

# $\beta$ -葡萄糖苷酶的异源表达及与纤维素酶协同酶解竹纤维\*

成奕瑾<sup>1</sup>, 张婷<sup>2</sup>, 黎海龙<sup>1</sup>, 龙传南<sup>1</sup>, 刘健<sup>1</sup>, 龙敏南<sup>1†</sup>

(1. 厦门大学能源研究院, 厦门 361102; 2. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361102)

**摘要:** 在毕赤酵母 GS115 中表达东方肉座菌 EU7-22 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*bgII*), 获得基因工程菌株 BP17。优化 BP17 发酵产酶条件后, 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力达 121 IU/mL。酶学性质研究表明, 该酶最适反应温度为 70 °C, 在 60 °C 以下有较好的热稳定性; 最适催化 pH 为 5.0, 在 pH 3.0 ~ 8.0 之间有较好的稳定性。将异源表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加到东方肉座菌的纤维素酶液中协同降解经过预处理的竹纤维, 当纤维素酶添加量为 FPA 20 IU/g 底物,  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量为 BG 6 IU/g 底物时, 纤维二糖浓度显著下降, 酶解得率达到 83.03%, 表明重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的加入更有利于纤维素的酶解糖化。

**关键词:** 东方肉座菌; 纤维素酶;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 毕赤酵母; 异源表达; 协同酶解

中图分类号: TK6; Q786

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.2095-560X.2013.03.005

## Heterologous Expression of the $\beta$ -Glucosidase and Its Synergistic Hydrolysis of Bamboo with Cellulase

CHENG Yi-jin<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>2</sup>, LI Hai-long<sup>1</sup>, LONG Chuan-nan<sup>1</sup>,  
LIU Jian<sup>1</sup>, LONG Min-nan<sup>1</sup>

(1. School of Energy Research, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** The  $\beta$ -glucosidase gene (*bgII*) from *Hypocrea orientalis* EU7-22 was cloned and effectively expressed in *Pichia pastoris* GS115. The  $\beta$ -glucosidase activity expressed by recombinant strain BP17 reached 121 IU/mL. The expressed  $\beta$ -glucosidase exhibited the optimum catalytic activity at 70 °C and pH 5.0. The enzyme exhibited good stability at pH 3.0 ~ 8.0 and remained 65% of its original activity after 1 h at 60 °C. The pretreated bamboo cellulose was synergistic hydrolyzed by the cellulases from *Hypocrea orientalis* EU7-22 and the recombinant  $\beta$ -glucosidase from strain BP17. Supplementing recombinant  $\beta$ -glucosidase greatly reduced the inhibitory effect caused by cellobiose, and the hydrolysis yield was improved to 83.03% with enhanced  $\beta$ -glucosidase activity of 6 IU/g substrate. The results indicated the recombinant  $\beta$ -glucosidase significantly boost the efficiency of saccharification.

**Key words:** *Hypocrea orientalis*; cellulase;  $\beta$ -glucosidase; *Pichia pastoris*; heterologous expression; synergistic hydrolysis

## 0 引言

木质纤维素生物质是地球上最丰富的可再生资源, 如今化石燃料日益短缺, 在未来数十年内, 生物质有望扮演石油在 20 世纪的角色<sup>[1]</sup>。木质纤维素生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素等构成。纤维素是由葡萄糖基通过  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键连接而成的高分子聚合物, 通过物理法、化学法和生物法可将纤维素降解为葡萄糖, 葡萄糖再经微生物

转化为乙醇等液体燃料。纤维素的生物降解关键在纤维素酶, 纤维素酶是一个复杂的酶系, 它由内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶 (EG, EC 3. 2. 1. 4)、外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶 (CBH, EC3. 2. 1. 91) 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (BG, EC 3. 2. 1. 21) 等组成, 通过三种酶的协同作用, 将纤维素降解为葡萄糖等单糖<sup>[2]</sup>。

在利用纤维素酶水解纤维素的过程中, 水解中间产物纤维二糖和终产物葡萄糖是内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶和外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶的强抑制剂<sup>[3,4]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶

\* 收稿日期: 2013-11-06 修订日期: 2013-11-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2010CB732201); 国家自然科学基金 (31170067); 中央高校基本科研业务费专项资金 (201112G026)

† 通信作者: 龙敏南, E-mail: longmn@xmu.edu.cn

的加入能够有效降低纤维二糖对内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的抑制作用<sup>[5]</sup>。因此,增强  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力是提高纤维素酶水解效率和葡萄糖产率的关键措施之一。

东方肉座菌 (*Hypocrea orientalis*) EU7-22 为木霉属 (*Trichoderma*) 真菌,是本课题组通过筛选、诱变获得的一株纤维素酶产生菌株。据研究<sup>[6]</sup>,此菌株的滤纸酶活 (FPA) 偏低,为 0.48 IU/mL,  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力也仅为 0.55 IU/mL。在利用该菌所产纤维素酶对纤维素进行降解时,较低的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力导致纤维二糖的积累,最终限制其对纤维素的降解。利用基因工程手段外源高效表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶,再复配到东方肉座菌粗酶液中进行纤维素的酶解糖化是解决此问题的手段之一。

本研究成功构建高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的毕赤酵母工程菌株,利用酵母生长快、易于培养等特点,可短时间内大量获得  $\beta$ -葡萄糖苷酶,将其添加到东方肉座菌所产纤维素酶液中协同降解纤维素底物,对研究纤维素的降解和资源化有着重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

东方肉座菌 EU7-22、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、毕赤酵母 GS115 均为本实验室保藏,表达质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司,质粒 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

#### 1.1.2 培养基

东方肉座菌 MENDELS 培养基<sup>[7]</sup>、PDA 培养基,大肠杆菌 LB 培养基见《分子克隆实验指南》(第三版),酵母 YPD、MM、MD、BMGY、BMMY 培养基的配制参照 Invitrogen 公司操作手册。

#### 1.1.3 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶、RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;DNA 纯化回收试剂盒,普通质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;蛋白质和 DNA 分子量标准购自 Fermentas 公司;胰蛋白胨、酵母浸出粉、琼脂、山梨醇、酵母基础氮源培养基、生物素购自上海生工生物工程公司。

### 1.2 *bgII* 基因的克隆

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

将活化的东方肉座菌 EU7-22 菌体接入 50 mL PDA 液体培养基中,摇床培养 24 h (30 $^{\circ}$ C, 180 r/min),

取 5 mL 接入 50 mL 芒草诱导培养基中培养 48 h,收集菌丝体,根据试剂盒说明书提取总 RNA。以总 RNA 为模板、按照 RT-PCR 试剂盒说明进行反转录,获得 cDNA。

#### 1.2.2 PCR 扩增 *bgII* 基因

根据 NCBI 数据库中东方肉座菌 EU7-22 的 *bgII* 基因全长序列 (No. JQ904600),设计一对引物 *bgIF*: GAATTCGTTGTACCTCCTGCAGGGACT (划线部分为 *EcoR* I 酶切位点) 和 *bgIR*: GCGGCCGCCTACGCTACCGACAGAGTGCT (划线部分为 *Not* I 酶切位点),以 cDNA 为模板扩增去掉信号肽序列的 *bgII* 基因。PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞后送测序公司测序。

### 1.3 基因工程菌株的构建

*bgII* 基因的成熟蛋白编码序列经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后插入毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K 的多克隆位点,得到重组质粒 pPIC9K-*bgII*,并对该质粒进行限制性酶切及测序鉴定。

根据 Invitrogen 公司毕赤酵母表达系统操作手册,用限制酶 *Bgl* II 线性化重组质粒 pPIC9K-*bgII*,利用电转化方法导入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中。将电转后的菌液涂布在 MD 平板上,培养 72 h (30 $^{\circ}$ C) 至长出单菌落,分别点种于 MM 和 MD 平板上。挑取在 MD 平板上生长而在 MM 平板上不生长或生长缓慢的菌落,分别点种于含 1.00、2.00、3.00 和 4.00 mg/mL G418 的 YPD 培养基平板上,以筛选多拷贝转化子。

培养有较高 G418 抗性水平的阳性菌株,参照毕赤酵母操作手册提取转化子的基因组 DNA,使用 pPIC9K 载体上 *AOX1* 通用引物进行 PCR 鉴定,获得重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-*bgII*。

### 1.4 转化子的诱导表达

重组子 GS115/pPIC9K-*bgII* 在 100 mL BMGY 培养基中培养 24 h (30 $^{\circ}$ C, 250 r/min),至  $OD_{600}$  为 2.0 ~ 6.0,离心收集菌体,加入 20 mL BMMY 培养基继续培养,每 12 h 补加 0.5 mL 甲醇诱导 *bgII* 基因的表达,同时取 0.5 mL 菌液测定菌体密度,再离心取上清液测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,绘制菌体生长曲线及产酶曲线,并对各时段发酵上清液进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定

采用对-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (pNPG) 为底物进行  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定。用 0.1 mol/L 柠檬

酸缓冲液 (pH 5.0) 将发酵上清液稀释至一定倍数, 取 50  $\mu\text{L}$  稀释后的酶液与 50  $\mu\text{L}$  pNPG (5 mmol/L) 溶液混合, 50 $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 30 min 后立即加入 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 mol/L) 溶液终止反应, 室温放置 5 min, 测定 405 nm 下的吸光值。酶活定义: 每分钟分解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  pNP 所需酶量定义为一个酶活力单位 (IU)。

### 1.6 滤纸酶活的测定

以 Whatman NO.1 滤纸为底物, 测定纤维素酶总活力。将滤纸一条 (6 cm  $\times$  1 cm, 约 50 mg) 卷成小卷, 放入 25 mL 具塞试管底部, 向试管中加入 1.5 mL 柠檬酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH = 4.8), 再加入用相同缓冲液适当稀释的酶液 0.5 mL, 轻轻摇匀后置于 50 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 1 h, 之后按 DNS 法测定糖浓度。以 100 $^{\circ}\text{C}$  水浴灭活 5 min 的稀释粗酶液为空白对照。一个滤纸酶活 (FPA) 国际单位 (IU) 定义为: 每分钟水解滤纸生成 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量。

### 1.7 酶学性质分析

以 pNPG 为底物, 测定不同 pH 值 (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 条件下重组酶活力, 确定酶的最适反应 pH。为确定酶的 pH 稳定性, 用最适反应 pH 的柠檬酸缓冲液稀释粗酶液, 分别于 25 $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, 测定剩余酶活力。将 0 h 酶液作为对照, 计算相对酶活力。测定不同温度 (30 $^{\circ}\text{C}$ , 40 $^{\circ}\text{C}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$ , 60 $^{\circ}\text{C}$ , 70 $^{\circ}\text{C}$ , 80 $^{\circ}\text{C}$ , 90 $^{\circ}\text{C}$ ) 条件下酶活力, 确定  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适催化温度。在以上温度下各保温 1 h 后测定剩余酶活力, 确定其对温度稳定性。

### 1.8 重组毕赤酵母表达条件的优化

在摇瓶水平, 对 GS115/pPIC9K-*bgII* 发酵产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的条件进行优化。设定不同甲醇添加量, 初始 pH 值, 诱导 pH 值等发酵条件 (具体见结果与讨论), 选取诱导第 96 h 的发酵液测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力。在最适发酵条件下培养该菌以确定产酶的最佳时间。

### 1.9 重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶与纤维素酶协同降解竹纤维

对姚秀清等<sup>[8]</sup>介绍的碱性双氧水预处理木质纤维素方法稍作改进, 预处理产自福建三明的毛竹纤维素, 获得已除去大部分木质素和半纤维素的竹纤维。采用意大利 VELP 公司的 FIWE3/6 纤维素测定仪测定竹纤维中各组分含量。

利用东方肉座菌所产纤维素酶与重组子所产  $\beta$ -葡萄糖苷酶协同作用, 共同水解竹纤维。酶解总

体系为 100 mL, 竹纤维质量浓度为 10 g/L, 加入一定量的纤维素酶液和重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶液, 用柠檬酸缓冲液补足至 100 mL, 再加入终浓度为 0.05% 的叠氮钠作为防腐剂。置于摇床 (50 $^{\circ}\text{C}$ , 130 r/min) 中水解。

每隔 12 h 取出 1 mL 糖化液, DNS 法测定其中的还原糖含量, 按下述公式计算酶解得率: 酶解得率 (%) =  $\text{MG} \times 100 \times 0.9 / (\text{MC} + \text{MH})$ , 其中 MG 为 100 mL 体系中还原糖含量 (g), MC 为 1 g 底物中纤维素含量 (g), MH 为 1 g 底物中半纤维素含量 (g)。

同时用 Waters 高效液相色谱仪测定酶解液中纤维二糖、葡萄糖和木糖的含量, 具体操作如下: 发酵液于 12000 r/min 条件下离心 2 min, 上清液用超纯水稀释一定倍数后, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤三次, 进样测定, 外标法定量。色谱条件为: Aminex HPX-87H (300 mm  $\times$  7.8 mm) 有机酸柱; Waters 2414 示差折光检测器; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ; 5 mM 稀硫酸作流动相, 流速 0.5 mL/min; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因工程菌株的构建

#### 2.1.1 *bgII* 基因的克隆

去掉信号肽序列后的 *bgII* 基因 cDNA 序列全长 2142 bp, 编码 713 个氨基酸, 与报道<sup>[6]</sup>的基因序列相似率为 100%。

#### 2.1.2 重组质粒的构建

重组质粒 pPIC9K-*bgII* 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 得到的片段长度分别 9.3 kb 和 2.2 kb, 证实已成功将 *bgII* 基因插入载体 pPIC9K 中。测序表明, *bgII* 位于 pPIC9K 甲醇启动子的下游, 并具有正确的阅读框。

#### 2.1.3 重组子的筛选和鉴定

pPIC9K-*bgII* 电转化毕赤酵母 GS115 后, 将 MD 平板上长出的单菌落分别接种到 MM 和 MD 平板上筛选 Muts 型转化子, 接着在含有 4.00 mg/mL G418 的平板上筛选到 12 个转化子。按照 Muts 型毕赤酵母的培养方法对挑选出的阳性转化子进行甲醇诱导培养, 取发酵第 96 h 上清液进行活性检测, 挑选一株酶活最高的菌株 BP17 进行后续研究。

### 2.2 重组子的诱导表达及表达产物的检测

采用两步发酵法对 BP17 进行甲醇诱导表达, 结果如图 1 所示。酶活力随时间的增加而提高, 在诱

导培养 144 h 最高, 达 25 IU/mL; 由于初始菌体浓度较高, 菌体生长到 36 h 即达到稳定期, 至第 144 h 菌体密度为 82 mg/mL。

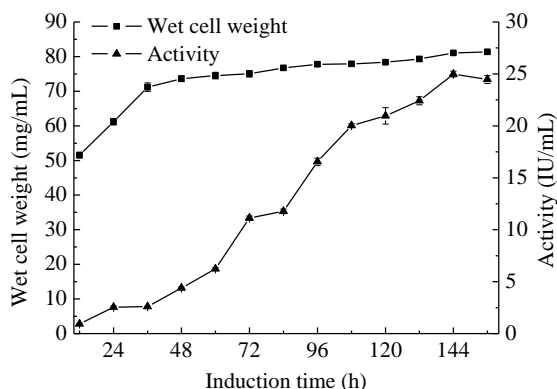


图1 重组毕赤酵母 BP17 发酵产  $\beta$ -葡萄糖苷酶进程

Fig. 1 Time course of  $\beta$ -glucosidase production by recombinant strain BP17

对各时段上清液进行 SDS-PAGE 分析 (图 2)。表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶  $M_r$  约为 76 kDa。Bradford 法测定第 144 h 粗酶液蛋白质含量为 443.2  $\mu$ g/mL。

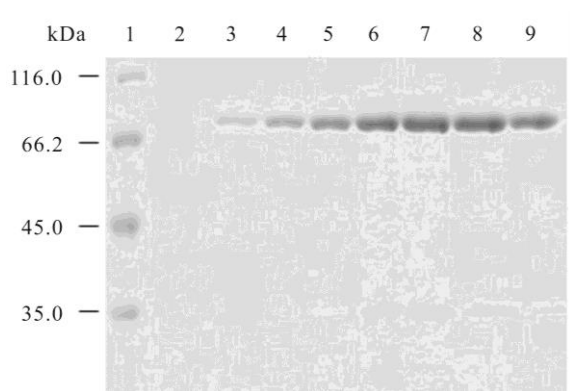


图2 重组毕赤酵母表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed product

1: Protein marker; 2: GS115/pPIC9K induced product; 3-9: GS115/pPIC9K-bglI induced for 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h respectively

### 2.3 重组表达产物的酶学性质

以 pNPG 为底物, 测得  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 为 5.0, 在 pH 3.0 ~ pH 8.0 范围内, 酶的稳定性较好, 在 pH 4.0 ~ pH 6.0 条件下, 室温保温 1 h 能保留 90% 以上的活力 (图 3)。

在最适反应 pH 下测得  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 70 $^{\circ}$ C, 当升至 80 $^{\circ}$ C 时酶活力迅速下降。重组酶在 50 $^{\circ}$ C 以下有很好的稳定性, 保温 1 h 后相对酶活力仍在 95% 以上。随着温度的升高, 酶趋于不

稳定, 在 60 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 酶的相对酶活力为 65%, 当温度达到 80 $^{\circ}$ C 时, 该酶的相对酶活力几乎为 0 (图 4)。

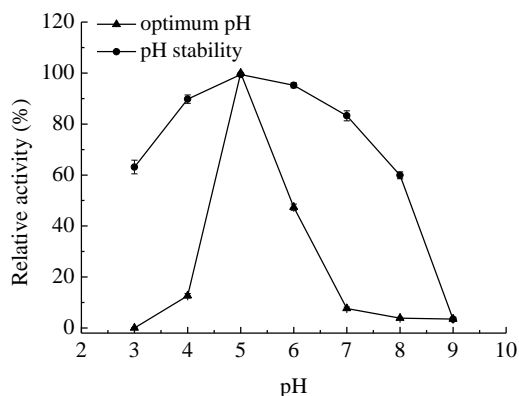


图3 pH 对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力及稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the activity and stability of recombinant  $\beta$ -glucosidase

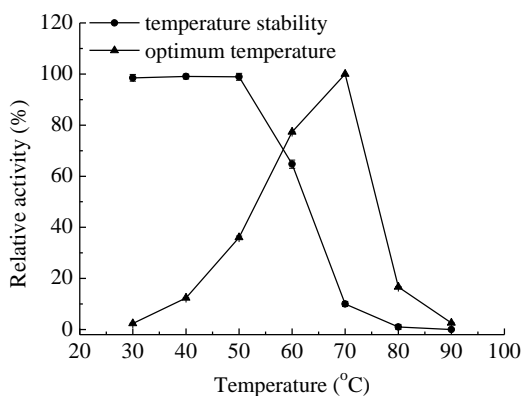
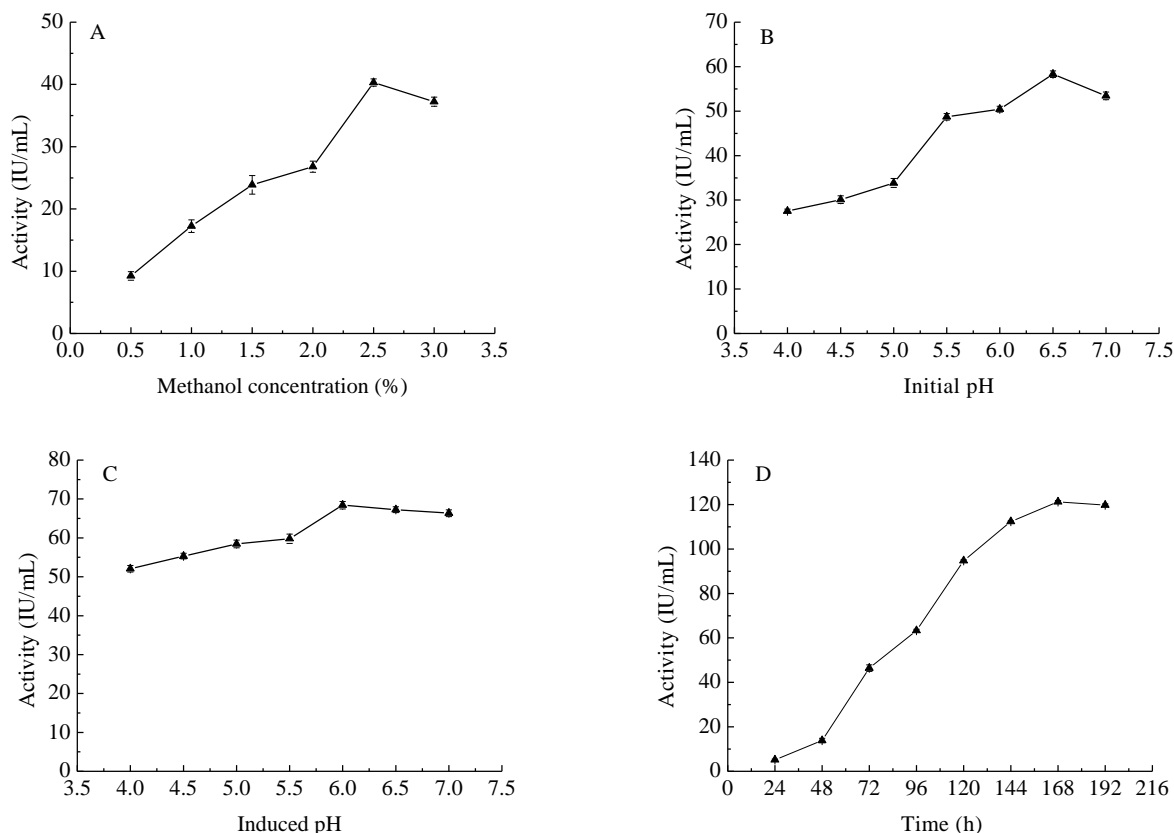


图4 温度对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力及稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity and stability of recombinant  $\beta$ -glucosidase

### 2.4 表达条件的优化

发酵条件对外源蛋白在毕赤酵母中的表达有较大影响, 本文优化了发酵过程中甲醇添加量, 初始 pH 值, 诱导 pH 值以及发酵时间等条件。结果如图 5 (A, B, C, D) 所示。在诱导阶段, 甲醇体积分数为 2.5% 时重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力最高 (图 5A)。当 BMGY 生长培养基 pH 值接近中性 (6.5 ~ 7.0) 时, 更有利于重组酶的表达 (图 5B)。当 BMMY 诱导培养基 pH 值在 6.0 ~ 7.0 时, 发酵液中重组酶的活力最高 (图 5C)。最后, 优化了重组酵母在最优条件下的培养时间, 诱导 144 h 酶活达到最大值 121 IU/mL (图 5D), 其活性为优化前的 4.84 倍, 与 Chen 等<sup>[9]</sup>在毕赤酵母中表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力 (60 IU/mL) 相比, 也有较大的提高。

图 5 BP17 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵条件优化Fig. 5 Conditions optimization of  $\beta$ -glucosidase produced by strain BP17

A: Methanol concentration on activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase; B: Effect of initial pH value on activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase; C: Effect of induced pH value on activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase; D: Effect of time on activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase

## 2.5 重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶与纤维素酶协同降解竹纤维

本研究将重组毕赤酵母 BP17 所产  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加到东方肉座菌 EU7-22 所产纤维素酶液中协同降解竹纤维 (纤维素、半纤维素、木质素含量分别为 82.04%、6.46%、4.83%)。纤维素酶添加量为 FPA 20 IU/g 底物,  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量从 0 ~ 10 IU/g 底物不等。测定酶解第 48 h 体系中各糖的浓度, 结

果如表 1 所示。在添加量为 0 ~ 6 IU/g 底物范围内, 随着  $\beta$ -葡萄糖苷酶含量的增加, 还原糖浓度和酶解得率都有所增加, 但继续增加  $\beta$ -葡萄糖苷酶的用量, 酶解效果并未发生太大的改变, 说明最适  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量为 6 IU/g 底物。 $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量仅为 2 IU/g 底物时, 纤维二糖的含量就已经显著下降, 由 0.92 g/L 降至 0.29 g/L, 说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶的加入对纤维二糖的降解作用很明显。

表 1  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量对酶解的影响Table 1 Effects of adding  $\beta$ -glucosidase to *Hypocrea orientalis* cellulases on the enzymatic hydrolysis

Dosages of BG (IU/g substrate)	Sugar concentration in hydrolysate (g/L)			Reducing sugar (g/L)	Hydrolysis yield (%)
	Cellobiose	Glucose	Xylose		
0	0.92	4.76	1.00	6.53	72.95
2	0.29	4.96	1.01	6.81	76.10
4	0.19	5.51	1.01	7.10	79.32
6	0.14	6.01	1.03	7.43	83.03
8	0.13	6.35	1.05	7.47	83.48
10	0.10	6.40	1.06	7.49	83.70

### 3 结论

丝状真菌是一类产纤维素酶能力较高的微生物,但普遍存在产 $\beta$ -葡萄糖苷酶能力不足的情况<sup>[10]</sup>,从而影响其对纤维素的降解效果。本文利用基因工程手段异源高效表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶,再复配到纤维素酶中以增强其对纤维素的降解效果。

毕赤酵母表达系统是理想的真核蛋白表达系统,可高密度发酵,转化子能稳定地表达外源蛋白,适合工业生产<sup>[11]</sup>。目前已从里氏木霉、黑曲霉等多种真菌克隆到 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因并成功在毕赤酵母中表达<sup>[12-14]</sup>。

克隆到东方肉座菌 EU7-22 的 *bgII* 基因,并在毕赤酵母中表达,获得基因工程菌株 BP17。表达产物在最佳条件下 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力可达 121 IU/mL,是出发菌株等量粗酶液活力(0.55 IU/mL)的 220 倍。酶学性质研究表明,该酶催化的最适 pH 为 5.0,最适温度为 70℃,在 pH 3.0 ~ pH 8.0 和温度 60℃ 以下较稳定。

$\beta$ -葡萄糖苷酶的添加显著提高了纤维素酶对底物的降解效率,在纤维素酶用量为 20 IU/g 底物, $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量为 6 IU/g 底物时,酶解得率最高可达到 83.03%,比只添加纤维素酶时提高了 13.82%。Chen 等<sup>[15]</sup>从黑曲霉中纯化到 $\beta$ -葡萄糖苷酶,并添加到里氏木霉的纤维素酶液中,添加量为 6.5 IU/g 底物时,水解得率达 83.9%,本研究结果与之相近。说明在纤维素酶原酶液中添加 $\beta$ -葡萄糖苷酶有利于纤维素的降解。毕赤酵母工程菌株 BP17 在木质纤维素降解方面具有潜在的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [2] Bhat M K, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. Biotechnology Advances, 1997, (15): 583-620.
- [3] Gruno M, V äjam ä P, Pettersson G, et al. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate[J].

- Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86: 503-511.
- [4] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1990, (36): 275-287.
- [5] Andrić P, Meyer A S, A Jensen P, et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocelluloses hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes[J]. Biotechnology Advances, 2010, (28): 308-324.
- [6] 龙传南, 成奕瑾, 郭小兵, 等. 东方肉座菌 EU7-22 纤维素酶基因的克隆及序列分析[J]. 生物技术通报, 2012, (11): 110-117.
- [7] Wyk van JPH, Mohulatsi M. Biodegradation of waste paper by cellulase from *Trichoderma viride*[J]. Bioresource Technology, 2003, 86(1): 21-23.
- [8] 姚秀清, 张全, 杨翔华, 等. 碱性双氧水法预处理木质纤维素[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(3): 34-37.
- [9] Chen P, Fu X Y, Tzi B N, et al. Expression of a secretory  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33: 2475-2479.
- [10] Tiwari P, Misra B N, Sangwan N S.  $\beta$ -glucosidase from the fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 1-10.
- [11] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expressing in yeast: A review[J]. Yeast, 1992, 8: 423-488.
- [12] Yang B, Willies D M, Wyman C E. Changes in the enzymatic hydrolysis rate of avicel cellulose with conversion[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94(6): 1122-1128.
- [13] Kawai R, Yoshida M, Tani T, et al. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium*  $\beta$ -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2003, 67(1): 1-7.
- [14] Hong J, Tamaki H, Kumagai H, et al. Cloning and functional expression of thermostable  $\beta$ -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73: 1331-1339.
- [15] Chen M, Xia L M, Xue P J. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59: 85-89.

#### 作者简介:

成奕瑾(1986-),女,硕士研究生,主要从事生物能源研究。

龙敏南(1965-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物质转化制生物基燃料与生物基化学品的研究与技术开发。