

降解棉秸秆耐热菌株的鉴定及降解条件优化

詹发强¹ 崔卫东^{1,2*} 周亚飞¹ 王炜^{1,2}

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

(2. 新疆特殊环境微生物工程技术研究中心 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 【目的】鉴定从新疆棉花秸秆高温堆肥中分离出的两株耐热真菌 Z₁、Z₂ 的属种, 并通过优化影响菌株产生纤维素酶的因素来提高菌株对秸秆的降解率。【方法】经形态学和菌株的 ITS 区克隆与序列分析确定属种, 以液体摇瓶发酵产滤纸酶活性(FPA)变化为衡量指标, 对 Z₁、Z₂ 以及二者混合菌(MS)的纤维素酶产生条件进行优化。【结果】菌株 Z₁ 为曲霉属烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* Fresen), Z₂ 为蚀丝霉属(*Myceliophthora* Cost.)。确定 Z₁ 以棉秸秆为碳源、以 NaNO₃ 为氮源、起始 pH 9.5、接种量 11%、50 °C 摇床培养 10 d, 对棉秸秆降解率为 10.19%; Z₂ 以麦秸秆为碳源、以 NaNO₃ 为氮源、起始 pH 5.5、接种量 9%、50 °C 摇床培养 10 d, 对麦秆降解率为 27.50%; MS 以棉花秸秆为碳源、以蛋白胨为氮源、起始 pH 5.5、接种量 11%、50 °C 摇床培养 10 d, 对棉秸秆的降解率为 53.45%。【结论】实验表明, MS (Z₁、Z₂ 混合)对秸秆的降解效果优于单菌株, 降解率达到一半以上, 两株耐热真菌在降解棉花秸秆、小麦秸秆等农作物废弃秸秆中具有较高的应用价值。

关键词: 棉花秸秆, 烟曲霉, 蚀丝霉, 滤纸酶活性

Identification of degradation cotton straw thermophilic strains and optimal degradate conditions

ZHAN Fa-Qiang¹ CUI Wei-Dong^{1,2*} ZHOU Ya-Fei¹ WANG Wei^{1,2}

(1. Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

基金项目: 自治区高技术研究发展项目(No. 200910103); 国家公益性行业(农业)专项项目(No. 200803033-A002G); 自治区科技支疆项目(No. 201091227)

*通讯作者: Tel: 86-991-4546798; ✉: cuwedo@163.com

收稿日期: 2011-07-19; 接受日期: 2011-09-29

(2. Xinjiang Research Centre of Microbial Engineering of Special Environment, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: [Objective] Two thermophilic fungal species which were isolated from the compost of cotton residue in Xinjiang were identified, and increased degradation rate of straw by optimizing the impact factors for cellulase production. **[Methods]** Two thermophilic fungal species were identified by morphological observation and analyzed the clone of the ITS gene fragment, The filter paper enzyme activity (FPA) of fungi was determined when they grown in a series of liquid state media containing pretreated natural cellulose as the carbon source, different nitrogen source, different initial pH, different inoculated amount and culture time, by analyzing the change of the FPA. **[Results]** Z₁ is *Aspergillus fumigatus* Fresen and Z₂ belongs to *Myceliophthora* Cost. (homology 97%). The filter paper enzyme activity (FPA) of fungi was determined when they grown in a series of liquid state media containing pretreated natural cellulose as the carbon source, different nitrogen source, different initial pH, different inoculated amount and culture time, by analyzing the change of the FPA, we had got the optimal conditions of fermentation. Under the optimal conditions, the decomposing (cotton residue) rate of Z₁ was 10.19% and MS was 53.45% for 10 days, the decomposing (wheat straw) rate of Z₂ was 27.50% for 10 days. **[Conclusion]** Degradation rate of straw MS better than single strains was more than half. It has great potential in recycling natural cellulose of Xinjiang when applied the fungal, which can degrade not only cotton residue but also wheat and rice straw, it has great potential for further apply in straw degradation.

Keywords: Cotton residue, *Aspergillus fumigatus* Fresen, *Myceliophthora* Cost, Filter paper enzyme activity (FPA)

新疆是我国三大棉花种植地区之一, 每年生产大量的棉花秸秆。据报道在 2009 年我区棉花秸秆产量超过 10^8 t, 大量的棉秆残留不仅是一种资源浪费, 而且通过焚烧等初级的处理方式对本地环境造成严重污染, 因此, 合理和有效地开发和利用这些剩余物使其成为可再生能源, 在促进农村经济和新疆地方经济发展将起到积极的作用^[1]。研究表明, 在 25 °C 条件下纤维素分子的半衰期是 50–80 多万年, 自然状态下完全降解极为困难^[2]。近几十年来, 国内外研究者研究利用一些物理和化学的方法对秸秆进行降解, 然而, 这些方法不仅费用极高而且效率较低^[3–6]。纤维素降解菌的使用具有经济、有效等特点, 正逐渐成为近期研究的重点^[7]。有许多微生物, 包括细菌、霉菌、酵母和

食用菌, 在自然条件下能够分解高纤维材料如秸秆、树叶和树木等^[8]。在本研究中, 从新疆棉花高温堆肥中分离出的两株耐热真菌, 经形态学和菌株的 ITS 区克隆与序列分析, 初步鉴定菌株的种属。以液体摇瓶发酵产滤纸酶活性(FPA)变化为衡量指标, 对 Z₁、Z₂ 以及二者混合菌(MS)的纤维素酶产生条件进行优化, 通过优化影响菌株产生纤维素酶的因素来提高菌株对秸秆的降解率, 为两株霉菌的进一步应用奠定理论及实验基础, 以期在棉秸秆降解以及资源化利用方面起到积极的作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 菌株分离自新疆地区的高温棉

秆堆肥中, 编号为 Z_1 、 Z_2 , 两株菌的生长特性及纤维素酶学性质已在前期研究中报道^[9]。

1.1.2 主要试剂: PCR 预混液, TaKaRa Biotechnology; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 秸秆及预处理: 收集乌鲁木齐周边农场的 4 种秸秆包括棉花秸秆、小麦秸秆、水稻秸秆及园林绿化垃圾, 分别切成 2 cm–3 cm 长, 并浸泡在氢氧化钠中(NaOH, 2%, W/V), 固体液体的重量比为 1:20。在 85 °C 水浴中处理 1 h, 水洗至中性, 烘干后备用。

1.2 方法

1.2.1 纤维素酶活性测定: 3,5-二硝基水杨酸显色法, 并用刘德海等^[10]提出的反应始终在 0.1 mol/L (pH 4.5)醋酸-醋酸钠缓冲溶液中进行。

1.2.2 形态学观察: 将 Z_1 、 Z_2 分别在 PDA 培养基上 50 °C 条件下培养, 使用扞片法培养 3–5 d, 观察菌落生长状况并且参照“真菌鉴定手册”^[11]来描述菌丝及孢子的形态。

1.2.3 菌株的分子生物学鉴定: 利用 ITS (Internally transcribed spacer-内源转录间隔区)序列进行菌种的分子鉴定, 以提取的各菌株总 DNA 作为扩增模板, 使用真菌通用引物^[12] (ITS1: 5'-TCC GTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCG CTTATTGATATG-3')进行 PCR 反应, 扩增菌株 ITS 片段。具体方法如下: 将待测菌株在 PDA 培养基上培养 72 h, 取菌丝体少许, 沸水煮沸 8 min 后迅速置于液氮中冷却 3 min。加入 567 μ L TE 缓冲液, 用吸管反复冲打使其重悬, 加入 30 μ L 10% SDS 和 3 μ L 20 mg/ μ L 的蛋白酶 K, 混匀, 37 °C 水浴 1 h。加入 100 μ L 5 mol/L NaCl, 充分混匀, 再加入 80 μ L CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 于 65 °C 水浴 10 min。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇, 混匀, 离心 5 min, 转移上清液。加入 0.6 体积异丙醇, 轻混直到 DNA 沉淀, 将沉淀用 1 mL 约

70% 的乙醇洗涤, 静置过夜。离心 5 min, 弃上清。加入 20 μ L TE 缓冲液于–20 °C 冰箱中保存待用。PCR 反应体系: 模板 1.0 μ L, 引物 (ITS1+ITS4) 1.0 μ L, Premix Taq 24.0 μ L, H₂O 24.0 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 55 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经纯化后送上海生物工程有限公司测序, 将测序得到的 ITS 序列提交至 GenBank 获得登录号, 同时与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行 BLAST 分析, 从中获取相近的序列, 用 ClustalX 软件和 MEGA 4.1 中 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.2.4 种子悬液及粗酶液的制备: 将 250 mL 三角瓶装入 50 mL 液体 PDA 培养基, 分别接种菌株 Z_1 、 Z_2 。50 °C、120 r/min 摇床振荡培养至有孢子产生, 即为种子悬液。以预先处理过的 4 种纤维素(麦秸秆、棉秸秆、稻秸秆、园林绿化垃圾)作为碳源, 添加量为 1.5% (W/V), 孢子悬液接种量为 4 mL (10^8 spores/mL)。在 50 °C、120 r/min 条件下培养 3 d, 取发酵液在 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 上清液即为粗酶液。

1.2.5 FPA 测定: 取 0.5 mL 粗酶液, 以 0.1 g 新华一号滤纸为底物, 加入 2 mL 醋酸缓冲液, Z_1 55 °C 水浴, Z_2 60 °C 水浴, MS 50 °C 水浴, 均保温 2 h, 然后加入 2.5 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 10 min, 530 nm 比色^[13]测得吸光度。在此条件下, 每分钟产生 1 μ mol 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。各组灭活粗酶液作为对照组^[14]。

$$X = \frac{WN \times 5.56}{Vt}$$

X: 酶活力; W: 葡萄糖含量(mg); N: 酶液定容总体积(mL); V: 反应液中酶液加入量(mL); t: 反应时间(min); 5.56: 1 mg 葡萄糖的 μ mol 数。所有酶活力测定均重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.6 产酶影响因子优化: (1) 碳源: 分别以预处理过的秸秆为唯一碳源, 接种 5% 种子悬液于以上不同碳源的发酵培养基, 50 °C、120 r/min 摇瓶培养 72 h, 取粗酶液测定 FPA。

(2) 氮源: 以最佳产酶碳源为基础碳源, 加入酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 作为唯一氮源(0.4%), 接种 5% 种子悬液于发酵培养基, 50 °C、120 r/min 摇瓶培养 72 h, 测定 FPA。

(3) 起始 pH: 应用已筛选的碳源、氮源, 调节发酵培养基的酸碱度在 pH 3.5–10.5 范围内, 接种 5% 种子悬液于发酵培养基中, 50 °C、120 r/min 摇瓶培养 72 h, 测定 FPA。

(4) 接种量: 应用已确定的碳源、氮源、起始 pH, 分别接种(V/V) 1%、3%、5%、7%、9%、11%、13%、15% 种子悬液于发酵培养基中, 50 °C、120 r/min 摇瓶培养 72 h, 测定 FPA。

(5) 培养时间: 应用已经确定的碳源、氮源、起始 pH、接种量, 于 50 °C、120 r/min 摇瓶培养 10 d, 每 24 h 测定 FPA。

(6) 秸秆降解量测定: 过滤在最适产酶条件下培养 10 d 的秸秆发酵液, 将残留物 80 °C 烘干称重, 用减重法计算出秸秆降解率。

2 结果与讨论

2.1 菌落形态观察及分子生物学鉴定

Z_1 接种后 1–4 d, 菌丝生长快且呈白色, 5 d 时开始出现墨绿色孢子, 镜检发现: 分生孢子穗圆筒形, 分生孢子梗光滑; 顶囊仅上半部产生孢子; 分生孢子球形, 未见子囊世代(图 1)。 Z_2 接种 2 d, 菌丝呈白色, 4 d 菌丝绒毛状, 内层较厚, 菌落中心菌丝淡褐色, 圆环状, 内圈浅黄色, 外层菌丝白色。镜检发现: 分生孢子拟卵圆形, 光滑, 分生孢子梗短或无, 分生孢子不串生(图 1)。

2.2 菌株 ITS 序列比对分析

将 Z_1 和 Z_2 序列提交至 GenBank 数据库, 获得 GenBank 登录号 Z_1 为 HQ 331439, Z_2 为 HQ 331440。用 BLAST 进行菌株之间同源性的比对, 构建系统发育进化树(图 2), Z_1 的 ITS 序列与 GenBank 中 *Aspergillus fumigatus* 的部分 ITS 序列同源性为 99%, 根据形态学观察结果与 ITS 分析结果, 确定菌株 Z_1 为曲霉属烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Fresen; Z_2 的 ITS 序列与 GenBank 中 *Myceliophthora* sp. 的部分 ITS 序列同源性为 97%, 根据形态学观察结果与 ITS 分析结果, 确定 Z_2 属于蚀丝霉属 *Myceliophthora* Cost.

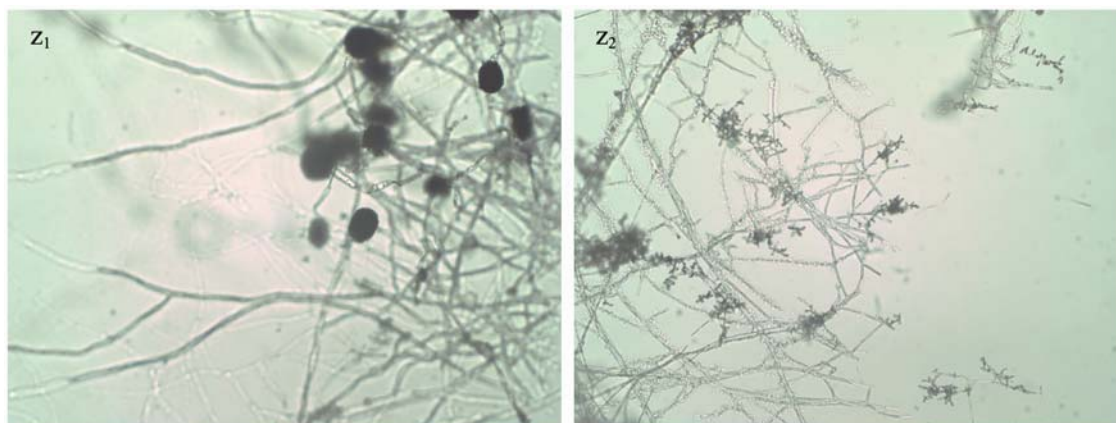


图 1 菌株菌丝及孢子的显微形态
Fig. 1 Morphological observations

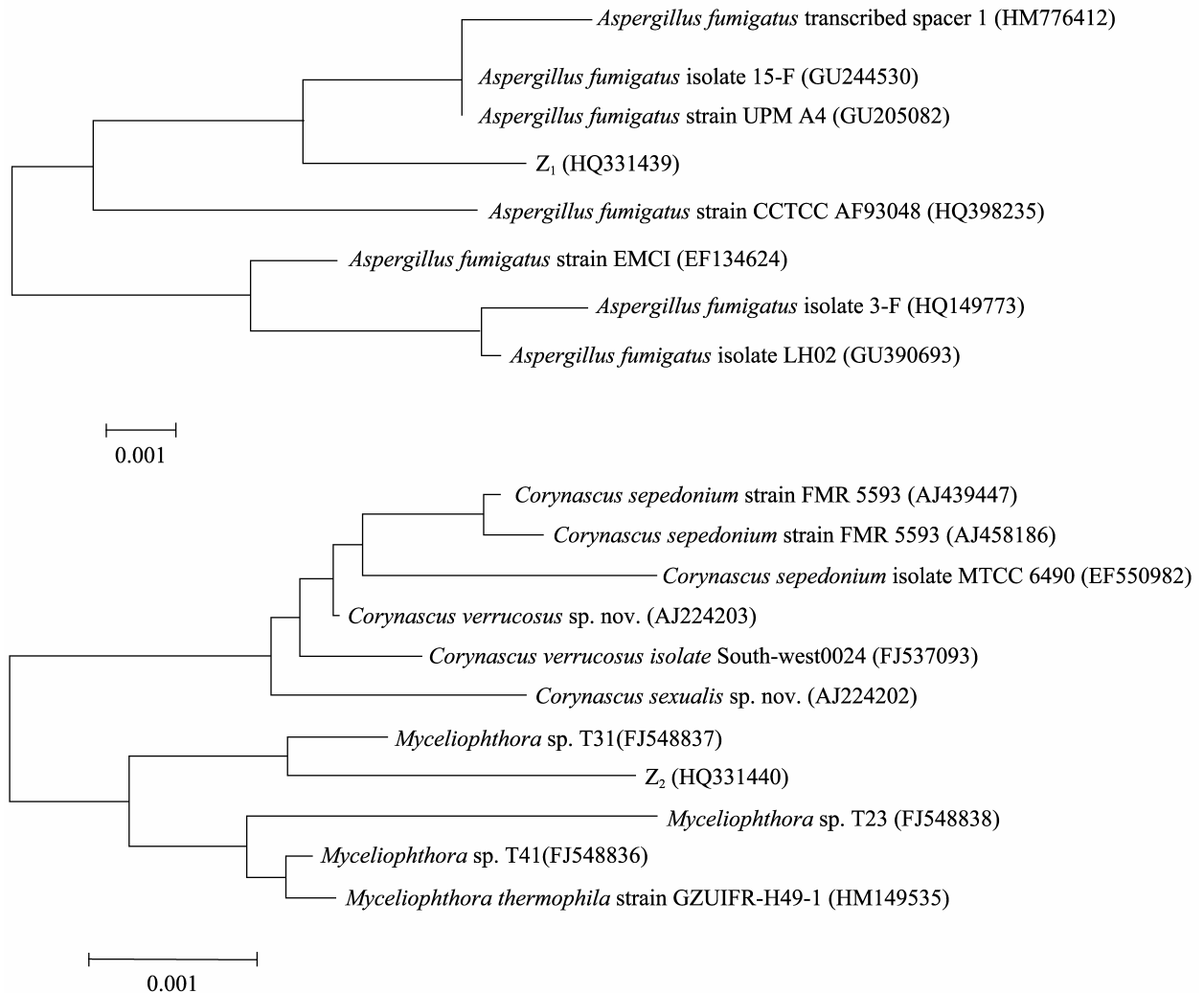


图 2 菌株 Z_1 和 Z_2 的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic trees of ITS of fungal strains Z_1 and Z_2

2.3 产酶影响因子的优化

2.3.1 碳源: 纤维素酶是诱导性酶, 单糖、双糖、纤维类物质均能促进纤维素酶的产生。培养基中的碳源除了构成菌体结构成分、菌体储藏物质、为菌体生长提供能源外, 还起着产酶诱导物的作用^[15]。以 4 种纤维素为底物(图 3), Z_1 的最适碳源为棉花秸秆, FPA 为 1.820 U/mL; Z_2 的最适碳源为麦秆, FPA 为 1.364 U/mL; MS 的最适碳源为棉花秸秆, FPA 为 1.609 U/mL。其中, Z_1 降解水稻秸秆的 FPA 为其最大酶活的 99.725%; Z_2 降解棉秸秆

的 FPA 为其最大酶活的 85.044%; MS 降解麦秆的 FPA 为其最大酶活的 99.938%。说明该组菌对水稻秸秆、麦秸秆也有较强的降解能力, 在秸秆降解方面有很好的应用潜力。

2.3.2 氮源: 在最适碳源的基础上, Z_1 和 Z_2 的最适氮源均为 NaNO_3 (图 4), FPA 分别为 2.346 U/mL、1.057 U/mL; MS 的最适氮源为蛋白胨, FPA 为 1.444 U/mL。此外, Z_1 、 Z_2 、MS 除了各自最适氮源外, 对酵母膏均有较强的利用能力。

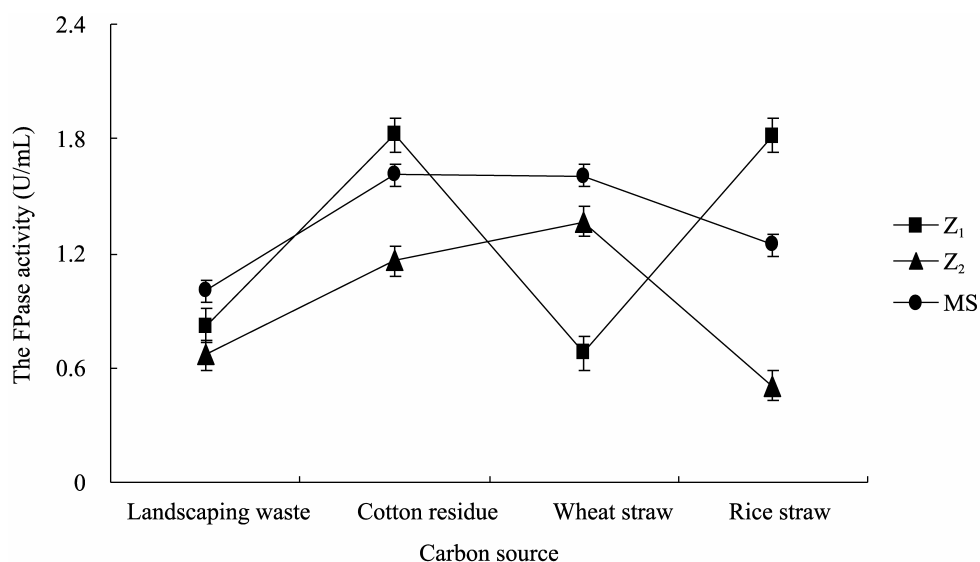


图 3 不同碳源产生还原糖的测定

Fig. 3 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of four sources of cellulose

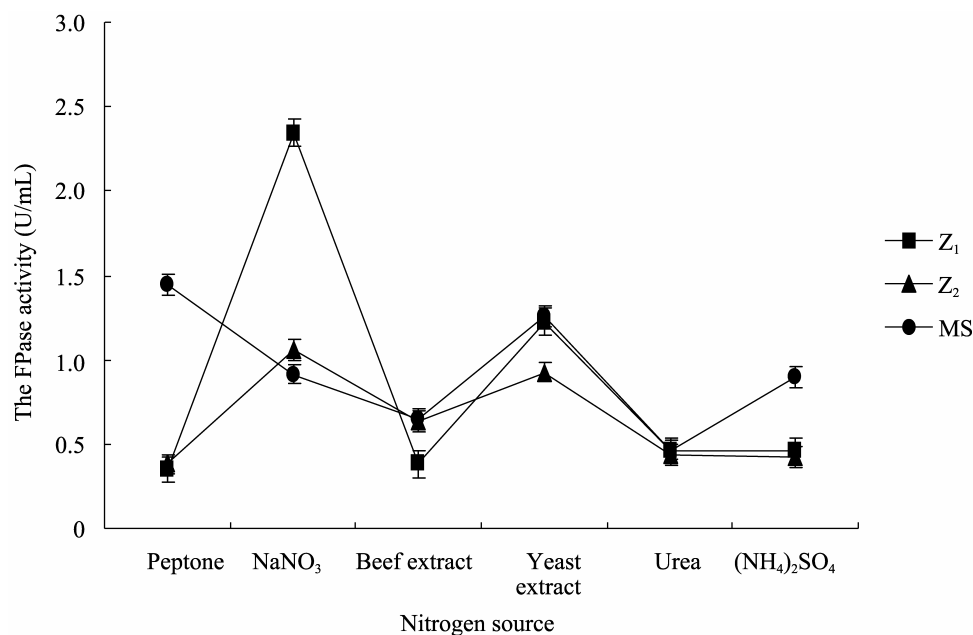


图 4 不同氮源产生还原糖的测定

Fig. 4 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of different sources of nitrogen

2.3.3 起始 pH: 以最适碳源、氮源为基础, 调整发酵液起始 pH (图 5), Z₁ 在 pH 9.5 时出现最大 FPA 1.099 U/mL, Z₂ 在 pH 5.5 时出现最大 FPA 2.059 U/mL, MS 出现两个峰值: pH 5.5 时出现最

大 FPA 1.525 U/mL (Z₂ 的 74.065%), 在 pH 9.5 时 FPA 0.986 U/mL (Z₁ 的 89.718%), Z₁、Z₂ 的最适起始 pH 在混合培养时均得到了体现。在混合培养时各自最适 pH 下的 FPA 所占比例不同, 可能与

pH 对菌株酶的作用有关。

2.3.4 接种量: 应用以上最适条件, 接种不同量孢子悬液, 测定各处理 FPA 活力(图 6), Z_1 和 MS 最适接种量为 11%, Z_2 最适接种量为 9%。结果表明 FPA 随着接种量的增加而提高, 到达最大值时

又随着接种量的增加而减小。这是由于在一定的环境条件下, 过小的接种量造成培养基营养相对过剩, 菌丝体大量繁殖, 造成产酶时间相对滞后; 过大的接种量会使菌丝体在生长后期出现营养不足, 造成产酶量下降。

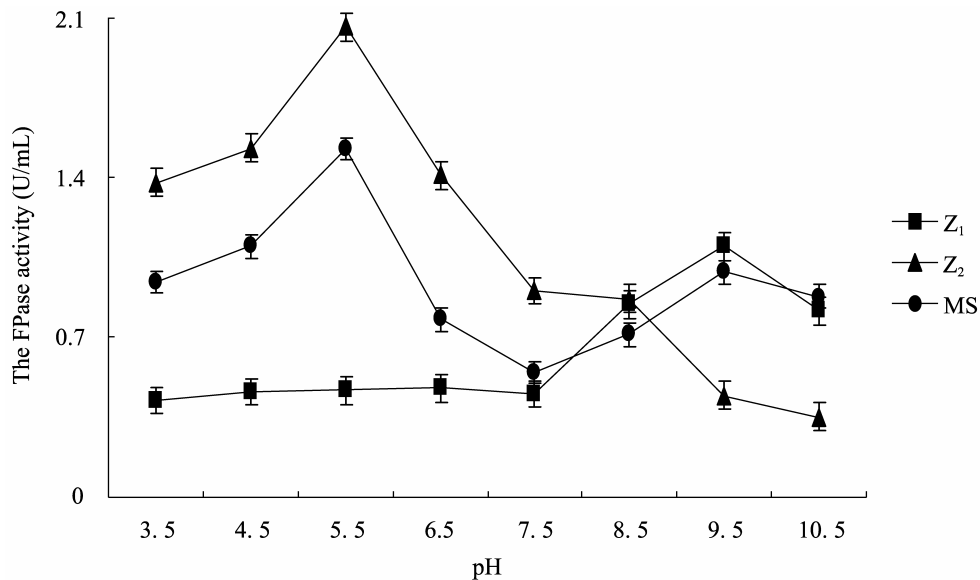


图 5 不同起始 pH 产生还原糖的测定

Fig. 5 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis in the initial different pH of fermentation broth

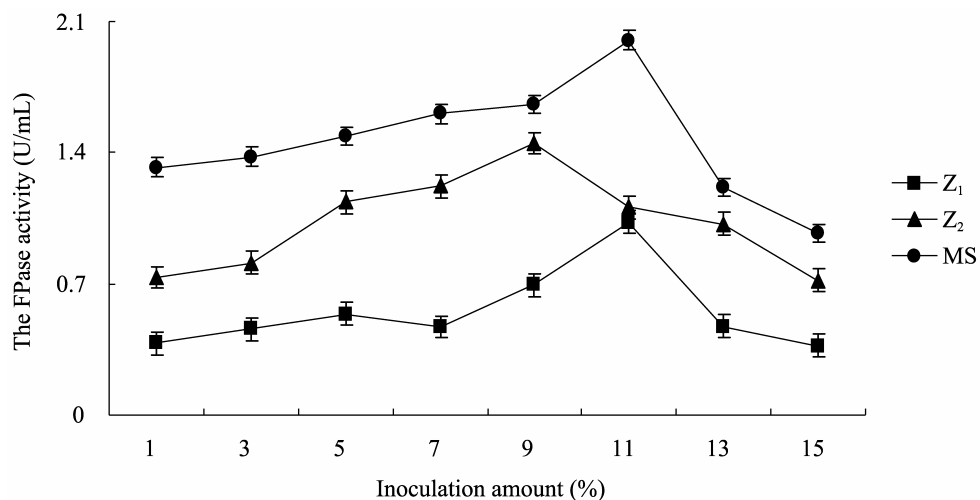


图 6 不同接种量产生还原糖的测定

Fig. 6 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of different inoculation amount

2.3.5 培养时间：在各菌株的最适酶活条件下，测定菌株的培养时间(图 7)， Z_1 、 Z_2 和 MS 均在第 4 天出现最高的 FPA， Z_1 为 1.465 U/mL， Z_2 为 2.269 U/mL，MS 为 2.851 U/mL。MS 在第 4 天至第 7 天的 FPA 保持在 2.500 U/mL 以上，说明菌株混合培养时纤维素酶可以长时间以较高的效率降解秸秆，不同菌株酶的 3 组成分之间的相互作用较强，对秸秆的快速降解，缩短秸秆发酵腐熟周期有较强的作用。

2.3.6 秸秆降解量测定及 pH 变化：摇瓶第 5 天和第 10 天的 pH 如表 1 所示， Z_1 第 10 天的 pH 高于第 5 天， Z_2 第 10 天的 pH 低于第 5 天。菌株对秸秆 5、10 d 降解率如表 2 所示， Z_1 对棉秸秆 5 d 降解率为 2.39%，10 d 降解率为 10.19%； Z_2 对麦秆 5 d 降解率为 7.29%，10 d 降解率 27.50%；MS 对棉秸秆 5 d 降解率为 21.46%，10 d 降解率为 53.45%。对秸秆的降解效果 MS 明显优于单菌株(图 8)，虽然 Z_2 的最适碳源不是棉秸秆，但是混合培养降解棉秸秆时它的贡献是巨大的。

3 结论

本试验通过对菌株形态的观察和生理生化特性测定，结合 ITS 序列同源性分析，由《真菌鉴定手册》确定菌株 Z_1 为曲霉属烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Fresen， Z_2 隶属于蚀丝霉属 *Myceliophthora* Cost.。对耐高温纤维分解菌株 Z_1 、 Z_2 及 MS 的纤维素酶产生条件进行优化，确定出各自最适的碳源、氮源、起始 pH、接种量、培养时间。 Z_1 以 NaNO_3 为氮源、起始 pH 9.5、接种量 11%、50 °C 摇床培养 10 d，对棉秸秆降解率为 10.19%； Z_2 以 NaNO_3 为氮源、起始 pH 5.5、接种量 9%、50 °C 摇床培养 10 d，对麦秆降解率为 27.50%；MS 以蛋白胨为氮源、起始 pH 5.5、接种量 11%、50 °C 摇床培养 10 d，对棉秸秆的降解率为 53.45%；实验表明，对秸秆的降解效果 MS 优于单菌株，降解率达到一半以上，本研究中的两株耐热真菌在降解棉花秸秆、小麦秸秆等农作物废弃秸秆中具有较高的应用价值。

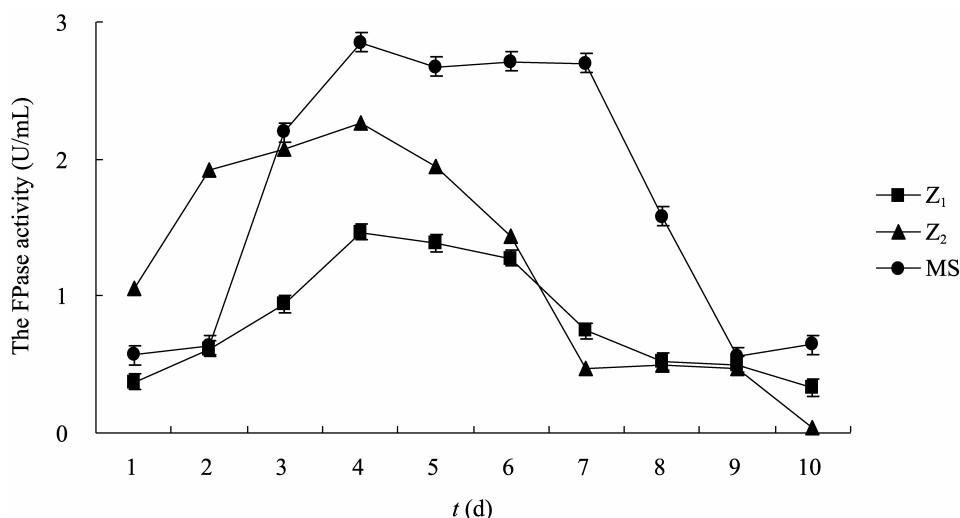


图 7 不同发酵时间产生还原糖的测定

Fig. 7 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of difference fermented time

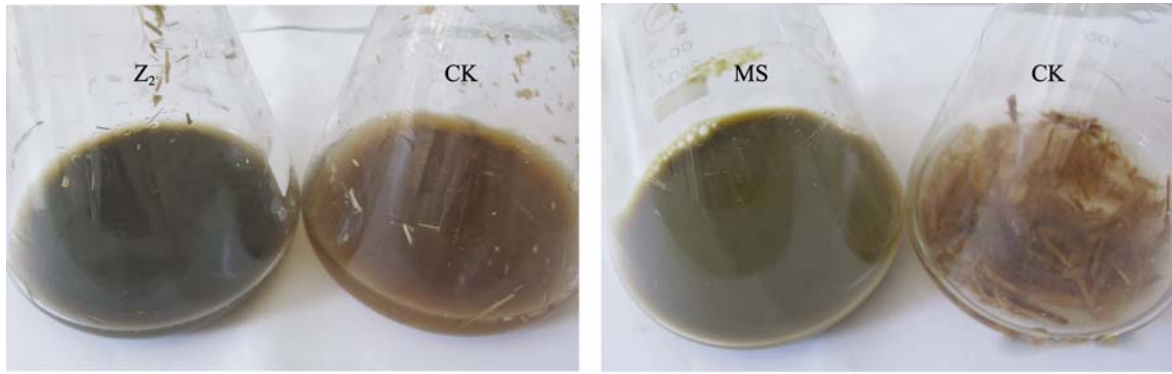


图 8 MS 和 Z₂ 第 10 天的降解效果
Fig. 8 The decomposing result of the tenth

表 1 菌株降解最适碳源第 5 天和第 10 天的 pH

Table 1 The final pH of fermentation broth of Z₁, Z₂ and MS after incubation for 5 days and 10 days with pretreated cotton residue and wheat straw

| 项目 Item | 起始 pH Initial pH | 第 5 天 pH The pH of fifth day | 第 10 天 pH The pH of tenth day |
|----------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Z ₁ | 9.50 | 8.08 | 8.22 |
| Z ₂ | 5.50 | 6.98 | 6.70 |
| MS | 5.50 | 6.58 | 6.04 |

表 2 菌株最适碳源第 5 天和第 10 天的降解率

Table 2 The decomposing rate of Z₁, Z₂ and MS after incubation for 5 days and 10 days with pretreated cotton residue and wheat straw

| 项目 Item | 第 5 天 5 days | | | 第 10 天 10 days | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | Z ₁ | Z ₂ | MS | Z ₁ | Z ₂ | MS |
| 降解量 Decomposing weight (g) | 0.035 9±0.000 1 | 0.109 3±0.000 2 | 0.321 9±0.000 3 | 0.152 8±0.000 2 | 0.412 5±0.000 2 | 0.801 8±0.000 2 |
| 降解率 Decomposing rate (%) | 2.39±0.01 | 7.29±0.02 | 21.46±0.02 | 10.19±0.01 | 27.50±0.02 | 53.45±0.02 |

4 讨论

(1) 摇瓶第 5 天和第 10 天 Z₁、Z₂ 的 pH 变化反映了一个相同的趋势：在秸秆分解过程中 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^[16]。分析其原因是：在菌体分解秸秆过程中会产生多种有机酸类物质，使 pH 能够迅速下降到微酸性，当秸秆的添加量较

低时，产生有机酸较少，菌系自身会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；但是随着秸秆添加量的增加，菌系消耗有机酸的时间延长，当添加的秸秆过多，所产生有机酸的量超过菌系的调节能力时，pH 无法再回升，菌系就会失去正常的分解能力^[17]。

(2) 秸秆的液体发酵与固体发酵相比，固体发酵有较高的溶氧水平和丰富的纤维素，对菌株

的生长和诱导纤维素酶的产生都十分有利。在固体发酵过程中,堆体的温度、pH 会随着发酵时间的持续而发生变化,对不同纤维素降解菌混合发酵来讲,不同温度要求、不同 pH 条件下的菌株在各自适宜条件下将会发挥最大的酶活力,对固体发酵最终纤维素的降解量会有很大的影响。

(3) 在实验过程中用 FPA 来衡量菌纤维素酶系的降解能力,是由于滤纸结构中包括结晶型纤维素和非结晶型纤维素^[18-20],能更好地反映菌株纤维素酶系的综合能力。一般认为纤维素的生物降解过程与一组复合的纤维素酶有关,它包括:内切 β -1,4-葡萄糖苷酶,简称内切酶(C_x);外切 β -1,4-葡萄糖苷酶,简称外切酶(C_1); β -糖苷酶,也称纤维二糖酶。纤维素的降解必须依靠 3 种酶的协同作用才能完成^[21]。以滤纸为底物经纤维素酶水解后生成还原糖的量来表征纤维素酶系总的糖化能力的方法得到广泛应用,它反映了 3 类酶组分的协同作用^[22],能更好地反映菌株纤维素酶系的综合能力。有研究证明,FPA 活性常表现出与 C_x 、 C_1 活性的正相关性,尤其是与 C_x 的活性。当 C_x 活性受到抑制时(如:表面活性剂),即使具有较高的 C_1 活力,FPA 活性也较低^[23]。如实验中确定菌株接种量和培养时间时,单株菌 FPA 活性均低于 MS 的 FPA 活性,这可能由单株菌较低的 C_x 活性引起,当混合培养时, C_x 活性相对于单株菌的 C_x 活性高,为 C_1 作用提供更多的还原性末端和非还原性末端,故 MS 的 FPA 活性较高,纤维素降解量也较大。

(4) 近年来,以高温堆肥为原料筛选高温纤维素分解菌的报道较多,郑惠华等^[24]筛选出产酶活性较高的高温放线菌 JSU-5,所产 C_x 酶活为 113.4 U/mL;马怀良等^[25]筛选的高温细菌 HB4 和高温霉菌 HM,高温细菌 HB4 的 C_x 酶活最高为 0.923 8 U/mL;高温霉菌 HM 的 FPA 酶活最高为 1.053 5 U/mL;这些菌株对秸秆的降解率尚未

见报道。刘长莉等^[26]报道的纤维素分解菌复合系 NSC-7,其内切酶及总纤维素酶活为 4.48 U/mL 和 7.51 U/mL,能够在 5 d 内分解 55.2%天然稻秆。赵方圆等^[27]报道的纤维素降解菌 YN1 总纤维素酶活力为 26.6 U/mL,在 7 d 内不仅能够分解 41.87%的稻草,而且可以分解 31.59%的稻壳。但是高温纤维素分解菌对棉秸秆降解情况的报道较少。

参 考 文 献

- [1] 宗望远,袁巧霞,丁羽,等.新疆棉花秸秆气化技术应用现状与建议[J].塔里木大学学报,2008,20(4):91-94.
- [2] Wolfenden R, Snider MJ. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts[J]. Accounts of Chemical Research, 2001, 34(12): 938-945.
- [3] El-Mastry HG. Utilisation of Egyptian rice straw in production of cellulases and microbial protein: effect of various pretreatments on yields of protein and enzyme activity[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1983, 34(7): 725-732.
- [4] 张木明,徐振林,张兴秀,等.预处理对稻草秸秆纤维素酶解产糖及纤维素木质素含量的影响[J].农产品加工·学刊,2006,58(3):4-6.
- [5] Gould JM. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1985, 27(3): 225-231.
- [6] Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [7] Shiratori H, Ikeno H, Ayame S, et al. Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3702-3709.
- [8] 陈子爱,邓小晨.微生物处理利用秸秆的研究进展[J].中国沼气,2006,24(3):31-35.

- [9] 周亚飞, 詹发强, 侯新强, 等. 棉秸秆降解高温菌株的筛选及产酶分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 206–213.
- [10] 刘德海, 杨玉华, 张发旺, 等. 饲用纤维素酶活力测定方法的探讨[J]. 饲料工业, 2002, 23(4): 34–35.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [12] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols A Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315–322.
- [13] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010(4): 115–118.
- [14] 朴哲, 崔宗均, 苏宝林. 高温堆肥的物质转化与腐熟进度关系[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(3): 74–78.
- [15] 武峙, 张迎君, 周心智. 降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选及产酶条件研究[J]. 纤维素科学与技术, 2009, 17(2): 20–26.
- [16] Wang WD, Wang XF, Liu CL, et al. Productions analyses and pH dynamics during rice straw degradation by the lignocellulose degradation bacteria system WSC-6[J]. Environmental Science, 2008, 29(1): 219–224.
- [17] Liu JB, Wang WD, Yang HY, et al. Process of rice straw degradation and dynamic trend of pH by the microbial community MC1[J]. Journal of Environmental Sciences, 2006, 18(6): 1142–1146.
- [18] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251–252.
- [19] Teather MR, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(4): 777–780.
- [20] Li X, Gao P. Isolation and partial properties of cellulose-decomposing strain of *Cytophaga* sp. LX-7 from soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 82(1): 73–80.
- [21] Kansoh AL, Essam SA, Zeinat AN. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*[J]. Polymer Degradation and Stability, 1999, 62(2): 273–278.
- [22] 傅力, 丁友昉, 张箴. 纤维素酶测定方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2002, 23(2): 45–48.
- [23] 刘焜滔, 禚淑霞, 龙传南, 等. 纤维素降解菌 L-06 的筛选、鉴定及其产酶条件的分析[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 1112–1116.
- [24] 郑惠华, 陈惠, 张志才. 高温纤维素分解菌筛选及 JSU-5 产纤维素酶特性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3040–3048.
- [25] 马怀良, 龚振杰, 陈欢, 等. 高温纤维素分解菌的分离、筛选及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(29): 13987–13988.
- [26] 刘长莉, 王小芬, 牛俊玲, 等. 一组纤维素分解菌复合系 NSC-7 的酶活表达特性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 20–24.
- [27] 赵方圆, 范宁杰, 朱建春, 等. 纤维素高效降解菌 YN1 的筛选及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 496–502.