

具有工业生产与应用功能的新型纤维素降解酶基因的克隆、蛋白质工程改造及高水平表达研究

吕红

复旦大学生科院，遗传工程国家重点实验室
上海市邯郸路220号，邮编200433



復旦大學



遗传工程国家重点实验室

研究领域简介:

纤维素降解酶涉及到我们生活的方方面面，在纤维素乙醇、饲料添加、水洗牛仔、洗涤业液、造纸、印染、污水处理等众多方面发挥着作用。纤维素降解酶主要包括了纤维素酶（内切和外切葡聚糖酶、葡萄糖苷酶），半纤维素酶（木聚糖酶、木糖苷酶），以及切割纤维素侧链的酶（如半乳糖苷酶、阿魏酸酯酶等）。不同的应用领域中对纤维素降解酶自身的特性有不同的要求，例如，在造纸业行业要求木聚糖酶具有耐高温耐强碱的特性，在饲料中添加的纤维素降解酶应具有耐高温并且在较广泛PH的范围内保持酶活性的特点，而在洗涤剂中的纤维素降解酶应在较低温度和碱性条件下有活性，等等。但是目前市场上现有的纤维素降解酶并不能满足各个行业的应用需求。因此，以工业应用为靶向，利用现代宏基因组和基因工程的技术手段，深入挖掘特殊环境微生物（特别是不可培养微生物）的基因资源，筛选克隆鉴定新型纤维素降解酶，为解决酶应用行业的核心科学问题，开展了系列的攻关研究，推动我国自主知识产权的酶制剂行业的发展，为企业服务，创造显著的经济效益和社会效益。

研究成果简介:

前期在国家863课题的资助下，依托复旦大学遗传工程国家重点实验室先进的仪器设备和研究条件，取得以下主要成果，并拥有自主知识产权。

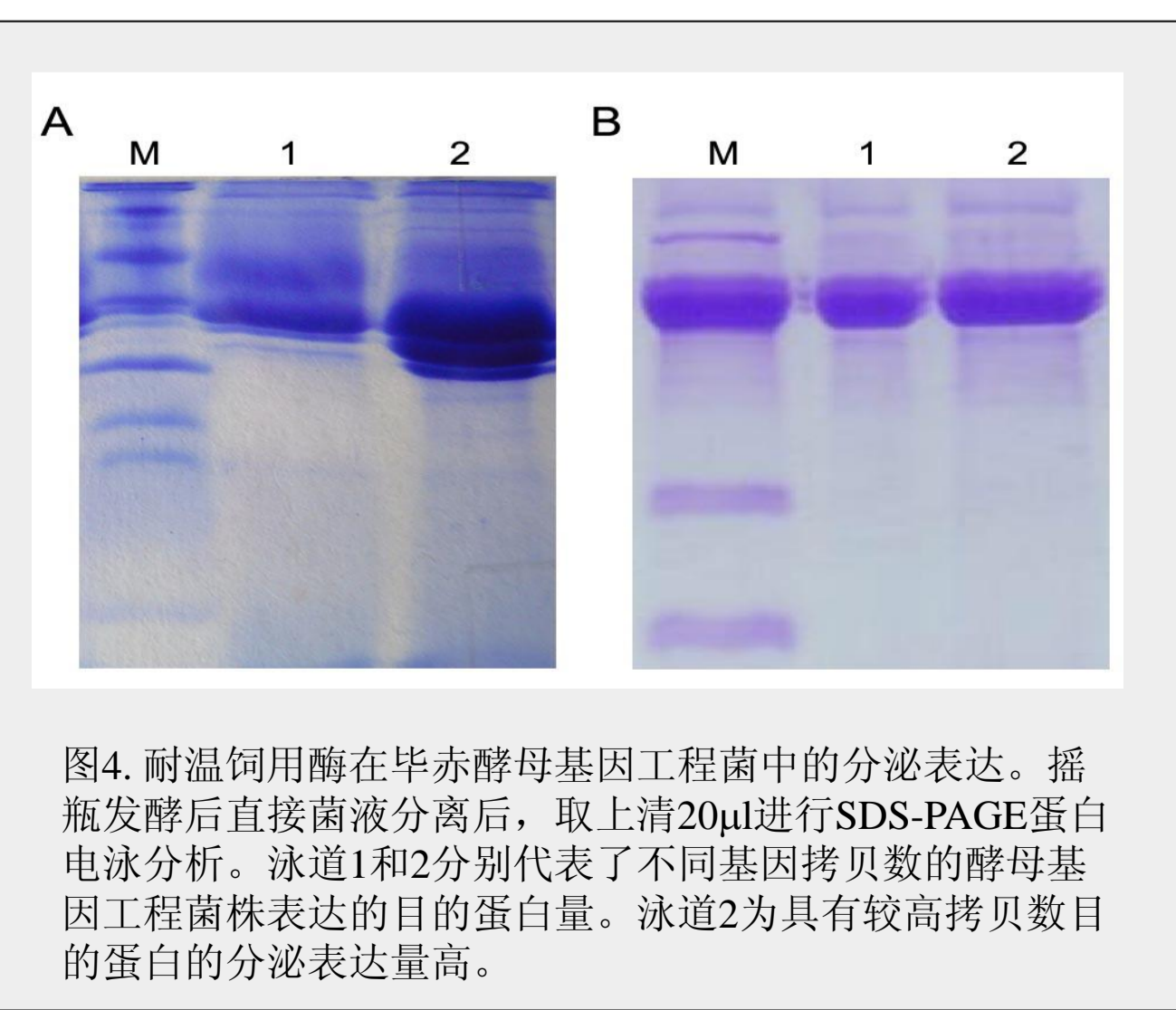
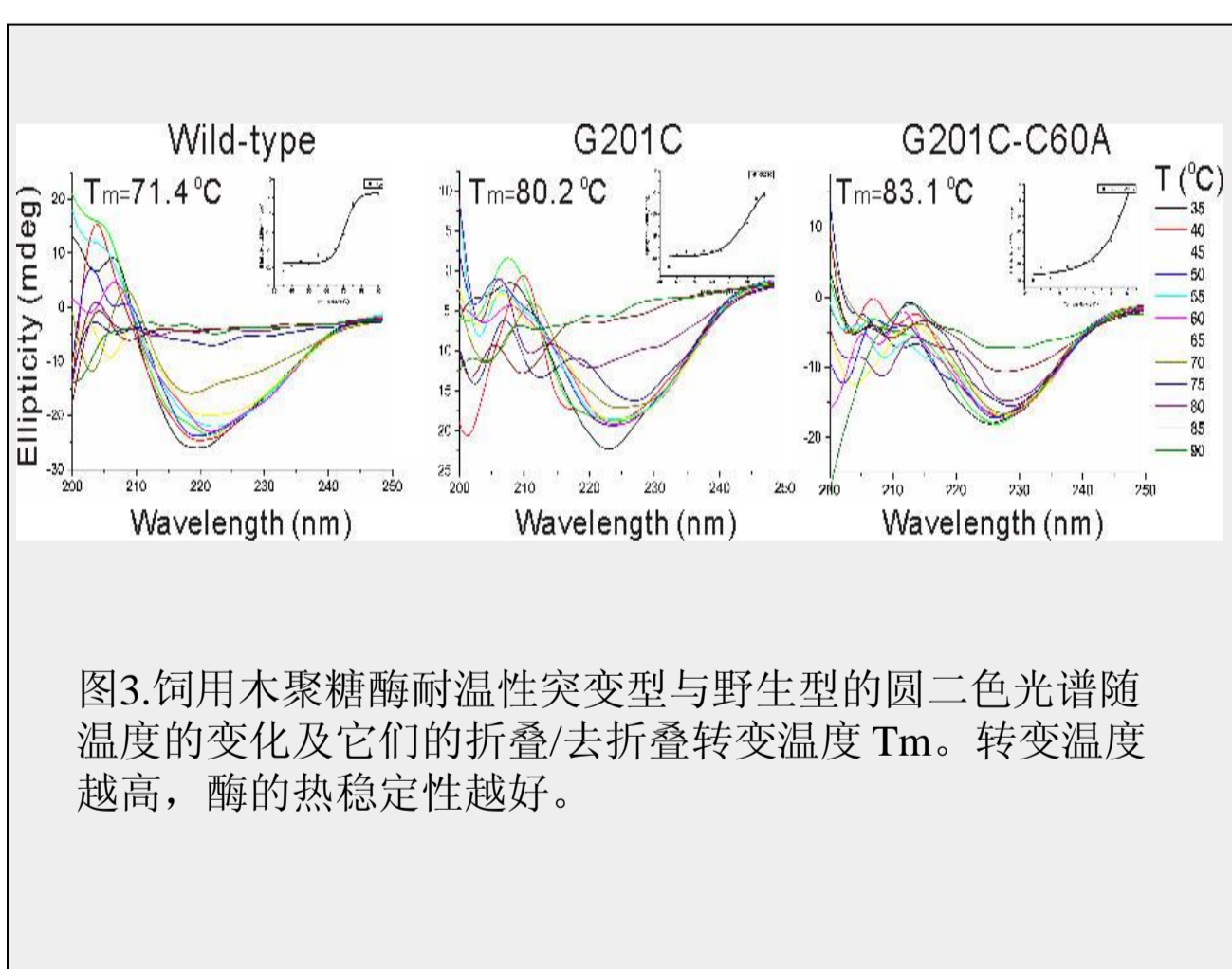
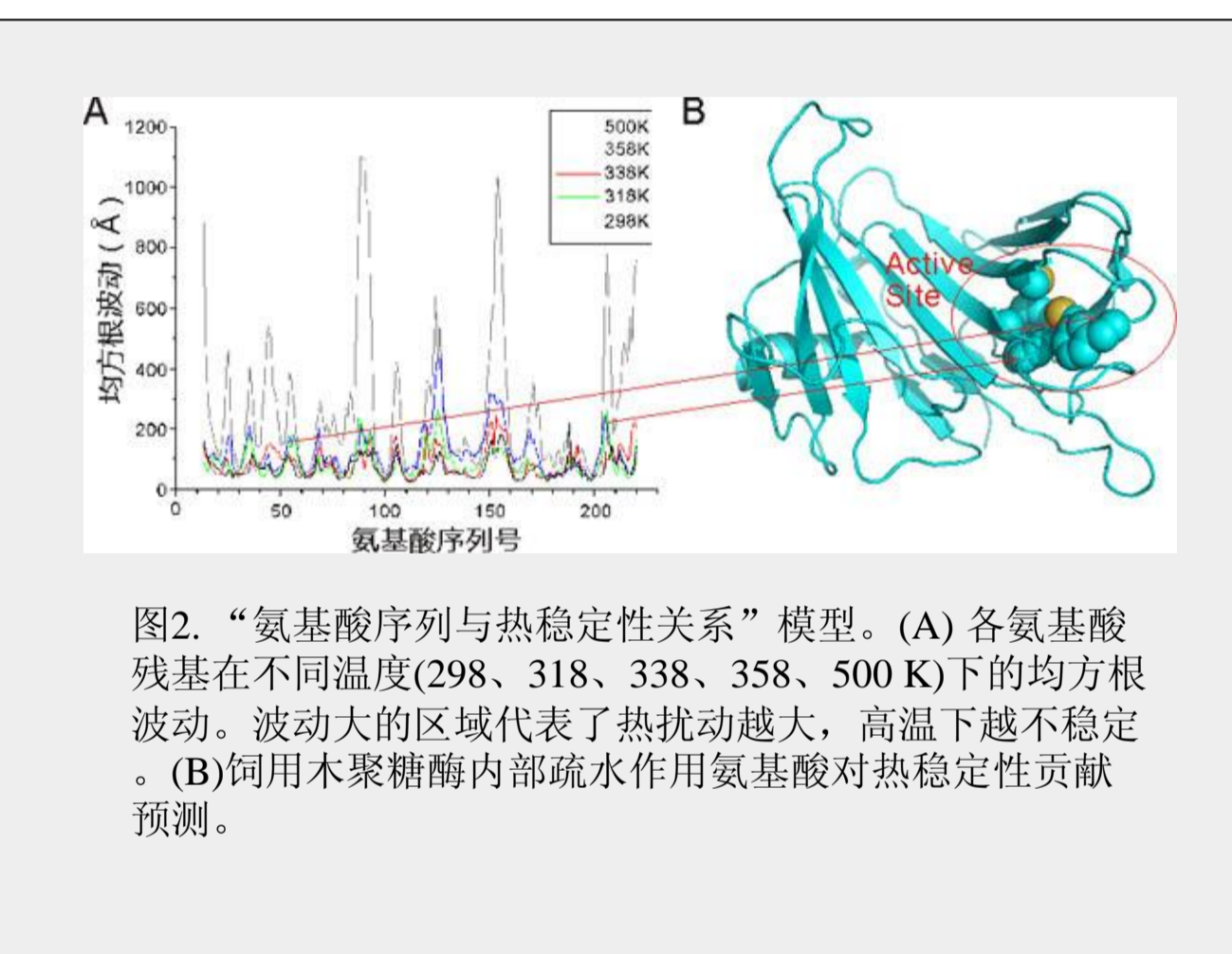
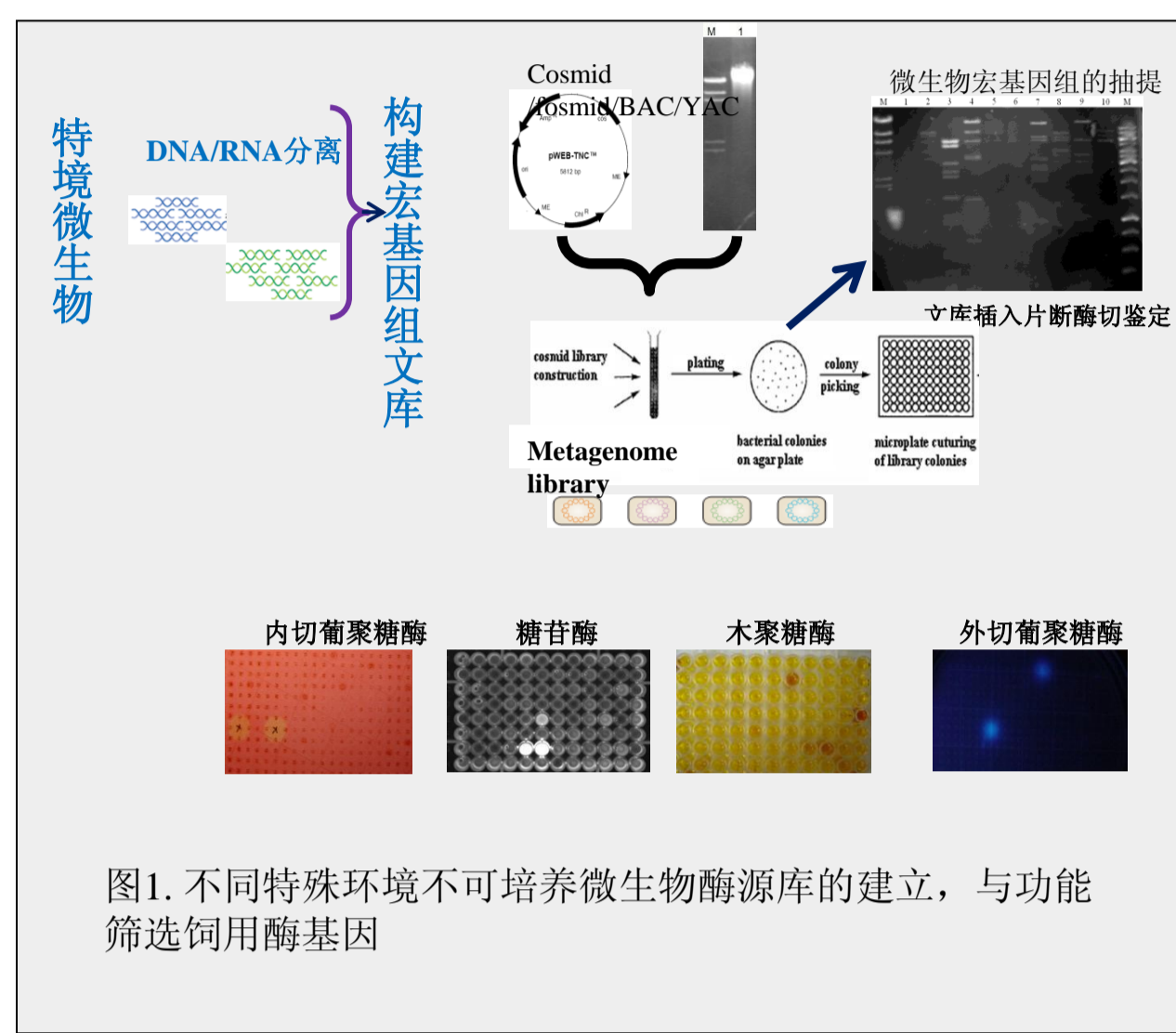
- 1) 建立了不同特殊环境不可培养微生物来源的酶源基因库，例如来源于中国碱性最高的青海湖微生物、来源于西沙群岛深海微生物、来源于中国牦牛瘤胃微生物等等；
- 2) 建立了高通量功能筛选的研究平台，可以从酶源库中快速筛选并克隆到我们所需要的酶基因；
- 3) 建立了蛋白质结构与稳定性之间关联的研究平台，以工业应用为靶向，通过蛋白质结构的改造，赋予蛋白质特殊的属性，如在高温下保持活性等；
- 4) 建立了高水平表达目标酶基因的酵母基因工程菌的研究平台，为生产企业提供具有工业生产能力的基因工程菌株。

研究成果举例:

饲用酶制剂的生产与应用，能够提高饲料利用率、缓解饲料原料匮乏、减少污染改善环境、提高畜禽免疫力、具有抗生素替代的潜力，促进绿色饲料工业发展，为食品安全提供保障。但是，高温饲料制粒过程中酶蛋白活性损失严重（高达90%），严重制约了酶制剂在饲料中的功能发挥。如何提升饲料酶的热稳定性，已成为所有酶制剂生产和应用行业共同要解决的瓶颈问题。

我们从中国牦牛瘤胃微生物不可培养微生物的宏基因组文库中，功能筛选并克隆了饲用酶的编码基因（图1）；建立了酶蛋白的氨基酸序列对酶蛋白热稳定性贡献预测的理论模型（图2）；完成了理性设计与功能进化相结合的蛋白质工程改造，并获得具有耐高温性能的饲用酶突变体（图3）；用现代基因工程手段，获得了具有工业生产能力的酵母基因工程菌株（图4）；与企业合作，完成了工程放大，实现了规模化的工业生产。

耐高温饲用酶在饲料中的应用，是原本不能使用酶制剂的高温饲料制粒能够大规模使用，每吨饲料成本降低10-30元，2010年全国1.56亿吨中50%是高温制粒饲料，市场潜力巨大。有效提高了饲料营养物质的利用率，减少氮磷排放对环境的污染，推动了绿色饲料工业和养殖业可持续发展；具有显著的经济和社会效益，对提升我国科技产品的国际竞争力产生了重要影响。



研究团队简介:

吕红教授/博导，长期从事微生物遗传与遗传工程的基础研究与应用研究。承担国家973、863、国家自然科学基金、教育部博士点基金等项目，在本研究领域重要SCI杂志如JBC、BBA-Mol Cell Res等上发表通讯作者论文30多篇，申请第一发明人专利9项，授权2项。

季朝能教授/博导：从事蛋白质晶体结构与功能的研究，在蛋白质结构解析与功能研究方面积累雄厚，承担了863、国家重大支撑计划、自然科学基金等项目的研究，先后发表SCI论文100篇，申请专利4项。

黄强副教授，从事生物大分子结构与相互作用的理论建模与模拟，在蛋白质结构与蛋白质的稳定性关联方面有很深入的研究。承担国家863、自然科学基金等课题，发表SCI论文30篇，专利申请3项，授权2项。

袁汉英副教授：利用现代基因工程技术手段，研究具有工业生产能力的酵母基因工程菌领域拥有相当丰富的科研积累。

周峻岗博士：利用现代宏基因组技术手段，建立一套特有的从特殊环境不可培养微生物中挖掘靶标酶的方法。

余垚副教授：在国内外受到了严格的酵母遗传和遗传工程的训练，建立了一套快速筛选、克隆、表达技术方法

目前具有工业化生产特征的成果:

- 耐高温木聚糖酶高水平分泌表达酵母基因工程菌
- 碱性木聚糖酶高水平分泌表达酵母基因工程菌

致谢

研究项目得到国家863的资助。
感谢复旦大学遗传工程国家重点实验室
感谢中国遗传学会
感谢复旦大学酵母分子遗传与遗传工程的全体老师和同学

合作趋向:

本研究团队依托复旦大学遗传工程国家重点实验室，用现代基因工程、蛋白质工程、生物化学、生物物理、遗传学、微生物等多学科相结合的先进理论以及技术方法，致力于酶制剂的研究开发与生产及应用，旨在解决酶制剂生产及应用中的瓶颈科学问题；同时挖掘开发新型生物酶及其用途，推动我国酶制剂行业的发展及国际化。

我们趋向与“注重研发、具有一定生产规模、酶制剂发酵生产企业”开展研发合作。

联系人：仲实

联系地址：zhongshi@fudan.edu.cn

联系电话：021-65642667