



## 双叉犀金龟肠道纤维素降解菌的筛选及酶活力比较

贾金姗, 马悦, 张俊杰, 阮长春, 杜文梅\*, 胡莹

(吉林农业大学生物防治研究所/吉林省农业害虫生物防治国际科技合作重点实验室, 长春 130118)

**摘要:** 纤维素类物质是地球上分布最为广泛的可再生资源, 筛选高效的纤维素降解菌对于纤维素生物资源开发和利用具有重要的意义。采用刚果红染色法, 从双叉犀金龟 *Allomyrina dichotoma* 3龄幼虫肠道筛选到58株纤维素降解菌, 选择透明圈直径与菌株直径比值较大的菌株进行酶活力测定, 综合刚果红染色法与酶活力测定结果, 菌株M24产纤维素酶能力最强, 其滤纸酶、内切葡聚糖苷酶、外切葡聚糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 活力大小分别为13.14 U/mL、45.67 U/mL、18.29 U/mL、36.30 U/mL; 通过16S rDNA序列比对分析, 鉴定其为贝莱斯芽孢杆菌; 通过基因组ONT测序技术获取该菌的全基因组序列, 该菌株基因组全长4 290 258 bp, 共注释到15个纤维素酶相关基因, 其中包括4个内切- $\beta$ -1,4葡聚糖酶基因(EC 3.2.1.4), 9个 $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.91)相关基因, 2个外切 $\beta$ -1,4葡聚糖酶(EC 3.2.1.91)相关基因。结果为构建纤维素降解工程菌提供了重要的理论依据和供试材料。

**关键词:** 双叉犀金龟; 肠道微生物; 纤维素降解菌; 酶活力; 基因组

中图分类号: Q965

文献标识码: A

### Screening of intestinal cellulose-degrading bacteria and comparison of enzyme activity in the *Allomyrina dichotoma*

JIA Jin-Shan, MA Yue, ZHANG Jun-Jie, RUAN Chang-Chun, DU Wen-Mei\*, HU Ying  
(Engineering Research Center of Natural Enemy Insects, Jilin Provincial International Cooperation Key Laboratory for Biological Control of Agricultural Pests, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

基金项目: 2023年吉林农业大学生科技创新基金(S202310193094)

作者简介: 贾金姗, 女, 硕士研究生, 主要研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: 2019354866@qq.com

\*通讯作者 Author for correspondence: 杜文梅, 副教授, 主要研究方向为昆虫行为生态学, E-mail: 280114191@qq.com

收稿日期 Received: 2023-12-31; 修回日期 Revision received: 2024-04-29; 接受日期 Accepted: 2024-05-09

**Abstract:** Cellulosic biomass is the most widely distributed renewable resource on earth, and the screening of efficient cellulose-degrading bacterial strains is of great significance for the development and utilization of cellulosic biomass resources. We screened 58 cellulose-degrading bacteria from the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Allomyrina dichotoma* by Congo red staining method, and selected the strain with larger ratio of transparent circle diameter to strain diameter for enzyme activity determination, and obtained the strongest cellulase-producing strain M24 by combining the results of Congo red staining method and enzyme activity determination, which was identified as *Bacillus velezensis* through comparison and analysis of 16S rDNA sequence. The crude enzyme solution of this strain was determined to contain filter paper enzyme, endoglucosidase, exoglucosidase and  $\beta$ -glucosidase with high activities of 13.14 U/mL, 45.67 U/mL, 18.29 U/mL and 36.30 U/mL, respectively. The whole genome sequence of the strain was obtained by genome ONT sequencing technology, and the genome of the strain was 4 290 258 bp in length, and a total of 15 cellulase-related genes were annotated, including 4 endo- $\beta$ -1,4 glucanase genes (EC 3.2.1.4), 9  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.91)-related genes, and 2 exo  $\beta$ -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)-related genes, thus providing an important theoretical basis and test material for constructing cellulose degradation engineering bacteria.

**Key words:** *Allomyrina dichotoma*; gut microorganisms; cellulose-degrading bacteria; enzyme activity; genome

木质纤维素作为一种生物质资源，主要由纤维素、木质素和半纤维素组成，经降解和加工处理可产生一系列烷烃类物质、生物油等高品质燃料和高附加值的化学品（Serrano-Ruiz *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011）。利用微生物对纤维素进行生物降解具有转化率高、副产物少、反应条件温和、能耗低等优点（张爽，2019），其中，外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶、内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶是参与其降解的主要功能酶（Chandel *et al.*, 2012）。在目前的生产应用中微生物所产生的纤维素酶大部分还存在活性不高、酶作用条件苛刻等问题（王丰园等，2022），因此选育和改良酶活性高、酶系多样均衡的高产纤维素酶菌株仍然是当前生物质降解木质纤维素研究的重点方向（王丰园等，2022）。

在自然界中，许多昆虫具有完整、复杂的纤维素消化降解系统，被看作是高效的生物能源转化器（孙建中和陈春润，2010），其中白蚁是进化最成功的高效木质纤维素降解者之一（蒋宇彤等，2020），肠道可产生大量纤维素酶类物质（外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶），对纤维素降解率可达到 74%~99%（Brune，2014）。除白蚁之外其它昆虫肠道纤维

素降解酶类物质也含量丰富，如竹虫幼虫 *Omphisa fuscidentalis*、松墨天牛 *Monochamus alternatus* 等昆虫肠道微生物可产生外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶（刘松，2017；罗巧玉，2018）；栎黄掌舟蛾 *Phalera assimilis*、东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 等昆虫肠道内可产生大量内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶（文竹等，2015；徐冲等，2016）。也有研究发现同种昆虫不同地区间肠道微生物存在显著差异，如采自湖南省邵阳市新宁县和云南省普洱市江城县的黄脊竹蝗 *Ceracris kiangsu* 肠道微生物多样性差异显著（杨丽君，2022）；浙江嘉兴、河南郑州和湖北武汉 3 个地理种群的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 肠道细菌的组成在“门”和“属”的水平上均存在显著差异（黄争艳等，2020）；云南省普洱市澜沧、保山市隆阳、昆明市石林、红河州开远 4 个地区草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 肠道可培养细菌的相对丰度也差异显著（李永萍等，2022）。由此可见，昆虫种类、地理种群不同，肠道内微生物多样性及产纤维素酶的种类也不同（马玲等，2023）。

双叉犀金龟 *Allomyrina dichotoma* 属鞘翅目 Coleoptera 双叉犀金龟属 *Allomyrina*，在中国、韩国、日本等东亚国家广泛分布（王成斌，2010）。幼虫以朽木、发酵木屑等为食，常见于森林、木材厂木屑堆、废弃的菌糠堆中，1 年发生 1 代（赵光杰等，2012；王道泽等，2014），3 龄幼虫重量一般可达到 24.08 g~34.52 g（陈杨博，2020），是一类具有观赏、环保、食用、药用及科学试验等用途的资源昆虫（Bac *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021）。双叉犀金龟作为一种以纤维素原料为食物的昆虫，其肠道具有发达的纤维素酶系，黄俊浩等已从取食竹子的双叉犀金龟幼虫（浙江省磐安）体内分离得到 31 株具有纤维素酶活性的可培养共生菌，37°C 培养 15 d 后，竹子纤维的降解率最高可达到 34%。

吉林省双叉犀金龟资源丰富，近年来被广泛用于生物转化木耳菌糠，约 9~10 头幼虫 70 d 可转化菌糠 1 kg。昆虫肠道微生物种群的构成受昆虫种类、饲养条件、地理种群等因素影响较大（张振宇等，2017），目前关于吉林省取食菌糠的双叉犀金龟肠道纤维素降解菌尚无报道。基于此，本研究以吉林省取食木耳菌糠的双叉犀金龟为研究对象，期望得到高效的纤维素降解菌，为构建纤维素降解工程菌提供了重要的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试昆虫：双叉犀金龟 3 龄幼虫于 2020 年 5 月 10-15 日采自吉林省蛟河市黄松甸镇，在 26~28°C，RH 60%~70% 的饲养室内，用木耳菌糠饲养。

主要试剂：1 mg/mL 刚果红溶液、1 mol/L NaCl 溶液、DNS 试剂、1 mg/mL 葡萄糖溶液、

0.1 mol/L pH 5.5 乙酸-乙酸钠缓冲溶液、1%羧甲基纤维素 (CMC-Na) 溶液、1%水杨苷溶液、1%微晶纤维素溶液、细菌 16S rDNA 通用引物 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492 R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') 与 PCR mix 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

主要培养基: LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0; 羧甲基纤维素钠培养基: 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂粉 20 g, pH7.0; 液体产酶培养基: CMC-Na 10 g, NaCl 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母粉 10 g, 蒸馏水 1 000 mL。

主要仪器: 培养箱、凝胶成像仪、核酸蛋白检测仪、PCR 仪、电泳仪、冷冻离心机、分析天平等。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 菌株分离

幼虫处理: 取 3 龄幼虫 10 头, 饥饿处理 48 h 后, 用无菌水冲洗 5 次后, 用 75%酒精浸泡 2 min 进行体表消毒, 再用无菌水漂洗 2 次。

解剖肠道: 在超净工作台中, 解剖每只完整肠道后, 分离前中肠和后肠, 将 10 只幼虫前中肠和后肠样品研磨混匀置于 50 mL 离心管备用;

分离菌株: 分别取 1 g 前中肠、后肠样品进行稀释, 共设置 8 个梯度  $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ , 选取每个梯度的稀释液各 100  $\mu$ L 涂布于 LB 培养基, 每个梯度重复 3 次, 倒置于 30°C 恒温培养箱培养, 设无菌水对照, 根据菌落形态大小及颜色的不同挑取单菌落至新的 LB 平板上, 并对挑取出的菌落进行连续划线直到分离出纯菌落, 每个重复 3 次, 倒置于 30°C 恒温培养箱中。

### 1.2.2 羧甲基纤维素钠琼脂平板筛选

挑取单菌落在羧甲基纤维素钠培养基划线, 倒置于 30°C 恒温培养箱培养, 选择能够快速生长的菌株, 用灭菌后的牙签蘸取待测菌株, 然后将含菌的牙签在羧甲基纤维素钠培养基上点接 1 次, 设 3 个重复, 然后放入 30°C 培养箱中培养 24 h, 取 5 mL 刚果红溶液对平板染色 15 min, 后倒去刚果红染色液, 再加入 15 mL NaCl 溶液脱色, 15 min 后倒去 NaCl 溶液, 洗脱 3 次, 观察菌落周围有无透明水解圈, 用游标卡尺测量菌落周围水解圈直径 (D) 和菌落直径 (d), 计算每株菌的 D/d 比值 (Hc), 使用 DPS 中的 Ducan 进行显著性差异分析 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 初步筛选出 D/d 较大的菌株。

### 1.2.3 菌株酶活力样品制备

将初筛得到的纤维素降解菌用 30 mL LB 培养基活化培养 12 h, 后取 1 mL 菌液接种于

50 mL 液体产酶发酵培养基中，置于 30°C，180 r/min 的恒温摇床中培养 24 h 后 4°C，8 000 rpm 离心 15 min，取上清液作为待测样品，4°C 保存备用。

#### 1.2.4 菌株酶活力测定

##### 1.2.4.1 绘制葡萄糖标准曲线与建立回归方程

(1) 取 1 g 无水葡萄糖 (105°C 烘干 2 h) 加蒸馏水溶解，定容至 100 mL 容量瓶，配置成 10 mg/mL 葡萄糖标准溶液，2~8°C 保存。

(2) 将标准液用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0 mg/mL。

(3) 每个浓度各取 50  $\mu$ L 再加入 150  $\mu$ L DNS 试剂至离心管中，每个浓度 3 个重复；混匀，沸水浴煮沸 15 min 显色，冷却后加入 1 050  $\mu$ L 双蒸水。

(4) 混匀，540 nm 处测定吸光值，以葡萄糖浓度 (y) 为纵坐标，吸光度 A (x) 为横坐标建立标准曲线。

##### 1.2.4.2 滤纸酶 (FPA) 活力测定

选择 Hc 值 >5 的 16 株菌进行酶活力测定，取 3 mL 初筛菌株粗酶液于 15 mL 试管中，加入 Whatman 1 号滤纸条 1  $\times$  6 cm (50 mg) 和 0.1 mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 3 mL，50°C 恒温水浴 60 min，沸水浴 5 min，加入 DNS 显色剂 3 mL，沸水浴反应 5 min，冰水冷却至室温，以无菌水作为对照，测量 OD<sub>540</sub>，试验设 3 次重复。

##### 1.2.4.3 内切葡聚糖酶活力测定

测定方法同 1.2.4.2，将上述滤纸条 50 mg 和 0.1 mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 3 mL 换为 1% 羧甲基纤维素 (CMC-Na) 溶液 3 mL，50°C 恒温水浴 30 min，其他条件不变，测定菌株的内切葡聚糖酶活力，试验设 3 次重复。

##### 1.2.4.4 外切葡聚糖酶活力测定

测定方法同 1.2.4.2，将上述滤纸条 50 mg 和 0.1 mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 3 mL 换为 1% 微晶纤维素溶液 3 mL，其他条件不变，测定菌株的外切葡聚糖酶活力，试验设 3 次重复。

##### 1.2.4.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定

测定方法同 1.2.4.2，将上述滤纸条 50 mg 和 0.1 mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 3 mL 换为 1% 水杨苷溶液 3 mL，其他条件不变，测定菌株的  $\beta$ -葡聚糖苷酶活力，试验设 3 次重复。

##### 1.2.4.6 酶活力计算

酶活力单位：50°C、pH5.5 条件下，每分钟水解产生 1  $\mu$ g 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

酶活力 (U/mL) = (葡萄糖含量 × 反应总体积 × 1 000) / (加入酶液体积 × t)

式中: 1 000: mg 转换为 μg 的放大倍数; t: 酶和底物反应时间 (min)

### 1.2.5 菌株 M24 鉴定

提取每株细菌菌株的基因组 DNA 为模板, 选用细菌 16S rDNA 通用引物 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 扩增。

PCR 反应 (体系 50 μL): PCR mix 25 μL, 正向引物 2 μL, 反向引物 2 μL, 模板 DNA 2 μL, dd H<sub>2</sub>O 19 μL。

反应条件: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 30s, 共 30 个循环; 然后 72°C 延伸 10 min, 4°C 终止反应。

反应结束后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测 PCR 产物。PCR 产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序结果通过 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 BLAST 比对分析。以筛选出的优势菌株 16S rDNA 基因序列及比对结果中相似度较高的 16S rDNA 基因序列为材料, 使用 MEGA 11.0 生物信息学软件构建系统进化树, 确定菌株所属类别。

### 1.2.6 菌株全基因组测序

测序样品准备: 将 M24 单菌落接种至液体 LB 培养基中, 置于 30°C 恒温摇床中, 180 rpm 震荡培养, 至对数生长期, 将菌液 14 000 rpm 离心, 取 1 g 菌体, 于液氮中保存, 送百迈客生物科技有限公司进行全基因组测序。基于组装结果进行编码基因预测、非编码 RNA 等预测, 然后对预测出的基因进行 eggNOG、CAZy 等数据库的功能注释分析。

### 1.2.7 数据分析

所有的结果数据均表示为平均值 ± 标准误, 试验数据利用 DPS 数据处理系统及 Microsoft Excel 2010 软件进行处理、分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选

初步从双叉犀金龟肠道分离纯化得到 144 株细菌, 利用 CMC-Na 培养基和刚果红染色法初步筛选得到 58 株纤维素降解菌, 其中后肠 36 株、前中肠 22 株; 分别计算 58 株细菌的 Hc 值 (D/d 比值) (表 1), 其 Hc 值在 1.78~8.42 之间。透明圈大小一定程度上反应了降解纤维素能力的高低, 但不能作为菌株纤维素酶活性的唯一定量指标, 本研究后续试验选择 Hc > 5 的 16 株菌, 测定其产纤维素酶能力。

表 1 透明圈直径、菌落直径及二者比值

Table 1 Transparent circle diameter, colony diameter and their ratio

菌种编号 Strain number	菌落直径 d (mm) Colony diameter	透明圈直径 D (mm) Transparent circle diameter	Hc= D/d	菌种编号 Strain number	菌落直径 d (mm) Colony diameter	透明圈直径 D (mm) Transparent circle diameter	Hc= D/d
H1	3.39 ± 0.09	14.63 ± 0.96	4.31	H58	5.45 ± 0.74	14.37 ± 0.38	2.64
H2	3.63 ± 0.23	16.83 ± 0.96	4.64	H60	4.48 ± 0.19	21.77 ± 0.99	4.86
H4	3.49 ± 0.20	18.48 ± 0.36	5.28	H68	3.92 ± 0.06	7.43 ± 0.86	1.90
H5	3.81 ± 0.37	14.24 ± 0.30	3.74	H69	4.24 ± 0.08	12.97 ± 0.20	3.06
H7	3.05 ± 0.07	13.53 ± 0.28	4.44	H70	4.14 ± 0.15	14.87 ± 0.33	3.59
H8	3.56 ± 0.23	13.77 ± 0.31	3.87	H73	4.37 ± 0.39	9.20 ± 0.63	2.11
H9	3.77 ± 0.08	15.03 ± 0.46	3.99	H78	3.85 ± 0.18	10.50 ± 0.79	2.73
H10	3.75 ± 0.24	19.60 ± 2.74	5.22	M1	4.35 ± 0.07	17.33 ± 0.37	3.99
H11	3.70 ± 0.17	21.9 ± 0.69	5.93	M4	3.77 ± 0.24	18.43 ± 0.94	4.89
H12	3.22 ± 0.04	18.08 ± 0.55	5.62	M7	3.92 ± 0.24	16.66 ± 0.56	4.25
H13	6.11 ± 0.42	18.84 ± 0.64	3.08	M11	3.77 ± 0.12	16.91 ± 0.89	4.48
H14	3.49 ± 0.14	12.70 ± 0.42	3.75	M12	5.86 ± 0.21	17.43 ± 0.82	2.97
H16	2.97 ± 0.10	18.65 ± 0.05	6.28	M16	10.56 ± 0.93	24.88 ± 0.47	2.35
H17	3.46 ± 0.17	15.18 ± 0.50	4.38	M17	3.74 ± 0.14	18.96 ± 0.14	5.08
H21	3.76 ± 0.19	18.13 ± 0.47	4.82	M23	6.96 ± 0.80	29.10 ± 0.10	4.18
H24	3.46 ± 0.11	15.26 ± 0.35	4.29	M24	4.25 ± 0.21	35.75 ± 1.21	8.42
H26	6.25 ± 0.75	17.35 ± 1.06	2.78	M25	5.12 ± 0.72	27.47 ± 1.37	5.36
H27	7.49 ± 0.26	13.30 ± 0.36	1.78	M32	6.30 ± 0.62	36.52 ± 1.94	5.79
H28	4.29 ± 0.33	16.85 ± 0.59	3.93	M33	4.21 ± 0.23	34.09 ± 0.34	8.09
H31	5.18 ± 0.42	15.33 ± 0.59	2.96	M34	3.79 ± 0.28	31.37 ± 1.33	8.28
H32	3.46 ± 0.06	16.18 ± 1.21	4.68	M39	4.27 ± 0.03	30.60 ± 0.58	7.16
H33	6.22 ± 0.70	16.54 ± 0.55	2.66	M41	7.68 ± 0.18	34.03 ± 0.50	4.43
H35	5.67 ± 0.08	17.65 ± 0.99	3.11	M44	7.01 ± 0.08	31.67 ± 0.23	4.52
H38	3.98 ± 0.40	17.93 ± 0.23	4.51	M46	7.39 ± 0.31	31.32 ± 0.39	4.23
H40	3.55 ± 0.33	21.21 ± 1.25	5.97	M47	4.34 ± 0.22	32.23 ± 0.41	7.43
H41	3.91 ± 0.20	17.29 ± 0.81	4.43	M49	5.97 ± 0.24	27.94 ± 0.21	4.68
H42	7.30 ± 0.73	15.91 ± 1.51	2.40	M52	4.95 ± 0.16	32.90 ± 1.24	6.65
H48	3.96 ± 0.02	16.82 ± 0.36	4.25	M53	10.54 ± 0.59	34.12 ± 0.65	3.24
H51	4.77 ± 0.38	17.07 ± 0.96	3.58	M54	4.33 ± 0.20	34.52 ± 0.84	7.98

注：表中数据为平均值±标准误。Note: Data in the table were average ± standard error.

## 2.2 菌株酶活力测定

### 2.2.1 绘制葡萄糖标准曲线与建立回归方程

以葡萄糖含量为横坐标、OD<sub>540</sub>为纵坐标，绘制葡萄糖标准曲线（图1），标准曲线方程为： $y=0.5255x-0.0191$ ，相关系数  $R^2=0.9901$ 。

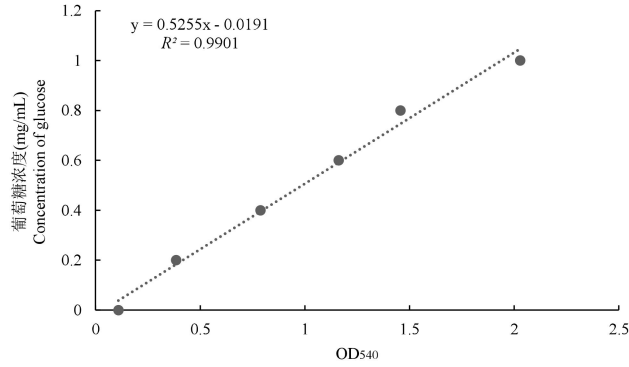


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Glucose standard curve

### 2.2.2 菌株纤维素酶活力测定

酶活反应中不同底物可以反应不同的酶活力的高低，供试16株菌的4种纤维素酶活力均有显著差异（表2）。滤纸酶活力代表总酶活力在5.00~13.14 U/mL之间，其中M24显著最高，为13.14 U/mL，其次为H11（11.22 U/mL）、H16（11.05 U/mL）、H12（11.05 U/mL）、M34（10.97 U/mL）；内切葡聚糖苷酶活力在8.39~45.67 U/mL之间，其中M24显著最高，为45.67 U/mL，其次为H12（43.21 U/mL）、H11（39.11 U/mL）；外切葡聚糖苷酶活力在10.53~20.42 U/mL之间，其中M25显著最高，为20.42 U/mL，其次为M34（19.36 U/mL）、M32（19.10 U/mL）、M24（18.29 U/mL）； $\beta$ -葡萄糖苷酶活力16.72~36.30 U/mL之间，其中M24显著最高，为36.30 U/mL，其次为H12（27.03 U/mL）、H4（27.37 U/mL）、M34（27.53 U/mL）。综合刚果红染色法与酶活力试验结果，M24产纤维素酶能力最强。

表2 16株产纤维素酶菌株的纤维素酶活力测定结果

Table 2 Cellulase activity assay results of 16 cellulase-producing strains

菌株号 Strain number	滤纸酶活力 (U/mL) Filter paper enzyme activity	内切葡聚糖苷酶活力 (U/mL) Endoglucosidase enzyme activity	外切葡聚糖苷酶活力 (U/mL) Exoglucosidase enzyme activity	$\beta$ -葡聚糖苷酶活力 (U/mL) $\beta$ -glucosidase enzyme activity
M33	6.87 ± 0.10 g	28.78 ± 0.39 f	14.88 ± 0.26 e	20.39 ± 0.32 e
M24	13.14 ± 0.13 a	45.67 ± 0.29 a	18.29 ± 0.18 c	36.30 ± 0.03 a
M32	10.30 ± 0.17 cd	32.84 ± 0.30 e	19.10 ± 0.30 b	24.21 ± 0.17 c
M47	5.75 ± 0.12 i	16.00 ± 0.51 i	12.06 ± 0.15 hi	16.72 ± 0.11 f
M52	6.31 ± 0.02 h	13.58 ± 0.37 j	16.09 ± 0.39 d	20.77 ± 0.32 e



H12	11.05 ± 0.03 b	43.21 ± 0.08 b	15.58 ± 0.11 de	27.03 ± 0.35 b
H16	11.05 ± 0.03 b	28.50 ± 0.26 f	13.47 ± 0.03 fg	25.05 ± 0.34 c
H40	7.08 ± 0.07 g	15.38 ± 0.08 i	10.54 ± 0.16 j	20.10 ± 0.26 e
H10	7.43 ± 0.10 f	11.93 ± 0.23 k	11.58 ± 0.6 li	22.23 ± 0.36 d
M54	9.98 ± 0.12 de	21.58 ± 0.14 h	12.86 ± 0.07 g	24.67 ± 0.25 c
H11	11.22 ± 0.08 b	39.11 ± 0.25 c	14.06 ± 0.22 f	24.14 ± 0.45 c
M39	5.00 ± 0.12 j	8.39 ± 0.43 l	10.74 ± 0.2 lj	20.00 ± 0.50 e
M17	9.82 ± 0.11 e	16.08 ± 0.56 i	12.73 ± 0.12 gh	19.84 ± 0.38 e
H4	9.84 ± 0.07 e	34.56 ± 0.42 d	17.72 ± 0.35 c	27.37 ± 0.55 b
M34	10.97 ± 0.21 b	13.63 ± 0.28 j	19.36 ± 0.14 b	27.53 ± 0.64 b
M25	10.41 ± 0.17 c	22.79 ± 0.61 g	20.42 ± 0.28 a	22.16 ± 0.24 d
	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
	$F_{15,32}=432.703$	$F_{15,32}=1\ 085.312$	$F_{15,32}=150.615$	$F_{15,32}=159.92$

注：小写字母表示处理间方差比较结果 ( $P < 0.05$ )。Note: Lowercase letters indicated the results of the inter-processing variance comparison ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 菌株 M24 分子生物学鉴定

利用引物 27 F 和 1492 R 扩增 16S rDNA 基因序列用于 M24 的鉴定,将菌株的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 上使用 BLASTn 进行序列比对分析,选取结果中相似度最高的菌属作为材料,利用 MEGA 11.0 构建系统发育树。菌株 M24 在芽孢杆菌属内贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 的亲缘关系较近,在进化树内聚为一类,且同源性高达 99.86% (图 2)

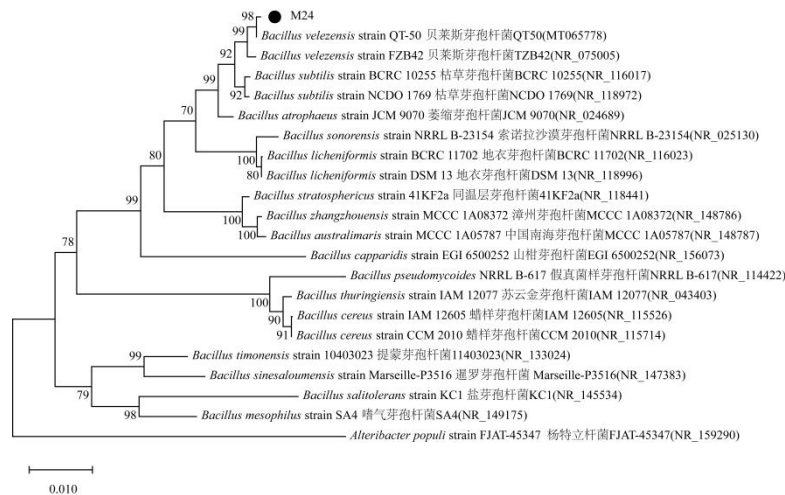


图 2 菌株 M24 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain M24

### 2.4 全基因组测序及基因注释

为了解菌株 M24 的纤维素降解相关基因,对菌株的基因组进行了测序,组装后得到该菌株的基因组,全长 4 290 258 bp, GC 含量为 46.01%, 编码基因 4 186 个, 平均长度 908 bp, rRNA 27 个, tRNA 87 个。

M24 基因组的基因与 eggNOG 数据库比对,将编码基因进行功能分类,结果发现有 3 197 个蛋白编码基因被注释,可分为 A~Z 共 24 类,维持生命基本功能的相关基因在功能基因中占比较大,其中转录相关基因 (K) 241 个 (7.54%), 碳水化合物运输和代谢 (G) 功能的基因 226 个 (7.07%), 次级代谢产物生物合成、运输和分解代谢 (Q) 功能的基因共有 77 个 (2.41%), 细胞内物质转运、分泌和膜泡运输 (U) 功能的基因有 32 个 (1.00%), 氨基酸转运与代谢的基因 286 个 (8.95%) (图 3)。

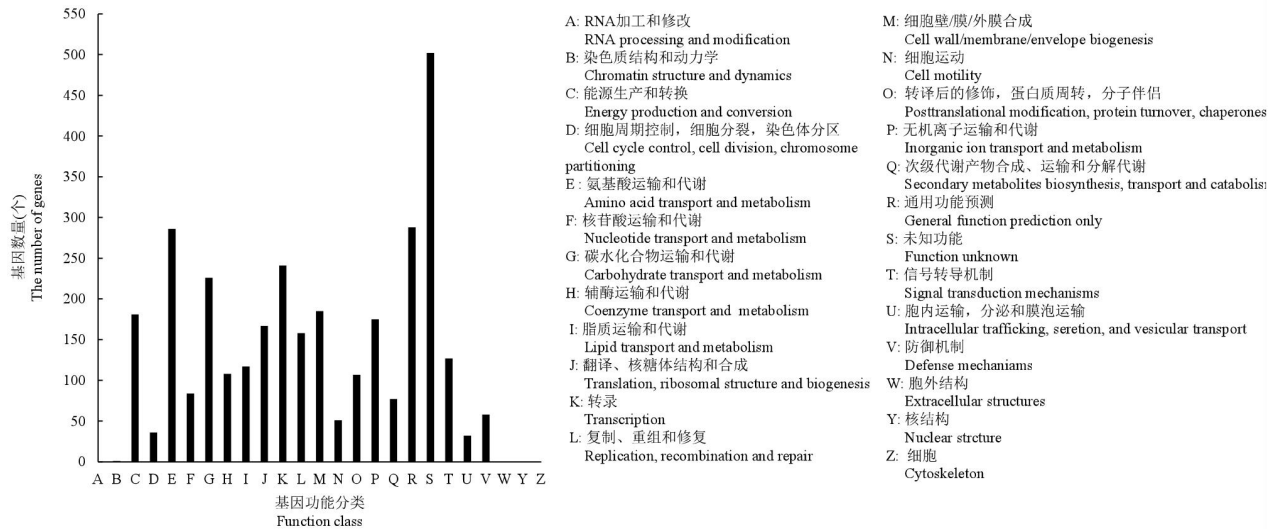


图 3 M24 eggNOG 功能分类

Fig. 3 eggNOG function classification from M24 strain

## 2.5 纤维素降解相关基因分析

根据 CAZy 数据库分析,首先注释糖脂代谢相关的基因,包括糖苷水解酶 (Glycoside Hydrolases, GHs) 51 个 (33.55%), 糖基转移酶 (Glycosyl Transferases, GTs) 39 个 (25.65%), 多糖裂解酶 (Polysaccharide Lyases, PLs) 3 个 (1.97%), 碳水化合物酯酶 (Carbohydrate Esterases, CEs) 32 个 (21.05%), 辅助氧化还原酶 (Auxiliary Activities, AAs) 6 个 (3.94%) 和非催化的结合碳水化合物的功能域 (Carbohydrate-binding modules, CBMs) 21 个 (13.81%) (图 4)。其次,重点进行了纤维素降解相关基因的注释分析,从中分析预测出内切-β-1,4 葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) 的相关基因有 4 个, β-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.91) 的相关基因有 9 个, 外切β-1,4 葡聚糖酶 (EC 3.2.1.91) 的相关基因有 2 个, 内切-β-1,4 葡聚糖酶基因编码的蛋白质属于 GH5 和 GH51 家族; β-葡萄糖苷酶基因编码的蛋白质属于 GH1、GH30、GH5、GH3 家族; 外切β-1,4 葡聚糖酶内切-β-1,4 葡聚糖酶基因编码的蛋白质属于 GH5 家族 (表 3)。

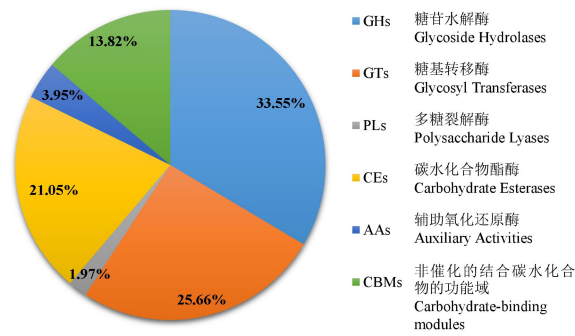


图 4 菌株 M24 CAZy family 分布

Fig. 4 CAZy family distribution of strain M24 genome

表 3 菌株 M24 基因组中纤维素酶相关酶家族

Table 3 Cellulase-related enzyme families in the M24 genome

基因编号 Gene_ID	CAZy 家族 CAZy_family	预测的特性活性 Predicted characteristic activity	EC# (预测) EC# (Predict)
GE000282	GH5		
GE001151	GH51		
GE001172	GH51	endo- $\beta$ -1,4-glucanase	EC 3.2.1.4
GE002362	GH5		
GE002149	GH1		
GE000286	GH30		
GE000456	GH30		
GE000457	GH1		
GE002362	GH5	$\beta$ -glucosidase	EC 3.2.1.21
GE002558	GH3		
GE002703	GH1		
GE003525	GH1		
GE000282	GH5		
GE000282	GH5		
GE002362	GH5	cellulose $\beta$ -1,4-cellobiosidase	EC 3.2.1.91

### 3 结论与讨论

初步从吉林地区取食木耳菌糠的叉犀金龟幼虫肠道中分离得到 58 株能够产生纤维素酶的细菌，其中后肠 36 株，前中肠 22 株，后肠中纤维素降解菌数量大于前中肠，通过刚果红染色初步筛选出 16 株菌进行酶活力测定，结果表明这 16 株菌均具有完整的纤维素酶系，其中 M24 纤维素酶活力最高，滤纸酶活力为 13.14 U/mL，内切葡聚糖苷酶活力为 45.67 U/mL，外切葡聚糖苷酶活力为 18.29 U/mL， $\beta$ -葡萄糖苷酶活力为 36.30 U/mL。与同类研究进行对比分析，发现吉林地区与浙江地区叉犀金龟肠道可分离纤维素降解菌的种类和数量均不同 (Huang *et al.*, 2022)。酶活力测定结果表明叉犀金龟肠道纤维素降解菌 M24 酶活力高于

白星花金龟肠道筛选的纤维单胞菌属 *Cellulomonas* sp. h9 内切葡聚糖苷酶活力(0.19 U/mL), 低于台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* 肠道筛选的约氏不动杆菌 *Acinetobacter johnsonii* 内切葡聚糖苷酶活力 (93.73 U/mL)。与不同环境中分离的菌株相比, 高于玉米青贮饲料中分离的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 内切葡聚糖苷酶活力 (6.40 U/mL), 但低于土壤中分离的土曲霉 *Aspergillus terreus*  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力 (167.70 U/mL) (许婧, 2014; 刘宇等, 2017; 陈志超等, 2019; 黄婉秋, 2020; 尹守亮等, 2022)。

经分子生物学鉴定, 确定菌株 M24 为贝莱斯芽孢杆菌, 贝莱斯芽孢杆菌广泛分布于自然界, 能促进植物生长、分泌次级代谢产物, 对水稻稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、高粱炭疽病菌 *Colletotrichum graminicola* 等植物病原真菌有明显抑制效果 (张晨芳, 2020; 朱峰等, 2020)。除生防作用以外, 贝莱斯芽孢杆菌还具有良好的纤维素降解能力 (尉婧等, 2022), 如从土壤、杜仲树皮内、台湾乳白蚁、暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 肠道内等均可获得具有该菌株, 其内切葡聚糖苷酶活力在 0.61~54.39 U/mL 之间 (Zhang *et al*, 2018; 陈龙等, 2019; 陈杰茹等, 2022); 本试验分离得到的贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* (M24) 内切葡聚糖苷酶活力为 45.67 U/mL, 在现有报道的贝莱斯芽孢杆菌中其纤维素酶活较高。

同种菌株之间也可能存在较大的表型差异 (Van *et al*, 2020), 本试验分离得到的贝莱斯芽孢杆菌全基因组数据显示, 其参与内切- $\beta$ -1,4 葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) 的相关基因有 4 个,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.91) 的相关基因有 9 个, 外切 $\beta$ -1,4 葡聚糖酶 (EC 3.2.1.91) 的相关基因有 2 个; 已发表的贝莱斯芽孢杆菌的纤维素降解关键基因数量在 7~26 个之间 (Zhang *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018; Zhang *et al*, 2023; Zhang *et al*, 2023), 形成这种同种菌株纤维素相关基因差异的原因极有可能是菌株的来源、地域以及昆虫取食的不同而产生的 (安晓娜等, 2020)。

综上所述, 从双叉犀金龟幼虫肠道中分离得到的 *Bacillus velezensis* M24 纤维素酶活力较高, 且有一定量的基因参与纤维素的降解。但纤维素生物降解需要活力强、产酶量大的菌株, 因此还需对菌株产酶条件进行优化以提高其产酶量, 可也尝试利用基因工程技术将纤维素降解微生物的酶基因在大肠杆菌及酿酒酵母上表达以获取活性更高、产率更大的纤维素酶, 通过基因组、转录组深入研究相关纤维素酶的作用机制, 调整不同组分比例以适应不同农业、工业应用需求, 以期为高效开发利用为木质纤维素类生物质资源的转化提供菌株资源。

#### 参考文献 (References)

- An XN, Li WC, Yu J, *et al.* Comparative genomics analysis of genetic diversity and habitat adaptability of *Lactobacillus reuteri* from different sources [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60 (5): 875-886. [安晓娜, 李伟程, 于洁, 等. 比较基因组学分析不同来源罗伊氏乳杆菌基因多样性及生境适应性 [J]. 微生物学报, 2020, 60 (5): 875-886]
- Bae SM, Fan M, Choi YJ, *et al.* Exploring the role of a novel peptide from *Allomyrina dichotoma* larvae in ameliorating lipid metabolism in obesity [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (22): 8537.
- Brune A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12 (3): 168-180.
- Chandel AK, Chandrasekhar G, Silva MB, *et al.* The realm of cellulases in biorefinery development [J]. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2012, 32 (3): 187-202.
- Chen JR, Duo SY, Zhu H, *et al.* Research on enzyme production conditions of *Bacillus velezensis* [J]. *Feedresearch*, 2022, 45 (1): 77-81. [陈杰茹, 多水银, 朱昊, 等. 贝莱斯芽孢杆菌产酶条件的探究 [J]. 饲料研究, 2022, 45 (1): 77-81]
- Chen L, Gu W, Xu HY, *et al.* Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF [J]. *Biotech.*, 2018, 8 (2): 114.
- Chen L, Wu XL, Li LJ, *et al.* Optimization of enzyme production conditions and analysis of enzymatic properties of a high-yield endocellulolytic enzyme *Bacillus velezensis* [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46 (5): 1353-1361. [陈龙, 吴兴利, 李立佳, 等. 一株高产内切纤维素酶贝莱斯芽孢杆菌的产酶条件优化及酶学性质分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46 (5): 1353-1361]
- Chen YB. Development of Biological Treatment Technology of Waste Material of Auricularia Substrate by *Allomyrina dichotoma* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University Master Thesis, 2020. [陈杨博. 利用双叉犀金龟生物治理菌糠废弃物技术开发 [D]. 长春: 吉林农业大学硕士论文, 2020]
- Cheng ZC, Yi Y, Zhao DL, *et al.* Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria from *Coptotermes formosanu* [J]. *China Brewing*, 2019, 38 (1): 54-58. [陈志超, 易弋, 赵东玲, 等. 台湾乳白蚁纤维素降解菌的分离和鉴定 [J]. 中国酿造, 2019, 38 (1): 54-58]
- Hang JH, Weng LY, Zhang XQ, *et al.* *Trypoxylus dichotomus* gut bacteria provides an effective system for bamboo Lignocellulose Degradation [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10 (5): 02147-22.
- Huang WQ. Screening and Analysis of Cellulose Degrading Microbial Strains from Intestinal Tract of *Protaetia brevitarsis* Larva [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Master Thesis, 2020. [黄婉秋. 白星花金龟幼虫肠道中纤维素降解菌的筛选及其作用 [D]. 北京: 中国农业科学院硕士论文, 2020]
- Jiang YT, ZhangS, Lin ZZ, *et al.* Research progress on transformation and degradation of lignocellulase in termite digestive system [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60 (12): 2635-2649. [蒋宇彤, 张硕, 林子佳, 等. 白蚁消化系统转化和降解木质纤维素酶研究进展 [J]. 微生物学报, 2020, 60 (12): 2635-2649]

- Li YP, Du GZ, Di T, *et al.* Diversity analysis of cultivable intestinal bacteria in different geographic populations of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53 (4): 1066-1077. [李永萍, 杜广祖, 狄藤, 等. 云南不同地理种群草地贪夜蛾肠道可培养细菌多样性分析 [J]. 南方农业学报, 2022, 53 (4): 1066-1077]
- Liu S. Study on The Microbial Diversity and Enzymatic Activity of *Omphisa fuscidentalis* Hampson [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Master Thesis, 2017. [刘松. 竹虫 (*Omphisa fuscidentalis*) 肠道微生物多样性及纤维素酶学特性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院硕士论文, 2017]
- Liu Y, Li Y, Yi JY, *et al.* Study on isolation, identification and enzyme-reaction conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* producing cellulase [J]. *Acta Ecologia Animalis Domastici*, 2017, 38 (4): 58-62. [刘宇, 李阳, 尹珺伊, 等. 一株产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其酶促反应适宜条件初步研究 [J]. 家畜生态学报, 2017, 38 (4): 58-62]
- Luo QY. Study on Intestinal Bacterial Diversity and Cellulose Degradation Function of Larva of *Monnochamus alternatus* [D]. Fuzhou: Fuzhou Agriculture and Forestry University Master Thesis, 2018. [罗巧玉. 松墨天牛幼虫肠道细菌多样性及纤维素降解功能研究 [D]. 福州: 福建农林大学硕士论文, 2018]
- Ma L, Cao JY, Bai JY, *et al.* Research progress in insect gut microbes and the methods for studying their functions [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2023, 66 (10): 1-9. [马玲, 曹靖瑜, 白建洋, 等. 昆虫肠道微生物及其功能研究方法进展 [J]. 昆虫学报, 2023, 66 (10): 1-9]
- Park W, Lee W, Yoo Y, *et al.* Protective effect of tetrahydroquinolines from the edible insect *Allomyrina dichotoma* on LPS-induced vascular inflammatory responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (10): 3406.
- Serrano-Ruiz JC, West RM, Dumesic JA. Catalytic conversion of renewable biomass resources to fuels and chemicals [J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2010, 1 (1): 79-100.
- Sun JZ, Chen CR. Cellulolytic insects and their potentials for viable biofuels: A new frontier discipline in Entomology and Bioengineering [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2010, 47 (6): 1033-1042. [孙建中, 陈春润. 昆虫与生物质能源利用: 一个新的交叉学科前沿 [J]. 昆虫知识, 2010, 47 (6): 1033-1042]
- Van Rossum T, Ferretti P, Maistrenko OM, *et al.* Diversity within species: Interpreting strains in microbiomes [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18 (9): 491-506.
- Wang DZ, Hong WY, Wu YJ, *et al.* Study on biological characteristics and control technology of *Dendrobium officinale* pest [J]. *Zhejiang Agricultural Journal*, 2014, 26 (3): 722-729. [王道泽, 洪文英, 吴燕君, 等. 铁皮石斛害虫独角仙的生物学特性及防治技术研究 [J]. 浙江农业学报, 2014, 26 (3): 722-729]
- Wang FY, Jin HY, Ding LF, *et al.* Research progress of cellulase and its activity enhancement [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022, 3: 65-68. [王丰园, 金海炎, 丁凌飞, 等. 纤维素酶及其活性提升研究进展 [J]. 现代农村科技, 2022, 3: 65-68]

- Wang ZY, Wang Y, He MT, *et al.* Diversity of intestinal bacteria in different geographic populations of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57 (3): 617-622. [王争艳, 王洋, 何梦婷, 等. 不同地理种群赤拟谷盗肠道细菌群落多样性分析 [J]. *应用昆虫学报*, 2020, 57 (3): 617-622]
- Wen Z, Jiang YR, Huang L, *et al.* Analysis of aerobic bacterial population and screening of the cellulose-producing bacteria from larval intestine of *Phalera assimilis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2015, 37 (6): 1203-1212. [文竹, 姜义仁, 黄伶, 等. 栋黄掌舟蛾幼虫肠道好氧菌群分析及产纤维素酶菌的筛选 [J]. *环境昆虫学报*, 2015, 37 (6): 1203-1212]
- Xu C, Zhong LJ, Cheng LY, *et al.* Screening and Identification of High-Yielding Cellulase Strain from Enteric Duct in East Asian Locust *Locusta migratoria manilensis* [J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36 (3): 69-72. [徐冲, 钟丽娟, 陈丽媛, 等. 东亚飞蝗肠道内高产纤维素酶菌株筛选及鉴定 [J]. *微生物学杂志*, 2016, 36 (3): 69-72]
- Xu J. Study on the Cellulase Activity in the Gut of *Holotrichia parallela* and the Construction of Microbial Community [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University Master Thesis, 2014. [许婧. 暗黑鳃金龟肠道纤维素酶活性研究及混合菌系的构建 [D]. 华中农业大学, 2014]
- Yang LJ, Li HW, Li XY, *et al.* Diversity analysis of gut microbes of yellow spined bamboo locust *Ceracris kiansu* Tsai [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2023, 45 (4): 952-964. [杨丽君, 李红卫, 李向永, 等. 黄脊竹蝗种群肠道微生物的多样性分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2023, 45 (4): 952-964]
- Yi SL, Yang YY, Li QY, *et al.* Isolation and identification of a high-yielding cellulase fungus [J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2022, 30 (2): 9-18. [尹守亮, 杨镒婴, 李秋园, 等. 一株高产纤维素酶真菌的分离与鉴定 [J]. *纤维素科学与技术*, 2022, 30 (2): 9-18]
- Yu J, Wang BX, Li SY, *et al.* Advances in the study of *Bacillus velezensis* [J]. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2022, 29 (4): 86-91. [尉婧, 王碧香, 李诗瑶, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 的研究进展 [J]. *天津农学院学报*, 2022, 29 (4): 86-91]
- Zhang CF. Study on the Degradation Mechanism of Nicosulfuron by *Bacillus velezensis* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University Master Thesis, 2020. [张晨芳. 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 降解烟嘧磺隆的作用机制研究 [D]. 保定: 河北农业大学硕士论文, 2020]
- Zhang S. The Screening of Cellulose Degrading Strains and Application to Corn Straw in Low Temperature [D]. Harbin: Northeast Agricultural University Master Thesis, 2019. [张爽. 低温纤维素降解菌的筛选及其玉米秸秆降解效果研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019]
- Zhang TJ, Wei SL, Liu YJ, *et al.* Screening and genome-wide analysis of lignocellulose-degrading bacteria from humic soil [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1167293.
- Zhang XB, He X, Chen J, *et al.* Whole-genome analysis of termite-derived *Bacillus velezensis* BV-10 and its application in king grass silage [J]. *Microorganisms*, 2023, 11 (11): 2697.

- Zhang ZY, Raza MF, Zheng Z, *et al.* Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* ZY-1-1 reveals the genetic basis for its hemicellulosic/cellulosic substrate-inducible xylanase and cellulase activities [J]. *Biotech.*, 2018, 8 (11): 465.
- Zhang ZY, Sheng P, Huang SW, *et al.* Diversity, function and application of insect gut microbiota [J]. *Biological Resources*, 2017, 39 (4): 231-239. [张振宇, 圣平, 黄胜威, 等. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用 [J]. 生物资源, 2017, 39 (4): 231-239]
- Zhao GJ, Xu CG, Xu H, *et al.* Conservation and utilization of rare insects in Fushun area, Liaoning, China [J]. *Green Technology*, 2012, 1 (4): 52-53. [赵光杰, 徐成刚, 徐红, 等. 辽宁抚顺地区珍稀昆虫的保护与利用 [J]. 绿色科技, 2012, 1 (4): 52-53]
- Zhou CH, Xia X, Lin CX, *et al.* Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels [J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40 (11): 5588-5592.
- Zhou M, Chen YY, Su XL, *et al.* Mechanical performance of a beam with corrugated steel webs inspired by the forewing of *Allomyrina dichotoma* [J]. *Structures*, 2021, 29 (33): 741-750.
- Zhu F, Wang JC, Tian CL, *et al.* Identification and Bioactivity Analysis of *Bacillus velezensis* Jnb16 [C]. Plant Health and Pest Control. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences. [朱峰, 王继春, 田成丽, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 Jnb16 的鉴定及生物活性分析 [C]. 植物健康与病虫害防控. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 2020]