

三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果

王洪媛, 范丙全*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】利用多种筛选方法, 获得高效秸秆纤维素降解真菌, 并研究其秸秆纤维素的降解能力。【方法】采用滤纸片孔洞法、滤纸条降解法、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水解圈测定法、秸秆失重法、纤维素分解率测定法、胞外酶活测定法等常规秸秆纤维素降解菌的筛选方法。【结果】筛选到3株具有较强纤维素降解能力的真菌菌株, 经初步鉴定菌株98MJ为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)、菌株W3为木霉(*Trichoderma sp.*)、菌株W4为扩张青霉(*Penicillium expansum*)。菌株W4具有非常强的秸秆纤维素降解能力, 10 d内对秸秆的降解率可达56.3%, 对纤维素、半纤维素和木质素的分解率分别为59.06%、78.75%和33.79%。菌株W4的胞外纤维素酶活力在14.25-49.75 U/mL之间。【结论】筛选获得3株高效秸秆纤维素降解真菌菌株, 其中菌株W4的纤维素酶活高于已报道的菌株, 是一株十分具有研究开发潜力的纤维素酶生产菌株。

关键词: 秸秆纤维素; 降解菌; 筛选; 纤维素酶

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0870-06

农作物秸秆是自然界蕴藏最丰富的可再生资源。秸秆纤维素的生物转化近些年受到了广泛关注, 大规模纤维素生物转化工艺的发展, 将有效解决或减轻食品和动物饲料的不足、废弃物处理、矿石燃料依赖性等一系列问题^[1]。自然界中能够降解纤维素的微生物很多^[2-3], 如: 担子菌: 虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*); 木腐菌: 粉孢革菌(*Coniophora puteana*)和地窖粉孢革菌(*Coniophora cerebella*); 半知菌: 康宁木霉(*Acrostalagmus koningii*)和里氏木霉(*Trichoderma reesei*)等。然而目前所应用和研发的菌株仍然存在着秸秆纤维素降解能力低、活性不稳定、产酶成本高、作用pH范围狭窄等问题。因此, 获取高效降解秸秆纤维素的微生物菌株及其制剂的应用是解决秸秆问题的关键技术。

目前我国科研工作者在筛选秸秆降解菌的过程

中, 主要采用的方法有: 滤纸片孔洞法、滤纸条降解法、羧甲基纤维素钠水解圈测定法、胞外酶活测定法、滤纸或秸秆失重法、秸秆纤维素分解率测定法等。本研究的主要目的是要综合利用这些方法筛选获得高效秸秆纤维素降解菌并研究其纤维素酶的活力, 同时期望找到一套能够有效获得高效秸秆纤维素降解菌的筛选方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 采集自东北漠河、北京郊区的森林、农田土壤、腐烂的秸秆、腐烂的木材以及堆肥中。

1.1.2 主要试剂仪器: DNS试剂, 柠檬酸缓冲液, 水杨素(Sigma公司), 羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司); 新华定性滤纸; 秸秆木质纤维素的制备: 将小麦秸秆剪成2-3 cm小段, 烘干后粉碎至

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD89B13); 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA10Z426)

* 通信作者。Tel: +86-10-82106212; E-mail: Bqfan@caas.ac.cn

作者简介: 王洪媛(1976-), 女, 山东莱州人, 助研, 博士, 主要从事农业微生物资源与利用的研究。E-mail: wanghy@caas.ac.cn

收稿日期: 2009-12-03; 修回日期: 2010-04-19

60 目,加入 2% 的氢氧化钠溶液至固液重量比为 1:4,在 85 °C 水浴中处理 1 h,水洗至 pH 为中性,烘干备用。秸秆木质纤维素中的纤维素、木质素和半纤维素的含量分别为 39.57%、34.83% 和 24.77%。

1.1.3 培养基:(1) 赫奇逊氏(Huchinson)无机盐培养基:KH₂PO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, NaNO₃ 2.5 g, FeCl₃ 0.01 g, CaCl₂ 0.1 g, 水 1000 mL, pH7.2 左右。(2) 滤纸培养基:赫奇逊氏无机盐培养基中添加琼脂粉 18 g/L,倒好平板后铺一片三角滤纸片在培养基上。(3) CMC-Na 平板培养基:CMC-Na 10.0 g,200 g 去皮马铃薯汁1000 mL,琼脂 18 g,加蒸馏水至 pH7.2 左右。(4) 种子培养基:采用马铃薯-蔗糖琼脂(PDA)培养基。(5) 液体发酵培养基:KH₂PO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, NaNO₃ 2.5 g, FeCl₃ 0.01 g, CaCl₂ 0.1 g, 秸秆木质纤维素 20 g 或滤纸条 10 g, pH 为 7.2 - 7.4。

1.2 滤纸片孔洞法富集初筛秸秆纤维素降解菌

采用滤纸片孔洞法进行秸秆纤维素降解菌的初筛:用无菌水浸泡采集的土壤、腐烂的秸秆及木材等样品,在摇床振荡 30 min,取样品悬液,用无菌水稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 的浓度梯度,吸取稀释浓度为 10⁻³ 的稀释液,涂在滤纸培养基上,置于 28 °C 培养箱中培养 24 - 48 h,挑选出在滤纸培养基上生长良好,且有降解孔洞出现的真菌菌落,并进一步在 PDA 培养基上进行分离纯化,将分离纯化后的菌株斜面接种于种子培养基上培养 2 - 4 d,后置 4 °C 冰箱冷藏、待用。

1.3 CMC-Na 水解圈测定实验

将初筛菌株接种至 CMC-Na 平板培养基,培养 2 - 5 d,用 0.1% 的刚果红水溶液浸染 30 min,弃染液,再用 1 mol/L 的 NaCl 水溶液脱色 1 h,测菌落直径(d, cm)和水解圈直径(D, cm),采用 D_p 表示水解能力: $D_p = (D/d)^2$ 。

1.4 滤纸降解实验

将初筛获得的菌株,置于液体种子培养基中 28 °C 摇床培养 5 d 制备菌液。在 40 mL 的赫奇逊氏无机盐培养基中加入 1 × 6 cm 的滤纸条,接入 1 mL 菌液进行恒温震荡(为避免由于震荡造成滤纸断裂,并满足菌株生长所需的有氧条件,本实验采用的摇床转速为 70 r/mim)培养 8 d,根据滤纸条的断裂程度判断降解效果:(+)为滤纸边缘膨胀;(++)

为滤纸整齐膨胀并弯曲;(+++)为滤纸不定形;(++++)为成团糊状;(+++++)为半清状。

1.5 秸秆失重的测定

接种筛选菌株到液体种子培养基中制备菌液,接种 1 mL 制备好的菌液到含有 2% 秸秆木质纤维素的液体发酵培养基中,进行恒温震荡培养,在培养 10 d 后,用滤纸过滤发酵液,将残留物 80 °C 烘干称重,用减重法计算出麦秸失重率。

1.6 秸秆分解率的测定

采用王玉万等^[4]的方法进行纤维素、半纤维素、木质素含量的测定。纤维素的分解率根据下式计算:

$$(\text{对照样品纤维素含量} \times \text{样品重量} - \text{残体纤维素含量} \times \text{残体重量}) / (\text{对照样品纤维素含量} \times \text{样品重量}) \times 100\%$$

半纤维素和木质素的分解率的计算方法除了将纤维素含量进行相应的替换外,其它的都如上式所示进行计算。

1.7 纤维素酶活测定

纤维素粗酶液的制备:接种环挑取在 PDA 上培养的新鲜菌丝于液体种子培养基中,28 °C,170 r/min 培养 60 h,用血球计数板在显微镜下观察孢子的生长情况,按 1% (10⁸ 个孢子量)的接种量到 300 mL 产酶培养基中,28 °C,170 r/min 液体发酵培养,每 24 h 取样测定纤维素的酶活力,将培养好的液体发酵产酶培养基先用两层纱布过滤,滤液再于 4 °C,10000 × g 离心 10 min,取上清液即为制备的粗酶液。

全酶活(FPase)的测定^[5]:取适当稀释后的酶液 0.5 mL,加入到含有 50 mg 处理过的无淀粉新华滤纸和 1.5 mL 0.05 mol/L pH5.0 柠檬酸缓冲液的具塞刻度试管,50 °C 水浴中保温 1 h,立即按 DNS 法测定还原糖含量。

外切酶活(exo-1,4-β-D-glucanase, CBH/Cex)的测定^[6]:取适当稀释后的酶液 0.5 mL,加入到含有 50 mg 脱脂棉和 1.5 mL 0.05 mol/L pH5.0 柠檬酸缓冲液的具塞刻度试管,50 °C 水浴中保温 1 h,立即按 DNS 法测定还原糖含量。

内切酶活(endo-1,4-β-D-glucanase, EG/Cen)活力的测定^[7]:取适当稀释后的酶液 0.5 mL,加入到含有 1.5 mL 1% CMC 柠檬酸缓冲液的具塞刻度试管,50 °C 水浴中保温 30 min,立即按 DNS 法测定还

原糖含量。

β -葡萄糖苷酶(β -1,4-glucosidase, β -Gase)活力的测定^[8]:取适当稀释后的酶液 0.5 mL,加入到含有 1.5 mL 1% 水杨苷醋酸缓冲液的具塞刻度试管,50 °C 水浴中保温 30 min,立即按 DNS 法测定还原糖含量。

以上酶活力单位(U/mL)定义为:每 mL 酶液在上述反应条件下在 1 min 内使底物降解生成 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量。酶活力的转换公式如下:

酶活力(U/mL) =

$$\frac{\text{葡萄糖含量}(\text{mg}) \times \text{酶液定容总体积}(\text{mL}) \times 5.56}{\text{反应液中酶液加入量}(\text{mL}) \times \text{时间}(\text{min})}$$

5.56 为 1 mg 葡萄糖的 μ mol 数(1 000/180 = 5.56)。

1.8 真菌菌落形态及生理生化测定

观察菌落和菌种形态特征,并参照《真菌鉴定手册》和中国真菌志(第三十五卷)进行菌种鉴定。

1.9 菌株的 ITS rDNA 序列鉴定

提取真菌基因组总 DNA。扩增 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的保守序列,PCR 引物为 ITS1:(5'-TCCGTAGGGAACCTGCGG-3'),ITS2:(5'-GCTGCGT TCTTCATCGATGC-3')。PCR 反应体系为 50 μ L,反应条件为:94°C 5 min,94°C 30 s,57°C 50 s,72°C 50 s;循环 30 次;72°C 10 min。

PCR 扩增产物测序后,将获得的 DNA 序列,输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析。利用 MEGA4.1 进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 纤维素分解菌的初筛

挑取滤纸片上出现孔洞部位的菌落,在 PDA 培养基上进行分离纯化,最终得到 8 株在分离培养基上生长速度快,且旺盛的真菌菌株。将初筛获得的 8 株真菌进行了 CMC-Na 水解圈的测定(见表 1)。

表 1 真菌的 CMC-Na 水解情况

Strain	Dp value	Strain	Dp value
W3	6.54 a	98DC	1.53 c
W4	7.29 a	109DC	1.73 c
W7	3.23 b	98MJ	2.91 b
W9	1.34 c	109MJ	1.76 c

显著性 P = 0.01

对初筛获得的 8 株纯培养真菌菌株进行了滤纸降解实验,研究其纤维素降解能力。在为时 8 d 的滤纸降解实验中有 3 株真菌显示出明显的滤纸降解效果,在本文中列出了各菌株培养 6 d 后的滤纸降解效果(表 2)。

表 2 菌株培养 6 d 的滤纸降解效果

Table 2 Disintegration results of filter paper scrip with isolates after culturing 6 d

Strain	W3	W4	98MJ
Disaggregation degree	++++	++++	++++

2.2 纤维素降解菌株的鉴定

根据秸秆降解实验和酶活力测定实验(见 1.6 和 1.7),菌株 W4 降解秸秆木质纤维素的能力最强,具有深入开展应用研究的潜力,因此利用菌落形态和 ITS 序列分析对菌株 W4 进行了菌株的鉴定。结果表明,菌株 W4 的菌落开展,绒状,表层着生一层暗绿色分生孢子粉,菌株生长后期背面观察呈褐色。分生孢子梗光滑,不对称分支 3-6 个,排列紧密,其顶端着生 5-8 个短小的瓶状小梗,(8.7-10.6) μ m \times 3.0 μ m,分生孢子多,呈椭圆形,部分变亚球形,光滑,长径 3.1-3.5 μ m,排成纠结的链。将扩增并验证得到的片段测序,然后经过 DNAMAN 软件校正和拼接,获得 578 bp 的核苷酸序列。对 W4 菌株的 ITS 序列在 NCBI 网站上进行同源性比较,发现该序列与青霉菌的序列同源性 >99%,利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 进行系统发育树的构建,结果如图 1,遗传距离显示菌株 W4 与青霉遗传距离最近。结合形态观察,参照《真菌鉴定手册》和

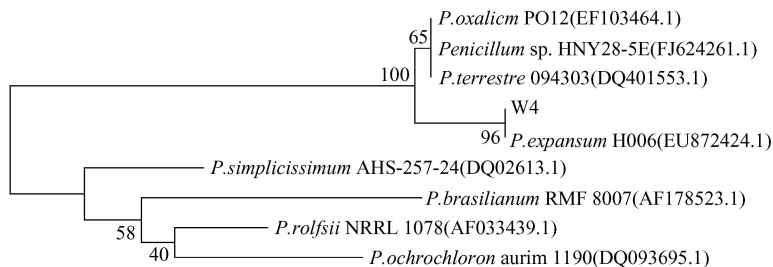


图 1 菌株 W4 的基于 ITS rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Strain W4 based on ITS rDNA sequences homology.

中国真菌志(第三十五卷)-青霉属及其相关有性型属,初步确定菌株 W4 属于青霉属扩张青霉组中的扩张青霉(*Penicillium expansum*)。

菌株 W3 在 PDA 培养基上生长时,初期菌丝白色透明,菌落伸展迅速,铺满平板后菌落逐渐增厚,呈棉絮状,此时产大量孢子,显微镜下观察菌丝白色透明,分生,有分生孢子头,孢子球形,半透明无隔,初步鉴定其为木霉(*Trichoderma sp.*)。

菌株 98MJ 在 PDA 培养基上生长缓慢,菌落开展,绒状,表层着生一层暗绿色分生孢子粉,菌株生长后期背面观察呈淡黄色。分生孢子梗无色,不对称分支,排列紧密,其顶端着生 6-10 个短小的瓶状

小梗,分生孢子着生于与瓶状小梗上,瓶状小梗大小 $13.0 \pm 5.6 \mu\text{m} \times 3.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$,分生孢子链集成圆柱形。分生孢子单细胞,椭圆形,光滑无色, $4.7 \pm 1.3 \mu\text{m} \times 3.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 。初步确定 98MJ 菌株属于青霉属中的草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。

2.3 秸秆降解情况

根据对 CMC-Na 的水解结果和滤纸的降解效果,选择真菌 W3、W4 和 98MJ 进一步研究其秸秆纤维素降解效果。实验分别对这 3 株菌在培养 5 d 和 10 d 后的秸秆变化情况进行了测定。秸秆的重量和各组分的含量以及秸秆的失重率和各组分的降解率分别在表 3 和图 2 中列出。

表 3 菌株降解 10 天后秸秆各组分的含量

Table 3 Contents of cellulose, hemicellulose and lignin of straw after being degraded 10 d

Time	Strain	Weight of straw /g	Content of cellulose %	Content of hemicellulose %	Content of lignin %
0 day	CK	1.000 d	39.57 b	34.83 c	24.77 b
	W3	0.720 d	53.22 d	22.64 b	23.50 ab
5 day	W4	0.744 d	51.72 d	17.47 a	22.31 ab
	98MJ	0.732 d	53.47 d	19.95 ab	20.63 a
	W3	0.547 b	41.86 c	21.57 b	31.99 c
10 day	W4	0.437 a	37.07 a	16.93 a	37.53 d
	98MJ	0.668 c	54.49 d	17.22 a	32.49 c

P = 0.01

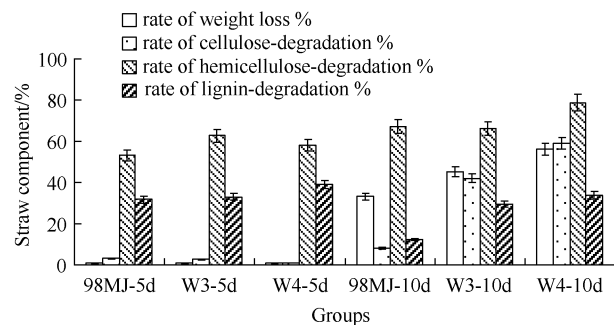


图 2 菌株降解 10 天后秸秆组分的变化情况

Fig.2 Changes of straw component after being degraded 10 d by strains.

培养 5 d 后,3 株真菌菌株 98MJ、W3 和 W4 的秸秆木质纤维素都有所分解,但差异性不大,秸秆失重率分别为 26.8%、28.0% 和 25.6%。在前 5 d,木质纤维素中半纤维素的含量明显降低,菌株 98MJ、W3 和 W4 对半纤维素的相对降解率分别为 58.08%、53.20% 和 62.68%。培养 10 d 后,纤维素的相对含量迅速降低,其降解率分别为 42.13%、8.01% 和 59.06%。培养 10 d 后,3 株真菌菌株 98MJ、W3 和 W4 的秸秆失重率都有了显著的增加,

分别为 33.2%、45.3% 和 56.3%,尤其是菌株 W4,其降解秸秆木质纤维素的能力最高,纤维素、半纤维素和木质素的分解率分别为 59.06%、78.75% 和 33.79%。

2.4 纤维素酶活测定结果

测定菌株 98MJ、W3、W4 各自制备的粗酶液的胞外纤维素酶活,其中包括外切葡聚糖酶(CBH/Cex)、内切葡聚糖酶(EG/Cen)、 β -葡萄糖苷酶(β -Gase)^[9]三种纤维素酶以及反映纤维素酶系总效率的滤纸酶活(FPase)。

结果表明,3 株真菌具有较强的胞外纤维素酶活力,而且其外切葡聚糖酶活(5.78-49.75 U/mL)和 β -葡萄糖苷酶活(5.48-33.29 U/mL)普遍高于内切葡聚糖酶活(2.89-14.25 U/mL)和滤纸酶活(2.95-21.27 U/mL)(见表 4)。3 株真菌的胞外纤维素酶活间具有显著差异,菌株 W4(14.25-49.75 U/mL) > 菌株 W3(4.17-9.46 U/mL) > 菌株 98MJ(2.89-5.78 U/mL),其中菌株 W4 的纤维素酶活最强,这与秸秆纤维素降解实验的结果一致。

表 4 纤维素酶活力测定结果

Table 4 Enzyme activity results of strains

	Strain	W3	W4	98MJ
Enzyme activity U/mL	FPase	4.17 b	21.27 c	2.95 a
	EG	4.26 b	14.25 c	2.89 a
	CBH	9.46 b	49.75 c	5.78 a
	β -Gase	8.68 b	33.29 c	5.48 a

P = 0.01

目前,木质纤维素降解酶的研究与应用主要集中于产酶量大、酶系组成比较齐全的木霉、白腐菌、青霉属等菌株^[10]。而与白腐菌相比,青霉菌又具有易培养和生长快的优势。因此,青霉具有很高的商业价值和潜力应用于木质纤维素的降解。已报道产木质纤维素降解酶系的青霉菌株有 19 种之多,其中尤以斜卧青霉(*Penicillium. decumbens*)、微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)和绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)等菌株的产酶能力最高^[11]。也有关于草酸青霉产酶的报告,但酶活力不高^[12-13]。

扩张青霉 W4 是本研究获得的纤维素酶活力最强的菌株,其胞外纤维素酶活在 14.25 - 49.75 U/mL 之间,高于许多已报道的菌株^[14-18]。马旭光等^[14]通过航空诱变获得的纤维素降解菌 ZM-8 的纤维素酶活力在 1.84 - 20.14 U/mL。Ahamed 等^[15]研究表明工业生产中常用的纤维素酶生产菌株里氏木霉 RUT-C30 产生的 FPase 为 5.02 U/mL,CMCase 活力为 4.2 U/mL。刘韞滔等^[16]获得的高效纤维素降解菌斜卧青霉 L-06 的纤维素酶活在 3.14 - 25.31 U/mL 之间。张明珠等^[17]获得的包括白腐真菌、绿色木霉在内的 7 种具有降解纤维材料能力的菌株,纤维素酶的活力在 0.28 - 12.54 U/mL。另有研究表明^[18],浓度为 2.5 g/L 的商业纤维素酶 Celluzyme 的 FPase 酶活为 9.20 U/L。扩张青霉 W4 是一株十分具有研究开发潜力的纤维素酶生产菌株。

3 结论

(1) 筛选到 3 株具有较强降解纤维素的真菌菌株,经初步鉴定 98MJ 为草酸青霉、W3 为木霉、W4 为扩张青霉。

(2) 获得 1 株具有高效降解木质纤维素的菌株扩张青霉 W4,其在 10 d 内秸秆降解率为 56.3%,纤维素、半纤维素和木质素的分解率为 59.06%、78.75% 和 33.79%,胞外纤维素酶活力在 14.25 - 49.75 U/mL 之间,是一株十分具有研究开发潜力的

纤维素酶生产菌株。

(3) 秸秆纤维素分解率和胞外纤维素酶活力能够比较准确的反映出菌株的秸秆木质纤维素降解能力。

致谢 本文的研究过程中,龚明波博士和殷中伟硕士在菌株筛选、酶活测定及秸秆降解实验中给予了诸多帮助,在此特表感谢。

参考文献

- [1] Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, Gokhale DV. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 2007, 98(7): 1467-1473.
- [2] Magalhaes PO, Ferraz A, Milagres AFM. Enzymatic properties of two beta-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101: 480-486.
- [3] Petr Baldrian VVK. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(3): 501-521.
- [4] 王玉万,徐文玉.木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序.微生物学通报(*Microbiology*), 1987, (2): 82-84.
- [5] 刘洁,李宪臻,高培基.纤维素酶测定方法评述.工业微生物(*Industrial Microbiology*). 1994, 24(4): 27-32.
- [6] Ghose TK. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59: 257-268.
- [7] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, Sashihara N. Cellulase of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30: 774-779.
- [8] Christakopoulos P, Goodenough PW, Kekos D. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224: 378-385.
- [9] Kansoh AL, Essam SA, Zeinat AN. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer Degradation and Stability*, 1999, 63(2): 273-278.
- [10] Jørgensen H, Mørkeberg A, Krogh KBR, Olsson L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbiology Technology*, 2005, 36: 42-48.

- [11] 孙宪响, 曲音波, 刘自勇. 青霉木质纤维素降解酶系研究进展. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*), 2007, 13 (5): 736-740.
- [12] 张倩, 王宝维, 张名爱, 姜晓霞, 王娜, 王巧莉, 范永存. 鹅源草酸青霉 F67 产纤维素酶培养条件的优化. 沈阳农业大学学报 (*Journal of Shenyang Agricultural University*), 2009, 40(1):47-52.
- [13] 胡亚林, 洗亮, 刘果, 段承杰, 冯家勋. 两株纤维素降解真菌的分离鉴定及其产纤维素酶学性质的初步研究. 广西农业科学 (*Guangxi Agricultural Sciences*), 2008, 39(4):425-428.
- [14] 马旭光, 张宗舟, 蔺海明. 黑曲霉产高酶活纤维素酶突变株 ZM-8 的筛选. 饲料工业 (*Feed Industry*), 2006, 27(24):11-13.
- [15] Ahamed A Vermette P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 40 (3): 399-407.
- [16] 刘韞滔, 淑霞, 龙传南. 纤维素降解菌 L-06 的筛选、鉴定及其产酶条件的分析. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2008, 24(06):1112-1116.
- [17] 张明珠, 张力, 韩大勇. 新型秸秆分解菌的筛选和酶活性研究. 中兽医医药杂志 (*Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*), 2008, (03):15-17.
- [18] Rodriguez C, Hiligsmann S, Ongena M. Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Microbial Ecology*, 2005, 16(5): 415-422.

Screening of three straw-cellulose degrading microorganism

Hongyuan Wang, Bingquan Fan*

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to screen straw-cellulose degrading microorganisms and to investigate their degradation ability of straw-cellulose. [**Methods**] The methods used to screen the high effect straw-cellulose degrading microorganism included the traditional isolation methods of straw-cellulose degrading microorganism such as holes observation method on filter paper sheet, disintegration test of filter paper scrip, hydrolysis spot diameter measurement method of CMC-Na, weight lose assay method of straw, measurement method of cellulose decomposition rate, measurement method of extracellular enzyme activity. [**Results**] We isolated 3 fungi with cellulose degrading ability, of which 98MJ was identified as *Penicillium oxalicum*, W3 as *Trichoderma sp.*, and W4 as *Penicillium expansum*. Strain W4 possessed high straw-cellulose degrading ability with straw-cellulose degrading rate of 56.3%, cellulose 59.06%, hemicellulose 78.75% and lignin 33.79% in 10 days. [**Conclusion**] Strain W4 was a cellulase-producing strain with broad development potential.

Keywords: Straw-cellulose; degrading microorganism; screening; cellulase

(本文责编: 张晓丽)