

木质纤维素分解复合菌系 WSD-5 组成菌株的分离及其产酶特性

王小娟 袁旭峰 王慧 李培培 王小芬 崔宗均*

(中国农业大学 农学与生物技术学院 生物质工程中心 北京 100193)

摘要: 复合菌系 WSD-5 具有高效的分解能力和产酶能力, 以探明 WSD-5 的协同分解机理和优化高效组合为目的, 通过纯培养分离手段, 获得了 11 株细菌和 3 株真菌。16S rDNA 比对结果表明, 细菌分别为 *Pseudomonas* sp.、*Pseudomonas aeruginosa*、*Achromobacter* sp.、*Stenotrophomonas* sp.、*Bacillus fusiformis*、*Bacillus cereus*、*Brevundimonas* sp.、*Ochrobactrum* sp.、*Cytophaga* sp.、Benzo(a)pyrene-degrading bacter、*Flavobacterium* sp. 的近缘种; 26S rDNA 比对结果表明 3 株真菌分别为 *Pseudallescheria boydii*、*Coprinus cinereus* 的近缘种。分离菌株中有 4 株细菌和 3 株真菌能在 CMC 平板上产生透明圈, 但以糖化力法测定酶活结果只有 3 株真菌具有产酶能力。3 株真菌的酶活动态测定结果, 酶活的高峰均出现在 7-14 d, 并且呈现多峰变化; 3 株真菌的酶活种类表现为, 滤纸酶活性、纤维素内切酶活性和外切酶活性均以菌株 F1 最高, 分别达到了 1.05、5.53 和 0.56 U/mL, β -葡萄糖苷酶活性和木聚糖酶活性以菌株 FC 最高, 分别达到 0.44 和 58.95 U/mL, 其木聚糖酶活为 F1 最高值的 6 倍。

关键词: 木质纤维素分解, 复合菌系, 滤纸酶活性, 纤维素酶活性, 木聚糖酶活性

Isolation and enzymatic characteristics of the microorganisms in lignocellulose-degradation microbial community WSD-5

WANG Xiao-Juan YUAN Xu-Feng WANG Hui LI Pei-Pei WANG Xiao-Fen
CUI Zong-Jun*

(Center of Biomass Engineering, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The microbial community WSD-5 could not only degrade wheat straw but also secrete extracellular enzyme efficiently. In order to further study the synergistic decomposition mechanism of WSD-5 and optimize the microbial combination, 11 bacterial strains and 3 fungal strains were isolated

基金项目: 国家“十一五”支持计划项目(No. 2006BAD07A01, 2008BAD04B01); 国家公益性行业(农业)科技计划(No. 200803033)

* 通讯作者: ✉ acuizj@cau.edu.cn

收稿日期: 2010-12-29; 接受日期: 2011-02-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

from the microbial community WSD-5. The closest relatives of 11 bacterial strains were *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus fusiformis*, *Bacillus cereus*, *Brevundimonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Cytophaga* sp., Benzo(a)pyrene-degrading bacter, *Flavobacterium* sp. by sequencing nearly complete 16S rDNA and the closest relatives of 3 fungal strains were *Pseudallescheria boydii*, *Coprinus cinereus* by sequencing 26S rDNA. Whereas transparent circles were detected on carboxymethylcellulose (CMC) plates with 4 bacterial strains and 3 fungal strains, there were only 3 fungal strains which had the enzymatic productivity by determining the enzyme activity. The results of dynamic trend of enzyme activity showed that the peak heights occurred at 7–14 days. The F1 expressed the highest filter paper activity (1.05 U/mL), the highest cellulose endonuclease activity (5.53 U/mL) and the highest exonuclease activity (0.56 U/mL). The highest β -glucosidase activity (0.44 U/mL) and xylanase activity (58.95 U/mL) were expressed by the FC. The highest xylanase activity of FC was 6 times higher than that of F1.

Keywords: Lignocellulose degradation, Microbial community, Filter paper enzyme activity, Cellulase activity, Xylanase activity

我国可开发的生物质资源总量约为 7 亿 t 左右标准煤, 其中农作物秸秆约占 50%以上^[1]。但这一丰富的资源, 当前的利用率非常低。因此, 它的开发和利用被认为是缓解能源和环境问题最有效途径之一。将纤维素转化为能源, 首先需要解决的是将纤维素多糖转化为单糖, 即纤维素的糖化问题, 这个过程主要依赖于纤维素酶, 即纤维素外切酶(EC 3.2.1.91)、纤维素内切酶(EC 3.2.1.4)和 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)的协同作用^[2]。工业化纤维素酶的获取主要是来源于微生物, 尤其以木霉属(*Trichoderma*)和青霉属(*Penicillium*)等胞外滤纸酶酶活比较高的类群为主^[3-4]。目前, 所应用和研发的微生物多为单一菌株, 存在着纤维素分解能力低、酶活性不稳定、产酶成本高、酶作用 pH 范围狭窄等问题。已有研究表明, 在发酵系统中将微生物共培养可以提高纤维素酶的产量^[5-6]。近年来, 筛选构建复合菌系对木质纤维素进行分解成为研究热点, 并收到了显著的效果。笔者等突破传统的微生物纯培养技术, 在不破坏自然界中微生物之间协同关系的前提下, 将酸碱反应不同的菌群优化组合, 筛选和驯化了高效而稳定的纤维素分解复合菌系 MC1^[7]。该复合菌系的分解能力远远高于纯培养的单个菌株, 可有效分解不同木质纤维素材料^[8-10]。然而, MC1 是 50 °C 培养的高温细菌复合菌系, 虽然明显提高了纤维素降解率, 但其细菌的结构组成致使产生的胞外酶活性

较低^[11]。

随后, 本研究室通过限制性培养筛选出了一组常温小麦秸秆分解复合菌系 WSD-5^[12], 该复合菌系具有较强的分解能力, 相对于初始秸秆, WSD-5 复合菌系使麦秆中的纤维素减少了 94.2%, 半纤维素减少 81.9%, 木质素减少 21.3%。WSD-5 复合菌系同时具有较强的产酶能力, 滤纸酶酶活最高为 1.30 U/mL, 纤维素内切酶酶活达 4.35 U/mL, 外切酶酶活达到了 0.60 U/mL, β 葡萄糖苷酶酶活达到了 0.43 U/mL, 木聚糖酶酶活达到 15.16 U/mL。通过克隆文库技术已知复合菌系 WSD-5 存在的微生物多样性非常丰富, 与复合菌系中的组成微生物相似的微生物有真菌、细菌、纤维素分解菌、非纤维素分解菌。本研究试图通过纯培养分离的手段, 获得其中的主要菌株, 为进一步探明复合菌系的协同分解机理和优化高效组合提供基础。

1 材料与方法

1.1 培养基的制备

(1) 培养 WSD-5 的培养基为 Mandals 培养基, 其成分为(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, KH_2PO_4 2.0, 蛋白胨 2.5, CaCO_3 2.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, MnSO_4 0.001 6, ZnCl_2 0.001 7, CoCl_2 0.001 7, 琼脂 12.0, pH 7.0。小麦秸秆(剪至 9 cm 长)作为唯一的碳源, 小麦秸秆添加量为 1%, 在 100 mL 的三角瓶中, 装入 40 mL 的培养基, 灭菌后待用。

(2) 分离培养基 I (g/L): 成分同于 Mandals 培养基, 用纤维二糖替代小麦秸秆作为唯一的碳源。

(3) 分离培养基 II (g/L)(牛肉膏-蛋白胨培养基): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂粉 12.0, pH 7.2。

(4) 分离培养基 III (g/L)(马丁培养基): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.5, 琼脂粉 12.0。

(5) CMC 平板培养基^[13](g/L): NaNO_3 2.0, K_2HPO_4 1.0, MgSO_4 0.5, KCl 0.5, CMC 2.0, 蛋白胨 0.2, 琼脂 12.0。

(6) 单菌液体产酶培养基: 成分等同于 Mandals 培养基, 滤纸作为唯一的碳源, 添加量为 0.5%, 在 100 mL 的三角瓶中, 装入 40 mL 的培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后备用。

1.2 平板划线法初筛单菌

用无菌镊子夹取培养 5 d 的 WSD-5 培养物置于 100 mL 三角瓶中(三角瓶中盛有 40 mL 的无菌生理盐水), 置于摇床 180 r/min 振荡 30 min。将此菌液进行梯度稀释, 将 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} 3 个稀释度的稀释液 300 μL , 涂布于直径 9 cm 的固体培养基表面; 另取不同梯度的稀释液 300 μL , 分别置于无菌培养皿中, 再于各皿中倾倒冷却至 45°C – 50°C 的培养基, 摇匀后等待凝固, 所有的操作过程在超净台中进行。每个梯度设置 3 个重复, 所有平板置于 35°C 培养。48 h 后, 在超净台中尽可能挑取菌落外观明显不同的, 在同样的培养基中划线培养, 培养 48 h 后, 重复此过程, 以达到分离纯化的目的。

1.3 DGGE 法复筛单菌及其序列分析

通过平板划线共分离出 25 株细菌和 3 株真菌。为了对 25 株细菌再一次筛选, 进行 DGGE 分析, 通过细菌的条带比较, 筛选出不同种的微生物。氯苯法^[14]提取各菌株的 DNA, 分别以这些细菌的 DNA 为模板, 用细菌引物 357F-GC [5'-CGCCCGC CGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGG GGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' (*E. coli* 位置: 341–357)]和 517R [5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (*E. coli* 位置: 517–534)^[15]], 对 25 株细菌 DNA 进行扩增, 扩增产物精制浓缩后用于 DGGE 分析^[15–16],

变性剂浓度范围设为 20%–55%。

经 DGGE 筛选, 最终确定出 11 株不同的细菌, 扩增这 11 株细菌 DNA 的 16S rDNA 全长序列, 使用细菌通用引物 27F [5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3' (*E. coli* 位置: 8–27)]和 1492 [5'-GGCTAC CTTGTTACGACTT-3' (*E. coli* 位置: 1492–1510)^[17]]; 扩增 3 株真菌 DNA 的 26S rDNA, 使用真菌引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'^[18])。PCR 产物送上海生工测序, 通过 BLAST 检索对所有的序列进行相似性比对, 选择最为相似的菌株作为参考菌株。应用 Clustal X 软件包处理序列信息^[19], 使用 MEGA 4 软件构建系统进化树^[20]。

1.4 CMC 平板水解圈测定实验

将 DGGE 复筛得到的细菌和 3 株真菌接种至 CMC 平板培养基, 培养 2 d (真菌培养 4 d), 用革兰氏碘液浸染 CMC 平板培养基 3–5 min^[13], 弃染液后测菌落直径(d , cm)和水解圈直径(D , cm), 采用 D_p 表示水解能力: $D_p = (D/d)^2$ 。

1.5 pH 值和温度对酶活性的影响

配置 1/15 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 4.92–8.04), 溶解质量分数 2% 的羧甲基纤维素 (CMC), 测定粗酶液的 CMC 酶活性, 用以测试粗酶液 CMC 酶作用最适 pH; 以最适 pH 的缓冲液溶解底物, 用以测试酶作用最适温度, 设定温度范围为 40°C – 70°C 。本研究中所有的酶活性均在最适 pH 和最适温度下测定。

1.6 酶活测定

本研究所测定的酶活包括滤纸酶(总酶活)、纤维素内切酶(CMC 酶)、纤维素外切酶(微晶纤维素酶)、 β -葡萄糖苷酶(纤维二糖酶)和木聚糖酶酶活。所使用的底物分别为滤纸条 50 mg (Whatman No. 1 滤纸, 约 $1\text{ cm} \times 6\text{ cm}$)、2% 的羧甲基纤维素、2% 的微晶纤维素粉、0.5% 的水杨苷、1% 的燕麦木聚糖, 缓冲液均为磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(1/15 mol/L)。

滤纸酶酶活测定采用 IUPAC 推荐的测定方法^[21], 反应结束后, 530 nm 处测定吸光值。分别用葡萄糖和木糖绘制标准曲线。外切酶的测定需要每 10 min 摇晃 1 次, 且水浴结束后, 将样品于

12 000 r/min 离心 1 min 后, 再向上清液中添加 3 mL DNS 溶液^[22]。在测定过程中, 应将所有的样品、酶的空白对照、糖标液以及光谱调零点样品同时沸水浴。根据标准曲线计算酶活力。1 个酶活性单位定义为 1 min 形成 1 μ mol 还原糖所需要的酶量。

2 结果与分析

2.1 复合菌系 WSD-5 中主要微生物的分离及其指纹基因序列分析

通过平板划线共分离出 25 株细菌和 3 株真菌。从细菌的形态分析可知, 25 株细菌中, 各菌株菌落形态相似, 难以简单区分, 因此通过 16S rDNA 的

DGGE 进行了复筛, 结果见图 1。通过对 DGGE 图中各泳道条带序列分析比较, 并结合菌落形态特征, 最终复筛出 11 株细菌, 编号为 B3、B4、B6、B7、B8、B10、C1、C8、C9、C10 和 D8, 并对其进行 16S rDNA 全长测序, 它们在 DGGE 图谱中所对应的泳道及其近缘菌株分析结果如表 1 所示。由表 1 可知 11 株细菌分别属于 *Pseudomonas* sp.、*Pseudomonas aeruginosa*、*Achromobacter* sp.、*Stenotrophomonas* sp.、*Bacillus fusiformis*、*Bacillus cereus*、*Brevundimonas* sp.、*Ochrobactrum* sp.、*Cytophaga* sp.、Benzo(a)pyrene-degrading bacter、*Flavobacterium* sp.。各细菌的系统发育分析见图 2。

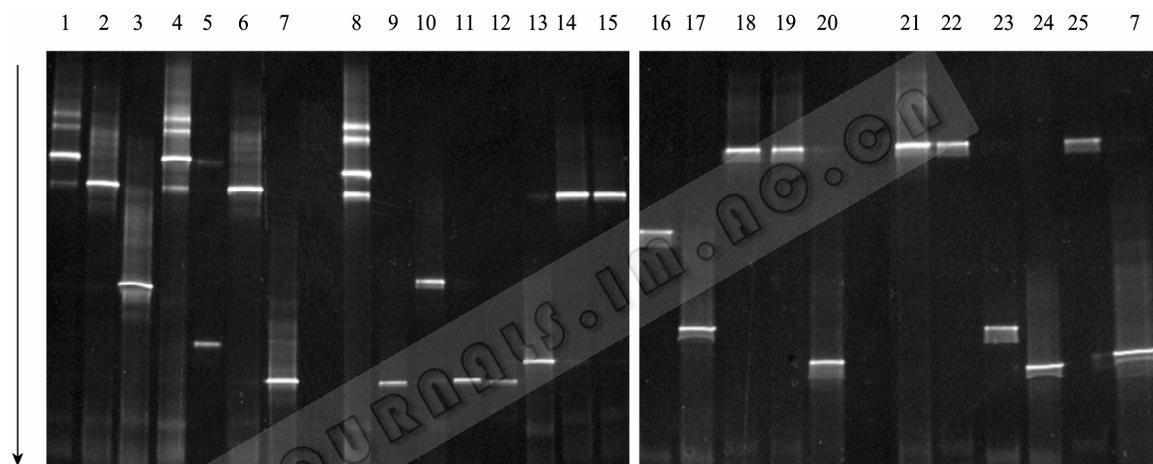


图 1 分离细菌菌株的 DGGE 复筛图谱

Fig. 1 DGGE profiles of the screening of bacteria

注: 1-25: 初步分离到的 25 株细菌.

Note: 1-25: The initial isolated bacteria.

表 1 复筛细菌的近缘菌株

Table 1 Identities of of bacteria based on the 16S rDNA sequence

单菌 Isolated strains	对应的 DGGE 泳道 Correspondence in DGGE profile	近缘种名称(登录号) Species with most similar sequence (GenBank accession No.)	同源性 Identity (%)
B3	3	<i>Bacillus cereus</i> (FJ982658)	99.4
B4	1、4	<i>Bacillus fusiformis</i> (EF472269)	99.7
B6	5	<i>Brevundimonas</i> sp. (EU593764)	100
B7	7、11、20	<i>Ochrobactrum</i> sp. (DQ305290)	99.6
B8	8	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ159438)	99.9
B10	10	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (FJ357297)	99.8
C1	13、17、23	Benzo(a)pyrene-degrading bacter (AF494539)	99.9
C8	24	<i>Flavobacterium</i> sp. (DQ311009)	95.7
C9	9、12、20	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. (GQ418019)	99.4
C10	2、6、14、15、18、19、21、22、25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DQ095913)	99.9
D8	16	Cf. <i>Cytophaga</i> sp. (AY238333)	99.6

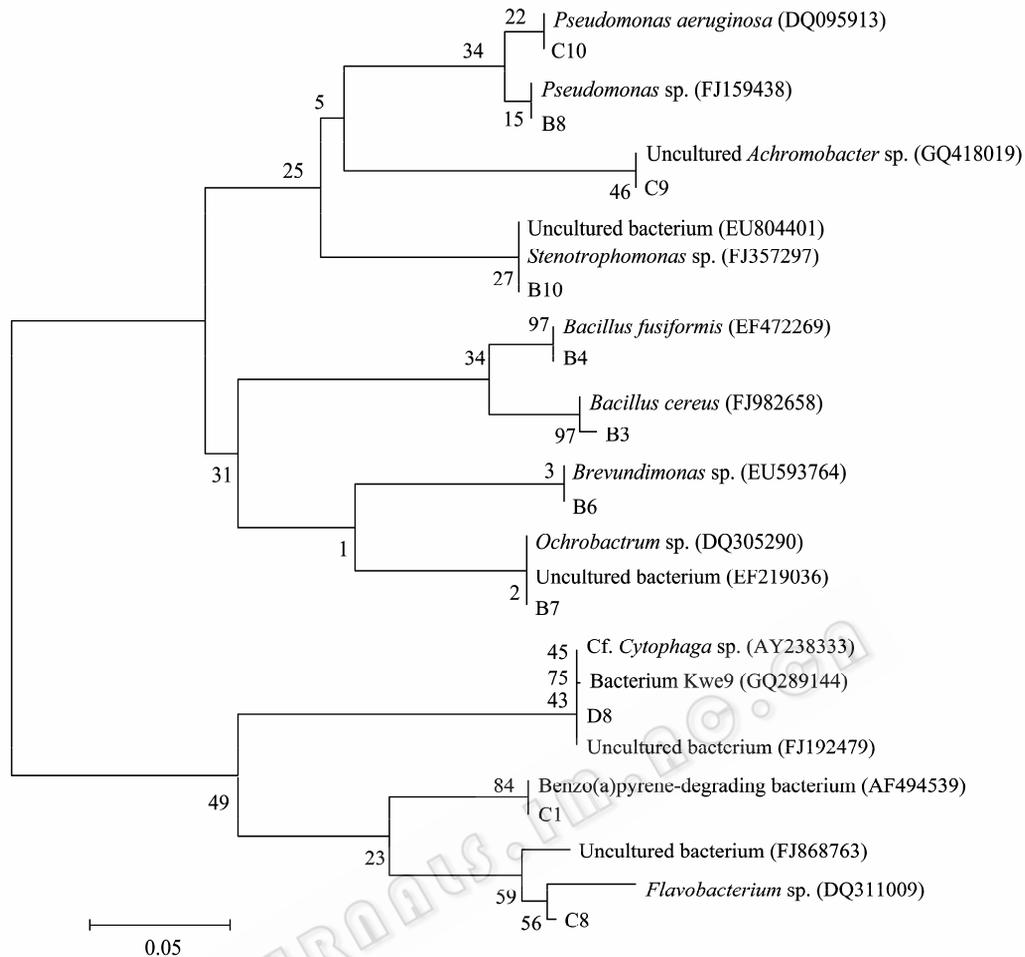


图2 基于16S rDNA全长序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of bacteria based on the 16S rDNA sequence

3株真菌的26S rDNA全长序列分析表明菌株F1和F3同时与*Pseudallescheria boydii*相似率最高,相似率分别为100%和99.7%,但从菌落形态上看,F1与F3却有显著的区别(图3)。菌株FC与*Coprinus cinereus*具有99.7%的相似率。

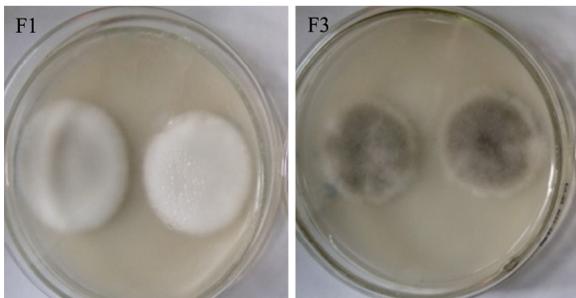


图3 F1与F3菌落形态上的差异

Fig. 3 Colony morphology differences of F1 and F3

2.2 分离菌株的CMC平板水解圈测定

将DGGE复筛获得的11株细菌和3株真菌进行了CMC水解圈的测定,表2中列出了有水解现象的单菌。11株细菌中有4株出现了水解圈,其中以B3的水解圈最大,但C8的 D_p 值最高。3株真菌经染色后均有水解圈出现,F1与F3的水解圈大小基本相同,FC的水解圈最大,直径达到了7.2 cm。但真菌菌落大小与水解圈大小一致,则真菌的 D_p 值均为1。

2.3 分离菌株的纤维素酶活测定

2.3.1 pH值和温度对酶活性的影响:将CMC-Na平板培养基中出现水解圈的菌株以滤纸作为唯一碳源培养5 d后,将菌液8 000 r/min离心10 min,收集上清液,得到相应单菌的粗酶液。用pH 5.29–8.04

	单菌 Isolated strains	水解圈直径 Transparent circle diameter (D, cm)	菌落直径 Colony diameter (d, cm)	水解能力 Dp Hydrolysis ability
细菌 Bacteria	B3	3.5	0.9	15.1
	C1	1.3	0.4	10.6
	C8	1.2	0.3	16.0
	D8	0.8	0.3	7.1
真菌 Fungal	F1	2.4	2.4	1.0
	F3	2.3	2.3	1.0
	FC	7.2	7.2	1.0

范围内的 2% 的羧甲基纤维素(CMC)溶液对粗酶液进行 CMCase (纤维素内切酶活)测定, 以确定各菌株粗酶液 CMCase 测定的最适 pH 值。结果, 4 株细菌均未检测到 CMCase, 可见用透明圈来说明菌株的产酶能力说服力不足。3 株真菌的检测结果见图 4。在 pH 5.29–8.04 值范围内, 3 株真菌的粗酶液均能检测到 CMCase, 其中 F1 粗酶液酶活在 pH 为 6.24 时最高, F3 及 FC 粗酶液酶活在 pH 为 5.91 时最高。以各真菌最适 pH 值的缓冲液溶解底物, 测定酶活的温度反应, 结果在 40 °C–70 °C 温度范围内, 3 株真菌的 CMCase 均在 60% 以上, 说明 3 株真菌的粗酶液对温度均有较强的耐受性。F1 与 F3 粗酶液酶活测定的最适温度为 55 °C, FC 的最适温度为 60 °C。

2.3.2 滤纸酶活性动态: 3 株真菌分解滤纸过程中产生的滤纸酶活性动态见图 5。各真菌滤纸酶活性表现不同。其中 F1 的酶活呈现多峰变化, 最高峰出现在分解的第 12 天, 达到了 1.05 U/mL, 在 3 株菌中最高, F3 与 FC 分泌的滤纸酶活基本上在同一水平上, 分解后期一直波动于 0.25 U/mL 左右。

2.3.3 纤维素酶活性动态: 3 株真菌分解滤纸过程中分泌的纤维素酶活性动态见图 6–8。总体上看, 真菌分解过程中表达的纤维素内切酶活性最高(图 6), 纤维素外切酶次之(图 7), β -葡萄糖苷酶活性最低(图 8)。各真菌分解前 5 天的酶活性都处于较低的水平, 之后开始上升, 酶活表达的最高峰均出现在分解的后期。

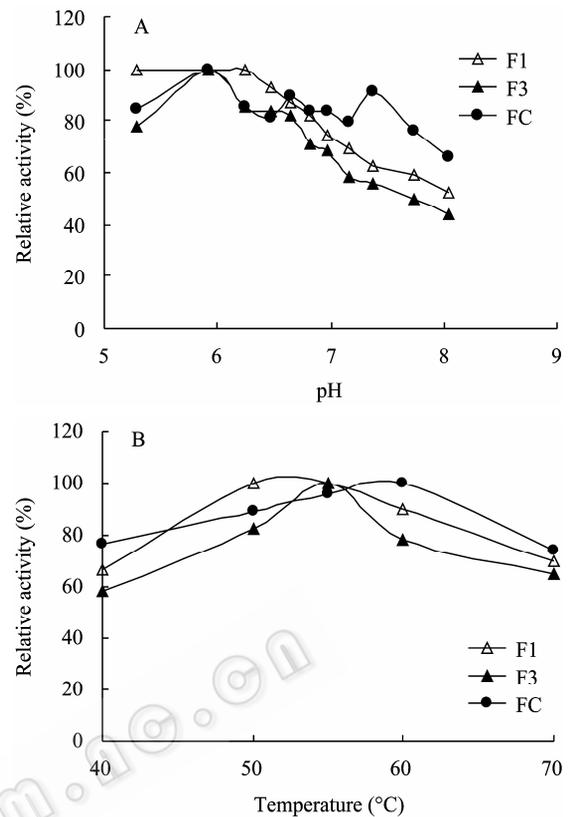


图 4 pH 值(A)和温度(B)对真菌酶活性的影响

Fig. 4 Relative enzyme activity of CMCase of the fungal culture at different pH levels (A) and temperatures (B)

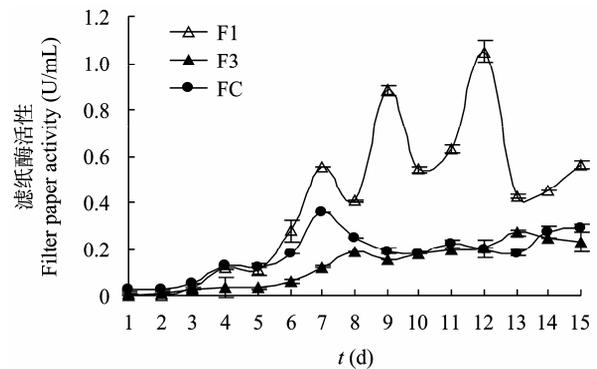


图 5 真菌的滤纸酶活性动态

Fig. 5 Dynamics of filter paper activity of fungi

F1 分泌的纤维素内切酶活性和外切酶活性最高, 最高峰均出现在分解的 12 d, 分别达到了 5.53 U/mL 和 0.56 U/mL (图 6 和图 7), 而其表达的 β -葡萄糖苷酶活与 F3 处于同一较低的水平上(图 8)。FC 分泌的纤维素内切酶活性与 F1 处于同一较高水平上, 但其最高峰出现在第 14 天, 达到了

3.97 U/mL(图 6), 低于 F1 的最高值。FC 的纤维素外切酶活性较低, 但其 β -葡萄糖苷酶活性相对最高, 在分解过程中持续上升, 到 14 d 达到最高峰, 达到 0.44 U/mL(图 8)。F3 分泌的纤维素酶活性均低于其余 2 株真菌。

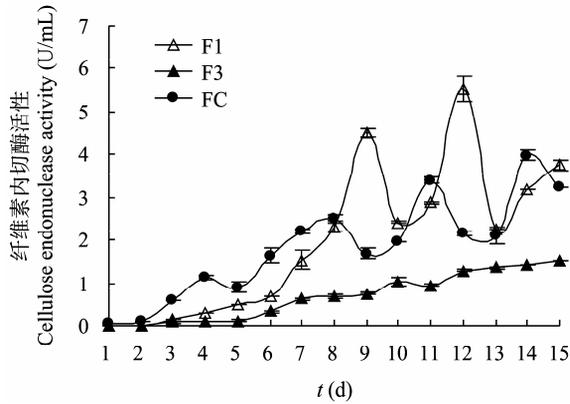


图 6 真菌的纤维素内切酶活性动态
Fig. 6 Dynamics of endoglucanase activity of fungi

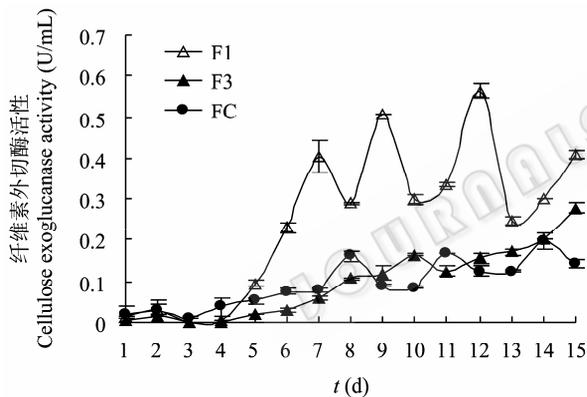


图 7 真菌的纤维素外切酶活性动态
Fig. 7 Dynamics of exoglucanase activity of fungi

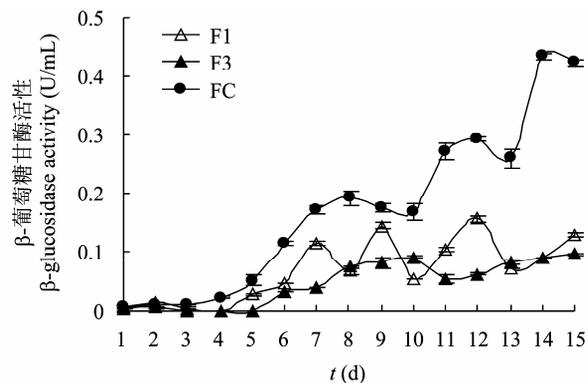


图 8 真菌的 β -葡萄糖苷酶活性动态
Fig. 8 Dynamics of β -glucosidase activity of fungi

2.3.4 木聚糖酶活性动态: 真菌的木聚糖酶活性动态如图 9 所示。FC 分泌的木聚糖酶活性显著高于 F1 和 F3, 分解至第 3 天开始逐渐上升, 到第 14 天达到最高值 58.95 U/mL。F1 产生的木聚糖酶活性略高于 F3, 但最高值也仅接近于 10 U/mL, 总体上都处于较低的水平。FC 产生的木聚糖酶活最高值高出 F1 的 6 倍。

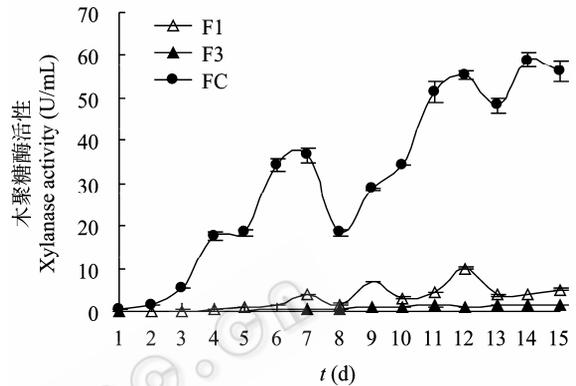


图 9 真菌的木聚糖酶活性动态
Fig. 9 Dynamics of xylanase activity of fungi

3 结论

(1) 从复合菌系 WSD-5 中分离出 11 株细菌、3 株真菌的纯培养菌株。指纹基因序列分析结果表明, 11 株细菌的近缘种分别为 *Pseudomonas* sp.、*Pseudomonas aeruginosa*、*Achromobacter* sp.、*Stenotrophomonas* sp.、*Bacillus fusiformis*、*Bacillus cereus*、*Brevundimonas* sp.、*Ochrobactrum* sp.、*Cytophaga* sp.、Benzo(a)pyrene-degrading bacter、*Flavobacterium* sp.; 真菌 F1 和 F3 的近缘种同为 *Pseudallescheria boydii*, 相似率分别为 100% 和 99.7%, 但这 2 株菌从菌落形态上却有显著的区别; 菌株 FC 与 *Coprinus cinereus* 具有 99.7% 的相似率。

(2) 在 11 株分离菌株中有 4 株细菌和 3 株真菌能在 CMC 平板上产生透明圈, 但只有 3 株真菌具有糖化力活性。

(3) 菌株 F1 的粗酶液在 pH 值为 6.24 时、菌株 F3 及 FC 粗酶液在 pH 5.91 时 CMC 酶活最高, F1 与 F3 粗酶液的 CMC 酶最适酶活表达温度为 55 °C, FC 的 CMC 酶活最适温度为 60 °C。

(4) 各菌株中, 以 F1 的滤纸酶活性最高, 达到了 1.05 U/mL, 纤维素内切酶活性和外切酶活性也是以 F1 的最高, 分别达到了 5.53 U/mL 和 0.56 U/mL; FC 的 β -葡萄糖苷酶活性和木聚糖酶活性以 FC 最高, 分别达到 0.44 U/mL 和 58.95 U/mL, 后者是 F1 最高值的 6 倍。

复合菌系 WSD-5 具有高效的分解能力和产酶能力, 但分离的菌株各菌的酶活并没有显著高于已报道的纯培养菌株的酶活, 可见复合菌系的高效分解能力与各组成菌的协同作用密切相关, 其协同机理还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 孙振钧. 中国生物质产业及发展取向[J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 1-5.
- [2] Bayer EA, Lamed R, Himmel ME. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management[J]. Environ Biotechnol, 2007, 18(3): 237-245.
- [3] Takao S, Kamagata Y, Sasaki H. Cellulase production by *penicillium purpurogenum*[J]. J Ferment Technol, 1985, 63(2): 127-134.
- [4] Mandel M, Sternberg D. Recent advances in cellulose technology[J]. J Ferment Technol, 1976, 54(4): 267-286.
- [5] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35(5): 377-391.
- [6] Brijwani K, Oberoi HS, Vadlani PV. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran[J]. Process Biochem, 2010, 45(1): 120-128.
- [7] 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.
- [8] Haruta S, Cui ZJ, Huang ZY, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4/5): 529-534.
- [9] 郭鹏, 王小芬, 朱万斌, 等. 纤维素分解菌复合系 MC1 分解木薯淀粉厂残渣[J]. 环境科学, 2008, 29(3): 795-798.
- [10] Guo P, Wang XF, Zhu WB, et al. Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1[J]. J Environ Sci, 2008, 20(1): 109-114.
- [11] 朴哲, 崔宗均, 苏宝琳, 等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的酶活特性[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(1): 59-66.
- [12] 王小娟, 李培培, 袁旭峰, 等. 4 组常温分解小麦秸秆复合菌系的比较研究[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(1): 24-29.
- [13] Kasana RC, Salwan R, Dhar H, et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine[J]. Curr Microbiol, 2008, 57(5): 503-507.
- [14] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(22): 5279-5280.
- [15] Wang XF, Haruta S, Wang P, et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 57(1): 106-115.
- [16] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [17] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, et al. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2354-2359.
- [18] Poláková S, Blume C, Zárate JÁ, et al. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*[J]. PNAS, 2009, 106(8): 2688-2693.
- [19] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [20] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics, 2008, 9(4): 299-306.
- [21] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. Pure Appl Chem, 1987, 59(2): 257-268.
- [22] Beukes N, Pletschke BI. Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus* cellulosome-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 264(2): 226-231.