

# 混合菌固态发酵产纤维素酶条件的研究

苏香萍<sup>1</sup> 龚大春<sup>1,2</sup> 陈国华<sup>1</sup> 周媛<sup>1</sup>

(1.三峡大学化学与生命科学学院,湖北 宜昌 443003;2.三峡大学艾伦·麦克德尔米德再生能源研究所,湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 以稻草秸秆粉为碳源,利用绿色木霉和黑曲霉进行固体发酵产纤维素酶的研究。以混合菌接种比例、麦麸与稻草粉质量比、发酵时间和三角瓶装量 4 因素为考察对象,通过单因素实验和正交实验优化混合菌固体发酵条件。确定该混合菌株的最优产酶条件,结果表明,混合菌最佳固体发酵条件为:绿色木霉和黑曲霉接种比例为 1:1、麦麸与稻草粉质量比为 1:3.0、发酵时间为 4 d、装量为 50 mL/1000 mL 三角瓶。在此最佳发酵条件下,FPA 酶活、CMC 酶活、 $\beta$ -G 酶活分别为 5.29 IU/mL、9.33 IU/mL 和 49.91 IU/mL,分别是单菌发酵的 2.28~2.47 倍、2.39~2.45 倍、1.38~2.09 倍。混合菌发酵产生的各酶活性均高于各种菌单独发酵产生的各酶活性。

**关键词:** 绿色木霉; 黑曲霉; 混合发酵; 纤维素酶

中图分类号:TS201.3;TQ925;Q93-3

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)09-0021-04

## Research on Cellulase-producing Conditions by Solid Fermentation of Mixed Strains

SU Xiang-ping<sup>1</sup>, GONG Da-chun<sup>1,2</sup>, CHEN Guo-hua<sup>1</sup> and ZHOU Yuan<sup>1</sup>

(1.College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002; 2. Alan MacDiarmid Renewable Energy Research Institute, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

**Abstract:** Straw stalk powder was used as carbon source, and cellulase-producing conditions by solid fermentation of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* were investigated. The solid fermentation conditions of mixed strains were optimized by single factor experiments and orthogonal experiments in four aspects including the inoculation ratio, the mass ratio of bran and straw powder, fermentation time and the filled content of flask. Finally the optimum solid fermentation conditions were summed up as follows: the inoculation ratio (*Trichoderma viride*:*Aspergillus niger*) was 1:1, the mass ratio of bran and straw powder was 1:3, fermentation time was 4 d, and the filled content of flask was 50 mL/1000 mL. Under the above conditions, the activity of FPAase, CMCase and  $\beta$ -Gase were 5.29 IU/mL, 9.33 IU/mL and 49.91 IU/mL respectively, which were 2.28~2.47 times, 2.39~2.45 times and 1.38~2.09 times as high as that by single strain fermentation. In conclusion, enzyme activity by mixed strains fermentation was higher than that by single strain fermentation.

**Key words:** *Trichoderma viride*; *Aspergillus niger*; mixed strains fermentation; cellulase

纤维素是自然界植物合成量最大的有机物之一,占农作物秸秆的 30%~50%<sup>[1]</sup>。纤维素利用的“瓶颈”问题是纤维素酶的活性低,人们已在提高纤维素酶活方面作了大量研究<sup>[2]</sup>,在高酶活菌株选育及发酵工艺上取得了一定进展,但至今仍无重大突破。纤维素酶是几种具有不同酶活性的酶复合物,主要分为外切纤维素酶(C1 酶)、内切纤维素酶(Cx 酶)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶(CB 酶)等<sup>[3]</sup>。C1 酶和 Cx 酶主要溶解纤维素,CB 酶主要将纤维二糖、纤维三糖转化为葡萄糖,当 3 个主要成分的活性比例适当时,就能协同作用完成对纤维素降解。而绿色木霉和黑曲霉 2 种霉菌所含上述 3 种酶的成分不同,作用于纤

维素的位点也不同,各酶对纤维素的降解程度也不同。混合发酵可以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<sup>[4]</sup>。

本课题采用固体发酵技术,探索绿色木霉和黑曲霉混合培养降解稻草秸秆粉的适宜产酶条件,得到较高的酶活,降低纤维素酶的生产成本,为纤维素酶的工业化生产奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 菌种

基金项目:湖北省教育厅高校产学研科技攻关项目(No. CXY2009B2008);三峡大学青年科学基金项目(No. KJ2008A002)。

收稿日期:2010-04-22

作者简介:苏香萍(1978-),女,讲师,从事微生物学方面的教学和研究工作。

绿色木霉 (*Aspergillus niger*)、黑曲霉 (*Richoderma viride*):由三峡大学艾伦·麦克德尔米德再生能源研究所保藏提供。

### 1.1.2 培养基

斜面培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂 15 g,水 1000 mL,pH 自然。

种子液培养基:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5%,MgSO<sub>4</sub> 0.08%,葡萄糖 8%。

固体发酵培养基:麸皮 6 g,稻草秸秆粉 18 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g,MgSO<sub>4</sub> 0.06 g,H<sub>2</sub>O 50 mL。

### 1.1.3 仪器

生化培养箱 BPC-250F:武汉瑞华仪器设备有限责任公司;恒温培养摇床 HQD98L:武汉海声达仪器设备有限公司;紫外可见分光光度计 UV-1100:上海天美科学仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 稻草秸秆的预处理

采用物理法进行预处理,即稻草烘干,剪切至 3 cm 左右,经烘干后粉碎过 80 目筛。

### 1.2.2 培养方法

将在斜面上培养 3 d 的绿色木霉菌株和黑曲霉菌株,分别制成 1.0×10<sup>7</sup> 个/mL 的孢子悬浮液。分别取 1 mL 接于 100 mL 液体种子培养基中,于 28℃、120 r/min 培养 3 d,将液体种子按 10% 的接种量,其 2 种菌接种比例为 1:1,接种于固体发酵培养基中,装量为 50 mL/500 mL 三角瓶,并搅拌均匀,于 28℃ 恒温培养 5~6 d。

### 1.2.3 粗酶液的制备

将固体发酵物加入 6 倍的柠檬酸缓冲液,搅拌均匀,在摇床上浸提 1 h,然后在 4000 r/min,离心 20 min,用滤布过滤,取上清液即为粗酶液,于 4℃ 冰箱保存,备用。

### 1.2.4 酶活力测定方法<sup>[5-7]</sup>

酶活定义:在 pH 值 4.8,温度 50℃ 下,每 1 mL 纤维素酶液在 1 h 内能水解底物生成 1 mg 的葡萄糖,称为 1 个酶活单位, IU。

CMC 酶活测定:取适当稀释的上清液 0.5 mL,加浓度为 1% 的 CMC-Na 1 mL,再加 pH 值 4.8 的醋酸缓冲液 0.5 mL,50℃ 反应 30 min,取出加 3 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液,沸水浴中保持 10 min,流水冷却后用蒸馏水定容至 25 mL,混匀,在波长 540 nm 处比色测 OD 值,以不加底物为对照。

FPA 酶活测定:取经适当稀释的上清液 0.5 mL,以 50 mg(1 cm×6 cm)新华滤纸条为底物,加 pH 4.8 的醋酸缓冲液 1.5 mL,50℃ 反应 60 min,后面步骤同 CMC 酶活测定。

β-葡萄糖苷酶(β-G 酶)活测定:取适当稀释的上清液 0.5 mL,加入浓度 1% 的水杨素溶液 1 mL,再加 pH 4.8 的醋酸缓冲液 0.5 mL,50℃ 反应 30 min,后面步骤同 CMC 酶活测定。

### 1.2.5 绿色木霉、黑曲霉单菌株发酵产酶

分别将绿色木霉孢子液、黑曲霉孢子液接入到装量为 50 mL/500 mL 的固体发酵培养基中,接种量均为 10 mL,于 28℃ 培养,摇床转速均为 120 r/min,发酵 5 d,分别测 CMC 酶、FPA 酶和 β-G 酶活。

### 1.2.6 混合菌固体发酵条件的研究

#### 1.2.6.1 混合菌种的接种量比对酶活的影响

保持混合种子液接种量 10% 不变,设定黑曲霉种子液占混合种子液体积百分比分别为 0、33%、50%、67% (即绿色木霉种子液与黑曲霉种子液接种量比例分别为 1:0、1:0.5、1:1.0、1:2.0),分别接种于装量为 50 mL/500 mL 的固体发酵培养基中,于 28℃ 培养,摇床发酵 5 d,测酶活。从而确定最佳混合菌种的接种量比。

#### 1.2.6.2 麸皮与稻草秸秆粉比对酶活的影响

保持每 50 mL 固体发酵培养基中麸皮和稻草秸秆粉总质量为 24 g 不变,设定稻草秸秆粉质量百分比分别为 71%、75%、78%、80% (即麸皮和稻草秸秆粉质量比分别为 1:2.5、1:3、1:3.5、1:4),吸取绿色木霉孢子液、黑曲霉孢子液各 5 mL,接种于装量为 50 mL/500 mL 的固体发酵培养基中,于 28℃ 培养,摇床发酵 5 d,测酶活。从而确定最佳麸皮和稻草秸秆粉质量比。

#### 1.2.6.3 装量对酶活的影响

将绿色木霉孢子液与黑曲霉孢子液各 5 mL,接种于三角瓶体积为 100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL (即装量为 50 mL/100 mL、50 mL/250 mL、50 mL/500 mL 和 50 mL/1000 mL)的固体发酵培养基中,于 28℃ 培养,摇床发酵 5 d,测酶活。从而确定装量对酶活的影响。

#### 1.2.6.4 培养时间对酶活的影响

将绿色木霉孢子液与黑曲霉孢子液各 5 mL,接种于装量为 50 mL/500 mL 的固体发酵培养基中,先 28℃ 摇瓶发酵 6 d,在发酵的 3 d、4 d、5 d、6 d,分别取出测酶活。从而确定混合发酵产酶所需时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿色木霉、黑曲霉单菌株发酵产酶

绿色木霉、黑曲霉的单菌株发酵产酶活结果(图 1)表明,2 株菌产生的纤维素酶各酶系的酶活是有区别的,综合考虑黑曲霉产酶活较高,其中黑曲霉产 β-G 酶活是绿色木霉的 1.52 倍。但绿色木霉 FPA 酶活却是黑曲霉的 1.08 倍。

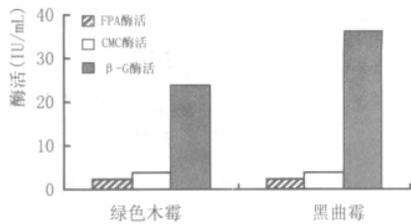


图1 绿色木霉、黑曲霉单菌株发酵产酶活性

## 2.2 混合菌固体发酵条件的研究

### 2.2.1 混合菌种的接种量比对酶活的影响

黑曲霉和绿色木霉 2 种混合菌接种量比例对混合发酵产酶的影响, 结果见图 2。

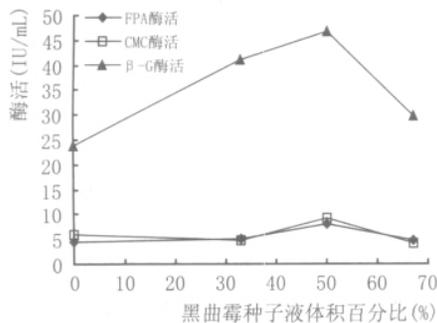


图2 混合菌种的接种比例对酶活的影响

由图 2 可知, 当黑曲霉种子液体积百分比为 50%, 即绿色木霉孢子液与黑曲霉孢子液接种比为 1:1 时, 产酶活最高, 且 3 种酶活力均高于单种菌株产的酶活力, 此时 FPA 酶活、CMC 酶活、β-G 酶活分别为 8.124 IU/mL、9.092 IU/mL 和 46.818 IU/mL。

### 2.2.2 麸皮与稻草秸秆粉比对酶活的影响

由于本试验以秸秆为主要碳源, 所以选择适宜的麸皮与稻草秸秆粉比例对于提高其降解率是十分必要的, 添加适量麸皮有利于初始阶段菌株对碳源的有效利用。不同麸皮和稻草秸秆粉质量比对绿色木霉和黑曲霉混合发酵产酶影响实验结果见图 3。

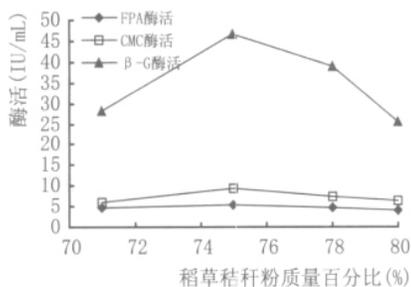


图3 麸皮与稻草秸秆粉质量比对酶活的影响

图 3 结果表明, 当稻草秸秆粉质量百分比为 75%, 即麸皮与稻草秸秆粉质量比例为 1:3 时酶活较高, 此时 FPA 酶活、CMC 酶活、β-G 酶活分别为 5.283 IU/mL、9.271 IU/mL 和 46.502 IU/mL。

### 2.2.3 装量对酶活的影响

装量对酶活的影响结果见图 4, 由于黑曲霉和绿色木霉均属于好氧菌株, 因此装量的大小也影响到发酵产酶的量。通过图 4 可看出, 产酶量的大小随通气量变化较大, 当三角瓶体积为 500 mL, 即装量为 50 mL/500 mL 时, 酶活较高, 此时 FPA 酶活、CMC 酶活、β-G 酶活分别为 6.921 IU/mL、7.918 IU/mL 和 46.290 IU/mL。

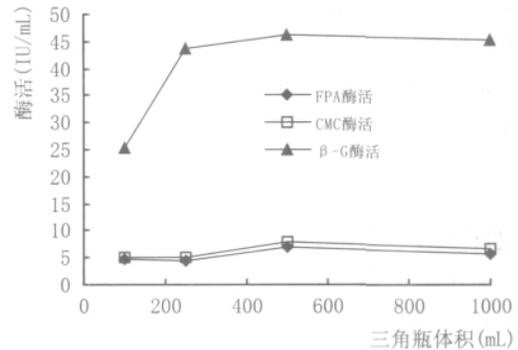


图4 装量对酶活的影响

### 2.2.4 培养时间对酶活的影响

生物降解过程中酶活的变化在不同培养时间时, 对不同菌株产酶能力的影响不同, 将黑曲霉与绿色木霉混合培养一段时间后, 分别在不同的时间段测定酶活力。绿色木霉与黑曲霉混合发酵时间对产酶影响结果见图 5。图 5 结果表明, 绿色木霉与黑曲霉混合发酵 4 d 时达到总酶活的高峰, 此时 FPA 酶活、CMC 酶活、β-G 酶活分别为 5.461 IU/mL、6.157 IU/mL 和 49.838 IU/mL, 故最适的培养时间为 4 d。

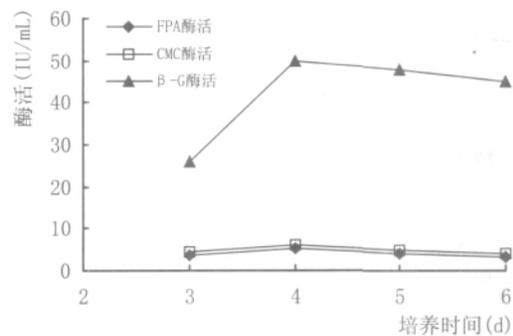


图5 培养时间对酶活的影响

## 2.3 最佳产酶条件的确定

在单因素实验的基础上, 选用装量、麦麸与稻草粉质量比、培养时间和混合菌接种比例进行 4 因素 3 水平正交设计实验, 分别测定 FPA 酶活、CMC 酶活、β-G 酶活, 各酶活单位为 IU/mL, 最终以 β-G 酶活为考察指标优化产酶条件, 正交设计见表 1, 正交实验及结果见表 2。

通过 3 个酶活的正交实验分析可得如下结论, 黑曲霉与绿色木霉的接种比例对酶活影响最大, 其次分别为

表1 正交实验因素水平设计

水平	A 装量	B 麦草比	C 培养时间(d)	D 接种比例
1	1000	1:2.5	3	1:0.5
2	500	1:3.0	4	1:1.0
3	250	1:3.5	5	1:2.0

培养时间、麸皮与稻草秸秆粉组成比例、三角瓶容量。最佳条件为  $A_1B_2C_2D_2$ , 在此最佳培养条件下的 FPA 酶活、CMC 酶活、 $\beta$ -G 酶活分别为 5.29 IU/mL、9.33 IU/mL 和 49.91 IU/mL, 分别是单菌株发酵的 2.28~2.47 倍、2.39~2.45 倍和 1.38~2.09 倍。

### 3 结论

3.1 经过单因素实验对混合菌产酶条件的初步探讨发现其产酶的最佳培养为:2 种混合菌接种最佳比例为 1:1, 最佳麦草比为 1:3, 最佳培养时间为 4 d, 装量为 50 mL/500 mL。

3.2 通过正交实验表明, 混合菌固体发酵产酶的最佳条件为:混合菌接种比例为 1:1、麦草比为 1:3、培养时间为 4 d、装量为 50 mL/1000 mL。在此最佳培养条件下的 FPA 酶活、CMC 酶活、 $\beta$ -G 酶活分别为 5.29 IU/mL、

(上接第 20 页)

(*S. Lactis*); 乳酸乳杆菌 (*L. Lactis*) 和短乳杆菌 (*L. Brevis*)。14 株乳酸菌的产酸特性可分为两种类型:一类菌株是 37 °C 发酵 12 h 时 pH 值可达到最小值, 此后逐渐上升; 另一类菌株是 37 °C 发酵 12 h 时 pH 值迅速下降, 到 24 h 可达到最小值, pH 值在 4.5 以下, 此后逐渐趋于平缓。

3.2 乳酸菌是白酒生产中的一大类细菌, 认识乳酸菌的种类及发酵特性有助于合理控制发酵进程, 有效做到“增己降乳”。从宋河中温酒曲中分离鉴定的 16 株乳酸菌中, 乳球菌和片球菌为乳酸菌的优势菌, 占总菌株总数的 62.4%。在白酒的酿造过程中, 过去一致认为, 乳球菌和片球菌为有害乳酸菌, 现已有报道, 在人工窖泥中接种乳球菌不但可抑制乳酸乙酯和乳酸钙的生成, 而且可促进其他酯类的生成, 能提高优质酒率, 延缓窖池老化<sup>[10]</sup>; 片球菌在发酵过程中也可作为促酵物, 同时与发酵风味有关<sup>[11]</sup>。对于分离到的乳球菌、片球菌及乳杆菌在白酒发酵过程中的应用值得继续研究。

#### 参考文献:

- [1] 李大和. 浓香型大曲酒生产技术 (第 2 版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.35-38.
- [2] Md. Harun-ur-Rashid, Kaname Togo, Minoru Ueda, et al. Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria

9.33 IU/mL 和 49.91 IU/mL, 分别是单菌株发酵的 2.28~2.47 倍、2.39~2.45 倍和 1.38~2.09 倍。

3.3 绿色木霉与黑曲霉混合发酵产生的纤维素酶活高于各自单菌株发酵产生的纤维素酶活。说明混菌发酵可使菌种间协同互助, 促进产酶, 纤维素酶活力得到了提高。

#### 参考文献:

- [1] LYND L R, PAUL J W, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66 (3): 506-577.
- [2] 李雯, 洪艳, 侯红萍. 纤维素酶高产菌株的研究进展 [J]. *酿酒科技*, 2009, (182): 105-106.
- [3] 王亚林, 严建芳, 吴灵英, 熊有枝, 等. 稻草发酵菌种得筛选与组配研究 [J]. *饲料研究*, 2001, (10): 24-25.
- [4] 涂璇, 薛泉宏, 司美茹, 龚明福. 多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响 [J]. *工业微生物*, 2004, (34): 30-34.
- [5] 张树政. 酶制剂工业 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 606-608.
- [6] 洪洞, 黄秀梨. 黑曲霉变种 2281-C 纤维素酶的纯化和性质 [J]. *北京师范大学学报 (自然科学版)*, 1998, (4): 12-15.
- [7] 陈洪章. 纤维素生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.1-2.

- isolated from traditional fermented milk Dahi in Bangladesh [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2007, 23: 125-133.
- [3] Pilar Calo-Mata, Samuel Arindo, Karola Boehme, et al. Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products [J]. *Food Bioprocess Technology*, 2008, (1): 43-63.
- [4] 侯小歌, 郭翠红, 金刚, 等. 酸奶中传统发酵乳酸菌的分离筛选及增菌研究 [J]. *安徽农业科学*, 2009, (13): 5848-5856.
- [5] 黄秀梨. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003. 114-116.
- [6] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物实验技术 [M]. 北京: 世界图书出版公司, 2000.386-387.
- [7] 樊明涛, 刘变芳, 金丹. “雪莲”中主要菌的分离鉴定及其发酵性能研究 [J]. *中国食品学报*, 2008, 8(1): 72-77.
- [8] R.E. 布坎南, N.E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.660-712.
- [9] 吴衍庸. 酒曲微生物分析与白酒香型初探 [J]. *酿酒科技*, 2004, 125 (5): 38-39.
- [10] 陈翔, 王亚庆. 利用 L-乳球菌延缓窖池老化技术 [J]. *酿酒科技*, 2007, 153 (3): 58-59.
- [11] Gardner N J, Savard T, Obermeier P, et al. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures [J]. *Food Microbiology*, 2001, (20): 261-275.