

耐低温纤维素降解真菌的筛选、 鉴定及酶活性研究

齐笑萱^{1,2}, 张 阳¹, 赵 爽², 韩斯琴², 梁小龙², 张 颖^{2*}

(1. 沈阳师范大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 【目的】为筛选低温下高效降解纤维素的菌种资源, 促进秸秆在低温条件的快速腐解。【方法】本研究利用低温稀释平板涂布法分离、刚果红定性、内切 β -葡聚糖酶活力定量等分析方法进行低温纤维素降解真菌的筛选, 依据菌株形态特征及 rDNA-ITS 序列分析鉴定菌种, 探究其在不同温度下的产酶能力, 并对粗酶提取物进行酶学性质的初步研究。【结果】① 筛选到一株低温下高效产纤维素酶的真菌 ZY-50, 鉴定为球芽异普可尼亚菌 (*Metapochonia-bulbillosa*), 目前尚无该菌产纤维素酶的报道; ② 球芽异普可尼亚菌 ZY-50 可在低温条件下生长并具有较强产纤维素酶能力, 其内切 β -葡聚糖酶活力在 28°C、16°C、10°C 温度下分别为 76.03 U mL⁻¹、128.34 U mL⁻¹ 和 115.67 U mL⁻¹, 该菌在 16°C 下产外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的能力较稳定, 最高分别为 2.31 U mL⁻¹、2.43 U mL⁻¹, 16°C 下滤纸酶活力最高为 7.89 U mL⁻¹; ③ 粗酶提取物的内切 β -葡聚糖酶最适作用温度为 60°C, 在 10~40°C 温度下, 在 1.5 h 内相对酶活为 90%, 最适 pH 为 5.0, 10 mmol L⁻¹ Co²⁺ 对其活性有显著的促进作用。【结论】球芽异普可尼亚菌 ZY-50 可在低温条件下生长且产纤维素酶活力较强, 在促进秸秆低温腐熟方面具有较好的应用潜力。

关键词: 秸秆腐熟; 低温; 纤维素酶; 真菌

中图分类号: Q939.961 **文献标识码:** A **文章编号:** 0564-3945(2024)02-0460-11

DOI: 10.19336/j.cnki.trtb.2023042101

齐笑萱, 张 阳, 赵 爽, 韩斯琴, 梁小龙, 张 颖. 耐低温纤维素降解真菌的筛选、鉴定及酶活性研究 [J]. 土壤通报, 2024, 55(2): 460-470

QI Xiao-xuan, ZHANG Yang, ZHAO Shuang, HAN Si-qin, LIANG Xiao-long, ZHANG Ying. Screening and Identification of Cold-adapted Fungi with Cellulose Degradation and Its Enzymatic Properties [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2024, 55(2): 460-470

【研究意义】东北地区是我国主要粮食生产基地, 每年产生的作物秸秆量达 1.2 亿 t^[1]。秸秆的资源化利用涉及秸秆还田、饲料化、工业造纸及生产淀粉、乙醇等^[2], 提高秸秆中纤维素的分解效率是秸秆资源化利用的关键问题。秸秆还田是当前普遍关注的提高土壤有机质含量、培肥地力的农业措施, 但东北地区秋冬季低温时间较长, 秸秆还田后自然腐解速度较慢, 如不能及时充分腐解, 不仅影响下季的作物播种、出苗和苗期生长, 还能导致一些病虫害和病原菌在土壤长时间存活, 给作物生产带来潜在危害^[3-4]。秸秆分解过程中需要多种酶的参与, 其中纤维素酶对促进秸秆降解具有重要作用, 但是土壤中自然存在的纤维素降解菌很少, 分泌到土壤中的纤维素酶的活性较低, 添加能够适应东北地区温

度的外源秸秆降解菌, 可以加快秸秆的原位腐解。

【前人研究进展】从不同环境中已分离获得多株低温产纤维素酶的菌株, 曾胤新等^[5]从北极楚科奇海分离到一株最适温度为 10°C 的耐冷假交替单胞菌, 5°C 时其纤维素酶活保持 50%; Fuxiaoyu 等^[6]从海洋中分离出 *Paenibacillus*.BME-14 的内切葡聚糖酶, 在 5°C 时纤维素酶活为最大酶活的 65%; 勾长龙等^[7]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。

【本研究切入点】真菌是自然界中纤维素的主要分解者, 能产生种类繁多并具有不同的催化活性的胞外酶, 是秸秆生物质的优良降解剂^[8-9]。大兴安岭地处我国高纬度寒区, 森林凋落物蕴含着丰富的微生物资源^[10], 也是宝贵的低温纤维素降解真菌资

收稿日期: 2023-04-29; 修订日期: 2023-06-02

基金项目: 村镇社区冻土冻融水环境修复关键技术及小型设备研究重点研发课题 (2019YFD1100504) 资助

作者简介: 齐笑萱 (1998-), 女, 辽宁法库人, 硕士研究生, 主要研究领域为低温环境微生物。E-mail: 896675169@qq.com

*通讯作者: E-mail: yzhang@iae.ac.cn

源库。【拟解决的问题】本研究从大兴安岭针阔混交林下枯枝落叶半分解区土壤中,筛选鉴定出一株可在低温条件下高效产纤维素酶的真菌,对其生长特性、产酶性质进行探究,为低温期秸秆快速腐解提供微生物菌种资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 实验样品 2021年7月,采集大兴安岭针叶

林下土壤半分解区枯枝落叶层(云杉、冷杉和红松为主要树种)和表层土壤(0~10 cm、基本理化性质见表1),混匀后于4℃冰箱保存备用。

1.1.2 培养基 PDA培养基:葡萄糖20 g,琼脂20 g,马铃薯汁1000 mL;孟加拉红培养基^[11];液体生长培养基^[12];羧甲基纤维素钠培养基^[13];产酶基础培养基:CMC-Na 15 g, KH₂PO₄ 2 g, 酵母粉5 g, 蒸馏水1000 mL。

表1 土壤基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of soil

材料 Material	pH	总有机碳 (g kg ⁻¹) Total organic carbon	全氮 (g kg ⁻¹) Total nitrogen	全磷 (g kg ⁻¹) Total phosphorus	全钾 (g kg ⁻¹) Total potassium
表层土壤	4.68	133.25	3.79	0.28	13.88

1.2 低温纤维素降解菌的分离和筛选

1.2.1 低温菌株分离筛选 称取10 g上述混合土壤样品,置入盛有90 mL无菌水的锥形瓶中,加入少量玻璃珠涡旋振荡20 min至悬浮均匀。将悬浮液稀释成10⁻²~10⁻⁶系列浓度梯度,分别用移液枪吸取200 μL悬浮液涂布到孟加拉红培养基及含有链霉素的PDA培养基上。将平板置于16℃倒置培养5~10 d,挑选出生长良好、形态各异的真菌菌落进行分离纯化培养,直至获得纯菌株。

1.2.2 初筛 使用打孔器在已纯化菌株菌丝生长旺盛的区域取菌饼(7 mm)接到羧甲基纤维素钠培养基正中,于4℃、16℃、28℃恒温培养箱中倒置培养。待培养3 d后,向羧甲基纤维素钠培养基中加入0.2%的刚果红染液进行染色,并用0.5%的NaCl溶液进行脱色^[14]。观察菌落周围是否出现透明水解圈,若产生水解圈,则表明该菌株能够降解纤维素,记录菌落和水解圈的大小并计算纤维素分解指数。

$$\text{纤维素分解指数} = \frac{\text{水解圈直径D (cm)}}{\text{菌落直径d (cm)}}$$

1.2.3 复筛 将初筛得到的菌株培养7 d后,用无菌水洗脱孢子,配置成1 × 10⁷ cfu mL⁻¹的孢子悬浮液。以5%的接种量接入产酶基础培养基中,分别在28℃、160 r min⁻¹恒温振荡培养4 d,16℃、160 r min⁻¹恒温振荡培养8 d,4℃、160 r min⁻¹恒温振荡培养12 d。将发酵液于4℃、10000 × g离心10 min,取上清液即为粗酶液。复筛采用DNS(3,5-二硝基水杨酸)比色法测定各菌株的内切β-葡聚糖酶活

力^[15],以每分钟生成相当于1 μg的葡萄糖为一个酶活力单位^[16]。

$$\text{酶活力 (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{葡萄糖生成量 (mg)} \times 1000}{\text{时间 (min)} \times \text{酶液加入量 (mL)}}$$

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌株的形态特征 将筛选菌株接种至PDA平板上,观察菌落生长状况及其形态特征;将载玻片置于已接种菌株的PDA平板上,待菌丝蔓延生长至载玻片上,取出载玻片,滴入适量棉蓝染液,盖上盖玻片,用显微镜观察菌丝形态。

1.3.2 分子生物学鉴定 利用真菌基因组DNA快速抽提试剂盒(生工生物工程股份有限公司)提取菌株DNA,以真菌ITS通用引物ITS1:(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4:(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增。反应体系(50 μl):2x premix Taq 25 μl, ITS1 1 μl, ITS4 1 μl, 模板DNA 3 μl, ddH₂O 20 μl。PCR反应条件:95℃ 4 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 40 s, 72℃ 7 min, 共进行35个循环。PCR扩增产物送至华大基因股份有限公司(北京)进行测序,将测定获得的序列在NCBI数据库中进行BLAST相似性比对、同源性分析,并使用MEGA7.0软件Neighbor-Joining法构建系统发育树,确定该菌株的系统发育学地位。

1.4 筛选菌株在不同温度下的产纤维素酶的能力

在28℃、16℃、10℃下分别进行3~10 d、5~13 d、10~19 d的产酶发酵,用DNS比色法进行酶

活力测定。以羧甲基纤维素钠溶液作为底物测定内切 β -葡聚糖酶活力；以脱脂棉为底物测定外切 β -葡聚糖酶活力；以水杨素溶液为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力；以滤纸为底物测定滤纸酶活力^[15]。

1.5 筛选菌株在不同温度下的生长量测定

将孢子悬浮液以 5% (v v⁻¹) 的接种量接入液体生长培养基中, 160 r min⁻¹ 振荡培养, 分别在 28℃ 培养 3 ~ 10 d、16℃ 培养 5 ~ 13 d、10℃ 培养 10 ~ 19 d, 无菌水洗涤菌丝两次, 用恒重滤纸过滤, 并 75℃ 烘干至恒重, 称量菌丝干重。

1.6 筛选菌株的酶学性质研究

1.6.1 温度对酶活力的影响 筛选菌株在 16℃ 下发酵所得的粗酶液分别在 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 的温度下测定内切 β -葡聚糖酶活力。以不同反应温度下酶活力中最大值为 100% 计算其相对酶活力 (%)。

1.6.2 酶活力的热稳定性 在最适反应温度的基础上, 将粗酶液分别于 10℃、20℃、30℃ 和 40℃ 水浴 0.5 h、1 h 和 1.5 h 进行预处理, 对照组不经过水浴处理, 直接在最适反应温度下反应测定酶活力。以未经处理酶活力为 100% 来计算水浴处理后酶活力的相对酶活 (%)。

1.6.3 pH 对酶活力的影响 在最适反应温度的基础上, 测定不同 pH 值的缓冲溶液对酶活力的影响, 取粗酶液分别加入到 pH3.0、4.0、5.0 和 6.0 的羧甲基纤维素钠柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中、pH7.0、8.0 和 9.0 的羧甲基纤维素钠 Tris-盐酸缓冲液中, 测定其内切 β -葡聚糖酶活力。将不同 pH 条件下反应体系中最大酶活力记为 100%, 分别计算其他 pH 条件下反

应后酶活力的相对酶活 (%)。

1.6.4 金属离子对酶活力的影响 在最适反应温度和 pH 条件下, 向测定内切 β -葡聚糖酶活力的反应体系中分别加入质量浓度为 10 mmol L⁻¹ 的 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、CoCl₂、ZnCl₂、FeCl₂ 溶液 0.5 mL^[16], 测定其内切 β -葡聚糖酶活力。以未经处理的对照组酶活力作为 100%, 计算其相对酶活 (%)。

1.7 数据处理

所有处理均三次重复, Microsoft Excel 2010 进行实验数据的整理和统计, 用 SPSS Statistics 20 和 Origin 2021 进行显著性分析并作图。

2 结果与分析

2.1 低温产纤维素酶真菌的分离及筛选

经纯化后, 从大兴安岭针阔混交林下枯枝落叶土壤中分离到 11 株可在 16℃ 下生长的真菌, 结合东北地区气候温度情况, 分别在 28℃、16℃、4℃ 下利用刚果红染色法定性分析菌株降解纤维素的能力, 共获得 6 株明显产生水解圈的菌株 ZY-1-8、ZY-2-9、ZY-2-1、ZY-28-17、ZY-30-16、ZY-50。菌株在不同温度下, 对纤维素的降解能力不同, 图 1 为菌株 ZY-50 在 28℃、16℃、4℃ 下产生水解圈的效果。各菌株在不同温度下分解纤维素的能力如表 2 所示, 纤维素分解指数在 1.1 ~ 1.8 之间。其中 ZY-1-8、ZY-2-9、ZY-30-16、ZY-50 这 4 株菌在 4℃ 的低温下仍有水解圈的产生, 表明这 4 株产纤维素酶的真菌具有更强的低温下产酶的能力, 进一步测定这 4 株菌的内切 β -葡聚糖酶活力。

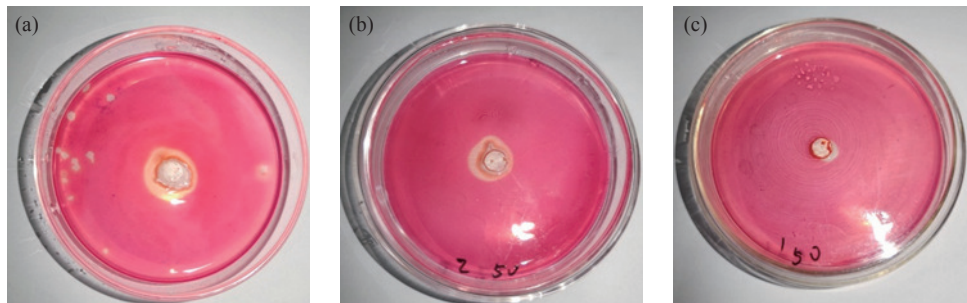


图 1 菌株 ZY-50 在 28℃(A)、16℃(B) 和 4℃(C) 下刚果红染色的水解效果

Fig.1 Hydrolytic effect of strain ZY-50 with Congo red staining at 28℃ (A), 16℃ (B) 和 4℃ (C)

内切 β -葡聚糖酶是纤维素酶的重要组成, 活力通常也高于其他纤维素酶, 因此利用 DNS 比色法测定初筛菌株的内切 β -葡聚糖酶活力, 作为产酶能力

复筛的评估指标。但受低温的影响, 菌株生长较慢, 产酶时间较晚, 因此不同温度下选择不同的时间来对菌株酶活力进行初步的定量测定, 结果如表 3 所

表 2 初筛菌株刚果红染色的水解圈大小

Table 2 Hydrolytic diameter of strains with Congo red staining

菌株 Strain	温度 (°C) Culture temperature	菌落直径d (mm) Colony diameter	水解圈直径D (mm) Hydrolysis circle diameter	纤维素分解指数直径比 D/d Diameter ratio
ZY-1-8	4	0.8 ± 0 c	1.13 ± 0.06 c	1.42 ± 0.07 a
	16	1.87 ± 0.06 b	2.17 ± 0.06 b	1.16 ± 0.06 b
	28	3.13 ± 0.06 a	3.53 ± 0.06 a	1.13 ± 0.00 b
ZY-2-9	4	0.8 ± 0 c	1.07 ± 0.12 b	1.33 ± 0.15 a
	16	1.33 ± 0.15 b	1.77 ± 0.06 a	1.33 ± 0.12 a
	28	1.53 ± 0.15 a	1.73 ± 0.15 a	1.13 ± 0.01 b
ZY-30-16	4	0.7 ± 0 b	0.97 ± 0.06 c	1.38 ± 0.08 b
	16	0.9 ± 0 a	1.33 ± 0.12 b	1.48 ± 0.13 b
	28	0.9 ± 0 a	1.63 ± 0.06 a	1.82 ± 0.06 a
ZY-50	4	0.7 ± 0 b	0.9 ± 0.10 c	1.29 ± 0.14 a
	16	1.27 ± 0.06 a	1.47 ± 0.12 b	1.16 ± 0.15 a
	28	1.4 ± 0.17 a	1.97 ± 0.35 a	1.40 ± 0.16 a

注: a、b、c表示相同菌株不同温度下的显著性 ($P < 0.05$)。

表 3 菌株的内切 β-葡聚糖酶活力

Table 3 Endo β-glucanase activity of strains

温度 Culture temperature (°C)	时间 Time (d)	菌株 Strain	内切β-葡聚糖酶活力 Endo β-glucanase activity (U mL ⁻¹)
4°C	12	ZY-1-8	1.00 ± 0.41a
		ZY-2-9	0.00 ± 0.00b
		ZY-30-16	0.00 ± 0.00b
		ZY-50	0.00 ± 0.00b
16°C	8	ZY-1-8	84.17 ± 4.59b
		ZY-2-9	1.16 ± 0.57d
		ZY-30-16	10.92 ± 0.35c
		ZY-50	130.19 ± 6.04a
28°C	4	ZY-1-8	62.66 ± 0.27b
		ZY-2-9	6.50 ± 0.30c
		ZY-30-16	0.00 ± 0.00d
		ZY-50	73.22 ± 2.82a

示。结果表明四株菌中, 菌株 ZY1-8 和 ZY-50 在 28°C、16°C 下产内切 β-葡聚糖酶的能力较高。

28°C 培养 4 d 后, 菌株 ZY-1-8 和 ZY-50 内切 β-葡聚糖酶活力分别为 62.66 U mL⁻¹、73.22 U mL⁻¹; 16°C 培养 8 d 后, 菌株 ZY-1-8 和 ZY-50 内切 β-葡聚糖酶活力分别为 84.17 U mL⁻¹、130.19 U mL⁻¹; 4°C 培养 12 d 后, 菌株 ZY-1-8 内切 β-葡聚糖酶活力为 1.00 U mL⁻¹, ZY-50 暂未测出活力。菌株 ZY-1-8 和 ZY-50 在 16°C 下 8 d 酶活力较高, 表明其在低温下具有较强的产内切 β-葡聚糖酶的能力, 将进一步对菌株 ZY-1-8 和 ZY-50 进行研究。

2.2 菌种形态特征及分子生物学鉴定

菌株 ZY-50 的菌落以中间接种的原菌落为中心向外蔓延, 呈圆形生长。菌落颜色白色至奶油色, 绒状, 质地紧密, 背面初始白色, 后随培养时间加

深至黄色红棕色。菌落中心微微凹陷, 四周凸起, 菌落背面有明显的放线状褶皱。菌丝弯曲纤长, 顶端渐尖, 分生孢子形成新月形的孢子头 (图 2)。

菌株 ZY-50 测序后得到 ITS rDNA 片段的长度为 598 bp, 在 GenBank 上对模式菌株及亲缘关系较近的菌株进行 BLAST 比对, 结果显示菌株 ZY-50 的 rDNA 序列与异普克尼亚属 (*Metapochonia*) 的多株菌株具有高度同源性。使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 法对菌株 ZY-50 及相似性较高的菌株构建系统发育树, 菌株 ZY-50 与 *Metapochonia bulbilosa* CBS145.70 的亲缘关系更近 (图 3), 相似性达 99%, 结合形态学特征与分子系统学将菌株 ZY-50 鉴定为球芽异普可尼亚菌 *Metapochonia-bulbilosa*, GenBank 登录号为 OQ848613。

鉴定菌株 ZY-1-8 为 *Didymella-combreti*, 亚隔孢壳科 (*Didymellaceae*) 该科中大多数种属为植物病原菌, 可侵染多种植物导致病害^[17], 因此暂不进行后续的研究。

2.3 菌株 ZY-50 不同温度下产纤维素酶能力

因菌株 ZY-50 在 4°C 下未测定出纤维素酶活力, 本研究将探讨 28°C、16°C 和 10°C 下菌株产纤维素酶的能力。内切 β-葡聚糖酶是参与纤维素降解反应第一步的酶类^[18], 作用于纤维素内部的无定型区域, 它们随机攻击纤维素链中分子间的 β-1,4-糖苷键, 从而产生新的链端, 活力通常也较高于其他纤维素酶。

如图 4 所示为菌株 ZY-50 在 28°C、16°C 和 10°C 下内切 β-葡聚糖酶活力。28°C 下酶活力在 5 d 达到最高峰值为 76.03 U mL⁻¹, 后下降。16°C 下, 5 ~ 13

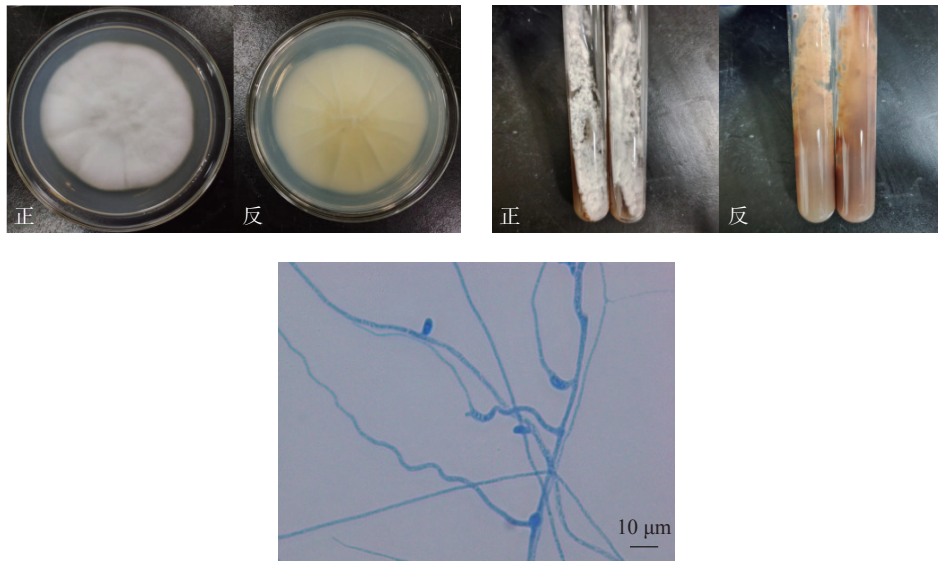


图 2 菌株 ZY-50 的形态学特征

Fig.2 Morphological characteristics of strain ZY-50

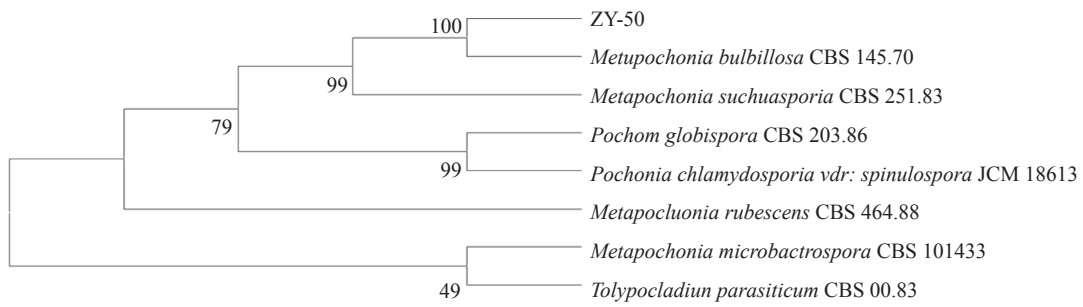
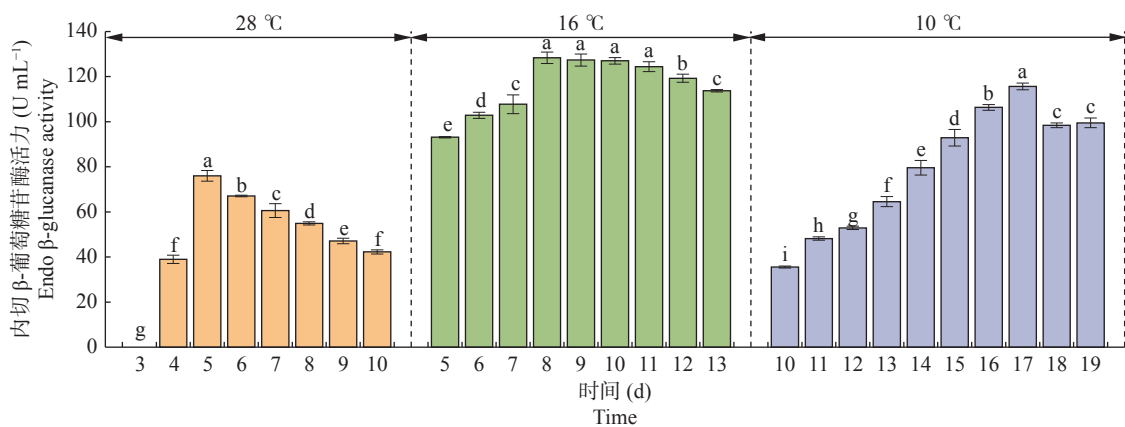


图 3 菌株 ZY-50 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain ZY-50



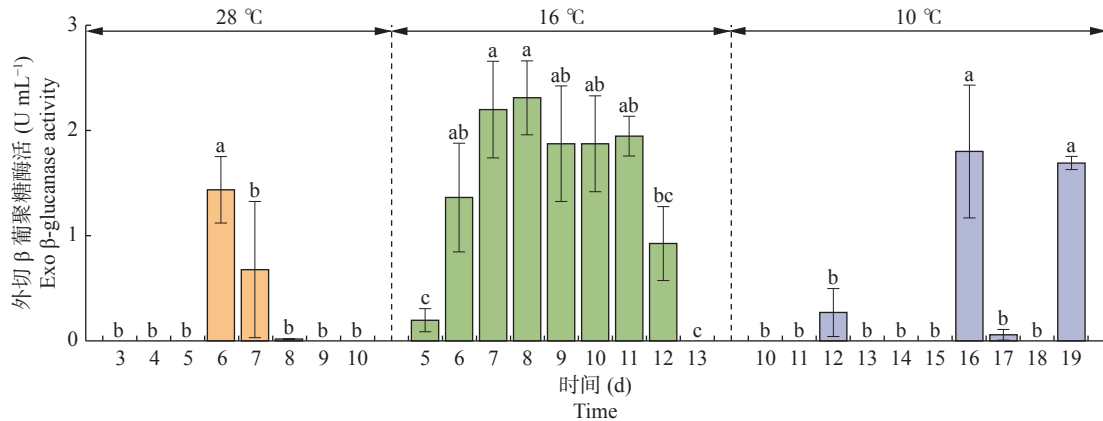
注: 不同小写字母表示相同温度下不同天数内切 β-葡聚糖酶活力多重比较结果 (P < 0.05)

图 4 菌株 ZY-50 在 28 °C (3 ~ 10 d)、16 °C (5 ~ 13 d) 和 10 °C (10 ~ 19 d) 下内切 β-葡聚糖酶活力

Fig.4 Endo β-glucanase activity of strain ZY-50 at 28 °C (3 ~ 10 d), 16 °C (5 ~ 13 d) and 10 °C (10 ~ 19 d)

d 酶活力保持在 93.12 ~ 128.34 U mL⁻¹, 8 d 达到最高 128.34 U mL⁻¹. 10 °C 下, 酶活力在 17 d 达到最高为 115.67 U mL⁻¹. 内切 β-葡聚糖酶活力测定结果发

现, 菌株 ZY-50 最高酶活力为 16 °C > 10 °C > 28 °C. 外切 β-葡聚糖酶: 作用于纤维素线状分子的末端, 每次切下 1 个纤维二糖分子, 又称纤维二糖水



注:a、b、c表示相同温度下不同天数外切β-葡聚糖酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

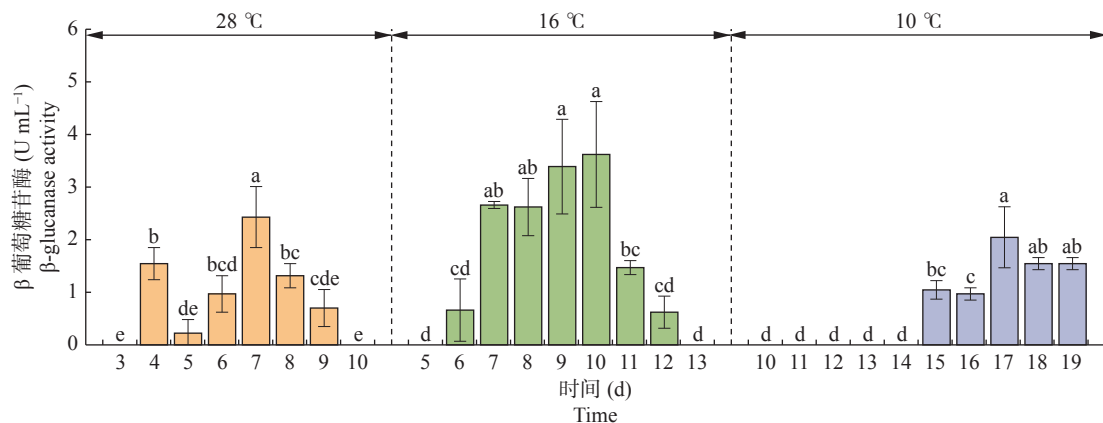
图5 ZY-50在28°C(3~10 d)、16°C(5~13 d)和10°C(10~19 d)下外切β-葡聚糖酶活力

Fig.5 Exo β-glucanase activity of strain ZY-50 at 28°C (3~10 d), 16°C (5~13 d) and 10°C (10~19 d)

解酶。图5所示为菌株ZY-50在28°C、16°C和10°C下外切β-葡聚糖酶活力。28°C下6~7 d有酶活产生;16°C下酶活力逐渐上升并于7~11 d稳定,峰值活力为2.31 U mL⁻¹;10°C下12、16、18、19 d有酶活力产生。不同温度下酶活力测定结果表明,菌株ZY-50在16°C下具有较稳定的产外切β-葡聚糖酶的能力。

β-葡萄糖苷酶:该酶水解纤维二糖或可溶性纤

维糊精,生成葡萄糖。如图6所示为菌株ZY-50在28°C、16°C和10°C下β-葡萄糖苷酶活力。28°C下,酶活力于4 d先下降后上升至7 d达到峰值2.43 U mL⁻¹,之后下降;16°C下在第5 d开始产生酶活,逐渐升高至10 d达到3.61 U mL⁻¹后下降;10°C下,15~19 d酶活力在1.04~2.04 U mL⁻¹。不同温度下酶活力测定结果表明,菌株ZY-50在16°C下具有较稳定的产β-葡萄糖苷酶的能力。



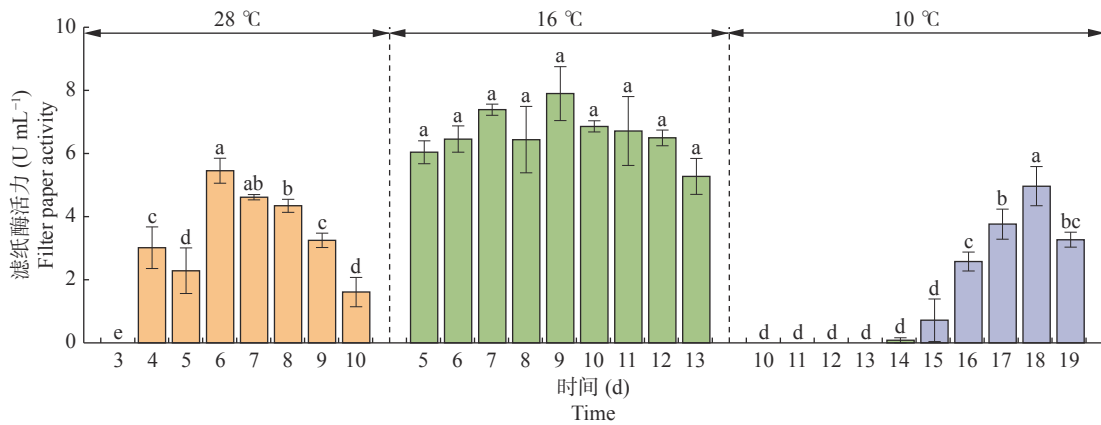
注:a、b...e表示相同温度下不同天数β-葡萄糖苷酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

图6 菌株ZY-50在28°C(3~10 d)、16°C(5~13 d)和10°C(10~19 d)下β-葡萄糖苷酶活力

Fig.6 β-Glucosidase activity of strain ZY-50 at 28°C (3~10 d), 16°C (5~13 d) and 10°C (10~19 d)

滤纸是聚合度和结晶度都居“中等”的纤维性材料,以其为底物经纤维素酶水解后生成还原糖的量表征纤维素酶系总的糖化能力,此方法得到广泛应用,反映了内切β-葡聚糖酶、外切β-葡聚糖酶、β-葡萄糖苷酶三种酶的共同作用,通称滤纸酶活(FPA)。不同型号滤纸结果相差很大^[19],本研究使用国内常用的新华一号滤纸。图7为菌株ZY-50在

28°C、16°C和10°C下的滤纸酶活力,28°C下,酶活力于4 d产生,6 d达到最高值5.4 U mL⁻¹后逐渐降低;16°C酶活力较稳定随时间变化不大,9 d活力最高为7.89 U mL⁻¹;10°C下,13 d酶活力逐渐升高至18 d达到4.96 U mL⁻¹。滤纸酶活力结果表明,菌株ZY-50在16°C下内切β-葡聚糖酶、外切β-葡聚糖和β-葡萄糖苷酶的共同作用较强并稳定。



注:a、b、c、d表示相同温度下不同天数滤纸酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

图 7 菌株 ZY-50 在 28°C (3 ~ 10 d)、16°C (5 ~ 13 d) 和 10°C (10 ~ 19 d) 下滤纸酶活力

Fig.7 FPA activity of strain ZY-50 at 28°C (3 ~ 10 d), 16°C (5 ~ 13 d) and 10°C (10 ~ 19 d)

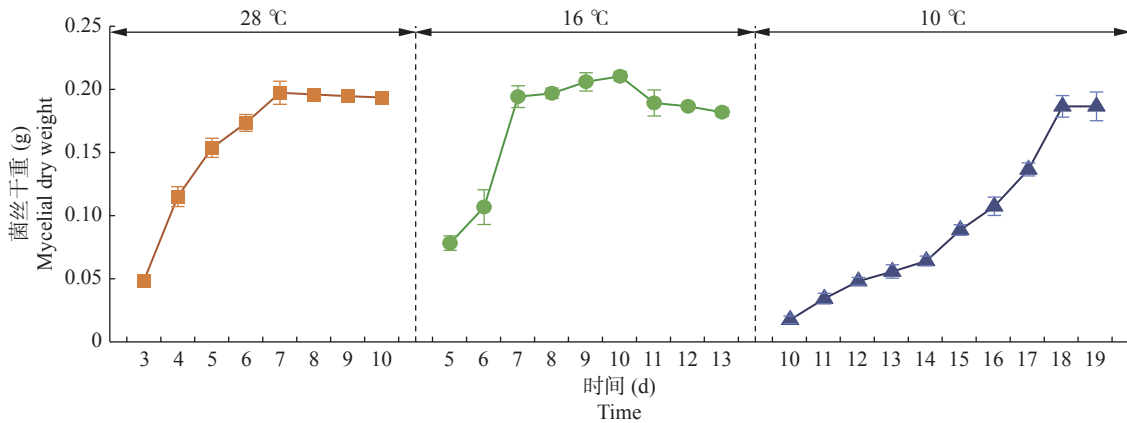


图 8 菌株 ZY-50 在 28°C (3 ~ 10 d)、16°C (5 ~ 13 d) 和 10°C (10 ~ 19 d) 下生长曲线

Fig.8 The growth curve of strain ZY-50 at 28°C (3 ~ 10 d), 16°C (5 ~ 13 d) and 10°C (10 ~ 19 d)

2.4 菌株 ZY-50 生长曲线

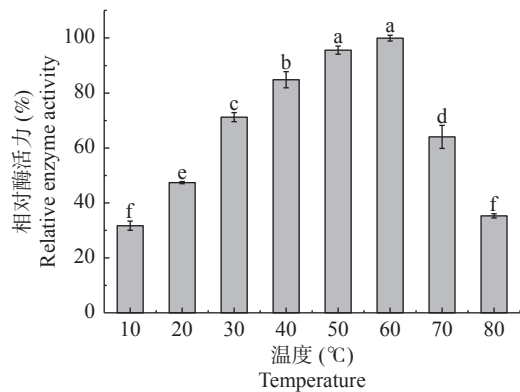
菌株 ZY-50 在 28°C (3 ~ 10 d)、16°C (5 ~ 13 d)、10°C (10 ~ 19 d) 下的生长曲线如图 8。28°C 下 3 ~ 7 d 时, 菌株 ZY-50 菌丝生长繁殖较快, 最大生物量为 0.197 g; 16°C 下, 菌丝在 6 ~ 7 d 增长迅速, 7 d 后生长稳定平缓, 10 d 到最大生物量 0.210 g; 10°C 下, 菌丝在 13 ~ 18 d 逐渐生长, 18 ~ 19 d 之后生长缓慢, 最大生物量为 0.186 g。

实验室中的生长速率可能不能反映自然界中的生长速率, 但在受控条件下记录生长速率可以进行标准化性状测量, 并可以提高我们对真菌生态学的理解^[20]。菌株 ZY-50 在 28°C 下繁殖速度较快, 但在 16°C 下菌丝干重质量最高, 结合菌株 ZY-50 产纤维素酶情况表明该菌株低温生长良好并具有更强产酶的能力。

2.5 菌株 ZY-50 酶学性质探究

2.5.1 反应温度对内切 β-葡聚糖酶性质的影响 结

果表明 (图 9), 在 10 ~ 80°C 的温度范围下, 菌株 ZY-50 的内切 β-葡聚糖酶活力随温度的升高而升高, 在 60°C 达到最高后酶活力下降, 60°C 为最适合酶促反应温度, 根据该温度判断菌株 ZY-50 所产的内切



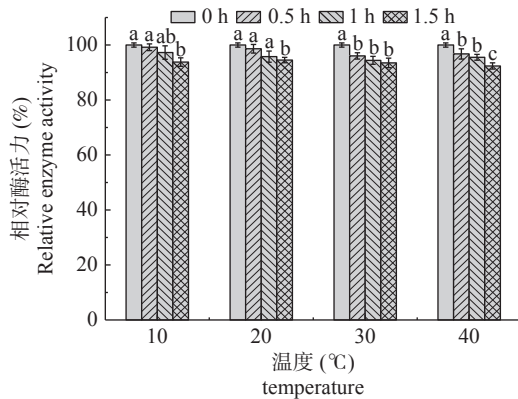
注:不同小写字母表示不同温度下酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

图 9 温度对酶活力的影响

Fig.9 Effects of temperature on the enzyme activities

β -葡聚糖酶为常温纤维素酶,其低温 10~20℃ 相对酶活力约为 30~50%。

2.5.2 内切 β -葡聚糖酶热稳定性 10℃、20℃、30℃ 和 40℃ 下,菌株 ZY-50 内切 β -葡聚糖酶在保温 0.5 h、1 h 和 1.5 h 的热稳定性如图 10 所示,保温 1.5 h 内的相对酶活都在 90% 以上,这说明内切 β -葡聚糖酶在低温及常温下均可以保持较高的稳定性。

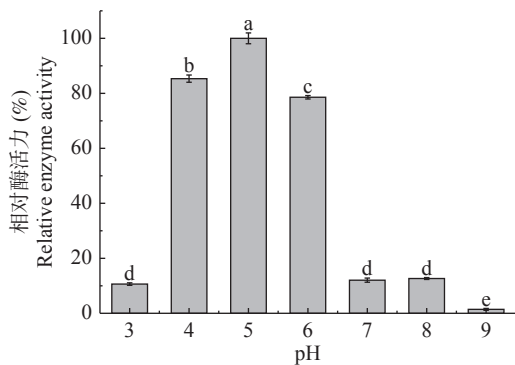


注:a、b、c 表示不同温度下酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

图 10 酶活力的热稳定性

Fig.10 Thermal stability on enzyme activities

2.5.3 pH 对内切 β -葡聚糖酶性质的影响 如图 11 所示,菌株 ZY-50 产内切 β -葡聚糖酶的相对酶活力随着 pH 的升高而升高,在 pH 为 5.0 时,达到最高,之后随着 pH 的升高相对酶活降低,该酶最适 pH 为 5.0,在 pH 4.0~6.0 具有较高活力。该酶为酸性纤维素酶,在偏酸性环境较稳定。

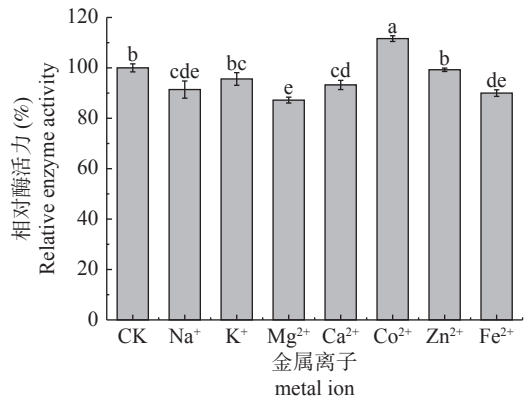


注:不同小写字母表示不同 pH 下酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

图 11 pH 值对酶活力的影响

Fig.11 Effects of pH on the enzyme activities

2.5.4 金属离子对内切 β -葡聚糖酶性质的影响 10 mmol L⁻¹ 金属离子对内切 β -葡聚糖酶活力的结果如图 12,其中 Co²⁺ 是对酶活里有促进作用的金属离子,相对酶活为 112%。金属离子 K⁺、Zn²⁺ 对酶活的影响



注:a、b、c、d 表示不同金属离子对酶活力多重比较结果 ($P < 0.05$)

图 12 金属离子对酶活力的影响

Fig.12 Effects of metal ion on the enzyme activities

响较小,金属离子 Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺ 对酶活抑制作用。

3 讨论

秸秆腐熟剂是一种能够快速降解秸秆的微生物菌剂,利用微生物的代谢作用将秸秆分解为有利于下茬作物吸收的营养物质,而低温秸秆降解菌种资源有限。陆水凤^[21]等在低温条件下添加低温菌剂,在还田过程中促进秸秆降解,并对土壤理化性质有一定的改善。

农作物秸秆中的纤维素含量较高,能够高效产纤维素酶的菌株是菌剂的主要组成成分。刚果红染色法被广泛应用于纤维素降解微生物的筛选研究,但不能代表微生物的产酶能力^[22],本研究发现,菌株 ZY-50 虽然水解圈较小,但在产酶培养基中分泌的内切 β -葡聚糖酶活力很高,Liang 也报道水解圈直径可能不能准确反映真实的纤维素酶活性^[23]。

当前大部分微生物降解纤维素的研究集中在同一温度下,高温、常温或低温,多数研究者仅针对一个温度对所筛选的菌株进行探究。从王一菲等人对东北黑土区农地土壤温度变化特征研究可知,11月至翌年四月 5~60 cm 土层土壤温度-10~10℃^[24],王风等人研究中可知春秋冬季黑土区土壤春秋(0~60 cm)温度为-20~20℃^[25],结合东北气候温度特征,本试验选择 4℃、16℃、28℃ 来进行降解菌株产纤维素酶的初步评价。结合菌株的特征进一步在多种温度下(10℃、16℃、28℃)对所筛选出来降解菌的产酶能力进行分析评价,为菌株 ZY-50 在自然环境中不同温度下的降解能力提供对应的理论依据,更适合东北地区春秋季节的实际情况。菌株 ZY-

50 在 16℃ 下产内切 β -葡聚糖酶、外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶能力均较 28℃ 和 10℃ 强, 可以反应这三种酶共同作用的滤纸酶活力出现同样的结果, 表明菌株 ZY-50 在 16℃ 具有较强的产纤维素酶的能力。菌株 ZY-50 最先产生且主要产内切 β -葡聚糖酶, 其活力远高于外切 β -葡聚糖酶活力和 β -葡萄糖苷酶活力。菌株 ZY-50 在 28℃ 内切 β -葡聚糖酶最高酶活力为 76.03 U mL⁻¹, 在低温 16℃ 下酶活力更强, 最高酶活力为 128.34 U mL⁻¹, 活力高于高云航分离的椭圆葡萄孢菌 23℃ 下酶活力最高为 59.7 U mL⁻¹[26], 较高于张梦君筛选的青霉菌, 其内切 β -葡聚糖酶活力 16℃ 下最高达 72.07 U mL⁻¹[27]。菌株 ZY-50 在 10℃ 下产内切 β -葡聚糖酶活力为 115.67 U mL⁻¹, 活力高于李春艳分离的节杆菌属细菌在 10℃ 下内切 β -葡聚糖酶最高活力 14.12 U mL⁻¹[28]。

酸碱度和温度是影响真菌纤维素酶活性的重要因素, 在对菌株 ZY-50 所产内切 β -葡聚糖酶的性质进行初步探究中, 可得内切 β -葡聚糖酶的活性温度范围较广, 耐受范围在 10~80℃ 之间, 温度稳定性较高, 在环境偏酸性下的酶活性表达更好。

孟建宇等人在 4℃ 下构建出 27 个低温降解复合系, 滤纸酶活性可达 158.02 U mL⁻¹[29]。菌株 ZY-50 在此温度下生长缓慢, 有待对菌株 ZY-50 进行低温驯化和极限低温产纤维素酶及菌剂复配的研究。在实际的降解应用中, 最好和其他高产外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的菌株复配, 多组分酶共同合作, 发挥最大功效。

在波兰苏格兰松枯木中真菌的丰度和多样性调查中, *Metapochonia-bulbillosa* 多次从被砍伐的木材中被分离出来[30]。从菌株 ZY-50 可生长的温度和生长速度判定, *Metapochonia-bulbillosa* 属于耐冷菌, 因为生长环境温度较低(大兴安林地区年均气温在 -4℃~-6℃[31]), 菌株 ZY-50 适应低温环境, 所以在低温下菌株 ZY-50 生长虽慢, 但总生物量高, 在低温下的纤维素酶活力更稳定, 作用能力更强。

Metapochonia 属通常在线虫防治上研究较多, 在抗真菌、抗病毒和抗寄生虫活性的生物活性次级代谢物方面具有潜力[32]。罗荣耀等[33]就药用植物来源的内生真菌 *Metapochonia-bulbillosa* XQ-4 次生代谢产物的研究, 得到的部分产物具有抗菌活性。本研究是首次对真菌 *Metapochonia-bulbillosa* 的纤维素降解能力进行探索研究, 后续将在低温下优化菌株发酵条件, 对其抗线虫及其他生物防治方面的功能

进行挖掘, 开发出即能加速秸秆腐解又能在一定程度防治秸秆腐解过程中病虫害的功能性秸秆腐熟菌剂, 为东北地区低温环境下的秸秆腐熟菌剂提供优良菌株, 提高土壤肥力和秸秆还田效果。

4 结论

从大兴安岭针阔混交林半分解区混合物中分离筛选到一株高效产纤维素酶的耐低温真菌 ZY-50, 鉴定菌株 ZY-50 为球芽异普可尼亚菌 (*Metapochonia-bulbillosa*)。该菌株 ZY-50 可在低温条件下生长并具有较强产纤维素酶能力, 其内切 β -葡聚糖酶活力在 28℃、16℃、10℃ 温度下分别为 76.03 U mL⁻¹、128.34 U mL⁻¹ 和 115.67 U mL⁻¹; 菌株 ZY-50 在 16℃ 下产外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的较稳定, 最高分别为 2.31 U mL⁻¹、2.43 U mL⁻¹; 16℃ 下的滤纸酶活最高为 7.89 U mL⁻¹。粗酶提取物内切 β -葡聚糖酶最适作用温度为 60℃; 在 10~40℃ 的温度下, 在 1.5 h 内相对酶活为 90%; 最适 pH 为 5.0; 10 mmol L⁻¹ Co²⁺ 对其活性有显著的促进作用。该菌种是一株具有潜在应用价值的耐低温纤维素降解菌资源。

参考文献:

- [1] Zheng G, Yin T, LU Z, et al. Degradation of rice straw at low temperature using a novel microbial consortium LTF-27 with efficient ability[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304: 123064.
- [2] 毕于运. 秸秆资源评价与利用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [3] 姜 延, 李思达, 马秀兰, 等. 东北黑土区农业废弃物资源化利用研究进展[J]. *吉林农业大学学报*, 2022, 44(6): 706-716.
- [4] 匡恩俊, 迟凤琴, 宿庆瑞, 等. 3种腐熟剂促进玉米秸秆快速腐解特征[J]. *农业资源与环境学报*, 2014, 31: 5.
- [5] 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): 58-62.
- [6] Fu X, Liu P, Lin L, et al. A Novel Endoglucanase (Ce19P) From a Marine Bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2010, 160(6): 1627-1636.
- [7] 勾长龙, 王雨琼, 王 巍. 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[J]. *中山大学学报自然科学版*, 2015, 54(5): 115-121.
- [8] Gupta V K, Kubicek C P, Berrin J G, et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(7): 633-645.
- [9] Wu D, Wei Z, Gao X, et al. Reconstruction of core microbes based on producing lignocellulolytic enzymes causing by bacterial inoculation during rice straw composting[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315:

- 123849.
- [10] 邱天艺,徐悦,甄锦程,等.大兴安岭森林凋落物的活性真菌及其代谢产物研究[J].*中国农学通报*,2022,038.(18):122-127.
- [11] 沈萍.微生物学实验.第5版[M].北京:高等教育出版社,2018,63-64.
- [12] 安琪,员瑗,戴玉成,等.木质纤维素降解真菌菌株筛选及对玉米秸秆的生物降解研究[J].*菌物学报*,2022,42(3):782-792.
- [13] Zhang G, Dong Y. Design and application of an efficient cellulose-degrading microbial consortium and carboxymethyl cellulase production optimization[J].*Front Microbiol*,2022,13:957444.
- [14] 穆春雷,武晓森,李术娜,等.低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及纤维素酶学性质[J].*微生物学通报*,2013,40(7):1193-1201.
- [15] 中华人民共和国国家发展和改革委员会.QB 2583-2003.纤维素酶制剂[S].轻工业标准化编辑出版委员会.2003.
- [16] 赵钰.产纤维素酶菌株的筛选及酶学性质研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2017.
- [17] 陈倩,蔡磊.亚隔孢壳科系统学与多样性研究[C].中国菌物学会第七届全国会员代表大会暨2017年学术年会摘要集,2017:20.
- [18] 李媛,张丽,陈安琪,等. *Thermotoga* sp. RQ7内切纤维素酶 TsCell12A 蛋白的酶学性质和晶体学研究[J].*复旦学报(自然科学版)*:2019,58(4):489-496.
- [19] 刘洁,李宪臻,高培基.纤维素酶活力测定方法评述[J].*工业微生物*,1994,24(4):27-32.
- [20] Aguilar-Trigueros C A, Hempel S, Powell J R, et al. Branching out: towards a trait-based understanding of fungal ecology[J].*Fungal Biology Reviews*,2015,29(1):34-41.
- [21] 陆水凤,王呈玉,王天野,等.玉米秸秆配施菌剂还田对土壤养分及腐殖质组成的影响[J].*江苏农业学报*,2019,35(4):834-840.
- [22] Teather R M, Wood P J. 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.
- [23] Liang Y L, Zhang Z, Wu M, et al. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1[J].*BioMed Research International*,2014,2015(5):512497.
- [24] 王一菲,郑粉莉,周秀杰,等.黑土农田冻结-融化期土壤剖面温度变化特征[J].*水土保持通报*,2019,39(3):57-64.
- [25] 王风,宋春雨,韩晓增.东北黑土区土壤温度变化特征[J].*黑龙江农业科学*,2006,(6):31-33.
- [26] 高云航,勾长龙,王雨琼,等.1株高效低温纤维素分解菌的分离鉴定及产酶条件优化[J].*中国兽医杂志*,2014,(12):77-79.
- [27] 张梦君,邱晨浩,柴立伟,等.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.
- [28] 李春艳,于琦,冯露,等.低温纤维素降解菌分离鉴定及产酶条件优化[J].*东北农业大学学报*,2015,46(10):74-81.
- [29] 孟建宇,冀锦华,贾丽娟,等.基于三种碳源筛选低温纤维素降解菌及其复合系的降解能力分析[J].*生物技术通报*,2019,35(8):77-84.
- [30] Otto E C, Held B W, Gould T J, et al. Fungal diversity in multiple post-harvest aged red pine stumps and their potential influence on *Heterobasidion* root rot in managed stands across Minnesota[J].*Frontiers in Fungal Biology*,2021:63.
- [31] 张先亮,崔明星,马艳军,等.大兴安岭库都尔地区兴安落叶松年轮宽度年表及其与气候变化的关系[J].*应用生态学报*,2010,21:2501-2507.
- [32] Labuda R, Bacher M, Gratzl H, et al. Luteapyrone, a novel γ -pyrone isolated from the filamentous fungus *metapochonia lutea*[J].*Molecules*,2021,26(21):6589.
- [33] 罗荣耀,张颖帆,陈德坤,等.香青内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4的次级代谢产物研究[J].*中草药*,2022,20(10):2217-2222.

Screening and Identification of Cold-adapted Fungi with Cellulose Degradation and Its Enzymatic Properties

QI Xiao-xuan^{1,2}, ZHANG Yang¹, ZHAO Shuang², HAN Si-qin², LIANG Xiao-long², ZHANG Ying^{2*}

(1. Shenyang Normal University College of Life Science, Shenyang 110034, China;

2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: **[Objective]** The aim was to screen strain resources for efficient cellulose degradation and to promote rapid decomposition of straw at low temperature. **[Method]** Low-temperature cellulose degrading fungi were screened by using low-temperature dilution plate coating method, Congo red characterization and quantification of endo- β -glucanase activities. The strains were identified based on morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis, their enzyme production capacities at different temperatures were investigated, and preliminary studies on the enzymatic properties of crude enzyme extracts were conducted. **[Result]** ① A cold-adapted fungus, namely ZY-50, was obtained and identified as *Metapochonia-bulbillosa*. There are no reports of cellulase production by this fungus. ② *Metapochonia-bulbillosa* ZY-50 could grow at low temperatures and has strong cellulase production ability. Its Endo β -glucanase activities were 76.03 U mL⁻¹, 128.34 U mL⁻¹ and 115.67 U mL⁻¹ at 28°C, 16°C and 10°C respectively, and the abilities of the fungus to produce Exo β -glucanase and β -Glucosidase were more stable at 16°C. The highest activities of them were 2.31 U mL⁻¹ and 2.43 U mL⁻¹. The synergistic effect of the three cellulases was stronger at 16°C, with the highest filter paper activity of 7.89 U mL⁻¹. ③ The endo- β -glucanase of the crude enzyme extract had an optimum action temperature of 60°C. The relative enzyme activity was 90% within 1.5 h at temperatures between 10 and 40°C. The optimum pH was 5.0, and its activity was promoted by 10 mmol L⁻¹ Co²⁺. **[Conclusion]** *Metapochonia-bulbillosa* ZY-50 can grow at low temperature and has a strong cellulase production ability, which has a high potential to promote straw decomposition at low temperature.

Key words: Straw decomposition; Low temperature; Cellulase; Fungi

[责任编辑: 刘轶飞]