

碱性纤维素酶产生菌株的筛选及其酶学性质研究*

Screening of Alkaline Cellulase-producing Strains and Research on Enzymatic Characteristics

陈雅娟¹, 董园¹, 芦志龙², 陈东², 黄日波^{1,2**}

CHEN Ya-juan¹, DONG Yuan¹, LU Zhi-long², CHEN Dong², HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 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)

(1. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. 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)

摘要:【目的】从堆肥中筛选和鉴定产碱性纤维素酶的菌株, 对菌株及其酶学特性进行研究。【方法】以刚果红平板染色法进行初筛, 摇瓶发酵复筛, 分离到高酶活菌株 C73。通过形态观察和 16S rRNA 序列分析对菌株进行鉴定。采用 DNS 定糖法测定发酵液酶活最适 pH 值、pH 值稳定性、最适温度、热稳定性及常见金属离子、SDS、EDTA 等对酶活的影响。【结果】该菌株形态呈杆状, 革兰氏阳性, 不产芽孢, 适宜在 pH 值 8.0~11.0、30~37℃ 条件下生长。16S rRNA 序列比对发现, 该菌株与琼斯氏菌 (*Jonesia* sp.) PC1 序列相似度大于 99%, 初步鉴定为琼斯氏菌属菌株。在发酵培养基中, 菌体浓度和 CMCase 活力分别在 40h 和 50h 达到最大值, 随着发酵时间的延长发酵液 pH 值稳定在 9.5 左右。粗酶液的最适作用 pH 值为 10.0, 此时 CMCase 活力达 2.3U/mL。在 pH 值 8.0~11.0 的范围内保持 60% 以上的酶活; 最适作用温度为 60℃, 且在 30~80℃ 的范围内保持 60% 以上的酶活。金属离子 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 $(NH_4)_2SO_4$ 对酶活力有较强的抑制作用。【结论】菌株 C73 呈现较高的碱性 CMCase 酶活、较高的热稳定性和 pH 值稳定性, 具有良好的工业应用前景。

关键词: 纤维素酶 琼斯氏菌 酶学性质

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2014)01-0028-06

收稿日期: 2013-04-02

修回日期: 2013-10-12

作者简介: 陈雅娟 (1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物技术研究。

* 国家 973 项目 (2010CB736209), 国家 863 项目 (2012AA022106), 国家国际合作项目 (2010DFB63590, 2011DFA61910), 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), 广西科技创新能力与条件建设计划项目 (桂科能 12237022), 广西自然科学基金项目 (13-051-08) 资助。

** 通讯作者: 黄日波 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物生物技术及酶工程研究。E-mail: rbhuang@163.com。

Abstract: 【Objective】 Strain with alkaline CMCase-producing abilities was screened from compost heaps and identified. Studies were conducted on the strain and its enzymatic characters. 【Method】 Strain C73 was screened primarily through Congo-red agar plates and secondly by flask fermentation. The strain was identified by morphism speculation and 16S rRNA sequence analysis. Enzymatic properties of optimal activity pH, pH stability, optimal activity temperature and thermo-stability as well as influence of metal ions, SDS and EDTA on the enzyme were determined through DNS method. 【Result】 The strain was rod-shaped, gram-positive, non-sporulating and could grow at pH 8.0~11.0, 30~37℃. Fermentation with CMC media showed maximum cell

growth and CMCase activity peaks were reached at 40h and 50h, with the pH of system decreased to 9.5. Optimal CMCase activity pH was 10.0, while the CMCase activity reached 2.3U/mL. 60% of CMCase activity was obtained at the pH range of 8.0~11.0. Optimal CMCase activity temperature was 60°C and 60% of residual CMCase activity was obtained after incubation at 30~80°C for 1 h. The addition of Mn^{2+} , Co^{2+} and $(NH_4)_2SO_4$ strongly inhibited CMCase activities. **【Conclusion】**Strain C73 exhibited higher alkaline CMCase activity, higher pH stability and thermo-stability and had a potential in industrial application.

Key words: cellulase, *Jonesia* sp., enzymatic properties

【研究意义】纤维素是地球上最丰富、最廉价的可再生有机物资源,仅我国每年可利用的木质纤维素资源可达 $2.0 \times 10^9 t^{[1,2]}$ 。随着化石燃料的日渐枯竭,纤维素生物质能源有望成为一种可靠的替代品^[2]。可见,纤维素资源的开发利用具有良好的经济效益、社会效益^[3]。纤维素是葡萄糖分子通过 β -1,4-糖苷键形成的聚合物。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,是纤维素资源开发的关键^[4]。**【前人研究进展】**成熟的纤维素酶多由丝状真菌产生,如根霉、木霉,其最适作用 pH 值为酸性(3~5),却在碱性条件下失去酶活,这类酶称为酸性纤维素酶^[4]。Horikosh 等^[5]于 20 世纪 70 年代筛选到在 pH 值 8~10 范围内具有纤维素酶活力的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。后来的研究陆续发现了一系列碱性纤维素酶产生菌株,大部分为芽孢杆菌属菌株、单胞菌属以及少量的放线菌和真菌^[6~8]。国内也进行了大量的研究^[9];如肖黎明等^[10]通过诱变改造软化芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*),得到了 52.3U/mL 的碱性纤维素酶活。蔡勇等^[11]通过复合诱变改造,使芽孢杆菌酶活提高到 53.86U/mL。**【本研究切入点】**目前,商业化的纤维素酶主要用于纤维素水解,但不能完全满足多样化的处理工艺。碱性纤维素酶广泛应用于纺织和洗涤剂行业^[4]。随着木质纤维素稀碱前处理工艺的广泛采用,能够适应碱性和高温作用环境的纤维素酶也成为现实需求^[12]。当前所研究和开发的纤维素酶仍然存在酶活不够高、耐热性差、pH 广适性差的问题^[13,14],仍需从自然界广泛筛选具有高酶活的、有良好应用前景的产酶菌株和纤维素酶。**【拟解决的关键问题】**本研究从畜禽堆肥中进行大量的筛选工作,得到了一种具有碱性纤维素酶活力的菌株,并对该菌株的生长特性、进化分类关系、产酶特性及该酶的酶学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

琼斯氏菌 C73 (*Jonesia* sp. C73)采自武鸣县某农舍附近的堆肥,大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 α 广西科学 2014 年 2 月 第 21 卷第 1 期

由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司,无氨基酸酵母氮源(YNB)购自 Difco, tryptone 和 yeast extract 购自 OXOID 公司,其他试剂为国产分析纯。引物合成与测序委托上海英骏公司。

1.1.3 培养基

筛选培养基:蛋白胨 10g、酵母粉 5g、羧甲基纤维素 (CMC)10 g、NaCl 5g、 KH_2PO_4 1g、琼脂粉 15g、刚果红 0.2g 及蒸馏水 1000mL,灭菌后用无菌 Na_2CO_3 溶液调整 pH 值至 8.0。

发酵培养基:蛋白胨 10g、羧甲基纤维素钠 10g、NaCl 5g、 KH_2PO_4 1g,加蒸馏水至体积为 1000 mL,灭菌后用无菌 Na_2CO_3 调整 pH 值至 8.0。

1.2 方法

1.2.1 产酶菌株筛选

称取 1g 堆肥样品,加入装有无菌生理盐水的三角瓶中,放置于 30°C 摇床震荡一段时间至土样完全溶解后,将菌悬液进行浓度梯度稀释,吸取 200 μ L 稀释倍数为 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 的菌悬液涂布于由筛选培养基制备的平板上,分别置于 30°C 和 37°C 培养箱培养 3 d,直至平板长出单菌落。挑取具有较大透明圈的单菌落进行划线,纯化培养。

挑取纯培养后的初筛菌株单菌落至装有已灭菌的 5mL 发酵培养基的试管中,按其初筛时的生长温度置于 200r/min 的摇床培养 2 d。之后收集培养物于 4°C、12000r/min 离心 10min,吸取上清液测定 CMC 酶活力,将酶活力较为理想的菌株作为目的菌株。酶活测定方法参考文献^[15]。其中,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 8.0)缓冲液 2.0mL。50°C 水浴反应 60min,立刻用 DNS 法^[16]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 U。

1.2.2 产酶菌株形态鉴定

通过革兰氏染色法染色后在显微镜下进行菌株形态观察。纯化菌株涂布发酵培养基平板,30~37°C

培养 24h 后观察菌落形态。

1.2.3 产酶菌株分子生物学鉴定

活化菌株接种 LB 培养基,接种量 5%,37℃,200r/min 培养 8h 至对数期,菌数 2×10^8 个/mL 以上。取培养液 2mL,12000r/min 离心 2min,弃上清,菌体用无菌蒸馏水洗涤 2 次,收集菌体细胞提取基因组 DNA。以该基因组 DNA 为模板,采用通用引物 27F/1492R 扩增菌株的 16S rDNA 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, Mg^{2+} 2.5mmol/L, dNTP 0.02mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.25U。反应条件为:95℃预变性 5min;94℃变性 30s,55℃退火 30s,72℃延伸 1min,30 个循环;最后 72℃延伸 10min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测、切胶回收正确条带后连接到 pMD-18T 载体并转化大肠杆菌 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。将测序得到的 16S rRNA 序列用 NCBI 的 BLAST 2.0 进行同源分析 (BLASTN),搜索 Genbank 核酸数据库得到最优匹配。

1.2.4 摇瓶产酶试验

将筛选到的菌种由培养平板接种到装有 200mL 发酵培养基的 500mL 的三角瓶,置于 37℃、200r/min 下培养 20h,制成液体菌种。然后按 1% 的接种量将液体菌种扩大培养,在 37℃、200r/min 下进行产酶试验,定时取样测定发酵液的 OD_{600} 、pH 值、蛋白质含量及 CMC 酶活力。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[17]。

1.2.5 酶学性质研究

酶的最适温度测定是按照酶活测定方法,取适当稀释的发酵液分别在 30℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃测定相对酶活(%)。酶的热稳定性测定是将发酵液在以上不同温度下保温 1h,迅速冷却后,测定残余酶活力(%)。

酶的最适 pH 值测定是按照酶活测定方法,以不同缓冲液(pH 值 3.0~5.0 的为醋酸-醋酸钠缓冲液,pH 值 5.5~8.0 的为磷酸盐缓冲液,pH 值 8.5~11.0 的为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)校准发酵液的 pH 值,在酶反应的最适温度下测定酶活性,以最高酶活为 100%,计算各反应体系相对酶活。酶的 pH 值稳定性测定是将发酵液用不同浓度 pH 值缓冲液校准后,4℃保温 1h,测定残余酶活力,以未经过处理酶的酶活力为 100%,绘制 pH 值相对剩余活力曲线。

酶促进剂与抑制剂研究是在相同条件下,向酶液中分别加入不同的离子,包括 Ba^{2+} 、 Na^{2+} 、 Li^{2+} 、

Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、SDS、 $(NH_4)_2SO_4$ 和 EDTA,使其终浓度为 0.5 mM/L,同时以未处理的酶液作为 100%对照,在酶反应的最适 pH 值和最适温度的条件下测定各离子对酶的影响,以残余酶活(%)表示。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选结果

2.1.1 菌株的分离

根据各菌株酶活力情况,将潜在的酶活力较高的 1 株菌株作为研究对象,命名为 C73。C73 菌株在分离培养基上培养 36 h 形成的透明圈,晕环和菌落直径比(D/d)为 2.1,如图 1 所示。



图 1 在筛选培养基上菌株 C73 对 CMC 的降解

Fig. 1 Digestion of CMC by strain C73 grown on screening medium

2.1.2 菌株 C73 的形态特征

显微镜下菌株 C73 细胞形态为杆状,0.5 \times 2 μ m,革兰氏染色阳性,不生孢。菌株 C73 在筛选培养基中 30℃培养 36h,菌落直径为 2~3mm、黄色、圆形凸起、表面光滑、边缘整齐。此结果与琼斯氏菌株已有报道相一致^[18~20]。

2.1.3 菌株 C73 的 16S rDNA 鉴定及系统发育分析

通过将 16S rDNA 序列在 Genbank 中进行同源性比对分析来确定其分类地位,结果显示菌株 C73 与琼斯氏菌属菌株 PC1(HQ413085.1)以及琼斯氏菌属菌株 YNUCC0043(DQ1123.44.1)具有最高的同源性(大于 99%)。因此将该株鉴定为琼斯氏菌 C73。通过构建进化发育树发现,该菌株更接近于琼斯氏菌属的青海琼斯氏菌(*Jonesia quinghaiensis*),却与本属的模式菌反硝化琼斯氏菌(*Jonesia denitrificans*)进化关系较远(图 2)^[21]。

2.2 琼斯氏菌 C73 的摇瓶产酶情况

琼斯氏菌 C73 在摇瓶条件下进行产酶试验结果显示,该菌在接种 15h 后生长旺盛,到 40h 后生长减缓,菌株 C73 进入衰亡期,随着细胞的裂解,其所产的酶逐渐释放出来。碱性纤维素酶的产生比细菌生

长延滞约 10h。初期酶活迅速上升,发酵 50h 达到酶活力峰值 2.3 U/mL。发酵液的蛋白质在 20h 后开始大量分泌,在菌体进入衰亡期后开始急剧下降,应是由于菌体自身代谢所致。纤维素酶的分泌早于蛋白质大量合成,可能是菌株受单一碳源的环境压力而形成的生存方式。发酵过程中,发酵液的 pH 值随发酵时间的延长而降低,在 0~56h 区间几乎呈线性下降至 9.3,之后略有上升,直至稳定在 9.5 左右(图 3)。这说明发酵过程同时伴随产酸。

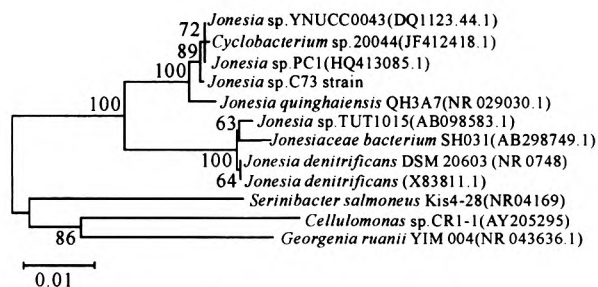


图 2 菌株 C73 16S rDNA 基因序列系统发育树*

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed with 16S rRNA sequence of strain C73

* *Jonesia* sp. YNUCC0043: 琼斯氏属菌株 YNUCC0043; *Cyclobacterium* sp.: 一种分枝杆菌属菌株; *Jonesia quinghaiensis*: 青海琼斯氏菌; *Jonesia bacterium*: 一种琼斯氏菌; *Jonesia denitrificans*: 反硝化琼斯氏菌; *Serinibacter salmonus*: 赭红丝氨酸杆菌; *Cellulomonas* sp.: 一种纤维单胞菌; *Georgania ruanii*: 阮氏乔治菌。

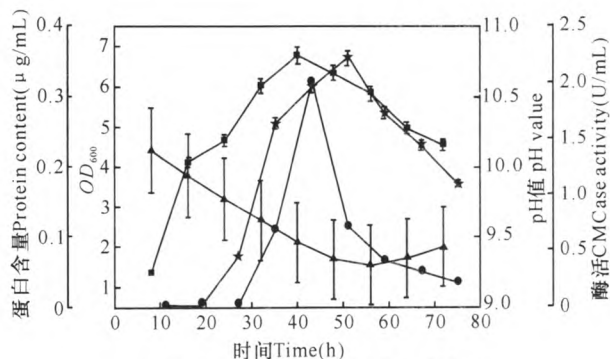


图 3 菌株 C73 的发酵产酶曲线

Fig. 3 Enzyme production curve of strain C73

■: OD_{600} ; ▲: pH 值; ★: 酶活; ●: 蛋白含量。

■: OD_{600} ; ▲: pH value; ★: CMCase activity; ●: Protein content.

2.3 琼斯氏菌 C73 的酶学特性

2.3.1 酶的最适温度与热稳定性

最适温度测定结果显示,该酶的最适温度为 50℃,在 30~55℃ 之间能维持 60% 以上的酶活力(图 4)。热稳定性研究结果显示,该酶在 50℃ 以下保温 30 min 具有 50% 以上的活力,而在 60℃ 以上迅速丧失活力,70℃ 下保温 30 min 后,酶活力不足原酶的 10%(图 5)。

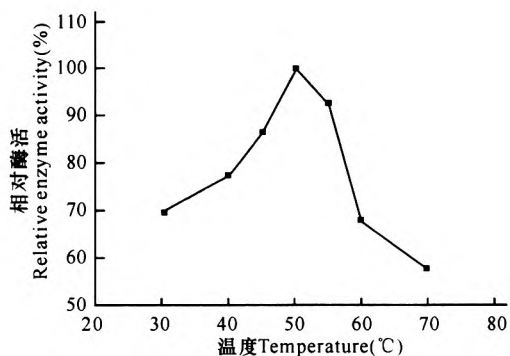


图 4 温度对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activity

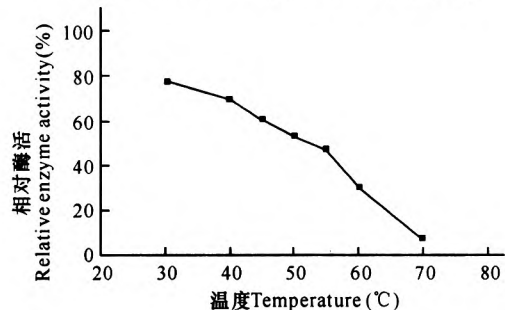


图 5 温度对酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on stability

2.3.2 酶的最适 pH 值与 pH 值稳定性

在最适温度 50℃ 下测定酶的最适 pH 值,结果显示,该酶的最适 pH 值为 9.5,在 pH 值 6.5~11.0 之间酶都具有 80% 以上的活力,pH 值范围较广泛(图 6)。

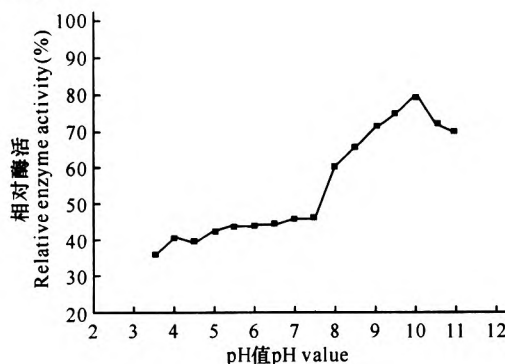


图 6 pH 对酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on activity

pH 值稳定性测定结果显示,该酶在 pH 值 7.0~11.0 的碱性环境中较稳定,可以保持大约 80% 的相对活力(图 7)。即便在 pH 值 3.5~7.0 的酸性环境中也可以保持 60% 的酶活力。这表明其在宽泛的 pH 值范围内、尤其是碱性环境中具有较强耐受性。这种特性非常有利于 pH 值多变的复杂体系中纤维素的降解。

2.3.3 酶的促进剂与抑制剂

在 pH 值 10.0 和最适温度 50℃ 的条件下测定各离子对酶的影响。由图 8 可以看出,金属离子 Ca^{2+}

对该酶有较强的促进作用, Li^+ 、 Na^+ 对酶也有不同程度的促进作用; 而 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对酶活力有较强的抑制作用, 其余离子对酶的影响不明显。

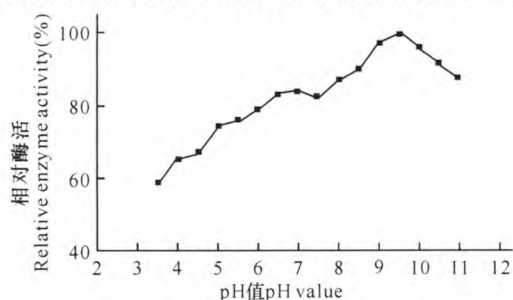


图7 pH 值对酶活性稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH on stability of activity

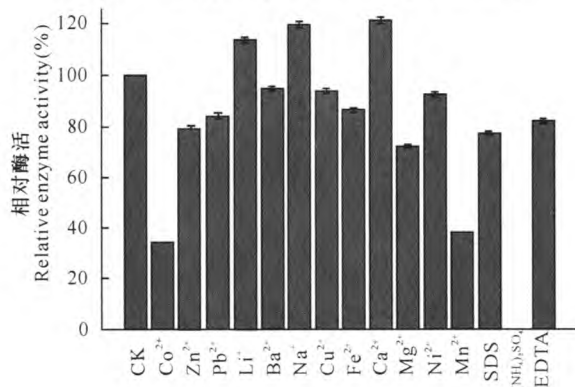


图8 离子对酶活的影响

Fig. 8 Effects of different ions on activity

3 讨论

本研究从堆肥中筛选到 1 株琼斯氏菌 C73, 其最适生长温度为 $30\sim 37^\circ\text{C}$, 最适生长 pH 值为 10.0 左右, 是一种典型的嗜碱细菌。已有报道显示琼斯菌属菌株可以降解木聚糖, 且可以产生分泌性纤维素酶^[20,21]。在本研究中, 摇瓶产酶条件下培养液中的碱性纤维素酶活力可达 $2.3\text{U}/\text{mL}$ 。琼斯氏菌 C73 产生的纤维素酶为单一的 CMC 酶, 其适宜反应温度为 50°C , 在 $30\sim 70^\circ\text{C}$ 的范围内保持 60% 以上 CMC-Case 活力; 最适反应 pH 值为 10.0, 在碱性范围内保持较高活力。金属离子 Ca^{2+} 对该酶有较强的促进作用, Li^+ 、 Na^+ 对酶也有不同程度的促进作用; 而 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对酶活力有较强的抑制作用, 其余离子对酶的影响不明显。目前, 国内外筛选了一系列具有较好的耐碱、耐热、高产的碱性纤维素酶生产菌株。Shitsuw 等^[5] 得到 1 株最适作用 pH 值为 9, 最适作用温度为 50°C 的产酶芽孢杆菌 KSM-64, 其最高酶活达 $2.6\text{U}/\text{mL}$ 。Ashabil 等^[7] 筛选到 1 株藓样芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 其最适作用 pH 值和温度分别为 10.0 和 30°C 。Susumu 等筛选到芽孢杆菌, 其最适作用 pH 值和温度分别为

9.5 和 30°C 。Ji-Yeon Kim 等^[22] 也得到 1 株芽孢杆菌, 其最适作用 pH 值和温度分别为 10.0 和 50°C , 与本研究酶活特性相近, 但 pH 值和温度稳定性较差。综上, 本研究所筛选的琼斯氏菌 C73 兼具耐强碱、耐高温、稳定性好的酶学特性, 有望应用于成熟的棉纺和洗涤剂工业领域。此外, 随着木质纤维素资源开发利用研究的深入^[23~26], 碱处理成为一种高效的纤维素前处理工艺。商用的纤维素酶只能在酸性或中性条件下作用, 因此必须对前处理产物进行酸化。考虑到本研究中纤维素酶耐强碱、pH 值适应范围广、热稳定性好的特点, 有望应用于纤维素乙醇的生产中, 可以节约大量的成本。

参考文献:

- [1] Hamelinck C N, Hooijdonk G, Faajj A P C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term[J]. Biomass Bioenergy, 2005, 28: 384-410.
- [2] 焦蕊, 贺丽敏, 许长新, 等. 纤维素生物降解的研究进展[J]. 河北农业科学, 2009, 13(9): 46-48. Jiao R, He L M, Xu C X, et al. Research progress of biodegradation of cellulase[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2009, 13(9): 46-48.
- [3] Ohmiya K, Sakka K, Karita S, et al. Structure of cellulases and their applications [J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 1997(14): 365-414.
- [4] Francis X. Industrial biotechnology and biomass utilisation: prospects and challenges for the developing world [R]. Vienna: Stockholm Environment Institute and United Nations Industrial Development Organization, 2007.
- [5] Shitsuw S, Katsuhisa S, Hiromi O, et al. Alkaline cellulases for laundry detergents: production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(1): 91-96.
- [6] Ashabil A, Lutfiye K, Burhan A. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(5): 789-796.
- [7] Ito S, Shikata S, Ozaki K, et al. Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(5): 1275-1281.
- [8] 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.
- [9] 曾青兰. 产碱性纤维素酶真菌产酶条件的研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2009, 43(4): 645-647. Zeng Q L. Conditions of enzyme production of alkaline cellulase by fungi[J]. Journal of Huazhong Normal University, 2009, 43(4): 645-647.

- sity (Natural Sciences), 2009, 43(4): 645-647.
- [10] 肖黎明,王卫卫,郭燕. 1株产碱性纤维素酶软化芽孢杆菌 IS-B4 的选育及产酶条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 59-62.
Xiao L M, Wang W W, Guo Y. Study on the screening and fermentation of alkaline cellulase higher production strain *Bacillus macerans* IS-B4[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(5): 59-62.
- [11] 蔡勇,阿依木古丽. 碱性纤维素酶高产菌株 *Bacillus* sp. CY1-3 的诱变选育[J]. 西北民族大学学报:自然科学版, 2007, 28(2): 13-16, 37.
Cai Y, AYM G L. Mutagenesis of alkaline cellulase high-producing *Bacillus* strain sp. CY1-3 [J]. Journal of Northwest University for Nationalities (Natural Science), 2007, 28(2): 13-16, 37.
- [12] Chen D, Guo Y, Huang R B, et al. Pretreatment by ultra-high pressure explosion with homogenizer facilitates cellulase digestion of sugarcane bagasses [J]. Bioresource Technology, 2010(101): 5592-5600.
- [13] 郭成栓,崔堂兵,郭勇. 嗜碱芽孢杆菌产碱性纤维素酶研究概况[J]. 氨基酸和生物资源, 2007, 29(1): 35-38.
Guo C S, Cui T B, Guo Y. Developments in alkaline cellulase from alkaliphilic *Bacillus* [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2007, 29(1): 35-38.
- [14] 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.
- [15] 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. QB2583—2003 Cellulases[S]. 2003-09-13.
- [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, Translated. 3rd edition. Beijing: Sciences Press, 2002.
- [17] 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.
- [18] Frederick M, Ausubel R B, Kinston R I. Short protocols in molecular biology [M]. John Wiley & Sons pressed, 1999.
- [19] Peter S, Cui X L, Erko S, et al. *Jonesia quinghaiensis* sp. nov., a new member of the suborder Micrococccineae [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004(54): 2181-2184.
- [20] Sianidis G, Pozidis C, Becker F, et al. Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans* [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 121(4): 498-507.
- [21] Whitman W B, Goodfellow M, Kämpfer P, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 5: The Actinobacteria, Part A. Bergey's Manual Trust [M]. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 2012. Georgia, USA.
- [22] Kim J Y, Hur S H, Hong J H. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. HSH-810 [J]. Biotechnology letters, 2005, 27(5): 313-316.
- [23] 张芸兰. 复合酶法提取冬瓜多糖的研究[J]. 广西民族大学学报:自然科学版, 2009, 15(1): 84-87.
Zhang Y L. Wax-gourd Polysaccharides Extraction by Compound Enzymes[J]. Journal of Guangxi University for Nationalities (Natural Science Edition), 2009, 15(1): 84-87.
- [24] 赵广河. 利用双酶法制备猴头菇氨基酸营养液[J]. 南方农业学报, 2012, 43(10): 1553-1557.
Zhao G H. Double enzymatic preparation method for amino acid nutrition liquid using *Hericium erinaceus* [J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(10): 1553-1557.
- [25] 谌斌. 紫红曲的原生质体紫外线诱变育种[J]. 广西科学院学报, 1999, 15(2): 87-89.
Chen B. Protoplast UV - mutagenic breeding of *Monascus anka* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 1999, 15(2): 87-89.
- [26] 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.

(责任编辑:陈小玲)