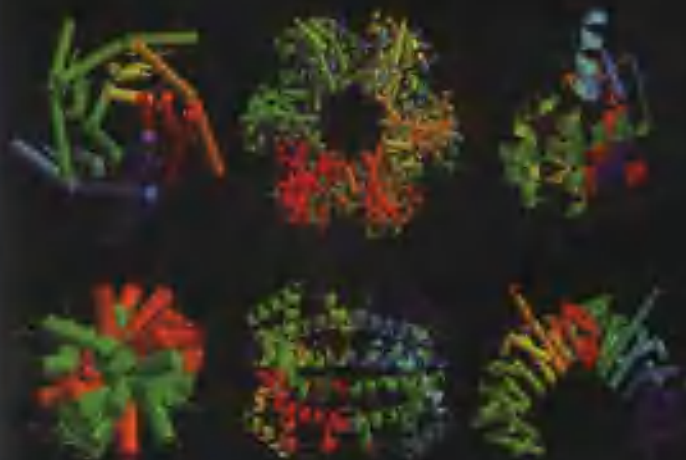




木聚糖酶工程菌的构建

MUJUTANGMEI GONGCHENGJUN DE GOUJIAN

包怡红 著

东北林业大学出版社

木聚糖酶工程菌的构建

包怡红 著

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

木聚糖酶工程菌的构建/包怡红著. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2005. 12

ISBN 7-81076-798-4

I. 木 II. 包 III. 木糖: 聚糖—酶—研究 IV. TQ351.37

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 156911 号

责任编辑: 冯 琪

封面设计: 彭 宇



NEFUP

木聚糖酶工程菌的构建

Mujutangmei Gongchengjun de Goujian

包怡红 著

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

黑龙江省教育厅印刷厂印装

开本 850 × 1168 1/32 印张 8.25 字数 205 千字

2005 年 12 月第 1 版 2005 年 12 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-798-4

TQ · 8 定价: 25.00 元



作者简介

包怡红，1970年4月生，黑龙江省哈尔滨市人。毕业于东北农业大学食品科学学院，并获得工学学士学位；曾在黑龙江省食品工业公司任工程师，黑龙江省乳品协会、黑龙江省白酒协会常务办公室任秘书；1998年和2001年先后在东北农业大学和中国科学院微生物研究所攻读研究生，并获得工学硕士学位和工学博士学位；现在东北林业大学林学院食品科学与工程教研室从事教学和科研工作，副教授，硕士生导师。

近年来，主持和参加10余项纤维素和半纤维素降解微生物改良及应用方面的科研工作；主持了黑龙江省自然科学基金、哈尔滨市青年基金、东北林业大学青年基金及东北林业大学杰出青年创新项目各一项；作为主要研究人员，参加了国家“863”计划项目、国家自然科学基金和黑龙江省重大攻关项目等多项科研工作。

在核心期刊已公开发表学术论文30余篇；主编图书1本，副主编及参编教材等图书6本。

前 言

随着社会的进步和经济的发展,现代科学技术发生了日新月异的变化。同时在跨入 21 世纪之际,人们也面临着人口膨胀、资源紧缺、环境污染、粮食危机、生态破坏等严峻挑战,此时微生物技术理论和应用表现出不可替代的重要作用。

生物质资源是可再生性物质资源,地球上每年光合作用的产物高达 150 亿 t,是人类社会赖以生存的基本物质来源,其中 90% 以上为木质纤维素类物质,木聚糖占 20% ~ 30%。目前这部分资源尚未得到充分的开发和利用。随着人口的膨胀,资源和能源日渐短缺,虽然我国石油和煤炭储量丰富,但从长远考虑,还需对这一课题予以重视。面向生物物质自然界中的大循环,开发高效转化木质纤维素类可再生资源的微生物技术,利用工农业废弃物等发酵生产的燃料、饲料、食品、医药、化工产品 & 农药、肥料等都具有重要的应用价值和发展前景。

我国在纤维素微生物降解、化能自氧细菌、石油降解微生物、塑料降解生物、生物农药生产、生物肥料、生物设施农业、地膜分解等方面都有相当的研究和开发应用基础,并有非常巨大的潜力。微生物的应用研究对微生物菌株提出了众多的要求,只靠从自然界中筛选和对菌种随机诱变选育是难以实现上述目标的。研究和开发新的分子生物技术,有目的地改造乃至创造新的生物功能,是开发微生物应用新技术的必要前提。因此,今后的主要目标应是围绕生物质资源开发、环境污染治理、开辟新能源等应用研究的需要,加强高效表达系统构建、代谢途径工程、蛋白质定向进化、高效筛选系统建立等方面的研究,既为工业生产提供优良的工程菌株,又为微生物菌株的分子生物技术改造提供了新思路、新途径、新方法和新目标。

生物催化剂在工业中的应用,现在普遍被认为是继医药和农业浪潮之后的“第三次浪潮”。微生物具有种类多、繁殖快、易培养、成本低、易推广、见效快等突出的优点,从而成为生物催化剂的主要来源和使用形式。经过多年的发展,微生物技术和酶工程技术通过发挥自身的优点,在生物催化剂方面取得了巨大的进步。例如,酶和细胞固定化技术大大提高了生物催化剂的稳定性,为各类生物反应器的研制和工艺研究创造了有利条件;能够耐受各种极端环境的微生物和酶的开发,扩展了生物催化剂的来源和使用条件;利用定向进化技术提高了酶的比活力,并对酶学性质进行了改善等。

虽然微生物技术和生物催化剂的开发应用已经取得了很大的成就,产生了广泛而深远的影响,但是从人们对它的期望及其潜在的巨大作用和目前实际产生的作用来看,这个领域的发展尚处在初级阶段。在基础研究、理论探讨、应用开发和生产实践的各个方面都有大量的和不断产生的难题等待着人们去克服。

由于目前基因工程、酶工程和细胞工程等高新技术的迅猛发展,为人们创造发现新菌种、构建系列新菌株和开发新工艺、新产品提供了新的可能。绿色环保的兴起、可持续发展战略和循环型社会构建任务的提出,使可再生性生物质的转化和利用得到了高度重视和广泛应用。

本书概述了木聚糖酶在国民经济中的主要作用,以及木聚糖酶的结构、分子结构域、结构与功能关系,并在国内首次阐明了木聚糖酶的催化机制;在分析微生物产生木聚糖酶的性能中,特别介绍了耐碱性木聚糖酶产生菌的筛选和工程菌株构建的科学价值和意义;从产生菌株的筛选、性质分析、产量的提高到木聚糖酶基因的克隆、表达、工程菌株的构建等方面,进行了系统、全面的理论分析和方法介绍。

为了让读者全面地了解 and 掌握木聚糖酶工程的发展以及基因

工程技术在工程菌株构建中的应用,本书尽力把近年来木聚糖酶的研究进展及其在各个领域的主要应用展现出来。尤其是重点介绍了木聚糖酶工程菌株构建的理论、实际操作、巨大芽孢杆菌表达系统的构建操作步骤,同时还涉猎了能够分泌木聚糖酶的酵母工程菌株的构建,扩展了生物催化剂的来源和使用条件。

在书中阐述了分子生物学手段在产酶工程菌构建中的应用;利用多种方法从基因水平将微生物进行优化育种,构建的木聚糖酶工程菌株提高酶活力的理论依据与试验操作;同时介绍了利用生物学技术对微生物未知序列的扩增,这一创新成果并得到试验应用验证。这不仅在理论上具有学术价值,而且为进一步的科学研究、工业化生产奠定了基础。

本书可供在酶工程、微生物学、生物化学、分子生物学和食品科学等相关专业从事教学和科学研究人员作为参考。限于能力和时间有限,加上涉及内容广泛,书中难免出现错误和不足,敬请学术界同仁和广大读者批评指正。

本书全部研究工作承蒙中国科学院微生物研究所生物技术中心研究员董志扬老师的指导,还有该中心的毛爱军、梁改芹、何永志老师的支持,以及刘伟丰、王远亮、李海燕、乔宇、赵云和课题组其他同学的热心帮助;同时本书的出版得到东北林业大学出版社的支持,在此,谨表衷心的感谢!

包怡红
2005年1月

目 录

1	木聚糖酶的研究进展	(1)
1.1	自然界中木聚糖的研究与开发	(2)
1.2	木聚糖酶系的组成	(9)
1.3	木聚糖酶的来源	(13)
1.4	木聚糖酶的性质	(17)
2	木聚糖酶的分子生物学研究进展	(22)
2.1	木聚糖酶的分子生物学	(22)
2.2	木聚糖酶基因的表达调控	(35)
2.3	木聚糖酶的结构与功能	(41)
2.4	木聚糖酶的催化机制	(46)
3	木聚糖酶的应用现状	(48)
3.1	木聚糖酶在造纸工业中的应用	(48)
3.2	木聚糖酶在食品行业中的应用	(52)
3.3	木聚糖酶在饲料行业及其他领域中的应用	(57)
3.4	木聚糖酶生产技术研究现状	(59)
4	耐碱性木聚糖酶高产菌株的分离与筛选	(66)
4.1	微生物酶的筛选	(66)
4.2	木聚糖酶产生菌株的分离与筛选	(77)
4.3	木聚糖酶产生菌株的鉴定	(85)
5	木聚糖酶酶学性质分析及其应用研究	(97)
5.1	材料与方法	(97)
5.2	结果与分析	(99)
5.3	讨论	(105)
6	木聚糖酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达	(107)
6.1	耐碱性木聚糖酶基因的克隆	(108)

6.2	重组木聚糖酶的酶学性质分析	(121)
7	木聚糖酶基因在巨大芽孢杆菌中的表达	(127)
7.1	木聚糖酶巨大芽孢杆菌工程菌株的构建	(127)
7.2	带有自身调控序列的木聚糖酶基因在巨大芽孢 杆菌的表达	(142)
7.3	工程菌巨大芽孢杆菌产酶条件的优化及酶学性质 研究	(154)
7.4	芽孢杆菌表达载体的构建	(159)
8	木聚糖酶高产工程菌株的构建及其性能分析	(175)
8.1	木聚糖酶高产工程菌株的构建	(176)
8.2	工程菌株产酶性能分析	(188)
9	木聚糖酶工业酒精酵母工程菌株的构建	(196)
9.1	工业酒精酵母菌株改良的研究进展	(196)
9.2	酵母基因表达系统	(204)
9.3	木聚糖酶酵母工程菌株的构建	(211)
9.4	双功能质粒的构建及其在酒精酵母中的 分泌表达	(225)
参考文献		(237)

1 木聚糖酶的研究进展

1891 年 Schulze 用稀碱处理植物材料时 (Schulze, 1891), 将其中溶于稀碱的部分称为半纤维素, 是一组由单一的 D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖或 L-阿拉伯糖构成主链, 并带分支结构的多糖。天然半纤维素中绝大部分是以 D-木糖为主链单位的木聚糖, 木聚糖属异质性多糖。

木聚糖是半纤维素的重要组成部分, 在植物细胞壁中的含量仅次于纤维素, 约占细胞干重的 35%。它的主链由 β -1, 4-糖苷键相连的 β -D-吡喃型木糖残基聚合而成 (Abigail C. E et al., 1998)。在农业副产物如玉米芯、麦麸、米糠、秸秆、甘蔗渣中富含的木聚糖, 是一种重要的可再生资源, 但由于种种原因难以得到有效的利用, 而在造纸制浆过程中, 富含木聚糖的工业废料往往直接排入水体, 导致水质的富营养化, 严重破坏生态环境, 这些现象在我国尤为突出 (孙迅等, 1998)。

木聚糖酶作为一种多酶体系广泛地存在于各种微生物中, 在近 40 年的研究历程中, 科学家们已从不同来源的微生物中分离到大量的不同类型和功能的木聚糖酶 (孙迅等, 1998; 杨瑞鹏等, 1990), 并对其酶学性质、催化机制以及分子结构也有了比较详尽的研究。随着生物技术的不断发展和进步, 特别是基因工程技术和蛋白质工程技术的广泛应用, 对木聚糖酶的了解更加深入, 已经分离出多种木聚糖酶基因, 并出现多种木聚糖酶产品 (刘相梅等, 2001)。其在饲料工业、造纸工业、能源工业以及食品医药领域的应用价值, 在科学界已引起广泛关注。

1.1 自然界中木聚糖的研究与开发

木聚糖(Xylan)是植物半纤维素的重要组分,占植物碳水化合物总量的1/3,是自然界中继纤维素之后含量第二丰富的可再生物质资源。它存在于陆生植物的细胞壁中以及植物的几乎所有部位。不同植物木聚糖的含量也不一样,一般硬材中所含木聚糖比软材中所含木聚糖多,硬材中能占到干重的15%~30%,软材中一般占干重的7%~10%。在一些一年生植物,如小麦、甘蔗、棉花的子壳中,木聚糖含量非常高,有的可达30%以上(Rolf A et al., 1995)。

1.1.1 木聚糖的结构

木聚糖是一种杂合多聚分子,主链由多个吡喃木糖基通过木糖苷键相连。根据糖苷键的类型,木聚糖可分两种: β -1,4-木聚糖和 β -1,3-木聚糖。前者存在于陆生植物细胞壁中,它的主链是由 β -1,4-糖苷键相连的 β -D-吡喃木糖残基聚合而成;而后者存在于海洋藻类的细胞壁中,其主链由 β -D-吡喃木糖残基通过 β -1,3-糖苷键聚合而成(Yamaura I et al., 1990)。

1.1.1.1 木聚糖的组成

自然界中的木聚糖多为异聚多糖,侧链上连着多种不同大小的短取代基,主要有O-乙酰基、4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸残基、L-阿拉伯糖残基(可进一步与香豆酸、阿魏酸等酚酸相连)等。这些侧链与植物细胞中其他几种结构性多糖(如木质素、纤维素、果胶、葡聚糖等)以共价或非共价键连接,组成植物细胞重要的结构——细胞壁。而同型木聚糖分布很少,仅见于茅草、烟草和某些种子的外壳中。不同植物或同一植物不同的

生长阶段,木聚糖的组成成分及其多聚化程度都有所不同:硬木木聚糖由 O-乙酰基-4-O-甲基葡萄糖醛酰木糖聚合而成,聚合度为 150~200,且具有高度的乙酰化;软木木聚糖是非乙酰化的,由阿拉伯-4-O-甲基葡萄糖醛酰木糖聚合而成,聚合度为 70~130。

木聚糖的结构变化范围很大,从仅由 β -1,4 糖苷键连接的多聚木糖线性分子到高度分支的异质多糖,前者是很难分离得到的。通常的木聚糖都含有 2~4 种不同的糖单体。木聚糖的主链与纤维素很类似,只是其单体为木糖而不是葡萄糖。构成木聚糖主链的糖单位为吡喃型木糖,以 β -1,4 糖苷键连接成链状骨架,同时主链上以 α -糖苷键连接有 L-阿拉伯糖、葡萄糖醛酸等侧链基团和分支(朱静等,1996)。一般在 C-2, C-3 位上易乙酰化,葡萄糖醛酸残基则以 O-键连在 C-2 位上,阿拉伯糖残基多出现于 C-2, C-4 位上。这些侧链类型及杂合程度的不同直接影响木聚糖的溶解性、天然构象及与其他结构多糖分子的结合情况,因而也极大地影响了木聚糖酶的作用方式及效率(Kuldami et al., 1999; Li et al., 2000)。木聚糖的主要结构特征见图 1-1。

1.1.1.2 木聚糖的性质

自然界中的木聚糖在主链聚合度、侧链基团的含量和种类等方面存在着较大的区别(Wong K et al., 1998),这些不同直接影响了木聚糖的溶解性、天然构象及与其他结构多糖分子的结合情况。如被子植物来源的硬木中,木聚糖主链长度相对较长,平均有 150~200 个木糖残基,其中约有 10% 的木糖在 0~2 位上以 α -1,2-糖苷键连接有 D-葡萄糖醛酸或 4-O-甲基-D-葡萄糖醛酸残基(Yamaura I et al., 1990)。主链木糖在 C-3 或 C-2 位上被高度乙酰化,例如,桦木木聚糖,每两个 D-木糖含有至少一个乙酰基团,乙酰基团的存在,可使木聚糖在水中的溶

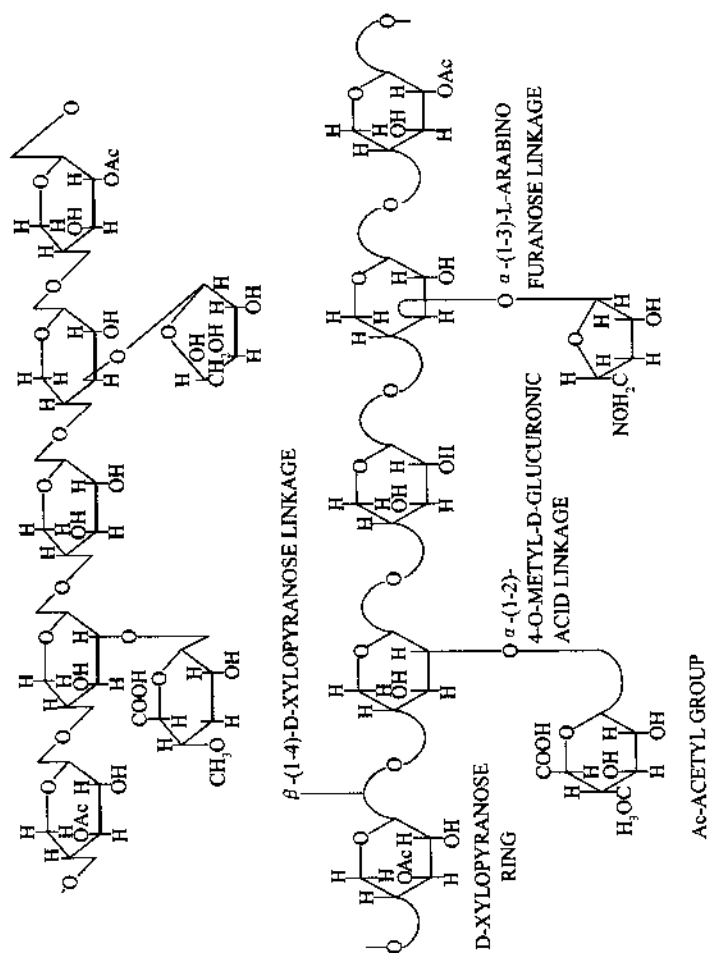


图1-1 木聚糖的结构

解度大大增加；而来源于裸子植物的软木中的木聚糖，其主链的聚合度相对较低，通常为 70 ~ 130 个木糖残基。软木木聚糖主链上连有更多葡萄糖醛酸侧链残基，没有乙酰化修饰。与硬木木聚糖不同的是软木木聚糖大约有 12% 的主链木糖在 0 ~ 3 位上与 L-呋喃型阿拉伯糖以 α -1, 3-糖苷键相连接；来自于草本植物的木聚糖还具有由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸以及木糖等残基构成的分支 (Kuldarni et al., 1999; Li et al., 1993)。

1.1.1.3 木聚糖的来源

木聚糖是植物次生细胞壁的重要成分，约占细胞干重的 35%，在植物性材料中与纤维素和木质素紧密地结合在一起。木聚糖的侧链基团和木质素之间以化学键相互连接，再通过氢键并在果胶等物质的参与下与纤维素结合，形成致密的结构。这种致密结构对维持植物形态具有重要作用 (朱静等, 1996; Whistler et al., 1970)。木聚糖在自然界中存在广泛，含量丰富。绿色植物每年通过光合作用固定了大量的生物质和能量，据估计，地球上每年生长的生物质总量约为 1.5×10^{11} t，这其中有 20% ~ 30% 为木聚糖。因此，近年来木聚糖的生物转化再利用一直是国内外各个研究领域的研究热点 (Whistler et al., 1970)。

另外，农业副产物如玉米芯、麦麸、米糠、秸秆、甘蔗渣等都含有大量的木聚糖。尤其是在木材制浆过程中释放出含有大量木聚糖的工业废料，流入河流与湖泊，沉积下来，不仅造成资源的浪费，而且造成严重的环境污染，破坏了生态环境。因此，将木聚糖转化成有用的产品，不仅增强了加工处理木质纤维素的整体经济，而且还开辟出一条从可更新资源获得能量的新途径 (孙讯等, 1998)，同时也解决了环境污染问题。

1.1.2 木聚糖的降解

利用木聚糖生产低聚木糖最先采用的是化学降解法，如

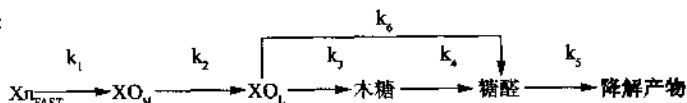
J. Havlicek 等采用三氟醋酸、Y. Mitsuishi 等采用盐酸、Bray 等采用硫酸等稀酸部分水解木聚糖进行酸法水解制备低聚木糖。另外，还可以通过热水抽提即利用木聚糖的自水解制备低聚木糖。工业上常用来降解木聚糖生产低聚木糖的方法主要有如下几种。

1.1.2.1 自水解法生产工艺

木质纤维素材料 (LCMs) 含有 3 种高聚物：纤维素、木质素和木聚糖。自水解即将木质纤维素与水混合，利用这几种高聚物对酸热敏感度的差异，由水和水解产生的各种物质（如乙醛、糖醛酸、酚酸等）产生的水合氢离子催化木聚糖降解产生低聚木糖，而纤维素和木质素几乎不发生降解。自水解对设备腐蚀低，不产生沉淀，资金、设备投资少，因此是一种较好的降解木聚糖生产低聚木糖的方法。

木聚糖热自水解过程与制备木聚糖中的预水解过程非常相似，基本遵循相同的反应动力学原理，在反应条件较严格时，木糖会脱水生成糖醛，糖醛又会降解。近年来研究工作者提出了木聚糖降解反应动力学模型，见图 1-2。

模型1:



模型2:

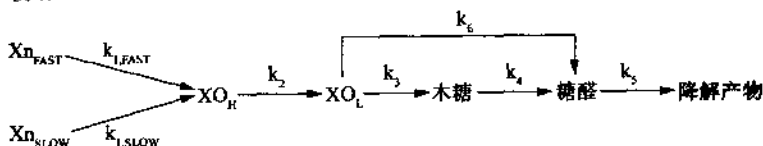


图 1-2 酸性体系中的木聚糖降解反应的动力学模型

Mehlberg, Tsao (2002) 认为热水解过程中存在 2 种不同敏感度的木聚糖组分，分别称为快反应木聚糖和慢反应木聚糖。但

Garrot (2001, 2002) 等认为在一般的非等温热处理过程中, 慢反应木聚糖几乎不参与水解反应。反应过程中, 木聚糖水解产生高相对分子质量和低相对分子质量的低聚糖, 而木糖和相对分子质量低的木聚糖能在酸性介质中分解, 该反应对木糖浓度略有影响。另外, 模型 1 的处理条件比较温和, 温度一般在 190°C 以下, 一旦采用严格的反应条件, 体系中木聚糖最后残留量仅为 6%, 因而在高温下部分慢反应组分也发生了降解, 此时反应过程采用模型 2。

将粉碎的玉米芯与水按一定比例混合放置于密闭的不锈钢反应器中, 采用图 1-3 模式加热水解, 加热最终温度为 206°C 。反应结束时, 木聚糖至低聚木糖的转化率达 65.5%, 转化为低聚木糖和木糖的木聚糖共计 72.2%。

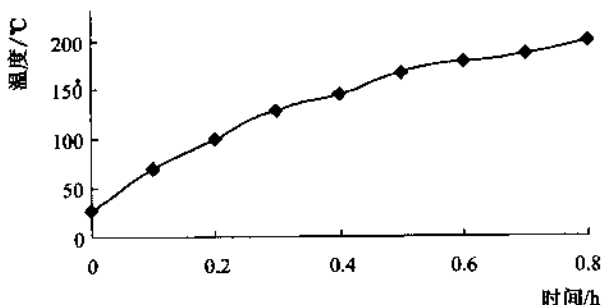


图 1-3 热水解与温度的关系

1.2.2.2 酸水解法

采用酸水解法进行降解半纤维素生产低聚木糖时, 由于水解速度快, 很难将反应停止在低聚木糖阶段, 并且酸水解反应会伴随有害物质生成, 造成产品精制工艺繁琐、得率低, 因此需选择合适的反应条件或反应器类型、操作模式, 以避免上述问题。

工业上常采用渗滤反应器, 能在反应过程中将糖从反应器中

移走，因而可以减少糖的降解。而且渗滤反应器作为非稳态反应器，可以改变操作过程的反应条件和操作模式。由于半纤维素由两种不同水解敏感性组分（易水解组分和难水解组分，易水解的半纤维素约占总戊糖的 60% ~ 80%）组成，因此理论上很适合采用不同的温度。易水解的木聚糖水解时可采用较低的温度，然后采用较高的温度水解剩余木聚糖；当糖降解反应对酸浓度的敏感度低于多糖的水解反应时，也可采用改变酸浓度的方法。

1.1.2.3 碱水解法

实验室研究木聚糖结构时一般采用碱来提取木聚糖，但工业化生产用碱法提取木聚糖却有较多不足，因为使用大量碱会引起设备腐蚀和环境污染。木质纤维素材料经碱液 NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和氨水处理得到木聚糖或可溶性木聚糖片段，木聚糖在碱性溶液中稳定，可用有机溶剂、酸、乙醇或酮沉淀法回收。有人采用稀碱液脱除玉米芯中的一部分木质素，然后用木聚糖酶降解处理过的玉米芯制取低聚木糖。此方法由于产生大量碱性废液且木聚糖酶用量偏高，因此有待进一步改进。对碱法提取木聚糖和蒸煮法提取木聚糖的酶水解产物进行比较发现，产物组成非常相似，木二糖和木三糖含量均很高。

1.1.2.4 酶水解法

通过酸和酶均可将木聚糖转化成单糖，酸水解速度快，但往往产生有毒副作用的化合物，为进一步的应用形成了障碍。而利用酶法水解则不存在这一问题，利用生物催化剂酶对半纤维素进行降解，不存在高温、高酸或高碱的反应条件所带来的不利因素。因此，开发新的有效的木聚糖酶，是木聚糖降解利用的必经之路，为处理半纤维素废料提供了新的前景。