

不同生态型柳枝稷茎秆细胞壁组成特点与降解效率的差异

赵春桥^{1,2} 范希峰² 侯新村² 武菊英² 胡跃高^{1*} 朱毅² 岳跃森²

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193;

2. 北京市农林科学院 草业与环境研究发展中心,北京 100097)

摘要 采用纤维素复合酶直接酶解(Direct enzymolysis,DE)、1% H₂SO₄ 预处理后酶解(Enzymolysis after 1% H₂SO₄ pretreatment,ACE)和1% NaOH 预处理后酶解(Enzymolysis after 1% NaOH pretreatment,ALE)3种处理方法对2种生态型柳枝稷 Alamo(低地型)和 Cave-in-Rock(高地型)茎秆进行降解效率的研究,并对其细胞壁组成特点进行分析。结果表明:1)DE处理下,Alamo 茎秆总产糖效率、六碳糖产糖效率和纤维素降解效率分别显著高于 Cave-in-Rock 24.94%、40.52%和 24.68%($P < 0.05$ 或 0.01);ACE处理下,Alamo 茎秆预处理产糖效率、酶解产糖效率和总产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 17.13%、25.69%和 16.87%,五碳糖产糖效率、六碳糖产糖效率和纤维素降解效率分别显著高于 Cave-in-Rock 9.71%、38.93%和 21.86%;ALE处理下,Alamo 茎秆酶解产糖效率和总产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 16.69%和 13.48%,五碳糖产糖效率、六碳糖产糖效率和纤维素降解效率分别显著高于 Cave-in-Rock 13.07%、17.46%和 6.59%;2)Alamo 茎秆细胞壁中纤维素含量显著高于 Cave-in-Rock 11.31%,纤维素结晶度和聚合度分别显著低 10.09%和 40.54%;半纤维素中阿拉伯糖(Ara)含量显著高于 Cave-in-Rock 5.28%,而木糖(Xyl)含量显著低于 Cave-in-Rock 1.37%,阿拉伯糖替代程度(Ara/Xyl)显著高于 Cave-in-Rock 6.74%;木质素单体紫丁香基(S)含量显著高于 Cave-in-Rock 16.40%。较高的纤维素含量、较低的纤维素结晶度和聚合度是 Alamo 茎秆高产糖效率的直接原因,推测阿拉伯糖的替代程度对纤维素结晶度和聚合度的影响以及较高含量的木质素单体 S 可能是 Alamo 茎秆高降解效率的深层次原因。

关键词 柳枝稷;生态型;茎秆;细胞壁;降解效率

中图分类号 S 261.2

文章编号 1007-4333(2015)02-0035-08

文献标志码 A

Difference of stem cell wall compositional characteristics and degradation efficiency in different genotypes of switchgrass

ZHAO Chun-qiao^{1,2}, FAN Xi-feng², HOU Xin-cun², WU Jü-ying²,

HU Yue-gao^{1*}, ZHU Yi², YUE Yue-sen²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Research & Development Center for Grass and Environment, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract Direct enzymolysis (DE), enzymolysis after 1% H₂SO₄ pretreatment (ACE) and 1% NaOH pretreatment (ALE) by mixed-cellulases was conducted to determine the degradation efficiency of Alamo (lowland) and Cave-in-Rock (upland) stem. Afterwards the cell wall compositional characteristics of stem was analysed in particular. 1)Under the disposal of DE, total sugar yield efficiency, hexose yield efficiency and cellulose degradation efficiency of Alamo

收稿日期: 2014-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(31101103);北京市科技新星计划(Z131105000413020);北京市农林科学院青年科研基金(QNJJ201219)

第一作者: 赵春桥,博士研究生,E-mail:spridgezhao111@163.com

通讯作者: 胡跃高,教授,主要从事荒漠化治理及燕麦相关研究,E-mail:huyuegao@cau.edu.cn

stem was 24.94% ,40.52% and 24.68% higher than Cave-in-Rock values, respectively. Under the disposal of ACE, sugar yield efficiency released from pretreatment, sugar yield efficiency released from enzymolysis and total sugar yield efficiency was 17.13% ,25.69% and 16.87% higher than those obtained from Cave-in-Rock, respectively. What is more, the pentose yield efficiency, hexose yield efficiency and cellulose degradation efficiency was 9.71% ,38.93% and 21.86% higher than those of Cave-in-Rock. Under the disposal of ALE, sugar yield efficiency released from enzymolysis and total sugar yield efficiency was 16.69% and 13.48% higher than those from Cave-in-Rock and the pentose yield efficiency, hexose yield efficiency and cellulose degradation efficiency was 13.07% ,17.46% and 6.59% higher than Cave-in-Rock values, respectively. All these differences were statistically significant ($P < 0.05$ or 0.01).

2) Content of cellulose of Alamo stem was 11.31% significantly higher than that from Cave-in-Rock, whereas the cellulose crystallinity indexes and degree of polymerization was 10.09% and 40.54% significantly lower than those from Cave-in-Rock, respectively. Content of arabinose (Ara) of hemicellulose in Alamo stem was 5.28% significantly higher than in Cave-in-Rock. However the content of Xylose (Xyl) was 1.37% lower than in Cave-in-Rock. The degree of Ara substitution in hemicellulose (Ara/Xyl) of Alamo stem was 6.74% significantly higher than in Cave-in-Rock. Syringyl (S) monomer units were 16.40% significantly higher than in Cave-in-Rock. Taken together, higher cellulose content, lower cellulose crystallinity indexes and degree of polymerization are the major factors rendering the higher degradation efficiency of Alamo stem. Influence of Ara on branch structure of hemicellulose which negatively affects cellulose crystallinity indexes and degree of polymerization as well as S monomer units might be the key factors rendering higher degradation efficiency of Alamo stem.

Key words switchgrass; ecotype; stem; cell wall; degradation efficiency

柳枝稷 (*Panicum virgatum* L.) 是一种生物质产量高、品质优良的木质纤维素类能源作物, 已成为纤维素乙醇生产的理想原材料^[1]。木质纤维素降解效率的高低直接决定其纤维素乙醇的转化难易, 而细胞壁组成结构严重阻碍木质纤维素材料的降解^[2]。研究不同生态型柳枝稷茎秆降解效率和细胞壁组成特点的差异, 探明影响柳枝稷茎秆降解效率的关键因素, 对柳枝稷品种选育和转化应用具有重要意义。

木质纤维素材料的细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素组成, 三者相互交联共同形成细胞壁错综复杂的三维网络结构^[3]。植物细胞壁的这种结构被认为是阻碍木质纤维素材料降解的天然屏障, 因此木质纤维素材料转化利用效率的高低在一定程度上取决于对其抗降解屏障的深入了解^[4]。Xu等^[5]认为芒草半纤维素对纤维素的结晶度产生不利影响, 从而导致其降解效率的增高, Wu等^[6]对小麦和玉米突变体的研究以及 Li等^[7]对芒草的研究表明, 半纤维素中阿拉伯糖的替代程度是影响降解效率的主要因素, 而 Li等^[8]认为提高木质素单体紫丁香基 (S) 的比例能够提高拟南芥的降解效率, Jasiukaityte-Grojzdek等^[9]认为纤维素的聚合度和结晶度对纤维素的降解效率有重要影响。前人对芒草、小麦、水稻及拟南芥等植物细胞壁中影响降解效率的主要因素及机制进行了研究, 但对不同生态型

柳枝稷细胞壁组成特点的差异, 尤其相互作用关系对降解效率的影响鲜见报道。

本研究从细胞壁组成特点出发, 通过对不同生态型柳枝稷茎秆降解效率差异的研究, 拟揭示影响柳枝稷茎秆降解效率的机制, 以期为高降解效率柳枝稷品种的选育和遗传改良提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 时间及地点

试验于 2014 年在北京市农林科学院草业与环境研究发展中心进行。

1.2 材料

供试柳枝稷材料为 Alamo(低地型)和 Cave-in-Rock(高地型)(表 1)地上部茎秆, 于 2013 年 11 月初在北京草业与环境研究发展中心能源草种植基地 (N39°34', E116°28') 获取。柳枝稷于 2012 年种植, 2013 年取样。柳枝稷所生长地的土壤肥力均匀, pH 为 7.62, 有机质含量为 15.2 g/kg, 速效氮含量为 84.0 mg/kg, 速效磷含量为 16.5 mg/kg, 速效钾含量为 129.0 mg/kg。随机取样, 每 6 株作为 1 重复, 取 3 重复。柳枝稷留茬高度为 5~10 cm。取样后迅速将样品洗净, 置于 105 °C 下杀青 20 min, 之后剥除叶、叶鞘和穗, 留取茎秆, 置于 50 °C 下烘干, 粉碎, 重复内单株样品充分混匀, 过 40 目筛, 存放于干燥器中待测。

表1 柳枝稷品种名、生态型、倍性和起源

Table 1 Names, ecotypes, ploidies and origins of switchgrass

品种 Cultivar	生态型 Ecotype	倍性 Ploidy	起源 Origin
Alamo	低地型	四倍体	美国
Cave-in-Rock	高地型	八倍体	美国

1.3 方法

1.3.1 试验设计

试验共设3种处理:纤维素复合酶直接酶解(Direct enzymolysis, DE)、1% H₂SO₄ 预处理后酶解(Enzymolysis after 1% H₂SO₄ pretreatment, ACE)和1% NaOH 预处理后酶解(Enzymolysis after 1% NaOH pretreatment, ALE)。以蒸馏水处理作为对照展开试验,并对柳枝稷茎秆纤维素、半纤维素和木质素含量及组成特点进行分析,各试验设3重复。

1.3.2 酸、碱预处理

称取柳枝稷茎秆粉末0.5 g于15 mL离心管中,向离心管中加入体积分数为1%的H₂SO₄溶液10 mL用作酸预处理,10 g/L的NaOH溶液10 mL用作碱预处理,10 mL蒸馏水用作对照,充分摇匀。酸预处理(ACE):将离心管放入高压灭菌锅中,120 °C保持20 min,然后置于50 °C,150 r/min摇床中震荡2 h,对照不进行高压灭菌处理,直接震荡140 min。碱预处理(ALE):直接将离心管置于50 °C,150 r/min摇床中震荡2 h;取出后,4 000g离心,取上清液,测定五碳糖和六碳糖含量。

1.3.3 酶解

将上述预处理后残渣弃上清液,并用蒸馏水洗4遍,0.2 mol/L醋酸钠缓冲液(pH 4.8)洗2遍,然后向其中加入4 g/L纤维素复合酶溶液5 mL,并用上述缓冲液定容至10 mL,直接酶解处理(DE)以加入10 mL蒸馏水作为对照。置于50 °C,150 r/min摇床中,酶解48 h后取出,沸水灭酶活,冷却,4 000g离心,取上清液,测定五碳糖和六碳糖含量。五碳糖和六碳糖的降解效率按照五碳糖和六碳糖产量占总干重的百分含量进行计算。纤维素降解效率按照酶解产六碳糖含量占纤维素含量的百分含量进行计算。

1.3.4 细胞壁组成成分提取及测定

细胞壁组成成分的提取参照Peng等^[10]的方法,并按照五碳糖和六碳糖含量的测定方法测定纤维素和半纤维素含量。GC/MS测定半纤维素单糖

组成^[7],铜乙二胺法测定纤维素聚合度^[11],X衍射法测定纤维素结晶度^[12],碱硝基苯氧化法测定木质素单体组成^[13],硫酸水解法测定Klason木质素含量^[14]。

1.3.5 五碳糖及六碳糖测定方法

采用硫酸蒽酮法测定六碳糖含量^[15],苔黑酚法测定五碳糖含量^[16]。标准曲线及计算公式如下:

$$S_{C5} = (39.524 \times A_{550} + 0.5769) / V_1 \times V_2$$

$$S_{C6} = (114.2 \times A_{620R} - 1.523) / V_3 \times V_2$$

在六碳糖测定过程中,溶液中五碳糖对六碳糖的测定有一定的干扰,因此按照不同浓度五碳糖对六碳糖的干扰程度制作标准曲线,并对六碳糖吸光值进行校正。校正公式为:

$$A_{620R} = A_{620} - 0.0021 \times (39.524 \times A_{550} + 0.5769) \times V_3 / V_1 + 0.0001$$

其中S_{C5}和S_{C6}分别代表五碳糖量和六碳糖量,A₅₅₀和A₆₂₀分别代表550 nm和620 nm下吸光值,A_{620R}代表校正后620 nm下吸光值,V₁和V₃分别代表五碳糖和六碳糖取样体积,V₂代表溶液总体积。各标准曲线R²均在0.9990以上。计算预处理产糖量和酶解产糖量时需扣除相应对照的产糖量。

1.3.6 精密仪器及药品规格

紫外分光光度计为上海洪纪仪器设备有限公司生产的756PC型,蒽酮与苔黑酚购于Sigma公司(日本),硫酸和盐酸购于国药集团化学试剂有限公司,药品均为分析纯规格。纤维素复合酶购于宁夏和氏璧生物技术有限公司,其中β-葡聚糖酶活力≥6×10⁴ U(50 °C,pH 4.8条件下,1 min内水解β-葡聚糖产生1 μmol葡萄糖所需酶量),纤维素酶活力≥600 U(50 °C,pH 4.8条件下,1 min内水解纤维素产生1 μmol葡萄糖所需酶量),木聚糖酶活力≥10×10⁴ U(50 °C,pH 4.8条件下,1 min内水解木聚糖产生1 μmol木糖所需酶量)。

1.3.7 统计分析

采用Excel 2007对原始数据进行整理和分析,

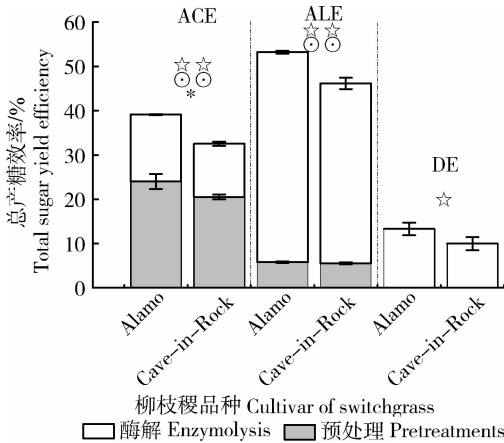
SPSS one way ANOVA 进行方差显著性分析, Oringin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理下 2 种生态型柳枝稷茎秆产糖效率

2.1.1 总产糖效率

ACE、ALE 和 DE 处理下, 2 种生态型柳枝稷茎秆总产糖效率差异显著($P < 0.05$) (图 1), Alamo 茎秆总产糖效率显著高于 Cave-in-Rock, 分别高 16.87%、13.48% 和 24.94%。ACE 处理, Alamo 茎秆预处理和酶解产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 17.13% 和 25.69%; ALE 处理, 2 种生态型柳枝稷茎秆预处理总产糖效率差异不显著, 而 Alamo 茎秆酶解总产糖效率显著高于 Cave-in-Rock 16.69%。不同处理间比较, ACE 处理预处理步骤产糖效率高于预处理后酶解产糖效率, 而 ALE 处理情况则恰恰相反。



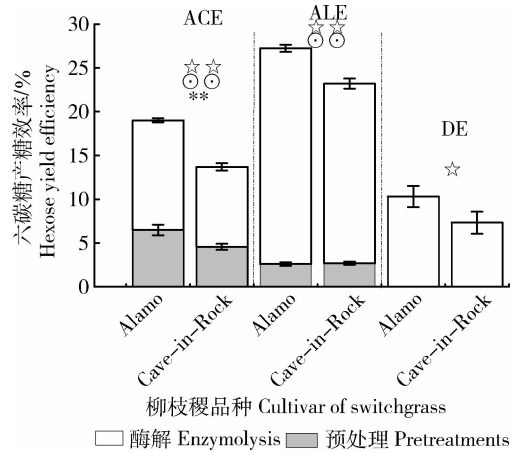
ACE 为 1% H_2SO_4 预处理后酶解, ALE 为 1% $NaOH$ 预处理后酶解, DE 为纤维素复合酶直接酶解, 图 2~4 同。
* 代表预处理产糖效率差异显著 ($P < 0.05$); $\odot\odot$ 代表酶解产糖效率差异极显著 ($P < 0.01$); \star 和 $\star\star$ 分别代表总产糖效率差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。ACE; Enzymolysis after 1% H_2SO_4 pretreatment; ALE; Enzymolysis after 1% $NaOH$ pretreatment; DE; Direct enzymolysis, the same as figure 2-4. * represents significant difference of sugar yield efficiency released from pretreatment at $P < 0.05$; $\odot\odot$ represents significant difference of sugar yield efficiency released from enzymolysis at $P < 0.01$; \star and $\star\star$ represent significant difference of total sugar yield efficiency released at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

图 1 柳枝稷茎秆总产糖效率

Fig. 1 Total sugar yield efficiency of switchgrass stem

2.1.2 六碳糖产糖效率

ACE、ALE 和 DE 处理下, 2 种生态型柳枝稷茎秆六碳糖产糖效率存在较大差异 (图 2), Alamo 茎秆六碳糖产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 38.93%、17.46% 和 40.52%。ACE 处理下, Alamo 茎秆预处理和酶解六碳糖产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 41.70% 和 37.39%; ALE 处理, 2 种柳枝稷茎秆预处理六碳糖产糖效率差异不显著, Alamo 茎秆酶解六碳糖产糖效率显著高于 Cave-in-Rock 20.19%; DE 处理, Alamo 茎秆六碳糖产糖效率显著高于 Cave-in-Rock 40.52%。ACE 和 ALE 处理, 六碳糖主要产生于酶解步骤, 预处理步骤六碳糖产糖效率较低。3 种处理间比较, ALE 处理下六碳糖产糖效率高于其余 2 种处理。



** 代表预处理产糖效率差异极显著 ($P < 0.01$); $\odot\odot$ 代表酶解产糖效率差异极显著 ($P < 0.01$); \star 和 $\star\star$ 分别代表六碳糖产糖效率差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。** represents significant difference of sugar yield efficiency released from pretreatment at $P < 0.01$; $\odot\odot$ represents significant difference of sugar yield efficiency released from enzymolysis at $P < 0.01$; \star and $\star\star$ represent significant difference of hexose yield efficiency at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

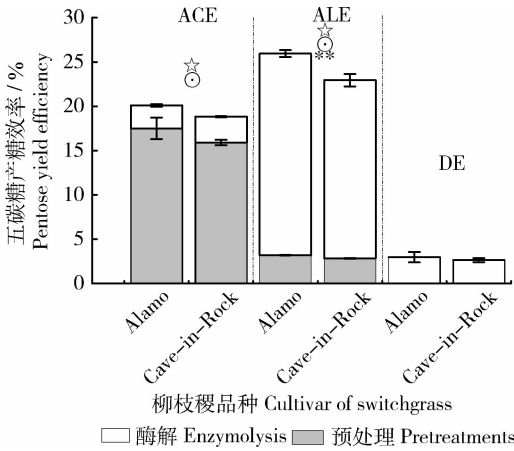
图 2 柳枝稷茎秆六碳糖产糖效率

Fig. 2 Hexose yield efficiency of switchgrass stem

2.1.3 五碳糖产糖效率

ACE、ALE 和 DE 处理下, 2 种生态型柳枝稷茎秆五碳糖产糖效率差异较小 (图 3), ACE 和 ALE 处理, Alamo 茎秆五碳糖产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 9.71% 和 13.07%, DE 处理, 2 种柳枝稷茎秆五碳糖产糖效率差异不显著。ACE 处理, 2 种柳枝稷茎秆预处理五碳糖产糖效率差异不显

著；ALE 处理，Alamo 茎秆预处理和酶解五碳糖产糖效率分别显著高于 Cave-in-Rock 12.72% 和 13.11%。3 种处理间比较，ALE 处理五碳糖产糖效率最高，而 DE 处理五碳糖产糖效率最低。ACE 处理五碳糖主要产生于预处理步骤，而 ALE 处理五碳糖主要产生于酶解步骤。



** 代表预处理产糖效率差异极显著 ($P < 0.01$)；○ 代表酶解产糖效率差异显著 ($P < 0.05$)；☆ 代表五碳糖产糖效率差异显著 ($P < 0.05$)。
 ** represents significant difference of sugar yield efficiency released from pretreatment at $P < 0.01$ ；○ represents significant difference of sugar yield efficiency released from enzymolysis at $P < 0.05$ ；☆ represents significant difference of pentose yield efficiency at $P < 0.05$.

图 3 柳枝稷茎秆五碳糖产糖效率

Fig. 3 Pentose yield efficiency of switchgrass stem

2.1.4 纤维素降解效率

不同处理下，柳枝稷茎秆酶解产生的六碳糖主要来源于纤维素，因此采用酶解产生的六碳糖占纤维素的百分含量(图 4)反映柳枝稷茎秆纤维素的降解效率。

ACE、ALE 和 DE 处理下，Alamo 茎秆纤维素降解效率分别显著高于 Cave-in-Rock 21.86%、6.59% 和 24.68%。其中以 DE 处理差异最大，ALE 处理差异最小。3 种处理间比较，ALE 处理柳枝稷茎秆纤维素降解效率高于其余 2 种处理。

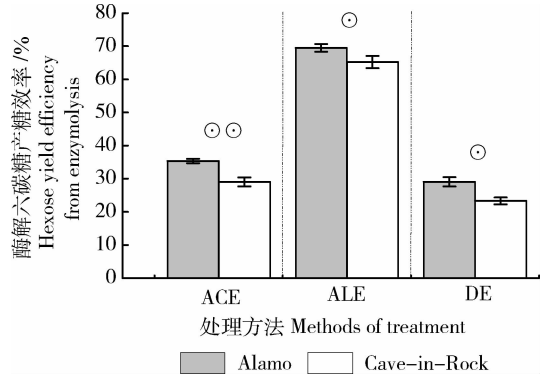
2.2 2 种生态型柳枝稷茎秆细胞壁组成特点

为揭示不同生态型柳枝稷茎秆降解效率差异的原因，进一步对 2 种柳枝稷茎秆细胞壁组成特点进行详细分析。

2.2.1 细胞壁纤维素、半纤维素和木质素含量

2 种生态型柳枝稷茎秆细胞壁组分含量存在一

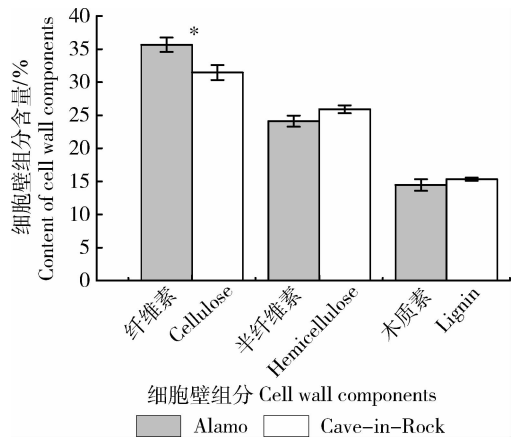
定的差异(图 5)。Alamo 细胞壁中纤维素含量显著高于 Cave-in-Rock 11.31%，半纤维素和木质素含量略低于 Cave-in-Rock，但并未达到显著水平。



○ 和 ○○ 代表纤维素降解效率差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。
 ○ and ○○ represent significant difference of cellulose degradation efficiency at $P < 0.05$ or 0.01 .

图 4 柳枝稷茎秆酶解六碳糖产率

Fig. 4 Hexose yields efficiency from enzymolysis of switchgrass stem



* 代表纤维素含量差异显著 ($P < 0.05$)。
 * represents significant difference of cellulose content at $P < 0.05$.

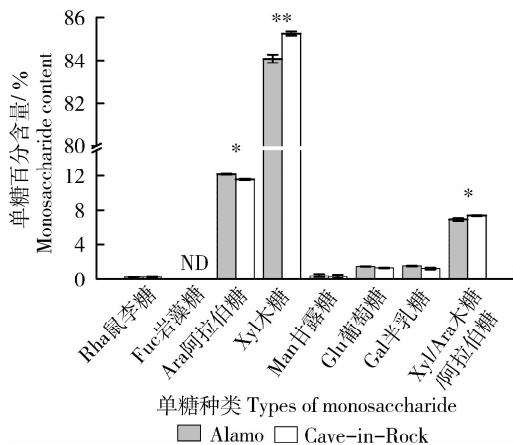
图 5 柳枝稷茎秆细胞壁组分含量

Fig. 5 Content of cell wall components of switchgrass stem

2.2.2 半纤维素单糖组成

2 种生态型柳枝稷茎秆半纤维素单糖种类相同(图 6)，均由阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、岩藻糖(Fuc)和葡萄糖(Glu)组成，且以 Xyl 和 Ara 为主，Fuc 含量甚微。Alamo 茎秆半纤维素中 Ara 含量显著高于 Cave-in-Rock 5.28%，而 Xyl 含量显著低于

Cave-in-Rock 1.37%, Ara/Xyl 值显著高于 Cave-in-Rock 6.74%。



* 和 ** 代表差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。ND 代表未检测到。

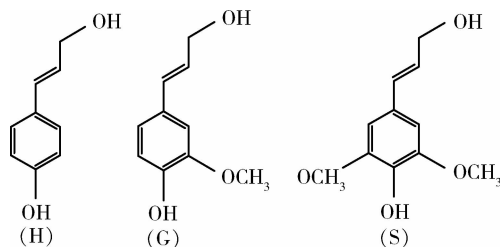
* and ** represent the significant difference at $P < 0.05$ or 0.01 . ND represents not detectable.

图 6 柳枝稷茎秆半纤维素单糖组成

Fig. 6 Monosaccharide composition of hemi-cellulose of switchgrass stem

2.2.3 木质素单体组成

禾本科草类植物木质素主要由香豆基(H)、松柏醇基(G)和紫丁香基(S)3种单体组成(图7),3种单体苯环上甲氧基含量不同,从而导致单体间相互交联的结合位点及甲氧基所造成的空间位阻不同。



H: 香豆基; G: 松柏醇基; S: 紫丁香基。

H: *p*-Hydroxybenzaldehyde; G: Vanillin; S: Syringaldehyde

图 7 木质素 3 种单体结构^[16]

Fig. 7 Structure of three lignin monomers

2种生态型柳枝稷茎秆木质素各单体的含量差异较小(表2)。Alamo 茎秆木质素中 S 单体含量显著高于 Cave-in-Rock, 高出 16.40%, 其他 2 种单体含量差异不显著, S/G 差异不显著。

表 2 柳枝稷茎秆木质素单体含量

Table 2 Monomer composition of lignin of switchgrass stem

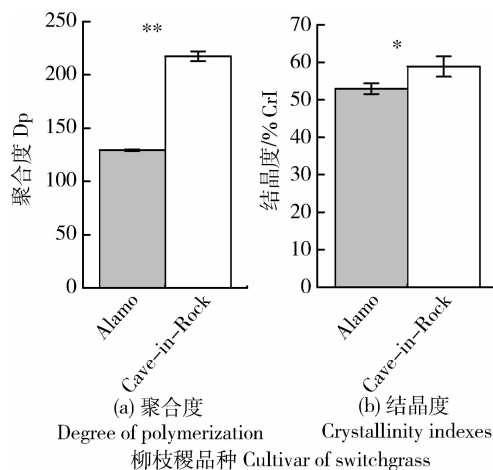
单体种类 Type of monomer	Alamo	Cave-in-Rock
香豆基/ $(\mu\text{mol/g})$ H	115.00 ± 11.48	105.32 ± 18.02
松柏醇基/ $(\mu\text{mol/g})$ G	257.64 ± 6.23	244.86 ± 26.00
紫丁香基/ $(\mu\text{mol/g})$ S	$185.52 \pm 7.40^*$	159.38 ± 5.08
S/G	0.72 ± 0.04	0.65 ± 0.05

注: * 代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * represents significant difference at $P < 0.05$.

2.2.4 纤维素聚合度和结晶度

2种生态型柳枝稷茎秆纤维素聚合度与结晶度存在着显著差异(图8), Alamo 茎秆纤维素聚合度显著低于 Cave-in-Rock 40.54%(图8(a)), 结晶度显著低于 Cave-in-Rock 11.22%(图8(b))。这说明 Alamo 与 Cave-in-Rock 茎秆中纤维素结构特征差异较大。



(a) 聚合度
Degree of polymerization
柳枝稷品种 Cultivar of switchgrass

(b) 结晶度
Crystallinity indexes
柳枝稷品种 Cultivar of switchgrass

* 和 ** 代表差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。

* and ** represent significant difference at $P < 0.05$ or 0.01 .

图 8 柳枝稷茎秆纤维素聚合度和结晶度

Fig. 8 Degree of polymerization and crystallinity indexes of cellulose of switchgrass stem

3 讨论

前人^[17]研究表明,植物细胞壁中有诸多因素如木质素、半纤维素含量以及木质素和半纤维素结构等共同影响细胞壁的降解。降低木质素含量有利于纤维素的积累^[18]。本研究表明,Alamo 茎秆细胞壁中木质素含量略低于 Cave-in-Rock 6.08%, 同时发

现其半纤维素含量同样略低于 Cave-in-Rock 7.47%, 推测分配于木质素和半纤维素的同化物相对较少共同导致 Alamo 茎秆中纤维素含量较高。酸预处理步骤主要去除了细胞壁中部分半纤维素, 对木质素作用较小^[19]。Alamo 茎秆在 ACE 处理下, 总六碳糖产率显著高于 Cave-in-Rock, ACE 处理后酶解六碳糖产率显著高于 Cave-in-Rock, 而且 DE 作用下 Alamo 茎秆六碳糖产率显著高于 Cave-in-Rock, 这表明, 纤维素含量较高是 Alamo 茎秆高产糖效率的因素之一。除纤维素含量对细胞壁的产糖效率有影响外, 纤维素结晶度和聚合度的增加导致纤维素酶或化学试剂所能接触到的纤维素作用面积减少, 也会影响纤维素本身的降解^[20-21]。纤维素的聚合度反映纤维素链的长短, 而纤维素结晶度反映出纤维素链和链之间的聚合程度^[22]。本研究发现, Alamo 茎秆中纤维素结晶度显著低于 Cave-in-Rock 11.22%, 聚合度显著低 40.54%。在 3 种处理下, Alamo 茎秆纤维素降解效率均显著高于 Cave-in-Rock, Alamo 茎秆较低的纤维素结晶度和聚合度显著影响纤维素的降解, 其中纤维素聚合度可能为主要因素。

Dai 等^[23]和 Lima 等^[24]的试验结果表明, 半纤维素的分支可能对其结合到纤维素链上有所帮助, 但半纤维素的分支结合到纤维素微纤丝表面或嵌入到纤维素微纤丝中, 严重干扰纤维素微纤丝的聚合, 影响纤维素的结晶度和聚合度^[25], 而半纤维素中阿拉伯糖的替代程度在一定程度上影响半纤维素的分支结构^[7]。本研究表明, Alamo 茎秆中半纤维素单糖阿拉伯糖的替代程度显著高于 Cave-in-Rock, 木糖含量显著低于 Cave-in-Rock。这可能由于半纤维素中阿拉伯糖的替代程度不同, 影响半纤维素的分支化程度, 使阿拉伯糖与纤维素不规则区域的结合程度不同, 进而影响纤维素的结晶度和聚合度, 从而导致 Alamo 茎秆较高的纤维素降解效率。

木质素的 3 种单体 H、G 和 S 通过 C—C 或 C—O 等共价键相互连接, 形成一种高度复杂、无规则的疏水网络结构, 严重阻碍纤维素的降解^[26]。但不同单体组成比例对细胞壁的降解产生怎样的影响, 目前仍存在争议^[27]。本研究表明, Alamo 茎秆中木质素单体 S 含量显著高于 Cave-in-Rock, 且在 DE 处理下, Alamo 茎秆六碳糖产率和纤维素降解效率显著高于 Cave-in-Rock, 推测可能由于 S 单体中含有较多甲氧基, 阻碍 S 单体与其他单体间形成

更多的共价键链接, 从而导致木质素对纤维素的包裹作用减弱和相对较高的产糖效率。木质素不仅阻碍纤维素酶与纤维素的接触, 还对纤维素酶产生不可逆的吸附作用, 致使纤维素酶失活^[28]。本研究发现, 较高含量的 S 单体, 可能导致木质素整体结构相对疏松和疏水作用减弱, 从而减弱木质素对纤维素酶的不可逆吸附作用, 这可能也是导致 Alamo 茎秆较高产糖效率的因素。

4 结 论

低地型柳枝稷品种 Alamo 茎秆细胞壁中纤维素含量较高、纤维素结晶度和聚合度较低是其产糖效率较高的直接原因, 而阿拉伯糖的不同替代程度对纤维素结晶度和聚合度的影响、木质素单体 S 对纤维素包裹作用和对纤维素酶不可逆吸附作用的减弱可能是 Alamo 茎秆较高产糖效率的深层次原因。

参 考 文 献

- [1] David K, Ragauskas A J. Switchgrass as an energy crop for biofuel production: A review of its ligno-cellulosic chemical properties[J]. *Energy Environ Sci*, 2010, 3(9): 1182-1190
- [2] DeMartini J D, Pattathil S, Miller J S, et al. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass[J]. *Energy Environ Sci*, 2013, 6(3): 898-909
- [3] Sticklen M B. Plant genetic engineering for biofuel production: Towards affordable cellulosic ethanol[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(4): 308-308
- [4] Himmel M E, Ding S Y, Johnson D K, et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315(5813): 804-807
- [5] Xu N, Zhang W, Ren S F, et al. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus*[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5(1): 58-70
- [6] Wu Z L, Zhang M L, Wang L Q, 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(1): 1-14
- [7] Li F C, Ren S F, Zhang W, et al. Arabinose substitution degree in xylan positively affects lignocellulose enzymatic digestibility after various NaOH/H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus*[J]. *Bioresource Technol*, 2013, 130: 629-637
- [8] Li X, Ximenes E, Kim Y, et al. Lignin monomer composition affects *Arabidopsis* cell-wall degradability after liquid hot water pretreatment[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2010, 3(1): 27
- [9] Jasiukaityte-Grojzdek E, Kunaver M, Poljansek I. Influence of

- cellulose polymerization degree and crystallinity on kinetics of cellulose degradation[J]. *Bioresources*, 2012, 7(3): 3008-3027
- [10] Peng L, Hocart C H, Redmond J W, 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(3): 406-414
- [11] Kokubo A, Sakurai N, Kuraishi S, et al. Culm brittleness of barley (*Hordeum vulgare* L) mutants is caused by smaller number of cellulose molecules in cell wall[J]. *Plant Physiol*, 1991, 97(2): 509-514
- [12] Segal L, Creely J, Martin A, et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer[J]. *Text Res J*, 1959, 29(10): 786-794
- [13] Lapierre C, Pollet B, Rolando C. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods[J]. *Res Chem Intermediat*, 1995, 21(3/4/5): 397-412
- [14] Yoo C G, Wang C, Yu C X, et al. Enhancement of enzymatic hydrolysis and klason lignin removal of corn stover using photocatalyst-assisted ammonia pretreatment [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2013, 169(5): 1648-1658
- [15] Leyva A, Quintana A, Sanchez M, et al. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation[J]. *Biologicals*, 2008, 36(2): 134-141
- [16] Fry S C. The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis[M]. London: Longman, 1988: 97-99
- [17] Davin L B, Lewis N G. Lignin primary structures and dirigent sites[J]. *Curr Opin Biotech*, 2005, 16(4): 407-415
- [18] Jordan D B, Bowman M J, Braker J D, et al. Plant cell walls to ethanol[J]. *Biochem J*, 2012, 442: 241-252
- [19] Hu W J, Harding S A, Lung J, et al. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(8): 808-812
- [20] Zhang R, Lu X B, Sun Y S, et al. Modeling and optimization of dilute nitric acid hydrolysis on corn stover[J]. *J Chem Technol Biot*, 2011, 86(2): 306-314
- [21] Ioelovich M. Accessibility and crystallinity of cellulose[J]. *Bioresources*, 2009, 4(3): 1168-1177
- [22] Zeng M, Gao H N, Wu Y Q, et al. Effects of ultra-sonification assisting polyethylene glycol pre-treatment on the crystallinity and accessibility of cellulose fiber [J]. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*, 2010, 47(10): 1042-1049
- [23] Dai L, Xiao S, Shen Y, et al. The synthesis of cellulose-graft-poly (L-lactide) by ring-opening polymerization and the study of its degradability[J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2012, 33(12): 4122-4126
- [24] Lima D U, Loh W, Buckeridge M S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2004, 42(5): 389-394
- [25] Pauly M, Albersheim P, Darvill A, et al. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants[J]. *Plant J*, 1999, 20(6): 629-639
- [26] Hayashi T, Marsden M P, Delmer D P. Pea Xyloglucan and cellulose: VI xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo[J]. *Plant Physiol*, 1987, 83(2): 384-389
- [27] Grabber J H. How do lignin composition structure and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies[J]. *Crop Sci*, 2005, 45(3): 820-831
- [28] Zhao J. Fractionation and characterization of lignin from corn stover before and after diluted acid pretreatment and their cellulase adsorption[J]. *Amer Chemical Soc*, 2011, 241: 1-7

责任编辑: 袁文业