

芒草木质素含量对里氏木霉产木质纤维素酶的影响

康永波¹⁻³ 李傲¹⁻³ 裴岩杰¹⁻³ 涂媛苑¹⁻³ 周诗光¹⁻³ 魏小洋¹⁻³ 李庆^{1,2,4},
郝勃^{1,2,5} 夏涛^{1,2,5} 彭良才¹⁻³

(华中农业大学 1. 作物遗传改良国家重点实验室; 2. 生物质与生物能源研究中心;
3. 植物科学技术学院; 4. 理学院; 5. 生命科学技术学院 湖北 武汉 430070)

摘要: [目的]研究芒草木质素含量对里氏木霉产木质纤维素酶的影响。[方法]选择了2组木质素含量差异显著($p < 0.01$, $n = 3$)、纤维素和半纤维素含量相近的芒草材料作底物来培养3株里氏木霉(野生型QM6a、突变型QM9414和RutC30),对诱导产生的木质纤维素酶的酶活和降解木质纤维素的效率进行分析。[结果]在第I组中,Mfl40木质素含量比Msa02低36%($p < 0.01$, $n = 3$)其诱导3菌株生产的木质纤维素酶体积比酶活高于Msa02组1.2~1.8倍($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$);在第II组中,Mfl37木质素含量比Mlu13低48%($p < 0.01$, $n = 3$)其生产的木质纤维素酶体积比酶活高于Mlu13材料1.2~3.3倍($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$)。[结论]芒草细胞壁中木质素含量对里氏木霉产木质纤维素酶量有显著负影响。

关键词: 里氏木霉, 芒草, 木质素, 纤维素酶, 木聚糖酶, 酶解

中图分类号: Q939.97 文献标识码: A DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2015.06.0118

Effects of lignin on *Trichoderma reesei* producing cellulase and xylanase in *Miscanthus* substrates

Yongbo Kang¹⁻³, Ao Li¹⁻³, Yanjie Pei¹⁻³, Yuanyuan Tu¹⁻³, Shiguang Zhou¹⁻³,
Xiaoyang Wei¹⁻³, Qing Li^{1,2,4}, Bo Hao^{1,2,5}, Tao Xia^{1,2,5}, Liangcai Peng¹⁻³

(Huazhong Agricultural University 1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and National Centre of Plant Gene Research; 2. Biomass and Bioenergy Research Centre; 3. College of Plant Science and Technology; 4. College of Science; 5. College of Life Science and Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract [Objective] The influence of lignin on *Trichoderma reesei* producing cellulase and xylanase in *Miscanthus* substrates. [Methods] Two pairs of *Miscanthus* were selected with distinct lignin levels and their biomass residues were incubated with three *Trichoderma reesei* strains (Wild type: QM6a; Mutants: QM9414 and RutC30) for cellulase and xylanase production. [Results] The Mfl40 sample at Pair I showed a lower lignin level than that of Msa02 by 36% at $p < 0.01$ level ($n = 3$), but it resulted in three *Trichoderma reesei* strains producing much higher holocellulase (cellulase and xylanase) activities 1.2–1.8 at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ levels ($n = 3$) respectively compared with the Msa02. Meanwhile, the Mfl37 in the Pair II also exhibited much higher holocellulase activities by 1.2–3.3 at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ levels ($n = 3$) respectively than those of Mlu13 sample due to its relatively lower lignin level by 48%. [Conclusion] The cellulase and xylanase productions released by three *Trichoderma reesei* strains were negatively affected by lignin levels of *Miscanthus*.

Keywords: *Trichoderma reesei*, *Miscanthus*, lignin, cellulase, xylanase, enzymatic hydrolysis

0 引言

芒草是芒属(*Miscanthus* spp.)植物的总称,其抗逆性强,生物产量大,收割处理容易,可以种植于各种边际土地和改良土壤。中国是芒草自然资源最

丰富的国家之一。芒草的纤维素与半纤维素含量可达60%以上^[1],是二代纤维素乙醇的优质原料来源^[2-3]。目前,对于芒草细胞壁组成与降解效率关系的研究非常广泛,例如芒草木质素的含量和组成与降解效率的关系^[4-6];芒草木质素组成对酵母发

收稿日期: 2015-05-27; 修回日期: 2015-09-30

资助项目: 教育部、国家外国专家局高等学校学科创新引智项目(No. B08032); 华中农业大学长江学者推进项目(No. 52204-07022); 中央高校基本科研业务费专项基金(No. 2662015PY019) 资助

作者简介: 康永波(1989-),男,山西忻州人,硕士生,研究方向: 生物质与生物能源, Tel: 027-87281399, Email: 657151276@qq.com。

* 通讯作者: 彭良才(1963-),男,教授,博导,研究方向: 植物纤维素生物合成、生物质降解与生物能源转化等,发表SCI论文40余篇,专著2部, Tel: 027-87281765, Fax: 027-87280016, Email: lpeng@mail.hzau.edu.cn & liangcaipeng@gmail.com。

酶的影响^[6]等。但是纤维素酶是限制芒草高效降解转化的主要因素。据报道,木质纤维素材料诱导软腐菌产生的酶液最适合酶解与该材料具有相似组成及结构的木质纤维素材料^[7-8]。因此,作者选用芒草材料作底物诱导软腐菌产生木质纤维素酶。

纤维素酶是水解植物细胞壁结构中纤维素 β -1,4糖苷键一类酶的总称。纤维素酶是世界第三大工业酶^[9],约占全球酶市场的20%^[10]。不久的将来,商业生物燃料的生产将会在很大程度上促进对纤维素酶的需求量^[9]。因此,研究如何提高纤维素酶活性、产量以及降低生产成本很有意义。

用木质纤维素作诱导底物可以很大程度地提高纤维素酶产量和活力^[11-13]。已经有用各种木质纤维素材料(木材、甘蔗渣、小麦、水稻等)作诱导底物的研究^[13-15]。由于不同木质纤维素材料的细胞壁组成成分不同,不同木质纤维素作诱导物对真菌纤维素酶生产的影响也不同^[7,16]。目前木质素是如何影响真菌纤维素酶的还不太清楚。虽然有实验通过用碱液处理的木质纤维素材料作诱导物间接证明木质素含量对真菌纤维素酶的产生有负影响^[8,17-20],但是由于碱处理原材料后不仅仅是除去木质素,对细胞壁的其他组成与结构也有影响,故论据不充分,使用未经过预处理的原料才可以更充分说明木质素对真菌产纤维素酶的影响。

因此,本文从大量芒草材料(纤维素占干重21~43%,半纤维素占干重15~29%,木质素占干重19~32%)中选择两组纤维素、半纤维素含量相近,木质素含量差异非常明显的原材料作诱导底物来研究细胞壁中木质素含量如何影响真菌纤维素酶的产生。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

芒草材料:成熟芒草秸秆于2010年收获于湖南农业大学芒草实验田。将收集的秸秆去掉叶和鞘,仅保留茎秆部分。将茎秆材料在50℃烘箱中干燥6~8d,然后使用粉碎机粉碎,得到的粉末过40目筛后,混合均匀。材料保存于50℃烘箱内待用。其中Mfl40和Msa02的芒草材料成分数据引自文献^[21]。

菌种:*T. reesei* RutC30(CICC 40358)、*T. reesei* QM9414(CICC 40359)购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心。*T. reesei* QM6a(ACCC30590)购买于

中国农业微生物菌种保藏管理中心。将其活化保存于甘油冷藏管中。

1.1.2 试剂

(NH₄)₂SO₄、NaCl、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、CaCl₂·H₂O、CoCl₂、维生素B₁₂、Tween80、H₂SO₄、HCl、苯酚、苔黑酚(均为国产化学纯);蛋白胨、酵母膏(均为北京双旋微生物培养基制造厂);羧甲基纤维素钠(CMC)、微晶纤维素(Avicel)(国产分析纯);Whatman No.1滤纸(购买于武汉金长诚/武汉金瑞成化玻仪器/武汉阿凡达生物化学经营部);水杨苷、桦木木聚糖(Sigma分析纯);蕈酮(Sigma ACS级)。

1.1.3 仪器

电子天平(岛津AOY120);恒温摇床(中科HQL150B);多管架自动平衡离心机(湘仪TDZ5-WS);分光光度计(中国上海Mapada V-1100D);循环水真空泵(上海东玺SHZ-D型)。

1.1.4 培养基

①种子液培养基:3.1 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.5 g/L NaCl, 1.2 g/L KH₂PO₄, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.005 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.075 g/L MnSO₄·H₂O, 0.03 g/L CaCl₂·H₂O, 0.002 g/L CoCl₂, 0.1 g/L 维生素B₁₂ 470 μ/L Tween80, 0.75 g/L 蛋白胨, 0.3 g/L 酵母膏, 1.5 g/L 羧甲基纤维素钠(CMC)。

②发酵液培养基:3.1 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.5 g/L NaCl, 1.2 g/L KH₂PO₄, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.005 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.075 g/L MnSO₄·H₂O, 0.03 g/L CaCl₂·H₂O, 0.002 g/L CoCl₂, 0.1 g/L 维生素B₁₂ 470 μ/L Tween80, 0.75 g/L 蛋白胨, 0.3 g/L 酵母膏。

1.2 方法

1.2.1 细胞壁成分测定

①纤维素、半纤维素含量测定:按照Peng L C等^[22]的细胞壁主要多糖成分提取方法提取纤维素、半纤维素。样品用0.5 mol/L磷酸缓冲液(pH 7)碾磨成匀浆状,然后用0.5 mol/L磷酸缓冲液(pH 7)、氯仿/甲醇(1:1, V/V)、DMSO/H₂O(9:1, V/V)、0.5%草酸铵冲液依次除去木质纤维素中的可溶性糖、脂类、淀粉和果胶。剩余残渣用4 mol/L KOH(含1 mg/mL NaHB₄)在室温下150 r/min提取1 h,然后用蒸馏水洗残渣至不含可溶性糖,收集所有上清即为4 mol/L KOH可提取的半纤维素,比色法测定C6和C5即为半纤维素。残渣用蒸馏水洗至中性后,加入4 mL 72%(W/W)硫酸水解1 h,取出后用蒸

馏水定容至 12 mL, 测定 C6 即为纤维素和少量 4 mol/L KOH 不可提取的半纤维素(C5 含量), 测定 C6 和 C5。所有实验重复 3 次。

②木质素测定含量: 酸水解两步法^[23], 实验重复 3 次。

1.2.2 测定六碳糖、五碳糖

用分光光度计测定总的六碳糖、五碳糖。硫酸蒽酮法测定总的六碳糖^[24], 盐酸苔黑酚法测定总的五碳糖^[25], 六碳糖标准曲线用葡萄糖制定, 五碳糖的标准曲线用木糖制定。所有实验重复 3 次。

1.2.3 菌种制备及纤维素酶生产

①把菌种从甘油冷藏管转接到 PDA 平板上, 28℃ 培养 5-8 d。用 2 mL 无菌蒸馏水悬浮 PDA 平板上的孢子, 制备浓度为 10^8 /mL 的孢子悬液。将孢子悬液按 2% (V/V) 的接种量接种到种子液中, 培养 4 d。

②将种子液按 10% (V/V) 的接种量接种到发酵液中(0.3 g 茎秆底物 + 30 mL 培养基) 培养 7 d。

③将发酵液 4 000 r/min 离心 5 min, 收集上清用于酶活测定实验。实验重复 3 次。

1.2.4 酶活测定

1.2.4.1 滤纸酶活测定: 参考 IUPAC 标准方法^[26], 称取 Whatman No. 1 滤纸 50 mg 于 15 mL 离心管中, 再分别加 3 mL 柠檬酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.8) 和 1 mL 粗酶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 反应 6 h, 然后沸水浴 10 min, 最后 3 000 g 离心 10 min, 收集上清测还原糖。[pH 4.8、温度 50℃ 条件下, 1 min 水解底物产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位]。实验重复 3 次。

1.2.4.2 外切葡聚糖酶酶活测定: 称取微晶纤维素(Avicel) 100 mg 于 15 mL 离心管中, 再分别加 3.5 mL 柠檬酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.8) 和 0.5 mL 粗酶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 反应 3 h, 然后沸水浴 10 min, 最后 3 000 g 离心 10 min, 收集上清测还原糖。[pH 4.8、温度 50℃ 条件下, 1 min 水解底物产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位]。实验重复 3 次。

1.2.4.3 内切葡聚糖酶酶活测定: 取 2 mL 2% (W/V) 的 CMC 溶液(溶于 0.05 mol/L, pH 4.8 的柠檬酸钠缓冲液中) 于 15 mL 离心管中, 再加 1.5 mL 柠檬酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.8) 和 0.5 mL 粗酶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 反应 3 h, 然后沸水浴 10 min, 最后 3 000 g 离心 10 min, 收集上清测还

原糖。[pH 4.8、温度 50℃ 条件下, 1 min 水解底物产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位]。实验重复 3 次。

1.2.4.4 β-葡聚糖苷酶酶活测定: 取 2 mL 15 mmol/L 的水杨苷溶液(溶于 0.05 mol/L, pH 4.8 的柠檬酸钠缓冲液中) 于 15 mL 离心管中, 再加 1.5 mL 柠檬酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.8) 和 0.5 mL 粗酶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 反应 3 h, 然后沸水浴 10 min, 最后 3 000 g 离心 10 min, 收集上清测还原糖。[pH 4.8、温度 50℃ 条件下, 1 min 水解底物产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位]。实验重复 3 次。

1.2.4.5 木聚糖酶酶活测定: 取 3.8 mL 0.5% (W/V) 的梓木木聚糖溶液(溶于 0.05 mol/L, pH 4.8 的柠檬酸钠缓冲液中) 于 15 mL 离心管中, 再加 1.5 mL 柠檬酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.8) 和 0.2 mL 粗酶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 反应 3 h, 然后沸水浴 10 min, 最后 3 000 g 离心 10 min, 收集上清测还原糖。[pH 4.8、温度 50℃ 条件下, 1 min 水解底物产生 1 μmol 木糖所需的酶量定义为一个酶活力单位]。实验重复 3 次。

1.2.5 测定还原糖

用 DNS 法测定总的还原糖^[27], 还原糖的标准曲线用葡萄糖制定。实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白质浓度测定

用分光光度计测定总的蛋白质浓度, 采用考马斯亮蓝法(Bradford 法), 用纯的牛血清白蛋白制定蛋白浓度标准曲线。实验重复 3 次。

1.2.7 芒草材料预处理

碱预处理: 将烘至恒重的茎秆粉末按固液比 1:20 加 4% (W/V) NaOH 溶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 处理 2 h。3 000 g 离心 5 min, 残渣用蒸馏水洗至中性, 然后置于 50℃ 烘箱中烘至恒重待用。

1.2.8 酶解实验

称取 0.1 g 上述 4% (W/V) NaOH 预处理的芒草于 15 mL 离心管中, 再分别加 5 mL 醋酸缓冲液(0.2 mol/L 醋酸缓冲液, pH 4.8) 和 1 mL 粗酶液, 在 50℃ 摇床中, 150 r/min 反应 48 h, 酶解液 3 000 g 离心 10 min, 收集上清测 C6 和 C5。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 芒草细胞壁组成

选择 2 组细胞壁组成中木质素差异很大的芒草(见表 1), 基于 *t*-test 分析, 每组的木质素含量差异

显著 ($p < 0.01$, $n = 3$), 而纤维素、半纤维素含量相近。第 I 组、第 II 组中木质素含量差异分别达到

36%、48%, 因此, 选定这两组来研究木质素含量对里氏木霉诱导产纤维素酶的影响。

表 1 芒草的细胞壁组成

Table 1 Cell wall composition in *Miscanthus* samples

Pair	Sample	Cell wall composition (% Dry matter)					
		Cellulose		Hemicelluloses		Lignin	
I	Mfl40	30.66 ± 0.55	-7% [@]	22.31 ± 0.16	16%	21.99 ± 0.30 ^{**}	-36%
	Msa02	32.96 ± 2.52		19.28 ± 0.46		29.95 ± 0.63	
II	Mfl37	35.99 ± 1.00	-11%	26.12 ± 1.58	-11%	20.62 ± 0.35 ^{**}	-48%
	Mlu13	39.84 ± 1.45		28.97 ± 1.41		30.45 ± 0.14	

* * A significant difference at pair by t -test at $p < 0.01$ ($n = 3$); @ Percentage of the increased or decreased level at pair: subtraction of two samples divided by low value.

2.2 芒草诱导里氏木霉产木质纤维素酶活测定

两实验组诱导 3 株里氏木霉菌(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 产生的酶液中纤维素酶体积比酶活测定结果见图 1。

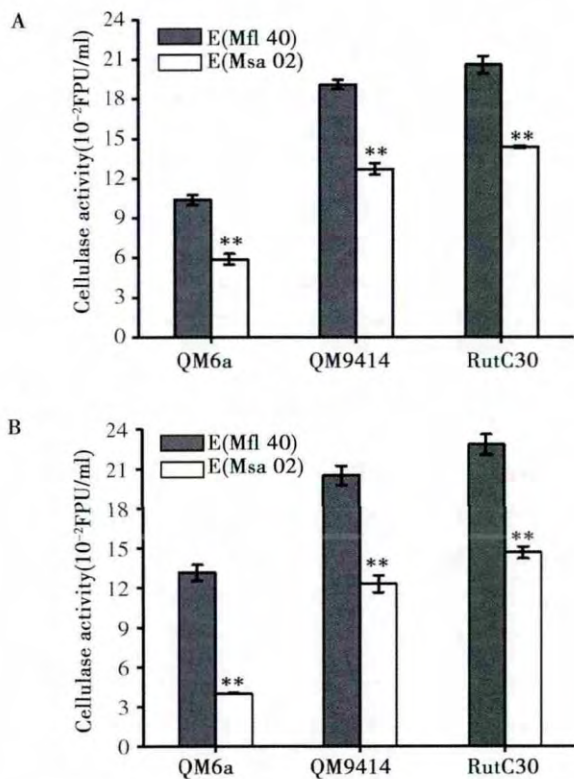


图 1 芒草诱导里氏木霉(QM6a、QM9414、RutC30) 产纤维素酶酶活

(A) 第 I 组; (B) 第 II 组; E(Mfl40): Mfl40 诱导里氏木霉产生的酶液。

Figure 1 Cellulase activity of the enzyme solution by *T. reesei* (QM6a, QM9414, RutC30) grown on two pairs of *Miscanthus* samples

(A) Pair I; (B) Pair II; E(Mfl40): The enzyme solution by *T. reesei* grown on Mfl40.

第 I 组(图 1A)中, Mfl40 木质素含量比 Msa02 的低 36%, 而诱导 3 株菌产生的纤维素酶酶活显著比 Msa02 高 ($p < 0.01$, $n = 3$), 分别比 Msa02 高 1.4、1.5、1.8 倍。第 II 组(图 1B)中, Mfl37 木质素含量比 Mlu13 的低 48%, 同样 3 株菌产生的纤维素酶酶活显著比 Mlu13 高 ($p < 0.01$, $n = 3$), 分别比 Mlu13 高 1.6、1.7、3.3 倍。可见, 芒草的木质素含量对诱导里氏木霉产生的纤维素酶活有负影响。

两实验组诱导 3 株里氏木霉(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 产生的半纤维素酶酶活测定结果如图 2。第 I 组(图 2A), Mfl40 木质素含量比 Msa02 的低 36%, 而诱导 3 株菌产生的酶液半纤维素酶酶活显著比 Msa02 高 ($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$), 分别高 1.2、1.3、1.3 倍。第 II 组(图 2B), Mfl37 木质素含量比 Mlu13 的低 48%, 同样 3 株菌产生的酶液半纤维素酶酶活显著比 Mlu13 高 ($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$), 分别高 1.2、1.2、1.5 倍。由此, 芒草木质素含量对诱导里氏木霉产生的酶液半纤维素酶活有负影响。

2.3 芒草诱导里氏木霉菌产酶液蛋白质浓度测定

两实验组诱导 3 株里氏木霉菌种(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 产生的酶液蛋白浓度测定结果见图 3。第 I 组(图 3A), Mfl40 木质素含量比 Msa02 的低 36%, 而诱导 3 株菌产生的酶液蛋白浓度显著比 Msa02 高 1.9、1.6、1.5 倍 ($p < 0.01$, $n = 3$)。第 II 组材料(图 3B), Mfl37 木质素含量比 Mlu13 的低 48%, 同样 3 株菌产生的酶液蛋白浓度显著比 Mlu13 高 2.8、2.0、1.6 倍 ($p < 0.01$, $n = 3$)。由此, 芒草的木质素含量对诱导里氏木霉产生的酶液蛋白浓度有负影响。由此推断: 芒草细胞壁中木质素含量对里氏木霉产生木质纤维素酶有显著

负影响。为了验证,接下来对两组诱导 3 株里氏木霉菌(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 产生酶液中的木质纤维素酶比活力进行测定。

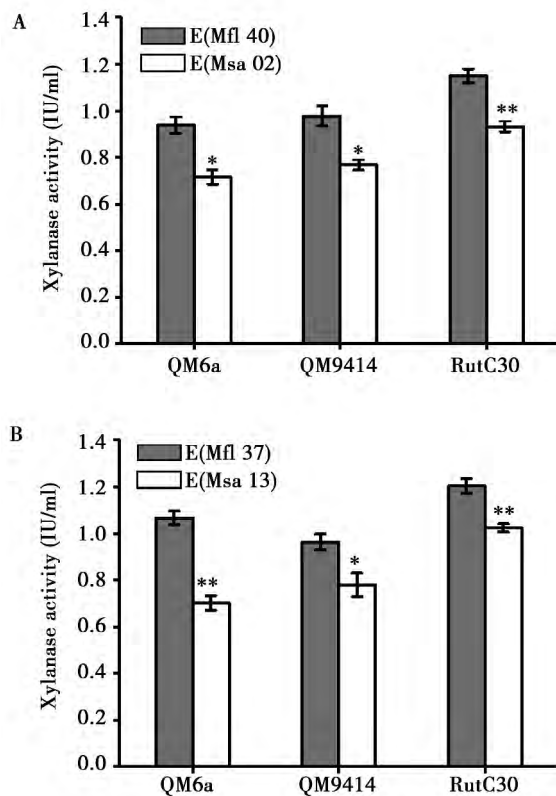


图2 芒草诱导里氏木霉(QM6a、QM9414、RutC30)产粗酶液的木聚糖酶酶活

(A) 第 I 组; (B) 第 II 组; E(Mfl40): Mfl40 诱导里氏木霉产生的酶液。

Figure 2 Xylanase activity of the enzyme solution by *T. reesei* (QM6a, QM9414, RutC30) grown on two pairs of *Miscanthus* samples

(A) Pair I; (B) Pair II; E(Mfl40): The enzyme solution by *T. reesei* grown on Mfl40.

2.4 芒草诱导里氏木霉菌产木质纤维素酶比活力测定

两组材料诱导 3 株里氏木霉(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 产生的酶液纤维素酶比活力测定结果见图 4。第 I 组(图 4A), Mfl40 木质素含量比 Msa02 的低 36%, 而诱导 3 株菌产生的酶液比活力无差异。第 II 组(图 4B), Mfl37 木质素含量比 Mlu13 低 48%, 同样 3 株菌产生的酶液比活力无差异。由此, 芒草细胞壁中木质素含量对里氏木霉生产木质纤维素酶比活力无影响。综合分析, 芒草细胞壁中木质素含量对里氏木霉产木质纤维素酶有显著负影响。

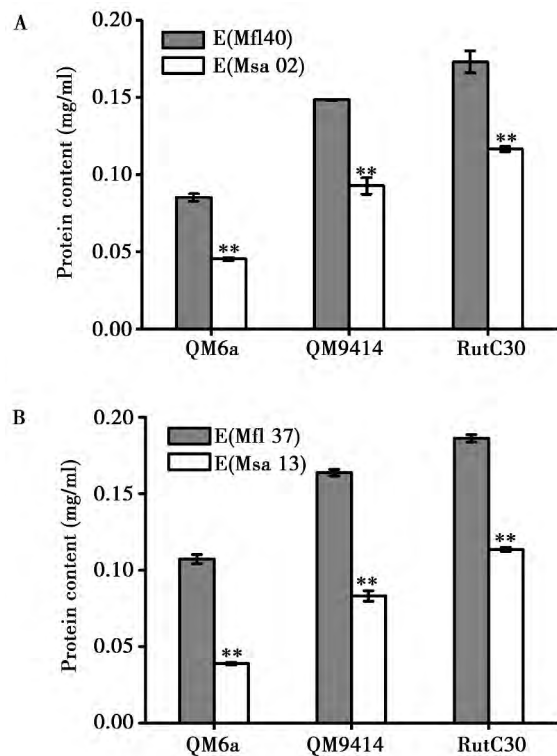


图3 芒草诱导里氏木霉(QM6a、QM9414、RutC30)产生粗酶液的蛋白浓度

(A) 第 I 组; (B) 第 II 组; E(Mfl40): Mfl40 诱导里氏木霉产生的酶液。

Figure 3 Protein content of the enzyme solution by *T. reesei* (QM6a, QM9414, RutC30) grown on two pairs of *Miscanthus* samples

(A) Pair I; (B) Pair II; E(Mfl40): The enzyme solution by *T. reesei* grown on Mfl40.

然后, 又对两实验组诱导 3 个里氏木霉菌种(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 产生的酶液的纤维素外切酶、纤维素内切酶、 β -葡苷酶酶活三大纤维素酶单酶酶活进行了测定(如表 2), 由表 2 得出: 第 I 组中, Mfl40 诱导 3 株里氏木霉产生的酶液中 3 种单酶酶活都显著比 Msa02 高($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$); 第 II 组中, Mfl37 诱导 3 株里氏木霉产生的酶液中 3 种单酶酶活都显著比 Mlu13 高($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$)。证明了芒草的木质素含量对诱导里氏木霉产纤维素酶有负影响。

2.5 芒草诱导里氏木霉产酶用于酶解木质纤维素

为进一步确证芒草诱导里氏木霉产酶酶解木质纤维素是否存在上述规律, 利用这两组芒草诱导 3 株里氏木霉(野生型 QM6a、突变型 QM9414 和 RutC30) 所产生的酶液酶解 4 种经 4% NaOH 预处理的材料, 细胞壁组成如表 3, 酶解产糖效率结果如图 3、图 4。

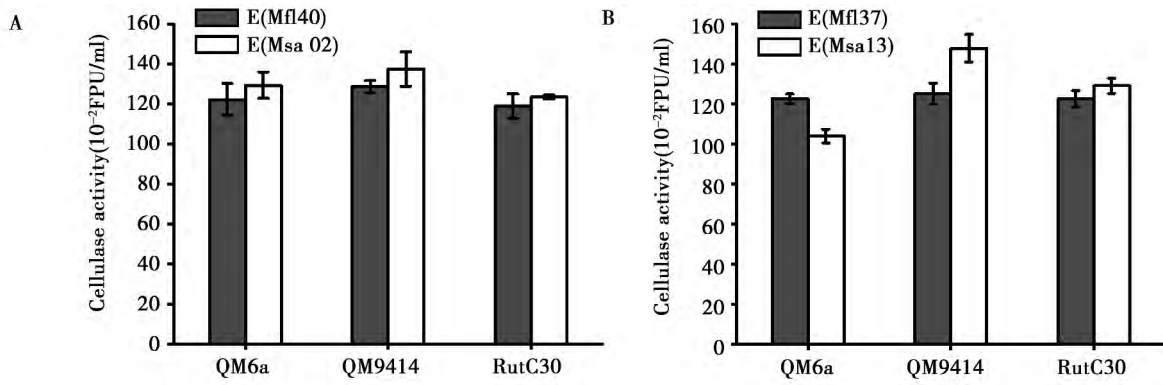


图4 两组芒草诱导里氏木霉(QM6a、QM9414、RutC30)产粗酶液的比活力测定

(A) 第 I 组; (B) 第 II 组; E(Mfl40) : Mfl40 诱导里氏木霉产生酶液。

Figure 4 Cellulase activity of the enzyme solution by *T. reesei* (QM6a QM9414 RutC30) grown on two pairs of *Miscanthus* samples

(A) Pair I ; (B) Pair II ; E(Mfl40) : The enzyme solution by *T. reesei* grown on Mfl40.

表2 两组芒草诱导 3 株里氏木霉产生的酶液的外切酶、内切酶及 β - 葡苷酶酶活

Table 2 Holocellulase (CBH ,EG and BG) activity of the enzyme solution by *T. reesei*(QM6a QM9414 , RutC30) grown on two pairs of *Miscanthus* samples

Strain	Pair	Sample	Avicelase(IU/ml)	CMCase(IU/ml)	Salicinase(IU/ml)
QM6a	I	Mfl40	0.21 ± 0.01 **	0.21 ± 0.01 *	0.11 ± 0.00 **
		Msa02	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.00	0.06 ± 0.00
	II	Mfl37	0.25 ± 0.01 **	0.24 ± 0.01 **	0.14 ± 0.00 **
		Mlu13	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.04 ± 0.00
QM9414	I	Mfl40	0.27 ± 0.01 *	0.27 ± 0.01 *	0.13 ± 0.00 **
		Msa02	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.00	0.10 ± 0.00
	II	Mfl37	0.34 ± 0.02 *	0.27 ± 0.01 *	0.16 ± 0.00 **
		Mlu13	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.10 ± 0.00
RutC30	I	Mfl40	0.43 ± 0.02 **	0.31 ± 0.00 **	0.08 ± 0.00 *
		Msa02	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.06 ± 0.00
	II	Mfl37	0.51 ± 0.02 **	0.27 ± 0.01 *	0.10 ± 0.00 *
		Mlu13	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.07 ± 0.00

* and ** A significant difference at pair by *t* - test at *p* < 0.05 and 0.01 (*n* = 3); @ Percentage of the increased or decreased level at pair: subtraction of two samples divided by low value.

表3 经 4% NaOH 预处理后芒草的细胞壁组成

Table 3 Cell wall composition in *Miscanthus* samples after 4% NaOH pretreatment

Pair	Sample	Cell wall composition (% Dry matter)			
		Cellulose	Hemicelluloses	Lignin	
I	Mfl40	44.21 ± 1.37	29.37 ± 0.23	11.98 ± 0.28	
	Msa02	45.91 ± 0.56	26.57 ± 0.64	17.08 ± 1.63	-43%
II	Mfl37	50.85 ± 1.75	28.76 ± 0.18	12.05 ± 0.37	
	Mlu13	51.97 ± 2.59	27.51 ± 0.16	18.10 ± 1.02	-50%

@ Percentage of the increased or decreased level at pair: subtraction of two samples divided by low value.

第 I 组诱导 3 株菌产生的酶液酶解 4 个木质纤维素材料(图 5) ,Mfl40 诱导产生的酶液酶解木质纤

维素的产糖效率均显著比 Msa02 的高 1.4 ~ 2.5 倍 (*p* < 0.05 或者 *p* < 0.01 ,*n* = 3) ,与体积比酶活结果

一致。

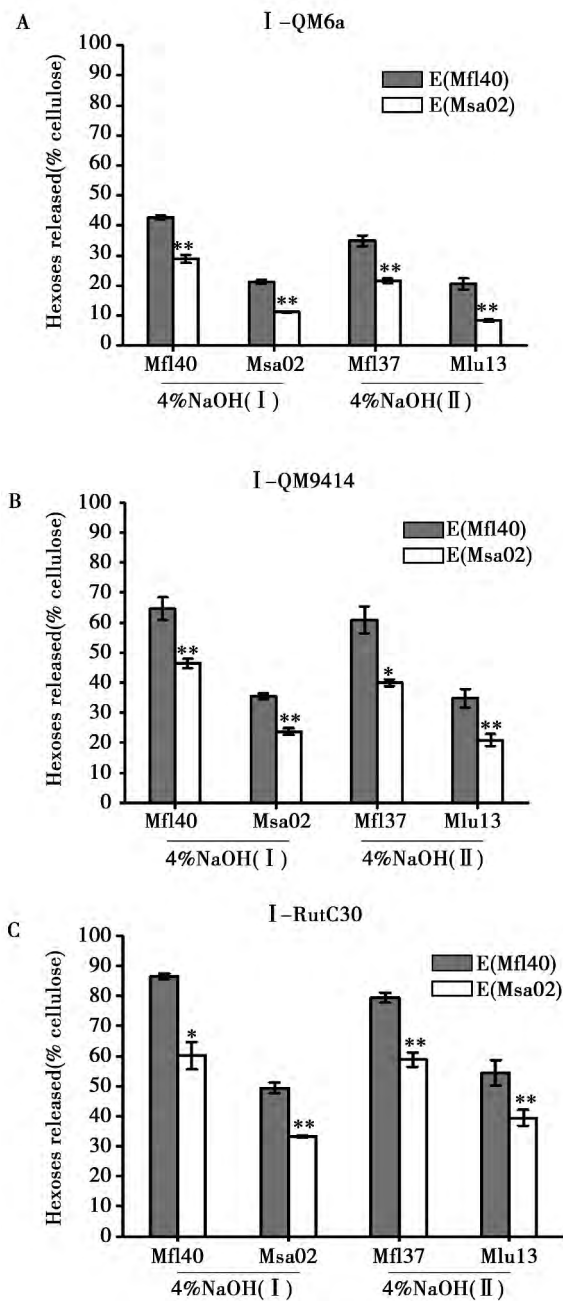


图5 第I组芒草诱导里氏木霉(QM6a、QM9414、RutC30)产生的粗酶液酶解木质纤维素材料(芒草经4%NaOH预处理)的酶解产糖效率

(A) QM6a产酶液; (B) QM9414产酶液; (C) RutC30产酶液。I-QM6a:酶液是由第I组诱导QM6a产生的。

Figure 5 Biomass digestibility after pretreatment with 4% NaOH of two pairs *Miscanthus* samples using the enzyme solution by *T. reesei* (QM6a, QM9414, RutC30) grown on Pair I *Miscanthus* samples

(A) The enzyme solution of *T. reesei* QM6a; (B) The enzyme solution of *T. reesei* QM9414; (C). The enzyme solution of *T. reesei* RutC30; I-QM6a: The enzyme solution by *T. reesei* QM6a grown on Pair I.

第II组诱导3株菌产生的酶液酶解4种木质纤维素材料(图6), Mfl37诱导产生的酶液酶解木质纤维素的产糖效率均显著比Mlu13高1.4~4.7倍($p < 0.01, n = 3$), 其结果与酶活结果一致。

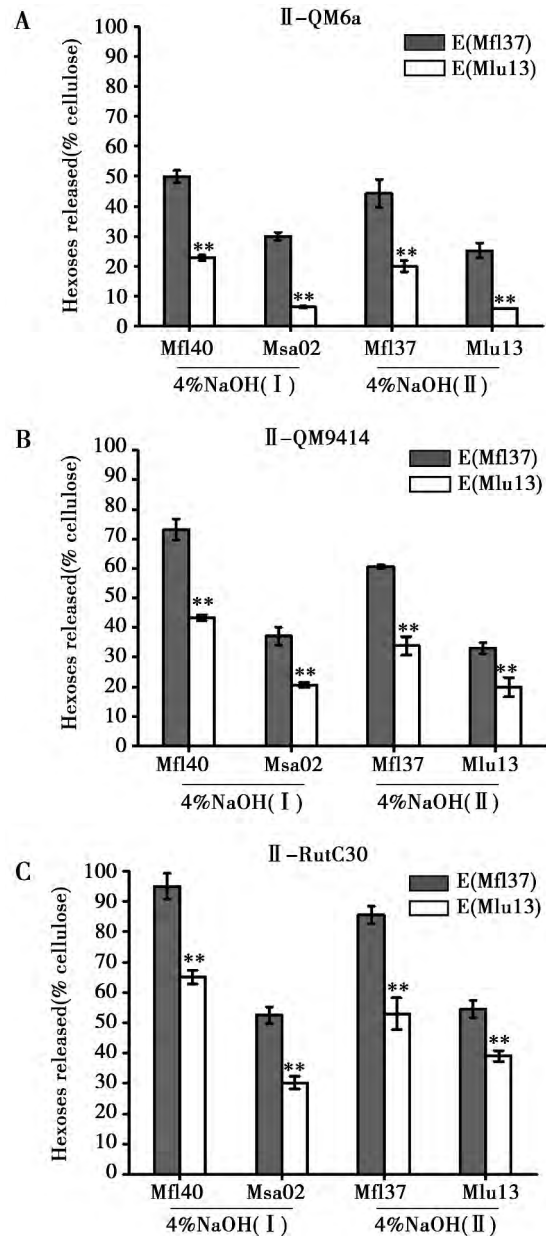


图6 第II组芒草诱导里氏木霉(QM6a、QM9414、RutC30)产生的粗酶液酶解木质纤维素(芒草经4%NaOH预处理)的酶解产糖效率

(A) QM6a产生的酶液; (B) QM9414产生的酶液; (C) RutC30产生的酶液。II-QM6a:酶液是由第II组诱导里氏木霉QM6a产生的。

Figure 6 Biomass digestibility after pretreatment with 4% NaOH of two pairs *Miscanthus* samples using the enzyme solution by *T. reesei* (QM6a, QM9414, RutC30) grown on Pair II *Miscanthus* samples

(A) The enzyme solution of *T. reesei* QM6a; (B) The enzyme solution of *T. reesei* QM9414; (C) The enzyme solution of *T. reesei* RutC30; II-QM6a: The enzyme solution by *T. reesei* QM6a grown on Pair II.

3 讨论

用木质纤维素作诱导底物可以大幅提高纤维素酶产量和活力^[11-14],而木质素如何影响真菌纤维素酶产生的机制还不太清楚。虽有实验通过用碱预处理的木质纤维素材料作诱导物间接证明木质素含量对真菌纤维素酶的产生有负影响^[8,17-20],如:①对木质纤维素材料进行酸碱预处理后作为底物诱导产酶,发现稀碱预处理后的材料诱导产生的酶的总酶活比稀酸处理的材料高^[17-18];②将油棕果渣的木质素移除后诱导产生的酶液总酶活比木质素含量高的材料高^[19]。③碱预处理的甘蔗渣诱导产生的酶液酶活比没有预处理的高^[20]。但是由于碱处理原材料后不仅仅是除去木质素,对细胞壁的其他组成与结构也有影响,导致证据不够充分,因此,本研究选用 2 组细胞壁组成中木质素含量差异很大 ($p < 0.01$, $n = 3$)、而纤维素、半纤维素基本相同的芒草原材料处理分别培养 3 株里氏木霉(野生型 QM6a、突变型 RutC30 和 QM9414;) 产生木质纤维素酶,通过对产生的酶液酶活分析及木质纤维素酶解实验,发现 3 株里氏木霉产生的酶液酶活规律一致,即木质素含量低的材料诱导产生的酶液质量比酶活与木质素含量高的材料诱导产生的酶液质量比酶活相近,木质素含量低的材料诱导产生的酶液体积比酶活显著比木质素含量高的材料诱导产生的酶液体积比酶活高($p < 0.05$ 或者 $p < 0.01$, $n = 3$) 因此,芒草细胞壁中木质素含量对里氏木霉产生木质纤维素酶量有显著负影响,这与有关报道基本一致^[8,17-20]。可能原因:①木质纤维素对木质纤维素酶的吸附作用^[28-30];②木质纤维素可以抑制里氏木霉生产木质纤维素酶。这为用里氏木霉生产纤维素酶提供了底物选择依据。

参考文献

[1] Keshwani DR, Cheng JJ. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review [J]. *Bioresour Technol* 2009, 100: 1515-1523.

[2] Sang T, Zhu WX. China's bioenergy potential [J]. *GCB Bioenergy*, 2011, 3: 79-90.

[3] 胡婷春, 熊兴耀. 新型能源植物—芒的研究进展 [J]. *农产品加工学刊* 2010, 5: 23-26.

Hu TC, Xiong XY. Research progress on the new energy plant: *Miscanthus* [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2010, 5: 23-26.

[4] Li ZR, Zhao CQ, Zha Y, et al. The minor wall-networks between monolignols and interlinked-phenolics predominantly affect biomass enzymatic digestibility in *Miscanthus* [J]. *PLoS ONE* 2014, 9

(8): e105115.

[5] Si SL, Chen Y, Fan CF, et al. Lignin extraction distinctively enhances biomass enzymatic saccharification in hemicelluloses-rich *Miscanthus* species under various alkali and acid pretreatments [J]. *Bioresour Technol* 2015, 183: 248-254.

[6] Li M, Si SL, Hao B, et al. Mild alkali-pretreatment effectively extracts guaiacyl-rich lignin for high lignocellulose digestibility coupled with largely diminishing yeast fermentation inhibitors in *Miscanthus* [J]. *Bioresour Technol* 2014, 169: 447-454.

[7] Juhasz T, Szengyel Z, Reczey K, et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources [J]. *Process Biochem* 2005, 40: 3519-25.

[8] Zhang L, Liu Y, Niu XR, et al. Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis [J]. *Biomass Bioenerg* 2012, (37): 16-24.

[9] Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases [J]. *Enzym Microb Tech* 2010, 46(7): 541-549.

[10] Chandel AK, Chandrasekar G, Silva MB, et al. The realm of cellulases in biorefinery development [J]. *Crit Rev Biotechnol* 2012, 32(3): 187-202.

[11] Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases [J]. *Enzyme Microb Technol* 2010, 46: 541-549.

[12] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008, 35: 377-391.

[13] Mach RL, Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, 60: 515-522.

[14] Dashtban M, Schraft H, Qin WS. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives [J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5: 578-595.

[15] Kovacs K, Macrelli S, Szakacs G, et al. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2009, 2: 14.

[16] Sipos B, Senko Z, Dienes D, et al. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources [J]. *Appl Biochem Biotechnol* 2010, 161: 347-364.

[17] Zhang QZ, Cai WM. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3 [J]. *Biomass Bioenerg*, 2008, 32: 1130-1135.

[18] Zhang L, Wang XQ, Ruan ZH, et al. Fungal cellulase/xylanase production and corresponding hydrolysis using pretreated corn stover as substrates [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, (172): 1045-1054.

[19] Zanirun Z, Bahrin EK, Yee PL. Effect of physical and chemical properties of oil palm empty fruit bunch, decanter cake and sago pith residue on cellulases production by *Trichoderma asperellum* UPM1 and *Aspergillus fumigatus* UPM2 [J]. *Appl Biochem Biotechnol* 2014, (172): 423-435.

- [20] Yoon LW ,Ngoh GC ,Chua ASM. Simultaneous production of cellulase and reducing sugar through modification of compositional and structural characteristic of sugarcane bagasse [J]. *Enzyme Microb Tech* 2013 53(4): 250 – 256.
- [21] Xu N ,Zhang W ,Ren SF ,et al. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus* [J]. *Biotechnol Biofuels* 2012 5: 58.
- [22] Peng LC ,Hocart CH ,Redmond JW ,et al. Fractionation of carbohydrates in *Arabidopsis* root cell walls shows that three radial swelling loci are specifically involved in cellulose production [J]. *Planta* 2000 211: 406 – 414.
- [23] Wu ZL ,Zhang ML ,Wang LQ ,et al. Biomass digestibility is predominantly affected by three factors of wall polymer features distinctive in wheat accessions and rice mutants [J]. *Biotechnol Biofuels* 2013 6: 183.
- [24] Fry SC ,The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis [M]. London: The Blackburn Press ,1988: 97 – 99.
- [25] Dische Z ,Color reactions of carbohydrates. In: Whistler RL ,Wolf from ML(Eds) ,Methods in Carbohydrate Chemistry [M]. New York: Academic Press ,1962: 475 – 514.
- [26] Ghose TK. Measurement of cellulose activities (recomendations of Commission on Biotechnology IUPAC) [J]. *Pure Appl Chem* ,1987 59: 257 – 268.
- [27] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. *Anal Chem* ,1959 31: 426 – 428.
- [28] Gao DH ,Haarmeyer C ,Balan V ,et al. Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification [J]. *Biotechnol Biofuels* 2014 7(1): 175.
- [29] Lou H ,Wang M ,Lai H ,et al. Reducing non – productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate [J]. *Bioresource Technol* 2013 146: 478 – 484.
- [30] Li YF ,Ge XY ,Sun ZP ,et al. Effect of additives on adsorption and desorption behavior of xylanase on acid – insoluble lignin from corn stover and wheat straw [J]. *Bioresource Technol* 2015 186: 316 – 320.

(上接第 563 页)

- [17] Wright S. Evolution and the genetics of population. In: Wright S. *Variability Within and Among Natural Population* [M]. Chicago: University of Chicago Press ,1978: 10 – 15.
- [18] Whitlock MC ,McCauley DE. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{st} \neq 1 / (4Nm + 1)$ [J]. *Heredity* ,1999 82(2): 117 – 125.
- [19] 李丕鹏,陆宇燕,李昂. 中国林蛙的分类及分布 [J]. *蛇志* ,2014 26(2): 156 – 160.
- [20] 黄通灵. 不同地理分布区中国林蛙的身体特征变异 [J]. *湖南省环境生物职业技术学院学报* 2011 17(2): 6 – 9.
- [21] 鄂春宇. 中国林蛙生物学特性及人工养殖技术 [J]. *渔业致富指南* 2005 (18): 33 – 35.
- [22] 王晓红,李彤. 中国林蛙栖息生境的研究 [J]. *吉林林业科技* ,2000 29(1): 9 – 12.
- [23] 陆宇燕,李丕鹏. 我国林蛙的研究概况和开展环渤海区域林蛙多样性研究的意义 [J]. *四川动物* 2005 24(3): 271 – 275.
- [24] 魏刚,徐宁. 湖侧褶蛙及阿尔泰林蛙的核型、C – 带、银带研究 [J]. *贵州科学* 2004 22(3): 54 – 58.
- [25] Yang Junxiao ,Zhou Weiwei ,Rao Dingqi ,et al. Validity and systematic position of *Rana altaica*(Rana: Ranidae): Results of a phylogenetic analysis [J]. *Zoological Research* 2010 31(4): 353 – 360.

(上接第 590 页)

- [5] Rieux A ,Fievez V ,Garinot M ,et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach [J]. *Journal of Controlled Release* 2006 116(1): 1 – 27.
- [6] Zhao K ,Shi XM ,Zhao Y ,et al. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles [J]. *Vaccine* 2011 29(47): 8549 – 8556.
- [7] Neimert – Andersson T ,Binmyr J ,Enoksson M ,et al. Evaluation of safety and efficacy as an adjuvant for the chitosan – based vaccine delivery vehicle ViscoGel in a single – blind randomised Phase I / II a clinical trial [J]. *Vaccine* 2014 32(45): 5967 – 5974.
- [8] Biswas S ,Chattopadhyay M ,Sen KK ,et al. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice [J]. *Carbohydrate Polymers* 2015 121(5): 403 – 410.
- [9] Zhang AL ,Li JY ,Zhao G ,et al. Intranasal co – administration with the mouse zona pellucida 3 expressing construct and its coding protein induces contraception in mice [J]. *Vaccine* ,2011 29(39): 6785 – 6792.
- [10] 张钰,李轶杰,刘菲,等. 草原兔尾鼠和昆明白小鼠卵透明带 3 (ZP3) DNA 疫苗免疫不育效果的研究 [J]. *分子细胞生物学报* 2007 40(5): 301 – 308.
- [11] 程明,何金生,付远辉,等. 以减毒鼠伤寒沙门菌为载体的人呼吸道合胞病毒 F 蛋白 DNA 疫苗滴鼻免疫抗体分析 [J]. *微生物学报* 2011 7(51): 965 – 971.
- [12] Han YL ,Li Y ,Song J ,et al. Immune responses in wild – type mice DNA prime – protein induced using a DNA prime – protein boost strategy [J]. *Biomedical and Environmental Sciences* ,2011 24(5): 523 – 529.
- [13] 刘赋佩,常丹,喻艳坤,等. IL – 15 增强小鼠卵透明带 3DNA 疫苗的滴鼻免疫效果 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2012 28(1): 25 – 28.
- [14] 周吉春,赵新新,刘青,等. 提高黏膜免疫的方法及研究进展 [J]. *微生物学通报* 2015 42(3): 574 – 583.
- [15] Yang XR ,Yuan XY ,Cai DN ,et al. International journal of pharmaceuticals low molecular weight chitosan in DNA vaccine delivery via mucosal [J]. *International Journal of Pharmaceutics* ,2009 375(1 – 2): 123 – 132.
- [16] 王振华,王迪,刘平,等. 不同途径免疫小鼠重组乳酸球菌诱导的黏膜及系统免疫应答分析 [J]. *中国兽医杂志* 2015 (1): 38 – 41.
- [17] Vadesilho CFM ,Ferreira DM ,Miyaji EN ,et al. Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Microbial Pathogenesis* 2012 ,53(5 – 6): 243 – 249.