

木质纤维素降解酶的酶学特性表征及在产乙醇菌内的表达

摘要

本论文以木质纤维素降解为可发酵单糖的过程为背景,对木质纤维素降解酶的酶学特性表征及在产乙醇基因菌内的表达进行了研究。首先对木质纤维素预处理过程中所产生的三类降解产物进行了定性和定量分析,确定了七种降解产物作为代表性的酶水解与发酵抑制剂,包括三种有机酸产物甲酸、乙酸、乙酰丙酸;两种呋喃类产物糠醛、羟甲基糠醛;两种苯酚类产物香兰素、对羟基苯甲醛。对上述七种抑制物对工业纤维素酶 Spezyme CP (Genencor International) 的抑制作用在静态和充分混合的条件下进行了详细的表征。在对纤维素酶组分进行合理简化的前提下,对纤维素酶 Spezyme CP 在上述抑制物存在的条件下的酶反应动力学进行了实验测定,获得了 Spezyme CP 的各种表观酶动力学参数,包括表观米氏常数、最大反应速率和各类抑制物的表观抑制因子。同时测定乙醇作为抑制因子的表观动力学常数,并与木质纤维素降解产物的抑制效应进行了对比。基于上述表征结果,对上述七种木质纤维素抑制产物和乙醇对工业纤维素酶的抑制进行了详细分析。这一结果对定量理解木质纤维素预处理降解产物对纤维酶的抑制具有重要的意义。在此工作的基础之上,选择纤维素酶组分中最适于进行基因工程调控的纤维二糖酶在产乙醇基因菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 进行了表达,以使 *Z. mobilis* ZM4 具备酶水解和乙醇发酵的双重功能。首先对不同物种来源的纤维二糖酶(β -葡萄糖苷酶)进行了筛选,挑选出了一个从 *Bacillus polymyxa* AS 1.794 获得的高特异性水解纤维二糖的酶基因。将该基因克隆到本实验室构建的高效接合转化穿梭质粒 pLOI193 中,结合转化到 *Z. mobilis* ZM4 中进行了过量表达,获得了高酶活的外源纤维二糖酶蛋白,为今后纤维素酶基因在产乙醇基因菌中的表达进行了有益探索。

关键字: 纤维素酶; 酶学特征表征; 抑制效应; 纤维二糖酶; 过量表达

Characterization of lignocellulose degradating enzymes and expression in ethanologenic strain

Abstract

The thesis studied the characteristic of the lignocellulose degradating enzyme and expression in ethanologenic strain *Zymomonas mobilis* ZM4 in the hydrolysis of lignocellulose to fermentable monosaccharides. The three kinds of lignocellulose degradation products were identified as the inhibitors on the enzymatic hydrolysis and fermentation, qualitatively and quantitatively, including three organic acids as formic acid, acetic acid, and levulinic acid, two furan derivatives as furfural and 5-hydroxymethyl furfural, two lignin degradation products as vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde. The inhibition of the seven inhibitors on the industrial cellulase enzyme Spezyme CP (Genencor International) was investigated in static state and well mixing state. The cellulase activity in the cellulase complex of Spezyme CP was assumed to be one single “cellulase” and the apparent kinetic parameters of this “cellulase” enzyme were measured as an approximate index of the inhibitory effect to the industrial cellulase enzyme. The inhibition parameters of ethanol was also measured in the same method. With this result, we analysed the inhibition of the three kinds of degradation by-products and ethanol on cellulase which gave a quantitative view to the enzymatic hydrolysis of lignocellulose under the inhibition performance of the lignocellulose degradation products. Based on the above works, a specially selected cellulase enzyme gene, beta-glucosidase gene, was cloned and expressed into ethanologenic strain *Zymomonas mobilis* ZM4. A cellobiase gene from *Bacillus polymyxa* AS 1.794 was selected and cloned in the pLT-20a conjugation shuttle vector constructed in our laboratory and then transformed in *Z. mobilis* ZM4. The cellobiase gene expressed in *Z. mobilis* ZM4 gave a high cellobiase activity. The result gave a useful view on the expression of cellulase on *Z. mobilis* ZM4 and expression of cellulase genes.

Key words: Cellulase; Characterization of enzymatic feature; Inhibition effect; Cellobiase; High expression

目 录

前言.....	1
第一章 综述.....	2
1.1 能源发展现状.....	2
1.2 发展燃料乙醇的意义.....	3
1.3 燃料乙醇的发展现状.....	4
1.4 开发纤维素制乙醇工艺的意义及开发方法.....	4
1.5 木质纤维素的组成和结构特征.....	5
1.6 木质纤维素的预处理方法.....	7
1.6.1 化学法.....	7
1.6.2 物理化学法.....	8
1.6.3 生物预处理.....	9
1.7 木质纤维素稀酸预处理所产生的副产物.....	9
1.8 木质纤维素的酶水解.....	10
1.8.1 纤维素酶的组成及其作用方式.....	10
1.8.2 纤维素酶的分子结构与功能.....	11
1.8.3 β -葡萄糖苷酶.....	11
1.9 β -葡萄糖苷酶的克隆表达.....	12
第二章 纤维素酶的特征.....	15
2.1 实验药品和材料.....	15
2.2 实验仪器.....	15
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 50mM pH4.8 柠檬酸缓冲液的配制.....	15
2.3.2 DNS 溶液的配制.....	15
2.3.3 纤维素酶活力测定.....	16
2.3.4 纤维二糖酶活力测定.....	17
2.3.5 玉米秸秆稀酸预处理.....	17
2.3.6 玉米秸秆稀酸预处理水解液成分测定.....	17
2.3.7 滤纸纤维素酶水解.....	17
2.3.8 纤维素酶动力学参数计算.....	17
2.4 实验结果.....	18
2.4.1 木质纤维素降解副产物存在情况下初始反应速率的确定.....	18
2.4.2 混合状态下滤纸纤维素酶水解.....	18
2.4.3 静止状态下滤纸纤维素酶水解.....	21
2.5 小结.....	27

第三章 纤维二糖酶基因的克隆表达.....	28
3.1 菌株和质粒.....	28
3.2 培养基, 培养条件及常用抗生素.....	28
3.2.1 培养基.....	28
3.2.2 培养条件.....	29
3.2.3 菌种保存.....	29
3.2.4 抗生素和相关化学试剂.....	29
3.3 溶液、缓冲液的配制及所用试剂.....	30
3.3.1 细胞破碎缓冲液.....	30
3.3.2 0.2mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液.....	30
3.4 所用仪器.....	31
3.5 实验方法.....	31
3.5.1 质粒 DNA 的提取.....	31
3.5.2 质粒 DNA 的定量.....	32
3.5.3 细菌基因组 DNA 的提取.....	32
3.5.4 琼脂糖凝胶电泳.....	33
3.5.5 PCR 扩增和 DNA 酶切.....	34
3.5.6 DNA 片段的分离与回收.....	34
3.5.7 DNA 连接.....	35
3.5.8 质粒 DNA 转化.....	36
3.5.9 基因的表达与蛋白的检测.....	37
3.5.10 凝胶摄像和保存.....	39
3.5.11 Bradford 蛋白浓度测定.....	39
3.5.12 粗酶液的提取.....	40
3.6 实验结果.....	41
3.6.1 纤维二糖酶基因的筛选.....	41
3.6.2 <i>Bacillus polymyxa</i> 1.794 基因在 <i>Zymomonas mobilis</i> ZM4 中的克隆表达.....	51
3.7 小结.....	55
第四章 结论.....	56
参考文献.....	57
发表文献.....	61
致 谢.....	62

前言

生物质能在可再生能源中占有特殊地位，它是唯一可储存和可运输的可再生资源，也是唯一可转化为液体燃料的可再生资源，且可将低品位的生物质转化为高附加值产品，是生物质转化领域发展的方向之一。对生物质能的高效转换和洁净利用技术的开发日益受到人们的重视，这中间又以纤维素制燃料酒精最易工业化。

木质纤维素生产生物质液体燃料-乙醇已引起了全世界的关注。其生产过程为：木质纤维素的预处理，糖化，发酵。目前糖化过程主要通过加入纤维素酶来进行。在预处理过程中产生的副产物抑制纤维素酶的活性，使其不能很好的发挥作用。酶水解产物纤维二糖、葡萄糖也对纤维素酶具有极大的抑制作用。为了达到相同的糖化效果，必须加入更大量的纤维素酶以补充被抑制的纤维素酶活性。纤维素酶的成本是决定纤维素生产酒精经济性的重要因素。

从上世纪 80 年代初起，纤维素酶就已经被广泛的研究。目前纤维素酶已经获得成功的商业化生产，但是因其较高的价格，使得纤维酶的研究仍然获得了广泛的研究。纤维素酶的使用增加了纤维素燃料乙醇的生产成本。国际上目前生产纤维素酶的大公司有杰能科和诺维信。它们生产的纤维素酶活力高，酶活比较稳定。

本文对木质纤维素预处理过程中所产生的三类降解产物进行了定性和定量分析，确定了七种降解产物作为代表性的酶水解与发酵抑制剂，且对抑制物对工业纤维素酶 Spezyme CP(Genencor International)的抑制作用在静态和充分混合的条件下进行了详细的表征；获得了 Spezyme CP 的各种表观酶动力学参数，包括表观米氏常数、最大反应速率和各类抑制物的表观抑制因子。测定乙醇作为抑制因子的表观动力学常数，并与木质纤维素降解副产物的抑制效应进行了对比。基于上述表征结果，对七种木质纤维素抑制产物和乙醇对工业纤维素酶的抑制进行了详细分析。这一结果对定量理解木质纤维素预处理降解副产物对纤维酶的抑制具有重要的意义。在此工作的基础之上，本文选择纤维素酶组分中最适于进行基因工程调控的纤维二糖酶在产乙醇基因菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 进行了表达，以使 *Z. mobilis* 具备酶水解和乙醇发酵的双重功能。本工作为今后纤维素酶基因在 *Z. mobilis* 中的“表面展示型”表达和其它纤维素酶基因的表达进行了有益探索。

第一章 综述

1.1 能源发展现状

化石能源是人类当前的主要能源,根据 BP 世界能源数据统计,2006 年全球能源消费结构中,石油占 35.8%、天然气占 23.7%,煤炭占 28.4%,核能占 5.8%,水力等占 6.3%。而化石能源属不可再生资源,在地球上的储量有限,按目前技术水平和开采量估算,石油可开采约 40 年,煤炭可开采约 200 年,天然气可开采约 60 年,化石能源已日益枯竭。大量使用矿物能源引起了严重的环境问题,由能源利用释放的温室气体占总排放量的 85%,造成了气候变暖、损害臭氧层、破坏生态圈碳平衡、释放有害物质、引起酸雨、海平面上升等一系列生态环境的明显改变。开发清洁的替代能源已成为人类社会必须加以解决的重大课题。

生物质能将是未来最重要的替代能源之一,其高效转换和洁净利用技术的开发与利用日益受到全世界的重视。

生物质是指直接或间接地来源于光合作用而形成的各种有机体,包括所有的动植物和微生物。生物质能则是指直接或间接地通过绿色植物的光合作用,把太阳能转化为化学能后蕴藏在生物质内部的能量,是一种以生物质为载体的能量,是可再生的绿色能源。生物质能一直是人类赖以生存的重要能源,仅次于煤炭、石油和天然气,居于世界能源消费总量的第 4 位,在整个能源系统中占有重要的地位。生物质能具有以下特点^[1]:

(1) 可再生性。只要太阳辐射能存在,绿色植物的光合作用就不会停止,生物质能就永远不会枯竭。因此,生物质能具有取之不尽、用之不竭的物质基础。

(2) 丰富性。据估计,地球上的植物通过光合作用,每年所生成的生物质能总量约为 $2 \times 10^{11} \text{t}$,相当于 $3 \times 10^{18} \text{kJ}$ 的能量,约为现在全世界年耗电量的 10 倍。

(3) 可替代性。生物质能是一种可替代化石能源转化成液态和气态燃料以及其他化工原料或者产品的碳资源。

(4) 清洁性。生物质燃料在使用过程中几乎没有 SO_2 产生,其燃烧所释放出的 CO_2 也大体上相当于其生长时通过光合作用所吸收的 CO_2 量,所以应用生物质能源时 CO_2 可被认为是零排放。

Van Maris 等^[2]曾经比较了两种不同的碳循环,它们分别通过传统的石油化工和现代的生物炼制实现。从本质上说现代生物炼制是平行于石油炼制的,生物炼制细胞工厂就是通过一系列的生物化学途径(类似于石油炼制中的裂解、裂化、重整等单元操作),利用生物质原料替代石油原料高效转化为燃料、材料或平台化合物等各类化学品的自然生产线^[2]。

目前,生物质能的研究已成为世界性的热门研究课题,许多国家制定了相应的开发研究计划。美国农业部投资 16 亿美元发展纤维乙醇,提出 10 年减免税收 21 亿美元的政策,并为企业担保 20 亿美元发展生物能源。2000 年国会通过了“生物质研发法案”;2002 年能源部和农业部提出了《生物能源和生物基产品发展规划》、《生物质技术路线图》,计划 2020 年使生物能达到能源总消费量的 25%,2050 年达到 50%。每年减少碳排放量 1 亿 t,增加农民收入 200 亿美元。总统布什强调“美国应该积极开发替代能源,摆脱对外国尤其是中东地区石油的依赖,争取到 2025 年把中东石油进口量减少 75%,从而实现石油独立”。欧盟 2003 年 5 月通过了《在交通领域促进使用生物燃料油或其他可再生燃料油的法案》,法案要求到 2005 年,欧盟成员国生物燃料应占燃料比重的 2%,2010 年后达到 5.75%。为实现第 7 个发展计划框架,投资 1 亿欧元研究生物液体能源。2005 年 1 月法国总统召开各部长参加的国务会议,提出要把生物能源开发列入国家议程。根据其发展计划,其生物燃料的总产量将从目前的 45 万 t 上升到 2007 年的 125 万 t,用于生产生物燃料的作物面积也将达到 100 万 hm^2 [3]。

我国生物质资源丰富,产量巨大。据统计,我国农作物秸秆可收集量每年约为 4.5 亿 t,折合标准煤 1.8 亿 t;稻壳 5000 万 t,折合标准煤 2000 万 t;林业加工过程中产生的木质废弃物约 2400 万 m^3 ,折合标准煤 150 万 t;各种天然薪材的合理提供量为 1.4 亿 t,折合标准煤 0.74 亿 t。中国《国民经济和社会发展第十一个五年规划纲要》明确提出,要“加快开发生物质能”。《中共中央国务院关于积极发展现代农业扎实推进社会主义新农村建设的若干意见》提出,“以生物能源、生物基产品和生物质原料为主要内容的生物质产业,是拓展农业功能、促进资源利用的朝阳产业”,“启动农作物秸秆固化成型燃料试点项目”,“鼓励有条件的地方利用荒山、荒地等资源,发展生物质原料作物种植” [4]。

开发生物质液化工艺对我国的意义更大。目前中国石油供应紧张问题日趋严重:2005 年,中国原油消费量 3.23 亿 t,居世界第二;国内生产原油 1.81 亿 t,净进口原油 1.19 亿 t,净进口轻柴油、航煤、燃料油等石油产品 1746 万 t,原油及石油产品净进口量 1.46 亿 t。石油对外依存度为 45%。估计 2020 年国内自产石油 2.0 亿 t,缺口 2.5 亿 t,对外依存度要达到 55% [5]。

1.2 发展燃料乙醇的意义

目前人们所说的燃料乙醇是指以玉米、甘蔗、小麦、甜菜等经济作物为原料,经过发酵、蒸馏制得乙醇,脱水后再添加变性剂,成为可用于发动机的燃料。

早在 20 世纪 30 年代,燃料乙醇就被开发作为车用燃料。20 世纪 70 年代的两次石油危机促使巴西和美国率先推行燃料乙醇发展计划,加拿大、法国、西班牙和瑞典随之效仿,形成了一定规模的生产和应用市场 [6]。和一般的生物质燃料相比,利用燃料乙醇还有以下几方面的优点:

(1) 可替代或部分替代汽油做发动机燃料,减少汽油用量,缓解化石燃料紧张,从而

减轻对石油进口的依赖，提高国家能源安全性；

(2)乙醇作为汽油的高辛烷值组份，可提高内燃机的抗爆性能，使发动机运行更平稳。可替代有污染性的汽油添加剂MTBE(甲基叔丁基醚)。

(3)因其是有氧燃料，掺混到汽油中后可使燃烧更充分，使颗粒物、一氧化碳、挥发性有机化合物等大气污染物排放量显著降低。

1.3 燃料乙醇的发展现状

美国是世界上生产燃料乙醇最多的国家，主要以玉米为原料。目前美国年消费汽油1400亿加仑，其中约三分之一混合乙醇，大部分为E10(乙醇汽油中乙醇含量为10%)，少部分为E85(乙醇汽油中乙醇含量为85%)。早在1997年，美国福特汽车公司就推出使用E85的灵活燃料车(FFV)，目前有超过500万辆FFV在美国销售^[7]。

巴西的燃料乙醇生产仅次于美国，主要以蔗糖和糖蜜(制糖工业的副产品)为原料。2005年乙醇消费量约970万t，2006年超过1000万t。早在1931年，巴西就制定法规，规定在所有出售的汽油中混合至少5%的乙醇，此后对该比例进行了多次调整。自2002年以来，该规定在20~25%的范围内浮动。目前巴西汽油中混合乙醇的比例在世界上是最高的。到2006年底，灵活燃料车已占巴西新车销售的90%。巴西燃料乙醇成功替代了40%的汽油需求，在2006年首次实现了车用燃料的供需平衡。燃料乙醇产业成为巴西经济重要的支柱产业。印度是仅次于巴西的世界上第二大产糖大国，它从2002年开始开发生物燃料。2003年印度政府要求一些地方政府的炼油厂在燃料中掺混5%的乙醇^[5]。

欧洲地区的德国、法国、英国，亚太地区的泰国、日本等也都进行了燃料乙醇的研究和开发。中国已成为世界第三大燃料乙醇生产国。2004年2月10日，八部委联合下发《车用乙醇汽油扩大试点方案》和《车用乙醇汽油扩大试点工作实施细则》，在中国部分地区开展车用乙醇汽油扩大试点工作。目前，获得国家批准生产的企业有4家：河南天冠燃料乙醇有限公司、吉林燃料乙醇股份有限公司、安徽丰原生物化工有限公司、黑龙江华润酒精有限公司，已形成燃料乙醇生产能力122万t。

1.4 开发纤维素制乙醇工艺的意义及开发方法

用糖类或粮食生产燃料酒精工艺简单，但是其产量的增加有一定限度，成本也难以显著降低。如当美国在2007到2008年扩大了玉米酒精的生产后，就引起了市场上玉米价格的显著上涨，并带动了国际粮价的普遍上涨，给很多发展中国家人民的生活造成了困难。

从国情出发，中国能用于生产燃料酒精的粮食更有限。目前中国年生产的燃料乙醇总量为102万t，大约使用粮食400万t，基本使用陈化粮。不过，随着中国国内汽油消费量的增加，现有的燃料乙醇生产能力根本不能满足试点区域的市场需要。所以，在中国发展燃料乙醇的问题上一直有较大的争议^[6]。

另一方面中国纤维素资源丰富。我国作为农业大国,每年有大量纤维素废弃物产生,秸秆年总量约有7亿t,林木废弃物约有2亿t^[7],但受制于一系列技术的制约,使得纤维素乙醇至今未能产业化。作为未来发展方向,这是中国生物质能源的最终解决方案之一。

目前河南农业大学的玉米秸秆生产燃料乙醇的工艺已在河南天冠集团进行了中试,天冠集团在2006年9月底已进行了年产3000t纤维素乙醇生产厂的奠基。吉林燃料乙醇有限公司已和华东理工大学就建立年产3000t纤维素乙醇的合作达成协议,并启动了项目实施。中国科学院过程工程所已在山东建立了年产3000t的纤维素乙醇示范工程。中粮集团在清华大学的技术支持下已经在黑龙江肇东投资建设了一个500t的试验装置,并且已经投入生产^[7]。

国外也已经出现了不少用纤维素制乙醇的中试装置^[8],有的每天可以生产乙醇几万升。

木质纤维素占植物干重的35%-50%^[9],它是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物,是植物细胞壁的主要成分。对人类而言,它同时又是自然界中数量最大的可再生性物质,它的降解是自然界碳素循环的中心环节。据估计每年全球通过生物合成可再生性纤维素1000亿t,除少量用于造纸、建筑、纺织等行业或用作粗饲料、薪柴外,大部分未被有效利用而白白烂掉或烧掉,全世界每年因农林废弃物焚烧造成直接的经济损失达数十亿元^[10]有些还造成环境污染(例如焚烧)。我国农作物秸秆每年约在 6.2×10^8 t左右^[11],资源十分丰富,但是大约有50%以上在田间地头被白白烧掉,焚烧产生的滚滚浓烟及有害气体既干扰公路、航空的安全,也对气候、生态等造成严重影响。随着全球经济的飞速发展,石油、煤炭和天然气等能源储量正以惊人的速度减少,而大力发展包括生物质能源在内的可再生能源是缓解能源危机的一个重要途径。目前利用生物质生产燃料乙醇替代石油,已经取得了很大成效。木质纤维素的利用与转化对于解决目前世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有十分重要的意义。

1.5 木质纤维素的组成和结构特征

纤维素是木质纤维素的主要成分,在自然界中纤维素是与其它物质结合在一起存在于植物的细胞壁结构中。细胞壁中的多糖主要是纤维素、半纤维素和果胶类,它们是由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸等聚合而成。次生细胞壁中还有大量木质素。

纤维素(cellulose)是植物细胞壁的主要成分,它是由1000~10000个 β -D-葡萄糖残基以 β -1,4-糖苷键相连的无分支的长链。分子量在50000~400000之间。纤维素内葡萄糖残基间形成大量氢键,而相邻分子间氢键使带状分子彼此平行地连在一起,这些纤维素分子链都具有相同的极性,排列成立体晶格状,可称为分子团,又叫微团(micellae)。微团组合成微纤丝(microfibril),微纤丝又组成大纤丝(macrofibril),因而纤维素的这种结构非常牢固,使细胞壁具有高强度和抗化学降解的能力。

存在于细胞壁中的纤维素是自然界中最丰富的多糖。据推算,每年地球上由绿色植

物光合作用生产的纤维素可达 10^{11} t之多, 而1990年全球粮食产量只有 2.2×10^9 t。半纤维素(hemicellulose)往往是指除纤维素和果胶物质以外的, 溶于碱的细胞壁多糖类的总

表1.1 从悬浮培养的细胞分离的细胞壁的组成^[12]

Table1.1 Constrution of cell wall

成分	重量组成(%)	占总碳水化合物的摩尔数(%)
鼠李糖	3.1	3.9
岩藻糖	1.3	1.7
阿拉伯糖	21.0	28.2
木糖	7.6	10.2
半乳糖	0.3	0.3
甘露糖	12.8	14.5
葡萄糖(非纤维素的)	3.7	4.2
葡萄糖(纤维素的)	23.0	24
半乳糖醛酸	13.4	13.2
蛋白质(总)	10	
羟脯氨酸	2	

称。半纤维素的结构比较复杂, 它在化学结构上与纤维素没有关系。不同来源的半纤维素, 它们的成分也各不相同。有的由一种单糖缩合而成, 如聚甘露糖和聚半乳糖。有的由几种单糖缩合而成, 如木聚糖、阿拉伯糖、半乳聚糖等。

半纤维素在纤维素微纤丝的表面, 它们之间虽彼此紧密连接, 但并非以共价键的形式连接在一起。因此, 它们覆盖在微纤丝之外并通过氢键将微纤丝交联成复杂的网格, 形成细胞壁内高层次上的结构。

果胶物质(pectic substances)也是细胞壁的组成成分。胞间层基本上是由果胶物质组成的, 果胶使相邻的细胞粘合在一起。果胶物质是由半乳糖醛酸组成的多聚体。

木质素(lignin)不是多糖, 是由苯基丙烷衍生物的单体所构成的聚合物, 在木本植物成熟的木质部中, 其含量达18%~38%, 主要分布于纤维、导管和管胞中。木质素可以增加细胞壁的抗压强度, 正是细胞壁木质化的导管和管胞构成了木本植物坚硬的茎干, 并作为水和无机盐运输的输导组织。在次生壁中, 纤维素和其它细胞壁成分结合成细长的束状结构, 称为微纤维。许多微纤维粘和在一起组成微纤维束。在每个微纤维中, 线状的纤维分子间通过氢键从侧面连接, 形成不同平行程度的区域: 分子排列整齐的区域称为结晶区; 分子排列不整齐的区域成为非结晶区或无定型区。在细胞壁中, 半纤维素等集中在微纤维之间的空隙, 在微纤维中, 半纤维素和木质素等可进入无定型区纤维素分子间的空隙。

1.6 木质纤维素的预处理方法

纤维素的降解有两条途径，即化学法和生物酶法，但化学法特异性差、纯度低、污染环境，而用生物酶法可克服这些缺点。目前常用的生物酶是纤维素酶。纤维素酶一方面可将纤维素水解成葡萄糖等有效成分，另一方面它可以通过提高植物细胞壁的通透性而提高细胞内含物(蛋白质、脂肪、淀粉)的提取率，所以纤维素酶可应用于以植物为原料的一切工业中。因此纤维素酶一经发现就受到了世界各国科学界的重视。但半纤维素和木质素通过共价键联结成网络结构，纤维素镶嵌其中，要直接对纤维素进行糖化水解或生物转化相当困难。因此，无论采取何种工艺分解利用纤维素，都必须首先对纤维素原料进行预处理。目前主要采用，预处理-纤维素酶水解两步法的木质纤维素降解方法。

植物纤维的高聚合度、毛细管结构、木质素和半纤维素所形成的保护层及其超分子结构中具有高结晶度的结晶区内存有大量氢键(包括分子链内、链间和分子链与表面分子之间形成的氢键)造成纤维素难以被利用。预处理的目的是改变天然纤维素的结构，破坏纤维素-木质素-半纤维素之间的连接，降低纤维素的结晶度，脱去木质素，增加原料的疏松性以增加纤维素酶系与纤维素的有效接触，从而提高酶效率。预处理必须满足以下要求：(1) 促进糖的形成，或提高后续酶水解形成糖的能力；(2) 避免糖的降解或损失；(3) 避免形成副产物阻碍后续水解和发酵过程；(4) 节约成本。目前木质生物资源的预处理方法有多种，应用研究较多的是化学法、物化法、生物法以及上述方法的综合。

1.6.1 化学法

(1) 酸水解

酸水解法分为浓酸水解和稀酸水解。高浓酸，比如硫酸和盐酸可用来处理木质纤维原料，但是强酸有毒、具有腐蚀性，需要耐酸反应器；另外，强酸预处理后必须回收，增加了生产成本。稀酸水解已经成功地用于木质纤维原料预处理。稀酸预处理方法主要有两种：一是低固体载荷(底物重量/反应混合物重量5%~10%)、高温(>160℃)、持续流动；二是高固体载荷(10%~40%)、低温(<160℃)，间歇流动。尽管稀酸预处理可以高效地促进纤维素水解，但是其成本比物理化学法比如蒸汽爆破法或AFEX法要高，而且预处理后必须将pH值调到中性以便于后续酶法水解或发酵。江南大学生物工程系实验室实验研究了酸两步水解法，即玉米芯先浓酸后稀酸水解得糖率81%，石灰中和后接种酵母发酵乙醇^[13]。

(2) 碱水解

碱水解的机理是基于连接木聚糖半纤维素和其它组分内部分子之间(比如木质素和其他半纤维素之间)酯键的皂化作用。连接键的脱除增加了木质纤维原料的多孔性。NaOH稀液处理引起木质纤维原料润胀，结果导致内部表面积增加，聚合度降低，结晶度下降，木质素和碳水化合物之间化学键断裂，木质素结构受到破坏。Chosdu等^[14]采用光照和2%NaOH溶液相结合的方法对玉米杆等原料进行预处理，发现未经预处理的玉米

杆葡萄糖得率为20%，而电子束照射和2%NaOH溶液处理后得率为43%。氨也被用来脱除木质素，Lyer等^[15]阐述了氨回收过滤法(温度170℃，氨用量2.5%~20%，反应时间1h)处理玉米穗轴、杆混合物及柳枝稷木质原料，脱木质素率分别为80%和65%~85%。

(3) 有机溶剂法

在有机溶剂法中，有机溶剂或水溶性有机溶剂和无机酸催化剂混合物可用来断裂木质素和半纤维素内在的化学键。使用的有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙酮、乙烯基乙二醇。有机酸比如草酸、乙酰水杨酸和水杨酸可作为有机溶剂法的催化剂。在高温条件下无需添加催化剂即可获得满意的脱木质素度。使用的溶剂经过排放、蒸发、浓缩和回收处理，既可降低成本又避免了阻碍微生物生长、酶法水解和发酵的化合物生成。加拿大Ligonot公司与澳大利亚SRI合作以蔗渣为原料，用乙醇在185℃，2.5 MPa压力下蒸煮脱木质素和半纤维素，蒸煮后脱水的净纤维浆料可以再水解获得六碳糖，或用此净纤维浆制纸。用有机溶剂乙醇融解木质素，能使木质素没有过度破坏而保持其活性状态，从而更好利用其生产高附加值产品。除木质素和纤维素后的浆料，更适合制高质量纸或更有利于水解变糖。巴西Dedini, copersugars (联产糖-乙醇工厂)合作并出资研究Dedini快速水解法(DHR)方法，已建成5 m³/d蔗渣快速水解中试工厂：工艺以乙醇-水的混合物作为溶剂，加稀硫酸0.1%~0.25%作反应催化剂，在170~185℃，20~25 kg/cm²的条件下在水解锅煮10~12 min后，总还原糖转化率为59%，水解液含糖80g/L(水解锅能力为20 kg/h粗蔗渣)，再用酵母转化为乙醇，乙醇连续发酵罐为10 L。中试产率1t 50%含水量的蔗渣产乙醇约100 L，成本427.4美元/m³乙醇。

1. 6. 2 物理化学法

(1) 蒸汽爆破法

蒸汽爆裂法是用高压饱和蒸汽处理生物质原料，然后突然减压，使原料爆裂降解。以蒸汽爆破法预处理木质纤维原料的尝试始于上世纪80年代早期，由Iotech公司研究发现^[23]。木质纤维原料经蒸汽爆破法预处理后，木糖的回收率一般在45%~65%^[17]。对物料进行蒸汽爆破时，若添加H₂SO₄(或用SO₂、CO₂)作为催化剂，或在蒸汽爆破之前，预先以SO₂或H₂SO₄对物料处理，可提高半纤维素的水解速率，提高单糖在糖液中所占的比例，并可使木质素分解，主要是使酸可溶木质素分解。

(2) 湿氧化法

在加温加压条件下，由于水和氧的共同作用，木质素可被过氧化物酶催化降解，处理后的物料可增强对酶水解的敏感度。用湿氧化法在195℃，15 min，1.2×10³ kPa，2 g/L Na₂CO₃对60 g/L玉米秸秆进行预处理^[18]，其中60%的半纤维素、30%的木质纤维素被溶解，90%的纤维素呈固态分离出来，纤维素酶解转化率达85%左右。我国吉林轻工业设计研究院(联合国援华玉米深加工研究中心)吉林陀牌农产品开发公司与丹麦瑞速国家实验室2003年开始合作研究“玉米秆湿氧化预处理生产乙醇”，2005年阶段性鉴定，规模为10 L发酵罐。阶段性实验结果：在实验室条件下，玉米秆经湿氧化预处理后纤维素得率

78.2%~83.6%；酶水解后酶解率86.4%；乙醇产率48.2%。在只利用六碳糖的情况下，7.88 t玉米秆产1 t乙醇。在10 L全自动发酵罐发酵乙醇，发酵时间62 h，酒精度6.2%。

(3) CO₂爆破法

在CO₂爆破法处理过程中，部分CO₂以碳酸的形式存在，增加木质纤维素的水解率。Walsum等^[19]使用CO₂爆破法对玉米秸秆进行预处理，结果表明：CO₂爆破法处理后的玉米秸秆比水蒸汽爆破后的玉米秸秆水解后木糖和呋喃糖得率明显提高，处理的效果与CO₂的压力有关，同时也证实了碳酸可以作为后续水解的催化剂。河北农业大学食品科技学院实验室研究用CO₂爆破法对纤维物质(玉米芯)预先处理后用稀酸水解半纤维素，然后用酶法水解纤维素转化为单糖，然后发酵成乙醇。

(4) 氨爆破处理(AFEX)

氨纤维爆裂法(ammonia fiber explosion, AFEX) 是将木质纤维素原料在高温和高压下用液氨处理，然后突然减压，造成纤维素晶体的爆裂。氨处理不会产生对微生物有抑制作用的物质，且木质素除去后，大部分的半纤维素和纤维素保留下来得以充分利用。杨雪霞^[20]等对玉米秸秆进行氨爆破处理，结果表明：氨化汽爆可使玉米秸秆中的半纤维素降解，使玉米秸秆的酶解率提高到42.92%，同时可使秸秆中的有机氮含量提高1.27倍，利用氨化汽爆秸秆进行固态发酵可提高蛋白质含量到23.45%。

(5) 液态热水法

液态热水法是指将物料置于高压状态的热水中，温度为200~230 ℃，处理物料2~15 min，使纤维物料的40%~60%溶解，这是由于液态热水起到了酸的作用，能使离子型物质分解，使半纤维素全部溶解^[21]。在220 ℃的温度下，把阔叶材和农作物剩余物用液态热水法处理2 min，67%的木素也能被溶解掉。

1.6.3 生物预处理

生物处理是利用分解木质素的微生物除去木质素，以解除其对纤维素的包裹作用。白腐菌、褐腐菌和侧耳真菌等微生物常被用来降解木质素和半纤维素^[22]，由于天然的纤维素分解菌活性低，降解速度慢，而纤维素的降解需要多种酶协同作用，所以充分利用自然界多种微生物的协同关系，人工筛选构建能够产生多种纤维素酶的高效稳定复合菌系，引起了人们的高度重视。从成本和设备角度出发，生物法预处理显示了独特的优势，可用专一的木质酶处理原料，分解木质素和提高木质素消化率。这种方法虽然在试验中取得了一定的成功，但大多停留在实验阶段。

1.7 木质纤维素稀酸预处理所产生的副产物

稀酸水解是一种目前公认的，经济可行的预处理方法^[24-25]。但在水解过程中半纤维素被水解的同时，也产生了一些副产物，如呋喃衍生物、酚类化合物、有机酸等。这些副产物被称为潜在的抑制因子，在发酵过程中可能抑制菌体生长及乙醇生成^[26-28]。木质

纤维素类生物质原料来源不同, 预处理后产生的抑制因子的种类和浓度也不同。当半纤维素被降解时, 木糖, 甘露糖, 乙酸, 乳糖, 葡萄糖都被释放出来(图1.1)。纤维素被降解为葡萄糖。当温度和压力比较高的时候, 木糖可以进一步被降解为糠醛^[29]。在高温高压下, 己糖的进一步降解产生5-羟甲基糠醛(HMF)^[30]。糠醛, 5-羟甲基糠醛的进一步降解产生甲酸。乙酰丙酸是通过5-羟甲基糠醛的进一步降解产生的。酚类物质如香兰素和对羟基苯甲醛是通过木质素的降解产生的^[31-32]。也有报道说碳水化合物的进一步降解也能够产生酚类物质。

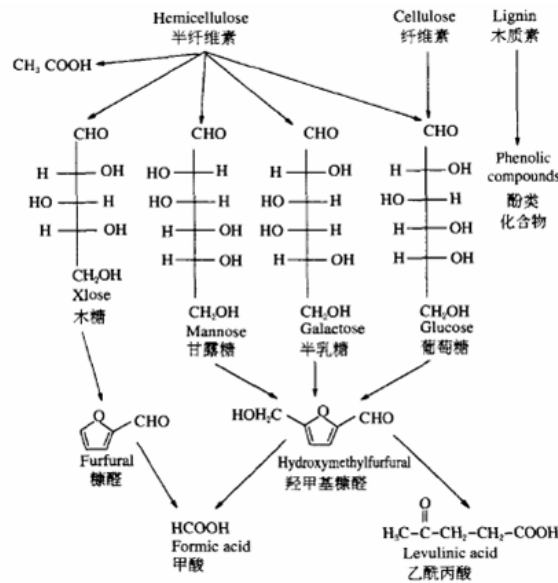


图1.1 木质纤维的预处理副产物^[23]

Fig 1.1 Byproducts of lignocellulose pretreatment

1.8 木质纤维素的酶水解

1.8.1 纤维素酶的组成及其作用方式

纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称, 主要由木霉属菌、曲霉属菌、镰刀属菌等有机物发酵而成。纤维素物质的复杂结构, 使得任何一种单一的酶都难以高效降解它。因此, 能水解天然纤维素的纤维素酶都是复杂的多酶体系, 目前普遍认为, 高效分解纤维素需要三种酶协同作用, 分别是: 内切葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase, EC3.2.1.4, 简称EG)作用于纤维素分子内部的非结晶区, 随即水解 β -1, 4-糖苷键, 将纤维素分子截短, 产生大量带非还原性末端的小分子纤维素; 外切葡聚糖水解酶(exo-1,4- β -D-glucanase, EC3.2.1.91)又称纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, 简称CBH), 它含有两种组分: CBHI和CBHII, 作用于纤维素线状分子末端, 水解 β -1, 4-糖苷键, 每次切下一个纤维二糖分子; β -糖苷酶(β -1,4-glucosidase, EC3.2.1.21, 简称BG)将纤维二糖水解成葡萄糖分子^[26]。纤维素酶这三种组分虽各有专一性, 但相互之间又具有协同作用。具有结晶结构的纤维素就是在它们三者的协同作用下被降解的^[33]。

1.8.2 纤维素酶的分子结构与功能

目前研究的纤维素酶主要来自细菌和丝状真菌。细菌产生的纤维素酶的量较少(0.1g/L),主要是EGs组分,对结晶纤维素的活性很低,多数不能分泌到细胞外部。丝状真菌能产生大量的纤维素酶(20 g/L),其中尤以木霉属的产量居高。里氏木霉(*Trichoderma reesei*, 也有资料译为李氏木霉, 简称为Treesei)和绿色木霉(*Trichoderma viride*, 简称为Tviride)等是木霉属中活性较高的菌种。真菌产生的纤维素酶含有完整的三组分,能分泌到菌体外部,一般不聚集形成多酶复合体,且组分间有较强的协同作用。

CBHs是木霉纤维素酶的主要组分,主要包括两种异构酶CBHI和CBHII,其中CBHI的含量很高,约占原酶蛋白总量的60%。它和底物的亲和性较高,但活性较CBHII低。CBHII所占的比例少,但特异性强,活力高,它降解微晶纤维素产生还原糖的能力是CBHI的3倍。一般认为真菌纤维素酶的Egs主要包括两种异构酶, EGI和EGII, 其中EGI是主要成分。

1986年, Tilbeurgh^[34]用木瓜蛋白酶有限水解Treesei的CBHI分子, 得到具有吸附结晶纤维素能力的吸附区(Cellulose Binding Domain, 以下简称CBD)和具有催化(水解)活性的核心蛋白区(Core Protein, 简称为CP)二个部分。酶分子失去吸附区后, 核心区近乎完全丧失了对结晶纤维素的吸附和水解能力, 但仍具有对纤维寡糖的水解能力。在此基础上, Tilbeurgh等^[35]人首次提出了CBHI分子的二维结构图。其后, 应用同类研究方法证实T.reesei的CBHII和内切酶的EGI,EGII也是具有类似结构的一级结构, 只不过CBHI和EGI的CBD位于C-末端(即COOH端), 而CBHII和EGII的CBD位于N-末端(即NH₂端)。Knowles^[36]等认为, CBD吸附于纤维素分子链表面后, 具有“疏解”纤维素链的作用。Wood Word^[37]等报道T.reesei的CBHII的CP也能吸附于纤维素上, 且具有“疏解”纤维素大分子链的作用, 由此他认为CBHII的CP相当于Reese等提出的C₁因子。

应用小角X衍射、核磁共振及疏水基簇分析法等, 科学家们已绘制出了CBHI和CBHII的三维结构图。CBHI和CBHII分子均呈蝌蚪状, “头部”是呈椭圆形的CP, “尾部”是由约30个氨基酸残基组成的CBD, “头”“尾”由柔性的链段区联结起来。CBHI的CBD大小约为3.0×1.8×1.0nm, 呈楔形, 一面疏水, 一面亲水, 被推测认为能够“插入”和“分开”纤维素的结晶区。CBHII的CP由7股平行双链旋绕组成 α/β 折叠桶状蛋白。 β -折叠“桶”的C-末端有两个环状物, 各含一个二硫键。由这两个环与“桶”外的侧链形成隧道状空穴, 长约2.0nm。纤维素分子链若呈“之”字形穿过空穴, 恰好可容纳一个纤维二糖单位。T.reesei的Egs的三维结构尚未完全弄清楚, 不过Egs分子的空穴被推测为呈“凹”状, 可水解纤维素分子链内部的葡萄糖苷键^[37]

1.8.3 β -葡萄糖苷酶

β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC 3.2.1.21), 又称 β -D-葡萄糖苷水解酶, 它属于纤维素酶类, 是一种能催化水解芳基或烃基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖的酶。根据其底物特异性, 该酶可分为三类, 第一类是芳香基 β -葡萄糖苷酶, 作用于含芳香基团的葡萄糖苷; 第二类是真正的纤维二糖酶, 水解纤维二糖释放葡萄糖; 第三类是广泛底物

范围的 β -葡萄糖苷酶，多数的 β -葡萄糖苷酶属于这一类。 β -葡萄糖苷酶广泛存在于生物界，从低等的细菌到高等的动物体内都能找到 β -葡萄糖苷酶，并且执行不同的功能。在细菌和真菌中， β -葡萄糖苷酶主要是纤维素酶系统中的一个组分，与纤维素内切酶和外切酶协同作用，负责将寡糖和纤维二糖水解形成葡萄糖，其酶的活性也随着糖链长度的增加而降低^[38]。在酿造葡萄酒的酵母中， β -葡萄糖苷酶负责将糖基化的前体物质转化成烯醇和其他一些具有芳香气味的物质^[39]。在植物和昆虫中， β -葡萄糖苷酶的作用是从含氰的糖化物中释放出氰，这也是机体防御体系的一部分。另外，在植物中， β -葡萄糖苷酶的功能还包括水解植物激素的前体、色素的代谢、种子发育和生物质的转化。因为 β -葡萄糖苷酶普遍存在于生物界中，所以它可以作为研究酶在特异性和碳水化合物代谢方面的进化。

1.8.4 β -葡萄糖苷酶在纤维素水解作用中的重要意义

β -糖苷酶是纤维素酶系中的一种，是纤维素降解的限速酶^[40]。在纤维素酶水解纤维素的过程中， β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖从而释放出葡萄糖成为关键性的一步，主要有以下几种问题：(1) β -葡萄糖苷酶的活性受其降解产物-葡萄糖的反馈抑制，而纤维二糖又是纤维素酶系中其他酶的抑制剂，从而整个纤维素的水解过程受到抑制；(2)在产纤维素酶的菌株中， β -葡萄糖苷酶含量都很低，远达不到实际应用的水平；(3)在反应过程中，由于热抑制作用，大量的 β -葡萄糖苷酶活性会消失。因此， β -葡萄糖苷酶的活力一般比内切葡聚糖酶和外切葡聚糖纤维二糖水解酶低一个数量级以上，是纤维素降解的限速酶^[41]。 β -葡萄糖苷酶的催化机制主要有纤维二糖水解机制和葡萄糖磷酸基团转移机制^[42]。

1.9 β -葡萄糖苷酶的克隆表达

β -葡萄糖苷酶基因现已从燕麦^[43-44]、蜀黍^[45]、早金莲^[46]、长春花^[47]、黑植^[48]等植物中进行了克隆和表达。

曾黎辉、吕柳新等^[49]运用*P.pastoris*表达系统获得了有活性的拟南芥 β -葡萄糖苷酶。为获得高效表达的转化子，方法之一是筛选含高拷贝外源基因的转化菌株。该实验的重组表达质粒pPICZABH19带有ZeocinTM抗性基因，在含200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ZeocinTM平板上能有效地筛选到高效表达的转化子，估计转化子的高效表达与目的基因的多拷贝插入有关，表明高拷贝的插入有利于 β -葡萄糖苷酶基因的高效表达。 β -葡萄糖苷酶翻译后的糖基化修饰对 β -葡萄糖苷酶的功能活性有重要的作用。*P.pastoris*对表达的外源蛋白有修饰功能，特别是糖基化，且糖基化程度适中。

李远华、江昌俊等^[50]对菇烯类香气前体及与抗病虫害有密切关系的茶树(*Camellia sinensis*) β -葡萄糖苷酶cDNA进行克隆和原核表达。结果表明，该酶cDNA全长序列为1475bp(Genbank登录号为AF537127)，与其他植物同源性为40%-60%。 α -螺旋构象14.33%， β -折叠构象25.43%，存在多个氨基酸功能结构域，利用pET-32a表达载体构建

的重组质粒, 转化到大肠杆菌菌株BL21(DE3)中, 诱导产生63 kDa的融合蛋白, 表达产物具有正常的生物学活性, 能催化葡萄糖苷键的水解反应, 诱导表达结果显示, 主要在细胞质中以可溶性蛋白的形式进行表达。通过软件分析, 其ORF由1350个核苷酸组成, 编码450个氨基酸。5'非翻译区(5'-UTR)与3'非翻译区(3'-UTR)分别由33个和92个核苷酸组成; 预测氨基酸序列功能结构域有: 4个N-豆蔻酰化位点, 5个蛋白激酶C的磷酸化位点, 2个酪蛋白激酶II磷酸化位点, 5个N-糖基化位点。

张彬彬、李杰等^[51]以里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的基因组DNA为模板, 根据GenBank上检索的 β -葡萄糖苷酶基因DNA序列, 设计特异性引物, 用高保真酶probest polymerase进行PCR扩增, 获得了2150bp的DNA片段。将其克隆在puc18的SmaI位点上。测序结果表明, 所获得的DNA序列与GenBank上检索的 β -葡萄糖苷酶基因的核苷酸序列同源性达99%, 氨基酸序列同源性达100%。

邵金辉、赵云等^[52]利用PCR技术, 从扣囊复膜抱酵母的总DNA中扩增得到 β -葡萄糖苷酶基因(BGLI), 长度为2596bp, 连接到pGEM-载体上, 限制性内切酶切下目的基因, 插入到巴斯德毕赤酵母表达载体pPIC9K中, 使之位于 α -因子信号肽下游, 且与之同框, 构建成重组质粒pSHL9K。通过电转化将重组质粒pSHL9K插入到*Pichia Pastoris* GS 115菌株染色体中, 获得高效表达BGLI基因的毕赤酵母重组工程菌株。重组酶的最适温度为50℃, 最适pH为5.4。培养基中 β -葡萄糖苷酶活性最高可达47 U mL⁻¹。培养基中分泌表达的总蛋白量可达9 g L⁻¹左右, SDS-PAGE显示培养基中只有重组酶蛋白一条带, 有利于对重组酶进一步分离和纯化。

山东大学邹文等^[53]以黄单胞菌XA5-5为供体菌, 广泛寄主质粒pRK404为载体, 在大肠杆菌中克隆了一个 β -葡萄糖苷酶基因, 重组质粒pIZSI接合导入黄单胞菌XA5-5, 得到了克隆子XA5-5(PIZSI)结果表明, 所克隆的基因编码的产物对于水杨苷底物有较强的亲和力, 并可以在一定程度上降低XA5-5中酶与pNPG底物的亲和力, 使其酶活减小。

刘小琳、贺鹏^[54]以絮凝基因 $FL01$ 为选择性标记构建酵母表达载体, 利用该载体克隆并表达 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)基因, 絮凝基因的引入与常规的各种载体固定化细胞技术相比, 具有简单、无辅助材料附加费用、对细胞无毒副作用、反应器内细胞浓度高、抗污染能力高、酒精产量高等突出优点, 这对酵母发酵产酒精展示了更为现实的工业化前景。

Karen Mine Harada, Keiko Tanaka等^[55]从土样中分离出一株能同化米糠半纤维素的细菌(HC1), 经过分类学和16S RNA序列分析得知它属于*Paenibacillus*属。这株细菌的宏基因组文库已被构建于*E.coli*中, 并通过 β -葡萄糖苷酶的降解表型筛选而得到编码 β -葡萄糖苷酶基因。核酸序列鉴定表明该酶的基因含有一个1347bp的ORF, 编码一个分子量为51.4 kDa、含448aa的蛋白质, 且与*B.polymyxa*的 β -葡萄糖苷酶A有73%的相似性, 属于糖苷水解酶家族I。从*E.coli*细胞中纯化出来的 β -葡萄糖苷酶是一个单体酶, 在37℃, pH 7.0条件下活力最高。

Hideshi Yanase, Koji Nozaki and Kenji Okamoto等^[56]将来源于*Ruminococcus albus*的

β -葡萄糖苷酶基因加上来源于 *Zymomonas mobilis* ZM6 的葡萄糖果糖氧化还原酶的信号肽基因片段克隆到 pZA22 载体上，电转化入 *Zymomonas mobilis* ZM6 中。该信号肽能使 61% 的 β -葡萄糖苷酶分泌到细胞周质中，并使 *Zymomonas mobilis* ZM6(pZAGF β g) 在以纤维二糖为唯一碳源的培养基中生长产生，乙醇的转化率为 0.49g 乙醇/纤维二糖。

第二章 纤维素酶的特征

2.1 实验药品和材料

商品纤维素酶Spezyme CP由 Genencor International公司生产。纤维二糖酶Novozyme 188由Novo Industrial A/S生产(购自Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)。

玉米秸秆是2006秋天收获自中国吉林省。Whatman No.1 filter paper 购自Whatman International Ltd (Maidstone, UK)。Furfural和 5-HMF 从Acros Organics (NJ, USA)购买。乙酰丙酸购自Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)。香兰素, 4-羟基苯甲醛, 氢氧化钠, 乙酸钠, 3,5-二硝基水杨酸, 纤维二糖由上海国药集团化学试剂有限公司生产。葡萄糖试剂盒从上海科欣生物工程有限公司购买。葡萄糖, 酒石酸钾钠, 柠檬酸钠, 柠檬酸, 甲酸, 乙酸, 苯酚都是分析纯。

2.2 实验仪器

分光光度计: DU-800, Beckman公司;

pH计: PHS-3C, 上海精密科技仪器有限公司;

天平: BS423S, 北京赛多利斯;

电热恒温水槽: DK-8D 型, 上海一衡科技有限公司;

HPLC: LC-20AD, 岛津;

制冰机: XB100, GRANT公司;

旋涡混合仪: XW-80A, 江苏海门市其林贝尔公司。

2.3 实验方法

2.3.1 50mM pH4.8 柠檬酸缓冲液的配制

(1) 组份

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 10.5g/L

$Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ 14.7g/L

(2) 步骤

配制50 mM的柠檬酸溶液A: 10.5 g柠檬酸定容至1000 mL; 配制50 mM的柠檬酸钠溶液B: 称14.7 g柠檬酸钠定容至1000 mL; 取9.2 mL A液体, 10.8 mL B液混匀, 测定pH, 适当加入少量A或B液使其pH达到4.8。

2.3.2 DNS溶液的配制^[57]

(1) 组份

蒸馏水: 372.63 mL

3,5-二硝基水杨酸: 2.79 g

氢氧化钠: 5.21 g

酒石酸钾钠: 80.53 g

苯酚: 2.00 mL

亚硫酸氢钠: 2.18 g

(2) 步骤

将3,5-二硝基水杨酸溶于蒸馏水中, 然后加入NaOH, 边加边搅拌。溶解后, 依次加入酒石酸钾钠、苯酚和亚硫酸氢钠, 溶解并搅拌均匀后置于棕色瓶中避光保存。

2.3.3 纤维素酶活力测定

纤维素酶活力的测定方法有滤纸糖化法测定酶活, 滤纸崩溃法测定酶活, CMC糖化法测定内切酶活力, 棉花糖化法测定外切酶活力。本文采用滤纸糖化法测定纤维素酶的总活力^[51]。纤维素酶活力是指, 1 h催化50 mg滤纸生成2.0 mg还原糖所用的酶量。

2.3.3.1 葡萄糖溶液浓度-吸光度标准曲线绘制

1. 配制10g/L的葡萄糖标准母液A

2. 配制一系列浓度的葡萄糖标准溶液

1.0 mg/0.5 mL葡萄糖标准液: 1.0 mL A液+4.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液

1.65 mg/0.5 mL葡萄糖标准液: 1.0 mL A液+2.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液

2.5 mg/0.5 mL葡萄糖标准液: 1.0 mL A液+1.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液

3.35mg/0.5 mL葡萄糖标准液: 1.0 mL A液+0.5 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液

3. 取上述0.5 mL标准葡萄糖溶液, 加入1.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中。

4. 将对照(1.5 mL磷酸柠檬酸缓冲液)葡萄糖标准样品分别加入3.0 mL DNS溶液。

5. 在沸水浴中加热5分, 后置于冰水浴中。

6. 取0.2 mL反应混合物加入到2.5 mL的水中置于比色皿中, 在540 nm处测定吸光度。

7. 以葡萄糖绝对量(mg/0.5 mL)对吸光度 A_{540} 作图, 建立标准曲线。

2.3.3.2 纤维素酶反应标准试样的测定

1. 称50mg Whatman No.1滤纸条。

2. 加入1.0 mL 50 mM柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液, 没过滤纸条。

3. 置于50 °C水浴中。

4. 加入0.5 mL适当稀释度的酶液, 每个酶样品至少两个浓度。

5. 水浴中反应60 min。其中缓冲液对照(1.5 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液), 酶对照(0.5 mL酶液+1.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液), 底物对照(1.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液+50 Whatman No.1滤纸条)按同样的步骤反应。

6. 取出水浴锅, 加入3.0 mL DNS溶液。

7. 取0.2 mL反应混合物加入到2.5 mL的水中置于比色皿中, 在540nm处测定吸光度。

8. 将吸光度代入葡萄糖溶液浓度-吸光度标准曲线, 计算各样品的还原糖(以葡萄糖为标准)含量。

9. 以还原糖(葡萄糖为标准)的量(mg/0.5 mL)对纤维酶稀释倍数做图。

10. 从上图中找出生成2.0 mg葡萄糖的纤维素酶稀释倍数。

纤维素酶活力计算方法:

纤维素酶活力=0.37 mol/minute·mL/纤维素酶稀释倍数

2.3.4 纤维二糖酶活力测定^[58]

用50 mM柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液配制80 mM纤维二糖溶液,取1.0 mL上述溶液加入1.0 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液适当稀释的纤维二糖酶溶液,50 ℃反应10 min。沸水浴加热2 min终止反应。以葡萄糖试剂盒测定生成的葡萄糖浓度。1个单位的纤维二糖酶活力(CBU)被定义为:1 min催化1 μmol纤维二糖生成2 μmol葡萄糖所需要的酶量。

2.3.5 玉米秸秆稀酸预处理

干玉米秸秆经粉碎后用直径5 mm的筛子分离。分离的秸秆碎片于室温下在2.5%硫酸中预浸1.5 h。将预浸的玉米秸秆稀酸混合物加入到预处理反应器中。在2.5 L预处理反应器中通入热的蒸汽(3 Mpa)在180 ℃维持5 min。预处理后的玉米秸秆用无菌的滤网分成固体和预处理液两部分。

2.3.6 玉米秸秆稀酸预处理水解液成分测定

玉米秸秆稀酸预处理水解液中的糖,降解副产物通过高效液相色谱(LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Japan)测定。色谱柱为Bio-rad Aminex HPX-87H。

2.3.7 滤纸纤维素酶水解

2.3.7.1 混合状态下滤纸纤维素酶水解

100 mL摇瓶中装入20 mL反应物,包括1 g滤纸(Whatman No.1),6 FPU 纤维素酶(Spezyme CP),90 CBU纤维二糖酶(Novozyme 188)及一系列浓度梯度的甲酸,乙酸,乙酰丙酸,糠醛,羟甲基糠醛,香兰素,对羟基苯甲醛,乙醇,pH为4.8。反应在50 ℃,200 rpm转速下进行60 min。以葡萄糖试剂盒测定反应生成的葡萄糖。

2.3.7.2 静止状态下滤纸纤维素酶水解

10~70 mg滤纸(Whatman No.1),纤维素酶,不同浓度的甲酸,乙酸,乙酰丙酸,糠醛,羟甲基糠醛,香兰素,对羟基苯甲醛,乙醇反应混合物在静止状态下于50 ℃ pH4.8的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中进行60 min。沸水浴中加热2 min终止反应。用DNS法和葡萄糖试剂盒分别测定还原糖和葡萄糖含量。

2.3.8 纤维素酶动力学参数计算

工业用纤维素酶Spezyme CP由内切葡聚糖苷酶,外切葡聚糖苷酶和β-葡萄糖苷酶组成的混合物。本文假设工业用纤维素酶Spezyme CP为一单纯酶。在该假设的基础上,测定了纤维素酶Spezyme CP的表观动力学常数。同样工业用纤维二糖酶也是一种多蛋白混合物,在假设其为单纯酶的基础上,运用米氏方程可以计算其动力学常数。通过以底物浓度对初始反应速率作图得到 Lineweaver-Burk 双倒数图。从该图中可以计算出表观最大反应速率,表观米氏常数,表观抑制常数。在竞争性抑制中,抑制物与底物竞争相同的酶位,形成致死的酶-抑制物复合物。酶反应初始速率可以表达为公式(1)。通过这个公式可以计算相关的动力学常数。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \frac{1}{S}$$

2.4 实验结果

2.4.1 木质纤维素降解副产物存在情况下初始反应速率的确定

木质纤维素的酶水解分两步进行：第一，内切葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase, EC3.2.1.4, 简称EG)作用于纤维素分子内部的非结晶区，随即水解 β -1, 4-糖苷键，将纤维素分子截短，产生大量带非还原性末端的小分子纤维素；外切葡聚糖纤维二糖水解酶(exo-1,4- β -D-glucanase, EC3.2.1.91)又称纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase, 简称CBH)，它含有两种组分：CBHI和CBHII，作用于纤维素线状分子末端，水解 β -1, 4-糖苷键，每次切下一个纤维二糖分子； β -糖苷酶(β -1,4-glucosidase, EC3.2.1.21, 简称BG)将纤维二糖水解成葡萄糖分子。纤维素酶这三种组分虽各有专一性，但相互之间又具有协同作用。具有结晶结构的纤维素就是在它们三者的协同作用下被降解的。在本工作中，用DNS法测定纤维素酶水解的初始反应速率。当呋喃类和酚类衍生物作为抑制物时，因为这两类物质能够与DNS试剂发生反应，所以用葡萄糖试剂盒测定初始反应速率。葡萄糖是纤维素降解反应过程的终产物，在纤维素酶水解过程中加入足够多的纤维二糖酶(Novozyme 188)，能够使纤维素分解生成的纤维二糖都迅速的被分解为葡萄糖，随着纤维二糖酶投入量的增加，生成葡萄糖增加，但纤维二糖酶增加到一定量，生成葡萄糖不再随酶的增加而增加，纤维二糖到葡萄糖的步骤不再是纤维素降解的限速步骤。

图2.1(a) 显示当没有抑制物存在的时候反应释放出的葡萄糖随着Novozyme188 (in CBU unit) 和 Spezyme CP (in FPU unit)酶活力之比增大而增加，但当Novozyme188 (in CBU unit) 和 Spezyme CP (in FPU unit)酶活力之比增大到20以后，再增加Novozyme188 (in CBU unit)，反应释放的葡萄糖不再增加。

当糠醛，5-羟甲基糠醛，香兰素抑制物存在时，Novozyme188 (in CBU unit) 和 Spezyme CP (in FPU unit)酶活力之比达到20以后，反应释放的葡萄糖同样不再随 Novozyme188 (in CBU unit)的投入而增加。在4-羟基苯甲醛和乙醇存在时候，如图2.1 (b) 和 2.1 (c)所示，Novozyme188 (in CBU unit) 和 Spezyme CP (in FPU unit)酶活力之比必须增加到30，反应释放的葡萄糖才不会随Novozyme188 (in CBU unit) 和 Spezyme CP (in FPU unit)酶活力之比的增加而增加。

2.4.2 混合状态下滤纸纤维素酶水解

在混合状态下对纤维素酶水解的研究是在摇瓶中于200 rpm转速下进行的。该研究考虑了质量的传递，实验结果如下图2.2所示。该图分别展示了有机酸，呋喃，木质素降解产物，乙醇对纤维素酶的抑制。对照实验也在同样的实验条件下进行，但是不加入任何抑制物。该实验中抑制物的浓度按照酸水解产物中各种抑制物的浓度设定如下表所示，最高浓度高于酸水解液中各种抑制物浓度。乙醇的浓度是根据发酵过程产生的最大乙醇浓度设定的。从图2.2中可以看到，几种副产物和乙醇都对纤维素酶具有抑制作用。

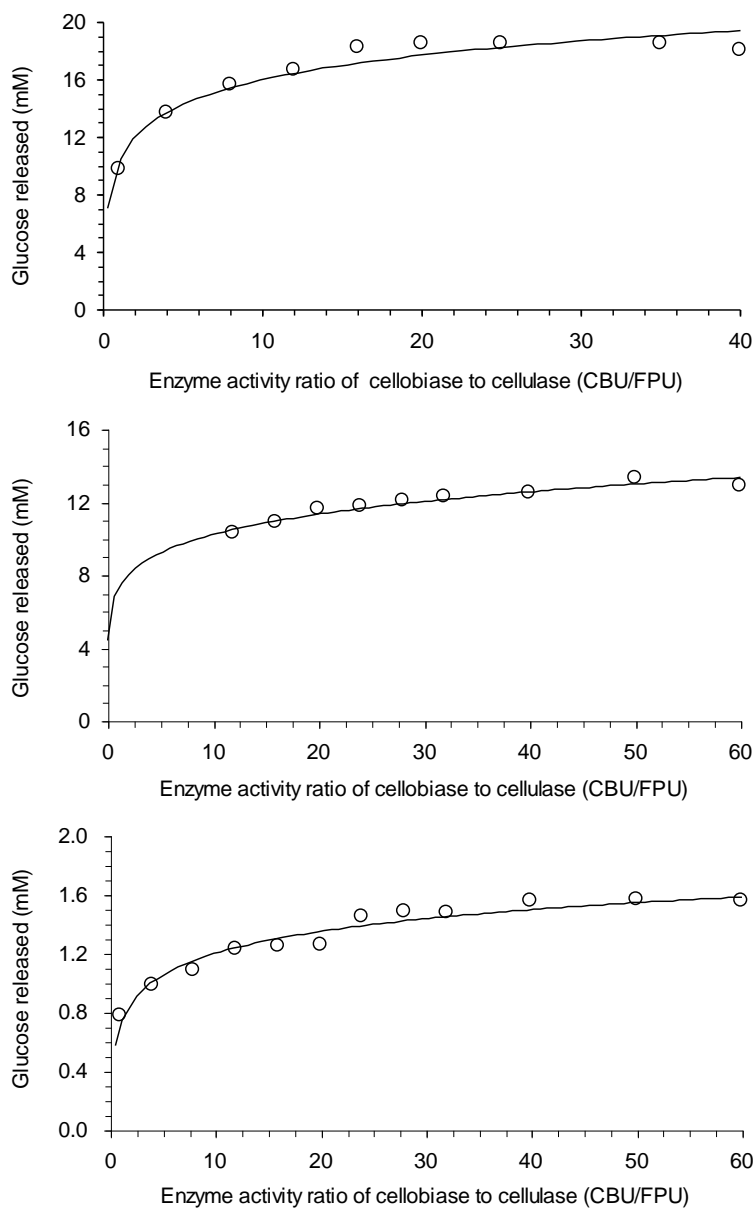


图2.1 纤维二糖酶(Novozyme 188)和纤维素酶(Spezyme CP)酶活力比率对初始反应速率的影响
(a)无抑制无存在.(b)糠醛,5-羟甲基糠醛,香兰素抑制物存在.(c)乙醇存在

Fig.2.1. Effect of the enzyme activity ratio of cellobiase (Novozyme 188) to cellulase (Spezyme CP) on hydrolysis reaction rate indicated by glucose released.

Glucose	84.65
Xylose	36.39
Acetic acid	9.10
Levulinic acid	1.49
Formic acid	2.56
Furfural	0.32
5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)	1.01
Vanillin	0.061
4-Hydroxybenzaldehyde	0.103

在混合状态下滤纸纤维素酶水解实验的对预处理降解副产物对纤维素酶水解的研究给出了一目了然的结果。25 mg/mL 的甲酸使葡萄糖的产生量降低25%；对于糠醛，5-羟甲基糠醛，当其浓度达到3 mg/mL时，生成的葡萄糖分别降低了5%和10%。木质素降解副产物也能够抑制酶水解。当香兰素和4-羟基苯甲醛的浓度达到1 mg/mL时，葡萄糖的生成量降低了7%和2%。乙醇对纤维素酶的抑制表现在浓度为60 mg/mL，酶水解产生的葡萄糖降低为原来的65%。

表2.1 木质纤维素酶水解液中的主要成分

Table 2.1 Composition of major components in enzymatic hydrolysate of lignocellulose

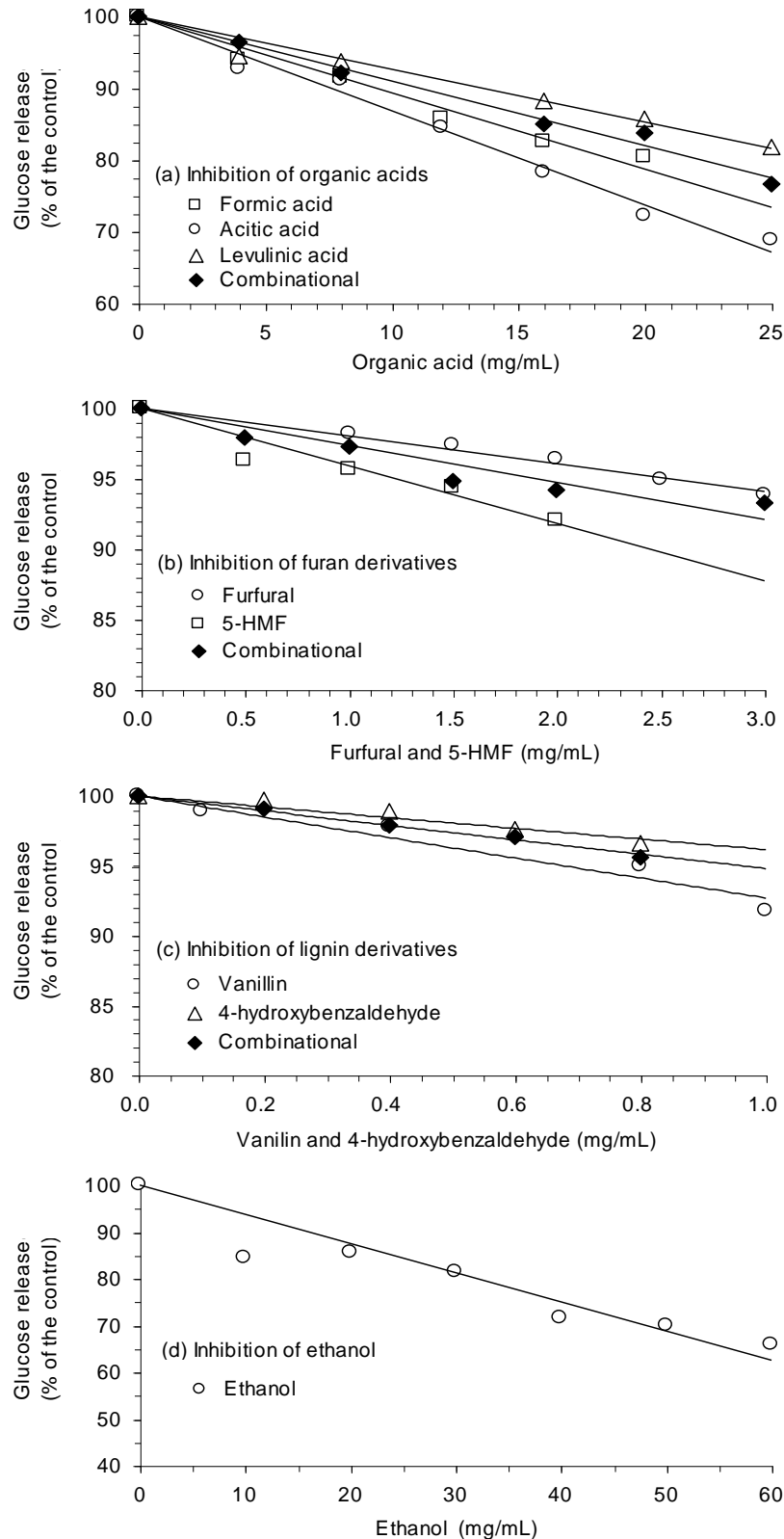


图2.2 混合状态下预处理降解副产物和乙醇对纤维素酶的抑制

Fig. 2.2. Inhibition performance under the well mixing state.

2.4.3 静止状态下滤纸纤维素酶水解

2.4.3.1 有机酸对滤纸纤维素酶水解的抑制作用

静止状态下有机酸对纤维素酶水解抑制的研究是在试管中进行的，实验的方法和酶活力测定的方法一致。为了测定有机酸对纤维素酶(Spezyme CP)抑制的表观动力学常数，假设这种由内切酶，外切酶，纤维二糖酶所组成的混合酶为单纯酶，进而定量的测定预处理降解副产物对纤维素酶的抑制作用。实验是在试管中进行，实验方法如材料与方法中所述。有机酸的浓度根据酸水解液中有机酸的浓度设定，但比酸水解液中有机酸的抑制物浓度高。甲酸 0~25 mg/mL，乙酸 0~30 mg/mL，乙酰丙酸 0~25 mg/mL。因为这三种有机酸不与DNS试剂反应，所以用DNS试剂测定初始反应速率。用初始反应速率对滤纸纤维素底物浓度作Linewaver-Burk双倒数图。如图2.3所示：甲酸，乙酸，乙酰丙酸对纤维素酶水解具有一定的抑制作用。抑制动力学常数列在表2.2。有机酸的 K_M/K_I 值在1.01到1.126的范围之间。乙酰丙酸具有最大的 K_M/K_I 值，表明甲酸是最大的潜在抑制剂。

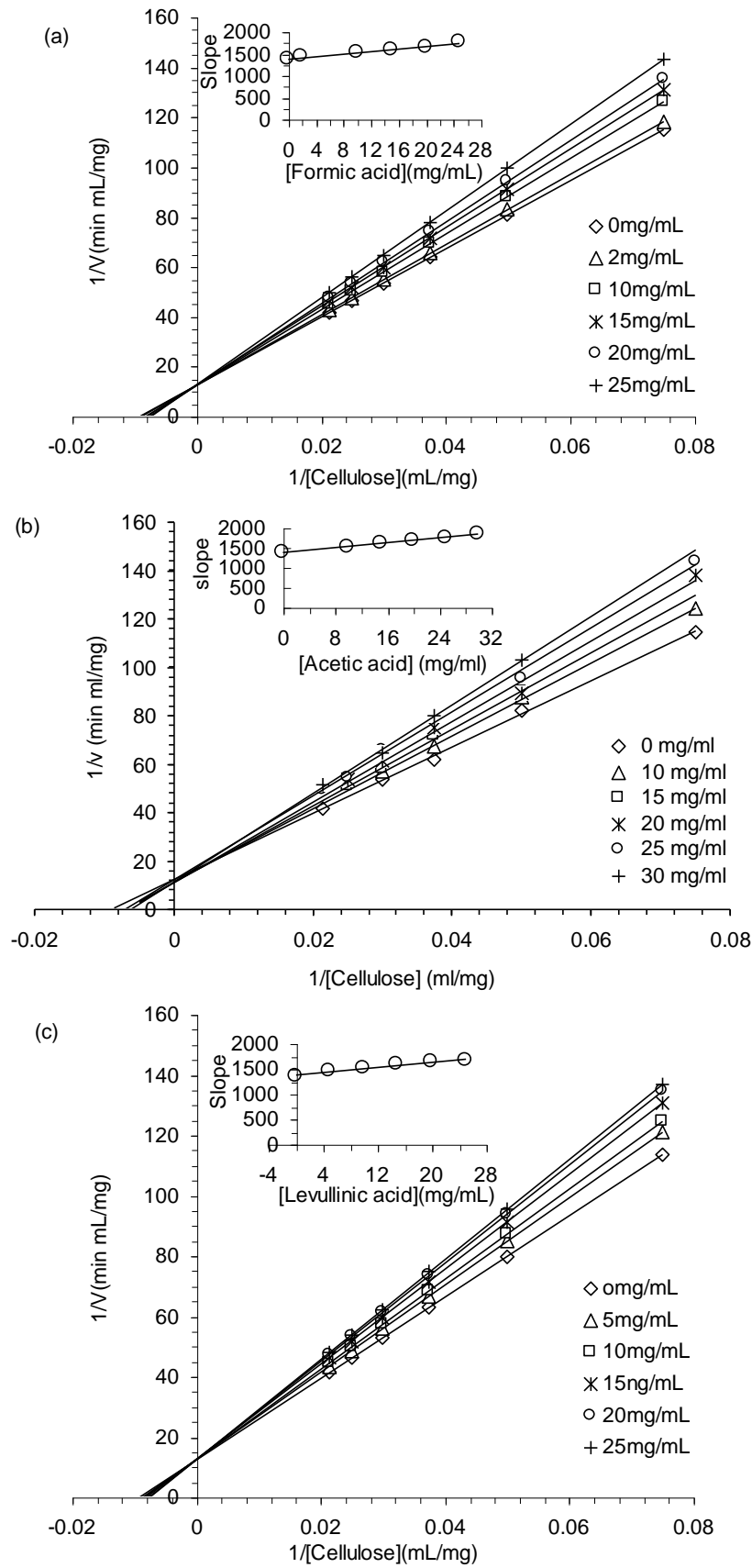


图2.3 静止状态下有机酸对纤维素酶抑制动力学参数测定

Fig. 2.3. Determination of the apparent inhibition parameters for organic acid under static state

2.4.3.2 呋喃类副产物对滤纸纤维素酶水解的抑制作用

呋喃类副产物糠醛，5-羟甲基糠醛对纤维素酶水解的抑制按照材料与方法中所讲的实验方法进行。实验中糠醛的浓度为1.6到6.7 mg/mL，5-羟甲基糠醛的浓度为3.3 到 13.3 mg/mL。用葡萄糖试剂盒的方法来测定初始反应速率。初始反应速率对底物滤纸纤维素浓度所作的Lineweaver-Burk double-reciprocal双倒数图如图2.4 所示。 K_M ， K_I ， V_{max} 等表观动力学常数也计算出来列在下表中。糠醛，5-羟甲基糠醛的 K_M / K_I 值分别为2.82 和 8.70。这表明呋喃类抑制物比有机酸类抑制物的潜在抑制作用要强，其中5-羟甲基糠醛的抑制作用比糠醛的一直作用强。

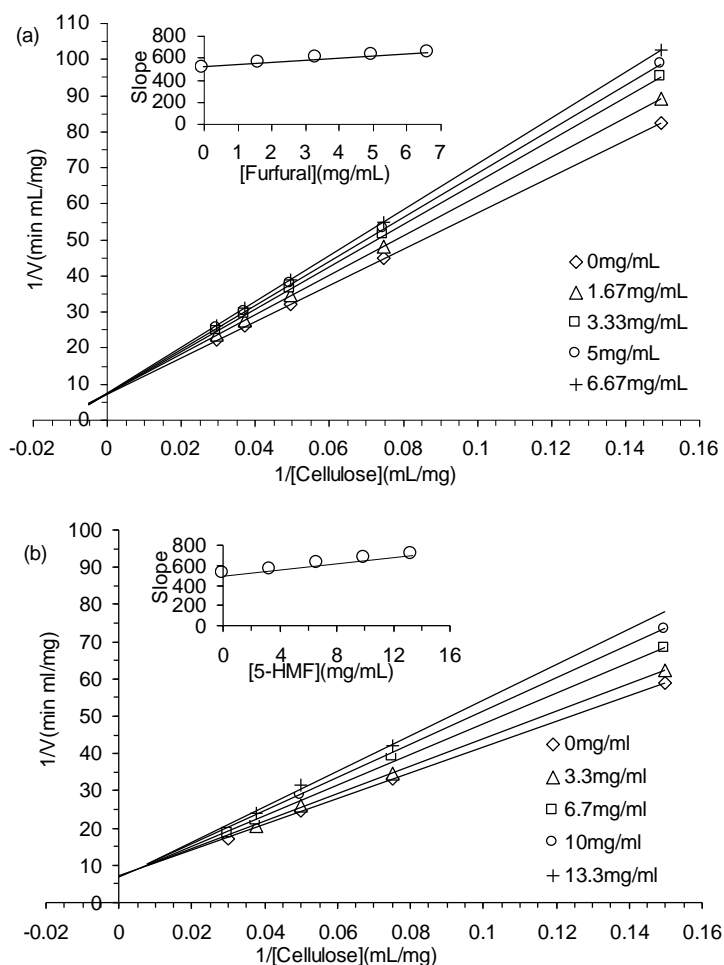


图2.4 静止状态下呋喃衍生物对纤维素酶抑制动力学参数测定

Fig 2.4. Determination of the apparent inhibition parameters for furan derivatives under static state

2.4.3.3 木质素降解产物对滤纸纤维素酶水解的抑制作用

木质素降解产物对滤纸纤维素酶水解的抑制作用研究使用和上面相同的方法。香兰素和4-羟基苯甲醛的浓度均为0.13 mg/mL到1.33 mg/mL，用葡萄糖试剂盒的方法来测定初始反应速率。初始反应速率对底物滤纸纤维素浓度所作的Lineweaver-Burk double-reciprocal 双倒数图如图2.5 所示。 K_M ， K_I ， V_{max} 等表观动力学常数也计算出来列在下表中。香兰素，4-羟基苯甲醛的 K_M / K_I 值分别为15.7和10.6。表明木质素降解产物是潜

在的最大的抑制物，其中香兰素对滤纸纤维素酶水解的抑制作用比4-羟基苯甲醛强。

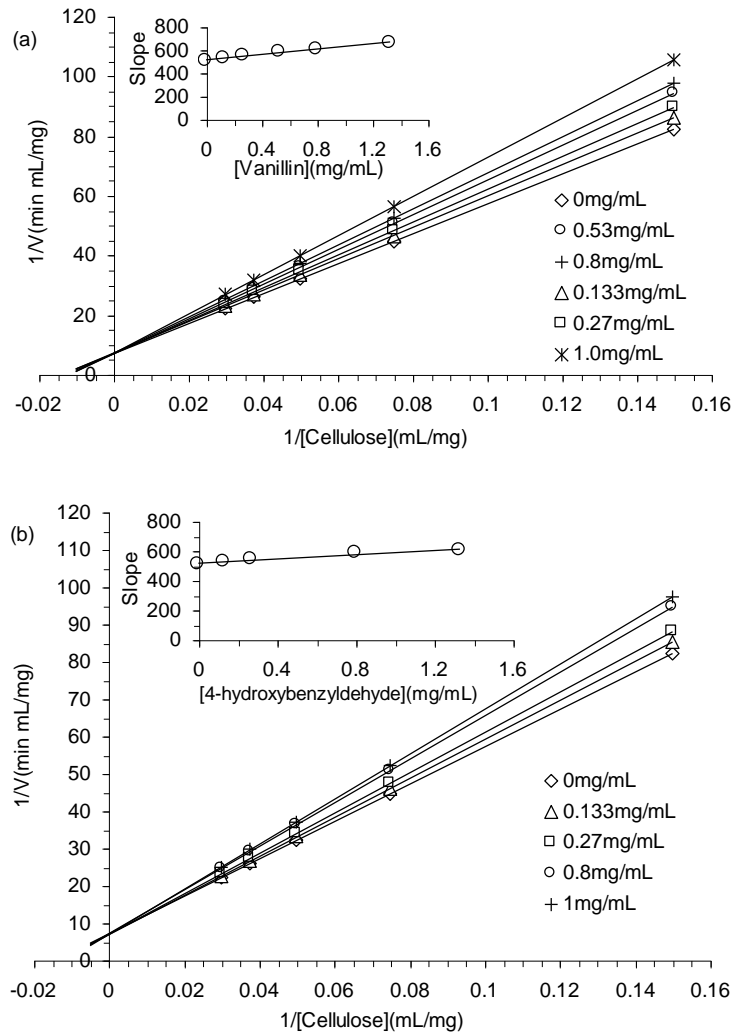


图2.5 静止状态下酚类衍生物对纤维素酶抑制动力学参数测定

Fig 2.5. Determination of the apparent inhibition parameters for lignin derivatives under static state

表2.2 纤维素酶抑制的表观动力学常数

Table 2.2. Apparent kinetic parameters of the hypothesized cellulase in Spezyme CP

Inhibitors	K_M (mg/mL)	K_I (mg/mL)	K_M/K_I	V_{max} (mg/min mL)
Formic acid	111.7	96.8	1.15	0.082
Acetic acid	111.7	88.7	1.26	0.082
Levulinic acid	110	109.5	1.01	0.082
Furfural	72.8	25.8	2.82	0.145
5-HMF	72.8	8.37	8.70	0.140
Vanillin	72.8	4.57	15.9	0.145
4-Hydroxybenzaldehyde	72.8	6.84	10.6	0.145
Ethanol	72.8	70.0	1.04	0.145

2.4.3.4 乙醇对滤纸纤维素酶水解的抑制作用

乙醇对滤纸纤维素酶水解初始反应速率影响的研究采用如上的相同方法进行.乙醇的浓度范围为0~60 mg/mL。用葡萄糖试剂盒测定初始反应速率。以初始反应速率对底物滤纸纤维素的浓度所作的Lineweaver-Burk 双倒数图如图2.6 所示。表观动力学常数列在表中。乙醇的表观 K_M , K_I 值为72.8, 1.04。由此可见, 在混合状态下, 当乙醇浓度达到60 mg/mL时, 它对滤纸纤维素酶水解具有强烈的抑制。但是乙醇本身对纤维素酶的潜在抑制作用并不如以上的三大类预处理降解副产物对纤维素酶的抑制作用大。

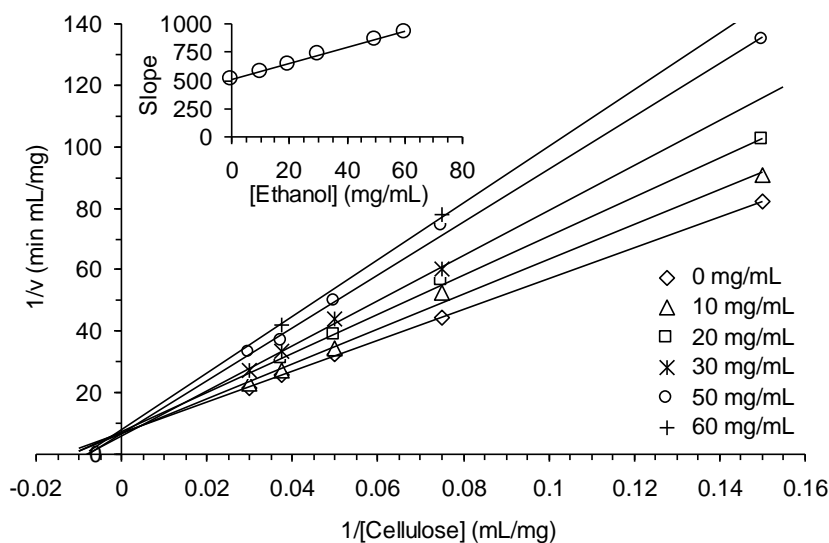


图2.6 静止状态下乙醇对纤维素酶抑制动力学参数测定

Fig2.6. Determination of the apparent inhibition parameters for ethanol under static state

2.5 小结

(1) 三种降解副产物对纤维素酶抑制作用强弱:有机酸<呋喃类衍生物<酚类衍生物。

(2) 有机酸中,乙酸的抑制作用最强,甲酸次之,乙酰丙酸最弱;呋喃类衍生物,5-HMF比糠醛的抑制作用强;酚类衍生物中,香兰素具有更强的抑制作用。

(3) 虽然抑制作用强度有机酸<呋喃类衍生物<酚类衍生物,但在水解液体中抑制物的浓度有机酸>呋喃类衍生物>酚类衍生物。实际抑制作用既要考虑抑制物的抑制强度也要考虑抑制物的浓度。

(4) 与以上三大类副产物对纤维素酶的抑制作用相比乙醇的抑制潜力较小,这与文献报道一致。

第三章 纤维二糖酶基因的克隆表达

3.1 菌株和质粒

实验中所用的菌株和质粒如表 3.1

表 3.1 菌株和质粒

Table 3.1 Strains and plasmids

菌株或质粒度	特性	来源或参考文献
Strains or plasmids	Relevant attributes	References or sources
DH 5a	SupE44A1acU169 (gr801acZAM15)hsdR1	实验室保存
BL21 (DE3)	Mobilization strain.	Novagen
<i>Z. mobilis</i> ATCC31821		Peter L. Rogers ^[59,60]
<i>Bacillus polymyxa</i> 1.794		CGMCC
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir		[61]
pET-28a(+)	Kan ^r	Novagen
pUC19	Amp ^r	[62]
pL0I193	Tc ^r , Cm ^r	Conway, T. ^[63]
pLT20a		实验室构建
pET-28a(+)- <i>bgIA</i>	pET-28a(+) 上克隆有 1400bp 左右 <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III 片段	本工作
pUC19-P <i>gfo</i>	pUC19 上克隆有 410bp 左右的 <i>Eco</i> RI, <i>Sa</i> II 片段	本工作
pUC19-P <i>gfo</i> - <i>bgIA</i>	pUC19 上克隆有 1800bp 左右的 <i>Eco</i> RI, <i>Sa</i> II 片段	本工作
pL0I193-P <i>gfo</i> - <i>bgIA</i>	pL0I193 上含有 1800bp 左右的 <i>Sa</i> II, <i>Pst</i> I 片段	本工作
pLT20a-P <i>gfo</i> - <i>bgIA</i>	pLT20a 上含有 1800bp 左右的 <i>Sa</i> II, <i>Pst</i> I 片段	本工作

3.2 培养基, 培养条件及常用抗生素

3.2.1 培养基

在本工作中, 所有的培养基均用去离子水配制, 除非特别说明, 否则均高压(1.05 kg/cm²)湿热灭菌 20 min 待用。

(1) 大肠杆菌培养基

LB培养基:

胰蛋白(Oxoid)	1.0%
酵母粉(Difco)	0.5%
NaCl	1.0%
pH	7.0

LA培养基: LB+1.2~1.5%(W/V)琼脂

(2) RM培养基

葡萄糖	2%
酵母粉	1%
KH ₂ PO ₄	0.2%
pH	6.0

3.2.2 培养条件

(1) 大肠杆菌培养条件

所有培养平板均在37℃恒温倒置培养16~24 h,

所有接入液体培养基的菌株均在37℃恒温摇床过夜培养。

(2) 运动发酵单孢菌培养条件

所有培养平板均在37℃恒温倒置培养2~3 d;

所有接入液体培养基的菌株均在37℃恒温摇床过夜培养1~2d。

3.2.3 菌种保存

(1) 长期保存: 将新鲜的菌液与60%(v/v)灭菌甘油1:1比例充分混合后, 置-80℃保存;

(2) 短期保存: *E.coli*划线培养于含适当抗生素的LA平板, 4℃可存放约四周。*Z.mobilis*划线培养于含适当抗生素的RM平板, 4℃可存放约四周。

3.2.4 抗生素和相关化学试剂

常用抗生素及使用浓度见表3.2

表3.2 所用抗生素的浓度

Table3.2 Concentration of the antibiotics used in this work

抗生素	缩写	溶剂	母液 (mg mL ⁻¹)	使用浓度 (μg mL ⁻¹)
卡那霉素	Kan	H ₂ O	10	50
氨苄青霉素	Amp	H ₂ O	10	100
四环素	Tc	Ethanol	10	20
氯霉素	Cm	Ethanol	10	40 (<i>E. coli</i>), 120 (<i>Z. mobilis</i>)
Nalidixic acid		H ₂ O	10	40
IPTG		H ₂ O	50	24
X-Gal		H ₂ O	20	40

以水为溶液的抗生素储存液应用0.22 μm滤器过滤除菌。

用乙醇溶解的抗生素溶液无须除菌处理，所有抗生素储存液都应放于不透光的容器中保存。

3.3 溶液、缓冲液的配制及所用试剂

所有的溶液都用超纯去离子水配制，使用前经过灭菌或者溶液的成分单独灭菌。一般溶液灭菌采用高压湿热灭菌，维持20 min，或者经过灭菌的微孔滤膜(孔径为0.45 μm)过滤灭菌。在某一实验中特别使用的溶液、缓冲液将在相应章节中介绍。化学试剂一般为国产，纯度为分析纯。

3.3.1 细胞破碎缓冲液

Buffer A: 50 mM Tris-HCl, 50 mM Tris, and 1 mM EDTA, pH 7.9

Pre-lysis Buffer: 10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1 mM EDTA, 4 mg/mL lysozyme, pH 7.9

Lysis Buffer: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.5%, Tween20, 0.5% Nonidet P40, pH 7.9.

3.3.2 0.2mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液

配制一系列pH值的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液

表3.3 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液

Table3.3 NaH_2PO_4 -citrate buffer

pH	0.2 mol/L Na_2HPO_4 (mL)	0.1 mol/L 柠檬酸(mL)
4.0	7.71	12.29
4.6	9.35	10.65
5.0	10.30	9.70
5.6	11.60	8.40
6.0	12.63	7.37
6.6	14.55	5.45
7.0	16.47	3.53
7.6	18.73	1.27
8.0	19.45	0.55

Na_2HPO_4 分子量为 14.98，0.2 mol/L 溶液为 28.40 g/L。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量为 178.05，0.2 mol/L 溶液含 35.01 g/L。

$C_4H_2O_7 \cdot H_2O$ 分子量为 210.14, 0.1 mol/L 溶液为 21.01 g/L。

3.4 所用仪器

- a) 菌体平板培养箱(恒温恒湿箱): LHS-150HC, 上海一恒科技;
- b) 用于摇瓶培养的摇床: HZ-9311K, 太仓华利达;
- c) 高速冷冻离心机: Avanti J-25, Beckman 公司;
- d) 低温小离心机: Centrifuge 5415R, Eppendorf 公司;
- e) 常温小离心机: Centrifuge 5415D, Eppendorf 公司;
- f) $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱: Forma-86 $^\circ\text{C}$, Thermo 公司;
- g) 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳仪: EPS300, 天能科技(上海)有限公司;
- h) 常压稳压电泳仪: EPS100, 天能科技(上海)有限公司;
- i) Bio-Rad 成像系统: FR-980, 复日科技;
- j) 分光光度计: DU800, Beckman 公司;
- k) 微型摇床: Thermomixer compact, Eppendorf 公司;
- l) 高效液相色谱分析仪: CTO-10AS VP PLUS, 岛津;
- m) 灭菌锅: YXO-LS-SH, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;
- n) 电热恒温水槽: DK-8D 型, 上海一恒科技;
- o) 精密电子天平: BS423S, 北京赛多利斯公司;
- p) 电热恒温鼓风干燥箱: DHG-9203A 型, 上海一恒科技;
- q) 超声波细胞破碎仪: JY92-II, 宁波新芝生物科技股份有限公司;
- r) 电热恒温水槽: DK-8D 型, 上海一衡科技有限公司;
- s) 超净工作台: 100 级 SW-CJ-IBU, 上海博迅公司;
- t) 制冰机: XB100, GRANT 公司
- u) 超纯水纯化系统: Milli-Q, Millipore 公司

3.5 实验方法

3.5.1 质粒 DNA 的提取

试剂盒提取质粒 (OMEGA公司生产)

- (1) 从选择性平板上挑取单菌落, 接入含有选择性抗生素的1~5 mL平板上培养12~16h, 220 rpm(大肠杆菌), 32~36h, 150rpm(运动发酵单孢菌)。
- (2) 室温下将1~5 mL菌体1000 rpm离心1 min。
- (3) 加入250 μL 的Solution I/RNase A, 振荡将细胞重新悬浮起来。完全悬浮的标准为没有明显的细胞团。
- (4) 加入250 μL 的Solution II, 慢慢混匀, 裂解2 min (不能超过5 min, 不能剧烈振荡)。
- (5) 加入350 μL 的Solution III, 迅速充分混匀直到形成白色沉淀。
- (6) 室温下, 大于1000 g转速下, 离心10 min。

- (7) 将上清液体小心地加入到一个干净的HiBind Miniprep Column (I) (将柱子装在一个2 mL的离心管中)。室温下, 1000 g离心1 min, 从而将细菌裂解物阻留在HiBind Miniprep Column (I)中。
- (8) 将离心下来的液体丢掉。加入250 μL Buffer HB到HiBind Miniprep Column(I), 室温下离心1 min。
- (9) 将离心下来的液体丢掉。在HiBind Miniprep Column (I)中加入700 μL 的无水乙醇稀释的DNA wash buffer。10000 g室温离心1 min。使液体流经HiBind Miniprep Column (I), 将液丢掉。(若DNA wash buffer在冰箱中存放, 则要放至室温再用)。
- (10) 重复步骤9一次。
- (11) 将空柱子放在13000 g下离心2min, 离干乙醇。
- (12) 将柱子放在1.5 mL离心管中。加入30~50 μL elution buffer或者是无菌去离子水直接加到柱子中, 在室温下放置1~2min。在13000 g离心以洗脱掉DNA。

3.5.2 质粒 DNA 的定量

使用DU800分光光度计, 预热10 min。

操作步骤:

- (1) 吸取5 μL DNA样品, 加水至1 mL混匀后, 转入分光光度计的石英比色杯中。当DNA很少时, 可用0.5 mL的比色杯, 上述的DNA样品与水容积均缩小一半。
- (2) 用1 mL水样校正分光光度计的零点。
- (3) 在260nm和280 nm分别读出光密度, DNA样品的浓度为 $\text{OD}_{260} \times \text{核酸稀释倍数} \times 50/1000$, 浓度单位为 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 按步骤(1)的稀释方式, DNA浓度($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)均为 OD_{260} 的200倍。如 OD_{260} 为0.1, 则样品浓度为 $0.1 \times 200 \times 50/1000 = 1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。
- (4) 如果 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值大于1.8, 说明DNA样品中存在RNA, 可考虑用RNA酶处理; 小于1.6, 样品中存在蛋白质或酚, 则应再抽提。

3.5.3 细菌基因组 DNA 的提取

细菌 DNA(小量)抽提试剂盒 W6511(Watson Biotechnologies, Inc.)

- (1) 细菌的消化(最大其始量: 4.5×10^9)
将1 mL菌液离心15 s, 弃上清。在细菌沉淀中加入40 μL DB液, 160 μL Lysozyme 和8 μL Rnase A。彻底振荡悬浮。37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴30~60 min, 期间来回颠倒离心管数次。
- (2) 加入400 μL DL液和25 μL Proteinase K, 迅速温和地来回颠倒离心管彻底混匀。置65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴至少30 min, 期间来回颠倒离心管数次。离心3 min后, 取上清至另外一个离心管中。
- (3) 加入200 μL 异丙醇, 剧烈振荡离心管至溶液混匀后, 全部移至吸附柱中, 离心30 s。弃去收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。再离心30 s, 将吸附柱放入一个干净的收集管中。

- (4) 加入500 μL WI液，静置1 min后，离心30 s。弃收集管内液体，将吸附柱放入同一个收集管中。
- (5) 加入500 μL WI液，离心15 s。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一个收集管中。再离心1 min。
- (6) 将吸附柱移入一个1.5 mL离心管中。在吸附膜中央加入100 μL T1(2 mM Tris)液，65 $^{\circ}\text{C}$ 静置5 min，离心1 min。将收集管(DNA)-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.5.4 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳也是常用的检测DNA大小、含量及质量的一种方法。

1 实验试剂

(1) DNA 样品；DNA 标准分子量标记物(Wide range DNA marker 500~12000 TAKARA)；琼脂糖；1 \times 电泳缓冲液 TBE；6 \times 样品缓冲液。

(2) 溴化乙锭：水中加入溴化乙锭，搅拌数小时至溶解。将配好的 10 mg/mL 溴化乙锭溶液装在棕色瓶中，室温保存，使用时稀释至 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 3.4 DNA 凝胶电泳缓冲溶液

Table3.4 DNA electrophoresis buffer

缓冲溶液	工作溶液		储存溶液(L)
	0.5x		5x
TBE	0.045 mol/L Tris-硼酸		54 g Tris 碱
	0.001 mol/L EDTA		27.5 g 硼酸
			20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
6 \times 样品缓冲液	0.2% 溴酚蓝		储存温度4 $^{\circ}\text{C}$
		50% (w/v) 蔗糖水液	

2 实验操作

(1) 照厂家说明准备好灌胶模具，置于水平面上。

(2) 根据DNA片段的大小，选择制备适宜浓度的琼脂糖凝胶。分离观察大片段时需采用稀胶(0.5~0.7%)，低压(1.5 $\text{V}\times\text{cm}^{-1}$)；要检测小片段时则用浓胶(0.9~1.5%)，高压(8 V/cm 左右)。本实验采用0.7%琼脂糖凝胶，90 V电压。

(3) 0.7%琼脂糖凝胶配制。取250 mL三角瓶，加入100 mL TBE缓冲液，称取0.7 g 琼脂糖加入缓冲液中，用微波炉加热至完全溶解。待完全溶解的凝胶稍微冷却后，滴入1滴溴化乙锭。在灌胶模具中插入梳齿，将凝胶倒入灌胶模具。凝胶厚度3~5mm，避免气泡产生。

- (4) 室温放置30~45 min, 待凝胶完全凝固后, 按照厂家说明将凝胶放入水平板电泳槽。
- (5) 在电泳槽中加入电泳缓冲液, 电泳缓冲液没过胶面 1 mm, 拔下梳齿形成样品池。
- (6) 取样品与6×样品缓冲液按照比例混合后, 用微量移液器缓慢加入样品池中。加样量控制在10~30 μL 。
- (7) 盖上电泳槽并且通电, 注意电源正负极, 确保样品向阳极移动。至示踪染料溴酚蓝前沿距离凝胶前端1 cm时, 切断电源。
- (8) 从电泳槽中取出凝胶, 于紫外灯下观察、拍照。

3.5.5 PCR 扩增和 DNA 酶切

3.5.5.1 PCR 扩增

- (1) 按以下次序, 将各成分在0.5 mL灭菌离心管内混合

dNTP	4 μL
Primer 1(生工引物合成部)	1 μL
Primer 2(生工引物合成部)	1 μL
模板DNA	1 μL
10 DNA polymerase buffer(Takara)	5 μL
Taq DNA polymerase(Takara)	1 μL
加ddH ₂ O至终体积50 μL	

- (2) 将PCR管放入已经编好程序的PCR仪中, 开机反应。
- (3) 反应结束后, 取5 μL PCR反应混合液进行电泳, 检测到是否扩增到目的片段。

3.5.5.2 DNA 的限制性内切酶酶切

常规的酶切体系如下:

DNA: 0.2~1 μg

10x酶解缓冲液: 2 μL (1xbuffer)或4 μL (2xbuffer)

适当限制性内切酶: 1 μL

ddH₂O补足20 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切1~4 h或过夜。酶切完毕后, 将反应液置65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温10~15 min中止酶反应, 即用或存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

3.5.6 DNA片段的分离与回收

3.5.6.1 试剂盒方法纯化PCR及PCR产物酶切片段

UNIQ-10柱式PCR产物纯化试剂盒 Cat.No.SK1142(生工生物工程上海有限公司)

- (1) PCR结束后, 从PCR管中将反应液移至干净的1.5 mL离心管中, 加入3倍体积的Binding Buffer I混匀。

- (2) 把混合液转移到套放于收集管的UNIQ-10, 室温放置2 min, 用台式离心机离心6000rpm 1 min。
- (3) 取下UNIQ-10柱, 倒掉收集管中的废液, 将UNIQ-10柱放入同一个收集管中, 加入500 μ L Wash Solution, 8000 rpm室温离心1 min。
- (4) 重复步骤3一次。
- (5) 取下UNIQ-10柱, 倒掉收集管中的废液, 将UNIQ-10柱放入同一个收集管中, 12000 rpm室温离心15 s。
- (6) 将UNIQ-10柱放入一根新的1.5 mL离心管中, 在柱子膜中央加入30~40 μ L Elution Buffer或水(pH>7.0), 室温或37 $^{\circ}$ C放置2 min。
- (7) 12000rpm室温离心1 min, 离心管中的液体即为回收的DNA片段, 可立即使用或保存于-20 $^{\circ}$ C。

3.5.6.2 凝胶回收试剂盒纯化DNA片段

Spin DNA Agarose Gel Purification Kit(OMEGA)

- (1) 用琼脂糖凝胶电泳将目的DNA片段与其它DNA尽可能分开, 然后用干净的手术刀割下含有所要回收DNA琼脂糖块, 放入1.5 mL离心管中。判定DNA片段的位置时, 要尽可能使用长波长UV, 在UV下照射的时间应尽可能短。
- (2) 按每100 mg琼脂糖凝胶加入400 μ L Solution SN, 置于55~65 $^{\circ}$ C水浴中5 min, 中途混匀几次, 至胶完全融化。胶融化后每400 μ L Solution SN加入100 μ L Solution B, 混匀。
- (3) 将3S柱放入2 mL收集管中, 将融化的胶溶液转移到3S柱中, 让盖子开着, 室温放置2 min。盖上离心管盖, 室温离心(10000 rpm)1 min。
- (4) 取下3S柱, 倒掉收集管中的废液, 将3S柱放入同一收集管, 加入600 μ L Wash solution, 室温离心(10000 rpm)1 min。
- (5) 重复步骤4一次。
- (6) 取下3S柱, 倒掉收集管中的废液, 将3S柱放入同一个收集管中, 室温高速离心(10000 rpm)2 min。
- (7) 将3S柱放入一根新的1.5 mL离心管中, 在3S柱子膜中央加30 μ L TE或水, 室温放置2 min。
- (8) 盖上离心管盖1000 rpm离心1 min, 离心管中的液体即为回收的DNA片段, 立即使用或保存-20 $^{\circ}$ C。

3.5.7 DNA连接

T4 DNA连接酶可以催化连接双链DNA5'-磷酸基和相邻核苷酸的3'-羟基。即可以连接粘性末端的T4 DNA连接酶, 也可以连接平头末端。推荐使用1:1, 1:3或3:1, 不同类的载体为了达到最高连接效率, 二者的比率不同。

例如:

3 kb的载体与0.5 kb的外源按1:1的连接比率, 一般连接使用的载体DNA为100~200ng, 在EP管中依次加下列样品:

载体DNA	100 ng
外源DNA	17 ng
T4 DNA连接酶 (wesic单位)(Takara)	0.1~1.0 U
Ligation buffer	1 μ L
ddH ₂ O	使终体积为10 μ L

(2) 室温下放置3 h或4 $^{\circ}$ C过夜或15 $^{\circ}$ C 4~16 h;

(3) 连接反应完成后, 可用转化和电泳方法, 检查连接反应是否成功。

3.5.8 质粒 DNA 转化

3.5.8.1 *E. coli*感受态细胞的制备(*E. coli* DH5a, *E. coli* S17-1)

(1) 培养*E. coli*细胞5 mL(LB培养基过夜培养)。

(2) 将4 mL过夜培养物接入到500 mL LB(含10mM MgSO₄, 0.2% glucose)。

(3) 培养OD₆₀₀=0.4。

(4) 将烧瓶中的细胞培养物在冰上制冷10 min。

(5) 将细胞分装在两个灭过菌的冷的离心管中(每个放250 mL)。

(6) 4 $^{\circ}$ C, 2000g离心5 min。

(7) 慢慢倒掉上清液, 将细胞沉淀温柔地悬浮在45 mL冰冷的0.1 M CaCl₂溶液(在冰上缓慢摇晃)。

(8) 2000g 4 $^{\circ}$ C离心5 min, 将细胞重新悬浮在5 mL 冰冷的0.1 M CaCl₂。

(9) 加入100 μ L DMSO, 缓慢搅拌混合, 在冰上放置15 min, 再加入100 μ L DMSO, 缓慢搅拌混合, 在冰上放置15 min。

(10) 将细胞分成200 uL液体分装在1.5 mL离心管, 在液氮中冷冻后在-80 $^{\circ}$ C。

3.5.8.2 热激转化大肠杆菌(*E. coli* DH5a, *E. coli* S17-1)

(1) 用冷的无菌吸头从每份CaCl₂溶液制备的感受态细胞悬液中吸取200ul转移到无菌离心管, 每管中加入的DNA(用不超过10 μ L的体积, 其中的DNA小于50 ng), 轻轻旋转以混合内容物, 在冰上放置30 min。

(2) 将管放入预加温至42 $^{\circ}$ C的循环水浴中, 恰恰放置90 s, 不要摇动(准确达到热激温度很关键)。

(3) 快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却1~2 min。

(4) 每管加入800 uL SOC培养基(可用LB代替), 用水浴将培养基加温至37 $^{\circ}$ C, 然后将管转移到摇床上, 温育45 min, 使细菌复苏(低于50 rpm/min的转速)。

(5) 将适当体积(每个90 mm平板达200 μ L)已转化感受态细胞转移到含20 mM MgSO₄和相应抗生素的SOB培养基(可用LB培养基代替)。(对于氨苄青霉素抗性, 每90 mm平板, 菌落应低与10⁴个, 37 $^{\circ}$ C培养应低于20 h。

- (6) 将平板置于室温直至液体被吸收。
 - (7) 倒置平板，于37℃培养，12~16 h后可出现菌落。
- 3.5.8.3 接合转化(*Z. mobilis* ATCC31821)
- (1) 按照3.12.2方法将质粒转化到*E.coli* S17-1中。
 - (2) 将带有质粒的*E.coli* S17-1在含有抗生素的液体LB培养基中培养至OD₆₀₀=0.6(一般10 h)。
 - (3) 在RM培养基中培养*Z.mobilis* ATCC31821至OD₆₀₀=0.5(一般24 h)。
 - (4) 取OD₆₀₀=0.6 *E.coli* S17-1和OD₆₀₀=0.5 *Z.mobilis* ATCC31821各500 μL,置于1.5 mL灭过菌离心管中，10000 g离心30 s,倒出上清液，将细胞用不含抗生素的RM培养基洗一次，倒掉上清液，将细胞在剩余的上清中悬浮起来(约50 μL,用移液枪吸打悬浮)。
 - (5) 将这些细胞转移到0.45 μm孔径的纤维素脂膜上(直径25 mm)，滤纸片事先放在RM的固体平板上，30℃培养10 h。
 - (6) 将滤纸片上的细胞在3 mL RM 培养基上悬浮。适当稀释后涂到含有nalidixic acid和相应抗生素(pLOI193-Psgfo-bglA 氯霉素，pLT-20a-Psgfo-bglA四环素)的平板上，30℃培养2 d 后长出较大的克隆。
- 3.5.9 基因的表达与蛋白的检测
- 3.5.9.1 所用试剂
- (1) 30%(w/v)凝胶贮存液：丙烯酰胺 29 g，亚甲双丙烯酰胺 1 g，加超纯水(ddH₂O)溶至 100 mL，过滤后放入棕色瓶 4℃保存。
 - (2) 1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)：Tris 碱 18.15 g，1 mol/L Tris-HCl，pH 8.0 加 ddH₂O 至 100 mL。
 - (3) 1.0 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)：Tris 碱 12.1 g，1 mol/L HCl 调节至 pH 6.8，加 ddH₂O 至 100 mL。
 - (4) 10% SDS。
 - (5) 10%过硫酸铵(AP)。
 - (6)TEMED(四甲基乙二胺)。
 - (7) Tris-甘氨酸电泳缓冲液，pH 8.3，可配成 5×贮存液备用，临用前稀释。Tris 碱 15.1 g，甘氨酸 94g，1% SDS 50 mL，加 ddH₂O 至 1000 mL。
 - (8) 样品处理液：0.5 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)10 mL，1 mol/L DTT 10 mL，SDS 2g，甘油 20 mL，溴酚蓝 0.1 g，加 ddH₂O 至 100 mL。
 - (9) 染色液：0.4%(w/v)考马斯亮蓝-R250 染色液：考马斯亮蓝 R250 4 g，无水乙醇 500 mL，冰乙酸 100 mL，加 ddH₂O 至 1000 mL。
 - (10) 脱色液：甲醇、冰醋酸、ddH₂O 以 3:1:6 配制而成。
- 采用不连续电泳法，分离胶和浓缩胶的配制见表3.5

表3.5 SDS-Page 胶的配制

Table3.5 Prescription of the SDS-Page gel

12%分离胶		5%浓缩胶	
成分	加入量	成分	加入量
30%丙烯酰胺(mL)	4	30%丙烯酰胺(mL)	0.83
分离胶缓冲液体(mL)	2.5	分离胶缓冲液体(mL)	0.63
ddH ₂ O(mL)	3.3	ddH ₂ O(mL)	3.4
TEMED(μ L)	10	TEMED(μ L)	5
10%过硫酸铵(μ L)	100	10%过硫酸铵(μ L)	50
10%SDS(μ L)	100	10%SDS(μ L)	50

3.5.9.2 分离胶与堆积胶的灌制

(1) 两块 12% 的分离胶(6cm×8cm×0.75mm)，需 10 mL：

水 3.3mL；30% 丙烯酰胺溶液 4mL；1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)2.5mL；10% SDS 100 μ L；10% APS 0.1 mL；TEMED 10 μ L

上述混合液混匀后灌入玻璃板间，以水封顶，注意使液面平。(凝胶完全聚合需 30-60 min)

(2) 两块 5% 浓缩胶(6 cm×8 cm×0.75 mm)，4 mL；水，3.4 mL；30% 丙烯酰胺溶液，0.83 mL；1.5 mol/L，Tris-HCl(pH 8.8)0.63 mL；10% SDS，50 μ L；10% APS，50 μ L；TEMED，5 μ L。

将分离胶上的水倒去，加入上述混合液，立即将梳子插入玻璃板间，完全聚合。

3.5.9.3 蛋白质样品的制备

所得 *Bacillus polymyxa* 的 β -葡萄糖苷酶基因在 Novagen 公司的 pET-28a 系统中表达。过程如下：

- (1) 将 PCR 扩增得到的 DNA 片段经限制性内切酶酶切后与用相同内切酶完全酶切的表达载体进行连接并转化到 E.coli BL-21 中；
- (2) 在含有 40 μ g/ mL 的 IPTG 和 20 μ g/mL 的 X-gal 的带卡那霉素抗性平板上筛选阳性克隆，提取质粒并经酶切和 PCR 验证后，将重组质粒转化到表达宿主 Ecoli BL-21 中；
- (3) 用无菌牙签挑取转化子点于含有相应抗生素、40 μ g/mL 的 IPTG 和 20 μ g/mL 的 X-gal 的 β -葡萄糖苷酶基因筛选平板上筛选活性最大的克隆，划线接种到含有相应抗生素的 LB 平板上 4 $^{\circ}$ C 保存；
- (4) 接种含有表达质粒的重组菌到 10 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 200 rpm 过夜培养。次日按 1% 接种量转接到 100 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 200 rpm 培养至 OD₆₀₀=0.6；
- (5) 加入 IPTG 至终浓度为 1 mM，37 $^{\circ}$ C 诱导 5h 后离心收集菌体；

- (6) 用5g/mL菌体的裂解缓冲液重悬菌体，加入溶菌酶至终浓度1 mg/mL，置冰上30 min;
- (7) 用超声波破碎细胞，于4 ℃下13000 rpm离心细胞破碎液10 min，分别收集上清和沉淀物;
- (8) 取上清20 μL，加入10μL的5xSampleBuffer混匀; 沉淀物重悬于20 μL ddH₂O中，加入10μL的5xSample Buffer混匀，沸水中煮5 min，13000 rpm离心5min后取10 μL上清液上样;
- (9) SDS-PAGE检测目标蛋白的表达情况。

3.5.9.4 SDS-PAGE蛋白质电泳

SDS-PAGE蛋白质电泳参照Laemmli的方法进行^[64]。

SDS-PAGE电泳在Amersham Biosciences的HoferminiVE垂直电泳系统上完成。

- (1) 在制胶器上将Spacer与两块玻璃板安装好;
- (2) 选择合适的凝胶浓度配制一定体积的分离胶液;
- (3) 将分离胶注入玻璃夹层中，上部无水乙醇封顶，保持胶面平整，室温放置约30 min后分离胶即可聚合完全;
- (4) 把分离胶表面的无水乙醇倒掉，并用滤纸吸干，灌入浓缩胶，将梳子平行插入，避免产生气泡;
- (5) 将样品与等体积的2×蛋白加样缓冲液混合，100 ℃煮沸5 min，取10~20 μL上样;
- (6) 加样完毕后，用100V电压电泳。当溴酚蓝指示剂到达底部边缘时停止电泳。大约需要1.5 h;
- (7) 电泳结束后，轻轻撬开两层玻璃板，取出凝胶。

3.5.9.5 染色与脱色

染色：将胶从玻璃板中取出，考马斯亮兰染色液染色，室温 1 h。

脱色：将胶从染色液中取出，放入脱色液中，2次脱色至蛋白带清晰。大约每次需30 min。

3.13.6 凝胶摄像和保存

凝胶摄像和保存：在图像处理系统下将脱色好的凝胶摄像，结果存于软盘中，凝胶可保存于双蒸水中或7%乙酸溶液中。

3.5.10 Bradford 蛋白浓度测定

3.5.10.1 试剂配制

- (1) 标准蛋白质溶液：可用牛血清蛋白预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，根据其纯度配制成0.5 mg/mL的溶液。
- (2) 蛋白试剂的配制：称取100 mg考马斯亮蓝 G250溶于50 mL 95%乙醇，加入100 mL 85%(W/V)磷酸，将溶液用水稀释到1000 mL。试剂的终浓度为0.01%考马斯亮蓝 G250，4.7%(W/V)乙醇，和8.5%(W/V)磷酸。

3.5.10.2 标准曲线测定

取 0~200 μL 标准蛋白质溶液于小试管中,用缓冲液调体积到 0.2 mL,然后加入 2 mL 蛋白试剂(Bradford 试剂),充分振荡混合,2 min 后于 595 nm 测定光吸收值。以 0.2 mL 缓冲液及 2 mL 蛋白试剂作为空白对照。用不同浓度的标准蛋白质溶液作标准曲线,以蛋白质浓度为横坐标,光吸收值为纵坐标,绘制标准曲线作为定量的依据。

3.5.10.3 样品处理与样品测定

根据需要对样品进行一定倍数的稀释,用缓冲液调体积到 0.2 mL,再加入 2 mL 蛋白试剂,充分振荡混合,2 min 后于 595 nm 测定光吸收值,以 0.2 mL 缓冲液及 2 mL 蛋白试剂作为空白对照。

最后与标准曲线对照,计算出样品中的蛋白浓度。

3.5.11 粗酶液的提取

- (1) 从划线平板中挑取工程菌的单菌落于装有 5 mL LB(pH 7.0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)的三角摇瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 过夜培养。
- (2) 以 1% 接种量接种到发酵瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 培养至 $\text{OD}_{600}=0.5\sim 0.6$ 。
- (3) 加入 IPTG 使其终浓度为 0.75 mg/mL , 37 度诱导 3 h。
- (4) 将发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 g 离心 5 min 收集细胞。
- (5) 弃上清,每升发酵液细胞量用 100 mL pH 7.0 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液洗涤重悬细胞。
- (6) 重复步骤(5)两次。
- (7) 弃去上清,每升发酵液细胞量用 20 mL pH 7.0 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液重悬细胞。
- (8) 250W, 超声破碎 20 个循环,每个循环破碎 5 s, 间隔 15 s。
- (9) 将细胞破碎的裂解液在 4 $^{\circ}\text{C}$, 13000 g 离心 20 min。
- (10) 分别收集上清液和沉淀。

3.5.12 高效液相色谱(HPLC)分析

流动相的配制: 0.005 M H_2SO_4 。做液相分析前须将流动相经超声脱气处理 10 min。接着打开液相色谱仪并通入流动液直至柱子平衡。

检测器: RID-10A;

泵: HPLC, LC-20AD;

色谱柱: Bio-rad Aminex HPX-87H., 流速: 0.6 mL/min, 柱温: 65 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 25 μL ;

保留时间: 纤维二糖: 7.4 min, 葡萄糖: 9.03 min, 乙醇: 22.2 min。

取样后的样品需进行适度倍稀释, 12000 rpm 离心 20 min, 经过滤膜过滤后方可进样。

柱子清洗过程

- (1) 流动相为 0.005 M H₂SO₄+5% 乙腈, 超声脱气(不可做高温灭菌处理)。在流速 0.2 mL/min, 柱温 65 °C 的条件下清洗 4 min。
- (2) 流动相为 0.005 M H₂SO₄+30% 乙腈, 超声脱气(不可做高温灭菌处理)。在流速 0.2 mL/min, 柱温 65 °C 的条件下清洗 12 h。
- (3) 流动相为 0.005 M H₂SO₄, 高温灭菌处理+超声脱气处理。在流速 0.2 mL/min, 柱温 65 °C 的条件下清洗至基线平衡。

3.6 实验结果

3.6.1 纤维二糖酶基因的筛选

本文根据文献中报道的具有较高纤维二糖酶活性的菌株 *Xanthomonas albilineans* 菌株, 选择了 *Xanthomonas albilineans* 同属 *Xanthomonas campestris pv campestris 8004* 菌的 *bgl2172* 基因, *bgl2244* 基因, *bgl2286* 基因以及文献报道的具有纤维二糖酶活性的 *Bacillus polymyxa 1.794* 的 *bglA* 基因。分别将这四个葡萄糖苷酶的基因克隆在 pET-28a 中, 转化 BL-21, IPTG 诱导表达。比较该四个来源的纤维二糖酶的比活力, 选取比活力最高的一个 *Bacillus polymyxa 1.794* 的 *bglA* 基因作为后续基因工程构建的基因。

3.6.1.1 *Xanthomonas campestris pv campestris 8004 bgl2172* 基因在 pET-28a 克隆表达

(1) pET-28a-*bgl2172* 质粒的构建

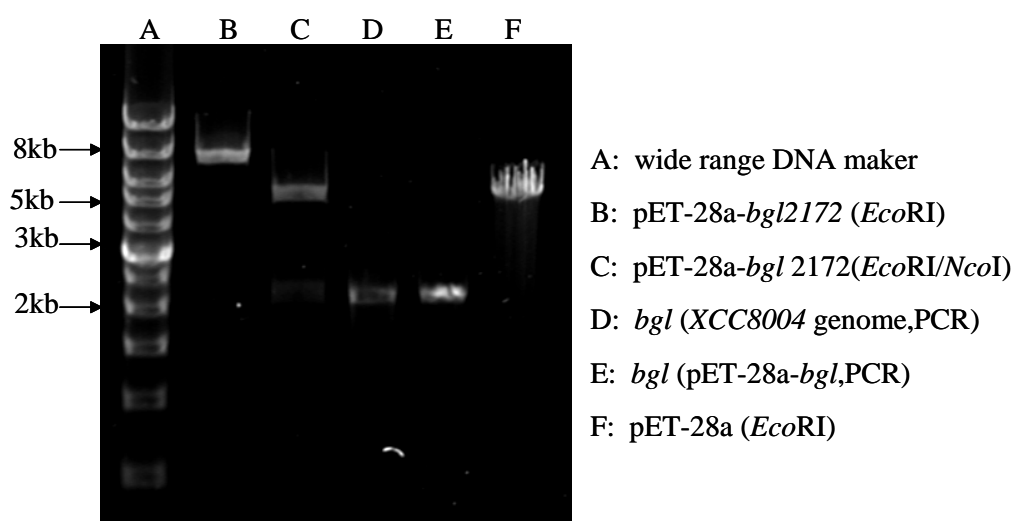


图3.1 pET-28a-*bgl2172* 酶切图谱

Fig.3.1 Construction of pET-28a-*bgl2172* plasmid

由图3.1 可以看出pET-28a-*bgl2172*质粒度已经成功构建起来。

(2) BGL2172蛋白表达

(a). IPTG剂量对BL-21(pET-28a-*bgl2172*)蛋白诱导表达的影响

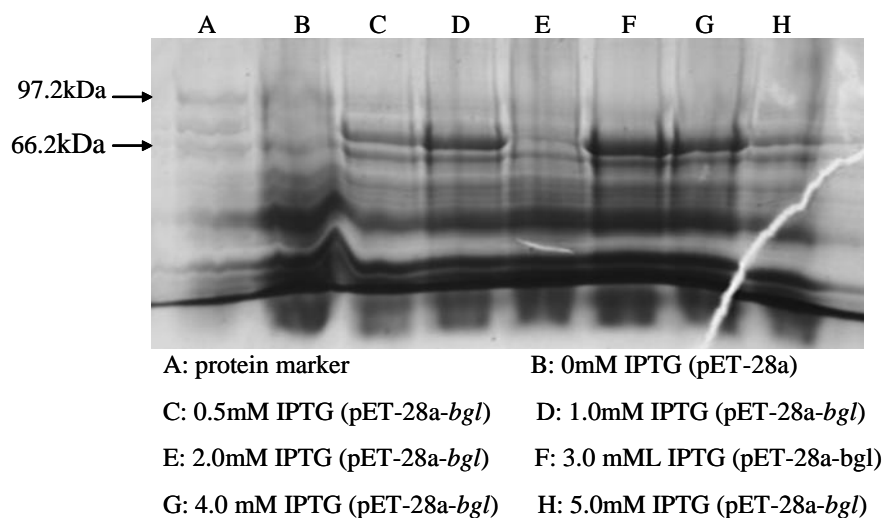


图3.2 IPTG 剂量对葡萄糖苷酶表达的影响

Fig.3.2 Effect of IPTG dosage on beta-glucanase expression

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基，接种BL-21(pET-28a-bgl2172)，培养至 $OD_{600}=0.4$ ，加入不同剂量IPTG，诱导表达4 h，取样1 mL，离心收集细胞，用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗3次重新悬浮细胞。取40 μ L细胞悬浮液加入10 μ L 5 \times Loading buffer，沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min，取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎液蛋白电泳图。目的蛋白的分子量为79KDa，由图可见，IPTG的最佳诱导浓度为3.0 mM。

(b) IPTG诱导时间对BL-21(pET-28a-bgl2172)蛋白表达的影响

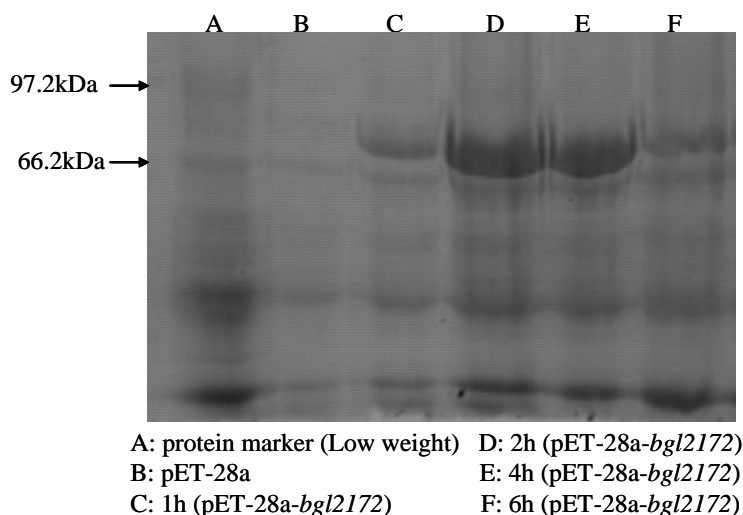


图3.3 IPTG诱导时间对葡萄糖苷酶表达的影响

Fig.3.3 Effect of stimulation time of IPTG on beta-glucanase expression

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基，接种BL-21(pET-28a-bgl2172)，培养至 $OD_{600}=0.4$ ，加入IPTG至3 mM，诱导表达，分别在0 h，2，4 h，6 h 取样1 mL，离心收集细胞，用pH

7.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗3次重新悬浮细胞。取40 μL 细胞悬浮液加入10 μL 5 \times Loading buffer, 沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min, 取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎液蛋白电泳图。由图可见, IPTG的最佳诱导时间为2 h。

(3) 酶反应最佳pH和温度的测定

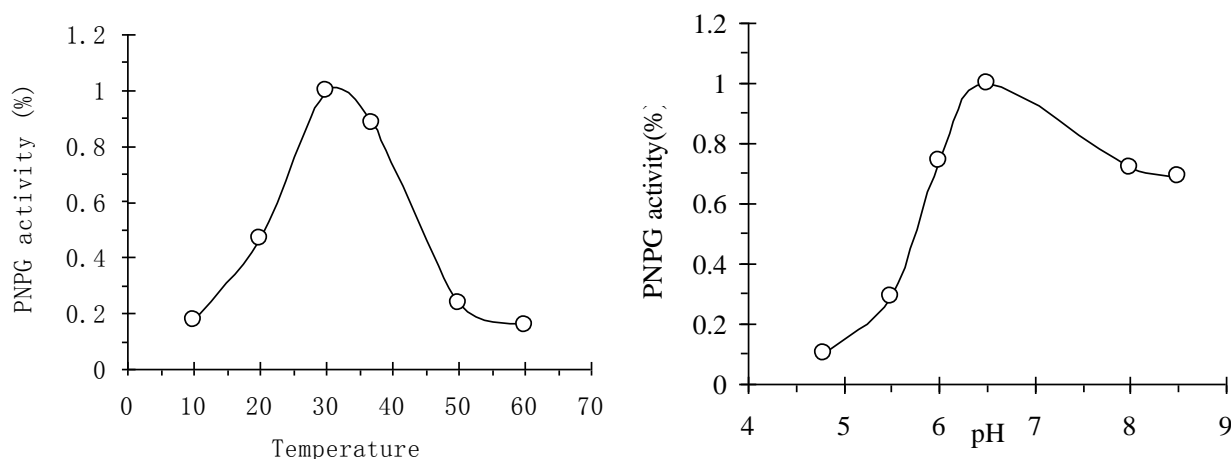


图3.4 葡萄糖苷酶反应最佳pH, 温度的测定

Fig.3.4 The optimum pH and temperature for beta-glucanase catalyze

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基, 接种BL-21(pET-28a-bgl2172), 培养至 $\text{OD}_{600}=0.4$, 加入3 mM IPTG诱导表达2 h, 离心收集细胞, 用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗三次, 用1 mL缓冲溶液重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL Eppendorf 管中, 放在冰水浴中用超声波破碎。200 W功率, 破碎5 s, 停10 s, 破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 pm转速下离心30 min。将上清液体和沉淀分离开来, 弃沉淀取上清液, 在不同的温度和pH缓冲溶液条件下测定酶活力。

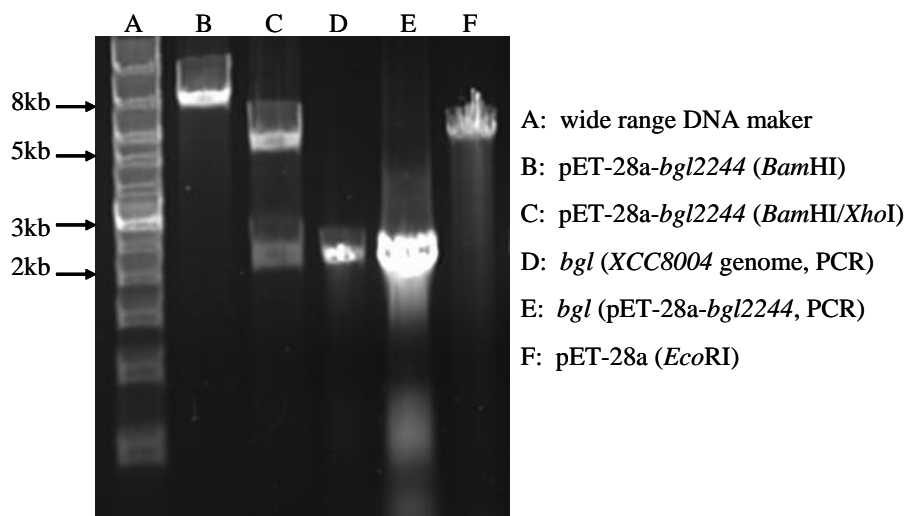
由图可知, 对PNPG底物最佳pH和温度分别pH 6.5, 温度30 $^{\circ}\text{C}$, 但对于纤维二糖底物, 无论在任何条件下该酶都不表现出活性。

(4) 酶蛋白含量的测定, PNP活力测定, 比活力的测定

酶的提取方法如上方法所述。蛋白浓度用Bradford 法测定, 测定方法如第三章中所述。30 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.5时, 测定最大酶活为: 8.834 U/mL, 蛋白浓度: 5.25 mg/mL, 比活1.68 U/mg。纤维二糖酶活力测定不到。

3.6.1.2 *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 8004 bgl2244基因在pET-28a的克隆表达

(1) pET-28a-bgl2244质粒的构建

图3.5 pET-28a-*bgl2244*质粒酶切图谱Fig.3.5 pET-28a-*bgl2244* plasmid construction

由图3.5可知，pET-28a-*bgl2244*质粒已经正确构建起来。

(2) BGL2244蛋白表达

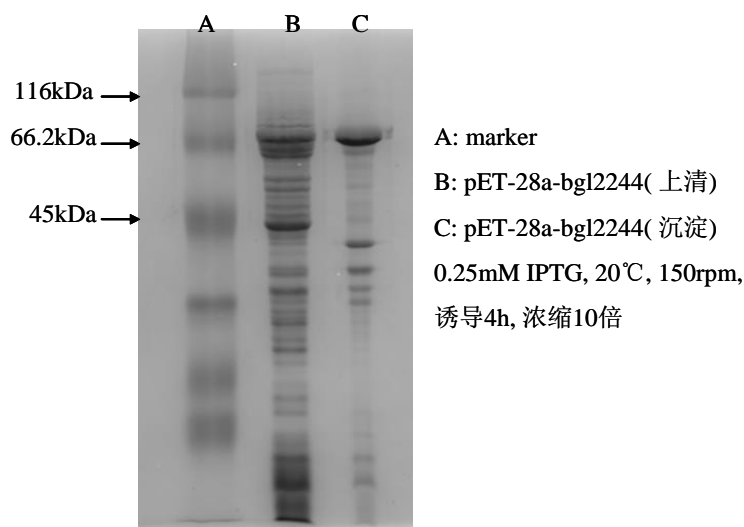


图3.6 BGL2244蛋白诱导表达

Fig.3.6 BGL2244 expression

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基，接种BL-21(pET-28a-*bgl2172*)，培养至 $OD_{600}=0.4$ ，加入0.25 mM的IPTG诱导表达4 h，离心收集细胞，用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗三次重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL eppendorg 管中，放在冰水浴中用超声波破碎。200 W功率，破碎5 s，停10 s，破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 rpm转速下离心30 min。将上清液体和沉淀分离开来，在沉淀蛋白中加入1 mL等体积缓冲溶液，悬浮起来。分别取40 μ L上清液和沉淀悬浮液加入10 μ L 5 \times Loading buffer，沸水浴煮

3 min。13000 rpm离心1 min，分别取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎上清液和沉淀液体蛋白电泳图。目的蛋白条带为82KDa。由图可见，BGL2244蛋白过量表达,且以大部分以可溶性蛋白的形式表达。

(3) BGL2244蛋白浓度的测定，酶活力的测定比活力的测定

BGL2244纤维二糖酶的提取方法如5.1.2.2 所述。蛋白浓度用Bradford 法测定，测定方法如第三章中所述。30 ℃，pH 6.5时,测定最大pNPG酶活为：3.7 U/mL，比活力：2.37 U/mg纤维二糖酶活力没有检测到。

3.6.1.3 *Xanthomonas campestris pv campestris 8004 bgl2286*基因在pET-28a克隆表达

(1) pET-28a-*bgl2286*质粒的构建

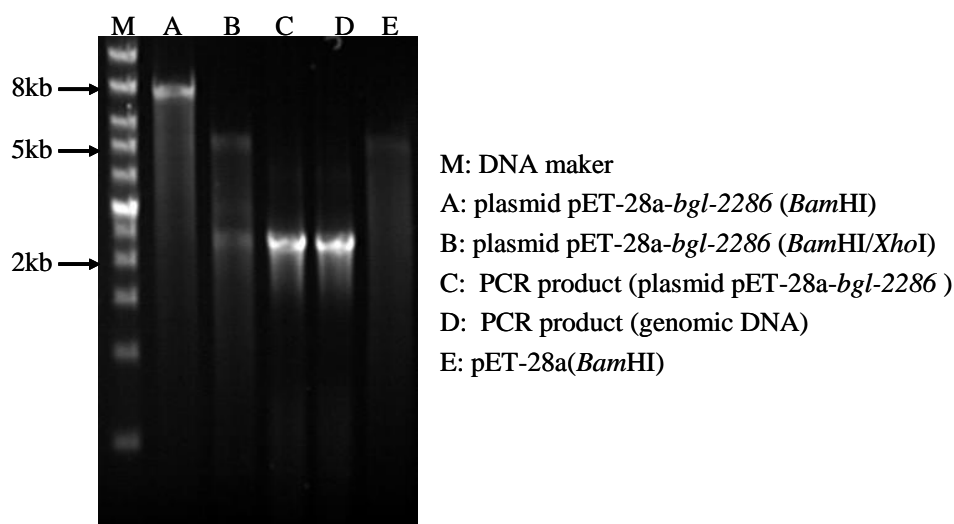


图3.7 pET-28a-*bgl2286*质粒酶切图谱
 Fig.3.7 pET-28a-*bgl2286* construction

由图3.7 可见， pET-28a-*bgl2286*质粒已经正确构建起来。

(2) pET-28a-*bgl2286*蛋白表达

(a) 37 ℃诱导表达BGL2286蛋白

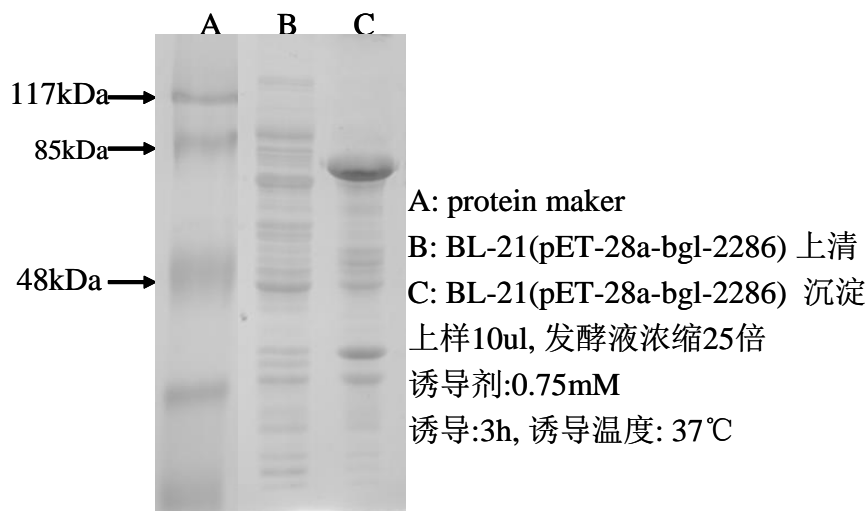


图3.8 37 °C, 0.75mg/mL IPTG诱导BGL2286蛋白表达

Fig.3.8 BGL2286expression with 0.75mg/mL IPTG

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基, 接种BL-21(pET-28a-bgl2172), 培养至 $OD_{600}=0.4$, 加入0.75mM 的IPTG在37 °C诱导表达3 h, 离心收集细胞, 用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗三次重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL eppendorg 管中, 放在冰水浴中用超声波破碎。200 W功率, 破碎5 s, 停10 s, 破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 rpm转速下离心30 min。将上清液体和沉淀分离开来, 在沉淀蛋白中加入1 mL等体积缓冲溶液, 悬浮起来。分别取40 μ L上清液和沉淀悬浮液加入10 μ L 5 \times Loading buffer, 沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min, 分别取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎上清液和沉淀液体蛋白电泳图。目的蛋白条带为84KDa。由图可见, 在37 °C, 0.75mM IPTG诱导的诱导表达条件下, BGL2286蛋白过量表达,但是形成包涵体, 没有可溶性蛋白产生。

(b) 30 °C诱导表达BGL2286蛋白

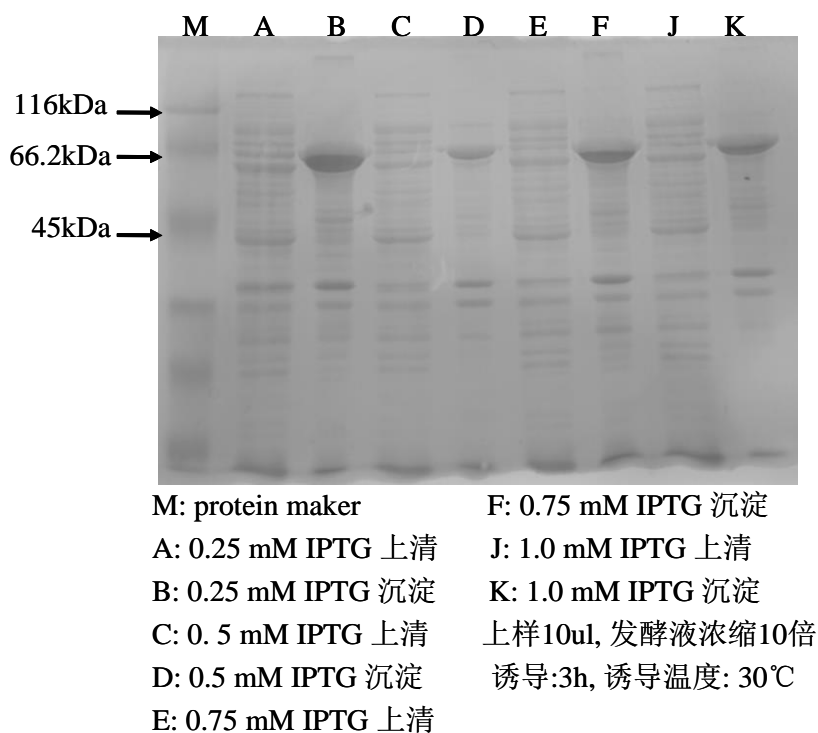


图3.9 30 °C, 不同浓度IPTG诱导BGL2286蛋白表达

Fig.3.9 BGL2286 expression with different concentration of IPTG at 30 °C

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基, 接种BL-21(pET-28a-bgl2172), 培养至 $OD_{600}=0.4$, 加入不同剂量的IPTG, 在30 °C诱导表达3 h, 离心收集细胞, 用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗三次重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL eppendorg 管中, 放在冰水浴

中用超声波破碎。200 W功率，破碎5 s，停10 s，破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 rpm转速下离心30 min。将上清液体和沉淀分离开来，在沉淀蛋白中加入1 mL等体积缓冲溶液，悬浮起来。分别取40 μ L上清液和沉淀悬浮液加入10 μ L 5 \times Loading buffer，沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min，分别取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎上清液和沉淀液体蛋白电泳图。由图可见，在30 $^{\circ}$ C，0.25-0.75 mM IPTG诱导的诱导表达条件下，BGL2286蛋白过量表达,但是形成包涵体，没有可溶性蛋白产生。

(c) 25 $^{\circ}$ C诱导表达BGL2286蛋白

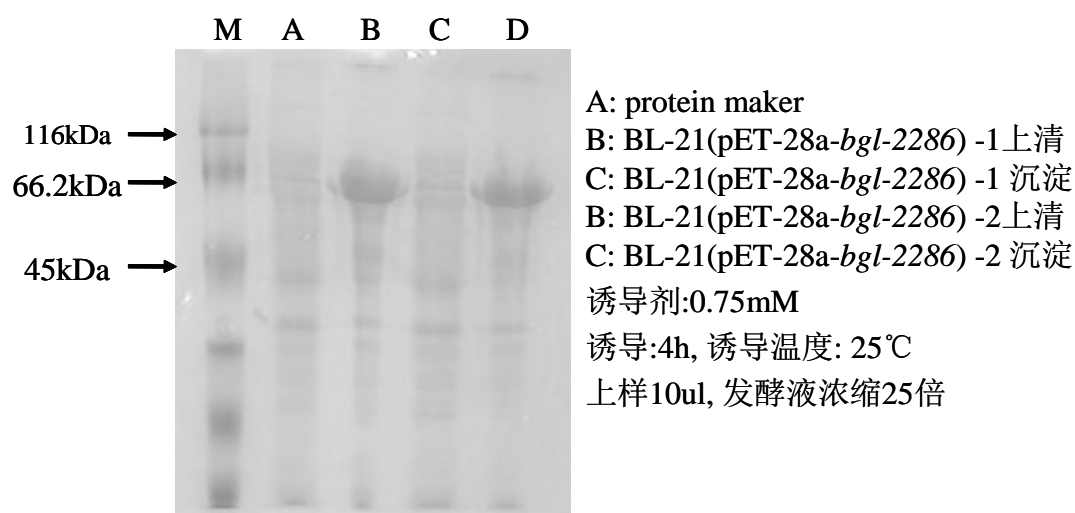


图3.10 25 $^{\circ}$ C，0.75mg/mL IPTG诱导BGL2286蛋白表达

Fig.3.10 Expression of BGL2286 with 0.75mg/mL IPTG at 25 $^{\circ}$ C

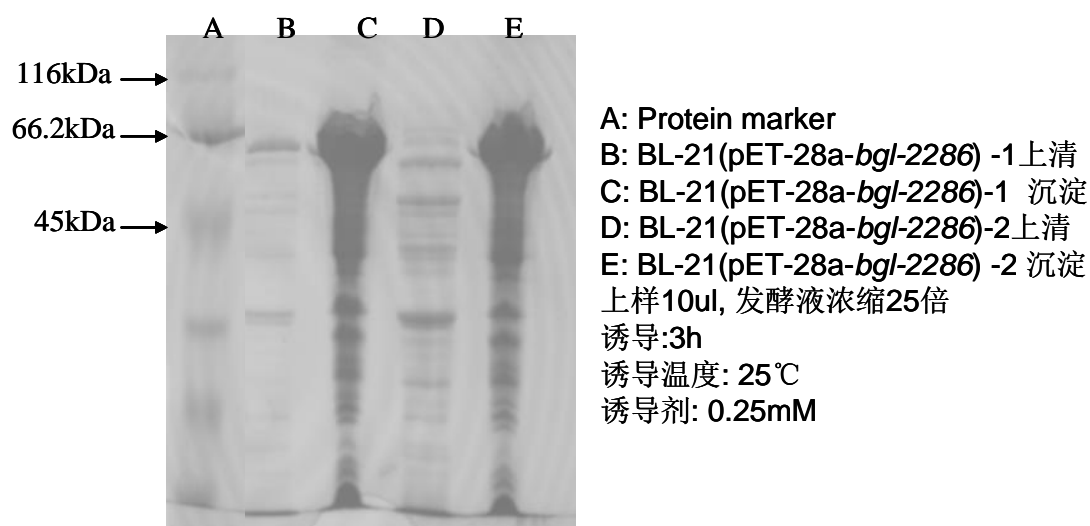


图3.11 25 $^{\circ}$ C，0.25mg/mL IPTG诱导BGL2286蛋白表达

Fig.3.11 Expression of BGL2286 with 0.25mg/mL IPTG at 25 $^{\circ}$ C

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基，接种BL-21(pET-28a-*bgl*2172)，培养至OD₆₀₀=0.4，加入0.25，0.75mM 的IPTG，在25 $^{\circ}$ C诱导表达4 h，离心收集细胞，用pH 7.0柠檬酸-柠檬

酸钠缓冲溶液清洗三次重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL eppendorg 管中, 放在冰水浴中用超声波破碎。200 W功率, 破碎5 s, 停10 s, 破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 rpm转速下离心30 min。将上清液体和沉淀分离开来, 在沉淀蛋白中加入1 mL等体积缓冲溶液, 悬浮起来。分别取40 μ L上清液和沉淀悬浮液加入10 μ L 5 \times Loading buffer, 沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min, 分别取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎上清液和沉淀液体蛋白电泳图。由图可见, 在25 $^{\circ}$ C, 0.25, 0.75 mM IPTG诱导的诱导表达条件下, BGL2286蛋白过量表达,但是形成包涵体, 没有可溶性蛋白产生。

(d) 15 $^{\circ}$ C诱导表达BGL2286蛋白

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基, 接种BL-21(pET-28a-bgl2172), 培养至OD₆₀₀=0.4, 加入不同剂量的IPTG, 在15 $^{\circ}$ C诱导表达5 h, 离心收集细胞, 用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗三次重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL eppendorg 管中, 放在冰水浴中用超声波破碎。200 W功率, 破碎5 s, 停10 s, 破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 rpm转速下离心30 min分。将上清液体和沉淀分离开来, 在沉淀蛋白中加入1 mL等体积缓冲溶液, 悬浮起来。分别取40 μ L上清液和沉淀悬浮液加入10 μ L 5 \times Loading buffer, 沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min, 分别取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎上清液和沉淀液体蛋白电泳图。由图可见, 在15 $^{\circ}$ C, 不同剂量IPTG诱导的诱导表达条件下, BGL2286蛋白过量表达,但是形成包涵体, 没有可溶性蛋白产生。

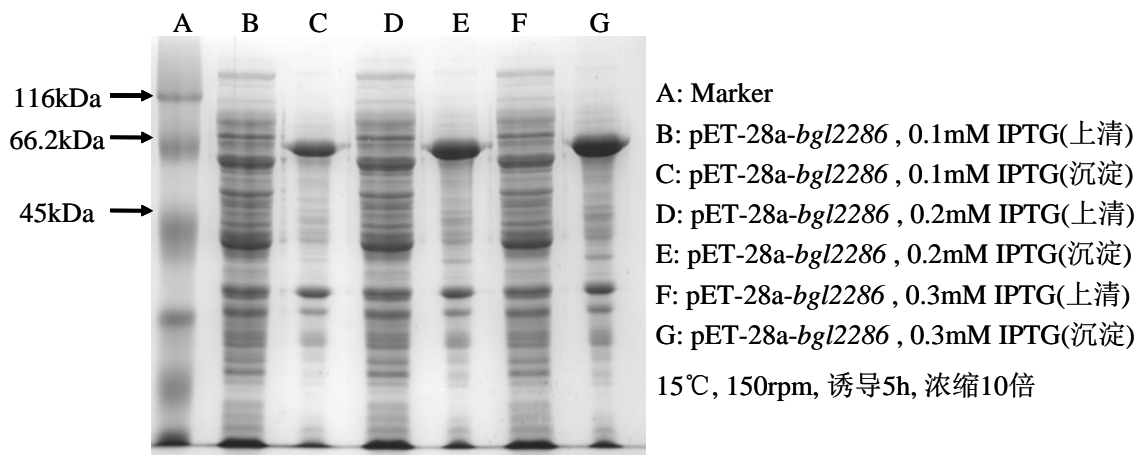
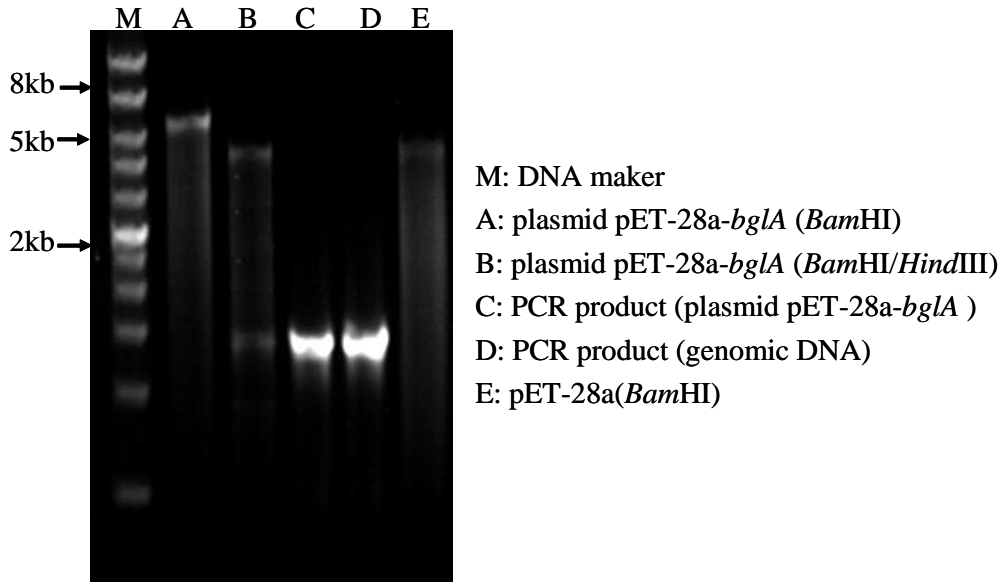


图3.12 15 $^{\circ}$ C, 不同浓度 IPTG诱导BGL2286蛋白表达

Fig.3.12 BGL2286expression with different concentration of IPTG at 15 $^{\circ}$ C

综上所述, 在下列一系列条件下: 37 $^{\circ}$ C, 0.75mM IPTG, 30 $^{\circ}$ C, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 mM IPTG; 25 $^{\circ}$ C, 0.25, 0.75mM IPTG, 15 $^{\circ}$ C, 0.1, 0.2, 0.3mM IPTG, BGL2286 均表达为包涵体蛋白, 没有可溶解性蛋白产生。分析原因为BGL2286在PET-28a 质粒中过量表达, 使之形成包涵体。

3.6.1.4 *Bacillus polymyxa* 1.794基因在pET-28a的克隆表达

(1) pET-28a-*bglA*质粒的构建图3.13 pET-28a-*bglA* 质粒酶切图谱Fig.3.13 pET-28a-*bglA* plasmid construction

由图5.13可知，pET-28a-*bglA*质粒已经正确构建起来。

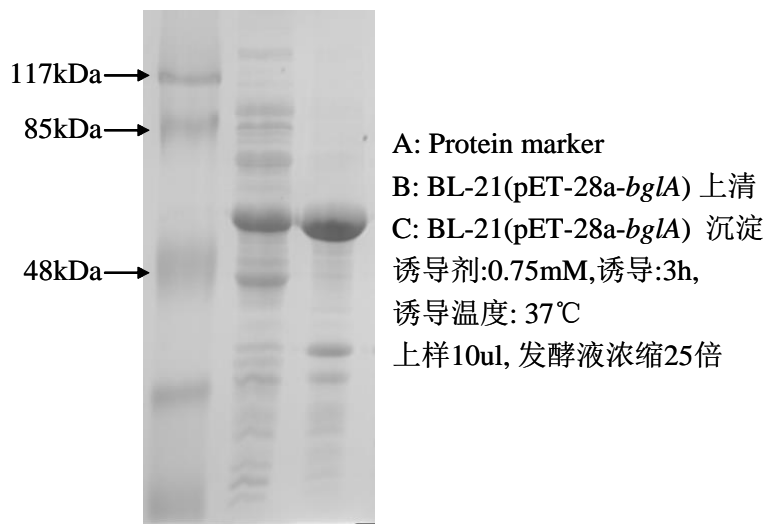
(2) pET-28a-*bglA*蛋白表达

图3.14 BGLA 蛋白的诱导表达

Fig.3.14 BGLA expression

100 mL摇瓶装20 mL LB培养基，接种BL-21(pET-28a-*bglA*)，培养至 $OD_{600}=0.4$ ，加入0.75mg/mL IPTG，在37 °C诱导表达3 h，离心收集细胞，用pH 7.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液清洗三次重新悬浮细胞。取1 mL菌液体在1.5 mL eppendorg 管中，放在冰水浴中

用超声波破碎。200 W功率，破碎5 s，停10 s，破碎20个循环。破碎后的细胞破碎液体在13000 rpm转速下离心30 min。将上清液体和沉淀分离开来，在沉淀蛋白中加入1 mL等体积缓冲溶液，悬浮起来。分别取40 μL 上清液和沉淀悬浮液加入10 μL 5 \times Loading buffer，沸水浴煮3 min。13000 rpm离心1 min，分别取上清做蛋白电泳。上图为细胞破碎上清液和沉淀液体蛋白电泳图。目的蛋白为51KDa。由图可见，在37 $^{\circ}\text{C}$ ，0.75 mM IPTG的诱导表达条件下，BGLA蛋白过量表达,主要以可溶性蛋白形式产生。

(3) pET-28a-*bg1A*纤维二糖酶最佳反应条件的测定

(a) pH对PNPG酶活力的影响

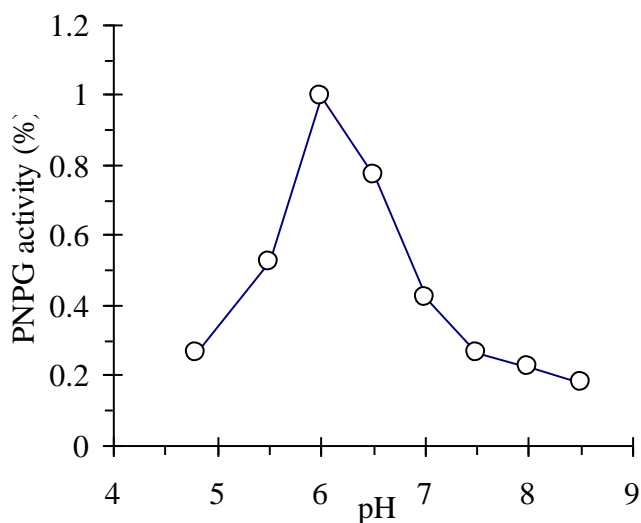


图3.15 pH对PNPG酶活力的影响

Fig.3.15 Effect of pH on PNPGase activity

(b). pH对纤维二糖酶活力的影响

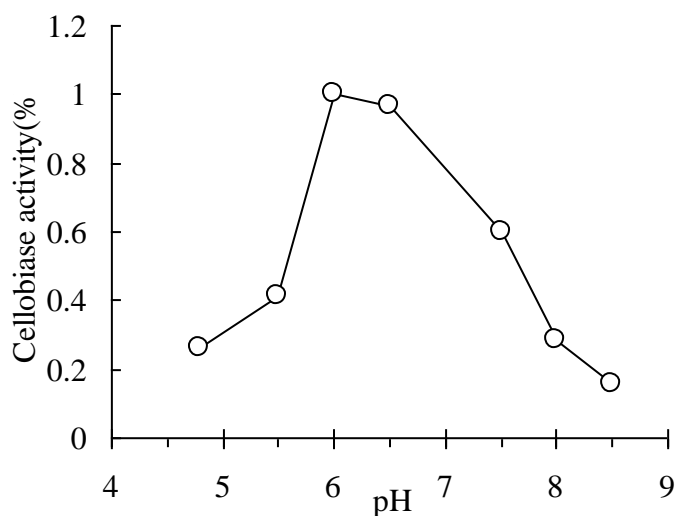


图3.16 pH对纤维二糖酶活力的影响

Fig.3.16 Effect of pH on cellobiase activity

按照实验方法部分中所述的方法提取BGLA 葡萄糖苷酶。分别在不同的pH条件下测定葡萄糖苷酶活力和纤维二糖酶的活力。酶活力的测定方法如第二章和第三章中所述的实验方法进行。由图可见,该酶对PNPG底物最佳酶活在pH 6.0,对纤维二糖底物最佳酶活也在pH 6.0处。

(4) pET-28a-*bglA*酶蛋白浓度,酶活力,比活力的测定

酶蛋白的制备方法如上所述。酶蛋白浓度的测定用Bradford 方法。在pH 6.0, 37 °C条件下,分别PNPG酶活和纤维二糖酶活。在该条件下,PNPG酶活力为5.39U/mL,比活力为5.35U/mg.;纤维二糖酶活力为:42.9U/mL,比活力为:41.76U/mg。

综上所述,*Xanthomonas campestris pv campestris* 8004菌*bgl2172*基因,*bgl2244*基因,*bgl2286*基因和*Bacillus polymyxa* 1.794 的*bglA*基因,分别克隆在pET-28a中转化BL-21,用IPTG诱导表达。在该四个表达的葡萄糖苷酶中*Xanthomonas campestris pv campestris* 8004菌*bgl2172*基因和*bgl2244*基因的基因产物都只有PNPG酶活性,没有纤维二糖酶活性。而*bgl2286*基因产物在BL-21(pET-28a-*bgl2286*)中大量表达,且形成包涵体。只有*Bacillus polymyxa* 1.794 的*bglA*基因能够过量表达出具有纤维二糖酶活性的可溶性蛋白。所以选择*Bacillus polymyxa* 1.794 的*bglA*基因作为继续构建能够代谢纤维二糖的基因工程菌*Zymomonas mobilis* ZM4 的纤维二糖酶基因来源。

3.6.2 *Bacillus polymyxa* 1.794 基因在 *Zymomonas mobilis* ZM4 中的克隆表达

Zymomonas mobilis ZM4 因其较快的生长速率和乙醇产率,而在木质纤维素发酵生产乙醇的过程中具有很大的应用前景。但是*Zymomonas mobilis* ZM4可以利用的碳源范围很小,它只能利用葡萄糖,蔗糖,不能利用纤维二糖,木糖等碳源。木质纤维素水解,糖化后产生大量的纤维二糖和木糖。若不被利用将造成极大的浪费。而且在同步糖化发酵过程中,纤维二糖的大量积累会抑制纤维素酶的活性。使得达到同样的效果所需要的纤维素酶量加大,从而降低了木质纤维素生产乙醇的成本。而通过基因工程的手段将*Bacillus polymyxa* 1.794 的*bglA*基因导入到*Zymomonas mobilis* ZM4中,可以使该菌表达分泌纤维二糖酶将能够很好的解决这个问题。

3.6.2.1 pUC19-Pgfo 质粒构建

Pgfo是来源于*Zymomonas mobilis* ZM4的葡萄糖果糖氧化还原酶的信号肽基因。有文献报道Pgfo能够引导外源蛋白表达到细胞周质空间中。本工作利用该信号肽将纤维二糖酶引导到*Zymomonas mobilis* ZM4细胞周质空间中。从图5.17可以看出,pUC19-Pgfo 质粒已经正确构建起来。

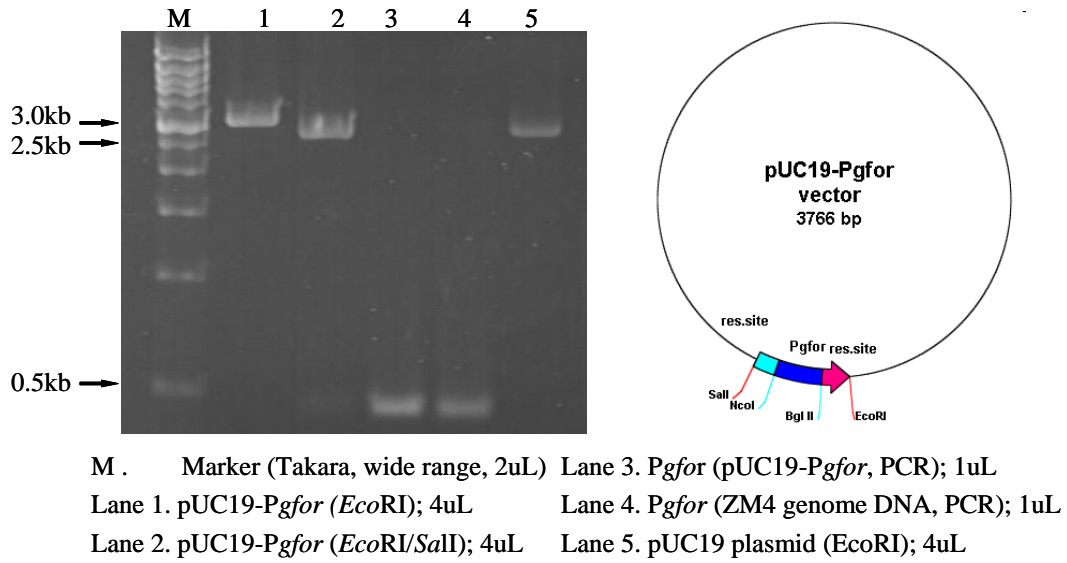


图3.17 pUC19-Pgfo质粒的构建

Fig.3.17 pUC19-Pgfo plasmid construction

3.6.2.2 pUC19-Pgfo-bglA 质粒构建

在克隆载体pUC19中将*Pgfo*和*bglA*基因连接起来，构建成pUC19-*Pgfo-bglA* 质粒。由图3.18 可见该质粒已经成功构建起来了。

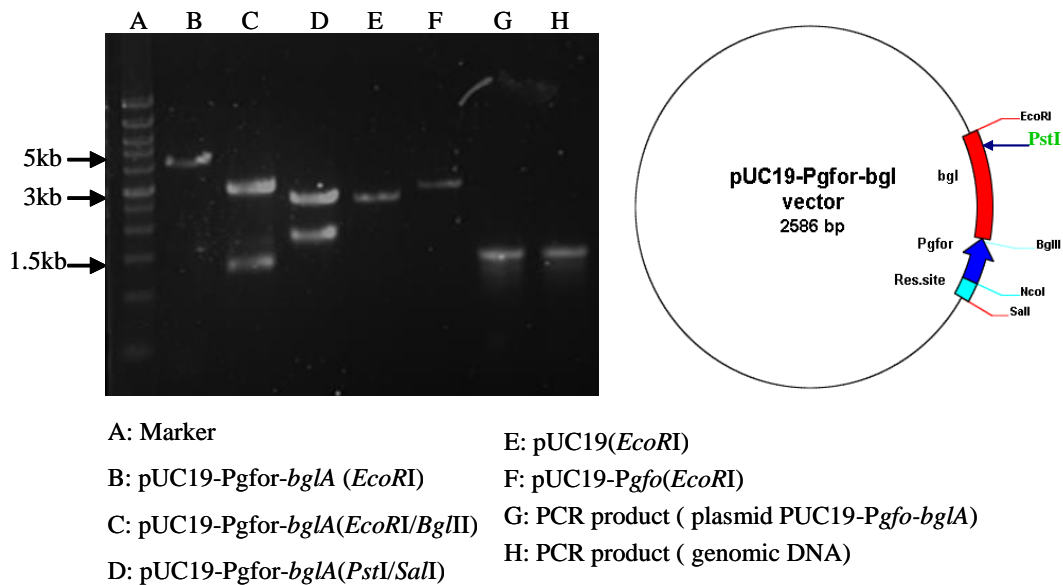


图3.18 pUC19-Pgfo-bglA 质粒酶切图谱

Fig.3.18 pUC19-Pgfo-bglA construction

3.6.2.3 pLOI193-Pgfo-bglA质粒构建

通过构建好的克隆载体pLOI193-*Pgfo-bglA*质粒，将*Pgfor-bglA*片段用*SalI*, *PstI* 双酶切下来，插入到pLOI193 质粒中。该质粒的构建过程为图3.19所示。

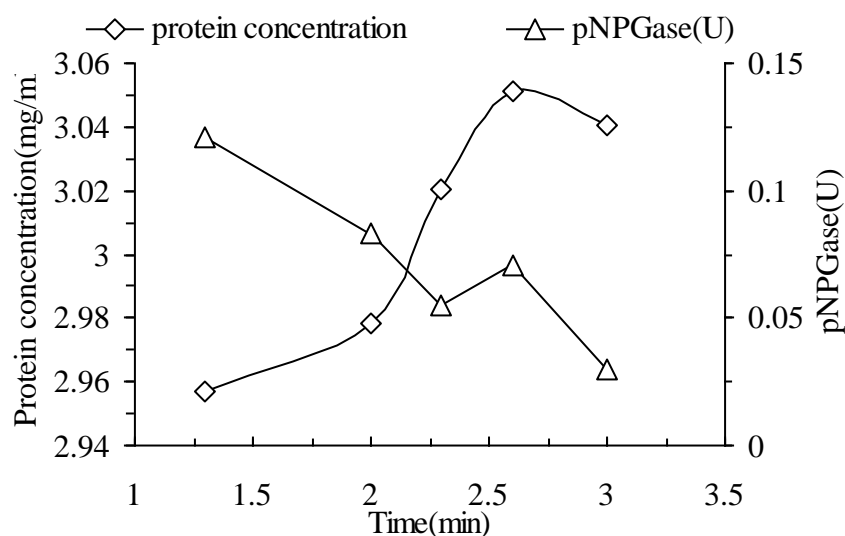


图3.21 破碎强度对纤维二糖酶活力的影响

Fig.3.21 Effect of intensity of ultrasonic on cellobiase activity

该实验在250W功率，破碎5 s，间隔15 s的条件下进行。循环数分别为20，24，28，32，36。培养300mL *Zymomonas mobilis* ZM4 (pLOI193-Pgfo-bglA)至 $OD_{600}=1.8$ ，收集细胞，用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗三次后，用5 mL缓冲溶液重新悬浮起来，分装到五个1.5mL离心管中，每管1mL菌液。然后按照上述方法破碎。破碎后酶的提取方法如上所述。由图3.21可见，随着破碎时间的增加，蛋白含量增加，但酶活力却不断下降。由此推测高的破碎强度与导致该纤维二糖酶活力的丧失。本工作后续的实验采用该条件下20个循环做为细胞破碎的条件。

3.6.2.6 不同破碎时间酶活力测定

取9个装50 mL 培养基250mL 摇瓶，在同一时间用相同的种子*Zymomonas mobilis* ZM4(pLOI193-Pgfo-bglA)接种,每隔4 h取出一瓶按照上述方法提取纤维二糖酶并测定酶活力，比活力。由图5.22可见该基因工程菌在36h 完全将葡萄糖消耗完。纤维二糖酶的活力在28 h对数后期时达到最高，最高纤维二糖酶活力为15.28 U/mL。对数期过后，酶活力急剧下降。在图3.23中纤维二糖酶比活力和PNPG酶比活力遵循相同的规律。分析酶活力在对数后期下降的原因为对数后期细胞内积累了大量的代谢副产物如甲醛抑制了酶活性，另外一些细胞裂解释放的蛋白酶对纤维二糖酶也具有降解作用。

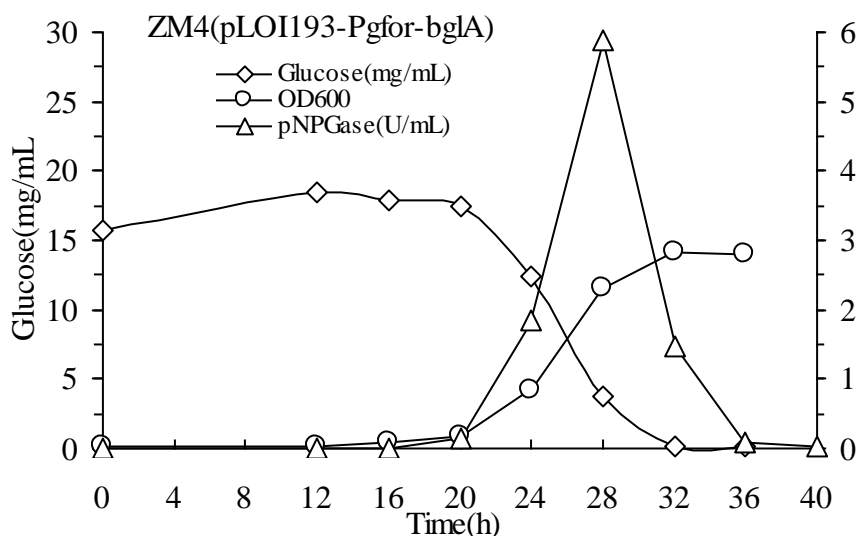


图3.22 不同时间酶活力的变化趋势

Fig.3.22 Time course of cellobiase activity during *Zymomonas mobilis* ZM4(pLOI193-Pgfo-bglA) fermentation

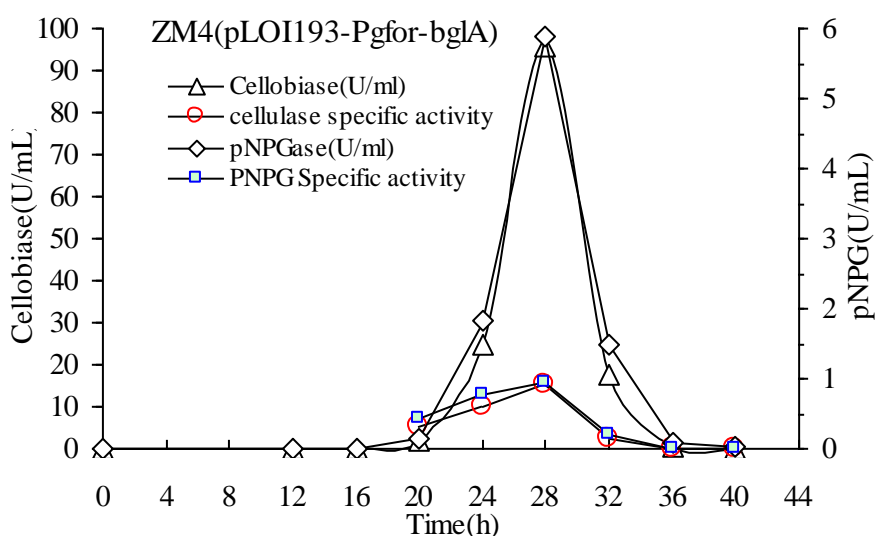


图3.23 不同时间酶比活力的变化趋势

Fig.3.23 Time course of cellobiase specific activity during *Zymomonas mobilis* ZM4(pLOI193-Pgfo-bglA) fermentation

3.7 小结

- (1) *E.coli* BL21(pET-28a-bglA)能大量表达可溶性纤维二糖酶蛋白 BGLA。
- (2) 该纤维二糖酶对 PNPG 底物和纤维二糖底物均具有催化活性，纤维二糖酶活性更高。
- (3) 成功构建基因工程菌 ZM4(pLOI194-Pgfo-bglA)，该菌在 RM 培养基中培养 28h 到达对数末期,酶活力达到最高。

第四章 结论

由于木质纤维素预处理过程产生大量的副产物，抑制糖化过程中纤维素酶的活性，提高了木质纤维素乙醇的生产成本，因此对纤维素酶表征和克隆表达的研究非常重要，通过实验研究得出如下结论：

(1) 木质纤维素酸预处理产生的副产物主要是有机酸(甲酸，乙酸，乙酰丙酸)，呋喃类(糠醛，5-羟甲基糠醛)，酚类衍生物(香兰素，4-羟基苯甲醛)；有机酸(甲酸，乙酸，乙酰丙酸)对纤维素酶水解具有一定的抑制作用。有机酸的 K_M/K_I 值在 1.07 到 1.77 的范围之间。乙酰丙酸具有最大的 K_M/K_I 值是有机酸类最大的潜在抑制剂；糠醛，5-羟甲基糠醛的 K_M/K_I 值分别为 6.8 和 11.9。呋喃类抑制物比有机酸类抑制物的潜在抑制作用要大。其中 5-羟甲基糠醛的抑制作用比糠醛的抑制作用大；香兰素，4-羟基苯甲醛的 K_M/K_I 值分别为 20.6 和 15.7。表明木质素降解产物是潜在的最大的抑制物，其中香兰素对滤纸纤维素酶水解的抑制作用比 4-羟基苯甲醛大。这些结论对定量理解木质纤维素预处理降解产物对纤维酶的抑制具有重要的意义。

(2) *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 8004 菌 *bgl2172* 基因，*bgl2244* 基因，*bgl2286* 基因和 *Bacillus polymyxa* 1.794 的 *bglA* 基因，分别克隆在 pET-28a 中转化 BL-21，用 IPTG 诱导表达，在该四个表达的葡萄糖苷酶中 *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 8004 菌 *bgl2172* 基因和 *bgl2244* 基因的基因产物都只有 PNPg 酶活性，没有纤维二糖酶活性；*bgl2286* 基因产物在 BL-21(pET-28a-*bgl2286*) 中大量表达，且形成包涵体；只有 *Bacillus polymyxa* 1.794 的 *bglA* 基因能够过量表达出具有纤维二糖酶活性的可溶性蛋白。本研究成功构建了 pLOI193-Pgfo-*bglA* 质粒，并转化到 *Z. mobilis* ZM4 中。该菌在 20 g/L 葡萄糖的 RM 培养基中培养时 28 h 达到最大酶活，最高纤维二糖酶活力为 15.28 U/mL。这为今后纤维素酶基因在 *Z. mobilis* ZM4 中的“表面展示型”表达和其它纤维素酶基因的表达积累了一些经验和基础。

参考文献

- [1] 曹稳根, 段红. 我国生物质能资源及其利用技术现状[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(14): 6001-6003
- [2] 黄英明, 高振, 黄和. 生物炼制实现可持续发展的新型工业模式[J]. 生物加工过程, 2006, 4(3): 1-8
- [3] 张百良, 宋华民, 李世欣. 生物能源发展及科技创新机遇[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 285-289
- [4] 赵军, 王述洋. 我国生物质能资源与利用[J]. 太阳能学报, 2008, 29(1): 90-94
- [5] 程景明, 徐莉, 徐伟平. 美国、巴西和中国燃料乙醇发展现状比较[J]. 世界农业, 2008(6): 10-13
- [6] 李艳君. 世界燃料乙醇新发展及其对中国的启示[J]. 国际经济合作, 2008(2): 28-34
- [7] 宋安东, 裴广庆, 王风芹等. 中国燃料乙醇生产用原料的多元化探索[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 302-307
- [8] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69(6): 27-642
- [9] 邹仪明. 植物纤维素化学(第二版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995, 152-154
- [10] 郭德宪, 曹健, 鲍宇茹. 利用生物技术降解纤维素的研究进展[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 82-86
- [11] 倪维斗, 李政, 靳晖. 对用生物质原料生产燃料用乙醇之我见[J]. 中国工程科学, 2001, 3(5): 44-49
- [12] Bonner J, Varner J E. Plant Biochemistry, Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion[J]. Academic Press, 1976, 714-770
- [13] 王晨霞, 方慧英, 诸葛健. 两步酸水解玉米芯条件及酒精发酵的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 36-39
- [14] Chosdu R, Himly N, Erizal Erlinda TB, et al. Radiation and chemical pretreatment of cellulosic waste[J]. Radiat Phys Chem, 1993, 4: 695-698
- [15] Lyer P V, Wu Z W, Kim S B. Ammonia recycled perolation process for pretreatment of herbaceous biomass[J]. Appl Bioch Biotechnol Prog, 1998, 14: 890-896
- [16] T. P. Schultz, M. C. Templetion, C. J. Bierman, G. D. Steam Explosion of mixed hard-wood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse[J]. Journal of Agricultural and Food Chmestry, 1984, 32: 116-1172
- [17] Moniruzzaman, M. Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice

- straw[J]. *Bioresource Technology*, 1996, 55: 111-117
- [18] Eniko V. Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 104: 37-50
- [19] Walsum G. P. Shi H. Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 93: 217-226
- [20] 杨雪霞, 陈洪章, 李佐虎. 玉米秸秆氨化汽爆处理及其固态发酵[J]. *过程工程学报*, 2001, 1(1): 86-89
- [21] Mosier N, Wyman C. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96: 673-686
- [22] Laser M, Schulman D. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 81: 33-44
- [23] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 4: 25-33
- [24] 张继泉, 孙玉英, 关凤梅等. 玉米秸秆稀酸预处理条件的初步研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2002, 10(2): 33-36
- [25] 路鹏, 江滔, 李国学. 木质纤维素乙醇发酵研究中的关键点及解决方案[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(9): 237-240
- [26] Martin C., Galbe M, Wahlbom C F, et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(3): 274-282
- [27] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24: 151-159
- [28] Martin C, Fernandez T, Garela R, et al. Preparation of hydrolysates from tobacco stalks and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 18: 857-862
- [29] Delgenes J P, Moletta R, Navarro J M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *P. stipitis* and *C. shehatae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19: 220-225
- [30] Dunlop, A.P. Furfural formation and behaviour[J]. *Ind. Eng. Chem.*, 1948, 40(2): 204-209
- [24] Dunlop, A.P. Furfural formation and behaviour[J]. *Ind. Eng. Chem.*, 1948, 40(2): 204-209
- [31] Bardet, M., Robert, D.R., Lundqvist, K. On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood[J]. *Sven. Papperstidn.* 1985, 6: 61-67
- [32] Lapierre, C., Rolando, C., Monties, B. Characterization of poplar lignins acidolysis

- products: capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds[J]. *Holzforschung*, 1983, 37: 189-198
- [33] Tomme P, Warrenraj, Gilkes NR, Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi[J]. *Adv Microbiol Physiol*, 1995, 37: 1-81
- [34] 赵云. β -葡萄糖糖苷酶的分子生物学研究北京师范大学硕士学位论文, 2004
- [35] Tilleurgh H.V., Tomme P, Claeysens M, Bhikhabhai R and Pettersson G, Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: Separation of functional domains[J], *FEBS Lett.*, 1986, 204: 223-227
- [36] Thomas M. Wood and Vicenta Garcia-Campayo. *Biochemistry and Genetics*[J], *Cellulose Degradation*, 1988, 153-170
- [37] Jonathan Woodward, Katheen A Affholter, Kandy K. Noles, Nancie T. Tory and Sherebanu F. Gaslightwala. Does cellobiohydrolase II core protein from *Trichoderma reesei* disperse cellulose microfibrils[J]. *Enzyme Microb. Technol*, 1992, 14(8): 625-630
- [38] William Bains, MULTAN: a program to align multiple DNA sequences[J]. *Nucleic Acid Res.*, 1986, 14(9): 159-9176
- [39] Bisaria VS, Mishra. Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion[J]. *CRC Crit Rev. Biotechn.* 1989, 9: 61-103
- [40] Rosi I., Vimela M, Domezio M. Characterization of β -glucosidase activity in yeast of enological origin[J]. *Appl. Bact.* 1994, 77: 519-52
- [41] 邵金辉等. β -糖苷酶在工农医领域的应用[J]. *生命的化学*, 2005, 25(1): 22-23
- [42] 王振宇, 鱼红闪, 金凤燮. 高温厌氧菌产纤维素内切酶和 β -葡萄糖糖苷酶的活性[J]. *大连轻工业学院学报*, 2005, 24(2): 110-11
- [43] Gus mayer S. Avenacosidase from oat: Purification, sequence analysis biochemical characterization of a new member of the 13(A) family of beta-glucosidases[J]. *Plant Mot Boil*, 1994, 26(3): 909-921
- [44] Kim SY, Kim YW, Hegerl R, et al. Novel type of enzyme multimerization enhances substrate affinity of oat beta-gucosidase[J]. *Struct Biol*, 2005, 150(1): 1-10
- [45] Cicek M. Structure and expression of a dhurrinase(beta-glucosidase) from sorghum[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(4): 1469-147
- [46] Crombie HJ. A xyloglucan oligosaccharide active, transglycosylating beta-D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium seedlings-purification, properties characterization of a cDNA clone[J]. *Plant*, 1998, 15(1): 27-38
- [47] Geerlings A. Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosyntheses in *Catkarantkus rosgIIS*[J]. *J Biochem*, 2000, 275(5): 3051-2056
- [48] Ketuat Cairns JR. Sequence and expression of Thai Rosewood beta-glucosidase

- /beta-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein[J]. J Biochem, 2000, 128(6): 999-1008
- [49] 曾黎辉. Pichiapa storis 表达葡萄糖苷酶基因研究[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(3): 331-335
- [50] 李远华, 江昌俊, 余有本. 茶树 β -葡萄糖苷酶基因mRNA的表达[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 103-106
- [51] 张彬彬, 李杰, 柏锡等. 里氏木霉 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及序列分析[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 199-204
- [52] 邵金辉, 赵云, 韩金祥等. 一种 β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌和巴斯德毕赤酵母中的克隆与鉴定[J]. 南通大学学报(医学版), 2005, 25(1): 37-39
- [53] 邹文等. 黄单胞菌XAS-5 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达[J]. 微生物学报, 1994, 34(4): 271-278
- [54] 刘小琳, 贺鹏, 卢大军等. 絮凝选择载体的构建及 β -葡萄糖苷酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 167-170
- [55] Harada K. M., Tanaka K. Degradation of rice bran hemicellulose by Paenibacillus sp. Strain HC1: gene cloning, characterization and function of β -D-glucosidase as an enzyme involved in degradation[J]. Arch Microbiol, 2005, 184(4): 215-224
- [56] Hideshi Yanase, Koki Nozaki & Kenji Okamoto. Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered Zymomonas mobilis[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27: 259-263
- [57] Bill, A., & John, B.(1996). NREL Laboratory Analytical Procedure. NREL/LAP-006
- [58] Chen M., Xia L. M., & Xue, P. J. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59: 85-89
- [59] Goodman, A. E., P. L. Rogers, and M. L. Skotnicki. Minimal medium for isolation of auxotrophic Zymomonas mutants[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1982, 44: 496-498
- [60] Skotnicki, M. L., K. J. Lee, D. E. Tribe, and P. L. Rogers. Comparison of Ethanol Production by Different Zymomonas Strains[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1981, 41: 889-893.
- [61] Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria[J]. Bio/Technology, 1983, 1: 784-791
- [62] Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors[J]. Gene 1985, 33: 103-119
- [63] Conway, T., M. O. K. Byun, and L. O. Ingram. Expression Vector for Zymomonas mobilis[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1987, 53: 235-241
- [64] Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 224(5259): 680-685

发表文献

Xinyun Jing, Xiaoxi Zhang, Jie Bao. 2009. Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Online. DOI 10.1007/s12010-009-8525-z.

致 谢

本文是在导师鲍杰教授的精心指导和关怀下完成的。导师敏锐的思维、严谨的治学态度、丰富的科学知识、无私的敬业精神以及诲人不倦的崇高品德使我感到由衷的钦佩，令我终生难忘，受益匪浅。谨此向他致以最衷心的感谢！

辛秀娟，胡凤仙老师在实验中给了我精心的指导，在此表示真心的感谢！

同时，实验过程中也得到博士生董宏伟，张建，楚德强，研究生陈曦，任佳，刘长俊，王修胜，李慧等同学的很大帮助，同样表示由衷的感谢！