

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(8):981-987; 4 August 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

瘤胃木质纤维素降解菌及降解酶基因的研究进展

陈富荣^{1,2}, 朱雅新², 东秀珠², 刘丽华¹, 黄力², 戴欣^{2*}

(¹ 内蒙古工业大学化工学院基因工程实验室, 呼和浩特 010051)

(² 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:反刍动物瘤胃是公认的木质纤维素高效降解的天然反应器,对瘤胃微生物的研究已成为开发生物能源的热点领域之一。目前的研究手段已经从传统的依赖分离培养从瘤胃中获得木质纤维素降解菌,并对降解菌中的木质纤维素降解酶逐一分析,发展到通过基因组/元基因组学技术,直接从瘤胃中发现并获得大量新的木质纤维素降解酶基因/基因簇,进而探讨其降解的分子机理。已有的研究表明,瘤胃微生物降解木质纤维素的过程非常复杂,涉及大量不同种类的微生物及基因/基因簇,随着新分析技术的建立和完善,对这些微生物和基因的研究已取得了诸多进展。本论文综述了近期有关该方向的研究进展。

关键词:瘤胃;木质纤维素降解;基因/基因簇;元基因组

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-0981

木质纤维素中的纤维素和半纤维素是自然界中含量最多的可再生资源,其开发和利用被认为是缓解能源问题最有效的途径之一。很早以前,人们就知道反刍动物的瘤胃具有高效消化降解木质纤维素的能力,瘤胃微生物也因此受到众多微生物学家、酶学家的关注。瘤胃微生物主要包括真菌、细菌和古菌,其中参与木质纤维素降解的主要是真菌和细菌,古菌则与甲烷形成相关。瘤胃真菌是迄今唯一已知的厌氧真菌类群,尽管已知它们在瘤胃降解木质纤维素中起非常重要的作用,但由于难以分离纯化和传代培养,对它们的生理生化特性了解不多。已有的研究大多集中于从瘤胃中分离具有木质纤维素降解功能的细菌,并通过培养纯化以及生理生化特性的研究,推测其在瘤胃木质纤维素降解中可能的作用机制。随着分子生物学技术尤其是环境元基因组学技术的发展,对瘤胃微生物的研究逐渐深入到基因水平,并取得了较大的进展。本文将对有关瘤胃中主要木质纤维素降解菌及降解酶基因的研究进展

做一综述。

1 通过分离培养获得的瘤胃木质纤维素降解菌及其降解酶

1966年, Hungate 根据瘤胃微生物的代谢特点将其分为 11 大类,即纤维分解菌、半纤维素分解菌、果胶分解菌、蛋白分解菌、淀粉分解菌、脂肪分解菌、维生素合成菌、产甲烷菌、单糖利用菌、酸利用菌、产氨细菌和尿素分解细菌等^[1]。至今分离获得纯培养的瘤胃细菌约有 29 个属 69 个种^[2],其中参与降解纤维素的细菌主要有:白色瘤胃细菌(*Ruminococcus albus*)、产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)、黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、小生纤维梭菌(*Clostridium cellobioparus*)、小瘤胃杆菌(*Ruminobacter parvum*);参与降解半纤维素的细菌主要有:溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、长芽孢梭菌(*Clostridium longisporium*)、湖头梭菌(*Clostridium locheadii*)。其中溶纤维丁酸弧菌中只有少量几个种

基金项目:国家自然科学基金(30770053);中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-YW-11B1)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807418; Fax: +86-10-64807429; E-mail: daixin@im.ac.cn

作者简介:陈富荣(1984-),女,内蒙古乌兰察布市人,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物。E-mail: chen_furong@126.com

收稿日期: 2010-01-14; **修回日期:** 2010-03-16

能高效降解木质纤维素^[3-4]。

对通过分离培养获得的瘤胃微生物的研究结果表明,瘤胃中纤维素降解的3个优势菌分别是黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、白色瘤胃细菌(*Ruminococcus albus*)和产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)。

1.1 黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)

黄色瘤胃球菌是瘤胃中重要的厌氧革兰氏阳性纤维降解菌。已有的研究表明,黄色瘤胃球菌中可能存在类似纤维小体(Cellulosome)的多酶复合物^[5]。黄色瘤胃球菌菌株17的纤维小体复合物由*ScaA*,*ScaB*,*ScaC*,*CttA*和*ScaE*等5个基因组成的*sca*基因簇编码,菌株FD-1虽然也含有与菌株17相同结构的*sca*基因簇,但它们的DNA序列有很大的差异,即编码纤维小体的基因簇具有菌株特异性^[6]。

对黄色瘤胃球菌FD-1基因组的分析表明,在目前已知的与纤维素降解有关的细菌中,该菌株具有最多的与纤维小体相关的蛋白,含有坞因子(dockerin)的酶的多样性表明,该菌株可以组成多种纤维小体。基因芯片分析显示^[7],菌株FD-1所利用的底物对纤维小体的形成有一定的诱导作用,在含有纤维素底物的培养基中生长时会优先表达与复杂碳水化合物水解有关的酶,但上调程度最高的一些半纤维素酶,而不是纤维素酶。对黄色瘤胃球菌菌株17的酶谱分析同样发现,在纤维素培养基中,该菌株会表达高分子量的木聚糖酶(典型的半纤维素酶)^[8]。对这些纤维小体相关蛋白表达结果可能的解释是:典型的纤维素是被其它植物细胞壁多糖物质包被的,因此瘤胃环境中的黄色瘤胃球菌很少遇到纯粹的纤维素,而需要大量的半纤维素酶降解木质纤维素中非纤维素的植物细胞壁组分^[9]。

1.2 白色瘤胃细菌(*Ruminococcus albus*)

白色瘤胃球菌分离于1957年(Hungate, 1957),被认为是瘤胃降解纤维素的主要菌种之一,其大部分分离株都能利用纤维素、木聚糖和纤维二糖作为碳源,并且具有多种木质纤维素降解酶,包括 β -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、 α -阿拉伯糖苷酶、纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶和 β -1,4-木聚糖酶等活性。人们发现白色瘤胃球菌对纤维素的黏附对于随后的纤维素降解是至关重要的一步,并已从基因的角度证实了白色瘤胃球菌纤维小体类似物的存在,但对其纤维降解机制的了解; 有对黄色瘤胃球菌认识的多^[5, 10-13]。

2004年Morrison研究小组在白色瘤胃球菌菌株8中发现了家族9和家族48的纤维素酶(Cel9B和Cel48A)。与梭菌纤维小体不同,白色瘤胃球菌的Cel9B和Cel48A在C端均有一个家族37的碳水化合物结合模块(Carbonhydrate binding module 37, CBM37),该结合模块代替了形成纤维小体复合物必需的坞因子结构域,且能结合许多多糖(包括纤维素)^[14],因此推测它们有可能参与白色瘤胃球菌对纤维素的黏附。最近的研究已证实,CBM37模块(module)能够帮助酶固定在细菌膜表面,它可能在白色瘤胃球菌纤维素酶的黏附过程中作为一个桥梁将细菌和它的多糖底物衔接起来。有趣的是,白色瘤胃球菌中许多这类糖苷水解酶都具有CBM37,而这种结构似乎是属于白色瘤胃球菌所独有的^[15]。

到目前为止,已经在白色瘤胃球菌中发现Type IV pili、多糖蛋白质复合物、纤维小体和CBM37模块参与底物的黏附过程。如果白色瘤胃球菌确实具有这4种黏附机制,这也许就解释了为什么白色瘤胃球菌能够在与其它两种主要的纤维素降解菌——黄色瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌与纤维素黏附的竞争中占据优势,并能够在瘤胃这样复杂的生态系统中生存。

1.3 产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)

产琥珀酸丝状杆菌是瘤胃中主要的纤维素降解菌之一^[16],它不仅能高效降解多种形式的结晶纤维素,也可以降解半纤维素,具有很高的降解不同植物细胞壁多糖的能力,所以一直是研究瘤胃微生物高效降解木质纤维素的主要模型。已对产琥珀酸丝状杆菌S85菌株酶系统中20多个酶(包括不同的纤维素酶、木聚糖酶、阿魏酸酯酶、乙酰酯酶、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶)的酶学性质进行了研究。对菌株S85全基因组序列的分析表明,该菌的纤维降解酶系比原来所认为的复杂得多,有100多个可能的糖苷水解酶(GH)基因存在于该基因组中,对于这100多个糖苷水解酶在体内如何协调从而高效降解木质纤维素的机制仍不清楚。新的研究表明,该菌株中存在一个具有独特的三结构域的乙酰木聚糖酯酶基因,它由一个酯酶结构域(CE)、一个碳水化合物结合结构域(CBM6)和一个未知功能的结构域(FPm-1)组成。FPm-1结构域为产琥珀酸丝状杆菌特有的模块,它在降解过程对碳水化合物结合方面起到的作用甚至比CBM6更加关键^[17],推测产琥珀酸丝状杆菌中这种独有的碳水化合物结合模块与白色瘤胃所独有的CBM37有着类

似的功能。当然,这一推测还有待进一步验证。

为了了解产琥珀酸丝状杆菌中糖苷水解酶的表达调控机理,Béra-Maillet 等利用 GH 基因转录产物定量分析方法(RT-qPCR)对羊瘤胃中 8 个 GH 基因(包括 5 个纤维素酶基因,1 个地衣聚糖酶基因,2 个木聚糖酶基因)的转录产物丰度进行分析,发现这些 GH 基因同时转录,且转录水平很接近。但在限菌羔羊(即瘤胃中纤维降解菌仅有产琥珀酸丝状杆菌的羔羊)的瘤胃微生物中,GH 基因表达水平明显高于普通羊,提示普通羊中存在的纤维降解菌之间的相互作用可能降低产琥珀酸丝状杆菌中 GH 基因的表达^[18],其机制仍有待进一步研究。

瘤胃中还有其他许多微生物参与木质纤维素的降解过程,如普氏菌属(*Prevotella*)的 *P. bryantii* 和 *P. ruminicola*,它们既能降解木聚糖,又具有羧甲基纤维素(CMC)酶活性。但这些菌种的纯培养物在体外并不能有效地降解植物细胞壁,而只有与其他纤维素降解菌共同培养时才能高效利用木聚糖和果胶^[19]。已在普氏菌属(*Prevotella*)中发现参与木聚糖降解的基因簇^[20-21],在 *P. bryantii* B₁₄ 的木聚糖降解基因簇中还发现了双组分调控蛋白 XynR^[22],这些结果都将有助于对瘤胃微生物木质纤维素降解机制进行更深入的研究。

2 瘤胃微生物的元基因组学研究

基于 16S rRNA 基因的定量分析表明^[23],采用传统的分离培养方法获得的 22 种主要瘤胃细菌优势种^[24],仅占瘤胃微生物中很小的一部分^[12]。在分离培养中被认为是优势的、并且被广泛研究的微生物(如黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌),只占瘤胃微生物总量的不到 1%,有些还不到 0.03%^[23]。也就是说,瘤胃中至少有 80% - 90% 的微生物目前尚未获得培养。对这些大量的未培养微生物基因的研究,有助于发现新的酶资源、新的酶学特性和新的代谢途径,也将为全面阐释瘤胃微生物木质纤维素降解机制奠定基础。

元基因组技术(Metagenomics)是近年来发展起来的、通过提取环境样品中总 DNA,构建文库或直接测序,获得并研究该样品所有基因的方法^[25]。这种技术,使人们得以在基因水平上直接分析环境样品中未培养微生物物种的物质代谢和能量代谢以及它们可能的生态功能^[26],同时也是获得新的功能基因和新的代谢类型的重要途径^[27-29]。目前已有多个实验室利用元基因组技术对各种瘤胃中的微生物

进行研究,并取得了一系列进展。

2.1 瘤胃噬菌体文库

2005 年,德国 GBF 的科学家成功构建了奶牛瘤胃微生物元基因组噬菌体文库^[30],该文库的 2×10^5 个噬菌体颗粒中插入片段的平均长度为 5.5 kb。从该文库中获得了 3 个新的降解酶基因,分别为聚酚降解活性(可能是一种新的木质素降解酶^[30]),多酚氧化酶^[31]以及 α -淀粉酶^[28]。2006 年,美国科学家构建了牛瘤胃液微生物元基因组噬菌体文库^[29],该文库插入片段平均长度为 3 kb。从文库中获得了 1 个可同时降解纤维素,木聚糖和甘露聚糖的酶基因 *GH6248*,它编码的、由 917 个氨基酸残基组成的酶具有糖苷水解酶家族 5 和家族 26 两个活性结构域,可降解羧甲基纤维素、 β -葡聚糖、地衣多糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖、甘露聚糖、木聚糖、阿拉伯木聚糖和木葡聚糖等多种底物。此类一个糖苷水解酶具有两个或多个催化结构域的例子还很少,推测在瘤胃中为了便于高效降解木质纤维素,纤维素酶和半纤维素酶通过基因融合形成了这种多功能酶。这种多功能酶具有潜在应用价值,即可以利用一种酶完成原来需要多个酶参与才能完成的过程。

2.2 瘤胃 cosmid 文库

2005 年,我国广西大学冯家勋实验室构建了成年黄牛瘤胃微生物元基因组 cosmid 文库^[32],该文库插入片段的平均大小为 35 kb,从中获得了 3 个可能与纤维素降解相关的新基因。其中 2 个基因编码的蛋白与未培养细菌纤维素酶相似性很高,这 2 个酶同时具有木聚糖酶活性;另外 1 个基因编码的是未培养细菌的 β -葡萄糖苷酶。随后,他们又从水牛瘤胃微生物元基因组 cosmid 文库中筛选到了 1 个新的酸性纤维素酶基因^[33],该酶在很宽的 pH 范围(pH3.5 - 10.5)内有活性,最适 pH 值为 4.5,且具有很多与其他纤维素酶不同的特性,表明瘤胃中纤维素酶及纤维素降解机制存在多样性。在该 cosmid 文库中还发现了 2 个参与木质纤维素降解的基因簇,其中几个糖苷水解酶相互协作,共同完成对木质纤维素的降解。

2.3 瘤胃 BAC 文库

从总体上看,目前国内外构建的瘤胃微生物元基因组文库主要是插入片段较小的噬菌体文库和 cosmid 文库,研究工作也主要集中在对新的单个基因或酶的筛选以及它们的异源表达及其产物酶学特性分析等方面。由于天然木质纤维素是由纤维素、

半纤维素以及木质素经多种化学键复合而成,任何单一的水解酶很难破坏这种复杂的分子结构,往往需要多种酶协同作用完成降解,而相关酶的编码基因有时通过基因簇的方式来协同表达和作用,因此,通过构建大片段 DNA 文库(如 BAC 文库)有可能获得降解酶基因/基因簇的更完整的信息。

2006 年,本实验室成功构建了荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 BAC 文库^[34],获得了 15360 个克隆,文库的插入片段平均长度为 54.5 kb,库容 837 Mb。对文库纤维素降解活性的初筛已经得到了 20 多个阳性克隆,分析这些阳性克隆对木聚糖、地衣多糖以及纤维二糖的降解活性发现,很多克隆具有两种或两种以上与纤维素、半纤维素降解有关的酶活。2008 年,本实验室还成功构建了青海牦牛瘤胃元基因组 BAC 文库。对该 BAC 文库中部分活性克隆的序列测定和分析,证实了瘤胃中许多纤维素降解酶相关基因是成簇排列的(结果未发表)。

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所从我们构建的荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 BAC 文库中筛选到两个新的脂肪酶基因 *RlipE1* 和 *RlipE2*,推测它们分别编码含 361 和 225 个氨基酸残基的脂肪酶。其中 *RlipE1* 与其他细菌酯酶/脂肪酶相似性低于 50%,根据氨基酸序列构建的进化树显示,*RlipE1* 同另外 6 个细菌脂肪酶聚为一簇,不属于任何一个已知的脂肪酶家族,它们可能构成脂肪分解酶的新的亚家族;*RlipE2* 与 *T. carboxydivorans* *Nor1* 的一个羧酸酯酶的相似性高达 90%。底物特异性研究表明,这两个酶对长酰基链底物($>C_{12}$)的活性远远大于短酰基链,说明它们属于脂肪酶家族,酯酶家族^[35]。2009 年,又从该 BAC 文库中筛选获得了 18 个脂肪酶酶活阳性克隆,并对克隆的脂肪酶酶学性质进行了分析,发现这些酶的最适 pH 为 7.4,属于中性脂肪酶,其中的一个脂肪酶的热稳定性很强,有工业应用前景^[36];另外他们还对该文库的尿酶克隆进行了筛选和分析,共筛选到 12 个尿酶阳性克隆,对其酶活力及酶活最适 pH 和温度的研究结果显示,12 个脲酶克隆具有高低不等的酶活力,最适 pH 差异也很大,酶切图谱上的 DNA 片段分析表明,筛选到的脲酶阳性克隆具有较大的插入片段,有助于进一步研究脲酶基因簇和脲酶基因的表达调控^[37]。

2.4 元基因组测序

随着测序技术的发展和完善,对瘤胃微生物元基因组进行、测序并注释已成为可能。2009 年,Brule 等分别对纤维素黏附的瘤胃微生物及瘤胃液

微生物元基因组进行了直接测序和分析^[38]。分析结果显示:(1)对瘤胃微生物元基因组测序有助于更好地了解瘤胃微生物在降解木质纤维素过程中的协同作用。元基因组学分析结果直接证实,原来认为的瘤胃中降解木质纤维素的瘤胃球菌,实际在瘤胃微生物中所占比例非常低;(2)瘤胃微生物元基因组序列中存在大量的编码糖苷水解酶催化模块的基因,它们分别属于 35 个不同的糖苷水解酶家族;仅发现 3 个家族的碳水化合物结合模块(CBM6, CBM13 and CBM32)和 3 个坞因子模块,没有发现纤维小体中常见的黏附因子(cohesin)和 CBM3 模块,表明瘤胃中并非以纤维小体作为其主要的木质纤维素酶组成方式(甚至很罕见);(3)基因组中编码降解木聚糖主链和果胶主链的酶基因相对较少,而降解这些多糖侧链的酶,如酯酶等则比较多。

数量巨大,种类繁多的瘤胃微生物构成了一个复杂的群落体系,通过这些微生物之间的协同作用最终将反刍动物摄入的木质纤维素降解为可提供给宿主利用的糖类、可挥发性脂肪酸以及蛋白质等物质。尽管对瘤胃微生物的研究已有六十多年的历史,但人们对瘤胃中木质纤维素降解这一复杂过程仍知之甚少。相信随着技术的进步,尤其是测序技术的日臻完善与发展,人们终将揭示瘤胃微生物木质纤维素降解的这一复杂机制。

参考文献

- [1] Hungate RE. The Rumen and Its Microbes. New York and London: Academic Press, 1966.
- [2] 黄青云. 畜牧微生物学. 北京:中国农业出版社, 2004.
- [3] Dehority BA, Grifo AP, Tirabasso PA, Fluharty FL. Relationship between rumen bacterial concentrations and total numbers. *Journal of Dairy Science*, 1992, 75(12): 3452-3454.
- [4] Miron J, Ben-Ghedalia D. Digestion of cell-wall monosaccharides of ryegrass and alfalfa hays by the ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993, 39(8):780-786.
- [5] 陈小连,刘建新,王佳堃,徐建雄. 瘤胃纤维分解菌多纤维素酶体及其类似物的研究进展. 中国畜牧杂志(*Chinese Journal of Animal Science*), 2009, 45(3):50-53.

- [6] Jindou S, Brulc JM, Levy-Assaraf M, Rincon MT, Flint HJ, Berg ME, Wilson MK, White BA, Bayer EA, Lamed R, Borovok I. Cellulosome gene cluster analysis for gauging the diversity of the ruminal cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 285(2):188-194.
- [7] Berg Miller ME, Antonopoulos DA, Rincon MT, Band M, Bari A, Akraiko T, Hernandez A, Thimmapuram J, Henrissat B, Coutinho PM, Borovok I, Jindou S, Lamed R, Flint HJ, Bayer EA, White BA. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Public library of science one*, 2009, 4(8):e6650.
- [8] Flint HJ, Zhang JX, Martin J. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Current Microbiology*, 1994, 29:139-143.
- [9] Aurilia V, Martin JC, Scott KP, Mercer DK, Johnston MEA, Flint HJ. Organisation and variable incidence of genes concerned with the utilization of xylans in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Anaerobe*, 2000, 6:333-340.
- [10] Morrison M, Miron J. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins? *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 185(2):109-115.
- [11] Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(6):1294-1309.
- [12] Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Review*, 2003, 27(5):663-693.
- [13] Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(2):121-131.
- [14] Xu Q, Morrison M, Nelson KE, Bayer EA, Atamna N, Lamed R. A novel family of carbohydrate-binding modules identified with *Ruminococcus albus* proteins. *FEBS Letters*, 2004, 566(1-3):11-16.
- [15] Ezer A, Matalon E, Jindou S, Borovok I, Atamna N, Yu Z, Morrison M, Bayer EA, Lamed R. Cell surface enzyme attachment is mediated by family 37 carbohydrate-binding modules, unique to *Ruminococcus albus*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(24):8220-8222.
- [16] Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Bera-Maillet C, Forano E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6):2676-2685.
- [17] Yoshida S, Mackie RI, Cann IK. Biochemical and domain analyses of FSUAxe6B, a modular acetyl xylan esterase, identify a unique carbohydrate binding module in *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(2):483-493.
- [18] Béra-Maillet C, Mosoni P, Kwasiborski A, Suau F, Ribot Y, Forano E. Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *Journal of Microbiology Method*, 2009, 77:8-16.
- [19] Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP. The Rumen Microbial Ecosystem. 2nd eds. London: Blackie Acad. & Professional, 1997.
- [20] Gasparic A, Martin J, Daniel AS, Flint HJ. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B(1)4: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta-(1,4)-xylosidase activities. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, 61(8):2958-2964.
- [21] Dodd D, Kocherginskaya SA, Spies MA, Beery KE, Abbas CA, Mackie RI, Cann IK. Biochemical analysis of a beta-D-xylosidase and a bifunctional xylanase-ferulic acid esterase from a xylanolytic gene cluster in *Prevotella ruminicola* 23. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(10):3328-3338.
- [22] Miyazaki K, Miyamoto H, Mercer DK, Hirase T, Martin JC, Kojima Y, Flint HJ. Involvement of the multidomain regulatory protein XynR in positive control of xylanase gene expression in the ruminal anaerobe *Prevotella bryantii* B(1)4. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(7):2219-2226.
- [23] Stevenson DM, Weimer PJ. Dominance of *Prevotella* and

- low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(1):165-174.
- [24] Krause DO, Russell JB. How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science*, 1996, 79: 1467-1475.
- [25] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-249.
- [26] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667):66-74.
- [27] Feng Y, Duan CJ, Pang H, Mo XC, Wu CF, Yu Y, Hu YL, Wei J, Tang JL, Feng JX. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(2):319-328.
- [28] Ferrer M, Beloqui A, Golyshina OV, Plou FJ, Neef A, Chernikova TN, Fernandez-Arrojo L, Ghazi I, Ballesteros A, Elborough K, Timmis KN, Golyshin PN. Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. *Biotechnology Journal*, 2007, 2(2):207-213.
- [29] Palackal N, Lyon CS, Zaidi S, Luginbuhl P, Dupree P, Goubet F, Macomber JL, Short JM, Hazlewood GP, Robertson DE, Steer BA. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74:113-124.
- [30] Ferrer M, Golyshina OV, Chernikova TN, Khachane AN, Reyes-Duarte D, Santos VA, Strompl C, Elborough K, Jarvis G, Neef A, Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12):1996-2010.
- [31] Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martinez-Arias A, Golyshina OV, Zumarraga M, Yakimov MM, Garcia-Arellano H, Alcalde M, Fernandez VM, Elborough K, Andreu JM, Ballesteros A, Plou FJ, Timmis KN, Ferrer M, Golyshin PN. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen; biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(32):22933-22942.
- [32] 赵广存. 牛瘤胃未培养微生物纤维素酶基因的克隆、鉴定及表达. 广西大学硕士论文, 2005.
- [33] Duan CJ, Xian L, Zhao GC, Feng Y, Pang H, Bai XL, Tang JL, Ma QS, Feng JX. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(1):245-256.
- [34] 朱雅新, 王加启, 马润林, 黄力, 董志扬. 荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 BAC 文库的构建与分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(2): 213-216.
- [35] Liu K, Wang J, Bu D, Zhao S, McSweeney C, Yu P, Li D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 385(4):605-611.
- [36] 赵圣国, 王加启, 刘开朗, 朱雅新, 卜登攀, 李旦, 于萍. 奶牛瘤胃微生物元基因组文库中脂肪酶的筛选与酶学性质. *生物工程学报(Journal of Biological Engineering)*, 2009, 25(6):869-874.
- [37] 赵圣国, 王加启, 卜登攀, 刘开朗, 李旦, 于萍, 魏宏阳, 周凌云, 李发弟. 奶牛瘤胃微生物 BAC 文库中脲酶克隆的筛选与分析. *中国农业大学学报(Journal of China Agricultural University)*, 2008, 13(6): 61-65.
- [38] Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller ME, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE, White BA. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(6): 1948-1953.

Lignocellulose degrading bacteria and their genes encoding cellulase/hemicellulase in rumen-A review

Furong Chen^{1,2}, Yaxin Zhu², Xiuzhu Dong², Lihua Liu¹, Li Huang², Xin Dai^{2*}

(¹ College of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051, China)

(² State Key Laboratory of Microbial Recourse, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Rumen of ruminant animals is known as a natural reactor involved in highly efficient lignocelluloses degradation. Rumen fibrolytic microbes have attracted an increasing attention for their potential value in biofuel research. Studies on rumen microbes have traditionally entailed the isolation of fibrolytic bacteria and subsequent analysis of fibrolytic enzymes. Developments in genomic and metagenomic approaches have made it possible to isolate directly genes and gene clusters encoding fibrolytic activities from rumen samples, permitting a global analysis of mechanisms of degradation of lignocellulose in rumen. Research in this field shows that lignocellulose degradation in rumen is a complex process involving a number of different microbes and is effected by a huge array of hydrolytic enzymes in a concerted fashion. This review briefly summarizes results from recent studies, especially metagenomic studies, on lignocellulose degradation in rumen.

Keywords: rumen; lignocellulose degradation; genes/gene clusters; metagenomics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770053) and the Project of Knowledge Innovation of Chinese Academy of Sciences (KSCX1-YW-11B1)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807418; Fax: +86-10-64807429; E-mail: daixin@im.ac.cn

Received: 14 January 2010/Revised: 16 March 2010

1953年创刊以来所有文章全文上网

从2008年1月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicron>)浏览、查询、免费下载全文!由于《微生物学报》历史久远,为方便读者查阅,将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表
2010年8月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊6年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008	月刊	48	1 - 12
2009	月刊	49	1 - 12
2010	月刊	50	8