

研究报告

## *Clostridium thermocellum* 与 *Bacillus licheniformis* 共培养分解纤维素的性质

姚义<sup>1</sup> 吕育财<sup>1\*</sup> 龚艳丽<sup>1</sup> 邓志威<sup>1</sup> 李宁<sup>2</sup> 郭金玲<sup>1</sup> 田毅红<sup>1</sup> 龚大春<sup>1</sup>

(1. 三峡大学生物与制药学院 湖北 宜昌 443002)

(2. 三峡大学水利与环境学院 湖北 宜昌 443002)

**摘要:**【目的】采取人工构建复合菌系的方法探索微生物协同降解纤维素的机理及菌间关系。【方法】从一组高温发酵木质纤维素原料产沼气的菌群中分离获得若干菌株, 其中一株细菌经 16S rRNA 基因全序列测序比对后鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 将该菌株与厌氧纤维素分解菌 *Clostridium thermocellum* CTL-6 进行共培养, 菌株组合表现出很强的滤纸纤维素分解能力。【结果】两菌共培养 9 d, 累计滤纸分解量为 484.6 mg, 滤纸相对分解率高达 93.2%; pH 变化呈先下降后逐步回升, 培养 3 d 后 pH 由初始时的 7.00 降到最低值 6.57, 第 9 天升至 7.73; 菌株组合能同时产生纤维素酶和半纤维素酶, 培养过程中两种酶活性大小均呈不断上升趋势, 最大值分别为 0.32 U/mL 和 0.57 U/mL。利用 HPLC 监测了乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸 5 种有机酸含量的变化, 其中丁酸、丙酸代谢量最高, 分别为 1 477.3 mg/L 和 1 068.8 mg/L; 除丙酸外, 其他 4 种有机酸含量变化趋势与滤纸降解的变化均无明显相关性。5 种有机酸总含量的变化与 pH 的变化趋势一致, 表明对 pH 变化起决定性作用的很可能是某种未检测的酸性较强的物质含量变化。【结论】*Bacillus licheniformis* 能有效促进 *Clostridium thermocellum* CTL-6 的纤维素分解活性, 且该菌株组合可作为后期进一步构建纤维素甲烷转化复合菌系的基础。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌, 纤维素分解菌, 纤维素生物降解, 协同作用, 共培养

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31370506, 31500422); Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2014CFB666)

\*Corresponding author: E-mail: yucaiyu@ctgu.edu.cn

**Received:** December 19, 2016; **Accepted:** February 23, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 27, 2017  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370506, 31500422); 湖北省自然科学基金项目(No. 2014CFB666)

\*通讯作者: E-mail: yucaiyu@ctgu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-19; 接受日期: 2017-02-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-27

## Cellulose degradation by co-cultivation of *Bacillus licheniformis* and *Clostridium thermocellum*

YAO Yi<sup>1</sup> LÜ Yu-Cai<sup>1\*</sup> GONG Yan-Li<sup>1</sup> DENG Zhi-Wei<sup>1</sup> LI Ning<sup>2</sup> GUO Jin-Ling<sup>1</sup>  
TIAN Yi-Hong<sup>1</sup> GONG Da-Chun<sup>1</sup>

(1. College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

(2. College of Hydraulic and Environmental Engineering, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

**Abstract:** [Objective] To explore synergy mechanism of cellulose biodegradation and relationships among the bacterial consortium, we took an approach of artificial constructing composite consortia. [Methods] Some strains were isolated from a microbial community which could ferment lignocellulose to produce biogas at high temperature. One of strains was identified as *Bacillus licheniformis* by sequencing nearly complete 16S rRNA gene. The strains' combination, which consisted of the *Bacillus licheniformis* and *Clostridium thermocellum* strain CTL-6, had strong filter paper cellulose degradation ability. [Results] Throughout the 9-day co-cultivation, the cumulative degradation amount of filter paper was 484.6 mg and relative degradation ratio was as high as 93.2%. Overall, the variation of pH decreased firstly and then gradually increased. The initial pH of the culture solution was 7.00. The pH dropped to the lowest value (about 6.57) in 3 d. At the end of the culture period (9 days), the pH was 7.73. The combination could produce cellulase and hemicellulase, and two kinds of enzyme activity all represented the rising trend. The maximum of cellulase activity and hemicellulase activity were 0.32 and 0.57 U/mL, respectively, on the day 9. Lactic acid, formic acid, acetic acid, propionic acid and butyric acid were detected by HPLC during the co-culture. Among the five organic acids, the propionic acid and butyric acid had higher metabolism yield and the maximum concentrations were 1 068.8 and 1 477.3 mg/L, respectively. In addition to propionic acid, the concentration change trends of other 4 organic acids had no significant correlation with the change of the filter paper degradation. The total concentration variation of the five organic acids was in accordance with the variation of pH. This result indicated that it probably existed some not-detected acidic substances, the concentration variation of which played a decisive role in the pH variation of the co-culture system. [Conclusion] *Bacillus licheniformis* could effectively promote the cellulolytic activity of *Clostridium thermocellum* CTL-6, and the strains' combination could also be used to artificially construct composite microbial which was able to convert cellulose to produce methane.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, *Clostridium thermocellum*, Cellulose biodegradation, Synergism, Co-culture

纤维素是一种重要的可再生资源，广泛存在于自然界中，是缓解世界能源危机潜在的替代原料<sup>[1]</sup>。利用微生物发酵技术可将纤维素转化成各种能源(如酒精、沼气、氢气)<sup>[2-4]</sup>或生物化工产品(如有机酸、糖类物质)<sup>[5-6]</sup>，且成本低、污染少，然而纤维素难以快速被降解是限制其资源化利用的瓶颈<sup>[7]</sup>。

近年来，纤维素生物降解取得了不少新的研究进展。例如，很多能有效分解滤纸等纯纤维素物质的优良菌株相继被发现和分离<sup>[8-10]</sup>；但更多的研究则表明，纤维素的彻底降解是多种微生物协

同作用的结果，具有良好共生关系的菌群相比单一菌株分解功能更稳定也更强<sup>[11-12]</sup>。因此，对复合菌系降解纤维素及其菌间关系的研究受到越来越多的重视。目前，纤维素分解复合菌系的获得主要有两种途径：从环境样品中直接筛选和对已知菌株进行组合构建<sup>[13]</sup>。虽然通过前者方式获得的复合菌系通常比纤维素分解单菌、人工组合菌系的分解能力要强，但由于其组成菌株数量、种类较多，不便于菌间关系和纤维素降解机理的研究。相对而言，通过人工组配获得的复合菌

系, 菌株构成简单、明确、可控制, 是研究纤维素分解复合菌系多菌共生关系的有效途径。

通过长时间驯化, 本实验室获得了一组能高温发酵木质纤维素原料产沼气的菌群, 并从中分离得到一些在该菌群中具有较高丰度的细菌和古菌。在此基础上, 我们将分离获得的菌株与一株现有的纤维素分解菌株进行人工组配, 构建菌株组成种类由 2 类逐步到增加到 4 类的纤维素分解复合菌系。在两菌共生组合构建的过程中, 一株地衣芽孢杆菌与纤维素分解菌的组合表现出了很强的滤纸纤维素分解能力。本文通过对该组合共培养性质的研究, 探索了两菌共生关系, 以期能为后续含有更多种类菌株的组合构建和更复杂菌间协同分解机理的解析提供前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源及分离

研究所用的纤维素分解菌(命名为 CTL-6)分离于能高效分解小麦秸秆的纤维素分解菌复合系 WDC2<sup>[14]</sup>, 是一株嗜热厌氧热纤维菌<sup>[10]</sup>。地衣芽孢杆菌(命名为 Ba2)从本实验室高温(55 °C)沼气发酵体系(发酵原料为蔬菜废叶)中分离获得。

菌株分离。取适量沼液进行倍比稀释, 将稀释菌液涂布于固体分离培养基, 55 °C 有氧静置培养, 待平板菌落长出后, 挑取单菌落进行划线分离。连续平板划线分离 3 次后, 保藏菌种并送生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨、琼脂粉, 北京奥博星生物技术有限公司; 葡萄糖、氯化钠、羧甲基纤维素钠、考马斯亮蓝, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 酵母浸粉, 安琪酵母股份有限公司; Sigma X0627 木聚糖, 上海研谨生物技术有限公司; 3,5-二硝基水杨酸, 国药集团化学试剂有限公司; D-木糖, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 牛血清蛋白, Biosharp 生物技术有限公司; 有机酸标准品(乳酸、甲酸、乙

酸、丙酸、丁酸), 北京万佳首化生物科技有限公司; 定量滤纸, 杭州沃华滤纸有限公司; 微孔滤膜, 上海市新亚净化器件厂; PCR 试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 分光光度计, 尤尼科(上海)仪器有限公司; SX620 型 pH 计, 上海三信仪表厂; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 恒温培养箱、烘箱, 上海一恒科技有限公司; 灭菌锅, 浙江新丰医疗器械有限公司; 恒温水浴锅, 上海爱朗仪器有限公司; 台式高速离心机, 无锡市瑞江分析仪器有限公司; HPLC, 浙江福立分析仪器股份有限公司; PCR 仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

### 1.3 培养基及培养条件

Ba2 所用培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 5.0, NaCl 5.0, 酵母浸粉 1.0, 初始 pH 7.0, 固体培养基按 1.5% (质量体积比)添加琼脂粉, 55 °C 有氧培养。

CTL-6 所用培养基(代号 DSM122) (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.30, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.60, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.43, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.52, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.13, Na-β-glycerophosphate·6H<sub>2</sub>O 6.00, 酵母浸粉 4.50, 滤纸或纤维素粉 5.00, 0.1% 刃天青 1 mL, 初始 pH 7.0。高温高压灭菌(0.1 MPa 灭菌 20 min)后再添加过滤除菌的还原型谷胱甘肽母液和 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 母液, 使培养基中上述两种成分的终浓度分别为 0.25 g/L 和 1.10 mg/L, 55 °C 厌氧培养。

PCS-FP 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, NaCl 5.0, 酵母浸粉 1.0, 滤纸(中速、Φ=9 cm) 0.5% (质量体积比), 初始 pH 7.0。

### 1.4 菌株共培养

菌株共培养使用 PCS-FP 培养基。将活化好的 Ba2 和 CTL-6 纯培养物分别按 5% 的接种率(体积比)接种至同一装有 50 mL PCS-FP 培养基的锥形瓶中, 锥形瓶采用锡箔纸封口, 55 °C 静置培养 1 d, 即可观察到培养液明显变浑浊、滤纸表面有发黄的分解迹象。

共培养分解滤纸的性质研究。将上述菌株共培养的培养物(培养 5 d)按 5%的接种率(体积比)接种到装有 100 mL PCS-FP 培养基的锥形瓶中,设培养第 1、3、5、7 和 9 天等 5 个时间节点,每个时间节点设 3 个重复,共计接种 15 瓶和 3 瓶无菌对照。通过定时监测滤纸降解率、pH、羧甲基纤维素(CMC)酶活、木聚糖(Xylan)酶活、生物量  $OD_{600}$ 、总蛋白和有机酸代谢产物等指标的变化,考察菌株共培养分解滤纸纤维素的性质。

### 1.5 理化指标检测方法

滤纸分解率测定。将添加到相应培养瓶中的滤纸和抽滤用的微孔滤膜(水系、 $\Phi=50$  mm $\times$ 8  $\mu$ m)预先置于 80 °C 烘箱烘干至恒重,放干燥器冷却后精确称量,分别计质量为  $m_0$ 、 $m_1$ ;通过抽滤的方法收集未被降解的残余滤纸,将残渣和滤膜一起烘干至恒重,冷却、称量,计总质量为  $m_3$ 。根据  $m_0$ 、 $m_1$  和  $m_3$ ,即可计算得到对应时间节点的滤纸分解量和分解率。计算公式如下:

$$\text{滤纸分解率} = \left( 1 - \frac{m_3 - m_1}{m_0} \right) \times 100\%$$

CMC 酶活和 Xylan 酶活测定采用 DNS 法<sup>[15-16]</sup>。所使用的底物分别为 0.625% (质量体积比)的羧甲基纤维素钠、1% (质量体积比)的木聚糖,底物配置和待测酶液稀释均采用 0.2 mol/L、pH 4.8 的 HAc-NaAc 缓冲溶液。取待测酶液 0.5 mL,加 2 mL 相应底物,60 °C 水浴保温 30 min 后加 2.5 mL DNS 试剂,沸水浴显色反应 5 min,冰水冷却至室温,测其在波长 520 nm 处的吸光度值。分光光度计调零采用相同处理的缓冲溶液空白样。酶活性单位定义:一定条件下,1 mL 酶液在 1 min 内催化底物生成 1  $\mu$ mol 还原糖作为 1 U (下文中引用他文报道的酶活数据,酶活定义与本文相同)。

总蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法<sup>[17]</sup>。将培养液 10 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 稀释适当倍数(3–5 倍)的上清培养液,加 5 mL 考马斯亮蓝溶液,振荡、混合均匀,静置 5 min 后测其在波长

595 nm 处的吸光度值。分光光度计调零采用相同处理的去离子水空白样。

有机酸代谢产物采用 HPLC 检测<sup>[18]</sup>。样品预处理:取 10 000 r/min 离心 10 min 的培养液 1 mL,添加 5  $\mu$ L 稀释 5 倍后的浓  $H_2SO_4$ ,调培养液 pH 至 2.0–2.3,4 °C 静置 20 min,使培养液中蛋白质充分变性析出,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜即可。色谱检测条件:色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm $\times$ 7.8 mm),流动相 5 mmol/L  $H_2SO_4$ ,等度洗脱,流速 0.6 mL/min,检测波长 210 nm,进样量 20  $\mu$ L。

### 1.6 菌株测序鉴定

采用 16S rRNA 基因全序列分析进行菌株分类鉴定,基因测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司。细菌测序鉴定选用通用引物 27F (5'-AGTTTG ATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3')。DNA 提取采用生工® Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,具体步骤参照产品说明书。25  $\mu$ L PCR 反应体系:10 $\times$ Buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, Primer 27F (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, Primer 1492R (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 10 ng, Dream Taq-TM DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,加双蒸水补足至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:94 °C 4 min;94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min,4 °C 终止反应。分离获得的 Ba2 株菌的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 登录号为 KY441462。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 16S rRNA 基因测序鉴定及形态学特征

按 1.1 中所述方法进行菌株分离共获得 6 株菌,分别命名为 Ba1、Ba2、Ba3、Ba4、Ba5、Ba6。根据 6 株菌 16S rRNA 基因全序列测序结果,采用 N-J 法(Neighbor-Joining method)构建的系统发育树见图 1。Ba1、Ba2、Ba4、Ba6 菌株可鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),Ba3、Ba5 菌株

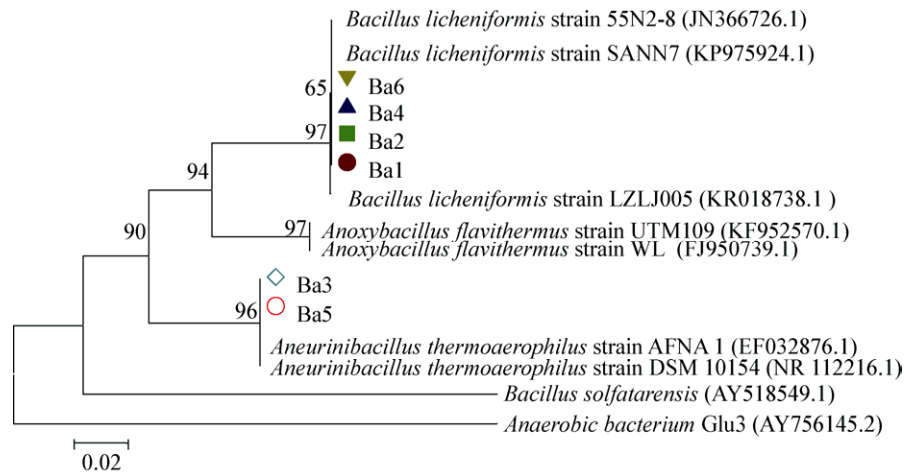


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注: Ba1、Ba2、Ba3、Ba4、Ba5、Ba6 为分离菌株的编号;分支节点上的数字代表在 1 000 次建树过程中的自展值;括号中的序号为 GenBank 登录号;标尺代表的序列差异度为 2%。

Note: Ba1, Ba2, Ba3, Ba4, Ba5 and Ba6 are serial numbers of the isolates. Bootstrap values for a total of 1 000 replicates are shown at the nodes of the tree. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The bar represents 2% sequence divergence.

可鉴定为解硫酸素芽孢杆菌 (*Aneurinibacillus thermoaerophilus*)。将 6 株菌分别与 CTL-6 进行共培养,发现相同时间内 Ba2、CTL-6 组合的相对滤纸分解率是 6 组组合中最大的,因此选择对 Ba2、CTL-6 共培养分解滤纸的性质进行研究。Ba2 单菌落呈 2 mm–3 mm 大小的圆形,乳白色,中间厚边缘薄,革兰氏染色结果为阴性(图 2)。

## 2.2 共培养滤纸分解效果

Ba2 和 CTL-6 共培养 9 d 的累计滤纸分解量为 484.6 mg,滤纸相对降解率高达 93.2%。培养过程中出现 2 次滤纸分解速率高峰,分别是第 1–3 天、第 5–7 天,2 d 内滤纸累计分解量分别为 252.3 mg 和 116.5 mg,第 3 天、第 7 天的滤纸降解率分别为 50.6% 和 87.2% (图 3)。前期研究结果显示:CTL-6 不能在 PCS-FP 培养基中生长,而在以滤纸为唯一碳源的 DSM122 培养基中培养 9 d 滤纸分解率为 80.9%<sup>[10,19]</sup>;Ba2 为好氧型细菌,虽然能在 PCS-FP 培养基中生长,但不能分解滤纸,且该菌株纯培养时未能检测到 CMC 酶活,可见 Ba2 不具有分解纤维素的功能。

综合分析,两菌共培养时 Ba2 通过消耗培养基中的氧创造有利于 CTL-6 生长的厌氧环境,使得菌株组合表现出分解滤纸纤维素的功能。与此同时,Ba2 的存在可能消耗纤维素分解的代谢产物,避免产物累积的反馈抑制影响,使得两菌共培养

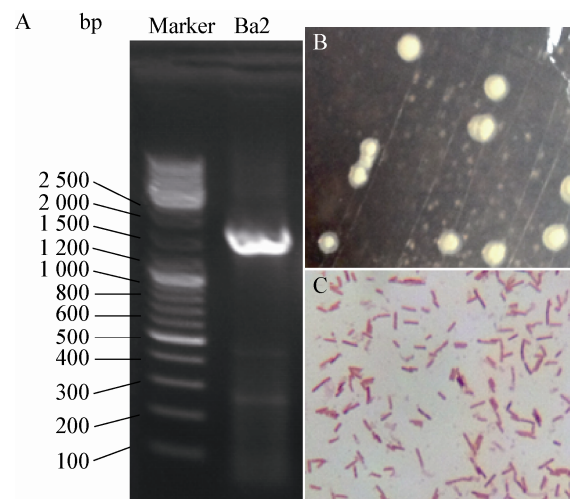


图 2 Ba2 菌株性质及 PCR 图片

Figure 2 Strain properties of Ba2 and PCR image

注: A: PCR 图; B: 菌落形态; C: 革兰氏染色结果(G<sup>-</sup>).

Note: A: PCR image; B: Colony morphology; C: Gram staining results (G<sup>-</sup>).

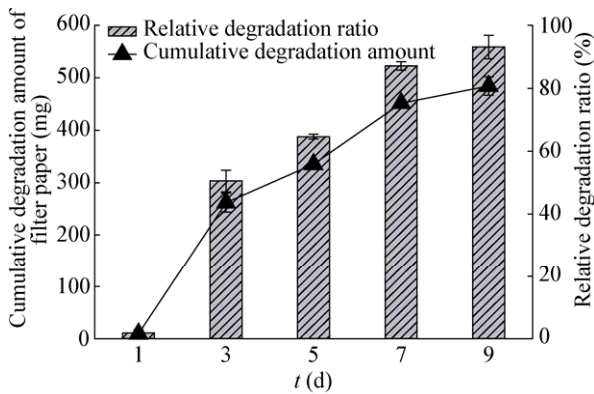


图3 Ba2和CTL-6共培养滤纸分解效果

Figure 3 Effect of filter paper degradation (the co-cultivation of Ba2 and CTL-6)

的纤维素分解能力相比 CTL-6 纯培养时的纤维素分解能力有显著提升。事实上,已有研究表明<sup>[20]</sup>纤维素的生物降解受水解产物的抑制影响,其主要产物纤维二糖即是抑制纤维素酶活性的重要物质。据此,我们推测地衣芽孢杆菌 Ba2 很可能具有促进 CTL-6 在 PCS 培养液中转化或利用纤维二糖的能力,具体结果有待后续实验的进一步研究。

### 2.3 酶活及总蛋白

目前多数文献中均以 CMC 酶活表示纤维素酶活性,用 Xylan 酶活表示半纤维素酶活。本研究结果表明, Ba2、CTL-6 在 PCS-FP 培养基中共培养可同时分泌纤维素酶和半纤维素酶,且两种酶在相同时间点的酶活大小有非常显著差异 ( $P < 0.01$ )。CMC 酶活和 Xylan 酶活变化趋势一致(图 4),均呈逐步上升,且随着培养时间的延长, Xylan 酶活与 CMC 酶活的差距也逐步增大。培养第 9 天时, CMC 酶活和 Xylan 酶活分别为 0.32 U/mL 和 0.57 U/mL。这与前人报道的纤维素分解复合菌群半纤维素酶活性显著高于纤维素酶活性的结果一致<sup>[21]</sup>。

由图 4 可知,总蛋白含量变化可分为 2 个时期,即线性增长期和平稳期,培养到第 7 天时,总蛋白含量基本不再上升。我们之前的研究结果显示, CTL-6 纯培养时监测到的总蛋白含量最高仅为 51.1 mg/L<sup>[10]</sup>,而 Ba2、CTL-6 共培养时培养体系胞外总蛋白含量最高可达 543.8 mg/L,是前者的

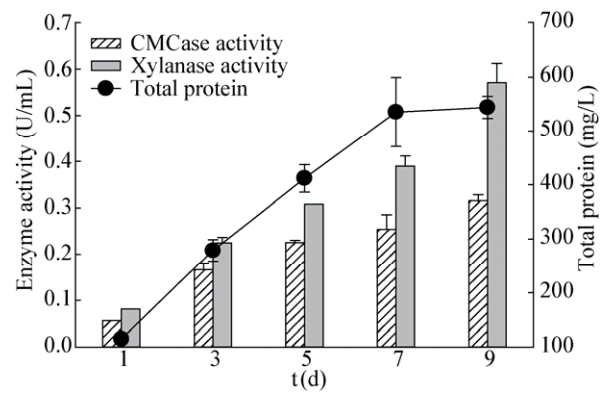


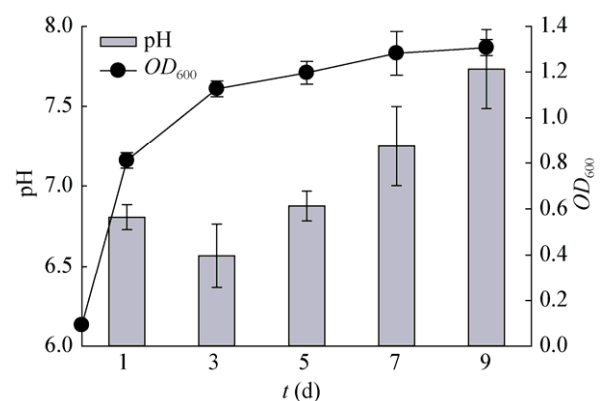
图4 酶活及总蛋白的变化

Figure 4 Changes of enzyme activity and total protein

10.6 倍。许多文献曾报道,地衣芽孢杆菌具有丰富的胞外酶系且产酶量高,能分泌多种消化性酶类(如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、木聚糖酶)<sup>[22-23]</sup>,可见该特性可能与 Ba2、CTL-6 共培养体系表现出高蛋白含量有直接关系。

### 2.4 pH 及生物量

Ba2、CTL-6 共培养分解滤纸过程中 pH 和  $OD_{600}$  值的变化如图 5 所示。pH 变化呈现“√”型,即前期下降、后期逐步回升,这也是纤维素分解复合菌群培养过程中比较典型的 pH 变化趋势<sup>[11,24-25]</sup>。培养液初始 pH 值为 7.0,培养 3 d 后 pH 值降到最低值 6.57,之后 pH 值开始不断上升,培养 9 d 时 pH 值为 7.73。培养液 pH 值的下降可以反映微生物对底物

图5 pH和生物量 $OD_{600}$ 的变化Figure 5 Changes of pH and  $OD_{600}$

的利用<sup>[26]</sup>。培养过程中, pH 下降期间相对应的正好是生物量快速增长和滤纸降解最快的时期, 这表明 Ba2、CTL-6 共培养时能很快适应环境, 并利用底物实现增殖, 且前期代谢产物以酸性物质为主。后期虽然生物量较高, 但滤纸降解速率并没有前期快, 这可能与底物量的减少、某些代谢产物累积的反馈抑制或者 pH 值上升对纤维素酶活性的影响等因素有关。

## 2.5 有机酸代谢产物

利用 HPLC 监测了 Ba2、CTL-6 共培养分解滤纸过程中乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸 5 种有机酸含量的变化(图 6)。结果显示: 乳酸含量波动不大, 培养第 3 天时含量最低, 为 580.6 mg/L; 培养第 7 天时含量最高, 为 802.8 mg/L; 乙酸含量呈先下降后上升的变化趋势, 培养第 5 天时乙酸含量最低, 为 210.2 mg/L; 丙酸和丁酸含量变化均表现为不断上升, 且丁酸含量在每个时间点都比其他有机酸要高, 到实验结束时, 丙酸和丁酸含量分别由培养第 1 天时的 395.1 mg/L 和 926.6 mg/L 上升到 1 068.8 mg/L 和 1 477.3 mg/L; 整个实验过程中未检测到甲酸存在。由于 Ba2、CTL-6 共培养组合丙酸和丁酸的产量相对较高, 而且随培养时间延长呈逐步上升的趋势。因此, 后期可考虑向该组合中添加丙酸和丁酸互营氧化菌、产甲烷菌, 进一步尝试构建纤维素甲烷转化的复合菌系。

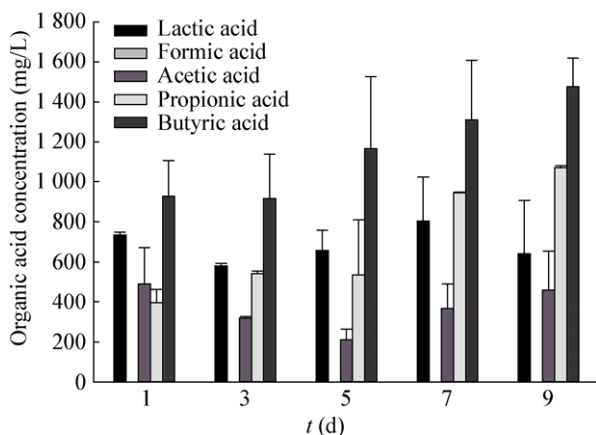


图 6 有机酸代谢产物含量的变化

Figure 6 Changes of concentration of organic acid products

结合上述结果与图 3 分析, 可发现滤纸降解最快的两个高峰时间段(第 1-3 天, 第 5-7 天)与丙酸含量的两次大幅上升正好对应, 而与其他有机酸含量的变化并无明显相关性。此外, 乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸这 5 种有机酸总含量的变化与 pH 的变化趋势一致, 即 pH 值最低时 5 种有机酸的总含量也最低。可见 Ba2、CTL-6 共培养分解滤纸过程中 pH 的变化与上述 5 种有机酸关系不大, 很可能与某种未监测的酸性较强的物质含量变化有关。

## 3 讨论

Kato 等<sup>[27]</sup>通过研究发现非纤维素降解菌在纤维素的降解中具有重要的作用。在本研究中, 非纤维素分解菌 Ba2 与纤维素分解菌 CTL-6 共培养后, 9 d 滤纸纤维素分解率高达 93.2%, 相比 CTL-6 纯培养时相对分解率(为 80.9%)提高了 15.2%。可见, Ba2 通过消耗培养体系中的氧为 CTL-6 创造厌氧环境, 进而在 Ba2、CTL-6 两菌共培养分解滤纸过程中能有助于 CTL-6 在非厌氧条件下分解纤维素成分和有效促进 CTL-6 的纤维素分解活性。纤维素的生物转化主要涉及两个过程: 水解过程(或糖化过程)和发酵过程<sup>[28]</sup>。单一菌株在降解纤维素时由于存在产物反馈抑制, 导致降解能力有限。当引入具有糖发酵功能的共生菌株后, 即可实现同步糖化发酵, 有效缓解或消除产物反馈抑制作用的影响, 使降解能力大大提升。

纤维素酶活性的大小并不能完全客观地反映菌系实际的纤维素分解能力。在本研究中, Ba2、CTL-6 共培养分解滤纸最快时相应的酶活大小并不高, 虽然该组合最终的滤纸分解率高达 93.2%, 但纤维素酶活最大监测值仅为 0.32 U/mL, 远低于某些相对分解率较低的菌系或菌株的酶活性大小。例如, 李莹等<sup>[29]</sup>和张杨等<sup>[30]</sup>曾报道一组纤维素分解复合菌系 F1, 该菌系培养 10 d 后对滤纸的降解率为 70.6%, 最大纤维素内切酶活为 56.25 U/mL; 赵银瓶等<sup>[13]</sup>分离得到的一株嗜热厌氧纤维素降解

菌 HCp, 培养 10 d 对滤纸纤维素降解率为 90.4%, 第 4 天时 CMC 酶活最大, 为 2.12 U/mL; 本研究所用菌株 CTL-6 纯培养 9 d, 滤纸降解率为 80.9%, 最大 CMC 酶活为 0.404 U/mL<sup>[10]</sup>。此外, 也有研究结果<sup>[19]</sup>显示, 纤维素分解复合菌系或菌株降解纤维素过程中 CMC 酶活通常随着培养时间的延长而上升, 纤维素分解最旺盛时相应的 CMC 酶活并非最高。

有报道表明, 纤维素分解复合菌系分解纤维素过程 pH 的下降主要与有机酸的大量产生有关, 到发酵中后期, 随着有机酸积累相对减少, pH 逐渐回升<sup>[25]</sup>。本研究中, 虽然 pH 变化趋势与前人报道一致, 但 pH 与有机酸含量变化之间的相关关系却并未体现。事实上, 我们监测的乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸这 5 种代表性有机酸总含量的变化与 pH 的变化趋势一致, 该结果表明对 Ba2、CTL-6 共培养分解滤纸过程中 pH 变化起决定性作用的很可能是某种未监测的酸性较强的物质含量变化, 具体结果有待后续进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Field CB, Campbell JE, Lobell DB. Biomass energy: the scale of the potential resource[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2008, 23(2): 65-72
- [2] Qu YB. Industrialization of cellulosic ethanol[J]. Progress in Chemistry, 2007, 19(7/8): 1098-1108 (in Chinese)  
曲音波. 纤维素乙醇产业化[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1098-1108
- [3] Cheng X, Zhu WB. Industrial marsh gas — the cinderella in China's renewable energy mix[J]. Sino-Global Energy, 2011, 16(1): 37-42 (in Chinese)  
程序, 朱万斌. 产业沼气——我国可再生能源家族中的“奇兵”[J]. 中外能源, 2011, 16(1): 37-42
- [4] Wang AJ, Cao GL, Xu CJ, et al. Progress and technology development on hydrogen production through bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(7): 931-941 (in Chinese)  
王爱杰, 曹广丽, 徐诚蛟, 等. 木质纤维素生物转化产氢技术现状与发展趋势[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 931-941
- [5] Zybrevna VN, Isakova EP, Biryukov VV. Selection of a mixed culture of cellulolytic thermophilic anaerobes from various natural sources[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2001, 37(4): 363-367
- [6] Wen ZY, Wei L, Chen SL. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production[J]. Bioresource Technology, 2004, 91(1): 31-39
- [7] Liu LH, Peng GX, Huang Y, et al. Study on effective cellulose degrading by stable multiple microorganism[J]. Shandong Chemical Industry, 2015, 44(4): 6-9 (in Chinese)  
刘丽辉, 彭桂香, 黄洋, 等. 高效稳定复合菌降解纤维素的研究[J]. 山东化工, 2015, 44(4): 6-9
- [8] Morgavi DP, Sakurada M, Mizokami M, et al. Effects of ruminal protozoa on cellulose degradation and the growth of an anaerobic ruminal fungus, *Piromyces* sp. strain OTS1, *in vitro*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(10): 3718-3723
- [9] Shiratori H, Ikeno H, Ayame S, et al. Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3702-3709
- [10] Lü YC, Wang XF, Li N, et al. Characterization of the effective cellulose degrading strain CTL-6[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(4): 649-655
- [11] Cui ZJ, Li MD, Piao Z, et al. Selection of a composite microbial system MC1 with efficient and stability cellulose degradation bacteria and its function[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2002, 23(3): 36-39 (in Chinese)  
崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 36-39
- [12] Haruta S, Cui Z, Huang Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 529-534
- [13] Zhao YP. Research on community structure and function microorganism of anaerobic cellulose degradation composite microbial system[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese)  
赵银瓶. 厌氧纤维素降解复合菌群落结构及功能微生物研究[D]. 成都: 中国农业科学院研究生院硕士学位论文, 2012
- [14] Lü YC, Zhu WB, Cui ZJ, et al. Characterization and community diversity of cellulose-degrading microflora WDC2 during degrading wheat straw[J]. Journal of China Agricultural University, 2009, 14(5): 40-46 (in Chinese)  
吕育财, 朱万斌, 崔宗均, 等. 纤维素分解菌复合系 WDC2 分解小麦秸秆的特性及菌群多样性[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(5): 40-46
- [15] Xia FB, Qiu YL, Sun XX. Studies on condition for determination of cellulase activity[J]. Feed Industry, 2005, 26(16): 23-26 (in Chinese)  
夏服宝, 邱雁临, 孙宪迅. 纤维素酶活力测定条件研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(16): 23-26
- [16] Wu YB, Feng XY. Study on the determination method of xylanase activity[J]. China Feed, 2008(4): 34-36 (in Chinese)  
武玉波, 冯秀燕. 木聚糖酶活力测定方法的研究[J]. 中国饲料, 2008(4): 34-36
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [18] Jiang Y, Fan GF, Du R, et al. Determination of sugars, organic



- acids and alcohols in microbial consortium fermentation broth from cellulose using high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(8): 805-808 (in Chinese)
- 姜艳, 范桂芳, 杜然, 等. 高效液相色谱法测定菌群降解纤维素产物中的糖、有机酸和醇[J]. 色谱, 2015, 33(8): 805-808
- [19] Lü YC, Li N, Yuan XF, et al. Enhancing the cellulose-degrading activity of cellulolytic bacteria CTL-6 (*Clostridium thermocellum*) by co-culture with non-cellulolytic bacteria W2-10 (*Geobacillus* sp.)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(7): 1578-1588
- [20] Kongruang S, Han MJ, Breton CIG, et al. Quantitative analysis of cellulose-reducing ends[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2004(116): 213-231
- [21] Liu CL. Microbial component and synergic mechanism of a lignocellulose degradation microbial community NSC-7[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Forestry University, 2008 (in Chinese)
- 刘长莉. 木质纤维素分解复合菌群 NSC-7 菌种组成及种间协作机理[D]. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 2008
- [22] Yu ZH, Ding K, Hou K, et al. Optimization of shake flask-ferment conditions for *Bacillus licheniformis* B. LY02 producing cellulase[J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2016, 37(4): 76-80 (in Chinese)
- 余祖华, 丁轲, 侯奎, 等. 产纤维素酶地衣芽孢杆菌 B. LY02 摇瓶发酵条件优化[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2016, 37(4): 76-80
- [23] Yang Y, Zhang FY, Cang GL, et al. Research advances in the application of bioactive substances produced by *Bacillus licheniformis*[J]. Current Biotechnology, 2013, 3(1): 22-26 (in Chinese)
- 杨阳, 张付云, 苍桂璐, 等. 地衣芽孢杆菌生物活性物质应用研究进展[J]. 生物技术进展, 2013, 3(1): 22-26
- [24] Lü YC, Li N, Luo B, et al. Effect of enriching condition with temperature and carbon on the activity and stability of cellulose-degrading community[J]. Journal of China Agricultural University, 2013, 18(6): 35-41 (in Chinese)
- 吕育财, 李宁, 罗彬, 等. 温度及碳源对纤维素分解菌群分解活性与稳定性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(6): 35-41
- [25] Wang WD, Wang XF, Liu CL, et al. Productions analyses and pH dynamics during rice straw degradation by the lignocellulose degradation bacteria system WSC-6[J]. Environmental Science, 2008, 29(1): 219-224 (in Chinese)
- 王伟东, 王小芬, 刘长莉, 等. 木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解稻秆过程中的产物及 pH 动态[J]. 环境科学, 2008, 29(1): 219-224
- [26] Kato S, Haruta S, Cui Z, et al. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 51(1): 133-142
- [27] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7099-7106
- [28] Sun Y, Cheng JY. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. Bioresource Technology, 2002, 83(1): 1-11
- [29] Li Y, Dong GJ, Fang X, et al. Dynamics of microbial community in process of cellulose decomposed by simplified bacterial community F1[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(8): 35-39 (in Chinese)
- 李莹, 董桂军, 方旭, 等. 简化的纤维素分解复合菌系 F1 的菌株组成动态[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(8): 35-39
- [30] Zhang Y, Li Y, Ai SQ, et al. Capability of cellulose degradation and enzyme activities of simplified artificial composite microbial system based on WSC-9[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2016, 28(2): 80-84 (in Chinese)
- 张杨, 李莹, 艾士奇, 等. 基于 WSC-9 的人工组建的简化复合菌系的纤维素分解能力与酶活特性[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2016, 28(2): 80-84