

纤维素酶产生菌的筛选及功能菌NF-101的全基因分析与产酶工艺优化

张智^{1*}, 王蒙爱¹, 冯丽荣², 郑莹¹, 盛新和¹, 章圣龙², 蒋士龙³, 解庆刚³

(1. 东北林业大学林学院黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)(2. 黑龙江国宏节能环保有限公司, 黑龙江哈尔滨 150040)(3. 黑龙江飞鹤乳业有限公司, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:我国北方地区是主要的农作物产区, 以种植秸秆为主。为了合理利用农作物的自然资源, 并寻找高效纤维素降解菌, 该研究从东北三省 20 个地点采集 100 件样品。经初筛分离得到可分解纤维素的菌种 2 052 株, 初步鉴定为细菌 1 207 株、霉菌 598 株、及放线菌 195 株, 保存至 -80 °C 超低温冰箱, 以作为建立降解纤维素酶功能菌库储备菌种。经复筛得到 16 株产纤维素酶能力较高的功能菌, 经 16S rDNA 及生理生化鉴定, 为粘质沙雷氏菌、地衣芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌等, 其中产酶能力最强的为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) NF-101。经单因素及响应面优化, NF-101 最佳产酶培养基为羧甲基纤维素钠 0.75 wt.%, 蛋白胨 0.6 wt.%, 磷酸二氢钾 0.2 wt.%, 硫酸镁 0.05 wt.%。最佳工艺条件为接种量 4%, 初始 pH 值 7.0, 温度 37 °C, 培养时间 72 h, 优化后滤纸酶活达到 181.22 U/mL, 与优化前相比提高了约 3.63 倍。对 NF-101 进行全基因分析, 证明该菌为高效降解纤维素酶优势菌株, 并为纤维素酶降解实验提供优势菌株及实验依据。

关键词: 菌种选育; 纤维素酶; 产酶条件优化; 全基因分析

文章编号: 1673-9078(2024)11-107-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1151

Screening of Cellulase-producing Bacteria, Whole-gene Analysis, and Optimization of the Enzyme Production Process for the Functional Bacterium NF-101

ZHANG Zhi^{1*}, WANG Mengai¹, FENG Lirong², ZHENG Ying¹, SHENG Xinhe¹, ZHANG Shenglong²,
JIANG Shilong³, XIE Qinggang³

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China) (2. Heilongjiang Guohong Energy Conservation and Environmental Protection Co. Ltd., Harbin 150040, China) (3. Heilongjiang Feihe Dairy Co. Ltd., Harbin 150040, China)

Abstract: Northern China is a major agricultural region, primarily producing cereal crops, which are associated with large amounts of residual straw. To efficiently utilize this natural agricultural resource and identify efficient cellulose-degrading bacteria, 100 samples were collected from 20 sites in three northeastern provinces. After preliminary

引文格式:

张智,王蒙爱,冯丽荣,等.纤维素酶产生菌的筛选及功能菌NF-101的全基因分析与产酶工艺优化[J].现代食品科技, 2024,40(11):107-118.

ZHANG Zhi, WANG Mengai, FENG Lirong, et al. Screening of cellulase-producing bacteria, whole-gene analysis, and optimization of the enzyme production process for the functional bacterium NF-101 [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 107-118.

收稿日期: 2023-09-23

基金项目: 黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目(2021ZXJ03B01); 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2020ZX07B01-3-2)

作者简介: 张智(1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品发酵、植物生物转化、功能食品、E-mail: Ldzhangzhi@163.com

screening, 2 052 strains capable of decomposing cellulose were isolated, which were provisionally identified as 1 207 strains of bacteria, 598 strains of mold, and 195 strains of actinomycetes. These strains were stored in an ultra-low temperature freezer at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent establishment of a functional cellulase-degrading strain library. After re-screening, 16 functional bacteria with high cellulase production ability were obtained, which were identified based on 16S rDNA analysis and physiological and biochemical identification as *Serratia marcescens*, *Bacillus licheniformis*, and halotolerant *Bacillus*, among which *B. licheniformis* NF-101 was found to be characterized by the most efficient enzyme production. Following single-factor and response surface optimization, the optimal enzyme-producing medium for cultivating NF-101 was identified as a medium comprising sodium carboxymethylcellulose 0.75 wt.%, peptone 0.6 wt.%, potassium dihydrogen phosphate 0.2 wt.%, and magnesium sulfate 0.05 wt.%. The optimal process conditions were a 4% inoculation amount, initial pH of 7.0, temperature of $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, and incubation time of 72 h. Optimized filter enzyme activity reached 181.22 U/mL, which represented an approximate 3.63-fold increase compared with that prior to optimization. Whole-gene analysis of NF-101 proved that it was a dominant strain for efficient cellulase-mediated degradation. It also provided information on a dominant strain and an experimental basis for cellulase degradation experiments.

Key words: strain selection; cellulase; optimization of enzyme-producing conditions; whole-gene analysis

纤维素酶以及纤维素酶降解微生物一直是社会研究的热点。纤维素酶的应用十分广泛。在工业中,可用于食品、纺织、饲料、中药成分提取等众多领域,特别是在纺织、洗涤和造纸等工业应用上有重要位置^[1]。在工业生产中,纤维素也起到了非常重要的作用,由于纤维素具有较好的柔韧性与粘性,因此在建筑工业与新型材料工业生产中常常被用来制成砂浆建材、粘联剂、填缝剂、水性涂料等^[2-4]。对于纤维素酶降解菌的探索和功能菌的筛选,国内外大量学者从未停止对其的探索和发掘。

纤维素酶的来源非常广泛,细菌、真菌、放线菌、植物及一些动物体内等都能产生纤维素酶^[5]。国内外众多学者已经从各种环境种取样并筛选分离出二百多种能够降解纤维素的细菌、真菌以及放线菌^[6],为本研究提供了大量的依据。其中以细菌为例,细菌产生的有机酸类物质可促进纤维素的降解^[7]。进一步可以将细菌分为好氧细菌与厌氧细菌,好氧菌如噬纤维菌 *Cytophaga*^[8]、假单胞菌 *Pseudomonas*^[9]、热酸菌 *Acidothermus*^[10]和芽孢杆菌 *Bacillus*^[11]等。厌氧菌有梭菌 *Clostridium*^[12]、热解纤维素菌 *Caldicellulosiruptor*和假单胞菌属 *Pseudomonas*^[13]等是细菌中主要降解纤维素的菌株。产生纤维素酶的细菌有纤维粘菌 (*Cytophaga*)和纤维杆菌 (*Cellulomonas*)等,它们附着在纤维素表面呈锯齿蚀痕。真菌有黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、根霉属 (*Rhizopus*)等^[14]。国内外对高产纤维素酶的微生物开展了大量的研究工作,左勇等^[15]以羧甲基纤维素钠为培养基的唯一碳源,从酒糟中分离纯化出一株具有产纤维素酶能力的维氏芽孢杆菌 P-7;

傅科鹤等^[16]从土壤中分离纯化获得一株高产纤维素酶的菌株 TW063-3;何深宏等^[17]从牛粪堆肥样品中分离得到的 57 株菌株中筛选出 10 株有较高纤维素酶活力;王靖等^[18]从快速腐烂的苕麻基质中筛选到 1 株产纤维素酶活力较高的菌株 F1-1。本文利用传统微生物学方法从自然界筛选出一株性能稳定、高产纤维素酶的纤维素降解菌,并对其产酶条件进行优化,将这株功能菌进行编号并放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行保存,旨在为其实际应用提供一定的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料主要来自哈尔滨、齐齐哈尔、伊春、沈阳、内蒙古以及山东烟台等地的牛粪、牦牛粪、马粪、羊粪、林场腐植土、发酵秸秆和青黄贮饲料等共计 100 份。其中牛粪 42 份(约 500 g)、羊粪 36 份(约 550 g)、青贮饲料 34 份(约 300 g)、腐殖质土壤 15 份(约 1 000 g)、沼液沼渣 15 份(约 1 L)及朽木 10 份(约 200 g)。

1.2 培养基

富集培养基: CMC-Na 10.0 g, 酵母粉 10.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 10.0 g, H_2O 1 000 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

刚果红鉴别培养基^[19]: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, MgSO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, NaCl 0.5 g, CMC-Na 20 g, 刚果红 0.4 g, 琼脂 22 g, H_2O 1 000 mL, pH 自然, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

滤纸条液体培养基^[20]: KH_2PO_4 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, NH_4NO_3 1 g, 蛋白胨 1, NaCl 0.1 g, $1\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ 的

滤纸条, H₂O 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

斜面培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, H₂O 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基: 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 10 g, 酵母粉 5 g, 葡萄糖 5 g, NaCl 5 g, H₂O 1 000 mL, pH 值 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

优化功能菌培养基^[21]: 蛋白胨 3 g, 酵母浸粉 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 4 g, NaCl 0.3 g, MgSO₄ 0.3 g, CMC-Na 20 g, H₂O 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 试验仪器

JA2003 分析天平, 上海良平仪器仪表有限公司; BS124S 电子天平, 沈阳龙腾电子仪器厂; DHG-9240 电子鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; SJ-3F pH 计, 上海圣科仪器设备有限公司; TGL-16G 台式离心机, 上海科房仪器设备有限公司; DK-98- II A 电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; DK-98- II A 酶标仪, 深圳雷杜生命科学有限公司; KQ-300DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UV-5500PC 722 可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 纤维素酶降解菌选育和试验方法

将 10 g 样品放入装有 90 mL 蒸馏水的锥形瓶中, 经震荡取上层液体即为菌悬液^[22]。以 5% 接种量接入富集培养基中, 在 37 °C、160 r/min 摇床中兼性厌氧条件培养 36 h。

按照本研究前期试验采取的初步筛选方法^[23]: 将富集培养的菌液梯度稀释, 每个梯度设 3 个平行, 采用刚果红鉴别培养基, 37 °C 兼性厌氧培养 72 h, 观察透明圈的显色情况。通过测量, 筛选出透明圈直径 (D, cm) 与菌落直径 (d, cm) 的比值 (D/d) 较高的菌株, 经纯化取单菌落进行复筛和保存。

将初筛菌株进行纯化, 然后以 5% 的接种量将种子液转接到滤纸条液体培养基中, 塑料薄膜盖封瓶口, 培养条件同上^[24]。培养结束后, 将菌悬液在 5 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液进行酶活测定。

葡萄糖标准曲线的绘制: 在比色皿中倒入不同梯度的葡萄糖标准液, 每个梯度 3 个平行并补充到 2.0 mL。向其中加入 2 mL DNS 试剂, 置于 100 °C 水浴锅中反应 5 min。反应结束后立即用冷水将其冷却至室温并定容至 15 mL, 在 540 nm 条件下测

定 OD 值。根据测量值进行葡萄糖标准曲线的绘制, 并拟合回归方程^[25]。

在 4 支具塞试管中分别放入 0.5 mL 粗酶液、50 mg 滤纸条和 1.5 mL 柠檬酸缓冲液。另取 1 支具塞试管作为对照, 并加入 1.5 mL DNS 试剂。在 50 °C 水浴锅中反应 1 h, 结束后立即加入 2.0 mL DNS 试剂, 再次置于 100 °C 水浴锅中 5 min, 取出待冷却后定容至 15 mL, 在 540 nm 处测吸光度^[26], 公式如下:

$$D = \frac{G \times V \times 5.56}{A \times B \times t} \quad (1)$$

式中:

D—吸光度;

G—葡萄糖含量, mg;

V—定容体积, mL;

5.56—为 1 mg 葡萄糖底物物质的量, μmol;

A—加酶量, mL;

B—底物质量, mg;

t—反应时间, h。

以葡萄糖的含量为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并拟合回归方程 $y=0.9237x+0.0211$ 。其中拟合系数 $R^2=0.9991 > 0.99$ 。

1.4.2 形态学鉴定及生理生化分析

可以参考《常见细菌系统鉴定手册》观察单菌落颜色、质地和形态等^[27]。

利用 16S rDNA 对提取菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增^[28]。由上海生物工程股份有限公司对纯化后 PCR 产物进行测序, 在 NCBI 网站上进行 BLAST 序列分析, 利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.4.3 菌株基因序列的测定和分析

试验对 NF-101 进行全基因组测序分析, 试验结果包括 COG、GO、KEGG 注释等生物信息学分析。

1.4.4 优化菌株产酶培养基

1.4.4.1 单因素优化

为了进一步提高菌株的酶活性, 根据单因素分析改变碳源 (羧甲基纤维素钠: 质量分数为 0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%), 氮源 (蛋白胨: 质量分数为 0.4%、0.6%、0.8%、1%、1.2%), 磷酸二氢钾 (质量分数为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%), 硫酸镁 (质量分数为 0.01%、0.03%、0.05%、0.07%、0.09%) 4 个单因素对菌株产纤维素酶的影响。进行单因素试验。

1.4.4.2 正交试验

在单因素优化的基础上，分别选取羧甲基纤维素钠、蛋白胨，磷酸二氢钾及硫酸镁含量为考察因素设计正交试验，采取 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，优化菌株发酵产酶培养基。正交试验因素与水平见表 1。

表 1 菌株发酵产酶培养基优化正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments for optimization of fermentation enzyme production medium of strains

水平	羧甲基纤维素钠/g	蛋白胨/g	磷酸二氢钾/g	硫酸镁/g
1	0.50	0.4	0.1	0.03
2	0.75	0.6	0.2	0.05
3	1.00	0.8	0.3	0.07

1.4.5 优化菌株产酶条件

在单因素试验结果的初步分析基础上，进行菌株产酶条件的优化，进行响应面及等高线结果分析。通过改变培养温度（28、30、37、40、45 °C）、pH 值（5.5、6、6.5、7、7.5）、接种量（2%、3%、4%、5%、6%）以及发酵时间（18、24、30、36、72 h）四个条件进行分析。采用 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计试验并将试验数据采用 DesignExpert 8.0.6 进行多元回归拟合分析，采用 Origin 8.5 软件作图，显著性分析采用 SPSS 19.0 软件完成。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

经过初筛共得到 2 052 株菌落周围具有透明圈、具有降解纤维素特性的菌株。初步鉴别分别为细菌、真菌、放线菌三类微生物，其中细菌 1 797 株、真菌 211 株、及放线菌 44 株，各占比例如图 1。

将透明圈明显的优势菌株进行拍照记录（见图 2）。选出 D/d 值较大的前 200 株作为复筛出发株（见图 3）。

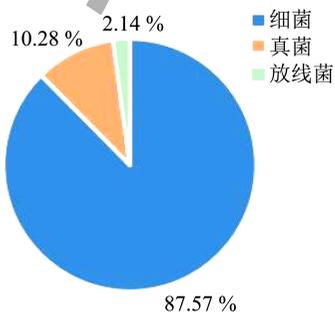


图 1 微生物数量分布图

Fig.1 Distribution of microbial population

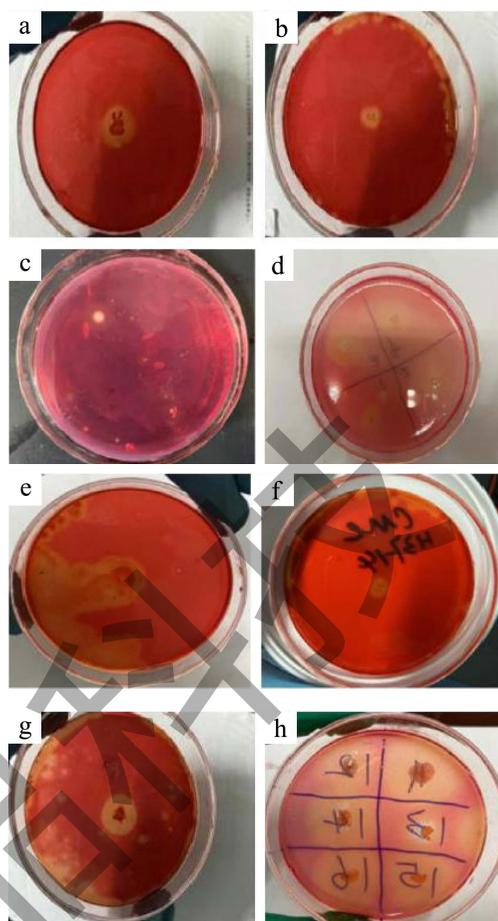


图 2 16 株纤维素降解菌透明圈图片

Fig.2 Pictures of 16 cellulose-degrading bacteria transparent circles

注：a 为 NF-101，b 为 NF-31，c 为 ZY-164，d 为 QZSL-144~147，e 为 JG-192，f 为 NF-14，g 为 QZSL-126，h 为 NF-46~51。

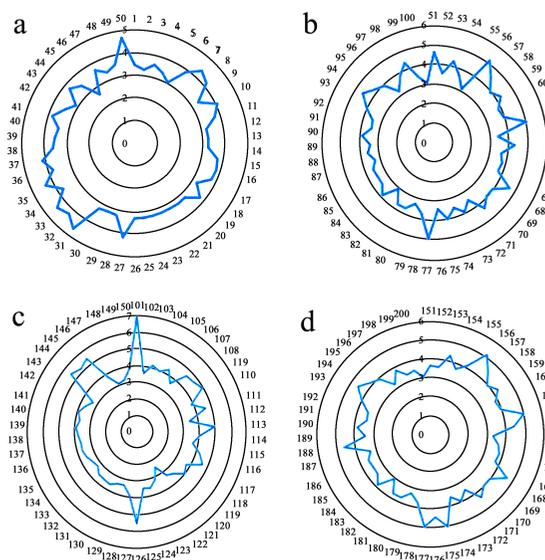


图 3 菌落直径对照图

Fig.3 Colony diameter control chart

2.2 复筛结果

比较以上 2 052 株菌株的透明圈 D/d 直径比值, 选取比值较大的前 200 株菌株, 对其进行滤纸酶活摇瓶复筛。结果如图 4 所示。

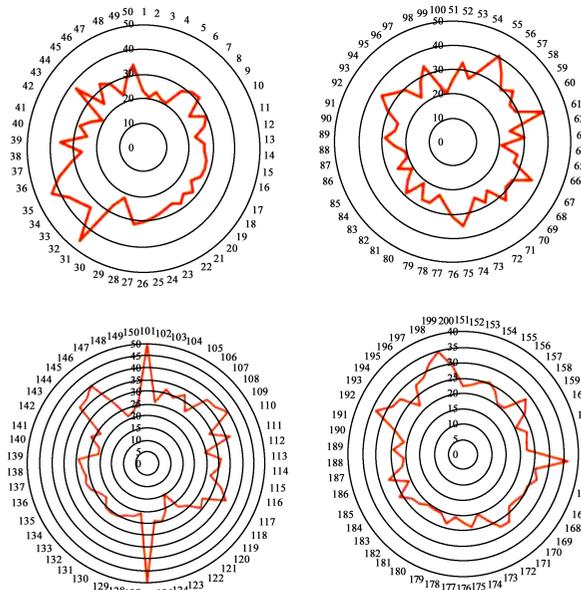


图 4 NF1-NF200 滤纸酶活

Fig.4 Enzy meactivity of NF1-NF200 filter paper

产纤维素酶活较高的前 16 株菌经分子生物学 16S rDNA 鉴定, 如表 2。

表 2 16株优势功能菌

Table 2 Sixteen strains of dominant functional bacteria

序列	菌号	属	酶活 (U/mL)	培养 温度/℃
1	NF-101	<i>Bacillus</i>	49.92	37
2	QZSL-126	<i>Salmonella</i>	49.52	55
3	NF-31	<i>Pseudomonas</i>	46.19	37
4	TR-35	<i>Pseudomonas</i>	43.29	37
5	NF-55	<i>Corynebacteriaceae</i>	40.57	37
6	NF-61	<i>Actinomyces</i>	40.36	37
7	QZSL-109	<i>Fusus</i>	39.98	37
8	QZSL-146	<i>Brachybacterium</i>	39.98	55
9	NF-44	<i>Amphibacillus Nijmura</i>	37.25	55
10	QZSL-108	<i>Pseudomonas</i>	36.87	37
11	NF-67	<i>Bacillus</i>	36.79	37
12	ZYL-107	<i>Bacillus</i>	36.50	37
13	QZSL-117	<i>Pseudomonas</i>	36.29	37
14	ZY-111	<i>Actinomyces</i>	36.50	37
15	TR-93	<i>Salmonella</i>	35.62	37
16	NF-39	<i>Klebsiella Trevisan</i>	35.66	55

经反复验证, 以上 16 株菌分别以 3% 的接种量接种到液体发酵产酶培养基中, 保鲜膜和纱布盖封瓶口, 培养温度 37 ℃、160 r/min 下培养 48 h, 提取获得粗酶液, 测定其滤纸酶活, 测量结果如表 2, 获得 16 种菌酶活性相对较高, 其中菌株 NF-101 的纤维素粗酶酶活力高于其他菌株, 滤纸酶活达到 49.92 U/mL, 即为筛选出的纤维素降解菌, 将筛选获得菌株进行分离纯化后接种到菌种保藏培养基中, 在 -4 ℃ 保存用于后续试验。

2.3 NF-101形态学鉴定

2.3.1 NF-101形态学观察

如图 5 所示, NF-101 在培养基上呈乳白色, 其特征为菌落不规则圆形, 扩展, 凸起, 表面皱褶, 边缘波形。



图 5 NF-101 菌落形态

Fig.5 Colony morphology of NF-101

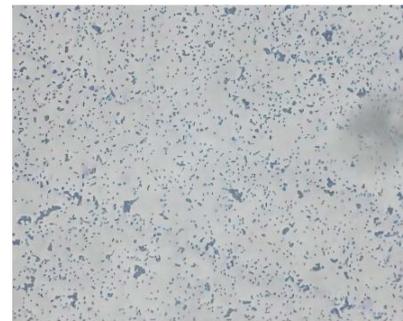


图 6 NF-101 显微镜下形态

Fig.6 Morphology of NF-101 under microscopy

2.3.2 NF-101菌株生理生化特征

进一步对 NF-101 进行生理生化特征测定, 实验结果如表 3 所示。初步判定得出该菌株为地衣芽孢杆菌或其变种。

2.3.3 NF-101 16S rDNA序列分析鉴定

如图 7 所示, 扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1.0% 琼脂糖凝胶, 1xTAE, 150 V, 100 mA, 20 min 条件下电泳观察。凝胶成像系统中观察电泳结果^[23]如下。点样顺序: NF-101, Marker。

表 3 菌株NF-101生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain NF-101

测试指标	结果	测试指标	结果
革兰氏染色试验	+	羧甲基纤维素钠试验	+
芽孢染色试验	+	葡萄糖试验	+
硫化氢试验	+	蔗糖试验	+
接触酶试验	+	果糖试验	+
甲基红试验	-	半乳糖试验	+
V-P 试验	+	麦芽糖试验	+
脲酶试验	-	吲哚试验	+
甘露糖	+	山梨糖	+
甘露醇	+	山梨醇	+
淀粉试验	+		

注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应。

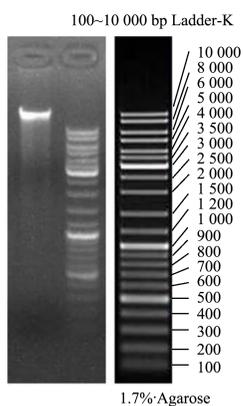


图 7 PCR 电泳结果

Fig.7 Results of PCR electro phoresis

结果表明，菌株 NF-101 与 *Bacillus licheniformis* 亲缘关系最近，同源性高达 99% 以上。如图 8 所示，根据上述结果鉴定该菌株为芽孢杆菌属 (*Bacillus cohn*)，推测为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)，将菌株命名为 *Bacillus licheniformis* NF-101。

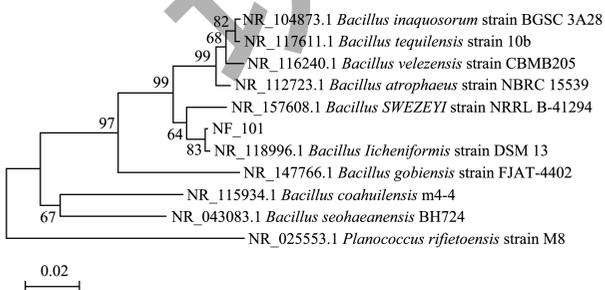


图 8 NF-101 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree constructed by NF-101 16S rDNA sequence

2.4 优化NF-101产酶培养基

2.4.1 单因素实验结果

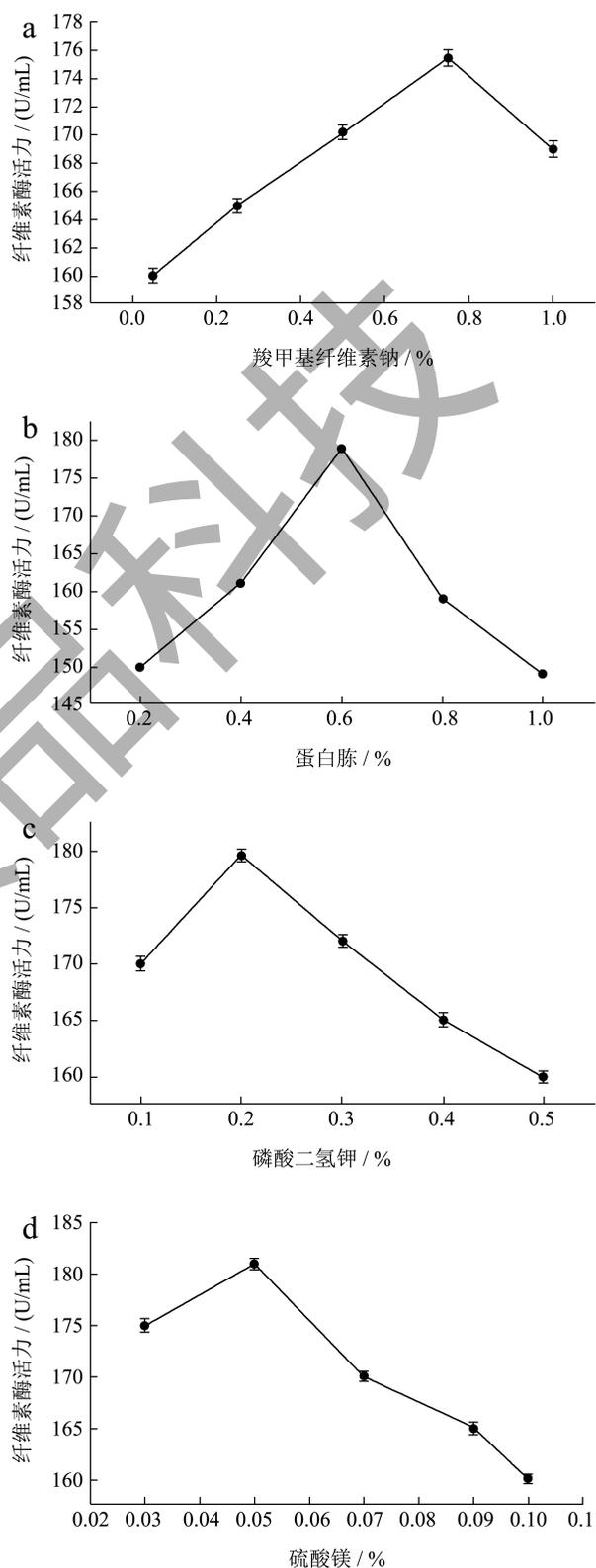


图 9 单因素实验结果

Fig.9 Results of univariate experiments

综合单因素试验结果，发现硫酸镁含量、蛋白胨含量、磷酸二氢钾含量对菌株发酵产酶影响较大，羧甲基纤维素钠含量对其影响相对较小。如图9所示，当蛋白胨为0.60%时，菌株滤纸酶活达到178.92 U/mL。继续添加氮源会抑制纤维素水解和甲烷生成。持续的氮源对纤维素的水解有一定的抑制作用。因此选择氮源（蛋白胨）含量0.60%作为最适氮源。在硫酸镁为0.05%时，菌株滤纸酶活达到181.02 U/mL。在磷酸二氢钾为0.2%时，菌株滤纸酶活达到179.65 U/mL。当碳源（CMC-Na）为0.75%时菌株的滤纸酶活性达到175.43 U/mL。综合分析显示，在蛋白胨0.60%、硫酸镁0.05%、磷酸二氢钾0.2%、CMC-Na 0.75%时，NF-101酶活最高。

2.4.2 正交试验结果

表4 菌株发酵产酶培养基优化正交试验结果与分析

Table 4 Results and analysis of optimized orthogonal experiments in fermentation enzyme production medium of strains

试验号	A	B	C	D	滤纸酶活/(U/mL)
1	1.00	1.00	1.00	1.00	176.82
2	1.00	2.00	2.00	2.00	180.96
3	1.00	3.00	3.00	3.00	173.92
4	2.00	1.00	2.00	3.00	175.42
5	2.00	2.00	3.00	1.00	177.16
6	2.00	3.00	1.00	2.00	177.92
7	3.00	1.00	3.00	2.00	178.31
8	3.00	2.00	1.00	3.00	178.56
9	3.00	3.00	2.00	1.00	176.72
K1	177.23	176.85	177.77	176.90	
K2	176.33	178.89	177.70	179.06	
K3	177.86	176.19	176.46	175.97	
极差	1.53	2.70	1.31	3.09	

对单因素进行优化后，对羧甲基纤维素钠、蛋白胨，磷酸二氢钾及硫酸镁4个因素为变量，正交试验结果如表4所示。分析滤纸酶活数据可知，当蛋白胨添加量改变时，酶活变化明显。因此得出结

论4个因素对滤纸酶活的影响依次为蛋白胨>硫酸镁>磷酸二氢钾>羧甲基纤维素。

由于各因素对菌株产酶的影响都不显著，此时可从表5中选择平均数大的组合成最优产酶组合。

2.4.3 最佳产酶培养基及验证

通过对正交表中进行比较后得出，最优组合条件为：羧甲基纤维素钠0.75%，蛋白胨0.6%，磷酸二氢钾0.2%，硫酸镁0.05%时。通过极差分析后，组合A₂B₂C₂D₂活性相对较高，滤纸酶活达到181.00 U/mL。

表5 正交试验方差分析

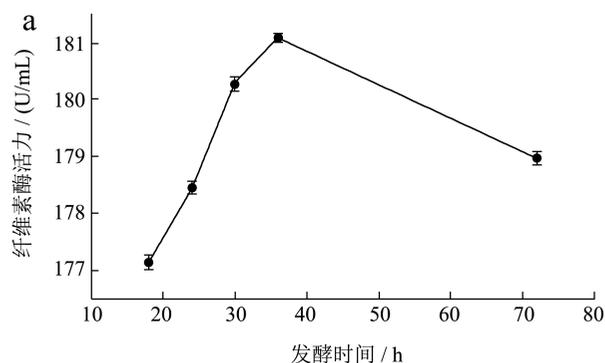
Table 5 Analysis of variance for thogonal experiments

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
A	3.236	2	1.618	0.202	0.821
B	23.883	2	11.941	1.493	0.276
C	6.465	2	3.232	0.404	0.679
D	30.281	2	15.140	1.893	0.206
误差	72.000	9	8.000		

2.5 优化NF-101产酶条件

2.5.1 单因素优化试验结果

通过单因素试验可知，纤维素酶活力受温度的影响较大，受时间的影响一般，如图10所示。当温度维持在37℃时，纤维素酶活力达178.92 U/mL，因此后续实验，培养温度应维持在37℃。当接种量在4 wt.%时，纤维素酶活力达176.83 U/mL。当pH值在7.0时，纤维素酶活力达175.01 U/mL。当发酵时间在72 h时，纤维素酶活力达181.09 U/mL。



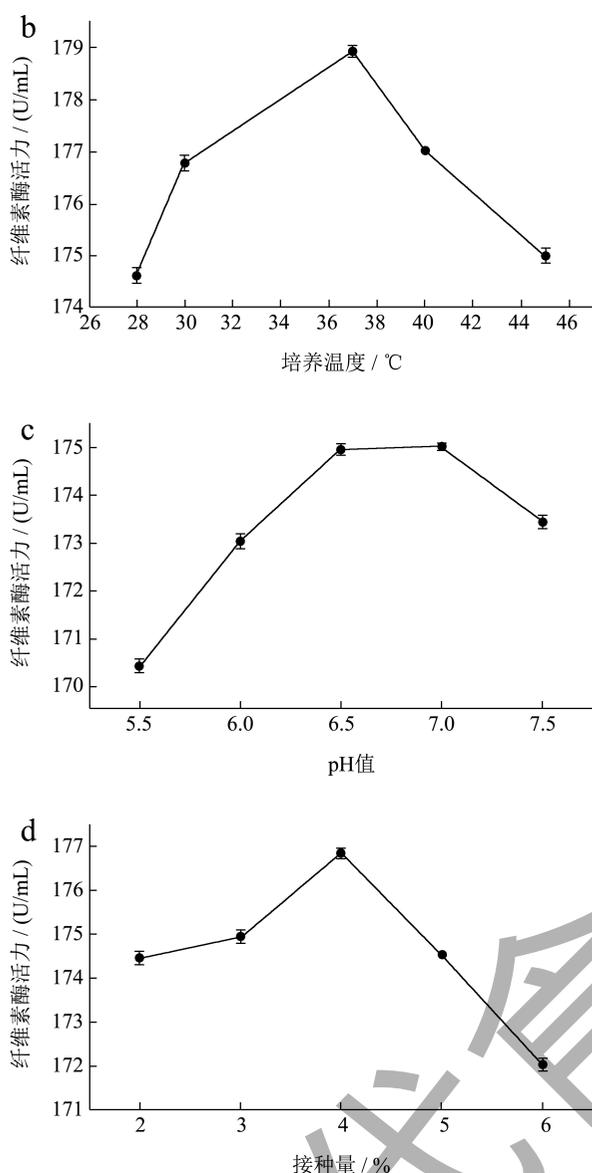


图 10 单因素实验结果

Fig.10 Results of univariate experiments

2.5.2 响应面优化试验结果

根据单因素试验结果，对影响纤维素酶活的4个主要因素进行响应面优化，试验设计与结果见表6。通过数据分析得到响应值纤维素酶活性(Y)对pH(A)、发酵时间(B)、培养温度(C)和接种量(D)的二次多项式回归模型： $Y=180.69+0.42*A+0.041*B+0.39*C+0.51*D+0.59*AB-0.37*AC-0.55*AD+0.50*BC+0.020*BD-0.33*CD-3.21*A^2-1.41*B^2-3.45*C^2-2.71*D^2$

由表7可知,该模型表现为极显著 ($P<0.0001$),失拟项不显著, $R^2=0.9813$, $R^2_{adj}=0.9627$,表明拟合度佳,可用于本试验预测。对纤维素酶活大小

的影响为: 接种量>pH>培养温度>发酵时间。

表 6 响应面试验设计及结果

Table 6 Response surface test design and results

序号	pH值	发酵时间 /h	培养温度 /°C	接种量 /(wt.%)	酶活 /(U/mL)
1	8.00	72.00	37.00	5	175.39
2	7.00	72.00	37.00	4	181.09
3	7.00	48.00	37.00	3	176.04
4	7.00	96.00	37.00	5	176.81
5	6.00	72.00	45.00	4	174.25
6	8.00	72.00	37.00	3	175.02
7	7.00	72.00	37.00	4	180.29
8	7.00	72.00	37.00	4	180.32
9	7.00	72.00	40.00	4	180.53
10	7.00	96.00	28.00	4	175.05
11	7.00	72.00	28.00	3	173.47
12	7.00	48.00	40.00	5	177.02
13	7.00	72.00	28.00	5	174.69
14	7.00	48.00	45.00	4	175.99
15	7.00	72.00	45.00	5	174.91
16	8.00	72.00	28.00	4	174.21
17	8.00	96.00	40.00	4	177.67
18	6.00	96.00	40.00	4	174.92
19	6.00	72.00	40.00	3	173.42
20	7.00	96.00	40.00	3	175.75
21	7.00	48.00	28.00	4	176.02
22	8.00	72.00	45.00	4	173.95
23	7.00	72.00	45.00	3	175.01
24	6.00	72.00	28.00	4	173.02
25	7.00	72.00	37.00	4	181.22
26	8.00	48.00	37.00	4	176.03
27	7.00	96.00	45.00	4	177.01
28	6.00	72.00	37.00	5	175.98
29	6.00	48.00	37.00	4	175.62

表 7 回归模型的方差分析

Table 7 ANOVA for regression models

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
回归模型	151.72	14	10.84	52.56	<0.000 1	**
A	2.13	1	2.13	10.35	0.006 2	**
B	0.020	1	0.020	0.097	0.760 0	
C	1.81	1	1.81	8.78	0.010 3	*
D	3.09	1	3.09	14.99	0.001 7	**
AB	1.37	1	1.37	6.64	0.021 9	*
AC	0.56	1	0.56	2.69	0.123 1	
AD	1.20	1	1.20	5.82	0.030 2	*
BC	0.99	1	0.99	4.80	0.045 8	*
BD	1.600E-003	1	1.600E-003	7.761E-003	0.931 0	
CD	0.44	1	0.44	2.11	0.168 1	
A ²	66.92	1	66.92	324.61	<0.000 1	**
B ²	12.82	1	12.82	62.18	<0.000 1	**
C ²	77.19	1	77.19	374.39	<0.000 1	**
D ²	47.58	1	47.58	230.78	<0.000 1	**
残差	2.89	14	0.21			
失拟项	2.12	10	0.21	1.11	0.500 1	
纯误差	0.76	4	0.19			
合计	154.60	28				

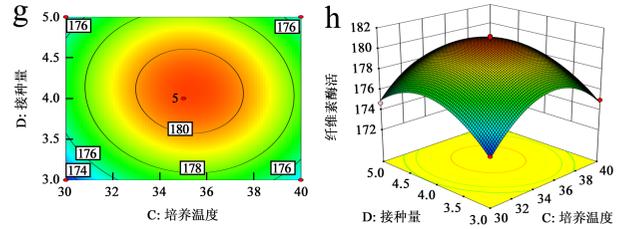


图 11 不同产酶条件对菌株滤纸酶活的影响等高线图 (左) 和响应面图 (右)

Fig.11 Contour plot (left) and response surface plot (right) of the effect of different enzyme production conditions on enzyme activity in strain filter paper

根据 Design-Expert 分析得到的最优工艺条件为: NF-101 发酵产酶培养基最佳条件为羧甲基纤维素钠 0.75 wt.%、蛋白胨 6.00 wt.%、硫酸镁 0.05 wt.%、磷酸二氢钾 0.20 wt.%; 运用响应面对回归方程进行最优解分析, 得到最佳工艺参数为: 温度 37 °C, 初始 pH 值为 7.0, 接种量 4%, 培养时间 72 h, 此条件下, 优化后其滤纸酶活达到 181.22 U/mL, 与优化前相比提高了约 3.63 倍。进行 3 次验证试验后, 其滤纸酶活均能达到 175.00 U/mL。

2.6 NF-101基因组分析及功能注释

2.6.1 基因组基本特征

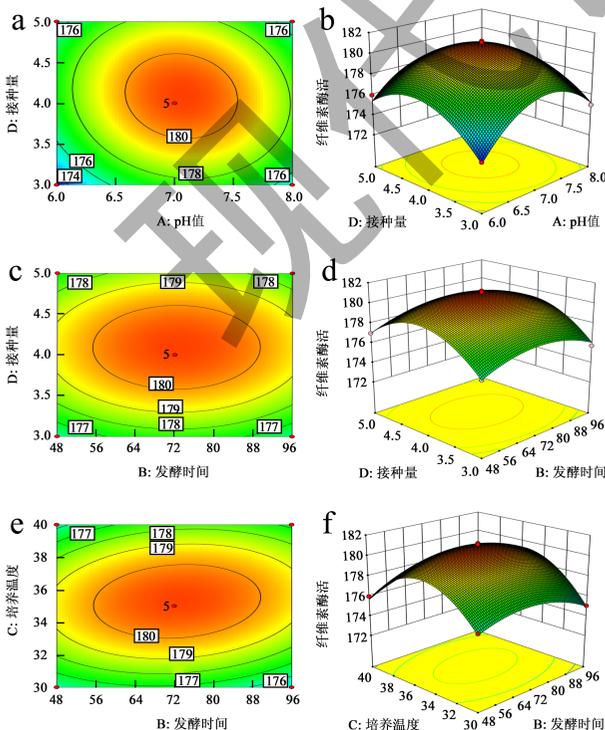


图 12 基因组圈图绘制

Fig.12 Genome circle mapping

注: circos 从外到内依次是组装结果中前 25 条 scaffold、基因分布 (外为负链基因分布, 内为正链基因分布)、gc 含量分布 (窗口大小 1 000 bp)、gcskew 值分布 (窗口大小 1 000 bp)、tRNA 分布、rRNA 分布以及同源基因的共线性关系。

采用 Circos 绘制基因组圈图, NF-101 基因组由一条环状染色体组成, 总基因长度为 4 467 043 bp,

837 bp 是基因的平均长度, 最短及最长基因长度分别为 60 bp 和 7 909 bp; 其环状基因组示意图如图 12 所示, 基因总数目为 4 350 个, 74 个 tRNA 基因和 18 个 rRNA 基因, GC 含量占比 42.88%。

2.6.2 纤维素降解相关基因预测

如图 13 所示, NF-101 被 3 个数据库同时注释的基因数为 1 164 条。此外, COG 和 NR 数据库注释基因数为 1 633 条, NR 和 KEGG 数据库注释基因数 56 条。

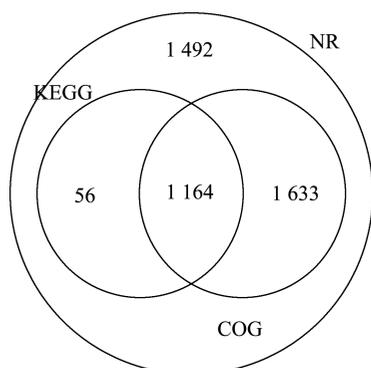


图 13 基因韦恩图

Fig.13 Gene Wayne diagram

2.6.3 COG功能分类注释中的纤维素酶基因

如图 14 所示为在 NF-101 基因组中 COG 的功能分类图。COG 注释基因数 2 547 条, 占编码蛋白基因的 78.44%。

与代谢编码的蛋白相关基因数共 1 254 条, 占比为 38.62%。E 为占比最高达到 11.58%, 相关基因数为 295 条, G 相关的基因数为 232 条, 占比为 9.11%。这两类功能说明 COG 数据库编码的蛋白基因主要参与细胞的基本功能, 这些相关的功能基因可以促进 NF-101 对外部环境的适应。

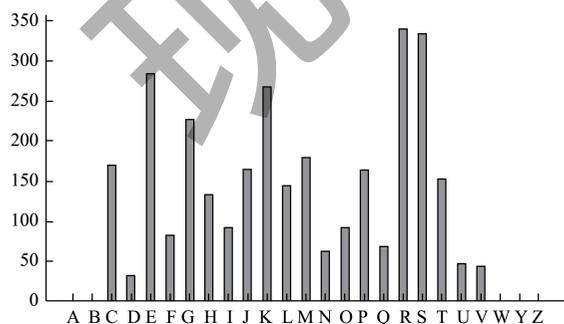


图 14 COG 功能分类注释结果

Fig.14 COG functional classification annotation results

参与碳水化合物运输与代谢通过 COG 注释基因数 G 为 226 条。分析表可知, COG 注释结

果, 进行比对后获得 4 条纤维素酶相关基因, 包括表示纤维素酶和参与纤维素酶促反应的相关蛋白的 ctg00004-000887、ctg-00005-001054、ctg00013-001887, 以及表示内切葡聚糖酶的 ctg00034-003378, 表明 NF-101 含有纤维素酶相关蛋白并且能够分泌内切葡聚糖酶。

2.6.4 GO功能分类注释中的纤维素酶基因

GO 注释基因的总数为 3 081 条, 占编码蛋白基因的 84.25%。分析图 15 可知, 基因种类和数目最多的为生物学过程, 基因种类达到 19 种, 5 种与细胞过程相关的基因, 占主要组分的为膜、含蛋白质复合物; 10 种与分子功能相关的基因。

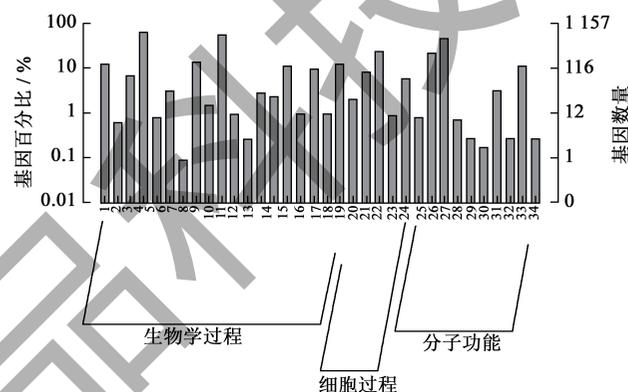


图 15 GO 功能分类注释结果

Fig.15 GO function classification annotation results

注: 1: 生物调控; 2: 细胞聚集; 3: 细胞成分组成或生物生成域部分; 4: 细胞过程; 5: 解毒; 6: 发育过程; 7: 生长; 8: 定位; 9: 运动; 10: 代谢过程; 11: 多生物体过程; 12: 多细胞生物过程; 13: 生物过程的负调节; 14: 物过程的正向调节; 15: 生物过程的调节; 16: 繁殖; 17: 对刺激的反应; 18: 信号; 19: 定位的建立; 20: 细胞外区域部分; 21: 含蛋白质复合物; 22: 膜; 23: 拟核; 24: 细胞; 25: 抗氧化活性; 26: 蛋白结合; 27: 催化活性; 28: 电子转移活性; 29: 分子功能调节剂; 30: 分子换能器活性; 31: 结构分子活性; 32: 过度调节器活性; 33: 转运体活性; 34: 酶调节剂活性。

如表 8 所示, GO 注释结果中搜索到 8 条纤维素酶相关基因。表示纤维素酶活性的 GO0008422, 其作用为将纤维素中的 β -1,4-糖苷键进行催化水解处理; 表示葡萄糖苷酶活性的 GO0015926, 其作用为催化葡萄糖基复合物的水解反应。

2.6.5 KEGG功能分类注释中的纤维素酶基因

经 KEGG 注释基因数共 1 942 条, 占编码蛋白基因的 53.10%。从图 16 中可知, 菌株 NF-101 代谢途径中, 碳水化合物代谢相关的基因数最多为 241 条。

表 8 GO相关基因信息

Table 8 GO-related gene information

基因 ID	GOID	GO 名称	注释
ctg00068_004471 ctg00015_002154 ctg00031_003192 ctg00058_004292 ctg00034_003378	GO:0008422	β -葡萄糖苷酶活性	催化末端非还原性 β -D-葡萄糖残基的水解与 β -D-葡萄糖的释放。
ctg00068_004471 ctg00015_002154 ctg00031_003192 ctg00058_004292 ctg00034_003378	GO:0015926	葡萄糖苷酶活性	催化水解葡萄糖基化合物, 含有衍生自环状葡萄糖或葡萄糖衍生物的物质。

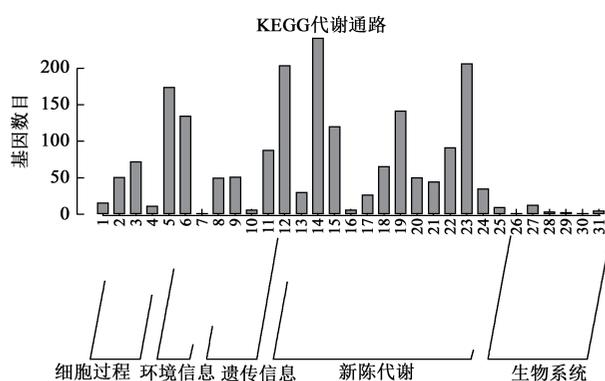


图 16 KEGG 功能分类注释结果

Fig.16 KEGG functional classification annotation results

注: 1. 细胞生长和死亡; 2. 细胞运动; 3. 细胞群落; 4. 运输和分解代谢; 5. 膜运输; 6. 信号传导; 7. 信号分子和相互作用; 8. 折叠、排序和降解; 9. 复制和修复; 10. 转录; 11. 氨基酸的代谢; 12. 其他次级代谢的生物合成; 13. 碳水化合物的代谢; 14. 能量代谢; 15. 酶制剂; 16. 糖类的生物合成和代谢; 17. 脂质代谢; 18. 萜类和聚酮类; 19. 其他氨基酸代谢; 20. 萜类化合物和多酮类化合物的代谢 21. 核苷酸代谢 22. 概述 23. 外来生物的生物降解和代谢; 24. 老化; 25. 消化系统; 26. 内分泌系统; 27. 环境适应; 28. 排泄系统; 29. 免疫系统; 30. 神经系统。

如表 9 所示 KEGG 注释结果中分析共有 1 648 种代谢通路, 分析表可知, 淀粉与蔗糖代谢途径中与纤维素酶解相关的基因共 5 条, 名称为内切葡聚糖酶, 对应酶编号 EC:3.2.1.4。

表 9 KEGG相关基因信息

Table 9 KEGG-related gene information

基因 ID	KOID	名称	酶编号	路径名称
ctg00034_003378	K01179	内切葡聚糖酶 Endoglucanase	E3.2.1.4	ko00500Starchand sucrosemetabolism

2.6.6 COG、GO、KEGG共同注释的纤维素酶基因

分析上述数据库注释基因可知, 其中 3 个数据

库均注释到的基因有 1 条, 分别为 ctg00034_003378。

3 结论

本试验通过对实验菌种各项指标得测试, 确定酶活最佳工艺条件为: 羧甲基纤维素钠 0.75%、蛋白胨 6%、硫酸镁 0.05%、磷酸二氢钾 0.2%。产纤维素酶最佳工艺条件: 温度 37 °C, 初始 pH 值 7.0, 接种量 5%, 培养时间 72 h。试验表明, 优化后滤纸酶活能得到 181.22 U/mL。并提高了产纤维素酶的能力, 验证了菌种的功能性。本试验进行了大量的采样和筛选, 从各种条件下筛选出高产纤维素酶菌株, 并建立纤维素酶菌库, 为之后纤维素酶产生菌的研究提供试验提供了大量优势菌种。

参考文献

- [1] YAO C L, WEI W L, ZHANG J Q, et al. Traditional Chinese medicines against Covid-19: a global overview [J]. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 8(3): 279-313.
- [2] 朱传,段质美,王永厚. 涂料助剂大全[M].上海:上海科学技术文献出版社,2000.
- [3] 李朝旺.微晶纤维素超轻墙体材料[P].技术与市场,2008 (11):136.
- [4] ZIMMERNMANN T, POHLER E, GEIGER T. Cellulose fibrils for polymer reinforcement [J]. Advanced Engineering Materials, 2004, 9: 754-761.
- [5] LILASECA F. Cellulose-based nanocomposites [C]// The 8th International Conference on Wood Fiber-Plastic Composites, 2005:283-295.
- [6] WANG W, WANG P, HU R. A novel screening method of cellulase-producing bacteria [J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2011, 47(1): 58-60.
- [7] KHAN A W, MURRAY W D. Influence of clostridium saccharolyticum on cellulose degradation by acetivibrio cellulolyticus [J]. Journal Appl Microbiol, 2010, 53(3): 379-383.
- [8] ABDALLAH A, ZHANG P, ZHONG Q Z, et al. Application of traditional Chinese herbal medicine by-products as dietary feed supplements and antibiotic replacements in animal production [J]. Current Drug Metabolism, 2019, 20(1): 54-64.
- [9] 张二红.高效纤维素酶菌种的筛选及菌群的构建[D].新疆:石河子大学,2015.
- [10] 张亮,林宁,杜茜,等.农作物秸秆高温堆肥生产有机肥及肥效研究[J].贵州农业科学,2015,43(7):91-96.
- [11] KOTHARI N, HOLWARDA EK, CAI C M, et al. Biomass augmentation through thermochemical pretreatments

- greatly enhances digestion of switch grass by clostridium thermocellum [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 219.
- [12] BRUNECKY R, DONOHOE BS, YARBROUGH JM, et al. The multi domain *Caldicellulosiruptor bescii* cel a cellulase excels at the hydrolysis of crystalline cellulose [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 9622.
- [13] 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.
- [14] 戴四发,黎观红.纤维素酶研究现状及其在畜牧业中的应用[J].安徽技术师范学院学报,2001,15(3):32-38.
- [15] 左勇,秦世蓉,何颂捷,等.酒糟中高产纤维素酶菌株的筛选及鉴定[J].饲料研究,2021,44(5):88-93.
- [16] 傅科鹤,等.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
- [17] 何深宏,程方俊,罗干,等.解淀粉芽孢杆菌高产纤维素酶菌株的筛选与鉴定[J].福建农业学报,2020,35(7):781-787.
- [18] 王靖,李智敏,谢纯良,等.纤维素酶高产菌株F1-1的选育与产酶条件的优化[J].湖北农业科学,2015,54(19):4790-4793
- [19] 穆春雷,武晓森,李术娜.低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及纤维素酶学性质[J].微生物学通报,2013,40(7):1193-1201.
- [20] ANANTHAKRISHNAN A N, BERNSTEIN C N, ILIOPOULOS D, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2018, 15(1): 39-49.
- [21] ROMAN B, VENKATARAMANAN S, JOHN M Y, et al. Synthetic fungal multifunctional cellulases for enhanced biomass conversion [J]. *Green Chemistry*, 2022, 22: 478-489.
- [22] ELNAZ G, NAFISEH S N, KAMRAN G. Molecularcloning and characterizing of *Bacillus subtilis* cellulase collected from oorthern iran forests [J]. *Gene Reports*, 2020, 20: 100772.
- [23] 包怡红,李雪龙.木聚糖酶产生菌-类芽孢杆菌的筛选及其酶学性质研究[J].中国食品学报,2008,2:36-41.
- [24] 张智,尹文哲,雅男,等.大熊猫粪便中纤维素降解菌的筛选及其产酶条件的优化[J].动物营养学报,2017,29(8): 2817-2825.
- [25] NING Z C, LU C, ZHANG Y.X, et al. Application of plant metabonomics in quality assessment for large-scale production of traditional Chinese medicine [J]. *Planta Medica*, 2013, 79(11): 897-908.
- [26] XOCHITL C M, TIMOTHY L T, HARRY S et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment [J]. *Genome Biology*, 2012, 13(9): R7.
- [27] 雅男.纤维素降解菌的筛选及酶学性质的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2017.
- [28] DIAMANT M, BLAAK E E, DE Vos W M. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Obesity Reviews*, 2011, 12(4): 272-281.