

红树林生境产嗜热纤维素酶芽孢杆菌的筛选及其活性分析

胡茵^{1,2}, 孙晓晖², 杨森森¹, 唐旭², 徐长安^{2*}, 贾若琨^{1*}

(1. 东北电力大学化学工程学院, 吉林 吉林 132000; 2. 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:本研究从红树林沉积物样品中筛选获得一株具有较高纤维素酶活性的菌株 ms-2, 通过革兰氏染色、生理生化试验, 以及 16S rDNA 基因片段比对鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ms-2。对其产酶性质进行研究表明该菌株所产纤维素酶为胞外酶而非膜锚定酶, 该酶具有良好的嗜热性, 且在弱酸条件下酶活性较高, 最适宜温度和 pH 分别为 65 °C 和 6.0, 在此条件下最高酶活性为 0.655 7 U/cm³; 另外, 在浓度为 1 mmol/dm³ Cu²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺ 和 Mn²⁺ 条件下, Cu²⁺ 对酶活性无显著影响, Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺ 和 Mn²⁺ 对酶活性均有不同程度的抑制作用, 其中 Mn²⁺ 的抑制最为明显, 酶活性下降了 29.96%。由于产业应用中酶解纤维素时通常需要在 55~60 °C 的温度下进行, 研究获得的嗜热纤维素酶不仅适合这样的温度环境, 还能维持较高的酶活性水平, 并且对 Cu²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺ 较不敏感, 有利于产业开发应用。

关键词:海洋生物学; 筛选; 鉴定; 枯草芽孢杆菌; 纤维素酶; 嗜热

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2020. 03. 006

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2020)03-0352-07

我国拥有丰富的纤维素资源, 但大部分的纤维素资源还未被有效的利用, 如果能够利用合理的手段将大部分纤维素资源开发与转化, 将会在一定程度上解决能源问题^[1-2]。据报道, 木质纤维素生物质开发第二代生物乙醇具有许多优点, 生物乙醇对于替代传统石油化工产品存在巨大潜力^[3-4]。有研究表明, 纤维素酶降解生物质纤维的过程中包括 3 种酶的共同催化作用, 多种酶通过切割纤维素中的 β -1, 4-葡萄糖苷键, 最终将生物质纤维分解成可发酵的单糖^[5]。纤维素酶在洗涤、造纸、医药等众多领域有广泛应用^[6-7], 未来随着生物燃料的商业化生产, 酶的需求量将大大增加^[8]。目前, 产业化生产用的纤维素酶主要来源于微生物, 真菌作为纤维素酶的主要来源, 具有产量高、活性高、易于分离和提取等优势^[9]; 与之相比, 细菌由于其生长周期短, 具有产酶速度快等优点, 且细菌来源的纤维素酶比

真菌来源的纤维素酶更为稳定, 以中性或者酸性为主^[10-11], 被认为是产业化生产纤维素酶的主要菌^[7,9]。如芽孢杆菌 (*Bacillus*) 作为水产微生态制剂的常用菌, 在养殖池底泥中更易形成优势菌群, 且能分泌多种酶类降解水环境中污染物, 净化水质。

红树林由于其特殊的地理位置, 有规律地受到海水浸泡和露空, 随着大量的植物残体和落叶的堆积, 不断地为微生物提供纤维素等物质^[12], 因此, 从红树林生境获得产纤维素酶菌株具有广泛的研究前景。本研究以红树林沉积物样品为实验材料, 采用羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 水解圈法筛选具有纤维素酶活性的芽孢杆菌, 旨在为纤维素酶微生态制剂的开发和相关应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及培养基

本研究细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海赛

收稿日期: 2019-04-29

基金项目: 海洋公益性行业科研专项资助项目 (201405038); 中国 APEC 基金资助项目 (OFWG032018S); “十三五”厦门市海洋经济创新发展示范资助项目 (16CZP016SF13, 16CZP017SF06); 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费资助项目 (海三科 2017027)

作者简介: 胡茵 (1994—), 女, 硕士研究生; E-mail: hurui@tio.org.cn

* 通讯作者: 贾若琨 (1983—), 男, 博士, 教授; E-mail: 19718026@qq.com; 徐长安 (1962—), 男, 硕士, 教授级高级工程师; E-mail: xuchangan@tio.org.cn

百盛基因技术有限公司;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生化鉴定试剂盒购自山东拓普生物工程有限公司;胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)购自生工生物工程股份有限公司;葡萄糖(分析纯)购自西陇化工股份有限公司;CMC-Na购自国药集团化学试剂有限公司;刚果红购自西陇科学股份有限公司;三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液(Tris-HCl)购自索来宝科技有限公司,DNS 试剂、Mcllvaine 缓冲溶液购自厦门市绿茵试剂玻仪有限公司。

产纤维素酶培养基:CMC-Na 10 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 琼脂 17 g, H₂O 1 000 cm³, pH = 7.0。

LB 培养基:Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g, NaCl 10 g, H₂O 1 000 cm³, pH 为 7.2 ~ 7.4(固体 LB 培养基中添加琼脂 15 g)。

1.2 主要仪器

实验主要仪器包括超净工作台 SW-CJ-1FD(苏州净化有限公司)、生化培养箱(宁波莱福科技有限公司)、多功能酶标仪 SpectraMax M5(美国美谷分子有限公司)、灭菌锅 GR85DF(美国致微仪器有限公司)、pH 计 BP-10(德国赛多利斯集团)、显微镜 DM750(德国莱卡仪器有限公司)、透射电子显微镜 JEM-1230(日本电子株式会社)。

1.3 样品的采集及预处理

本实验样品采自中国福建漳州红树林生态保护区(24°12' ~ 25°44'N, 116°50' ~ 118°02'E)的底泥沉积物和动植物,取 6 份不同样品各称取约 0.5 g 溶于体积分数为 0.9% 的 5 cm³ 无菌生理盐水中,经 80 °C 水浴 10 min 后按照梯度稀释并涂布于 LB 培养基,挑取单菌落进行划线分离培养。

1.4 实验方法

1.4.1 产纤维素酶菌株初筛 待筛菌株接种于 LB 培养基,在 37 °C、180 r/min 下培养 12 h 备用;在产纤维素酶培养基平板中心打出 8 mm 直径的小孔,加入 50 mm³ 菌液,正置于 37 °C 生化培养箱中培养 1 ~ 2 d,至菌体生长蔓延到孔外;在长出菌体的平板上滴加 1 mg/cm³ 刚果红溶液至覆盖满整个平板,10 min 后,倾去刚果红溶液,加入 4 mol/dm³ 的 NaCl 溶液,10 min 后倾去 NaCl 溶液,菌体周围出现的透明圈即为纤维素酶水解圈。

1.4.2 菌株复筛及酶活性测定方法 初筛水解圈较大的菌株接种于 LB 培养基,于 37 °C、180 r/min 下活化过夜,后按体积分数 5% 接种量接种于 100 cm³ LB 培养基中发酵 24 h 后离心(10 000 r/min, 6

min),离心所得上清液即为粗酶液,于 4 °C 下保存备用。

纤维素酶活性测定参照文献[13-15]的测定方法,在 10 cm³ 刻度试管中加入稀释酶液 0.2 cm³(3 支平行样),再各吸取 0.8 cm³ 体积分数为 1% 的 CMC-Na 溶液(pH = 5.0),摇匀,于 40 °C 条件下水浴 10 min,取出冷却至室温,加入 1.5 cm³ DNS 试剂,迅速混匀后于沸水浴中反应 10 min,冷却后,加去离子水定容至 10 cm³,轻轻上下摇匀,另取 0.2 cm³ 稀释酶液和 0.8 cm³ 0.1 mol/dm³ Mcllvaine 缓冲溶液作为空白,不加 CMC-Na 溶液,同样按照上述步骤,用空白调零点,于 554 nm 下测其吸光度。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 菌株的初步鉴定 观察待鉴定菌株所形成的菌落特征及革兰氏染色前后显微镜下的菌体形态,并进行菌株的理化性质分析^[16]。

1.5.2 16S rDNA 基因序列分析及鉴定 提取筛选菌株基因组 DNA,以 16S rDNA 基因保守序列 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 为引物进行 PCR 扩增,并对筛选的菌株进行鉴定^[17]。将测得的菌株 16S rDNA 基因序列在 GenBank 数据库中进行比对分析,并利用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

1.6 菌株产酶性质研究

吸取 10 cm³ 菌液于离心管中,在 4 °C、10 000 r/min 转速条件下离心 10 min,分别对菌液、上清液及 10 cm³ 50 mmol/dm³ Tris-HCl(pH = 7.0)缓冲液中的重悬菌株于 500 W 下超声破碎 25 min,分别测定各组分的纤维素酶活性。

1.7 不同条件下粗酶液酶活性的测定

1.7.1 最适温度测定 酶活性单位(U)定义:即在下列酶反应条件下每分钟由底物产生 1 μmol 还原糖的酶量作为 1 个酶活单位 U。将粗酶液与 1% 的 CMC-Na 溶液(pH = 5.0)以 1:4 的体积比混合,分别于不同温度(30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85 °C)条件下进行反应并测定纤维素酶活性,得出酶促反应的最适温度。

1.7.2 最适 pH 测定 将粗酶液与 1% 不同 pH 的 CMC-Na 溶液(pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)以 1:4 的体积比混合,并于最适温度下测定纤维素酶活性,得出酶促反应的最适 pH。

1.7.3 金属离子对酶活性影响的测定 分别添加 100 mm³ 10 mmol/dm³ 的 Mn²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 和 Cu²⁺ 于反应液中,并于最适温度和 pH 下测定纤维素酶活性。

2 结果与讨论

2.1 芽孢杆菌属菌株产纤维素酶情况分析

根据菌株分离结果,共获得 52 株芽孢杆菌属菌株。通过产纤维素酶平板测试,根据水解圈大小(直径)对产纤维素酶菌株进行初筛,其中水解圈大于 30 mm 有 4 株,水解圈介于 20 ~ 30 mm 有 15 株,水解圈小于 20 mm 有 8 株,无水解圈有 25 株,不同菌株产酶情况如图 1 所示。

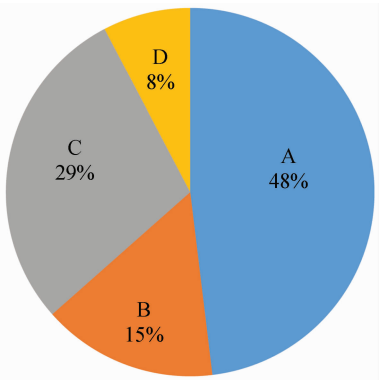


图 1 红树林样品中芽孢杆菌属不同菌株产酶情况
Fig. 1 Cellulase production of *Bacillus* strains from mangrove samples
图中百分数为不同产酶情况菌株数目占总菌株数目的比例;
A 表示无水解圈,B 表示水解圈直径 <20 mm,C 表示水解圈直径为 20 ~ 30 mm,D 表示水解圈直径 >30 mm。

2.2 纤维素酶活性复筛

根据水解圈大小及菌株的生长状况选择 4 株菌株,分别进行摇瓶复筛并测定粗酶液酶活性,相应结果见表 1。其中编号为 ms-2 的菌株在此条件下生长较快,水解圈直径大小为 26.776 mm(图 2),因而选用此菌株作进一步的研究。

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 菌株的初步鉴定 将菌株 ms-2 划线于 TSA(枯草芽孢杆菌生化鉴定试剂盒自带)平板上,于 37 ℃ 培养 18 ~ 24 h 后发现菌落呈浅褐色、不规则、扁平、干燥有褶皱形态。透射电镜显示菌体为直状或近直状的杆菌,长 2.38 ~ 4.19 μm,粗 0.7 ~ 0.9 μm,多为两个或两个以上菌体链状连接,如图 3(a、b)所示;革兰氏涂片染色结果呈阳性,菌体两端钝圆且呈杆状,单个或少量链状存在;有芽孢,芽孢端生或中生[图 3(c)];菌株 ms-2 的生化特征见表 2。

表 1 纤维素酶活性复筛分析
Tab. 1 Rescreening analysis of cellulase activity

菌株	酶活性/(U · cm ⁻³)
ms-2	0.221 0
ms-7	0.155 9
ms-9	0.239 2
ms-29	0.156 1



图 2 菌株 ms-2 纤维素酶水解圈
Fig. 2 Picture of cellulase hydrolysis rings by ms-2 strain

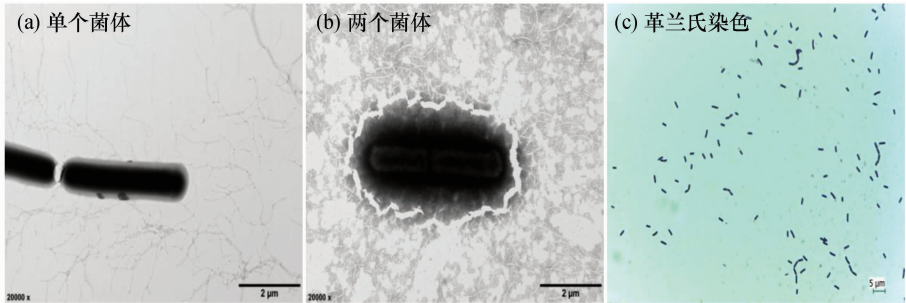


图 3 菌株 ms-2 透射电子显微镜图像与革兰氏染色鉴定结果
Fig. 3 Identification of ms-2 strain by transmission electron microscope and Gram staining
图(a、b)左下角数据为透射电子显微镜图片自带放大倍数,图(c)是普通电子显微镜,不带放大倍数。

2.3.2 16S rDNA 基因序列分析及鉴定 16S rDNA 基因比对结果表明,该基因片段与多株枯草芽孢杆

菌相似性达 99%(图 4),综合上述的菌株理化分析结果,鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌,将本研究筛选的

菌株 ms-2 命名为枯草芽孢杆菌 ms-2。

表 2 菌株 ms-2 生理生化性质鉴定分析

实验类型	ms-2	CMCC(B)63501
触酶试验	+	+
甘露醇	+	+
阿拉伯糖	+	+
V-P	+	+
硝酸盐还原	+	+
精氨酸	-	-

注:“CMCC(B)63501”为枯草芽孢杆菌标准菌株编号;“+”表示可利用该物质或有相应特征,“-”表示不可利用该物质或无相应特征。

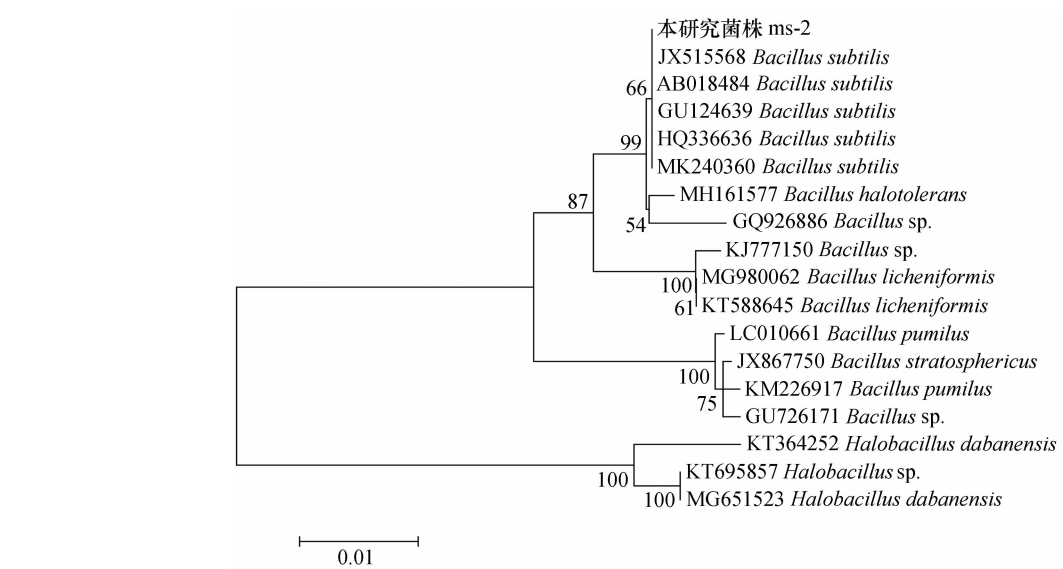


图 4 基于 16S rDNA 构建的菌株 ms-2 系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of ms-2 strain based on 16S rDNA

2.4 菌株产酶性质分析

取细菌菌液、发酵上清液和细胞裂解液,分别检测各组分的纤维素酶活性。如图 5 所示,菌液和发酵上清液中的纤维素酶活性无显著差异,细胞裂解液几乎无活性。结果表明该菌株所产纤维素酶为胞外酶而非膜锚定酶;细胞显示的微弱活性,可能来自于胞内翻译完成但尚未完成转运过程的纤维素酶前体物质。

2.5 粗酶液酶学性质分析

2.5.1 温度对酶活性的影响 如图 6 所示,粗酶液的活性随着温度升高呈稳定提高的趋势,并于 65 ℃ 时到达最高;而后随着温度升高而降低,当温度达到 75 ℃ 时,仍保留 60% 的活性;此后,随着温度上升,酶活性迅速下降,当温度到达 85 ℃ 时,酶活性下降到 27%。结果表明该酶最适宜温度为 65 ℃,具备

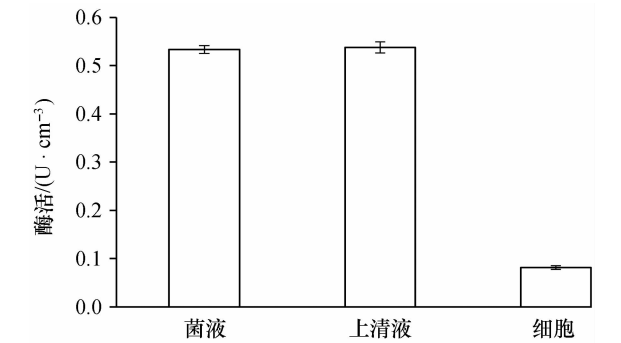


图 5 菌液、细胞和上清液纤维素酶活性检测结果
Fig. 5 Results of cellulase activity in bacterium liquid, supernatant and cell pellet

一定的热稳定性,属于嗜热酶。
2.5.2 pH 对酶活性的影响 在最适温度 65 ℃ 下, pH 对粗酶液酶活性的影响如图 7 所示,酶活性随着

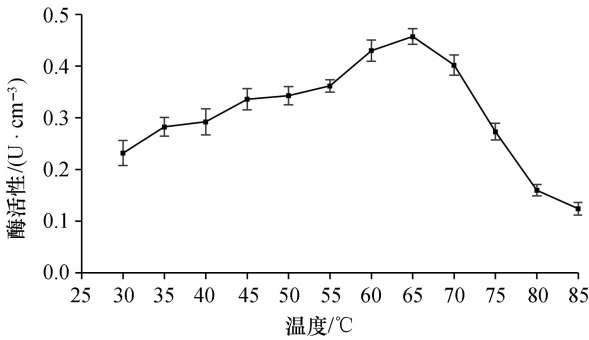


图6 酶活性随温度的变化结果

Fig. 6 Changes of enzyme activity with temperature

pH 的上升而逐渐上升,于 6.0 时达到最大值,而后随着 pH 的上升而逐渐下降,最适 pH 为 6.0 左右。pH 对酶活性的影响结果表明,pH 介于 5.0~7.0 之间酶活性达到最大酶活性的 84% 以上;在 pH=3.0 时,酶活性达到最大酶活性的 16% 以上。表明该菌株 ms-2 所产纤维素酶为弱酸性酶。在最适温度和 pH 条件下,该菌株所产纤维素酶的最高酶活性为 0.655 7 U/cm³。

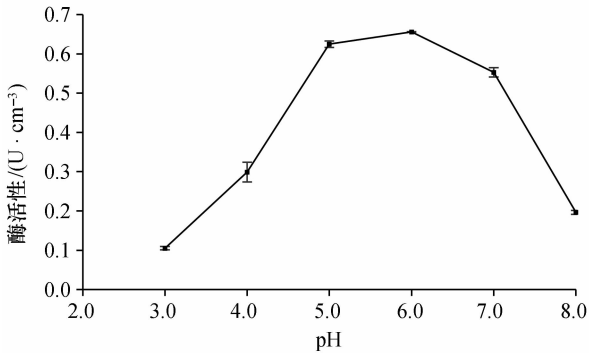


图7 酶活性随 pH 的变化结果

Fig. 7 Changes of enzyme activity with pH

2.5.3 金属离子对酶活性的影响 如图 8 所示,在浓度分别为 1 mmol/dm³ Cu²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺ 和 Mn²⁺ 的胁迫下,Cu²⁺ 对酶促反应无显著影响,Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺ 和 Mn²⁺ 对酶促反应均有不同程度的抑制作用,酶活性分别下降 2.84%、5.75%、9.49% 和 29.96%,其中 Mn²⁺ 对酶活性的抑制效果最为明显。

2.6 讨论

红树林是分布于热带和亚热带位于陆地和海洋交界的滩涂地带,是陆地向海洋过渡的特殊生态系统^[18],由于红树林落叶等木质纤维素的沉积,产纤维素酶微生物也是该区的重要生物组成部分^[19-21]。本研究通过对 52 株来源于红树林沉积物样品的芽孢杆菌属菌株进行产纤维素酶平板测试,结果表明,产纤维素酶的菌株共有 27 株,25 株无纤维素酶活

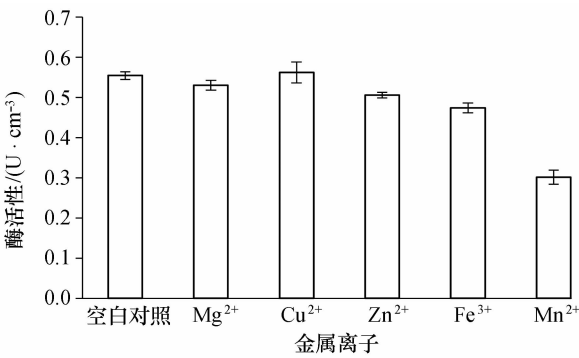


图8 金属离子对纤维素酶活性的影响

Fig. 8 Impact of metal ions on the cellulase

性;另外,通过产蛋白酶平板测试,发现这 27 株既有纤维素酶活性也有蛋白酶活性,另外 25 株中 23 株有蛋白酶活性,2 株既没有蛋白酶活性也没有纤维素酶活性,它们通过多种功能协同作用,共同形成细菌群落并完成功能分工。因此,从红树林生境获得产纤维素酶菌株具有广泛的研究前景。

真菌、细菌和放线菌为常见的产纤维素酶微生物,其中,由于芽孢的存在,具有芽孢的细菌在耐酸、耐碱、耐高温等方面有独特的优势,因此成为目前研究产纤维素酶微生物的一个重要方向。如芽孢杆菌作为水产养殖业常用菌种,其可以直接应用于养殖水体或添加到饲料中使用,具有耐酸、耐盐和耐高温等特性,特别是水产颗粒料加工时对菌体无显著影响,因此,芽孢杆菌在这方面具有明显的优势。不同菌株所产生的纤维素酶也有一定的差异性,Irfan 等(2017)通过对嗜热菌株枯草芽孢杆菌 K-18 产纤维素酶条件进行分析,初步确定了该酶的最适温度为 50 °C,最适 pH 为 7.0^[22];张耿峻等(2017)从嗜热菌资源丰富的温泉区土壤中筛选出一株具有纤维素酶活性的嗜热地芽孢杆菌 (*Geobacillus* sp.) HTA426,通过对该菌株产酶能力进行分析,其酶活性在温度为 60 °C 和 pH 为 7.0 条件下达到最高^[23];Li 等(2008)通过对温泉中分离得到耐热产纤维素酶的枯草芽孢杆菌产酶条件分析,发现该菌株产酶最适反应温度为 50 °C,此时酶活性为 0.26 U/cm³^[24]。目前,产嗜热纤维素酶菌株大多来源于温泉、活火山口附近等环境^[25];此外,红树林生境筛选出纤维素酶活性较高的菌株还是以真菌为主^[26-27],且绝大多数细菌产的纤维素酶最适反应温度在 55 °C 左右^[28]。本研究从红树林生境筛选出的枯草芽孢杆菌 ms-2 最适宜温度为 65 °C,与其他报道的研究成果相比^[28-29],该酶具有良好的嗜热性,且兼具较高的酶活性。由于产业应用中酶解纤维素

时通常需要在 55 ~ 60 °C 的温度下进行,研究获得的嗜热纤维素酶不仅适合这样的温度环境,还能在酶活性上维持较高的水平,有利于产业开发应用。

对纤维素酶基因的克隆始于 20 世纪 70 年代,目前为止大量纤维素酶基因已被克隆出来,并采取一系列技术手段来提高纤维素酶的活性和产量^[30]。研究表明,纤维素酶基因序列具有种属相似性^[31]。基于此,我们将在后续工作中进一步对枯草芽孢杆菌 ms-2 进行纤维素酶基因克隆和重组表达,用于产业化生产与应用。

参考文献:

- [1] 沈葵忠, 房桂干, 林艳. 中国竹材制浆造纸及高值化加工利用现状及展望[J]. 世界林业研究, 2018, 31(3): 68-73.
- [2] 马泽林, 刘家亨, 黄序, 等. 微生物利用木质纤维素的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(6): 124-133.
- [3] MENON V, RAO M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38(4): 522-550.
- [4] YU H, GUO J, CHEN Y, et al. Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *spathaspora passalidarum* U1-58[J]. Bioresource Technology, 2017, 232: 168-175.
- [5] ZHANG Y H P, HIMMEL M E, MIELENZ J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 452-481.
- [6] DEKA D, BHARGAVI P, SHARMA A, et al. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates[J]. Enzyme Research, 2011, doi: 10.4061/2011/151656.
- [7] 刘杰凤, 薛栋升, 姚善泾. 海洋微生物纤维素酶的研究进展及其应用[J]. 生物技术通报, 2011(11): 41-47.
- [8] LI W Y, ANG T N, NGOH G C, et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production[J]. Biomass & Bioenergy, 2014, 67(5): 319-338.
- [9] CAMASSOLA M, BITTENCOURT L R D, SHENEM N T, et al. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*[J]. Biocatalysis, 2009, 22(5/6): 391-396.
- [10] NAGENDRAN S, HALLEN-ADAM H E, PAPER J M, et al. Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(5): 427-435.
- [11] PAUDEL Y P, QIN W. Characterization of novel cellulase-producing bacteria isolated from rotting wood samples[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(5): 1 186-1 198.
- [12] HOLGUIN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(4): 265-278.
- [13] LO Y C, SARATALE G D, CHEN W M. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(6): 417-425.
- [14] WANG J, DING M, LI Y H, et al. A monovalent anion affected multi-functional cellulase EGX from the mollusca, *Ampullaria crosseana*[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 31(1): 108-114.
- [15] 赵凯, 许鹏举, 顾广烨. 3,5 - 二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
- [16] MOALEDJ K. Comparison of gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy[J]. Journal of Microbiological Methods, 1986, 5(5): 303-310.
- [17] WEBSTER G, NEWBERRY C J, FRY J C, et al. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(1): 155-164.
- [18] 高亚芹, 袁东星, 卢冰艳, 等. 九龙江河口红树林区柱状沉积物中汞的时空变化研究[J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(1): 58-64.
- [19] 赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. 海洋学报, 2018, 40(8): 138-151.
- [20] THATOI H, BEHERA B C, MISHRA R R, et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove

3 结论

本研究通过筛选得到一株具有较高纤维素酶活性的枯草芽孢杆菌 ms-2, 并对其粗酶液进行分析, 结果显示最适宜温度和 pH 分别为 65 °C 和 6.0, 在此条件下最高酶活性为 0.655 7 U/cm³, 此外, 该酶对 Cu²⁺ 稳定, Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺ 和 Mn²⁺ 等金属离子对该酶具有抑制作用。综上所述, 该菌所产纤维素酶为嗜热的弱酸性胞外酶, 因而具有良好的应用潜力。

- ecosystems: a review[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(1): 1-19.
- [21] CASTRO R, QUECINE M, LACAVALA P, et al. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem[J]. *Springerplus*, 2014, 3(1): 1-9.
- [22] IRFAN M, MUSHTAQ Q, TABSSUM F, et al. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 1-9.
- [23] 张耿峻, 韩业钜, 陈细妹, 等. 产纤维素酶嗜热地芽孢杆菌 HTA426 的筛选鉴定、酶学性质分析及其应用[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(4): 1 444-1 453.
- [24] LI W, ZHANG W W, YANG M M, et al. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Biotechnology*, 2008, 40(2): 195-201.
- [25] 彭静静. 耐热纤维素酶的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(1): 336-338.
- [26] 高兆明. 红树林纤维素降解菌和菌群及其相关酶类的研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [27] 曾思泉, 凌娟, 林丽云, 等. 1 株红树林来源枝孢属真菌的分离鉴定及纤维素酶性质分析[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(2): 43-48.
- [28] 杨智源, 陈荣忠. 短小芽孢杆菌葡聚糖内切酶基因的克隆及序列测定[J]. *微生物学报*, 2001, 41(1): 74-81.
- [29] 马军, 王耀嵘, 侯萍, 等. 一株源于红树林根际土壤产纤维素酶芽孢杆菌的鉴定及其酶学性质分析[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(5): 997-1 004.
- [30] PANDEY S, GULATI S, GOYAL E, et al. Construction and screening of metagenomic library derived from soil for β -1, 4-endoglucanase gene[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 5: 186-192.
- [31] PANDEY S, KUSHWAH J, TIWARI R, et al. Cloning and expression of β -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(9/10): 693-698.

Screening and activity analysis of thermophilic cellulase-producing *Bacillus* sp. from mangrove sediments

HU Rui^{1,2}, SUN Xiao-hui², YANG Miao-sen¹, TANG Xu², XU Chang-an^{2*}, JIA Ruo-kun^{1*}

(1. School of Chemical Engineering, Northeast Electric Power University, Jilin 132000, China;

2. Third Institute of Oceanography, MNR, Xiamen 361005, China)

Abstract: In this study, the ms-2 strain with high cellulase activity was screened and identified from mangrove sediments samples. It is identified as a strain of *Bacillus subtilis* according to its morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequencing result. The study on the enzyme producing properties found that the cellulase produced by the ms-2 strain was extracellular enzyme rather than membrane anchored enzyme. The enzyme presented good thermophilic activity and high activity in weak acid condition and produced the highest activity of 0.655 7 U/cm³ under the optimal conditions of 65 °C and pH 6.0. In addition, the enzyme activity showed no significant difference in 1 mmol/dm³ Cu²⁺, and significant inhibition in 1 mmol/dm³ Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ and Mn²⁺, respectively. The enzyme activity was inhibited by 29.96% by Mn²⁺ while it showed more and less inhibition by Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Fe³⁺, respectively. Enzymatic hydrolysis of cellulase in industrial applications usually needs to be carried out at 55–60 °C. Thermophilic cellulase obtained not only is suitable in such temperature environment, but also can maintain a high level of enzyme activity. Moreover, the feature of less sensitive to Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Fe³⁺ is favorable for the potential industrial application.

Key words: marine biology; screening; identification; *Bacillus subtilis*; cellulase; thermophilic

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2020. 03. 006