



# 绿色木霉固态发酵产纤维素酶活力的研究

王仪明<sup>1</sup>, 张宗舟<sup>1,2</sup>, 蔺海明<sup>1</sup>, 孙小弟<sup>3</sup>, 雷艳芳<sup>1</sup>, 王东明<sup>4</sup>

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001;

3. 天水师范学院工学院, 甘肃 天水 741000; 4. 甘肃省科学院自动化研究所, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:**以麦秆和麸皮为主要原料, 通过正交试验和单因素试验优化绿色木霉 *Trichoderma viride* 固态发酵产纤维素酶的最佳工艺条件, 并研究绿色木霉对小麦秸秆纤维素降解的影响, 为绿色木霉降解小麦秸秆纤维素提供最佳条件, 进而提高小麦秸秆的利用率。结果表明, 不同条件下绿色木霉产纤维素酶活力存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 最佳培养基为: 氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 值 5.5, 含水量为 200%, 麦秆: 麸皮质量比为 4:1; 最佳发酵条件为: 培养时间为 96 h、温度 35 °C、初始 pH 值 6.0、含氮量 0.4%、接种量 15%, 培养方式为半密闭; 发酵后小麦秸秆中中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)、纤维素含量和半纤维素含量比发酵前分别下降 5.22%、6.88%、4.73% 和 4.16%, 木质素含量无明显变化。

**关键词:**绿色木霉; 发酵条件; 纤维素酶活; 小麦秸秆; 纤维素

**中图分类号:** TQ925.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-0629(2009)05-0123-05

\* 1 纤维素类物质是世界上最丰富的可再生资源<sup>[1]</sup>。纤维素材料可转化为具有商业价值的乙醇、乙酸、单细胞蛋白等纤维素的产品<sup>[2-3]</sup>。纤维素的生物转化近些年受到了极大的重视, 大规模纤维素生物转化工艺的发展, 将有效解决食品和动物饲料不足的问题<sup>[4-6]</sup>。利用微生物所产生的纤维素酶将秸秆转化为营养价值较高的单细胞蛋白饲料倍受人们的青睐<sup>[7]</sup>。纤维素酶作为一种高活性生物催化剂使其成为研究新型蛋白饲料开发与利用的重要内容<sup>[7-8]</sup>。纤维素酶不是一个单种酶, 而是参与纤维素降解的多组分酶的总称, 一个完整的纤维素酶系, 通常由作用方式不同而能相互协同催化水解纤维素的 3 类酶组成: 内切葡聚糖酶(EG)、外切葡聚糖酶(EX)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶(BG), 在分解纤维素时, 任何一种酶都不能单独裂解纤维素, 只有 3 种酶共同存在并协同作用才能完成水解过程<sup>[9]</sup>。

目前, 用于研究生产纤维素酶的真菌大多数属于曲霉属 *Aspergillus*、木霉属 *Trichoderma*、青霉属 *Penicillium*、根霉属 *Rhizopus* 等。曲霉和根霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较高, 而在天然纤维素降解中起重要作用的  $\beta$ -葡聚糖纤维二糖水解酶

活力较低<sup>[10]</sup>。木霉菌株是公认产纤维素酶最高的菌种之一<sup>[11]</sup>。因此, 研究绿色木霉 *T. viride* 的培养条件及其对纤维素酶活的影响为纤维素酶的工业化生产奠定一些试验基础, 为更好地利用秸秆开辟新的途径。

研究以麦秆和麸皮为主要原料, 通过正交试验和单因素试验对绿色木霉固态发酵产纤维素酶的最佳培养基组分、时间、最适温度、pH 值、接种量和含氮量等工艺条件进行优化, 并比较发酵前后小麦秸秆的化学成分, 研究绿色木霉对小麦秸秆纤维素降解的影响, 为绿色木霉降解秸秆生产蛋白饲料提供最佳条件。这对提高秸秆的利用率和缓解我国高蛋白饲料严重紧缺的局面起到重要的促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

小麦秸秆粉(当地农户提供, 粉碎过 40 目筛), 麸皮(市售)。

。 收稿日期: 2008-09-01

基金项目: 国家科技支撑计划“西北内陆灌区农田循环生产”技术集成研究与示范”(2007BAD89B17)

作者简介: 王仪明(1981-), 男, 甘肃天水人, 硕士, 研究方向为纤维素降解及蛋白饲料生产。

通信作者: 张宗舟

绿色木霉由天水师范学院微生物实验室提供,保存于PDA斜面培养基。

**1.1.1 主要试剂** DNS试剂(3,5-二硝基水杨酸显色液);0.05 mol/L pH值4.5和pH值5.0的柠檬酸缓冲液;质量分数0.5%水杨酸苷溶液;质量分数0.51%羧甲基纤维素钠(CMC)溶液;中性洗涤剂;酸性洗涤剂。

**1.1.2 培养基**

**斜面培养基:**将孢子接种于斜面培养基,35℃培养,待形成一层灰绿色孢子后4℃保藏备用。

**种子培养基:**小麦秸秆粉10 g,营养液[质量分数2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,质量分数0.08% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,质量分数0.04% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]25 mL。

**固体产酶培养基:**麦秆6 g,麸皮4 g,营养液[2.0% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.08% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.04% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]25 mL。

上述培养基均需在1.0×10<sup>5</sup> Pa,121℃灭菌30 min,pH值自然。

**1.2 酶液的制备** 取生长良好的固体发酵曲5 g,加水50 mL,于30℃保温1 h,用沙芯漏斗过滤,然后在转速10 000 r/min冷冻离心机上离心10 min,提取上清液定容至100 mL,得到体积比为1:20粗酶液。

**1.3 试验方法** 葡萄糖酶活力采用标准曲线确定<sup>[12]</sup>;纤维素酶活力测定采用3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)<sup>[13]</sup>;中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)的测定采用范氏(Van Soest)法<sup>[14]</sup>;优化培养基采用L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>)正交设计<sup>[15]</sup>,进行4因素(pH值、氮源、含水量、麦秆:麸皮)4水平的正交试验,共16个组合(见表1);秸秆发酵前后成分的测定均采用3次重复试验。

**1.4 数据处理** 利用Excel和SAS9.0软件做方差分析。

表1 培养基正交试验因素和水平设计

| 组合 | pH值 | 氮源                                              | 含水量  | 麦秆:麸皮 |
|----|-----|-------------------------------------------------|------|-------|
| 1  | 4.5 | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 150% | 2:3   |
| 2  | 5.5 | (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 200% | 3:2   |
| 3  | 6.5 | CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>               | 250% | 4:1   |
| 4  | 7.0 | NH <sub>4</sub> Cl                              | 300% | 5:0   |

**2 结果分析**

**2.1 正交试验筛选绿色木霉的最佳培养基**

培养基组分对纤维素酶的形成有很大影响,方差分析结果表明,不同培养基对绿色木霉产纤维素酶的影响存在显著差异( $P<0.05$ )。氮源为(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,含水量为200%,pH值5.5,麦秆:麸皮为4:1,绿色木霉产β-葡萄糖苷酶、FPU酶和CMC酶活力最大,分别为1.31、0.39和5.92 U/mg;氮源为(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,含水量为150%,pH值5.5,麦秆:麸皮为5:0,绿色木霉产C1酶活力最大,为1.40 U/mg。通过新复极差分析发现(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>作为绿色木霉发酵的氮源较好(图1)。

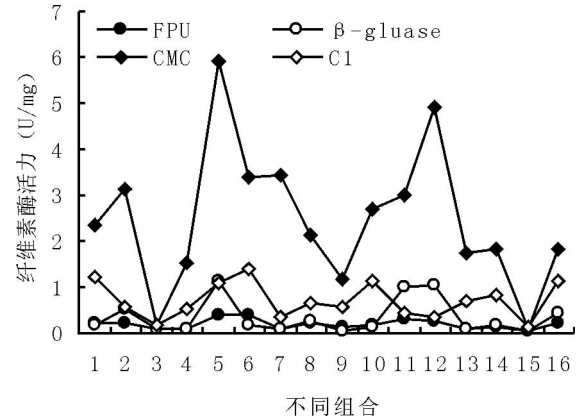


图1 不同处理组合对纤维素酶活力的影响

**2.2 单因素试验优化绿色木霉的发酵条件**

**2.2.1 培养时间对纤维素酶活力的影响** 不同培养时间影响绿色木霉产纤维素酶活力,在96 h绿色木霉产4种纤维素酶活力达到最大,随后下降。产C1酶活力最大为3.06 U/mg,产CMC酶活力最大为2.44 U/mg,产β-葡萄糖苷酶活力最大为0.39 U/mg,FPU酶活力最大为0.05 U/mg(图2)。

**2.2.2 培养温度对纤维素酶活力的影响** 经不同温度培养结果表明,在25℃条件下培养,酶活力随温度的升高而增大,一定温度时酶活力达到最大,在35℃产纤维素酶活力较高,随后酶活力下降。产C1酶活力最大为2.38 U/mg,产CMC酶活力最大为1.97 U/mg,FPU酶活力最大为0.47 U/mg,产β-葡萄糖苷酶活力最大为0.32 U/mg(图3)。

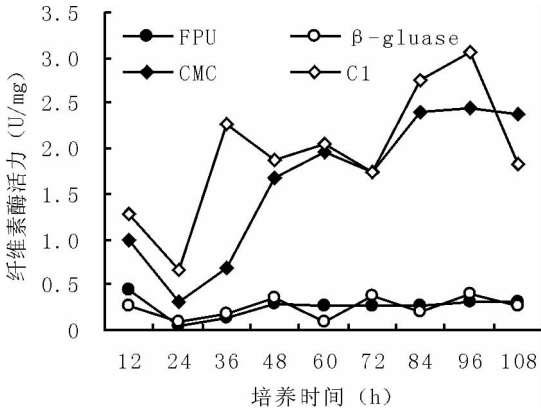


图 2 培养时间对纤维素酶活力的影响

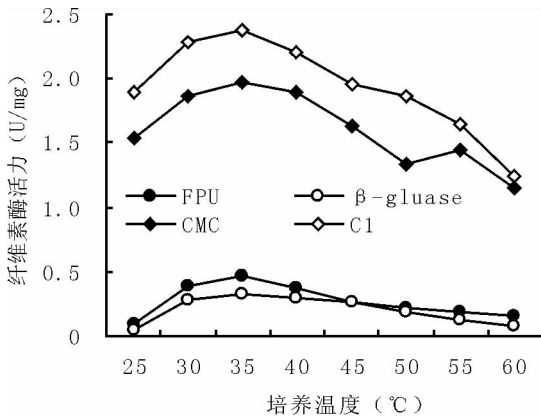


图 3 培养温度对纤维素酶活力的影响

**2.2.3 培养基初始 pH 值对纤维素酶活力的影响**  
试验从 pH 值为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 7 个水平中筛选出最适产纤维素酶的 pH 值。结果表明, pH 值 5.5 时 CMC 酶活力最大, 为 5.5 U/mg; pH 值 6.0 时 FPU 酶、β-葡萄糖苷酶和 C1 酶活力最大, 分别为 0.42、0.32 和 3.51 U/mg(图 4)。

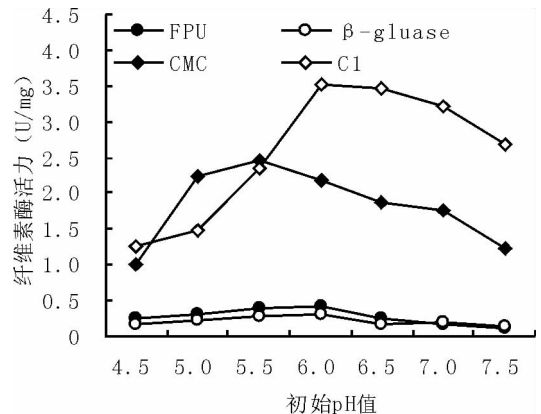


图 4 不同 pH 值对纤维素酶活力的影响

**2.2.4 接种量对纤维素酶活力的影响** 按接种量质量分数 5%、10%、15%、20%、25% 和 30% 接种于麦秆: 麸皮质量比为 4:1 的固体培养基中发酵。接种量为 15% 时酶活力最高(图 5)。

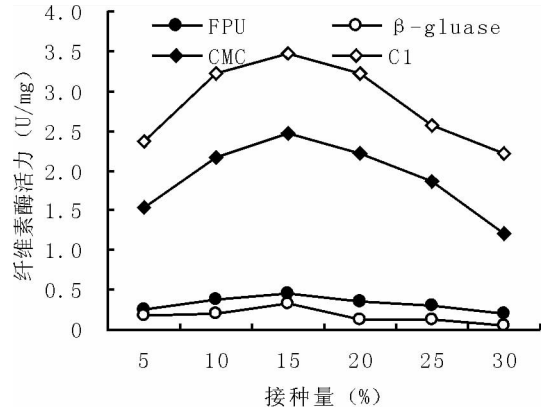


图 5 不同接种对纤维素酶活力的影响

**2.2.5 含氮量对纤维素酶活力的影响** 改变营养液中氮的含量, 在 0.2%~1.6% 内测定纤维素酶活力, 接种后 35 °C 培养 96 h, 发现纤维素酶活力随含氮量的增加逐渐增大, 当含氮量在 0.4% 酶活力较高, 随后逐渐下降(图 6)。

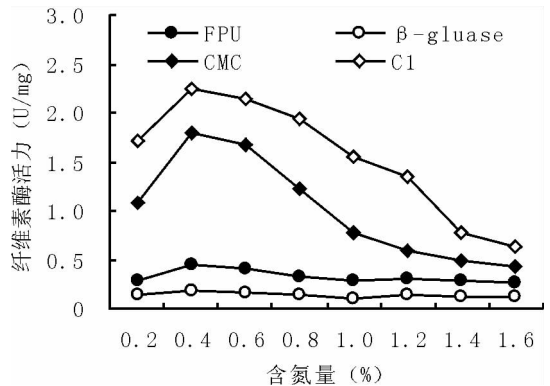


图 6 不同含氮量对纤维素酶活力的影响

**2.2.6 培养方式对纤维素酶活力的影响** 在氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 含水量为 200%, pH 值为 5.5, 麦秆: 麸皮为 4:1, 含氮量 0.4% 的固体基质上, 在接种量为 15%, 温度 35 °C, 分别选择密闭和半密闭的方式培养 96 h, 测定纤维素酶活力。结果表明, 半密闭条件下培养, 营养生长旺盛, 产纤维素酶活力较大(表 2)。

| 表 2 培养方式对纤维素酶活力的影响 |      |          |      | U/mg |
|--------------------|------|----------|------|------|
| 培养方式               | FPU  | β—gluase | CMC  | C1   |
| 密闭                 | 0.31 | 0.18     | 2.13 | 2.98 |
| 半密闭                | 0.42 | 0.25     | 3.26 | 3.46 |

注:密闭——保鲜膜封口,半密闭——麻纸封口。

2.3 绿色木霉发酵对秸秆纤维素的影响

在最佳条件下用绿色木霉发酵秸秆与未发酵的秸秆相比,发酵后秸秆的成分有不同程度的变化,NDF、ADF、纤维素和半纤维素含量分别为4.73%、4.16%、5.22%和6.88%,木质素含量无明显变化(表3)。

| 表 3 发酵对秸秆纤维素的影响 |      |      |      | % |
|-----------------|------|------|------|---|
| 秸秆成分            | 发酵前  | 发酵后  | 降解率  |   |
| 纤维素             | 53.6 | 50.8 | 5.22 |   |
| 半纤维素            | 18.9 | 17.4 | 6.88 |   |
| 木质素             | 18.5 | 18.3 | 1.08 |   |
| NDF             | 91.0 | 86.7 | 4.73 |   |
| ADF             | 72.1 | 69.1 | 4.16 |   |

3 讨论

3.1 纤维素酶是一种诱导酶,在发酵过程中,纤维素酶的大量合成必须有诱导物的作用,在培养和发酵过程中加入适当的诱导物可以增加酶的产量。麸皮富含微量生长因子或诱导物和纤维素等碳源物质,这些物质促进菌体的营养生长,比秸秆纤维素更易诱导菌种纤维素酶的产生<sup>[16]</sup>。本试验选择麦秆:麸皮为4:1。底物含水量的变化对微生物的生长及代谢能力有重要影响,含水量太小,物料容易因水分蒸发而变干,含水量太大,造成环境缺氧,影响菌体生长。本试验采用200%的含水量有利于菌体生长。

3.2 一般菌种生长的最适 pH 值与产酶的最适 pH 值不一致,发酵产纤维素酶过程中 pH 值变化总趋势是不断下降,pH 值较小既适于产酶也能使已产生的酶失活。因此,适当增大初始 pH 值可以缓冲发酵过程中酸生成带来的负面影响。一般菌种生长的最适温度与产酶的最适温度都是不一致的,试验中可采用分段升温的办法来提高纤维素酶的产率,变温处理有利于提高酶活力。试验的最适温度为 35℃。合适的接种量对产酶有

很大的影响,通常接种量过低产酶活性不高,并使生产周期延长。试验采用 15%的接种量可缩短菌体生长达到高峰所需的时间,使纤维素酶的合成提前。碳氮比的合理搭配对绿色木霉产纤维素酶影响较大,碳氮比低,培养初期菌体过快生长,对碳源消耗过快,碳氮比高,氮源不足导致菌体生长繁殖太慢。增加细胞通透性对提高纤维素酶活性有一定的作用,在培养基里添加表面活性剂或者采用半密封的培养方式会增加通气量,从而提高产酶量。

4 结论

4.1 正交试验结果表明,不同培养基对绿色木霉产纤维素酶的影响存在显著差异( $P<0.05$ )。绿色木霉产纤维素酶的最佳培养基为:氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、含水量为200%、pH 值5.5、麦秆:麸皮为4:1。

4.2 通过单因素试验确定绿色木霉产纤维素酶的最佳发酵条件为:培养时间96 h、初始 pH 值6.0、最适温度35℃、含氮量0.4%、接种量15%和半密闭培养方式。

4.3 在最佳条件下用绿色木霉发酵后与发酵前相比,小麦秸秆的化学成分有不同程度的变化( $P<0.05$ ),其中 NDF、ADF、纤维素含量和半纤维素含量分别下降5.22%、6.88%、4.73%和4.16%,木质素含量无明显变化( $P>0.05$ )。

参考文献

[1] Adsul M G,Bastawde K B,Varma A J,*et al.* Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production[J]. Biore-source Technology,2007,98(7):1467- 1473.

[2] Yoon J J,Kim Y K. Degradation of crystalline cellulose by the Brown-rot Basidiomycete fomitopsis palustris[J]. The Journal of Microbiology, 2005, 43 (6):487- 492.

[3] Lawford H G,Rousseau J D. Cellulosic fuel ethanol-alternative fermentation process designs with wild type and recombinant *Zymomonas mobilis*[J]. Ap-pplied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 105:

- 457-469.
- [4] 王汝富,常宁芳,陈仲斌,等. 甘肃开发利用秸秆饲料资源之实践[J]. 草业科学,2006,23(6):69-72.
- [5] 靳振江. 纤维素酶降解纤维素的研究进展[J]. 广西农业科学,2007,(38)2:127-130.
- [6] 张佩华,王加启,贺建华,等. 青贮对饲料稻秸秆 DM 和 NDF 瘤胃降解特性的影响[J]. 草业科学,2008,25(6):80-84.
- [7] 张涛,崔宗均,李建平,等. 不同发酵类型青贮菌制剂对青贮发酵的影响[J]. 草业学报,2005,14(3):67-71.
- [8] 李高扬,李建龙,王艳. 利用高产牧草柳枝稷生产清洁生物质能源的研究进展[J]. 草业科学,2008,25(5):15-22.
- [9] 高培基,许平. 环境资源微生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [10] 陈洪章. 纤维素生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [11] 季更生,林弦,曹阳. pH 值对绿色木霉合成纤维素酶的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(27):8593-8594.
- [12] 马旭光,张宗舟,蔺海明,等. 黑曲霉高产纤维素酶活突变株 ZM-8 的筛选[J]. 中国饲料,2007(5):30-32.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [16] 曲音波,高培基,王祖农. 斜卧青霉纤维素酶的研究[J]. 山东大学学报,1987,22(3):97-104.

### Study on cellulase activity produced by solid-state fermentation of *Trichoderma viride*

WANG Yi-ming<sup>1</sup>, ZHANG Zong-zhou<sup>1,2</sup>, LIN Hai-ming<sup>1</sup>,

SUN Xiao-di<sup>3</sup>, LEI Yan-fang<sup>1</sup>, WANG Dong-ming<sup>4</sup>

(1. College of Agriculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. School of Life-Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 740101, China;

3. School of Engineering, Tianshui Normal University, Tianshui 740101, China;

4. Institute of Automation, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** Using wheat bran and straw as raw materials, optimum technology conditions of cellulase activity produced by solid-state fermentation of *Trichoderma viride* was optimized by orthogonal and single factor test; the effect of *T. viride* on cellulose degradation of wheat straw was studied. The optimum conditions were provided to the degradation of wheat straw cellulose by *T. viride*, and further improve the utilization rate of wheat straw. The result showed that there was significant difference in cellulase activity produced by *T. viride* under different conditions ( $P < 0.05$ ). The optimal medium contained 8 g wheat straw and 2 g wheat bran, its nitrogen source was  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , water content was 200%, pH value was 5.5. The optimum fermentation conditions were as follows: 96 h cultivation time, 35 °C, pH value 6.0, 0.4% nitrogen content, 15% inoculum and semi-enclosed cultivation. The NDF, ADF, cellulose and hemi-cellulose content of wheat straw after fermentation declined by 5.22%, 6.88%, 4.73% and 4.16%, respectively, and there was no significant change in lignin.

**Key words:** *Trichoderma viride*; fermentation conditions; cellulase activity; wheat straw; cellulose