

文章编号: 1673-1689(2011)01-0144-07

红树林土壤纤维素酶产生菌筛选及产酶条件研究

王春燕, 刘四新*, 高阳, 周艳艳, 陈涛涛

(海南大学 食品学院, 海南 海口 570228)

摘要: 采用 CMC 唯一碳源平板法和内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶等 3 种酶平板鉴别法从海南红树林土壤中分离到 109 个有阳性信号的菌株, 经发酵产酶复筛选出一株产纤维素酶活相对较高的真菌 HBZ003。经鉴定该菌为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)。通过发酵产酶条件优化, 获得最佳培养基组成为: 麸皮 8 g/L, CMC 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, KNO_3 2 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 6 g/L, CaCl_2 0.5 g/L; 发酵条件为 250 mL 三角瓶中装培养液 100 mL, 在 pH 4.0、30 °C, 160 r/min 条件下振荡培养 5 d, 测得发酵液中 CMCase 和 FPA 分别为 16.04 U 和 4.08 U。

关键词: 红树林; 纤维素酶产生菌; 菌种筛选; 产紫青霉; 发酵条件

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Screening of Cellulase-Producing Strains from Mangrove Soil and Optimization of Fermentation Conditions

WANG Chun-yan, LIU Si-xin*, GAO Yang, ZHOU Yan-yan, CHEN Tao-tao

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In this study, 109 strains with positive signals were collected and screened from mangrove soil using unique G-source plating and differential plating technique for Endo-glucanase, exo-glucanase and β -glucosidase. A fungus HBZ003 with high enzyme activity was obtained identified as *Penicillium purpurogenum*. The optimum medium components for cellulose production by strain HBZ003 were determined and listed as follows: wheat bran 8 g/L, CMC 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, KNO_3 2 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 6 g/L and CaCl_2 0.5 g/L. The maximum activities of carboxymethyl cellulase activity (CMCase) and filter paper activity (FPA) were reached at 16.04 U and 4.08 U, respectively, after culture 5 days under 30 °C, initial pH 4.0 and 160 r/min.

Key words: mangrove, cellulase-producing strain, strain screening, *Penicillium purpurogenum*, fermentation conditions

纤维素酶降解纤维素与常规化学法相比具有很大优势, 而且其在众多工业领域如食品、饲料、医

药、纺织、洗涤剂 and 造纸工业等^[1], 具有广泛应用价值。但通常用酶量大、成本高, 同样限制了其实际

收稿日期: 2010-01-17

基金项目: 海南大学博士启动基金资助项目(Rndy0706)。

* 通信作者: 刘四新(1967-), 女, 湖南长沙人, 农学博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究。Email: liusixin@

21cn.com

应用。因此从特殊生态环境筛选高产的、适应性强的产酶菌株,并优化发酵工艺以提高纤维素酶的生产量,具有现实意义。

红树林(mangrove)是热带、亚热带陆海交汇的海湾河口潮间带特有的木本植物群落,红树林土壤兼有海洋和陆地的性质,具有沼泽化、盐渍化、强酸性、有机质含量高等主要特征^[2]。对红树林生态系统凋落物的微生物分解的研究表明,这种独特生境中蕴藏着极丰富的微生物多样性及其资源的珍稀性^[2-4],由于红树林中含有大量纤维素、木质素和几丁质等大分子有机物,因此红树林土壤中许多微生物都能产生降解纤维素、木质素和其他植物成分的酶,其中真菌最普遍,有些地区红树林中的放线菌也能产生纤维素酶^[3-5]。因此从红树林生态环境筛选高产纤维素酶菌株有着重要潜力。

作者致力于从海南省的红树林土壤环境筛选纤维素酶高表达基因以及高产菌株,以下报道菌株筛选及其产酶条件优化等试验情况。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采自海南东寨港、文昌两地红树林环境。从距植株直径约1~2 m范围、离地表约10~20 cm深处采集泥土装入无菌袋,立即带回实验室处理。

1.2 试剂

刚果红:中国远航试剂厂产品;CMC:国药化学集团有限公司产品;七叶素苷:4-甲基伞形酮- β -葡萄糖苷(MUC),柠檬酸高铁铵:Sigma公司产品,其余试剂均为分析纯。

1.3 培养基

1.3.1 富集培养基 CMC 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, K_2HPO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, CaCl_2 0.3 g, ZnSO_4 0.0017 g, MnSO_4 0.0016 g, CoCl_2 0.002 g, 陈海水 500 mL,加水至1 L, pH 值自然,在121 °C下灭菌20 min。灭菌方式下同。

1.3.2 平板筛选培养基

1) 初筛培养基 筛选细菌:CMC 10 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂粉 20 g, 陈海水 500 mL, 加蒸馏水至1 L, pH 7.2~7.4; 筛选真菌:CMC 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, NH_4NO_3 1 g, NaCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 琼脂粉 20 g, 氯霉素溶液(0.125 g/mL) 2 mL, 陈海水 500 mL, 加蒸馏水至1 L, pH 值自然; 筛选放线菌:CMC 10

g, 蛋白胨 1 g, KNO_3 1 g, NaCl 0.5 g, KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂粉 20 g, 重铬酸钾液(50 $\mu\text{g/g}$) 2 mL, 陈海水 500 mL, 加蒸馏水至1 L, pH 7.4~7.6。

2) 鉴别培养基 内切葡聚糖酶鉴别:CMC 10 g, 蛋白胨 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaCl 0.5 g, 琼脂粉 20 g, 加蒸馏水至1 L, pH 值自然; 外切葡聚糖酶鉴别:CMC 10 g, 蛋白胨 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaCl 0.5 g, 琼脂粉 20 g, 加蒸馏水至1 L, pH 值自然; β -葡萄糖苷酶鉴别:CMC 10 g, 蛋白胨 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaCl 0.5 g, 琼脂粉 20 g, 七叶素苷 1 g, 柠檬酸高铁铵 2.5 g, 加蒸馏水至1 L, pH 值自然。

1.3.3 液体种子培养基 参考文献[6]进行。

1.3.4 发酵基础培养基 CMC 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, ZnSO_4 0.0014 g, MnSO_4 0.0016 g, CoCl_2 0.003 g, 加蒸馏水至1 L, pH 值为5.3。

1.4 筛选方法

1.4.1 富集培养 称取10 g土样在无菌操作下加至90 mL无菌水中(之前加有玻璃珠),用涡旋振荡器充分振荡。静置半小时后取10 mL上清液加至90 mL的富集培养液(250 mL三角瓶)中,于160 r/min、28 °C下振荡培养48 h。

1.4.2 初筛 取10 mL富集培养液作梯度稀释,分别涂布于(真菌筛选)或倾注法接种于(细菌和放线菌筛选)3种初筛平板上,适温培养。挑取所有生长的单菌落接种于试管斜面,以备下述平板鉴别。

内切葡聚糖酶的鉴别^[7]:将斜面菌株点种于鉴别平板,每板小于30株,培养过夜。以0.1%刚果红溶液染色,20 min后用1 mol/L NaCl溶液脱色。刚果红能使具有 β -1,4-糖苷键结构的纤维性底物染成红色,而纤维素底物CMC经水解后生成纤维二糖和纤维糊精,由于纤维素底物分子量降低,刚果红不能吸附着色,使得菌落周围形成黄色透明水解圈。有黄色透明圈者为阳性菌落。

外切葡聚糖酶的鉴别:点种平板,培养过夜。将质量分数0.04% 4-甲基伞型酮- β -葡萄糖苷(MUC)的质量分数0.6%琼脂糖溶液倒于平板上,轻轻晃匀,约3 h后将平板置于340 nm下的紫外光下观测、拍照。由于MUC中的糖苷键被外切酶切断后,4-甲基伞型酮成为发色基团,在紫外光下可产生白色荧光,故有荧光信号者为阳性菌落。

β -葡萄糖苷酶的鉴别:点种平板,培养过夜。由于 β -葡萄糖苷酶能够水解七叶苷中的 β -糖苷键生成葡萄糖和七叶素,七叶素与培养基中柠檬酸高铁铵的三价铁离子反应,生成黑色化合物,使培养基呈黑色,故有黑色沉淀圈者为阳性菌落。

1.4.3 摇瓶复筛 以各阳性特征圈直径与菌落直径的比值(D/d)作为判别指标,挑选比值大于2的菌株进行分离纯化、斜面保藏,并再次鉴别,后分别接入液体种子培养基,在28℃、160 r/min振荡培养24 h,以体积分数5%接种量接入100 mL发酵培养基(250 mL三角瓶),在28℃、160 r/min下振荡培养96 h。分别测定两种酶活力(CM Case和FPA)。

1.5 菌株的鉴定

以形态观察和BIOLÓG生化鉴定系统结合进行。

1.6 酶活测定方法^[8-11]

1.6.1 羧甲基纤维素酶活(CM Case)测定 取0.5 mL适当稀释的发酵上清液,加至1.5 mL含质量分数1% CMC的乙酸-乙酸钠缓冲溶液中(pH 3.8),50℃恒温水浴中反应30 min。加入1.5 mL DNS(3,5-二硝基水杨酸)试剂(可终止酶反应),置沸水浴反应5 min,冷却、定容至25 mL,在540 nm下测定吸光值。以沸水浴灭活10 min的发酵上清液作空白对照。

1.6.2 滤纸酶活(FPA)测定 取0.5 mL适当稀释的发酵上清液,加至1.5 mL pH 3.8的乙酸-乙酸钠缓冲液中,再加1张滤纸条(Whatman No. 1, 6 cm×1 cm, 约50 mg),50℃恒温水浴中反应1 h后,加入1.5 mL DNS试剂(可终止酶反应),置沸水浴反应5 min,冷却、定容至25 mL,在540 nm下测定吸光值。以沸水浴灭活10 min的发酵上清液作空白对照。

酶活力定义:在pH 3.8、50℃下,每mL样液每分钟水解纤维素底物生成1 μ mol葡萄糖所需的酶量定义为1个酶活力单位,以U表示。

1.7 发酵条件研究

1.7.1 不同氮源对发酵产酶的影响 以10 g/L的

CMC为唯一碳源,在发酵基础培养基中添0.5 g/L的不同氮源,28℃、160 r/min下摇瓶培养96 h,分别测CM Case和FPA。

1.7.2 不同碳源对产酶的影响 在最佳氮源的基础上,分别添加10 g/L不同碳源,研究不同碳源对产酶的影响(条件同1.7.1)。

1.7.3 无机盐对发酵产酶的影响 在确定了最佳碳源、氮源的基础上添加不同种类不同浓度的无机盐,发酵后测定酶活力,研究不同无机盐对菌株发酵产酶的影响(条件同1.7.1)。

1.7.4 初始pH值对发酵产酶的影响 在最佳培养基的基础上,用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液调节不同发酵起始pH,在28℃、160 r/min下培养96 h后测定酶活,考察菌株的最适发酵起始pH。

1.7.5 培养时间对发酵产酶的影响 在最佳培养基及pH值、温度下,共培养8 d,每天同一时间取样测定各项酶活力,从而确定最佳产酶时间。

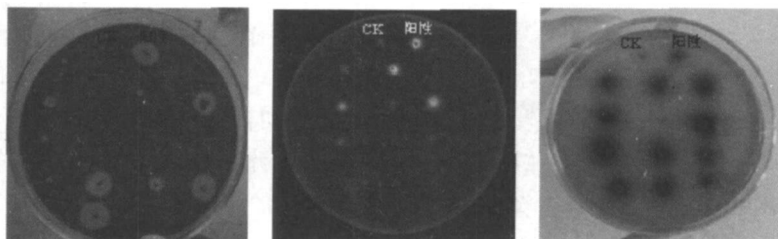
1.7.6 培养温度对发酵产酶的影响 在最佳培养基及pH值下,考察不同温度(20、25、30、35℃)下发酵5天所产酶活,从而确定其最适产酶温度。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛

样品经过一定时间的富集培养,用CMC唯一碳源平板法初筛,共挑到172个单菌落接至斜面,其中细菌筛选平板上生长的单菌落最多、共挑取105株,真菌和放线菌筛选平板上分别得到56株和11株。

对所有斜面菌株都分别点种于鉴别平板上进行产酶鉴别,根据是否产生黄色水解圈、荧光圈和黑色沉淀圈判断所对应菌株是否产生内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶。结果得到产内切葡聚糖酶菌株143株,产外切葡聚糖酶菌株25株,产 β -葡萄糖苷酶菌株126株。同时产生3种阳性信号的菌株12株。



注: CK: 大肠杆菌; 阳性对照: 绿色木霉 accc30206

图1 产内切葡聚糖酶(左)、外切葡聚糖酶(中)、 β -葡萄糖苷酶(右)菌株的平板鉴别特征

Fig.1 Identified features of strains with three kinds of cellulase on different media

以各阳性特征圈直径与菌落直径的比值(D/d)作为判别指标, 挑选比值大于 2, 共得到 109 株产不同类型纤维素酶的菌株。部分菌株在鉴定平板上的特征见图 1。

2 2 菌株复筛

将 109 个菌株分别进行摇瓶复筛, 发现筛选的菌株酶活力都不是很高, 其中只有 10 个菌株的酶活力较高, 详见表 1。从表 1 可见: 根据 D/d 大小, 可发现刚果红透明圈的大小与菌株发酵产 CM Case 基本成正相关; 其中, AZ102、BZ003、R107、Z005、030201、HBZ003 均为霉菌, AZ006、BZ001、040204 为细菌, 040203 为放线菌。真菌所产纤维素酶的种类较多, 酶系较齐全, 通常是某株菌在 2 个或 3 个鉴别平板上有阳性信号, 而细菌与放线菌所产纤维素酶的种类较少, 通常是某株菌只在某种鉴别平板上有阳性信号; 显示红树林环境微生物所产纤维素酶的内切酶较普遍, 而外切酶相对较少。其中,

HBZ003 的酶系齐全, 产酶活较高, 故对其进行更进一步的研究。

2 3 菌株 HBZ003 的鉴定

菌株 HBZ003 的菌落特征: 在 PDA 培养基上菌落形态较大, 表面干燥, 丝状交织, 粗而分化, 不透明, 与培养基结合较牢固, 表面呈绒毛状, 培养初期菌丝为白色, 后期孢子呈深绿色, 培养基背面菌落边缘红色至紫红色。

显微形态特征: 分生孢子梗生出菌丝侧枝, 直立, 呈三叉状分枝, 顶端膨大, 间枝一层, 小梗密集, 上生分生孢子团, 孢子呈椭圆形至圆形, 绿色。参照魏景超^[12]真菌鉴定手册中紫变青霉组, 菌株 HBZ003 与紫变青霉 (*Penicillium purpurogenum* Stroll) 的形态特征描述基本一致。

经 BIOLOG 生化鉴定系统鉴定(FF 鉴定板的)(如图 3), 结合该菌株的形态学特征, 鉴定菌株 HBZ003 为产紫青霉(*P. purpurogenum*)。

表 1 部分菌株的平板特征圈直径和酶活力

Tab. 1 Circle diameter of colonies and enzyme activities of some strains

菌株编号	透明圈与菌落直径比 (D/d)	荧光圈与菌落直径比 (D/d)	黑色圈与菌落直径比 (D/d)	CM Case(U) 发酵 5 d	FPA(U) 发酵 5 d	采样地
AZ006	4.0	—	2.0	7.49	174	海口东寨港
AZ102	4.0	2.5	3.0	7.93	2.66	海口东寨港
BZ001	—	3.0	3.5	5.73	1.67	海口东寨港
BZ003	3.0	3.0	5.0	7.18	2.18	海口东寨港
HBZ003	5.5	3.0	6.5	10.97	2.04	海口东寨港
R107	3.5	2.0	3.5	7.49	1.82	海口东寨港
Z005	4.5	2.0	3.0	9.87	1.88	海口东寨港
030201	3.6	1.0	3.0	8.87	1.70	文昌红树林
040203	4.0	—	4.0	8.92	1.92	文昌红树林
040204	—	4.0	3.0	3.56	0.97	文昌红树林

注: “—” 未显示阳性特征

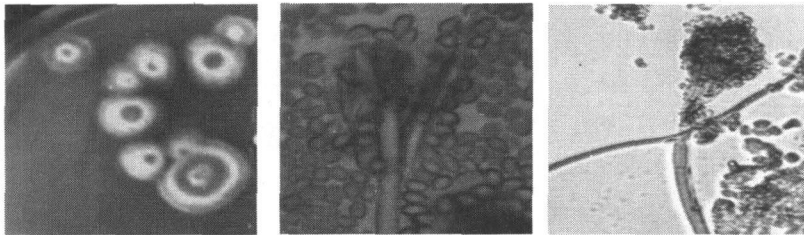


图 2 HBZ003 的菌落特征及显微特征

Fig. 2 Morphologic characteristics of strain HBZ003

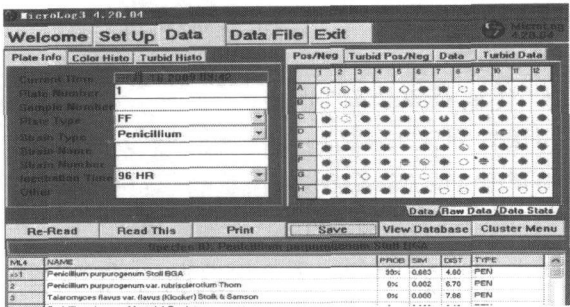


图 3 菌株 HBZ003 的 BIOLOG 生化鉴定结果

Fig.3 Biochemical results of strain HBZ003 by BIOLOG

2 4 菌株 HBZ003 的产酶条件

2 4 1 不同氮源对产酶的影响 表 2 结果表明,硫酸铵为最适氮源,硝酸钾、硝酸铵次之;将氨态氮和硝态氮以及氨态氮与有机氮以不同比例添加,则发现硫酸铵与硝酸钾以 3∶2、总量为 5 g/L 时,两种酶活力都最高。这可能是氨态氮和硝态氮添加到一定的比例时,可促进菌株的发酵产酶。此外,该菌株虽然利用无机氮源生长时不如牛肉膏、蛋白胨类的有机氮源旺盛,但利用无机氮时酶活力较高,这与高鸿健报道的青霉 DS-04 利用氮源的情况相似^[13]。

表 2 不同氮源对菌株产酶的影响

Tab.2 Effect of nitrogen resources on the cellulase activity			
氮源	CMCase/ U	FPA/ U	
牛肉膏	4.46	1.22	
蛋白胨	5.13	1.20	
尿素	0.35	0.23	
硫酸铵	9.21	1.43	
硝酸钾	8.31	1.32	
m(硫酸铵)∶m(硝酸钾)=3∶2	9.99	1.67	
m(硫酸铵)∶m(蛋白胨)=3∶2	9.15	1.42	

2.4.2 不同碳源对产酶的影响 由表 3 可见,以麸皮为碳源时,酶产量最高;而以麦芽糖和蔗糖为碳源时,虽然细胞生长迅速,但产酶量很低;当混合碳源麸皮与 CMC 以 4∶1 配比添加时,两种酶活力都较高。主要由于纤维素酶是诱导酶,在发酵中碳源是诱导物的主要来源,混合碳源麸皮与 CMC 之所以是最适碳源,可能与其中含有更合适的诱导物或生长因子有关。

2 4 3 无机盐对产酶的影响 一些金属离子在一定浓度下对纤维素酶的合成及酶活有促进或抑制作用。在红树林环境中 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 是主要的常量金属离子,因此选择了 4 种无机盐研究其

对产酶的影响。结果(表 4)表明 KH₂PO₄、NaCl、CaCl₂对产酶有促进作用,而添加各种浓度的 MgSO₄显示抑制产酶或抑制酶活性。

表 3 不同碳源对产酶的影响

Tab.3 Effect of carbon resources on the cellulase activity			
氮源	CMCase/ U	FPA/ U	
CM G Na	9.29	1.89	
微晶纤维素	8.23	1.68	
麸皮	9.60	2.10	
麦芽糖	0.71	0.73	
蔗糖	0.35	0.75	
m(麸皮)∶m(CM G Na)=4∶1	11.77	2.44	
m(麸皮)∶m(微晶纤维素)=4∶1	10.29	2.50	

表 4 无机盐对产酶的影响

Tab.4 Effect of inorganic salts on the cellulase activity			
无机盐	质量浓度/ (g/L)	CMCase/U	FPA/U
KH ₂ PO ₄	0	8.51	1.22
	1	9.03	1.51
	2	9.28	1.64
	3	10.22	1.64
	4	10.00	1.51
	5	9.18	1.48
NaCl	0	9.13	1.61
	2	10.91	1.73
	4	10.95	1.97
	6	13.42	1.97
	8	14.39	2.13
	1	10.40	1.59
CaCl ₂	0	8.89	1.58
	0.2	9.10	1.64
	0.3	9.29	1.78
	0.4	10.28	1.83
	0.5	12.89	2.19
	0.6	10.83	1.97
MgSO ₄	0	11.87	2.13
	0.5	11.26	1.98
	1.0	11.24	1.94
	1.5	10.97	1.70
	2.0	10.57	1.81

2.4.4 初始 pH 值的影响 结果(图 4)显示,当初始 pH 3~6 时,两种酶的活力相对都较高,可见该菌适于在酸性条件下产酶,其中,发酵最适初始 pH 值为 pH 4。海南红树林环境土壤的 pH 值一般是在 3.5~7.5 之间,因此,在初始 pH 3~6 适合该菌株发酵产酶;而当初始 pH 6~7 时,菌株产酶活性迅速下降。

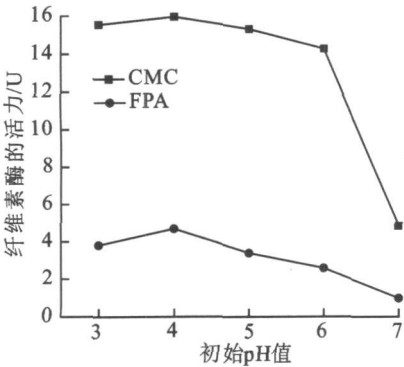


图 4 初始 pH 值对产酶的影响

Fig. 4 Influences of initial pH on the cellulase activity

2.4.5 培养时间的影响 由图 5 可知,培养 5 d 时,CMCase 和 FPA 均达到峰值,随后两种酶活均呈现下降趋势。故确定最佳发酵时间为 5 d。

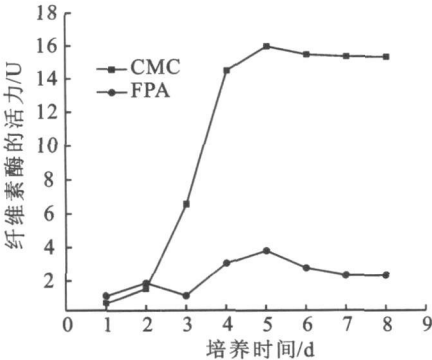


图 5 培养时间对产酶的影响

Fig. 5 Effect of culture on the cellulase activity

2.4.6 培养温度的影响 实验发现,该菌株在 20℃ 时不但菌体生长相对缓慢,产酶水平也较低,这

可能与其来源于海南的热带岛屿环境有关。该菌株在 25~30℃ 时产酶水平基本相当,而当温度超过 30℃ 时,两种酶活都显著下降,这可能与该菌株产酶代谢中的关键酶受超过 30℃ 抑制有关。作者以 30℃ 作为发酵温度,在前述获得的最佳发酵条件下,测得发酵液中 CMCase 和 FPA 分别可达 16.04 U 和 4.08 U。

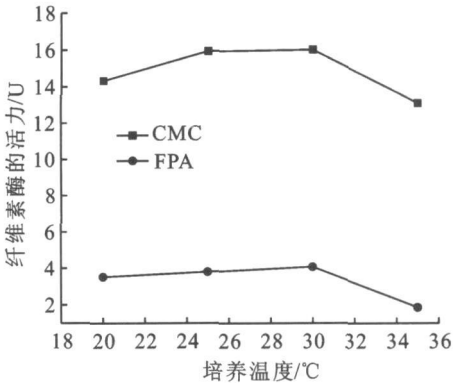


图 6 HBZ003 产纤维素酶的最适温度

Fig. 6 The optimum temperature for cellulase production by strain HBZ003

3 结 语

利用富集培养及 3 种纤维素酶的鉴别培养基的筛选,再通过摇瓶复筛,获得了 1 株具有较高活性的真菌 HBZ003,经鉴定为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)。

经过初步研究,其最适产酶条件为培养基含麸皮 8 g/L, CMC 2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3 g/L, KNO₃ 2 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 6 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L, 发酵液装量 100 mL/250 mL 三角瓶,在 pH 值 4.0、30℃、160 r/min 条件下摇瓶发酵 5 d,测得发酵液中 CMCase 和 FPA 分别为 16.04 U 和 4.08 U。作者的研究为海南红树林环境纤维素酶高产菌株的更广泛筛选和相关研究奠定了基础。

参考文献(References):

[1] 缪静,张术臻,程显好,等. 纤维素酶提取工艺及酶学性质的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 7954- 7955.
MOU Jing, ZHANG Shu-zhen, Cheng Xian-hao, et al. Study on the Extraction Technology and Enzymatic Properties of Cellulase[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2008, 36(19): 7954- 7955. (in Chinese)

[2] 蒋云霞,郑天凌,田蕴. 红树林土壤微生物的研究: 过去、现在、未来[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 848- 851
JIANG Yun-xia, ZHENG Tian-ling, TIAN Yun. Research on mangrove soil microorganisms: past, present and future[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2006, 46(5): 848- 851 (in Chinese)

[3] 林鹏. 中国红树林研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 592- 603.

- LIN Peng. A review on the mangrove research in China[J]. **Journal of Xiamen University Natural Science**, 2001, 40(2): 592–603. (in Chinese)
- [4] 林鹏, 张瑜斌. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性[J]. 海洋学报, 2005, 27(3): 133–141.
- LIN Peng, ZHANG Yubin. Microflora and antimicrobial activities of soil microorganisms in mangrove forests in the Jiulong Estuary, China[J]. **Acta Oceanologica Sinica**, 2005, 27(3): 133–141. (in Chinese)
- [5] Gina Huguin, Patricia Vazquez, Yeav Bashan. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview[J]. **Biol. Fert. Soils**, 2001, 33(4): 265–278.
- [6] 韩峰, 孙彩云, 宋小焱, 等. 拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokoningii*) UVIII 纤维素酶合成的诱导与阻遏[J]. 工业微生物, 2003, 33(1): 23–26.
- HAN Feng, SUN Caiyun, SONG Xiao-yan, et al. Induction and repression of cellulases production from *Trichoderma pseudokoningii* UVIII[J]. **Industrial Microbiology**, 2003, 33(1): 23–26. (in Chinese)
- [7] Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterisation of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1982, 43(4): 777–780.
- [8] 罗颖, 欧阳嘉, 许婧, 等. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报. 2007, 26(1): 84–89.
- LUO Ying, OU Yang-jia, XU Jing, et al. Screening and identification of a thermostable cellulase-secreting bacteria and its optimization for cellulase production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(1): 84–89. (in Chinese)
- [9] 林祥木, 童金秀, 陈汉清, 等. 产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的选择[J]. 福建农林大学学报, 2003, 32(4): 510–513.
- LIN Xiang-mu, TONG Jin-xiu, CHEN Han-qing, et al. The isolation of strains producing cellulases and the conditions of enzyme production[J]. **Journal of Fujian Agricultural University**, 2003, 32(4): 5–10 (in Chinese)
- [10] 胡晓燕, 曲音波. 细菌纤维素研究进展[J], 纤维素与纤维素学, 1998, 6(4): 56–64.
- HU Xiaoyan, QU Yinbo. Progress on research of bacterial cellulose[J]. **Journal of CELLULOSE SCIENCE AND TECHNOLOGY**, 1998, 6(4): 56–64. (in Chinese)
- [11] 李兰晓, 杜金华, 李军训, 等. CMC 糖化力法测定纤维素酶活性条件的研究[J]. 饲料工业, 2006(24): 49–52.
- LI Lan-xiao, Du Jin-hua, LI Jun-xun, et al. The Study of Determination of cellulase activity Conditions with CMC saccharification force method[J]. **Feed Industry**, 2006, 27(24): 49–52. (in Chinese)
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 511–512.
- [13] 刘清锋, 支晓鹏, 徐惠娟, 等. 纤维素降解菌青霉 T242 的分离及产酶特性[J]. 工业微生物, 2007, 37(3): 15–19.
- LIU Qing-feng, Zhi Xiaopeng, XU Huijuan, et al. Screening and characterization of cellulase-producing *Penicillium* sp. T242[J]. **Industrial Microbiology**, 2007, 37(3): 15–19. (in Chinese)
- [14] 高鸿健. 纤维素降解菌青霉 DS04 的筛选、产酶条件优化及其 CMC 酶性质研究[D]. 上海: 东北师范大学, 2006.