

# 耐低温降解生物质废弃物复合菌剂的混料设计优化

罗立津<sup>1,2,3</sup>, 万立<sup>2</sup>, 陈宏<sup>1</sup>, 徐福乐<sup>3</sup>, 贾伟<sup>1</sup>, 聂毅磊<sup>1</sup>, 温翠莲<sup>4</sup>

1. 福建省微生物研究所, 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007
2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室; 中国农业大学生物学院, 北京 100193
3. 福建超大现代农业科技研究所, 福州 350003
4. 福州大学材料科学与工程学院, 福州 350108

**摘要** 为了筛选制备耐低温高效降解农业生物质废弃物的复合菌剂, 在已获得的耐低温木质纤维素降解菌群 A25-3 的基础上, 采用混料设计 (mixture design) 对复合菌比例进行优化, 通过测定菌群 A25-3、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 不同比例搭配对纤维素酶 (CMCase、滤纸酶和外切葡聚糖酶)、蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响, 建立了各菌株 (群) 搭配比例与试验指标之间的回归方程。使用 Design Expert 8.0 软件的优化功能对满足所有期望的响应值进行优化, 得到复合菌的最优配比 (质量分数) 为绿色木霉 37.24%, 菌群 A25-3 67.76%。对该最优比例进行验证试验, 得到的结果与预测值基本一致。秸秆降解试验表明, 固体复合菌剂可高效降解秸秆, 有效提高堆肥体系的温度, 在低温环境下的堆肥和秸秆腐熟具有很好的应用前景。

**关键词** 混料设计; 复合菌剂; 纤维素酶; 耐低温; 生物质废弃物

**中图分类号** Q939.96

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.08.003

## Optimal mixture design of preparation of cold-adapted multiple species inoculant for biomass waste degradation

LUO Lijin<sup>1,2,3</sup>, WAN Li<sup>2</sup>, CHEN Hong<sup>1</sup>, XU Fule<sup>3</sup>, JIA Wei<sup>1</sup>, NIE Yilei<sup>1</sup>, WEN Cuilian<sup>4</sup>

1. Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China
2. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China
3. Fujian Chaoda Modern Agriculture Technology Research Institute, Fuzhou 350003, China
4. College of Materials Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

**Abstract** In this paper, an optimum mixture design is used for the preparation of cold-adapted multiple species inoculant. Based on the Design Expert software, a quadratic model is established as a function of the component fractions of species, such as the *Saccharomyces cerevisiae*, the *Trichoderma viride* and the flora A25-3, on the enzyme activity of the CMCase, the FPase, the cellobiohydrolase, the proteinase and the  $\alpha$ -amylase. The response values satisfying all expectations are optimized, and the most excellent combinations of the *Saccharomyces cerevisiae*, the *Trichoderma viride* and the flora A25-3 are 0%, 37.24% and 67.76%, respectively. The result of the

收稿日期: 2015-02-10; 修回日期: 2015-03-26

基金项目: 福州市科技计划项目 (2013-G-97); 福州大学校科技发展基金项目 (2012-xy-1)

作者简介: 罗立津, 博士, 研究方向为环境微生物, 电子信箱: 529047310@qq.com; 温翠莲 (通信作者), 博士, 研究方向为环境友好生态材料, 电子信箱: clwen@fzu.edu.cn

引用格式: 罗立津, 万立, 陈宏, 等. 耐低温降解生物质废弃物复合菌剂的混料设计优化[J]. 科技导报, 2015, 33(8): 24-29.

verification experiment on the formulation is consistent with the prediction. The straw degradation experiments show that the multiple species inoculant has a high level of degradation efficiency for the straw at a low temperature. It suggests that there is a great application prospect of the multiple species inoculant under cold conditions.

**Keywords** mixture design; multiple species inoculant; cellulase; cold-adapted; biomass waste;

中国是农业生物质废弃物产出量最大的国家,每年排放畜禽粪便约25亿t,农业生产中植物性废弃物逾20亿t<sup>[1]</sup>,但这些农业生物质废弃物大部分就地堆积或焚烧,已带来了严重的环境污染和资源浪费。如何有效地充分利用这类生物质资源值得思考和研究,而最关键的是如何实现木质纤维素的高效生物转化,据统计,全球植物性纤维素和半纤维素的年产量分别达到720亿t和600亿t<sup>[2]</sup>,成为地球上最大的可再生碳库<sup>[3]</sup>。这方面的研究已有大量的文献报道<sup>[3-6]</sup>。但现阶段堆肥技术由于低成本、高效率的特点仍是处理生物质废弃物的重要手段<sup>[7]</sup>。为了加快堆肥化进程,提高堆肥的效率和产品质量,常需要添加一些微生物菌剂。福建超大现代农业科技研究所前期的研究已从高寒地区长期堆积牛粪的土壤中富集获得了一组高活性的耐低温木质纤维素降解菌群A25-3,为了进一步提高菌群的降解生物质效率,有必要与其他高效降解生物质的菌株进行复配。已有大量的文献表明,木霉属(*Trichoderma*)中的许多种都具有很强的木质纤维素降解能力<sup>[8,9]</sup>,如绿色木霉(*Trichoderma viride*)<sup>[10,11]</sup>、瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)<sup>[1]</sup>、康氏木霉(*Trichoderma koningii*)<sup>[12,13]</sup>和拟康氏木霉(*Trichoderma pseudokoningii*)<sup>[14]</sup>等。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有合成 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase)和葡萄糖淀粉酶(glucoamylase)的特性,能从淀粉分子的非还原性末端开始,水解 $\alpha$ -1,4糖苷键和 $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键,广泛用于葡萄糖浆、高果糖浆和酒精生产的淀粉水解<sup>[15-17]</sup>,并有研究将酿酒酵母与其他水解酶的联合作用进行温和预处理,对家庭固体垃圾进行同步糖化和发酵,实现生物物质的高效转化<sup>[18]</sup>。也有利用酿酒酵母在降解有机物过程的放热作用,用于低温下提高牛粪堆肥的体系温度<sup>[19]</sup>。传统的复合菌剂制备方法大多是各个菌株等比例混合或简单按比例混合,进行效果试验,如果混合菌株较多,则需要大量的试验工作。而混料设计可以通过少量试验即可拟合试验指标与各菌比例的关系式,可更精确地分析和预测混合效果。为此,本研究引进酿酒酵母和绿色木霉,通过Design Expert 8.0中的混料设计(mixture design)的单形格子点设计(simplex lattice)方法,以复合菌剂的纤维素酶(CMCase、滤纸酶和外切葡聚糖酶)、蛋白酶和 $\alpha$ -淀粉酶活性为参照指标,对其混合配比进行优化,并进一步通过秸秆腐熟和模拟堆肥试验验证其效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

菌群A25-3为福建超大现代农业科技研究所从内蒙古高寒地区长期堆积牛粪的表层土壤样品中经低温驯化富集

获得的耐低温木质纤维降解菌群;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)购自中国农业微生物菌种保藏中心。

### 1.2 菌剂固体发酵培养

1) 发酵料配方:通过选用不同配比的发酵料,分别制备酿酒酵母、绿色木霉、菌群A25-3的固体菌剂。其中,酿酒酵母固体发酵料(质量分数):麸皮50%,玉米粉10%,豆粕10%,褐煤10%,磷矿粉20%;绿色木霉固体发酵料(质量分数):麸皮25%,锯末30%,玉米粉10%,豆粕10%,褐煤5%;菌群A25-3固体发酵料(质量分数):麸皮60%,玉米粉10%,豆粕20%,磷矿粉10%。固体料混匀后加1/5的水(1L水中含 $K_2HPO_4$  3g,  $(NH_4)_2SO_4$  3g,  $MgSO_4$  5g,  $CaCl_2$  5g)。

2) 培养方法:取5L玻璃大烧杯,装入约3.5L的发酵料,用8层纱布封口,115℃灭菌2h,冷却后接入15℃培养72h的菌群菌液200mL,在隔水式培养箱中培养,前12h将培养箱温度调至25℃,之后关闭加热开关,由菌群自身生长产热维持体系温度。每间隔12h在无菌条件下,翻动培养料。

### 1.3 试验设计

应用Design Expert 8.0软件,以酿酒酵母、绿色木霉和菌群的固体菌剂比例为自变量,以纤维素酶(CMCase、滤纸酶和外切葡聚糖酶)、蛋白酶和 $\alpha$ -淀粉酶为试验指标,通过限定各菌剂比例边界(均为0~100%),得到试验设计表(表1)。按照表1配制不同比例的固体菌剂,分别测定菌剂的酶活。对试验结果进行统计分析,得到3种菌剂的最佳配比及预测结果,依照行业标准技术指标要求,选定最佳配比进行验证试验,方法同上。

表1 混料设计表

Table 1 Mixture design matrix

| 系列 | 配比   |      |         |
|----|------|------|---------|
|    | 酿酒酵母 | 绿色木霉 | 菌群A25-3 |
| 1  | 1/3  | 1/3  | 1/3     |
| 2  | 1/2  | 0    | 1/2     |
| 3  | 0    | 0    | 1       |
| 4  | 0    | 1    | 0       |
| 5  | 1/2  | 1/2  | 0       |
| 6  | 1    | 0    | 0       |
| 7  | 0    | 1/2  | 1/2     |
| 8  | 1/2  | 1/2  | 0       |
| 9  | 1/6  | 2/3  | 1/6     |
| 10 | 1/6  | 1/6  | 2/3     |
| 11 | 0    | 1    | 0       |
| 12 | 1    | 0    | 0       |
| 13 | 0    | 0    | 1       |
| 14 | 2/3  | 1/6  | 1/6     |

#### 1.4 固体菌剂酶活分析

取 10 g 发酵料于 150 mL 的三角瓶中,加 50 mL 无菌水,120 r/min 震荡 30 min,静置片刻,收集上清悬浊液,5000 g 离心 15 min,收集上清,作为酶粗液,按行业标准《NY 609—2002 有机物料腐熟剂》方法<sup>[20]</sup>测定羧甲基纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶活性,按吕志伟的方法<sup>[21]</sup>测定滤纸酶和外切葡聚糖酶活性。其中羧甲基纤维素酶、滤纸酶和外切葡聚糖酶以每 g 固体菌剂每 min 释放 1 μg 葡萄糖的量定义为一个酶活力单位,用 U 表示;蛋白酶以每 g 固体菌剂每 min 释放 1 μg L-酪氨酸的量定义为一个酶活力单位,用 U 表示;α-淀粉酶以每 g 固体菌剂每 min 降解 1 mg 淀粉的量定义为一个酶活力单位,用 U 表示。

#### 1.5 固体菌剂对秸秆的腐熟作用

取 10 g 稻草秆,剪为 9 cm 小段,用纱布和牛皮纸包好,115℃灭菌,放置于 150 mL 三角瓶内,加入 50 mL 无菌水,每瓶添加 1 g 固体菌剂,置于 25℃下,静置,观察菌群固体菌剂对稻草秸秆的腐熟效果。

#### 1.6 模拟堆肥试验

泡沫箱模拟堆肥试验在福建超大集团有限公司位于内蒙古多伦县的奶牛场进行,具体方法为:取新鲜牛粪,晾晒至含水量 60%左右,用铁锹敲碎,过 1 cm 筛子,取饲养用干草剪成 2~3 cm 的小段,作为堆肥调理剂,按体积分数 5%添加,充分混匀,添加质量分数 0.5%的固体菌剂,混匀,盖上泡沫箱盖,保温发酵腐熟。

#### 1.7 数据处理

计算平均值、标准差,采用 Excel 2007 软件进行处理。所得数据输入 Design Expert 8.0 软件,得到多项式模型,并通过软件进行单因子方差分析(ANOVA)和差异显著性分析,取  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 模型建立

测定 3 种固体菌剂按比例培养的纤维素酶(CMCase、滤纸酶和外切葡聚糖酶)、蛋白酶和α-淀粉酶,利用 Expert Design 8.0 对试验结果进行拟合,得到各指标的回归方程:

$$Y_{CMCase} = -2.86A + 104.26B + 66.66C + 388.90AB + 342.83AC + 235.99BC - 2486.41ABC$$

$$Y_{FPase} = 0.66A + 56.99B + 25.46C + 6.25AB + 78.93AB + 203.57BC$$

$$Y_{cellulohydrolase} = -1.83A + 24.06B + 37.69C + 301.86AB + 105.03AC + 304.45BC - 1472.31ABC$$

$$Y_{protease} = 14.54A + 19.85B + 24.63C + 1.17AB - 12.10AC + 88.63BC - 355.87ABC$$

$Y_{amylase} = 40.10A + 63.76B + 89.90C - 5.78AB - 75.45AC - 106.09BC$  式中, $Y$ 为酶活, $A$ 为酿酒酵母固体菌剂的质量分数, $B$ 为绿色木霉固体菌剂的质量分数, $C$ 为菌群 A25-3 固体菌剂的质量分数。

对回归方程进行方差分析(表 2)表明,5 个模型的二次模型和线性混合模型都达到 0.01 极显著水平, $R^2=0.8804 \sim 0.9631$ ,说明结果的变异有 88.04%~96.31%是由变量引起的, $R^2_{adj}=0.8057 \sim 0.9315$ ,5 个模型的失拟项均未达显著性,说明模型可以很好地拟合酶活与固体菌剂比例的关系。

表 2 方差分析结果

Table 2 Analysis of variance

| 回归方程                   | 二次模型<br>P 值 | 线性混合<br>模型 P 值 | 失拟项<br>P 值 | $R^2$  | $R^2_{adj}$ |
|------------------------|-------------|----------------|------------|--------|-------------|
| $Y_{CMCase}$           | 0.0003      | 0.0005         | 0.2110     | 0.9512 | 0.9094      |
| $Y_{FPase}$            | <0.001      | <0.001         | 0.1415     | 0.9187 | 0.8678      |
| $Y_{cellulohydrolase}$ | 0.0001      | 0.0031         | 0.5352     | 0.9631 | 0.9315      |
| $Y_{protease}$         | 0.0004      | 0.0006         | 0.2332     | 0.9464 | 0.9005      |
| $Y_{amylase}$          | 0.0016      | 0.0009         | 0.3171     | 0.8804 | 0.8057      |

### 2.2 不同固体菌剂比例对相关酶活的影响

通过三元等值线图比较酿酒酵母、绿色木霉、菌群 A25-33 种固体菌剂比例变化对纤维素酶(CMCase、滤纸酶和外切葡聚糖酶)、蛋白酶和α-淀粉酶的影响(图 1)。结果表明,酿酒酵母和绿色木霉对 CMCase 活性影响最大,当两者质量分数各为 50%时,CMCase 活性预测值最大(147.929 U)。菌群 A25-3 对 FPase、外切葡聚糖酶和蛋白酶的活性影响最大,当菌群 A25-3 的质量分数为 62.764%,绿色木霉的质量分数为 37.236%时,FPase、外切葡聚糖酶和蛋白酶的活性预测值最大,分别为 84.7762、103.769 和 43.5634 U。菌群 A25-3 对α-淀粉酶活性的影响最大,当菌群 A25-3 的质量分数为 90.599%,酵母的质量分数为 9.401%时,α-淀粉酶活性可以达到 78.7948 U。

### 2.3 混合固体菌剂比例的优化

以上结果为各菌株(群)组成对单个指标的影响,通过软件的优化功能可以对满足所有期望的响应值进行优化。设定各值的变化范围,酿酒酵母、绿色木霉、菌群 A25-3 的质量分数在 0~100%之间变化,纤维素酶(CMCase、滤纸酶和外切葡聚糖酶)、蛋白酶和α-淀粉酶选取最大值,其中酶活上限设置尽可能大,最终软件给出 3 组组合,并给出预测值(表 3)。

根据农业行业标准《NY 609—2002 有机物料腐熟剂》的技术指标要求,为了保证产品质量,设定各个指标的设定各种酶活所期望的响应值为标准的 2 倍,即纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶分别  $\geq 60$  U,  $\geq 30$  U 和  $\geq 20$  U,获得不同比例的各个酶活指标重叠等高线图(图 2)。根据重叠等高线图限定的范围,只有 1 号组合满足要求。为此,选定了接近该组合为最佳配比。

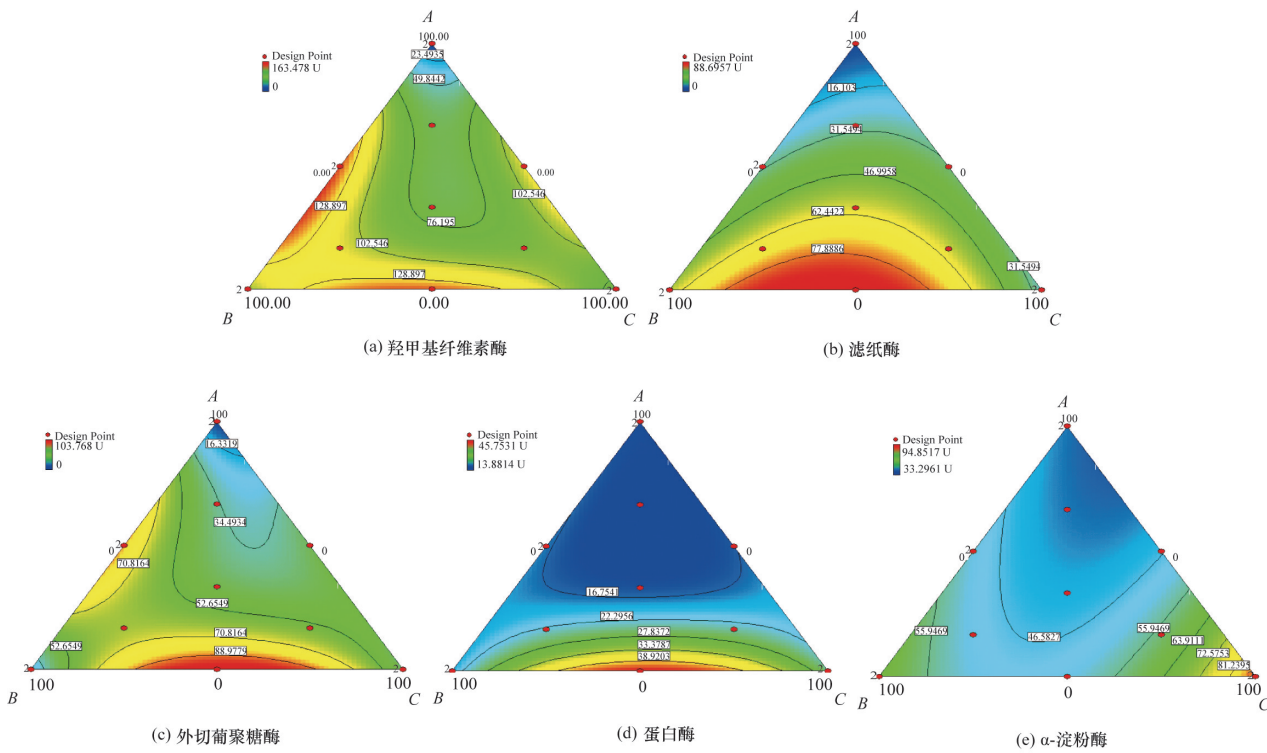


图1 酿酒酵母、绿色木霉、菌群A25-3交互作用对CMCase(a)、滤纸酶(b)、外切葡聚糖酶(c)、蛋白酶(d)、α-淀粉酶(e)活性的影响  
 Fig. 1 Interaction effects of *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viride* and flora A25-3 on CMCase(a), FPase (b), cellobiohydrolase (c), protease (d) and α-amylase (e)

表3 最佳组合及预测结果

Table 3 Optimal mixture proportions and the predicted values of the enzymes activity

| 序<br>列 | 酿酒<br>酵母/% | 绿色<br>木霉/% | 菌群<br>A25-3/% | CMCase 活性/U | 滤纸酶活性/U | 外切葡聚糖酶活性/U | 蛋白酶活性/U | α-淀粉酶活性/U |
|--------|------------|------------|---------------|-------------|---------|------------|---------|-----------|
| 1      | 0          | 37.236     | 62.764        | 135.817     | 84.776  | 103.768    | 43.563  | 55.373    |
| 2      | 20.208     | 79.792     | 0             | 145.326     | 46.610  | 67.504     | 18.970  | 58.044    |
| 3      | 9.452      | 0          | 90.548        | 89.431      | 29.873  | 42.944     | 22.640  | 78.739    |

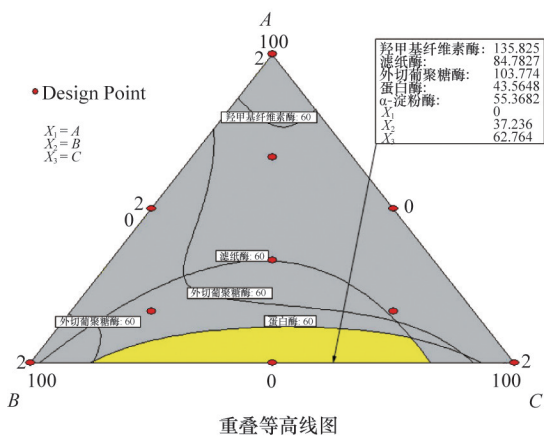


图2 酿酒酵母、绿色木霉、菌群A25-3交互作用对各种酶活影响的重叠等高线图

Fig. 2 Overlaid contour plot of *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viride* and flora A25-3 for enzymes activity

## 2.4 固体复合菌剂酶活

根据回归方程预测,羧甲基纤维素酶、滤纸酶、外切葡聚糖酶、蛋白酶和α-淀粉酶的预期活性分别为136.07、85.00、103.93、43.61和55.23 U。根据选定的最佳组配,制备成复合菌剂,通过测定各种酶的活性表明,除了CMCase的测定值(101.74 U),高于所期望的响应值)与预期有较大差异外,其他几种酶活性与预测值较为吻合,滤纸酶、外切葡聚糖酶、蛋白酶和α-淀粉酶分别为65.22、94.78、48.27和47.89 U(图3)。

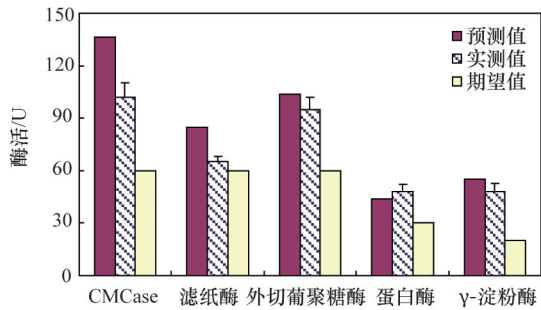
## 2.5 固体复合菌剂对稻秆的降解作用

将固体菌剂接种于装有已灭菌的稻秆的三角瓶中,置于室温下,25 d后稻秆几乎全部腐烂,而对照除了颜色变黑,几乎无多大变化(图4)。可见,固体菌剂对稻秆具有明显的腐熟作用。

## 2.6 固体复合菌剂对模拟堆肥体系温度的影响

堆肥体系温度的变化能够反映体系中微生物的代谢情

况。低温环境下,在泡沫箱中进行模拟堆肥试验表明,在堆肥前期,固体菌剂能够明显促进温度的升高,但可能由于体系较小,不利于保温的缘故,体系最高温度才47.5℃(图5)。



CMCase、滤纸酶、外切葡聚糖酶、蛋白酶的活力单位  
1 U=1 μg/(g·min<sup>-1</sup>); α-淀粉酶的活力单位 1U=1 mg/(g·min<sup>-1</sup>)

图3 复合菌剂酶活与预测值、期望效值的比较

Fig. 3 Experimental, predicted and expected values of enzymes activity of the multiple species inoculant

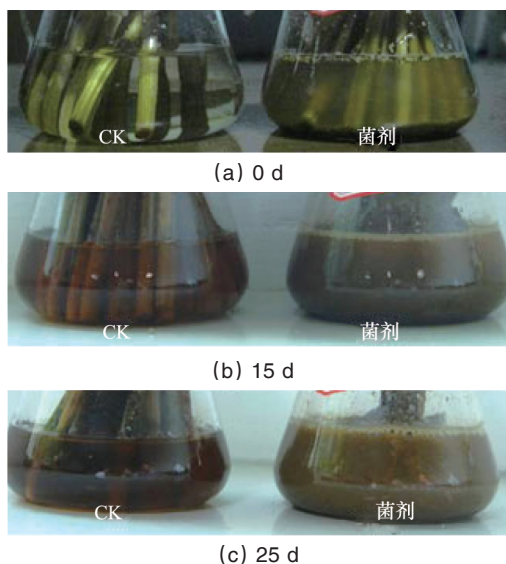


图4 固体复合菌剂对稻秆的降解作用

Fig. 4 Degradation of rice straw with the multiple species inoculant

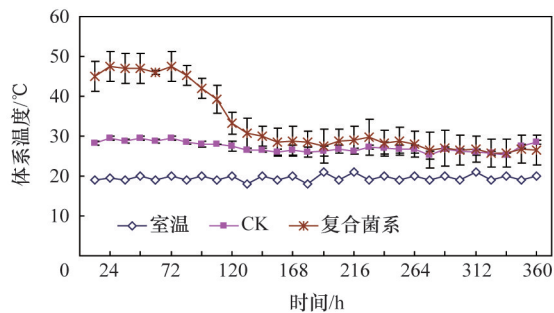


图5 固体复合菌剂对模拟堆肥体系温度的影响

Fig. 5 Effect of the multiple species inoculants on the system temperature of simulated composting

### 3 讨论

混料设计作为一种有效的试验手段已广泛应用于食品<sup>[22]</sup>、药品<sup>[23]</sup>、化工<sup>[24]</sup>、农药<sup>[25]</sup>的配方优化试验中。由于其优越性,混料设计试验逐渐被应用到微生物复合菌剂的开发中<sup>[26,27]</sup>。本研究通过混料设计试验,建立了3种菌剂不同配比与复合菌剂相关酶活之间的回归模型,依据回归模型,得出CMCase、FPase、外切葡聚糖酶和蛋白酶等技术指标的最大预测值,进一步通过设定所期望的响应值,选定了最佳配比。经验证试验结果表明,除了CMCase酶活(101.74 U)低于预期值(136.07 U)外,其他几种酶活性与预测值较为吻合。这说明混料设计试验用于固体复合菌剂菌株组配的优化设计上是可行的、高效的。通过本研究选定的最佳组配的复合固体菌剂的CMCase酶活低于预期值,可能是由于低温纤维素酶的最适作用温度普遍较低,一般最适作用温度为20~25℃<sup>[28]</sup>,本实验是在50℃测定的CMCase酶活性,可能由于温度较高而导致酶的活性受抑制,因此,有必要进一步分析该菌群纤维素酶的最佳反应条件。

目前普遍接受的观点是天然纤维素水解成葡萄糖的过程必须依靠3种组分的协同作用,即首先由内切型纤维素酶(endocellulase, EG)在纤维素聚合物的内部起作用,在纤维素的非结晶部位进行切割,产生新的末端,然后再由外切葡聚糖酶(cellobiohydrolase, EX)以纤维二糖为单位,从末端进行水解,最后由纤维二糖酶(cellobiase, CB)将纤维二糖彻底水解为葡萄糖<sup>[29]</sup>。由于高浓度的纤维二糖对EG酶和EX酶活力有强烈的抑制作用,而在低浓度时则是纤维素酶的诱导物,如果纤维素酶复合组分中缺乏纤维二糖组分就会严重影响纤维素的降解速率。在本实验中,绿色木霉和菌群A25-3组配制成固体复合菌剂,可提高纤维素酶活性的机制可能是由于所使用的菌群A25-3同时具有木聚糖酶和纤维二糖酶的活性,而绿色木霉生产木聚糖酶和纤维二糖酶的能力较弱,故在木质纤维素的降解过程中,通过木聚糖酶对木聚糖的水解可以降低其和纤维素的连接,从而增加了纤维素酶对纤维素吸附,而纤维二糖酶则水解产生的纤维二糖,使纤维二糖的含量在发酵过程中处于低浓度水平,从而诱导纤维素酶降解纤维素。

### 4 结论

研究采用混料设计,建立了耐低温降解菌群A25-3、酿酒酵母和绿色木霉固体菌剂之间的不同配比与复合菌剂相关酶(CMCase、滤纸酶、外切葡聚糖酶、蛋白酶和α-淀粉酶)活性之间的回归模型,选定了最佳质量分数配比为绿色木霉37.24%和菌群A25-3 62.76%。该优化配比验证试验结果表明,除了CMCase酶活外,其他几种酶活性与预测值较为吻合。该固体复合菌剂用于秸秆腐熟,可使秸秆得到快速降解。低温环境模拟堆肥试验表明,固体菌剂可在堆肥的前期有效提高体系温度。依据本研究优化筛选的组合制得的固体复合菌剂可用于低温环境下的农业生物质废弃物的堆肥腐熟。

## 参考文献 (References)

- [1] 张稀何, 洪春来, 朱凤香, 等. 农业废弃物资源化利用现状与前景展望[J]. 现代农业科技, 2013(20): 209, 218.  
Zhang Xihe, Hong Chunlai, Zhu Fengxiang, et al. Agricultural waste recycling use present situation and prospect[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013(20): 209, 218.
- [2] Gilbert H J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 444-55.
- [3] Kubicek C P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(2): 133-142.
- [4] Banerjee G, Car S, Scott-Craig J S, et al. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(23): 9097-9105.
- [5] McClendon S, Batth T, Petzold C, et al. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 1-10.
- [6] Inoue H, Decker S R, Taylor L E, et al. Identification and characterization of core cellulolytic enzymes from *Talaromyces cellulolyticus* (formerly *Acremonium cellulolyticus*) critical for hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 151.
- [7] 唐景春. 生物质废弃物堆肥过程与调控[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010: 17.  
Tang Jingchun. Biomass waste composting process and regulation[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2010: 17.
- [8] 曲音波. 木质纤维素降解酶系的基础和技术研究进展[J]. 山东大学学报: 理学版, 2011, 46(10): 160-170.  
Qu Yinbo. Progress in basic and technological research of enzyme system for lignocellulosics biodegradation[J]. Journal of Shandong University: Natural Science Edition, 2011, 46(10): 160-170.
- [9] Feng Y, Shao D, Zhao D Q, et al. Comparative evaluation of *Trichoderma cellulases* adsorption on lignocellulose and holocellulose from steam-pretreated *Lespedeza crytobotrya* stalk[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2014, 8(1): 43-49.
- [10] Chen Y, Huang J, Li Y, et al. Study of the rice straw biodegradation in mixed culture of *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger* by GC-MS and FTIR[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015: 1-9. doi: 10.1007/s11356-015-4149-8. (Published online)
- [11] Iqtedar M, Nadeem M, Naeem H, et al. Bioconversion potential of *Trichoderma viride* HN1 cellulase for a lignocellulosic biomass *Saccharum spontaneum*[J]. Natural Product Research, 2014: 1-8. doi: 10.1080/14786419.2014.971320. (Published online)
- [12] Wang Z, Ong H X, Geng A. Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(11): 1564-1571.
- [13] Wang Z, Bay H, Chew K, et al. High-loading oil palm empty fruit bunch saccharification using cellulases from *Trichoderma koningii* MF6 [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(4): 673-680.
- [14] Zhou Q, Lü X, Zhang X, et al. Evaluation of swollenin from *Trichoderma pseudokoningii* as a potential synergistic factor in the enzymatic hydrolysis of cellulose with low cellulase loadings[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(8): 1905-1910.
- [15] Adachi D, Koda R, Hama S, et al. An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(2): 118-122.
- [16] Acourene S, Ammouche A. Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(5): 759-766.
- [17] Hagman A, Piškur J. A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116942.
- [18] Nwobi A, Cybulska I, Tesfai W, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of solid household waste following mild pretreatment using a mix of hydrolytic enzymes in combination with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 99(2): 929-38.
- [19] Wang Y J, Yan L, Wang W D, et al. Effect of microbiological inocula on composting of cow manure[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2014, 8(3): 1867-1873.
- [20] 中华人民共和国农业部. NY 609—2002 有机物料腐熟剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY 609-2002 organic matter-decomposing inoculants[S]. Beijing: Standards Press of China, 2002.
- [21] 吕志伟. 木质纤维素降解菌群的酶学特性及应用研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2009.  
Lü Zhiwei. Enzymology and application research of lignocellulose-degrading microbial community[D]. Beijing: China Agriculture University Academic Dissertation, 2009.
- [22] Nikzade V, Tehrani M M, Saadatmand-Tarzan M. Optimization of low-cholesterol low-fat mayonnaise formulation: Effect of using soy milk and some stabilizer by a mixture design approach[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(2): 344-352.
- [23] Pauli E D, Malta G B, Sanchez P M, et al. Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves[J]. Analytical Chemistry Research, 2014, 11(2): 23-29.
- [24] Jeirani Z, Jan B M, Ali B S, et al. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012, 112(3): 1-7.
- [25] Chen F, Liu S S, Duan X T, et al. Predicting the mixture effects of three pesticides by integrating molecular simulation with concentration addition modeling[J]. RSC Advances, 2014, 61(4): 32256-32262.
- [26] Kurnia Y F, Yasni S, Nurtama B. Optimization formula of goat milk yoghurt and white oyster mushroom powder with mixture design methods[J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2014, 13(5): 296-302.
- [27] El-Dahmy R M, Elsayed I, Elshafeey A H, et al. Optimization of long circulating mixed polymeric micelles containing vinpocetine using simple lattice mixture design, *in vitro* and *in vivo* characterization[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 477(1): 39-46.
- [28] 林艳梅, 生吉萍, 申琳, 等. 适冷纤维素降解微生物研究进展[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 95-98.  
Lin Yanmei, Sheng Jiping, Shen Lin, et al. Trends in cold-adapted and cellulose-degrading microorganisms[J]. Biotechnology, 2010, 20(2): 95-98.
- [29] Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(2): 185-194.

(责任编辑 吴晓丽)