

纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及发酵产酶条件优化

李争明¹ 张娟¹ 邓中洋¹ 卢凡¹ 秦文胜²

(1. 湖北工业大学资源与环境工程学院微藻实验室 工业发酵湖北省协同创新中心 河湖生态修复及藻类利用湖北省重点实验室, 武汉 430068; 2. Department of Biology, Lakehead University, Ontario, P7B 5E1, Canada)

摘要: 以腐烂木材、腐殖土等材料作为菌源, 从中分离出 180 个菌株, 以期得到具有纤维素酶活性的菌株。采用革兰氏碘液染色法进行定性初筛, 获得了 44 个纤维素酶产生菌株。将此 44 个菌株发酵培养后, 使用滤纸酶活性测定法进行定量复筛, 滤纸酶活性最高的是菌株 J1-3-1。通过对 J1-3-1 菌株的 16S rRNA 的序列测定分析, 将 J1-3-1 鉴定为鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium* sp.)。经对 J1-3-1 进行产酶发酵条件优化, 分别确立了产生最高滤纸酶 (FPase) 活性、内切葡聚糖酶 (CMCase) 活性和 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 活性的发酵条件。在最优发酵产酶条件下, 菌株 J1-3-1 的滤纸酶、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的最高酶活性分别为 8.76、28.04 和 7.02 U/mL。

关键词: 纤维素酶产生菌; 筛选; 鉴定; 发酵; 鞘氨醇杆菌

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.05.023

Screening, Identification and Optimization of Cellulase-producing Strains

Li Zhengming¹ Zhang Juan¹ Deng Zhongyang¹ Lu Fan¹ Qin Wensheng²

(1. Microalgae Laboratory, School of Resource & Environmental Engineering, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei Provincial Key Laboratory of Lake Ecological Restoration & Algae Utilization, Hubei University of Technology, Wuhan 430068; 2. Department of Biology, Lakehead University, Ontario, P7B 5E1, Canada)

Abstract: To isolate efficient cellulase-producing bacteria, 180 bacterial isolated from rotten wood, humus, and other soil samples, and 44 were screened from them and confirmed as cellulase-producing bacteria by Gram's iodine solution staining. In the subsequent secondary screening tests, those 44 isolates were cultured in fermentation media and their total cellulase activities (FPase) were measured and compared. The strain J1-3-1, with the highest FPase activity, was identified as *Sphingobacterium* sp. by 16S ribosomal rRNA sequence analysis. The optimal fermentation conditions for enzymes production of J1-3-1 were determined. Under the optimal conditions, its activities of FPase, CMCase, and β -glucosidase reached 8.76, 28.04 和 7.02 U/mL, respectively. The results demonstrated that J1-3-1 was a promising candidate for potential industrial production of cellulase.

Key words: cellulase-producing bacteria; screening; Identification; fermentation; *Sphingobacterium* sp.

随着人口的膨胀和经济的迅猛发展, 全球对能源的需求量大幅提升, 其中化石燃料占能源消耗的 85% 以上^[1, 2]。如何满足世界对能源的需求、既实现经济的可持续性发展又能减轻化石燃料对环境的负面影响是目前世界各国关注的焦点。寻求来源丰

富、可再生、低碳绿色、经济适用的燃料来代替化石燃料是世界性研究热点^[3-6]。木质纤维素是自然界最丰富、可再生的生物质资源, 主要由纤维素、半纤维素、木质素等组成, 结构和成分非常复杂, 具有天然的屏障, 对生物降解具有一定的抗性^[7, 8]。

收稿日期: 2014-09-10

基金项目: 湖北工业大学·楚天学者启动基金项目

作者简介: 李争明, 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物化工; E-mail: lizm1987@163.com

通讯作者: 秦文胜, 男, 博士, 研究方向: 生物能源; E-mail: wqin@Lakeheadu.ca

卢凡, 男, 博士, 研究方向: 微藻生物技术; E-mail: lulab99@gmail.com

采用酶解法降解木质纤维素,首先要采用有效的预处理方法打破纤维素、半纤维素、木质素等高分子间相互交联而形成的天然阻碍,然后应用纤维素酶将预处理产物酶解、糖化,进而发酵得到相应的生物燃料和生物产品。提高纤维素酶活性和降低纤维素酶生产成本在生物质转化利用中具有重要的价值。

纤维素酶的来源非常广泛,原生动物、微生物(细菌、真菌、放线菌等)都具有合成、分泌纤维素酶的能力,其中通过微生物发酵可实现纤维素酶工业化生产。不同微生物合成的纤维素酶组成上有明显不同,对纤维素的降解能力也存在显著差异。放线菌产纤维素酶的能力较弱,目前研究得较少。细菌和真菌有合成、分泌多种纤维素酶、半纤维素酶的能力,已有众多研究者对其进行广泛而深入的研究,如里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、康氏木霉(*Trichoderma koningii*)等纤维素等纤维素酶高产菌株已被应用于商业。针对真菌的研究开展的比较早,真菌所产纤维素酶、半纤维素酶多为胞外酶,种类丰富且容易提取、纯化,更方便应用于科学研究或商业化生产。针对细菌的研究正在成为新的热点,原因主要有3点:首先是细菌较真菌生长更为迅速;再者细菌所分泌的酶成分较真菌丰富,更易发挥酶之间的协同效用,对降解纤维素更为有利;细菌对环境的适应力更强,所分泌的酶也更加稳定^[9]。本研究试图通过分离和筛选具有较高纤维素酶活性的细菌、并对这些菌的产酶条件进行优化研究,以期发现具有工业化应用前景的纤维素酶生产菌株。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 取样 本试验共计选样29个,其中优良菌株来源为:(1)湖北省武汉市狮子山上腐烂的树木、树叶及下方土壤;(2)湖北省武汉市九峰山森林公园腐烂树木、树叶。

1.1.2 培养基 (1)富集培养基R2A(g/L):酵母粉0.5;蛋白胨-D 0.5、酪蛋白氨基酸0.5、葡萄糖0.5、可溶性淀粉0.5、磷酸氢二钾0.3、硫酸镁0.5、丙酮酸钠0.3、琼脂15.0;(2)纤维素琼脂培养基(g/L):纤维素粉5.0、硝酸钠1.0、磷酸氢二钾1.0、氯化钾1.0、硫酸镁0.5、酵母粉0.5、琼脂15.0;(3)复筛培养

基(g/L):CMC-Na 10.0、硫酸铵4.0、磷酸氢二钾2.0、硫酸镁0.5、牛肉膏5.0;(4)发酵产酶培养基(g/L):CMC-Na 10.0、牛肉膏3.0、酵母粉0.5、硫酸铵4.0、磷酸氢二钾2.0、无水氯化钙0.3、硫酸镁0.5、吐温-80 2 mL/L。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离、纯化 每1.0 g样品用无菌磷酸钾缓冲溶液(PBS)重悬至20 mL,并涡旋高速振荡2 min;将每个样品悬液用无菌PBS以 10^x 梯度稀释;分别取稀释液200 μ L涂布至R2A平板上;平板在30℃下培养24 h,根据细菌生长(菌落状态)情况可适当缩短或延长培养时间;根据菌落形态、大小、颜色等,挑取单菌落进行纯化,可根据需要进行多次纯化。

1.2.2 初筛 挑取纯化的菌株单菌落至装有5 mL LB培养基的试管中,进行30℃、180 r/min过夜培养;各取LB菌液10 μ L点到纤维素琼脂培养基中心位置,自然均匀散开,30℃下培养48 h,根据实际情况可适当缩短或延长培养时间;培养完成之后,用碘液(每300 mL ddH₂O中含2.0 g KI和1.0 g I₂)染色^[10];每个平板用滴管滴加约5 mL碘液,静置5 min,有色圈出现者可初步定性为具有纤维素酶活性的菌株。

1.2.3 复筛 将初筛所得到的纤维素酶产生菌接种到发酵产酶培养基中,恒温30℃、150 r/min振荡转速,培养4 d。取所获得的发酵液,离心转速5 000 r/min、时间10 min,上清液即为粗酶液。以滤纸为底物测定各个菌株的酶活(FPase)。

1.2.4 菌株 J1-3-1的16S rRNA序列分析 在菌株J1-3-1划线活化后R2A平板上挑取单菌落,选择细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTCAGACTT-3')进行PCR,由武汉擎科创新生物技术有限公司进行序列测定。将测序结果通过BLAST程序与GenBank中的16S rRNA基因序列进行同源性对比。

1.2.5 发酵产酶条件优化

1.2.5.1 氮源添加量 取100 mL无氮培养基置于250 mL三角瓶中,并分别添加0.0%、0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%牛肉膏。

1.2.5.2 初始pH值 在此前试验的基础上,取100

mL 培养基置于 250 mL 三角瓶中, 用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调节培养基的 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5。

1.2.5.3 吐温-80 添加量 在此前试验的基础上, 取 100 mL 培养基置于 250 mL 三角瓶中, 分别添加 0.0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 和 1.2% (V/V) Tween-80。

1.2.5.4 接种量 在此前试验的基础上, 取适量培养基置于 250 mL 三角瓶中。然后分别加 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 和 10% (V/V) 菌液 ($OD_{600}=0.6$)。

1.2.5.5 正交试验 对氮源添加量、初始 pH、Tween-80 添加量、接种量进行 4 因素 3 水平正交试验, 确定菌株的最佳发酵产酶条件, 如表 1 所示。

表 1 正交试验的因素和水平

	氮源添加量 (%) (A)	Tween-80 添加量 (%) (B)	初始 pH (C)	接种量 (%) (D)
1	0.6	0.4	5.5	5
2	0.9	0.6	6.5	6
3	1.2	0.8	7.5	7

1.2.6 酶活性测定方法

1.2.6.1 滤纸酶活 (FPase) 取粗酶液 1.0 mL 于比色管中, 再放入 10 mm × 60 mm 滤纸条并加入 1.0 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0、50 mmol/L), 50℃水浴保温, 准确计时 60 min 后取出^[11-13]。

1.2.6.2 内切葡聚糖酶 (CMCase) 取粗酶液 1.0 mL 于比色管中, 再加入 1.0 mL 1% 的 CMC-Na 溶液 (pH4.8), 50℃水浴保温, 准确计时 60 min 后取出, 迅速冷却至室温^[12, 13]。

1.2.6.3 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 取粗酶液 1.0 mL 于比色管中, 再加入 1.0 mL 0.5% 水杨苷溶液 (pH4.8), 50℃水浴保温, 准确计时 60 min 后取出, 迅速冷却至室温^[14, 15]。

酶促反应完成之后, 加入 2 mL DNS 试剂, 沸水浴 5 min 之后取出, 迅速冷却至室温。在 540 nm 波长处测定吸光度 OD 值, 对照葡萄糖标准曲线计算葡萄糖当量。以高温灭活的粗酶液为对照组。酶活性定义: 酶促反应每进行 1.0 h 产生 1.0 μ mol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U/mL)。

2 结果

2.1 分离纯化

根据菌落的大小、形状、光泽、颜色、硬度、透明度等特征, 经过 2 次分离、纯化, 从富集培养基 R2A 上挑选得到 180 个菌株。

2.2 初筛

将上述 180 个菌株点种于纤维素琼脂培养基, 培养完成之后, 用革兰氏碘液染色, 筛选具有色圈(图 1)的菌株, 即具有纤维素酶活性的菌株 44 株。

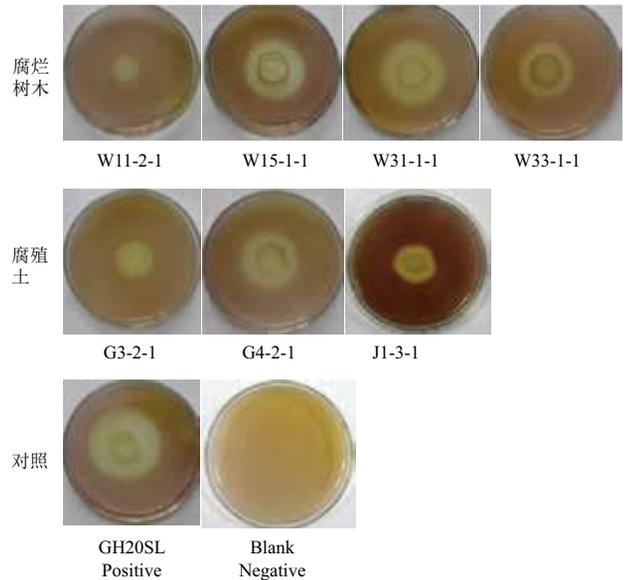


图 1 革兰氏碘液染色结果 (部分)

2.3 复筛

初筛得到 44 个纤维素酶产生菌株, 对此 44 个菌株进行产酶发酵, 发酵期结束后, 提取粗酶液, 以滤纸为底物测定各个菌株的酶活 (FPase)。复筛结果显示菌株 J1-3-1 滤纸酶活性最大 3.56 U/mL, 即其总酶活力最强, 选作后续试验菌种。

2.4 菌株 J1-3-1 的 16S rRNA 序列分析结果

鉴定菌株 J1-3-1 种属, 将其 16S rRNA 基因测序结果进行 BLAST 分析, 对比查找近似序列。从 GenBank 核酸数据库中选取部分相似 16S rRNA 序列, 采用 Clustalx1.83 软件进行多序列比对, 通过 Clustal W 算法在 MAGE6.05 软件中采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树 (图 2), bootstrap 值设定为 1 000。由此鉴定 J1-3-1 为鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium* sp.)。

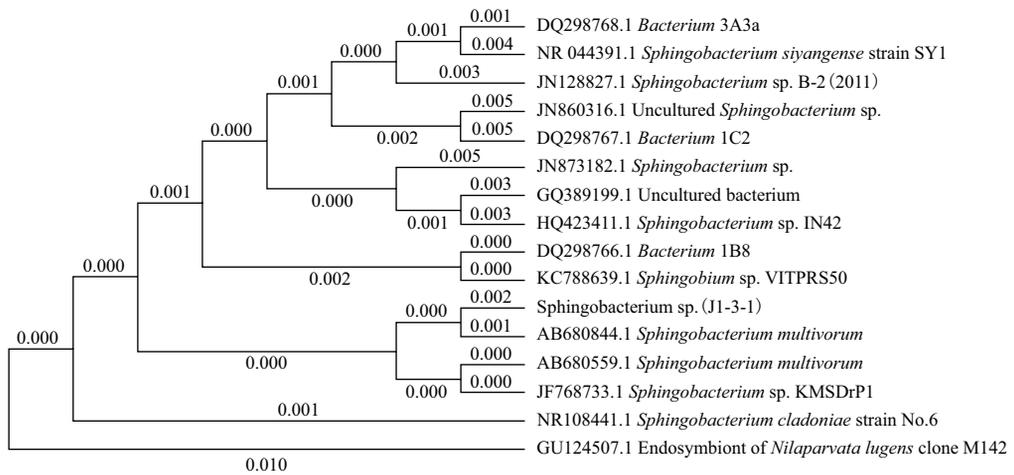


图 2 基于 16S rDNA 基因序列构建菌株 J1-3-1 的系统发育树

2.5 发酵产酶条件优化

2.5.1 氮源添加量 氮源添加量在 0.0% 到 0.9% 时 FPase、CMCase、β-葡萄糖苷酶活性是呈增长的趋势，之后 FPase、CMCase 酶活有所下降，而 β-葡萄糖苷酶活性则基本持平。

2.5.2 初始 pH 初始 pH 值在 5.0–7.0 范围 FPase、CMCase、β-葡萄糖苷酶活性是呈上升趋势的，FPase、β-葡萄糖苷酶活性均在初始 pH 为 6.5 时达到最大值 9.41 U/mL、7.57 U/mL，而 CMCase 则在初始 pH 为 7.0 时达到最大值 15.08 U/mL。初始 pH 值超过 7.0 后，3 种酶活性呈下降趋势。

2.5.3 Tween-80 添加量 Tween-80 添加量在 0.0%–0.8% 范围内纤维素酶活性处于上升趋势，在 0.8% 时 FPase、CMCase、β-葡萄糖苷酶活性达到最大值 3.83、12.31 和 3.95 U/mL，而后则有下降。一定浓度的 Tween-80 可以促进微生物生长，但浓度高于 0.6% 时不利于菌株生物量的积累。

2.5.4 接种量 接种量在 1.0%–6.0% 范围内基本处于上升趋势，在 6.0% 时 FPase、CMCase、β-葡萄糖苷酶活性达到最大值 5.77、11.54 和 5.48 U/mL，而后略有下降。

2.5.5 正交试验 选择氮源添加量、初始 pH 值、Tween-80 添加量和接种量这 4 个因素，参照、分析单因素试验的结果，每个因素设置 3 个水平来进行正交试验，共计 9 组试验，结果如表 2 所示。

表 2 正交试验及结果

试验号	A	B	C	D	FPase (U/mL)	CMCase (U/mL)	β-葡萄糖苷酶 (U/mL)
1	1	1	1	1	6.85	18.15	5.86
2	1	2	2	2	8.76	23.47	5.66
3	1	3	3	3	7.89	26.62	6.56
4	2	1	2	3	6.65	18.21	4.29
5	2	2	3	1	7.51	25.58	5.38
6	2	3	1	2	7.63	25.84	5.96
7	3	1	3	2	6.65	18.63	6.26
8	3	2	1	3	8.27	20.77	5.00
9	3	3	2	1	7.63	20.72	4.68

对试验结果进行极差分析，FPase、CMCase 及 β-葡萄糖苷酶活性极差分析分别见表 3、表 4 及表 5。

表 3 FPase 极差分析结果

	A	B	C	D
k1	7.83	6.72	7.58	7.33
k2	7.26	8.18	7.67	7.68
k3	7.56	7.71	7.35	7.60
极差 R	0.58	1.46	0.33	0.35
优方案	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂

表 4 CMCase 极差分析结果

	A	B	C	D
k1	22.41	18.33	21.25	21.15
k2	19.87	23.27	20.80	23.04
k3	20.37	24.39	23.61	21.87
极差 R	2.54	6.06	2.81	1.89
优方案	A ₁	B ₃	C ₃	D ₂

表5 β -葡萄糖苷酶活性极差分析结果

	A	B	C	D
k1	6.03	5.47	5.61	5.31
k2	5.21	5.35	4.87	5.96
k3	5.31	5.73	6.07	5.28
极差 R	0.82	0.38	1.19	0.67
优方案	A ₁	B ₃	C ₃	D ₂

由极差分析结果可知,对FPase影响最大的因素是Tween-80添加量,最优组合是A₁B₂C₂D₂,此组合存在于正交表中;对CMCase影响最大的因素是Tween-80添加量,最优组合是A₁B₃C₃D₂;对 β -葡萄糖苷酶活性影响最大的因素是初始pH,最优组合是A₁B₃C₃D₂。组合A₁B₃C₃D₂并未在正交表中出现,需要将此组合与正交表中CMCase和 β -葡萄糖苷酶活性最大的组合比较,如表6。

组合A₁B₃C₃D₂发酵结果略优于通过正交设计得到最优组合A₁B₃C₃D₃,由此可以将组合A₁B₃C₃D₂定位CMCase和 β -葡萄糖苷酶的最优组合。对于FPase,最优发酵条件则为A₁B₂C₂D₂:牛肉膏添加量0.6%、Tween-80添加量0.6%、初始pH值6.5、接种量6%;对于CMCase和 β -葡萄糖苷酶,最优发酵条件则为A₁B₃C₃D₂:肉膏添加量0.6%、Tween-80添加量0.8%、初始pH值7.5、接种量6%。

表6 组合A₁B₃C₃D₃和A₁B₃C₃D₂的结果比较

组合	CMCase (U/mL)	β -葡萄糖苷酶 (U/mL)
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	26.62	6.86
A ₁ B ₃ C ₃ D ₂	28.04	7.02

3 讨论

3.1 目的菌株筛选

滤纸是纯纤维素材料,其聚合度和结晶度都比较适中,降解滤纸的滤纸酶(FPase)活性所代表的是纤维素酶的总活力,体现的是纤维素酶系内的协同能力。本实验筛选到的滤纸酶活性最大的菌株为J1-3-1(3.56 U/mL),对其进行16S rRNA基因序列分析,结果表明:菌株J1-3-1与*Sphingobacterium multivorum*(AB6808044.1)亲缘关系最近,二者遗传距离仅为0.001,相似性达到99%,有文献证明相似性超过97%,即可认定为属内同种^[16, 17]。因此

鉴定菌株J1-3-1为多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)。多食鞘氨醇杆菌是对石油有高效降解活性的细菌^[18, 19],并且还有转化井冈霉素为井冈霉素、合成岩藻多糖降解酶和琼胶酶、降解甾体雌激素等多种性能^[20, 21],但是尚未发现该菌种具有降解纤维素功能的报道,而本研究首次揭示此菌株具有纤维素酶合成能力。

Maki等^[11]从纸浆污泥等样品中筛选获类芽孢杆菌属*Paenibacillus* E2和*Paenibacillus* E4,适当条件下培养48h,50℃、pH7.0(缓冲液50 mmol/L Tris-HCl)、保温2h后,滤纸酶活性用葡萄糖当量表征可分别达(101.45 ± 33.2)U/mL和(130.45 ± 78.5)U/mL;包衍等^[15]从水质净化厂的活性淤泥、环保公司堆肥等样品中筛选出纤维素分解菌,滤纸酶活性为1.53 U/mL;Ariffin等^[22]从油棕榈果壳堆肥中筛选获得短小芽孢杆菌*Bacillus pumilus* EB3,适当条件下培养24h,40℃、pH4.8(50mmol/L柠檬酸缓冲液)保温1h,滤纸酶活性为0.66 U/mL。与上述已报道的各类菌株相比,菌株J1-3-1产酶能力并不突出,需要对菌株发酵培养条件进行优化,以提高菌株的产酶能力。但菌株J1-3-1所产纤维素酶是中性酶,中性纤维素酶在纺织、食品、制药和造纸等领域有良好的应用前景,尤其是在纺织领域。相比于酸性纤维素酶,中性纤维素酶有适应pH、温度值范围广和稳定性好等优点,菌株J1-3-1具有深入研究的价值。

3.2 产酶条件优化

发酵是一种非常复杂的生化反应过程,其生产工艺受诸多因素的影响,如培养基组成、原料的品质、菌种菌量、操作条件等。任何发酵工艺的确定,都需要对发酵阶段进行深入研究,考察菌种的代谢规律,对发酵工艺条件进行优化。

培养基的碳氮比、pH值、表面活性剂以及菌种接种量直接影响了发酵效率和微生物的产酶能力。培养基的pH值,可以引起细胞膜表面电荷变化从而影响微生物对营养物质的吸收,还可以影响代谢过程中酶的活性。表面活性剂可以提高内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶的酶活性,并且可以加强复合酶系中各种酶的协同作用,如添加

适当浓度的鼠李糖脂、皂荚皂素、Tween-80 等表面活性剂均可以提高纤维素酶酶活。Tween-80 作为表面活性剂可以提高细胞膜的通透性，一方面利于细胞对营养物质的吸收，支持微生物的生长；另一方面减少酶在细胞膜上的附着，加强胞外酶的分泌，试验结果也充分证明了这一点。接种量的大小影响生产菌株在发酵体系内的生长、代谢、繁殖的速度。选定较大接种量可以缩短发酵体系内菌体密度达到高峰的时间，利于产物的形成及发酵基质的利用，并减小被杂菌污染的几率。接种量过大则会导致发酵体系溶氧不足，不利于产物合成，菌体易衰老；接种量过小会延长发酵周期，影响产率。

正交试验是高效、快捷、经济的试验方法，从全面实验中挑选出具有代表性的试验，可以综合考虑各因素对试验的影响，突出反映菌株的代谢规律以及影响产物合成的因素。优化之后 FPase、CMCase、 β -葡萄糖苷酶酶活分别为 8.76、28.04 和 7.02 U/mL，是优化之前的 1.31 倍、3.52 倍、1.97 倍。通过发酵条件的优化可以确立发酵产酶的最佳条件，从而大幅提升菌株的产酶效率，为发酵罐发酵提供依据。

4 结论

通过微生物富集、分离、纯化，并采用革兰氏碘液染色法进行定性初筛，及滤纸酶活性测定法进行定量复筛，获得产酶性能较好的菌株 J1-3-1。对 J1-3-1 菌株的 16S rRNA 的序列测定分析，将其鉴定为鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium* sp.)。进行产酶发酵条件优化，分别确立了菌株 J1-3-1 产生最高滤纸酶活性、内切葡聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性的发酵条件。对于 FPase，最优发酵条件为：氮源添加量 0.6%、Tween-80 添加量 0.6%、初始 pH 值 6.5、接种量 6%；对于 CMCase 和 β -葡萄糖苷酶，最优发酵条件为：氮源添加量 0.6%、Tween-80 添加量 0.8%、初始 pH 值 7.5、接种量 6%。在最优发酵产酶条件下，菌株 J1-3-1 的滤纸酶、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的最高酶活性分别为 8.76、28.04 和 7.02 U/mL。

参考文献

[1] Agarwal AK. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as

fuels for internal combustion engines [J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2007, 33 : 233-271.

- [2] Escobar JC, Lora ES, Venturini OJ, et al. Biofuels : environment, technology and food security [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009, 13 : 1275-1287.
- [3] Singh A, Pant D, Korres NE, et al. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass : challenges and perspectives [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (13) : 5003-5012.
- [4] Prasad S, Singh A, Jain N, et al. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India [J]. *Energy & Fuel*, 2007, 21 (4) : 2415-2420.
- [5] Singh A, Smyth BM, Murphy JD. A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14(1) : 277-288.
- [6] Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues [J]. *Resource, Conservation and Recycling*, 2007, 50 : 1-39.
- [7] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, et al. Enzymes for biofuels production biomass recalcitrance : Engineering plants and enzymes for biofuels production [J]. *Science*, 2007, 315 (5813) : 804-807.
- [8] Ding SY, Xu Q, Crowley M, et al. A biophysical perspective on the cellulosome : new opportunities for biomass conversion [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19 (3) : 218-227.
- [9] Maki M, Leung KT, Qin WS. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5 (5) : 500-516.
- [10] 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]. *Current Microbiology*, 2008, 57 : 503-507.
- [11] Maki ML, Broere M, Leung KT, et al. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers [J]. *International Journal of Biochemistry Molecular Biology*, 2011, 2 : 146-154.
- [12] Zhang YHP, Hong J, Ye XH. Cellulase assays [J]. *Biofuels : Methods in Molecular Biology*, 2009, 581 : 213-231.
- [13] Ghose TK. Measurement of cellulase activities [J]. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59 (2) : 257-268.

- [14] 武峥, 张迎君, 周心智. 降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选及产酶条件研究 [J]. 纤维素科学与技术, 2009, 17 (2): 20-26.
- [15] 包衍, 王晓辉, 张伟琼, 等. 纤维素分解菌的选育和酶活测定 [J]. 生物学杂志, 2007, 24 (2): 56-58.
- [16] Vandamme P, Pot B, Gills M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics [J]. Microbiology Review, 1996, 60 (2): 407-438.
- [17] Wei GF, Pan L, Du HM, et al. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts [J]. Journal of Microbial Methods, 2004, 59 (1): 91-108.
- [18] 高永超, 王加宁, 孔学, 等. 石油降解菌多食鞘氨醇杆菌的发酵条件优化 [J]. 生物技术, 2009, 19 (1): 74-77.
- [19] Yu Y, Zhang W, Chen GH, et al. Preparation of petroleum-degrading bacterial agent and its application in remediation of contaminated soil in Shengli Oil Field, China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21 : 7929-7937.
- [20] 董至恒, 孙东阳, 高焕, 等. 一株转化井冈霉素产生井冈霉胺细菌的筛选与鉴定 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34 (2): 79-82.
- [21] 王飞, 张丽. 超声波破碎法提取多食鞘氨醇杆菌中 17 β - 雌二醇降解酶的优化及酶学性质 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (4): 310-313.
- [22] Ariffin H, Abdullah N, Kalsom MS, et al. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3 [J]. International Journal of Engineering and Technology, 2006, 3 (1): 47-53.

(责任编辑 马鑫)