

张 荣, 奚永兰, 叶小梅, 等. 棘孢木霉 1285 对麦秸的降解及厌氧发酵的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 328-333.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.017

## 棘孢木霉 1285 对麦秸的降解及厌氧发酵的影响

张 荣<sup>1,2</sup>, 奚永兰<sup>2</sup>, 叶小梅<sup>1,2</sup>, 徐 蓉<sup>2</sup>, 常志州<sup>2</sup>, 李加友<sup>3</sup>, 洪 青<sup>1</sup>, 徐跃定<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014; 3. 嘉兴学院生物与化学工程学院, 浙江 嘉兴 314001)

**摘要:** 为了提高秸秆厌氧发酵产气效率, 本研究以 1 株新分离的秸秆降解菌棘孢木霉(*Trichoderma asperellum* 1285) 对麦秸木质纤维进行生物预处理, 研究 *T. asperellum* 1285 对麦秸木质纤维的降解效果, 并确定最佳的生物预处理时间; 随后将生物预处理的秸秆原料用于中温 [(37±1) °C] 厌氧发酵产沼气研究。结果显示: *T. asperellum* 1285 对麦秸的木质纤维具有较好的降解能力, 可有效降解木质素, 保留纤维素并降低干物质损失率, 降解预处理 8 d 时, 木质素损失率比对照组提高了 53.09%, 而干物质损失率、半纤维素损失率、纤维素损失率分别比对照组降低了 55.89%、16.08%、50.91%; 扫描电镜、红外光谱结果进一步证明麦秸经 *T. asperellum* 1285 预处理, 木质素可被有效降解而纤维素保留并暴露在外。将经过 *T. asperellum* 1285 生物预处理 8 d 后的麦秸用于中温厌氧消化产沼气, 总产气量和总产甲烷量分别为 (14 774.30±216.56) ml、(7 638.90±165.36) ml, 较未经过生物预处理的对照组分别提高 14.05%、16.01%。表明麦秸经 *T. asperellum* 1285 预处理可有效提高麦秸厌氧发酵产气效率。

**关键词:** 棘孢木霉; 生物预处理; 厌氧发酵; 甲烷

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0328-06

## Degradation and anaerobic fermentation of wheat straw affected by *Trichoderma asperellum* 1285

ZHANG Rong<sup>1,2</sup>, XI Yong-lan<sup>2</sup>, YE Xiao-mei<sup>1,2</sup>, XU Rong<sup>2</sup>, CHANG Zhi-zhou<sup>2</sup>, LI Jia-you<sup>3</sup>, HONG Qing<sup>1</sup>, XU Yue-ding<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Agricultural Resource and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. College of Biological, Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China)

**Abstract:** To improve the biogas production efficiency of straw in anaerobic fermentation, wheat straw was pretreated with *Trichoderma asperellum* 1285, a newly isolated strain degrading wheat straw. The time of pretreatment for wheat straw by the strain was determined, and the effect of pretreated wheat straw on anaerobic fermentation at mesophilic temperature [(37±1) °C] was investigated. *T. asperellum* 1285 showed strong degradation abilities for the lignocelluloses of wheat

straw, especially for lignin. Compared with control, the degradation rate of lignin was improved by 53.09%, while the degradation rates of dry matter, hemicelluloses and cellulose were reduced by 55.89%, 16.08% and 50.91%, respectively 8 d after degradation. Scanning electron microscope (SEM) and Fourier transform infrared

收稿日期: 2014-11-12

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(12)1002 ]

作者简介: 张 荣(1989-), 女, 山东临沂人, 硕士, 主要从事农业固体废物资源化利用研究。(Tel) 18761869663; (E-mail) 0309linlin@163.com

通讯作者: 叶小梅, (E-mail) yexiaomei610@126.com

spectroscopy (FTIR) confirmed the effective degradation of lignin and intactly maintained cellulose. Total gas production and methane production of pretreated wheat straw for eight day in anaerobic fermentation were (14 774.30±216.56) ml and (7 638.90±165.36) ml, 14.05 % and 16.01 % higher than those of control. The results indicated that *T. asperellum* 1285 could improve the anaerobic fermentation efficiency of wheat straw.

**Key words:** *Trichoderma asperellum*; biological pretreatment; anaerobic fermentation; methane

秸秆厌氧发酵产沼气是能源化利用的有效手段,可缓解中国能源短缺的危机,更可避免因秸秆处理不当所带来的环境问题<sup>[1]</sup>。秸秆中纤维素、木质素含量高,厌氧发酵转化率低,因此秸秆预处理成为提高秸秆沼气产率的关键技术之一<sup>[2-5]</sup>。目前,常用的秸秆预处理方法有物理法、化学法、生物法<sup>[6]</sup>。相比物理法和化学法,生物法作用条件温和、专一性强、无环境污染、处理成本低<sup>[7-8]</sup>,进而成为秸秆预处理的应用热点。生物降解法是采用降解木质素的微生物在培养过程中可以产生的酶类,从而可以专一性地降解木质素。目前,白腐真菌是秸秆生物预处理应用最为广泛的菌株,如 Tuyen 等<sup>[9]</sup>利用木素白腐菌、香菇、平菇、杏鲍菇等白腐真菌分别预处理玉米秸秆、稻草、油棕榈叶和甘蔗渣,结果表明,平菇、杏鲍菇等白腐真菌对油棕榈叶预处理后总产气量普遍提高了 68%~132%,木素白腐菌和香菇菌对甘蔗渣预处理后总产气量提高了 65%~71%。白腐真菌具有生长速度慢、培养周期长的缺点<sup>[10]</sup>,影响其大规模的工程化应用。木霉以其较快的生长速度优势以及同样分泌秸秆降解酶类从而成为一种较好的秸秆降解菌。但是目前对于木霉的研究应用主要在于生物防治方面<sup>[11-12]</sup>,而将其应用于秸秆预处理的研究少有报道。

本研究利用 1 株从土壤腐殖质中分离筛选的秸秆降解菌棘孢木霉(*T. asperellum* 1285)对麦秸进行生物预处理,通过麦秸干物质和相关木质纤维素的降解情况筛选确定最佳预处理时间,评价其秸秆预处理应用效果,并在此基础上进行厌氧发酵产气试验,以期对秸秆厌氧发酵生物预处理工程化利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

麦秸:取自江苏省农业科学院,风干。总固体含量(TS)87.81%,有机碳含量 51.20%,全氮含量 3.65 g/kg。

菌种:棘孢木霉 1285(*T. asperellum* 1285),土壤腐殖质中分离筛选。

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 15~20 g/L,装瓶量 40%;麸皮培养基:麸皮 20 g,水 10 g,放入 250 ml 三角瓶,搅拌均匀;基础培养基:葡萄糖 40 g/L,蛋白胨 10 g/L,pH 7.0,装瓶量 40%。

厌氧发酵接种物:为江苏省宜兴市坤兴养殖场沼气工程沼渣,总固体含量(TS)1.01%,挥发性固体含量(VS)0.44%,pH 7.56。

### 1.2 试验设计

1.2.1 *T. asperellum*1285 对麦秸木质纤维素的降解 接种 4 块直径 6 mm 菌龄 3 d 的 PDA 菌丝块至麸皮培养基,28℃恒温培养 3 d。

取自然风干、粉碎至 1~2 cm 麦秸 30 g,以尿素调节碳氮比为 30:1,调节含水率至 75%。以 0.1%~0.2%(干质量计)的接种量接种麸皮菌,混合均匀后密封,室温下静置培养,分别于 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d 破坏性取样,测定干物质、纤维素、半纤维素、木质素的损失率。以未经 *T. asperellum* 1285 预处理的麦秸设置对照。

1.2.2 麦秸降解后的厌氧发酵 厌氧发酵总反应容积 1 L,有效反应容积 800 ml。取经上述预处理 8 d 后的总固体含量为 40 g 的发酵原料,加入接种活性污泥 600 g,加水调整发酵物总质量至 800 g。密封后,于(37±1)℃下进行厌氧发酵,气体收集瓶为 1 L,以排水法收集气体,通过测定排出水的体积获得沼气产量。对照处理为未经 *T. asperellum* 1285 预处理的麦秸。同时设置活性污泥为空白对照,以扣除接种活性污泥本身产气量。每个处理重复 3 次。

1.2.3 项目测定及方法 采用范氏(Van Soest)洗涤纤维分析法<sup>[13]</sup>测定纤维素、半纤维素和木质素;干物质的测定采用 105℃烘 24 h 差质量法<sup>[14]</sup>;Nicolet iS10(美国 rmo Scientific 公司)用于麦秸红外光谱分析;日立 S-4800 对预处理后麦秸扫描电镜观

察;以排水集气法收集气体<sup>[15]</sup>,每日测定产气量;GC-9890A 气相色谱仪分析沼气中甲烷含量(TCD 检测器)。

1.2.4 数据整理与统计 所有数据均采用 Excel 2010、OriginPro 8 软件进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *T. asperellum* 1285 预处理对麦秸的降解

2.1.1 麦秸木质素、纤维素的降解 麦秸经 *T. asperellum* 1285 预处理 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d 后,干物质、半纤维素、纤维素、木质素损失率结果如图 1 所示。麦秸经 *T. asperellum* 1285 降解处理后,干物质(图 1A)、半纤维素(图 1B)、纤维素(图 1C)、木质

素(图 1D)的损失率均随处理时间延长而增加,其中对半纤维素和木质素的降解较为明显,接种 10 d 后,半纤维素和木质素的损失率分别为  $23.22\% \pm 0.56\%$ 、 $18.01\% \pm 0.89\%$ ,均高于对照组;*T. asperellum* 1285 对麦秸纤维素的降解效率较低,接种 10 d 后损失率仅为  $10.45\% \pm 0.42\%$ ,远低于对照组;而此时干物质损失率仅为  $10.10\% \pm 0.50\%$ 。综合分析,*T. asperellum* 1285 对麦秸预处理 8 d 效果最佳,木质素损失率为  $14.13\% \pm 0.72\%$ ,高于对照组,而干物质、纤维素、半纤维素损失率分别为  $6.13\% \pm 0.32\%$ 、 $9.94\% \pm 0.53\%$ 、 $18.58\% \pm 0.73\%$ ,低于对照组,从而保留更多的有效物质用于后期厌氧发酵,提高产气效率。

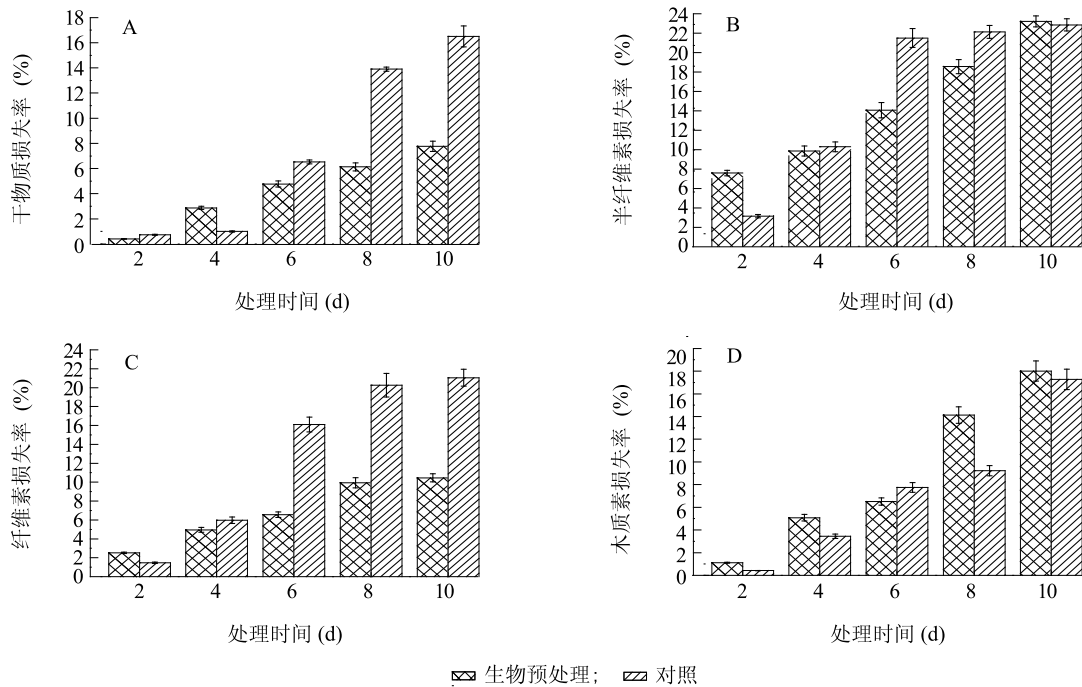
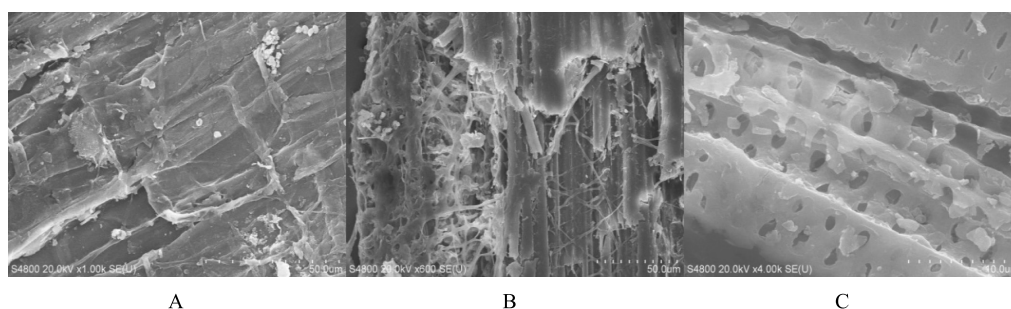


图 1 麦秸生物预处理后干物质、半纤维素、纤维素和木质素损失率

Fig. 1 Loss rates of total dry matter, hemicellulose, cellulose and lignin of bio-pretreated wheat straw

2.1.2 麦秸扫描电镜结果 麦秸经 *T. asperellum* 1285 预处理 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d 后,选取预处理效果较佳的 8 d 预处理后的麦秸进行扫描电镜分析,结果(图 2)显示,麦秸经 8 d 预处理,对照组(图 2A)麦秸表面光滑平整,结构完好,未出现较明显的破坏;而生物预处理组(图 2B)发现, *T. asperellum* 1285 通过分泌胶质使自身固着在麦秸表面,从而对麦秸进行降解。并且麦秸经生物降

解 8 d 后表面固型结构明显破坏,暴露出内部排列整齐、紧密的纤维素束状结构(图 2B);进一步放大至 4 000 倍可明显看出降解后的秸秆碎片纤维素骨架出现空洞(图 2C)。因此 *T. asperellum* 1285 在对麦秸的预处理过程中可以有效降解其表面物质,同时酶可进入秸秆内部催化降解,从而增大了厌氧发酵过程中秸秆与酶的接触面积,提高厌氧发酵效率。



A:对照;B:*T. asperellum* 1285 预处理麦秸( $\times 600$ );C: *T. asperellum* 1285 预处理麦秸( $\times 4\,000$ )。

图2 麦秸生物预处理后电镜照片

Fig. 2 The SEM photos of bio-pretreated wheat straw

**2.1.3 麦秸红外光谱** 红外光谱可以揭示麦秸在预处理过程中化学结构的变化。在 $3\,320\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,050\text{ cm}^{-1}$ 和 $896\text{ cm}^{-1}$ 主要表征的是O-H、C-O和碳水化合物中 $\beta$ 糖苷键的伸缩振动<sup>[16]</sup>。麦秸经*T. asperellum* 1285 预处理2 d、4 d、6 d、8 d、10 d后,选取预处理效果较佳的8 d预处理后的麦秸进行红外光谱分析,结果(图3)显示,经生物预处理后吸收强度均有所减小,表明麦秸在处理过程中被部分降解。 $1\,380\text{ cm}^{-1}$ 表征纤维素和半纤维素中C-H的非对称变形<sup>[17]</sup>,生物预处理组在此处吸收强度略高于对照,而 $1\,230\text{ cm}^{-1}$ 代表纤维素和半纤维素中C-O-C的伸缩振动,此处生物预处理组与对照无明显差异,这两种峰的出现是由于*T. asperellum* 1285 对半纤维素降解效率与对照组相当而对纤维素的降解效率较低,从而使更多纤维素得以保留的缘故。 $1\,630\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,320\text{ cm}^{-1}$ 代表木质素羰基共轭芳香环振动, $1\,510\text{ cm}^{-1}$ 代表木质素芳香环C=C的伸缩振动<sup>[18]</sup>,生物预处理后这些峰的吸收强度均有所下降,是由于木质素被部分降解的缘故。

## 2.2 麦秸 *T. asperellum* 1285 预处理后厌氧发酵产气特征

麦秸*T. asperellum* 1285 预处理后厌氧发酵产气特性见图4。由图4A可知,生物预处理组最高日产气量(第一次产气高峰)为 $(987.00 \pm 27.87)\text{ ml}$ ,明显高于对照组,而第二次产气高峰 $[(882.33 \pm 20.03)\text{ ml}]$ 更是比对照 $[(749.07 \pm 22.03)\text{ ml}]$ 提高17.79%。累积产气量(图4B)与累积产甲烷量(图4D)方面,生物预处理组自厌氧发酵5 d之后与对照组的差距逐步加大,但是二者变化趋势大致相同,均是发酵初期

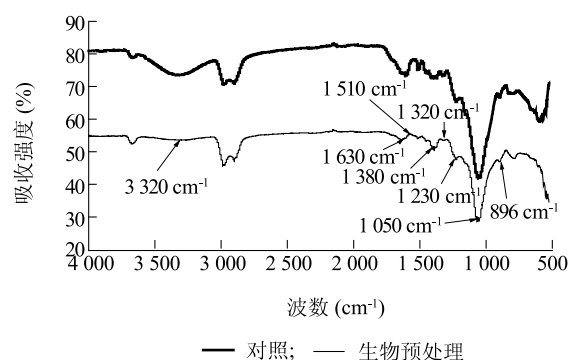


图3 生物预处理后麦秸的红外光谱图

Fig. 3 The FTIR spectra of bio-pretreated wheat straw

累积产气迅速上升,之后缓慢趋于平稳。可知,生物预处理组甲烷含量(图4C)与对照均是最初迅速上升,并经过一段波动之后甲烷含量趋于平稳,均稳定在50%以上,生物预处理组甲烷含量最高达到61.47%,并且连续10 d达到60%以上。表明麦秸经*T. asperellum*1285 生物处理后可有效提高产气量、产甲烷量。

由表1总产气量及相关TS产气量可知,整个发酵周期内,生物预处理组总产气量、总产甲烷量分别达到 $(14\,774.3 \pm 216.56)\text{ ml}$ 、 $(7\,638.90 \pm 165.36)\text{ ml}$ ,比对照组分别提高了14.05%、16.01%;相应的生物预处理TS产气量与TS产甲烷量也明显高于对照组,分别是对照组的1.14倍、1.16倍。因此,麦秸经生物预处理后可有效提高产气量、增加产气效率,提高麦秸生物转化率,这表明*T. asperellum* 1285 在秸秆预处理方面具有一定价值。



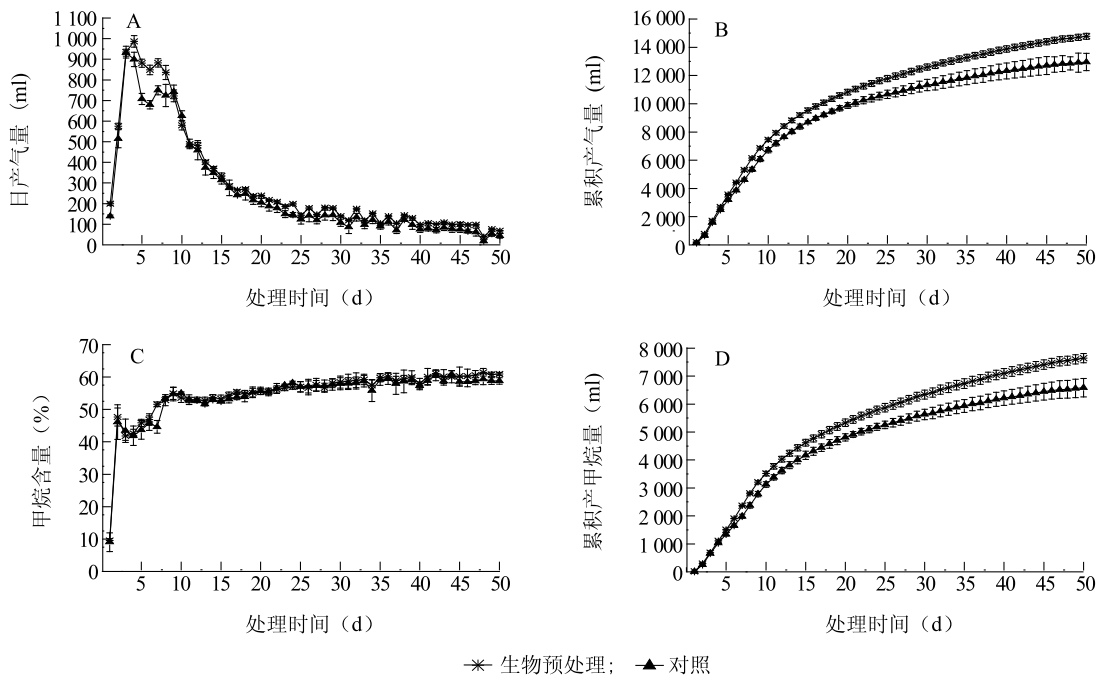


图 4 麦秸生物预处理后厌氧发酵产气特性

Fig.4 Gas production of wheat straw in anaerobic fermentation

表 1 麦秸生物预处理后厌氧发酵总产气量

Table 1 Total gas production of wheat straw in anaerobic fermentation

处 理	总产气量 (ml)	总固体 (TS) 产气量 (ml/g)	总产甲烷量 (ml)	总固体 (TS) 产甲烷量 (ml/g)
生物预处理	14 774.30±216.56	369.40±5.41	7 638.90±165.36	190.97±4.13
对照	12 954.70±609.91	323.90±12.25	6 585.70±332.91	164.64±10.82

### 3 讨 论

#### 3.1 *T. asperellum*1285 对麦秸木质纤维素的降解

由于纤维素易与半纤维素、木质素等难分解的物质相复合,利用纤维素之前,必须把它从木质素和半纤维素包裹中释放出来,而木质素难于降解,因此,纤维素的分解关键就在于木质素的降解<sup>[19]</sup>。目前,白腐菌几乎成为秸秆木质素降解的模式菌株。张杰等<sup>[20]</sup>利用 1 株新分离的白腐菌接种麦秸固态发酵培养 15 d 后木质素的降解率达到 11.47%。本研究以麦秸为基质,接种 *T. asperellum* 1285 固态培养 10 d 后,木质素降解率可达 18.01%±0.89%,高于张杰等<sup>[20]</sup>对白腐菌的降解研究效果。此外,*T. asperellum*1285 对半纤维素、纤维素也有不同程度的降解,接种 10 d 后,半纤维素和纤维素的降解率分别为 23.22%±0.56%、10.45%±0.42%,干物

质损失率仅为 10.10%±0.50%。由于 *T. asperellum* 1285 对纤维素的降解率不及对照组的 50%,而纤维素作为麦秸比重较大的组分,其损失率的减少必然导致干物质损失率降低。纤维素、半纤维素是厌氧发酵产甲烷最易于被降解转化的物质,秸秆预处理过程中,二者损失率的减少更有利于提高厌氧发酵过程中物质的转化效率。

#### 3.2 麦秸降解后的厌氧发酵

秸秆的生物处理目前被认为是最有前途的处理方法,国内学者针对秸秆生物降解也进行了许多研究。李海红等<sup>[21]</sup>研究了复合菌剂对麦秸的预处理效果,厌氧发酵 TS 产气量大大提高。本研究结果表明,麦秸经 *T. asperellum* 1285 处理 8 d 后,其中难降解的木质素被有效降解,也显著提高了麦秸的厌氧甲烷发酵转化率。范晓娟等<sup>[22]</sup>研究了白腐菌对水葫芦木质纤维素的降解及厌氧发酵的影响,研究发

现,木质素、纤维素含量对单位 TS 产气量影响较大,并呈负相关性。本研究中,麦秸经 *T. asperellum* 1285 预处理后,TS 产气量、TS 产甲烷量分别比对照组提高 14.05%、16.01%,总产气量、总产甲烷量也明显高于对照组,可能是由于木质素被有效降解,纤维素得以保留的缘故。

#### 参考文献:

- [1] 周立霞,黄 冲,潘 一,等. 秸秆制甲烷预处理技术研究进展 [J]. 当代化工, 2013,42 (3): 310-314.
- [2] ZHU X, LI X, YAO Q. Challenges and models in supporting logistics system design for dedicated biomass based bioenergy industry [J]. Bioresource Technology, 2011(2): 1344-1351.
- [3] VILLE C, YOUNG S H, TAYLOR C, et al. Feed stocks for lignocellulosic biofuels [J]. Science, 2010 (5993): 790-792.
- [4] 屈海泳,刘连妹,吴 纯. 木霉菌液体发酵对秸秆的降解作用 [J]. 江苏农业科学, 2014,42(7):283-285.
- [5] 陈 华,廖崇静,冯 珊,等. 酸碱处理提取水稻秸秆纤维素的研究[J]. 江苏农业科学, 2014,42(6):252-254.
- [6] 庞云芝. 基于提高麦秸厌氧消化性能的碱预处理方法研究及工程应用 [D]. 北京:北京化工大学机电工程学院, 2010.
- [7] FARID T, DIMITAR K, IRINI A. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation [J]. Bioresource Technology, 2010 (101): 4744-4753.
- [8] YANG X, ZENG Y, MA F, et al. Effect of biopretreatment on thermogravimetric and chemical characteristics of corn stover by different white-rot fungi [J]. Bioresource Technology, 2010(101): 5475-5479.
- [9] TUYEN D V, PHUONG H N, CONE J W. Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation and methane production [J]. Bioresource Technology, 2013 (2013): 256-263.
- [10] KAMEI I, HIROTA Y, MEGURO S. Integrated delignification and simultaneous saccharification and fermentation of hard wood by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60 [J]. Bioresource Technology, 2012 (126): 137-141.
- [11] GUILLEM S, MANUEL A, EVA C. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34 [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2013 (52): 77-83.
- [12] 夏 伟,张 红,颜艳伟,等. 棘孢木霉 I4 对立枯丝核菌的拮抗机制 [J]. 植物保护学报, 2010,37(5): 11-17.
- [13] 杨 胜. 饲料分析及饲料质量检测技术 [M]. 北京:北京农业大学出版社, 1983.
- [14] YANG Y H, WANG B C, WANG Q H, et al. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium [J]. Colloids Surf Biointerfaces, 2004, 34(1): 1-6.
- [15] GUNASEELAN V. Biochemical methane potential of fruit and vegetable solid waste feed stocks [J]. Biomass and Bioenergy, 2004 (26): 389-399.
- [16] ZHANG J H, DENG H B, LIN L, et al. Isolation and characterization of wheat straw lignin with a formic acid process [J]. Bioresource Technology, 2010 (101): 2311-2316.
- [17] 蒋侃侃. 马来酸预处理麦秸的研究 [D]. 南京:南京林业大学, 2011.
- [18] SUN X F, JING Z X, FOWLER P, et al. Structural characterization and isolation of lignin and hemicelluloses from barley straw [J]. Industrial Crops and Products, 2011 (33): 588-598.
- [19] 林云琴,周少奇. 白腐菌降解纤维素和木质素的研究进展 [J]. 环境技术, 2003 (4): 29-33.
- [20] 张 杰,章世元,周光玉,等. 白腐真菌的筛选以及对其秸秆降解能力的研究 [J]. 上海畜牧兽医, 2010 (2): 16-18.
- [21] 李海红,常 华,袁月祥. 复合菌剂预处理对秸秆厌氧发酵的影响 [J]. 西北大学学报:自然科学版, 2012, 42 (6): 949-952.
- [22] 范晓娟,朱红梅,韩士群,等. 白腐菌对水葫芦木质纤维素的降解及对厌氧发酵的影响 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29 (5): 1043-1050.

(责任编辑:袁 伟)