

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **分类号：** | **Q3** | **密 级：** | **公开** |
| **U D C ：** | **663.1** | **学校代码：** | **10127** |



**硕士学位论文**

**论文题目**：降解芦苇木质素菌种的选育及在制浆中的应用研究**英文题目**: The Study on Breeding Selection of Lignin-degrading

in *Phragmites australis* and Application in Pulping

**学** 位 类 别： 理学硕士

**研 究 生 姓 名**： 邢孟兰 **学号**： 201102223**学科(领域)名称**： 遗传学

**指** 导 教 师： 蔡禄 **职称**： 教授**协助指导教师：** 卢庆华 **职称：** 讲师

2014 年 6 月 7 日

摘 要

本文以探究高效降解木质素菌种为目标，选用普通青霉菌、向病菌、产黄青霉菌和木霉菌作为实验菌种，采用芦苇作为实验原材料。为得到理想的降解木质素菌株，通过对4株菌种进行不同的组合，比较木质素降解率，从而确定最佳菌种组合。然后进行混合菌种不同混合方式、不同混合比例和固液比的优化，得到最佳组合菌。利用漆酶和木聚糖酶混合漂白纸浆，探寻生物机械浆的最佳工艺条件。

本论文研究的主要结果如下：

1. 本实验通过对采取的腐朽树木根部的土样进行筛选，挑取单菌落，经过显微镜和ITS鉴定，最终得到单一菌种普通青霉菌。

2. 通过漆酶活测定，发现普通青霉菌可以产生漆酶，经过培养基成分优化，产酶最高达到55 U/mL。该菌的液体培养产酶条件为温度30℃，pH值为6，转速为170

rpm，最高产酶酶活达到59.6 U/mL，比优化前酶活提高了12.39倍。该菌的蛋白含量为14.67μg/mL。对芦苇木质素的降解率为35.25%。

研究的结论为：混合菌种对木质素的降解及其混合酶对纸浆的漂白都有明显的效果，将其应用于生物制浆中，具有重要的意义。

关键词：芦苇；木质素；漂白；漆酶；木聚糖酶

**Abstract**

This paper is aimed at exploring the efficient lignin-degrading strains as its goal, and common *Penicillium sp.*, bacteria, sulfoacid-producing *Penicillium sp*. and *Trichoderma sp.* were utilized as experimental strains and *Phragmites australis* as experimental materials.

For purpose of obtaining effective ligin-degrading stains, four different strains were combined to degrade lignin and the degradation rate of lignin was compared, so as to determine the optimum strain combination. Then different mixing methods of mixed strains, various mixing ratios and solid-to-liquid ratios were optimized to obtain the optimal combination strains. The optimal technological condition for bio-mechanical pulp was explored through the utilization of mixed laccase and xylanase to bleach paper pulp.

The main results of this thesis are as follows:

1. In this experiment, one strain was screened from soil sample of rotten tree roots and it was identified as common *Penicillium sp.* through microscopic examination and molecular identification.

2. Common *Penicillium sp.* was found to produce laccase by enzymatic determination and the yield of its enzyme was up to 55 U/mL through medium component optimization. And the liquid culture fermentation condition of this strain was obtained: temperature

30℃, pH value 6, rotating speed 170 rpm, and the highest yield of enzyme activity reached

59.6 U/mL under these conditions, with the activity increased by 12.39 times compared with that of enzyme activity without optimization. At the same time, the protein content was 14.67μg/mL and the lignin degradation rate was 35.25%.

3. Through the breeding selection of four different combination strains, the ABD combination showed the best lignin degradation rate. The lignin content was 10.66% and the degradation rate was 67.27% with the mixing ratio of A: B: D to 1:4:16 after eight days' treatment. The reasons may be related to their enzyme yields and the synergistic effects of different enzymes, which would have a good value in reducing investment costs in industrial manufactures. Therefore, the three strains were chosen as the dominant strain combination.

4. With the bleaching liquid by chemical methods and conditions optimized, the

Optimal conditions for the bleaching of pulp were shown: pulp concentration 4%, hydrogen peroxide 5%, EDTA 2%, hydrogen peroxide1%, temperature 60℃and reaction time 2 h. The whiteness of pulp reached 48.9% and was increased by 8.3% ISO, compared with the

Former whiteness 40.6%.

5. Through the pretreatment of paper pulp bleaching by laccase, xylanase and laccase/xylanase, the pulp brightness could reach 52.1%, and with the mixing ratio optimized and the ratio of laccase: xylanase to 2:1, the whiteness was 59.6%. The whiteness was improved by 7.5% ISO, compared with the paper pulp without enzyme pretreatment.

6. Through the detection of bleaching effluent, CODCr value of waste water was reduced and at the same time pH value showed the alkalescence by the utilization of enzyme. That is to say, the removal rate of CODCr by mixed enzymes was reduced by 20.01%, compared with that of bleaching effluent which had no pretreatment of enzymes, and the pH value was lowered from 10.3±0.2 to 8±0.2.

It comes to the conclusion that the mixed strains have obvious effects on lignin degradation and their mixed enzymes show the distinct effects for pulp bleaching, which will have important significance in biopulping.

**Key Words:** *Phragmites australis*; *Lignin*; *Biobleaching*; *Laccase*; *Xylanase*

目 录

[摘 要](#_Toc686774466) 1

**[Abstract](#_Toc686774467)** 2

**[1](#_Toc686774468)** [文献综述](#_Toc686774468) 4

**[1.1](#_Toc686774469)** [造纸原料](#_Toc686774469) 4

**[1.1.1](#_Toc686774470)** [芦苇](#_Toc686774470) 4

**[1.1.2](#_Toc686774471)** [芦苇在造纸中的研究进展](#_Toc686774471) 5

**[1.2](#_Toc686774472)** [木质素降解菌和降解酶系](#_Toc686774472) 5

**[1.2.1](#_Toc686774473)** [木质素](#_Toc686774473) 5

**[1.2.2](#_Toc686774474)** [降解木质素的微生物](#_Toc686774474) 5

**[1.2.3](#_Toc686774475)** [降解木质素的酶系及其降解机理](#_Toc686774475) 5

**[1.2.4](#_Toc686774476)** [混合菌种降解木质素](#_Toc686774476) 5

**[1.3](#_Toc686774477)** [纸浆漂白](#_Toc686774477) 6

**[1.3.1](#_Toc686774478)** [螯合处理](#_Toc686774478) 6

**[1.3.2](#_Toc686774479)** [过氧化氢漂白](#_Toc686774479) 6

**[1.3.3](#_Toc686774480)** [生物漂白](#_Toc686774480) 6

**[1.4](#_Toc686774481)** [制浆工艺](#_Toc686774481) 7

**[1.4.1](#_Toc686774482)** [化学机械制浆](#_Toc686774482) 7

**[1.4.2](#_Toc686774483)** [生物机械制浆](#_Toc686774483) 7

**[1.4.3](#_Toc686774484)** [生物化学制浆](#_Toc686774484) 7

**[1.5](#_Toc686774485)** [本课题的研究目的和基本内容](#_Toc686774485) 7

**[1.5.1](#_Toc686774486)** [研究意义](#_Toc686774486) 7

**[1.5.2](#_Toc686774487)** [研究的基本内容](#_Toc686774487) 8

**[2](#_Toc686774488)** [降解木质素菌种筛选](#_Toc686774488) 8

**[2.1](#_Toc686774489)** [实验仪器与试剂](#_Toc686774489) 8

**[2.1.1](#_Toc686774490)** [实验仪器](#_Toc686774490) 8

**[2.1.2](#_Toc686774491)** [实验试剂](#_Toc686774491) 9

**[2.2](#_Toc686774492)** [培养基配制](#_Toc686774492) 12

[1.5 g，定容至1 L，pH自然，1×10 5 Pa灭菌30 min。](#_Toc686774493) 12

[1.5 g，铁氰化钾0.15 g/100 mL，定容至1 L，pH自然，1×10 5 Pa灭菌30 min。](#_Toc686774494) 12

**[2.3](#_Toc686774495)** [实验方法](#_Toc686774495) 12

**[2.4](#_Toc686774496)** [结果与分析](#_Toc686774496) 12

**[2.5](#_Toc686774497)** [小结](#_Toc686774497) 12

**[3](#_Toc686774498)** [普通青霉菌产漆酶条件优化及酶学性质研究](#_Toc686774498) 12

**[3.1](#_Toc686774499)** [实验仪器与材料](#_Toc686774499) 12

**[3.1.1](#_Toc686774500)** [实验仪器](#_Toc686774500) 13

**[3.1.2](#_Toc686774501)** [实验材料](#_Toc686774501) 13

**[3.2](#_Toc686774502)** [实验方法](#_Toc686774502) 13

**[3.2.1](#_Toc686774503)** [漆酶酶活测定](#_Toc686774503) 13

**[3.2.2](#_Toc686774504)** [产酶条件的研究](#_Toc686774504) 14

**[3.2.3](#_Toc686774505)** [酶学性质的研究](#_Toc686774505) 14

**[3.2.4](#_Toc686774506)** [正交实验优化](#_Toc686774506) 14

**[3.2.5](#_Toc686774507)** [蛋白含量的测定](#_Toc686774507) 15

**[3.3](#_Toc686774508)** [结果与分析](#_Toc686774508) 17

**[3.3.1](#_Toc686774509)** [不同碳源对普通青霉菌产漆酶的影响](#_Toc686774509) 17

**[3.3.2](#_Toc686774510)** [不同氮源对普通青霉菌产漆酶影响](#_Toc686774510) 18

**[3.3.3](#_Toc686774511)** [金属离子对普通青霉菌产漆酶的影响](#_Toc686774511) 19

**[3.3.4](#_Toc686774512)** [发酵](#_Toc686774512)**[pH](#_Toc686774512)**[和温度对普通青霉菌产漆酶的影响](#_Toc686774512) 20

**[3.3.5](#_Toc686774513)** [温度对漆酶稳定性的影响](#_Toc686774513) 22

**[3.3.6](#_Toc686774514)****[pH](#_Toc686774514)**[对漆酶稳定性的影响](#_Toc686774514) 22

**[3.3.7](#_Toc686774515)** [正交试验](#_Toc686774515) 23

**[3.3.8](#_Toc686774516)** [优化前后普通青霉菌产漆酶的比较](#_Toc686774516) 25

**[3.3.9](#_Toc686774517)** [普通青霉菌蛋白含量测定](#_Toc686774517) 26

**[3.4](#_Toc686774518)** [小结](#_Toc686774518) 26

**[4](#_Toc686774519)** [混合菌种发酵对芦苇木质素的降解](#_Toc686774519) 26

**[4.1](#_Toc686774520)** [实验仪器与材料](#_Toc686774520) 26

**[4.1.1](#_Toc686774521)** [实验仪器](#_Toc686774521) 26

**[4.1.2](#_Toc686774522)** [实验材料](#_Toc686774522) 26

**[4.2](#_Toc686774523)** [实验方法](#_Toc686774523) 26

**[4.2.1](#_Toc686774524)** [酸木质素含量测定](#_Toc686774524) 26

[1.5 ：称取试样重量（g）](#_Toc686774525) 27

**[4.2.2](#_Toc686774526)** [水份含量测定](#_Toc686774526) 27

**[4.2.3](#_Toc686774527)** [乙醚抽提物测定](#_Toc686774527) 27

**[4.2.4](#_Toc686774528)** [综纤维素含量测定](#_Toc686774528) 28

**[4.2.5](#_Toc686774529)** [单菌种降解芦苇木质素及条件的优化](#_Toc686774529) 28

**[4.2.6](#_Toc686774530)** [两种菌混合降解芦苇木质素及条件的优化](#_Toc686774530) 28

**[4.2.7](#_Toc686774531)** [三种菌混合降解芦苇木质素及条件的优化](#_Toc686774531) 28

**[4.2.8](#_Toc686774532)** [四种菌混合降解芦苇木质素及条件的优化](#_Toc686774532) 28

**[4.3](#_Toc686774533)** [结果与分析](#_Toc686774533) 29

**[4.3.1](#_Toc686774534)** [芦苇原样分析](#_Toc686774534) 29

**[4.3.2](#_Toc686774535)** [单菌降解芦苇木质素及条件优化](#_Toc686774535) 30

**[4.3.3](#_Toc686774536)** [两种菌混合降解芦苇木质素及条件优化](#_Toc686774536) 31

**[4.3.4](#_Toc686774537)** [三种菌混合降解芦苇木质素及条件优化](#_Toc686774537) 34

**[4.3.5](#_Toc686774538)** [四种菌混合降解芦苇木质素](#_Toc686774538) 37

**[4.4](#_Toc686774539)** [小结](#_Toc686774539) 37

**[5](#_Toc686774540)** [生物酶预处理对机械浆漂白的影响](#_Toc686774540) 38

**[5.1](#_Toc686774541)** [实验仪器与材料](#_Toc686774541) 38

**[5.1.1](#_Toc686774542)** [实验仪器](#_Toc686774542) 38

**[5.1.2](#_Toc686774543)** [实验材料](#_Toc686774543) 38

**[5.2](#_Toc686774544)** [实验方法](#_Toc686774544) 38

**[5.2.1](#_Toc686774545)****[CODCr](#_Toc686774545)**[（化学需氧量）测定](#_Toc686774545) 38

**[5.2.2](#_Toc686774546)** [木聚糖酶活测定](#_Toc686774546) 38

**[5.2.3](#_Toc686774547)** [螯合稳定剂对纸浆白度的影响](#_Toc686774547) 40

**[5.2.4](#_Toc686774548)** [过氧化氢使用量对纸浆白度的影响漂白纸浆](#_Toc686774548) 40

**[5.2.5](#_Toc686774549)** [氢氧化钠使用量对纸浆白度的影响](#_Toc686774549) 40

**[5.2.6](#_Toc686774550)** [温度对纸浆白度的影响](#_Toc686774550) 40

**[5.2.7](#_Toc686774551)** [漂白时间对纸浆白度的影响](#_Toc686774551) 40

**[5.2.8](#_Toc686774552)** [生物酶预处理对纸浆白度的影响](#_Toc686774552) 40

**[5.2.9](#_Toc686774553)** [混合酶的比例对纸浆漂白的影响](#_Toc686774553) 40

**[5.2.10](#_Toc686774554)** [生物酶对漂白废水的影响](#_Toc686774554) 40

**[5.3](#_Toc686774555)** [结果与分析](#_Toc686774555) 41

**[5.3.1](#_Toc686774556)** [稳定剂对纸浆漂白的影响](#_Toc686774556) 41

**[5.3.2](#_Toc686774557)** [过氧化氢对纸浆漂白的影响](#_Toc686774557) 41

**[5.3.3](#_Toc686774558)** [氢氧化钠对纸浆漂白的影响](#_Toc686774558) 42

**[5.3.4](#_Toc686774559)** [温度对纸浆漂白的影响](#_Toc686774559) 42

**[5.3.5](#_Toc686774560)** [反应时间对纸浆漂白的影响](#_Toc686774560) 43

**[5.3.6](#_Toc686774561)** [生物预处理对纸浆白度的影响](#_Toc686774561) 43

**[5.3.7](#_Toc686774562)** [混合酶的比例对纸浆漂白的影响](#_Toc686774562) 44

**[5.3.8](#_Toc686774563)** [生物酶对漂白废水的影响](#_Toc686774563) 45

**[5.4](#_Toc686774564)** [小结](#_Toc686774564) 45

[结论](#_Toc686774565) 46

[参考文献](#_Toc686774566) 46

[附录](#_Toc686774567)**[A](#_Toc686774567)** [普通青霉菌](#_Toc686774567)**[ITS](#_Toc686774567)**[鉴定](#_Toc686774567) 48

[在学研究成果](#_Toc686774568) 49

# **1** 文献综述

## **1.1** 造纸原料

### **1.1.1** 芦苇

芦苇（*Phragmites australis Trin. ex Steudel*），是一种水生或湿生的多年生禾本科植物，多在沟渠、沼泽、河溪等多水地区生长，在我国分布广泛，东北、内蒙古、新疆、华北等地都是芦苇集中分布地区。芦苇具有较强生命力的根状茎，对水适应幅度较宽，从水深几厘米到一米都有芦苇群生长。而芦苇中纤维素的含量为44%，仅次于棉、麻，与木材相似，是一种优良的造纸材料。在内蒙古乌梁素海地区，芦苇面积已达120平方公里，占全湖面积的2/5，刈割产量可达10万吨，与洞庭湖芦苇产量基本相一致，是当地造纸厂的主要原料基地[1]。

### **1.1.2** 芦苇在造纸中的研究进展

早在2006年，湖南省芦苇产量可占全国总量的26.7%[2]，新疆博湖苇业[3]是现在全国产芦苇浆最大的企业，其年产量可达9.9 t。张菊先等[2]研究芦苇造纸，发现除了非纤维细胞含量比阔叶林高以外，其他的生物指标与其相近，因此可以用芦苇浆代替阔叶林木浆，用于一般的办公用纸、生活用纸和纸板的生产。艾尼瓦尔等[4]研究使用芦苇为原料，利用不同的白腐菌进行固体发酵结合化学法制浆，结果显示：卡伯值降低了11%和24%，白度提高了10%和30%，粘度也提高了8%和5%，而化学试剂NaOH的量减少了6%和30%，因此表明，这两个白腐菌对芦苇木质素有很好的降解能力。

目前，全球造纸行业仍然以木材为原料，其所占比例高达95%。而在我国造纸行业中木浆占20%，稻麦草占22%，竹子占15%，芦苇占12%，我国是以草浆为主的造纸大国[5]。而在经济比较发达的国家，木材浆占90%，其中包含10%的可回收利用的木本纸浆。有数据显示，在我国，纸板的产量和其消费量早在2009年就已经超越美国居于世界第一[6]。为了满足国民对于纸张的需求，每年需花费巨资从海外进口纸浆和纸产品。虽然我国森林资源匮乏，但拥有着丰富的非木材资源—芦苇。因此，有专家学者提出[7]，以芦苇代替木材并且进行制浆造纸，是解决目前木材资源短缺，促进造纸行业发展的必经之路。

还有专家研究分析[8-9]，芦苇的纤维形态结构及含量都比较适宜造纸原料需求，

芦苇的纤维素含量较高，可塑性好，是造纸行业的优质原料。随着科学技术的发展和造纸工业的创新，无氯、无污染漂白等新技术已基本形成，能很好地解决制浆过程中纸浆白度、韧性等问题，同时还克服了环境污染问题。芦苇可以生产出优质且廉价的文化、包装和生活用纸。因此，发展芦苇制浆产业化是解决我国造纸原料短缺的有效方法。

目前，在中国ft东齐明造纸厂、武汉晨鸣、汉阳造纸厂、湖南造纸厂、辽宁省凌海市金城造纸厂、新疆博斯腾湖纸厂都是以芦苇为原料生产大量的纸张。芦苇不同于木材，它具有年年刈割、有益于生态环境等特点，是一种具有综合利用前途的植物。但由于芦苇纤维素含量较高，而木质素的存在影响纤维素结合固化，因此木质素含量与化学浆得率、药品消耗和纸张脆性有直接关系，漂白度高容易引起氧化返黄。目前，除了有极少学者研究木质素结构模型外[10-11]，木质素的代谢途径和空间结构尚不清楚

[12]. 造纸原料木质素含量多少与制备的纸张或纸板有较大的关系，也就是说，在造纸

行业中，原料中木质素与成本呈现正相关，而与纸张质量成负相关。因此，工业化生产中会选择木质素含量相对较低的材料来作为造纸原料。Chandraya等[13]发现了竹子的木素含量与贮藏的时间存在关系，其研究结果表明木质素含量的减少是白腐菌起主要作用。

近年来，木质素降解的研究尚未突破，对于自然界中木质素降解菌降解木质素的机制、降解菌产生酶系以及酶系之间的相互作用的研究，笔者从分子水平和酶学性质方面进行相关研究。为实现廉价环保的制浆方法提供理论支持，对今后造纸行业的发展具有深远的意义

## **1.2** 木质素降解菌和降解酶系

### **1.2.1** 木质素

木质素是自然环境中含量仅次于纤维素的大分子化合物，它的结构稳定且复杂，一般在高等植物中含量较高且最为常见，人们常常将其分为三种：草本木质素、针叶树木质素和阔叶树木质素。木本植物的木质素含量一般来说大于草本植物的木质素含量[14]，它是绿色植物主要的填充物，使细胞壁和细胞的胞间层、次生壁紧密结合，起到重要的保护和支撑作用。

木质素是一种由许多结构单元组成的聚合物，不同原料、同一原料的不同部位木

质素的结构都不一样。目前，木质素的结构研究尚未清晰，国内外学者主要通过生物合成法、光谱法和模型法对其研究。结果显示，木质素是由结构单元为苯基丙烷组成的，具有一定的三维空间结构，是一种天然大分子化合物。木质素结构的侧链和苯环上都连接着不同的基团，分别为：酚羟基、甲氧基、羰基和醇羟基，除此之外，还可以是碳、芳基或者氢[15]。还有研究学者得出，木质素结构是单元之间通过碳碳键和醚键相连，连接部位还可能是苯环、酚羟基之间、三个碳之间或者苯环侧链之间[16]。

### **1.2.2** 降解木质素的微生物

木质素是自然界中仅次于纤维素含量的一类生物大分子，广泛存在于植物的细胞壁中，是一个具有稳定且复杂结构的聚合体，结构极其复杂，难以降解。因此，如何降解木质素，使其原料得以利用已成为人们研究的热点[17]。传统的制浆方法不仅需要大量的化学药品以及能源的消耗，而且过程中产生的废液还会对环境造成严重的污染。采用微生物降解木质素是一种既节约又无污染的制浆方法，目前，如何筛选出高效降解木质素的菌，成为当前的研究热点。

在自然界中，降解木质纤维素的微生物广泛存在，一般来说降解木质素的微生物主要以真菌为主，其中包括：白腐菌、软腐菌和褐腐菌，另外还有部分细菌。白腐菌具有较强的降解木质素能力，白腐菌分解过程中产生的胞外酶降解木质素不产生色素，对造纸行业有着重要的影响意义。白腐菌属于真菌门担子菌纲，是一种丝状真菌，研究中发现还有放线菌有降解木质素的作用[18]。其中白腐菌研究较多的有：木灵芝

（*Ganode ostrale*）、黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporim*）、多年层孔菌

（*Fomesannosus*）、粪生黑蛋巢菌（*Cyathus stereoreus*）、杂色木云芝（*Coriolus*

*Versicolor*）、糙皮侧耳菌（*Pleurotus ostreatus*）、贝壳状革菌（*Panus conchatus*）、射脉齿菌（*Phlebia radiata*）等，褐腐菌有拟管革裥菌（*Lenzitestrabea*），细菌为：节杆菌（*Arthrobacter sp.*）、小双孢菌（*Microbispora sp.*）、小单孢菌（*Micromonospora sp.*）、链霉菌（*Streptomyces sp.*）、诺卡氏菌（*Nocardia sp.*）、红球菌（*Rhodococcus sp.*）、高温单孢菌（*Thermomonsporamesophila*）等[19-20]。

邓動等[21]使用不同降解木质素的菌株进行比较，其结果显示：东方栓菌、白干酪菌、毛革盖菌、彩绒革盖菌S2在培养第15 d时，降解率分别为33.59%、21.90%、

36.71%和22.46%。黄慧等[22]研究黄孢原毛平革菌处理玉米稻秆，发现在第35 d时，降解率能够达到45.2%。蒋荣清等[23]将木质素降解菌应用于堆肥中，结果发现在第

14 d时，降解率达到36.25%，且该菌能够适应堆肥中温度的变化。

*Streptomyces viridosporus* T7A放线菌，它的降解能力很强，分泌几种胞外的过氧化物酶，这种酶在H2O2存在的条件下能够分解木质素，使其结构发生断裂[24]。另外，还有许多的放线菌都有分泌胞外酶的能力[25]。相对于真菌产漆酶而言，关于细菌的报道较少，随着细菌基因组的发展，实验数据显示能够产生漆酶的细菌也广泛存在[26-27]。

### **1.2.3** 降解木质素的酶系及其降解机理

白腐菌由于其生长在腐朽木头上并且其子实体呈现白色而得名，它分泌的胞外酶会导致木质素的自由基矿化，最终产生CO2和H2O，在各种降解木质素菌种中，它是降解木质素最彻底的[28]。木质素降解菌在降解木质素过程中，有三种酶对其作用：木质素过氧化物酶（Lignin peroxidase, LiP）、锰过氧化物酶（Manganese-dependent

peroxidase，MnP）、漆酶（Laccase, Lac）[29]。其中木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶都为血红素糖蛋白，需在H2O2存在的条件下才能降解木质素。LiP以低浓度的过氧化氢为氧化剂经过三个电子转移及一系列的甲基化，可以将部分木质素解聚[30]。

MnP 需在H2O2和α-羟基羧酸存在的条件下氧化Mn2+为Mn3+，Mn3+可以将木质素酚型单元水解为酚氧游离基，引起木质素的降解[31]。漆酶是一种含有Cu2+的多酚氧化酶糖蛋白，它可以能够通过活性中心的铜离子来氧化酚类化合物，脱去氢基上的质子或者电子，使得酚类化合物和木素类化合物裂解为自由基，逐一发生解聚反应，从而降解木质素[32-33]。

漆酶是一种糖蛋白，由多糖、多肽链和4个Cu2+组成，铜离子位于漆酶的活性中心，在漆酶的生化反应过程中起着重要的作用。这一系列过程都需要漆酶中的Cu2+协同传递电子，Ⅰ型Cu2+从还原态底物中吸收电子，将底物氧化成氧化态底物。之后，Ⅰ型铜离子可以经过半胱氨酸—组氨酸途径把单个电子传递给三核铜簇中心，将氧还原为水[34]。

木质素过氧化物酶是含有Fe-卟啉环的血红素辅基同工酶，它可以氧化含有电子的非酚类化合物，产生正离子的自由基，之后发生系列反应，其中包括：C-C键的断裂、脱甲基反应、醚键断裂、苯亚甲基羟基化、脱羧，醌、酚形成以及芳香环开裂。

锰过氧化物酶也是一种含有血红素的同工酶。在H2O2和Mn（Ⅱ）存在的条件下，可以氧化木质素模型物和酚型的木质素。Mn（Ⅱ）还原锰过氧化物酶，同时生成Mn（Ⅲ），之后Ⅲ型的Mn又氧化酚型化合物并且保护MnP不在受到自由基破坏。

因此，MnP发生氧化反应时必须有Mn的存在。

### **1.2.4** 混合菌种降解木质素

自然界中木质素等高分子物质存在较为丰富，它们的利用价值较大，但在利用其时普遍存在成本高这一问题，而通过应用微生物降解木质素并加以利用是目前最经济的方法。随着能源的枯竭，可再生能源利用备受关注。利用微生物降解木质素能够达到资源、环境共赢，可持续发展。但目前对微生物降解木质素的深入研究尚未得到突破，未能应用到产业化生产，存在以下几个最普遍的难点：降解时间长、未得到特别高效降解菌、木质素纤维素降解研究较少、混合微生物降解研究困难。许多研究学者在筛选得到木质素降解菌上做了大量的工作，但是以往的工作都集中在菌种的培养、产酶条件等优化问题上以及单菌种降解预处理木质素等工艺的优化[35-36]。而木质素的降解是微生物共同作用的结果，所以近几年研究者多将目光投向了复合菌种的木质素降解上。

乌梁素海地区的芦苇收割以后大部分以堆积焚烧等形式处理，造成环境的污染和资源浪费。所以，我们探索最佳的混合菌群降解芦苇中的木质素，使芦苇资源被合理地利用。生物制浆是利用微生物降解原料中的木质素，减少化学使用量得到纸浆的过程，在降解芦苇木质素的过程中，同时伴随着纤维素和半纤维素的降解，因此，需进一步弄清木质纤维的降解机理。研究结果显示，菌种的不同混合及其产生的酶对木质素、纤维素的降解存在着显著的差异，所以菌种混合方式和产酶需深入研究。

目前经过研究，许多研究学者以Forest Products Laboratory U. S. A的黄孢原毛平革菌（*P. Chrysosporium*）为研究对象，从其中分离得到降解木质素的木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶，对其进行分离纯化等研究，1996年，秦小琼等[37]报道了红栓菌可以产生胞外漆酶，在降解木质素酶系上做出了贡献；在研究木质素纤维素先后降解顺序上，Ericksson和Highley研究发现，在降解菌腐朽木材时，菌丝体线先穿过半纤维素，才开始降解纤维素和木质素，降解菌不仅可以用于造纸还可以应用于环境治理、饲料加工、发酵、生物肥料等领域，这些研究都取得了显著的效果。然而，到目前为止，混合菌种降解木素的机理还有待研究。

混合菌种发酵是指2种及2种以上的菌种固态或者液态共同发酵，一般情况下，混合菌种发酵比单菌更快、更有效。原因在于混合菌株之间存在着协同作用，这样可以提高底物的转化率，同时还存在着多级之间的转化[38]。混合菌种发酵还能克服木质

素降解过程中，酶的产生与其活性之间的问题。在混合菌种的发酵体系中，在一定的时间之内，木质素降解酶的产生不会受抑制，酶的活性也不会受抑制，反而失活的酶还可以被再次的激活。总而言之，在这样的体系中，酶促反应所生成的糖会被白腐菌所利用，从而避免酶促的终产物对酶有抑制作用[39]。Villas-Boas和Esposito等[40]研究表明，在培养基中，加入适量的酵母粉不仅可以缩短发酵的时间，还能提高木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶的酶活力。近些年来，研究学者对混合真菌的培养分泌木质素降解酶研究已逐渐开始，但主要集中在2种及2种以上的混合发酵，而针对多种菌的混合对木质素降解的研究报道仍然较少[41]。

虽然现在混合菌种降解木质素方面已有部分成果且已经应用于实践中，但是对于混合菌种之间的关系及其作用机理尚未有突破性的进展，目前，菌种之间的混合方式和作用都是随机的，缺乏理论基础，对于已经应用的混合菌种未能有效地证明菌种之间的关系，使其达到最佳状态，发挥最大作用。这样，对混合菌种的培养及其应用受到很大影响。如果在混合菌种代谢、作用机制和菌种之间的关系方面进行研究，提供理论依据，将会在混合菌种应用中有着巨大的贡献[42]。

## **1.3** 纸浆漂白

就世界而言，造纸行业占据着重要的地位，资源量巨大，同时也给环境带来了极大的伤害。制浆漂白过程就是一个污染较为严重的环节，在该过程中会产生大量的有毒有害的物质，危害着人们的身体，从而引起了大家的高度重视。漂白的技术很多，如物理法、化学法、生物法等。在这些方法中化学法对环境污染较大，而生物法则可避免了这个缺点，所以，许多研究学者采用生物技术进行漂白。漂白的基本原理就是：

1. 改变或者破坏发色的基团结构

2. 阻止或者去除发色基团之间的链接键

3. 防止发色基团发生共轭现象

4. 避免产生发色基团

### **1.3.1** 螯合处理

造纸原料在生长过程中，吸附一些金属离子，造纸过程中，纸浆中的金属离子对过氧化氢的分解存在着一定的影响。铜、锰、铁等离子都能促进过氧化氢的分解，产生自由基，自由基有利于脱掉木质素，但是这些自由基也能引起过氧化氢无效的分解，

影响漂白效果，还能导致碳水化合物的分解。镁、钙等碱性离子可以稳定过氧化氢。因此，在过氧化氢漂白过程中，需要控制金属离子的分布，尽可能保护碱性金属离子去除过渡金属离子。

过渡元素可以将纸浆中的酚类物质螯合成为复杂的螯合物，其螯合分子间的强度要远远高于羧基对其的吸引力。该螯合能力与稳定性也是与过度金属的性质密切相关，一般来说与原子的电荷强度、离子半径、电子层结构有关，电子层则是重要的影响因素[35-36]。三价金属的作用力要高于二价；过渡元素高于碱金属。金属螯合物主要分为惰性气体型和过渡金属离子型。惰性气体型一般指的是碱金属、碱金属和Al3+形成的螯合物，其特点是电荷较高、离子半径小的离子所形成的螯合物稳定性高；而过渡金属离子型，由于其电子结构具有空的d轨道、离子电荷高、半径小等有利于形成稳定螯合物的特点，常常被当做螯合剂所使用。二价金属形成螯合物的稳定性一般来说是：Mn2+> Fe2+> Co2+> Ni2+> Cu2+> Zn2+ 。

MgSO4·7H2O和Na2SiO4·9H2O一般用作螯合剂的稳定剂应用于造纸行业。而硫酸镁稳定H2O2的机理是有悖的，但是现在通常的解释是：1）硫酸镁可以吸引金属离子并与其形成化合物，从而使得其钝化了金属离子的活性；2）硫酸镁还可以对超氧自由基起到稳定作用，使得自由基的解离的时间变长。根据Colodette [43]的实验可知：没有过渡金属离子参与反应的状态下，Mg2+对H2O2有显著的稳定效果，可以大大提高过氧化氢的利用效率；但存在微量的过渡金属时，镁离子则不会起到稳定作用，甚至在锰离子存在下，会起到反作用，消耗过氧化氢。

### **1.3.2** 过氧化氢漂白

过氧化氢是重要的漂白剂之一，广泛应用于纸浆漂白中。它在整个漂白过程中需要无氯离子的存在，它具有稳定性好、泛黄值低、环境污染小、工艺适应性强等优点

[44]. 无论使用什么方法制浆，对于过氧化氢漂白纸浆的反应原理都是一样的。H2O2

在碱性的条件下，解离出一种阴离子—过氧氢根，它起主要的漂白作用，这个阴离子可以和有色物质发生亲核反应，使得木质素和有色物质的共轭侧链在碱性条件下发生断裂反应，这样增加了产物的亲水性，在以后过程中容易洗涤，很好地除去。另外，

H2O2在温和的条件下，它可以氧化木质素但是不改变其骨架和空间结构，只和发色基团发生反应进而褪色，进而实现漂白。H2O2在酸性条件下，且无杂质存在时，H2O2相当稳定。在碱性条件下，解离方程见式1.1：

H2O2 + OH− ↔HOO−+ H2O（式1.1）

Farver等[45]研究过氧化氢和漆酶的反应机理，发现二者有着特殊联系，且能产生具有高度亲和力和稳定结构的高聚物。RolfBrande等[46]研究表明过氧化氢和漆酶反应时，在400 nm处有新的吸收峰，这和漆酶420 nm的吸收峰不同，进一步证明了有新的产物生成。吴鼎泉等[47]采用微量热法证明了过氧化氢和漆酶的动力学关系，结果显示：在没有氧气的条件下，漆酶被还原生成一种名为氢醌—酶的复合物，之后分解为漆酶（带Cu+）和半醌。氧气存在的条件下，Cu+转变成Cu2+。李辉[48]等利用气相色谱测定H2O2和漆酶在反应中的消耗与产生。得出过氧化氢与漆酶在反应过程中会产生协同作用，少量的过氧化氢可以加速漆酶的酶促反应，并且催化过氧化氢的分解。

故此，笔者认为漂白过程中存在微量的过氧化氢会对漆酶的漂白起到积极的作用，由于这方面的文献报道较少，漆酶与过氧化氢二者之间的反应机理不甚明确。

### **1.3.3** 生物漂白

造纸行业在世界的发展中占据着重要的地位，但是造成的环境问题也是极为严重的。污染主要是水方面，造纸废水由多个阶段产生，尤其是漂白阶段的废水难以处理。其中含有氯化物、有毒物质、致癌物质、难以降解的有机物等，这样使得漂白受到限制，现阶段，纸浆的漂白剂技术逐渐转向全无氯、无元素氯和生物漂白的方向发展[49-50]。随着科学技术的发展，造纸行业中应用生物技术越来越广，生物漂白是一种新型的漂白技术，它可以减少化学使用量，降低环境污染，还可以减少能耗，提高漂白效果。

生物漂白是使用微生物的次级代谢产物酶与纸浆中的发色基团反应，有利于脱除木质素，从而提高纸浆的白度的过程。生物漂白的主要目的是改变纸张性能、减少化学使用量、减小对环境的污染[51]。目前，应用较为广泛的有木聚糖酶、木聚糖酶和木质素降解酶混合酶、漆酶/介体系统。

1. 木聚糖酶漂白机理：它能够水解存在于木质纤维表面的木聚糖，可以促进后续漂白中木质素的去除，同时还有一部分的LCC，因为半纤维素的分解而使剩余的木质素更好的释放，有利于后续漂白。

2. 木聚糖酶和木质素降解酶的协同作用：利用木聚糖酶降解纸浆表面覆盖的木聚糖，之后使用木质素降解酶分解木质素和LCC，使得剩余的木质素分离出来。

3. 漆酶和漆酶介体系统协同作用：是指漆酶在介体和氧气同时存在的情况下，进行木质素降解和漂白的过程。漆酶氧化还原的位点比较低，不能氧化高电位的木素，这时需要借助于中介体，中介体容易使得电子得失，可以传递电子。漆酶存在的条件下，介体活性较大，可以从介体得到电子，将其传递给木素，使木素氧化分解。

庞志强等[52]利用白腐菌产生的粗酶液对杨木进行预处理，实验结果显示：在过氧化氢漂白之前使用白腐菌粗酶液进行预处理，纤维的长度和组分都有明显变化，有利于漂白。但是当酶液量超过8 IU/g时，纤维长度变小，漂白效果有所下降。冯建良等人[53]采用白腐菌对麦草纸浆工艺进行优化预处理，除此之外，还使用白腐菌、漆酶和木聚糖酶进行漂白，结果显示：白腐菌处理麦草浆时，15 d大于30 d，并且漂白时漆酶漂白的效果好于木聚糖和白腐菌。漆酶处理的纸浆得率高于未处理的4.39%，裂断长和耐破指数分别提高了33.39%和42.86%. Reid和Paice等[54]人使用变色栓菌分别处理了硬木和软木的纸浆，结果发现：纸浆中剩余的木质素大部分都被去除，Kappa值也有所下降，纸浆的白度和亮度都有提高。

应用微生物进行预处理，存在以下问题：微生物预处理时，除了产生降解木质素的酶以外，还产生降解纤维素的酶，最终影响纸张的强度。微生物预处理时间较长，这样使得漂白率降低，难以实现产业化。当今时代，在生物漂白中，多数采用单种酶或者混合酶的形式。

#### 1.3.3.1 木聚糖在纸浆漂白中的研究进展

木聚糖是半纤维素的组成部分，广泛地存在于一年生的植物和阔叶木中。在很多碳水化合物的复合体中木聚糖是化合物和木质素的最主要的界面，木聚糖在细胞壁中有着黏结的作用，保护纤维素不受攻击。木聚糖酶可去除木聚糖，从而增多纤维的孔隙，它的可以内切的β-1, 4-木聚糖和外切的β-木聚糖。内切酶作用在长链且低聚的木糖中，而外切酶作用于短链，可以将从非还原性的末端水解出木糖残基。木聚糖酶不具有直接的降解木质素能力，是因为非木材原料中具有很多的LCC（碳水化合物和木质素复合体），他们经过木聚糖酶作用以后，破坏了半纤维素和木素的连接，生成了许多的碎片，在漂白过程中更加的容易。

芬兰国家Aunekosi造纸厂已将木聚糖用于漂白纸浆的应用中，在生产中，使用的化学试剂量和废水中的有机物都大幅度的降低[55]。另有学者研究突变的黑曲霉An-76产生的木聚糖酶，结果显示：木聚糖对纸浆和染料的性能改变是不一样的[56]。陈嘉川等[57]人筛选得到一株产木聚糖酶的耐碱性细菌，之后用于处理麦草浆，实验得出最佳条件为：酶量为50 IU/g、pH在7.5、温度是45℃、时间在90-120 min。实验

还证明，真菌产生的木聚糖酶和细菌是一样的，只是在用量上有区别。关莹等[58]人对杨木的硫酸盐浆进行木聚糖酶处理，最佳的反应条件是：酶为5 IU/g、pH在6.0、温度为50℃、时间是90 min、纸浆浓度为8%. Pedersen等[59]人利用木聚糖酶对木浆进行处理，结果显示：白度提高了2% ISO，并且在后续的漂白中较少了35%的化学使用量。

酶都具有很强的专一性，对于环境、生长条件都有很苛刻的要求，只有在适宜的条件下才能起到作用，酶受影响的条件很多，比如：温度、时间、用量、pH和浆浓，这些因素都会在漂白中影响木聚糖发挥作用[60]。

#### 1.3.3.2 木质素降解酶在纸浆漂白中的研究进展

生物漂白中应用木质素降解酶，是利用酶直接降解木质素，提高可漂性，有利于漂白。木质素降解酶包括：锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和漆酶[61]。

1990年有报道，表明漆酶在介体的辅助下传递电子，来氧化木素的非酚型模型，这样以来，吸引了研究学者们的兴趣，从此，开始研究漆酶对生物漂白的应用[62]。

Paice等[63]从木质素降解菌的菌液中提取酶液，对纸浆进行漂白，发现在很短的时间内亮度和白度都有提高。Rosana C等[64]人研究漆酶及其介体体系，在该体系中，介质存在的条件下，漆酶可以很好地降解木质素，在木聚糖酶并存在的条件下，降解效果更有显著提高，原因是木聚糖酶降解半纤维素为小分子，再次与木质素结合，有利于漆酶的降解。莫佳琳等[65]人筛选得到一株白腐菌，利用它产生的漆酶和ABTS一起作用于硫酸盐的竹浆，经过漂白后发现Kappa有所下降，并且白度增加了4.7% ISO，同时还可以保持很好的粘度。王玉峰等[66]人选择不同的介体和漆酶作用于纸浆的漂白中，结果显示：在这个系统中，经过生物漂白的木质素结构有明显的变化。

#### 1.3.3.3 漆酶和木聚糖酶在纸浆漂白中的应用

木聚糖酶可以分解LCC的复合体，它还可以水解木聚糖，抑制变色基团的产生。另外，漆酶可以氧化电位低的电势，在木质素降解的应用上有局限性，因此，采用两者结合的方式，来共同处理纸浆，可以很好地提高纸浆的强度。对于木聚糖酶和漆酶的共同作用，许多研究学者进行了大量的实验研究。喻力等[67]人利用木聚糖酶和漆酶共同作用于蔗渣浆，结果显示：他们的共同作用效果高于漆酶和漆酶介体系统。白度、强度、撕裂强度和耐破性都有明显提高，这一结果说明两种酶组合不仅可以使白度增加，还可以改善纸张的性能。尤纪雪等[68-69]对木聚糖酶和漆酶组合作用也做了大量的实验，他们使用组合酶对马尾松进行处理，结果说明：漆酶及其介体系统降解木质素能力低于组合酶，所以，可以使用两种酶组合代替漆酶/介体系统，对于纸浆的漂白

结果也是一样的。使用木聚糖酶和漆酶对浆料进行处理时，纸张的强度和耐破性都有提高，并且当酶量在适宜的范围内，产生的自由基和强度成正比[70-71]。

## **1.4** 制浆工艺

随着生物技术的发展，当今，造纸行业也朝着与世界和谐相处的方向发展，主要表现在：高效、速度快、质量高、能耗低和连续自动化。生物技术已经在造纸行业中拥有广泛的研究，有些环节已经使用。近些年来，利用生物方法来改善造纸原料、工艺流程，可以提高纸张的质量和性能，从而达到减少化学药品的使用量和节约能耗等目的。目前，制浆的工艺主要分为：高得率制浆（机械制浆）和化学制浆两个方面。在目前资源短缺的情况下，高得率制浆存在着较大的优势[72]。高得率制浆主要是利用少量或者不用化学药品处理原料，然后利用机械法解离原料成纸浆。化学制浆是使用化学试剂处理原料从而得到纸浆的过程。化学法制浆的得率为40~50%，高得率制浆的得率可以达到80~90%。由于高得率制浆污染低和得率高的特点，所以，现在研究成为一个热点，比如有：化学机械浆、生物机械浆、生物化学浆。

### **1.4.1** 化学机械制浆

CTMP（化学热磨的机械浆）是以热磨机械法制浆（TMP）为基础的，它在TMP生产之前加上化学法的处理，继而磨成纸浆的过程。这个方法的特点在于，原料利用率较高、适应性强、纸浆的得率高、工艺简单、污染较小等。此法比热磨机械浆能耗低，比化学浆污染小、得率高。

### **1.4.2** 生物机械制浆

就目前而言，研究生物制浆的学者主要集中于生物机械浆、生物化学浆的研究较少。生物机械浆的优点在于：污染小、能耗低。生物制浆就是利用降解木质素的微生物或者酶降解原料中的木质素，从而进行制浆的过程，选择微生物处理原料，对设备环境要求较高，但是，使用酶处理原料，处理时间较短、工艺要求简单、容易控制，适合连续化大规模生产。近些年的研究中，生物机械浆发展迅速，原因在于，纸浆得率高、污染小。但是存在着容易返黄、纸张的强度较低、能耗高等问题。生物机械浆便是通过微生物对造纸原料进行预处理，再次进行磨浆，结果可以提高纸张性能、降低能耗、减小环境污染。

Jujop[73]研究表明，在温度90℃、pH为2时，利用漆酶预处理，结果显示：节约能耗30%，还改善纸张性能。Petit-Conil等[74]人使用锰过氧化物酶对杨木纸浆进行预处理，节约的能量为25%。刘正贵等[75]使用*Phanerochaete chryscoporium*和*Trametes versicolor*对木片进行处理，再磨浆，发现经过预处理的纸浆可以降低能耗

39.1%，同时还提高了纸浆的强度。还有使用白腐菌对杨木进行预处理，之后进行机械法制浆，可以节省能耗为25-50%. Camarero等[76]实验研究表明：剑麻经过预处理之后，可以降低22%-66%的能耗。Gonzalo Idáraga 等[77]使用*P. eryngii* 和*P.*

*chrysosporium*对麦草纸浆进行预处理，发现可以降低能耗和化学药品的使用量。

### **1.4.3** 生物化学制浆

迄今为止，具有高效降解木质素的菌种较少，所以，许多研究者开始研究采用生物预处理方法进行生物—化学制浆，目的在于，先进行生物预处理，使得原料的木质素降低，使得纸浆在相同的条件下减少化学使用量，或者在相同的条件下，提高纸张的性能。

庞志强等[41]利用白腐菌产生的粗酶液对杨木进行预处理，实验结果显示：经过白腐菌粗酶液处理的纸浆，性能显著提高，打浆时的能耗降低，还有纤维长度增加，组分减小，纤维宽度提高。经过处理，不仅纸浆白度有所提高，而且纸张的强度也有提高。艾尼瓦尔等[4]人对芦苇进行白腐菌固体发酵预处理研究，继而进行化学制浆。结果显示：经过预处理之后，纸浆白度、黏度都有大幅度提高。

林志伟[78]采用白腐菌固体发酵麦草，结果发现降解使得纤维素的分离与化学法蒸煮的效果相似。Wolfaardt研究[79]白腐菌对蔗渣进行预处理，研究表明，经过预处理的蔗渣在蒸煮时可以减短时间，节省化学试剂的使用量。

## **1.5** 本课题的研究目的和基本内容

### **1.5.1** 研究意义

目前，在我国，造纸行业处于停滞阶段，主要原因在于造纸原料-木材的短缺，而非木材原料又难于大量集中，此外还有造纸行业的污水排放。于是，我们可以找到一种方法，既可以使得非木材原料得到充分的利用又能降低污染。

木质素的生物降解被应用于造纸行业的许多方面，如：废水处理，原料预处理、

纸浆的漂白。利用高效降解木质素菌处理芦苇，经过机械磨浆，混合酶（漆酶+木聚糖酶）漂白，使其转变成纸张，这不仅使非木材原料得到充分利用，还可改善环境，降低环境污染，这对我国造纸行业有着特殊的意义。

### **1.5.2** 研究的基本内容

本研究选用四株筛选的降解木质素能力较强的菌种，研究四种降解菌的组合，进行液体发酵降解芦苇木质素，获得高效降解木质素的复合菌种，此外，对最优组合进行了混合比例、固液比和混合方式的优化，为芦苇生物制浆提供一定的理论依据。

1.木质素降解菌筛选，以漆酶酶活的高低为参数指标，优化了普通青霉菌发酵适宜的培养条件。

2.采用单菌种和多菌种混合降解芦苇木质素的方法，对混合方式、混合比例进行优化，测定在不同的条件下芦苇木质素的降解率，得到高效降解木质素的复合菌种。

3.进行生物—化学法漂白纸浆，采用木聚糖酶和漆酶的混合酶助漂纸浆，通过实验得到最佳使用量及其最佳比例组合，计算减少的化学使用量。

# **2** 降解木质素菌种筛选

木质素是植物细胞的组成成分之一，它是一类大分子，它的结构复杂、稳定，微生物难以降解。在我国拥有着丰富的芦苇资源，大部分都已堆积焚烧，这样造成资源的浪费，而且对环境造成污染，所以筛选得到高效降解木质素的菌种是目前生物质降解的重要方向之一。当前，降解木质素成效最佳的是白腐菌，它能将其降解为CO2和H2O。本章筛选菌种的土样大多数都来自于腐朽树木根部的土壤，它们具有一定的降解木质素的能力。

## **2.1** 实验仪器与试剂

### **2.1.1** 实验仪器

主要的实验仪器见表2.1。

**表2.1** **主要的实验仪器**

| 名称 | 型号 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 锥形瓶 | 500 mL | 四川蜀玻有限责任公司 |
| 立式压力蒸汽灭菌器 | YQS-LS-30S11 | 上海特讯实业有限公司医疗设备厂 |
| 超净工作台 | ZHJH-C1112B | 上海智城分析仪器制造有限公司 |
| 高速万能粉碎机 | FW-100 | 上海申光仪器仪表有限公司 |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | 101型 | 上海跃进医疗器械厂 |
| 可见分光光度计 | 721型 | 上海菁华科技仪器有限公司 |
| 恒温振荡器 | HZQ-R | 中国・哈尔滨东联电子技术开发有限公司 |
| 打浆机 | ZQS2-23 | 陕西科技大学机械厂 |
| 电热恒温培养箱 | FD-1D-80 | 上海跃进医疗器械厂 |
| 电子分析天平 | FA2104B | 北京赛多利斯天平有限司 |
| 循环水式多用真空泵 | SHB-III型 | 郑州长城科工贸有限公司 |
| 数显六联磁力搅拌器 | HJ-6A型 | 金坛市医疗仪器厂 |
| 白度计 | WSB-1型 | 上海昕瑞仪器仪表有限公司 |
| 电热蒸煮锅  pH计 | ZQS1-15  CT-6020A | 陕西科技大学机械厂  深圳市柯迪达电子有限公司 |

### **2.1.2** 实验试剂

实验中所使用的主要试剂，见表2.2。

**表2.2** **实验所使用的主要试剂**

| 试剂 | 纯度 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 天津市北方天医化学试剂厂 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 天津市风船化学试剂科技有限公司 |
| EDTA二钠 | 分析纯 | 天津市风船化学试剂科技有限公司 |
| 无水乙酸钠 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 酒石酸钾钠 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| MgSO4·7H 2O | 分析纯 | 天津市永大化学试剂开发中心 |
| 冰乙酸 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 磷酸二氢钾 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 碘化钾 | 分析纯 | 天津市风船化学试剂科技有限公司 |
| 硫代硫酸钠 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 无水乙醚 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 苯酚 | 分析纯 | 天津市光复精细化工研究所 |
| 3,5—二硝基水杨酸 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 无水亚硫酸钠 | 分析纯 | 天津华东试剂厂 |
| 蛋白胨 | 分析纯 | 天津华东试剂厂 |
| 酵母浸粉 | 生物试剂 | 北京奥博星生物技术有限责任公司 |
| 硫酸锌 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 硫酸锰 | 分析纯 | 天津市化学试剂三厂 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市科盟化工工贸有限公司 |
| 磷酸氢二钠 | 分析纯 | 天津市科盟化工工贸有限公司 |
| 葡萄糖 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 浓硫酸 | 分析纯 | 天津市翔宇化工有限公司 |
| 双氧水 | 30% | 天津市永大化学试剂有限公司 |
| ABTS ammonium | Salt >99.0% | Sigma Aldrich |

## **2.2** 培养基配制

1. PDA 培养基：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，蛋白胨5 g, KH2PO4 3 g，MgSO4·7H 2O

## 1.5 g，定容至1 L，pH自然，1×10 5 Pa灭菌30 min。

2.筛选培养基：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，蛋白胨5 g, KH2PO4 3 g，MgSO4·7H 2O

## 1.5 g，铁氰化钾0.15 g/100 mL，定容至1 L，pH自然，1×10 5 Pa灭菌30 min。

3.保存培养基：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，定容至1 L，pH自然，1×10 5 Pa 灭

菌30 min。

## **2.3** 实验方法

将采集的腐朽树木根部的土样，取 5 g 放入装有 100 mL 无菌水的三角瓶中浸泡24 h，然后取浸泡好的土样涂布于筛选培养基上，恒温培养 3-4 d，观察菌落。挑取变蓝色菌落进行划线，直到分离出单菌落。选取其中生长相对较好的菌株保藏。木质素降解菌筛选研究的技术路线如图 2.1 所示

目的菌种的初筛

目的菌种的复筛

菌种培养

保存菌种

图2.1 实验流程

单宁酸平板法（Bavendamm法）[80]：在无菌的条件下，加入鞣酸（终浓度是0.01 g/100 mL），涂布筛选培养基。30℃培养10 d左右，每天记录，菌落周围是否有棕色氧化带产生。

铁氰化钾法筛菌：单独配制铁氰化钾0.1 g/250 mL，待培养基凝固后，滴加一层铁氰化钾，静置，接种。30℃培养，观察。（木质素降解菌与铁氰化钾产生变色反应，菌落周围产生黄绿色，其他地方为蓝绿色）[81]。

## **2.4** 结果与分析

在PDA-铁氰化钾培养基上产生变色反应，挑取变成蓝绿色的菌落，进一步挑取单菌落，最终得到1株木质素降解菌，其命名为普通青霉菌，命名是依据菌种的ITS测序（详见附录A）。

 

图2.2 普通青霉菌筛选变色的照片



图2.3 普通青霉菌在光学显微镜下的照片

## **2.5** 小结

本实验对采取的腐朽树木根部的土样进行筛选，挑取单菌落，经过显微镜和ITS

鉴定（详见附录A），最终得到单一菌种普通青霉菌。

# **3** 普通青霉菌产漆酶条件优化及酶学性质研究

目前，降解木质素的菌种研究主要集中在真菌，但是降解效果都不太理想，本文研究的菌株大多都是生长在腐朽的树木上，它们具有一定的降解能力，首先利用铁氰化钾培养基快速筛选得到降解木质素的菌种，之后探讨菌株在液体培养中培养条件及产酶性质的研究，最后应用于降解芦苇木质素中，从而选择出具有高效降解木质素的菌株。

微生物生长受环境条件的影响较大，木质素降解菌生长不仅需要合适的碳源、无机盐、氮源和金属离子，还需要适宜的温度和pH值，在最适宜的条件下生长，它能得到最快的生长速度，可以在最短的时间内进行扩大培养，用于应用研究菌种。

## **3.1** 实验仪器与材料

### **3.1.1** 实验仪器

主要的实验仪器见表2.1

### **3.1.2** 实验材料

1. 主要的实验试剂见表2.2

2. 普通青霉菌，从土样中筛选得到，保存于内蒙古科技大学，生物质能源实验室。

## **3.2** 实验方法

### **3.2.1** 漆酶酶活测定

漆酶能分解ABTS为ABTS自由基，在420 nm条件下，ABTS自由基具有比ABTS更大的自由基，漆酶分解ABTS，自由基的浓度增加，吸光度也随着增加。通过定义规定时间内吸光度的变化量为漆酶的酶活。

#### 3.2.1.1 测定酶活使用试剂的配制

0.5 mol/LABTS缓冲溶液的配制（pH4.6）：

溶液A: 0.2 mol/L醋酸：量11.55 mL冰乙酸溶于1000 mL水中。

溶液B: 0.2 mol/L醋酸钠：称16.4 g乙酸钠溶液1000 mL水中。

pH4.6醋酸-醋酸钠缓冲溶液的配制：取A溶液25.5 mL和B溶液24.5 mL，进行混合。

0.5 mol/LABTS醋酸-醋酸钠缓冲溶液的配制（pH4.6）：精确称取ABTS 0.274 g

加到100 mL pH4.6的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中。

#### 3.2.1.2 酶活的测定

（1）粗酶液的制备

吸取1.5 mL菌液14000 r/min，离心5 min，即得粗酶液。

（2）酶活的测定

取2 mL ABTS加入到比色皿中，再加入1 mL的粗酶液，启动反应，在420 nm

波长下，测量3 min之内的OD变化值。对照组为蒸馏水。

（3）酶活的定义

一定条件时，单位时间内催化1μmol的底物需要的酶量定义为1个酶活力单位

（U）。

酶活力的定义：在（pH4.6、25℃）条件下，1 min之内，氧化1 mL酶液吸光值的变化。

漆酶酶活力计算公式4.1：

酶活力（A）= 2 

*A*2 *A*1

3.6104 *T*

103

（式4.1）

式中：A1—吸光度初值；

A2—吸光度末值；

T—从A1增加到A2经历的时间。

2—1 mL酶液与2 mL 0.5 mol/L ABTS反应

103—L换算成mL的体积比

酶活力单位为μmol·L- 1·min - 1 即U/mL（液体）、U/g（固体）。

### **3.2.2** 产酶条件的研究

#### 3.2.2.1 不同碳源对普通青霉菌产漆酶的影响

以蛋白胨为氮源，加入等量的不同碳源（可溶性淀粉、乳糖、麦麸、蔗糖）取代

葡萄糖，摇床培养，第216 h时，测定其漆酶活力，确定最佳碳源。将得到的最佳碳源分别取15 g/L、16 g/L、17 g/L、18 g/L、19 g/L、20 g/L、21 g/L、22 g/L振荡培养，216 h时，测定其产酶情况，得出其最佳的浓度。

#### 3.2.2.2 不同氮源对普通青霉菌产漆酶的影响

以麦麸为碳源，加入等量的酵母膏、牛肉膏、硫酸铵、尿素代替蛋白胨进行培养，在216 h时，测定其酶活，确定最佳氮源。其条件不变，将最佳氮源分别取1 g/L、2

g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L、6 g/L、7 g/L振荡培养，216 h时测定其酶活，找到最佳浓度。

#### 3.2.2.3 金属离子对普通青霉菌产漆酶的影响

在发酵培养基中添加相同浓度的金属离子，170 r/min、30℃摇瓶培养7 d，测定不同金属离子对普通青霉菌产漆酶的影响。

#### 3.2.2.4 初始pH和温度对普通青霉菌产酶的影响

利用初始pH值为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的培养基培养菌种，在30℃、170 r/min条件下，摇瓶培养216 h，测其酶活。在温度为10℃、20℃、30℃、40℃、50℃的条件下进行发酵产酶实验， 确定最佳发酵温度。

### **3.2.3** 酶学性质的研究

#### 3.2.3.1 温度对漆酶稳定性的影响

把ABTS作为底物，考察了普通青霉菌漆酶在10℃、20℃、30℃、40℃、50℃保温30 min条件下对漆酶热稳定性的影响。

#### 3.2.3.2 pH对漆酶稳定性的影响

把ABTS作为底物，采用的缓冲液为柠檬酸—磷酸氢二钠的缓冲液，反应缓冲液的pH值从3.2到6.4，测量间隔数值为0.4，测其酶活。

### **3.2.4** 正交实验优化

选择对麦麸、酵母膏、铝离子和pH四个因素进行正交试验。根据L9（34）的正交试验的因素水平表，设计3水平，4 因素，9 组正交试验。测其酶活并进行比较。

**表3.1** **L9（34）正交试验设计**

| 水平 |  | 因素 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | A（麦麸） | B（酵母膏） | C(Al3+) | D(pH) |
| 1 | 15 g/L | 2 g/L | 0.5 g/L | 5 |
| 2 | 16 g/L | 3 g/L | 0.6 g/L | 6 |
| 3 | 17 g/L | 4 g/L | 0.7 g/L | 7 |

### **3.2.5** 蛋白含量的测定

#### 3.2.5.1 蛋白标准曲线绘制

试剂：称取考马斯亮蓝G-250 100 mg，溶于95%乙醇50 mL中，之后与85%磷酸100 mL进行混合，蒸馏水稀释定容至1 L。取100 mL加稀释液400 mL。稀释液

是95%乙醇25 mL和85%磷酸50 mL，定至500 mL。

标准蛋白质溶液：浓度为1 mg/mL的牛血清蛋白，微量定时浓度用100 μg/mL

牛血清蛋白作标准。

按照表3.2加入试剂，摇匀之后放置5 min。

**表3.2** **待测标准蛋白中各试剂用量**

| 编号 | 100 μg/mL  牛血清清蛋白（mL） | 灭菌纯水  （mL） | 0.01%考马  斯亮蓝  （mL） | 总体积  （mL） | 蛋白浓度  （μg/mL） | OD595  平均值 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 0 | 1 | 1.5 | 2.5 | 0 |  |
| 2 | 0.15 | 0.85 | 1.5 | 2.5 | 15 |  |
| 3 | 0.3 | 0.7 | 1.5 | 2.5 | 30 |  |
| 4 | 0.45 | 0.55 | 1.5 | 2.5 | 45 |  |
| 5 | 0.6 | 0.4 | 1.5 | 2.5 | 60 |  |
| 6 | 0.75 | 0.25 | 1.5 | 2.5 | 75 |  |

在检测波长595 nm处，测定吸光值，测得三组，取平均值。以牛血清蛋白的浓

度作为横坐标，595 nm处吸光值为纵坐标，绘制标准曲线，建立回归方程。

#### 3.2.5.2 蛋白标准曲线

以牛血清蛋白为标准品，制作蛋白的标准曲线，结果如图3.1所示。蛋白浓度 X

（μg/mL）与OD595 处吸光值之间的回归方程为Y=0.0037X+0.1282，其相关系数

R2=0.9975，经方差检验，P<0.001.

y = 0.0037x + 0.1282 R²= 0.9975

0.45

0.4

0.35

0.3

OD595

0.25

0.2

0.15

0.1

0 15 30 45 60 75 90

蛋白浓度（µg/mL）

图3.1 Bradford法测定蛋白质的标准曲线

利用Bradford 法测定菌液中蛋白质的浓度，将酶液配制成浓度范围为10-100

μg/mL的待测液。在检测波长595 nm处，测定吸光值，测定三组，取平均值。若样品值太大或太小，需要调整稀释倍数。将吸光度值代入方程，计算酶液的蛋白质含量。

## **3.3** 结果与分析

### **3.3.1** 不同碳源对普通青霉菌产漆酶的影响

不同碳源对普通青霉菌产酶的影响如图3.2所示。分别采用5种碳源进行产酶发酵实验。当采用麦麸为碳源时，明显较其他碳源所产酶活力高。不同浓度的麦麸对产酶也有较大的影响，麦麸浓度在16 g/L时，普通青霉菌产漆酶酶活最大。如图3.3所示。

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

麦麸 葡萄糖 蔗糖 可溶性淀粉 乳糖

不同碳源

图3.2 不同碳源对漆酶酶活的影响

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

麦麸浓度（g/L）

图3.3 麦麸浓度对漆酶酶活的影响

### **3.3.2** 不同氮源对普通青霉菌产漆酶影响

如图3.4所示，与有机氮源相比，无机氮源均不利于菌体产酶，可以看出酵母膏

的作用最为显著；牛肉膏次之；尿素的效果最差。因此选用酵母膏作为最佳氮源。当浓度为3 g/L时，漆酶酶活达到最高，结果如图3.5所示

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

尿素 牛肉膏 硫酸铵 蛋白胨 酵母膏

不同氮源

图3.4 不同氮源对漆酶酶活的影响

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

0 1 2 3 4 5 6 7 8

酵母膏浓度（g/L）

图3.5 酵母膏浓度对漆酶酶活的影响

### **3.3.3** 金属离子对普通青霉菌产漆酶的影响

结果如图3.6所示，Al3+可显著促进其漆酶的增加，而Cu2+、Fe3+、Zn2+也能微弱地促进漆酶的产生；Mn2+效果不明显，因此确定Al3+为最佳金属离子。当Al3+的浓度达到0.6 g/L时，普通青霉菌产漆酶活力达到最高。结果如图3.7。

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

Fe3+ Mn2+ Zn2+ Cu2+ Al3+

不同金属离子

图3.6 金属离子对漆酶酶活的影响

110

100

90

相对酶活（%）

80

70

60

0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8

Al3+浓度（g/L）

图3.7 铝离子浓度对漆酶酶活的影响

### **3.3.4** 发酵**pH**和温度对普通青霉菌产漆酶的影响

如图3.8所示，初始pH为6.0时所产漆酶酶活较高。图3.9显示，当发酵温度为30℃时，所产漆酶活力为17 U/mL，明显高于其他温度下所产酶活力。

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

3 4 5 6 7 8 9

pH

图3.8 不同pH 值对漆酶酶活的影响

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0

10 20 30 40 50

温度（℃）

图3.9 温度对漆酶酶活的影响

### **3.3.5** 温度对漆酶稳定性的影响

由图3.10可以看出：以ABTS为底物时，漆酶在20-40℃时酶活较稳定，随着温度的升高酶活而降低，到达50℃时，酶活降到40%以下。这说明该酶的热稳定性范围较窄。

100

80

60

相对酶活（%）

40

20

0 10 20 30 40 50 60

温度（℃）

图3.10 温度对漆酶稳定性的影响

### **3.3.6** **pH**对漆酶稳定性的影响

由图3.11可以看出：当底物为ABTS时，pH为3.6-4.0时漆酶酶活较高，pH 3.6

时酶活力最高。当pH<3.6时，酶活随着pH的增大而增大，当pH>3.6时，酶活随着

pH的增大而减小。

100

90

80

70

相对酶活（%）

60

50

40

30

20

10

0

2.0 2.4 2.8 3.2 3.6 4.0 4.4 4.8 5.2 5.6

pH

图3.11 pH对漆酶稳定性的影响

### **3.3.7** 正交试验

正交试验结果见表3.1和3.3。由表3.3中4个因素的极差R值，可以得出，4个因素对产漆酶量的影响，主次顺序为：D＞B＞A＞C，B、D为影响产漆酶量的主要因素，pH 对产漆酶量的影响最大，其次是酵母膏对漆酶产量的影响，可以看出

A3B1C3D2为最优组合，即麦麸最佳浓度为17 g/L，酵母膏最佳浓度为2 g/L，Al3+最佳浓度为0.7 g/L, pH为6.0。酶活最高为55000 U/L。

**表3.3 正交实验结果**

| 实验号 | A | B | C | D | 酶活  （U/mL） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 7.28 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 20.11 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.15 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.30 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 6.47 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2.86 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 55.00 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 5.28 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 4.41 |
| K1 | 0.918 | 2.086 | 0.514 | 0.605 |  |
| K2 | 0.321 | 1.062 | 0.827 | 2.599 |  |
| K3 | 2.156 | 0.247 | 2.054 | 0.191 |  |
| R | 1.835 | 1.839 | 1.540 | 2.408 |  |

### **3.3.8** 优化前后普通青霉菌产漆酶的比较

用优化后的培养基及培养条件进行发酵产酶，获得产酶曲线，并与优化前的产酶情况相比较，结果如图3.12所示，培养基及发酵条件优化后，普通青霉菌的产酶量

显著提升，在第8 d有最大酶活，约59.6 U/mL，比优化前的最大酶活4.81 U/mL 提

高了12.39倍，最高产酶时间提前了1 d。

优化后漆酶酶活优化前漆酶酶活

70

60

50

40

酶活（U/mL）

30

20

10

0

0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240 264 288

时间（h）

图3.12 普通青霉菌优化前后产漆酶酶活曲线

### **3.3.9** 普通青霉菌蛋白含量测定

采用Bradford法测量菌液中蛋白质的浓度，以牛血清蛋白制作标准曲线，结果为

1 mL酶液中蛋白含量为14.67μg。

## **3.4** 小结

1. 通过漆酶酶活测定，发现普通青霉菌可以产生漆酶，经过培养基成分优化，产酶最高达到55 U/mL。

2. 该菌的液体培养产酶条件：温度30℃，pH值6，转速170 rpm，最高产酶酶活达到59.6 U/mL，比优化前酶活提高了12.39倍。

3. 该菌的蛋白含量为14.67μg/mL。

# **4** 混合菌种发酵对芦苇木质素的降解

与微生物的纯培养相比，混合培养更快，更高效、更方便，相互之间的作用基本上是菌株的交替或互利共生的关系，具有底物利用率，完善多层次的转换效率等优点，近年来，许多研究人员已经进行了微生物资源的混合培养的研究，也取得了一定的研究成果。以前的研究都集中在单一菌株对木质素的降解，而这些单优势菌处理降解容易难以实现工业化的环境。

混合培养时，菌种分泌的化学信息物质可以影响菌株的生长、功能，进而影响整个菌落结构[33]。因此本研究尝试在普通青霉菌的基础上，再添加向病菌、产黄青霉菌和木霉菌三种菌作为实验菌种，分别将两菌种的组合菌、三菌种的组合菌和四种菌混合进行混合培养，考察组合菌降解芦苇木质素的效果，通过测定木质素含量，确定降解芦苇的最佳组合方式，进而筛选出更优的菌株组合，为后面得到优势复合菌提供依据。

## **4.1** 实验仪器与材料

### **4.1.1** 实验仪器

主要的实验仪器见表2.1

### **4.1.2** 实验材料

1. 主要的实验试剂见表2.2

2. 实验菌种：A：产黄青霉菌B：木霉菌C：向病菌D：普通青霉菌。四种菌都保存于内蒙古科技大学，生物质能重点实验室。

3. 芦苇：内蒙古巴彦淖尔市乌梁素海。

## **4.2** 实验方法

### **4.2.1** 酸木质素含量测定

采用国标（GB/ T 747-2003）法测量酸不溶木质素含量。

1. 样品的称取和浸泡

称量1.5 g，用定性滤纸将试样包好，并用绳子扎紧。称取另外一份，依据GB/T

2677.2测量其试样中的水分含量。

将滤纸包放入抽提筒中，并向平底烧瓶中加入醇醚（1:2）混合液400 mL，将抽提装置放入79℃的恒温水浴锅中抽提4 h。

将滤纸包取出，烘干，打开滤纸包，将试样放入100 mL的具塞锥形瓶中。

2. 样品的酸处理

向装有试样的锥形瓶中加入10-15℃的72%硫酸（H2SO4）溶液4 mL，将瓶口塞紧，轻轻摇荡，使试样全部浸透。然后恒温水浴锥形瓶设定温度为30℃，保温2 h。期间应不时轻摇动锥形瓶，使反应均匀进行。

当到达规定时间后，将锥形瓶中的内容物全部移入250 mL锥形瓶中，然后用热蒸馏水定容到154 mL，达到酸的终浓度为3%。

将锥形瓶加热煮沸4 h，期间不断加入热蒸馏水，使锥形瓶中体积始终维持在154

mL，到时间后，静置，使酸不溶木质素沉淀下来、液体冷却。

3. 酸不溶木质素的过滤、干燥与称量

使用经过特殊处理过的定性滤纸过滤出酸不溶木质素，且先称量恒重定性滤纸的质量（M0），再用热蒸馏水洗涤，直至洗液没有SO4 （滴加10%氯化钡溶液于洗涤液中，不产生白色沉淀为止）。将滤纸、残渣放入烘箱中105℃烘干至恒重，并进行称重M1。所得质量M1减去滤纸的重量M0即得到酸不溶木质素的质量（M1-M0）。

2-

4. 灰分测定

测定灰分时，先将瓷坩埚于马弗炉中900℃灼烧1 h，使其恒重，待冷却后称重。再将烘干至恒重的带有残渣的滤纸（木质素测定过程中，过滤所用后烘干的滤纸）移人瓷坩埚中，置于马弗炉中900℃灼烧4 h至恒重，待冷却后称重M2。

5. 酸不溶木质素含量计算式4.1：

X(%) = (M1−M0−M2)×100%（式5.1）

1.5

X：酸不溶木质素含量；M1：滤纸和残渣总重；M0：滤纸重量； M2：灰分重量；

## 1.5 ：称取试样重量（g）

### **4.2.2** 水份含量测定

采用国标（GB/T 462-2008）法测定水份的含量

用天平在预已烘干至恒重的烧杯中称取试样。在称取试样测木质素的同时，称取适量试样（> 2 g）用于测定试样的水分含量，其中试样质量W1。

再将称取的试样用烘干至恒重的滤纸包好，其中恒重滤纸的质量为W0。置于电热恒温鼓风干燥箱中105℃烘干，再滤纸包置于干燥器中冷却。然后称量滤纸和试样的质量W2，即烘干后试样质量为(W2-W0)。

根据公式计算各试样的水分含量式4.2：

ω= (W1−W2+W0) ×100%（式5.2）

W1

ω：试样水分的含量；

W0：恒重滤纸的质量；

W1：称取得试样的质量； W2：烘干后试样和滤纸的质量。

重复以上步骤两次，测定三个样。取平均值，即得试样的水分含量。

### **4.2.3** 乙醚抽提物测定

采用国标（GB / T 743-2003）法测定乙醚的抽提物质。

1. 称取5 g绝干试样，用定性滤纸包好，用线扎紧，滤纸和线绳使用之前已用乙醚抽提过。

2. 将其包好的滤纸包放入索氏抽提器内，将平底烧瓶烘干至恒重M2，量一定体积的以乙醚，装上冷凝管，加热至乙醚沸腾。

3. 抽提完毕后，将滤纸包（不能污染抽提液）重新连接旋转蒸发仪，回收溶剂，擦干底部，105℃烘干至恒重M1。

4. 计算式4.3:

乙醚提取物X(%) = (M1−M2)×100%（式5.3）

5

M1：平底烧瓶及残余物质量M2：平底烧瓶质量 5：绝干试样重（g）

### **4.2.4** 综纤维素含量测定

1. 抽脂

称取试样M0，用滤纸包好，进行醇醚1: 2比例混合抽提。

2. 综纤维素测定

将处理好的试样，全部移到250 mL锥形瓶中，分别加入0.5 mL冰醋酸，65 mL蒸馏水和0.6 g的亚氯酸钠。摇匀封口，置于恒温水浴锅中75℃加热1 h，过程中不断旋转、摇动，冷却之后，加入0.6 g亚氯酸钠和0.5 mL冰醋酸，恒温水浴锅中75℃加热1 h，重复三遍，大概木质素的含量在2-4%。

锥形瓶取出在水浴锅中，放入冰水浴进行冷却，用滤纸抽滤反复冲洗直至不显酸性为止，丙酮冲洗3遍，105℃烘干至恒重M1。之后称量完，测定灰分M0。

3. 计算式4.4:

X(%) = (M1−M0)×100%（式5.4）

M

X：综纤维素含量

M1：烘干后综纤维素质量M0：灰分质量 M：绝干试样重量

### **4.2.5** 单菌种降解芦苇木质素及条件的优化

先培养、活化四种菌种，将PDA液体培养基300 mL，在0.15 MPa，115℃的高压灭菌锅中灭菌30 min，冷却后接种四种真菌，进行培养。

将活化好的菌液接种于PDA培养基中，以5%的接种量，30℃，170 rpm培养，

3 d之后，向装有300 mL菌液的锥形瓶中加入剪接的芦苇10 g，浸泡3 d，之后每2 d

取样一次，分别测定酸不溶木质素含量，确定最佳菌种，在进行不同菌液加入量（100

mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mL）的优化。

### **4.2.6** 两种菌混合降解芦苇木质素及条件的优化

将木霉菌编号为A、产黄青霉菌编号为B、向病菌编号为C、普通青霉菌编号为

D. 采用两种菌混合方式进行混合，分别为AB、AC、AD、BC、BD、CD。配置300 mL PDA培养基于500 mL三角瓶中，用接种环分别挑取A，B，C，D四种菌种各一环，按照以上复合方式且以1: 1的比例接入液体PDA培养基中放入摇床培养。

培养3 d之后，分别向每瓶培养基中加入已灭过菌的芦苇10 g，每两天取样一次，测量酸不溶木质素含量，得到最优组合后，在进行不同菌液加入量（100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mL）和BD混合比例（1:1、1:2、1:3、1:4、1:5）的优化。

### **4.2.7** 三种菌混合降解芦苇木质素及条件的优化

将木霉菌编号为A、产黄青霉菌编号为B、向病菌编号为C、普通青霉菌编号为

D. 进行三种菌混合，共有4种混合方式。分别为ABC、ABD、ACD、BCD。配置300 mL PDA培养基于500 mL三角瓶中，用接种环分别挑取A，B，C，D四种菌种各一环，按照以上复合方式且以1: 1的比例接入液体PDA培养基中放入摇床培养。培养3 d之后，分别向每瓶培养基中加入已灭过菌的芦苇10 g，每两天取样一次，测量酸不溶木质素含量，得到最优组合后，在进行不同菌液加入量（100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mL）和ABD混合比例（1:1、1:2、1:3、1:4、1:5）的优化。

A、B两种菌单菌种降解时为第8 d降解效果最好，而D菌为第10 d降解效果最好，分别挑取单一菌种进行单菌培养，3 d之后将A、B菌按照1: 4的比例混合培养降解芦苇，到降解的第二天按照1: 4: 16的比例将其D菌混合其中，取样，测量木质素含量，每2 d取样一次。

### **4.2.8** 四种菌混合降解芦苇木质素及条件的优化

将木霉菌编号为A、产黄青霉菌编号为B、向病菌编号为C、普通青霉菌编号为

D. 进行四种菌混合，只有一种混合方式，为ABCD。配置300 mL PDA培养基于500

mL三角瓶中，用接种环分别挑去A，B，C，D四种菌种各一环，按照以上复合方式

且以1: 1的比例接入液体PDA培养基中放入摇床培养。培养3 d之后，分别向每瓶培养基中加入已灭过菌的芦苇10 g，每两天取样一次，测量酸不溶木质素含量。

## **4.3** 结果与分析

### **4.3.1** 芦苇原样分析

在造纸工业中，原料木质素的含量越低，生产成本就越低，纸张的质量就容易提高。本实验选用的原料为芦苇，测得化学成分结果见表4.1。

**表4.1 芦苇原样与生物预处理的芦苇化学成分分析**

|  | 水份  （%） | 灰分  （mg/kg） | 乙醚抽提物  （%） | 木质素含量  （%） | 总纤维素含量  （%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 原样 | 5.66 | 3.83 | 2.01 | 28.55 | 50.5 |
| 处理 3 d  处理 5 d  处理 7 d | 5.56  5.61  5.58 | 3.79  3.68  3.64 | 1.9  1.87  1.79 | 26.7  23.7  25.9 | 50.3  50.05  42.8 |

由表4.1可知，芦苇中纤维素含量比较高，木质素含量相对比较低，且芦苇经过混合微生物的处理之后，纤维素有极小程度的降低，木质素的降解幅度较大。研究表明：纤维素含量与纸浆得率成正比；木素含量愈低，制浆、漂白愈容易，且芦苇纤维素含量高，木质素含量较低，这样的原料在制浆过程中便于成浆，是一种优良的非木材纤维原料。

### **4.3.2** 单菌降解芦苇木质素及条件优化

由图4.1可以看出，B菌降解效果最好，且降解木质素含量呈下降趋势，在第10

d时，木质素含量为19.93%。从整体来看，在菌种降解芦苇过程中，大量的胞外酶可以降解外露的木质素，使其结构发生断裂。先降解外露的木质素然后进一步发生深层降解，同时纤维素也开始降解，所以，有可能木质素含量呈先下降后上升的趋势。

35

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |
|  |

A

B C

30 D

25

木质素含量（%）

20

15

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.1 单菌种降解芦苇木质素

实验得出四中单菌落降解芦苇时，B菌（产黄青霉菌）降解效果最好，在此基础之上，对产黄青霉菌降解芦苇条件进行优化，从图4.2可知，当加入菌液量为200 mL时，降解效果最好，在第10 d时，降解率为46.46%。

35

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

300 mL

250 mL

200 mL

30 150 mL

100 mL

木质素含量（%）

25

20

15

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.2 产黄青霉菌不同菌液的加入量对芦苇降解的影响

### **4.3.3** 两种菌混合降解芦苇木质素及条件优化

如图4.3显示，两种菌组合降解芦苇木质素时，木质素含量随着时间的增加都有所降低，在第4 d时，BC、AD和BD组合菌都有大幅度降低，而之后BC、AD组合菌木质素含量有所增加，BD组合菌一直呈下降趋势，且在第10 d时，降解木质素效果最好，木质素含量为15.72%。由此得出，BD组合菌降解效果最好。



AB AC AD BC BD CD

35

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  | | |
|  | | |
|  | | |
|  | | |
|  | | |

30

25

木质素含量（%）

20

15

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.3 两种菌混合降解芦苇木质素

由图4.4可以得出，同样是加入菌液量为200 mL时，降解效果最好，当加入菌液量为200 mL时，菌液正好浸泡芦苇，浸泡完全，可以使真菌在好氧的条件下，很好地生长，加入量大于200 mL时，通氧状态不好，影响菌株生长，不能很好地降解芦苇，小于200 mL时，菌液不能完全浸泡芦苇，不能全面降解芦苇。

35



30

25

300 mL

250 mL

200 mL

150 mL

100 mL

20

15

10

木质素含量（%）

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.4 BD混合菌不同菌液的加入量对芦苇降解的影响

由表4.2可知，降解效果最好的菌种组合及比例是B: D=1:4时，在第10 d木质素含量为11.99%。综合图4.1可以得出混合培养BD降解木质素情况明显高于单菌培养降解木质素，从单一菌来看，B菌降解效果优于D菌降解，达到相同效果时，混合菌比单一菌种降解速率快，由此说明两种菌之间具有协同降解作用。

**表4.2 不同比例的BD混合菌对芦苇木质素降解的影响**

| 时间（d） | 1:2 | 2:1 | 1:3 | 3:1 | 1:4 | 4:1 | 1:5 | 5:1 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 | 28.16% | 28.94% | 28.96% | 28.68% | 25.32% | 26.29% | 27.43% | 27.04% |
| 4 | 26.49% | 28.19% | 25.15% | 22.25% | 23.04% | 26.32% | 26.90% | 23.20% |
| 6 | 26.19% | 25.10% | 26.52% | 20.81% | 16.29% | 25.12% | 21.87% | 19.54% |
| 8 | 22.20% | 16.84% | 20.44% | 19.00% | 14.65% | 16.51% | 20.63% | 18.62% |
| 10 | 19.41% | 15.41% | 19.17% | 18.15% | 11.99% | 12.30% | 18.70% | 18.07% |

### **4.3.4** 三种菌混合降解芦苇木质素及条件优化

三种菌组合降解芦苇木质素时，木质素含量随着时间的增加都有所降低，且在第

8 d时，所有组合菌都有大幅度降低，且一直呈下降趋势，由图4.5可以看出，ABD组合菌降解效果最好，在第10 d时，木质素含量为13.81%，而且降解速率大于两种菌BD混合，说明A菌对BD菌生长有促进作用。

35

ABC ABD

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |
|  |

30 ACD

BCD

木质素含量（%）

25

20

15

10

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.5 三种菌混合降解芦苇木质素

图4.6显示，加入菌液量为200 mL时，降解效果最好，在第10 d降解效果最好，降解效率远大于其他菌液加入量。

35 300 mL

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

250 mL

200 mL

30 150 mL

100 mL

木质素含量（%）

25

20

15

10

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.6 ABD混合菌不同菌液的加入量对芦苇降解的影响

在BD菌混合比例1: 4的基础之上，对三种菌进行混合比例优化，ABD菌种在第8 d、A: B: D混合比例为1: 4: 16时，降解效果最好，降解率为67.27%。结果如表4.3所示。综合整个实验来看，A菌、B菌和D菌之间都存在着互惠性，表现出具有很强的降解木质素的能力，采用不同的菌种进行混合，会有更好地应用前景。

**表4.3** **不同比例的ABD混合菌对芦苇木质素降解的影响**

| 时间（d） | 1:2 | 2:1 | 1:3 | 3:1 | 1:4 | 4:1 | 1:5 | 5:1 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 | 26.73% | 27.51% | 26.69% | 30.24% | 26.41% | 28.32% | 26.17% | 24.14% |
| 4 | 19.24% | 20.03% | 20.43% | 21.77% | 21.24% | 19.56% | 17.73% | 17.40% |
| 6 | 19.20% | 19.68% | 20.35% | 20.40% | 20.03% | 18.71% | 17.01% | 17.38% |
| 8 | 12.63% | 16.00% | 18.61% | 12.07% | 10.66% | 17.71% | 14.60% | 16.80% |
| 10 | 14.50% | 15.84% | 18.94% | 15.48% | 12.09% | 17.06% | 11.57% | 19.56% |

综合图4.7和表4.3可知，同时加入三种菌的降解效果最好，在取样的第4 d降解效果最好，木质素含量为15.05%，高于三种菌同时加入的降解率。但是在之后的降解中，降解效果不如三种同时加入。由于先加入的AB菌生长达到稳定期，再加入

D菌，与其形成强烈的竞争关系，导致D菌大量死亡。

30

25

20

木质素含量（%）

15

10

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.7 ABD三种菌不同时间加入对木质素降解的影响

### **4.3.5** 四种菌混合降解芦苇木质素

四种菌混合，降解木质素含量呈现明显的下降趋势，在第10 d时，降解效果最好，木质素含量为19.26%，四种菌混合培养降解芦苇木质素效果小于三种菌和两种菌的效果，说明C菌对ABD菌种生长起抑制作用。

35

30

25

木质素含量（%）

20

15

2 4 6 8 10

时间（d）

图4.8 四种菌混合降解芦苇木质素

## **4.4** 小结

木质素和纤维素、半纤维素组成植物的细胞骨架，它的丰富量仅次于纤维素。目前，影响人们高效利用植物纤维素原料是木质素的阻碍。近年来，针对单一的白腐菌产酶及对木质素降解的研究较多，但对于混合菌作用降解木质素的研究较少，而组合菌在生长和生物降解中具有协同作用，具体原因可能是其酶系的协同作用和营养要求的互补。本实验采用四种菌进行不同的混合方式进行混合培养降解芦苇，从而得到高效降解木质素的菌种混合组合。

从以上实验结果可以看出，ABD组合菌木质素降解率最好，ABD组合菌在8 d、混合比例为A: B: D=1:4:16时，木质素含量为10.66%，降解率达到67.27%。其次为

BD组合菌，其木质素降解率也较高，在第10 d、混合比例为B: D为1:4时达到63.19%，说明三种菌混合降解效果最好，分析原因可能是跟其产酶及不同酶之间的协同作用有

关，这在工业生产中减少成本投资方面有很好的利用价值。因此，我们选择这三种组合菌作为优势菌种组合。

# **5** 生物酶预处理对机械浆漂白的影响

H2O2是目前使用较为广泛的漂白剂，它在整个漂白阶段无氯元素，但是这种漂白方式又受到很多因素的限制，单独的H2O2并不能使得纸浆的白度达到很高，为了提高纸浆白度我们进行了稳定剂螯合剂的预处理。

机械制浆和化学法制浆在纤维层都覆盖着木质素和难以降解的抽提物，这些物质都不是碳水化合物，这些物质对纸张的性能都有一定的影响。漆酶是含有Cu2+离子的多酚类氧化酶，它利用本身的铜离子氧化还原木素的酚类结构单元，最后将氧气还原成水。木聚糖酶，英文名称xylanase，是一类组成比较复杂的的酶，木聚糖酶是第一种生物漂白剂，而随着研究的不断深入，最近几年，漆酶/木聚糖酶、漆酶/介体（LMS）等复合酶或酶与介体的研究成为了新的热点。1984年，由Paice和Jurasek[82]提出了生物漂白。二人利用木聚糖酶将化学浆中含有的半纤维素除去来生产出醋酸纤维素。之后，芬兰的研究学者在1986年，应用木聚糖酶于纸浆的漂白处理，结果发现，使用木聚糖酶预处理，能减少化学漂白剂使用量，提高纸浆的白度同时，降低污染[83]。

将木聚糖酶和漆酶协同作用，对纸浆进行漂前的预处理，可以达到更好的效果，而且这种方法相对于单一酶的处理程序更简单，方法更有效。酶的协同作用应用于生物漂白是当前最热门的研究课题。本章主要是利用木聚糖酶和漆酶混合对纸浆进行漂白，之后进行漂白条件的优化，以及一些指标的测定。

## **5.1** 实验仪器与材料

### **5.1.1** 实验仪器

主要的实验仪器见表2.1

### **5.1.2** 实验材料

1. 主要的实验试剂见表2.2

2. 实验菌种：漆酶：产于普通青霉菌、木聚糖酶：产于纯绿青霉菌，保存于内蒙古科技大学，生物质能重点实验室。

## **5.2** 实验方法

### **5.2.1** **CODCr**（化学需氧量）测定

1. 标准滴定硫酸亚铁铵：取10 mL 0.25 mol/L K2Cr2O7溶液于锥形瓶中，再加入

3 mL 98%硫酸，加3滴指示剂，滴定。硫酸亚铁铵浓度=0.25×10/V。

V：滴定时使用的的硫酸亚铁铵体积，

颜色变化为：黄色变成绿色，最后变成红褐色即为终点。

2. 将样品进行稀释（加入消解液和催化剂，如果是绿色再次稀释）

3. 向消解管中依次加入硫酸汞2 mL，消解液3 mL，样品液2 mL，催化剂2 mL，同时做空白对照（蒸馏水代替样品液）。在消解仪中，将其放入消解，150℃，2 h。

4. 待冷却后，将其液体移入到锥形瓶中，用9 mL蒸馏水冲洗消解管。在锥形瓶中加入指示剂2-3滴，硫酸亚铁铵进行滴定。红褐色到达终点。

5. 计算如式5.1：

CODCr(O2, mg/L) = (V0−V1)×C×8×1000×N

V

（式6.1）

V0：空白滴定时，使用的硫酸亚铁铵标准液的量：mL V1：滴定样品时使用的硫酸亚铁铵的体积：mL C：硫酸亚铁铵的浓度：mol/L

8: 1/2氧的摩尔质量：g/mol V：样品液的体积：mL N：待测液的稀释倍数

### **5.2.2** 木聚糖酶活测定

木聚糖酶能够将木聚糖水解成木糖的还原糖类，这些还原糖能够与DNS试剂发生显色反应，根据这个原理可用来测定木聚糖酶的活性。本实验利用木聚糖（生化试剂）为底物，加入一定量的粗酶液反应一段时间后加入DNS，沸水浴5 min钟后，利用721可见光分光光度计测反应后的OD值。本实验中，酶活越高，水解木聚糖生成的还原糖越多，其OD值也会跟着增加，通过定义酶活含义，可以测定出酶活，判断酶活的高低。

1. 木聚糖的制备

称取50 g麦麸放入烧杯中，按1: 10的料液比加入蒸馏水和一定量NaOH，维持

pH在10左右，加热煮沸30 min，冷却后在4000 rpm转速下离心15min，取离心后的上层液体，按1: 2的体积比加入乙醇溶液，沉淀30 min，再在4000 rpm转速下离

心10 min，将得到的沉淀洗涤至中性，烘干，得到的即为木聚糖。

2. 测定酶活使用试剂的配制

（1）DNS的配制

称取酒石酸钾钠182.09 g，溶于500 mL蒸馏水中，加热，于热溶液中加入3,5

—二硝基水杨酸6.39 g, NaOH 21.09 g，待溶液冷却至50℃以下，依次加入苯酚5.09

g，无水亚硫酸钠5.09 g，搅拌至溶解完全，冷却后用蒸馏水定容至1000 mL，贮存预棕色瓶中，室温保存，放置一星期后即可使用。

（2）1%的木聚糖底物溶液（pH4.8）

溶液A: 0.2 mol/L醋酸（准确量取11.55 ml冰乙酸溶于1000 mL蒸馏水）。溶液B: 0.2 mol/L乙酸钠（称取16.4 g无水乙酸钠溶液1000 mL蒸馏水中）。

pH4.8醋酸缓冲液的配制：溶液A和溶液B混合比例为2: 3，并稀释一倍。

1%的木聚糖底物溶液（pH4.8）配制：按1%的含量称取一定量的木聚糖溶于配置好的缓冲液中。

1 g/L木糖溶液配置：称取1 g的木糖用pH4.8醋酸—醋酸钠缓冲液溶解，定容至

1 L。

3. 绘制标准曲线

取11支试管按顺序加入0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、的1mg/L的木糖溶液，补水至2 mL，再各加入3.0 mL的DNS试剂，摇匀后在沸水浴中保温显色5 min后，待冷却后，加入蒸馏水定溶至15 mL，摇匀，在520 nm波长处测其OD值。以木糖的含量为横坐标，以OD值为纵坐标绘制标准曲线见图5.1：



y = 0.0014x + 0.2618 R²= 0.9985

1.8

1.6

1.4

1.2

OD520

1

0.8

0.6

0.4

200 400 600 800 1000 1200

木糖含量（mg）

图5.1 木聚糖标准曲线

4．酶活的测定

取2 ml的发酵液4000 rpm离心15 min，得到的上清液即为粗酶液。取0.1 mL粗酶液加入pH4.8的醋酸缓冲液配制的1%的木聚糖溶液1.9 mL，放入水浴锅中50 ℃水浴酶解30 min，立即取出加入3 mL DNS溶液，至沸水裕中反应5 min，冷却后加

入10 mL水定容至15 mL，混匀后，于520 nm处测其吸光度，对照组为煮沸15 min

灭活酶液，其他条件不变。

1. 酶活计算

1 mL粗酶液在pH4.8、50℃下每分钟分解木聚糖产生1μg木糖为一个酶活单位。计算公式如式5.1：

酶活(U/mL) = D×N×2×10

30

（式6.1）

N：稀释倍数。

D：由待测溶液的吸光度值在木糖标准曲线上查出的对应的木糖的毫克数。

30：反应的时间为30 min。

### **5.2.3** 螯合稳定剂对纸浆白度的影响

为了使得过氧化氢漂白效果更好，在漂白之前，先加入稳定剂进行螯合处理，去除芦苇纸浆中的过渡离子，稳定剂分别为：EDTA、沸石、硅藻土、硅酸钠和硫酸镁，分别进行不同加入量（1%、2%、3%、4%、5%）的优化，其他漂白条件为：浆浓4%，双氧水2%，氢氧化钠0.5%，温度75℃，时间1.5 h。

### **5.2.4** 过氧化氢使用量对纸浆白度的影响漂白纸浆

将纸浆与试剂混合，放入1000 mL烧杯中，置于六连搅拌器上进行恒温反应。双氧水的加入量不同（1%、2%、5%、8%、10%），其他条件为：浆浓4%, EDTA 2%，氢氧化钠0.5%，温度75℃，时间1.5 h。

### **5.2.5** 氢氧化钠使用量对纸浆白度的影响

过氧化氢漂白过程中，碱的使用量起着很重要的作用。因为碱可以促进过氧化氢产生离子HOO-，这个离子具有漂白作用。但是碱量过高会抑制过氧化氢漂白，所以

NaOH的使用量影响纸浆的白度，即需确定一个最佳的使用量。针对氢氧化钠的使用量不同（0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%），其他条件相同，确定氢氧化钠的最佳使用量。

### **5.2.6** 温度对纸浆白度的影响

将纸浆与试剂混合，放入1000 mL烧杯中，置于六连搅拌器上进行不同温度（50℃、

60℃、70℃、80℃、90℃）下的反应。其他条件为：浆浓4%，双氧水2%和5%, EDTA

2%，氢氧化钠1%，时间1.5 h。

### **5.2.7** 漂白时间对纸浆白度的影响

将纸浆与试剂混合，放入1000 mL烧杯中，置于六连搅拌器上进行恒温反应。选取时间不同（60 min、90 min、120 min、150 min、180 min）其他条件为：浆浓4%，双氧水2%和5%, EDTA 2%，氢氧化钠1%，温度60℃。

### **5.2.8** 生物酶预处理对纸浆白度的影响

分别称取10 g纸浆，放入装有漆酶酶液、木聚糖酶酶液和漆酶/木聚糖酶混合酶液的三个烧杯中，酶加入量为300 mL，30℃处理4 h，处理完用蒸馏水冲洗纸浆3次，将其晾干，进行过氧化氢漂白。漂白条件为：浆浓4%, H2O2为2%和5%，温度60℃，NaoH 1%, EDTA 2%，处理时间2 h。

### **5.2.9** 混合酶的比例对纸浆漂白的影响

称取10 g纸浆放入烧杯中，向每一个烧杯中加入等量的不同比例（1:1、1:2、1:3、

1: 4、1:5）的漆酶/木聚糖酶混合酶液，30℃处理4 h，处理完用蒸馏水冲洗纸浆3次，将其晾干，进行过氧化氢漂白。漂白条件为：浆浓4%, H2O2为5%，温度60℃，NaOH 1%, EDTA 2%，处理时间2 h。

### **5.2.10** 生物酶对漂白废水的影响

分别选取不同的漂白废水（过氧化氢5%、漆酶+过氧化氢5%、木聚糖酶+过氧化氢5%和漆酶/木聚糖酶+过氧化氢5%）进行pH、CODCr的测定，进行比较。

## **5.3** 结果与分析

### **5.3.1** 稳定剂对纸浆漂白的影响

稳定剂及其用量都是影响漂白的重要因素，稳定剂过低，达不到很好地漂白效果，然而用量过多，又会引起负作用，白度反而会降低。由图5.2可知，稳定剂为EDTA时，漂白效果最好，且用量为2%. EDTA是一种在漂白中螯合金属离子的螯合剂，常应用于过氧化氢的漂白中，它可以螯合纸浆中的金属离子生成稳定的螯合物，阻碍了金属离子分解过氧化氢。

EDTA

沸 石 硅藻土硅酸钠硫酸镁

70

65

60

55

白度（%）

50

45

40

35

1 2 3 4 5

稳定剂加入量（%）

图5.2 稳定剂对纸浆漂白的影响

### **5.3.2** 过氧化氢对纸浆漂白的影响

由图5.3分析可知，随着双氧水量的增加，白度先是急剧上升，后上升较为缓慢。由于随着过氧化氢的量的增加，增大了对木质素的发色基团的破坏性，纸浆白度上升，但是使用量超过5%之后，白度上升缓慢，针对成本来说，漂白时，使用量选择在2-5%即可。

42

40

38

白度（%）

36

1 2 5 8 10

H2O2 (%)

加入量

图5.3 过氧化氢对纸浆漂白的影响

### **5.3.3** 氢氧化钠对纸浆漂白的影响

由图5.4可看出，就成本而言，NaOH用量为1%时，效果最好。在一定用量之内，随着用量的增大，纸浆白度而增大，当NaOH用量超过3%时，白度随着用量的增加而降低，这是因为NaOH能够促进双氧水分解生成具有漂白作用的HOO-离子，所以纸浆白度有很大的提高，当NaOH用量过高时，抑制了HOO-离子的产生，从而使得漂白液中的HOO-离子降低，随着白度就会下降。因此，在漂白过程中要控制碱的用量，增大漂白率，达到更理想的漂白效果。

45

44

43

42

白度（%）

41

40

39

38

0.5 1 1.5 2 2.5 3

NaOH加入量（%）

图5.4 氢氧化钠对纸浆漂白的影响

### **5.3.4** 温度对纸浆漂白的影响

图5.5为温度对漂白的影响，数据显示：增加反应温度有利于提高纸浆的白度。温度可以加快发色基团与过氧化氢的反应，但是当温度超过80℃时，白度会下降，由于温度过高，导致过氧化氢分解，无效利用，所以白度下降。因此，实验得出：就能耗而言，最佳反应温度为60℃，而且5%H2O2效果远大于2%。

2% H2O2

5% H2O2

50

49

48

47

46

45

白度（%）

44

43

42

41

40

39

38

40 50 60 70 80 90 100

温度（℃）

图5.5 温度对纸浆漂白的影响

### **5.3.5** 反应时间对纸浆漂白的影响

由图5.6可看出，纸浆漂白的白度随着时间的延长而白度有所提高，当时间超过2 h时，白度下降，因为时间过长，过氧化氢无效分解，漂白液中HOO-离子浓度降低，白度下降。实验得出反应最佳时间为2 h，且2% H2O2漂白的效果不如5%。

2% H2O2

5% H2O2

50

49

48

47

46

白度（%）

45

44

43

42

41

40

60 90 120 150 180

时间（min）

图5.6 反应时间对纸浆漂白的影响

### **5.3.6** 生物预处理对纸浆白度的影响

由图5.6可知，木聚糖/漆酶混合进行预处理时，漂白效果最好。对于木聚糖酶/漆酶混合处理纸浆时，木聚糖酶降解了纤维层的木聚糖，使得纤维变得疏松，木质素容易从纤维素的中溶出，漆酶又可以直接降解木质素，这样，在达到相同白度时可以减少化学试剂的使用量，在使用相同化学量时，又可以增加白度。

单种酶处理时，木聚糖酶高于漆酶，由于木聚糖酶可以降解纤维表面的木聚糖，有利于木质素从纤维素中溶出，同时，还降解了LCC复合物，有利于后续的过氧化氢与木质素重分的接触，从而提高纸浆的漂白度。而漆酶只能氧化分解木质素中的发色基团，对于后续的漂白有一定的作用。



2% H2O2

5% H2O2

53

52

51

50

白度（%）

49

48

47

木聚糖酶漆酶漆酶/木聚糖酶

不同的生物酶

图5.7 生物酶预处理对纸浆白度的影响

### **5.3.7** 混合酶的比例对纸浆漂白的影响

生物酶漂白过程中，酶的用量影响着纸浆的白度，酶量过少，起不到助漂的作用，酶量过多，又会影响纸浆的白度。由图5.8可知，当两种酶混合、漆酶量大于木聚糖酶量时，漂白效果较好，且最好比例为漆酶：木聚糖酶=2: 1。使用两种酶预处理纸浆时，木聚糖酶在预处理时，能降解了木聚糖使得木质素溶出，而漆酶又可以把纸浆中的木质素和溶出的木质素都降解，所以，两者结合会大幅度提高纸浆的白度，同时，漆酶的用量要多于木聚糖酶。因为当木聚糖酶使用量超过一定值时，随着木聚糖酶降

解木聚糖的水解产物（木糖）浓度的增大，木糖会抑制木聚糖酶的活性，从而使得漂白效果下降。

60

59

58

57

56

白度（%）

55

54

53

52

51

50

1:1 1:2 2:1 1:3 3:1 1:4 4:1

漆酶：木聚糖酶

图5.8 混合酶的不同比例对纸浆漂白的影响

### **5.3.8** 生物酶对漂白废水的影响

由表5.1可知，在化学漂白之前进行生物预处理，可以减少废水的CODCr值，同时还可以改变pH为弱碱性。在漂白过程中，废水的主要有机物为：酚类化合物和残余的木质素。漆酶可以直接酚类化合物和木质素，而木聚糖虽不能直接降解木质素，但是可以降解LCC（碳水化合物和木素复合体）。综合4者比较，得出：混合酶>漆酶>木聚糖酶。对于pH，混合酶>木聚糖酶>漆酶，由于漆酶和木聚糖酶预处理后，木质素的溶出及其纤维的松弛可以很好的利用过氧化氢和NaOH产生的HOO-，从而使得pH减小。

**表5.1 不同的漂白条件造纸废水指标的变化**

| 序号 | 漂白液 | CODCr (mg/L) | 初始 pH 终止 pH | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | H2O2 | 3633 | 13 | 10.3±0.2 |
| 2 | 漆酶+H2O2 | 3288 | 13 | 9.3±0.2 |
| 3 | 木聚糖酶+H2O2 | 3343 | 13 | 8.5±0.2 |
| 4 | 混合酶+H2O2 | 2906 | 13 | 8±0.2 |

## **5.4** 小结

1. 经过对化学法漂白液成分和条件的优化，得出最佳的漂白条件为：浆浓4%，双氧水5%, EDTA 2%，氢氧化钠1%，温度60℃，处理时间为2 h。纸浆的白度达到

48.9%相比于优化前白度（40.6%）提高了8.3% ISO。

2. 经过漆酶、木聚糖酶和漆酶/木聚糖酶预处理，后续进行5%过氧化氢漂白，得出混合酶预处理的效果最好，白度为52.1%，再对混合比例进行优化，得出最佳比例为漆酶：木聚糖酶=2: 1，白度为59.6%，与未经过酶处理的纸浆相比白度提高了7.5%

ISO，综合得出在达到相同白度的情况下，单种酶处理时，过氧化氢使用量减少了3%，最佳混合酶处理时，过氧化氢使用量节省了4.5%。

3. 在化学漂白之前进行生物预处理，可以减小废水的CODCr值，同时还可以使

pH变为弱碱性。即混合酶漂白纸浆时，废水中的CODCr值相比未经过混合酶处理的废水中的CODCr值减小了20.01%, pH值由10.3±0.2减小到8±0.2。

结**论**

本文以探究高效降解木质素菌种为目标，选用普通青霉菌、向病菌、产黄青霉菌和木霉菌作为实验菌种，采用芦苇作为实验原材料。为得到理想的降解木质素菌株，通过对4株菌种进行不同的组合，比较木质素降解率，从而确定最佳菌种组合。然后进行混合菌种不同混合方式、不同混合比例和固液比的优化，得到最佳组合菌。利用漆酶和木聚糖酶混合漂白纸浆，探寻生物机械浆的最佳工艺条件。

本论文研究的主要结果如下：

1. 本实验通过对采取的腐朽树木根部的土样进行筛选，挑取单菌落，经过显微镜和ITS鉴定，最终得到单一菌种普通青霉菌。

2. 通过漆酶活测定，发现普通青霉菌可以产生漆酶，经过培养基成分优化，产酶最高达到55 U/mL。该菌的液体培养产酶条件为温度30℃，pH值为6，转速为170

rpm，最高产酶酶活达到59.6 U/mL，比优化前酶活提高了12.39倍。该菌的蛋白含量为14.67μg/mL。对芦苇木质素的降解率为35.25%。

3. 通过对4种菌不同组合的优化，得出ABD组合菌木质素降解率最好，ABD组合菌在8 d、混合比例为A: B: D=1:4:16 时，木质素含量为10.66%，降解率达到

67.27%。分析原因可能是跟其产酶及不同酶之间的协同作用有关，这在工业生产中减少成本投资方面有很好的利用价值。因此，我们选择这三种组合菌作为优势菌种组合。

4. 经过对化学法漂白液成分和条件的优化，得出最佳的漂白条件为：浆浓4%，双氧水5%, EDTA 2%，氢氧化钠1%，温度60℃，处理时间为2 h。纸浆的白度达到

48.9%，相比于优化前白度（40.6%）提高了8.3% ISO。

5. 采用酶对纸浆进行漂白，通过漆酶、木聚糖酶和漆酶/木聚糖酶混合酶对纸浆预处理，可使纸浆白度达到52.1%，再次对混合比例进行优化，当漆酶：木聚糖酶=2: 1时，纸浆的白度为59.6%，与未经过酶预处理的纸浆相比白度提高了7.5% ISO。

6. 通过对漂白废水的检测，用酶漂白可以降低废水中的CODCr值，同时还可以使pH变为弱碱性。即混合酶漂白纸浆时，废水中的CODCr值相比未经过混合酶处理的废水中的CODCr值减小了20.01%, pH值由10.3±0.2减小到8±0.2。

参考文献

[1]段晓男，王效科，郭玉华，等．乌梁素海芦苇资源演变及影响因素分析[J]．干旱区资源与环境，2006, 20（7）：175-179．

[2]张菊先，王志杰．芦苇浆纤维特性及造纸前景[J]．工艺技术，2006, 25（2）：19-21．

[3]天ft网．国内最大芦苇制浆生产线设备在新疆调试成 功

[OL]．news. ts. cn/content/2012-11/20/content\_7459075. htm．2012-11-20．

[4]艾尼瓦尔，付时雨，詹怀宇．芦苇的生物化学制浆及漂白研究[J]．中国造纸学报，

18(2)：51-55．

[5]杨淑蕙主编．植物纤维化学[M]．北京：中国轻工业出版社，2001．

[[6]中商情报网](http://www.askci.com/)．中国纸与纸板产量和消费量跃居全球首 位

[OL]．[www. askci. com/news/201203/19/16346\_75. shtml](http://www.askci.com/news/201203/19/16346_75.shtml)．2012-3-19．

[7]李金花，宋红竹，薛永常，等．我国纸浆造纸木材纤维原料的现状及发展对策[J]．世界林业研究，2003, 16（6）：32-35．

**[8]** 马乃训，张文燕．竹材制浆造纸述评[J]．林业科学研究，1995, 58（3）：329-333．

**[9]**王蕾，王万贵，季祥，等．白腐菌Polyporus varius的木质素降解及其对芦苇综纤维素含量和kappa值的影响[J]．[河南师范大学学报（自然科学版），2011, 39（5）：](http://www.cnki.com.cn/Journal/A-A7-HNSX-2011-05.htm)114-119．

**[10]**邱卫华，陈洪章．木质素的结构、功能及高价值化利用[J]．纤维素科学与技术，

2006，14(1)：52-59．

**[11]**陶用珍，管映亭．木质素的化学结构及其应用[J]．纤维素科学与技术，2003，11

（1）：42-55．

[12] Lai C H, Tu M B, Shi Z Q, *et al*. Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. Bioresource Technology, 2014, 163: 320-327.

[13] Chandraya A, Guha S R D. Studies on the decay of bamboo during outside storage degradation of lingnin[J]. Indian Forester, 2001, 107(1): 54-59.

**[14]**蒋挺大．木质素[M]．第一版．化学工业出版社，2001: 1-33．

**[15]** Ma Q H, Xu Y. Characterization of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis[J]. Biochimie, 2008, 90(3): 515-524.

**[16]**张健中，罗勤慧．木质素酶及其化学模拟的研究进展[J]．化学通报，2001（8）：

470-477．

[17] Chandhry A S. Chemical and biological procedures to upgrade cereal. straws for ruminants[J]. Nutrition Abstracts and Reviews, 2008, 68(5): 319-328.

[18] Shim J Y, Cho K, Hee S. Degradation of azodye by an electroenzymatic method using horseradish peroxidase immobilized on porous support [J]. The Korean Journal of Chemical Engineering, 2007, 24 (1): 72-78.

**[19]**张力，邵喜霞，韩大勇．白腐真菌木质素降解酶系研究进展[J]．吉林畜牧兽医，

2009，51(30)：9-12．

**[20]**孙正茂，肖克宇．真菌木质素降解酶系的研究进展[J]．广东饲料，2006, 15（2）：

41-43．

**[21]**邓勋，宋瑞清，闵凯，等．高效选择性降解稻草木质素的菌株及其产酶特性的研究[J]．吉林农业大学学报，2009, 31（4）：390-397．

**[22]**黄慧，申源源，陈宏．黄孢原毛平革菌对玉米秸秆木质素的降解研究[J]．西南大学学报（自然科学版），2011, 33（7）：93-96．

**[23]**蒋荣清，袁兴中，曾光明，等．一组高效木质素降解复合菌的筛选[J]．应用与环境生物学报，2010, 16（2）：247-251．

[24] Pham L T M, Eom M H, Kim Y H. Inactivating effect of phenolic unit structures on the biodegradation of lignin by lignin peroxidase from Phanerochaete chrysosporium[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 61: 48-54.

[25] Kirby Ralph. Actinomycetes and Lignin Degradation[J]. Advances in Applied Microbiology, 2005, 58: 125-168.

[26] Laufera Z, Becketta R P, Minibayeva F V, *et al*. Occurrence of laccases in lichenized ascomycetes of the Peltigerineae[J]. Mycological Research, 2006, 110(7): 846-853.

[27] Rosadoa T, Bernardoa P, Koci K, *et al*. Methyl syringate: An efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases[J]. Bioresource Technology, 2012, 124: 371-378.

[28] Kersten P, Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin–degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(2): 77-87.

[29] Giles R L, Galloway E R, Elliott G D, *et al*. Two-stage fungal biopulping for improved enzymatic hydrolysis of wood[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8011-8016.

[30] Tang L, Zeng G M, Wang H, *et al*. Amperometric detection of lignin-degrading peroxidase activities from *Phanerochaetechrysosporium*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(7): 960-966.

[31] Dwivedi U N, Singh P, Pandey V P, *et al*. Structure–function relationship among

Bacterial, fungal and plant laccases[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68(2): 117-128.

**[32]**万云洋，杜予民．漆酶结构与催化机理[J]．化学通报，2007，（9）：662-670．

**[33]** Saha S K, Swaminathan P, Raghavan C, *et al*. Ligninolytic and antioxidative enzymes

Of amarine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511 during Poly R-478 decolourization [J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (9): 3076-3084.

**[34]**万云洋，杜予民．漆酶来源与绿色化学应用[J]．林产化学与工业，2008, 28（6）：

100-108．

[35] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(4): 454-466.

[36] Hatvani N, Mécsa I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by Lentinus edodes on solid medium[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(3): 381-386..

**[37]**秦小琼，付庭治，曹幼琴，等．红栓菌胞外漆酶的诱导纯化及部分特性研究[J]．微生物学报，1996, 36（5）：360-636．

**[38]**黄慧艳，张晓昱．白腐菌对培养环境pH的调节及其产漆酶的相关性[J]．微生物学杂志，2006, 26（2）：37-40．

**[39]**陈庆生，刘剑虹，李跃腾，等．多菌种共发酵体系的建立及生物转化玉米秸秆[J]．广州化工，2000, 28（4）：69-74．

**[40]** Villas-Boas S G, Esposito E, Mendonca M M. Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by Candida utilis and Pleurotus ostreatus[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(5): 461-467.

**[41]**王德培，刘瑛，夏兰英，等．里氏木霉和酵母菌混合发酵玉米秸秆的研究[J]．天

津轻工业学院学报，2002, 2: 1-2．

**[42]**冯树，周樱桥，张忠泽．微生物混合培养及其应用[J]．微生物学通报，2001，28

（3）：92-95．

**[43]** Colodette J L, Rothenberg S, Dence C W. Factor affecting hydrogen peroxides stability in the brightening of mechanical and chemimechanical Pulps[J]. Journal of Pulp & Paper Science, 2009, 15(2): 45-51.

**[44]**李栋，韩卿，王亚娟，等．硅酸钠模数对AOMG脱墨浆过氧化氢漂白的影响[J]．中

华纸业，2009, 30（4）：41-44．

[45] Farver O, Goldberg M, Lancet D, *et al*. Oxidative titration of Rhusvernicifera laccase and its specific interaction with hydrogen peroxide[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 73(2): 494-500.

[46] Brändén R, Malmström B G, Vänngård T. T he Interaction of Fungal Laccase with Hydrogen Peroxide and the Removal of Fluoride from the Inhibited Enzyme[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 18(2): 238-241.

**[47]**吴鼎泉，梅付明，屈松生，等．用微量热法研究漆酶和过氧化氢的反应[J]．物理

学学报，1991, 7（4）：490-494．

**[48]**李辉，付时雨，刘浩，等．过氧化氢与漆酶的协同催化反应[J]．造纸科学与技术，

2008，27(4)：9-12．

**[49]**田野，刘鹏，杨秀丽，等．纸浆生物漂白的研究进展[J]．华东纸业，2010, 41（4）：

17-22．

[50] Roncero M B, Torres A L, Colom J F, *et al*. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of *Eucalyptus* pulp[J]. Process Biochemistry, 2000, 36(1-2): 45-50.

[51] Fillat A, Roncero M B, Vidal T. Assessing the use of xylanase and laccases in biobleaching stages of a TCF sequence for flax pulp[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2011, 86(12): 1501-1507.

**[52]**庞志强，陈嘉川，杨桂花，等．白腐菌Trametes sp. Lg-9 粗酶液预处理对杨木

SCMP 性能的影响[J]．中华纸业，2010, 31（18）：20-23．

**[53]**冯建良，尤纪雪，叶汉林．白腐菌与酶生物预处理对麦草NaOH-AQ制浆性能的影响[J]．中华纸业，2006, 27（1）：39-42．

[54] Reid I D, Paice M G. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 13(2-3): 369-375.

[55] Vallsa C, Coloma J F, Baffertc Carole, *et al*. Comparing the efficiency of the laccase–NHA and laccase–HBT systems in eucalyptus pulp bleaching[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49(3): 401-407.

**[56]**张潇，张大同，李忠正，等．半纤维素酶E-An-76 在桦木硫酸盐浆漂白中的作

用[J]．中国造纸，1996, 15（5）：38-43．

**[57]**陈嘉川，杨桂花，李昭成．G6-2 细菌木聚糖酶漂白NaOH-AQ 麦草浆的研究

[J]．2000, 15: 43-49．

**[58]**关莹，张利萍，高慧．杨木硫酸盐浆木聚糖酶漂白性质的研究[J]．安徽农业大学学报，2010, 37（3）：547-551．

**[59]** Pedersen L S, Nissen A M, Elm D D, *et al*. Bleach boosting of kraft pulp using alkaline hemicellulases[C]. Proceedings 1991 International Pulp Bleaching Conference, Stockholm, 2001, 93(5): 39-42.

**[60]**刘玉新，牛梅红，汤德芳．木聚糖酶用于纸浆漂白[J]．纸和造纸，2004, 6: 76-78．

**[61]**徐志兵，张群，夏万燕．酶在纸浆漂白中的应用[J]．工业微生物，2002, 32（1）：

54-56．

[62] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenic substrates: Anexpanded role for laccase in lignin biodegradation. Federation of European Biochemical Societies, 2000, 267(1): 99-102．

[63] Paice M G, Reid I D, Bourbonnais R, *et al*. Manganese peroxidase, produced by Trametes versicolor during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 59(1): 260-265.

[64] Rosana C, Minussi A, Miranda A, Silva, *et al*. Purification, characterization and application of laccase from Trametes versicolor for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. AJ Biotech. 2007, 6(10): 1248-1254.

**[65]**莫佳琳，詹怀宇，付时雨．一种产漆酶真菌的鉴定及其漆酶在生物漂白中的应用

[J]．中国造纸学报，2008, 23（2）：10-14．

**[66]**王玉峰，胡惠仁，石淑兰．漆酶介体系统对高木素含量的硫酸盐浆的生物漂白化学[J]．天津造纸，2006, 4: 41-46．

**[67]**喻力，詹怀宇，付时雨．漆酶和木聚糖酶协同漂白蔗渣硫酸盐浆的研究[J]．纤维素科学与技术，2001, 9（3）：37-40．

**[68]**尤纪雪，连海兰，周楫，等．漆酶/木聚糖酶体系对OCC浆料改性的研究[J]．中国造纸学报，2009, 24（1）：31-34．

**[69]**吴淑芳，尤纪雪，叶汉玲，等．漆酶/木聚糖酶体系预处理促进马尾松硫酸盐浆漂白的研究[J]．中国造纸，2010, 29（6）：10-13．

**[70]**尤纪雪，陈星星，李雨楠，等．漆酶/木聚糖酶体系直接降解木质素的研究[J]．纤维素科学与技术，2008, 12（2）：12-17．

**[71]**尤纪雪，王玉秀，童国林，等．两种漆酶/木聚糖酶体系降解木质素能力的比较[J]．中国造纸，2009, 28（3）：1-5．

[72] Ian D R. Biologiccal pulping in paper manufacture[J]. Tend Biotechnol, 2001, 9: 262-265.

[73] Jujop. Enzymes are breaking into paper[J]. Pulp and Paper International, 2001, 33(9): 81-83.

[74] Bajpai P. Fiber Modification[M]. Patiala: Biotechnology for Pulp and Paper Processing, 2012: 159-183.

**[75]**刘正贵，王海毅，房桂干，等．氮源用量对杨木白腐菌降解效率的影响[J]．陕西

科技大学学报，2007, 26（2）：5-8．

[76] Camarero S, Barrasa J M, Pelayo M, *et al*. Evaluation of Pleurotus Species for Wheat-Straw Biopulping. Journal of pulp and paper science, 2008, 24(7):197-203.

[77] Idaraga G U, Ramos J, Young R A, *et al*. Biomechanical Pulping of Agave sisalana[J]. Hozforschung, 2005, 55 (1): 42-46.

**[78]**林志伟．白腐菌降解菌草及其降解酶系的特性研究[D]. 福建：福建农林大学，2008．

**[79]** Wolfaardt F, Dunn C, Grimbeek E, *et al*. Biopulping of sugar cane bagasse: Improvement of the semi-alk a linesulphite–anthra quiunone process. Proceedings of theinternational conference on biotechnology in the pulp and paper industry [C]. 2008, 2: B53.

**[80]**王蕾，王万贵，季祥，等．木素降解菌株的筛选及其对造纸原料中纤维素含量及

kappa值的影响[J]．纸和造纸，2011, 30（1）：63-68．

**[81]**张明旭，王贵龙，欧泽深，等．几种木质素降解菌的筛选及其协同作用降解煤炭的研究[J]．煤炭学报，2007, 32（6）：635-636．

[82] Paice M G, Jurasek L．Removing Hemicellulose from Pulps by Specific Enzymic Hydrolysis[J]. Wood Chemistry Technology, 2004, 4: 187-190．

[83] Bajpai P, Anand A, Bajpai P K. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes[J].

Biotechnology Annual Review, 2006, 12: 349-378.

**附录A** 普通青霉菌**ITS**鉴定

将2.4筛选到的产漆酶真菌进行ITS鉴定，测定结果如下：

NM-磺酸样本ITS测序结果AGCGGTGCATGCTCTCATCTGATGTCACCTGGATCAGAATTTTGGGTTGATCGG CAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGG ACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGGATCGGAGGA CGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGG CATGCCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATT

CACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT GCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTC AGACTACAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCG GGGGCGTAAGCCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAG GTAAAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAAT GATCCTTCCGCAGGTTcACCCCTACGGAAG

根据测序结果与其他物种进行比对，得出结果如表A.1所示。

**表A.1鉴定结果**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品名称 | 扩增序列 | 参考物种 | Accession No. | 分类 | 同源度 |
| NM-磺酸 | ITS | *Penicillium commune*  （普通青霉菌） | JQ082505 | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; Penicillium. | 99% |

### 在学研究成果

[1]卢庆华，邢孟兰，王蕾，等．青霉菌产漆酶条件及酶学性质的研究[J]．科学技术与工程，2014, 14(4)：170-174．

致**谢**

三年时光转眼过去，匆匆走过，感受颇多，需要感谢的人很多。三年的生活中，积淀了很多知识和人生感悟，这将对我以后的生活是一笔很大的财富。

首先，要感谢蔡禄教授，在三年之中给我实验上的教导，对我实验指出的意见，在我生活上对我的关心照顾。能作为蔡禄教授的学生，我深感荣幸和骄傲。感谢季祥副教授，谢谢您对我实验和生活的照顾，让我感觉到有家、有亲人的感觉。

还要感谢卢庆华老师和王蕾老师，谢谢你们在我的实验上给我的宝贵的建议和指导，没有你们辛苦的付出，我的实验不会如此的顺利，在此，特别向二位老师表示感谢。

同时，我还要感谢刘凯华、乔春燕、苗小丽、吴亚坤、高ft、程腾在平时的实验上的探讨以及对我实验的帮助，感谢学妹张超君和白金丽、学弟刘彬对我生活和实验的大力支持，像亲妹妹和弟弟一样每天相处。

最后，感谢各位专家、教授精心评审我的论文，向你们致以最诚挚的谢意，并感谢答辩委员会各位老师提出宝贵的指导意见！