

两株高产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及酶学特性

陈丽燕 张光祥 黄春萍 熊艳 李敏 常丽梅 张晓喻*

(四川师范大学生命科学学院 四川 成都 610101)

摘要: 从腐烂枯叶及附近土壤筛选分离得到 2 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, 将其初步鉴定为地衣芽孢杆菌 CT1 (*Bacillus licheniformis* CT1) 和枯草芽孢杆菌 CM2 (*Bacillus subtilis* CM2)。经摇瓶发酵, 测定其 CMCase、FPA 酶活力, 结果表明 CT1 和 CM2 在液体摇瓶培养 4 d 后的 CMC 酶活最大, 分别可达 163.3 U/mL 和 167.17 U/mL; CT1 摇瓶培养 2 d 后, FPA 酶活达到了 211.17 U/mL, CM2 摇瓶培养 3 d 后, FPA 酶活为 207.83 U/mL。进行不同碳源对菌株产酶能力影响的试验, 并通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染后初步分析纤维素酶谱条带, 发现菌株对不同来源纤维素的降解能力及产纤维素酶的种类均有所不同。

关键词: 纤维素-降解菌, 筛选, 纤维素酶, SDS-PAGE 凝胶电泳, 16S rRNA

Isolation, identification and enzymatic characteristics of cellulose-producing strains with high cellulase activity

CHEN Li-Yan ZHANG Guang-Xiang HUANG Chun-Ping XIONG-Yan LI-Min
CHANG Li-Mei ZHANG Xiao-Yu*

(College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610101, China)

Abstract: Two cellulose producing strains were isolated from decayed leaf and soil around it. According to morphology, biochemical and physiological characterization, and 16S rRNA sequence analysis, CT1 was identified as *Bacillus licheniformis* and CM2 was identified as *Bacillus subtilis*. Through determinations of CMC enzyme activity and filter paper enzyme activity using liquid fermentation. The result of the CMCase activity of CT1 is 163.3 U/mL and CM2 is 167.17 U/mL after 4 d, the FPA activity of CT1 is 211.17 U/mL after 2 d and CM2 is 207.83 U/mL after 3 d. The effect of carbon sources on the optimum cellulase-producing conditions of these strains were studied. By silver staining after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis preliminary separation cellulose enzyme special bands. The result showed that the utilization capabilities to different source cellulose were different.

Keywords: Cellulose-producing bacteria, Isolation, Cellulase, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 16S rRNA

纤维素是植物光合作用的主要产物,是地球上最丰富的可再生资源,利用微生物可将纤维材料转化为能源、饲料、化工等原料。秸秆是纤维组分含量很高的农作物残留物,全世界每年产农作物秸秆近 2 000 亿 t,中国每年就约有 7 亿 t^[1-2],采用微生物技术处理秸秆是当前研究最多的一种秸秆处理方法。目前研究较多的是霉菌,尤以绿色木霉、里氏木霉和康氏木霉为典型^[3-4],而对细菌、放线菌研究较少。分离筛选能够高产纤维素酶,有效降解纤维素的微生物菌种是应用纤维素材料的首要前提,从菌剂的角度来讲,芽孢杆菌因具有很好的稳定性和环境适应性、产酶活性高等优点而备受欢迎,因此高产降解纤维素的芽孢杆菌的获得能够得到比较稳定的菌剂,便于工农业上的应用,对解决当今世界所面临的粮食短缺、饲料资源紧张、能源危机和环境污染等问题具有深远的意义^[5-6]。

本研究从腐烂枯叶及附近土壤分离筛选能降解纤维素的细菌,通过固体培养初筛,液体摇瓶复筛,测定菌株的 CMC 酶活力和 FPA 酶活力,从中获得 2 株高产纤维素酶活的纤维素降解菌株,通过形态观察、生理生化试验和 16S rRNA 序列测定来确定种属,并研究两菌株对不同来源的纤维素的利用;同时利用 SDS-PAGE 凝胶电泳技术,初步分离菌株在不同碳源培养基所产生的纤维酶谱条带,为细菌的产酶特性、降解机理研究及后续工业大生产的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

纤维素降解菌分离供试材料采自四川师范大学树林的腐烂枯叶及其附近的土壤。

1.2 试剂及药品

化学试剂均为分析纯,购自成都科龙化工试剂公司;分子生物学试剂购自 Tiangen Biotech 公司,引物合成由上海 JINJIE 公司,测序由上海 Invitrogen 公司完成。

1.3 培养基

1.3.1 电泳药品配方:参见 Coligan J. E. 等的《精编蛋白质科学实验指南》^[7]。

1.3.2 培养基:纤维素降解菌的筛选参照文献^[8-9]报道的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)刚果红培养基,略有改变,成分如下所述。

种子培养基(g/L): PDA 和 NB 培养基。

筛选培养基(g/L): CMC-Na 5.0, MgSO₄ 0.3, K₂HPO₄ 1.0, NaH₂PO₄ 1.0, 琼脂 20.0, 刚果红 0.2, CaCl₂·2H₂O 0.3, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄ 0.001 6, ZnCl₂ 0.001 7, CoCl₂ 0.001 7, 自然 pH。

酶活培养基(g/L): CMC-Na 5.0, 蛋白胨 2.5, 酵母膏 0.5, MgSO₄ 0.3, KH₂PO₄ 2.0, NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 1.4, CaCl₂·2H₂O 0.3, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄ 0.001 6, ZnCl₂ 0.001 7, CoCl₂ 0.001 7, 自然 pH。

纤维素酶谱培养基(g/L): 碳源(竹子、稻草、Na₂CO₃) 5.0, MgSO₄ 0.3, KH₂PO₄ 2.0, NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 1.4, CaCl₂·2H₂O 0.3, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄ 0.001 6, ZnCl₂ 0.001 7, CoCl₂ 0.001 7, 自然 pH。

不同碳源的制备:选择乙基纤维素、新华滤纸、玉米秸秆、水稻秸秆、新鲜嫩竹杆作为不同的碳源。分别将 2 种秸秆和竹子裁剪成 2 cm-3 cm 小段,90 °C 烘干后粉碎至 40 目备用。

上述培养基灭菌条件:1×10⁵ Pa, 灭菌 20 min。

PDA、NB 培养基和生理生化鉴定培养基参见张纪忠的《微生物分类学》^[10]和周德庆的《微生物学实验手册》^[11]。

1.4 菌种的分离与纯化

称取土壤样品 1.00 g,置于 100 mL 无菌水中打散均匀后,在 28 °C 和 200 r/min 振荡培养 48 h 后,吸取上清液进行梯度稀释,将稀释液涂布在筛选培养基平板上,放置于 28 °C 的恒温箱中培养 48 h 后,从培养基上挑取周围有明显透明水解圈的菌落,于筛选平板上反复划线分离纯化。

将分离出的水解圈比较大的菌株点种到筛选平板培养基上,每个平板点 3 个点,28 °C 培养不同时间,1-5 d。用 0.02% 的刚果红染色,1 mol/L NaCl 冲洗,根据透明圈直径及其与菌落直径之比的大小选择产酶量高的菌株。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 生理生化鉴定: 将筛选所得菌株扩大培养, 转接到 NB 斜面培养基上, 置于 28 °C 恒温培养 24 h 活化菌株, 置于 4 °C 冰箱中保存。

各种生长、生理生化试验均以培养 18–24 h 的斜面为种子。有关其形态学观察和生理生化性状实验均按照张纪忠的《微生物分类学》和周德庆的《微生物学实验手册》进行属和种的初步鉴定。

1.5.2 16S rRNA 序列的 PCR 扩增: 以分离菌株的 DNA 为模板, 采用通用引物 8F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-ACGGTTACCTG TTACGACTT-3'), 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增。扩增体系为 50 μ L (10 \times buffer 5.0 μ L, MgCl₂ 3.0 μ L, dNTPs 4.0 μ L, 引物各 1.5 μ L, Taq 酶 0.4 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 33.6 μ L)。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55.3 °C 30 s, 72 °C 90 s, 32 个循环; 72 °C 5 min; 72 °C 20 min。PCR 产物测序由 Invitrogen 公司完成。将测序得到的特定序列, 在 NCBI 上通过 BLAST 程序与已知 16S rRNA 序列进行同源性比较及分析^[9]。

1.6 酶活力的测定

1.6.1 粗酶液的制备: 将筛选得到的纯菌株接种到 50 mL 摇瓶培养基中, 于 28 °C、160 r/min 摇瓶培养 1–6 d。每天取出 2 瓶发酵液, 5 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液即是细胞胞外酶液, 用于不同培养时间酶活力的测定。

1.6.2 DNS 法测定酶活力^[12]: (1) 葡萄糖标准曲线的绘制。

准确称取 104.8 mg 恒重的葡萄糖, 用蒸馏水溶解定容于 100 mL 容量瓶中, 配制成 1 mg/mL 标准葡萄糖溶液, 作为标准葡萄糖母液备用。

按照表 1 完成各试剂的添加及反应, 冷却后分别在 540 nm 下比色, 记录吸光值, 绘制葡萄糖标准曲线。

(2) 菌株 CMC 酶活力的测定^[9,13]。

在 10.0 mL 的试管中加入 6.0 mL 1.0% 羧甲基纤维素钠溶液 (pH 7.0、6.0、8.0), 再加入 2.0 mL 不同培养时间的粗酶液, 50 °C 水浴中酶解 30 min, 加入 2.0 mL DNS 溶液, 沸水浴 8 min, 取出于冰水中冷

却至室温, 定容至 10.0 mL, 在 540 nm 下测定吸光值, 根据葡萄糖标准曲线计算酶活力。

(3) 菌株 FPA 酶活力的测定^[13–14]。

取 1 cm \times 6 cm 新华 1 号滤纸加入 10.0 mL 试管中, 然后加入 pH 7.0 缓冲液 6.0 mL 作底物, 再加 2.0 mL 不同培养时间的粗酶液, 50 °C 酶解 30 min, 加入 2.0 mL DNS 溶液, 沸水浴 8 min, 取出于冰水中冷却至室温, 定容至 10.0 mL, 于 540 nm 下测定吸光值, 根据葡萄糖标准曲线计算酶活力。

管号 Tube	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖标准液 Glucose standard solution (mL)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 Distilled water (mL)	2.0	1.9	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
DNS (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
沸水中煮沸 8 min, 冷却							
蒸馏水 Distilled water (mL)	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5

酶活力的定义: 在 50 °C 条件下, 1 mL 酶液每分钟水解底物生成 1 μ g 葡萄糖的酶量, 称为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示。

酶活力的计算方法:

$$1 \text{ 个酶活力单位 } X = 1000 \times C \times V / V_1 \times T$$

式中: X: 样品的酶活力 (U/mL); C: 测试液中葡萄糖含量 (mg/10 mL); V: 定容体积 (mL); V₁: 吸取酶液的体积 (mL); T: 水解时间 (min)。

1.7 菌株对不同碳源的利用^[14–15]

将筛选培养基中的 CMC-Na 分别换成乙基纤维素、玉米秸秆、水稻秸秆 (d)、新华滤纸片、竹子 (z), 配制成不同碳源的培养基, 将分离纯化得到的纤维素降解菌株在每个平板点 3 个点, 28 °C 培养 4 d。用 0.02% 的刚果红染色 10 min, 再用 1 mol/L NaCl 冲洗, 用游标卡尺分别测量透明圈直径 (D) 和菌落直径 (d), 降解圈用透明圈直径和菌落直径的差值来表示, 根据其大小来初步判断菌株对不同纤维素材料的降解能力。

1.8 菌株竹子原纤维素酶活力的测定^[16-17]

将所得的 2 株菌分别接至装有 50 mL 以竹子原纤维为唯一碳源的发酵培养基中, 28 °C 振荡培养 2-6 d, 以不加菌种作空白对照, 用差重法计算酶降解率。

酶降解率(%)=[(酶解前质量-酶解后的质量)/酶解前质量]×100%。

1.9 SDS-PAGE 电泳^[18-19]

1.9.1 电泳样品的制备: 将所筛纯菌株培养在纤维酶谱培养基中, 以天然纤维素稻草(c)、竹子(z)为唯一碳源、以 Na₂CO₃ (0)为无机唯一碳源作对照, 分别摇瓶发酵 4 d 后, 8 000 r/min、4 °C 离心 25 min, 去除菌体, 取上清液用有机溶剂沉淀法丙酮(冷却到 -20 °C)处理酶液, 按 1:1 体积, 冰浴 10-20 min, 在 10 000 r/min 离心 15 min 后获得沉淀, 用 2 倍体积的 2×SDS 上样缓冲液溶解沉淀, 用搅拌机混匀, 95 °C 热处理 3-10 min, 既用 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.9.2 蛋白电泳: 蛋白纤维素酶相对分子质量的测定, 采用 SDS-PAGE 方法测定, 分离胶浓度为 12 %, 浓缩胶 5%, 用银染法^[19]对凝胶内的蛋白染色。在加样孔分别加入宽分子量标准蛋白 6 μL 和粗酶液浓缩蛋白 10 μL, 样品进胶前将电压控制在 80 V, 待前沿指示剂跑到浓缩胶和分离胶的分界线时, 将电压控制在 120 V 左右进行 40 min 电泳, 电泳完毕后, 将凝胶剥离后放入染色皿中, 之后参照书上的步骤进行银染。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

从腐烂枯叶及附近土壤中初步筛选到降解纤维素的细菌数株, 将降解能力较强的菌株进行纯化, 测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 根据透明圈直径与菌落直径之比的大小, 筛选出 2 株产酶量高的菌株 CT1 和 CM2, 结果见表 2、图 1。

2.2 菌株 16S rRNA PCR 扩增和序列分析

以 CT1 和 CM2 两细菌 DNA 为模板, 以 16S rRNA 通用引物 8F 和 1 492R 进行 PCR 扩增, 获得了 2 条特异的、大小约为 1.5 kb 的 PCR 产物, 结果见图 2。获得的特异片段经 PCR Product Purifi-

cation Kit 纯化后, 以正反双向引物进行测序, 获得测序长度分别为 1 507 bp 和 1 467 bp 片段, 将 16S rDNA 序列输入 GenBank 以 BLAST 进行同源性比较, 结果显示在 GenBank 数据库中同源性相近的均为芽孢杆菌属细菌, 选取最相近序列将 CT1 和 CM2 分别初步定为 *Bacillus licheniformis* 和 *Bacillus subtilis*。

表 2 纤维素分解菌刚果红染色结果
Table 2 Transparent hydrolysis circle of cellulose-decomposing bacteria by Congo red staining

菌种编号 Code	菌落直径 Diameter (C, mm)	透明圈直径 Transparent diameter (H, mm)	H/C
CT1	10.2	38.1	3.74
CM2	15.3	47.1	3.18



图 1 刚果红染色后呈现的酶水解纤维素透明圈

Fig. 1 Transparent hydrolysis circle by Congo red staining

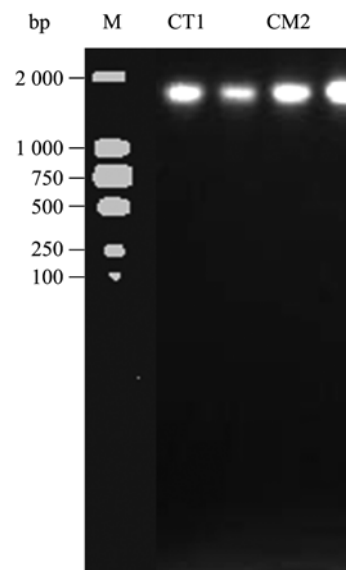


图 2 CT1 和 CM2 菌株 16S rRNA PCR 扩增片段

Fig. 2 The PCR fragments of 16S rRNA of CT1 and CM2 strains

2.3 纤维素酶活力的测定

2.3.1 葡萄糖标准曲线: 按 1.6.2 中方法(1)操作, 用分光光度法获得以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标所得的标准曲线回归方程为: $Y=0.473\ 67X-0.006\ 16$, $R^2=0.999\ 42$ 。浓度在 0.105–1.408 g/L 范围, 浓度 X 与吸光度 Y 之间呈良好的线性关系。

2.3.2 菌株 CMC 酶和 FPA 酶活力的测定: 用不同发酵时间粗酶液、不同 pH 值缓冲液配制的底物溶液, 测定 CT1 和 CM2 两菌株的菌株 CMC 酶活力。用不同发酵时间粗酶液测定两菌株 FPA 酶活力, 结果见图 3、图 4 和图 5。

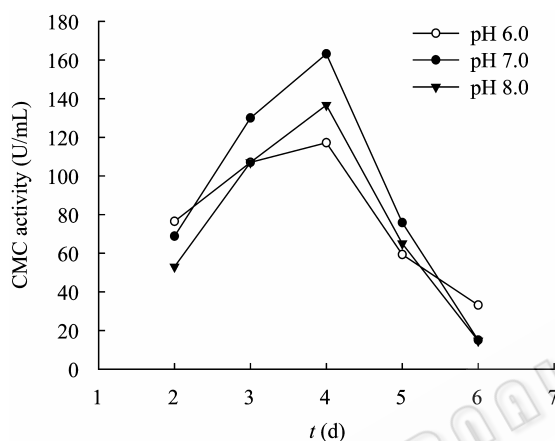


图 3 培养时间和不同 pH 底物对 CT1 产 CMC 酶的影响
Fig. 3 The effect of culture time and pH on the CMC activity of CT1

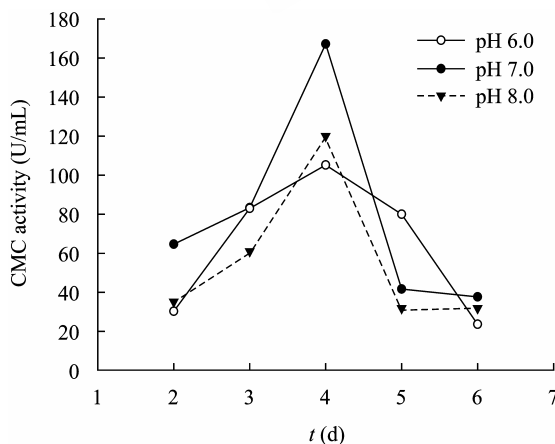


图 4 培养时间和不同 pH 底物对 CM2 产 CMC 酶的影响
Fig. 4 The effect of culture time and pH on the CMC activity of CM2

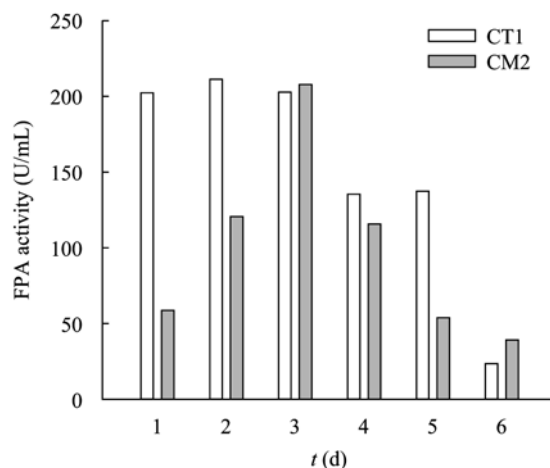


图 5 不同培养时间对两菌株产 FPA 酶的影响
Fig. 5 The effect of culture time on the FPAase activities of CT1 and CM2

图 3 和图 4 结果表明 CT1 菌株和 CM2 菌株产酶的最适 pH 为中性, 随着 pH 升高或降低, 产酶活力都受到影响, 并且随发酵天数的增加酶活力迅速降低。均在 pH 值为 7.0 的底物溶液中培养至第 4 天, 其 CMC 酶活力达到高峰期, 分别为 163.17 U/mL 和 167.17 U/mL。朱军莉等所筛选的纤维素分解菌 BSX5 产酶活最大可达 54.5 U/mL, 钱林等所筛选的蜡状芽孢杆菌 DSH 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^[9,13], 对比可知菌株 CT1 和 CM2 产纤维素酶能力较强。

图 5 为两菌株产 FPA 酶活力的差异状况, CT1 在前 3 天的酶活力相对较高, 且在第 2 天达最大值 211.17 U/mL, 第 3 天后酶活开始递减; CM2 在第 3 天的酶活力达最大值 207.83 U/mL, 且随发酵天数增加而降低。

2.3.3 竹子原纤维素酶活测定: CT1 菌株和 CM2 菌株不同培养时间的粗酶液对竹子原纤维素降解情况见图 6。

从图 6 可知, CT1 菌株和 CM2 菌株对竹子原纤维素降解能力随着培养时间的增加而增强, CT1 在培养第 5 天时降解率达最大, 为 17%, CM2 在第 5 天时达最大, 为 19%, 而目前对竹子原纤维的研究工艺主要是较易控制的化学开纤法, 其提取的效率一般在 10%左右^[17]。

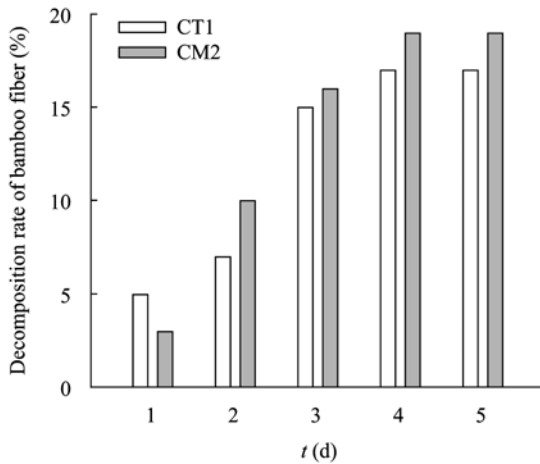


图6 培养时间对降解率的影响

Fig. 6 Effect of culture time on decomposition rate

2.3.4 菌株对不同碳源分解能力: 将菌株 CT1 和 CM2 分别接种到不同碳源的固体培养基平板上, 用刚果红染色后测定降解圈来表示其对不同纤维素材料的降解能力, 结果显示 CT1 和 CM2 对玉米秸秆、水稻秸秆和竹子原纤维素有较强的降解能力, CT1 对新华滤纸有一定的降解能力, 但酶活不高; CM2 则对新华滤纸没有降解能力, 2 个菌株对乙基纤维素均没有降解作用, 可见不同菌株对同一纤维素作用产生的酶活不一样, 同一菌株对不同来源的纤维素的利用能力也不一样。结果见表 3。

表3 菌株对不同碳源降解能力

Table 3 Utilization capabilities to different source cellulose

不同碳源 Different source cellulose	CT1	CM2
乙基纤维素 Ethyl cellulose	-	-
玉米秸秆 Corn straw	++	++
水稻秸秆 Rice straw	++	++
竹子原纤维素 Bamboo fiber	+++	++++
新华滤纸 Filter paper	+	-

注: ++++: 降解圈为 20 mm-25 mm; +++: 降解圈为 15 mm-20 mm; ++: 降解圈为 10 mm-15 mm; +: 降解圈为 5 mm-8 mm; -: 没有降解圈。

Note: ++++: Transparent circle 20 mm-25 mm; +++: Transparent circle 15 mm-20 mm; ++: Transparent circle 10 mm-15 mm; +: Transparent circle 5 mm-8 mm; -: No transparent circle.

2.4 不同碳源下纤维素酶谱的表达

图 7 为不同碳源下 CT1 和 CM2 两菌株表达的纤维素酶图谱。

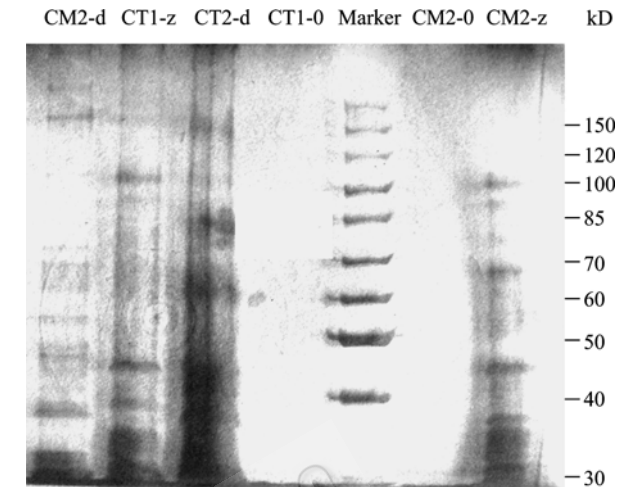


图7 CT1 和 CM2 两菌株在以唯一碳源培养基中所表达的纤维素酶成分电泳图

Fig. 7 The electrophoresis of cellulase components in two strains CT1 and CM2 culture on carbon source medium

注: -d: 菌株在以稻草为唯一碳源的培养基上生长; -z: 菌株在以竹子为唯一碳源的培养基上生长; -0: 以 Na_2CO_3 作为唯一碳源。

Note: -d: Rice-straw only carbon source; -z: Bamboo fiber only carbon source; -0: Na_2CO_3 only carbon source.

从图 7 可看出, 在相同生长量的情况下, 2 个菌株在以 Na_2CO_3 作为唯一碳源的对照培养基中均没有产生纤维素酶, 在分别以稻草和竹子为唯一碳源的培养基中产生丰富的纤维素酶, 蛋白质的分子量分布在 30-150 kD 之间, 其中大多数集中在 30-40 kD, 并且相同碳源下 2 个菌株所产生的纤维素酶谱有明显差异, 同种菌株在不同碳源下所产生的纤维素酶谱也有明显差异。

3 讨论

纤维素酶的来源非常广泛, 真菌、放线菌及细菌等在一定条件下均可产生, 至今已有很多有关纤维素酶生产菌株的研究报道^[20-22]。实验从腐殖质土壤中筛选出 2 株高效降解纤维素的菌株, 经鉴定分别为地衣芽孢杆菌 CT1 (*Bacillus licheniformis* CT1) 和枯草芽孢杆菌 CM2 (*Bacillus subtilis* CM2), 两菌

株均在培养第 4 天后所产 CMC 酶的活力达到最高, 分别为 163.17 U/mL 和 167.17 U/mL, 并且两菌株均在培养基 pH 为中性时酶活力最高; 地衣芽孢杆菌 CT1 在培养第 2 天后其 FPA 酶活可达最大值 211.17 U/mL; 枯草芽孢杆菌 CM2 在培养第 3 天后达到最大值 207.83 U/mL; 两菌株对玉米秸秆、水稻秸秆、竹子等不同天然纤维素均有较高的降解率, 其中进一步测定了对竹子原纤维的降解率, 两菌株在分别培养第 5 天时降解率分别能够达到 17% 和 19%。

纤维素酶是协同作用降解纤维素生成葡萄糖的多组分酶系。不同微生物产生的纤维素酶分子量差异很大, 即使同一酶系中的酶也有较大差异, 一般纤维素胞外酶的分子量 38–118 kD^[22]。本试验选择稻草秸秆和竹子原纤维为天然纤维素来源, 以 Na₂CO₃ 作为唯一对照碳源初步研究了两菌株所产生的纤维素酶的差异性, 通过 SDS-PAGE 初步分析纤维素酶谱, 结果表明 2 种菌株在同一碳源所表达的酶谱存在差异, 同一菌株在不同碳源下所表达的酶谱也存在差异^[23]。

由于芽孢杆菌具有耐碱、耐酸、耐高温等方面的明显优势, 便于实际操作和工业生产, 而降解纤维素仅靠一种微生物是很难实现的, 混合菌种发酵具有弥补菌种之间的差异, 产生多种不同功能的酶, 作用于纤维素的不同位点, 提高纤维素酶的活性的作用。若能进一步研究纤维素酶的协同作用, 应用混合发酵把天然纤维素, 如农作物秸秆、竹子纤维、城市废料、木材等中的纤维素, 转化为燃料、医药、食品及高科技纺织等行业的可利用资源, 这对当今高度重视的环境和生态问题将会有很大的研究前景和意义^[6,24]。

参 考 文 献

- [1] 朱建良, 邱晔平, 陈晓晔, 等. 1 株产纤维素酶真菌的鉴定及其酶学性质初探[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21): 9044–9046.
- [2] 王全, 李术娜, 李红亚, 等. 产芽孢纤维素降解细菌 XN-13 菌株筛选及酶活力测定[J]. 中国农学通报, 2009,

- 25(11): 180–185.
- [3] Robson LM, Chambliss GH. Cellulases of bacterial origin[J]. Enzyme Microb Technol, 1989, 11(10): 626–644.
- [4] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66(3): 506–577.
- [5] 吴敏峰, 耿秀蓉, 祝小, 等. 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 饲料工业, 2006, 27(20): 21–24.
- [6] 高凤菊, 李春香. 真菌与细菌纤维素酶研究进展[J]. 唐山师范学院学报, 2005, 27(2): 7–10.
- [7] Coligan JE. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 李慎涛, 等译. 北京: 科学出版社, 2007: 291–321.
- [8] 王淑军, 杨从发, 陈静. 固态降解农作物秸秆纤维素菌株分离筛选方法的研究[J]. 淮海工学院学报, 1999, 8(1): 42–45.
- [9] 钱林, 郑巧利, 付瑾, 等. 一株高效纤维素降解菌株的分离鉴定及其酶学性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 524–528.
- [10] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 67–110.
- [11] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 63–120.
- [12] 管斌, 丁友昉, 谢来苏, 等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 74–79.
- [13] 朱军莉, 韩剑众, 励建荣. 纤维素分解菌 BSX5 的分离、鉴定及产酶条件[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 15–18.
- [14] 冯健玲, 姚晓华, 韦秉兴, 等. 稻草秸秆纤维素分解菌的分离筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 477–480.
- [15] 赵磊, 马沛, 范代娣, 等. 秸秆降解菌株的筛选及其发酵生产乙醇的研究[J]. 太阳能学报, 2009, 30(4): 521–525.
- [16] 燕红, 杨谦, 潘忠诚. 一株地衣芽孢杆菌对稻草降解作用的研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(4): 360–366.
- [17] 于志财, 林杰, 路艳华. 竹原纤维的提取工艺及其性能的研究[J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2009, 26(4): 306–309.
- [18] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22–15.

- [19] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981: 112-118. 609-615.
- [20] Pathak AN, Ghose JK. 纤维素酶的来源和工艺[J]. 应用微生物, 1994, 4: 49-50. [22] 黄艳, 覃拥灵, 凌敏, 等. 不同碳源诱导康氏木霉产纤维素酶的研究[J]. 中国酿造, 2008, 15(8): 41-44.
- [21] Sewart BJ, Leatherwood, JM. Depressed synthesis of cellulase by cellulomonas[J]. J Bacterial, 1976, 128(2): [23] Wood TM. Properties and mode of action of celluloses[J]. Biotechnol Bioeng Symp, 1975(5): 111-133.
- [24] Campbell CJ, LallerreAre JH. The end of cheap oil[J]. Sci Am, 1998, 3: 78-83.

征订启事

2011年部分生物、农林类学术期刊联合征订表

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网址	E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemsctm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwxzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linyxx@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月刊	480	www.lifescience.net.cn	cblls@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn	tongbao@im.ac.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn/	actamicro@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	360	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	zwyczyxb2003@163.com
植物学报	2-967	双月刊	480	www.chinbullbotany.com	cbb@ibcas.ac.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgscxx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	120	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwx	xbzw@chinajournal.net.cn