

产外切葡聚糖酶真菌的筛选鉴定及毕赤酵母中的表达

唐自钟¹ 刘珊^{1,2} 韩学易¹ 晋海军¹ 陈惠^{1*} 刘默洋¹ 单志¹ 吴琦¹

(1. 四川农业大学 生命科学与理学院 四川 雅安 625014)

(2. 攀枝花学院 生物与化学工程学院 四川 攀枝花 617000)

摘要:【目的】外切葡聚糖酶是纤维素酶组分中一类对结晶纤维素有降解作用的酶类, 如何提高外切葡聚糖酶活力是研究的关键问题。【方法】从筛选鉴定得到的一株产外切葡聚糖酶活力较高的黑曲霉 Asp-524 菌株出发, 通过 PCR 技术克隆得到外切葡聚糖酶基因序列, 生物学信息分析后, 构建了毕赤酵母诱导型表达载体, 实现了该基因在毕赤酵母中的成功表达。【结果】抗性筛选得到的阳性转化子, 用终浓度为 1% 甲醇诱导 5 d 后, 酶活达到 4.74 U/mL。酶学性质分析显示重组外切葡聚糖酶最适 pH 为 5.0, pH 稳定性分析显示在 pH 为 4.0–6.0 范围内相对稳定, 酶活能保持在最高酶活力的 80% 以上, 最适反应温度为 50 °C, 经 60 °C 保温 1 h 后, 酶活仍能保持 80% 以上。【结论】结果说明该外切葡聚糖酶具有较好的热稳定性和 pH 稳定性, 这一研究为纤维素酶的实际应用奠定了一定基础。

关键词: 黑曲霉 Asp-524, 外切葡聚糖酶, 毕赤酵母, 菌种鉴定

Screening and identification of exo-1,4- β -D-glucannase-producing fungi, and its expression in *Pichia pastoris*

TANG Zi-Zhong¹ LIU Shan^{1,2} HAN Xue-Yi¹ JIN Hai-Jun¹ CHEN Hui^{1*} LIU Mo-Yang¹
SHAN Zhi¹ WU Qi¹

(1. College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

(2. Department of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China)

Abstract: [Objective] Exoglucanases is a class of cellulase which could degradation crystalline cellulose. Nowadays, how to improve the exoglucanase activity is of importance. [Methods] In this study, strain ASP-524, possessing higher level of cellobiohydrolase, was identified as *Aspergillus niger*. The *cbhB* gene was cloned from strain ASP-524, and expressed in *Pichia pastoris* GS115. [Results] After the induction of 1% methanol for 5 d, the expression strain reached a cellulase activity of 4.74 U/mL. The recombinant exoglucanase was a 57 kD protein with an optimum catalytic activity at pH 5.0 and 50 °C. [Conclusion] The enzyme was stable. The recombinant exoglucanase

基金项目: 四川省科技厅科技支撑项目(No. 2008Z0150)

*通讯作者: Tel: 86-835-2886126; 信箱: chenhui@sicau.edu.cn

收稿日期: 2013-05-08; 接受日期: 2013-07-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

was relatively stable in a broad pH range, from 4.0 to 6.0, and retained 80% activity.

Keywords: *Aspergillus niger* Asp-524, Exoglucanase, *Pichia pastoris*, Strain identification

随着社会的高速发展,在食品加工过程中,食品添加剂的可靠性等食品安全问题越来越受到人们的关注,纤维素酶作为一种蛋白酶类是安全可食用的食品添加剂,其在榨汁及蔗糖的生产中应用较广,同时纤维素酶在扩大食品工业原料和植物原料的综合利用,提高原料利用率,净化环境和开辟新能源等方面也具有十分重要的意义,且有望解决自然界不断产生的固体废物问题。纤维素酶在动物饲料、纺织、食品加工、污水处理、中草药有效成分提取等行业得到广泛应用,有效地改善产品质量,提高产量,具有良好的经济效益^[1-3]。

纤维素酶在食品加工中有极大的应用,在果实和蔬菜加工中,可使组织软化膨润降低果蔬的香味和维生素损失,分解果实和蔬菜,制成的果酱口感好,同时还可以利用纤维素酶分解蘑菇,制造新的调味料;在大豆加工过程中,乞永立等利用纤维素酶处理大豆,从而提高了优质水溶性蛋白质和油脂的获得率^[4];阎训友等用沸水浸泡茶叶和纤维素酶结合法,缩短了抽提时间,提高了水溶性较差的茶单宁、咖啡因等的抽提率,并保持了茶叶原有的色、香、味^[3]。纤维素酶在烟草改良、酒精发酵、酱油酿造、饮料行业中也有一定的应用。此外,纤维素酶在纺织、造纸等方面均有很大的应用潜力,还可应用于医药保健、石油开采、新型能源、环保以及洗涤剂等行业,而且还有一些很有价值的应用领域正在开拓^[1,3-4]。

外切葡聚糖酶是纤维素酶系中一类主要的酶,

是一类对纤维素结晶区起作用的纤维素酶类,在外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶 3 种酶协同作用下,将木质纤维素最终降解成为还原糖,在木质纤维素中纤维素主要的存在形态为结晶状态,这一特殊的结构对于纤维素的降解是最大的难点,外切葡聚糖酶(*cbh*)是纤维素酶中一类能结合到结晶纤维素区域,从还原端和非还原端使其结构变得疏松而有利于其它纤维素酶类进入到纤维素的内部,从而起到降解作用的一类酶组分^[5]。当今对于纤维素酶的研究很多,但大都集中在对内切葡聚糖酶和 β-葡聚糖苷酶的研究,对于外切葡聚糖酶的研究主要集中在外切葡聚糖酶 A (*cbhA*),而关于外切葡聚糖酶 B (*cbhB*)的研究较少。为推动纤维素酶的工业化应用进程,由于作用的特殊性,*cbh* 基因的克隆表达就成为了必然。

1 材料与方

1.1 菌株和质粒

本实验所用菌株和载体列于表1。

1.2 培养基和试剂

限制性内切酶(*Sal* II, *Xba* I)、DNA Marker、*Taq* DNA Polymerase、dNTPs、T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素钠、蛋白质分子量标准(低)购于大连宝生物公司;质粒提取试剂盒, DNA凝胶回收试剂盒购自美国OMEGA生物技术公司; SDS-PAGE试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

表1 本实验所用的菌株与载体		
Table 1 The strains and vectors used in this experiment		
菌株和载体 Strains and vectors	功能 Function	来源 Source
<i>Escherichia coli</i> DH5α	克隆宿主细胞	本实验室保存
pMD19-T	克隆载体	本实验室保存
<i>Aspergillus niger</i> Asp-524	产外切葡聚糖酶菌种	采样筛选得到
GS115	用于表达的宿主菌株	本实验室保存
pPICZαA	外切葡聚糖酶重组表达载体	本实验室保存

培养基为 LB 培养基(1 L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g; 酵母培养基 YPD (1 L): 葡萄糖 20 g, 胰腺蛋白胨 1 g, 酵母粉 5 g; PDA 培养基(1 L): 马铃薯(去皮) 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, pH 值自然; 纤维素选择培养基 A (1 L): 蛋白胨 10 g, 酵母粉 10 g, 羧甲基纤维素钠 10 g, 刚果红 0.2 g, NaCl 5 g, KH_2PO_4 1.0 g, 琼脂粉 20 g; 选择培养基 B (1 L): K_2HPO_4 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, 微晶纤维素粉 1.88 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂 14 g, 明胶 2 g, pH 自然; 液体种子培养基(1 L): 复合蛋白胨 10 g, 葡萄糖 10 g, 酵母膏 10 g, pH 7.0; 液态发酵培养基(1 L): 稻草 4 g, 麸皮 1 g, 磷酸铵营养液 12.5 mL, 调 pH 值至 6.0–7.0。

1.3 方法

1.3.1 产外切葡聚糖酶真菌的筛选: 初筛: 称取 1.0 g 新鲜采集样品放入小三角瓶中, 加入无菌水 9.0 mL 和几粒无菌玻璃珠, 经高速振荡混匀后静置, 取上清液以不同浓度梯度涂布于纤维素选择培养基 A 上, 30 °C 培养 2–3 d 后, 用接种环挑取单菌进行划线接种于选择培养基 B 上, 30 °C 恒温培养 2–3 d, 选择透明水解圈直径最大的单菌落进行保种。复筛: 将初筛得到的菌落以单菌落的形式接种于液体种子培养基中, 经培养后测定发酵液中产物的还原糖量, 挑选出还原糖浓度最高的菌株进行产酶试验, 将复筛得到的菌株接种于液态发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养 48 h, 用 DNS 法测定粗酶液的 CMC 酶活力和滤纸酶活力, 选择 CMC 酶活力和滤纸酶活均高的菌株为出发菌株^[6–9], 以上实验均采用 3 个平行^[10–12]。

1.3.2 产外切葡聚糖酶真菌的鉴定: 真菌分子鉴定采用 ITS 序列比较法, 将产酶培养的菌株, 4 °C、8 000 r/min 离心收集菌体, 提取总 DNA 为模板, 用真菌 ITS 通用引物 (ITS up: 5'-TCCG TAGGTGAACCT-3'; ITS down: 5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增, 产物经纯化后, 送英俊公司测序, 测序结果利用 BLAST

(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)、Clustal X 和 MEGA 4.0 软件进行多序列比对, 并构建系统发育树。

1.3.3 外切葡聚糖酶基因 *cbhB* 的克隆: 将筛选得到的黑曲霉 Asp-524 进行扩大培养, 收集菌体。采用 Trizol 法提取总 RNA, 以 RNA 为模板进行反转录, 以 2 μL 的反转录产物为模板进行 PCR 扩增得到双链 cDNA, 根据比对结果中同源性高的基因设计引物为: UP: 5'-ATGTCTTCCTTCCAAGTC TACCG-3'; DOWN: 5'-CTACAAACACTGCGAG TAGTACGC-3'。

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收后 TA 克隆连接至 pMD 19-T, 热激法转入大肠杆菌 DH5 α , 经氨苄抗性和蓝白斑筛选得到的阳性转化子送英俊公司测序。

1.3.4 外切葡聚糖酶 *cbhB* 基因表达载体的构建: 外切葡聚糖酶基因测序结果, 通过 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 网站进行在线信号态预测; 利用 DNAMAN 进行内含子预测, 在保证正确开放阅读框的前提下, 设计了不含有信号肽和内含子的引物, 并在引物上游 5' 端引入了 *Sac* II 酶切位点, 引物下游 5' 端引入了 *Xba* I 酶切位点, 表达引物为: Sense: 5'-CCGCGGCCAGCAGG TTGGAACCTACACCACTGAGAC-3', Antisense: 5'-TCTAGACCCAAACACTGCGAGTAGTACGCA TTCT-3', 划线部分为引入的酶切位点。

通过表达引物 (Sense 和 Antisense) 进行 PCR 扩增, 回收目的条带, 将表达载体 pPICZ α A 质粒和 PCR 扩增产物同时进行 *Sac* II 和 *Xba* I 双酶切, 胶回收相应条带, 以一定比例进行过夜连接后, 转入大肠杆菌 DH5 α , 经 25 g/L Zeocin 抗性筛选得到阳性转化子, 扩大培养后提取质粒经 *Sal* I 线性化后, 电击转化毕赤酵母 *GS115*, 挑取经 50 g/L Zeocin 抗性筛选得到的阳性转化子, 加入裂解液进行菌落 PCR 扩增筛选鉴定阳性转化子。挑取经菌落 PCR 鉴定的阳性转化子进行诱导表达。

1.3.5 酶学性质分析和 SDS-PAGE 分析: 酶活力测定方法: 以 1% 微晶纤维素悬浊液 (pH 5.0 柠檬酸-磷酸二氢钾缓冲液) 为底物, 发酵上清液按体积

比 1:2 与底物混合, 50 °C 反应 1 h 后离心, 取上清与 DNS 按体积比 1:1 混合, 沸水浴 5 min, 冷却后定容至 5 mL, 540 nm 比色, 参照标准曲线计算产生的还原糖量; 酶活力单位(U)定义: 在 50 °C、pH 5.0 条件下, 1 mL 原酶液每分钟分解底物产生相当于 1 mg 葡萄糖所需的酶量^[2,13]。

2 结果与分析

2.1 外切葡聚糖酶高产菌株的筛选鉴定

通过初筛和复筛后得到一株高产外切葡聚糖酶真菌, 命名为 Asp-524, 经诱导培养后活力最高达到 5.1 U/mL。形态学分析显示 Asp-524 在 PDA 培养基上生长速度很快, 蔓延迅速, 颜色由最初的白色, 迅速变为鲜黄色最后为黑色厚绒状, 背面无色, 中央略显黄褐色, 显微镜观察发现, 菌丝发达多分枝, 有隔多核, 分生孢子头为褐黑色放射状, 分生孢子梗长短不一, 顶囊为球形, 具双层小梗如图 1 所示, 初步鉴定为黑曲霉^[11-12]。

ITS 序列比对结果, 利用 MEGA 4.0 软件, 以 Neighbor-Joining 计算生成系统发育进化树(图 2)。

菌株 Asp-524 与黑曲霉(*Aspergillus niger*)的一致性高达 99%, 结合培养时的形态及显微镜下的观察可以最终确定该菌为黑曲霉。

2.2 *cbhB* 基因的克隆及生物信息学分析

RNA 提取后经 2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 3), 28S rRNA、18S rRNA 和 5.8S rRNA 对应

的三条带清晰可见, 通过 RT-PCR 方法, 以黑曲霉总 RNA 为模板, 反转录获得 cDNA, 以获得的 cDNA 为模板, 引物用 UP 和 DOWN, 用高保真酶 PrimerSTAR HS 进行 PCR 扩增得到 *cbhB* 基因, 片段大小为 1 600 bp 左右(图 4), T-A 克隆后挑取阳性转化子送英俊公司测序。

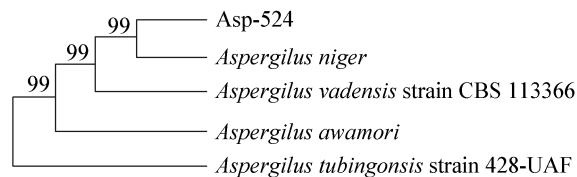


图 2 菌株 Asp-524 的 ITS 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of stain Asp-524 and related strains based on ITS sequence

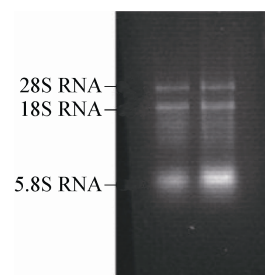


图3 黑曲霉总RNA的电泳检测

Figure 3 Electrophoresis analyses

注: 以上均为RNA样品。

Note: RNA samples.

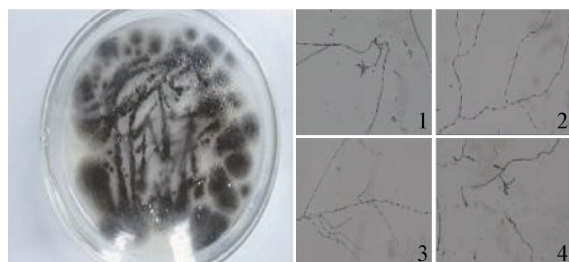


图 1 菌株 Asp-524 的培养特征和形态特征

Figure 1 Morphology and cultural characteristics of strain Asp-524

注: 1、4: 孢子束; 2、3: 菌丝。

Note: 1, 4: Spore; 2, 3: Mycelial.

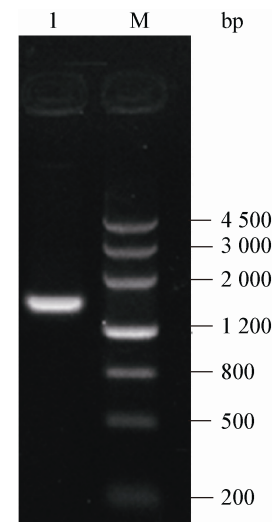


图4 *cbhB*基因PCR扩增结果

Figure 4 Results of PCR amplification of *cbhB*

注: M: DNA分子量标准; 1: PCR扩增结果。

Note: M: Marker III; 1: PCR products.

测序结果在 NCBI 上进行比对分析发现, 该基因与已公布的黑曲霉产外切葡聚糖酶基因 (GenBank: 4977345) 具有 92% 的一致性; 信号肽预测显示, *cbhB* 氨基酸序列含有一段长为 21 aa 的信号肽, 位于 N 端, 剪切位点为 ANA-QQ。

2.3 表达载体的构建

扩增的 PCR 产物和表达载体 pPICZα 经双酶切后, 连接转化入大肠杆菌 DH5α, 经含 25 g/L Zeocin 抗性 LB 平板(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L)筛选后, 挑选阳性转化子进行菌落 PCR, 用 *Sac* II 和 *Xba* I 双酶切鉴定(图 5), 得到 1 500 bp 和 3 600 bp 两条条带, 酶切鉴定结果正确, 确定其为阳性菌株并命名为 S-pPICZαA-cbh。

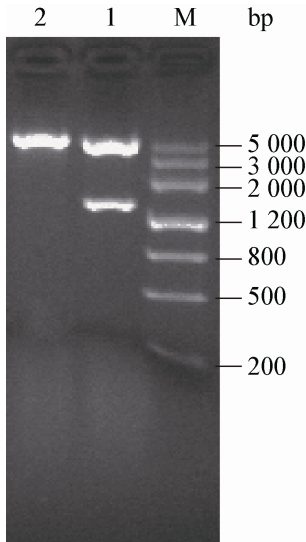


图 5 S-pPICZαA-cbh 载体的酶切鉴定图
Figure 5 Enzymes digestion of vector S-pPICZαA-cbh
注: M: DNA 分子量标准; 1: S-pPICZαA-cbh 双酶切; 2: S-pPICZαA-cbh 质粒.
Note: M: Marker; 1: S-pPICZαA-cbh plasmid was digested by *Sac* II and *Xba* I; 2: S-pPICZαA-cbh plasmid.

2.4 *cbhB* 基因在毕赤酵母中的诱导表达

将重组质粒通过 *Sal* I 线性化后纯化回收, 电激转化进巴斯德毕赤酵母 *GS115* 中, 涂布于含 50 g/L Zeocin 的 YPD 平板上, 30 °C 恒温培养 2 d 后, 转化子经菌落 PCR 鉴定筛选后, 随机挑选 10 个阳性转化子, 进行终浓度为 1% 的甲醇诱导表达, 酶活性测定筛选, 获得了酶活性较高的菌株命名为 S-pPICZαA-cbh-7 (表 2), 酶活力达 4.74 U/mL, 上清液进行离心收集后, 用 8 kD 的透析袋透析除盐, PEG20000 浓缩后, 用浓缩的粗酶液进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 6, *cbhB* 基因在毕赤酵母中表达成功, 表达分子量与预测的分子量大小一致, 约为 57 kD。

2.5 重组外切葡聚糖酶的酶学性质分析

2.5.1 重组外切葡聚糖酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性: 取诱导 120 h 后的上清粗酶液, 在 pH 3.0–10.0 条件下, 利用微晶纤维素为底物, 采用 DNS 法测酶活, 重组酶在 pH 5.0 时显示出最高酶活力; 将酶液置于 pH 3.0–10.0 缓冲液中保温 1 h, 然后在最适反应条件下测酶活, 得到 pH 稳定性, 结果表明重组酶在 pH 4.0–6.0 之间酶活较高, 达到 80% 以上, 显示了较好的稳定性, 随着 pH 增大, 酶活力急速下降(图 7)。

2.5.2 重组外切葡聚糖酶的最适反应温度和温度稳定性分析: 取粗酶液分别在 20–90 °C 保温 1 h, 测其对微晶纤维素的酶活, 重组酶在 50 °C 时酶活力达到最高, 将粗酶液分别在不同温度中保温 1 h 后测酶活, 重组酶在 60 °C 保温 1 h 后酶活力仍达到最高酶活力的 80% 以上, 而超过 60 °C 后热稳定性不强(图 8)。

表 2 酵母阳性菌株酶活筛选 Table 2 Screening for recombinant <i>GS115</i> with high activity										
菌株编号 Strain code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活 Enzyme activity (U/mL)	1.81	1.35	1.29	2.46	3.72	1.31	4.74	3.27	1.91	3.08

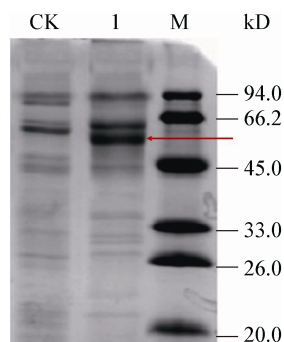


图6 重组毕赤酵母菌株 S-pPICZαA-cbh-7 分泌表达产物的 SDS-PAGE

Figure 6 SDS-PAGE analysis of expression of the reconstructed S-pPICZαA-cbh-7

注: M: 标准蛋白分子量; 1: 菌株 S-pPICZαA-cbh-7 的分泌蛋白; CK: 空白对照. 箭头所示: *cbhB* 表达的目的蛋白.

Note: M: Protein MW marker (low); 1: S-pPICZαA-cbh-7; CK: Control. Arrow: Target protein.

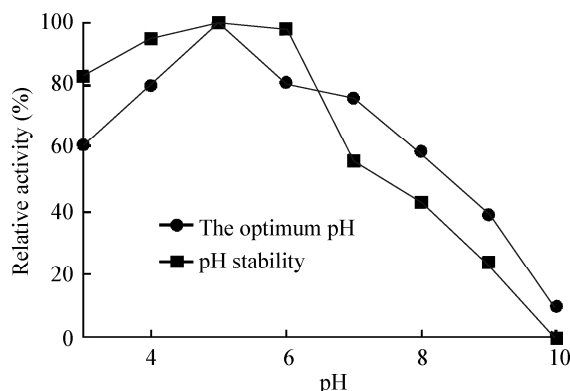


图7 重组毕赤酵母菌株 S-pPICZαA-cbh-7 产酶的最适 pH 和 pH 稳定性

Figure 7 pH value stability and pH activity profiles of the enzyme produced by S-pPICZαA-cbh-7

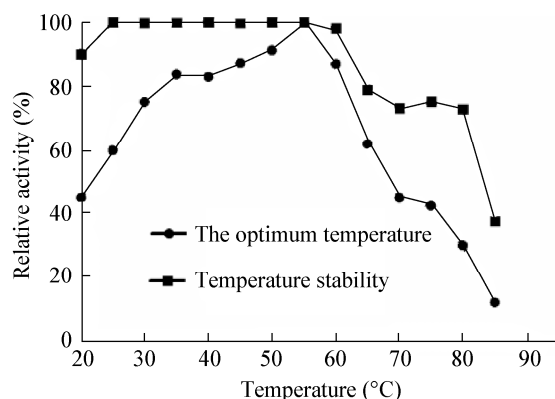


图8 重组毕赤酵母菌株 S-pPICZαA-cbh-7 产酶的热稳定性

Figure 8 Heat stability and optimal temperature of the enzyme produced by S-pPICZαA-cbh-7

3 讨论

到目前为止, 纤维素分解真菌多为木霉和青霉。张虹等用纤维素为提供唯一碳源的选择培养基, 从弃渣塘的土壤中分离到一株纤维素分解能力很强的真菌(QCF3), 经鉴定为绿色木霉^[8]; 叶汉玲等从 40 多个国内外产纤维素酶的菌株中筛选出纤维素分解酶活较高的绿色木霉 NF4^[9]; 而黑曲霉中有关纤维素酶的研究报道较少, 本实验筛选得到的黑曲霉菌株 Asp-524 具有较高的外切葡聚糖酶活力, 诱导培养 6 d 后最高酶活可达 5.10 U/mL, 与同类文献报道的产外切葡聚糖酶真菌相比其活力较高, 完全可以作为出发菌株进行基因的克隆表达研究^[5]。

纤维素在外切葡聚糖酶(*cbh*)、内切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶的协同作用下, 能够被充分降解成还原糖, 而木质纤维素中的纤维素主要存在形式为结晶状, 据报道外切葡聚糖酶(Exoglucanase, *cbh*)是一类能对结晶纤维素起作用的酶组分^[14-17], 哈佛大学的 Andrew C. Tolonen 等(2009)通过抑制 *Clostridium hytofermentas* 中纤维素酶第九家族的外切葡聚糖酶 CpHy3 367 的活性, 使得整个菌株破坏纤维素结构的能力大大减弱^[18], 由此可见在木质纤维素降解成还原糖的过程中, *cbh* 有着不可或缺的作用, 以上结论支持了 *cbh* 基因的克隆表达。

目前关于黑曲霉中外切葡聚糖酶基因序列的报道并在 GenBank 上注册的只有两条, 分别为 HM769954 和 AF156269。本实验获得的外切葡聚糖酶基因将进一步丰富产纤维素酶真菌的生物信息学资源, 生物信息学分析显示 *cbhB* 基因没有内含子这一特性与 Gielkens M. M. 等报道的情况相符^[17,19]。

毕赤酵母表达系统是一种生物研究中常用的真核蛋白表达系统, 具有高效表达和分泌外源蛋白的特点, 本实验实现了黑曲霉 Asp-524 中外切葡聚糖酶基因 *cbhB* 在毕赤酵母中的表达, 所得到的重组毕赤酵母菌株在 1% 甲醇的诱导下可以高效地合成并分泌 *cbhB* 蛋白, 其表达的重组酶在最适条件下的活力最高可达 4.74 U/mL, 而这一情况与出发

菌株黑曲霉 Asp-524 相比要低一些,造成这一结果的原因可能是,原始菌中对纤维素的降解是三种纤维素酶协同作用的结果,而在重组工程菌中,只存在一种纤维素酶,这也符合公认的纤维素酶降解的协同作用学说,即任何一种单独的高酶活力的纤维素酶都无法实现对天然纤维素的降解,这也是为什么越来越多的人希望通过基因工程的手段改变某一菌株中纤维素酶组分^[5],或者通过多种酶在一种工程菌中的共同表达来提高对天然纤维素的降解能力的原因^[20-24]。本研究认为,如果能采用合适的表达系统,单独表达各种纤维素酶,然后将纯化后的表达产物按照实际应用的要求以一定的比例混合,或者让一个工程菌同时能表达多种纤维素酶组分,让其自然界中的纤维素产生菌一样,可能降解纤维素的效果会更好^[5,10-11]。本实验中表达的重组葡聚糖外切酶具有较好的热稳定性和 pH 稳定性,为纤维素酶的进一步研究和实际应用奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] 宋京城,蔡健. 纤维素酶在食品工业中的应用[J]. 农产品加工·学刊, 2010(3): 103-109.
- [2] 谢占玲,吴润. 纤维素酶的研究进展[J]. 草业科学, 2004, 21(4): 51-55.
- [3] 闫训友,史振霞,张惟广,等. 纤维素酶在食品工业中的应用进展[J]. 食品工业科技, 2004, 25(10): 37-44.
- [4] 乞永立,耿月霞,任章启. 纤维素酶的生产及应用[J]. 河北化工, 2000(1): 25-26.
- [5] 张通. 产外切葡聚糖酶黑曲霉的筛选鉴定及其基因在毕赤酵母中的表达[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2011.
- [6] 阮周波,王忆丽,何未男,等. 纤维素酶产生菌的筛选、鉴定和产酶条件优化[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 110-115.
- [7] 段学辉,颜淑芳,高鹤. 几株纤维素酶产生菌的分离鉴定及其产酶能力[J]. 南昌大学学报: 工科版, 2010, 32(2): 475-480.
- [8] 张虹,李义. 纤维素酶产生菌的分离和鉴定[J]. 齐齐哈尔师范学院学报, 1997, 4: 62-63.
- [9] 叶汉玲,王鹏,高鸿海. 优良纤维分解菌的筛选及其产酶研究[J]. 南京林业大学学报, 1994, 3: 55-58.
- [10] 郝伟伟. 产 β -葡萄糖苷酶真菌的筛选鉴定及其酶的分离纯化和基因的克隆[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2011.
- [11] 黄惠琴,黄美容,叶建军,等. 2株产纤维素酶放线菌的筛选及分类鉴定[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(1): 77-73.
- [12] 张强,杨岩. 一株纤维素酶产生菌的筛选鉴定[J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2008, 21(5): 54-57.
- [13] Zhong Y, Liu X, Xiao P, et al. Expression and secretion of the human erythropoietin using an optimized *cbh1* promoter and the native *CBH I* signal sequence in the industrial fungus *Trichoderma reesei*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(5/6): 1169-1177.
- [14] Brunecky R, Baker JO, Wei H, et al. Analysis of transgenic glycoside hydrolases expressed in plants: *T. reesei CBH I* and *A. cellulolyticus* EI[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 908: 197-211.
- [15] Tavagnacco L, Mason PE, Schnupf U, et al. Sugar-binding sites on the surface of the carbohydrate-binding module of *CBH I* from *Trichoderma reesei*[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(6): 839-846.
- [16] Miettinen-Oinonen A, Paloheimo M, Lantto R, et al. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 116(3): 305-317.
- [17] Gielkens MM, Dekkers E, Visser J, et al. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4340-4345.
- [18] Tolonen AC, Chilaka AC, Church GM. Targeted gene inactivation in *Clostridium phytofermentans* shows that cellulose degradation requires the family 9 hydrolase Cphy3367[J]. Molecular Biology, 2009, 74(6): 1300-1313.
- [19] 吴振芳,陈惠,曾民,等. 内切葡聚糖酶基因在毕赤酵母中高效表达研究[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 67-72.
- [20] Azevedo Mde O, Felipe MS, Astolfi-Filho S, et al. Cloning, sequencing and homologies of the *cbh-1* (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*[J]. Journal of General Microbiology, 1990, 136(12): 2569-2576.
- [21] Reese ET. A microbiological process report; enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. Applied Microbiology, 1956, 4(1): 39-45.
- [22] Reese ET. Polysaccharases and the hydrolysis of insoluble substrates[J]. Biological Transformation of Wood by Microorganisms, 1975: 165-181.
- [23] Taleb F, Radford A. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: *cbh-1* cloning, sequencing and homologies[J]. Gene, 1995, 161(1): 137-138.
- [24] 张煜,刘刚,余少文,等. 里氏木霉纤维二糖水解酶 II 在毕赤酵母中的高效表达[J]. 菌物学报, 2005, 24(3): 19-25.