

研究报告

产木质纤维素降解酶真菌的筛选及产酶特性

白长胜¹, 刘秋瑾¹, 尹琚伊¹, 王欢¹, 田秋丰¹, 邱景会¹, 汤继龙², 史同瑞^{*1}

1 黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院 黑龙江省兽用药物重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161005

2 黑龙江领康生物科技有限公司, 黑龙江 齐齐哈尔 161200

白长胜, 刘秋瑾, 尹琚伊, 王欢, 田秋丰, 邱景会, 汤继龙, 史同瑞. 产木质纤维素降解酶真菌的筛选及产酶特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1098-1110.

BAI Changsheng, LIU Qiuji, YIN Junyi, WANG Huan, TIAN Qiufeng, QIU Jinghui, TANG Jilong, SHI Tongrui. Screening and enzymatic characterization of the fungal strains producing lignocellulose-degrading enzymes[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1098-1110.

摘要:【背景】利用微生物处理秸秆引起研究者的广泛关注。【目的】筛选生长速度快、木质纤维素降解酶活性强的真菌菌株, 用于植物秸秆降解和高效利用。【方法】从自然界采集的样品中分离纯化真菌菌株, 利用 PDA-愈创木酚和 PDA-羧甲基纤维素钠平板初筛, 再经过液体发酵检测漆酶酶活、羧甲基纤维素酶酶活及菌丝生长速率复筛目的菌株, 通过内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)测序法对目的菌株进行鉴定, 对目的菌株产漆酶和羧甲基纤维素酶活力进行测定及酶学性质研究。【结果】从样品中分离纯化到 18 株真菌, 通过初筛筛选出 9 株产木质纤维素降解酶真菌菌株, 再经过复筛, 筛选出一株产漆酶、羧甲基纤维素酶活力高、菌丝生长快的菌株 M1, 经过分子生物学鉴定 M1 为糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*), 其漆酶酶活为(243.59±1.11) U/mL, 羧甲基纤维素酶酶活为(36.03±0.63) U/mL。在 5 d 的培养期内, 菌丝生长速率为(9.43±0.32) mm/d。对菌株 M1 的发酵粗酶液的酶学性质进行了检测分析, 结果表明, 所产的漆酶在 pH 5.0–6.5 相对酶活为 90%以上, 在 pH 5.5 的介质中最为稳定, 在低于 55 °C 环境稳定性较高, 相对酶活 90%以上; 该菌所产羧甲基纤维素酶在 pH 5.5–6.5 相对酶活为 90%以上, 在 pH 6.0 的介质中最为稳定, 在低于 60 °C 环境相对稳定性较高, 相对酶活 90%以上。【结论】本研究筛选到的菌株 M1 具有较高的漆酶和羧甲基纤维素酶活性, 具有降解木质素和纤维素的潜力, 为植物秸秆的生物降解提供了有效的菌种资源。

关键词: 木质纤维素降解酶; 真菌; 筛选; 鉴定

资助项目: 黑龙江省重点研发计划(GA21B006)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Heilongjiang Province (GA21B006).

*Corresponding author. E-mail: systr@sina.com

Received: 2022-07-07; Accepted: 2022-08-25; Published online: 2022-09-27

Screening and enzymatic characterization of the fungal strains producing lignocellulose-degrading enzymes

BAI Changsheng¹, LIU Qiujin¹, YIN Junyi¹, WANG Huan¹, TIAN Qiufeng¹, QIU Jinghui¹, TANG Jilong², SHI Tongrui^{*1}

1 Heilongjiang Key Laboratory of Veterinary Drugs, Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005, Heilongjiang, China

2 Heilongjiang Lingkang Biotechnology Limited Company, Qiqihar 161200, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] Microbial degradation of straw has attracted increasing attention of researchers. [Objective] To screen out the fungal strains with fast growth and strong activities of degrading lignin and cellulose for the efficient utilization of straw. [Methods] The fungal strains were isolated from the samples collected in the natural environments. PDA-guaiacol and PDA-carboxymethylcellulose were used for preliminary screening and then the activities of laccase and carboxymethyl cellulase (CMCase) of the selected strains were determined by liquid fermentation. The target strain was obtained by re-screening based on mycelial growth rate and identified by sequencing of internal transcribed spacer (ITS). Furthermore, the laccase and CMCase activities of the target strain was determined and the enzymatic properties were studied. [Results] A total of 18 strains of fungi were isolated from the samples, among which 9 strains producing lignocellulose-degrading enzymes were selected through preliminary screening. After re-screening, strain M1 with high activities of laccase and CMCase and fast mycelial growth was screened out as the target strain and identified as *Pleurotus ostreatus*. The strain had the laccase and CMCase activities of (243.59±1.11) U/mL and (36.03±0.63) U/mL, respectively, as well as the mycelial growth rate of (9.43±0.32) mm/d during the 5 days of culture. The relative activity of laccase produced by strain M1 was the most stable at pH 5.5 and over 90% in a pH range of 5.0 to 6.5 and below 55 °C. The relative activity of CMCase produced by strain M1 was the most stable at pH 6.0 and over 90% in a pH range of 5.5 to 6.5 and below 60 °C. [Conclusion] *P. ostreatus* M1 had high laccase and CMCase activities and the potential of degrading lignin and cellulose. This study provides a promising fungal strain for the biodegradation of straw.

Keywords: lignocellulose-degrading enzyme; fungi; screening; identification

白腐菌(white rot fungi)是能够引起木质纤维素白色腐烂的一类丝状真菌的总称,其中,平菇、香菇、猴头菇、灵芝等药食同源型真菌均是属于木腐生菌类的白腐菌^[1-2]。平菇、榛蘑等药食同源型真菌具有良好的产酶能力,产生的酶系包括纤维素酶、木质素酶、蛋白酶、淀

粉酶等多种酶类,其中尤以产纤维素酶、木质素酶为优势^[3]。在白腐真菌的生长过程中,真菌菌丝能够侵入宿主植物的细胞内,产生木质素酶、纤维素酶和半纤维素酶等多种酶类,并且通过这些酶对植物纤维的降解转化而获取养分,因此,平菇等药食同源型真菌生长所需的

营养主要是通过自身分泌酶的降解作用,将植物细胞壁中的纤维素、木质素和半纤维素转变成可以利用的碳素营养源和多糖能源,为自身生长提供所需营养^[4-5]。

玉米、水稻、中草药等植物秸秆主要是由纤维素、半纤维素和木质素等纤维成分组成的。在植物细胞壁中,木质素与半纤维素以共价键的形式紧密结合一起,并将纤维素包裹其中,形成一层致密的高分子聚合物屏障,致使植物秸秆不易被降解^[6-7],因此,在利用生物酶降解植物秸秆时,往往需要纤维素酶、半纤维素酶和木质素酶等多种生物酶的协同作用才能实现植物秸秆的有效降解^[8]。在牛、羊等反刍动物中,由于降解木质素的酶类贫乏,难以将秸秆饲料进行高效利用,因此,分离筛选高产木质素酶的微生物可为秸秆资源的高效饲料化利用、降低家畜养殖成本提供技术支持。

平菇、香菇等食用真菌是一类常见的产木质素降解酶的优势白腐真菌,具有良好的产木质素降解酶能力,能够实现对植物秸秆的高效降解^[9]。黄茜等研究证实,利用平菇处理小麦秸秆可明显降低秸秆中的木质素含量,有助于在瘤胃内进行纤维降解和丙酸生成^[10]。本研究旨在从自然界中分离筛选高产木质素酶和纤维素酶的食用真菌,以期在产酶真菌在农作物秸秆还田、秸秆资源饲料化利用、食用真菌种植、中药生物发酵等领域的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

在内蒙古自治区、黑龙江省等地林区采集榛蘑、草蘑等野生食用真菌,以及真菌生长地的腐叶、朽木等样品 30 份,冷藏保存,用于产酶菌的分离。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNS 试剂:按技术规范 NY/T 912—2020 配制 DNS 试剂^[11]。

愈创木酚、刚果红、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt), ABTS]、碱木素均为分析纯,上海源叶生物科技有限公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS)、四水酒石酸钾钠、苯酚、无水亚硫酸钠、无水葡萄糖等试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、引物、DNA 聚合酶等,生工生物工程(上海)股份有限公司。

可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;pH 计和电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;电热恒温水浴锅和电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;显微镜,Olympus 公司;PCR 仪,东胜创新生物科技有限公司。

1.1.3 培 养 基

PDA 培养基:葡萄糖 20.0 g,琼脂 20.0 g,土豆浸液 1 000.0 mL, pH 自然。

PDA-愈创木酚培养基:在 PDA 培养基中添加愈创木酚 0.4 g/L,用于产漆酶真菌的初筛。

PDA-CMC 培养基:在 PDA 培养基中添加 CMC-Na 2.0 g/L,用于产纤维素酶真菌的初筛。

产漆酶液体发酵培养基(g/L):NaNO₃ 2.5, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, NaCl 1.0, CaCl₂·2H₂O 0.5, 酵母膏 0.1, 碱木素 3.0, pH 自然。

产纤维素酶液体发酵培养基(g/L):CMC-Na 5.0, 蛋白胨 3.0, MgSO₄·7H₂O 0.3, 酵母膏 0.5, CaCl₂·2H₂O 0.3, KH₂PO₄ 1.5, pH 7.0—7.3。

1.2 方 法

1.2.1 真菌分离与纯化

取采集的蘑菇子实体、腐叶或朽木样品,

用无菌剪刀剪成 1 cm 左右的小块, 用无菌纯水振荡漂洗 3 次, 每次漂洗 3–5 min, 用无菌滤纸吸干。取漂洗样品接种至 PDA 培养基, 置 28 °C 培养箱培养 4–5 d。取生长的真菌菌落, 用接种针挑取菌丝接种 PDA 培养基, 反复接种培养进行纯化。将纯化菌株转接 PDA 斜面培养基, 于 28 °C 培养箱培养 4 d, 然后置 4 °C 保存备用。

1.2.2 产酶真菌初选

1) 产漆酶真菌初选

参照孙思琦等^[12]的方法, 取纯化的真菌菌种分别接种至 PDA 平板, 置 28 °C 培养箱恒温培养 7 d, 然后用直径 9 mm 的无菌打孔器在菌落边缘制取菌饼。取菌饼接种 PDA-愈创木酚平板中央, 每个平板接种一块菌饼, 每个菌株作 3 个平行, 接种平板置 28 °C 培养箱恒温培养, 每天观察记录菌落周围红棕色显色圈的产生情况。培养至第 7 天, 用游标卡尺分别测量产生显色圈菌株的菌落直径(R)及显色圈直径(r), 并计算菌落直径与显色圈直径的比值(R/r)^[13], 初步判定筛选菌株产漆酶的能力。

2) 产纤维素酶真菌的初选

采用刚果红染色法测定筛选菌株产纤维素酶能力。取纯化真菌菌株分别接种至 PDA 平板, 置 28 °C 培养箱培养 7 d, 在菌落边缘用直径 9 mm 的无菌打孔器制取菌饼。取菌饼接种至 PDA-CMC 平板中央, 每个平板接种一块菌饼, 每个菌株作 3 个平行, 接种平板置 28 °C 培养箱培养。培养至第 7 天, 在平板中加入 1 mg/mL 的刚果红溶液并覆盖整个平板表面, 染色 15–20 min 后倾去刚果红染色液, 加入 1 mol/L 氯化钠溶液冲洗, 出现脱色圈的菌株用游标卡尺分别测量菌落直径(R)及透明水解圈直径(r), 并计算菌落直径与透明水解圈直径的比值(R/r)^[14], 初步判定菌株产纤维素酶的能力。

1.2.3 产酶真菌复选

1) 粗酶液制备

取初选真菌分别接种 PDA 平板, 置 28 °C 培养箱培养 7 d, 然后用直径 9 mm 的无菌打孔器在菌落边缘制取菌饼。每个菌株分别接种产漆酶液体发酵培养基和产纤维素酶液体发酵培养基各 3 瓶, 250 mL 三角瓶中装液量为 50 mL, 每个三角瓶接种一块菌饼, 于 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 7 d。培养液在室温 6 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液, 置 4 °C 保存^[15]。

2) 漆酶酶活测定

参照赵翠敏等^[16]和王福玲^[17]的方法测定筛选菌株的漆酶酶活。取粗酶液 0.1 mL, 加至 1.7 mL pH 5.0 的 0.1 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液中, 混匀, 再加入 0.5 mmol/L ABTS 底物溶液 0.2 mL, 混匀, 在 25 °C 反应 6 min, 加入 0.4 mol/L 的三氯乙酸溶液 0.5 mL 终止反应; 以蒸馏水代替粗酶液为对照, 在波长 420 nm 处测定吸光度。在 25 °C、pH 5.0 条件下, 以每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

3) 纤维素酶酶活测定

参照技术规范 NY/T 912—2020 采用 DNS 定糖法测定纤维素酶酶活^[11], 取 pH 5.5 的 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, 加入羧甲基纤维素钠(CMC-N)充分溶解, 配制成浓度为 15.0 g/L 的 CMC-Na 溶液作为底物溶液。取粗酶液 2 mL, 加入 2 mL 底物溶液, 在 37 °C 保温反应 30 min, 加入 5 mL DNS 溶液终止反应, 沸水浴 5 min, 冷却至室温, 加水定容至 25 mL。缓冲液 2 mL, 加入 2 mL 底物溶液和 5.0 mL DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 定容至 25.0 mL, 作为标准空白样, 测定波长 540 nm 处的吸光度。在 37 °C、pH 5.5 条件下, 每分钟水解羧甲基纤维素钠释放出相当于 1.0 μmol 葡萄糖含量时所需的酶量为 1 个

酶活力单位(U)。

4) 菌株生长特性测定

取复选的真菌菌株接种 PDA 平板, 置 28 °C 培养箱培养 7 d, 然后用直径 9 mm 的无菌打孔器在菌落边缘制取菌饼。取菌饼接种 PDA 平板中央, 每个平板接种一块菌饼, 每个菌株做 3 个平行, 接种平板置 28 °C 培养箱培养, 每天观察记录菌丝生长情况。培养至第 5 天, 按十字交叉法用游标卡尺分别测量菌株的菌落直径, 按公式计算菌丝生长速率(mm/d)和总生长量(mm)^[18]。

1.2.4 目的菌株鉴定

1) 形态学观察

取目的菌株接种 PDA 培养基, 置 28 °C 培养箱培养 5 d, 观察记录菌落形态、颜色及透明度等生物学特征。用透明胶带黏取真菌菌落, 然后从一侧轻轻黏贴在滴有美蓝染色液的载玻片上, 排出空气, 避免产生气泡, 在光学显微镜下观察真菌菌丝大小、形态、表面特征及孢子大小、形状及类型等。

2) 分子生物学鉴定

采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取分离真菌菌株的基因组 DNA, 具体步骤参照说明书操作。采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)全序列^[19]。预扩增片段长度为 500-750 bp。PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA (5 μg/mL) 0.5 μL, 10×PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL, sterilized ddH₂O 19.8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物

由生工生物工程(上海)股份有限公司纯化后测序。将测序结果提交到 NCBI 数据库, 利用 BLAST 进行同源性比较, 采用 MEGA 11.0 中的 MUSCLE 多序列比对算法, 以近邻结合法(neighbour-joining method)构建系统发育树, 检验方法为 bootstrap 法, 检验次数为 500 次, 选择 Kimura-2 替换模型, 构建目标菌株的系统发育树, 最终确定目标菌株的分类。

1.2.5 菌株产酶规律测定

取目的菌株分别接种产漆酶液体发酵培养基和产纤维素酶液体发酵培养基各 3 瓶, 250 mL 三角瓶中装液量为 50 mL, 每个三角瓶接种一块菌饼, 于 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 30 d, 从第 2 天开始隔天采取样品一次。样品于 6 000 r/min 离心 15 min, 取上清液置 4 °C 冰箱保存, 待测酶活; 收集菌丝体, 蒸馏水清洗过滤 3 遍, 60 °C 烘干至恒重, 称重, 计算生物量^[20]。

1.2.6 酶活稳定性测定

1) 热稳定性测定

取粗酶液样品分别置 20、30、40、50、60、70、80 °C 环境作用 1 h, 以未进行处理的粗酶液作为对照, 每组设 3 个平行, 测定漆酶和纤维素酶的酶活性, 计算相对酶活力。相对酶活力为存余酶活力与对照酶活力的百分比^[21-22]。

2) 酸碱稳定性测定

用 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液分别配制含 1.0% 粗酶溶液, 室温作用 1 h 后, 以用蒸馏水配制的 1.0% 粗酶溶液作为对照, 每组设 3 个平行, 测定漆酶和纤维素酶的酶活性, 计算相对酶活力。相对酶活力为存余酶活力与对照酶活力的百分比^[21-22]。

1.3 数据统计

试验数据采用 Excel 2007 处理并作图, 应

用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, 试验数据用(平均值 \pm 标准差)表示。

2 结果与分析

2.1 真菌菌株分离结果

从采集的试验材料中共计分离真菌 18 株, 其中采用组织分离法分离到食用菌 8 株, 分别命名为菌株 M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7 和 M8; 采用菌丝顶端纯化法分离到真菌 10 株, 分别命名为菌株 F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8、F9 和 F10。

2.2 产漆酶真菌初选结果

采用 PDA-愈创木酚平板显色法对分离的 18 株真菌进行木质素降解菌初步筛选, 结果表明, 在培养至第 5 天时, 有 7 株真菌在 PDA-愈创木酚平板上产生红棕色显色圈, 说明这 7 株真菌能够产生漆酶, 其余 11 株真菌未产生显色圈。在 7 株产漆酶真菌中, 菌株 M4 的 R/r 值最小, 为 0.64 ± 0.01 ; 次之为菌株 M5, R/r 值为 0.68 ± 0.01 ; 其次分别为菌株 M1、M2、F2、M3、F3, 试验说明菌株 M4 的产漆酶能力最强, 结果见表 1、图 1。

2.3 产纤维素酶真菌初选结果

采用 PDA-CMC 平板脱色法对分离的 18 株真菌进行产纤维素降解菌初步筛选, 结果有 8 株真菌在 PDA-CMC 平板产生透明水解圈, 说明这 8 株真菌能够产生纤维素酶, 其余 10 株真菌未产生透明水解圈。在产生透明水解圈的真菌中, 菌株 M3 的 R/r 值最小, 为 0.71 ± 0.02 ; 次之为菌株 M5, R/r 值为 0.78 ± 0.01 ; 其次分别为菌株 M4、M1、M6、F2、M2、F1, 试验表明菌株 M3 产纤维素酶能力最强, 结果见表 2、图 2。

表 1 产漆酶真菌初选结果

Table 1 Preliminary screening results of laccase producing fungi

菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter (R , mm)	显色圈直径 Coloration circle diameter (r , mm)	菌落直径与显色圈直径的比值 Ratio of colony diameter to coloration circle diameter (R/r)
M1	$37.30 \pm 0.57A$	$47.61 \pm 0.44A$	$0.78 \pm 0.02C$
M2	$20.99 \pm 0.31C$	$26.51 \pm 0.19B$	$0.79 \pm 0.01C$
M3	$21.25 \pm 0.17C$	$21.25 \pm 0.17D$	$1.00 \pm 0.00B$
M4	$17.24 \pm 0.43D$	$27.05 \pm 0.32B$	$0.64 \pm 0.01Db$
M5	$15.22 \pm 0.17E$	$22.39 \pm 0.15Ca$	$0.68 \pm 0.01Da$
F2	$20.72 \pm 0.53C$	$21.59 \pm 0.24CDb$	$0.96 \pm 0.02B$
F3	$26.28 \pm 0.14B$	$19.43 \pm 0.77E$	$1.35 \pm 0.05A$

同列数据不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$). 下同

In the same column, values with different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letters mean extremely significant difference ($P < 0.01$). The same below.

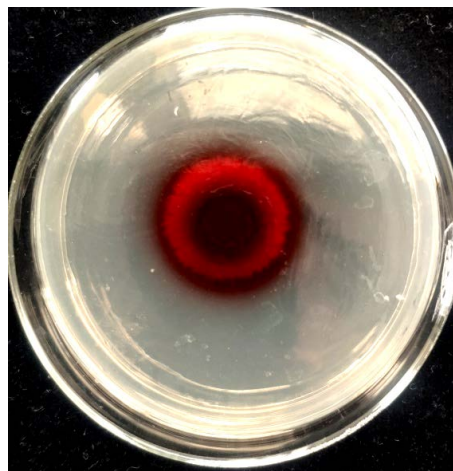


图 1 菌株 M1 在 PDA-愈创木酚培养基上的显色圈
Figure 1 Coloration circle formed of strain M1 on PDA-guaiacol medium.

2.4 真菌生长特性

菌株生长情况测定结果表明, 在 5 d 的培养期间, 菌株的菌丝生长速度与菌丝生长量呈正相关, 其中, 菌株 M1 的生长速率最快, 生

表 2 产纤维素酶真菌初选结果

Table 2 Preliminary screening results of cellulase producing fungi

菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter (R, mm)	透明水解圈 直径 Hydrolytic circle diameter (r, mm)	菌落圈与透明水解 圈直径的比值 Ratio of colony diameter to hydrolytic circle diameter (R/r)
M1	34.96±0.13B	40.96±0.44B	0.85±0.01Ca
M2	20.78±0.41Ca	22.70±0.30D	0.92±0.01B
M3	19.42±0.36Db	27.46±0.19C	0.71±0.02F
M4	11.12±0.35G	13.68±0.21G	0.81±0.04CEb
M5	13.48±0.35F	17.39±0.28F	0.78±0.01DEb
M6	16.41±0.43E	19.22±0.15E	0.85±0.02Ca
F1	41.33±0.59A	42.31±0.53A	0.98±0.00A
F2	20.30±0.60CDa	22.49±0.49D	0.90±0.01B

长量最大, 分别为(9.43±0.32) mm/d 和(47.14±1.59) mm; 其次是菌株 F1, 生长速率与生长量分别为(8.47±0.21) mm/d 和(42.39±1.03) mm; 菌株 M5 生长最慢, 其生长速率与生长量分别为(3.52±0.04) mm/d 和(17.62±0.20) mm, 结果见表 3。

2.5 菌株产酶活性复选结果

产酶能力测定结果表明, 在产漆酶真菌中, 菌株 M1 产漆酶量最大, 为(241.17±1.97) U/mL; 其

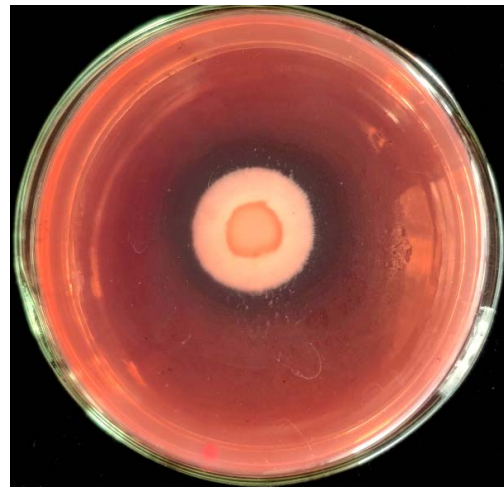


图 2 菌株 M1 在 PDA-CMC 培养基上的透明水解圈

Figure 2 Hydrolytic circle formed of strain M1 on PDA-carboxymethylcellulose sodium medium.

次是菌株 M4, 产漆酶量为(194.38±0.69) U/mL; 菌株 M6 产漆酶量最小, 为(0.89±0.04) U/mL。在产纤维素酶真菌中, 菌株 M3 产纤维素酶量最大, 为(39.49±1.05) U/mL; 其次是菌株 M1, 产纤维素酶量为(35.17±0.79) U/mL; 菌株 F3 产纤维素酶量最小, 为(0.23±0.03) U/mL, 结果见表 4。综合分析各菌株的产酶能力及生长特性, 确定真菌 M1 株为产酶优选菌株。

表 3 筛选菌株在 PDA 平板上的生长情况

Table 3 The growth of the selected fungi on PDA plate

菌株 Strain	菌丝生长量 Mycelium growth mass (mm)	菌丝生长速率 Mycelium growth rate (mm/d)	菌丝密度 Mycelium density	菌丝均匀度 Mycelium uniformity
M1	47.14±1.59A	9.43±0.32A	Dense	Uniform
M2	31.23±0.75C	6.25±0.15C	Relatively dense	Uniform
M3	21.98±0.25EFa	4.40±0.05Ea	Relatively sparse	Uniform
M4	22.76±0.46Ea	4.55±0.09Ea	Relatively sparse	Uniform
M5	17.62±0.20H	3.52±0.04F	Sparse	Relatively uniform
M6	20.09±0.87FGb	4.02±0.17Eb	Sparse	Uniform
F1	42.39±1.03B	8.48±0.21B	Dense	Relatively uniform
F2	21.56±0.71EGa	4.31±0.14Ea	Relatively sparse	Uniform
F3	27.87±0.94D	5.57±0.19D	Relatively dense	Uniform

表 4 真菌菌株液体培养产酶活性测定

Table 4 The results of enzyme activities of different fungi in liquid culture

菌株 Strain	漆酶酶活 Laccase enzyme activity (U/mL)	纤维素酶酶活 Cellulase enzyme activity (U/mL)
M1	241.17±1.97A	35.17±0.79B
M2	155.78±1.37D	10.84±0.35F
M3	87.06±1.16E	39.49±1.05A
M4	194.38±0.69B	15.86±0.49E
M5	167.26±0.86C	19.09±0.62C
M6	0.89±0.04H	17.56±0.50D
F1	1.60±0.08H	7.56±0.26G
F2	48.61±0.74F	11.17±0.22F
F3	25.61±0.39G	0.23±0.03H

2.6 菌株 M1 形态及菌落特征

在培养至第 7 天, 菌株 M1 菌落正面呈白色, 圆形, 菌丝密集, 绒毛状(图 3A); 延长培养时间菌落变为致密毡状, 部分菌丝逐渐变为橙色, 并产生橙色小液滴(图 3B); 基质为白色(图 3C); 显微镜观察发现菌丝较细长, 有分枝, 无孢子, 菌丝可观察到隔膜和锁状联合(图 3D)。

2.7 菌株 M1 分子学鉴定结果

菌株 M1 在国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC)登录号为 NMDCN00011VH, 分子生物学鉴定结果表明, 菌株 M1 与糙皮侧耳菌株(登录号为

KY951482.1)的 ITS 序列相似性达到 100%, 确定菌株 M1 为糙皮侧耳菌(*Pleurotus ostreatus*), 菌株 M1 的系统发育树构建结果见图 4。

2.8 目的菌株产酶规律

在菌株 M1 液态发酵过程中, 从发酵第 12 天开始产漆酶量迅速增大, 至发酵第 18 天达到较高值, 并持续至发酵第 30 天, 其中, 在发酵第 22 天达到高峰, 峰值为(243.59±1.11) U/mL; 从发酵第 6 天开始产纤维素酶量快速增大, 至发酵第 16 天达到较高值, 并持续至发酵第 30 天, 其中, 在发酵第 24 天达到高峰, 峰值为(36.03±0.63) U/mL。在发酵的第 8 天, 菌丝体生物量开始增加, 随后急剧增加, 至发酵第 18 天, 增速变缓, 在发酵第 20 天, 菌丝体生物量达到最大, 随后开始下降, 可能是菌丝体老化自溶(图 5)。

发酵结果表明菌株 M1 的产酶量和菌丝体生长快慢具有较强的关联性, 菌丝体生长越快, 漆酶和纤维素酶的产量相对也就越大。

2.9 酶活稳定性

2.9.1 酶的热稳定性

实验结果表明, 糙皮侧耳粗酶液中漆酶在低于 50 °C 环境中相对稳定性较高; 在温度高于 55 °C 环境中稳定性下降, 相对酶活降至 92.77%; 在高于 60 °C 环境中漆酶明显失活, 漆

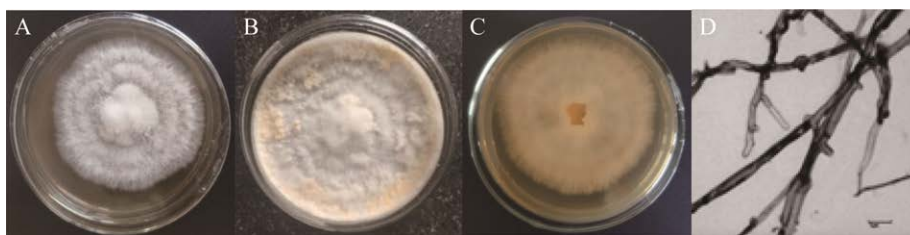


图 3 菌株 M1 菌落和菌丝形态 A: 培养 7 d 菌落形态. B: 培养 15 d 菌落形态. C: 菌落背面. D: 菌丝形态

Figure 3 Colony and mycelium morphology of strain M1. A: Colony morphology after culture 7 days. B: Colony morphology after culture 15 days. C: Back of colony. D: Mycelium.

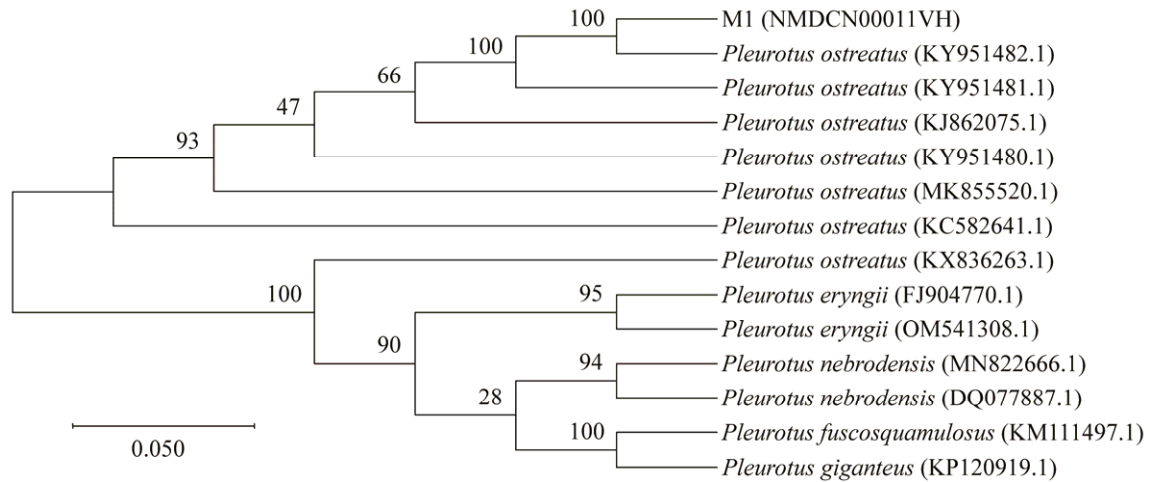


图 4 基于 ITS 序列构建的菌株 M1 系统发育树 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中;分支处的数字表示自展值;标尺所示长度为 0.050 核苷酸置换率

Figure 4 Phylogenetic tree of strain M1 constructed based on ITS sequence. GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets; The bootstrap values are shown at the node; Bar 0.050 means the nucleotide substitution rate of 0.050.

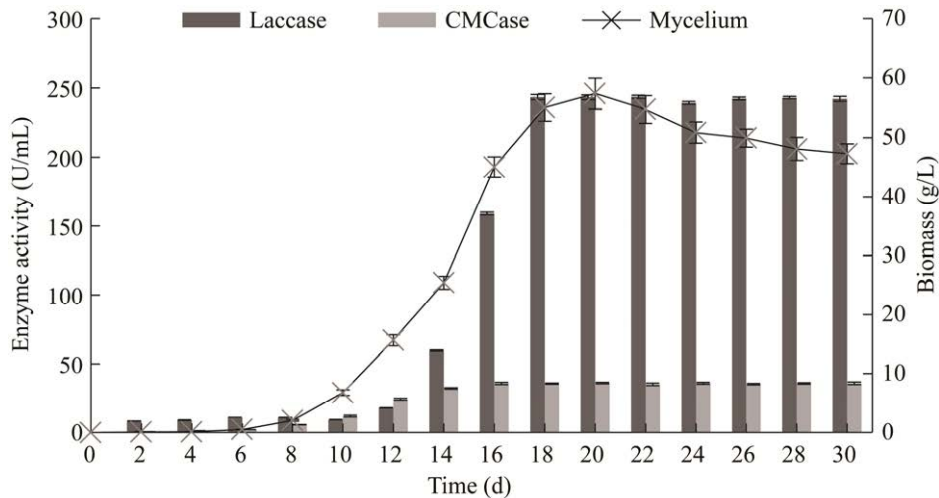


图 5 菌株 M1 液态发酵过程中酶活及生物量变化规律

Figure 5 Changes of enzyme activities and biomass during liquid fermentation of strain M1.

酶在低于 55 °C 环境相对稳定性较高。粗酶液中的纤维素酶在低于 55 °C 环境中相对稳定性较高;在温度高于 60 °C 环境中稳定性下降,相对酶活降至 91.05%;在高于 65 °C 环境中漆酶失活明显;在温度升至 75 °C 时其酶活仍为 67.99%;纤维素酶在低于 60 °C 环境相对稳定性

较高(图 6)。

2.9.2 酶的 pH 稳定性

实验结果表明,糙皮侧耳粗酶液中漆酶在 pH 5.0–6.5 范围的介质中能够保持较好的酶活性,相对酶活为 90.99% 以上,其中在 pH 5.5 的介质中最为稳定,相对酶活为 99.12%;粗酶液

中的纤维素酶在 pH 5.5–6.5 范围的介质中能够保持较好的酶活性, 相对酶活为 90.14% 以上, 其中在 pH 6.0 的介质中最为稳定, 相对酶活为 99.82% (图 7)。

3 讨论与结论

本研究采用 PDA-愈创木酚平板显色法、刚果红染色法分别定性测定了分离真菌产漆酶、纤维素酶的活性, 结果表明, 产酶菌株产生的显色圈和透明水解圈均较为清晰, R/r 值定性结果与产酶定量测定结果基本相符, 两种方法对于定性评价菌株的产酶活性简便易行。在应用

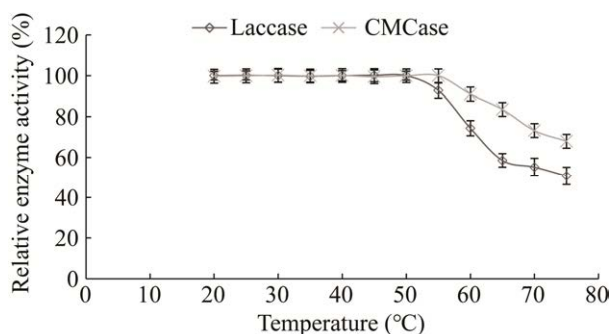


图 6 不同温度对菌株 M1 粗酶液中漆酶和纤维素酶酶活稳定性的影响

Figure 6 Effects of different temperature on laccase and cellulase stability of strain M1.

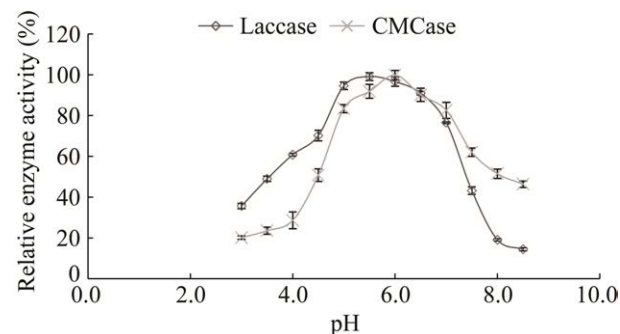


图 7 不同 pH 对菌株 M1 粗酶液中漆酶和纤维素酶酶活稳定性的影响

Figure 7 Effects of different pH on laccase and cellulase stability of strain M1.

PDA-愈创木酚平板显色法测定菌株产酶特性时, 依据 PDA-愈创木酚琼脂平板菌落圈直径与显色圈直径比值可评价菌株降解木质素的能力, 比值 <1 的菌株能优先降解木质素, 比值 >1 的菌株能优先降解纤维素^[23]。据此判定, 在本研究筛选的菌株中, 菌株 M3 和菌株 F3 的比值均 >1 , 为优先降解纤维素菌, M1 等其他菌株的比值均 <1 , 为优先降解木质素菌。

木质素降解酶包括锰依赖过氧化物酶、木质素过氧化物酶和漆酶。要实现植物纤维的有效降解, 首先要利用木质素酶降解木质素, 然后才能暴露其包裹的纤维素, 裸露的纤维素在纤维素酶的作用下得以降解, 因此, 木质素酶在植物秸秆的降解中发挥着关键作用^[8]。许多学者开展了产木质素酶微生物的分离与筛选研究, 并从土壤等样品中分离出真菌、细菌等多种产酶微生物。李红亚等分离获得一株降解木质素的解淀粉芽孢杆菌, 该菌株能够产生木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、纤维素酶和半纤维素酶等, 在发酵 10–16 d 陆续达到酶活峰值, 最高酶活力分别为 55.0、16.7、45.4 和 60.5 U/g^[24]。李灵灵等从森林地表土壤中分离筛选出一株产漆酶的真菌变色栓菌, 在优化产酶条件下培养至第 6 天, 产漆酶活性达到峰值, 产酶量达到 120.0 U/L^[25]。韩月颖等从土壤样品筛选到一株产木质素酶的嗜麦芽窄食单胞菌, 用于产酶活性测定结果表明, 产漆酶酶活为 9.37 U/mL^[26]。王强测定了 7 个侧耳属菌株的漆酶酶活, 糙皮侧耳的漆酶酶活最高, 为 189.11 U/mL^[27]。本研究从野生食用菌中分离筛选出产酶活性良好的糙皮侧耳菌 M1, 经测定该菌粗酶液中漆酶活性高达 (241.17 ± 1.97) U/mL, 明显高于已报道分离菌株, 究其原因, 除了菌株自身产酶特性外, 也与菌属特性有关。

在降解植物纤维的相关研究中, 筛选产纤

纤维素酶微生物的研究较多,其中分离的产纤维素酶微生物多为产纤维素酶的细菌,而产纤维素酶真菌分离较少。李明华等从富含腐叶的土壤中筛选出一株康氏木霉(*Trichoderma koningii*),培养 72 h 时纤维素酶酶活最高,达到 (19.18 ± 0.68) U/mL^[28]。张冬雪等从稻田土壤中筛选到一株草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) WAF6,培养 5 d 时纤维素酶酶活最高,达到 29.35 U/mL^[29]。孟建宇等从大兴安岭森林土壤中分离出 2 株纤维素降解真菌,在适宜培养条件下,草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)与树粉孢属(*Oidiodendron tenuissimum*)菌株的产 CMC 酶活性最高,分别达 103.89 U/mL 和 158.36 U/mL^[30]。张梦君等从西藏高海拔的植物根际土壤中分离筛选到一株高效产纤维素酶的低温真菌为青霉菌属(*Penicillium*),在低温 15 °C 和产纤维素酶的最佳培养条件下,其纤维素酶活力可达 72.07 U/mL^[31]。本研究分离筛选的糙皮侧耳菌 M1 粗酶液中纤维素酶活性为 (35.17 ± 0.79) U/mL,其纤维素酶活性高于已报道的糙皮侧耳菌。

综上所述,本研究分离筛选到的菌株 M1 经鉴定为糙皮侧耳,具有较强的降解木质素和纤维素能力,为植物秸秆生物降解提供了有效的菌种资源。

REFERENCES

- [1] 牛东泽. 白腐菌发酵对小麦秸秆营养价值及微生物多样性的影响[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018.
- NIU DZ. Effects of incubation with white rot fungi on the nutritional value and microbial diversity of wheat straw[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [2] 赖姗姗, 陈玉青, 刘媛媛, 杨成凤, 刘斌, 赵超. 平菇不同状态下营养成分分析比较与品质评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1619-1622.
- LAI SS, CHEN YQ, LIU YY, YANG CF, LIU B, ZHAO C. Analysis comparison and quality evaluation of nutritional components of *Pleurotus ostreatus* under different conditions[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(7): 1619-1622 (in Chinese).
- [3] 范寰, 梁军峰, 赵润, 张金凤, 张洪生. 白腐真菌在木质素微生物降解中的作用[J]. 天津农业科学, 2009, 15(5): 19-22.
- FAN H, LIANG JF, ZHAO R, ZHANG JF, ZHANG HS. Role of white rot fungi in microbial degradation of lignin[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2009, 15(5): 19-22 (in Chinese).
- [4] 宋安东, 梁振普, 周利霞, 陈刚, 裴红波, 汤建华. 平菇产木质素降解酶类研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(2): 28-32, 35.
- SONG AD, LIANG ZP, ZHOU LX, CHEN G, PEI HB, TANG JH. Study on the lignocellulolytic enzymes produced by *Pleurotus ostreatus*[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2005, 26(2): 28-32, 35 (in Chinese).
- [5] 朱子健, 高璠, 陈三凤. 蘑菇渣中纤维素分解菌的酶活力研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(9): 43-45, 292.
- ZHU ZJ, GAO F, CHEN SF. Study on cellulase activities of cellulose-degrading bacteria from mushroom residue[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(9): 43-45, 292 (in Chinese).
- [6] CHEN XL, YU J, ZHANG ZB, LU CH. Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(1): 245-250.
- [7] TEN HR, TEUNISSEN PJ. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi[J]. Chemical Reviews, 2001, 101(11): 3397-3413.
- [8] CHANG AJ, FAN JY, WEN XH. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 72: 26-30.
- [9] 杭怡琼, 薛惠琴, 郁怀丹, 陈谊. 白腐真菌对稻草秸秆的降解及其有关酶活性的变化[J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 403-407.
- HANG YQ, XUE HQ, YU HD, CHEN Y. Rice straw degradation by white rot fungi and variance of activities of related enzymes[J]. Mycosystema, 2001, 20(3): 403-407 (in Chinese).
- [10] 黄茜, 黄凤洪, 江木兰, 万楚筠, 刘睿. 木质素降解菌的筛选及混合菌发酵降解秸秆的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 66-70.
- HUANG Q, HUANG FH, JIANG ML, WAN CY, LIU R. The selection of lignin-degrading fungus and the straw fermentation by mixed strains[J]. China Biotechnology, 2008, 28(2): 66-70 (in Chinese).

- [11] 中华人民共和国农业农村部. 饲料添加剂 纤维素酶活力的测定 分光光度法: NY/T 912—2020[S]. 北京: 中国农业出版社, 2021-04-01.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Determination of cellulase activity in feed additives-Spectrophotometry: NY/T 912—2020[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2021-04-01 (in Chinese).
- [12] 孙思琦, 瓮岳太, 邸雪颖, 刘雪峰, 杨光. 木质素降解真菌的筛选及其对森林地表可燃物的降解效果[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(1): 29-36.
SUN SQ, WENG YT, DI XY, LIU XF, YANG G. Screening of lignin-degrading fungi and their degradation effect of forest surface fuel[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(1): 29-36 (in Chinese).
- [13] 张芳芳, 张桐, 戴丹, 张振豪, 张波, 李玉. 高效木质素降解菌的筛选及其对玉米秸秆的降解效果[J]. 菌物学报, 2021, 40(7): 1869-1880.
ZHANG FF, ZHANG T, DAI D, ZHANG ZH, ZHANG B, LI Y. Screening of efficient lignin-degrading fungal strains and their degradation on cornstalk[J]. Mycosystema, 2021, 40(7): 1869-1880 (in Chinese).
- [14] 魏姣, 万学瑞, 吴润, 畅通, 马亚茹, 刘磊, 张小丽, 张天亮, 杨润霞, 贾晓蕊. 产纤维素酶真菌菌株的分离筛选及产酶条件优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(2): 8-15.
WEI J, WAN XR, WU R, CHANG T, MA YR, LIU L, ZHANG XL, ZHANG TL, YANG RX, JIA XR. Isolation and screening of fungi strains producing cellulase and optimization of conditions for enzyme production[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2016, 51(2): 8-15 (in Chinese).
- [15] 徐安民, 李力, 马森. 白腐菌木质素降解酶高产菌株的筛选[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2020, 41(2): 78-82, 89.
XU AM, LI L, MA S. Screening of lignin degrading enzyme high-producing strain from white rot fungi[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2020, 41(2): 78-82, 89 (in Chinese).
- [16] 赵翠敏, 杜芳, 邹亚杰, 胡清秀, 郑素月. 基于不同基质刺芹侧耳菌丝生长与木质素降解酶的相关性研究[J]. 中国食用菌, 2020, 39(11): 109-114.
ZHAO CM, DU F, ZOU YJ, HU QX, ZHENG SY. Study on the relationship between mycelial growth and lignin degrading enzymes of *Pleurotus eryngii* based on different substrates[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(11): 109-114 (in Chinese).
- [17] 王福玲. 木质素降解菌株的筛选及其与离子液体预处理生物质的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2018.
WANG FL. The study of screening of lignin degrading strains and pretreatment of biomass by the degrading strain and ionic liquids[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [18] 沈盟, 袁晔, 宋小亚, 王保君, 郑巧平, 王瑞森, 张敏, 姚祥坦. 6 种林果树木屑的营养成分分析及其对食用菌生长的影响[J]. 上海农业学报, 2021, 37(4): 74-80.
SHEN M, YUAN Y, SONG XY, WANG BJ, ZHENG QP, WANG RS, ZHANG M, YAO XT. Analysis of nutrient composition of 6 kinds of forest and fruit trees sawdust and its effect on the growth of edible fungi[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2021, 37(4): 74-80 (in Chinese).
- [19] SCHOCH CL, SEIFERT KA, HUHDORF S, ROBERT V, SPOUGE JL, LEVESQUE CA, CHEN W, CONSORTIUM FB, LIST FBCA. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [20] 张宗启, 吴天祥, 刘力萍. 天麻中香草醇对灰树花菌丝体生物量和胞外多糖合成的影响[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(6): 62-68.
ZHANG ZQ, WU TX, LIU LP. Effects of vanillyl alcohol of rhizoma gastrodiae on mycelial biomass and synthesis of exopolysaccharide by *Grifola frondosa*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(6): 62-68 (in Chinese).
- [21] 甄静, 王继雯, 谢宝恩, 李冠杰, 刘莹莹, 周伏忠, 陈国参. 一株纤维素降解真菌的筛选、鉴定及酶学性质分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 709-714.
ZHEN J, WANG JW, XIE BE, LI GJ, LIU YY, ZHOU FZ, CHEN GC. Isolation, identification of a cellulase-producing strain and characterization of its cellulase-producing capability[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 709-714 (in Chinese).
- [22] 田嘉慧, 封佳丽, 卢俊桦, 毛林静, 胡著然, 王莹, 楚杰. 一色齿毛菌漆酶 LacT-1 的分离纯化与性质研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 186-194.
TIAN JH, FENG JL, LU JH, MAO LJ, HU ZR, WANG Y, CHU J. Isolation, purification and characterization of laccase LacT-1 from *Cerrena unicolor*[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(8): 186-194 (in Chinese).

- [23] ERIKSSON KEL, BLANCHETTE RA, ANDER P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990.
- [24] 李红亚, 李术娜, 王树香, 王全, 薛茵茵, 朱宝成. 解淀粉芽孢杆菌 MN-8 对玉米秸秆木质纤维素的降解[J]. 应用生态学报, 2015, 26(5): 1404-1410.
LI HY, LI SN, WANG SX, WANG Q, XUE YY, ZHU BC. Degradation of lignocellulose in the corn straw by *Bacillus amyloliquefaciens* MN-8[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(5): 1404-1410 (in Chinese).
- [25] 李灵灵, 王敬红, 赵铎, 刘嘉乐, 申贵男, 袁媛, 高亚梅, 晏磊, 魏丹, 王伟东. 木质素降解菌 BYL-7 的筛选及降解条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4059-4071.
LI LL, WANG JH, ZHAO D, LIU JL, SHEN GN, YUAN Y, GAO YM, YAN L, WEI D, WANG WD. Screening of lignin degrading strain BYL-7 and optimization of degradation conditions[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4059-4071 (in Chinese).
- [26] 韩月颖, 张喜庆, 曲云鹏, 高云航. 一株低温木质素降解菌的筛选、产酶优化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3700-3713.
HAN YY, ZHANG XQ, QU YP, GAO YH. Screening, enzyme-production optimization and enzymatic properties of a low-temperature lignin-degrading bacteria[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3700-3713 (in Chinese).
- [27] 王强. 降解木质纤维素的侧耳属菌株的筛选及酶学特性研究[D]. 邯郸: 河北工程大学硕士学位论文, 2019.
WANG Q. Screening and enzymatic characterization of *Pleurotus* strains degrading lignocellulose[D]. Handan: Master's Thesis of Hebei University of Engineering, 2019 (in Chinese).
- [28] 李明华, 孟秀梅, 王成龙. 纤维素酶高产菌筛选鉴定及酶学性质初步研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 134-138.
LI MH, MENG XM, WANG CL. Screening and identification of high-producing cellulose strain and enzymatic property[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 134-138 (in Chinese).
- [29] 张冬雪, 文亚雄, 罗志威, 郑双凤, 谭石勇. 纤维素降解菌的分离筛选及其对水稻秸秆的降解效果分析[J]. 江西农业学报, 2020, 32(1): 72-76.
ZHANG DX, WEN YX, LUO ZW, ZHENG SF, TAN SY. Isolation and screening of cellulose-degrading microbes and their degradation effects on paddy straw[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(1): 72-76 (in Chinese).
- [30] 孟建宇, 杨帆, 冀锦华, 郭慧琴, 陶羽. 大兴安岭森林土壤中纤维素降解真菌的分离及产酶条件优化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(17): 108-111, 120, 171.
MENG JY, YANG F, JI JH, GUO HQ, TAO Y. Isolation of cellulose-degrading fungi from soils in Da Hinggan forest and optimization of enzyme production conditions[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(17): 108-111, 120, 171 (in Chinese).
- [31] 张梦君, 邱晨浩, 柴立伟, 黄木柯, 赵嫣然, 黄艺. 高效降解纤维素低温真菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2494-2503.
ZHANG MJ, QIU CH, CHAI LW, HUANG MK, ZHAO YR, HUANG Y. Screening, identification and fermentation optimization of cold-adapted fungi with high efficiency of cellulose degradation[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2494-2503 (in Chinese).