

Bacillus velezensis 157 混合固态发酵生产多种 木质纤维素酶的发酵条件优化

陈龙 吴兴利¹ 于维¹ 谷巍² 徐海燕² 钱爱东³ 王春风³ 张芳毓^{1*}

(1. 吉林省农业科学院 畜牧科学分院, 吉林 公主岭 136100;

2. 山东宝来利来生物工程股份有限公司, 山东 泰安 271000;

3. 吉林农业大学 动物科学技术学院, 长春 130118)

摘要 为论证单一固态 *Bacillus velezensis* 157 发酵豆粕中混合碱处理玉米秸秆能否有利于提高内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶的产酶量, 利用 DNS 法对碱处理玉米秸秆与豆粕混合添加质量比进行优化后, 采用单因素法分别对单一发酵豆粕、碱处理玉米秸秆以及混合发酵碱处理玉米秸秆-豆粕中底物与水分质量比、发酵温度以及发酵时间进行优化, 并对发酵过程中 *B. velezensis* 157 的生长曲线进行测定。结果表明: 经发酵条件优化后, 以碱处理玉米秸秆和豆粕的质量比为 1.0 : 1.0, 底物与水分质量比为 1.0 : 0.5; *B. velezensis* 157 于 37 °C 培养温度下发酵 24 h 后, 混合发酵组的内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶、果胶酶以及菌落数, 均高于单一发酵碱处理玉米秸秆组和豆粕组, 酶活力分别可达 56.83±1.47、1 949.28±14.41、16.52±0.79 和 14.53±0.56 U/g, 相应酶活力与碱处理玉米秸秆组相比, 分别提高了 7.81、6.41、1.23 和 2.53 倍; 与豆粕组相比, 分别提高了 1.17、1.35、1.07 和 1.21 倍; 同时, 混合发酵组中 *B. velezensis* 157 菌落数高于豆粕组和碱处理秸秆组。因此, *B. velezensis* 157 混合固态发酵有利于提高 *B. velezensis* 157 内切葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶和果胶酶的酶产量, 节约了时间和成本, 为动物饲料酶制剂和生物饲料的开发提供依据。

关键词 *Bacillus velezensis* 157; 固态发酵; 产酶; 发酵条件优化

中图分类号 S816.6

文章编号 1007-4333(2019)09-0071-08

文献标志码 A

Optimization of fermentation conditions for the production of various lignocellulases by *Bacillus velezensis* 157 under solid-state fermentation

CHEN Long¹, WU Xingli¹, YU Wei¹, GU Wei², XU Haiyan², QIAN Aidong³,
WANG Chunfeng³, ZHANG Fangyu^{1*}

(1. Branch of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China;

2. Shandong BaoLai-LeeLai Bioengineering Co., Ltd., Tai'an 271000, China;

3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract The purpose of this study was to evaluate whether the mixture of alkali-treated maize straw in soybean meal could improve the production of cellulase, amylase, xylanase and pectinase by *Bacillus velezensis* 157 under solid-state fermentation. The mixture ratio of alkali-treated maize straw and soybean meal were optimized by using DNS method. The ratio of substrate to water, fermentation temperature and time were optimized by the method of single factor among single fermentation soybean meal, alkali-treated maize straw and mixed fermentation of alkali-treated maize straw and

收稿日期: 2018-12-28

基金项目: 吉林省科技厅重点科技研发项目(20180201042NY); 吉林省农业科学院创新工程项目(CXGC2017JQ003); 安全绿色饲料添加剂中试中心项目(20160626002NY)

第一作者: 陈龙, 助理研究员, 主要从事发酵饲料菌种筛选研究, E-mail: chenliang198931@163.com

通讯作者: 张芳毓, 助理研究员, 主要从事生物饲料开发研究, E-mail: zhangfangyu610@163.com

soybean meal, respectively. The growth curve of *B. velezensis* 157 during fermentation was also determined. The results showed that: After optimization of fermentation conditions, alkali-treated maize straw and soybean meal were treated as substrate in a ratio of 1.0 : 1.0, and the ratio of substrates to moisture is 1.0 : 0.5. The cellulase, amylase, xylanase, pectinase and colony number in the mixed fermentation group by *B. velezensis* 157 was higher than that the single fermentation of the alkali-treated maize straw and soybean meal at 37 °C and 24 h, and the activities of cellulase, amylase, xylanase, pectinase in mixture fermentation are 56.83 ± 1.47 , $1\ 949.28 \pm 14.41$, 16.52 ± 0.79 and 14.53 ± 0.56 U/g, respectively. The corresponding enzyme activity of mixed fermentation group was 7.81, 6.41, 1.23 and 2.53 times higher than that of alkali-treated maize straw group, and 1.17, 1.35, 1.07 and 1.21 times than the soybean meal group, respectively. Meanwhile, the number of *B. velezensis* 157 colony in mixed fermentation group was higher than both of them. In conclusion, it can be seen that the mixture of alkali-treated maize straw and soybean meal under solid-state fermentation at certain conditions improved the yield of cellulase, amylase, xylanase and pectinase produced by *B. velezensis* 157. This method saved time and reduced cost. This study laid a foundation for the research and development of animal feed additives and biological feed.

Keywords *Bacillus velezensis* 157; solid-state fermentation; enzyme production; fermentation condition optimization

我国是世界上主要的农业生产大国。在农业生产过程中产生数以百万吨计的农业废弃物,如农作物秸秆、谷壳、果壳以及甘蔗渣等,由于农业废弃物总体综合利用率低造成了资源浪费和环境问题^[1]。近年来,利用微生物发酵的热化学或酶法处理农用废弃物中的木质纤维素是一种高效、绿色、环保的新策略^[2]。纤维素酶、淀粉酶、果胶酶以及木聚糖酶在食品、生物乙醇生产、动物饲料生产、洗涤工业、造纸工业和环境处理等行业中得到越来越多的应用^[3]。固态发酵(Solid-state fermentation, SSF)是微生物在没有或基本没有游离水的固态底物上的发酵方式。利用廉价农业废弃物作为微生物生长和生产工业化酶的底物,生产高价值的代谢产物,不只降低了生产成本,更减轻了环境污染。固态发酵在实际应用中具有不需要昂贵的设备投资,发酵过程简单易操作,与微生物的自然栖息环境相似等优势^[4]。

真菌仍然是目前生产工业化酶的主要菌株,但真菌生产的商业化酶价格偏高,且真菌生长速度慢,发酵周期长。因此,近年来工业化酶生产研究焦点转移到能产酶的细菌^[5]。芽孢杆菌具有在单一发酵过程中产生多种酶的能力,包括脂肪酶和蛋白酶,淀粉酶和蛋白酶,蛋白酶和纤维素酶^[3]。利用微生物固态发酵的方式处理农业废弃物中的木质纤维素生产工业化酶具有积极意义。发酵底物的化学组成和物理表现与酶的生产密切相关,底物的成本和有效性是固态发酵底物选择的另一个重要因素。已有研究发现单一底物发酵往往会阻碍和限制微生物的营养需求,利用具有互补特性的底物可在一定程度上解决因底物单一造成的微生物生长状态不良的现

象^[6]。另外,固态发酵已在燃料乙醇工业和可发酵糖工业得到广泛的应用^[7]。

本课题组从杜仲树皮中分离得到一株乳酸菌 *Bacillus velezensis* 157,其具有多种木质纤维素分解活性,可利用豆粕、麦麸、麦秸、玉米秸秆、米糠等农业废弃物及农副产品为底物,通过固体发酵生产多种木质纤维素酶。其中:豆粕为单一固态发酵最适底物;玉米秸秆的利用率较低^[8]。目前,尚缺乏提高 *B. velezensis* 157 对玉米秸秆的综合利用率方面的研究,因此,为避免因单一底物(玉米秸秆)发酵时出现的营养缺失现象,本研究拟采用混合固态发酵的方式,利用 DNS 法对碱处理玉米秸秆与豆粕混合添加质量比进行优化后,采用单因素法分别对单一发酵豆粕、碱处理玉米秸秆以及混合发酵碱处理玉米秸秆-豆粕中底物与水分质量比、发酵温度以及发酵时间进行优化,绘制发酵过程中 *B. velezensis* 157 的生长曲线进行,测定 *B. velezensis* 157 在发酵过程中内切葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶、果胶酶的酶产量以及菌落数,获得优化条件,以期提高内切葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶和果胶酶的产量,为乳酸菌的二次发酵和新型发酵饲料的研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和农业废弃物

本试验所用菌株 *B. velezensis* 157 由本实验室(吉林农业大学动物微生物生态制剂工程研究中心)分离并保存。玉米秸秆采集于吉林农业大学试验田,豆粕购自长春博瑞农牧集团股份有限公司。

1.2.1 主要试剂和仪器

DNS试剂;LB培养基;全波长酶标仪为美国赛默飞世尔公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米秸秆和豆粕预处理

根据文献[9]中碱处理方法,将粉碎后的玉米秸秆与3% NaOH以1.0:10.0的质量比混合,室温静止放置2 h,而后121℃,30 min高压蒸汽爆破。将预处理的玉米秸秆用自来水洗至中性pH约为7.0,50℃烘干后过60目筛后于4℃冰箱保存。豆粕用自来水彻底清洗经60℃干燥恒重,粉碎过60目筛后于4℃冰箱保存。

1.2.2 *B. velezensis* 157 混合固态发酵及发酵条件优化

单一固态发酵:分别取5 g预处理玉米秸秆和5 g豆粕于150 mL锥形瓶中121℃,20 min高压灭菌,分别记为预处理秸秆组和豆粕组。混合固态发酵:首先确定预处理玉米秸秆与豆粕混合添加质量比进行优化,质量比分别为:1.0:1.0、1.0:2.0、1.0:3.0、1.0:4.0、2.0:1.0、3.0:1.0、4.0:1.0,并记为混合发酵组。将*B. velezensis* 157以3%接种量接入新鲜LB液体培养基于180 r/min摇床37℃过夜培养。通过灭菌蒸馏水调整固态发酵培养基水分,其中包括0.5 mL *B. velezensis* 157(24 h,每毫升约 10^6 细胞)也计算在水分含量中,培养基中固态底物与水的质量比为1.0:0.5,于恒温培养箱中37℃,72 h。采用单因素法对上述3组进行以下发酵条件优化:底物与水的质量比(1.0:0.5、1.0:1.0、1.0:1.5、1.0:2.0、1.0:2.5、1.0:3.0、1.0:3.5、1.0:4.0);发酵温度(15、30、37、50℃);发酵时间(1、2、3、4、5 d),各试验组均为3次重复。

1.2.3 木质纤维素酶活力测定

将发酵后的底物与灭菌蒸馏水以1.0:10.0的质量比进行混合,置37℃摇床混匀(180 r/min,30 min),混匀后的发酵底物于4℃,8 000 r/min离心30 min,0.22 μm微孔滤膜过滤,上清液即为粗酶液,为后期测定内切葡聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶、淀粉酶做准备^[2]。

内切纤维素酶活(CMCase)活性测定^[10]。以0.05 mol/L,pH 5.0的柠檬酸缓冲液作为溶剂,配置质量比为1%的CMC-Na的底物溶液。取100 μL底物与50 μL粗酶液充分混合,50℃恒温水浴30 min,后加入200 μL DNS溶液(3,5-二硝基

水杨酸)终止反应,煮沸5 min,冰水中冷却,加入1 mL蒸馏水混匀,取300 μL加入酶标板,用酶标仪测定其540 nm下吸光值。

α-淀粉酶(Amylase)活性测定^[11]。将50 μL粗酶液与100 μL 1%淀粉-磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L,pH 6.8)加入1.5 mL EP管,恒温水浴55℃,30 min,加入200 μL DNS试剂立即终止反应,煮沸5 min,冰水中冷却,加入1 mL蒸馏水于1.5 mL EP管中,酶标仪540 nm处测定吸光值。测定时首先以麦芽糖作为测定纤维素酶活的标准曲线,1 min生成1 μmol麦芽糖所需的酶量定义为1个酶活力单位(U/mL)。

木聚糖酶(Xylanase)活性测定^[12]。将50 μL粗酶液与100 μL 1%木聚糖-柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L,pH 5.3)加入1.5 mL EP管,恒温水浴50℃,30 min,加入200 μL DNS试剂立即终止反应,沸水中煮沸5 min,冰水中冷却,加入1 mL蒸馏水于1.5 mL EP管中,酶标仪540 nm处测定吸光值。以木糖作为测定纤维素酶活的标准曲线,1 min生成1 μmol木糖所需的酶量定义为1个酶活力单位(U/mL)。

果胶酶(Pectinase)活性测定^[13]。柑橘果胶先用2 mL无水乙醇稀释并混匀,将50 μL粗酶液与100 μL 1%柑橘果胶-柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 5.8)加入1.5 mL EP管,恒温水浴37℃,30 min,加入200 μL DNS试剂立即终止反应,煮沸5 min,冰水中冷却,加入1 mL蒸馏水于1.5 mL EP管中,酶标仪540 nm处测定吸光值。以D-半乳糖醛酸作为测定果胶酶活的标准曲线,1 min生成1 μmol D-半乳糖醛酸所需的酶量定义为1个酶活力单位(U/mL)。

上述各酶活测定中,对照组均为在粗酶液与底物-缓冲液混合后直接加入DNS试剂终止酶活,后续步骤同试验组操作过程。

1.2.4 豆粕组、碱处理玉米秸秆组和混合发酵组中*B. velezensis* 157生长曲线的测定

将发酵后的底物与灭菌生理盐水(0.85%)以1.0:10.0的质量比进行混匀,于37℃摇床上混匀(180 r/min,15 min),经倍比稀释涂布于LB琼脂平板进行菌落计数。

1.2.5 数据统计与分析

数据处理采用Graph Prism 7.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和多因素方差分析

(two-way ANOVA)并绘制折线图和柱状图,试验数据用 Mean±SD 表示,差异显著性表示如下:*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ns, $P>0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 碱处理玉米秸秆和豆粕混合固态发酵底物质量比的优化

通过改变碱处理玉米秸秆与豆粕混合的质量

比,确定对内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶酶活力的影响。其中,以碱处理秸秆与豆粕质量比 1.0 : 1.0 作为底物时,产酶效果最佳(图 1)。其中内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶等 4 种酶活分别可达 59.97 ± 0.42 、 2156.47 ± 2.88 、 19.36 ± 1.12 和 12.15 ± 0.98 U/g。因此,以碱处理玉米秸秆与豆粕的质量比为 1.0 : 1.0 进行后续水分优化。

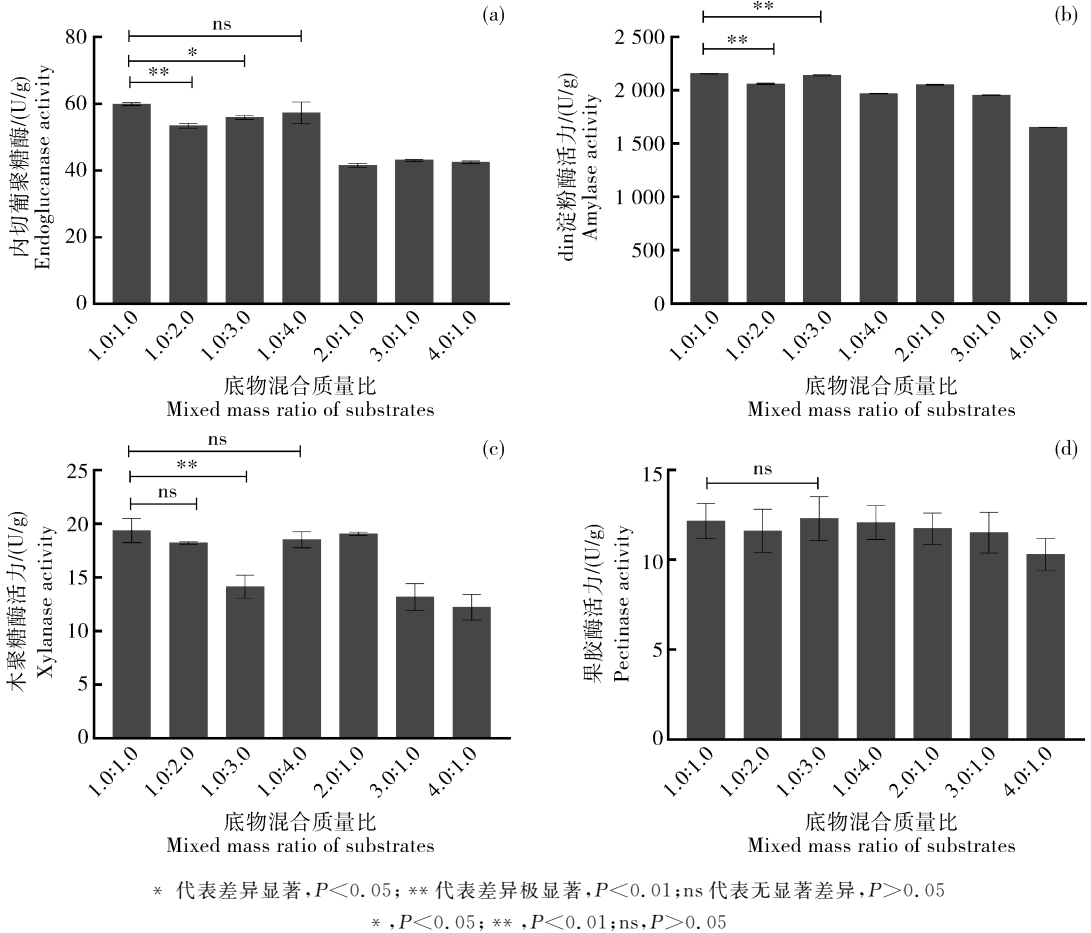


图 1 碱处理秸秆和豆粕混合不同质量比固态发酵对内切葡聚糖酶(a)、淀粉酶(b)、木聚糖酶(c)和果胶酶(d)酶活力的影响

Fig. 1 Substrate ratio optimization for the production of CMCase (a), amylase (b), xylanase (c) and pectinase (d) by *B. velezensis* 157 in mixed fermentation

2.2 碱处理玉米秸秆组、豆粕组和混合发酵组水分的优化

对碱处理玉米秸秆、混合发酵组和豆粕组的水分进行优化,结果发现 3 组处理中,均以底物与水分的质量比为 1.0 : 0.5 时,有利于提高内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶酶活力,其中:在碱处理玉米秸秆组中,与底物与水分的质量比为 1.0 : 1.0 相比,底物与水分的质量比为 1.0 : 0.5

时,相应内切葡聚糖酶,木聚糖酶酶活力无显著差异 ($P>0.05$),而淀粉酶和果胶酶活力可达最高值,显著差异 ($P<0.05$);在豆粕组中,内切葡聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶均在底物与水分的质量比为 1.0 : 0.5 时,酶活力可达最高值,但与底物与水分的质量比为 1.0 : 1.0 相比,差异不显著 ($P>0.05$);在混合发酵组中,其内切葡聚糖酶和淀粉酶在底物与水分的质量比为 1.0 : 0.5 时,酶活力可达最高值,分

别为： 58.87 ± 0.42 和 214.45 ± 3.18 U/g，与底物与水分的质量比为 1.0 : 1.0 相比，差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 碱处理玉米秸秆组、豆粕组和混合发酵组发酵温度的优化

对碱处理玉米秸秆组、豆粕组和混合发酵组进行发酵温度的优化，结果发现在 37 °C 培养温度下，有利于各组内切葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶和果胶酶等 4 种酶活的产生。其中：碱处理秸秆组、豆粕组、混合发酵组中内切葡聚糖酶、木聚糖酶和淀粉酶在 37 °C 条件下，酶活力显著高于 15、30、50 °C ($P < 0.05$)，而果胶酶在 30 和 37 °C 条件下，酶活力差异不显著 ($P > 0.05$)。此外，在 15 °C 低温环境下 *B. velezensis* 157 仍可以利用底

物进行发酵。

2.4 豆粕组、碱处理玉米秸秆组和混合发酵组发酵时间的优化

从图 2 可以看出，豆粕组和混合发酵组产酶效果优于单一发酵碱处理玉米秸秆组。其中，在发酵 24 h 时，混合发酵组的内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶、果胶酶活力均高于豆粕组 (48.35 ± 2.65 、 1442.39 ± 60.5 、 15.35 ± 1.01 和 11.96 ± 0.55 U/g)，其酶活分别可达 56.83 ± 1.47 、 $1\,949.28 \pm 14.41$ 、 16.52 ± 0.79 和 14.53 ± 0.56 U/g。在发酵 2 d 时，豆粕组的内切葡聚糖酶、果胶酶和木聚糖酶活力均高于混合发酵组 ($P > 0.05$)，而淀粉酶低于混合发酵组。在随后的发酵过程中，混合发酵组中四种酶活力均高于豆粕组。

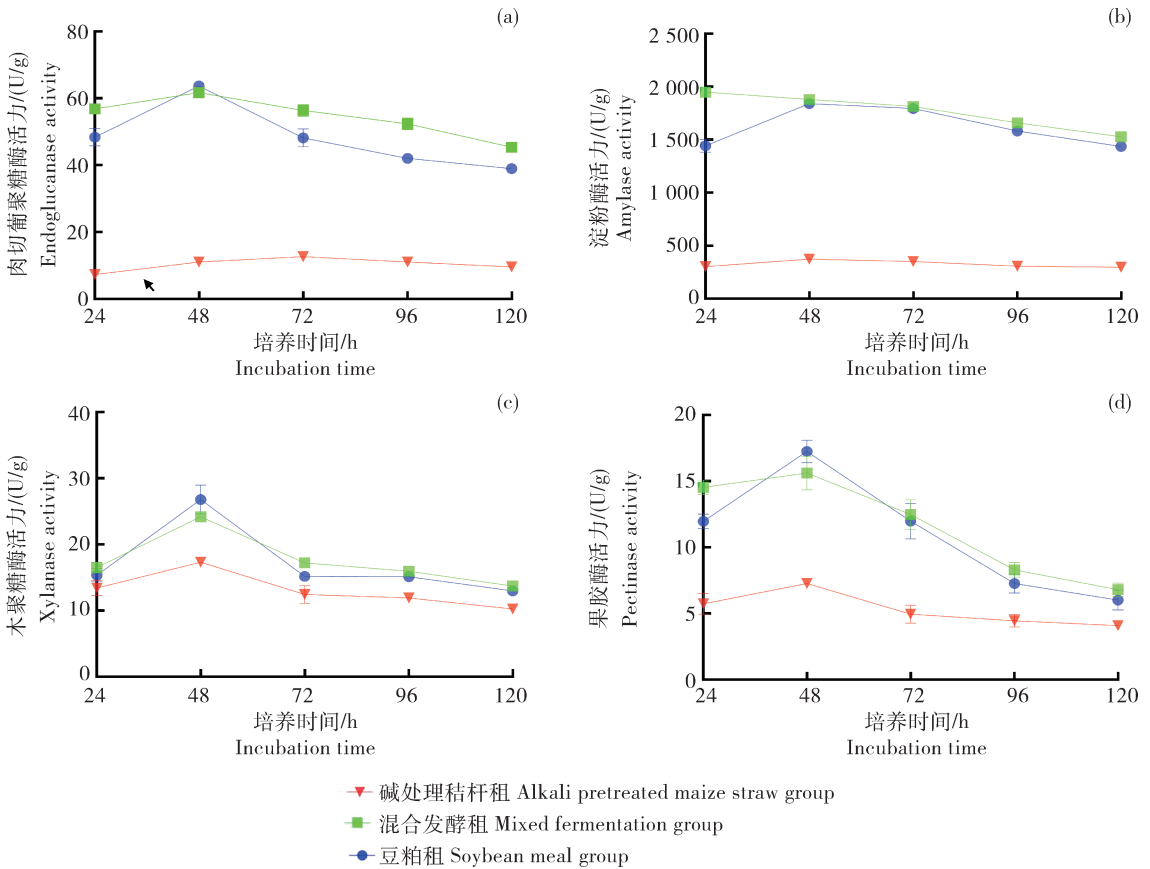


图 2 发酵时间对 *B. velezensis* 157 固态发酵碱处理秸秆组、豆粕组和混合发酵组的内切葡聚糖酶(a)、淀粉酶(b)、木聚糖酶(c)和果胶酶(d)酶活力的影响

Fig. 2 Effect of incubation time among pretreated corn straw, soybean meal and mixed fermentation on the production of CMCCase (a), amylase (b), xylanase (c) and pectinase (d) by *B. velezensis* 157 in SSF

2.5 豆粕组、碱处理玉米秸秆组和混合发酵组中 *B. velezensis* 157 的生长曲线测定

根据 *B. velezensis* 157 生长曲线趋势发现，*B.*

velezensis 157 在 12~24 h 为对数生长期，24~48 h 为稳定期。经菌落计数分析发现，在 24、72、96、120 h 时，混合发酵组中 *B. velezensis* 157 菌落数高

于豆粕组和碱处理秸秆组($P < 0.01$),而在48 h时,混合发酵组和豆粕组中 *B. velezensis* 157 菌落数无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

我国秸秆每年产量9亿多吨,由于秸秆的地区性、季节性、结构性过剩,露天焚烧引起空气和水源污染等环境问题。为提高秸秆资源的综合利用效率,国家发展改革委办公厅、农业部办公厅于2016年印发了《关于印发编制“十三五”秸秆综合利用实施方案的指导意见》,并制定了“十三五”秸秆综合利用实施方案,明确秸秆开发利用方向和总体目标,破解秸秆综合利用重点和难题^[14]。已有研究表明玉米秸秆富含纤维素(32%~36%)、半纤维素(35%~40%)和木质素(17%~20%)。在本课题组对 *B. velezensis* 157 进行了全基因测序分析,发现降解木质素的相关酶基因较少^[8,15]。Salim 等^[9]报道碱预处理对木质素含量高的底物,能促进木质素的溶解,改变纤维素的晶体结构。因此,本试验采用3% NaOH 对玉米秸秆进行预处理,去除玉米秸秆中的木质素成分,提高了 *B. velezensis* 157 对玉米秸秆中纤维素和半纤维素的利用率,减少因木质素的存在对木质纤维素酶的非特异性吸附。

在混合固态发酵底物混合质量比优化的试验中,发现碱处理玉米秸秆与豆粕混合质量比为1.0:1.0时,其产酶效果最佳,且产生的内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶活力优于单一发酵二者的产酶量。在生产实际以及本试验中,利用芽孢杆菌单独发酵豆粕常常出现极度粘稠等现象,导致豆粕的氧渗透率降低,营养扩散慢,抑制菌株生长。添加碱预处理的玉米秸秆,可以增加底物的膨胀程度,并在混合发酵过程中改变颗粒结构,增加底物透气性以及通氧量,有利于各种木质纤维素酶的分泌,提高酶产量;豆粕可为菌株提供良好的氮源、蛋白质和矿物元素,弥补碱处理玉米秸秆单一发酵缺乏氮源的问题,提高了 *B. velezensis* 157 生长活力。以上推测在本试验中进行豆粕组、碱处理玉米秸秆组和混合发酵组中 *B. velezensis* 157 的生长曲线测定中也得到证实。玉米秸秆和豆粕均为农业废弃物和农副产品,来源广泛,成本低廉,通过固态发酵可以实现变废为宝,生产木质纤维素酶,减少了生产成本,降低了工业化酶的价格。仅有少量文献对芽孢杆菌进行混合农业废弃发酵的报道^[2,16],大多

是通过液态发酵实现废弃物再利用。Kazeem 等^[2]以未处理的甘蔗渣和经 NaOH 预处理的米糠按1.0:1.0质量比混合,50℃液态发酵30 h后,单一发酵未处理甘蔗渣、碱处理米糠以及将二者进行混合液态发酵相应内切葡聚糖酶活分别为:0.102、0.150和0.380 U/mL,混合发酵组分别将单一发酵未处理甘蔗渣和碱处理米糠中内切葡聚糖酶活提高了3.7和2.5倍。Oke 等^[16]利用 *B. aerius* S5.2 对经碱处理后的油棕榈果枝,油棕榈叶以及米糠按照1.0:1.0:1.0进行混合发酵,发现:经混合发酵、单一发酵碱处理的油棕榈叶以及米糠产生的内切葡聚糖酶,分别为0.655、0.504和0.525 U/mL;其中,混合发酵和单一发酵经碱处理后的油棕榈果枝产生的内切葡聚糖酶产量相当($P > 0.05$);而高于单一发酵碱处理油棕榈叶及米糠的内切葡聚糖酶产量($P < 0.05$)。本研究对单一发酵豆粕组、碱处理秸秆组以及二者混合发酵组进行水分、温度、时间等主要发酵影响因素优化,确定其对 *B. velezensis* 157 在混合固态发酵中内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶酶活性的影响。

在固态发酵中,水分含量是影响固态发酵体系中酶产量的主要参数之一。Prakasham 等^[17]研究固态发酵时:一方面含水量不足很可能导致营养物质的溶解度降低,底物肿胀程度较低,干扰细胞的渗透性,导致抑制物质的积累进而影响微生物生长和产酶;另一方面,水分过多会引起颗粒结构的改变,导致底物孔隙率降低,影响氧的传递,以及营养物质的扩散。Salim 等^[9]发现,利用 *B. sp.* TMF-1 进行固态发酵时,低水含量有助于促进蛋白酶的产生,而含水比例高时,可促进内切葡聚糖酶和淀粉酶的产生。在本试验中内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶酶活力的最适底物与水分的质量比均为1.0:0.5,这可能由于选择的微生物以及底物不同,导致对水分含量的需求具有较大差异。

在酶生产过程中,培养温度对固态发酵又是一个重要影响因素^[18]。Mohamed 等^[19]研究确定 *Trichoderma harzianum* 固态发酵最适产酶温度时发现最适果胶酶和木聚糖酶的培养温度分别为35和28℃。已有研究报道真菌产木质纤维素的最适培养温度范围在28~32℃^[18]。*B. velezensis* 157 在混合发酵组中产酶的最适温度为37℃,其内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶和果胶酶酶活力分别可达60.57±0.32、2120.64±1.18、18.79±0.28和

14.15±0.68 U/g。然而,值得注意的是在 50 ℃ 的培养温度下,*B. velezensis* 157 仍能够进行发酵,说明 *B. velezensis* 157 在固态发酵中具有耐受高温产酶的潜力,有望应用于工业化酶生产。

发酵时间对于整个发酵过程至关重要,发酵时间短可以减少成本和能耗。本试验中,混合发酵组和豆粕组中 4 种酶的产酶趋势一致。其中:在发酵 24 h 时,混合发酵组的内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶、果胶酶活力与豆粕组相比,分别提高了 1.17、1.35、1.07 和 1.21 倍;测定 *B. velezensis* 157 生长曲线测定发现,在发酵 24 h 时,混合发酵组中的菌落数多于单一发酵豆粕组和碱处理玉米秸秆组,与产酶量趋势相一致。目前,有关混合不同底物进行固态发酵的报道较少,王聪等^[20]以甜高粱秸秆和酒糟为试验原料,利用青贮原理将二者进行混合固态发酵,进行了混合固态发酵品质及微生物多样性测定,但并无相关产酶变化的研究;Yang 等^[21]利用 *Penicillium decumbens* 进行混合固态发酵(90%玉米秸秆和 10%麦麸)4 d 后可产生最大木聚糖酶 13.59 U/g。在本试验中,相比于单一发酵豆粕或碱处理秸秆,*B. velezensis* 157 经混合固态发酵产酶发酵时间较短,更具省时优势。

综上,单一固态发酵豆粕中混合碱处理玉米秸秆有利于 *B. velezensis* 157 提高内切葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶和果胶酶的产量。然而,本研究仅从木质纤维素酶活力和发酵条件优化等方面进行探索,进一步研究中可通过纤维素和半纤维素含量测定、总还原糖和可溶性碳水化合物测定,综合评价 *B. velezensis* 157 混合固态发酵碱处理玉米秸秆与豆粕的降解效果,为乳酸菌二次发酵生产无抗发酵饲料提供依据。

4 结 论

本研究发现:经发酵条件优化后,以碱处理玉米秸秆和豆粕按 1.0 : 1.0 的质量比作为底物,且与水分质量比为 1.0 : 0.5;经 *B. velezensis* 157 于 37 ℃ 发酵 24 h 后,混合发酵组的内切葡聚糖酶、淀粉酶、木聚糖酶、果胶酶分别可达 56.83±1.47、1 949.28±14.41、16.52±0.79 和 14.53±0.56 U/g,均高于单一发酵碱处理玉米秸秆组(7.27±0.12、303.86±14.96、13.41±1.13 和 5.73±0.78 U/g)和豆粕组(48.35±2.65、1 442.39±60.51、15.35±1.01 和 11.96±0.55 U/g),其 4 种酶活力与碱处理玉米秸

秆组相比,分别提高了 7.81、6.41、1.23 和 2.53 倍,与豆粕组相比,分别提高了 1.17、1.35、1.07 和 1.21 倍;同时,混合发酵组中 *B. velezensis* 157 菌落数高于豆粕组和碱处理秸秆组。

参考文献 References

- [1] 陈光,吴卓夫,张兆业. 秸秆综合利用研究动态及展望[J]. 吉林农业大学学报,2016,38(5):505-510
Chen G, Wu Z F, Zhang Z Y. Research trend and prospect of comprehensive utilization of straw[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2016, 38(5):505-510 (in Chinese)
- [2] Kazeem M O, Shah U K, Baharuddin A S, Abdulrahman N A. Prospecting agro-waste cocktail: Supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 182(4):1-23
- [3] Vijayaraghavan P, Arun A, Aldhabi N A, Vincent S G P, Arasu M V, Choi K C. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulase and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1):1-13
- [4] Singhania R R, Patel A K, Soccol C R, Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(1):13-18
- [5] Ladeira S A, Cruz E, Delatorre A B, Barbosa J B, Martins M L L. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 and its detergent compatibility[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2015, 18(2):110-115
- [6] Scholl A L, Menegol D, Pitarello A P, Fontana R C, Zandoná Filho A, Ramos L P, Dillon A J P, Camassola M. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1 M29 solid-state cultivation[J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 77(9):97-107
- [7] Lim W S, Lee J W. Effects of pretreatment factors on fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of mixed hardwood[J]. *Bioresource Technology*, 2013(130):97-101
- [8] Chen L, Gu W, Xu H Y, Yang G L, Shan X F, Chen G, Wang C F, Qian A D. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(2):114
- [9] Salim A A, Grbavcic S, Sekuljica N, Stefanovic A, Jakovetic Tanaskovic S, Lukovic N, Knezevic-Jugovic Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 228:193-200

- [10] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959,31(3):426-428
- [11] Hashemi M, Shojaosadati S A, Razavi S H, Mousavi S M. Evaluation of Ca-independent α -amylase production by *Bacillus* sp KR-8104 in submerged and solid state fermentation systems [J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2011,9(3):188-196
- [12] Hero J S, Pisa J H, Perotti N I, Romero C M, Martinez M A. Endoglucanase and xylanase production by *Bacillus* sp AR03 in co-culture [J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017,47(6):589-596
- [13] Biz A, Finkler A T J, Pitol L O, Medina B S, Krieger N, Mitchell D A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016,111:54-62
- [14] 陈超玲, 杨阳, 谢光辉. 我国秸秆资源管理政策发展研究 [J]. 中国农业大学学报, 2016,21(8):1-11
Chen C L, Yang Y, Xie G H. Study of the development of crop straw management policy in China [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016,21(8):1-11 (in Chinese)
- [15] Chen L, Gu W, Xu H Y, Yang G L, Shan X F, Chen G, Kang Y H, Wang C F, Qian A D. Comparative genome analysis of *Bacillus velezensis* reveals a potential for degrading lignocellulosic biomass [J]. *3 Biotech*, 2018,8(5):253
- [16] Oke M A, Ishola M M, Taherzadeh M J, Annuar M S M, Simarani K. Effects of pretreatment of single and mixed lignocellulosic substrates on production of endoglucanase by *Bacillus aerius* S5. 2 [J]. *Bioresources*, 2016,11(3):6708-6726
- [17] Prakasham R S, Rao C, Sarma P N. Green gram husk: An inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp in solid-state fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2006,97(13):1449
- [18] Smits J P, Rinzema A, Tramper J, Sonsbeek H M V, Knol W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996,46(5-6):489-496
- [19] Mohamed S A, Almalki A L, Khan J A, Kabli S A, Algarni S M. Solid state production of polygalacturonase and xylanase by *Trichoderma* species using cantaloupe and watermelon rinds [J]. *Journal of Microbiology*, 2013,51(5):605-611
- [20] 王聪. 酒糟与甜高粱秸秆混合固态发酵品质及微生物多样性研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学 2018
Wang C. Study on the solid-state co-fermentation quality of distiller's grains and sweet sorghum straw and its microbial community evolution [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [21] Yang X, Chen H, Gao H, Li Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2001,78(3):277-280

责任编辑: 杨爱东