

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620131151463

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

定向进化和同步释放重组纤维素酶的研究

Directed Evolution and Simultaneous Release Research of
Recombinant Cellulases

王楠

指导教师姓名: 吴意珣 副教授

专业名称: 生物化工

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

定向进化和同步释放重组纤维素酶的研究

王楠

指导教师

吴意珣

副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要	I
Abstract	III
第一章 文献综述	1
1.1 生物质能与纤维素酶	1
1.1.1 生物质能源是解决能源短缺问题的研究热点	1
1.1.2 纤维素酶的开发是生物质能应用的关键技术	4
1.2 纤维素酶的定向进化	5
1.2.1 随机突变	6
1.2.2 定点突变	8
1.3 纤维素酶的自组装	8
1.4 蛋白重组表达系统	9
1.4.1 用表达系统生产重组纤维素酶	9
1.4.2 大肠杆菌重组表达蛋白的获得方式	10
1.5 Lysis 蛋白	13
1.5.1 大肠杆菌素	13
1.5.2 Lysis 蛋白作用机理	14
1.6 本课题研究的内容和意义	15
第二章 材料与方	16
2.1 实验材料	16
2.1.1 化学药品及仪器	16
2.1.2 菌种来源、质粒和引物	16
2.1.3 培养基	16
2.1.4 溶液配制	18
2.2 基因工程的基本操作	21
2.2.1 细菌基因组的提取	21
2.2.2 质粒的提取	22
2.2.3 DNA 的纯化	23
2.2.4 琼脂糖凝胶电泳	24

2.2.5 化学转化感受态的制备	25
2.2.6 化学转化	26
2.3 重组质粒的构建	26
2.4 重组菌株的表达与表征分析	29
2.4.1 重组菌株的表达	29
2.4.2 蛋白浓度测定	30
2.4.3 一维蛋白电泳	31
2.4.4 纤维素酶酶活的测定	32
2.5 重组纤维素酶的定向进化	34
2.5.1 纤维素酶的随机突变	34
2.5.2 纤维素酶的定点突变	36
2.6 重组纤维素酶的自组装	38
2.6.1 CBM 的获得	39
2.6.2 CD1 和 CBM1/2 的自组装	40
2.6.3 自组装重组菌株的表达表征	40
2.7 重组纤维素酶的同时释放	41
第三章 结果与讨论	44
3.1 重组纤维素酶的定向进化	44
3.1.1 随机突变	44
3.1.2 定点突变	49
3.2 重组纤维素酶的自组装	51
3.2.1 CBM 的获取	51
3.2.2 CD1 和 CBM1/2 的自组装	53
3.3 重组纤维素酶的同时释放	60
3.3.1 重组纤维素酶的选择	60
3.3.2 重组菌株的构建	61
3.3.3 重组纤维素酶在 pET28a 中的表达	66
3.3.4 裂解回路对纤维素酶释放的影响	69
3.3.5 CBM 对重组纤维素酶的影响	74
第四章 总结与展望	75

4.1 总结	75
4.2 展望	76
参考文献	77
致 谢	86
附 录	88
附录一 主要试剂	88
附录二 主要仪器	90
附录三 本研究所使用的引物	91
附录四 本研究所使用到的部分基因序列	93

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Chinese Abstract	I
Abstract	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Biomass and Cellulase	1
1.1.1 Biomass	1
1.1.2 Cellulase	4
1.2 Directed Evolution	5
1.2.1 Random mutation.....	6
1.2.2 Site-specific mutation	8
1.3 Self-assembly of Cellulase	8
1.4 Protein Expression System	9
1.4.1 Producted cellulase by expression system	9
1.4.2 Some methods to obtain recombinant protein from <i>E. coli</i>	10
1.5 Lysis	13
1.5.1 Colicin.....	13
1.5.2 Function mechanism of Lysis	14
1.6 Contents and Purpose of The Thesis	15
Chapter 2 Materials and Methods	16
2.1 Materials	16
2.1.1 Chemicals and instruments.....	16
2.1.2 Bacterial strains, plasmid and primers	16
2.1.3 Culture medium	16
2.1.4 Solution preparation.....	18
2.2 Basic Opiration of Genetic Engineering	21
2.2.1 Extraction of bacterial genomic DNA	21
2.2.2 Extraction of plasmid DNA.....	22
2.2.3 DNA purification	23
2.2.4 Agarose gel electrophoresis.....	24
2.2.5 Chemical competent cell preparation.....	25

2.2.6 Chemical transformation.....	26
2.3 Construction of Recombinant Plasmid	26
2.4 Recombinant Expression and Characterization.....	29
2.4.1 Heterogenous expression.....	29
2.4.2 Determination of Protein concentration	30
2.4.3 SDS-PAGE	31
2.4.4 Determination of enzyme activity	32
2.5 Directed Evolution of Recombinant Cellulase.....	34
2.5.1 Random mutation	34
2.5.2 Site-specific mutation	36
2.6 Self-assembly of Cellulase	38
2.6.1 Extraction of CBM.....	39
2.6.2 Self-assembly of CD1and CBM1/2	40
2.6.3 Expression and Characterization of self-assembly strains	40
2.7 Simultaneous Release of Cellulase	41
Chapter 3 Result and Discussion.....	44
3.1 Directed Evolution of Recombinant Cellulase.....	44
3.1.1 Random mutation.....	44
3.1.2 Site-specific mutation	49
3.2 Self-assembly of Cellulase	51
3.2.1 Extraction of CBM.....	51
3.2.2 Self-assembly of CD1and CBM1/2	53
3.3 Simultaneous Release of Cellulase	60
3.3.1 Selection of cellulases	60
3.3.2 Construction	61
3.3.3 Expression of pET28a-cellulases.....	66
3.3.4 Affect of Lysis module to Simultaneous release of cellulase	69
3.3.5 Affect of CBM to cellulase.....	74
Chapter 4 Conclusion and Prospect	75
4.1 Conclusion	75
4.2 Prospect.....	76

References	77
Acknowledgement	86
Appendix	88
Appendix I Chemicals	88
Appendix II Instruments	90
Appendix III Primers used in this study	91
Appendix IV Gene sequences used in this study	93

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

能源短缺和环境污染是我国乃至全球可持续发展面临的两大挑战。随着人口的增加和现代化工业进程的持续发展，有限的不可再生的煤炭等化石能源已无力支撑世界对于能源的巨大需求。开发新的、清洁环保的、可持续的替代能源，成为解决这两大挑战的主要方案。利用大自然中广泛的生物质为前体，经过一定的转化和利用，将储存在其中的太阳能变成燃料等可以直接利用的能源，同时在此过程中可以得到一定的化学品，这种生物炼制的理念被科学界广泛接纳并加以实践。木质纤维素作为地球上蕴藏最丰富的生物质资源，一直是生物质能研究的重点，通过纤维素酶，将木质纤维素降解成糖，然后经过发酵等生物转化生成最终的生物质燃料是一条行之有效的利用途径。

纤维素酶的生产，最常采用基因工程的方式进行并能够达到重组蛋白的外源表达和获取大量低价的产品的目的。其中大肠杆菌以其遗传背景清楚、培养条件简单、生长快、成本低、易大规模培养等优势被广泛应用于纤维素酶的生长中。然而，利用大肠杆菌生产纤维素酶具有两个不足之处：其一是大肠杆菌重组表达的纤维素酶酶活相对较低；其二是大肠杆菌分泌大分子的能力有限，产生的纤维素酶大多为胞内蛋白，需要用物理等方法破碎细胞，收集纤维素酶，增加了生产成本并在此过程中破坏了纤维素酶的活性。为改善以上两点不足，本文做了一些研究和探索，结果如下：

一、本研究采用大肠杆菌表达系统重组表达枯草芽孢杆菌 DB168 的纤维素酶基因 *cel5*，得到的重组菌株的比酶活为 1.471 U/mL。为提高其活性，本文利用易错 PCR 技术对其进行随机突变，通过 CMC 平板筛选，得到了三株酶活更高的菌株，对这三株菌以及另外两株酶活不变或降低的菌株进行测序分析，得出 Cel5 上 12 号 (G12D)，23 号 (N23T)，214 号 (K214Q)，140 号 (N140D)，170 号 (N170D) 氨基酸突变点存在纤维素酶酶活的关键位点。

二、因张以恒教授发现 Cel5 上 446 号、454 号氨基酸 K 到 E 的突变对于其酶活具有促进作用，所以本文采用了两种定点突变的方法进行测试，但都没有得到满意的突变结果，只有三段拼接两点突变实验中得到的 10 号菌株完成了 446 号氨

基因的突变，但是基因长度比原来多了 13 个氨基酸。

三、因催化域(catalytic domain, CD)和纤维素结合域(cellulose binding module, CBM)是影响纤维素酶酶活的两大关键，本文将 *cel5* 的核心催化域 CD1 和里氏木霉纤维素酶基因 *EG5*、*CBH1* 的纤维素结合域 CBM1、CBM2 进行了拼接，在 pET28a 中的构建得到的重组菌的重组蛋白不够明显，换用 pET32a 后大大改善，重组菌株酶活最高的达到 1.692 U/mL，比原来酶活有所提高但不明显。

四、为了解决需要破碎细胞提取纤维素酶的问题，本研究采用 E7 大肠杆菌素操纵子内的 *lysis* 基因，成功构建在 pET28a 和 pET32a 中五种纤维素酶 *cel5*，*CD1*，*E1*，*CD3*，*KPEG* 和 *Lysis* 裂解模块的共表达回路的十株重组菌。对在阿拉伯糖诱导下的重组菌的生长曲线的测定、一维蛋白电泳的分析和酶活的测定显示，pET28a-Bac-*cel5-lysis*，pET28a-Bac-*CD1-lysis*，pET28a-*KPEG-nosp-lysis* 中的 *Lysis* 模块能够很好的作用，达成细胞裂解与同步释放重组纤维素酶的目的。分析比较十株菌的差异，发现重组表达的纤维素酶蛋白的等电点特性对于 *Lysis* 的裂解释放效果具有决定性的作用，等电点大于 6.65，才能使得 *Lysis* 模块正常作用，在此基础上，等电点越大，裂解释放的效果越差。

关键词：生物质能；纤维素酶；定向进化；自组装；同步释放；大肠杆菌

Abstract

Energy shortage and environmental pollution are two of main challenges to human being in sustainable development in China and the whole world. With the increase of population and the sustainable development of modern industrial process, a limited non-renewable fossil fuels such as coal has been unable to support the huge demand for energy in the world. To developing the new, clean, environmental protection and sustainable alternative energy become the main solutions to the two challenges. Using the biomass which is widely existed in the nature as precursor, through certain transformation and utilization, could transform solar energy into fuel and harvest chemicals. Those biorefinery theory has been widely accepted and studied. Lignocelluloses are the most abundant resources in the earth. To convert this kind of cellulose to sugar by cellulases and then fermentated to fuel is the crucial technology for bioenergy and biorefinery.

Escherichia coli (*E. coli*) has been widely used as the expressing system of recombinant proteins in genetic engineering with its following advantages: a well-studied genetic background, simple cultivation conditions, fast growth, low cost and easy for scaling-up. Using this expressing system to express exogenous cellulases become an important means for large-scale industrial production. However, there are two shortages: one is the low activity of cellulase produced by *E. coli* and the other is the limited ability of secreting macromolecules of *E. coli*, which need to break the cell and collect the enzyme. Those process will increase the cost and reduce the enzyme activity. In order to solve the problems, our studies have focusing on increased the original activity and spontaneously released the enzyme. The major results are shown as follows:

(1). This study used *E. coli* to express cellulase gene *cel5* from *Bacillus subtilis* DB168, the specific activity of recombinant cellulase was 1.471 U/mL. The random mutation method, Error-prone PCR has been used to improve the CMCase, All the

mutant strains were screened by CMC plate and three strains with higher activity were selected. From the sequencing of three positive strains and other two strains, the results showed the direct mutagenesis points on G12D, B23T, K214Q, N140D, N170D amino acids exist the key sites on Cel5 activity.

(2). Professor Y.H.P. Zhang has reported the mutation of K446E and K454E could improve the enzyme activity of Cel5 from *B. subtilis*. We have done some efforts to achieve the mutation on Cel5, but no satisfactory results obtained. Only one strain showed the K446E amino acid mutated, but it had an extra 13 amino acids sequence inserted.

(3). Because catalytic domain (CD) and cellulose binding modular (CBM) are two critical points affecting cellulase activity, we devoted to self-assembly of the CD1 from *cel5* and most effective CBM1, CBM2 from gene *EG5*, *CBH1* of *Trichoderma reesei*. The cellulase in plasmid pET28a did not show obvious expression through SDS-PAGE analysis. When changed to construct the genes in plasmid pET32a, the CMCcase reached 1.692 U/mL, which is higher than that of the original gene.

(4). In order to solve the problem to harvest cellulases through cumbersome process, fusion of *lysis* gene, i.e., E7 colicin to five cellulases (*cel5*, *CD1*, *E1*, *CD3*, *KPEG*) have constructed in pET28a and pET32a, respectively. The cell growth, SDS-PAGE analysis and enzyme activity of all recombinant strains further induced by L(+)-arabinose. As a result, the *lysis* module in pET28a-Bac-*cel5-lysis*, pET28a-Bac-*CD1-lysis* and pET28a-*KPEG-nosp-lysis* worked successfully and cell lysis to release cellulases spontaneously. Comparing the difference between the three successful strains and other strains, *lysis* gene E7 colicin functioned well only when the isoelectric point of the recombinant protein is higher than 6.65. As a conclusion, the higher the isoelectric point is, the better lysis effect the strain has.

Key words: Biomass; Cellulase; Directed evolution; Self-assembly; Simultaneous release; *E. coli*

第一章 文献综述

1.1 生物质能与纤维素酶

1.1.1 生物质能源是解决能源短缺问题的研究热点

能源是人类生产和生活所必须的基本物质保障，作为国家经济和社会发展的基础以及世界各国战略安全的重要组成部分，能源的开发和利用一直都是人类研究的热点。目前，地球上能源的供应主要来自于化石能源，包括煤炭、石油和天然气等。它们都是不可再生的资源，随着人口的增加和现代化、工业化的发展，世界对于能源的需求越来越大，这迫使人类不断开采化石能源，化石能源日益减少，以及燃烧化石能源产生的环境污染和气候变化等原因，使得寻找和开发新的可持续的清洁能源成为关系国民经济和社会可持续发展的关键因素。我国是能源短缺国家，也是能源消耗大国，根据我国能源勘探结果，我国的石油资源极其贫乏。早在 1993 年，我国就由石油净出口国变为净进口国，此后，我国的石油进口量逐步上升，对石油进口的依赖度已经超过了三分之一。目前我国年能源消费总量达到了 5.86×10^{19} J，居世界第二位^[1]。随着我国经济不断的发展，必然导致能源生产的巨大压力，有研究预测，到 2020 年我国石油资源将趋于枯竭，而能源需求将达到 $8.79 \times 10^{19} \sim 10.55 \times 10^{19}$ J，能源供应问题将愈加突出^[2]，必将成为我国经济和社会发展的掣肘。

生物质能来源于太阳能，是太阳能在生物质中的保存与储备。它取之不尽，用之不竭。植物或者光合生物通过光合作用，吸收的二氧化碳，固定太阳能生产碳水化合物（生物质）和氧气，可以为自然界的各种生命体提供能源和碳源，生命体将其利用后，最终生成二氧化碳和热能，释放到大气中，构成了自然界的碳循环。自然界中的生物质种类繁多，分布广泛，但并不是所有的生物质都能作为生物质能加以利用，其基本条件是资源的可获得性和可利用性。按照原料的化学性质分，生物质能资源主要为糖类、淀粉和木质纤维素类；按照原料的来源分，则主要包括以下几类：1) 农业生产废弃物，主要是各种农作物的秸秆；2) 薪柴、

枝桠柴和柴草；3) 农林加工废弃物，主要包括木屑、谷壳、果壳等；4) 人畜粪便和生活有机垃圾等；5) 工业有机废弃物，主要是有机废水和废渣等；6) 能源植物，包括所有可作为能源用途的农作物，林木和水生植物资源等。目前，生物质能利用的原料来源主要是各类农林、工业和生活有机废弃物，它们能够提供大量的纤维素类原料。

将生物质能经过一定的转化和利用，可以得到常规的燃料^[3]。第一代生物质能就是在此想法下诞生的，其主要利用的是玉米、水稻、甘蔗、大豆、油菜等粮食和经济作物，巴西、美国和中国东北三省都有采用过此种方法，通过种植大量的玉米，利用其中的蔗糖和淀粉发酵制造燃料乙醇。虽然能够替代部分化石能源，但是这些植物大多为一年生，需年年耕地播种，大量灌溉施肥，投入的能量大，净能量产出却少得可怜。加上它们还与粮食作物争夺耕地，由此带来了一系列负面效应。比如，人们为补充耕地而砍伐森林，结果降低了地球的碳储存能力，反而不利于解决温室效应。同时，这种方法还造成了粮食价格的攀升，严重影响了粮食的供应。在这样的背景下，第二代生物质能——木质纤维素生物质能诞生了。其想法是利用环境中的废弃物（如甘蔗渣、稻秆、稻梗、玉米梗、桔梗、茶叶渣、果皮、大芒草等）和生长在极端环境（如非洲）的非农粮作物麻风树或海洋微藻等丰富的生物质资源进行转化，以解决第一代生物质能的“与人争粮、与粮争地”的问题^[4,5]。

美国国家再生能源研究室（NRRL）在 1982 年提出生物炼制（Biorefinery）理念，事实上生物炼制是与石油炼制平行的新型工业生产模式，利用如淀粉、半纤维素、纤维素等为原料，通过热化学、化学或生物等方法降解成一些中间平台化合物（如生物质合成气、糖类等），然后通过开发新的化学、生物和机械技术，加工成为生物燃料或化学品（如乙醇、丁醇、甘油、乳酸、琥珀酸等）。此新型工业模式可大幅提高再生生物资源的利用水平，更是取代化石资源需求的有效途径^[6-8]。木质纤维素是地球上蕴藏量最丰富的生物质资源，通过基因工程改造植物，使得木质纤维素的结构松散便于提取糖^[9]；或是提高纤维小体^[10]和纤维素酶的特性都能有效提高纤维素的降解。因此利用木质纤维素的生物炼制过程极有可能获得最大成功：一方面，其原料来源充足；另一方面，其生产的衍生性产品与传统

的石化产品相似^[11]。如图 1.1 所示,生物质能转化及利用是指中心的生物质(Plants)经由预处理获得纤维及半纤维素,然后水解成为糖以利于下游生物转化所需。木质素经由燃烧成蒸汽,或由化学催化及加工转换成再生材料。最终由生物转化(Biotransformation)、热力学方式或燃烧等手段生成最终能源,包括氢能、电能、各式生物质燃料等^[12]。

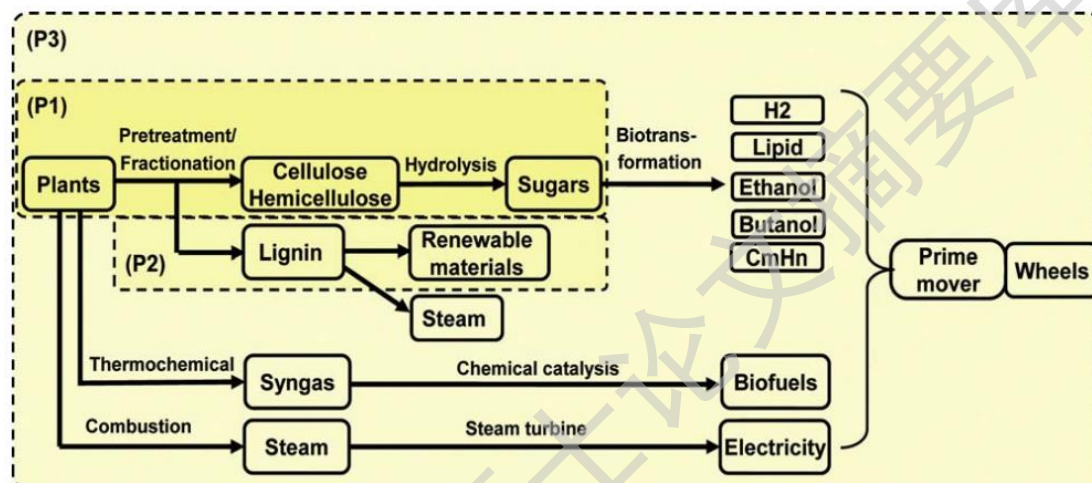


图 1.1 生物质能转化及利用示意图

Figure 1.1 Schematic diagram of conversion and utilization of biomass energy

为了更有效能地实现降低对化石燃料的依赖,利用地球上蕴藏最丰富的生物质资源木质纤维素,开发研究各种纤维素酶降解生物质资源的技术,具有安全性、环保、高附加值等特点,同时也是落实低碳经济发展目标的生物技术。Lynd 和 Zhang 等人,长期进行纤维素酶对木质纤维素降解的菌种筛选、基因改造、酶学反应机理及同步糖化发酵(Simultaneous Saccharification Fermentation, SSF)的平台及技术开发^[13-15],由牛胃中筛选出的微生物和基因组研究,揭示了更多酶分子参与降解木质纤维素的相关作用^[16]。应用于纤维素的降解的真菌及细菌的生物系统中,分子生物、酶学性质、微生物间协同性质的研究都有大量的报道^[17,18],但是离达到商业化生产纤维素酶的目标,仍有一段距离。国际上,丹麦诺维信(Novozymes)公司及美国杜拜化学公司(Dupont)收购的杰能科(Genencor)

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库