

纤维素酶的分泌表达及其在生物炼制中的应用

摘要

整合生物加工 (CBP) 工艺是木质纤维素生物炼制过程中一种重要策略。在利用纤维质底物进行微生物发酵的过程中, 用于 CBP 过程的菌株通常集成了纤维素酶生产、纤维质水解以及单糖发酵三个功能, 以此减少甚至替代发酵过程中纤维素酶的使用, 从而降低生物炼制加工成本。虽然自然界很少存在具备 CBP 齐全功能的野生菌种, 但是随着近年来人们在能源微生物领域研究的逐渐深入和基因工程技术的日趋成熟, 人们在 CBP 菌株的构建方面开始有越来越多的积累和认识, 许多有 CBP 潜力的微生物正在被进行各方面的研究, 以获得合适的 CBP 发酵菌株并在大规模发酵过程中进行应用。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 具备极其良好基因工程改造性能, 虽然野生型的大肠杆菌不具备产纤维素酶的能力以及高附加值产物的发酵生产能力, 但是由于其易于改造, 所以可以通过基因工程的手段将其改造成为一株 CBP 菌株。实验中, 首先通过在大肠杆菌基因组中整合源自运动发酵单胞菌的醇脱氢酶 (*adhB*) 基因和丙酮酸脱羧酶 (*pdC*) 基因, 从而在大肠杆菌中引入乙醇的生产途径, 使其能够利用碳源进行乙醇发酵生产。在此基础上, 我们又利用有效的启动子和信号肽, 在重组产乙醇大肠杆菌中分别分泌表达了不同的纤维素酶基因: 源自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因 (*celA*)、外切葡聚糖酶基因 (*cbhA*) 以及源自多黏芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 (*bglB*)。三种基因的重组菌都表现出了对应纤维素酶的分泌表达特性, 并在发酵过程中体现了对相应底物的利用能力和乙醇生产能力。然而, 大肠杆菌具有良好的外源基因表达能力, 但是其分泌能力并不理想, 为了改善重组菌纤维素酶的分泌情况, 我们在又尝试了在发酵过程中添加表面活性剂的策略, 以期其能增加细胞通透性并促进纤维素酶的分泌表达。通过实验我们在几种表面活性剂中确定 EDTA 具有最好的效果, 并在表达 *bglB* 基因的产乙醇重组大肠杆菌利用纤维二糖发酵产乙醇的过程中表现出了明显的效果, 促进了底物的利用并提高了乙醇的生产。

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 是一种革兰氏阴性菌, 通过 ED 途径专一地利用葡萄糖、果糖和蔗糖进行乙醇发酵, 能够得到接近理论产量的乙醇。同时, 运动发酵单胞菌还拥有良好的产物耐受性、低量氧气需求等性能, 因而成为一株优良的乙醇发酵菌株。但是运动发酵单胞菌缺乏对纤维质底物的利用能力和相关的纤维素降解基因。基于此, 本论文通过基因工程改造的手段, 在运动发酵单胞菌中尝试新的表达策略, 进行了纤维二糖酶基因 *bglB* 的表达。首先我们通过内源性沉默纤维素酶基因 ZMO1086 的过表达, 确认了纤维素酶在运动发酵单胞菌中表达的可能性并对其分泌表达的情况进行了研究; 接着, 利用 ZMO1086 的信号肽成功地将 *bglB* 在运动发酵单胞菌中进行了分泌表达。同时, 发现 *bglB* 能够通过和宿主菌中的果聚蔗糖酶基因 *sacB* 进行融合, 进而以

融合蛋白的形式进行分泌表达。相应的基因工程重组菌在利用纤维二糖的发酵试验中，体现出了一定的纤维二糖利用能力。本实验研究了外源纤维二糖酶在运动发酵单胞菌中分泌表达情况，测试了两种新的分泌表达策略，为今后运动发酵单胞菌中纤维素酶表达的实验提供了基础和思路。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 也是一种拥有成熟的基因改造系统的菌株，并具有相当良好的蛋白分泌性能。同时该菌株在生长过程中也能进行一些诸如丁醇、乳酸等物质的生产。研究发现了一个源自热纤梭菌的 β -1,3-1,4-葡聚糖基因 *licB*，并在枯草芽孢杆菌中进行了分泌表达。*licB* 基因在表达后表现出了相当优秀的耐热性能，最适酶活性高达 80 °C，且分泌到胞外的蛋白在 70 °C 下半衰期达到 5 h；同时 LicB 在 pH 4-11 的范围内都有很好的催化表现，并不易受金属离子的影响，仅 Cu²⁺和 Fe²⁺会对其酶活产生比较明显的抑制。良好的耐热性能以及广泛的 pH 适性使得 LicB 蛋白拥有相当广阔的应用前景，而枯草芽孢杆菌对纤维素酶表现出来的良好的表达和分泌性能也能在 CBP 发酵应用中起到重要的作用。

本研究文论通过对运动发酵单胞菌、大肠杆菌以及枯草芽孢杆菌这些潜在的 CBP 菌株进行了基因工程改造，尝试并实现了不同的纤维素酶基因在不同菌体中的表达，研究了菌体中纤维素酶分泌的情况并进行了一些 CBP 发酵的尝试和改进。通过实验我们总结了一些 CBP 基因工程菌研究的基本规律，为实现 CBP 基因工程菌的构建和应用打下了基础。

关键词：运动发酵单胞菌；大肠杆菌；枯草芽孢杆菌；CBP 基因工程菌；纤维素酶；分泌表达。

Secretive Expression of Cellulase Enzyme and Its Application in Biorefinery Processes

Abstract

Consolidated bioprocessing process (CBP) is an important strategy in biorefinery processes using lignocellulose as the substrate. CBP microbes must own the ability of cellulase production, cellulose hydrolysis, and fermentation to reduce the cost of biorefinery process through the decrease of the cellulase dosage. Few wild type strains are capable of CBP functions with all the three properties, therefore metabolic engineering is the major focus for developing CBP strains, and great efforts have been invested into the this field.

Escherichia coli is not capable of cellulose degradation and ethanol fermentation, but it could be genetically engineered to behave the CBP properties. In this thesis, *E. coli* was engineered by integrating two genes from *Zymomonas mobilis*, pyruvate decarboxylase gene (*pdh*) and alcohol dehydrogenase gene (*adhB*), into the genome of *E. coli* JM109 to obtain the ethanologenic *E. coli* recombinant. Then, the β -glucosidase gene *bglB* from *Bacillus polymyxa*, as well as the endoglucanase gene *celA* and the exoglucanase gene *cbhA* from *Clostridium thermocellum*, were heterologously expressed in the recombinant *E. coli* by using the screened promoters and signal peptides. The recombinant *E. coli* strains containing the genes demonstrated the corresponding intracellular cellulase activity and CBP fermentability. Moreover, the surfactants were used to enhance the release of cellulase proteins from the periplasm space into the medium by increasing the permeability of the cell membrane and promoting the secretion of the cellulase proteins. The addition of 0.5 % EDTA showed the most obviously improvement in the ethanol fermentation by using cellobiose as the substrate.

Zymomonas mobilis is a gram-negative facultative bacterium for production of ethanol at a high yield through ED pathway using glucose, fructose and sucrose as the substrate, as well as lower biomass production, facultative oxygen requirement and the tolerance to the toxicity of the final product. However, *Z. mobilis* is unable to degrade the lignocellulose. In this thesis, new expression strategies were investigated and the β -glucosidase gene *bglB* from *Bacillus polymyxa* was secretively expressed in *Z. mobilis*. The endogenous cellulase gene *ZMO1086* was over-expressed in *Z. mobilis* to test the possibility and secretion situation of cellulase. Then the signal peptide of *ZMO1086* was used to facilitate the secretive expression of *bglB* in *Z. mobilis*. We also found that the BglB protein could be secreted through the form of fusion

protein by fused with the levansucrase *sacB* gene of *Z. mobilis*. The recombinant *Z. mobilis* expressing the *bglB* gene showed the ability of cellobiose utilization. The study of the new expression strategies and the BglB secretion in *Z. mobilis* improved the understanding on the cellulase expression and provided some new methods for the future secretive expression of cellulase in *Z. mobilis*.

Bacillus subtilis is frequently used for the secretive expression of various heterogeneous proteins for its excellent protein secretive capacity. It also performance well in the fermentaion process to produce lactic acid or butane for its outstanding utilization of hexose and pentose, fast growth rate, and low nutrient need. A β -1,3-1,4-glucanase gene *licB* was obtained from *Clostridium thermocellum* and secretively expressed in *Bacillus subtilis*. LicB showed the optimal β -1,3-1,4-glucanase activity at 80 °C and pH at 7 in a wide pH range from 4 to 11. The secreted protein retained more than 50% activity when being incubated at 70 °C for 5 hours. It is active in the condition with different metal ion except for Cu^{2+} and Fe^{2+} . The thermostability and pH adaptability make LicB can be widely used in the industrial processing, and the excellent expression and secretion of cellulase in *Bacillus subtilis* may play an important role in the CBP research.

Conclusively, the genetic engineering research on the potential CBP strains of *Zymomonas mobilis*, *E. coli* and *Bacillus subtilis* were investigated. The secretion of cellulase through expressing different cellulase gene in different strains realized the CBP fermentation capacity at different extent. The study paved the way of constructing and applying CBP strain in biorefinery processes.

Key words: Consolidated bioprocessing (CBP), *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, cellulase, secretively expression.

目录

第一章 前言

生物炼制是通过微生物对再生的生物质进行利用，同时整合对生物质进行转化的工艺和设备来生产燃料、化学产品及能源的工艺流程。在未来生物产业的发展中，生物炼制被认为是新型生物产业的基础与核心。随着科技的逐年发展，近代科学技术在化学、机械和生物领域取得的进步使得生物炼制对于可再生的生物质原材料的应用能力大幅度提高。而近年来合成生物学、生物组学和系统生物学等新兴生物学科的兴起，人们对微生物进行分析和改造的手段也变得更加全面而丰富，为促进生物炼制的发展提供了许多崭新的研究方法和思路。

1.1 生物炼制的意义

目前随着人类社会的不断发展，全球各地的人们对于自然资源的需求和依赖也在不断增长。随着上世纪七十年代石油危机在全球的爆发，人们终于开始认识到，对传统化石燃料能源（包括石油、煤、天然气等）与日俱增的依赖已经开始影响到人类社会的运作。与此同时，全球石油燃料分布并不均匀（仅中东地区的石油储量便占全世界总储量的六成以上），因此对石油燃料的开采和使用客观上会受到地理、经济、政治等诸多因素的影响^[1]，而世界各国的能源安全也因此受到了相当大的制约。目前，随着这些传统能源的日益枯竭，人们开始提倡对能源的节约使用，限制无节制的开采，并着手常规能源的升级和进一步的开发。另一方面，随着近年来石油价格的逐年攀升和日益严重的全球性环境污染，人们对于改进当前世界上传统的能源消费结构的需求也越来越迫切。为此，人们急需寻找可再生的清洁能源来替代传统化石燃料能源，从而合理地控制人类社会的发展成本，缓解能源危机并保护人类赖以生存的环境，从而实现社会的可持续发展。

生物炼制的研究始于上世纪60年代。当时许多燃料、溶剂、人造纤维等工业材料的生产，其原料由原本的树木以及农作物，逐渐开始被石油衍生物原料所替代^[2]。但是上世纪70年代的石油危机，使得人们重新开始重视利用生物质原料合成燃料和制造材料的生物炼制工艺。虽然随着之后油价的回落，次年世界石油的使用量增长了大约有数倍，人们对生物炼制的开发热情也随之减退^[3]，但是人们也从那时起逐渐意识到，人类对有限石油资源日益增长的需求虽然促进了人类社会的飞速发展，但终非长久之策。而生物炼制工艺的发展正好满足了人们寻找替代能源的需求。以木质纤维素材料为原料的生物炼制在大大节约了成本的同时，可以生产多种有价值的产品，包括燃料、电能与热能为形式的能源（图 1.1）。

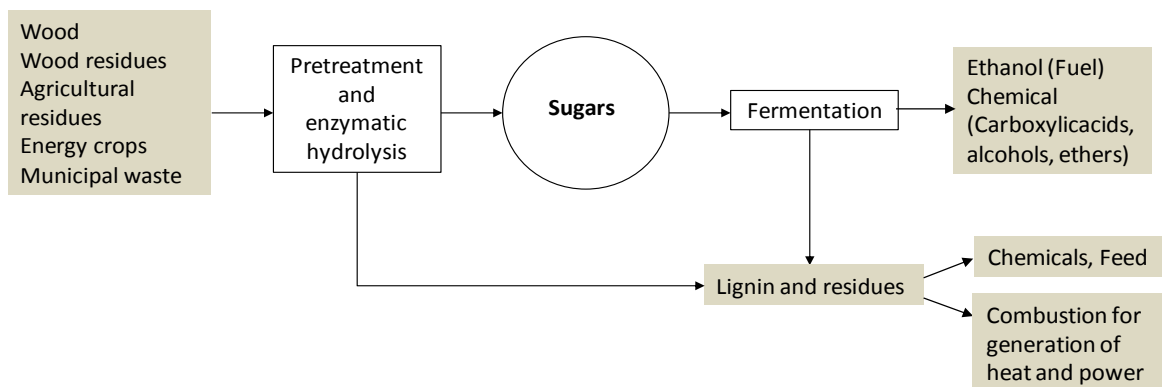


图 1.1 应用木质纤维素原材料进行生物炼制的流程^[4]

Fig. 1.1 Overview of an integrated biorefinery producing fuel, chemicals and energy from a variety of lignocellulosic materials

自然界中存在着极其丰富且多样的生物质资源，但是在人类的生产活动中对其的利用程度却相当低下，仅有一小部分被用于制造纤维或者纸类产品。绝大部分却成为了种植、砍伐和加工过程中的剩余物料或者废弃物，造成了极大的浪费。举例来说，中国每年农业生产中所产生的秸秆类纤维质就有大约 6 亿吨之巨。但是由于缺乏有效的利用手段，对其中的绝大部分只能采用抛弃、掩埋或者焚烧的手段进行处理，造成了大量的浪费和环境污染。生物炼制则能够对生物质进行合理的利用，其充足而廉价的原料使得生物炼制相较于其他产能方式而言，在原料成本上拥有显著的优势。同时，生物质资源的可再生性也保证了相关生物炼制产业的可持续性，不会因为产业的不断发展而导致环境破坏和资源枯竭。

在传统石油化学工业中，约 95 % 的石油被用作运输和生产所需的燃料，或者转化为各种形式的能源以满足社会发展的能源需求，而剩下的 5 % 石油则用于加工生产一些衍生的化学品^[5]。同样地，生物炼制也能够对这种发展和利用模式进行借鉴，在利用生物质材料生产生物燃料的同时，同时利用生物质原材料特有的天然性以及微生物代谢及其改造的多样性，生产一些高附加值的生物基化学品，拓展生物炼制所面向的领域，完善生物炼制产业的结构，使得生物炼制在补充甚至满足社会能源需求并进行可持续发展的同时，也能够其他方面为相关产业带来经济上的效益，实现产业的全面发展。与此同时，微生物细胞工厂作为生物炼制发展的研究核心，也随着生物炼制的兴起，在微生物领域取得了长足的进步。酒精酿造工艺作为传统的生物炼制行业，通过长期的研究和实践为生物乙醇的生产提供了丰富的手段和经验。在此基础上，生物乙醇成为了第一代生物燃料，也是最常用的液体生物燃料，一直以来都被认为是一种合适的替代能源^[6]，其工艺的成熟程度以及相关工业菌种的研究也都达到了相当高的水准。但是长久以来，生物炼制所面临的一个重大的问题就是微生物对生物质的利用。由于生物质紧密而稳定的结构，许多工业生产菌株往往不具备直接分解代谢天然生物质的能力^[7]，而对生物质进行额外的预处理和酶水解等降解处理则提高了生物炼制的成本。因此，如何以更低的

代价和更高的效率将生物质分解成可被微生物利用的糖类，从而提高生物炼制中微生物发酵的效率，也是人们在生物炼制研究中所面临的一个重大课题。

1.2 木质纤维素及纤维素酶概述

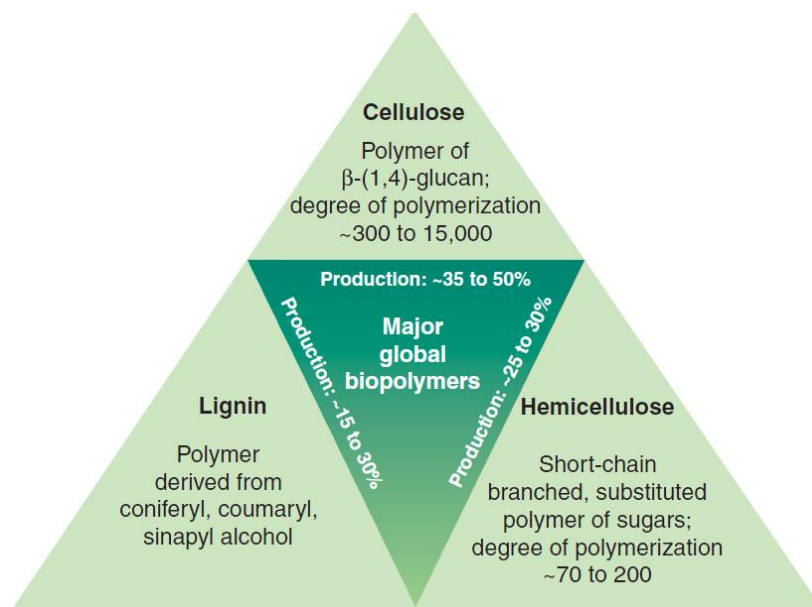


图 1.2 全球生物质资源的主要成分^[3]

Fig. 1.2 The main contents of biomass resources in global

1.2.1 木质纤维素

生物质（biomass）一词源于希腊语，其本意为生物、生命和质量。所谓生物质，顾名思义就是源于植物、动物和微生物等生物资源而形成的有机物质^[8]。在众多的生物质资源中，木质纤维素是其中含量最为丰富的一种。木质纤维素是植物通过光合作用将太阳能转化为化学能储存从而生成的有机资源，主要由纤维素（40 % - 50 %）、半纤维素（25 % - 35 %）和木质素（15 % - 20 %）三种高分子物质构成（图 1.2），同时还含有少量的果胶、蛋白质、萃取物和灰分等其它成分^[3,4,9]。在不同的植物器官中，纤维素、半纤维素和木质素的含量不尽相同，植物主要依靠这几种物质的紧密连接来构成植物细胞壁的结构骨架^[10,11]。同时，木质纤维素的组成还与植物的种类、年龄以及生长环境等息息相关。不同的植物其纤维素、半纤维素以及木质素的分布和含量以及半纤维素中糖的分布与含量都有很大的区别。

纤维素是植物细胞壁中含量最为丰富的成分，是由 D-葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键相结合而形成的链状高分子聚合物，聚合度往往能达到 10000 以上（图 1.3）。纤维素本身所具有的链状结构使其分子间或分子内形成氢键，从而聚合形成由 36 条纤维素链组成的丝状基纤维晶体。基纤维由于分子间有氢键维持，纤维素在大部分溶剂中都无法溶解，并拥有很高的抗拉强度。这也使得微生物对纤维素无法进行降解和利用^[12]。而纤维素的

疏水性表面也使其在水中能形成致密层，阻碍酶水解过程中在纤维素表面的酶和水解产物的自由扩散^[13]。

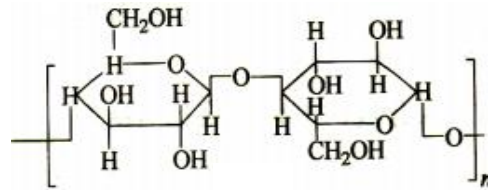


图 1.3 纤维素结构式

Fig. 1.3 The struction of cellulose

半纤维素是异构多糖复合物，主要由 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸和 4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸的单分子残基构成。半纤维素的聚合度一般在 200 以下，常带有短的侧链并可以被乙酰化^[11]。半纤维素依照聚合物分子骨架中所含的主要糖类进行分类，如木糖通过 β -1,4-键连接形成的木聚糖或甘露糖通过 β -1,4-键连接形成的甘露聚糖。草本植物中的半纤维素主要由葡糖醛基阿糖基木聚糖（glucuronoarabinoxylan）组成^[14]。而在软木类的木本植物中，半乳糖基葡糖基甘露聚糖（galactoglucomannan）则是主要的半纤维素成分，阿糖基葡糖醛基木聚糖（arabinoglucuronoxylan）次之^[15]。在硬木类的木本植物中，4-O-甲基葡糖醛基木聚糖（4-O-methyl-glucuronoxylans）是最为丰富的半纤维素成分，葡糖基甘露聚糖（glucomannans）则是含量第二丰富的半纤维素物质^[16]。基于这些半纤维素组分的差异，稻草、玉米秸秆等农业废弃物和硬木类物料均富含木糖，而软木类物料则一般甘露糖的含量较高（表 1.1）。

木质素是由不同的苯丙烷单分子连接形成的无定形网状高聚物，是木质纤维素中含量最丰富的非多糖组分。 ρ -香豆醇，松柏醇和芥子醇是木质素中三种主要的单体，通过烷基-芳基、烷基-烷基和芳基-芳基乙醚键相连接。在植物体内，木质素和半纤维素通过共价键相结合，包埋纤维素分子保护细胞壁上的多糖组分，使其避免被微生物或化学试剂直接降解，从而增加了细胞壁强度。通常来说，草本植物木质素的含量较低，而软木和硬木类的植物则含有较多的木质素（表 1.1）。

表 1.1 不同木质纤维素材料的组分

Table 1.1 Composition of different lignocellulosic materials

Material	Glucose ^a	Xylose ^b	Arabinose ^b	Mannose ^b	Lignin	Reference
	[% of total dry weight]					
Hardwood						
Birch	38.2	18.5	- ^c	1.2	22.8	[17]
Willow	43.0	24.9	1.2	3.2	24.2	[18]
Softwood						
Spruce	43.4	4.9	1.1	12.0	28.1	[19]

Pine	46.4	8.8	2.4	11.7	29.4	[20]
Grasses (Poaceae)						
Wheat straw	38.2	21.2	2.5	0.3	23.4	[20]
Rice straw	34.2	24.5	n.d. ^d	n.d. ^d	11.9	[20]
Corn stover	35.6	18.9	2.9	0.3	12.3	[17]

^a Glucose is mainly coming from cellulose.

^b Xylose, arabinose and mannose make up hemicelluloses.

^c Below detection limit.

^d Not determined.

1.2.2 纤维素酶

纤维素酶 (cellulase) 一词是由 cellul (ose)-和-ase 两个词拼接而成, 该称呼大致出现于 1900-1905 年^[21], 意即以纤维质为底物的酶。纤维素酶 (EC 3.2.1.4) 的主要作用是催化纤维素中的 β -1,4-D-糖苷键, 以及地衣多糖 (lichenin) 和谷物中的 β -D-葡聚糖的内水解。不过从广义上来说, 外切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.74 和 EC 3.2.1.91) 以及 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21) 也被包括在纤维素酶的范畴中^[22,23]。如今随着人们日益重视对生物质资源的开发和利用, 纤维素酶在工业生产中的应用也越来越广泛, 因为其催化底物纤维素、地衣多糖和 β -D-葡聚糖在木质纤维素中是广泛存在的^[24]。许多生物都能在生长过程中生产纤维素酶, 包括各种细菌、真菌、原生动物以及动物^[25], 而不同的微生物产生的纤维素酶, 其结构和功能都有较大的差异, 这也为纤维素酶研究提供了众多的选择。

纤维素结构复杂而紧密, 任何一种单独的酶都难以有效地对其进行降解。因此能降解天然纤维素的纤维素酶一般都是复杂的多酶体系。随着近年来蛋白质分离及纯化技术的不断改进, 纤维素酶的降解作用机理也逐渐明确。按照研究的结果, 现在一般认为参与纤维素降解的纤维素酶从功能上来说大致可以分为内切 β -1,4-葡聚糖酶 (endo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4)、外切 β -1,4-葡聚糖酶 (exo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.91) 以及 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21) 这三种类型^[26]。纤维素酶体系降解纤维素的机理见于图 1.4: 内切酶作用于纤维素分子内的非结晶区域并随机地水解 β -1,4-糖苷键, 将长链的纤维素分子截断, 产生大量的纤维糊精、纤维二糖、纤维三糖等具有还原性末端的低聚合度小分子纤维素; 接着外切酶作用于纤维素分子末端, 水解 β -1,4-糖苷键并生成纤维二糖分子; 最后就是 β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖生成葡萄糖。虽然 β -葡萄糖苷酶不能直接对纤维素产生降解作用, 但它可以消除纤维素水解过程中前两个催化步骤所生成的中间产物, 消除反应的产物抑制从而加快降解速度。

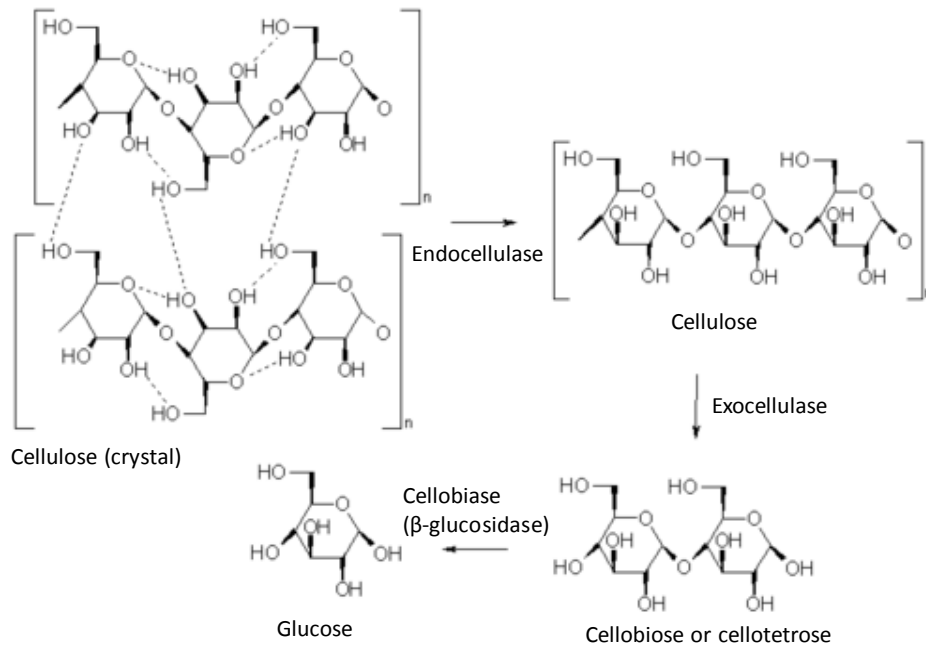


图 1.4 纤维素酶水解机理

Fig. 1.4 The mechanism of cellulase hydrolysis

由此可见，在三种不同功能的纤维素酶的共同作用下实现了纤维素的降解。鉴于纤维素复杂的结构且难以降解，通过多种不同功能的纤维素酶共同作用藉此提高纤维素酶的水解能力，也就是是纤维素酶反应中的协同作用，既不同酶组分共同作用产生的效果高于单独的酶组分所产生的效果的一种现象^[27]。协同作用的方式也有很多种，如不同外切酶或内切酶之间、外切酶与内切酶之间、以及 β-葡萄糖苷酶和内切酶或外切酶之间等多种反应方式，都能形成协同作用以提高纤维素酶的催化能力。

1.3 木质纤维素的生物利用

1.3.1 木质纤维素的降解

在传统的降解木质纤维素的方法中，对木质纤维素进行预处理和酶水解是比较常用且有效的方法。通过高强度预处理将木质纤维素紧密的结构变得松散，再通过纤维素酶将其转化为可利用的糖类。经过长期的研究，人们开发了许多不同的预处理方式(表 1.2)。

表 1.2 预处理方法及原理

Table 1.2 List of pretreatment methods and main mechanisms involved

Pretreatment Methods	Main principle
Diluted acid	Partial hydrolysis and solubilization of hemicelluloses, redistribution
Steam explosion (auto hydrolysis)	of lignin on fibre surfaces, fractionation of fibres
Acid-catalyzed steam explosion	
Hot water flow through	Removal of hemicelluloses and some lignin

Lime	Removal of lignin
Wet oxidation	Removal and partial degradation of lignin, solubilization and
Wet explosion	oxidation of some hemicelluloses
AFEX	Cleavage of lignin and partially depolymerization of hemicelluloses and cellulose
Organosolv/Avcel	Removal of lignin and some hemicelluloses

对于预处理而言，一个成功的预处理方式应当做到^[28]：能够最大化酶的转化效率、糖的损失降到最少、尽量多地生产有价值的副产物、不添加影响水解酶和发酵菌株活性的化学试剂、尽量减少能耗及试剂用量、可以大规模使用。可见，想要开发出达到所有上述标准的预处理方法，需要大量的研究和优化。不过在实际应用中，减少能耗和实现工业化生产是最重要的两点。预处理的最终目的就是提高之后酶水解的效率，通常来说就是尽量去除半纤维素和木质素的含量，从而加大纤维素的表面积并降低其聚合度^[29,30]。而去除木质素并减少半纤维素的含量已经被证明是提高纤维素降解效率的一种有效的手段^[31-33]。但是为了达到这个目的，预处理的发展也面临着许多需要解决的问题。其中很重要的一点就是预处理的能耗问题。利用生物质进行生物燃料等生产，其本意之一就是节约能源。因此人们对于生物炼制过程中的能源消耗及平衡十分的关注^[34]，不然有本末倒置之嫌。现有的预处理方法，基本都要将物料加热升温至 100-200℃左右，这需要消耗相当的能量。此外，一些预处理方法中对物料进行打碎和碾磨的步骤也会增加能耗^[35]。为了使生物炼制工艺变得更经济，人们目前主要在降低能耗以及减少废水产生的方面进行改善。为了这个目的，现阶段研究的工作中心主要集中在：（1）提高对大颗粒物料的处理能力，以减少粉碎物料所消耗的能量；（2）对物料进行高固含量的处理以减少水的利用和能耗；（3）对预处理中其他步骤所产生的余热（或蒸汽）进行整合利用。一般来说，在预处理过程中大规模使用电或者微波^[36]加热都会剧烈消耗能量，因为这会造成热量的大量损失。由此也可以总结出，在现今的预处理技术发展中，一个坚固的反应器是必须的硬件设施，用以承受对大颗粒物料进行高固含量的预处理。

通过预处理将生物质原料的结构变得相对松散后，人们就可以对原料进行进一步的降解，使其转化为可被微生物利用的单糖从而进行产物的生产。通常人们使用酶水解的方式来进行原料的降解。使用工业纤维素酶虽然能取得较好的水解效果，但是其成本也不低。因此如何降低对预处理原料进行酶水解的成本，也是人们研究的一个重点^[37-39]。而且在很多预处理过程中，物料中会有一些半纤维素的剩余。因此在水解过程中，很多时候不但需要纤维素酶，还需要半纤维素酶的参与方能进行高效的酶水解。由于不同的物料所对应的成分不同，因此使用酶的含量和配比也会随之产生变化。

对木质纤维素进行酶水解的过程中，会有很多因素对酶水解的效率产生影响（图 1.5）。虽然随着 Novozymes 和 Genencor 等公司在酶反应和生产等方面的研究^[39]，纤维素酶的价格逐渐降低。但是为了降低生物炼制的成本，纤维素酶的用量依然是越少越好。

在酶水解过程中，所使用的时间越长，对物料的降解就越彻底。但是当使用高固含量的物料时，不但预处理的难度增加，酶水解的效率也会因为产物抑制受到相当的影响。如果物料中还含有木质素，则会对纤维素链形成保护并吸附纤维素酶，这也是抑制纤维素酶的主要因素。此外，在水解过程中许多酶也会由于自身的变性或者降解而失活，从而降低水解效率。其余的一些抑制因素则和物料的构成以及预处理的方法有紧密的联系。

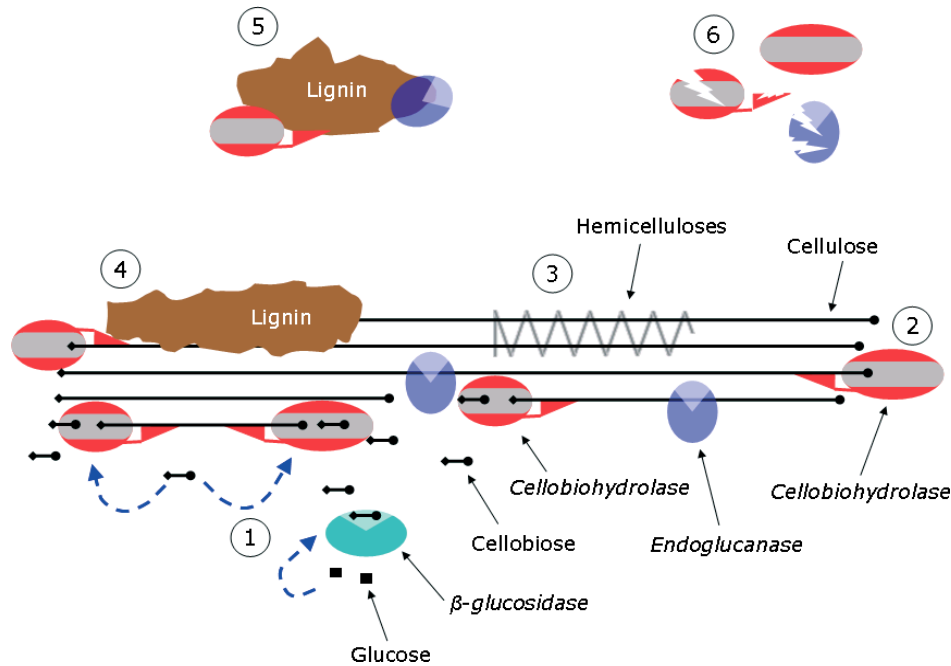


图 1.5 纤维素水解的限制因素^[4]

Fig. 1.5 Limit factors in efficient hydrolysis of cellulose

- 1: Glucose and cellobiose inhibit β -glucosidases and cellulase by product inhibition.
- 2: Unproductive binding of cellulase onto a cellulose chain. Due to the processivity of cellulase and their strong binding of the cellulose chain in their catalytic core, obstacles can make the enzymes halt and become unproductively bound.
- 3 & 4: Microfibrils associated with hemicelluloses and lignin prevent the cellulases from contacting the cellulose surface.
- 5: The unspecifically adsorption of enzymes by lignin particles or surfaces.
- 6: Proteolytic activity, mechanical shear or low thermostability may cause the denaturation or loss of enzyme activity.

虽然酶水解有多种抑制因素，但是人们也通过各种生物炼制工艺，用以缓解酶水解的抑制。为了消除酶水解的底物抑制，人们往往采用同步糖化发酵（SSF, simultaneous saccharification and fermentation），通过将糖化和发酵整合的方式，将产生的糖即时消耗掉。同时，作为发酵产物的乙醇或乳酸也会对纤维素酶产生抑制，虽然这种抑制比起葡萄糖还是较为温和^[40-42]。对于这种抑制，则应当在设计反应时选择那些不易受到该产物抑制的酶，或者对酶进行一些改善或者进化，以使得水解反应符合生物炼制过程的需要。

求。将木质纤维素转化为可被微生物利用的糖分是实现生物炼制的一个基础和前提。目前许多研究已经进入到了中试的阶段，这也在相当程度上促进了相应技术的发展。其中相当一部分是关于通过预处理的改进来提高酶水解的效率，但是对于高效的酶水解同样也进行了各种各样的研究，比如对于酶的混合比、稳定性及比活的改进都能在一定程度上减缓生物炼制中酶的使用和其成本。除了这些方法外，还有一些提高酶蛋白和底物交联能力的方式用以提高酶水解效率。通过这些研究的不断发展，我们也对于如何大规模应用预处理和酶水解这些技术有了更深的理解和认识，并期待在不久的将来对这一系列技术的整合和应用形成完善而高效的体系。

1.3.2 木质纤维素的发酵工艺

如今对木质纤维素进行生物炼制的工艺一般都基于对生物质糖类的发酵，并且通过各种改进以达到扩展工业结构（EISA）的标准。对于生物炼制过程而言，一般都包含生物物质的收集和储存、原材料的粉碎、高温化学预处理、糖化、发酵以及产物回收等步骤。随着最近的技术发展，对于使用诸如玉米秸秆等生物质原材料进行燃料乙醇的生产目前通常使用稀酸预处理以及同步糖化发酵（SSF, simultaneous saccharification and fermentation）的工艺。对于不同的工艺应用和步骤整合，SSF过程大致可以细分为三类：同步糖化发酵（SSF）、同步糖化共发酵(SSCF)以及整合生物加工(CBP)^[7]。同步糖化发酵（SSF）将糖化和发酵这两个过程整合在生物反应器中同时进行（图1.6）。由于发酵过程和糖化过程同时进行且糖化速度一般来说远低于糖的消耗速度，因此反应器中的糖浓度始终保持在较低的水平，有效缓解了糖作为酶水解的产物而对糖化过程产生的底物抑制以及高浓度糖对菌体产生的抑制，从而提高了糖化的效率和菌株生长发酵的效果。

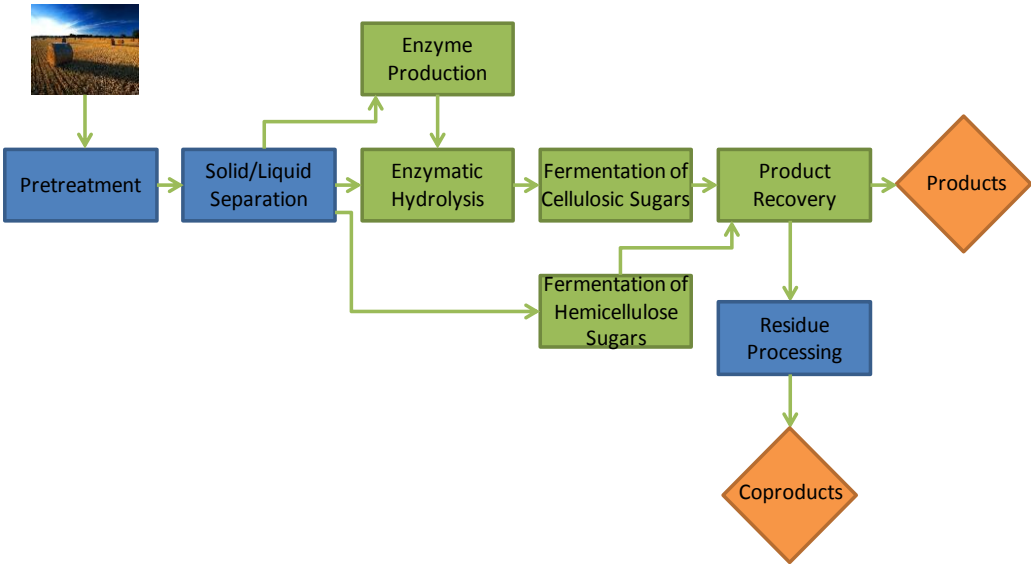


图1.6 同步糖化发酵流程

Fig. 1.6 Scheme for SSF (simultaneous saccharification and fermentation)

同步糖化共发酵（SSCF, simultaneous saccharification and cofementation)是指进行纤维素水解的同时，利用不同菌株对糖化所产生的戊糖和己糖进行发酵的工艺（图1.7）。

由于纤维素糖化后产生的糖种类多样，而单一的发酶菌株其底物利用范围十分有限，因此SSCF工艺在SSF的基础上进行了改进，发酵中同时使用不同的菌株实行共发酵，从而实现糖化产物的充分利用。该工艺通过共发酵手段，使得纤维素酶水解所产生的六碳糖和五碳糖能同时被利用进行发酵，避免了某些糖类在反应器中的积累并缓解了水解产物对纤维素酶的反馈抑制，同时提高了水解产物的利用效率。不过SSF和SSCF的实现依赖于发酵过程中纤维素酶以及半纤维素酶等水解酶的添加^[43-45]，而这些酶的使用在占了整个发酵成本的约16%^[46]，因此利用微生物本身的特性来减少或取代工业纤维素水解酶的使用，将能很大程度上降低相关生物炼制工艺的成本，而这也是整合生物加工(CPB)工艺的改造目的。

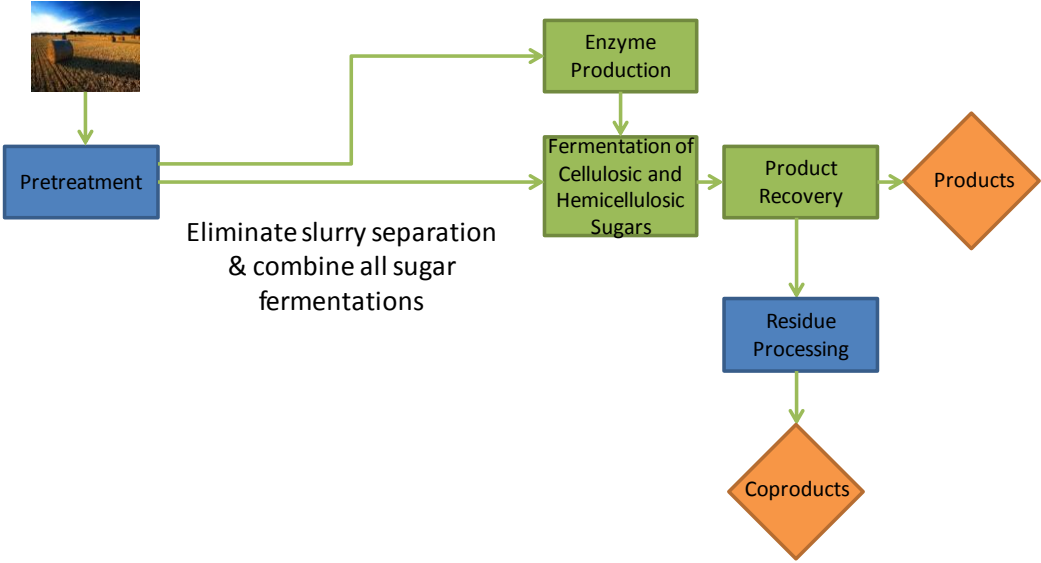


图1.7 同步糖化共发酵流程

Fig. 1.7 Scheme for SSCF (simultaneous saccharification and cofermentation)

1.3.3 整合生物加工 (CBP) 工艺

整合生物加工工艺 (CBP, consolidated bioprocessing) 是通过微生物细胞工厂的构建，将纤维素酶的生产、纤维素的水解和产物发酵的工艺 (图1.8)。自然界中很少会出现这种全能的微生物，因此通过基因工程的改造来实现这一目的就成了十分重要的手段，经改造后所得到的同时拥有这多种功能的发酵菌种则可以被称为整合生物加工菌株 (CBP strain)。整合生物加工工艺在同步糖化共发酵的优点上更进一步，利用微生物本生的能力和特性将各个步骤整合到一起，节约了空间和时间；同时由于其本身可以生产纤维素酶，从而减少了发酵过程中纤维素酶的使用，降低了生物炼制的成本^[47]。

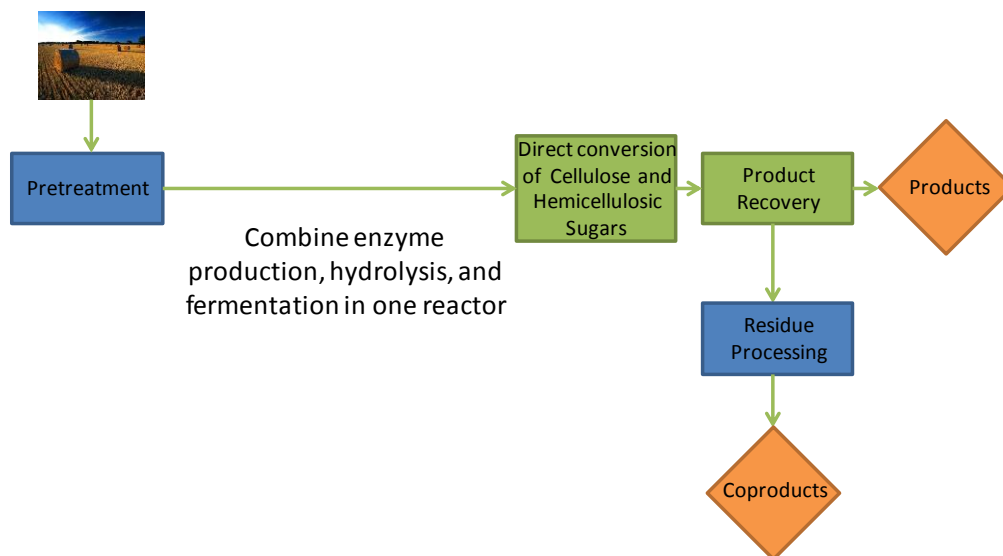


图1.8 整个生物加工流程

Fig. 1.8 Scheme for CBP (consolidated bioprocessing)

CBP 工程菌株的构建通常需要通过基因工程改造来完成。构建工程菌的思路也各有不同。对于自身拥有发酵生产能力的菌株（如酿酒酵母^[48]），则为其导入产纤维素酶基因，使其具有分解纤维素的能力；对于本身有能力代谢纤维素的菌株（如克雷伯氏菌^[49]），则可以为其添加一些产物生产的途径；对于那些虽然在纤维素代谢和目的产物生产上都没有天然能力，但是菌体本身具有良好的改造和发酵性能的微生物，则可以为其同时导入产纤维素酶基因和产物的代谢生产途径（如大肠杆菌^[50]和枯草芽胞杆菌^[51]）。

这些改造虽然目的明确，但是往往也面临着很多难题。木质纤维素的降解需要多种的纤维素酶体系共同进行水解催化，但是由于基因表达的限制以及菌体分泌性能的差异，菌体外源表达纤维素酶可能存在单一性，其种类以及分泌性能上的缺陷可能导致重组工程菌在纤维素代谢能力上的不足；对于导入目的产物生产途径的改造，产物及副产物的生成对菌体代谢的影响和生长的抑制也往往会成为改造的限制因素，产物的生产效率以及速率也极易受到影响；对那些优秀的工程菌进行改造，虽然各种基因操作比较成熟，生长及代谢的表现也较为高效，但是同时面对纤维素酶体系的分泌表达以及产物的生成两种改造，对菌体造成的影响可能更为明显。因此在实际的改造中，需要根据菌株自身发酵的特性配合合理的基因工程改造和发酵策略，来进行高效的 CBP 发酵。

1.4 微生物中纤维素酶的表达和分泌

纤维素酶只有接触到底物才能进行切割和降解，因此对于在 CBP 菌株中进行纤维素酶的表达，菌体不但要自身生产纤维素，还需将其分泌到胞外才能与底物进行接触。由于不同菌株拥有各自不同的分泌机制和性能，因此菌体中纤维素酶的分泌也是 CBP 菌株构建的一个重点。一个标准的细胞分泌途径通常包括高尔基体和内质网两个部分，

以及两种内膜系统，一种负责输入而另一种负责输出^[52]。通常蛋白质的分泌需要经过下列步骤：蛋白质的合成、向内质网的移位、N-聚糖的连接、糖基蛋白的折叠、N端和O端的糖基化、向高尔基体的转运、蛋白质分选、分泌小泡的形成、囊泡的形成、转运以及与质膜接触后溶解^[52,53]。这些组分构成了通常真核细胞中蛋白质由内质网到高尔基体的分泌途径。分泌细胞的种类分许多种，包括内分泌细胞、外分泌细胞及免疫细胞^[54-56]。

1.4.1 纤维素酶在细胞中的位置

对于真核细胞而言，存在着多种亚细胞结构：顶体精子、细胞壁、中心体、叶绿体、蓝小体、细胞质、细胞骨架、内质网、核内体、高尔基体、氢化酶体、溶酶体、黑素体、微粒体、线粒体、细胞核、过氧化酶体、质膜、纺锤体、突触以及液泡^[57]。革兰氏阳性菌包含4种亚细胞结构：细胞壁、细胞质、周质以及质膜；而革兰氏阴性菌则包括：细胞质、菌毛、鞭毛、内膜、外膜、周质以及拟核这几种亚细胞结构^[58]。蛋白质如果定位于不同亚细胞结构中，则其会拥有相应特异的功能并对细胞产生精密的影响。而对于同一种蛋白而言，在不同亚细胞结构中所含有的浓度往往不同，以起到功能上的差异。

对于纤维素酶而言，关于其在细胞中的定位已经展开了几十年的相关研究。早在上世纪70年代，人们已经就植物生长素处理过的豌豆中，在缓冲液中可溶及不可溶的纤维素酶的亚细胞结构定位进行了研究^[59]。在该研究中，研究者发现缓冲液可溶纤维素酶位于细胞壁的内表面而缓冲液不溶性纤维素酶位于内质网。这个结论也部分地反映了纤维素酶的可溶性，同时这也和革兰氏阳性菌中所包含的5条分泌途径的影响相关^[60]。此后，人们通过研究又提出了新的假设认为纤维素酶位于细胞质囊中，而IDP酶、ATP酶、UDPG转移酶和糖类沉淀都位于该相同的位置^[61]。对于真菌的研究则表明，真菌中高尔基体的形状并不明显，许多真菌都拥有其独立的和内质网相关联的球囊^[61-63]，纤维素酶就存在于这些源自内质网的球囊之中。

对于特定的纤维素酶而言，研究者也进行了许多对于其相关定位的研究。 β -葡萄糖苷酶（EC 3.2.1.21）一般有胞内、胞外及细胞壁关联型三种定位模式^[64]。比如在沃氏菌（*Prevotella ruminicola*）中， β -1,4,-D-内切葡聚糖酶就存在于细胞表面^[65]，因此菌体可以降解淀粉并利用水溶性的纤维糊精^[66]，甚至该菌属中的许多菌种都表现出了羧甲基纤维素酶活性^[67-70]。许多酶学的研究也表明，细菌同时拥有胞外及细胞关联的内切葡聚糖酶活性，其中80%都在细菌生长的平稳期分泌到胞外。在产琥珀丝状杆菌（*Fibrobacter succinogenes*）S85亚种中，小部分内切葡聚糖酶存在于周质空间，而剩余的大部分存在于细胞质以及膜空间中^[71]。研究者Groleau等人证明，细胞中游离的纤维素酶主要和细胞中可沉淀的膜组分有密切的关系，剩余的纤维素酶则一般是分子量较小蛋白（约45 kDa），以及在离心条件下亦不可沉淀的蛋白（其分子量普遍大于4000 kDa）^[72-74]。此外研究者们还通过一系列实验，将EG1、EG2^[75]和EG3^[76]这三种单独的内切葡聚糖酶蛋白、一个氯离子酶活关联型的纤维二糖苷酶^[77]，以及一个周质纤维糊精酶^[78,79]进行了纯化和测定。实验结果表明，其中纤维二糖苷酶的分泌与细胞的生长状态息息相关^[79]。

1.4.2 纤维素酶的分泌途径

在不同的微生物中，一般都拥有其各自不同的分泌途径（表 1.3）。分泌途径是由细胞中不同的部件以及不同的蛋白组成的，它们共同构成了细胞膜转运和蛋白分泌的转运体系^[53]。

表 1.3 不同微生物中的分泌途径

Table 1.3 List of general secretory pathways in different organisms

Organism	Secretory pathway	Description
Gram-negative bacteria	Type I secretory pathway	An oligomeric complex composed of an inner membrane ATP-binding cassette exporter, a membrane fusion protein, and an outer membrane homologue.
	Type II secretory pathway	A two-step process: 1) proteins are moved across the inner membrane through the Sec system, and 2) proteins are moved across the outer membrane.
	Type III secretory pathway	A highly regulated channel through both the inner and outer membranes forming a needle-like structure.
	Type IV secretory pathway	Involves conjugative transfer of DNA and nucleoprotein complexes.
	Type V secretory pathway	A large family of protein-translocating outer membrane porins.
	Type VI secretory pathway	Forms a transenvelope apparatus. It also exists in plant, animal, and human pathogens, and environmental strains.
	Type VII secretory pathway	Exists mainly in Mycobacterium and Gram-positive bacteria to a small degree.
Gram-negative bacteria	Sec-type pathways	Involves Sec-type signal peptides.
Mammalian cells	Non-vesicular secretory pathway	Type I is a self-sustained protein translocation across plasma membranes. Type II is an ATP-binding cassette transporter-based secretion.
	Vesicular secretory pathway	Type III is an autophagy-based secretion. Type IV comprises the proteins that bypass the Golgi apparatus to transport to the plasma membrane
Eukaryotic cells	Budding from endoplasmic reticulum to form the coat protein complex II (COPII) vesicles	Essential processes are similar from yeasts to higher eukaryotes.
Archaea	Similar to Sec-type pathways	Most Archaea have a homologue of CsaA.

革兰氏阴性菌拥有两层不对称的细胞膜，因此在上世纪 80 年代，人们就开始了

革兰氏阴性菌分泌机制的研究。经过多年的研究和发展，人们在革兰氏阴性菌中发现了七条分泌可溶性蛋白的途径^[80-81]。I型分泌途径是由内膜 ATP 关联转运部件、融膜蛋白以及外膜同源体构成的低聚复合物^[82,83]。II型分泌途径也称为常规分泌途径，其转运过程分为2个步骤：首先蛋白质通过分泌系统穿过内膜；接着蛋白再穿过外膜达成分泌^[84,85]。III型分泌途径是一种高度调控的贯通内膜和外膜的管道，呈针状结构^[86-88]。IV型分泌途径包括了 DNA 和核蛋白质复合物的接合转化，并根据序列的同源性分为 IVa 和 IVb 型两种分泌途径^[88-90]。V型分泌途径则拥有最简单的转运部件，其包含了相当大的一个外膜转运蛋白家族^[91]。VI型分泌途径是新发现的一种分泌途径^[92,93]，普遍存在于革兰氏阴性菌、植物以及人类病原体中^[94-96]。而在分支杆菌 (*Mycobacterium*) 和革兰氏阳性菌中则存在着 VII 型分泌途径^[97-99]。不过就目前研究显示，VII 型分泌途径和纤维素酶的分泌没有直接的联系。

相较于革兰氏阴性菌，革兰氏阳性菌的亚细胞结构更少、膜结构也更为简单，其菌体中也没有用于折叠多肽的专门的部件。不过革兰氏阳性菌的分泌途径并不少，研究表明，革兰氏阳性菌中也发现了许多不同的分泌途径。其中包括 Sec 分泌系统、双精氨酸转运 (Tat)、鞭毛输出部件 (FEA)、菌毛蛋白输出部件 (FPE)、穴蛋白 (holin) 以及 WXG100 分泌系统 (Wss) ^[100]。其中 Sec 分泌系统与蛋白质分泌的相关性最高^[101-104]。在众多不同的蛋白质分泌系统中，蛋白质的分泌主要分为内源性蛋白的分泌以及外源性蛋白的分泌。对于纤维素的分泌而言，一个厌氧细菌中标准的纤维小体可以由 20 多种纤维素/半纤维素水解酶组成。而在厌氧的真菌中，一个纤维小体复合体则通常由 6-10 种多肽构成^[105-107]，其中各个结构各司其职，用以将胞内的纤维素酶分泌至胞外或锚定在细胞表面。

1.4.3 纤维素酶的分泌机制

纤维素酶的分泌机制目前仍旧在不停的研究中，但是并没有一个确切的结果。通常认为按照纤维素酶在细胞中所处的位置不同，其分泌的机制也有所不同。大致包括：不受纤维素酶影响的独立分泌机制、由纤维素酶诱导的分泌机制以及与碳源无关的起泡反应^[71]。通常来说纤维素酶的分泌是需要诱导的，这个诱导过程也包括了用于构建分泌途径的新蛋白的产生。当然，除了分泌过程中的其他生成物的作用，纤维素酶本身也能触发分泌机制。此外，胞外的氯离子浓度也会刺激细胞纤维二糖酶的分泌^[78]。同时还有研究表明，欧文氏杆菌 (*E. carotovora*) 中用于分泌纤维素酶的革兰氏阴性菌 II 型分泌途径在许多菌中都有很广泛的通用性^[80,108,109]。通过研究人们大致总结出，纤维素酶在分泌的过程中，首先需要通过 N-聚糖与糖基化目标蛋白的天冬氨酸结合；接着通过内质网和高尔基体之间的传输，期间 Rab GTP 酶和一些交联因子会对这个过程进行调控。Rab GTP 酶是属于单分子鸟嘌呤三磷酸酶的 Ras 家族蛋白，该系列的蛋白包含 150 种结构上相互关联的蛋白^[52]。最后该反应进入细胞中的微小管和内质网关联的降解途径^[53]。总体而言，纤维素酶的分泌更倾向于一种输出型的转运过程，一般来说许多细胞天生并不具有分泌纤维素酶的能力。在细胞的其他过程中，Rab GTP 酶在细胞分泌外来体中起

到了相当显著的作用,因此 Rab GTP 酶很可能也在纤维素酶的分泌中起主要的调控作用。

1.5 立题目的及意义

基于目前生物炼制工艺的发展和应用需求,人们在菌种、发酵等各个领域均对生物炼制进行了大量的研究。其中整合生物加工(CBP)工艺便是相当高效且节能的一种生物炼制过程。通过微生物细胞工厂的构建,利用微生物本身的代谢能力完成原材料向产物的转化。因此,通过生物工程手段对天然微生物进行改造,从而构建高效率的 CBP 菌株是实现 CBP 工艺的基础。可用于生物工程改造的 CBP 菌株有很多种,其各自也需要不同的改造策略和应用方法。

在微生物研究中,类似于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)等菌株由于常年的研究和其自身的特性,都拥有相当良好的基因改造基础。但是作为 CBP 菌株,它们虽然拥有快速的菌体生长和广泛的底物利用范围,但是由于无法对生物质底物进行降解利用,其代谢的产物也无法作为主流的工业产品,因此无法满足 CBP 发酵的需求。如果对这类微生物进行基因工程改造,利用它们良好的改造和表达特性,为其导入所需的额外途径,使它们能在发酵中发挥各自的优势,就能成为优秀的 CBP 菌株。与此同时,人们也通过实验发现了很多优秀的发酵菌株,例如运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)等。它们本身具有良好的发酵特性,但是同样在发酵中受限于对生物质的降解能力,因而如果在 CBP 改造中能对它们进行针对性的改造,完善它们对生物质底物的降解和利用能力,同样也能使其成为优良的 CBP 工程菌。

虽然对 CBP 工程菌的改造方法不尽相同,但是作为一种发酵工艺,对发酵进行一些条件的优化和改良,促进重组菌对底物的利用和产物发酵,提高生物炼制产品的生产效率,是完善 CBP 工艺的必要环节。在 CBP 重组菌的构建中,由于纤维素酶作用机制的复杂性以及菌体分泌能力的差异,很多菌体在纤维素酶的生产 and 分泌上都不尽如人意,并直接影响其对生物质底物的代谢能力。因此如何促使纤维素酶在重组工程菌中进行分泌表达,提高纤维素酶的表达和分泌效率也是构建高效 CBP 菌株的一个重点。

本论文针对上述问题,进行了一系列研究和探讨,取得了一些有意义的结果。

1.6 本论文主要研究内容

本论文对 CBP 菌株的构建和应用进行了尝试,并对改造后的重组菌进行了发酵和应用上的研究。主要分为以下三个方面:

1.6.1 产乙醇重组大肠杆菌中分泌表达不同纤维素酶及发酵的研究

本研究利用大肠杆菌易于进行基因改造的特点,构建了能进行乙醇生产的重组菌 *E.coli* ZY81,并将源自热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)的内切葡聚糖酶基因(*celA*)、外切葡聚糖酶基因(*cbhA*)和源自多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)的 β -葡萄糖苷酶

(*bglB*) 在产乙醇重组大肠杆菌 P81 中进行了表达, 以期重组菌能够在发酵产乙醇的同时, 也能进行不同纤维素酶的生产。同时, 由于大肠杆菌其本身的分泌表达性能不强, 因此在实验中还尝试了添加表面活性剂, 用以提高细胞的通透性, 加强胞内蛋白向胞外的转运。最后, 由于纤维素降解需要不同纤维素酶之间的协同作用, 不同纤维素酶基因在重组大肠杆菌 P81 中也进行了共同分泌表达, 从而依靠重组菌本身对纤维素进行有效的降解和利用。

1.6.2 运动发酵单胞菌中纤维素酶的表达研究

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 有着出色的乙醇生产能力, 在乙醇发酵的过程中也存在着许多优点, 使得它成为了一种极具 CBP 潜力的菌种。但是由于运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 自身底物利用范围过于狭窄, 对于纤维素也没有相应的降解和代谢能力, 因此在 *Z. mobilis* 中额外的纤维素酶表达将是将其改造成为 CBP 菌株的一个必要过程。*Z. mobilis* 在进行纤维素酶的表达时, 只表现出了微弱的表达性能和分泌性能。因此本研究通过在 *Z. mobilis* 中过表达一些内源和外源的纤维素酶基因, 用以研究纤维素酶在 *Z. mobilis* 中高效表达的可能性。同时, 我们尝试了一些之前从未被使用过的分泌表达策略, 包括利用使用 *Z. mobilis* 本身的基因 ZMO1086 的信号肽以及与果聚蔗糖酶 SacB 进行融合表达等方法, 试图在 *Z. mobilis* 中进行纤维素酶过表达。试验中主要研究了源自多黏芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) 的 β -葡萄糖苷酶 (*bglB*) 在 *Z. mobilis* 中表达和分泌情况, 并成功地实现了 *bglB* 基因在 *Z. mobilis* 中的分泌表达。

1.6.3 耐热型 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达研究

本研究利用基因工程操作成熟、生长迅速且分泌性能良好的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 为宿主菌, 将源自热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum* DSM 1237) 的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因 (*licB*) 在其中进行了克隆表达, 达成了耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶通过微生物的分泌表达。出于实际工艺应用的需要, β -1,3-1,4-葡聚糖酶须要拥有较好的耐热性能和反应环境适应性, 因此我们对该种表达策略下所分泌表达的酶蛋白进行了分泌性、酶学特性、耐热性、最适 pH 范围、金属离子影响等各项指标进行了研究, 证明了所表达的酶蛋白具有良好的热稳定性和较好的催化性能, 并在一个广泛的 pH 范围内都能表现出良好的酶活。

第二章 纤维素酶在产乙醇大肠杆菌中的分泌表达研究

2.1 前言

目前,利用廉价而丰富的生物质以及微生物发酵来生产燃料乙醇是生物炼制研究的一个重要的内容。在这个相应的发酵过程中,发酵和纤维素酶的使用在整个发酵成本中都占了约相当的一部分,达到了 16 % 左右^[46]。由此可见,为了达成对生物质的降解和利用,需要在发酵过程中使用相当量的纤维素酶。为了降低成本,人们开始采用各种策略以减少在发酵过程中纤维素酶的使用^[110,111]。整合生物加工工艺(CBP)就能在一定程度上缓解这个问题,其通过微生物本身的特性以及基因工程改造,将纤维素酶生产、纤维素降解以及乙醇发酵等步骤整合在一起,从而降低了发酵成本^[9,112,113]。对于 CBP 过程而言,发酵菌株能同时生产纤维素酶和发酵生产乙醇是微生物所需要拥有的最重要的功能^[3,7,26]。

纤维素的降解并不只依靠单独的一种纤维素酶进行,通常来说需要内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶^[26,27,47,114]的共同作用。通常在发酵中所使用的商业纤维素酶,都是通过不同的菌株所生产的各种纤维素酶,进行提取并以一定比例混合后的产品。这些纤维素酶一般可以直接用于对木质纤维素的降解和糖化。但是对于 CBP 菌株的发酵而言,除了生产纤维素酶之外,还需要将纤维素酶分泌到细胞外,否则纤维素酶无法接触到需降解的纤维素,自然也无法发挥应有的水解作用^[1,21,115]。在三种纤维素酶中, β -葡萄糖苷酶在分泌上的要求并不是十分的高, β -葡萄糖苷酶主要负责将一分子纤维二糖水解两分子的葡萄糖^[116],但由于其底物纤维二糖分子量并不巨大,可以在一定程度上穿过细胞壁到达周质空间^[117],因此 β -葡萄糖苷酶只需要通过分泌达到周质空间就能够接触到相应的底物并进行催化。而内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶由于底物大多数为聚糖,分子量较高而无法通过细胞壁,因此其必须在分泌过程中被转运到胞外,才能接触到主要的催化底物并发挥功能。

目前对于 CBP 大肠杆菌的改造已有研究者进行了许多的研究^[50,117,118-128]。本实验中通过对大肠杆菌 JM109 进行基因工程改造,为其基因组中整合源自乙醇发酵菌株运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的丙酮酸脱羧酶(*pdc*)和乙醇脱氢酶(*adhB*)基因,使其能够在生长的同时利用碳源进行乙醇发酵。与此同时,在改造后的大肠杆菌 P81 中表达不同的纤维素酶基因:源自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因(*celA*)、外切葡聚糖酶基因(*cbhA*)和源自多黏芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因(*bglB*),以期重组大肠杆菌 P81 能够在发酵产乙醇的同时,也能进行不同纤维素酶的生产,并能对纤维素进行一定程度的降解。虽然大肠杆菌易于进行基因改造和异源表达^[129-139],但是其分泌性能却并不优秀,其本身的胞外蛋白数量就十分少。同时,基于其本身的分泌表达机制很多时候也只

能将蛋白转移到周质空间，而并非彻底转移到胞外^[140,141]。因此在实验中，还尝试了添加表面活性剂，以提高细胞的通透性，加强胞内蛋白向胞外的转运。最后，由于纤维素降解需要不同纤维素酶之间的协同作用，不同纤维素酶基因在重组大肠杆菌 P81 中也进行了共同分泌表达，以期依靠重组菌本身对纤维素进行有效的降解和利用。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 菌株和质粒

热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*, DSM 1237) 购自德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)，多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa* 1.794) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center)，运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*, ATCC 31821) 购自美国模式菌种收集中心 (American Type Culture Collection)。大肠杆菌 DH5 α 用于基因克隆和质粒构建等基因操作，大肠杆菌 JM109 作为用于改造的重组菌。实验中所使用的菌株和质粒具体见表 2.1。

表 2.1 菌株及质粒

Table 3.1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1.	Stored in lab
<i>E. coli</i> JM109	RecA1, gyrA96, endA1, hsdR17, thi-1, supE44, relA1, Δ (lac-proAB) /F ⁺ [traD36, proAB+, lacIq, lacZ Δ M15]	Stored in lab
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4	Wild type strain, ATCC 31821	Purchased from ATCC
<i>C. thermocellum</i> DSM1237	Wild type.	DSMZ
<i>Bacillus polymyxa</i> 1.794	Wild type, CGMCC 1.794	Purchased from CGMCC
<i>E. coli</i> ZY81	<i>E. coli</i> JM109 <i>pfl::P_{tac}-pdc-adhB</i>	In this study
Plasmids		
pUC19	Cloning vector	
pGEX-4T-1	Template plasmid, carrying <i>P_{tac}</i> promoter gene	Pharmacia
pMD19-T	Cloning T-vector	Takara
pKD4	Template plasmid, carrying kanamycin-resistance gene (Kan ^R) flanked by the recognition sites (FRT	[142]

pKD46	Helper plasmid, carrying bacteriophage λ -Red recombinase genes under the control of arabinose-inducible ParaBAD promoter (<i>araBp-gam-bet-exo</i>)	[142]
pCP20	Helper plasmid, carrying FLP recombinase gene under the control of an temperature sensitive promoter	[143]
pUC19-P43- <i>NprB-bglB</i>	Recombinant plasmid secretively expressing <i>bglB</i>	In this study
pUC19-P43- <i>NprB-celA</i>	Recombinant plasmid secretively expressing <i>celA</i>	In this study
pUC19-P43- <i>NprB-cbhA</i>	Recombinant plasmid secretively expressing <i>cbhA</i>	In this study
pUC19- <i>bglB-cbhA</i>	Recombinant plasmid secretively expressing <i>bglB</i> and <i>cbhA</i>	In this study
pUC19- <i>bglB-celA</i>	Recombinant plasmid secretively expressing <i>bglB</i> and <i>celA</i>	In this study
pUC19- <i>celA-cbhA-bglB</i>	Recombinant plasmid secretively expressing <i>bglB</i> , <i>cbhA</i> and <i>celA</i>	In this study

2.2.1.2 实验试剂

实验中所用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司(Vilnius Lithuania); DNA 分子量标品、蛋白质分子量标品、rTaq 及 Primer STAR HS DNA 聚合酶购自日本 Takara 大连分公司 (Dalian, China); 基因组抽提试剂盒 (Bacterial DNA Kit) 购自 Omega 生物公司 (Norcross, GA, USA); 质粒小量制备试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 购自上海捷瑞生物工程公司 (Shanghai, China); PCR 产物纯化试剂盒 (PCR Purification Kit) 购自上海生工生物工程公司 (Shanghai, China); 葡萄糖试剂盒购自上海科欣生物技术研究所以 (Shanghai, China); 胰蛋白胨 (Tryptone) 和酵母提取物 (yeast extract) 购自 Oxoid 公司 (Cambridge, UK); 卡那霉素 (Kanamycin, Km)、氨苄青霉素 (Ampicilin, Amp)、十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS)、溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA); 西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain) 购自比利时 Acros Organics 公司 (Geel, Belgium); 对硝基苯葡萄糖苷 (4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷, *pNPG*) 购自美国 Sigma 公司 (St. Lous, MO, USA); 微晶纤维素 (Avicel) 购自上海昌为医药辅料技术有限公司 (Shanghai, China); SPEZYME CP (55 FPU/ml) 购自丹麦 Danisco 公司 (Copenhagen, Danmark); 其他试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自上海国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。实验中使用的引物在上海捷瑞生物工程有限公司进行引物合成。

2.2.1.3 实验仪器

实验中所使用的仪器见表 2.2。

表 2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment instruments

仪器名称	规格	生产厂家
超低温冰箱	-86C	Thermo 公司
移液器	Research	Eppendorf 公司
PCR 仪	Mastercycler	Eppendorf 公司
微型摇床	5430	Eppendorf 公司
台式冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
大型超高速离心机	Avanti J-26	Beckman 公司
核酸蛋白质分析仪	DU-800	Beckman 公司
超声波破碎仪	JY92-II	宁波新芝生物科技有限公司
低温水槽	SDC-6	宁波新芝生物科技有限公司
制冰机	XB-70	宁波新芝生物科技有限公司
超纯水机	Milli-Q Synthesis	Millipore 公司
电转仪	GenePulserXcell™	Bio-Rad 公司
蛋白电泳系统	EPS-300	Bio-Rad 公司
核酸电泳系统	EPS-100	Bio-Rad 公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
三孔电热恒温水槽	DK-8D	上海一恒科学仪器有限公司
真空干燥箱	DZF-6050B	上海一恒科学仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
自动高温灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博迅实业有限公司
凝胶成像系统	FR-980	复日科技
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达
HPLC(自动示差检测)	LC-20AD	岛津公司
海尔冰箱	BCD-239VC	海尔公司
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
电子天平	BS223S	梅特勒
漩涡混合器	QL-901	江苏海门市其林贝尔公司
手掌型离心机	LX-100	江苏海门市其林贝尔公司
落地恒温震荡摇床	TS-2	太仓华利达有限公司
气浴摇床	SHZ-82	太仓华利达有限公司

2.2.1.4 菌种的培养及保存

大肠杆菌的培养均采用 LB (Luria broth) 培养基^[144]: 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl 以及 5 g/L 酵母提取物。如果需要配置琼脂固体培养基, 则再向其中添加 15 g/L 的琼脂。培养基成分添加完成后用 5 M NaOH 调节 pH 值到 7.0, 并在 115 °C 条件下灭菌 20 min。如果培养基在使用时需要添加抗生素, 则在使用前按所需浓度在无菌条件下加入相应的

抗生素。氨苄青霉素的使用浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 、卡那霉素使用浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 。如果需要使用含有抗生素的琼脂固体培养基，则在高温灭菌后等含有琼脂的培养基冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右时，按所需浓度加入相应的抗生素，摇晃均匀后等待培养基凝固，并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的培养条件如无特殊说明，所有的液体培养均是在摇床中以 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220rpm 条件进行培养；琼脂固体培养基培养均是将涂布有菌体的平板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中进行培养。

大肠杆菌感受态细胞的制备及所用的培养基：10 g/L 胰蛋白胨，10 g/L NaCl 以及 5 g/L 酵母提取物，10 mM MgSO_4 以及 2 g/L 葡萄糖。培养基成分添加完成后用 5 M NaOH 调节 pH 值到 7.0，并在 115 $^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 20 min。

M9 盐离子培养基：配制 1 mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20 % (w/v) 葡萄糖以及 1 mol/L CaCl_2 溶液，并在超净工作台中以无菌 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤除菌。同时，称取 0.5 g NH_4Cl 、3.0 g Na_2HPO_4 和 1.5 g KH_2PO_4 溶解于 450ml 去离子水和下各成份将其溶解於水中，然后用 1N NaOH 将溶液的 pH 调整到 7.4 并将整体积调整到 494 ml，之后在 115 $^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 20 min。接着在超净工作台中向其加入 1ml 的 1 mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 ml 的 20 % (w/v) 葡萄糖以及 50 μl 的 1 mol/L CaCl_2 溶液，混匀并完成 M9 培养基的制备。

菌种保藏的操作方法：在超净工作台中将 800 μL 培养到对数生长期的菌液与 800 μL 60 % 无菌甘油混合均匀，装入预先灭菌的冻存管中，保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。

2.2.1.5 实验试剂及溶液配制

氨苄青霉素贮存液：称取 1.00 g 氨苄青霉素粉末溶解于 50 ml 无菌超纯水中，搅拌使其充分溶解并继续加入超纯水，定容于 100 ml。接着在超净工作台中以无菌 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤除菌，再行分装于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

卡那霉素贮存液：贮存液浓度和配制的操作步骤参见氨苄青霉素贮存液的配制。

5 \times TBE 核酸电泳缓冲液：将 54 g Tris-base，27.5 g 硼酸以及 0.5 M EDTA 溶液 20 ml 溶于 1 L 的去离子水中，充分溶解后常温避光保存，使用时将其稀释成为 0.5 \times 工作液，既稀释 10 倍。

0.7 % 琼脂糖凝胶：称取 0.7 g 琼脂糖，溶于 100 ml 的 5 \times TBE 核酸电泳缓冲液，用微波炉加热至完全溶解，溶液澄清为止。之后加入 20 μL 溴化乙锭，混匀后即可用于凝胶配制。

5 \times 蛋白电泳样品缓冲液：将 0.6 ml 的 1 M Tris-HCl (pH=6.8) 缓冲液、5 ml 的 50 % 甘油、2 ml 的 10 % SDS、0.5 ml 的巯基乙醇、1 ml 的 1 % 溴酚蓝与 0.9 ml 蒸馏水混匀后，配制成 5 \times 蛋白电泳样品缓冲液，分装后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

10 \times 蛋白电泳缓冲液：将 10 g SDS、30g Tris-base 和 144 g 甘氨酸溶于 1 L 的去离子水中，充分溶解后常温保存，使用时将其稀释成为 1 \times 工作液，既稀释 10 倍。

0.1 M 柠檬酸缓冲液：分别配制 0.1 M 柠檬酸溶液和柠檬酸钠溶液，接着将两种溶液缓缓混合并搅拌均匀，使用 pH 计测量溶液的 pH 值，直到缓冲液达到所需的 pH。配制完成的缓冲液置于常温保存。

Tris-HCl 缓冲液: 将 Tris 按所需浓度溶于去离子水中, 然后用移液器缓慢加入浓 HCl 并混匀。使用 pH 计实时监测缓冲液的 pH 值直到达到所需的缓冲液 pH 值以完成缓冲液的配置, 常温保存。

pNPG 溶液 (2.4 mg/mL): 称取 0.072 g 的 4-硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (pNPG) 溶于 30ml 0.1M 柠檬酸缓冲液。配制完成后在 4 °C 避光保存。

0.5M 碳酸钠溶液 (Na₂CO₃): 称取 10.6 g 无水 Na₂CO₃ 粉末溶于去 200 ml 离子水中, 充分溶解后置于常温保存。

渗透冲击溶液: 配制 100ml 33 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液, 并称取 20 g 蔗糖、0.019g Na₂EDTA 并加入其中, 混匀后于-20 °C 条件下保存。

DNS 试剂: 称取 91 g 酒石酸钾钠并溶于 250 ml 水中, 稍微加热并称取 3.15 g 的 3,5-二硝基水杨酸、10.5 g 氢氧化钠以及 2.5 g 苯酚加入加热的溶液中, 充分溶解后冷却并定容至 500 ml。配置完成后贮藏于棕色瓶中, 于 4 °C 避光保存。

2.2.2 实验及分析方法

2.2.2.1 基因组及质粒 DNA 的抽提、纯化和制备

基因组和质粒制备前, 先将细菌培养至稳定期, 并离心取得适当量的菌体用以制备基因组或质粒 DNA。基因组抽提的具体操作步骤可参考 Omega 基因组抽提试剂盒 (Omega Bacterial DNA Kit) 说明书; 质粒提取的具体操作步骤可参考捷瑞质粒小量制备试剂盒 (捷瑞 Plasmid Mini Kit) 说明书; DNA 片段的琼脂糖凝胶回收的具体操作步骤可参考捷瑞琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (捷瑞 Gel Extraction Kit) 说明书; PCR 的产物纯化操作步骤具体可参考生工 PCR 产物纯化试剂盒 (生工 PCR Purification Kit) 说明书。

2.2.2.2 目的基因的克隆及质粒构建

本实验中采用 PCR 的方法对目的基因进行扩增, 用于进行 PCR 的引物见表 2.3。

表 2.3 本实验使用的引物

Table 2.3 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>pdC-S</i>	GGAATTCATATGAGTTATACTGTCGGTACCTA
<i>pdC-A</i>	ACGCGTCGACTAGAGGAGCTTGTTAACAGG
<i>adhB-S</i>	ACGCGTCGACGAGGTTATAGCTATGGCTTCTTCAACTTT
<i>adhB-A</i>	TCCGCTCGAGTTTTCTGTTTTGAAATTAG
<i>kan-S</i>	CGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTCTTGAGC GATTGTGTAGG
<i>kan-A</i>	ACTCAATAAAGTTGCCGCTTTACGGGGAAATTAGAACATTCTCGAGTTA AGGTTTAACGG
P1	GGAATTCATATGGGAGCTGTTGACAATTA
P2	GTACCGACAGTATAACTCATGAATACTGTTTCCTGTGTGA
P3	TCACACAGGAAACAGTATTCATGAGTTATACTGTCGGTAC

P4	CCGCTCGAGGTTTTCTGTGTTTTGAAATTAGA
R1	CGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTCTTGAGC GATGTGTAGG
R2	ACTCAATAAAGTTGCCGCTTTACGGGGAAATTAGAACATTCTCGGTAA GGTTTAACGG
D1	ATACTGGGTCATTTACCTGC
D2	CAATCCATCTTGTTCAATCA
D3	ATAGTGATAGTCGGTTTTGC
D4	CAGAATGAAGCGCGGAATAA
P43-S	CGGGATCCTGATAGGTGGTATGTTTTCGC)
P43-A	GCTCTAGAGTGTACATTCCTCTCTTACCTATAATG
P43- <i>NprB</i> -S	CGGAATTCTGATAGGTGGTATGTTTTCGCT
P43- <i>NprB</i> -A	CGGGATCCTGCAGCTGAGGCATGTGTT
<i>celA</i> -S	GCTCTAGATGCAGGTGTGCCTTTTAACAC
<i>celA</i> -A	CCCAAGCTTCTAATAAGGTAGGTGGGGTATG
<i>cbhA</i> -S	GCTCTAGAAGCCTGTTGAATATATACTTCCGC
<i>cbhA</i> -A	CCCAAGCTTTTACTCGTCAAGATAAGCTGTAACC
<i>bglB</i> -S	GCTCTAGAATGAGCGAGAATACCTTTATATTTC
<i>bglB</i> -A	CCCAAGCTTTTAAAACCCGTTCTTCGCC

实验中将新订购的引物在低温高速离心机中以 4 °C，12000rpm 条件下离心 3 min，防止引物管中的引物粉末随着开盖喷溅。之后按照引物订单上所标明的引物浓度，加入适量的无菌超纯水溶解引物粉，溶解后引物浓度为 10 μM。接着按照不同的 PCR 需求，在 PCR 专用管中按照表 2.4 的溶液配比加入相应的 PCR 试剂以完成相应 PCR 体系的配制。

表 2.4 PCR 反应体系

Table 2.4 Composition of PCR

Reagents	Volume (μl)
rTaq	
ddH ₂ O	7.0
Forward primer (10μM)	1.0
Reverse primer (10μM)	1.0
Template	1.0
rTaq Premix DNA polymerase (including DNA polymerase, buffer and dNTP)	10.0
Primer STAR	
5×Primer STAR buffer	10.0
dNTP (2.5 mM/each)	4.0

Forward primer (10 μ M)	1.0
Reverse primer (10 μ M)	1.0
ddH ₂ O	32.5
Template	1.0
Primer STAR HS DNA polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5

以上 PCR 体系均在冰上添加完毕后，用移液枪轻轻吹打混合均匀，同时将 PCR 仪器的顶盖预热至 105 °C，并将装有 PCR 体系的 PCR 管放入仪器并按照以下参数进行 PCR 循环程序：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s；按照引物设计时所设定的 T_m 温度退火 30 s；72 °C 进行 DNA 链延伸，延长时间按照片段长度确定（普通 taq 酶一般为 1000 bp/min）。之后将变性到延长的步骤重复 25-30 个循环后，再在 72 °C 下延伸 10 min，然后于 10 °C 保存。产物可以通过核酸电泳进行对片段长度进行验证。

目的基因通过 PCR 扩增后，使用 PCR 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，然后使用引物上预设的限制性内切酶对其进行酶切（具体酶切位点以及体系参见实验结果部分）；同时对所需的载体质粒使用相同的限制性内切酶进行酶切。将 PCR 和目的载体的酶切产物通过胶回收，取得酶切后的目的基因 DNA 片段和载体片段，然后使用 T4 DNA 连接酶将两个片段通过酶切后产生的粘性末端进行特异性的连接，连接的具体操作可参考 T4 DNA 连接酶（Fermentas T4 DNA Ligase）使用说明书。连接的体系配比见表 2.5。目的基因与目的载体相连成环状 DNA 后，即形成了新的目的质粒。将连接后的连接液转化进入大肠杆菌 DH5 α ，便能扩增制备所需的目的质粒。

表 2.5 连接体系

Table 2.5 The ligation system

Vector (μ l)	Target fragment (μ l)	10 \times Buffer (μ l)	T4 DNA Ligase (μ l)
V	8-V	1	1

In the ligation system, the concentration of target fragment should be 3-7 folds more than the vector to enhance the efficiency of ligation.

2.2.2.3 目的质粒在大肠杆菌中的转化及鉴定

实验中采用传统的氯化钙法制备大肠杆菌 DH5 α 感受态^[145]，用以完成目的质粒向大肠杆菌中的转化。具体的操作步骤为：

- 1) 将保存于-80 °C 冰箱中中保种的大肠杆菌 DH5 α 甘油管取出，在超净工作台中用接种环挑取少量的菌液涂布于 LB 琼脂平板上，放置于 37 °C 恒温培养箱中培养约 12 h，便可于平板上看到肉眼可清晰分辨的大肠杆菌 DH5 α 单菌落。
- 2) 用牙签挑取一个单菌落，接种于 20 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件进行震荡培养 12 h。
- 3) 取 2 ml 培养后的大肠杆菌 DH5 α 菌液，转接于 200 ml 制备大肠杆菌感受态的专用培

培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件进行震荡培养。约 2 h 后，当大肠杆菌 DH5 α 生长至对数生长初期 (OD_{600nm}=0.3-0.4)，将培养所用的摇瓶取出置于冰水混合物中冰浴 10 min。

- 4) 将冷却后的菌体培养液迅速转移至无菌预冷的离心杯中，于低温离心机中 4 °C、2000 g 离心 5 min。所有操作尽可能在冰上或低温条件下进行，以避免感受态细胞的转化效率受到影响。
- 5) 将离心后的菌液中的上清弃去，加入 25 ml 无菌预冷的 0.1 M CaCl₂ (过滤除菌)，于冰上轻轻摇晃悬浮菌体。
- 6) 再次将菌液于低温离心机中 4 °C、2000 g 离心 5 min，尽可能弃去上清。接着向离心杯中加入 2 ml 预冷 0.1 M CaCl₂，于冰上轻轻摇晃悬浮菌体。
- 7) 向离心杯中加入 40 μ l DMSO，密封杯口于冰上轻轻混合均匀后，将离心杯置于冰水混合物中冰浴 15 min；之后再次向离心杯中加入 40 μ l DMSO，密封杯口于冰上轻轻混合均匀后，将离心杯置于冰水混合物中冰浴 15 min。

在无菌条件下将感受态菌液以 100 μ l 每管分装至无菌的 1.5 ml 离心管中。加入分装菌液后的离心管迅速浸入液氮中速冻，然后保存于 -80 °C 超低温冰箱中，隔天即可使用。其感受态转化活性约能保持半年。对于所制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态，采用相应的热激转化法来进行目的质粒的转化操作。具体步骤为：

- 1) 从 -80 °C 超低温冰箱中取一管大肠杆菌 DH5 α 感受态 (100 μ l)，冰浴直至其菌液溶化。
- 2) 取 10 μ l 需要转化的连接产物或者质粒，通过移液器将其加入 100 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态中轻微吹打混匀后，将装有转化体系的 1.5 ml 离心管置于冰水混合物中冰浴 30 min。
- 3) 将装有转化体系的 1.5 ml 离心管放入 42 °C 水浴锅中热激 90 s。
- 4) 将装有转化体系的 1.5 ml 离心管重新插入冰水混合物中冰浴 2 min。
- 5) 向转化体系中加入 900 μ l 无菌 LB 培养基后放入摇床，以 37 °C，100 rpm 条件孵育 45 min。
- 6) 吸取 100 μ l (如转化效率不高可适当多取，最好不要超过 500 μ l) 转化菌液，涂布于含有相应抗生素的 LB 平板上，于 37 °C 恒温培养箱中培养 12-20 h 后，即可于平板上长出肉眼可辨的阳性克隆单菌落，接着挑取菌落培养后进行质粒抽和鉴定。

大肠杆菌阳性克隆的鉴定：挑取目的阳性克隆，接种于 20 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件震荡培养 18 h 至菌体明显浑浊，然后取适当菌量进行质粒抽提。抽提出的质粒可以按照质粒图谱，进行相应的限制性内切酶酶切，以检测酶切后的 DNA 片段大小是否符合理论值。单酶切体系为：5 μ l 质粒+1 μ l 10 \times 酶切缓冲液+0.5 μ l 限制性内切酶，最后用超纯水将酶切体系补齐至 10 μ l。双酶切体系为：5 μ l 质粒+2 μ l 10 \times Tango 缓冲液+0.5 μ l 限制性内切酶 \times 2，最后用超纯水将酶切体系补齐至 10 μ l。同时，对于含有目的基因的载体质粒还能以该质粒为模板，对目的基因进行 PCR，并

以无菌超纯水作为空白对照 PCR 的模板。通过核酸电泳观察目的质粒经过 PCR 是否能够得到相应的扩增条带，用以确认该质粒是否含有目的基因。

大肠杆菌电击转化细胞感受态制备操作步骤为：

- 1) 将保存于-80 °C 冰箱中保种的大肠杆菌甘油管取出，在超净工作台中用接种环挑取少量的菌液涂布于 LB 琼脂平板上，放置于 37 °C 恒温培养箱中培养约 12 h，便可于平板上看到肉眼可清晰分辨的大肠杆菌 DH5 α 单菌落。
- 2) 用牙签挑取一个单菌落，接种于 20 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件进行震荡培养 12 h。
- 3) 取 2 ml 培养后的大肠杆菌 DH5 α 菌液，转接于 200 ml 制备大肠杆菌感受态的专用培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件进行震荡培养，约 2 h 后当大肠杆菌 DH5 α 生长至对数生长初期 ($OD_{600nm}=0.4-0.6$)，将培养所用的摇瓶取出置于冰水混合物中冰浴 15 min。
- 4) 将冷却后的菌体培养液快速转移至无菌预冷的离心杯中，于低温离心机中 4 °C、2000 g 离心 5 min，弃去上清。所有操作尽可能在冰上或低温条件下进行，以免降低感受态细胞的转化效率。
- 5) 加入 20 ml 预冷的无菌去离子水，悬浮菌体并于低温离心机中 4 °C、2000 g 离心 5 min，弃去上清。
- 6) 加入 5 ml 预冷且无菌的 10 % 甘油，悬浮菌体并于低温离心机中 4 °C、2000 g 离心 5 min，弃去上清。
- 7) 加入 3 ml 预冷且无菌的 10 % 甘油，接着在无菌条件下将感受态菌液以 150 μ l 每管分装至无菌的 1.5 ml 离心管中。加入分装菌液后的离心管迅速浸入液氮中速冻，然后保存于-80 °C 超低温冰箱中。

大肠杆菌电击转化操作步骤为：

- 1) 将一管大肠杆菌电击转化感受态放置于冰水混合物中，冰浴使其溶解。
- 2) 向感受态中加入 10 μ l 质粒 (约 500 ng)，混匀后冰浴 15 min。
- 3) 将转化体系在无菌条件下转入预冷的 0.1 cm 电击杯进行电转，电转条件设定值为 200 Ω ，25 μ F，2000 V，4~5 ms。
- 4) 电击后迅速向电击杯中加入 500 μ l 预热的 LB 培养基，并将转化体系转移进入 1.5 ml 离心管中，于 37 °C、150 rpm 孵育 60 min 后，吸取 200 μ l (如转化效率不高可适当多取，最好不要超过 500 μ l) 转化菌液，涂布于含有相应抗生素的 LB 平板上，于 37 °C 恒温培养箱中培养 12-20 h 后，即可于平板上长出肉眼可辨的阳性克隆单菌落，接着挑取菌落培养后进行质粒抽和鉴定。

2.2.2.4 重组大肠杆菌胞内及胞外蛋白的提取

实验中使用超声破碎法进行重组大肠杆菌胞内蛋白的提取，渗透冲击法对大肠杆菌的周质和胞质的蛋白进行提取^[146]，使用硫酸铵沉淀法用来对菌液中的菌体胞外蛋白进行提取。提取获得蛋白则用于之后的实验。具体方法为：

- 1) 用牙签挑取一个重组大肠杆菌单菌落，接种于 20 ml LB (含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素) 培养基中，放置于摇床中以 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220rpm 条件震荡培养约 24 h，菌体约生长到至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=2.0$ 。
- 2) 将菌液摇瓶置于冰水混合物中，冰浴 10 min。接着将菌液转移至预冷离心杯中，于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 rpm 离心 2 min，沉淀即为大肠杆菌菌体，上清则含有待提取的胞外蛋白。
- 3) 将 2) 步骤中产生的沉淀，用 20 ml 柠檬酸缓冲液悬浮菌体，取 1 ml 菌体悬浮液加入 1.5 ml 离心管。
- 4) 将菌体悬浮液于冰上进行超声破碎，条件为 100W、超声时间 3 s、超声间隔 15 s，工作 15 次。
- 5) 将破碎后的菌体悬浮液于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 离心 5 min，上清即是所需的胞内蛋白。
- 6) 于 3) 步骤中用 20 ml 柠檬酸缓冲液悬浮的菌体后，另取 1 ml 菌体悬浮液加入 1.5 ml 离心管，于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 rpm 离心 2 min，弃去上清。
- 7) 向离心管中加入 1 ml 渗透冲击液，用移液器轻轻吹打悬浮菌体后混匀，然后将离心管置于冰上冰浴 10 min。
- 8) 将离心管于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 rpm 离心 2 min，弃去上清，再加入 1 ml 超纯水，用移液器轻轻吹打悬浮菌体后混匀，并冰浴 10 min。
- 9) 将离心管于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 rpm 离心 2 min，所得上清便是周质空间的蛋白溶液；同时将所得沉淀以 1 ml 柠檬酸缓冲液悬浮，将菌体悬浮液于冰上进行超声破碎，条件为 100W、超声时间 3 s、超声间隔 15 s，工作 15 次。将破碎后的菌体悬浮液于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 离心 5 min，上清即是所需的胞质蛋白溶液。
- 10) 将 2) 步骤中产生的上清液然转移进入另一个预冷离心杯中，于冰上以 60 % 的沉淀浓度分批次缓慢加入无水硫酸铵粉末（每 100 ml 菌液加入 36.1 g 无水硫酸铵），每次添加硫酸铵后要搅拌均匀以使其充分溶解。
- 11) 将离心杯于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 离心 10 min，弃去上清后用 1 ml Tris-HCl 缓冲液 (pH=7) 溶解沉淀，所得溶液既是胞外蛋白液（如此时有沉淀则于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 离心 3 min 取上清作为胞外蛋白液）。

2.2.2.5 重组大肠杆菌细胞光密度 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) 与细胞干重 (DCW, mg/mL) 曲线的测定

实验中需要对大肠杆菌的菌体量进行定义，因此对其菌液的光密度和细胞干重的关系进行了测定，以便在之后的实验中以细胞光密度 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) 来定量菌体，用作实验的参数，具体操作步骤为：用牙签挑取一个重组大肠杆菌单菌落后接种于 20 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220rpm 条件震荡培养约 12 h 然后 1 % 转接于 500 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220rpm 条件进行震荡培养。约 2 h 后，测量菌液此时的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值，同时取 30 ml 菌液并加入 50 ml 离心管中，于离心机中 10000 rpm 离心 2 min，弃去上清后用 15 ml 超纯水悬浮菌体并分装成 3 份作为平行。之后将分装后的菌

体悬浮液以 10000 rpm 离心 2 min，弃去上清，并重新加入 1 ml 超纯水悬浮菌体，然后将菌液加入预先烘干并称重的 6 cm 培养皿中，同时向离心管中再加入 1 ml 超纯水对离心管进行润洗，润洗液也一并加入培养皿中，然后将培养皿置于 115 °C 烘箱中烘干 12h 至恒重。之后将带有菌体的培养皿称重，得出每个培养皿中所对应的 10 ml 菌液中菌体的重量，并根据当时所测相应的 OD_{600nm} 值，计算出细胞光密度与细胞干重的关系并绘制曲线（附图 2），回归出关系式，其中横坐标为细胞光密度（OD_{600nm}），纵坐标为细胞干重（DCW, mg/mL）：

$$DCW (mg/mL) = 0.52 \times OD_{600nm}$$

2.2.2.6 磷酸处理微晶纤维素（PASC）的制备

试验中的纤维素外切及内切酶酶活测定实验中，采用 10 g/L 的磷酸处理微晶纤维素（PASC）作为底物，该材料的制备方法为^[147]：

- 1) 称取 1.0 g 微晶纤维素（Avicel），并将微晶纤维素粉末加入 250 ml 离心杯中，同时加入 3 ml 去离子水并轻轻将微晶纤维素粉末及水混合均匀至糊状，完成微晶纤维素的预浸。
- 2) 加入 50 ml 预冷的浓磷酸，边加边进行成分的搅拌，避免微晶纤维素结块，直至其成为均匀的糊状物，全过程均在冰上操作，几分钟内糊状物将由浑浊变得透明。之后将离心杯冰浴 1 h，期间每隔 10 min 就要对离心杯内的混合物进行一次充分的搅拌。
- 3) 将 200 ml 预冷的去离子水分几次加入离心杯，每次加 50 ml 水并进行充分的搅拌，并能观察到白色沉淀的生成。
- 4) 将离心杯在 4 °C、6000 rpm 离心 20 min，弃去上清。之后再次加入 200 ml 去离子水悬浮微晶纤维素并在相同条件下离心，重复洗涤四次，每次皆弃去上清。
- 5) 向离心后的沉淀加入 2 ml 的 2 M Na₂CO₃，充分混匀用以中和残余的磷酸来调节 pH。向离心杯中加入 100 ml 去离子水对微晶纤维素进行洗涤，搅拌均匀后在 4 °C、6000 rpm 离心 20 min，弃去上清并重复上述步骤，直至微晶纤维素水溶液达到 pH=5-7 为止。最后将处理后的微晶纤维素（PASC）以 100 ml 去离子水悬浮溶解，并置于 4 °C 保存。

2.2.2.7 纤维素酶活测定

对于纤维素酶活的测定，外切酶和内切酶的酶活测定采用磷酸处理微晶纤维素（PASC）作为底物并用 DNS 试剂进行酶活测定，β-葡萄糖苷酶则采用 pNPG 为底物进行对硝基苯显色反应以及葡萄糖试剂盒进行酶活测试。纤维素外切酶和内切酶的酶活测定具体方法为：按照 3.2.2.4 所示方法，进行重组大肠杆菌胞内及胞外蛋白的提取并进行酶活的测定。取 750 μl 酶液和 750 μl 的 PASC 在 15 ml 试管中混合均匀后，于 50 °C 反应 30 min；之后立刻加入 3 ml 的 DNS 试剂，并将试管置于沸水浴中煮沸 3 min，煮沸步骤在使 DNS 和底物结合显色的同时，也能使酶蛋白失活，终止酶反应。之后将试管置于冰水混合物中冰浴，待其冷却后从反应体系中取 200 μl 反应液，稀释于 2.5 ml 去离子水中，并测量其 OD_{540 nm} 的值。与此同时，每次在使用 DNS 试剂进行显色测定之

前，均需进行标准曲线的制作，配制浓度范围在 0-1.0 g/L 的葡萄糖标准溶液，将 1.5 ml 底物溶液和 3 ml DNS 混合于 15 ml 试管，并将试管置于沸水浴中煮沸 3 min，之后将试管置于冰水混合物中冰浴，待其冷却后从反应体系中取 200 μ l 反应液，稀释于 2.5 ml 去离子水中，并测量其 OD_{540 nm} 的值。通过已知的不同浓度所对应的吸光值，即可得到一条反应标准曲线。实验中一个酶活力单位 (U) 定义为：1 min 催化底物释放 1 g/L 还原糖所需的酶量。

β -葡萄糖苷酶 pNPG 酶活测定：该方法主要是测量底物通过酶催化后所释放的对硝基苯的含量，并通过其在 OD_{405nm} 下吸光值对所释放的对硝基苯进行定量。按照 3.2.2.4 所示方法，进行重组大肠杆菌胞内及胞外蛋白的提取并进行酶活的测定。取 200 μ l 酶液、800 μ l 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液 (pH=6.0) 以及 1 ml pNPG 溶液 (2.4 mg/ml) 在 15 ml 试管中混合均匀后，于 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min；同时将 200 μ l 酶液、1.800 ml 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液混合作为底物空白样品，将 1 ml 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液和 1 ml pNPG 溶液混合作为酶空白样品在相同条件下进行反应。反应结束后加入 0.5 M Na₂CO₃ 终止反应。然后对测量反应体系在 OD_{405nm} 下的吸光值。所得到的数值减去酶空白和底物空白样品的测得值后，即可得到反应体系中所释放的对硝基苯的含量，进而表征反应体系中酶蛋白的酶活。试验中一个酶活力单位 (U) 定义为：1 min 催化底物释放 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

β -葡萄糖苷酶纤维二糖酶活测定：按照 3.2.2.4 所示方法，进行重组大肠杆菌胞内及胞外蛋白的提取并进行酶活的测定。取 500 μ l 酶液、500 μ l 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液 (pH=6.0) 以及 1 ml 纤维二糖溶液 (5 g/L) 在 15 ml 试管中混合均匀后，于 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min；随后用葡萄糖试剂盒测定反应后体系中葡萄糖的浓度，以确定 β -葡萄糖苷酶的催化能力。葡萄糖测定试剂盒 (上海科欣生物技术研究所在葡萄糖测定试剂盒) 使用方法详见其说明书。试验中一个酶活力单位 (U) 定义为：1 min 催化底物释放 1 g/L 葡萄糖所需的酶量。

2.2.2.8 重组大肠杆菌的发酵培养

将保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保种的重组大肠杆菌甘油管取出，待其溶化后在超净工作台中以 1% (vol/vol) 接种量于 LB 培养基中接种 (对于含质粒的重组菌则于 LB 培养基中添加相应浓度和种类的抗生素，详见本章 3.2.1.5 关于试剂配制和使用的内容)，放置于恒温摇床中以 37 $^{\circ}$ C、220 rpm 的条件培养约 12-16 h 至 OD_{600nm} 值约为 1.5 左右。接着用移液器将种子液以 1% (vol/vol) 的接种量接入相应的 LB 发酵培养中，同样以 37 $^{\circ}$ C、220 rpm 的条件开始发酵培养 (对于含质粒的重组菌则同时添加相应浓度和种类的抗生素)。发酵过程中，当菌体生长到 OD_{600nm}=0.4-0.6 时，向发酵体系中加入 0.1 mM 的 IPTG 进行诱导，激活重组菌中产乙醇的基因。试验中根据菌体的发酵情况和实验需要，于合适的时间点取样用于分析菌体的发酵情况。对于发酵液的分析如无特别说明，均采用 HPLC 系统进行分析。本实验中使用配有 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱、岛津

LC-20AD 送液泵和岛津 RID-10A 视察检测器的 HPLC 系统。HPLC 使用及分析具体参数为：

流动相 5 mM H₂SO₄

流速 0.6 ml/min

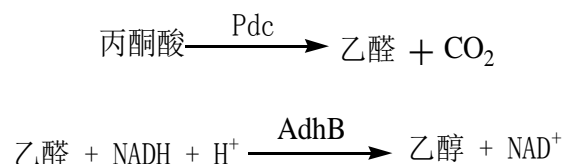
柱温 65 °C

其中待测的样品在从发酵液中取样之后，都要在 13000 rpm 的条件下离心 3 min 以去除样品中的菌体和其他固体杂质，接着将离心后的上清液用 0.22 μm 滤膜过滤并按照一定倍数进行稀释（以稀释后的样品浓度在 HPLC 的检测范围内为准）后使用 HPLC 进行检测。

2.3 结果与讨论

2.3.1 产乙醇重组大肠杆菌的构建

试验中，我们首先通过将源自运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 丙酮酸脱羧酶 (*pdc*) 和乙醇脱氢酶 (*adhB*) 通过同源重组，插入整合到大肠杆菌 *E.coli* JM109 的基因组中，从而实现大肠杆菌的乙醇生产。在普通的菌体代谢过程中，葡萄糖会被转化丙酮酸，进而参与各种代谢途径。而丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶则能够将丙酮酸转化为乙醇，实现乙醇的生产^[122]。



其中外源基因的插入方法采用 RED 重组^[142,143]，利用相应的工具质粒 (pKD46) 向目的宿主菌中导入功能基因 *gam*、*exo* 和 *bet*。其所表达的 Gam 蛋白能够抑制 *E. coli* 本身的 RecBCD 核酸外切酶对外源 DNA 片段的降解；Exo 蛋白能够与双链 DNA 的末端结合，并从 5'端向 3'端对 DNA 进行降解然后产生 3'突出端；Bet 蛋白则能在防止单链 DNA 被降解的同时，完成单链 DNA 的互补退火，从而实现重组^[148-152]。这几种基因所表达的蛋白质能够使菌体的基因组 DNA，通过其本身上下游一段较短的同源序列与一段含有相同同源序列的线性 DNA 片段发生高频重组，从而使外源线性基因片段能够定向的整合到该染色体的特定位点，对原有的序列发生交换并进行替代，从而实现重组。本实验中插入的重组功能片段 *Kan-Ptac-pdc-adhB* 的构建流程见图 2.1。

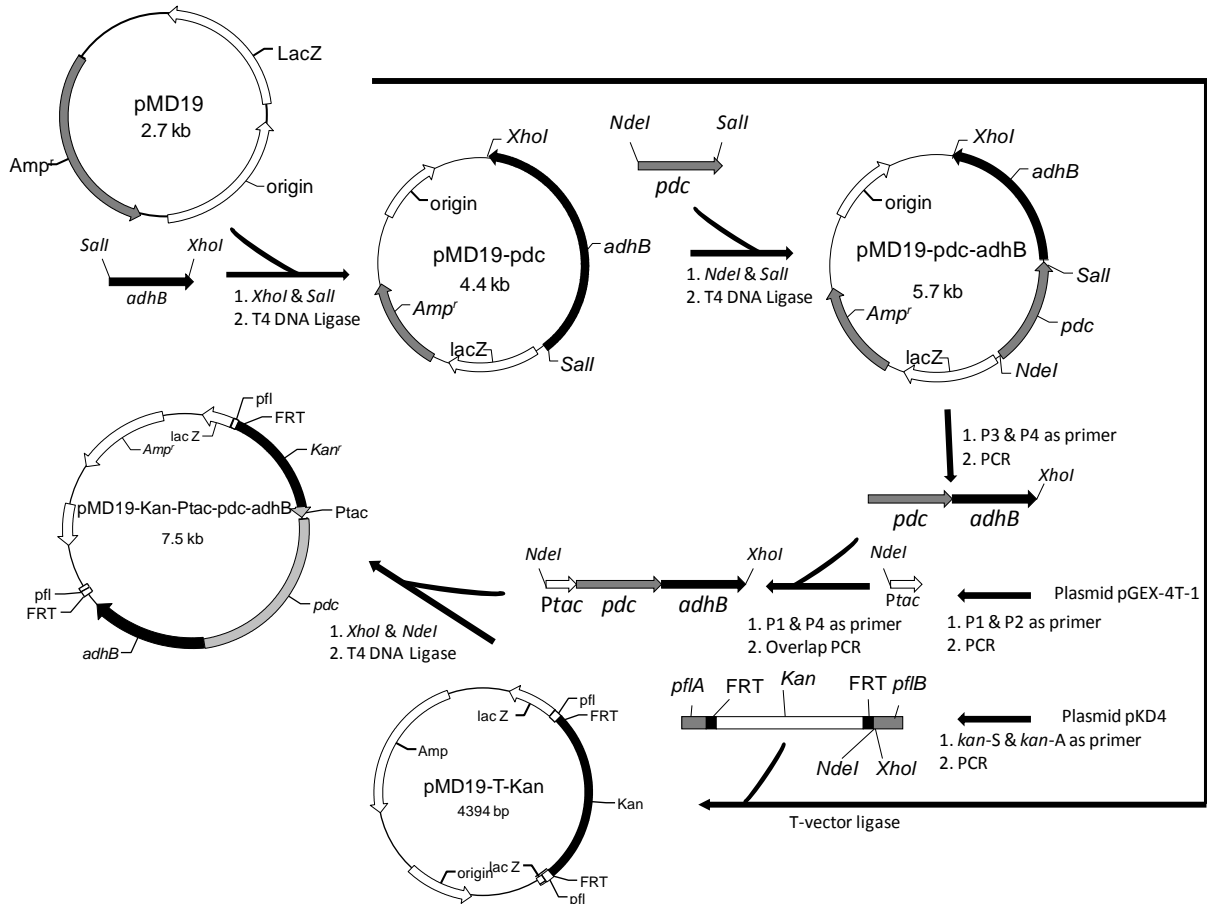


图 2.1 功能片段 *Kan-Ptac-pdc-adhB* 的构建

Fig. 2.1 Consturction of fragment *Kan-Ptac-pdc-adhB*

作为构建重组菌的第一步，首先通过 PCR 扩增，以引物 *pdc-S*、*pdc-A* 以及 *adhB-S*、*adhB-S* 从预先抽提的运动发酵单胞菌基因组中得到 *pdc* (1.7kb) 和 *adhB* (1.2kb) 基因片段 (图 2.2)。

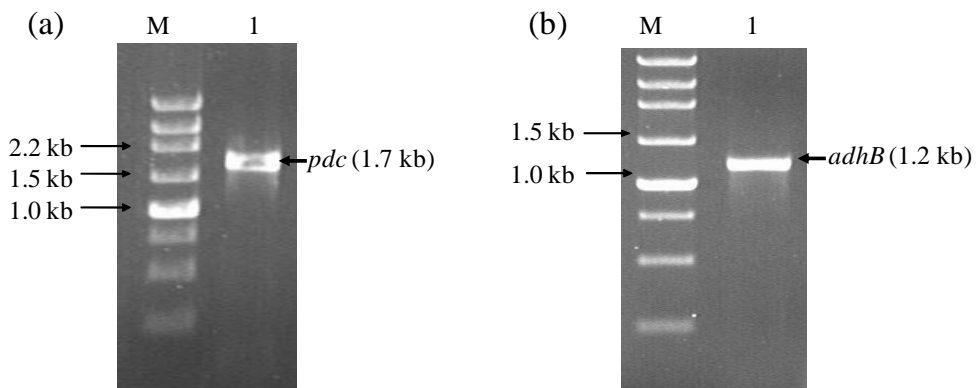


图2.2 *pdc*和*adhB*的PCR

Fig. 2.2 PCR amplification of *pdc* and *adhB*

(a) PCR amplification of *pdc*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, PCR production of *pdc* (1.7 kb). (b) PCR amplification of *adhB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, PCR production of *adhB* (1.2 kb).

得到 *pdC* 与 *adhB* 片段后，在 *pdC* 片段 5'端和 3'端有 *NdeI* 和 *SalI* 的限制性内切酶位点，*adhB* 片段 5'端和 3'端有 *XhoI* 和 *SalI* 的限制性内切酶位点。通过这些酶切位点，对这两种片段进行相应的双酶切，逐一连接到 T 载体（pMD19）上。依照图 2.1 所示流程，对片段 *adhB* 以及载体质粒 pMD19 进行 *XhoI* 和 *SalI* 双酶切，并进行连接构建完成 pMD19-*adhB*；接着再使用 *NdeI* 和 *SalI* 双酶切，并将 2 个片段连接到 pMD19 上，完成质粒 pMD19-*pdC-adhB* 的构建，并进行 PCR 鉴定。试验中使用 *Ptac* 启动子来对 *pdC* 和 *adhB* 这两个基因进行调控。利用引物 P1 和 P2，通过 PCR 的手段从质粒 pGEX-4T-1 中得到 *Ptac* 启动子片段。同时使用 P3 和 P4 引物从质粒 pMD19-*pdC-adhB* 扩增得到 *pdC-adhB* 片段。引物设计时，P2 和 P3 有一段互补的片段，进而使用重叠 PCR（Overlap）的手段，将 *Pta* 和 *pdC-adhB* 片段连接起来，得到片段 *Ptac-pdC-adhB*（图 2.3）。

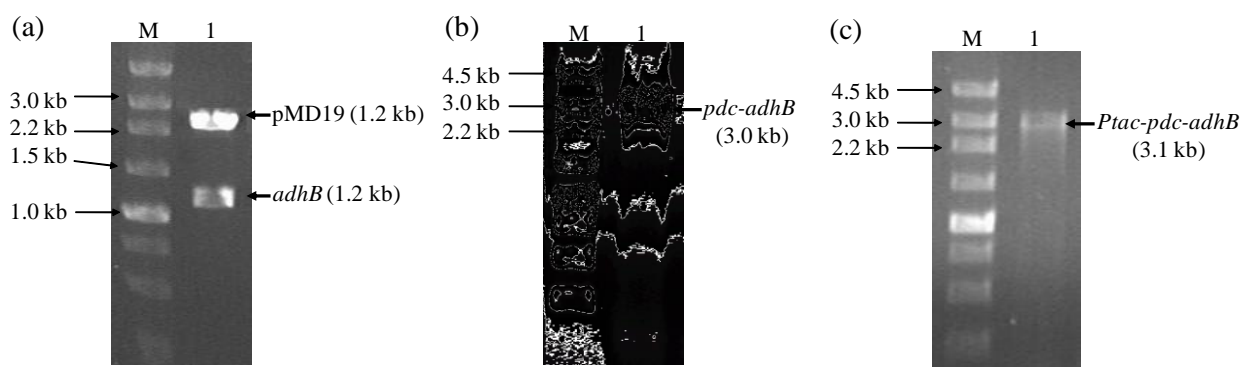


图 2.3 pMD19-*Ptac-pdC-adhB* 的构建及鉴定

Fig. 2.3 Construction and identification of pMD19-*Ptac-pdC-adhB*

(a) Identification of pMD19-*adhB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pMD19-*adhB* (*XhoI* & *SalI*). (b) PCR identification of *pdC-adhB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, PCR production of *pdC-adhB* (3.0 kb). (c) Overlap PCR production of *Ptac-pdC-adhB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, PCR production of *Ptac-pdC-adhB* (3.1 kb).

在得到片段 *Ptac-pdC-adhB* 片段后，我们又利用引物 *kan-S* 和 *kan-A*，通过 PCR 从 pKD4 上得到卡那霉素抗性基因 *kan*，并连接到 pMD19 上。其中卡那霉素抗性基因两端具有 FRT 功能片段，方便在同源重组后抗性基因的消除；而在片段的 5'和 3'端，则分别通过引物设计引入了大肠杆菌甲酸裂解酶基因（*pflA* 和 *pflB*）的两端同源序列，用于之后的同源重组。之后通过 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切及连接，将片段 *Ptac-pdC-adhB* 与 pMD19-*kan* 连接，构成质粒 pMD19-*kan-Ptac-pdC-adhB*（图 2.4）。

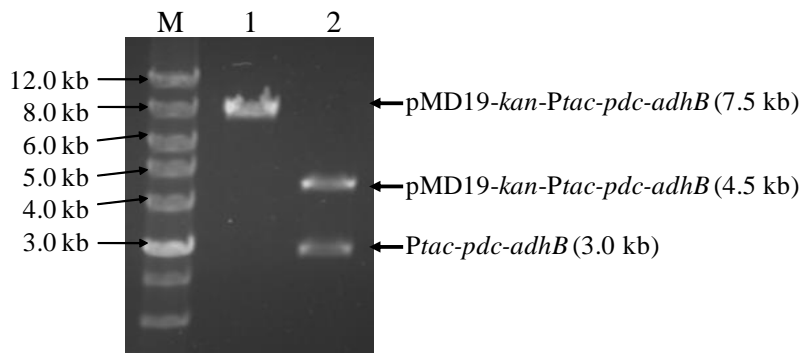
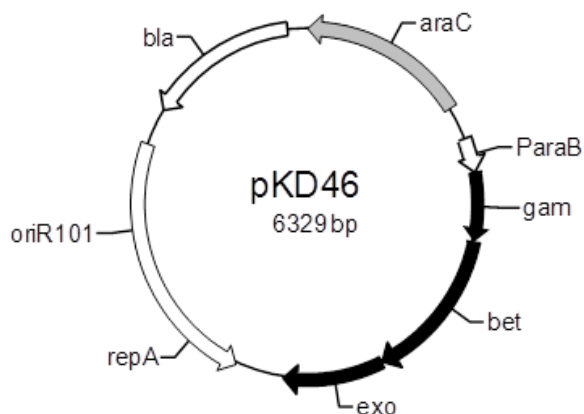


图 2.4 pMD19-kan-Ptac-pdc-adhB 的构建及鉴定

Fig. 2.4 Construction of pMD19-kan-Ptac-pdc-adhB

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); Lane 1, pMD19-kan-Ptac-pdc-adhB (*EcoRI*); Lane 2, pMD19-kan-Ptac-pdc-adhB (*XhoI* & *NdeI*).

完成了质粒 pMD19-kan-Ptac-pdc-adhB 后，以 pMD19-kan-Ptac-pdc-adhB 为模板使用引物 R1 和 R2 进行 PCR 试验，得到含有 *pfl* 基因同源臂的片段 *kan-Ptac-pdc-adhB*，之后便通过 RED 重组，将该片段整合到 *E. coli* JM109 的基因组中。首先通过常用的氯化钙转化法，将工具质粒 pKD46 转化进入试图进行改造的菌株 *E. coli* JM109，得到 *E. coli* JM109/pKD46。然后按照 2.2.2.3 所示的电击转化法将片段 *kan-Ptac-pdc-adhB* 转入 *E. coli* JM109/pKD46，并将转化后的菌液涂布于含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上，放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 使菌体进行外源片段和基因组目的基因 *pflA*、*pflB* 的同源重组。之后挑选该平板上所长出的阳性克隆转而涂布于含有较高浓度卡那霉素（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的 LB 平板上，并首先抽提所长出的阳性克隆的质粒，确认该菌体中的质粒 pKD46 已随着 37 $^{\circ}\text{C}$ 下的培养而丢失。之后再抽提该重组菌的基因组，并使用引物 D1 和 D2、D3 和 D4 对其基因组进行 PCR 鉴定（图 2.5），由于该两对引物所对应的片段包含了插入的目的基因，因此只有进行了正确同源重组的菌体才能通过 PCR 得到大小正确的目的片段。



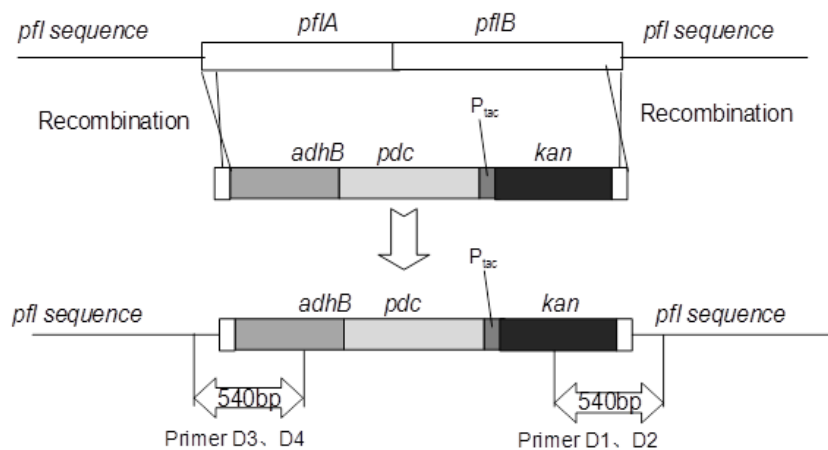


图 2.5 pKD46 以及片段重组和鉴定原理

Fig. 2.5 pKD46 and the principle of recombination

实验结果表明，通过筛选和鉴定我们成功地得到了发生同源重组的菌株。得到的重组菌能够在含有卡那霉素的 LB 平板上生长，同时在含有氨苄青霉素的 LB 平板上无法生长，这表明重组菌种的质粒 pKD46 已经消除，而对其抽提质粒后也发现其菌体内部没有质粒。接着我们使用相对应的引物对重组菌的基因组进行鉴定，也通过 PCR 得到了正确的条带（图 2.6），表明片段 *kan-Ptac-pdc-adhB* 已经通过同源重组整合到了宿主菌的基因组中。

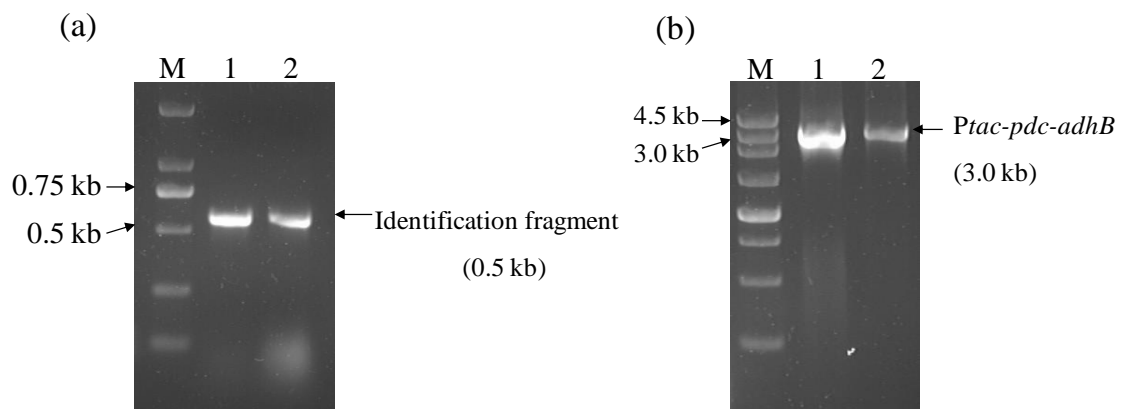


图 2.6 产乙醇重组大肠杆菌的构建及鉴定

Fig. 2.6 Construction and identification of ethanologenic *E. coli*

(a) PCR identification of the recombinant strain. Lane M, marker (DL 2000); Lane 1, PCR by using D1 and D2 as the primer; Lane 2, PCR by using D3 and D4 as the primer. (b) PCR identification of *Ptac-pdc-adhB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, PCR production by using the recombinant strain's genome as the template of *Ptac-pdc-adhB* (3.0 kb); Lane 2, PCR production by using pMD19-*kan-Ptac-pdc-adhB* as the template.

在得到了产乙醇重组大肠杆菌后，再通过质粒 pCP20 将插入的 *kan-Ptac-pdc-adhB* 片段中的卡那霉素抗性基因进行消除，以便于一些后续的质粒转化筛选操作。我们使用氯化钙转化法将 pCP20 转入产乙醇重组大肠杆菌内，然后将转化后的菌液于 30 °C 条件下孵育 8 h，进行抗性基因的消除。在卡那霉素抗性基因序列的两边我已在构建时特意加入了 FRT 位点，以便于 pCP20 对其进行消除（图 2.7）。之后再将菌体转接到 LB 培养基中并于 42 °C 条件下培养 12 h，利用质粒 pCP20 的温敏复制特性对质粒进行消除。最后将菌液涂布于 LB 平板并置于 37 °C 培养，在所长出的菌株中挑选单克隆并在分别含有氨苄青霉素以及卡纳青霉素的 LB 平板上划线，置于 37 °C 过夜培养，从中筛选出对两种抗生素均敏感的阳性克隆。之后便可以对所得的阳性克隆用 D1 和 D2、D3 和 D4 引物以其基因组为模板进行 PCR 鉴定，确认筛选后所得到的阳性克隆拥有正确的基因型，并最终得到了产乙醇重组工程大肠杆菌 *E. coli* P81 (*JM109 pfl::Ptac-pdc-adhB*)。在此基础上，我们将在其中表达不同的纤维素酶，使其能在对纤维素进行降解和利用的同时，实现乙醇的发酵生产。

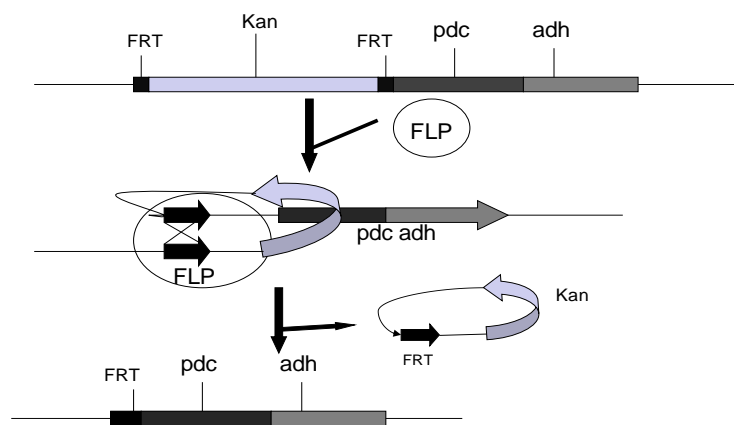


图 2.7 FLP 重组酶机理

Fig. 2.7 Principle of FLP recombinase

2.3.2 分泌表达不同纤维素酶基因的产乙醇大肠杆菌的构建

在上一步中，我们成功地构建了产乙醇菌株 *E. coli* P81。接着我们尝试表达了在该重组菌中表达不同类型的纤维素酶基因，尝试将源自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因 (*celA*)、外切葡聚糖酶基因 (*cbhA*) 和源自多黏芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶 (*bglB*) 在 *E. coli* P81 中进行分泌表达。试验中，我们选定使用的表达载体为 pUC19 (2.7 kb)，这是一种可以在大肠杆菌中进行复制的质粒，含有该质粒的大肠杆菌表现出氨苄青霉素抗性 (*Amp^r*)。同时在表达中使用 P43 启动子以及 *NprB* 信号肽^[153]，以实现目的基因在大肠杆菌中的分泌表达。构建重组质粒时，首先在 pUC19 质粒上添加启动子和信号肽功能片段。利用实验室之前构建的 pP43JM2 质粒^[153]为模板，利用 P43-*NprB*-S 和 P43-*NprB*-A 引物，通过 PCR 得到片段 P43-*NprB*，其长度为 387 bp。所设计的引物所为该片段的 5' 端和 3' 端分别引入了 *EcoRI* 和 *BamHI* 限制性内切酶位点，依照本章 2.2.2.2 中所描述的方法，对扩

增的P43-*NprB*片段和载体pUC19片段进行*EcoRI*和*BamHI*双酶切，之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组载体pUC19-P43-*NprB*（图2.8）。

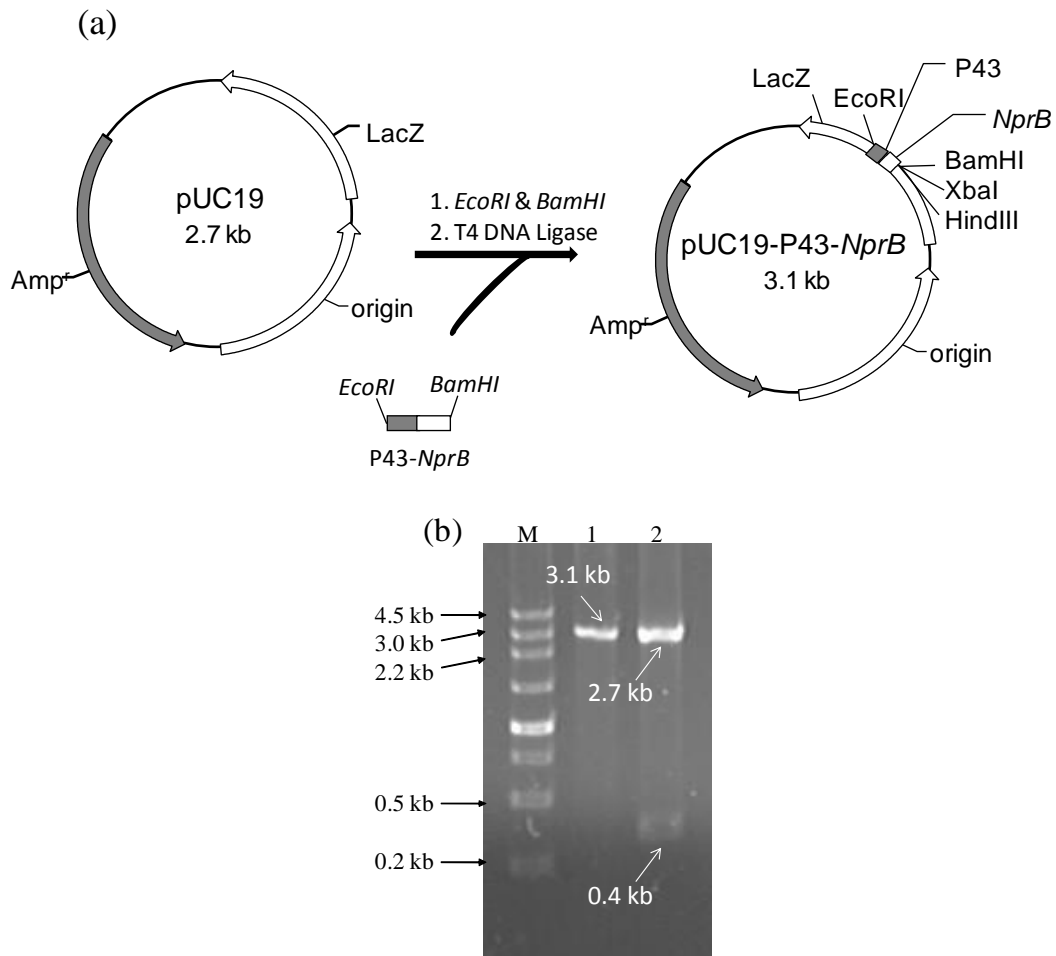


图 2.8 质粒 pUC19-P43-*NprB* 的构建及鉴定

Fig. 2.8 Construction and identification of pUC19-P43-*NprB*

(a) Construction of pUC19-P43-*NprB*. (b) Identification of pUC19-P43-*NprB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pUC19-P43-*NprB* (*EcoRI*); Lane 2, pUC19-P43-*NprB* (*EcoRI* & *BamHI*, 2.7 kb & 0.4 kb).

完成了 pUC19-P43-*NprB* 的构建后，我们接着通过 PCR 扩增，从预先抽提的热纤梭菌基因组中，使用引物 *celA-S* 和 *celA-A* 并通过 PCR 的方法得到 *celA* 基因片段，该基因全长 1.3 kb；之后再使用相同的方法用 *cbhA-S* 和 *cbhA-A* 以及 *bglB-S* 和 *bglB-A* 作为引物，从热纤梭菌和多粘芽孢杆菌的基因组中得到 *cbhA*（1.8 kb）以及 *bglB*（1.3 kb）基因片段（图 2.9a）。上述几段基因均通过引物在其 5'端和 3'端分别引入了 *XbaI* 和 *HindIII* 限制性内切酶位点。接着通过对扩增的目的基因片段和载体 pUC19-P43-*NprB* 进行 *XbaI* 和 *HindIII* 双酶切、胶回收和连接，得到重组目的质粒 pUC19-P43-*NprB-celA*、pUC19-P43-*NprB-cbhA* 和 pUC19-P43-*NprB-bglB*，并对重组质粒进行双酶切鉴定（图 2.9b-d）。

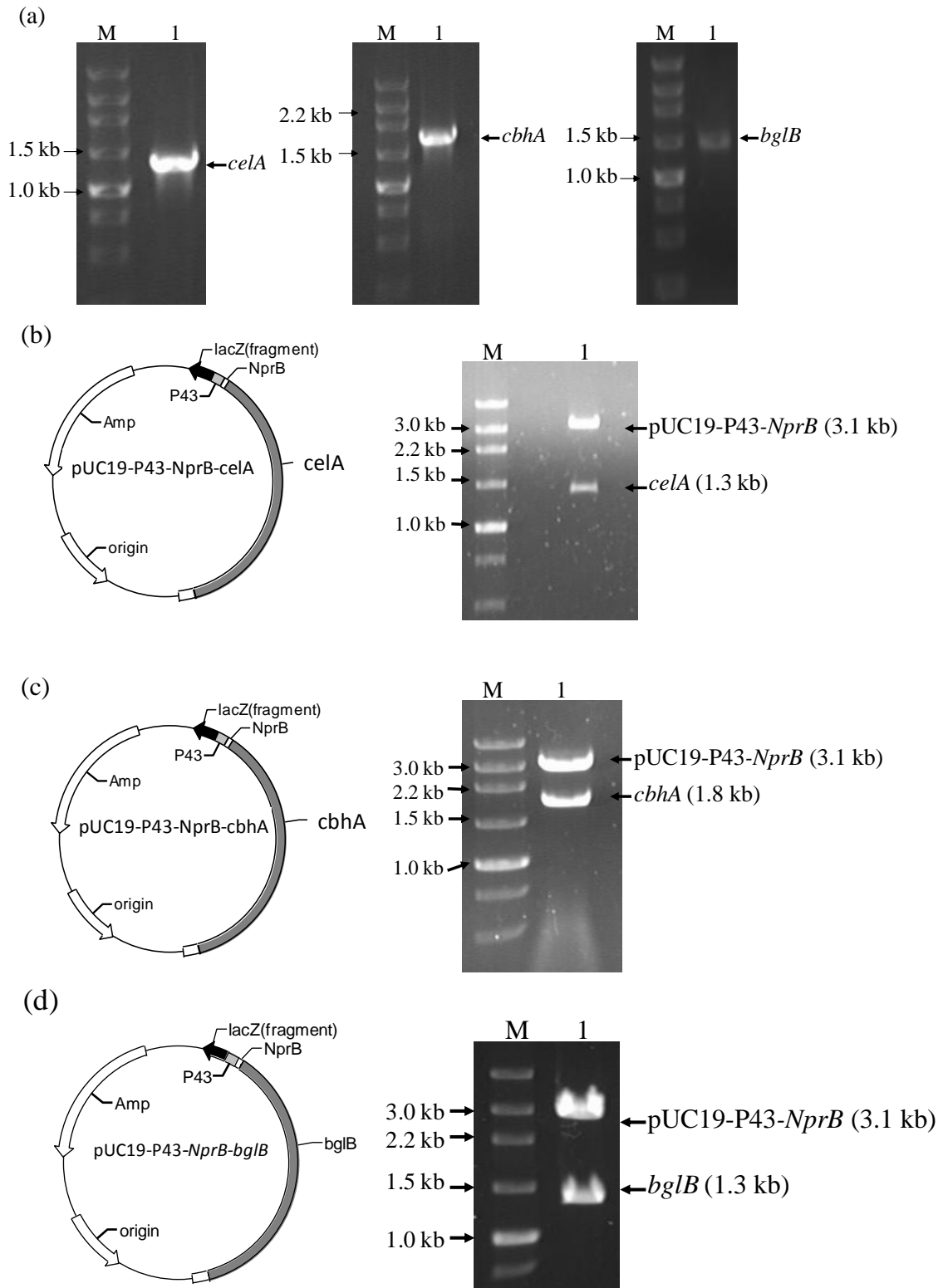


图 2.9 表达不同纤维素酶基因的重组质粒的构建

Fig. 2.9 Consturction of recombinant plasmid which expressed different cellulase gene

(a) PCR amplification of *celA* (1.3 kb), *cbhA* (1.8 kb) and *bglB* (1.3 kb). (b) Consturction and identification of pUC19-P43-NprB-*celA*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pUC19-P43-NprB-*celA* (*XbaI* & *HindIII*). (c) Consturction and identification of pUC19-P43-NprB-*cbhA*. Lane M, marker (250 bp DNA

ladder); Lane 1, pUC19-P43-*NprB-cbhA* (*XbaI* & *HindIII*). (d) Consturction and identification of pUC19-P43-*NprB-bglB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pUC19-P43-*NprB-bglB* (*XbaI* & *HindIII*).

从鉴定实验的结果表明，我们成功地构建了重组目的质粒 pUC19-P43-*NprB-celA*、pUC19-P43-*NprB-cbhA* 和 pUC19-P43-*NprB-bglB*，接着按照本文 2.2.2.3 所示的氯化钙转化法，将重组质粒分别转化进入之前所构建完成产乙醇重组大肠杆菌 *E. coli* P81 中，得到重组大肠杆菌 P81/*celA*、P81/*cbhA* 和 P81/*bglB*。

2.3.3 重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 的酶活测定及发酵试验

2.3.3.1 重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 的酶活测定

构建完成重组菌 P81/*celA*、P81/*cbhA* 和 P81/*bglB* 后，首先对 P81/*celA*、P81/*cbhA* 的胞内及胞外的纤维素酶酶活进行测定。其中 *celA* 表达为纤维素内切酶，*cbhA* 表达为纤维素外切酶。由于纤维素本身无法穿透细胞膜进入细胞体内，重组菌所表达的纤维素酶蛋白必须由胞内分泌至胞外才能与纤维素接触从而起到降解的作用。因此在酶活测定试验中对于胞内外所表达的纤维素酶都进行了检测（表 2.6）。试验中以 10 g/L 的 PASC 作为底物，其中 PASC 的制备方法见本章 2.2.2.6，酶活的定义及测定方法见本章 2.2.2.7。

表 2.6 *CelA* 及 *CbhA* 酶活

Table 2.6 Activity of *CelA* and *CbhA*

Activity (U/mg DCW)	Intracellular	Periplasmic space	Whole cell	Extracellular
<i>CelA</i>	1.06	1.39	2.44	0.03
<i>CbhA</i>	0.05	0.02	0.12	0.00

PASC was used as the substrate and the enzyme activity was assayed at the condition of pH6 and 50 °C.

所表达的外源基因由于不具备分泌所需的信号肽等组件，因此在构建重组质粒时在其上游添加了 *NprB* 信号肽。试验结果也表明，在信号肽 *NprB* 的作用下超过一半的 *CelA* 蛋白都分泌到了周质空间，其酶活达到了 1.39 U/mg DCW，但是由于大肠杆菌的分泌性能并不突出，因此真正分泌到胞外的蛋白其酶活仅为 0.03 U/mg DCW，只占分泌蛋白的 2.19 %。与此同时，在相同反应条件下，*CbhA* 并没有表现出对 PASC 明显的催化的酶活力，酶活相对 *CelA* 较低。而从所显示的酶活来看，*CbhA* 在重组菌种的分泌情况同样不高。

2.3.3.2 重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 的发酵试验

之前的酶活实验表明重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 所表达的蛋白对于 PASC 有一定的催化能力，且有一定程度的分泌表达。为了测试相应程度的分泌表达是否能在发酵中起到作用，因此尝试使用重组菌以 PASC 为底物进行发酵。首先，试验中首先使用不含

质粒的产乙醇重组菌 P81 进行发酵，以确定 P81 在发酵过程中能够利用碳源进行乙醇发酵。试验中使用含 10 g/L 葡萄糖的 LB 培养基作为发酵培养基，于 37 °C、220 rpm 的条件下进行发酵，实验结果见图 2.10。发酵结果显示，P81 在 30 h 内就将 10 g/L 的葡萄糖全部消耗完毕，并发酵产生了约 3.00 g/L 的乙醇，约达到理论产率的 60 %。野生型的大肠杆菌在 LB 培养基中生长的过程中只产生极其微量的乙醇作为副产物，因而这个结果说明重组菌 P81 实现了构建的预想，该重组菌能够利用碳源并进行乙醇的生产。

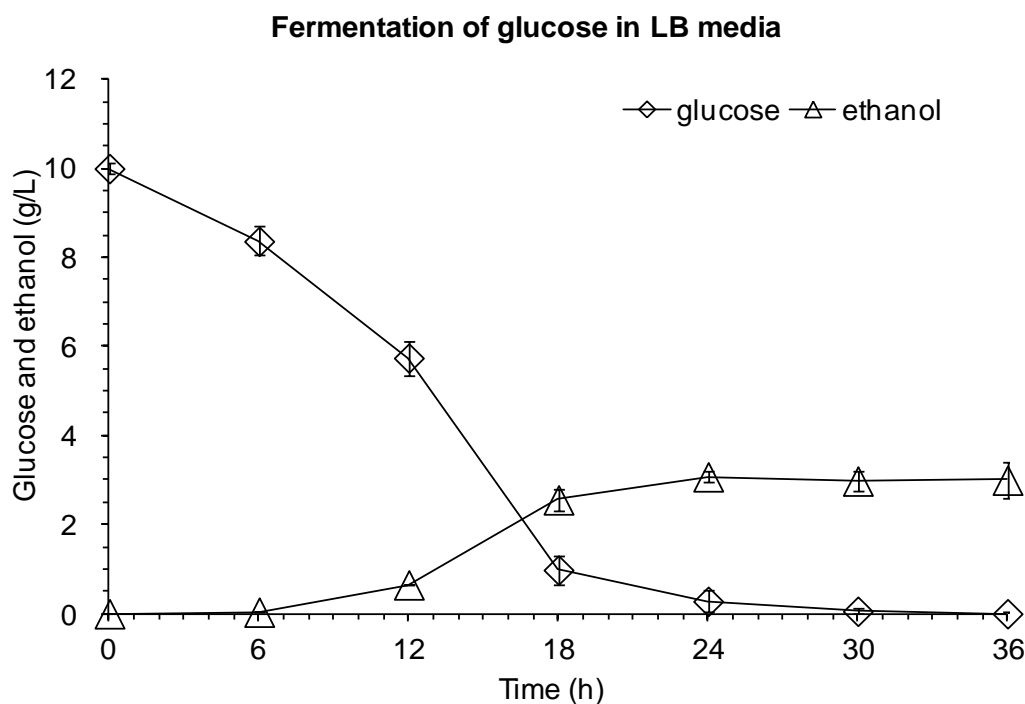


图 2.10 *E. coli* P81 利用葡萄糖产乙醇发酵

Fig. 2.10 Utilization of glucose and ethanol fermentation by *E. coli* P81

The ethanol fermentation by *E. coli* P81 with 10 g/L glucose in LB medium. (◇) for glucose concentration and (Δ) for ethanol concentration.

在确认了重组菌 P81 的乙醇发酵能力后，我们便将重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 在含有 10 g/L PASC 的 LB（含 100 μg/ml 氨苄青霉素）培养基中进行发酵，试验中使用 P81/pUC19 作为对照菌株（图 2.11）。但是经过了 48 h 的发酵，无论是对照菌还是重组菌在发酵过程中都只生产了约 0.02-0.03 g/L 的乙醇。这些乙醇可能只是大肠杆菌在 LB 培养基中生长所产生的一些微量的代谢产物。

由此我们可以得出结论：虽然重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 的的酶提取液对 PASC 有一定水解活性，但是对于重组菌而言，其分解能力仍旧不足以支持重组菌以 PASC 作为底物进行生长和发酵。同时，相较于对照菌株 P81/pUC19，表达纤维素酶的 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 在发酵过程中并没有产生更多的乙醇，这也说明 *celA* 和 *cbhA* 在 P81 中的表达并不能帮助重组菌对 PASC 进行降解和利用。其中最大的原因可能就是由

于 PASC 作为分子量较大的纤维素物质，无法穿过细胞壁，而重组菌所表达的纤维素酶蛋白绝大多数即使进行了分泌，也仅仅在细胞的周质空间中进行了表达，分泌到胞外的酶蛋白只占总量的 1% 左右。之前的试验中已经证明了重组菌 P81 可以利用葡萄糖进行乙醇生产，因此这次的发酵结果中仅有微量乙醇的生产，表明重组菌所表达的纤维素酶蛋白其低下的分泌效率使得重组菌无法对胞外的 PASC 进行有效的水解而产生可被菌体利用的碳源，导致没有乙醇产生；同时，PASC 其本身也可能由于结构过于紧密，重组菌所表达的纤维素酶蛋白可能没有对其进行高效降解的能力，并最终影响了发酵的结果。

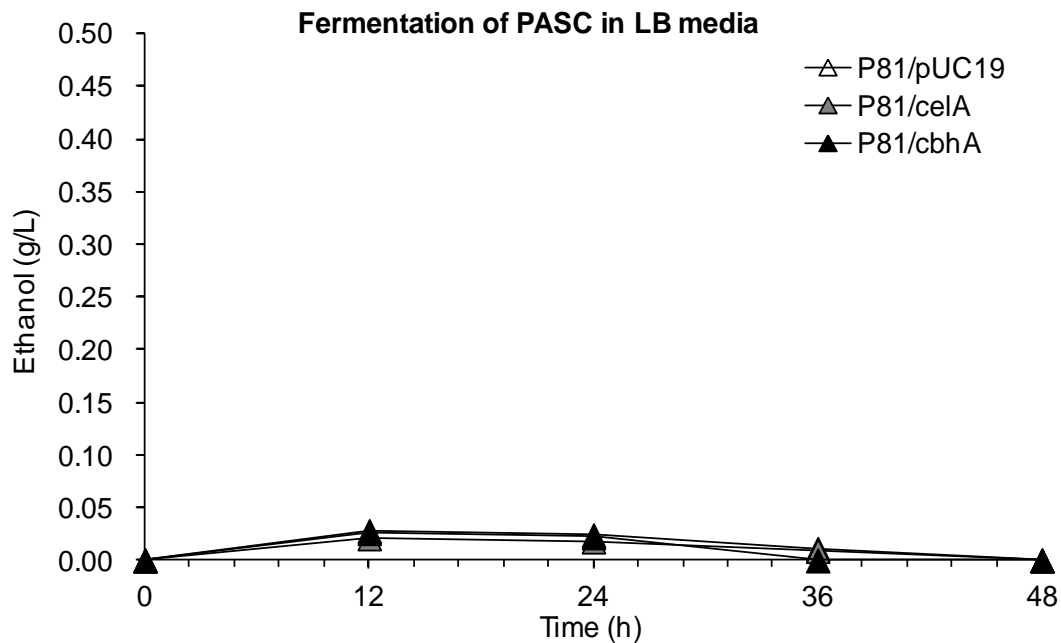


图 2.11 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 利用 PASC 产乙醇发酵

Fig. 2.11 Utilization of PASC and ethanol fermentation by *E. coli* P81

The ethanol fermentation by P81/*celA* and P81/*cbhA* with 10 g/L PASC in LB medium. P81/pUC19 was used as the control strain. Triangle is for ethanol concentration. White is for P81/pUC19, grey for P81/*celA* and black for P81/*cbhA*.

由于 PASC 的较大尺寸以及紧密结构，使得重组菌所表达的蛋白无法对其进行有效接触，也无法进行高效地降解，因此我们尝试对底物 PASC 进行一定的处理，使其更容易被重组菌利用。在 P81 中表达纤维素酶的目的主要是减少或者完全替代在糖化过程中的纤维素酶的应用，因此我试图先以少量的纤维素酶对 Avicel 以及 PASC 进行糖化，将其降解成为糊精从而有利于重组菌对其的利用（图 2.12）。试验中我使用纤维素酶 SPEZYME CP (55 FPU/ml) 来对 10 g/L 的 Avicel 和 PASC 分别进行糖化实验，糖化在 pH=4.8、50 °C 及 150 rpm 条件下进行，同时对底物使用了不同量的纤维素酶以研究在不同糖化条件下底物的水解情况，并从中得出水解底物以使重组菌能够对其进行利用所需的最低酶量。我们希望水解过程能够在尽可能少地使用纤维素酶的前提下，尽可能多得

释放短链纤维素，同时产生尽可能少的葡萄糖。这样首先能够减少纤维素酶的使用，降低发酵的成本，同时对于重组菌 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 的发酵能力研究也较为有利，可以更好地观察重组菌对于聚合度较低、结构相对松散的纤维糊精类物质的降解能力。由于检测条件的限制，我们通过水解产物中纤维二糖和葡萄糖的浓度来对水解的结果进行分析。

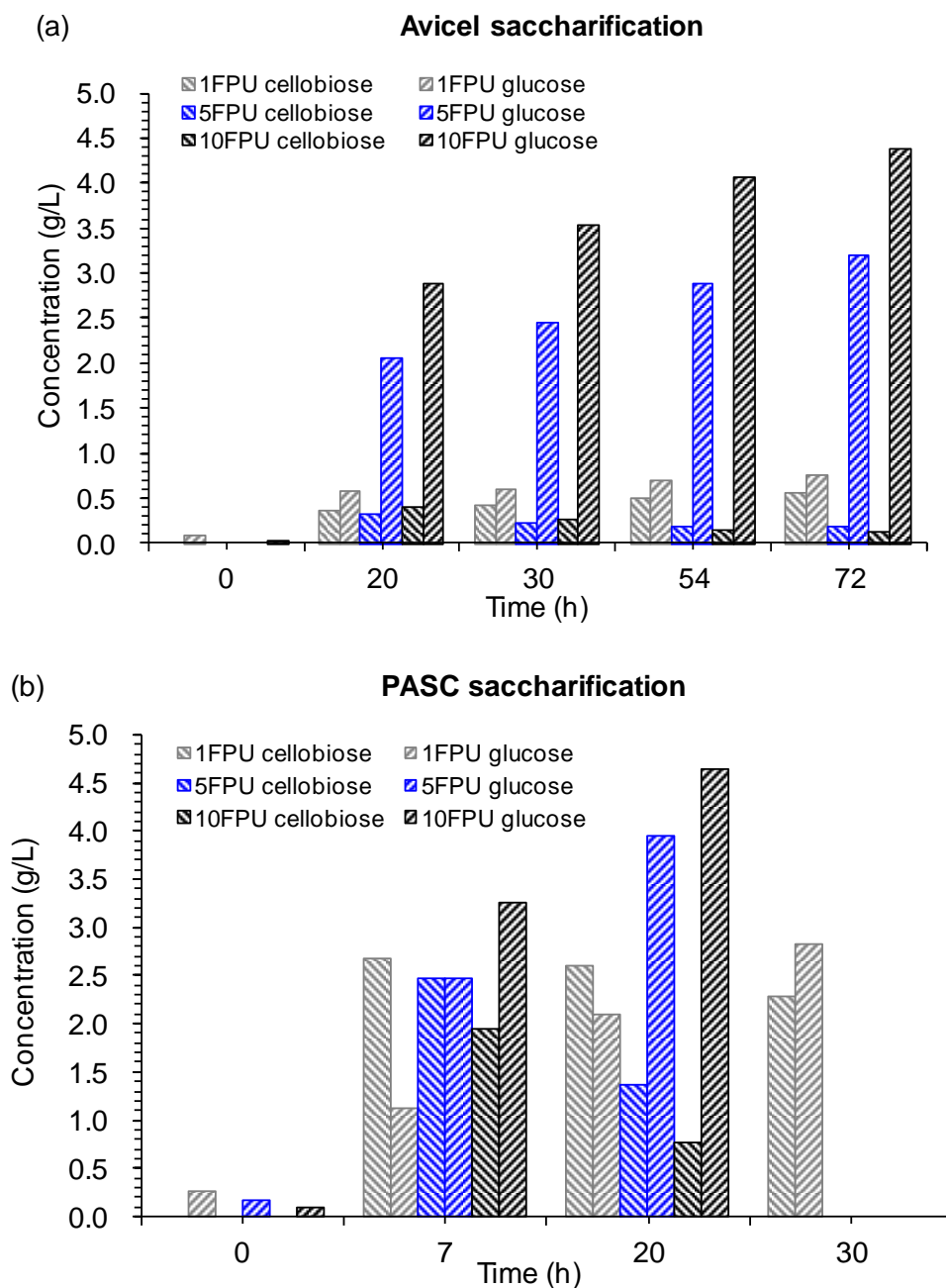


图 2.12 对 Avicel 以及 PASC 的糖化实验

Fig. 2.12 Saccharification of Avicel and PASC

(a) Saccharification of Avicel in different FPU/g substrate. (b) Saccharification of PASC in different FPU/g substrate.

从结果可以看出，无论在哪一种酶量下进行水解，Avicel 在水解过程中都只产生少量的纤维二糖，绝大多数产物都是葡萄糖。在该种条件下，无法产生大量的短纤维链则无法研究重组菌的对纤维质底物的利用能力。与此同时，对 PASC 的水解则呈现出了不同的结果，在 1 FPU/g 底物的糖化条件下，当水解进行到 7 h 时 PASC 会释放出相对少量的葡萄糖，以及相对较多的纤维二糖，随着糖化的进行葡萄糖的量不断上升，纤维二糖的量并没有显著增加。而在更高酶量的水解条件下，则只会释放出更多的葡萄糖，纤维二糖的浓度没有明显的减少。这个结果表明在 7 小时的时候，PASC 已经被降解的比较充分，且大部分都以不同长度的纤维素链形式存在，不会释放出过多的葡萄糖，这对于研究重组菌的发酵性能来说是较为有利的。因此我们对于 1 FPU/g 底物的水解进行了进一步的研究，对其糖化 pH 进行了一定的改变以期能得到更好的糖化结果（图 2.13）。从结果中我们可以发现，大约 5-6 小时纤维二糖的释放已经趋于稳定而葡萄糖的量则会随着糖化的进行慢慢地提升。不同的 pH（3.5、4.0、4.8）对于糖化酶的影响不大，通过糖化所释放的纤维二糖以及葡萄糖的浓度在不同 pH 条件下都十分相似。因此我们使用 SPEZYME CP(55 FPU/ml)对 10 g/L PASC 在 pH=4.8、50 °C 及 150 rpm 条件下糖化 6 h，并通过旋转蒸发的方式得到其中的糖并加入 LB 培养基作为碳源进行发酵试验。

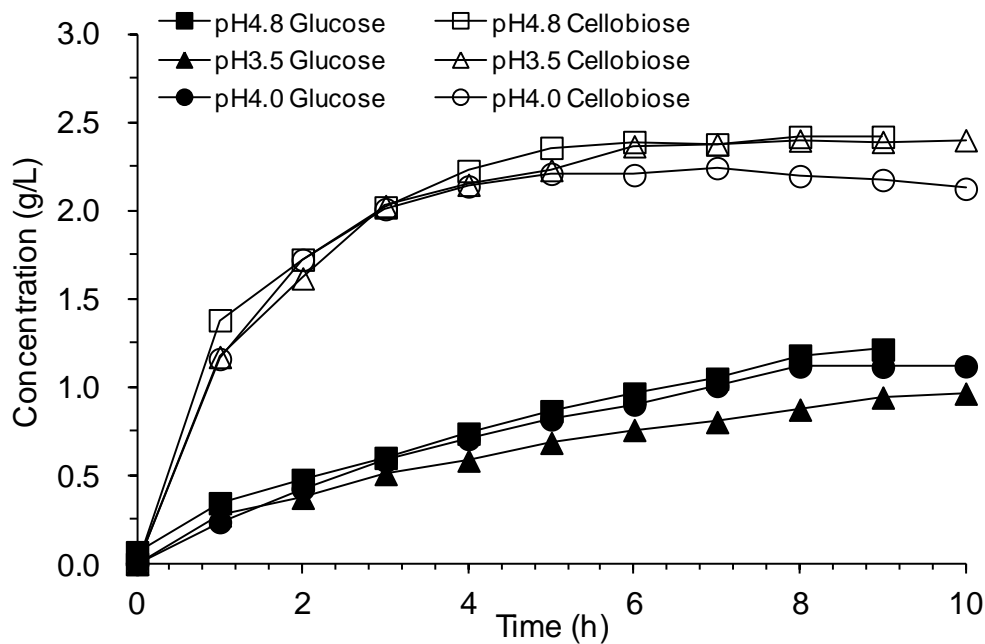


图 2.13 不同 pH 条件下对 PASC 的糖化实验

Fig. 2.13 Saccharification PASC in different pH

在确定了 PASC 底物的处理方法后，我们依照条件配制了含有 5 g/L 糖化后 PASC 的 LB 培养基（含 100 μg/ml 氨苄青霉素），试图让重组菌以其为碳源进行利用并进行乙醇生产。将重组菌 P81/celA 和 P81/cbhA 接入培养基中进行乙醇发酵，试验中使用 P81/pUC19 作为对照菌株，发酵在 37 °C、220 rpm 的条件下进行（图 2.14）。

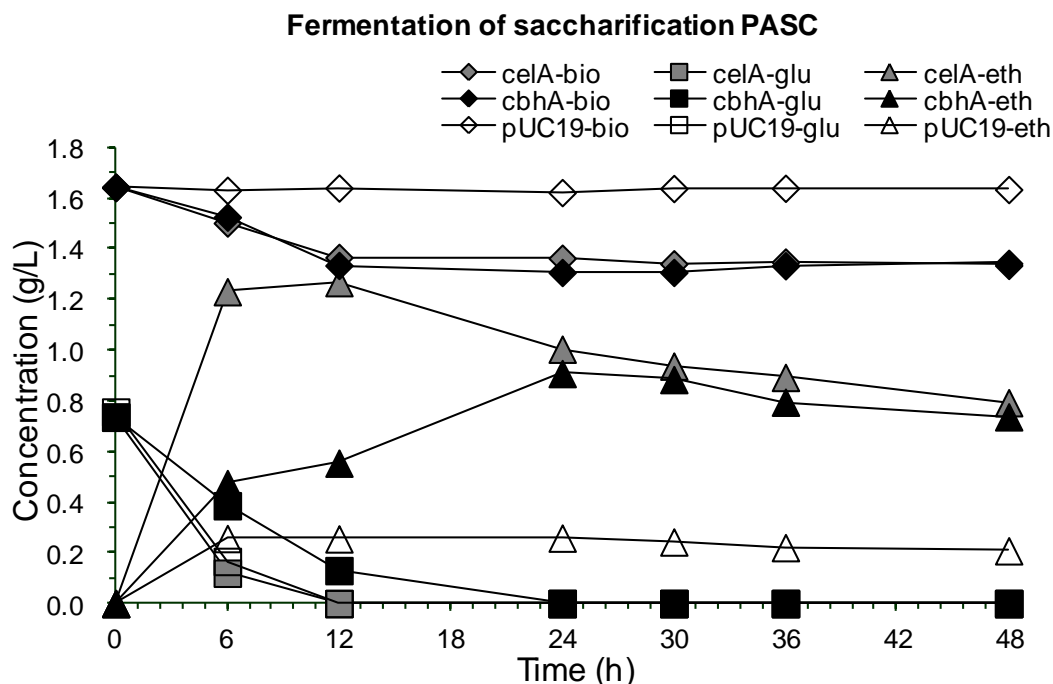


图 2.14 P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 利用糖化 PASC 产乙醇发酵

Fig. 2.14 Fermentation of saccharification by P81/*celA* and P81/*cbhA*.

The ethanol fermentation by P81/*celA* and P81/*cbhA* with 5 g/L saccharification PASC in LB medium. P81/pUC19 was used as the control strain. Triangle is for ethanol, square for glucose and diamond for cellobiose. White is for P81/pUC19, grey for P81/*celA* and black for P81/*cbhA*.

实验结果表明，P81/*celA* 在发酵过程中消耗了约 0.74 g/L 葡萄糖和 0.31 g/L 纤维二糖，并生成了 1.23 g/L 乙醇；而 P81/*cbhA* 也同样消耗了 0.74 g/L 葡萄糖和 0.30 g/L 纤维二糖，并生成了 0.91 g/L 乙醇。从两株重组菌的发酵情况来看，P81/*celA* 的生长和代谢能力更强，在 12 h 内就完成了所有葡萄糖的代谢，而 P81/*cbhA* 则花了 24 h 代谢才将相同的葡萄糖代谢完毕。对照菌株 P81/pUC19 在整个发酵过程中只消耗了 0.74 g/L 葡萄糖，生产了 0.26 g/L 乙醇，对纤维二糖则没有进行任何利用。重组菌对纤维二糖的利用表明，虽然 CelA 和 CbhA 分别作为内切和外切葡聚糖酶，但他们在发酵过程中对于纤维二糖也表现出了一定的水解能力。在完成发酵后，P81/pUC19 的乙醇产率约为理论值的 65%，但是依照重组菌消耗纤维二糖和葡萄糖的量，P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 的乙醇产率均超过了理论产量。这也表明重组菌对于除葡萄糖和纤维二糖以外的碳源，肯定也进行了一定程度的利用，才会最终产生这多于理论值的乙醇，其来源应该是由重组菌种所分泌表达的 CelA 和 CbhA，随着重组菌菌体的生长和自身蛋白的分泌，对于培养基中所含的纤维质底物进行了一定程度的降解，从而在培养基中生成了更多能被重组菌所利用的碳源，并最终生产了更多的乙醇。

2.3.3.3 表面活性剂的添加对重组菌 P81/*celA* 的影响

实验表明, P81/*celA* 在正确表达了相应的外源基因后能够表现出明显的葡聚糖酶酶活。但是重组菌对于这些外源葡聚糖酶的分泌并不显著, 只有大约 2 % 的目的蛋白被分泌到胞外。重组菌如果想要在发酵中对纤维质底物发挥更好的水解作用, 那么外源葡聚糖酶的分泌将十分重要, 因为纤维素酶只有分泌到胞外才能接触到底物并进行水解。有文献表明, 表面活性剂的添加能够增加细胞膜的通透性从而增进细胞对分泌蛋白的分泌性能^[140]。因此在试验中, 我们尝试在菌体生长时在培养基中分别添加 2 % 甘氨酸、0.5 % EDTA 以及 0.1 % 吐温-80^[141, 154]并检测重组菌的分泌情况。P81/*cbhA* 由于在酶活测试中活性表现得不明显, 无法明显体现出胞内和胞外酶活的变化, 因此没有对其进行相应的测试。

在测定表面活性剂对于重组菌分泌情况的影响之前, 我们首先确定了不同的表面活性剂对于酶蛋白本身的影响, 以防止纤维素酶蛋白自身的活性变化影响到胞内外酶活因表面活性剂的添加而产生的变化。(表 2.7)。实验结果表明, 0.5 % EDTA 的添加对于 CelA 的酶活有促进作用, 酶活上升了约 35%, 而同样条件下 2 % 甘氨酸的添加则略微抑制了 CelA 的活性, CelA 酶活大约降低了 9 %, 而 0.1 % 吐温-80 的添加对 CelA 几乎没有影响。这也说明对于之后的实验来说, 甘氨酸和吐温-80 的添加对于 CelA 酶活的变化不会带来很大的影响, 而 EDTA 则对该蛋白的酶活有一定的促进能力, 该种促进作用接下来的试验分析中应当被考虑。

表 2.7 不同表面活性剂对 CelA 酶活的影响

Table 2.7 CelA activity with different surfactant

PASC Activity (U/OD ml)	
Control	0.0208
0.5 % EDTA	0.0271
2 % Glycine	0.0188
0.1 % Tween-80	0.0211

PASC was used as the substrate and the enzyme activity was assayed at the condition of pH6 and 50 °C.

接着我们便测试了表面活性剂对于重组菌分泌状况的影响。试验中, 将重组菌接入培养基 12 h 后, 我们向培养基中分别加入相应浓度的表面活性剂 (2 % 甘氨酸、0.5 % EDTA 以及 0.1 % 吐温-80), 并继续培养至 24 h 后收集重组菌并对其进行相应的酶活测试。酶活试验中以 10 g/L 的 PASC 作为底物, 其中 PASC 的制备方法见本章 2.2.2.6, 酶活的定义及测定方法见本章 2.2.2.7。实验结果见图 2.15 及表 2.8。

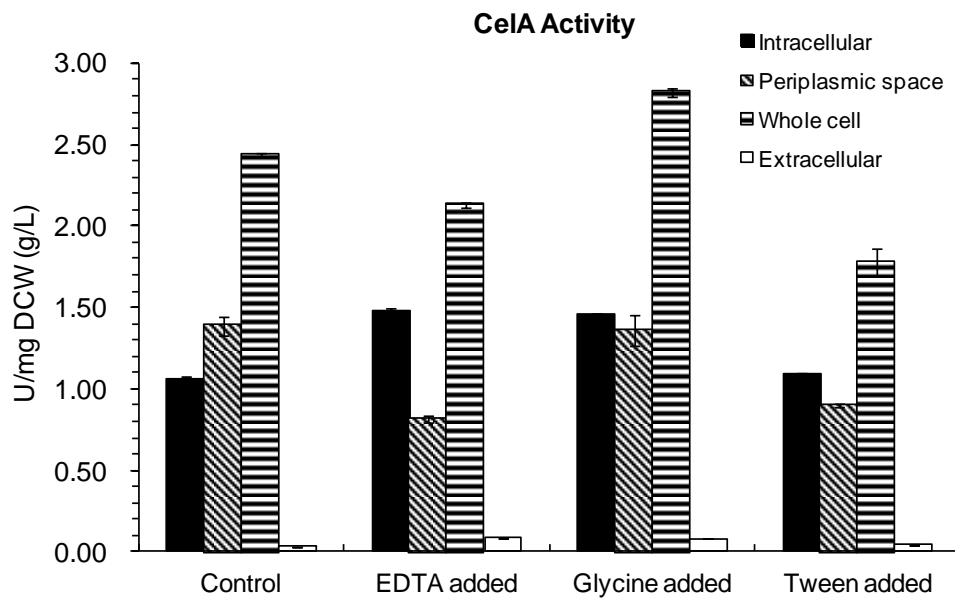


图 2.15 表面活性剂的添加对 *CelA* 分泌的影响

Fig. 2.15 *CelA* secretion with the addition of surfactant

PASC activities of the recombinant strain *E. coli* P81/*celA* when different surfactants were added. The surfactants were added at 12h after the inoculation. The activity without addition of surfactant was used as the control.

表 2.8 *CelA* 分泌情况

Table 2.8 *CelA* secretion

	Control	EDTA added	Glycine added	Tween added
Secretive proportion	2.19 %	9.31 %	5.54 %	4.39 %

从实验结果可以看出，重组菌在添加表面活性剂之后，其细胞不同部位所含的酶蛋白的量都产生了一定程度的变化。重组菌在对照条件下，约有 2.19 % 的酶蛋白被分泌到了胞外。而添加了 EDTA 后，重组菌在周质空间所显示的酶活有所下降，而其胞外酶活分泌率则提高到了 9.31 %。与此同时，甘氨酸和吐温-80 的添加也都在一定程度上降低了周质空间的酶活，并提高了胞外酶活的分泌率，分别达到了 5.54 % 和 4.39 %。结果也证明，表面活性剂通过增加细胞膜的通透性，促进了蛋白从周质空间向胞外的分泌和转移。从三种表面活性剂的添加结果来看，0.5 % EDTA 的添加取得了最明显的效果，胞外分泌率提高了 4 倍。虽然 EDTA 的添加能够提升 *CelA* 本身的酶活性，但是从胞外酶活的提升幅度来看，其对分泌的促进能力仍旧是最为显著的。

在确定了添加 0.5 % EDTA 用以促进重组菌的胞外分泌后，我们仍旧按照之前的条件，将重组菌 P81/*celA* 在含有 5 g/L 糖化后 PASC 的 LB 培养基（含 100 μ g/ml 氨苄青霉素）中进行发酵，并在发酵进行到 12 h 时加入 0.5 % 的 EDTA 作为表面活性剂，用以促

进菌体的蛋白分泌。试验中将重组菌在不添加表面活性剂的条件下同样进行发酵作为对照,发酵试验在 37°C、220 rpm 的条件下进行。但是结果并不如我们所想,重组菌 P81/*celA* 在添加 0.5 % EDTA 的发酵过程中,对于底物并没有体现出更高的利用性能,发酵结果中也没有更多的乙醇产生。该结果可能是由于在发酵过程中,CelA 由于自身活性的限制,只能对某些低聚合度底物进行分解并进而进行利用。因此虽然重组菌种 CelA 的分泌率提高了,但是 CelA 的催化能力仍旧没有增加,可利用的底物的范围和含量仍旧没有变化,因此导致了最终的发酵结果仍旧没有取得显著的变化。不过通过表面活性剂的添加来促进重组菌胞内及周质蛋白分泌的策略,仍旧可以再其他试验中进行尝试。

2.3.4 重组菌 P81/*bglB* 的酶活测定及发酵试验

2.3.4.1 重组菌 P81/*bglB* 的酶活测定

构建完成重组菌 P81/*bglB* 后,该重组菌所表达的是 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因,但是其所表达的蛋白 BglB 也体现出纤维二糖酶的活性,能够将 1 分子纤维二糖分解成为 2 分子可以被重组菌利用的葡萄糖。纤维二糖虽然无法通过细胞膜,但是由于其分子量并不大,因此可以在一定程度上通过细胞壁。该种情况下,重组菌所分泌的纤维素酶蛋白只要分泌到周质空间就能够接触到底物并进行水解,这也使得重组菌 P81/*bglB* 对纤维二糖的利用更加成为可能。试验中我们同样先对重组菌 P81/*bglB* 的胞内及胞外的 β -葡萄糖苷酶酶活进行了测定,用以研究重组菌的分泌情况(图 2.16)。试验中以 *pNPG* 作为底物,酶活的定义及测定方法见本章 2.2.2.7。试验中使用 *E. coli* JM109/*pUC19* 以及 P81/*pUC19* 作为对照菌株。

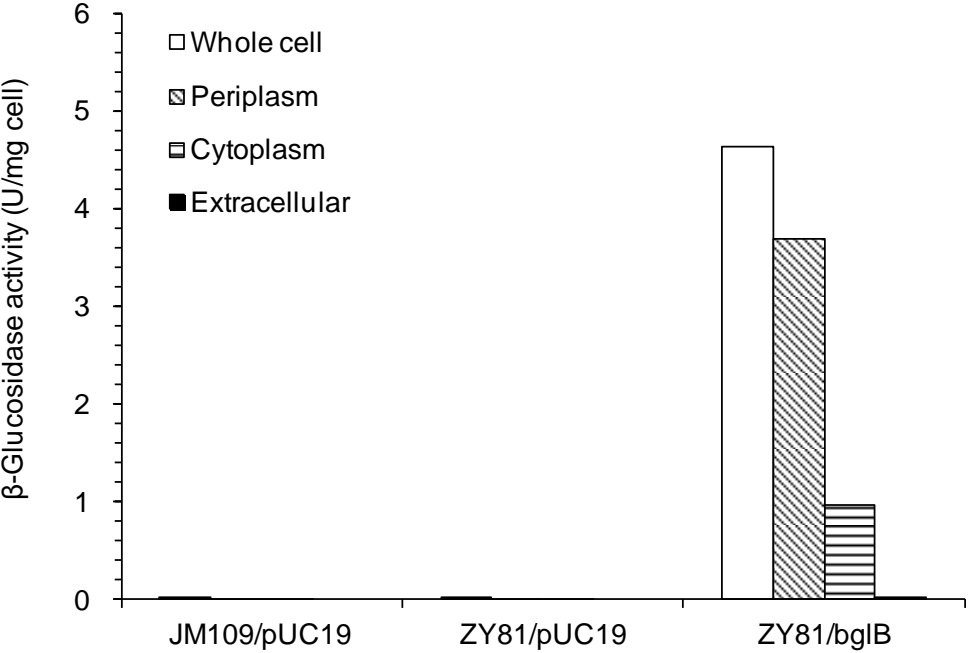


图 2.16 BglB 酶活测定

Fig. 2.16 β -Glucosidase activity of the strain P81/*bglB*

The glucosidase activity was determined using pNPG as substrate at 37 °C for 10 min. The strains *E. coli* JM109/pUC19 and P81/pUC19 were used as the controls.

实验结果中我们可以看出,重组菌 P81/*bglB* 的整体 β -葡萄糖苷酶活性达到了 4.64 U/g DCW, 而对照菌 *E. coli* JM109/pUC19 以及 P81/pUC19 的整体 β -葡萄糖苷酶活性只有大约 0.02 U/g DCW, 和重组菌相比几乎可以忽略不计。重组菌所表达的显著的酶活同时也证明了外源基因 *bglB* 在 P81 中得到了正确的表达。在 P81/*bglB* 中, 所表达的 β -葡萄糖苷酶大约有 79.02 % 被分泌到了周质空间中, 其酶活达到了 3.69 U/g DCW。与此同时, 在细胞胞质内的酶活为 0.95 U/g DCW, 约占总酶活的 20.47 %, 而胞外的 β -葡萄糖苷酶酶活为 0.03 U/g DCW, 只占总酶活的 0.64 %。这个结果说明在构建的重组菌中, *NprB* 信号肽发挥了应有的作用, 将大部分异源蛋白 BglB 从胞内分泌到了周质空间之中, 但是大肠杆菌本身有限的分泌性能还是使得蛋白向胞外分泌的效率不高。虽然分泌到胞外的酶活不是很多, 但处在周质空间中的蛋白已经可以接触到作为底物的纤维二糖, 并将其分解为葡萄糖让重组菌利用。基于此, 我们对重组菌 P81/*bglB* 的纤维二糖代谢能力进行了检测。

2.3.4.2 重组菌 P81/*bglB* 的对纤维二糖的利用

试验中, 我们首先将 P81/*bglB* 分别在含有 10 g/L 纤维二糖的 LB 培养基中进行发酵, 用以验证重组菌对纤维二糖的利用能力, *E. coli* JM109/pUC19 (没有产乙醇能力及纤维二糖代谢能力) 以及 P81/pUC19 (没有纤维二糖代谢能力) 则被用作对照菌, 在相同的条件下进行发酵 (图 2.17a)。从结果中可以发现, 三种菌都能够在发酵液中生长, 但是只有重组菌 P81/*bglB* 对纤维二糖进行了利用, 在 48 h 的时间内消耗了 5.94 g/L 纤维二糖并生产了 1.00 g/L 乙醇, 达到了理论产率的 33.99 %。两株对照菌对纤维二糖都没有任何利用, 也没有任何乙醇的产生。这个结果表明, 重组菌 P81 达到了设计的目的, 能够利用纤维二糖进行乙醇的生产。不过其利用纤维二糖生产乙醇时, 其乙醇产率低于利用葡萄糖的发酵过程 (60 %)。

葡萄糖作为纤维二糖分解后的产物, 其存在有可能对纤维二糖的利用产生一定的影响。在确认了重组菌 P81/*bglB* 对纤维二糖的代谢能力后, 我们又将其在含有 10 g/L 葡萄糖与 10 g/L 纤维二糖的 LB 中进行了发酵 (图 2.17b)。从实验结果中我们可以发现, 葡萄糖在经过 12 h 的发酵后已经消耗殆尽, 而期间重组菌同时也消耗了大约 1.79 g/L 纤维二糖。而在以纤维二糖为单碳源的发酵试验中 (图 2.17a), 重组菌在 12 h 内消耗了大约 3.21 g/L 的纤维二糖, 可见在葡萄糖存在的情况下重组菌 P81/*bglB* 对纤维二糖的代谢能力有明显的减弱, 降低了大约 44 %。通过上述的实验, 我们确认外源 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 在 P81 中得到了正确的表达并通过分泌组件发挥了应有的作用, 使得 BglB 能够被分泌到周质空间和胞外, 以对培养基中的纤维二糖进行降解和利用。

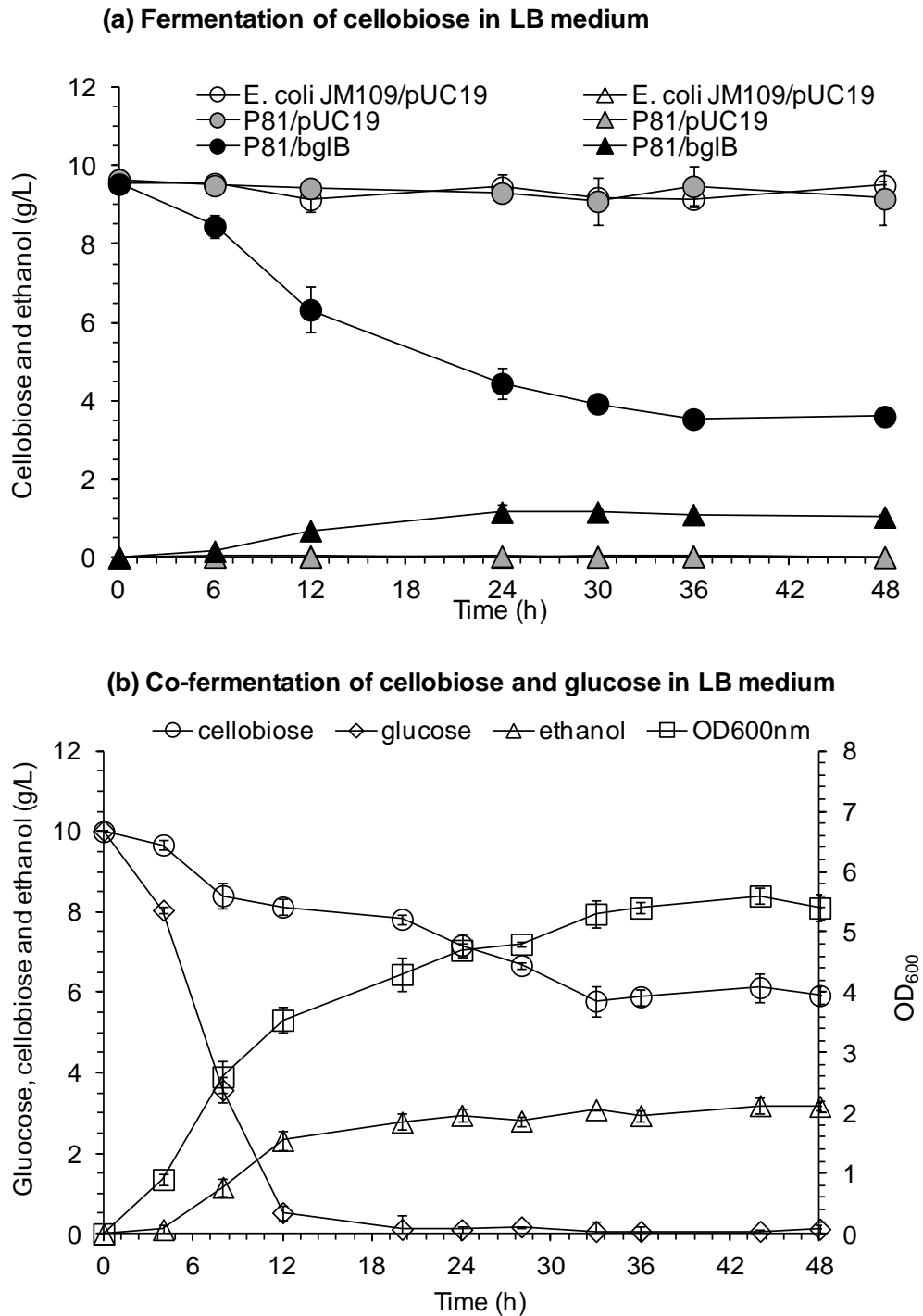


图 2.17 P81/bglB 的发酵试验

Fig. 2.17 Fermentation of P81/bglB

Utilization of cellobiose and ethanol fermentation by P81/bglB. (a) Fermentation with 10 g/L cellobiose in LB medium, circle for cellobiose concentration and triangle for ethanol concentration. White symbol for JM109/pUC19, gray symbol for P81/pUC19, and black symbol for P 81/bglB; (b) Co-fermentation in LB medium with 10 g/L cellobiose and 10 g/L glucose. Square for cell growth, diamond for glucose concentration, circle for cellobiose concentration and triangle for ethanol concentration. 1% of the P

81/*bglB* and control strain culture were inoculated and cultivated in 20 mL LB medium with 100 µg/mL ampicilin at 37 °C, 220 rpm in flask. 0.1 mM IPTG was added when the strain grew to $OD_{600nm}=0.4-0.6$.

2.3.4.3 表面活性剂的添加对重组菌 P81/*bglB* 的影响

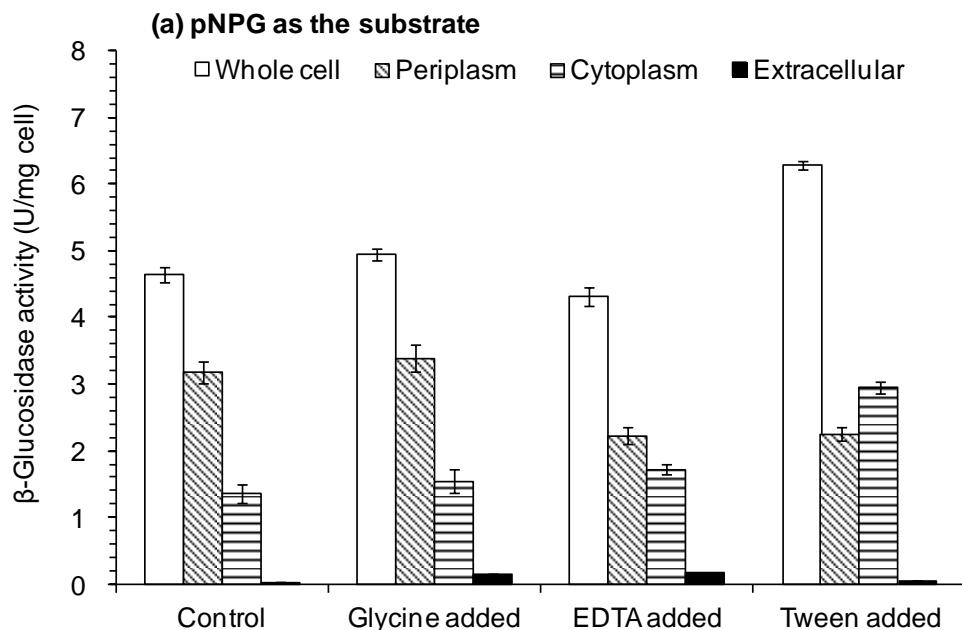
按照 3.3.3.3 中实验的结果，2 % 甘氨酸、0.5 % EDTA 以及 0.1 % 吐温-80 作为表面活性剂可以提高重组菌的表达率，促进细胞中周质空间的蛋白向胞外的分泌。因此我们也对重组菌 P81/*bglB* 进行了相同的实验，以检测表面活性剂对重组菌蛋白分泌的影响。同样地，我们首先测试了不同表面活性剂的添加对 BglB 本身酶活的影响（表 2.9），以避免其酶活变化影响对重组菌胞内外酶活分布测试的影响。结果表明，EDTA 的添加能够提高 BglB 大约 10 % 的酶活，而甘氨酸和吐温-80 的添加对于 BglB 酶活的几乎没有影响。

表 2.9 不同表面活性剂对 BglB 酶活的影响

Table 2.9 BglB activity with different surfactant

<i>p</i> NPG Activity (U/OD ml)	
Control	0.0168
0.5 % EDTA	0.0188
2 % Glycine	0.0164
0.1 % Tween-80	0.0158

接着我们测试了表面活性剂对于重组菌分泌状况的影响。试验中，将重组菌接入培养基 12 h 后，我们向培养基中分别加入相应浓度的表面活性剂（2 % 甘氨酸、0.5 % EDTA 以及 0.1 % 吐温-80），并继续培养至 24 h 后收集重组菌并对其进行相应的酶活测试。酶活试验中以 *p*NPG 作为底物，*p*NPG 作为底物，酶活的定义及测定方法见本章 2.2.2.7。实验结果见图 2.18a 及表 2.10。



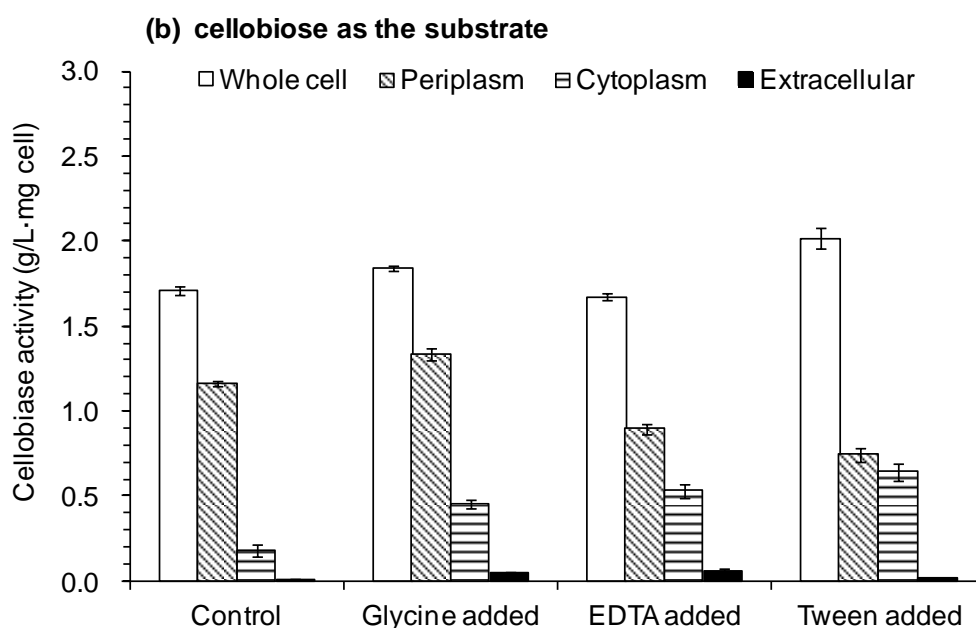


图 2.18 表面活性剂的添加对 BglB 分泌的影响

Fig. 2.18 BglB secretion with the addition of surfactant

β -glucosidase activities of the strain P81/*bglB* when different surfactants were added. (a) *p*NPG was used as the substrate at 37 °C for 10 min, (b) cellobiose was used as the substrate at 37 °C for 1 h. The surfactants were added at 12h after the inoculation. The activity without addition of surfactant was used as the control.

表 2.10 BglB 分泌情况

Table 2.10 Secretion of BglB

Secretive proportion	Control	Glycine added	EDTA added	Tween added
<i>p</i> NPG	0.64%	4.01%	6.69%	2.21%
Cellobiose	0.62%	3.28 %	6.38 %	2.13 %

实验结果表明，添加 EDTA 和吐温-80 都能够明显地减少重组菌在周质空间中 β -葡萄糖苷酶酶活所占的比重。添加 EDTA 使得周质空间中的 β -葡萄糖苷酶酶活从 79.02 % 降低到了 51.80 %，而添加吐温-80 则使其周质空间中所含的酶活量降低到了 35.77%。该种结果表明这两种表面活性剂的添加都促进了重组菌中位于周质空间的蛋白的分泌和转运。与此同时，甘氨酸的添加对于周质空间的蛋白并没有显著的促进分泌的作用，其含量没有明显的变化。而重组菌中 BglB 分泌到胞外的比率，也随着不同表面活性剂的添加而有了提升。其分泌率从原先的 0.64 %，在 2 % 甘氨酸、0.5 % EDTA 以及 0.1 % 吐温-80 的影响下分别提高到了 6.69%、4.01% 和 2.21%。从结果来看，EDTA 的添加同样取得了最好的效果，其胞外的分泌率提高了大约 10 倍。虽然 EDTA 能够提升大约 10 % 的 BglB 本身酶活，但是这与提高的胞外酶活量相比还相差很远。因此我们确认表面活性剂 EDTA 的添加，能够提高重组菌胞外蛋白的分泌率，并显著提高胞外 β -葡萄糖苷酶

酶活。由于 BglB 在发酵中被用于降解纤维二糖，因此我们也利用纤维二糖作为底物，在相同的条件下对 P81/bglB 的分泌和活性进行了测定（图 2.18b 和表 2.10）。实验结果也和上一个实验表现出了相同的趋势，EDTA 和吐温-80 促进了周质空间中蛋白向胞外的分泌，而甘氨酸的添加则对其没有明显的影响。最终 EDTA 表现出了最好的促进分泌的效果，将周质空间中所含的酶活量从 68.14 % 降低到 53.57 %，并将分泌率从 0.62 % 提高到了 6.38 %。通过这个实验我们再一次确认添加 0.5 % EDTA 作为表面活性剂，对于 P81 中蛋白的分泌表达，尤其是从周质空间向胞外的分泌能够取得最好的效果。

在确定了以 0.5 % EDTA 作为表面活性剂进行添加后，我们便决定将其应用于发酵过程中，以期能够改善重组菌 P81/bglB 在纤维二糖代谢中的表现。试验中我们将 P81/bglB 在含有 10 g/L 纤维二糖的 LB 培养基中进行发酵，并在发酵进行到 12 h 时加入 0.5 % 的 EDTA 作为表面活性剂，用以促进菌体的蛋白分泌。试验中将重组菌在不添加表面活性剂的条件下同样进行发酵作为对照，发酵试验在 37 °C、220 rpm 的条件下进行，实验结果见图 2.19。

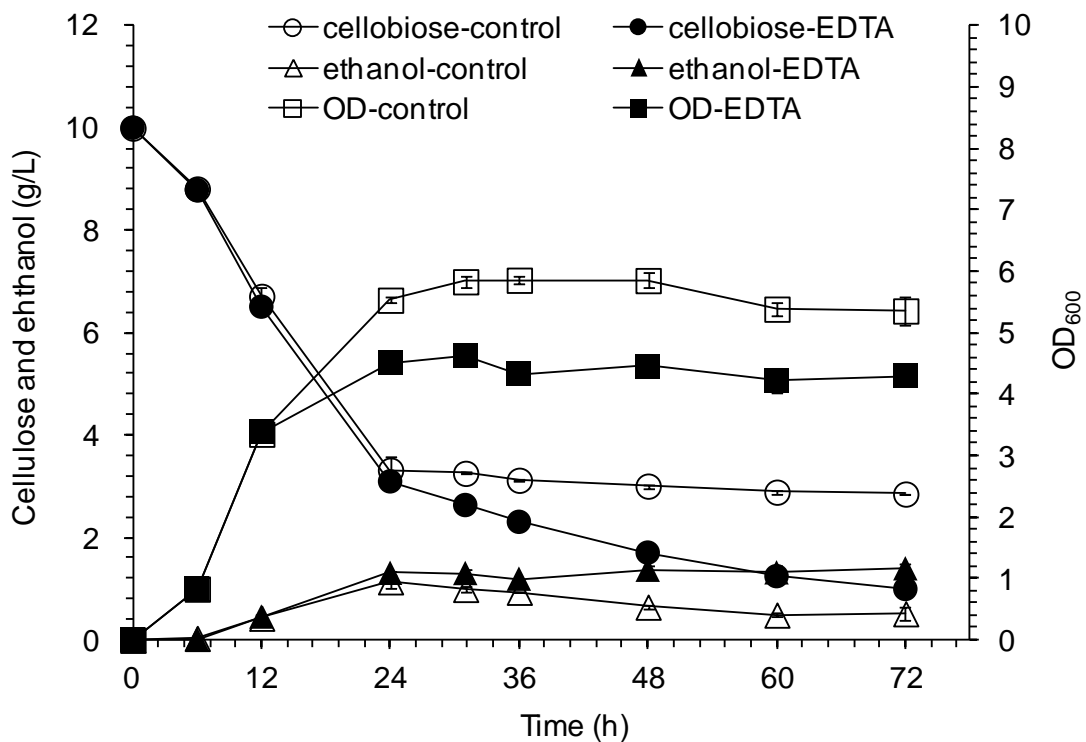


图 2.19 表面活性剂的添加对 P81/bglB 发酵的影响

Fig. 2.19 P81/bglB fermentation with the addition of surfactant

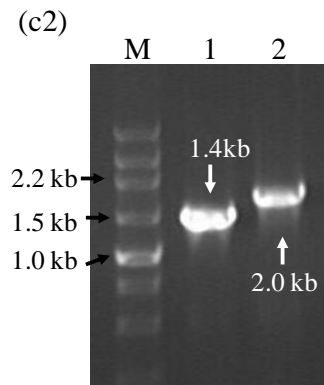
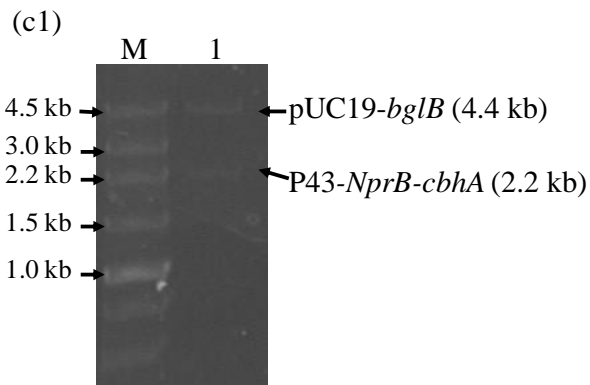
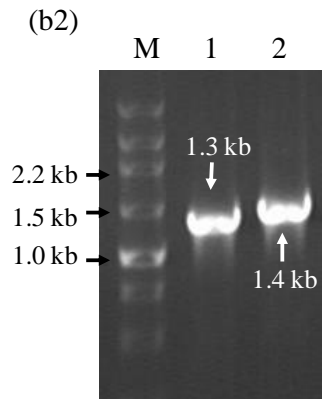
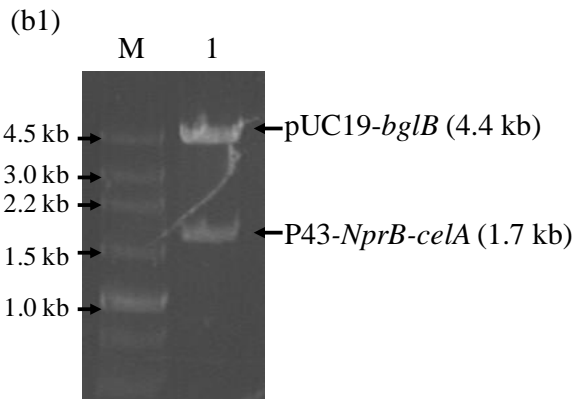
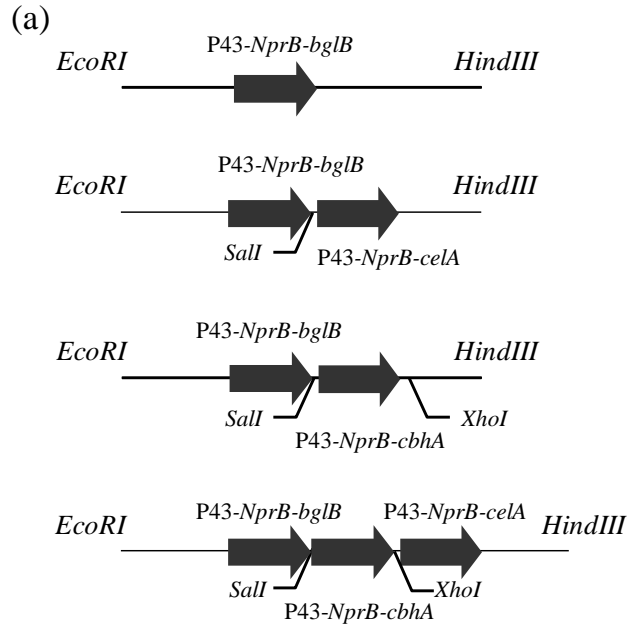
The fermentation of P81/bglB when surfactant was added. The fermentation of recombinant without the addition of surfactant was used as the control. The open symbols indicate the control fermentation and the closed indicated the fermentation with the addition of EDTA. Triangles indicate the ethanol concentration, square the cell growth and round the cellobiose concentration.

实验结果表明,在添加 EDTA 的情况下 P81/*bglB* 在 12 h 内生长到了 $OD_{600nm}=4.62$, 而在不添加 EDTA 的对照发酵中菌体则长到了 $OD_{600nm}=5.83$ 。EDTA 的添加导致菌体的生长降低了约 20 %左右,由此可见 EDTA 对于菌体的生长有一定的抑制作用。由于表面活性剂通过增加细胞的通透性来增加蛋白的分泌,这也势必导致菌体的耐受性降低并在一定程度上抑制菌体的生长。在添加 EDTA 的发酵试验中, P81/*bglB* 在 48 h 的发酵过程中消耗了 9.01 g/L 纤维二糖并产生了 1.39 g/L 乙醇,其产率达到理论值的 31.03 %。相较于对照发酵试验,虽然 P81/*bglB* 的生长受到了 EDTA 的抑制,但是 EDTA 的添加使得 P81/*bglB* 在 72 h 内多利用了 1.85 g/L 纤维二糖,并生产了额外的 0.88 g/L 乙醇。从之前的试验中我们也可以发现,纤维二糖通常无法在发酵过程中被全部消耗掉,在利用 10 g/L 的纤维二糖的试验中,图 2.17a 和图 2.19 中我们都可以看到,分别有 3.6 g/L 以及 2.9 g/L 的纤维二糖残余。但是在 EDTA 添加的发酵结果中,仅仅残余了 1.0 g/L 的纤维二糖,这可能是由于 EDTA 的添加增加了 β -葡萄糖苷酶的分泌和活性,在提升了 *BglB* 的催化能力的同时,也提高了参与到水解中的酶的含量,进而提高了酶对于底物的利用水平,降低了底物的最低反应浓度。从发酵结果来看,虽然菌体的生长受到一定的限制、乙醇的产率没有太大的提高(均为 30 %左右),但是对底物的利用能力和乙醇的产量,都因为 EDTA 的添加而有了进一步的提升。

2.3.5 不同纤维素酶基因的共表达

2.3.5.1 共表达重组菌的构建

通过实验,我们在产乙醇重组菌P81中分别表达了*celA*、*cbhA*以及*bglB*三个基因。三种基因在P81中都表现出了相应的酶活和分泌性,并且在发酵试验中也取得了一定的效果。通常情况下,对纤维素进行降解需要纤维素内切酶、外切酶和纤维二糖酶同时发挥作用。在这些纤维素酶单独作用时,只能对某些特定的纤维质底物进行降解,降解程度也视底物不同而不同,无法彻底地将纤维素降解成可被微生物利用的单糖。因此在通过实验,成功表达了源自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因(*celA*)、外切葡聚糖酶基因(*cbhA*)和源自多黏芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶(*bglB*)后,我尝试将这3种不同的基因在P81中同时进行表达,以期构建的重组菌能够有更好的纤维素降解能力。试验中,首先在原有的 pUC19-P43-*NprB-bglB*表达基础上,我构建了*bglB-celA*、*bglB-cbhA*和*bglB-cbhA-celA*三个基因片段(图2.20a)。接着通过相应的限制性内切酶酶切、胶回收和连接,得到重组目的质粒pUC19-*bglB-celA*、pUC19-*bglB-cbhA*和pUC19-*bglB-cbhA-celA*,并对重组质粒进行双酶切和PCR鉴定(图2.20b-d)。



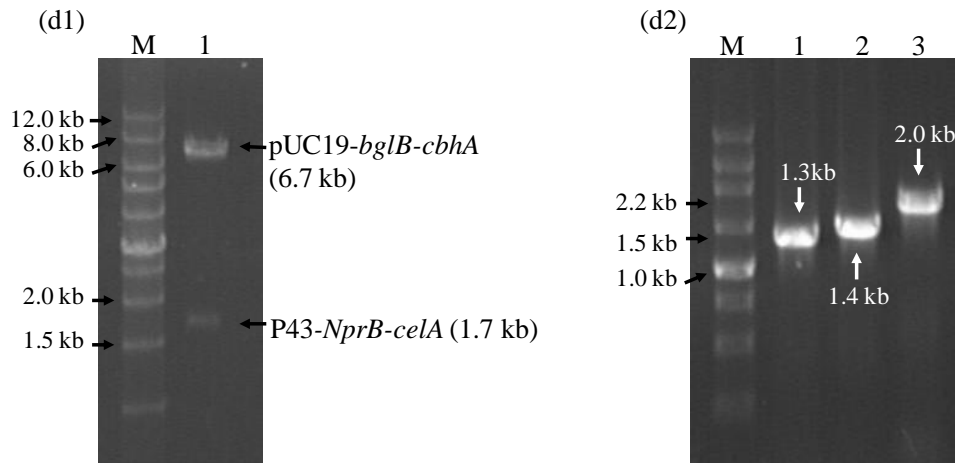


图 2.20 *celA*、*cbhA* 及 *bglB* 共表达质粒的构建和鉴定

Fig. 2.20 Consturction and identification of recombinant plasmid which co-expressed different gene (a) Fragment map of *bglB-celA*, *bglB-cbhA* and *bglB-cbhA-celA*. (b1) Identification of pUC19-*bglB-celA*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pUC19-*bglB-celA* (*Sall* & *HindIII*). (b2) PCR amplification of *celA* (1.3 kb) and *NprB-bglB* (1.4 kb). (c1) Identification of pUC19-*bglB-cbhA*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pUC19-*bglB-celA* (*Sall* & *XhoI*). (c2) PCR amplification of *NprB-bglB* (1.4 kb) and *cbhA* (2.0 kb). (d1) Identification of pUC19-*bglB-cbhA-celA*. Lane M, marker (Wide range DNA ladder); Lane 1, pUC19-*bglB-celA* (*Sall* & *XhoI*). (d2) PCR amplification of *celA* (1.3 kb), *NprB-bglB* (1.4 kb) and *cbhA* (2.0 kb).

鉴定结果表明,我们成功地构建了重组目的质粒pUC19-*bglB-celA*、pUC19-*bglB-cbhA*和pUC19-*bglB-cbhA-celA*,接着按照本文2.2.2.3所示的氯化钙转化法,将重组质粒分别转化进入之前所构建完成产乙醇重组大肠杆菌*E. coli* P81中,得到重组大肠杆菌P81/*bglB-celA*、P81/*bglB-cbhA*和P81/*bglB-cbhA-celA*。

2.3.5.2 共表达重组菌的酶活测定

在完成了重组大肠杆菌 P81/*bglB-celA*、P81/*bglB-cbhA* 和 P81/*bglB-cbhA-celA* 的构建后,我首先对重组菌的胞内及胞外的纤维素酶酶活进行测定。由于是重组菌中的纤维素酶采取了共表达的策略,理论上可以对于纤维质材料应该有一定的代谢能力,因此在酶活测定直接中使用 PASC 作为底物,用以检测重组菌的酶活性。试验和之前的酶活测定相似,对于胞内外所表达的纤维素酶都进行了检测(表 2.11)。试验中以 10 g/L 的 PASC 作为底物,并将重组菌 P81/*celA* 作为对照菌株,在相同条件下进行酶活测定。其中 PASC 的制备方法见本章 2.2.2.6,酶活的定义及测定方法见本章 2.2.2.7。

表 2.11 共表达重组菌酶活

Table 2.11 Activity of recombinant which co-express different cellulase gene

Released sugar (U/mg DCW)	<i>celA</i>	<i>bglB-celA</i>	<i>bglB-cbhA</i>	<i>bglB-cbhA-celA</i>
intracellular	0.6536	0.5397	0.1053	0.5023

periplasmic space	0.4180	0.4479	0.0055	0.3961
whole cell	1.0323	0.8819	0.1067	0.7946
extracellular	0.0173	0.0167	0.0010	0.0121

PASC was used as the substrate and the enzyme activity was assayed at the condition of pH6 and 50 °C.

从结果中我们可以看出，相比于 *celA* 基因的单独表达，共表达的基因在相同条件下所表现出来的酶活普遍较低。其中 *bglB-cbhA* 的表达则更是由于 *CbhA* 本身酶活较低，而 *BglB* 对于 PASC 没有降解能力而导致其共表达酶活明显得低下，其细胞的总酶活仅仅达到 0.11 g/mg DCW。对于 *bglB-celA* 和 *bglB-cbhA-celA* 的表达，*CelA* 对于 PASC 的活性比较高，因此这两种共表达所表现出的总酶活相对比较明显，分别达到了 0.54 g/mg DCW 和 0.50 g/mg DCW，但是均没有超过 P81/*celA* 的总酶活高。从 *celA*、*bglB-celA* 和 *bglB-cbhA-celA* 三种共表达重组菌的酶活来看，参与共表达的基因越多，则其酶活就越弱，说明不同基因的共表达形成了竞争的关系。在同一株菌体中，由于在表达设计时对不同的基因，都采用了相同的启动子和信号肽进行调控，使得通过质粒所表达的外源基因由于相同的表达系统，其总表达量可能有一定的上限，而不是线性叠加的关系。因而同时表达几个基因时，每一个基因的表达量可能就会较单独表达时更低。而在这个试验中，由于对 PASC 进行初步的降解主要依靠的 *CelA* 的活性，因此在共表达中 *CelA* 由于表达量的下降，导致整个共表达体系对 PASC 降解能力的下降。

纤维素酶的共表达，其主要目的是利用不同纤维素酶之间的协同作用，对纤维质底物进行更彻底的降解。在共表达的重组菌中，虽然之前的酶活实验表明，共表达纤维素酶的重组菌对 PASC 的降解能力有所下降，但是对 PASC 的降解程度可能更为彻底。为此，我们重新对其进行了酶活的测定实验。试验中同样采用 PASC 作为底物，但是表征酶活时，不再以产生的还原糖作为酶活力的计量单位，而是通过测量酶水解后的最终产物葡萄糖的浓度，来对共表达重组菌的降解能力进行评估。试验中以 10 g/L 的 PASC 作为底物，并将重组菌 P81/*celA* 作为对照菌株，在相同条件下进行酶活测定。酶反应后所产生的葡萄糖浓度则使用葡萄糖试剂盒来进行测定，重组菌 P81/*bglB-cbhA* 由于酶活较低，对 PASC 的降解能力有限，在本次实验中没有进行测定，实验结果见表 2.12。

表 2.12 共表达重组菌酶活

Table 2.12 Activity of recombinant which co-express different cellulase gene

Released glucose (g/mg DCW)	Control	<i>celA</i>	<i>bglB-celA</i>	<i>bglB-cbhA-celA</i>
whole cell	0.002	0.0105	0.0209	0.0158

PASC was used as the substrate and the enzyme activity was assayed at the condition of pH6 and 50 °C. The concentration of glucose was detected to represent the activity.

实验结果表明，P81/*celA* 的菌体酶活达到 0.0105 g/mg DCW，低于 P81/*bglB-celA* 的酶活（0.0209 g/mg DCW）以及 P81/*bglB-cbhA-celA* 的酶活（0.0158 g/mg DCW）。这个

结果表明，虽然共表达的重组菌在对 PASC 的降解能力上有所下降，但是降解的程度相较于 P81/*celA* 更为彻底，降解了更少的 PASC 却能产生更多的葡萄糖。这应该也是由于其中 *BglB* 的存在，使得重组菌所产生的纤维素酶体系能够在 *CelA* 对 PASC 进行初步的切割后，进行进一步的降解。其中同时表达三种不同纤维素酶的重组菌 P81/*bglB-cbhA-celA* 的酶活低于 P81/*bglB-celA*，首先可能是由于 *CbhA* 在对 PASC 的降解中催化活性一直不高导致；其次由于是三种基因的共表达，其中 *BglB* 的表达肯定会被削弱，这也就使得其催化降解纤维二糖生成葡萄糖的能力有所降低。

在测定了纤维素酶共表达重组菌的酶活之后，我们按照之前的条件，将重组菌 P81/*bglB-celA* 和 P81/*bglB-cbhA-celA* 在含有 10 g/L 糖化后 PASC 的 LB 培养基（含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素）中进行发酵。试验中将 P81/*celA* 作为对照菌株，同样在在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 的条件下进行发酵（图 2.20）。从结果中我们可以得知，对纤维二糖的代谢能力成为了重组菌主要的代谢手段。相较于对照菌 P81/*celA* 的发酵情况来看，P81/*bglB-celA* 和 P81/*bglB-cbhA-celA* 在葡萄糖的利用上稍微有些缓慢，这可能是由于表达了多种外源基因而导致重组菌的代谢负担过重，从而一定程度上影响了菌体基本的代谢和生长能力。但是由于这 2 种重组菌都能够产生 *BglB* 并对糖化 PASC 中的纤维二糖进行利用，P81/*bglB-celA* 在 48 h 的发酵中消耗了 4.56 g/L 纤维二糖，而 P81/*bglB-cbhA-celA* 在则消耗了 3.8 g/L 纤维二糖。这也和之前的酶活测定所显示的结果类似，*bglB-cbhA-celA* 的共表达在一定程度上虚弱了 *bglB* 的表达，并降低了相应重组菌对纤维二糖的利用能力。对照菌 P81/*celA* 则无法利用纤维二糖。P81/*bglB-celA* 和 P81/*bglB-cbhA-celA* 共表达重组菌在利用更多碳源的同时，自然也生产了更多的乙醇，分别达到 1.11 g/L 和 0.96 g/L，多于对照菌 P81/*celA* 所产生的 0.42 g/L 乙醇。从结果中可以发现，共表达重组菌之所以能够产生更多的产物，是由于其中 *bglB* 的表达对纤维二糖的利用能力显著提高的结果。对于纤维质底物的降解能力，共表达的重组菌和对照菌 P81/*celA* 在发酵中没有体现出明显的差异，P81/*bglB-cbhA-celA* 也没有因为表达了相对完备纤维素酶体系而获得更优秀的发酵结果。这可能还是由于其所表达的纤维素酶活性不够高，虽然在酶活上有一定的差异，但是在实际应用中，对于纤维质底物的降解能力仍旧十分有限，其所表现出来的差距不足以让实现纤维素酶共表达的重组菌在发酵中获得更加高效的底物利用能力，因而其在生长和乙醇发酵上都没有体现出理想的结果。从功能上来说，上述重组菌均具备了 CBP 菌株的特性，也能在一定程度上实现 CBP 的发酵过程；但是从实际应用效果上来说，这些菌株只具有初步的应用性能，距离真正实现高效的 CBP 过程还有一定的距离。

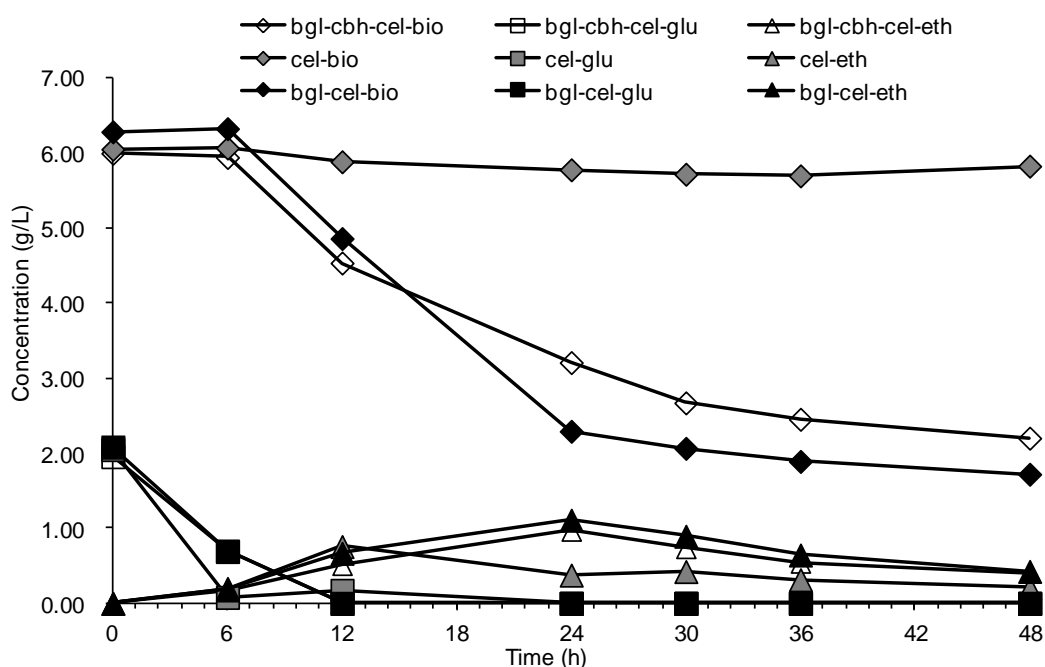


图 2.20 共表达重组菌的发酵实验

Fig. 2.20 Fermentation of the recombinant strain which co-expressed different cellulase gene

The ethanol fermentation by P81/*celA* and P81/*cbhA* with 5 g/L saccharification PASC in LB medium. P81/*celA* was used as the control strain. Diamond for cellobiose concentration, square for glucose concentration and triangle for ethanol concentration. White symbol for P81/*bglB-cbhA-celA*, gray symbol for P81/*celA*, and black symbol for P81/*bglB-celA*. 1% of the strain culture were inoculated and cultivated in 20 mL LB medium with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilin at 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm in flask. 0.1 mM IPTG was added when the strain grew to $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4-0.6$.

2.4 小结

整合生物加工工艺 (CBP) 菌株作为集纤维素酶生产、纤维素降解以及乙醇发酵等步骤于一体的工程菌株, 利用重组工程菌本身的性能, 实现微生物对纤维质底物的利用以及乙醇发酵, 从而降低生产成本。对于 CBP 菌株而言, 发酵菌株需要能够同时生产纤维素酶和发酵生产乙醇。在本次试验中, 通过在 *E.coli* 中整合源自 *Zymomonas mobilis* 的丙酮酸脱羧酶 (*pdc*) 和乙醇脱氢酶 (*adhB*) 基因, 构建了重组大肠杆菌 P81。P81 能够利用碳源并生成乙醇, 在利用葡萄糖时能乙醇产率够达到理论值的 60%。同时, 源自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因 (*celA*)、外切葡聚糖酶基因 (*cbhA*) 和源自多黏芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶 (*bglB*) 基因也在 P81 中进行了表达, 得到的重组菌均表现出了一定的纤维素酶酶活。同时信号肽 *NprB* 的使用, 也使得这些纤维素酶蛋白在 P81 中实现了一定程度的分泌, 使其能在重组菌胞外进行表达, 这样就能接触到无法穿膜的纤维质底物, 并对相应的底物拥有一定的降解能力。其中 P81/*bglB* 对纤维二糖的降解能力尤为突

出，能够以纤维二糖为单碳源进行乙醇的发酵生产。P81/*celA* 和 P81/*cbhA* 则只能对糖化后的 PASC 进行一定程度的利用，并进行乙醇的生产。虽然其单独对底物进行降解并利用的能力不足，但是仍旧能够在一定程度上缓解发酵过程中商品纤维素酶的使用量，从而降低成本。纤维素的降解通常来说也需要内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶的共同作用，但是三种基因的共表达由于在表达水平上的竞争和总体表达量上的不足，在实际发酵中并没有体现出明显的协同效应。

在本实验中我们同时发现，大肠杆菌虽然易于进行基因改造和异源表达，但是其分泌性能却并不优秀。同时，基于其本身的分泌表达机制很多时候也只能将蛋白转移到周质空间，而并非彻底转移到胞外。但是通过实验，我们发现添加不同的表面活性剂，就能够在一定程度上提高细胞的通透性，加强胞内蛋白向胞外的转运。虽然细胞通透性的增加会导致菌体自身耐受性的下降以及生长状态的降低，但是在 P81/*bglB* 的发酵试验中，其对底物的利用能力以及乙醇的发酵生产上仍旧能够取得明显的提升。这也为我们在研究大肠杆菌的分泌性能的同时，为提高大肠杆菌的分泌能力提供了一些借鉴和应用的思路。

试验中对 CBP 菌株的构建尝试虽然取得了成功，但是其实际应用效果依然不够高效，需要进行更多的研究来对其进行改善。首先就是重组大肠杆菌中异源纤维素酶的表达和分泌能力的提高。由于自然界中能够降解纤维素的菌种并不多见，而在产纤维素菌种之间寻找高效的发酵菌株则更加困难。因此利用基因工程改造，在合适的菌株中进行外源基因的表达以完善菌株的功能则成了一种必然的选择。大肠杆菌虽然易于改造，但是其外源纤维素酶蛋白的表达量和分泌能力仍旧不足，使得重组菌对于高聚合度的纤维素仍旧缺乏有效的降解能力，这也在很大程度上限制了其中的不同纤维素酶共表达策略的应用。如果能在这两个方面进行改善，提高菌体对底物的降解和利用能力，则其作为 CBP 菌株将拥有更好的应用前景。其次，重组大肠杆菌的发酵生产能力也有进一步提升的空间。乙醇作为生物质能源的主要产物，通常都是 CBP 菌株的目的产物。但是大肠杆菌由于其自身对乙醇的耐受力，以及试验中所体现出来的乙醇产率并不能够让人满意。因此，我们也可以通过提高重组大肠杆菌的耐受性，或者对其代谢途径进行改造使其生产其他的高附加值发酵产物，以提高 CBP 菌株在实际应用中的表现和价值。本实验通过在产乙醇大肠杆菌中表达纤维素酶的尝试，确认了大肠杆菌在 CBP 过程中所表现出来的潜力，并在一定程度上实现了 CBP 菌株的构建和应用；同时还在在发酵过程中进行了表面活性剂添加的尝试，为之后 CBP 菌株的构建和实际发酵应用打下了一定的基础。

第三章 运动发酵单胞菌中纤维素酶的表达研究

3.1 前言

运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)最早由 Linder 于 1924 年从龙舌兰酒中分离得到^[155-157]。运动发酵单胞菌为革兰氏阴性菌,并属于厌氧细菌,不过对于氧气仍旧有一定的耐受性,表现出兼性厌氧的特性^[158]。运动发酵单胞菌细胞形状呈现为圆端肥粗的杆状细胞,周生鞭毛运动;其细胞大小长约为 1.4-2.0 μm ,直径约为 4.0-5.0 μm ,通常成对出现,较少情况下可形成短链。与其他许多种微生物相比,运动发酵单胞菌的代谢途径相对简单,该菌通过 ED 途径(Etner-Doudoroff pathway)专一地利用葡萄糖、果糖和蔗糖作为碳源和能源。当运动发酵单胞菌利用蔗糖进行乙醇发酵时,会产生诸如聚糖和山梨醇等副产物,相较于底物的利用其乙醇的转化率一般在 70%左右^[159,160];不过当其对于葡萄糖和果糖进行代谢时,就能够得到近似理论产量的乙醇^[161]。基于此,运动发酵单胞菌一般被认为是一种极其优良而高效的乙醇生产菌株。除了极高的乙醇产率,运动发酵单胞菌在发酵过程中生物质的转化量并不高,其所摄取的营养以很高的比率转化成为乙醇;同时它对氧气的兼性需求特性也使得运动发酵单胞菌可以不依赖于特定的供氧条件而进行发酵;此外,其对终产物乙醇以及一些有毒抑制物的耐受性也十分的优秀^[161-172]。不过,虽然运动发酵单胞菌拥有很多优点,其在发酵应用中的缺点也显而易见:它的底物利用范围过于狭窄,仅限于葡萄糖、果糖和蔗糖^[173],这个特点限制了运动发酵单胞菌在发酵中的应用,尤其是以木质纤维质水解液为底物的发酵中的应用,其中通常都含有大量的戊糖^[174],这是运动发酵单胞菌所无法进行利用的。与此同时,由于运动发酵单胞菌无法直接对木质纤维素进行降解,因此当使用木质纤维素类的底物时,会不可避免地使用商品糖化酶对底物进行水解,而这一步也是生物乙醇发酵生产过程中成本最高的步骤之一,大约占整个发酵过程的 16%的成本^[16]。这些年来,随着对运动发酵单胞菌的研究越来越深入,人们也开始逐渐认识到运动发酵单胞菌在乙醇发酵中所蕴含的巨大潜力,并致力于将其改造成为可应用于大规模发酵的整合生物加工(CBP)菌株。整合生物加工(CBP)菌株将纤维素酶的生产、纤维质底物的糖化以及乙醇发酵生产整合在同一个微生物中,以使重组菌能够直接应用于发酵纤维质底物产乙醇的过程中,并通过减少发酵过程中商品纤维素酶的使用而大幅度降低发酵的成本^[9, 111-113, 175]。

纤维素会在纤维素酶的水解下,被逐渐分解最终成为可被微生物利用的单糖。因此,对于 CBP 菌株而言,高效的纤维素酶表达和分泌体系是十分重要的因素。没有实验表明野生型的运动发酵单胞菌能够直接利用纤维素,因此在将运动发酵单胞菌构建成为 CBP 菌株的过程中,外源纤维素酶蛋白的表达将是必要的步骤。虽然有着不少先关的研究,但是如何在运动发酵单胞菌高效地表达外源蛋白,目前仍旧没有形成一个最佳的方

案^[176]。通过基因工程改造，人们成功地在运动发酵单胞菌中表达了外源纤维素酶基因^[169,176-180]，但是其表达量和分泌情况始终不尽如人意。在外源蛋白的分泌表达改造中，通常会用到源自运动发酵单胞菌本身的信号肽或者分泌途径。比较常用的包括 ZMO0130 基因（PhoC，属于 SecB 依赖型分泌途径）的信号肽、ZMO0331 基因（一种假定功能的蛋白，属于 TAT 途径）的信号肽^[176]以及 ZMO0938（PhoD，碱性磷酸酶）的信号肽^[175]。

纤维素的降解需要内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶的共同作用。对于基因工程重组菌而言， β -葡萄糖苷酶的表达或许可以取得更理想的效果。相较于其他两种纤维素酶， β -葡萄糖苷酶的底物纤维二糖可以穿过细胞壁并接触到细胞膜，使得菌体能够更好地接触到纤维二糖并对其进行降解^[116,117]。这也可以在某种程度上缓解运动发酵单胞菌蛋白分泌能力不足的问题。本实验中，我们以运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 为宿主菌，以源自多黏芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) 的 β -葡萄糖苷酶基因 (*bglB*) 为目的基因，试验了几种目前未被尝试过的分泌表达策略，从而对 *Z. mobilis* 中外源纤维素酶的分泌表达情况进行探索和研究。首先，我们研究了源自 *Z. mobilis* 本身的纤维素酶基因 ZMO1086^[181]在 *Z. mobilis* 中的表达情况。在野生型的 *Z. mobilis* 中，ZMO1086 基因可以表达出极其微弱的纤维素酶活性，我们通过可以在 *Z. mobilis* 中复制的穿梭载体 pHW20a^[182]以及源自 *Z. mobilis* 本身烯醇酶基因 *eno* 的启动子 *P_{eno}*，在 *Z. mobilis* 中对 ZMO1086 进行了过表达，对 *Z. mobilis* 中纤维素酶的表达情况进行了一定的研究；接着，我们又利用 ZMO1086 基因的信号肽 (*SP1086*) 对 *bglB* 基因在 *Z. mobilis* 中进行了分泌表达的尝试；最后，我们还尝试了构建融合蛋白的策略，将 β -葡萄糖苷酶 BglB 通过和可分泌的蛋白果聚蔗糖酶 (*SacB*) 融合，并在 *Z. mobilis* 中实现分泌表达。通过本次实验，我们对纤维素酶在 *Z. mobilis* 中的表达有了一个初步的认识，对于外源纤维素酶在 *Z. mobilis* 中表达的可能性及一些基本条件进行了一定的探索和分析。同时我们还尝试了不同的分泌表达策略，为之后 *Z. mobilis* 的进一步的改造提供了充足的基础和一些新的思路和借鉴。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 菌株和质粒

多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa* 1.794) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center)，热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*, DSM 1237) 购自德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)，运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*, ATCC 31821) 购自美国模式菌种收集中心 (American Type Culture Collection)。大肠杆菌 DH5 α 用于基因克隆和质粒构建等基因操作，大肠杆菌 S17-1 用于重组质粒向 *Z. mobilis* 中的接合

转化，穿梭质粒 pHW20a 用于在 *Z. mobilis* 中进行外源基因的表达。实验中所使用的菌株和质粒具体见表 3.1。

表 3.1 菌株及质粒

Table 3.1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype and/or salient characteristics	Source/reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, Grant et al. (1990) endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Pro</i> , <i>res</i> ⁻ , <i>mod</i> ⁺ ; chromosomal integrated <i>2-Tc::Mu-Km::Tn7</i> ; <i>Tp</i> , <i>sm</i>	RP4; Simon et al. (1983) ^[183]
<i>Z. mobilis</i>	Wild type strain, ATCC 31821	Purchased from ATCC
<i>B. polymyxa</i>	Wild type strain, CGMCC 1.794	Purchased from CGMCC
<i>C. thermocellum</i>	Wild type strain, DSMZ 1237	Purchased from DSMZ
Plasmids		
pHW20a	<i>Tc</i> ^r , <i>mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZ</i> α , MCS, and <i>oriV</i>	Dong et al. (2011) ^[28]
pP43JM2	<i>Km</i> ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector.	Stored in the lab ^[153]
P- <i>bglB</i>	pHW20a-Peno- <i>bglB</i>	In this study
PS- <i>bglB</i>	pHW20a-Peno- <i>NprB-bglB</i>	In this study
P-ZM1086	pHW20a-Peno-ZMO1086	In this study
PSZ- <i>bglB</i>	pHW20a-Peno-SP1086- <i>bglB</i>	In this study
PB- <i>bglB</i>	pHW20a-Peno- <i>sacB-bglB</i>	In this study

3.2.1.2 实验试剂

实验中所用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司 (Vilnius Lithuania); DNA 分子量标品、rTaq 及 Primer STAR HS DNA 聚合酶购自日本 Takara 大连分公司 (Dalian, China); 基因组抽提试剂盒 (Bacterial DNA Kit) 购自 Omega 生物公司 (Norcross, GA, USA); 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS)、溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA); 西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain)、四环素 (Tetracycline, Tc)、萘啶酸 (Nalidixic acid, NA) 购自比利时 Acros Organics 公司 (Geel, Belgium); 质粒小量制备试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 购自上海捷瑞生物工程公司 (Shanghai, China); PCR 产物纯化试剂盒 (PCR Purification Kit) 购自上海生工生物工程公司 (Shanghai, China); 葡萄糖试剂盒购自上海科欣生物技术研究所以 (Shanghai, China); 胰蛋白胨 (Tryptone) 和酵母提取物 (yeast extract) 购自 Oxoid 公司 (Cambridge, UK); 对硝基苯葡萄糖苷 (4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷, pNPG) 购自美国 Sigma 公司 (St. Lous, MO, USA); 微晶

纤维素 (Avicel) 购自上海昌为医药辅料技术有限公司 (Shanghai, China); SPEZYME CP (55 FPU/ml) 购自丹麦 Danisco 公司 (Copenhagen, Denmark); 其他试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自上海国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。实验中使用的引物在上海捷瑞生物工程有限公司进行引物合成。

3.2.1.3 实验仪器

实验中所使用的仪器见本文第二章表 2.2。

3.2.1.4 菌种的培养及保存

大肠杆菌的培养、感受态的制备所用的培养基见本文 2.2.1.4 章节。

运动发酵单胞菌的培养采用 RM 培养基: 2.0 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L 酵母提取物和 20 g/L 葡萄糖。如果需要配置琼脂固体培养基, 则再向其中添加 15 g/L 的琼脂。培养基成分添加完成后用 5 M NaOH 调节 pH 值到 6.0, 并在 115 °C 条件下灭菌 20 min。如需要使用含有抗生素的液体培养基, 则在接入菌体前按所需浓度加入相应的抗生素。四环素的使用浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 、萘啶酸使用浓度为 30 $\mu\text{g/ml}$ 。如果需要使用含有抗生素的琼脂固体培养基, 则待含有琼脂的培养基冷却至 60 °C 左右时, 按所需浓度加入相应的抗生素, 摇晃均匀后等待培养基凝固, 并置于 4 °C 条件下避光保存。试验中, 含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素的 RM 培养基称为 RT 培养基, 含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素以及 30 $\mu\text{g/ml}$ 萘啶酸的 RM 培养基称为 RMNT 培养基。运动发酵单胞菌的培养条件如无特殊说明, 液体培养均是在恒温培养箱中在 30 °C 条件下进行静置培养; 琼脂固体培养基培养均是将涂布有菌体的平板放置于 30 °C 恒温培养箱中进行培养。

菌种保存的操作方法: 在超净工作台中将 800 μL 培养到对数生长期的菌液与 800 μL 60 % 无菌甘油混合均匀, 装入预先灭菌的冻存管中, 保存于 -80 °C 超低温冰箱中。

3.2.1.5 实验试剂及溶液配制

四环素贮存液: 称取 1.00 g 四环素盐酸盐粉末溶解于 100 ml 75 % (v/v) 乙醇中, 搅拌使其充分溶解并继续加入 75 % (v/v) 乙醇, 定容于 100 ml。之后在 -20 °C 条件下过夜放置, 再行分装并于 -20 °C 条件下避光保存。

萘啶酸贮存液: 称取 1.00 g 萘啶酸粉末溶解于 50 ml 无菌超纯水中, 并不停的搅拌。在搅拌的同时用 100 μl 移液器向溶液中缓慢地滴加 5 M NaOH, 直至溶液中的萘啶酸粉末完全溶解, 并加入超纯水定容于 100 ml。接着在超净工作台以无菌 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤除菌, 再行分装于 -20 °C 条件下避光保存。

5 \times TBE 核酸电泳缓冲液: 将 54 g Tris-base, 27.5 g 硼酸以及 0.5 M EDTA 溶液 20 ml 溶于 1 L 的去离子水中, 充分溶解后常温避光保存, 使用时将其稀释成为 0.5 \times 工作液, 既稀释 10 倍。

0.7 % 琼脂糖凝胶: 称取 0.7 g 琼脂糖, 溶于 100 ml 的 5 \times TBE 核酸电泳缓冲液, 用微波炉加热至完全溶解, 溶液澄清为止。之后加入 20 μL 溴化乙锭, 混匀后即可使用。

Tris-HCl 缓冲液: 将 Tris 按所需浓度溶于去离子水中, 然后用移液器缓慢加入浓 HCl 并混匀。使用 pH 计实时监测缓冲液的 pH 值直到达到所需的缓冲液 pH 值以完成缓

冲液的配置，常温保存。

*p*NPG 溶液 (2.4 mg/mL): 称取 0.072 g 的 4-硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 (*p*NPG) 溶于 30ml 0.1M 柠檬酸缓冲液。配制完成后在 4 °C 避光保存。

0.5M 碳酸钠溶液 (Na₂CO₃): 称取 10.6 g 无水 Na₂CO₃ 粉末溶于去 200 ml 离子水中，充分溶解后置于常温保存。: 称取 10.6 g 无水 Na₂CO₃ 粉末溶于去 200 ml 离子水中，充分溶解后置于常温保存。

渗透冲击溶液: 配制 100ml 33 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液，并称取 20 g 蔗糖、0.019g Na₂EDTA 并加入其中，混匀后于-20 °C 条件下保存。

羧甲基纤维素 CMC 溶液 (10 g/L): 称取 0.5 g 羧甲基纤维素粉末溶于 50 ml 去离子水中，充分溶解后进行使用，通常现配现用。

DNS 试剂: 称取 91 g 酒石酸钾钠并溶于 250 ml 水中，稍微加热并称取 3.15 g 的 3,5-二硝基水杨酸、10.5 g 氢氧化钠以及 2.5 g 苯酚加入加热的溶液中，充分溶解后冷却并定容至 500 ml。配置完成后贮藏于棕色瓶中，于 4 °C 避光保存。

3.2.2 实验及分析方法

3.2.2.1 基因组及质粒 DNA 的抽提、纯化和制备

基因组和质粒制备前，先通过适宜的条件将细菌培养至稳定期，并离心取得适当量的菌体用以制备基因组或质粒 DNA。基因组抽提的具体操作步骤可参考 Omega 基因组抽提试剂盒 (Omega Bacterial DNA Kit) 说明书；质粒提取的具体操作步骤可参考捷瑞质粒小量制备试剂盒 (捷瑞 Plasmid Mini Kit) 说明书；DNA 片段的琼脂糖凝胶回收的具体操作步骤可参考捷瑞琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (捷瑞 Gel Extraction Kit) 说明书；PCR 的产物纯化操作步骤具体可参考生工 PCR 产物纯化试剂盒 (生工 PCR Purification Kit) 说明书。

3.2.2.2 目的基因的克隆及质粒构建

本实验中采用 PCR 的方法对目的基因进行扩增，用于进行 PCR 的引物见表 3.2。

表 3.2 本实验使用的引物

Table 3.2 Primers used in this study

Amplified fragments	Primer	Sequence (5'-3')
<i>bglB</i>	bg11	CGGGATCCATGCGCAACTTGACCAAGAC (<i>Bam</i> HI)
	bg12	CCCAAGCTTTTAAAACCCGTTCTTCGCC (<i>Hind</i> III)
<i>Peno</i>	pe1	CGGAATTCTCGGCCATTGTCTATACTC (<i>Eco</i> RI)
	pe2	CGGGATCCATCGAAACCTTTCTTAAAATC (<i>Bam</i> HI)
<i>Peno-NprB</i>	pn1	CGGAATTCTCGGCCATTGTCTATACTC (<i>Eco</i> RI)
	pn2	CGGGATCCTGCAGCTGAGGCATGTGTT (<i>Bam</i> HI)
<i>ZMO0186</i>	zc1	CGGGATCCATGACCTATAGTCGTCGTTTTATC (<i>Bam</i> HI)
	zc2	CCCAAGCTTAAAGATTTAGCGGTTATGCG (<i>Hind</i> III)
<i>Peno-SP0186</i>	pes1	CGGAATTCTCGGCCATTGTCTATACTCCAGTTAC (<i>Eco</i> RI)

	pes2	CGGGATCCGGCCGCTTTACCCCTCCG (<i>Bam</i> HI)
<i>NprB-bglB</i>	nb1	CGGGATCCATGCGCAACTTGACCAAGAC (<i>Bam</i> HI)
	nb2	CCCAAGCTTTTAAAACCCGTTCTTCGCC (<i>Hind</i> III)
<i>sacB-bglB</i>	p1	CGGGATCCATGTTGAATAAAGCAGGCATTG (<i>Bam</i> HI)
	p2	ATAAAGGTATTCTCGCTCATACCACCACCACCACCACCTTTAT TCAATAAAGACAGGGCT
	p3	TGTCTTTATTGAATAAATAAGGTGGTGGTGGTGGTGGTATGAG CGAGAATACCTTTATATTTT
	p4	CCAAGCTTTTAAAACCCGTTCTTCGCC (<i>Hind</i> III)

试验中引物的处理、PCR 体系的制备以及 PCR 条件的设置均参考本文 2.2.2.2 章节。

目的基因通过 PCR 扩增之后，接着使用 PCR 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，然后再使用引物上预设的限制性内切酶对其进行酶切（具体酶切位点以及体系参见实验结果部分）；同时对载体质粒 pHW20a 使用相同的限制性内切酶进行酶切。将 PCR 和目的载体的酶切产物通过胶回收，取得含有酶切后粘性末端的目的基因 DNA 片段和载体片段，然后使用 T4 DNA 连接酶将两个片段的粘性末端进行特异性的连接，连接的具体操作可参考 T4 DNA 连接酶（Fermemtas T4 DNA Ligase）使用说明书。连接的体系配比见本文表 2.5。目的基因与目的载体相连成环状 DNA 后，即形成了新的目的质粒。将连接后的连接液转化进入大肠杆菌 DH5 α ，便能进行扩增。

3.2.2.3 目的质粒在大肠杆菌中的转化及鉴定

实验中采用氯化钙法制备大肠杆菌 DH5 α 和 S17-1 感受态、转化操作及鉴定的方法见本文 2.2.2.3 章节。

3.2.2.4 目的质粒在运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 中的转化及鉴定

实验中采用接合转化^[28]的方法，用以完成目的质粒向运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 中的转化。具体的操作步骤为：

- 1) 按照本文 2.2.2.3 章节所示方法，将待转的目的质粒转化进入大肠杆菌 S17-1，获得含有重组质粒的大肠杆菌 S17-1（未经特殊说明，一般使用 pHW20a 作为重组质粒的载体，即表明该重组菌拥有四环素抗性）。
- 2) 将保存于 -80 °C 冰箱中保种的运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 甘油管取出，在超净工作台用接种环挑取少量的菌液涂布于 RM 琼脂平板上，放置于 37 °C 恒温培养箱中培养约 24 h，便可于平板上看到肉眼可清晰分辨的运动发酵单胞菌单菌落。
- 3) 将含有重组质粒的大肠杆菌 S17-1 在超净台中用接种环挑取少量的菌体涂布于 LB（含 20 μ g/ml 四环素）琼脂平板上，放置于 37 °C 恒温培养箱中培养约 12 h，便可于平板上看到肉眼可清晰分辨的重组大肠杆菌 S17-1 单菌落。
- 4) 分别用牙签挑取一个 *Z. mobilis* 以及一个含有目的重组质粒的大肠杆菌 S17-1 单菌落，*Z. mobilis* 接种于 20 ml 的 RM 培养基中，放置于 30 °C 的恒温培养箱中静置培养大

约 18 h；大肠杆菌 S17-1 接种于 20 ml LB（含 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素）培养基中，放置于摇床中以 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220rpm 条件震荡培养大约 12 h。

- 5) 当大肠杆菌 S17-1 生长至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ ，而 *Z. mobilis* 生长至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4$ 时，用移液枪从两种菌液中各取 0.5 mL 的菌液，移至无菌 1.5 mL EP 管中混合均匀。
- 6) 将混合的菌液于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 g 离心 0.5 min，尽可能弃去上清后另外加入 900 μL 新鲜无菌 RM 培养基并轻轻敲打、弹震 EP 管身使其中的细胞重新悬浮并上下翻转 EP 管数次使其混合均匀，接着再次将混合的菌液于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 g 离心 0.5 min。小心地弃去上清并在 EP 管中剩余约 20-30 μL 的上清液体。
- 7) 于超净工作台中用移液器轻微吹打 EP 管中的细胞使之悬浮，并将其移至事先已贴在 RM 琼脂培养基上的 0.22 μm 滤膜上。该步骤操作时应当小心进行，尽量不要将菌液滴落于滤膜之外。之后将贴有滤膜的平板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中放置 12 h 以完成接合转化。
- 8) 于超净工作台中，滤膜取出并转移至加有 1 mL 无菌 RM 培养基的 EP 管中，在旋涡振荡器上振荡，使滤膜上的细胞重新悬浮于 RM 培养基之中。接着将 EP 管中的菌液涂布于 RMNT（含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素、30 $\mu\text{g/ml}$ 萘啶酸）平板上，置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中放置 48-60 h，即可于平板上长出肉眼可辨的阳性克隆单菌落，接着挑取菌落培养后进行质粒抽和鉴定。

运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 阳性克隆的鉴定：挑取目的阳性克隆，接种于 20 ml RMNT 培养基中，放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 24-48 h，直至菌液明显浑浊（菌体培养时间和菌体量视不同重组 *Z. mobilis* 而不同），然后取适当菌量进行质粒抽提。抽提出的质粒可以按照质粒图谱上所示的限制性内切酶位点，进行相应的限制性内切酶酶切，以检测酶切后的 DNA 片段大小是否符合理论值。单酶切体系为：5 μL 质粒+1 μL 10 \times 酶切缓冲液+0.5 μL 限制性内切酶，最后用超纯水将酶切体系补齐至 10 μL 。双酶切体系为：5 μL 质粒+2 μL 10 \times Tango 缓冲液+0.5 μL 限制性内切酶 \times 2，最后用超纯水将酶切体系补齐至 10 μL 。同时，对于含有目的基因的载体质粒还能以该质粒为模板，对目的基因进行 PCR，并以无菌超纯水作为空白对照 PCR 的模板。通过核酸电泳观察目的质粒经过 PCR 是否能够得到相应的扩增条带，用以确认该质粒是否含有目的基因。

3.2.2.5 运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 胞内及胞外蛋白的提取

实验中使用超声破碎的方法对运动发酵单胞菌的胞内蛋白进行提取；使用渗透冲击法^[146]对周质空间和胞质的蛋白进行提取；使用硫酸铵沉淀法用来对菌液中的菌体胞外蛋白进行提取。提取获得蛋白则用于之后的实验，具体方法为：

- 1) 用牙签挑取一个重组运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 单菌落，接种于 20 ml 的 RM 或者 RMNT 培养基中（视不同 *Z. mobilis* 而定），放置于恒温培养箱中以 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件静置培养约 24 h，菌体约生长到至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=2.0$ 。
- 2) 将菌液摇瓶置于冰水混合物中，冰浴 10 min。接着将菌液转移至预冷离心杯中，于低温离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 rpm 离心 2 min，沉淀即为 *Z. mobilis* 菌体，上清则含有

待提取的胞外蛋白。

- 3) 将 2) 步骤中产生的沉淀，用 20 ml Tris-HCL (pH=6.0) 缓冲液悬浮菌体，取 1 ml 菌体悬浮液加入 1.5 ml 离心管。
- 4) 将菌体悬浮液于冰上进行超声破碎，条件为 100W、超声时间 3 s、超声间隔 15 s，工作 15 次。
- 5) 将破碎后的菌体悬浮液于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 5 min，上清即是所需的胞内蛋白。
- 6) 于 3) 步骤中用 20 ml Tris-HCL (pH=6.0) 缓冲液悬浮的菌体后，另取 1 ml 菌体悬浮液加入 1.5 ml 离心管，于低温离心机中 4 °C、10000 rpm 离心 2 min，弃去上清。
- 7) 向离心管中加入 1 ml 渗透冲击液，用移液器轻轻吹打悬浮菌体后混匀，然后将离心管置于冰上冰浴 10 min。
- 8) 将离心管于低温离心机中 4 °C、8000 rpm 离心 2 min，弃去上清，再加入 1 ml 超纯水，用移液器轻轻吹打悬浮菌体后混匀，并冰浴 10 min。
- 9) 将离心管于低温离心机中 4 °C、8000 rpm 离心 2 min，所得上清便是周质空间的蛋白溶液；同时将所得沉淀以 1 ml Tris-HCl (pH=6.0) 缓冲液悬浮，将菌体悬浮液于冰上进行超声破碎，条件为 100W、超声时间 3 s、超声间隔 15 s，工作 15 次。将破碎后的菌体悬浮液于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 5 min，上清即是所需的胞质蛋白溶液。
- 10) 将 2) 步骤中产生的上清液然转移进入另一个预冷离心杯中，于冰上以 60 % 的沉淀浓度分批次缓慢加入无水硫酸铵粉末（每 100 ml 菌液加入 36.1 g 无水硫酸铵），每次添加硫酸铵后要搅拌均匀以使其充分溶解。
- 11) 将离心杯于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 10 min，弃去上清后用 1 ml Tris-HCl (pH=6.0) 缓冲液溶解沉淀，所得溶液既是胞外蛋白液（如此时有沉淀则于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 3 min 取上清作为胞外蛋白液）。

3.2.2.6 运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 细胞光密度 (OD_{600nm}) 与细胞干重 (DCW, mg/mL) 曲线的测定

实验中由于需要对运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 的菌体量进行定义，因此对其菌液的光密度和细胞干重的关系进行了测定，以便在之后的实验中以细胞光密度 (OD_{600nm}) 来定量菌体，用作实验的参数，具体操作步骤为：用牙签挑取一个重组 *Z. mobilis* 单菌落后接种于 20 ml RM 培养基中，放置于恒温培养箱中以 30 °C 条件静置培养约 24 h 然后 1 % 转接于 500 ml RM 培养基中，放置于恒温培养箱中以 30 °C 条件静置培养。约 2 h 后，测量菌液此时的 OD_{600nm} 值，同时取 30 ml 菌液并加入 50 ml 离心管中，于离心机中 10000 rpm 离心 2 min，弃去上清后用 15 ml 超纯水悬浮菌体并分装成 3 份作为平行。之后将分装后的菌体悬浮液以 10000 rpm 离心 2 min，弃去上清，并重新加入 1 ml 超纯水悬浮菌体，然后将菌液加入预先烘干并称重的 6 cm 培养皿中，同时向离心管中再加入 1 ml 超纯水对离心管进行润洗，润洗液也一并加入培养皿中，然后将培养皿置于 115

°C 烘箱中烘干 12 h 至恒重。之后将带有菌体的培养皿称重，得出每个培养皿中所对应的 10 ml 菌液中菌体的重量，并根据当时所测相应的 OD_{600nm} 值，计算出细胞光密度与细胞干重的关系并绘制曲线（附图 1），回归出关系式，其中横坐标为细胞光密度（OD_{600nm}），纵坐标为细胞干重（DCW，mg/mL）：

$$DCW (mg/mL) = 0.31 \times OD_{600nm}$$

该结果与其他实验者所报道的实验数据基本吻合^[184]。

3.2.2.7 磷酸处理微晶纤维素（PASC）的制备

试验中的用于测酶活所用的 10 g/L 的磷酸处理微晶纤维素（PASC）作为底物，该材料的制备方法见本文 2.2.2.6 章节。

3.2.2.8 纤维素酶活测定

对于运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 中的纤维素酶活的测定，外切酶和内切酶的酶活测定主要采用两种方法：以 10 g/L 磷酸处理微晶纤维素（PASC）作为底物并定量产生的还原糖量以定义酶活；或者以 10 g/L 羧甲基纤维素（CMC）为底物并定量产生的还原糖量以定义酶活。 β -葡萄糖苷酶则采用 *p*NPG 为底物进行对硝基苯显色反应以及葡萄糖试剂盒进行酶活测试。

以 PASC 为底物测定酶活的具体方法为：按照 3.2.2.5 所示方法，进行重组 *Z. mobilis* 胞内及胞外蛋白的提取并进行酶活的测定。取 750 μ l 酶液和 750 μ l 的 PASC 在 15 ml 试管中混合均匀后，于 30 °C 反应 30 min；之后立刻加入 3 ml 的 DNS 试剂，并将试管置于沸水浴中煮沸 3 min，煮沸步骤在使 DNS 和底物结合显色的同时，也能使酶蛋白失活，终止酶反应。之后将试管置于冰水混合物中冰浴，待其冷却后从反应体系中取 200 μ l 反应液，稀释于 2.5 ml 去离子水中，并测量其 OD_{540 nm} 的值。与此同时，每次在使用 DNS 试剂进行显色测定之前，均需进行标准曲线的制作，配制浓度范围在 0-1.0 g/L 的葡萄糖标准溶液，将 1.5 ml 底物溶液和 3 ml DNS 混合于 15 ml 试管，并将试管置于沸水浴中煮沸 3 min，之后将试管置于冰水混合物中冰浴，待其冷却后从反应体系中取 200 μ l 反应液，稀释于 2.5 ml 去离子水中，并测量其 OD_{540 nm} 的值。通过已知的不同浓度所对应的吸光值，即可得到一条反应标准曲线。实验中一个酶力活单位（U）定义为：1 min 催化底物释放 1 g/L 还原糖所需的酶量。

以 CMC 为底物测定酶活的具体方法为：按照 3.2.2.5 所示方法，进行重组 *Z. mobilis* 胞内及胞外蛋白的提取并进行酶活的测定。取 750 μ l 酶液和 750 μ l 的 CMC 溶液在 15 ml 试管中混合均匀后，于 30 °C 反应 60 min；之后立刻加入 3 ml 的 DNS 试剂，并将试管置于沸水浴中煮沸 3 min，煮沸步骤在使 DNS 和底物结合显色的同时，也能使酶蛋白失活，终止酶反应。之后将试管置于冰水混合物中冰浴，待其冷却后从反应体系中取 200 μ l 反应液，稀释于 2.5 ml 去离子水中，并测量其 OD_{540 nm} 的值。实验中一个酶力活单位（U）定义为：1 min 催化底物释放 1 g/L 还原糖所需的酶量。

β -葡萄糖苷酶 *p*NPG 酶活测定：该方法主要是测量底物通过酶催化后所释放的对硝基苯的含量，并通过其在 OD_{405nm} 下吸光值对所释放的对硝基苯进行定量。按照 3.2.2.5

所示方法,进行重组大肠杆菌胞内及胞外蛋白的提取并进行酶活的测定。取 200 μl 酶液、800 μl 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液 (pH=6.0) 以及 1 ml pNPG 溶液 (2.4 mg/ml) 在 15 ml 试管中混合均匀后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min; 同时将 200 μl 酶液、1.800 ml 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液混合作为底物空白样品,将 1 ml 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液和 1 ml pNPG 溶液混合作为酶空白样品在相同条件下进行反应。反应结束后加入 0.5 M Na_2CO_3 终止反应。然后对测量反应体系在 $\text{OD}_{405\text{nm}}$ 下的吸光值。所得到的数值减去酶空白和底物空白样品的测得值后,即可得到反应体系中所释放的对硝基苯的含量,进而表征反应体系中酶蛋白的酶活。试验中一个酶活力单位 (U) 定义为: 1 min 催化底物释放 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

3.2.2.9 运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 的发酵培养

将保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保种的 *Z. mobilis* 的甘油管取出,待其溶化后在超净工作台 中以 1 % (vol/vol) 接种量于 RM 培养基中接种 (对于含质粒的重组菌则于 RM 培养基 中添加相应浓度和种类的抗生素,详见本章 3.2.1.5 关于试剂配制和使用的内容),放 置于恒温培养箱中以 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件静置培养约 20-24 h 至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值约为 1.5 左右。接着用 移液器将种子液以 1 % (vol/vol) 的接种量接入相应的发酵培养基中,同样以 30 $^{\circ}\text{C}$ 的 条件开始静置发酵培养 (对于含质粒的重组菌则同时添加相应浓度和种类的抗生素)。 试验中根据菌体的发酵情况和实验需要,于合适的时间点取样用于分析菌体的发酵情况。 对于发酵液的分析如无特别说明,均采用 HPLC 系统进行分析,HPLC 分析条件见本文 2.2.2.8 章节。待测的样品在从发酵液中取样之后,都要在 13000 rpm 的条件下离心 3 min 以去除样品中的菌体和其他固体杂质,接着将离心后的上清液用 0.22 μm 滤膜过滤并按 照一定倍数进行稀释 (以稀释后的样品浓度在 HPLC 的检测范围内为准) 后使用 HPLC 进行检测。

3.3 结果与讨论

3.3.1 外源纤维素酶基因 *bglB* 在 *Z. mobilis* 中的表达尝试

运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 作为一株乙醇发酵能力极强的菌株,具有作为 CBP 菌株 的潜力。由于其缺乏纤维素的降解能力,因此我们尝试在其中进行纤维素酶的表达。一 开始,我们尝试使用源自多黏芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶基因 (*bglB*) 为目的基因在 *Z. mobilis* 中进行表达。一些前期的实验证明,该基因能够在同为革兰氏阴性菌的大肠杆菌 中进行分泌表达,并且能取得较好的分泌效果,因此尝试在同为革兰氏阴性菌的 *Z. mobilis* 中同样进行分泌表达。为了使该基因实现分泌表达,我们尝试使用源自热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的信号肽 *NprB*, 该信号肽在在众 多细菌中都起到了引导蛋白分泌的作用,包括革兰氏阳性菌和阴性菌^[153,185]。实验中,选定使用穿梭载体 pHW20a (9.9 kb) 作为外源基因的表达载体 (图 3.1),这是一种可以在大肠杆菌和 *Z. mobilis* 中

都进行复制的穿梭质粒。含有该质粒的大肠杆菌和 *Z. mobilis* 表现出四环素抗性 (Tc^r)。pHW20a 在本实验中使用接合转化的方法实现向 *Z. mobilis* 中的转化。

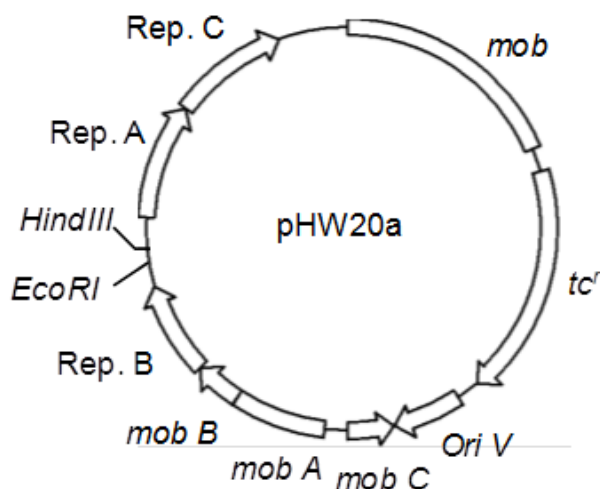


图 3.1 pHW20a 质粒图谱

Fig. 3.1 Plasmid map of pHW20a

为了构建在 *Z. mobilis* 中表达 *bglB* 基因的重组质粒，首先通过 PCR 扩增，从预先抽提的多粘芽孢杆菌基因组中得到 *bglB* 基因片段，该基因全长 1347 bp (图 3.2a)。接着对该 *bglB* 片段和实验室之前构建的 pP43JM2^[153] (含有 *NprB* 信号肽) 质粒进行 *XbaI* 和 *HindIII* 双酶切，酶切体系为：22 μ l 目的片段+6 μ l Tango buffer+1 μ l *XbaI*+1 μ l *HindIII*。之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组载体 pP43JM2-*bglB*。接着使用 nb1 和 nb2 引物，通过 PCR 从 pP43JM2-*bglB* 中扩增得到 *NprB-bglB* (1.4 kb) 片段 (图 3.2b)。

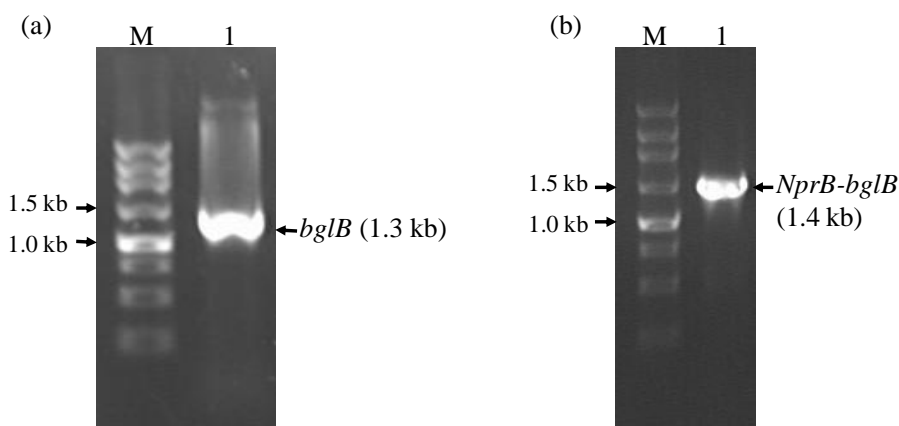


图3.2 *bglB*和*NprB-bglB*的PCR产物

Fig. 3.2 PCR fragment of *bglB* and *NprB-bglB*

(a) PCR amplification of *bglB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *bglB* (1.3 kb). (b) PCR amplification of *NprB-bglB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *NprB-bglB* (1.4 kb).

与此同时，使用引物 *pe1* 和 *pe2* 通过 PCR 扩增，从预先抽提的运动发酵单胞菌基因组中得到 *Peno* 基因片段（图 3.3），该启动子片段全长 209 bp。

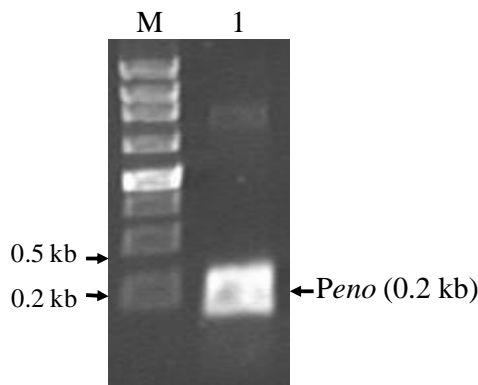
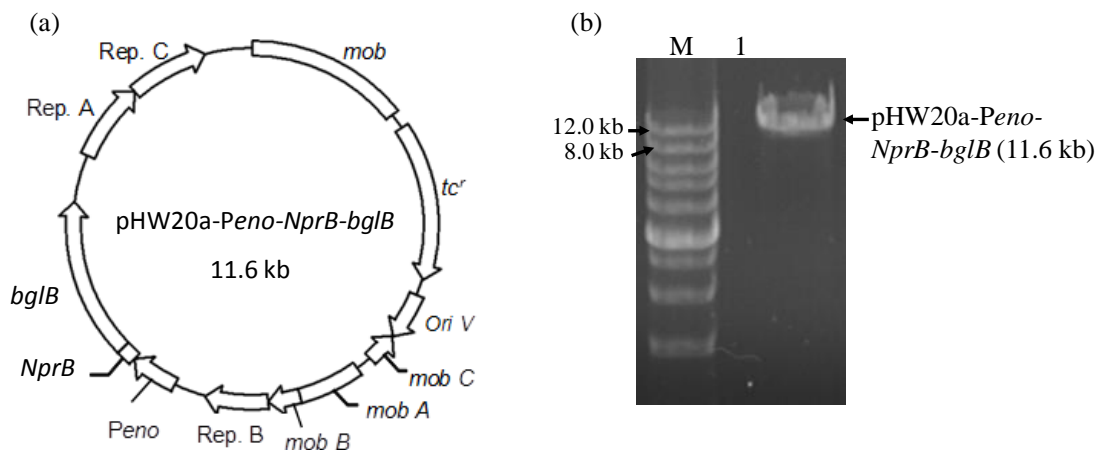


图3.3 *Peno*的PCR产物

Fig. 3.3 PCR fragment of *Peno*

PCR amplification of *Peno*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *Peno* (0.2 kb).

接着对 *Peno* 片段和 pHW20a (9.9 kb) 质粒进行 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切，酶切体系为：22 μ l 目的片段+6 μ l Tango buffer+1 μ l *XbaI*+1 μ l *HindIII*。接着对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组载体 pHW20a-*Peno*。*Peno* 启动子是 *Z. mobilis* 中烯醇酶基因 *eno* 的启动子，在 *Z. mobilis* 中处于该启动子调控下的蛋白通常会表现出较强的表达水平。最后对 pHW20a-*Peno* 以及 *NprB-bglB* 片段 *HindIII* 和 *BamHI* 双酶切，并对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到重组质粒 pHW20a-*Peno-NprB-bglB*（图 3.4a）。在得到了重组质粒后，我们对 pHW20a-*Peno-NprB-bglB* 进行了 *HindIII* 单酶切鉴定以及 *EcoRI/HindIII* 双酶切鉴定（图 3.4b 和图 3.4c）。单酶切体系为：8 μ l 目的片段+1 μ l Tango buffer+1 μ l *HindIII*；双酶切体系为：7 μ l 目的片段+2 μ l Tango buffer+0.5 μ l *HindIII*+0.5 μ l *EcoRI*。同时也对 pHW20a-*Peno-NprB-bglB* 中的 *bglB* 片段进行了 PCR 扩增，以确定重组质粒中正确地含有我们所需的基因 *bglB* 片段（图 3.4d）。



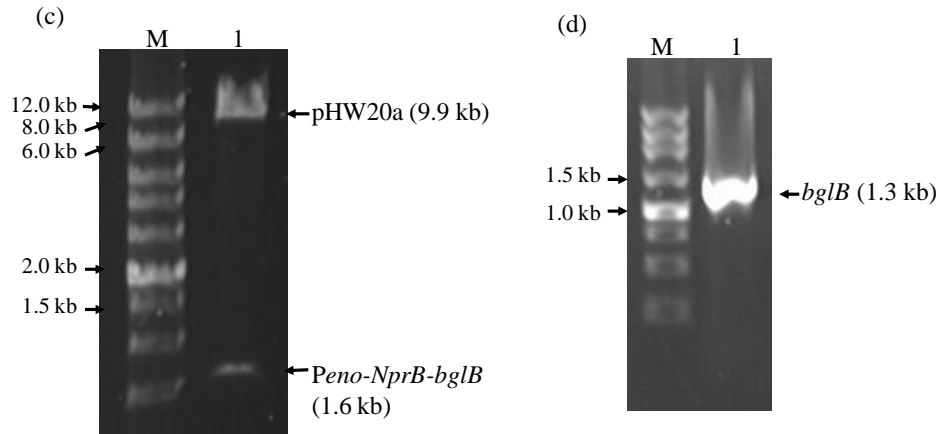


图 3.4 pHW20a-Peno-NprB-bglB 的构建与鉴定

Fig. 3.4 Construction and identification of pHW20a-Peno-NprB-bglB

(a) Plasmid map of pHW20a-Peno-NprB-bglB. (b) Identification of pUC19-bglB-celA. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, pHW20a-Peno-NprB-bglB (*HindIII*). (c) Identification of pHW20a-Peno-NprB-bglB. Lane M, marker (Wide range DNA ladder); Lane 1, pHW20a-Peno-NprB-bglB (*EcoRI* & *HindIII*). (d) PCR amplification of *bglB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *bglB* (1.3 kb).

完成了 pHW20a-Peno-NprB-bglB 的构建后，我们便按照 3.2.2.4 所示方法，尝试将质粒 pHW20a-Peno-NprB-bglB 通过接合转化进入 *Z. mobilis*。但是经过数次转化试验后，接合转化操作一直没有获得成功。而作为对照转化实验，我们同时进行了将质粒 pHW20a 向 *Z. mobilis* 中的接合转化，该接合转化则每次都能获得含有正确质粒的重组 *Z. mobilis*。这个结果表明质粒 pHW20a-Peno-NprB-bglB 无法通过转化进入 *Z. mobilis* 中，或者是含有该重组质粒的 *Z. mobilis* 不能正常的生长。由于 *Z. mobilis* 并不是一株易于进行基因工程改造的宿主菌，外源基因的表达在其中可能受到许多方面的限制；同时，如果在表达外源基因的同时对其进行一定程度的分泌，可能在一定程度上加大了对 *Z. mobilis* 的影响。所以我们决定首先实现 *bglB* 基因在 *Z. mobilis* 中的表达，而不在表达 *bglB* 的同时去实现外源蛋白的分泌。为此，我们将通过 PCR 得到的 *bglB* 片段和重组质粒 pHW20a-Peno 进行 *HindIII* 和 *BamHI* 双酶切，并对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到重组质粒 pHW20a-Peno-bglB（图 3.5a），并对其进行了 *HindIII* 单酶切鉴定以及 *EcoRI/HindIII* 双酶切鉴定（图 3.5b）

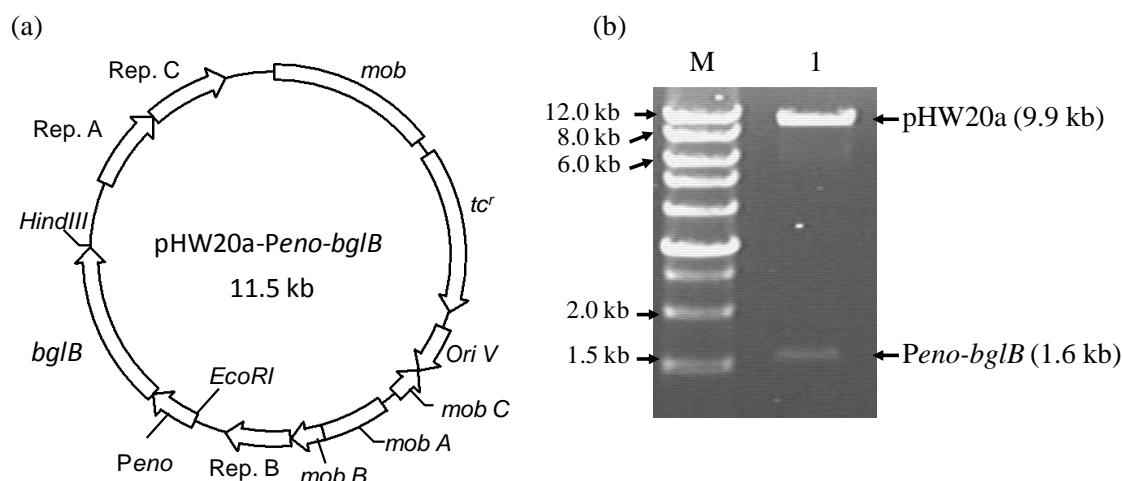


图 3.5 pHW20a-Peno-bglB 的构建与鉴定

Fig. 3.5 Construction and identification of pHW20a-Peno-bglB

(a) Plasmid map of pHW20a-Peno-bglB. (b) Identification of pHW20a-Peno-bglB. Lane M, marker (Wide range DNA ladder); Lane 1, pHW20a-Peno-bglB (*EcoRI* & *HindIII*).

在完成了 pHW20a-Peno-bglB 的构建后，我们依旧按照 3.2.2.4 所示方法，尝试将质粒 pHW20a-Peno-bglB 通过接合转化进入 *Z. mobilis*。但是同样地，经过数次接合转化试验后，我们始终没有得到相应的阳性克隆。可见，在 *Z. mobilis* 中表达外源纤维素酶并不能通过通用的表达策略来实现。对于 *Z. mobilis* 而言，在菌体中进行纤维素酶的分泌表达，可能对菌体本身产生一定的危害，从而抑制菌体的生长甚至直接导致菌体的死亡。其原因首先可能是由于外源蛋白的分泌以及表达，会为 *Z. mobilis* 带来一定的代谢负担，这可能在一定程度地上影响菌体的生长；其次，所表达的纤维素酶可能对 *Z. mobilis* 细胞壁中的肽聚糖产生一定程度的影响，造成菌体细胞壁的损伤从而导致菌体生长受抑制，或者死亡，作为一种不善于表达及分泌外源蛋白的菌种，*Z. mobilis* 可能对外源蛋白所造成的影响更为敏感。

3.3.2 ZMO1086 在 *Z. mobilis* 中的表达

3.3.2.1 ZMO1086 基因的获得和重组菌的构建

为了在 *Z. mobilis* 中实现纤维素酶的表达，我们在上一部分试验中进行了尝试，但是没有取得成功。在 *Z. mobilis* 中高效表达纤维素酶的可能性有待于研究。通过文献我们发现，在 *Z. mobilis* 基因组中存在着一个基因 ZMO1086，虽然在野生型的 *Z. mobilis* 中它的活性极其微弱，接近于一个沉默基因^[176,181]，但是 ZMO1086 在大肠杆菌中通过 pET28a 表达体系进行过表达后，能够体现出一定的纤维素酶活性^[181]，并对羧甲基纤维素 (CMC) 有一定的降解活性。鉴于 ZMO1086 的低表达量无法作为 *Z. mobilis* 中是否能够高效表达纤维素酶的佐证，因此我们尝试在 *Z. mobilis* 中对 ZMO1086 进行过表达，从而研究 *Z. mobilis* 中纤维素酶的表达情况。通过基因组中序列的分析，我们发现 ZMO1086 的 CDS 序列中在其 5' 端含有相应的信号肽序列 (SP1086)，因此我们没有为

ZMO1086 添加额外的信号肽，而是直接使用其自带的信号肽。为了实现 *ZMO1086* 在 *Z. mobilis* 中的过表达，我们将 *ZMO1086* 片段组装在启动子 *Peno* 的下游，并开始进行重组质粒 P-*ZMO1086* (pHW20a-*Peno*-*ZMO1086*) 的构建。首先通过 PCR 扩增，从预先抽提的运动发酵单胞菌基因组中得到 *ZMO1086* 基因片段，该基因全长 1026 bp (图 3.6)。

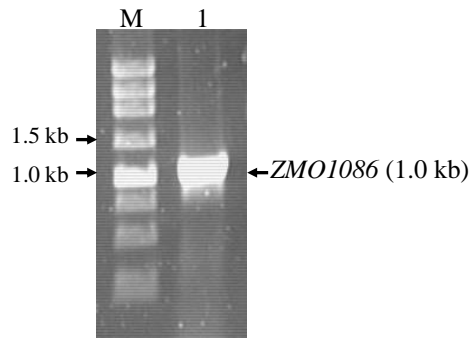


图3.6 *Peno*的PCR产物

Fig. 3.6 PCR fragment of *Peno*

PCR amplification of *ZMO1086*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *ZMO1086* (1.0 kb).

接着对该 *ZMO1086* 片段和之前构建的 pHW20a-*Peno* 质粒进行 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切，酶切体系为。之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组质粒 P-*ZMO1086* (图 3.7a)。在得到了重组质粒后，我们对 P-*ZMO1086* 进行了 *Eco*RI/*Hind*III 双酶切鉴定 (图 3.7b)。

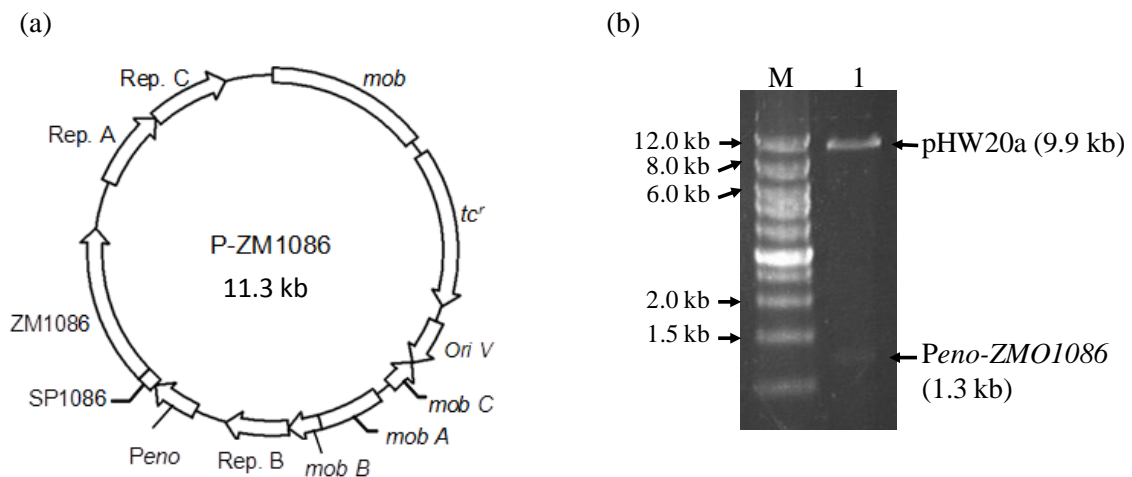


图 3.7 P-*ZMO1086*的构建与鉴定

Fig. 3.7 Construction and identification of P-*ZMO1086*

(a) Plasmid map of P-*ZMO1086*. (b) Identification of P-*ZMO1086*. Lane M, marker (Wide range DNA ladder); Lane 1, pHW20a-*Peno*-*ZMO1086* (*Eco*RI & *Hind*III).

在完成了 P-*ZMO1086* 的构建后，我们依旧按照 3.2.2.4 所示方法，尝试将质粒 P-*ZMO1086* 通过接合转化进入 *Z. mobilis*。接合转化之后，我们得到了相应的阳性克隆，并按照 3.2.2.4

所示的方法对得到的阳性 *Z. mobilis* 克隆进行了鉴定，确认重组质粒 P-ZMO1086 已经成功地转化进入了 *Z. mobilis*，并得到重组菌 *Z. mobilis* ZM4/P-ZMO1086。相较于之前 pHW20a-Peno-NprB-bglB 以及 pHW20a-Peno-bglB 的转化失败，此次转化成功的质粒 P-ZMO1086 和它们使用了相同的启动子，但是其纤维素酶基因和所含的信号肽都是源自 *Z. mobilis* 自身的基因片段。这也在一定程度上表明，在 *Z. mobilis* 中进行内源基因的表达要远比外源基因的表达容易得多。

3.3.2.2 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZMO1086 的酶活测定

在得到了重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZMO1086 后，我们对其胞内及胞外的纤维素酶酶活进行了测定。由于文献报道 ZMO1086 在一定程度上表现出纤维素内切酶活性，因此按照我们首先使用 PASC 作为底物，对其催化活性进行测试。试验中使用 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 作为对照菌株，以 10 g/L 的 PASC 作为酶活反应底物。其中 PASC 的制备方法见本章 3.2.2.7，酶活的定义及测定方法见本章 3.2.2.8，实验结果见表 3.3。

表 3.3 ZMO1086 酶活

Table 3.3 Activity of ZMO1086

Activity (U/mg DCW)	Intracellular	Periplasmic space	Whole cell	Extracellular
Control	0.01	0.00	0.01	0.00
ZMO1086	0.02	0.00	0.02	0.00

PASC was used as the substrate and the enzyme activity was assayed at the condition of pH6 and 50 °C.

从实验结果可以得出，无论是对照菌 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 还是 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZMO1086 所表现出来的酶活都十分的低下，这也表明 ZMO1086 对于 PASC 几乎没有降解活性。而相关的报道也曾经提到过，野生型运动发酵单胞菌会表现出微弱的 CMC 降解活性，而 ZMO1086 在大肠杆菌中进行过表达时也体现出 CMC 的降解活性。因此我们以 10 g/L 的 CMC 作为酶活反应底物，重新对 ZMO1086 的酶活进行测定，试验中同样使用 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 作为对照菌株，酶活的定义及测定方法见本章 3.2.2.8，实验结果见图 3.8。

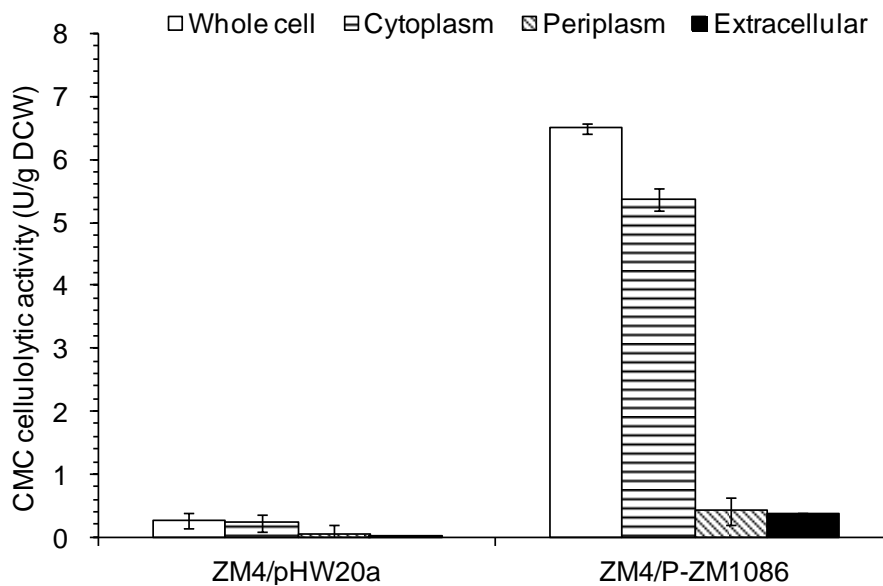


图 3.8 *Z. mobilis* ZM4/P-ZM1086 的 CMC 酶活性

Fig. 3.8 The CMC cellulolytic activity of *Z. mobilis* ZM4/P-ZM1086

The activity was determined by using CMC as the substrate at 30 °C for 1 hour. The strains ZM4/pHW20a was used as the controls.

从实验结果可以发现, *Z. mobilis* ZM4/ P-ZM1086 相较于对照菌拥有相当明显的 CMC 降解活性。对照菌 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 的菌体总酶活只有 0.27 U/g DCW, 而 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZM1086 的菌体总酶活则达到了 6.50 U/g DCW, 提高了大约 25 倍。这个结果首先表明, ZM1086 在重组菌中 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZM1086 得到了正确的表达, 才使得重组菌拥有十分明显的 CMC 降解活性; 其次则说明 ZM1086 本身的催化能力有限, 对于 PASC 就几乎没有降解能力, 仅能以 CMC 为底物表现出催化活性。但是虽然 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZM1086 在总酶活上表现出了明显的提升, 但是胞内的酶活性占了总酶活的约 90 %, 达到了 5.36 U/g DCW。这也说明虽然 ZM1086 蛋白在 *Z. mobilis* ZM4 获得了大量的表达, 但是其蛋白的分布情况却没有因为其自带信号肽而显出很强的分泌能力, 约 90 % 的蛋白都滞留在细胞胞质内; 处于周质空间的蛋白约占总蛋白的 6.31 %, 其酶活力为 0.41 U/g DCW; 而分泌到胞外的蛋白则更加少, 其表现出来的酶活只有 0.38 U/g DCW, 占总蛋白量的 5.90 %。

通过这个实验表明, ZM1086 所自带的信号肽 SP1086 能起到一定的作用, 将少量的蛋白 (约 10 %) 运送到周质空间以及胞外。不过我们也可以看出, 在 *Z. mobilis* 以比较显著的表达量对纤维素酶进行表达是可行的, 但是所表达的纤维素酶的分泌仍旧受到了很大程度的限制。从另一个方面来说, 也很有可能是由于这种较低分泌水平, 才能实现在 *Z. mobilis* 中纤维素酶的表达。在这种情况下, 大部分的纤维素酶蛋白都被保留在细胞胞内, 仅有很少的一部分蛋白会被分泌出去并接触到细胞壁, 保持这种较低蛋白的分泌率才能将纤维素酶对细胞壁的影响程度降到最低。但与此同时, 只有分泌出去的纤

纤维素酶蛋白才能接触到培养基中所含的纤维素底物，并对其降解。也就是说，对于 *Z. mobilis* ZM4/ P-ZMO1086 而言，其所表达的 ZMO1086 蛋白仅有 10 % 能够真正地接触到底物并起到催化降解的作用。

3.3.3 利用信号肽 SP1086 分泌表达 *bglB* 基因

3.3.3.1 PSZ-*bglB* 的构建

通过上一部分的实验，我们确认了在 *Z. mobilis* 中表达纤维素酶的可能性，并且对 ZMO1086 基因进行了过表达。但是由于 ZMO1086 本身的催化能力不强，其在发酵应用中很难真正起到降解纤维质底物的作用。源自多黏芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶基因 (*bglB*) 在所表达的蛋白对纤维二糖具有良好的催化能力，而对纤维二糖的利用能力则能在很大程度上减少发酵过程中纤维二糖酶的使用，从而降低发酵的成本。但是在之前的试验中，*bglB* 在 *Z. mobilis* 中的表达以失败告终。通过 ZMO1086 基因在 *Z. mobilis* 中的成功表达，我们发现 *Z. mobilis* 并不会明显地排斥内源基因的表达，因此我们尝试使用 ZMO1086 的信号肽 SP1086 来代替之前使用的外源信号肽 *NprB*。 *Z. mobilis* 中内源基因的顺利表达，很大程度上可能是因为内源基因由于其部件的同源性，其表达方式和表达量对于 *Z. mobilis* 的生长和代谢不会有太大的影响，而源自 *Z. mobilis* 的信号肽 SP1086 可能也具有合理引导、分布纤维素酶蛋白表达以及定位的能力，使其表达量和分泌情况能被 *Z. mobilis* 所接受；同时信号肽 SP1086 在上一部分试验中也体现出了引导胞内蛋白向胞外分泌的能力。基于这两点，因此我们开始重组质粒 PSZ-*bglB* (pHW20a-Peno-SP1086-*bglB*) 的构建。

试验中，我们首先使用 *pes1* 和 *pes2* 引物通过 PCR 扩增，从质粒 P-ZMO1086 中基扩增 Peno-SP1086 片段。接着对该片段和载体质粒 pHW20a 进行 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切。之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组载体 pHW20a-Peno-SP1086。接着通过 *bgl1* 和 *bgl2* 引物通过 PCR 从多粘芽孢杆菌基因组中扩增得到 *bglB* 基因片段，然后和 pHW20a-Peno-SP1086 同时进行 *HindIII* 和 *BamHI* 双酶切。之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组载体 PSZ-*bglB* (pHW20a-Peno-SP1086-*bglB*)。在得到了重组质粒后，我们对 PSZ-*bglB* 进行了 *EcoRI/HindIII* 双酶切鉴定 (图 3.9)。

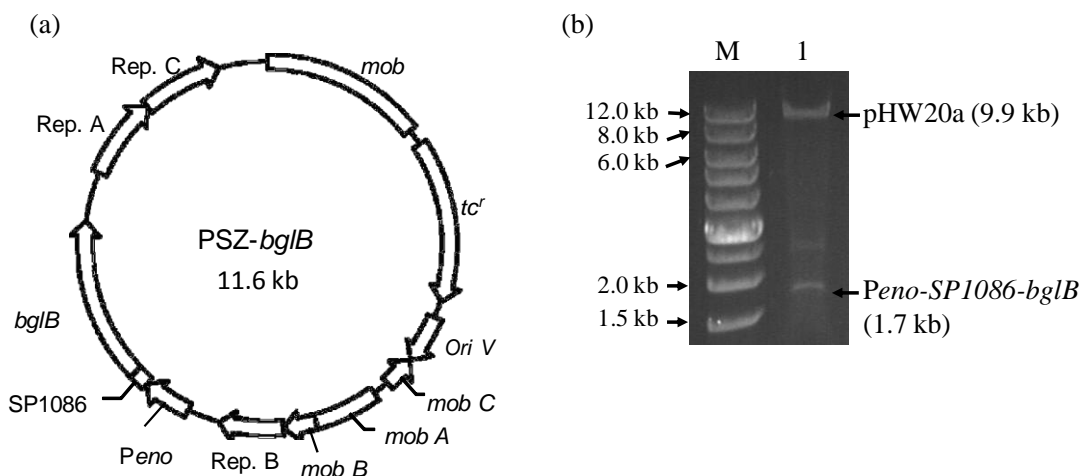


图 3.9 PSZ-*bglB* 的构建与鉴定

Fig. 3.9 Construction and identification of PSZ-*bglB*

(a) Plasmid map of PSZ-*bglB*. (b) Identification of PSZ-*bglB*. Lane M, marker (Wide range DNA ladder); Lane 1, PSZ-*bglB* (*EcoRI* & *HindIII*).

在完成了 PSZ-*bglB* 的构建后，我们同样使用接合转化的方法尝试将质粒 PSZ-*bglB* 通过接合转化进入 *Z. mobilis*。接合转化之后，我们得到了相应的阳性克隆，并按照对得到的阳性 *Z. mobilis* 克隆进行了鉴定，确认重组质粒 PSZ-*bglB* 已经成功地转化进入了 *Z. mobilis*，并得到重组菌 *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB*。在之前的试验中，和该重组质粒使用相同启动子和目的基因的重组质粒 pHW20a-*Peno-NprB-bglB* 在接合转化的尝试中没有获得成功，而将其外源信号肽 *NprB* 替换成内源信号肽 *SP1086* 后，则成功地通过结合转化获得了目的重组 *Z. mobilis*。该结果表明，*bglB* 作为一种外源的纤维素酶基因片段，并非不能在 *Z. mobilis* 中进行表达，但是必须在内源性信号肽的介导下进行。其原因可能就是由于内源性的信号肽才能更好地引导蛋白在细胞中的分泌，使纤维素酶蛋白在细胞中的分布情况趋于合理，并把对菌体的影响降低到最低。

3.3.3.2 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 的酶活测定

在得到了重组菌 *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* 后，我们对其胞内及胞外的 β -葡萄糖苷酶酶活进行了测定。试验中使用 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 作为对照菌株，以 pNPG 作为酶活反应底物，酶活的定义及测定方法见本章 3.2.2.8，实验结果见图 3.10。

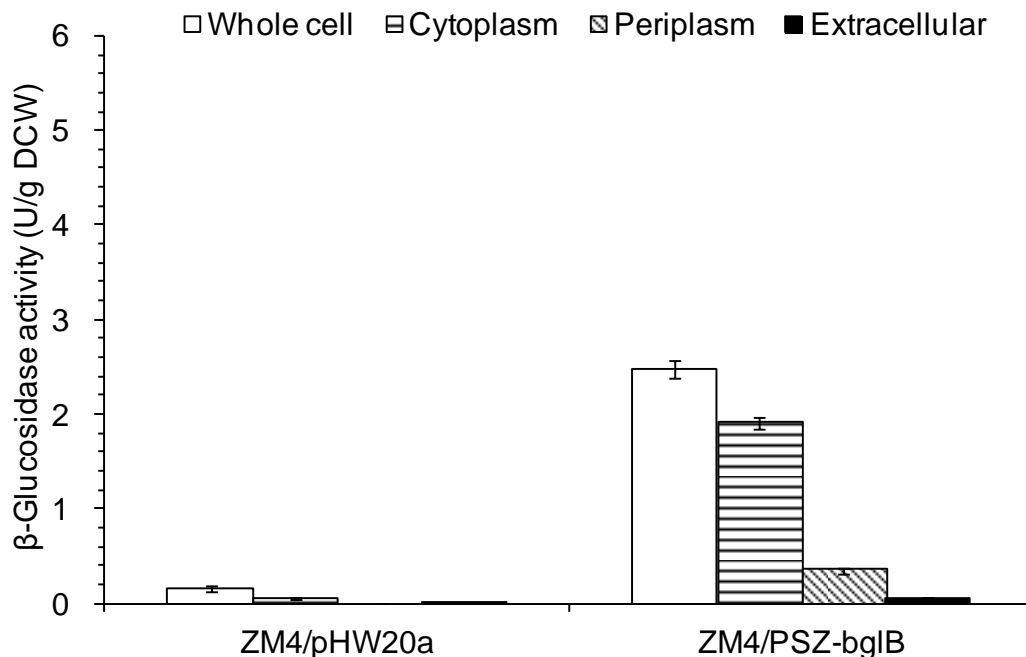


图 3.10 *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* 的 pNPG 酶活性

Fig. 3.10 The β -glucosidase activity of *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB*

The activity was determined by using pNPG as the substrate at 37 °C for 15 min. The strains *Z. mobilis*

ZM4/pHW20a was used as the controls.

从实验结果很明显地可以看出,重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 体现出了相当明显的 β -葡萄糖苷酶酶活, 菌体总酶活达到了 2.48 U/g DCW。作为对照菌的 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 的菌体总酶活则只有 0.16 U/g DCW, 几乎可以认为没有活性。这也与野生型的 *Z. mobilis* 无法代谢利用纤维二糖的表型相符合。重组菌中显而易见的 β -葡萄糖苷酶酶活也表明 *bglB* 基因在 *Z. mobilis* 中获得了正确的表达。从该结果可以看出, *bglB* 可以在 *Z. mobilis* 中表达, 而且能够在 *Z. mobilis* 中积累到一定的活性。这说明 SP1086 的确能够合理地介导蛋白进行正确的分泌, 从而使 *Z. mobilis* 能够承受外源蛋白过量表达所带来的对菌体的负担和影响。如果脱离了内源性信号肽的介导, 表达的外源蛋白可能会由于不合理的过量表达而使蛋白对菌体造成伤害, 并最终导致无法获得含有目的质粒的重组 *Z. mobilis*。

Z. mobilis ZM4/ PSZ-*bglB* 在表现出过量 β -葡萄糖苷酶活性的同时, SP1086 的介导也起到了一定的分泌作用。大约 80 % 的蛋白仍旧存在于细胞内的胞质中, 胞内蛋白所表达的酶活达到了 1.91 U/g DCW。BglB 蛋白的分泌主要是从胞内向周质空间的转移, 周质空间中所含蛋白所表现出来的 β -葡萄糖苷酶酶活为 0.35 U/g DCW, 占细胞总酶活的 14.11 %。分泌到胞外的蛋白所表现出来的 β -葡萄糖苷酶酶活为 0.05 U/g DCW, 占总酶活的 2.02 %。从其他 *Z. mobilis* 相关的外源纤维素酶表达改造结果来看^[9, 111-175], 成功地在 *Z. mobilis* 中进行了外源纤维素酶基因的分泌表达的实验通常都使用了内源性的信号肽或者表达部件 (*gfor* 基因的信号肽、ZMO0130 基因的信号肽、ZMO0331 基因的信号肽等); 还有一类表达成功的实验则是在 *Z. mobilis* 中表达外源的羧甲基纤维素酶 (CMCase), 这种可能是由于该种酶蛋白的催化活性与 *Z. mobilis* 本身所具有的纤维素酶相似, 从而更容易在 *Z. mobilis* 中进行表达。但是该种表达通常都只限于胞内, 没有内源信号肽的介导, 外源纤维素酶很难在 *Z. mobilis* 中实现分泌表达。而本实验也同样证明, 内源性信号肽 SP1086 对于 *bglB* 基因的表达是必不可少的。

3.3.4 利用果聚蔗糖酶 (SacB) 构建融合蛋白分泌表达 *bglB* 基因

3.3.4.1 融合蛋白 SacB-BglB 的构建及重组菌的构建

运动发酵单胞菌的底物利用范围较为狭窄, 仅限于葡萄糖、果糖和蔗糖。葡萄糖和果糖作为单糖, 可以通过渗透作用直接穿过细胞膜进入细胞, 并被细胞所利用。但是蔗糖作为双糖, 理论上是无法通过渗透作用进入运动发酵单胞菌菌体的, 而目前也没有明确的转运机制被确认为专门用于蔗糖的转运。与之相对应的, 运动发酵单胞菌自身拥有三种不同的蔗糖酶 (SacA、SacB 和 SacC), 在利用蔗糖的过程中利用中发挥着重要的作用^[186-193]。其中果聚蔗糖酶 SacB 和蔗糖酶 SacC 起到最主要的功能。由于蔗糖无法跨膜, 因此运动发酵单胞菌的蔗糖酶想要分解并利用蔗糖, SacB 和 SacC 必然需要有一定的胞外活性才能发挥作用。不过就目前的基因组信息来看, *sacB* 和 *sacC* 的基因序列中均没有发现信号肽或类似的片段, 因此关于蔗糖酶在运动发酵单胞菌中如何穿膜并表达

的机制目前仍旧不清楚。但是在运动发酵单胞菌对于蔗糖酶必然存在着相关的分泌或者转运机能，这也为我们提供了一定的思路。由于蔗糖是运动发酵单胞菌仅能利用的三种底物之一，其代谢的速率虽然不如葡萄糖和果糖，但也能被菌体较快地进行利用，因此蔗糖酶在运动发酵单胞菌中必然有着相对较高的表达和分泌水平。基于此，本实验选择了果聚蔗糖酶 *SacB*，并尝试将其和外源 β -葡萄糖苷酶蛋白 *BglB* 进行融合表达，藉由 *SacB* 较好的表达以及分泌水平，在运动发酵单胞菌中实现外源 β -葡萄糖苷酶蛋白 *BglB* 的分泌表达。

试验中，为了构建融合蛋白，我们首先利用重叠延伸 PCR 的方法，将 *sacB* 基因和 *bglB* 基因融合在一起（图 3.11）。

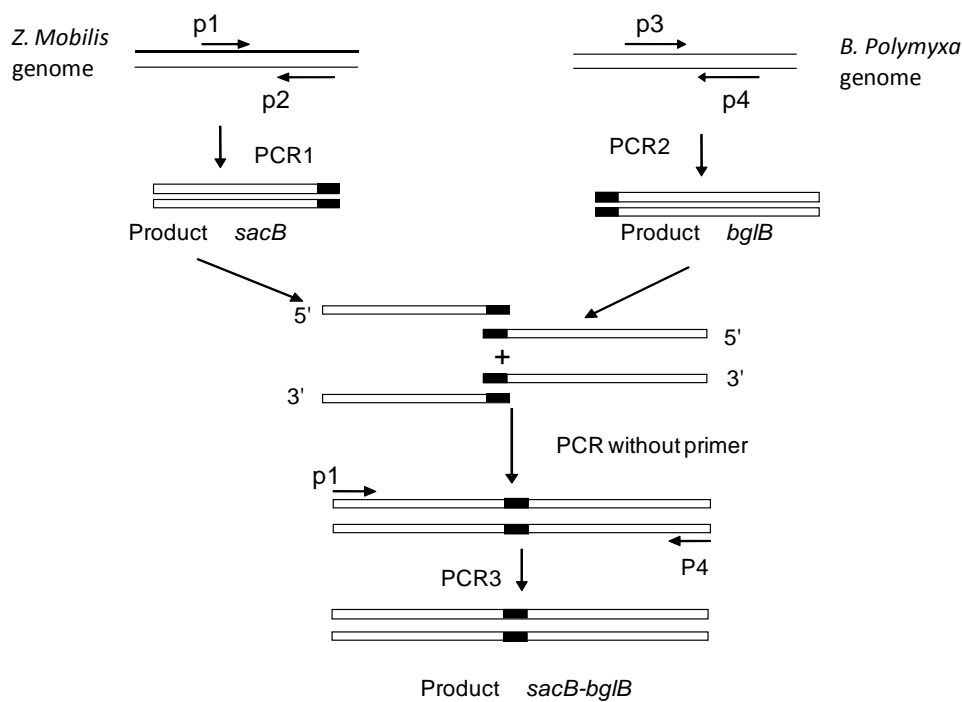


图 3.11 重叠延伸 PCR 流程图

Fig. 3.11 Map of Overlap PCR

首先，我们用引物 p1 和 p2 从运动发酵单胞菌基因组中通过 PCR 扩增得到 *sacB* 片段；同时用引物 p3 和 p4 从多粘芽孢杆菌基因组中通过 PCR 的方法扩增得到 *bglB* 片段。接着分别以上一步的两个产物 *sacB* 片段和 *bglB* 片段为共同模板，以引物 p1 和 p4 进行 PCR 扩增，并最终得到融合基因 *sacB-bglB* 片段，该片段大小约 2.7 kb（图 2.12）。其中的 *sacB* 和 *bglB* 基因之间的重叠延伸片段为 GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT，翻译成蛋白后表达为 7 个甘氨酸，并以此作为 *SacB* 和 *BglB* 两个蛋白的桥接片段。

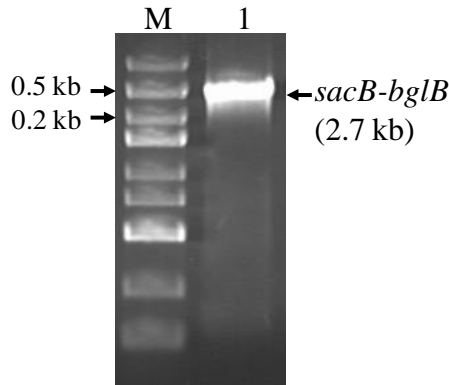


图 3.12 *sacB-bglB* 片段

Fig. 3.12 PCR fragment of *sacB-bglB*

PCR amplification of *sacB-bglB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *sacB-bglB* (2.7 kb).

在得到 *sacB-bglB* 片段后，我们将其和之前构建的重组质粒 pHW20a-Peno 进行 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切。之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组质粒 PB-*bglB* (pHW20a-Peno-*sacB-bglB*)。在得到了重组质粒后，我们对 PSZ-*bglB* 进行了 *Eco*RI/*Hind*III 双酶切以及 *sacB-bglB* 片段的 PCR 鉴定（图 3.13）。

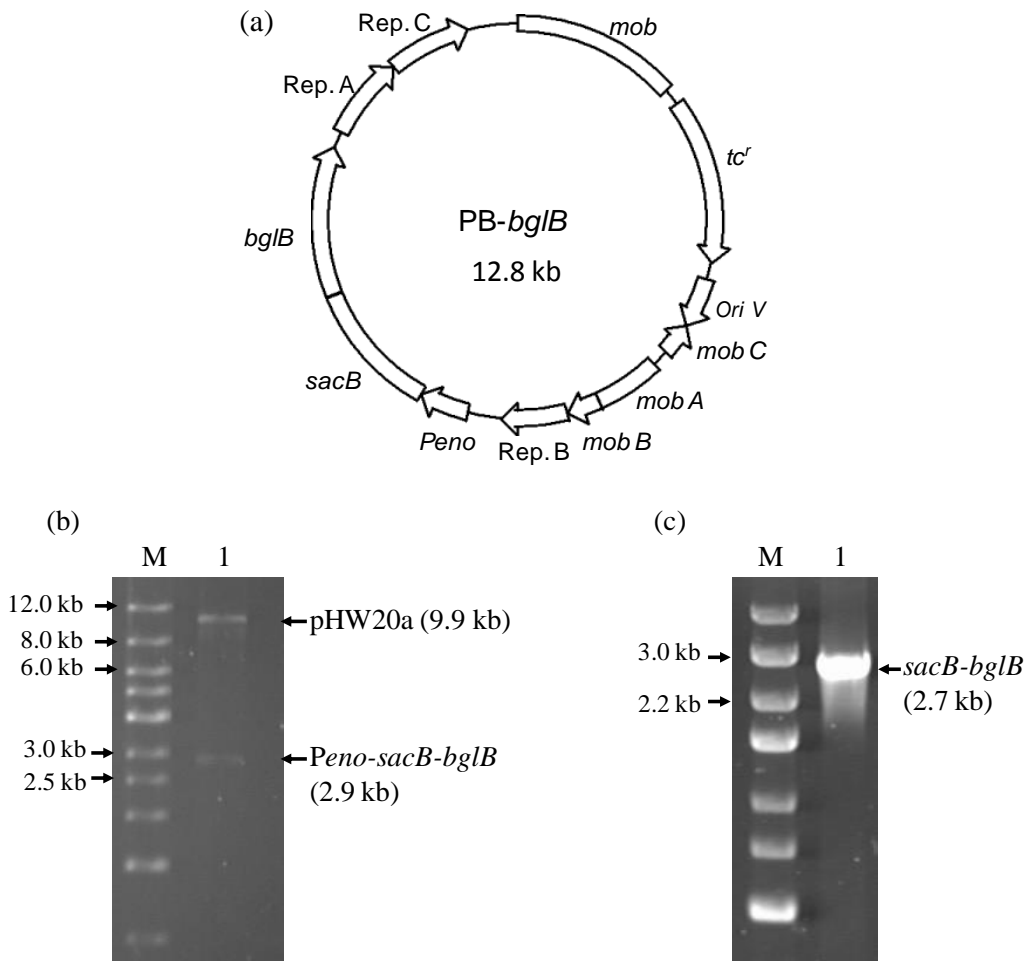


图 3.13 PB-*bglB* 的构建与鉴定

Fig. 3.13 Construction and identification of PB-*bglB*

(a) Plasmid map of PB-*bglB*. (b) Identification of PB-*bglB*. Lane M, marker (Wide range DNA ladder); Lane 1, PSZ-*bglB* (*EcoRI* & *HindIII*). (c) PCR identification of *sacB-bglB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *sacB-bglB* (2.7 kb).

在完成了 PB-*bglB* 的构建后，我们通过接合转化的方法，试将重组质粒 PB-*bglB* 通过接合转化的方法转化进入 *Z. mobilis*，并通过筛选得到了相应的阳性克隆，同时按照 2.2.2.4 所示的方法对得到的阳性 *Z. mobilis* 克隆进行了鉴定，确认了重组质粒 PSZ-*bglB* 已经成功地转化进入了 *Z. mobilis*，从而得到重组菌 *Z. mobilis* ZM4/PB-*bglB*。该重组菌的成功构建，说明除了使用 *Z. mobilis* 内源基因的信号肽来表达外源纤维素酶基因之外，我们还可以通过融合蛋白的方式来介导外源纤维素酶基因的表达。内源的信号肽可能是通过介导外源蛋白合理地表达、分泌以使外源纤维素酶的分泌表达对重组 *Z. mobilis* 的影响降低。而融合蛋白的表达成功，可能是由于借助了内源性蛋白本身对 *Z. mobilis* 的亲合性以及其在 *Z. mobilis* 中适度的表达特性。由于是融合蛋白，外源的目的蛋白会随着内源的蛋白一同进行表达，使其表达量能一直维持在 *Z. mobilis* 的可接受范围之内。

3.3.4.2 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 的酶活测定

在得到了重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 后，我们同样地对重组菌的胞内及胞外的 β -葡萄糖苷酶酶活进行了测定。和上一个 β -葡萄糖苷酶酶活测定实验相似，本试验中也使用 *Z. mobilis* ZM4/pHW20a 作为对照菌株，并将同样表达 *bglB* 基因的 *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* 的酶活作为对比。试验中以 pNPG 作为酶活反应底物， β -葡萄糖苷酶酶活的测定、以及相关酶活的测定方法见本章 3.2.2.8，实验结果见图 3.14。

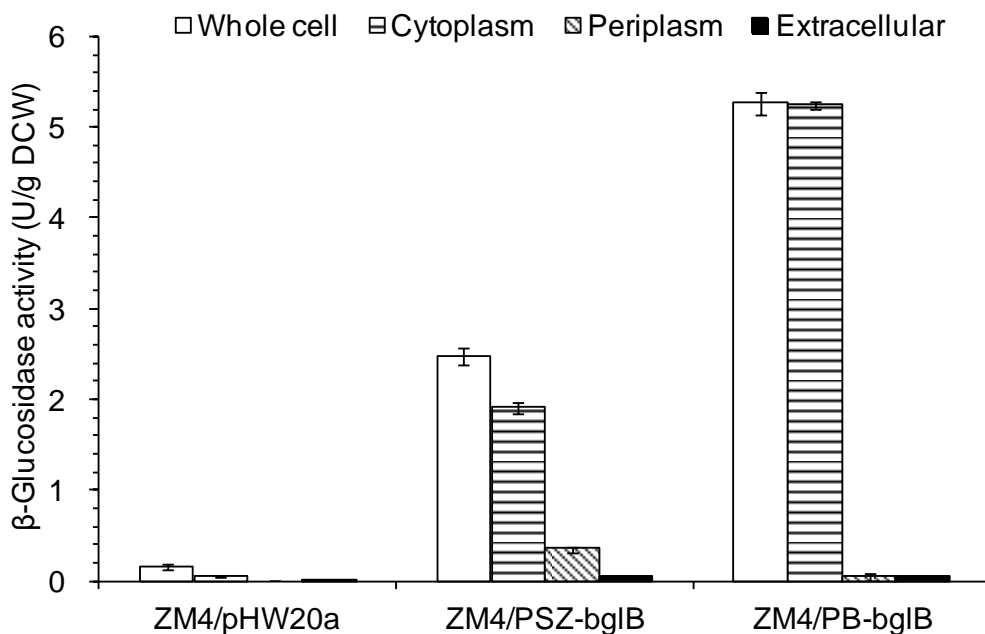


图 3.14 *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* 和 *Z. mobilis* ZM4/PB-*bglB* 的 β -葡萄糖苷酶酶活测定

Fig. 3.14 β -Glucosidase activity of the strain *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* and ZM4/PB-*bglB*.

The glucosidase activity was determined using *p*NPG as substrate at 37 °C for 15 min. The strain ZM4/pHW20a was used as the control.

从实验结果中我们可以看出，表达融合蛋白的重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 菌体总酶活达到了 5.26 U/g DCW，比使用内源信号肽 *SP1086* 表达 *bglB* 基因的重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 的总酶活（2.48 U/g DCW）高了 1 倍。由此可以推测，融合蛋白 *sacB-bglB* 中果聚蔗糖酶 *SacB* 的高表达，很可能也促进了与之融合的 *BglB* 的表达，从而导致了重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 总酶活的大量提升。但是和显著提升的酶活总量不同的是，其目的纤维素酶蛋白的分泌却有明显的下降。周质空间中的蛋白所测得的酶活仅为 0.05 U/g DCW，占总酶活的 1.0 %；而胞外蛋白所表现出的酶活为 0.06 U/g DCW，占总酶活的 1.1 %。显然，*Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 中 *BglB* 的分泌率远低于在 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 中的情况（14.11 %转运到周质空间、2.02 %分泌到胞外）。而从分泌量来看，虽然 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 中的总酶活仅为 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 的一半，但是其周质空间的蛋白酶活达到 0.35 U/g DCW，数倍于 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 周质空间中的酶活量；而两种重组菌的胞外酶活量则十分的相近。这个结果表明，使用融合蛋白来表达外源纤维素酶的策略虽然可行，并且能够取得更高的酶活表达量，但是总体上该种重组菌更倾向于将表达的纤维素酶蛋白保留在胞质之中，而非高效地进行分泌。换言之，在如此高的表达量下，如果融合蛋白能够同时进行大量的分泌，那么这些分泌出来的带有纤维素酶活性的蛋白很有可能对宿主菌的细胞壁形成一定程度的损害，从而影响菌体的生长；抑或大量的纤维素酶蛋白的分泌和表达，将会对宿主菌带来严重的代谢负担，并同样对菌体带来不利的影响。

3.3.5 重组菌利用纤维二糖进行乙醇发酵尝试

在得到了分泌表达 *bglB* 基因的重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 和 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 后，我们确认了它们菌体中 β -葡萄糖苷酶的表达，并尝试将它们应用于实际的 CBP 发酵过程中。试验中我们使用 RM 培养基作为发酵的培养基，并向其中额外加入 10 g/L 的纤维二糖作为碳源，*Z. mobilis* ZM4/ pHW20a 作为对照菌株。*Z. mobilis* ZM4 的具体的发酵条件及操作参见本文 3.2.2.9 章节，发酵试验重组菌对纤维二糖的利用结果见图 3.15，重组菌的葡萄糖代谢、生长和乙醇发酵结果见表 3.4。

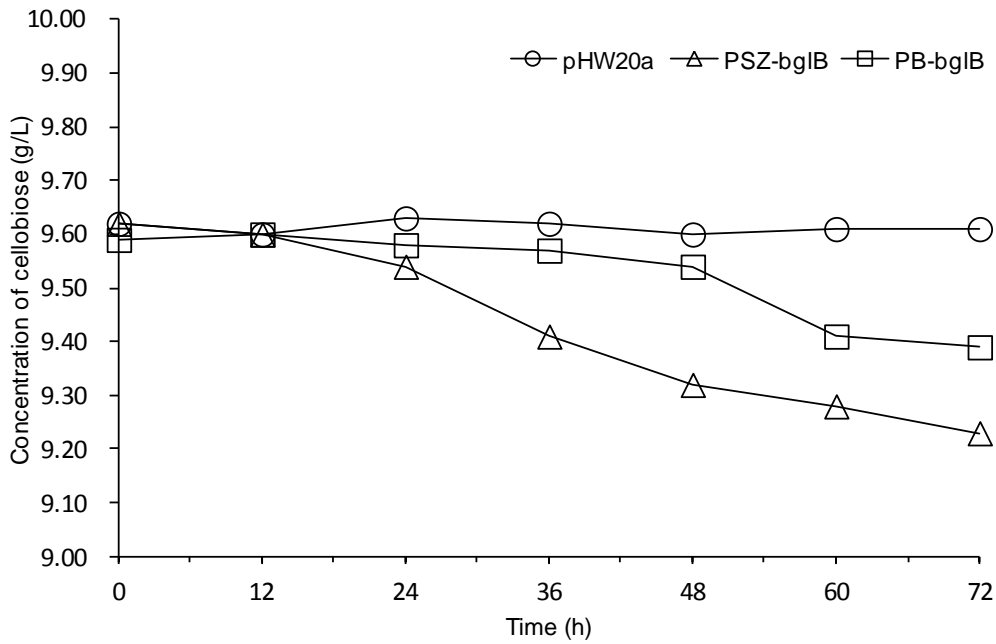


图 3.15 重组菌对纤维二糖的利用

Fig. 3.15 Cellobiose utilization of recombinant strain *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* and ZM4/PB-*bglB*.

The cellobiose utilization of recombinant strain *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* and ZM4/PB-*bglB* in RM medium with 10 g/L cellobiose. ZM4/pHW20a was used as the control strain. Circle for cellobiose concentration of *Z. mobilis* ZM4/pHW20a, triangle for *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* and square for *Z. mobilis* ZM4/PB-*bglB*.

表 3.4 重组菌纤维二糖发酵试验

Table 2.4 Fermentation of *Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* and ZM4/PB-*bglB*

Time (h)	ZM4/PSZ- <i>bglB</i>			ZM4/PB- <i>bglB</i>			ZM4/pHW20a		
	Glucose	Ethanol	OD _{600nm}	Glucose	Ethanol	OD _{600nm}	Glucose	Ethanol	OD _{600nm}
0	8.10	0.00	0.10	8.11	0.00	0.08	8.07	0.00	0.09
12	7.61	0.52	0.23	7.50	0.21	0.12	7.55	0.52	0.29
24	0.73	3.65	1.18	0.32	3.73	0.95	0.68	3.85	1.19
36	0.04	3.66	1.30	0.07	3.58	1.02	0.04	3.66	1.34

从发酵试验中我们发现，两株重组菌在生长、葡萄糖代谢和乙醇生产方面没有显著的区别，重组菌的生长稍微有些迟滞，这可能是由于其中外源蛋白的表达所带来的代谢负担，以及纤维素酶的分泌表达对菌体带来的损害所致。不过重组菌菌体生长的形态有明显的变化，对照菌 *Z. mobilis* ZM4/ pHW20a 的菌液中，菌体为均匀的细粉末状；但是

重组菌的菌体在培养基中则呈现碎块状，且比较容易堆积絮凝。这很有可能是因为纤维素酶的表达对菌体的细胞壁产生了一定的影响所导致的细胞形态变化。而从发酵的结果来看，重组菌对纤维二糖的利用能力并不显著。虽然纤维二糖可以穿过细胞壁而被周质空间中的纤维素酶蛋白接触并降解，但是对于重组菌而言，分泌效果较好的 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 也仅仅实现了大约 20 % 左右的酶蛋白的分泌，*Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 的分泌率则仅为 10 % 左右，而其分泌表达量也低于 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB*。实验结果也表现出相同的趋势，*Z. mobilis* ZM4/PSZ-*bglB* 消耗了大约 0.4 g/L 纤维二糖，而 *Z. mobilis* ZM4/PB-*bglB* 消耗了大约 0.2 g/L 纤维二糖，对照菌 *Z. mobilis* ZM4/ pHW20a 由于没有额外的 β -葡萄糖苷酶表达，因此对于纤维二糖没有任何利用。

从结果来看，重组菌对于纤维二糖的利用效果并不理想，所代谢的额外的纤维二糖量也没有带来明显的乙醇生产的提升。这主要还是由于 β -葡萄糖苷酶 *BglB* 在运动发酵单胞菌中的分泌效果不理想，从而导致重组菌所产生的纤维素酶无法有效地接触到底物并降低了降解效果；同时，运动发酵单胞菌中外源纤维素酶的表达量也可能是导致该结果的一个原因，限于运动发酵单胞菌本身的分泌表达性能并不优秀，较低的蛋白表达水平也在一定程度上削弱了重组菌对纤维质底物的利用能力。

3.4 小结

运动发酵单胞菌作为一种出色的乙醇生产菌株，其狭窄的底物利用范围以及无法降解利用纤维质材料的特性限制了它在实际发酵中的应用。因此，如果能对运动发酵单胞菌进行针对性地改造，使其能在纤维质原料的生物炼制过程中有更好的发酵表现，将具有很大的实用意义和经济价值。但是运动发酵单胞菌在基因工程改造中却显得十分不友好，外源基因的导入和表达都十分的困难，许多研究也围绕着这一点开展，试图构建一个稳定的基因改造平台。

在试验中，我们对运动发酵单胞菌的纤维素酶分泌表达能力进行了研究和探索，并依据实验结果，发现并确认了几种可以实现的纤维素酶分泌表达策略。在实验的一开始，我们尝试使用一种普片的分泌表达方法，利用信号肽 *NprB* 尝试在运动发酵单胞菌中实现外源纤维素酶 *bglB* 基因的分泌表达，但是没有获得成功。我们推测运动发酵单胞菌可能对纤维素酶的表达比较敏感，且其菌体在该种表达情况下可能会受到损害。因此我们在运动发酵单胞菌中过表达了内源纤维素酶基因 *ZMO1086*，确认了在运动发酵单胞菌中表达纤维素酶的可能性并研究了它的表达情况，决定采用 *ZMO1086* 的信号肽来分泌表达 *bglB* 基因。这种方法获得了成功，也在一定程度上展示了内源信号肽对于外源纤维素酶基因表达的重要性，它可能会以一种更合理、更能被宿主菌接受的形式对纤维素酶的基因进行表达，最大程度地避免该过量表达对菌体带来的损伤。与此同时，我们还发现，将 *bglB* 基因和运动发酵单胞菌中的果聚蔗糖酶基因 *sacB* 进行融合，就能够以融合蛋白的形式实现 *bglB* 在运动发酵单胞菌中的分泌表达，并且能够获得一个比较高的表达量。不过重组菌代谢利用纤维素的一个前提条件就是纤维素酶的分泌表达，而

在这一方面重组菌做的并不好。在 *SP1086* 的介导下，重组菌实现了大约 20 % 的酶蛋白从胞内向周质空间以及胞外的转运，而以融合蛋白策略进行表达的情况下，仅有 10% 左右的蛋白实现了分泌。低下的分泌率也使得在接下来的利用纤维二糖发酵产乙醇的实验没有获得理想的实验结果。

通过实验，我们发现了不同的在运动发酵单胞菌中分泌表达纤维素酶的方法，并通过重组菌的构建验证、实现了这些方法的可行性和实用性。为在运动发酵单胞菌中进行外源纤维素酶的表达提供了一定的思路和借鉴。同时，在试验中构建完成的重组菌 *Z. mobilis* ZM4/ PB-*bglB* 和 *Z. mobilis* ZM4/ PSZ-*bglB* 初步具有了 CBP 菌株的特性，虽然发酵性能仍旧有待提高，但是相关的改造思路和改造工具的确立则为以后的工作奠定了基础。

第四章 耐热型 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达研究

4.1 前言

β -葡聚糖是广泛存在于细菌、真菌以及植物诸如大麦、小麦、燕麦、水稻等稻谷类农作物细胞壁中的一种多糖^[194]。在稻谷类农作物细胞壁中，D-葡萄糖单体通过 β -1,3 和 β -1,4 糖苷键连接，形成 β -1,3-1,4-葡聚糖并构成细胞壁的一部分^[195]。这些农作物组分作为生物质原料的重要来源，除了日常的食用之外，也经常被用于许多其他诸如酒精酿制等生产领域。但是在酿制的过程中，原材料加工处理后残余的 β -葡聚糖通常会导致产品产生沉淀并增加其凝胶化程度，对于产品的纯化和储存都非常的不利。为了解决生产过程中由 β -葡聚糖所导致的问题，人们普遍在原料碾磨和发酵过程中添加 β -葡聚糖酶，用以降解 β -葡聚糖^[196,197]。此外，加工该种原料制作饲料等产品时，其中的 β -葡聚糖由于不易被消化，掺杂在饲料中容易导致被喂养的动物产生消化道方面的问题，因此在这些过程中 β -葡聚糖酶的应用也非常的广泛^[198]。

β -1,3-1,4-葡聚糖酶是一种内切葡聚糖酶，能特异性地水解 β -1,3-1,4-糖苷键，对纤维素中通过 β -1,4 或 β -1,3 糖苷键连接形成的葡聚糖则没有催化效果^[199]。自身能够产生 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的微生物有许多，比如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[200]、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)^[201]、球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*)^[202]、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)^[203]、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)^[204,205]、产琥珀丝状杆菌 (*Fibrobacter succinogenes*)^[206]、嗜热拟青菌 (*Paecilomyces thermophila*)^[207]、嗜热毛壳菌 (*Chaetomium thermophilum*)^[208]以及热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*)^[194]等。在实际的工艺应用中，一般的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶也存在着许多自身的不足。源自芽孢杆菌属的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶其最适反应温度一般都低于 50 °C，而且无法在较高的温度中维持酶蛋白的活性，在酒精酿造等一些需要经历高温过程的工艺中这些酶便很难保持活性；而源自嗜热菌嗜热毛壳菌 (*Chaetomium thermophilum*)^[208]和嗜热拟青菌 (*Paecilomyces thermophila*)^[207]的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶虽然最适反应温度较高，达到 50-70 °C，但是在它们的热稳定性并不好，这种条件的高温下很容易失活。同时他们并不广泛的反应 pH 范围 (pH 4-7) 也使得他们在许多工业应用中受到了限制。因此如何获得具有更优秀的耐热性以，同时对较广范围的催化条件具有更好适应性的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶，就能对相关的工艺进行更好的完善。此外，为这种生物酶寻找一种高产且能进行分泌表达的宿主菌，对于该生物酶的应用、纯化甚至直接的 CBP 发酵都能带来极大的帮助。

本论文将源自热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum* DSM 1237) 的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因 (*licB*) 进行了克隆表达，并通过穿梭载体 pP43JM2^[153]在具有良好分泌性能的枯草芽孢杆菌改造株 *Bacillus subtilis* WB800 (缺失八种胞外蛋白酶)^[209]中进行了分泌表

达。接着通过进一步的实验，对重组菌 *B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB* 所分泌表达的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的分泌性、酶学特性、耐热性、最适 pH 范围、金属离子影响等各项指标进行了研究，证明了在该种表达策略下，实现了耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的高效分泌表达，且所表达的酶蛋白拥有良好的耐热性能和较高的催化性能，并在一个广泛的 pH 范围内都能表现出良好的酶活。该重组菌的构建使得我们能够利用重组微生物，通过廉价的生物发酵得到拥有良好性能的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶，为相关酶的生产 and 应用提供了新的思路。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

4.2.1.1 菌株和质粒

热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*, DSM 1237) 购自德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)，枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* WB800) 由张以恒教授实验组 (Virginia Polytechnic Institute and State University, USA) 慷慨惠赠，大肠杆菌 DH5 α 用于基因克隆和质粒构建等基因操作。实验中所使用的菌株和质粒具体见表 4.1。

表 4.1 菌株及质粒

Table 4.1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ ,mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1.	Stored in lab
<i>B. subtilis</i> WB800	<i>nprE</i> , <i>aprE</i> , <i>epi</i> , <i>bpr</i> , <i>mpr</i> :: <i>ble</i> , <i>nprB</i> :: <i>bsr</i> , Δ <i>vpr</i> , <i>wprA</i> :: <i>hyg</i> .	[209]
<i>C. thermocellum</i> DSM1237	Wild type.	DSMZ
Plasmids		
pP43JM2	Km ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector.	Stored in the lab ^[153]
pP43JM2- <i>licB</i>	Secretively-express <i>licB</i> with promoter P43 and signal peptide <i>NprB</i> in <i>B. subtilis</i> .	In this study

4.2.1.2 实验试剂

β -1,3-1,4-葡聚糖 (β -1,3-1,4-glucan) 购自南京化学试剂公司 (Nanjing, China); 实验中所用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司 (Vilnius Lithuania); DNA 分子量标品、蛋白质分子量标品、rTaq 及 Primer STAR HS DNA 聚合酶购自日本 Takara

大连分公司 (Dalian, China); 基因组抽提试剂盒 (Bacterial DNA Kit) 购自 Omega 生物公司 (Norcross, GA, USA); 质粒小量制备试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 购自上海捷瑞生物工程公司 (Shanghai, China); PCR 产物纯化试剂盒 (PCR Purification Kit) 购自上海生工生物工程公司 (Shanghai, China); 胰蛋白胨 (Tryptone) 和酵母提取物 (yeast extract) 购自 Oxoid 公司 (Cambridge, UK); 卡那霉素 (Kanamycin, Km)、氨苄青霉素 (Ampicilin, Amp)、十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS)、溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA); 西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain) 购自比利时 Acros Organics 公司 (Geel, Belgium); 其他试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自上海国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。实验中使用的引物在上海捷瑞生物工程有限公司进行引物合成。

4.2.1.3 实验仪器

实验中所使用的仪器见表 2.2。

4.2.1.4 菌种的培养及保存

大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的培养均采用 LB (Luria broth) 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl 以及 5 g/L 酵母提取物。如果需要配置琼脂固体培养基, 则添加 15 g/L 的琼脂。培养基成分添加完成后用 5 M NaOH 调节 pH 值到 7.0, 并在 115 °C 条件下灭菌 20 min。如需要使用含有抗生素的液体培养基, 则在接入菌体前按所需浓度加入相应的抗生素。氨苄青霉素的使用浓度为 100 µg/ml、卡那霉素使用浓度为 50 µg/ml。如果需要使用含有抗生素的琼脂固体培养基, 则待含有琼脂的培养基冷却至 60 °C 左右时, 按所需浓度加入相应的抗生素, 摇晃均匀后等待培养基凝固, 并置于 4 °C 避光保存。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的培养条件如无特殊说明, 液体培养均是在摇床中以 37 °C, 220rpm 条件进行培养; 琼脂固体培养基培养均是将涂布有菌体的平板放置于 37 °C 恒温培养箱中进行培养。

热纤梭菌的培养所采用的培养基^[210]: 1.5 g/L KH₂PO₄, 2.9 g/L K₂HPO₄, 2.1 g/L Urea, 1 g/L MgCl₂ 6H₂O, 150 mg/L CaCl₂ 2H₂O, 1.25 mg/L FeSO₄ 6H₂O, 0.5 g/L L-谷胱甘肽, 5 g/L 纤维二糖, 10 g/L Morpholinopropane sulfonic acid, 6.0 g/L 酵母提取物, 3 g/L 柠檬酸钠。培养基成分添加完成后用 5 M NaOH 调节 pH 值到 7.0, 并在 115 °C 条件下灭菌 20 min。热纤梭菌在 60 °C 的厌氧条件下进行培养。

大肠杆菌感受态细胞制备所用的培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl 以及 5 g/L 酵母提取物, 10 mM MgSO₄ 以及 2 g/L 葡萄糖。培养基成分添加完成后用 5 M NaOH 调节 pH 值到 7.0, 并在 115 °C 条件下灭菌 20 min。

枯草芽孢杆菌感受态细胞制备所用的培养基: SP-A 盐溶液: 4 g/L (NH₄)₂SO₄, 28 g/L K₂HPO₄ 3H₂O, 12 g/L KH₂PO₄, 2g/L 柠檬酸钠; SP-B 盐溶液: 0.4 g/L MgSO₄ 7H₂O; 100×CAYE 溶液: 20 g/L 酪氨酸, 100 g/L 酵母提取物。培养基成分添加完成后在 115 °C 条件下灭菌 20 min。之后通过将 9.8 mL SP-A 盐溶液、9.8 mL SP-B

盐溶液、200 μL (1 % V) 葡萄糖溶液以及 200 μL 100 \times CAYE 溶液混合配制成 20 ml SPI 培养基；将 5.88 ml SP I 培养基、60 μL (1 % V) 50 mM CaCl_2 溶液以及 60 μL (1 % V) 250mM MgCl_2 溶液混合配制成 6 ml SP II 培养基。

实验中对所需菌种进行保种的操作方法：在超净工作台将 800 μL 培养到对数生长期的菌液与 800 μL 60 % 无菌甘油混合均匀，装入预先灭菌的冻存管中，保存于 -80°C 超低温冰箱中。

4.2.1.5 实验试剂及溶液配制

氨苄青霉素贮存液：称取 1.00 g 氨苄青霉素粉末溶解于 50 ml 无菌超纯水中，搅拌使其充分溶解并继续加入超纯水，定容于 100 ml。接着在超净工作台以无菌 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤除菌，再行分装于 -20°C 条件下避光保存。

卡那霉素贮存液：贮存液浓度和配制的操作步骤参见氨苄青霉素贮存液的配制。

5 \times TBE 核酸电泳缓冲液：将 54 g Tris-base, 27.5 g 硼酸以及 0.5 M EDTA 溶液 20 ml 溶于 1 L 的去离子水中，充分溶解后常温避光保存，使用时将其稀释成为 0.5 \times 工作液，既稀释 10 倍。

0.7 % 琼脂糖凝胶：称取 0.7 g 琼脂糖，溶于 100 ml 的 5 \times TBE 核酸电泳缓冲液，用微波炉加热至完全溶解，溶液澄清为止。之后加入 20 μL 溴化乙锭，混匀后即可使用。

5 \times 蛋白电泳样品缓冲液：将 0.6 ml 的 1 M Tris-HCl (pH=6.8) 缓冲液、5 ml 的 50 % 甘油、2 ml 的 10 % SDS、0.5 ml 的巯基乙醇、1 ml 的 1 % 溴酚蓝加入 0.9 ml 蒸馏水混匀后，配制成 5 \times 蛋白电泳样品缓冲液，分装后于 -20°C 条件下避光保存。

10 \times 蛋白电泳缓冲液：将 10 g SDS、30g Tris-base 和 144 g 甘氨酸溶于 1 L 的去离子水中，充分溶解后常温保存，使用时将其稀释成为 1 \times 工作液，既稀释 10 倍。

100 \times EGTA 溶液：配制 10 mM EGTA 溶液，溶解时需加少量 NaOH 至 pH8.0。

Tris-HCl 缓冲液：将 Tris 按所需浓度溶于去离子水中，然后用移液器缓慢加入浓 HCl 并混匀。使用 pH 计实时监测缓冲液的 pH 值直到达到所需的缓冲液 pH 值以完成缓冲液的配置，常温保存。

磷酸缓冲液：按照所需浓度配制 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 溶液，然后将两者按照一定浓度缓慢混合并混匀。使用 pH 计实时监测缓冲液的 pH 值直到达到所需的缓冲液 pH 值以完成缓冲液的配置，常温保存。

刚果红溶液：称取 0.02 g 刚果红溶于 200ml 的 0.1 M 磷酸缓冲液中 (pH=8.0)，于常温下避光保存。

4.2.2 实验及分析方法

4.2.2.1 基因组及质粒 DNA 的抽提、纯化和制备

基因组及质粒 DNA 的抽提、纯化等具体操作见第二章 2.2.2.1。

4.2.2.2 目的基因的克隆及质粒构建

本实验中采用 PCR 的方法对目的基因进行扩增，用于进行 PCR 的引物见表 4.2。

表 4.2 本实验使用的引物

Table 4.2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>licB-S</i>	<u>TCTAGA</u> ATGAAAAACAGGGTAATTTC (XbaI)
<i>licB-A</i>	AAGCTTTTCAAAGTGACGGAATTG (HindIII)

试验中引物的处理、PCR体系的制备以及PCR条件的设置均参考本文2.2.2.2章节。目的基因通过PCR扩增之后，接着使用PCR纯化试剂盒对PCR产物进行纯化，然后再使用引物上预设的限制性内切酶对其进行酶切（具体酶切位点以及体系参见实验结果部分）；同时对载体质粒pHW20a使用相同的限制性内切酶进行酶切。将PCR和目的载体的酶切产物通过胶回收，取得含有酶切后粘性末端的目的基因DNA片段和载体片段，然后使用T4 DNA连接酶将两个片段的粘性末端进行特异性的连接，连接的具体操作可参考T4 DNA连接酶（Fermemtas T4 DNA Ligase）使用说明书。连接的体系配比见本文表2.5。目的基因与目的载体相连成环状DNA后，即形成了新的目的质粒。将连接后的连接液转化进入大肠杆菌DH5 α ，便能进行扩增。

4.2.2.3 目的质粒在大肠杆菌中的转化及鉴定

实验中采用大肠杆菌DH5 α 感受态的具体制备步骤、操作方法以及阳性克隆的鉴定详见本文2.2.2.3章节。

4.2.2.4 目的质粒在枯草芽孢杆菌中的转化及鉴定

实验中采用化学法制备枯草芽孢杆菌感受态^[211]，用以完成目的质粒向枯草芽孢杆菌中的转化。具体的操作步骤为：

- 1) 将保存于-80 °C冰箱中保种的枯草芽孢杆菌甘油管取出，在超净工作台中用接种环挑取少量的菌液涂布于LB琼脂平板上，放置于37 °C恒温培养箱中培养约12 h，便可于平板上看到肉眼可清晰分辨的枯草芽孢杆菌单菌落。
- 2) 用牙签挑取一个单菌落，接种于20 ml LB培养基中，放置于摇床中以37 °C, 220rpm条件震荡培养12 h。
- 3) 取100 μ l培养后的枯草芽孢杆菌菌液，转接于5 ml SPI培养基中，放置于摇床中以37 °C, 220rpm条件进行震荡培养大约3 h后。当枯草芽孢杆菌生长至对数生长后期（OD_{600nm}=0.8-1.0），迅速从其中取200 μ l菌液转接于2 ml SP II培养基中，放置于摇床中以37 °C, 100rpm条件震荡培养1.5 h。
- 4) 向菌液中加入20 μ l 100 \times EGTA溶液放置于摇床中以37 °C, 100rpm条件震荡培养10 min。然后将转化体系按照500 μ l每管分装入1.5 ml离心管中。
- 5) 用移液器向离心管中加入约10 μ l需转化的目的质粒（高浓度质粒效果更佳），轻轻吹打混匀，放置于摇床中以37 °C, 100rpm条件震荡培养30 min。
- 6) 将离心管转移至另一个摇床中以37 °C, 220rpm条件震荡培养1.5 h。
- 7) 将菌体培养液于离心机中8000 rpm离心1 min。弃去上清，仅留少量上清用以重悬菌体，之后将菌液涂布于含有相应抗生素的LB平板上，于37 °C恒温培养箱中培

养约 24 h 后，即可于平板上长出肉眼可辨的阳性克隆单菌落，接着挑取菌落培后进行质粒抽和鉴定。

质粒鉴定方法参见 4.2.2.3 中大肠杆菌阳性克隆的鉴定。

4.2.2.5 枯草芽孢杆菌胞内及胞外蛋白的提取

实验中使用反复冻融后超声破碎的方法进行枯草芽孢杆菌胞内蛋白的提取；使用硫酸铵沉淀法用来对菌液中的菌体胞外蛋白进行提取。提取获得蛋白则用于之后的实验。具体方法为：

- 1) 用牙签挑取一个重组枯草芽孢杆菌单菌落，接种于 20 ml LB（含相应的抗生素）培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件震荡培养约 24 h，菌体约生长到至 $OD_{600nm}=2.0$ 。
- 2) 将菌液摇瓶置于冰水混合物中，冰浴 10 min。接着将菌液转移至预冷离心杯中，于低温离心机中 4 °C、10000 rpm 离心 2 min，沉淀即为枯草芽孢杆菌菌体，上清则含有待提取的胞外蛋白。
- 3) 将 2) 步骤中产生的沉淀，用 20 ml Tris-HCl 缓冲液（pH=7）悬浮菌体，取 1 ml 菌体悬浮液加入 1.5 ml 离心管。
- 4) 将含有菌体悬浮液的离心管插入液氮速冻，放置 20 s 后再将离心管放入 80 °C 甘油浴中 1 min，反复 5 次。
- 5) 将反复冻融后的菌体悬浮液于冰上进行超声破碎，条件为 100W、超声时间 3 s、超声间隔 15 s，工作 15 次。
- 6) 将破碎后的菌体悬浮液于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 5 min，上清即是所需的胞内蛋白。
- 7) 将 2) 步骤中产生的上清液然转移进入另一个预冷离心杯中，于冰上以 60 % 的沉淀浓度分批次缓慢加入无水硫酸铵粉末（每 100 ml 菌液加入 36.1 g 无水硫酸铵），每次添加硫酸铵后要搅拌均匀以使其充分溶解。
- 8) 将离心杯于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 10 min，弃去上清后用 1 ml Tris-HCl 缓冲液（pH=7）溶解沉淀，所得溶液既是胞外蛋白液（如此时有沉淀则于低温离心机中 4 °C、12000 rpm 离心 3 min 取上清作为胞外蛋白液）。

4.2.2.6 枯草芽孢杆菌细胞光密度（ OD_{600nm} ）与细胞干重（DCW，mg/mL）曲线的测定

实验中需要对枯草芽孢杆菌的菌体量进行定义，因此对其菌液的光密度和细胞干重的关系进行了测定，以便在之后的实验中以细胞光密度（ OD_{600nm} ）来定量菌体，用作实验的参数，具体操作步骤为：用牙签挑取一个重组枯草芽孢杆菌单菌落后接种于 20 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件震荡培养约 12 h 然后 1 % 转接于 500 ml LB 培养基中，放置于摇床中以 37 °C，220rpm 条件进行震荡培养。约 2 h 后，测量菌液此时的 OD_{600nm} 值，同时取 30 ml 菌液并加入 50 ml 离心管中，于离心机中 10000 rpm 离心 2 min，弃去上清后用 15 ml 超纯水悬浮菌体并分装成 3 份作为平行。之后将分装后的菌体悬浮液以 10000 rpm 离心 2 min，弃去上清，并重新加入 1 ml 超纯水悬浮菌体，

然后将菌液加入预先烘干并称重的 6 cm 培养皿中，同时向离心管中再加入 1 ml 超纯水对离心管进行润洗，润洗液也一并加入培养皿中，然后将培养皿置于 115 °C 烘箱中烘干 12h 至恒重。之后将带有菌体的培养皿称重，得出每个培养皿中所对应的 10 ml 菌液中菌体的重量，并根据当时所测相应的 OD_{600nm} 值，计算出细胞光密度与细胞干重的关系并绘制曲线（附图 3），回归出关系式，其中横坐标为细胞光密度（OD_{600nm}），纵坐标为细胞干重（DCW, mg/mL）：

$$DCW (mg/mL) = 0.26 \times OD_{600nm}$$

4.2.2.7 SDS-PAGE 蛋白电泳

按照本章 4.2.2.5 中所示方法，提取枯草芽孢杆菌的胞内及胞外蛋白。取 40 μl 蛋白样品与 10 μl 的 5×蛋白电泳样品缓冲液混匀，于 100 °C 煮沸 5 min，然后于离心机中 12000 rpm 离心 5 min，取 15 μl 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。SDS-PAGE 蛋白电泳中蛋白电泳胶的制备、电泳方法等具体操作步骤详见《分子克隆实验指南》（中文版第三版）第 418-425 页^[145]。

4.2.2.8 重组菌胞外 β-1,3-1,4-葡聚糖酶酶活测定

按照本章 4.2.2.5 中所示方法，提取枯草芽孢杆菌的胞外蛋白。将 1 ml 溶于 50 mM Tris-HCl 缓冲液的蛋白提取液和 1 ml 1 g/L 的 β-1,3-1,4-葡聚糖于 15 ml 试管中混合，在设定为所需温度的恒温水浴槽中孵育 5 min，然后将试管放于 100 °C 煮沸 3 min 终止反应。接着用刚果红定量法^[212]测定反应体系中剩余的 β-1,3-1,4-葡聚糖的浓度以确定酶的催化能力，具体操作步骤为：每次测量前需要制作标准曲线（附图 4），配制 0.1 M 的刚果红溶液以及浓度范围在 0-0.1 g/L 的 β-1,3-1,4-葡聚糖标准溶液。将 1 ml 底物溶液和 2 ml 刚果红溶液混合于 15 ml 试管，在 20 °C 孵育 30 min，然后测量反应体系 OD_{545 nm} 的值。按照不同浓度的标准底物所对应的 OD_{545 nm} 值即可得到反应标准曲线。之后将酶活测定的反应液做适当稀释（使其处于标准曲线范围内）后，采用相同的实验条件测定反应液中 β-1,3-1,4-葡聚糖的浓度。反应中将 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液和 1 ml 1 g/L 的 β-1,3-1,4-葡聚糖混合于 15 ml 试管中作为反应的空白对照。实验中一个酶力活单位（U）定义为：1 min 催化分解 1 g β-1,3-1,4-葡聚糖所需的酶量。实验中使用不同 pH 值的 50 mM Tris-HCl 缓冲液（pH=3-12）用以测量 β-1,3-1,4-葡聚糖酶的最适 pH 反应范围；检测金属离子对 β-1,3-1,4-葡聚糖酶的酶活影响实验则使用 10 mM 的金属离子浓度。

4.3 结果与讨论

4.3.1 *licB* 基因的克隆和表达

实验中，选定使用的表达载体 pP43JM2（8.5 kb）是一种可以在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中都进行复制的穿梭质粒。含有该质粒的大肠杆菌表现出氨苄青霉素抗性（Amp^r），含有该质粒的枯草芽孢杆菌则表现为卡那霉素抗性（Kan^r）。pP43JM2 本身自带 P43 启动子以及 *NprB* 信号肽，用于蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌表达^[153]。为了构建重组质粒，

首先通过PCR扩增，从预先抽提的热纤梭菌基因组中得到*licB*基因片段，该基因全长1005 bp（图4.1）。

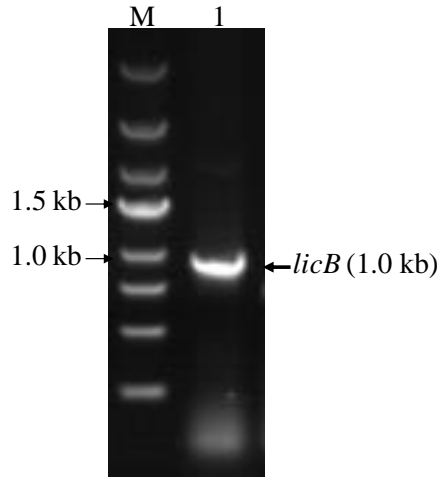


图4.1 *licB*的PCR产物

Fig. 4.1 *licB* PCR fragment

PCR identification of *licB*. Lane M, marker (250 bp DNA ladder); Lane 1, *licB* (1.0 kb).

为了完成之后的基因构建操作，通过所设计的引物PCR后得到的该片段，在其5'端和3'端分别有*XbaI*和*HindIII*限制性内切酶位点，依照本章2.2.2.2中所描述的方法，对扩增的*licB*片段和载体pP43JM2片段进行*XbaI*和*HindIII*双酶切，酶切体系为：22 μ l目的片段+6 μ l Tango buffer+1 μ l *XbaI*+1 μ l *HindIII*。之后对酶切后的片段进行胶回收和连接，得到目的重组载体pP43JM2-*licB*（图4.2）。

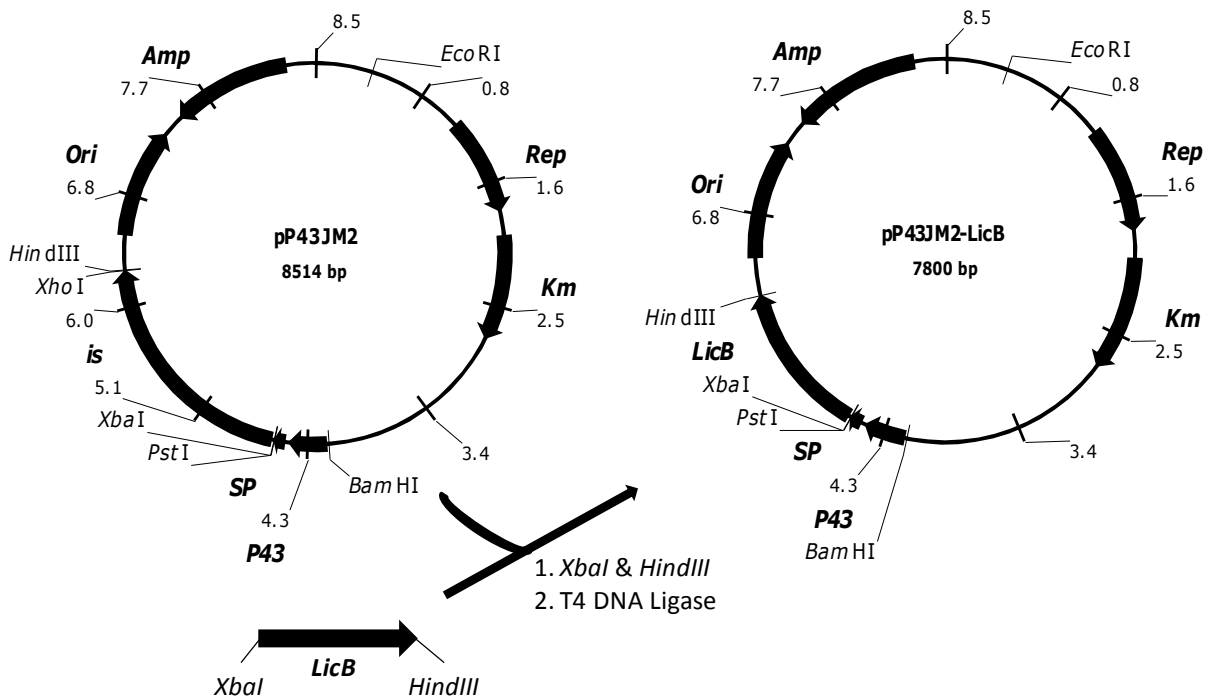


图4.2 质粒pP43JM2-*licB*构建流程

Fig. 4.2 Construction of recombinant plasmid pP43JM2-*licB*

Shuttle vector pP43JM2 and recombinant plasmid pP43JM2-*licB*. *licB* fragment was amplified by PCR. The PCR product and the vector pP43JM2 was cleaved by *XbaI* and *HindIII*, gel purified, and ligated to

give the plasmid pP43JM2-*licB*.

构建完成的质粒通过进行*XbaI*和*HindIII*双酶切和0.7 %核酸电泳验证（图4.2），证明了重组质粒pP43JM2-*licB*的片段大小和理论值相同，因此认为重组质粒pP43JM2-*licB*构建完成。

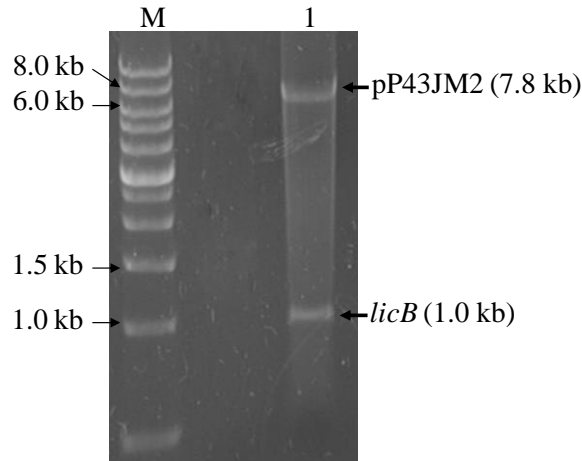


图4.3 pP43JM2-*licB*的鉴定

Fig. 4.3 Identification of recombinant plasmid pP43JM2-*licB*

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); Lane 1, pP43JM2-*licB* (*XbaI* & *HindIII*).

完成了重组质粒pP43JM2-*licB*的构建后，通过化学转化的方法将该质粒转化入宿主菌枯草芽孢杆菌*B. subtilis* WB800。含有重组质粒的阳性克隆对卡那霉素具有抗性，因此用含有50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的LB琼脂平板对转化子进行筛选，并抽提质粒进行PCR以及酶切鉴定，确认了*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*构建完成。为了确认LicB在*B. subtilis* WB800中有正确的表达，提取了*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*的胞内及胞外的蛋白进行SDS-PAGE电泳（图4.4）。

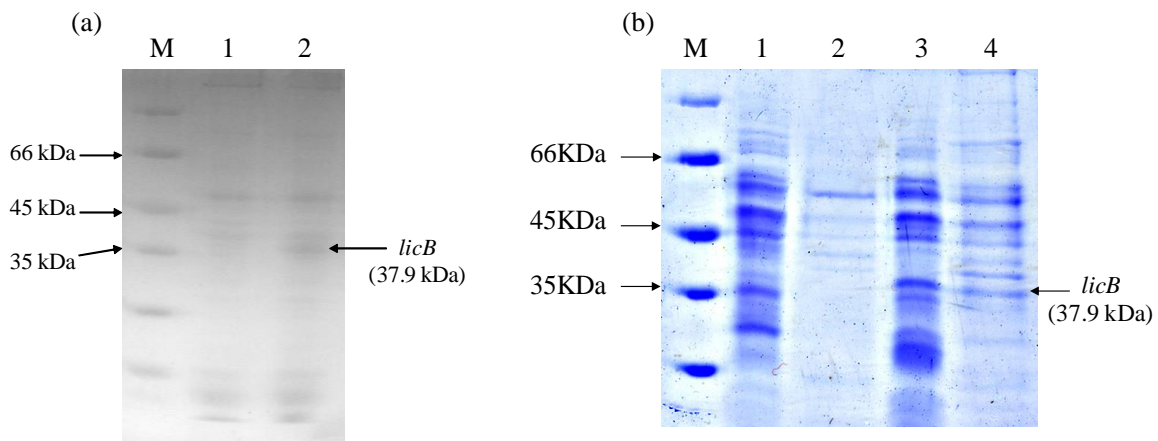


图4.4 *B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*的SDS-PAGE蛋白电泳

Fig. 4.4 SDS-PAGE of intra- and extracellular protein of *B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*

(a) SDS-PAGE of *B. subtilis* pP43JM2-*licB*. Lane M, Protein molecular weight marker (low molecular weight); Lane 1, protein of *B. subtilis* WB800 whole cell; Lane 2, protein of *B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB* whole cell. (b) SDS-PAGE of *B. subtilis* WB800 and *B. subtilis*

WB800/pP43JM2-*licB*. Lane M, Protein molecular weight marker (low molecular weight); Lane 1, *B. subtilis* WB800 cells' protein; Lane 2, *B. subtilis* WB800 extracellular protein; Lane 3, *B. subtilis* pP43JM2-*LicB* cells' protein; Lane 4, *B. subtilis* pP43JM2-*licB* extracellular protein.

*licB*所表达的蛋白大小约为37.9 kDa^[213]。通过蛋白电泳（图4.4a）我们可以发现，重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*LicB*相较于对照*B. subtilis* WB800，其菌体细胞中提取的蛋白在电泳图中可以在35-45 kDa之间发现一条额外的蛋白条带，并与LicB蛋白理论值大小38 kDa相近。因此我们判定*licB*在*B. subtilis* WB800中得到了正确的表达。同时该蛋白在构建设计时为其添加了信号肽，希望其能有分泌表达。为了进一步确认目的蛋白的分泌表达情况，在之后的实验中除了对菌体本身所表达的蛋白进行电泳检测，还对菌液中的胞外蛋白也进行了提取，并进行SDS-PAGE蛋白电泳（图4.4b）。在电泳图中，1号和3号样品分别为*B. subtilis* WB800和*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*的胞内蛋白条带。和图2.4a相似，重组菌相较于对照菌，胞内蛋白在38 kDa附近有明显的条带；而2号和4号样品分别为*B. subtilis* WB800和*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*的胞外蛋白条带，其中4号样品同样在38 kDa附近有相应的蛋白条带，而对照菌*B. subtilis* WB800的胞外蛋白在理论大小附近并没有相应的条带。这证明重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*在胞内表达LicB蛋白的同时，也在胞外进行了分泌表达。至此，*licB*基因在*B. subtilis* WB800中进行分泌表达的目的已经达成。

4.3.2 β -1,3-1,4-葡聚糖酶 LicB 的最适反应 pH

热纤梭菌的培养温度为 60°C，因此暂时使用 60°C 作为 LicB 的反应温度，对 LicB 其它的反应条件进行测定，由于只有胞外的蛋白才能对培养基中的底物进行催化，所以实验中均提取重组菌的胞外蛋白进行酶活的测定。实验中首先测试 LicB 反应的 pH 范围，将重组菌 *B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB* 接种于含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基中，37 °C、220rpm 培养 18 h 并提取胞外蛋白进行酶活测定。将所提取的胞外酶液用 pH 范围 3-12 的 50 mM Tris-HCl 缓冲液溶解，并与 1 g/L 的 β -1,3-1,4-葡聚糖混合后在 60 °C 反应 5 min 测试其在不同 pH 条件下对底物的催化能力。实验中将反应结果中的最大酶活力定义为 100 %酶活，并以百分比酶活的形式对不同 pH 下的 LicB 的催化能力进行表征，实验结果见图 4.5：

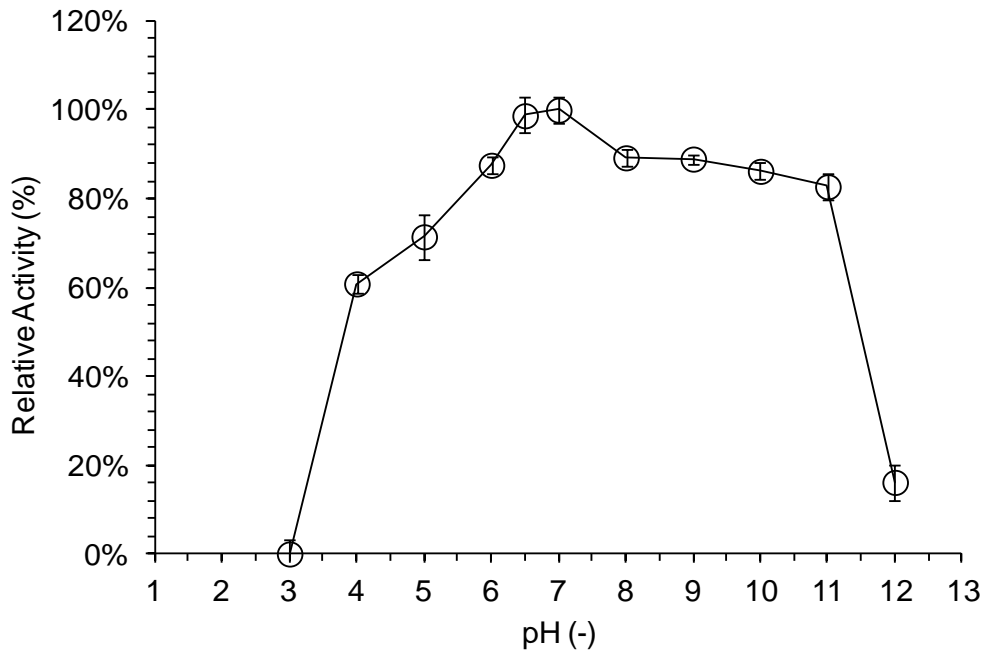


图 4.5 β -1,3-1,4-葡聚糖酶 LicB 在不同 pH 中的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活

Fig. 4.5 Extracellular β -1,3-1,4-glucanase activity assay of *B. subtilis* pP43JM2-LicB in different pH condition

Tris-HCl buffer (pH 3-12) were used to apply different pH condition at 60 °C. Activity was estimated as a percentage of the maximum. The maximum activity was defined as 100 %.

实验结果表明，LicB 在 pH 7.0 的条件下有最高的酶活力，同时其在一个较广的 pH 范围内都有相当高的酶活。在 pH 6-11 范围内，LicB 仍旧能保持 80 % 以上的酶活；在 pH 4-5 范围内也能保持 60 % 以上的酶活。相较之下，源自 *Chaetomium thermophilum* 的耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[208]只在 pH 4-6 的范围内保持 80 % 的酶活，而源自 *Paecilomyces thermophila* 的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[207]，则在 pH 6-8 的范围内保持 80 % 的酶活。可见由 *B. subtilis* WB800 所分泌表达的 LicB 拥有广泛的 pH 反应范围，这对于其在许多工业过程中的应用有很大的帮助。

4.3.3 金属离子对 β -1,3-1,4-葡聚糖酶LicB的影响

在工业应用过程中，反应体系中往往会含有许多金属离子和化学试剂，作为许多酶蛋白的重要辅因子，金属离子对酶活也可能产生很大的影响。通常比较常见金属离子包括： Mg^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等。因此在实验中，对于这些金属离子对于LicB酶活的影响也进行了测试。实验中在反应体系中添加10 mM的金属离子浓度，然后再pH 7、60 °C的条件下进行反应。实验中以不添加任何金属离子的反应条件作为空白对照，以空白对照的酶活力定义为100 %酶活，并以百分比酶活的形式对不同金属离子条件下的LicB的催化能力进行表征，实验结果见表4.3：

表4.3 金属离子对LicB的影响

Table 4.3 Effect of metal ions or chemicals on the activity of LicB.

Metal ion	Relative activity (%)
Control	100.00
Co ²⁺	96.59±2.12
Fe ²⁺	49.19±3.55
Ca ²⁺	100.03±1.04
K ⁺	101.47±1.83
Mn ²⁺	93.41±2.91
Cu ²⁺	63.07±3.02
Zn ²⁺	85.40±2.66
Na ⁺	99.91±1.09
Mg ²⁺	99.93±0.28
EDTA	95.56±2.47

Enzyme activity was assayed in the presence of a 10 mM concentration of different metal ions at the condition of pH7 and 60 °C. Activity assayed in the absence of metal ions was taken to be 100 %.

实验结果表明，在这些金属离子中，Cu²⁺（49.19 %）、Fe²⁺（63.07 %）以及Zn²⁺（85.40 %）对LicB有比较明显的抑制作用，其中Cu²⁺和Fe²⁺的添加都降低了40 %以上的酶活，而Zn²⁺也降低了约15 %的酶活，因而这几种金属离子的添加对于LicB的反应是极度不利的；而EDTA（95.56 %）、Mn²⁺（93.41 %）和Co²⁺（96.59 %）的添加则会少许地对酶活产生影响，大约降低了5 %左右的酶活；Mg²⁺、K⁺、Ca²⁺、Na⁺则对酶活基本没有影响，而在添加K⁺（101.47）后，酶活则有略微的提升。综合其在不同金属离子中的表现，可以LicB在催化反应中对Cu²⁺和Fe²⁺极为敏感，这两种离子会很大程度上抑制其酶活，而Zn²⁺也会在一定程度上对LicB进行抑制，但是效果并不是非常显著。其他的金属离子则基本不会对LicB酶活产生影响，这也说明LicB在大多数应用过程中，基本都不会受到金属离子的影响。

4.3.4 β-1,3-1,4-葡聚糖酶LicB在不同温度下的酶活及其热稳定性

LicB作为耐热β-1,3-1,4-葡聚糖酶，其耐热性使其能在许多高温的工业处理过程中进行应用，但是这同时也需要其在高温下有良好的酶催化活性以及稳定性，才能在高温反应中高效而稳定地发挥作用。因此在确定了LicB的最适反应pH后，我们对重组菌所分泌的LicB在不同温度下进行了酶活力的测定，以期找到LicB的最适反应温度。实验中，首先将重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*接种于含有50 μg/ml卡那霉素的LB培养基中，37 °C、220rpm培养18 h（OD_{600nm}=2.5左右）并提取胞外蛋白进行酶活测定。反应时将所提取的胞外酶液与1 g/L的β-1,3-1,4-葡聚糖混合，然后在pH 7的条件下，在不同温度（30-90 °C）反应5 min，以检测LicB的最适反应温度。实验中将*B. subtilis* WB800和*B. subtilis* WB800/pP43JM2两种菌作为对照菌株，在相同条件和操作下进行胞外酶活的测定，实验结果见图4.6：

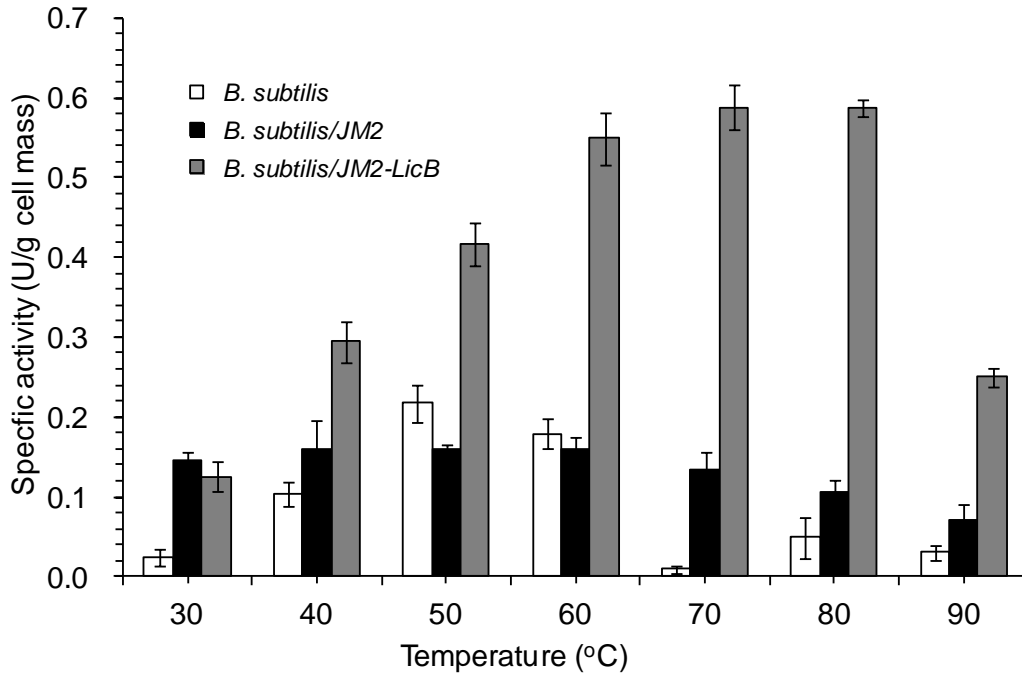


图4.6 对数生长期LicB在不同温度下的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活测定

Fig 4.6 Extracellular β -1,3-1,4-glucanase activity assay in exponential phase

B. subtilis WB800 and *B. subtilis* pP43JM2 were used as the control strains. The cells growth was measured by optical density at 600 nm. In exponential phase and, all the crude enzyme sample of these three strains were prepare when the strains grew to about $OD_{600nm}=2.5$. 1 U/g corresponds to the 1 g strain hydrolyze 1 g β -1,3-1,4-glucan per min.

实验结果表明, *B. subtilis* WB800本身就具有一定的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活性,这也与文献中所描述的一致^[199]。但是正如文献所说,源自枯草芽孢杆菌的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶一般在50 °C时拥有最佳的催化活性,从图2.6中也可看出,在50 °C之后*B. subtilis* WB800本身的胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活在不断降低,在70 °C以后基本已经失去了催化活性。而重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*由于表达了*licB*基因,分泌表达了大量的LicB蛋白,因此相较于对照菌株, *B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*在各个温度下都表现出了更高的胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活。但不同的是,随着温度的上升, LicB的酶活也随之升高,并在80 °C表现出了最佳的酶活力,为0.587 U/g DCW。此时对照菌株*B. subtilis* WB800和*B. subtilis* WB800/pP43JM2的胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活分别为0.049 和0.105 U/g DCW,明显低于重组菌所表现出的酶活。由此可以确认,重组菌由于LicB蛋白的表达而有了显著的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活提升,尤其在高温条件下,酶活的提升更为明显,并在80 °C达到最大值。因此80 °C也就是LicB的最适催化温度。

同时, LicB作为分泌蛋白,在相对应的培养条件和培养基中必须保持稳定,才能实现酶蛋白的积累并达到更加的生产 and 反应效果。之前的实验中所测得的是重组菌在对数生长前期所表现出的胞外酶活 ($OD_{600nm}=2.5$),为了确定LicB在培养过程中的稳定性,将培养时间提高到30 h并达到稳定期,此时*B. subtilis* WB800生长到了 $OD_{600nm}=6.0$, *B. subtilis* WB800/pP43JM2和*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*生长到了 $OD_{600nm}=4.5$ 。含有质

粒的枯草芽孢杆菌可能由于代谢负担更重的缘故，在相同的培养条件下，生长的速度和菌量都要低一些。此时提取各个菌株的胞外蛋白进行酶活测定。反应时将所提取的胞外酶液与1 g/L的 β -1,3-1,4-葡聚糖混合，然后在pH 7的条件下，在不同温度（30-90 °C）反应5 min，以检测LicB在不同温度下的酶活（图2.7）。

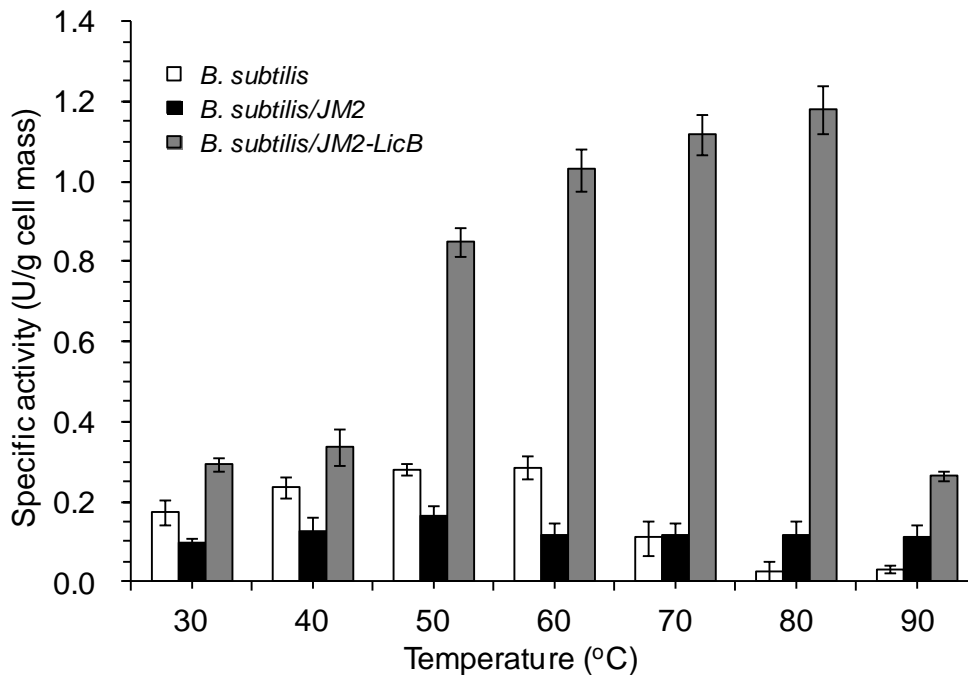


图4.7 稳定期LicB在不同温度下的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活测定

Fig. 4.7 Extracellular β -1,3-1,4-glucanase activity assay in steady phase

B. subtilis WB800 and *B. subtilis* pP43JM2 were used as the control strains. The cells growth was measured by optical density at 600 nm. In steady phase, *B. subtilis* grew to $OD_{600nm}=6.0$, *B. subtilis* pP43JM2 and *B. subtilis* pP43JM2-*licB* grew to $OD_{600nm}=4.5$ (*B. subtilis* without plasmid can grow better in the same culture condition). 1 U/g corresponds to the 1 g strain hydrolyze 1 g β -1,3-1,4-glucan per min.

通过菌体量的积累可以得知，对数生长后期的枯草芽孢杆菌相较于前期至少增长了1倍以上。在50 °C时，两组对照菌*B. subtilis* WB800的前期胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活为0.217 U/g DCW，而在后期则为0.281 U/g DCW；而*B. subtilis* WB800/pP43JM2的前期胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活为0.160 U/g DCW，而在后期则为0.165 U/g DCW。可见*B. subtilis* WB800和*B. subtilis* WB800/pP43JM2的胞外酶活并没有得到显著的积累，也就是说源自枯草芽孢杆菌本身的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在相应的培养条件下比较容易失活，因此随着培养时间的提升，虽然菌量有了成倍的增长，但是胞外的活性酶蛋白由于其稳定性不足，无法形成积累。相较于对照菌株，重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-*licB*在培养到稳定期时，菌量同样增长了近1倍，而其最适酶催化活性同样出现在80 °C的反应条件下，此时胞外 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活也从0.587 U/g DCW提高到了1.1808 U/g DCW，同样也提高了1倍。由此可见，LicB在枯草芽孢杆菌的培养条件下，出于其广泛的pH适性和热稳定性，蛋白的性质非常稳定，不容易失活。因此LicB在长时间的由*B. subtilis* WB800分

泌生产的过程中，不用担心蛋白会过度失活而导致酶活力的下降，可以很好地实现活性蛋白的积累，对于酶蛋白产品的生产和提取都有相当积极的效果，具有大规模生产的潜力。通常来说，普通的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最佳催化温度不会超过 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[200-205,214]。源自*Paecilomyces thermophila*的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[207]的最适反应温度能够达到 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，但是当温度提高到 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，其酶活会损失接近 80% 。LicB在 $60\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内，都体现出很高的酶活，并在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 达到最适的反应温度。虽然在 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时LicB的催化活性下降了约 40% ，但是仍然保持着一定的酶活水准。因此LicB作为一种耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶，拥有较高的反应温度、较广的反应温度和pH范围，在高温工业过程中表现出很高的应用价值。

在确定了LicB的最佳反应条件为 $\text{pH}=7.0$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后，我们在该条件下测定了LicB的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶酶动力学参数（图4.8）。图中酶动力学方程式为： $y=3.814x+2.3086$ ， $R^2=0.9931$ 。通过Lineweaver-Burk函数计算得到LicB的 K_m 值为 $1.65\pm 0.13\text{ mg/mL}$ ， V_{\max} 为 $0.43\pm 0.03\text{ g/min mg蛋白}$ 。

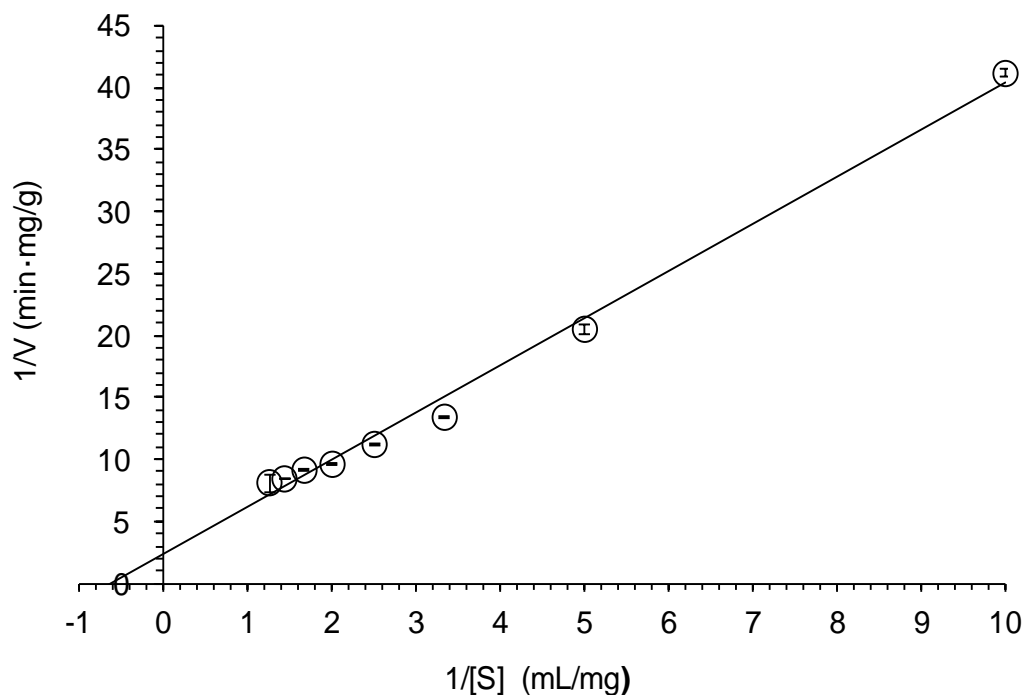


图4.8 LicB酶动力学曲线

Fig. 4.8 Lineweaver-Burk plot for determination of K_m and V_{\max} values of LicB

相较于其他文献中报道的源自枯草芽孢杆菌的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[215]，其在 $\text{pH}=6.0$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并用 β -葡聚糖的条件下， K_m 值为 2.7 mg/mL 。之所以在本实验中LicB表现出更低的 K_m 值，主要可能是因为所使用的底物（ β -1,3-1,4-葡聚糖）具有更高的特异性。LicB专一性地催化 β -1,3-1,4键连接的葡聚糖，对于由 β -1,3或者 β -1,4键连接的葡聚糖并没有水解能力，因此当使用 β -1,3-1,4-葡聚糖作为反应底物时，酶对底物就能体现出更高的亲和力，既表现出更低的 K_m 值。同时本实验中LicB的反应温度也更高（ $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ），可能更进一步促进了酶的催化能力。

LicB在高温下依旧拥有很高的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶催化活性，因此在如果其在高温下拥有很好的稳定性，能长久地保持活性进行催化，则可以在酿酒等高温过程中有更好的实用性^[216]。因此我们对重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-licB的胞外LicB在70和80 °C的热稳定性进行了测定(图4.9)，在这两个温度下LicB都表现出相当高的活性。实验中，先将重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-licB接种于含有50 μ g/ml卡那霉素的LB培养基中，37 °C、220rpm培养18 h (OD_{600nm} =2.5左右)并提取胞外蛋白进行酶活测定。反应时，先将所提取的胞外酶液在不同温度(70或80 °C)下孵育，每过一小时则取出相应孵育时间的酶液，与1 g/L的 β -1,3-1,4-葡聚糖混合，然后在pH 7的条件下80 °C反应5 min，以检测不同温度下赋予不同时间的LicB所剩余的活性。实验中将反应结果中的孵育0 h时的酶活力定义为100 %酶活，并以百分比酶活的形式对不同孵育时间的LicB的催化能力进行表征。

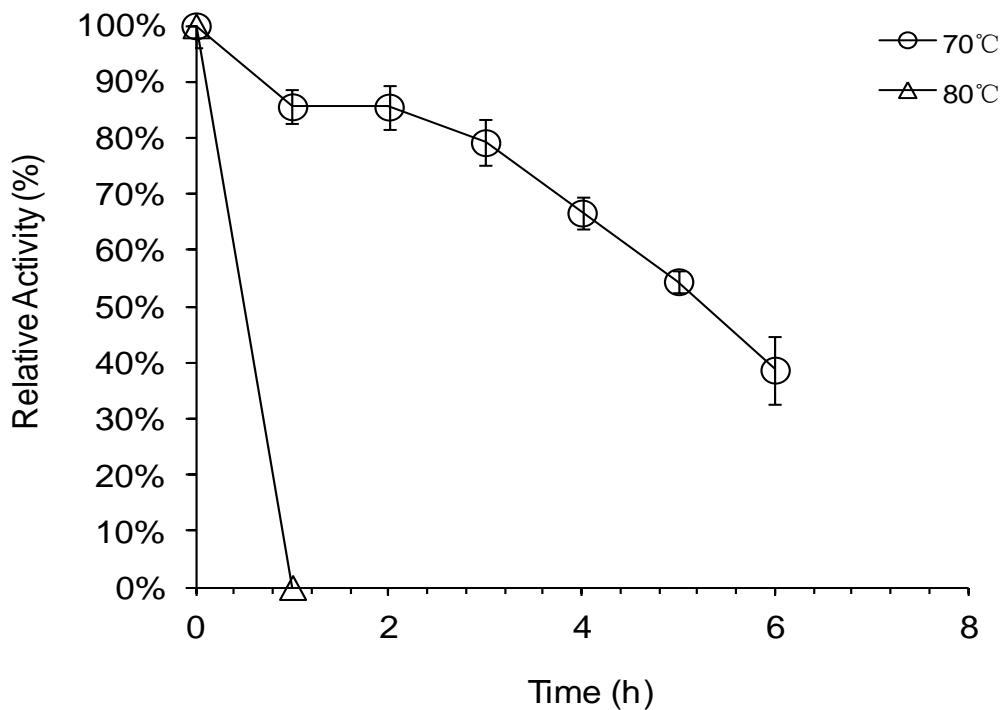


图4.9 LicB热稳定性

Fig. 4.9 The Thermal stability of extracellular β -1,3-1,4-glucanase of *B. subtilis* pP43JM2-licB
Extracellular enzyme extracts were incubated at 70 °C (\square) or 80 °C (Δ) in the absence of substrate and then assay its activity at 80 °C, pH=7. The original activity was regard as the 100 % activity.

实验结果表明，LicB虽然在80 °C有最佳的酶活力，但是在该条件下酶活损失也很快，1 h以内就损失了全部的酶活。而在70 °C时，LicB酶活与最适酶活相近，但是热稳定性则有明显的改善。通过3 h孵育，酶活仍旧保持在80 %以上，5 h后仍旧能保持约50 % 的酶活。相较于源自*Paecilomyces thermophila*的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶，其在70 °C和80 °C下的酶活半衰期分别为174 min和13 min^[207]，LicB虽然在80 °C下同样不稳定，但是在70 °C时则拥有更好的稳定性，且酶催化活力也相对较高。不过相较于在LicB在大肠杆菌中的

胞内表达^[194]（在70 °C和80 °C时，酶活半衰期均大于7 h），胞外LicB的热稳定性却有了显著的下降。这可能是由于在枯草芽孢杆菌中的分泌表达，使LicB在折叠过程中其折叠或结构产生了一定变化，从而导致了热稳定性的变化。

4.4 小结

普通的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在实际应用中，往往因为自身的最适酶活过低以及热稳定性不佳而不能高效地进行使用，在酒精酿造等一些需要经历高温过程的工艺中这些酶便很难保持活性。为了解决这个问题，人们开始对嗜热菌进行研究，并从中发现了许多能够生产耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的菌株。源自*Clostridium thermocellum*的LicB就是一种耐热的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶，为了探究其在实际应用中的潜力，对其进行了各种酶活性能的研究。而为了提高该酶的生产 and 利用效率，还需为其寻找一种合适的表达宿主菌，使其能进行高效的生产和分泌，甚至进行直接的CBP发酵。

研究中将源自*Clostridium thermocellum*的LicB通过穿梭质粒pP43HM2在枯草芽孢杆菌中进行了表达，并构建了重组菌*B. subtilis* WB800/pP43JM2-LicB。研究结果证明，重组菌能够分泌表达 β -1,3-1,4-葡聚糖酶LicB，其最适反应条件为80 °C、pH 7，而且在pH 4-11的范围内都有很好的催化表现。同时LicB不易受金属离子的影响，仅Cu²⁺和Fe²⁺会对其酶活产生比较明显的抑制。得益于其广泛的pH适性和较高的最适酶活，LicB在重组菌培养条件下不容易失活，能在培养基中随着重组菌的菌体生长进行蛋白积累，并保持活性。而在高温反应条件下，分泌到胞外的LicB其在70 °C下的半衰期大约为5 h，虽然蛋白的分泌所进行的折叠在一定程度上影响了其热稳定性，但是其高效的分泌表达策略、在高温下的活性以及广泛的反应条件使其在许多工业过程中都表现出良好的应用潜力。针对 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的应用需求，本研究的实验重点主要集中在耐热 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的分泌表达。而对于各种不同 β -葡聚糖酶研究者们也进行了许多不同的改造策略的研究，诸如通过构建融合蛋白^[217]或优化密码子^[195]等工作对蛋白的酶活、耐热性等方面进行改良。本实验中所表达的*licB*基因所表达的蛋白虽然分泌变表达、温度适性以及反应条件上具有优秀的特性，但是其在酶活力以及热稳定性方面仍旧拥有提高的空间。而枯草芽孢杆菌本身作为一种优秀的发酵及基因工程改造模式菌，其在CBP发酵中也拥有很大的潜力，目前通过该菌对性能优良的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶进行了高效的分泌表达，为其在之后的进一步改造和CBP发酵中的应用打下了良好的基础。

第五章 结论与展望

5.1 结论

整合生物加工工艺（CBP）由于能够在发酵过程中减少纤维素酶的使用而降低发酵的成本，因此成为生物炼制过程中一种十分重要的研究领域。在微生物发酵的过程中，集成了纤维素酶生产、纤维质底物水解以及产物生产的 CBP 菌株是实现 CBP 过程的基础。因此如何针对不同菌种的优缺点，进行合理的基因工程改造来构建优良的 CBP 菌株是研究的一个重点。本论文通过对运动发酵单胞菌、大肠杆菌以及枯草芽孢杆菌这些潜在的 CBP 菌株进行相关基因工程改造，尝试了在重组菌中进行纤维素酶基因的分泌表达、乙醇生产途径的构建、生物炼制工艺等方面的研究，得出了以下结论和创新：

5.1.1 纤维素酶在产乙醇大肠杆菌中的表达研究

试验中，大肠杆菌首先通过外源乙醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶的整合，实现了在菌体内乙醇生产途径的构建。该产乙醇大肠杆菌能够利用葡萄糖进行乙醇的发酵生产，并达到约 60 % 的乙醇得率。在此基础上，我们尝试在该重组菌中进行了不同纤维素酶的表达，并获得了成功。分别表达纤维素内切酶和外切酶的重组菌能够对糖化后的 PASC 进行一定程度的利用，并产生乙醇。与此同时，表达 β -葡萄糖苷酶基因的重组菌则能显著地利用纤维二糖并进行乙醇的生产。而在细菌生长和发酵的过程中，我们也发现添加表面活性剂能够提高重组菌中纤维素酶的分泌情况，并以此来提高重组菌对底物的利用能力。

5.1.2 运动发酵单胞菌中纤维素酶的表达研究

运动发酵单胞菌是一株优秀的乙醇发酵菌株，但是对该菌的基因工程操作比较困难，在其中进行外源纤维素酶的分泌表达也十分的困难。本实验通过研究，开发了两种新型的表达策略：利用内源纤维素酶基因 *ZMO1086* 的信号肽对外源纤维素酶蛋白进行介导，以及通过果聚蔗糖酶 *SacB* 构建融合蛋白进行外源纤维素酶蛋白的分泌表达。利用这两种方法，我们实现了外源 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 在运动发酵单胞菌中的分泌表达。并使重组运动发酵单胞菌初步拥有了对纤维二糖的利用能力，为将其改造成 CBP 菌株打下了基础。

5.1.3 耐热型 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达研究

普通的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶在实际应用中，往往因为自身的最适酶活过低以及热稳定性不佳而不能高效地进行使用。我们发现源自热纤梭菌的 *LicB* 是一种耐热的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶，我们在试验中将其在枯草芽孢杆菌中进行了高效的分泌表达，并对其进行了各种酶活性能的研究。结果表明，重组菌能够分泌表达 β -1,3-1,4-葡聚糖酶 *LicB*，其最适反应条件为 80 °C、pH 7，而且在 pH 4-11 的范围内都有很好的催化表现，同时 *LicB* 不易受金属离子的影响，并在重组菌培养条件下不容易失活。其高效的分泌表达策略、

在高温下的活性以及广泛的反应条件使其在许多工业过程中都表现出良好的应用潜力。

5.2 展望

以基因工程的手段对菌种进行改造，并将菌体改造成可以实际应用的 CBP 菌株，在生物炼制过程中具有非常良好的前景。本实验也以此为宗旨，对不同的具有 CBP 潜力的菌体进行改造，以期能够获得性能优良的重组基因工程菌。通过实验我们构建了几种不同的重组菌，都能够在一定程度上分泌表达纤维素酶，并进行相应产物的生产，初步实现了 CBP 菌株的概念，并在发酵应用中起到了一定的作用。

同时，在构建过程中我们也发现了许多的亟待解决的问题。首先，就是重组菌所对应的基因工程改造平台的构建。对于不同的重组菌，实验者想对其进行改造就必须采用相应的改造工具和方法。针对诸如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等具有比较成熟的改造系统的菌株，实验者就能十分容易滴按照目的进行基因工程改造。而这都得益于往年的科研工作者对于这些菌种的大量基础研究、改造尝试以及表达优化改进，从而使得如今的研究人员能够熟练而高效地对它们进行基因工程操作。随着近年来在微生物以及生物炼制领域的发展，越来越多具有优秀发酵性能的菌种被发现，并被利用于生物炼制的过程之中。但是其中许多菌并不具有成熟的基因改造平台，使得在其中的基因工程改造往往只能在摸索和尝试中进行，许多实验构想和改造设计也因此得不到很好的实施；与此同时，也有一些特殊的菌种，虽然具有良好的性能但是却很难被轻易改造，研究者虽然通过各种手段，也只能对其进行一些基础的重组，而无法通过一个成熟的体系来对其进行系统的改造。针对这些菌所进行基因工程操作具有不小的难度，也在很大程度上限制了相关 CBP 重组菌的构建。如果研究者能够在这一方面有所突破，构建面向更多菌种的基因工程改造平台，则能够大大提高 CBP 工程菌的研究进度。不过该方面的研究需要大量的针对性基础研究以及无数的尝试，因此要通过更多科研工作者的研究来、以及相关数据和理论的积累来实现。

在 CBP 工程菌的构建中，许多关键蛋白的表达量对于最终的发酵结果起着至关重要的作用。诸如纤维素酶的表达关乎于底物的利用水平，而涉及产物生产的蛋白表达和其上下游代谢流调控则关乎着产物的最终产量。随着近年来生物学领域的飞速发展，人们对于基因的编码到最终蛋白的表达和作用，在分子、转录、蛋白、代谢等水平上的研究都取得了长足的进步。这也使得研究者可以使用各种各样的手段，来调控 CBP 重组菌中关键基因的表达，以及关键蛋白的作用。随着近年来组学的发展，对于某些关键点的调控已经不仅限于单个基因和蛋白的优化，而将涉及到整个菌体内的各种因素，除了加强重组菌中目的基因的表达以外，加强菌体自身的耐受性、减轻菌体在发酵过程中的代谢负担等方法都能从其他方面加强重组菌的性能，并实现最优的调控策略。因此，将 CBP 菌株的构建和目前整个生物工程领域内的发展有机地结合起来，也将是未来 CBP 工艺发展的一个重要方法。

同时，在 CBP 菌株利用底物的过程中，除了纤维素酶的表达量会影响重组菌对纤维质底物的利用之外，纤维素酶的分泌情况也与之息息相关。目前随着菌体研究手段的越来越丰富，研究者对于菌体内的分泌途径的了解也越来越深刻。就目前而言，即便是对于最常用最熟悉的微生物大肠杆菌，其分泌的相关研究仍旧要依靠许多推测和理论来实现，也仍旧有新的分泌途径被发现。可见，人们对于微生物的分泌机制和相关研究仍然不够深入，但是随着科学技术的发展，越来越多的生物学领域发生了交叉，研究者也得以从不同的角度对研究内容进行解析，因此随着关于微生物分泌研究的发展，对于在 CBP 菌株中实现高效的分泌表达也将推动 CBP 工艺在生物炼制过程中的发展。

综上所述，CBP 菌株的构建虽然依赖于基因工程改造，但是随着工作的开展和认识的提高，其他学科的引入和应用对于 CBP 菌株的性能和 CBP 工艺的发展也会起到至关重要的作用。只有将研究不断的深入，整合不同领域的研究成果，才能最终完成高效 CBP 菌株的构建，实现生物炼制在能源及其他领域的可持续发展。

参考文献

- [1] G. Stephanopoulos. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*. 2007, 135: 801-804.
- [2] J. P. Wyk. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends Biotechnol.* 2001, 19: 172-177.
- [3] J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick Jr, J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, T. Tschaplinski. The Path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. 2006, 311: 484-489.
- [4] H. Jørgensen, J. B. Kristensen, C. Felby. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Bioref* 2007, 1: 119-134.
- [5] B. Kamm, M. Kamm. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* 2004, 64: 137-145
- [6] K. Liu, X.H. Lin, J. Yue, et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresour Technol.* 2010, 101(13): 4952-4958.
- [7] Q. Xu, A. Singh, M. E. Himmel. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Curr Opin Biotechnol.* 2009, 20: 364-371.
- [8] X. Fang, Y. Shen, J. Zhao. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresour Technol.* 2010, 101(13): 4814-4819.
- [9] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002, 66(3): 506-577.
- [10] N. Carpita, M. Tierney, M. Campbell. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol Biol.* 2001, 47: 1-5.
- [11] R. C. Kuhad, A. Singh, K. E. Eriksson. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1997, 57: 45-125.
- [12] O. P. Ward, M. Moo-Young. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. *CRC Crit Rev Biotechnol.* 1989, 8: 237-274.
- [13] J. F. Matthews, C.E. Skopec, P.E. Mason, P. Zuccato, R.W. Torget, J. Sugiyama, et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . *Carbohydr Res.* 2006, 341: 138-152.

- [14]N. C. Carpita. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996, 47: 445-476.
- [15]S. Willför, A. Sundberg, J. Hemming, B. Holmbom. Polysaccharides in some industrially important softwood species. *Wood Sci Technol.* 2005, 39: 245-258.
- [16]S. Willför, A. Sundberg, J. Hemming, B. Holmbom. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Sci Technol.* 2005, 39: 601-617.
- [17]M. Hayn, W. Steiner, R. Klinger, H. Steinmüller, M. Sinner, H. Esterbauer. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics, in bioconversion of forest and agricultural plant residues. Saddle JN.CAB International, Wallingford. 1993, 33-72.
- [18]P. Sassner, M. Galbe, G. Zacchi. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme Microb Technol.* 2006, 39: 756-762.
- [19]C. Tengborg, K. Stenberg, M. Galbe, G. Zacchi, S. Larsson, E. Palmqvist, et al. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol.* 1998, 70: 3-15.
- [20]A. Wiselogle, J. Tyson, D. Johnsson. Biomass feedstock resources and composition, in handbook on bioethanol: production and utilization. Wyman CE. Taylor and Francis, Washington. 1996, 105-118.
- [21]S. M. Yan, G. Wu. Secretory pathway of cellulase-a mini-review. *Biotechnol Biofuels.* 2013, 6: 177-188.
- [22]H. Watanabe, G. Tokuda. Cellulolytic systems in insects. *Annu Rev Entomol.* 2010, 55: 609-632.
- [23]U. P. Consortium. The Universal Protein Eesource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38: 142-148.
- [24]W. Parawira. Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Crit Rev Biotechnol.* 2012, 32: 172-186.
- [25]H. Watanabe, G. Tokuda. Animal cellulases. *Cell Mol Life Sci.* 2001, 58: 1167-1178.
- [26]K. Sharrock. Cellulase assay methods: a review. *J Biochem Bioph Meth.* 1988, 17(2): 81-105.
- [27]B. Nidetzky, M. Hayn, R. Macarron, W. Steiner. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different cellulose. *Biotechnol Lett.* 1993, 15: 71-76.
- [28]M. T. Holtzapple, A. E. Humphrey. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnol Bioeng.* 1984, 26: 670-676.
- [29]C. E. Wyman, B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch, Y. Y. Lee. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource*

- Technol. 2005, 96: 1959-1966.
- [30]N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 2005, 96: 673-686 .
- [31]V. S. Chang, M. T. Holtzapple. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol.* 2000, 84(6): 5-37.
- [32]X. Pan, C. Arato, N. Gilkes, D. Gregg, W. Mabee, K. Pye, et al. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol Bioeng.* 2005, 90: 473-481 (2005).
- [33]T. H. Kim, J. S. Kim, C. Sunwoo, Y. Y. Lee. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour Technol.* 2003, 90: 39-47.
- [34]A. E. Farrell, R. J. Plevin, B. T. Turner, A. D. Jones, M. O'Hare, D. M. Kammen. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science.* 2006, 311: 506-508.
- [35]D. J. Schell, C. Harwood. Milling of lignocellulosic biomass-results of pilot-scale testing. *Appl Biochem Biotechnol.* 1994, 45: 159-168.
- [36]S. D. Zhu, Y. X. Wu, Z. N. Yu, Q. M. Chen, G. Y. Wu, F. Q. Yu, et al. Microwaveassisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosyst Eng.* 2006, 94: 437-442.
- [37]M. E. Himmel, S. Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. W. Brady, et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science.* 2007, 315: 804-807.
- [38]C. Schubert. Can biofuels finally take center stage. *Nat Biotechnol.* 2006, 24: 777-784.
- [39]Y. H. P. Zhang, M. E. Himmel, J. R. Mielenz. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 2006, 24: 452-481.
- [40]M. Holtzapple, M. Cognata, Y. Shu, C. Hendrickson. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng.* 1990, 36: 275-287.
- [41]H. Chen, S. Jin. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. *Enzyme Microb Technol.* 2006, 39: 1430-1432.
- [42]A.B. Moldes, J. L. Alonso, J. C. Parajo. Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *J Chem Technol Biotechnol.* 2001, 76: 279-284.
- [43]F. M. Girio, Fonseca C, Carvalheiro F, et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol.* 2010,101(13):4775-4800
- [44]A. Cardona, J. A. Quintero, I. C. Paz. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour Technol.* 2010, 101(13): 4754-4766.

- [45]B. Kamm, B. U. Schneider, et al. Lignocellulosic feedstock biorefinery-combination of technologies of agroforestry and a biobased substance and energy economy. *Forum der Forschung*. 2006, 19: 53-62.
- [46]S. H. Ryu, M. N. Karim. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, 91: 529-542.
- [47]X. Z. Zhang, Y. H. Zhang. One-step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant. *Eng. Life Sci*. 2010, 10(5): 398-406.
- [48]A. Kotaka, H. Bando, M. Kaya, et al. Direct ethanol production from barley beta-glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* beta-glucosidase and endoglucanase. *Biosci Bioeng*. 2008, 105(6): 622-627.
- [49]H. Golias, J. D. Geoffrey, S. Grant, et al. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol*. 2002, 96(2): 155-168.
- [50]P. Vinuselvi, S. K. Lee. Engineered *Escherichia coli* capable of co-utilization of cellobiose and xylose. *Enzyme Microb Tech*. 2012, 50(1): 1-4.
- [51]X. Z. Zhang, N. Sathitsuksanoh, et al. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*. 2011, 13(4): 364-372.
- [52]H. Hilbi, A. Haas. Secretive bacterial pathogens and the secretory pathway. *Traffic*. 2012, 13: 1187-1197.
- [53]J. M. F. de Oliveira, M. W. van Passel, P. J. Schaap, L. H. de Graaff. Shotgun proteomics of *Aspergillus niger* microsomes upon D-Xylose induction. *Appl Environ Microbiol*. 2010, 76: 4421-4429.
- [54]T. Tolmachova, R. Anders, J. Stinchcombe, G. Bossi, G. M. Griffiths, C. Huxley, M. C. Seabra. A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol Biol Cell*. 2004, 15: 332-344.
- [55]M. Fukuda. Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J Biochem*. 2005, 137: 9-1316.
- [56]M. Fukuda. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*. 2008, 65: 2801-2813.
- [57]K. C. Chou, H. B. Shen. Euk-mPLOC: a fusion classifier for large-scale eukaryotic protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites. *J Proteome Res*. 2007, 6: 1728-1734.
- [58]K. C. Chou, H. B. Shen. Cell-PLOC: A package of Web servers for predicting subcellular

- localization of proteins in various organisms. Nat Protoc. 2008, 3: 153-162.
- [59]A. K. Bal, D. P. S. Verma, H. Byrne, G. A. MacLachlan. Subcellular localization of cellulases in auxin-treated pea. J Cell Biol. 1976, 69: 97-105.
- [60]M. Desvaux, M. J. Parham, I. R. Henderson. Type V protein secretion: simplicity gone awry. Curr Issues Mol Biol. 2004, 6: 111-124.
- [61]T. W. Hill, J. T. Mullins. Hyphal tip growth in *Achlya*: II. subcellular localization of cellulase and associated enzymes. Can J Microbiol. 1980, 26: 1141-1146.
- [62]A. Ghosh, S. A. Rabiai, B. K. Ghosh, H. T. Vasquez, H. D. E. Eveleigh, B. S. Montenecourt. Increased endoplasmic reticulum content of a mutant of *Trichoderma reesei* (Rut-C30) in relation to cellulase synthesis. Enzyme Microb Technol. 1982, 4: 110-113.
- [63]A. Ghosh, B. K. Ghosh, H. T. Vasquez, D. E. Eveleigh, B. S. Montenecourt. Cellulase secretion from a hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* Rut-C30. Arch Microbiol. 1984, 140: 126-133.
- [64]Y. J. Cai, S. J. Chapman, J. A. Buswell, S. T. Chang. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and beta-glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. Appl Environ Microbiol. 1999, 65: 553-559.
- [65]R. G. Gardner, J. E. Wells, J. B. Russell, D. B. Wilson. The cellular location of *Prevotella ruminicola* beta-1,4-D-endoglucanase and its occurrence in other strains of ruminal bacteria. Appl Environ Microbiol. 1995, 61: 3288-3292.
- [66]J. B. Russell. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. Appl Environ Microbiol. 1985, 49: 572-576.
- [67]O. Matsushita, J. B. Russell, D. B. Wilson. Cloning and sequencing of a *Bacteroides ruminicola* B14 endoglucanase gene. J Bacteriol. 1990, 172: 3620-3630.
- [68]G. Avgustin, H. J. Flint, T. R. Whitehead. Distribution of xylanase genes and enzymes among strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* from the rumen. FEMS Microbiol Lett. 1992, 99: 137-144.
- [69]P. E. Vercoe, K. Gregg. DNA sequence and transcription of an endoglucanase gene from *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* AR20. Mol Gen Genet. 1992, 233: 284-292.
- [70]T. R. Whitehead. Analyses of the gene and amino acid sequence of the *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* 23 xylanase reveals unexpected homology with endoglucanases from other genera of bacteria. Curr Microbiol. 1993, 27: 27-33.
- [71]M. McGavin, J. Lam, C. W. Forsberg. Regulation and distribution of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 endoglucanases. Appl Environ Microbiol. 1990, 56: 1235-1244.

- [72]D. Groleau, C. W. Forsberg. The cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. Can J Microbiol. 1981, 27: 517-530.
- [73]D. Groleau, C. W. Forsberg. Partial characterization of the extracellular endoglucanase produced by *Bacteroides succinogenes*. Can J Microbiol. 1983, 29: 504-517.
- [74]H. E. SchelHhorn, C. W. Forsberg. Multiplicity of extracellular beta-1,4-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. Can J Microbiol. 1984, 30: 930-937.
- [75]M. McGavin, C. W. Forsberg. Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes*. J Bacteriol. 1988, 170: 2914-2922.
- [76]M. McGavin, C. W. Forsberg, B. Crosby, A. W. Bell, D. Dignard, D. Y. Thomas. Structure of the cel-3 gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 and characteristics of the encoded gene product, endoglucanase 3. J Bacteriol. 1989, 171: 5587-5595.
- [77]L. Huang, C. W. Forsberg, D. Y. Thomas. Purification and characterization of a chloride-stimulated cellobiosidase from *Bacteroides succinogenes*. J Bacteriol. 1988, 170: 2923-2932.
- [78]L. Huang, C. W. Forsberg. Isolation of a cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. Appl Environ Microbiol. 1987, 53: 1034-1041.
- [79]L. Huang, C. W. Forsberg. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. Appl Environ Microbiol. 1990, 56: 1221-1228.
- [80]G. P. Salmond, P. J. Reeves. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. Trends Biochem Sci. 1993, 18: 7-12.
- [81]I. R. Henderson, J. P. Nataro, J. B. Kaper, T. F. Meyer, S. K. Farrand, D. L. Burns, B. B. Finlay. Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. Trends Microbiol. 2000, 8: 352.
- [82]D. G. Thanassi, S. J. Hultgren. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr Opin Cell Biol. 2000, 12: 420-430.
- [83]C. Andersen. Channel-tunnels, outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2003, 147: 122-165.
- [84]C. Stathopoulos, D. R. Hendrixson, D. G. Thanassi, S. J. Hultgren, J. W. St Geme 3rd, R. Curtiss 3rd. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens, an evolving story. Microbes Infect. 2000, 2: 1061-1072.
- [85]M. Sandkvist. Biology of type II secretion. Mol Microbiol. 2001, 40: 271-283.
- [86]D. Buttner, U. Bonas. Port of entry, the type III secretion translocon. Trends Microbiol. 2002, 10: 186-192.
- [87]A. Blocker, K. Komoriya, S. Aizawa. Type III secretion systems and bacterial flagella,

- insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100: 3027-3030.
- [88] A. Gauthier, N. A. Thomas, B. B. Finlay. Bacterial injection machines. *J Biol Chem*. 2003, 278: 25273-25276.
- [89] P. J. Christie, J. P. Vogel. Bacterial type IV secretion, conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*. 2000, 8: 354-360.
- [90] P. J. Christie. Type IV secretion, intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol*. 2001, 40: 294-305.
- [91] M. R. Yen, C. R. Peabody, S. M. Partovi, Y. Zhai, Y. H. Tseng, M. H. Saier. Protein translocating outer membrane porins of gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1562: 6-31.
- [92] J. D. Mougous, M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordonñez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak, J. J. Mekalanos. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. 2006, 312: 1526-1530.
- [93] S. Pukatzki, A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg, J. J. Mekalanos. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006, 103: 1528-1533.
- [94] F. Boyer, G. Fichant, J. Berthod, Y. Vandenbrouck, I. Attree. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*. 2009, 10: 104.
- [95] L. E. Bingle, C. M. Bailey, M. J. Pallen. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*. 2008, 11: 3-8.
- [96] A. Filloux, A. Hachani, S. Bleves. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*. 2008, 154: 1570-1583.
- [97] P. A. Champion, M. M. Champion, P. Manzanillo, J. S. Cox. ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol*. 2009, 73: 950-962.
- [98] W. Bitter, E. N. Houben, D. Bottai, P. Brodin, E. J. Brown, J. S. Cox, K. Derbyshire, S. M. Fortune, L. Y. Gao, J. Liu, N. C. G. van Pittius, A. S. Pym, E. J. Rubin, D. R. Sherman, S. T. Cole, R. Brosch. Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathog*. 2009, 10: e1000507.
- [99] M. H. Daleke, R. Ummels, P. Bawono, J. Heringa, C. M. Vandenbroucke-Grauls, J. Luirink, W. Bitter. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012, 109: 11342-11347.

- [100] M. Desvaux, M. Hébraud, R. Talon, I. R. Henderson. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 2009, 17: 139-145.
- [101] J. Rosch, M. Caparon. A microdomain for protein secretion in gram-positive bacteria. *Science.* 2004, 304: 1513-1515.
- [102] L. Diao, Q. Dong, Z. Xu, S. Yang, J. Zhou, R. Freudl. Functional implementation of the posttranslational SecB-SecA protein-targeting pathway in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 2012, 78: 651-659.
- [103] M. Anderson, Y. H. Chen, E. K. Butler, D. M. Missiakas. EsaD, a secretion factor for the Ess pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2011, 193: 1583-1589.
- [104] A. Fagerlund, T. Lindbäck, P. E. Granum. *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol.* 2010, 10: 304.
- [105] C. A. Wilson, T. M. Wood. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992, 37: 125-129.
- [106] E. A. Bayer, J. P. Belaich, Y. Shoham, R. Lamed. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 2004, 58: 521-554.
- [107] B. R. Ali, L. Zhou, F. M. Graves, R. B. Freedman, G. W. Black, H. J. Gilbert, G. P. Hazelwood. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol Lett.* 1995, 125: 15-21.
- [108] A. Pugsley. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 1993, 57: 50-108.
- [109] D. Wharam, V. Mulholland, G. P. C. Salmond. Conserved virulence factor regulation and secretion systems in bacterial pathogens of plants and animals. *Eur J Plant Pathology.* 1994, 101: 1-13.
- [110] F. Wen, N. U. Nair, H. Zhao. Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Curr Opin Biotechnol.* 2009, 20: 412-419.
- [111] L. R. Lynd. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 1996, 21: 403-465.
- [112] D. Grange, R. Haan, W. H. Zyl. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010, 87: 1195-1208.
- [113] L. R. Lynd, W. H. Zyl, J. E. McBride, M. Laser. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2005, 16: 577-583.
- [114] J. G. Shewale. β -glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose.

Int J Biochem. 1982, 14: 435-443.

- [115] C. Weber, A. Farwick, F. Benisch, D. Brat, et al. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010, 87: 1303-1315.
- [116] D. M. Adin, K. L. Visick, E. V. Stabb. Identification of a cellobiose utilization gene cluster with cryptic β -galactosidase activity in *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol.* 2008, 74: 4059-4069.
- [117] V. Parisutham, S. K. Lee. Engineering *Escherichia coli* for efficient cellobiose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 92: 125-132.
- [118] L. O. Ingram, T. Conway, D. P. Clark, G. W. Sewell, J. F. Preston. Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1987, 53(10): 2420-2425.
- [119] S. Romero, E. Merino, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 2007, 73(16): 5190-5198.
- [120] O. Delumeau, R. J. Lewis, et al. Protein-protein interactions that regulate the energy stress activation of σ^B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2002, 184(20): 5583-5589.
- [121] C. M. Gowen, S. S. Fong. Applications of systems biology towards microbial fuel production. *Trends Microbiol.* 2011, 19: 516-524.
- [122] K. Ohta, D. S. Beall, J. P. Mejia, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl Environ Microbiol.* 1991, 57: 893-900.
- [123] A. Petersohn, M. Brigulla, et al. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2001, 183(19): 5617-5631.
- [124] M. F. S. Barbosa, L. O. Ingram. Expression of the *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase II (*adhB*) and pyruvate decarboxylase (*pdc*) genes in *Bacillus*. *Curr Microbiol.* 1994, 28: 279-282.
- [125] J. Stulke, W. Hillen. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol.* 2000, 54: 849-880.
- [126] S. R. Garcia, C. H. Bustos, et al. Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.* 2009, 8(1): 23-30.
- [127] E. B. Messaoud, M. B. Ali, et al. Purification and properties of a maltoheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116. *Enzyme Microb Tech.* 2004, 34(7): 662-666.
- [128] H. Y. Cho, Y. W. Kim, T. J. Kim, H. S. Lee, D. Y. Kim, J. W. Kim, Y. W. Lee, S. B.

- Lee, K. H. Park. Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, 1478: 333-340.
- [129] Y. Kim, L. O. Ingram, K. T. Shanmugam. Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanogenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl Environ Microb*. 2007, 73: 1766-1771.
- [130] B. S. Dien, N. N. Nichols, P. J. O'Bryan, R. J. Bothast. Development of new ethanogenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem Biotech*. 2000, 84-86: 181-196.
- [131] M. Orencio-Trejo, N. Flores, A. Escalante, G. Hernández-Chávez, F. Bolívar, G. Gosset, A. Martinez. Metabolic regulation analysis of an ethanogenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnol Biofuels*. 2008, 1: 8.
- [132] K. Kotarska, B. Czuprynński, G. Kłosowski. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. *J Food Eng*. 2006, 77: 965-971.
- [133] S. E. Lindsay, R. J. Bothast, L. O. Ingram. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995, 43: 70-75.
- [134] F. Alterthum, L. O. Ingram. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1989, 55: 1943-1948.
- [135] S. A. Underwood, M. L. Buszko, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram. Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanogenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 2004, 70: 2734-2740.
- [136] S. A. Underwood, S. Zhou, T. B. Causey, L. P. Yomano, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram. Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2002, 68: 6263-6272.
- [137] H. G. Lawford, J. D. Rousseau. Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* carrying genes from *Zymomonas mobilis*. *Appl Biochem Biotech*. 1991, 28: 221-236.
- [138] F. S. Chambergo, E. D. Bonaccorsi, A. J. S. Ferreira, A. S. P. Ramos, J. R. Ferreira Júnior, J. Abrahão-Neto, J. P. Farah, H. El-Dorry. (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem*. 2002, 277: 13983-13988.
- [139] T. Fuhrer, U. Sauer. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J Bacteriol*. 2009, 191: 2112-2121.
- [140] F. J. M. Mergulhao, D. K. Summersb, G. A. Monteiro. Recombinant protein secretion in

Escherichia coli. Biotechnol Adv. 2005;23:177-202.

- [141] J. H. Choi, S. Y. Lee. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;64:625-35.
- [142] K. A. Datsenko, B. L. Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. P Natl Acad Sci USA. 2000, 97: 6640-6645.
- [143] P. P. Cherepanov, W. Wackernagle. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene. 1995, 158: 9-14.
- [144] S. E. Luria, M. Delbruck. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics. 1943, 28: 491-511.
- [145] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, et al. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [146] G. Shefali, A. Nidhi, S. Y. Syed. Efficient extracellular secretion of an endoglucanase and a β -glucosidase in *E. coli*. Protein Expres Purif. 2013, 88: 20-25.
- [147] Y. Zhang, J. Cui, L. Lynd, L. Kuangs. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. Biomacromolecules. 2006, 7(2): 644-648.
- [148] D. M. Carter, C. M. Radding. The role of exonuclease and β protein of phage λ in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of lambda exonuclease. J Biol Chem. 1971, 246(8): 2502-2512.
- [149] R. Kovall, B. W. Matthews. Toroidal structure of lambda-exonuclease. Science. 1997, 277(5333): 1824-1827.
- [150] K. Muniyappa, C. M. Radding. The homologous recombination system of phage λ . Pairing activities of β protein. J Biol Chem. 1986, 261(16): 7472-7478.
- [151] S. I. Passy, X. Yu, Z. Li, et al. Rings and filaments of β protein from bacteriophage λ suggest a superfamily of recombination proteins. P Natl Acad Sci USA. 1999, 96(8): 4279-4284.
- [152] A. E. Karu, Y. Sakaki, H. Echols. The gamma protein specified by bacteriophage λ . Structure and inhibitory activity for the RecBC enzyme of *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1975, 250(18): 7377-7387.
- [153] J. M. Liu, X. J. Xin, C. X. Li, J. H. Xu, J. Bao. Cloning of thermostable cellulase genes of *Clostridium thermocellum* and their secretive expression in *Bacillus subtilis*. Appl Biochem Biotech. 2011, 166: 652-662.
- [154] A. Shokri, A. M. Sanden, G. Larsson. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2003, 60: 654-664.

- [155] H. Sahn, S. Breinger-Meyer, G. Sprenger. The genus *Zymomonas*. The Prokaryotes. 2006, 5: 201-221.
- [156] J. P. Belaich, J. C. Senez. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 1965, 89: 1195-120
- [157] P. Lindner. Gärungsstudien über Pulque in Mexiko. Bericht des Westpreussischen Botanisch-Zoologischen Vereins. 1928, 50: 253-255.
- [158] P. Rogers, K. Lee, M. Skotnicki, et al. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv Biochem Eng. 1982, 23: 37-83.
- [159] [159] L. Viikari. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. Crit Rev Biotechnol. 1988, 7: 237-261.
- [160] L. Viikari. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Appl Microbial Biotechnol. 1984, 19: 252-255.
- [161] M. Zhang, C. Eddy, K. Deanda, M. Finkstein, S. Picataggio. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. Science. 1995, 267: 240-243.
- [162] Ming Xiong He, Bo Wu, Han Qin, Zhi Yong Ruan, Fu Rong Tan, Jing Li Wang, Zong Xia Shui, Li Chun Dai, Qi Li Zhu, Ke Pan, Xiao Yu Tang, Wen Guo Wang and Qi Chun Hu. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. Biotechnology for Biofuels. 2014, 7:101
- [163] P. L. Rogers, Y. J. Jeon, K. J. Lee, H. G. Lawford. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007, 108: 263-288.
- [164] P. L. Rogers, K. J. Lee, D. E. Tribe. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. Process Biochem. 1980, 15: 7-11.
- [165] P. L. Rogers, K. J. Lee, and D. E. Tribe. 1979. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. Biotechnol. Lett. 1:165-170.
- [166] M. D. Yablonsky, A. E. Goodman, N. Stevnsborg, O. G. Delima, J. O. F. Demorais, H. G. Lawford, P. L. Rogers, and D. E. Eveleigh. *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profiles. J Biotechnol. 1988, 9: 71-79.
- [167] Y. Lin, S. Tanaka. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 2006, 69: 627-642.
- [168] H. Doelle, L. Kirk, R. Crittenden, H. Toh, M. Doelle. *Zymomonas mobilis*: science and industrial application. Crit Rev Biotechnol. 1993, 13: 57-98.
- [169] H. Yanase, K. Nozaki, K. Okamoto. Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 2005, 27: 259-263.
- [170] M. L. Skotnicki, K. J. Lee, D. E. Tribe, P. L. Rogers. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. Appl. Environ. Microbiol. 1981, 41: 889-893.
- [171] K. Deanda, M. Zhang, C. Eddy, S. Picataggio. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. Appl Environ

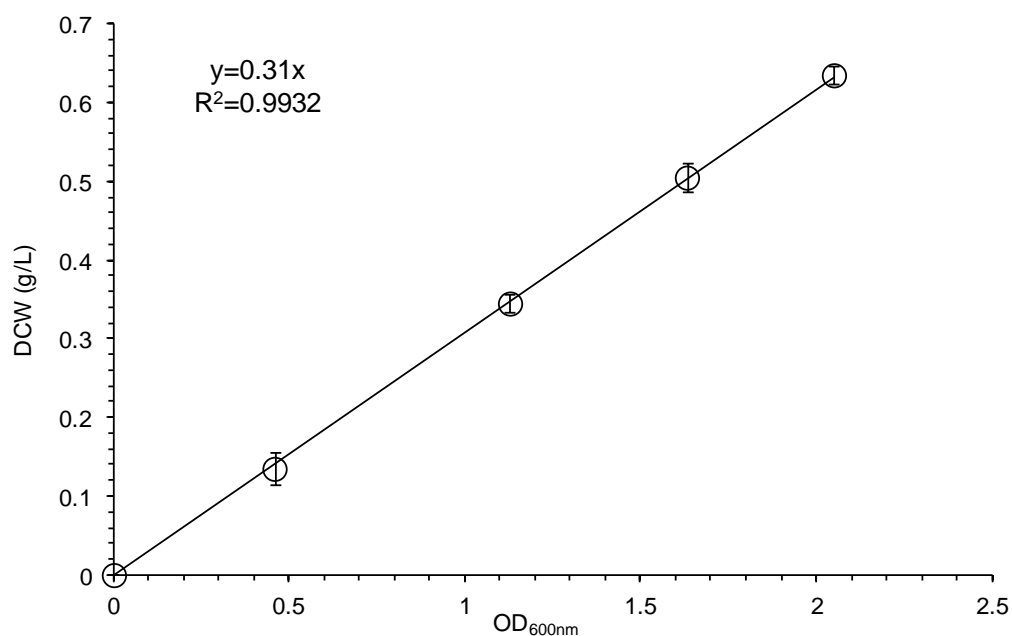
- Microbiol. 1996, 62: 4465-4470.
- [172] M. Agrawal, Z. Mao, R. R. Chen. Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain. *Biotechnol Bioeng.* 2011, 108: 777-785.
- [173] M. Agrawal, R. R. Chen. Discovery and characterization of a xylose reductase from *Zymomonas mobilis* ZM4. *Biotechnol Lett.* 2011, 33: 2127-2133.
- [174] T. Jeffries, Y. Jin. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv Appl Microbiol.* 2000, 47: 222-268.
- [175] B. Wu, M. X. He, H. Feng, Z. X. Shui, X. Y. Tang, Q. C. Hu, Y. Z. Zhang. Construction of a novel secretion expression system guided by native signal peptide of PhoD in *Zymomonas mobilis*. *Biosci Biotech Bioch.* 2014, 78: 708-713.
- [176] J. G. Linger, W. S. Adney, A. Darzins. Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol.* 2010, 76: 6360-6369.
- [177] N. Brestic-Goachet, P. Gunasekaran, B. Cami, J. C. Baratti. Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J Gen Microbiol.* 1989, 135: 893-902.
- [178] A. Lejeune, D. E. Eveleigh, C. Colson. 1988. Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosae* in *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988, 49: 363-366.
- [179] N. Misawa, T. Okamoto, K. Nakamura. Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol.* 1988, 7: 167-178.
- [180] K. H. Yoon, S. H. Park, M. Y. Pack. Transfer of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase gene into *Zymomonas anaerobia*. *Biotechnol Lett.* 1988, 10: 213-216.
- [181] K. N. Rajnish, G. M. Kishore Choudhary, P. Gunasekaran. Functional characterization of a putative endoglucanase gene in the genome of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett.* 2008, 30: 1461-1467.
- [182] H. W. Dong, J. Bao, D. D. Y. Ryu, J. J. Zhong. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnol Bioeng.* 2011, 10: 1616-1627.
- [183] R. Simon, U. Prierer, A. Puhler. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech.* 1983, 1: 784-791.
- [184] J. C. Saez-Miranda, L. Saliceti-Piazza, J. D. McMillan. Measurement and analysis of intracellular ATP levels in metabolically engineered *Zymomonas mobilis* fermenting glucose and xylose mixtures. *Biotechnol Prog.* 2006, 22: 359-368.
- [185] Y. Zhang, Z. C. Luo, J. Bao. Construction of an ethanologenic *Escherichia coli* strain with secretive expression of β -glucosidase. *Chin J Biotech.* 2013, 29: 1254-1267.
- [186] A. Vigants, D. Upite, R. Scherbaka, J. Lukjanenko, R. Ionina. An influence of ethanol and temperature on products formation by different preparations of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Folia Microbiol.* 2013, 58: 75-80.

- [187] V. Senthilkumar, J. Rajendhran, S. J. W. Busby, P. Gunasekaran. Characterization of multiple promoters and transcript stability in the *sacB-sacC* gene cluster in *Zymomonas mobilis*. Arch Microbiol. 2009, 191: 529-541.
- [188] V. Senthilkumar, N. Rameshkumar, S.J.W. Busby, P. Gunasekaran. Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (*sacC*) improves levan production. J Appl Microbiol. 2004, 96: 671-676.
- [189] J. Lukjanenko, P. Zikmanis, R. Sherbaka, R. Jonina, A. Vigants. Ethanol production improvement in *Zymomonas mobilis* by supplementation of fructan-cleaving enzymes on sucrose containing substrates. J Biotechnol. 2010, 150: 360.
- [190] R. Kannan, G. M. N. Aft-Abdelkader, V. AM. J. Baratti, P. Gunasekaran. Molecular cloning and characterization of the extracellular sucrose gene (*sacC*) of *Zymomonas mobilis*. Arch Microbiol. 1995, 163: 195-204.
- [191] V. K. Ananthalakshmy, P. Gunasekaran. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. Enzyme Microb Tech. 1999, 25: 109-115.
- [192] N. A ĩ-Abdelkader, A. D. Caro, J. Guzzo, G. P. F. Michel, J. C. Baratti. The intracellular sucrose (SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. Biotechnol Lett. 2000, 22: 461-467.
- [193] P. Gunasekaran, G. Mukundan, R. Kannan, S. Velmurugan, N. Ait-Abdelkader, E. Alvarez-Macarie, J. Baratti. The *sacB* and *sacC* genes encoding levansucrase and sucrose form a gene cluster in *Zymomonas mobilis*. Biotechnol Lett. 1995, 17: 635-642.
- [194] S. Silke, H. S. Wolfgang. Properties of a thermoactive β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Clostridium thermocellum* expressed in *Escherlichia coli*. Biochem Bioph Res Co. 1991, 31: 447-452.
- [195] D. Teng, Y. Fan, Y. L. Yang, Z. G. Tian, J. Luo, J. H. Wang. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol. 2007, 74: 1074-1083.
- [196] L. G. Declan, H. W. Hilde. Mashing with unmalted barley-impact of malted barley and commercial enzyme (*Bacillus spp.*) Additions. MBAA Technical Quarterly. 2005, 42: 184-198.
- [197] S. Li, W. C. Sauer, S. X. Huang, V. I. Gabert. Effect of beta-glucanase supplementation to hullless barley- or wheat-soybean meal diets on the digestibilities of energy, protein, beta-glucans and amino acid in young pigs. J Anim Sci. 1996, 74: 1649-1656.
- [198] Planas, A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanase: structure, function and protein engineering. Biochim Biophys Acta. 2000, 1543: 361-382.
- [199] P. F. Gilvan, F. R. Lucas, R. S. Camila, C. T. Celisa, R. S. Angelica, R. O. Renata, T. M. Mario, J. W. Richard. Biochemical and structural characterization of a

- β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochem.* 2011, 46: 1202-1206.
- [200] M. Liu, J. Wang, J. Liu, J. M. Yao, Z. L. Yu. Expression of *Bacillus subtilis* JA18 endo- β -1,4-glucanase gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Ann Microbiol.* 2006, 56: 41-45.
- [201] O. Olsen, R. Borriss, O. Simon, K. K. Thomsen. Hybrid *Bacillus* (1-3,1-4)- β -glucanase: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Mol Gen Genet.* 1991, 225: 177-185.
- [202] J. Singh, N. Batra, R. C. Sobti. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate *Bacillus sphaericus* JS1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2004, 31: 51-56.
- [203] D. Teng, J. H. Wang, Y. Fan, Y. L. Yang. (2006). Cloning of β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006, 72: 705-712.
- [204] D. S. Lee, H. G. Chang. Cloning and expression of a β -1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* KCTC 3004 in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 1995, 17: 355-360.
- [205] J. Y. Kim. Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (*bglBC1*) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnol Lett.* 2003, 25: 1445-1449.
- [206] T. N. Wen, J. L. Chen, S. H. Lee, N. S. Yang, L. F. Shyr. A truncated *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- β -glucanase with improved enzymatic activity and thermotolerance. *Biochemistry.* 2005, 44: 9197-9205.
- [207] S. Q. Yang, Q. J. Yan, Z. Q. Jiang, G. S. Fan, L. Wang. Biochemical characterization of a novel thermostable β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. *J Agric Food Chem.* 2008, 56: 5345-5351.
- [208] H. Li, J. Chen, A. N. Li, D. C. Li. Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007, 23: 1297-1303.
- [209] X. C. Wu, W. Lee, S. L. Wong. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J Bacteriol.* 1991, 173(17): 4952-4958.
- [210] E. Johnson, A. Madia, A. Demain. Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microb.* 1981, 41(4): 1060.
- [211] J. Spizizen. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *P Natl Acad Sci USA.* 1958, 44: 1072.
- [212] J. Zhang, X. F. Du, N. Q. Rao. Measurement of β -glucan from oats by congo red. *Journal of Anhui Agricultural University.* 2007, 34(1): 23-26.

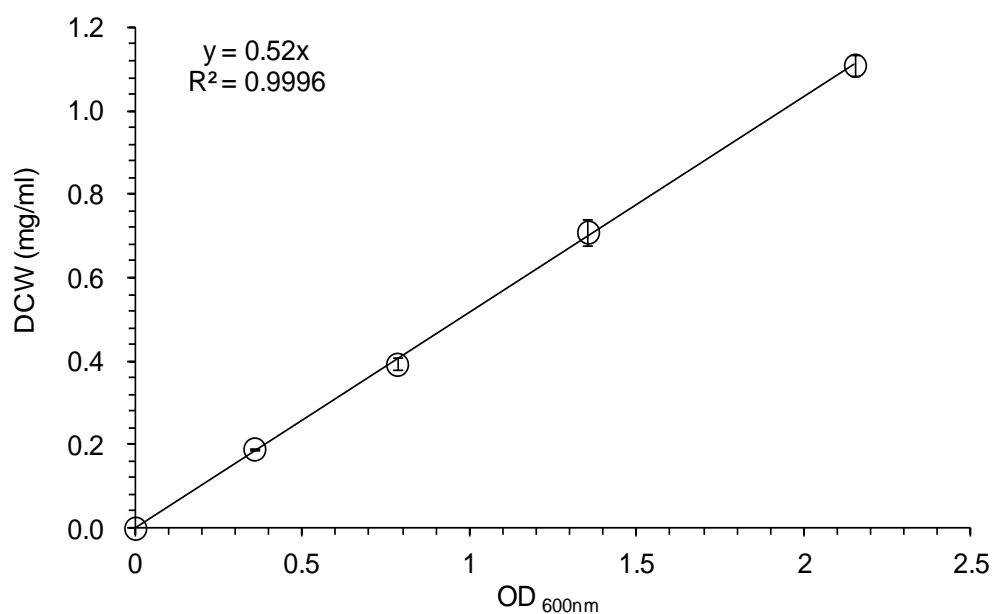
- [213] S. Silke, H. S. Wolfgang, W. L. Staudenbauer. Structure of the *Clostridium thermocellum* gene *licB* and the encoded β -1,3-1,4-glucanase. *Eur J Biochem.* 1992, 204: 13-19.
- [214] J. Y. Qiao, B. Dong, Y. H. Li, B. Zhang, Y. H. Cao. Cloning of a β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009, 152: 334-342.
- [215] J. Sun, H. X. Wang, W. P. Lv, C. Y. Ma, Z. X. Lou, Y. X. Dai. Construction and characterization of a fusion β -1,3-1,4-glucanase to improve hydrolytic activity and thermostability. *Biotechnol Lett.* 2011, 33(11): 2193-2199.
- [216] D. H. Westermann, N. J. Huige. In *Microbial Technology* (H. J. Peppler and D. Perlman, ed), Academic Press, New York. 1979, Vol. 2: 1-37.
- [217] H. L. Lee, C. K. Chang, K. H. Teng, P. H. Liang. Construction and characterization of different fusion proteins between cellulases and β -glucosidase to improve glucose production and thermostability. *Bioresource Technology.* 2011, 102: 3973-3976.

附录



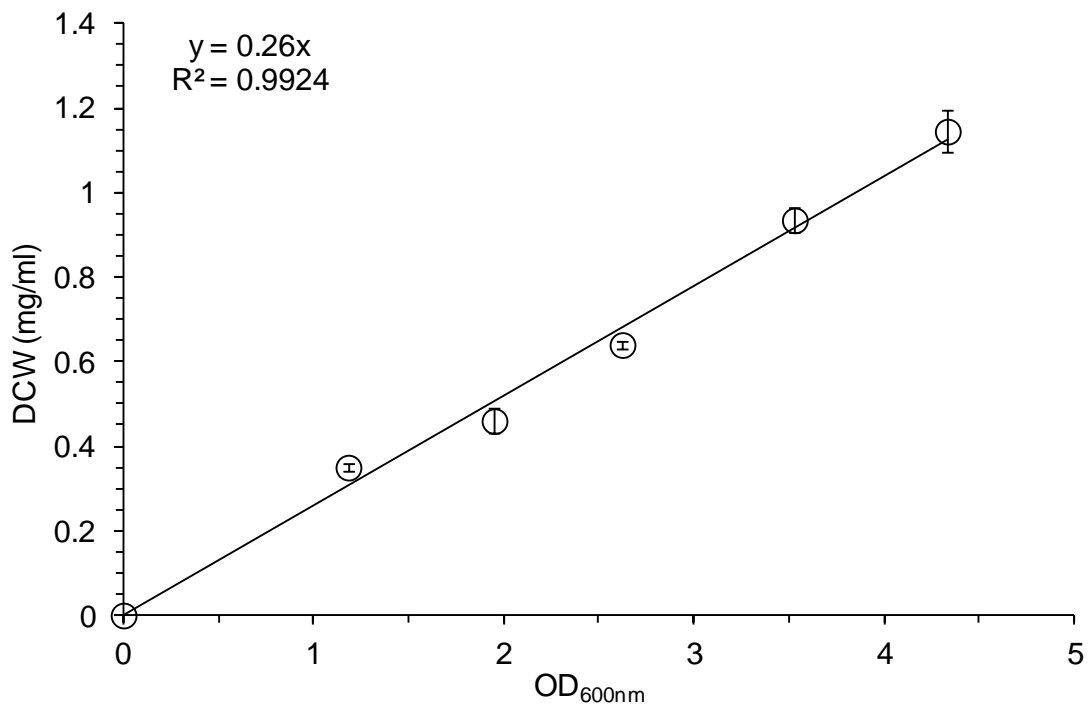
附图 1: 运动发酵单胞菌细胞光密度 (OD_{600nm}) 与细胞干重关系图

Appendix Fig.1 The relationship between *Zymomonas mobilis* cell concentration and its optical density at 600nm



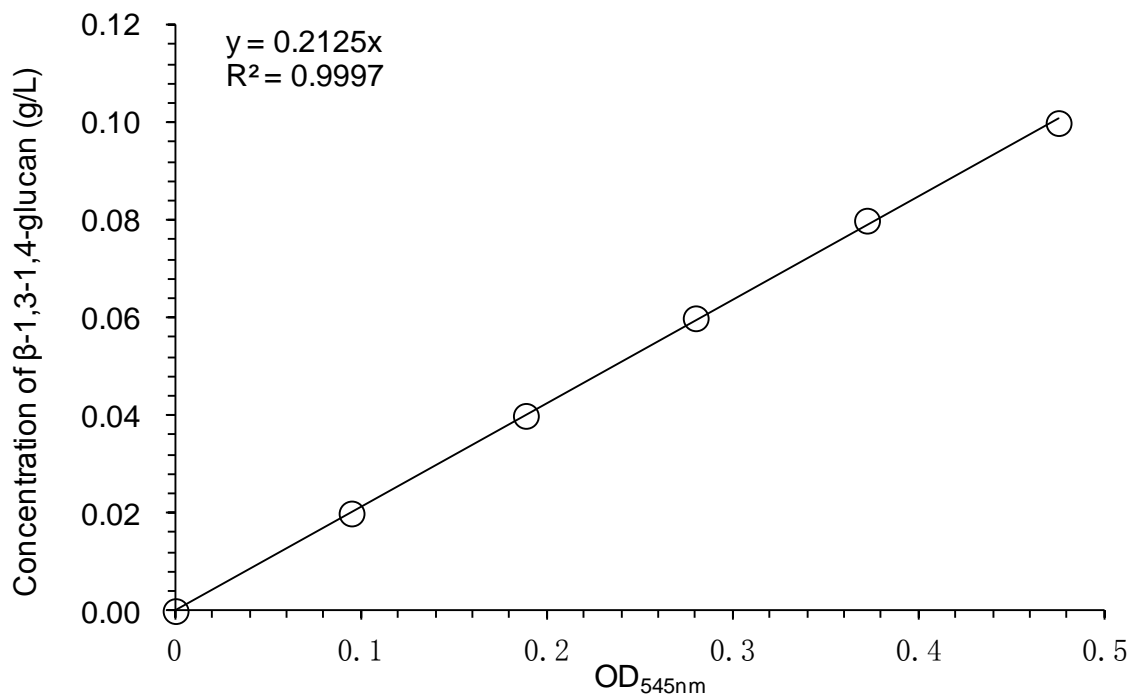
附图 2: 大肠杆菌 *E. coli* P81 细胞光密度 (OD_{600nm}) 与细胞干重关系图

Appendix Fig.2 The relationship between *E. coli* P81 cell concentration and its optical density at 600nm



附图 3: 枯草芽孢杆菌细胞光密度 (OD_{600nm}) 与细胞干重关系图

Appendix Fig.3 The relationship between *B. subtilis* cell concentration and its optical density at 600nm



附图 4: 刚过红法测定 β-1,3-1,4-葡聚糖标准曲线

Appendix Fig.4 The standard curve of β-1,3-1,4-glucan concentration by Congo red spectroscopic method

博士期间研究成果

研究论文:

致谢

啊