

一株高活性纤维素降解细菌的筛选鉴定及酶学特性^①

陈晶晶, 陶少强, 夏 强, 王雅楠, 秦 冰, 朱 林*

(安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

摘 要: 利用小麦/玉米秸秆还田土壤样品, 通过富集培养和刚果红平板染色法筛选分离出纤维素降解细菌 XWS-12; 对分离的菌株进行 16S rRNA 基因序列系统发育分析, 初步鉴定为伯克氏菌属(*Burkholderia*), 定名为 *Burkholderia* sp. XWS-12。以玉米秸秆和麸皮为碳源, 研究了氮源、发酵时间、初始发酵温度、培养基初始 pH 等条件对该伯克氏菌产纤维素酶的影响。结果显示, 该菌株产纤维素酶最适氮源为硝酸钠, 培养时间为 60 h, 培养温度为 37℃, 培养基初始 pH 为 4, 该菌株的 CMC 酶活力最高, 可达 25 U/ml。其粗酶液的最适反应温度为 50℃, 最适反应 pH 为 5, 在 pH 4~8 的范围内酶活力较稳定。粗酶液的热稳定较差, 当温度超过 50℃时, 该酶活力显著下降; 当温度为 50℃时, 保温 1 h, 该酶活力损失 53%。

关键词: 纤维素分解菌; 筛选; 鉴定; 酶学特性; 纤维素酶活力

中图分类号: S154.39

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 1 000 亿 t 以上^[1]。我国农作物秸秆资源丰富, 每年产量可达 6 亿多 t, 其中大部分未被充分利用, 造成了资源的浪费和严重的环境污染^[2]。研究和开发适宜的技术来转化和利用农作物秸秆纤维素资源, 可减轻农业废弃物对生态环境的污染, 促进农业的可持续发展。

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。其中木霉属中的里氏木霉和绿色木霉由于产生纤维素酶系较全、活性高且具有降解木材的能力, 已经被深入研究, 成为最典型的纤维素酶生产菌株^[3-4]。目前对细菌、放线菌的纤维素酶研究也有了很大的进展, 纤维素降解细菌中的好氧细菌, 如纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、纤维弧菌属(*Cellvibrio*)与噬纤维菌属(*Cytophaga*)等有很好的纤维素降解能力。细菌是微生物中种类最多, 数量最大的类群, 所以从细菌中筛选到高纤维素酶活力的菌株有很大的空间。

本研究从秸秆还田后的土壤中分离筛选能降解纤维素的细菌, 通过固体培养初筛、复筛、测定菌株

的纤维素酶活力, 从中获得高产纤维素酶的菌株, 并通过形态观察和 16S rRNA 基因序列测定来确定种属, 研究该菌株的产酶条件和酶学特性, 为提高秸秆还田效果创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 纤维素降解菌分离材料采自安徽省蒙城县农业示范科技园小麦、玉米秸秆均还田的土壤^[5]。

1.1.2 试剂及药品 化学试剂为分析纯, 部分为工业用, 购自上海生工生物工程有限公司; 引物合成、测序也由上海生工生物工程有限公司完成; 分子生物学试剂购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.3 培养基 种子培养基: 蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 酵母浸出汁 5 g, pH 7.0, 加蒸馏水至 1 000 ml。富集培养基^[6]: CMC-Na 20 g, 微晶纤维素 5 g, 纤维素粉 5 g, K₂HPO₄ 1 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CuCl₂·2H₂O 0.1 g, FeCl₃ 0.02 g, 加蒸馏水至 1 000 ml。羧甲基纤维素培养基^[7]: CMC-Na 15 g, NH₄NO₃ 1 g, 酵母膏 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水至 1 000 ml。纤维素刚果红培养基^[8]: K₂HPO₄ 0.5 g, 微晶纤维素 1.88 g, MgSO₄ 0.25 g,

基金项目: 安徽省自然科学基金(1408085MD75)和安徽省高校自然科学重点项目(KJ2013A113)共同资助。

* 通讯作者(zhulin@ahau.edu.cn)

作者简介: 陈晶晶(1987—), 女, 湖北随州人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物方面的研究。E-mail: tsq729@126.com

明胶 2 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水至 1 000 ml, pH 6~7。天然秸秆液体培养基: NaCl 6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, KH_2PO_4 0.5 g, 酵母膏 10 g, 玉米秸秆粉(秸秆切成 5 cm 左右的小段, 用自来水洗净, 风干后用微型植物粉碎机将秸秆粉碎成 40 目) 20 g, 加蒸馏水至 1 000 ml, pH 自然。菌种保藏培养基: PDA 培养基。所有培养基 121℃ 灭菌 20 min 备用。

1.2 菌种的分离与纯化

从小麦/玉米秸秆还田的土壤样品中称取土样 0.5 g, 分别加入 100 ml 富集培养基中, 37℃、180 r/min 培养 3 天, 取菌悬液 1 ml 梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 涂布于羧甲基纤维素培养基上 37℃ 培养 3~5 天。陆续挑取平板上单个菌落继续划线于纤维素刚果红培养基上, 37℃ 再培养 2 天, 重复于固体平板分离 3 次。最终从固体平板中挑选出水解圈直径/菌落直径比值最大的 1 个单菌落于 PDA 斜面上备用。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 基因组提取及 16S rRNA 基因扩增 对筛选到的细菌使用上海生工生物工程有限公司基因组抽提试剂盒(产品编号: SK8226)提取基因组 DNA, 然后扩增细菌的 16S rRNA 基因。扩增体系 25 μl , 组成为: 无菌水 19.2 μl 、10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μl 、dNTPs 2 μl 、引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 各 0.5 μl (10 pmol/ μl)、rTaq DNA 聚合酶 0.3 μl 、菌株的基因组 DNA 1 μl (稀释 10 倍)。扩增程序: 94℃ 10 min; 94℃ 40 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.3.2 16S rRNA 基因测序及分析 PCR 产物先切胶回收, 经 pMD[®]19-T Simple Vector 连接后转入大肠杆菌 DH5 α 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 基因序列放到 GenBank 核酸序列数据库并与已知的相关序列进行比对, 用 MEGA4.0 构建系统发育树。

1.4 纤维素酶活的测定

1.4.1 粗酶液的制备 将菌种接种于以秸秆为唯一碳源的液体培养基中 37℃ 液体摇瓶培养 60 h, 所得培养液于 4℃、5 000 r/min 离心 10 min。上清液即为粗酶液。

1.4.2 CMC 酶活力的测定 取 0.2 ml 上清液于 25 ml 干燥刻度试管中, 加入 1.8 ml 10 g/L CMC-Na 溶液(pH 4.8, 0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制), 50℃ 水浴 30 min 后, 加入 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂 3.0 ml, 沸水浴 5 min,

终止反应并显色。冷水淋浴冷却, 定容至 25 ml, 摇匀, 于 520 nm 波长下测定吸光度。空白对照为酶液在沸水浴中 15 min 使其失活, 其他条件不变。

本试验酶活力 $X = 1\,000 \times G \times 25 / (0.2 \times 30 \times 180)$, 式中, X : 样品的酶活力(U/ml); 1 000: 换算倍数; G : 标准曲线上光吸收值所对应的葡萄糖毫克数; 25: 定容体积(ml); 0.2: 加酶量(ml); 30 为作用时间(min); 180: 葡萄糖的摩尔质量(g/mol)。在上述条件下, 酶活力按照国际单位规定定义为: 每分钟催化羧甲基纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位 U。

1.5 产酶条件及酶学性质

1.5.1 种子培养 从平板挑取一环菌接入摇瓶, 50 ml/150 ml 的种子培养基中, 在 37℃, 200 r/min 条件下摇瓶培养 8 h。

1.5.2 产酶条件的优化 (1) 玉米麸比产酶结果的影响。向锥形瓶中加入不同比例(9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3)的玉米秸秆粉与麸皮 1 g, 酵母膏 1 g, KH_2PO_4 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, 50 ml 装量, 在发酵培养基中接入 1 ml 种子液, 37℃, 200 r/min 培养 60 h, 取发酵液测定酶活力。3 次重复。

(2) 不同氮源对产酶结果的影响。以 1 g 最适的碳源(玉米秸秆粉与麸皮比例为 9:1)为基础, 分别加入不同氮源: 酵母膏、蛋白胨、硝酸铵、尿素、硫酸铵和硝酸钠, 各种氮源用量均为 1 g, 50 ml 装量, 在发酵培养基中接入 1 ml 种子液, 37℃, 200 r/min 培养 60 h, 取发酵液测定酶活力。3 次重复。

(3) 初始 pH 对产酶结果的影响。以 1 g 最适碳源(玉米秸秆粉与麸皮比例为 9:1), 最适氮源硝酸钠为基础, 50 ml 装量, 初始 pH 分别为 3、4、5、6、7、8 条件下, 在发酵培养基中接入 1 ml 种子液, 37℃, 200 r/min 培养 60 h, 取发酵液测定酶活力。3 次重复。

(4) 不同培养时间对产酶结果的影响。以上述最适碳源、氮源及最适初始 pH 为基准, 50 ml 装量, 在发酵培养基中接入 1 ml 种子液, 37℃, 200 r/min 条件下培养 24 h 后, 每隔 12 h 取上清液测定酶活力。3 次重复。

(5) 不同培养温度对产酶结果的影响。以最适碳源、氮源、最适初始 pH 及最适培养温度为基准, 50 ml 装量, 在发酵培养基中接入 1 ml 种子培养液, 分别在 25℃, 28℃, 30℃, 33℃, 37℃ 和 42℃, 200 r/min 条件下培养 60 h, 取发酵液测定酶活力。3 次重复。

1.5.3 纤维素酶的酶学性质 (1) 粗酶液的最适

温度。将粗酶液分别置于 30℃ ~ 80℃ 的水浴条件, 其他条件不变, 测定其酶活力。3 次重复。

(2) 粗酶液的热稳定性。粗酶液分别在 30℃ ~ 80℃ 水浴保温 1 h, 迅速冷却后, 在 50℃ 条件下测定粗酶液的酶活力, 未处理的粗酶液酶活力为 100%。3 次重复。

(3) 粗酶液的最适 pH。分别用 pH 3 ~ 9 缓冲液配制 10 g/L (w/v) 的羧甲基纤维素钠溶液作为底物, 然后在最适反应温度 50℃ 条件下, 测定粗酶液的酶活力。3 次重复。

(4) 粗酶液的 pH 稳定性。将发酵过的粗酶液分别置于 pH 3 ~ 9 的缓冲液条件下室温(25℃)放置 1 h, 测定其残余纤维素酶酶活力, 未处理的粗酶液酶活力为 100%。3 次重复。

2 结果

2.1 XWS-12 菌株的分离

将筛选到的在刚果红固体培养基上水解圈直径/

菌落直径比值最大的编号为 XWS-12 细菌菌株进行液体产酶发酵试验, 测定其粗酶液的 CMC 酶活力。结果显示该菌株于天然秸秆液体培养基中培养 60 h (50 ml 装量, 37℃, 200 r/min, pH 自然), 测得其粗酶液的 CMC 酶活力高达 21.08 U/ml。

2.2 菌株 XWS-12 的 16S rRNA 基因序列分析

菌株 XWS-12 的 16S rRNA 基因序列同源性比较结果显示其 16S rRNA 序列与伯克氏菌属的很多菌株相似度高达 100%, 部分达到 97%。以 16S rRNA 基因序列同源性为基础构建系统发育树(图 1), 菌株 XWS-12 与伯克氏属聚为一支。同时菌株 XWS-12 形态观察结果显示, 革兰氏染色阴性, 菌落浅黄色, 呈圆形, 表面湿润光滑, 边缘整齐, 不透明; 菌体长度约 1.2 ~ 2.0 μm, 宽度约 0.4 ~ 0.8 μm, 短杆状, 与伯克氏属菌株的生理生化性质一致。根据菌株的形态特征, 结合其分子鉴定结果, 初步判断菌株 XWS-12 属于伯克氏属的一个种, 暂命名为 *Burkholderia* sp. XWS-12。

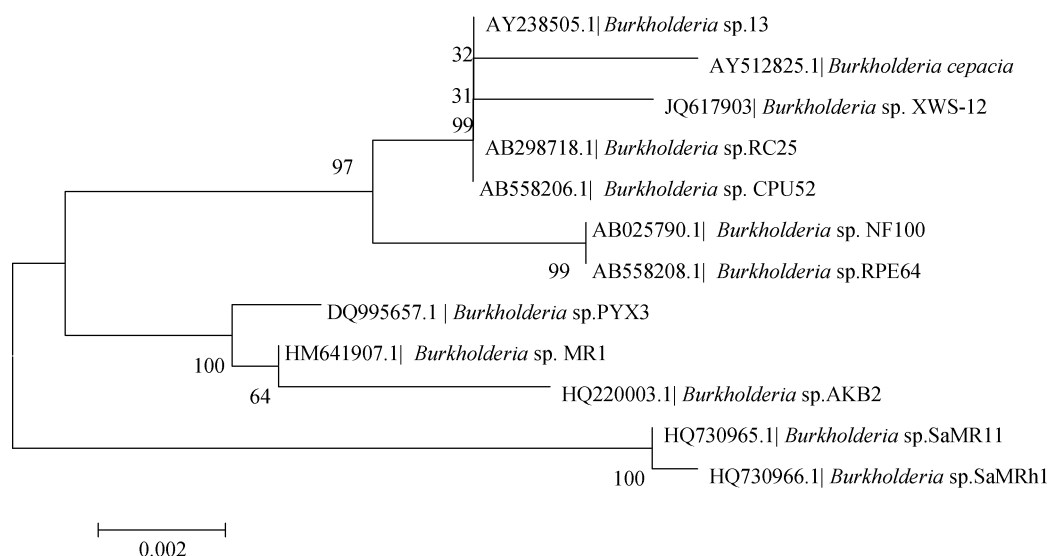


图 1 XWS-12 菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of XWS-12 strain

2.3 纤维素酶液体发酵结果分析

2.3.1 不同碳源的影响 随着玉米秸秆粉与麸皮的比例逐渐降低, 纤维素酶酶活力逐渐降低, 但降低的趋势不明显, 选择玉米秸秆粉与麸皮的比例为 9 : 1, 有利于酶活力的提高(图 2)。

2.3.2 不同氮源的影响 如图 3 所示, 在所提供的氮源中, 无机氮硝酸钠作为氮源其产酶效果最好, 有机氮源酵母膏对 XWS-12 菌株产酶也有明显的促进作用。

2.3.3 不同发酵时间的影响 对 *Burkholderia* sp. XWS-12 菌株培养 84 h, 培养初期 24 ~ 36 h 其纤维素酶活力显著增加, 培养至 60 h, 纤维素酶的酶活力

达最大, 之后开始缓慢降低(图 4)。

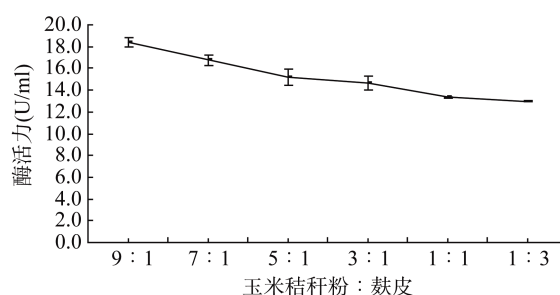


图 2 碳源对纤维素酶活性的影响

Fig. 2 Effects of carbon sources on the activity of cellulase

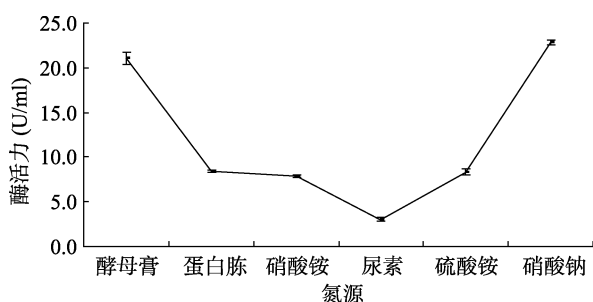


图3 氮源对纤维素酶活性的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on the activity of cellulase

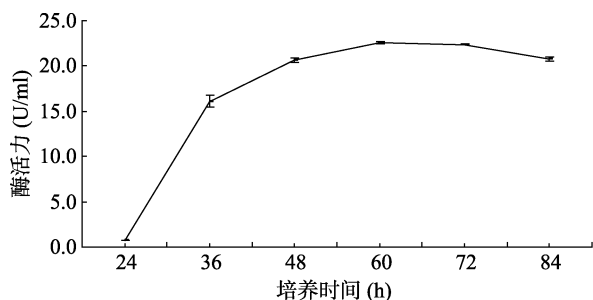


图4 培养时间对纤维素酶活性的影响

Fig. 4 Effects of culture time on the activity of cellulase

2.3.4 不同 pH 的影响 培养基的初始 pH 影响 *Burkholderia* sp. XWS-12 菌株的纤维素酶活力。由图 5 可知,当培养基初始 pH 为 4 时,该菌株的纤维素酶活力最高;当培养环境偏碱或偏酸该酶活力显著降低。

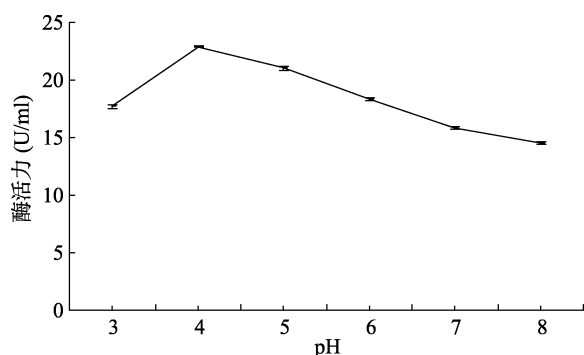


图5 pH 对纤维素酶活性的影响

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

2.3.5 不同培养温度的影响 如图 6 所示,培养温度对该菌株的纤维素酶活力影响较大。当温度低于 37℃ 时,随温度升高,纤维素酶活力迅速增加,37℃ 时酶活力最高,超过 37℃ 后随温度升高,纤维素酶活力迅速下降。因此,对 XWS-12 菌株来说,产酶最适培养温度为 37℃。

2.4 菌株 XWS-12 纤维素酶酶学性质研究

2.4.1 最适温度及热稳定性 由图 7 可知,在 50℃ 时 XWS-12 菌株的纤维素酶活力最高,随着温度

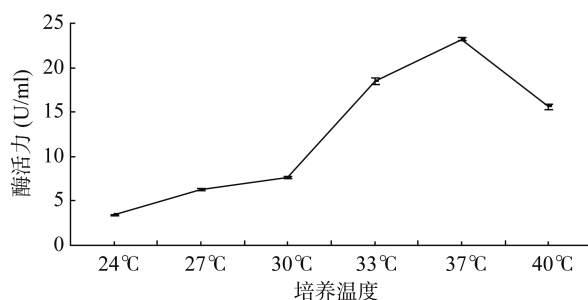


图6 不同培养温度对产纤维素酶的影响

Fig. 6 Effects of different culture temperatures on the production of cellulase

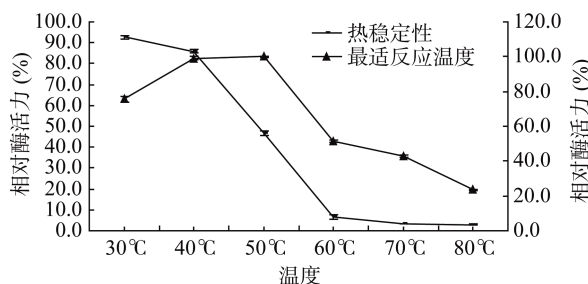


图7 温度对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the enzyme activity

的提高,纤维素酶活力迅速下降,酶活力只是在一个很窄的温度范围内表现很高,纤维素酶在 30℃~40℃ 条件下相对稳定,酶活力基本没有多少损失,但超过 40℃ 时,其酶活力迅速下降,说明该酶热稳定性较差,在储存过程中注意低温保藏。

2.4.2 最适 pH 及 pH 稳定性 如图 8 所示,在 pH 4 时,纤维素酶活力表现最高,在偏酸条件下,纤维素酶的酶活力明显下降,在略偏碱性的条件下,纤维素酶的酶活力变化不大,因此该菌产生的纤维素酶催化反应的最适反应 pH 为 4 或者以上。该菌所产生的纤维素酶,在 pH 为 5 时稳定性基本不变,但当 pH 下降到 4 以下纤维素酶稳定性均会迅速下降,所以该纤维素酶不耐酸性环境,因此该酶只能在弱酸或中性环境下保存。

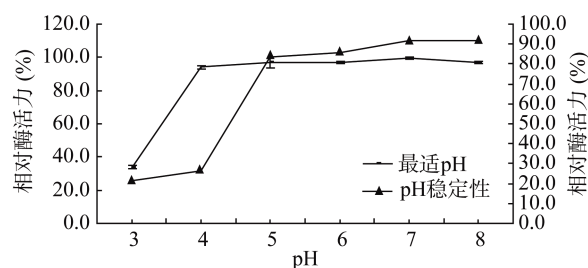


图8 pH 对纤维素酶活力的影响

Fig. 8 Effect of pH on the enzyme activity

3 讨论

本文采用培养的手段对秸秆还田后的土壤中能

够利用纤维素的细菌进行了初步研究,采用 PCR 技术,成功扩增出菌株 *Burkholderia* sp. XWS-12 的 16S rRNA 基因,克隆测序后将序列在 GenBank 进行 BLAST 序列同源性比较,结果显示其 16S rRNA 序列与 *Burkholderia* sp. PYX3(DQ995657.1)、*Burkholderia* sp. SaMR11(HQ730965.1) 和 *Burkholderia* sp. SaMRh1(HQ730966.1) 相似度为 100%,与 *Burkholderia* sp. NF100(AB025790.1)、*Burkholderia* sp. CPU52(AB558206.1)、*Burkholderia* sp. RC25(AB298718.1) 和 *Burkholderia* sp. RPE64(AB558208.1) 相似度高达 97%,结合菌株特征初步确定该菌属于变形菌门、 β -变形菌纲、伯克氏菌目、伯克氏菌科、伯克氏菌属的伯克氏菌(暂命名为: *Burkholderia* sp. XWS-12)。

近年来,关于伯克氏菌属中的部分细菌降解多糖的研究也陆续有了一些进展,比如聚半乳糖醛酸酶、木聚糖酶、壳多糖酶以及纤维素酶活性的研究^[10-13]。本文筛选的一株伯克氏菌除了对其纤维素酶活力进行了研究之外,还研究了其酶学性质。

一般认为纤维素酶是一种诱导酶^[14],因此在发酵培养中普遍采用含有纤维素的原料作为碳源。常用的纤维素原料有稻草、秸秆、玉米芯、木糖渣、麸皮等。本文以麸皮、玉米秸秆的混合物作为发酵培养的碳源进行发酵实验,来选择适宜的配比,主要是考虑到麸皮作为辅助产酶物质加入发酵基础培养基中,其数量既不能太多,多了会产生抑制作用。因此,随着麸皮添加量的增加,纤维素酶活力会出现相应的变化,从中便可以找出最佳的培养基配比比例。

伯克氏菌 XWS-12 是本研究获得的纤维素酶活力最强的菌株,其 CMC 酶活力高达 25 U/ml。钱林等^[15]从黄浦江淀山湖的水底沉积物中获得的纤维素降解菌蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的纤维素酶活力在 4.58 U/ml。胡爽等^[16]从青贮饲料中分离的产纤维素酶的细菌地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 的纤维素酶活力在 2.55 U/ml。一株链霉菌属的转化株 T3-1 纤维素酶活力高达 40.3 U/ml^[17]。苏贝等^[18]对海洋细菌 *Cellulophaga* sp. QY201 产内切纤维素酶的发酵条件进行了研究,优化后发酵上清液的内切纤维素酶活力可达到 7.85 U/mL。吕静琳等^[19]从腐烂朽木及其附近土壤中得到的样品中筛选到一株产纤维素酶的蜡状芽孢杆菌 LT3, CMC 酶活力为 71.17 U/mL。郑哲等^[20]通过对一株产纤维素酶细菌进行紫外线诱变,获得了酶活力高达 38.30 U/ml 的突变菌株,该研究对提高纤维素酶活性具有一定参考价值和借鉴意义。本研究的伯克氏菌 XWS-12 是一株具有一定研究开发潜力的纤维素酶生产菌株。

4 结论

(1) 研究获得了一株高活性纤维素降解细菌,初步鉴定其为伯克氏菌属的一株伯克氏菌(暂命名为: *Burkholderia* sp. XWS-12)。

(2) 菌株 *Burkholderia* sp. XWS-12 产纤维素酶最适宜碳源为秸秆与麸皮的比例为 9:1,最适宜氮源为硝酸钠,培养时间为 60 h,培养温度为 37℃,培养基初始 pH 为 4,该菌株的 CMC 酶活力最高可达 25 U/ml,是一株十分具有研究开发潜力的纤维素酶生产菌株。

(3) 纤维素酶液的最适反应温度为 50℃,酶液的热稳定较差;当温度超过 50℃,该酶活力显著下降,当温度为 50℃,保温 1 h,该酶活力损失 53%。最适反应 pH 为 5,在 pH 4~8 的范围内酶活性较稳定。

参考文献:

- [1] Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24: 452-481
- [2] Wang T, Liu XM, Yu Q, Zhang X, Qu YB, Gao PJ, Wang TH. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* [J]. *Biomolecular Engineering*, 2005, 22 (1/3): 89-94
- [3] Baldrian P, Valášková V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(3): 501-521
- [4] Béguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose[J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 1994, 13(1): 25-58
- [5] 王磊, 朱林, 陶少强, 李金才, 沈学善. 麦玉秸秆还田对土壤养分动态变化的影响[J]. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(4): 791-794
- [6] Nakajima-Kambe T, Okada N, Takeda M, Akutsu-Shigeno Y, Matsumura M, Nomura N, Uchiyama H. Screening of novel cellulose-degrading bacterium and its application to denitrification of groundwater[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(4): 429-433
- [7] 余晓斌, 郝学财. 纤维素酶液体发酵最佳培养基的确定[J]. *工业微生物*, 2005, 35(3): 1-5
- [8] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(4): 251-252
- [9] Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(2): 1-8
- [10] Kong H, Shimosaka M, Ando Y, Nishiyama K, Fujii T, Miyashita K. Species-specific distribution of a modular family 19 chitinase gene in *Burkholderia gladioli*[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2001, 37(2): 135-141
- [11] Massa C, Clausen MH, Stojan J, Lamba D, Campa C. Study of the mode of action of a polygalacturonase from the phytopathogen *Burkholderia cepacia* [J]. *Biochem. J.*, 2007, 407(2): 207-217

- [12] Mohana S, Shah A, Divecha J, Madamwar D. Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash [J]. *Bioresour. Technol.*, 2008, 99(16): 7 553–7 564
- [13] Fujii K, Kuwahara A, Nakamura K, Yamashita Y. Development of a simple cultivation method for isolating hitherto-uncultured cellulase-producing microbes[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91(4): 1 183–1 192
- [14] Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals[J]. *Journal of Bacteriology*, 1957, 73(2): 269–278
- [15] 钱林, 郑巧利, 付瑾, 王慧萍, 郑春丽, 柳建设. 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
- [16] 胡爽, 王炜, 詹发强, 杨红兰, 山其木格. 一株产纤维素酶细菌的筛选鉴定[J]. *生物技术*, 2008, 18(5): 36–38
- [17] Jang HD, Chen KS. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 19: 263–268
- [18] 苏贝, 韩峰, 于文功. 海洋细菌 *Cellulophaga* sp.QY201 产内切纤维素酶发酵条件的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 10: 1 874–1 877
- [19] 吕静琳, 黄爱玲, 郑蓉, 李殿殿, 吕瞰. 一株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. *生物技术*, 2009(6): 26–29
- [20] 郑哲, 贾翠英, 张玉辉. 一株产纤维素酶细菌紫外线诱变研究[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(3): 66–69

Isolation and Enzymatic Characteristics of a Cellulose-decomposing Bacteria Strain with High Cellulase Activity

CHEN Jing-jing, TAO Shao-qiang, XIA Qiang, WANG Ya-nan, QIN Bing, ZHU Lin*

(College of Resources and Environmental Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: A highly active cellulose-decomposing strain XWS-12 was isolated from the soil of wheat and maize straw returning by enrichment culture and Congo red staining test. The isolated strain was identified by phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences, and this strain was preliminarily identified as *Burkholderia* sp. XWS-12. Using corn straw and bran as carbon source, the cellulase producing conditions of the bacterium were analyzed by single factor experiments, including nitrogen source, incubating time, initial temperature, initial pH *et al.* The results showed that the optimal cellulase producing conditions of *Burkholderia* sp. XWS-12 were as follows: the best nitrogen source was NaNO₃, incubating time was 60 h, initial temperature was 37°C and initial pH of culture medium was 4, under which the activities of the CMCase activity reached 25 U/ml. The optimal reaction temperature of the crude enzyme solution was 50°C, the optimum reaction pH value 5. In the range of pH 4–8, the enzyme activity was more stable. In different temperature conditions, the results of the enzyme activity change showed that when the temperature was more than 50°C, the enzyme activity decreased significantly. Under the temperature of 50°C for 1 h, the loss of enzyme activity was above 53%.

Key words: Cellulose-decomposing bacteria, Isolation, Identification, Enzymatic characteristics, Cellulase activity