

混菌固态发酵产纤维素酶条件的优化

李 蕾¹, 张 力², 乔 梁¹, 史兆国^{1*}

(1. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 以羧甲基纤维素酶活力、滤纸酶活力为考察指标, 探讨绿色木霉(*Trichoderma viride*) 化 L4C 和黑曲霉(*Aspergillus niger*) 混合固态发酵产纤维素酶的最佳培养时间; 并以降解率为考察指标, 通过单因素和正交试验对混菌固态发酵产纤维素酶条件进行优化, 以促进秸秆资源的饲料化利用、缓解粮食危机, 降低环境污染。结果表明, 绿色木霉化 L4C 和黑曲霉混合固态发酵最佳时间为 3 d, 最佳总接种量为 10%, 绿色木霉化 L4C 与黑曲霉的最佳接种比例为 1:1, 培养基最佳氮源为硫酸铵, 麸皮与稻草秸秆粉最佳质量比为 3:7, 最适宜培养基含水量为 50%。在该条件下稻草秸秆半纤维素降解率可达 34.83%, 纤维素降解率可达 39.75%, 木质素降解率可达 27.41%。

关键词: 混菌固态发酵; 纤维素酶; 绿色木霉; 黑曲霉

中图分类号: TQ925 Q939.97 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)10-0150-06

Optimization of Cellulase Produced by Mixed Solid Culture

LI Lei¹, ZHANG Li², QIAO Liang¹, SHI Zhao-guo^{1*}

(1. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: The optimum fermentation time of solid fermentation of mixed *Trichoderma viride* L4C and *Aspergillus niger* with filter paper activity and carboxymethyl cellulase activity as indexes was studied, and the solid fermentation conditions were optimized by single factor test and orthogonal experiments with degradation rate as index, so as to promote the utilization of straw for fodder, relieving food crisis, reducing the environmental pollution. The optimum solid fermentation conditions were fermentation time of 3 d, total inoculum volume of 10%, inoculation ratio of *Trichoderma viride* L4C to *Aspergillus niger* of 1:1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source, mass ratio of bran to straw stalk powder of 3:7, moisture contents of 50%. Under the above conditions, the degradation rate of hemicellulose, cellulose, lignin for straw stalk were 34.83%, 39.75% and 27.41%.

Key words: solid fermentation of mixed bacteria; cellulase; *Trichoderma viride*; *Aspergillus niger*

农作物秸秆是世界上年产量最多的农业副产品, 每年约产生 29 亿 t^[1]。2009 年, 我国主要农作物秸秆总量约 6.46 亿 t, 其中以玉米、稻草、小麦秸秆为主, 分别约为 2.25 亿、1.89 亿、1.19 亿 t^[2-3]。我国虽然秸秆数量多, 但是利用率较低, 大部分以堆

积、焚烧或废弃等形式直接倾入环境, 这不仅造成了资源的浪费, 而且还污染环境。秸秆的主要成分是纤维素, 利用纤维素降解菌生产发酵饲料是当前饲料业的一个发展方向, 其将纤维素分解为牲畜可利用的简单糖类, 同时可增加饲料中的蛋白质含量。

收稿日期: 2014-04-04

基金项目: 秸秆发酵饲料的研制(YB1202)

作者简介: 李 蕾(1988-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物营养与饲料科学。

E-mail: lilei_1314@126.com

* 通讯作者: 史兆国(1966-), 男, 甘肃定西人, 教授, 硕士, 主要从事家禽营养与生产研究。E-mail: shizhaoguo@gsau.edu.cn

细菌、真菌、放线菌等都能产生纤维素酶,其中真菌中的木霉因产酶量大、活力高而被广泛研究和应用^[4]。而木霉中的绿色木霉(*Trichoderma viride*)被认为是最好的纤维素酶产生菌之一,其纤维素酶产率高,酶系比例适当,能有效酶解纤维素类物质^[5]。另外,青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和镰刀菌属(*Fusarium*)的一些类群降解纤维素的能力也较强。

与传统的利用单一菌种发酵纤维素材料相比,混菌发酵降解率高、发酵时间短,在我国被广泛研究和应用,主要集中于高纤维素酶活力菌株的选育、发酵工艺的优化等方面^[6-8]。与液态发酵相比,固态发酵成本低、能耗较小,是国内外研究较多的一种发酵工艺^[9-10]。混菌固态发酵是指多菌株参与的固体发酵过程,采用良好的发酵基质,通过多菌株的协同发酵,使得多菌株发酵过程代谢途径的多样性转化为发酵产物的多样性,不仅产生多种降解酶,同时还能产生多种活性分子^[11]。混菌固态发酵已经得到广泛应用,鞠兴荣等^[12]进行了混菌固态发酵菜籽粕制备菜籽肽的菌种筛选,陈洪伟等^[13]采用固态发酵方法发酵麸皮制备蛋白饲料,潘天玲等^[14]研究了混菌固态发酵豆渣生产菌体蛋白质的工艺。但未见关于混菌固态发酵稻草秸秆产纤维素酶条件的优化研究。为此,本研究以纤维素降解率、半纤维素降解率、木质素降解率为考察指标,以稻草秸秆粉为主要发酵原料,对绿色木霉化 L4C 和黑曲霉二元复合菌系的固态发酵条件进行优化,这对促进秸秆资源的饲料化利用、缓解粮食危机,降低环境污染均具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌种:绿色木霉化 L4C、黑曲霉(*Aspergillus niger*)2 个菌株,由江苏农牧科技职业学院微生物实验室提供。

原料:稻草秸秆采集于江苏省泰州市海陵区稻田,经测定,其纤维素、半纤维素以及木质素含量分别为 28.89%、37.93%、6.92%。

培养基:PDA 培养基(1 L):去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g,加水溶解并定容至 1 L,121 °C 灭菌 30 min,用于菌种保存及活化。种子培养基(1 L):葡萄糖 15 g、蛋白胨 10 g、酵母膏 10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g、 KH_2PO_4 6 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g、 CaCO_3 0.4 g,加水溶解并定

容至 1 L,调节 pH 值至 4.8,以 50 mL/瓶分装于 250 mL 三角瓶中,121 °C 灭菌 30 min。发酵培养基(干料 2 kg):氮源(硫酸铵、硝酸钠、酵母粉、蛋白胨、尿素)40 g、 KH_2PO_4 10 g、 CaCO_3 10 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g,溶于 4 L 水,然后将这 4 L 盐溶液倒入 2 kg 稻草秸秆粉和麸皮混合物中,充分拌匀,以 25 g/瓶分装于 250 mL 三角瓶中,121 °C 灭菌 60 min。

试剂:0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 值 4.8)、3,5-二硝基水杨酸显色剂(DNS 显色剂)、1% 羧甲基纤维素钠溶液、中性洗涤剂、酸性洗涤剂、72% 硫酸溶液。

仪器设备:立式高压蒸汽灭菌器、SHP-160 生化培养箱、HH-6 数显恒温水浴锅、光学显微镜、小型台式离心机(Eppendorf)、722 型分光光度计、SKY-1102C 恒温振荡器、DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱、高速万能粉碎机、酸度计。

1.2 混菌固态发酵产纤维素酶条件的单因素试验

将冰箱保存的绿色木霉化 L4C 菌种和黑曲霉菌种分别接种到 PDA 斜面培养基上,在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下培养 4~6 d 至产生较多孢子后使用或于 4 °C 冰箱保存备用。用无菌水洗下经活化的孢子,分别将菌种接入种子培养基中,置于 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养 48 h。将培养好的两种子液按一定总接种量、一定接种比例,接种到麸皮和稻草秸秆粉一定质量比、一定含水量的固体发酵培养基上,28 °C 恒温静置培养。发酵一定时间后,于 80 °C 烘干发酵基质,测定其纤维素、半纤维素、木质素含量。

1.2.1 发酵时间 将两菌种子液按 10% 总接种量、1:1 接种比例接种到以硫酸铵为氮源、麸皮和稻草秸秆粉质量比为 3:7、含水量为 50% 的固体发酵培养基上,28 °C 恒温发酵 2、3、4、5 d,分别取样提取粗酶液,测定羧甲基纤维素酶、滤纸酶活力。

1.2.2 混合菌株总接种量 将两菌种子液分别按 5%、10%、15%、20% 总接种量,1:1 接种比例,接种到以硫酸铵为氮源、麸皮和稻草秸秆粉质量比为 3:7、含水量为 50% 的固体发酵培养基上,28 °C 恒温发酵 3 d,终止发酵后测定半纤维素、纤维素、木质素含量。

1.2.3 混菌接种比例 绿色木霉化 L4C 与黑曲霉种子液分别按 0:5、1:4、2:3、1:1、3:2、4:1、5:0 接种比例,10% 总接种量,接种到以硫酸铵为氮源、麸皮和稻草秸秆粉质量比为 3:7、含水量为 50% 的固体发酵培养基上,28 °C 恒温发酵 3 d,终止

发酵后测定半纤维素、纤维素、木质素含量。

1.2.4 氮源种类 将两菌种种子液按 10% 总接种量、1:1 接种比例,接种到分别以硫酸铵、硝酸钠、酵母粉、蛋白胨、尿素为氮源,麸皮和稻草秸秆粉质量比为 3:7、含水量为 50% 的固体发酵培养基上,28℃ 恒温发酵 3 d,终止发酵后测定半纤维素、纤维素、木质素含量。

1.2.5 麸皮与稻草秸秆粉质量比 将两菌种种子液按 10% 总接种量、1:1 接种比例,接种到以硫酸铵为氮源,麸皮与稻草秸秆粉质量比分别为 10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9、0:10,含水量为 50% 的固体发酵培养基上,28℃ 恒温发酵 3 d,终止发酵后测定半纤维素、纤维素、木质素含量。

1.2.6 培养基含水量 将两菌种种子液按 10% 总接种量、1:1 接种比例,接种到以硫酸铵为氮源,麸皮和稻草秸秆粉质量比为 3:7,含水量分别为 40%、50%、60%、70%、80% 的固体发酵培养基上,28℃ 恒温发酵 3 d,终止发酵后测定半纤维素、纤维素、木质素含量。

1.3 混菌固态发酵产纤维素酶发酵条件的正交试验

在单因素试验结果的基础上,选用混菌总接种量、混菌接种比例、麸皮与稻草秸秆粉质量比、培养基含水量进行四因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验(试验设计见表 1),以确定上述 4 个因素的最佳条件。

表 1 混菌固态发酵产纤维素酶发酵条件的正交试验设计

水平	因素			
	总接种量 (A)/%	接种比例 (B)	麸皮:稻草 秸秆粉(C)	含水量 (D)/%
1	5	1:1	2:8	45
2	10	2:3	3:7	50
3	15	3:2	4:6	55

1.4 测定项目及方法

1.4.1 酶活力 羧甲基纤维素酶、滤纸酶活力的测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[15],标准曲线的绘制见参考文献^[16]。

1.4.2 纤维素、半纤维素、木质素含量 纤维素、半纤维素、木质素含量的测定采用范式(Van Soest)法,测定方法见《饲料分析及饲料质量检测技术》^[17]。

1.5 数据统计与分析

试验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,并采用 LSD 和 Duncan's 法进行多重比较。所有数据均以平均数±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 混菌固态发酵产纤维素酶条件的单因素试验结果

2.1.1 混菌固态发酵时间对酶活力的影响 由图 1 和图 2 可见,随发酵时间延长,混菌、单菌的羧甲基纤维素酶、滤纸酶活力均先增加后降低,且混菌酶活力均高于单菌。混菌发酵 3 d 时羧甲基纤维素酶、滤纸酶活力均最大,分别为 1 980.37 U/mL、752.8 U/mL,均高于单菌发酵;当发酵时间大于 3 d 时,羧甲基纤维素酶、滤纸酶活力逐渐下降。因此,在发酵 3 d 时终止发酵,测定发酵原料的降解率。

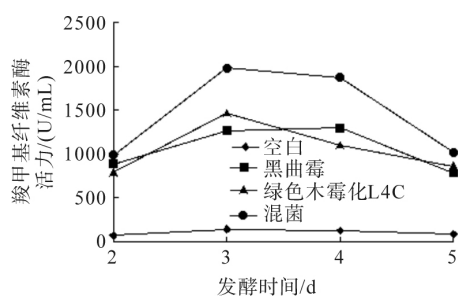


图 1 发酵时间对羧甲基纤维素酶活力的影响

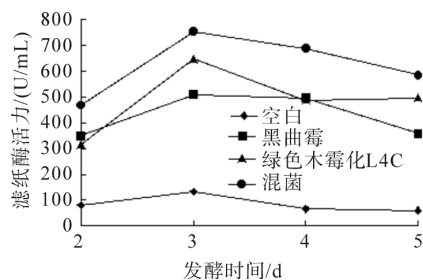


图 2 发酵时间对滤纸酶活力的影响

2.1.2 混菌总接种量对稻草秸秆降解效果的影响

由表 2 可见,随着混菌总接种量增加,稻草秸秆纤维素、半纤维素及木质素降解率均先增加后降低。当总接种量低于 10% 时,稻草秸秆纤维素、半纤维素及木质素降解率均随总接种量增加而增加。当总接种量为 10% 时,稻草秸秆纤维素、半纤维素降解率最高,分别为 37.11%、33.97%;此时木质素降解率也较高,为 25.83%。当总接种量增加至 15% 时,稻草秸秆纤维素、半纤维素降解率下降,其中纤维素降解率达到显著水平;木质素降解率最高,为 26.95%,与 10% 总接种量差异不显著。当总接种量大于 15% 时,稻草秸秆纤维素、半纤维素及木质素降解率均随总接种量增加而降低。这是由于接种量过低会使微生物生长缓慢、发酵周期延长;而接种量过高又会导致微生物生长过于迅速而不利于产

酶,降解率不高^[18]。因此,选择 10%作为混合菌株的总接种量。

表 2 混菌总接种量对稻草秸秆降解效果的影响 %

总接种量	半纤维素降解率	纤维素降解率	木质素降解率
0	16.61±0.28 ^d	21.96±0.78 ^d	10.12±0.63 ^d
5	28.57±0.67 ^b	31.69±0.56 ^c	19.34±0.78 ^b
10	33.97±0.75 ^a	37.11±0.35 ^a	25.83±1.50 ^a
15	32.74±0.26 ^a	34.78±1.04 ^b	26.95±0.16 ^a
20	23.70±0.87 ^c	31.81±0.07 ^c	17.96±0.87 ^b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

2.1.3 混菌接种比例对稻草秸秆降解效果的影响

由表 3 可见,随着绿色木霉化 L4C 与黑曲霉接种比例增加,稻草秸秆纤维素、半纤维素及木质素降解率均先增加后降低,均以接种比例 1:1 最大,分别为 35.51%、33.31%、24.22%;当绿色木霉化 L4C 和黑曲霉接种比例大于 1:1 时,秸秆降解效果逐渐变差。这是由于混菌发酵时如果某一种菌接种量过大就会抑制另一种菌的生长,进而影响酶的产生和秸秆的降解效果。因此,选择 1:1 作为绿色木霉化 L4C 与黑曲霉的最佳接种比例。

表 3 绿色木霉化 L4C 与黑曲霉接种比例对稻草秸秆降解效果的影响 %

绿色木霉化 L4C:黑曲霉	半纤维素 降解率	纤维素 降解率	木质素 降解率
0:5	18.56±0.89 ^d	22.92±0.45 ^d	12.94±0.37 ^c
1:4	23.77±0.94 ^c	25.57±0.79 ^c	14.70±0.56 ^b
2:3	28.55±0.46 ^b	30.62±0.41 ^b	22.43±1.90 ^a
1:1	33.31±0.74 ^a	35.51±0.36 ^a	24.22±0.64 ^a
3:2	23.13±0.33 ^c	27.30±0.37 ^c	22.77±0.13 ^a
4:1	23.13±0.48 ^c	27.17±0.63 ^c	14.89±0.14 ^b
5:0	19.98±0.43 ^d	23.00±0.28 ^d	13.88±0.84 ^c

2.1.4 氮源种类对稻草秸秆降解效果的影响 由表 4 可见,以硫酸铵作为氮源时,绿色木霉化 L4C 和黑曲霉对稻草秸秆纤维素、半纤维素降解率最高,木质素降解率较高,分别为 31.82%、28.94%、25.02%。以硝酸钠为氮源时,木质素降解率最高,为 25.4%,但与以硫酸铵为氮源的差异不显著;纤维素降解率和半纤维素降解率较高,分别为 29.18%、26.68%,其中半纤维素降解率显著低于以硫酸铵为氮源的降解率。以酵母和蛋白胨为氮源时,稻草秸秆降解效果不是很好。以尿素为氮源时,稻草秸秆降解效果最差。因此,选择硫酸铵作为氮源。

表 4 氮源种类对稻草秸秆降解效果的影响 %

氮源种类	半纤维素降解率	纤维素降解率	木质素降解率
硫酸铵	28.94±0.24 ^a	31.82±0.59 ^a	25.02±1.01 ^a
硝酸钠	26.68±0.32 ^b	29.18±0.39 ^a	25.40±0.70 ^a
酵母	25.13±0.33 ^b	26.90±1.23 ^b	19.51±0.67 ^b
蛋白胨	25.18±0.70 ^b	26.69±0.18 ^b	19.75±0.96 ^b
尿素	19.62±0.23 ^c	22.78±0.43 ^c	16.02±1.10 ^c

2.1.5 麸皮与稻草秸秆粉质量比对稻草秸秆降解效果的影响

由表 5 可见,随着麸皮与稻草秸秆粉质量比的减小,稻草秸秆纤维素、半纤维素及木质素的降解率均先增加后降低,3:7 时最大,分别为 36.51%、29.05%、24.84%;麸皮添加比例过高和过低时秸秆降解效果均较差,这是因为麸皮中含有促进微生物生长的营养因子,少量的麸皮能够提高酶活力,而过多的添加麸皮又会使酶活力降低,因为麸皮用量过大会增加培养基的黏性和含糖量,影响通气性,抑制产酶率,故稻草秸秆的降解率会降低。因此,麸皮与稻草秸秆粉质量比以 3:7 为佳。

表 5 麸皮与稻草秸秆粉质量比对稻草秸秆降解效果的影响 %

麸皮:稻草 秸秆粉	半纤维素 降解率	纤维素 降解率	木质素 降解率
10:0	19.97±0.13 ^e	24.97±0.56 ^{de}	10.22±0.33 ^e
9:1	22.06±0.70 ^d	24.67±0.77 ^e	10.62±0.23 ^e
8:2	22.11±0.77 ^d	25.94±0.71 ^{cde}	13.83±0.41 ^d
7:3	23.71±0.08 ^c	26.56±0.14 ^c	17.77±0.31 ^c
6:4	23.18±0.86 ^{cd}	27.12±0.63 ^c	18.43±0.78 ^c
5:5	24.10±0.30 ^c	32.32±0.93 ^b	18.32±0.05 ^c
4:6	27.89±0.17 ^b	36.06±0.56 ^a	24.22±0.65 ^a
3:7	29.05±0.53 ^a	36.51±0.37 ^a	24.84±0.23 ^a
2:8	26.91±0.57 ^b	33.00±0.65 ^b	19.78±0.14 ^b
1:9	24.00±0.72 ^c	28.38±0.68 ^c	18.61±0.89 ^c
0:10	21.18±0.39 ^c	28.23±0.47 ^{cd}	13.46±0.05 ^d

2.1.6 培养基含水量对稻草秸秆降解效果的影响

由表 6 可见,随着培养基含水量增加,稻草秸秆纤维素、半纤维素及木质素降解率先增加后降低,50%时最大,分别为 33.11%、28.24%、21.2%;当含水量大于 50%时,纤维素、半纤维素、木质素的降解率均呈下降趋势。这是因为培养基含水量过少,满足不了微生物生长对水分的需要,同时随着培养时间延长培养基水分会慢慢蒸发,也会影响微生物的生长及产酶;而含水量太高培养基松散性和透气性变差,影响微生物与空气的交流。因此,培养基含水量选择 50%。

表 6 培养基含水量对稻草秸秆降解效果的影响 %

含水量	半纤维素降解率	纤维素降解率	木质素降解率
40	23.44±0.49 ^b	28.13±0.45 ^b	21.11±0.17 ^a
50	28.24±0.92 ^a	33.11±0.34 ^a	21.20±0.15 ^a
60	23.18±0.39 ^b	25.36±0.48 ^c	17.87±0.04 ^b
70	17.72±0.21 ^c	25.20±0.62 ^c	14.46±0.12 ^c
80	16.40±0.43 ^c	19.12±0.27 ^d	14.32±0.15 ^d

2.2 混菌固态发酵产纤维素酶条件的正交试验结果

由表 7 可知,对于半纤维素降解率来说,该混菌固态发酵的最优条件为 $A_2B_2C_2D_1$;对于纤维素降解率来说,该混菌固态发酵的最优条件为 $A_2B_1C_2D_1$;对于木质素降解率来说,该混菌固态发酵的最优条件为 $A_2B_2C_2D_2$ 。可见,对于 3 种指标来说,混菌接种比例和培养基含水量的最优条件不一致,需进一步考虑这

2 种因素对该 3 个指标的影响大小,以确定最优的混菌接种比例和培养基含水量。4 种因素对半纤维素降解率的影响大小顺序是总接种量>接种比例>麸皮与稻草秸秆粉质量比>培养基含水量,对纤维素降解率的影响大小顺序是总接种量>接种比例>培养基含水量>麸皮与稻草秸秆粉质量比,对木质素降解率的影响大小顺序是培养基含水量>麸皮与稻草秸秆粉质量比>总接种量>接种比例。可见,培养基含水量对木质素降解率影响最大,故培养基含水量应取 50%。混菌接种比例对半纤维素和纤维素降解率的影响程度均大于木质素,且对纤维素降解率的影响较大,故混菌接种比例应取 1:1。综上,混菌固态发酵的最优条件为混菌总接种量 10%、接种比例 1:1、麸皮与稻草秸秆粉质量比 3:7、培养基含水量 50%。

表 7 混菌固态发酵产纤维素酶条件的正交试验结果

试验编号	因素				半纤维素降解率/%	纤维素降解率/%	木质素降解率/%
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	24.52	28.57	14.78
2	1	2	2	2	29.96	26.01	27.89
3	1	3	3	3	19.82	21.94	14.58
4	2	1	2	3	33.62	37.69	25.19
5	2	2	3	1	34.56	35.98	19.75
6	2	3	1	2	25.75	23.62	25.12
7	3	1	3	2	20.49	22.53	22.89
8	3	2	1	3	18.23	19.45	18.56
9	3	3	2	1	19.57	21.29	17.68
k_1 (半降)	24.77	26.21	22.83	26.22			
k_2 (半降)	31.31	27.58	27.71	25.40			
k_3 (半降)	19.43	21.71	24.20	23.89			
k_1 (纤降)	25.51	29.60	23.88	28.61			
k_2 (纤降)	32.43	27.15	28.33	24.05			
k_3 (纤降)	21.09	22.28	26.81	26.36			
k_1 (木降)	19.08	20.95	19.48	17.40			
k_2 (木降)	23.35	22.06	23.59	25.30			
k_3 (木降)	19.71	19.17	19.07	19.44			
R (半降)	11.88	5.87	4.88	2.33	$A>B>C>D$		
R (纤降)	11.34	7.32	4.45	4.56	$A>B>D>C$		
R (木降)	4.27	2.89	4.52	7.9	$D>C>A>B$		

2.3 混菌固态发酵产纤维素酶最佳条件的验证

在正交试验最佳发酵条件即混菌总接种量 10%、接种比例 1:1、麸皮与稻草秸秆粉质量比 3:7、培养基含水量 50%下,进行 3 次平行验证试验,以考察最佳发酵条件的合理性和可靠性。试验结果表明在最佳发酵条件下,稻草秸秆纤维素、半纤维素、木质素降解率分别为 39.75%、34.83%、

27.41%,高于表 7 试验结果,说明优化后的发酵条件重复性好,数据可靠。

3 结论与讨论

纤维素的有效降解要依靠纤维素酶的多重体系,混合菌株可以相互补充,充分发挥各酶之间的协同作用,进而使纤维素酶的活性达到较高水平。

本试验研究的是木霉与曲霉的混合发酵,由这 2 种菌混合发酵可以提高纤维素酶的活力和稻草秸秆的降解率,这与张海等^[19]对木霉和曲霉混合培养试验结果一致。这是因为木霉产的 β -葡萄糖苷酶活性普遍偏低,而许多曲霉属菌株如黑曲霉、海枣曲霉(*Alphoenicis*)等都能产生高活力的 β -葡萄糖苷酶。

微生物的混菌发酵受多种因素的影响如混合培养时间、稻草麸皮比例、混菌总接种量、接种比例、培养基含水量、氮源等。其中,氮源是主要的营养源,不仅为微生物的生长提供氮元素,通常也是能量的提供者,因此是影响微生物生长的主要因素。在混菌发酵培养条件优化过程中众多学者是以纤维素酶活力为指标进行研究的^[20-21],本试验以纤维素酶活力和稻草秸秆降解率双重指标对绿色木霉化 L4C、黑曲霉发酵产纤维素酶降解秸秆的部分条件进行了优化。结果表明,混菌发酵最佳时间是 3 d,最佳氮源为硫酸铵,最佳总接种量为 10%,最佳接种比例为 1:1,最佳麸皮与稻草秸秆粉质量比为 3:7,最佳培养基含水量为 50%。在上述最佳条件下,稻草秸秆纤维素降解率可达 39.75%,半纤维素降解率可达 34.83%,木质素降解率可达 27.41%。发酵基质或培养条件的改变将使混菌中各菌的生长状况不同,也使各菌代谢条件发生变化,这些都可以导致复合酶的酶系组成发生不同程度的变化,因此,在实际生产中可以根据不同加工业的需求,控制发酵条件和发酵培养基的组成,以提高秸秆饲料的降解效果。

参考文献:

- [1] 孟建宇,冯福应,刘向红,等. 1 株纤维素降解菌的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学杂志,2011,31(4):47-51.
- [2] 国家统计局. 中国统计年鉴 2010[M]. 北京:中国统计出版社,2010.
- [3] 全国农业技术推广服务中心. 中国有机肥料养分志[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [4] 任恒星,冷云伟,李浩,等. 纤维素酶生产研究进展[J]. 安徽农学通报,2010,16(15):63-65.
- [5] 耿冰,郭美锦,张嗣良. pH 值对绿色木霉(*Trichoderma viride*)产纤维素酶的影响[J]. 工业微生物,2008,38(5):1-6.
- [6] 涂璇,薛泉宏,司美茹,等. 多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响[J]. 工业微生物,2004,34(1):30-34.
- [7] 赵林果,金耀光,李强,等. 白腐菌及黑曲霉所产的纤维素复合酶对稻草秸秆的生物降解[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(3):71-75.
- [8] 陈娜,顾金刚,徐凤花,等. 产纤维素酶真菌混合发酵研究进展[J]. 中国土壤与肥料,2007(4):16-21.
- [9] Panagiotou G, Kekos D, Macris B J, et al. Production of cellulytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation[J]. Ind Crops Products, 2003, 18: 37-45.
- [10] Yang Y H, Wang B C, Wang Q H, et al. Research on solid state fermentation on rice chaff with a microbial consortium[J]. Colloid Surf, 2004, 34: 1-6.
- [11] 刘秀花,王莉. 混菌固体发酵培养基优化研究[J]. 商丘师范学院学报,2009,25(6):99-102.
- [12] 鞠兴荣,王雪峰,王立峰,等. 混菌固态发酵菜籽粕制备菜籽肽的菌种筛选[J]. 食品与发酵工业,2011,37(9):104-108.
- [13] 陈洪伟,叶淑红,王际辉,等. 混菌固态发酵麸皮制备蛋白饲料的研究[J]. 中国酿造,2011,30(6):74-77.
- [14] 潘天玲,张东峰,赵昌盛,等. 混菌固态发酵豆渣生产菌体蛋白的研究[J]. 化学与生物工程,2004(4):35-41.
- [15] 赵玉萍,杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发,2006(3):116-118.
- [16] 王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.
- [17] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2007:67-78.
- [18] 马洁. 筛选高效纤维素降解菌及利用秸秆发酵酒精初步研究[D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [19] 张海,颜日祥. 用混合培养法提高木霉 A10 的纤维素酶活性[J]. 西北大学学报,1990,20(2):73-79.
- [20] 司美茹,薛泉宏,蔡艳. 混合发酵对纤维素酶和淀粉酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2002,30(5):69-73.
- [21] 胡奎娟,吴克,潘仁瑞,等. 固态混合发酵提高木聚糖酶和纤维素酶活力的研究[J]. 菌物学报,2007,26(2):273-278.