

## 秸秆质外体蛋白对纤维素酶活力的影响

# Effect of Straw Apoplast Protein on Cellulase Activity

卢迪<sup>1,2</sup>, 陈洪章<sup>2\*</sup>, 马润宇<sup>1</sup>

LU Di<sup>1,2</sup>, CHEN Hong-Zhang<sup>2\*</sup> and MA Run-Yu<sup>1</sup>

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

**摘 要** 研究了玉米秸秆在储存过程中质外体蛋白含量的变化情况, 及其对 *Penicillium expansum* 纤维素酶活力的影响。结果表明, 随着储存时间的延长, 可抽提的玉米秸秆质外体蛋白的数量逐渐减少, 与 *P. expansum* 纤维素酶的协同作用也随之减弱。储存玉米秸秆质外体蛋白没有内源性纤维素酶活力, 而新鲜玉米秸秆有内源性 EG 活性, 但它的稳定性较差, 储存半年后基本降解或失活。储存秸秆质外体蛋白对 FPA 酶活力、棉花酶活力、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力有明显的增效作用, 最大增效分别达到 95.32%、102.06% 和 96.6%。而对 CMCase 却表现出抑制作用, 最大抑制率为 49.52%。质外体蛋白-EG- $\beta$ G 表现出明显的协同关系, 而它对 CBH 酶活力没有影响。消除内源性 EG 的影响后, 新鲜玉米秸秆质外体蛋白对 FPA 活力、棉花酶活力、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的促进率, 以及 CMCase 的抑制率均高于储存秸秆的质外体蛋白。可见质外体蛋白是天然纤维素酶解研究不可忽视的影响因素。

**关键词** 秸秆质外体蛋白, 纤维素酶, 纤维素酶活力, 细胞壁蛋白

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0257-06

**Abstract** We studied the alteration of the maize straw apoplast proteins in the process of preservation, and analyzed the effects of apoplast proteins on *Penicillium expansum* cellulase activities. The results show that: the extractable apoplast proteins are gradually decreased during the preservation of maize straw. Meanwhile, their synergistic effects on *P. expansum* cellulase are also attenuated. The apoplast proteins extracted from fresh maize straw possess endogenous EG activities, which is unstable and completely vanished after 6 months preservation. The apoplast proteins from the preserved straw exhibit significant synergistic effect on FPA, cotton lyase and  $\beta$ -glucosidase. The maximal synergistic values are 95.32%, 102.06% and 96.6%, respectively. But interestingly, they inhibit the CMCase activity (max. 49.52%). Apoplast proteins show distinctive synergy with  $\beta$ G and EG, but have no effect on CBH activity. After eliminating the effect of endogenous EG, the apoplast proteins from fresh maize straw have enhanced synergistic or inhibiting effects on FPA, Cotton lyase,  $\beta$ G and CMCase than those extracted from the preserved straw. Based on our observation, the apoplast proteins play important roles in regulating the cellulase activities. The detailed analysis of the related mechanisms will greatly benefit the studies of the natural biomaterials hydrolysis.

**Key words** apoplast proteins of straw, cellulase, cellulase activity, cell wall bound proteins

Received: December 1, 2005; Accepted: January 6, 2006.

This work was supported by the grants from the State Key Development Program for Basic Research of China (No. 2004CB71700) & Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KJCXZ-SW-206-2).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-82627067; Email: hzchen@home.ipe.ac.cn

国家重点基础研究发展计划项目 (No. 2004CB71700) 和中国科学院知识创新项目 (No. KJCXZ-SW-206-2) 联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

同一来源的纤维素酶不同组分间协同降解纤维素的现象已经发现了 40 余年<sup>[1]</sup>, 普遍认为是外切  $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶 (cellobiohydrolase, E. C. 3. 2. 1. 91, CBH), 内切  $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶 (endoglucanase, E. C. 3. 2. 1. 4, EG) 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase, E. C. 3. 2. 1. 21,  $\beta$ G) 三种组分协同作用的结果, 但是合理的协同作用机制还有很多争议。协同作用之所以迄今为止仍然没有被系统的提出来是因为很多研究具有非确定性, 它们的结论有时甚至是相悖的<sup>[2]</sup>。特别是纤维素酶在天然底物上的作用难以估计, 获得的结果常常很有争议, 很多时候竞争或非竞争抑制都有被观察到<sup>[3]</sup>。这其中有纤维素酶组分纯化效果不理想以及生物质本身的复杂性等因素的影响。

植物质外体蛋白是植物生理学研究领域中较为前沿的课题。近年来随着试验技术的进步, 人们发现细胞壁除了含有多糖和多聚酚类物质外, 还含有上百种蛋白<sup>[4]</sup>, 其含量约占细胞壁重量的 10%<sup>[5]</sup>, 担负着协调细胞生长和发育、支持细胞壁基本结构、响应生物和非生物压力等多种功能。细胞壁蛋白严密复杂的调控与表达已经在植物生长、新陈代谢和胞外刺激响应等诸多方面被广泛的观察到<sup>[6-9]</sup>。可见细胞壁上的质外体蛋白的多功能特性可能会对作用于其上的纤维素酶的活性有一定的影响。

目前研究天然底物对纤维素酶解的影响主要集中在纤维素的超分子结构上, 即聚集态对酶解的影响, 而细胞壁结构中的活性成分对酶解的影响研究得并不多。对此我们选取玉米 (*Zea mays*) 秸秆为材料, 研究质外体蛋白对纤维素酶活性的影响, 从一个全新的视角来探讨植物细胞壁成分对纤维素酶解的影响因素。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学药品、试剂、底物和酶

苯甲基磺酰氟 (Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride, PMSF) 由 Amresco 公司 (美国) 提供。羧甲基纤维素钠 (Carboxymethyl Cellulose, CMC) 等其他生化试剂购自 Sigma 化学公司。*Penicillium expansum* 纤维素酶由 Sunson (中国) 提供。

### 1.2 植物原料

玉米秸秆从北京郊区采集, 采摘季节是秋天。试验用的秸秆原料取自 7 节玉米茎中的第 4~6 节的节间部位 (木质化组织)。将新采摘的玉米秸秆分为两部分。一部分直接放到 -20℃ 的冰箱中冻存; 另一部分在阴凉处风干, 并在室温储存。使用前, 冻

存的玉米秸秆用高速匀浆机匀浆, 风干的秸秆用超微粉碎机粉碎, 取 40~60 目的筛分进行试验。

### 1.3 细胞壁的制备

称取一定量玉米秸秆置于研钵中, 加入冰冻的研磨缓冲液 (pH 4.8, 50mmol/L 醋酸缓冲液, 含 50mmol/L NaCl, 30mmol/L 抗坏血酸) 和 100mg PVPP (polyvinyl polypyrrolidone, 交联聚乙烯吡咯烷酮), 搅拌均匀后加入液氮研磨, 然后用尼龙滤布 (47 $\mu$ m<sup>2</sup>) 过滤, 并用冰冻的研磨缓冲液、0.1mol/L NaCl, dH<sub>2</sub>O、-20℃ 丙酮、50mmol/L pH 4.8 醋酸钠缓冲液等一系列溶液清洗<sup>[10]</sup>。滤布上的滤渣即是制得的细胞壁。

### 1.4 提取质外体蛋白

质外体蛋白的萃取方法见文献 [11]。混合 3 次萃取液, 并加入等体积的 -20℃ 的乙醇, 充分摇匀, 4℃ 下放置过夜。4000g/min 离心 10min 以获得乙醇沉淀物, 将沉淀置于低温处吹干, 再加入沉淀体积 3~4 倍的醋酸钠缓冲液 (50mmol/L pH 4.8), 冰上振荡 10min, 然后置于冰箱 2h, 最后 16 000g/min 离心 20min, 所得上清液即是提取到的质外体蛋白。质外体蛋白的提取率指质外体蛋白占细胞壁干重的比率。

### 1.5 蛋白浓度测定

蛋白浓缩液用考马斯亮蓝法测定 ([Bradford, 1976]) 以牛血清蛋白为标准。

### 1.6 酶活力测定方法

滤纸酶 (FPA) 活力、 $\beta$  葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase) 活力、棉花酶 (cotton lyase) 活力以及羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活力的测定方法见文献 [12], 其中 CMCase 活力测定方法是测定 EG 酶活力的经典测定方法。酶活力的测定均在 50℃ 和 pH 4.8 条件下进行。还原糖测定见 DNS 法<sup>[13]</sup>。酶活力单位: 产生 1 $\mu$ mol/min 葡萄糖的酶量为一个酶国际单位 IU。

### 1.7 质外体蛋白对纤维素酶活性的影响

在不同体积的蛋白液中, 加入等量经稀释的纤维素酶液, 在室温中育化 10min, 使质外体蛋白与纤维素酶充分混合。根据试验需要加入不同的底物 (见 1.6), 用 50mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 4.8) 定容到 3mL, 进行纤维素酶活力分析 (具体方法见 1.6), 计算纤维素酶活力时, 应先扣除本底还原糖的含量。质外体蛋白纤维素酶活力空白对照试验的操作方法同上, 只是反应体系中不添加纤维素酶。

### 1.8 质外体蛋白的热敏性试验

取部分蛋白液沸水浴 10min。待蛋白液降至室温后, 对灭活蛋白与未经沸水浴的蛋白分别进行纤维素酶活力试验, 并以纤维素酶空白为对照, 测定纤

纤维素酶活力(见 1.6)

## 2 结果与分析

### 2.1 储存秸秆的质外体蛋白对纤维素酶活力的影响

从存放期为 6 个月的玉米秸秆中提取质外体蛋

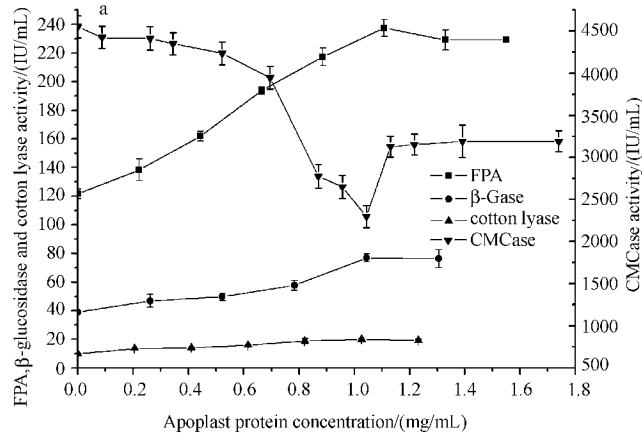


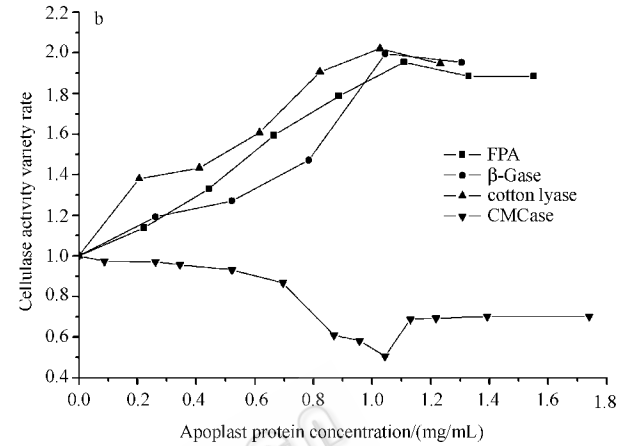
图 1 储存玉米秸秆质外体蛋白对纤维素酶活力的影响

Fig. 1 Effect of apoplast protein from preserved maize straw on cellulase activity

a) cellulase activity value ; b) a transition of fig. 1a to show the relative values of cellulase activity variety rate.

白,分别以 1% 的羧甲基纤维素钠、1% 的水杨素、滤纸和脱脂棉等 4 种不同底物为试验对象,进行纤维素酶活力试验(方法见 2.6、2.7),所得结果如图 1a、1b 所示。

当反应体系中的蛋白浓度达到 1.0437mg/mL 时,CMCase 的酶活力抑制率为 49.52% 达到最高,



之后随着体系蛋白浓度的增加 CMCase 酶活力稍有回升。而 FPA 活力、棉花酶活力、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力则随质外体蛋白浓度的增加而升高,分别在反应体系中蛋白浓度为 1.1083mg/mL、1.0266mg/mL 和 1.0445mg/mL 时达到最高,酶活力提高比率分别为 95.32%、102.06% 和 96.6%(见图 1a)。此外,在同时进行的质外体蛋白纤维素酶活力空白对照试验(即反应体系中未添加纤维素酶)中,没有检测到内源性纤维素酶的活性。可见玉米质外体蛋白尽管不具有内源性纤维素酶活力,但它对 *P. expansum* EG 的酶活力是有抑制作用的,并能够提高  $\beta$ G、CBH 和 FPA 的活力。

图 1b 表示的是各纤维素酶活力的变化率,它由图 1a 转化而来。从图 1b 我们可以非常直观地看到,在质外体蛋白的影响下各组纤维素酶活力变化有一定的相关性。结晶纤维素与纤维素滤纸的水解程度以相似的速度和比率随着  $\beta$ G 活性的增加而增加,说明在 *P. expansum* 纤维素酶系中, $\beta$ -葡萄糖苷酶是提高 *P. expansum* 纤维素酶活力的关键酶,只有有效解除纤维二糖酶积累对 CBH 的抑制作用,纤维素酶活力才能提高<sup>[17]</sup>。当 EG 活力受到抑制程度增大时  $\beta$ G 活力逐步受到促进,可见质外体蛋白对 *P. expansum* 纤维素酶的作用实质上是质外体蛋

白- $\beta$ G-EG 之间的协同作用。值得一提的是,在天然纤维素降解中居于核心地位的 CBH<sup>[18]</sup>与质外体蛋白的相互作用却没有被观察到。

质外体蛋白的热敏性试验(见图 2)进一步证明了,在其中发挥作用的物质是具有热敏性的蛋白质。灭活蛋白与 *P. expansum* 纤维素酶混合后的酶活力与 *P. expansum* 纤维素酶相比稍有变化,这可能是

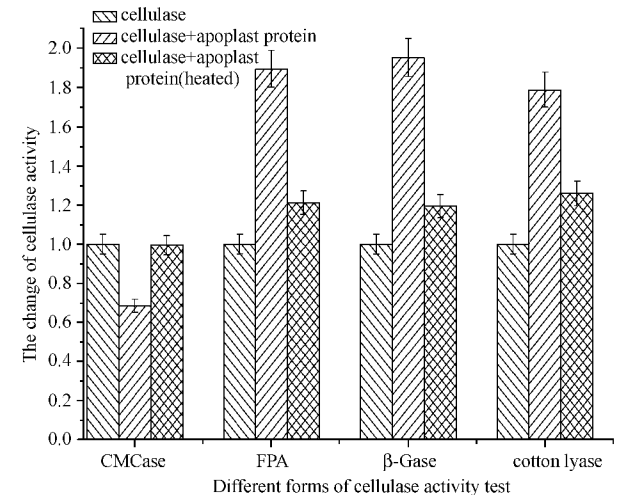


图 2 储存玉米质外体蛋白的热敏性试验

Fig. 2 Heat inactivation of apoplast proteins attenuates their synergistic and inhibiting effects on

different components of cellulase

降温后有少部分蛋白复性所致,或者部分有增效作用的蛋白有较强的抗热变性能力。

至于何种质外体蛋白起到 EG 抑制作用还不清楚。William S. 等<sup>[14]</sup>在研究 XEGIP(一种纤维素内切酶抑制蛋白)同源基因组时,发现 XEGIP 的同源基因广泛存在于包括玉米、大豆等在内的高等植物中,并预测类 XEGIP 蛋白有削弱微生物病原菌分泌的内葡聚糖酶降解植物细胞壁的能力。尽管类 XEGIP 蛋白的生物功能还没有完全确定,但为数不多的几项证据<sup>[15,16]</sup>已经为这一推测提供了有力的支持。根据实验结果,我们推测玉米类 XEGIP 蛋白可能作为玉米质外体蛋白的一种成分参与了对 *P. expansum* EG 的抑制作用。

## 2.2 新鲜秸秆的质外体蛋白对纤维素酶活力的影响

从新鲜玉米秸秆中提取质外体蛋白,进行纤维素酶活力试验(方法见 1.6、1.7),所得结果如图 3 所示。

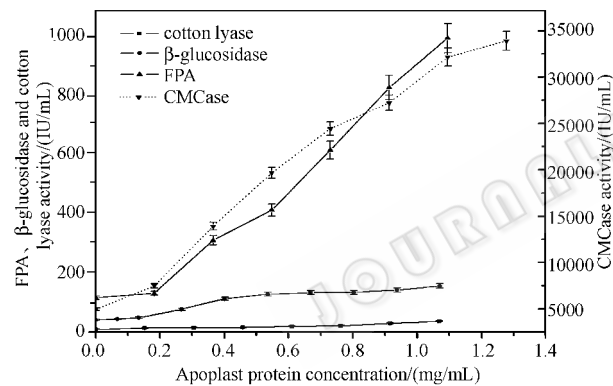


图 3 新鲜玉米秸秆质外体蛋白对纤维素酶活力的影响

Fig.3 Effect of apoplast protein from flesh maize straw on cellulase activity

新鲜玉米秸秆质外体蛋白对 *P. expansum* FPA、CMCase 酶、棉花酶以及 β-葡萄糖苷酶均有促进作用,当反应体系中蛋白浓度分别为 1.09516mg/mL、1.09516mg/mL、1.0682mg/mL 和 1.0707mg/mL 时,酶活力分别提高了 7.5443 倍、5.4846 倍、2.744 倍和 2.7905 倍,增效幅度远远大于储存秸秆质外体蛋白对 *P. expansum* 纤维素酶活力的促进作用(见图 3)。可见玉米质外体蛋白对 *P. expansum* 纤维素酶活力的影响与秸秆储存时间的长短有关。

新鲜玉米秸秆质外体蛋白对 CMCase 活性有促进作用(见图 4),而非储存秸秆所显示的抑制作用。从新鲜秸秆质外体蛋白 CMCase 活力的不加酶空白对照实验可以看出,新鲜秸秆的质外体蛋白具有明

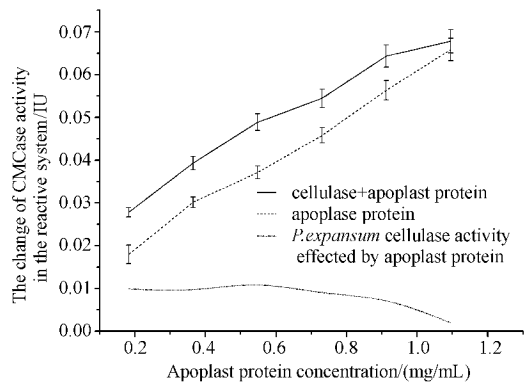


图 4 新鲜玉米秸秆质外体蛋白对 CMCase 酶活力的影响及其空白对照试验

Fig.4 Effect of apoplast protein from flesh maize straw on CMCase activity and blank test

显的内源性 EG 活性,而储存秸秆的质外体蛋白是没有 EG 活性的(见 2.2)。植物内切葡聚糖酶与 *P. expansum* EG 没有相近关系,*P. expansum* EG 属于糖基水解酶家族 12 的成员,而植物内切 β-1,4-葡聚糖酶属于在结构上无关的配糖水解酶家族 9,该家族包括具有转化作用的酶<sup>[19]</sup>。虽然这种看法还没有得到确定,但体内测试表明<sup>[14]</sup>植物内切葡聚糖抑制蛋白并不抑制其内源性 EG 的活性。因此通过差减不加酶的空白对照,可以看到去除内源性纤维素酶活力后,新鲜玉米秸秆仍表现出具有对 *P. expansum* EG 活性的抑制能力。当体系蛋白浓度为 1.09516mg/mL 时,抑制率高达 80.14%(图 4 虚线所示)。此外我们还发现新鲜玉米秸秆质外体蛋白中的 EG 稳定性较差,秸秆储存半年后基本降解或者失活。

由于受到植物内源性 EG 的影响,新鲜玉米秸秆质外体蛋白具有 FPA 酶活力,并对 *P. expansum* FPA 的促进作用有大幅提高。通过差减不加酶的空白对照,可以看到质外体蛋白对 *P. expansum* FPA 活性的影响表现出较为复杂的状况:首先 *P. expansum* FPA 活力受到抑制,随着体系蛋白浓度的增加,抑制程度逐渐减小,并转而受到促进,且增效幅度随蛋白浓度的增加而增大(见图 5)。

此外,在新鲜秸秆质外体蛋白中没有检测到棉花酶活力和 β-葡萄糖苷酶活力,因此新鲜秸秆质外体蛋白没有 β-葡萄糖苷酶和 CBH 活性。

## 2.3 存储过程中质外体蛋白含量的变化

细胞壁的结构非常致密,质外体蛋白被压缩在多糖基质中,而不是简单吸附在细胞壁上,因此质外体蛋白的提取存在一定的困难。为了考察秸秆在储

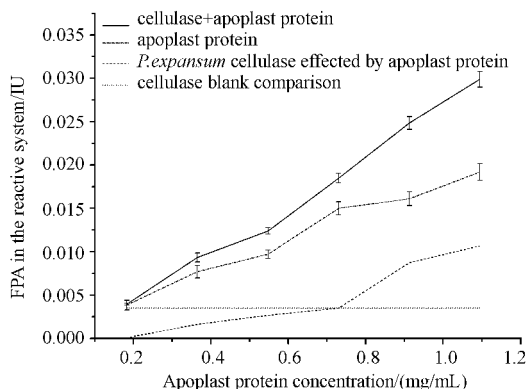


图5 新鲜玉米秸秆质外体蛋白对 FPA 的影响及其 FPA 空白对照试验

Fig.5 Effect of apoplast protein from flesh maize straw on FPA activity and blank test

存过程中质外体蛋白的变化情况,我们选取了目前质外体蛋白研究文献中最常用的方法(见 1.3、1.4),并以此为基础简单考察随着储存时间的延长,玉米秸秆质外体蛋白含量的变化趋势。

结果显示,随着储存时间延长,玉米质外体蛋白含量日趋减少,6个月时蛋白含量只有新鲜时的34.71%,半年后蛋白降解或失活速度有所减缓,蛋白含量趋于稳定(见图6)。由此可见,储存秸秆质外体蛋白含量下降,是秸秆质外体蛋白对 *P. expansum* 纤维素酶活性增效作用减弱的关键影响因素。

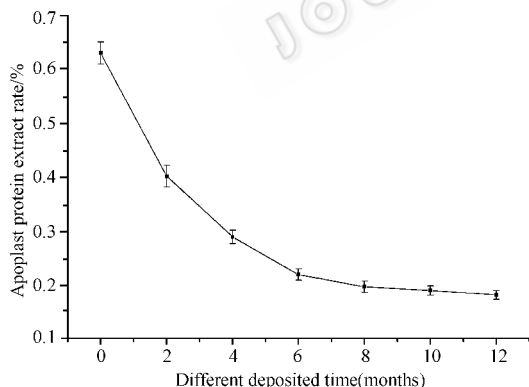


图6 质外体蛋白含量的变化趋势

Fig.6 Alteration of the extractable apoplast proteins during preservation of the maize straw

### 3 讨论

储存秸秆的质外体蛋白不具有纤维素酶活力,但却对纤维素酶活力有增效作用。因此这些增效因子可能是一些不具有纤维素酶活力,但却参与细胞壁纤维素装配、沉积、再组织和选择性降解的功能蛋白。在已报道的玉米质外体蛋白中,扩张蛋白<sup>[20]</sup>、

转糖基酶<sup>[7]</sup>、过氧化物酶<sup>[9]</sup>、裂解酶<sup>[6]</sup>等质外体蛋白是改变细胞壁纤维素结构的主要调控蛋白,它们没有纤维素酶活力。所以我们推测这些蛋白可能参与了纤维素酶的协同增效作用。在这些可能的增效因子中,扩张蛋白的性质与质外体蛋白增效因子的特性非常相似。多项研究已经表明虽然它不具有纤维素酶活力,但它能够提高纤维素酶对微晶纤维素的水解程度<sup>[21]</sup>,并使滤纸、结晶纤维素、半纤维素结构疏松<sup>[22]</sup>。

在 Reese 关于微生物纤维素酶降解机制的著名  $C_1$ - $C_x$  假说中<sup>[1]</sup>, $C_1$  因子具有破坏纤维素结晶区结构的功能,它能为纤维素酶其他组分与纤维素的结合创造条件。由于结晶区是由微纤维束间通过氢键结合的,因此推测  $C_1$  应该非葡聚糖酶的解氢键因子<sup>[23]</sup>。使结晶纤维素无定型化或膨胀的  $C_1$  因子已在微生物中被发现,这是一种被称为 swollenin 的蛋白<sup>[24]</sup>,它能够疏松棉花织物,却不产生还原糖,并且与植物的扩张蛋白、真菌纤维素酶有相似的序列。而植物的扩张蛋白被认为是细胞壁松弛的主要调节物质<sup>[20]</sup>,它能够打断细胞壁多聚物之间的氢键诱导酸依赖的细胞壁延展和压力松弛<sup>[25]</sup>。显然  $C_1$  因子和质外体蛋白中纤维素酶增效因子之间具有一些共性。因此在天然纤维素酶解时, $C_1$  因子不但来自于微生物本身,还可能来自作用底物——天然纤维素。

此外,玉米质外体蛋白的这种增效作用可以被热变性大大削弱,可见增效因子是具有热不稳定性的,因此生产过程中对天然纤维素底物进行简单的热变性,并不一定有利于天然纤维素的酶解效率的提高。

我们的实验结果表明,质外体蛋白对天然纤维素酶解的影响是非常显著的。这也为我们提供了一种新的思路:即天然纤维素酶解效率除了受纤维自身的凝聚态结构影响外,细胞壁中的蛋白质对酶解的影响也不可忽视,从植物的生理学角度出发研究天然纤维素酶解,将为进一步弄清纤维素酶解机制提供帮助。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Reese EG, Siu GH, Levinson HS. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bact*, 1950, **59**: 485
- [2] Bernd Nidetzky, Walter Steiner, Marianne Haynt *et al.* Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model

- [ 3 ] Holtzapple M , Cognata M , Shu Y *et al.* Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng* , 1990 , **36** :275 – 287
- [ 4 ] Sang-Jik Lee , Ramu S Saravanan , Cynthia MB *et al.* Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant physiology and Biochemistry* 2004 **42** ( 12 ) :979 – 988
- [ 5 ] Borderies G , Jamet E , Lafitte C *et al.* Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures : a critical analysis. *Electrophoresis* , 2003 , **24** :3421 – 3432
- [ 6 ] Fry SC , Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* , 1995 , **46** :497 – 520
- [ 7 ] Rose JKC , Bennett AB. Cooperative disassembly of the cellulosexyloglucan network of plant cell walls parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci* , 1999 , **4** :176 – 183
- [ 8 ] Andrews SR , Adams KS , Burton CE Evered. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J Exp Bot* , 2002 **53** :2185 – 2191
- [ 9 ] Pedreira J , Sanz N , Pena MJ *et al.* Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. *Plant Cell Physiol* , 2004 **45** :530 – 534
- [ 10 ] Carpita NC. Tensile strength of living plant cells. *Plant Physiol* , 1985 , **79** :484 – 488
- [ 11 ] Bonnie S Watson , Zhentian Lei , Richard A Dixon *et al.* Summer proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* , 2004 , **65** :1709 – 1720
- [ 12 ] Vallander L , Erik KE. Enzymic Saccharification of pretreated wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering* , 1985 , **17** :650 – 639
- [ 13 ] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* , 1959 , **31** :426 – 428
- [ 14 ] William S York , Qiang Qin , Jocelyn KC Rose. Proteinaceous inhibitors of endo- $\beta$ -glucanases. *Biochimica et Biophysica Acta* ( Proteins & Proteomics Volume ) 2004 , **1696** ( 2 ) :223 – 233
- [ 15 ] Satoh S , Sturm A , Fujii T *et al.* cDNA cloning of an extracellular dermal glycoprotein of carrot and its expression in response to wounding. *Planta* , 1992 , **188** :432 – 438
- [ 16 ] Chung RPT , Neumann GM , Polya GM. Purification and characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton *Gossypium hirsutum*. *Plant Sci* , 1997 , **127** :1 – 16
- [ 17 ] Holtzapple MT , Cognata M , Shu Y *et al.* Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng* , 1990 , **36** :275 – 287
- [ 18 ] Wood TM , Mccrae SL. Synergism between enzyme involved in the solubilization of native cellulose. *Adv Chem Ser* , 1979 , **181** :181 – 209
- [ 19 ] Qiang Qin , Arl W Bergmann *et al.* Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *The Plant Journal* , 2003 , **34** :327 – 338
- [ 20 ] Wu Y , Sharp RE , Durachko DM *et al.* Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties , expansin activity , and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol* , 1996 , **111** :765 – 772
- [ 21 ] Cosgrove DJ , Durachko DM , Li LC. Expansins may have cryptic endoglucanase activity and can synergize the breakdown of cellulose by fungal cellulases. *Annu Meeting Am Soc Plant Physiol Abstr* , 1998 , **171**
- [ 22 ] Whitney SEC , Gidley MJ , McQueen-Mason S. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J* , 2000 , **22** :327 – 334
- [ 23 ] Wood TM , Wood Mccrae. The purification and properties of the c1 components of *T. Konigic* cellulase. *Biochem J* , 1972 , **125** :53 – 59
- [ 24 ] Markku Saloheimo I , Marja Paloheimo I , Satu Hakola I *et al.* Swollenin , a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins , exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem* , 2002 **269** :4202 – 4211
- [ 25 ] Gao Y ( 高英 ) , Wang XC ( 王学臣 ) . The review of the development of researches on expansin. *Chinese Agricultural Science Bulletin* ( 中国农学通报 ) , 2005 **21** ( 7 ) :82 – 86