

吴孔阳,李婉婉,杨同香,等. 1 株耐高温纤维素酶产生菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(9):312-314.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.072

# 1 株耐高温纤维素酶产生菌的分离与鉴定

吴孔阳<sup>1</sup>, 李婉婉<sup>1</sup>, 杨同香<sup>2</sup>, 杜如月<sup>1</sup>, 杨 晓<sup>1</sup>

(1. 洛阳师范学院生命科学学院,河南洛阳 471934; 2. 河南科技大学食品与生物工程学院,河南洛阳 471023)

**摘要:**从环境样品中筛选得到 1 株耐高温纤维素酶产生菌 A13。形态及生理生化特征测定结果表明,A13 菌株与芽孢杆菌属(*Bacillus*)中地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的特征基本一致。测定了该菌株的 16S rDNA 序列并根据 16S rDNA 构建了系统发育树,在系统发育树中,A13 菌株与地衣芽孢杆菌形成一个类群,序列同源性为 90%。最终确定该菌株为地衣芽孢杆菌。

**关键词:**耐高温;产纤维素酶菌株;分离;形态学鉴定;分子生物学鉴定;系统发育树

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)09-0312-03

当煤、石油等不可再生资源逐渐短缺甚至枯竭时,资源便成了全球共同面临的重大问题。纤维素是最丰富的有机物质,是地球上最广泛最丰富的自然资源和可再生资源之一<sup>[1]</sup>,每年纤维素的产量都高达 2 000 亿 t,但是纤维素难以被分解利用,不仅不能更好地为人类所用,反而还会造成浪费甚至导致环境污染。自 1906 年纤维素酶在蜗牛消化道内被发现以来,学术界开始普遍采用微生物去降解纤维素<sup>[2]</sup>。纤维素酶不是单一成分的酶,而是一类复杂的复合物,是由多种酶协同起作用的多酶体系,能够将纤维素降解为葡萄糖<sup>[3]</sup>,因此在纤维素酶的作用下降解纤维素不仅可以为全球的能源供应作出贡献,同时还能有效解决废弃物处理等一系列问题<sup>[4]</sup>。

纤维素酶产生菌得到学术界的广泛研究,仅被记录在 Swiss Protein 数据库中的纤维素酶氨基酸序列就已经达到 649 条,基因序列共有 433 条<sup>[5]</sup>,但是从微生物中筛选出的产纤维素酶菌株的产酶能力低且热稳定性较差,真正高产的微生物菌株相对较少,纤维素酶的生产依旧处于高成本低产量的状态,纤维素酶产生菌的选育依然是今后研究的一个重要方向。本研究拟从环境样品中分离筛选产纤维素酶菌株,并对其进行形态学和分子生物学鉴定,以期能够得到 1 株耐高温的产纤维素酶菌株,为相关基础研究提供相应的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品 试验用样品采集自生活污水堆肥。

1.1.2 培养基 纤维素分离培养基:酵母粉 5.0 g/L,羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 10.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L,115 ℃ 灭菌 30 min。葡萄糖蛋白胨水培养基:蛋白胨

0.5 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g/L,葡萄糖 0.5 g/L,pH 值 7.2~7.4。吡啶产生试验培养基:牛肉膏 3.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,胰蛋白胨 10.0 g/L,pH 值 7.0~7.2,121 ℃ 灭菌 20 min。柠檬酸盐利用试验培养基:MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L,柠檬酸钠 2.0 g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g/L,琼脂 15.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,1% 溴百里香酚蓝水溶液 10.0 g/L,pH 值 6.8~7.0,115 ℃ 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂 葡萄糖、四水酒石酸钠、3,5-二硝基水杨酸、苯酚、无水亚硫酸钠、羧甲基纤维素钠、无水乙醇、刚果红、NaCl、溴甲酚紫指示剂、甲基红、乙醚、吡啶等均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株分离 用电子天平准确称取 5 g 采集的样品加入到烧杯中,同时向烧杯中加入 45 mL 无菌水,然后把烧杯放置于沸水中水浴处理 10 min,将处理过的烧杯放在 130 r/min 的摇床培养箱中振荡培养 30 min,取 20 μL 振荡培养后的悬液,用移液枪涂布到新的纤维素分离培养基中,最后将培养基倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 18~22 h。待培养基中长出菌落后,将培养基以及所需试验材料放置于超净工作台中,在紫外灯下照射 20 min,然后用无菌牙签挑取适量的菌株,分别点接到新的纤维素分离培养基上,并为各菌株编号,将点接过菌株的纤维素分离培养基倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中持续培养 18~22 h。待培养基中长出菌落后,把适量的刚果红溶液(1 mg/mL)倒入培养基中,要保证刚果红溶液能够完全盖住培养基表面,将培养基静置染色 1 h 后倒出刚果红溶液,再用蒸馏水进行反复清洗,直至流出的液体无红色为止,最后用适量 NaCl 溶液(1 mol/L)浸泡洗脱 30 min,倒出 NaCl 溶液。

观察菌株周围能否产生透明圈,以菌株产生的透明圈直径和菌落直径的比值作为初步判断纤维素分解能力的指标,并将比值较大的菌株单独重新点接到新的纤维素分离培养基上,持续培养 18~22 h,之后同样进行刚果红溶液染色、NaCl 溶液浸泡洗脱等步骤,最后用游标卡尺准确测量菌株周围透明圈的直径和菌落直径,并计算两者的比值。

1.2.2 菌株的鉴定 对经过筛选得到的产纤维素酶菌株进行形态学观察和一系列生理生化鉴定,在参照《伯杰氏细菌

收稿日期:2018-01-03

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:182102110258);河南省高等学校重点科研项目(编号:18A55004、18B180018);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201710482077)。

作者简介:吴孔阳(1985—),男,河南商城人,博士,讲师,研究方向为食品微生物学。E-mail:kywu2007@126.com。

系统鉴定手册》<sup>[6-7]</sup>(中文第 8 版)和《常见细菌系统鉴定手册》的基础上,对菌株进行鉴定。

把菌株接种到葡萄糖蛋白胨水培养基中,然后将培养基放置于 37 ℃、160 r/min 的摇床培养箱中振荡培养 18~22 h,待液体培养基中出现浑浊后,取 1.5 mL 培养液于离心管进行离心,用于提取菌株的基因组 DNA。以所提取到的基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 27F 和 1492R,利用 PCR 扩增技术扩增 16S rDNA。

扩增的基本程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min<sup>[8]</sup>。取 5 μL 扩增后的 PCR 产物置于 PCR 管中,随后进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,之后将 PCR 扩增产物送往北京中科希林生物科技有限责任公司进行 DNA 测序。在 NCBI 上通过 Blast 程序对测序结果进行基因同源性的分析,并构建系统发育树作进一步分析。

1.2.3 酶活性测定 根据国际单位制,将单位时间内 1 mL 酶液水解底物所能生成 1 μmol 葡萄糖的酶量称为 1 个酶活性单位,以 U/mL 表示<sup>[9]</sup>。参考文献[10]绘制葡萄糖标准曲线,测定纤维素酶活性大小,取 0.5 mL 离心后的上清液作为粗酶液,加入含有 0.625% 羧甲基纤维素钠、pH 值为 4.4 的缓冲液 2 mL,置于 50 ℃ 水浴锅中酶解 0.5 h,然后加入 2.5 mL 二硝基水杨酸(DNS)显色液于沸水浴中加热 5 min,待冷却后在 540 nm 处测吸光度。纤维素酶活性计算公式:

纤维素酶活性 =  $m \times 1 / V \times n_0$ 。

式中: $m$  表示葡萄糖含量,mg; $V$  表示所用酶液量,mL; $n$  表示酶液的稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选结果

本试验从堆肥样品中得到耐高温菌株共 18 株,记为

A1~A18,最终筛选出能产纤维素酶的菌株共 14 株,将分离出来的菌株进行刚果红染色,其中产生透明圈直径与菌落直径比值较大的菌株有 8 株(表 1)。透明圈直径与菌落直径的比值越大,说明菌株产纤维素酶的活力就越强。由表 1 可知,A13 菌株透明圈直径与菌落直径的比值最大,其产纤维素酶的活力最强,菌株 A13 刚果红染色结果如图 1 所示,最终选择菌株 A13 进行后续试验。

表 1 8 株耐高温纤维素酶菌落直径、产生菌透明圈直径及二者之比

菌株	透明圈直径 (mm)	菌落直径 (mm)	透明圈直径/菌落直径
A1	18	7	2.57
A3	7	4	1.75
A5	21	8	2.63
A9	35	17	2.06
A11	16	13	1.23
A13	14	5	2.80
A15	30	11	2.73
A18	15	7	2.14

2.2 酶活性测定

利用 DNS 法测定不同浓度的葡萄糖溶液在 540 nm 处的吸光度,绘制葡萄糖标准曲线,其标准曲线为  $y = 0.3974x + 0.0108$ , $r^2 = 0.9979$ ,表明  $D_{540\text{ nm}}$  与葡萄糖浓度之间呈现较好的线性关系,因此可以通过该方程和酶活性计算公式得出菌株 A13 的纤维素酶活性,达到 9.27 U/mL。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 菌株的形态鉴定 耐高温纤维素酶菌株 A13 在平板上的形态特征见图 2,在光学显微镜下的观察结果见图 3,菌落特征及革兰氏染色的情况见表 2。

2.3.2 生理生化鉴定结果 对所筛选得到的菌株 A13 进行甲基红试验、乙酰甲基甲醇试验、吲哚试验和柠檬酸盐利用试验等一系列生理生化鉴定,结果见表 3,通过对菌株形态特征

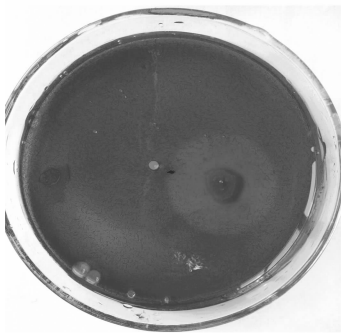


图1 A13 菌株刚果红染色结果

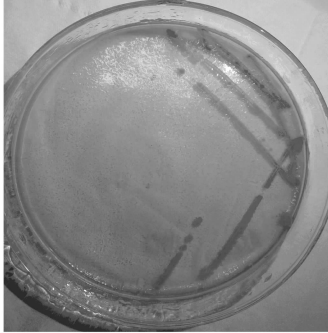


图2 A13 菌株形态特征



图3 A13 菌株显微镜观察

表 2 菌株 A13 形态鉴定结果

细胞形态	菌落特征	革兰氏染色
杆状	乳白色、边缘不整齐、表面湿润粗糙、不透明	G <sup>+</sup>

注:G<sup>+</sup> 表示革兰氏阳性。

表 3 A13 菌株生理生化性质

试验	性质
甲基红试验	弱 +
乙酰甲基甲醇试验	+
吲哚试验	-
柠檬酸盐利用试验	-

注:“-”表示该试验为阴性;“+”表示该试验为阳性。

及其所具有生理生化特征的鉴定,并对照《伯杰氏细菌鉴定手册》(中文第 8 版)和《常见细菌系统鉴定手册》,初步将菌株 A13 鉴定为芽孢杆菌属。

2.3.3 菌株的系统发育分析 以菌株 A13 的基因组 DNA 作为模板对 16S rDNA 进行 PCR 扩增,在琼脂糖凝胶电泳图上

观察到 1 条大小为 1 500 bp 左右的特异性条带(图 4)。将 PCR 扩增产物送至测序公司进行 DNA 测序,并将所得序列提交到 NCBI 网站上进行同源 DNA 序列的比对分析。结果(图

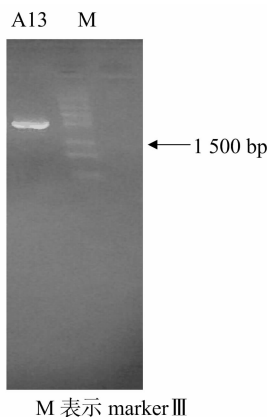


图4 菌株 A13 的 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳

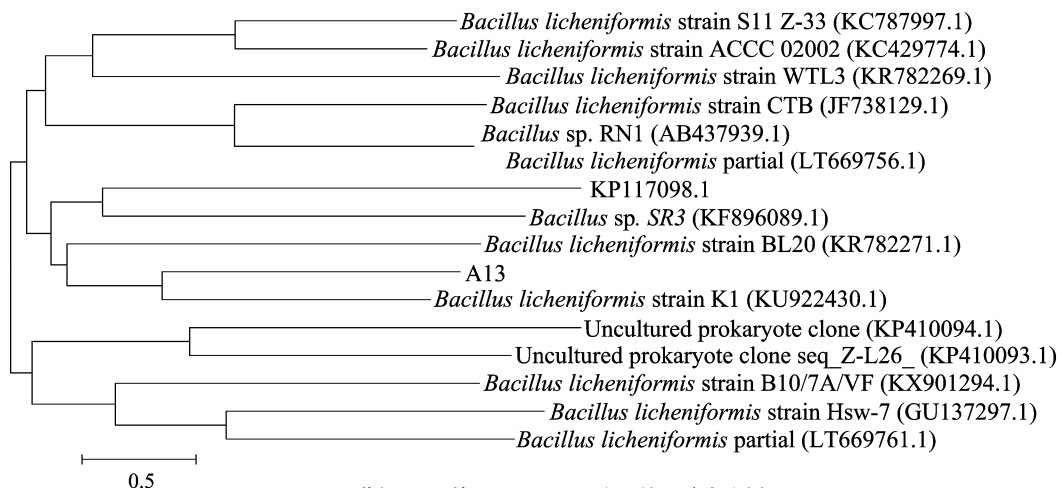


图5 菌株 A13 基于 16s rDNA 序列的系统发育树

而使纤维素酶的发展受到了一定的限制。因此有必要进一步寻找更多成本低、催化性能高的纤维素酶。王巍杰等通过响应面法优化地衣芽孢杆菌发酵树叶饲料时的纤维素酶活性，最终优化后酶活性达到  $6.73 \text{ U}^{[12]}$ 。余祖华等通过摇瓶发酵优化地衣芽孢杆菌 *B. LY02* 产纤维素酶的条件，产酶活性达到了  $0.6835 \text{ U/mL}^{[13-14]}$ 。

本试验初步分离得到 14 株具有产纤维素酶能力的菌株，经测定最终筛选出 1 株酶活性最高的菌株 A13，结合菌株的形态特征、生理生化特征以及对系统发育树的分析结果，最终将菌株鉴定为地衣芽孢杆菌，其酶活性为  $9.27 \text{ U/mL}$ ，后期通过诱变选育和发酵条件优化有望进一步提高其产纤维素酶活力。

#### 参考文献:

- [1] Lynd L R, Weimer P J, van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506–577.
- [2] 穆春雷, 武晓森, 李术娜, 等. 低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及纤维素酶学性质 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1193–1201.
- [3] 李素芬, 霍贵成. 纤维素酶的分子结构组成及其功能 [J]. 中国饲料, 1997(13): 12–14.
- [4] 王洪媛, 范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果 [J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 870–875.

5) 表明, 菌株 A13 的 16S rDNA 序列与地衣芽孢杆菌 [*Bacillus licheniformis* strain K1 (KU922430.1)] 等具有 90% 的相似程度, 菌株 A13 与 *Bacillus licheniformis* 的遗传距离最近, 结合菌株 A13 形态学特征、生理生化特征以及系统发育树分析结果, 将菌株 A13 鉴定为地衣芽孢杆菌。

#### 3 结论与讨论

纤维素酶可用于降解天然纤维素, 是将资源合理利用的一种方式<sup>[11]</sup>。随着科技的发展, 纤维素酶在各行各业中的市场需求量增大, 例如在饲料、酿酒、制药、食品、造纸、纺织、环保、石油开采等行业中, 纤维素酶都具有举足轻重的地位。但是由于纤维素酶发酵活力较低、生产成本高以及耐热性不高等原因, 纤维素酶并不能被普遍应用于所需的生产实践中, 进

- [5] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势 [J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 83–87.
- [6] 任世英, 邵奎, 李雯, 等. 一株耐高温纤维素酶产生菌的分离和鉴定 [J]. 工业微生物, 2016, 46(4): 19–24.
- [7] 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.
- [8] 龚丽琼, 邓朝霞, 黄祖新, 等. 高温大曲中筛选产纤维素酶的耐高温芽孢杆菌 [J]. 福建师范大学学报 (自然科学版), 2012, 28(3): 106–112.
- [9] 陈红漫, 杨会颖, 蔡金涛, 等. 一株耐热纤维素酶产生菌的筛选及酶学特性 [J]. 生物技术, 2010, 20(4): 58–61.
- [10] 江国忠. 高产纤维素酶枯草芽孢杆菌的筛选、应用及其产酶条件研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2010.
- [11] 刘洁丽, 王靖. 生物产纤维素酶研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2008, 25(12): 9–12.
- [12] 王巍杰, 王胜春, 尹丹. 响应面法优化地衣芽孢杆菌发酵树叶饲料提高纤维素酶活力的研究 [J]. 饲料工业, 2012, 33(17): 11–14.
- [13] 余祖华, 丁轲, 侯奎, 等. 产纤维素酶地衣芽孢杆菌 *B. LY02* 摇瓶发酵条件优化 [J]. 河南科技大学学报 (自然科学版), 2016, 37(4): 76–80.
- [14] 余祖华, 丁轲, 侯奎, 等. 产纤维素酶地衣芽孢杆菌的诱变选育及其产酶条件优化 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(4): 1006–1011.