

# 不同碳源诱导下牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 的产酶机制

杜雪儿, 周琳琳, 张帆, 李永, 赵聪聪, 王腊梅, 姚军虎, 曹阳春\*

西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100

杜雪儿, 周琳琳, 张帆, 李永, 赵聪聪, 王腊梅, 姚军虎, 曹阳春. 不同碳源诱导下牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 的产酶机制[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4927-4938.

DU Xue'er, ZHOU Linlin, ZHANG Fan, LI Yong, ZHAO Congcong, WANG Lamei, YAO Junhu, CAO Yangchun. Enzyme production mechanism of anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. YF3 in yak rumen induced by different carbon source[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4927-4938.

**摘要:** 为探究体外发酵牦牛瘤胃源厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 在不同碳源诱导下的产酶机制, 本研究利用厌氧培养管在 10 mL 基础培养基中分别添加不同碳源复杂度的葡萄糖(glucose, Glu)、滤纸(filter paper, Flp)、微晶纤维素(avicel, Avi)各 8 g/L 作为唯一碳源进行体外发酵, 检测发酵液中的纤维降解酶活性和挥发性脂肪酸, 并利用转录组学探究 *Orpinomyces* sp. YF3 的产酶机制。结果表明葡萄糖诱导下的发酵液中羧甲基纤维素酶、微晶纤维素酶、滤纸酶和木聚糖酶的活性, 及乙酸的比例显著升高( $P < 0.05$ ), 丙酸、丁酸、异丁酸的比例显著降低( $P < 0.05$ )。进一步分析发现与纤维降解酶相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)在 Glu 组中显著上调。基因本体论(gene ontology, GO)功能富集显示 DEGs 主要集中在木聚糖酶、纤维素酶、葡萄糖和碳水化合物等的分解代谢过程及相关酶活性, 京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析富集到的纤维降解酶相关的差异通路主要是淀粉和蔗糖代谢途径、其他聚糖降解途径。以上结果表明, 以葡萄糖为碳源底物的 *Orpinomyces* sp. YF3 可增加纤维素降解酶活性, 提高乙酸比例, 通过调控纤维降解酶基因的表达及相关代谢通路来提高对底物的降解能力, 提高能量利用效率。这为 *Orpinomyces* sp. YF3 在实际生产中的应用提供了理论基础。

**关键词:** 牦牛; 瘤胃厌氧真菌; 纤维降解酶; 挥发性脂肪酸; 转录组学

资助项目: 国家自然科学基金(31972592, 31402102); 陕西省重点研发计划(2021NY-019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31972592, 31402102) and the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2021NY-019).

\*Corresponding author. E-mail: caoyangchun@126.com

Received: 2023-03-05; Accepted: 2023-05-15

# Enzyme production mechanism of anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. YF3 in yak rumen induced by different carbon source

DU Xue'er, ZHOU Linlin, ZHANG Fan, LI Yong, ZHAO Congcong, WANG Lamei, YAO Junhu, CAO Yangchun\*

College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** In order to investigate the enzyme production mechanism of yak rumen-derived anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. YF3 under the induction of different carbon sources, anaerobic culture tubes were used for *in vitro* fermentation. 8 g/L of glucose (Glu), filter paper (Flp) and avicel (Avi) were respectively added to 10 mL of basic culture medium as the sole carbon source. The activity of fiber-degrading enzyme and the concentration of volatile fatty acid in the fermentation liquid were detected, and the enzyme producing mechanism of *Orpinomyces* sp. YF3 was explored by transcriptomics. It was found that, in glucose-induced fermentation solution, the activities of carboxymethyl cellulase, microcrystalline cellulase, filter paper enzyme, xylanase and the proportion of acetate were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the proportion of propionate, butyrate, isobutyrate were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The results of transcriptome analysis showed that there were 5 949 differentially expressed genes (DEGs) between the Glu group and the Flp group, 10 970 DEGs between the Glu group and the Avi group, and 6 057 DEGs between the Flp group and the Avi group. It was found that the DEGs associated with fiber degrading enzymes were significantly up-regulated in the Glu group. Gene ontology (GO) function enrichment analysis identified that DEGs were mainly associated with the xylan catabolic process, hemicellulose metabolic process,  $\beta$ -glucan metabolic process, cellulase activity, endo-1,4- $\beta$ -xylanase activity, cell wall polysaccharide metabolic process, carbohydrate catabolic process, glucan catabolic process and carbohydrate metabolic process. Moreover, the differentially expressed pathways associated with fiber degrading enzymes enriched by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were mainly starch and sucrose metabolic pathways and other glycan degradation pathways. In conclusion, *Orpinomyces* sp. YF3 with glucose as carbon source substrate significantly increased the activity of cellulose degrading enzyme and the proportion of acetate, decreased the proportion of propionate, butyrate and isobutyrate. Furthermore, the degradation ability and energy utilization efficiency of fungus in the presence of glucose were improved by means of regulating the expression of cellulose degrading enzyme gene and participating in starch and sucrose metabolism pathway, and other glycan degradation pathways, which provides a theoretical basis for the application of *Orpinomyces* sp. YF3 in practical production and facilitates the application of *Orpinomyces* sp. YF3 in the future.

**Keywords:** yak; rumen anaerobic fungi; fiber-degrading enzyme; volatile fatty acids; transcriptomics

反刍动物瘤胃中存在大量微生物, 主要分为细菌、古菌、真菌和原生生物<sup>[1]</sup>, 它们能分解多种复杂聚合物, 如蛋白质、脂质和碳水化合物等, 从而为机体提供能量。此外, 它们还能利用低质量的植物纤维在瘤胃环境中发酵产生挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs), 合成其他小分子物质, 如氨基酸和维生素等供小肠吸收, 进而转化为高质量的肉和奶等产品<sup>[2-3]</sup>。已有研究发现, 体外添加瘤胃厌氧真菌对后续微生物的进一步发酵及动物生产性能的提高具有积极效果<sup>[4-5]</sup>。牦牛由于常年放牧养殖, 恶劣的生活环境和低质牧草的采食使其进化出极强的抗逆性和耐粗饲能力, 瘤胃内的厌氧真菌与其他来源的真菌相比也具有更强的植物细胞壁降解能力<sup>[6-7]</sup>, 因此对牦牛瘤胃中厌氧真菌的深度研究也成为近年来的热点之一。

瘤胃厌氧真菌作为纤维降解菌的重要菌类, 约占瘤胃微生物总量的5%–20%<sup>[8]</sup>, 能利用其独特的假根系统对植物组织结构进行物理性分解, 还能分泌碳水化合物活性酶(carbohydrate active enzymes, CAZymes), 如纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶和酯酶等<sup>[9-10]</sup>, 也能根据所在家族特异性功能催化不同底物, 对植物壁进行酶解, 二者共同发挥作用为自身和宿主提供能量, 维持生长和健康<sup>[11-12]</sup>。有研究者发现将厌氧真菌从瘤胃液中分离后直接进行体外发酵或者添加至活体动物中能有效提高粗饲料利用率, 如分离纯化的厌氧真菌可用作青贮饲料添加剂帮助动物改善摄入的青贮饲料的干物质消失率<sup>[13]</sup>。有研究者以秸秆作为底物进行厌氧真菌的体外发酵或直接与甲烷古菌共培养后获得了更高的甲烷产量<sup>[14-15]</sup>。然而不同碳源底物对厌氧真菌的诱导效果及其产酶机制目前还不清晰。

本研究利用碳源复杂度不同的底物对实验室分离获得的牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces*

sp. YF3 进行体外发酵, 检测酶活性和挥发性脂肪酸含量, 并结合转录组学探究 *Orpinomyces* sp. YF3 的体外发酵特性和产酶机制, 期望为今后牦牛瘤胃厌氧真菌功能和特性研究及体外添加厌氧真菌等手段的使用奠定基础, 为后续进一步开发应用厌氧真菌产生的纤维降解酶提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用试验材料是分离自青海牦牛瘤胃液的厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 (GenBank 登录号: MW801447)。

基础培养基: 酵母膏 1.0 g/L, 蛋白胨 1.0 g/L, 刃天青溶液 1.0 mL/L, 碳酸氢钠 7.0 g/L, L-半胱氨酸盐酸盐 1.7 g/L, 无细胞瘤胃液 170.0 mL/L, 盐溶液I 82.5 mL/L, 盐溶液II 16.5 mL/L。

盐溶液I (g/L): NaCl 6.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

盐溶液II: 4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 蒸馏水定容至 1 000 mL。

### 1.2 试验方法

将厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 置于分别添加了 0.08 g 葡萄糖、滤纸、微晶纤维素的 10 mL 基础培养基, 共 3 个处理, 每次处理 4–5 个重复, 39 °C 培养 6 d 后采样。

### 1.3 测定指标和方法

#### (1) 酶活性测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)比色法利用多功能酶标仪(BioTek Synergy HT)检测木聚糖酶、乙酰酯酶、滤纸酶活性、羧甲基纤维素酶和微晶纤维素酶。将菌液室温解冻, 1 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 上清液即用于后续检测的酶液。

纤维素酶和半纤维素酶活性检测: 稀释合适倍数的酶液、10 g/L 底物(纤维素酶底物分别

为羧甲基纤维素钠、微晶纤维素和滤纸；半纤维素酶底物主要是木聚糖)、50 mmol/L PBS 于水浴锅中 39 °C 预热 15 min, 1.5 mL 离心管中依次加入 75  $\mu$ L 粗酶液、75  $\mu$ L PBS 和 50  $\mu$ L 底物, 放入水浴锅 39 °C 反应(纤维素酶反应 30 min, 半纤维素酶反应 15 min)后加入 300  $\mu$ L 终止反应的 DNS, 煮沸 5 min 后, 冷却至室温吸取 200  $\mu$ L 样品混匀于 96 孔酶标板点样, 用多功能酶标仪在 540 nm 下检测吸光度。根据反应酶解的单糖(葡萄糖和木糖)标曲计算酶活。

**乙酰酯酶活性测定:** 将稀释合适倍数的酶液、2 mmol/L p-硝基苯乙酯和 50 mmol/L PBS 于 39 °C 预热 15 min, 1.5 mL 离心管依次加入 50  $\mu$ L 粗酶液、100  $\mu$ L PBS 和 50  $\mu$ L 底物(p-硝基苯乙酯), 于酶标仪中 39 °C 反应 30 min 后, 415 nm 下检测吸光度, 根据 p-硝基苯的标曲计算酶活性。

**滤纸酶活性检测:** 将酶液和醋酸-醋酸钠缓冲液 39 °C 预热 15 min, 剪切 1 cm $\times$ 3 cm 的新华 1 号滤纸, 卷成小卷放入 5 mL 离心管内, 依次加入 1.75 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.8)和 0.25 mL 粗酶液混匀, 离心管置于 50 °C 水浴锅 1 h, 加入 1 mL DNS 试剂, 煮沸 10 min 后冷却。用酶标仪在 540 nm 下检测吸光度, 根据葡萄糖标曲计算酶活。详细方法参考曹阳春<sup>[6]</sup>的研究。

## (2) 挥发性脂肪酸(VFA)测定

**样品预处理:** 室温解冻菌液或 4 °C 过夜解冻, 13 500 r/min、4 °C 离心 10 min 分离菌液中的固相和液相, 于 4 mL 离心管依次加入 400  $\mu$ L 偏磷酸和 2 mL 菌液上清液, 颠倒混匀, 4 °C 静置 3–4 h, 13 500 r/min、4 °C 离心 15 min, 于 1.5 mL 离心管依次加入 200  $\mu$ L 巴豆酸和 1 mL 上清液, 颠倒混匀, 4 °C 静置 0.5–1 h, 将混合液全部经滤膜(0.45  $\mu$ m 有机系)转移到气相瓶, 4 °C 保存待测。采用气相色谱仪(Agilent 7820A GC)测定菌液 VFA, 色谱仪安装 SP-2560 毛细管色谱柱并

使用氢火焰离子检测器(flame ion detector, FID), 详细方法参照 Zhao 等<sup>[7]</sup>的文章。

## 1.4 转录组学测序

### 1.4.1 总 RNA 提取及测序

总 RNA 提取及测序由美吉生物科技有限公司完成。

取适量菌体样本, 液氮充分研磨后转移入加有 1 mL 预冷 Trizol 的 1.5 mL 离心管中, 振荡使其充分裂解, 室温放置 5 min, 13 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 吸取上层液体至另一离心管中, 加入 200  $\mu$ L 氯仿, 振荡混匀后常温放置 5 min, 13 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 吸取上层水相(400  $\mu$ L)至另一离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 室温放置 10 min, 13 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇, 使沉淀悬浮, 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 弃上清, 把离心管离心数秒, 甩下管壁上悬挂的残液, 用 10  $\mu$ L 枪头吸尽残液, 室温晾干 3–5 min, 加入 20–50  $\mu$ L 灭菌的 0.1% DEPC 水溶解, –80 °C 储存。

### 1.4.2 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的分析

利用 fastx\_toolkit\_0.0.14 对原始数据进行质量评估得到高质量数据, 利用 Trinity 软件对所得数据进行从头组装, 利用 TransRate 和 CD-HIT 软件进行筛选、优化和比对聚类获得非冗余序列。利用 BUSCO 软件评估 unigene 或 transcript 的组装完整性。根据组装的参考序列比对每个样本的 clean reads, 所获样本的 mapping 结果作为后续各样本基因和转录本定量的基础。利用 GO 和 KEGG 数据库对试验数据进行功能注释。利用 DESeq2 软件对数据进行统计分析, 基于校正后的  $P$ -value 获得的  $P$ -ajust 值作为默认参数:  $P$ -ajust<0.05 &  $|\log_2FC| \geq 2$ 。

### 1.4.3 DEGs 的功能富集分析

利用 GO 和 KEGG 数据库对 DEGs 进行通

路富集分析。

### 1.5 数据统计分析

利用 Excel 2019 对数据进行整理, 采用 IBM SPSS Statistics 26.0 统计软件对羧甲基纤维素酶活性、微晶纤维素酶活性、乙酰酯酶活性和木聚糖酶活性, 及总 VFA、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和木异戊酸含量进行单因素 ANOVA 分析, 用 Duncan 多重比较法检验组间差异,  $P < 0.05$  代表差异显著,  $P > 0.05$  代表差异不显著,  $0.05 < P < 0.1$  代表有变化趋势。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同碳源底物对 *Orpinomyces* sp. YF3 菌液中纤维素降解酶活性和 VFA 的影响

由表 1 可知, Glu 组羧甲基纤维素酶活性显著大于 Avi 组 ( $P < 0.05$ ), Glu 组的微晶纤维素酶

活性显著大于 Flp 组和 Avi 组 ( $P < 0.05$ ), Flp 组的乙酰酯酶活性显著大于其他 2 组 ( $P < 0.05$ )。对 VFA 含量进行检测, 如表 2 所示, 发现 Glu 组的乙酸含量显著大于 Flp 组和 Avi 组 ( $P < 0.05$ ), Flp 组的丙酸和异丁酸含量显著大于 Glu 组 ( $P < 0.05$ ), 且 Avi 组的丙酸和丁酸含量显著大于 Glu 组 ( $P < 0.05$ )。其他指标在各组间无明显差异 ( $P > 0.1$ )。

### 2.2 测序数据的质量评估

测序后对每个样本的原始测序数据进行碱基错误率和碱基含量分布等质量评估, 并进行质控, 从而得到高质量的质控数据 (clean data), 如表 3 所示, 每个样本的 Q20 和 Q30 值至少大于 97.39% 和 92.10%, 且 GC 含量比值均在合理范围内, 表明测序结果可靠, 可进行后续结果分析。

表 1 不同碳源底物对厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 纤维素降解酶活性的影响

Table 1 Fiber-degrading enzyme activity of *Orpinomyces* sp. YF3 in the presence of different carbon source

Enzyme	Carbon source			SEM	P-value
	Glu	Flp	Avi		
Xylanase	247.00	156.76	150.63	23.64	0.170
Carboxymethyl cellulase	145.20a	109.94ab	57.09b	14.36	0.029
Avicelase	255.84a	132.77b	134.16b	19.43	<0.001
Acetyl esterase	38.56b	47.10a	30.29c	2.14	<0.001

Different letters in the same row means significant difference between the treatments ( $P < 0.05$ ), same letter in the same row means not significant difference between treatments ( $P > 0.05$ ).

表 2 不同碳源底物对厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 挥发性脂肪酸的影响

Table 2 Total VFA and individual VFA molar proportions (%) of *Orpinomyces* sp. YF3 in the presence of different carbon sources

Item	Group			SEM	P-value
	Glu	Flp	Avi		
Total VFA	20.97	17.46	17.74	1.06	0.342
VFA proportion					
Acetate	76.25a	71.10b	69.33b	1.14	0.014
Propionate	12.79b	15.75a	16.81a	0.62	0.004
Isobutyrate	0.58b	1.29a	0.70b	0.11	0.001
Butyrate	8.52b	9.69ab	10.74a	0.37	0.035
Isovalerate	0.93	1.10	1.11	0.05	0.208
Valerate	0.93	1.07	1.30	0.06	0.187

Different letters in the same row means significant difference between the treatments ( $P < 0.05$ ), same letter in the same row means not significant difference between treatments ( $P > 0.05$ ).

表3 测序数据质控统计

Table 3 Statistics for quality control of the sequencing data

Sample name	Raw reads	Clean reads	Error rate (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC content (%)
Flp1	44 812 104	44 140 574	0.023 9	98.49	95.26	48.25
Flp2	44 191 754	43 752 600	0.023 6	98.58	95.52	54.07
Flp3	43 685 310	42 517 238	0.023 8	98.52	95.33	51.98
Flp4	44 208 422	43 026 906	0.023 7	98.56	95.44	49.97
Glu1	45 061 694	44 893 488	0.026 2	97.69	92.87	41.61
Glu2	40 977 942	40 793 958	0.026 8	97.44	92.26	40.46
Glu3	48 993 206	48 817 818	0.027 0	97.39	92.10	39.77
Glu4	46 252 758	45 964 720	0.026 4	97.51	92.72	52.32
Avi1	44 533 714	43 725 218	0.023 8	98.52	95.38	51.24
Avi2	45 575 554	43 485 900	0.023 9	98.47	95.23	53.63
Avi3	44 365 510	43 780 340	0.023 7	98.60	95.47	50.42
Avi4	41 948 832	41 329 438	0.023 9	98.47	95.22	52.07
Avi5	44 147 166	43 534 122	0.023 8	98.53	95.36	51.11

Flp: Filter paper; Glu: Glucose; Avi: Avicel.

### 2.3 不同碳源底物发酵厌氧真菌

#### *Orpinomyces* sp. YF3 的差异表达基因

对3个处理组鉴定到的基因进行差异表达分析,共检测到15 844个DEGs,两两比较后发现,Glu组与Flp组存在5 949个DEGs,Glu组与Avi组存在10 970个DEGs,Flp组与Avi组存在6 057个DEGs。其中Glu组与Flp组间有975个DEGs上调,4 974个DEGs下调,Glu组与Avi组间有1 320个DEGs上调,9 650个DEGs下调,Flp组与Avi组间有2 895个DEGs上调,3 162个DEGs下调(图1)。利用功能注释对碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzyme, CAZymes)基因两两比较进行分析,发现共注释到202个DEGs,包含多个糖苷水解酶家族基因(glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶家族基因(glycosyl transferases, GTs)、多糖裂解酶基因(polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶基因(carbohydrate esterases, CEs)和碳水化合物结合模块基因(carbohydrate-binding modules, CBMs),其中糖苷水解酶和糖基转移酶的基因数量在各组之间

最多(表4)。对纤维降解酶相关的DEGs进行聚类分析,如图2所示,发现Glu组与Flp组和Avi组之间存在显著差异,且Glu的DEGs表达量高于其他2组,表明厌氧真菌*Orpinomyces* sp. YF3发酵葡萄糖能促进纤维素降解酶相关基因的表达。

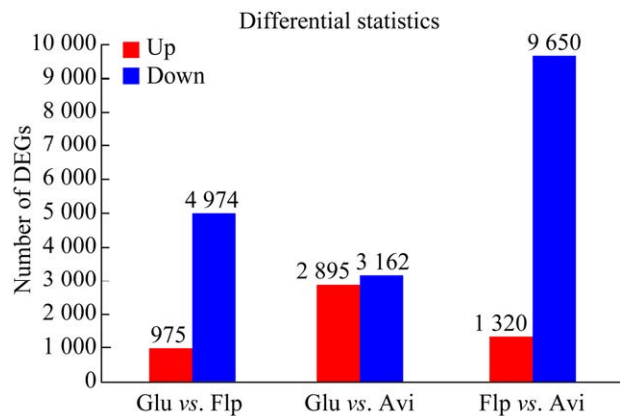
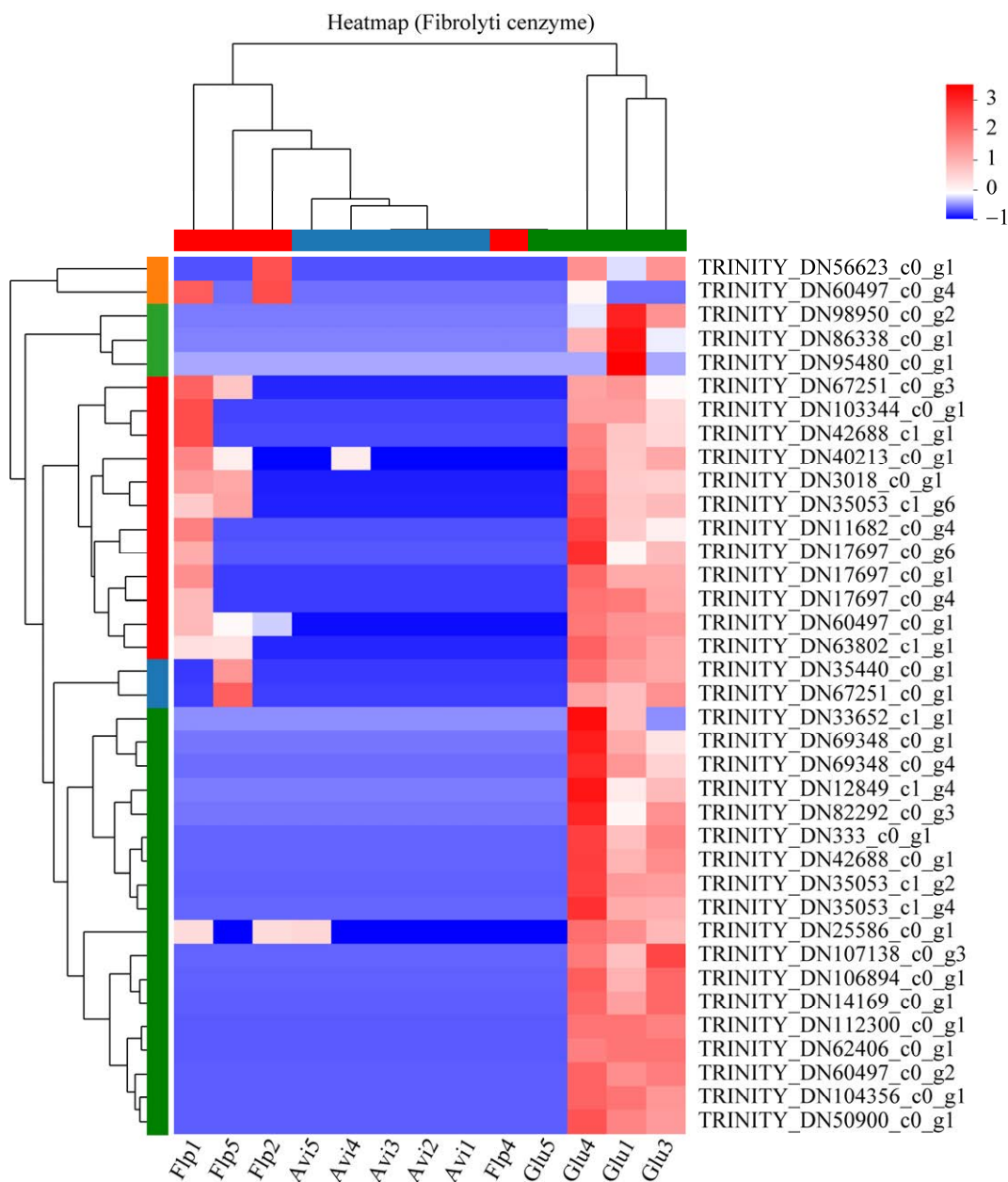


图1 *Orpinomyces* sp. YF3发酵3种碳源差异表达基因统计图

Figure 1 Statistical diagram of differentially expressed genes in *Orpinomyces* sp. YF3 when comparing different carbon source pairs.

表 4 *Orpinomyces* sp. YF3 发酵 3 种碳源 CAZyme 家族差异表达基因数Table 4 The number of DEGs in the CAZyme family of *Orpinomyces* sp. YF3 when comparing different carbon source pairs

Group	Glycoside hydrolase	Glycosyl transferases	Carbohydrate-binding modules	Carbohydrate esterases	Polysaccharide lyase
Glu vs. Flp	32	42	19	7	1
Glu vs. Avi	61	62	31	16	2
Flp vs. Avi	20	25	6	3	1

图 2 *Orpinomyces* sp. YF3 发酵 3 种碳源与纤维降解酶相关基因的聚类分析Figure 2 Cluster analysis of fiber-degrading enzyme related genes in *Orpinomyces* sp. YF3.

## 2.4 DEGs 的 GO 和 KEGG 分析

利用 GO 功能注释对纤维降解酶相关的 DEGs 进行分析,发现主要分布在代谢过程、细胞过程、细胞外区域、结合和催化活性过程中(表 5)。对鉴定到的 DEGs 进行 GO 富集分析,发现所有 DEGs 主要集中在木聚糖分解代谢过程、纤维素代谢过程、纤维素酶活性、木聚糖酶活性和碳水化合物分解代谢等过程中(图 3A)。进一步对编码纤维降解酶的生物代谢途径进行了 KEGG 分析,结果表明这些基因富集在淀粉和蔗糖代谢以及其他聚糖降解两条代谢途径中(图 3B)。前者主要与内切葡聚糖酶编码基因有关,后者主要与阿魏酸酯酶编码基因有

关。对这 2 种基因进一步分析后发现与 Flp 组和 Avi 组相比, Glu 组内编码内切葡聚糖酶和阿魏酸酯酶的基因明显上调(表 6)。

表 5 GO 分类统计表

Table 5 GO classification statistics

GO ID	Type	Description	Percent
GO: 0008152	Biological process	Metabolic process	31/37
GO: 0009987	Biological process	Cellular process	16/37
GO: 0005576	Cellular component	Extracellular region	16/37
GO: 0005488	Molecular function	Binding	22/37
GO: 0003824	Molecular function	Catalytic activity	28/37

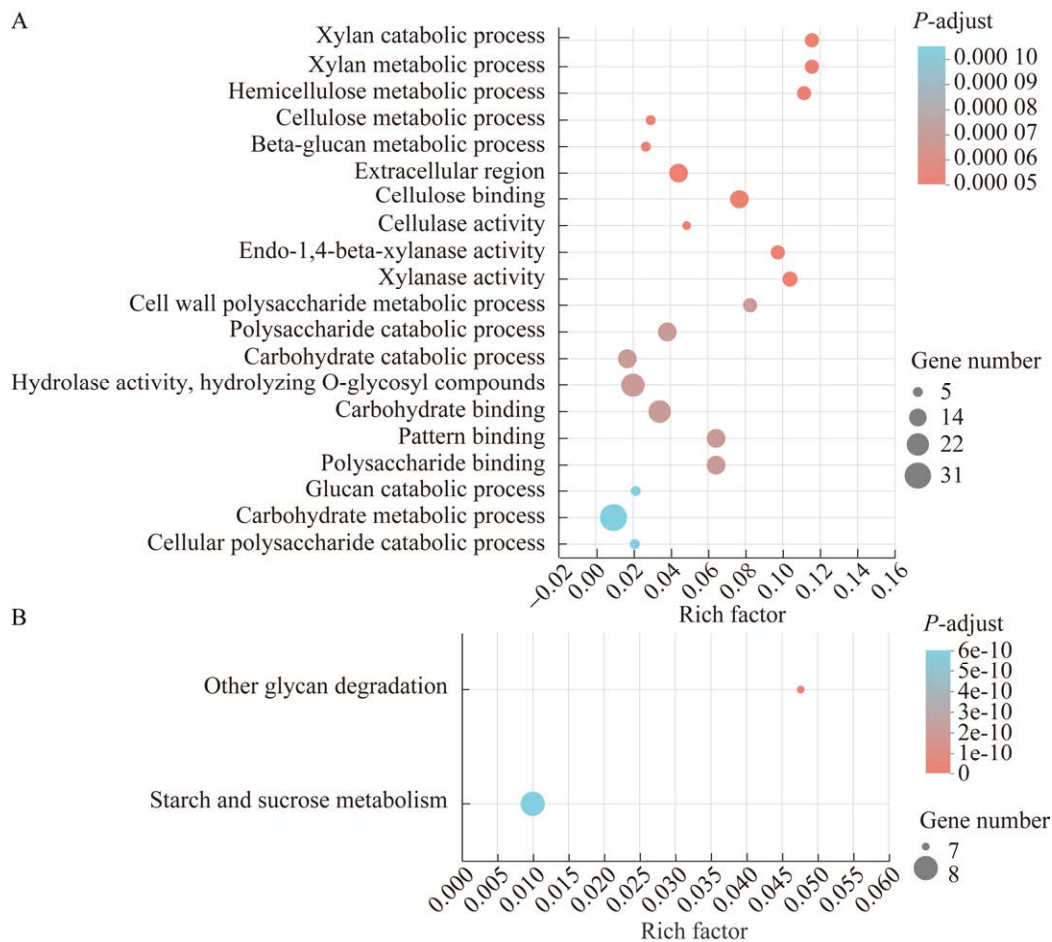


图 3 纤维降解酶相关的 DEGs 的 GO (前 20)和 KEGG 富集分析

Figure 3 Enrichment analysis of GO (top 20) and KEGG of DEGs related to fiber-degrading enzymes. GO functional enrichment analysis (top 20) (A) and KEGG pathway enrichment analysis (B).



表 6 参与淀粉和蔗糖代谢途径、其他聚糖降解途径的纤维降解酶基因分析

Table 6 Gene analysis of fiber-degrading enzymes involved in starch and sucrose metabolism and other glycan degradation pathways

Gene ID	Up/Down			Description
	Glu-Flp	Glu-Avi	Flp-Avi	
TRINITY_DN14169_c0_g1	↓	↓	—	Endoglucanase
TRINITY_DN25586_c0_g1	—	↓	—	Endoglucanase
TRINITY_DN56623_c0_g1	—	↓	—	Endo- $\beta$ -1,4-xylanase activity
TRINITY_DN60497_c0_g1	—	↓	↓	Endoglucanase
TRINITY_DN60497_c0_g2	↓	↓	↓	Endoglucanase
TRINITY_DN60497_c0_g4	—	—	↓	Endoglucanase
TRINITY_DN67251_c0_g1	—	↓	—	Cellulase
TRINITY_DN86338_c0_g1	↓	↓	—	Endoglucanase
TRINITY_DN107138_c0_g3	↓	↓	—	Feruloyl esterase
TRINITY_DN17697_c0_g1	—	↓	—	Feruloyl esterase
TRINITY_DN17697_c0_g4	—	↓	—	Feruloyl esterase
TRINITY_DN17697_c0_g6	—	↓	—	Feruloyl esterase
TRINITY_DN333_c0_g1	↓	↓	—	Feruloyl esterase
TRINITY_DN62406_c0_g1	↓	↓	—	Feruloyl esterase
TRINITY_DN63802_c1_g1	—	↓	↓	Feruloyl esterase

↓: Significant down-regulation of gene expression. —: There is no significant difference in gene expression.

### 3 讨论

厌氧真菌是反刍动物瘤胃中最早定殖的微生物之一，能分泌多种降解植物细胞壁的酶<sup>[2]</sup>，对饲料进行发酵后能产生多种 VFA 为机体提供能量<sup>[18]</sup>，参与维持瘤胃内环境稳态<sup>[19]</sup>。研究发现瘤胃产生的乙酸和丙酸与奶牛乳脂率成正比<sup>[20]</sup>。本研究发现以葡萄糖为底物进行发酵的厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 菌液中的乙酸比例显著升高，以微晶纤维素作为发酵底物的丙酸比例最高，表明 *Orpinomyces* sp. YF3 发酵葡萄糖和微晶纤维素的效果更好，有利于提高奶牛的生产性能。而 CAZymes 是将碳水化合物以低聚糖或多糖的形式组装，然后与核酸、蛋白质、脂类、多酚和其他天然物质结合进行生物转化(合成、代谢、修饰和运输)的酶家族，主要包括糖苷水解酶、糖基转移酶、多糖裂解酶、碳水化合物酯酶和碳水化合物结合模块<sup>[21-22]</sup>。大量研究报道厌氧真菌中存在大量编码与碳水化合物

代谢相关的酶的基因<sup>[23-24]</sup>。有研究发现厌氧真菌 C1a 在葡萄糖上生长时的糖苷水解酶和碳水化合物酯酶的转录水平相对更高<sup>[25]</sup>。本试验对牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 以滤纸、葡萄糖和微晶纤维素作为碳源底物的转录模式进行了探究，结果表明，牦牛厌氧真菌能诱导大量 CAZymes 家族基因在不同发酵底物上的表达，主要是糖苷水解酶和糖基转移酶家族基因，能参与碳水化合物代谢的淀粉和蔗糖代谢途径。其中葡萄糖诱导的纤维降解酶相关基因表达量较高，表明葡萄糖诱导的纤维降解酶活性高于滤纸和微晶纤维素。

葡萄糖、滤纸和微晶纤维素的成分与结构不同，可被各种纤维素降解酶分解<sup>[26]</sup>，这表明瘤胃厌氧真菌有一组核心基因，专门用于编码降解木质纤维素底物的酶<sup>[24]</sup>。在本研究中，3 种不同底物诱导厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 后转录的纤维降解酶基因具有编码碳水化合物底物的核心基因，与前人研究一致。因此纤维降

解酶编码基因的差异可能是由于底物特异性造成的。研究表明,在葡萄糖代谢过程中产生的许多类型的代谢物会抑制纤维素酶的合成而不是分泌<sup>[27]</sup>。用纤维素基质培养厌氧真菌比用可溶性糖培养真菌能更有效地诱导纤维素酶的产生<sup>[28]</sup>。以大麦地衣  $\beta$ -多糖、葡聚糖和羧甲基纤维素为底物培养的真菌比以海参、海带多糖、木聚糖和支链淀粉为底物培养的真菌产生更高的纤维素酶活性<sup>[29]</sup>。本研究以葡萄糖、滤纸和微晶纤维素为底物诱导纤维降解酶基因转录,发现编码阿魏酸酶、内切木聚糖酶和内切葡聚糖酶的纤维降解酶基因的表达增加了,其中,以葡萄糖为底物的牦牛真菌合成的纤维降解酶基因表达量高于以滤纸为底物合成的纤维降解酶基因表达量,而以滤纸为底物合成的纤维降解酶基因表达量又高于微晶纤维素,表明厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 在不同碳源下能通过改变纤维素酶基因的表达量来调节纤维素酶的活性。葡萄糖诱导的纤维素酶活性较高可能是由于葡萄糖能促进菌株繁殖,进而导致真菌细胞壁释放更多多糖,进一步诱导了纤维降解酶相关基因的表达并使其酶活性增加。此外牦牛真菌发酵葡萄糖产生的木聚糖酶基因的表达量高于滤纸发酵产生的木聚糖酶基因的表达量,但木聚糖酶活性的变化与其基因表达量的变化不一致,因此碳源对木聚糖酶活性的调控可能是通过干扰代谢过程而不是其基因表达。

## 4 结论

本研究利用厌氧发酵技术探究牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 在葡萄糖、滤纸和微晶纤维素 3 种不同碳源诱导下的产酶机制。与滤纸和微晶纤维素相比, *Orpinomyces* sp. YF3 以葡萄糖作为发酵底物产生的纤维降解酶活性及乙酸的含量更高,丙酸、丁酸、异丁酸含量更

低,且能调控纤维降解酶基因的表达并参与淀粉和蔗糖代谢途径、其他聚糖降解途径来提高 *Orpinomyces* sp. YF3 对底物的降解能力。虽然不同碳源诱导下 *Orpinomyces* sp. YF3 能通过调控纤维降解酶基因的表达并参与相关代谢通路来影响纤维降解酶活性,但木聚糖酶的活性可能不受基因表达的影响。对牦牛瘤胃厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. YF3 的产酶性能与机制的研究有助于增加牦牛瘤胃厌氧真菌的相关理论知识,也为此类菌种和厌氧真菌在相关制剂等方面的生产和应用奠定了坚实基础。

## REFERENCES

- [1] MORGAVI DP, KELLY WJ, JANSSEN PH, ATTWOOD GT. Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production[J]. *Animal*, 2013, 7: 184-201.
- [2] FERDEŞ M, DINCĂ MN, MOICEANU G, ZĂBAVĂ BŞ, PARASCHIV G. Microorganisms and enzymes used in the biological pretreatment of the substrate to enhance biogas production: a review[J]. *Sustainability*, 2020, 12(17): 7205.
- [3] JAMI E, ISRAEL A, KOTSER A, MIZRAHI I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(6): 1069-1079.
- [4] PAUL SS, KAMRA DN, SASTRY VRB. Fermentative characteristics and fibrolytic activities of anaerobic gut fungi isolated from wild and domestic ruminants[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2010, 64(4): 279-292.
- [5] MA J, ZHU YX, WANG ZS, YU X, HU R, WANG XY, CAO G, ZOU HW, SHAH AM, PENG QH, XUE B, WANG LZ, ZHAO SN, KONG XY. Comparing the bacterial community in the gastrointestinal tracts between growth-retarded and normal yaks on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 600516.
- [6] LIAO YP, HU R, WANG ZS, PENG QH, DONG XW, ZHANG XF, ZOU HW, PU QJ, XUE B, WANG LZ. Metabolomics profiling of serum and urine in three beef cattle breeds revealed different levels of tolerance to heat stress[J]. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry, 2018, 66(26): 6926-6935.
- [7] DAI QD, MA J, CAO G, HU R, ZHU YX, LI GY, ZOU HW, WANG ZS, PENG QH, XUE B, WANG LZ. Comparative study of growth performance, nutrient digestibility, and ruminal and fecal bacterial community between yaks and cattle-yaks raised by stall-feeding[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 1-11.
- [8] EDWARDS JE, FORSTER RJ, CALLAGHAN TM, DOLLHOFFER V, DAGAR SS, CHENG YF, CHANG J, KITTELMANN S, FLIEGEROVA K, PUNIYA AK, HENSKE JK, GILMORE SP, O'MALLEY MA, GRIFFITH GW, SMIDT H. PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: insights, challenges and opportunities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1657.
- [9] WILLIAMS AG, ORPIN CG. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1987, 33(5): 418-426.
- [10] STEENBAKKERS PJM, HARHANGI HR, BOSSCHER MW, van der HOOFT MMC, KELTJENS JT, van der DRIFT C, VOGELS GD, den CAMP HJMO. Beta-glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 is a family 3 glycoside hydrolase[J]. *Biochemical Journal*, 2003, 370(3): 963-970.
- [11] HESS M, PAUL SS, PUNIYA AK, van der GIEZEN M, SHAW C, EDWARDS JE, FLIEGEROVÁ K. Anaerobic fungi: past, present, and future[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 584893.
- [12] MORAÍS S, MIZRAHI I. Islands in the stream: from individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(4): 362-379.
- [13] LEE SM, GUAN LL, EUN JS, KIM CH, LEE SJ, KIM ET, LEE SS. The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(3): 565-573.
- [14] AYDIN S, YILDIRIM E, INCE O, INCE B. Rumen anaerobic fungi create new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass[J]. *Algal Research*, 2017, 23: 150-160.
- [15] YILDIRIM E, INCE O, AYDIN S, INCE B. Improvement of biogas potential of anaerobic digesters using rumen fungi[J]. *Renewable Energy*, 2017, 109(8): 346-353.
- [16] 曹阳春. 牦牛瘤胃厌氧真菌多样性与饲料细胞壁降解酯酶特性研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2012.
- CAO YC. Study on the diversity of anaerobic fungi in yak rumen and characteristics of esterase degradation in feed cytoderm[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [17] ZHAO XH, ZHANG T, XU M, YAO JH. Effects of physically effective fiber on chewing activity, ruminal fermentation, and digestibility in goats1[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(2): 501-509.
- [18] THOMAS M, WEBB M, GHIMIRE S, BLAIR A, OLSON K, FENSKE GJ, FONDER AT, CHRISTOPHER-HENNINGS J, BRAKE D, SCARIA J. Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 12257.
- [19] BENSADOUN A, PALADINES OL, REID JT. Effect of level of intake and physical form of the diet on plasma glucose concentration and volatile fatty acid absorption in ruminants[J]. *Journal of Dairy Science*, 1962, 45(10): 1203-1210.
- [20] 罗治杰, 马露, 卜登攀, 秦霞. 瘤胃发酵产物乙酸和丙酸比对奶牛生产性能及乳成分影响的荟萃分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(5): 1613-1624.
- LUO ZJ, MA L, BU DP, QIN X. Meta-analysis: how the ruminal acetic acid to propionic acid ratio affect the production and milk composition of dairy cow[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(5): 1613-1624 (in Chinese).
- [21] LEVASSEUR A, DRULA E, LOMBARD V, COUTINHO PM, HENRISSAT B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 1-14.
- [22] CHETTRI D, VERMA AK, VERMA AK. Innovations in CAZyme gene diversity and its modification for biorefinery applications[J]. *Biotechnology Reports*, 2020, 28: e00525.
- [23] SOLOMON KV, HAITJEMA CH, HENSKE JK,

- GILMORE SP, BORGES-RIVERA D, LIPZEN A, BREWER HM, PURVINE SO, WRIGHT AT, THEODOROU MK, GRIGORIEV IV, REGEV A, THOMPSON DA, O'MALLEY MA. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1192-1195.
- [24] KUCHARSKA K, RYBARCZYK P, HOŁOWACZ I, ŁUKAJTIS R, GLINKA M, KAMIŃSKI M. Molecules pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2937.
- [25] COUGER MB, YOUSSEF NH, STRUCHTEMEYER CG, LIGGENSTOFFER AS, ELSHAHED MS. Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 1-17.
- [26] GRUNINGER RJ, NGUYEN TTM, REID ID, YANKE JL, WANG P, ABBOTT DW, TSANG A, MCALLISTER T. Application of transcriptomics to compare the carbohydrate active enzymes that are expressed by diverse genera of anaerobic fungi to degrade plant cell wall carbohydrates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1581.
- [27] NISIZAWA T, SUZUKI H, NISIZAWA K. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1972, 71(6): 999-1007.
- [28] BARICHIEVICH EM, CALZA RE. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(1): 43-48.
- [29] AMORE A, GIACOBBE S, FARACO V. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi[J]. *Current Genomics*, 2013, 14(4): 230-249.

(本文责编 陈宏宇)