

研究报告



两株芽孢杆菌在苧麻纤维复合脱胶中的应用

王慧慧 张非 舒潼 李攀登 吴亚 余天意 付春华 余龙江*

华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074

摘要:【背景】苧麻纤维细长、强韧、洁白、有光泽，被誉为“天然纤维之王”，应用广泛。但其被以半纤维素和果胶为主要成分的胶质所包裹，脱胶是生产精干麻工艺的核心工序。利用单一菌株脱胶，往往因其脱胶酶系不全，存在胶质去除率低的问题，导致后期仍需要大量的碱和漂白剂处理。

【目的】丰富苧麻脱胶过程中关键酶系，从而提高苧麻胶质去除率，并降低脱胶后期化学试剂的用量，推进苧麻生物脱胶的工艺应用。【方法】选用2株芽孢杆菌HG-9(高果胶酶和甘露聚糖酶)和HG-25(高木聚糖酶)建立了复合微生物脱胶技术，并对其进行了优化。【结果】当2株菌接种量均为6%，水料比16:1，初始pH值5.9，在温度37.6℃下脱胶处理14h时脱胶效果最佳，与菌株HG-9单独脱胶相比，脱胶时间减少2h，胶质去除率、半纤维素去除率和木质素去除率分别提高9.32%、21.24%和17.93%，次氯酸钠用量减少20%。通过电子显微镜分析其形貌特征发现，混合脱胶获得的纤维表面更加平滑，无明显扭曲和损伤且纤维分散度较高。【结论】通过复合微生物协同作用，丰富脱胶过程中关键酶系，提高了苧麻纤维胶质去除率，缩短了脱胶时间，而且减少了脱胶后期漂白剂的用量，为苧麻生物脱胶工业化应用的进一步发展提供了指导。

关键词: 苧麻纤维，复合微生物脱胶，协同作用，胶质去除率

Application of two *Bacillus* sp. strains in composite degumming of ramie fibersWANG Huihui ZHANG Fei SHU Tong LI Pandeng WU Ya YU Tianyi
FU Chunhua YU Longjiang*College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan,
Hubei 430074, China

Abstract: [Background] Ramie fiber is known as the “king of natural fiber” and used in many fields due to its excellent properties such as slender, strong, white, and shiny. However, the fiber is wrapped by the gum materials with hemicellulose and pectin as the main components, and degumming is the pivotal process for obtaining the refined ramie fibers. Using a single strain for ramie degumming, the gum removal rate is always low due to its incomplete degumming enzyme system. As a result, lots of alkalis and bleachers have to be used to remove the residual gum materials in the later stage. [Objective]

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21676111); Major Technological Innovation of Hubei Province (2019AAA033)

*Corresponding author: Tel: 86-27-87792264; E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

Received: 21-11-2020; Accepted: 02-02-2021; Published online: 16-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(21676111); 湖北省技术创新专项重大项目(2019AAA033)

*通信作者: Tel: 027-87792264; E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

收稿日期: 2020-11-21; 接受日期: 2021-02-02; 网络首发日期: 2021-03-16

Enriching the key enzyme systems in the degumming process of ramie fibers, improving the gum removal rate, reducing the usage of chemical reagents in the later stage, and promoting the industrial application of ramie biological degumming. **[Methods]** One strain *Bacillus* sp. HG-9 with highly activities of pectinase and mannanase and another *Bacillus* sp. HG-25 with highly activities of xylanase were selected to establish a mixed microbial degumming technology. Besides, the related parameters of the degumming process were optimized. **[Results]** When the inoculation amount of the two strains, the ratio of water to material, the initial pH value, the temperature, and the degumming time were 6%, 16:1, 5.9, 37.6 °C, and 14 h, respectively, the effect was best. Compared with strain HG-9 alone, the degumming time was reduced by 2 h, and the removal rate of gums, hemicellulose, and lignin were increased by 9.32%, 21.24%, and 17.93%, respectively. The amount of sodium hypochlorite was reduced by 20%. The results of scanning electron microscopy showed that the fibers obtained by composite degumming was smoother, without obvious distortion and damage. Meanwhile, the fiber dispersion was high. **[Conclusion]** With the synergistic action of composite microorganisms, the key enzymes in the degumming process was enriched, the gum removal rate was improved, the degumming time and the amount of bleacher in the later stage was reduced. This study provided meaningful guidance for the further industrial application of ramie biological degumming.

Keywords: ramie fiber, composite microbial degumming, synergistic action, gum removal rate

苧麻纤维细长、透气性好、传热快、散湿快、纤维强大且轻盈、不易霉变, 被誉为“天然纤维之王”, 广泛用于纺织、医疗、军工等行业^[1-2]。但苧麻韧皮纤维中含有 30%左右的胶质, 主要包括半纤维素、果胶等^[3-4]。胶质的存在会影响苧麻纤维的质量, 必须把这些胶质去除, 以得到精干麻, 即脱胶^[5-6]。传统的脱胶工艺使用大量的酸碱, 不仅污染环境, 还会损伤麻纤维, 导致精干麻品质差^[7-8]; 酶脱胶一般使用商品酶, 成本较高且效率低, 无法实现大规模工业生产^[9-10]; 而微生物脱胶条件温和, 绿色环保, 越来越受到学者的关注^[11-13]。

目前报道的应用于苧麻脱胶的微生物较多, 主要集中在芽孢杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、欧文氏菌属和曲霉菌等^[14-16], 其特征主要是能产生降解苧麻胶质的酶类, 如果胶酶、半纤维素酶。然而, 多数菌株分泌的酶类只有一种或几种, 或者缺少脱胶关键酶, 导致脱胶处理达不到麻纺对纤维残胶率的要求^[17]。复合微生物脱胶是近年来研究的热点, 通常是将 2 株或以上的菌株同时或者依次作用于原麻, 不同微生物所利用的胶质成分、产酶顺序、分泌的酶类组成比例及水解方式相互协同, 从而逐步实现胶质成分的有效降解, 提高脱胶效果。然而, 苧麻复合微生物脱胶虽

然取得一定进展, 但仍存在脱胶体系中关键酶系不足, 脱胶时间长达几十小时, 脱胶效率比较低, 这些限制了苧麻生物脱胶的大规模生产^[18-19]。因此, 发掘合适的微生物进行复合脱胶及工艺优化仍是苧麻生物脱胶技术发展的关键。

本研究以实验室保藏的高产果胶酶、甘露聚糖酶的芽孢杆菌 HG-9 和高产木聚糖酶的芽孢杆菌 HG-25 为基础, 进行混合脱胶, 并进一步对复合微生物脱胶条件进行优化, 不仅促进了苧麻胶质的进一步去除, 缩短了脱胶时间, 而且减少了脱胶后期漂白剂的用量, 具有良好的经济效益和环境效益。

1 材料与方法

1.1 苧麻韧皮

苧麻韧皮由湖北精华纺织集团有限公司提供, 并于干燥阴凉处保藏。

1.2 菌株

芽孢杆菌 HG-9 (CCTCC 号: M2014439) 和芽孢杆菌 HG-25 (CCTCC 号: M2014438) 由本实验室筛选保藏。

1.3 主要试剂、仪器和培养基

酵母提取物、胰蛋白胨, 安琪酵母股份有限公司; 氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 琼脂粉,

Biosharp Life Sciences 公司。

恒温摇床、恒温培养箱, 武汉瑞华仪器设备有限责任公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 电子显微镜, FEI 公司; pH 计、电子分析天平, 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司; 电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胍 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。LB 固体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胍 10.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.4 菌株 HG-9 和 HG-25 的扩大培养

取保藏的菌株 HG-9 和 HG-25, 划线法涂布于装有 LB 固体培养基的培养皿, 37 °C 倒置培养。然后挑取单菌落至 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 分别培养 8 h 和 10 h。

1.5 菌株 HG-9 和 HG-25 单独脱胶研究

1.5.1 菌株 HG-9 单独脱胶研究

取 5 g 苕麻, 置于装有 60 mL 水的 250 mL 锥形瓶中, 接入 5 mL 培养 8 h (此时菌体生长最为旺盛, 达到 3.0×10^9 CFU/mL) 的菌株 HG-9 菌悬液。脱胶初始 pH 自然, 37 °C、180 r/min 脱胶 16 h。脱胶过程中每隔 2 h 取 2 mL 脱胶液, 采用二硝基水杨酸 (DNS) 法^[20]测定其果胶酶活力、甘露聚糖酶活力、木聚糖酶活力和纤维素酶活力。

果胶酶活力测定原理: 果胶酶作用下, 果胶可被降解为还原性糖, DNS 在碱性条件下可与还原糖发生反应, 产物在沸水浴条件下显色。产物颜色的深浅与生成的还原糖的量成正比, 从而通过反应液颜色表征脱胶液中果胶酶的活力。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Table of orthogonal factor level

水平/因素 Level/Factor	菌株 HG-9 (A) 接种量 Inoculum size of strain HG-9 (A) (%)	菌株 HG-25 (B) 接种量 Inoculum size of strain HG-25 (B) (%)
1	4	4
2	6	6
3	8	8
4	10	10

果胶酶活测定: 取 1.8 mL 果胶溶液于试管中, 加入 0.2 mL 脱胶上清液, 37 °C 反应 30 min, 然后加入 3 mL DNS 溶液混合均匀置于沸水浴条件下 5 min, 冰水冷却后测定 OD_{540} 吸光值。

酶活性定义: 在特定条件(37 °C、pH 7.0)下, 每分钟内转化生成 1 μ mol 半乳糖醛酸所需酶量为一个酶活性单位 U。

甘露聚糖酶、木聚糖酶和纤维素酶活力测定时底物分别为甘露聚糖、木聚糖和羧甲基纤维素钠, 产物分别为甘露糖、木糖和葡萄糖。

脱胶完成后, 用自来水将苕麻样品冲洗干净, 置于称量瓶中, 105 °C 烘至恒重后于电子分析天平称重, 并对菌株 HG-9 处理前后苕麻组成成分进行分析。

1.5.2 菌株 HG-25 单独脱胶研究

取 5 g 苕麻, 置于装有 60 mL 水的 250 mL 锥形瓶中, 接入 4.8 mL 培养 10 h (此时菌体生长最为旺盛, 达到 2.5×10^9 CFU/mL) 的菌株 HG-25 菌悬液。脱胶初始 pH 为 6.0, 于 35 °C、180 r/min 脱胶 16 h。脱胶过程中每隔 2 h 取 2 mL 脱胶液, 分别测定果胶酶活力、甘露聚糖酶活力、木聚糖酶活力和纤维素酶活力。

酶活测定方法同 1.5.1。

脱胶完成后, 用自来水将苕麻样品冲洗干净, 置于称量瓶中, 105 °C 烘至恒重后于电子分析天平称重, 并对菌株 HG-25 处理前后苕麻组成成分进行分析。

1.6 菌株 HG-9/HG-25 混合脱胶研究

1.6.1 混合菌接种量的正交优化

根据菌株 HG-9 和 HG-25 单独脱胶特点, 采用 $L_{16}(4^2)$ 正交设计, 以脱胶率为指标确定 2 株菌株最佳接种比例, 因素水平见表 1。通过正交试验获得最佳接种量组合, 并对该条件下的苕麻脱胶率进行测定。

1.6.2 混合菌脱胶条件的响应面优化设计

根据菌株 HG-9 和 HG-25 单独脱胶条件, 采用 Box-Behnken Design 响应面法对苧麻混合菌脱胶条件进行优化。以苧麻脱胶率作为响应值, 设计三因素三水平的响应面分析法, 因素水平见表 2。对优化条件下的脱胶率及胶质去除率进行测定。

1.6.3 脱胶时间对复合微生物脱胶效率的影响

取 5 g 苧麻样品置于装有 80 mL 水的锥形瓶中, 接种培养 8 h 的 HG-9 菌悬液和培养 10 h 的 HG-25 菌悬液, 接种量均为 6%, 脱胶初始 pH 为 5.9, 在 37.6 °C 和 180 r/min 下分别处理 12、14、16、18、20 h, 并对苧麻脱胶率及相应的胶质去除率进行分析。

1.7 漂白剂使用量研究

取 5 g 苧麻样品, 菌株 HG-9 单独脱胶及 HG-9/HG-25 混合脱胶后, 加入 0.25 g 氢氧化钠和 100 mL 水, 在冷凝回流条件下煮沸 2 h。取出苧麻, 在流水下冲洗干净, 置于装有 100 mL 水的烧杯中, 分别加入 0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 g 次氯酸钠, 漂白 5 min, 对漂白后的苧麻进行洗涤、干燥, 并测定苧麻残胶率。

1.8 苧麻各组成成分含量、脱胶率和残胶率的测定

苧麻各组成成分含量、含胶率及残胶率测定根据国家标准 GB/T 5889-1986《苧麻化学成分定量分析方法》^[21]。

$$\text{脱胶率}=(M_1-M_2)/M_1\times 100\%$$

公式中 M_1 为苧麻原麻恒重质量(g); M_2 为苧麻原麻脱胶后恒重质量(g)。

表 2 试验因素及水平设计表

Table 2 Table of experimental factors and levels

水平	因素		
Level	Factor		
	水料比	初始 pH 值	脱胶温度
	Water-to-material ratio	Initial pH	Degumming temperature (°C)
-1	12:1	5	32
0	14:1	6	37
1	16:1	7	42

$$\text{胶质去除率}=(M_1-M_2)/M_0\times 100\%$$

公式中 M_0 为苧麻原麻的胶质含量(g); M_1 为苧麻原麻恒重质量(g); M_2 为苧麻原麻脱胶后恒重质量(g), 本研究中所用苧麻韧皮胶质含量为 27.99%。

1.9 苧麻纤维微观形态分析

将苧麻原麻及不同微生物处理后的苧麻样品剪切至约 0.50 cm 后制样, 于电子显微镜下观察其微观形态差异。该分析由华中科技大学分析测试中心测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株 HG-9 苧麻脱胶研究

由图 1 可知, 利用菌株 HG-9 单独脱胶时, 其产生的脱胶酶系主要包括果胶酶和甘露聚糖酶, 而且随着脱胶过程的进行, 它们的酶活力逐渐增加, 在 8 h 时分别达到 118.02 U/mL 和 99.48 U/mL。此外, 其产生的木聚糖酶活性较低, 在 8 h 时仅为 4.88 U/mL, 而且其基本不产纤维素酶, 从而避免了对苧麻纤维素的损伤。

菌株 HG-9 脱胶处理 16 h 后苧麻各组成成分变化如图 2 所示, 可以看出其脱胶率可达 12.2%, 胶质去除率达 43.54%。其中, 果胶和水溶物去除效果较好, 含量从 5.32% 和 5.75% 分别降至 0.75% 和 0.86%, 去除率可达 85.90% 和 85.04%; 而半纤维素去除效果较差, 其含量从 13.89% 降至 11.83%, 去除率只有 14.83%, 可见, 甘露聚糖酶不足以去除苧

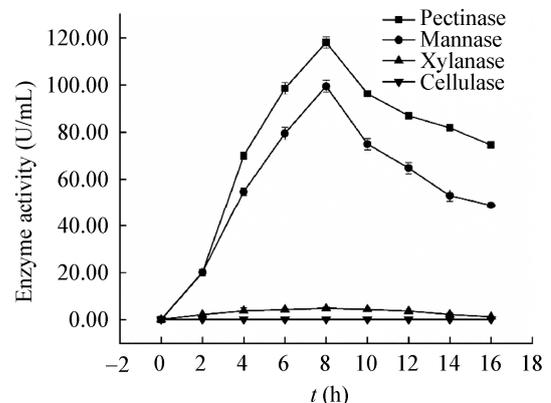


图 1 菌株 HG-9 在苧麻脱胶过程中各酶活变化趋势

Figure 1 The change trend of enzyme activity during ramie degumming of strain HG-9

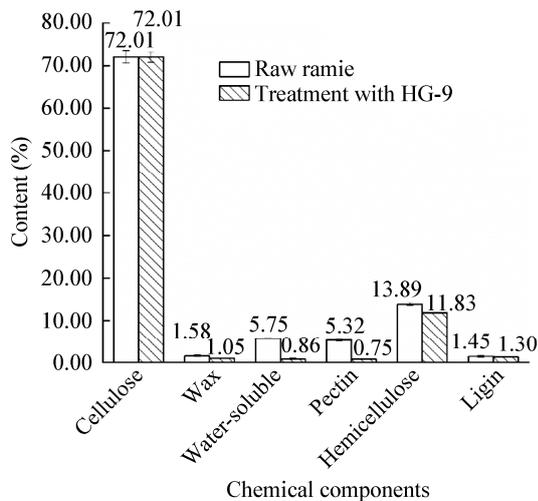


图2 菌株 HG-9 脱胶处理前后苧麻化学成分分析
Figure 2 Analysis of chemical components of ramie before and after degumming by strain HG-9

麻半纤维素, 推测木聚糖酶也是苧麻脱胶的关键酶。此外, 其木质素含量从 1.45% 降至 1.30%, 去除率只有 10.34%。在结构上, 木质素通过共价键与半纤维素连接, 推测半纤维素的去除可带动木质素的去除。基于对菌株 HG-9 脱胶能力的分析, 选择一株具有高木聚糖酶活性的菌株以实现二者的高效协同脱胶十分重要。

2.2 菌株 HG-25 苧麻脱胶研究

为研究菌株 HG-25 的脱胶性能, 对其脱胶过程中的关键酶活力进行了测定(图 3)。由图 3 可知, 菌株

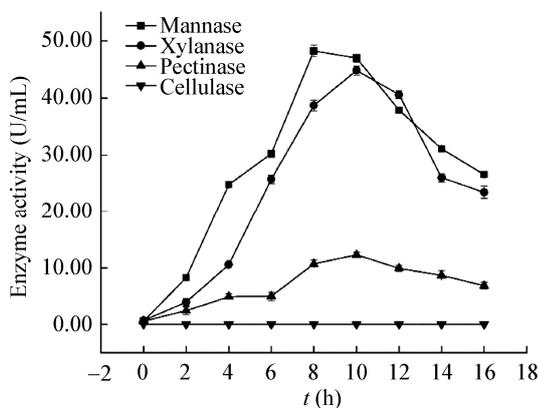


图3 菌株 HG-25 在苧麻脱胶过程中各酶活变化趋势
Figure 3 The change trend of enzyme activity during ramie degumming of strain HG-25

HG-25 在单独脱胶时所产酶系主要包括木聚糖酶和甘露聚糖酶, 而且随着脱胶过程的进行, 它们的酶活力逐渐增加, 在 10 h 时木聚糖酶活性到达最大值, 为 44.83 U/mL, 甘露聚糖酶在 8 h 时活力最高, 为 48.25 U/mL; 而其产生的果胶酶活性较低, 而且不产纤维素酶, 从而避免了对苧麻纤维素的损伤。

菌株 HG-25 脱胶处理苧麻 16 h 后各成分变化见图 4。可以看到, 经菌株 HG-25 处理后的苧麻其半纤维素含量由 13.89% 降至 9.15%, 去除率达 34.12%。菌株 HG-25 在产酶和胶质去除上均与 HG-9 具备很好的互补性。因此, 基于 HG-9 的单菌种脱胶中缺少脱胶关键酶木聚糖酶引起脱胶不完全、纤维品质低的问题, 菌株 HG-25 的引入对进一步提高苧麻脱胶率, 特别是半纤维素去除率具有重要作用。

2.3 正交设计优化菌株 HG-9 和 HG-25 接种量

以苧麻脱胶率为指标, 采用 $L_{16}(4^2)$ 正交设计对菌株 HG-9 和 HG-25 混合脱胶的最佳接种量进行优化(表 3)。

表 3 中 A 代表菌株 HG-9 接种量, B 代表菌株 HG-25 接种量, 1-4 分别代表接种量 4%、6%、8% 和 10%。根据 K 值大小可知菌株 HG-9 和 HG-25 接种量的最佳组合为 A2B2, 即接种量均为 6%。在

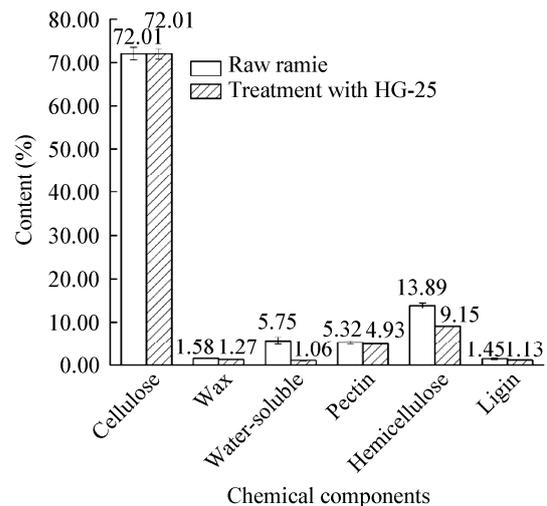


图4 菌株 HG-25 脱胶处理前后苧麻化学成分分析
Figure 4 Analysis of chemical components of ramie before and after degumming by strain HG-25

表 3 正交试验设计及结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

实验编号 Experiment No.	A HG-9 接种量 A Inoculum size of HG-9	B HG-25 接种量 B Inoculum size of HG-25	脱胶率 Degumming rate (%)
1	1	2	13.40
2	2	2	14.21
3	4	1	12.81
4	4	2	12.59
5	3	1	12.78
6	4	3	11.90
7	2	4	13.36
8	2	3	14.29
9	2	1	14.20
10	4	4	11.24
11	3	4	12.04
12	3	3	13.95
13	3	2	14.31
14	1	3	11.87
15	1	4	11.29
16	1	1	13.77
K_1	13.20	13.39	
K_2	14.02	13.63	
K_3	13.27	13.00	
K_4	12.14	11.98	
R	1.88	1.65	

该优化条件下进行脱胶试验验证, 苧麻脱胶率可达 $14.30\% \pm 0.13\%$, 提高了 0.27%, 可用于二者混合脱胶。在微生物混合脱胶过程中, 接种量过低不利于菌体的生长增殖, 接种量过高, 又会给生长环境带来压力, 因此, 优化合适的接种量十分有必要。

2.4 微生物混合脱胶条件的响应面优化

2.4.1 响应面优化试验结果

以水料比、初始 pH 值和脱胶温度作为独立自变量, 脱胶率为响应值, 响应面试验结果见表 4。

2.4.2 模型建立与显著性分析

利用 Design Expert 对试验数据进行回归拟合分析, 得到的回归方程模型如下:

$$Y = -142.572 + 8 + 4.441X_1 + 14.692 - 3X_2 + 4.129 - 5X_3 - 0.363 - 8X_1X_2 + 0.004 - 3X_1X_3 - 0.052X_2X_3 - 0.072 - 8X_1^2 -$$

$$0.588 - 5X_2^2 - 0.051 - 7X_3^2$$

其中, X_1 – X_3 分别代表水料比、初始 pH 值和温度。方程式中各系数的正负可反映它们对苧麻脱胶率的影响方向, 而系数绝对值的大小则可反映对苧麻脱胶率的影响程度。

对回归方程模型进行方差分析, 结果见表 5。

由表 5 中 F 值可知, 各考察因素对苧麻脱胶率的影响因素次序是 X_1 (水料比) > X_2 (初始 pH) > X_3 (温度)。该模型 P 值为 0.002 1, 小于 0.01, 差异极显著; 失拟项 P 值为 0.145 3, 大于 0.1, 不显著; 模型的决定系数 $R^2 = 0.935 9$, 表明模型拟合度高, 其可信性高。此外, 一次项中 X_1 、 X_2 极显著, X_3 不显著; 交互项中 X_1X_2 显著, X_1X_3 和 X_2X_3 不显著; 二次项中 X_1^2 不显著, X_2^2 显著, X_3^2 极显著。

表 4 Box-Behnken Design 实验设计及结果

Table 4 Experiment design and results of Box-Behnken design

实验编号 Experiment No.	水料比 Water-to-material ratio	初始 pH 值 Initial pH	温度 Temperature (°C)	脱胶率 Degumming rate (%)
1	16:1	6.0	42	14.01
2	12:1	6.0	42	12.68
3	12:1	7.0	37	13.89
4	16:1	5.0	37	14.55
5	14:1	6.0	37	14.67
6	14:1	5.0	42	12.01
7	14:1	6.0	37	14.32
8	14:1	6.0	37	14.65
9	14:1	7.0	42	12.82
10	14:1	6.0	37	14.33
11	12:1	6.0	32	11.65
12	14:1	5.0	32	11.64
13	12:1	5.0	37	11.31
14	14:1	6.0	37	13.89
15	16:1	7.0	37	14.22
16	16:1	6.0	32	12.81
17	14:1	7.0	32	13.49

表 5 方差分析表

Table 5 Table of variance analysis

来源 Source	总和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	19.991 9	9	2.221 3	11.351 4	0.002 1**
X_1 : 水料比 X_1 : Water-to-material ratio	4.590 5	1	4.590 5	23.458 2	0.001 9**
X_2 : 初始 pH 值 X_2 : Initial pH	3.013 5	1	3.013 5	15.399 7	0.005 7**
X_3 : 温度 X_3 : Temperature	0.465 6	1	0.465 6	2.379 4	0.166 9
X_1X_2	2.117 0	1	2.117 0	10.818 5	0.013 3*
X_1X_3	0.007 2	1	0.007 2	0.036 9	0.853 1
X_2X_3	0.270 4	1	0.270 4	1.381 8	0.278 2
X_1^2	0.356 6	1	0.356 6	1.822 1	0.219 1
X_2^2	1.458 2	1	1.458 2	7.451 9	0.029 3*
X_3^2	7.044 8	1	7.044 8	36.000 5	0.000 5**
残差 Residual	1.369 8	7	0.195 7		
失拟项 Lack of fit	0.966 9	3	0.322 3	3.200 0	0.145 3
净误差 Pure error	0.402 9	4	0.100 7		
总离差 Cor total	21.361 7	16			

注: $R^2=0.935 9$; $P>0.1$, 差异不显著; *, $P<0.05$, 差异显著; **, $P<0.01$, 差异极显著

Note: $R^2=0.935 9$; $P>0.1$, Insignificant difference; *, $P<0.05$, Significant difference; **, $P<0.01$, Highly significant difference

2.4.3 响应面分析

为了分析回归方程预测的三因素对苧麻脱胶率的影响, 利用 Design-Expert 得到响应曲面图(图 5-7)。由图 5-7 可知, 在一定范围内, 脱胶率随水料比和初始 pH 值的增加而增加, 高水料比低 pH

值和低水料比高 pH 值都不能获得较好的脱胶率, 说明水料比和初始 pH 值对于菌株 HG-9 和 HG-25 混合脱胶有显著的交互作用。然而对于水料比与温度及初始 pH 值与温度, 它们的交互作用对苧麻韧皮脱胶率的影响较小。

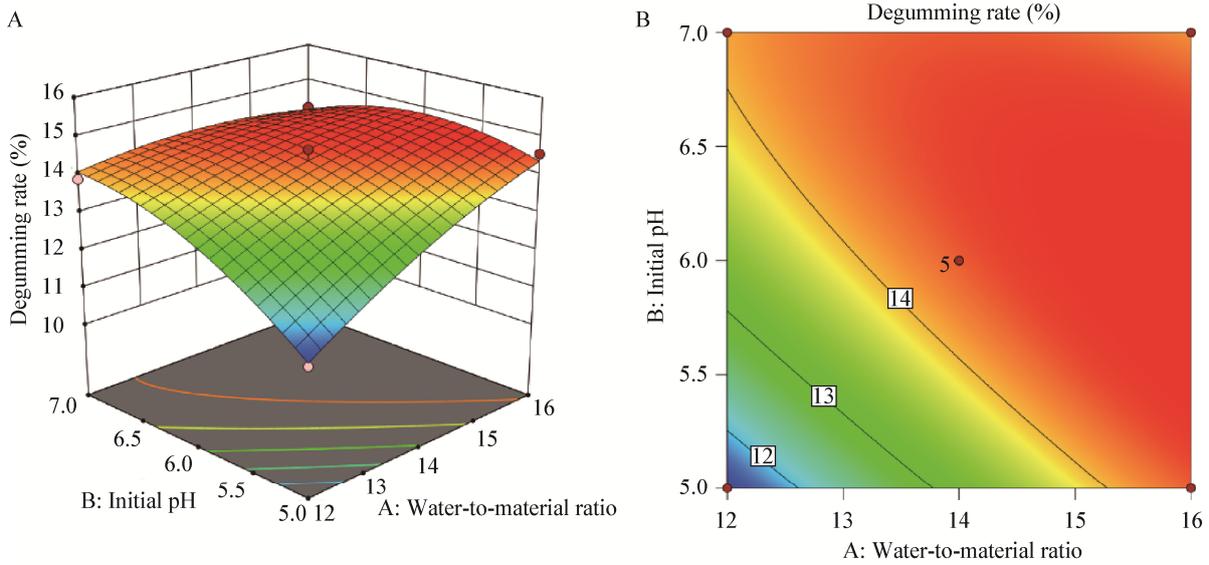


图 5 水料比和初始 pH 对脱胶率交互影响的响应面图(A)和等高线(B)
 Figure 5 Response surface plot (A) and contour line (B) of the interactive effect of water-to-material ratio and initial pH on the degumming rate

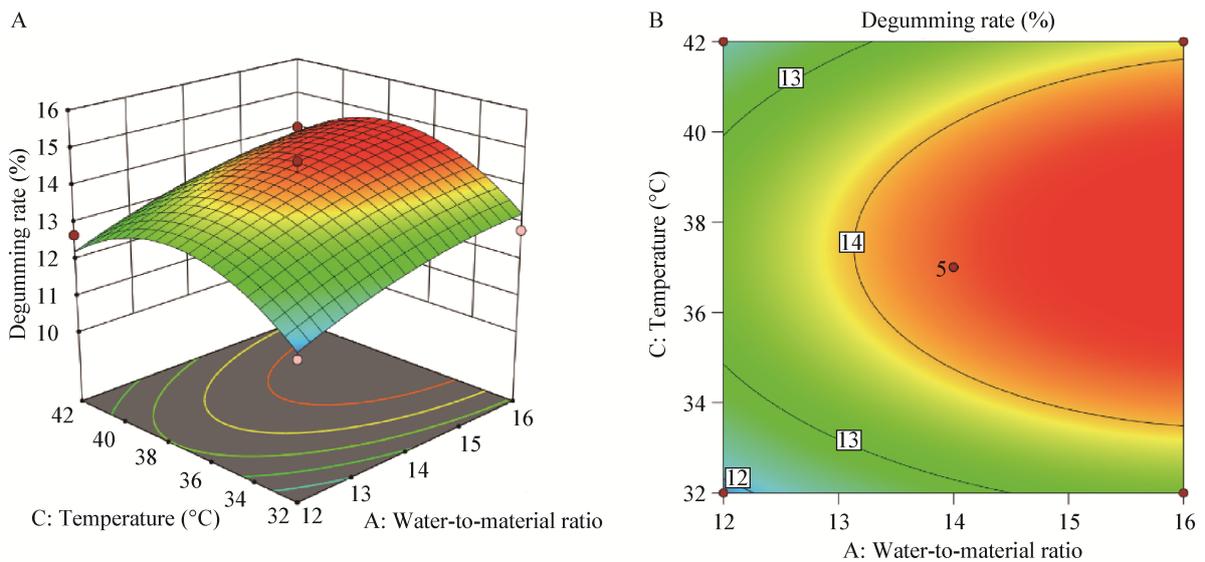


图 6 水料比和温度对脱胶率交互影响的响应面图(A)和等高线(B)
 Figure 6 Response surface plot (A) and contour line (B) of the interactive effect of water-to-material ratio and temperature on the degumming rate

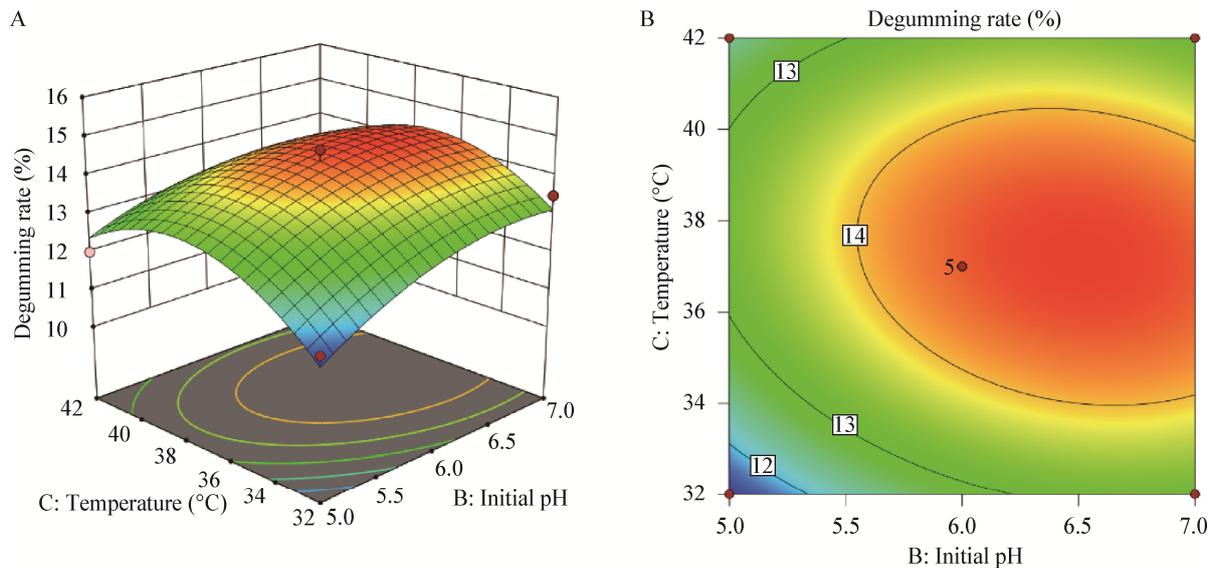


图 7 初始 pH 和温度对脱胶率交互影响的响应面图(A)和等高线(B)

Figure 7 Response surface plot (A) and contour line (B) of the interactive effect of initial pH and temperature on the degumming rate

2.4.4 菌株 HG-9 和 HG-25 混合脱胶条件优化及验证

利用 Design Expert 对菌株 HG-9 和 HG-25 混合脱胶条件进行优化,发现水料比 16:1, 初始 pH 值 5.88, 温度 37.61 °C 时理论脱胶率最高, 为 14.86%。为了验证模型的可靠性, 在上述条件下进行了苧麻脱胶试验。结合实际操作情况, 水料比 16:1 保持不变, 初始 pH 值调整为 5.9, 脱胶温度调整为 37.6 °C。结果表明脱胶率为 14.82%±0.15%, 同理论值仅相差 0.04%, 表明该试验模型的准确性。

在该优化条件下, 苧麻的胶质去除率为 52.91%, 相对 HG-9 单独脱胶增加了 9.32%, 这一结果证明了 2 株菌具有很好的协同作用, 即 3 种关键脱胶酶果胶酶、甘露聚糖酶和木聚糖酶对于苧麻胶质的去除十分关键, 而且它们之间存在很好的协同作用, 只用一种酶或者 2 种酶处理, 均达不到很好的脱胶效果。刘唤明等^[22]将果胶酶、甘露聚糖酶和木聚糖酶用于苧麻脱胶, 分别用 3 种单一酶脱胶及 3 种酶联合脱胶, 发现只用一种酶处理时, 胶质去除率分别为 4.3%、1.0%和

1.2%; 3 种酶联合处理时最终残胶率为 5.2%, 进一步证实了 3 种酶间协同作用的存在。

2.5 脱胶时间对苧麻脱胶率的影响

对于苧麻脱胶, 尤其是大型脱胶系统, 脱胶时间对其运行成本和脱胶效果有很大影响, 基于菌株 HG-9 和 HG-25 的脱胶条件, 对混合脱胶时间进行优化(图 8)。

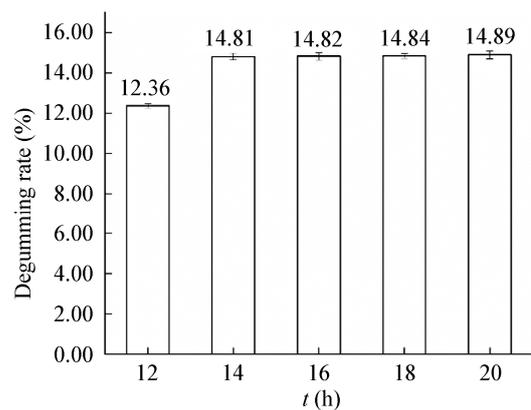


图 8 脱胶时间对混合菌株 HG-9/HG-25 苧麻脱胶率的影响

Figure 8 Effect of degumming time on the degumming rate of ramie fibers by strain HG-9/HG-25

由图 8 可以看出, 随着脱胶时间的延长, 苧麻脱胶率一直在增加, 但 14 h 后增长缓慢。脱胶前期, 菌株生长相对缓慢, 分泌的酶无法满足对苧麻胶质的降解, 而到达 14 h 后, 微生物生长进入平稳期甚至衰亡期, 残留的胶质与纤维素的结合更紧密, 难以去除, 导致脱胶效率降低。因此, 最佳脱胶时间选择为 14 h, 比菌株 HG-9 单独脱胶缩短了 2 h。

2.6 复合微生物脱胶效果评价

2.6.1 苧麻胶质去除率分析

对苧麻原麻及不同微生物处理的苧麻进行总胶质、脂蜡质、水溶物、果胶、半纤维素和木质素的含量测定, 结果如图 9 所示。

从图 9 可知, 混合菌脱胶与 HG-9 单独脱胶相比, 残留的脂蜡质和水溶物均有少量增加, 而在纤维的纺纱过程中, 一定量脂蜡质的存在是必需的; 对于半纤维素, 其含量由 11.83% 降至 8.88%, 去除率提高 21.24%。菌株 HG-9 和 HG-25 并不分泌木质素降解酶类, 但混合脱胶下木质素去除率增加 17.93%, 而木质素通过共价键与半纤维素连接, 说明半纤维素可带动去除木质素。半纤维素和木质素去除率的增高可减少后期碱液和漂白剂的用量, 具有显著的经济效益和环保效益。但是, HG-9/HG-25 混合脱胶后, 苧麻中主要的胶质成分, 如半纤维素和果胶, 并没有被完全去除。半纤维素和果胶是苧麻胶质的主要成分, 分别占胶质总量的 50% 和 17%^[23]。与纤维素不同的是, 果胶和半纤维素结构复杂, 它们除了由 1,4-糖苷键形成的主链外, 还带有很多支链, 如葡萄糖醛酸、阿拉伯呋喃糖苷、乙酰基和半乳糖等^[24-26]。这些支链结构的存在会造成空间障碍, 降低主链降解酶和主链的可及性, 限制降解酶的作用, 导致果胶和半纤维素的不完全去除^[27]。此外, 在脱胶条件优化时, 通气情况也会对菌株的生长和脱胶效果有一定的影响, 在今后的脱胶研究中, 一方面可引入这些支链降解酶与主链降解酶发挥协同作用, 另一方面可通过对转速条件进行优化, 从而进一步提高苧麻脱胶效率, 减少后期化学试剂的使用, 促进苧麻绿色高效脱胶。

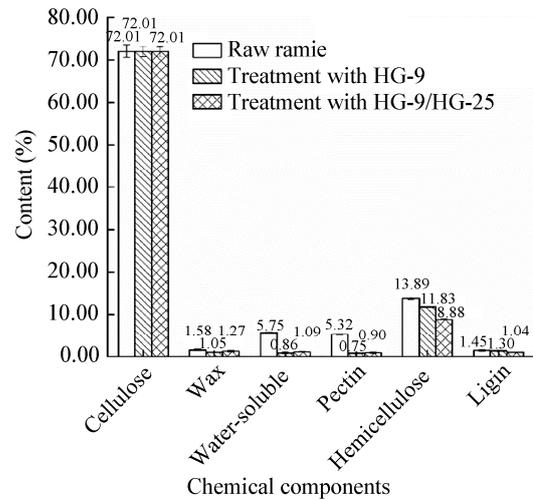


图 9 苧麻组成成分含量分析

Figure 9 Analysis of ramie composition content

2.6.2 漂白剂使用量分析

以苧麻残胶率为指标, 对菌株 HG-9 单独脱胶及其与 HG-25 混合脱胶后所需漂白剂用量进行对比(图 10)。

由图 10 可知, 对于 HG-9 单独处理后的苧麻纤维, 当次氯酸钠使用量为 0.12 g 时, 其残胶率为 1.70%, 进一步增加次氯酸钠的用量, 其残胶率几乎保持不变; 而对于混合脱胶后的苧麻纤维, 次氯酸钠使用量为 0.10 g 时, 残胶率便可达到 1.70%, 增加次氯酸钠使用量, 残胶率也不会进一步降

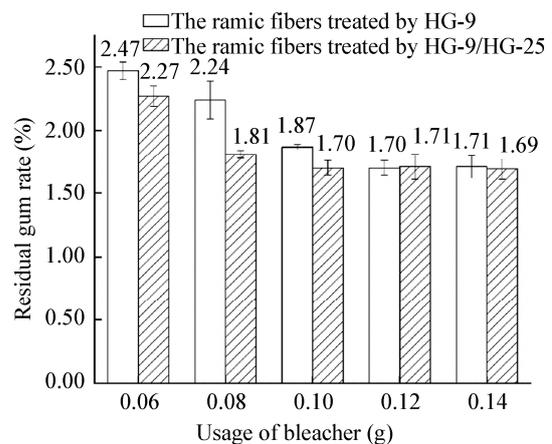


图 10 苧麻脱胶后期漂白剂使用量

Figure 10 Usage of bleach in the later stage of ramie degumming

低。对于国家一等品苧麻精干麻，其残胶率要低于2%，因此，对于混合脱胶后的苧麻纤维，只需0.08 g的次氯酸钠就可达到一等品要求，减少了次氯酸钠的使用量。这不仅可以减少对苧麻纤维的损伤也可降低水污染，具有很好的经济效益和环保效益。

2.6.3 苧麻纤维微观形态分析

扫描电镜可用来观察苧麻纤维表面的形态结构。对苧麻原麻、菌株HG-9和HG-25单独脱胶及HG-9/HG-25混合脱胶后的样品进行扫描电镜测试(图11)。

图11A所示为苧麻原麻，可以看到，纤维之间存在很多胶质并粘连成纤维束，纤维束表面凹凸不平，存在网格状结构。图11B和图11C所示分别为单独使用菌株HG-9和HG-25脱胶后的苧麻纤维，可见纤维与之间的胶连物大大减少，单根纤维被暴露，但纤维表面还残留一些附着物。图11D所示为混合菌脱胶后的苧麻纤维，与HG-9和HG-25单独脱胶相比，其纤维表面更加光滑平整，更多的胶质被去除，从微观角度证明了混合菌之间良好的协同作用。

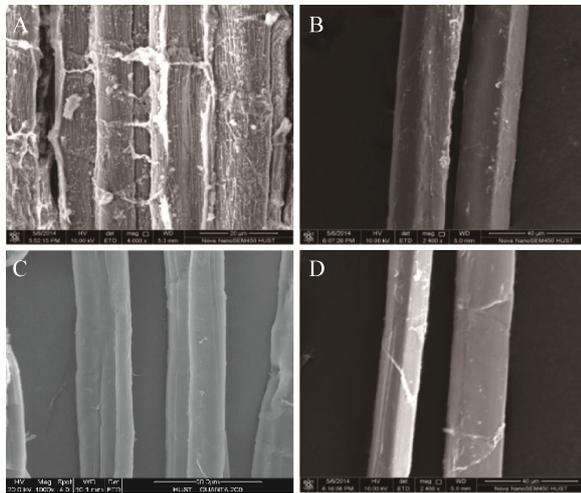


图11 苧麻样品扫描电镜图

Figure 11 Scanning electron micrograph of ramie fibers

注：A：苧麻原麻，4 000×；B：菌株HG-9单独脱胶后的苧麻样品，2 400×；C：菌株HG-25单独脱胶后的苧麻样品，1 000×；D：混合菌脱胶后的苧麻样品，2 400×

Note: A: The raw ramie fibers, 4 000×; B: The ramie fibers treated with HG-9, 2 400×; C: The ramie fibers treated with HG-25, 1 000×; D: The ramie fibers treated with HG-9/HG-25, 2 400×

3 结论

本研究利用正交设计及响应面法对菌株HG-9和HG-25混合脱胶条件进行了优化，当接种量、水料比和初始pH值分别为6%、16:1和5.9时，在37.6℃下处理14h，脱胶效果最佳，而且二者在脱胶过程中具有很好的协同作用。与菌株HG-9单独脱胶相比，脱胶时间缩短2h，胶质去除率提高9.32%，漂白剂用量减少20%，而且纤维表面变得更加光滑、平整，纤维分散度更好。由此可见，果胶酶、甘露聚糖酶和木聚糖酶具有很好的协同作用，并在苧麻脱胶中发挥重要的作用。本研究不仅提高苧麻胶质去除率，缩短苧麻脱胶时间，而且减少脱胶后期漂白剂用量，为苧麻绿色生物脱胶的进一步优化及工业化应用提供了指导。

REFERENCES

- [1] Ni JL, Zhu AG, Wang XF, Xu Y, Sun ZM, Chen JH, Luan MB. Genetic diversity and population structure of ramie (*Boehmeria nivea* L.)[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 115: 340-347
- [2] Sarkar D, Sinha MK, Kundu A, Kar C. Why is ramie the strongest yet stiffest of bast fibers[J]. *Current Science*, 2010, 98(12): 1570-1572
- [3] Mukhopadhyay A, Dutta N, Chattopadhyay D, Chakrabarti K. Degumming of ramie fiber and the production of reducing sugars from waste peels using nanoparticle supplemented pectate lyase[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 202-208
- [4] Mao KW, Chen HG, Qi HH, Qiu ZD, Zhang L, Zhou JG. Visual degumming process of ramie fiber using a microbial consortium RAMCD407[J]. *Cellulose*, 2019, 26(5): 3513-3528
- [5] Cheng LF, Liu ZC, Feng XY, Wang QM, Li Q, Zheng K, Yang Q, Duan SW. Screening on compound pectinase for ramie degumming and its effect analysis[J]. *Journal of Textile Research*, 2017, 38(6): 64-68 (in Chinese)
成莉凤, 刘正初, 冯湘沅, 汪启明, 李琦, 郑科, 杨琦, 段盛文. 苧麻脱胶果胶复合酶的优选及其效果分析[J]. *纺织学报*, 2017, 38(6): 64-68
- [6] Fan XS, Liu ZW, Liu ZT, Lu J. A novel chemical degumming process for ramie bast fiber[J]. *Textile Research Journal*, 2010, 80(19): 2046-2051
- [7] Guo FF, Zou MY, Li XZ, Zhao J, Qu YB. An effective degumming enzyme from *Bacillus* sp. Y1 and synergistic action of hydrogen peroxide and protease on enzymatic degumming of ramie fibers[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 212315

- [8] Liu ZC, Duan SW, Sun QX, Peng YD, Feng XY, Zheng K, Hu ZX, Zhang YX. A rapid process of ramie bio-degumming by *Pectobacterium* sp. CXJZU-120[J]. Textile Research Journal, 2012, 82(15): 1553-1559
- [9] Lyu ZR, Li ZF, Jiang HL, Sun ZY. Research progress of ramie fiber preparation[J]. Cotton Textile Technology, 2020, 48(11): 68-72 (in Chinese)
吕泽瑞, 黎征帆, 江惠林, 孙泽宇. 苧麻纤维制备研究进展[J]. 棉纺织技术, 2020, 48(11): 68-72
- [10] Wang Q, Chen HG, Liu L, Guo SW, Liu JS. Isolation, identification and degumming efficiency of dominant bacteria from ramie degumming bacterial consortium RAMCD407[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2561-2567 (in Chinese)
王茜, 陈洪高, 刘露, 郭帅威, 柳建设. 苧麻脱胶菌群 RAMCD407 中优势菌的分离、鉴定及脱胶能力分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2561-2567
- [11] Fan P, He F, Yang Y, Ao MZ, Ouyang J, Liu Y, Yu LJ. *In-situ* microbial degumming technology with *Bacillus* sp. HG-28 for industrial production of ramie fibers[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 97: 50-58
- [12] Cheng LF, Wang QM, Feng XY, Duan SW, Yang Q, Zheng K, Liu ZY, Liu ZC, Peng YD. Screening a bacterium and its effect on the biological degumming of ramie and kenaf[J]. Scientia Agricola, 2018, 75(5): 375-380
- [13] Shu T, Bai Y, Wang YW, Wang HH, Li PD, Xiang MX, Yu TY, Xu H, Yu LJ. A high-efficiency and eco-friendly degumming process for ramie fibers[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 276: 124217
- [14] Basu S, Saha MN, Chattopadhyay D, Chakrabarti K. Large-scale degumming of ramie fibre using a newly isolated *Bacillus pumilus* DKS₁ with high pectate lyase activity[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(2): 239-245
- [15] Duan SW, Liu ZC, Feng XY, Zheng K, Cheng LF, Hu ZX. Study on the diversity of the herbaceous fiber extraction strain resources[J]. Plant Fiber Sciences in China, 2007, 29(6): 330-333 (in Chinese)
段盛文, 刘正初, 冯湘沅, 郑科, 成莉凤, 胡镇修. 草本纤维提取菌种资源多样性研究[J]. 中国麻业科学, 2007, 29(6): 330-333
- [16] Xiao L, Wang GX, Chen GJ. The research advancement of the enzymatic degumming of ramie (*Boehmeria nivea*)[J]. Microbiology China, 2004, 31(5): 101-105 (in Chinese)
肖丽, 王贵学, 陈国娟. 苧麻酶法脱胶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 101-105
- [17] Zheng LS, Du YM, Zhang JY. Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polysaccharide-degrading enzymes[J]. Bioresource Technology, 2001, 78(1): 89-94
- [18] Du ZF, Huang FR. Process optimization of composite microorganism degumming of ramie[J]. Journal of Textile Research, 2012, 33(5): 56-61 (in Chinese)
杜兆芳, 黄芙蓉. 苧麻复合微生物脱胶工艺优化[J]. 纺织学报, 2012, 33(5): 56-61
- [19] Wang Q, Chen HG, Fang G, Chen AQ, Yuan P, Liu JS. Isolation of *Bacillus cereus* P05 and *Pseudomonas* sp. X12 and their application in the ramie retting[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 97: 518-524
- [20] Wang TL, Qiu HW, Chen HH, An Y, Ding LX. Applying 3,5-dinitrosalicylic acid method to measure pectinase activity[J]. Food & Machinery, 2008, 24(3): 96-99,104 (in Chinese)
王天龙, 仇宏伟, 陈海华, 安燕, 丁立孝. 3,5-二硝基水杨酸法测定果胶酶活力的条件研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 96-99,104
- [21] National Standard (Mandatory) of the People's Republic of China: method of quantitative analysis of ramie chemical components. GB 5889—1986[S]. Beijing: Standards Press of China, 1986 (in Chinese)
国家标准局. 中华人民共和国国家标准: 苧麻化学成分定量分析方法 GB 5889—1986[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986
- [22] Liu HM, Liang YX, Peng DX. Study on the the enzymatic degumming of ramie[J]. Plant Fibers and Products, 2006, 28(2): 87-90 (in Chinese)
刘唤明, 梁运祥, 彭定祥. 苧麻酶法脱胶的研究[J]. 中国麻业, 2006, 28(2): 87-90
- [23] Li ZF, Li ZL, Ding RY, Yu CW. Composition of ramie hemicelluloses and effect of polysaccharides on fiber properties[J]. Textile Research Journal, 2016, 86(5): 451-460
- [24] Round AN, Rigby NM, MacDougall AJ, Morris VJ. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy[J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(4): 487-497
- [25] She YL, Li XT, Song HL, Ma JJ, Lyu YG. Research advance in microorganism xylanases[J]. China Brewing, 2009, 28(2): 1-4 (in Chinese)
余元莉, 李秀婷, 宋焕禄, 马家津, 吕跃钢. 微生物木聚糖酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2009, 28(2): 1-4
- [26] Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(2): 165-178
- [27] Zhu TD, He Y, Yang B, Liu JC, Wu MC. Combinative degradation of xylan with acetyl xylan esterase and xylanase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(4): 375-380 (in Chinese)
朱天地, 何瑶, 杨标, 刘加驰, 邬敏辰. 乙酰木聚糖酯酶协同木聚糖酶降解木聚糖的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(4): 375-380