



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106916752 A

(43) 申请公布日 2017. 07. 04

(21) 申请号 201510999193. 0

C12R 1/645(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 28

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 11334 2015. 09. 08

(71) 申请人 国家电网公司

地址 100031 北京市西城区西长安街 86 号

申请人 江苏大学 国网节能服务有限公司

(72) 发明人 赵鹏翔 管国强 赵锦 崔凤杰

卜令习 黄达明 赵正凯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 苏红梅

(51) Int. Cl.

C12N 1/14(2006. 01)

C12N 9/42(2006. 01)

C12P 19/14(2006. 01)

C12P 19/02(2006. 01)

C12P 7/10(2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页

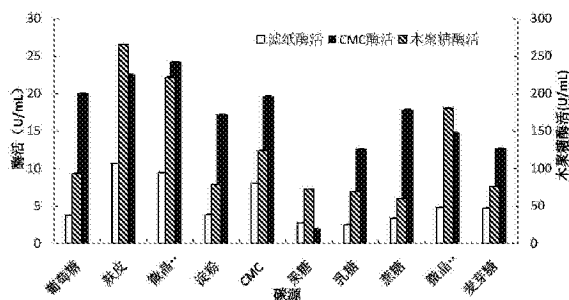
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法及其专用菌株

(57) 摘要

本发明涉及一种嗜热子囊菌株 (Thermoascus aurantiacus)UJS1412, 其保藏编号为 CGMCC No. 11334, 还涉及该菌株用于生产纤维素酶和 / 或木聚糖酶的用途, 还涉及使用该菌株制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法。该菌株生产的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂耐高温, 可以高效降解小麦秸秆、玉米秸秆和水稻秸秆等木质纤维素, 将其水解为葡萄糖和木糖, 可用于生产燃料乙醇、有机酸等生物产品。



1. 嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412, 其保藏编号为 CGMCC No. 11334。

2. 权利要求 1 的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 用于生产纤维素酶和 / 或木聚糖酶的用途。

3. 一种制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法, 该方法使用权利要求 1 的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶。

4. 权利要求 3 的制备方法, 该方法包括使用权利要求 1 的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 进行液体发酵的步骤,

优选地, 液体发酵的温度为 40 ~ 50°C, 例如 40 ~ 45°C ;

优选地, 发酵时间为 4 ~ 8 天, 例如 4 ~ 7 天, 例如 5 天、6 天或 7 天 ;

优选地, 发酵时的初始 pH 值为 4.5 ~ 6.0, 例如 4.8、5.0、5.5 或 5.8。

5. 权利要求 4 的制备方法, 其特征在于, 发酵所用的碳源选自葡萄糖、麸皮、微晶纤维素、淀粉、羧甲基纤维素 (CMC)、果糖、乳糖、蔗糖和麦芽糖, 优选以麸皮和 / 或微晶纤维素为碳源 ; 发酵所用的氮源选自蛋白胨 (例如胰蛋白胨、小麦蛋白胨、鱼粉蛋白胨)、牛肉膏、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母膏、玉米浆和  $\text{NaNO}_3$  为氮源, 优选以蛋白胨为氮源,

优选在发酵时, 将碳源和碳源加水配制成液体, 另外添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、吐温 -80 等营养物质。

6. 权利要求 5 的制备方法, 其特征在于, 以麸皮和 / 或微晶纤维素为碳源, 以蛋白胨为氮源, 将其加水配制成浓度分别为 3 ~ 30g/L, 5 ~ 50g/L 和 0.5 ~ 5g/L 的液体, 另外添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 ~ 3g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1 ~ 0.5g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.1 ~ 0.8g/L, 吐温 -80 0.1 ~ 1% (v/v)。

7. 一种纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂, 其酶解温度为 40°C ~ 80°C (例如 40°C ~ 70°C, 40°C ~ 65°C, 40°C ~ 60°C, 45°C ~ 60°C, 48°C ~ 60°C, 50°C ~ 60°C, 51°C ~ 60°C, 52°C ~ 60°C, 53°C ~ 60°C, 54°C ~ 60°C 或 55°C ~ 60°C)。

8. 权利要求 7 的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂, 其酶解 pH 为 4 ~ 5.5 (例如 4 ~ 5, 4 ~ 5.1, 4 ~ 5.2, 4 ~ 5.3 或 4 ~ 5.4)。

9. 权利要求 7 或 8 的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂, 其特征在于以下 i) 至 iv) 中的一项或多项 :

i) 纸酶活为 2 ~ 12U/mL ;

ii) CMC 酶活为 12 ~ 25U/mL ;

iii) 木聚糖酶活为 50 ~ 280U/mL ;

iv) 该酶制剂由权利要求 1 所述的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 经液体发酵制备得到, 或者由权利要求 3 至 6 任一项所述的制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法制备得到。

10. 权利要求 7 至 9 任一项所述的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂在降解木质纤维素 (例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等) 中的用途。

11. 一种降解木质纤维素 (例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等) 的方法, 该方法采用权利要求 7 至 9 任一项所述的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂催化降解木质纤维素。

12. 权利要求 11 的降解木质纤维的方法, 包括以下步骤 :

1) 预处理 : 用 NaOH 溶液 (例如 0.8 ~ 1.5mol/L, 优选为 1mol/L) 预处理木质纤维素

(例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等),洗涤至中性烘干;

2) 将预处理后的木质纤维素配制成溶液(优选浓度为 $10 \sim 50\text{g/L}$ ),加入所述的纤维素酶和/或木聚糖酶制剂进行酶解反应,

优选地,所述的纤维素酶和/或木聚糖酶制剂添加量为 $0.1 \sim 1\text{mL}$ 酶液/g 秸秆;

优选地,酶解温度为 $40^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ (例如 $40^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$ , $40^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$ , $40^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $45^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $48^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $50^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $51^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $52^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $53^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , $54^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 或 $55^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ );

优选地,酶解 pH 为 $4.0 \sim 5.5$ (例如 $4 \sim 5$ , $4 \sim 5.1$ , $4 \sim 5.2$ , $4 \sim 5.3$ 或 $4 \sim 5.4$ );

优选地,酶解时间为 $6 \sim 24$ 小时。

## 制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法及其专用菌株

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体地涉及一种制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法及其专用菌株。

### 背景技术

[0002] 纤维素酶 (cellulose) 又称纤维素酶系,是一类能够将纤维素降解为葡萄糖的多组分酶系的总称,它们协同作用,将纤维素降解为寡糖和纤维二糖,最终水解为葡萄糖。纤维素酶主要由外切  $\beta$ -葡聚糖酶、内切  $\beta$ -葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶等组成。

[0003] 纤维素酶广泛存在于自然界的生物体中,细菌、真菌、动物体内等都能产生纤维素酶。用于生产纤维素酶的细菌有梭菌属 (*Clostridium*)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)、杆菌属 (*Bacillus*)、高温单胞菌属 (*Thermomonospora*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、拟杆菌属 (*Bacteriodes*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、醋弧菌属 (*Acetovibrio*)、小双孢菌属 (*Microbispora*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*) 等。其中,纤维单胞菌 (*C. fimi*) 和高温单胞菌 (*T. fusca*) 是被广泛研究的两种产生纤维素酶的细菌。如中国专利申请 CN104232522A 公开了一株从堆肥中分离筛选出来的能产纤维素酶的细菌 (*Achromobacter xylosoxidans*), 保藏编号为 CCTCC No. M2013365, 该菌经 28h 发酵后纤维素酶活为 0.183U/mL。一般用于生产的纤维素酶来自于真菌,例如白绢菌 (*Sclerotium rolfsii*)、白腐真菌 (*P. chrysosporium*) 以及木霉属 (*Trichoderma*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、裂殖菌属 (*Schizophyllum*) 和青霉菌属 (*Penicillium*) 等种属中的一些真菌,其中木霉属是研究最广泛的纤维素酶产生菌。中国专利申请 CN104263658A 公开了一种里氏木霉菌株 (*Trichoderma reesei*) CGMCC NO. 9644, 该菌蛋白分泌能力强,具有更强的纤维素酶生产能力,其所产滤纸酶活比出发菌株提高了 13 ~ 31%。中国专利申请 CN104328057A 公开了采用空间诱变筛选培育的高产纤维素酶的里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) CGMCC NO. 9537, 其滤纸酶活力提高了 25.83% ~ 34.49%。

[0004] 目前市场上销售的纤维素酶约 20% 来自木霉属和曲霉属。大部分纤维素酶的酶解温度为 40 ~ 50 $^{\circ}$ C,但在生产实践中,由于很多工业生产环境都是高温环境 (如酒精发酵),因此耐高温酶比常温酶更具实用意义。同时,耐高温酶还具有以下诸多优点:(1) 高温反应,减少杂菌污染,提高产物纯度;(2) 室温贮藏期较长;(3) 一定程度可抗化学变性 (如耐表面活性剂);(4) 可用热处理去除大量杂蛋白,易于大规模生产与纯化。故,耐高温酶成为纤维素降解酶研究中的一大热点。

### 发明内容

[0005] 发明人通过不懈努力,从高温堆肥中筛选出一株具有同时产纤维素酶和 / 或木聚糖酶的嗜热菌,经形态观察和分子生物学技术鉴定,该菌株属于嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*),将其命名为嗜热子囊菌 UJS1412。该菌株能够用于生产纤维素酶和 / 或木聚糖酶,该菌株生产的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂耐高温,可以高效降解小麦秸秆、玉米秸秆和水稻秸秆等木质纤维素,将其水解为葡萄糖和木糖,可用于生产燃料乙醇、有机酸等生

物产品。

[0006] 在此基础上,本发明涉及以下几个方面:

[0007] 本发明的第一方面涉及一种嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412,其保藏编号为 CGMCC No. 11334。

[0008] 该菌株已于 2015 年 09 月 08 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 11334,分类命名为嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*),菌株名称为 UJS1412。

[0009] 本发明所述的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 的形态学特征为:所述嗜热子囊菌 UJS1412 在 PDA 平板培养基上于 40 ~ 50℃ 下培养 2 ~ 3 天,菌丝呈乳白色稀疏网状;3 天后渐转为棕黄色至深棕色,培养基背面观察呈浅黄色(如图 1 所示)。显微观察发现,菌丝呈明显的子囊菌特征,无色,光滑,具有分枝和隔膜;子囊孢子为卵圆形至椭圆形,壁光滑。

[0010] 本发明所述的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 能够用于生产纤维素酶和 / 或木聚糖酶,该菌生产的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂可以高效降解小麦秸秆、玉米秸秆和水稻秸秆等木质纤维素,将其水解为葡萄糖和木糖,可用于生产燃料乙醇、有机酸等生物产品。

[0011] 本发明的第二方面涉及嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 用于生产纤维素酶和 / 或木聚糖酶的用途。

[0012] 本发明的第三方面涉及一种制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法,该方法使用本发明所述的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶。

[0013] 在一个优选的实施方案中,本发明第三方面所述的制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法,包括使用本发明所述的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 进行液体发酵的步骤。优选的液体发酵的温度为 40 ~ 50℃,例如 40 ~ 45℃。优选的发酵时间为 4 ~ 8 天,例如 4 ~ 7 天,例如 5 天、6 天或 7 天。发酵时优选的初始 pH 值为 4.5 ~ 6.0,例如 4.8、5.0、5.5 或 5.8。

[0014] 在另一个优选的实施方案中,本发明第三方面所述的制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法中,发酵所用的碳源选自葡萄糖、麸皮、微晶纤维素、淀粉、羧甲基纤维素(CMC)、果糖、乳糖、蔗糖和麦芽糖,优选以麸皮和 / 或微晶纤维素为碳源;发酵所用的氮源选自蛋白胨(例如胰蛋白胨、小麦蛋白胨、鱼粉蛋白胨)、牛肉膏、NH<sub>4</sub>Cl、尿素、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、酵母膏、玉米浆和 NaNO<sub>3</sub>为氮源,优选以蛋白胨为氮源。发酵时,将碳源和氮源加水配制成液体,另外添加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、吐温-80 等营养物质。

[0015] 在一个具体的实施方案中,本发明第三方面所述的制备纤维素酶和 / 或木聚糖酶的方法,该方法以麸皮和 / 或微晶纤维素为碳源,以蛋白胨为氮源,将其加水配制成浓度分别为 3 ~ 30g/L,5 ~ 50g/L 和 0.5 ~ 5g/L 的液体,另外添加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 ~ 3g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.1 ~ 0.5g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.1 ~ 0.8g/L, 吐温-80 0.1 ~ 1% (v/v)。优选将配置好的液体培养液置于 250 ~ 500mL 摇瓶或 5 ~ 30L 生物反应器中,40 ~ 50℃ 发酵 4 ~ 7d。

[0016] 采用本发明所述的制备方法制备得到的纤维素酶和 / 或木聚糖酶,相对于现有的

纤维素酶,更耐高温,其酶解温度为 40℃~80℃(例如 40℃~70℃,40℃~65℃,40℃~60℃,45℃~60℃,48℃~60℃,50℃~60℃,51℃~60℃,52℃~60℃,53℃~60℃,54℃~60℃或 55℃~60℃),特别是温度为 45℃~60℃时,还能保持较高的酶活性;其酶解 pH 为 4~5.5(例如 4~5,4~5.1,4~5.2,4~5.3 或 4~5.4)。本发明所述的制备方法制备得到的纤维素酶和/或木聚糖酶的滤纸酶活为 2~12U/mL,CMC 酶活为 12~25U/mL,木聚糖酶活为 50~280U/mL。

[0017] 本发明的第四方面涉及一种纤维素酶和/或木聚糖酶制剂,该酶制剂由本发明第三方面任一项所述的制备方法制备得到,其酶解温度为 40℃~80℃(例如 40℃~70℃,40℃~65℃,40℃~60℃,45℃~60℃,48℃~60℃,50℃~60℃,51℃~60℃,52℃~60℃,53℃~60℃,54℃~60℃或 55℃~60℃),酶解 pH 为 4~5.5(例如 4~5,4~5.1,4~5.2,4~5.3 或 4~5.4)。该酶制剂的纸酶活为 2~12U/mL,CMC 酶活为 12~25U/mL,木聚糖酶活为 50~280U/mL。

[0018] 本发明的第五方面涉及一种纤维素酶和/或木聚糖酶制剂,该酶制剂的酶解温度为 40℃~80℃(例如 40℃~70℃,40℃~65℃,40℃~60℃,45℃~60℃,48℃~60℃,50℃~60℃,51℃~60℃,52℃~60℃,53℃~60℃,54℃~60℃或 55℃~60℃),酶解 pH 为 4~5.5(例如 4~5,4~5.1,4~5.2,4~5.3 或 4~5.4)。该酶制剂的纸酶活为 2~12U/mL,CMC 酶活为 12~25U/mL,木聚糖酶活为 50~280U/mL。该酶制剂可以由本发明第一方面所述的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 经液体发酵制备得到,也可以由本发明第三方面任一项所述的制备纤维素酶和/或木聚糖酶的方法制备得到。

[0019] 本发明的第六方面涉及本发明第四方面或第五方面所述的纤维素酶和/或木聚糖酶制剂在降解木质纤维素(例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等)中的用途。

[0020] 本发明的第七方面涉及一种降解木质纤维素(例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等)的方法,该方法采用本发明第四方面或第五方面所述的纤维素酶和/或木聚糖酶制剂催化降解木质纤维素。

[0021] 在一个优选的实施方案中,本发明第七方面所述的降解木质纤维素的方法,包括以下步骤:

[0022] 1) 预处理:用 NaOH 溶液(例如 0.8~1.5mol/L,优选为 1mol/L)预处理木质纤维素(例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等),洗涤至中性烘干;

[0023] 2) 将预处理后的木质纤维素配制成溶液(优选浓度为 10~50g/L),加入所述的纤维素酶和/或木聚糖酶制剂进行酶解反应,

[0024] 优选地,所述的纤维素酶和/或木聚糖酶制剂添加量为 0.1~1mL 酶液/g 秸秆;

[0025] 优选地,酶解温度为 40℃~80℃(例如 40℃~70℃,40℃~65℃,40℃~60℃,45℃~60℃,48℃~60℃,50℃~60℃,51℃~60℃,52℃~60℃,53℃~60℃,54℃~60℃或 55℃~60℃);

[0026] 优选地,酶解 pH 为 4.0~5.5(例如 4~5,4~5.1,4~5.2,4~5.3 或 4~5.4);

[0027] 优选地,酶解时间为 6~24 小时。

[0028] 在一个具体的实施方案中,本发明第七方面所述的降解木质纤维素的方法,包括以下步骤:将木质纤维素(例如小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆等)经的 NaOH 溶液(例如

0.8 ~ 1.5mol/L, 优选为 1mol/L) 预处理后洗涤至中性, 烘干后配制成溶液 ( 优选浓度为 10 ~ 50g/L), 添加本发明第四方面或第五方面所述的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂, 添加量优选为 0.1 ~ 1mL 酶液 /g 秸秆, 酶解温度 40°C ~ 80°C ( 例如 40°C ~ 70°C, 40°C ~ 65°C, 40°C ~ 60°C, 45°C ~ 60°C, 48°C ~ 60°C, 50°C ~ 60°C, 51°C ~ 60°C, 52°C ~ 60°C, 53°C ~ 60°C, 54°C ~ 60°C 或 55°C ~ 60°C ), pH 为 4.0 ~ 5.5 ( 例如 4 ~ 5, 4 ~ 5.1, 4 ~ 5.2, 4 ~ 5.3 或 4 ~ 5.4 ), 酶解时间优选为 6 ~ 24 小时。该方法酶解所得的葡萄糖和木糖对原料中葡萄糖和木糖的得率分别为 50 ~ 90% 和 30 ~ 70%。

[0029] 发明的有益效果

[0030] 本发明提供的嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) UJS1412 能够用于生产纤维素酶和 / 或木聚糖酶, 该菌生产的纤维素酶和 / 或木聚糖酶制剂相对于现有的纤维素酶更耐高温, 其酶解温度为 40°C ~ 80°C, 特别是温度达到 55°C ~ 60°C 时, 还能保持较高的酶活性, 可以高效降解小麦秸秆、玉米秸秆和水稻秸秆等木质纤维素, 将其水解为葡萄糖和木糖, 可用于生产燃料乙醇、有机酸等生物产品。

## 附图说明

[0031] 图 1 : 嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) UJS1412 在平板上的形态 ;

[0032] 图 2 : 不同碳源对嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) UJS1412 产酶能力的影响 ;

[0033] 图 3 : 不同氮源对嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) UJS1412 产酶能力的影响 ;

[0034] 图 4 : 温度对嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) UJS1412 产纤维素酶 / 木聚糖酶活的影响 ;

[0035] 图 5 : pH 对嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) UJS1412 产纤维素酶 / 木聚糖酶活的影响。

## 具体实施方式

[0036] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将会理解, 下列实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者, 按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

[0037] 实施例 1 菌株筛选、分离与鉴定

[0038] 1.1 菌株筛选与分离

[0039] 高温堆肥样品采自江苏省句容市郊, 采样时间为 2014 年 8 月 10 日。将采集高温堆肥样品用无菌水振荡, 取适量涂布秸秆分离筛选琼脂平板 ( 筛选琼脂平板由 1mol/L NaOH 预处理的小麦秸秆 10g/L, 琼脂 15g/L 制成)。挑取透明水解圈较大的菌落至培养液中 ( 培养液由 1mol/L NaOH 预处理的小麦秸秆 20g/L, 蛋白胨 5g/L,  $K_2HPO_4$  0.5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g/L, KCl 0.5g/L 配制而成, 自然 pH), 40°C 200rpm 摇瓶培养 36 小时, 测定发酵液中木聚糖酶及纤维素酶酶活, 最后筛选得到 1 株同时产纤维素酶和木聚糖酶的高产菌株, 命名为 UJS1412, 斜面 and 冷冻干燥保藏。

[0040] 将筛选获得的菌株,接种于 PDA 培养基平板上,分别置于 40℃,45℃和 50℃下培养,观察菌丝呈乳白色发散状生长,菌丝之间呈稀疏网状;3 天后渐转为棕黄色至深棕色,培养基背面观察呈浅黄色(如图 1 所示)。玻片培养,显微镜下对菌丝、分生孢子梗、分生孢子等形态特征进行观察,发现菌丝呈明显的子囊菌特征,为无色,光滑,具分枝和隔膜;子囊孢子呈卵圆形至椭圆形、壁光滑。

[0041] 1.2 基于 18s rDNA 序列的分子鉴定

[0042] 一、仪器与试剂

[0043] 1、仪器

[0044]

仪器名称	仪器来源	型号
测序仪	Applied Biosystems	3730XL
DNA 电泳槽	北京六一仪器厂	DYCP-31DN
稳压电泳仪	北京六一仪器厂	DYY-5
电热恒温水槽	上海一恒科学仪器有限公司	DK-8D
凝胶成像仪	上海复日科技仪器有限公司	FR980
恒温培养箱	太仓市科教器材厂	DHP-9162
恒温摇床	太仓市实验设备厂	TH2-C
PCR 仪	Applied Biosystems	2720thermal cycler
冷冻高速离心机	BBJ	HC-2518R
Surf 系列精密单道可调移液器	生工	SP10-1000

[0045] 2、试剂

[0046]

试剂名称	试剂来源	cat. No.
Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒	生工	SK8259
DreamTaq-TM DNA Polymerase	MBI	EP0702
dNTP	生工	D0056
琼脂糖	BBI	AB0014
SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒	生工	SK8131
DNA Ladder Mix maker	生工	SM0337
引物	生工	合成部合成
枪头、PCR管、离心管等	生工	铸塑部生产
克隆测序用		
pMD®18-T Vector 连接试剂盒	Takara	D101A
SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒	生工	SK8191

## [0047] 二、实验过程

## [0048] 1、基因组 DNA 提取

[0049] 采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒（购自生工生物工程（上海）有限公司）提取菌株 UJS1412 的基因组 DNA，具体的提取步骤参见产品说明书。

## [0050] 2、PCR 扩增

[0051] 采用真菌通用引物 ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (SEQ ID NO :1)) 及 ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (SEQ ID NO :2)) 扩增菌株整个 ITS 序列（内部转录间隔区，internal transcriber spacer）序列。

## [0052] PCR 反应体系：

[0053]

试剂	体积 (μL)
模板 (基因组DNA 20-50ng/μL)	0.5
10 × Buffer (with Mg <sup>2+</sup> )	2.5
dNTP (各2.5mM)	1
酶	0.2
F (10μM)	0.5
R (10μM)	0.5
加双蒸H <sub>2</sub> O 至	25

## [0054] PCR 循环条件：

[0055]

温度	时间	程序
94℃	4min	预变性
94℃	45 sec	30 cycle
55℃	45sec	
72℃	1 min	
72℃	10 min	修复延伸
4℃	∞	终止反应

- [0056] 3、凝胶电泳
- [0057] 1%琼脂糖电泳,150V、100mA 20min 电泳观察(见电泳图 DNA Ladder Mix make)。
- [0058] 4、纯化回收
- [0059] PCR 产物电泳条带切割所需 DNA 目的条带,纯化方式见 SK8131 说明书。
- [0060] 5、连接
- [0061] 将 PCR 产物经胶回收纯化、过 PCR 柱纯化,与 pGEM-T 连接,具体步骤按 **Takara pMD® 18-T Vector** 连接试剂盒操作。
- [0062] 6、感受态细胞 (E. coli JM109) 的制备:(氯化钙法)
- [0063] 6.1 从于 37℃ 培养 16 小时的新鲜平板中挑取一个单菌落,转到一个含有 100ml LB 培养基的 1L 烧瓶中。于 37℃ 剧烈振荡培养 3 小时(旋转摇床,300 转/分)。
- [0064] 6.2 在无菌条件下将细菌转移到一个无菌、一次性使用的、用冰预冷的 50ml 聚丙烯管中,在冰上放置 10 分钟,使培养物冷却至 0℃。
- [0065] 6.3 于 4℃,以 4000 转/分离心 10 分钟,回收细胞。
- [0066] 6.4 倒出培养液,将管倒置 1 分钟,使最后残留的痕量培养液流尽。
- [0067] 6.5 以 10ml 用冰预冷的 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>重悬每份沉淀,放置于冰浴上。
- [0068] 6.6 于 4℃,以 4000 转/分离心 10 分钟,回收细胞。
- [0069] 6.7 倒出培养液,将管倒置 1 分钟,使最后残留的痕量培养液流尽。
- [0070] 6.8 每 50ml 初始培养物用 2ml 用冰预冷的 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>(含 20%甘油)重悬每份细胞沉淀。
- [0071] 6.9 将细胞分装成小份(100 μl/支),放于 -70℃ 冻存。
- [0072] 7、连接产物转化
- [0073] 7.1 取 100 μL 感受态细胞,置于冰上,完全解冻后轻轻将细胞均匀悬浮。
- [0074] 7.2 加入 10 μL 连接液,轻轻混匀。冰上放置 30 分钟。
- [0075] 7.3 42℃ 水浴热激 90 秒。冰上放置 15 ~ 20 分钟。
- [0076] 7.4 加 400 μL LB 培养基,37℃ 200 ~ 250rpm 振荡培养 1 小时。
- [0077] 7.5 用枪头吸取 200 μL 培养菌液,涂布在预先用 20 μL 100mM IPTG 和 100U 20mg/ml X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上。
- [0078] 7.6 平板在 37℃ 下正向放置 1 小时以吸收过多的液体,然后倒置培养过夜。
- [0079] 8、蓝白斑筛选
- [0080] 当外源 DNA 片段插入到 pUC57 中后,由于外源 DNA 的核酸序列存在改变了 LacZ 基因的编码,从而影响了其产物 β-半乳糖苷酶 α-片段的活性,因此重组克隆在 X-gal/IPTG 平板上呈现为白色,而非重组克隆呈蓝色,选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落。
- [0081] 9、质粒提取与测序
- [0082] 选择阳性克隆提取质粒并纯化。用 M13+/- 引物扩增(体系如上)。M13+/- 引物测序。
- [0083] 上述菌种鉴定实验过程及测序工作由生工生物工程(上海)有限公司完成,所得的序列如 SEQ ID NO :3 序列所示。
- [0084] 菌株 UJS1412 的 18S rDNA 序列测序结果用 NCBI 的 BLAST 2.0 进行同源分析,通过与 Genbank 核酸数据库对比后,发现其与 *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 有

95%左右的相似度,确定该菌株为嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*)。

[0085] SEQ ID NO :3 :

[0086] ACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTTGGGGTCCTTCGGGGCCCGATCTCCCACCCTTTGTTGTGCGGAA  
TTTGTTCCTCGGCGGGTTTGCTTTATGGCAGACGGGCTCCGGGCCACCCGCCGAGGACCATTCAAACCTCTGCTT  
TAACAATGCAGTTTGAGAAGATTTAATAATAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAA  
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC  
CCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCAATCAAGCTACGCTTGGTATTGGGCGCGCGGCT  
TTTCCTTGCGAAAGGCCCGCCGAAATGCATCGGCGAGGAAACCGACCCCGGCGTGTTAGATTTCTGAACGTCAGG  
AGCACCGGTGCCCTCCGCCGTACAATCTTTTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC。

[0087] 证明本发明菌株属于嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)。

[0088] 该菌株已于 2015 年 09 月 08 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 11334,分类命名为嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*),菌株名称为 UJS1412。

[0089] 实施例 2 嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 产纤维素酶 / 木聚糖酶的条件筛选

[0090] 将保藏的菌株接入 PDA 斜面培养基 (配制方法为:将 200g 马铃薯沸水中煮 20min 后,8 层纱布过滤,取滤液,加入 20g 葡萄糖和 20g 琼脂,补加水至 1L, pH 自然。121℃条件下灭菌 30min),40℃培养 7 天进行活化。

[0091] 将活化的菌株接入液体种子培养基 (玉米淀粉 15g/L、蛋白胨 4g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.51mL/L 的微量元素, pH 自然。装液量 100mL/250mL) 中,40℃培养 3 天,制得种子液。

[0092] 产酶液体培养基的配方:碳源 10g/L、蛋白胨 1g/L、酵母膏 1g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L、CaCl<sub>2</sub> 0.3g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.4g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.3g/L、吐温-80 1mL/L,微量元素 (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5g/L、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.6g/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.4g/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 3.7g/L) 1mL/L, pH 6.5。分别添加葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉、微晶纤维素、CMC 和麸皮等作为产酶培养基中的碳源,筛选其最适的碳源。按 10% (v/v) 的接种量,28℃培养 7 天,分别测定滤纸酶活、CMC 酶活以及木聚糖酶活,测定结果见表 1 和图 2。

[0093] 表 1 碳源对酶活的影响

[0094]

碳源	滤纸酶活 (U/mL)	CMC 酶活 (U/mL)	木聚糖酶活 (U/mL)
葡萄糖	3.8±0.006	20.1±0.402	93.5±0.441
麸皮	10.690±0.021	22.512±0.450	265.666±0.181
微晶纤维素 1	9.450±0.015	24.210±0.484	221.227±1.063
淀粉	3.897±0.014	17.256±0.345	78.604±0.140
CMC	8.062±0.008	19.682±0.394	124.007±0.221
果糖	2.725±0.024	1.973±0.039	72.929±0.020
乳糖	2.523±0.005	12.647±0.253	69.382±0.201
蔗糖	3.412±0.002	17.903±0.358	60.159±0.020
微晶纤维素 2	4.827±0.015	14.830±0.297	180.761±0.181
麦芽糖	4.706±0.043	12.728±0.255	76.476±0.000

[0095] 注:微晶纤维素 1 购自国药集团化学试剂有限公司;微晶纤维素 2 购自上海楷洋生物技术有限公司

[0096] 分别采用酵母膏、胰蛋白胨、小麦蛋白胨、鱼肉蛋白胨、牛肉膏、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  等作为上述产酶培养基中的氮源,筛选其最适的氮源。按 10% 的接种量,28℃ 培养 7 天,分别测定滤纸酶活、CMC 以及木聚糖酶活,测定结果见表 2 和图 3。

[0097] 表 2 氮源对酶活的影响

[0098]

氮源	滤纸酶活 (U/mL)	CMC 酶活 (U/mL)	木聚糖酶活 (U/mL)
胰蛋白胨	6.65±0.133	19.3±0.386	229.15±1.124
牛肉膏	8.102±0.162	21.137±0.423	282.209±0.441
小麦蛋白胨	8.709±0.174	23.805±0.476	295.376±1.364
氯化铵	7.375±0.147	21.218±0.424	219.070±0.341
尿素	4.544±0.091	14.911±0.298	135.358±0.622
鱼粉蛋白胨	6.606±0.132	20.086±0.402	213.395±0.662
硫酸铵	6.121±0.122	20.814±0.416	214.813±0.421
酵母膏	8.709±0.174	21.461±0.429	194.240±1.244
玉米浆	8.992±0.180	21.541±0.410	267.311±1.826
硝酸钠	3.210±0.064	13.455±0.269	67.253±0.140

[0099] 其中,滤纸酶活的测定方法为:将待测酶液用 0.05mol/L, pH4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲液稀释适当倍数。实验组(加入 1.0mL pH4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲液,50mg 滤纸条、0.5mL 酶液),再取 3 支试管分别是空白管(加入 1.5mL 缓冲液)、酶对照组(1.0mL 缓冲液、0.5mL 酶液)、底物对照组(1.5mL 缓冲液+滤纸条)。放入 50℃ 水浴 60 分钟,水浴结束后,立即加入 3.0mL 二硝基水杨酸(DNS)混合终止酶反应,沸水中水浴 5min,然后移至冰水中冷却。取 0.2mL 反应物加 2.5mL 水稀释,然后在 540nm 处测吸光度,用空白组调零。通过葡萄糖标准曲线线性回归方程求出葡萄糖的含量。

[0100] CMC 酶活的测定:将待测酶液用 0.05mol/L, pH4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲液稀释适当倍数。实验组(加入 1.0mL 1% (w/v) CMC 溶液、0.5mL 酶液),再取 3 支试管分别为空白管(加入 1.5mL 缓冲液)、酶对照组(1.0mL 缓冲液、0.5mL 酶液)、底物对照组(0.5mL 缓冲液、1% (w/v) CMC 溶液)。将试管放入 50℃ 水浴锅中水浴 30 分钟,水浴后,加入 3.0mL DNS

混匀,沸水浴 5min,然后移至冰水中冷却。取 0.2mL 混合物加 2.5mL 水稀释,然后在 540nm 处测吸光度,用空白管调零。通过葡萄糖标准曲线线性回归方程求出葡萄糖的含量。

[0101] 滤纸酶活 /CMC 酶活计算公式 :

$$[0102] \quad X = \frac{W \times N \times 5.56}{V \times T}$$

[0103] X—纤维素酶 (U/mL) ;W—葡萄糖生成量 (mg) ;V—反应液中酶液加入量 ;5.56—1mg 的葡萄糖的  $\mu\text{mol}$  数 ( $1000/180 = 5.56$ ) ;N—样品稀释倍数 ;T—反应时间 ;

[0104] 木聚糖酶活的测定 :将待测酶液用 0.05mol/L, pH5.3 的乙酸缓冲液稀释适当倍数。

[0105] 实验组 (加入 1.0mL 1% (w/v) 木聚糖溶液、1.0mL 酶液),再取 3 支试管分别为空白管 (加入 2.0mL 缓冲液)、酶对照组 (1.0mL 缓冲液、1.0mL 酶液)、底物对照组 (1.0mL 缓冲液、1.0mL 1% (w/v) 木聚糖溶液)。置于 40℃ 条件下反应 30min,取出。迅速、准确地向三支试管中加入 DNS 试剂 3.0mL,于空白管中准确加入稀释好的待测酶液 1.0mL,将三支试管同时置于沸水浴中,准确计时,煮沸 5min 后取出,迅速冷却至室温,用水定容至 25mL。以空白管在分光光度计 540nm 下较零,分别测量二支试管中样品的吸光度,取平均值,通过木糖标准曲线线性回归方程求出木糖的含量。

[0106] 木聚糖酶活计算公式 :

$$[0107] \quad X = \frac{W \times N \times 6.67}{V \times T}$$

[0108] X—木聚糖酶 (U/mL) ;W—木糖生成量 (mg) ;V—反应液中酶液加入量 ;6.67—1mg 的木聚糖的  $\mu\text{mol}$  数 ( $1000/150 = 6.67$ ) ;N—样品稀释倍数 ;T—反应时间。

[0109] 根据表 1 和表 2 以及图 2 和图 3 所示,菌株 UJS1412 最适碳源为麸皮和结晶纤维素,最适氮源为蛋白胨。

[0110] 当配置发酵培养基为 :麸皮 3g/L, 微晶纤维素 5g/L, 蛋白胨 0.5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.1g/L, 吐温 -800.1% (v/v), 40℃, 初始 pH 为 4.5, 发酵 7 天, 发酵醪经离心去除菌体后既得酶制剂, 检测结果显示 :此时嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产的酶制剂, 其滤纸酶活为 2U/mL, CMC 酶活为 12U/mL, 木聚糖酶活为 50U/mL。

[0111] 当配置发酵培养基为 :麸皮 10g/L, 微晶纤维素 15g/L, 蛋白胨 2g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.3g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.4g/L, 吐温 -800.5% (v/v), 45℃, 初始 pH 为 6.0, 发酵 7 天, 发酵醪经离心去除菌体后既得酶制剂, 检测结果显示 :此时嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产的酶制剂, 其滤纸酶活为 9U/mL, CMC 酶活为 17U/mL, 木聚糖酶活为 200U/mL。

[0112] 当配置发酵培养基为 :麸皮 30g/L, 微晶纤维素 50g/L, 蛋白胨 5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.5g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.8g/L, 吐温 -801% (v/v), 40℃, 初始 pH 为 6.0, 发酵 7 天, 发酵醪经离心去除菌体后既得酶制剂, 检测结果显示 :此时嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产的酶制剂, 其滤纸酶活为 12U/mL, CMC 酶活为 25U/mL, 木聚糖酶活为 280U/mL。

[0113] 实施例 3 嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产纤维素酶 / 木

## 聚糖酶的酶学性质

[0114] 取实施例 2 制备的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂, 分别加入 1.0mL 1% (W/V) CMC(用 0.05mol/L, pH4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制)、50±5mg 滤纸条和 1.0mL 1% (W/V) 木聚糖溶液(用 0.05mol/L, pH5.3 的乙酸缓冲液配制), 将反应体系分别置于 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80℃ 反应 30min 后分别测定滤纸酶活、CMC 酶活和木聚糖酶活。以最高酶活值为 100%, 其余以此折算为最高活力的百分数为相对酶活, 测定结果见表 3 及图 4。由表 3 及图 4 可以看出, 本发明的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂在温度为 40℃~80℃ 范围内具有活性, 在 40℃~65℃ (优选 45℃~60℃) 范围内具有比较高的活性, 特别是温度为 60℃ 时, 滤纸酶活, CMC 酶活和木聚糖酶还能够保持较高的催化活力, 相对酶活分别为 100%, 90% 和 88%。

[0115] 表 3 不同温度条件下纤维素酶 / 木聚糖酶活力

[0116]

温度 (℃)	滤纸相对酶活 (%)	CMC 相对酶活 (%)	木聚糖相对酶活 (%)
30	23±0.343	79±0.160	32±0.187
35	37±0.869	81±1.509	37±0.212
40	59±0.343	81±0.526	47±0.200
45	68±0.137	80±0.709	71±1.203
50	89±2.150	87±0.366	83±0.108
55	94±1.578	86±0.114	100±0.000
60	100±2.539	90±1.052	88±0.702
65	63±0.823	100±0.778	42±0.892
70	52±0.137	92±0.114	32±0.955
75	24±0.663	91±0.206	19±0.188
80	13±0.046	71±0.160	13±0.082

[0117] 取实施例 2 制备的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂, 分别加入 1.0mL 1% (W/V) CMC(用 0.05mol/L, pH4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制)、50±5mg 滤纸条和 1.0mL 1% (W/V) 木聚糖溶液(用 0.05mol/L, pH5.3 的乙酸缓冲液配制), 别溶于 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10 的缓冲液中, 配成所需浓度的溶液。于 60℃ 反应 30min 后分别测定滤纸酶活, CMC 酶活和木聚糖酶活。以最高酶活值为 100%, 其余以此折算为最高活力的百分数为相对酶活, 测定结果见表 4 及图 5。由表 4 及图 5 可以看出, 嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂在 pH 值为 4.0~5.5 范围内具有较高活性, 当 pH 值为 5.0 时, 滤纸酶活, CMC 酶活和木聚糖酶还能够保持较高的催化活力, 相对酶活分别为 100%, 80% 和 100%。

[0118] 表 4 不同 pH 值下纤维素 / 木聚糖酶活力

[0119]

pH	滤纸相对酶活 (%)	CMC 相对酶活 (%)	木聚糖相对酶活 (%)
2	10±0.149	100±0.480	7±4.214
3	75±0.686	96±0.435	17±4.013
4	89±0.435	94±0.091	59±4.816
5	100±1.006	80±0.983	100±7.056
6	39±0.709	51±0.412	19±6.020
7	17±0.103	27±0.023	20±17.858
8	10±0.252	25±0.183	19±2.007
9	9±0.149	18±0.206	39±7.224
10	3±0.000	3±0.023	8±0.803

[0120] 实施例 4 嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产纤维素酶 / 木聚糖酶的应用

[0121] 取粉碎的水稻秸秆 100g, 加入 1mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 24h, 水洗至中性后烘干, 经 HPLC 法 (色谱条件: Shodex Suger SH1011 (8.0mm I. D×300mm); 流动相: 0.005mol/L 的稀硫酸溶液; 流速: 0.6mL/min; 检测器: 示差检测器; 柱温: 50°C; 进样量: 10 μL) 测定, 葡萄糖和木糖在原料中的含量分别为 76% 和 12%。取经前述获得的经 NaOH 预处理 24 小时后的玉米秸秆, 加水配制成 50g/L 浓度, 加入实施例 2 制备的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂 0.1mL 酶液 /g 秸秆, 酶解温度 45°C, pH 为 4.5, 酶解 6 小时后取样测定。经 HPLC 分析, 酶解液中葡萄糖和木糖对原料中葡萄糖和木糖的得率分别为 50% 和 30%。

[0122] 取粉碎的玉米秸秆 100g, 加入 1mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 24h, 水洗至中性后烘干, 经 HPLC 法 (色谱条件: Shodex Suger SH1011 (8.0mm I. D×300mm); 流动相: 0.005mol/L 的稀硫酸溶液; 流速: 0.6mL/min; 检测器: 示差检测器; 柱温: 50°C; 进样量: 10 μL) 测定, 葡萄糖和木糖在原料中的含量分别为 72% 和 18%。取经前述获得的经 NaOH 预处理 24 小时后的玉米秸秆, 加水配制成 50g/L 浓度, 加入实施例 2 制备的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂 0.8mL 酶液 /g 秸秆, 酶解温度 55°C, pH 为 5.5, 酶解 24 小时后取样测定。经 HPLC 分析, 酶解液中葡萄糖和木糖对原料中葡萄糖和木糖的得率分别为 85% 和 57%。

[0123] 取粉碎的小麦秸秆 100g, 加入 1mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 24h, 水洗至中性后烘干, 经 HPLC 法 (色谱条件: Shodex Suger SH1011 (8.0mm I. D×300mm); 流动相: 0.005mol/L 的稀硫酸溶液; 流速: 0.6mL/min; 检测器: 示差检测器; 柱温: 50°C; 进样量: 10 μL) 测定, 葡萄糖和木糖在原料中的含量分别为 68% 和 24%。取经前述获得的经 NaOH 预处理 24 小时后的小麦秸秆, 加水配制成 50g/L 浓度, 加入实施例 2 制备的嗜热子囊菌株 (*Thermoascus aurantiacus*)UJS1412 所产酶制剂 1mL 酶液 /g 秸秆, 酶解温度 60°C, pH 为 5.0, 酶解 12 小时后取样测定。经 HPLC 分析, 酶解液中葡萄糖和木糖对原料中葡萄糖和木糖的得率分别为 90% 和 70%。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

<110>	国家电网公司；江苏大学；国网节能服务有限公司	
<120>	制备纤维素酶和/或木聚糖酶的方法及其专用菌株	
<130>	IDC150163	
<160>	3	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	引物1	
<400>	1	
	tccgtaggtg aacctgcgg	19
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	引物2	
<400>	2	
	tcctccgctt attgatatgc	20
<210>	3	
<211>	519	
<212>	DNA	
<213>	标志序列	
<400>	3	
	acctgcggaa ggatcattaa agagttgggg tccttcgggg cccgatctcc caccctttgt	60
	tgtcgcgaat ttgttgctc ggcgggtttg cctttatggc agacgggctc cgcccaccc	120
	gccgcaggac cattcaaact ctgctttaac aatgcagttt gagaagattt aataataaat	180
	caaaactttc aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg	240
	ataagtaatg tgaattgcag aatfcagtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc	300
	ccttggfatt ccgaggggca tgctgttctg agcgtcattt caccaatcaa gctacgcttg	360
	gtattgggcg cgcggctttt ccttgcgaaa ggcccgcccg aatgcacatcg gcgaggaaac	420
	cgacccccgg cgtgttagat ttctgaacgt caggagcacc ggtgcctctc gccgtacaat	480
	cttttttct aaggttgacc tcgatcagg taggaatac	519

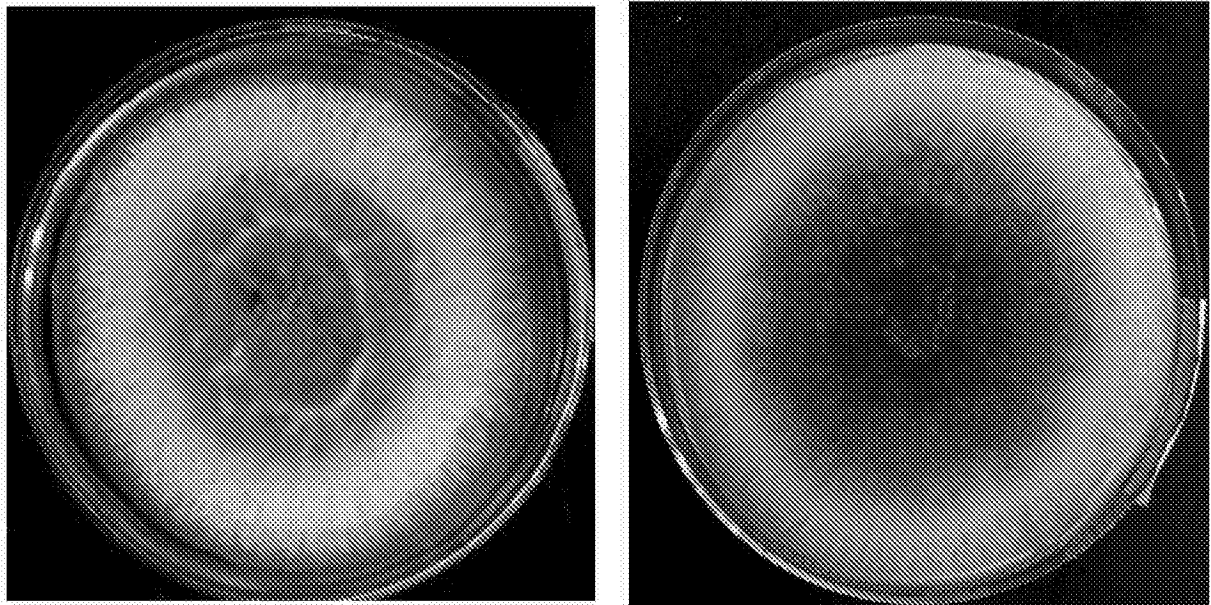


图 1

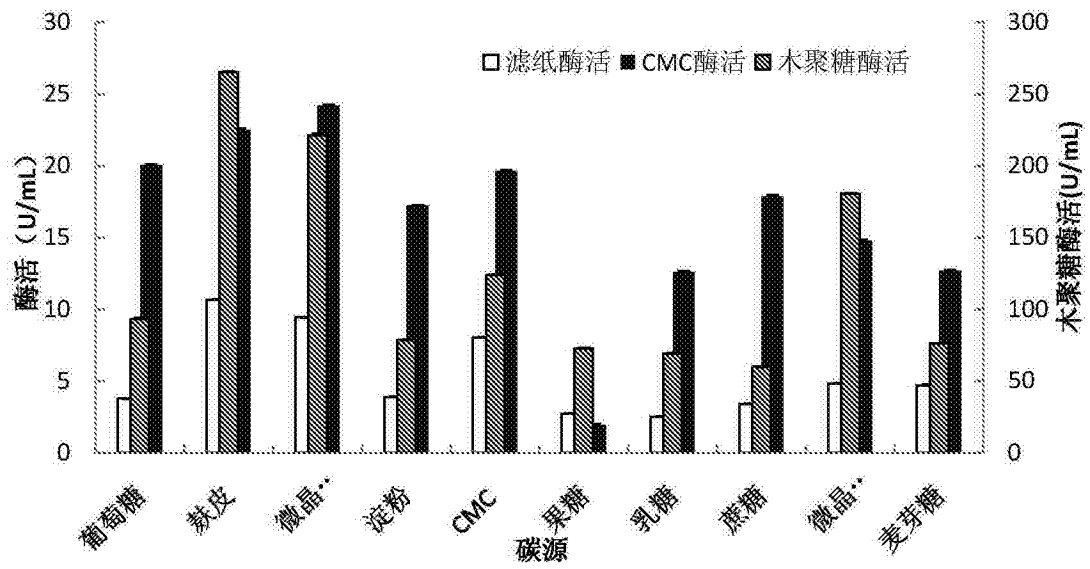


图 2

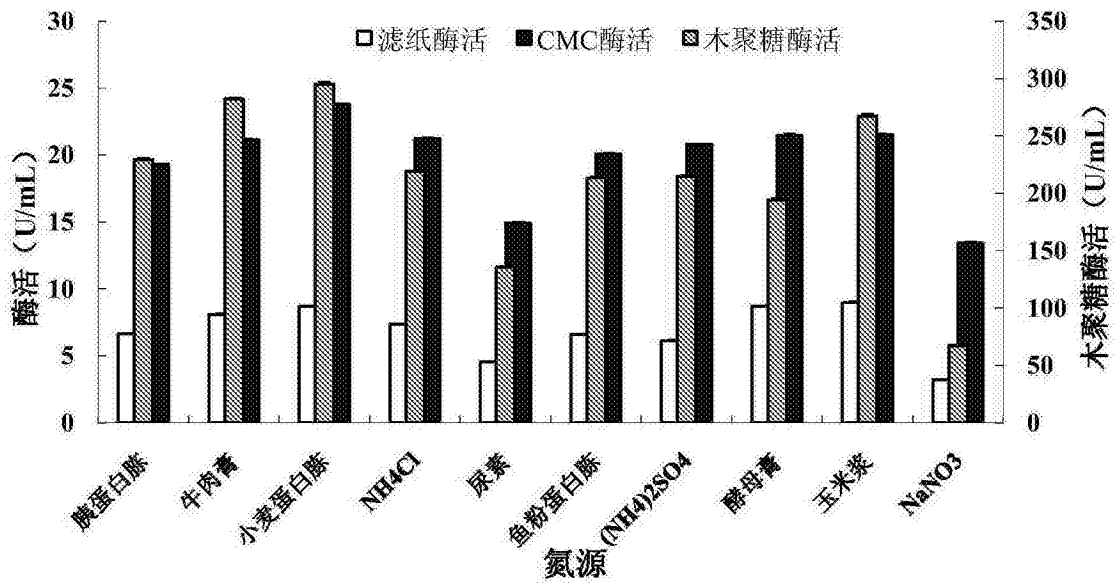


图 3

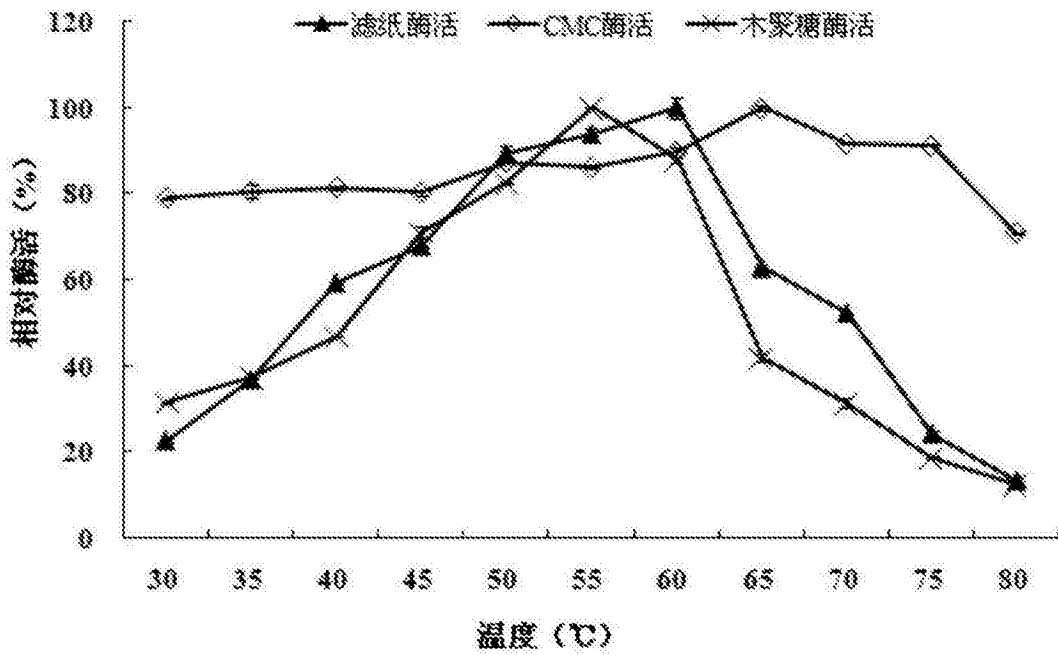


图 4

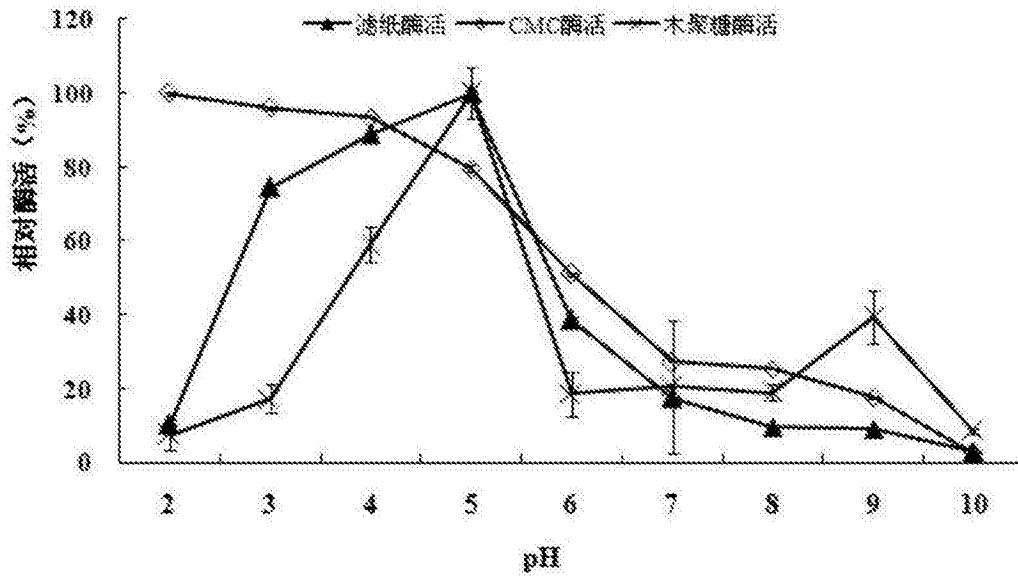


图 5