

纤维素分解菌系 WSD-5 常温产酶高温糖化小麦秸秆研究

温博婷¹ 袁旭峰¹ 华彬彬¹ 尹永焕¹ 王小芬¹ 钟萼蓉² 崔宗均^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院/中国农业大学生物质工程中心,北京 100193;

2. 黑龙江省农垦科学院 经济作物开发研究所,黑龙江 佳木斯 154007)

摘要 将木质纤维素原料转化为燃料乙醇,受到全世界的期待。本研究探讨了利用复合菌系直接分解糖化的新途径。结果显示,该复合菌系优化的产酶活条件是转速为 0 r/min,底物添加量为 3%,第 6 天酶活达到峰值,主要酶活为木聚糖酶活、CMC 酶活和滤纸酶活,分别为 15.18、3.43 和 0.79 IU/mL。在第 15 天培养结束后,WSD-5 对小麦秸秆中纤维素、半纤维素以及木质素的分解率分别达到 71.3%、90.6% 和 51.7%。在酶活高峰期,在添加底物的同时升温至 55 ℃保温糖化,结果发现还原糖的浓度显著提高。酶解小麦秸秆产生的总还原糖达到 125 mg/g 以上,两次糖化总还原糖浓度为常温发酵时的 15 倍以上。当底物浓度为 6% 时的转化率最高,达到 150.73 mg/g。在糖化的过程中,产生了少量的甲酸、乙酸等可溶性小分子化合物,可以作为甲烷发酵的底物,具有一定的利用意义。试验扩大到 3 m³ 规模的中试试验。本研究为木质纤维素的低成本分解糖化提供了新的思路和途径。

关键词 木质纤维素; 复合菌系; 复合酶系; 糖化

中图分类号 Q 939.96; S 154.39

文章编号 1007-4333(2014)02-0036-07

文献标志码 A

Enzymatic digestibility by the composite microbial system of WSD-5: Enzyme production at room temperature and saccharification at high temperature

WEN Bo-ting¹, YUAN Xu-feng¹, HUA Bin-bin¹, YIN Yong-huan¹, WANG Xiao-fen¹,
ZHONG E-rong², CUI Zong-jun^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology/Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Crop Development, Heilongjiang Academy of Land-reclamation Sciences, Jiamusi 154007, China)

Abstract The world is looking forward to the conversion of lignocellulose into bioethanol efficiently. This study applied a new approach to utilize composite microbial system for saccharification directly. The experiment expanded in the pilot scale of 3 m³. Experiment results showed that the highest enzyme activities were obtained when stirring rate was 0 rpm, and substrate loading rate was 3%. The highest cellulase and hemicellulase were obtained at day 6 after cultivation. The key enzyme activities in the fermentation broth were detected, CMCase was 3.43 IU/ml and Xylanase was 15.18 IU/ml. The weight loss of cellulose, hemicellulose and lignin were 71.3%, 90.6% and 51.7%, respectively. After 6 days of fermentation, the crude enzyme were obtained and used for saccharification directly. The results showed that the concentration of reducing sugar significantly increased to 125 mg/g, which was more than 15 times than that in the fermentation broth. It peaked to 150.73 mg/g when the substrate loading rate was 6%. A small amount of organic acid was produced during saccharification, which were also the soluble small molecule compounds which would be used for biogas. This study provided a new idea and method of a low cost saccharification.

Key words lignocellulose; composite microbial system; cellulolytic enzyme system; saccharification

收稿日期: 2013-07-22

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303080); 国家科技支撑计划项目(2012BAD14B01); 中国农业大学研究生科研创新专项(2012YJ015)

第一作者: 温博婷, 博士研究生, E-mail: hhyykl@cau.edu.cn

通讯作者: 崔宗均, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质资源转化与利用研究, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

我国的纤维素类生物质资源非常丰富,其具有低成本、可再生的特点,不仅可以水解生成乙醇还可以厌氧发酵生成甲烷^[1-2]。2003年,我国年均作物秸秆产量达到近8亿t,并且每年仍以1200万t的数量稳步递增。在我国,小麦秸秆是十分重要的农作物秸秆,其产量仅次于玉米秸秆而位居第二^[3];然而,45%的小麦秸秆都是在田间被焚毁,没有被很好的利用,这不仅给环境带来了严重的污染,而且造成了大量的资源浪费。因此开发新的技术将作物秸秆转化为高效、洁净、方便的高品质能源,对缓解我国能源紧张状况,促进社会经济的可持续发展和生态环境的改善具有重要意义^[4]。天然木质纤维素由于结构复杂,用纯培养微生物产生的酶分解需要繁琐的前处理。本实验室摆脱传统的微生物纯培养手段,在不破坏自然界中微生物之间协同关系的前提下,长期定向驯化构建了高效而稳定的纤维素分解菌复合系,对木质纤维素类原料具有很好的分解溶化作用^[5-7]。但在培养过程中,菌系分解底物的同时消耗分解产物,使得分解产物(尤其是还原糖)难以积累。这也成为此类复合系大规模应用于木质纤维素分解的瓶颈。

针对上述问题,笔者等筛选了细菌和真菌共存并适合在常温下生长的复合菌系 WSD-5。Clone Library 分析表明,复合菌系 WSD-5 主要有 15 种细菌和 5 种真菌。包括 *Bacillus cereus*、*Benzo(a)pyrene-degrading bacter*、*Flavobacterium ferrugineum*、*Pseudallescheria boydii*、*Coprinus cinereus* 和 *CDC group ll-E subgroup A* 等。其中 *Flavobacterium ferrugineum*^[8]是具有纤维素分解能力的细菌; *CDC group ll-E subgroup A* 属嗜纤维菌属,而大多数嗜纤维菌属的细菌都具有纤维素分解能力^[9]。

微生物之间的协同作用增强了 WSD-5 分解小麦秸秆的能力,并且 WSD-5 分泌胞外酶的能力也很强。但由于 WSD-5 最初是由固体培养基筛选的,生长过程不容易控制,难以获得大量的酶液。因此本研究采用液体发酵罐培养 WSD-5,优化其液体发酵参数,使其较好的发酵产酶。

复合菌系 WSD-5 在 30℃ 分泌纤维素酶和半纤维素酶,并对木质纤维素原料具有很强的分解能力^[10],而分解酶活是在 55℃ 最高。由此本研究提出设想:根据分解菌系适宜生长温度(30℃)和酶解适宜温度(55℃)不同的特点,在菌系生长最适的常温条件下培养复合菌系产酶,在产酶高峰期提高反

应温度使之在酶解最适的高温条件下水解、糖化,即“常温产酶,高温糖化”。在这个高温下活菌几乎停止代谢,而不消耗其产生的还原糖,使还原糖得到积累。本试验按照上述设想,拟用少量小麦秸秆作为底物常温发酵 WSD-5 产酶,在酶活高峰期再添加不同量的小麦秸秆作为糖化底物进行高温糖化,以探讨利用复合菌系产生的粗酶液直接糖化的可行性和技术途径,并探讨重复利用一次糖后的底物残渣提高底物转化率的问题。

1 材料和方法

1.1 试验材料

培养基:改良的 Mandals 培养基^[11], $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 2.0 g, CaCO_3 2.0 g, 蛋白胨 2.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg, MnSO_4 1.6 mg, ZnCl_2 1.7 mg, CoCl_2 1.7 mg, 溶解在 1 L 水中, pH 7.2。

菌种:本研究所用的微生物菌种是从秸秆堆肥和土壤混合物中,经过长期定向筛选和驯化所得木质纤维素分解菌复合系 WSD-5。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦秸秆预处理

选用烘干的小麦秸秆,用 1% 的 NaOH 浸泡 24 h,而后用去离子水冲洗至中性,并于 60℃ 干燥。作为培养 WSD-5 的底物及小麦秸秆的糖化底物。

1.2.2 复合菌系发酵产酶条件的优化

本试验所用的设备为 5 L 的 Infors 发酵罐,型号为 Minifors。发酵罐中加入 2 L Mandals 培养液和小麦秸秆,121℃ 灭菌 15 min。待冷却后,接入 100 mL 预培养 7 d 的种子溶液。在培养的过程中补加无菌水以维持 2 L 的发酵体积。设置温度为 30℃,通气量为 4 L/min。

1) 转速对发酵产酶的影响。为了检测转速对酶活的影响,设置底物添加量为 1%。转速分别为:200、100 和 0 r/min。分别在第 1、3、5、6、7、9、11、13 和 15 天取样,用于酶活的测定。

2) 底物添加量对发酵产酶的影响。为了检测底物添加量对酶活的影响,设置转速为 0 r/min。底物添加量分别为:1%、2%、3% 和 4%。分别在第 1、3、5、6、7、9、11、13 和 15 天取样,用于酶活的测定。

1.2.3 酶活的测定

本研究所测定的是 WSD-5 培养过程中的滤纸酶活(纤维素总酶活)、CMC 酶活(纤维素内切酶活)

和木聚糖酶活。所使用的底物分别为滤纸 50 mg (Whatman No. 1 滤纸)、质量分数 2% 的羧甲基纤维素和 1% 的燕麦木聚糖。缓冲液均为磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液 (1/15 mol/L), 缓冲液的 pH 为 6.24。酶活测定的反应温度为 55 °C。

酶活测定采用 DNS 法^[12-13], 在 530 nm 处测定吸光值。在测定过程中, 应将所有的样品、酶的空白对照、糖标液以及光谱调零点样品同时沸水浴。根据标线计算酶活力。1 个酶活力单位 (1 U) 定义为: 每分钟生成 1 μmol 葡萄糖/木糖所需要的酶量。

1.2.4 秸秆的总减重及其各成分的减重

以优化后的条件培养 WSD-5, 分别于第 0、6、15 天取出底物秸秆, 测定秸秆及其各成分的减重。秸秆用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体^[14], 离心后以去离子水洗至中性, 于 105 °C 烘干后称重, 计算减重及减重率。将秸秆分解残渣粉碎, 过 1 mm 筛, 准确称取 0.5 g, 装入 F57 专用袋中, 用 ANKOM220 型纤维分析仪 (北京和众视野科技有限公司, 北京) 测定纤维素、半纤维素和木质素含量。

1.2.5 培养过程中 OD 值及 pH 的测定

分别于第 0、1、3、5、6、7、9、11、13 和 15 天取样, 测定培养过程中的 OD 值和 pH。OD 值是利用光密度来反映菌株的生物量。取 0.5 mL 待测液, 用 mini-DNA/RNA 分析仪, 在 600 nm 处监测吸光值。

培养液 pH 是用 HORIBA D-21S pH 计测定。

1.2.6 复合酶系对秸秆的水解糖化

以优化后的发酵条件培养 WSD-5, 将培养 6 d 的培养液作为粗酶液直接用于后续的糖化试验。取 40 mL 粗酶液于 50 mL 离心管中, 将 1.2.1 处理后的小麦秸秆粉碎, 过 2 mm 的筛子。分别以 1%~10% 的添加量放入离心管中, 每个添加量设置 2 个重复, 对照为不添加秸秆的粗酶液。静置于 55 °C 恒温培养箱中保温糖化 48 h, 测定产生的还原糖及有机酸含量。

将用于糖化的各梯度的底物取出, 去离子水冲洗后于 60 °C 烘干, 作为第二次小麦糖化试验用的底物, 其他操作同第一次糖化。

1.2.7 还原糖的测定

还原糖的测定方法参照文献^[15]。

1.2.8 有机酸的测定

有机酸的测定所用的仪器为岛津公司的 LC-

20A 型高效液相色谱 (HPLC)。基本配置为 SIL-20A 的系统控制器, CTO-20A 的柱温箱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, 色谱柱是伯乐公司的 Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm)。测定所用的流动相是 0.005 mol/L 的 H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min。

2 结果与分析

2.1 复合菌系液体产酶条件的优化

2.1.1 转速对 WSD-5 产酶能力的影响

设置 3 种不同的转速: 200、100 和 0 r/min。由图 1 所示, 当转速为 0 r/min 的时候, CMC 酶活、木聚糖酶活和滤纸酶活均在第 6 天达到酶活的峰值; 这比转速在 200 和 100 r/min 时出现的酶活峰值提前了 1 d。与转速为 200 r/min 时的各酶活相比, 当

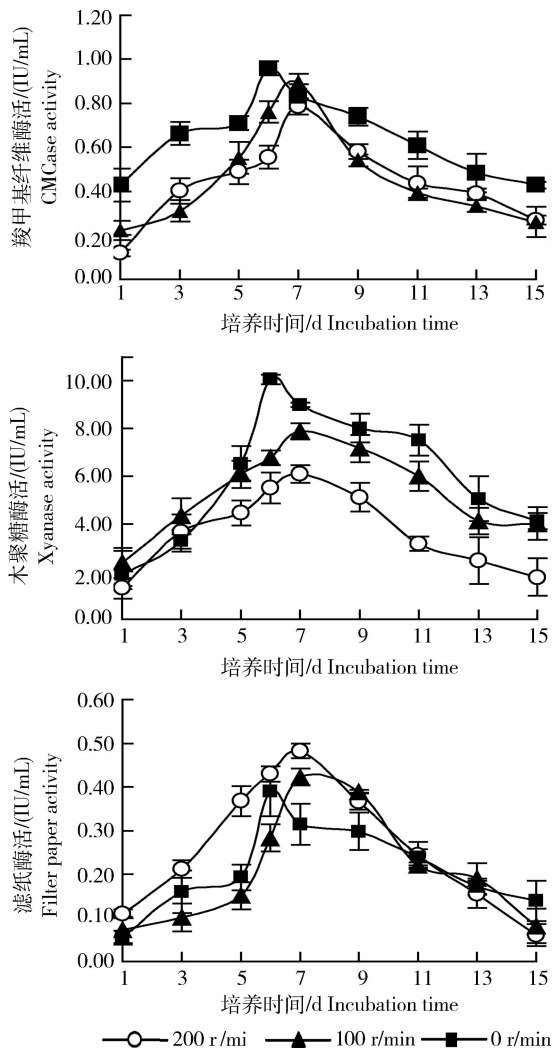


图 1 转速对 WSD-5 发酵产酶的影响

Fig. 1 Effect of stirring rate on enzyme activity

转速为 100 r/min 时,CMC 酶活和滤纸酶活分别增加了 0.10 和 0.06 IU/mL,木聚糖酶活增加了 1.77 IU/mL。当转速为 0 r/min 时,CMC 酶活和木聚糖酶活分别比 200 r/min 增加了 0.17 和 4.00 IU/mL。在 15 d 的培养过程中,转速对木聚糖酶活的作用显著,而对 CMC 酶活和滤纸酶活的影响较小。从经济效益与节省能源的角度考虑,最后确定转速设置为 0 r/min。

2.1.2 底物添加量对 WSD-5 液体产酶的影响

由图 2 可知,各酶活在不同底物添加量下酶活的峰值都出现在第 6 天。当底物添加量为 1%~3% 时,各酶活随着底物添加量的增加而增加;但当底物添加量达到 4% 时,酶活却急速下降。当底物添加量为 3% 时酶活达到了最大值,其在前 6 天的培养过程中,CMC 酶活从 0.43 增至 3.43 IU/mL,

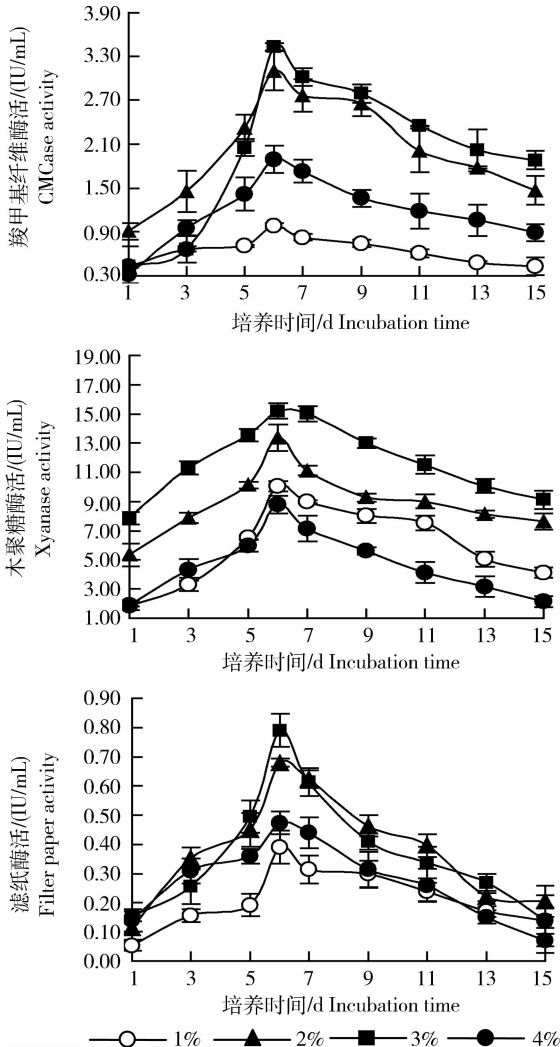


图 2 底物添加量对 WSD-5 发酵产酶的影响

Fig. 2 Effect of substrate loading rate on enzyme activity

木聚糖酶活从 7.87 上升到 15.18 IU/mL。继续培养至第 15 天时,CMC 酶活下降到 1.88 IU/mL 而木聚糖酶活降至 9.12 IU/mL。滤纸酶活在整个培养过程中的酶活一直处于比较低的水平,最大值为 0.79 IU/mL。在底物添加量为 4% 时酶活下降,分析原因可能是产生了大量的代谢产物从而抑制了复合菌系中微生物的生长。

最后确定了发酵优化的条件为:转速为 0 r/min,底物添加量为 3%。

酶活的改变可能有很多的因素,包括底物量的改变,酶的作用位点,酶的稳定性等^[16]。由图 2 可知,木聚糖酶活明显高于 CMC 酶活及滤纸酶活。分析原因,CMC 酶活及滤纸酶活检测的是纤维素酶活,由于大量的纤维素酶结合在底物上^[17],而检测的酶活是上清液中的酶活,还有部分的纤维素酶由于结合在底物上而无法被检测。

2.2 产酶过程中 pH 及 OD 值

由图 3 可知,在产酶培养过程中,无论是 OD 值还是 pH,第 6 天都是 WSD-5 的重要转折点。OD 值由第 0 天的 1.086 迅速上升至第 6 天的 2.521,而后缓慢的下降;至第 15 天培养结束时,OD 值为 2.296。而 pH 在第 15 天的培养过程中一直呈现上升的趋势,且 pH 前期上升较后期迅速。第 0 天 pH 为 7.2,之后 OD 值一直上升至第 15 天的 9.0。

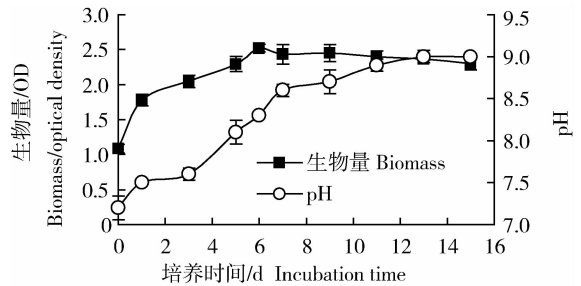


图 3 WSD-5 在发酵过程中的 pH 及 OD 值

Fig. 3 Changes in pH and OD during the fermentation of WSD-5

2.3 产酶过程中底物的分解率

由图 4 可知,经碱处理后的小麦秸秆即第 0 天的小麦秸秆,其全纤维素(纤维素+半纤维素)的百分含量为 78.1%。复合菌系以小麦秸秆为唯一碳源培养至第 6 天时,对小麦秸秆的分解率是 57.50%;培养到第 15 天时,对小麦秸秆的分解率达到 73.80%。图 4 显示了在发酵过程中纤维素、半纤维素、木质素

以及可溶性物质的变化。培养初始阶段,纤维素、半纤维素以及木质素分别为 32.70、14.16 和 4.00 g;培养至第 6 天时,3 种成分质量依次减少至 14.36、4.39 和 2.79 g;到第 15 天时,剩余的纤维素、半纤维素以及木质素分别为 9.38、1.33 和 1.93 g。由此可见,WSD-5 对小麦秸秆具有很强的分解能力,第 15 天时纤维素、半纤维素以及木质素的分解率分别为 71.3%、90.6%、51.7%。前人的研究大多针对单菌,而单菌对天然木质纤维素物质(如秸秆)的分解效果仍未得到有效的提高。越来越多的研究发现,在自然环境和工程环境中,天然木质纤维素分解现象多是在多菌共同作用下完成的,而具有良好共生关系的菌群比单菌具有更好的天然木质纤维素分解活性^[5-6]。这也是 WSD-5 对半纤维素、纤维素和木质素均具有较高分解率的原因。

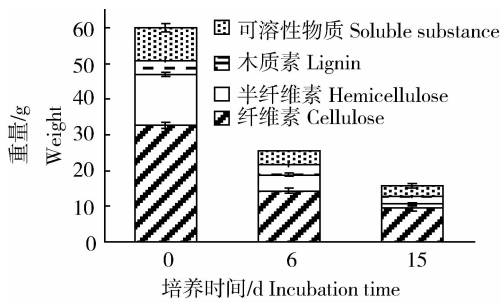


图 4 发酵过程中 WSD-5 对小麦秸秆的分解
Fig. 4 Weight loss of wheat straw during the fermentation of WSD-5

需要指出的是,由于 WSD-5 分泌的酶液没有经过浓缩等的处理,测得的 3 种酶活和商业酶相比,并不显著高,但 WSD-5 对秸秆的实际分解能力却是商业酶制剂无法比拟的。说明酶活并不能客观地评价其对木质纤维素的分解能力,而用底物减少的方法测得的分解能力则更能体现出微生物菌群对木质纤维素的利用水平。

2.4 WSD-5 粗酶液对小麦秸秆的糖化能力

2.4.1 两次糖化过程中产生的还原糖

以培养 6 d 的 WSD-5 发酵液作为粗酶液,经碱处理后的小麦秸秆作为糖化底物进行了糖化试验。对第一次糖化结束后的小麦秸秆残渣,用同样粗酶液进行第二次的糖化试验,以期提高 WSD-5 分泌的酶液对小麦秸秆的糖化率和对小麦秸秆的转化率。图 5 中的柱形图代表的是两次糖化产生的还原糖浓度的总和,可以更直观的看出底物添加量对小麦秸

秆的糖化能力以及达到最大利用时所产生的总还原糖的量。

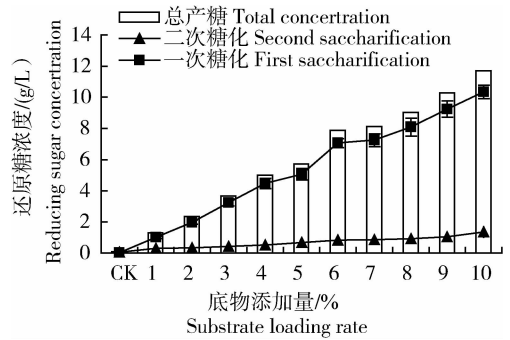


图 5 两次糖化过程中产生的还原糖

Fig. 5 Quantitative analysis of reducing sugar during two steps of saccharification

由图 5 可知,不论是第一次还是第二次的糖化,随着底物浓度的递增,产生的还原糖的浓度也一直增加,其中第一次糖化时的还原糖浓度增加的更为显著。在底物浓度 1% 下,还原糖的产量为 1.005 g/L;底物浓度为 6% 时,还原糖浓度达到 7.063 g/L;底物浓度为 10% 时,还原糖量达到最高值 10.358 g/L。都远远高于对照组的还原糖 0.043 g/L。相比之下,在小麦秸秆的第二次糖化中,还原糖浓度增加的趋势和第一次糖化结果相同,但增加的极为缓慢。在 1% 的底物浓度下,还原糖的产量为 0.297 g/L;在浓度为 6% 时,还原糖浓度为 0.825 g/L;10% 的底物浓度时,还原糖浓度达到最高值 1.350 g/L。而在 WSD-5 的常温培养过程中,3% 的底物添加量所产生的还原糖浓度仅为 0.240 g/L;而在高温糖化过程中,以同样的底物浓度(3%)进行两次糖化所产生的总还原糖达 3.680 g/L,为常温时的 15.33 倍。由此可以看出,常温产酶高温糖化得到的还原糖浓度明显提高,证明了该试验思路的可行性。

2.4.2 两次糖化过程中底物的转化率

图 6 是基于图 5 产生的还原糖浓度得出的纤维素和半纤维素的转化率,柱形图表示的是两次糖化产生的还原糖总转化率。由图 6 可见,在第一次的糖化中,各底物浓度下的总转化率均在 125 mg/g 以上,其中以 6% 底物浓度的转化率最高,达到 150.73 mg/g。而在第二次的糖化中,各底物浓度下的转化率没有明显差异,其中 1% 底物浓度的全纤维素转化率最高,为 38.03 mg/g。而两次相加

后,6%底物浓度的总转化率仍然最高,最高值为168.91 mg/g。

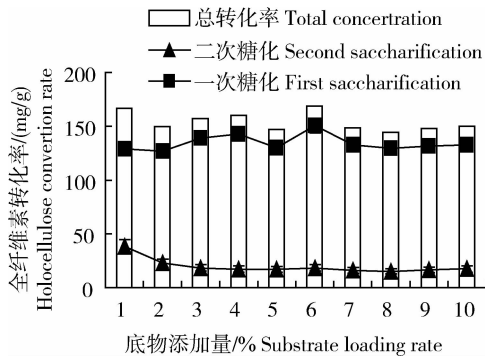


图6 两次糖化过程中全纤维素的转化率

Fig. 6 Conversion rate of holocellulose during two steps of saccharification

由此可以得知,WSD-5 不仅对小麦秸秆具有很强的分解能力,其产生的粗酶液还具有良好的糖化能力。然而所得的还原糖浓度并不是很高,分析原因:其中一方面是用于糖化的粗酶液是未经浓缩的粗酶液,其蛋白质含量仅为0.1 mg/mL(数据未显示),酶浓度过低导致酶的糖化能力不高;另外,经1% NaOH 处理的小麦秸秆,木质素的去除力不高,反而在后期的洗涤中和过程中会损失一定量的纤维素和半纤维素。因此,今后工作的重点将是对粗酶液进一步的浓缩等处理,以及木质纤维素的有效前处理,用以更大程度的挖掘复合酶系水解木质纤维素的潜力。

2.4.3 糖化过程中产生的有机酸

图7分析了在水解过程中所产生的主要有机酸:甲酸、乙酸、丁酸以及乳酸。由于在水解过程中无法避免复合菌系 WSD-5 中的微生物不存在于粗酶液中。而在55℃时,虽然大多数的微生物生长受到抑制,但仍有些微生物保持一定的活性,因此在糖化的过程中产生了有机酸。由图7可以看出,丁酸的浓度最高,其次是甲酸和乙酸,乳酸的浓度最低。4种有机酸浓度基本遵循着随底物浓度的增加而增加的规律。当10%时,甲酸、乙酸、丁酸及乳酸的浓度分别为0.87、0.53、1.66和0.37 g/L。

这说明虽然高温抑制了大部分活菌代谢,但仍有少量活菌存在。然而从另一个角度考虑,短链的挥发性产物,如乙酸、丁酸等有机酸是可溶性小分子化合物,和上述产生的还原糖一起都是甲烷厌氧发酵重要且较易利用的底物,这也使得 WSD-5 的粗酶

液有了更为广泛的应用前景和利用价值。

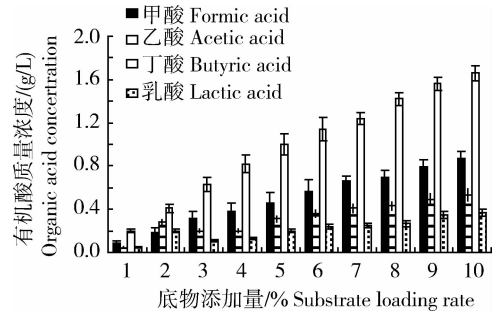


图7 第一次糖化过程中产生的有机酸

Fig. 7 Quantitative analysis of major volatile products during the first saccharification

3 结论

1) WSD-5 不仅对木质纤维素具有很强的分解能力,并且可以很好的分泌胞外酶。为了获得大量的酶液,将其在5L的发酵罐中培养,并优化其产酶条件。结果显示,在通气量为4 L/min,转速为0 r/min,底物添加量为3%的条件下,CMC酶活、木聚糖酶活及滤纸酶活均在第6天出现峰值。通过优化复合菌系的液体培养条件,使得 WSD-5 可以在发酵罐中进行扩大培养的同时仍然可以分泌高质量的粗酶液用于后续的水解试验,具有很好的应用价值。

2) 目前关于木质纤维素糖化的研究多数是利用商业酶制剂,然而商业酶存在着成本高的问题。本研究根据分解菌系的适宜生长温度和酶解适宜温度不同的特点,在菌系生长最适的常温条件下培养菌系而产酶,在产酶高峰期提高反应温度使之在酶解最适的高温下分解、糖化。依据“常温产酶,高温糖化”的原理,利用复合菌系 WSD-5 分泌的复合酶系作为粗酶液,对其糖化小麦秸秆的能力进行了研究。糖化得到的最高还原糖浓度为10.358 g/L,秸秆最高转化率为150.73 mg/g,比常温培养产生的还原糖浓度提高了15.33倍。在水解的同时伴随有机酸的产生,还可以用于甲烷厌氧发酵。本试验是首次对复合菌系分泌的粗酶液水解能力进行研究,证明复合菌系不仅可以降解纤维素类原料,而且其粗酶液对木质纤维素还具有很好的水解能力。

参 考 文 献

[1] Gomez L D, Steele-King C G, McQueen-Mason S J. Sustainable

- liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls [J]. *New Phytol*, 2008, 178(3): 473-485
- [2] Horna S J, Estevez M M, Nielsen H K. Biogas production and saccharification of *Salix* pretreated at different steam explosion conditions [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 7932-7936
- [3] 孙健, 陈砾, 王红林. 纤维素原料生产燃料酒精的技术现状[J]. *可再生能源*, 2003(6): 5-9
- [4] 张荣成, 李秀金. 作物秸秆能源转化技术研究进展[J]. *现代化工*, 2005, 25(6): 14-17
- [5] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. *环境科学*, 2002, 23(3): 36-39
- [6] Haruta S, Cui Z J, Huang Z. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(4/5): 529-534
- [7] Wang X J, Yuan X F, Wang H. Characteristics and community diversity of a wheat straw-colonizing microbial community [J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(40): 7853-7861
- [8] Lednická D, Mergaert J, Cnockaert M C. Isolation and identification of cellulolytic bacteria involved in the degradation of natural cellulosic fibres [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2000, 23(2): 292-299
- [9] Mullings R, Parish J H. Mesophilic aerobic Gram negative cellulose degrading bacteria from aquatic habitats and soils [J]. *J Appl Bacteriol*, 1984, 57(3): 455-468
- [10] Wen B T, Yuan X F, Cao Y Z. Optimization of liquid fermentation of microbial consortium WSD-5 followed by saccharification and acidification of wheat straw [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 118: 141-149
- [11] Gaunt D M, Trinci A P J, Lynch J M. Metal ion composition and physiology of *Trichoderma reesei* grown on a chemically defined medium prepared in two different ways [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1984, 83(4): 575-581
- [12] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure Appl Chem*, 1987, 59(2): 257-268
- [13] Beukes N, Pletschke B I. Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus cellulosome*-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 264(2): 226-231
- [14] Updegraff D M. Semimicro determination of cellulose in biological materials [J]. *Anal biochem*, 1969, 32(3): 420-424
- [15] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- [16] Parawira W, Murto M, Read J S. Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste [J]. *Process Biochem*, 2005, 40(9): 2945-2952
- [17] Lv Z W, Yang J S, Wang E. Characterization of extracellular and substrate-bound cellulases from a mesophilic sugarcane bagasse-degrading microbial community [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(12): 1467-1472

责任编辑: 袁文业