

竹林土壤中纤维素降解菌的筛选及产酶条件优化

蒋玉俭, 李新鑫, 孙飞飞, 余学军

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了寻找较为高效的纤维素降解菌, 以便更好利用纤维素资源, 结合分析被刚果红染色后形成的透明圈大小以及羧甲基纤维素酶活力强弱, 从浙江省临安市竹林土壤中分离筛选出 1 株高效纤维素降解菌 J6-1。经形态学观察初步鉴定该菌株属于青霉属 *Penicillium*。对该菌株的液态发酵产酶条件和产酶稳定性进行研究。结果表明: 最佳产酶条件是以 $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 稻草粉作碳源、以 $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母膏为氮源, 10%接种量, pH 5.0, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 发酵培养 5 d。经优化后菌株 J6-1 最高羧甲基纤维素钠酶活和滤纸酶活分别达到了 $41.82 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $17.26 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$, 并且经 5 次传代培养, 酶活力仍得到保持。青霉 J6-1 可用作进一步实际应用研究的试验菌株。图 3 表 3 参 34

关键词: 森林微生物学; 纤维素降解菌; 筛选; 产酶条件; 优化

中图分类号: S718.8

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2015)07-0821-08

Screening of a cellulose-decomposing strain from bamboo stand soils and optimization of its cellulase production

JIANG Yujian, LI Xinxin, SUN Feifei, YU Xuejun

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Cellulose, the most extensive and abundant renewable resource in nature with an annual worldwide accumulation of photosynthetic plant cellulose materials of 10^{12} t of which an estimate of 89% has been used unreasonably (such as in direct burning), should be produced by more effective cellulolytic microorganisms to transform these renewable resources into available energy. At present, although important research about screening cellulolytic microorganisms has been conducted, few studies on isolating and screening cellulose-decomposing microorganisms from bamboo stand soils have been described. This research isolated and screened efficient cellulolytic microorganisms from bamboo stand soils based on the size of transparent circles and the activity of carboxymethyl-cellulase (CMCase). An efficient cellulose-decomposing fungus, J6-1, was obtained and preliminary morphological observation identified it as *Penicillium* (Strain J6-1). On the basis of single-factor experiments, the orthogonal experiment of 4 factors at 3 levels was then taken to optimize the liquid fermentation conditions conditions of cellulase production. And the hereditary stability of cellulase produced Strain J6-1 was evaluated by the cellulase activity analysis of 5 consecutive generations. Experimental results showed that the optimum conditions for cellulase production were as follows: $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ straw powder as carbon, $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ yeast extract as a nitrogen source, a 10% inoculation quantity, fermentation at $40 \text{ }^\circ\text{C}$, and an initial pH of 5.0 for 5 d. After optimization of strain J6-1, the highest activity of carboxymethyl-cellulase (CMCase) was $41.82 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ and filter paper enzyme activity (FPAase) was $17.26 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$. Thus, these characteristics of high cellulase activity could be subcultured serially, and strain J6-1 could be used for further

收稿日期: 2015-01-08; 修回日期: 2015-03-09

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2012T201-05)

作者简介: 蒋玉俭, 从事竹林培育与利用研究。E-mail: jiangyujian.2009@163.com。通信作者: 余学军, 副研究员, 从事竹子栽培与利用研究。E-mail: yuxj@zafu.edu.cn

practical application. [Ch, 3 fig. 3 tab. 34 ref.]

Key words: forest microbiology; cellulose-decomposing microorganisms; screen; enzyme production; optimization

纤维素是自然界中分布最广、储量最丰富的可再生有机资源^[1], 占植物干质量的 35%~50%^[2], 在碳循环中有着重要作用^[3], 其全球累积量为 $10^{12} \text{ t}\cdot\text{a}^{-1}$ 以上^[4-5]。然而, 纤维素具有不溶于水和难以降解的特性, 使得如此庞大的纤维素类资源并未被充分利用。目前, 中国的纤维素类资源主要用于燃烧, 能量利用率非常低(10%左右)^[6]。另外, 一些未及时处理的纤维类资源则变成固体垃圾, 造成严重的环境污染。所以, 如果使用适当处理方法将这些可再生的纤维素降解为便于利用的糖液, 再进一步转化为具有商业价值的产品, 如乙醇^[7]、单体蛋白^[8-9]以及有机酸^[10]等, 这对解决人类所面临的能源危机、食物短缺和环境污染等问题具有重大意义^[11-12]。过去处理纤维素主要采用酸^[13]、碱^[14]以及蒸汽加热^[15]等方法, 但 these 方法存在一些缺点, 例如条件要求高、产物回收率不高和废弃物存在二次污染等。目前, 较有效且接近自然的纤维素处理方法就是利用微生物产生的纤维素酶来降解纤维素, 其具有反应条件温和、产物产率高和无二次污染等优点。纤维素酶是一种能降解纤维素生成葡萄糖的复合酶, 其完整酶系主要包括内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4), 外切葡聚糖酶(EC 3.2.1.91), β -葡萄糖苷酶等 3 类酶^[16], 其中, 内切葡聚糖酶用于降解纤维素分子内部 β -1,4-糖苷键, 形成大量小分子纤维; 外切葡聚糖酶用于降解纤维素分子末端 β -1,4-糖苷键, 生成纤维二糖; β -葡萄糖苷酶用于降解纤维二糖生成葡萄糖。催化纤维素水解需要一个完整的纤维素酶系相互协同作用。因此, 分离和筛选出具有较完整纤维素酶系的菌株非常重要。以往许多研究筛选的纤维素降解菌来自树林土壤和动物肠道等, 如刘清锋等^[17]从稻田腐烂秸秆中分离筛选出降解纤维素能力较强的青霉 *Penicillium* T24-2; Sheng 等^[18]从暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 的肠道中筛选出 1 株高纤维素酶活力的假单胞菌 *Pseudomonas* HP207, 对从竹林土壤分离纤维素降解菌的研究较少。实际上, 竹林土壤富含纤维素, 生活着大量不同种类的纤维素降解菌, 是高效纤维素降解菌的理想来源地。因此, 本实验从浙江省临安市竹林中采集土样, 利用羧甲基纤维素选择培养基分离筛选出 1 株纤维素降解能力较强的菌株 J6-1, 并对其进行了菌种的初步鉴定及产纤维素酶条件优化。

1 材料与方 法

1.1 培养基

富集培养基(液体): 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)15.0 g, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1.0 g, 氯化钠(NaCl)0.1 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.3 g, 硝酸钠(NaNO_3)2.5 g, 氯化铁(FeCl_3)0.01 g, 氯化钙(CaCl_2)0.1 g; 定容至 1.0 L, 自然 pH 值。

选择培养基(固体): 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)15.0 g, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1.0 g, 氯化钠(NaCl)0.1 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.3 g, 硝酸钠(NaNO_3)2.5 g, 氯化铁(FeCl_3)0.01 g, 氯化钙(CaCl_2)0.1 g, 琼脂 15 g; 定容至 1.0 L, 自然 pH 值。

种子培养基: PDA 培养基(马铃薯 200.0 g, 蔗糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 水 1 000.0 mL, 自然 pH 值)。

液体发酵培养基: 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)15.0 g, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1.0 g, 氯化钠(NaCl)0.1 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.3 g, 硝酸钠(NaNO_3)2.5 g, 氯化铁(FeCl_3)0.01 g, 氯化钙(CaCl_2)0.1 g; 定容至 1.0 L, 自然 pH 值。

1.2 菌株的分离筛选

1.2.1 样品采集 实验样品(不同程度腐烂的苍糠、稻草、竹叶以及土壤)来自杭州市余杭区和临安市各村的竹林(雷竹 *Phyllostachys violascens* 林和毛竹 *Phyllostachys edulis* 林)。采用 5 点取样法^[19]取 0~5 cm 土壤混合样品 200.0 g, 将采集的样品装到无菌袋中并编号, 放入冰盒中带回实验室 4 °C 保存。共采集到 20 个样品。

1.2.2 富集培养 称取 10.0 g 样品加到 90.0 mL 富集培养基中, 30 °C, 120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 3 d 后取培养液以体积为 5% 的接种量接入新的富集培养基中, 再反复富集 2 次^[20]。

1.2.3 菌株的筛选分离 取 1.0 mL 富集菌液依次稀释成比例梯度为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 和 10^{-6} , 再分别从中取 0.1 mL 涂布到羧甲基纤维素钠培养基(CMC-Na 平板)上, 30 °C 恒温箱培养 3 d 后, 挑取单

菌落分别点种 3 个 CMC-Na 平板上(即 3 次重复)于 30 ℃ 恒温箱培养 6 d, 用 1.0 g·L⁻¹ 刚果红溶液对平板染色 30 min, 再用 1.0 mol·L⁻¹ 氯化钠溶液浸洗 2 次(每次 30 min), 然后采用十字交叉法测量 CMC-Na 平板上透明圈直径(D , mm)和菌落直径(d , mm), 选取 H_c 值($H_c=D/d$, 即透明圈直径与菌落直径的比值)较大且快速生长的菌落进行划线分离纯化并保存^[18-21]。

1.3 粗酶液的制备

将筛选到的菌株分别接种到种子培养基中, 30 ℃, 150 r·min⁻¹ 培养 3 d, 再以 10% 的接种量接入装有 50.0 mL 发酵产酶培养基的 250.0 mL 三角瓶中, 30 ℃, 150 r·min⁻¹ 下培养, 5 d 后, 取 5.0 mL 发酵液, 于 4 ℃, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 所得的上清即为粗酶液^[22]。

1.4 酶活力测定方法

1.4.1 羧甲基纤维素酶活力(CMCase)的测定 取粗酶液 0.1 mL 加入 1.9 mL 质量分数为 1% 羧甲基纤维素钠的柠檬酸缓冲液(pH 4.8, 0.05 mol·L⁻¹), 以沸水浴灭活的粗酶液反应作为对照, 50 ℃ 恒温水浴 30 min 后, 加入 2.0 mL DNS 显色液, 沸水浴显色 10 min 后, 冷水浴快速冷却停止反应, 然后定容至 25 mL, 于 540 nm 波长测定其吸光度 $D(\lambda)$ 值。上述条件下, 定义 1 h 1.0 mL 酶液催化底物水解生成 1.0 μmol 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U)^[23] (1 U=16.67 nkat)。

1.4.2 滤纸酶活力(FPAase)的测定 取粗酶液 0.1 mL 加入 50.0 mg(1.0 cm × 6.0 cm) 折叠成 M 型的 Whatman 滤纸条, 再加入 1.9 mL 柠檬酸缓冲液(pH 4.8, 0.05 mol·L⁻¹), 以沸水浴灭活的粗酶液反应作为对照, 按 DNS 法测定还原糖。

1.5 菌株的初步鉴定

观察菌落和菌体形态特征, 参照《真菌鉴定手册》^[24]和《中国真菌志》^[25]对菌株进行形态学鉴定。

1.6 产酶条件优化

以液体发酵培养基作为基础配方, 选择不同氮源(酵母膏、尿素、硝酸钠、硝酸铵、蛋白胨), 碳源(羧甲基纤维素钠、竹粉、滤纸、稻草粉、蔗糖、葡萄糖), 接种量(1%, 5%, 10%, 15%, 20%), 初始 pH 值(3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0), 培养温度(20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ℃), 培养时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d)进行单因素实验, 进而通过正交实验确定目标菌株的最佳产酶条件。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的筛选

从竹林腐殖土壤中初步筛选获得 26 株经刚果红染色后能够产生透明水解圈的菌株, 再测定羧甲基纤维素酶活力进行复筛, 5 株较好菌株结果见表 1, 其中菌株 C2-2 拥有较大 H_c 值为 2.96, 其 5 d 发酵培养后的羧甲基纤维素酶活力仅 $4.43 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 明显低于菌株 J6-1 的 $6.87 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 故确定最佳纤维素降解菌株为 J6-1。

表 1 5 株菌的 H_c 值及羧甲基纤维素酶活力大小

Table 1 H_c values and cellulase activity of 5 strains		
菌株编号	H_c 比值	羧甲基纤维素酶活力/($\times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)
J6-1	2.61	6.87
C2-2	2.96	4.43
B2-2	2.43	3.95
C5-1	2.17	4.89
E2-1	2.30	2.60

2.2 菌株 J6-1 的生物学特征

菌体形态特征见图 1, 菌株 J6-1 在羧甲基纤维素固体培养基上生长时, 菌落呈絮状, 中心脐状突起

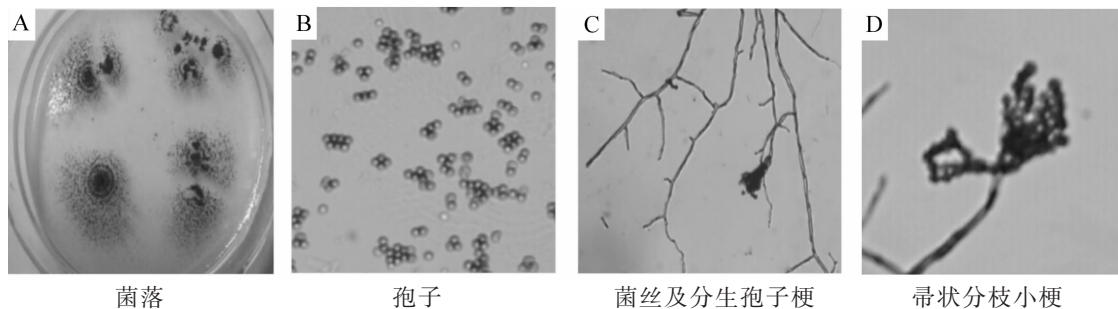


图 1 菌株 J6-1 的形态学特征

Figure 1 Morphological characteristic of strain J6-1

边缘整齐, 初期为浅绿色, 后期呈灰绿色, 在40倍显微镜下观察到该菌株的分生孢子近球形, 分生孢子梗从菌丝垂直长出, 排列成扫帚状的间枝着生于其顶端。可初步判断该菌株为青霉属 *Penicillium*。

2.3 菌株 J6-1 发酵条件优化

2.3.1 氮源对菌株产酶活力的影响 分别以酵母膏、尿素、硝酸钠、硝酸铵、蛋白胨为氮源进行发酵实验。结果如图 2A 所示: 氮源对菌株的产酶能力的影响较大, 使用有机氮时的酶活明显高于使用无机氮。这表明菌株 J6-1 能较好利用有机氮。当用酵母膏作氮源时, 菌株 J6-1 纤维素酶活力最高, 羧甲基纤维素酶活力达到 $16.62 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 滤纸酶活达到 $3.76 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此选用酵母膏作为最佳氮源。

2.3.2 碳源对菌株产酶活力的影响 分别以羧甲基纤维素钠、竹粉、滤纸、稻草粉、蔗糖、葡萄糖为碳源进行发酵实验。结果如图 2B 所示: 不同碳源条件下酶活力存在较大差异, 当以稻草粉作唯一碳源时, 菌株 J6-1 的羧甲基纤维素酶活与滤纸酶活均达到最大值, 分别为 $20.73 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $8.20 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当以滤纸作为碳源时, 酶活力最低。稻草主要含有纤维素、半纤维素、果胶、木质素粗蛋白等物质, 对菌株产酶有较好诱导作用^[26]。故最佳碳源为稻草粉。

2.3.3 不同接种量对菌株产酶活力的影响 在最优碳源、氮源条件下, 分别接种 1%, 5%, 10%, 15% 和 20% 种子液进行发酵实验。结果如图 2C 所示: 接种量不同对酶活力有较大影响。当接种量为 10% 时, 羧甲基纤维素酶活力最高; 当接种量增加到 20% 时, 酶活力明显下降; 这表明接种量过大, 菌体大量生长, 占用更多空间和资源, 导致菌株产酶减少, 最终选定最适接种量为 10%。

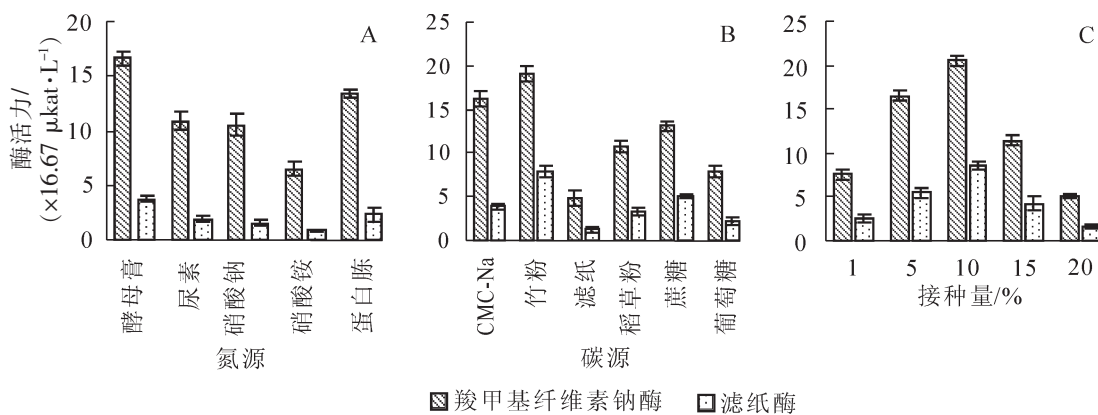


图 2 氮源(A), 碳源(B), 接种量(C)对菌株 J6-1 产酶活力的影响

Figure 2 Effect of different nitrogen sources, carbon sources and inoculation quantity on cellulase activity of strain J6-1

2.3.4 不同 pH 值对菌株酶活力的影响 在最优碳源、氮源条件下, 调整初始 pH 值分别为 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0 接种 10% 种子液进行发酵实验。结果如图 3A 所示: 培养基 pH 值对菌株 J6-1 酶活力影响较大, 滤纸酶活变化趋势与羧甲基纤维素酶活变化趋势保持一致; 随着 pH 值升高, 菌株 J6-1 酶活力呈现先增大后减小趋势。当 pH 值从 pH 3.0 升高到 pH 5.0 时, 羧甲基纤维素酶活力由 $8.85 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 快速增加到最大酶活 $25.39 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 滤纸酶活从 $3.15 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $10.41 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$; 之后再升高 pH 值, 羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活力均降低。在 pH 5.0 时, 羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活均表现出最佳酶活力, 说明菌株最佳发酵培养的酸碱度为 pH 5.0。

2.3.5 不同温度对菌株产酶活力的影响 在最优碳源、氮源、pH 5.0 条件下, 调整培养温度分别为 20, 25, 30, 35, 40, 45 和 50 °C 接种 10% 种子液进行发酵实验。结果如图 3B 所示: 随着温度升高, 菌株酶活力先增大后急剧下降, 说明培养温度对菌株 J6-1 发酵产酶影响较大, 较低或较高温度均不利于产酶, 在 40 °C 的培养温度下, 羧甲基纤维素酶活最大为 $34.57 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$; 然而, 当温度为 35 °C 时, 滤纸酶活达到最高为 $14.36 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此, 菌株 J6-1 最佳培养温度范围为 35~40 °C。

2.3.6 培养时间对菌株产酶活力的影响 在最优碳源、氮源、pH 5.0, 40 °C 条件下, 接种 10% 种子液进行发酵实验, 分别取 1~7 d 发酵液进行酶活力测定。结果如图 3C 所示: 滤纸酶活变化趋势与羧甲基纤维素酶活变化趋势保持一致; 菌株 J6-1 经过 2 d 发酵培养后, 酶活迅速提高; 当发酵培养 5 d 时, 菌株

J6-1 的羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活均达到最大值，分别为 $36.57 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $15.42 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ ；继续加长培养时间，可能由于菌株生物量达到饱和营养供应不足，菌株 J6-1 产酶酶活逐渐减弱。因此，最佳取样时间为 5 d。

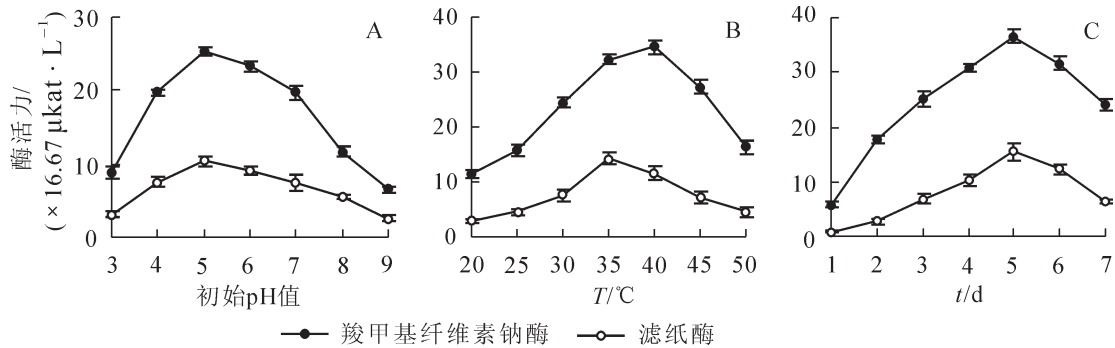


图 3 初始 pH(A), 培养温度(B)和培养时间(C)对菌株 J6-1 产酶活力的影响

Figure 3 Effect of initial pH, temperature and time on cellulase activity of strain J6-1

2.3.7 正交优化菌株 J6-1 产酶条件 根据以上单因素实验结果，采用正交法去确定菌株 J6-1 最佳培养条件。选择稻草粉量、酵母膏量、培养温度、培养时间 4 个因素，每个因素取 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交实验，培养条件为 10%接种量、初始 pH 5.0, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 液体摇瓶发酵。实验结果如表 2 所示：各因素对菌株 J6-1 产酶影响大小依次是稻草粉量、酵母膏量、培养时间、培养温度，在 6 号实验条件下，其羧甲基纤维素酶活力和滤纸酶活力分别为 $40.59 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $16.43 \times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ 。正交实验表明最佳培养条件为 A2B3C2D2，即 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 稻草粉、 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母膏、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 5 d。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验设计及分析

Table 2 Design and results analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal test

实验号	因素				羧甲基纤维素酶活力/ 力/ ($\times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)	滤纸酶活力/ ($\times 16.67 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)
	A 稻草粉/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	B 酵母膏/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	C 培养温度/ $^\circ\text{C}$	D 培养时间/d		
1	1(10)	1(2.0)	1(35)	1(4)	28.28	9.47
2	1(10)	2(2.5)	2(40)	2(5)	30.15	11.26
3	1(10)	3(3.0)	3(45)	3(6)	30.67	10.61
4	2(15)	1(2.0)	2(40)	3(6)	36.44	14.55
5	2(15)	2(2.5)	3(45)	1(4)	38.18	15.59
6	2(15)	3(3.0)	1(35)	2(5)	40.59	16.43
7	3(20)	1(2.0)	3(45)	2(5)	31.87	12.50
8	3(20)	2(2.5)	1(35)	3(6)	29.29	11.45
9	3(20)	3(3.0)	2(40)	1(4)	34.72	14.68
K_1 (羧甲基纤维素酶)	29.70	32.20	32.72	33.73		
K_2 (羧甲基纤维素酶)	38.40	32.54	33.77	34.20		
K_3 (羧甲基纤维素酶)	31.96	35.33	33.57	32.13		
k_1 (滤纸酶活力)	10.45	12.17	12.45	13.25		
k_2 (滤纸酶活力)	15.52	12.77	13.50	13.40		
k_3 (滤纸酶活力)	12.88	13.91	12.90	12.20		
R (羧甲基纤维素酶活力)	6.44	2.79	0.85	2.07		
r (滤纸酶活力)	2.65	1.73	0.45	1.19		
优化方案	A ₂	B ₃	C ₂	D ₂		

2.4 菌株 J6-1 酶活稳定性研究

将已筛选到的菌株 J6-1 进行连续 5 代传代培养，然后最佳条件发酵培养测定其每代菌株羧甲基纤维素酶活力和滤纸酶活力。结果如表 3 所示：各子代菌株均能较好延续原代菌株酶活力，羧甲基纤维素

酶活力和滤纸酶活力分别维持在 $41.82 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $17.26 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。

表3 菌株 J6-1 传代酶活力

Table 3 Cellulase activity of Strain J6-1 passage

传代次数	羧甲基纤维素酶活力/ ($\times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$)	滤纸酶活力/ ($\times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$)	传代次数	羧甲基纤维素酶活力/ ($\times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$)	滤纸酶活力/ ($\times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	42.37	17.78	4	41.03	17.55
2	41.93	16.22	5	41.28	16.42
3	42.50	18.31	平均	41.82	17.26

3 讨论与结论

本研究采用透明圈初筛、酶活测定复筛的方法,从竹林土壤中分离出1株高效纤维素降解真菌,通过生物学观察初步鉴定该菌株为青霉菌属 *Penicillium*。然后测定了该菌株的羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活,并进一步对该菌株的发酵产酶条件进行了优化;结果表明:在添加 $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 稻草粉、 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母膏作碳源和氮源,10%接种量,pH 5.0, $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 发酵培养 5 d 条件下,该菌株获得最佳羧甲基纤维素酶活和滤纸酶活,分别为 $41.82 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $17.26 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

目前,已经筛选出不同种类降解纤维素的细菌^[27]、放线菌^[28]和真菌^[29]。这些筛选到的降解纤维素材料的活性微生物普遍被应用于生物质能源发酵工艺(替代能源的生产)^[30]、饲料生产^[31]和秸秆还田土壤培肥^[32]等方面。本研究筛选到的菌株来自竹林土壤,不仅可应用于以上研究,在竹林土壤生长环境也具有独特优势^[33],更适合用于制作促竹林有机物降解菌制剂,不会引入外来菌株而造成二次污染。

在纤维素酶活的研究中,滤纸酶活通常被用来表征 3 种酶组分协同作用后的总酶活^[34]。本实验筛选到的青霉菌 J6-1 经优化后其滤纸酶活力可到达 $17.26 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$,高于可晓等^[22]从雷竹林土壤中筛选到的青霉菌 2.1(滤纸酶活为 $11.19 \times 16.67 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$),对纤维素降解效果更好。其次,该菌株最佳产酶 pH 5.0,温度为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,表现出一定的耐酸能力,能适应自然界高温环境,这对于其实际应用具有重大意义。

4 参考文献

- [1] LYND L R, WYMAN C E, GERNGROSS T U. Biocommodity engineering [J]. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(5): 779 - 793.
- [2] LYND L R, WEIMER P J, van ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamental and biotechnology [J]. *Microbiol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 506 - 577.
- [3] DOI R H, KOSUGI A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexed [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(7): 541 - 551.
- [4] JARVIS M. Cellulose stacks up [J]. *Science*, 2003, **426**(6967): 611 - 612.
- [5] ZHANG Y H P, LYND L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(7): 797 - 824.
- [6] 陈洪章, 李佐虎. 纤维素原料微生物与生物量全利用[J]. 化工科技市场, 2001(5): 17 - 20.
CHEN Hongzhang, LI Zuohu. Lignocellulosical microorganisms and biomass total utilization [J]. *Chem Technol Mark*, 2001(5): 17 - 20.
- [7] BEGUIN P, AUBERT J P. The biological degradation of cellulose [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **13**(1): 25 - 58.
- [8] KUZMANOVA S, VANDESKA E, DIMITROVSKI A. Production of mycelial protein and cellulolytic enzymes from food wastes [J]. *J Ind Microbiol*, 1991, **7**(4): 257 - 261.
- [9] MOO-YOUWG M, CHAHAL D S, SWAN J E, et al. SCP production by chaetomium cellulolyticum, a new thermotolerant cellulolytic fungus [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **19**(4): 527 - 538.
- [10] ANDREN R K, MANDELS M F H, MODEIROS J E. Production of sugar from waste cellulose by enzymatic hydrolysis: primary evaluation of substrates [J]. *Process Biochem*, 1976, **11**: 2 - 11.
- [11] 徐昶, 龙敏南, 乌小兵, 等. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, **44**(1): 107 - 111.

- XU Chang, LONG Minnan, WU Xiaobing, *et al.* Screening and characterization of a high cellulase producing strain *Aspergillus glaucus* XC9 [J]. *J Xiamen Univ Nat Sci*, 2005, **44**(1): 107 – 111.
- [12] LUTZEN N W, NIELSEN M H, OXENBOELL K M, *et al.* Cellulases and their applications in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars [J]. *Phil Trans Royal Soc B*, 1983, **300**(1100): 283 – 291.
- [13] HAN Y W, GALLIHAN C D. Cellulose fermentation: effect of substrate pretreatment on microbial growth [J]. *Appl Microbiol*, 1974, **27**(1): 159 – 165.
- [14] CHAHAL D S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**(1): 205 – 210.
- [15] BELTRAME P L, CARNITI P, VISCIGLIO A, *et al.* Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw [J]. *Bioresour Technol*, 1992, **39**(2): 165 – 171.
- [16] KANSOH A L, ESSAM S A, ZEINAT A N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesie* [J]. *Polym Degradation Stab*, 1999, **63**(2): 273 – 278.
- [17] 刘清锋, 支晓鹏, 徐慧娟, 等. 纤维素降解菌青霉 T24-2 的分离及产酶特性[J]. 工业微生物, 2007, **37**(3): 16 – 19.
- LIU Qingfeng, ZHI Xiaopeng, XU Huijuan, *et al.* Screening and characterization of cellulase-producing *Penicillium* sp.T24-2 [J]. *Ind Microbiol*, 2007, **37**(3): 16 – 19.
- [18] SHENG Ping, HUANG Shengwei, WANG Qi, *et al.* Isolation, screening, and optimization of the fermentation conditions of highly cellulolytic bacteria from the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, **167**(2): 270 – 284.
- [19] 王爱军, 柴兆祥, 李金花, 等. 马铃薯干腐病菌和黑痣病菌拮抗芽胞杆菌的筛选及鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2013, **29**(4): 586 – 594.
- WANG Aijun, CHAI Zhaoxiang, LI Jinhua, *et al.* Screening and identification of antagonistic *Bacillus* strains against pathogens of fusarium dry rot and black scurf in potato [J]. *Chin J Biol Control*, 2013, **29**(4): 586 – 594.
- [20] 高小鹏, 杨晗, 袁茂林, 等. 纤维素降解菌的筛选及酶活力测定[J]. 湖北农业科学, 2011, **50**(15): 3072 – 3073.
- GAO Xiaopeng, YANG Han, YUAN Maolin, *et al.* Isolation of cellulose-degrading strains and enzyme activity determination [J]. *Hubei Agric Sci*, 2011, **50**(15): 3072 – 3073.
- [21] 王洪媛, 范丙全. 3株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学报, 2010, **50**(7): 870 – 875.
- WANG Hanyuan, FAN Bingquan. Screening of three traw-cellulose degrading microorganism [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2010, **50**(7): 870 – 875.
- [22] 郭成栓, 欧阳蒲月, 崔堂兵, 等. 1株碱性纤维素酶产生菌的分离、鉴定及酶谱分析[J]. 生物技术, 2011, **21**(1): 57 – 59.
- GUO Chengshuan, OUYANG Puyue, CUI Tangbing, *et al.* Isolation, identification, and zymographic analysis of a high alkaline cellulase-producing strain H12 [J]. *Biotechnology*, 2011, **21**(1): 57 – 59.
- [23] 可晓, 陈双林, 张小平, 等. 雷竹林存留有机覆盖物高效降解菌株分离及产酶条件优化[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(2): 244 – 250.
- KE Xiao, CHEN Shuanglin, ZHANG Xiaoping, *et al.* Selection of strains used to degrade organic mulching materials from *Phyllostachys violascens* forest and optimization of its enzyme production [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, **29**(2): 244 – 250.
- [24] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [25] 孔华忠. 中国真菌志: 青霉属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [26] 李新华, 富艳鑫, 郑煜焱. 米糠蛋白提取工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2010, **31**(22): 251 – 254.
- LI Xinhua, FU Yanxin, ZHENG Yuyan. Optimization of extraction conditions for rice bran protein [J]. *Food Sci*, 2010, **31**(22): 251 – 254.
- [27] 黄宁珍, 付传明, 何金祥, 等. 纤维素降解真菌分离筛选、产酶特性及高效水解菌系的初步构建 [J]. 西南农业学报, 2010, **23**(5): 1489 – 1496.
- HUANG Ningzhen, FU Zhuanming, HE Jinxiang, *et al.* Isolation of cellulose-degradation fungi their zymogenic characteristics and preliminary design of high effect complex microbial communities [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2010, **23**(5): 1489 – 1496.

- [28] 吴翔, 陈强, 徐丽华, 等. 1株降解纤维素的高温放线菌的筛选及其产酶条件研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, **26**(增刊): 101 - 104.
WU Xiang, CHEN Qiang, XU Lihua, *et al.* Screening of a cellulose-decomposing thermoactinomuces strain and its enzyme-producing conditions [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2007, **26**(supp): 101 - 104.
- [29] 韩立荣, 张双玺, 祝传书, 等. 高效纤维素降解真菌的筛选和鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, **36**(9): 169 - 174.
HAN Lirong, ZHANG Shuangxi, ZHU Chuanshu, *et al.* Screening and identification of superior fungus degraded cellulose [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2008, **36**(9): 169 - 174.
- [30] 奚立民, 曹树勇, 柯中炉. 木质纤维素类生物质制备燃料乙醇的微生物研究进展[J]. 化工进展, 2009, **28**(11): 2003 - 2008.
XI Limin, CAO Shuyong, KE Zhonglu. Research progress in microorganisms for the conversion of lignocellulosic biomass to fuel ethanol [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2009, **28**(11): 2003 - 2008.
- [31] 刁治民, 张雄伟, 熊亚, 等. 微生物纤维素酶在饲料工业中的生产现状及应用[J]. 青海草业, 2006, **15**(3): 15 - 20.
DIAO Zhimin, ZHANG Xiongwei, XIONG Ya, *et al.* The research on the productive status and applied of microbial cellulase [J]. *Qinghai Pratac*, 2006, **15**(3): 15 - 20.
- [32] 肖春玲, 徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志, 2002, **22**(2): 33 - 35.
XIAO Chunling, XU Changxin. Application study on microbial cellulase [J]. *J Microbiol*, 2002, **22**(2): 33 - 35.
- [33] 徐有权, 顾文杰, 王立群, 等. 酸性半纤维素降解细菌的筛选与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2012, **32**(2): 36 - 40.
XU Youquan, GU Wenjie, WANG Liqun, *et al.* Screening and characterization of acidic hemicellulose-degrading bacteria [J]. *J Microbiol*, 2012, **32**(2): 36 - 40.
- [34] 黄容姿, 万金泉, 马邕文, 等. 废水处理系统中纤维素酶的诱导形成及调节控制[J]. 造纸科学与技术, 2011, **30**(2): 52 - 56.
HUANG Rongzi, WAN Jinquan, MA Yongwen, *et al.* Induction and regulation of cellulase formation in a wastewater biotreatment process [J]. *Paper Sci Technol*, 2011, **30**(2): 52 - 56.

《浙江农林大学学报》2016年征订启事

《浙江农林大学学报》连续7次入选全国中文核心期刊, 荣获第二届全国国家期刊奖百种重点期刊奖, 首届浙江省优秀科技期刊二等奖, 第二届浙江省优秀科技期刊一等奖, 浙江省精品科技期刊, 首届和第二届全国优秀科技期刊三等奖, 全国高校优秀科技期刊一等奖。

《浙江农林大学学报》主要报道农林基础学科、森林培育学、森林经理学、经济林学、林业工程、植物保护学、林木遗传育种、植物学、生态学、动物学、生物技术、环境保护学、园林学和园艺学等学科的学术论文、问题讨论和研究简报等, 供农林科技工作者、园林绿化和规划设计人员、环境保护工作者、大专院校师生、基层干部、农林科技专业户及科技信息人员参阅。双月刊。国内外公开发行。ISSN 2095-0756, CN 33-1370/S。所刊文章被国内外20多种文摘刊物和数据库收录。附英文目次和英文摘要。

定价: 20.00元/期, 全年120.00元/份。国内订户请向全国非邮发报刊联合发行部订阅, 地址: 300381天津市大寺泉集北里别墅17号。电话: 022-23973378。E-mail: LHZD@public.tpt.tj.cn。也可直接向浙江农林大学学报编辑部汇款订阅。邮局汇款: 311300浙江省临安市环城北路88号浙江农林大学学报编辑部。电话: 0571-63732749。E-mail: zlx@zafu.edu.cn。银行汇款: 建行临安市支行营业部。账号: 33001617335050018761。户名: 浙江农林大学。

国外读者请向中国出版对外贸易总公司办理订阅手续。地址: 100011北京782信箱。

欢迎订阅, 欢迎投稿。