

## 嗜热厌氧纤维素分解菌的分离、鉴定及其酶学特性

赵银瓶, 马诗淳, 孙颖杰, 黄艳, 邓宇\*

农业部沼气科学研究所, 农业部农村可再生能源开发利用重点实验室, 成都 610041

**摘要:** 【目的】分离高效降解纤维素的嗜热厌氧菌, 通过与嗜热产乙醇菌株联合培养的方式, 为生产纤维素乙醇提供微生物资源。【方法】利用厌氧分离技术从降解纤维素的马粪富集物中分离到一株嗜热厌氧细菌 HCp。采用形态学观察、生理生化鉴定、结合 16S rDNA 序列的系统发育学分析确定该菌株的分类地位, 利用 DNS 酶活分析方法测定此分离菌株的酶学性质。【结果】分离菌株 HCp 革兰氏染色阴性, 直杆, 细胞单个或成对出现, 菌体大小为  $(0.35 - 0.50) \mu\text{m} \times (2.42 - 6.40) \mu\text{m}$ , 严格厌氧, 形成芽胞, 能运动, 对新霉素有一定的抗性。此菌能利用滤纸纤维素、纤维素粉、微晶纤维素、脱脂棉和水稻秸秆、明胶等, 还可以利用葡萄糖、纤维二糖、木糖、木聚糖、果糖、蔗糖、核糖、半乳糖、麦芽糖、山梨糖、海藻糖、蜜二糖、甘露糖等。该菌株在 pH 6.5-8.5、温度 35-70℃、盐浓度 0%-1.0% 范围内利用纤维素生长, 最适 pH 为 6.85, 最适温度为 60℃, 最适 NaCl 浓度为 0.2%, 最佳生长条件下, 在 10 d 内滤纸纤维素降解率可达 90.40%。在 HCp 的纤维小体中, 滤纸酶、羧甲基纤维素酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、木聚糖酶的最适作用温度分别为 70℃、70℃、70℃、60℃, 并且羧甲基纤维素酶具有较高的热稳定性。部分长度的 16S rDNA 序列分析表明, 分离菌株 HCp 与 *Acetivibrio cellulolyticus*、*A. cellulosolvens* 相似性为 97.5%。【结论】分离菌株 HCp 是从马粪富集物中分离到的一株嗜热厌氧细菌, 该菌具有较强的降解纤维素能力, 生长温度范围广, 酶的热稳定性好, 纤维素底物利用广泛等特性, 为纤维素降解产乙醇提供了良好的材料。

**关键词:** 纤维素降解, 嗜热厌氧细菌, 系统发育分析, 纤维小体, 酶学性质

**中图分类号:** Q814    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2012)09-1160-07

在我国, 以纤维素为主要成分的生物质资源极其丰富, 其中纤维素和半纤维素成分在木质或农业生物质组成中占比可达 70% - 80%<sup>[1]</sup>。成分的异质性和结构的特殊性成为这些生物质资源抗微生物和酶攻击的主要原因。长期以来, 纤维素的水解过程一直被认为是整个生物转化过程中最重要的限速阶段。自然界存在着多种具有纤维素降解能力的嗜热厌氧菌,

这一类微生物所产生的纤维素酶通常具有较高的作用温度。耐热酶在工业应用中具有许多突出的优点, 所以嗜热微生物也一直是研究的热点之一<sup>[2]</sup>。

纤维素分解菌通过产生纤维素酶, 从而使纤维素类物质发生降解。其中纤维素  $\beta$ -1,4-糖苷键的水解主要由三类酶起作用:  $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶、外切葡聚糖水解酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[3]</sup>。半纤维素酶

**基金项目:** 国际科技合作项目“白酒丢糟及农产秸秆的生物质能转化研究”(2009DFA60890); 四川省科技基础条件平台项目“四川省微生物资源共享平台(2011年)”

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-28-85260729; E-mail: dengkaiyu@yahoo.com.cn

**作者简介:** 赵银瓶(1984-), 女, 河南宁陵县人, 硕士研究生, 从事厌氧环境微生物研究。E-mail: zhaoyinping2005@163.com

**收稿日期:** 2012-04-06; **修回日期:** 2012-05-05

定义为攻击半纤维素主链的聚糖水解酶,  $\beta$ -1,4-D-木聚糖酶, 是反映半纤维素酶活力的主要指标<sup>[4]</sup>。木聚糖酶属于水解酶类, 可以将木聚糖降解成低聚木糖或木糖<sup>[5]</sup>。

本研究根据纤维素降解细菌对不溶性纤维素粉水解时形成水解圈的特性, 经反复的滚管、挑菌、筛选, 最终从马粪富集物中获得了菌株 HCp。该菌株嗜热、严格厌氧, 具有较强的纤维素降解能力和较高的纤维素酶活力, 分解底物范围广, 具有潜在的应用前景和研究价值。本文报道了分离菌株 HCp 的生物学特性、16S rDNA 系统发育分析及其纤维素酶和半纤维素酶的酶学特性, 为进一步的研究和应用提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 菌株 HCp 分离自西藏马粪富集物。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 细菌基因组提取试剂盒购于天根生物公司, PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 纤维二糖、木聚糖、D-木糖等购于 SIGMA 试剂公司, 荧光相差显微镜 Nikon 80i 购于 Nikon 公司, 气相色谱仪 7820A 购于 Agilent 公司, PCR 仪型号为 Mastcycler Gradient 购于 Eppendorf 公司, 凝胶成像仪 IS2200 购于 AlphaImager, 微量紫外可见分光光度计 NanoDrop ND-1000、酶标仪 VARIOSKAN FLASH 购于 Thermo 公司。

### 1.2 厌氧技术与培养条件

培养基成分及培养条件: 0.1% NaCl, 0.1% 尿素, 0.05%  $K_2 HPO_4 \cdot 3H_2 O$ , 0.1%  $KH_2 PO_4$ , 0.05%  $MgCl_2 \cdot 6H_2 O$ , 0.1% 酵母粉, 0.1% 半胱氨酸盐, 0.01% 刃天青, 0.5% 滤纸(液体培养基)或 0.2% 纤维素粉(固体培养基), PH7.0, 60°C 厌氧静止培养。

培养基的制备、滚管、挑菌等操作使用亨盖特(Hungate)厌氧技术<sup>[6]</sup>。

### 1.3 分离、纯化和生理实验

培养基配方, 分离、纯化以及生理实验的方法和步骤见文献 [7]; 滤纸纤维素降解率的测定见文献 [8]。

### 1.4 底物实验和产物测定

在基础培养基 (0.1% NaCl, 0.1% 尿素,

0.05%  $K_2 HPO_4 \cdot 3H_2 O$ , 0.1%  $KH_2 PO_4$ , 0.05%  $MgCl_2 \cdot 6H_2 O$ , 0.1% 酵母粉, 0.1% 半胱氨酸盐, 0.01% 刃天青) 中加入不同的底物作为碳源(可溶性底物 0.2%, 不溶性底物 0.5%), 按 1% 的量接种。60°C 条件下培养 2-5 d, 待菌生长后再转接 3 次以确定该菌底物利用的范围; 用 Agilent 气相色谱 7820A 对代谢产物进行定量检测, 检测条件见文献 [9]。

### 1.5 抗生素抗性实验

采用纤维二糖为碳源的培养基, 加入新霉素 (Neomycin Sulfate, Neo)、氨苄青霉素 (Ampicillin Na, Amp)、链霉素 (Streptomycin Sulfate, Str)、卡那霉素 (Kanamycin Sulfate, Kan)、氯霉素 (Chloramphenicol, Chl)、红霉素 (Erythromycin, Ery)、利福平 (Rifampicin, Rif) 和四环素 (Tetracycline Hcl, Tet), 终浓度均为 100  $\mu g/mL$ , 以未加抗生素的培养液作为对照, 测定  $OD_{600}$  确定菌体生长情况。

### 1.6 酶活测定

菌株 HCp 接种于滤纸条为底物的培养基中, 于 60°C 培养箱中培养 40 h (滤纸条完全崩解)。将发酵液经 4000  $\times g$  离心 10 min, 取上清液测定纤维素酶活以及半纤维素酶活。

酶活力单位 (U) 定义为: 在指定温度下, 底物在酶的催化下, 每 min 产生 1  $\mu mol$  还原糖 (葡萄糖或木糖) 所用该酶的量 (1 个酶活单位 ( $\mu mol/min$ ))。

**1.6.1 滤纸酶 (FPA) 最适温度及酶活测定:** 将 0.5 mL 粗酶液、2 mL 柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 4.5), 对照首先加入 2.5 mL 的 DNS 以终止酶反应, 然后将 50 mg 滤纸粉加入各试管, 每个实验组设置 3 个重复, 混合后置 50-100°C (每隔 10°C 设定一个处理), 恒温水浴保温 1 h, 用 DNS 试剂法测定葡萄糖的量。

**1.6.2 羧甲基纤维素酶 (CMCase) 最适温度及热稳定性实验:** 0.5 mL 粗酶液, 加入 2 mL 含有 0.5% CMC 的柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 5.0), 水浴 25 min, 实验设置同 1.6.1; 取用经 100°C 沸水煮 0 min、15 min、30 min、60 min 的酶液测定酶活力以检测此酶的热稳定性。

**1.6.3  $\beta$ -葡萄糖苷酶最适温度及酶活测定:** 0.5 mL 粗酶液, 加入 2 mL 含有 0.5% 水杨苷的柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 4.5), 水浴 10 min, 实验设置同 1.6.1。

**1.6.4 木聚糖酶最适温度及活力测定:**0.5 mL 粗酶液,加入 2 mL 含有 0.5% 木聚糖的柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 5.0),水浴 20 min,测定木糖的含量,实验设置同 1.6.1。

### 1.7 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

供试菌株用滤纸条培养基增培至滤纸溃烂,离心收集菌体,以细菌基因组提取试剂盒制备模板 DNA。

用于 16S rDNA PCR 反应的引物为一对通用引物 27 f 和 1492 r<sup>[10]</sup>。PCR 反应体系(50  $\mu$ L),反应条件见文献[6]。PCR 产物测序由上海生工和诺赛基因生物公司完成。

### 1.8 系统发育分析

将测定得到的 16S rDNA 的部分序列在 GenBank 数据库中 BLAST 比对,下载相似性较高的模式菌株序列,用 Clustal X 软件进行 16S rDNA 的相似性分析,用 MEGA 4.1 软件采用邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育树,Bootstrap 稳定性验证 1000 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 分离菌株形态学

分离菌株在纤维素粉为碳源的固体培养基中滚管培养 2 d 后,形成无色透明圈,边缘整齐,直径约为 4.0 mm - 8.0 mm。菌落呈乳白色,直径约为 0.5 mm - 0.8 mm。

此菌以滤纸为碳源,培养 40 h 的菌体为直杆状,细胞单个或成对出现,运动,形成芽胞。菌株菌体大小为(0.35 - 0.50)  $\mu$ m  $\times$  (2.42 - 6.40)  $\mu$ m,多数芽胞着生于菌体顶端,椭圆状,大小为(0.65 - 1.16)  $\mu$ m  $\times$  (0.81 - 2.05)  $\mu$ m(图 1)。

### 2.2 分离菌株的生理生化特性

**2.2.1 生理特征:**菌株 HCp 为严格厌氧的革兰氏阴性细菌,在 pH 6.5 - 8.5、温度 35 - 70 $^{\circ}$ C、盐浓度 0% - 1.0% 范围内利用纤维素生长。最适 pH 为 6.85,最适温度为 60 $^{\circ}$ C,最适 NaCl 浓度为 0.2%。菌株在 pH 6.85,60 $^{\circ}$ C,NaCl 浓度为 0.2% 条件下,以纤维二糖为底物,菌株的比生长速率(回归直线斜率)为 0.37 /h,即倍增时间为 2.7 h(图 2)。

分离菌株在滤纸培养基中培养 24 h,滤纸明显软化,表面呈现絮状;28 - 30 h 滤纸大部分断裂;

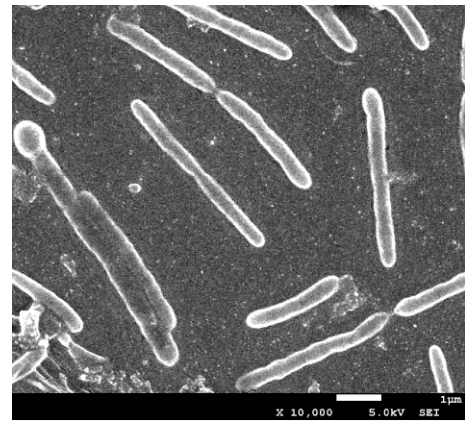


图 1 HCp 菌落形态的扫描电镜照片(10000  $\times$ )

Fig. 1 HCp cells under electron microscope (10000  $\times$ ).

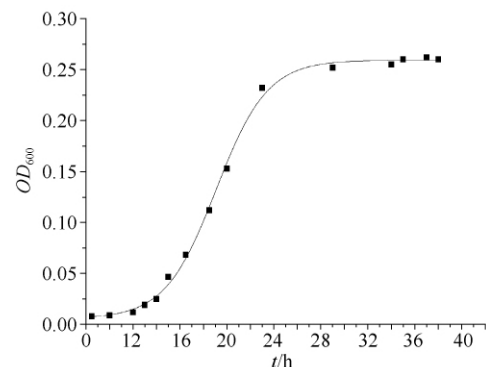


图 2 菌株 HCp 的最适生长曲线

Fig. 2 The optimal growth curve of strain HCp.

32 - 40 h 滤纸完全溃烂崩解。

由图 3 可知,菌株 HCp 在 2 d、3 d 滤纸降解速度最快,两天内滤纸失重率达 50%。4 - 10 d 的滤纸失重率增加趋势变缓,10 d 后由于底物几乎消耗殆尽,降解率不再增加。

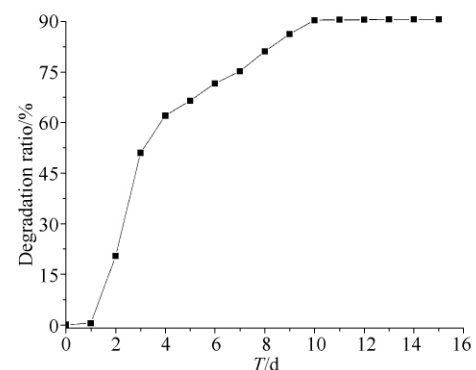


图 3 菌株 HCp 对滤纸的降解能力

Fig. 3 Filter paper degradation by strain HCp.

**2.2.2 生化特征:**(1) 底物利用:实验结果表明(表

1), 菌株 HCp 不仅能利用纤维素滤纸、纤维素粉、微晶纤维素、脱脂棉和水稻秸秆、明胶等, 还能利用葡萄糖、纤维二糖、木糖、木聚糖、果糖、蔗糖、核糖、半乳糖、麦芽糖、山梨糖、海藻糖、蜜二糖、甘露糖、甘露醇、覃糖、树胶醛糖、阿拉伯糖、乙酸钠、丙酸钠、水杨苷等, 不能利用淀粉、糊精、酒石酸钠、柠檬酸钠、棉

子糖、L-鼠李糖等。

(2) 产物测定: 以纤维二糖、纤维素粉、微晶纤维素、滤纸条、水稻秸秆 5 种碳源为底物培养 5 d 时测定产酸产醇情况。表 2 中显示的结果表明, 菌株 HCp 发酵纤维素类底物的主要产物为乙醇和乙酸, 同时含有微量的丙酸、丁酸等。

表 1 分离菌株 HCp 与其他厌氧纤维素降解菌的比较

Table 1 Comparison of the isolated stain HCp with other cellulolytic anaerobic bacteria

Characteristics	HCp	<i>Acetivibrio Cellulolyticus</i> <sup>[10]</sup>	<i>Clostridium thermocellum</i> <sup>[11]</sup>	<i>Clostridium stercorarium</i> <sup>[11]</sup>	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> <sup>[12]</sup>
Gram staining	-	-	-	-	-
Spores detected	+	-	+	+	-
Optimum temperature/°C	60	35	60-64	65	65
Substrate utilization					
Cellobiose	+	+	+	+	+
Xylan	+	-	+	+	ND
Glucose	+	-	+	+	+
Fructose	+	-	-	+	-
Sucrose	+	-	-	-	+
Galactose	+	-	-	+	ND
Mannose	+	-	-	ND	ND
Sorbinose	+	-	+	-	ND
Raffinose	-	ND	ND	-	-
Maltose	+	-	+	+	-
Rice straw	+	-	+	+	+

ND indicated no determination.

表 2 不同碳源的发酵产物

Table 2 Fermentation products of HCp using different carbon sources

Fermentation end products (mg/L)	Carbon sources				
	Cellobiose	Filter paper	Microcrystalline cellulose	Cellulose powder	Rice straw
Ethanol	233.321	267.156	301.370	293.430	222.797
Acetate	408.157	492.566	467.499	456.527	531.470
Butyric acid	5.947	5.647	5.805	6.711	1.641
Valeric acid	1.340	1.297	0	1.023	0.720
Total	651.648	769.790	777.466	758.976	764.020

Other detected products including methanol, propanol, butanol, propionic acid, isobutyric acid, isovaleric acid are less than 1 mg/L.

(3) 抗性实验: 抗生素实验表明, 菌株对新霉素有一定的抗性, 氨苄青霉素、链霉素不同程度地抑制菌株的生长, 而卡那霉素、氯霉素、红霉素、利福平和四环素对 HCp 的生长具有显著的抑制作用(图 4)。

### 2.3 分离菌株 HCp 的酶学特性

**2.3.1 纤维素酶的活力测定:** 测定菌株 HCp 的 3 种纤维素酶组分活力: 羧甲基纤维素酶(CMCase)、滤纸酶(FPA)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase), 它们的最适作用温度均为 70°C, 培养 4 d 时的酶活力分别为 2.12 U/mL、1.46 U/mL、0.55 U/mL。

选取 CMCase 为指标测定 70°C 反应条件下, 菌株 HCp 培养 1-10 d 的 CMCase 酶活, 结果表明, CMCase 在第 3 天时迅速达到酶活最大值, 这与滤纸

纤维素降解率的情况吻合。

**2.3.2 半纤维素酶(木聚糖酶)的活力:** 菌株 HCp 培养 4 d, 取样并测定木聚糖酶(xylanase)的最适作用温度为 60°C。取 1-10 d 的培养液, 60°C 反应条件下测定木聚糖酶活。木聚糖酶活随培养时间的增加呈现升高的趋势, 第 8 天时的酶活最高为 25 U/mL。

**2.3.3 酶的热稳定性:** 从图 5 可以看出, 在 100°C 下处理不同时间(15min、30min、1h), CMCase 保留的酶活力分别为 97%、78%、36%, 热稳定较好; 木聚糖酶保留的酶活力分别为 26%、16%、7.5%, 100°C 的高温处理快速地抑制了大部分木聚糖酶的活力。

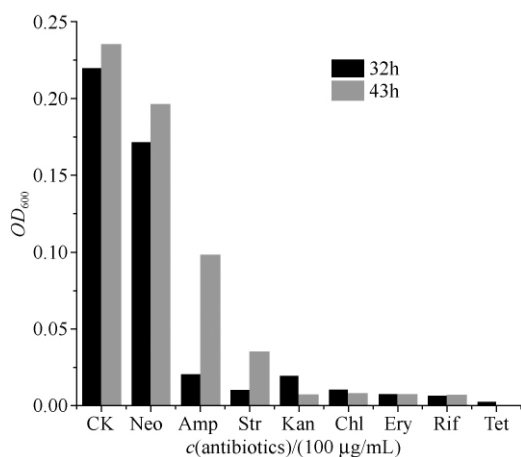


图4 抗生素对菌株 HCp 的生长影响

Fig. 4 Effects of antibiotics on the growth of strain HCp.

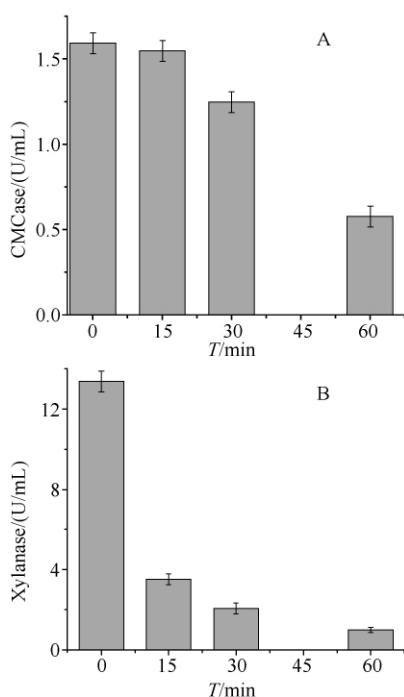


图5 菌株 HCp 羧甲基纤维素酶(A)和木聚糖酶(B)的耐热性实验

Fig. 5 Heat stability of CMCase(A) and xylanase(B) in strain HCp.

## 2.4 系统发育学分析

分离菌株 HCp 的 16S rDNA 部分序列长度为 1350bp, GenBank 序列登录号为 JQ820024。系统发育树见图 6。比对后, HCp 与 *A. cellulolyticus*、*A. cellulosolvens* 的相似性最大, 为 97.5%。

## 3 讨论

本研究根据纤维素降解细菌对不溶性纤维素粉

水解时形成水解圈的特性, 从马粪富集物中分离到了菌株 HCp, 并对其生物学特性、16S rDNA 系统发育分析及其纤维素酶和半纤维素酶的酶学特性等方面进行了研究。主要结论如下:

菌株 HCp 为嗜热厌氧纤维素降解菌, 与 *A. cellulolyticus*<sup>[10]</sup> 的模式菌株相似性最高, 为 97.5%, 然而它们在形态及生理生化特性上却有很大的差异: (1) 形态学上的差异: 菌株 HCp 形成芽胞, 在固体培养基上形成菌落边缘光滑; *A. cellulolyticus* 不生成芽胞, 菌落边缘锯齿状。(2) 生长温度不同: 菌株 HCp 生长温度范围广 (35 – 70℃), 最适温度为 60℃, 嗜热; *A. cellulolyticus* 的生长范围窄 (20 – 40℃), 最适生长温度为 35℃, 属于中温菌。(3) 利用底物不同: *A. cellulolyticus* 只利用纤维素和纤维二糖; 分离菌株 HCp 除了能利用上述两种底物, 还能利用脱脂棉、明胶、葡萄糖、木糖、木聚糖、果糖、蔗糖、核糖、半乳糖、麦芽糖、山梨糖、海藻糖、蜜二糖、甘露糖等。由此可见, 菌株 HCp 和模式菌株 *A. cellulolyticus* 差异很大, 依据 16S rDNA 相似性和生理生化特征, 菌株 HCp 可以初步定为新种, 然而还需要通过 G + C 含量、DNA 分子杂交及细胞膜脂肪酸成分等进行进一步的验证。

分离菌株 HCp 的降解滤纸纤维素的速度很快, 32 – 40 h 滤纸完全溃烂崩解; 而 *T. ethanolicus*-B<sub>2</sub> 需要 3 – 4 d 滤纸才能完全崩解<sup>[13]</sup>。菌株 HCp 培养 10 d 滤纸降解率可高达 90.4%; 而 *C. thermocellum* LQRI (ATCC35609) 对滤纸的降解率为 79.8%<sup>[14]</sup>; 崔宗均等人<sup>[15]</sup> 构建的高效降解纤维素的稳定复合菌系 MC1 对滤纸降解率为 88%。因此, 无论是与单一培养物还是复合菌系相比, 分离菌株 HCp 降解滤纸的速率均具有显著优势。

分离菌株 HCp 不仅能产生纤维素酶还具有木聚糖酶活性。其中, 菌株 HCp 的 CMCase 酶活力 (2.12 U/mL) 比 *C. thermocellum* (1.7 U/mL) 要高, 但是 HCp 的木聚糖酶活力 (25 U/mL) 却低于 *C. thermocellum* (56 U/mL)<sup>[16]</sup>。这些酶在降解纤维素底物时怎样协调发挥作用、HCp 的产酶条件如何等问题还需进一步地研究。另外, HCp 所产生的纤维素酶和木聚糖酶最适作用温度都在 60℃ 以上, 热稳定性也比较好, 并且该菌株还可以分解纤维素或发酵糖类产生乙醇。高温具有提高底物转化率和乙醇

产率、能够降低污染概率并且便于酒精分馏等优点<sup>[17]</sup>。尽管菌株 HCp 的乙醇产量并不能达到工业生产水平,但是它具有较强的纤维素降解能力,因

此,可通过将 HCp 与其他嗜热产乙醇菌株联合培养等方式,拓展其在纤维素乙醇开发方面的潜在应用价值。

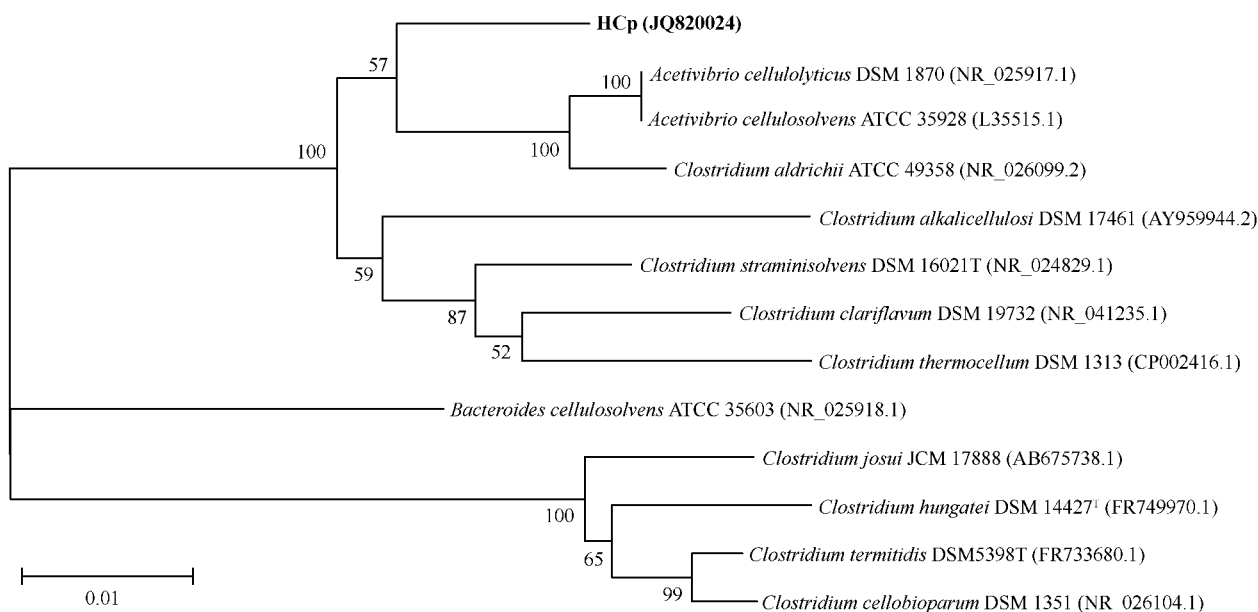


图6 基于16S rDNA序列相似性构建的菌株HCp的系统进化树

Fig. 6 Unrooted phylogenetic tree of strain HCp based on the 16S rDNA sequence similarities. The tree was constructed using the neighbor-joining method by MEGA 4.1 software based on bootstrap (1000 replications, 64238 seed; >50% indicated only). HCp refers to the strain isolated. Accession numbers in GenBank of the sequences was bracketed behind the species name. The numbers at each branch point indicate the percentage of bootstrap supporting. Scale bar, 0.01 estimated sequence divergence.

## 参考文献

- [1] Adlakha N, Rajagopal R, Kumar S, Reddy VS, Yazdani SS. Synthesis and Characterization of Chimeric Proteins Based on Cellulase and Xylanase from an Insect Gut Bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77(14): 4859-4866.
- [2] Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(1): 33-64.
- [3] Margeot A, Hagerdal BH, Edlund M, Slade R, Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current opinion in biotechnology*, 2009, 20(3): 372-380.
- [4] Ghose TK, Bisaria VS. Measurement of hemicellulase activities part 1: xylanases. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(12): 1739-1752.
- [5] Robison PD. Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Biotechnology letters*, 1984, 6(2): 119-122.
- [6] Hungate RE. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes// Norris JR, Riboons DW, (ed.). *Methods in Microbiology*. 3B. New York: Academic Press, 1969: 117-132.
- [7] 马诗淳, 罗辉, 杨丽丽, 杨磊, 尹小波, 张辉, 邓宇. 中温厌氧纤维素菌的分离鉴定, 系统发育学分析及其酶学性质的研究. *中国沼气 (China Biogas)*, 2009, 27(3): 3-7.
- [8] 王佳婧, 刘晓凤, 袁月祥, 闫志英, 廖银章, 赫纯, 贺蓉娜. 厌氧纤维素降解产氢复合菌系 L-3 研究. *应用与环境生物学报 (Chin J Appl Environ Biol)*, 2010, 16(1): 104-108.
- [9] 张文静, 马诗淳, 邓宇, 张辉. 一株高效降解木糖的耐酸、嗜热厌氧杆菌的生理特性及产物分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51(11): 1510-1519.
- [10] Keis S, Shaheen R, Jones DT. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2001, 51(6): 2095-2103.
- [11] Patel GB, Khan AW, Agnew BJ, Colvin JR. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov. sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1980, 30(1): 179-185.
- [12] 韩如畅, 闵航, 陈美慈, 赵宇华. 嗜热厌氧纤维素降解

- 细菌的分离、鉴定及其系统发育分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42 (2) : 138-144.
- [13] 胡国全, 邓宇, 徐恒, 张朝武. 极端嗜热厌氧纤维素菌的分离、鉴定、系统发育学分析以及酶学性质的研究. *应用与环境生物学报 (Chin J Appl Environ Biol)*, 2004, 10 (2) : 197-201.
- [14] 方治国, 欧阳志云. 热纤维梭菌不同菌株的纤维素降解和酒精生产能力. *环境科学学报 (Acta Scientiae Circumstantiae)*, 2010, 30 (8) : 1926-1931.
- [15] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 黄志勇, Ishii M, Igarashi Y. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能. *环境科学 (Environmental Sciences)*, 2002, 23 (3) : 36-39.
- [16] Karita S, Nakayama K, Goto M, Sakka K, Kim WJ, Ogama S. A Novel Cellulolytic, Anaerobic, and Thermophilic Bacterium, *Moorella* sp. Strain F21. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67 (1) : 183-185.
- [17] 方治国, 欧阳志云. 嗜热厌氧乙醇菌在纤维素酒精生产中的作用. *环境科学学报 (Acta Scientiae Circumstantiae)*, 2011, 31 (4) : 752-758.

## Isolation, identification and enzyme characterization of a thermophilic cellulolytic anaerobic bacterium

Yingping Zhao, Shichun Ma, Yingjie Sun, Yan Huang, Yu Deng\*

Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China

**Abstract:** [Objective] To identify a thermophilic bacterium from horse manure to degrade cellulose efficiently, and to enrich microbial resources producing cellulolytic ethanol by co-culturing with thermophilic ethanol producing bacterium. [Methods] We used Hungate anaerobic technique to isolate a strain named as HCp from horse manure mixed culture; its phylogeny was identified through 16S rDNA sequencing. Enzymatic assays were determined using DNS method. [Results] The isolated HCp cells were straight with rods size of (0.35 – 0.50)  $\mu\text{m}$   $\times$  (2.42 – 6.40)  $\mu\text{m}$ , in the form of single or paring. This strain belongs to a strictly anaerobic Gram-negative bacterium, it is able to form spores, shows motile ability and resistance to neomycin. The strain could degrade filter paper cellulose, cellulose powder, microcrystalline cellulose, cotton wool, rice straw and gelatin, and it was also able to utilize abundant saccharides as substrates such as cellobiose, glucose, xylose, xylan, raffinose, maltose, sorbose, fructose and galactose. The growth pH ranges from 6.5 to 8.5, temperature from 35 to 70°C and concentration of NaCl on cellulose from 0% to 1.0%, while the optima of pH6.85, 60°C and 0.2% NaCl. Under the optimal growth conditions, the filter paper cellulose degradation rate was up to 90.40% after 10 days. The optimum temperatures for FPA, CMCase,  $\beta$ -glucosidase and xylanase were 70°C, 70°C, 70°C, and 60°C respectively. CMCase activity was found with high thermal stability. The phylogenetic analysis based on partial 16S rDNA revealed that HCp was close to *Acetivibrio cellulolyticus* and *A. cellulosolvans* with 97.5% sequence similarities. [Conclusion] Strain HCp is thermophilic, efficiently cellulolytic anaerobe. It is able to utilize vast substrates and produce highly thermostable enzymes. It is a potential bacterium that can be used for cellulolytic ethanol production.

**Keywords:** cellulose degradation, thermophilic anaerobic bacterium, phylogenetic analysis, cellulosome, enzyme characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Cooperative Project of National Technology "the Biomass Energy Transference of Liquor Distillers' Grains and Agricultural Straw" (2009DFA60890) and by the Project of Sichuan, China for Technology Fundamental Platform "Microbial Resources Sharing Platform of Sichuan Province (2011) "

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-85260729; E-mail: dengkaiyu@yahoo.com.cn

Received: 6 April 2012/ Revised: 5 May 2012