(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2016 年 4 月 28 日 (28.04.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/061827 A1

(51) 国际专利分类号:
D01C 1/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/089506

(22) 国际申请日: 2014 年 10 月 24 日 (24.10.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: **华中科技大学 (HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY)** [CN/CN]; 中国湖北省武汉市洪山区珞喻路 1037 号, Hubei (CN)。 **湖北精华纺织集团有限公司 (BUBEI JINGHUA TEXTILE GROUP CO.,LTD)** [CN/CN]; 中国湖北省咸宁市咸安区双溪桥镇麻纺路 1 号, Hubei 437000 (CN)。

(72) 发明人: **余龙江 (YU, Longjiang)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。 **樊培 (FAN, Pei)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。 **杨英 (YANG, Ying)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。 **何峰 (HE, Feng)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。 **敖明章 (AO, Mingzhang)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。 **胡祖德 (HU, Zude)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。 **胡振华 (HU, Zhenhua)**; 中国湖北省武汉洪山区珞喻路 1037 号, Hubei 437000 (CN)。

(74) 代理人: **深圳市顺天达专利商标代理有限公司 (SHENZHEN STANDARD PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.)**; 中国广东省深圳市福田区深南大道 1056 号银座国际大厦 810-815 室, Guangdong 518040 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。

(54) **Title**: BIOLOGICAL DEGUMMING METHOD FOR RAMIE

(54) **发明名称** : 一种苎麻生物脱胶方法

(57) **Abstract**: The present invention relates to a biological degumming method for ramie. The method comprises the following steps: using bacillus (Bacillus sp. HG-28) as a strain; obtaining a degumming bacteria solution F used for biological degumming of ramie after a strain activation step, a step of expanded culture and a dilution step are performed; and then, conducting biological degumming by immersing raw ramie into the degumming bacteria solution F. By implementing the present invention, energy consumption is low, pollution is low, the biological degumming needs a short time and a simple operation process, the degumming efficiency is high, and the strain culture needs a short time and low cost; the obtained degummed ramie has high quality, a low residual gum content and high breaking strength, is superior to requirements on appearance and technical specifications for degummed ramie at a first level in national standards GB/T 20793-2006 of China; and the prospective of large-scale production is wide.

(57) **摘要**: 本发明涉及一种苎麻生物脱胶方法，包括如下步骤：使用芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 作为菌种，经过菌种活化步骤、扩大培养步骤、稀释步骤，获得用于苎麻生物脱胶的脱胶菌液 F，然后将苎麻原麻浸没于脱胶菌液 F 中进行生物脱胶。实施本发明，能耗较小、污染较轻；生物脱胶时间短、过程易操作、脱胶效率高；菌体培养的时间短、成本低；得到的苎麻精干麻品质高、残胶率低、断裂强度高，优于国家标准 GB/T 20793-2006 一级精干麻的外观和各项技术指标的要求；规模化生产前景广阔。

WO 2016/061827 A1

说明书

发明名称: 一种苎麻生物脱胶方法

技术领域

[1] 本发明属于生物技术领域，更具体的说，涉及一种使用 芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 进行 苎麻生物脱胶的方法。

背景技术

[2]

[3] 苎麻， 学名 *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. ，是一种提供重要纺织纤维的经济作物。 苎麻单纤维长、强度大、吸湿散湿快、导热性好，是优良纺织原料及医用材料，用途广泛。苎麻纤维可以纯纺，也可与棉、毛、丝等混纺，其织物具有防腐、抑菌、透气、挺括等优点。我国是苎麻纤维生产大国，其产量占世界 95% 以上，在国际市场具有重大需求，是我国具有国际市场竞争优势的特色产业。

[4] 目前，制约苎麻产业发展存在的主要瓶颈问题是如何在降低苎麻纤维生产成本与生产过程的污染问题的前提下，提高苎麻纤维的品质，以满足国内外高端市场需求。由于苎麻含胶质占总重量 19% ～ 30% 左右，在纺织加工前要进行脱胶，目前，几乎所有厂家在苎麻脱胶过程中都采用化学脱胶方法，首先用酸浸泡苎麻，然后用碱液煮练苎麻，煮练后的苎麻通过拷打机拷打后，再用漂白剂漂洗、酸中和，然后水洗、脱水、给油、烘干得到成品苎麻精干麻。苎麻的化学脱胶需要使用大量酸、碱，产生的废水量大且很难处理，对环境会造成大量污染。因此，目前不少苎麻初加工企业由于生产废水污染水体、不能达标排放被迫关停，以致苎麻原料需求减小，农民种麻收入得不到保障，种麻积极性受到打击，整个产业面临困境。所以，苎麻脱胶过程中的节能减排技术问题已成为制约苎麻产业可持续发展的瓶颈。

[5] 近年来，为了减少或根治脱胶造成的污染，已公认利用微生物进行苎麻脱胶是未来主要发展方向，相继开展了苎麻生物脱胶技术研究和相关工艺探索。

[6] 刘自鎔等在 CN1371990A 号专利中公开了一株可产生韧皮纤维脱胶酶的菌株及其在苎麻、大麻脱胶中的应用，该菌株具有培养条件粗放、生长繁殖快，在同

一培养条件下可产生脱胶所需的多种酶，脱胶效果好，且 2 ～ 6 小时即可完成，脱胶率达到 95%，纤维分散度 100%，不损伤纤维，无环境污染。但是该菌株两级种子培养时间比较长（累计达 16 ～ 28 小时），种子培养结束后还需再发酵 12 ～ 18 小时后才能用于苎麻脱胶，生产周期过长；且精干麻产品残胶率偏高（2.18%），断裂强度偏小（4.30 cN/dtex），只能达到 GB/T 20793-2006 二级品的要求，不适合用于高品质苎麻精干麻大规模生产。

[7] 刘正初等在 CN101235357B 号专利中公开了一种欧文氏杆菌工厂化发酵快速提取苎麻纤维工艺。该菌株嗜好甘露糖，纯培养 7 ～ 9 小时达到分泌非纤维素降解关键酶（果胶酶、β- 甘露聚糖酶和木聚糖酶）的高峰。将其菌剂活化 5 ～ 6 小时后接种到苎麻等草本纤维原料上发酵 5 ～ 6 小时的发酵草料变成蓝色，剥离和部分降解伴生于纤维细胞间的果胶、半纤维素及部分木质素，再借助高压水柱冲洗可除去附着在纤维上的非纤维素残留物，达到提取纯净纤维的目的。但是其活化菌液制备时间较长、过程较繁琐、且需要使用超滤膜设备，不利于在工厂里进行种子的全套活化生产程序。

[8] 曹军卫等在 CN1177003C 号专利中公开了一株新的嗜碱芽孢杆菌菌株及其在苎麻脱胶中的应用。该发明提供的技术具有脱胶周期短，脱胶效率高，菌种不易被污染，酶活力稳定，处理成本低，纤维质量好等优点。吴瑜等在 CN101270343A 号专利中公开了一种苎麻脱胶菌。该发明苎麻脱胶菌的脱胶能力有质的提高，对麻纤维无损伤，经过脱胶后杂质几乎全部脱掉，脱胶速度至少提高一倍。张兴群等在 CN101654660B 号专利中公开了一种具有苎麻脱胶活性的枯草芽孢杆菌菌株及其制备和应用，利用以该菌株为核心的体系用于苎麻脱胶，利用该体系进行苎麻脱胶具有脱胶时间短，苎麻纤维分散率达到 100％，脱胶率达到 90％以上，精干麻质量达到化学脱胶水平。上述几种方法存在培养体系价格高、培养时间长等问题，且均只是实验室小试，离实际运用于工业生产尚有较大差距。

[9] 以上现有技术存在的问题主要在于所述菌株活化与扩增环节培养条件相对严苛、培养时间较长，脱胶环节存在时间长、难于控制、化学品与水的消耗量偏大，苎麻精干麻产品品质不高。目前，真正用于工业生产的脱胶微生物与生物脱

胶技术尚不成熟，未能完全解决存在的瓶颈问题。

发明内容

[10] 本发明所要解决的技术问题在于：提供一种苎麻生物脱胶方法，解决现有苎麻脱胶工业存在的污染严重、工艺条件严苛、生产周期长、产品品质不高的问题。

[11] 本发明解决上述问题的技术方案在于：

[12] 提供一种苎麻生物脱胶方法，所述方法包括如下步骤：

[13] S1、脱胶菌液培养：使用芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 作为菌种，经过菌种活化步骤、扩大培养步骤、稀释步骤，获得用于苎麻生物脱胶的脱胶菌液 F；

[14] S2、生物脱胶：将装入麻笼的苎麻原麻浸没于脱胶菌液 F 中，苎麻原麻与脱胶菌液 F 的质量比为 1 : 11 ～ 1 : 12，以 0.5 ～ 3 m^3/h 的通气量通入空气，生物脱胶 4 ～ 12 h 后，将发酵罐密封，加热使压力升至 0.1 ～ 0.15 MPa，保持 20 ～ 40 min，结束脱胶过程。

[15] 在本发明的苎麻生物脱胶方法中，所述步骤 S1 之前还包括菌种保存步骤，所述菌种保存步骤具体为：

[16] 将芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 菌种接种到装有 50 ～ 100 mL 一号培养基的 250 mL 锥形瓶中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 90 ～ 180 r/min 的转速，于摇床上培养 3 ～ 6 h，得到菌液 A。将菌液 A 与体积分数为 50% 的甘油水溶液按 3:2 的比例分别移入 1 ～ 5 mL 的离心管内混和均匀，得到菌液 B，－20°C 条件下保存备用；

[17] 其中，所述一号培养基包括：10 g/L 的蛋白胨、5 g/L 的酵母浸粉、10 g/L 的 NaCl。与水混和、定容后，调节初始 pH 值为 7 ～ 7.5。

[18] 在本发明的苎麻生物脱胶方法中，所述菌种活化步骤进一步包括：

[19] 将保存有菌液 B 的离心管移至室温下保持 5 ～ 15 min，然后将菌液 B 按 0.1% ～ 5% 的接种量接种到装有 200 ～ 400 mL 一号培养基或二号培养基的 1 L 锥形瓶中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 90 ～ 180 r/min 的转速，于摇床上培养 3 ～ 6 h，得到菌液 C；

[20] 其中，所述二号培养基包括：10 g/L 的蛋白胨、5 g/L 的酵母浸粉、5 g/L 的

NaCl。与水混和、定容后，调节初始 pH 值为 6.8 ～ 7.7。

[21] 在本发明的苎麻生物脱胶方法中，所述扩大培养步骤进一步包括：

[22] 将所述菌液 C 按 1% ～ 5% 的接种量接种到装有 25 ～ 35 L 二号培养基的 50 L 种子罐中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 90 ～ 180 r/min 的转速和 5 ～ 30 L/min 的通气量，培养 2 ～ 5 h，得到菌液 D；

[23] 然后将菌液 D 接种到装有 300 ～ 700 kg 二号培养基或三号培养基的 1 t 种子罐中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 60 ～ 150 r/min 的转速和 0.5 ～ 3 m^3/h 的通气量，培养 2 ～ 5 h，得到菌液 E；

[24] 其中，所述三号培养基包括： 5 ～ 20 g/L 的黄豆粕粉、 5 ～ 15g/L 的麸皮、 0 ～ 5 g/L 的 NaCl 、 0 ～ 0.1 g/L 的 K_2HPO_4 、 0 ～ 0.1 g/L 的 $(NH_4)_2SO_4$。与水混和、定容后，调节初始 pH 值为 6.8 ～ 7.7。

[25] 实施本发明，具有如下有益效果：芽孢杆菌菌株 *Bacillus* sp. HG-28 用于苎麻脱胶，能耗较小、污染较轻；生物脱胶时间短、过程易操作、脱胶效率高；菌体培养的时间短、成本低；得到的苎麻精干麻品质高、残胶率低、断裂强度高，优于国家标准 GB/T 20793-2006 《苎麻精干麻》一级精干麻的外观和各项技术指标的要求；规模化生产前景广阔。

具体实施方式

[26] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[27] 本发明使用的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 是使用选择培养基从咸宁咸安区苎麻种植园土壤中分离得到的，通过 16*S* rDNA 序列分析和构建系统发育树被鉴定为芽孢杆菌，并将其命名为 *Bacillus sp.* HG-28。 *Bacillus sp.* HG-28 已于 2013 年 7 月 2 号提交给中国典型培养物保藏中心（简称 CCTCC，地址在中国湖北省武汉市武汉大学）保藏，保藏编号为 CCTCC No: M 2013308。

[28] 实施例 1

[29] 菌种活化步骤： 将保存有菌液 B 的离心管移至室温下保持 5min，然后将菌

液 B 按 0.1% 的接种量接种到装有 200 一号培养基的 1 L 锥形瓶中，在 38°C 的温度下、保持 180 r/min 的转速，于摇床上培养 6 h ，得到菌液 C ；一号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉与 10 g/L 的 NaCl ，并调节初始 pH 值为 7 。

[30] 扩大培养步骤： 将菌液 C 按 5% 的接种量接种到装有 35 L 二号培养基的 50 L 种子罐中，在 33°C 的温度下、保持 90 r/min 的转速和 5 L/min 的通气量，培养 5 h ，得到菌液 D ；然后将菌液 D 接种到装有 700 kg 二号培养基的 1 t 种子罐中，在 38°C 的温度下、保持 60 r/min 的转速和 0.5 m^3/h 的通气量，培养 2h ，得到菌液 E ；二号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉、 5 g/L 的 NaCl ，并调节初始 pH 值为 6.8 。

[31] 稀释步骤包括： 将 5.5t 水注入发酵罐中，保温 34°C ，调节 pH 值为 6.8 ，将菌液 E 按 2% 的体积分数注入发酵罐中，混和均匀，得到脱胶菌液 F 。

[32] 生物脱胶：将 装入麻笼的苎麻原麻浸没于 脱胶 菌液 F 中， 苎麻 原麻 与脱胶菌液 F 的质量比为 1 : 11 ，以 3 m^3/h 的通气量通入空气， 生物脱胶 12 h 后，将发酵罐密封，加热使压力升至 0.15 MPa ，保持 40 min ，结束脱胶过程。

[33] 生物脱胶完成后，经过拷麻、漂白、给油、烘干等工序， 经检测，脱胶后的苎麻单纤维细度为 5.26 dtex 、束纤维断裂强度 5.02 cN/dtex 、残胶率 1.75% 、白度 51 度、 pH 值 6.89 、回潮率 9.13% 。

[34] 实施例 2

[35] 菌种 活化步骤： 将保存有菌液 B 的离心管移至室温下保持 15 min ，然后将菌液 B 按 5% 的接种量接种到装有 400 mL 一号培养基的 1 L 锥形瓶中，在 33°C 的温度下、保持 90 r/min 的转速，于摇床上培养 3 h ，得到菌液 C ；一号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉与 10 g/L 的 NaCl ，并调节初始 pH 值为 7.2 。

[36] 扩大培养步骤： 将菌液 C 按 1% 的接种量接种到装有 25 L 二号培养基的 50 L 种子罐中，在 38°C 的温度下、保持 180 r/min 的转速和 30 L/min 的通气量，培养 2 h ，得到菌液 D ；二号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉、 5 g/L 的 NaCl ，并调节初始 pH 值为 7.2 。然后将

菌液 D 接种到装有 300 kg 三号培养基的 1 t 种子罐中，在 33°C 的温度下、保持 150 r/min 的转速和 3 m^3/h 的通气量，培养 5 h，得到菌液 E；三号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 5 g/L 的黄豆粕粉、 15 g/L 麸皮、 5 g/L 的 NaCl，并调节初始 pH 值为 6.8。

[37] 稀释步骤 包括： 将 5.5t 水注入发酵罐中，保温 37°C，调节 pH 值为 7.5，将菌液 E 按 6% 的体积分数注入发酵罐中，混和均匀，得到脱胶菌液 F。

[38] 生物脱胶：将 装入麻笼的苎麻原麻浸没于 脱胶 菌液 F 中， 苎麻 原麻 与脱胶菌液 F 的质量比为 1 : 12，以 0.5 m^3/h 的通气量通入空气， 生物脱胶 4 h 后，将发酵罐密封，加热使压力升至 0.1 MPa，保持 20 min，结束脱胶过程。

[39] 生物脱胶完成后，经过拷麻、漂白、给油、烘干等工序， 经检测，脱胶后的苎麻单纤维细度为 5.19 dtex 、束纤维断裂强度 5.05 cN/dtex 、残胶率 1.63% 、白度 49 度、 pH 值 7.01 、回潮率 9.06%。

[40] 实施例 3

[41] 菌种 活化步骤： 将保存有菌液 B 的离心管移至室温下保持 10 min，然后将菌液 B 按 3% 的接种量接种到装有 300 mL 二号培养基的 1 L 锥形瓶中，在 37°C 的温度下、保持 120 r/min 的转速，于摇床上培养 4 h，得到菌液 C；二号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉、 5 g/L 的 NaCl，并调节初始 pH 值为 7.7。

[42] 扩大培养步骤： 将所述菌液 C 按 3% 的接种量接种到装有 30 L 二号培养基的 50 L 种子罐中，在 37°C 的温度下、保持 120 r/min 的转速和 20 L/min 的通气量，培养 4 h，得到菌液 D；然后将菌液 D 接种到装有 500 kg 三号培养基的 1 t 种子罐中，在 37°C 的温度下、保持 120 r/min 的转速和 1.5 m^3/h 的通气量，培养 4 h，得到菌液 E；三号培养基的配方是：单位体积的水中混和有 20 g/L 的黄豆粕粉、 5 麸皮、 0.1 g/L 的 K_2HPO_4 、 0.1 g/L 的 $(NH_4)_2SO_4$，并调节初始 pH 值为 7.7。

[43] 稀释步骤 包括： 将水注入发酵罐中，保温 36°C，调节 pH 值为 7.0，将菌液 E 按 4% 的体积分数注入发酵罐中，混和均匀，得到脱胶菌液 F。

[44] 生物脱胶：将 装入麻笼的苎麻原麻浸没于 脱胶 菌液 F 中， 苎麻 原麻 与脱胶

菌液 F 的质量比为 1 : 12 ， 以 1.5 m^3/h 的通气量通入空气， 生物脱胶 6 h 后，将发酵罐密封，加热使压力升至 0.12 MPa ， 保持 30 min ， 结束脱胶过程。

[45] 生物脱胶完成后，经过拷麻、漂白、给油、烘干等工序， 经检测，脱胶后的苎麻单纤维细度为 5.12 dtex 、束纤维断裂强度 5.15 cN/dtex 、残胶率 1.53% 、白度 51 度、 pH 值 6.98 、回潮率 9.21% 。

权利要求书

[权利要求 1] 一种苎麻生物脱胶方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

S1 、脱胶菌液培养：使用 芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 作为菌种，经过 菌种 活化步骤、扩大培养步骤、稀释步骤，获得用于 苎麻生物脱胶的脱胶菌液 F ；

S2 、生物脱胶：将 装入麻笼的苎麻原麻浸没于 脱胶 菌液 F 中，苎麻 原麻 与脱胶菌液 F 的质量比为 1 : 11 ～ 1 : 12 ，以 0.5 ～ 3 m^3/h 的通气量通入空气， 生物脱胶 4 ～ 12 h 后，将发酵罐密封，加热使压力升至 0.1 ～ 0.15 MPa ，保持 20 ～ 40 min ，结束脱胶过程。

[权利要求 2] 据权利要求 1 所述的 苎麻生物脱胶方法，其特征在于，所述步骤 S1 之前还包括 菌种保存步骤，所述菌种保存步骤具体为：

将芽孢杆菌 *Bacillus* sp. HG-28 菌种接种到装有 50 ～ 100 mL 一号培养基的 250 mL 锥形瓶中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 90 ～ 180 r/min 的转速，于摇床上培养 3 ～ 6 h ，得到菌液 A ;将菌液 A 与体积分数为 50% 的甘油水溶液按 3:2 的比例分别移入 1 ～ 5 mL 的离心管内混和均匀，得到菌液 B ， – 20°C 条件下保存备用；

其中，所述一号培养基包括： 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉、 10 g/L 的 NaCl 。

[权利要求 3] 根据权利要求 2 所述的 苎麻生物脱胶方法，其特征在于，所述菌种 活化步骤进一步 包括：

将保存有菌液 B 的离心管移至室温下保持 5 ～ 15 min ，然后将菌液 B 按 0.1% ～ 5% 的接种量接种到装有 200 ～ 400 mL 一号培养基或二号培养基的 1 L 锥形瓶中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 90 ～ 180 r/min 的转速，于摇床上培养 3 ～ 6 h ，得到菌液 C ；

其中， 所述二号培养基包括： 10 g/L 的蛋白胨、 5 g/L 的酵母浸粉、 5 g/L 的 NaCl 。

[权利要求 4] 根据权利要求 3 所述的 苎麻生物脱胶方法，其特征在于，所述 扩

大培养步骤进一步 包括：

将所述菌液 C 按 1% ～ 5% 的接种量接种到装有 25 ～ 35 L 二号培养基的 50 L 种子罐中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 90 ～ 180 r/min 的转速和 5 ～ 30 L/min 的通气量，培养 2 ～ 5 h ，得到菌液 D ；

然后将菌液 D 接种到装有 300 ～ 700 kg 二号培养基或三号培养基的 1 t 种子罐中，在 33 ～ 38°C 的温度下、保持 60 ～ 150 r/min 的转速和 0.5 ～ 3 m^3/h 的通气量，培养 2 ～ 5 h ，得到菌液 E ；

其中，所述三号培养基包括： 5 ～ 20 g/L 的黄豆粕粉、 5 ～ 15g/L 的麸皮、 0 ～ 5 g/L 的 NaCl 、 0 ～ 0.1 g/L 的 K_2HPO_4 、 0 ～ 0.1 g/L 的 $(NH_4)_2SO_4$ 。

[权利要求 5] 根据权利要求 4 所述的 苎麻生物脱胶方法，其特征在于，所述 稀释步骤进一步 包括：

将水注入发酵罐中，保温 34 ～ 37°C ，调节 pH 值为 6.8 ～ 7.5 ，加入所述菌液 E 并混和均匀得到脱胶菌液 F ，所述菌液 E 占脱胶菌液 F 的体积分数为 2% ～ 6% 。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/089506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

D01C 1/04 (2006.01) i; C12R 1/07 (2006.01) n; C12N 1/20 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

D01C, C12S, C12R, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, WPI, EPODOC: fibre, fermentation, BACILLUS, activate, dilution, preservation, centrifuge tube, test tube, glycerol, ventilation, soybean meal, bran, NACL, K2HPO4, (NH4)2SO4, bacilli, BAC+, ramee, ramie, degum+, culdture, culture, foster

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101838856 A (HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 22 September 2010 (22.09.2010), embodiment 1-2	1-5
A	CN 101654660 A (DONGHUA UNIVERSITY), 24 February 2010 (24.02.2010), the whole document	1-5
A	CN 101285211 A (FLAX COMPREHENSIVE USING INSTITUTE, HEILONGJIANG ACADEMY OF SCIENCES), 15 October 2008 (15.10.2008), the whole document	1-5
A	CN 1177003 A (WUHAN UNIVERSITY), 25 March 1998 (25.03.1998), the whole document	1-5
A	CN 1371990 A (SHANDONG UNIVERSITY), 02 October 2002 (02.10.2002), the whole document	1-5
A	PANG, Zongwen et al.; "Study on Ramie Bio-degumming Technology", GUANGXI TEXTILE SCIENCE & TECHNOLOGY, vol. 35, no. 01	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 July 2015 (15.07.2015)	**28 July 2015 (28.07.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **SUN, Bei** Telephone No.: (86-10) **4557**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/089506

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 101186905 B1 (PARK, S.K.), 02 October 2012 (02.10.2012), the whole document	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/089506

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101838856 A	22 September 2010	CN 101838856 B	30 November 2011
CN 101654660 A	24 February 2010	CN 101654660 B	09 May 2012
CN 101285211 A	15 October 2008	None	
CN 1177003 A	25 March 1998	None	
CN 1371990 A	02 October 2002	CN 1157475 C	14 July 2004
KR 101186905 B1	02 October 2012	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2014/089506

A. 主题的分类

D01C 1/04(2006.01)i；C12R 1/07(2006.01)n；C12N 1/20(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

D01C,C12S,C12R,C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNKI,CNABS,CNTXT,WPI,EPODOC:麻，菌，苎麻，脱胶，芽孢杆菌，发酵，BACILLUS，活化，培养，稀释，保存，离心管，试管，甘油，通气，黄豆粕粉，麸皮，NACL，K2HPO4，(NH4)2SO4，bacilli，BAC+，ramee，ramie，degum+，culdture，culture，foster

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101838856 A (华中科技大学) 2010年 9月 22日 (2010-09-22) 实施例1-2	1-5
A	CN 101654660 A (东华大学) 2010年 2月 24日 (2010-02-24) 全文	1-5
A	CN 101285211 A (黑龙江省科学院亚麻综合利用研究所) 2008年 10月 15日 (2008-10-15) 全文	1-5
A	CN 1177003 A (武汉大学) 1998年 3月 25日 (1998-03-25) 全文	1-5
A	CN 1371990 A (山东大学) 2002年 10月 2日 (2002-10-02) 全文	1-5
A	庞宗文等. "苎麻微生物脱胶技术工艺的研究" 广西纺织科技, 第第35卷卷，第第01期期，	1-5

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。　　☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 7月 15日	2015年 7月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国	孙蓓
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)4557

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2014/089506

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	KR 101186905 B1 (PARK SUN KYU) 2012年 10月 2日 (2012 - 10 - 02) 全文	1-5

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/089506

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101838856	A	2010年 9月 22日	CN	101838856	B	2011年 11月 30日
CN	101654660	A	2010年 2月 24日	CN	101654660	B	2012年 5月 9日
CN	101285211	A	2008年 10月 15日		无		
CN	1177003	A	1998年 3月 25日		无		
CN	1371990	A	2002年 10月 2日	CN	1157475	C	2004年 7月 14日
KR	101186905	B1	2012年 10月 2日		无		