

# 麝鼠肠道纤维素分解菌的分离 鉴定及其酶学特性分析

吴佳勇 封孝兰 曾德军 谌颖莲 竭航

重庆市药物种植研究所 重庆 408435

**摘要:** 本研究旨在从麝鼠 (*Ondatra zibethicus*) 肠道中分离出高效分解纤维素的菌株, 为开发纤维素分解菌微生物制剂提供菌种资源。本研究利用以羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为单一碳源的培养基, 从麝鼠盲肠内分离出一株高效分解纤维素的菌株 WJ-3, 并对该菌株进行形态鉴定、生理生化鉴定和 16S rDNA 分子鉴定。对菌株 WJ-3 所产羧甲基纤维素酶 (CMCase) 进行酶学特性实验, 分析此纤维素酶的最佳反应 pH 和最佳反应温度, 以及此纤维素酶对不同温度和不同酸碱度的耐受性。结果表明, 菌株 WJ-3 属于空气芽孢杆菌 (*Bacillus aerius*), 并将其命名为 *Bacillus aerius* WJ-3。菌株 WJ-3 所产羧甲基纤维素酶在 pH 4.0 ~ 6.0 的范围内反应时, 酶活性随 pH 值升高而增加, 其最佳反应 pH 为 6.0, 且此纤维素酶在 pH 4.0 ~ 8.0 范围内保存 30 min 后均能保持 80% 以上的相对酶活性; 菌株 WJ-3 所产羧甲基纤维素酶在温度 30 ~ 50 °C 范围内反应时, 随温度上升酶活性逐渐增加, 在 50 °C 时酶活性最高, 之后随温度的升高酶活性逐渐下降, 且纤维素酶在此温度范围内保存 30 min 后均能保持较高的酶活性。综上所述, 菌株 *Bacillus aerius* WJ-3 所产羧甲基纤维素酶的酶活性较高, 并且此纤维素酶的耐酸碱性及热稳定性良好, 是具有一定利用价值的菌种资源。

**关键词:** 麝鼠; 纤维素分解菌; 羧甲基纤维素酶

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 01-143-09

## Isolation, Identification and Enzymatic Characteristics of Cellulolytic Bacteria from the Intestinal Tract of Muskrats

WU Jia-Yong FENG Xiao-Lan ZENG De-Jun CHEN Ying-Lian JIE Hang

Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 408435, China

**Abstract: [Objectives]** The purpose of this study was to isolate strains capable of efficiently decomposing cellulose from the intestines of Muskrat (*Ondatra zibethicus*), so as to provide strain resources for the development of microbial preparations of cellulose decomposing bacteria. **[Methods]** Six cellulose decomposing bacteria were isolated from the cecum of Muskrat using the culture medium with sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the only carbon source. The Congo red staining experiment and the

**基金项目** 重庆市基本科研业务费项目 (No. cstc2020jxjl-jbky130002), 国家自然科学基金项目 (No. 81973428);

**第一作者简介** 吴佳勇, 男, 助理研究员; 研究方向: 动物营养与饲料学研究; E-mail: 407356345@qq.com。

收稿日期: 2021-08-09, 修回日期: 2021-11-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202201015

determination of carboxymethyl cellulase (CMCase) activity were carried out. Bacterium strain WJ-3 with highly efficient cellulose decomposing activity was screened, and further identified by morphological observation, physiological and biochemical analysis as well as 16S rDNA gene sequencing approach. The 16S rDNA gene sequence was analyzed by BLAST in national center for biotechnology information (NCBI), and the phylogenetic tree was constructed by MEGA 6.0 software. The enzymatic characteristics of CMCase produced were tested to analyze the optimal reaction pH and temperature of the cellulase, as well as the tolerance of the cellulase to different temperatures and pH values. Ultimately, all the data were processed with Spss 23.0 software. **[Results]** A strain WJ-3 with efficient cellulose decomposing activity was identified and it was agram-positive, spore-forming, and rod-shaped bacterium (Fig. 2, Fig. 3). The physiological and biochemical test results of strain WJ-3 were shown in Table 2. By the 16S rDNA gene sequence analysis, strain WJ-3 was identified as *Bacillus aerius*, and named *Bacillus aerius* WJ-3 (GenBank Accession: MZ 292092.1). The phylogenetic tree of strain WJ-3 was shown in Figure. 5. When the CMCase produced by strain WJ-3 reacted in the range of pH 4.0 - 6.0, the enzyme activity increased with the increase of pH value, and the best reaction pH was 6.0 (Fig. 6), and the cellulase could maintain more than 80% of the relative enzyme activity after being stored in the range of pH 4.0 - 8.0 for 30 min (Fig. 7); When the CMCase produced by strain WJ-3 reacted in the temperature range of 30 - 50 °C, the enzyme activity gradually increased with the increase of temperature, the enzyme activity was the highest at 50 °C (Fig. 8), and then the enzyme activity of CMCase decreased with the increase of temperature, the cellulase could maintain high enzyme activity after being stored in the temperature range of 30 - 50 °C for 30 min (Fig. 9). **[Conclusion]** The enzyme activity of CMCase produced by strain *Bacillus aerius* WJ-3 is relatively high, with satisfactory acid and alkali resistance as well as thermal stability. It is a strain resource with certain utilization value.

**Key words:** Muskrat; Cellulose-decomposing bacteria; Carboxymethyl cellulase

麝鼠 (*Ondatra zibethicus*) 又名青根貂, 原生于北美洲, 属于啮齿目田鼠亚科麝鼠属, 其产毛皮质优良且雄麝鼠香腺分泌的麝鼠香化学成分与麝香 (moschus) 相似, 被视为有替代天然麝香的潜力(赵喜印 1995, 李臣光等 2020)。麝鼠以植食为主, 相关调查指出, 麝鼠可采食的植物多达 100 余种, 包括水生植物和陆生木本、草本植物的根茎叶及果实, 植物性食物占比为 93.40%, 偶食鱼和贝类, 且食量大, 日均采食量能达到其体重的 50%以上, 由此认为, 麝鼠对植物具有较强的消化利用能力(朱靖等 1965, 华树芳等 1988, Zhang et al. 2021)。然而麝鼠对植物性食物的消化利用是颇具挑战的, 由于植物中含有大量的纤维物质, 其是构成细胞壁的主要成分, 它们结构致密、性质稳定难以分解, 诸多研究指出动物本身分泌的消

化酶并不能对纤维素进行消化 (Bedford 2000, 王成章 2011, Brownawell et al. 2012), 因此动物对植物纤维的消化利用主要是依靠消化道内的共生微生物分泌的纤维素酶将纤维素分解为可供机体进行消化吸收的产物 (Kamra 2005)。麝鼠是单胃动物, 区别于反刍动物经瘤胃微生物发酵利用纤维素, 单胃动物主要是依靠消化道后段部分的盲肠和结肠中的微生物将纤维素分解为可供机体利用的物质 (计成 2008), 因此麝鼠以植物作为主要营养源的这一特点很可能与其肠道中存在着大量纤维素分解菌有关。

本研究利用以羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na) 为单一碳源的培养基从麝鼠盲肠内分离出具备纤维素分解能力的菌株, 对其进行羧甲基纤维素酶 (carboxymethyl cellulase, CMCase) 活性的测

定, 筛选出产酶活性高的菌株。揭示麝鼠对植物纤维素的消化利用机理, 为草食单胃动物肠道纤维素分解菌研究提供科学依据, 以期为开发鼠源纤维素分解菌微生物制剂提供菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本研究挑选 6 只体重为 1 kg 左右的健康 12 月龄雄性麝鼠作为实验对象, 购自河北省辛集市中国麝鼠养殖基地。麝鼠日粮由粗青绿饲料 (70%) 和精饲料 (30%) 组成, 青粗饲料为苜蓿草颗粒、干草、青菜叶和胡萝卜, 精饲料为配合饲料。将实验麝鼠断颈处死后迅速剖开腹腔找到盲肠, 用无菌棉线进行结扎后剪下盲肠放入 50 ml 无菌离心管中, 置于冰盒内迅速带回实验室进行菌株分离。

### 1.2 纤维素分解菌的分离纯化

将麝鼠盲肠表面用酒精消毒后置于 SW-CJ-1FD 超净工作台 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司), 取盲肠内食糜 1 g 放入 99 ml 灭菌生理盐水中, 充分稀释后用移液枪吸取 1 ml 稀释液注入装有 9 ml 灭菌生理盐水的试管中, 制成  $10^{-3}$  稀释度的盲肠食糜稀释液, 并继续按 10 倍的级差等梯度稀释, 选取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  三个梯度的稀释液, 分别吸取 50  $\mu$ l 稀释液滴入纤维素分解菌分离培养基平板 (配方: CMC-Na 5.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g, 胰蛋白胨 1.25 g, NaCl 2.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CaCl}_2$  0.005 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002 g, 琼脂粉 7.5 g, 定容至 500 ml)。用涂布棒进行涂布, 并倒置于 SPX-150B 生化培养箱 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司) 中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后进行观察。将生长于平板上的菌落用接种针点种于分离培养基上, 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养 48 h 后用 5 g/L 浓度的刚果红溶液染色 5 min, 并用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗去平板表面多余染液, 查看菌落四周是否形成水解透明环, 使用游标卡尺对形成透明环的菌落进行测量, 并记录其菌落直径 ( $d$ ) 与透明环直径 ( $D$ )。以  $D/d$  比

值大小作为纤维素分解菌的初筛标准, 选择  $D/d$  比值较大的菌落, 放入冻存管中加甘油置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保藏。

### 1.3 纤维素分解菌的复筛

**1.3.1 菌株粗酶液的制备** 将保藏的菌株置于 Luria-Bertani 培养基 (配方: 胰蛋白胨 5.0 g, 酵母提取物 2.5 g, NaCl 5.0 g, 定容至 500 ml), 进行反复划线活化培养后, 挑取单菌落于 Luria-Bertani 液体培养基中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下保持 200 r/min 培养 48 h 后吸取菌液, 以 2% 的接种量接种入发酵产酶液体培养基 (配方: 在 Luria-Bertani 培养基的基础上加 1% 的 CMC-Na), 在 BSD-TX270 恒温震荡培养箱 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司) 中培养 48 h 后, 将菌液进行低温离心并吸取上层溶液即制成粗酶液, 用于后续纤维素酶活力的测定。

**1.3.2 羧甲基纤维素酶活力测定** 本实验采用分光光度法对纤维素酶活力进行测定, 参考中国农业行业标准 (NY/T912-2020) 中的方法进行测定 (中华人民共和国农业农村部 2020)。

制备试样溶液, 在试管中加入 2 ml 确定比例稀释的粗酶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后加入 2 ml CMC-Na 溶液 (15 g/L), 于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 30 min 后加入 DNS 试剂 (北京酷来搏科技有限公司) 5.0 ml 终止反应, 加入 0.3 g/L 的葡萄糖溶液 1.0 ml 后沸水浴 5 min, 用 pH 5.5 醋酸-醋酸钠缓冲液定容至 25 ml。

制备空白试样溶液, 在试管中加入 2 ml 确定比例稀释的粗酶液 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min, 加入 DNS 溶液 5.0 ml 后再加入 2 ml CMC-Na 溶液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 30 min, 加入 0.3 g/L 的葡萄糖溶液 1.0 ml, 沸水浴 5 min, 用 pH 5.5 醋酸-醋酸钠缓冲液定容至 25 ml。

将上述试样溶液利用 UV-2450 分光光度计 (日本岛津制作所) 在波长 540 nm 处测定吸光度, 以葡萄糖标准曲线回归方程计算试样中葡萄糖浓度, 根据公式  $X = [100n(c - c_0)] / (180.2mt)$  计算出样品中纤维素酶活性, 其中,  $X$  为纤维素酶活性 (单位 U/L),  $c$  为试样中葡

葡萄糖浓度,  $c_0$  为空白试样中葡萄糖浓度,  $n$  为粗酶液稀释倍数,  $m$  为粗酶液试样体积,  $t$  为酶解反应时间。

在反应温度为 37 °C pH 为 5.5 的情况下以每 1 min 从浓度为 7.5 g/L 的 CMC-Na 溶液中酶解生成 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所用酶量定义为 1 个酶活力单位, 以 U/L 表示。

#### 1.4 目标纤维素分解菌的鉴定

**1.4.1 目标菌株的形态及生理生化鉴定** 选择产酶活性最高的菌株作为目标菌株进行形态及生理生化鉴定, 参考朱旭芬 (2010) 的方法对目标菌株进行革兰氏染色和芽孢染色镜检。使用芽孢杆菌生理生化鉴定试剂盒 (青岛海博生物技术有限公司) 对目标菌株进行生理生化实验, 并参考东秀珠 (2001) 的方法对菌株生理生化特性进行分析。

**1.4.2 目标菌株的 16S rDNA 分子鉴定** 利用细菌基因组提取试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司), 提取目标菌株基因组, 并使用细菌 16S rDNA 片段扩增引物 (上游引物 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 下游引物 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') 对目标菌株进行 PCR 扩增 (Scarpellini et al. 2002)。PCR 反应体系为 2  $\times$  Taq Mix 25  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  DNA 模板 (20 mg/L), 分别添加 1  $\mu\text{l}$  上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 加入双蒸水至 50  $\mu\text{l}$ 。PCR 扩增反应程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 35 次; 72 °C 终延伸 7 min。反应结束后将 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并送样至派森诺生物科技公司进行测序。将获得的测序结果在美国国家生物信息中心 (NCBI) 网站与已知序列进行 BLAST 比对, 选择同源性较高的序列进行系统发育分析, 并利用 MEGA 6.0 软件基于邻接法 (neighbor-joining method) 构建目标菌株的系统发育树。

#### 1.5 目标菌株的酶学特性分析

CMCase 最佳反应 pH 实验。将粗酶液与

CMC-Na 分别用 pH 4.0 ~ 6.5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液和 pH 7.0 ~ 8.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲溶液溶解稀释后, 在 37 °C 温度下与底物 CMC-Na 反应 30 min 后测定酶活性, 分析在不同 pH 条件下酶的反应活性变化。

CMCase 酸碱耐受性实验。将粗酶液分别用不同 pH 的缓冲液稀释后于 37 °C 恒温水浴保存 30 min 后测定其酶活性, 分析酶在不同酸碱度下的稳定性。

CMCase 最佳反应温度实验。将粗酶液分别于 30 ~ 70 °C 的条件下与底物 CMC-Na 反应 30 min 后测定酶活性, 分析在不同温度下酶的反应活性变化。

CMCase 温度耐受性实验。将粗酶液分别置于 30 ~ 70 °C 的条件下水浴保存 30 min 后测定其酶活性, 分析酶对不同温度的耐受性。

所测得酶活性数据经 Spss 23.0 软件计算平均数与标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维素分解菌的分离及复筛

利用纤维素分离培养基, 配合刚果红染色实验分离筛选出 6 株  $D/d$  比值较大的菌株 (图 1)。对 6 株菌株分别进行 CMCase 活性测定, 6 株菌株均能产生羧甲基纤维素酶, 其中, 菌株 WJ-3 产酶活性高于其他 5 株, 达到  $6.5 \times 10^{-4}$  U/L (表 1)。



图 1 菌株刚果红染色实验

Fig. 1 Congo red staining test of the strain

表 1 纤维素分解菌的透明环直径与菌落直径比值 ( $D/d$ ) 和羧甲基纤维素酶活性测定结果

Table 1 The ratio of transparent circle diameter to colony diameter of cellulose decomposing bacteria ( $D/d$ ) and the determination results of CMCase activity

菌株编号 Strain number	透明环直径 ( $D$ , cm) Transparent circle diameter	菌落直径 ( $d$ , cm) Colony diameter	$D/d$ 值 $D/d$ value	羧甲基纤维素酶活性 ( $\times 10^{-4}$ U/L) CMCase activity
WJ-1	1.46	0.55	2.66	1.8
WJ-2	1.45	0.38	3.82	3.3
WJ-3	1.83	0.45	4.07	6.5
WJ-4	0.82	0.29	2.83	2.3
WJ-5	1.91	0.44	4.34	5.7
WJ-6	1.16	0.36	3.22	4.1

## 2.2 菌株 WJ-3 的形态及生理生化鉴定

将菌株 WJ-3 点种于 Luria-Bertani 平板上培养 48 h 后, 菌落形态呈圆形, 中心有较小隆起, 不透明且表面粗糙伴褶皱感, 颜色为灰白色或黄白色。经革兰氏染色后镜检, 判断为革兰氏阳性菌 (G+), 菌体呈杆状 (图 2); 经孔雀石绿染色后镜检可见绿色芽孢 (图 3); 菌株生理生化实验结果见表 2。初步判断菌株 WJ-3 属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。

## 2.3 菌株 WJ-3 的 16S rDNA 分子鉴定

以菌株 WJ-3 的 DNA 为模板扩增的 16S rDNA 序列长度为 1 428 bp (图 4)。将测序结果在 NCBI 库中进行 BLAST 比对发现, 菌株 WJ-3 与多株芽孢杆菌属的菌株序列相似度较高, 其中, 与空气芽孢杆菌 (*B. aerius*) 相似

度最高达 99% 以上。系统发育树显示, 菌株 WJ-3 与 *Bacillus aerius* strain 24K (NR 118439.1) 处于同一分支上 (图 5), 相似度最高, 结合菌株形态及生理生化实验结果, 判断菌株 WJ-3 为空气芽孢杆菌, 并将其命名为 *Bacillus aerius*

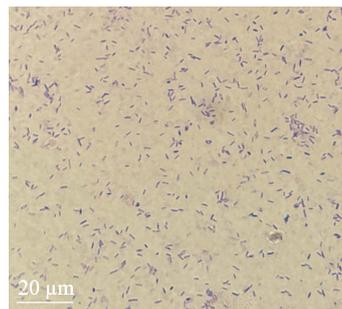


图 2 菌株 WJ-3 革兰氏染色镜检 (放大 1 000 倍)

Fig. 2 Microscopic examination of strain WJ-3 by gram staining (the magnification of strain is 1 000 times)

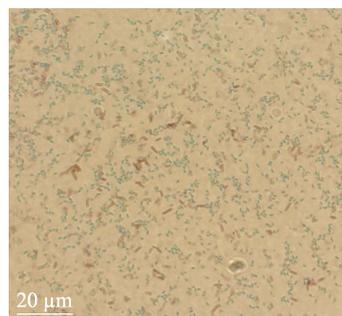


图 3 菌株 WJ-3 孔雀石绿染色镜检 (放大 1 000 倍)

Fig. 3 Microscopic examination of strain WJ-3 by malachite green staining (the magnification of strain is 1 000 times)

表 2 菌株 WJ-3 生理生化实验结果

Table 2 Results of physiological and biochemical experiments of strain WJ-3

试验项目 Test items	结果 Result	试验项目 Test items	结果 Result
V-P 试验 Voges-Proskauer test	+	明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	+
柠檬酸盐利用试验 Citrate test	-	7% NaCl 生长试验 Growth test of 7% NaCl	+
丙二酸盐利用试验 Malonate test	-	pH 5.7 生长试验 Growth test of pH 5.7	+
D-木糖试验 D-xylose glycolysis test	+	硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	+
L-阿拉伯糖试验 L-Arabinose glycolysis test	+	淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
D-甘露醇试验 D-Mannitol glycolysis test	+		

“+” 为阳性; “-” 为阴性。“+” Positive; “-” Negative.

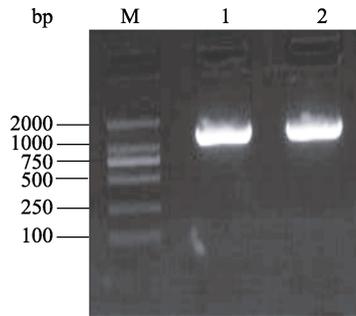


图4 菌株 WJ-3 的 16S rDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electropherogram of 16S rDNA PCR products of strain WJ-3

M. DL2 000 DNA 分子量标准; 1 和 2. 菌株 WJ-3 16S rDNA PCR 产物。

M. DL2 000 DNA Maker; 1 and 2. 16S rDNA PCR products of strain WJ-3.

WJ-3, 将菌株基因序列上传至 NCBI GenBank (登录号为 MZ 292092.1)。

## 2.4 菌株 WJ-3 的酶学特性分析

### 2.4.1 CMCase 最佳反应 pH 与酸碱耐受性分析

将 WJ-3 所产纤维素酶 (CMCase) 在不同 pH 条件下与羧甲基纤维素钠反应后测定其酶活力。CMCase 在 pH 4.0 ~ 6.0 反应时酶活性呈上升趋势, 在 pH 6.0 时酶活性最高, 达到  $6.7 \times 10^{-4}$  U/L, 之后随 pH 上升酶活性逐步下降 (图 6)。CMCase 酸碱耐受性实验结果显示, CMCase 在 pH 6.0 条件下保存时酶活性最高, 在 pH 4.0 ~ 8.0 范围内均能保持 80% 以上的相对酶活性, 说明该酶具有一定的耐酸碱性 (图 7)。

### 2.4.2 CMCase 最佳反应温度及温度耐受性分析

将菌株 WJ-3 所产纤维素酶在不同温度下与羧甲基纤维素钠进行反应并测定其酶活性, 在温度 30 ~ 50 °C 区间内反应时, 随温度上升 CMCase 活性逐渐增加, 在反应温度 50 °C 时酶活性达顶峰, 为  $9.1 \times 10^{-4}$  U/L, 之后随反应温度升高酶活性逐步下降 (图 8); CMCase 温度耐受性实验结果表明, 该酶在 30 ~ 50 °C 范围内保存 30 min 后都能保持较高的酶活性, 在 50 °C 以上保存 30 min 后, 随着温度上升 CMCase 活性明显下降 (图 9)。

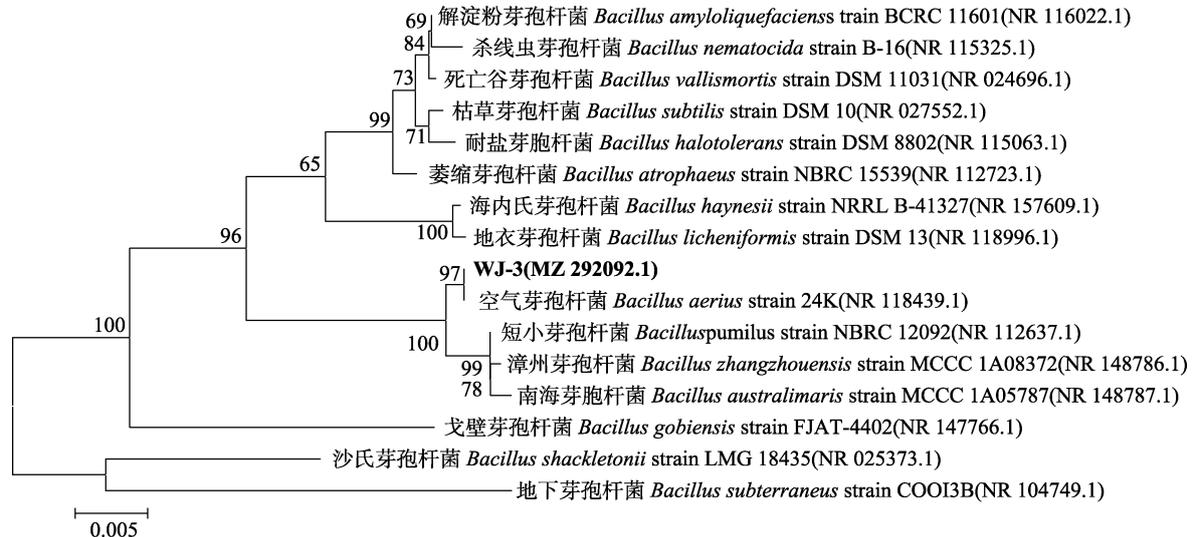


图5 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 WJ-3 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain WJ-3 based on 16S rDNA gene sequence

图中比例尺 0.005 表示遗传距离, 发育树各分支项目名称分别对应为菌株中文名、菌株学名及编号, 括号中为菌株 GenBank 登录号。

The scale bar of 0.005 indicates the genetic distance, and each branch of the phylogenetic tree corresponds to the Chinese name, scientific name and number of the strain respectively, and the GenBank accession numbers are shown in brackets.

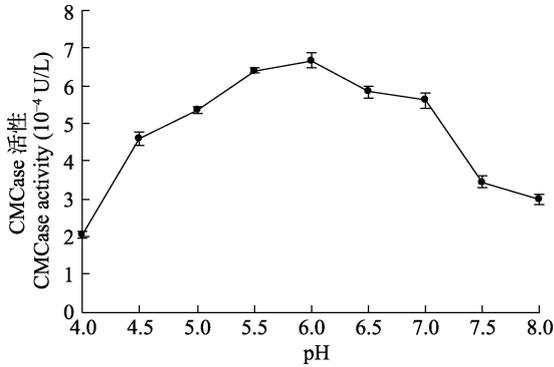


图 6 菌株 WJ-3 所产纤维素酶最佳反应 pH

Fig. 6 Optimal reaction pH of CMCase produced by strain WJ-3

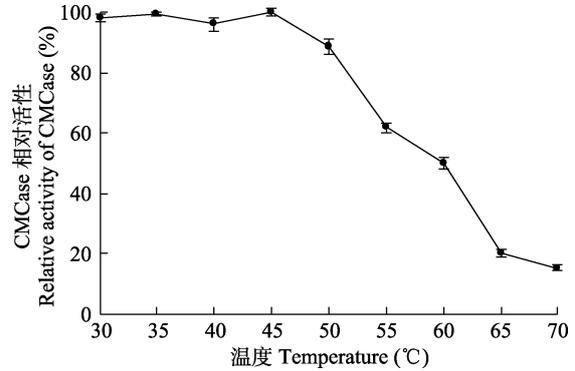


图 9 菌株 WJ-3 所产纤维素酶温度耐受性分析

Fig. 9 Temperature tolerance analysis of CMCase produced by strain WJ-3

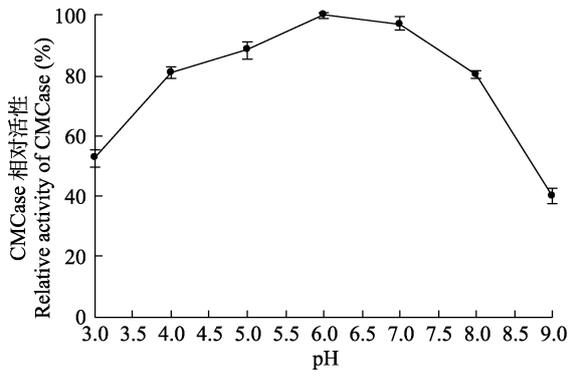


图 7 菌株 WJ-3 所产纤维素酶耐酸碱碱性分析

Fig. 7 Acid and alkaline resistance analysis of CMCase produced by strain WJ-3

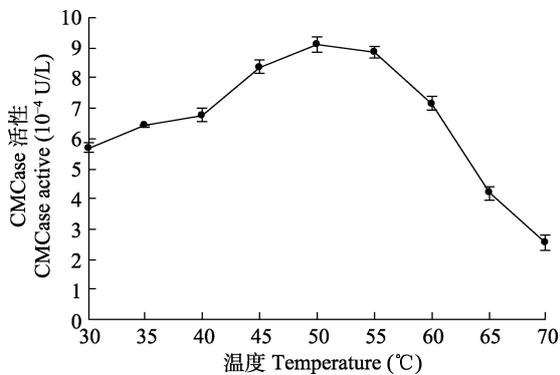


图 8 菌株 WJ-3 所产纤维素酶最佳反应温度

Fig. 8 Optimal reaction temperature of CMCase produced by strain WJ-3

### 3 讨论

#### 3.1 纤维素分解菌的分离与复筛

纤维素是大自然中存量丰富的可再生资源，纤维素是由 D-吡喃葡萄糖环通过  $\beta$ -1,4-糖苷键联结而成的大分子聚合物，由于其聚合度大，加之纤维素大分子之间氢键的形成，使其具有结晶性，通常难以对其进行分解利用，造成资源浪费（叶代勇等 2006）。目前对纤维素的主要处理方法包括化学处理法、物理处理法以及微生物降解法，相比之下微生物降解法具有高效、环保、廉价等优势，纤维素分解菌的研究对开发节粮型饲料、微生物菌剂、酶制剂等方面具有重要意义（王平 2010，孙玲红 2016）。目前从土壤、水体和动物消化道等自然环境中均有分离出纤维素分解菌的报道（孙玲红 2016，孙孟喜 2017，王霞等 2017）。

目前对于纤维素分解菌的初筛主要采用以纤维素为单一碳源的培养基对样品中的菌株进行分离，并配合刚果红染色法对菌株产酶能力进行判断。但本实验结果显示，刚果红染色法判断菌株产酶能力并不准确，在研究中虽然菌株 WJ-5 经刚果红染色后的  $D/d$  值大于 WJ-3，但是产酶活性却低于 WJ-3，因此想要准确判断菌株产酶能力，进行 CMCase 活性的测定是必不可少的。本研究分离出的菌株 *Bacillus aerius*

WJ-3 所产 CMCCase 在 37 °C 反应时活性为  $6.5 \times 10^{-4}$  U/L, 高于杨伟平 (2015) 分离出的藏猪源纤维素分解菌以及何静等 (2019) 分离出的骆驼源纤维素分解菌所产 CMCCase 在 40 °C 条件下利用分光光度法所测得的酶活性; 低于曹晓燕等 (2015) 报道的菌株在 40 °C 条件下测得的 CMCCase 活性的结果。但值得注意的是, 王光琴等 (2021)、李艳宾等 (2016) 分离出的纤维素分解菌产酶活性分别高达 0.314 39 U/L 和 0.069 1 U/L, 与本研究所分离菌株酶活性差异很大, 本研究分析认为, 纤维素酶活性不仅受到菌种类型、培养条件等因素的影响, 还与纤维素酶活性检测方法以及对酶活性单位的定义有关。杨伟平等 (2019) 认为, 目前测定纤维素酶的方法较多, 由于实验情况不尽相同, 研究者会选择适合于自己实验目的的测定方法。康纪婷等 (2010) 指出, 纤维素酶是多组分的复合酶系, 结构复杂, 学界目前对于纤维素酶各个组分的认识也尚未一致, 这些因素使得纤维素酶测定方法很难统一, 各研究结果难以比较, 因此亟待制定出一套标准化的纤维素酶测定方法。

### 3.2 *Bacillus aerius* WJ-3 酶学特性分析

纤维素酶由于来源不同, 酶组分也有较大的差异, 其最适反应 pH 以及对环境酸碱度的耐受性也不一样 (刘燕等 2007)。纤维素分解菌主要包括细菌、真菌、放线菌三大类, 其中纤维素分解细菌主要为芽孢杆菌属菌种 (宫秀杰等 2021)。Mawadza 等 (2000) 研究认为, 芽孢杆菌属产纤维素酶在较大的 pH 范围内具有一定的稳定性。本研究经测定菌株 *Bacillus aerius* WJ-3 所产纤维素酶在 pH 4~8 范围内均能保持 80% 以上的相对酶活性, 这也印证了上述观点。孙玲红 (2016) 和杨伟平等 (2014) 各自分离出一株解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 和一株枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 两菌株的纤维素酶分别在 pH 7 和 pH 5.5 时反应酶活性最高, 前者在 pH 5~8 后者在 pH 3~8 范围内能保持较高酶活性。本实验分离菌株 *Bacillus aerius* WJ-3 在 pH 6 时反应酶活性最佳, 在 pH

4~8 范围内酶活性较高, 结果介于上述二者之间, 这可能是因为分离出的菌株同属于芽孢杆菌属, 所以结果相似。

在纤维素酶与纤维素进行反应的过程中, 温度是影响酶活性的重要因素之一, 一般认为化学反应速率会随反应温度的上升而加快, 但纤维素酶本质是蛋白质, 过高的温度会使其失去活性, 抑制酶解反应的进行。经测定, 在反应温度 50 °C 时, 菌株 *Bacillus aerius* WJ-3 所产纤维素酶的活性最高, 该纤维素酶在 30~50 °C 范围内保存 30 min 后仍能保持较高的酶活性。研究认为, 纤维素酶的酶解反应具有一个最佳温度范围, 大部分在 40~60 °C 区间内 (康纪婷等 2010), 本研究结果也验证了其观点。Lee 等 (2008) 及王平等 (2010) 分别分离出的解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 所产纤维素酶的最佳反应温度均为 50 °C, 与本研究结果基本一致。高云航 (2014) 所分离出的椭圆葡萄孢菌 (*Botrytis elliptica*) 产 CMCCase 在 23 °C 反应时活性最高, CMCCase 最佳反应温度低于本研究结果。

综上所述, 菌株 *Bacillus aerius* WJ-3 产羧甲基纤维素酶活性较高, 耐酸碱性及热稳定性良好, 是具有一定利用价值的菌种资源。

### 参 考 文 献

- Bedford M R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 86(1/2): 1–13.
- Brownawell A M, Caers W, Gibson G R, et al. 2012. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. *Journal of Nutrition*, 142(5): 962–974.
- Kamra D N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89(1): 124–135.
- Lee Y J, Kim B K, Lee B H, et al. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99(2): 378–386.
- Mawadza C, Hatti-Kaul R, Zvauya R, et al. 2000. Purification and

- characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83(3): 177–187.
- Scarpellini M, Mora D, Colombo S, et al. 2002. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains. *Current Microbiology*, 45(1): 24.
- Zhang T X, Zhang M S, Shi M H, et al. 2021. Musk secretion in Muskrats (*Ondatra zibethicus* L.): association with lipid and cholesterol metabolism-related pathways. *Biocell*, 45(2): 281–306.
- 曹晓燕, 汪珊如, 徐雯, 等. 2015. 竹鼠肠道中厌氧纤维素降解菌的分离与鉴定. *动物营养学报*, 27(6): 1976–1982.
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 43–66.
- 高云航, 勾长龙, 王雨琼, 等. 2014. 1 株高效低温纤维素分解菌的分离鉴定及产酶条件优化. *中国兽医杂志*, 50(12): 77–79.
- 宫秀杰, 钱春荣, 于洋, 等. 2021. 近年纤维素降解菌株筛选研究进展. *纤维素科学与技术*, 29(2): 68–77.
- 何静, 李国伟, 海勒, 等. 2019. 双峰驼粪便中纤维素分解菌的筛选及酶学特性分析. *西北农业学报*, 28(11): 1750–1759.
- 华树芳, 佟煜人, 宋建华, 等. 1988. 家养麝鼠食性(植物部分)的初步观察. *动物学杂志*, 23(2): 23–26.
- 计成. 2008. *动物营养学*. 北京: 高等教育出版社, 54–64.
- 康纪婷, 吴翔, 甘炳成, 等. 2010. 纤维素酶活力测定方法. *河北农业科学*, 14(4): 151–153.
- 李臣光, 安培培, 王大涛, 等. 2020. 麝鼠香腺发育及腺细胞培养分离的初步研究. *兽类学报*, 40(2): 175–182.
- 李艳宾, 张琴, 滕立平, 等. 2016. 1 株拮抗棉花枯、黄萎病菌的纤维素分解菌筛选. *西北农业学报*, 25(11): 1730–1735.
- 刘燕, 张宏福, 孙哲. 2007. 纤维素酶的分子生物学与基因工程研究进展. *饲料工业*, 28(18): 11–14.
- 孙玲红. 2016. 鹅盲肠产纤维素酶细菌的分离鉴定及酶学性质研究. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文.
- 孙孟喜. 2017. 耐盐纤维素分解菌群的筛选及其餐厨垃圾乙醇发酵方式的研究. 广州: 华南农业大学硕士学位论文.
- 王成章. 2011. *饲料学*. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 18–19.
- 王光琴, 黄莺, 温明霞, 等. 2021. 5 株纤维菌属菌株的分离、鉴定及产酶活性研究. *中国农学通报*, 37(15): 112–119.
- 王平. 2010. 牛瘤胃中纤维素降解菌的分离鉴定及对玉米秸秆发酵效果的研究. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文.
- 王平, 王朋朋, 左瑞雨, 等. 2010. 牛瘤胃中米曲霉的分离鉴定及对玉米秸秆降解效果的研究. *河南农业大学学报*, 44(3): 295–299.
- 王霞, 华琳, 张海龙, 等. 2017. 纤维素降解菌 CMC-4 的分离鉴定、诱变和酶学特性研究. *土壤*, 49(5): 919–925.
- 杨伟平. 2015. 藏猪肠道细菌群落组成与纤维素分解菌的研究. 咸阳: 西北农林科技大学博士学位论文.
- 杨伟平, 丁雅倩, 马梦柯, 等. 2019. 动物粪便中纤维素分解菌的分离和鉴定. *家畜生态学报*, 40(2): 75–79.
- 杨伟平, 孟凡旭, 马丽, 等. 2014. 藏香猪源纤维素分解菌的分离鉴定及酶学特性分析. *动物营养学报*, 26(3): 620–629.
- 叶代勇, 黄洪, 傅和青, 等. 2006. 纤维素化学研究进展. *化工学报*, 57(8): 1782–1791.
- 赵喜印. 1995. 麝鼠的生活习性与行为特点. *贵州畜牧兽医*, 19(3): 41–42.
- 中华人民共和国农业农村部. 2020. NY/T 912-2020 饲料添加剂纤维素酶活力的测定分光光度法. 北京: 中国农业出版社.
- 朱靖, 严志堂. 1965. 麝鼠的食性和食物基地. *动物学报*, 17(4): 352–363.
- 朱旭芬. 2010. *现代微生物学实验技术*. 浙江: 浙江大学出版社, 32–47.