

# 1 株产高温纤维素酶细菌的分离及 Biolog 鉴定

赵 旭, 王文丽, 李 娟

(甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以羧甲基纤维素钠为唯一碳源, 从来自甘肃永昌的双孢菇培养料中分离筛选得到 1 株降解纤维素的耐高温菌 X<sub>3</sub>。利用 Biolog GEN III 微孔板将该菌株鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus vallismortis/subtilis*)。在初始 pH 为 7.0、温度为 50 ℃、接种量为 2%、摇床转速为 200 r/min 的条件下培养 72 h, 该菌株粗酶液的 CMCase 活力达到 20.36 U/mL。

**关键词:** 芽孢杆菌; 高温纤维素酶; 筛选; Biolog 鉴定

**中图分类号:** S181 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)06-0030-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.06.003

## Isolation and Biolog Identification of A *Hyperthermophilic* cellulose Producing Strain

ZHAO Xu, WANG Wenli, LI Juan

(Institute of Soil, Fertilizer and Water-saving Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** Using sodium carboxymethyl cellulose as sole carbon resource, a *Hyperthermophilic* cellulase strain X3 was isolated from culture medium of *Agaricus bisporus* in Yongchang Gansu. The strain was identified as *Bacillus vallismortis/subtilis* with Biolog GEN III micropore plate. The enzyme yield of strain X3 reached 20.36 U/mL after culturing 72 hours under the conditions as follows: initial pH was 7.0, temperature was 50 ℃, inoculum was 2%, rotation speed was 200 r/min.

**Key words:** *Bacillus*; *Hyperthermophilic* cellulose; Screening; Biolog identification

纤维素是绿色植物细胞壁的主要成分, 是绿色植物通过光合作用形成的物质, 为地球上含量最大的碳水化合物<sup>[1]</sup>。然而由于纤维素降解速度缓慢, 并且难溶于水, 所以目前对纤维素的开发利用效率还非常低。我国纤维素类资源丰富, 农业生产中每年都产生数量非常巨大的作物秸秆和皮壳<sup>[2]</sup>, 然而目前处理这些农业废弃物最主要的方法是在原地焚烧, 这种方法虽然省时省力, 但原地焚烧秸秆不仅没有充分利用秸秆给农民带来应有的经济效益, 而且还严重污染了环境, 加

速了环境的恶化<sup>[3]</sup>。理化降解纤维素的方法因降解成本高, 容易污染环境而使用较少。无污染、绿色环保分解利用纤维素的有效途径之一是利用纤维素酶的水解作用将其分解成小分子的有机物, 并用这些有机物被用来合成多种为我们能利用的有益物质。纤维素酶(Cellulase)是一类能够降解纤维素生成葡萄糖等小分子有机物的酶的总称, 主要由真菌、放线菌、细菌等微生物产生, 原生动物、软体动物、昆虫等在一定的条件下也可以产纤维素酶<sup>[4]</sup>。研究发现, 真菌产生的纤维素酶活

收稿日期: 2018-03-26

基金项目: 兰州市科技支撑计划(2015-3-58)。

作者简介: 赵 旭(1982—), 男, 甘肃陇西人, 助理研究员, 硕士, 主要从事农业微生物方面的研究工作。Email: zhaoxu6939438@163.com。

通信作者: 王文丽(1968—), 女, 甘肃民勤人, 研究员, 主要从事农业资源与环境方面的研究工作。Email: wang\_wenli@sina.com。

[2] 范丽娟. 食用向日葵新品种区域试验分析[J]. 辽宁农业科学, 2017(1): 71-73.

[3] 王兴珍, 卯旭辉, 贾秀苹, 等. 甘肃省向日葵产业发展现状和对策[J]. 甘肃农业科技, 2017(3): 74-77.

[4] 金梦阳, 危文亮, 严新初. 我国向日葵育种研究现状

及发展对策[J]. 内蒙古农业大学学报, 2008(9): 232-235.

[5] 再生斌, 刘建华. 食用向日葵新品种(系)引种试验初报[J]. 农业科技与信息, 2017(24): 49-50.

(本文责编: 陈 珩)

性较高,但其对纤维素的降解作用比较剧烈,会降低产品的质量。与真菌相比,细菌产生的纤维素酶对纤维素的降解要温和的多,而且降解过程的可控性强,因此细菌产生的纤维素酶在工业生产中具有广阔的应用前景<sup>[5-6]</sup>。Biolog微生物鉴定系统是通过分析菌株对GenIII微孔板上71种碳源的利用情况和23种化学物质的敏感性来鉴定菌株的设备,GenIII微孔板上的四唑类氧化还原染料颜色变化强弱代表微生物对碳源的利用程度和对化学物质的敏感程度<sup>[7-8]</sup>。我们采用Biolog GEN III微孔板对从高温蘑菇培养料中分离筛选出的1株纤维素降解菌细菌进行了生理生化分析及鉴定,以期在高温纤维素降解细菌的进一步研究应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 品

样品取自甘肃省永昌县新城子镇的腐熟双孢菇培养料。

### 1.2 试 剂

供试试剂CMC-Na、刚果红、蛋白胨、酵母膏均购自国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 培 养 基

1.3.1 富集培养基 CMC-Na 10.0 g、蛋白胨 1.0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、定容至1 000 mL、121℃灭菌30 min。

1.3.2 筛选培养基 CMC-Na 10.0 g、蛋白胨 1.0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、NaNO<sub>3</sub> 6.0 g、琼脂 15.0 g、pH 7.0、水1 000 mL、121℃灭菌30 min。

1.3.3 发酵培养基 CMC-Na 10.0 g、蛋白胨 1.0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、NaNO<sub>3</sub> 6.0 g、琼脂 15.0 g、pH 7.0、水1 000 mL、121℃灭菌30 min。

### 1.4 菌株的分离纯化

1.4.1 富集 称取10 g样品加入250 mL的三角瓶中(装有玻璃珠和90 mL富集培养基),在50℃、150 r/min摇床中每培养72 h传代1次。传代2次后涂布平板分离。

1.4.2 分离 采用梯度稀释涂平板法。吸取富集培养液1 mL,接入9 mL生理盐水中,获得10<sup>-1</sup>的菌悬液,按以上方法依次稀释得到10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>…10<sup>-8</sup>的菌悬液,选取梯度10<sup>-4</sup>~10<sup>-8</sup>的菌悬

液,分别吸取100 μL涂布于纤维素培养基平板,50℃下培养72 h。通过平板涂布分离,共获得15株50℃下可以在CMC平板上生长的菌株,分别命名为X1~X15。

1.4.3 纯化 待平板上长出菌落后,将平板培养基上的单个菌落挑取并划线接种到纤维素培养基上,50℃培养72 h。待长出菌落后,连续将单个菌落在纤维素平板培养基上划线培养3次,直到没有杂菌为止。

### 1.5 菌株的培养和初筛

将初步分离纯化到的所有菌株接种到纤维素平板培养基上,50℃下培养72 h。待长出菌落后,用质量浓度为1 mg/L的刚果红染色30 min,然后用1 mol/L的NaCl溶液浸泡洗脱30 min,倾去洗液,观察菌落有无透明圈,并测定透明圈直径。CMC酶相对活性<sup>[9]</sup>(A)计算公式如下:

$$A = \text{溶解圈直径(cm)} / \text{菌体培养时间(d)}。$$

### 1.6 菌株羧甲基纤维素酶(CMCCase)活力测定

CMC酶活力测定参照DNS法<sup>[10]</sup>。取2.0 mL质量分数为1%的CMC-Na溶液(用0.05 mol/L pH 4.8的柠檬酸缓冲液配制)加入到10.0 mL的具塞试管中,然后加入0.5 mL粗酶液并摇匀,60℃水浴30 min取出,加入3 mL DNS试剂,沸水浴5 min,冷却至室温,定容至10 mL。最后在540 nm波长下测定吸光值,以空白作为对照调零。通过标准曲线计算出还原糖的含量。酶活力单位定义为每mL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。

### 1.7 菌株的Biolog鉴定

1.7.1 材料 Biolog GEN III微孔板(MicroPlate)、浊度仪、8通道电动移液器、BUG琼脂、OmniLog系统以及GN、GP数据库。

1.7.2 方法 将筛选获得的菌株在培养基(BUG+B)上33℃下培养24 h,用无菌棉签挑取少量菌落,将专用接种液制备为均一菌悬液,与标准菌悬液进行浊度对比。首先调节菌悬液浓度至90%~98% T,然后将调好浓度的菌悬液移入到V型加样槽中,再用8通道电动移液器将菌悬液按顺序加入GEN III微孔板的所有孔中(每孔加入量为100 μL),最后将加好菌悬液的GEN III微孔板放入培养箱33℃培养。依次在培养4、8、12、16、24 h时用OmniLog读数仪读取数据,并通过与数据库比较获得鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维素降解菌的分离及初筛

通过刚果红对菌株进行初筛的结果(图1)可以看出, 15株菌中共选出6株具有透明圈, 且CMC酶相对活性较大的菌株, 其中菌株X<sub>3</sub>的刚果红染色透明圈最大, CMC酶相对活性最高。

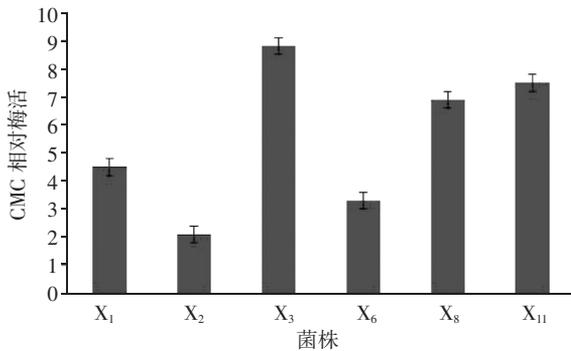


图1 菌株 CMC 酶相对活性比较

### 2.2 选出菌株羧甲基纤维素酶(CMCase)活性比较

为了进一步验证初筛出菌株的产酶能力, 对初筛选出的菌株进行液体发酵培养, 测定羧甲基纤维素酶(CMCase)活性结果(图2)。菌株X<sub>3</sub>的羧甲基纤维素酶(CMCase)活性最高, 菌株X<sub>1</sub>的羧甲基纤维素酶(CMCase)活性最低。菌株X<sub>3</sub>在50℃培养条件下培养72h后, 粗酶液的羧甲基纤维素酶(CMCase)活力达20.36 U/mL。选出的6株纤维素菌中菌株X<sub>3</sub>和X<sub>11</sub>的酶活性较高, 比菌株X<sub>2</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>8</sub>的CMCase高出60%以上; 菌株X<sub>1</sub>的CMCase活性仅为2.97 U/mL。

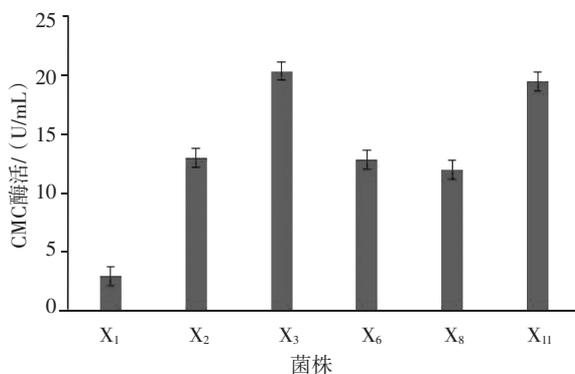


图2 菌株 CMCase 活性比较

### 2.3 菌株X<sub>3</sub> GEN III 微孔板的鉴定及分析

菌株X<sub>3</sub>在GEN III微孔板上的显色变化(图3)所示, 菌株X<sub>3</sub>的阳性反应为25个, 阴性反应为39个, 处于“边界值”的反应为32个。碳源利用测试的阳性反应有15个, 阴性反应有30个, 说明菌株X<sub>3</sub>能利用D-蜜二糖等25种碳源。化学敏感

性测试的阳性反应有10个, 阴性反应有9个。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	○	●	●	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

图3 X<sub>3</sub>在GEN III 鉴定板上的反应

### 2.4 选出菌株的Biolog 鉴定

接有X<sub>3</sub>菌悬液的GenIII微孔板33℃培养16~24h, 经Biology微生物鉴定系统鉴定得到的结果如表1所示。Biolog的菌株鉴定结果包括可能性(PROB)、相似性(SIM)和位距(DIST)3个参数, 其中SIM值代表与数据库相应菌株数据的相似度。如果SIM值 $\geq 0.50$ , 则认为系统确定的种属鉴定结果可信。SIM值越接近1.00, 可信度就越高。如果SIM值 $< 0.50$ , 而鉴定结果中所有属名相同的SIM值之和又大于0.5, 则可将结果认定为鉴定菌株的属名<sup>[11-12]</sup>。菌株X<sub>3</sub>与芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis/subtilis*)相似度值为0.660, 大于临界值0.50, 遗传距离为 $4.875 \leq 5.00$ , 所以鉴定结果为芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis/subtilis*)。芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis/subtilis*)是细菌中的一个科, 能形成芽孢(内生孢子), 对外界有害因子的抵抗力很强, 广泛分布于土壤、水、空气以及动物肠道等处。目前, 研究芽孢杆菌产高温纤维素酶及应用的报道较少。

表1 菌株X<sub>3</sub> Biolog 鉴定结果

序号	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.660	0.660	4.875	GP-Rod-SB	<i>Bacillus vallismortis/subtilis</i>
2	0.099	0.099	5.708	GP-Rod-SB	<i>Bacillus licheniformis</i>
3	0.090	0.090	5.766	GP-Rod-SB	<i>Bacillus atrophaeus/subtilis</i>
4	0.054	0.054	6.067	GP-Rod-SB	<i>Bacillus sonorensis</i>

key: <x: positive, x: negative, <x--mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

## 3 结论讨论

本研究利用刚果红透明圈鉴别法从蘑菇培养料中分离筛选出1株产纤维素的菌株X<sub>3</sub>。该菌株在培养基初始pH为7.0、培养温度为50℃、接种量为2%、摇床转速为200 r/min的条件下培养72

h, CMCase 活力达到 20.36 U/mL。利用 Biolog 鉴定系统将菌株 X<sub>3</sub> 初步鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus vallismortis/subtilis*)。

产纤维素酶的微生物种类繁多。多年来,国内外学者对产纤维素酶微生物进行了大量的分离筛选工作,形成了完善可靠的分离筛选方法<sup>[13]</sup>。目前较为常用的主要有刚果红透明圈鉴别法和滤纸条崩溃法两种<sup>[14]</sup>。有学者从温泉水和堆肥中分离筛选出嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)<sup>[15-16]</sup>, 该菌产生的纤维素酶活最适温度高于 60 ℃, 并且热稳定性很好。芽孢杆菌是一类可以在恶劣生长环境中生长的细菌, 在生长环境恶劣它形成芽孢以抵抗恶劣环境对细胞的危害。芽孢杆菌可以在酸碱、高温的环境中生存, 从而放宽了芽孢杆菌菌剂的生产和储存条件, 有利于菌剂的大规模生产和储存<sup>[17]</sup>。虽然 Biolog 微生物鉴定系统常被用于鉴定纯培养的革兰氏阴性和阳性细菌, 但 Biolog 微生物鉴定系统具有局限性, 就是它仅能对数据库内已有的菌种进行鉴定, 而数据库以外的菌种就得不到鉴定结果<sup>[18-19]</sup>。影响 Biolog 微生物鉴定系统鉴定结果的因素很多, 如微生物培养液的纯度、数量、活性、培养时间、培养温度等都会影响鉴定结果。16S rDNA 鉴定方法是在属水平上对细菌进行鉴定的方法, 如果要将细菌鉴定到种, 还需要借助生理生化的方法。Biolog 微生物鉴定系统不仅可以将菌株鉴定到种水平, 而且减化了操作步骤, 节省了工作时间<sup>[20]</sup>。相信随着 Biolog 微生物鉴定系统数据库的不断补充和培养条件的优化, 其鉴定结果也将会更加准确, 将在微生物的鉴定工作中发挥非常重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 金 嫫, 王 晶, 李新华. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蛋清制备抗氧化活性肽[J]. 食品研究与开发, 2009(6): 59-62.
- [2] 杨 盛, 侯红萍. 纤维素酶及其研究进展[J]. 中国调味品, 2008(11): 27-30.
- [3] 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.
- [4] 钱文佳, 阚光锋, 徐 仲, 等. 产低温纤维素酶南极细菌的筛选[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 15-18.
- [5] ITO S. Alkaline celluloses from alkalophilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics and application to detergents[J]. *Extremophiles*, 1997(1): 61-66.
- [6] 刘 刚, 余少文, 孔 舒, 等. 碱性纤维素酶及其应用的研究进展[J]. 生物加工过程, 2005(2): 9-14.
- [7] BOCHNER B R. Sleuthing out bacterial identities[J]. *Nature*, 1989, 339: 157-158.
- [8] BOCHNER B R. "Breathprints" at the microbial level[J]. *ASM News*, 1989, 55: 536-539.
- [9] 史玉英, 沈其荣, 娄无忌, 等. 纤维素分解菌群的分离和筛选[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 59-62.
- [10] MILLER G H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal. Chem.*, 1959(31): 426-428.
- [11] 曾哲灵, 罗敏, 梁丽军. Biolog 微生物自动分析系统在乳杆菌鉴定中的应用[J]. 南昌大学学报(理科版), 2008, 32(4): 385-393.
- [12] 刘 鹏, 魏亚东, 崔铁军. Biolog 系统和 16SrDNA 序列分析方法在植物病原细菌鉴定中的应用[J]. 植物检疫, 2006, 20(2): 86-87.
- [13] 李路军, 游银伟, 任鹏飞, 等. 一株具有纤维素降解能力的链霉菌 LLJ-03 的鉴定及初步研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1253-1256.
- [14] 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, 2012.
- [15] 熊世勤, 彭 谦, 陇 猷, 等. 耐热纤维素酶产生菌及产酶条件[J]. 云南大学学报, 1999, 20(2): 91-94.
- [16] 贺 云. 产胞外耐高温纤维素酶细菌的获得和酶的纯化及性质研究[J]. 常州工学院学报, 2006(1): 14-16.
- [17] 张立静, 李术娜, 朱宝成. 高效纤维素降解菌短小芽孢杆菌 T-7 的筛选、鉴定及降解能力的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 112-118.
- [18] WILSON W J, DILLARD H R, DEER S V. Assessment of phenotypic variability in *Erwinia stewartii* based on metabolic profiles[J]. *Plant Disease*, 1999, 83(2): 114-118.
- [19] JONES J B, CHASE A R, HARRIS G K. Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant pathogenic bacteria[J]. *Plant Disease*, 1993, 77(6): 553-558.
- [20] TANG Y W, ELLIS N M, HOPKINS M K, et al. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(12): 3674-3679.

(本文责编: 杨 杰)