

# 高产纤维素酶芽孢杆菌的筛选、鉴定与发酵条件优化

杨艳红<sup>1\*</sup>, 张浩铂<sup>2</sup>, 姚心怡<sup>2</sup>, 贺禧<sup>2</sup>, 王哲<sup>2</sup>

<sup>1</sup>重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054; <sup>2</sup>重庆市育才中学, 重庆 400050

**摘要:** 纤维素是生产生物质能源最广泛、最廉价的原材料, 筛选高活性纤维素酶菌株是纤维素能源开发利用的关键。采用刚果红-CMC 平板筛选高产纤维素酶菌株; 结合菌株形态、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析对菌株进行鉴定; 采用正交实验筛选菌株 AF1 的最佳产酶发酵条件。筛选获得 5 株高活力的纤维素酶产生芽孢杆菌, 鉴定为 2 株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、3 株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。5 株菌的水解圈直径与菌落直径比值均大于 4.5, 其中解淀粉芽孢杆菌 AF1 最大达到 8.04, 优化 AF1 菌株最佳固体发酵培养基为: 玉米秸秆粉 20 g, NaCl 0.4 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, 麸皮 32 g, 吐温 80 0.2 g, 蛋白胨 0.7 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04 g, 糖蜜 0.4 g, 吐温 20 0.4 g, 水 115 mL; 最佳理化发酵条件为: 温度 30 °C、pH 6.5、接种量 1.5% (OD<sub>600</sub>=1.0)。在最佳条件下发酵 42 h, 最高酶活达 26.904 U/g, 为纤维素酶制剂研究和生物能源的开发提供菌株来源。

**关键词:** 纤维素酶; 16S rDNA; 菌株鉴定; 芽孢杆菌; 发酵条件

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

## Screening, identification and fermentation condition optimization of *Bacillus* with high cellulase production

YANG Yan-hong<sup>1\*</sup>, ZHANG Hao-bo<sup>2</sup>, YAO Xin-yi<sup>2</sup>, HE Xi<sup>2</sup>, WANG Zhe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy & Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

<sup>2</sup>Chongqing Yucai Secondary School, Chongqing 400050, China

**Abstract:** Cellulose is the most widespread and cheapest raw material for biomass energy production. Screening of high-activity-cellulase-producing strain is the key to the development and utilization of cellulose energy. Congo red-CMC plate was used to screen cellulase-producing strains. The strains were identified by morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The optimal fermentation conditions of strain AF1 were screened by orthogonal experiments. Five cellulase-producing strains with high activity were obtained and identified as two strains of *Bacillus subtilis* and three strains of *Bacillus amyloliquefaciens*. The ratio of the hydrolytic circle diameter and colony diameter of the five strains was more than 4.5, and AF1 was the maximum reaching to 8.04. The

optimal solid fermentation medium for AF1 strain was: corn straw powder 20 g, NaCl 0.4 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, bran 32 g, twain 80 0.2 g, peptone 0.7 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04 g, molasses 0.4 g, twain 20 0.4 g, water 115 mL; The optimal physical and chemical fermentation conditions were as follows: temperature 30°C, pH 6.5, inoculum amount 1.5%(OD<sub>600</sub>=1.0). And under these optimal conditions, the maximum  $\alpha$ -amylase activity is obtained 26.904 U/g after 42 h, which could provide strain source for cellulase preparation research and bio-energy development.

**Key words:** cellulase; 16S rDNA; strain identification; *Bacillus*; fermentation conditions

近年来, 随着石化燃料的无限使用, 全球油价剧烈波动, 严重影响人类的日常生活<sup>[1]</sup>。人们越来越关注新的替代能源的研究和开发, 纤维素生物质燃料是目前公认的最具生产价值和前景的可再生能源<sup>[2]</sup>。纤维素生物质是地球上分布最广、含量最丰富的生物质, 主要由纤维素、半纤维素, 木质素组成<sup>[3]</sup>。但纤维素、半纤维素和木质素是通过氢和共价键紧密结合, 具有顽固性生物质结构, 我们仅开发了不到 2%的纤维素资源<sup>[4,5]</sup>。利用现代生物技术将纤维素转化为乙醇等液体燃料, 产量稳定、可再生和无污染, 有希望解决能源危机、环境污染和粮食危机等问题<sup>[6]</sup>。但要解决这一问题, 最关键的是要获得高效、低廉的纤维素酶。

纤维素酶 (cellulase) 是降解纤维素生成单糖或多糖的一组复合酶系的总称, 主要包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 $\beta$ -1, 4 葡萄糖苷酶, 3 种酶相互协同降解纤维物质<sup>[7]</sup>。目前, 对纤维素酶产生菌的研究主要集中在真菌如木霉属、青霉属和曲霉属等, 而其纤维素酶多数结合在细胞膜上, 使用很不方便, 且酶的分离提取成本太高。并且真菌纤维素酶不仅生产周期长, 产生的纤维素酶大多也要在较高温度条件下才能发挥较好的效能, 室温或较低温度下, 酶活力都非常低<sup>[8]</sup>。细菌相对于真菌生长速度快, 能获得更高表达量的重组酶, 能生产更复杂的糖苷水解酶进行酶解协同反应。同时, 细菌具有极高的自然多样性, 更有可能产生耐热的、碱稳定性酶<sup>[9,10]</sup>。到现在为止, 研究较多的产纤维素酶的细菌有: 弧菌、芽孢杆菌、拟杆菌、纤维素单胞菌、梭状芽孢杆菌、欧文氏菌、瘤胃球菌和热单胞菌<sup>[11]</sup>。

目前为止, 虽然已经做了大量的木质纤维素的转化研究, 但是由于半纤维素酶和纤维素酶的商业成本非常高, 把纤维素生物质转化成生物乙醇仍面临巨大挑战<sup>[12]</sup>。因此, 开发新型、高效、低成本的纤维素酶迫在眉睫, 选育纤维素酶高产菌株尤其重要<sup>[13]</sup>。从实验室保存菌株中筛选出纤维素酶高产细菌菌株, 对其进行鉴定研究, 为纤维素酶制剂研究提供菌株来源和为遗传改良、基因工程菌株的构建等工作奠定一定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

42 株菌株为重庆理工大学药学与生物工程学院发酵工程实验室保存；葡萄糖、刚果红等常规试剂均为国产分析纯。其他主要试剂包括：DNA 提取试剂盒、1×TSE101 金牌 mix、TSINGKE 高纯度低电渗琼脂糖、DNA 凝胶回收试剂盒（北京擎科生物科技有限公司，货号分别为：TSP101-200；1×TSE101；TSJ001；TSP601-50）。

主要仪器设备：HS-1300U 水平双人单面净化工作台（上海苏净有限公司）；ZQZY-88CES 全温振荡培养箱（上海知楚仪器有限公司）；WFZ UV-2100 紫外分光光度计（上海尤尼柯仪器有限公司）；GI54DWS 立式压力蒸汽灭菌器（美国 ZEALWAY）；GL10MD 大容量高速离心机（湘仪离心机有限公司）；3730XL 测序仪（美国 Applied Biosystems）；Legend Micro17 离心机（美国 Thermo）；2720 thermal cycler PCR 仪（美国 Applied Biosystems）；JY300 C 电泳仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；JY04S-3C 凝胶成像仪（北京君意东方电泳设备有限公司）。

筛选培养基：CMC-Na 0.4 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、NaCl 1.0 g、CaCl<sub>2</sub> 0.1 g、FeCl<sub>3</sub> 0.02 g、酵母膏 0.05 g、水 100 mL，pH 7.0~7.2。牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉膏：0.3 g，蛋白胨：1.0 g，NaCl：0.5 g，蒸馏水 100 mL，pH 7.0。菌种鉴定培养基：参见《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 初筛

把各个菌株点种于筛选培养基平板，30 °C 培养 3 d，用 0.1% 刚果红试剂染色，5 min 后用 mol/L NaCl 溶液脱色。挑选菌落周围出现清晰的透明水解圈的菌株继续进行纯化与复筛。

#### 1.2.2 纯化与复筛

将初筛选出的菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上进行划线，再挑取单菌落点重复上述试验，每个菌在平板上点种 3 个做平行实验，确保获得分离菌株的纯培养物。经刚果红染色，用游标卡尺测定各个菌落周围水解圈大小和菌落直径大小，计算每个菌落的平均水解圈大小，以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示，根据水解圈直径与菌落直径的比值大小，选出纤维素酶酶活相对较高的菌株，置 4 °C 冰箱保存备用。

### 1.2.3 菌株形态与染色及菌落形态观察

将复筛出的分离菌株划线接种于牛肉膏蛋白胨培养基平板，置 30 °C 培养 1~2 d，参照《现代微生物学实验技术》<sup>[23]</sup>，观察分离菌株菌体形态与其他特征。

### 1.2.4 生理生化特征

参照文献《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[14]</sup>和《现代微生物学实验技术》<sup>[15]</sup>进行。

### 1.2.5 16S rDNA 序列测定

把各个菌株培养至对数期，严格按照 DNA 提取试剂盒操作，获得基因组 DNA，DNA 样品适量稀释后作为 PCR 模板进行 PCR 反应，DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化。纯化产物送北京擎科生物科技有限公司成都分公司进行全序列测序。序列通过 NCBI 网站中的 BLAST 程序与 GenBank 中的核酸数据进行对比分析。根据比对结果，从数据库中选取与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知相关序列，采用 MEGA 11.0 软件进行多重序列比对分析，用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树。

### 1.2.6 AF1 菌固体发酵培养基筛选

活力定义：以滤纸为底物，在一定反应条件 (pH 6.0, 45 °C, 恒温 30 min) 下，以水解反应中，1 g 发酵固体产生的纤维素酶 1 min 催化纤维素生成 1 μg 葡萄糖为 1 个滤纸酶活单位，以 U 表示。

滤纸酶活力测定方法：采用 DNS 法<sup>[14]</sup>。

对上述筛选到产酶活力最大的 AF1 菌株的固体发酵培养基进行优化筛选。先预实验确定最佳纤维素粉为玉米秸秆粉，最佳迟效氮源蛋白胨和麸皮。在此基础上对培养基的主要成分进行 13 因素 3 水平的正交实验优化，固体发酵从第 1 d 开始取样，每 24 h 取一次样，直到测定滤纸酶活下降为止，以最高滤纸酶活为指标进行直观分析和方差分析。

### 1.2.7 AF1 菌理化因素发酵条件筛选

先经预实验初步确定发酵条件为 pH 6.5，温度 35 °C。然后以 pH、温度和接种量为考察因素进行进一步正交优化，取样检测具体方法同“1.2.6”。以最高滤纸酶活为指标进行直观分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 初筛和复筛

42 株菌株点种于筛选培养基初筛发现有 16 个菌落周围有明显水解圈。初筛菌株纯化和产

酶复筛后，根据水解圈直径与菌落直径之比，筛选出 5 株相对酶活较高的菌株（水解圈直径/菌落直径 $\geq 4.5$ ）。本实验室为了菌株管理方便，根据菌株分离的样品来源地或者菌株特性对 5 株菌分别进行编号为：B4、AF1、RC1、B1 和 ZB6。其中 AF1 菌株的活性最高（水解圈直径/菌落直径=8.04），见表 1 和图 1。菌株 B4 分离自重庆南川区含有很多落叶的水塘淤泥；菌株 ZB6 分离自重庆南川一饲喂红薯藤等杂食养猪场的猪粪；菌株 AF1 分离自实验室 PDA 平板上；RC1 分离自重庆市荣昌养猪场的猪粪、B1 分离自重庆理工大学食堂餐厨垃圾。

表 1 5 株产纤维素酶细菌水解圈与菌落直径比较

Table 1 Hydrolysis circle and colony diameter of 5 strains producing cellulase

菌株 Strain	水解圈直径 Hydrolytic circle diameter (mm)	水解圈/菌落直径 Hydrolytic circle diameter/Colony diameter
B4	31.08 $\pm$ 0.21	6.91
AF1	32.16 $\pm$ 0.08	8.04
RC1	42.12 $\pm$ 0.13	6.81
B1	32.02 $\pm$ 0.22	5.82
ZB6	28.52 $\pm$ 0.09	4.61

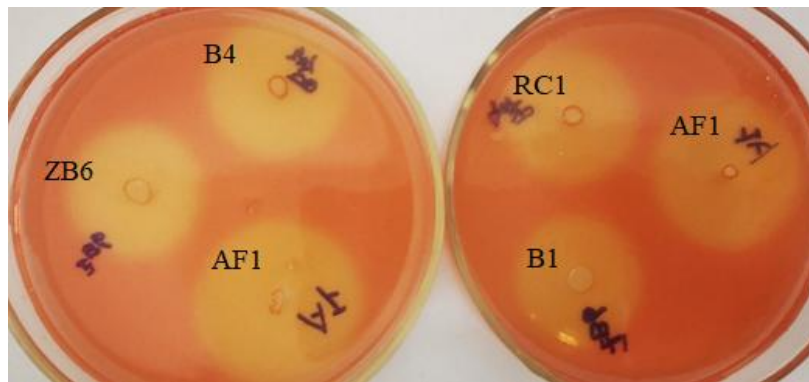


图 1 产酶细菌的平板复筛实验

Fig. 1 Plate screening test of cellulase-producing strains

## 2.2 菌落形态及个体形态

复筛分离的 5 株菌株菌落均呈圆形，乳白色，大小不等，多数中心隆起，边缘有的整齐、有的呈锯齿状，有的不规则，表面有的湿润且黏稠、有的表面干燥且有皱褶（见图 2）。菌体革兰氏染色均为阳性，均为杆状，有的长杆状，有的短杆状，均有芽孢中生，芽孢不大于菌体横径，各菌体形态特征具体见表 2。



图 2 5 株复筛菌株的菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of 5 rescreening strains

表 2 5 株复筛菌株的菌落形态和菌体特征

Table 2 Colony morphology and cell characteristics of 5 rescreening strains

菌株 Strain	菌落形态 Cololy morphology	菌体特征 Cell characteristic
B4	圆形，乳白色，不透明，表面干燥，有隆起，外围有一圈不透明环，质地干燥、易挑起，边缘呈不规则锯齿状	杆状、单生，革兰氏染色呈阳性，芽孢呈椭圆形，中生，无荚膜
AF1	圆形，乳白色，不透明，表面干燥粗糙，中心有隆起，边缘整齐	杆状、单生，革兰氏染色呈阳性，芽孢呈椭圆形，中生，无荚膜
RC1	圆形，乳白色，不透明，表面湿润，有隆起，边缘整齐完整，质地较粘	短杆状、单生，革兰氏染色呈阳性，芽孢呈椭圆形，中生，有荚膜
B1	圆形，乳白色，不透明，表面干燥、有皱褶，边缘呈锯齿状	短杆状、单生，革兰氏染色呈阳性，芽孢呈椭圆形，中生，无荚膜
ZB6	圆形，乳白色，不透明，表面干燥、有皱褶，边缘不规则	短杆状、单生，革兰氏染色呈阳性，芽孢呈椭圆形，中生，无荚膜

### 2.3 生理生化特征

复筛出的 5 株菌株的生理生化特征试验结果见表 3。常规项目中，5 株菌株除了运动性、V-P 试验存在差别，其他项目都相同，且相同的项目中只有吲哚实验呈阴性，其余项目全部呈阳性。糖利用试验结果发现：这 5 株菌株除了 B4 菌株对木糖利用能力一般，其余菌株对五碳糖木糖和阿拉伯糖的利用能力都非常好，由此推测：这几株分解纤维素的菌株之所以对五碳糖木糖和阿拉伯糖有利用偏好，这是因为五碳糖木糖和阿拉伯糖是组成半纤维素的重要单糖，而半纤维素又像粘合剂一样附着在纤维素上对其起保护作用<sup>[16]</sup>。而这些菌株为了利用纤维素，则先产生半纤维素酶分解利用半纤维素，破坏保护纤维素的外壳，使得纤维素可以更多地暴露出来，然后再产生纤维素酶进一步分解纤维素。对于六碳单糖，5 株菌株对葡萄糖、果糖和半乳糖都能利用或者较好地利用；对于二糖，除了 RC1 不能利用蔗糖而外，其他菌株对蔗糖、麦芽糖、乳糖和海藻糖都能利用或者较好地利用；对于淀粉，五株菌株都能利用，其中 RC1 对

淀粉利用最好。

综合 5 株菌株的形态特征及生理生化特性，《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[14]</sup>中相应属、种的有关性状，可将五株菌株全部归入芽孢杆菌属（*Bacillus*）。

表 3 5 株复筛菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of 5 rescreening strains

试验 Test	各个菌株特征 Characteristics				
	B4	AF1	RC1	B1	ZB6
运动性试验 Motility	—	+	—	—	+
O-F 试验 O-F test	发酵型	发酵型	发酵型	发酵型	发酵型
酪蛋白水解 Hydrolysis of casein	+	+	+	+	+
淀粉水解试验 Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+
明胶液化试验 Hydrolysis of gelatin	+	+	+	+	+
纤维素水解试验 Hydrolysis of cellulose	+	+	+	+	+
甲基红试验 Methyl red test	+	+	+	+	+
V-P 试验 V-P test	—	+	—	+	+
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction	+	+	+	+	+
过氧化氢酶试验 Catalase test	+	+	+	+	+
尿素分解试验 Urea taking test	+	+	+	+	+
吲哚试验 Indole test	—	—	—	—	—
糖发酵试验 Fermentation of carbohydrates					
木糖 Xylose	+	+++	+++	+++	+++
阿拉伯糖 Arabinose	+++	+++	+++	+++	+++
葡萄糖 Glucose	++	++	+	++	+
果糖 Fructose	+	+++	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	++	+	+
蔗糖 Saccharose	++	+	—	++	++
麦芽糖 Maltose	++	++	++	++	+
乳糖 Lactose	+	+	++	+	+
海藻糖 Fucose	+	++	++	++	++
可溶性淀粉 Starch	+	++	+++	+	+

注：在特征中，“+”表示试验结果为阳性；“—”表示试验结果为阴性；在糖类利用试验中，“+++”表示菌株对该糖利用能力非常高；“++”表示对该糖利用能力较好；“+”表示对该糖利用能力一般；“—”表示不能利用该糖。

Note: In the Regular characteristics, "+" means the test result is positive, "-" means the test result is negative; In the

sugar utilization test, "+++" means that the strain has a very high utilization capacity of the sugar, "++" means that the strain has a good utilization capacity of the sugar, "+" means that the strain has a general utilization capacity of the sugar, and "-" means that the strain cannot use the sugar.

## 2.4 菌株 16S rDNA 鉴定结果

以各菌株的总 DNA 为模板，用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增各个菌株 16S rDNA 片段，得到 5 个菌株的 DNA 片段分别为：B1 (1 451 bp)、B4 (1 449 bp)、AF1 (1 475 bp)、RC1 (1 450 bp) 和 ZB6 (1 449 bp)。它们在 GenBank 中的登录号分别为：OM756734、OM755768、KM373520、OM756735 和 OM756736。

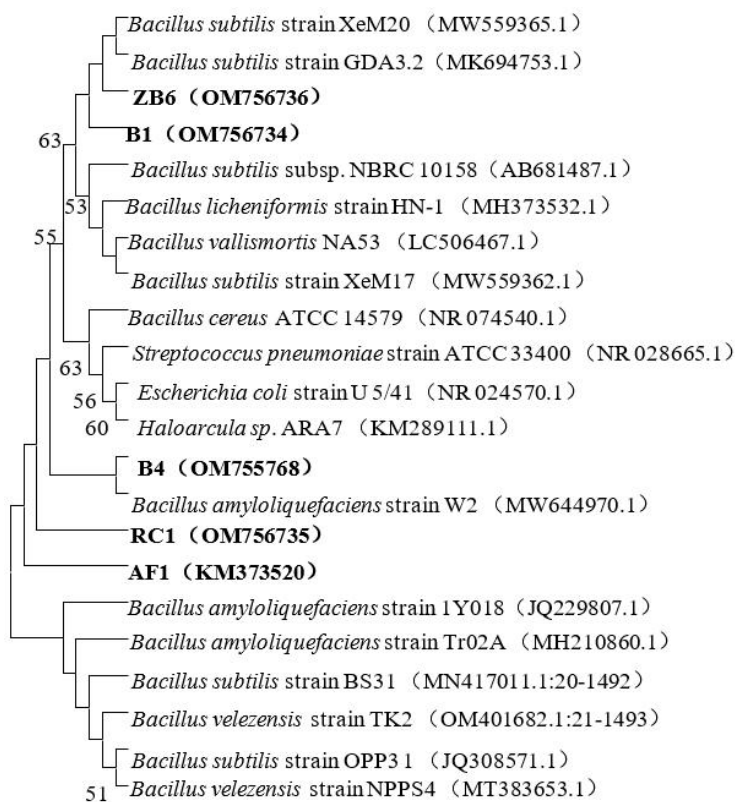


图 3 5 菌株的 16S rDNA 全序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic neighbor-joining tree based on 16S rDNA sequence of 5 strains

注：步长值为 1 000，节点上的频率大于 50%的保留，括号中的数字表示序列在 GenBank 中的登录号。

Note: Bootstrap percentage values (>50%) based on 1 000 tree replications are indicated at the branching points. The

numbers in parentheses represent the sequence's login number in GenBank.

经各菌株 16S rDNA 序列在 GenBank 中作同源性检索分析，5 株分离菌 16S rDNA 序列与



GenBank 中已注册参考菌株的 16S rDNA 序列同源性均高于 99.5%，从中选取部分同源性较高的菌种，用 MEGA11.0 构建的系统发育树（图 3），分析发现：菌株 B4、AF1 和 RC1 是解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*），B1 和 ZB6 是枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。

### 2.5 AF1 菌固体发酵培养基筛选

培养基筛选的正交试验结果如表 4 所示。由极差值 R 可以得出各因素对菌株 AF1 产酶活力的影响程度由大到小依次为：水 > NaCl > CaCl<sub>2</sub> > 玉米秸秆粉 > 麸皮 > 吐温 80 > MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O > (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> > 蛋白胨 > 糖蜜 > 吐温 20。由正交分析得出 AF1 菌的固体发酵培养基最佳配比为：玉米秸秆粉 20 g 水 125 mL，NaCl 0.4 g，CaCl<sub>2</sub> 0.2 g，麸皮 32 g，吐温 80 0.2 g，蛋白胨 0.7 g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04 g，糖蜜 0.4 g，吐温 20 0.4 g。

表 4 AF1 菌发酵培养基成分正交实验结果

Table 4 Results of orthogonal test on medium components of AF strain

试验号 Test No.	水 Water	麸皮 Wheat bran	玉米秸秆粉 Corn straw powder	蛋白胨 Peptone	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	糖蜜 Molasses	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	Tween 80	Tween 20	空 Blank	滤纸酶活 Filter paper activity (U/g)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12.86
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	15.68
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	9.99
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	17.16
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	12.32
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	17.64
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	12.47
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	16.65
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	14.23
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	11.61
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	13.13
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2	13.87
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2	11.24
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3	12.50
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1	11.63
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1	12.50

17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2	11.93
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	11.42
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	9.24
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3	11.07
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1	12.87
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1	10.63
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	13.76
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3	14.12
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3	15.42
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1	11.84
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2	15.07
K1	129.01	110.32	112.88	116.24	113.13	116.08	122.09	117.51	122.78	125.00	113.01	117.06	112.01	
K2	109.84	121.00	128.06	116.15	118.88	122.06	116.87	119.64	124.30	121.14	123.65	116.66	120.89	
K3	114.00	121.53	111.90	120.46	120.84	114.70	113.88	115.70	105.76	106.71	116.18	119.12	119.95	
k1	14.33	12.26	12.54	12.92	12.57	12.90	13.57	13.06	13.64	13.89	12.56	13.01	12.44	
k2	12.20	13.44	14.23	12.91	13.21	13.56	12.99	13.29	13.81	13.46	13.74	12.96	13.43	
k3	12.67	13.50	12.43	13.38	13.43	12.74	12.65	12.86	11.75	11.86	12.91	13.24	13.33	
R	2.13	1.25	1.80	0.48	0.86	0.82	0.91	0.44	2.06	2.03	1.18	0.27	0.99	

根据表 5 方差分析进行因素显著性判断可见，玉米秸秆粉、NaCl、CaCl<sub>2</sub> 和水对 AF1 菌滤纸酶活有非常显著影响。在上述正交优化结果中，玉米秸秆粉和 NaCl 的最优水平在中间水平，可以不做筛选；而水和 CaCl<sub>2</sub> 的最优水平则处于边缘水平即皆为第一水平，可以在第一水平附近进一步设置不同梯度做进一步筛选。同时为了验证正交实验结果的可靠性，选择正交实验结果表 4 中最好的 6 号实验和优化方案做对比，进行验证实验，补充实验设计及结果见表 5。

表 5 发酵培养基成分正交实验方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal test on medium components

差异源 Difference sources	SS	df	MS	F	显著性 Significance
玉米秸秆粉 Corn straw powder	18.19	2	9.10	7.22	**
水 Water	22.45	2	11.23	8.91	**
NaCl	23.33	2	11.66	9.25	**
CaCl <sub>2</sub>	20.52	2	10.26	8.14	**
麸皮 Wheat bran	8.75	2	4.38	3.48	
Tween 80	6.43	2	3.21	2.55	

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.43	2	1.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.27	2	1.64
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.70	2	1.85
蛋白胨 Peptone	1.14	2	0.57
糖蜜 Molasses	0.73	2	0.36
Tween 20	0.25	2	0.13
随机误差 Error e	5.16	2	2.58
误差 Error e <sup>Δ</sup>	17.68	14	1.26

注：查 F 分布表  $F_{0.01}(2,14) = 6.51$ ,  $F_{0.05}(2,14) = 3.74$ , 当  $3.74 \leq F \leq 6.51$  时, 表示该因素对实验结果有显著的影响, 用“\*”表示; 当  $F \geq 6.51$ , 3 时表示该因素对实验结果有非常显著的影响, 用“\*\*\*”表示。

Note: Check the F distribution table,  $F_{0.01}(2,14) = 6.51$ ,  $F_{0.05}(2,14) = 3.74$ . When  $3.74 \leq F \leq 6.51$ , this factor has a significant influence on the experimental results, which is represented by "\*". When  $F \geq 6.51$ , it indicates that this factor has a very significant influence on the experimental results, which is represented by "\*\*\*".

根据表 6 可以看出, 正交优化结果可靠, 最优发酵培养基方案为 3 号, 即: 玉米秸秆粉 20 g, 水 115 mL, NaCl 0.4 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, 麸皮 32 g, 吐温 80 0.2 g, 蛋白胨 0.7 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04 g, 糖蜜 0.4 g, 吐温 20 0.4 g, 酶活最高可达到 26.52 U/g。

表 6 正交补充实验结果

Table 6 Results of supplement tests

试验号 Test No.	因素 Factor												滤纸酶 活 Filter paper activity (U/g)
	水 Water	麸皮 Wheat bran	玉米秸秆 粉 Corn straw powder	蛋白胨 Peptone	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	糖蜜 Molasses	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	Tween 80	Tween 20	
1	125	30	20	0.5	0.8	0.8	0.08	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	21.17
2	125	32	20	0.7	0.8	0.5	0.04	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	<b>22.96</b>
3	115	32	20	0.7	0.8	0.5	0.04	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	<b>26.52</b>
4	105	32	20	0.7	0.8	0.5	0.04	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	21.38
5	125	32	20	0.7	0.8	0.5	0.04	0.4	0.4	<b>0.1</b>	0.2	0.4	21.96
6	125	32	20	0.7	0.8	0.5	0.04	0.4	0.4	<b>0</b>	0.2	0.4	19.94

注：试验号 1 是正交结果表 4 中的 6 号方案；2 是正交优化的方案；3、4 是分别是水 115 和 105 mL 的补充实验，5、6 分别是 CaCl<sub>2</sub> 为 0.1 g 和 0 g 的补充实验。

Note: Test No. 1 is Scheme No. 6 in Table 4 of orthogonal results; 2 is the orthogonal optimization scheme; 3 and 4

were supplementary experiments with 115 and 105 mL water, respectively. 5 and 6 were supplementary experiments with 0.1 g and 0 g CaCl<sub>2</sub>, respectively.

## 2.6 AF1 菌理化因素发酵筛选

发酵理化条件筛选采用正交试验，结果见表 7，由极差值 R 可以得出各因素对产酶活力影响由大到小依次为：pH > 温度 > 接种量。同时，正交分析得出 AF1 菌的固体发酵条件为：温度 30 °C，pH 6.5，接种量 1.5% (OD<sub>600</sub>=1.0)。

表 7 理化条件筛选结果

Table 7 Results of orthogonal tests on physical and chemical factors

试验号 Test No.	温度 Temperature	pH	接种量 Quantity of inoculation	空白列 Blank column	滤纸酶活 Filter paper activity (U/g)
1	1	1	1	1	18.69
2	1	2	2	2	25.14
3	1	3	3	3	18.15
4	2	1	2	3	18.87
5	2	2	3	1	17.43
6	2	3	1	2	17.07
7	3	1	3	2	17.70
8	3	2	1	1	20.48
9	3	3	2	3	17.07
K1	61.98	55.26	56.24	56.60	
K2	53.37	63.06	61.09	59.92	
K3	55.26	52.30	53.28	54.09	
k1	20.66	18.42	18.75	18.87	
k2	17.79	21.02	20.36	19.97	
k3	18.42	17.43	17.76	18.03	
R	2.87	3.59	2.60	1.94	

AF1 菌在上述确定的最佳培养基和最佳理化条件下进行发酵，做三个平行组，取不同发酵时间的样品测定滤纸酶活，并取平均酶活，做酶活随发酵时间的变化曲线，确定最佳发酵时间，结果如图 4 所示：在前 36 h 内滤纸酶活随发酵时间缓慢上升，36 h 至 42 h 之间，滤纸酶活迅速增加，到 42 h 到达 26.904U/g，42 h 以后滤纸酶活迅速下降。

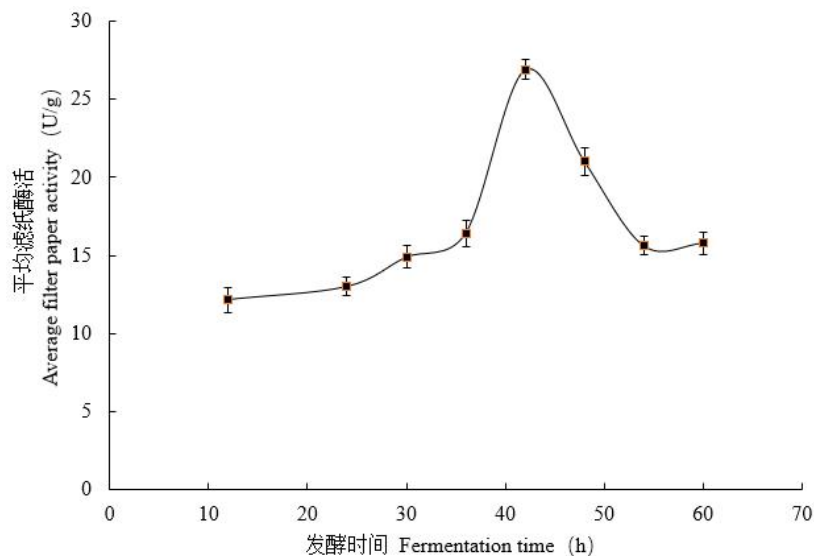


图 4 酶活随发酵时间的变化曲线

Fig.4 Curve of enzyme activity with fermentation time

### 3 结论

本研究从实验室保存菌株中共筛选出 5 株高产纤维素酶的细菌，经形态、生理生化特征和 16SrDNA 分析鉴定，均为芽孢杆菌属，2 株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)，3 株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。自然界中许多真菌和细菌都能产生多种纤维素酶。目前，对真菌纤维素酶的研究比较多，市场上的纤维素酶也主要来源于真菌。产纤维素酶细菌也由于其很强的适应性和其他优点而引起极度关注，它们很可能成为工业上非常重要的纤维素酶来源。其中芽孢杆菌能产生和分泌大量胞外酶而成为研究的主要细菌，此外，它们还能在纤维素基质生长缓慢的条件下形成内生孢子和次级代谢产物使得它们占据竞争优势，其中枯草芽孢杆菌又是报道最多的纤维素酶优良产生菌<sup>[17]</sup>，解淀粉芽孢杆菌鲜有报道。

本文在刚果红-CMC 平板上其水解圈直径与菌落直径比值均大于 4.5，最小的 ZB6 为 4.61，最大 AF1 菌的比值达到了 8.04，远远超过现有国内外文献报道的用相同方法筛选出的高酶活细菌菌株<sup>[9, 18-21]</sup>。其中文献报道最大酶活是唐昊等<sup>[28]</sup>从长足大竹象的肠道分离出一株菌株 PX19，其最高酶活菌株的水解圈直径与菌落直径比值也只有 4.83。通过对 AF1 菌的产纤维素酶固体发酵条件优化筛选后，其最高滤纸酶活可以达到 26.904 U/g。除此之外，经前期研究团队研究发现，AF1 菌还能产生高活性的淀粉酶、蛋白酶和广谱抗菌活性物质，用于雏鸡饲喂能显著提高饲料转化率，抑制病原菌生长，减少疾病发生，降低死亡率，是一株具有多功能的强

大菌株<sup>[22-25]</sup>，具有很大开发潜能。

#### 参考文献

- 1 Vu HP,Nguyen LN,Vu MT,et al.A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks[J].Sci Total Environ,2020,743:140630.
- 2 Haldar D,Purkait MK.A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass:mechanistic insight and advancements[J].Chemosphere,2021,264:128523.
- 3 Lynd LR,Wyman CE,Gerngross TU.Biocommodity engineering[J].Biotechnol Prog,1999,15:777-793.
- 4 Baruah J,Nath BK,Sharma R,et al.Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass of value-added products[J].Front Energy Res,2018,6:141.
- 5 He J.New energy for human society—biomass energy[J].Guangxi Jieneng(广西节能),2005(1):35-36.
- 6 Wood BE,Ingram LO.Ethanol production from cellobiose,amorphous cellulose,and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *zymomonasmobilis*genes for ethanol production and plasmidsexpressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*[J].Appl Environ Microbiol,1992,58:2103-2110.
- 7 Gupta P,Samant K,Sahu A.Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential[J].Int J Microbiol,2012,2012:578925.
- 8 Römling U.Molecular biology of cellulose production in bacteria[J].Res Microbiol.2002,153(4):205-212.
- 9 Li F,Xie Y,Gao X,et al.Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production[J].Electron J Biotechnol,2020,48:29-35.
- 10 Sadhu S,Ghosh PK,De TK,et al.Optimization of cultural condition and synergistic effect of lactose with carboxymethyl cellulose on cellulase production by *Bacillus* sp.isolated from fecal matter of elephant(*Elephas maximus*)[J].Adv Microbiol,2013,3:280-288.
- 11 Sreena CP,Sebastian D.Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs[J].J Genet Eng Biotechnol,2018,16:9-16.
- 12 Barbosa KL,Malta VRD,Machado SS,et al.Bacterial cellulase from the intestinal tract of the sugarcane borer[J].Int J Biol Macromol,2020,161:441-448.
- 13 Mollers KB,Cannella D,Jorgensen H,et al.Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for

- bioethanol production by yeast fermentation[J].Biotechnol Biofuels,2014,7:64.
- 14 Dong XZ,Cai MY.Handbook of systematic identification of common bacteria( 常见细菌系统鉴定手册)[M].Beijing:Science Press,2001
- 15 Zhu XF.Modern microbiology experimental techniques( 现代微生物学实验技术 )[M].Hangzhou:Zhejiang University Press,2011.
- 16 Somerville C,Youngs H,Taylor C,et al.Feedstocks for Lignocellulosic Fuels[J].Sci,2010,329:790-792.
- 17 Ghadiri E,Naghavi NS,Ghaedi K.Molecular cloning and characterizing of *Bacillus subtilis* cellulase collected from central-northern Iran forests[J].Gene rep,2020,20:100772.
- 18 Li H,Bai GJ,Lan N,et al.Screening,identification and characterization of high cellulase producing strain[J].Chin J Animal Sci Vet Med(中国畜牧兽医),2019,46:711-718.
- 19 Sriariyanun M,Tantayotai P,Yasurin P,et al.Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. isolated from rice paddy field soil[J].Electron J Biotechnol,2016,19:23-28.
- 20 Liang Q,Li H,Wang ZY.Isolation and identification of cellulase-producing strains and characterization of their cellulases[J].J Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报),2019,35(1):120-125.
- 21 Tang H,Sun C,Li YQ,et al.Screening and genome sequencing of cellulolytic bacterium *Raoultella ornithinolytica* LL1[J].Biotechnol Bull(生物技术通报), 2021,37(6):85-96.
- 22 Yang YH,Li SC,Hu Y,et al.Research on growth conditions and physiological tolerance features of *Bacillus* species AF1 with multifunction[J]. J Chongqing Univ Technol:Nat Sci(重庆理工大学学报:自然科学),2015,29(8):78-83.
- 23 Yang YH,Li SC,Lan SY,et al.Identification of an acid-stable  $\alpha$ -amylase-producing strain and its enzymatic characteristics[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:1544-1549.
- 24 Yang YH,Yu Y,Hu YQ,et al.Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* AF1 on chicken's live performance and intestinal flora[J].J Chongqing Univ Technol:Nat Sci(重庆理工大学学报:自然科学),2019,33(11):199-206.
- 25 Yang YH,Yu Y,Hu YQ,et al.Antimicrobial activity and anti-MRSA mechanism of the fermentation broth of *Bacillus amyloliquefaciens* AF1[J].Biotechnol Bull(生物技术通报),2017,33(9):223-230.

收稿日期: 2022-07-22 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 重庆市雏鹰计划研究项目 (CY210906)

\*通信作者 Tel: 023-62563181; E-mail: yyh@cqut.edu.cn