

一株产纤维素酶嗜盐真菌的筛选、鉴定及其酶学性质研究

李馨伟, 杨力权, 李 蕾, 杨润芬, 范诗源, 桑 鹏, 尹以瑞*

大理大学农学与生物科学学院, 云南 大理

收稿日期: 2022年5月13日; 录用日期: 2022年6月15日; 发布日期: 2022年6月23日

摘 要

本研究从青海茶卡盐湖来源样品中纯化出一批嗜盐真菌, 通过刚果红染色法初步筛选可降解纤维素的菌株, 利用DNS测定法进一步筛选, 获得一株产纤维素酶能力较强的菌株, 命名为F33。通过形态观察和ITS rRNA序列比较分析, 初步鉴定该菌株为枝孢属(*Cladosporium* sp.) (GenBank登录号: ON318389)。使用玉米杆作为碳源进行诱导, 收集发酵液对其分泌的纤维素酶进行酶学性质研究, 发现菌株F33来源纤维素酶最适反应温度为45℃、最适pH为4.0, 盐浓度在0~3.0 mol/L时, 保持50%以上的相对活性。此外, Mn^{2+} 对该菌株所产的纤维素酶有较强的促进作用, 而化学试剂十二烷基硫酸钠(SDS)对其有明显的抑制作用, 在标准条件下测得总酶活力达到 0.54 ± 0.03 U/mL。这些性质说明菌株F33所产纤维素酶系具有嗜酸、耐盐的特性, 预示着其在食品、饲料、纺织、造纸业等领域有广阔的应用前景。

关键词

嗜盐菌, 纤维素酶, 酶学性质, 产酶条件

Screening and Identification of a Halophilic Fungi and Its Optimization of Cellulase Production

Xinwei Li, Liqun Yang, Lei Li, Runfen Yang, Shiyuan Fan, Peng Sang, Yirui Yin*

College of Agriculture and Biological Science, Dali University, Dali Yunnan

Received: May 13th, 2022; accepted: Jun. 15th, 2022; published: Jun. 23rd, 2022

Abstract

In this study, a batch of halophilic fungi were purified from the samples from the Chaka salt lake in

*通讯作者。

文章引用: 李馨伟, 杨力权, 李蕾, 杨润芬, 范诗源, 桑鹏, 尹以瑞. 一株产纤维素酶嗜盐真菌的筛选、鉴定及其酶学性质研究[J]. 微生物前沿, 2022, 11(2): 90-101. DOI: 10.12677/amb.2022.112011

Qinghai, and the degradable cellulose strains were preliminarily screened by Congo red staining, and further screened by DNS assay to obtain a strain with strong cellulase-producing ability F33. Through morphological observation and comparative analysis of ITS rRNA sequences, the strain was preliminarily identified as a *Cladosporium* sp. (GenBank accession number: ON318389). The use of corn stalks as a carbon source for induction, the collection of fermentation broth and the enzymatic properties of the cellulase secreted by it were found that the optimal reaction temperature of cellulase from F33 source was 45°C, the optimal pH was 4.0, and there was more than 50% enzyme activity within 0~3.0 mol/L NaCl. In addition, Mn^{2+} has a strong promoting effect on the cellulase produced by this strain, and the chemical reagent sodium lauryl sulfate (SDS) has a significant inhibitory effect on it, and the total enzyme activity measured under standard conditions reaches 0.54 ± 0.03 U/mL. These properties indicate that the cellulase produced by strain F33 has the characteristics of acidophilicity and salt tolerance, indicating that it has broad application prospects in the fields of food, feed, textile, and paper industry.

Keywords

Halophilic Fungi, Cellulase, Enzymatic Properties, Enzyme-Producing Conditions

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着时代的快速发展和生活质量的提高,环境问题逐渐成为人们关注的热点问题。纤维素废弃物是日常生活中常见的废弃物,一般通过室外焚烧进行处理,而焚烧产生的大量温室气体和颗粒物是导致空气质量降低、雾霾天气增多以及全球变暖等问题的主要“元凶”[1]。研究发现,纤维素酶可作为纤维素废弃物的水解酶,能将其有效降解,不仅解决了环境污染问题,还在食品、饲料、纺织、造纸业等领域有广阔的应用前景[2] [3]。

鉴于盐碱地区土壤的理化性质,盐碱化土壤含盐量较大,植物凋谢物是盐碱化土壤营养物的主要来源之一,纤维素是植物凋谢物的主要成分之一[4]。因此筛选出可降解纤维素的耐盐菌对解决盐碱地区的资源循环利用问题和环境污染问题具有重要意义。嗜盐真菌与其他极端微生物相比更易培养,且对菌培养条件要求不苛刻,具有很大的发展潜能[5]。已有文献报道:在高盐环境生长的真菌 *Penicillium* sp. NICS01 可以作为生物肥料和生物防治剂来改善植物生长,提高植物抵抗盐斜坡和枯萎病病菌感染的能力[6];工业上使用的嗜盐酶很多也都是来自嗜盐菌,嗜盐酶因其特殊的活性,可应用于处理海产品、酱制产品以及化工、制药、石油、发酵等排放含高浓度无机盐废水的工业部门[7]。

本研究从盐碱地区筛选出具有生产嗜盐性纤维素酶的菌株,并对其最适温度、pH 等酶学性质进行探究,为该菌种的选育和实际应用提供了理论基础,为耐盐纤维素酶的开发和应用提供依据。

2. 材料与方

2.1. 实验材料

样品采自青海茶卡盐湖的泥层土样 100 g,海拔 3059 m,北纬 36°20'60",东经 99°02'21"。

2.2. 产纤维素酶真菌菌株的筛选

通过稀释涂布法(10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-4})对样品进行初筛,将 150 μ L 的稀释菌悬液涂布到 2.5%和 5%盐浓

度的 PDA 固体培养基中倒置培养 3 d [8], 挑取单菌落菌丝四区划线法直至得到纯化菌种; 复筛通过刚果红染色法[9], 选取水解圈与菌圈直径比(D/d 值)较大的菌株于恒温摇床中 27℃、180 r·min⁻¹ 液体发酵, 4 d 后 4℃、8000×g 离心 15 min 取上清作为粗酶液进行酶活力测定[10] [11]。结合 D/d 值和酶活力大小确定高产纤维素酶菌株。液体发酵培养基: 10 g·L⁻¹ 羧甲基纤维素钠(CMC)、4 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、1.2 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、1 g·L⁻¹ KH₂PO₄、1 g·L⁻¹ K₂HPO₄、1 g·L⁻¹ NaNO₃、0.5 g·L⁻¹ 酵母粉、50 g·L⁻¹ NaCl/25 g·L⁻¹ NaCl。

2.3. 产纤维素酶真菌菌株的形态观察

制作高产纤维素酶菌株的玻片[12]在显微镜下观察其菌体形态。

2.4. 产纤维素酶真菌菌株的分子生物学鉴定

挑取少量真菌菌丝于 25 μL 含 2% CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)的 TE 缓冲液(pH 8.5)中, PCR 仪中 98℃裂解 30 min, 10,000×g 离心 10 min, 取上清液作为真菌基因组模板。利用真菌核糖体 RNA 基因间隔区序列(ITS)通用引物(ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC, ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG), 使用 Taq 酶进行 PCR 扩增。利用琼脂糖凝胶电泳跑出 DNA 条带后, 送擎科生物科技有限公司进行测序。测序获得序列与 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中序列进行比对, 利用 MEGAX 的邻位法(Neighbor joining)构建系统发育树, 根据菌株间的亲缘关系确定菌株的种属[13] [14]。

2.5. 菌株产酶最适碳源的筛选

将筛选出的高产纤维素酶菌株(F33)接种于 100 mL 初始 pH 为 7.0, 1%不同碳源(小麦、玉米、稻秆、杨木、松木)的产酶发酵液中 28℃、180 r·min⁻¹ 培养 96 h 后取样, 对所得粗酶液进行酶活测定[15] [16], 确定其最适碳源。

2.6. 粗酶液中纤维素酶最适反应温度和温度的影响力测定

在已知的最适条件下, 以初始 pH 为 7.0、浓度为 1%的 CMC 作为底物与粗酶液在不同温度下(0℃~90℃)反应相同时间, 以确定 F33 来源纤维素酶最适反应温度[17] [18]。通过将粗酶液在不同温度(40℃、45℃、50℃)下孵育不同时间(0、20、40、60、80、100 min)后, 测定其残留活性[19] [20], 来探究温度对 F33 来源纤维素酶稳定性的影响, 以未处理(0 min)粗酶液为阳性对照(100%)。

2.7. 粗酶液中纤维素酶最适 pH 和 pH 的影响力测定

在已知的最适条件下, 用不同 pH 缓冲液(磷酸二氢钠 - 柠檬酸缓冲液 pH 3.0~8.0、氢氧化钠 - 甘氨酸缓冲液 pH 8.0~10.0)将 CMC 稀释到 1%后, 与粗酶液反应相同时间, 以确定 F33 来源纤维素酶最适反应 pH [21] [22]。将粗酶液与不同 pH 缓冲液(pH 3.0~10.0) 1:1 混合, 在 4℃孵育 12 h 和 24 h 后测其残留活性[23]以确定 pH 对 F33 来源纤维素酶的影响。

2.8. 盐浓度对纤维素酶的影响

在已知的最适条件下, 将 0.5 M、1.0 M、1.5 M、2.0 M、2.5 M、3.0 M、3.5 M 的 NaCl 加入到 1%的 CMC 中作为酶促反应的底物, 取粗酶液测其残留活性[24], 以确定盐浓度对 F33 来源纤维素酶的影响。

2.9. 不同金属离子和抑制剂对纤维素酶活力的影响

在已知的最适条件下, 取粗酶液分别加入 1 mM 和 10 mM 不同金属离子(K⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Ni²⁺、

Ba²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺和 Al³⁺)以及 0.1%和 1%的化学试剂[乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)和二硫苏糖醇(DTT)]进行酶活测定[25],以确定金属离子和抑制剂对 F33 来源纤维素酶的影响,其中无添加剂的反应混合物作为对照(100%)。

2.10. 发酵时间对产纤维素酶的影响

将菌株 F33 种子液,以 1%接种量接种于发酵培养基中,27℃,180 r/min 震荡培养,每 12 h 取上清进行酶活测定[26],以确定 F33 来源纤维素酶的最适发酵时间。

3. 结果与分析

3.1. 产纤维素嗜盐菌的筛选

通过刚果红染色法共筛选出 42 株菌株有透明圈,有 16 株菌圈直径比(D/d 值) > 1,如表 1 所示。其中菌株 F33 在刚果红培养基上的透明圈最大,直径为 90 mm,菌落直径为 210 mm,菌圈直径比(D/d 值)约为 2.33 (图 1)。16 株菌株酶活测定结果如图 2 所示,F28、F33、F53 的纤维素酶活性相对较高,其中 F33 的酶活性最高。

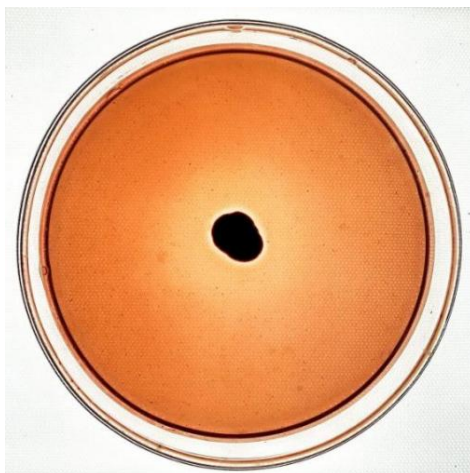


Figure 1. The halophilic cellulase hydrolysis rings by F33 strain
图 1. 菌株 F33 嗜盐纤维素酶水解圈

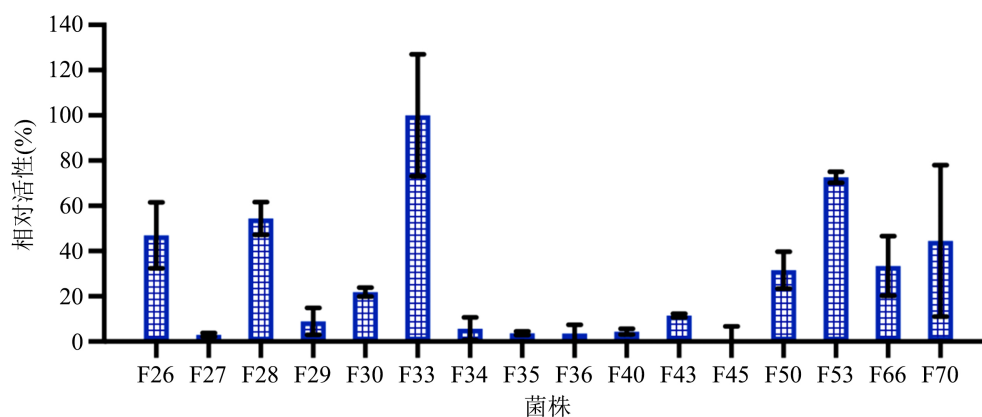


Figure 2. The relatively cellulase activity in fermentation medium of various strains
图 2. 各菌株发酵培养基中相对纤维素酶活力

Table 1. Diameter of hydrolysis circle and cell diameter on Congo red plate of each strain
表 1. 各菌株刚果红平板上水解圈直径以及菌体直径

菌株	透明圈 D (mm)	菌体 d (mm)	透明圈/菌体(D/d)
F26	170	130	1.31
F27	260	240	1.08
F28	280	130	2.15
F29	290	120	2.42
F30	140	120	1.17
F33	210	90	2.33
F34	340	180	1.89
F35	350	20	1.75
F36	210	130	1.62
F40	330	30	1.1
F43	170	130	1.31
F45	190	160	1.19
F50	180	90	2
F53	150	110	1.36
F66	220	130	1.69
F70	240	180	1.33

3.2. 产纤维素酶菌株 F33 的形态特征

用划线法将 F33 接种在 5% NaCl PDA 平板培养基上, 菌落培养 6 d 后(见图 3(a)、图 3(b))。菌落白色至浅棕绿色, 圆形, 绒状。菌丝体表生, 具隔, 分枝, 棕黄色。分生孢子梗直立或微弯曲, 圆柱形, 结节, 隔膜, 简单或分枝, 棕绿色, 粗糙到粘结, 厚壁。产孢细胞单芽生或多芽生, 棕绿色至浅棕色至无色, 梭形。分生孢子浅棕绿色或半透明, 卵形至短椭圆体, 光滑, 厚壁。

3.3. 产纤维素酶菌株 F33 的分子生物学鉴定

通过 ITS 通用引物扩增检测到长度为 543 bp 的 DNA 条带(图 4), 经测序获得 ITS rRNA 核苷酸序列, 序列在线上传至 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), GenBank 登录号: ON318389, 与菌株 *Cladosporium perangustum* F05-01 (登录号: KX664325.1) 同源率为 99.08%。基于菌株 F33 ITS 序列在 NCBI 数据库中同源系列构建系统进化树, 可知菌株 F33 与枝孢菌属聚在一枝, 结合形态学特征, 最终确定 F33 为 *Cladosporium* sp. (图 5)。

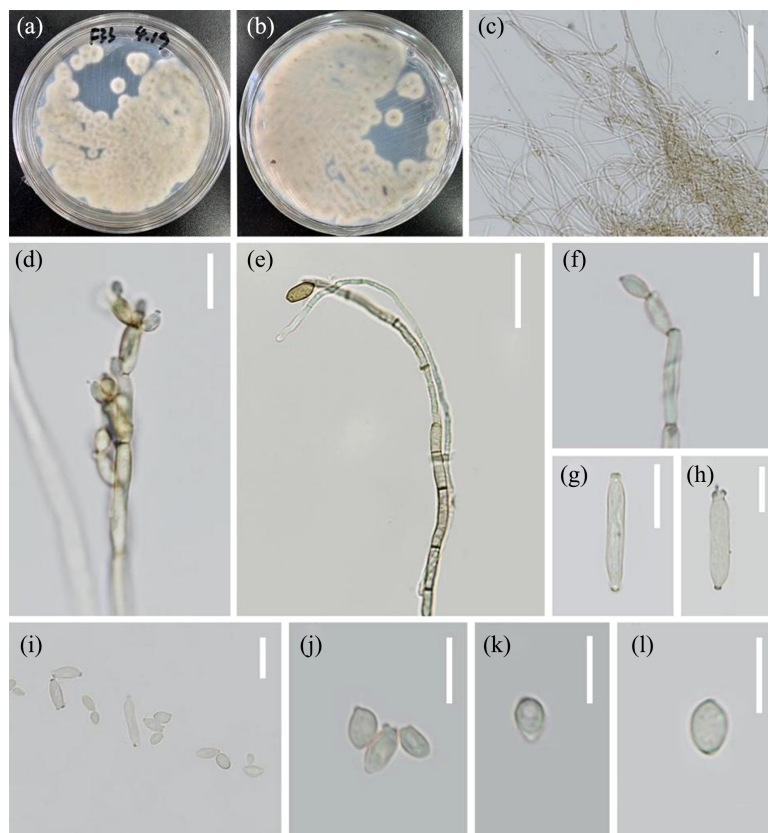


Figure 3. Characteristics of F33 strain colony. (a) colony front; (b) colony back; (c) F33 hyphae (40x); (d)~(e) F33 conidiophores and conidia (100x); (f)~(h) F33 Conodiogenous cells (100x); (i)~(j) F33 conidia (100x). Scale bars: C = 90 μm , D = 20 μm , E = 30 μm , F-L = 10 μm

图 3. 菌株 F33 的表型特征和细胞形态。(a) 菌落正面; (b) 菌落反面; (c) F33 菌丝(40 \times); (d)~(e) F33 分生孢子梗及分生孢子(100 \times); (f)~(h) F33 产孢细胞(100 \times); (i)~(j) F33 分生孢子(100 \times)。标尺: C = 90 μm , D = 20 μm , E = 30 μm , F-L = 10 μm

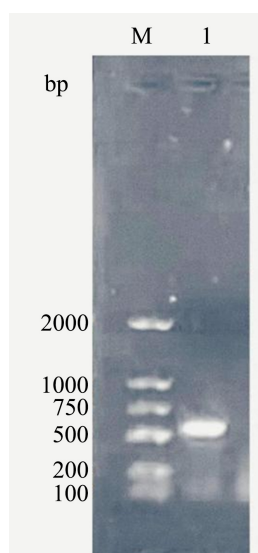


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of the amplification products of F33 gene. M: DNA marker; 1: The amplification products of F33

图 4. F33 基因扩增产物的琼脂糖凝胶检测。M: DNA marker; 1: F33 基因扩增产物

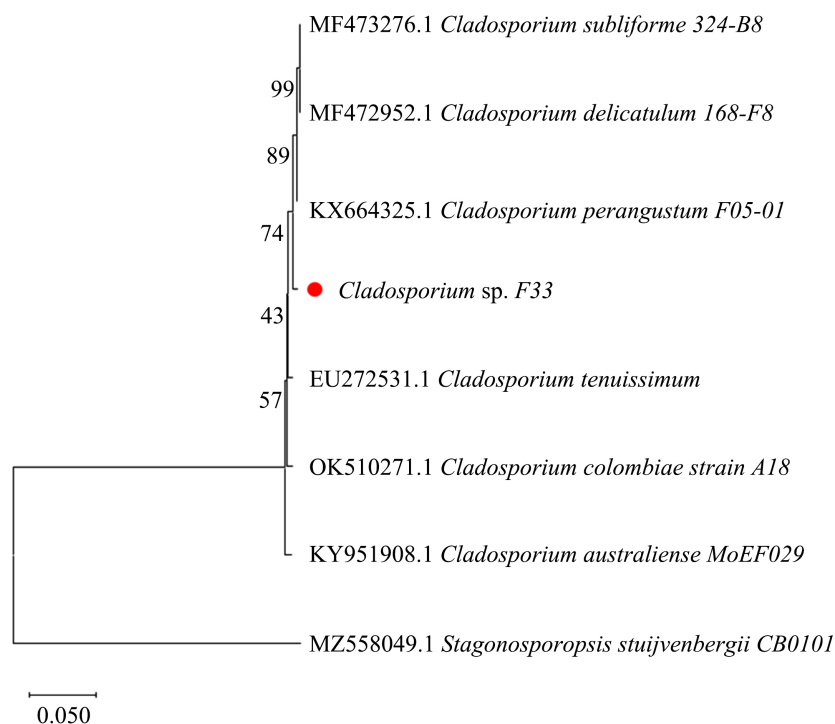


Figure 5. The phylogenetic tree of F33 based on ITS rRNA sequence
图 5. 基于 ITSrRNA 序列同源性构建菌株 F33 的系统进化树

3.4. F33 来源纤维素酶的最适碳源

通过不同碳源发酵后，菌株的产酶量也有所不同(见图 6)，唯一碳源为稻秆、玉米秆以及小麦的活性相对较高，其中玉米秆为菌株 F33 的最适碳源。

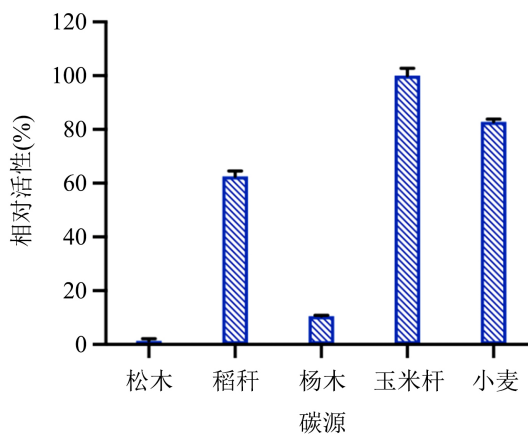


Figure 6. The optimal carbon source of strain F33
图 6. 菌株 F33 的最适碳源

3.5. F33 来源纤维素酶的最适反应温度及其稳定性影响

F33 来源纤维素酶的最适反应温度为 45℃ (图 7(a))。F33 来源粗酶液在 35℃~55℃，表现出最高活性 80% 以上的相对活性；从 0℃~45℃ 菌株 F33 的酶活力在逐步提高，在 45℃ 时达到峰值，45℃ 以后酶活力

开始逐渐失活。随着时间的推移,该酶表现出较高的稳定性,在 40℃、45℃ 和 50℃ 下孵育 120 min 后,分别保留约 82%、73% 和 60% 的相对活性(图 7(b)),说明该酶为中温酶且在 40℃~50℃ 表现出较高的稳定性。

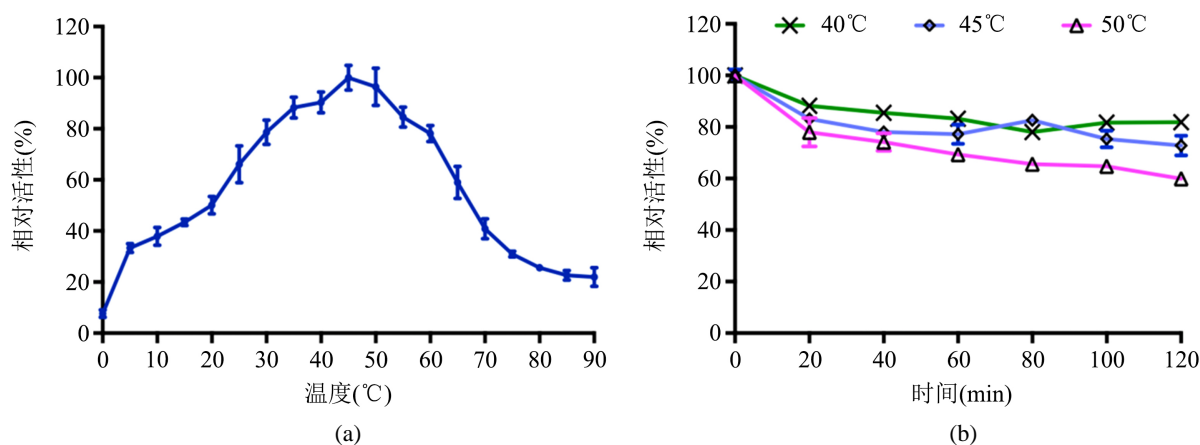


Figure 7. Effects of pH on the cellulase activity (a) and stability (b) of strain F33

图 7. pH 对菌株 F33 来源纤维素酶活性(a)及稳定性(b)的影响

3.6. F33 来源纤维素酶的最适反应 pH 及其稳定性影响

F33 来源纤维素酶的最适反应 pH 为 4.0 (图 8(a)). F33 来源粗酶液在 pH 3.6~9.6 时都有一定的活性 40% 以上的相对活性,酸碱跨度较大;在 pH 3.6~5.6 时表现出最高活性 75% 以上的相对活性。pH 对 F33 来源纤维素酶稳定性的影响表明粗酶液在 pH 4.0~10.0 孵育 24 h 后,表现出较高的稳定性(>75%) (图 8(b)). 说明该酶为嗜酸酶且 pH 稳定性较好。

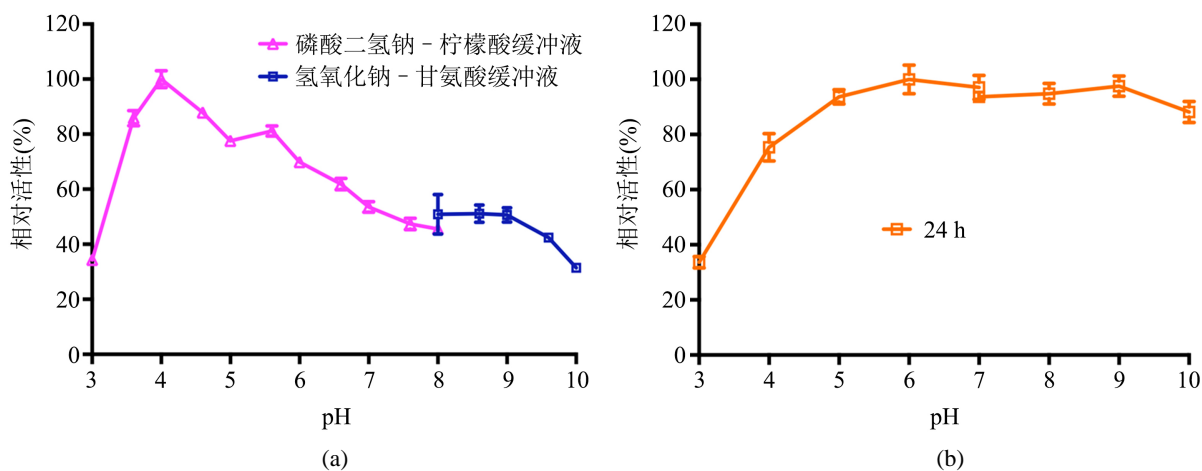


Figure 8. Effects of temperature on the cellulase activity (a) and stability (b) of strain F33

图 8. 温度对菌株 F33 来源纤维素酶活性(a)及稳定性(b)的影响

3.7. 盐浓度对 F33 来源纤维素酶的影响

F33 来源纤维素酶在 0.5~3.0 mol/L NaCl 条件下表现出较好的活性(图 9),在当 NaCl 浓度为 3.0 mol/L 时,仍表现出 50% 以上的相对活性,说明该酶在盐环境有较好的耐受性,其中它的最适盐浓度为 0.5 mol/L NaCl。

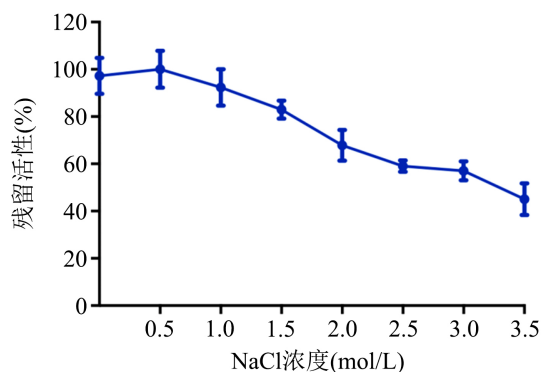


Figure 9. Salt activation of Cellulase F33
图 9. 盐浓度对菌株 F33 来源纤维素酶活性的影响

3.8. 不同金属离子和化学试剂对纤维素酶的影响

在 F33 来源纤维素酶加入 1 mM 金属离子和 0.1% 浓度抑制剂时, 相比对照组, 金属离子 Mn^{2+} (119%) 对该酶有一定的促进作用; 抑制剂 SDS (57%) 有较强的抑制作用。其余测试对粗酶液纤维素酶活性均无显著作用, 活性均保持在 80% 以上(图 10(a))。在加入 10 mM 金属离子和 1% 浓度抑制剂时, 相比对照组, 金属离子 Mn^{2+} (181%) 对该酶有较强的促进作用, Fe^{3+} (65%)、 Pb^{2+} (73%) 和 Al^{3+} (69%) 表现出显著的抑制作用; 抑制剂 SDS (0%) 完全抑制了酶活性, DTT (118%) 对其有一定的促进作用。其余测试对该纤维素酶活性无明显作用效果, 酶活性范围均在 86%~108% (图 10(b))。

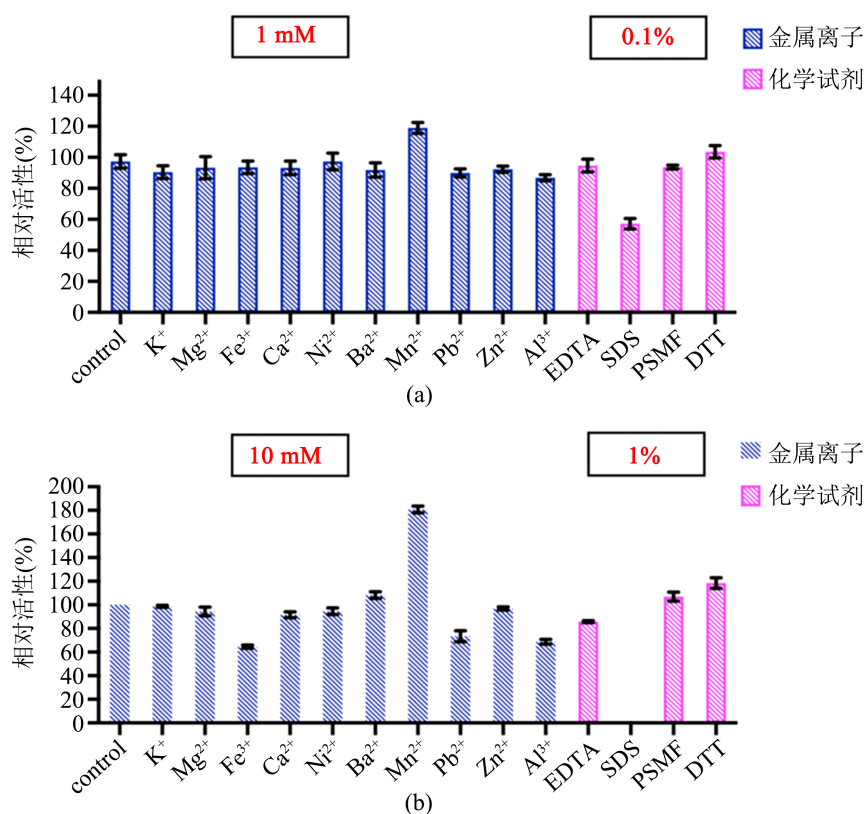


Figure 10. Effects of different metal ions and chemical agent on the cellulase activity of strain F33
图 10. 不同金属离子及化学试剂对 F33 菌株产酶影响

3.9. 培养时间对菌株 F33 产酶影响

菌株 F33 在发酵培养基中培养 24 h 后, 随着培养时间的增加其发酵液中纤维素酶活性不断提高, 在 60~156 h 酶活力变化较快, 156~204 h 酶活力增加趋缓, 204 h 后酶活力又开始大幅度上升, 孵育 300 h 时酶活力达到最高, 为 0.54 ± 0.03 U/mL (图 11)。

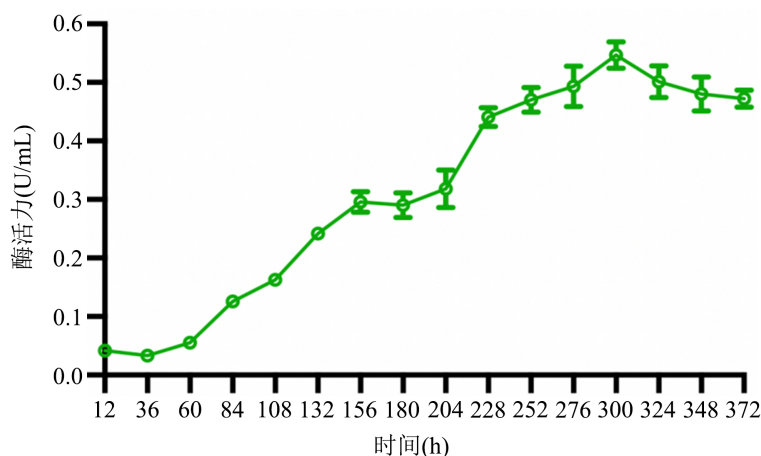


Figure 11. Effects of different culture time on the cellulase production of strain F33

图 11. 不同培养时间对菌株 F33 纤维素酶的影响

4. 讨论

近年来, 国内外对于嗜盐纤维素酶产生菌的研究主要集中在细菌和放线菌上[27] [28] [29] [30], 关于真菌产嗜盐纤维素酶的报道较少, 且大多局限于曲霉属 *Aspergillus Link* [31] [32] [33] [34] [35]。研究从青海茶卡盐湖土样中筛选真菌, 利用刚果红染色法和 DNS 法筛选出一株可降解纤维素酶且酶活力相对较高的嗜盐真菌 F33, 结合形态观察和 ITS rRNA 同源序列结果分析显示, 鉴定该菌株为枝孢属(*Cladosporium* sp.)。通过单因素实验得到 F33 纤维素酶最优发酵时间为 300 h, 发酵温度 45°C, pH 4.0, 酶活力可达 0.54 ± 0.03 U/mL, 具有较强的产纤维素酶的能力。F33 是在 5% 盐浓度的培养基纯化得到的菌株, 其最适盐浓度为 0.5 mol/L, 且在 3.5 mol/L 高盐浓度下依旧有 45% 左右的相对活性, 因此嗜盐真菌 F33 可在高盐环境下降解纤维素有着普通真菌不可比拟的优势。

目前, 嗜盐菌是极具应用前景的微生物资源, 其研究已成为极端环境微生物研究的重要组成部分。目前已实现利用嗜盐菌生产胡萝卜素和类胡萝卜素等食品添加剂的生产[36], 部分嗜盐真菌具有较好抗肿瘤作用, 例如陈显强等人在海盐田中发现一株嗜盐真菌 *Epicoccum sorghinum* 的提取物对 FGFR2 过表达的乳腺癌细胞 MDA-MB-231-(S252W)增殖有较强的抑制作用[37], 红树林在平衡高盐环境的渗透压作用中, 嗜盐微生物也起到了关键作用[38], 嗜盐菌是极端环境微生物的重要类群, 对菌株 F33 的挖掘, 具有良好的开发和应用前景。嗜盐真菌在高盐环境中经过长时间进化, 已经有了自己的嗜盐方法和适应机制, 未来将会深入研究极端微生物是如何适应极端环境, 阐明生物多样性形成的机制与极端环境的适应机制问题, 探索生命的奥秘, 同时开发其用途进一步造福于人类。

基金项目

本研究获得云南省基础研究专项——青年项目(202101AU070138)、大理苍山高海拔真菌多样性科学考察和大理大学高层次人才科研启动费支持。

参考文献

- [1] Bhat, M.K. (2000) Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, **18**, 355-383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- [2] 吴大付, 任秀娟, 李东方, 等. 纤维素酶的应用现状与前景[J]. 广西轻工业, 2007, 23(12): 1-2.
- [3] 宋国安. 纤维素酶的应用开发前景[J]. 河南化工, 1999(6): 5-6.
- [4] 鲁奥. 盐碱地中纤维素降解菌的植物促生特性研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 东北师范大学, 2019.
- [5] 陈军, 高圣. 浅谈嗜盐菌微生物的特性和发展前景[J]. 科技成果纵横, 2010(3): 53+56.
- [6] Radhakrishnan, R., Kang, S.M., Baek, I.Y., et al. (2014) Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of *Penicillium* Species against the Effects of High Soil Salinity and Root Disease. *Journal of Plant Interactions*, **9**, 754-762. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.930524>
- [7] 尤作亮. 海水直接利用及其环境问题分析[J]. 给水排水, 1998, 24(3): 64-67.
- [8] 李春冬, 徐伟良, 鲁铁, 等. 一株锡林郭勒盟木霉的鉴定及其产纤维素酶研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 100-104.
- [9] 曹要玲. 耐碱性木聚糖酶高产菌株的筛选、产酶条件优化及其木聚糖酶基因的克隆[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2006.
- [10] Zhang, J.E. (2007) Normal Methods and Techniques of Ecological Experiment. Chemical Industry Press, Beijing.
- [11] 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.
- [12] 梁雅玲, 吴昆生, 王玲, 等. 一种改进的真菌标本片制作法[J]. 昆明医学院学报, 1987(3): 74.
- [13] 曾思泉, 凌娟, 林丽云, 等. 1株红树林来源枝孢属真菌的分离鉴定及纤维素酶性质分析[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(2): 37-42.
- [14] 毛婷, 朱瑞清, 牛永艳, 等. 纤维素降解芽孢菌的筛选及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 71-76.
- [15] 李刚, 孙俊良, 葛晓虹, 等. 碳源对枯草芽孢杆菌产 α -淀粉酶的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 13-14+18.
- [16] 夏服宝, 邱雁临, 孙宪迅. 纤维素酶活力测定条件研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(16): 23-26.
- [17] 黄燕华, 冯定远. DNS法测定纤维素酶活性的适宜反应温度, pH值和反应时间的研究[C]//中国畜牧兽医学动物营养学分会. 第九届学术研讨会论文集, 2004: 328.
- [18] Xiao, Y., Yang, J.Y., Zhang, B.G., et al. (2019) Fermentation Conditions for Cellulase Production by *Irpex lacteus* F036 and Its Enzymatic Properties. *Food and Fermentation Industries*, **45**, 70-76.
- [19] 翟兴礼, 苏云金. 芽孢杆菌四个亚种对温度和pH值的耐受性[J]. 商丘师范学院学报, 2009, 25(6): 103-105.
- [20] 李卓佳, 杨莺莺, 陈康德, 等. 几株有益芽孢杆菌对温度、制粒工艺及pH值的耐受性[J]. 广东海洋大学学报, 2003, 23(6): 16-20.
- [21] Sher, H., Faheem, M., Ghani, A., et al. (2017) Optimization of Cellulose Enzyme Production from *Aspergillus oryzae* for Industrial Applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2**, 155-158. <https://doi.org/10.33865/wjb.002.02.0088>
- [22] 唐鑫, 夏延斌, 吴灿, 等. 植物乳杆菌发酵盐渍辣椒汁培养基及其条件的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 66-71.
- [23] 苏俊, 冯新忠, 古丽斯玛依·艾拜都拉, 等. 两株耐碱酵母的pH耐受实验观察[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1114-1117.
- [24] 穆军, 焦炳华, 孙炳达, 等. 一株具有抗菌和细胞毒活性的海洋嗜盐菌XD20的筛选和鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(1): 8-11.
- [25] 李德莹, 龚大春, 田毅红, 等. 金属离子对纤维素酶活力影响的研究[J]. 酿酒科技, 2009(6): 40-42+46.
- [26] 张琪, 朱丹, 牛广财, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵黑豆豉的前发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 179-183.
- [27] 郭璟. 分离自青海湖的三株耐盐菌及嗜盐菌的鉴定及纤维素降解能力的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2015, 45(5): 23-26.
- [28] 秦雯娜, 赵坤, 郭立忠, 等. 1株产纤维素酶嗜盐放线菌的鉴定、发酵优化及酶学性质的研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2016, 33(1): 27-34.
- [29] Gong, M.F., Guan, Q.L., Ou, X.F., et al. (2017) Screening and Production of Cellulase of Bacteria Isolated from Intestinal Tract of *Pomacea canaliculata*. *Journal of Biodiesel Materials & Bioenergy*, **11**, 278-281.

- <https://doi.org/10.1166/jbmb.2017.1679>
- [30] Korany, A.H., Ali, A.E., Essam, T.M., *et al.* (2017) Optimization of Cellulase Production by *Halobacillus* sp. QLS 31 Isolated from Lake Qarun, Egypt. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, **183**, 189-199. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2438-z>
- [31] 刘杰凤, 薛栋升, 何可可, 等. 一株耐盐纤维素酶海洋曲霉的筛选及产酶条件研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012(7): 711-718.
- [32] 陈作国. 海洋黑曲霉液体发酵耐盐纤维素酶的培养条件优化和扩大化生产[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [33] 曲丽丽. 海洋黑曲霉固态发酵耐盐纤维素酶的培养条件优化及粗酶制剂的制备[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [34] Gunny, A.N.N., Arbain, D., Jamal, P. and Gumba, R.E. (2015) Improvement of Halophilic Cellulase Production from Locally Isolated Fungal Strain. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **22**, 476-483. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.021>
- [35] Bano, A., Chen, X.M., Prasongsuk, S., *et al.* (2019) Purification and Characterization of Cellulase from Obligate Halophilic *Aspergillus Flavus* (TISTR 3637) and Its Prospects for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **189**, 1327-1337.
- [36] 韦娜. 嗜盐菌的分离鉴定及其应用研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [37] 陈显强, 邢楠楠, 黄亮华, 高程海, 罗小卫, 刘永宏. 嗜盐真菌多样性及其抗肿瘤活性研究[J]. 广西科学, 2020, 27(5): 526-531.
- [38] Mani, K., Salgaonkar, B.B., Das, D. and Bragança, J.M. (2012) Community Solar Salt Production in Goa, India. *Aquatic Biosystems*, **8**, Article No. 30. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-30>