

湖光岩风景区耐高温微生物多样性分析及产酶特性研究

赖崇熙, 刘唤明*, 唐金燕

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省现代农业科技创新中心, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要 [目的] 筛选湖光岩风景区耐高温菌株并且对其进行多样性分析以及产酶特性的研究。[方法] 通过 50 °C 高温分离与筛选, 分离出耐高温微生物菌株, 对分离得到的菌株划线纯化, 并且进行 16S rRNA 鉴定, 通过水解圈法进一步探究它们表现出来的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的产酶能力。[结果] 分离得到 10 株菌株, 经过 16S rRNA 分析发现, 有 7 株菌株属于芽孢杆菌 (*Bacillus*), 占耐高温菌株的 70%, 属于优势菌株, 2 株菌株属于短芽孢杆菌 (*Brevibacillus*), 1 株菌株属于解脲芽孢杆菌 (*Ureibacillus*)。对筛选出的耐高温菌株进行蛋白酶、产纤维素酶及产淀粉酶的产酶能力研究, 发现共 5 株表现出有产蛋白酶能力, 有 4 株表现出有产淀粉酶能力, 有 4 株表现出有产纤维素酶能力。[结论] 湖光岩风景区耐高温菌株为芽孢杆菌, 并且部分菌株具有产多种酶的能力。

关键词 耐高温; 产酶特性; 16S rRNA; 生物多样性; 湖光岩风景区

中图分类号 X172 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)18-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.18.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Diversity Analysis and Enzyme Production Characteristics of High-temperature Resistant Microorganisms in Huguangyan Scenic Area

LAI Chong-xi, LIU Huan-ming, TANG Jin-yan (School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Modern Agricultural Science and Technology Innovation Center, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] The high temperature resistant strains of Huguangyan scenic area were screened and their diversity and enzyme production characteristics were studied. [Method] The high-temperature resistant microbial strains were isolated and screened at 50 °C. The isolated strains were streaking purified and identified by 16S rRNA. The enzyme-producing capacities of protease, amylase and cellulase expressed by them were further explored by hydrolytic circle method. [Result] 10 strains were isolated, according to 16S rRNA analysis, there were 7 strains belonging to *Bacillus*, accounting for 70% of the high-temperature resistant strains, belonging to the dominant strain, 2 strains belonging to *Brevibacillus* and 1 strain belonging to *Ureibacillus*. The ability of protease production, cellulase production and amylase production of the selected high-temperature resistant strains was studied, and it was found that 5 strains showed protease production ability, 4 strains showed amylase production ability, and 4 strains showed cellulase production ability. [Conclusion] The high temperature resistant strain in Huguangyan scenic area is *Bacillus*, and some strains have the ability to produce a variety of enzymes.

Key words High temperature resistance; Enzyme production characteristics; 16S rRNA; Biodiversity; Huguangyan Scenic Area

耐高温微生物是一类最适生长温度大于 50 °C 微生物的总称^[1], 其通常分布在地质结构活跃的酸性硫磺区、淡水温泉和间歇喷泉深海火山口等^[2]。虽然目前耐高温菌株的探究并不多, 但是在实际的工业生产中已经有各种各样的研究应用, 例如詹亚斌等^[3]运用耐高温油脂降解菌株降解厨余垃圾, 加快堆肥腐熟的过程; 刘辉等^[4]用耐高温的酿酒酵母进行酿酒, 提高乙醇的生产效率, 降低成本, 提高乙醇的稳定性; 侯世杰^[5]利用耐高温复合菌剂对有机废弃物进行堆肥处理, 实现废弃物的资源化回收; 温俊丽^[6]研究发现新的高温产电厚壁菌门细菌为高温燃料电池的研发提供了新的思路; Seesat 等^[7]用嗜热木质纤维素分解菌对稻秆进行发酵并且在 15 d 达到了产甲烷和沼气的最大值; Liu 等^[8]研究发现嗜热细菌+ 0.2 g/g VSS 烷基聚葡萄糖可以有效降解海洋养殖中产生的废弃物等。耐高温微生物与常规的微生物相比存在极大的优势, 耐高温的特性使其在发酵工业、废水处理、工业生产等方面都有广泛的应用前景^[9]。耐高温微生物产生的酶系具有催化效率高、对反应冷却系统要求低、热稳定性强、节约能源、专一性强等特点^[10], 这些优点使得耐高温酶

系一度成为人们的研究热点, 其中以蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶尤为突出。Darwesh 等^[11]使用 G550 菌株产生的耐高温碱性蛋白酶作为生物防治剂抑制线虫的繁殖; Liu 等^[12]使用耐高温的纤维素酶发酵生产生物乙醇并且生产率达 0.112 g/g 干物底; Vaikundamoorthy 等^[13]研究表明海洋细菌蜡样芽孢杆菌产生的耐高温淀粉酶对海洋生物膜形成的细菌铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌表现出良好的抗生物膜活性, 具有成为良好抗菌剂的潜力。这些都表明耐高温的微生物及其酶系已经成为人们的研究热点, 但是目前所发现的耐高温的微生物及其酶系并不多, 需要人们不断地探索, 才能满足人们的生产以及科研的要求。

湖光岩坐落于我国大陆南端, 具有特殊的玛珥火山地貌, 是世界两大玛珥湖之一^[14]。玛珥湖是由于火山爆发导致底层塌陷形成盆地, 而火山的喷发物在附近形成“围墙”将其与周围环境分隔开, 盆地形成积水最后变成湖^[15]。也正是如此使得湖光岩玛珥湖可以记录下其气候的变化、季风的演变, 而其土壤和湖水中很好地保存了各种各样的古细菌、耐高温菌、甲烷微菌、藻类、浮游植物等^[16-18]。湖光岩的特殊地貌使得在这里生长的微生物与其他地区的微生物存在一定程度上的差别, 有的学者也进行了关于湖光岩的微生物的多样性研究^[19-21], 但是目前鲜见湖光岩耐高温微生物相关方面的研究。因此该研究通过对湖光岩耐高温微生物的多样

基金项目 湛江市海洋经济创新发展展示示范项目(XM-202107-02B2)。

作者简介 赖崇熙(1998—), 男, 广东南沙人, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工。*通信作者, 副教授, 硕士, 硕士生导师, 从事水产品加工研究。

收稿日期 2021-11-21

性分析以及产酶特性的研究,为湖光岩的菌株开发利用提供参考,为耐高温微生物以及耐高温酶的丰富发展提供助力。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试材。土壤样品,取自湛江市湖光岩风景区 10 cm 以下;革兰氏染色液试剂盒,北京陆桥技术股份有限公司;2×MightyAmp Buffer Ver.2、MightyAmp DNA 聚合酶,宝生物工程(大连)有限公司;16S rRNA 细菌通用引物 1492R、16S rRNA 细菌通用引物 27F、DL 2000 DNA Marker、ddH₂O, 生工生物工程(上海)股份有限公司;核酸染色液,北京索莱宝科技有限公司;6×loading buffer、琼脂糖,广州艾基生物技术有限公司。

1.1.2 培养基。羟甲基纤维素钠培养基,参考张进良^[22]的方法,即 NaCl 6 g、CaCl₂ 0.1 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 2 g、(NH₄)₂SO₄ 2 g、CMC-Na(羧甲基纤维素钠)10 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。脱脂牛奶培养基^[23]:脱脂奶粉 100 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL,将配好的琼脂和奶粉进行分开灭菌,防止奶粉发生变性,琼脂 121 ℃ 灭菌 20 min,脱脂奶粉 100 ℃,5 min。可溶性淀粉培养基:可溶性淀粉 20 g、KNO₃ 1 g、NaCl 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄ 10 mg、琼脂 20 g、水 1 000 mL。营养琼脂:琼脂 20.0 g、牛肉膏 3.0 g、氯化钠 5.0 g、蛋白胨 10.0 g。

1.1.3 仪器。AUY220 电子天平,日本岛津企业管理(中国)有限公司;SW-CI-2F 洁净工作台、BXP-280S 微生物培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;A300 梯度 PCR 仪,杭州朗基科学仪器有限公司;LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌锅,上海华线医用核子仪器有限公司;H6-1 微型电泳槽,上海精益电器厂有限公司;DYY-8C 电泳仪,北京六一生物科技有限公司;JY3002 精密电子天平,上海精密科学仪器有限公司;L1100A 生物显微镜,广州粤显光学仪器有限公司;ZF-20D 暗箱式紫外分析仪,孔义市子华仪器有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 湖光岩风景区耐高温微生物的分离纯化。称取 10 g 的土壤样品加至 90 mL 的无菌水中,振荡 20 min 使样品与无菌水充分混匀,配制 10⁻¹ 的稀释液。取 1 mL 的稀释液加至 9 mL 的无菌水中依次配制 10⁻²、10⁻³ 稀释度的稀释液。取分别 100 μL 的 10⁻²、10⁻³ 稀释菌液在营养平板上进行涂布分离,将涂布完成的平板在培养箱中正面放置 10 min,待菌悬液吸收完全后再倒置进行 50 ℃ 培养 24 h,通过此法分离出的菌株为耐高温微生物。挑取涂布平板内菌落特征不一样的菌落用四分法划线于营养琼脂平板内,对菌株进行多次纯化直到分出单个菌落为止,并且制作成斜面进行菌种保藏。

1.2.2 耐高温菌株的鉴定。

1.2.2.1 形态学鉴定。从分离出的耐高温微生物菌种斜面上取一环菌株在营养琼脂上进行划线,在 50 ℃ 恒温培养箱培养 48 h,观察并且记录菌株的菌落形态,通过革兰氏染色进行制片,然后用显微镜进行观察,记录染色结果。

1.2.2.2 分子生物学鉴定。采用 16S rRNA 进行鉴定,对分离出的菌株进行划线,得到单菌落,采用细菌的 DNA 作为模板,用通用引物 27F(-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-)和 1492R(-GGTTACCTTGTACGACTT-)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 30 μL:2×MightyAmp buffer 15.00 μL, Mighty-Amp DNA 聚合酶 0.75 μL,引物 27F(10 μmol/μL) 0.75 μL,引物 1492R(10 μmol/μL) 0.75 μL, ddH₂O 12.75 μL。PCR 反应条件:98 ℃ 预变性 2 min,98 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 15 s,68 ℃ 延伸 90 s,进行 40 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 终止反应保存。取 4 μL 的 PCR 扩增产物与 1 μL 的 6×loading buffer 混合在 1% 的凝胶中电泳,将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列检测。将检测结果与 EzBioCloud 和 NCBI 中的碱基序列数据进行 Blast 对比,搜索出同源相关性最高的标准参考序列,对其构建系统发育树并且进行多样性分析。

1.2.3 产酶能力测定。

1.2.3.1 产蛋白酶能力。将筛选出的菌株挑取单菌落于脱脂奶粉平板上,50 ℃ 培养 24 h,水解圈越大,产酶能力越强。

1.2.3.2 产淀粉酶能力。将筛选出的菌株挑取单菌落于可溶性淀粉平板上,50 ℃ 培养 24 h,滴加卢戈氏碘液观察水解圈大小,水解圈越大,产酶能力越强。

1.2.3.3 产纤维素酶能力。将筛选出的菌株挑取单菌落于羧甲基纤维素钠平板上,50 ℃ 培养 5 d,加入 1% 刚果红溶液,使刚果红溶液覆盖整个平板等待 15 min 左右,用 1 mol/L 氯化钠溶液洗去刚果红溶液,观察水解圈大小,水解圈越大,产酶能力越强。

2 结果与分析

2.1 耐高温微生物的分离 从湖光岩的土壤样品中,通过高温培养分离出 10 株细菌,编号为 S₁~S₁₀,对其进行纯化,根据菌落的颜色、菌落的形态特征、菌落的干湿黏稠特征、菌落的大小、边缘分布特征、有无光圈等记录其菌落特征,结果如表 1 所示。其中 S₇ 和 S₉ 菌株表现出淡黄色,其余 8 株均为白色;细菌形态为圆形的共有 7 株,分别为 S₁、S₂、S₃、S₄、S₅、S₈、S₉,剩余的 S₁₀ 为不规则形状,S₇ 为点状,S₆ 为线状;只有 S₁₀ 菌株不易挑起;只有 S₆ 和 S₁₀ 菌株边缘不完整,其中 S₆ 边缘呈不规则,S₁₀ 边缘呈啮蚀状;只有 S₆ 菌株表面不光滑;所有菌株都没有光泽。

2.2 耐高温微生物形态学鉴定 经革兰氏染色以及镜检检测,10 株有耐高温特点的菌株有一株为革兰氏阴性菌,编号为 S₂,其余 9 株均为革兰氏阳性菌。10 株菌株的形态全部呈杆状,其中,S₉、S₁₀ 为长杆菌,其余 8 株为短杆菌。

2.3 湖光岩风景区耐高温微生物多样性分析 将 10 株耐高温菌株进行 16S rRNA 序列检测,采用 NCBI、EZBioCloud、GenBank 等公共数据库进行相似性搜索,把与检测出的基因序列相似性较高的已取得证书的模式菌株的基因序列下载下来,对它们的类别进行区分以及统计它们之间的相似性,结果见表 2。从表 2 可以看出,这 10 株细菌被分为 3 个类群,S₁、S₉、S₁₀、S₃、S₇、S₄、S₈ 为芽孢杆菌(*Bacillus*)类群,而 S₅、

S₂ 为短芽孢杆菌 (*Brevibacillus*) 类群, S₆ 为解脲芽孢杆菌 (*Ureibacillus*) 类群。其中 *Bacillus* 属的菌株有 7 株, 占耐高温菌株的 70%, 占绝对优势, 属于优势菌群。

表 1 耐高温菌株的菌落形态

Table 1 Colony morphology of high temperature resistant strains

菌株编号 Strain No.	颜色 Color	形状 Shape	边缘 Edge	菌落状态 Colony status	是否湿润 Is it moist	是否光滑 Is it smooth	挑取 Pick	是否黏稠 Is it sticky	是否有光泽 Is it shiny
S ₁	白色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₂	白色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₃	白色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₄	白色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₅	白色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₆	白色	线状	不规则	扁平	否	否	易挑起	否	否
S ₇	淡黄色	点状	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₈	白色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₉	淡黄色	圆形	完整	拱起	是	是	易挑起	是	否
S ₁₀	白色	不规则	呈啮蚀状	扁平	否	是	不易挑起	否	否

表 2 所筛选细菌与其系统发育关系最为密切的典型菌株之间的系统发育关系

Table 2 Phylogenetic relationship between the screened bacteria and the typical strains with the closest phylogenetic relationship

类群 Group	相似度最高的模式菌株 The most similar type strain	相似性 Similarity//%
<i>Bacillus</i>	S ₁ <i>Bacillus thaonhiensis</i>	99.10
	S ₉ <i>Bacillus zanthoxyli</i>	99.23
	S ₁₀ <i>Bacillus velezensis</i>	99.71
	S ₃ <i>Bacillus safensis</i>	98.83
	S ₇ <i>Bacillus cereus</i>	99.17
	S ₄ <i>Bacillus altitudinis</i>	99.24
	S ₈ <i>Bacillus oceanisediminis</i>	99.21
<i>Brevibacillus</i>	S ₅ <i>Brevibacillus thermoruber</i>	98.76
	S ₂ <i>Brevibacillus borstelensis</i>	99.64
<i>Ureibacillus</i>	S ₆ <i>Ureibacillus suwonensis</i>	98.69

把送检得出的样品的基因序列与相似性较高的已取得证书的模式菌株的基因序列采用 MEGA 7.0 进行系统发育树的构建, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 这 10 株菌株均与不同的典型菌株聚在一起, 再结合表 2 细菌序列比对结果, 这些从湖光岩风景区筛选出的有 50 °C 耐高温特性的菌株与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rDNA 基因序列相似性在 98.6%~99.8%, 说明这些菌株由湖光岩风景区筛选出的有 50 °C 耐高温特性的菌株与其系统发育关系最密切的相关菌株之间存在不同程度的遗传差异。

2.4 产酶特性 由表 3 可知, 有 4 株菌株具有产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的能力, 其中菌株 S₁₀ 的产酶能力最强, 这些菌株将在工业生产中有巨大的应用前景。菌株 S₅ 只具备产蛋白酶的能力, 有 5 株菌株均不具有产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的能力。

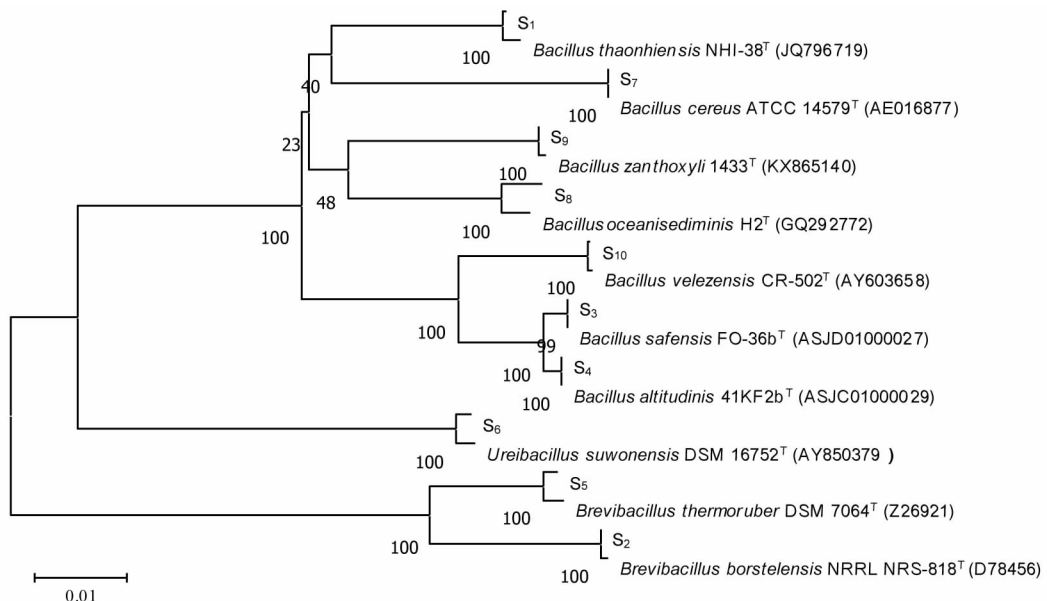


图 1 依据 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA sequence

3 讨论与结论

微生物具有生长范围广、繁殖快等特点,因此微生物制剂被广泛应用于农业、工业、食品以及医学与生物技术领域^[24]。但是随着工业的发展,人们对于生产效率的要求不断提高,酶制剂就出现在人们的眼前,通过微生物的发酵产生大量的生物酶再将其分离制作成酶制剂,酶制剂具有微量高效、专一性强、节能环保、绿色无毒、反应条件温和的优点,这使得其在基础研究、医药、养殖、日常生活、环保、饲料工业、皮革工业、食品领域得到了广泛的应用^[25-26]。

酶制剂在实际生产中往往是以一种或几种单一酶制剂为主体,与其他单一酶制剂混合而成的^[27],这样使得复合酶制剂的生产和应用变得比较烦琐。蛋白酶在洗涤剂、皮革、医疗、食品等工业领域有着广泛的应用^[28];纤维素酶被广泛应用在食品、造纸、发酵、纺织、农业、制药、生物燃料等行业^[29];淀粉酶在从食品、饮料、纺织等不同过程中都有出色的应用市场^[30],这些酶的运用领域都是相关联的,因此探究发现能同时产生大量蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶的微生物就显得十分有必要,这样就可以直接解决工业上多种酶的需求,节约生产流程和成本。

表3 菌株产酶能力

Table 3 Enzyme production capacity of the strain

菌株编号 Strain No.	产蛋白酶能力 Protease-producing ability	产淀粉酶能力 Amylase-producing ability	产纤维素酶能力 Cellulase-producing ability
S ₃	++	+	++
S ₄	+	+	+++
S ₁	++	+	++
S ₅	++	-	-
S ₁₀	+++	+	+++
S ₉	-	-	-
S ₆	-	-	-
S ₇	-	-	-
S ₈	-	-	-
S ₂	-	-	-

注:以R表示水解圈直径与菌落直径之比, $0 \leq R < 2$ 用“+”表示, $2 \leq R < 4$ 用“++”表示, $R \geq 4$ 用“+++”表示,“-”表示无水解圈产生

Note: R is the ratio of hydrolytic circle diameter to colony diameter, “+” ($0 \leq R < 2$), “++” ($2 \leq R < 4$), “+++” ($R \geq 4$), “-” indicates that no hydrolytic circle is generated

经过耐高温的分离培养、纯化得到10株耐高温微生物,对其进行16S rRNA鉴定发现其中有7株菌株属于*Bacillus*,2株菌株属于*Brevibacillus*,1株属于*Ureibacillus*。通过测定分离菌株的产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶能力可以得知,菌株S₁₀的产酶能力最强,能同时产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶,相信该菌株的探索研究能为湖光岩的菌株开发利用提供参考。

参考文献

[1] 侯小珊.高温蛋白酶产生菌的选育及其在固态发酵菜籽粕制备多肽中的应用[D].镇江:江苏大学,2019.
[2] 曹井国,赵树欣,程丽娟,等.高温菌及其在有机废液处理中的应用[J].工业水处理,2006,26(1):9-12.
[3] 詹亚斌,魏雨泉,陶兴玲,等.耐高温油脂降解菌株的筛选、鉴定及其在好氧堆肥中的应用[J].环境污染与防治,2021,43(7):812-818.

[4] 刘辉,何太波,赵国森,等.耐高温酿酒酵母菌的筛选及发酵性能研究[J].酿酒科技,2020(6):46-49.
[5] 侯世杰.耐高温菌的分离筛选及其在农村有机废弃物资源化处理中的应用[D].西安:西安建筑科技大学,2020.
[6] 温俊丽.高温微生物燃料电池产电性能的研究[D].秦皇岛:燕山大学,2019.
[7] SEESATAT A, RATTANASUK S, BUNNAKIT K, et al. Biological degradation of rice straw with thermophilic lignocellulolytic bacterial isolates and biogas production from total broth by rumen microorganisms[J/OL]. Journal of environmental chemical engineering, 2021, 9(1) [2020-06-25]. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104499.
[8] LIU Y J, GUO L, GAO P T, et al. Thermophilic bacteria combined with alkyl polyglucose pretreated mariculture solid wastes using as denitrification carbon source for marine recirculating aquaculture wastewater treatment[J/OL]. Science of the total environment, 2021, 792 [2021-06-25]. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148447.
[9] 黄山,孟醒,毛虎章,等.新疆火焰山土壤中耐高温菌株的分离与鉴定[J].南开大学学报(自然科学版),2011,44(5):109-111.
[10] 周莲.酒糟中高温菌的筛选及生物有机肥发酵菌剂的研究[D].贵阳:贵州大学,2016.
[11] DARWESH O M, EL-HAWARY A S, EL KELANY U S, et al. Nematicidal activity of thermostable alkaline protease produced by *Saccharomonospora viridis* strain Hw G550[J]. Biotechnology reports, 2019, 24:1-25.
[12] LIU D Y, ZHANG R F, YANG X M, et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes[J]. International biodeterioration & biodegradation, 2011, 65(5):717-725.
[13] VAIKUNDAMOORTHY R, RAJENDRAN R, SELVARAJU A, et al. Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity[J]. Bioorganic chemistry, 2018, 77:494-506.
[14] 邓隼丰.湖光岩——露天的“自然博物馆”[J].地理教学,2020(11):2, 65.
[15] 韩超.湛江地区湖光岩玛珉湖沉积物记录的1200年以来大气汞沉降历史[D].北京:中国地质大学(北京),2018.
[16] 吕同艳,胡道功,马秀敏,等.湖光岩——古气候记录者[N].中国矿业报,2017-12-13(005).
[17] HOU Q H, FANG Z, ZHU Q M, et al. Microbial diversity in Huguangyan Maar Lake of China revealed by high-throughput sequencing[J]. Journal of oceanology and limnology, 2019, 37(4):1245-1257.
[18] 张国维.湖光岩玛珉湖溶解态氮与浮游植物及其氮吸收的研究[D].湛江:广东海洋大学,2014.
[19] 秦青英,曾永辉,郭倩茹,等.环境16S rDNA和16S reDNA序列分析湖光岩玛珉湖的浮游细菌组成[J].广东海洋大学学报,2013,33(3):1-9.
[20] 纪建达.湖光岩玛珉湖浮游细菌与古菌多样性的研究[D].湛江:广东海洋大学,2010.
[21] 陈晓洁.湖光岩玛珉湖好氧不产氧光合细菌遗传多样性的分析[D].湛江:广东海洋大学,2012.
[22] 张进良.高温纤维素分解菌的分离和鉴定[J].河南师范大学学报(自然科学版),2011,39(3):141-143,147.
[23] 曹慧,张腾月,赵龙妹,等.土壤中高产蛋白酶菌株产酶条件及酶学性质[J].微生物学通报,2020,47(7):2072-2081.
[24] 占今舜,张彬.微生物制剂的应用研究进展[J].江西饲料,2013(2):16-19.
[25] 付建蒙.酶制剂的研究与应用现状[J].农家参谋,2019(10):218.
[26] 冷向军.水产饲料中酶制剂的研究与应用[J].饲料工业,2018,39(22):1-7.
[27] 刘明锋,陈立祥.复合酶制剂在动物生产中的应用研究进展[J].饲料博览,2014(3):32-34.
[28] SHARMA K M, KUMAR R, PANWAR S, et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties[J]. Journal, genetic engineering & biotechnology, 2017, 15(1):115-126.
[29] SINGH A, BAJAR S, DEVI A, et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications[J/OL]. Bioresource technology reports, 2021, 14 [2021-05-27]. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652.
[30] SHARMA A, SATYANARAYANA T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications[J]. Process biochemistry, 2013, 48(2):201-211.