一株耐盐纤维素酶海洋曲霉的筛选及产酶条件研究

刘杰凤[1,2]， 薛栋升[2]， 何可可[2]， 陈慧英[2]， 姚善泾*[2]
（1. 广东石油化工学院 生物工程系，广东 茂名 525000；2. 浙江大学 化学工程与生物工程学系，浙江 杭州 310027）

摘要：从东海海底泥中分离到了一株耐盐和高产内切葡聚糖酶（CMCase）及 β-葡萄糖苷酶（β-Gluase）的海洋曲霉 ZJUBE-1，根据形态特征及 18S rDNA 分析，初步鉴定该菌为黑曲霉（*Aspergillus niger*）。通过液体发酵产酶优化，获得最佳培养基组成，质量分数分别为：麸皮 2.5%，氯化铵（或蛋白胨、磷酸二氢铵）1%，含 NaCl 3.0%～3.6%的人工海水作无机盐液。发酵条件为 100 mL 三角瓶装培养液 30 mL，在起始 pH 6.0、37 ℃，接种量为 6%，180 r/min 条件下振荡培养 7 d，测得发酵液中 CMCase、β-Gluase 酶活及滤纸酶活（FPA）分别为 5.3、5.4、0.75 U/mL。该菌在 NaCl 质量分数 24%下仍具产酶能力，所产 3 种纤维素酶的最适反应温度均为 65 ℃，最适反应 pH 分别为 4.0、5.0、5.0；在 NaCl 质量分数为 2%～12%（β-Gluase 在 2%～16%）范围内，3 种酶活力维持较高水平。该菌及其所产纤维素酶的高度耐盐性预示着其在废水处理、纺织业、海洋养殖、海产品加工或海藻的能源化利用等高盐环境下可能有较好的应用前景。

关键词：海洋；曲霉；耐盐；纤维素酶；黑曲霉
中图分类号：TQ 92　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2012)07—0711—08

Screening of a Cellulase Producing Halotolerant Strain Marine *Aspergillu* sp and Its Fermentation Conditions

LIU Jie-feng[1,2]， *XUE Dong-sheng*[2]， *HE Ke-ke*[2]， *CHEN Hui-ying*[2]， *YAO Shan-jing**[2]
（1. Department of Bioengineering，Guangdong University of Petrochemical Technology，Maoming 525000，China；2. Department of Chemical and Biological Engineering，Zhejiang University，Hangzhou 310027，China；）

Abstract：In this manuscript，a halotolerant marine strain *Aspergillus* sp ZJUBE-1 possessed the production of endoglucanase and β-Gluase with high cellulase activities was isolated from the submarine mud sample of Zhejiang inshore，and identified as *Aspergillus niger* by two different methods of both the morphology and 18S rDNA gene sequences. The optimal medium compositions for liquid-state fermentation for cellulase production by strain ZJUBE-1 were determined and listed as follows：wheat bran 2.5%，NH_4Cl or $(NH_4)H_2PO_4$ 1%，NaCl 3～3.6%. Under the condition of shaking culture for 7 days，at 37 ℃，the initial medium pH 6.0 and rotating speed 180 r/min，the maximum activities of carboxymethyl cellulase activity（CMCase），β-glucosidases（β-Gluase）and filter paper activity（FPA）were respectively reached at 5.3 U/mL-1，5.4 U/mL-1 and 0.75 U/mL，respectively. Moreover，the result showed that the strain still has cellulase productive ability，even the NaCl concentration exceed 24%. The studies on enzymatic properties showed that the optimal reaction temperature for CMCase，β-Gluase and FPA was the same temperature at 65 ℃，but the optimal pH value of three

收稿日期：2011—06—29
基金项目：国家 973 计划项目（2007CB707805）；广东省科技计划项目（2010B030800017）。
作者简介：刘杰凤（1965-），女，广东茂名人，副教授，主要从事生物技术研究。E-mail：gdmmljf@126.com
*通信作者：姚善泾（1957-），男，浙江杭州人，教授，博士研究生导师，主要从事生物技术研究。E-mail：yaosj@zju.edu.cn

enzyme production were different, corresponding to 4.0, 5.0, 5.0, respectively. It was also found that even on the condition of 2～12% NaCl (β-Gluase is about in 2～16%), the production of three cellulase keep higher activities. These above-mentioned results indicated that the strain ZJUBE-1 has an extensive applications under high salinity environment in many fields, such as wastewater treatment, textile industry, HYPERLINK" http://dict.cnki.net/dict_result.aspx?searchword=%e6%b5%b7%e4%ba%a7%e5%93%81%e5%8a%a0%e5%b7%a5&tjType=sentence&style=&t=marine+products+processing" marine products processing and the utility of seaweed for energy source for its high salt-tolerant property in the near future.

Key words: marine, *Aspergillus* sp, salt-tolerant, cellulase, *Aspergillus niger*

纤维素酶在食品、酿造、纺织、造纸、饲料等方面得到了广泛应用,近年来,在可再生资源利用、生物能源开发、环境保护等领域显示着良好的应用前景[1-4]。目前,纤维素酶主要源自陆源微生物,很少涉及海洋微生物产纤维素酶的研究。由于海洋环境独特,有可能造就多种多样的极端微生物及其独特的酶系,使其有着不同于陆源微生物酶的性能。海洋微生物酶一般在高盐条件下仍具有高的活性,同时海洋微生物酶还具有耐高温、可以在室温下长时间保持高活性、耐极端 pH 等特性[5]。这些特性将可以在很大程度上解决因工业化生产中的高盐、高温、强碱或强酸等使酶失活的问题。因此,海洋微生物作为产酶资源正成为一个新的研究热点。近年来,国内外一些学者展开了对海洋微生物产纤维素酶的研究[6-11],主要集中在海洋细菌产低温纤维素酶及产碱性纤维素酶领域,而对海洋真菌产纤维素酶的研究较少,尤其是海洋曲霉产纤维素酶的研究鲜见报道,而且现有报道的海洋微生物产纤维素酶活力与陆源微生物纤维素酶相比,都有较大差距。

作者从东海海域海底泥分离到一株具有在高盐下高产纤维素酶活性的真菌菌株 ZJUBE-1,从形态学和 18S rDNA 生物学手段对其进行鉴定,并对 ZJUBE-1 产纤维素酶的条件以及粗酶液的性质进行初步研究(产酶试验结果中的滤纸酶活另报道),为海洋纤维素酶生产菌株的研究提供了理论和实际价值。

1 材料与方法

1.1 培养基

富集培养基:CMC-Na 10 g,蛋白胨 1 g,葡萄糖 20 g, NH_4Cl 10 g,陈海水 1 000 mL;羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基:CMC-Na 10 g,NH_4Cl 10 g,琼脂粉 20 g,人工海水 1 000 mL,pH 7.0～7.4;纤维素-刚果红培养基:经酸处理纤维素粉 2 g,刚果红 0.2 g,明胶 2 g,琼脂 15 g,人工海水 1 000 mL;液体发酵产酶培养基:麸皮等碳源 15 g,氯化铵等氮源 10 g,陈海水 1000 ml,自然 pH 值。

1.2 菌株筛选

富集培养:称取来自东海海底 10 ～ 20 m 处泥样 5 g,加入 50 mL 富集培养基,振荡培养 3 d;平板初筛:取 0.2 mL 经富集培养的上层水样涂布于羧甲基纤维素钠培养基平板上,28 ℃培养,直至长出菌落。连续划线分离,得到纯化的单菌落;菌落鉴别:将已纯化的单菌落点接于纤维素-刚果红培养基平板上,28 ℃培养 5 d,选取产生透明水解圈较大的菌株为初筛菌种;摇瓶复筛:取适量初筛菌株接种于含质量分数 1%麸皮和 1%纤维素粉的液体发酵培养基中,28 ℃,160 r/min 振荡培养,第 5 或第 6 天测定培养液中纤维素酶活力,选取酶活最高的一株真菌进行产酶试验。

1.3 菌株鉴定

根据分离菌的培养特性、菌落特征及菌株形态,参照文献[12]和[13]初步鉴定到属,并对菌株进行 18s rDNA 分子鉴定。

1.4 液体发酵产酶试验

按一定接种量将浓度约为 5×10^7 个/mL 的菌株孢子悬液接入相应液体发酵培养基(100 mL 锥瓶装液 30 mL),于一定条件下培养。取发酵液,4 ℃、5 000 r/min 离心 15 min,上清液分级稀释,测定发酵液中的酶活力。考察碳源及氮源、培养温度、初始 pH、培养时间等因素对菌株产酶能力的影响。

1.5 酶活力测定及酶活力定义

还原糖质量浓度:用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定[8],以酶解液中还原糖(葡萄糖)含量表示酶活力大小。标准曲线的回归方程为:

$$y = 0.623x + 0.163,\ R^2 = 0.997 \quad (1)$$

式中 x 为光密度（$A_{540\ nm}$），y 为葡萄糖质量浓度（mg/mL）。

酶活力测定参考文献［19－21］方法，略有改进，具体如下：

内切葡聚糖酶（CMCase）酶活：取适当稀释的酶液 0.5 mL，加入 2.0 mL 1 g/dL 的 CMC-Na 溶液（溶于 0.1 mol/L 柠檬酸钠—柠檬酸缓冲液，pH 4.8），60 ℃ 反应 30 min，加入 2.5 mL DNS 终止反应，沸水浴显色 5 min，测定 $A_{540\ nm}$。以灭活酶液作对照；β-葡萄糖苷酶（β-Gluase）酶活：方法同前，底物为 0.5 g/dL 的水杨苷溶液（溶于醋酸—醋酸钠缓冲液，pH 5.0）；滤纸酶（FPA）酶活：取 50 mg（1 cm×6 cm）新华滤纸，加入酶液 0.5 mL，再加入 pH 4.8 的柠檬酸钠－柠檬酸缓冲液 2.5 mL，50 ℃反应 1 h，其它同前。

酶活力定义：在上述反应条件下，每分钟催化底物水解生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

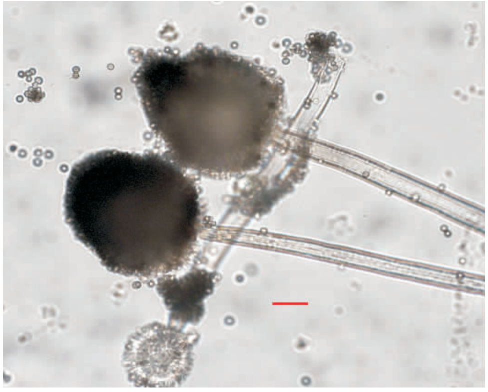
2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态学鉴定 在羧甲基纤维素钠培养基平板上插入盖玻片培养，观察菌落形态和菌丝性状。菌落形态：培养 12 h 后，培养基表面出现白色的菌落，分布疏松；至 24 h 后，菌落表面颜色变棕黑色，绒毛状，菌落背面为白色；到第 3 天时，黑色菌落长满整个平板。菌丝、分生孢子梗和孢子等形态：在显微镜下观察，可见菌丝体透明，分支有隔膜（见图 1A）；从基质中生出不分枝的孢子梗，孢子布满于孢子梗顶端的整个膨大部分，聚集成球状的褐黑色分生孢子头，分生孢子呈球形或长椭圆形，分生孢子壁光滑（见图 1(a)、(b)）。参照文献［12］和［13］，该菌株的形态特征与半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、丛梗孢科、曲霉属的黑曲霉符合。

2.1.2 分子鉴定 经上海生物工程有限公司进行测序分析，得到曲霉菌株的一段长度为 1 416 bp 的 18S rDNA 序列，将测序结果用 Blast 软件与 GenBank 中已知的基因序列进行同源性比较，发现其与 12 株已报道的曲霉属菌株有 98% 以上的同源性，其中，与 *Aspergillus niger* 的同源性达到 99%。结合形态学特征，初步将该菌鉴定为黑曲霉（*Aspergillus niger*），定名为 *Aspergillus niger* ZJUBE-1，并已在中国武汉菌种保藏中心保藏，其编号为 CCTCCM 2010132。

(a)



(b)

图 1 ZJUBE-1 菌丝及分生孢子光镜照片(a)分生孢子及分生孢子头光镜照片(b)

Fig. 1 Photograph of mycelium and conidispores (a), conidispores and conidial head (b) of ZJUBE-1

2.2 NaCl 浓度对菌株生长及产酶的影响

将曲霉分别接种于含不同 NaCl 质量浓度的液体发酵培养基培养，观察菌株的生长情况并测定酶活，测定结果见图 2 所示。结果表明，该菌株在试验的 NaCl 质量浓度范围（0～24 g/dL）均能生长，并显示出酶活性，在 NaCl 质量浓度为 2.4～12 g/dL 的培养基中生长较快，接种 10 h 后即明显可见小菌球，并且产酶量较高，但无 NaCl 存在或 NaCl 质量浓度高于 20 g/dL 时，产酶能力较弱。图 2 结果表明，该曲霉产 CMCase 的最适宜 NaCl 质量浓度为 2.4 g/dL 左右，而产 β-Gluase 的最适 NaCl 质量浓度为 3.6% 左右。该菌的产酶最适盐度刚好与海水质量盐度一致（3.3 g/dL 左右），并且该曲霉能耐受远大于海水的渗透压，显示出较强的耐盐性，

表明该菌源自海洋或已在海洋环境经历了较长的进化历程。

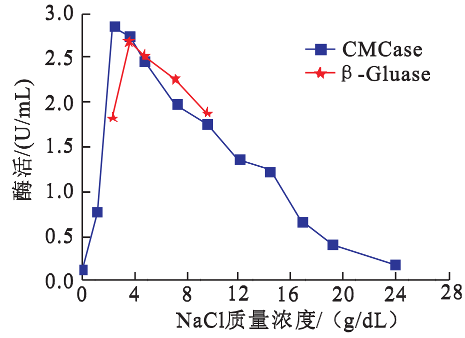


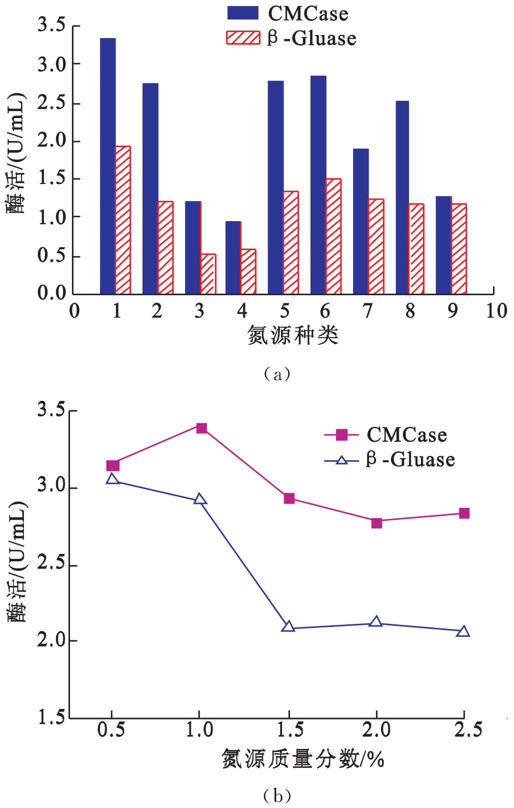
图 2　NaCl 质量浓度对菌株产酶性能的影响

Fig. 2　Effects of NaCl concentration on cellulase production

2.3　碳源和氮源对菌株生长及产酶性能的影响

2.3.1　不同氮源种类及用量对菌株生长及产酶的影响

以不加氮源作对照，考察了 6 种有机氮源和 5 种无机氮源对菌株生长及产酶的影响，结果见图 3(a)。



1. peptone; 2. yeast extract; 3. corn steep liquor; 4. beef extract; 5. urea; 6. NH_4Cl; 7. $NH_4H_2PO_4$; $(NH_4)_2SO_4$; 9. $(NH_4)_2HPO_4$; 10. NH_4NO_3

图 3　氮源种类(a)及氮源用量(b)对菌株产酶的影响

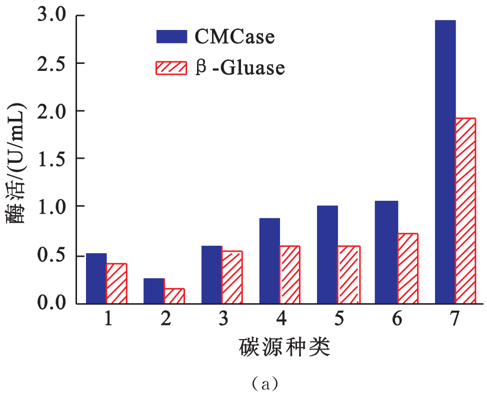
Fig. 3　Effects of nitrogen source species (a) and nitrogen source ratio (b) on cellulase production

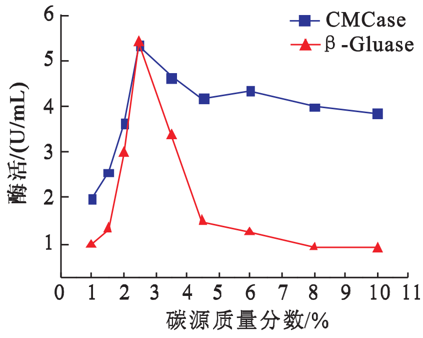
可见，氮源种类对菌株产酶的影响较显著，在总氮质量分数为 0.4% 的氮源浓度下，有机氮蛋白胨对菌株产酶最有利，无机氮中以磷酸二氢铵及氯化铵对产酶效果较好。尿素作唯一氮源时，纤维素酶活较低，可能与其浓度过高而起抑制作用有关。实验还发现，干酪素作唯一氮源时的结果与对照一样，酶活相当低，但对菌株生长无明显影响，表明其对产酶起一定的抑制作用。仅以无机氮作氮源时，产酶高峰较有机氮源滞后 10 h 左右，说明有机氮源中的氨基酸等小分子物质对该菌产酶是有利的，但玉米浆中各种有机酸可能对该菌产酶不利。综合考虑原料来源、生产成本、发酵时间等因素，可采用酵母浸膏及氯化铵复合氮源进行试验。作者采用酵母浸膏及氯化铵复合氮源进行试验。改变氯化铵浓度，考察了氮源用量对菌株产纤维素酶的影响，结果见图 3(b)(接种量 4 g/dL)。结果表明，无机氮源用量在 0.5～1 g/dL 较适于菌株产酶。

2.3.2　碳源种类及用量对菌株生长及产酶的影响

固定其它培养条件，考察了多种碳源对菌株生长及产酶的影响，以多糖作碳源的实验结果见图 4(a)。实验结果表明，菌株能较好地利用所考察的碳源生长，以天然纤维素类物质作为碳源能明显促进纤维素酶的合成，其中麸皮的促进作用最显著。相对于其它农作物秸秆，麸皮除含有大量纤维素、半纤维素和木质素外，还含有丰富的维生素、微量矿物元素及较多的氨基酸等营养物质，更适于菌株的生长及酶的合成分泌。稻壳作为单一碳源时酶活低，可能与其木质素和二氧化硅含量较高等有关。

以对产酶正影响最显著的麸皮为碳源，考察了碳源用量对菌株产纤维素酶的影响，结果见图 4(b)。





（b）

1. CMC；2. starch；3. rice shell；4. beanpod；5. rice straw；6. corn straw；7. wheat bran

图 4　碳源种类(a)及碳源浓度(b)对菌株产酶的影响

Fig. 4　Effects of carbon source(a) and carbon source concentration(b) on cellulase production

由图可知，在接种量为 6％时，碳源用量占发酵液体积的 2.5 g/dL 左右最适于产酶，尤其对 β-Gluase 的合成有强烈的促进作用，当碳源质量浓度超过 4.5 g/dL 以后，再增加碳源用量酶活变化不大，而且 β-Gluase 已降至较低水平。

2.4　培养条件对产酶的影响

2.4.1　培养基初始 pH 值对菌株产酶的影响　不同初始 pH 值对菌株生长及产酶的影响结果如图 5 所示。由图可知，初始培养基 pH 值对该菌产纤维素酶系活力也有较大的影响，当初始 pH 值在 6.0 左右时，CMCase 和 β-Gluase 活力最高，但 pH 7.0 之后，酶活较低。由于培养基配方中添加了无机氮源氯化铵后，pH 值刚好在 6 左右，所以，后续实验均为自然 pH 值。

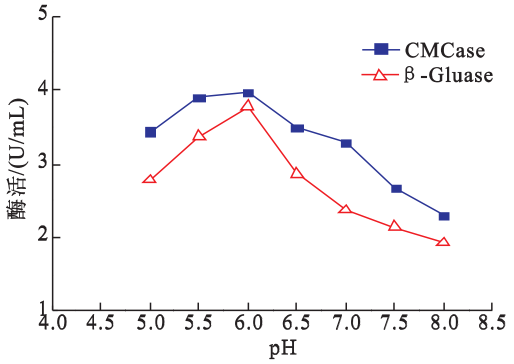


图 5　初始 pH 对菌株产酶的影响

Fig. 5　Effects of initial pH on cellulase production

2.4.2　不同培养温度对菌株产酶的影响　固定其它培养条件，考察了培养温度在 20～50 ℃范围内对菌株生长及产酶的影响，结果如图 6 所示。

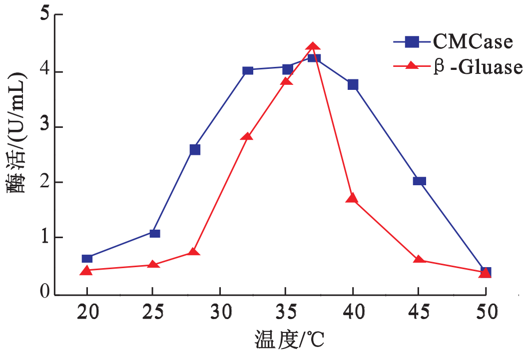


图 6　培养温度对菌株产酶的影响

Fig. 6　Effects of temperature on cellulase production

由图可知，由于菌株在低于 25 ℃时生长较缓慢，故产酶能力较低。当培养温度在 30～37 ℃时，CMCase 及 β-Gluase 活随着温度的升高而迅速上升，温度超过 37 ℃时，产纤维素酶能力迅速下降；同时，菌株 β-Gluase 受培养温度影响较 CMCase 敏感。一般真菌的最适生长温度为 28～32 ℃，多数文献报道的曲霉产纤维素酶培养温度也在 30 ℃左右[4－16]。而实验结果表明该曲霉的最适生长温度及产酶温度均在 37 ℃左右，同时还能在 50 ℃的温度下生长并有产酶能力，说明该海洋曲霉的温度耐受性比较高。

2.4.3　培养时间对酶活力的影响　分别在 28℃和 37℃下培养，从接种的第三天开始，每隔 24 h 取样测定酶活，考察菌株产酶能力随培养时间的变化情况，酶活变化曲线见图 7 所示（测定前按平均每天蒸发量 0.2 mL 补充无菌水）。

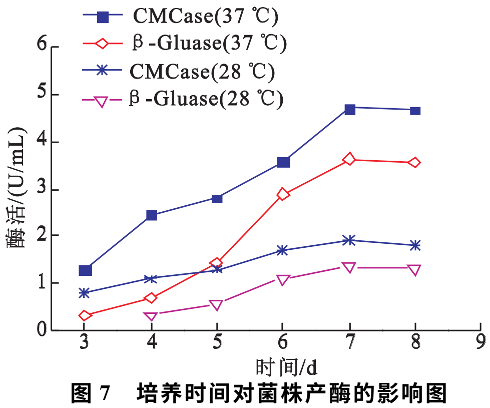


图 7　培养时间对菌株产酶的影响图

Fig. 7　Effects of culture time on cellulase production

由图 7 可知，对于纤维性碳源来说，在保证充足的营养条件下，该菌产 CMCase 及 β-Gluase 活力随着培养时间的延长而增大，直至菌体死亡溶解（约在第七天后），酶活才达高峰，并且发酵液中的

酶活在高峰后的两天内仍维持较高水平。说明该菌产纤维素酶在所培养的温度范围稳定性好,酶量不断积累,而酶活损失少。

2.4.4 接种量对菌株产纤维素酶的影响 不同接种量对菌株产纤维素酶的影响结果如图 8 所示。结果表明,孢子悬液(5×10^7 个/mL)占发酵液的体积分数为 4%~6%时酶活最高。接种量小,菌体浓度低,因而所产酶量少,酶活低。孢子悬液的体积分数大于 6%时,酶活呈下降趋势,超过 8%时,酶活变化不大。这是因为菌体浓度增加至一定程度时,受溶氧影响从而生长受到抑制所致。

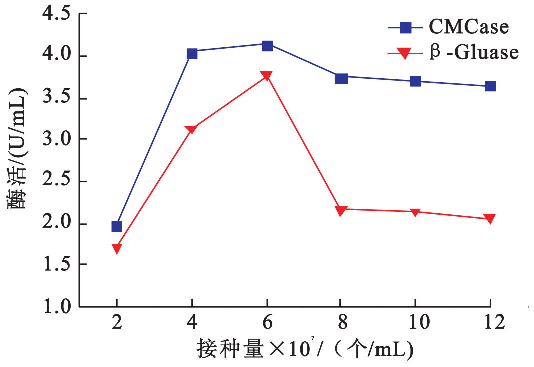
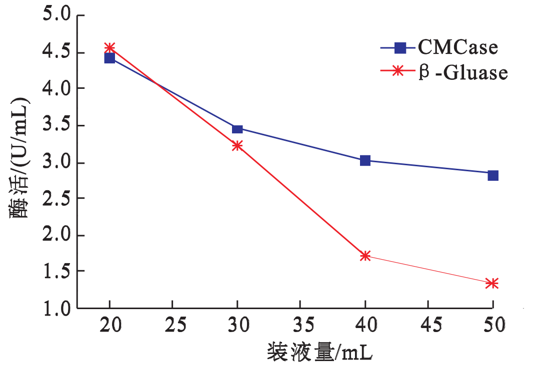


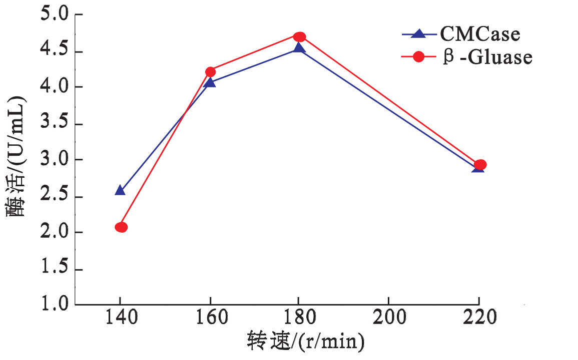
图 8 接种量对菌株产纤维素酶的影响

Fig. 8 Effects of inoculum size on cellulase production

2.4.5 装液量及摇床转速对菌株产酶的影响 陆生的曲霉产纤维素酶的培养是好氧发酵,培养过程的通气量对菌株生长及产酶有较大的影响。作者在上述单因素试验所确定的最佳实验条件下,在 100 mL 的摇瓶中,改变总发酵液体积(170 r/min),或固定其它条件(30 mL),改变摇床转速,考察了发酵系统通气量对海洋曲霉产纤维素酶的影响,结果见图 9(a)、图 9(b)(装液量试验中期及后期补充蒸发的水分)。



(a)



(b)

图 9 装液量(a)及摇床转速对菌株产酶的影响(b)

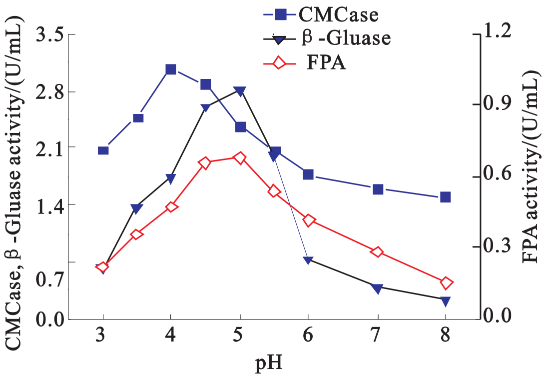
Fig. 9 Effects of liquid volume(a) and rotation speed (b) on cellulase production

由图可知,通气量对海洋曲霉产酶也有较大的影响,在摇瓶中,最适宜的装液量为发酵液体积占总容积的 1/5~1/3(100 mL 摇瓶装液 20~30 mL),适宜的摇床转速为 170~180 r/min。过高的转速对菌丝体有损伤作用,反而对产酶不利。

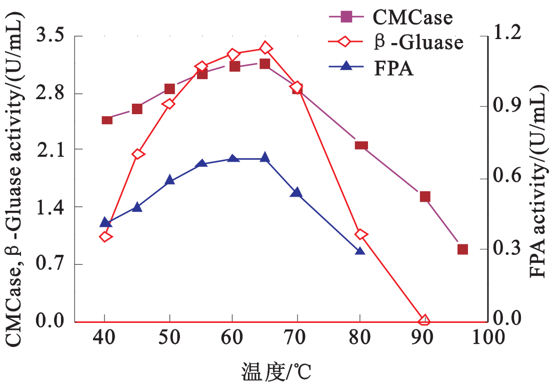
2.5 酶学性质初步研究

2.5.1 粗酶液酶促反应的最适 pH 和最适温度 将粗酶液用不同 pH 缓冲液稀释后,分别与相应的 pH 缓冲液配制的底物于 50 ℃下作用 30 min,测定酶活力,结果见图 10(a)。实验结果表明,CMCase 在 pH 3.5~4.5 有较高的酶活力,最适反应 pH 值为 4.0;β-Gluase、FPA 两种酶在 pH 4.5~5.5 酶活力较高,最适反应 pH 值为 5.0。

将粗酶液与底物在 pH 值为 4.5 或 5.0(β-Gluase)缓冲液中,于不同温度下直接进行酶促反应 30 min,测定酶活力,结果见图 10(b),实验结果表明,3 种酶最适反应温度均为 65 ℃。



(a)



(b)

图 10　最适反应 pH 值(a)和最适反应温度(b)

Fig. 10　The optimal pH(a) and temperature (b)

2.5.2　NaCl 质量浓度对酶活力的影响　在最适温度和 pH 下,改变反应体系中 NaCl 质量浓度所测定的结果见图 11。结果表明,CMCase、PFA 在 NaCl 质量浓度为 2～12 g/dL 时酶活力较稳定,而 β-Gluase 在 NaCl 质量浓度达 16 g/dL 时酶活力仍保持较高水平。继续增加 NaCl 质量浓度时,酶活稍有下降,但变化幅度不大。

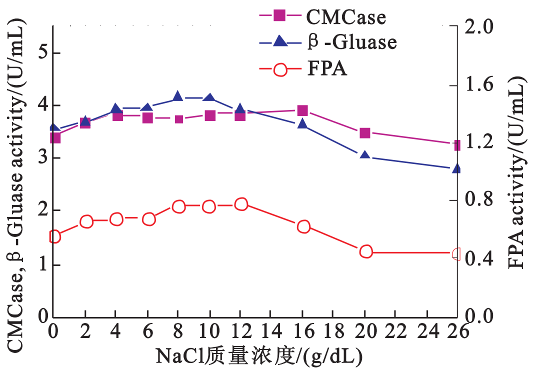


图 11　NaCl 质量浓度对纤维素酶活的影响

Fig. 11　Effect of NaCl concentraction on cellulase activity

3 结　语

从东海海泥分离到一株 *Aspergillus niger* ZJUBE-1。通过对海洋曲霉产酶条件的研究表明,该菌能在以纤维素为基质的培养基中诱导产酶,产生的纤维素酶属于胞外酶系,其中内切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶活力较高。在所考察的碳源种类中,麸皮对产纤维素酶的促进作用最强,适宜的麸皮质量分数为 2.5% 左右;蛋白胨、酵母膏、氯化铵或磷酸二氢铵作氮源均适于产酶,适宜的氮源用量为 1%;培养液中 NaCl 含量对菌株产酶也有较大影响,适宜的产酶质量浓度为 2.4～3.6 g/dL。适宜的产酶条件为:起始 pH 6.0,37 ℃,接种量 6%,转速 170～180 r/min,培养时间 7 d。在此条件下,发酵液的 CMCase 活力最高达 5.3 U/mL,β-Gluase 达 5.4 U/mL,FPA 达 0.75 U/mL。菌株产 β-Gluase 能力受培养条件尤其是培养温度、碳源用量及通气量等的影响较 CMCase 敏感。

对粗酶液的酶学性质研究结果表明:CMCase、β-Gluase、FPA 最适作用 pH 值分别为 4.0、5.0、5.0;最适作用温度均为 65 ℃。纤维素酶在温度低于 60 ℃、pH 3.5～5.5、2～12 g/dL NaCl 的环境下稳定性较好。研究还发现,未稀释的粗酶液(含 3 g/dL NaCl)在 9℃ 存放 2 个月后,残余酶活仍大于 80%;存放 4 个月后,CMCase 活力损失很少,β-Gluase 酶液仍保持有 70% 的酶活性。

该菌株能在 NaCl 质量浓度高于 24 g/dL 的环境生长,并且产酶条件较宽,所产 CMCase 及 β-Gluase 酶活较高,对 NaCl 的耐受性高,值得进一步研究开发与利用。

参考文献(References):

[1] GUO Yi-ping, FAN Shao-qun, FAN Yao-ting, et al. The preparation and application of crude cellulase for cellulose-hydrogen production by anaerobic fermentation[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2010, 35 (2): 459-468.

[2] Rajeev K, Singhania R R, Mathew G M, et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production[J]. **Renewable Energy**, 2009, 34 (2): 421-424.

[3] Jonathan R M. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2001, 4: 324-329.

[4] FANG Xu, SHEN Yu, ZHAO Jian, et al. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China[J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101 (13): 4814-4819.

[5] Rasmussnen R S, Morrissey M T. Marine biotechnology for production of food ingredients[J]. **Advances in Food and Nu-**

trition Research, 2007, 52: 237－92.

[6] CHI Zhen-ming, CHI Zhe, ZHANG Tong, et al. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications[J]. **Biotechnology Advances**, 2009, 27 (3): 236－255.

[7] 王玢，汪天虹，张刚，等.产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究，海洋科学，2003,27 (5): 41－45.
WAN Bin, WANG Tian-hong, ZHANG Gang, et al. Screening and characterization of the cold-adaptive cellulase-producing bacteria[J]. **Marine Sciences**, 2003, 27 (5): 41－45. (in Chinese).

[8] Trivedi N, Gupta V, Kumar M, et al. An alkali-halotolerant cellulase from Bacillus flexus isolated from green seaweed Ulva lactuca[J]. **Carbohydr Polym**, 2011, 83 (2): 891－897.

[9] Trivedi N, Gupta V, Kumar M, et al. Solvent tolerant marine bacterium Bacillus aquimaris secreting organic solvent stable alkaline cellulose[J]. **Chemosphere**, 2011, 83 (5): 706－712.

[10] Lee B H, Kim B K, Lee Y J, et al. Industrial scale of optimization for the production of carboxymethyl cellulase from rice bran by a marine bacterium. *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2010, 46 (1): 38－42.

[11] 王春燕，刘四新，高阳，等.红树林土壤纤维素酶产生菌筛选及产酶条件研究[J].食品与生物技术学报，2011，30(1): 144－150.
WANG Chun-yan, LIU Si-xin, GAO Yang, et al. Screening of cellulase-producing strains from mangrove soil and optimization of fermentation condition[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2011, 30(1): 144－150. (in Chinese)

[12] 戴芳澜.真菌的形态和分类[M]. 北京:科学出版社,1987.

[13] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社，1979.

[14] LIN PJ, Scholz A, Krull R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pelletmorphology and product formation of *Aspergillus niger*[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2010, 49 (2): 213－220.

[15] Couri S, da Costa Terzi S, Saavedra Pinto, et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8[J]. **Process Biochemistry**, 2000, 36 (3): 255－261.

[16] Singh R, Kumar R, Bishnoi K, et al. Optimization of synergistic parameters forthermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2009, 48 (4): 28－35.