

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 32420101152097

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

东方肉座菌纤维素酶基因克隆及其在
毕赤酵母中的表达

Gene cloning of cellulases from *Hypocrea orientalis* and its
expression in *Pichia pastoris*

成奕瑾

指导教师姓名: 龙敏南 教 授

专 业 名 称: 能 源 化 学

论文提交日期: 2013 年 04 月

论文答辩时间: 2013 年 05 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 05 月

东方肉座菌纤维素酶基因克隆及其在毕赤酵母中的表达

成奕瑾

指导教师

龙敏南
教授

厦门大学

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.....	I
Abstract.....	III
1 前言.....	III
1.1 纤维素生物质	1
1.1.1 概述.....	1
1.1.2 纤维素生物质的结构.....	2
1.1.3 纤维素生物质的应用.....	3
1.2 纤维素酶	5
1.2.1 纤维素酶的来源.....	5
1.2.2 纤维素酶的酶学性质.....	6
1.2.3 纤维素酶基因工程研究进展.....	8
1.3 纤维素酶基因在毕赤酵母中的表达	11
1.3.1 毕赤酵母表达系统的特点.....	11
1.3.2 宿主菌株.....	13
1.3.3 表达载体.....	14
1.3.4 外源蛋白高效表达策略.....	15
1.3.5 毕赤酵母表达纤维素酶研究进展.....	17
1.4 本研究目的及主要内容	18
2 材料与amp;方法	19
2.1 实验材料	19
2.1.1 材料与试剂.....	19
2.1.2 常用试剂配方.....	19
2.1.3 培养基.....	21
2.1.4 仪器设备.....	22
2.2 实验方法	22
2.2.1 东方肉座菌 EU7-22 cDNA 的合成.....	22
2.2.2 纤维素酶基因的克隆.....	23
2.2.3 毕赤酵母表达载体的构建.....	27

2.2.4 毕赤酵母的电转化.....	28
2.2.5 转化子的筛选.....	30
2.2.6 重组毕赤酵母的诱导表达.....	30
2.2.7 酶活检测.....	31
2.2.8 粗酶液的 SDS-PAGE.....	33
2.2.9 重组毕赤酵母 GS115- <i>bglI</i> 发酵产酶条件优化.....	34
2.2.10 重组 β -葡萄糖苷酶的酶学性质	35
2.2.11 重组 β -葡萄糖苷酶协同降解纤维素	36
3 结果与讨论	38
3.1 纤维素酶基因在毕赤酵母中的表达	38
3.1.1 东方肉座菌 RNA 的提取	38
3.1.2 纤维素酶基因编码信号肽的分析.....	38
3.1.3 东方肉座菌纤维素酶基因的克隆.....	39
3.1.4 重组质粒的构建.....	44
3.1.5 转化子的筛选和鉴定.....	44
3.1.6 重组毕赤酵母的诱导表达.....	47
3.2 重组毕赤酵母表达 β-葡萄糖苷酶研究.....	54
3.2.1 重组毕赤酵母 GS115- <i>bglI</i> 发酵条件优化.....	55
3.2.2 重组 β -葡萄糖苷酶的酶学性质	58
3.2.3 重组 β -葡萄糖苷酶在纤维素水解中的协同作用	59
4 结论与展望	64
4.1 结论与分析	64
4.2 展望.....	66
参 考 文 献	68
硕士期间发表的论文	77
致 谢.....	78

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 Cellulosic biomass	1
1.1.1 Summary	1
1.1.2 Structure of cellulosic biomass	2
1.1.3 Utilization of cellulosic biomass.....	3
1.2 Cellulase	5
1.2.1 Originate of cellulase	5
1.2.2 Enzymatic properties of cellulase	6
1.2.3 Advances in gene engineering of cellulase	8
1.3 Expression of cellulase gene in <i>Pichia pastoris</i>	11
1.3.1 Characteristic of <i>Pichia pastoris</i> expression system	11
1.3.2 Host strains.....	13
1.3.3 Expression vector.....	14
1.3.4 High level expression strategies by <i>Pichia pastoris</i>	15
1.3.5 Progress of cellulase expression in <i>Pichia pastoris</i>	17
1.4 Purpose and subjects of this research	18
2 Materials and methods	19
2.1 Materials	19
2.1.1 Materials and reagents	19
2.1.2 Formula for reagents	19
2.1.3 Mediums	21
2.1.4 Equipments	22
2.2 Methods	22
2.2.1 Synthesis of cDNA from <i>Hypocrea orientalis</i> EU7-22	22
2.2.2 Gene cloning of cellulases	23
2.2.3 Construction of <i>Pichia pastoris</i> expression vector	27
2.2.4 Electroporation of <i>Pichia pastoris</i>	28
2.2.5 Screening of recombinants.....	30
2.2.6 Induced expression of <i>Pichia pastoris</i>	30
2.2.7 Activity detection of cellulases	31

2.2.8 SDS-PAGE of crude enzyme	33
2.2.9 Fermentation condition optimization of recombinant <i>Pichia pastoris</i> GS115- <i>bglI</i>	34
2.2.10 Enzymatic characteristics of recombinant β -glucosidase	35
2.2.11 Research on synergistic effect of recombinant β -glucosidase in hydrolysis of cellulose	36
3 Results and analysis	38
3.1 Expression of cellulase genes in <i>pichia pastoris</i>	38
3.1.1 Extraction of RNA from <i>Hypocrea orientalis</i>	38
3.1.2 Signal peptide analysis of cellulases.....	38
3.1.3 Gene cloning of cellulases from <i>Hypocrea orientalis</i>	39
3.1.4 Construction of recombinant vector.....	44
3.1.5 Screening and identification of recombinants.....	44
3.1.6 Induced expression of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	47
3.2 Research on β-glucosidase from recombinant <i>pichia pastoris</i>.....	54
3.2.1 Fermentation condition optimization of recombinant <i>Pichia pastoris</i> GS115- <i>bglI</i>	55
3.2.2 Enzymatic characteristics of recombinant β -glucosidase	68
3.2.3 Synergistic effect of recombinant β -glucosidase in hydrolysis of cellulose.....	59
4 Conclusions and prospects	64
4.1 Conclusions and analysis.....	64
4.2 Prospects	66
References	68
Publication	77
Acknowledgment.....	78

摘要

纤维素生物质是地球上最丰富的可再生资源,利用它可以生产燃料乙醇等生物液体燃料,进而缓解全世界日益突出的能源危机和环境污染问题。然而,由于纤维素生物质结构的特殊性,工业上将其水解为可发酵糖的生产成本过高,成为燃料乙醇炼制过程中的瓶颈。纤维素的酶法水解因条件温和、副产物少、环境友好等特点受到广泛重视。利用基因工程手段外源高效表达纤维素酶是降低纤维素酶生产成本的途径之一。

本论文以东方肉座菌 EU7-22 为研究对象,利用 RT-PCR 技术克隆出 7 种纤维素酶基因的 cDNA 序列,包括 β -葡萄糖苷酶 I 基因 (*bglI*),外切葡聚糖酶 I 基因 (*cbhI*),外切葡聚糖酶 II 基因 (*cbhII*),内切葡聚糖酶 I 基因 (*egl*),内切葡聚糖酶 II 基因 (*eglII*),内切葡聚糖酶 III 基因 (*eglIII*) 和内切葡聚糖酶 IV 基因 (*eglIV*)。分别与毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K 连接,重组质粒经电转化法导入毕赤酵母 GS115 中,构建了 7 株纤维素酶表达菌株。经过体积分数为 0.5% 的甲醇诱导,毕赤酵母工程菌株 GS115-*bglI* 能够高效表达 β -葡萄糖苷酶,酶活力为 25 IU/mL;菌株 GS115-*egl*、GS115-*eglII* 和 GS115-*eglIII* 能够高效表达内切葡聚糖酶,活力分别为 0.36 IU/mL、0.57 IU/mL 和 0.36 IU/mL。虽然工程菌株 GS115-*cbhI*、GS115-*cbhII* 和 GS115-*eglIV* 分泌表达了重组酶,却未表现出相应的纤维素酶活性,可能是由于纤维素酶基因自身结构限制或者蛋白质的过度糖基化修饰所致。

优化了高产 β -葡萄糖苷酶的工程菌株 GS115-*bglI* 的发酵产酶条件,在甲醇体积分数为 2.5%,最适 BMGY 培养基 pH 值为 6.5~7.0,最适 BMMY 培养基 pH 值为 6.0~7.0,发酵 168 h,重组酶的活性最高,可达 121 IU/mL。研究了重组 β -葡萄糖苷酶的酶学性质,该酶催化的最适 pH 为 5.0,最适温度为 70℃,在 pH 3.0~8.0 和温度 60℃ 以下酶的稳定性较好。将来源于工程菌株 GS115-*bglI* 的 β -葡萄糖苷酶添加到东方肉座菌的纤维素酶液中协同降解纤维素,结果显示重组 β -葡萄糖苷酶的加入能够有效提高纤维素酶的水解效率,在纤维素酶添加量为 20 IU/g 底物, β -葡萄糖苷酶添加量为 6 IU/g 底物,酶解时间为

48 h 时, 酶解效果最佳, 酶解得率达到 83.03%, 比只添加纤维素酶 (添加量 20 IU/g 底物, 酶解得率 72.95%) 时, 酶解得率提高了 13.8%。

本文的研究验证了东方肉座菌各种纤维素酶基因在毕赤酵母中的表达效果, 为进一步提高纤维素酶的外源表达效果奠定了基础。 β -葡萄糖苷酶高效表达菌株 GS115-*bgII* 在将纤维素生物质降解为葡萄糖并进一步资源化利用方面具有潜在的应用价值。

关键词: 东方肉座菌 纤维素酶 基因克隆 毕赤酵母 表达 纤维素水解

Abstract

Cellulosic biomass is one of the most abundant renewable resources on the earth, which is used to produce fuel ethanol and other bio-liquid fuel. It can alleviate the energy crisis and environmental pollution that become more and more serious. However, due to the special structure of cellulosic biomass, the production cost is too high when convert it into fermentable sugars in industry, which become a bottleneck in the fuel ethanol refining process. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass has caught much attention because of its modest reaction conditions, fewer by-products and environmental friendly. One way to reduce the cost of cellulases production is to construt heterologous expression strains that can highly express cellulose.

In this study, seven cDNA gene sequences of cellulases in *Hypocrea orientalis* EU7-22 were cloned through RT-PCR, including β -glucosidase I gene (*bglI*), cellobiohydrolase I gene (*cbhI*), cellobiohydrolase II gene (*cbhII*), endoglucanase I gene (*egI*), endoglucanase II gene (*egII*), endoglucanase III gene (*egIII*) and endoglucanase IV gene (*egIV*). All of the genes were inserted into the *Pichia* expression vector pPIC9K respectively to construct the recombinant plasmids. The linearized plasmids were transformed into the host strain *Pichia pastoris* GS115 via electroporation and seven cellulase expression strains were established. With the induction of 0.5% (v/v) methanol, the β -glucosidase activity of recombinant *Pichia pastoris* strain GS115-*bglI* was 25 IU/mL. The endoglucanase activity of three recombinant strains, GS115-*egI*, GS115-*egII* and GS115-*egIII*, was 0.36 IU/mL, 0.57 IU/mL and 0.36 IU/mL respectively. However, the engineering strain GS115-*cbhI*, GS115-*cbhII* and GS115-*egIV* expressed recombinant enzymes, they did not show a corresponding cellulase activity due to the structure of genes or the heavily glycosylation of proteins.

The expression level of β -glucosidase secreted by GS115-*bglI* was discussed in shake flask and the parameters were optimized. The optimum volume fraction of methanol was 2.5%, the optimum BMGY medium pH was 6.5 to 7.0, the optimum pH of BMMY medium was 6.0 to 7.0, the optimum fermentation time was 168 h. Under the optium condition, the activity of β -glucosidase could reach 121 IU/mL. Through

the research of recombinant β -glucosidase, The maximum activity was measured at 70 °C and pH 5.0. The enzyme exhibited good stability at pH 3.0~7.0 and under a temperature below 60 °C. The pretreated bamboo was synergistic hydrolyzed by cellulase from *Hypocrea orientalis* EU7-22 and β -glucosidase from recombinant GS115-*bglI*. The hydrolysis yield (%) was calculated by reducing sugar which was determined by DNS method. Cellobiose, glucose and xylose produced during hydrolysis were analyzed by HPLC. For the certain cellulase dosage at 20 IU g⁻¹ substrate and β -glucosidase dosage at 6 IU g⁻¹ substrate, the degree of hydrolysis was 83.03% when hydrolyzed for 48 h. The hydrolysis yield had an increase of 13.8%.

This study verified the effect of cellulases expression in *Pichia pastoris*. It established the foundation for heterogeneous expression of cellulases. At the same time, GS115-*bglI* has great potential on the utilization of lignocellulose degradation.

Keywords: *Hypocrea orientalis*; cellulose; gene cloning; *Pichia pastoris*; expression; synergistic hydrolysis

1 前言

化石能源主要由石油、天然气和煤炭等构成，是当今能源结构的主体，约占世界能源消耗总量的 80% 以上^[1]，在一定程度上决定了经济发展的规模和增长速度。随着世界经济的快速发展，能源消费需求不断增加。据国际能源署（IEA）预计，到 2035 年，全球能源需求量将达到 167.4 亿吨石油当量。然而，化石能源又是不可再生的能源，怎样解决化石能源的有限储量和人类日益增长的能源需求之间的矛盾成为人类社会在 21 世纪面临的巨大挑战。此外，化石燃料在燃烧过程中大量释放 CO_x、SO_x、NO_x 等气体，导致全球气候变暖，形成酸雨，造成臭氧层破坏，生物多样性下降和土壤荒漠化等，严重污染环境。为了实现社会和经济的可持续发展，开发清洁的可再生能源成为解决上述问题的必经之路。

1.1 纤维素生物质

1.1.1 概述

生物质能源是一种重要的可再生能源，在使用过程中，不仅不会净增温室气体排放，还能维持甚至增加土壤的碳储量，从而缓解化石能源短缺和全球环境污染问题。发展生物质能源具有重要的生态环保意义。生物质能源主要包括燃料乙醇、生物柴油、沼气、氢气和燃料电池等。燃料乙醇是目前世界上生产和使用最广泛的生物燃料。将它添加到汽油、柴油中作为燃料，可缓解石油资源短缺，降低汽车尾气污染，减少温室气体排放等^[2]。含乙醇 10%~15% (v/v) 的汽油具有辛烷值高和抗爆性好的优点，且不需要对现有汽车发动机进行改进^[3]。鉴于燃料乙醇的诸多优点，目前世界各国都加大了对它的投入力度。

理论上，任何含有大量糖类物质（包括淀粉或纤维素等）的原料都可用于燃料乙醇的生产。第一代燃料乙醇主要以玉米、小麦等粮食作物为原料，生产成本较高，且存在“与人争粮”的问题，威胁人类粮食安全。第二代燃料乙醇扩大了原料的选取范围，包括粮食植物的茎、叶、表皮如稻草、麦秸秆、玉米秸秆等，还包括芒草、柳枝稷等能源植物，甚至包括木屑、树皮等工业废弃物和果汁制取所剩的果肉纤维^[4]，原料来源如此广泛，生产成本自会显著降低，且能减少 90%

的温室气体排放。因而第二代燃料乙醇具有更强的经济和环境效益。

1.1.2 纤维素生物质的结构

纤维素生物质作为第二代燃料乙醇的主要原料，具有分布广泛，数量巨大，形式多样，价格低廉等优点。它是地球上最丰富的可再生资源，以农作物资源和林业资源的形式广泛存在^[5]。据统计，全世界每年有 1.55×10^{11} 吨植物体干物质生成，纤维素、半纤维素占其总量的 50%。我国是一个农业大国，每年可开发的纤维素生物质资源约有 6 亿吨^[6]，这些纤维原料都可通过一定的方式水解成葡萄糖，并进一步通过微生物发酵转化成乙醇。

天然纤维素原料的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素。三种组分的总和占原料总重量的 80%，其中纤维素含量一般为 35%~50%，半纤维素含量一般为 20%~35%，木质素的含量一般为 5%~30%^[7]。纤维素是不溶于水的链状高分子聚合物，由葡萄糖基通过 β -1,4-葡萄糖苷键连接而成^[8]，直链状纤维素分子以氢键构成平行的微晶束，结构牢固，很难被降解，是纤维素生物质转化为乙醇的技术难点^[9]。半纤维素是由两种或两种以上的单糖基组成的不均一聚糖，主要有木糖、甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖及其衍生物。木质素是一类由苯基丙烷单元通过碳-碳键（C-C）和醚键（C-O-C）连接而成的高分子聚合物。

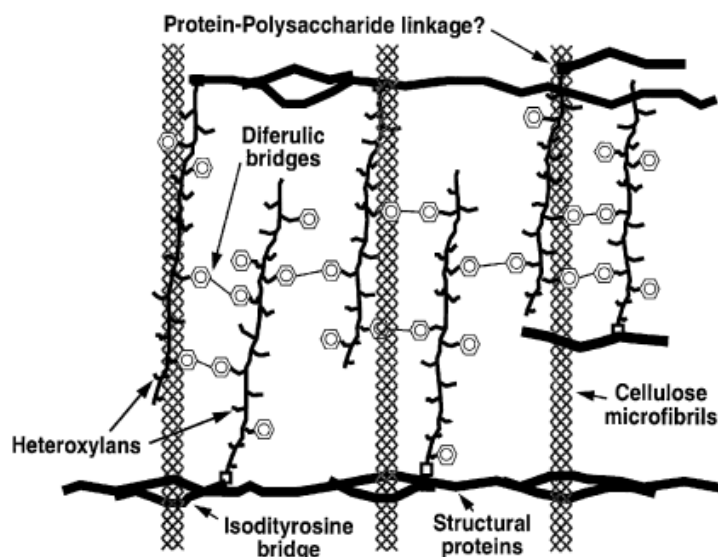


图1-1 纤维素生物质结构示意图

Fig.1-1 The structure of lignocelluloses

天然纤维素材料的结构性质非常复杂，半纤维素主链常以氢键形式与纤维素

的微晶束相连，侧链则通过醛酸或阿魏酸与木质素相连，形成难降解的纤维素/半纤维素/木质素聚合物^[10]（如图 1-1^[11]）。这些都加强了天然纤维素结构的复杂性，因此需要经过预处理使其降解为小分子糖，以便被微生物所利用。

1.1.3 纤维素生物质的应用

目前，纤维素生物质的利用方式渐趋多元化，主要可分为三类：直接燃烧、热化学转换和生物化学转化。纤维素的直燃技术由来已久，长期以来都是我国生物质能利用的主要方式；热化学转换是通过控制反应温度，使生物质气化、炭化、热解和催化液化，以生产气态、液态燃料；生物化学转化是利用生物化学技术将生物质转化为 CH_4 、 H_2 、燃料乙醇或其他生物基化学品。在所有的生物质能中，燃料乙醇具有巨大的发展潜力。

通过生物转化途径生产燃料乙醇主要包括四个步骤：①底物的预处理；②水解糖化；③发酵；④乙醇的分离提取。预处理的主要目的是降低纤维素的分子质量，打开其密集的晶状结构，以利于进一步的分解和转化^[12]。预处理是燃料乙醇生产中关键的第一步，它的效果不仅影响乙醇的最终产率，还直接影响下游的成本。生物质原料的预处理方法有很多，如物理方法、物理-化学方法、化学方法以及生物方法等^[13]。水解糖化主要是将预处理后的纤维素水解为葡萄糖等小分子糖，目前该步骤主要包括酸水解和酶水解^[14]。浓酸水解较早应用于纤维素的糖化，原理是结晶纤维素在较低温度下完全溶解于 72% 的浓硫酸、42% 的盐酸或 77%~83% 的磷酸中，导致纤维素的均相水解，浓硫酸最常用，主要优点是糖的回收率高，约有 90% 的纤维素和半纤维素转化的糖被回收；缺点是具有毒性和腐蚀性，对反应设备要求高，需对酸进行回收^[15]。稀酸水解法的原理是稀酸引起纤维素微细结构（如聚合度、纤维密度、结晶度等）的变化，稀酸预处理现已成功地应用于酶水解预处理，但运用于水解糖化则不合适，原因是：①糖的转化率较低，只有 50%^[16]；②需高温高压条件，能耗大；③水解过程中生成抑制微生物生长的副产物如糠醛等，从而影响后续乙醇发酵；④对木质素脱除效果较差；⑤对反应设备存在腐蚀性^[7]。与之相反，酶法工艺条件温和、产物得率高（转化率 > 90%）、设备简单、能耗低，同时具有副产物少、环境友好等特点^[17]，使得酶解法成为最有前景的水解纤维素的方法^[18]。

预处理后的纤维素生物质经过酶解糖化生成己糖和戊糖等单糖，在酵母等可

产酒化酶的微生物的发酵作用下生成乙醇。根据糖化和发酵的整合程度，这一过程大致可分为四种类型，即分步糖化发酵（SHF）、同步糖化发酵（SSF）、同步糖化共发酵和直接转化法（DMC）。分步糖化发酵是将纤维素酶解反应和己糖发酵分步进行，其优点是二者可在各自的最适条件下进行，酶解最适温度为45~50℃，最适 pH 为 4.5~5.5；乙醇发酵最适温度为 30~35℃，最适 pH 一般为中性。但酶解产物纤维二糖和葡萄糖对纤维素酶有抑制作用^[19]，导致酶解糖化效率不高。同步糖化发酵即纤维素酶解和己糖发酵在同一个反应器中进行，在这一过程中纤维素酶解产生的葡萄糖被微生物迅速利用，解除了葡萄糖的反馈抑制作用，提高了酶解效率。但由于酶解与己糖发酵的最适条件不一致，为了二者兼顾，SSF 采用的温度一般为 37~38℃。同步糖化共发酵，即纤维素酶解、己糖发酵和戊糖发酵同时进行，由于大多数发酵菌种不能同时利用水解液中的混合糖，因而可采用混菌发酵或构建发酵戊糖和己糖生产乙醇的基因工程菌。同步糖化共发酵在同步糖化发酵的基础上进一步简化了设备，缩短了发酵周期。直接微生物转化法是将纤维素酶的生产，纤维素酶解糖化，己糖、戊糖发酵偶合成一步，可减少反应容器，节约成本，但菌种耐乙醇浓度低，副产物多，乙醇得率低，不利于生产^[20]。

燃料乙醇的含水量很小，所含乙醇体积分数大于 99.2%。因此需从生物质发酵液中提纯乙醇，由于乙醇与水可形成共沸物，传统工艺采用蒸馏法，能耗高，所得乙醇中水的体积分数过高（约 5%），若想控制水的体积分数在 1% 以内，就必须采用更高级的脱水工艺，如：渗透汽化、吸附蒸馏、特殊蒸馏、加盐萃取蒸馏、变压吸附和超临界萃取分离等^[21]。

近年来第二代燃料乙醇的生产技术取得了较大的进展，生产成本有所下降，但仍然达不到工业化的要求，表现为：原料容易霉变，贮存技术难度大；预处理过程产生大量抑制纤维素酶活性的有害物质，木质素的脱除成本过高，技术需要突破；纤维素酶生产菌株的产酶活性不高，生物酶的回收利用难度较大，导致成本偏高；发酵过程中对戊糖利用还存在技术瓶颈，导致资源的浪费；现有的蒸馏工艺能耗大，成本高，有必要开发先进的乙醇发酵与精馏工艺设备。

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫