实验	X0	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1 ²	X2 ²	X3 ²	残胶率% y
Mc	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3.312
	2	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	2.383
	3	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	3.495
	4	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	2.526
	5	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	4.254
	6	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	4.562
	7	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	4.217
	8	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	3.931
2p	9	1	+1.682	0	0	0	0	1	1	0	2.452
	10	1	-1.682	0	0	0	0	2.283	0	0	4.395
	11	1	0	+1.682	0	0	0	2.283	0	0	3.256
	12	1	0	-1.682	0	0	0	0	2.283	0	3.351
	13	1	0	0	+1.682	0	0	0	2.283	2.283	5.224
	14	1	0	0	-1.682	0	0	0	0	2.283	3.563
Mo	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.762
	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.934
	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.556
	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.251
	19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.436
	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2.154

经过程序计算得到下面的回归方程：

$$y = 2.517056 - 0.144982x_1 - 0.036745x_2 - 0.067209x_3 - 0.124250x_1x_2 \\ + 0.240000x_1x_3 - 0.079250x_2x_3 + 0.281435x_1^2 + 0.238998x_2^2 + 0.624466x_3^2$$

5.1.2.2 回归方程显著性检验

$$S_{\text{总}} = \sum_{\alpha} y_{\alpha}^2 - \frac{1}{N} \left(\sum_{\alpha} y_{\alpha} \right)^2, f_{\text{总}} = N - 1$$

$$S_{\text{剩}} = \sum_{\alpha} y_{\alpha}^2 - b_0 B_0 - \sum_{j=1}^p b_j B_j - \sum_{i < j} b_{ij} B_{ij} - \sum_{j=1}^p b_{jj} B_{jj}$$

$$S_{\text{回}} = S_{\text{总}} - S_{\text{剩}}, f_{\text{回}} = C_{p+2}^2 - 1$$

$$F_2 = \frac{S_{\text{回}}/S_{\text{回}}}{S_{\text{剩}}/S_{\text{剩}}} \sim F(f_{\text{回}}, f_{\text{剩}})$$

经程序处理得到以下关于回归方程的方差分析结果，F 值远大于 10.2，因此回归方程拟和程度比较好，能够用来预测。

方差分析表

表 5-3

来源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性 ($\alpha=0.01$)
回归	7.548839	9	0.8387599	111.8070	F(9,5)=10.2
剩余	7.501856	10	0.7501560	0.7501856	-
总计	15.050694	19	-		

5.1.2.3 回归系数显著性检验

$$D(b_0) = K\sigma^2, t_0 = |b_0| / \sqrt{K S_{\text{误}} / f_{\text{误}}}$$

$$D(b_j) = e^{-1}\sigma^2, t_j = |b_j| / \sqrt{e^{-1} S_{\text{误}} / f_{\text{误}}}$$

$$D(b_{ij}) = m_c^{-1}\sigma^2, t_{ij} = |b_{ij}| / \sqrt{m_c^{-1} S_{\text{误}} / f_{\text{误}}}$$

$$D(b_{jj}) = F\sigma^2, t_{jj} = |b_{jj}| / \sqrt{F S_{\text{误}} / f_{\text{误}}}$$

经程序处理得到关于回归系数显著性的假设检验结果，

$$t_0 = 29.276 > t_{\alpha,01}(10) = 4.587$$

$$t_1 = 2.541 > t_{\alpha,1}(10) = 1.812, \quad t_{12} = 1.667 > t_{\alpha,2}(10) = 1.372$$

$$t_2 = 2.644 > t_{\alpha,1}(10) = 1.812, \quad t_{13} = 3.220 > t_{\alpha,01}(10) = 3.169$$

$$t_3 = 0.178, \quad t_{23} = 0.763, \quad t_{11} = 5.067 > t_{\alpha,01}(10) = 4.587$$

$$t_{22} = 4.303 > t_{\alpha,01}(10) = 3.169, \quad t_{33} = 11.243 > t_{\alpha,01}(10) = 4.587$$

除了 x_3 和 x_2x_3 的回归系数不显著外，其他的回归系数都存在不同程度的显著性，去掉不显著的回归系数，得到最后回归方程：

$$y = 2.517056 - 0.144982x_1 - 0.036745x_2 - 0.124250x_1x_2 + 0.240000x_1x_3 \\ + 0.281435x_1^2 + 0.238998x_2^2 + 0.624466x_3^2$$

从上面的回归方程可以看出，温度升高能够提高脱胶效果，残胶率降低但是这是一个二次变化曲线，这是因为温度升高能够提高酶分子对纤维胶质的渗透分解，但是，升高温度同时会降低酶的活性。时间的延长可以提高酶脱胶效率，这也是一个二次曲线，这是由于胶质的去除在反应初始阶段，胶质容易去除，随着反应的继续进行，胶质分解变得困难，延长酶液浸渍时间能够使得酶对胶质的渗透更加彻底，胶质的去除更加彻底。pH 没有一次项这是因为 pH 只

在最适条件下发挥作用，稍加改变，酶活性影响很大，提高脱胶效果需要在最适 pH 值下进行处理。

5.1.3 求解最优化工艺

最优化数学模型可表述成以下形式：

$$\begin{aligned} \min f(X) = & 2.517056 - 0.144982x_1 - 0.036745x_2 - 0.124250x_1x_2 \\ & + 0.240000x_1x_3 + 0.281435x_1^2 + 0.238998x_2^2 + 0.624466x_3^2 \end{aligned}$$

线性约束条件可表述为如下形式：

$$\begin{cases} C_1(X) = x_1 - 30 \geq 0 \\ C_2(X) = 70 - x_1 \geq 0 \\ C_3(X) = x_2 - 2 \geq 0 \\ C_4(X) = 8 - x_2 \geq 0 \\ C_5(X) = x_3 - 7 \geq 0 \\ C_6(X) = 10 - x_3 \geq 0 \end{cases}$$

取初始设计参数 $X^{(0)} = [55, 4, 8.5]^T$

在 MATLAB6.1 中，编写 M 文件，求解上述最优化问题，最后得到最优化工艺条件：

温度：60.56℃，pH：8.54，时间：4.25h

5.1.4 最优化结果讨论

5.1.4.1 设计最优化脱胶工艺

苧麻酶脱胶最优化工艺设计

表 5-4

工艺	酶处理工艺	精练工艺
优化前工艺	温度：50℃，时间：3.5h，pH 值：8.0，浴比：1:12，酶/水比：1:1	NaOH6g/l，NaSiO ₃ 4%，助剂 2%，浴比：1:12，时间：2h，压力：0.2MPa
最优化工艺	温度：60℃，时间：4h，pH 值：8.5，浴比：1:12，酶/水比：1:1	NaOH4g/l，NaSiO ₃ 4%，助剂 2.5%，浴比：1:12，时间：1.5h，压力：0.1MPa

在以上最优化结果的基础上，参考理论分析，并经过调整，重新设计了整个酶法脱胶工艺。设计思想是尽量减少碱液用量，充分强调酶液浸渍瓦解胶质

体系，保持纤维自然属性不受到损害。

在最优化工艺条件下，对脱胶处理后的精干麻作了如下一些质量对比分析。

5.1.4.2 精干麻质量对比

精干麻质量对比分析 表 5-5

项目	优化前	优化后
纤维支数	1855	1880
纤维长度	9.12	9.49
束强	5.7	5.28
短纤率	4.62	5.49
制成率	63.5	65
残胶率 (%)	2.37	1.80

加强了酶液的渗透处理作用，使整个脱胶工艺中，胶质的去除作用变得更加柔和，用碱量减少，精练对纤维损伤变得更小，细的纤维更多的保留下来，纤维支数提高，纤维制成率提高。酶液对韧皮的作用更加深入，使胶质的去除更加彻底，残胶率降低，纤维变得更加柔软，纤维的表面状态没有受到较大剥蚀，上油率提高。外观表现纤维更分散，光泽柔和，手感更加柔软等。(表 5-5)

5.1.4.3 细纱品质对比

细纱质量对比分析 表 5-6

项目	优化前	优化后
条干 (CV%)	36.75	17.75
单纱断裂强力 N/tex	24	26.5
强力不匀率	5.77	3.57
细节 (只/400m)	361	204
粗节 (只/400m)	107	68.7

精干麻质量的提高，大大改善了纤维纺纱性能，从细纱品质看来，条干均匀度有了较大提高，粗细节减少，因此，使单纱强力也有了较大提高，强力不匀率降低，表现为细纱断头减少，挡车容易，能够为后道工序提供更好的细纱产品 (表 5-6)。

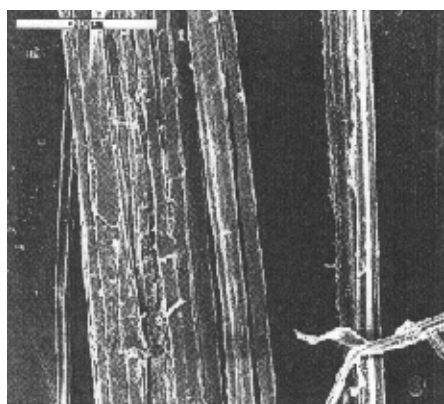
5.1.4.4 纤维扫描照片对比^{[69][70]}

图 5-1 优化前酶麻



图 5-2 优化后酶麻

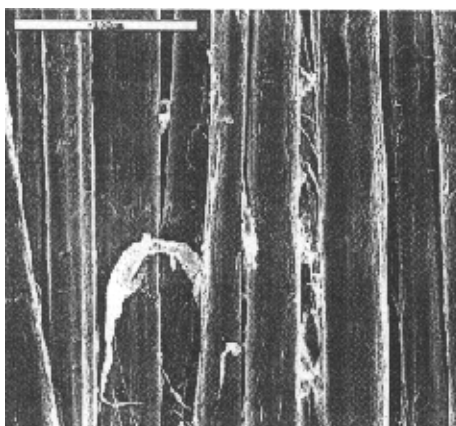


图 5-3 优化前精干麻

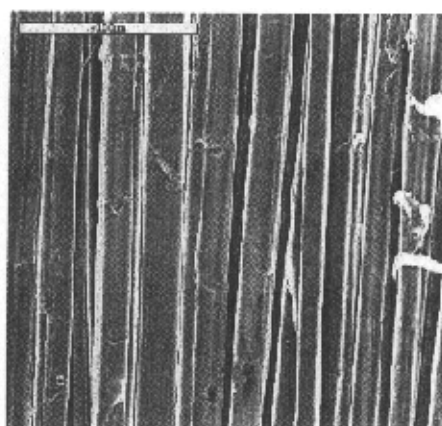


图 5-4 优化后精干麻

工艺优化前的酶液浸渍后，纤维之间还存在较多胶质粘结（图 5-1），最优化工艺，酶液浸渍苧麻后，纤维之间的大部分胶质已经去除（图 5-2），降低了后道碱液精练强度，从精干麻分析，优化前的精干麻纤维之间还有部分胶质粘结（图 5-3），最优化工艺处理的精干麻经过渗透处理，胶质去除均匀，表现为纤维分散良好（图 5-4）。

最优化工艺结果说明，在酶脱胶过程中，酶对纤维细胞壁之间胶质的瓦解作用是十分重要的。通过酶液对纤维细胞壁外层胶质的去除，半纤维素的去除变得容易的多了。温度升高除了会对酶液产生失活影响外，但同时能够加剧酶液对纤维的渗透，因此，对消除胶质屏蔽是十分有利的，时间延长无疑会保证

这种渗透作用更加充分和彻底，增加表面活性剂尤其是渗透剂的用量，对提高酶液的渗透作用十分必要，保持在最适酸碱度条件下完成这一过程是十分必要的。

5.2 苎麻酶脱胶机理分析

5.2.1 酶法脱胶及其影响因素分析^{[6][9][40][57]}

在苎麻酶脱胶过程中，酶分子首先接近纤维表面，并吸附在纤维表面的胶质部位，酶分子活性中心结合部位先与胶质发生专一性结合，形成中间络合物，活性中心催化部位再发生专一性催化，促进果胶，半纤维素分子链苷键水解断裂，大分子果胶和半纤维素被切断，与纤维素的结合力减弱而溶解于水中，胶质结构体系受到破坏。不同脱胶酶专一性结合位置不同，切断苷键生成产物也不一样，活性部位专一性结合和催化作用不能决然分开，有的反应可能经历几次反应才能完成。随着胶质分解向纤维内层深入，酶分子需要从原麻纤维表面渗透进内层纤维之间，与胶质结合，完成胶质的水解分离，同时，从纤维细胞壁上分离下来的胶质，需要从内层纤维之间游离出来，分散进入溶液体系。在酶脱胶过程中，使原麻纤维保持一定分散状态，有利于酶与胶质的结合。胶质从纤维细胞间分离出来，会重新吸附在纤维表面上，在酶脱胶过程中，使溶液保持一定的循环状态，让分离胶质从纤维之间分散出来也是很必要的。在企业酶脱胶生产中，只是将原麻放入煮练锅中进行，没有实现酶液循环流动，这是需要改进的地方，并考虑添加一些分散剂，分散胶质。

温度对脱胶率的影响（图 5-5），在 60℃ 酶脱胶率、碱脱胶率和总脱胶率出现最高，酶液浸渍苎麻的主要作用是破坏胶质体系。温度升高，酶分子运动加快，纤维分散状态发生改变，利于酶分子对内层纤维的渗透并与胶质结合，纤维内层胶质体系受到破坏，为后道精练打开了胶质屏障，结果表现为精练脱胶率最高。脱胶酶液最适温度为 55℃，这不并不是酶脱胶率最高处理温度。在化学脱胶中，提高碱液对胶质的渗透是依赖于高温高压煮练完成，这对纤维有严重损害，并且这种方式会带来脱胶不匀。筛选出所产酶液的高温热稳定性比较好的细菌，这样在脱胶中可以保持较高处理温度，能够增强酶液对胶质的

渗透作用^{[54][55]}。

温度对酶脱胶率的影响 表 5-7

温度	酶脱胶率	碱脱胶率	总脱胶率
50℃	12.22%	16.51%	26.29%
55℃	12.39%	16.83%	26.58%
60℃	13.49%	17.31%	27.89%
65℃	12.88%	15.63%	26.50%

pH 值对脱胶率的影响 表 5-8

pH 值	酶脱胶率	碱脱胶率	总脱胶率
7.5	11.11%	15.32%	24.73%
8.0	10.70%	15.71%	24.85%
8.5	11.89%	17.75%	27.53%
9.0	10.64%	16.46%	25.34%

最适 pH 处的酶脱胶率、碱脱胶率和总脱胶率都出现最高（图 5-6），从酶

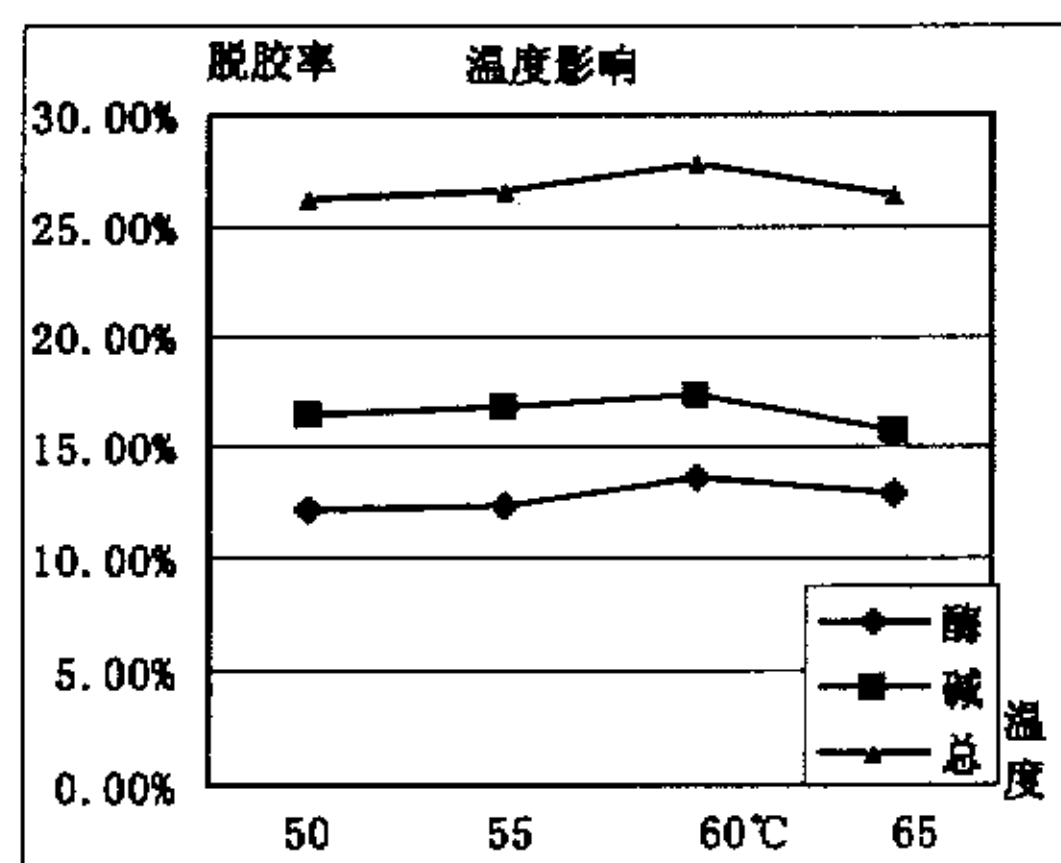


图 5-5 温度对脱胶率的影响

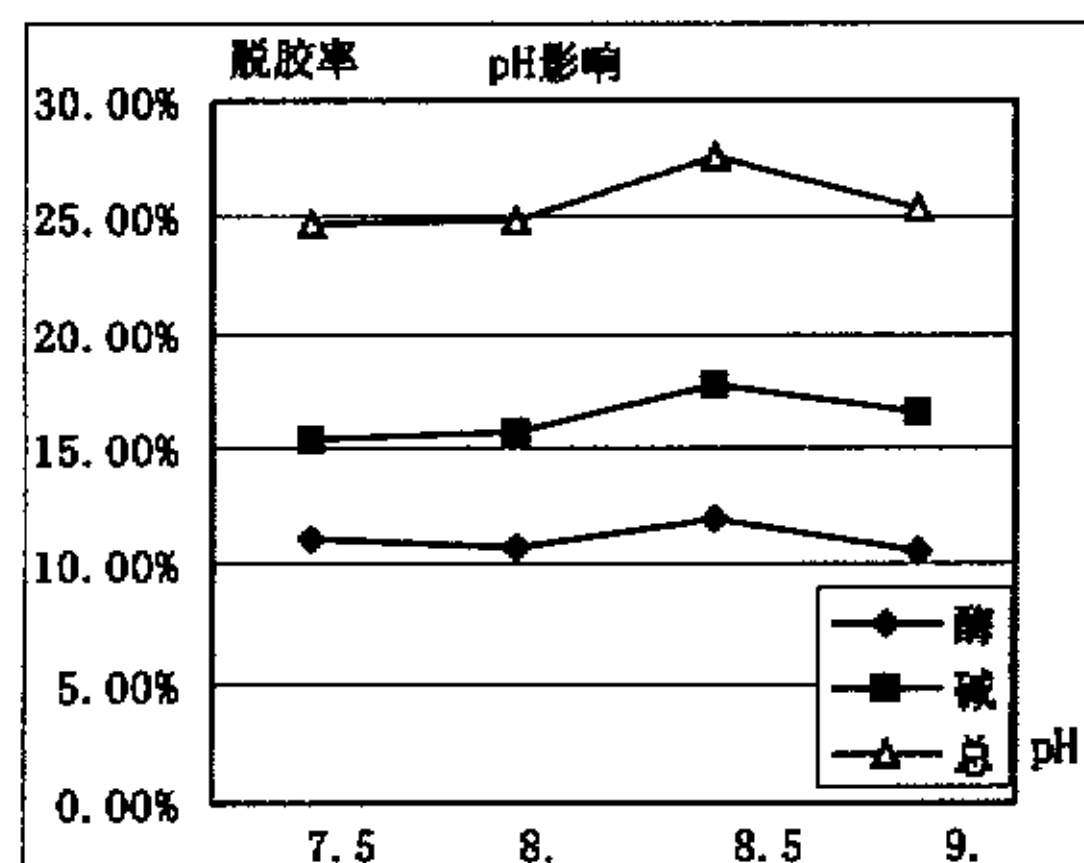


图 5-6 pH 对脱胶率的影响

最适 pH 作用分析，这是因为在最适 pH 条件，酶的活性基团和胶质相关基团的解离状态最有利于酶与胶质的结合，催化效率最高，表现为酶在最适 pH 下对胶质体系瓦解程度最好，出现酶脱胶率最高，酶液最适 pH 也是酶脱胶效率最好的工艺条件^[55]。

延长酶液浸渍时间，能够提高酶脱胶效果（图 5-7）。但是，延长时间对酶

脱胶效果的提高是有限的，大于 4h，脱胶率提高缓慢，这也可从脱胶酶液 pH 值变化反映出来（图 5-15），酶液浸渍苧麻，开始一段时间，pH 值下降比较快，几乎成直线下降，达到 4h 曲线趋于平缓，认为酶的作用强度已经减弱。这可认为是由于酸性产物生成，酸性环境，酶液活性降低。也可认为酶液对胶质的渗透是有限的，在纤维表面，酶分子容易发挥作用，在纤维内层，由于空间限制，酶分子与胶质结合变得困难，胶质催化水解速度降低，生成酸性产物越来越少。

时间对酶脱胶率的影响 表 5-9

时间	酶脱胶率	碱脱胶率	总脱胶率
2h	9.15%	13.54%	21.45%
3h	10.43%	16.10%	25.26%
4h	11.17%	17.07%	26.33%
5h	11.62%	16.65%	26.37%

酶浓度对脱胶率的影响 表 5-10

酶/水比	酶脱胶率	碱脱胶率	总脱胶率
1:1	12.31%	18.09%	27.87%
1:2	11.84%	17.87%	27.78%
1:3	10.84%	17.31%	27.41%
1:4	8.78%	16.14%	25.87%
1:5	3.70%	14.08%	22.15%

酶液浓度对脱胶效果的影响是十分显著的（图 5-8），酶浓度太低，底物与酶分子没有充分结合，胶质体系没有受到破坏，精练处理脱出胶质困难。但是，在酶浓度为 1:1 和 1:2 时，酶脱胶率的提高变化并不是十分显著。

从图 5-5、图 5-6 图 5-7 图 5-8 图 5-9 几图中可以看出，酶脱胶率要低于碱脱胶率，说明碱液精练在除胶质中发挥了主导作用，大部分胶质的去除是通过精练过程来完成的。

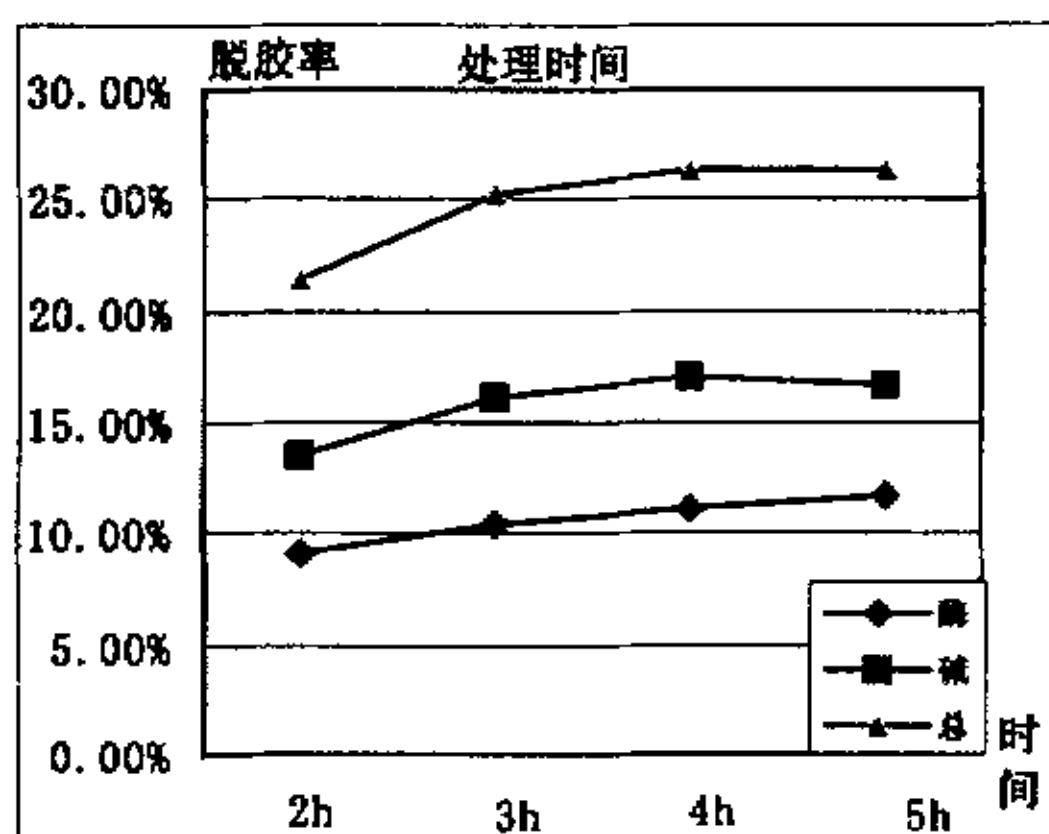


图 5-7 时间对脱胶率的影响

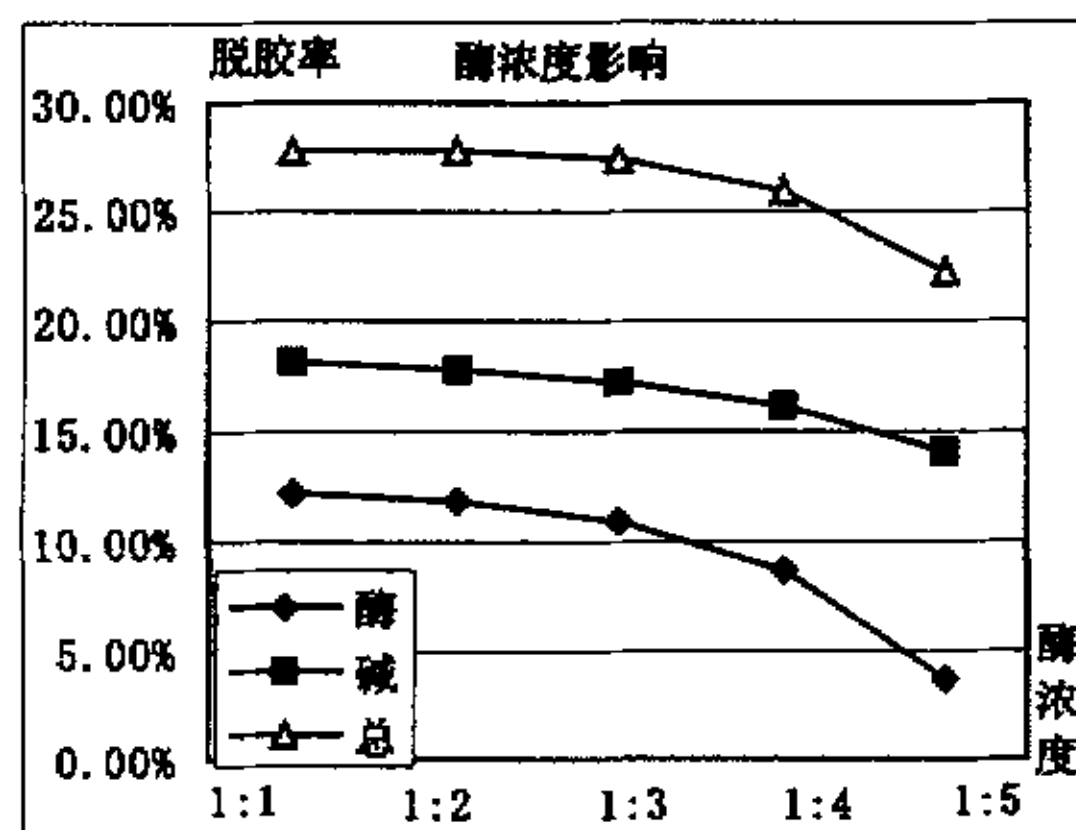


图 5-8 酶液浓度对脱胶率的影响

5.2.2 酶水解产物分析

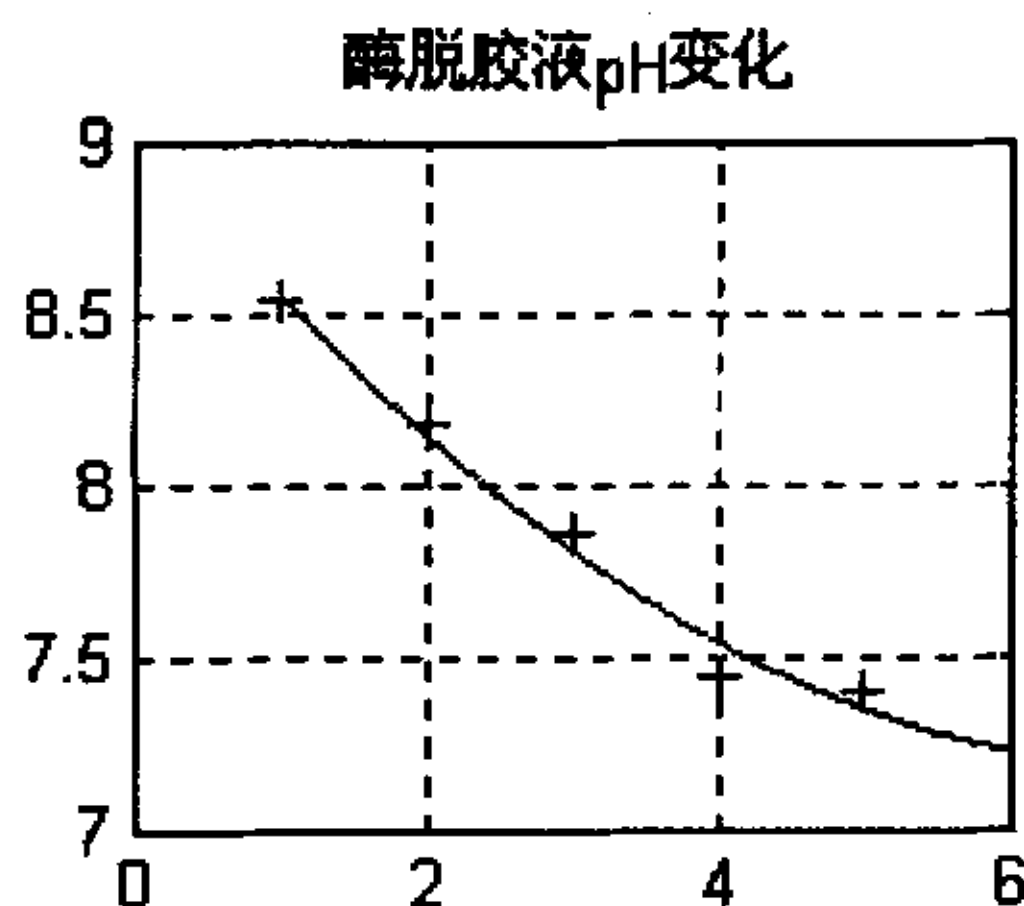


图 5-9 酶脱胶液 pH 变化

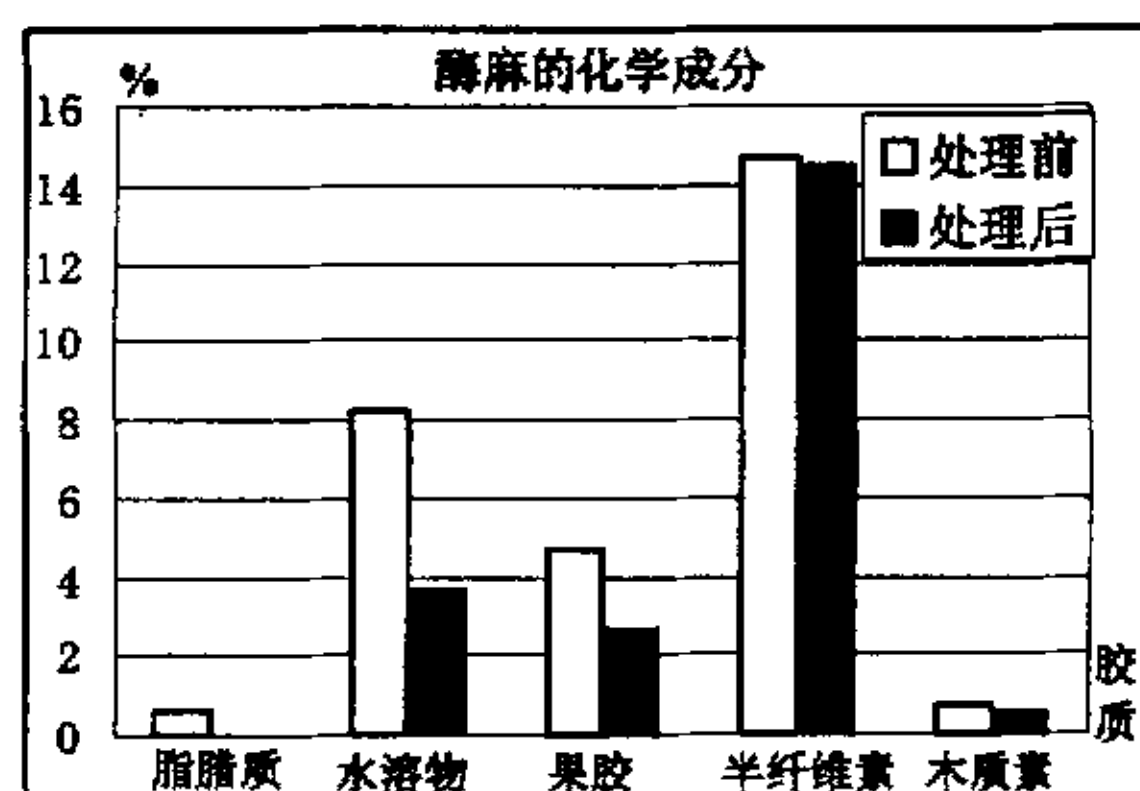


图 5-10 酶麻化学成分变化

酶液催化水解果胶和半纤维素，生成酸性物质。酶液 pH 值变化曲线（图 5-9）可以看出，酶液浸渍原麻的前三个小时，pH 下降速率比较快，几乎呈直线下降，证明有大量酸性产物生成。延长酶处理时间，pH 下降趋势趋于平缓，这一方面是因为在酸性环境中，酶活性降低，反应速度下降，酸性产物产生越来越少。另一方面是由于反应继续进行，酶与纤维深层胶质的结合变得困难，酶催化反应速度降低^[26]。

用该芽孢杆菌发酵酶液浸渍大麻，并对脱胶废液进行纸层析分析，与酸解大麻废液相比，酶解、碱解产物种类比较少。酶与酸、碱脱胶作用位点存在不同，作用机制也不尽相同。有人笼统地把决定生物脱胶效果的物质叫做“浸软因子”，实际上，所谓“浸软因子”就是各种酶的组合效应^{[71][72]}。果胶酶和其

他多糖降解酶的协同作用可以提高脱胶效果,当脱胶酶液中存在较高活性果胶酶时,一定活性的木聚糖、甘露聚糖酶等能够提高脱胶效果。一般而言,果胶酶对脱胶效果有直接影响,因此,可以将其作为衡量脱胶酶液质量的一个重要指标。

5.2.3 酶麻化学成分变化

酶处理苧麻化学成分分析 表 5-11

名称 化学组分	慈利原麻 (%)		酶处理后 (%)		去除率 (%)
	麻样 1	麻样 2	麻样 1	麻样 2	平均值
脂腊质 (%)	0.43	0.48	0.20	0.21	54.87
水溶物 (%)	8.33	8.18	3.50	3.6	56.94
果胶 (%)	5.74	5.10	2.15	1.89	62.74
半纤维素 (%)	14.06	14.21	12.36	12.40	12.415
木质素 (%)	0.69	0.51	0.91	0.95	-59.075
总含胶 (%)	29.63	29.35	18.43	18.83	36.82

原麻经过酶液浸渍处理,大部分水溶物和脂腊质被溶解在热溶液中。实际上,该细菌所产酶液主要作用于原麻中的果胶和半纤维素成分,从图中可以看出(图 5-10),一半以上的果胶得到催化水解,半纤维素被只去除了一小部分,这是因为细菌主要合成果胶酶,半纤维素酶比较少。木质素出现比重增加,这是因为该酶液对木质素去除极少,其他胶质的去除,使得木质素表现出了含量比重增大。果胶和一部分半纤维素的去除,不能只看成是一个胶质去除量的问题,而应该更关注这种去除效应,即胶质结构体系受到的破坏作用。当然,一定程度上,可以酶脱胶率来衡量酶液对胶质体系的破坏程度。

酶法脱胶大部分胶质的去除是通过精练过程来完成的,酶液浸渍生苧麻的主要作用是破坏胶质体系,纤维之间胶质体系受到破坏,为后道精练打开了胶质屏障。半纤维素等胶质易于溶解在热碱液中,碱液对胶质的去除效果还是十分显著的,完全去除碱液精练,看来是不明智的。苧麻胶质体系十分复杂,完全依赖于生物处理,从酶的角度分析,需要许多酶的协同作用才能完成,也许不是一次处理就能够解决的。先用生物方法如酶,打破胶质结构体系,再采用温和精练去除胶质,应该认为是一个比较合理的胶质去除工艺。

5.2.4 电镜扫描结果

5.2.4.1 纤维分散情况

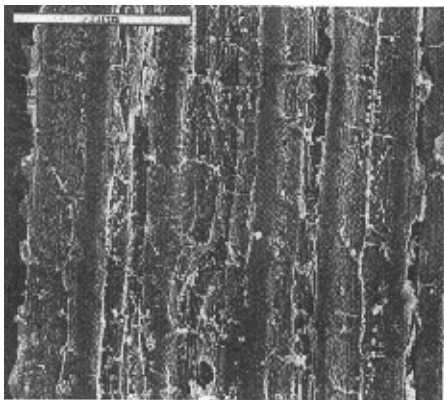


图 5-11 原麻

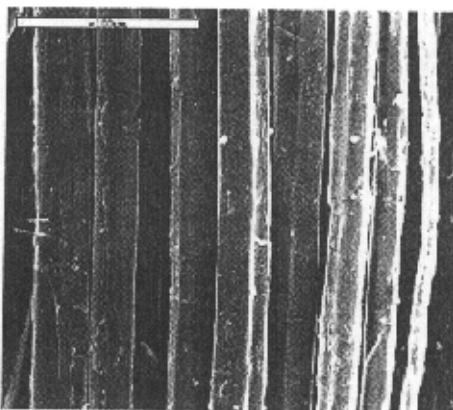


图 5-12 酶麻

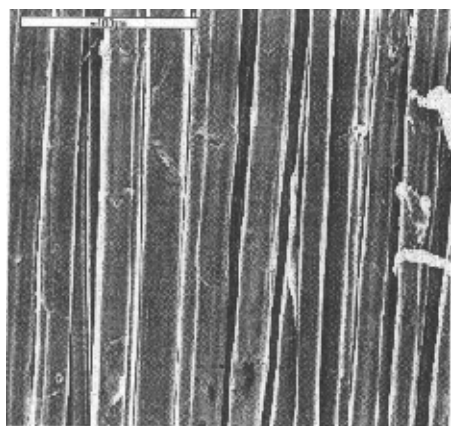


图 5-13 化学脱胶精干麻

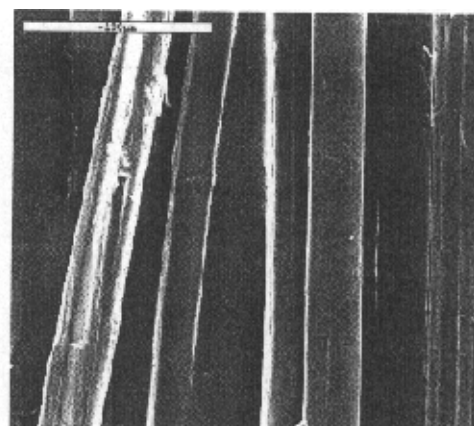


图 5-14 酶脱胶精干麻

在原麻扫描电镜照片（图 5-11）中可以看到，纤维之间被胶质粘连，难以分开，形成整块状，看不到单根纤维。酶液浸渍处理后，纤维之间大部分胶质已经去除，纤维相互分离，可以看到单纤维状态，同时可以看出，还有一些胶质附着在纤维表面（图 5-12）。通常在化学脱胶过程中，在碱煮初期，碱液的渗透，使纤维次生壁中的大部分半纤维素等胶质溶出进入碱液，进入碱液中的一些胶质还会进一步形成膨润的高分子凝胶被覆在纤维表层，影响了碱液往纤维深部的渗透，纤维次生壁中的半纤维素、木质素等胶质的溶出速度也就随之缓慢下来。要消除表层高分子凝胶对碱液渗透的阻碍作用，通常采用提高碱液

浓度, 延长煮练时间, 提高煮练温度, 更换碱液或更换煮练原麻, 添加助剂等措施。苧麻的碱煮练过程, 实质上是碱液对苧麻纤维表面和分子晶格空间始终保持固、液非均相间的最小表面张力, 使苧麻一进入碱液, 就能够被迅速润湿、渗透, 发生纤维膨化而龟裂、剥落、溶出, 并在碱液中降解、水解、增溶、分散的过程。对纤维素而言, 只是一个促进碱和其他助剂迅速达到最大空间的界面接触过程, 即是一个纤维的洗涤过程。酶浸渍纤维之间的壳状胶质去除, 为碱液精练打开了屏障, 大量胶质主要是半纤维素可以直接与碱液作用, 能够比较容易的分散溶解于热碱液中, 这样整个脱胶强度降了下来, 避免了对纤维表面状态有损害的强烈“剥皮效应”^[52], 表现为温和精练处理后的苧麻纤维良好的分散状态(图 5-13)。在精干麻扫描照片中, 似乎看不出酶精干麻和化学脱胶精干麻的分散状态有多大显著差别, 但从纤维的纺纱性能对比, 却发现这两种脱胶方法对纤维产生了不同的影响。(图 5-14)酶法脱胶精干麻, 因其胶质去除过程比较温和彻底, 表现为纤维手感柔软, 色泽温和, 纺纱性能大为改善, 成纱质量好。化学脱胶, 胶质去除依赖于两道强烈化学煮练过程来完成, 纤维手感粗糙, 色泽发亮, 这是因为纤维表面受到强烈的化学剥蚀作用, 表面光学性能、毛吸管性能和吸附性能发生改变, 水洗烘干后, 纤维分离困难, 需要增加上油处理。从苧麻复杂的胶质成分结构分析, 在目前研究水平下, 全生物脱胶是一个需要努力去探索的目标, 并且可以预见, 全生物脱胶需要复杂的处理工艺才能完成。采用自制粗酶液预处理, 破坏胶质体系, 打开精练屏障, 在温和条件下, 用碱液溶解胶质这是比较合理的, 不仅可以大幅度降低用碱量和煮练强度, 改善苧麻纤维的手感和纺纱性能, 而且也避免了只依赖于生物处理成本太高, 精干麻质量却未能满足纺纱要求的缺点, 在比较长的一段时间内, 应该认可这种联合工艺可行性和合理性。

5.2.4.2 纤维表面特征变化

对原麻、酶液浸渍苧麻纤维、酶液浸渍后碱液精练苧麻纤维和纯化学脱胶处理苧麻纤维进行电镜扫描(放大 2000 倍)。没有经过任何脱胶处理的原麻, 纤维外面包覆着一层壳状胶质, 纤维之间相互粘结在一起, 从酶脱胶处理苧麻

纤维的成分变化分析,纤维外面的包覆胶质主要是果胶和脂腊质成分。胶质与纤维分离间隙处,能够看到苧麻纤维表面的天然纹理结构,细长小沟槽(图 5-15)。原麻经酶液浸渍处理后,包覆在纤维外面的胶质得到去除,纤维已经完全显现出来,苧麻纤维表面的天然纹理特征十分明显。但是,这时纤维之间却依然没有相互分散开,麻样外观看起来依然成块状,但与原麻相比,可以明显看到纤维之间已经有明显分离现象。纤维之间的一些连接物质,主要是半纤维素,还没有得到完全溶解,纤维表面附着一些小块物,这是从纤维表面分离下来的胶质重新附着在纤维表面。仔细观察酶液浸渍后的苧麻纤维表面,再与酶液浸渍后的精练苧麻纤维相比,似乎可以看到一层很薄的膜状物质,这可能是导致纤维依然还相互粘结在一起的原因,可能主要是胞间层内侧次生壁,成分主要为半纤维素(图 5-16)。与化学脱胶苧麻纤维表面相比,酶精练麻保留了纤维细胞表面的天然纹理特征,酶脱胶处理,苧麻纤维表面受到的损害比较小(图 5-18),经过化学脱胶处理精干麻表面看不到纤维表面的天然纹理结构,强烈化学脱胶对纤维表面剥蚀比较厉害,表现出一些微细的纤维从纤维细胞壁表面分离出来,并且可以看到,纤维表面有了被化学脱胶处理留下的刻痕(图 5-17),这是因为强烈碱液煮练作用对纤维细胞壁原纤层之间的连接物质产生了渗透溶解,即发生了“剥皮反应”,^[52]所谓剥皮反应就是在碱的影响下,纤维素具有还原性末端基的葡萄糖基会逐个掉下来,直到产生纤维素末端基转化为偏变糖酸基的稳定反应为止,掉下来的葡萄糖基在溶液中最后转化为异变糖酸,并以钠盐的形式存在于煮练液中。这种作用表现为在化学脱胶中,脱胶制成率底。纤维表面表现为手感粗糙,摩擦系数增加,纺纱性能下降。

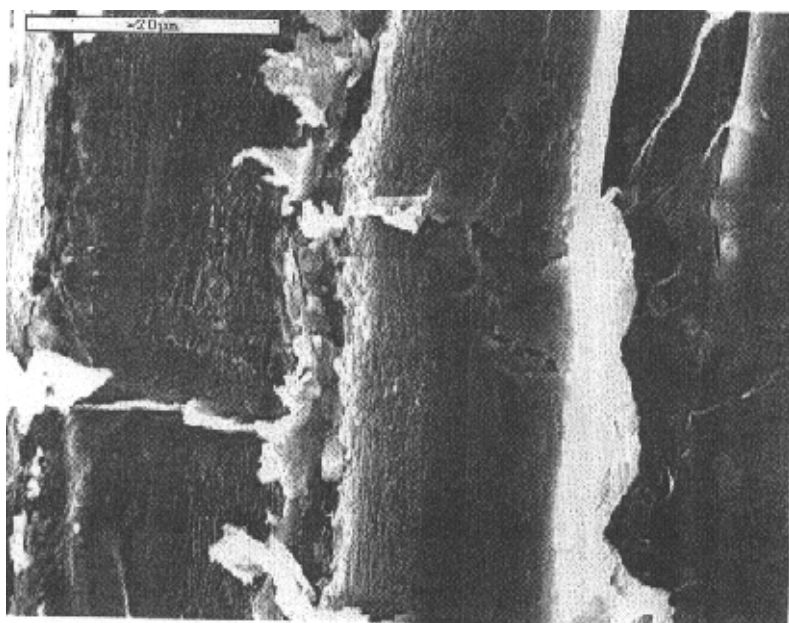


图 5-15 原麻 2000 倍扫描照片

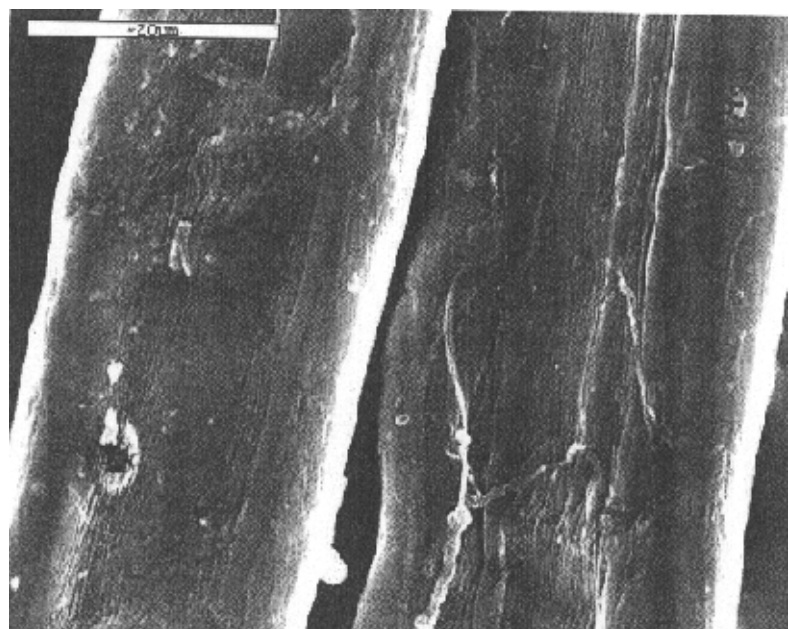


图 5-16 酶麻 2000 倍扫描照片

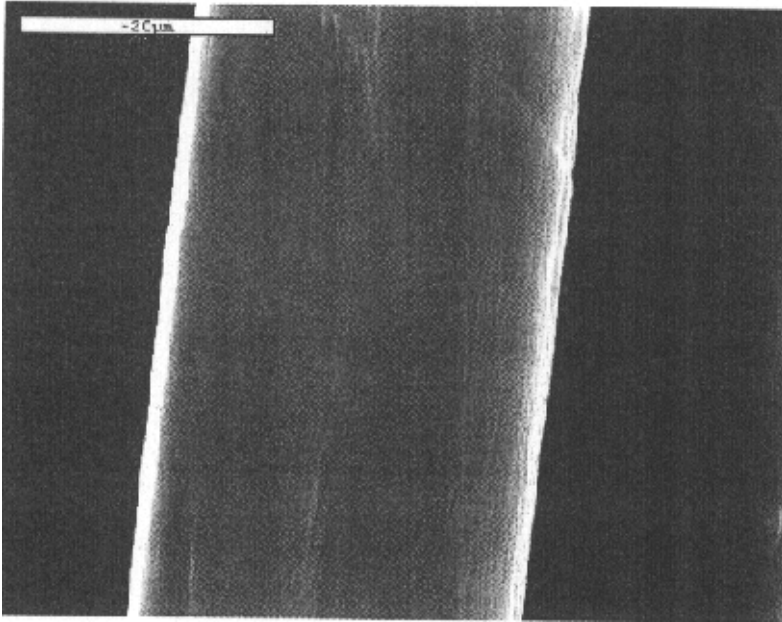


图 5-17 纯化学脱胶精干麻 2000 倍扫描照片

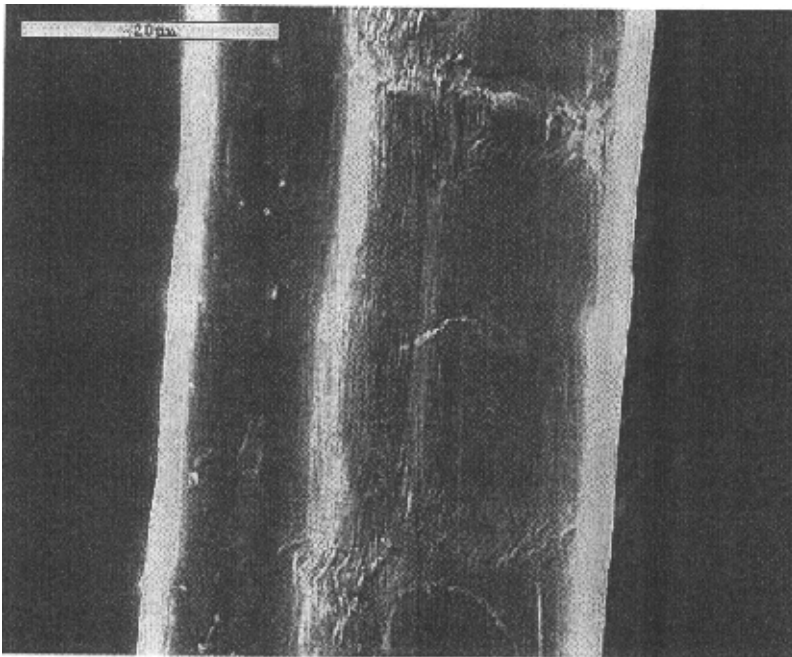


图 5-18 酶脱胶精干麻 2000 倍扫描照片

第六章 结束语

本研究课题通过原生质体紫外线诱变筛选细菌，并分析了其合成酶液性质。通过最优化试验设计建立起试验回归模型，借助于计算机和工具软件，寻找到比较合理的脱胶工艺条件，初步分析了酶脱胶机理。取得的主要结论有：

1. 合成酶液活性升高的细菌大多出现在 90s 左右紫外线照射时间。同一条件下，果胶酶活性出现升高的细菌比半纤维素酶活性升高的比例要大。
2. 不能认为诱变菌株和出发菌株合成酶液是同一物质，表现为酶液最适 pH 和最适温度，底物亲和性发生了改变。
3. 筛选出细菌合成酶液稳定性在 pH=8.5，温度 55℃ 左右最好，钙离子和钴离子对酶液有激活效应。
4. 通过最优化实验设计，能够以较少实验次数，建立比较准确的回归方程，借助于最优化理论，可以迅速地寻找到最佳脱胶工艺条件。
5. 酶的最适温度并不是酶催化效果最佳条件，增加温度，延长浸渍时间，可以提高酶分子对纤维胶质的渗透和破坏作用，酶液浸渍时间控制在 4h 是比较合适，最适 pH 是酶的最佳脱胶条件，1:1 的酶浓度脱胶效果最好。
6. 原麻经过酶液浸渍处理，大部分水溶物和脂腊质被溶解在热溶液中，一半以上的果胶得到催化水解，半纤维素被只去除了一小部分。大部分胶质的去除是通过精练过程来完成的，酶液浸渍生苧麻的主要作用是破坏胶质体系，纤维之间胶质体系受到破坏，为后道精练打开了胶质屏障，碱液对胶质的去除效果还是十分显著的，完全去除碱液精练，从经济成本上看来，是不合理的。
7. 酶处理后胶质会重新吸附在纤维表面，因此，在酶处理过程中，保持一定的机械分离作用是必要的。酶解产物为酸性物质，并且与化学脱胶产物存在差异。
8. 纯化学脱胶对纤维的表面剥蚀厉害，酶脱胶能够保持苧麻纤维表面天然特征，扫描照片显示精干麻纤维表面与原麻纤维表面纹理十分相似。

6.2 本课题研究存在的主要不足

由于实验条件限制，一些研究工作还深入的不够，未能将课题各个方面展开进行深层次探讨，并且，由于个人认识能力限制，对一些问题分析还不够深刻，希望能够在以后的研究工作中，对苧麻酶脱胶进行更深入研究和分析。具体存在以下几方面的不足：

1. 诱变细菌只采用了一种紫外线诱变方法，如果能够与基因工程结合，实现 DNA 片段剪切、嫁接等，必将对苧麻生物脱胶产生深远影响。

2. 没有添加辅助酶制剂进行研究试验。

3. 酶处理后纤维的表面形态与纤维的纺纱性能之间的关系还没有进行比较详细的研究等等。

致 谢

本研究课题是在导师刘让同教授悉心指导下完成的。在调研、选题、试验中，导师耐心给予我许多指导，并提供了大量帮助。论文初稿完成后，导师不辞辛苦，对论文进行了严格审核，并多次提出大量修改意见，为论文顺利完成倾注了大量精力和心血，在此向导师表示衷心感谢。研究生学习阶段，导师除了在学业上、生活上给予我许多帮助，并且言传身教，为人师表，“润物细无声”，使我得到了许多教诲，分析问题，解决问题能力有了很大提高，并养成了良好的工作习惯。在这篇硕士论文完成之际，谨向导师刘让同教授致以我深深的敬意。

在课题研究过程中，湖南益阳苧麻纺织印染厂李玉玲小姐给予我极大帮助，没有她大量心血的付出和不断督促，我不会这么顺利完成本论文。另外，纺织材料和产品设计中心来侃副教授，张一心副教授也给予了我许多热心指导，其他一些同学也为课题的完成提供了许多有益的建议和帮助。陕西省功能性服装重点实验室，纺织网络信息中心等各位老师为本课题的完成提供了大量便利。在此，谨向各位尊敬的老师和同学表示我诚挚的谢意和良好的祝愿。

参考文献

- [1]顾名淦, 汪家骏等, 麻纤维开发利用, 纺织工业出版社, 1993, 6
- [2]棉纺教研室, 麻的初步加工, 西北纺织工学院, 1989, 7
- [3]濮美珍编著, 苧麻织物的设计与生产, 纺织工业出版社, 1988, 8
- [4]许符节编著, 苧麻脱胶与纺纱, 株洲苧麻纺织科技情报站, 1985, 7
- [5]姜繁昌, 邵宽等编著, 苧麻纺纱学, 纺织工业出版社, 1990, 12
- [6]王德骥编著, 苧麻纤维素化学与工艺学—脱胶与改性, 科学出版社,
2001, 2
- [7]寻传民, 苧麻脱胶技术发展的趋势, 苧麻纺织科技, 1992, Vol.15, No. 6,
P9~14
- [8]祝志峰, 邵宽, 苧麻煮练工艺数学模型的研究, 苧麻纺织科技, 1994,
Vol.17, No.3, P4~7
- [9]万勤义, 试论苧麻碱煮过程及方式的变革, 纺织学报, 1991, Vol.12, No. 1,
P40~42
- [10]欧阳曙, 姚刚, 苧麻化学脱胶新技术的评述与应用, 苧麻纺织科技, 1993,
Vol.16, No. 1, P23~26
- [11]姚穆主编, 纺织材料学 (第二版), 中国纺织出版社, 1996, 4
- [12]D.AKIN et al, Structural Effects on Flax Stems of Three Potential Retting
Fungi, Textile Research Journal, 1998, 6, P829~836
- [13]Ali M.M.Appl.Microbiol, 1958, No. 6, P87~89
- [14]Chauhury S.D,Pak.J.Sci,1953, No. 5, P11~18
- [15]李桂珍, 生物技术在麻纺织领域的开发与应用, 麻纺织技术, 1998, Vol. 21,
No. 3
- [16]郭湘军译, 韧皮纤维剥制后的脱胶方法, 苧麻纺织科技, 1988, Vol. 11,
No. 1, P46~49
- [17]K. Gurucharanam, K. S. Deshpande, 黑曲霉 SS 多糖对苧麻脱胶的作用,
苧麻纺织科技, Vol. 11, No. 5, P50~52

- [18]刘正初等, 苧麻生物脱胶技术的应用研究, 纺织学报, 1991, Vol.12, No.10, P18~20
- [19]刘正初等, 苧麻细菌化学联合脱胶工艺生产应用效益分析, 纺织学报, 1990, Vol.11, No.8, P39~40
- [20]刘正初等, 苧麻纤维形态结构物理性能与脱胶方法的关系, 纺织学报, 1994, Vol.15, No.12,
- [21]中华人民共和国国家专利 85103481
- [22]刘正初等, 苧麻生物脱胶新技术工业化生产应用研究, 纺织学报, 2001, Vol.22, No.2, P27~29
- [23]汪测生, 苧麻生物脱胶技术的创新, 四川纺织科技, 2001, No.1, P4~6
- [24]中华人民共和国国家专利 95112564
- [25]卢士森等, 生物能力学原理在红麻好氧性微生物脱胶中的应用, 中国纺织大学学报, 1999, Vol.25, No.4, P63~65
- [26]刘自镭等, 大麻酶法脱胶机理初探, 纺织学报, 2001, Vol.22, No.3, P52~53
- [27]熊耀辉, 丹麦苧麻酶脱胶工艺研究, 苧麻纺织科技, 1989, Vol.12, No.3, P33~36
- [28]管映亭等, 苧麻果胶酶—化学法联合脱胶的研究, 苧麻纺织科技, 1992, Vol.15, No.6, P25~27
- [29]谢卓荣, 欧阳曙等, 100 吨苧麻生物脱胶生产性试验, 苧麻纺织科技, 1992, Vol.15, No.6, P30~32
- [30]蒋国华, 苧麻微生物脱胶研究, 纺织学报, 2001, Vol.22, No.6, P63~64
- [31]中华人民共和国国家专利 85104285
- [32]中华人民共和国国家专利 94105708
- [33]中华人民共和国国家专利 97109044
- [34]中华人民共和国国家专利 98111947

- [35]刘自镛等, 芽孢杆菌(Bacillus SP.NO.74)大麻脱胶酶系的研究, 微生物学, 1991, No.1, P48~53
- [36]郑皆德, 刘让同, 苧麻酶法脱胶新工艺的应用研究, 纺织学报, 2002, Vol.23, No.4, P66~67
- [37]房宽俊编著, 纺织品的生态加工技术, 中国纺织出版社, 2001, 6
- [38]郑国昌, 细胞生物学(第二版), 高等教育出版社, 1998, 5
- [39]钱存柔, 黄仪秀主编, 微生物实验教程, 北京大学出版社, 2000, 4
- [40]张树政主编, 酶制剂工业(上、下册), 自然科学出版社, 1984
- [41]茆诗松等, 回归分析及其试验设计, 华东师范大学出版社, 1981, 10
- [42]白新桂, 数据分析与试验优化设计, 清华大学出版社, 1986
- [43]陈瑞华等编, 纺织最优化方法与应用, 中国纺织出版社, 1994, 6
- [44]刘晓霞, 苧麻脱胶快速预氯处理工艺, 麻纺织技术, 1997, Vol.20, No.4, P7~9
- [45]许德生等, 苧麻织物浆料配方的最优化设计, 苧麻纺织科技, 1992, Vol.15, No.3, P16~17
- [46]刘晓霞, 苧麻预氯处理时精干麻脱胶效果与工艺参数的关系, 麻纺织技术, 1998, Vol.21, No.3, P26~29
- [47]陈立周, 机械最优化设计, 武汉地质出版社, 1986
- [48]D. E. AKIN et al, Effect of Retting Enzymes on the Structure and Composition of Flax Cell Walls, Textile Research Journal, April, 1997, 279~287
- [49]D. E. AKIN et al, Color Measurement of Flax Retted by Various Means, October 2000, 852~858
- [50]G.BUSCHLE-DILLER et al, Structural Changes in Hemp Fibers as a Result of Enzymatic Hydrolysis with Mixed Enzyme Systems, Textile Research Journal, April1999, 244~251
- [51]郭义明 主编 植物纤维化学 第二版 中国轻工业出版社 1997, 7
- [52]杨树惠 主编 植物纤维化学 第三版 中国轻工业出版社 2001, 1

- [53]寻传民, 论苧麻脱胶的主攻对象, 苧麻纺织科技, 1992, Vol.15, No.6, P22~26
- [54]郑集, 陈钧辉 编著 普通生物化学 (第三版), 高等教育出版社, 1998, 7
- [55]陈石根, 周润琦编著, 酶学, 复旦大学出版社, 2001, 2
- [56]吕晶, 陈水林, 酶及其在纺织加工中的应用, 纺织学报, 2002, Vol.23, No.2, P73~77
- [57]宋心远等, 新型染整技术, 中国纺织出版社, 1999, 11
- [58]H. G. 施莱杰, 陆卫平等译, 普通微生物学, 复旦大学出版社, 1990, 6
- [59]郑庆康, 木质素的生物降解, 四川纺织科技, 1998, No.1, 38~39
- [60]张启峰等编著, 有机分析教程, 中国标准出版社, 1996, 3
- [61]Somogyi M., J. Biol. Chem., 1952, 195.19
- [62]刘自镛, 任建平等, 大麻酶法脱胶研究, 纺织学报, 1999, Vol.20, No.5 26~28
- [63]姜锡瑞主编, 酶制剂应用手册, 中国轻工业出版社, 2001, 1
- [64]中华人民共和国国家标准 GB5889-86
- [65]张玉展, 基因工程概论, 华东理工大学出版社, 2001, 1
- [66]贺延龄, 陈爱侠编著, 环境微生物学, 中国轻工业出版社, 2001, 4
- [67]GUNNAR HENRIKSSON et al, Influence of Chelating Agents and Mechanical Pretreatment on Enzymatic Retting of Flax, Textile Research Journal, November 1997, 829~836
- [68]ANDERS PETER S. ADAMSEN, DANNY E. AKIN, Chelating Agents and Enzyme Retting of Flax, Textile Research Journal, 296~302
- [69]DANNY E. AKIN et al, Quality Properties of Flax Fibers Retted with Enzymes, Textile Research Journal, October 1999, 747~753
- [70]DANNY E. AKIN et al, Retting Flax with Endopolygalacturonase from *Rhizopus oryzae*, Textile Research Journal, JANUARY 2002, 27-34

[71] M.Yoshikawa et al., *Physiol.Plant,Pathol.*1977,11,P61

[72]M.Lee, et al.,*J.Bacteriol.*,1979,103, 595