

# 棉秸秆降解高温菌株的筛选及产酶分析

周亚飞<sup>1,2</sup> 詹发强<sup>2</sup> 侯新强<sup>2</sup> 赵忠润<sup>1,2</sup> 崔卫东<sup>2</sup> 龙宣杞<sup>2</sup> 王炜<sup>2\*</sup>

(1. 石河子大学生命科学院 新疆 石河子 832003)

(2. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘要:** 从新疆地区分离具有降解棉秸秆纤维素功能的菌株, 得到 4 株耐高温真菌(50 °C)。纤维素酶学性质分析表明, 该 4 株菌的纤维素酶具有良好的耐酸性(最适 pH 为 4.5)和耐高温性(最高达 60 °C)。以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、微结晶纤维素、棉花、滤纸、淀粉、果胶为底物测定酶活力, 滤纸酶活力(FPA)最高达 2.63 U/mL、淀粉酶活力最高达 6.17 U/mL、果胶酶活力最高达 5.86 U/mL。4 株真菌酶学特性分析表明, 该系列菌株在秸秆生物质利用方面有很大的应用潜力。

**关键词:** 高温, 纤维素分解菌, 酶活力, 棉花秸秆

## Isolation and characterization of four cellulose-decomposing thermophilic fungal strains from Xinjiang

ZHOU Ya-Fei<sup>1,2</sup> ZHAN Fa-Qiang<sup>2</sup> HOU Xin-Qiang<sup>2</sup> ZHAO Zhong-Run<sup>1,2</sup>  
CUI Wei-Dong<sup>2</sup> LONG Xuan-Qi<sup>2</sup> WANG Wei<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

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

**Abstract:** Four thermophilic fungal strains producing cellulase (50 °C) were isolated from the compost of cotton residue in Xinjiang, having the ability of acid-resistant (the optimal pH is 4.5) and temperature-resistant (the highest temperature is 60 °C). The enzyme activities were measured using multiple substrates, such as sodium carboxy methyl cellulose (CMC-Na), microcrystalline cellulose, cotton, filter paper, starch and pectin. The highest filter paper enzyme activity (FPA) is 2.63 U/mL, the amylase activity is 6.17 U/mL and the pectinase activity is 5.86 U/mL. It was showed that these fungal strains and their secreted enzymes have great potential on cellulolytic biomass (cotton residue) degradation and utilization.

**Keywords:** Temperature, Cellulolytic fungi, Cellulase, Cotton residue

新疆是我国最大的产棉基地, 植棉面积占全国的 1/4, 棉花产量占全国总产量的 1/3, 由于地域

优势和植棉效益日益突出, 新疆棉花种植面积不断扩大<sup>[1]</sup>。据报道, 2009 年新疆棉花的种植面积达

基金项目: 国家公益性行业(农业)专项(No. 2009-2011); 自治区高技术研究发展项目(No. 2009-2011)

\* 通讯作者: Tel: 86-991-4534829; 信箱: whangwei0718@126.com

收稿日期: 2010-07-20; 接受日期: 2010-11-25

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2 015 万亩, 棉花总产量 237.46 万 t, 棉秸秆产量 1 000 余万 t。20 世纪 90 年代以来, 新疆棉区长期实行棉花秸秆还田<sup>[2]</sup>, 未经腐熟处理的棉秸秆直接还田造成棉田土传病害加重、土壤肥力减退、棉株营养失衡等问题, 严重影响了棉花的生长发育和产量<sup>[3]</sup>。秸秆堆肥腐熟是实现秸秆减量化、无害化和资源化的有效途径之一, 但是如何快速降解秸秆, 减少秸秆养分损失, 降低处理成本, 仍是堆肥过程亟待解决的问题。

在通常的秸秆好氧堆肥过程中, 初期易分解的含氮化合物、糖类、淀粉等强烈分解, 并伴随着高温, 称为一次发酵; 中后期堆温开始回落, 在相对厌氧条件下纤维素等较难分解的化合物缓慢分解, 此为二次发酵。经过两次发酵, 堆体才趋于稳定, 进入完熟<sup>[4]</sup>。在好氧堆肥过程中堆体通风会耗费大量能源, 还可能将大量含氮、含硫化合物吹散到大气中, 不仅引起大气污染, 浪费了秸秆的养分, 同时也抑制了纤维素等难分解物质的快速分解, 延长了发酵周期。

有研究发现堆肥过程中的微生物, 在 50 °C–60 °C 的高温 and 0.02–0.5 mg/L 的微好氧条件下可强烈分解木质纤维素, 仅 8–10 d 能将水稻秸秆分解<sup>[5]</sup>, 因此在堆肥初期创造微好氧环境, 加入纤维素(耐)高温降解菌株, 促进以纤维素为主的难分解物质的降解, 可以免去典型的二次发酵, 实现一次发酵, 从而缩短堆肥时间, 减少环境污染, 提高秸秆养分的保全率。

分离筛选(耐)高温纤维素降解菌株不但有助于秸秆的快速降解, 延长堆体 60 °C 以上高温持续的时间, 还可以有效地缩短堆肥腐熟所需的时间<sup>[6]</sup>。高温可以杀灭秸秆中携带的有害病菌和杂草种子, 有利于减少秸秆还田引起的病害传播。棉秸秆高温降解菌株的分离鉴定, 在提高还田棉秸秆的再利用率、降低连作棉田病害的发生、提高土壤的肥力和生物质能源利用方面等具有潜在应用价值, 为新疆棉花秸秆的资源化开发提供多种新途径。因此高温降解棉秸秆菌株的筛选和研究有着非常重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

菌株从乌鲁木齐市周边棉花秸秆自然降解堆分离得到。

### 1.2 培养基

**1.2.1 初筛培养基:** 刚果红纤维素培养基<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 复筛培养基:** PDA 培养基。种子培养基: 液体 PDA 培养基。液体发酵培养基(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{NaCl}$  0.1,  $\text{NaNO}_3$  2.5,  $\text{FeCl}_3$  0.01,  $\text{MgSO}_4$  0.3,  $\text{CaCl}_2$  0.1, 棉秸秆 30, pH 7.2。棉秸秆剪成 2 cm–3 cm 小段, 烘干后粉碎至 60 目, 加入体积分数为 2% 的  $\text{NaOH}$  溶液至固液质量比为 1:5, 在 85 °C 水浴中处理 1 h, 水洗至中性, 烘干后使用。

### 1.3 试验试剂

pH 5.0 柠檬酸缓冲液; 羧甲基纤维素钠(天津福晨)溶液; 3,5-二硝基水杨酸显色液; 0.1% 标准葡萄糖溶液; 0.1 mol/L (pH 4.5) 醋酸-醋酸钠缓冲液<sup>[8]</sup>; 1.0% 微晶纤维素(Avicel, Sigma 0904 上海斯高勒生物科技有限公司)溶液<sup>[9]</sup>; 可溶性淀粉: 天津福晨; 1.0% (W/V) 果胶(PB0685-25G, 上海生工)溶液: 取醋酸钠缓冲液(pH 4.5) 100 mL, 称 1 g 果胶均匀分散于溶液中, 加热, 搅拌至溶解。

### 1.4 分离培养

**1.4.1 初筛分离培养:** 将采集的样品混合均匀, 按四分法取 10 g 样放入装有 90 mL 无菌水并放有小玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 在摇床上振荡 20 min, 使微生物细胞分散, 静置 20–30 s 即成  $10^{-1}$  稀释液。然后连续稀释制成  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  浓度的稀释菌液备用。取 0.2 mL 各浓度的稀释液, 用平板涂布法在 PDA 培养基上(3 个重复)涂板, 置于 50 °C 恒温培养箱中培养, 挑取平板上长出的单菌落作纯培养。将单菌落点种于刚果红纤维素培养基(3 个重复)上, 50 °C 培养 3 d, 检测时用 1 g/L 刚果红染色 1 h, 然后用 1 mol/L  $\text{HCl}$  洗脱 1 h。根据透明圈大小进行复筛。酶的相对活性  $A = \text{溶解圈直径} / \text{天数}$ 。

**1.4.2 复筛分离培养:** 将初筛获得的单菌落接种 PDA 培养基, 在 4 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 和 65 °C 下进行耐热性试验, 重复 3 次。将复筛得到的 4 株菌( $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ )接种种子培养基,

50 °C、150 r/min 摇瓶培养 3 d。按 10%接种量接种液体发酵培养基, 设单株培养, 混合培养(MS)和不接种对照, 共 6 组。50 °C、150 r/min 培养 6 d, 摇瓶为 500 mL 三角瓶, 装液量为 100 mL。

### 1.5 纤维素酶特性分析

**1.5.1 pH 对内切纤维酶( $C_x$ )活力的影响<sup>[9]</sup>:** 取 0.5 mL 粗酶液, 以 2 mL 1.0% (W/V)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液为底物, 加入 2 mL 缓冲液(pH 3.0–11.0), 50 °C 保温 2 h 后, 加入 2.5 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 10 min, 530 nm 比色。各组灭活粗酶液作为对照组。吸取培养一定时间的滤液, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 即为粗酶液。

**1.5.2 温度对  $C_x$  活力的影响:** 取 0.5 mL 粗酶液, 以 2 mL 1.0% (W/V) CMC-Na 溶液为底物, 加入 2 mL 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 不同反应温度(30 °C–65 °C)下保温 2 h, 其余同上 DNS 法比色测定还原糖含量。

**1.5.3 晶体纤维素酶活力测定<sup>[10–11]</sup>:** 取 0.5 mL 粗酶液, 以 2 mL 1.0% (W/V)微晶纤维素(Avicel)溶液为底物, 加入 2 mL 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 各种菌最适温度下保温 2 h, 其余同上 DNS 法比色测定还原糖含量。

**1.5.4 不同底物纤维素酶系活力测定:** (1) 分解棉纤维酶活力测定<sup>[12]</sup>: 取 50 mg 脱脂棉, 加 2 mL 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 再加入酶液 1.0 mL, 滴入甲苯 1 滴, 各种菌最适温度保温 24 h, 其余同上 DNS 法比色测定还原糖含量。

(2) 滤纸酶(FPA)活力测定: 取 0.5 mL 粗酶液, 以 0.1 g 新华一号滤纸为底物, 加入 2 mL 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 各种菌最适温度下保温 2 h。其余同上 DNS 法比色测定还原糖含量。

(3) 淀粉酶活力测定: 取 0.5 mL 粗酶液, 以

2 mL 1.0% (W/V)淀粉溶液为底物, 加入 2 mL 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 各种菌最适温度下保温 2 h, 其余同上 DNS 法比色测定还原糖含量。

(4) 果胶酶活力测定: 取 0.5 mL 粗酶液, 以 2 mL 1.0% (W/V)果胶溶液为底物, 加入 2 mL 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 各种菌最适温度下保温 2 h, 其余同上 DNS 法比色测定还原糖含量。

### 1.6 棉秸秆降解量测定<sup>[5]</sup>

### 1.7 酶活力定义和计算<sup>[8]</sup>

比色读数由葡萄糖标准曲线<sup>[8]</sup>换算成葡萄糖毫克数, 在反应条件下, 每分钟水解含纤维素底物释放出 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

$$X = \frac{W \times N \times 5.56}{V \times t}$$

$X$ : 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  $\mu$ mol 数。所有酶活力测定均重复 3 次, 结果取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 初筛分离结果

采集的样品经过 50 °C 培养得到 4 株真菌, 经 18S rDNA 鉴定 2 株( $Z_1$ 、 $Z_3$ )为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* Fresen), 另 2 株( $Z_2$ 、 $Z_4$ )可能隶属于蚀丝霉属(*Myceliophthora* Cost.)(同源性 97%)。

初筛试验结果(图 1, 表 1)表明, $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$  和  $Z_4$  在羧甲基纤维素钠培养基上均可较好地生长,  $Z_2$  和  $Z_4$  具有较强的纤维素分解能力, 其中  $Z_2$  的  $A$  值最大,  $Z_3$ 、 $Z_4$  次之,  $Z_1$  较小且与  $Z_3$  的  $A$  值接近。

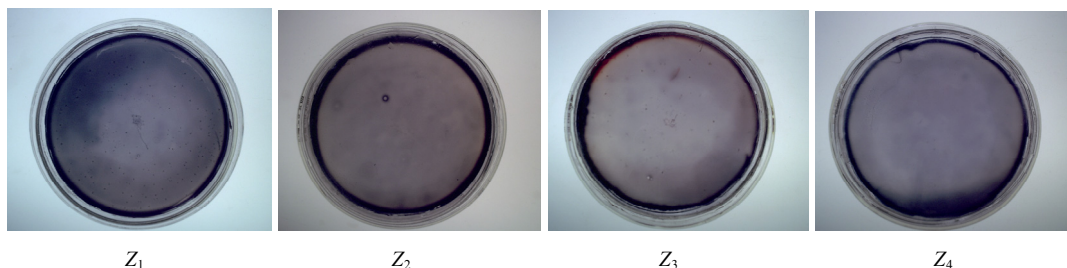


图 1 刚果红-纤维素培养基效应测定  
Fig. 1 Effects of congo red-cellulose media

表 1 刚果红纤维素平板上透明圈的大小 Table 1 The size of the transparent zone on plates containing Congo red		
菌株 Strain	透明圈直径 The diameter of the transparent zone (cm)	A 值 The A value
Z <sub>1</sub>	4.47±0.52	1.49±0.17
Z <sub>2</sub>	7.63±0.60	2.54±0.20
Z <sub>3</sub>	4.70±0.60	1.57±0.20
Z <sub>4</sub>	6.23±0.74	2.08±0.25

2.2 复筛分离结果

将 4 株菌接种在 PDA 培养基上分别于 4℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃ 和 65℃ 培养。

结果(表 2)表明 4 株菌为耐热菌, 其中 Z<sub>1</sub> 耐热能力最强, 最高可达 65℃, 有较强的温度适应能力, 在 4℃-65℃ 范围内可生长。Z<sub>3</sub> 在 4℃-50℃ 范围内可生长。接种后 4 d, 菌丝呈白色生长较快, 5 d 菌落呈墨绿色产生大量孢子, 菌落最外层菌丝白色。65℃ 条件下 Z<sub>1</sub> 仅微弱生长。Z<sub>2</sub> 和 Z<sub>4</sub> 在 28℃-50℃ 范围内可生长, 接种后 2 d 菌丝呈白色, 4 d 菌丝大量生长, 内层较厚呈浅褐色, 产生孢子, 外层菌丝白色。在堆肥过程中, 纤维素降解主要发生在高温阶段, 有纤维素分解能力的耐高温菌就可以延长秸秆降解的高温持续时间, 避免二次发酵, 使秸秆纤维更迅速、更充分地得到分解。

2.3 纤维素酶特性

2.3.1 pH 对内切酶(C<sub>x</sub>)活力的影响: 用 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠配制不同 pH 缓冲液, 比较酶活力(图

表 2 菌株耐热性试验 Table 2 Strains temperature text				
菌株 strain	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	Z <sub>4</sub>
4℃	√		√	
20℃	√		√	
30℃	√	√	√	√
40℃	√	√	√	√
50℃	√	√	√	√
60℃	√			
65℃	√			

注: √: 可以生长。  
Note: √: The strain can grow at this temperature.

2)。由图 2 可知, Z<sub>1</sub>、Z<sub>2</sub>、MS 和 Z<sub>4</sub> 在 pH 4.5 时, C<sub>x</sub> 酶活力均达到最大值。Z<sub>3</sub> 在 pH 4.5-5.23 之间, C<sub>x</sub> 酶活力相对稳定, 说明 Z<sub>3</sub> 菌株的 C<sub>x</sub> 酶对 pH 变化具有一定的耐受性。各菌株的酶活力随 pH 的增大逐渐降低, 在 pH 3.0-11.0 范围内 Z<sub>1</sub>、Z<sub>2</sub> 和 MS 仍保持较高的纤维素酶活力, 表明菌株在秸秆腐熟整个过程中可以较好地适应堆体 pH 的变化。图中 Z<sub>1</sub> 的 C<sub>x</sub> 酶活力为菌株所测值中最大, 与刚果红纤维素平板筛选的结果不同, 王淑军<sup>[13]</sup>和冯健玲<sup>[14]</sup>认为刚果红纤维素平板法与酶活力测定法相比其灵敏度不够高, 用作定量指标是不可靠的<sup>[15]</sup>。刘起丽<sup>[16]</sup>认为刚果红纤维素平板法结果受接种方式、接种量、观测时间的影响较大, 透明圈直径的大小基本上可以反映该菌株纤维素酶活的高低, 但是不能仅凭透明圈的大小来确定酶活的大小。通过对刚果红纤维素法和酶活测定法试验的重复, 分析认为除了以上两个可能因素外, 该现象与菌株有关, 有文献指出存在少数菌株 A 值大小和酶活力测定结果不一致的现象<sup>[13-14]</sup>。

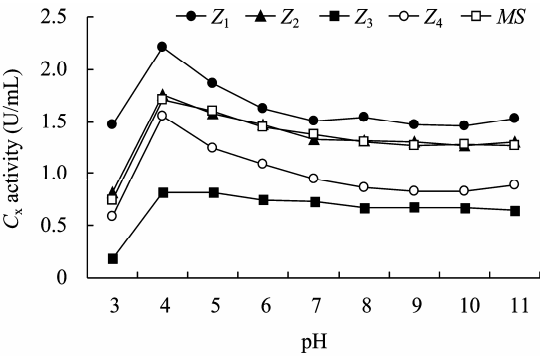


图 2 pH 对内切纤维素酶活力的影响  
Fig. 2 The effect of pH on C<sub>x</sub> activity  
注: 数据误差: Z<sub>1</sub>: ±0.17; Z<sub>2</sub>: ±0.17; Z<sub>3</sub>: ±0.13; Z<sub>4</sub>: ±0.19; MS: ±0.18.  
Note: Standard deviation: Z<sub>1</sub>: ±0.17; Z<sub>2</sub>: ±0.17; Z<sub>3</sub>: ±0.13; Z<sub>4</sub>: ±0.19; MS: ±0.18.

2.3.2 温度对 C<sub>x</sub> 活力的影响: 试验结果(图 3)显示: 在 pH 4.5 时, Z<sub>1</sub>、Z<sub>3</sub> 和 Z<sub>4</sub> 的 C<sub>x</sub> 酶在 55℃ 时均达到最大值 2.48、1.58、2.14 U/mL。在 60℃ 时该酶活力分别为最适酶反应活力的 91.42%、85.46%和 86.17%。Z<sub>2</sub> 的 C<sub>x</sub> 酶在 60℃ 时达到最大

值 2.95 U/mL。MS 的  $C_x$  酶在 50 °C 时达到最大值 2.18 U/mL, 60 °C 时该酶的活力为最适反应酶活力的 90.44%。 $C_x$  酶活力在 50 °C 时的高低顺序为:  $Z_1$ 、 $Z_2$ 、MS、 $Z_4$ 、 $Z_3$ , 与最适 pH 条件下酶活顺序一致。在各组菌的  $C_x$  酶最适 pH、温度下, 以 CMC-Na 为底物,  $C_x$  活性由高到低依次为:  $Z_2$ 、 $Z_1$ 、MS、 $Z_4$ 、 $Z_3$ 。在 30 °C–65 °C 范围内  $Z_1$  保持较高的  $C_x$  酶活力, 对高温的耐受性较其他组菌株强。

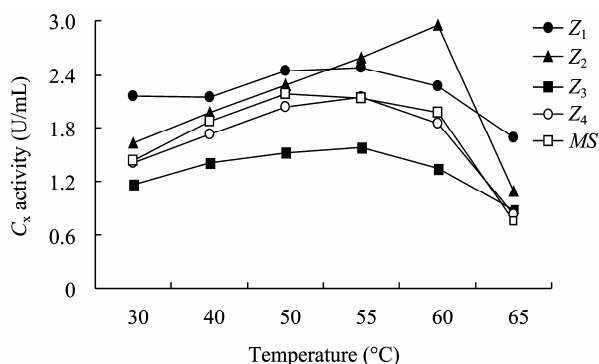


图3 温度对内切纤维素酶活力的影响

Fig. 3 The effect of temperature on  $C_x$  activity

注: 数据误差:  $Z_1$ :  $\pm 0.18$ ;  $Z_2$ :  $\pm 0.43$ ;  $Z_3$ :  $\pm 0.17$ ;  $Z_4$ :  $\pm 0.31$ ; MS:  $\pm 0.35$ .

Note: Standard deviation:  $Z_1$ :  $\pm 0.18$ ;  $Z_2$ :  $\pm 0.43$ ;  $Z_3$ :  $\pm 0.17$ ;  $Z_4$ :  $\pm 0.31$ ; MS:  $\pm 0.35$ .

**2.3.3 晶体纤维素酶活力测定:** 以 Avicel 为底物, 在各组菌最适反应条件下检测酶的活力(图 4),  $Z_2$  最适反应酶活为 2.99 U/mL,  $Z_1$  最适反应酶活为 2.52 U/mL, 其他各组菌的酶活力均在  $Z_1$  和  $Z_2$  活力范围之间。Avicel 一般反映的是纤维素酶系外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶三者的综合能力, 图 4 中  $Z_1$  酶活力最低, 认为该结果与 Avicel 非常高的结晶度有关, 虽然  $Z_1$  的  $C_x$  酶活性很高, 但是  $Z_1$  的外切酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性若没有其它菌株的外切酶( $C_1$ )和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性高, 高的结晶度又没能体现出菌株  $Z_1$  的  $C_x$  酶优势, 就会导致菌株降解纤维素转化为葡萄糖的量相对较少, 以至  $Z_1$  的 Avicel 酶活力测定值较低。但总体来讲, 菌株对 Avicel 还是具有较强的作用能力, 可以较好地降解 Avicel。

**2.3.4 不同底物纤维素酶系活力测定:** 图 5 显示分别以棉花、滤纸、淀粉、果胶为底物时测定的相应酶的活力大小。

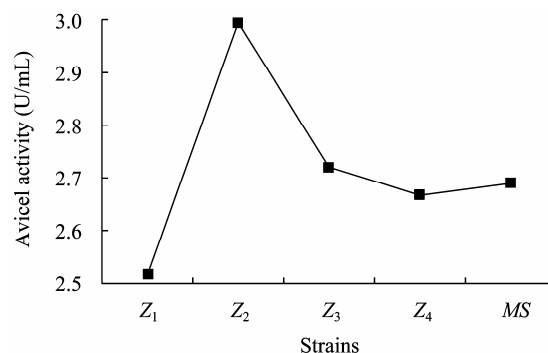


图4 最适反应条件下  $C_1$  活力

Fig. 4 The  $C_1$  activity during its best condition

注: 数据误差:  $\pm 0.11$ .

Note: Standard deviation:  $\pm 0.11$ .

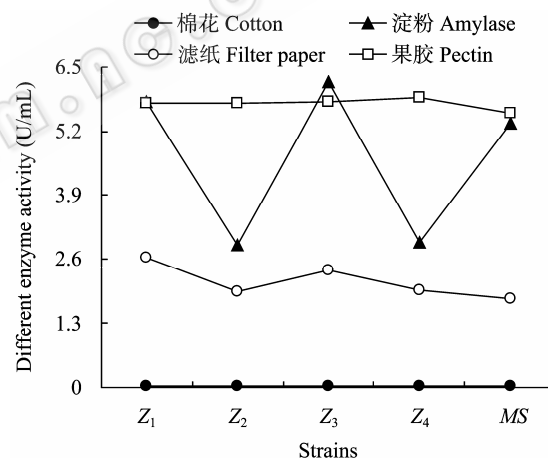


图5 不同底物酶的活力

Fig. 5 Different enzyme activity

注: 数据误差: 棉花:  $\pm 0.10$ ; 滤纸:  $\pm 0.30$ ; 淀粉:  $\pm 1.00$ ; 果胶:  $\pm 0.07$ .

Note: Standard deviation: Cotton:  $\pm 0.10$ ; Filter paper:  $\pm 0.30$ ; Amylase:  $\pm 1.00$ ; Pectin:  $\pm 0.07$ .

以棉纤维为底物时,  $Z_1$  酶活为 0.03 U/mL,  $Z_2$  为 0.03 U/mL,  $Z_3$  酶活力为 0.02 U/mL,  $Z_4$  为 0.03 U/mL, MS 为 0.03 U/mL。各组菌降解棉花的酶活与以其他纤维素为底物比较时, 酶活力较低。该结果与棉花纤维具有较高的结晶度、聚合度、小的表面积和复杂的空间结构等有关系。

在各组菌的最适反应条件下, 其对滤纸降解的

酶活力由高到低依次为:  $Z_1$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_2$ 、 $MS$ 。 $Z_1$ 的FPA酶活力最高达2.63 U/mL,  $MS$ 酶活力较低为1.81 U/mL。滤纸是聚合度和结晶度都居“中等”的纤维性材料, 以其为底物由纤维素酶水解后生成还原糖的量来表示纤维素酶系总的糖化能力, 可以较好地反映纤维素酶系的协同作用<sup>[17]</sup>。刘韞滔<sup>[18]</sup>研究表明, 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, 这与测定pH对 $C_x$ 活力影响时 $Z_1$ 较高的 $C_x$ 活力相一致。由图5可见, 各组菌对滤纸均有很强的分解作用。

对纤维素有降解能力的菌株, 对淀粉也有很好地分解能力<sup>[17]</sup>。其中 $Z_3$ 淀粉酶活为6.17 U/mL,  $Z_1$ 淀粉酶活为5.80 U/mL,  $MS$ 淀粉酶活为5.35 U/mL, 三者均具有很强的淀粉分解能力。 $Z_2$ 淀粉酶活为2.88 U/mL,  $Z_4$ 淀粉酶活为2.94 U/mL, 与 $Z_1$ 、 $Z_3$ 、 $MS$ 比较, 虽然 $Z_2$ 、 $Z_4$ 酶活值较低, 但整体而言, 这些菌对淀粉均具有很强的分解能力, 可以进一步分解由纤维素酶分解植物细胞壁而释放出的细胞内容物, 从而促进淀粉类物质的利用, 提高秸秆原料的利用率。

果胶是植物细胞壁的组成成分之一, 可以抵抗外界对植物细胞壁的伤害, 对植物细胞具有保护作用。有果胶降解能力的菌株可以更有效地分解植物体, 使植物残体分解更充分, 原料利用更完全。其中 $Z_4$ 果胶酶活为5.86 U/mL,  $Z_1$ 、 $Z_2$ 果胶酶活均为5.75 U/mL,  $Z_3$ 果胶酶活为5.80 U/mL,  $MS$ 果胶酶活为5.57 U/mL。供试菌之间的果胶酶活接近, 均表现出很强的果胶分解能力。

## 2.4 棉秸秆降解量测定

由试验结果(表3)分析可知, 4株菌对棉秸秆的降解率基本一致, 混合菌群的降解率较单株菌高。

摇床温度为50 °C, 并非各单株菌纤维素酶活力的最适温度, 在秸秆固体发酵时随着堆温的变化, 各菌株会在其适宜温度范围内发挥出最大酶活力, 秸秆的降解程度最终会更高。

表3 菌株6 d内对棉秸秆的降解率  
Table 3 The ratio of the different strains decomposing cotton straw in 6 days

项目 Item	降解量 Decomposing weight (g)	降解率 Decomposing rate (%)
对照 CK Without bacterial	0	0
$Z_1$	0.6419	42.79
$Z_2$	0.6413	42.75
$Z_3$	0.6314	42.09
$Z_4$	0.6377	42.51
$MS$	0.7392	49.28

注: 降解量误差:  $\pm 0.04$ ; 降解率误差:  $\pm 0.03$ 。

Note: Standard deviation: Decomposing weight:  $\pm 0.04$ ; Decomposing rate:  $\pm 0.03$ .

## 3 讨论

纤维素降解菌株分泌的酶系是复合酶, 由主体酶(纤维素酶)和辅助酶(半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等)组成<sup>[19]</sup>。酶对植物体的降解作用不是各组成酶活力的简单相加, 而是复合酶系中各种酶的协同作用。本实验通过对分离所得的4株真菌酶学分析发现, 它们的纤维素酶最适反应pH均为4.5, 最适反应温度 $Z_2$ 为60 °C,  $Z_1$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 均为55 °C,  $MS$ 为50 °C。FPA活力测定说明参加滤纸降解的酶之间有很强的协同作用。菌株对棉纤维的分解能力不是很高, 因为棉花纤维的构象, 聚合度较滤纸纤维复杂, 影响了酶与纤维相应位点的结合。试验所得结果显示: 测试菌中 $C_x$ 酶活最高为2.95 U/mL, FPA酶活最高为2.63 U/mL, 菌株6 d内对棉秸秆的降解率最高为49.28%。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<sup>[20]</sup>等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<sup>[21]</sup>等筛选的高温细菌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<sup>[22]</sup>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<sup>[11]</sup>等报道的纤维素降解菌YNI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。

### 3.1 菌株 $Z_3$ 纤维素酶活的分析

由不同纤维素为底物测得的菌株酶活力变化趋势可以看出, 菌株  $Z_3$  在以滤纸为底物时测得的酶活力仅次于  $Z_1$ , 以 Avicel 为底物时测得的酶活力仅次于  $Z_2$ , 说明该菌株纤维素酶系之间有很强的协同能力。但是  $Z_3$  棉花分解的酶活力仅为 0.02 U/mL, 为该组所测值中最低,  $C_x$  酶活力也为所测值中最低。分析认为以棉花为底物时,  $Z_3$  低的酶活力由底物复杂的纤维素结构引起。 $Z_3$  较高的 FPA 酶活力和 Avicel 酶活力, 可能与菌株的  $C_1$  酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶有关, 它们能把  $C_x$  酶水解产生的葡聚糖链很好的分解为葡萄糖, 从而提高  $Z_3$  的测试值。这也正好说明了纤维素的分解是由  $C_x$ 、 $C_1$ 、 $\beta$ -葡萄糖苷酶三者协同作用的, 3 种酶的活性、比例恰当时才能更好地完成纤维素的有效降解<sup>[23]</sup>。

### 3.2 影响纤维素降解率的因素

试验中单株菌和混合菌对秸秆降解的结果可知, 混合菌处理并没有大幅度提高秸秆降解率。增大秸秆降解量可以从改善培养基碳氮比、找出菌株最佳氮源、添加无机盐等方面着手, 以提高纤维素酶的产量。也有研究表明, 在培养基中适当添加表面活性剂可以增加细胞膜的通透率、减少酶在膜上的吸附量, 从而提高降解纤维素酶的活力, 增大秸秆降解量<sup>[24]</sup>; (耐)高温菌与常温纤维素降解菌配合使用, 加速秸秆固体发酵时高温期的到来、延长堆体高温持续时间; 在固体发酵的动态过程中, 随着堆体温度的不断升高, (耐)高温菌株会在其适宜条件下发挥纤维素酶的最大活力; 在固体堆中加入生长扩散程度高的菌, 这些方法都会进一步提高堆肥时秸秆的降解量。

植物细胞壁主要是由纤维素、半纤维素和果胶组成。棉秸秆的高温降解菌株, 其纤维素酶可以很好地破坏细胞壁, 使细胞内容物溶解出来, 再由纤维素酶系中的蛋白酶和淀粉酶等进一步降解, 这样不但可以增加植物营养的吸收率, 也增加了非淀粉多糖的消化进而提高了多纤维原料的利用率<sup>[19]</sup>, 为

秸秆饲料化也提供了一条可行途径。

## 参 考 文 献

- [1] 李艳宾, 万传星, 张琴, 等. 棉秆腐解液对棉花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6): 1258-1262.
- [2] 郑重, 赖先齐, 邓湘娣, 等. 新疆棉区秸秆还田技术和养分需要量的初步估算[J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 264-266.
- [3] 梁智, 周勃, 邹耀湘, 等. 土壤湿热灭菌对连作棉花生长发育的影响[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 87-89.
- [4] Haug RT. The practical handbook of compost engineering[M]. Florida: Boca Raton Lewis Publishers, 1993: 710-718.
- [5] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 *MCI* 的筛选及功能[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 36-39.
- [6] 牛俊玲, 崔宗均, 李国学, 等. 高温堆肥中复合菌系对木质纤维素和林丹降解效果的研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(2): 375-379.
- [7] 张宇昊, 王颀, 张伟, 等. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(1): 33-36.
- [8] 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.
- [9] 卜元卿. 秸秆原位降解菌选育与应用及其土壤菌群分子多态性变化[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2001.
- [10] 武峥, 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.
- [11] 赵方圆, 范宁杰, 朱建春, 等. 纤维素高效降解菌 *YNI* 的筛选及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 496-502.
- [12] 徐昶, 龙敏南, 郭小兵, 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): 107-110.
- [13] 王淑军, 杨从发, 陈静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001(12): 21-23.
- [14] 冯健玲, 姚晓华, 韦秉兴, 等. 稻草秸秆纤维素分解菌的分离筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 477-480.



- [15] 苏杨, 张政, 杨齐, 等. 纤维素降解真菌 A25-2 的分离、鉴定及其产纤维素酶的酶学特性[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 427-433.
- [16] 刘起丽, 徐瑞富, 李春喜, 等. 接种方式对纤维素刚果红培养基筛选菌株的影响[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(1): 147-148.
- [17] 傅力, 丁友昉, 张麓. 纤维素酶测定方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(2): 45-48.
- [18] 刘韞滔, 裯淑霞, 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.
- [19] 卜登攀. 饲用纤维素酶及产酶微生物[J]. 宁夏农学院学报, 2000, 21(4): 72-78.
- [20] 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): 3040-3042, 3048.
- [21] 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.
- [22] 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): 720-724.
- [23] 余晓斌, 具润漠. 里氏木霉液体发酵法生产纤维素酶[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(1): 20-25.
- [24] 邱雁临, 王金华, 吴周和, 等. 纤维素酶酶活的影响因子初探[J]. 湖北农业科学, 2003(5): 93-95.

~~~~~  
(上接 p.205)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

### 4 特别说明

#### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

#### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

#### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>