

木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解稻秆过程中的产物及 pH 动态

王伟东^{1,2}, 王小芬³, 刘长莉¹, 李玉花¹, 吕育财³, 崔宗均^{3*}

(1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江八一农垦大学生命科技学院, 大庆 163319; 3. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 为了探明 WSC-6 分解稻秆过程中的代谢特性, 本试验以稻秆为唯一碳源, 50℃ 静止培养 WSC-6, 以一次性添加不同量稻秆和多次连续添加的方式, 研究了 WSC-6 分解稻秆的相对分解率、绝对分解量、分解产物及 pH 变化特性. 结果表明, 一次性添加 1% 稻秆时, pH 由初始的 7.8 迅速下降, 第 3 d 降到 6.0 后逐渐回升, 6 d 后稳定在 8.0 左右, 在此过程中 DO 值保持在 0.01 ~ 0.12 mg·L⁻¹ 微好氧条件. 以 GC-MS 法在稻秆分解过程中检测到乙醇、乙酸、乳酸、甘油等 10 种以上有机物, 其中乳酸的含量最高, 为 7.381 g·L⁻¹. 在 90 d 的实验中, 一次性添加不同量稻秆时, 随着稻秆量的增加, pH 下降得快而低, 且回升时间拖后, 当稻秆量为 5% 时 pH 下降到 5.0 后不再回升. 在多次连续添加稻秆的实验中, 隔 12d 和 15d 添加的处理 pH 重复下降和回升的规律性变化, 分解活性保持旺盛. 90 d 后隔 15 d 添加的处理相对分解率最高, 为 86.7%; 绝对分解量以隔 6 d 添加的处理最高, 为 32.4 g. pH 变化规律能够反映 WSC-6 对木质纤维素的分解进程及分解活性.

关键词: 稻秆; 木质纤维素分解菌; 复合系; WSC-6; pH

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)01-0219-06

Productions Analyses and pH Dynamics During Rice Straw Degradation by the Lignocellulose Degradation Bacteria System WSC-6

WANG Wei-dong^{1,2}, WANG Xiao-fen³, LIU Chang-li¹, LI Yu-hua¹, LÜ Yu-cai³, CUI Zong-jun³

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. College of Biological Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China; 3. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: To detect the metabolic characteristic of rice straw degradation by composite microbial system WSC-6, we cultured WSC-6 in the media used rice straw as the limiting carbon source. The rice straw was added in the style of different quantity once or the same quantity at the different time intervals during 90 days culture. The systems were cultivated under static condition at 50℃. The degradation ratio, absolute degradation quantity, products from degradation and dynamics of pH value of fermentation system were all investigated. The results showed: when 1% rice straw was added once, the pH of fermentation system decreased from initial 7.8 to 6.0 within the first three days inoculation, and after six-day cultivation, it increased to 8.0 and was stable. For dissolved oxygen concentration (DO), the value was maintained at range of 0.01 to 0.12 mg·L⁻¹ of microaerobic condition. During the rice straw degradation, more than ten kinds of products including ethanol, acetic acid, lactic acid and glycerol and so on were detected using GC-MS. Especially, the highest concentration of lactic acid among all products was 7.381 g·L⁻¹ at 24 h after inoculation. During 90-day cultivation, for the addition treatments of the different quantity once, the more rice straw added, the quicker and lower the pH decreased, and the longer time intervals returned the pHs were. Especially for 5.0% addition, when 5.0% of rice straw was added once, pH did not increase again after it decreased. Among the addition of the same quantity at the different time intervals, the trend of decrease-increase in pH at 12-day and 15-day intervals could be repeated and high degradation activity well maintained. After 90-day of inoculation, the highest degradation ratio occurred in the treatment at 15-day interval, which was 86.7%. The highest absolute quantity occurred in the treatment at 6-day interval, which was 32.4 g. The trend of pH changes can indicate the activity of lignocellulose degradation and degradation process of the WSC-6.

Key words: rice straw; lignocellulose degradation bacteria; composite bacterial system; WSC-6; pH

木质纤维素类物质是世界上最丰富、廉价和可再生的资源之一, 广泛存在于树木、秸秆、园林废弃物和畜禽粪便等有机固体废弃物中^[1~3]. 据估计, 全世界每年的木质纤维素产量多达 2 000 亿 t, 作物秸秆的总产量为 29 亿 t, 仅中国作物秸秆年产超过 6 亿 t^[4,5]. 但由于木质纤维素在自然环境中难以分解,

收稿日期: 2006-12-12; 修订日期: 2007-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571088); 黑龙江省博士后基金项目(LDH-Z05009); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1151G030); 黑龙江省“十一五”科技重点攻关项目(GB06B502)

作者简介: 王伟东(1970~), 男, 博士后, 副教授, 主要研究方向为生物质资源综合利用, E-mail: wwdcyy@sohu.com
* 通讯联系人, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

从而大量废弃成为环境垃圾.在世界能源危机和环境污染日益严重的背景下,人们迫切希望充分利用木质纤维素类生物质资源生产酒精等能源物质,因此,秸秆等木质纤维素的生物分解与利用成为国际上开发新能源的研究热点^[6-9].在 20 世纪中后期,木质纤维素微生物分解的研究多集中在真菌上,而且以纯培养为特征^[10-12],细菌对于木质纤维素的分解能力往往被忽视.进入 21 世纪以来,随着对自然界微生物群体功能的认识逐步加深,人们逐渐意识到纯培养的局限性.微生物群体功能的研究成为应用微生物发展的一个趋势和热点^[4,13,14].崔宗均等^[4,15-17]通过限制性培养和微生物间的优化组合获得了高效分解木质纤维素的微生物复合菌系,在国内外同行间引起高度重视,高效分解木质纤维素复合菌系的成功构建为加速天然木质纤维素资源的利用研究开辟了新的道路.

本研究以高温发酵的堆肥为材料,以水稻秸秆为唯一碳源,连续多代对菌系进行驯化,成功地构建了一组木质纤维素分解菌复合系 WSC-6,该复合菌系在 8d 内能够分解稻秆木质纤维素的 90%,连续继代培养 4 a 中菌系的菌种组成稳定,且木质纤维素分解活性保持不变^[18-20].本研究旨在探明 WSC-6 对木质纤维素的分解潜力,分解能力的持久性规律,以及木质纤维素的分解活性和 pH 值变化间的相关性,为今后进一步提高 WSC-6 的分解能力及工业化应用提供理论依据和技术支持.

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌种:本实验室从堆肥中筛选的木质纤维素分解菌复合系 WSC-6^[20].

稻秆:籽粒收获后的干稻秆,用 1% NaOH 浸泡 24 h 后,流水冲洗至中性,105℃ 烘箱烘至恒重,备用.

1.2 培养基及培养条件

PCS 培养基:蛋白胨 5.0 g,木质纤维素 10.0 g (处理的稻秆或滤纸),酵母粉 1.0 g,碳酸钙 3 g,氯化钠 5 g 溶解在 1 L 水中,在 121℃ 灭菌 20 min.接种后于 50℃ 静止培养.

1.3 稻秆分解过程中溶解氧量(DO)和 pH 的测定

在直径为 10 cm 的 1 L 柱形发酵罐内,添加 400 mL PCS 培养基和 4 g 稻秆,按培养基体积的 5% 量接种 WSC-6 菌液.发酵罐密封后,用导管以 290 mL·h⁻¹ 的流量向气层通气.发酵罐盖上安装 DO 测

定仪和 pH 计,接种后 24 h 内每隔 6 h 记录 1 次 DO 和 pH,此后每天记录 1 次.

1.4 稻秆分解产物的 GC-MS 测定

在 100 mL PCS 培养基中加入 1.0 g 稻秆,50℃ 静止培养.在接种后第 24、48、96 和 144 h,分别取发酵液 200 μ L,过 0.2 μ m 的滤膜,用气质联机(GC-MS, model QP.5050, Shimadzu, Japan)测定.分析柱:CP-Chirasil-Dex CB 型毛细管柱(25 m $\times$ 0.25 mm);柱箱温度程序:50℃ 2 min 后以 5℃/min 速度升至 100℃,再以 15℃/min 速度升至 190℃,保持 2 min,共 18 min;气化温度:190℃;离子源检测器,检测温度为 230℃,检测器电压为 1.5 kV;载气为氦气(64 kPa),流量为 30 mL/min;进样器为分流,分流比 1/22,进样量为 1 μ L.

测定数据的处理方法:对 GC-MS 检测的数据,利用 NIST 数据库进行定性分析.根据各峰的定性分析结果,配制相应标准样品的稀释液作为标准物进样,根据峰面积的比值利用外标法进行定量分析.

1.5 一次性添加及多次连续添加稻秆时 pH 及分解量

在 500 mL 三角瓶内添加 400 mL PCS 培养基和稻秆,用 3 层锡箔纸包瓶口,灭菌后接种 5% WSC-6,50℃ 静止培养.在培养过程中每天测定 1 次 pH,第 90 d,测定残留稻秆的干重.根据添加稻秆的时间和质量设 2 组试验.

第 1 组设 5 个处理,分别稻秆质量和培养基体积比一次性添加 1%、2%、3%、4% 和 5% 的稻秆,连续培养 90 d.

第 2 组设 5 个处理,第 1 次各添加 1% 稻秆,以后每处理分别隔 3、6、9、12 和 15 d 连续添加 1% 稻秆,连续培养 90 d.分别测定各处理的 pH 和稻秆减重.

pH 测定:取培养液 0.5 mL 用日本 HORIBA 产 B-212 型微量 pH 计测定.

稻秆减重测定:将培养 90 d 的培养液用玻璃纤维滤纸(Whatman, Japan)过滤,滤渣用盐酸和硝酸的混合液冲洗去除菌体^[21],剩余物于 105℃ 烘干至恒重后,剩余干物质的量与稻秆的总添加量(无菌对照)比较计算分解量和分解率.

2 结果与讨论

2.1 稻秆分解过程的外观特征

一次性添加稻秆的处理:培养液开始为淡黄色,培养 24 h 后,培养液变得微浑,出现少量气泡,有微

酸臭味.3 d后,浑浊度加深,有浓烈酸味,部分稻秆变柔软,站立的稻秆塌陷到液面下;5 d后,各处理浑浊度加大,稻秆部分变为丝状;8 d后,添加 1% 稻秆的培养液中见不到稻秆形状,仅有少量丝状物残留在发酵罐底部;10 d后,添加 2% 稻秆的培养液中颜色变为暗黄绿色,稻秆明显减少.40 d后,稻秆添加量 1%、2%和 3%的处理中,稻秆被完全分解,培养液也逐渐变清;稻秆添加量为 4%和 5%的处理稻秆变为柔软的絮状物,培养液粘稠度加大,成为糊状.发酵过程中发酵液颜色和粘稠度的加大,证明稻秆被微生物分解后,培养液中增加了多种可溶性发酵产物.

连续添加稻秆的各处理:每隔 3 d 和 6 d 分别连续添加稻秆的处理,除了浑浊度及气味和上述情况相似外,前 30 d 可见到添加的稻秆变软、减少,但 30 d 后不再减少,培养 60 d 后,液体逐渐呈青色.每隔 12 d 和 15 d 添加稻秆的处理,在培养的 90 d 内追加的稻秆陆续被分解,始终保持旺盛的分解状态,分解状况明显的优越于其他 3 个处理.

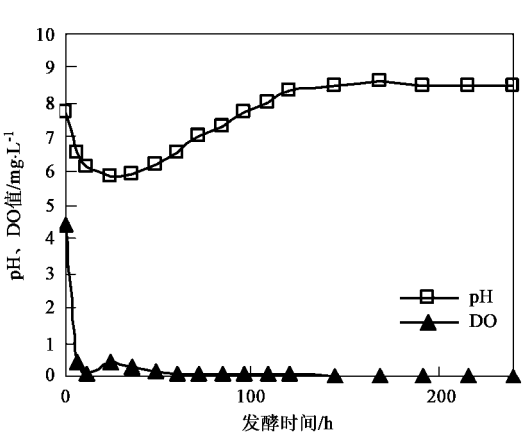
2.2 稻秆分解过程中 DO 和 pH 变化

按 1.3 中设定的测定时间和方法定期测定 DO,在培养的前6 h内,DO 由最初的 4.43 mg•L⁻¹下降到 0.42 mg•L⁻¹,到第 12 h 下降到 0.05 mg•L⁻¹,随后又略微上升,在 24 h 为 0.44 mg•L⁻¹,然后逐渐下降,在稻秆旺盛分解的 3~8 d内 DO 始终保持在 0.01~0.12 mg•L⁻¹(图 1).虽然 WSC-6 适合于如此低的溶氧量,但完全密封时木质纤维素不分解.

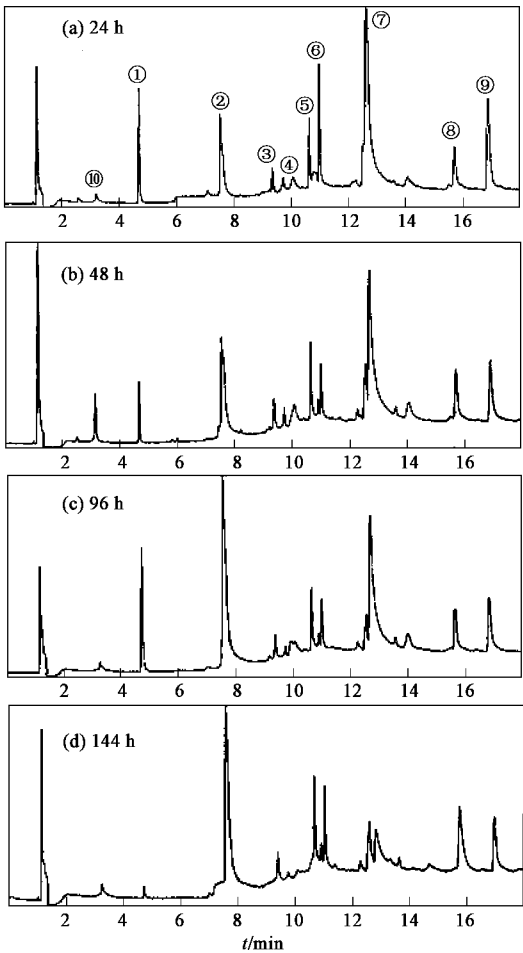
培养液的 pH 值在培养初期随着培养时间的延长逐渐下降,在 24 h 内,由最初的 7.6 下降到 5.8,培养 36 h 后 pH 值又逐渐上升,培养 10 d 后 pH 值稳定在 8.5 左右(图 1),这种 pH 的变化趋势是 WSC-6 和崔宗均等构建的 MCl^[4]旺盛分解木质纤维素时的特征,如果分解衰退,则 pH 下降缓慢或下降后不再回升.

2.3 WSC-6 分解稻秆的产物分析

在培养的第 24、48、96 和 144 h 分别用 GC-MS 分析发酵液成分,检测出 10 余个峰,其中能够用数据库定性的共有 10 种产物(图 2),包括: Ethanol、Acetic acid、Propanoic acid、Pentanol、4-Methyl-Propanoic acid、Butanoic acid、lactic acid、Glycerol、2-Hydroxy-Propanoic acid 和 Acetaldehyde.这些物质大部分是有机酸及其衍生物,产物中含量较高的为乙醇、乙酸、乳酸和甘油.表 1 列出了各个发酵时期各种主要产物的浓度.乙醇的浓度在发酵后 24 h 浓度



PCS 培养基, 50℃ 静止培养, 稻秆添加量 1%
图 1 WSC-6 在批处理分解试验中溶氧量(DO)和 pH 变化
Fig.1 Changes of DO and pH under the condition of inoculant volume 1%



①Ethanol ②Acetic acid ③Propanoic acid ④Pentanol
⑤4-Methyl-Propanoic acid ⑥Butanoic acid ⑦lactic acid
⑧Glycerol ⑨2-Hydroxy-Propanoic acid ⑩Acetaldehyde

图 2 WSC-6 稻秆分解产物的 GC-MS 分析图
Fig.2 Products from degradation of WSC-6 using GC-MS

为 $0.175\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 96h 浓度达到最大值, 为 $0.211\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 之后逐渐减少, 到 144 h 时已经几乎检测不到. 培养 24 h, 乙酸浓度已达到 $0.350\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 96 h 之内始终处于积累状态, 在第 96 h 浓度达到最大值, 为 $1.534\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. 乳酸的浓度在 16 h 时达到 $1.177\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 而 24 h 达到 $7.000\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 浓度在所有的产物

中最高. 结合以上结果与图 1 可见, 乳酸和乙酸大量积累与 pH 迅速下降同时发生, 证明 pH 的下降主要由有机酸的大量产生有关, 而到发酵中后期, 有机酸积累相对减少, pH 才逐渐回升. 甘油的含量一直较高. 如果想获得某种发酵产物, 在该产物积累的高峰期停止发酵, 就可以实现收集该产物的目的.

产物	时间/h					
	8	16	24	48	96	144
乙醇	0.097 ± 0.008	0.201 ± 0.028	0.175 ± 0.019	0.062 ± 0.007	0.211 ± 0.014	0.000 ± 0.000
乙酸	0.476 ± 0.031	0.446 ± 0.052	0.368 ± 0.022	0.449 ± 0.055	1.534 ± 0.111	0.651 ± 0.047
乳酸	0.277 ± 0.025	1.177 ± 0.203	7.381 ± 0.301	4.313 ± 0.441	4.684 ± 0.265	0.413 ± 0.058
甘油	0.031 ± 0.002	0.093 ± 0.011	0.098 ± 0.008	0.107 ± 0.018	0.104 ± 0.015	0.126 ± 0.020

2.4 一次性添加不同量稻秆时的 pH 变化

稻秆添加量分别为 1%、2%、3%、4% 和 5% 的 5 个处理在 90 d 发酵过程中 pH 动态如图 3 所示. 添加量为 1% 的处理, 在接种第 3 d pH 下降到 6.5, 之后逐渐回升, 在第 14 d pH 上升到 8.0 以上, 并保持稳定; 添加量为 3% 的处理 pH 下降到 5.3, 恢复到 8.0 以上并保持稳定需要 59 d; 4% 的处理直到实验结束才恢复到 8.0 以上; 而 5% 的处理 pH 下降后不再回升. 到实验结束时, 添加量为 1% 的处理, 添加的稻秆全部分解; 2% 和 3% 的处理, 大部分被分解; 5% 的处理仍然有很多秸秆剩余. 总的规律为随着稻秆添加量的增加 pH 下降得越低, 回升越慢, 分解能力丧失得越快. 图 2 的结果表明稻秆分解时产生多种有机酸类, 由此可见, 当稻秆的添加量较低时, 产生有机酸较少菌系自身较快消耗所产生的有机酸, 使 pH 较快回升, 菌系的分解能力也保持不变; 随着稻秆添加量的增加, 菌系消耗有机酸的时间延长, 当添加的稻秆过多, 所产生有机酸的量超过菌系的调节能力时, pH 无法再回升, 菌系也失去正常分解能力. 由图 3 可知 pH 在一定程度上能够反映出 WSC-6 分解稻秆的进程和分解能力.

2.5 多次连续添加稻秆时的 pH 变化

为了探讨 WSC-6 分解稻秆的潜力, 在第 1 次添加 1% 的稻秆后间隔不同时间连续添加了 1% 的稻秆. 结果, 第 1 次添加稻秆后培养 24 h 时 pH 由 8.1 迅速下降到 6.1, 3 d 后 pH 开始回升至 6.4, 6 d 后回升至 6.7, 9 d 后回升至 7.2. 在 pH 还没有回升至该菌系的平衡点 8 左右的情况下, 隔 3 d 添加的处

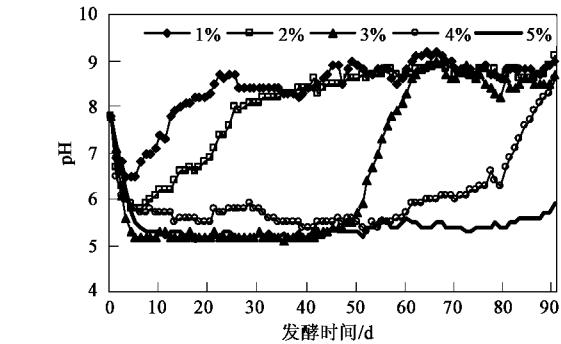


图 3 一次性添加不同量稻秆时培养液的 pH 变化

Fig.3 Changes of pH during fermentation under different addition once

理和隔 6 d 添加的处理在第 2 次添加稻秆后 pH 下降至 6.1 左右没有再回升(图 4); 隔 9 d 添加的处理比隔 3 d 和隔 6 d 添加处理 pH 回升幅度高、回升次数多, 但在 49 d 以后 pH 失去回升能力, 始终在 6 以下, 同时也失去了分解能力.

隔 12 d 添加的处理在第 1 次 pH 回升至 7.6, 第 2 次添加后回升至 7.2, 以后在 90 d 的实验中 pH 每次都在 6.0~7.2 之间起伏变化, 一直保持较旺盛的分解能力; 隔 15 d 添加的处理在第 1 次 pH 回升至 7.8, 第 2 次以后每次添加后 pH 都能回升至 7.8 以上, 在 90 d 的实验中 pH 每次都在 6.7~7.8 之间起伏变化, 每次添加的稻秆全部分解.

综上所述, 不同间隔时间添加稻秆后, 各处理发酵液的 pH 变化大致分为 3 种情况: ①pH 曲线为规则性的波浪曲线, 为每隔 12 d 和 15 d 添加的处理; ②每隔 3 d 和 6 d 添加的处理 pH 曲线经过 1 个峰值

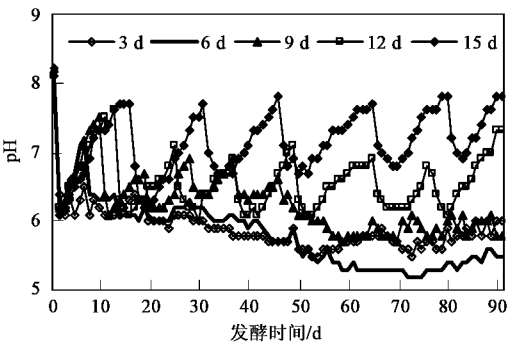


图 4 不同间隔时间多次添加稻秆时的 pH 变化
Fig.4 Changes of pH during fermentation under the same addition at different time intervals

后,基本没有再恢复的峰值出现;③每隔 9 d 添加的处理介于二者之间,在接种后 49 d 内表现出规律性的波动变化,之后 pH 调节能力减弱,到试验结束时 pH 为 5.8.由此说明,添加稻秆的频度对 pH 变化有

很大影响.如果过于频繁,分解产生的有机酸超过复合系自身的协调能力,则 pH 不呈规律性变化,分解能力减弱.实验结果表明,当多次添加 1% 稻秆时只要间隔 12 d 以上添加,WSC-6 既具有较强的 pH 调节能力,又能够充分保持分解稻秆.

2.6 稻秆的分解率和绝对分解量

分解率与绝对分解量是反映菌系分解潜力的重要指标,表 2、3 列出了不同处理方式下稻秆的分解量和分解率.从分解率上看,一次性添加量越少分解率越高,多次添加的间隔时间越长分解率越高.但是从分解量上看,一次性添加量越多分解量越大,间隔越短分解量却不一定越大,从表 3 可见,间隔 6 d 分解量最大.所以,不同的添加方式对底物的分解量和分解率都有很大影响,少量多次的添加方式分解量高于一次性添加.该方式可以最大程度的发挥复合系的分解潜力,在少量多次添加的试验中,每次间隔

表 2 一次性添加不同量稻秆的分解量及分解率

项目	添加比例/%				
	1	2	3	4	5
添加次数	1	1	1	1	1
添加总重/g	4.00±0.00	8.00±0.00	12.00±0.00	16.00±0.00	20.00±0.00
残重/g	0.60±0.03	2.10±0.07	5.50±0.33	9.50±0.50	13.20±1.02
分解量/g	3.40±0.07	5.90±0.53	6.10±0.71	6.50±0.34	6.80±0.43
分解率/%	85.00±7.50	73.70±6.50	50.80±6.10	40.50±2.14	34.00±2.46

表 3 不同间隔时间多次添加稻秆的分解量及分解率¹⁾

项目	间隔天数/d				
	3	6	9	12	15
添加次数	12	12	10	7	6
添加总重/g	48.00±0.00	48.00±0.00	40.00±0.00	28.00±0.00	24.00±0.00
残重/g	17.00±1.76	15.60±1.82	12.40±1.43	4.80±0.44	3.20±0.85
分解量/g	31.00±2.62	32.40±3.54	27.60±2.06	23.20±1.98	20.80±1.87
分解率/%	64.60±5.55	67.40±6.32	69.00±5.48	82.80±7.85	86.70±7.40

1)每次添加稻秆量为 1%

6 d 添加的分解量最大.

3 结论

(1)WSC-6 分解稻秆的产物中,检测到乙醇、乙酸和乳酸等 10 多种有机物,在分解的不同阶段产物的种类和浓度不同,这对开发秸秆转化技术提供参考.

(2)WSC-6 发酵体系的 pH 变化与分解能力具有

相关性.pH 能够迅速下降到微酸性,再恢复到微碱性并保持稳定的变化规律,是 WSC-6 分解木质纤维素时的特殊规律,是具有正常分解能力的体现.若 pH 下降后不能恢复到微碱性水平,则表明该发酵体系木质纤维素的分解能力衰退.

(3)底物的添加量和添料时间间隔直接影响菌系的分解能力.一次性添加量越少分解率越高,1% 的一次性添加量分解率最高,但 5% 的分解量最大.

多次添加时间间隔的时间越长,分解率越高,而间隔时间 6 d 的分解量最大,且多次的添加的分解量远高于一次性添加的处理.该结果对挖掘纤维素分解菌的分解潜力,开发秸秆纤维素利用技术具有重要参考价值.

参考文献:

- [1] Schwarz W H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 634-649.
- [2] Pérez J, Muñoz-Dorado J, T de la Rubia, *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview[J]. Int Microbiol, 2002, **5**: 53-63.
- [3] 王伟东,崔宗均,王小芬,等.快速纤维素分解菌复合系 MCI 对秸秆的分解能力及稳定性[J].环境科学,2005, **26**(5): 156-160.
- [4] 崔宗均,李美丹,朴哲,等.一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MCI 的筛选及功能[J].环境科学,2002, **23**(3): 36-39.
- [5] 高祥照,马文奇,马常宝,等.中国作物秸秆资源利用现状分析[J].华中农业大学学报,2002, **21**(3): 242-247.
- [6] Zhang M, Eddy C, Deanda K, *et al.* Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis* [J]. Science, 1995, **267**: 240-243.
- [7] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 17-34.
- [8] Yasuya F, Shouji T, Mitsuyoshi U, *et al.* Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a Yeast strain displaying cellulolytic enzymes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(10): 5136-5141.
- [9] Kato S, Haruta S, Cui Z, *et al.* *Clostridium straminisolvans* sp. nov., retelic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community[J]. Int J System Evol Microbiol, 2004, **54**: 2043-2047.
- [10] Takao S, Kamagata Y, Sasaki H. Cellulose production by *Penicillium purpurogenum*[J]. J Ferment Technol, 1985, **63**(2): 127-134.
- [11] Tilbeurgh H, Tomme P, Claeysens M, *et al.* Limited proteolysis of the cellobiohydrolase from *T. reesei* [J]. FEBS Lett, 1986, **204**(2): 223-227.
- [12] Teeri T T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases[J]. Trends in Biotechnology, 1997, **15**(5): 160-167.
- [13] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. Apply Microbiology Biotechnology, 2002, **59**: 529-534.
- [14] Wang X, 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.
- [15] Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al.* Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Cellulose-Degrading Community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(11): 7099-7106.
- [16] Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al.* Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, **51**: 133-142.
- [17] Yang H Y, Wang X F, Liu J B, *et al.* Effect of different water soluble carbohydrate contents on silage fermentation of the wheat straw[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, **101**(3): 232-237.
- [18] 王伟东,崔宗均,牛俊玲,等.一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响[J].中国农业大学学报,2004, **9**(5): 7-11.
- [19] 王伟东,王小芬,高丽娟,等.高效稳定纤维素分解菌复合系 WSC-6 的筛选及其功能[J].黑龙江八一农垦大学学报,2005, **17**(3): 14-17.
- [20] 王伟东,崔宗均,杨洪岩,等.高效稳定纤维素分解菌复合系 WSC-6 的稳定性研究[J].中国环境科学,2005, **25**(5): 567-571.
- [21] Updegraff D M. Semimicro Determination of Cellulose in Biological Materials[J]. Analytical Biochemistry, 1969, **32**: 420-424.