

产纤维素酶菌群的筛选及产酶特性机理的研究

张子良¹, 张松涛², 李佳佳², 刘玉香^{1*}

(1. 太原理工大学环境与生态学院, 山西 太原 030001; 2. 山西省水利发展中心, 山西 太原 030001)

摘要:为农业固体废弃物的资源化利用提供高效菌种资源, 采用了刚果红染色初筛和纤维素酶活测定复筛相结合的方法, 从学校周边湖泊的腐殖土中筛选获得一株高产纤维素酶菌群 (CTS)。宏基因组学分析显示, 其优势菌属为栓孔菌属 (*Trametes*)、帚枝霉属 (*Sarocladium*) 和草孔菌属 (*Pilatotrama*)。通过单因素实验及响应面法优化产酶条件, 确定最优条件为: 玉米芯添加量 4% (质量体积比, *w/v*)、蛋白胨添加量 0.2% (*w/v*)、初始 pH=4.66、培养温度 29.60℃、培养时间 3.16 d。优化后, 菌群 CTS 的内切葡聚糖酶 (CMCase)、 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase)、滤纸酶 (FPase) 活力分别提升至 49.1 U/mL、46.8 U/mL 和 53.1 U/mL, 较初始条件显著提升了 60.24%、75.47%、93.53%。结合三维荧光光谱 (3D-EEM) 与碳水化合物活性酶 (CAZy) 的分析, 揭示了菌群的高效产酶机制的特性, 为资源化利用提供了优良的微生物菌种。

关键词: 纤维素酶; 产酶优化; 响应面法; 混合菌群; 产酶机制

中图分类号: X71

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2026)08-0178-08

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2026.08.030

Screening of cellulase-producing microbial communities and study on the characteristics and mechanisms of enzyme production

ZHANG Zi-liang¹, ZHANG Song-tao², LI Jia-jia², LIU Yu-xiang^{1*}

(1. College of Environment and Ecology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030001, China;

2. Shanxi Provincial Water Resources Development Center, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Providing efficient microbial resources for the agricultural solid waste utilization, employed a combination of Congo red staining for preliminary screening and cellulase activity assay for secondary screening to isolate a high-yield cellulase-producing microbial consortium, CTS, from humus soil around a lakeside near the university. Metagenomic analysis revealed that the dominant genera in CTS were *Trametes*, *Sarocladium*, and *Pilatotrama*. Through single-factor experiments and response surface methodology (RSM), the optimal enzyme production conditions were determined as follows: corn cob addition of 4% (*w/v*), peptone addition of 0.2% (*w/v*), initial pH of 4.66, cultivation temperature 29.60℃, and cultivation time 3.16 days. After optimization, the endoglucanase (CMCase), β -glucosidase, and filter paper enzyme (FPase) activities of the CTS consortium significantly increased to 49.1 U/mL, 46.8 U/mL, and 53.1 U/mL, respectively, representing remarkable improvements of 60.24%, 75.47%, and 93.53% compared to the initial conditions. Integrated analysis using three-dimensional excitation-emission matrix (3D-EEM) spectroscopy and carbohydrate-active enzymes (CAZy) annotation elucidated the high-efficiency enzyme production characteristics of the consortium, providing an excellent microbial resource for agricultural waste valorization.

Key words: cellulase; enzyme production optimization; response surface methodology; mixed microbial consortium; enzyme production mechanism

木质纤维素生物质是地球上最丰富的可再生生物质资源, 占全球植物类生物质的 90% 以上, 是自然界最主要的碳库^[1-3]。其纤维素含量高, 被视为理想的生物转化原料, 但大量木质纤维素尚未得到合理利用, 导致资源浪费和经济损失^[4-5]。

木质纤维素主要由纤维素 (40%~60%)、半纤维素 (20%~40%) 和木质素 (10%~20%) 交联构成, 在常温下结构稳定、难以利用, 具有天然抗降解性^[3,6-7]。有效的预处理可打破这一屏障, 提高反应可及性, 为高效转化为糖类及高附加值化学品奠定基础^[8-9]。现有预处理方法包括物理、化学和生物法, 物理法和化学法虽能破坏纤维素结构, 但普遍存

在条件苛刻、成本高和二次污染等问题^[10]。微生物法降解纤维素具有环境友好、条件温和、资源利用率高等优势^[11-12]。依靠微生物分泌的纤维素酶系包括羧甲基纤维素酶 (CMCase)、 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase)、滤纸酶 (FPase) 等的协同作用下可将纤维素水解为可发酵还原糖^[13-14]。

自然界中产纤维素酶的微生物主要有真菌、放线菌和细菌。真菌 (如木霉、青霉、曲霉) 所产酶系更为全面, 降解能力较强^[15-16]。但单一菌种存在酶系不全、酶活稳定性差和代谢负担大等问题, 限制了其应用^[17]。相比之下, 复合菌群通过多菌种协同, 可完整表达纤维素酶系, 提高产酶效率, 并表现出更

收稿日期: 2025-10-09; 修回日期: 2026-05-26

基金项目: 山西省水利厅科技项目 (2025ZF03)

作者简介: 张子良 (2001-), 男, 硕士生, 研究方向为生物质废弃物资源化利用及微生物技术研究, 1902155384@qq.com; 刘玉香 (1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向为废弃物资源化利用及微生物技术研究, 通讯联系人, yuxiangliu2002@126.com。

强的底物适应性与环境抗逆性^[18-19]。

本研究以玉米芯为碳源,定向富集筛选出高效产纤维素酶的菌群,采用了刚果红染色法并结合测定 CMCase、 β -glucosidase、FPase 3 种关键纤维素酶进行了初筛和复筛。利用单因素实验和 BBD 响应面法优化产酶条件。并借助三维荧光光谱(3D-EEM)和碳水化合物活性酶(CAZy)分析,阐明了其高效产酶的代谢特性。为木质纤维素的生物处理提供了优良菌群资源与理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源

土壤样品采自太原理工大学明向湖周边腐殖质富集区,于 4℃ 下保存。玉米芯取自山东省泰安市某农场,经洗净除尘后烘干、粉碎过 40 目筛(粒径约 0.45 mm),并于 60℃ 烘至恒重,密封备用。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(1 L):称取马铃薯 200 g 去皮后切成边长 1 cm 左右的小丁,在锅中加入 1 L 蒸馏水,煮沸 30 min,用玻璃棒捣碎,再用 8 层纱布过滤马铃薯液,过滤至烧杯中,再称取葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g,全部加入过滤好的马铃薯液中,用玻璃棒充分搅拌至粉末完全溶解。

富集培养基(1 L):玉米芯 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g(固体培养基添加 15 g 琼脂)。

产酶培养基(1 L):CMC-Na 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, CaCl_2 0.1 g。

鉴别培养基(1 L):玉米芯 10.0 g,蛋白胨 3 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g。

上述培养基均 121℃ 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌群的初筛

取 10 g 土样置于 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 无菌水,磁力搅拌 2 h。取 1 mL 上述混合液接种于 PDA 液体培养基中,30℃、130 r/min 振荡培养 3 d。培养结束后混匀菌液,并稀释至 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 梯度。每个稀释度取 20 μL 涂布于固体富集培养基,每梯度 3 个重复,30℃ 培养 3 d。挑取单菌落接种于含 5 mL 液体富集培养基的试管中,相同条件下培养 3 d,获

得菌悬液。取 20 μL 菌液点接于鉴别培养基(每板 3~4 个点),待菌液干后以封口膜密封平板,标记后倒置,30℃ 培养 3 d,每日观察。菌落生长后,加入 1 mg/mL 刚果红溶液染色 15 min,蒸馏水漂洗,再以 1 mol/L NaCl 溶液脱色 15 min。产酶菌落周围出现透明圈^[20]。分别测量菌落直径(d)与透明圈直径(D),计算 D/d 值,筛选比值较大者作为目的菌株。

1.2.2 菌群的复筛

将初筛获得的水解圈较大菌株接种于 PDA 培养基,在 30℃、130 r/min 条件下振荡培养 3 d 制备种子液。将种子液转接至产酶培养基中,相同条件下继续培养 3 d。经 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为粗酶液。采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定其 FPase、CMCase 和 β -glucosidase^[21]。

FPase 测定方法如下:于试管中放入 1 cm×6 cm(约 50 mg)Whatman No. 1 滤纸小卷,加入 1.5 mL pH=4.8 柠檬酸盐缓冲液使其充分润湿。50℃ 预热 5 min 后,样品管加入 0.5 mL 适当稀释的粗酶液,空白管加入 0.5 mL 灭活酶液。50℃ 反应 30 min 后,立即加入 1.5 mL DNS 试剂终止反应,沸水浴加热 5 min,冷却后定容至 25 mL 并混匀。CMCase 与 β -glucosidase 分别以 1% CMC-Na 和 0.5% 水杨苷为底物,其余步骤同前。酶活力单位(U)定义为:每分钟催化产生 1 μg 还原糖所需的酶量。于 540 nm 波长下测定吸光度(OD_{540}),按公式(1)计算酶活。

$$U = (A \times n \times 1\,000) / (180 \times T \times V) \quad (1)$$

式中, n 为稀释倍数; T 为反应时间,min; V 为加酶体积,mL。

1.2.3 菌群生物信息学分析

于发酵产酶高峰期(培养第 3 d)取样,无菌条件下取 5 mL 菌群发酵液,置于预冷的离心管中,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,收集菌体沉淀。用无菌 PBS 缓冲液清洗 2 次,最终菌体重悬于 1 mL DNA 保护液中,并于 -80℃ 超低温保存。样品委托上海欧易生物医学科技有限公司进行二代宏基因组鉴定分析,并将其用于后续的实验。

1.2.4 产纤维素酶优化实验设计

为了研究碳源添加量、氮源类型、氮源添加量、温度、时间、初始 pH 对菌群 CTS 产纤维素酶的影响,如表 1 所示,以产酶培养基为基础,各培养条件下仅改变单一影响因子,其余反应条件固定不变,分别为碳源添加量 1%、氮源添加量 0.1%、30℃、3 d、初始 pH 4.8 对菌群 CTS 产纤维素酶的影响。各条件均设 3 个平行实验。

表 1 单因素实验

因素	变化值
玉米芯添加量	1%、2%、3%、4%、5% (质量体积比, w/v)
氮源类型	蛋白胨、牛肉膏、酵母浸粉、硝酸铵、尿素
氮源添加量	0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% (w/v)
时间	1、2、3、4、5、6 d
温度	20、25、30、35、40℃
初始 pH	2、4、8、7、10

响应面优化:基于单因素结果,选取初始 pH、培养时间和温度 3 个显著影响菌群 CTS 产纤维素酶的因素,以 FPase 活为响应值进行优化。数据采用 IBM SPSS Statistics 24 进行方差分析。采用 Design-Expert 13 按表 2 设计实验进行 Box-Behnken 设计,以探究初始 pH(A)、培养温度(B)、培养时间(C)3 个因素对最佳产酶工艺的影响及其交互作用。

表 2 实验设计因素和水平

编码	因素	变化值
A	初始 pH	4、8、7、10
B	培养温度/℃	25、30、35
C	培养时间/d	3、4、5

2 结果与讨论

2.1 菌群的富集筛选

2.1.1 初筛

刚果红染色法初筛得到 15 个产生清晰透明圈的菌落,表明其具备产纤维素酶能力。各平板上的透明圈直径与菌落直径之比(D/d)结果如表 3 所示,透明圈直径与菌落直径之比(D/d)越大,表明菌落降解纤维素能力越强^[22]。

表 3 透明圈直径与菌落直径情况

菌落编号	菌落直径/cm	透明圈直径/cm	透明圈/菌落
H-1	1.40	9.60	6.86
H-2	0.30	0.90	3.00
H-3	0.30	1.60	5.34
H-4	0.90	5.20	5.78
H-5	0.20	1.50	7.50
H-6	0.20	0.60	3.00
H-7	0.50	2.00	4.00
H-8	0.63	4.31	6.84
H-9	0.30	1.40	4.06
H-10	0.10	0.20	2.00
H-11	0.30	1.20	4.00
H-12	1.50	5.70	3.80
H-13	0.10	0.20	2.00
H-14	1.00	2.40	2.40
H-15	0.10	0.60	6.00

2.1.2 复筛

以 CMCase、 β -glucosidase 和 FPase 为指标复筛产纤维素酶菌,结果如图 1 所示。结果表明 CMCase 活性排名前 3 的菌落为 H-8、H-2、H-5 分别为 34.4、33.2、24.5 U/mL; β -glucosidase 活性排名前 3 的菌落为 H-5、H-8、H-2 分别为 29.1、26.5、21.1 U/mL;FPase 活性排名前 3 的菌落为 H-8、H-11、H-2 分别为 27.8、21.8、19.8 U/mL,综合菌落透明圈大小和 3 种纤维素酶活,最终确定以菌落 H-8 作为研究对象,并结合二代宏基因测序鉴定分析结果命名为菌群 CTS 用于后续实验。

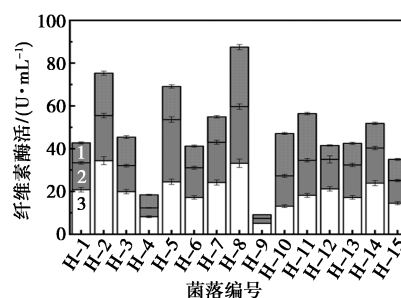
1—羧甲基纤维素酶活;2— β -葡萄糖苷酶活;3—滤纸酶活

图 1 不同菌落的纤维素酶活性

2.2 菌群的生物信息学分析

2.2.1 微生物群落分析

为揭示群落组成及进化关系,在门、属、种水平进行了分类学分析如图 2 所示。其中,图 2(a)、(b)、(c)分别对应门、属、种水平的分类统计结果。菌群 CTS 中以担子菌门(*Basidiomycota*)为主,占 86.77%,子囊菌门(*Ascomycota*)次之,占 12.91%,两者合计达 99.68%。研究显示,担子菌门是自然界中纤维素降解的核心类群,其酶系统完备、降解机制独特,能够高效产酶并降解纤维素,在生物质资源化中具有不可替代的生态功能^[23-26]。子囊菌门则凭借快速繁殖和强适应性,在纤维素转化中也发挥重要作用^[27]。两者协同作用共同保障了菌群 CTS 的高效产酶能力。在属水平上,栓菌属(*Trametes*)丰度最高,达 61.62%。该属菌株所产纤维素酶具有较宽的最适 pH 范围、良好的耐酸性和有机溶剂耐受性;其分泌的高活性纤维素酶系(包括内切、外切葡聚糖酶)与漆酶协同作用,可有效解构纤维素结晶区,显著提高木质纤维素的糖化效率,是一类重要的白腐菌资源^[28-29]。在种水平上,相对丰度前 3 的物种分别为 *Aaosphaeria-arxii* (9.92%)、*Abortiporus-biennis* (9.80%) 和 *Acaulospora-colombiana* (9.55%)。该自然筛选菌群显示出良好的环境适应性,可能

优于人工复配菌群,为纤维素的高效转化提供了实践基础。

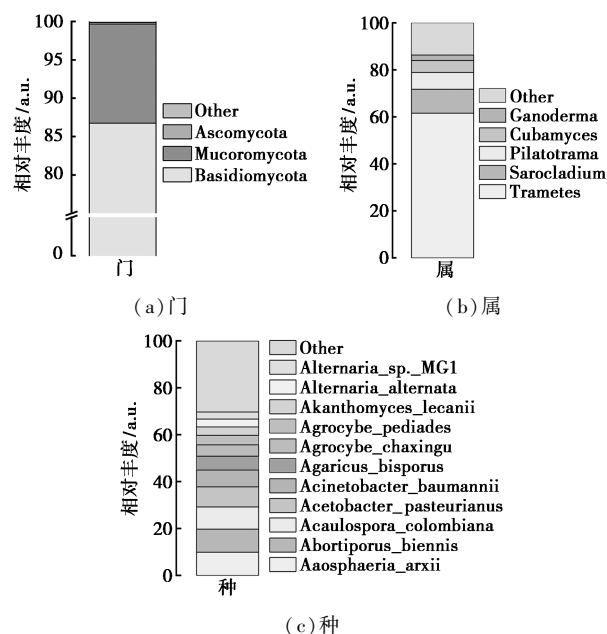


图 2 相对丰度柱状图

2.2.2 碳水化合物活性酶(CAZy)分析

为阐明菌群 CTS 的纤维素降解代谢能力,通过碳酶谱分析了其碳水化合物活性酶(CAZy)的多样性(图 3)。其中,图 3(a)~(d)分别展示了各 CAZy 酶家族基因的绝对数量、4 类关键酶(*EG/CBH/BG/AA9*)的相对丰度、各酶家族基因的相对丰度以及 *GH* 家族的功能类别分布。宏基因组测序表明,与纤维素降解相关的酶主要分布于 6 大 CAZy 类别:糖苷水解酶(*GH*)、糖基转移酶(*GT*)、碳水化合物结合模块(*CBM*)、碳水化合物酯酶(*CE*)、多糖裂解酶(*PL*)和辅助活性酶(*AA*)。图 3(a)、(b)显示,各家族的基因数量及相对丰度分别为:*GH* (433, 28.6%)、*GT* (235, 23.8%)、*CBM* (13, 4.8%)、*CE* (55, 14.3%)、*PL* (23, 9.5%)、*AA* (141, 19%)。*GH* 家族丰度最高,是菌群高产纤维素酶的关键特征。作为核心降解酶,*GH* 直接催化纤维素聚合物水解为单糖,在多糖底物裂解中起关键作用^[30]。高效纤维素降解还需依赖 3 类水解酶与辅助氧化酶之间的平衡。如图 3(c)可见,内切葡聚糖酶(*EG*)主要分布于 *GH5*、*GH6*、*GH7* 和 *GH74* 等多个家族,功能为在纤维素链内部随机切割,生成新的末端。外切葡聚糖酶(*CBH*)主要属于 *GH7*,负责从纤维素链末端切下纤维二糖单元; β -葡萄糖苷酶(*BG*)则广泛分布于 *GH1*、*GH3*、*GH9*、*GH30* 和 *GH116* 等家族,其功能为水解纤维二糖为葡萄糖,并缓解其对内切酶和外切

酶的抑制。酶系的完整是实现高效连续降解的关键。图 3(d)统计结果显示,内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和辅助氧化酶的相对丰度分别为 8.2%、4.3%、6.1%和 6.2%。综上表明该菌群具备完整且比例协调的酶系统。

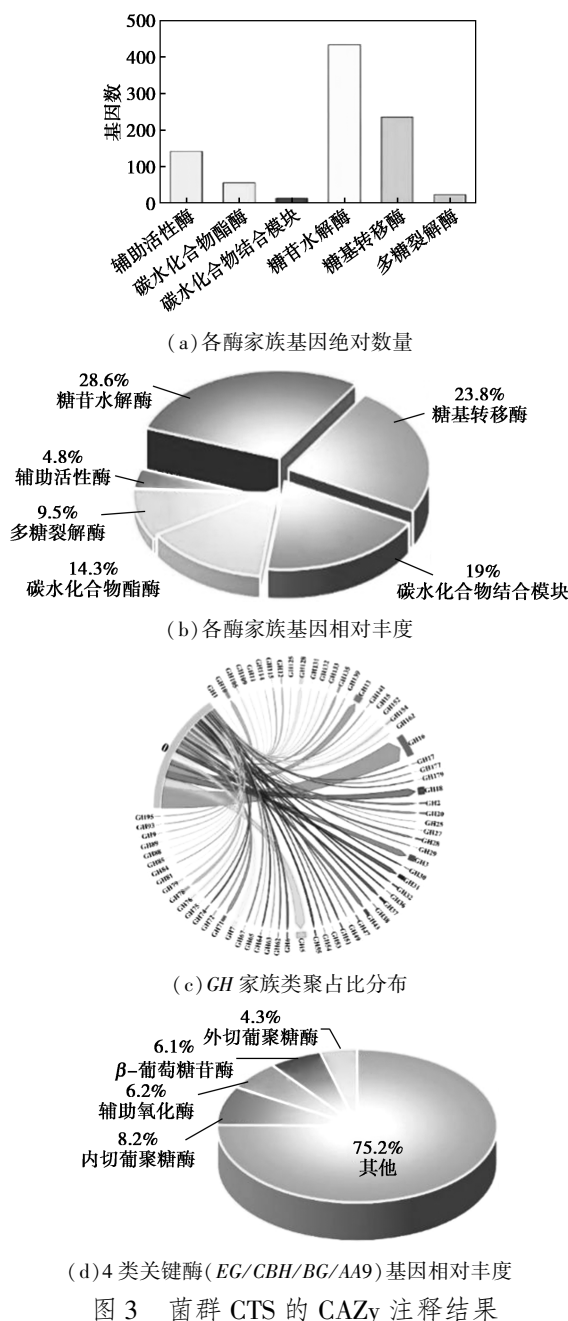


图 3 菌群 CTS 的 CAZy 注释结果

2.3 菌群产纤维素酶条件优化

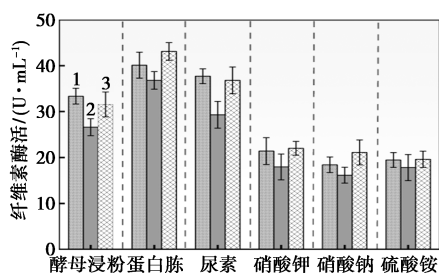
2.3.1 单因素实验

单因素实验结果如图 4 所示。首先对氮源类型进行筛选,如图 4(a)所示,有机氮源较无机氮源更有利于 3 种酶活力的提升,原因可能在于其可直接提供氨基酸用于酶蛋白合成,避免了耗能的从头合成过程。其中,以蛋白胨为氮源时产酶效果最佳。

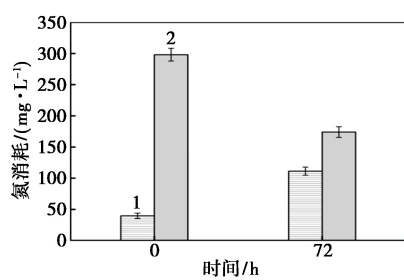
在确定蛋白胨为最适氮源的基础上,进一步优化其添加量。结果如图 4(c) 所示,当蛋白胨添加量为 0.2% 和 0.3% 时,3 种纤维素酶活均高于其他组。结合图 4(b) 中氮代谢分析可知,菌体生长与产酶过程总氮消耗约 124 mg/L,且蛋白胨分解导致氨氮浓度由 39.6 mg/L 显著上升至 111 mg/L。综合考虑酶活表现与氮代谢特征,最终选择 0.2% 蛋白胨为最佳氮源添加量。

在碳源优化方面,玉米芯添加量对产酶性能的影响如图 4(c) 所示。随着玉米芯添加量的增加,3 种纤维素酶活力均呈现先上升后下降的趋势,并在添加量为 4% 时达到峰值。这可能是因为低添加量下,玉米芯作为碳源、能源及诱导物,有效促进了微生物生长和纤维素酶基因表达;而高浓度底物及其降解产物可能引发碳分解代谢阻遏效应,从而抑制酶合成。此外,温度对酶活的影响也显示于图 4(c) 中。菌群 CTS 在低温(20~25℃)和高温(35~40℃)条件下酶活均较低。低温可能导致细胞膜流动性下降和酶折叠异常,进而引起信号传导延迟;高温则可能引发蛋白质变性及溶氧下降,从而降低酶活。

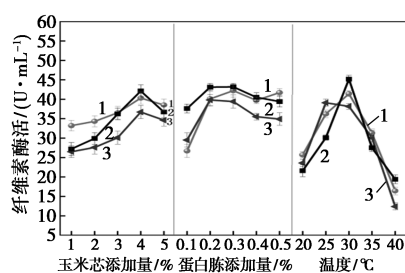
培养时间和初始 pH 是调控产酶菌群代谢动态与酶合成峰值的关键因素。由图 4(d) 可知,3 种纤维素酶活力随培养时间延长(1~6 d)呈先升后降并趋于稳定的趋势。培养初期(1~2 d)菌群可能处于适应期,资源主要用于生长;第 3 d 时因纤维二糖和葡萄糖等降解产物积累,酶活达到峰值;第 4~5 d 可能因代谢废物积累,导致酶活下降。随初始 pH



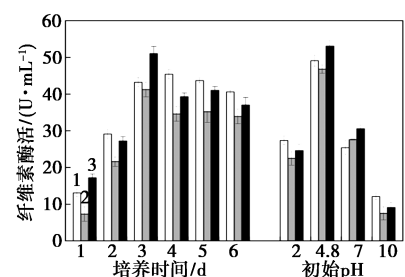
1—羧甲基纤维素酶活;2— β -葡萄糖苷酶活;3—滤纸酶活
(a) 不同氮源下 3 种纤维素酶活性



1—氨氮;2—总氮
(b) 氮源消耗情况



1—羧甲基纤维素酶活;2— β -葡萄糖苷酶活;3—滤纸酶活
(c) 不同玉米芯添加量和蛋白胨添加量及温度下的 3 种纤维素酶活性



1—羧甲基纤维素酶活;2— β -葡萄糖苷酶活;3—滤纸酶活
(d) 不同培养时间和初始 pH 下的 3 种纤维素酶活性

图 4 不同单因素对产酶性能的影响

升高(2.0~10.0),3 种酶活力也呈现先增后降的趋势。偏酸性环境(pH 4.0~5.0)更有利于激活真菌纤维素降解通路,促进菌群 CTS 产酶。当 pH 偏离最适范围时,酶活性中心关键基团的离子化状态遭到破坏,维持高级结构的离子键和氢键被削弱,导致酶蛋白变性及活性丧失。

2.3.2 响应面模型设计

单因素实验结果表明,初始 pH、培养时间以及温度对菌群 CTS 的纤维素酶生产能力均具有显著影响。在此基础上,为进一步探究上述关键因素间的交互作用,本研究采用 Box-Behnken 设计(BBD)模型,以滤纸酶活(FPase)为响应值,系统优化了产酶工艺条件。详细的实验设计方案与响应面分析结果见表 4。

表 4 BBD 实验设计及结果

实验号	初始 pH X_1	培养温度 $X_2/^\circ\text{C}$	培养时间 X_3/d	Fpase Y/(U·mL ⁻¹)
1	4.8	30	3	49.8
2	3.3	35	3	24.6
3	4.8	30	3	51.6
4	3.3	30	4	34.8
5	3.3	25	3	36.6
6	4.8	35	4	32.7
7	6.3	25	3	24.8
8	4.8	25	4	33.9

续表

实验号	初始 pH X_1	培养温度 $X_2/^\circ\text{C}$	培养时间 X_3/d	Fpase $Y/(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$
9	6.3	30	4	34.7
10	6.3	35	3	28.3
11	4.8	35	2	27.8
12	4.8	25	2	29.6
13	3.3	30	2	33.7
14	4.8	30	3	53.8
15	6.3	30	2	23.7
16	4.8	30	3	49.2
17	4.8	30	3	51.6

2.3.3 响应面实验结果和方差分析

以 Fpase(Y)为响应值,初始 pH(X_1)、培养时间(X_2)、温度(X_3)为变量,建立的二次回归方程如式(2)所示。

$$Y = 26.03X_1 + 25.66X_2 + 49.21X_3 + 0.49X_1X_2 + 1.66X_1X_3 - 0.102X_2X_3 - 4.91X_1^2 - 0.47X_2^2 - 8.51X_3^2 - 466.61 \quad (2)$$

该二次回归编码方程的 $R^2 = 0.990\ 0$,表明该模型在实验范围内实验结果和预测值拟合较好;修正决定系数为 0.977 2,表明该方程的拟合程度较高;变异系数为 4.33%,表明实验数据的重复性优异。BBD 实验设计及结果如表 5 所示,该模型的 F 值和 P 值分别为 77.32 和 0.000 1,表明该模型显著,同时该模型的失拟项 P 值为 0.7249,其不显著,说明该实验的误差较小,进一步表明该模型拟合良好。在一次项中,初始 pH(X_1)、培养时间(X_2)和温度(X_3)的 P 值分别为 0.012 1、0.006 5 和 0.003 0,均

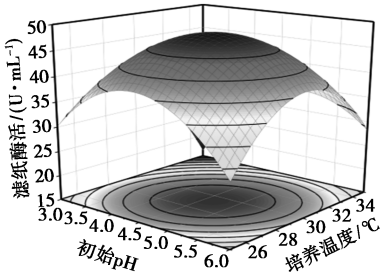
表 5 方差分析表

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1743.98	9	193.78	77.32	<0.0001
X_1	28.24	1	28.24	11.27	0.0121
X_2	36.58	1	36.58	14.60	0.0065
X_3	49.45	1	49.45	19.73	0.0030
X_1X_2	56.31	1	56.31	22.47	0.0021
X_1X_3	25.55	1	25.55	10.19	0.0152
X_2X_3	0.98	1	0.98	0.39	0.5512
X_1^2	440.49	1	440.49	175.76	<0.0001
X_2^2	549.13	1	549.13	219.11	<0.0001
X_3^2	292.59	1	292.59	116.75	<0.0001
残差	17.54	7	2.51		
失拟项	4.50	3	1.50	0.46	0.7249
净误差	13.04	4	3.26		<0.0001
合计	1761.52	16		77.32	

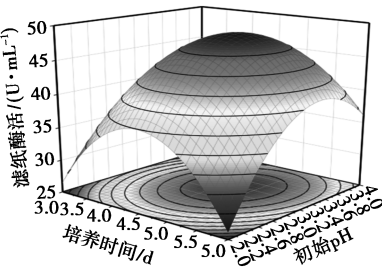
小于 0.05,为显著因素。在二次项中,初始 pH 和培养温度(X_1X_2)和初始 pH 和培养时间(X_1X_3) P 值均小于 0.05,表明交互作用显著; X_{12} 、 X_{22} 和 X_{32} 的 P 值均小于 0.000 1,表现出极显著。综上,可以用该模型代替实际值对菌群 CTS 产 Fpase 进行工艺优化和预测。

2.3.4 各影响因素之间的交互作用分析

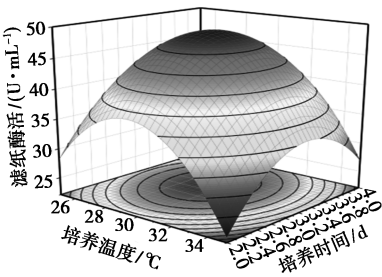
如下图 5 所示各影响因素之间的交互作用分析。初始 pH 与温度的交互效应见图 5(a)。响应曲面呈典型抛物面,存在明确峰值区域,表明在特定初始 pH 与温度组合下 Fpase 达到最大。酶活随 pH 或温度升高均呈先升后降趋势,过高或过低均会抑制酶活性。交互项 P 值小于 0.05,说明初始 pH 与温度对酶活存在显著交互作用,即不同 pH 水平下温度对酶活的影响程度和趋势存在差异,反之亦然。初始 pH 与培养时间的交互效应见图 5(b)。在 30℃ 条件下,FPase 随初始 pH 和培养时间变化均呈先升后降,响应曲面呈穹顶状,存在明确峰值。交互项 P 值小于 0.05,表明两者交互作用显著,即不同



(a) 初始 pH 与温度的交互效应



(b) 初始 pH 与培养时间的交互效应



(c) 温度与培养时间的交互效应

图 5 响应面交互作用分析

初始 pH 下培养时间对酶活的影响程度和趋势不同,反之亦然。温度与培养时间的交互效应见图 5(c)。FPase 随温度和时间变化同样表现为先升后降,响应曲面呈穹顶状,提示存在最优组合。然而,交互项 P 值为 0.155 6(大于 0.1),表明温度与时间对酶活的交互作用不显著,两者影响相对独立,在不同温度下时间对酶活的影响趋势基本一致,反之亦然。

2.3.5 菌群产酶最佳工艺条件

通过 BBD 响应面优化获得的最佳产 Fpase 条件为:初始 pH 4.66、培养温度 29.60℃、培养时间 3.16 d,预测最大酶活为 51.7 U/mL。经验证,该条件下实际酶活达到 53.2 U/mL,与预测值相对误差仅为 2.90%,表明模型拟合良好,预测结果可靠。筛选获得的菌群 CTS 在最优条件下表现出高效产纤维素酶能力,其中 CMCase 与 β -glucosidase 分别达到 49.1 U/mL 和 46.8 U/mL,显示出较强产纤维素酶能力。

2.4 产酶过程中的三维荧光光谱分析

利用三维荧光光谱(3D-EEM)对菌群 CTS 产纤维素酶过程进行分析如图 6 所示,从图 6(a)~(d)分别为 0、1、3、5 d 的光谱图,蛋白特征区[激发(Ex)250~280 nm/发射(Em)280~380 nm]可知归属为用于监测蛋白胨消耗,荧光强度面积随培养时间持续减弱,表明蛋白胨被水解为小肽/氨基酸,高效用于菌体生长与酶合成。还原型辅酶 I(NADH)代谢活性区(Ex340 nm/Em440~460 nm)荧光强度同步增强,证实代谢活性提升,为产酶供能。而纤维素降解产物区(Ex300~400 nm/Em400~550 nm)荧光强度逐步增强原因是寡糖衍生物及黄腐酸类物质的生成。第 3 d 强度显著增强(关键转折点),表明酶积累及高效底物降解;第 5 d 趋于稳定与酶活峰值时间相对应。综上所述,由蛋白区减弱与 NADH 代谢区荧光增强为产酶提供了基础;酶解产物区荧光增强直接反映酶积累过程。三区域信号时序变化(氮耗→代谢激活→产物累积)完整呈现菌群 CTS 高效产酶机制。

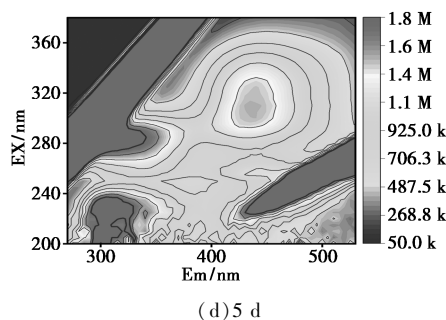
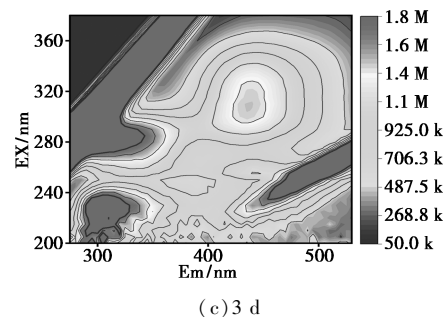
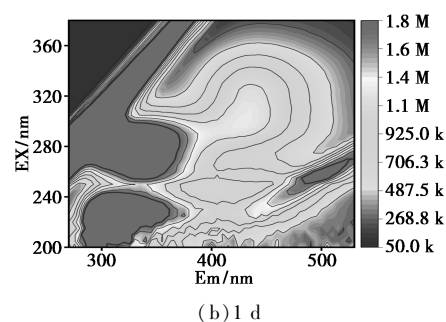
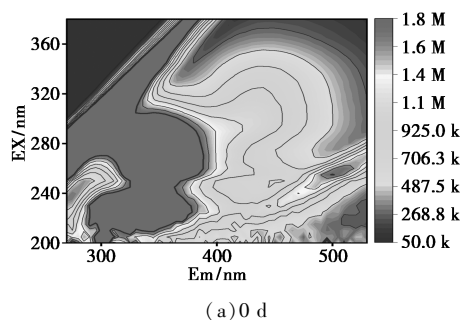


图 6 产纤维素酶过程中的 3D-EEM 图

3 结论

(1)本研究从自然环境中成功筛选出一株高效产纤维素酶的菌群 CTS,该菌群具有耐酸性强、降解周期短等显著特点。宏基因组学分析表明,其优势菌属主要包括栓孔菌属(*Trametes*)、帚枝霉属(*Sarocladium*)和革孔菌属(*Pilatotrama*)。

(2)通过系统优化碳源、氮源、温度、时间及初始 pH 等关键发酵参数,确定了菌群 CTS 的最佳产酶条件为:玉米芯添加量 4%(w/v)、蛋白胨添加量 0.2%(w/v)、初始 pH 4.66、培养温度 29.6℃、培养时间 3.16 d。在此优化条件下,CMCase、 β -glucosidase、FPase 活性分别达到 49.1、46.8 U/mL 和 53.1 U/mL,显示出优良的纤维素酶生产能力。

(3)通过三维荧光光谱(3D-EEM)与碳水化合物活性酶(CAZy)数据库的协同分析,从分子水平揭示了该菌群高效产酶的代谢机制与关键功能酶系基础。本研究不仅为木质纤维素生物物质的高效降解与资源化利用提供了具有潜力的优良菌种资源,也为

复杂菌群协同产酶机制的研究提供了理论依据与技术支撑,对推进生物质能源与绿色制造技术的发展具有积极意义。

参考文献

- [1] Choudhary P, Pandey V K, Pathak A. Process innovations in catalytic pyrolysis of lignocellulosic biomass for sustainable conversion; A review on economical approach [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2025, 201: 108073.
- [2] Erakhrumen A A. Growing pertinence of bioenergy in formal/informal global energy schemes; Necessity for optimising awareness strategies and increased investments in renewable energy technologies [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 31: 305–311.
- [3] Kumar N, Saini H, Aggarwal N K, *et al.* Biological pretreatment of lignocellulosic biomass as a sustainable option for biofuel production [J]. *Next Sustainability*, 2025, 5: 100133.
- [4] Gc R B, Awasthi G P, Shin M, *et al.* Nanocellulose from Mankamana-3 corn cob biomass; Synthesis, characterization, surface modification and potential applications [J]. *Bioresource Technology Reports*, 2024, 28: 101971.
- [5] 周礼, 庄文颖. 高产纤维素酶的木霉菌株筛选及发酵条件优化 [J]. *菌物学报*, 2023, 42(9): 1966–1988.
- [6] Garcia-Ochoa F, Vergara P, Wojtusik M, *et al.* Multi-feedstock lignocellulosic biorefineries based on biological processes; An overview [J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 172: 114062.
- [7] Ashokkumar V, Venkatkarthick R, Jayashree S, *et al.* Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bio-products-A critical review [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126195.
- [8] Wang Q, Chen J, Lian Y, *et al.* Insights into environmentally friendly solvent pretreatment of lignocellulosic biomass; Strategies, mechanisms, and future perspectives [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2025, 367: 124027.
- [9] Chen L Z, Tang T, Li D, *et al.* Characterization of microbial consortium for rice straw degradation and the role of nitrogen sources in community assembly [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 520: 166199.
- [10] Periyasamy S, Karthik V, Kumar P S, *et al.* Chemical, physical and biological methods to convert lignocellulosic waste into value-added products. A review [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2022, 20(2): 1129–1152.
- [11] Saini S, Sharma K K. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose; A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193: 2304–2319.
- [12] Zhang G Y, Dong Y J. Design and application of an efficient cellulose-degrading microbial consortium and carboxymethyl cellulase production optimization [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 957444.
- [13] Yang M, Zhang K D, Zhang P Y, *et al.* Synergistic cellulose hydrolysis dominated by a multi-modular processive endoglucanase from *Clostridium cellulosi* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 932.
- [14] Xue D S, Lin D Q, Gong C J, *et al.* Expression of a bifunctional cellulase with exoglucanase and endoglucanase activities to enhance the hydrolysis ability of cellulase from a marine *Aspergillus niger* [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 52: 115–122.
- [15] Liu Y S, Tang Y H, Gao H Y, *et al.* Challenges and future perspectives of promising biotechnologies for lignocellulosic biorefinery [J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5411.
- [16] 张欢, 寇巍, 王晓明, 等. 产纤维素酶菌株的选育分析及发酵工艺优化 [J]. *环境化学*, 2014, 32(4): 605–612.
- [17] Srivastava N, Singh R, Srivastava M, *et al.* Impact of mixed lignocellulosic substrate and fungal consortia to enhance cellulase production and its application in NiFe_2O_4 nanoparticles mediated enzymatic hydrolysis of wheat straw [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126560.
- [18] Sahil S, Karvembu P, Kaur R, *et al.* Enhanced biogas production from rice straw through pretreatment with cellulase producing microbial consortium [J]. *Energy Nexus*, 2023, 12: 100246.
- [19] 华彬彬. 分解木质纤维素复合菌系的形成机理及应用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2023.
- [20] Li H, Zhang M Q, Zhang Y H, *et al.* Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from silkworm excrement and optimization of its cellulase production [J]. *Polymers*, 2023, 15(4): 4142.
- [21] Yang M, Zhao J J, Yuan Y, *et al.* Comparative metagenomic discovery of the dynamic cellulose-degrading process from a synergistic cellulolytic microbiota [J]. *Cellulose*, 2021, 28(4): 2105–2123.
- [22] 张晶, 钱玉婷, 曲萍, 等. 秸秆降解放线菌的分离鉴定及其降解特性 [J]. *中国农业大学学报*, 2023, 28(12): 75–83.
- [23] Gao Q, Guo L N, Li S H, *et al.* Biodegradation mechanism of cellulose, hemicellulose, and lignin in bacteria-dominant aerobic composting from agricultural biomass waste: A Review [J]. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2025, 11: 100879.
- [24] Wang F, Zhou F, Zhang L J, *et al.* Mechanisms of manganese-modified biochar and white-rot fungi in enhancing compost humification: Boosting polyphenol pathway by lignocellulose degradation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 507: 160637.
- [25] 杨瑞恒, 李燕, 唐利华, 等. 基于全基因组数据解析伞菌目木质纤维素降解酶系的差异 [C]. 中国菌物学会第七届全国会员代表大会暨 2017 年学术年会论文集, 2017: 705–717.
- [26] 孙江慧, 张楠, 沈其荣, 等. 几种食用真菌降解稻草的潜力研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(6): 49–54.
- [27] 常师飞, 任文义, 程雨辰, 等. 稻草微贮早期真菌群落演变及其木质纤维素降解酶的预测 [J]. *微生物学通报*, 2024, 51(5): 1614–1625.
- [28] Alzabaidi A R, Alabbasi N, Meilan R, *et al.* Transcriptome response of the white-rot fungus *Trametes versicolor* to hybrid poplar exhibiting unique lignin chemistry [J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2025, 12(1): 2.
- [29] Corrêa A G, Rodrigues P O, Azevedo L C B, *et al.* Reuse of grape pomace and wheat bran for biosynthesis of on-site lignocellulose-degrading enzymes by *trametes villosa* and *trichoderma asperellum* under solid state fermentation [J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2024, 15: 4747–4760.
- [30] Cai L, Chen T B, Zheng S W, *et al.* Decomposition of lignocellulose and readily degradable carbohydrates during sewage sludge biodegrading, insights of the potential role of microorganisms from a metagenomic analysis [J]. *Chemosphere*, 2018, 201: 127–136. ■