

文章编号: 1673 1689(2011)01-0106-07

响应面法优化康宁木霉产纤维素酶固态发酵培养基

陈晓萍^{1,2}, 孙付保^{1,2}, 陈晓旭^{1,2}, 张建华^{1,2}, 张宏建^{1,2}, 毛忠贵^{* 1,2}
(江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 采用响应面法试验设计, 对康宁木霉(*Trichoderma konigii*) 固态发酵玉米皮生产纤维素酶的条件进行了优化, 并建立了纤维素酶随麸皮添加量、物料初始水分质量分数和 pH 值变化的二次回归方程。利用该方程探讨了各因子对纤维素酶的影响。结果表明, 各因子对纤维素酶的影响顺序为: 物料初始水分质量分数 > 麸皮添加量 > pH 值, 各因子间交互作用不显著。结合单因素实验, 最终确定适宜的发酵条件为: 麸皮添加量 24.4 g/dL; 营养液添加量: 1.0 g/dL 硫酸铵, 0.05 g/dL 磷酸二氢钾, 0.1 g/dL 硫酸镁, 0.2 g/dL 乳糖; 初始水分质量分数 58.6%; pH 5.5。在此条件下发酵 120 h, 滤纸酶活达到 11.3 IU/g, 较未优化前提高了 2.9 倍。

关键词: 康宁木霉; 固态发酵; 纤维素酶; 响应面法; 培养基优化

中图分类号: S 816.35

文献标识码: A

Optimization of *Trichoderma konigii* Cellulase Production on Solid-State Fermentation Medium by Response Surface Analysis

CHEN Xiao-ping^{1,2}, SUN Fu-bao^{1,2}, CHEN Xiao-xu^{1,2}, ZHANG Jian-hua^{1,2},
ZHANG Hong-jian^{1,2}, MAO Zhong-gui^{* 1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Corn bran was used as the substrate for cellulase production using *Trichoderma konigii* to achieve its high value utilization, and the nutritional and environmental conditions were optimized for enhancing cellulase yield. Such key parameters as wheat bran addition, initial moisture content and pH were optimized by Box Behnken experimental design. Experimental results showed that the impact order of three key parameters on cellulase production were listed as follows: initial moisture content > wheat bran addition > pH, while the dependence between three factors was not significant. Predicted results indicated that cellulase production was high up to 11.3 FPAase units / g dry substrate after the fermentation of 5 days with 24.4% of wheat bran addition, 1.0% of ammonium sulfate, 0.05% of potassium dihydrogen phosphate, 0.1% of magnesium sulfate, 0.2% of lactose, 58.6% of the initial water content and pH 5.5.

Key words: *Trichoderma konigii*, solid state fermentation, cellulase, response surface analysis, medium optimization

收稿日期: 2010-03-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(20906041)。

* 通信作者: 毛忠贵(1954-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物资源高值化和清洁生产研究。Email: maozg@vip.163.com

中国玉米年产量位于美国之后,居世界第二位,玉米深加工的副产品——玉米种皮年产量达 2 000 万 t。玉米种皮作为膳食纤维原料,含有比麦麸和米糠更丰富的总纤维(纤维素和半纤维素)^[1],它的开发利用主要集中在食品^[2]以及功能性物质^[3-4]提取等方面。在饲料工业,由于玉米皮本身复杂的化学组成和不均一的结构,导致难以被动物直接消化吸收,而且玉米皮本身的适口性和营养性很差,因而玉米皮在饲料行业未能得到有效利用。针对此问题,作者提出了微生物固态发酵玉米皮产纤维素酶的新思路,这是因为:第一,在发酵过程中,微生物发酵产生的纤维素酶可使纤维水解成单糖后被微生物利用转化为蛋白质;第二,纤维素酶作为一种非消化性酶能帮助动物利用原本无法利用或利用率极低的物质^[5],分解植物细胞壁,促进营养物质的消化吸收;消除饲料中的抗营养因子,提高饲料转化率,减少环境污染。其中,真菌纤维素酶产量高、活性大^[6-9],在畜牧业和饲料工业中有着极其广泛的应用。

基于此,作者以成本低廉、来源丰富的玉米皮作为原料,采用微生物固态发酵方式生产纤维素酶,并利用响应面实验设计^[10-15]优化产酶的最优培养基配比,希望能为低成本利用生物质资源技术提供更有利的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与菌株

1.1.1 实验原料 玉米皮:山东菱花味精厂提供。

1.1.2 实验菌株 康宁木霉(*Trichoderma konigii*) 30167:购自中国农业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 实验方法

1.2.1 康宁木霉产酶的生长曲线 以初始发酵培养配制,每隔 24 h 取样,测定滤纸酶活和还原糖质量浓度,绘制生长曲线。

1.2.2 康宁木霉固态发酵工艺的单因子实验 分别以麸皮添加量、硫酸铵添加量、乳糖添加量、硫酸镁添加量、磷酸二氢钾添加量、水分质量分数、pH 值等 7 个单因子来考察其对纤维素酶产量的影响。

1.2.3 响应面法优化发酵工艺 综合单因素实验结果,根据 Box-Behnken 中心组成设计原理,设计了三因素三水平的响应面分析(RSA)实验,实验因子和水平见表 1。

1.3 测定方法

1.3.1 孢子菌悬液制备^[16] 从斜面刮几环孢子接入盛有玻璃珠的无菌水中,振荡打散孢子,用血球

计数板法^[17]计数并调整孢子浓度。

表 1 实验设计因素水平表

因素	水平		
	- 1	0	1
X_1 麸皮/(g/dL)	10	20	30
X_2 水分质量分数/%	50	60	70
X_3 pH 值	4.5	5	5.5

1.3.2 酶活力测定方法

1) 粗酶液制备^[18]:称取培养适当的固体曲 1 g,溶于 9 mL、pH 4.8 的乙酸缓冲液中,40 ℃浸提 1 h,其间摇晃 3~5 次。浸提完毕后,3 000 r/min 离心 5 min,上清液即为用于测定的粗酶液。

2) 酶活单位的定义^[19]:50 ℃下,每毫升酶液(或每克绝干曲)每分钟水解底物生成 1 μmol 还原糖所对应的酶活定义为 1 个酶活单位(IU)。

3) 滤纸酶活(FPA)的测定:于试管中加 pH 4.8 乙酸缓冲液 1.5 mL,再加入卷曲的滤纸条(1 cm×6 cm)一张,50 ℃预热 5 min 后,在试管中加入 0.5 mL 酶液,50 ℃保温 60 min。反应完毕后,加入 1.5 mL DNS 试剂以终止其反应,沸水浴 5 min 后用流水冷却至室温,定容至 10 mL。在 540 nm 处测定吸光值,并从葡萄糖标准曲线查出相应的葡萄糖质量浓度,折算成酶单位。

2 结果与讨论

2.1 康宁木霉产纤维素酶生长曲线

向固态培养基中接种康宁木霉孢子悬液,搅拌均匀后培养,因为 FPA 法操作步骤简单,成本低,而且较 CMCase 精确度高。研究表明,可用 FPA 法所测的酶活性代表纤维素酶活性,因此选择 FPA 为研究目标^[20]。每 24 h 取出固体发酵培养基,测定滤纸酶活和还原糖质量浓度,结果见图 1。

由图 1 可知,在 40 h 以内,酶的分泌量很小,而此时培养基内只有白色菌丝体;当培养时间达到 48 h 时,酶的分泌量开始迅速增加,培养基中开始有绿色的孢子产生;当培养到 72 h 时,培养基中的孢子逐渐增多,继续培养时,白色菌丝全部转化成绿色的孢子,滤纸酶活也逐渐升高,因此选择发酵时间为 5 d。在 72 h 时,还原糖的质量浓度最高。这是因为发酵初期,康宁木霉分解玉米皮产生的糖大于利用的糖,而过了 72 h 后,利用的糖大于分解的糖,所以还原糖质量浓度下降。

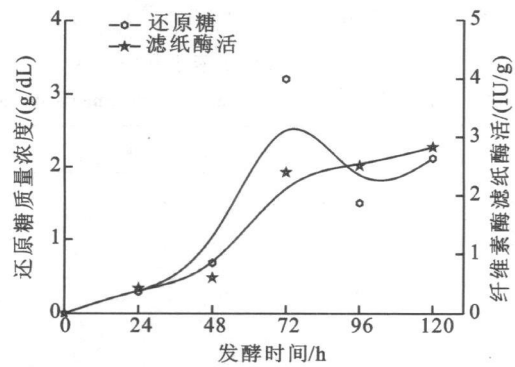


图 1 发酵时间对产酶的影响

Fig. 1 Effect of different fermentation time on cellulase production

2 2 康宁木霉发酵产酶过程中的单因子影响

通过单因素实验来考察固态发酵培养基的一些关键参数,如:麸皮添加量、硫酸铵、乳糖、硫酸镁和磷酸二氢钾添加量、水分质量分数和初始 pH 值对康宁木霉发酵产酶的影响。

2 2 1 麸皮添加量对康宁木霉产酶的影响 以玉米皮和麸皮混合物作为实验材料,调节麸皮所占比例为 0、10、20、30、40 g/dL,实验结果见图 2。实验表明,当麸皮添加量为 20 g/dL 时,滤纸酶活最高,虽然麸皮作为粗纤维原料诱导纤维素酶的产生,并为纤维素酶的产生提供必要的营养因子,但是过高的麸皮含量同样会导致纤维素酶活的下降。这可能是因为麸皮质量浓度过高,培养基的蓬松度下降,从而导致通风量的下降阻遏了纤维素酶的产生,这与陈和秀^[21]和袁宏伟^[22]研究纤维素酶的产酶情况一致,因此选择麸皮的添加量为 20 g/dL。

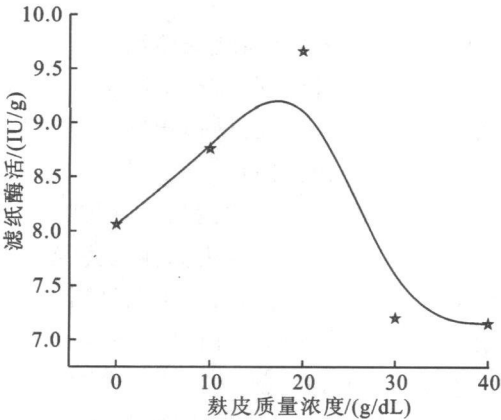


图 2 麸皮质量浓度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of wheat bran addition on cellulase production

2 2 2 硫酸铵质量浓度对康宁木霉产酶的影响

将硫酸铵配制成不同质量浓度的溶液加入发酵培养基中进行单因素实验,结果见图 3。硫酸铵的质量浓度从 0 增加到 1 g/dL 时,滤纸酶活呈上升趋势

势,说明微生物利用氮源来合成酶;但当硫酸铵质量浓度超过 1.0 g/dL 时,酶活急剧下降,这可能是由于玉米皮中本身的氮源比较丰富,外加氮源过多导致碳氮比失调,使菌体生长过慢,不利于产酶。可见,控制适宜的氮源是必须的,实验中选择硫酸铵添加量为 1.0 g/dL。

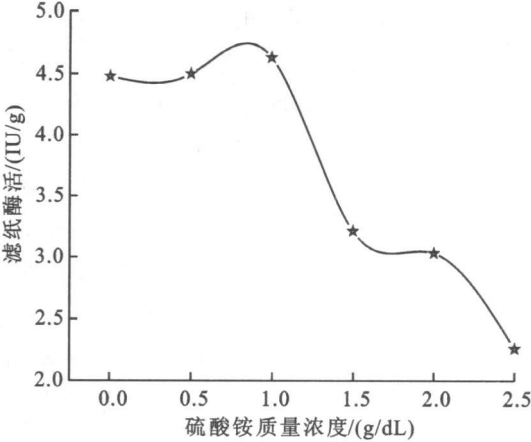


图 3 硫酸铵质量浓度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of different $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on cellulase production

2 2 3 乳糖质量浓度对康宁木霉产酶的影响 调节发酵培养基中乳糖质量浓度分别至 0、0.1、0.2、0.4 g/dL,其它条件不变,结果见图 4。在乳糖质量浓度小于 0.2 g/dL 时,随着添加的增大,诱导作用显著增强;在质量浓度为 0.2 g/dL 时,产酶最高,达到 8.7 IU/g,为对照组的 1.5 倍;当添加质量浓度超过 0.2 g/dL 时,继续提高乳糖的质量浓度并不能增强其诱导能力,反而使酶活下降,可能是由于乳糖过多对微生物产生反馈抑制。因此选择乳糖的最适添加量为 0.2 g/dL。

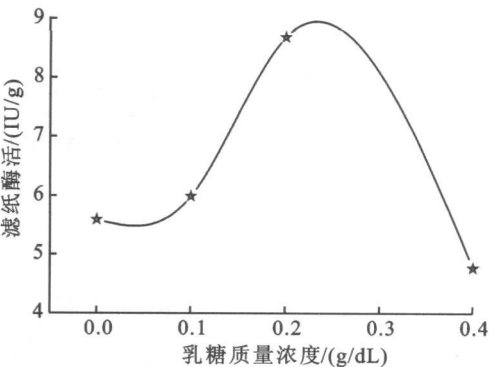


图 4 乳糖质量浓度对产酶的诱导作用

Fig. 4 Effect of the lactose concentration on cellulase production

2 2 4 硫酸镁质量浓度对康宁木霉产纤维素酶的影响

调节发酵培养基中硫酸镁添加质量浓度分别至 0、0.05、0.1、0.2、0.3 g/dL,其它条件不变,结

果见图 5。在 0.1 g/dL 范围内,随着镁离子质量浓度的增加,纤维素酶逐渐上升,当硫酸镁的质量浓度为 0.1 g/dL 时,滤纸酶活为 9 IU/g,是对照组的 1.2 倍,这是因为镁离子在各种酶的合成代谢中都发挥着重要作用;当硫酸镁质量浓度超过 0.2 g/dL 后,继续提高质量浓度并不能增强酶的活性。因此选择硫酸镁的质量浓度为 0.1 g/dL。

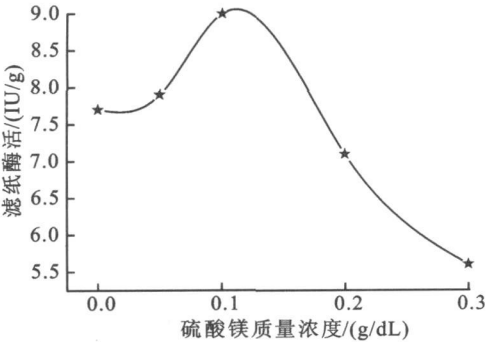


图 5 硫酸镁添加量对产酶的诱导作用

Fig. 5 Effects of the MgSO_4 concentration on cellulase production

2.2.5 磷酸二氢钾质量浓度对康宁木霉产酶的影响 磷元素在细胞壁中也大量存在,在微生物的能量代谢方面发挥着很大的作用^[23],而通常微生物对磷元素的需求来自于无机的 PO_4^{3-} ; K^+ 是细胞中重要的无机阳离子,它是糖代谢中某些酶的重要辅助因子,并且参与许多输送过程。作者通过调节无机营养液中磷酸二氢钾的质量浓度(0、0.05、0.1、0.2、0.3 g/dL) 试图确定最佳的磷酸二氢钾的添加量,结果见图 6。当磷酸二氢钾添加量为 0.05 g/dL 时,滤纸酶活最高为 8.1 IU/g,是对照组的 1.1 倍,再增加磷酸二氢钾的质量浓度却并不能提高酶活,这可能是因为玉米皮中含有较丰富营养物质,因此选择磷酸二氢钾的最适质量浓度为 0.05 g/dL。

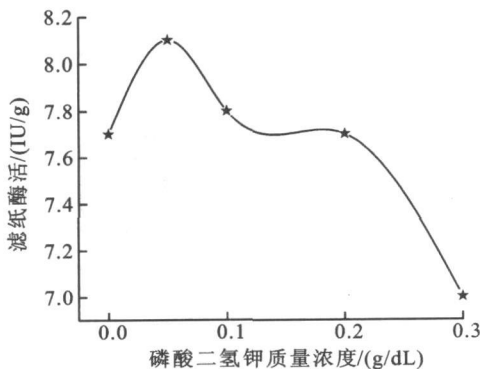


图 6 KH_2PO_4 质量浓度对产酶的影响

Fig. 6 Effects of the KH_2PO_4 concentration on cellulase production

2.2.6 含水量对康宁木霉产酶的影响 固态发酵

中,培养基内的水分含量决定着微生物对营养成分的利用情况,因此含水量对微生物的生长和酶合成至关重要。通过固定固体料用量,分别加入不同体积营养液(保证相同的无机盐含量)以达到不同的初始含水量,结果见图 7。利于康宁木霉产酶的最适含水量为 60% 左右,类似现象和王菁莎^[24]等报道相一致,他们认为水分太多,透气性下降,氧气供给不足,菌丝体生长前期延长,形成孢子时间延长,使纤维素酶活力下降;而水分太少,菌丝体前期生长良好,但菌丝体后期生长需水分即营养供应不足,也使酶活力下降。因此,作者选择 60% 作为培养基适宜的初始水分质量分数。

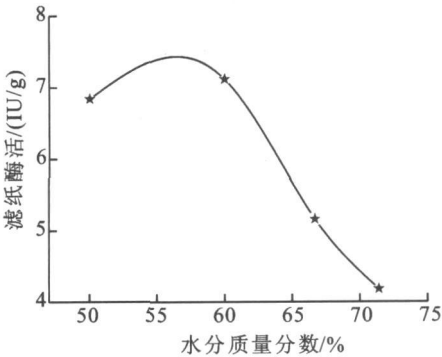


图 7 水分质量分数对产酶的影响

Fig. 7 Effects of the water concentration on cellulase production

2.2.7 初始 pH 值对康宁木霉产酶的影响 培养基环境中 pH 值是影响纤维素酶合成的重要因素之一。由于麸皮和玉米芯具有较大的缓冲作用,如选用缓冲液来改变培养基的初始 pH 值,会有很大误差,且改变了培养基中盐的质量浓度^[13]。选择在营养盐中滴加不同量的 HCl 或 NaOH 来改变其初始 pH 值,将所加营养盐溶液配成 7 个梯度(pH 3.0~6.0) 进行发酵,结果见图 8。在 pH 3.0~5.0 范围内,纤维素酶活逐渐上升,且在 pH 5.0 时,酶活到达最高,为 11.4 IU/g,因此确定培养基的最适宜 pH 5.0。

2.3 中心组合实验

通过上述单因素实验能够确定单个发酵条件对康宁木霉产酶的影响,但不能确定各个因素之间的浓度水平以及各因素之间的交互作用,采用中心组合实验设计(CCD) 进一步优化发酵玉米皮最优条件。作者采用 3 因素 3 水平的中心组合实验设计,将麸皮添加量、含水量和初始 pH 值重新编码和进行水平标注,见表 2。不同因素组合条件下对应的响应值在表 3 中给出,其中 13、14 次实验为中心点重复实验,用于考察模型的误差。

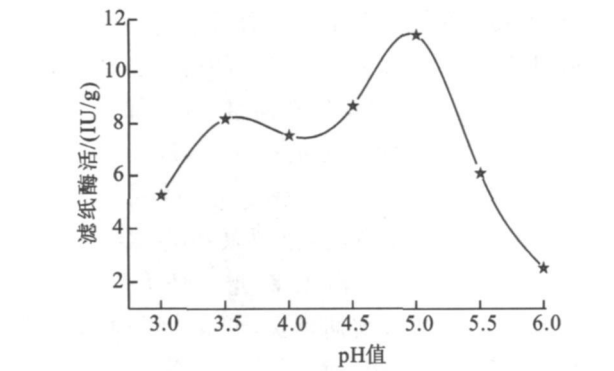


图 8 初始 pH 值对产酶的影响

Fig.8 Effects of different initial pH on cellulase production

表 2 Box Behnken 实验设计及结果

Tab.2 Box Behnken experiments design matrix with experiment values

编号	X_1	X_2	X_3	滤纸酶活/ (IU/g)
1	0	-1	-1	11.9
2	0	-1	1	9.5
3	0	1	-1	6.6
4	0	1	1	6.4
5	-1	0	-1	7.0
6	-1	0	1	5.9
7	1	0	-1	7.0
8	1	0	1	11.8
9	-1	-1	0	3.4
10	-1	1	0	2.2
11	1	-1	0	8.8
12	1	1	0	3.0
13	0	0	0	11.5
14	0	0	0	12.1

由表 2 可知, 滤纸酶活的最小值是 2.2 IU/g, 而最大值是 12.1 IU/g, 这些结果说明所选的因素对滤纸酶活的产量影响很明显。

而由表 3 知, F 值为 11.96, $Pr = 0.0146 < 0.05$, 表明此模型是显著的。

说明回归方程的拟合程度较好, 其全变量二次回归方程为:

$$Y = 11.80 + 1.51X_1 - 1.93X_2 + 0.14X_3 - 1.15X_1X_2 + 1.48X_1X_3 + 0.55X_2X_3 - 4.06X_1^2 - 3.39X_2^2 + 0.19X_3^2$$

该方程表达了康宁木霉发酵产纤维素酶所选的 3 个自变量之间的线性关系是显著的, 即这种实验方法是可靠的。其中 X_1 和 X_3 的回归系数为正值, 均可使 Y 线性增加; X_1 、 X_2 、 X_1^2 和 X_2^2 对 Y 的

影响是极显著的($p < 0.01$); 但交互作用均不显著($p > 0.05$)。响应面分析见图 9。

表 3 回归方程各项的方差分析

Tab.3 Analysis of variance for the response surface quadratic model

方差来源	方差	自由度	均差	F 值	$Pr > F$	
模型	145.22	9	16.135 28	11.957 59	0.014 6	显著
X_1	18.30	1	18.301 25	13.562 76	0.021 2	
X_2	29.65	1	29.645	21.969 43	0.009 4	
X_3	0.15	1	0.151 25	0.112 09	0.754 6	
X_1X_2	5.29	1	5.29	3.920 33	0.118 8	
X_1X_3	8.70	1	8.702 5	6.449 28	0.064 0	
X_2X_3	1.21	1	1.21	0.896 71	0.397 3	
X_1^2	52.81	1	52.812 5	39.138 49	0.003 3	
X_2^2	36.72	1	36.720 5	27.212 97	0.006 4	
X_3^2	0.11	1	0.112 5	0.083 37	0.787 1	
误差	5.40	4	1.349 375			

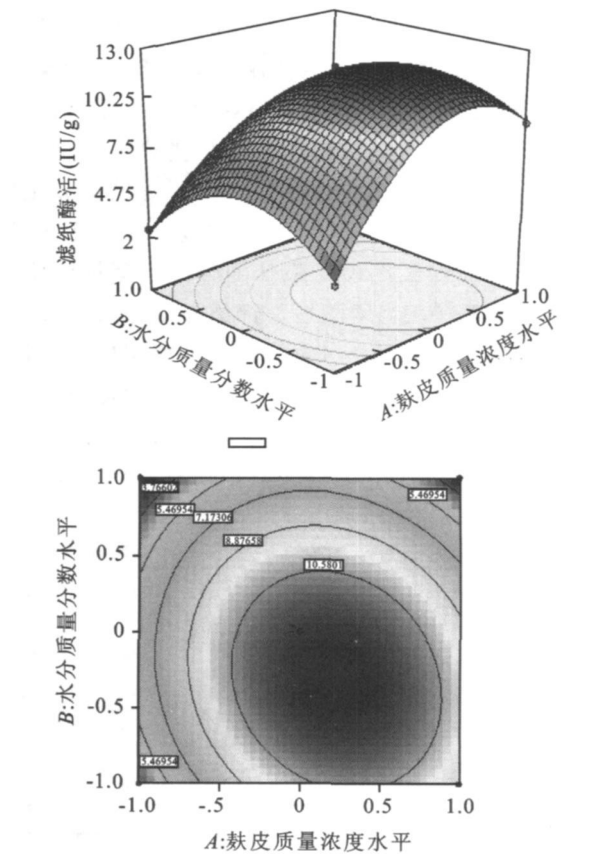


图 9 产量的响应面及等高线

Fig.9 Response surface and contour plot of the cellulase production

经典型性分析得到康宁木霉产酶最优条件为: 麸皮添加量 24.4 g/dL, 初始物料水分质量分数

58.6%, 发酵初始 pH = 5.5, 在此条件下重复 3 次取平均值, 最终得到的滤纸酶活为 13.1 IU/g, 是优化前纤维素酶活的 4.5 倍。而王菁莎^[24] 同样采用康宁木霉固态发酵法优化秸秆产纤维素酶, 其酶活仅为 2.9 IU/ml; 李素波^[25] 采用诱变后的康宁木霉发酵秸秆, 滤纸酶活最高可达到 69 U/g, 证明菌种诱变对提高滤纸酶活具有较大的作用。经优化后的培养基产纤维素酶有了较大幅度的提高, 但距最高水平相比还有一定的差距, 这可能是因为本实验采用的菌种并未诱变, 因此若想获得更高的纤维素酶活, 可在菌种改造方面进一步探索。

3 结 语

玉米皮为玉米种子的副产物, 具有较秸秆类纤

维质相对丰富的营养价值, 且具有成本低、来源广等特点, 是一种生产畜牧饲料的重要发酵碳源。作者在单因素的基础上用中心组合设计对康宁木霉发酵玉米皮的工艺进行优化, 根据实验数据拟合得到发酵产酶的理论模型, 并在此模型下重复验证。结合模型和实验得到优化工艺为: 麸皮添加量为 24.4 g/dL, 营养液添加量为 1.0 g/dL 硫酸铵, 0.05 g/dL 磷酸二氢钾, 0.1 g/dL 硫酸镁, 0.2 g/dL 乳糖, 初始水分质量分数 58.6%, pH 5.5, 发酵时间 5 d。在此条件下, 得到了较高的纤维素酶活力值产品。

参考文献(References):

- [1] 胡叶碧, 王璋. 纤维素酶和木聚糖酶对玉米皮膳食纤维组成和功能特性的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 103-105.
HU Ye bi, WANG Zhang. The effect of cellulose and xylanase hydrolysis on the composition and functional properties of corn bran dietary fibers[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2006, 27(11): 103-105. (in Chinese)
- [2] 王战勇, 苏婷婷, 胡珍珠. 双酶法制备玉米皮膳食纤维的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(1): 37-39.
WANG Zhan yong, SU Ting ting, HU Zhen zhu. Study of preparation corn bran dietary fiber by two enzyme method[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**, 2009, 31(1): 37-39. (in Chinese)
- [3] 李志洲, 刘军海. 微波法从玉米皮中提取肌醇的条件研究[J]. 中国饲料, 2009, 12: 40-41.
LI Zhi zhou, LIU Jun hai. Study on preparation of inositol hydrolysed from corn hull by microwave[J]. **China Feed**, 2009, 12: 40-41. (in Chinese)
- [4] 陈红, 王秀娟, 李侠, 等. 微波辅助提取玉米皮中黄色素及其稳定性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 57-61.
CHEN Hong, WANG Xiu juan, LI Xia, et al. Microwave assisted extraction and stabilization of yellow pigment from corn bran[J]. **Food Science**, 2009, 30(14): 57-61. (in Chinese)
- [5] 刘亚力, 刘宁. 饲用酶制剂生产技术研究及其应用[J]. 畜禽业, 1999(8): 21-24.
LIU Ya li, LIU Ning. Research and application of production technique of enzyme preparations for feed use[J]. **Livestock and Poultry Industry**, 1999(8): 21-24. (in Chinese)
- [6] 钟发刚, 王新华. 饲用纤维素酶研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2002, 14(5): 308-309.
ZHONG Fa gang, WANG Xiu hua. Progress of the cellulose for feed use[J]. **Chinese Journal of Microbiology**, 2002, 14(5): 308-309. (in Chinese)
- [7] Camassola M, Dillon A J P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*[J]. **Industrial Crops and Products**, 2009, 29(2-3): 642-647.
- [8] Kalogeris E, Iniotaki F, Topakas E, et al. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw[J]. **Bioresour Technology**, 2003, 86(3): S960-S9524.
- [9] Alam M Z, Mahmat M E, Muhammad N, et al. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2007, 46: 61-64.
- [10] HAO Xue cai, YU Xiao bin, YAN Zhong li. Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology[J]. **Food Technology and Biotechnology**, 2006, 44(1): 89-94.
- [11] Prakash Gvsb, Padmaja V, Kiran Rrs. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation[J]. **Bioresour Technology**, 2008, 99(6): 1530-1537.
- [12] 艾斌凌, 王义强, 陈介南. 麸皮对里氏木霉 *Rut C-30* 产纤维素酶的促进作用[J]. 生物质化学工程, 2009, 43(2): 27

- 32.

- AI Bir ling, WANG Yi qiang, CHEN Jie nan. Enhancement of bran to cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut G 30[J]. **Biomass Chemical Engineering**, 2009, 43(2): 27- 32. (in Chinese)
- [13] 邬敏辰, 符丹丹, 谢慧. 宇佐美曲霉产木聚糖酶的固态发酵条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 50- 53.
WU Min chen, FU Dan dan, XIE Hui. Solid fermentation for xylanase production by *Aspergillus usamii*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2005, 31(4): 50- 53. (in Chinese)
- [14] Rocky salimi K, Hamidi esfahani I. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology[J]. **Food and Bioproducts Processing**, 2010, 88: 61- 66.
- [15] 李亚萍, 程卫东, 詹萍, 等. 响应面法优化微波辅助提取 β -胡萝卜素工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 487- 491.
LI Ya ping, CHENG Wei dong, ZHAN Ping, et al. Optimization for microwave assisted extraction of β -carotene by response surface method[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 487- 491. (in Chinese)
- [16] Khanahmadi M, Roostaazad R, Mitchell D A, et al. Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed bed solid state fermentation[J]. **Chemical Engineering Science**, 2006, 61(17): 5654- 5663.
- [17] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 220- 222.
- [18] 董义伟, 李大平, 田崇民, 等. 纤维素酶的固态发酵及酶学性质的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 393- 395, 409.
DONG Yi wei, LI Da ping, TIAN Chong min, et al. Studies on the solid state fermentation and enzyme character of cellulase[J]. **Natural Product Research and Development**, 2007, 19: 393- 395, 409. (in Chinese)
- [19] Mekala N K, Singhanian R R, Sukumaran R K, et al. Cellulase production under solid state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2008, 151: 122- 131.
- [20] 乔君毅, 亢晋, 张福元, 等. 黑曲霉发酵玉米秸秆产纤维素酶的研究[J]. 饲料研究, 2008, 12: 63- 66.
QIAO Jun yi, KANG Jin, ZHANG Fu yuan, et al. Study on cellulase production by fermenting corn stalk with *A. niger* [J]. **Feed Research**, 2008, 12: 63- 66. (in Chinese)
- [21] 陈和秀, 龙敏南, 徐方成, 等. 木聚糖酶生产菌株的筛选及产酶条件的优化[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(11): 41- 44.
CHEN He xiu, LONG Min nan, XU Fang cheng, et al. Screening and condition optimization of a xylanase producing strain[J]. **China Biotechnology**, 2007, 27(11): 41- 44. (in Chinese)
- [22] 袁宏伟, 黄俊生. 棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) 固态发酵产纤维素酶及酶的性质[J]. 饲料工业, 2008, 29(2): 15- 17.
YUAN Hong wei, HUANG Jun sheng. Its characteristic and cellulase from solid state fermentation with *T. asperellum* [J]. **Feed Research**, 2008, 29(2): 15- 17. (in Chinese)
- [23] 陈曦, 赵建国. 混株发酵混合酒糟生产含酶蛋白饲料的研究[J]. 中国酿造. 2006, 5: 30- 33.
CHEN Xi, ZHAO Jian guo. Production of protein feed from a mixture of lees fermented by multi strains[J]. **China Brewing**, 2006, 5: 30- 33. (in Chinese)
- [24] 王菁莎, 王颀, 刘景彬. 康宁木霉固态发酵秸秆生产纤维素酶的研究[J]. 纤维素科学与技术. 2005, 13(4): 26- 31.
WANG Jing sha, WANG Jie, LIU Jing bin. Studies on solid state fermentation for cron stalk by trichoderma koningii producing cellulase[J]. **Journal of Cellulose Science and Technology**, 2005, 13(4): 26- 31. (in Chinese)
- [25] 李素波, 孙智敏, 周剑平, 等. 康宁木霉菌株的诱变选育及固态发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2008(13): 30- 33.
LI Su- bo, SUN Zhi- min, ZHOU Jian- ping, et al. Mutation breeding of *Trichoderma koningii* and optimization of solid- state fermentation conditions[J]. **China Brewing**, 2008(13): 30- 33. (in Chinese)