

# 一株高效纤维素降解菌株的分离鉴定 及其酶学性质

钱林 郑巧利 付瑾 王慧萍 郑春丽 柳建设\*

(东华大学环境科学与工程学院 上海 201620)

**摘要:** 从黄浦江淀山湖的水底沉积物中筛选分离得到一株产纤维素酶的菌株。经细菌形态观察, 生理生化实验并结合 16S rRNA 序列分析, 鉴定该菌为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 同时发现其在系统发育树中处于一个独立的分支, 推测该菌为 *Bacillus* 属中一个新的亚种。对该菌株产酶及酶活特性进行了初步研究, 发现纤维素酶的产生与细菌的生长密切相关。该菌株在 37°C, pH 7.0 的条件下, 发酵 66 h 后纤维素酶活达到最高值 4.58 U/mL。

**关键词:** 纤维素酶, 降解, 16S rRNA, 蜡状芽孢杆菌

## Isolation and Identification of a Cellulose Degrading Bacterium and Its Cellulase Characterization

QIAN Lin ZHENG Qiao-Li FU Jin WANG Hui-Ping  
ZHENG Chun-Li LIU Jian-She\*

(School of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

**Abstract:** A cellulose degrading strain DSH was isolated from the sediment of Dianshan Lake, Huangpu River, Shanghai. Basing on morphology, biochemical and physiological characterization, DSH was characterized as *Bacillus cereus*. A phylogenetic tree was constructed with the published 16S rRNA sequences of relative bacteria species. In the phylogenetic tree, the DSH strain is in a new branch which has the closest relative to *Bacillus cereus* strain JBE0004 with 99.78% sequence similarity. The generation of cellulose was closely correlated to its growth rate. The highest cellulose activity of DSH strain was 4.58 U/mL when grown at 37°C, pH 7.0 for 66 h.

**Keywords:** Cellulose, Degrading, 16S rRNA, *Bacillus cereus*

能源是经济和社会发展的物质基础。随着全球经济的发展, 能源供需之间的矛盾日趋明显, 寻找和开发可再生能源和新能源成为影响国家安全

的重要议题。纤维素是陆地上光合作用的初级产物, 它占植物干重的 35%–50%, 是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物。同时, 纤维素是自然界中

基金项目: 全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(No. 200549); 国家自然科学基金项目(No. 50874032); 上海市重点学科建设项目(No. B604)

\* 通讯作者: Tel: 86-21-67792523; E-mail: liujianshe@dhu.edu.cn  
收稿日期: 2010-01-25; 接受日期: 2010-02-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

数量最大的可再生资源,占陆地生态系统生物量的80%,每年通过全球生物合成可再生性纤维素达1000亿吨以上<sup>[1-2]</sup>。我国农业和工业生产中每年可制造数百万吨的农作物秸秆和纤维素废弃物,然而由于难以大量被动物分解利用,这些资源大部分通过简单的焚烧方式利用,利用率极低,在浪费能源的同时会对环境造成较大的污染。如何有效地开发利用纤维素资源已成为当今研究的热门课题<sup>[3-4]</sup>。

进一步寻找和开发高产纤维素酶菌种,是纤维素资源能否高效利用的关键。目前分离到的产纤维素酶的微生物主要集中在真菌、放线菌和部分酵母菌等<sup>[5-6]</sup>,较少发现细菌特别是蜡状芽孢杆菌能产纤维素酶。本文通过富集培养,利用纤维素为唯一碳源的平板分离法,从黄浦江淀山湖的水底沉积物中分离出一株高效产纤维素酶的细菌,经形态观察、生理生化实验并结合16S rRNA序列分析,鉴定其为一株产纤维素酶的蜡状芽孢杆菌,并对该菌生长和产纤维素酶动力学行为做了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

菌株分离自上海市黄浦江上游淀山湖的水底沉积物。

### 1.2 试剂

化学试剂均为分析纯,购自上海国药集团及上海生工公司;分子生物学试剂购自MBI公司和NEB公司,引物合成及测序由上海生工完成。

### 1.3 培养基

种子培养基(g/L): CMC-Na 20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.3, FeSO<sub>4</sub> 0.1, ZnSO<sub>4</sub> 0.1, 蛋白胨 2.5。

分离培养基(g/L): CMC-Na 0.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5。固体培养基是在上述液体培养基中加入1%琼脂。

发酵培养基(g/L): CMC-Na 5, 蛋白胨 5, 酵母膏 1。

### 1.4 菌种的分离与纯化

称取水底沉积物0.5 g,加入大约20 mL无菌水,使沉积物悬浮,取悬浮液1 mL接种到含100 mL液体种子培养基的250 mL摇瓶中,37℃、170 r/min 培

养5 d。取1 mL培养液梯度稀释至10<sup>-2</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-8</sup>涂布于固体选择培养基上37℃培养2 d。挑取平板上菌落饱满、透明圈明显的单个菌落接种于液体选择培养基中,37℃、170 r/min再培养2 d。重复液体培养和固体平板分离4次。最终从固体平板中挑选出1个单菌落,经液体培养基扩大培养,命名为DSH,随后对其开展一系列研究。

### 1.5 菌种鉴定

**1.5.1 生理生化特征:**菌株的生理和生化特征实验测定方法及初步的鉴定见《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup>。

**1.5.2 基因组提取及16S rRNA基因扩增:**对纯化后培养的菌株使用上海生工公司基因组抽提试剂盒提取DNA,然后扩增细菌的16S rRNA基因。扩增体系50 μL,组成为:无菌水33 μL、10×PCR Buffer 5 μL、dNTPs 5 μL、引物63F (5'-CAGGCCTAACA CATGCAAGTC-3')和1387R (5'-GGGCGGWGTGTA CAAGGC-3')<sup>[8]</sup>各2 μL (5 pmol/μL)、Taq DNA聚合酶1 μL、DSH菌株的基因组DNA 2 μL。扩增程序:94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 10 min。

**1.5.3 16S rRNA基因测序及分析:**PCR产物先切胶回收,经PBS-T载体连接后转入大肠杆菌DH5α感受态细胞,经蓝白筛选后挑阳性克隆子送上海生工测序。将菌株的16S rRNA基因序列提交到GenBank核酸序列数据库并与数据库中已知的相关序列进行比较,通过ClustalX 1.8软件进行全序列比对<sup>[9]</sup>,并用MEGA3.1构建系统发育树<sup>[10]</sup>。

### 1.6 纤维素酶活的测定<sup>[11-12]</sup>

发酵液经4000 r/min离心10 min,上清液作为粗酶液。用0.5 mL适当稀释的酶液于50℃恒温水浴预热2 min后,加入1.5 mL用醋酸缓冲液pH 4.8配制的1%羧甲基纤维素钠溶液,50℃恒温水浴酶解30 min,加入1 mL浓度为1 mol/L的氢氧化钠摇匀以终止反应。然后加入2 mL的DNS于沸水浴中5 min,用流动的冷水终止反应,冷却后在540 nm下测定其吸光值,并对照标准曲线后测算酶活力。在上述条件下,酶活力按照国际单位规定定义为:每分钟催化纤维素水解生成1 μmol葡萄糖的酶量为1个酶活力单位U。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的形态学特征

扫描电子显微镜显示, 该菌为短杆状, 见图 1; 在羧甲基纤维素钠固体培养基上, 菌株 DSH 形成乳白色圆型菌落, 隆起, 粘着, 扩展(图 2)。

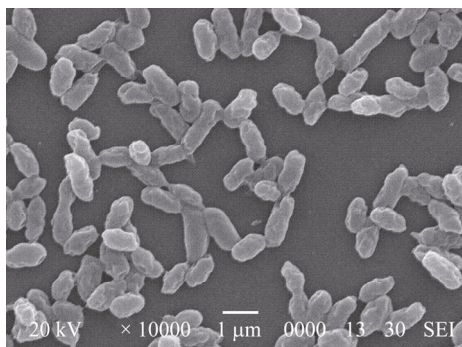


图 1 菌株 DSH 的扫描电镜照片  
Fig. 1 SEM image of strain DSH



图 2 菌株 DSH 菌落照片  
Fig. 2 Colony image of strain DSH

### 2.2 生理和生化特征

革兰氏染色结果表明, 菌株 DSH 为革兰氏阳性。菌株 DSH 能在多种碳源中生长, 能利用葡萄糖、果糖、乳糖、半乳糖和麦芽糖作为唯一碳源进行生长; 其接触酶反应阳性, 氧化酶反应阳性。根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>, 其特征与芽孢杆菌属细菌较为相似。

### 2.3 菌株 DSH 的 16S rRNA 基因序列分析

采用 PCR 技术, 成功扩增出菌株 DSH 的 16S rRNA 基因, 然后克隆和测序。测定的序列长度为 1371 bp, 在 GenBank 中的序列登录号为 GQ927755。将该序列结果输入 GenBank 以 BLAST 进行序列同源性比较, 结果显示其 16S rDNA 序列与 *Bacillus cereus* strain JBE0004 (FJ982654) 的亲缘关系最近, 相似度为 99.78%。以 16S rRNA 基因序列同源性为基础构建系统发育树(图 3)。菌株 DSH 与 *Bacillus* 属的序列有较高的同源性, 但在系统发育树中其处在一个单独的分支, 说明菌株 DSH 具有相对独立的进化地位, 可能为 *Bacillus* 属中一个新的亚种。

### 2.4 菌株 DSH 生长及产酶能力分析

**2.4.1 纤维素酶反应最适温度的确定:** 为明确菌株 DSH 产酶的最佳生长温度, 以羧甲基纤维素酶为反应底物, 改变反应体系的温度条件, 并测定它们的酶活力。以最高值为 100%, 用相对酶活力对温度作图。由图 4 可以看出, 菌株 DSH 所产生的纤维素酶在 30℃–50℃ 下, 相对酶活力较高, 达到 85%–100%。在此温度范围之外, 相对酶活力较低。其中最佳反应温度条件为 37℃。

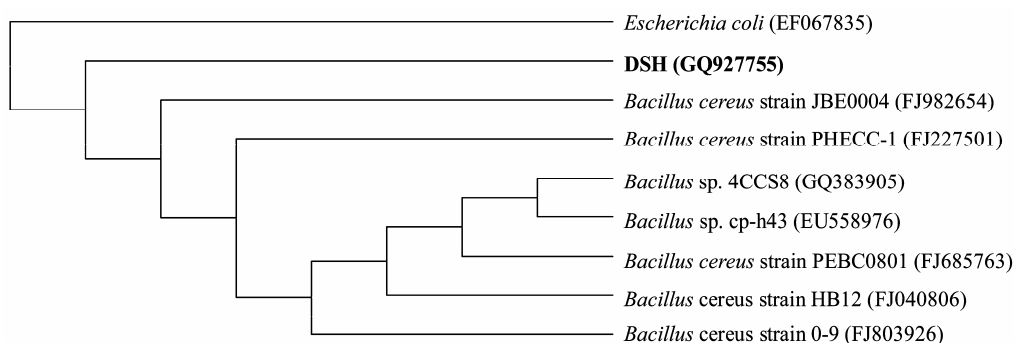


图 3 DSH 菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of DSH strain

注: 括号内数字为 GenBank 登录号。

Note: The number in the bracket denotes the GenBank accession number.

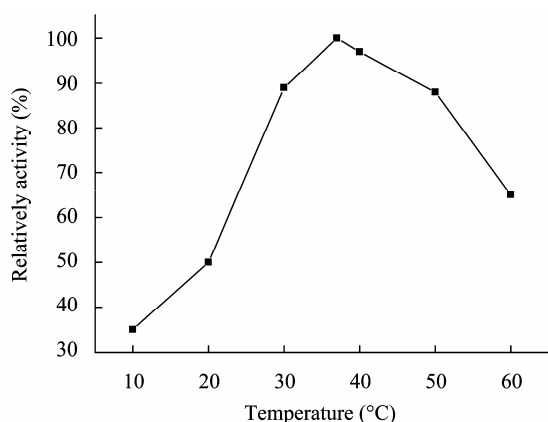


图4 温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperatures on the activity of cellulase

**2.4.2 纤维素酶反应最适 pH 的确定:** 为明确菌株 DSH 产酶的最佳生长 pH, 以羧甲基纤维素酶为反应底物, 改变反应体系的 pH 条件, 并测定它们的酶活力。以最高值为 100%, 用相对酶活力对 pH 作图。由图 5 可以看出, 菌株 DSH 所产生的纤维素酶在 pH 6.0–7.0 的情况下, 相对酶活力较高, 达到 80%–100%。在此 pH 范围之外, 相对酶活力较低。其中最佳反应 pH 条件为 7.0。pH 值的改变能影响酶分子活性部位的解离, 最适 pH 值时, 酶分子上活性基团的解离状态最易于底物结合, pH 值高于或低于最适值时, 活性基团的解离状态发生改变, 酶和底物的结合力降低, 因而酶反应速度降低<sup>[14]</sup>。

**2.4.3 不同发酵时间菌株 DSH 的生长曲线及酶活分析:** 接种菌株 DSH 于发酵培养基, 37°C、pH 7.0, 170 r/min 摇床培养。隔段时间测定培养基的  $OD_{600}$  值及纤维素酶活(图 6)。DSH 在接种 18 h 后进入对数生长期, 42 h 时进入稳定生长期, 在 76 h 时  $OD_{600}$  值达到最高值, 持续一段时间之后进入衰亡期。

随着细菌增长速度的加快, 细菌产酶的活力也进一步提高。如图 6 所示, 酶活的增量滞后于细菌进入对数生长期的时间, 从 32 h 开始, 酶活力呈指数式快速增加; 菌株 DSH 的酶活曲线先于生长曲线达到最高, 在 66 h 的时候出现产酶的峰值, 达到 4.58 U/mL。当细菌进入衰亡期后, 酶的活力也跟着降低。

菌株 DSH 的生长曲线和酶活能力随时间的变化曲线这两条曲线走势极为相似, 表明了纤维素酶的产生与细菌的生长密切相关。一般在菌体生长的对数期, 菌体代谢活动旺盛, 分泌胞外酶的活性也

较强。生长曲线–酶活关系的测定为后期酶学的进一步研究及发酵条件的优化提供了基础。

目前菌株 DSH 所产纤维素酶活力与国内外已报道的高酶活菌株相比还比较低<sup>[15–16]</sup>, 若通过优化培养条件, 或通过驯化、诱变和基因工程手段提高其纤维素酶活力, 尝试对选育出的菌株采用混合发酵培养以期获得酶活力高的混合纤维素酶, 具有相当广阔的工业应用前景。

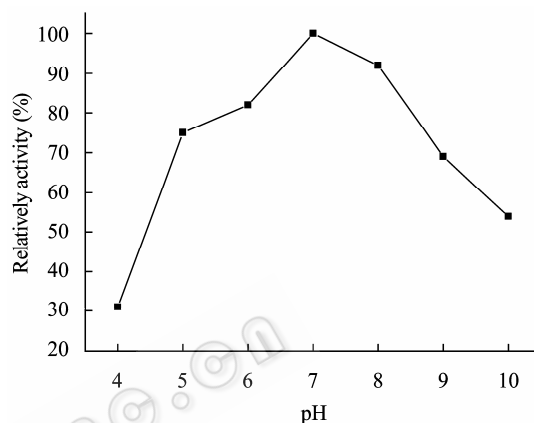


图5 pH 值对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH values on the activity of cellulase

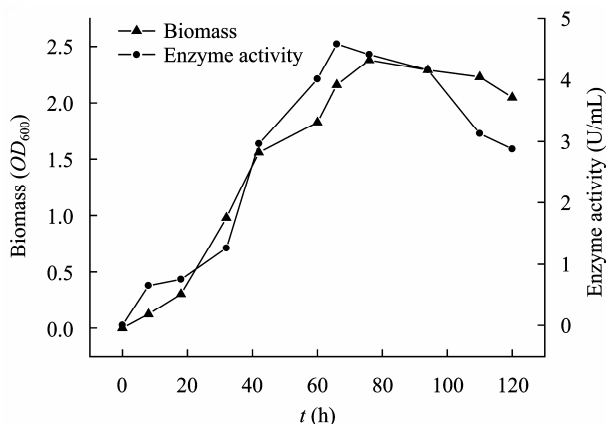


图6 菌株 DSH 的生长和产纤维素酶活力变化曲线

Fig. 6 Growth curve and CMCase-producing activity of strain DSH

### 3 结论

(1) 从黄浦江淀山湖的水底沉积物中筛选分离得到一株产纤维素酶的菌株, 经鉴定为蜡状芽孢杆菌, 命名为 *Bacillus cereus* sp. strain DSH。

(2) 菌株 DSH 产纤维素酶的最佳反应温度条件为 37°C, 最佳反应 pH 为 7.0, 产纤维素酶活力最高出现在发酵 66 h 后, 达到 4.58 U/mL。

(3) 纤维素酶的产生与细菌的生长密切相关, 菌株生长曲线-酶活关系的测定为后期酶学的进一步研究及发酵条件的优化提供了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 2006(24): 452-481.
- [2] Lyndl R, Paul JW, Van ZYL WH, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(3): 506-577.
- [3] Hill J, Nelson E, Tilman D, *et al.* Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(30): 11206-11210.
- [4] Zeng X, Ma Y, Ma L. Utilization of straw in biomass energy in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2007(11): 976-987.
- [5] 陈冠军, 杜宗军, 高培基. 耐碱性真菌纤维素酶生产菌的筛选及酶学性质的初步研究. *工业微生物*, 2000, **30**(4): 23.
- [6] 刘森林, 邢苗, 刘刚, 等. 碱性纤维素酶革兰氏阴性菌株筛选及酶学性质研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(4): 91-94.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-390.
- [8] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M, eds. *Nucleic Acid Techniques in bacterial Systematics*, 1991: 115-175.
- [9] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997(4): 4876-4882.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software or molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004(5): 150-163.
- [11] Hardin MT, Mitchell DA, Howes T. Approach to designing rotating drum bioreactors for solid state fermentation on the basis of dimensionless design factors. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, **67**(3): 274-282.
- [12] Ghose TK. Measurement of cellulose activities. *Pure and App Chem*, 1987, **59**(2): 257-268.
- [13] RE 布坎南, NE 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-795.
- [14] 刘宗林, 彭义交, 胡阿伟. 一株纤维素酶学特性的研究. *食品科学*, 2003(3): 32-35.
- [15] 韩如, 梅建凤, 闵行, 等. 嗜热厌氧纤维素降解菌对纤维素的粘附及其酶活性研究. *浙江大学学报*, 2001, **27**(2): 165-168.
- [16] Jang HD, Chen KS. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003(19): 263-268.

## 栏目介绍

### 教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2-5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版(1974-2006)一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将其主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王闵

电子信箱: gg@im.ac.cn