

一株产纤维素酶菌株的分离、鉴定及产酶特性

黄春凯¹ 左小明^{1,2*} 王红蕾^{1*} 刘天卉¹ 薛冬桦¹

(1. 长春工业大学 化学与生命科学学院 吉林 长春 130012)

(2. Centre for Infectious Diseases, Sydney Medical School, University of Sydney, Sydney 2145, Australia)

摘要:【目的】筛选并鉴定一株产纤维素酶的菌株,初步探究该菌的产酶特性,为综合利用纤维素筛选菌源。【方法】在常温条件下,采用滤纸培养基对菌种富集,采用 CMC-Na 初筛纤维素降解菌,采用 LB 培养基分离纯化菌株,经形态学、生理生化特征试验、16S rRNA 基因序列测定等分析筛选菌株的系统分类地位。单因素试验确定培养时间、培养温度、初始 pH 及 NaCl 浓度对筛选菌株产酶活力的影响。【结果】从腐烂的玉米秸秆中分离出一株在常温下产纤维素酶细菌 KZ-2,根据菌落形态特征、生理生化特征鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析,初步鉴定 KZ-2 为肠杆菌(*Enterobacter* sp.),为潜在新种。产酶条件实验显示:该菌使用产酶发酵培养基 120 h 产酶量达到最大值,在 25–35 °C、初始 pH 4.5–5.5、NaCl 浓度 1.0%–2.0% 范围内为最佳产酶条件,在最适条件下酶活可达 80.93 U/mL。该菌株所产纤维素酶最适反应 pH 为 7.0,最适反应温度为 50 °C。【结论】KZ-2 是一株具有降解纤维素能力的细菌,在常温下即可分泌纤维素酶,并且该菌株为潜在新种,具有潜在的开发价值。

关键词: 腐烂玉米秸秆, 纤维素酶, 肠杆菌, 产酶特性

Isolation, identification and characterization of a cellulase-producing strain

HUANG Chun-Kai¹ ZUO Xiao-Ming^{1,2*} WANG Hong-Lei^{1*} LIU Tian-Hui¹
XUE Dong-Hua¹

(1. College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun, Jilin 130012, China)

(2. Centre for Infectious Diseases, Sydney Medical School, University of Sydney, Sydney 2145, Australia)

Abstract: [Objective] To obtain microorganism strains for comprehensive utilization of cellulose, an ambient temperature cellulase-producing strain was isolated and identified. The optimal culture conditions for enzyme production were determined. [Methods] Filter paper medium was used to enrich the microorganism cultures. CMC-Na medium was used to screen the cellulose-degrading strains initially under the condition of ambient temperature. A strain, KZ-2, was isolated and purified using LB medium, followed by identification utilizing morphological, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequence profiles. Single factor test based on incubation time, culture temperate, initial pH and sodium chloride (NaCl) concentration was performed to optimize the conditions for cellulase production. [Results] Strain KZ-2, capable of producing extracellular cellulase under ambient

*通讯作者: ✉: wanghonglei@mail.ccut.edu.cn

收稿日期: 2014-08-03; 接受日期: 2014-10-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-19

temperature, was isolated from decomposing maize straw. It was identified as a strain of *Enterobacter* sp. and potentially to be a novel species. The optimized enzyme production could be obtained when the strain was cultivated for 120 hours at 25–35 °C with initial pH 4.5–5.5, NaCl concentration of 1.0%–2.0%. The maximum cellulase activity of 80.93 U/mL was achieved under the optimal conditions. Initial enzymatic property analyses of the cellulase produced demonstrated that the enzyme was most active at pH 7.0 with a temperature of 50 °C. **[Conclusion]** The cellulose-degrading strain KZ-2 is able to secrete cellulase under ambient temperature and is potentially a novel species. The strain is expected to be further studied and developed to explore its marketing values.

Keywords: Decomposing maize straw, Cellulase, *Enterobacter* sp., Cellulase-producing characteristics

纤维素是自然界最为丰富的可再生资源之一,然而纤维素难以降解却导致其利用率具有一定的局限性^[1]。近年来对纤维素降解方面的研究已有不少报道,而最经济、环保的方法是生物降解,即通过微生物等产生的纤维素酶来催化降解纤维素^[2]。

纤维素酶是一类广泛用于医药、食品、棉纺、环保及可再生资源利用领域的酶制剂^[3]。迄今为止,国内外已有较多学者对降解纤维素的微生物做了大量的工作,产纤维素酶的菌种有很多,目前研究较多的是真菌、细菌和放线菌^[4]。长久以来,人们对真菌降解纤维素的研究较多,如木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)等^[5-7]。细菌所产生的纤维素酶一般最适 pH 为中性至偏碱性^[8],随着中性纤维素酶和碱性纤维素酶在棉织品水洗整理工艺及洗涤剂工业中的成功应用,细菌纤维素酶制剂已显示出良好的应用前景。

本研究以滤纸为唯一碳源的选择性培养基进行富集,并采用 CMC-Na 平板培养基和 LB 培养基分离纯化,通过滤纸崩解实验和酶活测定获得 4 株能产纤维素酶的细菌,其中 KZ-2 产纤维素酶相对较高。本文进一步根据菌体的形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析等方面对 KZ-2 进行了鉴定,并对其产酶特性和酶学特性进行了初步试验。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品采集: 腐烂玉米秸秆采自长春郊外农田,放入桶中加少量水后,室温放置 15 d。

1.1.2 培养基: 富集培养基(g/L): NaNO₃ 2.5, KH₂PO₄ 1.0, CaCl₂ 0.050 7, MgSO₄ 0.3, NaCl 0.1, FeCl₃ 0.01, 滤纸片 10, 蒸馏水 1 L。固体培养基(g/L): NaNO₃ 2, K₂HPO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, CMC-Na 10, 琼脂 10, 蒸馏水 1 L。滤纸崩解培养基(g/L): 酵母提取物 1.5, 胰蛋白胨 1.0, NaCl 1.0, 蒸馏水 1 L。每支试管分装 7 cm 深度, 并放 1 cm×6 cm 滤纸条, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.0, 蒸馏水 1 L。产酶发酵培养基(g/L): CMC-Na 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 10.0, NaCl 10.0, pH 5.0, 蒸馏水 1 L。

1.2 方 法

1.2.1 菌种的富集: 称取腐烂玉米秸秆 2 g, 加入盛有 20 mL 无菌水的 50 mL 三角瓶中, 30 °C 摇床 120 r/min 振荡 1 h 制成菌悬液, 静置 15 min, 吸取上清液 2 mL 加入含有 200 mL 富集培养基的三角瓶中, 30 °C、120 r/min 摇床培养 60 h。

1.2.2 菌种的分离与纯化: 将上述菌悬液按照梯度稀释的方法, 制成不同浓度的菌悬液, 取 10⁻¹–10⁻⁶ 不同稀释度菌液涂布至 CMC-Na 平板上, 30 °C 培养 4 d, 测量菌落直径。根据不同形态特征的菌落, 选择生长情况良好的菌落, 接种至 LB 液体培养基中, 30 °C、120 r/min 培养 24 h。将菌悬液划线接种于 LB 培养基平板上 30 °C 培养 24 h, 分离出单菌落。

1.2.3 滤纸条崩解效果测定: 挑取纯化后菌落分别接种到滤纸条崩解培养液中, 30 °C、120 r/min 振荡培养 7 d。观察滤纸条的崩解情况。

1.2.4 酶活的测定: (1) 葡萄糖标准曲线的绘制:

按 DNS 法绘制标准曲线^[9]。

(2) 粗酶液的制备: 接种 1 mL 种子培养液至装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 30 °C、120 r/min 培养 5 d, 收集菌液至 50 mL 离心管中, 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min, 所得上清液即为粗酶液。

(3) 羧甲基纤维素酶活测定: 取粗酶液 0.5 mL 于试管中, 加入 1.5 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.0)配制含 1%的 CMC-Na 底物溶液。50 °C 保温 50 min, 然后加入 2 mL DNS 试剂, 煮沸显色 5 min, 在 540 nm 波长下测定吸光度值, 并从葡萄糖标准曲线上查出相对应的葡萄糖含量, 计算酶活力单位。酶活力单位定义: 每毫升酶液在 1 min 内催化底物生成 1 μg 葡萄糖所需要的酶量, 即 1 U/mL。

酶活力计算公式: $X=(B \times n \times 1\ 000)/(0.5 \times t)$

式中: B : 从标准曲线查出净葡萄糖的浓度(g/L); n : 总体积; 0.5: 测定时吸取酶液的毫升数。

(4) 滤纸酶活(FPA)测定: 将滤纸剪成长条, 规格为(1 cm×6 cm), 放入 20 mL 具刻度试管中, 加入 0.5 mL 粗酶液和 1.5 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 50 °C 恒温水浴 50 min 后取出, 加入 2 mL DNS 试剂终止反应, 摇匀后于沸水浴中处理 5 min, 取出冷却, 按 DNS 法进行还原糖测定。

1.2.5 菌株生长情况: 取 1 mL 培养液加入 9 mL 无菌水, 以不接菌的培养液为参照, 在 600 nm 测定吸光值。通过 OD_{600} 值评价菌株的生长情况。

1.2.6 菌种的鉴定: (1) 细菌形态观察及生理生化鉴定: 将分离出的单菌落制成菌悬液后接种于 LB 液体培养基, 30 °C 培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液, 用 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次, 用戊二醛固定后做电子扫描观察菌体形态。LB 琼脂平板上划线接种, 30 °C 恒温培养 24 h, 观察细菌生长情况及菌落特征, 革兰氏染色, 光学显微观察染色特征。参考《伯杰氏细菌鉴定手册》^[10]和《常见细菌鉴定手册》^[11]进行部分生理生化特征鉴定, 主要包括吲哚试验、V-P 试验、明胶水解及部分生

化鉴定等。

(2) 菌株分子生物学鉴定: 提取 KZ-2 菌株基因组作为 PCR 扩增模板, 通用引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC-3' 和 1495R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(50 μL): 模板 DNA 1 μL, 引物 27F (10 μmol/L) 和 1495R (10 μmol/L)各 2 μL, 2×PCR MasterMix 25 μL, 双蒸水 20 μL。PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。目的片段电泳回收后送到北京华大基因测序, 得到的序列用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行比对。

1.2.7 产酶条件研究: (1) 培养时间对菌株产纤维素酶的影响: 将筛选出的菌株接种于产酶发酵培养基, 分别培养 24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144、156 h, 以不加菌的培养液作参照, 30 °C、120 r/min 培养, 测量稀释 10 倍后液体培养基中菌株 KZ-2 的 OD_{600} 值, 并按 DNS 法测定其酶活力, 确定该菌在此条件下的最佳产酶时间。

(2) 培养温度对菌株产纤维素酶的影响: 将筛选出的菌种接种于产酶发酵培养基, 分别置于 15、20、25、30、35、40、45 °C 不同培养温度下培养, 于摇床 120 r/min 培养 5 d, 测量稀释 10 倍后液体培养基中菌株的 OD_{600} 值并按 DNS 法测定其酶活力。

(3) 初始 pH 对菌株产纤维素酶的影响: 用磷酸缓冲液分别配制成 pH 值 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 九个 pH 梯度的发酵产酶培养基, 接种后于摇床 30 °C、120 r/min 培养 5 d, 测量稀释 10 倍后液体培养基中菌株的 OD_{600} 值并按 DNS 法测定其酶活力。

(4) 初始 NaCl 浓度对菌株产纤维素酶的影响: 将产酶发酵培养基的 NaCl 含量分别调到 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%和 3.5%七个不同浓度梯度, 接种后于摇床 30 °C、120 r/min 培养 5 d, 按 DNS 法测其酶活力。

1.2.8 KZ-2 菌株酶学性质初步研究: (1) pH 对酶活力的影响: 用 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、

8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配置 1% 的 CMC 底物溶液,加入粗酶液反应,在 50 °C 下测定 CMCA 酶活力与 FPA 酶活力。

(2) 温度对酶活力的影响:调节温度分别为 25、30、35、45、50、55、60 °C,在最适 pH 条件下反应 50 min,测定不同温度下的 CMCA 酶活力与 FPA 酶活力。

(3) 金属离子对酶活力的影响:在最适温度和 pH 条件下,向酶反应体系中各加入 0.2 mL、0.01 mol/L 的 KCl、CuCl₂、MgCl₂、FeCl₃、ZnCl₂,然后测定 CMCA 酶活力与 FPA 酶活力。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

将稀释 10⁻⁶ 的富集菌悬液涂布于 CMC-Na 平板培养基培养 4 d 后长出不同形态特征的菌落,选择生长状况良好的菌落划线于 LB 培养基分离得到 4 株菌株。分别将纯化过的菌株制成菌悬液,取 1 mL 菌液加入到装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C、120 r/min 培养 5 d 后,然后测定 CMCA 酶活力与 FPA 酶活力。筛选结果见表 1。其中 KZ-2 滤纸崩解能力最强且酶活也最高。以此作为后续研究对象。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的形态特征及理化特征: LB 液体培养基培养 24 h 电子显微镜下观察结果如图 1 所示,菌体为棒状。KZ-2 菌株在 LB 琼脂平板中培养 24 h 后,形成 2.5 mm 左右的菌落,菌落扁平圆形,表

面有光泽,边缘整齐,湿润,显白色乳状,不透明。KZ-2 生理生化特征研究结果表明,该菌为革兰氏阴性菌,兼性厌氧,吲哚实验和明胶水解显阴性,V-P 反应显阳性,具体特征如表 2 所示。

2.2.2 菌株 KZ-2 的 16S rRNA 基因鉴定:以 KZ-2 菌株 DNA 为模板扩增该菌的 16S rRNA 基因,产物电泳纯化后送至北京华大基因测序,拼接处理后得到部分 16S rRNA 基因序列(共 910 bp),于 GenBank 数据库中序列经行 BLAST 比对后,发现 16S rRNA 基因与 KZ-2 相似性最高的类群为 *Enterobacter aerogenes*,相似性达 95%。利用 MEGA 5.0 的 Neighbor-Joining 构建系统发育树,结果如图 2 所示。结合 KZ-2 的菌落形态特征、理化鉴定结果以及 16S rRNA 基因分析,初步鉴定 KZ-2 菌株为肠杆菌属的成员,并为潜在新种。

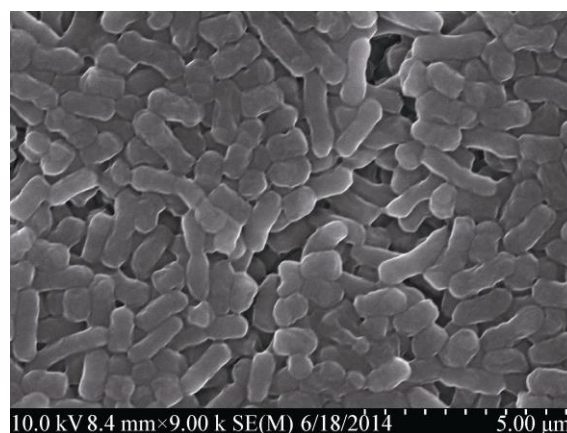


图 1 KZ-2 电子扫描电镜图

Figure 1 Scanning electron microscopy of KZ-2

表 1 产纤维素酶菌株筛选结果

Table 1 Screening results of bacteria producing cellulose

菌株编号 Number	菌落直径 Colony diameter (mm)	滤纸崩解 Paper disintegration	CMCA 酶活 Enzyme activity of CMCA (U/mL)	FPA 酶活 Enzyme activity of FPA (U/mL)
KZ-1	2.1	++	43.52	32.40
KZ-2	2.4	+++	80.38	78.98
KZ-3	2.3	++	47.24	44.31
KZ-4	1.9	+	25.61	15.64

注:+++ : 降解效果较好,滤纸大部分溃烂; ++ : 降解效果一般,滤纸部分溃烂; + : 滤纸零星溃烂。

Note: +++: Strong degradation; ++: Medium degradation; +: Weak degradation.

表 2 KZ-2 菌株部分生理生化特征
Table 2 Partly biochemical and physiological characteristics of the strain KZ-2

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
吲哚实验 Indole test	-	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+
V-P 实验 V-P test	+	明胶水解 Gelation hydrolysis	-
穿刺培养 Stab culture	兼性厌氧	芽孢染色 Spore stain	-
硫化氢生成 H ₂ S production	-	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-
鞭毛染色 Flagella stain	+	脲酶实验 Urease test	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

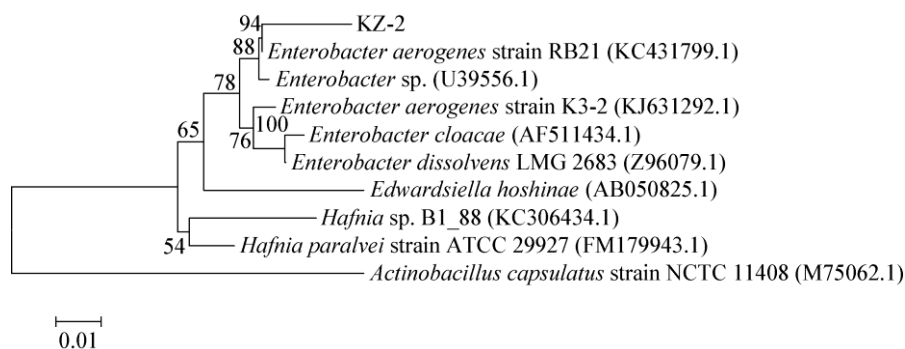


图 2 菌株 KZ-2 的 16S rRNA 基因系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain KZ-2 and related species based on 16S rRNA gene sequences

注: 线段 0.01 表示序列差异的分支长度; 发育树节点的数值表示 Bootstrap 值; 括号内的数值为 GenBank 数据库中的登录号。

Note: Bar=1% nucleotide divergence. Number at notes present bootstrap percentages (based on 1 000 sampling). Those in parentheses are the GenBank accession number.

2.3 菌株 KZ-2 产酶条件研究

2.3.1 培养时间对菌株生长和菌株产酶的影响: 如图 3 所示, 该菌的各个生长阶段比较明显。菌体生长的延滞时间较长, 48 h 后逐步进入生长对数期, 当发酵达 72 h 左右时, 菌体生长达到稳定期, 144 h 后细菌开始衰退。由产酶量曲线可知, 产酶量与细菌生长基本保持同步, 二者关系表现为偶联型, 即菌体快速生长过程中酶量也迅速增加, 菌体生长稳定期时产酶量基本保持稳定, 对该菌培养 120 h CMCA 酶活力和 FPA 酶活力均达最大值。因此对该菌培养 120 h 后能较好地反映该菌的产酶量。

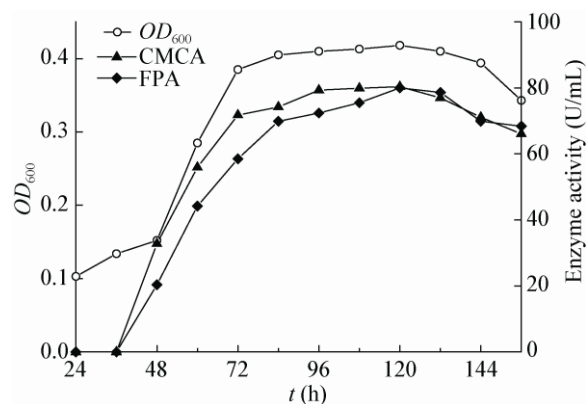


图 3 培养时间对 KZ-2 生长和产纤维素酶的影响

Figure 3 Effects of incubation time on growth and cellulase production for KZ-2

2.3.2 培养温度对菌株产酶的影响:如图4所示,在温度为25–35 °C时菌生长良好,其产酶量也较高,当温度低于25 °C或高于35 °C时细菌生长受到抑制,导致产酶量也降低。

2.3.3 初始 pH 对菌株产酶的影响:如图5所示,当培养基的初始 pH 小于4.5时,KZ-2的生长严重受到限制,此时产纤维素酶量也较低;当 pH 大于4.5时,菌体生长基本保持稳定,在初始 pH 为5.5时出现峰值。由产酶曲线可知当初始 pH 为4.5–5.5时 CMCA 酶活较高,之后随着初始 pH 的升高而迅速降低,当 pH 值高于6.5后基本保持不变;当初始 pH 在5.0–6.5时 FPA 酶活酶较高,当 pH 值大于6.5时其值也降低,但是没有 CMCA 降低明显。

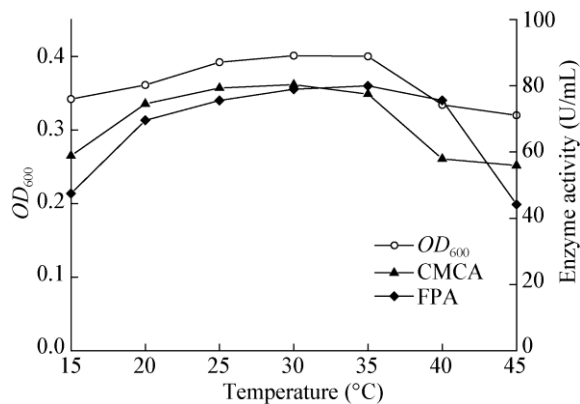


图4 培养温度对 KZ-2 产纤维素酶的影响
Figure 4 Effects of temperature on cellulase production for KZ-2

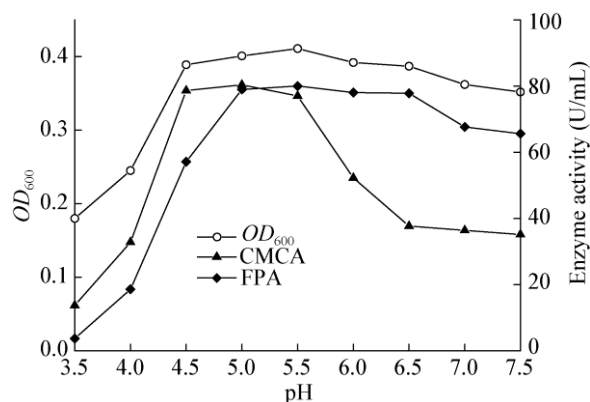


图5 初始 pH 对 KZ-2 产纤维素酶的影响
Figure 5 Effect of initial pH on cellulase production for KZ-2

2.3.4 初始 NaCl 浓度对菌株产酶的影响:结果见图6。实验表明初始 NaCl 浓度对 KZ-2 的生长具有一定的影响,在初始 NaCl 浓度在1.0%–2.0%时该菌生长情况良好,且此时产酶量也较高。

2.4 菌株 KZ-2 纤维素酶学性质

2.4.1 pH 对酶活力的影响:由图7可以看出 KZ-2 所产的粗酶液在 pH 6.0–8.0 之间都能保持较高的酶活,在 pH 7.0 时酶活最高。由此说明 KZ-2 所产的纤维素酶最适 pH 为中性。

2.4.2 温度对酶活力的影响:结果如图8所示,KZ-2 所产的纤维素酶在 30–45 °C 时缓慢升高,在 45–55 °C 时酶活相对保持稳定,在 50 °C 时有最高活性,当温度高于 55 °C 后酶活迅速下降。

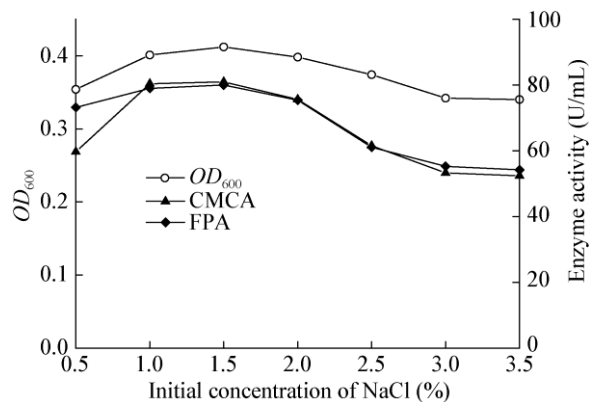


图6 初始 NaCl 浓度对 KZ-2 产纤维素酶的影响
Figure 6 Effect of initial NaCl concentration on cellulase production for KZ-2

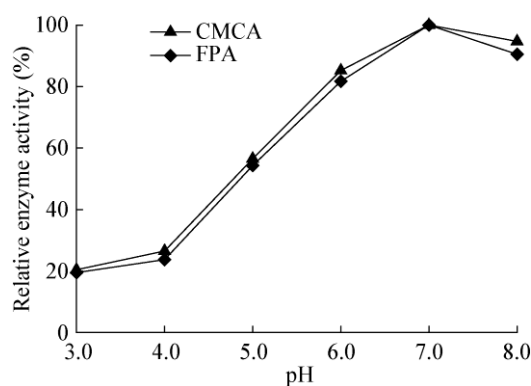


图7 pH 对酶活力的影响
Figure 7 Effects of pH on relative activity of the cellulase

2.4.3 氯化盐对酶活力的影响: 在 pH 7.0、50 °C 反应温度下,加入 0.01 mol/L 的 KCl、CuCl₂、MgCl₂、FeCl₃、ZnCl₂ 溶液各 0.2 mL, 然后测定酶活。酶活力如图 9 所示, KCl 和 FeCl₃ 对酶活力有促进作用, CuCl₂ 和 ZnCl₂ 对酶活力有抑制作用, 而 MgCl₂ 对酶活力并无太大的影响。

3 讨论

纤维素降解菌的筛选方法有很多, 现在较为常用的方法是滤纸条培养基法和刚果红鉴别培养基平板法^[12]。滤纸是聚合度和结晶度均居中等的纤维材料, 因此能够较真实地反映天然纤维素的情况,

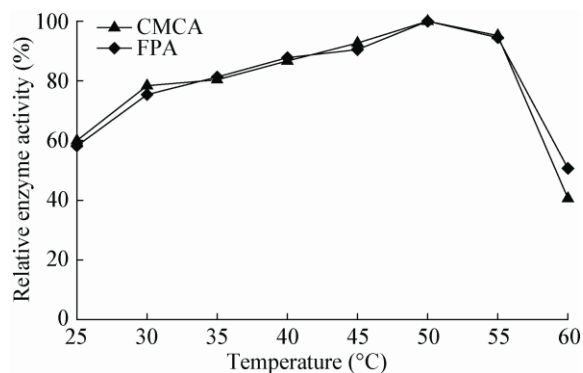


图 8 反应温度对酶活力的影响

Figure 8 Effects of temperature on relative activity of the cellulase

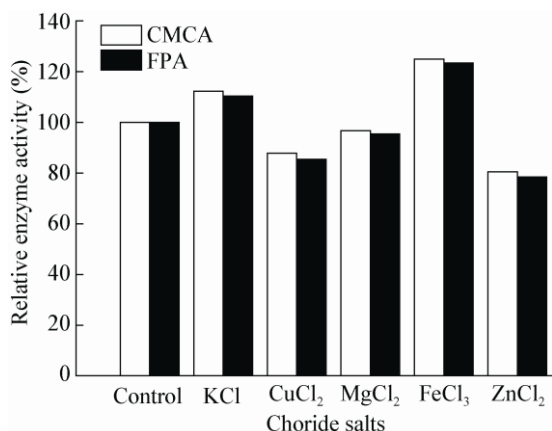


图 9 氯化盐对酶活力的影响

Figure 9 Effect of chloride salts on activity of the cellulase

如果所筛菌株能在以滤纸条为唯一碳源的培养基上生长, 认为该菌株可能具备产纤维素酶的能力。本研究以滤纸为唯一碳源的选择性培养基进行富集, 从腐烂玉米秸秆分离纯化得到一株产纤维素酶菌株肠杆菌(*Enterobacter* sp.) KZ-2, 16S rRNA 基因序列发现, 与其同源性最高的菌株为产气肠杆菌, 该类微生物的研究目前主要集中于致病机理、发酵产氢气和发酵产乳酸等方面^[13-15], 其产纤维素酶的报道较少。结合生理生化实验, 将该菌初步命名为肠杆菌 KZ-2 (*Enterobacter* sp. KZ-2), 并对其产纤维素酶特性和酶学特性进行初步研究。以往文献报道的产中性纤维素酶的主要菌种是长梗木霉、腐殖菌、芽胞杆菌等^[16], 而 *Enterobacter* sp. 能产中性纤维素酶却未见文献报道, 这一发现为进一步开发工程菌株提供了新的菌源。

纤维素分解细菌所产生的酶有很多重要的应用价值, 但产酶水平偏低, 可能与酶本身特点、液体发酵培养基成分有关。目前有不少纤维素降解菌产酶条件的报道, 于婷婷等^[17]通过单因素实验确定培养时间、培养温度、摇床速率和初始 pH 对一株细菌产纤维素酶的影响, 该菌在最佳产酶条件下最大 CMCA 酶活和 FPA 酶活分别为 54.97 U/mL 和 23.10 U/mL; 刘健国等^[18]通过正交实验确定一株纤维素降解细菌最佳氮源, 并确定该菌在最佳产酶条件下, CMCA 最大酶活为 38.96 U/mL。本实验通过调节温度, 设计不同的初始 pH 值、初始 NaCl 浓度对 KZ-2 产酶条件进行了研究, 并测定稀释 10 倍后菌液的 OD₆₀₀ 值以评价菌体生长与产酶量的关系。该菌在最佳产酶条件范围内连续培养 5 d, CMCA 酶活和 FPA 酶活分别为 80.93 U/mL 和 80.03 U/mL。

酶学性质的初步研究显示, KZ-2 产生纤维素酶反应的最适 pH 为 7.0, 在 pH 6.0-8.0 之间都能保持较高的酶活; 最适反应温度以 50 °C 为宜, 且具有较好的温度稳定性, 与刘森林等^[19]筛选的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的酶学性质相似。KZ-2 菌株所产纤维素酶的这些性质使其在棉织品的水洗整理工业中具有良好的开发前景, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hasunuma T, Okazaki F, Okai N. A review of enzymes and microbes for lignocellulose biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 513-522
- [2] Nogawa M, Goto M, Okada H, et al. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*[J]. *Curr Genet*, 2001, 38(6): 329-334
- [3] Lynd LR, Wei Mer PJ, Pretorius IS, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2002, 66(3): 506-577
- [4] Xiong DM, Zhong HL. Research progress in cellulose-degrading bacteria community[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2011(5): 94-97 (in Chinese)
熊冬梅, 周红丽. 纤维素降解菌群的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2011(5): 94-97
- [5] Zhang Q, Lo CM, Ju LK. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(4): 753-760
- [6] Ikeda Y, Park EY, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillusniger*[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(8): 1030-1035
- [7] Solov'eva IV, Okunev ON, Vel'kov VV, et al. The selection and properties of *Penicillium verrucosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases[J]. *Microbiology*, 2005, 74(2): 172-178
- [8] Shen XL, Xia LM. Studies on screening of cellulase producing bacteria and enzymatic characteristics thereof[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2002, 22(1): 47-51 (in Chinese)
沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性的研究[J]. *林产化学与工业*, 2002, 22(1): 47-51
- [9] Dong XY. *Biochemical Experiment*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 34-36 (in Chinese)
董晓燕. *生物化学实验*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 34-36
- [10] Buchana RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 382-533 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. *伯杰氏细菌鉴定手册*[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 382-533
- [11] Dong XZ, Cai MY. *Ommon Bacteria Manual System Identification*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 348-392 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 348-392
- [12] Fu LL. Separation and screening of crop straw cellulose degrading bacteria[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2012 (in Chinese)
付丽丽. 作物秸秆纤维素降解菌的分离与筛选[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2012
- [13] Liao M, Zhang HJ, Xie XM, et al. Isolation and identification of degradation bacteria *Enterobacter aerogenes* for pyrethroids pesticide residues and its degradation characteristics[J]. *Environmental Science*, 2009(8): 2445-2451 (in Chinese)
廖敏, 张海军, 谢晓梅, 等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌产气肠杆菌的分离、鉴定及降解特性研究[J]. *环境科学*, 2009(8): 2445-2451
- [14] Wang RX, Qian CX, Yuan XM, et al. Scale-up batch fermentation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013(11): 12-17,30 (in Chinese)
王瑞兴, 钱春香, 袁晓明, 等. 产气肠杆菌发酵产氢的批式放大试验研究[J]. *环境科学与技术*, 2013(11): 12-17,30
- [15] Urdaneta D, Raffé D, Ferrer A, et al. Short-chain organic acids produced on glucose, lactose, and citrate media by *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, and *Enterobacter aerogenes* strains[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 54(2): 99-103
- [16] Zeng QL, Huang XL, Hong YZ. Identification of fungi producing neutral cellulase and characterization of its enzymatic reactions[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27(5): 621-624 (in Chinese)
曾青兰, 黄小罗, 洪玉枝. 产中性纤维素酶真菌的鉴定及其酶学性质的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(5): 621-624
- [17] Yu TT, Ge X, Li MJ, et al. Screening of strains of cellulase-producing bacteria in compost of sewage sludge and straw and optimization of cellulase-producing conditions[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2013, 29(6): 768-772 (in Chinese)
余婷婷, 葛晓, 李买军, 等. 秸秆污泥堆肥产纤维素酶细菌的筛选及产酶条件优化[J]. *生态与农村环境学报*, 2013, 29(6): 768-772
- [18] Liu JG, Han M. Isolation and fermentation process optimization of a cold-adapted cellulase-producing bacteria[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2014, 50(1): 38-41 (in Chinese)
刘建国, 韩梅. 一株低温产纤维素酶细菌的筛选及其发酵产酶条件的优化[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(1): 38-41
- [19] Liu SL, Chen WL, Xing M. Screening of *Bacillus* strain producing neutral cellulase and characterization of enzymatic reactions[J]. *Industrial Microbiology*, 2010, 40(6): 55-59 (in Chinese)
刘森林, 陈伟利, 邢苗. 产中性纤维素酶耐碱芽孢杆菌的筛选及酶学性质研究[J]. *工业微生物*, 2010, 40(6): 55-59