

两株长白山地区低温纤维素降解 真菌的筛选鉴定及其产酶条件优化*

勾长龙¹, 王雨琼^{1,2}, 王 巍¹, 赵晗旭¹, 娄玉杰^{1,2}, 高云航¹
(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118;
2. 吉林农业大学动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林 长春 130118)

摘 要: 为分离出耐低温纤维素酶高产真菌菌株, 并进行菌株的产酶条件优化, 获得最大的酶活力。通过刚果红染色法初筛以及 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)酶活测定法复筛, 分别从长白山地区的牛粪和土壤中各分离出 1 株耐低温高效纤维素降解真菌, 并对其进行形态学鉴定、分子生物学鉴定以及产酶条件研究。结果显示经初筛和复筛得到 2 株耐低温纤维素降解菌 FF2-2 和 F-3I, 其 FPA 酶活分别为 (11.23 ± 0.39) 和 (5.59 ± 0.36) U/mL。通过形态学和 ITS rRNA 分子生物学鉴定, 菌株 FF2-2 被鉴定为短梗霉属的出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans*, 菌株 F-3I 为曲霉属的花斑曲霉 *Aspergillus versicolor*; 菌株 FF2-2 和 F-3I 产酶的最适碳源分别是 $w = 0.5\%$ 的麸皮、 $w = 0.5\%$ 的淀粉; 最适氮源分别为 $w = 1\%$ 牛肉膏和硫酸铵混合物、 $w = 1\%$ 牛肉膏; 最适初始 pH 分别为 7.0 和 6.0; 最适发酵温度均是 23 °C; 最适发酵时间分别是 3 d 和 5 d。优化后菌株 FF2-2 和 F-3I 的 FPA 酶活力分别提高了 2.6 倍和 5.5 倍。

关键词: 长白山地区; 低温纤维素分解菌; 鉴定; 产酶条件优化

中图分类号: S872 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2015)05-0115-08

Screening and Identification of Two Cold-Adapted Cellulase-Decomposing Fungal Isolates Collected in Changbai Mountain Area and Optimization of Their Enzyme-Producing Conditions

GOU Changlong¹, WANG Yuqiong^{1,2}, WANG Wei¹, ZHAO Hanxu¹, LOU Yujie^{1,2}, GAO Yunhang¹
(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to screen the efficient cold-adapted cellulase-decomposing strains and optimize conditions for maximum production of enzyme activity, in this study, we isolated the cold-adapted cellulase-decomposing strains with congo red method and flask fermentation from cattle manure and the soil of mountain. The strains were identified by morphological observation and molecular biology identification, and their fermentation condition were also optimized. The result showed that their FPA were (11.23 ± 0.39) U/mL, (5.59 ± 0.36) U/mL, and the strain FF2-2 and F-3I were respectively identified as *Aureobasidium pullulans* and *Aspergillus versicolor*. The optimum carbon and nitrogen source of two strains were 0.5

* 收稿日期: 2015-01-05

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-38); 公益性行业(农业)科研专项资助项目(201303091)。

作者简介: 勾长龙(1988年生), 男; 研究方向: 动物微生物生态学; 通讯作者: 高云航; E-mail: gaoyunhang@126.com

% wheat bran, 0.5 % starch, and 1 % beef extract and ammonium sulfate mixture, 1 % beef extract, respectively. The optimum pH were 7.0 and 6.0, respectively. The optimum fermentation temperature for both strains was 23 °C, and the optimum fermentation time was 3 d, 5 d respectively. The FPAs of strain FF2-2 and F-3I increased 2.6 and 5.6 times respectively after optimization.

Key words: Changbai Mountain's District; cold-adapted cellulase-decomposing strains; identification; optimization of enzyme production conditions

纤维素类物质是自然界中最丰富的一类可再生资源^[1], 由于其特殊的晶体结构, 使其不能被充分利用, 大部分被弃置^[2]。纤维素酶是一种能够将纤维素分子降解为纤维二糖和葡萄糖等小分子物质的一组复合酶, 现已被广泛应用于食品、医药、纺织、能源转化等领域^[3]。但大部分酶的最适作用温度范围为 45 ~ 65 °C, 需要长时间的加热和冷却的处理过程, 而低温纤维素酶的最适作用温度范围为 15 ~ 25 °C^[4], 较低的最适温度以及低温下的高效反应, 不仅可以缩短处理时间、节省费用, 同时只需温和的热处理即可使其丧失活力, 降低了对酶理化性质的影响。因此低温纤维素酶已成为了酶学研究的热点之一, 而产纤维素酶微生物的获得则是研究酶的首要前提^[5]。目前研究者已从不同环境中分离获得多株低温产纤维素酶的菌株, 曾胤新等^[6]从北极楚科齐海分离到一株产低温纤维素酶的交替假单胞菌 *Pseudoalteromonas sp.* BSW20308, 5 °C 时仍可保持 50% 的纤维素酶活力; Fu xiaoyu 等^[7]从海洋中分离获得一株芽孢杆菌 *Bacillus sp.* BME-14, 在 5 °C 时纤维素酶活为最大酶活的 65%。本研究从长白山土壤和牛粪中筛选出两株低温下具有较高纤维素酶活的真菌菌株, 对两株菌的形态特征、生长性质、及产酶性质进行了研究, 以为低温纤维素酶规模化生产和应用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 ①牛粪, 采样时间: 2012 年 1 月, 采样地点: 吉林农业大学牛场, 用铁锹除去粪堆表层冻结的粪便和杂物, 取粪堆中层处于结冻临界点的粪样置于自封袋中 (无菌操作), 带回实验室后置于 4 °C 冰箱保存; ②长白山土壤, 采样时间: 2012 年 2 月采样地点: 长白山南坡山麓下 (E127°23', N41°32'), 采样深度 5 ~ 20 cm, 无菌采集后置于装有冰袋的保温箱中带回实验室置于 4 °C 冰箱保存。

1.1.2 培养基 ①马铃薯葡萄糖琼脂培养基

(PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然, 高压灭菌 30 min。②羧甲基纤维素钠培养基^[8]: 羧甲基纤维素钠 20 g, 酵母膏 0.5 g, Na₂HPO₄ 2.5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, 蛋白胨 2.5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH: 7.0 ~ 7.2, 高压灭菌 30 min。③产酶发酵培养基: 羧甲基纤维素钠 5 g, 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调 pH7.0, 高压灭菌 30 min。

1.2 耐低温纤维素酶高产真菌菌株的初筛

称取 10 g 样品转移至盛有 90 mL 无菌水的锥形瓶中, 摇床振荡 2 h 后静置 1 h。取上清液稀释为 10⁻¹ ~ 10⁻⁷ 七个稀释度, 分别涂布于 PDA 培养基上, 15 °C 培养 3 ~ 7 d。根据菌落形态特征挑取单个菌落点种于羧甲基纤维素钠培养基上培养 5 d, 加入刚果红染色 15 min, 然后用 1 mol/L NaCl 浸洗 15 min^[9], 挑选出水解圈直径 (*D*) 与菌落直径 (*d*) 比值较大的菌株进行保存。

1.3 耐低温纤维素酶高产真菌菌株的复筛

将初筛菌株接种到装有 50 mL 产酶发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 15 °C、160 r/min 条件下培养 3 d, 4 000 r/min 离心 10 min 得到粗酶液。

用 3, 5-二硝基水杨酸法 (DNS) 测定菌株的纤维素酶活力即滤纸酶活力 (Filter paper enzyme activity 简称为 FPA)。酶活单位 (U/mL) 定义: 每 mL 粗酶液每 min 水解滤纸产生 1 μg 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位^[10]。

1.4 耐低温纤维素酶高产真菌的形态学鉴定

参照《微生物分类学》^[11]和《真菌鉴定手册》进行菌落形态和培养特征观察^[12], 利用插片法培养真菌, 15 °C 培养 3 d, 取出已经被菌丝体覆盖的盖玻片, 置于载玻片上, 通过光学显微镜观察孢子和菌丝的形态。

1.5 耐低温纤维素酶高产真菌的分子生物学鉴定

真菌 DNA 提取按参考文献^[13]进行。以提取两菌株的基因组为模板, 利用真菌核糖体 rDNA 内转录间隔区 ITS 通用引物 (ITS1: 5' - TCCGTAG-GTGAACCTGCGG - 3'; ITS4: 5' - TCCTCCGCT-

TATTGATATGC - 3') 进行 PCR 扩增, PCR 回收产物与载体 pMD - 18T 连接后转化 *Escherichia coli* DH5a 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 经菌落 PCR 鉴定后送生工基因公司进行测序。所得序列与 GeneBank 数据库中序列进行 Blast 分析比对, 利用 MEGA6.0 构建系统进化树, 根据菌株间的亲缘关系确定菌株的种属。

1.6 耐低温纤维素酶高产真菌菌株的产酶条件优化

1.6.1 孢子悬浮液的制备

刮取 F - 3I 和 FF2 - 2 的斜面菌种接种到马铃薯葡萄糖液体培养基中, 置于振荡培养箱中 15 °C、160 r/min 振荡培养 3 d, 制成孢子悬浮液备用。

1.6.2 碳源对酶活的影响

改变产酶发酵培养基中的碳源, 备选碳源分别为羧甲基纤维素钠、葡萄糖、蔗糖、淀粉、秸秆、麸皮。将孢子悬浮液以 2% 的接种量接入培养基中, 15 °C, 160 r/min 振荡培养 3 d, 测定滤纸酶活力 (FPA), 试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.6.3 氮源对酶活的影响

确定最佳碳源后, 采用不同的氮源取代发酵培养基的氮源, 备选氮源分别为: 牛肉膏、酵母粉、蛋白胨、硫酸铵、牛肉膏和蛋白胨混合物、硫酸铵和酵母粉混合物。研究不同氮源对菌株酶活力的影响。以 2% 的接种量将孢子悬浮液接种到发酵培养基中, 15 °C、160 r/min 振荡培养 3 d, 测定滤纸酶活力 (FPA), 试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.6.4 pH 值对酶活的影响

确定最佳碳源、氮源后, 将发酵培养基的初始 pH 值分别调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 以 2% 的接种量将孢子悬浮液接种到发酵培养基中, 15 °C, 160 r/min 振荡培养 3 d, 测定滤纸酶活力 (FPA), 试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.6.5 发酵温度对酶活的影响

确定了最佳碳氮源和 pH 后, 设置菌株发酵温度分别为 4、10、15、23、30 和 37 °C, 按 2% 接种量接种到发酵培养基中, 160 r/min 振荡培养 3 d, 测定滤纸酶活力 (FPA), 试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.6.6 发酵时间对酶活的影响

在确定上述条件的基础上, 将孢子悬浮液以 2% 的接种量接种到发酵培养基中, 23 °C、160 r/min 振荡培养 (分别培养 1~6 d), 测定滤纸酶活力 (FPA), 试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.7 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 和 SPSS 软件进行整理和统计, 用 SPSS 统计软件进行单因素方差分

析, 用邓肯氏新复极差测验法 DMRT (Duncan's Multiple Range Test, DMRT 法) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 耐低温纤维素酶高产真菌菌株的筛选

利用刚果红染色法重复筛选后, 从牛粪中分离出 10 株, 从长白山土壤中分离出 12 株能够产生清晰水解圈的真菌菌株, 挑出其中 6 株水解圈较大的菌株 (见图 1) 进行摇瓶发酵复筛, 复筛结果如表 1 所示。

表 1 菌株滤纸酶活测定结果¹⁾
Table 1 FPA activity results of strains

菌株	滤纸酶活力/(U · mL ⁻¹)
FF2 - 1	1.56 ± 0.11f
FF2 - 2	11.23 ± 0.39a
FF2 - 5	3.24 ± 0.11c
FF2 - 9	3.80 ± 0.17c
F - 3I	5.59 ± 0.36b
F - 3J	2.30 ± 0.17d

1) 同列数据有不同小写字母的表示在 0.05 水平差异显著 (邓肯氏检验)

从表 1 可见, 菌株 FF2 - 2 (分离自牛粪) 和 F - 3I (分离自长白山土壤) 具有较高的产纤维素酶活性。

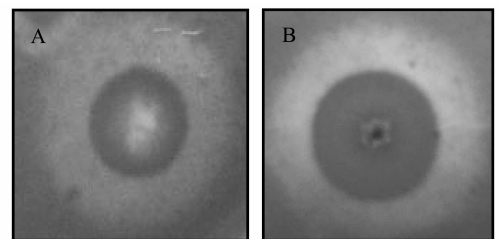


图 1 刚果红染色后的水解圈

Fig. 1 The hydrolytic zone on the screening plate

A: FF2 - 2 ; B: F - 3

2.2 耐低温纤维素酶高产真菌菌株的形态学鉴定

菌株 FF2 - 2 菌落丝绒状 (图 2A), 前期白色, 后期为黄绿色。显微镜下观察分支稀少, 分生孢子串生, 基内菌丝发达, 气生菌丝不发达, 分生孢子梗无横隔, 菌丝末端膨胀成半圆形顶囊, 顶囊上覆盖着辐射状小梗, 小梗上产生分子孢子链, 分生孢子椭圆形或者球形直径为 3.75 ~ 5.15 μm (图

2 C), 初步鉴定菌株为短梗霉属 *Aureobasidium* sp.^[10-11]。

菌株 F-3I 的菌落初期圆形致密生长 (图 2 B), 菌丝绒状, 后期产生白色分生孢子。显微镜

下观察气生菌丝顶端不膨大, 菌丝和分生孢子梗都有横隔, 菌丝膨大的顶端形同扫帚状, 分生孢子呈圆形或者椭圆形, 直径为 2.5 ~ 3 μm (图 2 D), 菌株 F-3I 初步鉴定为曲霉属 *Aspergillus* sp.^[10-11]。

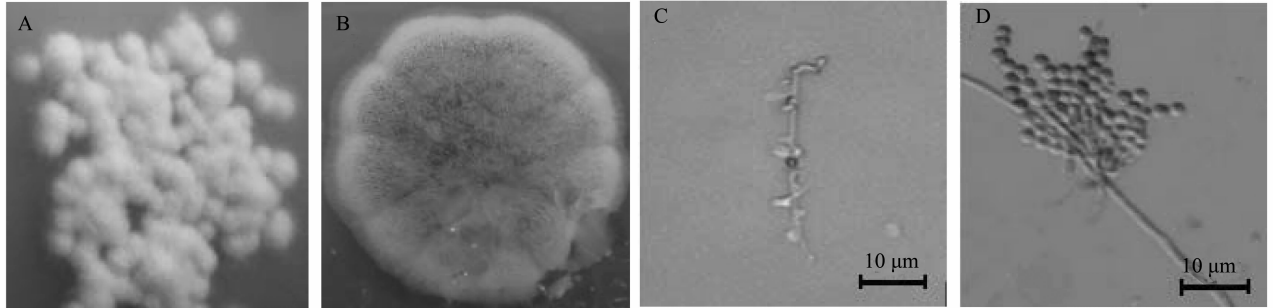


图 2 二株真菌的菌落形态和显微形态特征

Fig. 2 The micromorphology and Colony morphology of strains

A: FF2-2 的菌落形态; B: F-3I 的菌落形态; C: FF2-2 的显微形态特征; D: F-3I 的显微形态特征

2.3 菌株的分子生物学鉴定

2.3.1 菌株的 ITS rRNA 序列鉴定 采用 CTAB 法提取两菌株的总 DNA, 获得核苷酸片段大小约为 22 000 bp (图 3 左), 以两菌株基因组 DNA 为模

板, 利用一对真菌 ITS 通用引物进行 PCR, 取 3 μL PCR 产物进行 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳, 分别得到了 542、528 bp 的核苷酸片段, 其大小与预期结果相符 (图 3 右)。

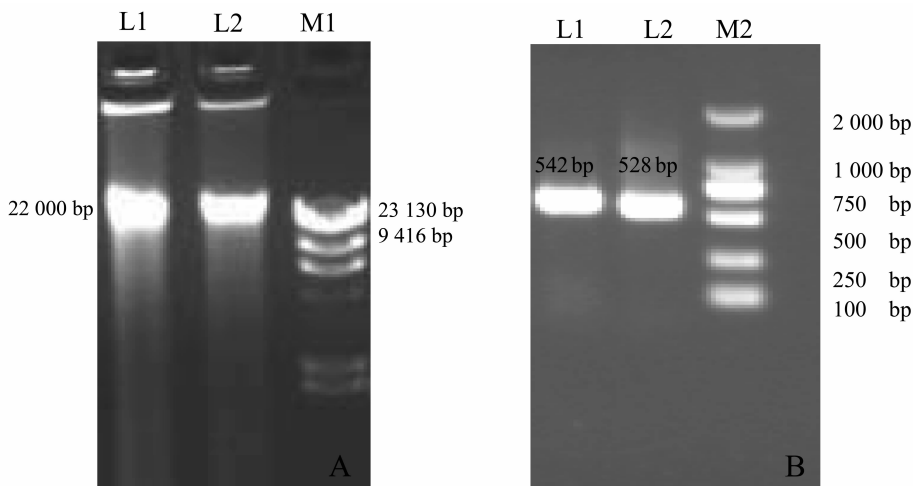


图 3 两株真菌总基因组提取结果 (A) PCR 产物电泳结果 (B)

Fig. 3 The electrophoresis analysis of two fungi total DNA (A) and PCR product (B)

A: M₁ 为 DNA 相对分子质量标准 ($\lambda\text{HindIII}$); L1、L2 分别为 FF2-2、F-3I 基因组 DNA;

B: M₂ 为 DNA 相对分子质量标准 (DL2000 Marker); L1、L2 分别为 FF2-2、F-3I ITS-PCR 产物

2.3.2 序列比对及基因系统进化树的构建 两株真菌 ITS rRNA 序列扩增产物经胶回收纯化后, 与克隆入 pMD18-T 载体连接转化后, 送至上海生工生物公司测序, 菌株 FF2-2、F-3I 的核苷酸片

段大小分别是 542、528 bp。根据 BLAST 和 DNAMAN 软件对测得的核苷酸序列进行比较分析, 并利用 MegAlign 软件构建基因系统进化树, 如图 4A 和图 4B 所示。

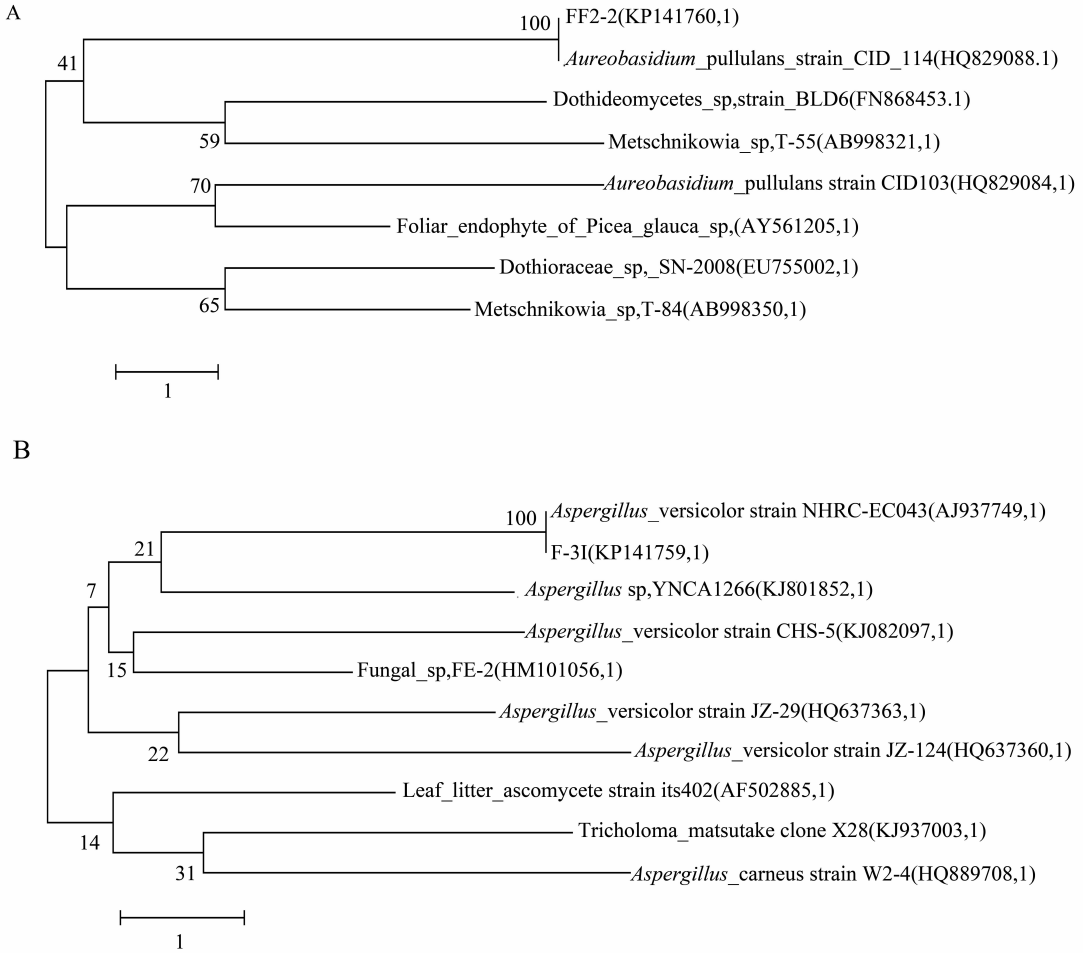


图 4 基于 ITS rRNA 序列同源性菌株 FF2 - 2 (A) 和 F - 3I (B) 的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic trees of stain FF2 - 2 (A) and F - 3I (B) based on ITS rRNA sequence

由图 4 可知，菌株 FF2 - 2 与 *Aureobasidium pullulans* strain CID 114 的亲缘关系最近，同源性为 100%；菌株 F - 3I 与 *Aspergillus versicolor* strain NHRC - EC043 的亲缘关系最近，同源性为 100%。结合形态学特征，最终确定菌株 FF2 - 2 为短梗霉属的出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans*，菌株 F - 3I 为曲霉属的花斑曲霉 *Aspergillus versicolor*。

2.4 菌株的产酶条件优化

2.4.1 碳源对酶活力的影响 由图 5 可知，在不同碳源下，菌株 F - 3I 的酶活力差异显著，以淀粉为唯一碳源时，酶活力最高 (11.42 ± 0.66) U/mL，麸皮次之 (8.32 ± 0.20) U/mL；菌株 FF2 - 2 在以葡萄糖、淀粉、秸秆为碳源时，酶活力差异不显著，而以麸皮为碳源时，酶活力与以其它碳源时的酶活力差异极显著，最高酶活力达到 (15.32 ± 1.09) U/mL，由于麸皮属于天然可再生资源，价格较为廉价，且在实际应用中可行性更高，因此两菌株均采用麸皮为最佳碳源进行深入性研究。

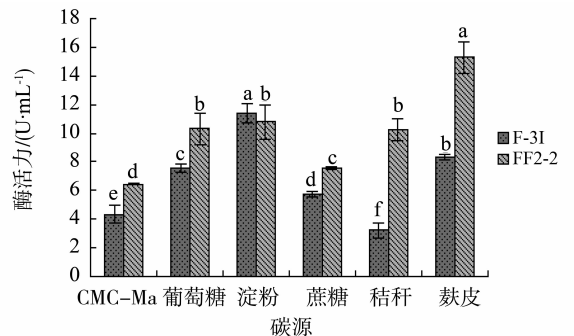


图 5 不同碳源对菌株 FF2 - 2 和 F - 3I 酶活力的影响
Fig. 5 Effects of different carbon sources on the enzyme activity of strain FF2 - 2 and strain F - 3I

2.4.2 氮源对酶活力的影响 由图 6 可知，在不同氮源下菌株 F - 3I 的各酶活力差异显著，以牛肉膏为氮源时，酶活力最高；菌株 FF2 - 2 在以牛肉膏和蛋白胨为氮源时酶活力无显著差异，酶活力显著高于其它氮源时的酶活力，两菌株在以硫酸铵为氮源时酶活力均为最低。

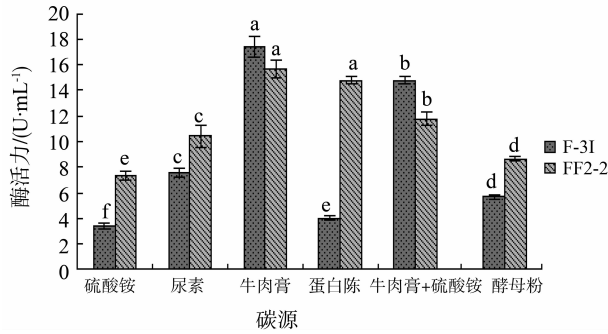


图 6 不同氮源对菌株 FF2-2 和 F-3I 酶活力的影响

Fig. 6 Effects of different nitrogen sources on the enzyme activity of strain FF2-2 and strain F-3I

2.4.3 初始 pH 对酶活力的影响 在 pH 为 6 和 7 时, 菌株 F-3I 的产酶活力无显著差异, 与其它 pH 条件下的酶活力差异显著; 菌株 FF2-2 在 pH 为 7 时产酶活力与其它 pH 时酶活力差异极显著, 酶活力高达 (25.77 ± 0.79) U/mL, 说明 2 株菌在中性环境下均能较好的生长和产酶。如图 7 所示。

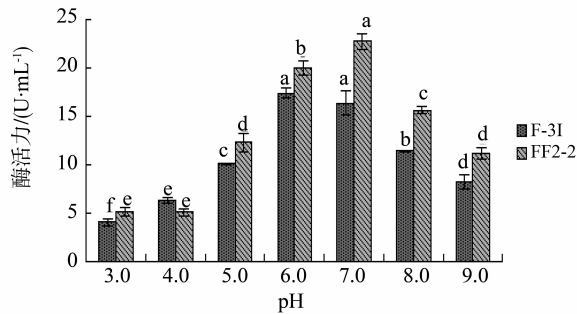


图 7 不同初始 pH 对菌株 FF2-2 和 F-3I 酶活力的影响

Fig. 7 Effects of different initial pH on the enzyme activity of strain FF2-2 and strain F-3I on enzyme activity

2.4.4 温度对酶活力的影响 由图 8 可知, 温度在 4 ~ 23 °C 之间时, 两株菌的酶活随温度的升高逐渐升高, 4 个温度下两株菌的酶活力均差异显著; 当温度为 23 °C 时, 菌株 F-3I 的酶活达到最高, 为 (22.33 ± 1.26) U/mL, 而菌株 FF2-2 在 23 °C 和 30 °C 时的酶活力差异不显著, 此时酶活力最高。当培养温度高于 23 °C 时, 随着温度的升高, 酶活力呈下降趋势。

2.4.5 时间对酶活力的影响 由图 9 可知, 菌株 F-3I 在发酵前 2 d 酶活力差异不显著, 随着时间的增长, 在第 5 天时酶活力达到最高值; 而菌株 FF2-2 在培养第 3 天时, 产酶活力最高。

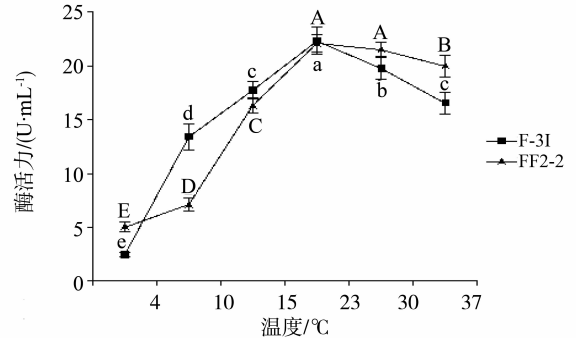


图 8 不同温度对菌株 FF2-2 和 F-3I 酶活力的影响

Fig. 8 Effects of different temperature on the enzyme activity of strain FF2-2 and strain F-3I

F-3I 的显著性用大写字母表示, FF-2 的显著性用小写字母表示, 不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)

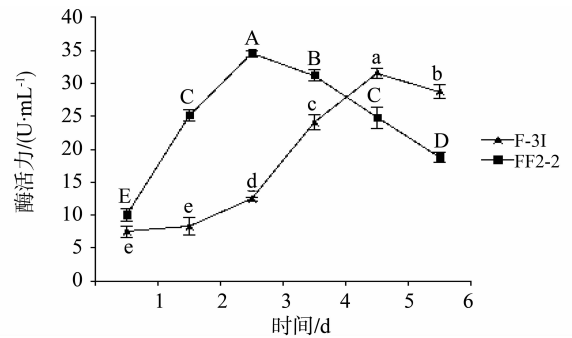


图 9 不同时间对菌株 FF2-2 和 F-3I 酶活力的影响

Fig. 9 Effects of different time on the enzyme activity of strain FF2-2 and strain F-3I

F-3I 的显著性用大写字母表示, FF-2 的显著性用小写字母表示, 不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)

3 讨论与结论

目前低温微生物的获得主要来源于极端环境, 张淑红等^[14]从青藏高原冰山雪样中分离出假单胞菌属的低温纤维素降解菌 LHG-C-9, 其生长范围在 -5 ~ 30 °C, 最适产酶温度为 30 °C; 吕明生等^[15]从连云港海域的海水和海泥中分离得到低温产纤维素酶菌株 Z6, 其生长温度范围在 4 ~ 35 °C, 最适产酶温度为 25 °C。极端环境中微生物的数量和种类固然繁多, 但这些环境超低温、强辐射、冻融的寡营养状态增加了微生物培养的难度^[16], 同时样品的获得也十分艰难, 因此不能被广泛的深入研究。本试验从长白山地区的土壤和牛粪中通过温度诱导分离出两株高效的纤维素降解菌, 生长温度和产酶温度与张淑红、吕明生的研究结果相符合。这充分说明普通环境中同样能够获得具有高催化特

性的低温微生物,同时样品采集便利,节省资金,而且实际应用中适应性更强。

近年来研究比较多的低温菌主要有交替假单胞菌 *Pseudoalteromonas*、芽孢杆菌 *Paenibacillus*、木霉 *Trichoderma*、青霉 *Penicillium*、以及根霉 *Rhizopus ehrenberg*^[5]。本文获得的两株低温纤维素分解菌 FF2-2 和 F-3I,经形态学和 ITS rRNA 分子生物学鉴定 FF2-2 为短梗霉属的出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans*,菌株 F-3I 为曲霉属的花斑曲霉 *Aspergillus versicolor*;目前 *A. pullulans* 的研究主要在生物防治领域以及产普鲁兰多糖方面,Zhang Dianpeng 等^[17]研究 *A. pullulans* 对桃子采后病害的防治效果;高璇璇等^[18]通过紫外诱变出芽短梗霉来提高普鲁兰多糖的产量。而对 *A. versicolor* 的研究主要集中于菌丝体中化学成和次级代谢产物方面,Krupiński M 等^[19]从 *A. versicolor* IM 2161 提取化学成分来消除壬基酚的毒性作用;张连庆等^[20]提取 *A. versicolor* ZLQ-43 的次级代谢产物抑制肿瘤细胞;目前尚未发现出芽短梗霉 *A. pullulans* 和花斑曲霉 *A. versicolor* 产低温纤维素酶的报道,因此这两株菌具有很大的开发潜力。

本试验同时测定了5种因素对两菌株产酶活力的影响。在碳源方面,发现在以麸皮为唯一碳源时菌株 FF2-2 的酶活力远远高于其它物质作为碳源时的酶活力,而菌株 F-3I 在以麸皮为唯一碳源时,同样具有较高的酶活力。在实际生产过程中麸皮作为农业废弃物,不仅较容易获得,同时价格低廉,具有很强的生产应用价值。在温度方面,目前已报道的中高温纤维素分解菌,酶活性受温度影响较大,一般在45~65℃范围内获得最大酶活力,而低于45℃时,随着温度下降酶活性逐渐减弱或者丧失^[4]。而本试验筛选出的两株纤维素分解菌均能在23℃时获得最大酶活力,随着温度升高,酶活力反而下降,这说明该酶对热较敏感。同时最适产酶温度也符合 Margensin 等^[21]提出的最适反应温度在30℃左右的酶属适冷酶范畴。

本试验通过反复筛选分别从牛粪和长白上土壤中成功筛选出菌株 FF2-2、F-3I,经形态学、分子生物学鉴定菌株 FF2-2 为短梗霉属的出芽短梗霉,F-3I 为曲霉属的花斑曲霉。经产酶条件优化后菌株 FF2-2 和 F-3I 产酶的最适碳源分别是 $w = 0.5\%$ 的麸皮、 $w = 0.5\%$ 的淀粉;最适氮源分别为 $w = 1\%$ 牛肉膏和硫酸铵混合物、 $w = 1\%$ 牛肉膏;最适初始 pH 分别为 7.0、6.0;最适发酵温度均是 23℃;最适发酵时间分别是 3 d 和 5 d。优化后菌

株 FF2-2 的 FPA 酶活力提高了 2.6 倍,菌株 F-3I FPA 酶活力提高了 5.5 倍。

参考文献:

- [1] 魏志文,张梅梅,赵艳霞,等.一株纤维素酶产生菌的产酶条件优化[J].中国农学通报,2011,27(27):122-126.
- [2] 周俊强,邱忠平,韩云平,等.纤维素降解菌的筛选及其产酶特性[J].环境工程学报,2010,4(3):705-708.
- [3] 陈亮,迟乃玉,张庆芳.低温纤维素酶菌株 CNY086 选育及发酵培养基优化(I)[J].微生物学通报,2009,36(10):1547-1552.
- [4] AKILA G, CHANDRA T S. A novel cold-tolerant clostridium strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulose[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 219: 63.
- [5] 董硕,迟乃玉,王鑫,等.低温纤维素酶的研究进展[J].生物技术通报,2011(2):37-41.
- [6] 曾胤新,俞勇,陈波,等.低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定、生长特性及酶学性质[J].高技术通讯,2005,15(4):98-104.
- [7] FU Xiaoyu, LIU Pengfu, LIN Ling, et al. A novel endoglucanase(Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus Sp.* BME-14[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(6):1627-1636.
- [8] 高云航,王巍,李秋菊,等.白蚁肠道木质素及纤维素分解菌的分离鉴定及产酶条件优化[J].中山大学学报:自然科学版,2013,52(2):84-89.
- [9] QAISAR S, ZOHRA R, AMAN A, et al. Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 104(15):199-203.
- [10] 邓先余,邹谋勇,黄志坚,等.一株产纤维素酶细菌的分离鉴定及其酶学特性研究[J].中山大学学报:自然科学版,2012,51(5):93-99.
- [11] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990.
- [12] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [13] 吴乃虎.基因工程原理[M].北京:科学出版社,2001.
- [14] 张淑红,刘秀花,梁峰,等.低温纤维素降解菌的筛选及其酶学性质初步研究[J].微生物学杂志,2009,29(3):97-100.
- [15] 吕明生,吕凤霞,房耀维,等.低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质初步研究[J].食品科学,2007,28(12):235-239.

- of European Conference on Artificial Life. Paris, 1991: 134 - 142.
- [12] PAREPINELLI R S, LOPES H S, FREITAS A A. Data mining with an Ant Colony Optimization algorithm [J]. IEEE Transaction in Evolutionary Computation, 2002, 6 (4): 321 - 332.
- [13] COSTA E P, LORENA A C, CARVALHO A, et al. Comparing several approaches for hierarchical classification of proteins with decision trees [C] // 2nd Brazilian Symposium on Bioinformatics (BSB2007). Angra dos Reis, BRAZIL, 2007: 126 - 137.
- [14] OMKAR S N, RAGHAVENDRA K U. Rule extraction for classification of acoustice mission signals using Ant Colony Optimisation [J]. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 2008, 21: 1381 - 1388.
- [15] LIU XP, LI X, LIU L, et al. An innovative method to classify remote sensing images using Ant Colony Optimization [J]. IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing, 2008, 46(22): 4198 - 4208.
- [16] LIU X P, LI X, LIU L, et al. A bottom-up approach to discover transition rules of cellular automata using ant intelligence [J]. International Journal of Geographical Information Science, 2008, 22(11/12): 1247 - 1269.
- [17] 刘小平, 黎夏, 叶嘉安, 等. 利用蚁群智能挖掘地理元胞自动机的转换规则 [J]. 中国科学 D 辑: 地球科学, 2007, 37(6): 824 - 834.
- [18] 戴芹, 刘建波. 基于蚁群规则挖掘算法的多特征遥感数据分类 [J]. 地理研究, 2009, 28(4): 1136 - 1145.
- [19] OTERO F, FREITAS A, JOHNSON C G. cAnt-Miner: An ant colony classification algorithm to cope with continuous attributes [C] // DORIGO M, et al, eds. Springer, Heidelberg; ANTS2008, LNCS: 5217: 48 - 59.
- [20] 宫清华, 黄光庆, 郭敏, 等. 基于 GIS 技术的广东省洪涝灾害风险区划 [J]. 自然灾害学报, 2009, 18(1): 58 - 63.
- [21] 广东省地图集 [M]. 广州: 广东地图出版社, 2003.
- [22] 广东省防汛防旱防风总指挥部. 广东水旱风灾害 [M]. 广州: 暨南大学出版社, 1996.

(上接第 121 页)

- [16] 徐宇丽, 王大伟, 史学伟, 等. 天山冻土产低温脂肪酶菌株的筛选及其多样性分析 [J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 233 - 240.
- [17] ZHANG Dianpeng, SPADARO D, GARIBALDI A, et al. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action [J]. Biological Control, 2010, 54(3): 172 - 180.
- [18] 高璇璇, 汪建明, 卢星达, 等. 高产普鲁兰多糖的出芽短梗霉的诱变育种 [J]. 中国食品添加剂, 2013(1): 45 - 49.
- [19] KRUPINSKI M, SZEWCZYK R, DŁUGONSKI J. Detoxification and elimination of xenoestrogen nonylphenol by the filamentous fungus *Aspergillus versicolor* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 82: 59 - 66.
- [20] 张连庆, 车茜, 李德海, 等. 海洋真菌 *Aspergillus versicolor* ZLQ-43 的次级代谢产物的研究 [J]. 中国海洋药物, 2014, 33(3): 1 - 6.
- [21] MARGESIN R, SCHUNNER F. Low - temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil [J]. Applied Microbiology And biotechnology, 1998, 49(4): 482 - 486.