



孟祥海,王佰成,张星哲,等.食用菌菌渣高效降解菌的筛选及主菌株产酶环境优化[J].黑龙江农业科学,2023(12):55-63.

食用菌菌渣高效降解菌的筛选及主菌株产酶环境优化

孟祥海¹,王佰成¹,张星哲¹,杨冰¹,李玉梅²,王延锋¹,王金贺¹,王希明³

(1. 黑龙江省农业科学院 牡丹江分院,黑龙江 牡丹江 157000; 2. 黑龙江省黑土保护利用研究院,黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 东宁市农业技术推广中心,黑龙江 牡丹江 157299)

摘要:为筛选出高效降解食用菌废弃菌渣的复合菌系,有效促进菌渣的降解速率,明确复合菌系主要功能菌株最佳发酵环境。利用富集培养、限性继代培养和低温逐代驯化技术对 205 份采集的菌源材料进行筛选,通过对纤维素酶活性的测定,选取最佳菌源提取物料。同时采用划线分离培养,分离主要功能菌株,对菌株的产酶条件进行优化。结果表明,从 205 份菌源提取物质中分离纯化的 1 个具有较强的纤维素降解能力的材料,发现该菌属于曲霉属,产酶较高的主菌株是聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*),对该菌株的产酶环境优化发现,产半纤维素酶和纤维素酶的最优环境是菌渣 35 g·L⁻¹、硫酸铵 3.5 g·L⁻¹、吐温-80 为 1.4 mL·L⁻¹、KH₂PO₄ 1.0 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1.0 g·L⁻¹、NaCl 0.5 g·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹,培养时间为 15 d。最终明确了复合菌系中主要功能菌株的菌株类别及其发酵环境,可为废弃菌渣资源的快速降解提供宝贵资源,并为菌渣资源肥向利用提供技术依据。

关键词:食用菌;废弃菌渣;纤维素降解菌;筛选;产酶条件

菌渣是指含有大量纤维素物质,也含有丰富的菌体蛋白和多种酶等活性物质的食用菌产业末端产生的废弃物质。中国是全球最大的食用菌生产国,自 2013 年以来产量已突破 3 000 万 t,占全球总产量的 70% 以上^[1]。2021 年黑龙江省食用菌业规模稳定在 67.6 亿袋,其中木耳菌渣占 64.37 亿袋,总产量(鲜品)达到 338 万 t,废弃菌渣总产量达到 270.4 万 t^[2]。在食用菌产业快速发展的同时,生产出食用菌后的栽培废弃物总量也呈逐年上升趋势。国内多数菌渣被作为生物质燃料焚烧发电,随着国家双碳政策及黑土地保护政策的提出,菌渣作为一种优质有机肥源被重视。目前利用废弃菌渣的途径主要是将其发酵制成有机肥料^[3-7],因菌渣结构的纤维素晶体性导致难以降解,从而导致有机物利用率较低,且国内外对菌渣有机肥料的研究大多集中在传统堆肥发酵水平,堆肥时间

长、费时费力、耗财,菌渣的腐解率一直没有得到很好的提高^[8-10],因此,废弃菌渣的高效降解问题一直是制约菌渣肥向利用的主要因素^[4],而高效降解菌渣离不开纤维素降解菌的筛选。目前有关纤维素降解菌的报道较多,但研究大多集中在秸秆降解方面,对废弃菌渣降解的报道较少,刘晓梅等^[11]从不同地点堆放的杏鲍菇菌渣中采集样品,筛选到 4 株具有高效纤维素降解能力的细菌,经过制备复合菌剂发现在菌渣堆肥过程中促腐效果较好。葛江丽等^[12]从土壤、腐殖质和牲畜粪便中筛选出能够高效降解菌糠纤维素的菌株 N3,并优化了其发酵条件。黑龙江省近几年主推以生物技术解决乡村振兴路上废弃菌渣利用率低和缺乏轻简化处理手段等问题,故本研究于黑龙江省不同地点采集菌源提取物质 205 种,进行室内微生物培养试验,筛选出废弃的菌渣高效降解复合菌系,经滤纸条降解实验和纤维素酶活力测定,并对主要成分菌株进行分类鉴定,明确其最佳的产酶条件,为菌渣资源的利用提供技术依据。进而挖掘产酶量高的优等菌株,改变以往人工培养复合菌群在天然木质纤维素分解过程中区域适应性差的问题^[13]。

收稿日期:2023-08-12

基金项目:黑龙江省自然基金项目(LH2020C094);黑龙江省重点研发计划(GA21B002);国家农业微生物伊春观测实验站;国家农业科学牡丹江观测实验站;黑龙江省农业科技创新跨越工程(CX23GG08)。

第一作者:孟祥海(1985—),男,硕士,助理研究员,从事土壤肥料研究。E-mail:mengxianghai538@163.com。

通信作者:张星哲(1967—),男,博士,副研究员,从事植物保护研究。E-mail:jxnczx@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌源提取物采集 2018年10月至2020年5月,在黑龙江省年均气温 $-7\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的区域内,采集包括菌渣(木耳菌渣、大球盖菇菌渣等)、发酵堆肥菌渣、作物腐烂秸秆(玉米秸秆、水稻秸秆、烂杂草等)、耕层及剖面土壤(暗棕壤、草甸土、树林土、秸秆还田土、菜园土、常规耕地土等)、粪肥堆(牛、羊、猪粪等)、牛羊胃瘤残留物等有机肥源腐熟物质在内的205种菌源。

1.1.2 碳源材料 以检测滤纸 WhatmanNo. 1 和黑龙江省农业科学院牡丹江分院食用菌研究中心的食用菌菌渣作为培养基中的碳源,洗净烘干后备用。

1.1.3 培养基 富集培养液:胰蛋白胨 5.0 g,酵母浸粉 1.0 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 L。继代培养基:(NH_4)₂SO₄ 2.0 g,K₂HPO₄ 1.0 g,MgSO₄·7H₂O 0.05 g,CaCO₃ 2.0 g,NaCl 0.2 g,土壤浸出液 10 mL,蒸馏水 1 L。产酶培养基:CMC-Na 10.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 10.0 g,酵母素 5.0 g,pH 自然;菌渣培养基:蛋白 3.0 g,(NH_4)₂SO₄ 6.0 g,尿素 3.0 g,CaCl₂ 0.1 g,MgSO₄·7H₂O 5.0 g,K₂HPO₄ 1.0 g,NaCl 0.1 g,FeSO₄·7H₂O 0.05 g,MnSO₄·7H₂O 0.016 g,ZnSO₄·7H₂O 0.014 g,CaCl₂ 0.02 g,蒸馏水 1 L^[11]。

分离培养基:①赫奇逊 CMC 培养基(A,g·L⁻¹);②赫奇逊 CMC-Na 培养基(B,g·L⁻¹);③纤维素刚果红平板培养基(C,g·L⁻¹);④纤维素刚果红平板培养基(D,g·L⁻¹),4种培养基具体配方参考文献[14]。

筛选培养基:①Dubos 纤维素培养基(E,g·L⁻¹):K₂HPO₄ 1.0 g,NaNO₃ 0.5 g,KCl 0.5 g,CMC 5.0 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,Fe₂(SO₄)₃·7H₂O 0.001 g,pH7.5;②蛋白胨纤维素培养基(F,g·L⁻¹):CaCO₃ 2.0 g,K₂HPO₄ 0.5 g,NaCl 5.0 g,MgSO₄ 0.5 g,蛋白胨 5.0 g,纤维素 5.0 g,刚果红 0.1 g,酵母膏 5.0 g,微量元素溶液 0.5 mL,50℃静置培养^[15]。

1.2 试验设计

1.2.1 复合菌系的筛选 富集培养液:取编号为5g的菌源样品接种到装有富集培养基的灭菌三角瓶中,50 r·min⁻¹震荡30 min后静置,于28℃培养,每天观察培养物情况,培养20~30 d至富集培养基颜色变深,滤条断裂分解,菌渣溃烂时,取培养液10%的接种量接种到上述新鲜富集培养基中继续富集培养,如此反复5次转接,完成富集培养。

继代培养:取富集培养后的培养液,在25℃条件下,以菌渣和WhatmanNo. 1滤纸为唯一碳源的继代培养基中,按10%的接种量或1 cm×1 cm小块固体平板琼脂样品(捣碎)接种,培养到滤纸条黄化断裂并记录黄化断裂时间,如此5次转接。

低温驯养:从第6代继育开始,每隔1代培养温度降低1℃,当培养温度降至15℃后,每隔2代再降1℃,直到降至8℃。对分解能力减弱的样品,在限制继代培养的低温驯化中予以淘汰。

初筛:在产酶培养基和菌渣培养基中接种经限制性继代培养和低温驯化培养仍保持良好分解能力的培养物,测定纤维素酶活性和菌渣降解率。

复筛:测定菌渣木质纤维素的降解率及对其他纤维素物质(滤纸、脱脂棉)的降解能力,将初筛所得的复合菌系以5%的接种量接入菌渣培养基,在15℃条件下恒温培养。

1.2.2 分离复合菌系纤维素降解菌 吸收复合菌系培养液1 mL,按10倍法稀释至10⁻⁶,取10⁻⁶稀释液0.1 mL涂布于分离培养基A、B、C、D中,每次处理3次重复,28℃培养72~96 h,计算菌落数量。根据菌落的形态、色泽等对单菌落进行挑选,经提纯处理后按常规方法进行保存^[16]。

1.2.3 滤纸分解效果鉴定(菌株初筛) 采用滤纸分解法,将滤纸剪成小条,放入试管内,使其略呈液面外露,并将滤纸剪成小条,使滤纸在试管内露出液面。以滤纸为唯一碳源的培养基E(杜博斯液态培养基)接种各菌株,再振荡培养5 d,30℃110 r·min⁻¹,观察滤纸崩解作用;FPA酶(3,5-二硝基水杨酸比色法测定)是在初筛的基础上,针对

崩解效果较好的菌株进行测定,为评价指标进一步筛选,得到纤维素功能降解菌株^[17]。

1.2.4 培养基筛选(复筛) 将筛选得到的功能菌株分别接种到菌株筛选培养基 E 和 F 中,进行功能培养基的筛选,每处理 3 次重复,同时测定 FPA 酶活性,确定最佳菌株。

1.2.5 菌株鉴定 分子生物学鉴定筛选出的纤维素降解菌株;真菌透过 ITSrDNA 进行分子特征辨识,并提取真菌基因组 DNA,利用一般引引物 ITS1、ITS4R 扩增 PCR。细菌主要通过 16S rDNA 进行分子特征鉴定,用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,用通用引物 27F 和 1492R 扩增 PCR。扩增产物送至北京美优安诺生物科技有限公司测序,获得的 DNA 序列提交至 NCBI 数据库,利用 MEGA 构建系统发育树^[16-18],通过 BLAST 序列比对^[18-19]。

1.2.6 菌株产酶条件优化 每个菌种试管内加入适量无菌水,强烈振荡制成等浓度的菌悬液或孢子悬液。取等量不同菌种的菌悬液孢子悬液,混合均匀即成发酵用的种子液。本试验设置 4 个变量分别为菌渣、硫酸铵、时间和吐温-80,采用均匀设计 $U_7(7^4)$,每个变量设置 7 个水平,总计 7 个处理,每处理 5 次重复(表 1)。

表 1 试验设计

处理	菌渣 $x_1/$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	硫酸铵 $x_2/$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	时间 $x_3/$ d	吐温-80 $x_4/$ ($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)
T1	5	2.5	9	0.2
T2	10	1.0	13	1.2
T3	15	2.0	3	1.0
T4	20	3.5	15	0.6
T5	25	0.5	5	0.4
T6	30	3.0	7	1.4
T7	35	1.5	11	0.8

于基础底液(KH_2PO_4 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaCl 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)中加入相应的硫酸铵和吐温-80 充分振荡,取 100 mL 分装于三角瓶中,加入对应的菌渣量,经 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min 并冷却,加入 5 mL 种子液,在恒温水浴振荡器(120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 28 $^\circ\text{C}$)中按表 1 的时间培养。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 粗酶液的制备 培养后的发酵液经 4 $^\circ\text{C}$ 、3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后的上清液即为粗酶液^[20]。

1.3.2 纤维素酶活力的测定 主要测定滤纸酶活性(FPA)、羧甲基纤维素酶活性 CMC、 C_1 酶活性、 β -葡萄糖苷酶活性等 4 个纤维素酶活性。CMC 酶活测定按照国际理论与应用化学协会(IUPAC)推荐国际标准方法^[21]。用 50 mg 脱脂棉代替滤条,其余步骤参照 FPA 的测定方法测定外切-1,4-P-葡聚糖酶活性(C_1 酶活)。

滤纸酶活性(FPA)测定方法:取 4 支 25 mL 试管,在测定管中加入 0.2 mL 酶液和 1.8 mL 的柠檬酸钠缓冲液(pH4.8),在空白管中加入 1.8 mL 的柠檬酸钠缓冲液高温灭活。将 1 cm \times 6 cm 滤条加入上述试管中,充分浸泡后同时放置 50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴 60 min;再加入 DNS 显色液 3 mL,沸水浴 10 min,冷却后移到容量为 25 mL 的容量瓶中,加入蒸馏水至刻度。空白调整为零,测 540 nm 处 OD 值,如此反复进行 4 次。

β -葡萄糖苷酶活性测定方法:取 4 支试管,将 2 mL 酶液和 1.8 mL 水杨苷(质量分数 0.5%)加入测定管,在空白管中加入 0.2 mL 酶液,经高温灭活后加入 pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液 1.8 mL。经 50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴 30 min 后,加入 DNS 显色液 3 mL,经沸水浴 10 min 冷却后移至 25 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度。空白调零,540 nm 测 OD 值,重复 4 次^[22]。

在上述条件下,定义每分钟催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为酶活力单位,以国际单位为基础。

酶活力($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)=葡萄糖含量(mg) \times 稀释倍数 \times 5.56 反应液中酶液加入量(mL) \times 时间(min)^[23]

1.4 数据分析

试验结果用平均值 \pm 标准差表示。回归方程建立采用最优多元线性分析(SPSS 19.0),根据方程优化产酶条件。产酶条件的验证采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 菌渣高效降解复合菌的筛选

对 205 份菌源提取材料,采用富集培养、限制性继代培养、低温驯化培养等技术进行初筛,经过

5 次重复转接,富集培养获得具有纤维素分解能力的培养物,可使 43 份材料发生崩解、断裂的滤纸条和腐烂的菌渣丝状化;经过 10 次的继代培养,富集后表现较好的培养物通过测定 43 个菌源提取材料的降解率,初步筛选出 25 个具有较强的菌渣降解率的样品。其中降解率在 50% 以上的有 1 份材料、降解率在 40% 以上的有 1 份材料、降解率在 30% 以上的有 4 份材料、降解率在 20% 以上的有 10 份材料、降解率在 10% 以上的有 8 份材料、降解率在 10% 以下的有 1 份材料。经低温驯化培养得到可在 15 ℃ 条件下分解纤维素物质的菌系 17 份,通过不同代数菌渣降解率及纤维素酶活性测定,获得一株可在低温(12 ℃)条件下可以分解菌渣且纤维素酶活较高的复合菌系 MDJ39。

2.2 MDJ39 复合菌系纤维素降解菌株的分离与鉴定

由表 2 可知,以培养基 D 分离效果最好,平均分离菌落数为 39.4 CFU·g⁻¹,显著优于其他 3 种分离培养基。

样品	分离菌落数/(CFU·g ⁻¹)			
	培养基 A	培养基 B	培养基 C	培养基 D
1	3	8	5	4
2	1	1	2	30
3	2	2	0	100
4	3	2	3	60
5	2	1	1	3
均值	2.2	2.8	2.2	39.4

由表 3 可知,从 MDJ39 中共获得了 33 个菌株,其中降解能力较强的菌株 11 个,有中度降解能力的菌株 4 个,有轻微降解能力菌株 9 个,没有任何降解能力的菌株 9 个。

通过测定 FPA 酶活性,从 11 个菌株中进一步筛选纤维素降解功能菌。结果表明:MDJ39-33 的 FPA 酶活性最好,为 21.55 U·mL⁻¹,显著好于其他菌株,被确定为纤维素降解菌株(表 4)。同时,比较发现 MDJ39-33、MDJ39-31、MDJ39-23、MDJ39-21、MDJ39-13 功能菌株在蛋白胨纤维素培养基上 FPA 酶活性较高(表 5),其中 MDJ39-33 FPA 酶活性最高,为 41.55 U·mL⁻¹。

表 3 纤维素降解菌株初步筛选(滤纸)

菌株	降解度	菌株	降解度	菌株	降解度
MDJ39-1	+++	MDJ39-12	++	MDJ39-23	+++
MDJ39-2	+	MDJ39-13	+++	MDJ39-24	-
MDJ39-3	-	MDJ39-14	++	MDJ39-25	++
MDJ39-4	-	MDJ39-15	-	MDJ39-26	-
MDJ39-5	+++	MDJ39-16	+	MDJ39-27	++
MDJ39-6	+	MDJ39-17	+	MDJ39-28	+
MDJ39-7	+	MDJ39-18	-	MDJ39-29	+++
MDJ39-8	+	MDJ39-19	+++	MDJ39-30	-
MDJ39-9	+	MDJ39-20	+	MDJ39-31	+++
MDJ39-10	-	MDJ39-21	+++	MDJ39-32	+++
MDJ39-11	-	MDJ39-22	+++	MDJ39-33	+++

注:十表示菌株的降解能力;-表示菌株无降解能力。

以酶活较高的 MDJ39-33、MDJ39-31、MDJ39-23、MDJ39-21、MDJ39-13 功能菌株编号为真菌 1 号、真菌 2 号、细菌 3 号、细菌 4 号和细菌 5 号,对 5 株功能菌株的酶活性测定(表 6)。结果显示:滤纸酶活:真菌 1 号>细菌 4 号>细菌 5 号>细菌 3 号>真菌 2 号;CMC 酶活:真菌 1 号>真菌 2 号>细菌 4 号>细菌 3 号>细菌 5 号;C₁ 酶活:细菌 5 号>真菌 1 号>细菌 3 号>细菌 4 号>真菌 2 号; β -GC 酶活:真菌 1 号>细菌 3 号>细菌 5 号>细菌 4 号>真菌 2 号。可见滤纸酶活、CMC 酶活、 β -GC 酶活最高的均是真菌 1 号,分别为 43.25、50.10 和 44.18 U·mL⁻¹,细菌 5 号的 C₁ 酶活最高,为 0.62 U·mL⁻¹。

表 4 纤维素降解菌株复筛

菌株编号	酶活/(U·mL ⁻¹)
MDJ39-1	4.05
MDJ39-5	2.10
MDJ39-13	10.54
MDJ39-19	1.65
MDJ39-21	11.32
MDJ39-22	2.79
MDJ39-23	12.56
MDJ39-29	8.78
MDJ39-31	17.04
MDJ39-32	5.29
MDJ39-33	21.55

表 5 功能菌株在不同培养基上的 FPA 酶活 单位:U·mL⁻¹

培养基	MDJ39-13	MDJ39-21	MDJ39-23	MDJ39-31	MDJ39-33
Dubos 纤维素培养基(E)	13.02	15.50	23.41	25.54	18.19
蛋白胨纤维素培养基(F)	30.21	24.62	25.12	20.20	41.55

表 6 功能菌株的酶活性测定 单位:U·mL⁻¹

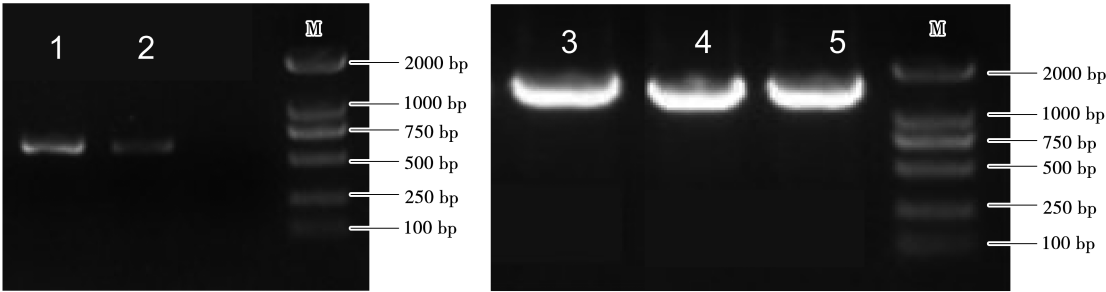
菌株	滤纸酶活	CMC 酶活	C ₁ 酶活	β-GC 酶活
真菌 1 号	43.25±0.02	50.10±0.15	0.60±0.19	44.18±0.47
真菌 2 号	15.94±0.15	47.20±0.03	0.38±0.71	6.45±0.38
细菌 3 号	23.25±0.05	38.52±0.20	0.54±0.16	13.37±0.67
细菌 4 号	31.24±0.07	41.30±0.11	0.39±0.50	11.44±0.66
细菌 5 号	27.01±0.13	37.23±1.68	0.62±0.73	12.71±0.33

2.3 纤维素降解功能菌株的分子生物学鉴定

以酶活较高的 MDJ39-33、MDJ39-31、MDJ39-23、MDJ39-21、MDJ39-13 功能菌株编号为 1 号~5 号的基因组 DNA 为模板,将 3 株细菌利用细菌通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增,2 株真菌通用引物 ITS/1ITS4R 扩增,利用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检验。如图 1 所示,两株真菌在 500~750 bp 之间出现明显的荧光条带,3 株细菌在 1 000~2 000 bp 之间出现明亮的荧光条带。

测序后将 16S rDNA 区片段和 ITS 片段的测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,筛选出同源性较高的序列,并采用 Mega 软件的 Neighbor-joining 法并构建系统发育树(图 2~图 6)。

序列比对结果表明,1 号菌株与聚多曲霉(*Aspergillus sydowii* NR 131259)的亲缘关系最近,将其鉴定为聚多曲霉,2 号菌株与日龄镰孢菌(*Fusarium pseudonygamai* MH862656)的亲缘关系最近,将其鉴定为日龄镰孢菌。3 号菌株与溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus hominis* MF678883)的亲缘关系最近,将其鉴定为溶血性葡萄球菌。4 号菌株与博代氏杆菌(*Bordetella petrii* DSM 12804 AJ249861)的亲缘关系最近,将其鉴定为博代氏杆菌属。5 号菌株与爪哇产碱菌(*Alcaligenes javaensis* AB914514)的亲缘关系最近,将其鉴定为爪哇产碱菌。



1~5 泳道,分别为菌株 MDJ39-33、MDJ39-31、MDJ39-23、MDJ39-21 和 MDJ39-13;M: Marker DL2000。

图 1 菌株 1~5 号的 PCR 产物电泳图

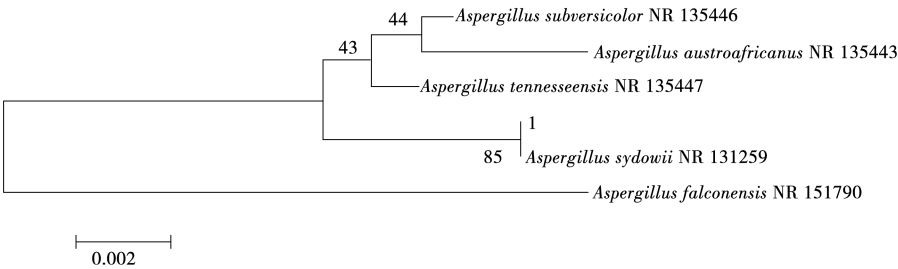


图 2 1 号菌株的进化树分析

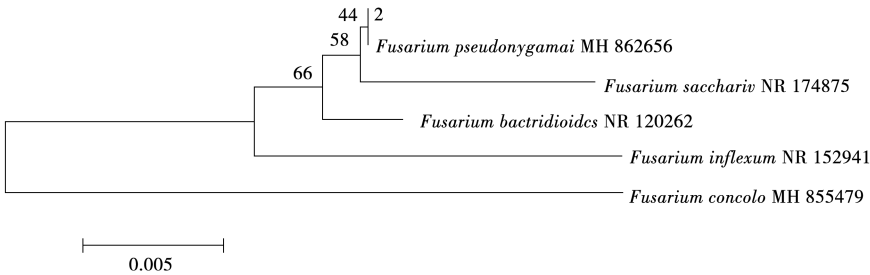


图 3 2 号菌株的进化树分析

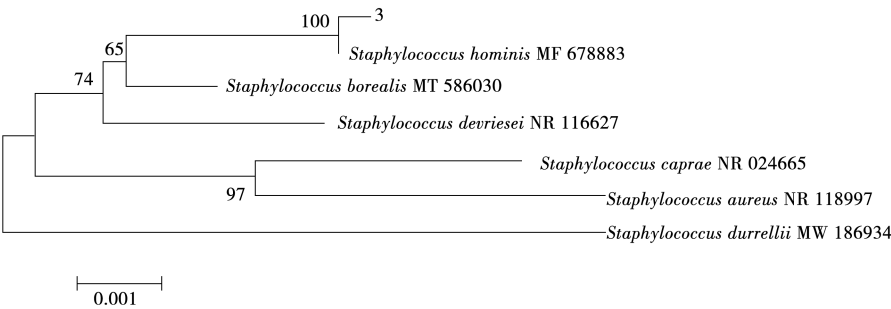


图 4 3 号菌株的进化树分析

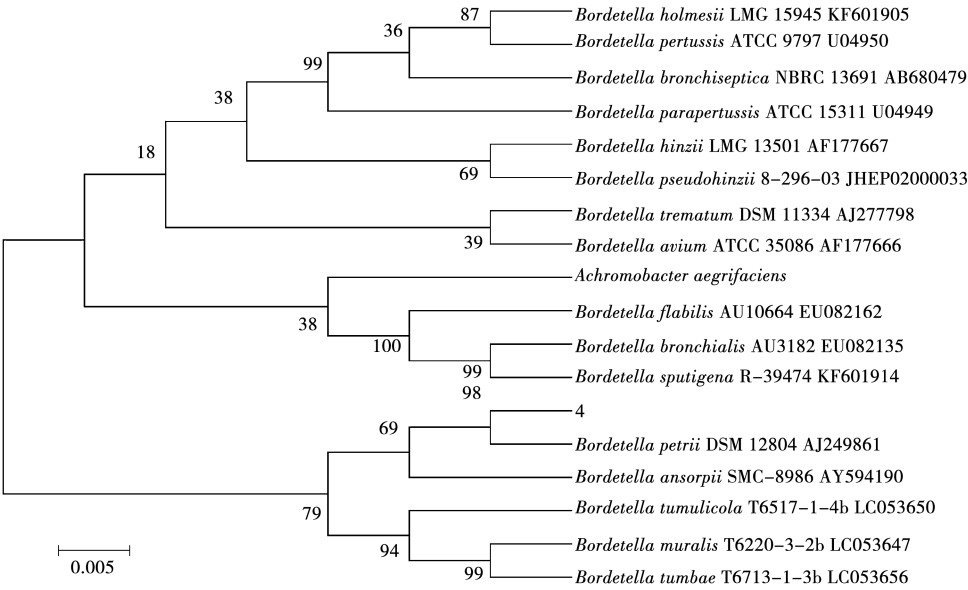


图 5 4 号菌株的进化树分析

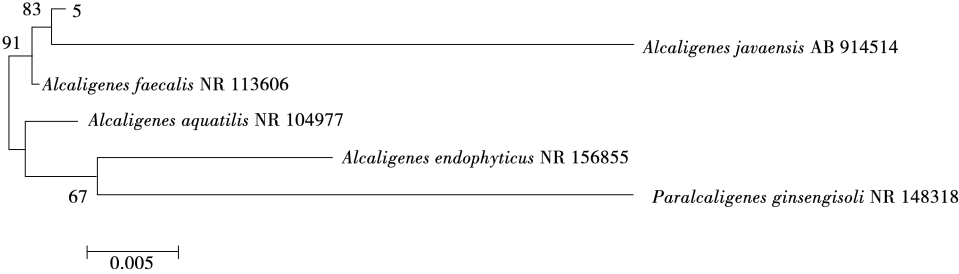


图 6 5 号菌株的进化树分析

2.4 主要纤维素降解菌株产酶环境条件

2.4.1 直观分析 对酶活性最高的 MDJ39-33 菌株进行产酶环境优化,由表 7 可知,T 6 处理的半纤维素酶活和各纤维素酶活最高,为较优的产

酶环境,即菌渣 30 g·L⁻¹、硫酸铵 3 g·L⁻¹、吐温-80 1.4 mL·L⁻¹、KH₂PO₄ 1.0 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1.0 g·L⁻¹、NaCl 0.5 g·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹,培养时间为 7 d。

表 7 不同产酶环境对 MDJ39-33 菌株半纤维素酶和纤维素酶活力的影响

处理	FPA	CMC	C ₁	β-葡萄糖苷酶	半纤维素酶
T1	13.5±0.093	30.4±0.292	0.7±0.007	26.0±0.240	23.2±0.170
T2	14.9±0.063	34.8±0.321	0.8±0.012	31.8±0.325	24.7±0.160
T3	18.6±0.097	40.7±0.309	0.8±0.006	49.3±0.553	27.1±0.202
T4	16.0±0.082	39.7±0.105	0.8±0.014	32.1±0.476	27.5±0.260
T5	19.6±0.089	43.8±0.199	0.9±0.009	41.7±0.318	33.6±0.162
T6	33.1±0.101	56.2±0.227	1.0±0.007	57.6±0.521	40.6±0.178
T7	20.1±0.085	52.8±0.397	0.9±0.010	47.8±0.524	37.6±0.259

2.4.2 回归分析 将菌渣(*x*₁)、硫酸铵(*x*₂)、培养时间(*x*₃)和吐温-80(*x*₄)作为自变量,酶活(*y*)作为因变量,采用逐步回归法建立各酶活的多元

非线性回归方程,如表 8 所示。各方程的决定系数(*R*²)较高,说明各方程拟合度较好。

表 8 酶活回归方程

酶	回归方程
FPA	$y=22.61x_1^2-0.01x_1^3+0.77x_1+0.63x_2-27.37x_4-0.38x_3x_4+13.65$ (<i>R</i> ² =0.983)
CMC	$y=-0.1x_3^2+0.49x_1+0.32x_1x_4+28.63$ (<i>R</i> ² =0.921)
C ₁	$y=-0.01x_3^2-0.71x_4^2+0.21x_2x_4+1.0x_3x_4+0.89$ (<i>R</i> ² =0.564)
β-葡萄糖苷酶	$y=0.59x_1+24.99x_4-1.58x_3x_4+20.41$ (<i>R</i> ² =0.877)
半纤维素酶	$y=0.47x_1-21.97x_4-0.37x_2x_3+6.43x_2x_4+0.96x_3x_4+28.37$ (<i>R</i> ² =0.922)

根据各酶活的回归方程可推导出理论最高酶活与最佳产酶条件(表 9)。与硫酸铵浓度无关的是 CMC 酶活和 β-葡萄糖苷酶,与菌渣量无关的是 C₁ 酶活。FPA 酶活代表了纤维素酶系活力综合作用效果,因此在实践中可作为产纤维素酶环境优化的指标。虽然产半纤维素酶和纤维素酶的环境在培养时间上有一定的差异,但半纤维素酶活在培养时间为 15 d 时,根据方程推导理论最佳酶活为 46.3 U·mL⁻¹,仍保持较高的酶活力。理论上产半纤维素酶和纤维素酶的最优环境是菌渣 35 g·L⁻¹、硫酸铵 3.5 g·L⁻¹、吐温-80 1.4 mL·L⁻¹、KH₂PO₄ 1.0 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 1.0 g·L⁻¹、NaCl 0.5 g·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹,培养时间为 15 d。

在理论最优产酶环境下,重复 10 次试验验证,各酶活实际值与理论之间差异均不显著(*P*>0.05)。

表 9 理论最佳酶活力和产酶环境

酶	最高酶活/ (U·mL ⁻¹)	产酶环境			
		菌渣/ (g·L ⁻¹)	硫酸铵/ (g·L ⁻¹)	时间/ d	吐温-80/ (mL·L ⁻¹)
FPA	35.0	35	3.5	3	1.4
CMC	61.4	35	—	3	1.4
C ₁	19.3	—	3.5	15	1.4
β-葡萄糖苷酶	69.4	35	—	3	1.4
半纤维素酶	46.3	35	3.5	15	1.4

3 讨论

菌渣结构复杂,木质素含量较高,自然降解速度缓慢,而低温一直是影响废弃菌渣还田后难以快速分解的主要因素。国内外当前菌渣降解茵研究多集中在中温和高温阶段,且以菌渣与畜禽粪便(比例较高)混合堆肥为主,工作量大,成本高,难以大面积推广使用。本试验研究采用微生物提

取物与低温诱导驯化技术,以当地土著微生物存在载体-食用菌菌渣及土壤等物料为低温降解菌的菌源提取材料,不存在外来菌源对本区域菌体污染的问题。国内外目前缺少有关单独菌渣高效降解菌的研究,菌渣降解的实质就是酶解过程,丁寅寅等^[24]对食用菌菌渣中酶的利用进行了研究,发现菌渣中含有大量的木质素降解酶,主要有漆酶、木质素过氧化物酶及纤维素酶等。微生物降解法因其能够提高废弃物利用效率、保护环境且耗能小,已被广泛关注。菌渣的粗纤维结构十分复杂,其分解是一门复杂的酶学过程,研究其在基质化利用中降解纤维素的方法主要围绕利用微生物制造纤维素酶进行研究^[25]。

当前降解纤维素的微生物主要有细菌、真菌和放线菌三类^[26]。已知的产纤维素酶的细菌主要有梭菌属、芽孢杆菌属、单胞菌属和枝孢菌属等,但胜利等^[27]研究从森林腐熟土壤中筛选出一株产纤维素降解菌 DT13,经形态学、革兰氏染色和分子生物学鉴定确定 DT13 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),通过设计单因素试验与正交试验对菌株 DT13 产纤维素酶条件进行优化,确定其最佳产酶条件为初始 pH7.0、发酵温度 40℃、发酵时间 96 h。就应用而言,对纤维素酶的研究大多集中在青霉、曲霉、木霉等真菌上。因真菌在生长过程中产生大量穿透力强的菌丝,并附着在物质表面,通过增大接触面积加快其降解速率,且真菌在酸性条件下能分泌大量胞外酶,加快纤维素降解的过程^[28]。李子婧等^[29]筛选到 1 株高效纤维素降解率的木霉真菌 (*Trichoderma longibrachiatum* ZJ-10),在最适条件下测定的菌株 ZJ-10 的酶活力可达到 $80.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。链霉菌是土壤中优势的放线菌群,在高温和碱性条件下仍然具有较高的酶活性,赖国栋等^[30]在土壤中分离出 3 株具有高效降解纤维素功能的链霉菌菌株,其纤维素酶活分别达到 37.714, 30.694 和 25.336 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。虽然关于纤维素降解的菌株目前已经报道,但用于处理食用菌菌渣的较少,且酶活较低,本试验筛选出具有高效降解纤维素的菌株为聚多曲霉,在培养时间为 15 d 时,半纤维素酶活最高可达到 $46.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,该菌株对食用菌菌渣降解功能的研究具有重要的应用前景。

4 结论

本研究从黑龙江省采集的样品中,筛选分离得到 5 株纤维素降解菌株,其中降解能力最强的为真菌 GMDJ39-33,经分子生物学鉴定属于聚多曲霉。产半纤维素酶和纤维素酶的最优条件是菌渣 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸铵 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、吐温-80 $1.4 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,培养时间为 15 d。

参考文献:

- [1] WILLIAMS B C, McMULLAN J T, McCAHEY S. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 79 (3): 227-230.
- [2] PHAN C W, SABARATNAM V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(4): 863-873.
- [3] 李林超, 张超, 董庆, 等. 堆肥过程中纤维素降解菌的分离与鉴定[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 165-171.
- [4] 郜道玉, 周源, 龚萍, 等. 耐高温纤维素降解菌株的筛选、鉴定及其酶活力的测定[J]. *饲料研究*, 2022, 45(19): 69-73.
- [5] 吴婧, 聂彩娥, 朱媛媛, 等. 一株兼具产 IAA 能力纤维素降解菌的筛选、鉴定及条件优化[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(12): 54-63.
- [6] 潘知乐, 杨鸿, 时佳旭, 等. 纤维素降解菌的筛选鉴定及其特性研究概况[J]. *环境科学与管理*, 2019, 44(4): 102-105.
- [7] 张必周, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温降解菌的分离与鉴定及复配菌降解效果研究[J]. *玉米科学*, 2020, 28(6): 168-175.
- [8] 李娜, 韩永武, 金勋, 等. 一株低温秸秆纤维素降解菌的分离、鉴定及降解特性[J]. *玉米科学*, 2019, 27(1): 159-163.
- [9] 单建荣, 全鑫, 朱用哲, 等. 一株低温纤维素降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. *生态学杂志*, 2021, 40(4): 1128-1136.
- [10] 马海玲. 基于动物粪便的纤维素分解菌筛选及分解纤维素能力研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2012.
- [11] 刘晓梅, 邹亚杰, 胡清秀, 等. 菌渣纤维素降解菌的筛选与鉴定[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(7): 1384-1391.
- [12] 葛江丽, 施汉钇, 刘瑰琦, 等. 筛选产纤维素酶菌株及其产酶条件的优化[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(30): 10441-10442, 10455.
- [13] 韩梦颖, 王雨桐, 高丽, 等. 降解秸秆微生物及秸秆腐熟剂的研究进展[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(6): 1024-1030.
- [14] 罗萍, 陈永辉, 贺军军, 等. 菠萝渣纤维素降解菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学杂志*, 2011, 31(2): 59-63.

- [15] 石春芳,李欣,莫紫琳. 醋渣纤维素降解菌的筛选鉴定及混合菌系的构建[J]. 科学技术与工程,2018,18(9):194-197.
- [16] 武肖莎,李再兴,黄亚丽,等. 高温木质纤维素降解菌的筛选鉴定及其堆肥应用[J]. 安徽农业科学,2021,49(20):68-71.
- [17] 孙悦. 高温纤维素降解菌的分离与鉴定研究[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院,2021.
- [18] 李林超. 堆肥中具有纤维素降解功能的菌株筛选及其应用效果评价[D]. 泰安:山东农业大学,2020.
- [19] ZHANG Q, LO C M, JU L K. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4):753-760.
- [20] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2):257-268.
- [21] 齐云,袁月祥,陈飞,等. 一组纤维素分解菌的分离、筛选及其产酶条件的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6):510-512.
- [22] 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.
- [23] 魏景超. 真菌分类鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社,1974.
- [24] 丁寅寅,刘明广. 食用菌菌渣中酶的利用研究[J]. 吉林工程技术师范学院学报, 2016, 32(2):89-91.
- [25] 官秀杰,钱春荣,于洋,等. 近年纤维素降解菌株筛选研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2021, 29(2):68-77.
- [26] 许玉林,郑月霞,叶冰莹,等. 一株纤维素降解真菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2013, 40(2):220-227.
- [27] 倡胜利,邹莎莎,吴书云,等. 纤维素降解菌的分离、鉴定与产酶条件探究[J]. 南方农业, 2022, 16(2):21-23,54.
- [28] ADSUL M G, BASTAWDE K B, VARMA A J, et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7):1467-1473.
- [29] 李子婧,刘帆,汤胜,等. 纤维素降解菌长枝木霉菌(*Trichoderma longibrachiatum*) ZJ-10 的筛选及产酶条件优化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2022, 48(5):614-624.
- [30] 赖国栋,秦长生,赵丹阳,等. 纤维素降解菌株的分离与筛选[J]. 林业与环境科学, 2021, 37(4):24-32.

Screening of High-Efficiency Degrading Bacteria from Edible Fungi and Optimization of Enzyme-Producing Conditions of Main Strains

MENG Xianghai¹, WANG Baicheng¹, ZHANG Xingzhe¹, YANG Bing¹, LI Yumei², WANG Yanfeng¹, WANG Jinhe¹, WANG Xingming³

(1. Mudanjiang Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang 157000, China; 2. Heilongjiang Institute of Black Soil Protection and Utilization, Harbin 150086, China; 3. Agricultural Technology Extension Center of Dongning, Mudanjiang 157299, China)

Abstract: In order to screen a compound strain that can efficiently degrade waste mushroom residue, effectively promote the degradation rate of mushroom residue, and determine the optimal fermentation environment for the main functional strains of the compound strain. The indoor test method was used to screen 205 bacterial source materials collected by enrichment culture, limited subculture and low-temperature generation by generation domestication technology. The best bacterial source extraction materials were selected through the determination of cellulase activity. At the same time, the main functional strains were isolated by streak culture, and the enzyme production conditions of the strains were optimized. The results showed that a material with the strongest cellulose degradation ability was isolated and purified from 205 bacterial extracts. It was found that the strain belonged to *Aspergillus*, and the main strain with high enzyme production was *Aspergillus sydowii*. The optimization of enzyme production conditions of the strain showed that the optimal conditions for producing hemicellulase and cellulase were 35 g·L⁻¹ of bacterial residue, 3.5 g·L⁻¹ of ammonium sulfate, 1.4 mL·L⁻¹ of Tween-80, 1.0 g·L⁻¹ of KH₂PO₄, 1.0 g·L⁻¹ of MgSO₄·7H₂O, 0.5 g·L⁻¹ of NaCl, 0.1 g·L⁻¹ of FeSO₄·7H₂O, the incubation time was 15 days. The results of this study identified the main functional strains in the complex strains and their fermentation environment, which provided valuable resources for the rapid degradation of waste bacterial residue resources and provided technical basis for the utilization of bacterial residue resource fertilizer.

Keywords: edible fungi; waste bacterial residue; cellulose degrading bacteria; screening; enzymatic conditions