

校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620070153822

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

灰绿曲霉纤维素酶酶学性质、基因克隆

与蛋白质组学的研究

Enzymology, Gene Cloning and Proteomics of *Aspergillus*

glaucus XC9

陶毅明

指导教师姓名: 陈清西 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 5 月

学位授予日期: 2010 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	1
ABSTRACT.....	3
1 前 言.....	5
1.1 纤维素简介.....	5
1.1.1 纤维素分子结构.....	5
1.1.2 纤维素的类型.....	5
1.1.3 纤维素的降解.....	7
1.1.4 生物能源与生物乙醇.....	8
1.2 纤维素酶简介.....	9
1.2.1 纤维素酶的研究历史.....	9
1.2.2 纤维素酶的来源.....	10
1.3 纤维素酶的组分及测活方法.....	10
1.3.1 纤维素酶活测定中的底物.....	11
1.3.2 外切葡聚糖酶活力的测定.....	11
1.3.3 内切葡聚糖酶活力的测定.....	11
1.3.4 β -葡萄糖苷酶活力的测定.....	12
1.3.5 纤维素酶总活力的测定.....	12
1.4 纤维素酶的分子结构与催化机理.....	12
1.4.1 结合域.....	12
1.4.2 催化域.....	13
1.4.3 连接区.....	13
1.5 纤维素酶基因的克隆与表达.....	14
1.5.1 反向 PCR.....	14
1.5.2 纤维素酶基因的克隆.....	16
1.6 真菌纤维素酶基因的表达调控.....	16
1.6.1 糖类及纤维素类物质对纤维素酶基因表达的影响.....	16
1.6.2 丝状真菌启动子.....	16
1.6.3 丝状真菌反式作用因子.....	17
1.7 固定化酶及固定化方法.....	18
1.7.1 固定化酶.....	18
1.7.2 酶的固定化方法.....	18

1.8 真菌蛋白质组学	20
1.9 纤维素酶的应用	22
1.9.1 酿酒业.....	22
1.9.2 乙醇生产.....	22
1.9.3 饲料添加剂.....	22
1.9.4 纺织业.....	23
1.9.5 食品加工.....	23
1.9.6 洗涤剂工业.....	23
1.9.7 造纸业.....	24
1.10 本课题的来源、研究内容与研究意义	24
2 材料与方法	25
2.1 主要材料和试剂	25
2.2 主要仪器	26
2.3 试剂配方	27
2.4 培养基	29
3 实验方法	30
3.1 外切葡聚糖酶 CBH 和内切葡聚糖酶 EG 的分离纯化.....	30
3.1.1 粗酶液的预处理.....	30
3.1.2 酶的分离与纯化.....	30
3.1.3 SDS-PAGE 电泳.....	30
3.1.4 酶活性测定.....	30
3.1.5 糖含量测定.....	31
3.1.6 蛋白浓度测定.....	32
3.2 酶的基本性质	31
3.2.1 Sephadex G-100 凝胶柱层析法测定分子量	31
3.2.2 pH 对酶活力的影响与酶的酸碱稳定性测定	31
3.2.3 温度对酶活力的影响与酶的热稳定性测定	32
3.2.4 底物浓度对酶活力的影响.....	32
3.2.5 酶的化学修饰.....	32
3.2.6 乙酸、乳酸和乙醇对酶的抑制作用和机理	33
3.3 酶在脲和乙醇溶液中的失活动力学.....	33
3.3.1 脲对酶活力的影响.....	33

3.3.2 乙醇对酶活力的影响.....	33
3.3.3 酶经脲和乙醇变性后内源荧光发射光谱的测定.....	33
3.3.4 酶在脲溶液中的失活动力学模型的建立.....	33
3.4 纤维素酶的固定化.....	34
3.4.1 海藻酸钠固定化酶的制备.....	34
3.4.2 聚丙烯酰胺凝胶固定化酶的制备.....	34
3.4.3 固定化酶活性的测定.....	34
3.5 反向 PCR 克隆 <i>CBH</i> 全长基因.....	35
3.5.1 基因组 DNA 的提取.....	35
3.5.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成.....	35
3.5.3 <i>cbh</i> 基因组 DNA 片段的克隆.....	35
3.5.4 反向 PCR 扩增 <i>cbh</i> 全长基因.....	36
3.5.5 <i>cbh</i> 全长基因的扩增.....	37
3.5.6 DNA 电泳回收.....	37
3.5.7 胶回收与连接.....	37
3.5.8 实时荧光定量 PCR 检测 <i>cbh</i> 基因表达.....	37
3.5.9 其它常规克隆方法.....	38
3.6 胞外差异蛋白质组学研究.....	38
3.6.1 材料处理.....	38
3.6.2 双向凝胶电泳.....	39
3.6.3 硝酸银染色.....	39
3.6.4 扫描和图象处理.....	39
3.6.5 肽指纹质谱鉴定.....	39
4 结果与分析.....	42
4.1 外切葡聚糖酶 <i>CBH</i> 与内切葡聚糖酶 <i>EG</i> 的分离纯化.....	41
4.2 酶的基本性质.....	42
4.2.1 酶分子量的测定.....	44
4.2.2 酶催化反应的动力学特征.....	45
4.2.3 pH 对酶活力及稳定性的影响.....	46
4.2.4 温度对酶活力及稳定性的影响.....	47
4.2.5 金属离子对酶活力的影响.....	48
4.3 酶活性中心的化学修饰.....	49
4.3.1 组氨酸咪唑基的化学修饰.....	49
4.3.2 色氨酸残基的化学修饰.....	49

4.3.3 氨基和羧基的化学修饰	49
4.3.4 巯基的化学修饰	50
4.3.5 丝氨酸羟基、二硫键和精氨酸残基的化学修饰	50
4.4 乙酸、乳酸和乙醇对酶活力的抑制作用及机理	52
4.4.1 乙酸对酶活力的影响	52
4.4.2 乙酸对酶的抑制类型及抑制常数	53
4.4.3 乳酸对酶活力的影响	54
4.4.4 乳酸对酶的抑制类型及抑制常数	55
4.4.5 乙醇对酶活力的影响	57
4.4.6 乙醇对酶的抑制类型及抑制常数	57
4.4.7 酶经乙醇微扰后荧光发射光谱的变化	59
4.5 CBH 在脲溶液中的失活动力学	60
4.5.1 脲对 CBH 活力的影响	60
4.5.2 低浓度脲对 CBH 的作用表现为可逆过程	60
4.5.3 CBH 经脲变性后荧光发射光谱的变化	60
4.5.4 CBH 经脲变性后活力变化与构象变化结果比较	60
4.5.5 CBH 在脲溶液中失活动力学模型的建立	61
4.5.6 CBH 在脲溶液中失活微观速度常数的测定	63
4.6 EG 在脲溶液中的失活动力学	65
4.6.1 脲对 EG 活力的影响	65
4.6.2 低浓度脲对 EG 的作用表现为可逆过程	65
4.6.3 EG 经脲变性后荧光发射光谱的变化	66
4.6.4 EG 经脲变性后活力变化与构象变化结果比较	66
4.6.5 EG 在脲溶液中失活动力学模型的建立	67
4.6.6 EG 在脲溶液中失活微观速度常数的测定	68
4.7 海藻酸钠固定化纤维素酶	70
4.7.1 包埋-交联法	70
4.7.2 交联-包埋法	73
4.8 聚丙烯酰胺凝胶固定化纤维素酶	75
4.8.1 聚丙烯酰胺浓度对固定化酶的影响	75
4.9 游离酶与固定化酶性质比较	76
4.9.1 固定化酶活力与回收率	76
4.9.2 最适反应 pH	76
4.9.3 酸碱稳定性	77
4.9.4 最适反应温度	78

4.9.5 热稳定性.....	79
4.9.6 操作稳定性.....	80
4.9.7 储存稳定性.....	81
4.10 CBH 全长基因的克隆.....	81
4.10.1 <i>cbh</i> 基因片段的克隆.....	81
4.10.2 反向 PCR 扩增 <i>cbh</i> 全长基因.....	83
4.10.3 <i>cbh</i> 基因 cDNA 的克隆.....	86
4.10.4 氨基酸序列分析与结构预测.....	88
4.10.5 不同碳源条件下 <i>cbh</i> 基因的表达.....	92
4.11 胞外差异蛋白质组学.....	94
4.11.1 阻遏和诱导下的胞外差异蛋白.....	94
4.11.2 胞外差异蛋白的鉴定.....	95
5 讨论.....	101
5.1 纤维素酶的分离纯化与基本性质.....	101
5.1.1 纤维素酶的分离纯化.....	101
5.1.2 纤维素酶的活性中心.....	101
5.2 脲溶液对酶的失活作用.....	102
5.3 乙醇溶液对酶的失活作用.....	103
5.4 纤维素酶固定化.....	104
5.5 CBH 基因克隆.....	104
5.5.1 RNA 的提取.....	104
5.5.2 未知基因的克隆.....	105
5.5.3 反向 PCR.....	106
5.5.4 <i>cbh</i> 基因的表达调控.....	106
5.6 胞外差异蛋白质组学.....	107
5.6.1 样品处理.....	107
5.6.2 蛋白点的鉴定.....	108
6 结论.....	109
参考文献.....	110
缩略语中英文对照.....	132
总结与展望.....	133

攻读博士期间发表的论文	134
致谢.....	135

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

ABSTRACT	3
1 INTRODUCTION	5
1.1 INTRODUCTION OF CELLULOSE	5
1.1.1 Cellulose Structure	5
1.1.2 Types of Cellulose	5
1.1.3 Degradation of Cellulose.....	7
1.1.4 Bioenergy and Biofuel.....	8
1.2 INTRODUCTION OF CELLULASE	9
1.2.1 Research History of Cellulase	9
1.2.2 Sources of Cellulase	10
1.3 COMPONENTS OF CELLULASE OF DETERMINATION METHODS	10
1.3.1 Substrates in Cellulase Activity Determination.....	11
1.3.2 Determination of Exo-glucanase Activity	11
1.3.3 Determination of Endoglucanase Activity.....	11
1.3.4 Determination of β -glucosidase Activity.....	12
1.3.5 Determination of Total Cellulase Activity.....	12
1.4 MOLECULAR STRUCTURE AND CATALYTIC MECHANISM OF CELLULASE	12
1.4.1 Binding Domain	12
1.4.2 Catalytic Domain	13
1.4.3 Linker	13
1.5 CELLULASE GENE CLONING	14
1.5.1 Inverse PCR	14
1.5.2 Gene Cloning of Cellulase	16
1.6 REGULATION MECHANISM OF FUNGI CELLULASE GENE	16
1.6.1 Effects of Saccharides and Cellulose on Regulation of Cellulase Gene.....	16
1.6.2 Promoter of Fungi	16
1.6.3 Trans-acting Factors of Fungi.....	17
1.7 ENZYME IMMOBILIZATION AND ITS METHODS	18
1.7.1 Enzyme Immobilization	18
1.7.2 Methods of Immobilization.....	18
1.8 PROTEOMICS OF FUNGI	20
1.9 APPLICATIONS OF CELLULASE	22
1.9.1 Liquor Industry.....	22
1.9.2 Ethanol Production	22
1.9.3 Feed Additive	22
1.9.4 Textile Industry	23

1.9.5 Food Process	23
1.9.6 Detergent Industry.....	23
1.9.7 Paper Industry	24
1.10 FUNDS SUPPORT, RESEARCH CONTENTS AND RESEARCH MEANING	24
2 MATERIALS	25
2.1 MATERIALS AND REAGENTS	25
2.2 EQUIPMENT.....	26
2.3 REAGENTS FORMULA.....	27
2.4 CULTURE.....	29
3 METHODS	30
3.1 PURIFICATION OF ENDO- AND EXO-GLUCANASES	30
3.1.1 Pretreatment of Crude Enzyme	30
3.1.2 Purification of Enzyme.....	30
3.1.3 SDS-PAGE	30
3.1.4 Determination of Enzyme Activity.....	30
3.1.5 Determination of Sugar Content.....	31
3.1.6 Determination of Protein Content	31
3.2 ENZYME CHARACTERIZATIONS.....	31
3.2.1 Determination of Molecular Weight by Sephadex G-100	31
3.2.2 Effects of pH on Enzyme Activity and pH Stability.....	31
3.2.3 Effects of Temperature on Enzyme Activity and Thermostability.....	32
3.2.4 Effects of Substrate Concentration on Enzyme Activity	33
3.2.5 Chemical Modification of Enzyme	32
3.2.6 Inhibition of Acetic Acid, Lactic Acid and Ethanol on Enzyme Activity.....	33
3.3 INACTIVATION KINETICS OF ENZYME IN UREA AND ETHONAL SOLUTIONS	33
3.3.1 Effects of Urea on Enzyme Activity.....	33
3.3.2 Effects of Ethanol on Enzyme Activity	33
3.3.3 Fluorescence Emission Spectrum of Enzyme Denatured in Urea and Ethanol.....	33
3.3.4 Inactivation Kinetics Models of Enzyme Denatured in Urea.....	33
3.4 CELLULASE IMMOBILIZATION	34
3.4.1 Cellulase Immobilized by Sodium Alginate.....	34
3.4.2 Cellulase Immobilized by Polyacrylamide.....	34
3.4.3 Determination of Immobilized Cellulase Activity.....	34
3.5 CBH GENE CLONING BY INVERSE PCR	35
3.5.1 Extraction of Genomic DNA.....	35
3.5.2 Extraction of Total RNA and Synthesis of the First-strand cDNA.....	35
3.5.3 Cloning of <i>cbh</i> Fragment from Genomic DNA.....	35

3.5.4 Cloning of <i>cbh</i> Gene by Inverse PCR	36
3.5.5 Amplification of <i>cbh</i> Gene	37
3.5.6 DNA Electrophoresis	37
3.5.7 DNA Gel Recycle and Ligation	37
3.5.8 Detectation of <i>cbh</i> Gene by QF-PCR	37
3.5.9 Other Methods Used in Gene Cloning	38
3.6 PROTEOMICS OF EXTRACELLULAR DIFFERENTIAL PROTEINS	38
3.6.1 Preparation of Proteins	38
3.6.2 2-D Electrophoresis	38
3.6.3 Yan SN Silver Staining Method	39
3.6.4 Scanning and Image Process	39
3.6.5 Identification of Peptide Mass Fingerprinting	39
4 RESULTS AND ANALYSIS	41
4.1 PURIFICATION OF EXO- AND ENDO-GLUCANASES	41
4.2 ENZYME CHARACTERISATIONS	44
4.2.1 Determination of Molecular Weight	44
4.2.2 Kinetics Parameters	45
4.2.3 pH Effects and pH Stability	46
4.2.4 Temperature Effects and Thermo-stability	47
4.2.5 Effects of Metal Ions on Enzyme Activities	48
4.3 CHEMICAL MODIFICATION OF ENZYME ACTIVE SITE	49
4.3.1 Chemical Modification of His Residues	49
4.3.2 Chemical Modification of Try Residues	49
4.3.3 Chemical Modification of Amino and Carboxylic Groups	49
4.3.4 Chemical Modification of Thiol Groups	50
4.3.5 Chemical Modification of Ser, Disulfide Bonds and Arg Residues	50
4.4 INHIBITION MECHANISMS OF ACETIC ACID, LATIC ACID AND ETHONAL ON ENZYME ACTIVITY	52
4.4.1 Effects of Acetic Acid on Enzyme Activity	52
4.4.2 Inhibition Types and Inhibition Constant of Acetic Acid on Enzyme	53
4.4.3 Effects of Latic Acid on Enzyme Activity	54
4.4.4 Inhibition Types and Inhibition Constant of Latic Acid on Enzyme	55
4.4.5 Effects of Ethonal on Enzyme Activity	57
4.4.6 Inhibition Types and Inhibition Constant of Ethonal on Enzyme	57
4.4.7 Changes of Fluorescence Emission Spectrum of Enzyme after Disturbed by Ethanol	59
4.5 INACTIVATION KINETICS OF CBH IN UREA SOLUTION	60
4.5.1 Effects Urea on CBH Activity	60
4.5.2 Reversible Course of Low Urea Inhibition Effect on CBH	60

4.5.3 Fluorescence Emission Spectrum of CBH Denatured in Urea	60
4.5.4 Comparison of Changes of CBH Activity and Configuration	61
4.5.5 Model Building of Inactivation of CBH in Urea Solution	61
4.5.6 Determination of Inactivation Rate of CBH in Urea Solution	62
4.6 INACTIVATION KINETICS OF EG IN UREA SOLUTION.....	65
4.6.1 Effects of Urea on EG Activity	65
4.6.2 Reversible Course of Low Urea Inhibition Effect on EG.....	65
4.6.3 Fluorescence Emission Spectrum of EG Denatured in Urea.....	66
4.6.4 Comparison of Changes of EG Activity and Configuration	66
4.6.5 Model Building of Inactivation of EG in Urea Solution	67
4.6.6 Determination of Inactivation Rate of EG in Urea Solution	68
4.7 CELLULASE IMMOBILIZED BY ALGINATE SODIUM.....	70
4.7.1 Method of Entrapment-Crosslinking.....	70
4.7.2 Method of Crosslinking- Entrapment.....	73
4.8 CELLULASE IMMOBILIZATION BY POLYACRYLAMIDE	75
4.8.1 Effects of Concentrations of Polyacrylamide on Cellulase Immobilization.....	75
4.9 COMPARISONS OF FREE ENZYME AND IMMOBILIZED ENZYME	76
4.9.1 Recovery of Immobilizer Cellulase.....	76
4.9.2 Optimum pH.....	76
4.9.3 pH Stability	77
4.9.4 Optimum Temperature	78
4.9.5 Thermo- stability	79
4.9.6 Operation Stability	80
4.9.7 Storage Stability	81
4.10 GENE CLONING OF CBH.....	81
4.10.1 Gene cloning of <i>cbh</i> Fragment	81
4.10.2 Amplification of <i>cbh</i> Gene by Inverse PCR.....	83
4.10.3 cDNA Cloning of <i>cbh</i> Gene	86
4.10.4 Amino Acid Sequence Analysis and Structure Prediction	88
4.10.5 Detection of <i>cbh</i> gene by QF-PCR.....	92
4.11 PROTEOMICS OF EXTRACELLULAR DIFFERENTIAL PROTEINS	94
4.11.1 Differential Proteins under Repressed and Induced Conditions	95
4.11.2 Identification of Extracellular Differential Proteins	95
5 DISCUSSION	101
5.1 CELLULASE PURIFICATION AND CHARACTERIZATIONS	101
5.1.1 Purification of Cellulase.....	101
5.1.2 Cellulase Active Sites.....	101
5.2 EFFECTS OF UREA ON ENZYME.....	102

5.3 EFFECTS OF ETHANOL ON ENZYME	103
5.4 CELLULASE IMMOBILIZATION	104
5.5 CBH GENE CLONING.....	104
5.5.1 Extraction of Total RNA	104
5.5.2 Cloning of Sequence Unknown Gene	104
5.5.3 Inverse PCR	105
5.5.4 Regulation of <i>cbh</i> gene.....	106
5.6 PROTEOMICS OF EXTRACELLULAR DIFFERENTIAL PROTEINS	107
5.6.1 Preparation of Proteins.....	107
5.6.2 Identification of Proteins.....	108
6 CONCLUSIONS	109
REFERENCES.....	110
ABBREVIATIONS	132
SUMMARY AND PROSPECTS	133
PUBLICATIONS	134
ACKNOWLEDGEMENT.....	135

摘 要

本研究从灰绿曲霉发酵液中分离纯化出一种外切葡聚糖酶(CBH)和一种内切葡聚糖酶(EG)。Sephadex G-100 凝胶柱层析和 SDS-PAGE 测得 CBH 全酶分子量为 71 kDa, 由两个 35 kDa 亚基组成; EG 为单体蛋白, 全酶分子量为 32 kDa。CBH 催化 *p*NPC 的最适 pH 为 6.0, 最适温度为 55 °C, K_m 值为 1.4 mmol/L, 酶活在 pH 5.0 ~ 8.0 区间和温度低于 55 °C 时稳定; EG 催化 CMC-Na 的最适 pH 为 4.0, 最适温度为 50 °C, K_m 值为 5.0 mg/mL, 酶活在 pH 3.5~ 7.5 区间和温度低于 65 °C 时稳定。 Na^+ 、 K^+ 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 以及 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 对 CBH 和 EG 酶活均无影响; Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对 CBH 有激活作用, Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 对 EG 有激活作用, 而 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对 CBH 和 EG 均有不同程度的抑制效应。乙醇、乙酸和乳酸对 CBH 和 EG 都表现为非竞争性抑制作用。酶的化学修饰结果表明: 组氨酸咪唑基、色氨酸吡啶基、羧基是 CBH 和 EG 酶活性的必需基团; ϵ -氨基和巯基还是 CBH 活性中心的必需基团。

建立酶在脲溶液中的失活作用动力学模型, 比较了游离酶和酶-底物络合物在不同浓度脲溶液中的失活速度常数。结果表明, 底物存在对酶有一定的保护作用。以荧光发射光谱研究酶经不同浓度脲变性后的分子构象变化, 结果显示, CBH 和 EG 经变性后, 338 nm 荧光发射峰逐渐红移, 说明酶分子充分伸展, 变性完全。比较酶经脲变性后的活力与构象变化的关系, 表明酶在脲溶液中的失活先于其去折叠的过程, 这种活力丧失快于酶分子整体构象变化的现象表明酶活性中心处于对变性剂较为敏感的区域。

灰绿曲霉纤维素酶的固定化研究表明, 用海藻酸钠为载体, 采用先包埋后交联的方法对酶进行固定的最佳条件是: 1.0% 海藻酸钠包埋, 1.5% $CaCl_2$ 硬化 1 h, 0.5% 戊二醛交联 2 h; 采用先交联后包埋的方法对酶进行固定的最佳条件是: 0.3% 戊二醛交联 2 h, 1.5% 海藻酸钠包埋, 1.0% $CaCl_2$ 硬化 1 h。用聚丙烯酰胺凝胶为载体时, 胶浓度以 10% 为宜。与游离酶相比, 三种固定化酶的酸碱稳定性和热稳定性都有明显改善。包埋-交联法和交联-包埋法得到的固定化酶最适反应 pH 偏向中性和碱性。聚丙烯酰胺凝胶固定化纤维素酶反复使用 4 次, 每次反应 1 h, 其酶活仍保持在 80% 以上, 具有良好的操作稳定性。三种固定化纤维素酶在 4 °C 放置 3 个月仍有最初酶活的 80% 以上。

通过简并 PCR 和反向 PCR 获得 *cbh* 全长基因(GenBank 收录号 GU385810), 这是从灰绿曲霉中获得的第一个纤维素酶基因。该基因有 2 个内含子, 含 3 个开放阅读框, 编码 505 个氨基酸。荧光定量 PCR 研究表明葡萄糖和纤维二糖抑制 *cbh* 表达; 而 CMC-Na 和微晶纤维素是强烈诱导 *cbh* 表达。

运用双向电泳和MALDI-TOF鉴定了灰绿曲霉在CMC-Na培养时分泌的主要胞外蛋白, 表明该菌株有完整的纤维素降解酶系, 除内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶以外, 还有类几丁质酶和 β -N-乙酰葡萄糖苷酶。

关键词: 灰绿曲霉 纤维素酶 酶学性质 固定化酶 基因克隆 蛋白质组学

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库