

产纤维素酶新菌株的筛选及其产酶特性研究*

Breeding of a Novel Cellulase-producing Bacterial Strain and Characters Analysis of Its Cellulase

芦志龙¹, 张穗生^{1**}, 吴仁智¹, 陈东^{1,2}, 黄日波¹

LU Zhi-long¹, ZHANG Sui-sheng¹, WU Ren-zhi¹, CHEN Dong^{1,2}, HUANG Ri-bo¹

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】筛选分离新的纤维素酶产酶菌株, 并对其生长特性和产酶特性进行研究。【方法】从堆肥样品中分离得到一株产纤维素酶菌株, 定名为 CP1, 利用 16S rRNA 序列对比和 Biolog 微生物鉴定系统进行鉴定。通过测定菌株生长速率确定其最适生长条件。采用 CMC 发酵培养基进行纤维素酶的研究, 确定其产酶曲线。测定粗酶液最适作用温度和 pH 值, 热稳定性和金属离子对其影响。【结果】经鉴定该菌株为梭形芽孢杆菌 (*Lysinibacillus fusiformis*), 其最适生长温度为 30℃, 最适生长 pH 值为 6。在含 CMC-Na 的培养基培养, 该菌株的生长与产酶同步进行, 培养 48h 菌株生长量达到最大, 培养液的 CMC 酶活力同时达到最大值, 为 0.46U/mL。该菌株所产的纤维素酶既有酸性 CMC 酶活力, 又有碱性 CMC 酶活力, 并以碱性 CMC 酶为主, 酸性 CMC 酶的活力只有碱性 CMC 酶的 71.4%。其酸性 CMC 酶的最适作用 pH 值为 6.0, 碱性 CMC 酶的最适作用 pH 值为 8.0。另外, 该菌株所产碱性 CMC 酶活的最适作用温度为 40~50℃, 而且 0.5% 的 Cu²⁺ 使其酶活降低 45%。【结论】菌株 CP1 为首次报道的梭形芽孢杆菌产纤维素酶新菌株, 具有独特的酸碱性环境下的纤维素酶活力。

关键词: 梭形芽孢杆菌 纤维素酶 新菌株 CMC 酶活力

中图分类号: Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2014)01-0022-06

Abstract: 【Objective】 Screening and isolating novel cellulase producing strains, and studying on growth property and characters analysis of the cellulase. 【Method】 A novel endoglucanase-producing strain, defined as CP1, was isolated from composite heaps samples collected in rural area of Nanning, Guangxi Province, China. The strain was identified by 16S rRNA alignment and Biolog microbial identification system. Optimal growth conditions were determined by growth rate. Studies on the cellulase were carried out by fermentation in CMC fermentation medium and CMCase activities were deter-

收稿日期: 2013-09-04

修回日期: 2013-10-11

作者简介: 芦志龙(1983-), 男, 助理研究员, 主要从事微生物学及生物质能源方面研究。

* 国家 973 项目(2010CB736209), 国家 863 项目(2012AA022106, 2012AA023202, 2013AA050701), 国家国际合作项目(2010DFB63590, 2011DFA61910), 国家科技支撑项目(2011BAD22B01), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 10100019-21, 桂科攻 1099071, 桂科合 1140010-15), 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053062), 广西科学院基本科研业务费项目(11YJ24SW08)资助。

** 通信作者: 张穗生(1972-), 女, 副研究员, 主要从事微生物学及生物质能源方面的研究。

mined by time. Optimal pH and temperature of enzyme activity, thermol resistance as well as influences of metal ions on the crude CMCCase activities were assayed. **【Result】**The strain was identified as *Lysinibacillus fusiformis*. The optimized temperature and pH for the growth of strain CP1 were 30°C and pH6.0, respectively. The growth and endoglucanase-production of strain CP1 were synchronous that the maximum growth with absorption at OD600 reaching to 1.29 and the maximum CMCCase activity of 0.46U/mL were simultaneously occurred at culturing for 48h. The endoglucanase produced by strain CP1 exhibited CMCCase activity both in acid range and in alkaline range. The alkaline CMCCase was the major endoglucanase. The activity of acid CMCCase was only 71.4% of the alkaline CMCCase. The optimal pH was pH6 for acid CMCCase and pH8.0 for alkaline CMCCase. Furthermore, the alkaline CMCCase activity of endoglucanase produced by strain CP1 was decreased by 45% in addition of 0.5% Cu²⁺. **【Conclusion】**The strain was a novel cellulase producing strain first reported from *Lysinibacillus fusiformis*, and its cellulase had CMCCase activities at wide pH range across acidic to alkaline conditions.

Key words: *Lysinibacillus fusiformis*, cellulase, novel strain, CMCCase activity

【研究意义】纤维素是木质纤维中含量最高的组分,也是全球最大的可再生有机物资源^[1]。纤维素酶为能够作用于纤维素底物 β -1,4 葡萄糖苷键的一类生物酶的总称^[2]。由于开发利用木质纤维资源对人类社会的今后发展具有重大意义,而纤维素酶对纤维素资源的开发起到极为关键的作用^[1],对其研究一直是国内外的热点。**【前人研究进展】**该类酶上世纪 40 年代首次被发现^[2]。早期发现的纤维素酶主要由丝状真菌的木霉、根霉等菌种产生,通常为酸性酶^[3]。其最适作用 pH 值在 3~5,在碱性条件下基本没有酶活或活力很低。上世纪 70 年代,在嗜碱性的枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp. N-4 和 *Bacillus* sp. 1139 菌株)中发现了最适作用 pH 在碱性范围的纤维素酶,即碱性纤维素酶^[4~6]。随后发现芽孢杆菌属(*Bacillus*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的数十株嗜碱性菌株均能够产生碱性纤维素酶^[2]。此外,动物源碱性纤维素酶开始被报道,并成为开发碱性纤维素酶的重要方向^[7]。**【本研究切入点】**目前,酸性纤维素酶主要用于纤维素的水解糖化^[8],而碱性纤维素酶则广泛用于洗涤工业^[9,10]。不过,至今所研发的纤维素酶仍存在酶活力不足等问题,有必要挖掘新的酶资源。**【拟解决的关键问题】**本文从自然界筛选得到 1 株产纤维素酶的新菌株,能够同时产酸性纤维素内切酶和碱性纤维素内切酶,为此,对该菌株的生长和产酶规律,以及所产纤维素内切酶活力的特点进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

用于菌株分离的样品采自广西南宁市武鸣县郊
广西科学 2014 年 2 月 第 21 卷第 1 期

的畜禽堆肥。

LB 培养基、CMC-刚果红平板筛选培养基、CMC 液体发酵培养基按文献[11]配制。BUG 培养基和菌种鉴定 96 孔板为美国 Biolog 公司的产品。缓冲液按文献[12]配制。PCR 反应引物、dNTP、Taq DNA 聚合酶、pMD-18T 载体、T4 DNA ligase、大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 菌株、Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒等购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 是 Fermentas 公司产品, Yeast extract 和 Trypton 是 OXIOD 公司产品。其它试剂均为国产分析纯以上级别。

1.2 菌株筛选

取样品 1g,加 10mL 无菌蒸馏水,充分振摇,静置 30min,取上清液稀释 10⁵倍,涂布接种 CMC-刚果红平板筛选培养基,30°C 培养 72h 至菌落长出,挑取透明水解圈较大的菌落,接种 CMC 液体发酵培养基,37°C、200rpm 摇瓶培养 24h,测定培养液的碱性 CMC 酶活力,选取活力最高的培养瓶,取菌液划线接种 CMC-刚果红平板筛选培养基培养,纯化菌种 3 次,最后得到 1 株产碱性纤维素酶的高产菌株,命名为 CP1,斜面和冷冻干燥保藏,用于本文研究。

1.3 菌株活化培养

保藏菌株接种 LB 培养基,37°C、200rpm 摇瓶培养过夜,再转接 1 次同条件培养 8h,菌数约 2 \times 10⁸ 个/mL,4°C 保存,2d 内使用。

1.4 菌株形态观察

LB 培养基培养的菌体用革兰氏染色^[13],显微镜观察菌株形态。

1.5 分子鉴定

活化菌株接种 LB 培养基,接种量 5%,37°C,

200rpm 培养 8h 至对数期,菌数 2×10^8 个/mL 以上。取培养液 2mL, 12000rpm 离心 2min, 弃上清, 菌体用无菌蒸馏水洗涤 2 次, 收集菌体细胞, 按 CTAB 法^[14] 提取基因组 DNA。

以该基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F/1492R^[15], PCR 扩增菌株的 16S rRNA 序列。50 μ L 的反应体系含 PCR 缓冲液 5 μ L, 正、反向引物各 1 μ mol/L, Mg²⁺ 2.5mmol/L, dNTP 0.02mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.25U。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测、分离, 然后用 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒切胶回收, 用 T4 ligase 连接到 pMD-18T 载体上。将带有目的片段的载体通过转化 *E. coli* DH5 α 菌株扩增培养后, 选择阳性克隆提取质粒交上海生工测序。分子操作均按文献^[16]和试剂盒说明书进行。将测序得到的 16S rRNA 序列用 NCBI 的 BLAST2.0 进行同源分析 (Nucleotide-Nucleotide Blast), 搜索 Genbank 核酸数据库, 根据比对结果对菌株进行分子鉴定。

1.6 菌株生化鉴定

采用 Biolog 微生物鉴定系统进行。操作按仪器的说明书, 原理见文献^[17]。活化的菌株接种 BUG 培养基, 接种量 5%, 33 $^{\circ}$ C、200rpm 培养 24~48h, 调整菌液浊度至 5%, 将菌液加入仪器的 GENIII 96 孔生化鉴定板, 利用仪器的 MicroStation 读取鉴定板中各孔的颜色反应特征值, 通过 ML3 DC 分析程序与数据库中细菌的生理生化数据进行匹配, 根据 CP1 菌株与数据库菌株之间匹配的概率、相似性和位距对 CP1 菌株进行鉴定。

1.7 菌株生长及产酶特性测定

活化菌株接种 CMC 发酵培养基, 接种量 5%, 30 $^{\circ}$ C、200rpm 下培养, 定时取样测定培养液的 OD₆₀₀ 和 CMC 酶活力, 观察菌株生长和产纤维素酶情况。为优化菌株的培养条件, 对 3~12 的 pH 值条件以及 25~37 $^{\circ}$ C 温度条件下菌株生长也进行观察。

1.8 酶液制备

活化菌株接种 CMC 发酵培养基, 30 $^{\circ}$ C、200rpm 培养 48h, 取培养液, 4 $^{\circ}$ C、4000rpm 离心 10min, 取上清, 55% (NH₄)₂SO₄ 溶液沉淀粗蛋白, 4 $^{\circ}$ C、10000rpm 离心 10min, 收集沉淀, 加入培养液同体积的 pH 值 8.0, 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液溶解, 4 $^{\circ}$ C 保存, 用于测定酶的活力, 2d 内使用。

1.9 酶活力测定

以 CMC 钠盐为底物, 测定纤维素内切酶的活

力, 即 CMC 酶活力, 方法按文献^[11]。酶反应体系含粗酶液 0.5mL, CMC 钠盐 1% (g/mL), 0.1mol/L 的 Tris-HCl (pH 值为 8.0) 缓冲液 2.0mL。50 $^{\circ}$ C 水浴反应 60min, 立刻用 DNS 法^[18] 测定 CMC 水解所释放的葡萄糖量。以作用 CMC 钠盐底物 1min 释放 1mg 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.10 CMC 酶的最适作用 pH 值测定

将反应液的 pH 值用缓冲液调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0, 测定不同 pH 值下的 CMC 酶活力, 以 pH 值为 8.0 测定的酶活力为 100%, 用百分比表示测定结果。所用缓冲液分别为: pH 值 3~6 用柠檬酸盐缓冲液, pH 值 7~8 用 Tris-HCl 缓冲液, pH 值 9~12 用 Gly-NaOH 缓冲液。缓冲液的浓度均为 0.1mol/L。

1.11 CMC 酶的最适作用温度测定

同上 CMC 酶活力测定, 测定的酶反应温度分别 30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C, 以 50 $^{\circ}$ C 下测定的酶活力为 100%, 用百分比表示测定结果。

1.12 CMC 酶的热稳定性测定

将测定用酶液于 50 $^{\circ}$ C 水浴保温 1、2、3 和 4h, 冰水冷却, 测定酶液的 CMC 酶活力。以酶液不经温浴测得的酶活力为 100%, 用百分比表示测定结果。

1.13 金属离子对酶活力影响分析

向酶测定反应体系加入各种金属离子至浓度为 0.5%, 然后测定酶的活力, 观察各种金属离子对酶活力的影响, 以不添加金属离子测定的酶活力为 100%, 用百分比表示结果。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

采集的样品用无菌蒸馏水浸提, 取上清液接种 LB 培养基富集培养, 再涂布接种刚果红筛选平板培养基筛选, 发现 20 个菌落的水解圈直径/菌落直径的比值较大。挑取这些菌落接种 CMC 发酵培养基培养, 取培养液于 pH 值 8.0 测定其 CMC 酶活力, 再对活力高的菌落进行菌株纯化, 最后得到 1 株 CMC 酶活力较高的菌株 CP1。

2.2 产酶菌株鉴定

革兰氏染色后在显微镜下观察, 菌株 CP1 呈革兰氏阳性, 短杆状, 在 LB 琼脂平板培养 48h 后形成 1mm 左右的圆形、表面光洁的乳白色菌落。

对该菌株的 16S rRNA 序列进行分析, 用 NCBI 的 BLAST2.0 对 GenBank 数据库进行同源搜索, 发现该菌株的 16S rRNA 序列与 100 株 *Lysinibacillus fusiformis* (梭形芽孢杆菌^[19]) 的 16S rRNA 序列具

有 99% 的同源性, 比对的查询覆盖率(Query cover) 为 97% 以上。其中 1 株登录号为 HQ143586 的 DZQ17-H 菌株的查询覆盖率达到 100%, 初步表明菌株 CP1 可能为 *Lysinibacillus fusiformis* 菌株。

进一步采用 Biolog 微生物鉴定系统对菌株进行鉴定。按该系统规定, 细菌培养 4~6 h, SIM \geq 0.75, 培养 16~24 h, SIM \geq 0.5, DIST $<$ 5.0 为良好匹配^[17]。由表 1 结果可见, 菌株 CP1 属 *Lysinibacillus fusiformis* 菌株。

综合上述分子鉴定和利用 Biolog 系统鉴定的结果表明, 所筛选得到的纤维素酶产酶菌株 CP1 为梭形芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)。

表 1 菌株 CP1 利用 Biolog 微生物鉴定系统的鉴定结果

Table 1 Identification result of strain CP1 by Biolog Microbial Identification System

排序 Rank	概率 PROB	相似性 SIM	位距 DIST	匹配菌株 Species
1	0.951	0.742	3.162	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
2	0.042	0.287	9.521	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
3	0.040	0.006	14.85	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>
4	0.001	0.001	15.90	<i>Bacillus subtilis</i>

注: 鉴定时菌株培养 24h。Note: The strain was cultured 24h when identified

2.3 菌株生长和产酶特性

由图 1(a)可知, 30℃ 下菌株 CP1 生长最好, 生长量分别较 25℃ 和 37℃ 高 13% 和 36%, 表明该菌株最适生长温度为 30℃。

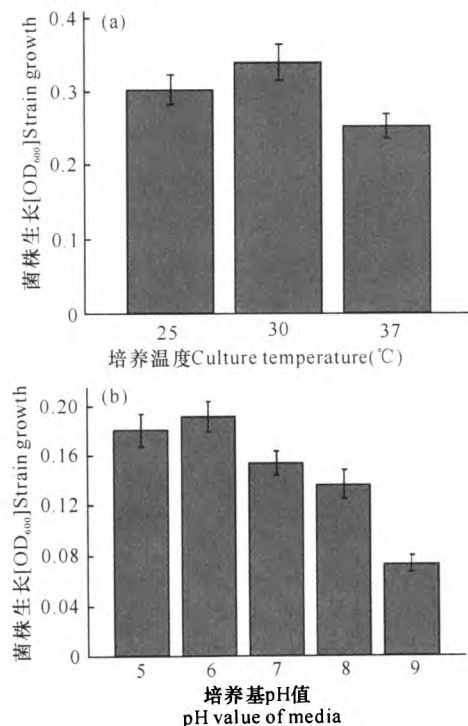


图 1 菌株 CP1 在不同温度(a)和不同 pH(b)下的生长情况

Fig. 1 The growth of strain CP1 under different temperature and different pH value.

由图 1(b)可知, 菌株 CP1 在 pH 值为 6 的环境生长最好, pH 值为 5 时生长略有下降, 生长量是 pH 值为 6 时的 94.7%。随着培养基的 pH 值由 6 调高至 9, 菌株的生长量迅速下降, pH 值为 9 的生长量只有 pH 值为 6 的 36.8%, 表明该菌株生长的最适 pH 值为 6。

根据菌株生长的最适温度和 pH 值, 将菌株 CP1 接种 CMC 发酵培养基培养, 其生长和产酶曲线见图 2。该菌株的对数生长期为 12h, 培养 12h 后生长量由线性增长转变为近水平增长。另外, 菌株的生长和产酶几乎同步进行, 生长曲线与产酶曲线呈平行变化。培养 48h 菌株的生长量达到最大, OD₆₀₀ 为 1.29, 菌液的 CMC 酶活力也达到最高, 为 0.46U/mL。

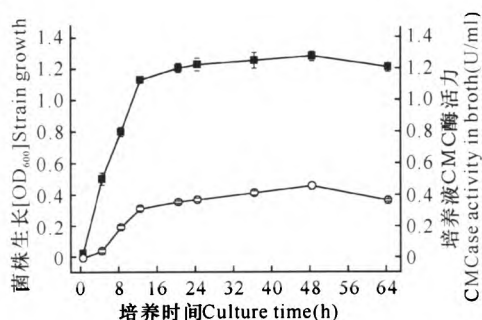


图 2 菌株 CP1 的生产曲线和 CMC 酶活力产酶曲线

Fig. 2 Curves of strain CP1 growth and the CMCase in broth

■: 菌株生长; ○: 菌株培养液 CMC 酶活力。

■: Strain growth; ○: CMCase activity in broth.

2.4 酶学性质

图 3(a)为菌株 CP1 所产 CMC 酶活力在不同 pH 值条件下的变化情况。结果显示, 该菌株所产的纤维素酶既有酸性 CMC 酶的活力, 又有碱性 CMC 酶的活力。酸性 CMC 酶的最适作用 pH 值为 6, 碱性 CMC 酶的最适作用 pH 值为 8。酸性 CMC 酶活力为碱性 CMC 酶活力的 71.4%。

图 3(b)为该菌株所产碱性 CMC 酶活力随温度的变化曲线。可见, 菌株所产碱性 CMC 酶活力的最适作用温度为 40~50℃, 温度低于 40℃ 或高于 50℃ 时酶活力均迅速下降。

图 3(c)为菌株所产碱性 CMC 酶活力的热稳定性变化曲线。将酶液在 50℃ 下保温, 酶活呈线性急剧下降, 保温 1h 酶活力下降超过 50%, 残留酶活只有原酶的 45%, 保温 3h 残留酶活只有 19%, 而保温 4h 酶活残留只有 3%, 表明该菌株所产的碱性纤维素内切酶的热稳定性较差。

在测定酶活力时加入 0.5% 的各种金属离子, 观察金属离子对菌株 CP1 所产碱性 CMC 酶活力的影

响,结果如图 4 所示,Ca²⁺、Co²⁺和 Mn²⁺等 3 种离子对酶活略有促进,分别使酶活力提高 4.6%、11.6%和 5.4%。K⁺、Fe²⁺、Mg²⁺和 Ni⁺等 4 种离子对酶活力稍有抑制,加入酶反应体系后使酶活力降低了 7.0%(K⁺)~3.3%(Mg²⁺)。Na⁺对酶的活力几乎没有影响。而 Cu²⁺对菌株所产碱性 CMC 酶具有明显的抑制作用,使酶活力降低了 45.0%。

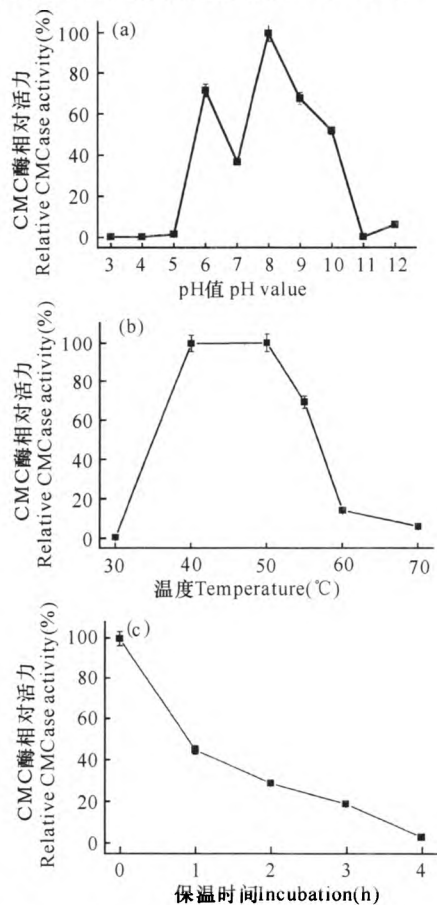


图 3 菌株 CP1 所产 CMC 酶活力的基本性质

Fig. 3 The activity characters of crude CMCCase produced by strain CP1

(a)不同 pH 值,(b)不同温度,(c)热稳定性。

(a) Different pH value, (b) Deifferent temperature, (c)

Thermol resistance.

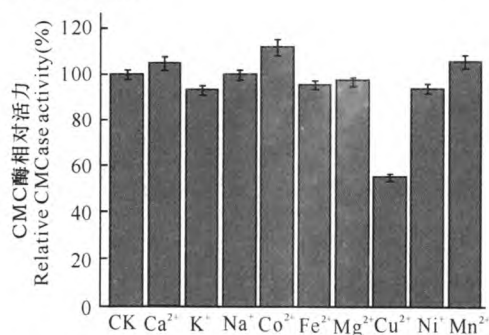


图 4 金属离子对菌株所产 CMC 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of ions on the activity of CMCCase produced by strain CP1

3 讨论

本文从畜禽堆肥分离得到 1 株产纤维素酶的菌株 CP1,经鉴定为梭形芽孢杆菌^[19](*Lysinibacillus fusiformis*)。据文献,梭形芽孢杆菌广泛分布于土壤、动植物组织和奶制品中,具有分解苯环类有机物的能力^[20],被广泛用于对污染物的处理^[21,22],最近有报道称该菌还具有分解二氯甲烷^[19]和降解木聚糖^[23]的能力,但未见该菌能够产纤维素酶的报道。因此,本研究所分离得到的菌株 CP1 为 1 株能够产纤维素酶的梭形芽孢杆菌新菌株。

与至今普遍报道的产纤维素酶微生物不同,菌株 CP1 所产的纤维素酶包含酸性纤维素内切酶和碱性纤维素内切酶两种活力。二者相比,碱性纤维素内切酶(CMC 酶)的活力较高,酸性 CMC 酶的活力只有碱性 CMC 酶的 71.4%(图 3)。因此,该菌株所产的纤维素酶以碱性纤维素酶为主。从目前报道的各种产纤维素酶菌株看,产碱性纤维素酶的菌株通常是一些嗜碱性芽孢杆菌(*Bacillus*)^[2,9],但本文分离得到的菌株 CP1 最适生长 pH 值为 6.0(图 1),显然,该菌株与现有报道的产碱性纤维素酶菌株不同。该菌所产的酸性 CMC 酶的最适作用 pH 值为 6.0,与现已知最适作用 pH 值为 3~5 的酸性纤维素酶不同,所产碱性 CMC 酶的最适作用 pH 值为 8.0,则与目前报道的各种碱性纤维素酶基本一致^[1]。此外,与现有报道的碱性 CMC 酶活力几乎不受金属离子影响不同,菌株 CP1 所产的碱性 CMC 酶活力受 Cu²⁺的显著抑制(图 4)。综合这些结果,我们认为,菌株 CP1 所产的纤维素酶具有许多与现有报道的纤维素酶不同的特性,值得进一步研究。由于酶活力使用粗酶液进行测定,对于该菌株所产二种 CMC 酶活性是由一种酶产生,还是由二种或多种酶产生,目前尚未清楚,有待进一步研究。

4 结论

本文分离得到了 1 株能够产纤维素酶的梭形芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)新菌株。与现已报道的纤维素酶和产酶微生物不同,该菌的最适生长 pH 值为 6.0,最适生长温度为 30°C,所产的纤维素酶在酸性和碱性范围均具有内切酶活力,酸性纤维素酶和碱性纤维素酶的最适作用 pH 值分别为 6.0 和 8.0。此外,金属 Cu²⁺对该菌所产的碱性纤维素酶具有强烈的抑制作用。这些结果表明,本文所分离得到的菌株 CP1 所产的纤维素酶具有与现有报道不同的特点,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓天福,程梦林,莫建初. 木质纤维素降解酶的应用及前景[J]. 中国农学通报,2010,26(14):82-85.
Deng T F, Cheng M L, Mo J C. Application progress and develop prospect of lignocellulolytic enzymes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(14): 82-85.
- [2] 张颖. 纤维素酶与碱性纤维素酶的研究进展[J]. 中山大学研究生学刊:自然科学、医学版,2005,26(2):13-21.
Zhang Y. Progress in studies of cellulases and alkaline cellulases[J]. Sun Yat-sen University: Natural Science, Medicine, Journal of the Graduates, 2005, 26(2): 13-21.
- [3] 陈小玲,陈东,芦志龙. 瑞氏木霉内切- β -1,4 葡聚糖酶基因 *Egl1* 的分子改造[J]. 广西科学,2011,18(3):264-268.
Chen X L, Chen D, Lu Z L. Molecular modification of Endo- β -1,4-glucanase Gene *Egl1* from *Trichoderma reesei* [J]. Guangxi Sciences, 2011, 18(3): 264-268.
- [4] Fukumori F, Kudo T, Horikoshi K. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139 [J]. Journal of General Microbiology, 1985, 131: 3339-3345.
- [5] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, et al. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil[J]. Can J Microbiol, 1984, 30: 774-779.
- [6] Ito S, Shikata S, Ozaki K, et al. Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 1275-1281.
- [7] 杨登峰,关妮,米慧芝,等. 眉斑并脊天牛纤维素酶性质的研究[J]. 广西科学,2011,18(3):261-263,268.
Yang D F, Guan N, Mi H Z, et al. Research on *Glenea cantor* cellulase characteristics [J]. Guangxi Sciences, 2011, 18(3): 261-263, 268.
- [8] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69(6): 627-642.
- [9] Ito S, Kobayashi T, Ara K, et al. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures[J]. Extremophiles, 1998, 2(3): 185-190.
- [10] 刘春芬,贺稚非,蒲海燕,等. 纤维素酶及应用现状[J]. 粮食与油脂,2004,17(1):15-17.
Liu C F, He Z F, Pu H Y, et al. The research of cellulases and its application[J]. Cereals & Oils, 2004, 17(1): 15-17.
- [11] Shikata S, Saeki K, Okoshi H, et al. Alkaline cellulases for Laundry Detergents; Production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(1): 91-96.
- [12] 吴冠芸. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京:科学出版社,1999.
Wu G Y. Commonly used databook for biochemistry and molecular biology [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [13] 郭俊涛. 微生物的鉴别与图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2007.
Guo J T. Identifications and atlases of microbials[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [14] Frederick M, Ausubel R B, Kinston R I. Short protocols in molecular biology[M]. first edition. John Wiley & Sons pressed, 1999.
- [15] Marchesi J R, Sato Takuichi, Weightman A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Appl and Environ Microbiol, 1998, 64(2): 795-799.
- [16] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南:上册[M]. 黄培堂,译. 第3版. 北京:科学出版社,2002.
Sambrook J, Rusel D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Huang P T, Tranlated. 3rd edition. Beijing: Sciencs Press, 2002.
- [17] 程池,杨梅,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):50-54.
Cheng C, Yang M, Li J X, et al. Biolog microbial identification system- Study on the operating regulation of bacterial identification[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5): 50-54.
- [18] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. QB 2583-2003 纤维素酶制剂[S]. 2003-09-13.
National Development and Reform Commission. QB 2583-2003 Cellulases[S], 2003-09-13.
- [19] 胡志航. 二氯甲烷降解菌的分离鉴定、微生物菌剂及基因文库的构建研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2010.
Hu Z H. Isolation of dichloromethane-degrading strain and the research on preparation of composite microorganism agent and constructing the genomic bank[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Techonlogy, 2010.
- [20] Niu X, Ding C, Yan J L, et al. Screening of the bacterium for chlorobenzene degradation and its enzymatic properties[J]. Advanced Materials Research, 2013, 610-613: 404-408.
- [21] Patil P S, Shedbalkar U U, Kalyani D C, et al. Biodegradation of Reactive Blue 59 by isolated bacterial consortium PMB11 [J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2008, 35(10): 1181-1190.
- [22] Wan S, Li G, An T, et al. Biodegradation of ethanethiol in aqueous medium by a new *Lysinibacillus sphaericus* strain RG-1 isolated from activated sludge [J]. Biodegradation, 2010, 21(6): 1057-1066.
- [23] Lv Z, Yang J, Yuan H. Production, purification and characterization of an alkaliphilic endo- β -1,4-xylanase from a microbial community EMSD5 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 43(4): 343-348.

(责任编辑:陆雁)