

热泉土壤来源的纤维素降解菌的分离与初步鉴定

王旭, 王志, 蔡梦宇, 周育*

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 通过富集培养方法, 从 5 份热泉土壤中筛选得到 6 株具有羧甲基纤维素 (CMC) 降解活性的菌株。采用原核生物保守 16S rRNA 核糖体基因序列分析, 发现它们分别隶属于假单胞菌属、芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属。在此基础上, 对 6 株纤维素降解菌的生长温度、pH 值、抗生素敏感性、盐离子耐受性以及羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活力做了初步研究。结果表明, 芽孢杆菌属的菌株 WP-6 和 WP-3 的 CMCase 活力最强, 胞内酶活力最高达 $72.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 假单胞菌株 WP-2 的 CMCase 活力最弱, 胞内外酶活力均小于 $5.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。生理学结果显示, 6 个降解菌株都具有嗜热特点及不同程度的耐盐特性, 给后续高温及盐离子耐受性纤维素酶开发提供了较好的材料。

关键词: 降解菌; 羧甲基纤维素酶; 富集; 分离; 酶活力

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)03-0482-05

Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria from the hot spring soil

WANG Xu, WANG Zhi, CAI Mengyu, ZHOU Yu

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Six cellulose-degrading bacterial strains were isolated and identified from five hot spring soils by the enrichment and culture-dependent method. Six isolates were identified by analyzing the 16S rRNA gene sequence, and the isolates were allocated to three genera of *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. Moreover, the growth temperature, pH value, NaCl tolerance, antibiotic susceptibility and CMCase activity of the six isolates were determined and compared. The results showed that *Bacillus* spp. WP-3 and WP-6 displayed the highest CMCase, and *Pseudomonas* sp. WP-2 displayed the lowest CMCase to carboxy methyl cellulose (CMC) among the tested strains. The highest CMCase activity was $72.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, which was obtained from intracellular of strain WP-6, and the lowest CMCase activity was about $5.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, which was observed from strain WP-2. Physiological investigation indicated that the six strains were thermophilic and halotolerant, and the characteristics were interesting to further application studies.

Key words: degrading bacteria; CMCase; enrichment; isolation; identification

纤维素酶是一类能够降解木质纤维素或半纤维素酶系的总称, 包括多组分的复合生物催化剂, 主要由 β -1,4-葡聚糖外切酶 [EC.3.2.1.91]、 β -1,4-葡聚糖内切酶 [EC.3.2.1.4] 和 β -葡萄糖苷酶 [EC.3.2.1.21] 组成^[1-2]。自 20 世纪 80 年代以来, 因生物化学及生物技术兴起, 纤维素酶的研究得以快速发展。植物利用二氧化碳, 通过光合作用产生的木质纤维是地球上最丰富、最廉价的再生资源。作为粮食

生产过程中产生的副产物, 中国每年秸秆产量约为 $6 \times 10^8 \sim 7 \times 10^8 \text{ t}$ 之多^[3]。传统农业对于秸秆的处理方式主要是喂养牲畜、焚烧和沤肥等, 部分发达地区开始采用秸秆和牲畜粪便进行沼气发酵。这些处理方式存在利用率低、污染环境以及存在安全隐患等问题, 特别是秸秆在田间就地焚烧, 不仅浪费资源, 而且增大二氧化碳的排放量, 加剧全球温室效应, 在我国大部分地区已经明令禁止秸秆就地焚烧

收稿日期: 2016-07-26

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1608085QC57) 和安徽省杰出青年基金 (1608085J08) 共同资助。

作者简介: 王旭, 实验员。E-mail: wangxu@ahau.edu.cn

* 通信作者: 周育, 博士, 教授。E-mail: microbes@ahau.edu.cn

处理^[3-5]。

目前, 纤维素酶应用领域主要集中于可再生能源生产、提高养殖业饲料转化率和中药材活性成分提取率等。在清洁能源领域, 随着化石燃料日益消耗, 世界各国开始以生物质为原材料, 使用纤维素酶或纤维素降解工程菌株进行乙醇等生物质燃料工业化生产, 这被认为是解决化石燃料短缺的重要途径之一^[4-6]。养殖业中, 畜禽饲料中含有大量的纤维素, 除某些反刍动物具有分解纤维素能力外, 大部分畜禽不具此能力。纤维素酶已成为畜牧业中的新型饲料添加剂, 能够分解结构复杂的纤维素, 生成易消化单糖或寡糖, 摧毁植物细胞壁释放内容物, 便于动物消化吸收。此外, 作为添加剂, 纤维素酶在水产养殖领域也有很好的应用^[7]。在中药提取工艺中, 添加纤维素酶提取中药有效成分, 可以缩短提取时间、提高提取率和降低工业成本等。大量研究表明, 纤维素酶在山楂、银杏叶、竹叶和葛根的总黄酮提取, 在黄连和黄柏小檗碱的提取, 以及在香菇蛋白及灵芝多糖的提取过程中, 均显示出很好的应用潜力。此外, 纤维素酶在食品工业、造纸业和纺织业中也具有很大的应用潜力^[8-10]。

本研究选取我国东南沿海地区热泉底部土壤为实验材料, 建立有效的高温纤维素降解菌株富集与分离方法, 筛选具有纤维素降解活性的耐热微生物资源, 为后期的耐高温纤维素酶开发利用, 积累重要的生物资源。耐高温纤维素酶的研究与开发, 对纤维素酶在工业生产中的应用具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

土壤样品采集于福建省多个地区的热泉底部淤泥, 采集地及温泉水温等信息见表 1, 热泉的温度范围 65~90℃。土壤采集存放于无菌取样袋中, 低温冰包运回实验室, 在 48 h 内完成细菌富集分离。

1.2 试剂与仪器

主要试剂: 进口酵母粉和胰蛋白胨为 OXOID 公司产品, 羧甲基纤维素 (CMC), 琼脂粉及刚果红购自北京鼎国生物技术有限公司。其他常规化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司, 均为国产分析纯。PCR 所用 *rTaq* 聚合酶系大连宝生物 (Takara LTD.) 公司产品。

主要仪器设备: PCR 扩增仪 (Bio-Rad), 水平电泳仪 (北京六一), 凝胶成像仪 (Bio-Rad), 高速冷冻离心机 (Eppendorf), 超声波细胞破碎仪 (Biosafar 650-92), 恒温培养箱 (凯航, HGP-400)。

分光光度计 (岛津, UVmini-1240), 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博讯), 分析天平 (北京赛多利斯, BS 224s), 恒温摇床 (上海智诚), 数显鼓风干燥箱 (上海博讯)。

表 1 土壤样品采集信息

样品编号	采集地	地理位置	水温/℃
Sample code	Sampling site	Geographical position	Water temperature
S1	福建福州市郊	26°13'N, 119°24'E	75
S2	福建福州市郊	26°15'N, 119°24'E	66
S3	福建清流县	26°04'N, 119°18'E	85
S4	福建清流县	25°27'N, 113°55'E	65
S5	福建厦门沧海区	24°33'N, 117°56'E	90
S6	福建厦门沧海区	24°33'N, 117°55'E	85

1.3 方法

1.3.1 高温纤维素降解菌分离 准确称取 5.0 g 热泉底部土壤和 1.0 g Whatman 滤纸片, 加入 100 mL 无菌水中, 置于 55℃ 温度和 150 r·min⁻¹ 转速的摇床中震荡培养 18 h, 富集高温纤维素降解菌。富集培养结束后, 将上述悬浊液适当稀释, 涂布于含有 5 g·L⁻¹ CMC 的 LB 平板上, 倒置于 55℃ 恒温培养箱中培养 48 h, 将培养后的琼脂平板用 5 g·L⁻¹ 刚果红染色液染色, 浸泡 30 min 后, 于 1 mol·L⁻¹ 浓度的 NaCl 溶液中脱色 30 min。菌落周围出现透明水解圈的初定为 CMCCase 阳性菌株。稳定传代 3 次后仍有活性的菌株判定其为高温纤维素降解菌。

1.3.2 降解菌种 16S rRNA 基因克隆及系统发育学分析 采用 16S rRNA 基因克隆的通用引物 16SF: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3' 和 16SR: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 进行降解菌株 16S rDNA 序列扩增^[11]。PCR 体系参照 TAKARA 公司的 *rTaq* 酶说明书进行。PCR 反应体系 (50 μL) 为: 10× PCR buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL, 引物 16SF (20 μmol·L⁻¹) 1 μL, 引物 16SR (20 μmol·L⁻¹) 1 μL, TaKaRa *rTaq* (5 U·μL⁻¹) 0.25 μL, 模板 DNA 0.25 ng, 灭菌水 38.5 μL。PCR 扩增条件为 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 70 s, 循环次数为 30 次; 72℃ 终延伸 10 min。扩增产物采用 DNA 胶回收试剂盒 (Promega) 进行回收, 委托上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

将获得的序列在 EzBioCloud 数据库中进行比对, 选取代表性的相近序列采用 CLUSTAL_X 软件进行多重比对^[12], 将生成的 aln 比对文件应用 MEGA 5.0 软件构建邻位连接法系统发育树^[13], 系

统发育树的遗传距离采用 Kimura-2 参数模型进行计算,系统发育树重复抽样计算次数为 1 000 次^[14]。通过以上的数据库比对和系统发育树构建,对高温纤维素降解菌进行分子生物学快速鉴定,判定其分类学地位。

1.3.3 菌株生理学特征研究 抗生素敏感实验: 将获得的纤维素降解菌株分别接种于 LB 液体培养基中,55℃摇床培养过夜。用新鲜 LB 培养基制备 $10^6 \sim 10^8$ 倍稀释菌液(调整 OD_{600} 光密度值为 0.6),分别取稀释液 50 μL 涂 LB 平板,晾干后贴上含有不同浓度抗生素(氯霉素、利福平、卡那霉素、链霉素、环丙沙星、红霉素和青霉素 G 的浓度分别为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 四环素,浓度为 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的无菌纸片,55℃恒温培养箱中倒置培养过夜。

菌株生理学特征测定: 将纤维素降解菌株分别划线接种于 LB 琼脂平板上,置于 25℃、30℃、37℃、42℃、48℃和 55℃培养箱中进行过夜培养,观察菌株是否可以在相应温度条件下生长。将纤维素降解菌株分别接种于改良 LB 液体培养基中,设置培养基 pH 值梯度为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 和 10.0,置于 55℃和 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速的摇床中震荡培养 12 h,测定 OD_{600} 光密度值,检测菌株生长的最适 pH。将纤维素降解菌株分别接种于不同 NaCl 浓度梯度的改良 LB 液体培养基中(pH 为 7.0),设置 NaCl 浓度梯度为 0.0%、3.0%、5.0%、8.0%、10.0%和 12.0%,置于 55℃和 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速的摇床中震荡培养 12 h,测定 OD_{600} 光密度值,检测菌株盐离子耐受性。生理学实验每组设置 3 个平行实验组。

1.3.4 降解菌株细胞内外粗酶液制备及 CMCase 活力测定 将待测菌株按照 5.0%的接种量添加至 LB 液体培养基,在 55℃和 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下震荡过夜培养。培养结束后,以 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集菌体和上清液,上清液为胞外粗酶液,同时将菌体沉淀以等体积磷酸盐缓冲液重悬,超声破碎菌体后,在 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下冷冻离心,收集上清液获得胞内粗酶液。

CMCase 活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸法,在 575 nm 条件下测定纤维素降解酶水解 CMC 所释放的还原糖含量来确定纤维素酶的活力^[15]。纤维素酶活力反应在 2.0 mL 磷酸盐缓冲体系(pH 7.0)中进行,包括 1.2 mL 待测粗酶液和 0.8 mL 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CMC,反应条件为 42℃孵育 30 min。纤维素酶活力单位计算以每分钟水解获得 1.0 μmol 还原糖的纤维素酶量定义为一个单位的 CMCase (U)。

2 结果与分析

2.1 高温纤维素降解菌筛选结果

纤维素降解菌对 CMC 降解活性(即 CMCase 活性)初步检测,采用 CMC 水解圈直径(D)与相应菌落直径(d)之间的比值(D/d)的大小来表示^[6]。在本实验中,从 5 份温泉土壤中分离得到 6 株具有纤维素降解活性细菌,其中样品 S1 未分离到纤维素降解菌。最终获得的 6 株纤维素降解菌的 CMCase 活性定性检测结果显示,菌株 WP-1^T、WP-3 和 WP-6 活性最显著(图 1)。在初步筛选的 CMC 平板上产生水解圈显示的酶活力主要为菌株分泌型胞外酶活力水解结果,胞外酶活力对于原始菌株的开发应用具有重要的指示作用。



图 1 高温纤维素降解菌的 CMCase 活性初步检测结果
Figure 1 Qualitative detection for thermophilic cellulose-degrading strains

表 2 降解菌 CMCase 活性初步检测结果
Table 2 CMCase primary determination for cellulose-degrading strains

菌株 Strain	水解圈直径/mm Hydrolysis diameter (D)	菌落直径/mm Colony diameter (d)	D/d
WP-1 ^T	3.30	1.48	2.229
WP-2	2.91	2.79	1.043
WP-3	8.45	2.70	3.130
WP-4	5.41	2.81	1.925
WP-5	7.86	3.51	2.239
WP-6	8.51	3.26	2.610

初步活性检测发现,分离得到的 6 株纤维素降解菌中,菌株 WP-3 的胞外 CMCase 活性最强, $D/d > 3.0$ 。菌株 WP-1^T、WP-5 和 WP-6 也表现出较强的 CMCase 活性($D/d > 2.0$)。菌株 WP-2 的 CMCase 水解活性最微弱, D/d 值仅为 1.043(见表 2)。因此,进一步的系统分类学分析,只对菌株 WP-2 进行 16S rRNA 基因作快速鉴定,不单独构建 WP-2 系统进化树。

2.2 高温纤维素降解菌生物学特征

在初步筛选基础上,对降解菌株生长温度范围、pH 值、抗生素敏感性以及盐离子耐受浓度等重要生

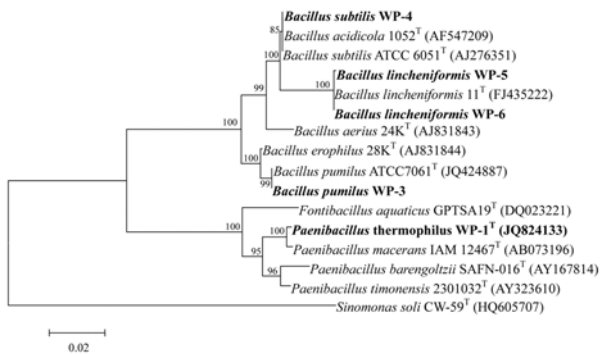
理学特征进行测定, 了解降解菌株的基本生理学特征, 评估降解菌种的抗逆性和应用开发潜力。结果如表 3 所示, 除菌株 WP-2 之外, 其余 5 株菌均能在 55 °C 温度条件下正常生长, 菌体生长速度与 42 °C 相比未发现明显的减弱。酸碱适应性实验显示, 6 个供试菌株的 pH 值生长范围较为宽泛, 但在强酸 (pH<4.5) 或强碱 (pH>9.0) 条件下均不能生长。盐离子耐受性实验中, 在高达 12% 的盐浓度条件下, 除菌株 WP-1^T 外, NaCl 对其他 5 个菌株生长未表现

出明显抑制作用。抗生素敏感性检测结果发现, 只有菌株 WP-6 对红霉素、氯霉素和青霉素 G 具有较为显著的抗性, 其余菌株对测试抗生素皆较为敏感, 因此在菌株培养和进一步的研究过程中, WP-6 培养可添加一定的抗生素进行杂菌抑制, 生物学操作性更佳。CMC 降解菌株生理学结果显示, 6 个纤维素降解菌株表现出了不同程度的耐热和耐盐特性, 这些抗逆特性为高耐受性纤维素酶开发应用提供了较好的研究材料。

表 3 纤维素降解菌的生理特性指标

Table 3 Physiological characteristics for cellulose-degrading strains

菌株编号 Strain code	样品编号 Sample code	抗生素敏感性结果 Antibiotic susceptibility	生理生化指标 Physiological index		
			55 °C	pH	12% NaCl
WP-1 ^T	S3	全部敏感	+	5.0~8.5	- (<4%)
WP-2	S4	全部敏感	<55 °C	5.0~8.5	+
WP-3	S2	全部敏感	+	4.5~8.5	+
WP-4	S3	全部敏感	+	4.5~9.0	+
WP-5	S6	全部敏感	+	4.5~8.0	+
WP-6	S5	红霉素, 氯霉素和青霉素 G 不敏感, 其余敏感	+	4.5~8.5	+



WP-1^T, 嗜热类芽孢杆菌 (*Paenibacillus thermophilus*); WP-3, 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*); WP-4, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); WP-5, 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*); WP-6, 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)

图 2 高温纤维素降解菌系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of thermophilic cellulose-degrading strains based on 16S rRNA gene sequence

2.3 高温纤维素降解菌株系统分类学地位

通过 16S rRNA 基因序列快速鉴定, 6 个纤维素降解菌株分别隶属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 和类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.)。根据系统发育学分析结果 (图 2), WP-1^T 隶属于类芽孢杆菌属, 与浸麻类芽孢杆菌 (*Paenibacillus macerans*) 序列相似性达到 99.3%, 多相分类学研究发现 WP-1^T 为类芽孢杆菌属新种, 并命名为嗜热类芽孢杆菌 (*Paenibacillus thermophilus*)^[17]。WP-2 隶属于假单胞菌属, 与斯氏假单胞

菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 亲缘关系最近, 16S rRNA 基因相似度为 99.5%。WP-3 隶属于芽孢杆菌属, 与短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 的 16S rRNA 基因相似度为 100%。WP-4 隶属于芽孢杆菌属, 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 16S rRNA 基因相似度为 100%。WP-5 和 WP-6 属于芽孢杆菌属的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 其 16S rRNA 基因相似度分别为 99.8% 和 100%。从本次鉴定结果来看, 通过富集培养筛选得到的高温纤维素降解菌主要为革兰氏阳性产孢细菌, 该类群细菌也是自然界分布最为广泛的微生物种群之一。

2.4 高温纤维素降解菌粗酶液活力

降解菌株胞内外粗酶液酶活力检测结果 (图 3) 显示, 菌株 WP-1^T、WP-3 和 WP-6 胞内酶活力较强, 检测结果均大于 40.0 U·mL⁻¹, 胞内酶活力最高的菌株为 WP-3 达到 72.0 U·mL⁻¹。除菌株 WP-2 和 WP-5 胞内和胞外酶活力较低外, 其他几株降解菌的胞外酶活力比较相近, 约为 20 U·mL⁻¹。此外, 在本次实验中有 5 株降解菌的胞内酶活性大于胞外酶, 只有 WP-4 的胞外酶降解活性略大于胞内酶。胞内酶活力大于胞外酶, 表明该菌株表达的纤维素水解酶向胞外分泌能力较弱, 在应用过程中需要将纤维素酶进行分泌性表达或细胞破碎。综合菌株抗逆性, 生理学特征及胞内、胞外羧甲基纤维素水解活力结果, 降解菌株 WP-3 和 WP-6 水解活力最强, 逆境耐受能力显著, 具备较好的应用开发潜力。本研究分别

检测各菌株的胞内和胞外酶活力,以充分评估所筛选的6株降解菌中酶活最高的菌株及活性最高的降解酶,在此基础上结合菌株的环境耐受性研究结果,为后续降解酶基因克隆及异源超量表达,确定最佳研究对象。

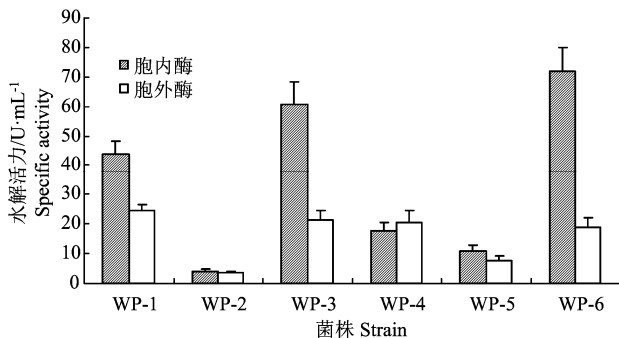


图3 高温纤维素降解菌胞内外粗酶液水解活力

Figure 3 The intra- and extra-cellular specific activities of thermophilic cellulose-degrading strains

3 讨论

关于芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属的糖苷水解酶的研究很多,包括降解菌株筛选和目的基因克隆表达等,例如纤维素酶 cel5A、cel12A 和 β -1,3-, β -1,4-葡聚糖酶等^[11-14]。纤维素酶或糖苷水解酶在工业生产中的应用及相关研究已十分的广泛,如酿酒、中药提取、风味剂和饲料添加剂等^[18-20]。本研究针对纤维素酶应用过程中对温度和盐离子等复杂环境不耐受,导致生物酶失活和快速衰减的难题,从福建省多个热泉底部土壤中分离耐高温和高盐的纤维素降解菌株,为高温和高盐耐受性纤维素酶开发筛选具有研究价值的菌种资源。研究结果发现,芽孢杆菌属是热泉环境中广泛分布的纤维素降解菌种,从福建省的福州市、清流县和厦门等3个地区的6个样品采集点中,有5个样品采集点都分离到了该属降解菌株(其中的一株为类芽孢杆菌属细菌)生理学检测结果显示,从热泉土壤中分离得到的纤维素降解菌,因为其在极端的生存环境,6个菌株具备不同程度的逆境生存特点,如耐热、耐盐等。本研究获得的高温和高盐耐受性降解菌株或降解酶,在工业菌株发酵、菌剂及酶制剂制备过程中保持稳定的活力,对发酵过程中不断添加的新鲜培养基所积累的盐离子具有较高的耐受性,在实际工业化生产应用具有重要的意义。此外,本研究中同时检测了6个菌株的抗生素敏感性,这主要是为后续的降解菌株基因克隆等遗传操作提供预防杂菌污染抗性筛选标记,使后续的研究更加便捷。综合各降解菌株降解酶活力和生理学特点,降解菌株 WP-3

和 WP-6 水解酶活力和逆境耐受能力最强,应用开发研究价值最大,其相关降解酶基因克隆和生物学性质研究还在进一步进行中。

参考文献:

- [1] WANG H, SQUINA F, SEGATO F, et al. High-temperature enzymatic breakdown of cellulose[J]. Appl Environ Microb, 2011, 77(15): 5199-5206.
- [2] LYND L R, LASER M S, BRANSBY D, et al. How biotech can transform biofuels[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(2): 169.
- [3] 毕于运, 高春雨, 王亚静, 等. 中国秸秆资源数量估算[J]. 农业工程学报, 2009, 25(12): 211-217.
- [4] RAGAUSKAS A J, WILLIAMS C K, DAVISON B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. Science, 2006, 311(5760): 484-489.
- [5] CHANG M C Y. Harnessing energy from plant biomass[J]. Curr Opin Chem Biol, 2007, 11(6): 677-684.
- [6] 吴显荣, 穆小民. 纤维素酶分子生物学研究进展及趋向[J]. 生物工程进展, 1994, 14(4): 25-27.
- [7] 周娟, 潘振亮, 杨焕民. 饲料纤维素酶的研究与应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2007, 28(1): 50-53.
- [8] 贲永光, 丘泰球, 李坤平, 等. 纤维素酶法提取黄芪总黄酮的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2478-2480.
- [9] 马桔云, 赵晶岩. 纤维素酶在黄连提取工艺中的应用[J]. 中草药, 2000, 31(2): 103-104.
- [10] 云秀芳. 纤维素酶在酱油生产中的应用研究[J]. 中国调味品, 2001(3): 15-19.
- [11] CUI X L, MAO P H, ZENG M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiodiaceae*[J]. Int J Syst Evol Micr, 2001, 51(2): 357-363.
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [13] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [14] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [15] BRUNECKY R, ALAHUHTA M, XU Q, et al. Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA[J]. Science, 2013, 342(6165): 1513-1516.
- [16] 徐春淼, 韦中, 廖汉鹏, 等. 一种评价稻秆降解菌分解能力的方法[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 417-423.
- [17] ZHOU Y, GAO S, WEI D Q, et al. *Paenibacillus thermophilus* sp. nov., a novel bacterium isolated from a sediment of hot spring in Fujian province, China[J]. Anton Leeuw Int J G, 2012, 102(4): 601-609.
- [18] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. Biotechnol Adv, 2000, 18(5): 355-383.
- [19] ANDO S, ISHIDA H, KOSUGI Y, et al. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*[J]. Appl Environ Microb, 2002, 68(1): 430-433.
- [20] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiol Mol Biol R, 2002, 66(3): 506-577.