

研究报告

## 苎麻脱胶菌群 RAMCD407 中优势菌的分离、鉴定及脱胶能力分析

王茜<sup>1,2</sup> 陈洪高<sup>2</sup> 刘露<sup>2</sup> 郭帅威<sup>2</sup> 柳建设<sup>1\*</sup>

(1. 东华大学环境科学与工程学院 上海 201620)

(2. 武汉纺织大学纺织印染清洁生产教育部工程研究中心 湖北 武汉 430200)

**摘要:**【目的】以苎麻生物脱胶菌群 RAMCD407 为研究材料, 分析其菌种功能, 初步阐明菌群的种间协作机理。【方法】利用 4 种不同的培养基, 对该菌群中的微生物进行分离培养, 通过 16S rRNA 基因序列比对鉴定, 将分离得到的菌株进行果胶酶活力、木聚糖酶活力和胶质去除率的测定与筛选。筛选得到的菌株重新组合成为复合菌系 JHY, 并分析各菌种对 JHY 的功能影响。【结果】共获得 25 个菌株, 这 25 个菌株分别属于芽孢杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、鲁梅利杆菌属、鞘氨醇杆菌属和微小杆菌属。从中筛选出 6 株细菌, 分别为 Y1、2H3、Y2、JY31、2H2 和 2H1, 组成复合菌系 JHY。经测定, 2H2 在复合菌系 JHY 中发挥重要作用, 能提高复合菌系的果胶酶活力、木聚糖酶活力和胶质去除率; JY31 的存在抑制了其它菌株的生长, 降低了复合菌系 JHY 的酶活力和胶质去除率。【结论】2H2 为复合菌系 JHY 的重要菌种, 去除 JY31 可提高复合菌系 JHY 的脱胶效率。

**关键词:** 苎麻脱胶菌, 分离, 复合菌系, 重建, 功能分析

## Isolation, identification and degumming efficiency of dominant bacteria from ramie degumming bacterial consortium RAMCD407

WANG Qian<sup>1,2</sup> CHEN Hong-Gao<sup>2</sup> LIU Lu<sup>2</sup> GUO Shuai-Wei<sup>2</sup> LIU Jian-She<sup>1\*</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

(2. Engineering Research Center for Clean Production of Textile Dyeing and Printing, Ministry of Education, Wuhan Textile University, Wuhan, Hubei 430200, China)

**Abstract:** [Objective] Ramie degumming bacterial consortium RAMCD407 was used to analyze the bacterial function and reveal the mechanism of interactions among different strains. [Methods] Several bacteria were cultured and isolated from RAMCD407 from four media, and these bacteria were then identified by 16S rRNA gene sequencing. Pectinase activity, xylanase activity and gum removal ratio

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 21377023); Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2012BAD36B03)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-67792523; E-mail: liujianshe@dhu.edu.cn

Received: January 08, 2016; Accepted: May 06, 2016; Published online (www.cnki.net): May 24, 2016  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21377023); 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAD36B03)

\*通讯作者: Tel: 86-21-67792523; E-mail: liujianshe@dhu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-08; 接受日期: 2016-05-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-24

of the isolated microbes were measured. Composite strains JHY were constructed by combination of the isolated strains, and the influences of different strains on the performance of JHY were analyzed.

**[Results]** Twenty-five isolated strains were identified as genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rummeliibacillus*, *Sphingobacterium*, and *Exiguobacterium*. Among them, strain 2H2 played an important role, and it could improve the pectinase activity, xylanase activity and gum removal ratio of JHY; However, strain JY31 could reduce the enzyme activity and gum removal ratio of JHY by inhibiting the growth of other strains. **[Conclusion]** 2H2 was the important strain in JHY, and elimination of JY31 could improve the gum removal efficiency of JHY.

**Keywords:** Ramie degumming bacteria, Isolation, Composite strains, Rebuilding, Function analysis

我国苧麻生物脱胶技术研究主要集中在3个方面:(1)沤麻<sup>[1]</sup>,即在小河、池塘或水田中利用自然菌群脱胶,由于存在条件难以控制、脱胶时间长、纤维质量不均匀等问题,目前只有少数地方制作夏布时还在使用;(2)酶脱胶,即利用微生物发酵生产的果胶酶<sup>[2]</sup>和木聚糖酶<sup>[3]</sup>等脱胶关键酶复配后脱胶,虽然果胶酶和木聚糖酶等都已经商品化,但这些酶主要针对食品和饲料行业开发,专门针对苧麻脱胶研发的酶类较少,在应用这些商品化的酶时还存在胶质去除不彻底、成本高、使用条件较为严格等缺陷,因此目前鲜有商业应用;(3)从环境中筛选苧麻脱胶优势菌,经放大培养后用于脱胶。分离出的菌种主要集中在芽孢杆菌属<sup>[4]</sup>、假单胞菌属<sup>[5]</sup>、肠杆菌属<sup>[6]</sup>、欧文氏菌属<sup>[7]</sup>和曲霉菌等,部分菌种如枯草芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌和胡萝卜欧文氏菌等早在十年前就曾经进行过生产试验,但至今尚未有大规模应用。究其原因,一方面,纯培养菌脱胶需要专业的设备和复杂的灭菌操作;另一方面,纯培养菌脱胶能力有限,目前所得到的脱胶菌,其脱胶能力尚不能满足工业的需求。因此,人们一直在找寻脱胶能力更强的菌种。

RAMCD407是由自然菌群经长期驯化获得的苧麻生物脱胶菌群,该菌群脱胶效率高,结构稳定,传代超过200次菌群的脱胶时间和胶质去除率仍无明显变化,且脱胶成本低,操作条件粗放,利于工业推广。针对RAMCD407脱胶机理的研究中存在细菌多样性高、无法分离菌群中的所有菌种等问题,本研究从RAMCD407分离出部分菌株,从中筛选6个菌株重建一个稳定的脱胶菌群,通过单一菌株在复合系中的作用测定分析单个菌株在脱胶

过程中的功能,为阐明菌群的种间协作机理打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

苧麻原麻:采自湖北省咸宁市,手工剥皮,按照国标法<sup>[8]</sup>检测其平均胶质含量为33.3%。脱胶菌群:苧麻脱胶共生菌群RAMCD407由武汉纺织大学纺织印染清洁生产教育部工程研究中心经由自然菌群长期驯化并构建成功,于塑料桶中以苧麻为唯一营养源长期传代保存,保存体系为10L,苧麻含量为10%(质量体积比),接种量为10%(质量体积比),传代周期为3d。

培养基:LB培养基<sup>[9]</sup>;苧麻培养基<sup>[10]</sup>;果胶培养基<sup>[11]</sup>;木聚糖培养基<sup>[11]</sup>;发酵培养基<sup>[11]</sup>;0.10%刚果红染液<sup>[11]</sup>;VTY培养基(g/L):酵母提取物5.0,胰蛋白胨10.0,L-半胱氨酸1.0,A液20mL,B液20mL,蒸馏水56mL,苧麻发酵液0.30mL,终体积100mL。其中A液(g/L):CaCl<sub>2</sub>0.60,MgSO<sub>4</sub>0.45;B液(g/L):NaCl4.50,(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>4.50,H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>4.90,pH7.4。

### 1.2 主要试剂和仪器

DNA小量快速提取试剂盒,大连宝生物工程有限公司。多功能酶标仪,美国Bio-Tek公司;厌氧培养箱,英国Ruskinn公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 微生物的分离纯化:**将共生菌群RAMCD407重新传代,每24h取样一次,共取样3次后将菌液混合均匀后取1mL稀释至10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup>,涂布在相应固体培养基上,分别在好氧和厌氧条件下42℃静置培养24h,选取形态不同的菌落进行划线分离,

配合镜检直至获得纯培养菌落, 好氧条件下获得的纯培养菌落接种至相应液体培养基中, 42 °C、150 r/min 培养 24 h 后进行保藏, 厌氧条件下获得的纯培养菌落接种至相应液体培养基中, 于厌氧培养箱中 42 °C 静置培养 24 h 后进行保藏。

**1.3.2 微生物鉴定:** 总 DNA 的提取使用细菌组 DNA 小量快速提取试剂盒, 并使用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增<sup>[11]</sup>, 扩增片段由上海桑尼公司纯化后测序, 得到的序列于 GenBank 中进行 BLAST 分析。

**1.3.3 微生物脱胶关键酶活力测定和功能分析:** 将菌株接种至发酵培养基中, 42 °C、150 r/min 培养 48 h, 菌液经 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液作为粗酶液采用 DNS 酶活测定法<sup>[12]</sup>进行果胶酶和木聚糖酶活力测定。将酶活较高的菌株活化后, 在 500 mL 三角瓶中加入 30 g 原麻, 加入 30 mL 菌液和 270 mL 蒸馏水, 调节初始 pH 8.5, 42 °C 静置培养 60 h 后按国标法<sup>[8]</sup>测定纤维残胶率后计算胶质去除率, 并按国标法<sup>[13]</sup>测定纤维强力。

**1.3.4 脱胶复合系的重构与功能分析:** (1) 复合系的重构: 在纯培养菌株中挑选果胶酶活和木聚糖酶活最高的 6 个菌株进行脱胶复合系的重建。将这 6 个菌株活化放大后等比例混合, 取复合系菌液 1 L, 接种至 9 L 自来水中, 并加入 1 000 g 干苕麻, 42 °C 进行脱胶, 测定脱胶过程中的胶质去除率和纤维强力。

(2) 重构复合系的功能分析: 通过测定不同菌株组合的产脱胶关键酶的能力和脱胶能力, 采取“淘汰法”<sup>[14]</sup>测定了单一菌株在复合系 JHY 系中发挥作用的大小, 并采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析及显著性检验。

(3) 复合系的拮抗验证实验: 取复合系 JHY 各个菌株的菌悬液 0.5 mL, 均匀涂布于苕麻固体培养基上。将灭菌滤纸片(1 cm×1 cm)在各菌悬液中完全浸湿, 然后将滤纸片均匀分布, 平铺于涂布了单一菌悬液的苕麻固体培养基上。42 °C 培养 3 d 后分别检查各菌株(滤纸片)和涂布于苕麻固体培养基上单一菌株之间的拮抗活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 纯培养微生物分离纯化

由表 1 可知, 共分离得到 25 株菌株, 分为 6 个属, 分别为芽孢杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、鞘氨醇杆菌属、鲁梅利杆菌属和微小杆菌属, 其中以芽孢杆菌属居多, 包括蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)等, 序列比对的相似性全部在 98%–100%之间, 可以确定所有菌种均与已知菌属为同一属。

### 2.2 纯培养微生物产脱胶关键酶活力测定和功能分析

经酶活力检测, 有 9 株菌株酶活力较高, 测定其脱胶能力, 结果见表 2。其中, 2H3、Y1、Y2、JY31、2H4 同时具有较高的果胶酶活力和木聚糖酶活力, 2H1、V61 和 LH22 具有较高的果胶酶活力, 木聚糖酶活力基本检测不到; 2H2 具有较高的木聚糖酶活力, 果胶酶活力基本检测不到。单个纯培养菌株最多能够去除约 57.05%的胶质, 而相同条件下菌群 RAMCD407 能够去除约 79.34%的胶质, 残胶率约为 6.88%, 束纤维断裂强力为 5.77±0.11 cN/dtex。

### 2.3 重建复合系的脱胶能力分析

从表 2 可知, 果胶酶活最高的 5 个菌株为 Y1、2H3、Y2、JY31 和 2H1, 木聚糖酶活最高的 5 个菌株为 2H3、Y2、JY31、2H2 和 2H4, 考虑到 2H4 的木聚糖酶活相对较低, 因此选择 Y1、2H3、JY31、Y2、2H1 和 2H2 进行脱胶复合系的重建。将这 6 个菌株活化后等量混合, 命名为复合系 JHY, 按 10%接种量, 浴比(质量体积比) 1:10 和初始 pH 8.5 进行沤麻, 测定脱胶过程中的胶质去除率和纤维强力。

由图 1 可知, 复合系 JHY 的胶质去除率在 72 h 时达到最高, 但此时纤维强力出现明显下降, 因此选择 66 h 作为复合系 JHY 的脱胶周期。结合表 3 可知, JHY 中的 6 个菌株脱胶能力差别较大, 脱胶能力最弱菌株 2H2 的胶质去除率为 28.86%, 脱胶能力最强菌株 Y1 的胶质去除率可达 57.05%, 但经测定, JHY 的胶质去除率最高只能达到 50.87%, 可推测 6 株菌株之间存在一定的拮抗作用。

表1 纯培养微生物的16S rRNA基因序列比对结果  
Table 1 BLAST result of 16S rRNA gene sequences of bacteria pure culture

菌株编号 No.	培养基 Medium	代谢类型 Type of catabolism	NCBI 数据库中最相似菌种 Most similar strain in NCBI	相似性 Similarity (%)
Y2	VTY	好氧	蜡样芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	99
2H3	苜麻培养基	好氧	蜡样芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	99
LH21	LB	好氧	蜡样芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	100
Y1	苜麻培养基	好氧	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	99
LY23	LB	好氧	芽孢杆菌属( <i>Bacillus</i> sp. FJAT-25773)	100
2H5	苜麻培养基	好氧	深海微小杆菌( <i>Exiguobacterium profundum</i> )	99
Y3	VTY	好氧	鲁梅利杆菌( <i>Rummeliibacillus stabekisii</i> )	99
Y4	VTY	好氧	球形赖氨酸芽孢杆菌( <i>Lysinibacillus sphaericus</i> )	99
Y5	VTY	好氧	鲁梅利杆菌( <i>Rummeliibacillus stabekisii</i> )	99
Y6	VTY	好氧	鲁梅利杆菌( <i>Rummeliibacillus stabekisii</i> )	99
H21-1	苜麻培养基	好氧	球形赖氨酸芽孢杆菌( <i>Lysinibacillus sphaericus</i> )	99
LH4	LB	好氧	同温层芽孢杆菌( <i>Bacillus stratosphericus</i> )	100
LH6	LB	好氧	郭霍氏芽孢杆菌( <i>Bacillus kochii</i> )	99
LH7	LB	好氧	aryabhatai 芽孢杆菌( <i>Bacillus aryabhatai</i> )	100
2H1	基础培养基	好氧	短小芽孢杆菌( <i>Bacillus pumilus</i> )	100
2H4	基础培养基	好氧	弯曲芽孢杆菌( <i>Bacillus flexus</i> )	99
V51	VTY	兼性厌氧	阴沟肠杆菌( <i>Enterobacter cloacae</i> )	99
V52	VTY	兼性厌氧	阴沟肠杆菌亚种( <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> )	99
V61	VTY	兼性厌氧	阴沟肠杆菌( <i>Enterobacter cloacae</i> )	99
V62	VTY	兼性厌氧	阴沟肠杆菌( <i>Enterobacter cloacae</i> )	99
LH1	LB	好氧	嗜稳鞘氨醇杆菌( <i>Sphingobacterium thalpophilum</i> )	99
LH51	LB	好氧	鞘氨醇杆菌属( <i>Sphingobacterium composti</i> )	100
2H2	基础培养基	兼性厌氧	阴沟肠杆菌( <i>Enterobacter cloacae</i> )	99
JY31	基础培养基	好氧	类产碱假单胞菌( <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> )	98
LH22	LB	好氧	类产碱假单胞菌( <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> )	98

表2 纯培养微生物的酶活检测和脱胶能力分析  
Table 2 Hydrolyzation circle and enzyme activity of bacteria pure culture

菌株编号 No.	果胶酶活 Pectinase activity (U/mL)	木聚糖酶活 Xylanase activity (U/mL)	胶质去除率 Gum removal ratio (%)	束纤维断裂强力 Breaking strength of bundle fiber (cN/dtex)
Y2	78.38±3.82	78.82±4.12	38.03±1.22	8.39±0.26
2H3	101.21±4.88	110.79±5.47	55.56±2.30	7.07±0.17
Y1	111.68±5.10	33.42±1.78	57.05±2.15	6.84±0.21
2H1	52.09±2.47	—	25.11±1.16	8.34±0.20
2H4	32.36±1.72	40.96±2.11	23.06±1.22	8.39±0.24
V61	42.66±2.09	—	57.05±2.15	6.84±0.21
2H2	—	48.05±2.71	28.86±1.18	8.10±0.15
JY31	77.23±3.47	86.90±4.53	42.66±2.26	8.01±0.12
LH22	49.24±2.49	—	20.27±1.33	10.83±0.22

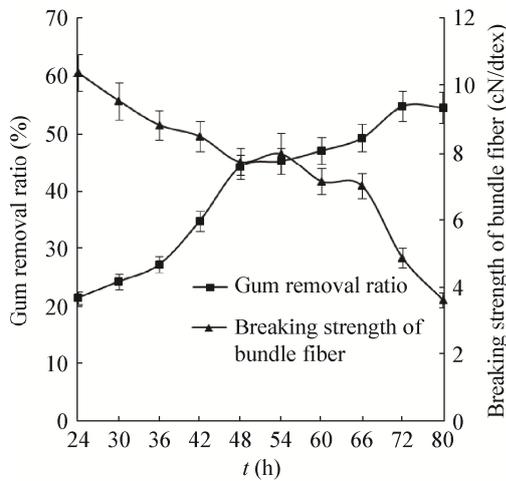


图1 复合系 JHY 脱胶过程中的胶质去除率与纤维强力变化

Figure 1 Gum removal ratio and fiber strength in the whole retting process of composite microbial system JHY

#### 2.4 复合系各菌种对整体脱胶功能的影响

通过单因素方差分析(未在图中列出)除 $\Delta 2H3$ 和 $\Delta 2H2$ 外,各菌系组合的果胶酶和纤维素酶活力均显著高于单一菌株( $P < 0.05$ ),说明通过构建复合菌系的方法可以显著提高菌系的果胶酶和纤维素酶活力水平。单一菌株中,由表2可知Y1的木聚糖酶活显著低于其他单菌( $P < 0.05$ ),2H1未检测出木聚糖酶活,2H2未检测出果胶酶活,但从图2可知复合菌系中 $\Delta 2H2$ 的两种酶活力显著低于其他复合菌系,表明2H2能提高整个菌系的两种酶活力。复合菌系中 $\Delta JY31$ 的两种酶活力最高,且显著高于其他复合菌系,表明JY31在复合菌系的生长导致了复合菌系整体酶活力的降低。 $\Delta 2H3$ 的木聚糖酶活力相比 $\Delta Y1$ 和 $\Delta Y2$ 差异不显著但显著低于JHY,表明2H3在复合菌系中的存在对木聚糖酶活的提高有一定作用,而 $\Delta Y1$ 、 $\Delta Y2$ 和 $\Delta 2H1$ 与JHY的两种酶活力差异不显著( $P > 0.05$ ),说明3株细菌的存在与否对复合菌系的两种酶活力影响较小。

通过单因素方差分析(未在图中列出),不同菌株组合的胶质去除率均未显著低于任何单一菌株( $P > 0.05$ ),说明单一菌株的脱胶能力有限,胶质的降解不仅仅依赖于果胶酶和木聚糖酶,需要多种酶

的协同作用。单一菌株处理中,Y1对胶质去除率显著高于其他菌株( $P < 0.05$ ),而2H2的胶质去除率最低( $P < 0.05$ ),说明Y1在对胶质的降解过程中发挥重要作用。从图3可知,与JHY相比, $\Delta Y1$ 、 $\Delta 2H3$ 、 $\Delta Y2$ 和 $\Delta 2H2$ 的胶质去除率均显著降低( $P < 0.05$ ),说明复合菌系中Y1、2H3、Y2和2H2在对苕麻胶质的降解中均发挥了重要作用,特别是2H3和2H2。 $\Delta 2H1$ 与JHY的胶质去除率差异不显著( $P > 0.05$ ),说明2H1在复合菌系中发挥的作用较小,但对复合菌系中其他菌株作用的发挥没有负面影响。与JHY相比, $\Delta JY31$ 的胶质去除率显著升高( $P < 0.05$ ),达到62.94%,表明JY31对复合菌系JHY中其它菌株产生了一定的抑制作用,限制了其它菌对苕麻胶质的有效降解。

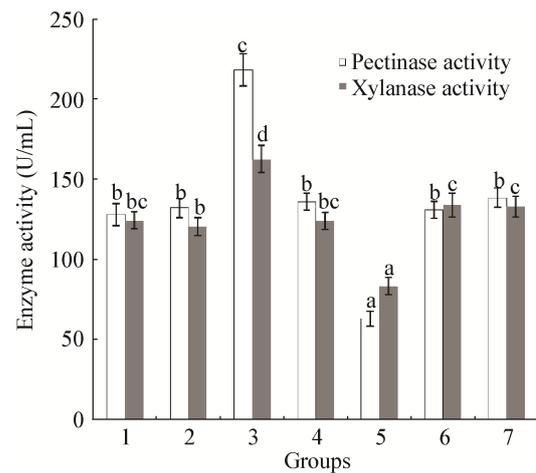


图2 不同菌株组合苕麻的果胶酶活力和木聚糖酶活力  
Figure 2 Pectinase activities and xylanase activities of different mixed-cultures

注:根据邓肯多重范围检验,不同字母表示组间存在显著差异( $P < 0.05$ )。1: $\Delta Y1$ (除Y1外的其他5株菌);2: $\Delta 2H3$ (除2H3外的其他5株菌);3: $\Delta JY31$ (除JY31外的其他5株菌);4: $\Delta Y2$ (除Y2外的其他5株菌);5: $\Delta 2H2$ (除2H2外的其他5株菌);6: $\Delta 2H1$ (除2H1外的其他5株菌);7:复合系JHY。  
Note: According to Duncan's multiple range test, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) among different mixed-cultures. 1:  $\Delta Y1$  (The other 5 stains without Y1); 2:  $\Delta 2H3$  (The other 5 stains without 2H3); 3:  $\Delta JY31$  (The other 5 stains without JY31); 4:  $\Delta Y2$  (The other 5 stains without Y2); 5:  $\Delta 2H2$  (The other 5 stains without 2H2); 6:  $\Delta 2H1$  (The other 5 stains without 2H1); 7: Composite microbial system JHY.

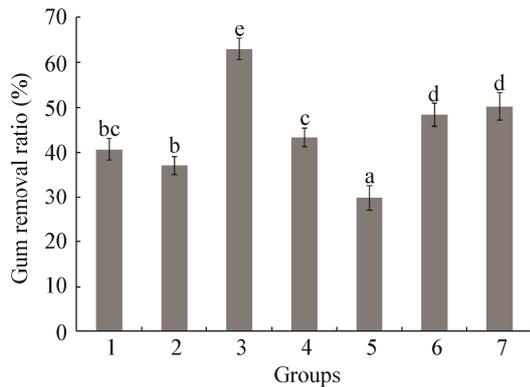


图3 不同菌株组合沤麻的胶质去除率

Figure 3 Gum removal ratio of different mixed-cultures

### 2.5 复合系拮抗验证实验

从表3可以看出, Y1、2H3、Y2和2H1与其它菌株均不存在拮抗作用, 其中2H2除了与JY31不能交叉生长外, 与其它菌株都可以交叉生长, 具有较好的相容性, JY31与2H3和Y2之间均存在拮抗作用, JY31与2H2之间虽无明显拮抗作用但不能交叉生长, JY31与Y1和2H1之间无明显拮抗作用。说明在复合系JHY中, 2H2的存在不影响除了JY31以外的其他菌株的生长, 而JY31的存在抑制了Y2和2H3的生长, 对2H2的生长也有一定负面影响。

综上所述, 去掉JY31可有效提高整个复合菌系的果胶酶活力、木聚糖酶活力和胶质去除率。将 $\Delta$ Y1、 $\Delta$ 2H3、 $\Delta$ Y2、 $\Delta$ 2H2和 $\Delta$ 2H1按体积等比例混合接种, 按RAMCD407脱胶条件脱胶66h后测得苧麻纤维的胶质去除率为61.52%。

表3 复合系JHY中6个菌株间的拮抗活性  
Table 3 The antagonistic activities among 6 strains of composite microbial system JHY

菌株编号 No.	Y1	2H2	JY31	Y2	2H1	2H3
Y1		++	++	++	+	++
2H2			+	++	++	++
JY31				-	++	-
Y2					+	++
2H1						++
2H3						

注: - : 具有拮抗作用; + : 菌株间无明显拮抗作用但不能交叉生长; ++ : 菌株间无拮抗作用, 可以交叉生长。

Note: - : Antagonism between two strains; + : No significant antagonism between two strains, but no cross growth; ++ : No significant antagonism between two strains, and cross growth.

## 3 讨论

本研究从一个稳定的苧麻生物脱胶菌群RAMCD407中分离出了25株脱胶微生物, 这些微生物分属于芽孢杆菌属、肠杆菌属、假单胞菌属、鲁梅利杆菌属、鞘氨醇杆菌属和微小杆菌属。芽孢杆菌<sup>[15-19]</sup>是经常被报道的沤麻菌种, 在所分离的菌种中也占据了绝对的优势(超过了60%), 而且能够分泌果胶酶<sup>[20]</sup>或者木聚糖酶<sup>[21]</sup>, 再次证实了它们在苧麻脱胶过程中扮演着相当重要的角色。关于肠杆菌、假单胞菌、鞘氨醇杆菌参与沤麻的报道并不多见, 仅个别(Darah等)<sup>[22]</sup>研究发现肠杆菌属的某个种可分泌聚半乳糖醛酸酶, 对脱胶有促进作用, 微小杆菌和鲁梅利杆菌参与沤麻过程尚属首次报道。

经果胶酶活力、木聚糖酶活力和胶质去除率测定, 筛选出6株细菌重新组合, 得到一个稳定的脱胶复合菌系JHY。在复合系统各菌种对整体脱胶功能的影响中发现, 2H2本身并未检测出果胶酶活, 木聚糖酶活偏低, 单独脱胶时的效果并不好, 但其缺失会显著降低复合菌系JHY的果胶酶活、木聚糖酶活和胶质去除率, 表明在复合菌系JHY中, 2H2是关键菌种, 对复合系的脱胶有明显促进作用。由表1和表3可知, 2H2为兼性厌氧菌, 除JY31外, 2H2与其它菌株都有较好的相容性, 可以交叉生长, 推测复合系JHY在脱胶初期以好氧菌为主, 好氧菌的大量繁殖消耗了沤麻液中的氧气, 脱胶中后期沤麻环境变为兼性厌氧, 此时2H2的快速生长与其它菌株发生协同作用, 促进了其它菌株分泌胞外酶, 并加快了胶质的降解。而JY31同时具有相对较高的果胶酶和木聚糖酶活力, 在单独脱胶时也有一定效果, 其缺失却显著提高了复合菌系JHY的果胶酶活、木聚糖酶活和胶质去除率, 而且由表3可知, JY31的存在抑制了Y2和2H3的生长, 对2H2的生长也有一定负面影响, 而这3个菌株对复合系JHY的两种酶活力和胶质去除率都有贡献, 表明JY31的存在对复合系存在负面影响, 抑制了其它菌株的生长、脱胶关键酶的分泌和胶质的降解。Y1、2H3和Y2虽然在对苧麻胶质的降解中均发挥了重

要作用,且与其它菌株均不存在拮抗作用,但 Y1 和 Y2 的存在对复合菌系 JHY 的两种酶活力并没有显著影响,仅 2H3 对木聚糖酶活性的提高有一定作用,这表明苧麻脱胶不仅是多菌种协同作用的结果,也是多酶系共同作用的结果。

因此,2H2 在复合系 JHY 中发挥重要作用, JY31 则对复合系 JHY 的脱胶效果有负面影响。在去除 JY31 后复合系的胶质去除率在 66 h 可达到 61.52%,与原菌群 RAMCD407 的胶质去除率 79.34%仍有一定差距,这可能是因为:(1) 受培养基和分离方法所限, RAMCD407 中还有对脱胶有重要贡献的菌株未被分离出来;(2) 本研究仅选取了有果胶酶和木聚糖酶活力的菌株进行复合系重构,在未被选取的菌株中可能有产生甘露聚糖酶、多聚半乳糖酶<sup>[6]</sup>、木质素降解酶等酶系的菌株,这些酶对胶质的降解有协同促进作用。这些研究会在今后的工作中完成。

## 参 考 文 献

- [1] Cai BY, Jiang YF, Ge JP, et al. Diversity analysis of bacterial populations in the fermentation liquid of hemp retting[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(17): 4691-4698 (in Chinese)  
蔡柏岩, 江云飞, 葛菁萍, 等. 大麻沤麻液细菌种群多样性[J]. *生态学报*, 2010, 30(17): 4691-4698
- [2] Akin DE, Foulk JA, Dodd RB, et al. Enzyme-retting of flax and characterization of processed fibers[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 89(2/3): 193-203
- [3] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(3/4): 326-338
- [4] Basu S, Saha MN, Chattopadhyay D, et al. 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
- [5] Xue XH, Ding RY, Yu CW, et al. Optimization of fermentation conditions of flax degumming bacterium and extraction of enzymes[J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2013, 35(4): 185-190 (in Chinese)  
薛小华, 丁若焱, 郁崇文, 等. 亚麻脱胶菌发酵条件的优化及酶的粗提[J]. *中国麻业科学*, 2013, 35(4): 185-190
- [6] Xiao L, Wang GX, Chen GJ. The research advancement of the enzymatic degumming of ramie[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
- [7] Zhang YX, Liu ZC. Studies on the extracellular enzymes from highly efficiently degumming *Erminnia* sp. T85-260 for ramie under pure culture[J]. *China's Fiber Crops*, 2000, 22(4): 23-27,35 (in Chinese)  
张运雄, 刘正初. 苧麻高效脱胶菌 T85-260 纯培养过程中的胞外酶系研究[J]. *中国麻业科学*, 2000, 22(4): 23-27,35
- [8] China Textile Industry Association. GB 5889-1986 Method of quantitative analysis of ramie chemical components[S]. Beijing: China Standard Press, 1986 (in Chinese)  
中华人民共和国纺织工业部. GB 5889-1986 苧麻化学成分定量分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986
- [9] Zhou L, Zhang YK, Chen X, et al. The screening of a flocculant-producing strain and optimizing of its culture conditions[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(4): 584-588 (in Chinese)  
周礼, 张永奎, 陈晓, 等. 一种高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养基优化[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(4): 584-588
- [10] Ge JP, Ling HZ, Song G, et al. The Study on Isolation of Pectinase-producing Strains and its Cultural Conditions[J]. *China Biotechnology*, 2004, 24(8): 93-95 (in Chinese)  
葛菁萍, 凌宏志, 宋刚, 等. 果胶酶产生菌的分离及培养条件研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(8): 93-95
- [11] Yu M, Chen HG, Wang CQ, et al. Isolation and Characterization of Two Predominant Strains from Ramie Degumming Bacterial Consortium RAMCD407[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(4): 144-150 (in Chinese)  
余苗, 陈洪高, 王超群, 等. 苧麻脱胶共生菌群 RAMCD407 中两株优势菌的分离、鉴定和脱胶能力分析[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(4): 144-150
- [12] Montero GA, Smith CB, Hendrix WA, et al. Supercritical fluid technology in textile processing: an overview[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2000, 39(12): 4806-4812
- [13] China Textile Industry Association. GB 5882-1986 Testing method of bundle breaking tenacity of ramie fiber[S]. Beijing: China Standard Press, 1986 (in Chinese)  
中华人民共和国纺织工业部. GB 5882-1986 苧麻束纤维断裂强度试验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986
- [14] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7099-7106
- [15] Tamburini E, León AG, Perito B, et al. Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the water retting process[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(9): 730-736
- [16] Huang XL, Sun HL, Xie DP, et al. Screening and identification of microbial retting bacteria for flax[J]. *Journal of Biology*, 2003, 21(1): 20-22 (in Chinese)  
黄小龙, 孙焕良, 谢达平, 等. 亚麻微生物脱胶菌种的筛选与鉴定[J]. *生物学杂志*, 2003, 21(1): 20-22
- [17] Chen J, Wang Q, Hua ZZ, et al. Research and application of biotechnology in textile industries in China[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(7): 1651-1655
- [18] Munshi TK, Chattoo BB. Bacterial population structure of the jute-retting environment[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(2): 270-282
- [19] Nair AGH, Donio MTBS, Viji VRT, et al. Isolation from coconut retting effluent of *Bacillus cereus* TC-2 antagonistic to pathogenic *Vibrios*[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(3): 631-637
- [20] Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16(3): 277-282
- [21] Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A, et al. Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(4): 283-289
- [22] Darah I, Nisha M, Lim SH. Polygalacturonase production by calcium alginate immobilized *Enterobacter aerogenes* NBO<sub>2</sub> cells[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2629-2636