

牛粪堆肥中纤维素高效降解菌的筛选与产酶条件优化

王文凡^{#1}, 刘银秀^{#2}, 谢晓杰¹, 杨健¹, 赵卓群¹, 王敏¹, 郑华宝^{*1}

1 浙江农林大学环境与资源学院 浙江省土壤污染生物修复重点实验室, 浙江 杭州 311300

2 浙江省耕地质量与肥料管理总站, 浙江 杭州 310000

王文凡, 刘银秀, 谢晓杰, 杨健, 赵卓群, 王敏, 郑华宝. 牛粪堆肥中纤维素高效降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4796-4811.

WANG Wenfan, LIU Yinxiu, XIE Xiaojie, YANG Jian, ZHAO Zhuoqun, WANG Min, ZHENG Huabao. Screening of efficient cellulose degrading bacteria in cow manure compost and optimization of enzyme production conditions[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4796-4811.

摘要:【背景】纤维素是一种有待开发利用的生物物质资源, 对于能源危机、环境污染问题的解决具有重要作用。【目的】从牛粪堆肥中分离出产纤维素酶的细菌, 研究该菌株的纤维素降解能力。

【方法】采用纤维素固体平板刚果红染色法进行初筛、液体发酵纤维素酶活测定法进行复筛。【结果】筛选获得一株具有高产纤维素酶活性的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 命名为 N5。单因素分析试验结果显示, 菌株 N5 具有较好的 pH、温度和盐度耐受性, 正交优化试验结果表明, 菌株 N5 产纤维素酶的最佳条件为: 发酵初始 pH 5.0, 发酵时间 96 h, 发酵温度 40 °C。在此条件下, 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)酶活为 189.27 U/mL。此外, 菌株 N5 能够在 7 d 内使水稻秸秆减重率达到 19.35%。扫描电镜结果表明菌株 N5 能够有效促进水稻秸秆降解。

【结论】菌株 N5 具有较高的纤维素酶活力, 具有开发成高效好氧堆肥菌剂的潜质, 这为固体废弃物中纤维素的生物转化提供了优质菌种资源。

关键词: 纤维素降解; 解淀粉芽孢杆菌; 产酶条件; 秸秆降解

资助项目: 浙江省重点研发计划(2021C03190); 浙江省“三农九方”项目(2022SNJF077); 浙江农林大学科研发展基金(2034020081); 杭州市农业与社会发展科研项目(202203B23)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Zhejiang Province Key Research and Development Program (2021C03190), the Zhejiang Province “San Nong Jiu Fang” Project (2022SNJF077), the Zhejiang A&F University Research and Development Fund (2034020081), and the Hangzhou Agricultural and Social Development Research Project (202203B23).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zhenghuabao@zafu.edu.cn

Received: 2023-03-21; Accepted: 2023-06-18; Published online: 2023-07-12

Screening of efficient cellulose degrading bacteria in cow manure compost and optimization of enzyme production conditions

WANG Wenfan^{#1}, LIU Yinxiu^{#2}, XIE Xiaojie¹, YANG Jian¹, ZHAO Zhuoqun¹, WANG Min¹, ZHENG Huabao^{*1}

1 Key Laboratory of Soil Contamination Bioremediation of Zhejiang Province, School of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 Zhejiang Provincial Farmland Quality and Fertilizer Management Station, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

Abstract: [Background] Cellulose is a biomass resource to be developed and utilized, which is important for solving energy crisis and environmental pollution. [Objective] To isolate cellulase-producing bacteria from cow manure compost and investigate their cellulose degradation ability. [Methods] The cellulose solid plate Congo red staining method was used for preliminary screening, followed by liquid fermentation and cellulase activity measurement for secondary screening. [Results] A bacterium with high cellulase activity was isolated and identified as *Bacillus amyloliquefaciens* strain N5. Single-factor analysis experiments demonstrated that strain N5 exhibited good tolerance to pH, temperature, and salinity. Orthogonal optimization experiments revealed that the optimal conditions for cellulase production by strain N5 were an initial fermentation pH of 5.0, fermentation time of 96 hours, and fermentation temperature of 40 °C. Under these conditions, the enzyme activity reached 189.27 U/mL. Furthermore, strain N5 achieved a 19.35% reduction in weight of rice straw within 7 days, indicating its effective promotion of rice straw degradation. Scanning electron microscopy results confirmed the ability of strain N5 to facilitate rice straw decomposition. [Conclusion] Strain N5 exhibits high cellulase activity and holds potential for developing efficient aerobic composting agents. It provides a valuable bacterial resource for the biological transformation of cellulose in solid waste.

Keywords: cellulose degradation; *Bacillus amyloliquefaciens*; enzyme production conditions; straw degradation

纤维素(C₆H₁₀O₅)_n是一种由葡萄糖组成的天然多聚糖^[1],广泛存在于自然界中,主要以农业废弃物形式存在,包括农作物秸秆、蔬菜和甘蔗渣等^[2-4]。纤维素是一种优质的生物质资源,可以用于生产液体燃料及其他高值化学品^[5]。农业废弃物的处理处置方式主要是焚烧及填埋等,这容易造成纤维素资源的浪费^[6-7]。纤维素

在常温环境下比较稳定,纤维素复杂的结构和抗物理、化学或生物降解的能力使纤维素的降解成为研究的热点^[8-9]。有研究表明,采用机械粉碎^[10]、超声波处理^[11]或酸碱处理^[12]等物理化学法能够对纤维素的降解有一定效果,但在处理成本及环境保护方面存在一定局限性^[13-14]。有研究利用蚯蚓对菇渣纤维素进行降解,但是

降解过程耗时长, 原材料需要调配碳氮比^[15]。自然界中的纤维素能够在多种微生物的协同作用下发生降解, 降解作用主要来源于微生物分泌的纤维素降解酶, 利用微生物降解纤维素具有环保、高效及成本低等优势^[16-18]。因此, 筛选能够产纤维素降解酶的微生物, 用于处理纤维素是一种行之有效的方法^[19]。

目前的研究已筛选分离得到许多可降解纤维素的细菌、真菌和放线菌^[1,20], 其中真菌产纤维素酶的能力很强^[21], 而细菌有更强的环境适应性, 具有生长更快且能够产生特异性更高的多酶复合物等优点。近几年的研究中, 孟建宇等^[22]通过对大兴安岭森林土壤进行筛选, 获得了两株能够产纤维素酶的真菌, 两株真菌的羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)酶活性分别达到 103.89 U/mL 和 158.36 U/mL。江高飞等^[23]研究获得了具有较高热稳定性并且能够有效降解纤维素的菌株, 该菌株在 55–65 °C 和 75 °C 条件下依旧能发挥较高的纤维素降解效果。吴文韬等^[24]分离到一株高效纤维素降解菌 NH11, 经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 30 °C 发酵 5 d 时, 预处理前后玉米秸秆降解率分别为 14.24% 和 24.73%。

目前的研究中, 纤维素降解菌主要以真菌为主^[25-26], 纤维素降解细菌的筛选和研究十分必要。人们在生产生活中对纤维素的处理需求不断增加, 纤维素降解菌的筛选及应用暂未满足需求, 所以丰富纤维素降解菌资源并对纤维素降解酶进行深入研究具有重要意义。本研究以牛粪堆肥为样品, 筛选具有纤维素降解作用的细菌, 研究降解菌的产酶特性和秸秆降解效果, 以期为后续农业废弃物纤维素的降解利用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

牛粪堆肥样品取自浙江杭州某养殖场, 取样置于冰盒运回实验室, 保存于 4 °C 冰箱备用。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0。

CMC 培养基(g/L): CMC-Na 10.0, K₂HPO₄ 1.0, NH₄NO₃ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.02, 琼脂 15.0, 自然 pH。

滤纸降解培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 1.0, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 酵母膏 0.1, 滤纸条(1 cm×6 cm) 3 条/瓶, 自然 pH。

秸秆培养基: 水稻秸秆烘干剪成 3–4 cm 左右的段状秸秆 2 g, 无机盐培养液 100 mL, 自然 pH。

发酵产酶培养基(g/L): CMC-Na 10.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母膏 5.0, 自然 pH。

以上所有培养基均 121 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

酵母膏和蛋白胨, OXOID 公司; CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司; 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS), 上海麦克林生化科技有限公司; 酒石酸钾钠和刚果红, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 电热恒温水浴和恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 高压灭菌锅和无菌操作台, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 高速离心机, 杭州奥盛仪器有限公司; pH 计, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; 电子天平, 常州奥豪斯仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与纯化

降解菌株分离^[27]:称取 1 g 牛粪堆肥样品用无菌水进行 10 倍倍比稀释,将一定稀释度的稀释液涂布于 CMC-Na 培养基平板上,置于 30 °C 恒温培养箱培养 3–4 d。将分离纯化的菌株以点种法接种于 CMC-Na 培养基上,每株菌 3 个重复,30 °C 恒温培养 48 h 后,倒入 1 mg/mL 刚果红溶液染色 30 min,倒去刚果红溶液,用 1 mol/L 的 NaCl 溶液浸泡 15 min 脱色,通过计算透明水解圈直径(D)和菌落直径(d)的比值(D/d)来初步判断菌株产酶能力,选取比值大的菌株进行划线保存^[28]。

1.2.2 滤纸崩解试验

为进一步验证所获得菌株对纤维素的降解能力,设置滤纸崩解试验,以不加菌作为空白对照;分别以 5% 接种量接种至滤纸崩解培养基中,混匀后置于 35 °C、160 r/min 条件下培养 7 d,观察滤纸条的断裂程度,从而判断相应菌株的降解效果,选出较优菌株作为下一步复筛的目标菌株。

1.2.3 菌种鉴定

菌株形态学观察:挑取纯化菌株单菌落在 LB 固体培养基上进行划线,于 35 °C 倒置培养至平板上长出清晰菌落,观察菌落形态特征,并挑选生长良好的菌落用于透射电镜观察。挑取单个菌落,参照东秀珠等《常见细菌系统鉴定手册》^[29]上的方法进行革兰氏染色,显微镜下观察菌体形态。

分子生物学鉴定:采用 OMEGA 细菌基因组提取试剂盒提取菌株的总 DNA,以细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L):模板 DNA (20 ng/ μ L) 2 μ L,通用引物 27F (10 μ mol/L)

和 1492R (10 μ mol/L)各 5 μ L, *Taq* 酶(0.05 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 \times *Taq* 缓冲液(含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, ddH₂O 8.3 μ L。PCR 反应条件:94 °C 10 min; 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至有康生物工程有限公司进行测序。将获得的序列通过 BLAST 与 GenBank 中的已知序列进行比对,并利用 MEGA 7.0 软件对菌株亲缘性相近属种进行分析,采用邻接法构建系统发育树^[30]。

1.2.4 纤维素酶活的定量测定

发酵液酶活力测定:将 N5 单菌落接种于 LB 液体培养基中,35 °C、160 r/min 培养 24 h 后,取 1 mL 菌液接种于 100 mL 的发酵培养基中,35 °C、160 r/min 恒温摇床振荡培养 24 h 后,定时取样测定菌株发酵液的酶活力,发酵液酶活力测定周期为 120 h。

粗酶液制备^[31]:将上述菌株发酵液于 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min 后,上清液即为粗酶液。

酶活力的测定:将 1 mL 1% 的 CMC-Na 加入到 25 mL 具塞试管中,加入 1 mL 适当稀释的粗酶液后摇匀,于 50 °C 下准确反应 30 min 后,迅速加入 2 mL 的 DNS 试剂,沸水浴反应 5 min,迅速冷却,用蒸馏水定容到 25 mL,在波长 540 nm 处测定吸光值,以葡萄糖为标准,计算酶活力单位。

酶活力单位定义为:在上述反应条件下,1 min 内将底物转化为 1 μ g 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位(U/mL),酶活力计算公式为^[32-33]:

$$\text{酶活力} = \frac{G \times N \times 1000}{T \times V}$$

式中: G 为对照葡萄糖标准曲线得到的葡萄糖浓度(540 nm); N 为反应体积(mL); T 为反应时间(min); V 为粗酶液的体积(mL)。

1.2.5 菌株产酶优化

初始发酵培养条件为：初始 pH 7.0、温度 35 °C、转速 160 r/min、装液量 100 mL (250 mL 三角瓶)、接种量 1%。

单因素试验：在初始发酵培养条件下，选取发酵时间(0–12 h 内每 2 h 取样，后每 12 h 取样)、发酵温度(30、35、40、45 和 50 °C)、接种量(1%、2%、3%、4%和 5%)、发酵初始 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)以及培养基的 NaCl 浓度(1%、2%、3%、4%和 5%)进行单因素试验，发酵 72 h 后测定菌株的 CMC 酶活和细菌生长量(OD_{600})。每个处理 3 个重复，在最佳条件下研究各因素对菌株产纤维素酶的影响。

正交优化试验：依据单因素试验结果，选择发酵时间、发酵初始 pH 和发酵温度，设计三因素三水平正交试验，采用 $L_9(3^3)$ 正交表。

1.2.6 秸秆降解试验

将 N5 菌液按 5% (体积分数)接种至水稻秸秆段无机盐液体发酵培养基中，并设置空白对照，35 °C、160 r/min 液体发酵 7 d。液体发酵降解结束后，将稻秆降解残余物在 100 目的过滤网内用大量清水冲洗，除去附着菌体和可溶性物质，在 105 °C 条件下烘干至恒重，同时称取秸秆剩余物干重，计算秸秆的减重率^[34]。

$$\text{秸秆减重率}(\%) = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} \times 100$$

式中： M_0 为对照组秸秆剩余物干重(g)； M_1 为处理组秸秆剩余物干重(g)。

1.2.7 水稻秸秆扫描电镜分析

利用扫描电子显微镜，观察分析经不同处理之后水稻秸秆的降解特性。试验设置 2 个处理，空白对照不加菌以及经过菌株 N5 处理的水稻秸秆。将 N5 菌液按 5% (体积分数)接种至水稻秸秆无机盐液体发酵培养基中，35 °C、160 r/min 液体发酵 7 d。发酵完成后将培养基用 500 目尼龙沙过滤，把空白对照和经菌株 N5 处理的水稻秸秆进行风干。送至浙江省农科院通过切片、固定、冲洗、脱水和置换等环节进行处理后，用导电胶带将样品粘在扫描电镜样品台，真空镀金，使用扫描电镜观察水稻秸秆表面变化。

2 结果与分析

2.1 降解菌筛选分离结果

2.1.1 降解菌初筛结果

以牛粪堆肥为试验样品，使用刚果红染色法对初筛获得菌株进行检测(图 1)，获得 5 株具有产纤维素酶能力的菌株。五株菌的 D/d 在 1.03–4.69 之间，其中 N5 的水解圈最大， D/d 为 4.96。水解圈大小依次为 $N5 > N3 > N1 > N2 > N4$ ，表明这些菌株均有一定的产纤维素酶的能力。

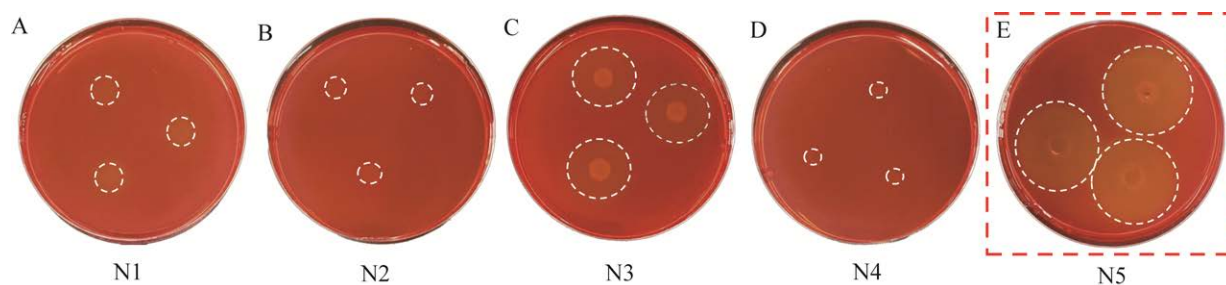


图 1 所筛选菌株在 CMC 培养基上的水解效果

Figure 1 Hydrolysis effect of selected strains on CMC culture medium.

2.1.2 滤纸崩解试验结果

对 CMC-平板筛到的菌株进行进一步的复筛, 根据滤纸最终降解的程度来筛选优势菌株。试验结果显示, 培养 7 d 后, 与空白对照比较发现, 3 株纤维素降解菌具有崩解滤纸的能力, 其中菌株 N5 的崩解效果十分显著, 而且仅 3 d 就可以将滤纸条完全崩解。菌株 N3 可将滤纸条崩解为近似糊状, 而菌株 N1 效果稍差, 可将滤纸完全崩解为不定形细碎状, 因此选择菌株 N5 用于接下来的试验(图 2)。

2.2 菌种鉴定结果

菌株 N5 在 LB 固体培养基上的菌落呈不规

则圆形, 淡黄色不透明, 边缘不规则且表面较粗糙有褶皱, 中间隆起(图 3A)。在透射电镜下对培养 24 h 的单个菌体呈椭圆形杆状, 菌体长度为 1.0–2.4 μm , 宽度为 0.6–0.8 μm , 单端极生双鞭毛(图 3B); 培养 72 h 后的菌体产生芽孢, 芽孢椭圆形, 中生到端生(图 3C)。在光学显微镜下放大 100 倍观察发现, 菌体细胞呈杆状, 两端钝圆, 单个、成对或成串出现, 内生芽孢, 菌株 N5 革兰氏染色呈阳性(图 3D)。16S rRNA 基因系统发育树如图 4 所示, 结果表明菌株 N5 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)为同一类群, 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)

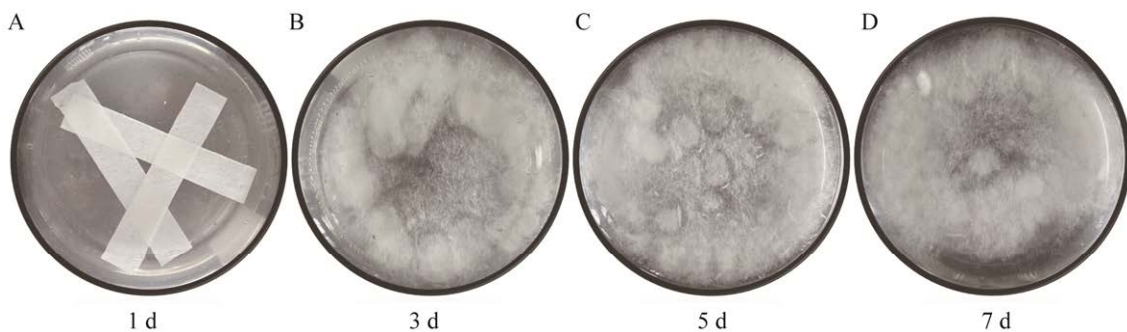


图 2 N5 滤纸崩解过程

Figure 2 N5 filter paper disintegration process.

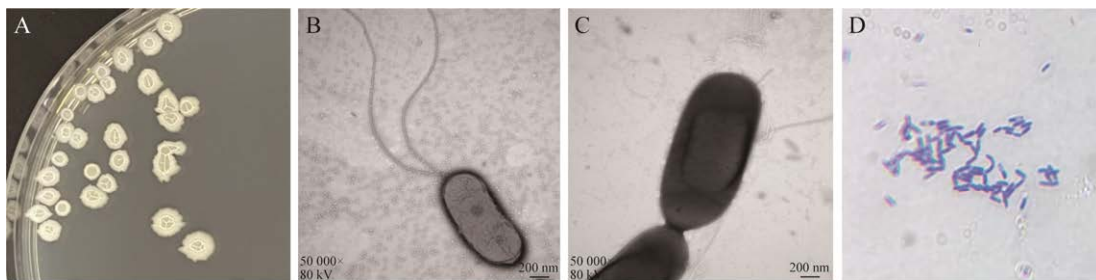


图 3 菌株 N5 菌落形态特征观察

A: 菌株菌落形态特征图. B: 培养 24 h 菌株在透射电镜下的个体形态图(50 000 \times). C: 培养 72 h 菌株在透射电镜下的形态个体图(50 000 \times). D: 光学显微镜下菌株个体形态(100 \times)

Figure 3 Observation of colony morphological characteristics of strain N5. A: Colony morphological characteristics of strain N5. B: Individual morphological characteristics of strain N5 cultured for 24 h under transmission electron microscopy (50 000 \times). C: Individual map of strain morphology cultured for 72 h under transmission electron microscopy (50 000 \times). D: Individual morphology of strain under optical microscope (100 \times).

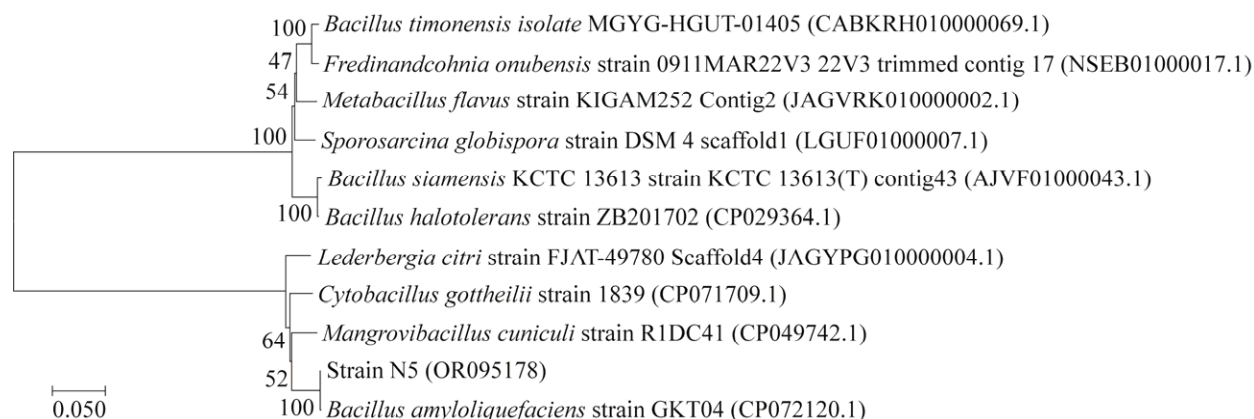


图4 菌株 N5 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 扩号中的序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号；分支上的数字表示置信度；标尺代表遗传系数

Figure 4 Phylogenetic tree construction of strain N5 based on 16S rRNA gene sequence. The number in the extension represents the accession number of the bacterium in the GenBank database; The number on the branch represents the confidence level; The scale represents the genetic coefficient.

strain GKT04 (CP072120.1)亲缘关系最接近(序列相似性为 99.93%),结合透射电镜以及菌落形态将 N5 确定为解淀粉芽孢杆菌。

2.3 解淀粉芽孢杆菌 N5 产酶条件优化结果

2.3.1 不同发酵时间对产酶的影响

菌株 N5 在不同发酵时间的产酶能力如图 5 所示,随着发酵时间从 12 h 延长至 72 h,菌株 N5 的 CMC 酶活性持续升高,在 72 h 酶活达到

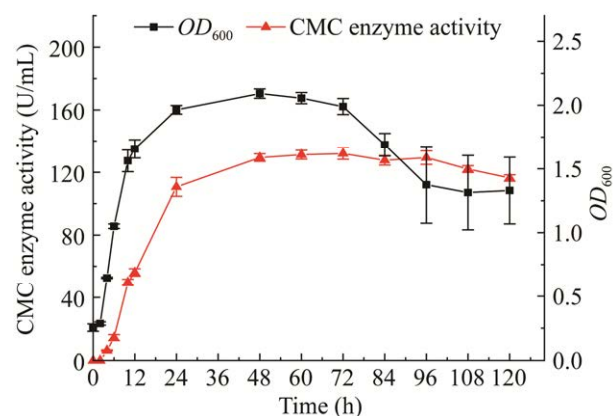


图5 解淀粉芽孢杆菌 N5 产酶的时间进程

Figure 5 Temporal course of enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* N5.

最大值 132 U/mL;但在 72 h 后,菌株 N5 的 CMC 酶活并未随发酵时间的延长而进一步提高。结果表明,菌株 N5 的最佳产酶时长为 72 h。

2.3.2 不同发酵温度对产酶的影响

微生物酶的生成与培养温度密切相关,选取最佳发酵时间(72 h)进行不同发酵温度试验。结果如图 6A 所示,发酵温度的影响较为明显,温度不仅影响微生物的生长繁殖,同时也会对酶活性造成一定影响。随着温度的升高,菌株 N5 生长受到严重抑制,当发酵温度为 50 °C 时,菌株生长的 OD₆₀₀ 为 0.43, CMC 酶活为 108.14 U/mL;在发酵温度为 35 °C 时,CMC 酶活达到最大,为 154.33 U/mL。结果表明菌株 N5 产酶的最佳温度为 35 °C。

2.3.3 不同接种量对产酶的影响

接种量不仅能够影响菌株生长周期,而且关系着实际应用的经济成本。根据上述结果使用最佳发酵时间(72 h)和发酵温度(35 °C)进行不同接种量试验。如图 6B 所示,接种量对菌株产 CMC 酶活性的影响较小,随着接种量的增加,CMC 酶活性有一定程度降低。这表明较高

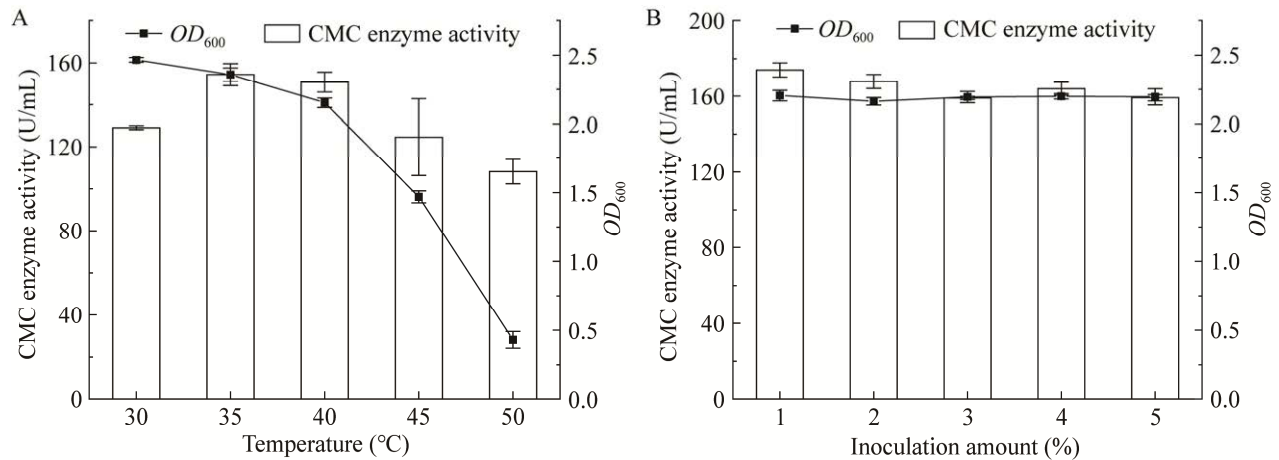


图 6 培养温度(A)和接种量(B)对产酶的影响

Figure 6 Effect of cultivation temperature (A) and inoculation amount (B) on enzyme production.

的接种量可能导致发酵初期菌株之间对营养物质产生竞争^[35], 从而导致菌株 N5 的 CMC 酶活性并未提高, 结果表明菌株 N5 发酵最佳接种量为 1%, 此时 CMC 酶活为 169.59 U/mL。

2.3.4 不同 pH 对发酵产酶的影响

pH 会对微生物的生长繁殖和产酶活性产生影响。在不同 pH、发酵时间为 72 h、温度为 35 °C、接种量为 1% 的条件下进行发酵试验, 以考察 pH 对解淀粉芽孢杆菌 N5 产酶的影响。结果如图 7A 所示, 在酸性较强(pH 4.0)条件下, 菌株 N5 的生长情况和 CMC 酶活较差, 在培养至 72 h 时 OD_{600} 值和 CMC 酶活分别为 0.46 和 43.31 U/mL; 而在 pH 值为 9.0 时, 菌株的生长情况最好, 在培养至 72 h 时 OD_{600} 为 2.20; 在 pH 5.0–9.0 范围内, pH 的变化对 CMC 酶活影响较小; 在 pH 5.0 条件下, 菌株 N5 产 CMC 酶活性最高, 达到 176.74 U/mL。结果表明, 菌株 N5 在 pH 5.0–9.0 范围内具有较高的 CMC 酶活, 最佳产酶 pH 值为 5.0。

2.3.5 不同盐度对产酶的影响

纤维素降解环境复杂, 探究不同盐度对菌株产 CMC 酶活的影响, 在最佳发酵时间(72 h)、

温度(35 °C)、接种量(1%)和 pH 值(5.0)条件下进行不同盐度产酶试验, 结果如图 7B 所示, 可以看出, 随着培养基中盐度的升高, 菌株生长并未受到严重抑制, 但盐度对菌株产 CMC 酶活造成一定的影响, 较高浓度的盐分会增加渗透压, 降低微生物代谢酶的活性。当盐度从 1% 提高至 5% 时, 酶活性从 186.21 U/mL 降低至 132.11 U/mL, 结果表明, 菌株 N5 的最佳产酶条件为 1% 的盐度且具有较好的盐度耐受性, 在实际应用中能够适应如厨余垃圾堆肥等盐度较高的纤维素降解环境。

2.3.6 正交试验结果

通过对菌株 N5 发酵产酶单因素分析, 可知主要影响因素为发酵时间、发酵 pH 以及发酵温度, 即培养基最佳初始 pH 值为 5.0、培养温度为 35 °C、培养时间为 72 h。因此, 根据单因素试验结果选择 A 发酵时间(48、72 和 96 h)、B 初始 pH 值(4.0、5.0 和 6.0)和 C 发酵温度(30、35 和 40 °C)设计三因素三水平正交试验。测定各组合得到的粗酶液 CMC 酶活, 结果如表 1 所示。在菌株发酵产 CMC 酶过程中, 初始培养条件的影响顺序为发酵初始 pH (B)>发酵时间

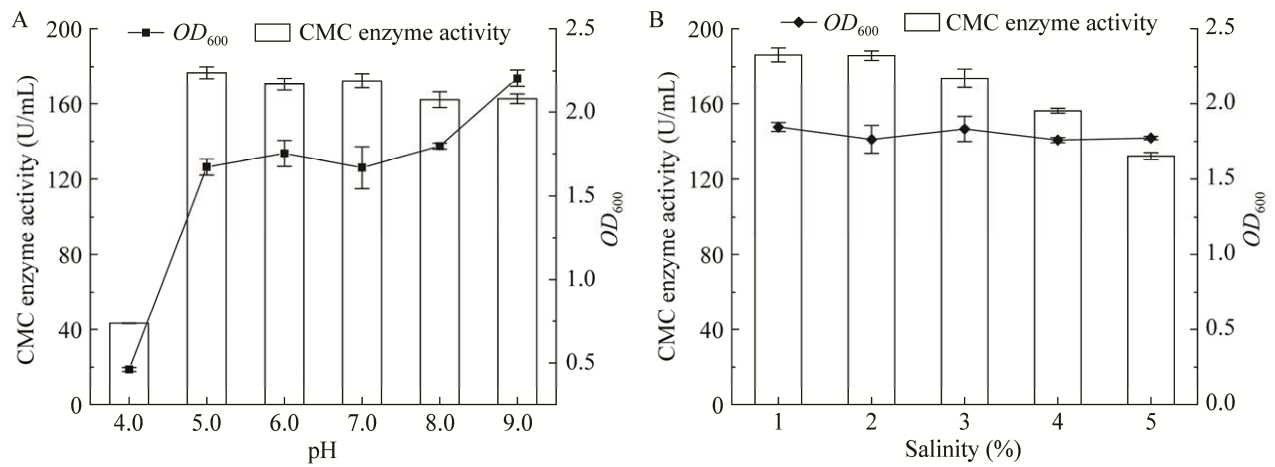


图7 pH (A)和盐度(B)对产酶的影响

Figure 7 The effect of pH (A) and salinity (B) on enzyme production.

表1 菌株 N5 产酶优化正交试验表

Table 1 Orthogonal experimental table of strain N5 enzyme production conditions optimization

试验号 Test No.	因素 Factor			CMC 酶活 CMC enzyme activity (U/mL)
	A: Time	B: pH	C: Temperature	
1	1	1	1	54.23
2	2	2	2	173.36
3	3	3	3	181.77
4	1	2	3	175.97
5	2	3	1	150.17
6	3	1	2	93.94
7	1	3	2	134.23
8	2	1	3	53.65
9	3	2	1	152.78
K_1	364.43	201.83	357.19	
K_2	377.19	502.12	401.54	
K_3	428.49	466.17	411.39	
K_1	121.48	67.28	119.06	
K_2	125.73	167.37	133.85	
K_3	142.83	155.39	137.13	
极差 Range	21.35	100.10	18.07	
影响主次 Primary and secondary impact	$B>A>C$			
最优水平 Optimal level	A_3	B_2	C_3	
最优组合 Optimal combination	$A_3B_2C_3$			

(A)>发酵温度(C), 根据试验结果可知(表 1), 菌株 N5 产 CMC 酶的最佳条件组合为发酵初始 pH 值为 5.0、发酵时间 96 h、发酵温度 40 °C (A_3 、 B_2 和 C_3)。在此条件下进行 3 次验证试验, 得

到实际 CMC 酶活为 189.27 U/mL。正交试验结果与单因素结果存在一定差异, 主要是因为延长发酵时间对 CMC 酶活性有一定提高; 同时较高的温度主要影响了菌株 N5 的生长, 但是对

菌株 CMC 酶的活性有一定促进作用。

2.3.7 秸秆降解试验结果

将菌株 N5 接种至水稻秸秆培养基中, 以不加菌为对照, 培养 7 d 后称量水稻秸秆剩余干重并计算减重率, 结果如图 8 所示。在未添加菌株 N5 的试验中, 7 d 后水稻秸秆减重率为 4.05%; 在添加降解菌 N5 之后减重率达到了 23.40%, 这表明添加降解菌 N5 后能够有效提高水稻秸秆降解率, 达到对水稻秸秆的高效处理。

2.3.8 水稻秸秆扫描电镜分析

采用扫描电镜分别对未经处理(图 9A、9B)和经过菌株 N5 降解处理(图 9C、9D)的水稻秸秆表面结构进行扫描。图 9B 中所示秸秆电镜中

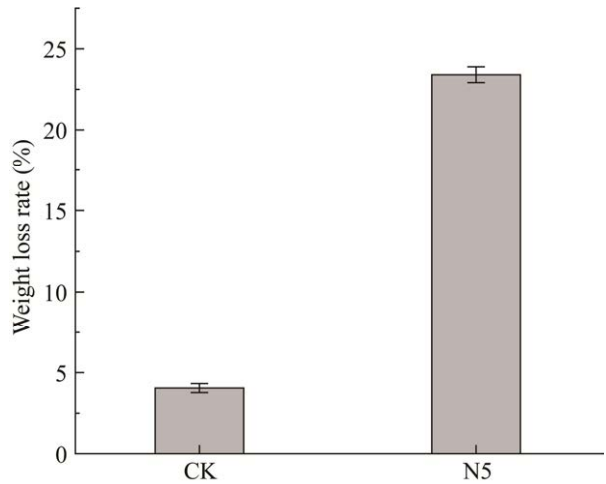


图 8 菌株 N5 对秸秆的降解效果

Figure 8 Degradation effect of strain N5 on straw.



图 9 菌株 N5 对水稻秸秆降解的扫描电镜 A: 500 倍下未经处理的秸秆. B: 4 000 倍下未经处理的秸秆. C: 500 倍下经过 N5 处理的秸秆. D: 4 000 倍下经过 N5 处理的秸秆

Figure 9 Scanning electron microscopy of the degradation of rice straw by strain N5. A: Untreated straw at 500×. B: Untreated straw at 4 000×. C: Straw treated with N5 at 500×. D: Straw treated with N5 at 4 000×.

突出的点为水稻秸秆结构中的硅结构,硅结构表面存在一层蜡质层,硅结构与蜡质层包裹着水稻秸秆,是秸秆难以降解的主要原因。与菌株 N5 处理的秸秆相比,未经处理的秸秆形态结构规整致密,表面较为光滑且具有良好的完整性,这是由于秸秆表面硅结构和蜡质层未被有效破坏。经过菌株 N5 处理 7 d 后,可看到秸秆表面产生较大不均匀的裂纹和孔隙,这可能是由于在菌株 N5 的作用下秸秆表面蜡质层脱落,暴露出硅结构和纤维素,使微生物可以更好地利用底物,达到对秸秆的降解作用^[36]。

3 讨论

研究者从自然环境中筛选研究纤维素降解微生物已有一定的成功经验,其中解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶的研究已有部分成果。国立东等^[37]研究所获得的解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶活性在最适条件(温度 37 °C, pH 7.0, 接种量 6%)下为 21.14 U/mL;黄颖婕等^[38]从牛粪秸秆堆肥中分离获得的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloiquefaciens*) X7, 37 °C 培养 72 h, 纤维素酶活为 40.02 U/mL。本研究筛选获得的一株解淀粉芽孢杆菌 N5 最适产纤维素酶的条件为温度 40 °C, pH 5.0, 发酵时间 96 h, 酶活最高达到 189.27 U/mL。相较于其他学者研究获得的解淀粉芽孢杆菌,本研究获得的菌株 N5 具有更好的产纤维素酶活性以及较为广泛的环境耐受性。

在进行微生物产纤维素酶活的优化条件研究中,温度是影响酶活性的重要因素,当温度低于酶的最适温度时会降低酶的活性,而当温度高于酶的最适温度时也会导致酶活性下降甚至失活。有研究报道从牛粪中筛选获得了一株低温降解纤维素的假单胞菌 YSX-3, 该菌株最佳产酶条件为培养温度为 9 °C, CMC 酶活为 130.21 U/mL^[39]。本研究获得的菌株 N5 产 CMC

酶活性在温度 35 °C 时最高,为 154.33 U/mL;并且在 50 °C 条件下,菌株 N5 生长受抑制,CMC 酶活仍达 108.14 U/mL。这可能是由于在一定温度范围内,温度升高对酶促反应的进行有一定的促进作用^[40]。前人的一项研究显示纤维素酶的活性随温度升高而增强,但在高于 45 °C 以后酶活性随温度升高而减弱^[41]。上述结果表明,菌株 N5 产 CMC 酶活具有较好的温度耐受性,能够用于中高温环境下(如堆肥)纤维素的处理。

pH 的变化可能会影响酶分子中的氨基酸侧链的解离,导致酶活性降低甚至失活,同时 pH 也会影响菌株的正常生理活动,从而对酶的分泌造成影响^[42-44]。李美霖等^[45]从枯树叶覆盖土壤中分离的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) SKX-1 菌株最适产酶 pH 值为 7.0,酶活为 173.30 U/mL。李蘅香等^[46]从沼气站秸秆堆肥中分离筛选得到一株解淀粉芽孢杆菌,在 pH 6.0 条件下发酵 60 h,酶活为 161.34 U/mL。然而本研究的菌株 N5 最适产酶 pH 值为 5.0, CMC 酶活力为 176.74 U/mL;在 pH 5.0-9.0 的范围内菌株生长良好($OD_{600}>1.67$),且有较高的 CMC 酶活(>43.31 U/mL)。本研究的结果显示,解淀粉芽孢杆菌 N5 在偏酸和偏碱性条件下均能够产纤维素酶,与现有报道的纤维素降解细菌相比有一定优势。

接种量关系到发酵初期细菌的数量、繁殖速度以及营养物质的利用^[47]。菌株 N5 在不同接种量的条件下,产酶效果并无明显变化。接种量为 1% 时,菌株 N5 的 CMC 酶活性达到最大。通常酶活在发酵初期随着发酵时间的增加而提升,但随着发酵时间的延长,微生物代谢物的积累可能导致酶活降低^[48]。菌株 N5 达到最佳效果的发酵时间为 72 h。纤维素降解菌的应用环境具有多样性和复杂性,能够耐受多种环境因素是菌株能否在实际应用中有所作为的

关键。菌株 N5 的生长随着盐度的增加受到一定的抑制, 盐度的增加并未严重影响菌株的 CMC 酶活, 盐度为 1% 时 CMC 酶活最高, 为 186.21 U/mL, 当盐度提高到 5% 时 CMC 酶活仍达到 132.11 U/mL。

秸秆的微生物降解一般是由于具有木质纤维素降解作用的微生物分泌木质素酶和纤维素酶等, 在酶的作用下可以将秸秆中的木质素和纤维素分解为小分子化合物, 最后氧化分解为 CO₂ 和水, 达到对秸秆的降解作用^[49]。李静等^[50]构建了高效降解纤维素的复合菌系组合 C, 作用 20 d 对玉米秸秆的降解率为 31.8%。孙玲等^[51]从腐烂秸秆及附近土壤中筛选获得了高效秸秆纤维素降解细菌, 在 10 d 内对玉米秸秆的降解率为 24.14%。对比可知, 本研究获得的菌株 N5 对水稻秸秆有较好的降解效果, 菌株 N5 能够在 7 d 内使水稻秸秆减重率达到 19.35%; 扫描电镜观察结果显示, 水稻秸秆在接种菌株 N5 发酵 7 d 后, 菌株 N5 能够有效破坏水稻秸秆表面蜡质层, 进一步破坏秸秆表面的硅结构, 进而分解秸秆中的木质素和纤维素, 达到对秸秆的有效降解作用。

4 结论

本研究以牛粪堆肥为对象进行了纤维素降解菌的筛选, 获得了一株解淀粉芽孢杆菌 N5, 该菌株有着较好的 pH 适应范围以及盐度耐受性, 菌株 N5 可以有效降解水稻秸秆, 在秸秆堆肥、畜禽粪便堆肥和厨余垃圾堆肥的实际工业应用中有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] 佟硕秋, 王婧, 林宗梅, 陶怡, 吴拥军. 纤维素降解菌研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(3): 67, 91.
TONG SQ, WANG Q, LIN ZM, TAO Y, WU YJ. Research progress of cellulose degrading bacteria[J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(3): 67, 91 (in Chinese).
- [2] WU D, WEI ZM, MOHAMED TA, ZHENG GR, QU FT, WANG F, ZHAO Y, SONG CH. Lignocellulose biomass bioconversion during composting: mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives[J]. Chemosphere, 2022, 286(Pt 1): 131635.
- [3] 安琪, 员瑗, 戴玉成, 韩美玲. 木质纤维素降解真菌菌株筛选及对玉米秸秆的生物降解研究[J]. 菌物学报, 2023, 42(3): 782-792.
AN Q, YUN Y, DAI YC, HAN ML. Screening of lignocellulose degrading fungal strains and their biodegradation of corn straw[J]. Mycosystema, 2023, 42(3): 782-792 (in Chinese).
- [4] 万文结, 刘月, 薛芷筠, 张泽文, 程国军, 李晓华, 何冬兰. 纤维素降解菌 *Arthrobacter oryzae* HW-17 的纤维素降解特性及纤维素酶学性质[J]. 环境科学学报, 2017, 37(10): 3679-3686.
WAN WJ, LIU Y, XUE ZJ, ZHANG ZW, CHENG GJ, LI XH, HE DL. Cellulose degradation characteristics and cellulase properties of cellulose-decomposing bacterium *Arthrobacter oryzae* HW-17[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(10): 3679-3686 (in Chinese).
- [5] 傅科鹤, 范莉莉, 陈慧颖, 黄颖, 张同林. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(3): 214-218.
FU KH, FAN LL, CHEN HY, HUANG Y, ZHANG TL. Screening of cellulase-producing strains and optimization of enzymatic production conditions[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(3): 214-218 (in Chinese).
- [6] KULCU R, YALDIZ O. Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes[J]. Bioresource Technology, 2004, 93(1): 49-57.
- [7] 张楠, 刘东阳, 杨兴明, 徐阳春, 沈其荣, 黄启为. 分解纤维素的高温真菌筛选及其对烟杆的降解效果[J]. 环境科学学报, 2010, 30(3): 549-555.
ZHANG N, LIU DY, YANG XM, XU YC, SHEN QR, HUANG QW. Screening of thermophilic cellulose-decomposing fungi and their efficiency in decomposing tobacco stems[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(3): 549-555 (in Chinese).
- [8] BRODEUR G, YAU E, BADAL K, COLLIER J, RAMACHANDRAN KB, RAMAKRISHNAN S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review[J]. Enzyme Research,

- 2011, 2011: 1-17.
- [9] HOUFANI AA, ANDERS N, SPIESS AC, BALDRIAN P, BENALLAOUA S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 134: 105481.
- [10] 纪冠亚. 不同尺度机械粉碎对秸秆物性及酶解效率的影响和机理研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018.
- JI GY. Multi-scales mechanical fragmentation of crop residues: impact on properties and enzymatic hydrolysis and related mechanism[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [11] 李得钊, 胡芳, 许秀葵, 王煜, 杨松松, 李凯停. 超声波强化木质纤维素预处理的研究进展[J]. *纤维素科学与技术*, 2020, 28(1): 69-77.
- LI DZ, HU F, XU XK, WANG Y, YANG SS, LI KT. Progress of ultrasound intensification for lignocellulose pretreatment[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2020, 28(1): 69-77 (in Chinese).
- [12] 史旭洋, 钱程, 刘艳, 刘心同, 尚鑫, 刘硕, 刘禹廷, 于蕴波, 张军, 任晓冬. 不同方法预处理的玉米秸秆结构与酶解分析[J]. *分析化学*, 2018, 46(9): 1501-1506.
- SHI XY, QIAN C, LIU Y, LIU XT, SHANG X, LIU S, LIU YT, YU YB, ZHANG J, REN XD. Structure and enzymatic hydrolysis analysis of corn stover pretreated with different pretreatment methods[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 46(9): 1501-1506 (in Chinese).
- [13] DAR M A, SYED R, PAWAR K D, Dhole N P, XIE R, PANDIT R S, SUN Evaluation and characterization of the cellulolytic bacterium, *Bacillus pumilus* SL8 isolated from the gut of oriental leafworm *Spodoptera litura*: an assessment of its potential value for lignocellulose bioconversion[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2022, 27: 102459.
- [14] 宫秀杰, 钱春荣, 于洋, 郝玉波, 李梁, 姜宇博, 吕国一. 近年纤维素降解菌株筛选研究进展[J]. *纤维素科学与技术*, 2021, 29(2): 68-77.
- GONG XJ, QIAN CR, YU Y, HAO YB, LI L, JIANG YB, LÜ GY. Progress on screening of cellulose degrading strains in recent years[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2021, 29(2): 68-77 (in Chinese).
- [15] 史雅静, 徐明, 王振宇, 庞月, 张改琴, 贾媛媛, 李秀超, 方永俊, 韩雪松, 赵秋伶. 蚯蚓对菇渣中纤维素和木质素生物转化的研究[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(5): 1779-1785.
- SHI YJ, XU M, WANG ZY, PANG Y, ZHANG GQ, JIA YY, LI XC, FANG YJ, HAN XS, ZHAO QL. Biotransformation of lignocellulose in mushroom residue by earthworm[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(5): 1779-1785 (in Chinese).
- [16] 武凤霞, 孙悦, 肖强, 张淑彬, 李钰飞, 刘建斌. 高温纤维素降解菌群 PN-8 对小麦秸秆的降解能力及影响因素研究[J]. *河南农业科学*, 2022, 51(4): 77-86.
- WU FX, SUN Y, XIAO Q, ZHANG SB, LI YF, LIU JB. Degradation ability and influencing factors of cellulose-degradation microbial community PN-8 on wheat straw[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2022, 51(4): 77-86 (in Chinese).
- [17] FU ZH, LIU J, ZHONG LB, HUANG H, ZHU P, WANG CX, BAI XP. Screening of cellulose-degrading yeast and evaluation of its potential for degradation of coconut oil cake[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 996930.
- [18] 李静, 李明源, 王继莲, 张甜, 周茜. 纤维素的微生物降解研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 396-403.
- LI J, LI MY, WANG JL, ZHANG T, ZHOU Q. Research progress on microbial degradation of cellulose[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(9): 396-403 (in Chinese).
- [19] 张耿峻, 韩业钜, 陈细妹, 王小琴, 约比, 黄佳钦, 叶志超, 李清荷. 产纤维素酶嗜热地芽孢杆菌 HTA426 的筛选鉴定、酶学性质分析及其应用[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(4): 1444-1453.
- ZHANG GL, HAN YJ, CHEN XM, WANG XQ, YUE B, HUANG JQ, YE ZC, LI QH. Isolation, identification, characterization and application of cellulase-producing *Geobacillus kaustophilus* HTA426[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(4): 1444-1453 (in Chinese).
- [20] ŠUCHOVÁ K, FEHÉR C, RAVN JL, BEDŮ S, BIELY P, GEIJER C. Cellulose- and xylan-degrading yeasts: enzymes, applications and biotechnological potential[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 59: 107981.
- [21] 邹潇潇, 易子霆, 孙前光, 鲍时翔, 黄惠琴. 纤维素降解真菌 DF14101 的筛选与鉴定[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(6): 68-72.
- ZOU XX, YI ZT, SUN QG, BAO SX, HUANG HQ. Screening and identification of a cellulose-degrading fungus DF14101[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(6): 68-72 (in Chinese).
- [22] 孟建宇, 杨帆, 冀锦华, 郭慧琴, 陶羽. 大兴安岭森

- 林土壤中纤维素降解真菌的分离及产酶条件优化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(17): 108-111, 120, 171.
- MENG JY, YANG F, JI JH, GUO HQ, TAO Y. Isolation of cellulose-degrading fungi from soils in Da Hinggan forest and optimization of enzyme production conditions[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(17): 108-111, 120, 171 (in Chinese).
- [23] 江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 郑海平, 梅新兰, 韦中, 徐阳春, 沈其荣. 高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2465-2472.
- JIANG GF, BAO YZ, YANG TJ, ZHENG HP, MEI XL, WEI Z, XU YC, SHEN QR. Screening of thermophilic cellulolytic bacteria and investigation of cellulase thermostability[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(10): 2465-2472 (in Chinese).
- [24] 吴文韬, 鞠美庭, 刘金鹏, 刘博群, 佟树敏. 一株纤维素降解菌的分离、鉴定及对玉米秸秆的降解特性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 712-719.
- WU WT, JU MT, LIU JP, LIU BQ, TONG SM. Isolation and identification corn stalk degradation characteristics of cellulose-degrading bacterial strain NH11[J]. Microbiology China, 2013, 40(4): 712-719 (in Chinese).
- [25] 白长胜, 刘秋瑾, 尹琚伊, 王欢, 田秋丰, 邱景会, 汤继龙, 史同瑞. 产木质纤维素降解酶真菌的筛选及产酶特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1098-1110.
- BAI CS, LIU QJ, YIN JY, WANG H, TIAN QF, QIU JH, TANG JL, SHI TR. Screening and enzymatic characterization of the fungal strains producing lignocellulose-degrading enzymes[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1098-1110 (in Chinese).
- [26] 甄静, 王继雯, 谢宝恩, 李冠杰, 刘莹莹, 周伏忠, 陈国参. 一株纤维素降解真菌的筛选、鉴定及酶学性质分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 709-714.
- ZHEN J, WANG JW, XIE BE, LI GJ, LIU YY, ZHOU FZ, CHEN GC. Isolation, identification of a cellulase-producing strain and characterization of its cellulase-producing capability[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 709-714 (in Chinese).
- [27] LI F, XIE Y, GAO X, SHAN M, SUN C, NIU YD, SHAN A. Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2020, 48: 29-35.
- [28] 李林超, 张超, 董庆, 郭成, 周波, 高峥. 堆肥过程中纤维素降解菌的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9): 165-171.
- LI LC, ZHANG C, DONG Q, GUO C, ZHOU B, GAO Z. Isolation and identification of cellulose degrading microorganisms in composting process[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(9): 165-171 (in Chinese).
- [29] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [30] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [31] 李林超. 堆肥中具有纤维素降解功能的菌株筛选及其应用效果评价[D]. 山东: 山东农业大学硕士学位论文, 2020.
- LI LC. Screening and evaluation of strains with cellulose degradation function in compost[D]. Shandong: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [32] MEI JF, SHEN XB, GANG LP, XU HJ, WU FF, SHENG LQ. A novel lignin degradation bacteria—*Bacillus amyloliquefaciens* SL-7 used to degrade straw lignin efficiently[J]. Bioresource Technology, 2020, 310: 123445.
- [33] 赵萍, 夏文旭, 郭健, 雷晨瑶, 王聪, 肖宇轩, 丁毛毛, 王雅. 一株玉米秸秆纤维素分解菌株的分离鉴定及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 991-997.
- ZHAO P, XIA WX, GUO J, LEI CY, WANG C, XIAO YX, DING MM, WANG Y. Isolation and identification of cellulose decomposing strain of maize stover and enzymatic properties[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 991-997 (in Chinese).
- [34] 李正风, 朱杰, 唐丽, 董高峰, 吴涛, 廖头根, 张伟, 夏玉珍, 王奕权, 李岩. 烟草秸秆中产纤维素酶细菌筛选、鉴定及酶活测定[J]. 西南农业学报, 2020, 33(3): 645-650.
- LI ZF, ZHU J, TANG L, DONG GF, WU T, LIAO TG, ZHANG W, XIA YZ, WANG YQ. Isolation, identification and cellulase enzyme activity determination of cellulase-producing bacteria from tobacco straw[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(3): 645-650 (in Chinese).
- [35] NAVEED M, TIANYING H, WANG F, et al., Isolation of lysozyme producing *Bacillus subtilis* strains,

- identification of the new strain *Bacillus subtilis* BSN314 with the highest enzyme production capacity and optimization of culture conditions for maximum lysozyme production[J]. *Current Research in Biotechnology*, 2022, 4: 290-301.
- [36] 王金昌, 靳亮, 王慧宾, 张森旺, 占智高, 况文东, 关丽梅, 陈俊晖, 刘兰, 黄晓萍. *Penicillium oxalicum* T1 降解天然水稻秸秆历程的研究[J]. *江西科学*, 2021, 39(4): 582-584, 613.
WANG JC, JIN L, WANG HB, ZHANG SW, ZHAN ZG, KUANG WD, GUAN LM, CHEN JH, LIU L, HUANG XP. Degradation of natural rice straw by *Penicillium oxalicum* T1[J]. *Jiangxi Science*, 2021, 39(4): 582-584, 613 (in Chinese).
- [37] 国立东, 王永春, 于纯森, 刘维丽, 张妍, 刘晓艳. 一株高产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌分离及产酶条件优化[J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(7): 53-60.
GUO LD, WANG YC, YU CM, LIU WL, ZHANG Y, LIU XY. Isolation of a high yield cellulase *Bacillus amyloliquefaciens* strain and its enzyme production optimization[J]. *China Food Additives*, 2020, 31(7): 53-60 (in Chinese).
- [38] 黄颖婕, 周尚峰, 刘震夷, 岳勇志, 李祖任, 邬腊梅, 王立峰. 牛粪堆肥纤维素高效降解菌的筛选和应用[J]. *湖南农业科学*, 2018(2): 50-53.
HUANG YJ, ZHOU SF, LIU ZY, YUE YZ, LI ZR, WU LM, WANG LF. The screening and application of efficiently cellulose degradation bacteria in cow dung compost[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2018(2): 50-53 (in Chinese).
- [39] 单建荣, 全鑫, 朱用哲, 邢宇, 张旭, 王宏燕, 范金霞. 一株低温纤维素降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. *生态学杂志*, 2021, 40(4): 1128-1136.
SHAN JR, QUAN X, ZHU YZ, XING Y, ZHANG X, WANG HY, FAN JX. Screening of a low-temperature cellulose degrading bacterium and optimization of cellulase production conditions[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, 40(4): 1128-1136 (in Chinese).
- [40] 张智, 温冬灼, 冯丽荣, 章圣龙, 杨可心, 张晓彤. 耐热解淀粉芽孢杆菌 BA-DES4 产纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(11): 136-143.
ZHANG Z, WEN DZ, FENG LR, ZHANG SL, YANG KX, ZHANG XT. Separation, purification and enzymatic property of cellulase produced by thermostable *Bacillus amyloliquefaciens* BA-DES4[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(11): 136-143 (in Chinese).
- [41] 倪小英, 张永普, 贾守菊, 万桂平. pH 和温度对小英蛭淀粉酶和纤维素酶活性的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 2009(1): 151-154.
NI XY, ZHANG YP, JIA SJ, WAN GP. Effects of temperature and pH on the digestive amylase and cellulose activities of *Siliqua minima*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2009(1): 151-154 (in Chinese).
- [42] SHARMA B, DANGI AK, SHUKLA P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 210: 10-22.
- [43] AWASTHI MK, WONG JWC, KUMAR S, AWASTHI SK, WANG Q, WANG MJ, REN XN, ZHAO JC, CHEN HY, ZHANG ZQ. Biodegradation of food waste using microbial cultures producing thermostable α -amylase and cellulase under different pH and temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 248: 160-170.
- [44] SADHU S, GHOSH PK, ADITYA G, MAITI TK. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung[J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2014, 26(4): 323-332.
- [45] 李美霖, 郭东会, 冯惠萍, 王淑华, 沈亚北, 王玉琪. 产纤维素酶菌株的筛选与鉴定及发酵条件优化研究[J]. *现代农业科技*, 2018(19): 234-236, 239.
LI ML, GUO DH, FENG HP, WANG SH, SHEN YB, WANG YQ. Study on screening, identification of producing cellulase strains and its optimization of fermentation conditions[J]. *Modern Agricultural Science and Technology* 2018(19): 234-236, 239 (in Chinese).
- [46] 李薷香, 王凤学, 钟超, 王春明, 邵婷婷, 贾红华, 韦萍. 1 株解淀粉芽孢杆菌 CEL-1 发酵产纤维素酶的条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(12): 379-382.
LI HX, WANG FX, ZHONG C, WANG CM, SHAO TT, JIA HH, WEI P. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus amyloliquefaciens* CEL-1[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(12): 379-382 (in Chinese).
- [47] 冯海玮, 周培, 毛亮, 时唯伟, 支月娥. 一株高效纤维素降解菌的筛选及其产酶条件优化[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2013, 31(2): 24-29.
FENG HW, ZHOU P, MAO L, SHI WW, ZHI Y.E Screening of microbes with high quality of cellulose-decomposing enzyme and optimization of the conditions for cellulase production[J]. *Journal of*

- Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science Edition), 2013, 31(2): 24-29 (in Chinese).
- [48] SHU GW, YANG H, CHEN H, ZHANG QH, TIAN Y. Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ACE inhibitory activity in fermented milk by *L. plantarum* LP69[J]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2015, 14(2): 107-116.
- [49] 蔡艳玲, 何美丹. 水稻秸秆降解研究进展[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(2): 120-124, 132.
CAI YL, HE MD. Research progress of rice straws degradation[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(2): 120-124, 132 (in Chinese).
- [50] 李静, 张瀚能, 赵翀, 张金羽, 张琪, 张靖莹, 刘茂柯, 陈强, 赵珂. 高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及秸秆降解效果分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(4): 689-696.
- LI J, ZHANG HN, ZHAO C, ZHANG JY, ZHANG Q, ZHANG JY, LIU MK, CHEN Q, ZHAO K. Isolation and screening of cellulose decomposing microbe and the straw decomposing effect of complex microbial system[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(4): 689-696 (in Chinese).
- [51] 孙玲, 吴景贵, 李建明, 范围, 王彩云, 姚颜莹. 纤维素降解细菌对玉米秸秆的降解效果[J]. *吉林农业大学学报*, 2019, 41(4): 402-407.
SUN L, WU JG, LI JM, FAN W, WANG CY, YAO YY. Effects of cellulose-degrading bacteria on degradation of corn stalk[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2019, 41(4): 402-407 (in Chinese).