

吴旭东, 黄仕新, 吴鹏, 等. 一株烟用产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及酶学特性研究 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (3): 405–413.
WU X D, HUANG S X, WU P, et al. A High Cellulase-producing Bacterium from Tobacco Lamina [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (3): 405–413.

一株烟用产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及酶学特性研究

吴旭东^{1,2}, 黄仕新², 吴鹏², 徐长安², 龙腾^{1*}, 唐旭^{2*}

(1. 福建中烟工业有限责任公司技术中心, 福建 厦门, 361021; 2. 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门, 361005)

摘要:【目的】从不同品种烟叶原料中分离筛选高产纤维素酶细菌菌株, 为提高烟叶原料使用价值提供优秀菌种资源。【方法】采用稀释涂布法从 37 份片烟样品中分离纯化菌株, 利用刚果红染色法结合摇瓶复筛进行筛选, 测定菌株纤维素酶活性, 通过形态学观察与 16S rRNA 序列鉴定功能菌的系统发育学地位, 并对功能菌所产纤维素酶进行酶学性质研究。【结果】筛选到 1 株烟用纤维素酶活性高的菌株 FX-1, 其在 37 °C 发酵 48 h 纤维素酶酶活力最高, 达 56.261 U·mL⁻¹。FX-1 菌体呈杆状, 可产芽孢, 革兰氏阳性, 其 16S rRNA 序列与 *Bacillus subtilis* 相似度最高 (100%), 系统发育树中与枯草芽孢杆菌位于同一分支中, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。通过酶学性质分析, 酶反应的最适温度为 60 °C, 最适 pH 为 5.0, 在温度 30~55 °C 或 pH 值 3.0~7.0 保温 30 min 后仍有较高活力, 相对酶活有 90% 以上, 具有良好的热稳定性和耐酸能力。【结论】从 37 份片烟样品中筛选获得 1 株高产纤维素酶菌株 FX-1, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌。FX-1 所产纤维素酶的反应条件较宽, 酶学性质稳定, 在烟草行业中具有良好的产业化开发利用前景。

关键词: 烟用; 纤维素酶; 筛选; 鉴定; 酶学特性

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 03-0405-09

A High Cellulase-producing Bacterium from Tobacco Lamina

WU Xudong^{1,2}, HUANG Shixin², WU Peng², XU Changan², LONG Teng^{1*}, TANG Xu^{2*}

(1. Technology Center, Fujian China Tobacco Industry Co., Ltd., Xiamen, Fujian 361021, China; 2. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: 【Objective】Bacteria with a high cellulase-producing capacity were isolated from different varieties of tobacco for the potential of upgrading the economic value of tobacco raw materials. 【Methods】Candidate bacterial strains were isolated and purified from 37 flue-cured tobacco strip samples using dilution coating method. They were screened by the Congo red staining combined with shaking flask culture and cellulase activity determination. Phylogenetic property of a strain identified by morphological observation was confirmed with 16S rRNA sequencing. The cellulase activities were investigated. 【Results】FX-1 was preliminarily identified as a strain that produced high cellulase activity of 56.261 U·mL⁻¹ after 48h fermentation at 37 °C. It was a gram-positive, rod-shape, spore-producing bacterium that showed a perfectly matching 16S rRNA sequence in a branch of *Bacillus subtilis* phylogenetic tree. The cellulase from FX-1 displayed a peak activity at 60 °C and pH 5.0. Greater than 90% of its relative activity was retained after being held at 30-55 °C or pH 3.0-7.0 for 30 min. 【Conclusion】A high cellulase-producing bacterium screened from 37 flue-cured tobacco strip samples was preliminarily identified as a strain of *B. subtilis*. The cellulase produced by the strain FX-1 exhibited a wide-range temperature and pH stability, and thus, had a considerable potential to be developed for new commercial use in tobacco manufact.

Key words: tobacco; cellulase; screening; identification; enzymatic property

收稿日期: 2021-09-10 初稿; 2022-02-15 修改稿

作者简介: 吴旭东 (1998-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物研究 (E-mail: wuxudong@tio.org.cn)

* 通信作者: 龙腾 (1983-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事烟草原料研究 (E-mail: lt10625@ftic.cn); 唐旭 (1974-), 男, 博士, 正高级工程师, 主要从事海洋微生物技术研究 (E-mail: tangxu@tio.org.cn)

基金项目: 福建中烟工业有限责任公司技术合作项目 (FJZYHJH2020003)

0 引言

【研究意义】近年来,卷烟工业企业不断优化提升产品结构,如何进一步提高烟叶质量和可用性、满足卷烟品牌原料需求成为工业企业亟需解决的关键问题。筛选优质的烟用产纤维素酶菌株有助于缓解烟草行业中烟叶的等级结构矛盾、部位结构矛盾和区域结构矛盾。【前人研究进展】纤维素是构成烟叶细胞组织和骨架的基本物质。烟叶中纤维素的含量一般在 11% 左右,随着烟叶等级的降低而增加^[1]。纤维素含量较高时,会使卷烟制品组织粗糙,烟叶燃烧后产生较强的呛咳刺激感^[2-4]。微生物及发酵酶制剂技术可以降低烟叶、烟草薄片及烟梗中纤维素等物质的含量,促进其内部大分子有机物质的分解和转化,从而改善品质,减少有害物质产生^[5-7]。国内外学者利用生物技术对降低烟叶及烟梗中纤维素进行了大量的研究工作。Gravely 等^[8]提出用曲霉属 (*Aspergillus* spp.) 微生物来降解烟梗中的纤维素方法;叶建斌等^[9]利用烟草中分离的类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* spp.) 对再造烟叶原料进行发酵处理,发现再造烟叶香气增加,刺激性明显减轻,感官品质提升;于少藤等^[10]使用从烟叶表面分离筛选到的产纤维素酶菌株 (*Pseudomonas gessardii*) yc10 对烟叶进行发酵试验,发现烟叶纤维素降解率达 23.49%,总糖含量增加,烟叶中香气成分增加;王莹等^[7]和范坚强等^[11]从烟草中筛选了多个可降解大分子物质的微生物,并利用所产纤维素酶和果胶酶混合处理烟丝,处理后烟丝纤维素失重率达到 41.23%,烟气细腻柔和,香气饱满,能有效提高烟草品质。【本研究切入点】为提高纤维素降解菌在卷烟生产过程中实际应用的可行性。【拟解决的关键问题】以 37 份片烟样品作为研究对象,通过刚果红染色法初筛,摇瓶液体复筛,测定菌株的 CMC 酶活,以分离筛选出适用于烟叶原料的高效降解纤维素菌株,通过形态特征观察、生理生化和分子生物学方法,对筛选出的菌株进行菌种鉴定,同时对该菌株所产纤维素酶的酶学特性进行研究,为卷烟工业企业烟叶原料的保值增值提供优质菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 实验所用样品片烟来自云南、福建等国内外烟叶主产区,见表 1。

1.1.2 培养基 LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

液体富集培养基:羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 5 g, NH_4NO_3 1 g, 酵母膏 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

筛选培养基:CMC-Na 5 g, NH_4NO_3 1 g, 酵母膏 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

产纤维素酶发酵培养基:CMC-Na 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.1.3 主要仪器和试剂 仪器:GR60DF 全自动立式高压灭菌锅(厦门致微仪器有限公司),MQT-60R 振荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司),SW-CJ-IFD 超净工作台(苏州净化有限公司),生化培养箱(宁波莱福科技有限公司),徕卡显微镜 DM570 (徕卡仪器有限公司)。

试剂:刚果红、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、苯酚、葡萄糖等常规试剂均为国产分析纯。PCR 引物由上海生工合成。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海赛百盛基因有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的富集与筛选 称取碾碎后的片烟 2 g 置于 50 mL 液体富集培养基中,37 ℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养 48 h 后,取富集后的培养液稀释涂布至筛选培养基平板上,37 ℃ 培养箱倒置培养 48~72 h,再进行刚果红染色,选择生长较好、透明圈较大的菌株接于斜面 and LB 固体培养基中。

1.2.2 DNS 试剂制备 甲液配制:6.9 g 结晶苯酚溶于 15.2 mL 10% 氢氧化钠,加蒸馏水稀释至 69 mL,再加 6.9 g 亚硫酸氢钠溶解备用;乙液配制:225 g 酒石酸钾钠溶于 300 mL 10% 氢氧化钠,加入 880 mL 1% 3,5-二硝基水杨酸。将甲、乙液混合于棕色瓶静置 7~10 d 即可。

1.2.3 粗酶液的制备 将筛选得到的菌株接种于 LB 培养基中,37 ℃、180 r·min⁻¹ 振荡活化过夜后,按 5% 接种于 100 mL 发酵培养基中发酵 24 h,获得的发酵液在 4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 离心 6 min,所得上清液即为粗酶液,后续进行酶活测定。

1.2.4 酶活力测定

1.2.4.1 葡萄糖标准曲线的绘制 取 6 支 10 mL 刻度试管并编号,按表 2 分别加入质量浓度为 1.5 mg·mL⁻¹ 的葡萄糖溶液、蒸馏水和 DNS 试剂,配成不同葡萄糖含量的反应液。将各管摇匀后,沸水浴 10 min,冷却后加纯水定容至 10 mL,颠倒混匀后吸取 200 μL 至 96 孔板检测 OD_{540} 值,以葡萄糖质量 (mg) 为横坐标,扣除空白后的 OD_{540} 值为纵坐标绘制标准曲线。

表 1 样品片烟来源

Table 1 Source of flue-cured tobacco strip samples

编号 Number	等级 Grade	编号 Number	等级 Grade
1	云南马沾YLC1Y-2019片烟 Yunnan Mazhan YLC1Y-2019 flue-cured tobacco strips	20	湖南永州宁远C3F-2019片烟 Hunan Yongzhou Ningyuan C3F-2019 flue-cured tobacco strips
2	云南马沾C4FY-2018片烟 Yunnan Mazhan C4FY-2018 flue-cured tobacco strips	21	湖南永州宁远B2F-2019片烟 Hunan Yongzhou Ningyuan B2F-2019 flue-cured tobacco strips
3	云南保山AB-2019香料烟 Yunnan Baoshan AB-2019 spice tobacco	22	辽宁YELC3F-2019片烟 Liaoning YELC3F-2019 flue-cured tobacco strips
4	云南楚雄YLC1-2019片烟 Yunnan Chuxiong YLC1-2019 flue-cured tobacco strips	23	辽宁B23F-2019片烟 Liaoning B23F-2019 flue-cured tobacco strips
5	云南大理祥云YLC1Y-2019片烟 Yunnan Dali Xiangyun YLC1Y-2019 flue-cured tobacco strips	24	贵州遵义铜仁YLC2Y-2019片烟 Guizhou Zunyi Tongren YLC2Y-2019 flue-cured tobacco strips
6	云南马沾ELC1Y-2019片烟 Yunnan Mazhan ELC1Y-2019 flue-cured tobacco strips	25	贵州遵义铜仁YLC1Y-2019片烟 Guizhou Zunyi Tongren YLC1Y-2019 flue-cured tobacco strips
7	云南楚雄ELC1-2019片烟 Yunnan Chuxiong ELC1-2019 flue-cured tobacco strips	26	山东潍坊诸城B2F-2019片烟 Shandong Weifang Zhucheng B2F-2019 flue-cured tobacco strips
8	云南大理祥云ELC1Y-2019片烟 Yunnan Dali Xiangyun ELC1Y-2019 flue-cured tobacco strips	27	山东潍坊诸城C3F-2019片烟 Shandong Weifang Zhucheng C3F-2019 flue-cured tobacco strips
9	云南曲靖大F03-2019片烟 Yunnan Quchu Da F03-2019 flue-cured tobacco strips	28	重庆彭水B2F-2019片烟 Chongqing Pengshui B2F-2019 flue-cured tobacco strips
10	云南楚雄F03-2019片烟 Yunnan Chuxiong F03-2019 flue-cured tobacco strips	29	黑龙江哈尔滨C3L-2019片烟 Heilongjiang Harbin C3L-2019 flue-cured tobacco strips
11	福建龙岩三明YLC2YCB-1-2018片烟 Fujian Longyan Sanming YLC2YCB-1-2018 flue-cured tobacco strips	30	巴西TMBIO-FJ-2019片烟 Brazil TMBIO-FJ-2019 flue-cured tobacco strips
12	福建三明尤溪YLC1CB-2019片烟 Fujian Sanming Youxi YLC1CB-2019 flue-cured tobacco strips	31	巴西B1O/C-2019片烟 Brazil B1O/C-2019 flue-cured tobacco strips
13	福建龙岩永定YLC1Y-2019片烟 Fujian Longyan Yongding YLC1Y-2019 flue-cured tobacco strips	32	巴西L1O-2019片烟 Brazil L1O-2019 flue-cured tobacco strips
14	福建龙岩三明YLC2YCB-1-2019片烟 Fujian Longyan Sanming YLC2YCB-1-2019 flue-cured tobacco strips	33	津巴布韦L1O/C(天泽)-2019片烟 Zimbabwe L1O/C(Tianze)-2019 flue-cured tobacco strips
15	福建三明尤溪ELC1CB-2019片烟 Fujian Sanming Youxi ELC1CB-2019 flue-cured tobacco strips	34	津巴布韦L1O/C(英美)-2019片烟 Zimbabwe L1O/C(Anglo-American)-2019 flue-cured tobacco strips
16	福建龙岩永定ELC1Y-2019片烟 Fujian Longyan Yongding ELC1Y-2019 flue-cured tobacco strips	35	津巴布韦L1OA(环球)-2019片烟 Zimbabwe L1OA(Global)-2019 flue-cured tobacco strips
17	福建龙岩南平SLC4-2019片烟 Fujian Longyan Nanping SLC4-2019 flue-cured tobacco strips	36	赞比亚L1OL-3(CNT)-2019片烟 Zambia L1OL-3(CNT)-2019 flue-cured tobacco strips
18	福建龙岩三明CF03-2019片烟 Fujian Longyan Sanming CF03-2019 flue-cured tobacco strips	37	阿根廷ASBOCF-1-2019片烟 Argentina ASBOCF-1-2019 flue-cured tobacco strips
19	福建龙三南X2F03-2019片烟 Fujian Long Sanan X2F03-2019 flue-cured tobacco strips		

表 2 葡萄糖标准曲线制作参数
Table 2 Parameter of glucose standard curve

管号 Tube number	葡萄糖溶液 Glucose solution/mg·mL ⁻¹	蒸馏水 Distilled water/mL	DNS/mL
0	0.0	2.0	1.5
1	0.2	1.8	1.5
2	0.4	1.6	1.5
3	0.6	1.4	1.5
4	0.8	1.2	1.5
5	1.0	1.0	1.5

注：葡萄糖溶液为1.5 mg·mL⁻¹。
Note: glucose solution was 1.5 mg·mL⁻¹.

1.2.4.2 CMC 酶活测定 参考罗燕青等^[12]的方法，进行略微改动。在 10 mL 刻度试管中（3 支实验管）加入 0.2 mL 稀释酶液，加入 1.8 mL 1% 的 CMC-Na 溶液（pH 5），摇匀，于 60 ℃ 条件下水浴 10 min，取出冷却至室温，加入 1.5 mL DNS 试剂，迅速混匀后沸水浴反应 10 min，冷却后，加水定容至 10 mL，轻轻上下摇匀，另取稀释酶液 0.2 mL 和 0.1 mol·L⁻¹ pH 为 5 的缓冲溶液 1.8 mL 作为空白，不加 CMC 溶液，同样依上述步骤，用空白调零点，于波长 540 nm 测吸光度值。

酶活力单位定义：在 60 ℃，pH 5.0 条件下，催化 1% CMC-Na 每分钟生成 1 μg 还原糖所需的酶量作为 1 个酶活力单位 U（μg·min⁻¹·mL⁻¹）。

酶活力(U) =
$$\frac{N_1 \times N_2 \times G \times 10^3}{10 \times 0.2}$$

式中 G：由标准曲线查得的葡萄糖质量（mg）；N₁：粗酶液稀释倍数；N₂：比色时反应液稀释倍数；10³：毫克与微克的转换；10：酶水解反应时间（min）；0.2：测定酶活力时所用粗酶液的体积（mL）。

1.2.5 菌株的鉴定

1.2.5.1 形态观察及生理生化特性 参照《伯杰氏菌手册》^[13]、《常见细菌系统鉴定手册》^[14] 观察菌株的培养形态、革兰氏染色与芽孢染色，并测定其生理生化特征。

1.2.5.2 分子生物学鉴定 按细菌基因组 DNA 提取试剂盒（上海赛百盛）提取总 DNA，使用标准引物 27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'），1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）扩增 16S rRNA 序列，PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测为单一明

亮条带，切下条带经胶回收试剂盒（上海生工）回收 PCR 产物送测序公司（广州基迪奥）进行测序，测序结果上传 NCBI 进行 BLAST 分析，采用 MEGA 5.1 软件中的邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育进化树。

1.2.6 纤维素酶酶学特性研究

1.2.6.1 最适反应温度的测定 在 10 mL 刻度试管中加入稀释酶液与 1% 的 CMC 溶液（pH 5）后，于不同温度 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃ 条件下水浴，其他条件同“1.2.4”的方法，测定不同温度下 CMC 酶活。

1.2.6.2 最适反应 pH 的测定 在上一步得出最适温度条件下，设置加入 1% 的 CMC 溶液的 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0，其他条件同“1.2.4”的方法，进行酶活反应测定。

1.2.6.3 酶的热稳定性的测定 在进行酶活反应前，先将酶液分别置于 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃ 温度下保温 30 min，再按照“1.2.4”的方法，进行酶活反应测定。其中以未处理的酶液酶活力为 100%，得到该纤维素酶对温度的耐受力结果。

1.2.6.4 酶的酸碱稳定性的测定 在进行酶活反应前，先将酶液分别于 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲液中，4 ℃ 保温 30 min 后，再按照“1.2.4”的方法，进行酶活反应测定。其中以未处理的酶液酶活力为 100%，得到该纤维素酶对温度的耐受力结果。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

经分离纯化得到的菌株于筛选培养基上培养 48 h 后，通过刚果红染色，比较水解圈直径（H）和菌落直径（C）大小，选择比值较大的菌株进行复筛，最终得到一株酶活力为 56.261 U·mL⁻¹ 的菌株，编号为 FX-1，其刚果红染色结果见表 3，纤维素酶水解圈见图 1，以此作为后续研究对象。

表 3 FX-1 菌株刚果红染色结果
Table 3 Congo red staining of FX-1

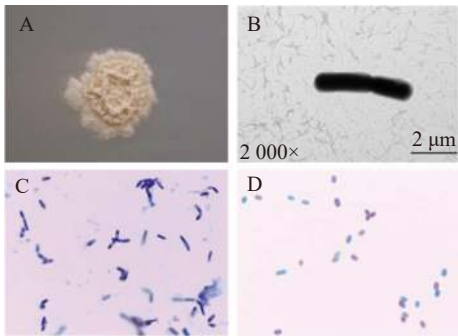
菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter/mm	水解圈直径 Hydrolysis circle diameter/mm	H/C
FX-1	5.89±0.41 (SD=0.3141)	23.58±0.38 (SD=0.3138)	4.01±0.23 (SD=0.2529)



图 1 菌株 FX-1 纤维素酶水解圈
Fig. 1 Cellulase hydrolysis circle of FX-1

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的形态及生理生化鉴定 菌株 FX-1 在 LB 固体培养基上培养 24 h 后，菌落为灰白色、干燥、表面有不规则隆起褶皱，边缘毛刺状，结果如图 2-A 所示；透射电镜观察显示菌体呈棒状或近棒状，长约为 1.6~2.2 μm，粗约 0.8~1.0 μm，多为 2 个或 2 个以上菌体链状连接，结果如图 2-B 所示；革兰氏染色阳性，菌体呈现为杆状，芽孢染色为绿色，菌体为红色，芽孢中生，椭圆形，不膨大，结果如图 2-C、D 所示；其部分生理生化特性见表 4。根据这些特征，可初步判断该菌株为芽孢杆菌属（*Bacillus* spp.）细菌。



注：A：菌落形态；B：透射电镜图（20000×）；C：革兰氏染色（1000×）；D：芽孢染色（1000×）。
Note: A: colony morphology of FX-1; B: TEM image of FX-1 (20 000×); C: gram stained FX-1 (1 000×); D: bacteriophage staining of FX-1 (1 000×).

图 2 菌株 FX-1 形态特征
Fig. 2 Morphological characteristics of FX-1

2.2.2 分子生物学鉴定 FX-1 的 16S rRNA 序列长度为 1416 bp，NCBI 比对显示 FX-1 的 16S rRNA 序列与 *Bacillus subtilis* 相似度最高（100%），进一步使用 MEGA 软件（版本 5.1）利用 NJ 法构建 FX-1 系统发育树，如图 3 所示。结果显示 FX-1 与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、特基拉芽孢杆菌（*Bacillus*

tequilensis）（相似度 99.79%）处于同一分支，置信度为 86%，结合生理生化特征（表 4），将 FX-1 鉴定为枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。

2.3 酶活力测定

2.3.1 葡萄糖标准曲线 由图 4 可见，标准曲线 $y=0.3094x-0.0102$ ，线性相关系数 R^2 为 0.9984，线性良好，可以用于纤维素酶活力测定。

2.3.2 纤维素酶活性分析 用不同发酵时间的粗酶液测定 FX-1 菌株的 CMC 酶活力，同时测定相应时间菌株的生长量情况，结果如图 5，表明 FX-1 菌株在发酵 48 h 时纤维素酶酶活力最高，达 $56.261\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，而其生物量最高时是在 36 h。在 48 h 后，菌株的产酶活性随着生物量的下降而有所降低，在一定时间内二者呈正相关。由此可见，该纤维素酶合成模式属于延续合成型^[15]。

2.4 菌株 FX-1 所产纤维素酶的酶活特性

2.4.1 FX-1 纤维素酶最适反应温度 以羧甲基纤维素钠为底物，温度为 30~75 ℃，测定不同温度下 CMC 酶活力，结果如图 6，表明 FX-1 所产生的纤维素酶在 60 ℃ 条件下酶活力达最大值，且在 30~70 ℃ 均有活性。这说明该酶最适反应温度为 60 ℃，具有良好的耐热性。

2.4.2 FX-1 纤维素酶最适反应 pH 在得出最适温度条件下，以不同 pH 的羧甲基纤维素钠溶液为底物，测定 CMC 酶活力，结果如图 7，表明 FX-1 菌株产生的纤维素酶的最适反应 pH 为 5.0，且该酶在 pH 3.0~8.0 均有活性，与王霞等^[16]获得的地衣芽孢杆菌 CMC-4 所产纤维素酶适应性 pH 范围相似，且范围更大，说明该菌株所产纤维素酶 pH 适应范围较广，具有较好的耐酸性与耐碱性。

2.4.3 FX-1 纤维素酶的热稳定性 在进行酶活反应前，先将酶液分别置于 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃ 温度下保温 30 min，再测定 CMC 酶活力，结果如图 8，表明 CMC 在 30~55 ℃ 下热稳定较好，相对酶活有 90% 以上；当在温度 $\geq 60\text{ ℃}$ 保温 30min 时，酶活力迅速下降，但相对酶活依然高于 30%，说明该酶具有一定的耐热性。

2.4.4 FX-1 纤维素酶的酸碱耐受能力 在进行酶活反应前，先将酶液分别于 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲液中，4 ℃ 保温 30 min，再测定 CMC 酶活，结果如图 9，表明 pH 为 3.0~7.0，CMC 酶较稳定，当 pH 为 8.0 时，酶活迅速下降，但相对酶活依然高于 60%，说明该酶具有一定的耐酸碱能力，但主要过程 pH 值还是较为偏酸性，可知该酶为酸性酶^[17]。

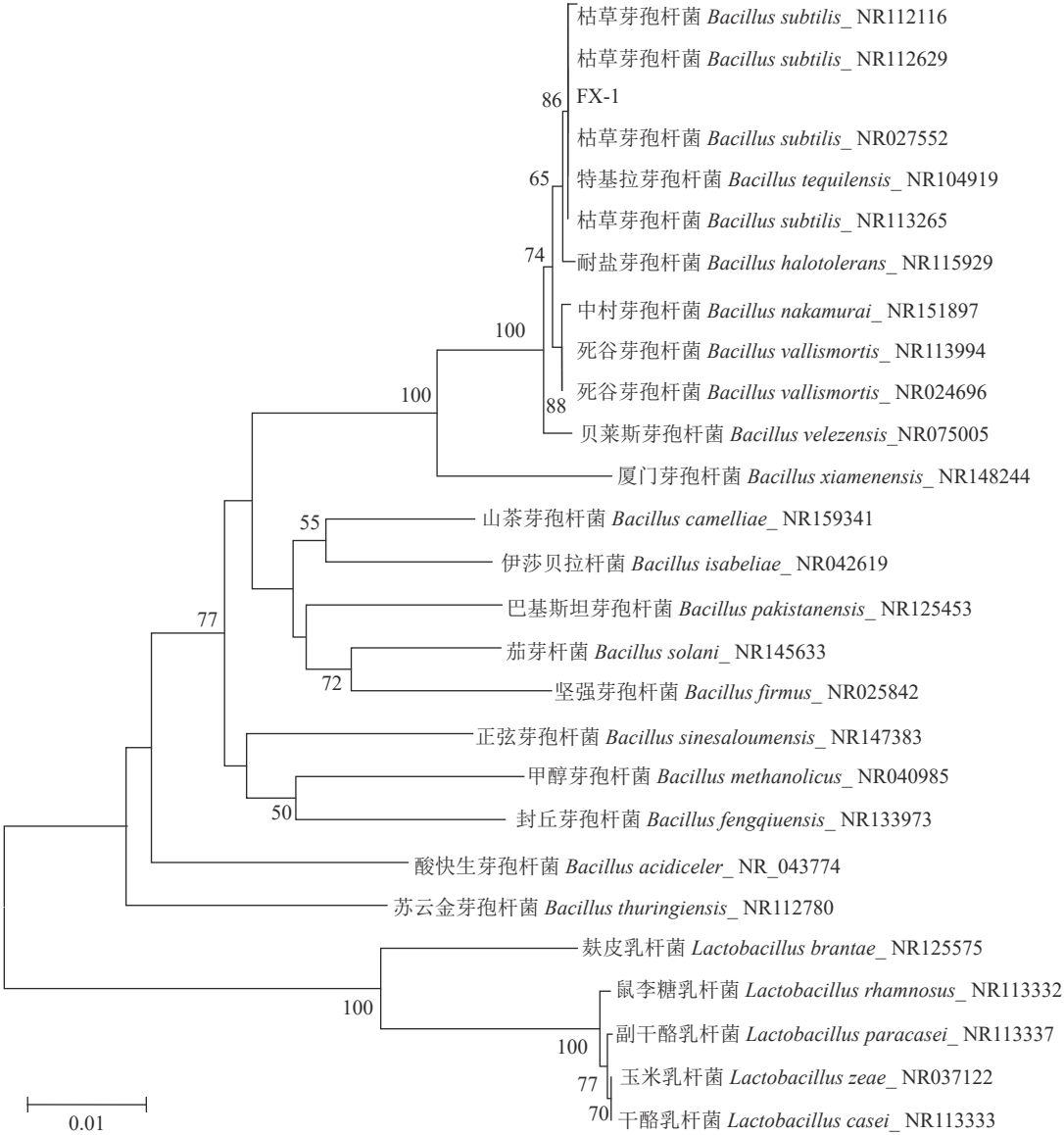


图 3 FX-1 菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of FX-1

表 4 菌株 FX-1 的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of FX-1

测定指标	结果	测定指标	结果
Measurement item	Result	Measurement item	Result
革兰氏染色	+	硝酸盐还原试验	+
Gram stain	+	Nitrate reduction test	+
接触酶试验	+	V-P 试验	+
Exposure to enzyme test	+	V-P test	+
柠檬酸盐试验	+	吲哚试验	-
Citrate test	+	Indole test	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

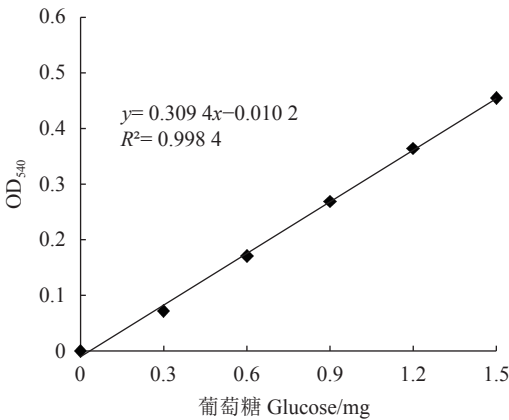


图 4 葡萄糖标准曲线

Fig. 4 Standard curve of glucose

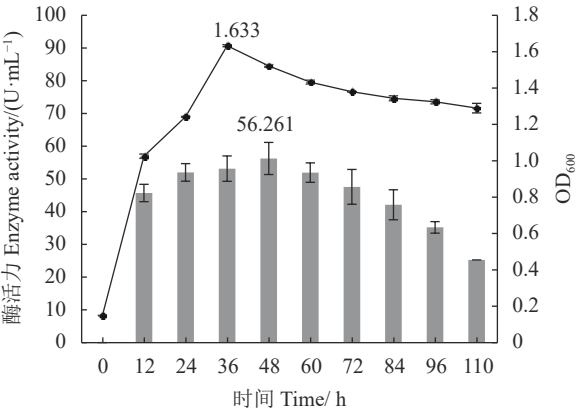


图 5 培养时间对菌株生长和产酶的影响

Fig. 5 Effect of incubation time on growth and enzyme production of FX-1

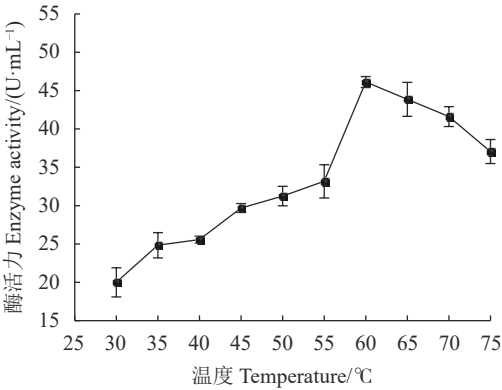


图 6 FX-1 纤维素酶不同反应温度条件下酶活变化情况

Fig. 6 FX-1 cellulase activity at different reaction temperatures

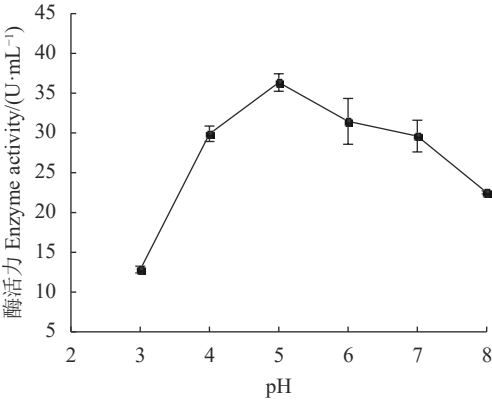


图 7 FX-1 纤维素酶不同 pH 条件下酶活变化情况

Fig. 7 FX-1 cellulase activity under different pH conditions

3 结论与讨论

纤维素降解菌广泛分布于自然界，细菌、真菌、放线菌等微生物在一定条件下都能合成、分泌纤维素酶^[18]。细菌是微生物中种类最多，数量广泛的类群。与真菌相比，细菌生长更迅速，环境适应能力更强，其中芽孢杆菌具有良好的稳定性、环境适应性以及产酶活性高等优点，有利于工农业应

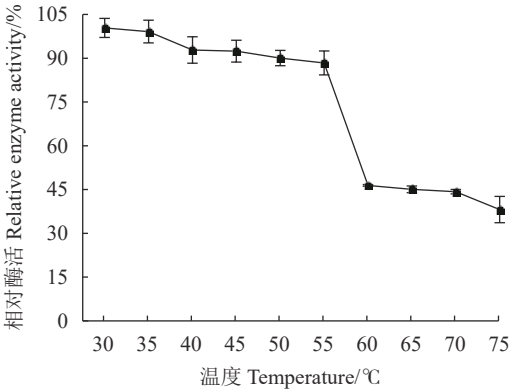


图 8 FX-1 纤维素酶在不同温度环境下的耐受情况

Fig. 8 Tolerance of FX-1 cellulase to elevated temperatures

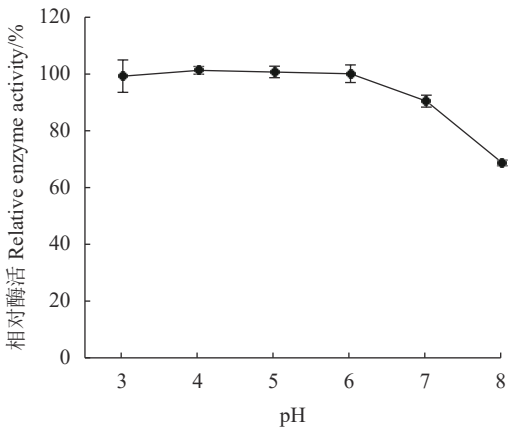


图 9 FX-1 纤维素酶在不同酸碱环境下的耐受情况

Fig. 9 Tolerance of FX-1 cellulase to acidic and alkaline conditions

用^[18, 19]，也更适于烟草行业。目前，关于芽孢杆菌产纤维素酶活性的研究多有报道，如薛磊等^[20]研究发现芽孢杆菌属细菌是云南烟草种植区的优势菌群，筛选到的芽孢杆菌 YN14 产纤维素酶活性高；Abd 等^[21]在对土壤和灌溉水产纤维素酶细菌的分离筛选研究中，发现能够分泌纤维素酶的 40 株菌株中，纤维素酶活力最高的 5 株菌皆为芽孢杆菌；Yang 等^[22]表明在所有的纤维素分解细菌分离物中，蜡样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的纤维素酶活性最高。

分离筛选到可有效降解纤维素的纤维素酶高产菌株是实现应用的前提。本研究从 37 份片烟样品中分离筛选到了一株产纤维素酶菌株 FX-1，该菌株能在以羧甲基纤维素钠（CMC）为唯一碳源的培养基上生长，刚果红染色后有明显的透明圈。菌落为灰白色、干燥、表面有不规则隆起褶皱；透射电镜观察显示菌体呈棒状或近棒状的杆菌；部分生理生化测试结果显示菌株 FX-1 为革兰氏阳性，接触酶实验阳性，V-P 试验测定阳性，能还原硝酸盐和柠檬酸盐。上述形态观察和生理生化特征与芽孢杆菌属 *Bacillus*

细菌的表型特征相似。从 16S rRNA 序列与 *Bacillus subtilis* 相似性（相似度最高 100%）和系统发育进化树分析，FX-1 与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、特基拉芽孢杆菌（*Bacillus tequilensis*）（相似度 99.79%）处于同一分支，置信度为 86%。综上，结合生理生化、16S rRNA 基因序列同源性、系统发育树等方面分析，将 FX-1 初步鉴定为枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。

从枯草芽孢杆菌 FX-1 产纤维素酶的生长特性可以看出，发酵 48 小时，纤维素酶活性可以达到 $56.261 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此前很多烟草源产纤维素酶菌株的筛选研究中，杨宗灿等^[23]从原烟表面分离筛选得到的烟叶纤维素降解菌株 XC-19-1，其发酵产纤维素酶活性为 $6.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；邹芳等^[24]从烟稻轮作区获得的枯草芽孢杆菌 YC-2 的 CMC 酶活力为 $38.65 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；梅金飞^[25]从烟草秸秆废弃物中获得的嗜热芽孢杆菌 SL-2A 的 CMC 最大酶活力为 $48.72 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见枯草芽孢杆菌 FX-1 具有较高的纤维素酶活性。对其酶学特性研究也表明，FX-1 菌株所产纤维素酶活稳定，在 pH 3.0~7.0、温度 30~55 °C 保温 30 min 后仍有较高活力，说明其具有较强的耐酸能力和耐热能力。该酶催化的最适 pH 值为 5.0，最适温度为 60 °C，可知该酶为中温酸性酶。综上，本研究所得菌株 FX-1 是 1 株能高产酸性纤维素酶的枯草芽孢杆菌，经进一步开发后，将在烟草行业中具有良好的产业化应用前景。

参考文献：

- [1] 闫金玉, 闫洪洋, 李兴波, 等. 烤烟烟叶细胞壁物质的对比分析 [J]. *烟草科技*, 2005, 38 (10): 6-11.
YAN K Y, YAN H Y, LI X B, et al. Comparative analysis of cell wall substances in flue-cured tobacco leaf [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2005, 38 (10): 6-11. (in Chinese)
- [2] BALIGA V, SHARMA R, MISER D, et al. Physical characterization of pyrolyzed tobacco and tobacco components [J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2003, 66 (1/2): 191-215.
- [3] 蒲俊, 刘彦岭. 烤烟纤维素含量与烟叶品质的相关性研究 [J]. *中国农业文摘 (农业工程)*, 2019, 31 (2): 67-70.
PU J, LIU Y L. The correlation between the content of cellulose in cured tobacco and the quality of tobacco leaves [J]. *Agricultural Science and Engineering in China*, 2019, 31 (2): 67-70. (in Chinese)
- [4] BANOŽIĆ M, JOKIĆ S, AČKAR Đ, et al. Carbohydrates-key players in tobacco aroma formation and quality determination [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25 (7): 1734.
- [5] YANG Y, PENG Q R, OU M Y, et al. Research progress in tobacco fermentation [J]. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2018, 6 (6): 105-114.
- [6] 卓治非, 林大燕, 高忠渊, 等. 生物技术在造纸法再造烟叶中应用的研究进展 [J]. *黑龙江造纸*, 2017, 45 (1): 15-17.
ZHUO Z F, LIN D Y, GAO Z Y, et al. The research progress of the application of biotechnology in paper-making reconstituted tobacco [J]. *Heilongjiang Pulp & Paper*, 2017, 45 (1): 15-17. (in Chinese)
- [7] 王莹, 范坚强, 包可翔, 等. 一株片烟中纤维素降解菌的筛选鉴定及其初步应用研究 [J]. *现代农业科技*, 2011 (8): 25-28.
WANG Y, FAN J Q, BAO K X, et al. Screening and identification of a cellulose degradation bacteria from tobacco *Lamina* and its preliminary application [J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2011 (8): 25-28. (in Chinese)
- [8] GRAVELY L E, GEISS V L, et al. Microbial digestion of tobacco materials using mixed cultures [P]. *US Patent*: 4476881, 1984.
- [9] 叶建斌, 王璐, 杨峰, 等. 类芽孢杆菌发酵原料浸提液提升再造烟叶品质 [J]. *中国烟草学报*, 2019, 25 (1): 33-38.
YE J B, WANG L, YANG F, et al. Improving quality of reconstituted tobacco via fermenting extract of its raw material with *Paenibacillus* sp [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2019, 25 (1): 33-38. (in Chinese)
- [10] 于少藤, 毛淑蕊, 胡安妥, 等. 改善烟叶品质微生物的筛选及其作用效果研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44 (4): 766-777.
YU S T, MAO S R, HU A T, et al. Study on screening of microorganisms for improving tobacco leaf quality and their effects [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44 (4): 766-777. (in Chinese)
- [11] 范坚强, 周彬, 宋纪真, 等. 片烟黑曲霉菌株产纤维素酶的条件优化及酶的分离纯化 [J]. *浙江农业学报*, 2012, 24 (6): 1122-1128.
FAN J Q, ZHOU B, SONG J Z, et al. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* separated from tobacco and its separation and purification [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2012, 24 (6): 1122-1128. (in Chinese)
- [12] 罗艳青, 张丹, 冯海玮, 等. DNS 法检测灰略红链霉菌 JSD-1 产纤维素酶的 CMC 酶活条件的优化 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36 (3): 156-162.
LUO Y Q, ZHANG D, FENG H W, et al. Optimization of conditions for CMCase activity of cellulase detected with DNS method for *Streptomyces griseorubens* (JSD-1) [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36 (3): 156-162. (in Chinese)
- [13] 布坎南 (R. E. BUCHANAN) 等. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] 郭勇. 酶工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [16] 王霞, 华琳, 张海龙, 等. 纤维素降解菌 CMC-4 的分离鉴定、诱变和酶学特性研究 [J]. *土壤*, 2017, 49 (5): 919-925.
WANG X, HUA L, ZHANG H L, et al. Isolation, identification, mutagenesis of cellulose-degrading bacterium CMC-4 and its enzymatic properties [J]. *Soils*, 2017, 49 (5): 919-925. (in Chinese)

- [17] 孙会刚, 徐慧敏, 黄天姿, 等. 产酸性纤维素酶细菌的筛选鉴定及其酶学性质 [J]. 食品科技, 2021, 46 (7): 55–59.
SUN H G, XU H M, HUANG T Z, et al. Screening, isolating and enzymatic properties of bacterium producing acidic cellulase [J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46 (7): 55–59. (in Chinese)
- [18] 李碧婵, 陈金燕, 苏雅娜, 等. 纤维素酶高产细菌的筛选、鉴定及酶学特性分析 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55 (17): 4572–4576.
LI B C, CHEN J Y, SU Y N, et al. Screening and identification of a cellulase producing bacterium and its cellulase characterization [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55 (17): 4572–4576. (in Chinese)
- [19] KALAIYARASI M, VIJAYARAGHAVAN P, RAJ S R F, et al. Statistical approach for the production of protease and cellulase from *Bacillus cereus* KA3 [J]. *Bioprocess Engineering*, 2017, 1: 93.
- [20] 薛磊, 郑泽浩, 郭志刚, 等. 烟草增香细菌的筛选及其作用效果 [J]. 中国烟草科学, 2019, 40 (5): 60–67.
XUE L, ZHENG Z H, GUO Z G, et al. Screening and application of aroma-enhancing bacteria for tobacco [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2019, 40 (5): 60–67. (in Chinese)
- [21] ABD ELHAMEED E, SAYED A R M, RADWAN T E E, et al. Biochemical and molecular characterization of five *Bacillus* isolates displaying remarkable carboxymethyl cellulase activities [J]. *Current Microbiology*, 2020, 77 (10): 3076–3084.
- [22] YANG J K, ZHANG J J, YU H Y, et al. Community composition and cellulase activity of cellulolytic bacteria from forest soils planted with broad-leaved deciduous and evergreen trees [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (3): 1449–1458.
- [23] 杨宗灿, 冯颖杰, 李龙飞, 等. 烟叶中纤维素高效降解菌的筛选与作用效果研究 [J]. 河南农业大学学报, 2018, 52 (3): 418–423.
YANG Z C, FENG Y J, LI L F, et al. Study on screening and application of an efficient cellulose-degrading strain from tobacco leaf [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2018, 52 (3): 418–423. (in Chinese)
- [24] 邹芳, 赵娟, 雷燕萍, 等. 一株烟草秸秆降解菌的分离、鉴定及酶学性质研究 [J]. 土壤, 2016, 48 (5): 939–945.
ZOU F, ZHAO J, LEI Y P, et al. Isolation, identification and enzymatic property of a tobacco straw degradation strain [J]. *Soils*, 2016, 48 (5): 939–945. (in Chinese)
- [25] 梅金飞. 烟杆高效菌剂研发及其应用[D]. 安徽: 阜阳师范大学, 2020.
MEI J F. Development and application of high-efficiency bactericide in tobacco rods[D]. Anhui: Fuyang Normal University, 2020. (in Chinese)

(责任编辑: 吴宇琳)