

# 瑞氏木霉纤维素酶基因在酿酒酵母中的表达研究

丁新丽,汪天虹\*,张光涛,卢 翌

(山东大学微生物技术国家重点实验室,山东 济南 250100)

**摘 要:** 从瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*) cDNA 文库中克隆到外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I (CBHI) cDNA 基因,将该基因分别连接到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表达载体 pAJ401 和 pVT100\_U 上,构建了重组质粒 pAJ401-cbh1 和 pVT100\_U-cbh1。分别电转化 2 个重组质粒转移至酿酒酵母 H158 中,得到重组酵母 HPC 和 HAC,实现了 CBHI 的分泌型表达。再将质粒 pAJ401-cbh1 转入已含有瑞氏木霉内切葡聚糖酶 I 基因 *egl* 的重组酵母 H1m 中,构建了同时表达 *cbh1* 和 *egl* 的重组酵母菌株 HMEPC。比较 HMEPC 和 H1m 对纤维素底物的降解,前者滤纸酶活比后者提高 14.3%,表明 CBHI 与 EGI 对滤纸降解有协同作用。

**关键词:** 瑞氏木霉; 纤维素酶基因; 酿酒酵母

中图分类号: Q78 TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2005)09-0028-03

## Study of the Expressions of Cellulase From *Trichoderma Reesei* in *Saccharomyces Cerevisiae*

DING Xin-li, WANG Tian-hong, ZHANG Guang-tao and LU Yi

(National Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

**Abstract:** The *cbh1* gene was obtained by PCR from *T.reesei* cDNA library and was inserted into *S.cerevisiae* expression vector pAJ401 and pVT100\_U to construct the expression cassette of *cbh1*. The *cbh1* gene was transferred to *S.cerevisiae* on the different expression plasmid, and CBHI was produced by recombinant *S. cerevisiae* strains HPC and HAC with cellobiohydrolases activities 4 U/L and 3.5 U/L respectively. CBHI and EGI co-expressing recombinant *S.cerevisiae* strain HMEPC was constructed. The filter paper activity of HMEPC increased 14.3% than that of H1m, which indicated the synergism between *cbh1* and *egl* (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** *Trichoderma reesei*; cellobiohydrolases I; gene expression; *Saccharomyces cerevisiae*

纤维素物质是地球上最丰富的可再生资源,植物材料的主要组分除了半纤维素和木素以外,就是纤维素。纤维素物质占地球总生物量的 40%,它由  $\beta$ -1,4-键连接的葡萄糖单位长链组成,这些长链再形成更复杂的纤维素结构。将纤维素物质转化为人类社会所需要的糖类、乙醇及其他化工产品是对可再生资源利用中的一项重要内容,与人类的生存有密切关系。

丝状真菌瑞氏木霉是目前发现的对纤维素降解最有效的菌种之一。纤维素酶系含有三大类组分:内切葡聚糖酶(endoglucanase, EG)、纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, CBH)和葡萄糖苷酶(glucosidases)<sup>[1]</sup>,不同的纤维素酶组分通过相互之间协同作用降解纤维素。因此瑞氏木霉纤维素酶基因的克隆和表达具有重要的意义和

广泛的应用前景。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株和质粒

实验中所用大肠杆菌 *Escherichia coli*, 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 各菌株及质粒的遗传特征见表 1。

#### 1.2 培养基

培养 *E. coli* 用 LB 培养基;培养 *S.cerevisiae* H158 用 YPD 培养基;培养重组酵母用选择性合成培养基 SC-Ura 或 SC-Ura-Leu。

#### 1.3 分子克隆用酶及试剂盒

限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自宝生物工程(上海)有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自上海博亚生物技

收稿日期: 2005-04-01

作者简介:丁新丽(1979-),女,威海市人,硕士,研究方向为微生物遗传与分子生物学。

\*汪天虹 通讯作者。

表1 菌株与质粒

| Strains and plasmids      | Properties of heredity                                                                                            | Selective marker | References or sources              |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------|
| pUCm-T Vector             | Amp <sup>r</sup> Lac POZ rep                                                                                      | Amp <sup>r</sup> | Sangon Present paper               |
| pUCm-T-cbh1               | plasmid pUCm-T with entire <i>cbh1</i>                                                                            | Amp <sup>r</sup> | gene from <i>T.reesei</i>          |
| pAJ401                    | 5.55Kb, with Ura3, 2μ plasmid origin and <i>pgk1</i> promoter and terminator of <i>S. cerevisiae</i>              | SC-Ura           | Inst. of Biotechnol., VTT, Finland |
| pAJ401-cbh1               | plasmid pAJ401 with entire <i>cbh1</i> gene from <i>T.reesei</i>                                                  | SC-Ura           | this study                         |
| pVT100_U                  | 6.88Kb, with Ura3, 2μ plasmid origin and <i>adh1</i> promoter and terminator of <i>S. cerevisiae</i>              | SC-Ura           | this lab                           |
| pVT100_U-cbh1             | plasmid pVT100_U with entire <i>cbh1</i> gene from <i>T.reesei</i>                                                | SC-Ura           | Present paper                      |
| <i>E.coli</i> DH5 α       | F', supE44, Δ (argF lacZya) U169 Φ80lacZΔ15, hs-dR17(rk', mk'), recA1, end A1, gyr96, thi1, relA1, λ <sup>-</sup> |                  | this lab                           |
| <i>S.cerevisiae</i> H158  | leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his4-519                                                                             | SC-Ura           | Inst. of Biotechnol., VTT, Finland |
| <i>S.cerevisiae</i> H1m   | <i>S.cerevisiae</i> H158 with plasmid pRS415ME                                                                    | SC-Leu           | this lab <sup>[2]</sup>            |
| <i>S.cerevisiae</i> HPC   | <i>S.cerevisiae</i> H158 with plasmid pAJ401-cbh1                                                                 | SC-Ura           | this study                         |
| <i>S.cerevisiae</i> HAC   | <i>S.cerevisiae</i> H158 with plasmid pVT100_U-cbh1                                                               | SC-Ura           | this study                         |
| <i>S.cerevisiae</i> HMEPC | <i>S.cerevisiae</i> H158 with plasmids pRS415ME and pAJ401-cbh1                                                   | SC-Leu-Ura       | this study                         |

术有限公司,PCR引物由博亚公司合成。凝胶回收试剂盒购自Omega公司。

#### 1.4 DNA操作

大肠杆菌质粒DNA提取、限制性内切酶酶切、DNA片段回收、DNA连接和大肠杆菌转化等均按《分子克隆实验指南》所述进行。酵母质粒的提取和酵母细胞电穿孔转化按《精编分子生物学实验指南》所述进行。

#### 1.5 PCR引物设计和扩增反应

根据文献<sup>[3]</sup>给出的瑞氏木霉*cbh1*cDNA序列,设计两对特异性引物A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>和B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>。其中A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>用于PCR合成*cbh1*cDNA全长序列,其5'端均引入Xho I限制性酶切位点和保护碱基;B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>用于扩增*cbh1*cDNA部分序列,以便进行重组质粒的验证。

合成*cbh1*cDNA全长序列PCR反应条件:

A<sub>1</sub> 5'-ATATCTCGAG-CCAAGAATCTACCGTGCGTC-3'

Xho I

A<sub>2</sub> 5'-GTCACCTCGAG-CGCGGACTGGCATCATGTATC-3'

Xho I

以*T.reesei*cDNA库为模板,A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>为引物,循环条

件 94℃ 5 min 94℃ 0.5 min 55℃ 0.5 min 72℃ 2 min 30个循环 72℃ 10 min。

扩增*cbh1*cDNA部分序列PCR反应条件:

B<sub>1</sub> 5'-GACTGGCATCATGTATCGGAA-3'

B<sub>2</sub> 5'-TACTTGCTCACGCCACCATCC-3'

以含有*cbh1*cDNA的重组质粒为模板,B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>为引物,循环条件 94℃ 5 min; 94℃ 0.5 min 60℃ 0.5 min 72℃ 2 min 30个循环 72℃ 10 min。

#### 1.6 *cbh1*cDNA基因序列测定

按双脱氧法进行。

#### 1.7 重组酵母CBH I酶活测定

pNPC溶于50 mmol/L pH 4.8 醋酸缓冲液中,浓度为0.5%(w/v),同时加入0.1%(w/v)葡萄糖内酯以抑制β-葡萄糖苷酶对纤维二糖侧链的水解。2 mL反应液中加CBH I培养物上清液1 mL 50℃保温12 h后加10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 mL终止反应 420 nm测定对硝基酚的生成量<sup>[4]</sup>。单位酶活力定义为1 min产生1 μmol对硝基酚的酶量为一个酶活力单位。

#### 1.8 滤纸酶活测定方法

该方法为反应多酶组分协同水解纤维性材料产生还原糖能力的酶活力测定方法。50 mg±5 mg Whatman No.1 滤纸加1 mL pH 4.8 50 mM NaAc 缓冲液和1 mL酶液 50℃反应12 h,用DNS法于550 nm测定还原糖生成量(以葡萄糖为标准)<sup>[4]</sup>。每1 min产生1 μg葡萄糖所需酶量定义为一个酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因克隆和序列分析

按1.5所述,以引物A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>进行PCR获得了1611 bp *cbh1*cDNA特异条带(图略),将其连接到pUCm-T载体,获得质粒pUCm-T-cbh1(图1A)。用*cbh1*cDNA基因内部以及pUCm-T质粒载体上的BamH I、Xho I酶切位点进行鉴定,BamH I酶切产生了3.9 kb和0.5 kb两片段,Xho I酶切产生了1.6 kb和2.8 kb两片段,实验结果显示*cbh1*基因片段插入方向正确。对质粒插入片段进行测序,测序结果与文献报道序列一致<sup>[3]</sup>。

### 2.2 酿酒酵母纤维二糖水解酶表达质粒的构建

质粒pUCm-T-cbh1用Xho I酶切后回收1.6 kb *cbh1*片段,分别插入经Xho I酶切的质粒pAJ401和pVT100\_U,得到含P<sub>pgk1</sub>-*cbh1*-T<sub>pgk1</sub>表达盒的重组质粒pAJ401-cbh1(见图1B)和含P<sub>adh1</sub>-*cbh1*-T<sub>adh1</sub>表达盒的

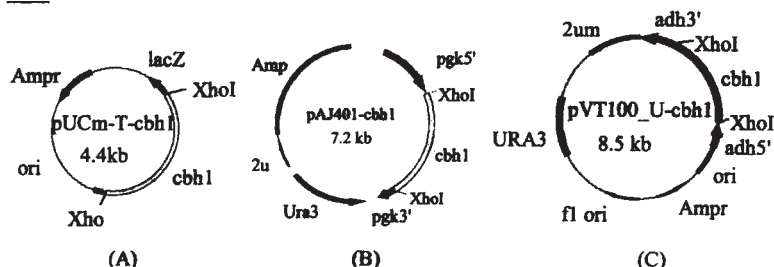


图 1 pUCm-T-cbh1(A) pAJ401-cbh1(B)和 pVT100\_U-cbh1(C)质粒图

重组质粒 pVT100\_U-cbh1(见图 1C)。

### 2.3 *cbh1* 分泌型表达质粒对酿酒酵母的转化

使用电穿孔方法将质粒 pAJ401-cbh1 和 pVT100\_U-cbh1 分别转入酿酒酵母 H158 菌株,转化细胞涂布于选择性培养基 SC-Ura 上;将 pAJ401-cbh1 转化含有瑞氏木霉 *egl* 基因的重组酿酒酵母 H1m 菌株,转化细胞涂布于选择性培养基 SC-Leu-Ura 上。30℃培养 3~6 d,得到的 3 种酵母转化子依次命名为 HPC、HAC 和 HMEPC。

### 2.4 重组酿酒酵母验证

挑选重组酵母 HPC、HAC 和 HMEPC 各一株,提取其酵母总 DNA,用琼脂糖凝胶电泳检测染色体带和质粒带(图略)。以重组酵母总 DNA 为模板,以 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 为引物进行 PCR 扩增,得到了 0.6 kb *cbh1* 特异带;以质粒 pAJ401-cbh1 为模板进行 PCR 作为对照,得到相同大小的特异性带(图略)。试验结果证实 HPC、HAC 和 HMEPC 3 种重组酵母细胞中确实转入了 *cbh1*。

### 2.5 重组酵母 CBHI 酶活测定

随机挑选 HPC、HAC 和 HMEPC 转化子各 9 株,接入 5 mL YPD 液体培养基,30℃ 200 r/min 培养 72 h。取出 3 mL 培养液,离心取上清液,用 pNPC 法测定分泌至胞外的 CBHI 酶活力。重组酵母 HPC、HAC 和 HMEPC 的酶活力分别为 0.067 u/L、0.058 u/L 和 0.063 u/L,宿主菌株 H158 无酶活力(图 2)。

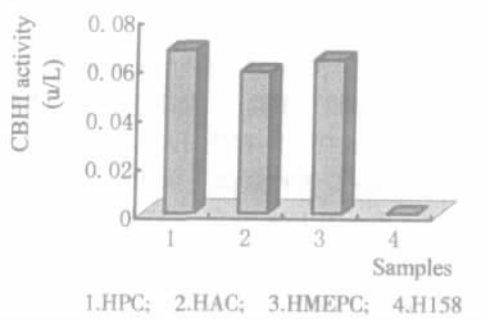


图 2 重组酵母 CBHI 酶活

### 2.6 *cbh1* 和 *egl* 在重组酵母 HMEPC 中的共表达

接种 H1m、HMEPC、HPC 和 H158 菌株于 5 mL YPD 液体培养基中,30℃ 200 r/min 培养 12 h,然后以相同菌浓度接入 50 mL YPD 液体摇瓶中,30℃ 200 r/min 培养 72 h。取出 2 mL 培养液,离心取上清液,测定各酵母

菌株所分泌的胞外酶对滤纸的分解情况。结果 H158 无滤纸酶活力,HPC 和 HMEPC 的滤纸酶活力分别为 H1m 的 3.1% 和 114.3%(见图 3)。

本实验从瑞氏木霉 cDNA 文库中克隆到外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I(CBHI)基因,并构建了分别在不同酵母启动子 *pgk1* 和 *adh1* 控制下的 *cbh1* 表达质粒 pAJ401-cbh1 和 pVT100\_U-cbh1。通过电转化使重组质粒转移至实验室酿酒酵母 H158 菌株中,得到了 2 种酵母转化子

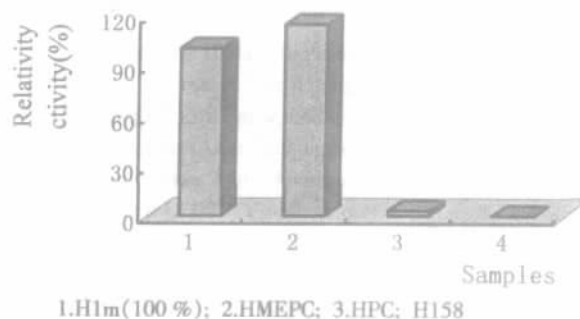


图 3 重组酵母的相对滤纸酶活

HPC 和 HAC。它们所产生的 CBHI 都能在酶自身信号肽序列引导下进行分泌型表达,但其 pNPC 酶活力都不高,分别为 0.067 u/L 和 0.058 u/L,其原因有可能是酶的糖基化程度过高、以及向胞外分泌的比例较少所致。由实验结果还可以看到 *pgk1* 和 *adh1* 虽同为酵母强启动子,但在它们控制下的 *cbh1* 表达程度并不相同, *pgk1* 的启动功能似乎更强,比 *adh1* 高出约 15.5%。而 HMEPC 是含有 *cbh1* 与 *egl* 两个表达质粒的重组酵母菌株,以 pNPC 为底物的测定方法只体现其 CBHI 酶活力,因此测定的酶活力数值与 HPC 和 HAC 菌株接近,为 0.063 u/L。

内切纤维素酶能够通过内部随机攻击碳水化合物链而水解可溶性的替代性纤维素,如经常用来确定内切葡聚糖酶活性的底物羧甲基纤维素(carboxyl-methylcellulose, CMC),但对高度有序的结晶纤维素活力较低;外切纤维素酶对替代纤维素无效但能够降解结晶纤维素,从纤维素链的非还原末端或还原末端剪切纤维二糖单位,葡萄糖苷酶能把其他酶产生的纤维二糖和其他短的纤维寡糖水解成葡萄糖<sup>[5]</sup>。本论文中,以滤纸为底物的酶活测定方法可以反应多酶组分协同水解纤维性材料产生还原糖能力。由于 HPC 只含有 *cbh1* 表达质粒,其对滤纸的降解由还原糖法基本检测不到(仅为 H1m 的 3.1%)。含有 *cbh1* 与 *egl* 两个表达质粒的重组酵母 HMEPC 与只含有 *egl* 表达质粒的重组酵母 H1m 相比,对纤维素底物滤纸的降解酶活前者比后者提高了 14.3%,这也在一个侧面证实了 CBHI 与 EGI 对滤纸降解的协同作用。同时,本试验结果也为扩展酿酒酵母底物利用范围,以及通过遗传操作改良酿酒酵母菌株、改进啤酒发酵生

(下转第 35 页)

表 5 贵州省 12 种白酒中醛及缩醛类组分的相对百分含量

| 组分名称            | 茅台酒   | 习酒   | 珍酒   | 怀酒   | 董酒   | 习水大曲 | 鸭溪窖酒 | 安酒   | 精酿醇  | 青酒   | 平坝窖酒 | 金华白酒 |
|-----------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 3-甲基丁醛          | 0.69  | 0.42 | 0.78 | 0.55 | 0.06 | 0.26 | 0.28 | 0.26 | 0.22 | 0.31 | 0.01 | 0.38 |
| 1,1-二乙氧基乙烷      | 13.13 | 8.82 | 6.63 | 5.90 | 1.96 | 4.59 | 3.33 | 5.15 | 2.25 | 2.31 | 0.27 | 3.09 |
| 1,1-二乙氧基丙烷      | 0.17  | 0.12 | 0.29 | 0.14 | 0.02 | 0.05 | 0.04 | 0.06 | 0.27 | -    | -    | -    |
| 1,1-二乙氧基-2-甲基丙烷 | 1.05  | 0.37 | 1.14 | 0.20 | 0.05 | 0.45 | 0.26 | 0.43 | -    | -    | 0.01 | 0.50 |
| 糠醛              | 0.21  | 0.11 | 0.13 | 0.11 | -    | -    | 0.02 | -    | 0.02 | 0.03 | -    | -    |
| 1,1-二乙氧基-3-甲基丁烷 | 7.57  | 4.06 | 6.87 | 4.22 | 0.65 | 3.56 | 2.86 | 3.37 | 1.82 | 0.65 | 0.06 | 0.64 |
| 1,1-二乙氧基己烷      | 0.12  | 0.06 | 0.12 | 0.11 | 0.06 | 0.19 | 0.19 | 0.14 | 0.06 | 0.02 | -    | -    |
| 2-乙氧基呋喃甲烷       | 0.25  | 0.22 | 0.23 | 0.16 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 壬醛              | -     | -    | -    | 0.04 | -    | 0.04 | 0.05 | 0.05 | -    | -    | -    | -    |

酒中重要的风味成分。其中,1,1-二乙氧基乙烷、1,1-二乙氧基-3-甲基丁烷、1,1-二乙氧基-2-甲基丙烷、3-甲基丁醛、1,1-二乙氧基己烷、2-乙氧基呋喃甲烷等是贵州白酒特征性的缩醛类组分。

## 2.6 贵州 12 种白酒中的其他组分

据报道,在洋酒的 GC-MS 分析中<sup>[4,5]</sup>,也发现烷烃物质的存在。在分析图谱过程中,发现茅台酒、习酒、习水大曲中含有一定量的异辛烷、辛烷和癸烷。茅台酒在 RT22.17 min 处出现 2,5-二甲基-3-N-丁基吡嗪化合物的特征峰,相对含量为 0.03 %。习酒、珍酒、青酒中出现了二甲基二硫化物和二甲基三硫化物的特征峰。习水大曲出现二甲基二硫化物特征峰。怀酒在 RT18.45 min 处发现有甘菊环(azulene)特征峰,含量为 0.17 %,这些物质可能与当时使用的生产工具有关。鸭溪大曲、精酿醇、安酒中出现了庚烷特征峰。精酿醇在 RT13.77 min 处出现二甲基三硫化物的特征峰。平坝窖酒出现了庚烷、辛烷和癸烷的特征峰。金华白酒也出现了辛烷的特征峰。

## 3 讨论

3.1 研究结果表明,贵州酱香型白酒中的挥发性醇类组分主要是 3-甲基丁醇、2-甲基丁醇、己醇和 2-甲基丙醇等组分(除乙醇外),它们对香气的贡献较大。董酒中 3-甲基丁醇、己醇、2-甲基丙醇和 2-甲基丁醇等组分较突出。浓香型白酒中 3-甲基丁醇和己醇等组分较明显。

3.2 贵州传统酱香型白酒和浓香型白酒中挥发性的酸

类组分主要由棕榈酸、油酸和亚油酸等构成。其中,浓香型白酒中己酸的相对百分含量比较明显。

3.3 贵州酱香型白酒中的丙酸乙酯、苯乙酸乙酯、2-甲基丙酸乙酯的相对百分含量要高于浓香型白酒,这是贵州白酒酯类组分的一大特点。

3.4 贵州白酒中的 1,1-二乙氧基乙烷、1,1-二乙氧基-3-甲基丁烷、1,1-二乙氧基-2-甲基丙烷、3-甲基丁醛、1,1-二乙氧基己烷、2-乙氧基呋喃甲烷等是贵州白酒特征性的缩醛类组分。

致谢: 特别感谢江南大学中央研究所的王利平老师、刘扬岷老师和袁身淑老师在仪器分析工作和数据分析中给予的帮助。

## 参考文献:

- [1] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [2] 沈怡方.李大和.低度白酒生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
- [3] 吴天祥.贵州名优白酒香气成分的研究.贵州省教育厅科学基金项目.2003.
- [4] Benn SM,Peppard TL.Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis[J].Agric Food Chem, 1996 (44):557-566.
- [5] WuTian-xiang,et al. Study on fragrance of China's Moutai Liquor by GC/MS analysis[A]. Proceedings of 5th international food science and technology forum[C]. 2002.

(上接第 30 页)

产等方面进行了有益的前期探索工作和奠定了一定的技术基础。

## 参考文献:

- [1] Penttila M.E., Andre L., Saloheimo M. et al. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanase in the yeast *saccharomyces cereviae*[J]. Yeast, 1987,(3):75-85.
- [2] 丁新丽,黄晶,汪天虹.瑞氏木霉内切葡聚糖酶基因在酿酒酵母中的表达研究[J].食品与发酵工业,2004,(11):18-22.
- [3] Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M. et al. Molecular

- cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27[J]. Biotechnology (N.Y.), 1983,(1):691-696.
- [4] Mandels M, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulase, In: Gaden EL, Mandels MH, Reese ET, Spano LA eds[J].Bio/Technology and Bioengineering Symposium.1976,(6):21-33.
- [5] Stahlberg J, Johansson G, Pettersson G. A binding-Site-Deficient, catalytically active, core protein of endoglucanase I II from the culture filtrate of *T. reesei*[J] Eur. J. Biochem, 1988, 173-183.