

文章编号: 1673-1689(2007)01-0084-06

# 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化

罗颖<sup>1</sup>, 欧阳嘉<sup>1,2</sup>, 许婧<sup>1</sup>, 何冰芳<sup>1</sup>

(1. 南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009; 2. 南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210047)

**摘要:**从温泉热源地区采集的大量泥土和水样中,筛选出一株在60℃生长的纤维素酶产生菌SH2。结合菌株的生理生化特性分析与Biolog微生物自动鉴定仪的鉴定结果,命名为热葡糖苷酶地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)SH2,该菌株兼性好氧,在45~60℃能较好地生长。对菌体生长与产酶培养条件优化表明:初始pH值为5.5,碳、氮源分别为蔗糖和玉米浆时有利于产酶,经48h发酵后纤维素酶酶活达0.36 IU/mL。纤维素酶反应条件研究表明,该纤维素酶的最适pH值为6.0,在pH 4.0~10.0范围具有较强的耐受性;在45~65℃间酶活差异仅在5%之内,显示了很好的温度耐受性。

**关键词:**热葡糖苷酶地芽孢杆菌 纤维素酶 耐热性

中图分类号:TQ 920.1

文献标识码:A

## Screening and Identification of a Thermostable Cellulase-Secreting Bacteria and Its Optimization for Cellulase Production

LUO Ying<sup>1</sup>, OUYANG Jia<sup>1,2</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, HE Bing-fang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210047, China)

**Abstract:** A thermophilic strain SH2 possessing cellulase was isolated at 60°C from hot-spring samples of east China coast. Based on the analysis of morphology and some biochemical and physiological characteristics, strain SH2 was identified as *Geobacillus thermoglucosidasius* combined with the analysis of Biolog Microstation Identification System. It was facultative aerobe. Strain SH2 was capable of growing well on 45 °C ~ 60 °C. According to optimization condition of cell growth and enzyme production, the initial pH is 5.5. The supernatant of strain incubated medium showed efficient activity of cellulase with addition of sucrose and corn steep as carbon and nitrogen sources respectively. The highest enzyme activity was reached 0.36 IU/mL after incubation for 48h. The optimal pH of the cellulase for the reaction is 6.0. This enzyme shows stable active over a broad range of temperature from 45 °C to 65 °C. These characteristics of the cellulase demonstrated that it's potential application in thermostable cellulase

收稿日期: 2006-03-07.

基金项目: 国家“973”项目(2003CB716000).

作者简介: 罗颖(1980-),女,四川宜宾人,微生物专业硕士研究生. Email: ivy\_luo1980@163.com

通讯作者: 何冰芳(1962-),女,浙江黄岩人,理学博士,教授,博导. 主要从事应用微生物、酶工程方面的研究. Email: bing-

万方数据 @njut.edu.cn

needed industry.

**Key words** : *Geobacillus thermoglucosidasius* ; cellulase ; thermophilic

世界上每年生成 1500 ~ 2000 亿 t 植物性有机物,其中约一半为纤维素物质,如何将纤维素物质降解转化为糖、乙醇、甲烷等容易利用的小分子有机物是当前国际上的重大课题之一。目前,对纤维素的降解利用主要采用酸碱化处理等化学手段,以及汽爆及蒸气加热等物理手段<sup>[1]</sup>。生物法由于对设备要求低,分解后的产物易回收利用,对环境污染较小等特点而备受重视。由于耐热细菌可生长于高温环境,培养过程中不易受常温微生物的污染等优点,分离和筛选多功能的高效纤维素产生菌就显得尤为重要,特别是它产生的纤维素酶具有较好的热稳定性,提高反应温度可加快降解速度,因此耐热纤维素酶在高温领域具有广泛的应用前景<sup>[2-4]</sup>。

纤维素酶是一个复杂酶系,根据其功能的不同可分为 3 大类:作用于纤维素非结晶区的内切葡聚糖酶(又称 CMCase),作用于纤维素无定型区切割糖苷键的外切葡聚糖酶,以及作用于纤维二糖的 $\beta$ -葡萄糖苷酶。通常 3 类酶的协同作用才能将结构复杂的天然纤维素降解<sup>[5-7]</sup>。关于纤维素酶产生菌的筛选研究多集中于里氏木霉等真菌领域,对于细菌领域的纤维素酶产生菌研究相对较少,偶见耐热纤维素酶产生菌的筛选,多为厌氧耐热纤维素酶产生菌<sup>[6]</sup>。关于兼性好氧菌的研究报道更少,这类细菌往往仅产单一的纤维素酶<sup>[7]</sup>,这在很大程度上限制了生物法降解天然纤维素的应用。

作者从东海温泉的热源地区采集样品中筛选出具有 CMCase 酶活的菌株,优化了菌体生长及产酶条件,同时对纤维素酶的性质进行了初步研究。研究表明,该菌株所产的纤维素酶有着较好的温度耐受性,对简单粉碎的麸皮有较强的降解能力,可能存在着混合功能的纤维素酶。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集** 在东海温泉的热源地区采集泥土和水样若干,温泉温度约 70 ~ 90 °C。

**1.1.2 培养基** CMCase 产生菌富集培养基:

1) 羧甲基纤维素培养基(g/L):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3, NH<sub>4</sub>Cl 2.0, 酵母膏 0.2, 羧甲基

纤维素钠(CMC-Na)5.0;玉米浆 1.0 mL/L, NaOH 调节 pH 值至 7.0。

2) 微晶纤维素培养基(g/L):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3, NH<sub>4</sub>Cl 2.0, 酵母膏 0.2, 微晶纤维素 5.0;玉米浆 1 mL/L, NaOH 调节 pH 值至 7.0。

3) 固体培养基(g/L):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, NH<sub>4</sub>Cl 2.0, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.5, 琼脂粉 18.0, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)5.0; NaOH 调节 pH 值至 7.0。

4) 基本培养基(g/L):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3, NH<sub>4</sub>Cl 2.0, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)5.0; NaOH 调节 pH 值至 7.0。

5) 最佳发酵培养基(g/L):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3, NH<sub>4</sub>Cl 2.0, 酵母膏 0.2, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)5.0, 蔗糖 5.0;玉米浆 8.0 mL/L, NaOH 调节 pH 值至 7.0。

**1.1.3 缓冲液配制** 不同 pH 值(4.0-10.0)缓冲液配制见文献[8],其中 pH 4.0 ~ 6.5 选择柠檬酸盐缓冲体系, pH 6.5 ~ 8.0 选择磷酸盐缓冲体系, pH 8.0 ~ 10.0 选择甘氨酸-NaOH 缓冲体系,浓度均为 50.0 mmol/L。

**1.1.4 试剂** CMC-Na(600 ~ 800 mPa·s)、酵母膏、蛋白胨均为上海国药集团化学试剂有限公司生产,微晶纤维素购自上海源聚生物科技有限公司;玉米浆为南京产,其他均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 耐热菌的富集培养与分离** 取少量温泉土样(温泉边缘土壤,70 ~ 80 °C,约 0.5 g)加入富集培养基中富集培养(25 mm × 150 mm 规格的试管装液量为 10.0 mL,60 °C,200 r/min),培养 3 d 后转接,在液体培养基中共转接两次,为防止液体蒸发,试管塞上棉塞,并定时补加一定的灭菌水。

将经过富集培养后的菌液作适当稀释,稀释梯度根据培养液的浑浊度而定(10<sup>5</sup> ~ 10<sup>7</sup> 倍)。取 100  $\mu$ L 稀释液,涂平板培养。培养约 24 h 后,用接种环挑出同一平板上不同形态的单菌落,再转接到平板上进行单菌落分离,作为初选菌并作进一步酶活力测定。

**1.2.2 刚果红杯碟快速筛选法** 用打孔器(自制,打孔直径约 7 mm)在固体平板上打孔,孔的数量根据样品数量而定,每盘约 5 ~ 10 个,其中将阳性对照

(1 g/L 饲料级纤维素酶酶液)注入中间孔处,便于比较<sup>[9]</sup>。

加入各菌株的培养液,将液体注满孔,不能溢出,放入 55 ~ 60 °C 培养箱中静置培养至孔中液体干掉为止(约 2 ~ 3 h)。用 0.1% 的刚果红溶液浸没平板染色 1 h,再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,每次洗脱时间为 5 min,洗脱两次<sup>[9]</sup>。具有一定纤维素酶活力的会出现较明显的透明圈。以培养基为空白对照,以饲料级纤维素酶液为阳性对照。

**1.2.3 CMCase 酶活测定方法** 按 1% 的量称取相应质量的 CMC-Na,溶于一定 pH 值的缓冲液中,取 1.0 mL CMC-Na 溶液与经适当稀释的酶液 0.5 mL 混合反应,30 min 后中止反应,用 DNS 法<sup>[10]</sup>测定 OD<sub>540 nm</sub>,以葡萄糖作标准。酶活单位定义:1 mL 培养液中每分钟产生 1 μmol 的葡萄糖为一个酶活单位(IU/mL)。

**1.2.4 菌体生物量测定** 将发酵液稀释适当倍数,在分光光度计 640 nm 波长处测其吸光值。菌体生物量以 OD<sub>640 nm</sub> 表示。

**1.2.5 SH<sub>2</sub> 菌种鉴定** 针对革兰氏染色结果进行生理生化特性研究,利用 Biolog 微生物鉴定系统,针对不同菌株提供的相应培养基对菌种进行培养,再选用相应的鉴定板进行鉴定,具体操作见文献[11]。

Biolog 微生物鉴定系统的鉴定原理:利用微生物对 95 种有机物分解代谢的能力与大量的数据库中微生物的性质相比较,由相关计算机系统给出目的菌的属与种名称,同时给出可信度数据<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 耐热纤维素酶产生菌的筛选

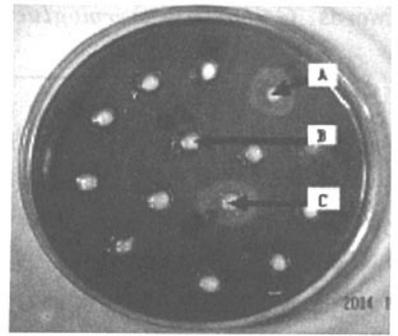
采用纤维素酶产生菌富集培养基进行富集培养,分离后得到近 20 株菌,将各菌株分别培养,取发酵液进行刚果红快速平板法筛选。由图 1 可见,阴性对照的培养基(B)未出现透明圈,菌株 SH<sub>2</sub>(A)具有与 1 g/L 饲料级纤维素酶液(C)相当的酶活,其余孔中的发酵液不显现酶活或活力较弱。

通过富集与筛选,从温泉泥土中筛选出 3 株具备一定纤维素酶活性的菌株,其中菌株 SH<sub>2</sub> 的发酵液能在 CMC 平板上形成显著的透明圈(见图 1),具有较高纤维素酶活力。

### 2.2 菌株的形态学特征及生理特征鉴定

菌株 SH<sub>2</sub> 在 CMC 平板上的菌落呈灰白色,有光泽,菌落表面平坦,边缘形状光滑规则,培养约 24 h 后多为细衰鞭状,部分出现偏端生芽孢,孢体膨大

呈椭圆形(见图 2)。革兰氏染色呈阳性。



A - SH<sub>2</sub> 发酵液; B - 培养基(空白对照); C - 饲料级纤维素酶,其余孔为其他菌株的培养液。

图 1 刚果红杯快速筛选纤维素酶产生菌

Fig. 1 Rapid screening for microorganisms possessing cellulase by the analysis of Congo red plant

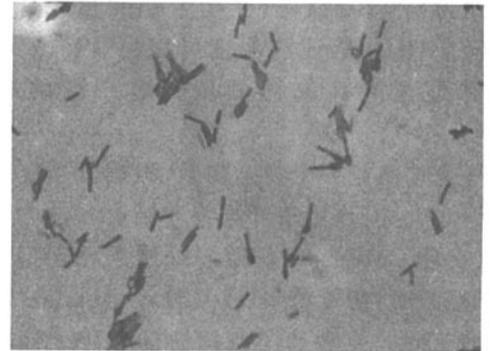


图 2 菌株 SH<sub>2</sub> 培养 24 h 后的形态

Fig. 2 The growth form of SH<sub>2</sub> after incubation for 24 h

通过穿刺培养,菌株 SH<sub>2</sub> 在培养基的表面和深处均能生长,表明该菌是兼性好氧菌。不同温度下的生长实验表明,菌株在 45 ~ 60 °C 的温度范围内能较好地生长。

将菌株 SH<sub>2</sub> 细胞悬浮液加入含有 95 种有机物的 Biolog 微孔板中,分别在培养 6 h 和 24 h 后,经 Biolog 细菌鉴定系统分析为 *Geobacillus thermoglucosidasius*, 给出的 SIM 值(相似率)为 0.81(一般认为 SIM 值高于 0.6,分析结果可靠)。该菌株的部分生理生化特性与伯杰氏手册描述的生理生化特性(形态特征、产芽孢、最适生长温度 55 °C、产葡糖苷酶等)一致,鉴定该菌株归属热葡糖苷酶地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)。

### 2.3 菌株 SH<sub>2</sub> 产耐热纤维素酶的条件优化

**2.3.1 不同培养温度对菌株 SH<sub>2</sub> 生长和产酶的影响** 接种后的培养液分别于 45、50、55、60、65 °C 中振荡培养 48 h 后,对菌体的生长和产酶分别进行检测,结果见图 3。可见培养温度对菌株 SH<sub>2</sub> 生长与产酶有显著影响,其最适生长温度和最适产酶温度都在 45 °C,当温度高于 50 °C 后菌的生长较弱,但培

养液仍具有较高的纤维素酶活力,同时也表明该菌所产的纤维素酶具有较高热稳定性。

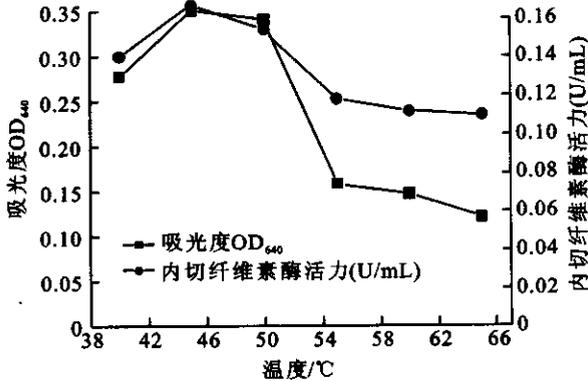


图 3 培养温度对菌株 SH2 生长和产酶的影响

Fig. 3 The effect of temperature on SH2 growth and the enzyme activity

2.3.2 培养基起始 pH 值对菌株 SH2 的生长与酶活的影响 以  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -citrate 缓冲体系配制不同 pH 值(4.0~8.0)的培养基,浓度为 100 mmol/L,在保证相同接种量的条件下,于 45 °C 培养 48 h 后测定其酶活和生物量,确定 SH2 最佳的初始培养 pH 值,结果见图 4。初始 pH 值的影响较大,当 pH 值为 6.0~8.0 时,菌体生长较好,但纤维素酶活力却较低,而初始 pH 值为 5.5 左右时,菌体的生物量较低,酶活达到了最高值,故确定培养液的最适初始 pH 值为 5.5。

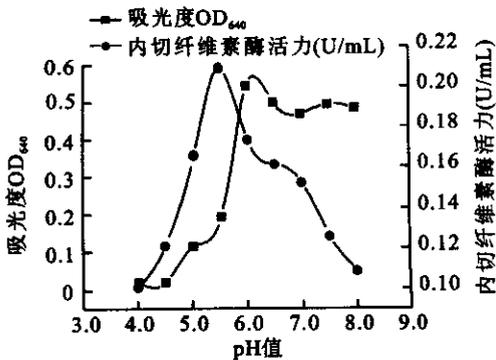


图 4 培养基起始 pH 值对菌株 SH2 生长和产酶的影响

Fig. 4 The effect of initial pH on SH2 growth and the enzyme activity

2.3.3 碳源对菌株 SH2 生长与产酶的影响 纤维素酶是诱导酶,在微生物发酵过程中,碳源又是诱导物的主要来源。为确定不同碳源对产酶的影响,以除去碳源的基本培养基为对照,选用不同的纤维素材料和一些可溶性糖类作为辅助碳源,分别添加到基础培养基中,45 °C 培养 48 h 时测定发酵液酶活和生物量(见表 1)。SH2 在不同种类的碳源培养基中,产酶能力有很大差别,少量添加蔗糖和葡萄糖,特别是蔗糖,能较大幅度地提高酶活,活力约为

添加前的 2.5 倍。很多研究表明,高质量浓度的葡萄糖或蔗糖对纤维素酶有阻遏作用,从菌株 SH2 的培养情况看,当葡萄糖和蔗糖的质量浓度高于 5 g/L 时,对纤维素酶的产生有一定的阻遏作用,而低质量浓度时有明显的促进作用。

研究还表明,麸皮能有效促进菌体生长,但 CMCase 酶活与菌体生长的提高幅度相比却无显著提高,考虑到本实验主要检测的是 CMCase 酶活(内切葡聚糖酶活力),麸皮成分复杂,作为惟一碳源时,需要多功能酶的协助才能降解;为此作者以木聚糖为底物,检测到该菌的发酵液还具有较高的木聚糖酶活力,初步测定木聚糖酶活力为 0.29 IU/mL。

表 1 不同碳源对菌株 SH2 生长和产酶的影响

Tab. 1 Effect of carbon sources on enzyme activity produced by SH2

碳源	质量浓度/(g/L)	生物量(OD <sub>640</sub> )	CMCase/(IU/mL)
对照	0	0.455	0.049
麸皮	5	3.165	0.108
玉米芯	5	0.755	0.066
CMC	5	0.715	0.084
CMC + 蔗糖	4 + 1	0.775	0.146
CMC + 葡萄糖	4 + 1	0.715	0.126
CMC + 蔗糖	4 + 3	0.665	0.217
CMC + 葡萄糖	4 + 3	0.703	0.136
CMC + 蔗糖	4 + 5	0.621	0.137
CMC + 葡萄糖	4 + 5	0.705	0.125

注:对照为基本培养基。

2.3.4 氮源对菌株 SH2 的生长与产酶的影响 以仅含少量无机氮源的基本培养基为对照,通过添加不同种类和数量的氮源进行实验,45 °C 培养 48 h 时测定发酵液酶活和生物量,确定 SH2 产酶的最佳氮源(见表 2)。多数有机氮源和无机氮源的添加都对酶活有一定的促进作用,但效果不明显。玉米浆(固型物质量分数 50%)对菌株 SH2 的纤维素酶的产酶具有明显的促进作用,当添加量达 10 mL/L 时,酶活达到 0.256 IU/mL,但玉米浆中成分复杂,究竟是何种成分影响其产酶,还有待进一步研究验证。

## 2.4 菌株 SH2 耐热纤维素酶的性质研究

2.4.1 反应温度对菌株 SH2 所产纤维素酶活性的影响 分别在不同的温度下进行酶反应(45~65 °C)检测其反应后的酶活。从图 5 可知,在 45~65

℃下反应 CMCase 酶活基本不变,其活性差异仅在5%的范围之内,具有很好的温度适应性。耐热纤维素酶在实际工业酶领域具有较广泛的用途<sup>[2,13]</sup>,因此菌株 SH2 所产的热稳定性 CMCase 有着重要的实际应用潜力。

表2 不同氮源对菌株 SH2 生长和产酶的影响

Tab.2 Effect of nitrogen sources on enzyme activity produced by SH2

氮源	质量浓度/ (g/L)	生物量 (OD <sub>640</sub> )	CMCase/ (IU/mL)
对照	0	0.56	0.106
牛肉膏	5	0.83	0.126
玉米浆	5 mL/L	1.25	0.195
玉米浆	10 mL/L	1.84	0.256
玉米浆	15 mL/L	1.46	0.231
蛋白胨	5	1.32	0.141
酵母膏	5	1.23	0.135
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5	0.71	0.125
NH <sub>4</sub> Cl	2.5	0.62	0.123
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.5	0.61	0.127
尿素	2.5	0.74	0.121

注:对照为基本培养基。

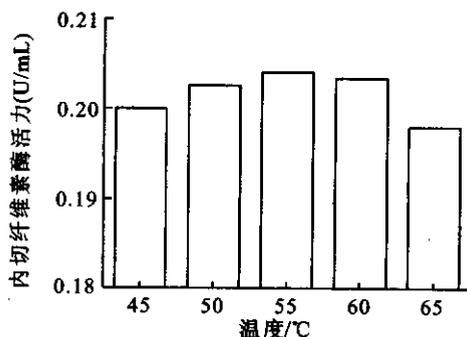


图5 反应温度对菌株 SH2 纤维素酶酶活的影响

Fig.5 The effect of reactive temperature on enzyme activity

2.4.2 反应 pH 值对菌株 SH2 的耐热纤维素酶活性的影响 将 0.5 mL 培养液与 1 mL 不同 pH 值的底物混合,55 ℃,180 r/min 条件下反应 30 min,测定酶活力(见图 6)。CMCase 在较宽的 pH 值范

围内有较高的酶活,其中 pH 值为 4.0 或 10.0 时分别能达到最高活力的 76% 和 53%,最适 pH 值为 6.0。耐热菌为适应恶劣环境往往具备一些抗逆的生理生化特性,文献[14]报道耐热菌所产的酶在 pH 值的变化上也多能表现出较好的耐受性,菌株 SH2 所产的纤维素酶在温度和 pH 值等方面具有较高的耐受性,此性质为该酶的实际开发应用奠定了基础。

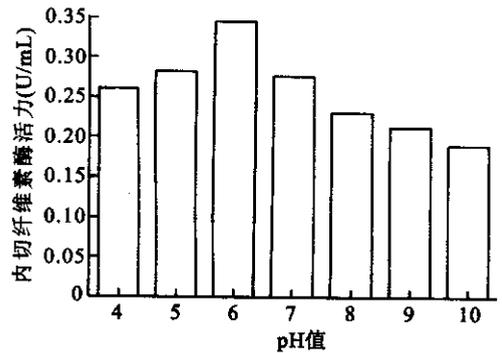


图6 反应 pH 值对菌株 SH2 纤维素酶酶活的影响

Fig.6 The effect of reactive pH on enzyme activity

### 3 结论

从东海温泉采集的泥土和水样中,经过富集培养与改进的刚果红杯碟平板筛选法快速筛选相结合,筛选出一株耐热纤维素酶产生菌 SH2。经形态特征的观察及部分生理生化特性的验证,并结合 Biolog 细菌自动鉴定仪鉴定,该菌株为热葡糖苷酶地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)。

菌株 SH2 在 45 ~ 60 ℃ 生长较好,产酶的最适初始培养基 pH 值为 5.5,以蔗糖为辅助碳源、以玉米浆为有机氮源时表现出较高酶活,发酵 48 h 后,纤维素酶活达 0.36 IU/mL。热葡糖苷酶地芽孢杆菌 SH2 所产纤维素酶具有很好的热稳定性和较广泛的 pH 值适应性,该酶在 45 ~ 65 ℃ 的范围内有稳定的酶活,在 pH 值为 4.0 或 10.0 时分别能达到最高活力的 76% 和 53%。

研究还发现,菌株 SH2 在以麸皮为唯一能源的培养基中生长良好,且培养液中有较高的葡萄糖含量,表明该菌可能具备复合的纤维素酶系。

### 参考文献(References):

- [1] Beltrame, Carniti P, Visciglio A, et al. Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw[J]. *Bioresour Technol*, 1992, 39: 165-171.
- [2] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review[J]. *Bioresour Technol*, 2003, 89: 17-34.

- [ 3 ] Yoshihiro H , Kenzo K. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate[ J ]. *Bacillus sp* KSM-S237 **Extremophiles** ,1997 ,1 :151 -156.
- [ 4 ] 李淑彬 ,陆广欣 ,林如妹 ,等. 嗜热菌—工业用酶的新来源[ J ]. 中国生物工程杂志 2003 23( 7 ) :67 -71.  
Li SB , Lu GX , Lin RM , et al. Thermophiles bacteria as a source of novel enzymes for industrial application[ J ]. **China Biotechnology** ,2003 23( 7 ) :67 -71.( in Chinese )
- [ 5 ] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[ J ]. 自然科学进展 ,2003( 13 ) :21 -29.  
Gao PJ. Research Development of degradation mechanism of cellulase and its molecular structure and function[ J ]. **Progress in Natural Science** ,2003( 13 ) :21 -29.( in Chinese )
- [ 6 ] 胡国全 ,邓宇 ,徐恒 ,等. 极端嗜热厌氧纤维素菌的分离鉴定、系统发育分析及其酶学性质的研究[ J ]. 应用与环境生物学报 ,2004 ,10( 2 ) :197 -201.  
Hu GQ , Deng Y , Xu H , et al. Isolation of a thermophilic cellulolytic anaerobic bacterium and its biological characteristics[ J ]. **China J Application and Environment Biology** ,2004 ,10( 2 ) :197 -201.( in Chinese )
- [ 7 ] 陈燕勤 ,毛培宏 ,曾宪贤. 细菌纤维素酶结构和功能的研究进展[ J ]. 化学与生物工程 ,2004( 6 ) :4 -6.  
Chen YQ , Mao PH , Zeng XX , et al. Studies on structures and functions of the cellulase from Bacteria[ J ]. **Chemistry & Bioengineering** ,2004 ,6 :4 -6.( in Chinese )
- [ 8 ] 陈钧辉 ,陶力 ,李俊 ,等. 生物化学实验[ M ]. 北京 :科学出版社 ,2003.
- [ 9 ] 沈业寿 ,王光存 ,陈斌. 超薄层琼脂板扩散法快速检测纤维素酶[ J ]. 中国食用菌 ,1994 ,13( 5 ) :33 -34.  
Shen YS , Wang GC , Chen B. Quick determination of cellulose by ultrathin-layer agar plate diffusion technique[ J ]. **Edible Fungi of China** ,1994 ,13( 5 ) :33 -34.( in Chinese )
- [ 10 ] 管斌 ,丁友昉. 还原糖测定方法的规范[ J ]. 无锡轻工大学学报 ,1999 ,18( 3 ) :74 -79.  
Guan B , Ding YF. The modification of the DNS method for the determination of reducing sugar[ J ]. **Journal of Wuxi University of Light Industry** ,1999 ,18( 3 ) :74 -79.( in Chinese )
- [ 11 ] Robin S. Microlog System Release 4.2 User guide[ M ]. USA :Hayward CA ,2004.
- [ 12 ] 谢家仪 ,王永力. BIOLOG 细菌自动鉴定系统的应用与研究[ J ]. 微生物学通报 ,1996 ,23( 5 ) :264 -267.  
Xie JY , Wang YL. Application and study of the biolog automated bacterial identification system[ J ]. **Microbiology** ,1996 ,23 ( 5 ) :264 -267.( in Chinese )
- [ 13 ] 郭春雷 ,彭谦. 高温菌研究进展[ J ]. 生物学杂志 . 2003 ,20( 4 ) :1 -3.  
Guo CL , Peng Q. The progress of thermophilic microbiology research[ J ]. **Journal of Biology** ,2003 ,20( 4 ) :1 -3.( in Chinese )
- [ 14 ] Vieille C , Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes :sources , uses , and molecular mechanism for thermostability[ J ]. **Microbiol Mol Biol Rev** ,2001 ,65 ,143.

( 责任编辑 :李春丽 )