

产自 *Cladosporium* sp. F39 的嗜酸耐盐纤维素酶及其酶学性质研究

李 蕾, 李馨伟, 黄裕颖, 刘全林, 杨力权, 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22日; 录用日期: 2022年6月17日; 发布日期: 2022年6月27日

摘 要

极端环境来源纤维素酶在造纸、纺织和纤维素乙醇生产等工业领域有巨大的运用潜力, 因而备受关注。本研究以小麦秸秆为唯一碳源, 从青海茶卡盐湖土壤中分离到一株具有降解纤维素功能的真菌菌株, 命名为F39, 通过形态学和ITS rRNA分子生物学鉴定, 菌株F39被鉴定为*Cladosporium* sp. (GenBank登录号: ON318388)。用小麦秸秆发酵培养基进行诱导, 发现该菌株所产纤维素酶的最适pH为5.0, 最适温度为50℃, 最适盐度为0.2 g/mL, 在最适温度和pH条件下测得活性为0.237 U/mL; 在pH 4.0~6.0或35℃~65℃或盐浓度低于2.5 g/mL时保持60%以上活性。在大多数金属离子条件下活性表现稳定。金属离子Mn²⁺能激其强烈活性。酶抑制剂DTT和SDS低浓度存在的条件下活性表现强促进作用。菌株在小麦渣发酵培养基中发酵培养312 h后的上清纤维素酶活力(底物为羧甲基纤维素钠(CMC-Na))最高, 为0.223 U/mL。以上结果表明该菌株所产纤维素酶有嗜酸、耐盐和耐热的特点, 在饲料加工、生物乙醇生产等行业具有良好的运用潜力。

关键词

嗜盐真菌, *Cladosporium* sp., F39, 纤维素酶, 酶学性质

Acidophilic and Halophilic Cellulase Produced by *Cladosporium* sp. F39 and Its Enzymatic Properties

Lei Li, Xinwei Li, Yuying Huang, Quanlin Liu, Liquan Yang, Yirui Yin*

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

Received: May 22nd, 2022; accepted: Jun. 17th, 2022; published: Jun. 27th, 2022

*通讯作者。

文章引用: 李蕾, 李馨伟, 黄裕颖, 刘全林, 杨力权, 尹以瑞. 产自 *Cladosporium* sp. F39 的嗜酸耐盐纤维素酶及其酶学性质研究[J]. 生物过程, 2022, 12(2): 138-147. DOI: 10.12677/bp.2022.122016

Abstract

The discovery of enzymes with high activity and special activity in extreme environments is of great significance to the development of new materials. In this study, sodium carboxymethyl cellulose and rice straw were used as the only carbon source, and a cellulose-degrading strain F39 was isolated from Chaka Salt Lake in Qinghai Province, China. After morphological observation and ITS sequence comparison analysis, the strain was preliminarily identified as *Cladosporium* sp. (ON318388) Using wheat residue fermentation medium for induction, the optimum pH and temperature of cellulase production were 5.0 and 50°C, and the highest activity was 0.237 U/mL under the optimum conditions. Keep at pH 4.0~6.0 or 45°C~65°C, or keep more than 60% activity when the salt concentration is low of 2.5 g/mL. The activity is stable under most metal ions. The metal ion Mn²⁺ can stimulate its strong activity. The activity of enzyme inhibitor DTT and SDS was strongly promoted in the presence of low concentration. The supernatant of the strains fermented in wheat residue fermentation medium for 312 hours had the highest activity towards carboxymethyl cellulose sodium (CMC-Na) which was 0.223 U/mL. The *Cladosporium* sp. has acid and salt tolerance, good performance and great economic value.

Keywords

Halophilic Fungi, *Cladosporium* sp., F39, Cellulase, Enzymatic Properties

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

纤维素酶是一类能够水解纤维素的 β -D-糖苷键生成葡萄糖的多组分酶的总称[1], 包括外切葡聚糖苷酶、内葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶, 在食品、饲料、医药、纺织、造纸等工业领域有广阔的应用前景[2]。纤维素酶广泛分布于自然界中的真菌、细菌和古菌中……目前工业级水解酶活性较高的代表菌种为里氏木霉、康氏木霉和黑曲霉[3]。作为生物燃料产业的关键酶系, 纤维素酶在工业应用中需要适应一些特殊的物化环境, 如高温、高盐、强酸、强碱等[4]。所以从自然界中, 特别是高盐度、极酸、极碱、高温的极端环境中筛选纤维素酶产生菌一直是学者们研究的热点[5]。从这些环境中筛选产纤维素酶的优良菌株, 除了寻找高活力的产酶菌外, 再就是寻找能耐受极端环境的纤维素酶, 这对于工业生产具有巨大的运用潜力。

嗜盐微生物指较高浓度盐存在时, 才能生存和生长的微生物[6]。一些嗜盐微生物能够在高盐, 高 pH 的培养基中存活, 甚至也能在高温下进行培养, 那么使用嗜盐微生物作为研究对象可以使发酵过程保持无菌、不被污染, 从而能进行长时间连续发酵[7]。嗜盐耐盐真菌具有独特的耐盐机制, 并且往往能够产生特殊的代谢产物, 对于工业生产抗生素、有机酸、工业酶制剂、改善植物抗盐抗旱和开发新型材料等有着重要意义[8]。因此, 嗜盐真菌是一类极具研究价值的微生物。

很多研究证明嗜盐真菌具有很多特殊活性。据报道, 在西班牙南部不同的高盐环境中, 盐生芽孢杆菌属、盐单胞菌属和盐生芽孢杆菌属分别产生大量淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶[9]。在来自海洋杆菌属的中度嗜盐菌、来自突尼斯太阳盐场的色卤杆菌属和卤单胞菌属中也观察到水解酶产生能力[10]。侯靖等人于一平浪盐矿筛选产胞外蛋白酶菌株盐矿盐古球菌 *Halococcus salifodinae* 具有蛋白酶活性[11]; 张辞海等从

双峰盐场中筛选出嗜盐菌特氏盐芽孢杆菌 *Halobacillus trueperi* 具有最高的蛋白酶活力[12]; 张伟等筛选出耐盐性菌株 *Halorubrum* sp., 具有产 α -淀粉酶的能力[13]。林佳辉等筛选的中盐菌株 *Salinicola* sp., 具有烷烃降解特性[14]。赵娜娜等筛选的嗜盐菌株 *Halomonas* sp. 具有高效降酚能力[15]。随着世界各地盐碱化程度的加重和工业需求的增加, 挖掘产纤维素酶且具有特殊活性的能降解纤维素的耐盐和嗜盐微生物的分离筛选具有研究价值。

本研究从茶卡盐湖土壤样品中, 筛选获得一株产纤维素酶嗜盐真菌, 并对其形态学和产纤维素酶性质进行研究, 旨在为嗜盐纤维素酶的开发和应用研究提供依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 样品

样品采自青海省茶卡盐湖(海拔约 3059 m, 99°02'0.85"E, 36°31'0.51"N)水平面下 15 cm 处的水样, 4℃ 暂存。

2.1.2. 培养基

选择培养基(g/L): 小麦秸秆 10 g, 土豆 200 g, NaCl 50 g, 琼脂 20 g, pH 自然。

刚果红筛选培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 1 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, NaCl 25 g/50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, K_2HPO_4 1 g, CaCl_2 0.3 g, 酵母粉 0.5 g, 蛋白胨 0.5 g/L 琼脂 20 g。

发酵培养基(g/L): 小麦秸秆 10 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, NaCl 50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, K_2HPO_4 1 g, CaCl_2 0.3 g、酵母粉 0.5 g。灭菌条件: 121℃, 0.12 MPa 灭菌 30 min。

2.2. 产纤维素酶嗜盐菌株的分离

取 1 mL 样品, 分别稀释为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 涂布在选择培养基上, 在 25℃ 下培养; 待菌落长出后, 挑取单个菌落进行平板划线培养, 重复划线 3~5 次后实现菌株的分离与纯化, 获得菌株的纯培养。利用刚果红-羧甲基纤维素钠水解圈法进行初筛, 将菌株点接于筛选培养基上, 培养 3~5 d 后, 用 0.1% 刚果红溶液染色 20 min, 再用 1 mol/L NaCl 溶液洗脱 25 min, 依据水解圈与菌落的直径比来初步判断纤维素酶高产菌株, 再将活性菌株接种于发酵培养基中培养 10 d, 利用胞外酶活测定法作为复筛法进行菌株的筛选。发酵条件: 25℃ 180 r/min 培养 6 d 后, 4℃、8000×g 离心 15 min 收取上清液, 作为粗酶液用于酶学特性的测定。

2.3. 菌株的鉴定

2.3.1. 菌株的形态观察

将菌株接种于 PDA 培养基上 25℃ 培养 10 d, 观察记录菌落的大小、质地、颜色、边缘情况等。利用 OLYMPUS BX51 荧光显微镜对所制片内的菌体进行微观拍照, 拍摄的图片需要记录其菌丝、分生孢子梗、产孢细胞形状大小和分生孢子的形态大小等特征。

2.3.2. 分子生物学鉴定

挑取少量真菌菌丝于 50 μL 含 2% CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)的 TE 缓冲液(pH 8.5)中, 于 PCR 仪下 99℃ 沸水浴 45 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 rDNA 基因间隔区序列(ITS)通用引物(ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), 使用 Taq 酶进行 PCR 扩增。将 PCR 扩增产物送擎科生

物科技有限公司进行测序。得到的序列校正后提交到 GenBank 中, 并进行 Blast 比对。利用 MEGA7.0 使用邻接法(neighbor joining)构建系统进化树, 根据菌株间的亲缘关系确定菌株的种属。

2.4. 粗酶液中纤维素酶活性测定

将菌株接种于液体发酵培养基中, 25℃下培养 10 d, 取发酵液在 8000 r·min⁻¹、4℃条件下离心 20 min, 上清即为粗酶液。取 50 μL 粗酶液加入到 250 μL 含 1% (W/V)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)柠檬酸钠缓冲液(pH)中, 55℃孵育 30 min。加入 450 μL (3,5)-二硝基水杨酸(DNS)终止反应, 沸水浴 10 min 后, 使用酶标仪于 540 nm 下测定还原糖的释放量[16]。一个单位(U)的酶活性定义为 1 min 释放 1 μmol 葡萄糖当量的还原糖所需的酶量, 每组反应均进行 3 个生物学重复。所得结果用 prism.exe 软件进行绘图分析。

2.5. 最适反应 pH 和温度的测定

为测定 F39 来源纤维素酶最适反应 pH, 在 55℃下使用 pH 2 到 10 的缓冲液检测不同 pH 对粗酶液的影响。柠檬酸钠缓冲液(pH 2.0~8.0)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8~10.0)。为测定 F39 来源纤维素酶最适反应温度, 在柠檬酸钠缓冲液(pH 5.6)中检测不同温度(0℃~90℃)对粗酶液的影响。

2.6. pH 和温度对纤维素酶稳定性的影响

pH 对 F39 来源纤维素酶稳定性的影响, 通过将 100 μL 粗酶液加入 400 μL 缓冲液(pH 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10)中, 于 4℃下孵育 24 h 后, 在标准条件下测定其残留活性。以生理盐水(0.9% NaCl, pH 7.0)同等稀释粗酶液为阳性对照(100%)。温度对 F39 来源纤维素酶稳定性的影响, 通过将粗酶液在不同温度(45℃、55℃和 65℃)下, 孵育不同时间(0、20、40、60、80、100 和 120 min)后, 在标准条件下测定其残留活性, 以未处理(0 min)粗酶液为阳性对照(100%)。

2.7. 盐浓度对纤维素酶活力的影响

为测定 F39 来源纤维素酶最适反应盐浓度, 在 55℃、pH 5 下使用不同盐浓度缓冲液检测不同盐浓度对粗酶液的影响。配置不同浓度的 NaCl 缓冲液, 称取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 g 的 NaCl 溶解在 1 mL 缓冲液中, 为测定 F39 来源纤维素酶在柠檬酸钠缓冲液(pH 5.6)中检测不同浓度(0~3.5 g/mL)对粗酶液的影响, 测定其残留活性。使用标准条件下, 未添加 NaCl 的反应混合物作为对照(100%)。

2.8. 不同金属离子和抑制剂对纤维素酶活力的影响

为测定金属离子和抑制剂对 F39 来源纤维素酶的影响, 在标准的反应体系中分别加入不同的金属离子(K⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Ni²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺和 Al³⁺)至浓度为 1 mmol/L, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)和不同抑制剂[十二烷基硫酸钠(SDS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)和二硫苏糖醇(DTT)]至浓度为 0.1%。使用标准条件下, 无添加剂的反应混合物作为对照(100%)。

2.9. 培养时间对产酶的影响

将 F39 菌株于 PDA 培养基中, 30℃下培养 3 d 的培养物作为种子液, 取种子液以 1% (V/V)接种量接种于发酵培养基中, 180 r/min, 30℃下进行培养间隔 12 h, 连续收取上清液, 用于纤维素酶活力的测定。

3. 结果与分析

3.1. 产纤维素酶菌株筛选结果

通过选择培养基分离到一株具有纤维素酶活性的嗜盐真菌, 将其命名为 F39。该菌株的刚果红水解圈见图 1, 水解圈直径与菌落直径比为 2.26 ± 0.14。

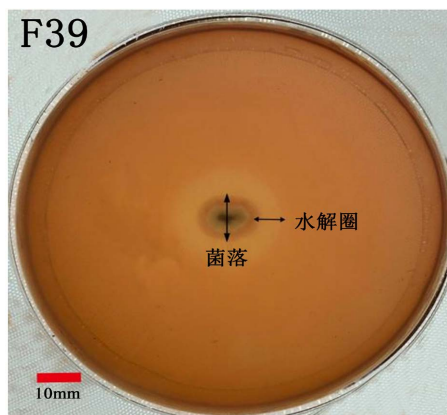


Figure 1. Congo red hydrolytic circle of strain F39

图 1. 菌株 F39 刚果红水解圈

3.2. 产纤维素酶菌株 F39 的形态特征

图 2 为菌株 F39 的微观形态，由图可知，该菌株菌体外形棕色微绿，培养基表面绒毛状菌丝，菌丝体直、弯曲，具分枝，亚透明到橄榄棕色。分生孢子梗直立，颜色茎顶端略微减弱，橄榄棕色，光滑和厚壁，产孢末端和侧面由架空菌丝产生，双分枝，隔片。分生孢子呈简单和分支链，亚透明至橄榄棕色，形状和大小可变，亚球形、椭球卵形、卵形、梭形，亚圆柱形，斜形，光滑至轻微粗糙壁。



Figure 2. Colony morphology and microscopic characteristics of F39. (a), (b): Pure culture colonies; (c), (f): Conidiophore and conidia; (d), (e): Conidiophore; (g): Conidia

图 2. 菌株 F39 的菌落形态学和显微形态特征。注：(a)，(b)：纯培养菌落；(c)，(f)：分生孢子梗和分生孢子；(d)，(e)：分生孢子梗；(g)：分生孢子

3.3. 产纤维素酶菌株 F39 的分子进化树构建

通过 ITS 通用引物测序获得 bp ITS rRNA 核苷酸序列, 序列在线上传至 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), 登录号: ON318388, 与菌株 *Cladosporiaceae* sp. (登录号: OL818314) 和 *Cladosporium* sp. (登录号: MZ452398) 亲缘关系最近, 同源性分别为 99.44% 和 99.44%。基于菌株 F39 ITS 序列在 NCBI 数据库中同源系列构建系统进化树, 见图 3, 可知菌株 F39 与枝孢菌属聚在一枝, 结合形态学特征, 最终确定 F39 为 *Cladosporium* sp. 菌株。

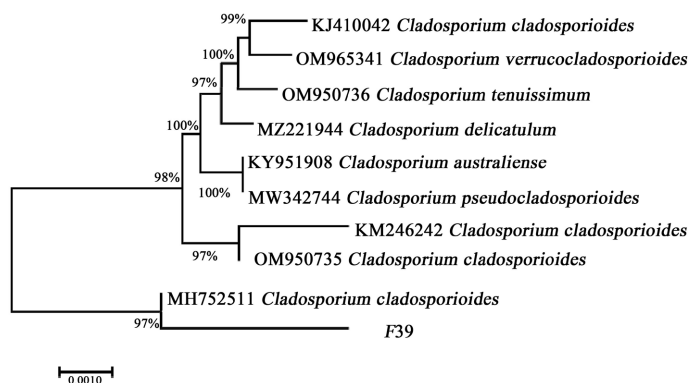
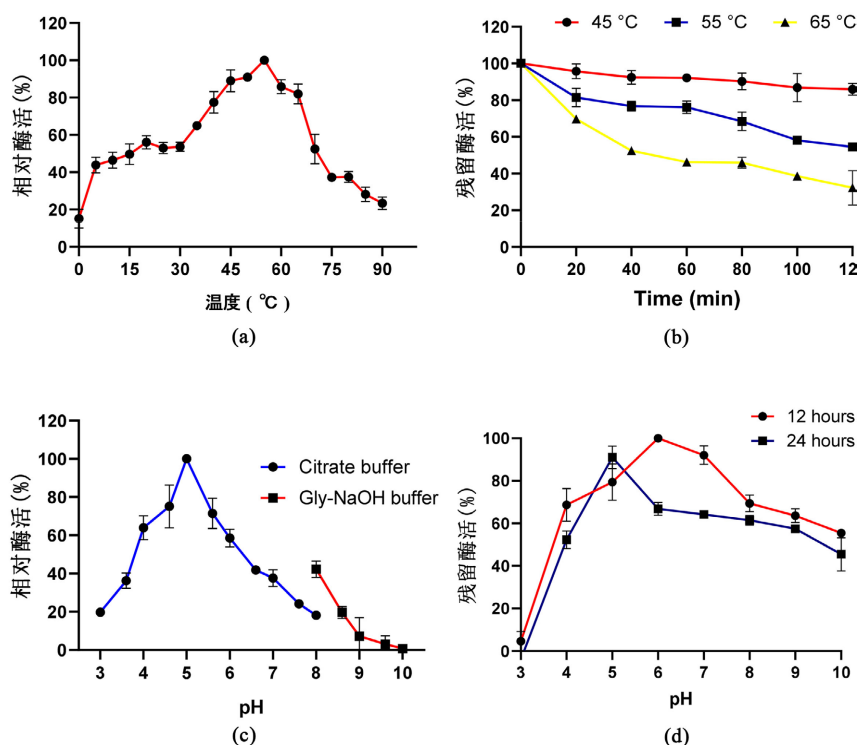


Figure 3. The phylogenetic tree of F39 based on ITS rRNA sequence homology

图 3. 基于 ITS rRNA 序列同源性构建菌株 F39 的系统进化树



注: 相对酶活表示在一定条件范围内的相对酶活性(酶活性与酶最大活性的百分比); 残留活性表示酶在不同条件下处理后残余酶在最适宜温度下测出的活性。

Figure 4. Effects of temperature and pH on cellulase activity from strain F39

图 4. 温度和 pH 对菌株 F39 来源纤维素酶活性的影响

3.4. 菌株 F39 来源纤维素酶的最适反应 pH 和温度

菌株 F39 来源纤维素酶的最适反应 pH 和温度分别为 pH 5 和 55℃ (图 4)。F39 来源粗酶液在 45℃~65℃, 表现出最高活性 80% 以上的相对活性(图 4(a)); 在 5℃ 和 80℃ 分别表现出约 40% 和 37% 的相对活性(图 4(a))。F39 来源粗酶液在 pH 5, 表现出最高活性 80% 以上的相对活性; 在 pH 3.5~7, 表现出超过 40% 的相对活性(图 4(c))。这说明 F39 来源纤维素酶系为嗜酸、嗜热纤维素酶。此外, 粗酶液在 5℃~70℃, 仍表现出 40% 以上的相对酶活, 说明该纤维素酶系表现出良好的热稳定性。

3.5. 温度和 pH 对 F39 来源纤维素酶稳定性的影响

F39 来源粗酶液表现出较高稳定性(图 4(b)), 在 45℃、55℃ 和 65℃ 下孵育 120 min 后, 分别保留约 85%、54% 和 32% 的相对活性, 其在 65℃ 下的半衰期为 40 min。55℃ 下的半衰期为 120 min。pH 对 F39 来源纤维素酶稳定性的影响表明粗酶液在 pH 5 孵育 24 h 后, 表现出较高的稳定性(>80%), 在 pH 6 和 pH 7 下孵育 12 h 后, 其活性提高了 9%。

3.6. 盐浓度变化对纤维素酶活力的影响

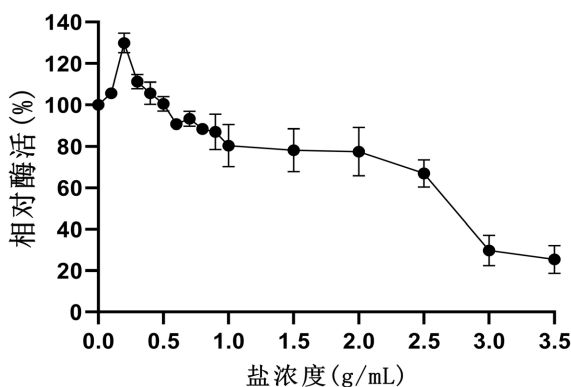


Figure 5. Effect of salt concentration on cellulase activity from F39

图 5. 盐浓度对 F39 的来源纤维素酶活力的影响

测定不同盐浓度(盐质量 g/mL)底物对 F39 的来源纤维素酶活力在的影响。由图 5 可以看到, 盐浓度在 0.1~0.5 g/mL 间, 测得其相对活力分别为 105.61%, 129.93%, 111.23%, 105.0%, 100.49%, 该盐浓度范围内对 F39 产纤维素酶的活力有促进作用。F39 来源粗酶液在盐度为 0.2 g/mL 时, 表现出强烈促进作用, 相对酶活力提高至 129.93%。盐浓度高于 0.5 g/mL 时, 表现出抑制作用, 随着盐度增加, 相对酶活逐渐降低, 盐浓度低于 2.5 g/mL 时, 保持降至 60% 以上相对酶活。当盐浓度为 3.5 g/mL, 相对酶活降至 25%。

3.7. 不同金属离子和抑制剂对菌株 F39 来源纤维素酶的影响

不同金属离子和抑制剂对菌株 F39 来源纤维素酶的影响见图 6。酶反应中添加 1 mol/L 金属离子, 所有测试的金属离子对粗酶液纤维素酶活性均无抑制作用, Mn^{2+} 能激其活性至最高活性。其余测试金属离子对粗酶液纤维素酶活力无显著影响。0.1% 浓度的抑制剂 EDTA 和 PSMF 对 F39 来源的纤维素酶活力均有稍微促进作用(见图 7), 0.1% SDS 和 DTT 对其活性有强烈促进作用, 是该酶强的促进剂。

3.8. 不同培养时间对菌株 F39 产纤维素酶的影响

菌株 F39 在发酵培养基中培养 48 h 后, 随着培养时间的增加其上清液纤维素酶活性不断提高, 144 h 时, 相对酶活超过 20%, 随后酶活力大幅度增加, 264 h 后其活性趋于稳定, 达到最高活性的 80%, 至

312 h 时达到最高活性, 为 0.223 U/mL (图 8)。312 h 后, 活性开始降低, 到 408 h 时, 仍维持最高活性的 80% 以上。

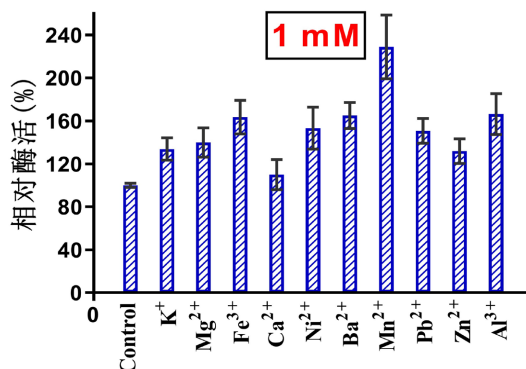


Figure 6. Effect of metal ions on cellulase activity from F39
图 6. 金属离子对 F39 的来源纤维素酶活力的影响

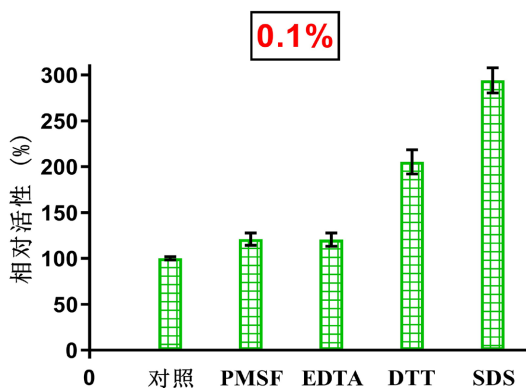


Figure 7. Effect of inhibitor on cellulase activity from F39
图 7. 抑制剂对 F39 的来源纤维素酶活力的影响

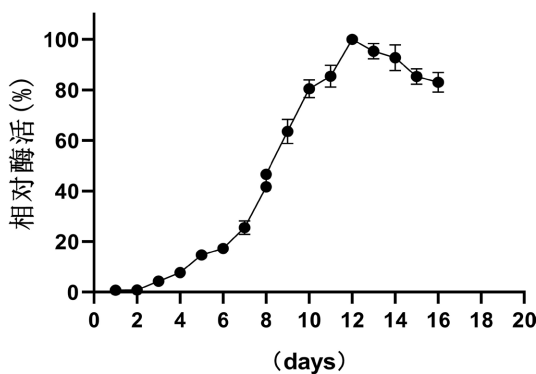


Figure 8. Effects of different culture time on the cellulase production of F39. The fermentation medium was inoculated with 1% inoculum and incubated under 180 r/min, at 30°C. Cellulase activity of fermentation broth supernatant was measured by sampling at 1 day interval

图 8. 不同培养时间对菌株 F39 产纤维素酶的影响。以 1% 接种量接种于发酵培养基中, 180 r/min, 30°C 下进行培养, 间隔 1 d 取样测定发酵液上清的纤维素酶活性

4. 讨论

嗜盐真菌是一类生活在高盐生境中的极端微生物,可以在 3.0 mol/L 甚至更高的盐浓度下生长的微生物[17]。嗜盐真菌易于在高盐环境中生长,能够极大程度地减少发酵过程中其他微生物的污染,并能产生极端酶和其他特殊生物活性物质[18]。极端盐碱环境微生物所产酶系可在高盐碱环境中仍保持酶活性。因此,这类极端微生物产纤维素酶的筛选、基因克隆及高效表达已成为国内外研究热点。本研究从青海查卡盐湖土壤样品中筛选出 1 株降解小麦渣、玉米秆渣的真菌菌株 F39,其产纤维素酶的产酶温适宜度范围和 pH 分别为 45℃~65℃和 pH 5,在其条件下酶活力测得 0.237 U/mL。经发育系统学分析,鉴定 F39 菌株是枝孢属枝孢菌 *Cladosporium* sp.,是纤维素降解菌的主要类群,分离于盐环境中,其生长温度为 25℃,最适产酶盐度为 0.2 g/mL,属于典型的嗜盐真菌,产生的纤维素酶在酸性或中性偏酸性条件下水解纤维素底物。*Cladosporium* sp. F39 菌株与王焱等人从高盐环境诺邓火腿上分离的一株具有产纤维素酶能力的 *Cladosporium sphaerospermum* 菌株,同为枝孢属[19]。我们从盐湖中分离的这株 *Cladosporium* sp. 菌株产纤维素酶具有耐酸、耐盐能力,在酸性或高盐环境种保持降解纤维素的能力,在特殊环境中显示出良好的使用性能和巨大的经济价值。该研究说明极端盐环境中筛选特殊活性的嗜盐真菌值得在科学理论探索和生产应用中开展更深入的研究。

致 谢

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] 顾方媛,陈朝银,石家骥,等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008(1): 83-87.
- [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(12): 1-2.
- [3] Druzhinina, I.S. and Kubicek, C.P. (2017) Genetic Engineering of *Trichoderma reesei* Cellulases and Their Production. *Microbial Biotechnology*, **10**, 1485-1499. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12726>
- [4] Zhang, H., Zhang, G., Yao, C., et al. (2015) Structural Insight of a Trimodular Halophilic Cellulase with a Family 46 Carbohydrate-Binding Module. *PLOS ONE*, **10**, e0142107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142107>
- [5] 王焱,韩燕峰,梁宗琦. 采自武夷山高温木质素降解菌优良菌株筛选及其木质素降解效果测定[J]. 菌物学报, 2016, 35(10): 1169-1177.
- [6] 谢可辉. 盐土微生物菌群分析及其中新的纤维素酶基因的挖掘[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津大学, 2018.
- [7] Yin, J., Chen, J.C., Wu, Q., et al. (2015) Halophiles, Coming Stars for Industrial Biotechnology. *Biotechnology Advances*, **33**, 1433-1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>
- [8] 杜剑晖,还萍,李岭卓,等. 一株极端嗜盐真菌的筛选及初步研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2018, 40(2): 189-194.
- [9] 侯靖,徐佳琪,李杨,等. 一平浪盐矿产蛋白酶嗜盐古菌的鉴定及其酶学性质[J]. 食品工业科技, 2017, 38(23): 124-128, 136.
- [10] Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. and Ventosa, A. (2003) Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 295-300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x>
- [11] Baati, H., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A. and Ammar, E. (2010) Isolation and Characterization of Moderately Halophilic Bacteria from Tunisian Solar Saltern. *Current Microbiology*, **60**, 157-161. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9516-6>
- [12] 张辞海,曹凯,张家胜,等. 一株盐芽孢杆菌的筛选及其粗酶的酶学特性研究[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(1): 122-128.
- [13] 张伟,吴晓卫,姚彦红,等. 一株耐盐性 α -淀粉酶高产菌的分离、鉴定及诱变选育[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(16): 130-133, 141.

-
- [14] 林佳辉, 王丹, 李霜. 一株中度嗜盐菌 *Salinicola* sp. 在高盐环境中的烷烃降解特性[J]. 化工进展, 2019, 38(4): 1894-1902.
- [15] 赵娜娜, 许继飞, 宋晓雪, 等. 嗜盐高效降酚菌株 *Halomonas* sp. H17 的筛选及降解苯酚特性[J]. 环境科学学报, 2019, 39(2): 318-324.
- [16] Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- [17] Gunde-Cimerman, N., Ramos, J. and Plemenitaš, A. (2009) Halotolerant and Halophilic Fungi. *Mycological Research*, **113**, 1231-1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- [18] 孔凡晶, 王现洁. 青藏高原盐湖嗜盐微生物资源及应用前景[J]. 科技导报, 2017, 35(12): 27-31.
- [19] 王垚, 徐志鸿, 虞泓, 等. 一株产纤维素酶嗜盐真菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 菌物学报, 2019, 38(3): 393-402.