

## 里氏木霉 GH61 家族糖苷酶的高效表达及酶学特性研究

冯飞 王绍文 王娟 刘刚\*

(深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳大学生命科学学院 广东 深圳 518060)

**摘要:**【目的】GH61 家族糖苷水解酶具有葡聚糖氧化酶活性, 通过对葡聚糖链的随机氧化而破坏木质纤维素的结晶结构, 从而使木质纤维素容易被纤维素酶降解。重组表达、纯化获得里氏木霉的 GH61 家族糖苷水解酶(TrGH61, 原名为 EGIV), 并研究其在纤维素酶水解木质纤维素中的作用。【方法】通过 Overlap PCR 将里氏木霉丙酮酸脱羧酶的启动子、纤维二糖水解酶 *cbh1* 的信号肽、EGIV 基因和 PDC 终止子依次连接构建了里氏木霉的表达盒, 通过该表达盒使 TrGH61 蛋白基因整合到里氏木霉的基因组 DNA 上进行同源表达。研究表达产物 TrGH61 的水解活性、与纤维素酶水解协同效应, 以及 TrGH61 作为金属氧化酶的特性研究。【结果】在 PDC 启动子的作用下, TrGH61 得到高效表达, 摇瓶培养的表达量达到 2.33 g/L。TrGH61 有微弱的内切葡萄糖苷酶活性, 比活力为 0.02 IU/mg, 但能显著提高纤维素酶水解稻草粉的活性, 协同度最高可达 1.998。低浓度的金属离子  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  和还原性电子供体还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸、焦性没食子酸均能显著促进其水解效应。TrGH61 能够降低稻草粉纤维素聚合度和结晶度。【结论】通过 PDC 启动子可以实现 TrGH61 蛋白高效组成型表达, TrGH61 作为纤维素酶活性促进因子, 通过破坏纤维素结晶结构作用机制协同增强纤维素酶水解木质纤维素。

**关键词:** 里氏木霉, 纤维素酶, GH61 糖苷酶, 金属氧化酶, 协同作用

## High-level expression and characterization of GH61 glycoside hydrolase from *Trichoderma reesei*

FENG Fei WANG Shao-Wen WANG Juan LIU Gang\*

(Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

**Abstract: [Objective]** The GH61 family glycoside hydrolases exhibit glucan oxidative activity; they randomly oxidize glucan and thus partially destroy the crystallized structure of lignin cellulose, overcoming the major hurdle for the activity of cellulase upon lignin cellulose. In this work, a GH61 family glycoside hydrolase in *Trichoderma reesei* (TrGH61, previous name is endoglucanase IV) was obtained through homologous expression and purification, and its function in enzymatic degradation of lignin cellulose was studied. **[Methods]** The promoter of *T. reesei* pyruvate decarboxylase gene, the signal peptide of cellulbiohydrolase, the endoglucanase IV gene, and the terminal region of the PDC gene were sequentially ligated through overlap PCR, forming the expression cassette of

基金项目: 深圳市基础研究计划项目(No. JCYJ20120613115323982)

\*通讯作者: Tel: 86-755-26534966; 信箱: zjuliug@szu.edu.cn

收稿日期: 2013-07-28; 接受日期: 2014-01-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

TrGH61. The expression cassette was then transformed into *T. reesei* QM9414 with the aid of plasmid pAN7.1, and TrGH61 was homologously expressed and purified to homogeneity. The hydrolytic activity towards cellulosic materials, the synergistic effect with cellulase and the oxidase activity were studied. **[Results]** Highly efficient production of the TrGH61 was achieved under the control of the PDC promoter, and the expressing level was 2.33 g/L in shake flask cultivation. The expressed TrGH61 exhibited faint endoglucanase activity, with a specific activity of 0.02 IU/mg. Moreover, it enhanced the activity of cellulase towards straw mill when it was added into the reaction mixture, with a synergistic degree of 1.998. Metal ions  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ , and electron donor reduced glutathione, L-ascorbic acid, and pyrogallol acid, enhanced the activity of TrGH61 effectively. The cellulose crystallinity and degree of polymerization of rice straw were decreased by TrGH61. **[Conclusion]** TrGH61 can be effectively expressed with the *T. reesei* PDC promoter, and the purified TrGH61 can act as a cellulase activity enhancer, improving the action of cellulase by destroy the crystal structure of cellulose on lignin cellulose.

**Keywords:** *Trichoderma reesei*, Cellulase, GH61 glycosidase, Metal-dependent oxidative enzyme, Synergistic effect

木质纤维素是世界上最丰富的可再生资源,对它进行有效的利用对于缓解能源和石油资源紧张的局面具有重要的意义。然而,木质纤维素中的纤维素组分因氢键而形成牢固的结晶结构(纤维素微纤丝),而纤维素微纤丝又与半纤维素、木质素形成复杂的网络结构,使得木质纤维素难以被纤维素酶水解<sup>[1]</sup>。纤维素酶对纤维素的水解效率低下是纤维素乙醇(由木质纤维素转化生成的燃料乙醇)工业化生产的主要瓶颈之一,也是备受关注的重要课题。除提高纤维素酶的本身活性外,一些具有促进纤维素酶活性的蛋白逐渐进入人们的视野,如 GH61 糖苷水解酶家族蛋白<sup>[2]</sup>。

由于 GH61 家族蛋白具有微弱的内切葡聚糖酶活性,所以起初一直被作为糖苷水解酶。后来发现 GH61 蛋白并不是传统意义上的糖苷水解酶<sup>[3]</sup>, GH61 蛋白的三维结构与糖苷水解酶有所不同,它在扩展的平面上有个重要的  $\beta$  折叠,中心包含一个被认为是与金属离子结合的 N-末端的组氨酸<sup>[4]</sup>。GH61 蛋白的这种结构类似于 CBM33 家族蛋白,被认为是 CBM33 家族的真菌类似物<sup>[5]</sup>。Quinlan 等<sup>[2]</sup>证实金属铜离子和还原性电子供体是 GH61 家族蛋白发挥活性所必须具备的两个条件。进一步的研究表明 GH61 家族蛋白属于氧化酶,可以通过氧化反应使得纤维素被部分氧化降解,并在一定程度上破坏其结晶结构,从而使纤维素更容易被纤维素

酶降解<sup>[6-7]</sup>。近年来关于 GH61 在纤维素降解中的活性研究逐步增多。目前主要研究的 GH61 蛋白主要是来自于 *Trichoderma reesei* Cel61B<sup>[4]</sup>(过去称之为 EG VII 蛋白)、*Phanerochaete chrysosporium* PcGH61D<sup>[3]</sup>、*Heterobasidion irregulare* HiGH61<sup>[8]</sup>、*T. aurantiacus* GH61A<sup>[9]</sup>、*T. terrestris* GH61B 和 GH61E<sup>[10]</sup>。

里氏木霉内切葡萄糖苷酶IV (EGIV, 本文定名为 TrGH61)属于糖苷酶 GH61 家族蛋白<sup>[11]</sup>。但以往认为它属于内切纤维素酶,并从这一角度研究了其酶学性质<sup>[12]</sup>,其氧化酶的特性研究尚未见报道。本文通过从里氏木霉基因组 DNA 中扩增 TrGH61 基因,利用 Overlap PCR 构建里氏木霉表达盒进行同源表达、获得纯化 TrGH61 蛋白。研究 TrGH61 蛋白在纤维素酶降解木质纤维素中的协同效应,进行金属离子和还原性电子供体对 GH61 蛋白酶解作用的影响等金属氧化酶特性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和载体:** 里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC 26921); pMD18-T Simple 载体购自宝生物(大连)有限公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10F'购自 Invitrogen (上海)公司;质粒 pAN7-1 由本实验室

保存<sup>[13]</sup>。

**1.1.2 培养基:** 大肠杆菌的培养使用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L), 固体培养时加入 2%琼脂, 用于转化子筛选时加入 100 mg/L 氨苄青霉素; 里氏木霉的培养使用 PDA 固体培养基(土豆汁 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%), 液体培养时使用 Mandels 液体基本培养基<sup>[14]</sup>。*Trichoderma reesei* 重组菌株的筛选培养基为用 STC 溶液配制的 PDA, 并含 100 g/L 的潮霉素 B。*T. reesei* 的产酶培养基为含 0.3 g/L 酵母提取物的 Mandels 液体基本培养基。

**1.1.3 酶和试剂:** Prime STAR<sup>®</sup> HS DNA 聚合酶、DNA A-Tailing Kit 试剂盒、蛋白质分子量标准和 DNA 分子量标准购自 TaKaRa 公司(大连); 真菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、培养基成分如蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、琼脂糖等均购自上海生物工程公司。氨苄青霉素和潮霉素 B 分别购自上海生物工程公司和 Invitrogen (上海)公司。铜乙二醇溶液(CED 溶液)购自中国纸浆造纸研究院。纤维素酶来源于本实验室。

## 1.2 方法

**1.2.1 里氏木霉基因组 DNA 的提取:** 使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取里氏木霉 QM9414 基因组 DNA, 具体操作参见供应商的使用说明。

**1.2.2 表达盒  $P_{\text{pdc}}\text{-}S_{\text{cbh1}}\text{-}eg4\text{-}T_{\text{pdc}}$  的构建:** 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 6 个引物, 其中 Ppdc-S-1R 与 *eg4*-F, *eg4*-R 与 T<sub>pdc</sub>-F 各有 20 bp 的序列互补片段, 以利于 Overlap-PCR 扩增表达盒  $P_{\text{pdc}}\text{-}S_{\text{cbh1}}\text{-}eg4\text{-}T_{\text{pdc}}$  (表 1)。

使用 PCR 方法分别扩增 *T. reesei* 的 *eg4*、里氏木霉丙酮酸脱羧酶基因的启动子( $P_{\text{pdc}}$ )和纤维二糖水解酶基因的信号肽序列( $S_{\text{cbh1}}$ )、丙酮酸脱羧酶基因的终止序列( $T_{\text{pdc}}$ )。然后通过 Overlap PCR 方法将  $P_{\text{pdc}}$ 、 $S_{\text{cbh1}}$ 、*eg4* 和  $T_{\text{pdc}}$  依次连接构建表达盒  $P_{\text{pdc}}\text{-}S_{\text{cbh1}}\text{-}eg4\text{-}T_{\text{pdc}}$ 。

表 1 PCR 及 Overlap PCR 所用引物

Table 1 Primers used in the PCR and Overlap PCR procedures

引物名称 Primer names	引物碱基序列 Primer sequences (5'→3')
Ppdc-S-1F	CCAAGCAGGTGACCAAGAAAG
Ppdc-S-1R	AATATGTCCATGTCCGACAACAGCACGA GCTGTGGCCA
<i>eg4</i> -F	TCTTGGCCACAGCTCGTGCTGTTGTCGG ACATGGACATATT
<i>eg4</i> -R	CTAGTGGTGATGGTGGTGGTGGTTAAG GCACTGGGCGT
T <sub>pdc</sub> -F	CACCACCACCATCACCCTAGCCCGGC ATGAAGTCTGACC
T <sub>pdc</sub> -R	TCCCGTAGAGCTTTTCGC

**1.2.3 表达载体的构建与里氏木霉转化:** 使用 DNA A-Tailing Kit 试剂盒(大连宝生物)在表达盒  $P_{\text{pdc}}\text{-}S_{\text{cbh1}}\text{-}eg4\text{-}T_{\text{pdc}}$  片段的 3'末端添加一个“A”尾后与 pMD18-T Simple 载体连接, 转化大肠杆菌 *E. coli* TOP10F'。提取重组质粒并通过 *Xba* I 酶线性化后, 与 pAN7-1 共转化 *T. reesei* QM9414, 主要参照 Penttila 等的方法进行<sup>[15]</sup>。

**1.2.4 TrGH61 的同源表达与纯化:** 将阳性转化子接种于产酶培养基, 于 28 °C、200 r/min 振荡培养 4 d。培养物于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清获得粗酶液。利用亲和层析的方法通过蛋白快速层析仪分离纯化获得纯化的 TrGH61, 取粗酶液和纯化蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析, 按照分子生物学实验指南进行<sup>[16]</sup>。

**1.2.5 TrGH61 蛋白葡聚糖酶活性测定<sup>[17]</sup>:** 分别采用 2%的甲基纤维素钠(CMC-Na)、滤纸(Whatman No. 1)、微晶纤维素、玉米芯、稻草粉和木聚糖作为底物, 测定其葡聚糖酶活性。一个活力单位(IU)定义为在 50 °C、pH 4.8 条件下每小时释放 1 mg 还原糖所需要的酶量。

**1.2.6 TrGH61 蛋白与纤维素酶对木质纤维素水解的协同效应:** (1) 以稻草粉为底物: 将 TrGH61 蛋白与纤维素酶对稻草粉进行协同酶解反应<sup>[18]</sup>。

分别取不同浓度的 TrGH61 蛋白(0.1、0.3、0.5 mg)与 0.005 FPU (滤纸活力国际单位)纤维素酶和 5 mg 稻草粉混匀, 用 0.05 mol/L NaAc 缓冲液

(pH 4.8)定容至 500  $\mu\text{L}$ , 置于 1.5 mL EP 管中, 在 50  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡反应, 每组实验分别设置 15 管。不同时间(6、12、24、36、48 h)取样测定还原糖, 每次每组取 3 管, 取平均值, 并计算 TrGH61 蛋白与纤维素酶作用的协同度。对照组: 不同浓度 TrGH61 蛋白分别与 0.005 FPU 纤维素酶水解 5 mg 稻草粉。

协同度定义为 TrGH61 蛋白与纤维素酶共同作用产生的还原糖除以两者单独作用产生的还原糖之和, 即: 协同度=
$$\frac{\text{还原糖}_{(\text{TrGH61}+\text{纤维素酶})}}{(\text{还原糖}_{\text{TrGH61}}+\text{还原糖}_{\text{纤维素酶}})}$$

(2) 以微晶纤维素为底物: 将 TrGH61 蛋白与纤维素酶对稻草粉进行协同酶解反应。

分别取不同浓度的 TrGH61 蛋白(0.1、0.3、0.5 mg)与 0.001 FPU 的纤维素酶和 5 mg 微晶纤维素 Avicel 混匀, 用 0.05 mol/L NaAc 缓冲液(pH 4.8)定容至 500  $\mu\text{L}$ , 在 50  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡反应 24 h 测定还原糖, 对照组为 0.3 mg TrGH61 和 0.001 FPU 纤维素酶分别与 5 mg 微晶纤维素单独反应。每组实验做 3 个重复。

**1.2.7 还原性电子供体对 TrGH61 蛋白的作用研究:** (1) 还原性电子供体对 TrGH61 降解微晶纤维素的作用。

取 0.1 mg TrGH61 蛋白与 0.001 FPU 的纤维素酶和 5 mg 微晶纤维素 Avicel 混匀, 分别将两种还原性电子供体 L-抗坏血酸、焦性没食子酸(使用 0.05 mol/L NaAc 缓冲液溶解)加入使其浓度达到 10 mmol/L, 在 50  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡反应 24 h 测定还原糖, 设置 4 个对照组, 分别为单独加 0.1 mg TrGH61、单独加 0.001 FPU 纤维素酶、加 L-抗坏血酸和 0.1 mg TrGH61、加焦性没食子酸和 0.1 mg TrGH61。每组实验做 3 个重复。

(2) 不同浓度还原性电子供体对 TrGH61 酶解活性的影响。

取 0.1 mg TrGH61 蛋白与 0.001 FPU 的纤维素酶分别与不同浓度(0.5、1.0、5.0、10 mmol/L)还原性电子供体还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸、焦性没食子酸和 5 mg 稻草粉混匀, 用 0.05 mol/L NaAc

缓冲液(pH 4.8)定容至 500  $\mu\text{L}$ , 在 50  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡反应 24 h 测定还原糖量, 对照组为 0.1 mg TrGH61 蛋白与 0.001 FPU 的纤维素酶与 5 mg 微晶纤维素单独反应。计算添加还原性电子供体条件下与对照组还原糖相对转化量。每组实验做 3 个重复。

还原糖相对转化量=
$$\frac{\text{添加电子供体还原糖转化量}}{\text{对照组还原糖转化量}}$$

**1.2.8 金属离子对 TrGH61 蛋白的作用研究:** 取 0.1 mg TrGH61 蛋白分别与不同浓度(0.5、1.0、5.0、10 mmol/L)金属离子  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和 5 mg 稻草粉混匀, 用 0.05 mol/L NaAc 缓冲液(pH 4.8)定容至 500  $\mu\text{L}$ , 在 50  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡反应 24 h 测定还原糖, 对照组为 0.1 mg TrGH61 与 5 mg 微晶纤维素单独反应。计算添加金属离子条件下与对照组 TrGH61 酶解还原糖相对转化量。每组实验做 3 个重复。

还原糖相对转化量=
$$\frac{\text{添加金属离子还原糖相对转化量}}{\text{对照组还原糖相对转化量}}$$

**1.2.9 TrGH61 蛋白对底物结晶结构的影响:** (1) 应用粘度法<sup>[19]</sup>计算稻草粉纤维素的聚合度。

取 0.05 g TrGH61 蛋白与 0.2 g 稻草粉混匀, 用 0.05 mol/L NaAc 缓冲液(pH 4.8)定容至 20 mL, 置于 40 mL 离心管中, 在 50  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡反应, 另外单独取 0.2 g 稻草粉反应作为对照。2 d 后分别离心取稻草粉沉淀反复冲洗至中性, 烘干。分别取烘干的稻草粉置于锥形瓶中, 加入 25 mL 蒸馏水混匀, 然后向锥形瓶中加入 25 mL CED 溶液, 并向瓶中充入氮气以除去空气, 封住锥形瓶, 不停地振荡直至稻草粉充分溶解。将试样置于安装在 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温浴中的乌氏粘度计中, 准确测量试样从粘度计上标线流至下标线的时间( $t$ )。同时单独取溶剂测量溶剂的时间( $t_0$ )。每组均重复实验 3 次取平均值。应用粘度法计算稻草粉纤维素的聚合度。

(2) 应用 X 射线衍射法<sup>[20]</sup>测定、计算稻草粉纤维素的结晶度。

取 0.05 g TrGH61 蛋白与 0.2 g 稻草粉混匀,

用 0.05 mol/L NaAc 缓冲液(pH 4.8)定容至 20 mL, 置于 40 mL 离心管中, 在 50 °C、250 r/min 振荡反应, 另外单独取 0.2 g 稻草粉反应作为对照。1 d 后分别离心取稻草粉沉淀反复冲洗至中性, 烘干至恒重后过 80 目筛, 即为待扫描样品。采用 Rigaku D/max-2500 PC 型 X 射线衍射(XRD)仪进行扫描。主要扫描参数为: X 光管为铜靶, 用镍片消除 CuK $\alpha$  辐射, 工作电压为 40 kV, 电流为 30 mA, 样品扫描范围为 10°–80°。根据 X 射线衍射图谱强度, 采用 Segal 法计算相对结晶度  $C_r$ :

$$C_r (\%) = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100 \quad (1)$$

其中:  $I_{002}$ : 002 面的最大衍射强度;  $I_{am}$ :  $2\theta=18.5^\circ$  时的衍射强度, 即无定形区的衍射强度。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达盒 $P_{pdc}$ - $S_{cbh1}$ - $eg4$ - $T_{pdc}$ 的构建与转化

通过 PCR 方法分别扩增到大小为 1 545 bp 的  $P_{pdc}$ - $S_{cbh1}$  片段、1 021 bp 的  $eg4$  片段、1 051 bp 的  $T_{pdc}$  片段, 再通过 Overlap PCR 方法将 3 个片段依次连接起来, 如图 1 所示, 该表达盒分子量大小为 3 617 bp, 与预期大小相符。

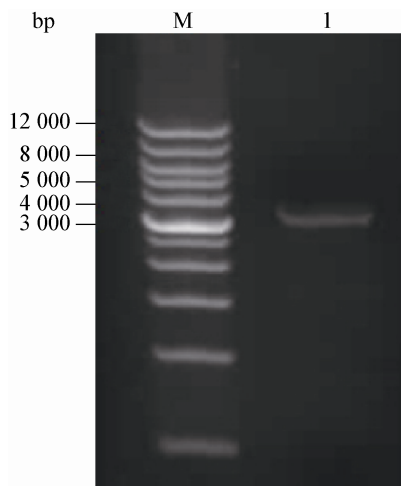


图 1 表达盒  $P_{pdc}$ - $S_{cbh1}$ - $eg4$ - $T_{pdc}$  的凝胶电泳分析  
Figure 1 Agarose gel electrophoresis analysis of the expression cassette

注: M: 500–12 000 bp DNA 分子量标准; 1: Overlap PCR 扩增表达盒。

Note: M: 500–12 000 bp DNA marker; 1: Overlap PCR of expression cassette.

将 10  $\mu$ g  $P_{pdc}$ - $S_{cbh1}$ - $eg4$ - $T_{pdc}$  表达盒与 10  $\mu$ g pAN7-1 对里氏木霉原生质体进行共转化, 在含 100 g/L 潮霉素 B 的筛选平板上, 于 28 °C 培养 3–5 d 后得到具有潮霉素 B 抗性的转化子 19 株, 转化效率约为 2 株转化子/ $\mu$ g DNA。

### 2.2 TrGH61 的表达与纯化

将筛选到的 19 株阳性转化子分别接种到 25 mL 液体基本培养基中, 菌体生长 48 h 后转入产酶培养基中表达。分别取粗酶液进行 SDS-PAGE, 筛选到一株表达量最高的里氏木霉工程菌 TEB-H, 根据构建表达盒时在蛋白 N 端引入的 6 $\times$ His Tag, 取 TEB-H 粗酶液使用带 6 $\times$ His Tag 的亲和层析柱纯化蛋白, 取 TEB-H 粗酶液和纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 同时用 6 $\times$ His Tag 单克隆抗体进行 Western-blot 检测分析, 表明由于表达载体中整合了里氏木霉丙酮酸脱羧酶 PDC 的组成型高效启动子, 在未添加诱导物的前提下粗酶液中只存在单一条带的目的蛋白 TrGH61, 并且使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定粗酶液蛋白浓度达到 2.33 g/L, 成功实现了 TrGH61 蛋白的高效表达。如图 2、3 所示, TrGH61 的分子量为 56 kD 左右。

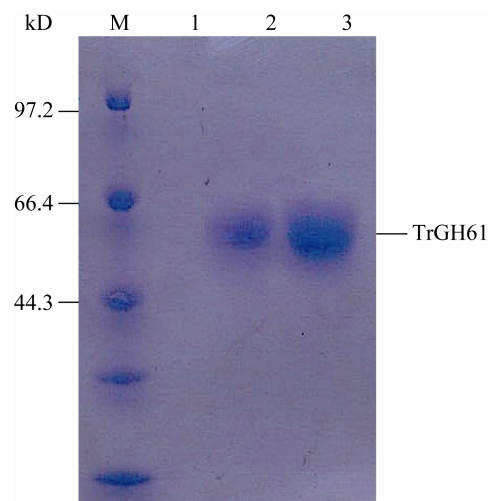


图 2 重组表达 TrGH61 的 SDS-PAGE 分析  
Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant TrGH61

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 里氏木霉 QM9414 发酵液; 2: 重组菌株粗酶液; 3: TrGH61 纯化蛋白。

Note: M: Standard protein molecular weight marker; 1: Fermentation broth of *T. reesei* QM9414; 2: Crude enzyme of recombinant strain; 3: Purified TrGH61 protein.

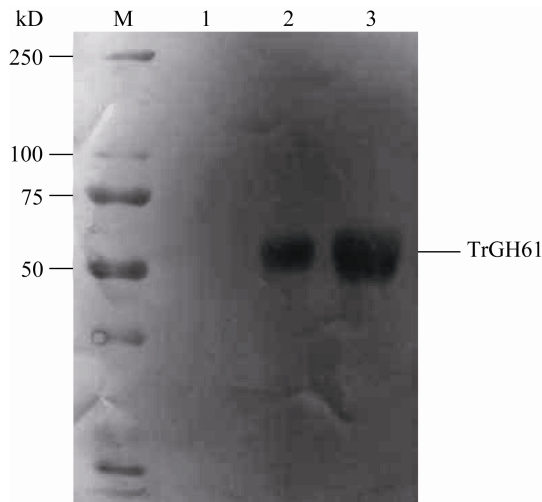


图3 重组表达 TrGH61 的 Western-blot 分析

Figure 3 Western-blot analysis of the recombinant TrGH61

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 里氏木霉 QM9414 发酵液; 2: 重组菌株粗酶液; 3: TrGH61 纯化蛋白。

Note: M: Standard protein molecular weight marker; 1: Fermentation broth of *T. reesei* QM9414; 2: Crude enzyme of recombinant strain; 3: Purified TrGH61 protein.

### 2.3 TrGH61 的葡聚糖酶活性检测

利用纯化后 TrGH61 酶液分别水解 2% 的甲基纤维素钠(CMC-Na)、滤纸(Filter paper)、微晶纤维素(Avicel)、玉米芯(Corn cob)、稻草粉(Straw powder)和木聚糖(Xyloglucan), 测定其葡聚糖酶活性, 由表 2 可知, TrGH61 只对 CMC-Na 具有一定活性, 比活力为 0.02 IU/mg。而对于其他纤维素底物葡聚糖酶活性均极低, 实验结果表明 TrGH61 只具有微弱的内切葡萄糖苷酶活性。

表 2 TrGH61 对不同木质纤维素类底物的活性  
Table 2 Different cellulosic substrate activity of TrGH61

纤维素底物 Cellulosic substrate	酶活 Enzyme activity ( $10^{-2}$ IU/mg)
CMC-Na	2.21±0.07
Filter paper	n.d.*
Avicel	0.39±0.01
Corn cob	0.96±0.01
Straw powder	0.46±0.04
Xyloglucan	0.71±0.13

注: \*: 未检测到。

Note: \*: Not detected.

### 2.4 TrGH61 与纤维素酶在水解木质纤维素中的协同效应

**2.4.1 TrGH61 对纤维素酶在水解稻草粉中的作用影响:** 由图 4 所知, TrGH61 能够显著地增强纤维素酶对稻草粉的水解作用, 存在很好的协同作用, 并且 TrGH61 的浓度越高, 协同效应越显著, 其中当水解 24 h 时协同度最高, 比如 0.5 mg TrGH61 蛋白和 0.005 FPU 纤维素酶协同反应 24 h 后纤维素酶活性提高近 100%, 协同度为 1.998。

**2.4.2 TrGH61 对纤维素酶在水解微晶纤维素中的作用影响:** TrGH61 对纤维素酶水解微晶纤维素没有促进作用, 相反还存在一定的抑制。如图 5

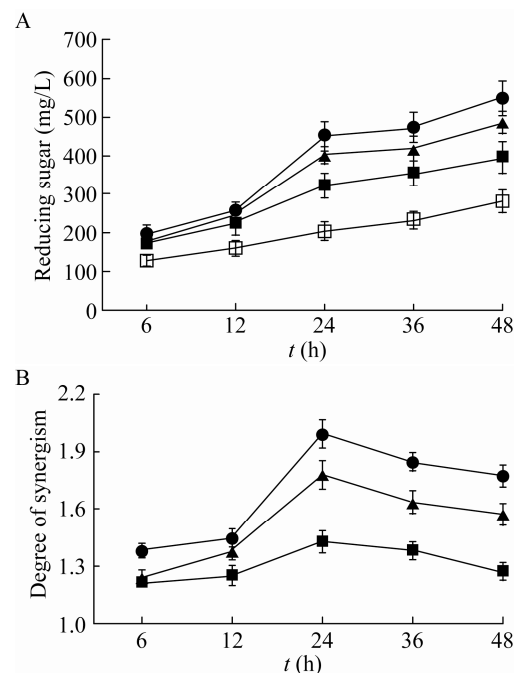
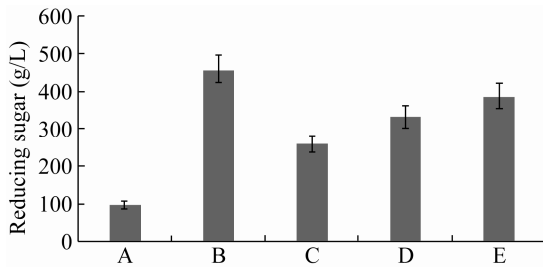


图 4 TrGH61 与纤维素酶水解稻草粉的协同反应

Figure 4 Synergistic reaction on hydrolysis of straw powder between TrGH61 and cellulase

注: A: TrGH61 对纤维素酶活性的促进作用; B: TrGH61 与纤维素酶共同作用的协同度。—□—: 0.005 FPU 纤维素酶; —■—: 0.005 FPU 纤维素酶+0.1 mg TrGH61; —▲—: 0.005 FPU 纤维素酶+0.3 mg TrGH61; —●—: 0.005 FPU 纤维素酶+0.5 mg TrGH61。

Note: A: Enhancing effector of TrGH61 on cellulase activity; B: Degree of synergism of TrGH61 and cellulase. —□—: 0.005 FPU cellulase; —■—: 0.005 FPU cellulase+0.1 mg TrGH61; —▲—: 0.005 FPU cellulase+0.3 mg TrGH61; —●—: 0.005 FPU cellulase+0.5 mg TrGH61.



**图 5 TrGH61 与纤维素酶水解微晶纤维素的协同反应**  
**Figure 5 Synergistic reaction on hydrolysis of avicel between TrGH61 and cellulase**

注: A: 0.3 mg TrGH61; B: 0.001 FPU 纤维素酶; C: 0.001 FPU 纤维素酶+0.1 mg TrGH61; D: 0.001 FPU 纤维素酶+0.3 mg TrGH61; E: 0.001 FPU 纤维素酶+0.5 mg TrGH61.

Note: A: 0.3 mg TrGH61; B: 0.001 FPU cellulase; C: 0.001 FPU cellulase+0.1 mg TrGH61; D: 0.001 FPU cellulase+0.3 mg TrGH61; E: 0.001 FPU cellulase+0.5 mg TrGH61.

所示,纤维素酶水解微晶纤维素的体系中加入不同浓度的 TrGH61 蛋白后,产生的还原糖量比不加入 TrGH61 蛋白产生的还原糖量要低,但是值得注意的是随着加入的 TrGH61 浓度升高,还原糖量也相应增加。Dimarogona 等研究认为微晶纤维素只含有纤维素成分,相比稻草粉而言缺少木质素等其他成分,而木质素作为电子供体具有促进 TrGH61 糖苷酶活性的作用,所以导致 TrGH61 不但不能协同促进纤维素酶水解微晶纤维素,相反还存在一定的竞争性抑制<sup>[21]</sup>。

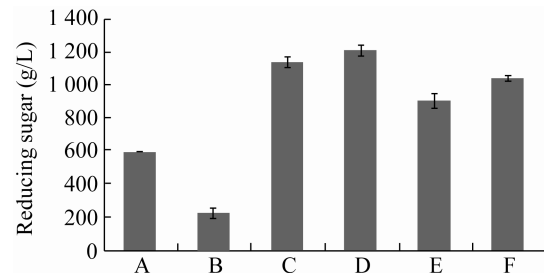
## 2.5 还原性电子供体对 TrGH61 蛋白的作用研究

如图 6 所示,加入还原性电子供体 L-抗坏血酸、焦性没食子酸(图 6 中 C、D)后能够显著增强 TrGH61 与纤维素酶水解微晶纤维素协同效应。说明 TrGH61 与纤维素酶共同水解微晶纤维素还原糖量低的原因可能是微晶纤维素中缺乏某些成分作电子供体,同时也说明 TrGH61 蛋白是一种氧化酶。其氧化活性随还原性电子供体浓度增大而增大,如图 7 所示,在 10 mmol/L 浓度焦性没食子酸作用下其还原糖转化量可以提高接近 13 倍。

## 2.6 金属离子对 TrGH61 蛋白的作用研究

本文进行了  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、

$\text{Mn}^{2+}$ 六种金属离子对 TrGH61 降解稻草粉产还原糖量的研究。如图 8 所示,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 对 TrGH61 降解稻草粉没有影响,但低浓度的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 就能显著地促进 TrGH61 降解稻草粉。其中,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 在 0.5 mmol/L 低浓度下产还原糖量提高倍数分别为 1.58 和 1.65,表明 TrGH61 是一种金属依赖性氧化酶。

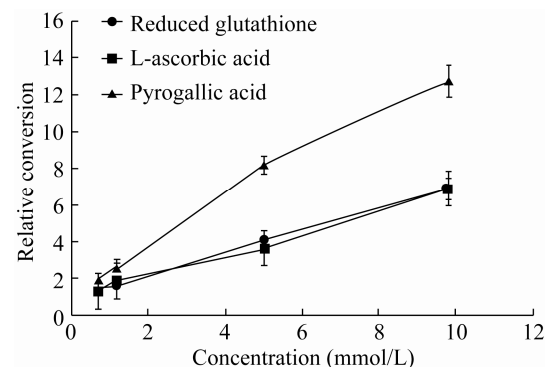


**图 6 还原性电子供体对 TrGH61 与纤维素酶协同作用降解微晶纤维素的作用**

**Figure 6 Effect of redox-active electron donor on synergism of TrGH61 and cellulase in hydrolysis of avicel**

注: A: 纤维素酶; B: 纤维素酶+TrGH61; C: 纤维素酶+TrGH61+L-抗坏血酸; D: 纤维素酶+TrGH61+焦性没食子酸; E: TrGH61+L-抗坏血酸; F: TrGH61+焦性没食子酸.

Note: A: Cellulase; B: Cellulase+TrGH61; C: Cellulase+TrGH61+L-ascorbic acid; D: Cellulase+TrGH61+Pyrogallic acid; E: TrGH61+L-ascorbic acid; F: TrGH61+Pyrogallic acid.



**图 7 不同浓度电子供体条件对 TrGH61 与纤维素酶协同降解微晶纤维素的影响**

**Figure 7 Effect of reductive electron donor concentration on synergism of TrGH61 and cellulase in hydrolysis of avicel**

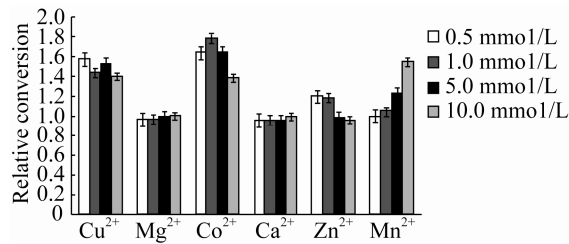


图8 不同金属离子对 TrGH61 与纤维素酶协同作用降解稻草粉的影响

Figure 8 Effect of metal ions on synergism of TrGH61 and cellulase in hydrolysis of straw mill

## 2.7 TrGH61 蛋白对底物结晶结构的影响

**2.7.1 稻草粉的聚合度分析:**采用粘度法测定稻草粉的聚合度<sup>[18]</sup>,结果列于表3,实验组  $t$  为 344 s,  $t_0$  为 228 s, 对照组  $t$  为 352 s,  $t_0$  为 228 s。由表3可知,经 TrGH61 蛋白处理的稻草粉聚合度  $DP$  值为 220,相比未处理的稻草粉  $DP$  值 239 有所降低,表明 TrGH61 蛋白对纤维素底物结晶结构存在一定破坏。

**2.7.2 稻草粉的结晶度分析:**经 TrGH61 蛋白处理稻草粉(图9中B)的纤维素结晶度(公式1求得)为 33.26%,而未处理组(图9中A)纤维素结晶度为 44.58%,表明 TrGH61 处理后稻草粉纤维素结晶区比例显著降低,说明 TrGH61 能够破坏稻草粉纤维素结晶区而影响纤维素结晶结构。

表3 试样  $t$ 、 $t_0$  及  $DP$  值的测定结果

Table 3 Measured data of  $t$ ,  $t_0$  and  $DP$  for samples

试样 Samples	试样稻草粉质量 Sample mass of straw powder (50 mL/g)	$t$ (s)	$t_0$ (s)	$DP$
实验组 Treated by TrGH61	0.2	344	228	220
对照组 Control	0.2	352	228	239

## 3 讨论

作为植物细胞及组织的主要成分,木质纤维素天然具有抵御纤维素酶降解的能力,但这也成为有效利用木质纤维素资源制备生物燃料的主要障碍<sup>[22]</sup>。数十年来,大量研究人员长期致力于提高

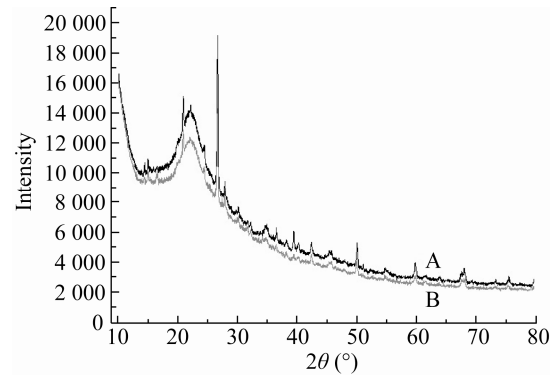


图9 稻草粉的 X 射线衍射图谱

Figure 9 The diffraction pattern of X-ray of rice straw

注: A: 对照组; B: TrGH61 蛋白处理组。

Note: A: Control; B: Treated by TrGH61.

纤维素酶对木质纤维素的水解效率,并取得了长足的进展,但对第二代生物燃料的工业化生产而言仍存在差距<sup>[23]</sup>。以往的研究工作多数从提高纤维素酶本身的活性入手,很少能跳出酶水解反应的框框。GH61 糖苷酶家族蛋白具有糖苷氧化酶活性,它通过使纤维素的糖苷键氧化断裂而破坏其牢固结构,其开发与应用可能是提高木质纤维素可降解性的另一种有效途径<sup>[24]</sup>。建立 GH61 家族蛋白的高效表达与纯化技术是对其开发应用的有力保障。

本文利用 *T. reesei* QM9414 进行了 TrGH61 蛋白的高效同源表达,较系统地研究了纯化蛋白的酶学性质以及其与纤维素酶在木质纤维素水解中的协同效应。GH61 蛋白在水解木质纤维素中的作用研究越来越受关注,但迄今为止缺乏其高效表达和制备技术。本工作利用 *T. reesei* 的组成型启动子  $P_{pdc}$  (丙酮酸脱羧酶基因的启动子)实现了 TrGH61 的组成型高效表达,并证实了表达纯化的 TrGH61 与纤维素酶在水解木质纤维素中的协同作用,明确了金属离子和外源电子供体对 TrGH61 与纤维素酶协同作用的影响,初步探讨了 TrGH61 氧化降解稻草粉纤维素的作用机制,为其制备以及在木质纤维素水解中的实际应用提供技术基础。



## 参 考 文 献

- [1] 布坎南 BB, 格鲁依森姆 W, 琼斯 RL, 等. 植物生物化学与分子生物学[M]. 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 等译. 北京: 科学出版社, 2004: 45-66.
- [2] Quinlan RJ, Sweeney MD, Leggio LL, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(37): 15079-15084.
- [3] Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, et al. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose[J]. PLoS One, 2011, 6(11): 1-11.
- [4] Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, et al. The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 383(1): 144-154.
- [5] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Ishida T, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides[J]. Science, 2010, 330(6001): 219-222.
- [6] Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, et al. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(2): 890-892.
- [7] Harris PV, Welner D, McFarland KC, et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family[J]. Biochemistry, 2010, 49(15): 3305-3316.
- [8] Yakovlev I, Vaaje-Kolstad G, Hietala AM. Substrate-specific transcription of the enigmatic GH61 family of the pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* during growth on lignocellulose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(4): 979-990.
- [9] Dotson WD, Greenier J, Ding H. Polypeptides having cellulolytic enhancing activity and polynucleotides encoding same: US, 7271244[P]. 2007-09-18. <http://google.com.tw/patents/EP2653539A1?cl=en&hl=zh-CN>.
- [10] Brown K, Harris P, Zaretsky E, et al. Polypeptide from a cellulolytic fungus having cellulolytic enhancing activity: US, 07361495 B2[P]. 2008-04-22. <http://google.com.hk/patents/US7361495?hl=zh-CN&cl=en>.
- [11] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008, 11(28): 83-87.
- [12] 汤新, 刘刚, 田生礼, 等. 里氏木霉内切葡萄糖苷酶IV在毕赤酵母中的表达[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 47-51.
- [13] 刘刚, 张燕, 李云, 等. 利用红色荧光蛋白分析里氏木霉合成纤维素酶的机理[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 69-74.
- [14] Mandels M, Andreotti RE. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation[J]. Process Biochemistry, 1978(13): 6-13.
- [15] Penttil M, Nevalainen H, Ratto M, et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Gene, 1987, 61(2): 155-164.
- [16] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南(下册)[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2008: 1471-1485.
- [17] Mandels M, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 1976(6): 21-23.
- [18] 康康. 青霉 Swollenin 的基因克隆表达及促进纤维素酶活性研究[D]. 广东: 华南农业大学博士学位论文, 2010.
- [19] 哈丽丹·买买提, 努尔买买提, 吾满江·艾力. 粘度法测定植物纤维素的聚合度[J]. 合成纤维工业, 2006, 29(1): 40-42.
- [20] 任大明, 马艳, 于盼盼, 等. NaOH 与<sup>60</sup>Co-γ 射线复合处理对酶法水解稻草的影响[J]. 辽宁农业科学, 2013(2): 24-26.
- [21] Dimarogona M, Topaka E, Olsson L, et al. Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*[J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 480-487.
- [22] Himmel ME, Ding SY, Johnson Dk, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. Science, 2007, 315(5813): 804-807.
- [23] Aden A, Foust T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to the ethanol[J]. Cellulose, 2009, 16(4): 535-545.
- [24] Leggio LL, Welner D, Maria LD. A structural overview of GH61 proteins-fungal cellulose degrading polysaccharide monooxygenases[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2012, 2(3): 1-8.