

运动发酵单胞菌基因操作体系的改进及其在生物炼制过程中的应用

摘要

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 是一种革兰氏阴性兼性厌氧细菌。由于其高效的乙醇发酵性能和独特的代谢特征, 该菌株在生物炼制领域被认为具有广阔的应用前景。深入开展运动发酵单胞菌代谢工程等方面的研究, 将有助于推动其在生物炼制中的广泛应用。但由于目前运动发酵单胞菌基因操作体系存在效率较低、假阳性率高、大质粒操作困难和克隆位点极有限等缺陷, 严重阻碍了代谢工程在该菌株中的开展。本学位论文首先对运动发酵单胞菌现有的基因操作体系给予了改进, 并通过新构建的 pHW20a 质粒将同源和异源基因分别在该菌株中进行了表达。借助于所构建的各种运动发酵单胞菌重组菌, 对该菌株的生理代谢规律及限制其在生物炼制过程中应用的若干因素进行了一些探讨。

基因工程是认识微生物生理代谢的一个基本手段。建立基因工程操作所必需的高效和便捷的基因操作体系, 对于微生物代谢途径重构具有十分重要的意义。本论文首先在运动发酵单胞菌已有可移动质粒 pLOI193 的基础上, 通过质粒结构的精简以及不同来源功能基因的优化整合, 获得了一个高转化效率的接合穿梭质粒 pHW20a。实验证明, 该质粒的接合转化效率比 pLOI193 高约两个数量级。借助于 pHW20a 质粒将来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 的苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*), 来源于酿酒酵母的 NAD⁺-依赖型甲酸脱氢酶基因 (*FDHI*) 以及运动发酵单胞菌 ZM4 菌株自身的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 (*ppc*) 和葡萄糖-果糖氧化还原酶基因 (*gfo*) 在运动发酵单胞菌 ZM4 菌株中分别进行了表达。通过对 pHW20a 及其衍生质粒转化效率和稳定性的研究, 揭示了影响可移动质粒接合转化效率和稳定性的关键因素。

基于运动发酵单胞菌 *mdh* 基因表达重组菌的初步研究结果, 本论文对 *ppc* 基因在运动发酵单胞菌代谢中的作用进行了探讨。在现有报道中, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCase) 通常作为微生物的回补途径而用于草酰乙酸的合成。本研究通过同源重组, 将运动发酵单胞菌 ZM4 菌株中的 *ppc* 基因进行敲除。通过研究突变株在生长上对 *ppc* 基因缺失的响应, 证实运动发酵单胞菌以 PEPCase 途径作为由葡萄糖合成草酰乙酸的唯一途径而在合成代谢中发挥着极其重要的作用, 同时也揭示了运动发酵单胞菌不同于一般微生物的代谢特点。随后, 通过研究草酰乙酸对运动发酵单胞菌生长的促进作用以及 *ppc* 基因表达水平对宿主细胞生理代谢的影响, 初步确认 *ppc* 基因可能借助转录水平的变化而在其碳代谢和能量代谢上的调节作用, 进一步认识了运动发酵单胞菌非耦联生长的复杂调控机制。

基于 *gfo* 基因在运动发酵单胞菌中的过量表达, 对生物法制备山梨醇的催化细胞进行了发酵制备。并通过发酵过程变量分析, 获知了运动发酵单胞菌限制基因过量表达的潜在因素。利用 *gfo* 过表达菌株和金属离子抑制剂等手段, 明显提高了生物法制备山梨醇的过程效率和收率, 由此改善了限制生物法制备山梨醇应用的关键问题。

基于 *FDHI* 基因在运动发酵单胞菌中的表达, 甲酸代谢途径和 NADH 再生体系在该菌株中得到成功建立。*FDHI* 基因的表达, 使得重组菌在代谢甲酸的同时实现了 NADH 的再生, 从而显著改善了运动发酵单胞菌对甲酸和呋喃类抑制物的耐受性和 (或) 代谢性能。玉米秸秆水解液发酵实验证实, 重组菌的生长和乙醇发酵性能均得到了明显加强。重组菌乙醇发酵结束时, 其细胞浓度和乙醇收率比对照菌株均提高了一倍左右。通过本研究在运动发酵单胞菌体系中证实了加强胞内 NADH 水平可提高乙醇发酵菌株耐受和代谢呋喃类抑制物。本研究发现 NADH 的充分供给有可能在增强运动发酵单胞菌耐受

(或代谢) 芳香族抑制物上亦发挥重要的作用。

本学位论文通过对运动发酵单胞菌基因操作体系的改进及菌株生理和代谢的研究,总结了运动发酵单胞菌基因工程和代谢工程研究的一些基本规律,从而为推广运动发酵单胞菌在生物炼制过程的应用奠定了理论基础。

关键词: 运动发酵单胞菌; 穿梭质粒; 非耦联生长; 山梨醇生物制备; NAD^+ 依赖型-甲酸脱氢酶。

Construction of a *Zymomonas mobilis* Genetic Manipulation System and Its Applications in Biorefinery Processes

Abstract

Zymomonas mobilis is a gram-negative facultative bacterium with great potentials for biorefinery processes for its extraordinary ethanol fermentation performance and unique metabolic features. The research on the metabolic engineering of *Z. mobilis* will benefit this promising microorganism into the biorefinery applications. However, the present genetic manipulation systems for *Z. mobilis* have many problems, including low transformation efficiency, high false positive rate, relative big plasmid size, and extremely limited cloning sites in the vector etc. These problems severely restricted the extensive implementation of this unique strain in the field of metabolic engineering. In this thesis, the genetic manipulation system of *Z. mobilis* was improved and some heterologous and homologous genes were expressed in *Z. mobilis* ZM4 with improved shuttle vector, pHW20a. The physiology and metabolism of *Z. mobilis* were further studied with the constructed recombinant strains and several key problems hindering the application of *Z. mobilis* in biorefinery process were also studied.

Genetic engineering was an effective method for understanding the physiology of microorganism. The construction of a high efficient and convenient genetic manipulation system sufficient to genetic manipulation is also very important for reconstructing microorganism metabolic pathways. In this thesis, a shuttle vector, pHW20a, for *Z. mobilis* was constructed from the existed mobilizable pLOI193 plasmid by removing the redundant genes and integrating DNA fragments from various sources. Transconjugation experiments proved pHW20a was a efficient plasmid and its transformation efficiency was about two magnitudes higher than the previous pLOI193 shuttle vector. Using the newly constructed pHW20a, the *Escherichia coli* BL21 (DE3) *mdh* gene, the *Saccharomyces cerevisiae* *FDH1* gene, and *Z. mobilis* native *gfo* gene and *ppc* gene, which encode MDH, FDH, GFOR and PEPCase respectively, were expressed by pHW20a in *Z. mobilis* ZM4. The plasmid transformation efficiency and stability studies with constructed pHW20a derivatives unveiled the key factors influencing transconjugation efficiency and segregational stability.

Based on the previous expression results of *mdh* in *Z. mobilis* (pHW20a-*mdh*), the function of *ppc* gene in *Z. mobilis* ZM4 metabolism was further analyzed. Phosphoenolpyruvate carboxylase normally acts as an anaplerotic pathway enzyme for oxaloacetic acid production in some microorganisms. In this study, the *ppc* gene of *Z. mobilis* wild strain was disrupted by homologous recombination and the PEPCase pathway of *Z. mobilis* ZM4 was confirmed as the sole pathway for oxaloacetic acid synthesis from glucose, which was indicated by the distinct growth response of the mutant strain to *ppc* knock-out. The important role of PEPCase in the anabolism of *Z. mobilis* indicated the unusual metabolism of this ethanologenic bacterium. In the following study, the regulations of *ppc* gene to the carbon metabolism and energy metabolism in *Z. mobilis* at transcription level were preliminarily confirmed by *ppc* gene transcription study, the growth improvements of *Z. mobilis* with OAA supply and influence to recombinant cell growth from *ppc* expression at different levels. The foregoing experimental results proved the PEPCase pathway was important in *Z. mobilis* anabolism and partially participated in its uncoupled growth.

Based on the over-expression of *gfo* in *Z. mobilis* recombinant strain, the cells for sorbitol biotransformation were prepared and the potential factors hindering the gene over-expression in *Z. mobilis* ZM4 was also discovered by analyzing the key fermentation parameters. The utilization of *gfo* over-expression cells and metal ion inhibitors significantly improved the sorbitol productivity and yield. The problems existed in the sorbitol biorefining was relieved

by the strategies proposed in this study.

Based on the expression of *FDHI* the formate metabolic pathway and NADH regeneration system were established simultaneously in *Z. mobilis* ZM4. The expression of *FDHI* in *Z. mobilis* had the formate metabolism coupled with NADH regeneration in the constructed *Z. mobilis* recombinant cells and the tolerance or (and) metabolism of the recombinant strain to formate and furan inhibitors were improved consequently. The corn stover hydrolysate fermentation demonstrated the expression of *FDHI* in *Z. mobilis* recombinant cells was effective in improving the cell growth, ethanol productivity, and ethanol yields. At the same operation conditions, both the cell density and ethanol yield of the *FDHI* expressing recombinant strain were twice that much of the control strain at the end of *Z. mobilis* (pHW20a-*fdh*) fermentation. According to the previous reports, the improved supply of NADH can enhance the tolerances and metabolisms of some microorganism to furan inhibitors. The encouraging results confirmed this rule also to be effective in *Z. mobilis*. The improved tolerance to 4-hydroxybenzaldehyde, a lignin derivative compound, indicated the NADH regeneration system might also be involved in improving the tolerances (or even metabolisms) of *Z. mobilis* to aromatic inhibitors.

Some general genetic and metabolic rules of *Z. mobilis* were summarized during improving its genetic manipulation system and analyzing its physiology and metabolism in this thesis. The inspiring results enhanced the understanding of this ethanologenic strain and will definitely pave the way of applying this bacterium in the biorefinary process.

Key words: *Zymomonas mobilis*; shuttle vector; uncoupled growth; sorbitol biotransformation; NAD⁺-dependent formate dehydrogenase.

目 录

| | |
|--|----|
| 第一章 前言..... | 1 |
| 1.1 生物炼制与微生物的作用..... | 1 |
| 1.2 运动发酵单胞菌及其代谢的研究进展..... | 2 |
| 1.2.1 运动发酵单胞菌的发现、特点及分类..... | 3 |
| 1.2.2 运动发酵单胞菌基本代谢途径的研究进展..... | 4 |
| 1.3 运动发酵单胞菌中的非耦联生长现象..... | 6 |
| 1.3.1 非耦联生长——葡萄糖的快速代谢..... | 7 |
| 1.3.2 非耦联生长——ATP 溢出反应..... | 8 |
| 1.4 运动发酵单胞菌基因操作体系及其代谢工程研究进展..... | 9 |
| 1.4.1 运动发酵单胞菌基因操作体系的研究进展..... | 9 |
| 1.4.2 运动发酵单胞菌代谢工程研究进展..... | 11 |
| 1.5 立题目的及意义..... | 12 |
| 1.6 本论文主要研究内容..... | 13 |
| 1.6.1 运动发酵单胞菌基因操作体系的改进..... | 13 |
| 1.6.2 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶调控运动发酵单胞菌非耦联生长的初步研究..... | 13 |
| 1.6.3 重组运动发酵单胞菌应用于山梨醇生物催化制备过程的研究..... | 13 |
| 1.6.4 运动发酵单胞菌甲酸代谢途径和 NADH 再生体系的构建及其在玉米秸秆水解液发酵中的应用..... | 13 |
| 第二章 运动发酵单胞菌基因操作体系的改进..... | 14 |
| 2.1 前言..... | 14 |
| 2.2 材料与方法..... | 14 |
| 2.2.1 实验材料..... | 14 |
| 2.2.2 实验及分析方法..... | 19 |
| 2.3 结果与讨论..... | 25 |
| 2.3.1 穿梭质粒 pHW20a 的构建..... | 25 |
| 2.3.2 穿梭质粒 pBBR1MCS-2- <i>tc^r</i> 的构建..... | 43 |
| 2.3.3 <i>Gfo</i> 基因过表达菌株——运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 的构建..... | 45 |
| 2.3.4 <i>Mdh</i> 基因表达菌株——运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a- <i>mdh</i>) 的构建..... | 48 |
| 2.3.5 pHW20a 及其衍生质粒接合转化效率的比较..... | 55 |
| 2.3.6 pHW20a 及其衍生质粒在宿主中稳定性的研究..... | 56 |
| 2.3.7 借助 pHW20a 在运动发酵单胞菌中表达功能基因的应用..... | 57 |
| 2.3.8 运动发酵单胞菌 ZM4 批式发酵过程中 <i>ppc</i> 转录水平的研究..... | 59 |
| 2.4 小结..... | 60 |
| 第三章 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶在运动发酵单胞菌代谢过程中的作用..... | 62 |
| 3.1 前言..... | 62 |
| 3.2 材料与方法..... | 62 |
| 3.2.1 实验材料..... | 62 |
| 3.2.2 实验及分析方法..... | 66 |
| 3.3 结果与讨论..... | 67 |

| | | |
|---|---|-----|
| 3.3.1 | pUC19- <i>ppc::tc^r</i> 敲除质粒的构建 | 67 |
| 3.3.2 | <i>Ppc</i> 过表达质粒 pHW20a- <i>Pgap-ppc</i> 和 pHW20a- <i>Pppc-ppc</i> 的构建及转化 | 74 |
| 3.3.3 | 运动发酵单胞菌 ZM4 菌株生理代谢的初步研究 | 79 |
| 3.4 | 小结 | 82 |
| 第四章 运动发酵单胞菌重组菌应用于山梨醇生物制备过程的研究 | | 83 |
| 4.1 | 前言 | 83 |
| 4.2 | 材料与方法 | 83 |
| 4.2.1 | 实验材料 | 83 |
| 4.2.2 | 实验及分析方法 | 85 |
| 4.3 | 结果与讨论 | 87 |
| 4.3.1 | 利用 <i>gfo</i> 高表达菌株制备山梨醇生物催化细胞 | 87 |
| 4.3.2 | <i>Gfo</i> 高表达对山梨醇细胞催化反应的促进作用 | 88 |
| 4.3.3 | 金属离子对改善细胞催化反应性能的评价 | 90 |
| 4.3.4 | Zn ²⁺ 和 Ca ²⁺ 浓度对催化生产山梨醇的促进作用 | 92 |
| 4.3.5 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O 抑制与反复冻融对细胞催化生产山梨醇的性能评价 | 93 |
| 4.4 | 小结 | 94 |
| 第五章 运动发酵单胞菌甲酸代谢途径和 NADH 再生体系的构建及其在玉米秸秆水解液发酵中的应用 | | 95 |
| 5.1 | 前言 | 95 |
| 5.2 | 材料与方法 | 95 |
| 5.2.1 | 实验材料 | 95 |
| 5.2.2 | 实验及分析方法 | 98 |
| 5.3 | 结果与讨论 | 102 |
| 5.3.1 | 运动发酵单胞菌 <i>FDHI</i> 基因表达重组菌的构建 | 102 |
| 5.3.2 | <i>FDHI</i> 基因表达对运动发酵单胞菌甲酸代谢及甲酸耐受性的促进作用 | 107 |
| 5.3.3 | NADH 再生体系在运动发酵单胞菌中的建立及对胞内 NADH 水平的改善 | 108 |
| 5.3.4 | NADH 再生体系对运动发酵单胞菌咪唑类抑制物耐受性能改善作用的评价 | 110 |
| 5.3.5 | NADH 再生体系对运动发酵单胞菌代谢甲酸和咪唑类化合物的促进作用 | 111 |
| 5.3.6 | 在玉米秸秆水解液体系中 <i>FDHI</i> 基因表达对运动发酵单胞菌发酵性能的改善 | 113 |
| 5.3.7 | NADH 再生体系对运动发酵单胞菌耐受芳香族抑制物性能的促进作用 | 115 |
| 5.4 | 小结 | 116 |
| 第六章 结论与展望 | | 117 |
| 6.1 | 结论 | 117 |
| 6.1.1 | 运动发酵单胞菌基因操作体系的改进 | 117 |
| 6.1.2 | PEPCase 在运动发酵单胞菌代谢中的作用 | 117 |
| 6.1.3 | 运动发酵单胞菌重组菌应用于山梨醇生物制备过程的研究 | 117 |
| 6.1.4 | 运动发酵单胞菌甲酸代谢途径和 NADH 再生体系的构建及其在玉米秸秆水解液发酵中的应用 | 117 |
| 6.2 | 展望 | 117 |
| 附 录 | | 137 |
| 博士期间研究成果 | | 146 |
| 致 谢 | | 147 |

第一章 前言

生物炼制是以可再生生物资源为原料，生产能源与化工产品的新型工业模式。微生物细胞工厂是实现和推动生物炼制过程发展的核心。近代生物技术的发展，尤其是组学研究、系统生物学和合成生物学等新兴学科的兴起，更是为解决生物炼制过程中的关键问题提供了新的研究手段和新的思路。微生物的研究和开发以此为契机进入了一个全新的研究领域。

1.1 生物炼制与微生物的作用

早在上个世纪七十年代，由于全球性的第一次石油危机，人们开始反省经济运作过分依赖石油的安全性。而全球气候的恶劣变化和随后的每一次石油危机都愈发使人们认识到寻找可再生资源实现经济和社会可持续发展的紧迫性和必要性。

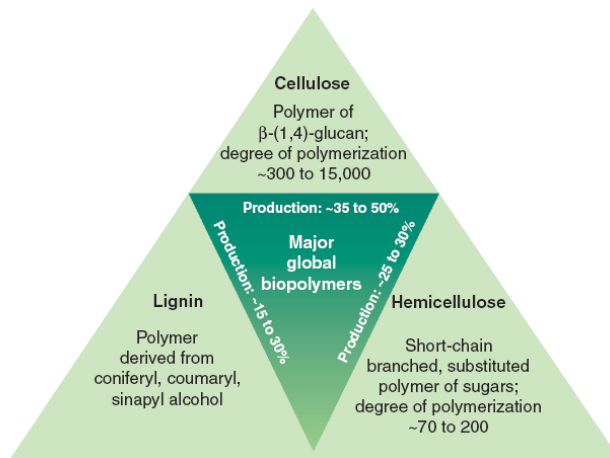


图 1.1 全球来源于农业废弃物、木材及草本能源作物的主要生物资源^[1]

Fig. 1.1 Key global biomass resources from agricultural residues, wood, and herbaceous energy crops

面对全球丰富的生物可再生资源（图 1.1），建立经济合理的糖平台将这些高分子聚合糖类转化为可以直接利用的单糖或碳源是生物炼制过程的基础。而通过从自然界筛选以及利用传统菌种选育和基因工程技术获取性质优良的微生物，是实现生物炼制过程不可缺少的环节。目前在生产生物能源和生物基化学品的产业链上，已经有一些微生物开始发挥细胞工厂的作用，而大量的基础研究和蓬勃兴起的系统生物学和合成生物学技术，也使得这些简单的生命体开始展露其不平凡的作用和广阔的应用前景（表 1.1）。

表 1.1 应用于生物炼制过程（或具有应用潜力）部分已报道的微生物及其作用

Table 1.1 Some microorganisms applied in (or have the potential for) biorefinary process and their functions according to the previous reports

| Biorefinary products | Microorganisms | References |
|----------------------|---|------------|
| Ethanol | Yeast, <i>Zymomonas sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , and <i>Corynebacterium glutamicum</i> etc. | [2-20] |
| Lipid | <i>Trichosporon fermentans</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Botryococcus braunii</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , and <i>Scenedesmus sp.</i> etc. | [21-26] |
| Hydrogen/ methane | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> - <i>Clostridium beijerinckii</i> , <i>Caldicellulosiruptor</i> , <i>saccharolyticus</i> , and Activated sludge etc. | [27-30] |

| | | |
|------------------------|---|-------------|
| Butanol/ acetone | <i>Clostridium sp.</i> etc. | [16, 31-38] |
| Lactic acid | <i>Rhizopus oryzae, Bacillus coagulans, and Lactococcus lactis</i> etc. | [39-43] |
| Sorbitol/Gluconic acid | <i>Z. mobilis</i> | [44] |
| 1,3-Propanediol | <i>Clostridium butyricum</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> etc. | [45-46] |
| Succinic acid | <i>Actinobacillus succinogenes</i> and <i>E. coli</i> etc. | [47-52] |
| Citric acid | <i>Aspergillus nige</i> and <i>Candida lipolytica</i> etc. | [53-56] |
| D-Malic acid | <i>Arthrobacter pascens</i> etc. | [57] |
| Cyanophycin biopolymer | <i>E. coli, Ralstonia eutropha, Corynebacterium glutamicum, and Pseudomonas putida</i> etc. | [58] |
| Caproic acid | <i>Ruminococcus flavefaciens-Clostridium kluyveri</i> etc. | [59] |
| Ethylene | <i>Saccharomyces cerevisiae, Enterobacter aerogenes, E. coli, Trichoderma reesei, Pseudomonas syringae, and Ralstonia solanacearum</i> etc. | [60-67] |
| | | |

鉴于传统石油化学工业中，仅有5%的石油被用于生产各类化学品，剩下约95%的石油则主要被用于生产运输燃料或者转化为各种形式的能源以满足经济和社会发展的需求^[68]。作为石油经济的替代（或补充）模式，生物炼制过程亦毫无疑问将遵循这一产品输出比例，即以生物能源生产为主导，生物基化学品的生产为辅。作为第一代生物燃料，由于燃料乙醇无论是生产工艺的成熟度还是可利用微生物的种类相比较而言都具有较好的产业化基础。长期发展的传统酒精酿造工业为生物质乙醇的生产提供大量可供借鉴的经验和丰富的种质资源。酵母（Yeast）和运动发酵单胞（*Zymomonas mobilis*）作为传统乙醇酿造工业的高效菌株，在长期的应用过程中其生理代谢和过程控制都已被进行了深入的研究，而大肠杆菌（*Escherichia coli*）作为遗传背景清晰并且基因工程改造相对容易的模式菌株，也有望作为应用于生物炼制过程的候选菌株而为人们所共识。

社会和经济对生物质能源低价格要求和高产出需求之间的矛盾一直是困扰生物炼制过程的关键问题，而生物基化学品高附加值的特点极有可能通过能源产品和化学产品生产过程的耦联而将这一矛盾有所缓解或解决。在大肠杆菌、酵母和运动发酵单胞菌这三种极有可能应用于生物质燃料乙醇生产过程的菌株中，运动发酵单胞菌一方面由于其极高的乙醇收率、高效的发酵效率、较低的细胞得率以及对发酵底物和产物浓度具有高耐受性而显示其独特的乙醇发酵生产特点；另一方面，运动发酵单胞菌独特的代谢途径，在生产生物基化学品方面也显露出巨大的应用潜力^[69]。通过对运动发酵单胞菌的深入研究和过程匹配，该菌株极有可能成为众多应用于生物炼制过程的微生物的重要一员。

1.2 运动发酵单胞菌及其代谢的研究进展

运动发酵单胞菌是一种革兰氏阴性兼性厌氧细菌，归类为变形细菌（*Proteobacteria*）纲alpha亚纲鞘脂单胞菌目（*Sphingomonadales*）鞘脂单胞菌科（*Sphingomonadaceae*）发酵单胞菌属（*Zymomonas*）（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=542>）。由于高效的乙醇发酵性能及其独特的代谢途径，在近一个世纪的研究历程中，该菌株在食品、医药、精细化工和能源等领域显示出巨大的应用潜力并得到了广泛的研究^[69-71]。面对生物炼制过程中出现的种种问题，通过近二十年间对运动发酵单胞菌的不懈研究，相关的工作也不断取得了一系列阶段性的成果。随着生物技术的发展，对该菌的研究更从简单的分离鉴定和培养发酵优化，逐步深入至菌种的选育和基因工程改造。组学的研究和各种生物芯片技术的出现，更给科研工作者深入了解运动发酵单胞菌，并将其改造成符合工业实际应用需要的菌株提供了一个良好的契机。

1.2.1 运动发酵单胞菌的发现、特点及分类

发酵单胞菌最早发现于欧洲国家的苹果酒 (Ciders) 酿造过程中。有关的记载最早出现于1903年的英格兰劳埃德 (Lloyd) [72-73]。当时在苹果酒的酿造过程中, 常常会出现苹果酒发酵紊乱的现象。通常苹果酒发酵紊乱的初期, 发酵液会表现出酒体浑浊的现象, 随即有大量气体产生。酒浆在甜度降低的同时, 酒液也逐渐失去原有的苹果酒风味。最后, 酒体又重新澄清, 但是在酿造容器的底部会出现大量的沉淀。当时把这种苹果酒发酵紊乱的现象称为“苹果酒病 (Cider sickness)” [73]。1911年, Barker和Hillier首次于英格兰从发酵变质的苹果酒中分离得到该菌, 并对导致苹果酒发酵紊乱的微生物进行了探讨。甚为可惜的是, Barker和Hillier并未对该菌株以拉丁文进行系统命名 [72]。直至1951年, Millis从苹果酒和梨酒 (Pperries) 中又分离得到了几种类似于Barker所报道的菌株, 并证实其中导致苹果酒变质的微生物为发酵单胞菌, 但这已距运动发酵单胞菌的首次命名和公开报道延迟了23年。在Barker和Hillier第一次发现发酵单胞菌之后, Linder于1923至1924年间以北美洲墨西哥当地龙舌兰汁液 (Agave) 酿造龙舌兰酒 (Pulque) 的研究过程中, 从酒浆中分离得到类似的菌株。Linder将该菌命名为运动端杆菌 (*Termobacterium mobile*), 并于1928年对其进行了首次公开报道 [72, 74-75]。随后, 从棕榈酒 (Palm wine) 和变质的桶装啤酒 (Keg beers) [76]等分离得到的不同来源的菌株相继也见诸报道, 并曾分别被命名为林氏假单胞菌 (*Pseudomonas lindneri*) [77], 运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobile*) [78], 厌氧白杆菌 (*Achromobacter anaerobium*) [79] 和林氏酿酒单胞菌 (*Saccharomonas lindneri*) [74, 80]等。直至二十世纪七十年代, Swings和De Ley等人利用现代分子生物学技术将前人报道的总共约40株不同来源的发酵单胞菌菌株进行了系统的研究, 并最终确认这些不同来源的菌株皆归属于同一菌种——运动发酵单胞菌种 [81-83]。表 1.2系援引于2006年Hermann Sahm对发酵单胞菌属表型的总体描述 (并根据最新文献报道略作修改) [72, 84]。

表 1.2 发酵单胞菌菌种的基本表型描述 [84]

Table 1.2 Basic phenotypic description of the genus *Zymomonas*

-
1. Gram-negative rods, 2- to 6- μm length, 1- to 5- μm width;
 2. Either motile or nonmotile; motility can be easily lost; one to four lophotrichous flagella;
 3. Pleomorphic cell arrangement, rosettes, chains, filaments;
 4. Spores, capsules, intracellular storage compounds (lipids, glycogen and poly- β -hydroxybutyrate) absent;
 5. Catalase, superoxide dismutase, and peroxidase positive, oxidase negative [85];
 6. Anaerobic and microaeroduric;
 7. Ferments glucose and fructose producing ≥ 1.5 moles of ethanol and CO_2 ;
 8. Sucrose utilization inducible, may be accompanied by levan production;
 9. No other monosaccharides, disaccharides, polysaccharides or fatty acids metabolized;
 10. Contains pentacyclic triterpenoids (hopanoids), vaccenic acid, and sphingolipids in its cell membranes;
 11. Forms sorbitol and gluconic acid from sucrose or glucose fructose (presence of a periplasmic enzyme, glucose-fructose oxidoreductase);
 12. G+C content, 47.5 to 49.5mol %; genome size approximately 2,085 kb.
-

总体而言, 运动发酵单胞菌只能利用一些简单的糖分 (例如: 葡萄糖、果糖和蔗糖) 用于乙醇发酵。同时, 该菌亦可耐受高浓度发酵底物和产物, 对葡萄糖和乙醇耐受浓度分别为30% (wt/vol) 和13% (wt/vol) [71, 77, 82]。在含有大量葡萄糖的发酵基质中, 运动

发酵单胞菌可迅速消耗大量的葡萄糖（超过95%）生成乙醇并释放出等摩尔的二氧化碳。整个发酵过程中，只有不超过3%的葡萄糖被用于细胞的生长^[82]。在氧存在的发酵条件下，运动发酵单胞菌可以借助细胞内的过氧化氢酶（Catalase）、超氧歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）或过氧化物酶（Peroxidase）解除氧分子对细胞的毒害作用^[85]。

表 1.3 发酵单胞菌亚种和亚种间的表型差异^[71, 82, 86-87]

Table 1.3 *Z. mobilis* subspecies and differential phenotypes

| Features | <i>Z. mobilis</i> subspecies | | |
|--|---|---------------------------|----------------------------|
| | <i>mobilis</i> | <i>pomaceae</i> | <i>francensis</i> |
| Growth in standard medium + 0.5% NaCl (0.2% bile salt) | Growth after 1-3 days | No growth | No growth or slight growth |
| Growth in standard medium at 36 °C | Growth after 1 day | Scant growth after 2 days | No growth or slight growth |
| Sucrose as a sole carbon source | Growth ^[88] | No growth ^[88] | Growth ^[86] |
| Growth in standard medium + 0.0075% KCN | Growth after 1-5 days | No growth | Not report |
| Final pH after 7 days of growth at 34 °C in standard medium | 4.9-5.4 | 4.7 | Not report |
| No. of amino acids stimulating growth | 0-5 (exact number depends on the individual strain) | 6 | Not report |
| Galactose, D-mannose, mannitol, and D-raffinose metabolism | Negative | Negative | Positive |
| Tolerance towards O ₂ | Various degrees of microaerophily | Most anaerobic strain | Not report |
| Similarity of 16S-23S rRNA ISR to <i>mobilis</i> subsp. | 100% | 94% | 87% |
| Similarity of HSP60 gene fragment to <i>mobilis</i> subsp. | 100% | 90% | 84% |
| Similarity of <i>gyrB</i> gene fragment to <i>mobilis</i> subsp. | 100% | 86% | 80% |

Cited from the report of Swings and De Ley^[82] and revised with the recent report of Coton, M. et al.^[86]. Standard medium contains 2% glucose + 0.5% yeast extract.

根据生长、代谢和基因型的差异，运动发酵单胞菌又可进一步细分为三个亚种，分别为：运动发酵单胞菌运动亚种（*Z. mobilis subsp. mobilis*，分离自龙舌兰酒浆和棕榈酒酒浆），运动发酵单胞菌梨亚种（*Z. mobilis subsp. pomaceae*，分离自变质的苹果酒和梨酒酒浆）和运动发酵单胞菌弗朗西斯亚种（*Z. mobilis subsp. francensis*，分离自法国的木莓白兰地酒）（见表 1.3）。运动亚种与后两种亚种最明显的性状差异是：运动亚种可以在高于36-40°C的温度范围生长^[82]，而梨亚种和弗朗西斯亚种则无法在36°C以上的范围内生长^[72, 82]。弗朗西斯亚种是2006年从法国苹果白兰地酒（French ‘framboise’ ciders）分离得到的菌株。该亚种的主要生理特点与梨亚种极为相似，但基因型更接近运动亚种。该菌种可直接利用高浓度蔗糖进行乙醇发酵，可利用的底物甚至还包括半乳糖、D-甘露糖、D-棉子糖和甘露醇^[83, 86]。在不同温度和底物浓度等条件下对乙醇发酵性能和发酵副产物浓度的比较，M. L. Skotnicki等人最终证实发酵单胞菌运动亚种的ZM4菌株是发酵单胞菌中最为理想的乙醇发酵菌株。鉴于ZM4菌株的优良生长特性和乙醇发酵性能，该菌株经常作为基础研究、基因工程改造和乙醇发酵过程应用的主要候选菌株^[89-91]。

1.2.2 运动发酵单胞菌基本代谢途径的研究进展

运动发酵单胞菌醇解途径的鉴定是该菌株研究历程中的第二个里程碑。早在 1936年 Dickens, F.就在动物组织中发现，除了 EMP 途径（Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP pathway）以外还可能存在着其它直接将磷酸葡萄糖氧化的代谢途径，该途径在当

时统称为“磷酸己糖分流”（Hexosemonophosphate shunt）的糖酵解途径^[92-93]。随后，这种包括磷酸戊糖途径在内的磷酸己糖分流途径陆续在细菌^[94-99]和动物组织^[92-93, 100]等多种生命体系中陆续被报道，并视为广泛存在于细菌及其它生物体系中的重要代谢途径。直至 1952 年，N. Entner 和 M. Doudoroff 以嗜糖假单胞菌（*Pseudomonas saccharophila*）为研究模型，并以 C¹⁴ 同位素标记的葡萄糖和葡萄糖酸为研究材料，通过科学实验确认有一种分流途径通过将 6-磷酸葡萄糖酸裂解转化成丙酮酸和三磷酸甘油醛而实现葡萄糖的酵解^[101]。为了纪念两位科学家的卓越贡献，后人将新发现的 6-磷酸葡萄糖酸直接裂解的代谢途径命名为 ED 途径（Etner-Doudoroff pathway, ED pathway）。1954 年，Martin Gibbs 和 R. D. Demoss 通过使用 C¹⁴ 同位素标记的葡萄糖研究发现，运动发酵单胞菌正是借助于 N. Entner 和 M. Doudoroff 报道的 ED 途径进行葡萄糖和果糖的乙醇酵解^[102]。由此，人们对运动发酵单胞菌的生理和代谢认识进入了一个全新的阶段。随着 1991 年对编码 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶基因鉴定的完成^[103]，人们终于揭开运动发酵单胞菌乙醇代谢途径的神秘面纱（表 1.4）。尽管 ED 代谢途径随后在包括诸多古细菌（*Archaea*）在内的微生物中相继被发现^[104-105]，甚至在大肠杆菌等好氧微生物中也发现了该途径^[99, 106-110]，但作为一个仅利用 ED 代谢途径实现酵解和底物水平磷酸化的微生物，运动发酵单胞菌无论在应用研究还是代谢的基础理论研究中都具有相当重要的研究价值^[111]。

表 1.4 运动发酵单胞菌酵解途径的酶及其基因

Table 1.4 Enzymes relevant to glycolytic pathway of *Z. mobilis* and their genes.

| Gene | Function/enzyme | References of the genes |
|-------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Glf</i> | Glucose/fructose transporter | [89, 112-116] |
| <i>Glk</i> | Glucokinase | [89, 113, 115, 117-120] |
| <i>Frk</i> | Fructokinase | [89, 117-118, 120-121] |
| <i>Pgi</i> | Glucose 6-P isomerase | [89, 122] |
| <i>Zwf</i> | Glucose 6-P dehydrogenase | [89, 113, 115, 120, 123-125] |
| <i>Pgl</i> | 6-Phosphogluconolactonase | [89, 126] |
| <i>Edd</i> | 6-Phosphogluconate dehydratase | [89, 113, 115, 127] |
| <i>Eda</i> | KDPG aldolase | [89, 103, 128-129] |
| <i>Gap</i> | Ga 3-P dehydrogenase | [89, 130-131] |
| <i>Pgk</i> | Phosphoglycerate kinase | [89, 130, 132] |
| <i>Pgm</i> | Phosphoglycerate mutase | [89, 130, 133] |
| <i>Eno</i> | Enolase | [89, 130, 134] |
| <i>Pyk</i> | Pyruvate kinase | [89, 130, 135] |
| <i>Pdc</i> | Pyruvate decarboxylase | [89, 136-142] |
| <i>AdhA</i> | Alcohol dehydrogenase I (zinc-dependent) | [89, 143-147] |
| <i>AdhB</i> | Alcohol dehydrogenase II (iron-dependent) | [89, 138, 143-145, 147-154] |
| <i>PdhA-D</i> | Pyruvate dehydrogenase complex | [89, 155-156] |
| <i>Gfo</i> | Glucose-fructose oxidoreductase | [89, 157-165] |
| <i>Gnl</i> | Gluconolactonase | [89, 166] |
| <i>SacA</i> | Sucrase (intracellular) | [89, 167] |
| <i>InvA</i> | Invertases A | [89, 168] |
| <i>SacB</i> (or <i>InvB</i>) | Sucrase or invertase B (extracellular) | [89, 168-171] |
| <i>LevU</i> (or <i>sacC</i>) | Levansucrase or sucrase C (extracellular) | [89, 170, 172-179] |
| <i>Ppc</i> | Phosphoenolpyruvate carboxylase or PEPCase | [89, 180] |

The genes with grey background indicate the enzymes participate in the branch reaction from ED (from glucose to ethanol) pathway.

根据以往报道可知,运动发酵单胞菌由于缺少编码6-磷酸果糖激酶的基因(Fructokinase, *frk*),因此无法形成完整的EMP酵解途径,而只能单一的依赖ED途径进行糖酵解及乙醇发酵^[89]。ED途径每代谢1摩尔葡萄糖仅能生成1摩尔三磷酸腺苷(ATP)、2摩尔乙醇和2摩尔的二氧化碳。与EMP酵解途径相比,ED代谢途径代谢生产高能磷酸化合物(ATP)的得率明显较弱。整个运动发酵单胞菌酵解途径中,受到PEP抑制的6-磷酸葡萄糖脱氢酶以及磷酸甘油酸变位酶是酵解途径的限制步骤^[124, 181]。在运动发酵单胞菌细胞内参与ED酵解途径的酶中,除编码乙醇脱氢酶I的基因(Alcohol dehydrogenase I, *adhA*)由于启动子以及密码子偏好性之原因导致表达水平较低以外^[146],其它参与由葡萄糖酵解生产乙醇代谢途径的基因均具有极高的表达水平,所有组成ED代谢途径的酶几乎占胞内可溶性蛋白的一半以上^[182]。在整个酵解途径中,编码葡萄糖促扩散蛋白(Glucose-facilitated diffusion transporter或glucose facilitator, *glf*)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, *zwf*)、6-磷酸葡萄糖酸脱水酶(6-phosphogluconate dehydratase, *edd*)和葡萄糖激酶(Glucokinase, *glk*)的基因按照顺序以单拷贝成簇的方式存在于运动发酵单胞菌的染色体上,并共同形成一个*glf*操纵子(*Glf operon*)。该操纵子的启动子与其它高表达基因的启动子高度同源,同时该操纵子的转录受到底物(葡萄糖和果糖)的差异性调控(果糖诱导的mRNA转录水平为葡萄糖诱导水平的三倍)。另外,该操纵子转录后的mRNA的稳定性也很高,在果糖和葡萄糖基质中的mRNA半衰期分别为(11.52分钟和12分钟)^[115]。虽然有报道表明,运动发酵单胞菌ED酵解途径中的葡萄糖激酶稳定性较差,但通过这种基因的高度表达弥补了自身酶稳定性不足的问题^[113],由此确保该操纵子中的各个基因表达产物所搭建的代谢途径具有极高的代谢通量。J. P. Mejia等人通过对编码参与酵解途径各个基因的转录水平以及mRNA稳定性总体分析发现,在运动发酵单胞菌基因组中尽管这些基因都以单拷贝的形式存在,但由于多种高表达调控机制的存在,从而保证在运动发酵单胞菌细胞内存在着极高的葡萄糖酵解代谢通量。例如,ED代谢途径上的一些基因在长期进化过程中形成多启动串联调控的模式(如*gap*, *Pgk*和*adhB*基因),因此其转录起始强度非常高^[131, 153-154];而6-磷酸葡萄糖异构酶(Glucose 6-P isomerase, *pgi*)的高转录水平则主要取决于该基因的开放阅读框(Open reading frame)前具有很强的Shine-Dalgarno序列^[122];2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶(KDPG aldolase, *eda*)和丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase, *pdh*)等编码基因的高表达,则由于这些基因拥有极强的核糖体结合位点(以及利用对应于高丰度tRNA的密码子),从而保证mRNA以非常高的效率进行翻译^[103, 140];同时,由于ED途径上的这些基因转录产生的mRNA稳定性也非常高,半衰期约为6-18分钟(其中稳定性最差的是受到果糖诱导表达的*frk*基因,其mRNA半衰期为6.2-6.6分钟;烯醇酶的mRNA稳定性最高,可达 17.7 ± 1.7 分钟),从而保证了这些基因胞内mRNA的水平。较高的转录(翻译)效率以及mRNA的高稳定性,保证了细胞内这些基因的表达在生长和发酵过程中始终保持在极高的水平^[103, 121, 134]。由于以上调控机制的存在,运动发酵单胞菌细胞内这些酵解途径基因的表达水平与合成代谢途径的基因相比具有绝对的优势,从而在葡萄糖底物和乙醇产物间建立起了一条酵解的“高速公路”。

1.3 运动发酵单胞菌中的非耦联生长现象

三磷酸腺苷(ATP)的生成和利用是生物体能量代谢的核心枢纽,通过该高能化合物的形成,能量借助于高能磷酸键的生成和水解完成了能量的转移,因此ATP是生物体是能量转移反应的中心(图1.2)。通常,微生物的合成代谢通过氧化磷酸化(包括底物水平磷酸化、呼吸链氧化磷酸化和光和磷酸化)与底物的分解代谢进行耦联,并以氧化磷酸化作为速率控制步骤。当这种氧化磷酸化的控制不存在,即生物合成速率成为控制因素时,非耦联新陈代谢就会发生,通常表现为维持能在能量代谢中的比重增大或者其

它无效能量消耗水平的显著提高, 这种现象称为非耦联生长 (Uncoupled growth)。Russel 和 Cook 对非耦联的定义是: 化学渗透氧化磷酸化作用不能产生以 ATP 为形式的最大理论能量, 即非耦联的氧化磷酸化作用^[183]。这表明 ATP 在分解代谢中的产生速率大于其在合成代谢中的消耗速率, 这样便会减少生物体的生成。

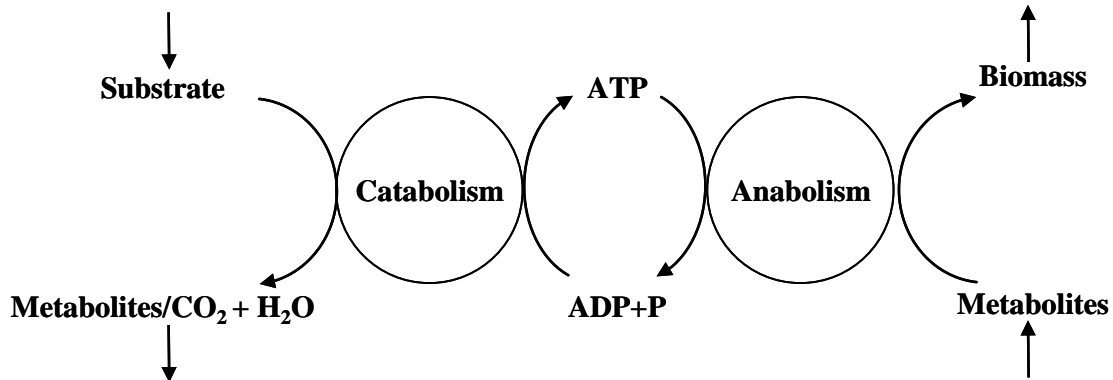


图 1.2 分解代谢和合成代谢关系图

Fig. 1.2 The diagram of the relationship between catabolism and anabolism

运动发酵单胞菌作为一种高效生产乙醇的菌种, 通过利用 ED 途径作为唯一的酵解途径实现底物水平的磷酸化和乙醇的生成。与传统的乙醇发酵菌株——酿酒酵母相比, 运动发酵不仅仅同样具有极高的乙醇得率, 而且单位细胞的催化效率更高。在厌氧的发酵条件下, 处于对数生长期的运动发酵单胞菌单位干重细胞催化代谢葡萄糖的速率为 $0.75\text{--}1.0 \mu\text{mol}/(\text{mg min})$, 是酿酒酵母代谢速率的 3~5 倍^[71, 184-187]。牛链球菌 (*Streptococcus bovis*) 作为另一个非耦联生长的革兰氏阳性严格厌氧细菌, 其葡萄糖代谢速率亦仅为运动发酵单胞菌的 4/6 至 5/6^[188]。由于在运动发酵单胞菌乙醇发酵过程中仅产生极少的菌体, 属于典型的非耦联生长, 因此对其独特代谢和生长特点的基础研究在近一个世纪的探索过程中始终从未停止过^[189]。

1.3.1 非耦联生长——葡萄糖的快速代谢

较低的能量产生效率 ($Y_{\text{ATP/S}}=1 \text{ mol ATP/mol glucose}$) 作为 ED 代谢途径的特点以及 ED 途径相关基因过量表达的代谢负担, 曾经在很长的时间里被认作是运动发酵单胞菌低细胞得率的内在原因^[10, 190]。然而在随后关于 ED 代谢途径相关酶的性质研究发现, 运动发酵单胞菌 ED 代谢途径上的许多酶都不存在变构调节效应 (Allosteric regulation)^[181, 191], 因此在乙醇代谢途径上的各个酶始终都保持极高的催化效率。由此可知, 在运动发酵单胞菌 ED 途径上的代谢通量主要取决于相关基因的表达水平以及各酶在细胞内的浓度。鉴于运动发酵单胞菌 ED 代谢途径相关基因在胞内以极高的水平得到表达, 因此该菌株可以快速的代谢和利用葡萄糖生成乙醇和二氧化碳 (图 1.3)^[184]。通过对运动发酵单胞菌的 ED 代谢通量以及能量生成效率分析可知, 该菌株的 ATP 比生成速率 ($Y_{\text{ATP/X}}$, mol ATP/g DCW) 并不逊色于酵母细胞, 甚至高于酵母的能量产生效率要高 3~5 倍^[71, 184-187]。根据以上信息分析可知, 尽管运动发酵单胞菌利用葡萄糖生成 ATP 的得率较低, 但由于其 ED 途径极高的代谢速率, 因此单位细胞中的能量供给得到了很好的保障。总而言之, 运动发酵单胞菌 ED 代谢途径的能量供应能力并非是导致该菌株出现非耦联生长的原因, 伴随着葡萄糖的高速消耗, 运动发酵单胞菌甚至需要一些途径将多余的 ATP 进行消耗, 从而实现 ADP 的再生以保证 ED 代谢途径的顺利运转^[186, 192-193]。该菌株在长期的进化过程之中之所以选择如此一条 ATP 产生效率较低的代谢途径, 亦有可能是为了适应其独特生理代谢的需求。

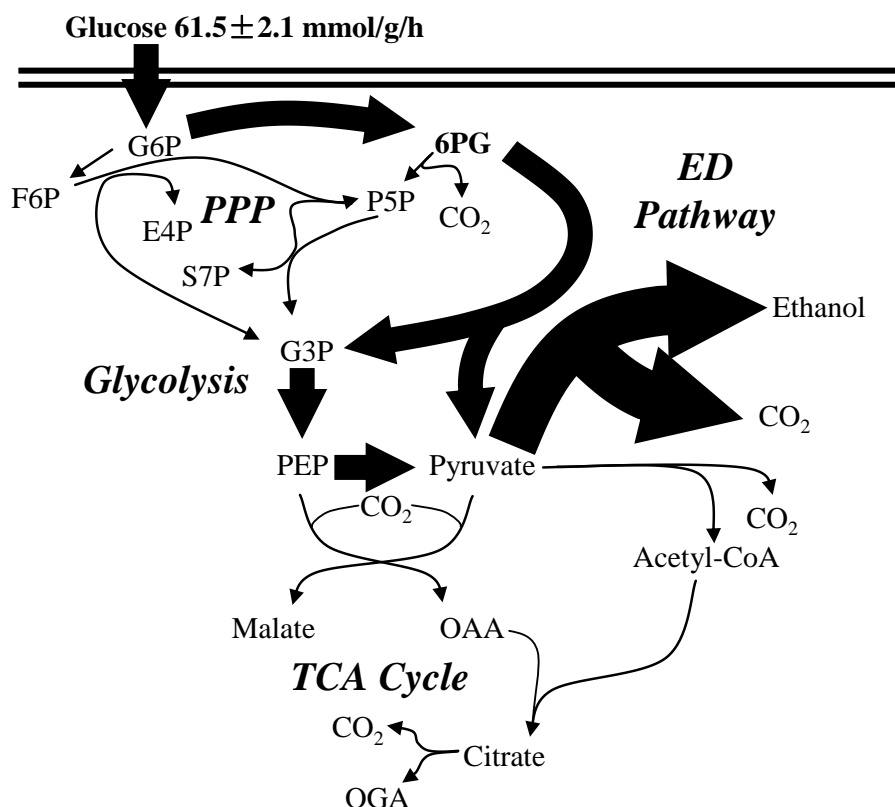


图 1.3 运动发酵单胞菌胞内碳代谢流分布

Fig. 1.3 *In vivo* carbon flux distribution in *Z. mobilis*

This diagram was cited from reference^[184]. All fluxes were normalized to the glucose uptake rate that is given at the top of each panel, and the widths of the arrows are scaled to the relative percentages of flux. Fluxes below 2.6% of the glucose uptake rate are represented by nonscaled hairlines. Larger confidence intervals were estimated for reactions with low flux. Abbreviations: G6P, glucose-6-P; 6PG, 6-P-gluconate; F6P, fructose-6-P; P5P, pentose-5-P; E4P, erythrose-4-P; S7P, sedoheptulose-7-P; G3P, glyceraldehyde-3-P; OGA, 2-ketoglutarate; PPP, PP pathway; Acetyl-CoA, acetyl coenzyme A.

1.3.2 非耦联生长——ATP溢出反应

人们曾经有很长时间认为，生物体经过长期进化能够选择最有效的方式对代谢过程生成的ATP加以利用。然而经过对细菌这一简单生命体生长和代谢的研究发现，在分解代谢过程中产生的ATP仅有很少一部分参与合成代谢，这部分能量不超过能量生成理论值的三分之一，其中维持能（Maintain energy）在剩下超过三分之二的能量中亦占有很少的比例。因此，根据能量的守恒规则，在生物体中必然存在其它途径对比例相当大的能量加以利用或者消耗。这种能量被用于生物合成代谢以外的现象称之ATP溢出反应（ATP-spilling reaction）或者能量溢出（Energy spilling）^[194]。

由于ED途径作为运动发酵单胞菌产生ATP的主要来源（ $Y_{ATP}=1 \text{ mol ATP/mol glucose}$ ），并且该菌可以由葡萄糖合成乙酰辅酶A（Acetyl-CoA），由此计算运动发酵单胞菌基于ATP的细胞得率理论值约为31.9 g DCW/mol ATP^[195]。根据以往报道，运动发酵单胞菌即使在厌氧和葡萄糖限制的条件下，其基于葡萄糖（或ATP）的细胞最大得率（ $Y_{Glucose}^{Max}$ ）亦仅为 10.8 DCW/mol glucose（等于 Y_{ATP}^{Max} ）^[196]。由此可知在所消耗的ATP中，有大量的能量被用于生长维持或者其它途径的代谢或消耗^[197]，即具有严重的能量溢出现象。将运动发酵单胞菌细胞加入至纯葡萄糖溶液后，葡萄糖依然可以在细胞量没有增加的情况下被高速的代谢生成乙醇，这足以证明在该菌株的细胞内含有ATP溢出反应或者ATP无效循环（Futile cycle）途径，并通过高效的代谢行为消耗掉大量多余的ATP，从而解除ATP对ED代谢途径上部分酶的反馈抑制以及实现ADP的循环^[118]。

膜结合的 H^+ -ATPase (ATP synthase complex、 F_0F_1 -ATPase、 Mg^{2+} -dependent ATPase 或 proton translocating ATPase) 广泛存在于各种细胞中, 并参与能量的代谢和调节。在不同细胞及生长状态下, 该酶既可催化 ATP 合成也可以催化 ATP 水解^[198]。在运动发酵单胞菌细胞中, 亦发现膜结合的 F_0F_1 -type H^+ -ATPase, 并发现其中一种具有质子泵的功能。该酶对 ATP 表现出很高的亲和力, 其催化 ATP 的代谢量占 ATP 循环总量的 20%^[193, 199-200]。另外, 在随后的报道中亦纯化鉴定了两种磷酸水解酶, 分别是酸性磷酸水解酶和碱性磷酸水解酶, 并推测这两种水解酶也很有可能参与了 ATP 的消耗过程^[201-203]。虽然质子泵 ATPase 参与了 ATP 的代谢过程, 但是该酶本身并不会直接导致能量的消耗, 这主要是由于该酶通过消耗 ATP 而将质子泵出膜外从而形成跨膜的质子动势 (Transmembrane proton-motive force, Δp), 从而完成不同能量形式的相互转换。通过研究发现, 处于指数生长期的运动发酵单胞菌, 当培养环境 pH 值由 5.6 降低至 3.5 时, 其胞内的 pH 值仅由 6.4 降低至 5.7。由此可见, 通过该菌通过质子泵 ATPase 等的调节作用, 可以将跨膜的 pH 梯度保持在两个单位以上。该现象似乎很好的支持了质子泵在维持胞内 pH 环境以及消耗 ATP 的作用。然而通过 ^{31}P NMR 对跨膜 pH 梯度进行检测却发现, 即使当培养环境的 pH 值在 6.0 时, 运动发酵单胞菌胞内 pH 值仍保持在相当低的水平 (不超过 6.4)^[181], 这一研究结果却无法解释质子泵 ATPase 在能量溢出过程中的作用。由于运动发酵单胞菌外膜的渗透性较差, 因此目前用于测量跨膜电位 (Transmembrane electric potential, $\Delta \psi$) 的电极无法获取膜质子导电率 (Membrane proton conductance) 等信息, 而运动发酵单胞菌跨膜的质子流 (Transmembrane proton flux) 的相关数据也未见报道^[189]。目前对于运动发酵单胞菌能量溢出的初步解释只是推测在该菌的细胞膜上很有可能存在着一个无效的质子循环 (Futile cycle of protons) 或跨膜质子的泄露 (Protons leakage), 从而导致质子泵 ATPase 参与了 ATP 溢出效应。在运动发酵单胞菌代谢后期, 大量乙醇或二氧化碳的积累或排放, 有可能改变了质膜渗透性引起跨膜质子势的消耗^[191, 204-207]。该推测目前被视为运动发酵单胞菌质子泄露或者无效质子循环的主要原因。

虽然曾有大量的科研工作者对 H^+ -ATPase 能量消耗 (或质子泄露) 的假设进行了大量的研究工作以验证其科学性, 然而根据以上报道不难发现, H^+ -ATPase 能量消耗理论仍疑点重重, 其中的部分论据亦彼此相悖, 有关的结论仍然有待进一步的验证和推敲。另外, 作为运动发酵单胞菌能量溢出的真相, 仅用 H^+ -ATPase 能量消耗理论, 也仅解释能量溢出 30% 左右的消耗量, 其余的能量消耗途径仍然不明。

1.4 运动发酵单胞菌基因操作体系及其代谢工程研究进展

1.4.1 运动发酵单胞菌基因操作体系的研究进展

运动发酵单胞菌不仅仅具有高效的乙醇代谢能力, 而且其中亦有多种具有特殊用的酶, 因此对其进行基因工程的研究亦从未停止过。作为基因工程改造的手段, 质粒作为基因工程改造过程中传输外源遗传信息的载体也是改造目的菌株遗传信息的工具, 在认识和改造运动发酵单胞菌的过程中也历经着不断的变迁和改进。基于不同转化手段和来源的形形色色的穿梭质粒, 极大的方便了对运动发酵单胞菌的研究 (见表 1.5)。

通常, 根据质粒的转移性质, 应用于运动发酵单胞菌基因操作的穿梭质粒可划分为转移质粒 (Mobilizable vector) 和非转移质粒 (Non-mobilizable vector)。其中电击转化和氯化钙转化法可以广泛的应用于各类质粒的转化, 而转移质粒则可借助于大肠杆菌 S-17 λ π 这类基因组上整合有 RP4 (或含有例如 RP4, R68.45, pUB307 和 pRK2013 这类辅助质粒^[208-210]) 的供体菌株 (Donor cells) 而转化至受体细胞 (Recipient cells) 中。具体而言, 应用于运动发酵单胞菌中的质粒共有两类来源: 其中一种是将来源于大肠杆菌的质粒 (例如, pBR322, pBR329 或 pACYC184 等) 与来源于运动发酵单胞菌自身的质

粒（例如，pZMP1，pNSW1，pNSW2 和 pZM2 等）经杂交后而获得的质粒^[209, 211-213]。这类质粒既带有大肠杆菌系统的复制子也带有运动发酵单胞菌系统的复制子，通过两套质粒复制系统的整合，从而确保杂合质粒可以在两种宿主进行复制。由于这类质粒通常不具有转移性质，因此只能利用电击转化或者氯化钙转化法将其转化至运动发酵单胞菌中^[211-212]。另一类，是在革兰氏阴性细菌广泛宿主质粒的基础上，通过结构优化而获得的穿梭质粒（既有直接运用的商业化或者成熟应用的质粒^[6, 214-217]，也有根据运动发酵单胞菌研究需要进行针对性改造的质粒^[159, 208, 218-223]）。这类质粒由于含有在革兰氏阴性细菌内均可以识别的复制子及 *mob* 基因，因此可采用接合转化法将其转化至运动发酵单胞菌中。鉴于氯化钙转化法对运动发酵单胞菌的转化效率不高，采取该法的相关报道极少。而运动发酵单胞菌的电击转化方法依然存在着诸如假阳性率较高等问题^[224]，因此适于运动发酵单胞菌接合转化法的质粒亦根据研究目的而不断有所改善及应用。在所有报道的可移动质粒中，pLOI193 系列质粒由于在其质粒结构上分别含有两种不同来源的 *mob* 基因，因此使得其转化效率比改造前的质粒高两个数量级^[222]。Conway, T., M. O. 和 L. O. Ingram 等人的工作大大方便了对运动发酵单胞菌的基因操作。然而，由于 pLOI193 的质粒尺寸过大，并且缺乏充足的酶切克隆位点和筛选标记，这也使得 pLOI193 的构建工作显得美中不足。

1.5 运动发酵单胞菌基因操作质粒及其基因工程改造历程

Table 1.5 The vectors used for *Z. mobilis* strains and the advance of genetic engineering *Z. mobilis* recombinant strains

| Vectors for <i>Z. mobilis</i> strains | Mobilizable or nonmobilizable | Functional genes to be expressed | Research | Reference |
|--|-------------------------------|--|--|-----------|
| pRD1, pJB4JI, R68.45, R1 <i>drd</i> 19 | Mobilizable | Null | F/C/E | [210] |
| RP4, pRD1, pGC91.14, R68.45, and pRK290 | Mobilizable (except pRK290) | Null | F/C/E | [215] |
| RP1 | Mobilizable | <i>LacZ</i> operon from Tn951 | Lactose utilization | [216] |
| pNSW601 | Non-mobilizable | Null | Transformation tested by CaCl ₂ | [213] |
| pCVD305 & pRK290 | Mobilizable | <i>LacZ</i> from pBR327 | F/C/E | [223] |
| pZA31, pZA32, & pZA33 | Non-mobilizable | Null | F/C/E | [225] |
| RP1 | Mobilizable | <i>LacZ</i> operon from Tn951 | Galactose utilization | [226] |
| pLOI193 | Mobilizable | <i>Gfo</i> from <i>Z. mobilis</i> ZM6 | <i>Gfo</i> overexpression confirmation | [159] |
| pZA22 | Non-mobilizable | Null | F/C/E | [211-212] |
| pZA22 | Non-mobilizable | Galactose operon (<i>galETK</i>) of <i>E. coli</i> | Galactose utilization | [227] |
| pZA22 | Non-mobilizable | Carboxymethylcellulase gene (ACM1) from <i>Acetobacter xylinum</i> | Carboxymethylcellulase utilization | [228] |
| pZA22 | Non-mobilizable | Cellulose (CMCase) gene of <i>Cellulomonas uda</i> CB4 | Carboxymethylcellulase utilization | [229] |
| pZA22 | Non-mobilizable | B-glucosidase gene from <i>Ruminococcus albus</i> (β g) | Cellobiose utilization | [230] |
| pKT210, pKT212, pKT248, pKT240, & pGSS33 | Mobilizable | Null | F/C/E | [208] |

| | | | | |
|---|-----------------|--|--|-----------|
| Sa | Mobilizable | Null | F/C/E | [231] |
| pNSW301 & pNSW312 | Mobilizable | Null | F/C/E | [231-234] |
| pLOI193 & pLOI204 | Mobilizable | Null/ <i>lacZ</i> from Tn951 | Galactose utilization | [222] |
| pZA24 | Mobilizable | Beta-glucosidase gene (<i>gluA</i>) from <i>Ruminococcm albus</i> ^[235] | Cellobiose utilization | [236] |
| pRK404 | Mobilizable | Beta-glucosidase gene from <i>Xanthomonas albilineans</i> XA1-1 ^[237] | Cellobiose utilization | [221] |
| pOK2 | Non-mobilizable | Null | F/C/E | [209] |
| pPTZ1, pPTZ3, & pPTZ4 | Non-mobilizable | Chloramphenicol acetyltransferase gene from Tn1736Tc | F/C/E | [238-239] |
| pRK404 | Mobilizable | α -glucosidase gene from <i>Bacillus brevis</i> | Maltose utilization | [240] |
| pPTZ4 | Non-mobilizable | <i>AlaD</i> from <i>Bacillus sphaericus</i> | L-alanine production | [241-242] |
| pZMOCPI | Non-mobilizable | Null | Integrative shuttle vector test | [243] |
| pZB186 (functionally equivalent to pZA22) | Non-mobilizable | <i>XylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tktA</i> and <i>talB</i> | Xylose utilization | [90] |
| pZB186 (functionally equivalent to pZA22) | Non-mobilizable | <i>AraA</i> , <i>araB</i> , <i>araD</i> , <i>tktA</i> and <i>talB</i> | Arabinose utilization | [244] |
| pBZIP1 | Mobilizable | <i>InaZ</i> gene of <i>Pseudomonas syringae</i> | Develop a reporter gene system | [220] |
| pBBR1MCS-2 | Mobilizable | <i>XylB</i> from <i>E. coli</i> | Enhance xylose metabolism | [214] |
| pJB99 | Non-mobilizable | <i>Pbp</i> in <i>cbpA</i> gene from <i>E. coli</i> K-12 | Enhancement of acid tolerance | [245] |
| pBBR1MCS-2 | Mobilizable | Glucoamylase genes (GA I) from <i>Aspergillus awamori</i> SG1 | Sweet potato starch utilization | [6] |
| pHW20a | Mobilizable | <i>Gfo</i> from <i>Z. mobilis</i> ZM4 | <i>Gfo</i> over-expression | [246] |
| pBBR3DEST42 | Mobilizable | <i>NhaA</i> gene from <i>Z. mobilis</i> ZM4 | Enhance tolerance to Na ⁺ | [218] |
| pBBR3DEST42 | Mobilizable | <i>Hfq</i> gene from <i>Z. mobilis</i> ZM4 | Enhance tolerance to biomass pretreatment inhibitors | [219] |

Cited from reference^[224] and updated (or corrected) with the recently published information. Null, no functional genes were expressed in the research work. F/C/E, the research work of the shuttle vectors in the reference was focused on the feasibility, characterization, and transformation efficiency.

1.4.2 运动发酵单胞菌代谢工程研究进展

通过表 1.5 分析可知, 对运动发酵单胞菌不断进行质粒改造和基因表达的过程, 亦是对该菌株进行深入研究和基因工程改造的历程。从 1984 年, A. Goodman 和 Peter L. Rogers 等人尝试将 *lacZ* 操纵子在运动发酵单胞菌进行表达以来, 对这一菌株的代谢工程研究就从未停止过^[216]。通过对表中的信息进行分析发现, 针对运动发酵单胞菌的基因工程改造主要集中于四个方面。首先, 通过一些基因的表达, 从而增加对该菌株生理、代谢和遗传信息的认识^[153, 159, 165, 214, 241, 247]; 其次, 通过将外源的基因进行表达, 从而在该菌株细胞内重构全新的代谢网路, 使其对发酵基质的可利用范围逐步由蔗糖、果糖、葡萄糖这类简单糖份扩展至木糖、阿拉伯糖、纤维二糖、半乳糖、甘露糖、棉籽糖和淀

粉等^[6, 90-91, 217, 221, 226, 230, 236, 240, 244, 248-250]；再次，通过将一些来源于运动发酵单胞菌性质优良的酶的编码基因进行过量表达，从而获得更具应用或研究价值的菌株（例如过量表达编码葡萄糖-果糖氧化还原酶编码基因 *gfo*）^[159, 246]；最后，通过将自身或者外源的基因在运动发酵单胞菌中进行表达，从而增强其在某些方面的特性^[218-219, 242, 249]。

虽然前人针对运动发酵单胞菌生理、代谢和遗传背景等方面已经取得了许多非常辉煌的研究成果，然而该菌株基础研究和基因工程改造方面仍然还留有继续深入研究的余地。例如，虽然对运动发酵单胞菌 *gfo* 基因表达的机理进行了大量的探讨^[160, 162, 164-165, 251-252]，然而该基因的翻译后修饰的机制仍然不清晰。由于利用大肠杆菌等工程菌对 *gfo* 的过量表达仍然无法实现，进行山梨醇生物制备的细胞目前仍然局限于运动发酵单胞菌野生菌株。获取大量廉价的酶制剂仍然是山梨醇生物制备的关键问题。虽然应用不同的工艺策略对山梨醇生物制备过程进行了优化（例如利用 CTAB、反复冻融以及超声波等细胞处理方法增强细胞通透性，从而强化催化过程的传质及山梨醇的收率）^[144, 157, 253-260]，但由于操作复杂、能量设备要求较高以及处理剂的加入不利于后期分离等原因，运用运动发酵单胞菌细胞进行山梨醇制备始终没有十分理想的生产工艺。另一方面，通过将一些糖类代谢的相关基因在运动发酵单胞菌中进行表达，实现了该菌株可利用底物范围的逐步扩大，但运动发酵单胞菌在生物质水解液这一恶劣环境的适应能力和发酵性能仍然远远不能满足生物炼制过程实际应用的需要。最近，Yang 等人通过对运动发酵单胞菌一株耐受乙酸突变株的基因组信息进行了分析，并发现了该突变株可以耐受 Na^+ 的等位基因，亦对其功能进行了验证^[218]。但鉴于生物质水解液主要抑制物的复杂性，除了乙酸钠仍有大量其它抑制物在通过协同作用对该乙醇发酵菌株的生长和代谢产生毒害作用，相关研究仍然有待继续深入。

1.5 立题目的及意义

运动发酵单胞菌性质独特、代谢方式特异，美国杜邦公司（DuPont）和布罗因公司（Broin Company）皆看好该菌株，并期望通过合作开发出极具商业应用价值的运动发酵单胞菌基因重组菌株，并将其应用于木质纤维素燃料乙醇的工业生产过程中（http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article_id=2624）。另外，来源于运动发酵单胞菌的酶制剂也开始应用于许多有价值化学品的生产过程中^[69]。但基于运动发酵单胞菌遗传操作体系、代谢调控机制以及基因工程改造的现有研究报道分析可知，目前对该菌株的研究仍有不足。

首先，现有应用于运动发酵单胞菌基因工程改造中的遗传操作体系仍然存在一些不足之处。虽然 pLOI193 穿梭质粒的构建能够使接合转化法较好的弥补电转化假阳性高以及氯化钙转化法效率低的问题，然而其有限的克隆位点以及较大的质粒尺寸仍然无法满足运动发酵单胞菌基因工程改造的需求。

另一方面，通过对运动发酵单胞菌非耦联生长的研究成果分析可知，目前对该菌株的基本生理代谢等方面的认识仍然不足。尤其是与运动发酵单胞菌生长密切相关的非耦联生长现象的生理意义和调控机制目前仍然缺乏全面的了解。甚至 H^+ -ATPase 在该菌株能量溢出中的调控作用，自今也无法给出全面合理的解析^[189]。开展相关研究将有助于增强对该菌株代谢网络以及调控机制的认识，同时为进一步合理设计并通过基因工程手段改造该菌株提供相关研究依据。

最后，目前应用生物炼制过程的运动发酵单胞菌重组菌的性质及其过程工艺条件仍有待进一步改善。具有优良性质的工程菌株是生物炼制过程得以实现的重要基础，而操作工艺的优化更是使过程经济化和合理化的必经之路^[69]。

本论文针对以上问题，分别进行了不同程度的探讨，并获得了一些有意义的结果。

1.6 本论文主要研究内容

本论文对运动发酵单胞菌基因操作体系的改进，并将其应用于该菌株基因工程改造和生物炼制过程的研究主要分为以下四个方面：

1.6.1 运动发酵单胞菌基因操作体系的改进

本研究以Conway, T.和L. O. Ingram等人构建之pLOI193质粒为出发，通过结构优化和引入筛选标记及多克隆位点，从而希望能够获得具有较低分子量、结构精简、转化效率提高、克隆位点较多以及方便筛选的一个工具质粒。其次，将来源于大肠杆菌的苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*)、来源于酿酒酵母的NAD⁺-依赖型甲酸脱氢酶基因 (*FDHI*)、和来源于自身的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 (*ppc*) 和葡萄糖-果糖氧化还原酶基因 (*gfo*) 分别借助于新构建的载体 (pHW20a) 在运动发酵单胞菌中进行了表达，从而对新构建质粒在代谢工程研究的适用性进行了分析。最后，通过对pHW20a及衍生质粒稳定性和转化效率的分析，考察了pHW20a质粒在基因表达和代谢研究中的基本性能，并对影响可移动质粒接合转化效率的重要因素进行了分析。

1.6.2 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶调控运动发酵单胞菌非耦联生长的初步研究

为了在运动发酵单胞菌代谢网络中重构TCA循环，本研究尝试借助pHW20a质粒和运动发酵单胞菌*ppc*基因的启动子，将大肠杆菌的*mdh*基因在运动发酵单胞菌中进行表达，并对*ppc*基因转录水平进行分析，以获取一个弱启动子以应用于运动发酵单胞菌的代谢工程研究。同时，将运动发酵单胞菌*ppc*基因进行敲除以及借助pHW20a质粒将*ppc*基因在运动发酵单胞菌中进行不同程度的过量表达，以及考察添加草酰乙酸对菌体生长的影响，从而对*ppc*基因在运动发酵单胞菌生理代谢中的调控作用进行了分析。

1.6.3 重组运动发酵单胞菌应用于山梨醇生物催化制备过程的研究

借助运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 菌株的发酵研究，对影响运动发酵单胞菌过量表达蛋白的潜在限制性因素进行了分析。同时，针对目前生物法制备山梨醇的关键问题在本论文中也进行了研究并提出了一些有效的策略。

1.6.4 运动发酵单胞菌甲酸代谢途径和NADH再生体系的构建及其在玉米秸秆水解液发酵中的应用

鉴于生物质水解液中甲酸和呋喃化合物对运动发酵单胞菌生长和乙醇发酵的抑制作用，本论文尝试借助pHW20a质粒在运动发酵单胞菌细胞中建立起（或加强）相应的代谢途径，以便能够从根本上解决抑制物对运动发酵单胞菌细胞的毒害作用。同时，针对以往报道NAD(P)H可以增强乙醇发酵菌株代谢呋喃抑制物的论断，在运动发酵单胞菌单胞菌体系内进行了求证。最后，针对所构建的*FDHI*基因重组菌在玉米秸秆水解液体系中发酵性能明显改善的现象，初步探讨了NADH再生体系对运动发酵单胞菌耐受芳香族抑制物的改善作用。

第二章 运动发酵单胞菌基因操作体系的改进

2.1 前言

从自然界分离到的运动发酵单胞菌野生菌株 (*Zymomonas mobilis*) 是一种仅能利用诸如葡萄糖, 果糖和蔗糖等简单糖类的乙醇高效发酵菌株。该菌株为革兰氏阴性厌氧菌, 利用特殊的Entner-Doudoroff途径 (ED pathway) 进行底物磷酸化和乙醇生产。为了将该菌株利用基因工程等手段改造成为可以直接利用基于木质纤维素进行燃料乙醇和生物炼制过程的优良菌株, 国内外学者针对该菌株进行了大量的代谢工程和应用研究^[69]。通过将来源于其它菌株的诸如编码纤维二糖酶、木糖异构酶、木糖激酶、阿拉伯糖异构酶等基因在野生运动发酵单胞菌中进行表达, 从而使运动发酵单胞菌重组菌株可利用碳源谱扩展到纤维二糖、木糖、阿拉伯糖和乳糖等^[90, 230, 240, 244]。前人的工作极大的促进了该乙醇发酵菌株的工业应用。其中一些基因工程菌株已经被尝试直接应用于木质纤维素乙醇的发酵过程^[8, 91, 261-262]。

尽管有关运动发酵单胞菌基因操作体系及代谢工程研究已有大量的报道, 然而电转化法假阳性率高、氯化钙化学转化法效率低和可移动质粒基因操作困难等诸多问题一直未能完全解决。本文以pLOI193质粒作为出发质粒, 通过对其质粒结构优化并引入*lacZ α* 基因及多个克隆位点, 从而获得一个同时具备高接合转化效率和充足克隆位点的穿梭质粒pHW20a。为证实pHW20在实际基因操作过程中的可行性, 本学位论文通过将运动发酵单胞菌自身的*gfo* (Gene ID: 3187982) 和*ppc* (Gene ID: 3187638) 基因, 来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 的*mdh*基因 (Gene ID: 8180871) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) S288c的*FDH1*基因 (Gene ID: 84626310) 分别借助pHW20a在运动发酵单胞菌ZM4菌株中进行了表达。通过对本学位论文所构建一系列质粒接合转化效率和质粒稳定性的考察, 发现了影响可移动质粒接合转化效率的关键因素, 并同时影响质粒稳定性的因素进行了分析。本章通过将*gfo*基因高表达质粒 (pHW20a-*gfo*) 转化至运动发酵单胞菌ZM4菌株, 从而实现葡萄糖-果糖氧化还原酶 (Glucose-fructose oxidoreductase) 基因在运动发酵单胞菌中的过量表达。同时, 通过将来源大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 的苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase, MDH) 基因借助于pHW20a质粒在ZM4菌株中进行表达, 实现了运动发酵单胞菌ZM4菌株不完整TCA循环MDH缺失途径的回补。通过对*mdh*基因重组菌的发酵研究以及ZM4野生菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCase) 基因转录水平的分析, 确认*ppc*基因的启动子为弱启动子, 并揭示*ppc*基因可能通过限制运动发酵单胞菌合成草酰乙酸而参与运动发酵单胞菌的非耦联生长调控过程。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 菌株和质粒

运动发酵单胞菌ZM4 (*Z. mobilis* ZM4, ATCC 31821) 和ZM6 (*Z. mobilis* ZM6, ATCC 29191) 菌株分别购自于美国典型菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockvill, MD, USA)。pLOI193质粒由L. O. Ingram教授实验室慷慨馈赠 (University of Florida, USA)。大肠杆菌DH5 α 用于基因克隆及质粒构建等基因操作。大肠杆菌S 17-1 λ π 用于运动发酵单胞菌双亲本接合转化操作。其它菌株及质粒详见表 2.1。

2.2.1.2 主要试剂

DNA分子量标准品购自于日本TAKARA大连分公司或天根生物科技有限公司。蛋白质分子量标准品购自于日本TAKARA大连分公司。本研究所用寡核苷酸皆由Primer V5.0根据NCBI公布之基因序列自行设计，并由上海生物工程技术有限公司合成。合成引物的纯度及分子量皆经聚丙烯酰胺电泳和质谱鉴定（详见表 2.2）。

表 2.1 本研究涉及之菌株及质粒

Table 2.1 Strains and plasmids used in this study

| Strains/plasmids | Features ^a | Source/reference |
|--|---|------------------|
| Strains | | |
| <i>Z. mobilis</i> ZM4 | Wild type, ATCC 31821. | From ATCC |
| <i>Z. mobilis</i> ZM6 | Wild type, ATCC 29191. | From ATCC |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F ⁻ , ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i> . [263] | |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3). | Novagen |
| <i>E. coli</i> S17-1 λ π | <i>Pro, res⁻, mod⁺</i> ; chromosomal integrated RP4; 2- <i>Tc::Mu-Km::Tn7;Tp, sm</i> . [264] | |
| Plasmids | | |
| pUC19 | <i>Ori</i> (pMB1 mutant), <i>amp^r</i> , MCS, <i>lacZα</i> ; cloning vector. [265] | |
| pBR322 | <i>Amp^r, tc^r, Ori</i> (pMB1); <i>Tc^r</i> donor vector. [266] | |
| pBBR1MCS-2 | <i>Km^r, oriV, mob</i> (RK2), 5.1 kb. [267] | |
| pBBR1MCS-2- <i>tc^r</i> | <i>Tc^r</i> , pBBR1MCS-2 derived plasmid, 5.2 kb. In this study | |
| pLOI193 | <i>Cam^r, tc^r, mob</i> (RSF1010), <i>mob</i> (RP4), <i>ColE1</i> and <i>oriV</i> . [222] | |
| pET-28a (+) | <i>Km^r, ori</i> pMB1, T7 promoter/terminator. Novagen | |
| pUC19- <i>mdh</i> | Plasmid with <i>mdh_{Ec}</i> subcloned into pUC19. In this study | |
| pET-28a- <i>mdh</i> | Over-express <i>mdh_{Ec}</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3). In this study | |
| pUC19DN | pUC19 derived plasmids without NdeI site. In this study | |
| pUC19DN- <i>Pppc</i> | Plasmid with <i>ppc_{Zm}</i> promoter subcloned into pUC19DN. In this study | |
| pUC19DN- <i>Pppc-mdh</i> | Express <i>mdh_{Ec}</i> under the control of <i>ppc_{Zm}</i> promoter in <i>Z. mobilis</i> strain. In this study | |
| pUC19- <i>gfo</i> | Plasmid subcloned <i>gfo_{Zm}</i> complete gene. In this study | |
| pUC19- <i>tc^r</i> | Plasmid subcloned <i>tc^r</i> complete gene from pBR322. In this study | |
| pUC19- <i>mob</i> (RP4) ^{pre} | Plasmid subcloned <i>mob</i> (RP4) from pLOI193. In this study | |
| pUC19- <i>mob</i> (RP4) | Plasmid deleted the fragment flanked by two EcoRI sites in pUC19- <i>mob</i> (RP4) ^{pre} . In this study | |
| pUC19- <i>mob</i> (RP4)- <i>tc^r</i> | Plasmid with combined <i>mob</i> (RP4) and <i>tc^r</i> genes. In this study | |
| pHW10a | <i>Tc^r, mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010) and <i>oriV</i> . In this study | |
| pHW20a | <i>Tc^r, mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZα</i> , MCS and <i>oriV</i> . In this study | |
| pHW20a- <i>mdh</i> | Express <i>mdh</i> in <i>Z. mobilis</i> with <i>ppc</i> promoter of ZM4. In this study | |
| pHW20a- <i>gfo</i> | Over-express <i>gfo</i> with its native promoter in <i>Z. mobilis</i> . In this study | |

^aZm, gens from *Z. mobilis* ZM4. Ec, genes from *E. coli* BL21 (DE3).

表 2.2 本研究涉及之引物
Table 2.2 Oligonucleotides used in this study

| Primer No. | Primer name ^b | Sequence (5'→3') |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 1 | <i>Mdh-S</i> | CGGGATCCCATATGAAAGTCGCAGTCCTCGG |
| 2 | <i>Mdh-A</i> | GGAATTCTTACTTATTAACGAACTCTTCGCCC |
| 3 | <i>Gfo-S</i> | CGGAATTCTCGAAATTAACGATCACCCAC |
| 4 | <i>Gfo-A</i> | GCTCTAGACCATGGTCAATAACCACCCTGACGG |
| 5 | <i>Pppc-S</i> | CGCGGATCCGCGGTGGCGTCTATGAGAGCATG |
| 6 | <i>Pppc-A</i> | CGGAATCCCCGGGCATATGAAACCATCCCTTTGCCTA |
| 7 | <i>Tc^r-S</i> | AACTGCAGCATGTTTGACAGCTTATCATCG |
| 8 | <i>Tc^r-A</i> | GGAATTCATGGTTCATTTCAGGTCGAGGTG |
| 9 | <i>LacZ-S</i> | AGATCTACGCGTCTATGCGGCATCAGAGCAG |
| 10 | <i>LacZ-A</i> | GCGGCCGCTCGAGTAGCTCACTCATTAGGCACCC |
| 11 | QRT- <i>gap-S</i> | GATATCGTGATGGAATGCAC |
| 12 | QRT- <i>gap-A</i> | GAGCCAAGCAGTTGGTGG |
| 13 | QRT- <i>ppc-S</i> | GCCCTGAATCCATTACGA |
| 14 | QRT- <i>ppc-A</i> | GCTTGAACCATTCCTCCA |

^bWords in italic style, the target genes; qRT, the primer paires used for real-time qRT-PCR; S, sense primer; A, anti-sense primer.

细菌基因组抽提试剂盒 (Qiagen DNeasy Tissue Kit) 购自美国Qiagen公司 (Valencia, CA, USA)。TRIzol[®]试剂购自美国Invitrogen公司 (Carlsbad, CA, USA)。RNase-free DNase I和反转录第一条cDNA链试剂盒 (RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自加拿大Fermentas公司 (MBI Fermentas, Canada)。PCR产物纯化试剂盒 (PCR Purification Kit), 胶提取试剂盒 (Gel Extraction Kit)和质粒抽提试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 均购自美国Omega生物工程公司 (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA); 卡那霉素 (Kanamycin, Km), 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp), 异丙基 β -D-巯基半乳-吡喃糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside, IPTG), 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS), 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris-(hydroxymethyl) aminomethane, Tris base), 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB), 焦炭酸二乙酯 (Diethylpyrocarbonate, DEPC) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-Gal) 均购自美国Amresco公司 (Cleveland, OH, USA)。西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain)。氯霉素 (Chloramphenicol, Cm), 四环素 (Tetracycline, Tc), 萘啶酸 (Nalidixic acid, Na), 草酰乙酸 (Oxalacetic acid, OAA), 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (N-morpholinoethanesulfonic acid, MES) 和对-硝基苯酚 (*p*-nitrophenol) 购自于比利时Acros Organics化学公司 (Geel, Belgium)。酵母提取物 (Yeast extract) 和胰蛋白胨 (Tryptone) 购自于英国Oxoid有限公司 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)。牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 和还原性辅酶I (NADH) 购自于美国Sigma-Aldrich公司 (St. Louis, MO, USA)。培养基的配制使用去离子水, 其它分析检测和基因操作使用Milli-Q Synthesis制备的超纯水 (本章中随后简称为超纯水)。其它试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自于国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。

本研究所使用之DNA和蛋白质分子量标准品电泳条带分布如下:

DNA分子量标准品——

1 kb Plus DNA Ladder (bp) : 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 10000;

2000 bp DL (bp) : 100, 250, 500, 750, 1000, 2000;

250 bp DL (bp) : 250, 500, 750, 1000, 1500, 1750, 2250, 3000, 4500;

Marker Wide Range 12000 bp (bp) : 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 12000。

低分子量蛋白标准品——

Low molecular weight (kDa) : 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1, 14.3。

2.2.1.3 实验仪器

主要仪器:

Thermo scientific Forma -86C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA); Eppendorf Research 移液器 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Mastercycler PCR 仪 (Eppendorf 公司); Mastercycler® ep realplex 2S detection system (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); 5415R 小型高速冷冻离心机 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); 5430 Thermomixer compact 微型摇床 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Mini-Sub Cell GT 水平电泳槽 (Bio-Rad 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Power Pac 3000 通用电源 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统 (Millipore Corporation, MA, USA); LC-20AD 送液泵 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); RID-10A 示差检测器 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); CTO-10AS VP Plus 柱温箱 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); 全自动紫外与可见分析装置 FR-200A (复日科技); BS423S 和 BS224 电子天平 (Sartorius Group, Goettingen, Germany); DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); Avanti J-26 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); QL-901 型旋涡混合器 (江苏海门其林贝尔); LX-100 手掌型离心机 (江苏海门其林贝尔); YXQ-LS-75S II 立式压力蒸气灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司); JY92-II 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司); KWT-100A 超声波清洗机 (科伟达超声波设备有限公司); GHP-9160 恒温恒湿培养箱 (上海一恒科技有限公司); HZ-9311K 落地恒温振荡摇床 (太仓华利达有限公司); SDC-6 恒温水槽 (宁波新芝生物科技有限公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); XB-100 制冰机 (宁波格兰特制冷设备制造有限公司); CD-239VC 冰箱 (海尔公司); PHS-3C pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); Biotech-4BG 3L 四联发酵罐 (上海保兴生物工程设备有限公司)。

主要耗材:

Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); 200 μ L PCR-2CP-RT-C 和 200 μ L thin-wall 8 strip PCR tubes (Axygen Scientific Inc, CA, USA); Whatman 1 号滤纸 (Whatman International Ltd.); 封口膜 PM-996 (Parafilm® M PM-996, American National Can, Chicago, IL, USA); 0.22 μ m 和 0.45 μ m 混合纤维素滤膜 (上海迪清过滤技术有限公司)。

本研究样品分析测定所需玻璃器皿首次使用, 皆以0.1 N HCl浸泡12 h, 并以洗洁精刷洗干净。用自来水冲洗9次, 并根据需要用去离子水或超纯水润洗3~5次, 烘干待用。

2.2.1.4 培养基、培养条件及菌种之保存

本研究大肠杆菌培养基为 Luria broth (LB) 培养基^[268]: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 以及 10 g/L NaCl。如需配置琼脂固体培养基, 则添加 1.5 g/L 琼脂粉。用 5 N

NaOH 调节 pH 值至 7.0, 于 115 °C 高温灭菌 20 min^[268]。如培养含有抗性质粒的菌株, 则在培养前在液体培养基中添加所需浓度的抗生素。抗性平板则需在琼脂培养基灭菌冷却至 60 °C 左右, 添加所需浓度的抗生素并在超净操作台中将摇匀的液态琼脂培养基倒入 9 cm 无菌培养皿中。待培养基冷却凝固, 将培养皿置于 4 °C 保存待用。如无特殊说明, 大肠杆菌的培养条件均为: 以无菌牙签从固态琼脂培养基平板上挑取单菌落接种于 20% (vol/vol) 培养基装液量的摇瓶 (或 5 mL 培养基装液量的试管 10×150 mm) 中, 并将其置于 37 °C, 220 rpm 培养 12 h。所获得的菌液用于质粒抽提、基因组 DNA 制备、菌种的保藏及其它用途。

大肠杆菌感受态细胞制备培养基: 10 mmol MgSO₄, 2.0 g 葡萄糖, 10.0g NaCl, 5.0g 酵母提取物, 10.0 g 胰蛋白胨。培养基以 5 N NaOH 调节培养基 pH 值至 7.0, 以量筒分别量取 500 mL 该培养基装于 2 L 三角摇瓶中。以八层纱布和一层牛皮纸包扎摇瓶, 并于 115 °C 高温灭菌 20 min 冷却待用。

本研究中培养运动发酵单胞菌及基因重组菌之种子培养基均为 RM 培养基 (或含有 20 µg/mL 四环素的 RM 培养基, 简称为 RT 抗性培养基)。培养基组成为: 10 g/L 酵母提取物, 2 g/L KH₂PO₄, 以及 20 g/L 葡萄糖, 以 5 N NaOH 调节 pH 值至 6.0。如需配置固体琼脂培养基, 则添加 1.5 g/L 琼脂粉。灭菌条件为, 115 °C 灭菌 20 min。四环素在培养基中的添加参考 LB 抗性培养基的制备方法。如无特殊说明, 运动发酵单胞菌的培养条件均为: 以无菌牙签从固态琼脂培养基平板上挑取单菌落, 并接种于 20% (vol/vol) 培养基装液量的摇瓶 (以硅胶塞密封) 中。接种后的培养液置于 30 °C 恒温培养箱中静置培养 22-24 h, 直至 OD_{600nm} 达到 2.0 左右。所获得的菌液用于质粒抽提、基因组 DNA 制备、菌种的保藏、接合转化及发酵菌种的活化和扩大培养。

本研究所涉及菌株的保存皆以 30% 甘油管保存于 -80 °C 超低温冰箱中。具体方法为: 将培养达到对数后期的细胞与 60% (wt/vol) 无菌甘油等体积混合, 并以 1.8 mL 体积分装于无菌冻存管中。用标示有菌种、质粒、保种日期、保种人命及简明培养条件等信息的标签纸外贴冻存管, 同时以透明胶带外封标签纸做防水处理。

本研究中运动发酵单胞菌及重组菌株发酵培养基如无特殊说明皆为 YPMAG100 培养基, 培养基组成为: 100 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母提取物, 1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄ 和 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O (由于该培养基葡萄糖浓度较高, 为防止灭菌过程中葡萄糖焦化产生有害成分, 因此葡萄糖单独配制成水溶液进行灭菌)。葡萄糖溶液和其它营养组分配制的培养基溶液分别于 115 °C 灭菌 20 min, 并于发酵前以酒精火焰保护将葡萄糖溶液倒入发酵罐中与灭菌后的其它营养组份混合。发酵培养基初始 pH 值以 115 °C 高温灭菌 20 min 的 5 N NaOH 调节至 6.0。发酵过程中采用高浓度的 NaOH 进行 pH 的调节^[269]是因为, 高浓度碱溶液的加入不会对发酵过程中的发酵体积产生显著影响, 从而有利于发酵最终细胞和乙醇收率的计算; 同时, 5 N NaOH 也满足发酵 pH 自动控制稳定性的需求, 并可避免局部碱浓度过高对细胞引起的损伤。

2.2.1.5 抗生素溶液的制备

1) 四环素盐酸盐贮存液的制备: 首先, 配制 75% (vol/vol) 的乙醇溶液。用洁净移液管移取 21 mL 超纯水至 100 mL 洁净容量瓶中, 加入 95% (vol/vol) 市售分析纯乙醇定容至 100 mL。盖封容量瓶, 并上下颠倒 10 次以上混合均匀, 待用。于分析天平称量 1.00 g 四环素盐酸盐于洁净 100 mL 烧杯中, 加入约 50 mL 新鲜配制的 75% (vol/vol) 的乙醇溶液, 缓慢摇匀直至药物粉末完全溶解; 将该溶液与容量瓶剩余 50 mL 左右的溶液往复转移 3~5 次混合均匀。于超净工作台中, 以 1 mL 体积将配制的 10 mg/mL 四环素盐酸盐乙醇溶液分装于 1.5 mL 无菌离心管中。储存于 -20 °C 避光保存 24 小时后待用。

2) 氨苄青霉素贮存溶液的制备: 于分析天平称量 1.00 g 氨苄青霉素粉末于洁净 50 mL 烧杯中, 加入 50 mL 超纯水, 缓慢摇匀直至药物粉末完全溶解。将烧杯中的溶液转移至

100 mL 洁净的容量瓶中，并以 10 mL 超纯水润洗烧杯 3~4 次。每次润洗液皆转移至容量瓶中，并最终超纯水定容至 100 mL。上下颠倒容量瓶 10 次以上，将溶液混合均匀。于超净工作台中，以无菌 0.22 μm 无菌硝酸纤维素过滤头过滤除菌；并以 1 mL 体积将配制的 10 mg/mL 氨苄青霉素溶液分装于 1.5 mL 无菌离心管中。储存于 -20 °C 避光保存待用。

3) 萘啶酸贮存液的制备：于分析天平称量 1.00 g 萘啶酸粉末于洁净 250 mL 烧杯中，加入 50 mL 超纯水。将烧杯置于脱色摇床 100 rpm 转速旋转摇动，并以 100 μL 移液枪缓慢滴加 5 N NaOH 直至药物粉末刚好完全溶解。将烧杯中的溶液转移至 100 mL 洁净的容量瓶中，并以 10 mL 超纯水润洗烧杯 3~4 次。每次的润洗液皆转移至容量瓶中，并最终超纯水定容至 100 mL。上下颠倒容量瓶，将溶液混合均匀。于超净工作台中，以无菌 0.22 μm 无菌硝酸纤维素过滤头过滤除菌。以 1 mL 体积将新鲜配制的 10 mg/mL 萘啶酸溶液分装于 1.5 mL 无菌离心管中。储存于 -20 °C 避光保存待用。

4) 卡那霉素贮存液的制备：浓度和具体操作步骤参考氨苄青霉素贮存溶液的制备。

5) 氯霉素贮存液的制备：浓度和具体操作步骤参考四环素盐酸盐贮存溶液的制备。

2.2.2 实验及分析方法

2.2.2.1 质粒抽提，基因组 DNA 制备和 DNA 分离纯化

细菌基因组 DNA 的制备详见 Qiagen 细菌基因组抽提试剂盒 (Qiagen DNeasy Tissue Kit) 说明书；质粒的抽提详见 Omega Biotek 公司 Omega Plasmid Mini Kit (Norcross, GA, USA) 说明书；PCR 产物及分子克隆酶反应产物的纯化详见 Omega PCR Purification Kit 说明书；DNA 片段琼脂糖胶纯化和回收步骤参考 Omega Gel Extraction Kit 说明书。以上使用试剂盒的操作最后洗脱步骤皆以 115 °C 高温灭菌 20 min 的 Q 级水将纯化柱上吸附的 DNA 进行溶解洗脱。抽取的 DNA 及纯化后的 DNA，使用 Beckman DU800 蛋白质核酸分析仪于 260 nm 和 280 nm 波长下测定浓度和纯度，并置于 -20 °C 保存待用。TAE 缓冲液的制备，琼脂糖核酸电泳胶的制备，以及琼脂糖核酸电泳的方法详见《分子克隆实验指南》(中文版第三版) 第 387-397 页^[270]。

2.2.2.2 PCR 体系

购买的引物于 4 °C 15,000 ×g 离心 10 min，使引物聚集于离心管底部。根据生产商附带说明书提供之信息，于超净台内以无菌超纯水溶解引物配制成 25 μM 贮存液，并于 -20 °C 长时间保存待用。PCR 体系见表 2.3 (50 μL)。

表 2.3 本研究涉及之 PCR 体系中各种溶液的配比

Table 2.3 The volume and concentration of reagents used in PCR system

| Reagents (concentration) | Volume ^c |
|---|---------------------|
| Primer pairs (stock solution, 25 μM) | 1.0 μL/each |
| Template DNA (plasmids or genomic DNA, diluted to 50 ng/μL) | 1.0 μL |
| dNTP Mixture (stock solution, 2.5 mM/each) | 4.0 μL |
| ×10 PCR Buffer Mg ²⁺ free (or ×10 pfu Buffer) | 5.0 μL |
| MgCl ₂ (stock solution, 25 mM) | 3.0 (0) μL |
| Taq or pfu (stock solution, 2.5 U/μL) | 1.0 μL |
| Sterilized ultra water (18 MΩ) | 34.0 (37.0) μL |

^c Volume listed in bracket was used for PCR catalyzed by pfu DNA polymerase.

PCR 体系皆在冰浴上配制，并最后加入 DNA polymerase。盖上 PCR 管管盖后，轻弹管底部 3~5 下使反应体系混合均匀。将含有 PCR 溶液的 PCR 管于掌式离心机快速离心 5 s，并迅速置于提前预热热盖的 PCR 仪上运行 PCR 程序。PCR 程序通用模式如下 (表 2.4)。

表 2.4 本研究PCR程序之通用模式
Table 2.4 Universal PCR program in this study

| Steps | Temperature (°C) ^d | Duration | Description |
|-------|------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 94 | 3 min | Templates denaturation |
| 2 | 94 | 30 s | Templates denaturation |
| 3 | Temp. | 30 s | Annealing |
| 4 | 72 | Elongation time (×2) min | Elongation |
| 5 | Goto step 2, 24 cycles (29 cycles) | | More cycles needed |
| 6 | 72 | 10 min | Elongation |
| 11 | 10 | 10 h | Preservation |
| 12 | End | | End |

^dTemp., temperature for the primer pairs annealing with the template; 29 cycles, more cycles needed for the preparation of small dsDNA less than 1.0 kb. (×2), elongation time needed in the PCR catalyzed by pfu DNA polymerase, which was twice that much of the reaction catalyzed by Taq DNA polymerase (according to the protocol of pfu DNA polymerase provided by the merchant).

2.2.2.3 PCR及DNA片段的克隆（酶切、末端平滑化和连接）及测序

纯化的PCR产物或者制备的质粒的酶切、末端平滑化和连接反应，皆参考Fermentas提供分子克隆用酶说明书，具体操作条件和反应体系的组成详见结果与讨论部分。

用于测序菌液的制备：将含有待测序质粒的菌株，用接种针从LB抗性平板上挑取单菌落，并在超净工作台中划线于新鲜抗性平板上。于37 °C恒温恒湿培养箱内孵育12 h直至长出大小清晰可辨的菌落为止。重复划线培养1~2次，用无菌牙签挑取单菌落接种于LB液体抗性培养基，于37 °C恒温摇床220 rpm过夜培养（或8~12 h）直至OD_{600nm}大于2.0。于超净工作台吸取1 mL菌液至1.5 mL无菌离心管中。用Parafilm[®] M密封离心管管盖，并标注宿主和质粒名称，填写测序说明书提交测序商测序。测序结果以Oligo version 6软件进行数据校正记录，并以NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件进行序列比对分析。

2.2.2.4 氯化钙制备和转化大肠杆菌感受态细胞

用氯化钙制备和转化大肠杆菌感受态细胞的方法参考《分子克隆实验指南》（中文版第三版）方法并略有改动^[270]。具体步骤详见如下叙述：

- 1) 从-80 °C超低温冰箱中取出大肠杆菌甘油管，并以接种环沾取少量菌液划线于LB平板上，于37 °C恒温恒湿培养箱内孵育12 h直至长出大小清晰可辨的菌落。
- 2) 以无菌牙签挑取单菌落并接种于20 mL LB液体培养基中，于37 °C恒温摇床220 rpm恒温过夜培养（12 h）。
- 3) 在无菌超净工作台内取4 mL过夜培养的菌液，并接种于提前在37 °C预热的500 mL大肠杆菌感受态液体培养基中。接种后的摇瓶置于37 °C，220 rpm恒温培养。
- 4) 接种后的摇瓶培养约2.0~2.5 h直至OD_{600nm}=0.3~0.4后，将整个摇瓶即刻取出，并置于冰水混合物中冷却10 min。
- 5) 将冷却的培养液于无菌环境下分装于-20 °C预冷的两个250 mL无菌离心杯，并迅速在天平上配平（以下有关菌体离心和分装的操作均应迅速进行，并且全过程应始终保持菌体处于低于4 °C的无菌环境下。菌体暴露于高于4 °C的环境中会严重影响感受态细胞的转化效率），于提前2~4 °C预冷的离心机中，以2,000 ×g离心5 min。

- 6) 小心将离心杯的上清液迅速倾倒至废液缸中, 并各取 22.5 mL 冰浴预冷的 0.1 M 过滤灭菌的 CaCl_2 溶液加入离心杯中。密封杯口, 并在冰水浴中缓慢轻柔震荡直至菌体细胞完全被悬浮。
- 7) 合并菌体悬浮液, 并于提前预冷至 2~4°C 温度范围的离心机中 2,000 \times g 离心 5 min。
- 8) 离心结束之后, 弃上清液, 并迅速将离心杯倒置于喷有 75% 乙醇的滤纸上, 尽量使杯内残余的液体空干 (10 s), 并重新置于冰浴中冷却。
- 9) 取 5 mL 冰浴预冷的 0.1 M CaCl_2 溶液至离心杯中, 密封离心杯口并在冰水浴中缓慢震荡直至菌体完全被悬浮。
- 10) 在离心杯中缓缓滴加 100 μL DMSO, 轻柔混合均匀, 并于冰浴中静置 15 min; 在离心杯中再次缓缓滴加 100 μL DMSO, 轻柔混合均匀, 并于冰浴中静置 15 min。
- 11) 在无菌超净工作台内以 100 μL 容积分装至 1.5 mL 无菌离心管中, 并迅速将离心管缓缓浸入液氮中速冻。
- 12) 分装后的感受态细胞置于 -80 °C 超低温冰箱中进行保存 (可保存半年左右)。隔天保存的大肠杆菌感受态细胞以 10 ng pUC19 质粒转化测试转化效率, 并以灭菌的超纯水作为阴性对照。转化效率应为 10^6 至 10^7 之间。
- 13) 转化氯化钙制备大肠杆菌感受态细胞的操作详见《分子克隆实验指南》(中文版第三版) 第 98~99 页^[270]。

2.2.2.5 接合转化法转化运动发酵单胞菌及接合转化效率的计算

根据运动发酵单胞菌结合转化文献报道^[222]并略有改动。

- 1) 按照材料与方法 2.2.2.4 制备大肠杆菌 S 17-1 λ π 感受态细胞, 并将待转化之质粒先转化至大肠杆菌 S 17-1 λ π 感受态细胞中。
- 2) 将运动发酵单胞菌和重组大肠杆菌 S 17-1 λ π 菌株分别划线于 RM 琼脂平板和 LT 抗性平板, 并分别置于 30 °C 和 37 °C 恒温培养箱中分别培养 24 h 和 12 h, 直至长出清晰可辨的单菌落。
- 3) 以无菌牙签挑取运动发酵单胞菌单菌落, 接种于 20 mL RM 液体培养基于 30 °C 恒温培养箱中静置培养 22 h 至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 约 2.0 以上; 同时以无菌牙签挑取重组大肠杆菌 S 17-1 λ π 菌株单菌落, 接种于 5 mL LT 液体抗性培养基中于 37 °C 220 rpm 培养 12 h。
- 4) 将运动发酵单胞菌按不同的比例用 30 °C 预热的 RM 培养基稀释于一系列无菌试管中, 并于 30 °C 恒温培养箱中静置培养; 同时, 亦将过夜培养的重组大肠杆菌 S 17-1 λ π 菌株培养液按照 1% (vol/vol) 接种于 37 °C 预热的 LT 液体抗性培养基中于 37 °C 220 rpm 培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.5。于 600 nm 处迅速测定各运动发酵单胞菌培养试管中的吸光值, 并选取 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.4 的实验组用于运动发酵单胞菌和重组大肠杆菌 S 17-1 λ π 的接合孵育处理。
- 5) 于无菌超净工作台, 各取 0.5 mL 运动发酵单胞菌 ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4$) 和重组大肠杆菌 S 17-1 λ π ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$) 的培养液分装于两个 1.5 mL 无菌离心管中, 于 10,000 \times g 室温离心 30 s。于无菌超净工作台, 用移液枪吸尽上清液, 并各用 0.5 mL 的 RM 培养基重新轻柔吹打悬浮细胞。将两种细胞悬浮液合并于一个 1.5 mL 的无菌离心管中, 并上下颠倒 3~5 次混合均匀后于 10,000 \times g 室温离心 30 s。
- 6) 于无菌超净工作台, 用移液枪吸尽上清液, 并用 20 μL 的 RM 培养基重新轻柔吹打悬浮细胞。将细胞悬浮液用 100 μL 移液枪小心转移至贴于 30 °C 预热 RM 琼脂平板上的无菌混合纤维素滤膜上。将滴有菌悬液的平板盖置于无菌超净工作台静置 10 min, 直至菌液完全被平板中的 RM 琼脂培养基吸干。
- 7) 将接合转化的平板用 Parafilm 封住四周后, 于 30 °C 恒温培养箱中静置培养 12 h。随后, 于无菌超净工作台将接合转化的菌体及滤膜一起转移至 1.5 mL 无菌离心管中, 并加入 1 mL RM 液体培养基振荡悬浮。

- 8) 将 100~200 μL 细胞悬浮液均匀的涂布于含有四环素和萘啶酸的 RM 琼脂培养基 (RMNT 抗性平板) 上。并将该平板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 48 h 直至长出清晰可辨的菌落进行计数。
- 9) 接合转化效率的计算: 根据 48 h RMNT 抗性平板上的菌落数 (单个统计样本的菌落数应控制在 50~200 个菌落数范围内, 即过低的菌落数可通过将单批多个平板数作为一个统计样本计算)、稀释倍数以及涂布的菌液量计算一次接合转化实验总的转化子的个数。根据以下公式计算转化效率:

$$E_R (10^{-8}) = N / (0.50 \times (7.98 \times OD_{600\text{nm}} - 2.03))$$

其中:

- E_R , 基于受体细胞 (运动发酵单胞菌) 计算得到的接合转化效率;
- N , 单次转化实验所计算得到的总转化子的个数;
- 0.50, 接合转化过程中使用 $OD_{600\text{nm}}=0.40$ 运动发酵单胞菌菌液的体积 (mL);
- $OD_{600\text{nm}}$, 接合转化过程中使用运动发酵单胞菌菌液光密度的测量值;
- $(7.98 \times OD_{600\text{nm}} - 2.03)$, 将运动发酵单胞菌对数中期菌液稀释并涂布于 RM 琼脂平板, 根据平板菌落计数统计得到的菌液细胞浓度与 600 nm 细胞光密度之关系式 (详见附图 1)。

2.2.2.6 运动发酵单胞菌光密度 ($OD_{600\text{nm}}$) 与细胞干重 (DCW, g/L) 关系曲线的确立
在运动发酵单胞菌发酵培养过程中, 从接种 4 h 后每隔 2 h 取 40 mL 发酵液, 用 Beckman J26XP 离心机于室温 15,000 $\times g$ 离心 5 min 收集菌体。用等体积去离子水于漩涡振荡混合器重新悬浮菌体细胞, 并于室温 15,000 $\times g$ 离心 5 min 收集菌体。细胞经去离子水悬浮/离心重复操作共三次, 最终用 40 mL 的去离子水重新悬浮细胞, 均分三等分并分别取 1 mL 于 600 nm 波长处测量 $OD_{600\text{nm}}$ (经去离子水适当稀释后, 以去离子水为空白进行测定。测量值应在: 0.10~0.60 线性数值范围内)。用移液管精确量取振荡悬浮均匀的菌液 10 mL, 并转移至事先清洗干净并干燥预称质量的 6 cm 培养皿中。将含有菌液的培养皿于 115 $^{\circ}\text{C}$ 8~12 h 至恒重。于分析天平上称量含有干燥菌体细胞的培养皿, 并计算对应于不同光密度的细胞干重。以菌体细胞 600 nm 处测得 $OD_{600\text{nm}}$ 值为横坐标, 对应的细胞干重值为纵坐标, 绘制运动发酵单胞菌 $OD_{600\text{nm}}$ 与干重关系曲线, 并回归出关系式 (详见附图 2)。

$$DCW (g/L) = 0.31 \times OD_{600\text{nm}}$$

该关系式与文献报道吻合^[271]。

2.2.2.7 用于酶活测定细胞的制备和超声波破碎法制备细胞裂解液

以量筒量取相当于约 6.2 g (约 20 $OD_{600\text{nm}}$) 细胞干重的培养液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10,000 $\times g$ 离心 5 min。弃上清, 用等体积冰浴预冷的缓冲液重悬细胞 (该缓冲液对应于测定酶活体系缓冲液)。将细胞悬浮液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10,000 $\times g$ 离心 5 min。细胞悬浮/离心操作共重复三次。最终将细胞以 1 mL 冰冷缓冲液悬浮并转移至 1.5 mL 离心管中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10,000 $\times g$ 离心 5 min。尽去上清液, 并将细胞储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中 (三天内完成胞内酶活的测定)。

-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出冻存细胞, 并迅速加入 1 mL 冰浴预冷的缓冲液 (该缓冲液亦对应于酶活测定体系缓冲液)。将离心管置于冰水浴中, 以 $\phi 3$ mm 超声波破碎仪探头进行细胞破碎。破碎条件为: 200 W, 工作 60 s (每工作 5 s, 间隔 15 s, 共 12 个循环)。超声波破碎的细胞裂解液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 15,000 $\times g$ 离心 30 min, 收集上清液并置于冰浴中待用。

2.2.2.8 酶活测定

1) 苹果酸脱氢酶 (MDH) 活力的测定^[272]: 苹果酸脱氢酶活定义为, 1 min 内催化生成 1 μM 苹果酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (Unit, 等同于每分钟催化氧化 1 μM NADH)。首先以超纯水配制 10 mM 的草酰乙酸二钠盐溶液, 4 mM NADH 溶液, 50 mM pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 以及 ($\times 2$) 50 mM pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液。50 mM pH 8.0 的

Tris-HCl缓冲液用于细胞的洗涤处理和超声波破碎过程。将细胞裂解液和以上化学试剂按如下体积配成酶活测定体系：

| 试剂名称： | 体积： |
|--|-------------------|
| 细胞裂解液 | 200 μL |
| ($\times 2$) 50 mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液 | 400 μL |
| 超纯水 | 300 μL |
| 4 mM NADH | 100 μL |

以上各溶液添加完毕后，加入100 μL 草酰乙酸二钠盐溶液触发反应。迅速振荡1 s，并将反应液迅速倒入石英比色皿中（10 \times 10 \times 30 mm）并用配有恒温装置的Beckman DU800核酸蛋白分析仪测定340 nm处吸光值（OD_{340nm}）随时间（min）的变化值。测定酶活体系控制温度为30 $^{\circ}\text{C}$ ，测定点时间间隔为3 s。将测得之数据，选取反应初始阶段线性较好的区域回归成线性方程。以 $k_{340\text{nm}}$ 表示线性方程的斜率。按照如下公式计算酶活（Unit/ μL ）。

$$\text{Activity}(\text{Unit} / \text{mL}) = \frac{|k_{340\text{nm}}| \times 1}{6.2 \times 0.2}$$

式中：

$|k_{340\text{nm}}|$ —每分钟吸光度变化值的绝对值（340 nm处）；

1—1 mL的反应体积； 6.2—1 μM NADH的吸光度（340 nm处）^[273]。

2) 葡萄糖-果糖氧化还原酶（GFOR）酶活力的测定：对硝基苯酚水溶液在中性偏碱的pH值环境中呈现黄色，其颜色随着pH的降低逐渐变淡，以此原理可以用于测定溶液中的 H^+ 浓度。以市售分析纯浓盐酸和10 mM K-MES（pH 6.4）缓冲液配制0.08 M盐酸储存液；以超纯水配制0.29 mM对硝基苯酚溶液。以10 mM K-MES（pH 6.4）缓冲液稀释盐酸储存液，获得0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0和7.0 mM浓度梯度的HCl-K-MES标准溶液。取洁净试管8支，分别加入20 μL 不同浓度的HCl-K-MES标准液以及20 μL 10 mM K-MES（pH 6.4）缓冲液和4 mL 0.29 mM对硝基苯酚（*p*-nitrophenol）溶液，迅速振荡混合均匀并在405 nm波长下测量吸光值。分别以405 nm波长下的吸光值和加入盐酸的摩尔量为纵横坐标绘制标准曲线（详见附图 3）。

GFOR酶活定义为：25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，每分钟催化葡萄糖和果糖氧化还原反应释放1 μmol 葡萄糖酸的酶量。GFOR酶活根据Zachariou and Scopes所报道之方法测量^[160]。按照2.2.2.7叙述之步骤，将发酵液中的细胞经离心以及10 mM K-MES（pH 6.4）缓冲液反复清洗三次之后，于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱冻存。冻存的细胞，按照2.2.2.7叙述之超声波破碎方法进行裂解。裂解液于4 $^{\circ}\text{C}$ 15,000 $\times g$ 离心30 min去除细胞碎片，并收集上清液置于冰浴中用于GFOR酶活的测定。1.5 mL离心管中添加提前于25 $^{\circ}\text{C}$ 预热的100 μL 以10 mM K-MES（pH 6.4）缓冲液配制的0.4 M葡萄糖和0.8 M 果糖混合溶液，以迅速添加100 μL 细胞裂解液起始反应。将底物和细胞裂解液迅速混合均匀后置于25 $^{\circ}\text{C}$ 循环水浴锅内，反应2 min。以沸水浴终止反应，并将离心管置于冰浴中迅速冷却。反应物于15,000 $\times g$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min去除变性的蛋白质等固体悬浮物。取20 μL 离心上清液加入洁净试管中，并按次序加入10 mM K-MES（pH 6.4）缓冲液20 μL 和4 mL 0.29 mM对硝基苯酚（*p*-nitrophenol）溶液。迅速振荡混合均匀并在405 nm波长下以K-MES（pH 6.4）缓冲液为空白测定吸光值。同时以20 μL K-MES（pH 6.4）缓冲液替代20 μL GFOR酶活测定反应液作为对照组测量初始吸光值。通过计算对照组与待测组在405 nm波长下的差值（ $\Delta A_{405\text{nm}}$ ），根据绘制的盐酸-对硝基苯酚吸光值标准曲线计算反应液中生成的葡萄糖酸的量。

2.2.2.9 蛋白质浓度的测定

采用Bradford法^[274]测定蛋白质浓度。

1) Bradford试剂的配制: 称取考马斯亮兰G-250 100 mg溶于50 mL 95% (wt/vol) 的乙醇中, 加入100 mL 85% (wt/vol) 的磷酸, 用蒸馏水稀释至1升。以Whatman 1号滤纸过滤, 所得的最终溶液中含0.01% (wt/vol) 考马斯亮兰G-250, 4.7% (wt/vol) 乙醇, 8.5% (wt/vol) 磷酸, 此即Bradford试剂。该试剂装于棕色试剂瓶, 并置于4 °C避光保存。

2) 标准曲线的确立

在分析天平上称取0.1002 g (实际称量值) 的标准牛血清白蛋白, 并用超纯水溶解定容于100 mL重铬酸钾浓硫酸洗液处理过的容量瓶中。将该溶液反复颠倒10次混合均匀, 以500 μ L体积分装于洁净的1.5 mL离心管中, 于-80 °C长期保存。

于-80 °C超低温冰箱取一支浓度约为1 mg/mL的BSA标准水溶液, 待彻底融化后于漩涡混合振荡器混合均匀。在洁净干燥的试管中分别加入0、5、10、15和20 μ L, 用超纯水补至0.2 mL。然后分别加入2 mL Bradford试剂, 充分混匀。室温下静置5 min, 并在1小时内完成在595 nm处测量反应液的吸光值。吸光值的测定以加入0 μ L BSA水溶液试管内的反应液为空白对照, 以BSA加入量从少到多的次序依次测定。根据BSA加入质量为纵坐标, 以595 nm处测量反应液的吸光值为横坐标, 绘制Bradford法测定蛋白质浓度标准曲线 (详见附图 4)。

3) 细胞裂解液蛋白质浓度的测定: 取合适体积的酶液, 加裂解缓冲液 (根据测量酶活所需的缓冲液而定) 至200 μ L, 然后加入2 mL Bradford试剂。漩涡混合振荡器混合均匀充分显色5 min后, 以只加入200 μ L裂解缓冲液的对照组为空白, 于一小时内于595 nm处测量反应液的吸光值。测得的A₅₉₅值根据标准曲线计算出反应体系加入的蛋白质质量 (μ g), 并根据反应体系中加入待测样品体积换算成蛋白质浓度 (μ g/ μ L)。对于浓度过高的蛋白质溶液应作适当稀释, 使测量值在0.10~0.42范围内 (根据文献报道和实验室实际操作确认, 超出0.42的OD_{595 nm}值不在标准曲线的线性范围内)。

2.2.2.10 葡萄糖和乙醇HPLC标准曲线的绘制

本研究以配有Bio-Rad Aminex HPX-87H色谱柱、岛津RID-10A示差检测器和岛津LC-20AD送液泵的HPLC系统, 对待测样品的葡萄糖和乙醇浓度进行分析。HPLC分析参数为: 柱温65 °C, 5 mM H₂SO₄为流动相, 流速为0.6 mL/min, 进样体积为20 μ L。葡萄糖和乙醇标准溶液的制备及标准曲线的绘制如下所述。

1) 葡萄糖 (Glucose) HPLC标准曲线的绘制:

取洁净称量瓶一只, 称取约5 g分析纯葡萄糖 (C₆H₁₂O₆ · H₂O) 并于80 °C烘干4~6小时, 直至达到恒重 (每次称量前将样本从烘箱中取出并置于干燥器中冷却至室温)。用分析天平称取约0.44 g左右的一水葡萄糖于50 mL洁净烧杯中, 并精确记录实际称量值 (0.4312 g)。以超纯水于100 mL洁净容量瓶中配制成3.920 g/L的葡萄糖标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释, 从而获得0.122、0.245、0.490、0.980、1.960和3.920 g/L浓度梯度的葡萄糖标准溶液, 并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以HPLC葡萄糖出峰面积 (μ v s) 为横坐标, 以进样葡萄糖标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标, 绘制葡萄糖HPLC标准曲线 (详见附图 5-1)。

2) 乙醇 (Ethanol) HPLC标准曲线的绘制:

取洁净烘干的100 mL容量瓶一只, 用分析天平称取约1.0 g左右的分析纯无水乙醇并精确记录实际称量值 (0.9840 g), 以超纯水于100 mL洁净容量瓶中配制成9.840 g/L的乙醇标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释, 从而获得0.615、1.230、2.460、4.920和9.840 g/L浓度梯度的乙醇标准溶液, 并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以HPLC乙醇出峰面积 (μ v s) 为横坐标, 以进样乙醇标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标, 绘制乙醇HPLC标准曲线 (详见附图 5-2)。

2.2.2.11 运动发酵单胞菌ZM4重组菌质粒稳定性

运动发酵单胞菌 ZM4 重组菌质粒稳定性研究方法参考 Song Y 等人之报道^[275]。将

-80 °C 冰箱保存的运动发酵单胞菌重组菌甘油管迅速置于 40 °C 温水中融化, 并于超净工作台以 2% (vol/vol) 接种量接种于含有四环素 (20 µg/mL) 的 RM 培养基中。将接种后的培养基置于 30 °C 恒温培养箱中静置培养约 20-24 h 直至 OD_{600nm} 约为 1.0 (以此作为第一代)。用移液枪吸取菌液重新以 1% (vol/vol) 接种量接种于新鲜的 RM 培养基中, 并于 30 °C 恒温培养箱中静置培养约 8~10 h 直至细胞浓度为 OD_{600nm}=1.0 (用于下一次菌种传代和含有质粒菌株比例的统计实验)。同时, 每次菌体生长至 OD_{600nm}=1.0 时, 将菌液稀释至 $\times 10^{-5}$, 将此菌液稀释液取 50 µL 并分别涂布于 RM 培养基平板和 RT 抗性平板上 (保证稀释后平板长出的菌落数在 50-200 范围以内, 若质粒稳定性较差, 可根据实际情况调整稀释倍数)。根据 RT 抗性平板上长出菌落的个数的平均值 (N^{RT} , 1/mL) 与 RM 平板上长出菌落的个数的平均值 (N^{RM} , 1/mL) 的比值 ($R=N^{RT}/N^{RM}\times 100\%$) 计算菌液中含有质粒细胞的比例。经过一系列的传代, 通过计算每一代 OD_{600nm} 为 1.0 菌液的 R 值来衡量质粒在 *Z. moiblis* 菌株细胞的稳定性。

2.2.2.12 运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌的发酵及发酵变量的测定

运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌的发酵操作相关文献报道^[271]。将 -80 °C 冰箱保存的运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌甘油管迅速置于 40 °C 温水中融化, 并于超净工作台以 2% (vol/vol) 接种量接种于 RM 培养基中 (如为重组菌则需添加 20 µg/mL 的四环素)。将接种后的培养液于 30 °C 恒温培养箱中静置培养约 20-24 h, 直至 OD_{600nm} 约为 2.0。用移液枪吸取菌液重新以 1% (vol/vol) 接种量接种于新鲜的 RM (或 RT) 培养基中, 于 30 °C 恒温培养箱中静置培养约 10~12 h 直至细胞浓度为 OD_{600nm}=1.0~1.1。将培养至对数中后期的菌种按照 10% (vol/vol) 的接种量接种于发酵培养基 (YPMAG100 或 YPMAG100+10 µg/mL Tc) 中开始发酵培养。发酵过程中, 隔时取样测定葡萄糖、乙醇以及 OD_{600nm} 等相关发酵变量。

以配有 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱、岛津 RID-10A 示差检测器和岛津 LC-20AD 送液泵的 HPLC 系统, 对发酵液中的葡萄糖和乙醇浓度进行分析。HPLC 分析参数为: 柱温设定在 65 °C, 以 5 mM H₂SO₄ 为流动相, 流速为 0.6 mL/min。所有的样品均在 4 °C 15,000 × g 离心力下离心 5 min, 收集上清液并以 0.22 µm 滤膜进行过滤。滤出液按照标准曲线的标定范围以超纯水进行稀释, 并以 20 µL 进样体积进行分析。分析结果以本章材料与方法之 2.2.2.10 所制定的标准曲线进行葡萄糖和乙醇浓度的计算。

用于酶活测定和总 RNA 提取的细胞处理方式参考前文相关方法。

2.2.2.13 总 RNA 的提取、cDNA 的制备以及 real-time qRT-PCR

从运动发酵单胞菌 ZM4 菌体细胞中提取总 RNA 根据 Invitrogen 公司提供之 TRIzol® 试剂说明书, 按照革兰氏阴性细菌之提取方法进行提取。随后按照 Fermentas 公司提供之 RNase-free DNase I 和 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 去除总 RNA 中的基因组 DNA 并反转录获取第一条 cDNA 链。所制备的 cDNA 用 Mastercycler® ep realplex 2S detection system 进行定量分析。Real-time qRT-PCR 所使用之引物序列详见表 2.2 之引物 11#-14#。PCR 体系的配制按照 Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (MBI Fermentas Inc.) 试剂所提供之说明书进行。PCR 体系为: 退火温度, 58.3 °C; 延伸时间, 30 s; 循环数, 40; PCR 结束后绘制熔点曲线; 其它参数同于 2.2.2.2 之 PCR 程序设定。

2.3 结果与讨论

2.3.1 穿梭质粒 pHW20a 的构建

鉴于目前用于运动发酵单胞菌接合转化效率最高的 pLOI193 质粒, 由于其含有两个来源不同的 *mob* 基因, 从而保证其极高的接合转化效率。另一方面, 由于在质粒结构上含有了来源于 RSF1010 质粒的复制子 (*oriV*), 因此保证其能够在包括运动发酵单胞菌在内的革兰氏阴性细菌中进行复制和扩增。鉴于以上特点, 在新构建的质粒中仍然考

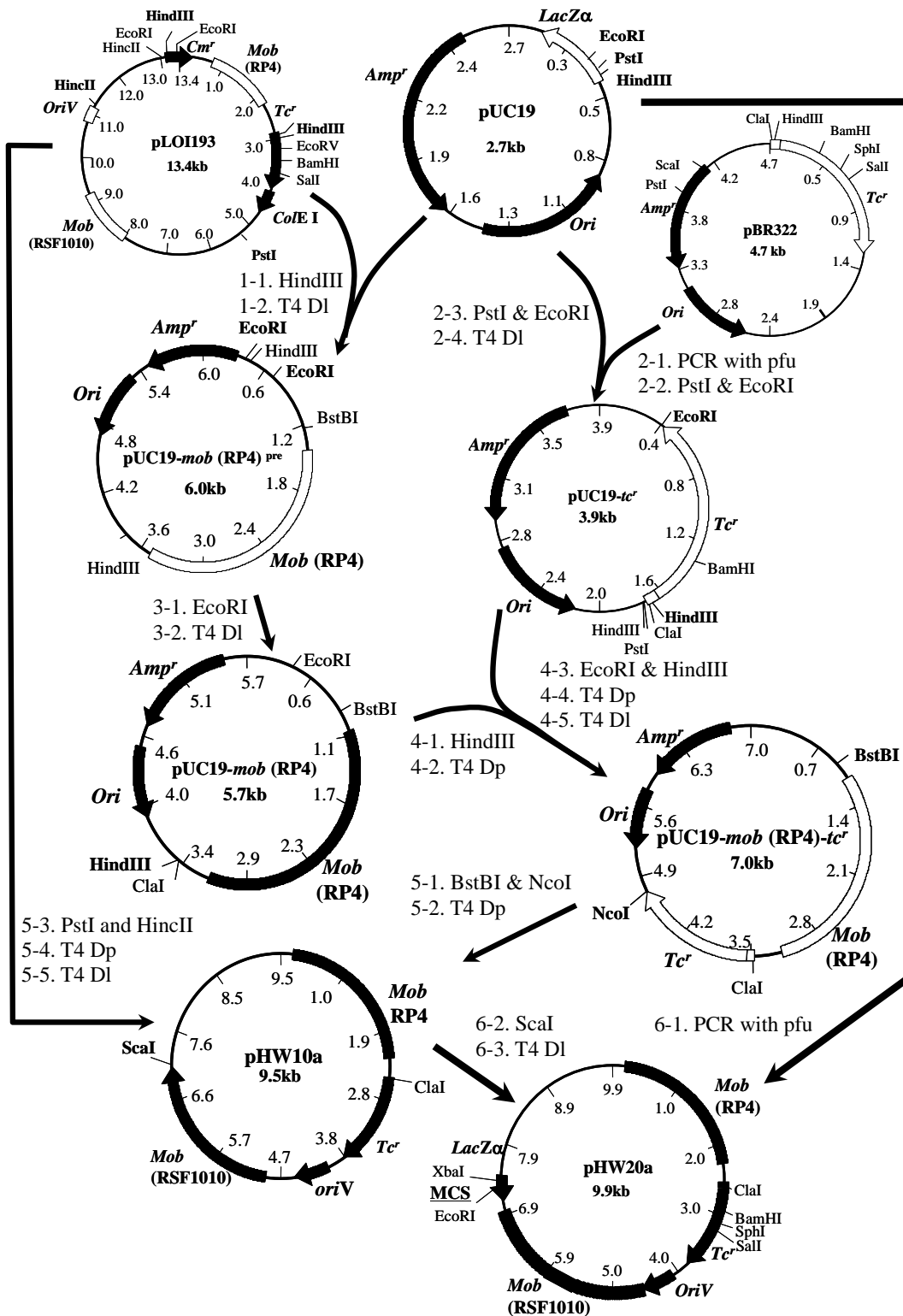


图 2.1 pHW20a质粒构建技术路线图

Fig. 2.1 Scheme of constructing pHW20a

The plasmid map of pLOI193 was cited from the report of Conway, T. *et al.*^[222]. MCS, the multiple cloning sites presented in *lacZα*; T4 DI, T4 DNA ligase; T4 Dp, T4 DNA polymerase. 1-1, the first numeral in the serial number represented the sequence of plasmid would be constructed in the whole steps, and the second numeral indicated the order of the molecular manipulation steps during plasmid construction with the enzymes following the serial number. White arrows and bands indicated the DNA fragments would be digested out for the next plasmid's construction. Restriction sites in boldface style indicated the sites which would be used in the next genetic manipulation.

考虑保留以上功能基因。另外，四环素抗性基因 (tc^r) 作为目前用于运动发酵单胞菌转化子筛选最有效的抗性基因，仍然作为抗性筛选标记保留在新构建的质粒中。针对pLOI193质粒较大、可供选择克隆位点极为有限、冗余片段较多、以及缺乏诸如*lacZ α* 之类筛选标记等缺点，新构建的质粒针对对pLOI193以上种种优缺点进行了保留和改造。其中，pLOI193, pUC19和pBR322分别作为*mob*基因、*oriV*复制子、多克隆位点、*lacZ α* 和四环素抗性基因的来源（详细技术路线见图 2.1）。

2.3.1.1 pUC19-*mob* (RP4)^{pre}的构建

首先，从pLOI193质粒通过HindIII酶切获取来源于RP4 (Access No.: L27758.1) 的*mob*基因片段和一小段不完整的四环素抗性基因启动子，并以pUC19质粒对该片段进行克隆。根据以发表文献报道，该*mob*基因片段包括*traI*的5'端部分序列、*traJ*、*traK*、*traL*的5'端部分序列和*oriT*，并完全具备质粒转移功能^[264]。酶切体系如下：

| 试剂名称: | 体积: |
|----------------------|--------------|
| pLOI193 (或 pUC19) | 10.0 μ L |
| $\times 10$ Buffer R | 2.0 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 7.0 μ L |
| HindIII | 1.0 μ L |

酶切体系于37 $^{\circ}$ C孵育2 h，以0.7%琼脂糖核酸电泳和Omega Gel Extraction Kit回收3.0 kb (pLOI193) 和2.7 kb (pUC19) 的片段，并以0.7%琼脂糖核酸电泳确认结果 (见图 2.2)。

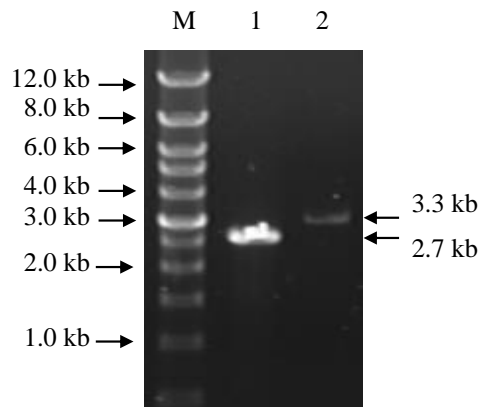


图 2.2 以pUC19克隆包含RP4质粒*mob*基因的pLOI193质粒DNA片段

Fig. 2.2 Cloning of pLOI193 DNA fragment containing *mob* (RP4) by pUC19.

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19 (HindIII, 2.7 kb); lane 2, pLOI193 (HindIII, 3.0 kb).

将回收纯化的两片段按照如下体系以T4 DNA连接酶 (T4 DNA ligase) 进行连接，连接后构建的质粒命名为pUC19-*mob* (RP4)^{pre}：

| 试剂名称: | 体积: |
|------------------------------------|--------------|
| pLOI193 (HindIII, 3.0 kb) | 16.0 μ L |
| pUC19 (HindIII, 2.7 kb) | 1.0 μ L |
| $\times 10$ T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μ L |
| T4 DNA ligase | 1.0 μ L |

连接体系于16 $^{\circ}$ C孵育12 h，并转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。以含有IPTG、X-Gal和氨苄青霉素的LB琼脂培养基（简称为LIXA抗性平板）对转换子进行筛选培养。随机挑选6个白色菌落重新划线于新鲜的LIXA抗性平板做进一步纯化培养。挑取单菌落接种于含有氨苄青霉素的LB液体抗性培养基（简称为LA液体抗性培养基）中培养，并以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒。以如下体系对来源于6个不同菌落的质粒分别进行BamHI和HindIII单/双酶切反应。

| | |
|---|-------------------|
| 试剂名称: | 体积: |
| 转化子来源质粒 | 4.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.5 μL |
| $\times 10$ BamHI Buffer (或 $\times 10$ Buffer R) | 1.0 μL |
| BamHI (或 HindIII) | 0.5 μL |

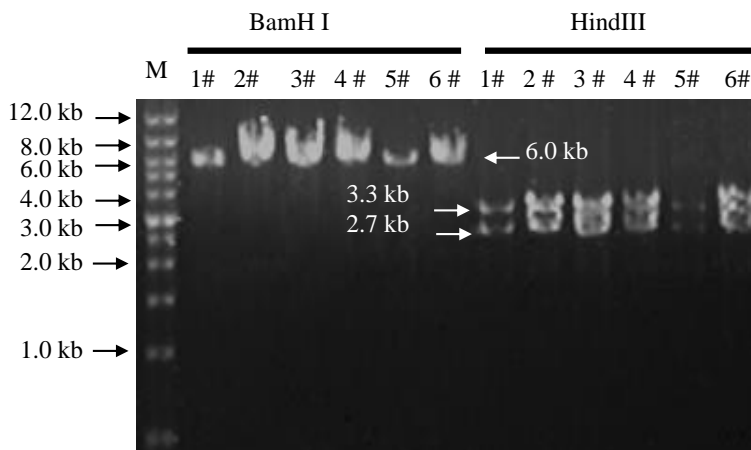


图 2.3 用BamHI或HindIII酶切初筛pUC19-mob (RP4)^{pre}

Fig. 2.3 Screening pUC19-mob (RP4)^{pre} from the plasmids in transformants by BamHI or HindIII digestion.

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); BamHI, Plasmids 1-6# from transformants 1-6# digested by BamHI; HindIII, Plasmids 1-6# from transformants 1-6# digested by HindIII.

反应体系于37 °C孵育2 h, 酶切反应结果以0.7%琼脂糖核酸电泳进行分析(图 2.3)。根据电泳结果分析可知, 1-6#菌落经BamHI单酶切得大小约为6.0 kb的单一一条带, 经HindIII单酶切获得大小约为2.7 kb和3.3 kb的两个条带。由此初步断定, 所挑选的6个克隆皆为阳性克隆。为了进一步确认克隆结果, 将电泳条带清晰的1#菌落再次划线, 并挑取单菌落以LA液体抗性培养基制备所得菌液提交测序。测序结果如下(图 2.4):

```

AAGCTTCGACGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATA
TACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGC
TCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAA
AAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCG
GAATTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCTTGTTAC
ACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCC
CGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCC
CCTAAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTT
TTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTA
TACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGG
CTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGG
CGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTGAATAAGTGA
TAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTTCGAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTCGGTTTCAGGGCA
GGGTGCTTAAATAGCCGCTTATGTCTATTGCTGGTTTACCGGTTTATTGACTACCGGAAGCAGT
GTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTTTGGCTCAGGCTCTCCCCGTGGAGGTAATA
ATTGACGATATGATCCAGCCGACCAGGCTTTCCACGCCCGCGTGCCGCTCCATGTCGTTCCGG
CGGTTCTCGGAAACGCGCTGCCGCGTTTCGTGATTGTCACGCTCAAGCCCGTAGTCCCGTTCCG
AGCGTCGCGCAGAGGTCAGCGAGGGCGCGGTAGGCCGATACGGCTCATGGATGGTGTTCG
GGTCGGGTGAATCTTGTTGATGGCGATATGGATGTGCAGGTTGTCGGTGTCTGATGCACGGC
ACTGACGCGCTGATGCTCGGCGAAGCCAAGCCAGCGCAGATGCGGTCTCAATCGCGCGCA
ACGTCTCCGCGTCGGGCTTCTCTCCGCGCGGAAGCTAACCAGCAGGTGATAGGTCTTGTCGG
CCTCGGAACGGGTGTTGCCGTGCTGGGTCGCCATCACCTCGGCCATGACAGCGGGCAGGGTGT
TTGCCTCGCAGTTCGTGACGCGCACGTGACCCAGGCGCTCGGTCTTGCTTGTCTCGTCCGGTAT

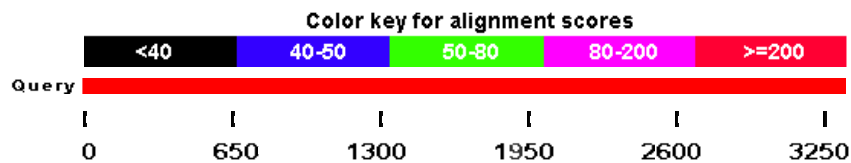
```

GTACTTCACCAGCTCCCGGAAGTCGCTCTTCTTGATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGCAAT
 CACGCGCACCCCCCGCCGTTTTAGCGGCTAAAAAAGTCATGGCTCTGCCCTCGGGCGGACCA
CGCCCATCATGACCTTGCCAAGCTCGTCTCTTCTTCGATCTTCGCCAGCAGGGCGAGGA
TCGTGGCATCACCGAACCGCGCCGTGCGCGGGTCGTCCGGTGAAGCCAGAGTTTCAGCAGGCCG
 CCCAGGCGGCCAGGTCGCCATTGATGCGGGCCAGCTCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGAC
 GCCCCTGATTTTGTAGCCCTGGCCGACGGCCAGCAGGTAGGCCGACAGGCTCATGCCGGCCG
 CGCCGCTTTTCCTCAATCGCTCTTCGTTCGTCTGGAAGGCAGTACACCTTGATAGGTGGGCTG
 CCTTCCCTGGTTGGCTTGGTTTCATCAGCCATCCGCTTGCCCTCATCTGTTACGCCGGCGGTAG
 CCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTGAGCACCGCCAGGTGCCAATAAGGGACAGTG
 AAGAAGGAACACCCGCTCGCGGGTGGGCTACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCCGTTGG
 ATACACCAAGGAAAGTCTACACGAACCCTTTGGCAAAATCCTGTATATCGTGCGAAAAAGGA
 TGGATATACCGAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGCAGGGTTATGCAGCGGAAAAGCGCT
 GCTTCCCTGCTGTTTTGTGGAATATCTACCGACTGGAAACAGGCAAATGCAGGAAATTAAGTGA
 ACTGAGGGGACAGGCGAGAGACGATGCCAAAGAGCTACACCGACGAGCTGGCCGAGTGGGT
 TGAATCCCGCGCGGCCAAGAAGCGCCGGCGTGATGAGGCTGCGGTTGCGTTCCTGGCGGTGA
 GGGCGGATGTCGAGGCGGCGTTAGCGTCCGGCTATGCGCTCGTCACCATTTGGGAGCACATGC
 GGGAAACGGGGAAGGTCAAGTTCTCCTACGAGACGTTCCGCTCGCACGCCAGGCGGCACATC
 AAGGCCAAGCCCGCCGATGTGCCCGCACCGCAGGCCAAGGCTGCGGAACCCGCGCCGGCACC
 CAAGACGCCGGAGCCACGGCGGCCGAAGCAGGGGGGCAAGGCTGAAAAGCCGGCCCCCGCT
 GCGGCCCGACCGGCTTCACCTTCAACCCAACCCGGACAAAAAGGATCTACTGTAATGGCG
 AAAATTCACATGGTTTTGCAGGGCAAGGGCGGGGTCGGCAAGTCGGCCATCGCCGCGATCAT
 TGCGCAGTACAAGATGGACAAGGGGACAGACACCCTTGTGCATCGACACCGACCCGGTGAACC
 CGACGTTGAGGGGCTACAAGGCCCTGAACGTCCGCGGCTGAACATCATGGCCGGCGACGAA
 ATTAACTCGCGCAACTTCGACACCCTGGTCGAGCTGATTGCGCCGACCAAGGATGACGTGGTG
ATCCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCC
 TATATCGCCGACATACCGATGGGGAAGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCTATACC
 TGCTGGACAGCATGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCAT
 AATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCAGCGCGTCGG
 CCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGA
 AGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCATGTTTGACAGCT
 TATCATCGATAAGCTT

图 2.4 pLOI193质粒克隆片段的DNA测序结果

Fig. 2.4 Sequence of the cloned DNA fragment from pLOI193

AAGCTT, HindIII restriction sites; GAATTC, EcoRI restriction site; TTCGAA, BstBI restriction site; GATC, Sau3AI restriction sites; sequence with underline, sequence 100% homologous to RP4; sequence with double underline, Sequence of the incomplete promoter of *tc^r*.



| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|-----------|-------------|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| 48597 | | 3681 | 3681 | 59% | 0.0 | 100% |

图 2.5 位于Sau3AI酶切位点间的克隆片段与RP4质粒的mob基因序列比对结果

Fig. 2.5 Blasting result of cloned sequence between Sau3AI sites with *mob* (RP4)

将该序列与已公布RP4质粒全序列 (Access No.: L27758.1) 一起提交NCBI网站, 并使用Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件进行序列比对分析 (见图 2.5)。根据Blast分析结果可知, 已克隆序列与文献公布来源于RP4质粒两个Sau3AI酶切位点间1993 bp的DNA序列完全同源 (100% identity)。

同时, 根据该序列绘制质粒图, 并将如图 2.6所示结构的质粒命名为pUC19-*mob* (RP4)^{pre}。根据发表文献报道, 对已克隆并与RP4完全同源DNA序列所包含的顺式作用元件进行解析(图 2.6)。

根据以上结果综合分析得出如下结论, 来源于RP4具有转移功能的核苷酸序列已经从pLOI193质粒克隆至新构建的pUC19-*mob* (RP4)^{pre}质粒中。已克隆的核苷酸序列除包括来源于RP4的*mob*基因外, 还包括一段四环素抗性基因启动子部分的序列和氯霉素抗性基因编码序列的一部分(图 2.4序列5'端)。为了尽量减少新构建质粒的分子量, 以及避免非必须DNA序列在新构建质粒中的出现, 在随后的操作中将使用HindIII与BstBI两限制性内切酶从已克隆的序列中获取分子量仅为2.5 kb的DNA片段。

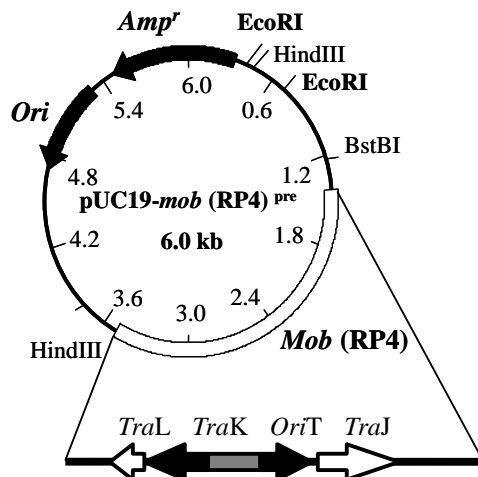


图 2.6 pUC19-*mob* (RP4)^{pre}质粒图以及与*mob* (RP4) 基因同源序列中的顺式作用元件
Fig. 2.6 The map of pUC19-*mob* (RP4)^{pre} and the cis-acting cassettes located in the cloned sequence homologous to *mob* (RP4)

Grey box, *oriT*; black arrows, complete open reading frame of genes; open arrows, incomplete open reading frame of genes (partial DNA sequence at the 3' end was deleted). Direction of the arrows, 5'→3'.

2.3.1.2 pUC19-*mob* (RP4)的构建

根据pUC19-*mob* (RP4)^{pre}中克隆DNA测序结果以及pUC19-*mob* (RP4)^{pre}质粒图可见, 四环素抗性基因启动子部分包含HindIII酶切位点, 为了将该常用酶切位点从四环素抗性基因序列中去除, 以保证该常用酶切位点可以在新构建的质粒中用于基因克隆, 本研究以定点突变的方式从四环素抗性基因的启动子序列中去除HindIII酶切位点。主要方法为: 用T4 DNA聚合酶(T4 DNA polymerase)对HindIII粘性末端平滑化处理。为了便于四环素抗性基因与*mob* (RP4)的组装以及四环素抗性基因HindIII酶切位点的突变, 首先利用pUC19-*mob* (RP4)^{pre}的两个EcoRI酶切位点, 将所包含的一段约为0.3 kb具有HindIII酶切位点的序列删除, 从而避免利用HindIII进行酶切反应时将pUC19-*mob* (RP4)^{pre}质粒切成两个DNA片段以致丢失*mob* (RP4)基因。酶切反应体系如下:

| 试剂名称: | 体积: |
|--------------------------|-------------|
| 转化子来源质粒 | 5 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 3.5 μ L |
| $\times 10$ EcoRI Buffer | 1.0 μ L |
| EcoRI | 0.5 μ L |

以0.7%琼脂糖核酸电泳对酶切产物进行分离(见图 2.7), 并切胶回收大小在5.7 kb的DNA片段。以Omega Gel Extraction Kit纯化回收分离之片段。

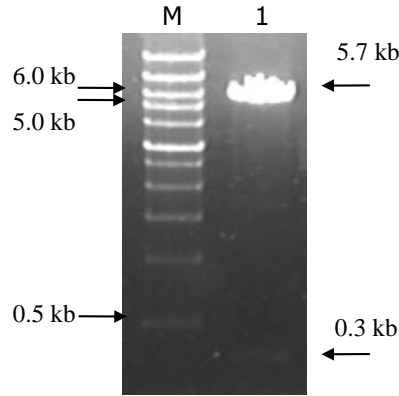


图 2.7 pUC19-*mob* (RP4)^{pre}EcoRI酶切产物琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.7 Agarose gel electrophoresis graph of pUC19-*mob* (RP4)^{pre} digested by EcoRI
Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19-*mob* (RP4)^{pre} (EcoRI).

将回收纯化的两DNA片段按如下体系配制成连接反应液，并于16℃孵育12 h。

| | |
|--|---------|
| 试剂名称: | 体积: |
| pUC19- <i>mob</i> (RP4) ^{pre} (EcoRI, 5.7 kb) | 1.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 16.0 μL |
| ×10 T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中，并以LA抗性平板对转化子于37℃筛选培养。随机挑选4个白色菌落重新划线于新鲜的LA抗性平板对转化子做进一步的纯化培养。挑取单菌落接种于LA液体抗性培养基中于37℃ 220 rpm培养12 h，并以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒。以如下体系对来源于6个不同菌落的质粒进行酶切反应：

| | |
|--------------|--------|
| 试剂名称: | 体积: |
| 转化子来源质粒 | 4.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.5 μL |
| ×10 Buffer R | 1.0 μL |
| HindIII | 0.5 μL |

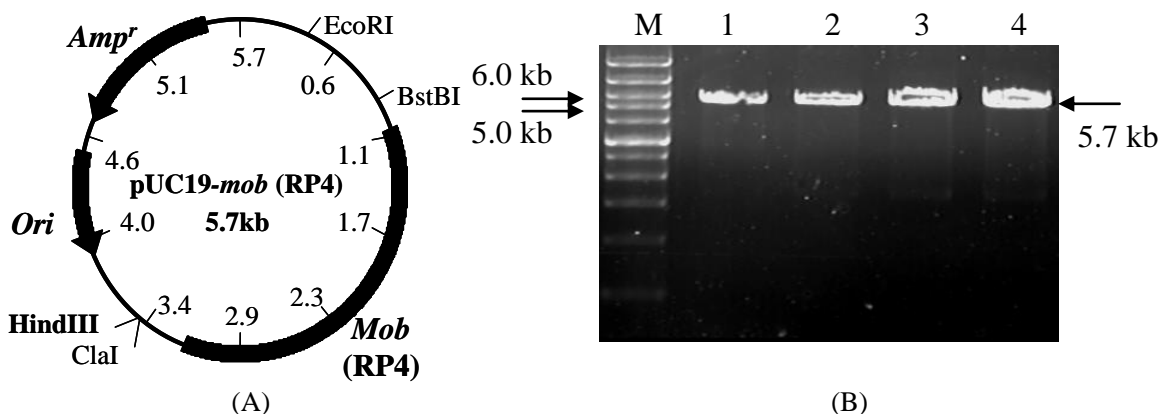


图 2.8 pUC19-*mob* (RP4)质粒图及用HindIII酶切初筛pUC19-*mob* (RP4)电泳图

Fig. 2.8 The plasmid map of pUC19-*mob* (RP4) and the electrophoresis gel graph of preliminarily screening pUC19-*mob* (RP4) by HindIII digestion

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1-4, Plasmids from transformants 1-4# digested by HindIII.

将酶切体系于37℃孵育2 h，并以0.7%琼脂糖核酸电泳分析酶切结果，见图 2.8 (B)。根据HindIII单酶切电泳图谱结果分析可知，所随机挑选的四个菌落中所含有质粒皆有可

能为按照设计方案所欲得到的质粒。由于删除了pUC19-*mob* (RP4)^{ptc}两个EcoRI酶切位点所包含约为0.3 kb的DNA片段,因此新构建的质粒只具有1个HindIII酶切位点,并且酶切后理论上只应产生一个大小为5.7 kb的基因片段。新构建的质粒命名为pUC19-*mob* (RP4),详见图 2.8 (A)。

2.3.1.3 pUC19-*tc^r*的构建

以pBR22质粒为四环素抗性基因来源,通过以pBR22质粒为模板,以引物7和8(表 2.2)和pfu通过PCR获取四环素抗性基因片段。以pUC19对四环素抗性基因进行亚克隆,并以含有四环素的LB琼脂平板(LT抗性平板)对亚克隆质粒的转化子进行筛选。

以pBR22质粒为模板制备四环素抗性基因的PCR体系参考材料与方 法 2.2.2.2。其中退火温度为58 ℃,延伸时间为3.0 min,总循环数为25 cycles。以Omega PCR Purification Kit对PCR产物进行纯化,并以PstI和EcoRI分别对纯化后的PCR产物和pUC19质粒进行双酶切,酶切反应体系如下所述:

| 试剂名称: | 体积: |
|--|----------|
| <i>Tc^r</i> PCR 纯化产物 (或 pUC19) | 10.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.0 μL |
| ×10 Tango Buffer | 4.0 μL |
| PstI 和 EcoRI | 各 1.0 μL |

将两酶切体系于37 ℃孵育过夜(8 h),并以0.7%琼脂糖核酸电泳纯化酶切产物。经Omega Gel Extraction Kit回收的两DNA片段以0.7%琼脂糖核酸电泳确认纯化回收结果(图 2.9)。

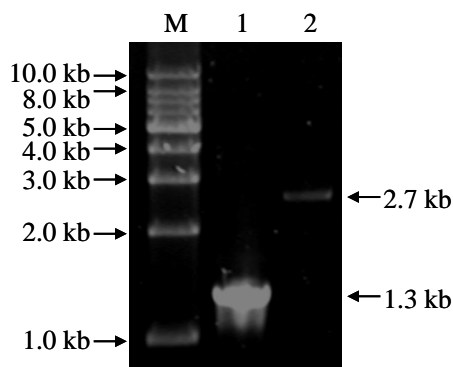


图 2.9 *Tc^r* (EcoRI和PstI, 1.3 kb) 以及pUC19 (EcoRI和PstI, 2.7 kb) 纯化产物的琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.9 Confirm the purified *tc^r* (EcoRI & PstI, 1.3 kb) & pUC19 (EcoRI & PstI, 2.7 kb) by agarose gel electrophoresis

Lane M, marker (1 kb Plus DNA Ladder, Tiangen); lane 1, *tc^r* (EcoRI & PstI); lane 2, pUC19 (EcoRI & PstI).

将经回收纯化的两个酶切产物按照如下体系配制成连接反应液,并于16 ℃孵育12 h。

| 试剂名称: | 体积: |
|--|---------|
| <i>tc^r</i> (EcoRI 和 PstI, 1.3 kb) | 1.0 μL |
| pUC19 (EcoRI 和 PstI, 2.7 kb) | 15.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 1.0 μL |
| ×10 T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞,以LT抗性平板对转化子进行筛选培养。随机挑选1个菌落重新划线于新鲜LT抗性平板于37 ℃孵育12 h,挑取单菌落接种于

LT液体抗性培养基用于质粒DNA的制备。以如下体系配制单酶切和双酶切反应体系：

| 试剂名称（单酶切体系）： | 体积： | 试剂名称（双酶切体系）： | 体积： |
|------------------------------|--------|------------------------------|----------|
| pUC19- <i>tc^r</i> | 5.0 μL | pUC19- <i>tc^r</i> | 10.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 2.5 μL | 灭菌的超纯水 | 4.0 μL |
| ×10 Tango Buffer | 2.0 μL | ×10 Tango Buffer | 4.0 μL |
| EcoRI | 0.5 μL | PstI 和 EcoRI | 各 1.0 μL |

将酶切体系于冰上配制完毕后，于37℃孵育2 h。同时，用四环素抗性基因引物（引物7和8）以pBR322质粒为对照，对抽取质粒作PCR（Taq DNA polymerase）鉴定。质粒图以及质粒鉴定电泳图谱详见图 2.10。

根据所获得转化子具有四环素抗性和琼脂糖核酸电泳鉴定图谱可知，四环素抗性基因已经被克隆于pUC19载体上。该质粒将在本章和本论文其它相关工作中作为具有多种可选择克隆位点四环素抗性基因的来源。

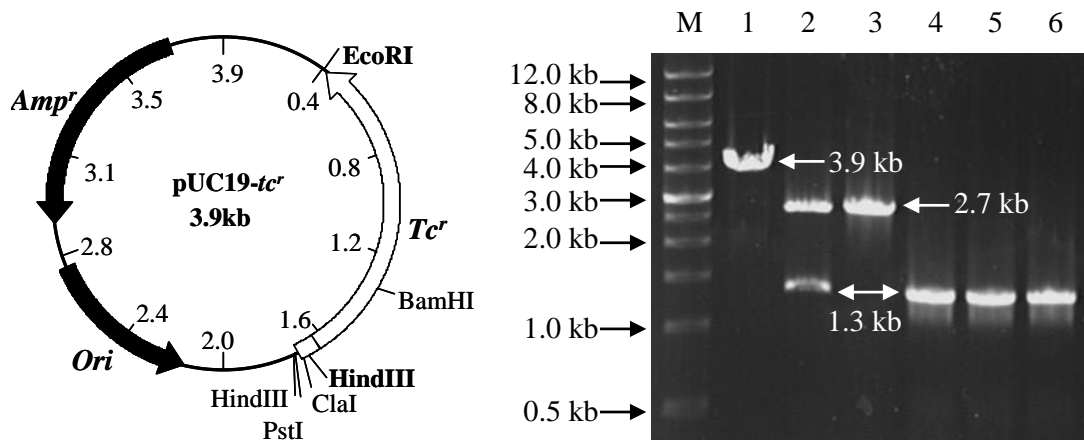


图 2.10 pUC19-*tc^r*质粒图以及琼脂糖核酸电泳鉴定图谱

Fig. 2.10 The plasmid map of pUC19-*tc^r* and agarose gel electrophoresis graph for its identification. Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19-*tc^r* (EcoRI, 3.9 kb); lane 2, pUC19-*tc^r* (EcoRI & PstI, 1.3 kb); lane 3, pUC19 (EcoRI & PstI, 2.7 kb); lane 4, *tc^r* (EcoRI & PstI, 1.3 kb); lane 5, *tc^r* PCR products with pUC19-*tc^r* as the template (1.3 kb); lane 6, *tc^r* PCR products with pBR322 as the template (1.3 kb).

2.3.1.4 pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*的构建

为了实现四环素抗性基因启动子上HindIII酶切位点的突变，四环素抗性基因编码区以及pUC19-*mob* (RP4)四环素抗性基因启动子以平滑化后的HindIII位点进行对接。正确连接接后的四环素抗性基因编码区将重新获得除HindIII位点突变以外的完整启动子。新构建的质粒将获得完整的四环素抗性基因，该质粒命名为pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*。

以 pUC19-*tc^r* 质粒作为四环素抗性基因的来源，通过使用 EcoRI 和 HindIII 从质粒上酶切获得四环素抗性基因（1.3 kb），以 0.7% 琼脂糖核酸电泳和 Omega Gel Extraction Kit 纯化回收目的基因片段；同时，使用 HindIII 对前期构建的 pUC19-*mob* (RP4)进行单酶切，从而得到线性化的质粒 DNA（5.7 kb），以 Omega PCR Purification Kit 对其进行纯化。以 T4 DNA polymerase 将所获得四环素抗性基因片段和线性化的 pUC19-*mob* (RP4)质粒双链 DNA 进行末端平滑化处理。酶切和末端平滑化体系如下所述配制：

| 试剂名称（酶切体系 1）： | 体积： | 试剂名称（酶切体系 2）： | 体积： |
|------------------------------|----------|-------------------------|--------|
| pUC19- <i>tc^r</i> | 10.0 μL | pUC19- <i>mob</i> (RP4) | 6.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 5.0 μL | 灭菌的超纯水 | 2.0 μL |
| ×10 Tango Buffer | 4.0 μL | ×10 Buffer R | 1.0 μL |
| HindIII 和 EcoRI | 各 1.0 μL | HindIII | 1.0 μL |

酶切反应体系于冰上配制完毕后，混合均匀并离心，于37℃孵育2 h。

| 试剂名称: | 体积: |
|--|--------------------|
| 经酶切并纯化后的 <i>tc'</i> 或 pUC19- <i>mob</i> (RP4) 线性 DNA | 10.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.8 μL |
| $\times 5$ T4 DNA Polymerase Reaction Buffer | 4.0 μL |
| dNTP Mix, 2 mM each | 1.0 μL |
| T4 DNA Polymerase (1 unit) | 0.2 μL |

粘性末端平滑化反应体系于11℃孵育20 min后，立即以Omega PCR Purification Kit进行反应产物的回收纯化，并以0.7%琼脂糖核酸电泳定回收纯化的两个DNA片段(图 2.11)。

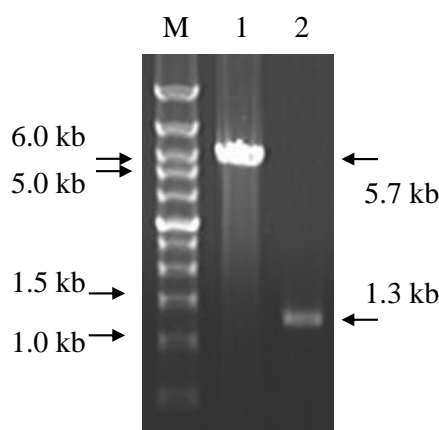


图 2.11 末端平滑化的pUC19-*mob* (RP4)和四环素抗性基因琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.11 Agarose gel electrophoresis graph of purified pUC19-*mob* (RP4) (HindIII) and *tc'* (HindIII&EcoRI) treated by T4 DNA polymerase

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19-*mob* (RP4) (HindIII) blunted by T4 DNA polymerase; lane 2, *tc'* (HindIII & EcoRI) blunted by T4 DNA polymerase.

将末端平滑化的pUC19-*mob* (RP4)线性DNA片段和末端平滑化的四环素抗性基因片段按照如下体系配制成连接反应液，并置连接反应体系于16℃孵育12 h。

| 试剂名称: | 体积: |
|---|-------------------|
| pUC19- <i>mob</i> (RP4) (HindIII 和 T4 DNA polymerase, 5.7 kb) | 3.0 μL |
| <i>Tc'</i> (HindIII 和 EcoRI 以及 T4 DNA polymerase, 1.3 kb) | 5.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 9.0 μL |
| $\times 10$ T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中，并以LT抗性平板进行筛选培养。

随机挑选4个菌落重新划线于新鲜的LT抗性平板上于37℃恒温培养箱中培养12 h。挑取单菌落接种于LT液体抗性培养基中于37℃ 220 rpm培养12 h，并以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒。根据设计的pUC19-*mob* (RP4)-*tc'*推测序列可知，新构建的质粒应当只具有一个EcoRI酶切位点；并且由该限制性内切酶酶切质粒DNA只应产生一个大小为7.0 kb左右的线性DNA。以如下体系配制EcoRI酶切反应体系：

| 试剂名称: | 体积: |
|--------------------------|-------------------|
| 转化子来源质粒 | 4.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.5 μL |
| $\times 10$ EcoRI Buffer | 1.0 μL |
| EcoRI | 0.5 μL |

酶切反应体系于冰上配制完毕后，混合均匀并离心，于37℃孵育2 h。并以0.7%琼脂糖核酸电泳分析来源于四个不同转化子质粒的酶切DNA产物分子量（图 2.12）。

由图 2.12分析可知，从1#，3#和4#转化子中抽取的质粒经EcoRI酶切后仅有单一条带，并且其分子量与欲构建之pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*质粒分子量之理论值相符。由此初步推断，1#，3#和4#转化子中所含有的质粒可能为欲构建之质粒。

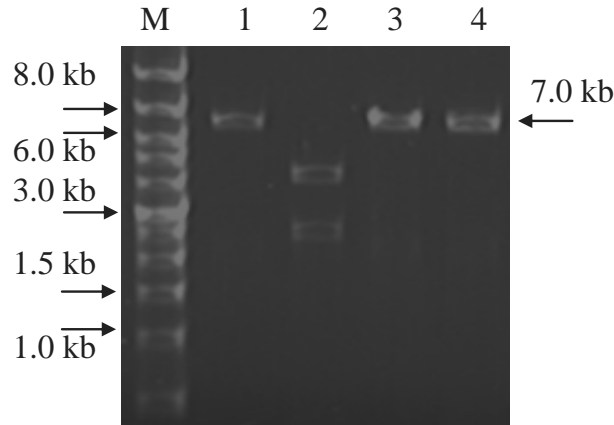


图 2.12 质粒构建连接产物转化子初步筛选鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.12 Agarose gel electrophoresis graph of preliminarily identifying the plasmids constructed Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1-4, plasmids 1-4# from transformants 1-4# digested by EcoRI.

将来源于1#转化子中的质粒以BstBI单酶切，EcoRI和HindIII双酶切，NcoI单酶切，EcoRI和BamHI双酶切，以及四环素抗性基因PCR做进一步鉴定。各反应体系如下所述：

| | | | |
|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| 试剂名称(酶切体系 1): | 体积: | 试剂名称(酶切体系 2): | 体积: |
| 质粒 1# | 4.0 μ L | 质粒 1# | 4.0 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 4.5 μ L | 灭菌的超纯水 | 4.5 μ L |
| $\times 10$ Buffer Tango | 1.0 μ L | $\times 10$ Buffer Tango | 1.0 μ L |
| BstBI | 0.5 μ L | NcoI | 0.5 μ L |
| 试剂名称(酶切体系 3): | 体积: | 试剂名称(酶切体系 4): | 体积: |
| 质粒 1# | 4.0 μ L | 质粒 1# | 4.0 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 3.0 μ L | 灭菌的超纯水 | 3.0 μ L |
| $\times 10$ Buffer Tango | 2.0 μ L | $\times 10$ Buffer Tango | 2.0 μ L |
| EcoRI 和 HindIII | 各 0.5 μ L | EcoRI 和 BamHI | 各 0.5 μ L |

上所述酶切反应于37℃孵育2 h。另外，以所制备的Plasmid 1#和pBR22质粒为模板，用四环素抗性基因引物和Taq DNA polymerase进行PCR。50 μ L反应体系的配制参考材料与方法 2.2.2.2。其中退火温度为58℃，延伸时间为1.5 min，总循环数为25 cycles。以0.7%琼脂糖凝胶核酸电泳分析酶切和PCR产物（图 2.13）。

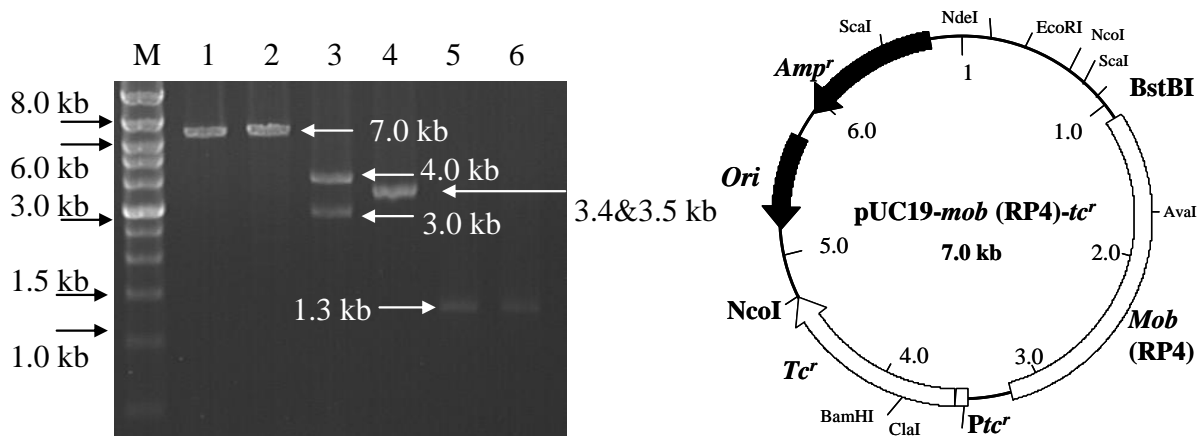


图 2.13 pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*质粒鉴定之琼脂糖核酸电泳图和质粒图

Fig. 2.13 Preliminary identification of the plasmids in the transformants by EcoRI digestion and agarose gel electrophoresis

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, plasmids 1# (BstBI); lane 2, plasmids 1# (EcoRI & HindIII); lane 3, plasmids 1# (NcoI); lane 4, plasmids 1# (EcoRI & BamHI); lane 5, *tc^r* PCR products with plasmid 1# as the template; lane 6, *tc^r* PCR products with pUC19-*tc^r* as the template.

由图 2.13分析可知，四环素抗性基因已经被克隆至pUC19-*mob* (RP4)质粒。BstBI单酶切条带证实所构建的质粒分子量符合理论值大小（约7.0 kb）。EcoRI和HindIII双酶切仅获得一条分子量与BstBI单酶切产物大小相仿的DNA条带，从而证实HindIII酶切位点在pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*质粒构建过程中已经从四环素完整的抗性基因中突变消失。通过BamHI和EcoRI双酶切反应所产生的一个重叠条带（约3.4~3.5 kb）进一步可以确认：在pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*质粒构建过程中，位于四环素抗性基因3'末端的EcoRI酶切位点同样已经被去除。由所构建的pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*质粒经NcoI彻底酶切后所产生的两条分子量分别约为3.0 kb和4.0 kb的DNA条带可以推断，来源于pUC19-*tc^r*的不完整的*tc^r*（HindIII和EcoRI）DNA片段5'端已经与pUC19-*mob* (RP4)上部分四环素抗性基因启动子的3'端进行了互补对接。并且转化子所具有的四环素抗性，也进一步证实四环素抗性基因CDS序列和启动子的互补对接。

2.3.1.4 pHW10a质粒的构建

根据所公布RSF1010之序列信息（GeneBank Access No.: M28829）和pLOI193质粒之构建过程可知^[222]，pLOI193质粒中含有诸多冗余基因片段其中包括链霉素抗性基因*Sm^rA*和*Sm^rB*，*ColE1*复制子和*Cm^r*抗性基因（图 2.14）。

为了将这些多余的基因片段从原有的pLOI193中去除，首先使用PstI和HincII限制性内切酶对pLOI193进行彻底酶切消化，从而将包括来源于RP4的*mob*基因在内的大约7.7 kb的DNA片段去除。利用琼脂糖核酸电泳对消化产生的大约5.7 kb的DNA片段进行回收。由图 2.14所提供两个质粒的物理谱图可知，回收的DNA片段包括了用于接合转移的所有顺式作用元件和保证新构建质粒可以在革兰氏阴性细菌广泛宿主中进行复制的复制子（*oriV*）及所需蛋白的编码基因。根据图 2.1所示之pHW20a构建示意图，通过将来源于pLOI193的5.7 kb片段和来源于pUC19-*mob* (RP4)-*tc^r*的*mob* (RP4)-*tc^r*多顺反子以T4 DNA polymerase进行末端平滑化处理，以T4 DNA ligase进行连接，从而得到一个带有四环素抗性基因，以及两个不同来源*mob*基因的穿梭质粒—pHW10a。

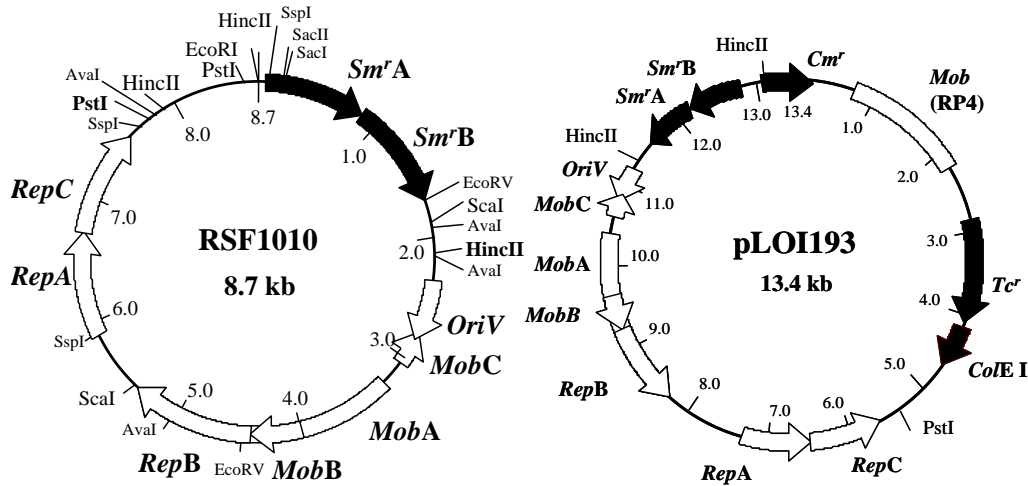


图 2.14 RSF1010和pLOI193质粒谱图

Fig. 2.14 Plasmid maps of RSF1010 and pLOI193

RepA, *repB*, and *repC* encoded proteins participating in the replication of RSF1010 [276-277]. *MobA*, *mobB*, and *mobC* encoded proteins necessary for the mobilization of RSF1010. *SmrA*, streptomycin resistance gene A; Open arrows indicated the genes would be retained in the new constructed shuttle vector-pHW20a. Open box marked with *Mob* (RP4), the cis-acting elements constituting the *mob* cassette from RP4. The black arrows, genes would be deleted or not be involved in pHW20a.

以PstI和HincII双酶切制备RSF1010 (PstI和HincII, 5.7 kb) 片段和以BstBI和NcoI双酶切制备*mob* (RP4)-*tc^r* (BstBI和NcoI, 3.8 kb) 多顺反子的反应体系如下所述:

| | | | |
|------------------|----------|--|----------|
| 试剂名称 (酶切体系 1): | 体积: | 试剂名称 (酶切体系 2): | 体积: |
| pLOI193 | 15.0 μL | pUC19- <i>mob</i> (RP4)- <i>tc^r</i> | 15.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 2.0 μL | 灭菌的超纯水 | 2.0 μL |
| ×10 Buffer Tango | 2.0 μL | ×10 Buffer Tango | 2.0 μL |
| PstI 和 HincII | 各 1.0 μL | Bstp119I(BstBI)和 NcoI | 各 1.0 μL |

上所述酶切反应于37 °C孵育4 h。待酶切和PCR结束后, 反应产物以0.7%琼脂糖凝胶核酸电泳纯化目的DNA片段, 并以Omega Gel Extraction Kit对目的DNA片段进行回收纯化。将回收得到的两个带有粘性末端的DNA片段分别以T4 DNA polymerase对其进行末端平滑化处理, 反应体系如下所述:

| | |
|--|---------|
| 试剂名称: | 体积: |
| 胶纯化后的RSF1010(PstI 和 HincII, 5.7 kb) 片段或 <i>mob</i> (RP4)- <i>tc^r</i> (BstBI 和 NcoI, 3.8 kb) | 10.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.8 μL |
| ×5 T4 DNA Polymerase Reaction Buffer | 4.0 μL |
| dNTP Mix, 2 mM each | 1.0 μL |
| T4 DNA Polymerase (1 unit) | 0.2 μL |

粘性末端平滑化反应体系于冰上配制完毕后, 于11 °C孵育20 min, 并立即以Omega PCR Purification Kit进行反应产物DNA片段的回收纯化, 并以0.7%琼脂糖核酸电泳鉴定回收纯化的两个DNA片段 (图 2.15)。

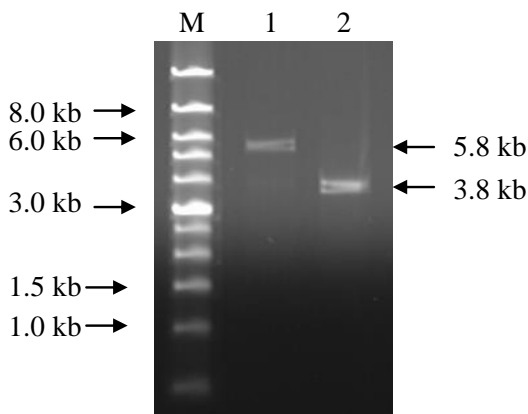


图 2.15 末端平滑化的RSF1010 (PstI和HincII, 5.7 kb) 和mob (RP4)-tc^r (BstBI和NcoI, 3.8 kb) 琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.15 Agarose gel electrophoresis graph of RSF1010 (PstI & HincII, 5.7 kb) and *mob* (RP4)-*tc^r* (BstBI & NcoI, 3.8 kb) with blunted ends

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, RSF1010 (PstI & HincII, 5.7 kb) blunted by T4 DNA polymerase; lane 2, *mob* (RP4)-*tc^r* (BstBI & NcoI, 3.8 kb) blunted by T4 DNA polymerase.

将末端平滑化的RSF1010 (PstI和HincII, 5.7 kb) 和*mob* (RP4)-*tc^r* (BstBI和NcoI, 3.8 kb) DNA片段按如下体积配制连接反应体系, 并于16 °C孵育12 h。

| | |
|--|--------|
| 试剂名称: | 体积: |
| RSF1010 (PstI 和 HincII, 5.7 kb) | 5.0 μL |
| <i>Mob</i> (RP4)- <i>tc^r</i> (BstBI 和 NcoI, 3.8 kb) | 5.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 7.0 μL |
| ×10 T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中, 以LT抗性平板上于37 °C对转化子筛选培养。随机挑选4个菌落重新划线于新鲜的LT抗性平板, 从中挑取单菌落接种于LT液体抗性培养基中于37 °C 220 rpm培养, 用于质粒抽取。根据设计质粒的推测序列分析可知, RSF1010 (PstI和HincI, 5.7 kb) 和*mob* (RP4)-*tc^r* (BstBI和NcoI, 3.8 kb) 会以两种不同的连接方向产生两种新质粒—pHW10a或者是pHW10b, 其质粒大小均为9.5 kb(图 2.16)。

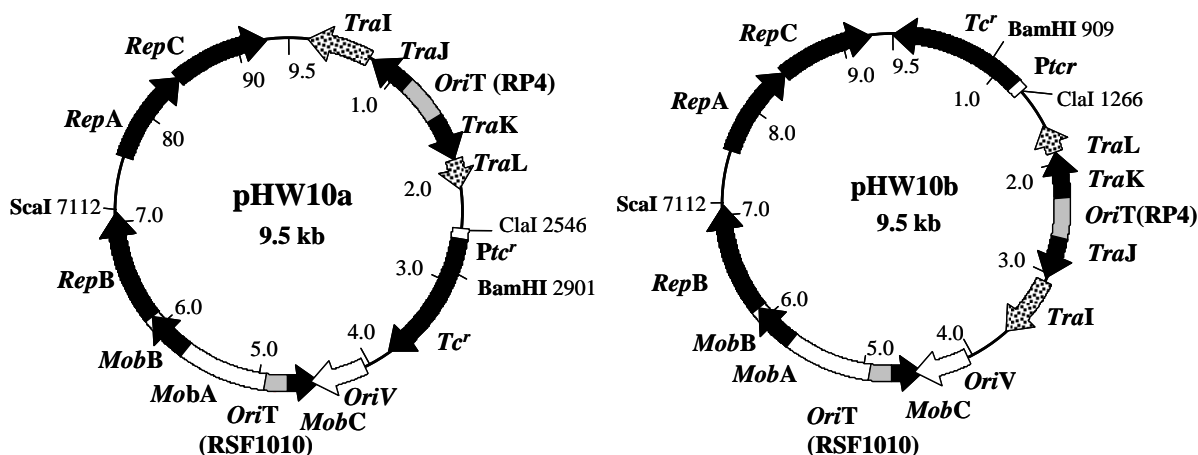


图 2.16 pHW10a和pHW10b质粒图谱

Fig. 2.16 Plasmid maps of pHW10a and pHW10b

Grey boxes, *OriT*; open arrows with dots, incomplete genes; black arrows, complete CDS of cis-acting elements; open arrows, overlapping genes (*mobA* and *oriV*).

两种质粒的ScaI和BamHI双酶切反应产物经琼脂糖凝胶电泳分析会产生不同分子量分布的电泳图谱 (pHW10a: 4.2 kb和5.3 kb; pHW10b: 6.2 kb和3.3 kb)。根据此原理可以用于转化子中所含有质粒种类的鉴定。以如下体系配制ScaI酶切反应体系:

| | |
|-------------------------|-------------|
| 试剂名称: | 体积: |
| Plasmids 1#-4# | 8.5 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 0.0 μ L |
| $\times 10$ ScaI Buffer | 1.0 μ L |
| ScaI | 0.5 μ L |

酶切反应体系于冰上配制完毕后,混合均匀并离心,于37 $^{\circ}$ C孵育2 h。并以0.7%琼脂糖核酸电泳分析酶切反应产物分子量,见图 2.17 (A)。

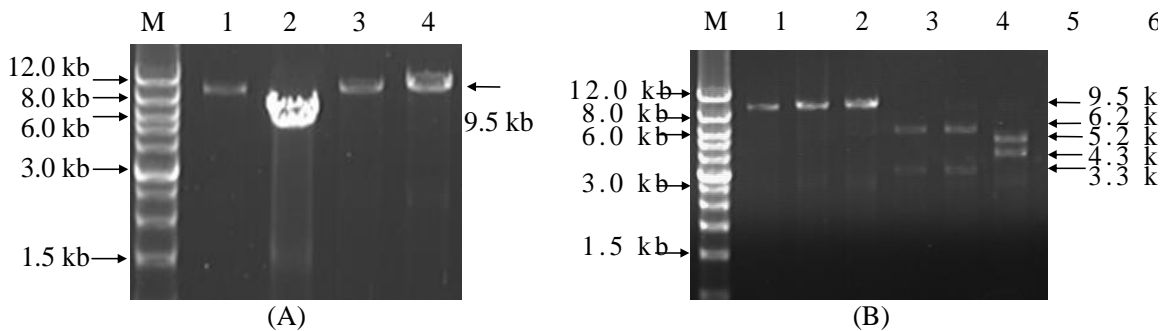


图 2.17 pHW10a和pHW10b质粒的初步鉴定

Fig. 2.17 Preliminary identification of pHW10a and pHW10b

(A) Preliminary identification of plasmids from transformants 1#-4# by ScaI digestion. Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1-4, plasmids 1-4# from transformants 1-4# digested by ScaI. (B) Further identification of plasmids from transformants 1#, 3#, and 4#. Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1-3, plasmids from 1#, 3#, and 4# transformants digested by ScaI; lane 4-6, plasmids from 1#, 3#, and 4# transformants digested by ScaI and BamHI.

由图 2.17 (A)分析可知,1#, 3#和4#转化子中所含有之质粒经过ScaI单酶切后仅产生一条大小位于8.0 kb和12.0 kb DNA marker之间的条带,与所欲构建之pHW10a和pHW10b理论大小(9.5 kb)相仿。因此,来源于这三个转化子的质粒留做进一步分析鉴定。将经ScaI酶切的1#, 3#和4#酶切产物,以Omega PCR Purification Kit进行纯化,并按照如下反应体系配制BamHI酶切反应体系:

| | |
|----------------------------|-------------|
| 试剂名称: | 体积: |
| Plasmids 1#, 3#和 4# (ScaI) | 8.5 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 0.0 μ L |
| $\times 10$ BamHI Buffer | 1.0 μ L |
| BamHI | 0.5 μ L |

酶切反应体系于冰上配制完毕后,混合均匀并离心,于37 $^{\circ}$ C孵育2 h。以0.7%琼脂糖核酸电泳分析来源于三个不同转化子质粒的ScaI单酶切产物以及ScaI和BamHI双酶切产物的分子量,详见图 2.17 (B)。由图 2.17 (B)分析可知,1#和3#转化子经ScaI和BamHI双酶切后,产物的DNA分子量大约分别为6.2 kb和3.3 kb,其分子量分布与pHW20b经ScaI和BamHI双酶切后产生DNA条带分子量的理论值相符;同时,4#转化子中所含有之质粒经ScaI和BamHI双酶切后,产生的DNA片段分子量大约分别为4.2 kb和5.3 kb,其分子量分布与pHW20a经ScaI和BamHI双酶切后产物的分子量分布理论值相符。以pUC19-*tc'*质粒作为对照模板,分别取1#和4#转化子中的质粒为模板并以四环素抗性基因PCR做进一步验证 (PCR条件详见2.3.1.3 pUC19-*tc'*的构建部分),单酶切反应,双酶切反应和四环素抗性基因PCR结果均以0.7%琼脂糖核酸电泳分析 (图 2.18)。

根据图 2.18提供鉴定结果信息分析可知, pHW10a和pHW10b两质粒已经被成功构建。其单酶切反应, 双酶切反应以及PCR产物的DNA条带分子量均与欲构建质粒的理论分子量相符。

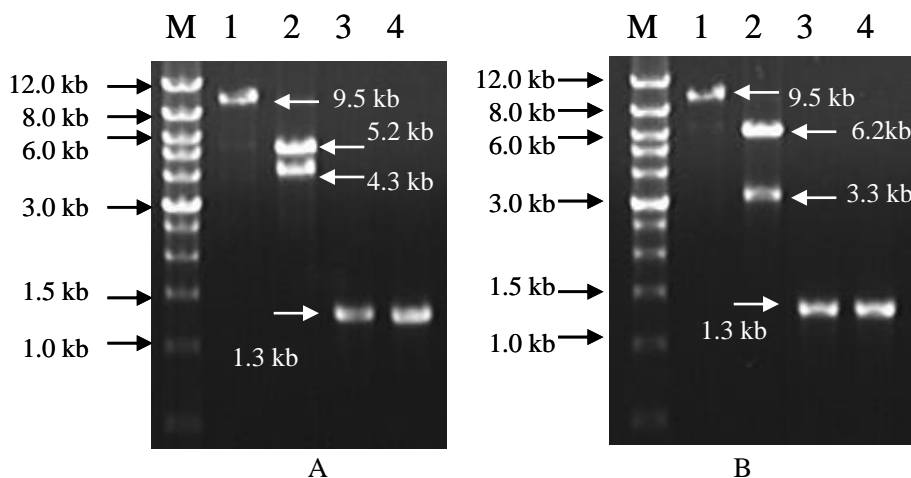


图 2.18 构建质粒pHW10a和pHW10b的鉴定

Fig. 2.18 Identification of pHW10a and pHW10b by restriction digestion and PCR reaction (A) Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pHW10a (ScaI, 9.5 kb); lane 2, pHW10a (ScaI & BamHI, 5.2 kb & 4.3 kb); lane 3, tc^r PCR products with pHW10a as the template; lane 4, tc^r PCR products with pUC19- tc^r as the template. (B) Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pHW10b (ScaI, 9.5 kb); lane 2, pHW10b (ScaI & BamHI, 6.2 kb & 3.3 kb); lane 3, tc^r PCR products with pHW10b as the template; lane 4, tc^r PCR products with pUC19- tc^r as the template.

2.3.1.5 pHW20a质粒的构建

虽然, pHW10a和pHW10b两个质粒基本上已经具备作为穿梭工具质粒的主要要素, 但是从两个质粒图上可以看出: 由于删减了大部分的冗余基因片段及其紧凑的结构, 所以此两质粒所能提供的克隆位点极其有限。为弥补将其不足之处, 以PCR制备了pUC19质粒的 $lacZ\alpha$ 基因, 并将其克隆至pHW10a质粒中。为了进一步获得较多的可以利用的克隆位点, 因此在 $lacZ\alpha$ PCR正反引物(引物9#和10#)匹配序列的5'端各额外合成一小段II型(Class II)限制性内切酶可识别的寡核苷酸序列。 $LacZ\alpha$ PCR(体系配制参考2.2.2.2 PCR体系)条件为: 退火温度为60 °C, 延伸时间为1.0 min, 总循环数为25 cycles。PCR产物经Omega PCR Purification Kit对其进行纯化, 并借助pHW10a质粒的ScaI酶切位点对其进行克隆。ScaI酶切pHW10a反应体系如下所述:

| 试剂名称: | 体积: |
|-------------------------|--------------|
| pHW10a | 15.0 μ L |
| 灭菌的超纯水 | 2.0 μ L |
| $\times 10$ ScaI Buffer | 2.0 μ L |
| ScaI | 1.0 μ L |

酶切反应体系于37 °C孵育2 h, 以0.7%琼脂糖核酸电泳分离回收大小约为9.5 kb的DNA条带, 并Omega Gel Extraction Kit对其进行纯化。经纯化获得的 $lacZ\alpha$ PCR产物和pHW10a (ScaI, 9.5 kb) dsDNA以0.7%琼脂糖核酸电泳确认纯化回收结果(图 2.19)。

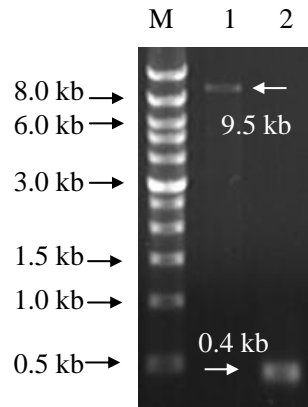


图 2.19 经纯化后pHW10a (ScaI)和lacZα PCR产物的琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.19 The agarose gel electrophoresis graph of purified pHW10a (ScaI, 9.5 kb) and purified lacZα PCR products (0.4 kb)

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, purified pHW10a (ScaI, 9.5 kb); lane 2, lacZα PCR products (0.4 kb).

按如下体积配制连接反应体系:

| 试剂名称: | 体积: |
|-----------------------------|---------|
| pHW10a (ScaI, 9.5 kb) | 10.0 μL |
| lacZα PCR products (0.4 kb) | 3.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.0 μL |
| ×10 T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接反应体系于16℃孵育12 h, 并将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中。以含有IPTG和X-gal的LT抗性平板(简称为LIXT抗性平板), 于37℃对转化子进行筛选培养。从LIXT抗性平板上随机挑选8个蓝色菌落并重新划线于LT抗性平板上于37℃恒温培养箱中培养12 h。挑取单菌落接种于LT液体抗性培养基中, 于37℃ 220 rpm培养12 h。取1 mL菌液于10,000×g离心1 min, 以100 μL无菌超纯水重新悬浮菌体, 并置于100℃甘油浴中加热裂解5 min制备质粒DNA。以来源于不同转化子的质粒DNA为模板, 通过使用Taq DNA polymerase的lacZα PCR对各质粒做初步筛选鉴定。LacZα PCR条件为(材料与方法 2.2.2.2), 退火温度为60℃, 延伸时间为0.5 min, 总循环数为25 cycles。来源于各转化子质粒的lacZα PCR以大肠杆菌DH5α (pUC19) 菌体100℃热裂解液和pUC19质粒作为对照, 反应结束后以0.7%琼脂糖核酸电泳确认产物的分子量(图 2.20)。

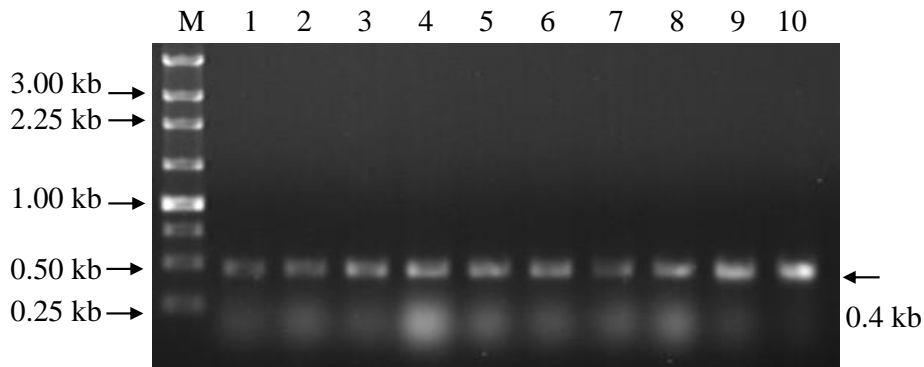


图 2.20 lacZα PCR筛选阳性克隆

Fig. 2.20 Screen the positive clone by lacZα PCR

Lane M, marker (250 bp DNA ladder); lane 1-8, lacZα PCR products with boiled cell lysates from transformants 1#-8#; lane 9, lacZα PCR products with boiled cell lysates from E. coli DH5α (pUC19); lane 10, lacZα PCR products with pUC19.

根据图 2.20, 以所筛选得到的蓝色菌落中所含有的质粒为*lacZα* PCR之模板, 其反应产物DNA分子量皆与*lacZα*之理论值相符。从而初步证实*lacZα*已被克隆至pHW10a中。以Omega Plasmid Mini Kit从过夜培养的1#转化子细胞中制备质粒DNA, 将其分别以如图 2.21所示之限制性内切酶单酶切反应, 双酶切反应和*lacZα* PCR进行鉴定, 同时将该质粒递交测序(图 2.22)以再次确认额外设计的酶切位点以及*lacZα*克隆结果。



图 2.21 鉴定pHW20a琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.21 The agarose gel electrophoresis graph of pHW20a identification

Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, pHW20a (ClaI & NdeI, 5.3&4.6 kb); lane 2, pHW20a (BamHI, 5.4&4.5 kb); lane 3, pHW20a (ClaI, 9.9 kb); lane 4, pHW20a (HindIII, 9.9 kb); lane 5, pHW20a (EcoRI, 9.9 kb); lane 6, pHW20a (XbaI, 9.9 kb); lane 7, pHW10a (ScaI, 9.5 kb); lane 8, pHW20a (ClaI & HindIII, 4.8&5.1 kb); lane 9, pHW20a (ClaI & XbaI, 4.9&5.0 kb); lane 10, pHW20a (ClaI & EcoRI, 4.8&5.1 kb); lane 11, *lacZα* PCR products with pHW20a as a template; lane 12, *lacZα* PCR products with pUC19 as a template; lane m, marker (250 bp DNA ladder).

如图 2.23所示, 克隆有*lacZα*的pHW10a质粒, 其理论产物应有两种 (pHW20a或pHW20b)。此两种质粒经ClaI和NdeI双酶切产生的DNA条带分子量分别为: 5.3 kb和4.6 kb (pHW20a) 或4.9 kb和5.0 kb (pHW20b); 经BamHI酶切产生的DNA条带分子量分别为: 5.4 kb和4.5 kb (pHW20a) 或4.4 kb和5.5 kb (pHW20b)。图 2.20和图 2.21所提供之信息显示, 从1#转化子细胞中制备之质粒DNA经ClaI和NdeI双酶切后产生的小DNA片段明显小于大片段的分子量, 且位于4.0 kb和5.0 kbDNA分子量标准品之间; 大片段分子量明显位于5.0 kb和6.0 kbDNA分子量标准品之间。结合SacI位点插入序列的测序结果分析可知, 1#转化子细胞中所含有之质粒系pHW20a。同时经HindIII、EcoRI、ClaI和XbaI单酶切反应及*lacZα*测序结果确认, 所设计之HindIII和EcoRI酶切位点在构建的pHW20a质粒上只有一个, 且位于*lacZα*的多克隆位点处。额外设计的四个酶切位点均正确出现在新构建质粒的*lacZα*序列两翼。

```

1      AGATCTACGC GTCTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTA CTG AGAGTGCACC
51     ATATGCGGTG TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC
101    AGGCGCCATT CGCCATTCAG GCTGCGCAAC TGTTGGGAAG GGCGATCGGT
151    GCGGGCCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA
201    GGCGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA
251    ACGACGGCCA GTGAATTCGA GCTCGGTACC CGGGGATCCT CTAGAGTCGA
301    CCTGCAGGCA TGCAAGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT GTTTCCTGTG
351    TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT
401    AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTACTCG AGGCGGCCGC

```

图 2.22 pHW10a ScaI酶切位点插入序列测序结果

Fig. 2.22 Sequence of DNA inserted into pHW10a at ScaI site

The DNA sequence underlined indicated the sequence was homologous to *lacZα* in pUC19 with 100% identity. DNA sequence with a black background indicates the designed sequence for extra restriction endonuclease sites (BglIII, MluI and XhoI, NotI). *LacZα* was inserted into pHW10a in count-clockwise direction, and the start codon and terminal codon were highlighted in boldface style.

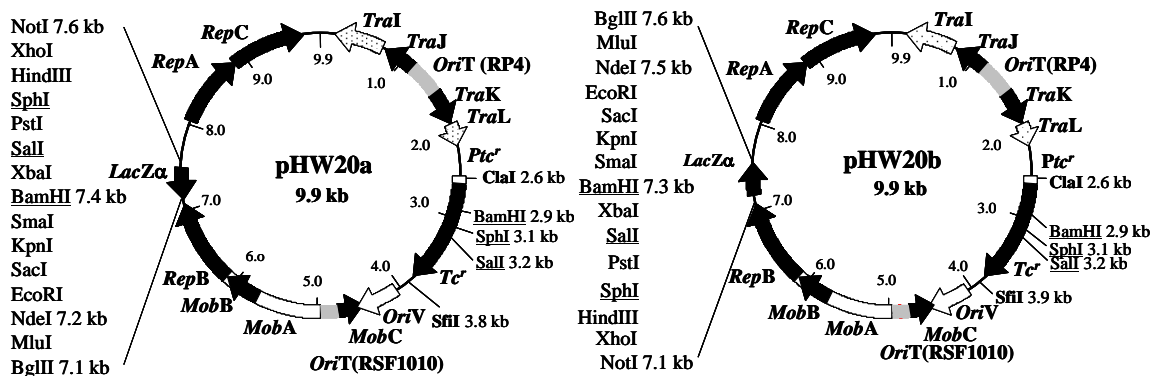


图 2.23 pHW20a和pHW20b质粒详图

Fig. 2.23 Detailed plasmid map of pHW20a and pHW20b

The underlined restriction endonuclease sites indicated those sites were not unique in pHW20a, and their counterpart in *tc^r* were also marked in plasmid map. *RepA*, *repB*, and *repC* encoded proteins participating in the replication of pHW20a [276-277]. *MobA*, *mobB*, and *mobC* encoded proteins necessary for the mobilization of pHW20a. Open arrows marked with dots indicated the incomplete gene. *TraI*, *traJ*, *traK*, *traL*, and *oriT* constituted the *mob* gene of RP4. The shadowed boxes indicated two *oriT*s from RSF1010 and RP4. *OriT*, regions for transfer replication. *OriV*, plasmid replication region.

通过对pHW20a质粒图以及前期数据的分析可知，pHW20a通过四环素抗性基因HindIII酶切位点的突变、含有多克隆位点的*lacZα*序列的克隆以及添加额外四个ClassII限制性酶切位点，新构建的pHW20a质粒拥有丰富的多克隆位点。大量可用克隆位点的设计，无疑使新构建质粒能够满足多基因共同表达等复杂基因操作的需求。同时，由于该质粒以*oriV*作为复制子，这决定了该质粒可以作为一工具质粒广泛的应用于其它革兰氏阴性细菌的基因操作中，尤其是类似运动发酵单胞菌这类较难转化的细菌。同样，*ClaI*和*SfiI*酶切位点在pHW20a质粒上皆为独有的酶切位点，并且位于四环素抗性基因上游和下游。这种预留设计将有利于根据pHW20a应用菌株的抗性特点而方便的更换抗性基因，从而确保了该质粒在其它菌株中的应用潜力。作为外源基因克隆的筛选标志，*lacZα*及其启动子一并被设计在pHW20a的结构单元中。对于某些菌株，*lacZα*启动子的存在将有可能对研究结果产生不利或者失真的影响。鉴于此一考虑，通过*lacZα*正向引物添加的一小段可以被NotI和XhoI识别的核苷酸序列，可以根据具体的研究需要将*lacZα*启动子从构建的质粒上删除。该设计亦有利于pHW20a应用于不同的研究需要。新构建之pHW20a质粒的序列及所含功能基因的说明详见附图 6。

2.3.2 穿梭质粒pBBR1MCS-2-*tc^r*的构建

作为通用的商业化接合转移质粒，pBBR1MCS及其四个衍生质粒由于具有良好的稳定性，广泛的宿主以及含有多克隆位点的*lacZα*筛选基因等一系列优良特性，并且它们已经被广泛的应用于革兰氏阴性细菌的分子克隆操作中[267, 278]。但由于该系列之质粒皆仅含有一个*mob*基因，因此根据Conway, T.等人之报道，该系列质粒在应用于运动发酵单胞菌菌株的接合转化操作时，其效率明显不如含有两个*mob*基因的接合转移质粒。为了确认并比较pHW20a与pBBR1MCS系列质粒的接合转化效率，本研究将来源于pHW20a已经突变的四环素抗性基因借助于PstI和EcoRI酶切位点克隆至pBBR1MCS-2质粒中。所获得的质粒命名为，pBBR1MCS-2-*tc^r*。四环素抗性基因PCR和PCR产物的纯化参考pUC19-*tc^r*质粒的构建（第二章材料与amp方法 2.3.1.3）。为了降低PstI作用于pBBR1MCS-2第3268 bp位点的效率，因此酶切反应采用顺序酶切法。先使用EcoRI对pBBR1MCS-2质粒进行酶切反应，体系如下所述：

| 试剂名称: | 体积: |
|----------------------|--------------------|
| pBBR1MCS-2 | 20.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 6.0 μL |
| $\times 10$ Buffer O | 3.0 μL |
| EcoRI | 1.0 μL |

将EcoRI酶切pBBR1MCS-2反应体系于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h彻底酶切。由于EcoRI酶切产生的片段两段的PstI酶切位点两翼DNA片段的不均匀性，因此势必会在PstI 3268位点处造成相对较低的酶切效率。EcoRI酶切反应结束后，将上述反应体系按如下所述配制PstI酶切反应体系：

| 试剂名称: | 体积: |
|-------------------------|--------------------|
| pBBR1MCS-2 (EcoRI) 反应产物 | 20.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 8.0 μL |
| $\times 10$ Buffer O | 1.0 μL |
| PstI | 1.0 μL |

将上述酶切反应体系于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h，进行PstI对pBBR1MCS-2 (EcoRI) 的部分酶切。酶切反应结束后，立即加入含有SDS的 $\times 10$ loading buffer并以0.7%琼脂糖核酸电泳分离获取分子量在3.9 kb的DNA条带。以Omega Gel Extraction Kit将目的DNA片段进行纯化回收。以0.7%琼脂糖核酸电泳确认四环素抗性基因PCR产物和pBBR1MCS-2 (EcoRI和PstI, 3.9 kb) 纯化回收结果 (图 2.24)。

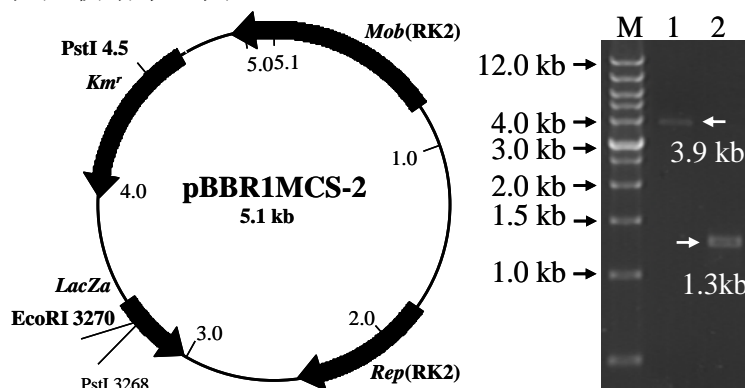


图 2.24 pBBR1MCS-2质粒图以及 tc^r (EcoRI和PstI, 1.3 kb) 和pBBR1MCS-2 (EcoRI和PstI, 3.9 kb) 纯化产物琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.24 Plasmid map of pBBR1MCS-2 and the confirmation of the purified tc^r (EcoRI & PstI, 1.3 kb) & pBBR1MCS-2 (EcoRI & PstI, 3.9 kb) by agarose gel electrophoresis
Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pBBR1MCS-2 (EcoRI & PstI, 3.9 kb); lane 2, tc^r (EcoRI & PstI, 1.3 kb)。

将回收纯化的 tc^r (EcoRI和PstI, 1.3 kb) 和pBBR1MCS-2 (EcoRI和PstI, 3.9 kb) 双酶切产物按如下体系配制连接反应液，并置连接反应体系于16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h。

| 试剂名称: | 体积: |
|------------------------------------|-------------------|
| Tc^r (EcoRI 和 PstI, 1.3 kb) | 2.0 μL |
| pBBR1MCS-2 (EcoRI 和 PstI, 3.9 kb) | 6.0 μL |
| $\times 10$ T4 DNA Ligation Buffer | 1.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中，并以LT抗性平板于37 $^{\circ}\text{C}$ 对转化子进行筛选培养。随机挑选1个菌落重新划线于新鲜的LT抗性平板上，于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养做进一步纯化。挑取单菌落接种于LT液体抗性培养基中于37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm培养12 h，以Omega

Plasmid Mini Kit抽取质粒。以如下体系配制EcoRI和PstI酶切反应体系：

| 试剂名称 (酶切体系 1) : | 体积: | 试剂名称 (酶切体系 2): | 体积: |
|------------------------------|--------|------------------------------|----------|
| pUC19- <i>tc^r</i> | 5.0 μL | pUC19- <i>tc^r</i> | 10.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 2.5 μL | 灭菌的超纯水 | 4.0 μL |
| ×10 Tango Buffer | 2.0 μL | ×10 Tango Buffer | 4.0 μL |
| EcoRI | 0.5 μL | PstI | 各 1.0 μL |

将酶切体系于37℃孵育2 h；同时，用四环素抗性基因引物（引物7和8）以pHW20a质粒为对照，对抽取质粒作PCR鉴定。新构建质粒（pBBR1MCS-2-*tc^r*）的质粒图和质粒鉴定琼脂糖核酸电泳图谱详见图 2.25。

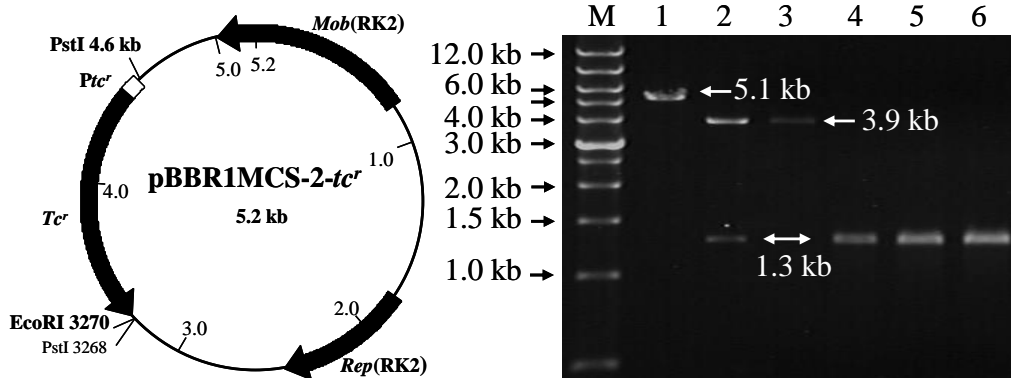


图 2.25 pBBR1MCS-2-*tc^r*质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.25 Plasmid map of pBBR1MCS-2-*tc* and agarose gel electrophoresis graph of its identification Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pBBR1MCS-2-*tc^r* (EcoRI, 5.1 kb); lane 2, pBBR1MCS-2-*tc^r* (EcoRI & PstI, 3.9 kb & 1.3 kb); lane 3, pBBR1MCS-2 (EcoRI & PstI, 3.9 kb); lane 4, *tc^r* (EcoRI & PstI, 1.3 kb); lane 5, *tc^r* PCR products with pBBR1MCS-2-*tc^r* as the template (1.3 kb); lane 6, *tc^r* PCR products with pHW20a as the template (1.3 kb).

根据构建pBBR1MCS-2-*tc^r*构建过程中连接产物的转化子可以在四环素抗性平板生长的特性，以及图 2.25中所显示之信息可知，pBBR1MCS-2-*tc^r*质粒已经按照预定设计构建完毕。

2.3.3 Gfo基因过表达菌株——运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 的构建

2.3.3.1 Gfo基因过表达质粒——pHW20a-*gfo*质粒的构建

为了验证pHW20a质粒在表达运动发酵单胞菌自身基因的性能，本研究将运动发酵单胞菌ZM4菌株自身的*gfo*基因（Gene ID: 3187982），通过pHW20a将其在原宿主菌中进行了表达。通过pHW20a多拷贝质粒的特性，*gfo*基因在运动发酵单胞菌ZM4菌株细胞内的拷贝数得到了增加，从而实现*gfo*基因的过量表达。*Gfo*过表达质粒pHW20a-*gfo*的构建如下所述：

首先，以寡聚核苷酸*gfo*-S和*gfo*-A（表 2.2之3#和4#引物）为引物，以ZM4基因组DNA为模板，通过pfu DNA 聚合酶（pfu DNA polymerase）PCR获取包括*gfo*启动子（P*gfo*）在内的全基因序列（1.6 kb）。PCR体系（参考本章实验材料与方法之2.2.2.2）及反应条件为：退火温度为59℃，延伸时间为4.0 min，总循环数为25 cycles。PCR产物经Omega PCR Purification Kit对其进行纯化，并以XbaI和EcoRI分别对纯化后的PCR产物和pHW20a质粒进行双酶切，酶切反应体系如下所述：

| 试剂名称: | 体积: |
|-------------------------------|----------|
| <i>Gfo</i> PCR 纯化产物（或 pHW20a） | 10.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 4.0 μL |
| ×10 Tango Buffer | 4.0 μL |
| XbaI 和 EcoRI | 各 1.0 μL |

将两种酶切体系分别于37 ℃孵育4 h, 并以0.7%琼脂糖核酸电泳回收酶切产物。经Omega Gel Extraction Kit纯化的两个DNA片段以0.7%琼脂糖核酸电泳确认纯化回收结果(图 2.26)。

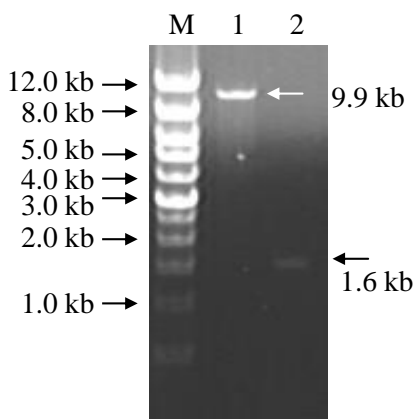


图 2.26 pHW20a (EcoRI和XbaI, 9.9 kb) 和*gfo* (EcoRI和XbaI, 1.6 kb) 纯化产物琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.26 Confirm the purified DNA fragments of pHW20a (EcoRI & XbaI, 9.9 kb) & *gfo* (EcoRI & XbaI, 1.6 kb) by agarose gel electrophoresis

Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pHW20a (EcoRI & XbaI, 9.9 kb); lane 2, *gfo* (EcoRI & XbaI, 1.6 kb).

将回收纯化的*gfo*和pHW20aDNA片段按照如下体系于16 ℃连接反应12 h。

| 试剂名称: | 体积: |
|-----------------------------------|--------|
| <i>Gfo</i> (EcoRI 和 XbaI, 1.6 kb) | 5.0 μL |
| pHW20a (EcoRI 和 XbaI, 9.9 kb) | 3.0 μL |
| 灭菌的超纯水 | 9.0 μL |
| ×10 T4 DNA Ligation Buffer | 2.0 μL |
| T4 DNA ligase | 1.0 μL |

将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中, 并以LIXT抗性平板对转化子筛选培养。随机挑选3个白色菌落重新划线于新鲜LIXT抗性平板, 并挑取单菌落接种于LT液体抗性培养基中用于质粒抽提。质粒鉴定PCR使用Taq DNA polymerase, 延伸时间为2 min, 其它参数同于*gfo*基因pfu DNA polymerase催化的PCR。PCR产物以0.7%琼脂糖核酸电泳确认结果(图 2.27)。

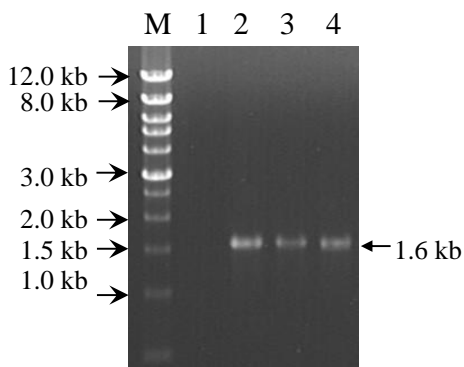


图 2.27 转化子中所含质粒的*gfo* PCR琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.27 The agarose gel electrophoresis graph of *gfo* PCR products with the plasmids from the transformants as the template

Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1-3, *gfo* PCR products with the plasmids from transformants 1#-3#; lane 4, *gfo* PCR products with *gfo* (EcoRI & XbaI, 1.6 kb).

根据图 2.27可知, 2#-3#转化子中所含质粒可能为欲构建之*gfo*过表达质粒, 而1#转化子可能为假阳性克隆。为了进一步确认构建结果。以XbaI和EcoRI单/双酶切反应以及*gfo*基因PCR对来源于2#转化子的质粒做进一步详细鉴定。各反应产物以0.7%琼脂糖核酸电泳分析, 结果见下图所示(图 2.28):

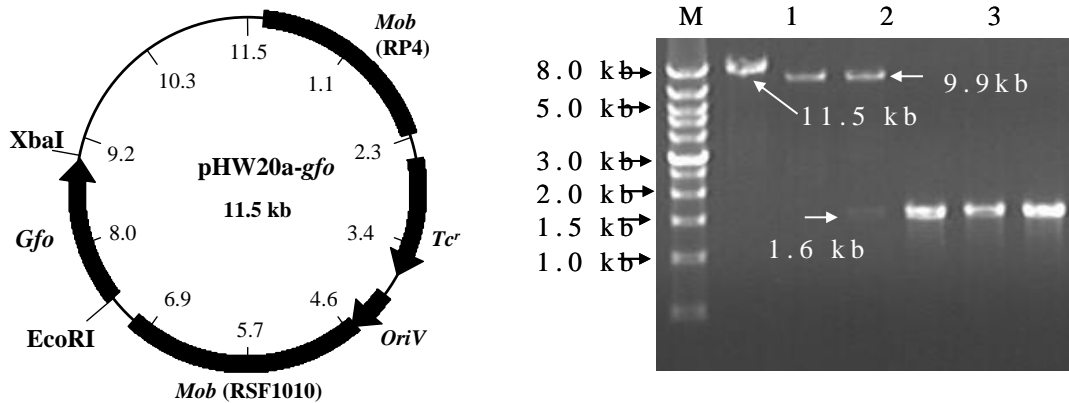


图 2.28 pHW20a-*gfo*质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.28 Plasmid map of pHW20a-*gfo* and the agarose gel electrophoresis graph for its identification. Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, plasmids from transformants 2# (XbaI); lane 2, pHW20a (EcoRI & XbaI, 9.9 kb); lane 3, plasmids from transformants 2# (XbaI & EcoRI); lane 4, *gfo* (EcoRI & XbaI, 1.6 kb); lane 5, *gfo* PCR products with the plasmids from transformants 2#; lane 6, *gfo* PCR products with *gfo* (EcoRI & XbaI, 1.6 kb).

根据图 2.28之鉴定结果分析可知, 在所挑选的三个白色转化子菌落中, 菌落2#所含有的质粒基本可以确认为*gfo*基因过表达质粒 (pHW20a-*gfo*)。

2.3.3.2 运动发酵单胞菌的接合转化及重组菌株的鉴定

根据材料与方法之2.2.2.5将所构建的pHW20a-*gfo*质粒转化至运动发酵单胞菌ZM4和ZM6两菌株, 并计算接合转化效率。并从RMNT抗性平板上筛选的到的转化子挑取单菌落在RMNT抗性平板上重新划线培养以获取运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌的纯种。将再次划线培养获取的单菌落接种于RT液体培养基中获取菌体细胞, 并用Omega Plasmid Mini Kit从获取的细胞中制备质粒DNA。以XbaI和EcoRI单酶切/双酶切反应及*gfo*基因PCR进行鉴定(图 2.29)。

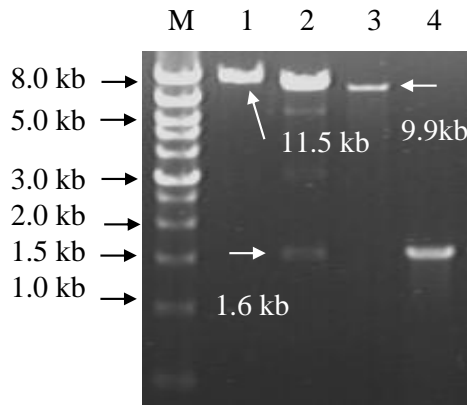


图 2.29 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.29 The agarose gel electrophoresis graph of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*) identification. Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, plasmids from ZM4 transformants (XbaI); lane 2, plasmids from ZM4 transformants (EcoRI & XbaI, 9.9 kb); lane 3, pHW20a (XbaI & EcoRI); lane 4, *gfo* PCR products with the plasmids from ZM4 transformants as the template.

由图 2.29分析可知,来源于运动发酵单胞菌转化子质粒的单酶切反应,双酶切反应和 *gfo* 基因PCR产物的DNA分子量均符合pHW20a-*gfo*所应具备的信息。由此确认pHW20a-*gfo*已经借助大肠杆菌S 17-1 λ π 转化至运动发酵单胞菌ZM4菌体细胞中。在本章后续的运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 发酵研究中,将通过测定重组菌GFOR酶活并与对照菌株GFOR酶活的比较来进一步确认转化结果。

2.3.4 *Mdh*基因表达菌株——运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*mdh*) 的构建

根据前人的研究结果表明,运动发酵单胞菌野生菌的基因组由于缺少包括苹果酸脱氢酶(MDH)在内的三个位于TCA循环上酶的编码基因,因而形成了一个特殊的不完整的TCA循环代谢网络^[89, 180]。为了进一步验证pHW20a质粒的性能,本研究同时选择来源于大肠杆菌BL21 (DE3)的*mdh*基因(Gene ID: 8180871)作为表达对象。所构建的基因重组菌,将随后作为对运动发酵单胞菌ZM4菌株进行代谢分析的切入点。考虑到*mdh*基因编码的蛋白参与了TCA这一主代谢网路,为了实现其在运动发酵单胞菌ZM4这一特殊细菌中的表达及MDH缺失代谢途径的回补,因此在表达该基因时我们考虑使用一弱启动子进行基因转录水平的调控。对于表达一个极有可能对菌体代谢具有强烈扰动、巨大负担或者产生毒害作用的基因,弱启动子或者可调节的启动子是常常用于这类基因表达的一种有效的策略。根据文献检索,有关运动发酵单胞菌ZM4菌株弱启动子的相关研究并无报道。由于运动发酵单胞菌ZM4具有极高的乙醇生产效率和得率,因此作为催化磷酸烯醇式丙酮酸代谢分支途径的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)编码基因(*ppc*)极有可能处于很低的表达水平;同时,PEPCase催化代谢反应能量消耗代价过高以及运动发酵单胞菌ZM4自身ED途径ATP生产得率极低的特点都决定*ppc*基因应该具有较低的表达水平^[101, 180]。由于根据以往文献报道,直接从细胞粗提物中测定PEPCase活性由于会受到细胞粗提物中丙酮酸羧化酶(Pyruvate carboxylase)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶(PEP carboxykinase)活性的干扰^[180],因此通过直接测定PEPCase的酶活几乎无法直接用于该蛋白表达水平的评估。基于以上种种考虑,本研究选择*Pppc*作为*mdh*转录的调控元件。该设计一方面可以增加*mdh*基因在运动发酵单胞菌中表达的成功概率;另一方面,通过*mdh*的酶活测定可以对*ppc*转录水平做初步的探讨。

2.3.4.1 pUC19DN质粒的构建

为了方便*Pppc*启动子序列与*mdh* CDS借助于NdeI酶切位点进行连接,本研究从pUC19质粒出发构建一个缺失NdeI酶切位点的衍生质粒—pUC19DN。pUC19DN质粒的构建方法是以NdeI限制性内切酶对pUC19质粒进行消化后,以T4 DNA polymerase对线性化的pUC19 (NdeI) 双链DNA进行粘性末端平滑化处理,并借助于T4 DNA ligase重新进行环化自连接处理(注:相关酶切、连接和PCR等分子克隆基本操作可参考pHW20a构建过程及生产厂商之说明书,随后的各章节如无特殊之处将不一一赘述)。连接反应体系于16℃孵育12 h。随后将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,以LIXA抗性平板上于37℃恒温培养对转化子进行筛选培养。随机挑选2个蓝色菌落和2白色菌落重新划线于新鲜的LIXA抗性平板上于37℃恒温培养箱中培养12 h。挑取单菌落接种于LA液体抗性培养基中,并于37℃ 220 rpm培养12 h。以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒,并以pUC19质粒为对照用NdeI进行消化处理。五种质粒的NdeI酶切产物以0.7%琼脂糖核酸电泳分析结果(图 2.30)。

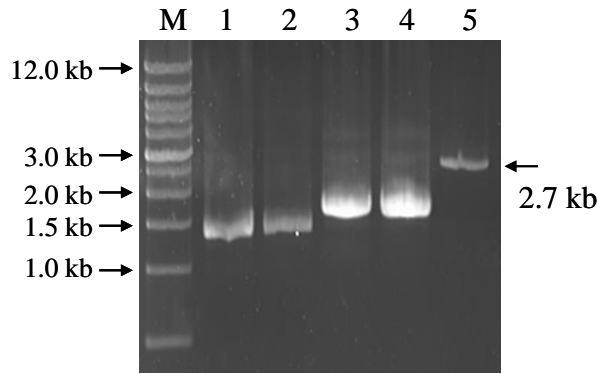


图 2.30 转化子中所含质粒的NdeI酶切反应产物琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.30 The agarose gel electrophoresis graph of the plasmids digested with NdeI
Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1-2, plasmids from transformants 1#-2# (blue, NdeI); lane 3-4, plasmids from transformants 3#-4# (white, NdeII); lane 5, pUC19 (NdeI, 2.7 kb).

由图 2.30分析推断，1#-4#转化子中所含有的质粒经NdeI酶切处理后都无法获得分子量与pUC19（NdeI）相同的DNA片段。由此可以初步推断，这四个来源于不同转化子的质粒皆由于三步酶处理反应过程发生了变化。考虑到超螺旋结构的pUC19会在电泳图谱1.4 kb左右的位置有一条带，因此将来源于转化子1#的质粒做进一步鉴定。通过EcoRI对质粒1#进行酶切处理，随后将质粒1#，质粒1#(NdeI)，质粒1#(EcoRI)和pUC19(NdeI)用0.7%琼脂糖核酸电泳分析以上四种DNA的分子量（图 2.31）。

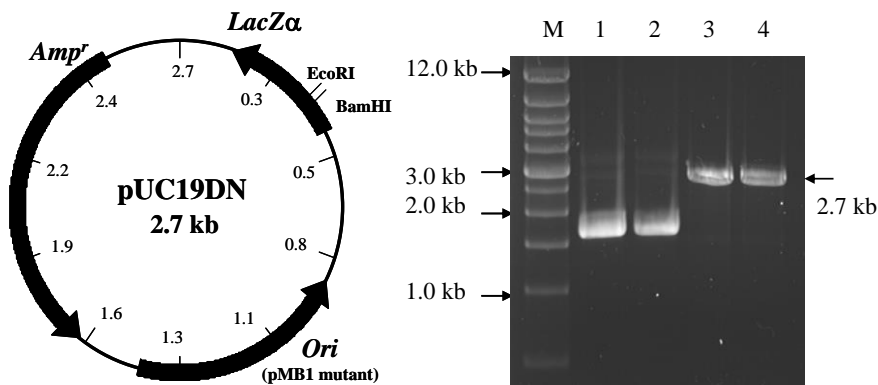


图 2.31 pUC19DN质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图

Fig. 2.31 The plasmid map of pUC19DN and the agarose gel electrophoresis graph for its identification
Lane M, Marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, plasmid 1#; lane 2, plasmid 1# (NdeI); lane 3, plasmid 1# (EcoRI); lane 4, pUC19 (NdeI).

由图 2.31分析可知，质粒1#经EcoRI进行酶切之后仅获得一条分子量为2.7 kb的DNA片段，其分子量与pUC19使用NdeI进行单酶切所获得的分子量大体相符；而质粒1#在使用NdeI酶切处理后，其条带与酶切反应前的质粒DNA条带并无明显差异。由此可以推断位于pUC19质粒上的NdeI酶切位点已经被去除。为了进一步确认质粒的构建结果，我们将该含有该质粒的菌株递交测序，以M13+/-引物进行测序的结果与设计预期完全相符。由此可以确认pUC19DN质粒已经被成功构建。

2.3.4.2 借助于pUC19和pUC19DN分别对mdh基因和ppc启动子亚克隆

首先，本研究以寡聚核苷酸mdh-S和mdh-A为引物（表 2.2之1#和2#引物），以大肠杆菌BL21（DE3）基因组DNA为模板，利用pfu DNA polymerase催化的PCR制备mdh基因（0.9 kb）；同时，以寡聚核苷酸Pppc-S和Pppc-A为引物（表 2.2之5#和6#引物），以运动发酵单胞菌ZM4基因组DNA为模板，利用pfu DNA polymerase催化的PCR制备ppc

启动子 (*Pppc*, 0.6 kb)。两PCR体系参考本章实验材料与方法之2.2.2.2。*Mdh*基因由pfu DNA polymerase催化的PCR条件为：退火温度为62 ℃，延伸时间为2.0 min，总循环数为30 cycles；*Pppc*基因由pfu DNA polymerase催化的PCR条件为：退火温度为57 ℃，延伸时间为2.0 min，总循环数为30 cycles。PCR产物以Omega PCR Purification Kit对其进行纯化。以pUC19对*mdh*基因借助于EcoRI和BamHI酶切位点对其进行亚克隆；同时，以pUC19DN对*Pppc*同样借助于EcoRI和BamHI对其进行亚克隆。通过蓝白斑筛选获得对应之亚克隆质粒。以EcoRI和BamHI限制性酶切酶的单/双酶切反应及*Pppc*基因PCR对转化子中的质粒进行鉴定（详见图 2.32和图 2.33）。

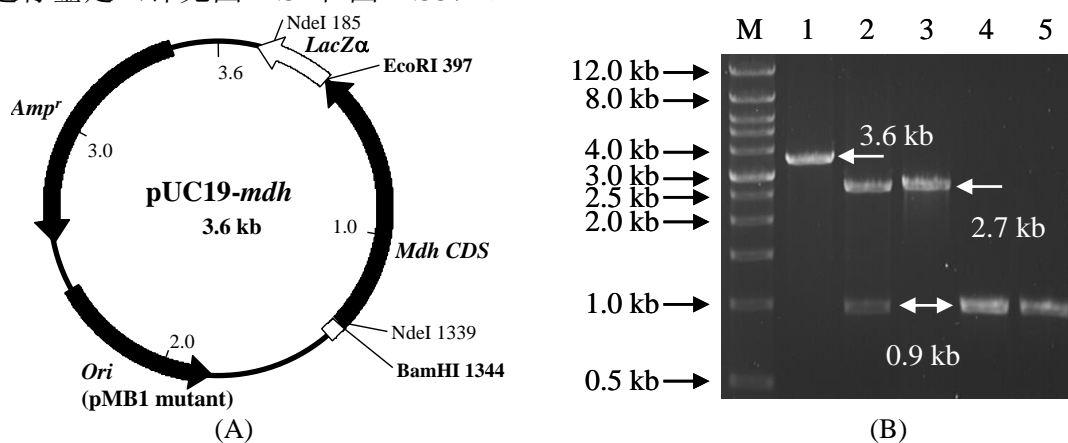


图 2.32 pUC19-*mdh*质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图

Fig. 2.32 The plasmid map of pUC19-*mdh* and the agarose gel electrophoresis graph for its identification (A) Open arrow and open box, disrupted *lacZα* during the *Pppc* subcloning via EcoRI and BamHI sites. (B) Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19-*mdh* (EcoRI, 3.6 kb); lane 2, pUC19-*mdh* (EcoRI & BamHI, 2.7 kb & 0.9 kb); lane 3, pUC19 (EcoRI & BamHI, 2.7 kb); lane 4, *mdh* PCR products with pUC19-*mdh* as the template (0.9 kb); lane 5, *mdh* PCR products with *E. coli* BL21 (DE3) genomic DNA as the template (0.9 kb).

根据图 2.32和2.33所提供之信息分析可知，*mdh*基因和*Pppc*已经分别被克隆至pUC19质粒和pUC19DN质粒中。将含有两种质粒的菌株分别提交测序。其中测序结果均与已公布序列进行比对，两种序列与已公布之基因序列同源性分别达到99%和100%。

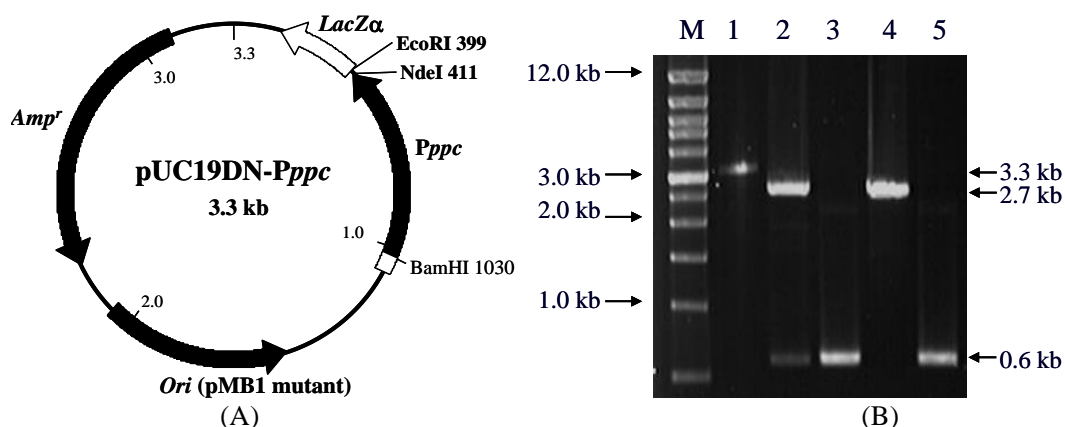


图 2.33 pUC19DN-*Pppc*质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图

Fig. 2.33 Plasmid map of pUC19DN-*Pppc* and the agarose gel electrophoresis graph for its identification (A) Open arrow and open box, disrupted *lacZα* during the *Pppc* subcloning via EcoRI and BamHI sites. (B) Lane M, Marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19DN-*Pppc* (EcoRI, 3.3 kb); lane 2, pUC19DN-*Pppc* (EcoRI & BamHI, 2.7 kb & 0.6 kb); lane 3, *Pppc* PCR products with pUC19DN-*Pppc* as the template (0.6 kb); lane 4, pUC19DN (EcoRI & BamHI, 2.7 kb); lane 5, *Pppc* PCR products with *Z. mobilis* ZM4 genomic DNA as the template (0.6 kb).

2.3.4.3 借助于大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a (+) 表达体系验证亚克隆之 mdh 基因

鉴于 mdh 测序结果与已公布序列略有出入, 为了保证该基因可以编码具有活性的酶蛋白, 本研究首先以大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a (+) 表达体系将亚克隆的 mdh 基因进行诱导表达并通过酶活测定确认克隆基因序列的功能。

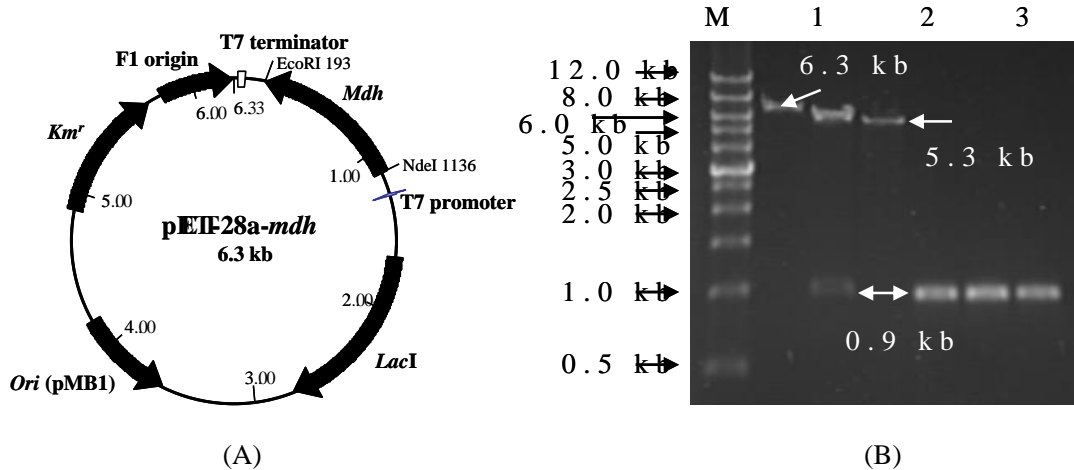


图 2.34 pET-28a- mdh 质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图

Fig. 2.34 The plasmid map of pET-28a- mdh and the agarose gel electrophoresis graph for its identification

(A) Open arrow and open box, T7 promoter and T7 terminator. (B) Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pET-28a- mdh (EcoRI, 6.3 kb); lane 2, pET-28a- mdh (EcoRI & NdeI, 5.3 kb & 0.9 kb); lane 3, pET-28a (+) (EcoRI & NdeI, 5.3 kb); lane 4, mdh (NdeI & EcoRI, 0.9 kb); lane 5, mdh PCR products with pET-28a- mdh as the template (0.9 kb); lane 6, mdh PCR products with *E. coli* BL21 (DE3) genomic DNA as the template (0.9 kb).

由pUC19- mdh 质粒出发, 选择NdeI和EcoRI酶切位点制备 mdh 基因; 同时, 用NdeI和EcoRI对pET-28a (+) 进行彻底消化。两个酶切反应产物均以0.7%琼脂糖核酸电泳分离分子量分别为0.9 kb (mdh , NdeI和EcoRI) 和5.3 kb (pET-28a (+), NdeI和EcoRI) 的DNA片段, 并以Omega Gel Extraction Kit纯化回收目的DNA片段。两片段以T4 DNA ligase于16 °C连接12 h后, 将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 并于含有卡那霉素的LB琼脂培养基 (简称为LK抗性平板) 上进行筛选。随机挑取LK抗性平板上获得的转化子菌落, 对其进行划线纯化、液体培养, 并用Omega Plasmid Mini Kit制备其中含有的质粒。以EcoRI单酶切和0.7%琼脂糖核酸电泳进行初步筛选, 并挑取EcoRI单酶切反应产生分子量大约为6.2 kb DNA片段的质粒做pET-28a- mdh 质粒的详细鉴定。pET-28a- mdh 质粒图和质粒鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图详见图 2.34。

根据图 2.34信息分析可初步推断, mdh 基因已经借助于NdeI和EcoRI酶切位点由pUC19- mdh 质粒克隆至pET-28a (+)。为了确认前期克隆 mdh 基因的结果, 我们将所构建的 mdh 过表达质粒pET-28a- mdh 转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞中, 并根据《Molecular cloning: a laboratory manual》所叙述之方法进行 mdh 的诱导表达及全细胞蛋白SDS-PAGE变性电泳分析 mdh 基因表达结果^[270] (图 2.35); 同时, 培养所得之菌体细胞亦根据本章材料与方法2.2.2.7、2.2.2.8及2.2.2.9所述之方法进行细胞的裂解、细胞裂解液酶活测定及裂解液蛋白质浓度的测定 (表 2.5)

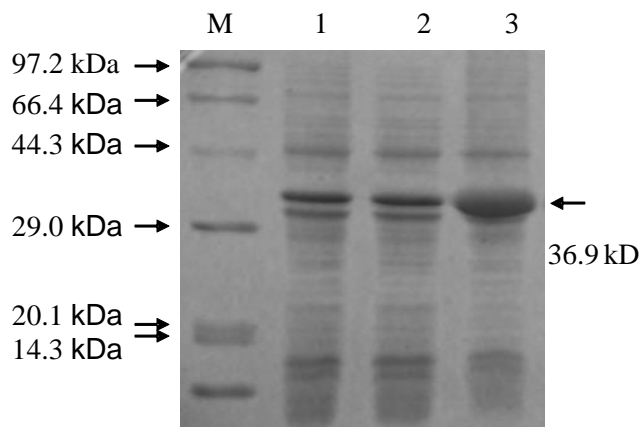


图 2.35 大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a-*mdh* IPTG诱导表达MDH之全细胞蛋白SDS-PAGE电泳图

Fig. 2.35 The whole cell SDS-PAGE graph of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-*mdh* induced by IPTG. Lane M, Protein molecular weight marker (low molecular weight); lane 1, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a (+) with 0.0 mM IPTG; lane 2, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-*mdh* with 0.0 mM IPTG; lane 3, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-*mdh* with 0.5 mM IPTG.

表 2.5 IPTG诱导大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a-*mdh*表达MDH之酶活测定

Table 2.5 The MDH specificity activity of the cell lysates

| Strains | IPTG (mM) | MDH specific activity (Unit/mg protein) |
|---|-----------|---|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a (+) | 0.0 | 1.5 |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a- <i>mdh</i> | 0.0 | 11.2 |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a- <i>mdh</i> | 0.5 | 278.8 |

根据经IPTG诱导表达的大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a-*mdh*菌株及其对照组的全细胞蛋白SDS-PAGE变性电泳图所示, 在相同细胞处理量的条件下3#泳道与对照相比, 在约36.9 kDa处明显有一条蛋白粗条带。由于该条带的蛋白分子量与MDH单亚基与His Tag和T7 tag融合蛋白的分子量相符, 由此可以初步推断克隆于pET-28a (+) 的*mdh*基因及其上游连接的His Tag一起在大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株内得到了过量表达。为了进一步确认表达产物的活性, 我们同时将收获的细胞在低温Tris-HCl缓冲液中进行超声破碎裂解, 并对裂解液的离心上清液测定MDH酶活。通过裂解液离心上清液蛋白质浓度的测定, 计算IPTG诱导表达菌株及其两组对照体系的MDH比酶活力单位。通过表 2.5所提供之信息, 在克隆有*mdh*基因并被IPTG诱导表达的细胞裂解液中, 离心后得到的上清液的MDH比活力单位比空载质粒对照组提高了约185.9倍, 比没有加入IPTG的相同菌株对照组的比酶活力单位提高了24.9倍。由此证实*mdh*基因已经被成功的制备和克隆, 并且该克隆的*mdh*基因可以表达出具有MDH酶活力的蛋白质。

2.3.4.4 Pppc与*mdh*基因的连接—pUC19DN-Pppc-*mdh*的构建

以NdeI和EcoRI对pUC19DN-Pppc和pUC19-*mdh*进行顺序酶切消化, 并以0.7%琼脂糖核酸电泳回收分子量分别为3.3 kb和0.9 kb的DNA片段。将以Omega Gel Extraction Kit回收纯化的两种DNA片段于16 °C以T4 DNA polymerase连接12 h。连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 并以LA抗性平板筛选转化子。对所得到的转化子以EcoRI和NdeI的单/双酶切反应和*mdh*基因PCR进行鉴定 (图 2.36)。

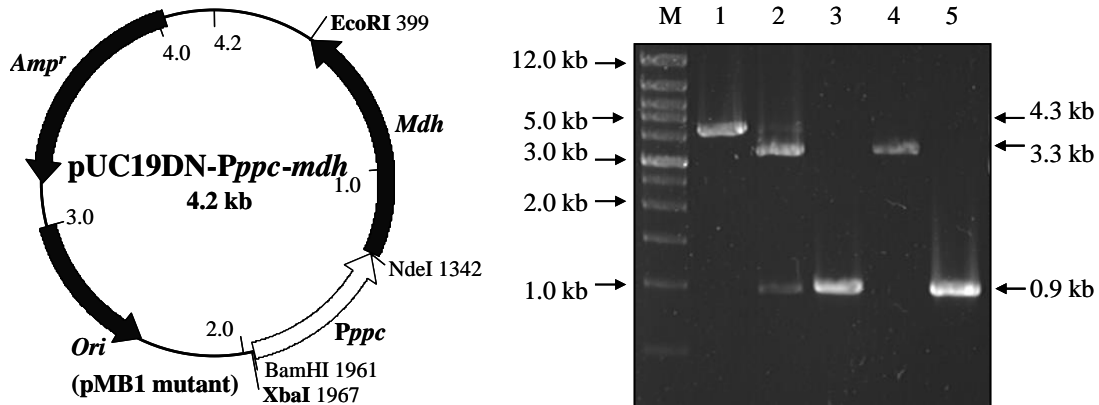


图 2.36 pUC19DN-Pppc-mdh质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.36 Plasmid map of pUC19DN-Pppc-mdh and the agarose gel electrophoresis graph for its identification

Lane M, marker (wide range 500 bp-12 kb); lane 1, pUC19DN-Pppc-mdh (EcoRI, 4.3 kb); lane 2, pUC19DN-Pppc-mdh (EcoRI & NdeI, 3.3 kb & 0.9 kb); lane 3, mdh PCR products with pUC19DN-Pppc-mdh as the template; lane 4, pUC19DN-Pppc (EcoRI & NdeI, 3.3 kb); lane 5, mdh PCR products with *E. coli* BL21 (DE3) genomic DNA as the template.

根据以上电泳图谱分析可知，被鉴定的质粒经EcoRI单酶切产生的唯一DNA片段的分子量为4.3 kb，与欲构建的pUC19DN-Pppc-mdh质粒分子量相符；经EcoRI和NdeI双酶切后产生的两个DNA片段，其分子量（3.3 kb和0.9 kb）分别于pUC19DN-Pppc（3.3 kb）的质粒分子量以及mdh（0.9 kb）基因的大小相符。由此可以推断，mdh基因已经借助于pUC19DN-Pppc质粒与Pppc启动子相连。

2.3.4.5 借助pHW20a穿梭质粒克隆Pppc-mdh表达元件—pHW20a-mdh质粒的构建

由质粒pUC19DN-Pppc-mdh出发，以XbaI和EcoRI酶切获取Pppc-mdh表达元件（图 2.36）；同时以XbaI和EcoRI进行pHW20a的酶切，从而获得两个相应的粘性末端用于Pppc-mdh（XbaI和EcoRI）表达元件的克隆。以0.7%琼脂糖核酸电泳和Omega Gel Extraction Kit纯化回收的Pppc-mdh（XbaI和EcoRI, 1.6 kb）和pHW20a（XbaI和EcoRI, 9.9 kb），并以T4 DNA polymerase于16℃连接12 h。将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中，并以LIXT抗性平板筛选转化子。对所得到的转化子白色单菌落进行划线纯化及后续的细胞培养。以转化子菌体热裂解液为模板，以Pppc引物和Taq DNA polymerase进行PCR，并将反应产物以0.7%琼脂糖核酸电泳分析PCR产物。对于能够在PCR中获取分子量为0.6 kb片段的转化子，以Omega Plasmid Mini Kit从培养的细胞中制备质粒DNA。并XbaI和EcoRI的单/双酶切反应和Pppc基因的PCR进行鉴定（图 2.37）。

由图 2.37分析可知，含有Pppc-mdh表达元件的DNA片段已经被克隆至本研究所构建的穿梭质粒pHW20a中。为了确认mdh基因在运动发酵单胞菌 ZM4菌株中的表达及表达水平，在完成pHW20a-mdh质粒向运动发酵单胞菌ZM4菌株的接合转化后，MDH的酶活及细胞裂解液的蛋白质浓度均被测定，并用于计算MDH的比活。

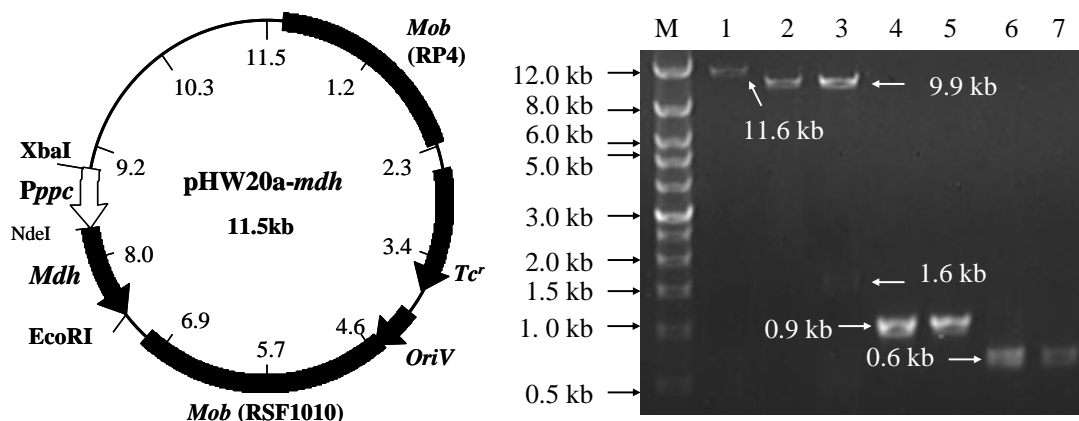


图 2.37 pHW20a-mdh质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.37 Plasmid map of pHW20a-mdh and the agarose gel electrophoresis graph for its identification. Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, pHW20a-mdh (XbaI); lane 2, pHW20a-mdh# (XbaI & EcoRI); lane 3, pHW20a (EcoRI & XbaI, 9.9 kb); lane 4, mdh PCR products with pHW20a-mdh as the template; lane 5, mdh PCR products with *E. coli* BL21 (DE3) genomic DNA as the template; lane 6, Pppc PCR products with pHW20a-mdh as the template; lane 7, Pppc PCR products with *Z. mobilis* ZM4 genomic DNA as the template.

2.3.4.6 运动发酵单胞菌ZM4菌株的接合转化及运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-mdh) 菌株的鉴定

根据材料与方法之2.2.2.5将所构建的pHW20a-mdh质粒转化至运动发酵单胞菌ZM4并计算接合转化效率。从RMNT抗性平板上筛选到的转化子挑取单菌落，并在RMNT抗性平板上重新划线培养以获取纯种。将再次划线培养获取的单菌落接种于RT液体抗性培养基中获取菌体细胞，并用Omega Plasmid Mini Kit从获取的细胞中制备质粒DNA。以XbaI单酶切反应及PCR进行鉴定（图 2.38）。

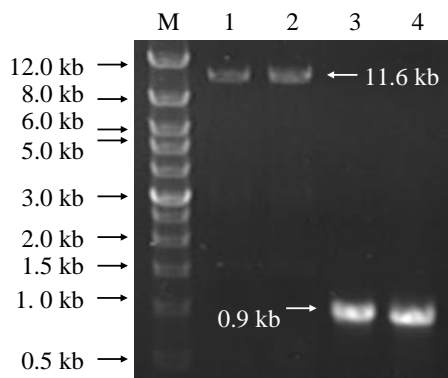


图 2.38 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-mdh) 鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 2.38 The agarose gel electrophoresis graph of identifying *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-mdh). Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, plasmids from ZM4 transformants (XbaI, 11.6 kb); lane 2, pHW20a-mdh (XbaI, 11.6 kb); lane 3, mdh PCR products with the plasmids from ZM4 transformants as the template; lane 4, mdh PCR products with *E. coli* BL21 (DE3) genomic DNA as the template.

由图 2.38所示结果可知，从pHW20a-mdh运动发酵单胞菌ZM4转化子所制备的质粒，其限制性内切酶酶切图谱以及mdh PCR产物的电泳条带均与pHW20a-mdh相一致，由此可以判断pHW20a-mdh已经被转化至运动发酵单胞菌ZM4菌株中。在本章后续的运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-mdh) 发酵研究中，将对该重组菌的胞内MDH酶活进行测定以进一步确认转化结果。

2.3.5 pHW20a及其衍生质粒接合转化效率的比较

根据材料与方法之2.2.2.5将本论文所构建的质粒（其中部分表达质粒的构建及功能将在随后的章节给予详细说明）转化至运动发酵单胞菌ZM4，同时亦将pHW20a和pHW20a-*gfo*转化至运动发酵单胞菌ZM6。根据所使用的运动发酵单胞菌的细胞数以及平板菌落计数得到的转化子数量，计算各质粒接合转化运动发酵单胞菌的效率（见表 2.6）。

表 2.6 各可移动质粒对运动发酵单胞菌菌株接合转化效率的比较
Table 2.6 Transconjugation efficiency of mobilizable plasmids to *Z. mobilis* strains

| Plasmid | Recipient cell | Plasmid size (kb) | Transformation Efficiency |
|--|-----------------------|-------------------|-------------------------------|
| pHW10a | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 9.5 | $7.1\sim 9.6 \times 10^{-5}$ |
| pHW20a | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 9.9 | $3.4\sim 5.6 \times 10^{-5}$ |
| pHW20a- <i>gfo</i> | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 11.5 | $5.5\sim 6.9 \times 10^{-5}$ |
| pHW20a- <i>fdh</i> * | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 11.1 | $0.9\sim 9.3 \times 10^{-6}$ |
| pHW20a- <i>ppc</i> * | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 13.0 | $0.2\sim 0.6 \times 10^{-7}$ |
| pHW20a- <i>mdh</i> | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 11.5 | $\sim 1.7 \times 10^{-10}$ |
| pLOI193 | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 13.4 | $0.8\sim 2.0 \times 10^{-7}$ |
| pBBR1MCS-2- <i>tc</i> ^r (c) | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | 5.2 | $1.5\sim 2.0 \times 10^{-8}$ |
| pHW20a | <i>Z. mobilis</i> ZM6 | 9.9 | $7.3\sim 8.5 \times 10^{-5}$ |
| pHW20a- <i>gfo</i> | <i>Z. mobilis</i> ZM6 | 11.5 | $9.3\sim 10.1 \times 10^{-5}$ |

* The detail information about pHW20a-*ppc* and pHW20a-*fdh* could be found in chapter 3 and chapter 5.

根据表 2.6 所统计之信息，本研究所构建之 pHW20a 接合质粒其对运动发酵单胞菌 ZM4 菌株的接合转化效率 ($3.4\sim 5.6 \times 10^{-5}$) 明显优于对照组 pBBR1MCS-2-*tc*^r ($1.5\sim 2.0 \times 10^{-8}$)。由此说明，即使在 pHW20a 分子量明显比 pBBR1MCS-2-*tc*^r 偏大的情况下，pHW20a 所拥有的两个 *mob* 基因依然能够保证其接合转化效率明显优于 pBBR1MCS-2-*tc*^r 质粒。该实验结果也进一步确认了 Conway 等人提出的两个 *mob* 基因可以显著增加接合质粒转化效率的论断^[222]。通过将 pLOI193 质粒上的冗余基因及多余 DNA 序列进行删减，所得到的 pHW10a 质粒的 DNA 分子量比 pLOI193(13.4 kb)缩小了 3.9 kb，其转化效率($7.1\sim 9.6 \times 10^{-5}$)比 pLOI193 提高了约两个数量级。当 *lacZα* 插入 pHW10a 后，所构建得到的 pHW20a 质粒 DNA 分子量 (9.9 kb) 仅比 pHW10a 略有增加，其接合转化效率 ($3.4\sim 5.6 \times 10^{-5}$) 也与 pHW10a 无显著差异。当 *fdh* 基因克隆至 pHW20a 质粒后，分别得到了大小为 11.1 kb 的质粒。这个质粒的 DNA 分子量比 pHW10a 和 pHW20a 有显著提高，但比 pLOI193 质粒明显偏小，因此其接合转化效率 ($0.9\sim 9.3 \times 10^{-6}$) 表现出低于 pHW10a 和 pHW20a 但高于 pLOI193 的特点。当 DNA 分子量更大的 *ppc* 基因克隆至 pHW20a 后，得到了一个 DNA 分子量接近 pLOI193 的质粒 pHW20a-*ppc*。该质粒的分子量为 13.0 kb 与 pLOI193 接近，因此表现出接合转化效率接近 pLOI193 的特点。Conway 等人在构建运动发酵单胞菌穿梭表达载体时曾经将 ColEI 复制子从 pLOI193 中去除，从而获得一个分子量与 pLOI193 相似的接合质粒 pLOI204 (13.2 kb)。在对 pLOI193 和 pLOI204 进行接合转化效率比较时发现，在未对质粒分子量产生显著影响的前提下 ColEI 的去除并未对质粒的转化效率产生显著的影响^[222]。根据以上实验结果及文献信息可以推断 pHW20a 转化效率的提升可能系质粒 DNA 分子量减少所致。另外，通过将 pHW20a 和 pHW20a-*gfo* 接合转化至运动发酵单胞菌 ZM6，其接近于 ZM4 菌株的接合转化效率证实 pHW20a 亦可以应用于其它运动发酵单胞菌的基因工程改造过程。

与 pHW20a-*gfo* 相比，pHW20a-*mdh* 虽然拥有相同的分子量 (均为 11.5 kb)，然而在接合转化运动发酵单胞菌 ZM4 菌株时，其转化效率相差四个数量级。由于两个基因借助与 pHW20a 进行克隆的时候均选用相同的克隆位点 (XbaI 和 EcoRI)，因此这种显著

的差距极有可能来自于基因表达产物对 ZM4 菌株原有的代谢网路的影响所致。由于 *gfo* 编码的葡萄糖-果糖氧化还原酶的主要生理作用是通过生成山梨醇参与运动发酵单胞菌菌株细胞内渗透压的调节作用^[252]，因此与 *mdh* 的表达产物相比，该基因并未涉及运动发酵单胞菌菌株的核心代谢网络。由于运动发酵单胞菌 ZM4 菌株自身的代谢网路缺少编码苹果酸脱氢酶的基因，因此其 TCA 循环并非为一闭合完整的循环代谢网络。在 pHW20a-*mdh* 向运动发酵单胞菌菌株转化过程中，这种极低的转化效率有可能反映了 *mdh* 基因的表达会对宿主的代谢产生显著的影响所致。少量 pHW20a-*mdh* 质粒转化子的获取，则可能是少数运动发酵单胞菌 ZM4 菌株的代谢网络在转化过程中自动发生变化，从而适应了 *mdh* 基因表达对其代谢流的重新分布所致。

2.3.6 pHW20a及其衍生质粒在宿主中稳定性的研究

按照 2.2.2.11 运动发酵单胞菌 ZM4 重组菌质粒稳定性测定方法^[275]，考察本论文所构建的 pHW20a 及衍生表达质粒在宿主细胞内的稳定性。将各重组菌每代细胞生长至 OD_{600nm} 为 1.0 时发酵液中含有质粒细胞在总细胞量的比例整理统计于图 2.39。

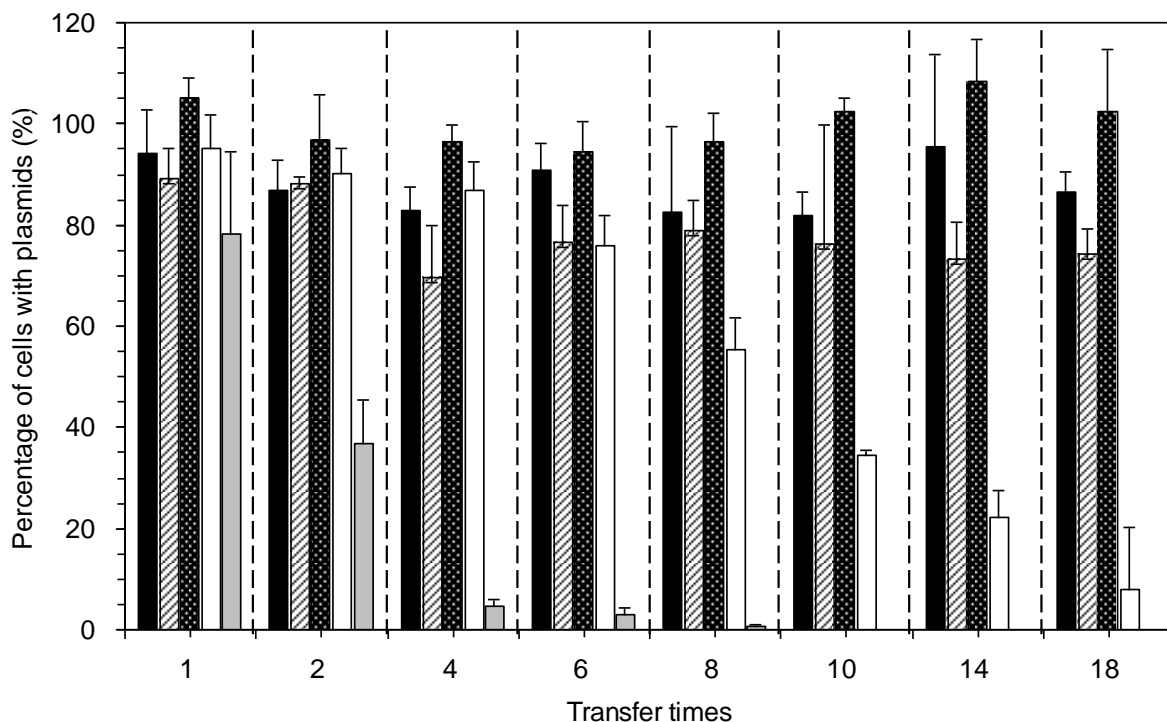


图 2.39 质粒在宿主细胞中的稳定性

Fig. 2.39 Stabilities of plasmids in host cells

The ratio of the colonies grown on RM agar plates with tetracycline to the colonies grown on RM agar plates was used to estimate the percentage of strains harboring plasmids in the total cells during continuous transfer. Black columns, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). White columns with strips, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*mdh*). Black columns with white dots, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*fdh*)*. White columns, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*ppc*)*. Grey columns, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*). The average values from three separate experiments were given in the figure. The maximum and minimum deviation values were also indicated by the error bars. * The detail information about pHW20a-*ppc* and pHW20a-*fdh* could be found in chapter 3 and chapter 5.

根据图 2.39 所示之结果，绝大部分质粒在宿主细胞内都具有良好的稳定性。当运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a)，运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*mdh*) 和运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*fdh*) 在不含有四环素的 RM 液体培养基中连续传代的过程中，含有 pHW20a 质粒的细胞始终在整个发酵液中占据着较高的比例。经过连续传种 18 次（约

120 代), 含有质粒的 ZM4 细胞在总细胞约占 75% 以上。运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*ppc*) 经过 8 次连续传代, 含有质粒的 ZM4 细胞在总细胞中亦占有约 60% 的比例。由于 pHW20a 所含有的复制子 (*oriV*) 来源于革兰氏阴性细菌广泛宿主质粒 RSF1010, 并且该质粒为独立于宿主染色体复制的松弛型质粒^[276-277, 279-280]。由于 pLOI193、pLOI197 和 pLOI204 等以 *oriV* (RSF1010) 为复制子的质粒在运动发酵单胞菌细胞内一般保持中等程度的拷贝数 (约 30 个) 并且能够在运动发酵单胞菌宿主细胞中保持良好的稳定性^[222], 因此 *oriV* 复制子的使用可能是 pHW20a 质粒具有良好稳定性的原因之一。另一方面, 通过本论文相关章节关于 *mdh* 和 *fdh* 基因表达以及 *ppc* 基因在运动发酵单胞菌野生菌株中转录水平的相关研究发现, 表达质粒 pHW20a-*mdh*、pHW20a-*fdh* 和 pHW20a-*ppc* 所携带的基因在宿主中均以很低的水平进行表达或转录。因此, 这些 pHW20a 衍生质粒所携带基因的低水平表达 (表现为对宿主不会产生明显的代谢负担), 可能是这些表达质粒具有良好稳定性的另外一个重要原因^[281-282]。

与 pHW20a 良好稳定性形成鲜明对照的是, pHW20a-*gfo* 质粒在连续的转接培养过程中迅速的从运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞中丢失。经过 8 次连续的转接 (约 50 代), 该质粒几乎彻底的从宿主细胞中丢失。由于 *gfo* 基因在运动发酵单胞菌 ZM4 中为组成表达的基因, 即使在野生型菌株中, 亦然保持着相当高的表达水平 (占细胞可溶性蛋白总量的 1%)^[159]。当 *gfo* 的拷贝数借助于 pHW20a-*gfo* 而在运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 中得到显著提高时, 其产物的过量表达势必会对宿主产生极大的代谢负担。这种原因可能是造成 pHW20a-*gfo* 极差稳定性的一个主要原因。与 pHW20a-*gfo* 相比, pHW20a-*mdh* 质粒却始终能够在宿主细胞中得到稳定的复制与分配。pHW20a-*mdh* 质粒的良好稳定性, 很可能与调控 *mdh* 基因表达的 *Pppc* 是一个弱启动子有关。然而, pHW20a-*gfo* 和 pHW20a-*mdh* 接合转化效率与质粒稳定性截然相反表现现象的背后是否还有其它潜在的机制在起作用? 这一在本研究未能得到充分论证及阐述的命题仍需在随后的研究过程中做深入的探讨和研究。

2.3.7 借助pHW20a在运动发酵单胞菌中表达功能基因的应用

2.3.7.1 *Gfo*在运动发酵单胞菌中的过量表达

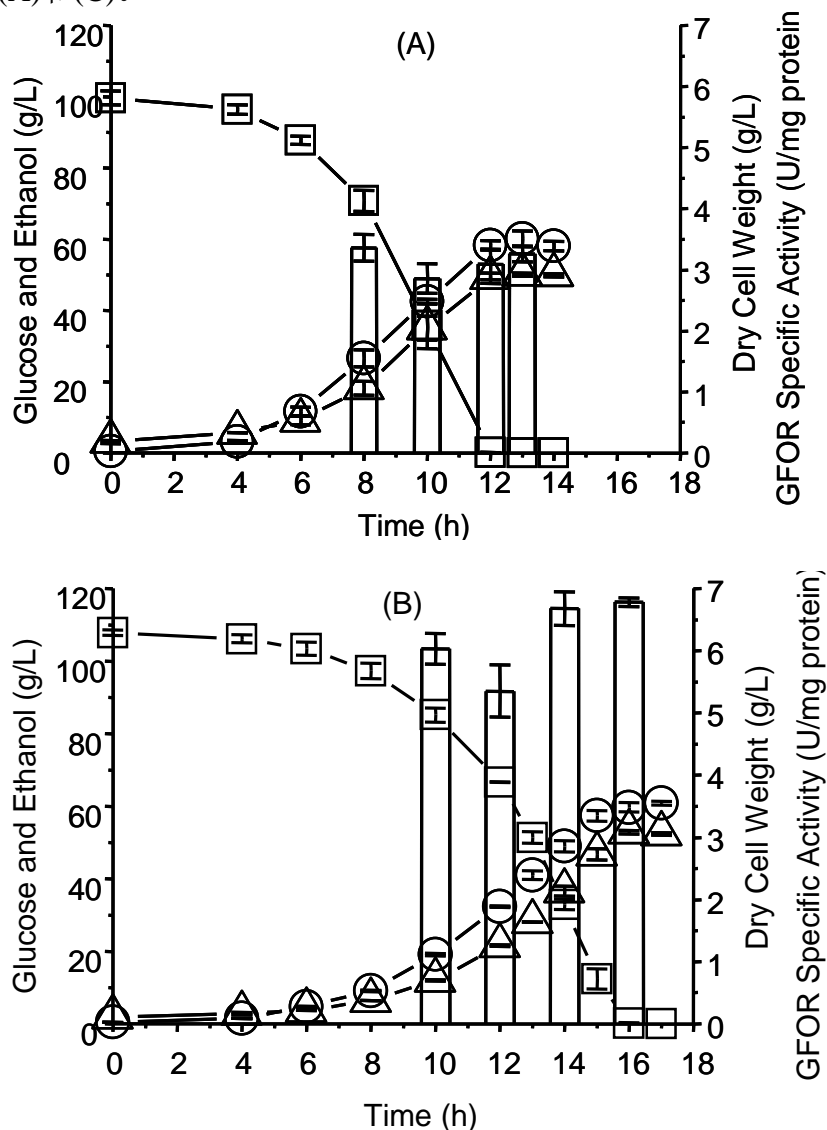
作为可以用于生物法制备山梨醇的生物催化剂, 葡萄糖-果糖氧化还原酶 (GFOR) 一直被国内外学者广泛关注。在过去的二十年间, 许多学者都试图将该酶在大肠杆菌体系中进行过量表达和制备^[159, 162, 283]。然而由于该酶在运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 的表达过程中具有极其复杂的表达后修饰机制, 因而该酶始终未能在运动发酵单胞菌菌株以外的体系中成功的过量表达^[283]。本研究中, 通过新构建的pHW20a多拷贝质粒期望将*gfo*基因能够过量的表达。为了确认基因的表达结果, 以运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 为对照菌株并根据实验材料方法之2.2.2.12对两株重组菌进行批式发酵并测定过程中细胞干重、乙醇产量、葡萄糖消耗以及比酶活力单位等发酵变量, 详见图 2.40 (A)和(B)。

由图 2.40 A和B分析可知, 对数末期运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 和运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 的GFOR比活力单位分别为 $3.52 \pm 0.14 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ (13th h) 和 $6.78 \pm 0.07 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ (16th h)。通过将pHW20a-*gfo*转化至运动发酵单胞菌ZM4, *gfo* 的表达水平约为对照菌株的1.93倍。通过对两菌株发酵持续时间的比较发现, *gfo*过表达菌株的发酵时间 (葡萄糖浓度低于0.5 g/L) 明显比对照菌株延长 (分别约为16 h和12 h), 这有可能是由于*gfo*在过表达菌株中的大量表达对宿主的代谢负担所致^[282]。这一结果也进一步支持了pHW20a-*gfo*极差的稳定性系*gfo*过表达引起宿主代谢负担所致的推论。在整个发酵过程中, 两种菌株的GFOR比酶活力单位始终保持在相对稳定的水平, 这与文献报道GFOR为运动发酵单胞菌组成型表达酶的结论相符^[159]。通过GFOR活力的测定, 确认该酶已经在运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*gfo*) 中得到有效的表达, 并进而证实

pHW20可以在运动发酵单胞菌体系中应用于自身基因的表达。

2.3.7.2 借助*ppc*启动子在运动发酵单胞菌中构建MDH代谢途径

苹果酸脱氢酶MDH是广泛存在于各种生物体内,实现苹果酸和草酰乙酸相互转化的酶。由于该酶位处于TCA循环并催化与 NAD^+ 相耦联的代谢反应。由此可见,该酶在生物体中催化的代谢反应不仅仅涉及了碳代谢,同时亦通过调节NADH和 NAD^+ 之间的相互转化而广泛的参与生命过程中的其它代谢调控^[284]。曾有报道,在真核生物中,该酶亦通过调节NADH和 NAD^+ 的平衡而介导了精氨酸在线粒体与胞质间的跨膜运输(Malate-aspartate shuttle)^[285]。这一在其它生物体代谢过程中扮演重要角色的基因为何在运动发酵单胞菌中缺失^[89]以及该基因对运动发酵单胞菌生理代谢的影响一直未有相关报道。为了进行相关的研究,我们试图构建一个回补MDH途径的运动发酵单胞菌重组菌,同时该菌株亦被用于测试pHW20a在运动发酵单胞菌ZM4中表达外源基因的一个案例。为了确认*mdh*的表达结果,以运动发酵单胞菌ZM4(pHW20a)为对照菌株并根据实验材料方法之2.2.2.12对所构建的运动发酵单胞菌ZM4(pHW20a-*mdh*)基因工程菌进行批式发酵并测定过程中细胞干重、乙醇产量、葡萄糖消耗及MDH比活等发酵变量,详见图 2.40 (A)和(C)。



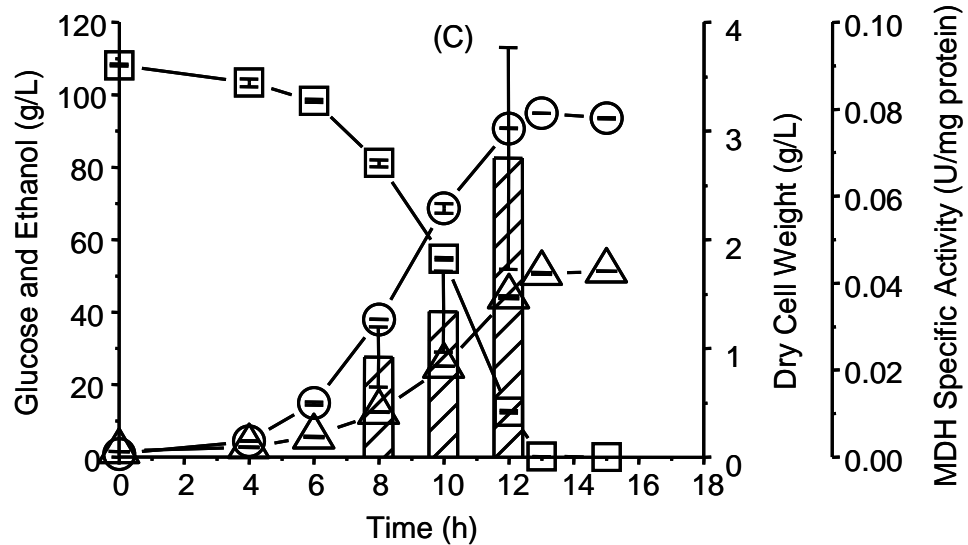


图 2.40 运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a), 运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-gfo) 和运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-mdh) 的批式发酵

Fig. 2.40 Batch fermentation of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a), *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo), and *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-mdh)

(A) Fermentation of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). (B) Fermentation of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo). (C) Fermentation of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-mdh). Circles, dry cell weight. Squares, glucose concentration. Triangles, ethanol concentration. Open columns, specific activity of GFOR. Columns with stripes, specific activity of MDH. The average values from three separate experiments were given and the standard deviation values were also indicated by the error bars in the figure.

由图 2.40 (A)结果可知, 始终无法在运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a) 细胞裂解液中测到 MDH 酶活, 该结果与以往文献报道相符并进一步确认该基因在运动发酵单胞菌 ZM4 中的缺失^[89, 180]。根据图 2.40 (C)数据结果显示, 在整个发酵过程中运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-mdh) 细胞中的 MDH 比酶活力单位随着发酵的进行而不断的提升, 并在第 12 h 达到 0.07 ± 0.03 U/mg protein。这一结果可能与所构建之表达质粒使用 *ppc* 启动子作为调控 *mdh* 表达元件相关。然而令人费解的是, 虽然 pHW20a-mdh 转化运动发酵单胞菌 ZM4 的效率很低, 但是运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-mdh) 在乙醇发酵过程中所表现出的生长状态、葡萄糖消耗以及乙醇的生成却与对照菌株运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a) 的表现极为相似 (仅发酵时间略有延长)。以目前的数据分析, 推究该现象有可能与调控 *mdh* 表达的 *Pppc* 启动子为弱启动子以及转化子细胞代谢网络对 *mdh* 的适应相关。这一假设仍需在随后的工作中给予进一步的证实。

MDH 纯酶比活力单位根据文献报道为 $1,980$ U/mg protein^[286], 按目前 MDH 酶活力单位的标准定义而换算的比酶活力单位为 950.4 U/mg protein。如果按此数据及所获得的运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-mdh) 细胞中 MDH 比酶活力单位的结果计算, MDH 在第 12 h 的表达量约占细胞内可溶性蛋白总量的 0.01%。该结果在某种程度上证实 *Pppc* 启动子在运动发酵单胞菌 ZM4 菌中有可能为弱启动子。在本研究的发酵条件下, MDH 的比酶活力单位随着发酵的进行而不断增强的结果亦暗示 *ppc* 可能为一被调控的基因而参与细胞的生长和繁殖过程中。这一数据在某种程度上支持了我们对 *Pppc* 为弱启动子的推论。

2.3.8 运动发酵单胞菌 ZM4 批式发酵过程中 *ppc* 转录水平的研究

由于基因在表达的过程中, 其表达水平不仅仅受到转录水平的调节, mRNA 的稳定性、mRNA 的二级结构 (发夹结构的形成)、密码子的偏好性等因素都会对表达产物的浓度产生重要的影响。为了进一步确认 *ppc* 的启动子对其调控基因的转录强度, 本研究

以位于酵解途径并组成型表达的三磷酸甘油醛脱氢酶编码基因 (*gap*, GAPDH) 作为看家基因, 通过 real-time qRT-PCR 对 *ppc* 的转录水平及其 mRNA 在批式发酵过程中的丰度变化进行分析。

以野生型运动发酵单胞菌 ZM4 菌株作为研究对象, 并按照实验材料和方法之 2.2.2.12 进行乙醇发酵。分别收集发酵接种前的菌种、对数前期、对数中期、对数末期的细胞, 并依照 2.2.2.13 中所述之方法对 *gap* 和 *ppc* 两基因的 mRNA 丰度进行分析 (图 2.41)。

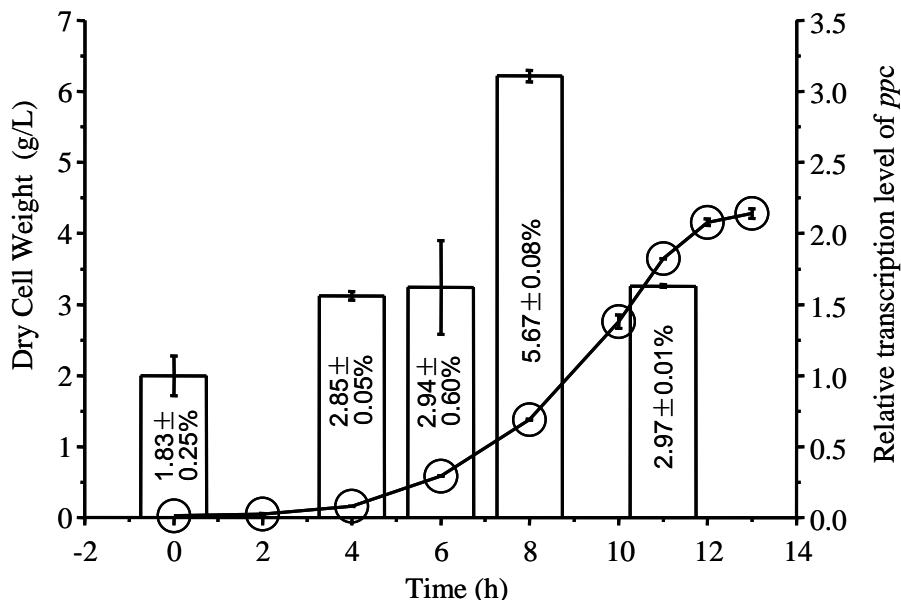


图 2.41 运动发酵单胞菌 ZM4 批式发酵过程中 *ppc* 基因的相对转录水平

Fig. 2.41 Batch fermentation of *Z. mobilis* ZM4 and relative transcription level of *ppc* with *gap* as the control

Circle, dry cell weight. Open columns, the relative transcription level of *ppc* during their batch fermentation. The Arabic numerals on the columns, the ratio of the *ppc* transcription level to the *gap* transcription level calculated from qRT-PCR results. The average values from three separate experiments were given and the standard deviation values were indicated by the error bars.

根据图 2.41 之结果, *ppc* 的转录水平与菌种的比生长速率密切相关。随着菌体进入对数生长期, *ppc* 的转录水平逐渐增强; 当细胞的比生长速率达到极大值时, *ppc* 的转录水平也随之达到极大值。整个发酵过程中, 与位于酵解途径的 *gap* 基因的转录水平相比, *ppc* 的 mRNA 丰度始终维持在比较低的水平 (2.85~5.67%); 即使当 *ppc* mRNA 水平达到极大值时 (8th h), 其 mRNA 的丰度仅为 *gap* mRNA 丰度的 5.67%。这种较低的转录水平势必会引起 PEPCase 的低表达, 该结果也与运动发酵单胞菌 ZM4 乙醇发酵过程中的低细胞得率以及高乙醇收率相符。

2.4 小结

根据前文所述之结果, 本研究通过对应用于运动发酵单胞菌 ZM4 的高效率接合质粒 pLOI193 的结构精简和优化, 并通过补加 *lacZα* 和增强的多克隆位点, 从而得到了一个更为高效、用途更为灵活并且更易于基因操作的工具质粒——pHW20a。与其它革兰氏阴性细菌广泛宿主的质粒相比, 该质粒对运动发酵单胞菌接合转化效率更高, 并且具有良好的遗传稳定性。通过将一系列的可移动质粒转化至运动发酵单胞菌中发现, 可移动质粒的分子量对于其接合转化效率是极为重要的影响因素。根据这一结论不难发现, 虽然 pHW20a 的接合转化效率以及基因操作等方面有了显著的改善, 但该质粒仍然存在着分子量过大等不利因素。这一缺憾也希望能够通过对各个顺式作用元件之间功能

的优化在以后的工具质粒构架过程中得到进一步的改善。

在测试pHW20a在运动发酵单胞菌ZM4基因工程改造应用过程中，首先通过应用pHW20a多拷贝质粒的性质，将*gfo*这一编码葡萄糖-果糖氧化还原酶的基因在运动发酵单胞菌ZM4中进行了过量表达。虽然GFOR过表达的程度有限，但期望通过增加对运动发酵单胞菌代谢行为的深入认识，可以在短期内将GFOR的表达水平进一步提高。另外，通过借助于该质粒，*mdh*基因在Pppc启动子的调控下表达于运动发酵单胞菌ZM4中，回补了野生型菌株缺失的一个重要代谢途径。虽然通过酶活测定确认了*mdh*基因的表达，但是pHW20a-*mdh*低接合转化效率的现象仍然未能获得很好的解释。这一在本研究中未能解决的疑问，将留待日后对其做深入的探讨。最后，通过MDH比活以及借助real-time qRT-PCR对*ppc*和*gap*两基因转录水平的测定，本研究还确认了*ppc*基因为一受到某种调控的弱转录基因（与位于ED途径的*gap*基因相比）。该结果在某种程度上也丰富了我们对于运动发酵单胞菌菌株高糖耗速率与低细胞量这种相悖现象的认识。同时，Pppc这一弱启动子的确认，也使其成为随后开展运动发酵单胞菌代谢工程研究又一可供选择的调控元件。

第三章 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶在运动发酵单胞菌代谢过程中的作用

3.1 前言

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 是一种特殊的革兰氏阴性细菌。该菌可以在绝对厌氧的条件下利用高浓度简单的糖 (葡萄糖、果糖和蔗糖等) 生长, 同时生成大量的乙醇以及极少的菌体。这种远远超出细胞生长及代谢维持的高糖耗现象被称为非耦联生长 (Uncoupled growth) [188]。经研究发现, 该菌通过特殊的 Entner-Doudoroff 代谢途径 (ED pathway) 借助于底物水平的磷酸化反应实现 ATP 的再生 [101]。该途径通过降解 1 mol 的葡萄糖 (或果糖) 生成 1 mol 的 ATP, 同时伴随 2 mol 乙醇的生成。由于该菌株通过 ED 酵解途径的产能得率较低, 由葡萄糖转化生成 ATP 的得率仅有 Embden-Meyerhof-Parnas 途径 (EMP pathway) 的一半, 因此曾有很长的一段时间, 学者们将该菌发酵细胞得率低的原因都归结于 ED 途径较低的 ATP 产率。随着运动发酵单胞菌 ED 代谢途径上相关酶的性质及其基因转录和表达等研究的不断深入, 人们对运动发酵单胞菌的非耦联生长又有了重新的认识。虽然, ED 途径的 ATP 产率较 EMP 途径明显偏低, 但是由于参与该途径相关酶的催化效率和表达水平极高, 因此单位时间单位细胞内所获得 ATP 的绝对量完全超出细胞合成代谢的需求 [125], 甚至比酵母 EMP 酵解途径的 ATP 生成效率高 2-3 倍 [151, 192]。由此可以确认, ATP 的生成并非是野生运动发酵单胞菌代谢过程中的限制因素。相反, 由于该菌株的 ED 代谢途径效率极高, 为了实现葡萄糖等发酵基质向终产物 (乙醇) 的迅速转化, 该菌株甚至需要一些额外的能量消耗途径来降低细胞内的能量负担 [192]。经研究发现 F_1F_0 ATPase、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶以及二氧化碳的去膜电位效应均参与了这种能量消耗过程 [192-193, 201, 206]。虽然目前人们对运动发酵单胞菌非耦联生长以及 ATP 溢出等机理有了进一步的了解, 但是对以上现象仍然无法给出合理而全面的解释 [189]。

作为细胞中与能量和代谢相关的一个重要酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvatecarboxylase, PEPCase) 催化了由磷酸烯醇式丙酮酸向草酰乙酸的直接转化。在此转化过程中, PEPCase 通过将磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP) 中的高能磷酸键直接水解, 实现了二氧化碳的固定 [287]。随着运动发酵单胞菌 ZM4 基因组测序工作的完成, 发现在该菌中 PEPCase 参与的草酰乙酸途径可能并不像其它细菌中一样仅仅作为草酰乙酸 (OAA) 生成的一个补救途径 (Anaplerotic pathway) 而参与运动发酵单胞菌 ZM4 的合成代谢 [288-289]。目前, 有关运动发酵单胞菌 PEPCase 的研究报道仅限于纯化和性质的初步研究 [180], 因此研究 PEPCase 在运动发酵单胞菌代谢和生长中的作用, 将有助于增进对该菌株非耦联生长的认识。

本文通过同源重组的方法将运动发酵单胞菌 ZM4 基因组中编码 PEPCase 的基因 (*ppc*) 通过四环素抗性基因的插入突变进行了敲除。通过该突变株在基本合成培养基上与野生菌株显著的生长差异, 证实运动发酵单胞菌仅依赖于 PEPCase 途径进行草酰乙酸的生成。通过研究草酰乙酸添加对运动发酵单胞菌乙醇发酵的影响以及 *ppc* 表达水平对重组菌生长和代谢的影响, 对 PEPCase 在运动发酵单胞菌生长和代谢中的作用有了更为深入的了解, 亦对该菌株非耦联生长的调控机制有了更为全面的理解。

3.2 材料与方方法

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 菌株和质粒

运动发酵单胞菌 ZM4 菌株 (*Z. mobilis* ZM4, ATCC 31821) 购自于美国典型菌种保

藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC, MD, USA)。大肠杆菌S 17-1 $\lambda \pi$ (*Escherichia coli* S 17-1 $\lambda \pi$) 用于运动发酵单胞菌双亲本接合转化操作。穿梭质粒 pHW20a 用于 *ppc* 基因在运动发酵单胞菌 ZM4 中的表达。运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*Pppc-ppc*) 重组菌和运动发酵单胞菌 ZM4 (*ppc::tc^r*) 突变株由本研究构建。其它菌株及质粒详见表 3.1。

表 3.1 本研究涉及之菌株及质粒
Table 3.1 Strains and plasmids used in this study

| Strains/plasmids | Features ^a | Source/reference |
|--|---|------------------|
| Strains | | |
| <i>Z. mobilis</i> ZM4 | Wild type, ATCC 31821. | From ATCC |
| <i>Z. mobilis</i> ZM4 (<i>ppc::tc^r</i>) | <i>Z. mobilis</i> ZM4 mutant strain with <i>ppc</i> knock-out. | |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F ⁻ , ϕ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻, mk⁺</i>) <i>phoA supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> . | [263] |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB⁻ mB⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3). | Novagen |
| <i>E. coli</i> S17-1 $\lambda \pi$ | <i>Pro, res⁻, mod⁺</i> ; chromosomal integrated RP4; <i>2-Tc::Mu-Km::Tn7;Tp, sm</i> . | [264] |
| Plasmids | | |
| pUC19 | <i>Ori</i> pMB1, <i>amp^r</i> , MCS, <i>lacZα</i> ; cloning vector. | [265] |
| pET-28a (+) | <i>Km^r</i> , <i>ori</i> pMB1, T7 promoter/terminator. | Novagen |
| pUC19- <i>tc^r</i> | Plasmid subcloned <i>tc^r</i> complete gene from pBR322. | In chapter 2 |
| pUC19- <i>ppc</i> | Plasmid with <i>ppc_{Zm}</i> subcloned into pUDEH. | In this study |
| pET-28a- <i>ppc</i> | Over-express <i>ppc_{Zm}</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3). | In this study |
| pUC19- <i>ppc::tc^r</i> | Plasmid for <i>ppc_{Zm}</i> knock-out by homologous recombination. | In this study |
| pHW20a | <i>Tc^r</i> , <i>mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZα</i> , MCS and <i>oriV</i> . | In chapter 2 |
| pHW20a- <i>Pppc-ppc</i> | Express <i>ppc_{Zm}</i> in <i>Z. mobilis</i> with <i>ppc_{Zm}</i> promoter of ZM4. | In this study |
| pUC19DN | pUC19 derived plasmids without NdeI site. | In chapter 2 |
| pUC19DN- <i>Pgap</i> | Plasmid with <i>gap_{Zm}</i> promoter subcloned into pUC19DN. | In this study |
| pUC19DN- <i>Pgap-ppc</i> | Plasmid carries the expression cassette of <i>ppc_{Zm}</i> under the control of <i>gap_{Zm}</i> promoter from <i>Z. mobilis</i> strain. | In this study |
| pHW20a- <i>Pgap-ppc</i> | Express <i>ppc_{Zm}</i> in <i>Z. mobilis</i> under the control of <i>gap_{Zm}</i> promoter from ZM4. | In this study |

^a*Zm*, gens from *Z. mobilis* ZM4.

3.2.1.2 主要试剂

DNA分子量标准品购自于日本TAKARA大连分公司或天根生物科技有限公司。蛋白质分子量标准品购自于日本TAKARA大连分公司。本研究所用寡核苷酸皆由Primer V5.0根据NCBI公布之基因序列 (Gene ID: 3187638) 自行设计, 并由上海生物工程技术有限公司合成。引物的纯度及分子量皆经聚丙烯酰胺电泳和质谱鉴定 (详见表 3.2)。

细菌基因组抽提试剂盒 (Qiagen DNeasy Tissue Kit) 购自于美国Qiagen公司 (Valencia, CA, USA)。PCR产物纯化试剂盒 (PCR Purification Kit), 胶提取试剂盒 (Gel Extraction Kit) 和质粒抽提试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 均购自美国Omega生物工程公司 (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA); 卡那霉素 (Kanamycin, Km), 氨苄青霉素 (Ampicillin,

Amp), 异丙基 β -D-巯基半乳-吡喃糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside, IPTG), 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS), 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris-(hydroxymethyl) aminomethane, Tris base), 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-Gal) 均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA)。西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain)。氯霉素 (Chloramphenicol, Cm), 四环素 (Tetracycline, Tc), 萘啶酸 (Nalidixic acid, Na) 和草酰乙酸 (Oxalacetic acid, OAA) 购自于比利时 Acros Organics 化学公司 (Geel, Belgium)。酵母提取物 (Yeast extract) 和胰蛋白胨 (Tryptone) 购自于英国 Oxoid 有限公司 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)。NAD⁺-依赖型苹果酸脱氢酶 (Malic dehydrogenase from *Thermus sp.* recombinant, 170 unit/mg protein, ammonium sulfate suspension), 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 和还原性辅酶 I (NADH) 购自于美国 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。培养基的配制使用去离子水, 其它分析检测和基因操作之溶液配置使用 Milli-Q Synthesis 制备超纯水 (本章随后简称为超纯水)。其它试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自于国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。

表 3.2 本研究涉及之引物
Table 3.2 Oligonucleotides used in this study

| Primer No. | Primer name ^b | Sequence (5'→3') |
|------------|---------------------------------------|--|
| 1 | <i>Ppc-S</i> | ACATGCATGCCATATGACCAAGCCGCGCACA |
| 2 | <i>Ppc-A</i> (<i>Pppc-ppc-A</i>) | GGGGTACCGGATCCTCAACCGCTGTTGCGAAGTG |
| 3 | <i>Tc^r-S</i> | AACTGCAGCATGTTTGACAGCTTATCATCG |
| 4 | <i>Tc^r-A</i> | GGAATTCCATGGTTCCATTTCAGGTCGAGGTG |
| 5 | <i>Pgap-S</i> | CGCGGATCCGCGGTTGGACTTTGTTTCGATCAAC |
| 6 | <i>Pgap-A</i> | CGGAATCCCGGGCATATGTTTATTCTCCTAACTTATTAAGTAGC |
| 7 | <i>Pppc-ppc-S</i> | GCTCTAGACTCGAGTGGCGTCTATGAGAGCATG |
| 8 | <i>LacZ-S</i> | AGATCTACGCGTCTATGCGGCATCAGAGCAG |
| 9 | <i>LacZ-A</i> | GCGGCCGCTCGAGTAGCTCACTCATTAGGCACCC |

^bWords in italic style, the target genes; qRT, the primer paires used for real-time qRT-PCR; S, sense primer; A, anti-sense primer.

本研究所使用之 DNA 和蛋白质分子量标准品电泳条带分布如下:

DNA 分子量标准品——

1 kb Plus DNA Ladder (bp): 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 10000;

2000 bp DL (bp): 100, 250, 500, 750, 1000, 2000;

250 bp DL (bp): 250, 500, 750, 1000, 1500, 1750, 2250, 3000, 4500;

Marker Wide Range 12000 bp (bp): 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 12000。

低分子量蛋白标准品——

Low molecular weight (kDa): 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1, 14.3。

3.2.1.3 实验仪器

主要仪器:

Thermo scientific Forma -86C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA); Eppendorf Research 移液器 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Mastercycler PCR 仪 (Eppendorf 公司); 5415R 小型高速冷冻离心机 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); 5430 Thermomixer compact 微型摇床 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Mini-Sub Cell GT 水平电泳槽 (Bio-Rad 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Power Pac 3000 通用电源 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); MicroPulser 电穿孔仪 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统 (Millipore Corporation, MA, USA); LC-20AD 送液泵 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japan); RID-10A 示差检测器 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japan); CTO-10AS VP Plus 柱温箱 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japan); 全自动紫外与可见分析装置 FR-200A (复日科技); BS423S 和 BS224 电子天平 (Sartorius Group, Goettingen, Germany); DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); Avanti J-26 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); QL-901 型旋涡混合器 (江苏海门其林贝尔); LX-100 手掌型离心机 (江苏海门其林贝尔); YXQ-LS-75S II 立式压力蒸气灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司); JY92-II 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司); KWT-100A 超声波清洗机 (科伟达超声波设备有限公司); GHP-9160 恒温恒湿培养箱 (上海一恒科技有限公司); HZ-9311K 落地恒温振荡摇床 (太仓华利达有限公司); SDC-6 恒温水槽 (宁波新芝生物科技有限公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); XB-100 制冰机 (宁波格兰特制冷设备制造有限公司); CD-239VC 冰箱 (海尔公司); PHS-3C pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); Biotech-4BG 3L 四联发酵罐 (上海保兴生物设备工程有限公司)。

主要耗材:

0.1 cm 间距电击杯 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); 封口膜 PM-996 (Parafilm[®] M PM-996, American National Can, Chicago, IL, USA); 0.22 μm 和 0.45 μm 混合纤维素滤膜 (上海迪清过滤技术有限公司)。

本研究样品分析测定过程所需之玻璃容器及器皿首次使用前, 皆以 0.1 N HCl 浸泡 12 h, 并以洗洁精刷洗干净。用自来水冲洗 9 次, 并根据需要用去离子水或超纯水润洗 3~5 次, 烘干待用。

3.2.1.4 培养基、培养条件及菌种之保存

本研究大肠杆菌培养之培养基为 Luria broth (LB) 培养基^[268]。大肠杆菌培养方法详见第二章材料与方法之 2.2.1.4。

大肠杆菌感受态细胞制备培养基及其制备方法详见第二章材料与方法之 2.2.1.4 和 2.2.2.4。

本研究中培养运动发酵单胞菌及重组菌之种子培养基均为 RM 培养基或 RT 抗性培养基。所获得的菌液用于质粒抽提、基因组 DNA 制备、菌种的保藏、接合转化及发酵菌种的活化和扩大培养。培养基的组成和制备详见第二章材料与方法之 2.2.1.4。

研究运动发酵单胞菌生长的基础合成培养基 (BM) 参考文献报道^[290]。

本研究所涉及菌株的保存皆以 30% 甘油管保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。具体方法详见第二章材料与方法之 2.2.1.4。

本研究中运动发酵单胞菌及重组菌株发酵培养基如无特殊说明皆为 YPMAG20 培养基, 培养基组成为: 20 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母提取物, 1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。培养基溶液以 5 N NaOH 调节至初始 pH 6.0, 于 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

3.2.1.5 抗生素溶液的制备

四环素盐酸盐 (Tc)、氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Km)、萘啶酸 (Na) 和氯霉素 (Cm) 贮存液的制备详见第二章材料与方法之 2.2.1.5。

3.2.2 实验及分析方法

3.2.2.1 质粒抽提, 基因组DNA制备和DNA分离纯化

质粒抽提, 基因组DNA制备和DNA分离纯化详见第二章材料与方法之 2.2.2.1。

3.2.2.2 PCR体系

PCR体系详见第二章材料与方法之 2.2.2.2。

3.2.2.3 PCR及来源于质粒DNA片段的克隆(酶切、末端平滑化和连接)及测序

PCR及来源于质粒DNA片段的克隆(酶切, 末端平滑化和连接)及测序详见第二章材料与方法之 2.2.2.3。类似限制性内切酶或反应体系应用参考pHW20a构建过程的单酶切反应, 双酶切反应体系和连接反应体系, 本章就不再一一赘述。

3.2.2.4 氯化钙制备和转化大肠杆菌感受态细胞

质粒 DNA 及 DNA 连接反应产物转化至氯化钙制备的大肠杆菌感受态细胞中。用氯化钙制备和转化大肠杆菌感受态细胞的方法参考《分子克隆实验指南》(中文版第三版)略有改动^[270]。具体步骤详见第二章材料与方法之 2.2.2.4。

3.2.2.5 运动发酵单胞菌ZM4电击转化感受态细胞制备和电击转化方法

制备运动发酵单胞菌电击转化感受态细胞详见《分子克隆实验指南》(中文版第三版)^[270]之大肠杆菌电击转化感受态细胞的制备方法(其中运动发酵单胞菌电击转化感受态细胞制备培养基为RM培养基, 培养方法参考本章材料与方法之 3.2.1.4)。运动发酵单胞菌生长至OD_{600nm}约为0.6时收获细胞进行电击转化感受态细胞的制备。电击转化运动发酵单胞菌方法具体操作步骤根据文献报道略有改动^[291]。电击杯规格: 0.1 cm电击杯; 电击条件, 电压1.8 kv, 电击时间5 ms。

3.2.2.6 接合转化法转化运动发酵单胞菌菌株

接合转化法转化运动发酵单胞菌详见文献报道^[222]及第二章材料与方法之 2.2.2.5。

3.2.2.7 用于酶活测定细胞的制备和超声波破碎法制备细胞裂解液

以量筒量取相当于约6.2 g(约20 OD mL)细胞干重(DCW)的培养液, 于4 °C 10,000 × g离心5 min, 弃上清。用等体积冰浴预冷的缓冲液重悬细胞(该缓冲液对应于测定酶活体系缓冲液), 并将细胞悬浮液于4 °C 10,000 × g离心5 min。细胞悬浮/离心重复操作共三次。最终以1 mL冰冷缓冲液将细胞悬浮, 并转移至1.5 mL离心管中。于4 °C 10,000 × g离心5 min, 并将收集之细胞储存于-80 °C超低温冰箱中(三天内完成胞内酶活的测定)。

-80 °C超低温冰箱中取出冻存细胞, 并迅速加入1 mL冰浴预冷的缓冲液(该缓冲液亦对应于测定酶活体系缓冲液)。将离心管置于冰水浴中, 以φ3 mm超声波破碎仪探头进行细胞破碎。破碎条件为: 200 W, 工作60 s(每工作5 s, 间隔15 s, 共12个循环)。细胞裂解液于4 °C 15,000 × g离心30 min, 收集上清液于并置于冰浴中待用。

3.2.2.8 PEPCase酶活测定

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)通过催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)利用HCO₃⁻的羧化反应, 生成草酰乙酸和正磷酸。该反应可以与MDH催化草酰乙酸和NADH生成苹果酸和NAD⁺的反应耦合, 并通过检测340 nm波长下NADH吸光度的变化速率来间接测定PEPCase的酶活。PEPCase酶活力定义为, 在酶活测定体系里1 min内催化1 μM磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化反应所需要的酶量定义为1个酶活单位(Unit, 等同于每分钟催化氧化1 μM NADH)。PEPCase酶活力的测定参考Maruyama, H.等人的方法^[292]略有改动。在80mM pH 7.8的Tris-HCl缓冲体系中, 加入10 mM KHCO₃, 2.0 mM PEP-K, 2.0 mM MgCl₂, 2.0 mM NADH和14 units MDH。反应体系在30 °C下预热5 min, 通过加入大约0.001~0.010 unit PEPCase的样本触发反应(反应体系最终体积为1 mL)。通过以配有恒温装置的Beckman DU800核酸蛋白分析仪在340 nm处检测反应体系吸光度(OD_{340nm})

的变化速率来计算NADH浓度的变化速率。测定酶活体系控制温度为30 ℃，测定点时间间隔为3 s。将测得之数据，选取反应初始阶段线性较好的区域回归成线性方程。以 $k_{340\text{nm}}$ 表示线性方程的斜率。按照如下公式计算酶活（Unit/ μL ）。

$$\text{Activity}(\text{Unit} / \text{ml}) = \frac{|k_{340\text{nm}}| \times 1}{6.2 \times V_s}$$

式中：

$|k_{340\text{nm}}|$ —每分钟吸光度变化值的绝对值（340 nm处）； 1—1 mL的反应体积；
6.2—1 μM NADH的吸光度（340 nm处）^[273]； V_s —加入样品的体积（ μL ）。

3.2.2.9 蛋白质浓度的测定

采用Bradford法^[274]测定样品中的蛋白质浓度。相关试剂的配置，标准曲线的制定以及具体操作步骤详见第二章材料与方法之2.2.2.9。

3.2.2.10 葡萄糖（Glucose）和乙醇（Ethanol）HPLC标准曲线的制定

本研究以配有Bio-Rad Aminex HPX-87H色谱柱、岛津RID-10A示差检测器和岛津LC-20AD送液泵的HPLC系统，对待测样品的葡萄糖和乙醇浓度进行分析。HPLC分析参数为：柱温设定在65 ℃，以5 mM H_2SO_4 为流动相，流速为0.6 mL/min，进样体积为20 μL 。葡萄糖和乙醇标准曲线详见第二章材料与方法之2.2.2.10。

3.2.2.10 运动发酵单胞菌ZM4及重组菌的发酵及发酵变量的测定

运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌的发酵操作相关文献报道^[271]。将-80 ℃ 冰箱保存的运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌甘油管迅速置于 40 ℃ 温水中融化，并于超净工作台中以 2% (vol/vol) 接种量接种于 RM 培养基中（如为重组菌菌则需添加 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的四环素）。将接种后的培养液于 30 ℃ 恒温培养箱中静置培养约 20-24 h，直至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 约为 2.0。用移液枪吸取菌液重新以 1% (vol/vol) 接种量接种于新鲜的 RM（或 RT）培养基中，于 30 ℃ 恒温培养箱中静置培养约 10~12 h 直至细胞浓度为 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.0\sim 1.1$ 。将培养至对数中后期的菌种按照 10% (vol/vol) 的接种量接种发酵培养基（如为重组菌则根据实验需要添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tc）。接种后的发酵液以 5 mL 等份分装于无菌试管中（硅胶塞密封），并将三组平行样置于 30 ℃ 恒温培养箱中发酵培养。发酵过程中，根据需要隔时取出试管样测定细胞浓度（ $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ），葡萄糖浓度和乙醇浓度等相关发酵变量（如需测定酶活，则以带有硅胶塞的 100 mL 三角摇瓶进行大体积培养）。

以配有Bio-Rad Aminex HPX-87H色谱柱、岛津RID-10A示差检测器和岛津LC-20AD送液泵的HPLC系统，对发酵液中的葡萄糖和乙醇浓度进行分析。所有的样品均在4 ℃ 15,000 \times g离心力下离心5 min，收集上清液并以0.22 μm 滤膜进行过滤。滤出液按照标准曲线的标定范围以超纯水进行稀释，并以20 μL 进样体积进行分析。分析结果以第二章材料与方法之2.2.2.10所制定的标准曲线进行葡萄糖和乙醇浓度的计算。

3.3 结果与讨论

3.3.1 pUC19-ppc::*tc*^r敲除质粒的构建

根据文献报道，以pMB1作为复制子的质粒无法在运动发酵单胞菌中进行质粒复制^[247]，因此本研究选择pUC19质粒作为运动发酵单胞菌ZM4菌株ppc基因敲除的自杀质粒。首先，通过利用pUC19质粒对ppc基因进行亚克隆，并通过大肠杆菌BL21（DE3）/pET-28a（+）表达体系对亚克隆得到的ppc基因进行表达和酶活鉴定。随后，以本论文第二章构建的pUC19-*tc*^r质粒作为四环素抗性基因的来源，借助于PstI和NcoI酶切位点将四环素抗性基因插入pUC19-ppc质粒的ppc CDS中，从而得到了用于ppc基因同源重组的敲除质粒pUC19-ppc::*tc*^r（详细技术路线见图 3.1）。

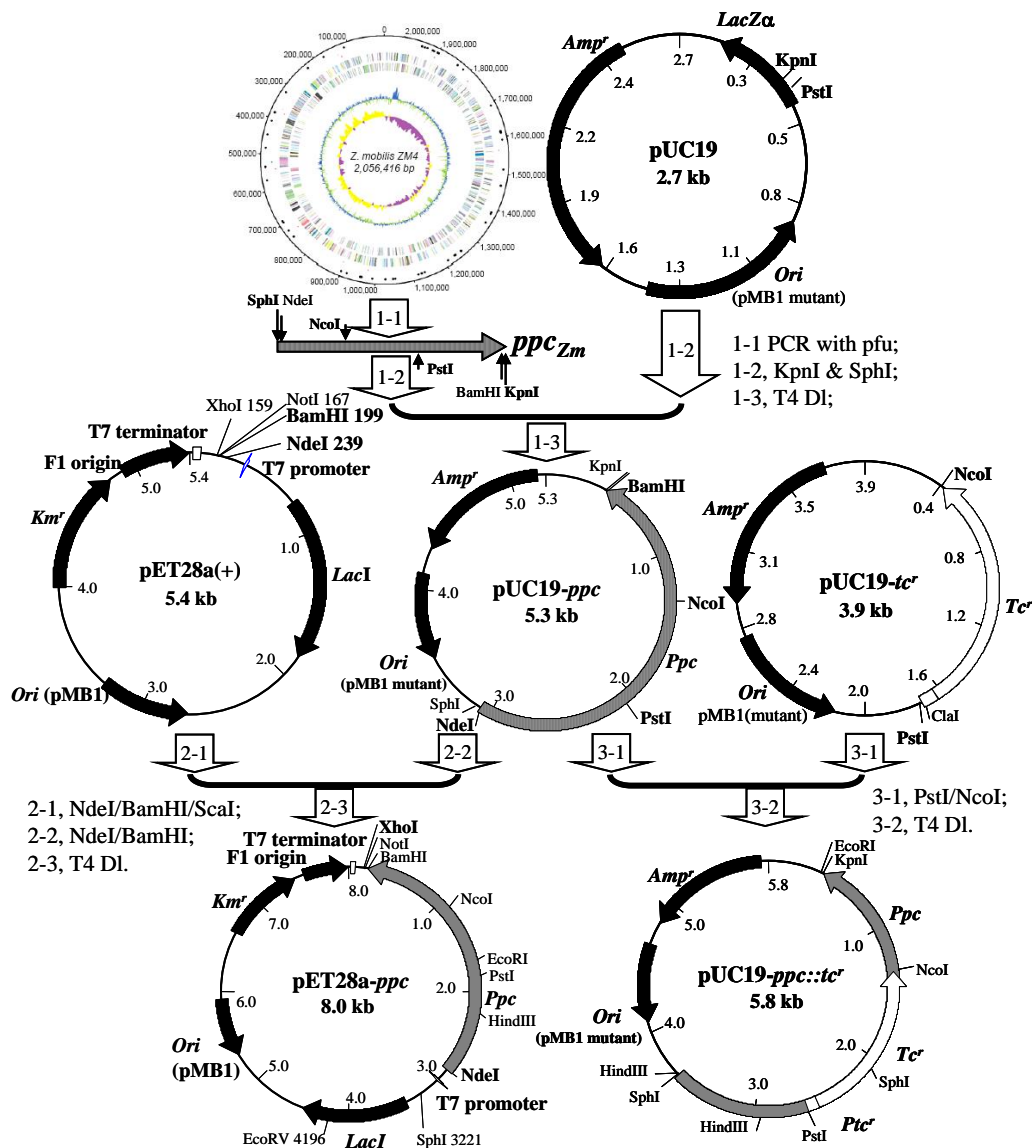


图 3.1 *Ppc*基因亚克隆、表达质粒及基因敲除质粒构建技术路线图

Fig. 3.1 Scheme of *ppc* subcloning and the construction of vectors for *ppc* expression and knockout. The genome physical map was cited from the report of Jeong-Sun Seo *et al.*^[89]. T4 D1, T4 DNA ligase; T4 Dp, T4 DNA polymerase. 1-1, the first numeral in the serial number represented the sequence of plasmid would be constructed in the whole steps, and the second numeral indicated the order of the molecular manipulation steps during plasmid construction with the enzymes following the serial number. White arrows and bands indicated complete DNA sequence of *tpc^r*; arrows (box) with stripes, *ppc* CDS. Restriction sites in boldface style indicated the sites which would be used in the next genetic manipulations.

3.3.1.1 借助pUC19质粒进行ppc基因的亚克隆

为了获取编码PEPCase的CDS序列，本研究首先按照第二章材料与方法之2.2.2.1以Qiagen公司的Qiagen DNeasy Tissue Kit从运动发酵单胞菌ZM4菌体制备基因组DNA。并以寡核苷酸 *Ppc-S* 和 *Ppc-A* 为引物，按照第二章材料与方法之2.2.2.2以 pfu DNA polymerase催化的PCR制备 *ppc* 基因的编码序列。50 μL PCR体系的反应条件为：退火温度65 ℃，延伸时间6 min，总循环数25 cycles。PCR产物经Omega PCR Purification Kit对其进行纯化，并以 *KpnI* 和 *SphI* 分别对纯化后的PCR产物和pUC19质粒进行双酶切，并以0.7%琼脂糖核酸电泳回收酶切产物。经Omega Gel Extraction Kit纯化的DNA片段以0.7%琼脂糖核酸电泳确认纯化回收结果。随后，将经回收纯化的pUC19 (*KpnI*和*SphI*, 2.7 kb)

和 *ppc* (KpnI和SphI, 2.7 kb) DNA片段配制成连接反应体系, 并于16 °C 孵育12 h。

将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 并以LIXA抗性平板于37 °C对转化子进行筛选培养。随机挑选7个白色菌落重新划线于新鲜的LIXA抗性平板上做进一步纯化培养。挑取单菌落接种于LA液体抗性培养基中于37 °C 220 rpm培养12 h, 以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒。以KpnI和SphI的单/双酶切连接反应和*ppc*基因的PCR对筛选得到的阳性克隆进行鉴定。使用Taq DNA polymerase的PCR条件为: 延伸时间为3 min, 其它参数同于制备*ppc*基因的PCR条件。酶切反应产物和PCR产物以0.7%琼脂糖核酸电泳确认结果(图 3.2)。

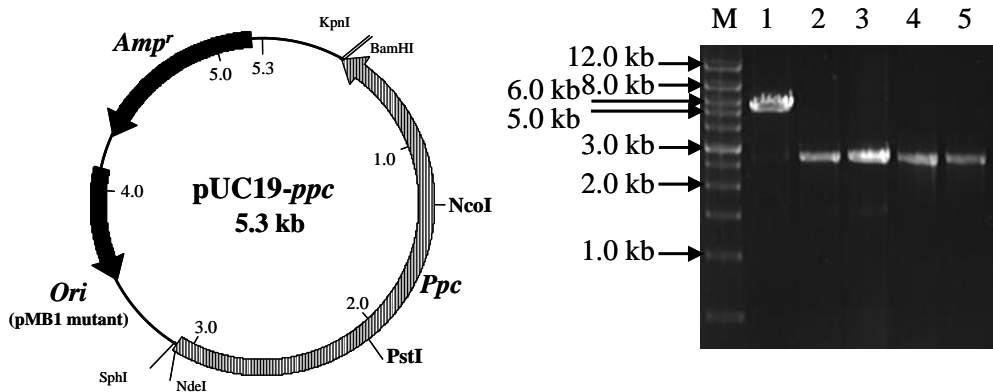
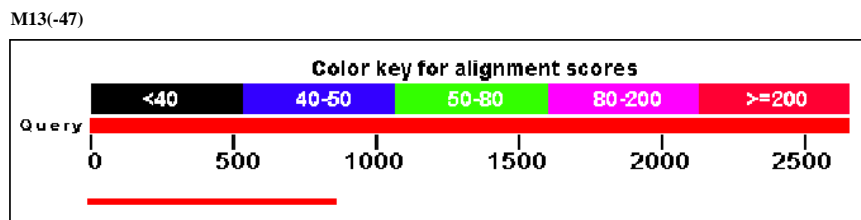


图 3.2 pUC19-*ppc*质粒图以及该质粒鉴定之琼脂糖核酸电泳图谱

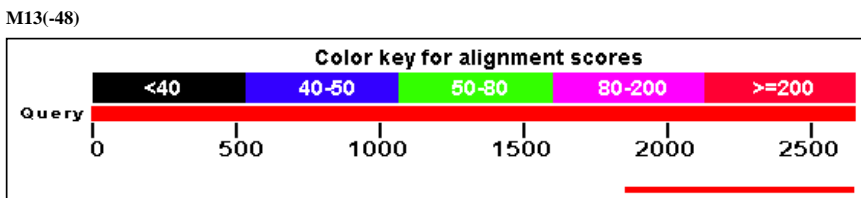
Fig. 3.2 The map of pUC19-*ppc* and the agarose gel electrophoresis graph for its identification Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19-*ppc* (KpnI); lane 2, pUC19-*ppc* (KpnI & SphI); lane 3, pUC19 (KpnI & SphI); lane 4, *ppc* PCR products with pUC19-*ppc* as the template; lane 5, *ppc* PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template.



Sequences producing significant alignments:

| Accession | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|-----------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| 45417 | 1605 | 1605 | 32% | 0.0 | 99% |

(A)



Sequences producing significant alignments:

| Accession | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|-----------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| 49757 | 1223 | 1223 | 25% | 0.0 | 99% |

(B)

图 3.3 克隆DNA片段测序结果与*ppc*基因序列比对

Fig. 3.3 Blasting results of cloned DNA sequence with *ppc* CDS from *Z. mobilis* ZM4 published (A) Blasting results of dsDNA sequenced by M13(-47) with *ppc*. (B) Blasting results of dsDNA sequenced by M13(+48) with *ppc*.

为进一步确认克隆结果，将鉴定后的菌株提交测序（测序引物M13-47和M13-48，正反方向各测定1个反应）。测序结果与已公布*ppc*质粒全序列（Gene ID: 3187638）一起提交NCBI网站，并使用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件进行序列比对分析（见图 3.3）。根据Blast分析结果可知，已克隆序列与公布之*ppc* CDS序列高度同源（99% identity），由此可以初步断定，来源于运动发酵单胞菌ZM4的*ppc*基因已经被克隆于pUC19质粒载体中。考虑到PCR法制备基因的不确定性及测序结果的不完整性，本研究随后利用大肠杆菌BL21（DE3）/pET-28a（+）表达体系对亚克隆得到的*ppc*基因进行了克隆表达和表达产物的酶活鉴定。

3.3.1.2 借助于大肠杆菌BL21（DE3）/pET-28a（+）表达体系验证亚克隆之*ppc*基因

为了保证亚克隆之*ppc*基因可以随后应用于研究*ppc*过表达对运动发酵单胞菌生理代谢的影响，因此需要确保该基因可以表达出具有活性的酶蛋白。

由pUC19-*ppc*质粒出发，选择NdeI和BamHI酶切位点制备具有NdeI和BamHI粘性末端的*ppc*基因片段。由于NdeI和BamHI对pUC19-*ppc*进行双酶切仅能够得到两条大小分别为2.5 kb（pUC19, NdeI和BamHI）和2.7 kb（*ppc*, NdeI和BamHI）的重叠带。为了实现两片段的进一步分离，随后以ScaI对经Qomega PCR Purification Kit纯化后的pUC19-*ppc*（NdeI和BamHI）双酶切产物进行进一步的消化。将酶切体系分别于冰上配制完毕后，混合均匀并离心。于37℃孵育4 h。同时用NdeI和BamHI对pET-28a（+）进行彻底消化。两个酶切反应产物均以0.7%琼脂糖核酸电泳分离分子量分别为2.7 kb（*ppc*, NdeI和BamHI和ScaI）和5.3 kb（pET-28a（+），NdeI和BamHI）的DNA片段，并以Omega Gel Extraction Kit从含有目的DNA片段的胶块中纯化回收目的DNA。两片段以T4 DNA ligase于16℃连接12 h后，将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中，并于含有卡那霉素的LB琼脂培养基（简称为LK抗性平板）上进行筛选。随机挑取LK抗性平板上获得的转化子菌落，对其进行划线纯化、液体培养，并用Omega Plasmid Mini Kit制备其中含有的质粒。以BamHI单酶切和0.7%琼脂糖核酸电泳进行初步筛选，并挑取BamHI单酶切反应产生分子量大约为6.2 kb DNA片段的质粒做pET-28a-*ppc*质粒的详细鉴定。pET-28a-*ppc*质粒图和质粒鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图详见图 3.4。

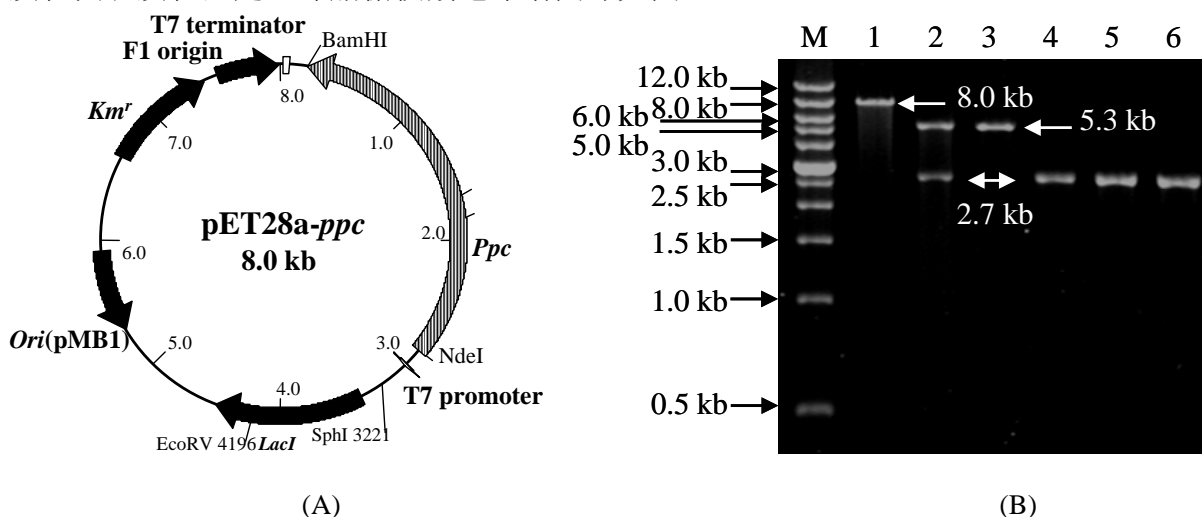


图 3.4 pET-28a-*ppc*质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图

Fig. 3.4 The plasmid map of pET-28a-*ppc* and the agarose gel electrophoresis graph for its identification (A) Open arrow and open box, T7 promoter and T7 terminator. (B) Lane M: Marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pET-28a-*ppc* (BamHI, 8.0 kb); lane 2, pET-28a-*ppc* (BamHI & NdeI, 5.3 kb & 2.7 kb); lane 3, pET-28a (+) (BamHI & NdeI, 5.3 kb); lane 4, *ppc* (NdeI & BamHI, 2.7 kb); lane 5, *ppc* PCR products with pET-28a-*ppc* as the template (2.7 kb); lane 6, *ppc* PCR products with *Z. mobilis* chromosome as the template (2.7 kb).

根据图 3.4可初步推断, *ppc*基因已经借助于NdeI和BamHI酶切位点由pUC19-*ppc*质粒克隆至pET-28a (+)。为了对克隆之*ppc*基因的功能进行分析, 将所构建的*ppc*表达质粒pET-28a-*ppc*转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞中, 并根据《Molecular cloning: a laboratory manual》所叙述之方法进行诱导表达及全细胞蛋白SDS-PAGE变性电泳分析^[270](图 3.5)。同时, 培养所得之菌体细胞亦根据本章材料与方法3.2.2.7, 3.2.2.8及3.2.2.9所述之方法进行细胞裂解、酶活测定及蛋白质浓度测定(表 3.3)

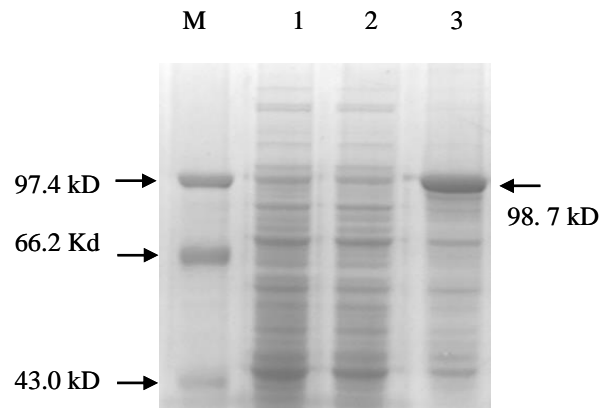


图 3.5 IPTG诱导大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a-*ppc*表达PEPCase之全细胞蛋白SDS-PAGE电泳图

Fig. 3.5 The whole cell SDS-PAGE graph of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-*ppc* induced by IPTG. Lane M, Protein molecular weight marker (low molecular weight); lane 1, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a (+) with 0.0 mM IPTG; lane 2, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-*ppc* with 0.0 mM IPTG; lane 3, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-*ppc* with 0.5 mM IPTG.

表 3.3 IPTG诱导大肠杆菌BL21 (DE3) /pET-28a-*ppc*表达PEPCase之酶活测定

Table 4.3 The PEPCase specificity activity of the cell lysates

| Strains | IPTG (mM) | PEPCase specific activity (Unit/mg protein) |
|---|-----------|---|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a (+) | 0.0 | 0.02 |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a- <i>ppc</i> | 0.0 | 10.50 |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a- <i>ppc</i> | 0.5 | 250.00 |

由图 3.5可知, 在相同细胞载样量下, 3#泳道与对照相比, 在约98.7 kDa处明显有一条蛋白过量表达条带。由于该条带的蛋白分子量与PEPCase单亚基与His Tag融合蛋白的分子量(98.7 kDa)几若相仿, 由此可以初步推断克隆于pET-28a (+)的*ppc*基因及其上游的His Tag编码序列一起在大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株内得到了过量表达。为了进一步确认表达产物的活性, 本研究同时将收获的细胞在低温Tris-HCl缓冲液中进行超声波裂解, 并对裂解液的离心上清液进行PEPCase酶活分析。通过离心上清液蛋白质浓度的测定, 计算IPTG诱导表达菌株及其两组对照体系的PEPCase比酶活力单位。通过表 3.3所提供之信息, 在克隆有*ppc*基因并被IPTG诱导表达的细胞裂解液中, 离心上清液的PEPCase比活力单位比空载质粒对照组提高了约12500倍, 比相同菌株未经IPTG诱导的对照组提高了23.8倍。由此证实*ppc*基因已经被成功的制备和克隆, 并且克隆的*ppc*基因可以编码具有PEPCase酶活力的酶蛋白。

3.3.1.3 *Ppc*基因敲除质粒(pUC19-*ppp-tc^r*)的构建

以PstI和NcoI对pUC19-*tc^r*和pUC19-*ppc*进行双酶切消化, 并以0.7%琼脂糖核酸电泳回收分子量分别为1.3 kb和4.5 kb的DNA片段。将以Omega Gel Extraction Kit回收纯化的两种DNA片段于16 °C以T4 DNA polymerase连接12 h。连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受

态细胞中，并以LT抗性平板筛选转化子。对所得到的转化子以PstI和NcoI的单/双酶切反应，四环素抗性基因PCR（引物3#和4#）以及 ppc 基因PCR进行鉴定（图 3.6）。

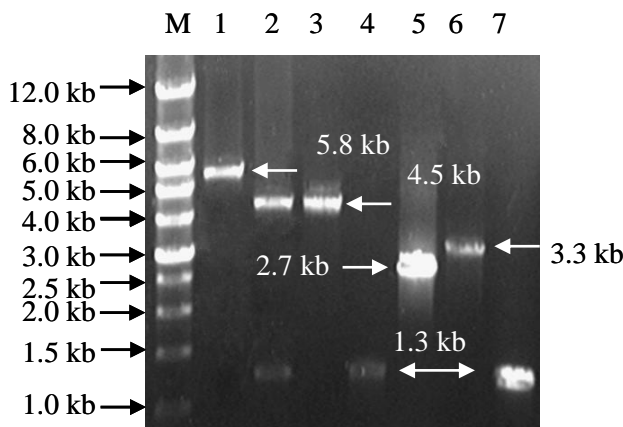


图 3.6 pUC19- $ppc::tc^r$ 质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 3.6 Plasmid map of pUC19- $ppc::tc^r$ and the agarose gel electrophoresis graph for its identification Lane M, marker (wide range 500 bp-12 kb); lane 1, pUC19- $ppc::tc^r$ (PstI, 5.8 kb); lane 2, pUC19- $ppc::tc^r$ (PstI & NcoI, 4.5 kb & 1.3 kb); lane 3, pUC19- ppc (PstI & NcoI, 4.5 kb); lane 4, tc^r (PstI & NcoI, 1.3 kb); lane 5, ppc PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template; lane 6, ppc PCR products with pUC19- $ppc::tc^r$ as the template (Elongation time, 3.5 min); lane 7, tc^r PCR products with pUC19- $ppc::tc^r$ as the template.

根据以上电泳图谱分析可知，PstI单酶切产物的DNA分子量为5.8 kb，和欲构建的pUC19- $ppc::tc^r$ 质粒分子量相符。经PstI和NcoI双酶切后产生的两个DNA片段，其分子量（4.5 kb和1.3 kb）分别与pUC19- ppc （PstI和NcoI，4.5 kb）以及 tc^r （PstI和NcoI，1.3 kb）的分子量相符。以 ppc 引物分别以运动发酵单胞菌ZM4基因组和构建质粒为模板进行PCR。两反应体系产物的分子量分别约为2.7 kb和3.3 kb。以pUC19- $ppc::tc^r$ 为模板的PCR产物明显比 ppc 基因大约0.6 kb，这主要是由于在pUC19- $ppc::tc^r$ 的 ppc 基因中插入了大小1.3 kb的四环素抗性基因并删除了约0.7 kb的 ppc 基因片段所致。以上数据表明，四环素抗性基因已经借助于PstI和NcoI酶切位点插入至pUC19- ppc 质粒的 ppc 基因中，并且四环素抗性基因两翼分别有约0.9 kb和1.0 kb的 ppc 基因同源序列用于同源重组双交换。

3.3.1.4 以pUC19- $ppc::tc^r$ 电击转化运动发酵单胞菌ZM4敲除 ppc 基因

为了将pUC19- $ppc::tc^r$ 质粒转化至运动发酵单胞菌ZM4并按照图4.7所示之方式以同源重组双交换实现 ppc 基因的敲除，按照本章材料与方法之3.2.2.5将pUC19- $ppc::tc^r$ 电击转化至运动发酵单胞菌ZM4。随后将200 μ L悬浮于RM培养基并在30 $^{\circ}$ C恒温培养箱中静止培养2 h的菌液均匀涂布在含有5mM草酰乙酸（Sodium oxaloacetate, OAA）RT抗性平板上（ROT抗性平板）。涂布后的平板以Parafilm封口四周，并置于30 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育48 h。将平板长出的四个单菌落重新划线于ROT抗性平板上，并置于30 $^{\circ}$ C恒温培养箱中再次孵育48 h。从划线培养的ROT抗性平板上，随机挑选一个单菌落接种于ROT液体培养基中，并于30 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育24 h。保存菌种并收集菌体细胞，以Qiagen DNeasy Tissue Kit抽取基因组DNA用于菌体基因型的鉴定。

首先，以筛选得到菌株的基因组DNA为模板，以运动发酵单胞菌ZM4野生型菌株的基因组DNA为对照，通过Taq DNA polymerase催化的四环素抗性基因和 ppc 基因PCR对转化子的基因型进行初步鉴定（其中在 ppc 的PCR中，延伸时间为6 min）。各PCR产物以0.7%琼脂糖核酸电泳分析各产物DNA的分子量（图 3.8）。

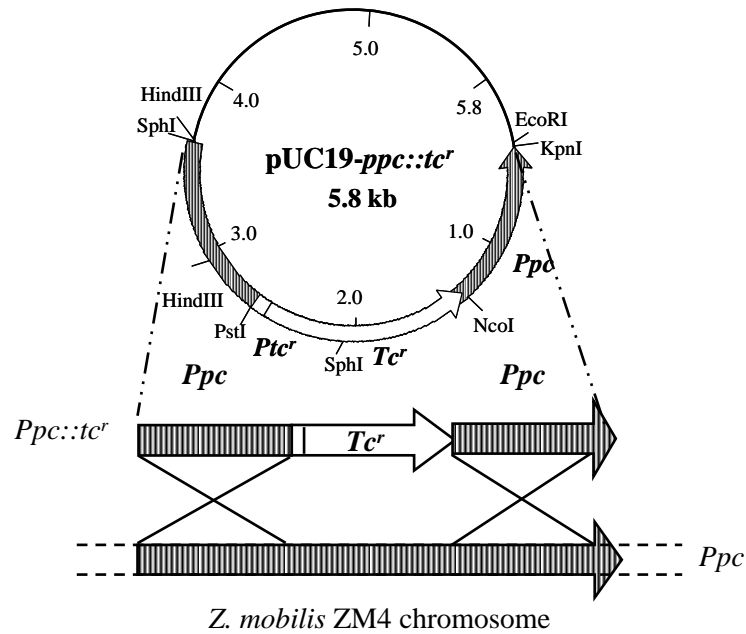


图 3.7 同源重组双交换敲除运动发酵单胞菌ZM4基因组中ppc基因的示意图

Fig. 3.7 Scheme of *ppc* knock-out from *Z. mobilis* ZM4 chromosome by double cross-over homologous recombination for

Open box, *tc^r* promoter; open arrow, *tc^r* CDS; Arrow and box with stripes, *ppc* CDS; dash line, chromosome of *Z. mobilis* ZM4.

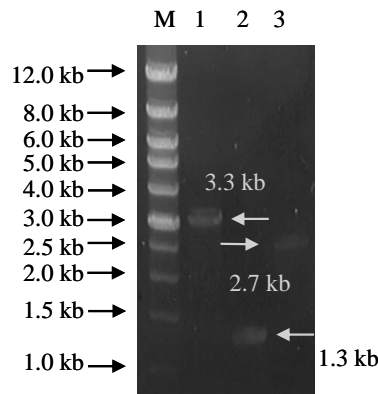


图 3.8 用PCR对筛选得到的转化子基因型进行初步鉴定

Fig. 3.8 Preliminary identification of the genome type of the transformants by PCR

Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, *ppc* PCR products with transformants chromosome as the template; lane 2, *tc^r* PCR products with transformants chromosome as the template; lane 3, *ppc* PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template.

由图 3.8分析可知，以转化子基因组为模板的四环素抗性基因PCR产物分子量约为 1.3 kb，因此四环素抗性基因已经被整合至运动发酵单胞菌ZM4的基因组中。该结果至少可以证实，通过质粒的转化至少已经实现了同源重组的单交换。而*ppc*基因PCR产物的分子量只有约3.3 kb（比对照组的PCR产物分子量明显偏大约0.5 kb）的单一一条带，由此可以初步推断，经过筛选和划线培养之后得到的单菌落其*ppc*基因片段很有可能通过双交换发生了第二次同源重组。为了进一步确认*ppc*基因的PCR结果，将纯化后的*ppc* PCR产物分别以NcoI和PstI进行单/双酶切反应。以0.7%琼脂糖核酸电泳分析酶切反应产物DNA的分子量，结果见图 3.9 (A)。随后，也分别以pUC19-*ppc::tc^r*质粒，运动发酵单胞菌野生菌株基因组DNA和重组子基因组DNA为模板，以*lacZ-S*和*lacZ-A*引物对两种运动发酵单胞菌的基因组进行PCR分析，结果见图 3.9 (B)。

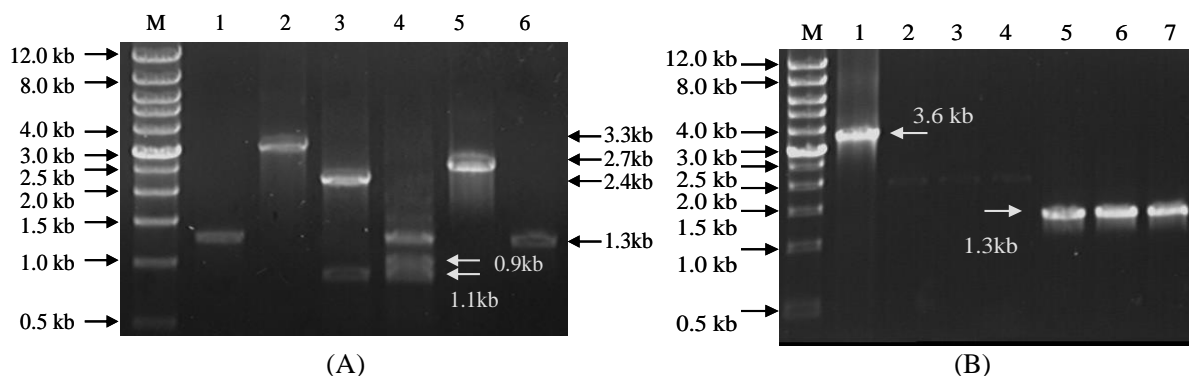


图 3.9 筛选得到的转化子基因型鉴定之核酸琼脂电泳图

Fig. 3.9 The agarose gel electrophoresis graph of identifying the genome type of the transformants (A), lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, *tc'* PCR products with transformants chromosome as the template; lane 2, *ppc* PCR products with transformants chromosome as the template (PCR products 2); lane 3, PCR products 2 (NcoI); lane 4, PCR products 2 (NcoI & PstI); lane 5, *ppc* PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template; lane 6, *tc'* PCR products with pBR322 as the template. (B), lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1, *lacZα* PCR products with pUC19-*ppc::tc'* as the template; lane 2-3, *lacZα* PCR products with transformants chromosome as the template (two parallel reactions); lane 4, *lacZα* PCR products with *Z. mobilis* ZM4 wild strain chromosome as the template; lane 5-6, *tc'* PCR products products with transformants chromosome as the template; lane 7, *tc'* PCR products with pBR322 as the template.

由图 3.9 (A)可知, 以重组子基因组DNA为模板的*ppc*基因PCR产物与*ppc::tc'*片段经NcoI单酶切以及NcoI和PstI双酶切产物的琼脂糖核酸电泳谱图相符。由此证明, 经ROT抗性平板筛选得到菌株的*ppc*基因已经与pUC19-*ppc::tc'*质粒发生了同源重组。另由图3.9 (A)和(B)分析可知, 不仅四环素抗性基因已经借助同源重组整合至运动发酵单胞菌的基因组, 而且由于无法以重组子基因组DNA为模板获取pUC19-*ppc::tc'*质粒位于*lacZα*启动子至终止密码子之间的CDS序列, 因此该重组子为同源重组双交换的*ppc*基因突变株。

3.3.2 *Ppc*过表达质粒pHW20a-Pgap-*ppc*和pHW20a-Pppc-*ppc*的构建及转化

为研究*ppc*在运动发酵单胞菌ZM4生理代谢中的作用, 本研究构建了两个*ppc*过表达质粒。其中一个通过将*ppc*基因置于运动发酵单胞菌ZM4自身的强启动子Pgap的调控下, 并将其借助多拷贝质粒pHW20a在运动发酵单胞菌中进行过量表达。另外, 通过直接克隆含有*ppc*启动子的*ppc*基因全长序列至pHW20a, 从而期望借助于pHW20a多拷贝之特性将*ppc*基因在运动发酵单胞菌ZM4重组菌中得到较弱水平的高表达。

3.3.2.1 *Ppc*过表达质粒pHW20a-Pgap-*ppc*的构建

*Ppc*过表达质粒pHW20a-Pgap-*ppc*的构建参考图 3.10。首先, 通过PCR获得Pgap序列, 并利用PCR正反引物5'端的限制性内切酶识别位点 (BamHI和EcoRI) 将该启动子序列克隆至表达元件构建载体pUC19DN中。随后, 分别通过限制性内切酶XhoI和EcoRI将表达质粒pET-28a-*ppc*与pUC19DN-Pgap进行酶切获得线性化质粒。以T4 DNA polymerase将两个线性化的DNA片段粘性末端进行平滑化处理, 并随后以NdeI进行消化得到一端是NdeI粘性末端, 一端是平末端的*ppc* CDS序列以及相应的pUC19DN-Pgap载体片段。通过互补之NdeI粘性末端实现*ppc*基因CDS序列和Pgap的连接。最后, 利用XbaI和NotI酶切位点将表达元件Pgap-*ppc*酶切制备并克隆至质粒pHW20a中。

3.3.2.1.1 借助于pUC19DN对Pgap的亚克隆

首先, 本研究以寡核苷酸Pgap-S和Pgap-A为引物 (表 3.2之5#和6#引物), 以运动发酵单胞菌ZM4基因组DNA为模板, 利用pfu DNA polymerase以PCR制备Pgap基因 (0.3 kb)。Pgap的pfu DNA polymerase PCR条件为: 退火温度为55 °C, 延伸时间为0.5 min, 总循环数为30 cycles。PCR产物以Omega PCR Purification Kit对其进行纯化, 并以

pUC19DN质粒借助于EcoRI和BamHI酶切位点对Pgap进行亚克隆。通过蓝白斑筛选获得对应转化子，并以EcoRI和BamHI的单/双酶切反应及Pgap基因的PCR对转化子中的质粒进行鉴定（详见图 3.11）。

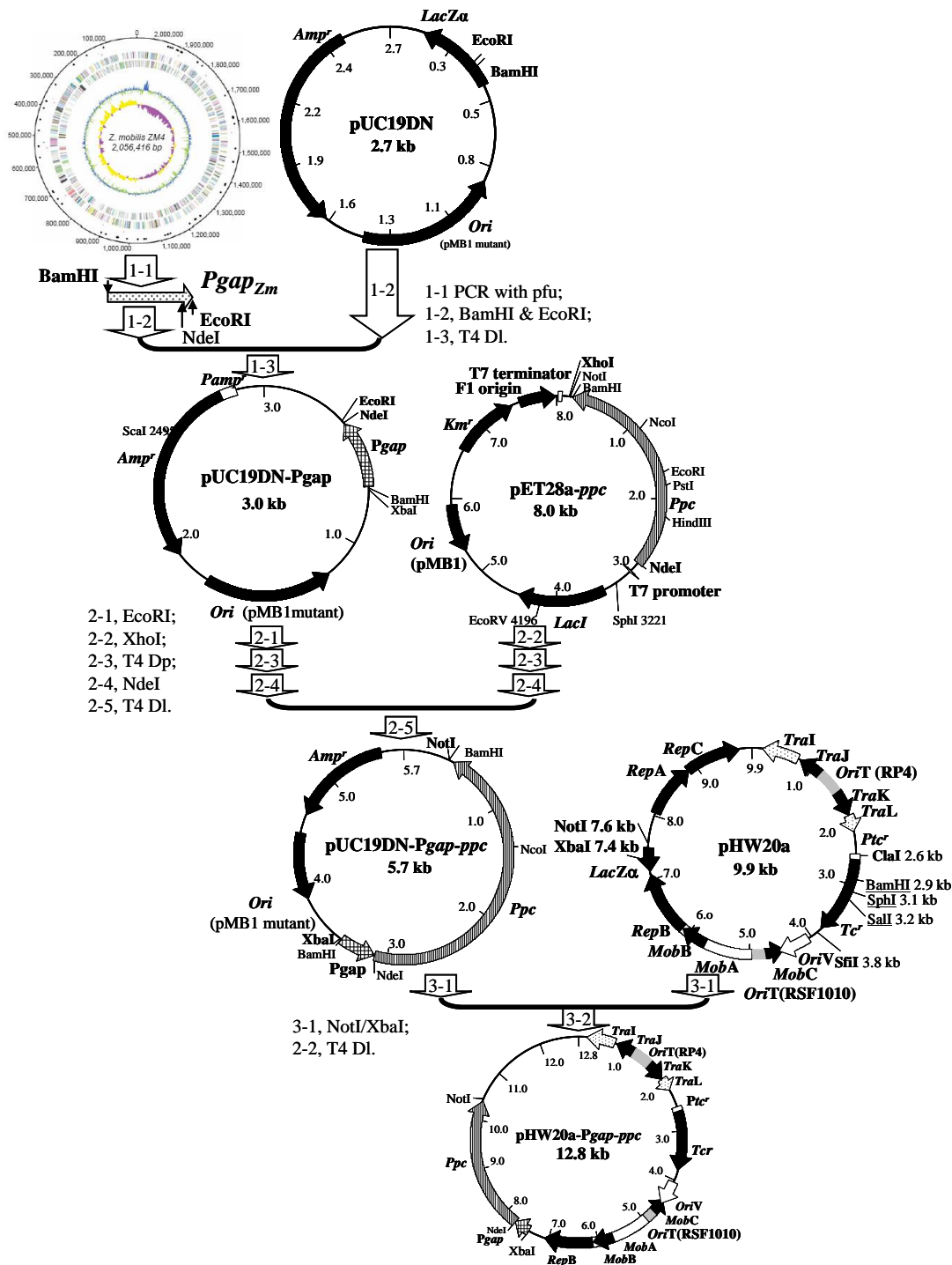


图 3.10 *Ppc*过表达表达质粒pHW20a-*Pgap-ppc*构建技术路线图

Fig. 3.10 Scheme of constructing *ppc* over-expression vectors-pHW20a-*Pgap-ppc*. The genome physical map was cited from the report of Jeong-Sun Seo *et al.*^[89]. T4 Dl, T4 DNA ligase; T4 Dp, T4 DNA polymerase. 1-1, the first numeral in the serial number represented the sequence of plasmid would be constructed in the whole steps, and the second numeral indicated the order of the molecular manipulation steps during plasmid construction with the enzymes following the serial number. Open arrows and bands indicated overlap genes; arrows with dots, incomplete CDS of the genes; arrows (box) with stripes, *ppc* CDS. Restriction sites in boldface style indicated the sites which would be used in the next genetic manipulations.

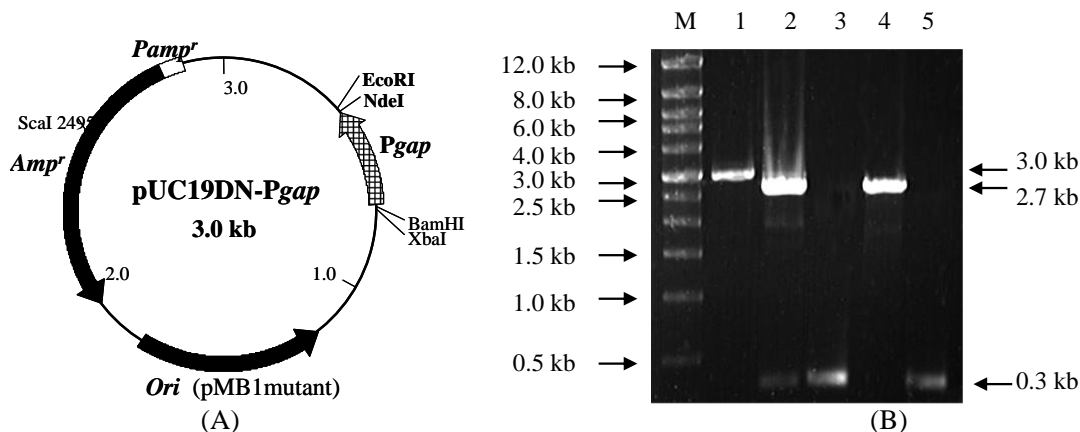


图 3.11 pUC19DN-Pgap质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳谱图

Fig. 3.11 Plasmid map of pUC19DN-Pgap and the agarose gel electrophoresis graph for its identification (A) Arrow with grids, the promoter of *gap*(Pgap). (B) Lane M: Marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19DN-Pgap (EcoRI, 3.0 kb); lane 2, pUC19DN-Pgap (EcoRI & BamHI, 2.7 kb & 0.3 kb); lane 3, Pgap PCR products with pUC19DN-Pgap as the template (0.3 kb); lane 4, pUC19DN (EcoRI & BamHI, 2.7 kb); lane 5, Ppc PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template (0.3 kb).

根据图 3.11所提供之信息分析可以初步断定, Pgap已经被克隆至pUC19DN质粒中。将初步鉴定后的菌株提交测序。测序和比对结果表明, 亚克隆之Pgap基因序列与其公布序列同源性达到100%。

3.3.2.1.2 Pgap与ppc基因的连接—pUC19DN-Pgap-ppc的构建

以EcoRI和XhoI对pUC19DN-Pgap和pET-28a-ppc进行酶切, 所获得之线性质粒片段以Omega PCR Purification Kit对其进行纯化回收。随后, 以T4 DNA polymerase进行粘性末端的平滑化处理。将反应产物再次以Omega PCR Purification Kit对其进行纯化回收, 并以NdeI对pUC19DN-Pgap (EcoRI粘性末端和平末端)和pET-28a-ppc (XhoI粘性末端和平末端)进行酶切反应。NdeI酶切之反应产物以0.7%琼脂糖核酸电泳纯化分子量分别为3.0 kb的pUC19DN-Pgap (EcoRI, T4 DNA polymerase和NdeI) DNA片段和2.7 kb的pET-28a-ppc (XhoI, T4 DNA polymerase和NdeI) DNA片段。以Omega Gel Extraction Kit回收纯化两种DNA片段, 并于16 °C以T4 DNA polymerase连接12 h。连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中, 并以LA抗性平板筛选转化子。对所得到的转化子以EcoRI和NdeI的单/双酶切反应和ppc基因的PCR进行鉴定 (图 3.12)。

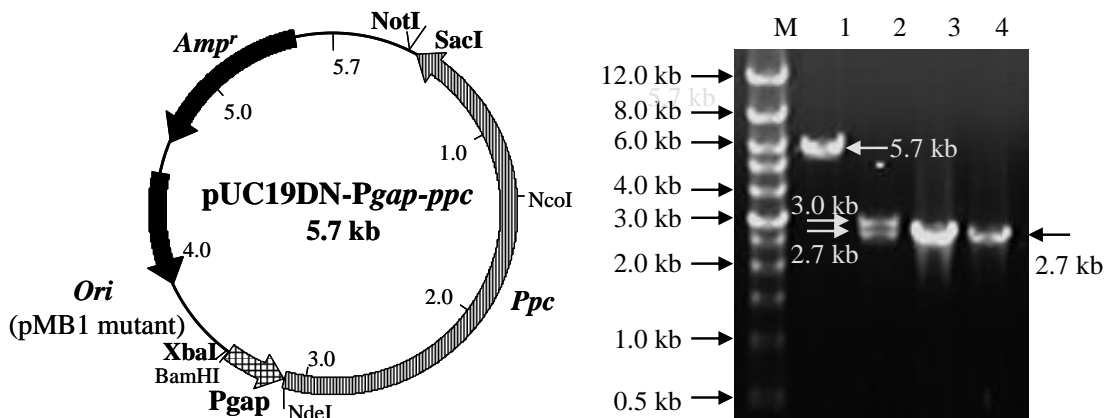


图 3.12 pUC19DN-Pgap-ppc质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 3.12 Plasmid map of pUC19DN-Pgap-ppc and the agarose gel electrophoresis graph for its identification

Lane M, marker (wide range 500 bp-12 kb); lane 1, pUC19DN-Pgap-ppc (NdeI, 5.7 kb); lane 2, pUC19DN-Pgap-ppc (NdeI & NotI, 3.0 kb & 2.7 kb); lane 3, ppc PCR products with pUC19DN-Pgap-ppc as the template; lane 4, ppc PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template.

根据以上电泳图谱分析可知，质粒经NdeI单酶切产生的DNA片段分子量为5.7 kb，与欲构建的pUC19DN-Pgap-ppc质粒分子量相符。经NdeI和NotI双酶切后产生的两个DNA片段，其分子量（3.0 kb和2.7 kb）分别与pUC19DN-Pgap（3.0 kb）质粒的分子量以及ppc（2.7 kb）基因的分子量相符。由此可以推断，借助于pUC19DN-Pgap质粒已经实现了ppc基因与Pgap启动子的连接。

3.3.2.1.3 借助pHW20a质粒克隆Pgap-ppc表达元件（pHW20a-Pgap-ppc质粒的构建）

由质粒pUC19DN-Pgap-ppc出发，以XbaI和NotI进行Pgap-ppc表达元件的制备（图 3.12）。同时，以XbaI和NotI对pHW20a质粒进行双酶切，从而获得两个相应的粘性末端用于Pgap-ppc（XbaI和NotI）表达元件的克隆。以0.7%琼脂糖核酸电泳和Omega Gel Extraction Kit纯化回收Pgap-ppc（XbaI和NotI，3.0 kb）和pHW20a（XbaI和NotI，9.7 kb），并以T4 DNA polymerase于16℃连接11 h。将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中，以LIXT抗性平板筛选转化子。对所得到的12个转化子白色单菌落进行划线纯化及后续的细胞培养。以Omega Plasmid Mini Kit从培养的细胞中制备质粒DNA，并以XbaI单酶切反应对12个转化子中的质粒进行初步鉴定（图 3.13）。

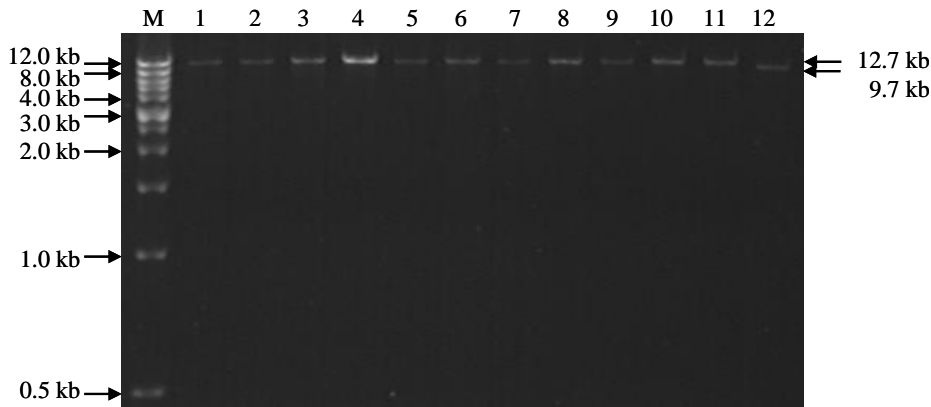


图 3.13 pHW20a-Pgap-ppc初步鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 3.13 The agarose gel electrophoresis graph of pHW20a-Pgap-ppc preliminary identification by XbaI Lane M, wide range marker, (500 bp-12 kb); lane 1-11, plasmids from transformants 1#-11# (XbaI); lane 12, pHW20a (XbaI和NotI, 9.7 kb).

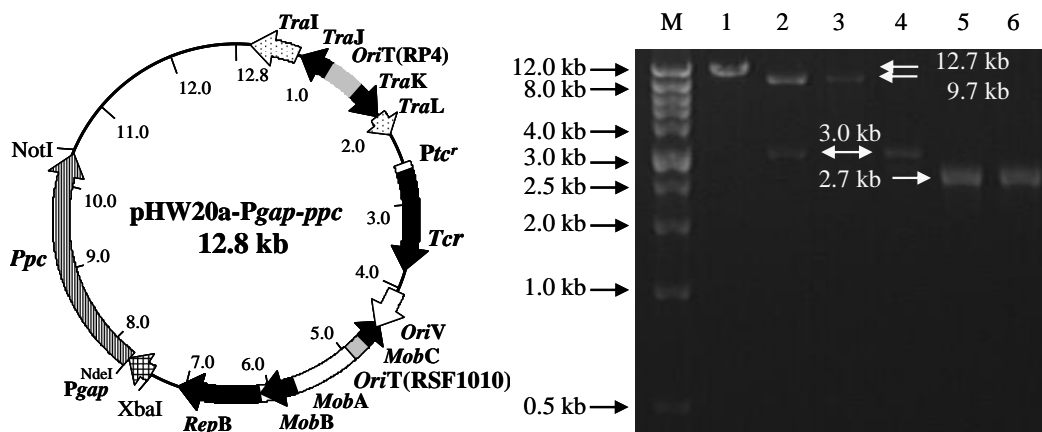


图 3.14 Ppc过表达质粒pHW20a-Pgap-ppc图谱及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 3.14 Plasmid map of pHW20a-Pgap-ppc and agarose gel electrophoresis graph for its identification Lane M, marker (wide range 500 bp-12 kb); lane 1, pHW20a-Pgap-ppc (XbaI, 12.7 kb); lane 2, pHW20a-Pgap-ppc (XbaI & NotI, 3.0 kb & 9.7 kb); lane 3, pHW20a (XbaI & NotI, 9.7 kb); lane 4, Pgap-ppc (XbaI & NotI, 3.0 kb); lane 5, ppc PCR products with pUC19DN-Pgap-ppc as the template (2.7 kb); lane 6, ppc PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template (2.7 kb).

由图 3.13分析可知,来自于各转化子的质粒经XbaI酶切后,其DNA片段明显比对照pHW20a(XbaI和NotI, 9.7 kb)略大并且其分子量接近于12.0 kb。以上数据证明,有一DNA片段已经被克隆至穿梭质粒pHW20a中。为了进一步确认Pgap-ppc已经被克隆至pHW20a穿梭质粒中,随后将4#转化子中的质粒以XbaI和NotI单/双酶切反应以及ppc基因的PCR做进一步鉴定(图 3.14)。图 3.14中数据显示,Pgap-ppc表达元件已经被克隆之pHW20a中,该质粒命名为pHW20a-Pgap-ppc。

3.3.2.2 Ppc过表达质粒pHW20a-Pppc-ppc的构建

为了构建置于ppc基因自身启动子调控下的高表达质粒,本研究以运动发酵单胞菌ZM4基因组为模板,以寡核苷酸Pppc-ppc-S和ppc-A(引物7#和2#)为引物,通过pfu DNA polymerase催化的PCR制备包括启动子和CDS序列在内的ppc基因全序列。PCR条件为:退火温度,62.5 °C;延伸时间,3.5 min;循环数,25 cycles。随后,将Omega PCR Purification Kit纯化回收的PCR产物(Pppc-ppc)和pHW20a皆以XhoI和KpnI进行双酶切。以0.7%琼脂糖核酸电泳分离分子量分别为3.3 kb(Pppc-ppc, XhoI和KpnI)和9.8 kb(pHW20a, XhoI和KpnI)的DNA片段。

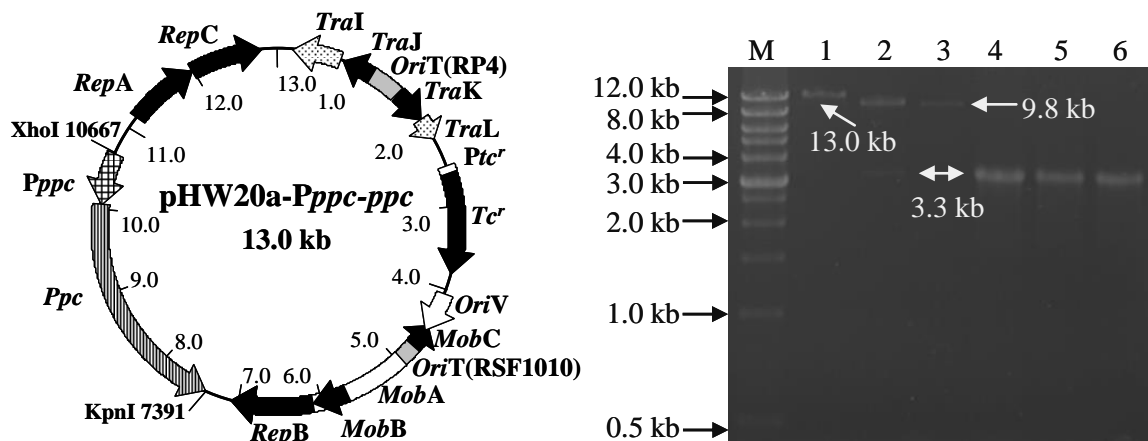


图 3.15 Ppc过表达质粒pHW20a-Pppc-ppc图谱及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 3.15 Plasmid map of pHW20a-Pppc-ppc and agarose gel electrophoresis graph for its identification. Lane M, wide range marker (500 bp-12 kb); lane 1, pHW20a-Pppc-ppc (XhoI, 13.0 kb); lane 2, pHW20a-Pppc-ppc (XhoI & KpnI, 9.8 kb & 3.3 kb); lane 4, pHW20a (XhoI & KpnI, 9.8 kb); lane 5, Pppc-ppc (XhoI & KpnI, 3.3 kb); lane 6, Pppc-ppc PCR products with pHW20a-Pppc-ppc as the template; lane 7, Pppc-ppc PCR products with the plasmids from ZM4 transformants as the template.

由图 3.15所示结果可知,ppc过表达质粒pHW20a-Pppc-ppc已经构建完成,其限制性内切酶酶切图谱以及Pppc-ppc基因PCR产物均相符理论要求。

3.3.2.3 Ppc基因过表达质粒的转化

按照本章材料与方法之2.2.2.6转化Ppc基因过表达质粒(pHW20a-Pgap-ppc和pHW20a-Pppc-ppc)至运动发酵单胞菌ZM4,并计算其接合转化效率。

两质粒的接合转化结果分别为:pHW20a-Pgap-ppc一直无法转化至运动发酵单胞菌ZM4菌株,pHW20a-Pppc-ppc的转化效率为 $0.2\sim 0.6 \times 10^{-7}$ 。由于在运动发酵单胞菌ZM4菌株中ppc基因编码的PEPCase催化了PEP的分支代谢途径,因此强烈表达该基因势必会影响到运动发酵单胞菌ATP的生成。运动发酵单胞菌作为一个利用ED代谢途径进行葡萄糖酵解过程的厌氧细菌,其净产生的能量来源于PEP对ADP的磷酸化。根据第二章之结论,gap的转录强度是ppc基因转录强度的20-40倍,因此将ppc基因置于Pgap启动子调控之下,并且借助于pHW20a质粒在运动发酵单胞菌中进行扩增拷贝数时,表达极为强烈的ppc基因极有可能会造成运动发酵单胞菌胞内ATP生成的严重不足,从而严重影响到了

宿主的正常生理代谢过程。该假设也许正是造成pHW20a-Pgap-ppc无法转化至运动发酵单胞菌ZM4的主要原因。为了证实以上假设，在随后的研究中对运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-Pppc-ppc) 发酵过程中的细胞生长和乙醇代谢进行了研究。

3.3.3 运动发酵单胞菌ZM4菌株生理代谢的初步研究

3.3.3.1 PEPCase途径作为运动发酵单胞菌ZM4 OAA生成唯一途径的确认

为了确认PEPCase在运动发酵单胞菌代谢中的作用，本研究将本章构建之ppc基因突变株运动发酵单胞菌ZM4 (*ppc::tc'*) 和野生菌株分别在RM琼脂培养基、BM琼脂培养基以及添加有2.5 mM OAA的BM琼脂培养基上进行划线培养，结果见图 3.16。

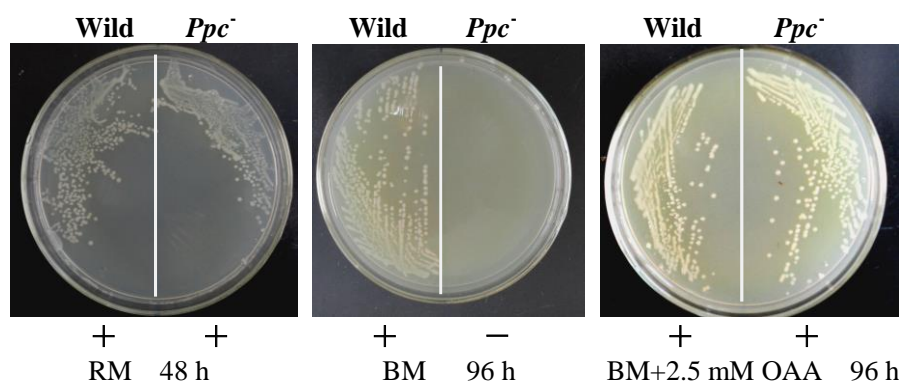


图 3.16 运动发酵单胞菌ZM4 (*ppc::tc'*) 和野生型菌株在不同培养基上的生长状态

Fig. 3.16 Growth state of *Z. mobilis* ZM4 (*ppc::tc'*) on different medium with wild strain as the control

根据图 3.16之信息分析可知，运动发酵单胞菌ZM4的ppc基因突变株虽然在含有Yeast extract的RM培养基上可以生长，但是该菌株却无法在基础培养基上生长，而野生型菌株在这两种培养基上都可以正常长出菌落。由此可见，通过ppc基因的敲除，运动发酵单胞菌ZM4突变株已经成为OAA营养缺陷型菌株。为了进一步证实该菌株ppc基因敲除后无法正常的合成OAA，本研究将ppc突变株和野生菌株在含有2.5 mM OAA的BM培养基上进行划线培养。结果显示，两菌株都可以长出清晰可辨的菌落。由此可以证实，ppc编码的PEPCase是运动发酵单胞菌ZM4菌株由葡萄糖合成OAA的唯一代谢途径。

根据以往文献报道，磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶广泛的存在于碳四（C4）和景天科（CAM）植物中，并在固定CO₂方面起着极其重要的作用^[287]，但是该酶却很少存在于动物细胞中。部分微生物也有编码该酶的基因，但是在细菌中PEPCase主要以合成OAA补救途径的方式而参与菌体的代谢。本论文研究的对象——运动发酵单胞菌ZM4，是相当特殊的一种细菌。它不仅可以在厌氧条件下利用独特的ED途径高强度的发酵生产乙醇，同时该菌株并不像其它生物体那样具有完整的TCA循环。而通过本研究，进一步确认了运动发酵单胞菌不同于一般微生物的独特代谢特点。

3.3.3.2 草酰乙酸对运动发酵单胞菌ZM4 生长的影响

根据本论文第二章之2.3.8研究发现，在运动发酵单胞菌ZM4的乙醇发酵过程中，ppc转录水平与酵解途径的gap基因相比，其总体的水平较低而且在整个过程中ppc转录水平的变化几乎是与菌体的最大生长速率的变化相一致的。由此分析，运动发酵单胞菌ZM4自身的ppc基因有可能在发酵过程中参与了菌体非耦联生长的调控，并有可能是限制菌体生长的总多因素之一。为了确认这一假设，在随后的研究中根据本章材料与方法之3.2.2.10首先考察了OAA添加对菌体生长的影响（图 3.17）。

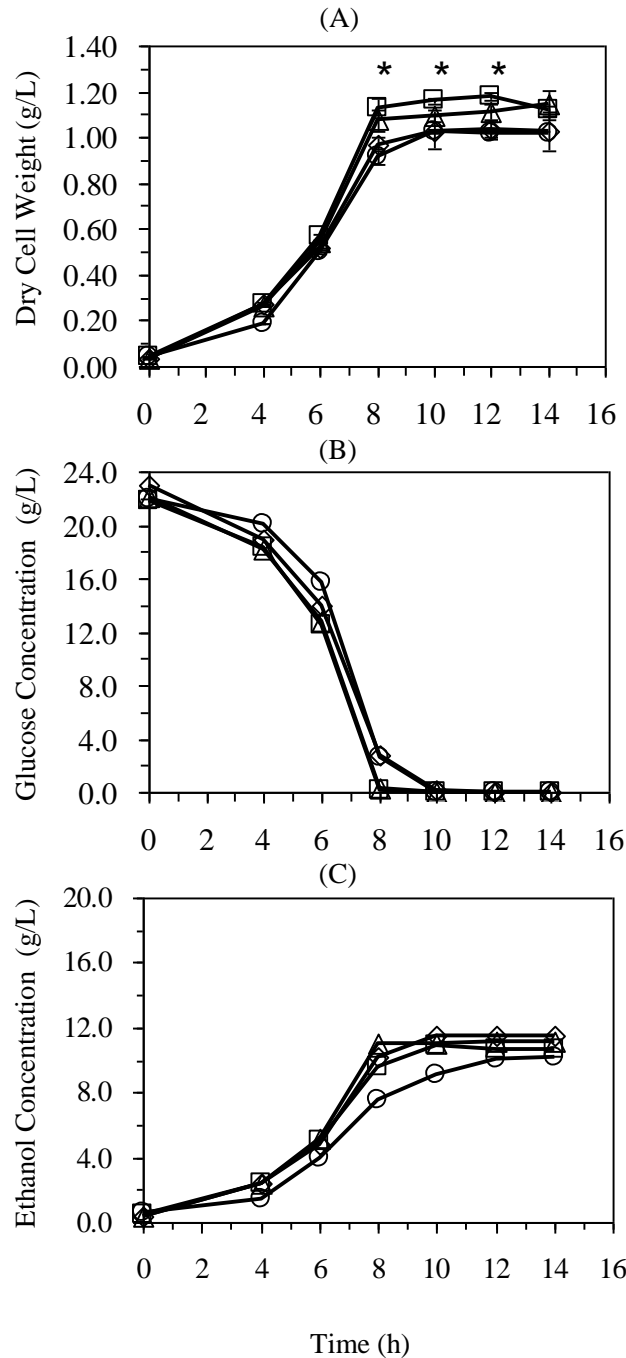


图 3.17 草酰乙酸对运动发酵单胞菌ZM4生长的影响

Fig. 3.17 Effects of OAA on the growth of *Z. mobilis* ZM4

(A) Growth profile of *Z. mobilis* ZM4 in different medium; (B) glucose consuming profile of *Z. mobilis* ZM4; (C) ethanol producing profile of *Z. mobilis* ZM4. Squares, 10.0 mM OAA in the YPMAG20 fermentation medium; triangles, 5.0 mM OAA in the YPMAG20 fermentation medium; diamonds, 5 mM extra glucose in the YPMAG20 fermentation medium; circles, H₂O was added in the YPMAG20 fermentation medium as the control. *, there are significant differences between 5.0 mM or 10.0 mM OAA addition groups and glucose addition group during fermentation from 8th to 12th hour ($P < 0.05$).

根据图 3.17可知, 通过在YPMAG20发酵培养基中添加生成天冬氨酸族氨基酸(包括, 天冬酰胺, 甲硫氨酸、苏氨酸和赖氨酸)的重要前体物质OAA^[293], 菌体的生长速率和最大细胞量均有所提高(8~12 h, $P < 0.05$)。然而, 与添加无菌水的对照相比, 通过在培养基中额外添加5 mM的葡萄糖并未对菌体的生长产生显著影响。虽然理论上1 mol葡萄糖会转化为1 mol乙醇, 1 mol OAA和0 mol ATP, 但是可能由于*ppc*的转录(或

表达)水平很低以及该菌株高效的乙醇代谢途径,因此添加的葡萄糖无法有效的转化为OAA。该假设很有可能是造成葡萄糖添加组和无菌水添加组菌体生长情况极为相似的主要原因。另一方面,与添加5 mM OAA的菌体生长状况相比,添加10 mM OAA的实验组并未有显著的提高。根据已发表之文献报道,由于运动发酵单胞菌中存在着众多能量损耗的途径^[192-193, 201, 206],因此用于合成代谢的ATP供应不足可能是该菌株生长的又一限制因素。由此可以说明,运动发酵单胞菌由葡萄糖合成OAA的代谢通量是与其自身用于合成代谢的ATP供应量相匹配的。

3.3.3.3 Ppc基因过表达对运动发酵单胞菌ZM4生长的影响

为了进一步验证ppc在运动发酵单胞菌在碳代谢和能量代谢中的调节作用,本研究以pHW20a转化菌株为对照,研究运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-Pppc-ppc)在两种不同发酵培养基中的生理代谢反应(图 3.18)。其中一种培养基是正常的YPMAG20+Tc (10 μg/mL)发酵培养基;另外一种培养基是不含有Yeast Extract的发酵培养基(即PMAG20+Tc 10 μg/mL)。

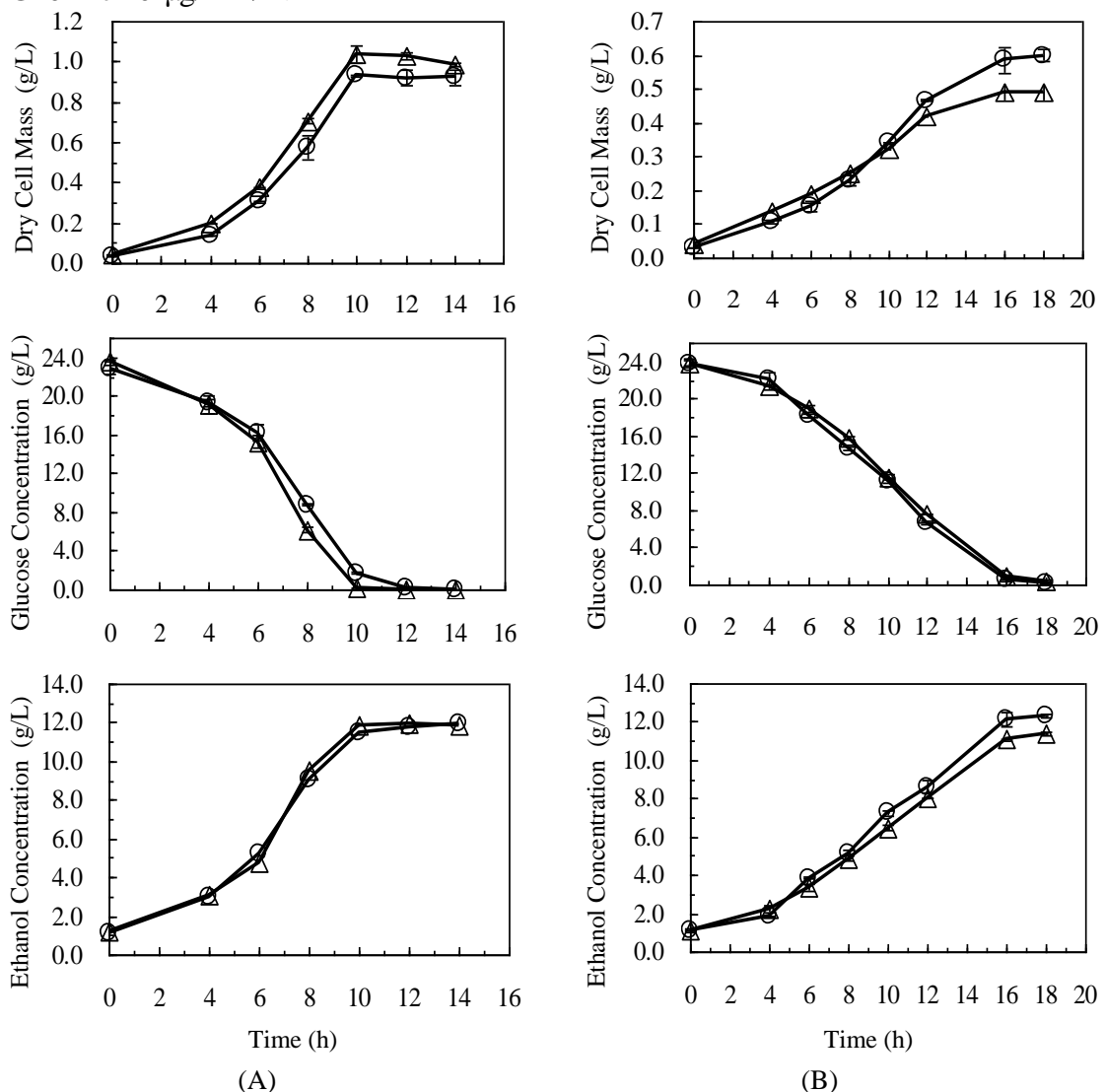


图 3.18 运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-Pppc-ppc) 和运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a) 在不同发酵培养基中生长状态的区别

Fig. 3.18 Differential growth states of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-Pppc-ppc) and *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a) in two different fermentation medium
 (A) Fermentation of *Z. mobilis* ZM4 recombinant strains in YPMAG20 medium; (B) Fermentation of *Z. mobilis* ZM4 recombinant strains in PMAG20 medium. Triangles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-Pppc-ppc); circles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a).

根据图 3.18 (A)之结果分析可知, 虽然两菌株在两种培养基中的葡萄糖和乙醇代谢趋势大致相仿, 然而菌体生长的情况却表现出截然相反的趋势。在含有Yeast Extract的YPMAG20中进行发酵时, *ppc*过表达菌株的生长速率和最大细胞的率均比对照组有所提高。发酵过程中细菌的生长状态与本章结果与讨论之3.3.3.2中添加草酰乙酸的情况相似。由此可以说明, 在以YPMAG20作为发酵培养基时, 通过添加OAA或者适度增强PEPCase代谢途径的代谢通量, 均会对菌体的生长有促进作用。这也进一步说明*ppc*的低水平表达极有可能通过限制OAA的合成而参与了该菌株的非耦联生长。另一方面, 在没有添加Yeast Extract的发酵培养基中, 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 却表现出优于*ppc*过表达重组菌的生长状态。根据第二章之2.3.8研究结果和图3.18之结果分析*ppc*过表达菌株在PMAG20培养基中生长受到抑制的原因为: 在YPMAG20培养基中, *ppc*以较低的水平在运动发酵单胞菌菌体中进行表达, 并可能受到诸如OAA及相关衍生氨基酸的反馈阻遏。当培养基中来源于Yeast Extract的OAA衍生氨基酸或者OAA本身已经被耗尽时, *ppc*的反馈阻遏被解除, 其转录水平亦开始增强并通过提升胞内的PEPCase酶活生成合成代谢所需的足量OAA。在*Ppc*转录由低水平向高水平转变的过程中, PEPCase的酶活加强必然会导致ATP的供应不足, 从而使ATP对合成代谢的供应不足又成为新的限制因素。在不含有Yeast Extract的发酵培养基中, 由于不存在反馈阻遏效应, 因此在该发酵条件下, 运动发酵单胞菌的*ppc*基因本身就处于较强的转录水平; 而*ppc*基因高表达质粒pHW20a-*ppc*的存在又进一步增强了*ppc*基因的表达水平。两种效应的联合作用必然导致*ppc*基因在重组菌细胞内的强烈表达, 从而引起重组菌细胞内ATP的合成和供给不足, 以致对菌体的生长产生不利的影 响。

3.4 小结

本章通过同源重组获得了一个运动发酵单胞菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因(*ppc*)的突变株。通过对该突变株的研究, 确认了PEPCase作为唯一由葡萄糖生成草酰乙酸的代谢途径参与了该菌株的生长和代谢调节, 从而发现运动发酵单胞菌不同于一般微生物的独特代谢特点。通过 real-time qRT-PCR 对 *ppc* 基因转录水平的分析以及草酰乙酸对运动发酵单胞菌生长的影响实验发现, 受到阶段调控的 *ppc* 基因有可能是限制运动发酵单胞菌生长并介导该菌株非耦联生长的关键因素之一。通过 *ppc* 基因过表达菌株生理代谢的研究, 从而发现该基因可能受到源自于 Yeast Extract 中草酰乙酸衍生氨基酸的反馈阻遏调节, 且 PEPCase 极有可能通过能量和碳代谢的双重调节参与了运动发酵单胞菌的非耦联生长。

虽然通过以上研究揭示了 *ppc* 基因在运动发酵单胞菌能量溢出及非耦联生长中的关键作用, 然而以上的实验结果对于最终证实 PEPCase 通过能量和代谢的双重调节参与了运动发酵单胞菌的非耦联生长的结论仍然不足。目前尚缺乏运动发酵单胞菌 *ppc* 基因转录调控机理以及参与能量和碳代谢调节的直接证据, 相关的研究亦正在进行之中。

第四章 运动发酵单胞菌重组菌应用于山梨醇生物制备过程的研究

4.1 前言

山梨醇作为一种最具开发潜力的关键中间体，广泛的应用于维生素C的合成（占总产量的20%）以及作为甜味剂、保湿剂和软化剂应用于食品工业、化妆品和药品的生产。鉴于山梨醇的广泛用途及巨大的需求量，该化合物被美国能源部认定为12个最具开发潜力的生物质来源关键中间体之一。另外，葡萄糖酸也被美国能源部评为是最具开发潜力的30个关键中间体之一。生物法生产山梨醇就目前而言，在能生产山梨醇的微生物中只有运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）具有实现工业化的潜力。运动发酵单胞菌能够组成型的表达一种葡萄糖-果糖氧化还原酶（Glucose-Fructose oxidoreductase, GFOR）。该酶通过催化葡萄糖和果糖之间的氧化还原反应，生成山梨醇和葡萄糖酸。由于GFOR催化反应的高度选择性以及该反应条件的温和性，生物法制备山梨醇避免了高压容器的使用和苛刻的反应条件。反应生成的两个产物（山梨醇和葡萄糖酸）都是重要的化工原料，可分别进行回收利用。根据GFOR催化反应的特点不难看出，利用GFOR催化生产山梨醇的化工过程符合当今经济和社会发展对低能耗，低污染工业技术的需求，有可能发展成为现有化学法生产山梨醇的替代技术。

为了改善生物制备山梨醇这一生物炼制过程的效率和产物收率，人们曾经尝试用各种方法抑制包括ED代谢途径在内的各种葡萄糖和果糖代谢途径。通过使用吐温和CTAB等化学试剂处理细胞，山梨醇的收率分别可以达到75%，98%并一度接近理论值^[256, 258]。另有文献报道，通过对运动发酵单胞菌细胞进行反复冻融，山梨醇的收率可以进一步提高至100%^[257]。Silveira 等人通过使用浓缩后的高浓度葡萄糖和果糖糖浆，山梨醇催化反应的转化率几近达到了理论值^[294]。然而对以上报道分析可知，由于山梨醇的制备过程中均以运动发酵单胞菌野生菌株为催化剂，并且在细胞处理过程使用了不利于后续分离纯化的表面活性剂或者采用操作复杂的高能耗细胞处理工艺，因此对于真正的山梨醇催化制备工艺而言是相当不利的。由于生物质来源的葡萄糖和果糖很难达到很高的浓度，因此采用浓缩的方法而获取高糖反应底物在经济上也是十分不利于实际工业应用的。

本学位论文通过对运动发酵单胞菌ZM4（pHW20a-*gfo*）重组菌发酵培养的研究，从而论证了以*gfo*过表达重组菌获取生物制备山梨醇催化细胞的可行性，并揭示了运动发酵单胞菌限制基因过量表达的重要影响因素。通过将*gfo*过表达重组菌的冻融细胞应用于山梨醇和葡萄糖酸的生物催化制备过程中，并对催化反应的效率和山梨醇收率进行了研究，从而确认了*gfo*过表达重组菌细胞在催化山梨醇制备反应中的优良性能。最后，针对现有运动发酵单胞菌催化细胞预处理技术复杂以及经济性差的缺点，提出了使用金属离子抑制剂的策略。通过实验验证，*gfo*过表达重组菌细胞和金属离子抑制剂的联合应用，可以有有效的简化和强化生物制备山梨醇的过程工艺。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

4.2.1.1 菌株和质粒

运动发酵单胞菌ZM4（ATCC 31821）购自于美国典型菌种保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC, Rockvill, MD, USA）。运动发酵单胞菌ZM4（pHW20a-*gfo*）本实验室构建。

4.2.1.2 主要试剂

山梨醇 (Sorbitol, AR) 和葡萄糖酸 (Gluconic acid) 均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA)。四环素 (Tetracycline, Tc), 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (N-morpholinoethanesulfonic acid, MES) 和对-硝基苯酚 (*p*-Nitrophenol) 购自于比利时 Acros Organics 化学公司 (Geel, Belgium)。酵母提取物 (Yeast extract) 购自于英国 Oxoid 有限公司 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)。培养基的配制使用去离子水, 其它分析检测操作之溶液配置使用 Milli-Q Synthesis 制备超纯水 (本章随后简称为超纯水)。其它试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。

4.2.1.3 实验仪器

主要仪器:

Thermo scientific Forma -86C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA); Eppendorf Research 移液器 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); 5415R 小型高速冷冻离心机 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统 (Millipore Corporation, MA, USA); LC-20AD 送液泵 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); RID-10A 示差检测器 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); CTO-10AS VP Plus 柱温箱 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); BS423S 和 BS224 电子天平 (Sartorius Group, Goettingen, Germany); DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); Avanti J-26 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); QL-901 型旋涡混合器 (江苏海门其林贝尔); YXQ-LS-75S II 立式压力蒸气灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司); JY92-II 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司); KWT-100A 超声波清洗机 (科伟达超声波设备有限公司); GHP-9160 恒温恒湿培养箱 (上海一恒科技有限公司); HZ-9311K 落地恒温振荡摇床 (太仓华利达有限公司); SDC-6 恒温水槽 (宁波新芝生物科技有限公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); XB-100 制冰机 (宁波格兰特制冷设备制造有限公司); CD-239VC 冰箱 (海尔公司); PHS-3C pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); Biotech-4BG 3L 四联发酵罐 (上海保兴生物设备工程有限公司)。

主要耗材:

Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); 封口膜 PM-996 (Parafilm[®] M PM-996, American National Can, Chicago, IL, USA); 0.22 μm 混合纤维素滤膜 (上海迪清过滤技术有限公司)。

4.2.1.4 培养基、培养条件及菌种之保存

本研究中培养运动发酵单胞菌 ZM4 菌株及 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌之种子培养基皆为 RM 培养基 (或含有 20 μg/mL 四环素的 RT 抗性培养基)。培养基组成, 配制方法以及四环素的使用详见第二章材料与与方法之 2.2.1.4。

运动发酵单胞菌的培养条件均为: 无菌干燥的牙签从 RM 培养基平板 (或 RT 抗性平板) 上挑取单菌落接种于 20 mL RM (或 RT) 液体培养基装液量的摇瓶 (以硅胶塞密封) 中, 并将其置于 30 °C 恒温培养箱中静置培养 22-24 h, 至 OD_{600nm}=2.0 左右。所获得的菌液用于菌种的保藏及发酵菌种的活化和扩大培养。

本研究所涉及菌株的保存皆以 30% 甘油管保存于 -80 °C 超低温冰箱中。具体方法为: 将培养至对数后期的细胞在超净工作台中与等体积 60% (wt/vol) 无菌甘油等体积混合, 并以 1.8 mL 体积分装于无菌冻存管中。用标示有菌种、质粒、保种日期、保种人命及简明培养条件等信息的标签纸外贴冻存管, 同时以透明胶带外封标签纸做防水处理。

本研究中运动发酵单胞菌 ZM4 及运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞的制备皆为 YPMAG100 培养基, 培养基组成为: 100 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母提取物, 1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O (由于该培养基葡萄糖浓度较高, 为防止灭菌过

程中葡萄糖焦化产生有害成分,因此葡萄糖单独配制成水溶液进行灭菌)。葡萄糖溶液和其它营养组分配制的培养基溶液分别于115℃灭菌20 min,并于发酵前以酒精火焰保护将葡萄糖溶液倒入发酵罐中与灭菌后的其它营养组份混合。发酵培养基初始pH值以115℃高温灭菌20 min的5 N NaOH调节至6.0。

4.2.1.5 抗生素溶液的制备

四环素盐酸盐贮存液的制备及在培养基中的添加,详见第二章材料与方法之2.2.1.5。

4.2.2 实验及分析方法

4.2.2.1 运动发酵单胞菌光密度(OD_{600nm})与细胞干重(DCW, g/L)关系曲线的确立

运动发酵单胞菌光密度(OD_{600nm})与细胞干重(DCW, g/L)关系曲线的确立,详见第二章材料与方法之2.2.2.6。

4.2.2.2 用于酶活测定细胞的制备和超声波破碎法制备细胞裂解液

以量筒量取相当于约6.2 g(约20 OD mL)细胞干重的培养液,于4℃ 10,000 × g离心5 min。弃上清,用等体积冰浴预冷的缓冲液重悬细胞(该缓冲液对应于测定酶活体系缓冲液)。将细胞悬浮液于4℃ 10,000 × g离心5 min。细胞悬浮/离心操作共重复三次。最终将细胞以1 mL冰冷缓冲液悬浮并转移至1.5 mL离心管中,于4℃ 10,000 × g离心5 min。尽弃上清液,并将收集之细胞储存于-80℃超低温冰箱中(三天内完成胞内酶活的测定)。

-80℃超低温冰箱中取出冻存细胞,并迅速加入1 mL冰浴预冷的缓冲液(该缓冲液亦对应于测定酶活体系缓冲液)。将离心管置于冰水浴中,以φ3 mm超声波破碎仪探头进行细胞破碎。破碎条件为:100 W,工作60 s(每工作5 s,间隔10 s,共12个循环)。超声波破碎的细胞裂解液于4℃ 15,000 × g离心30 min,收集上清液并置于冰浴中待用。

4.2.2.3 葡萄糖-果糖氧化还原酶(GFOR)酶活测定

运动发酵单胞菌ZM4及*gfo*过表达重组菌的GFOR比酶活力单位的测定,详见第二章材料与方法之2.2.2.8。

4.2.2.4 蛋白质浓度的测定

以Bradford法^[274]测定蛋白质浓度,标准曲线的确立详见第二章材料与方法之2.2.2.9。

4.2.2.5 HPLC标准曲线的绘制

本研究以配有Bio-Rad Aminex HPX-87H色谱柱、岛津RID-10A示差检测器和岛津LC-20AD送液泵的HPLC系统,对待测样品的果糖、葡萄糖、山梨醇、葡萄糖酸和乙醇浓度进行分析。HPLC分析参数为:柱温设定在65℃,以5 mM H₂SO₄为流动相,流速为0.6 mL/min,进样体积20 μL。各待测组分标准溶液的制备及标准曲线的绘制如下所述。

1) 果糖(Fructose) HPLC标准曲线的绘制:取洁净称量瓶一只,称取约0.5 g分析纯果糖并于60℃烘干4~6小时,直至达到恒重(每次称量前将样本从烘箱中取出并置于干燥器中冷却至室温)。用分析天平称取约0.4 g左右的果糖于50 mL洁净烧杯中,并精确记录实际称量值(0.4060 g)。以超纯水于100 mL洁净容量瓶中配制成2.540 g/L的果糖标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释,从而获得0.254、0.508、1.015、2.030和4.060浓度梯度的果糖标准溶液,并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以HPLC果糖出峰面积(μv s)为横坐标,以进样果糖标准溶液的浓度(g/L)为纵坐标,绘制果糖HPLC标准曲线(详见附图 5-3)。

2) 葡萄糖(Glucose) HPLC标准曲线的绘制:详见第二章材料与方法之2.2.2.10。

3) 山梨醇(Sorbitol) HPLC标准曲线的绘制:取洁净称量瓶一只,称取约0.5 g分析纯山梨醇于60℃烘干4~6小时,直至达到恒重(每次称量前将样本从烘箱中取出并置于干燥器中冷却至室温)。用分析天平称取约0.40 g左右的山梨醇于50 mL洁净烧杯中,并精确记录实际称量值(0.4430 g)。以超纯水于100 mL洁净容量瓶中配制成4.430 g/L的山梨醇标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释,从而获得0.069、0.138、0.277、0.554、

1.108、2.215和4.430浓度梯度的山梨醇标准溶液，并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以HPLC山梨醇出峰面积 ($\mu\text{v s}$) 为横坐标，以进样山梨醇标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标，绘制山梨醇HPLC标准曲线（详见附图 5-4）。

4) 葡萄糖酸 (Gluconic acid) HPLC 标准曲线的绘制：取洁净烘干的 100 mL 容量瓶一只，用分析天平称取约 0.5 g 左右的分析纯葡萄糖酸并于 60 °C 烘干 4~6 小时，直至达到恒重（每次称量前将样本从烘箱中取出并置于干燥器中冷却至室温）。用分析天平称取约 0.40 g 左右的葡萄糖酸于 50 mL 洁净烧杯中，并精确记录实际称量值 (0.3200 g)。以超纯水于 100 mL 洁净容量瓶中配制成 3.200 g/L 的葡萄糖酸标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释，从而获得 0.100、0.200、0.400、0.800、1.600 和 3.200 g/L 浓度梯度的葡萄糖酸标准溶液，并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以 HPLC 葡萄糖酸出峰面积 ($\mu\text{v s}$) 为横坐标，以进样葡萄糖酸标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标，绘制葡萄糖酸 HPLC 标准曲线（详见附图 5-5）。

5) 乙醇 (Ethanol) HPLC标准曲线的绘制：详见第二章材料与方法之2.2.2.10。

4.2.2.6 运动发酵单胞菌ZM4及重组菌的发酵培养

从-80 °C 冰箱保存的甘油管迅速置于 40 °C 温水中融化甘油管，并于超净工作台中以 2% (vol/vol) 接种量接种于 RM 培养基中（如为重组菌则需添加 20 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素）。接种后的培养液于 30 °C 恒温培养箱中静置培养约 20-24 h 直至 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 约为 2.0。用移液枪吸取菌液重新以 1% (vol/vol) 接种量接种于 RM（或 RT）培养基中，于 30 °C 恒温培养箱中静置培养约 10~12 h 直至细胞浓度为 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.0\sim 1.1$ 。将培养至对数中后期的菌种按照 10% (vol/vol) 的接种量接种于发酵培养基（YPMAG100 培养基）中开始发酵培养。发酵过程中，根据需要隔时隔时取样测定葡萄糖、乙醇以及 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 等相关发酵变量，以确定发酵的终止时间。

用于 HPLC 分析样品的处理和分析方法详见第二章材料与方法之 2.2.2.12。

4.2.2.7 生物催化法制备山梨醇细胞的收集和冻融处理

按照材料与方法之 4.2.2.6 培养的运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌生长进入对数末期，即葡萄糖刚刚消耗完时（葡萄糖浓度低于 0.5 g/L），测定发酵液中细胞的光密度 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$)。根据运动发酵单胞菌光密度 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) 与细胞干重 (DCW, g/L) 之间的关系，将发酵液按照所含有细胞干重量为 10 g (DCW) 为计量单位进行离心和收集。发酵液的离心条件为，在 4 °C 和 8,000 $\times\text{g}$ 的离心力下离心 5 min。将收集的细胞立即用于山梨醇的细胞催化反应或冻存于-20 °C 进行冻融处理。

生物催化法制备山梨醇细胞的冻融处理方法参考 Bringer-Meyer 和 Sahm 等人的文献报道^[257]。离心收集的细胞放于-20 °C 冻存 12 h 之后，随后放于室温进行解冻 4 h，完成一次冻融处理。

4.2.2.8 细胞催化制备山梨醇细胞的反应体系及操作条件

细胞催化制备山梨醇细胞的反应体系在 3 L 发酵罐中进行。以去离子水新鲜配制的 500 mL 160 g/L 葡萄糖和 160 g/L 果糖（或添加各种金属离子试剂）混合溶液为底物（实际浓度以 HPLC 分析结果为准）。催化反应以加入相当于 10 g (DCW) 的细胞促发催化反应，并开始计时催化反应的持续时间。反应温度利用发酵罐的温度自动控制系统控制在 39.0 ± 0.1 °C，搅拌转速为 150 rpm。由于催化反应过程中初始反应速度快，生成大量的葡萄糖酸，为避免加入过多碱对反应体系体积的影响，采用 14 mol/L 的 NaOH 手动控制 pH 值在 6.4 ± 0.2 。催化反应开始后，每隔一定时间取样分析葡萄糖、果糖、葡萄糖酸、山梨醇和乙醇的浓度。

用于 HPLC 分析样品的处理和分析方法详见第二章材料与方法之 2.2.2.12。

4.3 结果与讨论

4.3.1 利用 *gfo* 高表达菌株制备山梨醇生物催化细胞

运动发酵单胞菌 ZM4 作为生产葡萄糖-果糖氧化还原酶的一个重要菌株，本研究通过在运动发酵单胞菌中增加 *gfo* 基因的拷贝数而使 GFOR 的比活得到了显著的提高。本章首先以 *gfo* 高表达菌株发酵制备山梨醇生物催化细胞，同时以野生型菌株为对照，考察了 *gfo* 的高表达对该重组菌株乙醇发酵、细胞收率和 GFOR 的产量的影响。

通过在 3 L 发酵罐中的相同发酵操作，本研究对运动发酵单胞菌 ZM4 和运动发酵单胞菌 ZM4 (*pHW20a-gfo*) 的相关发酵指标进行了测定和计算 (图 4.1 和表 4.1)。

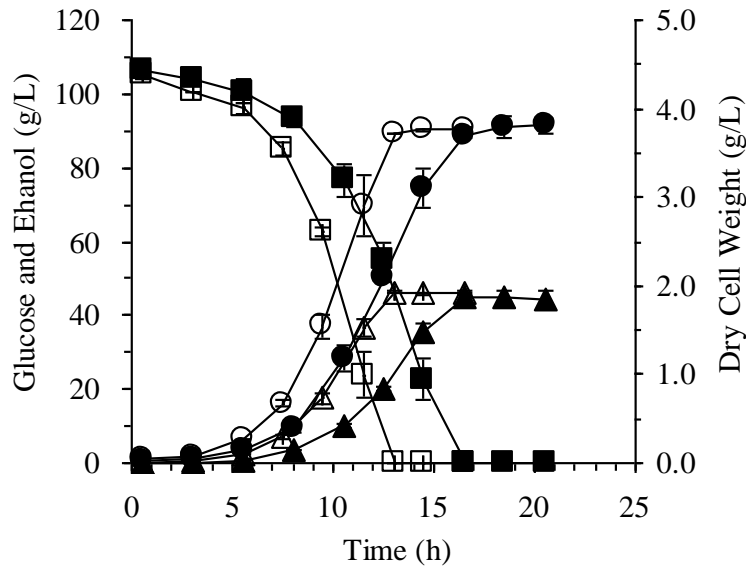


图 4.1 运动发酵单胞菌 ZM4 野生菌和运动发酵单胞菌 ZM4 (*pHW20a-gfo*) 重组菌 批次发酵过程曲线

Fig. 4.1 Fermentation profiles for the wild *Z. mobilis* ZM4 wild strain and *Z. mobilis* ZM4 (*pHW20a-gfo*) recombinant strain

Squares, glucose; circles, Dry cell weight; triangles, ethanol. Open symbols, *Z. mobilis* ZM4; closed symbols, *Z. mobilis* ZM4 (*pHW20a-gfo*).

表 4.1 *Gfo* 过表达对运动发酵单胞菌 ZM4 (*pHW20a-gfo*) GFOR 和乙醇产量的影响
Table 4.1 Effects of *gfo* over-expression on GFOR and ethanol production of *Z. mobilis* ZM4 (*pHW20a-gfo*)

| Fermentation parameters | Strains (<i>Z. mobilis</i>) | |
|---|-------------------------------|-------------------|
| | Wild strain | <i>pHW20a-gfo</i> |
| Maximum specific growth rate, μ_m (1/h) | 0.44±0.02 | 0.39±0.06 |
| Cell yield, $Y_{X/S}$ (g/g) | 0.0356±0.0003 | 0.0355±0.0003 |
| Specific activity of GFOR, E_S (U/mg protein) | 2.40 ±0.28 | 4.17±0.15 |
| GFOR yield, $Y_{E/S}$ (U/g) | 13.8±1.6 | 24.4±0.5 |
| Duration time (h) | 12.5 | 16.0 |
| Ethanol yield, $Y_{p/s}$ (%) | 43.30±0.02 | 41.70±1.52 |

由上表之结果分析可知, 在 3 L 发酵罐中进行发酵培养, 运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌细胞中 GFOR 比活 (E_S , 4.17 ± 0.15 U/mg protein) 是运动发酵单胞菌 ZM 野生菌 (E_S , 2.40 ± 0.28 U/mg protein) 的 1.7 倍; 运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌的 GFOR 产率 ($Y_{E/S}$, 24.4 ± 0.5 U/g) 为运动发酵单胞菌 ZM 野生菌 ($Y_{E/S}$, 13.8 ± 1.6 U/g) 的 1.8 倍。这表明在通过提高重组菌胞内 *gfo* 基因的拷贝数, GFOR 的表达和生产水平明显得到了提高。在相同的发酵条件下, 虽然 *gfo* 过表达菌株的生长速率 (μ_m , 0.39 ± 0.06 1/h) 略低于野生菌 (μ_m , 0.44 ± 0.02 1/h), 但两菌株最终的乙醇收率, 细胞得率与野生型菌株并没有显著差异。由此可知, 虽然 *gfo* 的过量表达虽然会对菌体产生一定的代谢负担, 但是该重组菌最终的乙醇产率以及细胞的得率并未发生明显改变。该实验结果表明, 重组菌通过 *gfo* 的高表达将更为有效地利用代谢过程中产生的能量以及发酵基质用于合成代谢过程。*Gfo* 基因的过量表达将有效地实现运动发酵单胞菌乙醇和 GFOR 的联产制备, 这无疑对提高该菌株乙醇发酵过程的整体经济性产生有益的影响。

ED 代谢途径是运动发酵单胞菌 ZM4 细胞中 ATP 生成的主要来源。虽然 ED 代谢途径利用葡萄糖转化生成 ATP 的转化率要明显的低于 EMP 途径。但另外根据相关报道, 由于运动发酵单胞菌 ED 途径的极高代谢速率 (与乙醇的单位细胞生产效率相对应), 因此 ATP 生成的效率依然完全可以满足菌株的代谢需求^[71, 184-187, 189]。在运动发酵单胞菌的乙醇发酵过程中, 该菌株甚至还要借助于碱性磷酸酶等 ATP 无效循环途径去额外的消耗多余的 ATP 以保证乙醇代谢能够顺畅的进行^[189, 201-202]。通过对运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 的发酵分析可知, 由于整运动发酵单胞菌发酵生成的乙醇并没有因为 *gfo* 的过量表达而有所改变, 因而葡萄糖代谢而产生的 ATP 总量理论上应与野生菌株相似。鉴于本章第三章的初步结果可知, 虽然目前 *gfo* 基因在重组菌中得到一定程度的高表达, 然而过于强大的 ED 代谢途径, 较弱的合成代谢流量以及大量的能量溢出途径的存在是实现 *gfo* 基因在运动发酵单胞菌中进一步过量表达的限制性因素。

4.3.2 *Gfo* 高表达对山梨醇细胞催化反应的促进作用

运动发酵单胞菌细胞经复冻融后会增加催化细胞的渗透性, 从而使得参与 ED 途径中关键酶的辅因子在这一过程中可能丢失, 同时亦使部分酶因为冻融而导致失活^[256]。GFOR 由于良好的稳定性, 并且维持其催化活性所需的 NADPH 辅因子亦以共价接合的方式紧密的接合于 GFOR 蛋白上, 因而辅酶不会由于细胞渗透性的增加而丢失^[160]。另外, 以运动发酵单胞菌冻融细胞催化生产山梨醇的工艺与细胞裂解、超声波处理或者添加难以分离的化学处理剂 (例如 吐温和 CTAB 等) 过程相比^[44, 255, 258, 295-296], 由于不需要特殊的设备而其没有额外添加有毒的化学物质, 因此该过程生产山梨醇的工艺更易于操作并且有利于产物的分离纯化。本研究使用该细胞预处理方法, 研究了 *gfo* 过表达对制备山梨醇催化反应的影响。同时, 通过优化冻融次数对最终产物产量和底物转化效率的影响, 从而得出一个优化的可操作工艺。

按照本章材料与方法之 4.2.2.7 和 4.2.2.8 所述方法, 将冻融的两种菌株分别进行山梨醇制备的催化反应, 结果见图 4.2。

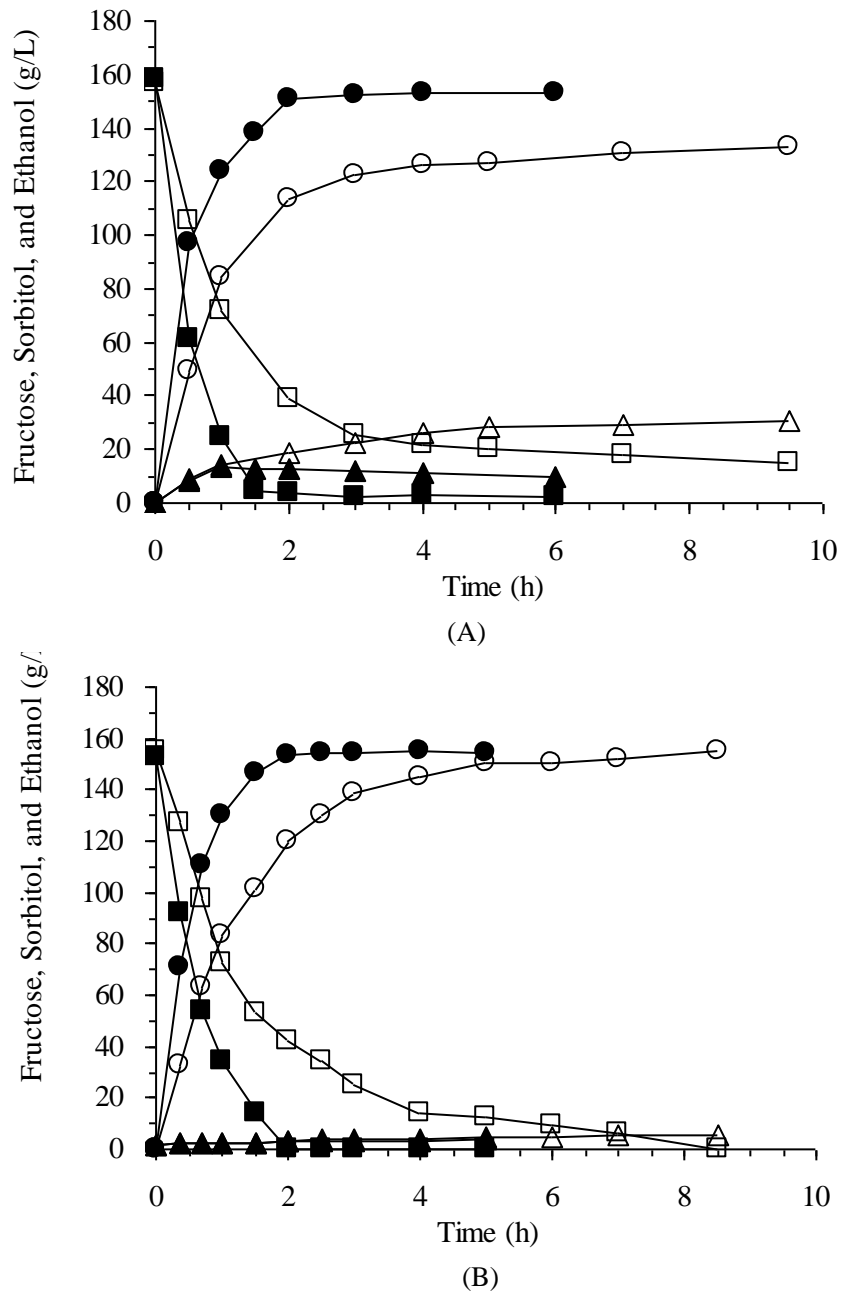


图 4.2 *Gfo* 高表达对细胞催化生产山梨醇的促进作用

Fig. 4.2 Improvements in sorbitol production with *gfo* over-expression recombinant cells (A) Cells frozen and thawed once. (B) Cells frozen and thawed twice. Squares, fructose; circles, sorbitol; triangles, ethanol. Open symbols, *Z. mobilis* ZM4; closed symbols, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*).

反应终止时间以山梨醇浓度达到最大浓度之 95% 衡量。根据图 4.2 (A) 结果分析可知，在相同的催化细胞使用量下通过使用 *gfo* 过表达菌株的冻融细胞，催化反应时间 (2 h) 比对照菌株 (6 h) 明显缩短。反应终止时，使用运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 冻融细胞的山梨醇浓度为 151.03 g/L，运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a) 冻融细胞的山梨醇浓度为 126.29 g/L。运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌和对照菌株催化反应的山梨醇产率分别为 91.85% 和 80.56%，*gfo* 过表达重组菌催化生成山梨醇的产率比对照菌株提高了 14.14%。另外，当反应终止时，运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌和对照菌株催化生产山梨醇的乙醇浓度分别为 12.79 g/L 和 25.77 g/L；反应副产物的产量减少了 50.37%。由于运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌胞内的 GFOR

比活得到了显著的提高,因此在催化反应过程中葡萄糖能够更为有效的参与山梨醇生成的反应过程。所以根据反应获得的最大山梨醇产率计算,运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌冻融细胞催化的山梨醇产率 (97.5%) 亦比对照菌株 (84.80%) 得到改善。

以上数据表明,通过使用 *gfo* 过表达菌株的冻融细胞,无论山梨醇的产量、转化效率 (最大转化率)、生产效率还是副产物的生成都显著得到了改善。但是根据反应副产物 (乙醇) 的生成结果可知,冻融的结果仍然无法使全部细胞的 ED 代谢途径失去效能。为了进一步提高山梨醇催化的转化率,降低反应的副产物生成,本研究尝试通过两种菌株反复冻融的细胞用于该催化反应过程 (图 4.2)。

图 4.2 (B)中为细胞经过两次反复冻融后的实验结果。由图分析可知,使用运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌和野生菌细胞的反应,其山梨醇产率最终均可达到 100%。当达到最大山梨醇产量的 95%时,运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞催化的反应不到 2 h,山梨醇和乙醇产量分别为 153.75 g/L 和 3.69 g/L;而运动发酵单胞菌 ZM4 则需要 4.5 h,山梨醇和乙醇生成量分别为 147.57 g/L 和 4.44 g/L。当果糖完全消耗尽时,运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞催化的反应仅需 2 h,山梨醇和乙醇产量分别为乙醇生成量为 153.75 g/L 和 3.69 g/L;而运动发酵单胞菌 ZM4 则需要 8.5 h,山梨醇和乙醇生成量分别为 154.80 g/L 和 5.51 g/L。这表明细胞经过两次反复冻融后,几乎所有细胞的 ED 代谢途径均受到抑制,从而保障葡萄糖可充分的参与山梨醇的生产过程中。由于运动发酵单胞菌 ZM4 无法代谢山梨醇,因此少量乙醇生成可能系经过反复冻融后运动发酵单胞菌细胞中仍有相关的酶可以缓慢的催化葡萄糖酸向乙醇的转化。

根据以上之结果,通过使用运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 重组菌的冻融细胞以及反复冻融的细胞处理方法,山梨醇的生产效率、收率以及副产物的减少方面均明显得到了改善。

4.3.3 金属离子对改善细胞催化反应性能的评价

根据 4.3.2 之研究结果分析,虽然通过反复冻融可以提高山梨醇催化制备过程中底物的利用效率以及产物的收率,然而作为一个将应用与实际工业生产制备过程的技术,冻融处理仍然存在着操作复杂以及能耗过高等缺点。为了对冻融处理工艺过程的以上缺点做进一步的改善,本研究同时探讨通过使用一些金属离子盐抑制 ED 代谢途径中的一些酶,以期能够替代复杂和能耗过多的冻融工艺。根据 Brenda Enzyme Database 数据库提供之相关信息^[297],有可能作用于 ED 代谢途径之相关酶的金属离子抑制剂如图 4.3 所示。

其中,作为常见的金属离子及其对 ED 途径相关酶的抑制数量分别为: Ca^{2+} (5), Cu^{2+} (8), Zn^{2+} (7), Mg^{2+} (6), Fe^{2+} (2) 和 Fe^{3+} (1)。由于 Fe^{3+} 为具有较强的氧化性极易与其它有机物作用生成 Fe^{2+} 。同时,在本研究的催化体系中不存在供氧等条件以维持体系的高氧化状态,这势必很难维持体系中的三价铁离子状态;另外,根据数据库提供之信息,低浓度的 Fe^{3+} 仅对 ED 代谢途径的最后一步存在抑制效果。故本研究对于 Fe^{3+} 以及其它不利于食品卫生行业应用的重金属离子 (Co^{2+} , Ag^+ , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^+ 和 Pb^{2+} 等) 及价格过于昂贵的 Li^+ 和 Sr^+ 离子将不再作考察。本章通过以常见的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 MgCl_2 和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为抑制剂,分别对以上二价金属离子对催化生产山梨醇反应的影响进行了探讨。按照本章材料与方法之 4.2.2.7 和 4.2.2.8,将 2 mM 的各二价金属盐溶于葡萄糖-果糖混合溶液并以新鲜制备的运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞进行制备山梨醇的催化反应,结果见表 4.2。

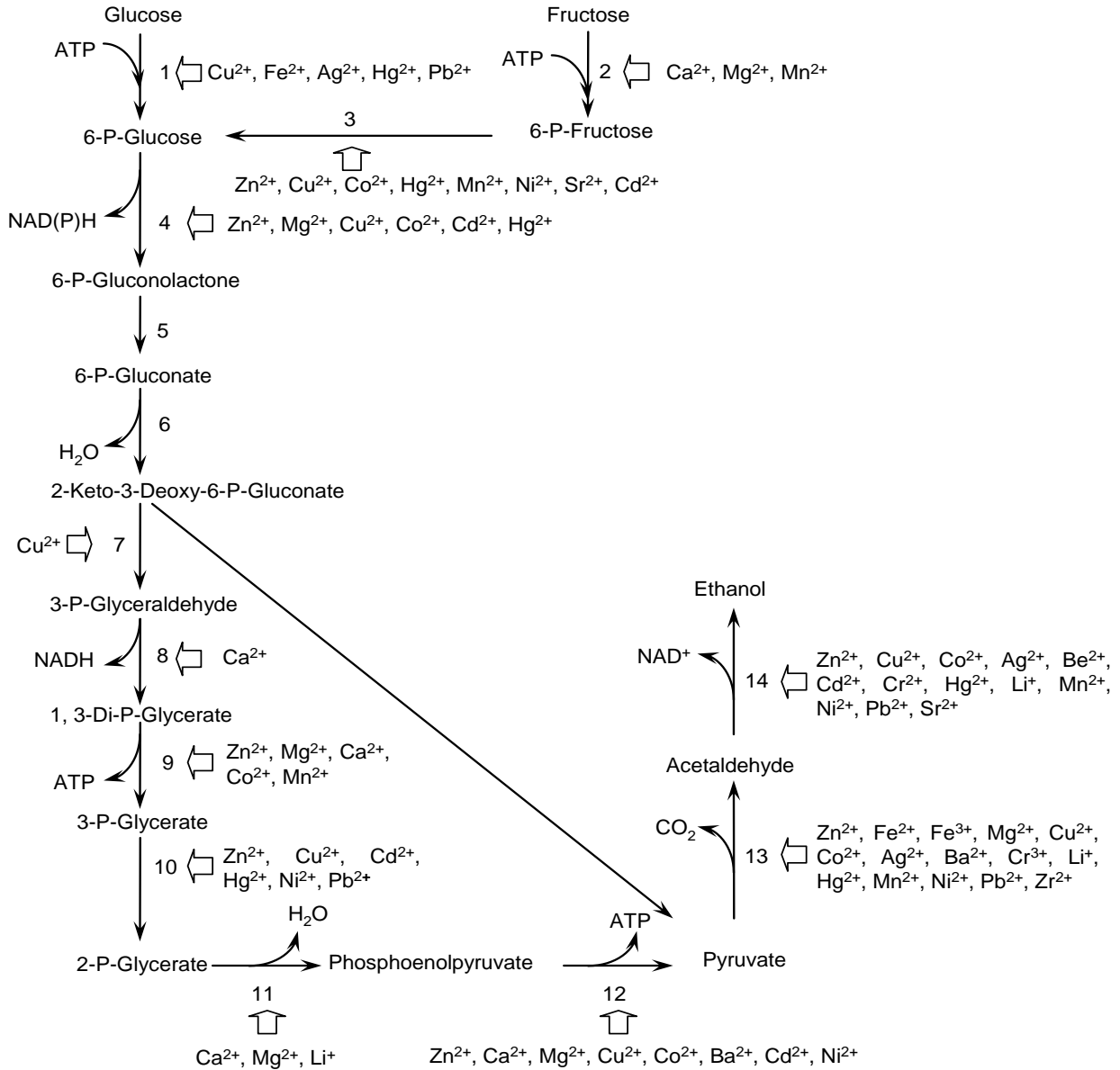


图 4.3 运动发酵单胞菌 Entner-Doudoroff 代谢路径中酶的金属离子抑制剂

Fig. 4.3. Metal ions inhibiting the enzymes in Entner-Doudoroff pathway of *Z. mobilis*

1, glucokinase; 2, fructokinase; 3, 6-p-glucose isomerase; 4, 6-p-glucose dehydrogenase; 5, 6-p-gluconolactonase; 6, 6-p-gluconate dehydratase; 7, 2-keto-3-deoxy-6-p-gluconate aldolase; 8, 3-p-glyceraldehyde dehydrogenase; 9, phosphoglycerate kinase; 10, phosphoglycerate mutase; 11, enolase; 12, pyruvate kinase; 13, pyruvate decarboxylase; 14, alcohol dehydrogenase.

根据表 4.2 中之结果显示，通过在催化反应中添加表中的金属离子盐，山梨醇的产率都会有所改善。在所研究的二价金属盐中以 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 抑制效果最为显著。反应的最终得率可以达到 101.2% ($Y_{p/s}$)，副产物乙醇的产率仅为 0.2% ($Y_{E/s}$)；其次是 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，其山梨醇得率和乙醇浓度分别为 98.6% 以及 1.1%。由于 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 有可能也对 GFOR 产生抑制作用，因此整个催化周期十分迟缓，大约需要 5.0 h。相比之下， CaCl_2 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等 MgCl_2 等二价金属盐的影响较为逊色。无论山梨醇的最终收率，还是乙醇的生成均明显低于 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。根据表国药集团（上海）试剂公司提供以上各种盐类（CP 级别）的国内试剂价格为衡量标准，在所用的五种盐类中， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的售价最高， CaCl_2 的售价最低。虽然 CaCl_2 的抑制效果较差，但是其销售价格明显低于其它各二价金属盐类；同时由于葡萄糖酸钙的溶解度较低，因此以

CaCl₂ 为抑制剂亦有利于后续的纯化过程^[298]。随后对 ZnSO₄·7H₂O 和 CaCl₂ 对山梨醇催化反应的影响做进一步研究。

表 4.2 常见二价金属盐对运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-gfo) 催化果糖和葡萄糖的影响
Table 4.2 Effects of divalent metal salts on the bioconversions of fructose and glucose to sorbitol and gluconic acid using *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) cells^a

| Salts | Control | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | CaCl ₂ | FeSO ₄ ·7H ₂ O | MgCl ₂ | CuSO ₄ ·5H ₂ O |
|-----------------------|---------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| C _{Gi} (g/L) | 153.7 | 158.8 | 160 | 155.9 | 155.2 | 160.1 |
| C _{Fi} (g/L) | 153.5 | 158.7 | 158.0 | 155.0 | 154.0 | 159.1 |
| C _P (g/L) | 138.3 | 156.4 | 149.6 | 142.8 | 139.7 | 161.0 |
| C _E (g/L) | 16.7 | 3.5 | 10.3 | 13.2 | 15.7 | 0.5 |
| Y _{P/s} (%) | 90.1 | 98.6 | 94.6 | 92.1 | 90.7 | 101.2 |
| Y _{E/s} (%) | 5.4 | 1.1 | 3.2 | 4.2 | 5.1 | 0.2 |
| D (h) | 2.0 | 2.5 | 2.5 | 2.0 | 2.0 | 5.0 |

^aControl, no divalent metal salt was added in the reaction system; C_{Gi} (g/L), initial concentration of glucose; C_{Fi} (g/L), initial concentration of fructose; C_P (g/L), concentration of fructose; C_E (g/L), concentration of ethanol; Y_{P/s} (%), yield of sorbitol estimated by initial concentration of fructose (g/L); Y_{E/s} (%), yield of ethanol estimated by initial concentration of total sugar (fructose+glucose, g/L); D (h), duration time reach the maximum sorbitol concentration. The theoretical yield of sorbitol was 101.1% (g sorbitol/g fructose).

表 4.3 国药集团（上海）试剂公司提供之试剂价格
Table 4.3 The prize of the chemicals according to the information from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.

| Chemicals | quantity | Package (g) | Prize (RMB/Package) | MW (g/mol) | Unit Price (RMB/mol) |
|--------------------------------------|----------|-------------|---------------------|------------|----------------------|
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | CP≥99.0% | 500 | 23 | 249.68 | 11.49 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | CP | 500 | 5.5 | 278.05 | 3.06 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | CP | 500 | 12.8 | 287.5 | 7.36 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | AR | 500 | 18 | 203.3 | 7.32 |
| CaCl ₂ | CP | 500 | 8 | 110.98 | 1.78 |

4.3.4 Zn²⁺和 Ca²⁺浓度对催化生产山梨醇的促进作用

为了寻找一个最优的 Zn²⁺和 Ca²⁺外处理工艺,本研究对两种金属离子添加浓度进行了优化。根据本章材料与方法之 4.2.2.7 和 4.2.2.8,通过在反应体系中添加不同浓度的 ZnSO₄·7H₂O 和 CaCl₂,并将达到最大山梨醇转化率时的相关反应参数统计于表 4.4 和表 4.5 中。

由表 4.4 和表 4.5 分析可知,随着 ZnSO₄·7H₂O 浓度的提高,催化反应的时间并未随之延长,并且山梨醇的收率以及对乙醇生成的抑制均有显著提高。当 ZnSO₄·7H₂O 浓度提升至 7 mM 时,山梨醇的转化率达到理论值。由此可以推论,在一定的浓度范围内,ZnSO₄·7H₂O 极大程度的抑制反应副产物的生成,同时并不会对运动发酵单胞菌 ZM4 GFOR 产生显著的抑制效果。由此可以保证反应底物在相当大的程度向目标产物转化。而当 CaCl₂ 浓度提高时,山梨醇的收率以及乙醇生成的抑制亦有显著的提高。虽然当 CaCl₂ 浓度提高至 180 mM 时催化反应的终止时间与添加 ZnSO₄·7H₂O 相同,然而转化率并未达到理论值;当浓度提高至 450 mM 时,虽然果糖已经可以完全转化为山梨醇,

然而反应时间已经明显延长。由此可见，无论从反应添加剂的用量还是从反应的催化效率和转化率评估， $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 将具有潜在的应用价值。

表 4.4 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-gfo) 细胞催化制备山梨醇的影响

Table 4.4 Effects of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on the preparation of sorbitol with *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) cells^b

| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (mM) | 0 | 0.35 | 2.00 | 3.50 | 7.00 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C_{Gi} (g/L) | 153.7 | 155 | 158 | 160 | 157.1 |
| C_{Fi} (g/L) | 153.5 | 154.7 | 158.7 | 158.5 | 158.9 |
| C_P (g/L) | 138.3 | 152.8 | 156.4 | 159.1 | 161.1 |
| C_E (g/L) | 16.7 | 5.6 | 3.5 | 1.9 | 1.8 |
| $Y_{P/s}$ (%) | 90.1 | 98.8 | 98.6 | 100.4 | 101.4 |
| $Y_{E/s}$ (%) | 5.4 | 1.8 | 1.1 | 0.6 | 0.6 |
| D (h) | 2.0 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |

^bControl, no divalent metal salt was added in the reaction system; C_{Gi} (g/L), initial concentration of glucose; C_{Fi} (g/L), initial concentration of fructose; C_P (g/L), concentration of fructose; C_E (g/L), concentration of ethanol; $Y_{P/s}$ (%), yield of sorbitol estimated by initial concentration of fructose (g/L); $Y_{E/s}$ (%), yield of ethanol estimated by initial concentration of total sugar (fructose+glucose, g/L); D (h), duration time reach the maximum sorbitol concentration. The theoretical yield of sorbitol was 101.1% (g sorbitol/g fructose).

表 4.5 $CaCl_2$ 浓度对运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-gfo) 细胞催化制备山梨醇的影响

Table 4.5 Effects of $CaCl_2$ concentration on the preparation of sorbitol with *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) cells^c

| $CaCl_2$ (mM) | 0 | 2 | 45 | 180 | 450 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C_{Gi} (g/L) | 153.7 | 160 | 158.1 | 158.7 | 152.7 |
| C_{Fi} (g/L) | 153.5 | 158 | 159.3 | 158.9 | 150.4 |
| C_P (g/L) | 138.3 | 149.6 | 157.9 | 158.1 | 153.2 |
| C_E (g/L) | 16.7 | 10.3 | 5.05 | 2.96 | 0.14 |
| $Y_{P/s}$ (%) | 90.1 | 94.6 | 99.1 | 99.5 | 101.9 |
| $Y_{E/s}$ (%) | 5.4 | 3.2 | 1.6 | 0.9 | 0.0 |
| Duration (h) | 2.0 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 5.0 |

^cControl, no divalent metal salt was added in the reaction system; C_{Gi} (g/L), initial concentration of glucose; C_{Fi} (g/L), initial concentration of fructose; C_P (g/L), concentration of fructose; C_E (g/L), concentration of ethanol; $Y_{P/s}$ (%), yield of sorbitol estimated by initial concentration of fructose (g/L); $Y_{E/s}$ (%), yield of ethanol estimated by initial concentration of total sugar (fructose+glucose, g/L); D (h), duration time reach the maximum sorbitol concentration. The theoretical yield of sorbitol was 101.1% (g sorbitol/g fructose).

4.3.5 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 抑制与反复冻融对细胞催化生产山梨醇的性能评价

为了评价冻融法与 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 抑制法对运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-gfo) 细胞催化山梨醇的促进作用，相关结果列于表 4.6。

与未经任何处理的细胞相比，冻融与 Zn^{2+} 添加均能获得良好的催化效率和转化率。相比之下， Zn^{2+} 添加的工艺其简单的处理步骤以及对能耗的需求明显优于反复冻融的处理方式。由此可见，通过在运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-gfo) 催化生产山梨醇的工艺中，添加金属离子抑制剂将有助于生物法制备山梨醇向实际工业过程的转化。

表 4.6 运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞处理方式对催化制备山梨醇影响的比较
Table 4.6 Effects of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*) cells treatment on the biotransformation of sorbitol^d

| Treatment | No treatment | Frozen-thawing twice | 7 mM ZnSO ₄ · 7H ₂ O |
|-----------------------|--------------|----------------------|--|
| C _{Gi} (g/L) | 153.7 | 158.0 | 157.1 |
| C _{Fi} (g/L) | 153.5 | 152.6 | 158.9 |
| C _P (g/L) | 138.3 | 154.1 | 161.1 |
| C _E (g/L) | 16.7 | 3.2 | 1.8 |
| Y _{P/s} (%) | 90.1 | 101.0 | 101.4 |
| Y _{E/s} (%) | 5.4 | 1.0 | 0.6 |
| D (h) | 2.0 | 2.5 | 2.5 |

^dControl, no divalent metal salt was added in the reaction system; C_{Gi} (g/L), initial concentration of glucose; C_{Fi} (g/L), initial concentration of fructose; C_P (g/L), concentration of fructose; C_E (g/L), concentration of ethanol; Y_{P/s} (%), yield of sorbitol estimated by initial concentration of fructose (g/L); Y_{E/s} (%), yield of ethanol estimated by initial concentration of total sugar (fructose+glucose, g/L); D (h), duration time reach the maximum sorbitol concentration. The theoretical yield of sorbitol was 101.1% (g sorbitol/g fructose).

4.4 小结

通过本研究发现, 通过将 pHW20a-*gfo* 转化至运动发酵单胞菌 ZM4, GFOR 的比活不仅比对照菌株提高一倍, 而且 GFOR 的收率也提高了 1.8 倍。与对照菌株相比, 发酵终止时两种菌株的乙醇收率和细胞得率均未有明显差异。由此可知, 通过使用 *gfo* 基因过表达菌株, 可以在不影响运动发酵单胞菌乙醇发酵收率的前提下有效的获得高 GFOR 活力的催化细胞, 有效地提高运动发酵单胞菌在生物炼制过程的经济性。同时, 通过发酵分析并结合前期研究结果发现, 运动发酵单胞菌强势的 ED 代谢途径, 较弱的合成代谢途径以及 ATP 溢出途径将是实现该菌株进行 GFOR 大量制备的关键性限制因素。随后, 通过分析 *gfo* 过表达菌株细胞催化生产山梨醇的反应过程发现, *gfo* 的过表达不仅仅提高了催化反应的速率, 同时也进一步提高了山梨醇的转化率以及降低乙醇这一廉价副产物的生成。考虑到反复冻融工艺的复杂性和能耗过大的特点, 本研究提出了一种通过添加二价金属离子抑制细胞乙醇代谢途径以提高产物收率的策略。通过对常见的二价金属离子盐的筛选, 本研究得到了四种金属离子盐可作为候选的催化反应添加剂 (ZnSO₄ · 7H₂O、CaCl₂、FeSO₄ · 7H₂O、和 CuSO₄ · 5H₂O)。通过以上研究, 对山梨醇生物制备过程的主要限制性因素进行了探讨, 并为下一步的研究工作提供了指导依据。

然而, 由于时间和分析手段的限制以及对该菌株的相关代谢信息的所知有限, 有关运动发酵单胞菌的代谢和生长的相关研究仍未有深入的了解。虽然 *gfo* 基因表达水平在重组菌株中有一定的提高, 然而 GFOR 总体的收率仍然较低。了解运动发酵单胞菌代谢和生长的调控机制, 将有利于进一步改善 GFOR 的生产水平。同时, 对运动发酵单胞菌 *gfo* 基因表达后修饰机理的研究, 使得该基因能够在大肠杆菌等体系进行大量表达, 将是制备大量廉价 GFOR 酶的唯一出路。另一方面, 虽然本研究对 Zn²⁺和 Ca²⁺两离子的抑制浓度有所探索和优化, 但是对于其作用的机制和抑制途径仍然有待深入。相关研究的深入将对改善工艺和提出更有效的催化反应调控策略有所裨益。最后, 本研究对于 Fe²⁺, 尤其是 CuSO₄ 的研究仍缺乏系统性。通过对 FeSO₄ 和 CuSO₄ 使用浓度和作用机制的优化及深入了解, 有可能发现更为有效的反应添加剂及金属盐离子的复配策略。

第五章 运动发酵单胞菌甲酸代谢途径和 NADH 再生体系的构建及其在玉米秸秆水解液发酵中的应用

5.1 前言

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 是一种高效率的乙醇发酵菌株。该菌株利用高效的 Entner-Doudoroff 代谢途径 (ED pathway) 代谢葡萄糖、果糖和蔗糖等简单的糖分进行乙醇发酵。由于该菌株可以在很少生物量形成的基础上催化生产大量的乙醇, 并对糖浓度和乙醇浓度表现出良好的耐受性, 因此该菌株被列为极具应用和开发潜力的燃料乙醇发酵菌株而得到了广泛的研究^[82]。

木质纤维素水解液, 作为其中一种重要的生物质糖源, 由于其具有可再生性和成本低廉等特点, 因此应用该基质进行乙醇发酵被视作有效降低生物质能源生产成本、增进能源安全、减少二氧化碳净排放和降低市区污染的一种有效手段^[299]。然而, 由于木质纤维素的组成复杂以及结构致密, 因此生物质材料的预处理过程是获取发酵菌株可直接利用单(寡)糖的前提^[300]。稀酸预处理由于其处理效率较高、能量消耗较小、操作工艺简单、运行成本较低、设备性能要求较小以及易于放大等特点, 该方法仍然作为其中一种主要的生物质预处理工艺得到了广泛的应用与研究^[301-304]。然而, 稀酸的应用和高温(高压)的处理条件作为稀酸预处理工艺的两个主要特点, 在处理工程中将不可避免的生成一些对发酵菌株生理代谢产生不利影响的化合物——抑制物组分^[305-306]。根据这些化合物的化学性质及化学结构, 抑制物被分为三大类: 有机酸(甲酸、乙酸和乙酰丙酸等)、呋喃类化合物(糠醛和 5-羟甲基糠醛)和芳香族化合物(4-羟基苯甲醛、香兰素、香草醛、儿茶酚、苯酚、愈创木酚等)^[306-307]。尽管前期研究表明, 运动发酵单胞菌对呋喃类化合物以及芳香族衍生物的耐受性均优于酵母菌, 然而对有机酸类抑制物的耐受性却明显不足^[308]。野生运动发酵单胞菌由于缺乏相关的代谢途径(尤其是乙酸和甲酸), 因此始终无法代谢这些有机酸, 并从根本上解除对菌体生长和代谢的毒害作用^[89, 309-310]。另有文献报道, 酵母等呋喃抑制物代谢菌株在对其代谢和生物脱毒过程中, NAD(P)H 及醇脱氢酶广泛参与了糠醛和 5-羟甲基糠醛的还原代谢过程, 并通过将其转化为相应的醇从而降低对细胞生长和代谢的毒害作用^[311-315]。因此提高运动发酵单胞菌胞内还原力水平, 有可能对改善该乙醇发酵菌株对呋喃类抑制物的耐受和代谢性能产生积极的作用。

为了进一步改善运动发酵单胞菌利用木质纤维素水解液发酵生产乙醇的性能, 本文借助于 pHW20a 质粒通过表达来源于酵母的 *FDHI* 基因, 以期建立甲酸代谢途径及与之耦合的 NADH 再生体系。通过甲酸代谢途径和 NADH 再生体系在运动发酵单胞菌中的建立, 借此可以改善运动发酵单胞菌对甲酸和呋喃类抑制物的耐受(或代谢)性能, 并提高该乙醇发酵菌株在木质素水解液中的发酵性能。

5.2 材料与方法

5.2.1 实验材料

5.2.1.1 菌株和质粒

运动发酵单胞菌 ZM4 菌株 (*Z. mobilis* ZM4, ATCC 31821) 购自于美国典型菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC, MD, USA)。大肠杆菌 S 17-1 λ π (*Escherichia coli* S 17-1 λ π) 用于运动发酵单胞菌双亲本接合转化操作。穿梭质粒 pHW20a 用于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) S288c 的 *FDHI* 基因 (Gene ID: 84626310) 在运动发酵单胞菌 ZM4 菌株中的表达。运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a-*fdh*)

重组菌由本研究构建。其它菌株及质粒详见表 5.1。

表 5.1 本研究涉及之菌株及质粒
Table 5.1 Strains and plasmids used in this study

| Strains/plasmids | Features ^a | Source/reference |
|--------------------------------------|---|------------------|
| Strains | | |
| <i>Z. mobilis</i> ZM4 | Wild type, ATCC 31821. | From ATCC |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F ⁻ , ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1.</i> | [263] |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3). | Novagen |
| <i>E. coli</i> S17-1 λ π | <i>Pro, res⁻, mod⁺</i> ; chromosomal integrated RP4; 2-Tc::Mu-Km::Tn7; <i>Tp, sm.</i> | [264] |
| Plasmids | | |
| pHW20a | <i>Tc^r, mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZα</i> , MCS and <i>oriV</i> . | In chapter 2 |
| pUC19DN-Pgap | Plasmid with <i>gapZm</i> promoter subcloned into pUC19DN. | In chapter 4 |
| pET-28a(+)- <i>fdh1</i> | Over-express <i>FDH1</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>km^r</i> . | [316] |
| pUC19DN-Pgap- <i>fdh</i> | Ligation of <i>FDH1</i> CDS with the <i>gapZm</i> promoter of <i>Z. mobilis</i> . | In this study |
| pHW20a- <i>fdh</i> | Express <i>FDH1</i> in <i>Z. mobilis</i> with its native <i>gapZm</i> promoter. | In this study |

^aZm, gens from *Z. mobilis* ZM4.

5.2.1.2 主要试剂

DNA分子量标准品购自于日本TAKARA大连分公司。本研究所用寡核苷酸皆由Primer V5.0根据NCBI公布之基因序列自行设计,并在扩增序列5'端引入NdeI酶切位点以及3'端引入BglII和EcoRI酶切位点。引物由上海生物工程技术有限公司合成,其纯度及分子量皆经聚丙烯酰胺电泳和质谱鉴定(详见表 5.2)。

PCR产物纯化试剂盒(PCR Purification Kit),胶提取试剂盒(Gel Extraction Kit)和质粒抽提试剂盒(Plasmid Mini Kit)均购自美国Omega生物工程公司(Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA);卡那霉素(Kanamycin, Km),氨苄青霉素(Ampicillin, Amp),异丙基 β -D-巯基半乳-吡喃糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside, IPTG),十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfonate, SDS),三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-(hydroxymethyl) aminomethane, Tris base),溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)和5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3- indolyl- β -D-galactoside, X-Gal)均购自美国Amresco公司(Cleveland, OH, USA)。西班牙琼脂糖(Biowest, Spain)。四环素(Tetracycline, Tc),糠醛(2-Furaldehyde, furfural),萘啶酸(Nalidixic acid, Na),5-羟甲基糠醛(5-(Hydroxymethyl)furfural, HMF)和4-羟基苯甲醛(4-Hydroxybenzaldehyde)购自于比利时Acros Organics化学公司(Geel, Belgium)。酵母提取物(Yeast extract)和胰蛋白胨(Tryptone)购自于英国Oxoid有限公司(Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA),乙二胺四乙酸二钠盐(Disodium ethylenediamine tetraacetate, EDTA Na₂),吩嗪硫酸乙酯(phenazine ethosulfate, PES),噻唑兰(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumd bromide, MTT),氧化型辅酶I(β -Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)和还原型辅酶I(β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form, β -NADH)

购自于美国Sigma-Aldrich公司 (St. Louis, MO, USA)。玉米秸秆 (CS-JL, 中国吉林省)。Accellerase 1000 (65.8 FPU/mL) 购自Genencor International Inc. (Rochester, NY, USA)。培养基的配制使用去离子水, 其它分析检测和基因操作使用Milli-Q Synthesis制备的超纯水 (本章随后简称为超纯水)。其它试剂如无特殊说明均为国产分析纯, 购自国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。

表 5.2 本研究涉及之引物
Table 5.2 Oligonucleotides used in this study

| Primer No. | Primer name ^b | Sequence (5'→3') |
|------------|--------------------------|--|
| 1 | <i>FDHI-S</i> | GCTCTAGACATATGTCGAAGGGAAAGGTTTTG |
| 2 | <i>FDHI-R</i> | CGAATTCAGATCTGCGGCCGCTCTTATTTCTTCTGTCCATAAGCTC |

^bWords in italic style, the target gene; qRT, the primer paires used for real-time qRT-PCR; S, sense primer; A, anti-sense primer.

本研究所使用之DNA分子量标准品电泳条带分布如下:

DNA分子量标准品——

2000 bp DL (bp) : 100, 250, 500, 750, 1000, 2000;

250 bp DL (bp) : 250, 500, 750, 1000, 1500, 1750, 2250, 3000, 4500;

Marker Wide Range 12000 bp (bp) : 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 12000。

5.2.1.3 实验仪器

主要仪器:

Thermo scientific Forma -86C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA); Eppendorf Research 移液器 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Mastercycler PCR 仪 (Eppendorf 公司); 5415R 小型高速冷冻离心机 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); 5430 Thermomixer compact 微型摇床 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany); Mini-Sub Cell GT 水平电泳槽 (Bio-Rad 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Power Pac 3000 通用电源 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); MicroPulser 电穿孔仪 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统 (Millipore Corporation, MA, USA); LC-20AD 送液泵 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); RID-10A 示差检测器 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); CTO-10AS VP Plus 柱温箱 (Shimadzu Corporation, Kyoto Prefecture, Japna); 全自动紫外与可见分析装置 FR-200A (复日科技); BS423S 和 BS224 电子天平 (Sartorius Group, Goettingen, Germany); DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); Avanti J-26 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); QL-901 型旋涡混合器 (江苏海门其林贝尔); LX-100 手掌型离心机 (江苏海门其林贝尔); YXQ-LS-75S II 立式压力蒸气灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司); JY92-II 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司); KWT-100A 超声波清洗机 (科伟达超声波设备有限公司); GHP-9160 恒温恒湿培养箱 (上海一恒科技有限公司); HZ-9311K 落地恒温振荡摇床 (太仓华利达有限公司); SDC-6 恒温水槽 (宁波新芝生物科技有限公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); XB-100 制冰机 (宁波格兰特制冷设备制造有限公司); CD-239VC 冰箱 (海尔公司); PHS-3C pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); 海尔 XQS75-Y928 型洗衣机 (青岛海尔股份有限公司); SF-高速粉碎机 (上海科太粉碎设备厂); 预处理反

反应器为本实验室自行设计之 15L 不锈钢反应器（反应器主体由 DZF24 5C 型蒸汽蒸汽发生器（上海蒸源机电设备有限公司），15L 预处理反应釜和接收容器 3 部分组成。反应釜为圆筒状，外壁以加热套及石棉隔热层保温。反应器内、外部温度由沿中轴线插入的热电偶和固定于外壁和加热套之间的热电偶分别测得）；配备自行设计螺带搅拌桨^[317]及 Biotech-2002 Bioprocess Controller 自动控制器的 Biotech-5JGZ 型 5 L 水解罐（上海保兴生物设备工程有限公司）。

主要耗材：

Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱（Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA）；200 μL PCR-2CP-RT-C（Axygen Scientific Inc, CA, USA）；Whatman 1 号滤纸（Whatman International Ltd.）；封口膜 PM-996（Parafilm[®] M PM-996, American National Can, Chicago, IL, USA）；0.22 μm 和 0.45 μm 混合纤维素滤膜（上海迪清过滤技术有限公司）。

本研究样品分析测定过程所需之玻璃容器及器皿首次使用前，皆以 0.1 N HCl 浸泡 12 h，并以洗洁精刷洗干净。用自来水冲洗 9 次，并根据需要用去离子水或超纯水润洗 3~5 次，烘干待用。

5.2.1.4 培养基、培养条件及菌种之保存

本研究大肠杆菌培养之培养基为 Luria broth (LB) 培养基^[268]。LB 培养基的组成以及大肠杆菌的培养详见第二章材料与方法之 2.2.1.4。

大肠杆菌感受态细胞制备培养基组成及其制备方法详见第二章材料与方法之 2.2.1.4 和 2.2.2.4。

本研究中培养运动发酵单胞菌及重组菌之种子培养基均为 RM 培养基（或含有 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素的 RT 抗性培养基）。所获得的菌液用于质粒抽提、基因组 DNA 制备、菌种保藏、接合转化及发酵菌种的活化和扩大培养。培养基组成和菌种培养方法详见第二章材料与方法之 2.2.1.4。

本研究中运动发酵单胞菌及所构建之基因重组菌株发酵培养基如无特殊说明皆为 YPMAG20 培养基，培养基组成为：20 g/L 葡萄糖，5 g/L 酵母提取物，1 g/L KH_2PO_4 ，1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。培养基溶液以 5 N NaOH 调节至初始 pH 6.0，并于 115 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。

本研究所涉及菌株的保存皆以 30% 甘油管保存于 -80 $^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中。具体方法为：将培养至对数后期的细胞在超净工作台中与等体积 60% (wt/vol) 无菌甘油等体积混合，并以 1.8 mL 体积分装于无菌冻存管中。用标示有菌种、质粒、保种日期、保种人命及简明培养条件等信息的标签纸外贴冻存管，同时以透明胶带外封标签纸做防水处理。

5.2.1.5 抗生素溶液的制备

四环素盐酸盐 (Tc)、氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Km)、萘啶酸 (Na) 和氯霉素 (Cm) 贮存液的制备详见第二章材料与方法之 2.2.1.5。

5.2.2 实验及分析方法

5.2.2.1 质粒抽提，基因组 DNA 制备和 DNA 分离纯化

质粒抽提，基因组 DNA 制备和 DNA 分离纯化详见第二章材料与方法之 2.2.2.1。

5.2.2.2 PCR 体系

PCR 体系详见第二章材料与方法之 2.2.2.2。

FDH1 的 PCR 条件为：退火温度，60 $^\circ\text{C}$ ；延伸时间，1.5 min (Taq DN polymerase) / 3 min (pfu DNA polymerase)；循环数，25 cycles。

5.2.2.3 PCR 及来源于质粒 DNA 片段的克隆（酶切、末端平滑化和连接）及测序

DNA 片段的克隆（酶切，末端平滑化和连接）及测序详见第二章材料与方法之 2.2.2.3。限制性内切酶的使用或反应体系的配制参考第二章各质粒构建过程的单/双酶切反应体系和连接反应体系，本章就不再一一赘述。

5.2.2.4 氯化钙制备和转化大肠杆菌感受态细胞

质粒 DNA 及 DNA 连接反应产物转化至氯化钙制备的大肠杆菌感受态细胞中。用氯化钙制备和转化大肠杆菌感受态细胞的方法参考《分子克隆实验指南》(中文版第三版)略有改动^[270]。具体步骤详见第二章材料与方法之 2.2.2.4。

5.2.2.5 接合转化法转化运动发酵单胞菌菌株

接合转化法转化运动发酵单胞菌菌株详见第二章材料与方法之 2.2.2.5。

5.2.2.6 用于酶活测定细胞的制备和超声波破碎法制备细胞裂解液

以量筒量取相当于约 6.2 g (约 20 OD mL) 细胞干重 (DCW) 的培养液, 于 4 °C 10,000 × g 离心 5 min。弃上清, 用等体积并冰浴预冷的缓冲液重悬细胞 (该缓冲液对应于测定酶活体系缓冲液)。将细胞悬浮液于 4 °C 10,000 × g 离心 5 min。细胞悬浮/离心操作共重复三次。最终将细胞以 1 mL 冰冷缓冲液悬浮并转移至 1.5 mL 离心管中, 于 4 °C 10,000 × g 离心 5 min。尽去上清液, 并将收集之细胞储存于 -80 °C 超低温冰箱中 (三天内完成胞内酶活测定)。

-80 °C 超低温冰箱中取出冻存细胞, 并迅速加入 1 mL 冰浴预冷的缓冲液 (该缓冲液亦对应于测定酶活体系缓冲液)。将离心管置于冰水浴中, 以 φ3 mm 超声波破碎仪探头进行细胞破碎。破碎条件为: 100 W, 工作 60 s (每工作 5 s, 间隔 15 s, 共 12 个循环)。超声波破碎的细胞裂解液于 4 °C 15,000 × g 离心 30 min, 收集上清液并置于冰浴中待用。

5.2.2.7 NAD⁺ 依赖的甲酸脱氢酶酶活测定

NAD⁺ 依赖的甲酸脱氢酶 (NAD⁺ dependant-formate dehydrogenase, FDH) 催化甲酸脱羧反应生成二氧化碳并将生成的两个电子转移至 NAD⁺。该反应可以通过检测 340 nm 波长下 NADH 的吸光度变化速率测定 FDH 酶活。FDH 酶活单位定义为: 在 30 °C 的反应体系中, 每分钟催化生成 1 mmol NADH 的酶量定义为一个 FDH 酶活单位 (Unit)。FDH 酶活力的测定参考 Susana J. Berr ós-Rivera 等人的方法^[318-319]。在 pH 7.5 10 mM 的磷酸钠缓冲体系中, 添加 1.67 mM NAD⁺, 167 mM 甲酸钠和 100 mM β-巯基乙醇。反应体系在 30 °C 预热 5 min, 以加入 100 μL 的待测样品触发酶催化反应 (可根据样品的 FDH 酶活适当调整样品加入体积), 反应体系的终体积为 1 mL。在配有恒温装置的 Beckman coulter DU800 核酸蛋白分析仪上, 以光程为 1 cm 的石英比色皿检测 340 nm 反应体系吸光值的变化速率, 从而计算生成 NADH 的反应速度。酶活测定体系温度控制为 30 °C, 测定点时间间隔为 3 s。将测得之数据, 选取反应初始阶段线性较好的区域回归成线性方程。以 k_{340nm} 表示线性方程的斜率, 按照如下公式计算酶活 (Unit/μL)。

$$\text{Activity}(\text{Unit}/\text{mL}) = \frac{|k_{340\text{nm}}| \times 1}{6.2 \times V_s}$$

式中:

|k_{340nm}|—每分钟吸光度变化值的绝对值 (340nm 处);

1—1 mL 的反应体积;

6.2—1 μM NADH 的吸光度 (340 nm 处)^[273];

V_s—加入样品的体积 (μL)。

5.2.2.8 蛋白质浓度的测定

采用 Bradford 法^[274] 测定样品中的蛋白质浓度。相关试剂的配置, 标准曲线的制定以及具体操作步骤详见第二章材料与方法之 2.2.2.9。

5.2.2.9 HPLC 标准曲线的制定

本研究以配有 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱、岛津 RID-10A 示差检测器和岛津 LC-20AD 送液泵的 HPLC 系统, 对待测样品的葡萄糖、乙醇、5-羟甲基糠醛、糠醛和甲酸浓度进行分析。HPLC 分析参数为: 柱温设定在 65 °C, 以 5 mM H₂SO₄ 为流动相, 流速

为0.6 mL/min, 进样体积为20 μ L。

5.2.2.9.1 葡萄糖 (Glucose) 和乙醇 (Ethanol) HPLC标准曲线的制定

葡萄糖和乙醇标准溶液的制备及标准曲线的制定详见第二章材料与方法之2.2.2.10。

5.2.2.9.2 5-羟甲基糠醛 (HMF) HPLC标准曲线的绘制:

取洁净称量瓶一只, 用分析天平称取约0.1 g左右的5-羟甲基糠醛于50 mL洁净烧杯中, 并精确记录实际称量值(0.1040 g)。以超纯水于100 mL洁净容量瓶中配制成1.040 g/L的5-羟甲基糠醛标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释, 从而获得0.0325、0.0650、0.1300、0.2600、0.5200和1.0400 g/L浓度梯度的5-羟甲基糠醛标准溶液, 并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以5-羟甲基糠醛出峰面积 (μ v s) 为横坐标, 以进样5-羟甲基糠醛标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标, 绘制5-羟甲基糠醛HPLC标准曲线 (详见附图 5-6)。

5.2.2.9.3 糠醛 (Furfural) HPLC 标准曲线的绘制:

取洁净烘干的 100 mL 容量瓶一只, 用分析天平称取约 0.2 g 左右的分析纯糠醛并精确记录实际称量值 (0.1805 g), 以超纯水于 100 mL 洁净容量瓶中配制成 1.805 g/L 的糠醛标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释, 从而获得 0.113、0.226、0.451、0.903 和 1.805 g/L 浓度梯度的糠醛标准溶液, 并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以 HPLC 糠醛出峰面积 (μ v s) 为横坐标, 以进样糠醛标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标, 绘制糠醛 HPLC 标准曲线 (详见附图 5-7)。

5.2.2.9.4 甲酸 (Formic acid) HPLC 标准曲线的绘制:

取洁净烘干的 100 mL 容量瓶一只, 用分析天平称取约 1.0 g 左右的分析纯无水乙醇并精确记录实际称量值 (1.2281 g), 以超纯水于 100 mL 洁净容量瓶中配制成 12.281 g/L 的甲酸标准溶液。以超纯水按照一定比例进行稀释, 从而获得 0.384、0.768、1.535、3.070、6.141 和 12.281 g/L 浓度梯度的甲酸标准溶液, 并按照浓度从低至高的顺序进行液相分析。以甲酸 HPLC 出峰面积 (μ v s) 为横坐标, 以进样甲酸标准溶液的浓度 (g/L) 为纵坐标, 绘制甲酸 HPLC 标准曲线 (详见附图 5-7)。

5.2.2.10 运动发酵单胞菌ZM4及重组菌的发酵及发酵变量的测定

运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌的发酵操作参考相关文献报道并略有改动^[20, 271]。将 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的运动发酵单胞菌 ZM4 及重组菌甘油管迅速置于 40 $^{\circ}$ C 温水中融化, 并于超净工作台中以 2% (vol/vol) 接种量接种于 RT 抗性培养基中 (20 μ g/mL 四环素)。将接种后的培养液于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置培养约 20-24 h, 直至 OD_{600nm} 约为 2.0。用移液枪吸取菌液重新以 1% (vol/vol) 接种量接种于新鲜的 RT 抗性培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置培养约 10~12 h 直至细胞浓度为 OD_{600nm}=1.0~1.1。将培养至对数中后期的菌种按照 10% (vol/vol) 的接种量接种于三份发酵培养基 (YPMAG20+10 μ g/mL Tc) 中。接种后的发酵液以 5 mL 等份分装于无菌的试管中 (硅胶塞密封), 并将三组平行样置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中发酵培养。发酵过程中, 根据需要隔时取出试管样测定细胞浓度 (OD_{600nm}), 葡萄糖浓度以及乙醇浓度等相关发酵变量 (如需测定酶活, 则以带有硅胶塞的 100 mL 三角摇瓶进行大体积的分装和培养)。

以配有Bio-Rad Aminex HPX-87H色谱柱、岛津RID-10A示差检测器和岛津LC-20AD送液泵的HPLC系统, 对发酵液中的葡萄糖、乙醇、甲酸、5-羟甲基糠醛和糠醛等相关组分的浓度进行分析。HPLC分析参数为: 柱温设定在65 $^{\circ}$ C, 以5 mM H₂SO₄为流动相, 流速为0.6 mL/min。所有的样品均在4 $^{\circ}$ C 15,000 \times g离心力下离心5 min, 收集上清液并以0.22 μ m滤膜进行过滤。滤出液按照标准曲线的标定范围以超纯水进行稀释, 并以20 μ L进样体积进行分析。分析结果以本章材料与方法之5.2.2.9所制定的标准曲线进行出峰面积与浓度间的换算。

5.2.2.11 运动发酵单胞菌胞内NAD⁺和NADH的提取及浓度测定

运动发酵单胞菌胞内 NAD^+ 和 NADH 的提取参考Leonardo M.等人之文献报道^[320]。将1.0 mL菌液置于1.5 mL Eppendorf管中,并于 $15,000 \times g$ 离心1 min。尽弃上清液,并将细胞迅速置于液氮中速冻2 min。以移液器分别取250 μL 0.2 M HCl (用于 NAD^+ 提取)和0.2 M NaOH (用于 NADH 提取)加入含有细胞沉淀的Eppendorf离心管中,并迅速置于 100°C 甘油浴中加热10 min。迅速将 100°C 甘油浴加热10 min的离心管置于冰浴中冷却5 min。分别加入250 μL 0.1 M NaOH或0.1 M HCl分别中和提取液中多余的酸或碱。于漩涡振荡器上迅速震荡混匀,随后于 4°C , $5,000 \times g$ 离心5 min除去裂解的细胞碎片。以移液器小心吸取上清液至干净的离心管中,并置于 -80°C 超低温冰箱中保存待测(48 h内完成样品的测定)。

分别将含有 NAD^+ 和 NADH 的细胞提取液按照Bernofsky和Swan报道之方法进行测定^[321]。以噻唑兰(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)作为指示剂及电子最终受体,接受来源于乙醇的电子。反应体系中 NADH (或 NAD^+)的浓度在一定范围内与MTT于570 nm下的显色速率线性相关。 NAD^+ 和吩嗪硫酸乙酯(phenazine ethosulfate, PES)可通过氧化态和还原态的交替转化,建立电子的传递链。来源于酵母的ADHII作为 NAD^+ 依赖型的乙醇脱氢酶,特异的识别反应体系中的 NADH 和 NAD^+ ,从而将整个循环耦合氧化还原反应体系的反应速度和辅酶I的浓度进行关联。

测定 NAD^+ 和 NADH 浓度的循环耦合反应体系总体积为1 mL,其中含有:100 μL of 1.0 M Bicine (pH 8.0), 200 μL 辅酶I提取液,100 μL 16.6 mM PES, 100 μL 4.2 mM MTT, 100 μL 无水乙醇和100 μL 40 mM EDTA (pH 8.0)。反应体系于 30°C 预热3 min并以添加10 unit来源于酵母的ADHII触发检测反应体系。加入ADHII后,将Eppendorf离心管迅速于漩涡混合器上震荡3 s,并转移反应液至1 cm光程的1 mL玻璃比色皿中,于带有恒温装置的Beckman coulter DU800核酸蛋白分析仪上于570 nm处检测吸光值的变化10 min。以分析纯的 NAD^+ 和超纯水配置一系列不同浓度的 NAD^+ 标准溶液(1 μM 至200 μM),并以上述反应体系测定MTT于570 nm处吸光值变化。以反应初始阶段线性相关系数较好的MTT吸光值变化速率为横坐标,以 NAD^+ 标准溶液的浓度(μM)为纵坐标,绘制辅酶I的浓度标准曲线,并以此计算待测样品中 NADH (或 NAD^+)之浓度。

5.2.2.12 玉米秸秆水解液的制备

5.2.2.12.1 玉米秸秆的清洗及干燥

玉米秸秆水解液(Corn Stover Hydrolysate, CSH)的制备取材于2006年吉林省生产玉米的农业废弃物——玉米秸秆。首先将粉碎大小为2~3 cm的玉米秸秆碎块以自来水悬浮清洗去除大量的泥沙、金属和石块,随后以压榨机压滤去除大量的水分。将清洗后的玉米秸秆于 105°C 烘干8-12 h至恒重,并将其储存于真空袋中抽去空气备用。以锤式粉碎机粉碎干燥的秸秆,并以20-60目筛网过筛。取直径约为0.5 cm颗粒大小的玉米秸秆碎末用于稀酸预处理。

5.2.2.12.2 玉米秸秆的稀酸蒸汽预处理

本研究中硫酸的使用剂量为2% (wt/wt),即每100 g干燥玉米秸秆原料与2 g的分析纯硫酸混合。其中硫酸预先配置成4% (wt/wt)的稀硫酸储液用于料液的混合。将800 g玉米秸秆干物料与400 g稀硫酸混合均匀,并于室温预浸12 h。将稀酸过夜预浸的玉米秸秆湿物料于预处理反应器内进行蒸汽预处理。预处理条件为: 190°C 维持3 min(升温时间为4 min,降压时间为2 min),蒸汽压力为1.1~1.2 MPa。将稀酸蒸汽预处理后的物料于冷水浴中冷却后保存于 4°C 冰箱中待用。

5.2.2.12.3 稀酸蒸汽预处理玉米秸秆的糖化

首先,将预处理后的玉米秸秆约10 g于 105°C 烘箱内烘干6~8 h至恒重,并通过烘干前后的质量差值计算预处理后秸秆的固含量(C_S , wt/wt)。

$$C_S = (W_T - W_C) / (W_T - W_C) \times 100\% \quad (5-1)$$

其中:

W_C —干燥平皿的质量 (g);

W_I —称取预处理物料后平皿和湿物料的初始总质量 (g);

W_T —烘干物料至恒重后平皿和干物料的最终总质量 (g);

其中干燥过程中其它挥发性组分引起的误差忽略不计。

随后,精确称重 5.0 g 预处理后的玉米秸秆并加入 10 mL 蒸馏水以 20% (C_A , wt/wt) NaOH 调整 pH 值为 5.0, 以 pH 计检测体系的 pH 值。精确记录所添加的 NaOH 的质量 (W_A , g)。糖化过程中所需 Accellerase 纤维素酶的用量 (V_E , mL) 基于预处理后原料 (W_W , g) 的干重 (W_D , g) 进行配比 (每克干物料需要添加 15 FPU Accellerase)。其中湿原料中所含有的干物料质量按照本章 5.2.2.12.3 测定的固含量 (C_S) 进行计算, 所使用的 Accellerase 纤维素酶根据酶活单位计算所需的体积并于天平上称重 (W_E , g)。Accellerase 1000 滤纸酶活的测定方法参考文献报道^[322]。

按照以下公式计算以稀酸蒸汽预处理原料制备 30% 固含量 ($C_{30\% S}$, wt/wt) 玉米秸秆水解液反应体系所需额外补加的去离子水 (W_{Extra} , g):

$$C_{30\% S} = W_D / (W_W + W_A + W_E + W_{Extra}) \times 100\% \quad (5-2)$$

$$W_D = W_W \times C_S \quad (5-3)$$

$$W_{Extra} = W_W \times C_S / C_{30\% S} - (W_W + W_A + W_E) = W_D / C_{30\% S} - (W_W + W_A + W_E) \quad (5-4)$$

其中, $C_{30\% S} = 30\%$ 。

稀酸蒸汽预处理玉米秸秆制备 30% 固含量水解液的步骤如下: 向 5L 带有螺带搅拌桨的发酵罐中加入一定量 (W_{Extra}) 去离子水, 并于 115°C 下灭菌 20 min。将罐体置于自动温控和酸碱控制的发酵装置上, 设定水解糖化温度为 50°C, 螺带搅拌桨转速为 200 rpm。然后一次性加入所需的纤维素酶 (W_E , g) 和 400 g 湿物料, 以 20% (C_A , wt/wt) NaOH 控制 pH 值为 5.0。随后定时加入固含量已知的预处理物料, 每隔约 30 min 补料 100 g 预处理后的湿物料。大约在 6 h 内将所有物料全部加完, 使所加物料在发酵罐中的固体含量为达到 30% (wt/wt)。维持 50°C, 200 rpm 的糖化条件 48 h, 整个过程以 20% (wt/wt) 的 NaOH 控制 pH 值为 5.0 左右 (糖化过程中加入的 NaOH 量极少, 其重量和体积忽略不计)。

待糖化结束后, 将糖化醪以 20% (wt/wt) 的 NaOH 调整 pH 值为 6.0, 并于 10,000 × g 离心 15 min。取上清液于 115°C 下蒸汽灭菌 20 min, 并于无菌离心杯中 10,000 × g 离心 15 min。于无菌环境下以灭菌干燥滤纸过滤除去蒸汽灭菌过程产生的沉淀和部分悬浮物。取 20 mL 过滤后的无菌水解液以 pH 计测定 pH 值, 并以一定体积蒸汽灭菌的 20% (C_A , wt/wt) NaOH 调整 pH 值至 6.0。以相同 NaOH 添加比例调整灭菌过滤后水解液的 pH 值, 并密封于无菌蓝盖瓶中 4 °C 储存待用。该溶液即为所需 30% (wt/wt) 固含量的水解液发酵基质 (Corn Stover Hydrolysate 30%, CSH30)。水解液中葡萄糖、甲酸、5-羟甲基糠醛和糠醛的含量按照本章材料与方法之 5.2.2.9 进行分析和计算。

5.2.2.13 运动发酵单胞菌重组菌的玉米秸秆水解液发酵培养

按本章材料与方法之 5.2.2.12 制备的 CSH30, 以相同浓度的葡萄糖溶液按照比例进行稀释, 从而得到具有不同抑制物浓度的水解液稀释液。按照本章材料与方法之 5.2.2.10 制备运动发酵单胞菌 *FDHI* 基因重组菌 (及对照菌株) 的二级种子, 并以 10% (vol/vol) 接种量接种于稀释后的玉米秸秆水解液中。隔时取样并对样品中的葡萄糖、乙醇、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛浓度进行分析和计算。

5.3 结果与讨论

5.3.1 运动发酵单胞菌 *FDHI* 基因表达重组菌的构建

5.3.1.1 pHW20a-Pgap-fdh 表达质粒的构建

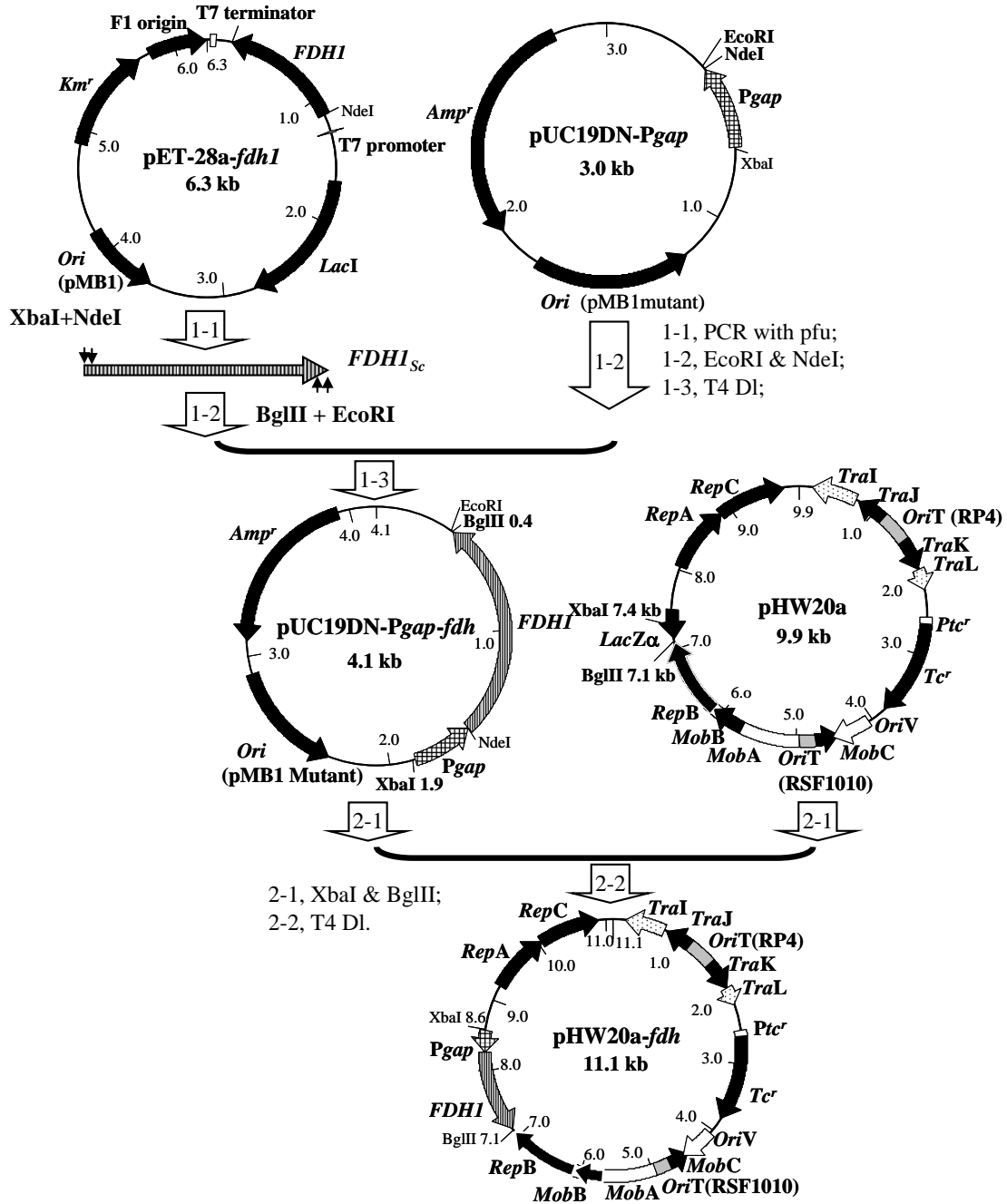


图 5.1 甲酸脱氢酶基因表达质粒构建技术路线图

Fig. 5.1 Scheme of constructing vector for expressing *FDHI* in *Z. mobilis* ZM4

The plasmid pET-28a-*fdh1* was kindly provided from Prof. LQ Fan^[316]. T4 D1, T4 DNA ligase; T4 Dp, T4 DNA polymerase. 1-1, the first numeral in the serial number represented the sequence of plasmid would be constructed in the whole steps, and the second numeral indicated the order of the molecular manipulation steps during plasmid construction with the enzymes following the serial number. White arrows and bands indicated overlap genes; arrows with dots, incomplete CDS of the genes; arrows with grids, *Pgap*; arrows with stripes, *FDHI* CDS. Restriction sites in boldface style indicated the sites which would be used in the next genetic manipulations.

根据文献报道，来源于酵母的 *FDHI* 基因可以催化甲酸代谢生成二氧化碳并同时实现 NAD^+ 向 $NADH$ 的转换。利用甲酸脱氢酶催化反应的这一特点，人们已经成功的将其作为 $NADH$ 再生体系应用于 L-丙氨酸发酵以及手性化合物的催化制备等生物过程中，并通过菌种筛选和定向进化等手段获取了对 $NADP^+$ 和 NAD^+ 表现出不同偏好性的甲酸脱氢酶^[323-326]。为了在运动发酵单胞菌中建立甲酸代谢途径的同时可以利用水解液中的甲酸

实现NADH的再生，并借此研究甲酸代谢途径及其耦合之NADH再生体系对运动发酵单胞菌耐受（或代谢）甲酸及咪唑类抑制物的影响。本研究以华东理工大学范立强教授提供的*FDHI*基因表达质粒pET-28a-*fdh1*作为NAD⁺-依赖型甲酸脱氢酶编码基因的来源，并借助本学位论文第三章构建之pUC19DN-P*gap*质粒实现P*gap*与*FDHI* CDS序列的连接。借助于pHW20a穿梭质粒，将P*gap*-*fdh*表达元件克隆至pHW20a，从而构建了一个可以在运动发酵单胞菌细胞内表达*FDHI*基因的质粒——pHW20a-*fdh*（详细技术路线见图 5.1）。

5.3.1.1.1 借助pUC19DN-P*gap*质粒进行P*gap*-*fdh*表达元件的组装

为了借助pUC19DN-P*gap*质粒进行*FDHI*基因CDS与P*gap*启动子的组装，本研究首先以寡核苷酸*FDHI*-S和*FDHI*-A为引物，按照本章材料与方法之5.2.2.2以pET-28a-*fdh1*质粒为模板利用pfu DNA polymerase制备*FDHI*基因CDS序列。经Omega PCR Purification Kit纯化的PCR产物和pUC19DN-P*gap*质粒分别以NdeI和EcoRI进行双酶切，并以0.7%琼脂糖核酸电泳回收酶切产物。随后，将回收纯化的pUC19DN-P*gap*（NdeI和EcoRI，3.0 kb）和*FDHI*（NdeI和EcoRI，1.1 kb）DNA片段于16℃水浴连接反应12 h。连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中，并以LA抗性平板于37℃恒温培养箱中对转化子筛选培养。随机挑选6个菌落重新划线于新鲜的LA抗性平板上于37℃恒温培养箱中培养12 h。挑取单菌落接种于LA液体抗性培养基中，并于37℃ 220 rpm培养12 h。以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒，并以EcoRI和NdeI单/双酶切连接反应和*FDHI*基因PCR对筛选得到的转化子进行鉴定。酶切反应产物和PCR产物以0.7%琼脂糖核酸电泳确认结果（图 5.2）。

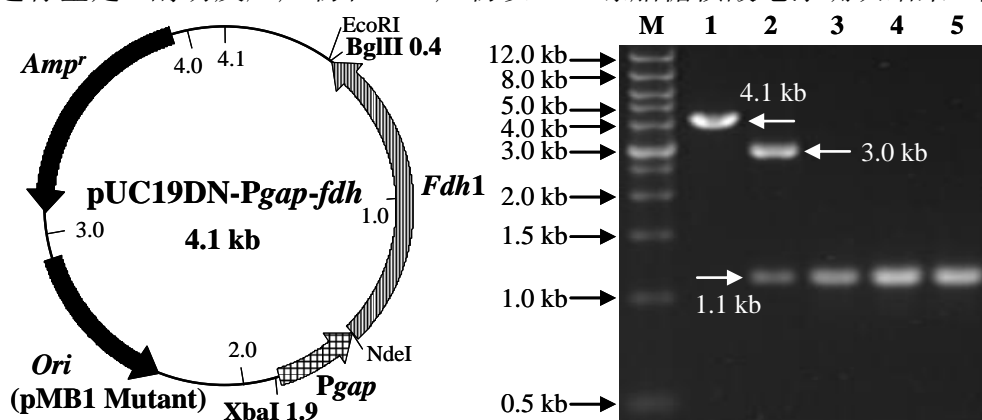


图 5.2 pUC19DN-P*gap*-*fdh*质粒图以及该质粒鉴定之琼脂糖核酸电泳图谱

Fig. 5.2 The map of pUC19DN-P*gap*-*fdh* and the agarose gel electrophoresis graph for its identification. Lane M, marker (wide range 500 bp-12.0 kb); lane 1, pUC19DN-P*gap*-*fdh* (EcoRI); lane 2, pUC19DN-P*gap*-*fdh* (EcoRI & NdeI); lane 3, pUC19DN-P*gap* (EcoRI & NdeI); lane 4, *FDHI* PCR products with pUC19DN-P*gap*-*fdh* as the template; lane 5, *FDHI* PCR products with pET-28a-*fdh1* as the template.

为了进一步确认克隆结果，将鉴定后的菌株提交测序（测序引物M13-47和M13-48，两端各测定1个反应）。测序结果与已公布*FDHI*质粒全序列（Gene ID: 84626310）一起提交NCBI网站，并使用Blast在线软件进行序列比对分析（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>，结果见图 5.3）。根据Blast分析结果可知，已克隆序列与公布之酵母S288c的*FDHI*基因CDS序列完全匹配（100% identity），由此可初步断定，*FDHI*基因已经借助于pUC19DN-P*gap*质粒实现了*FDHI*基因CDS与P*gap*启动子的连接。新构建的质粒命名为pUC19DN-P*gap*-*fdh*。

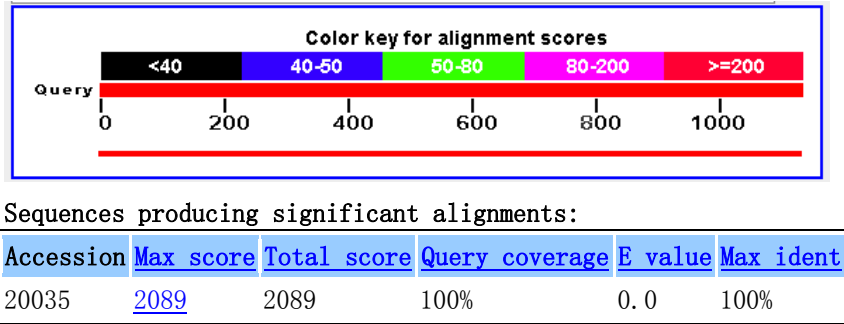


图 5.3 克隆之基因片段测序序列与*S. cerevisiae*来源*FDH1*公布之基因序列比对结果
Fig. 5.3 Blasting results of cloned gene sequence with *FDH1* from *S. cerevisiae*.

5.3.1.1.2 运动发酵单胞菌*FDH1*表达质粒 (pHW20a-*fdh*) 的构建及转化

为了实现*FDH1*基因在运动发酵单胞菌ZM4菌株中的表达，本章利用pHW20a穿梭质粒，将*Pgap-fdh*表达元件通过XbaI和BglII两酶切位点从pUC19DN-*Pgap-fdh*质粒克隆至pHW20a相应的位点中。通过XbaI和BglII两限制性内切酶的单/双酶切反应和*FDH1*基因PCR，对克隆之基因片段进行了鉴定，从而初步确认表达质粒pHW20a-*fdh*的构建（图5.4）。

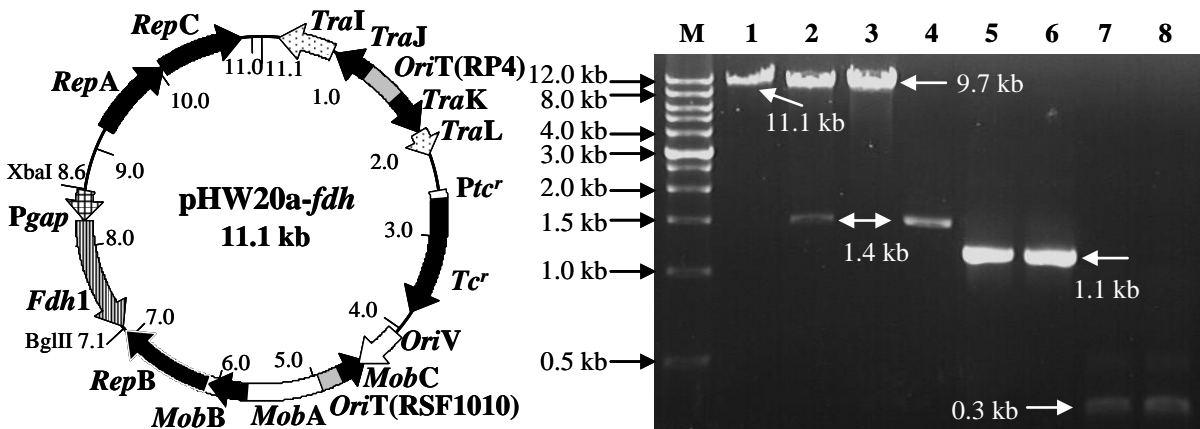


图 5.4 pHW20a-*fdh*质粒图及其鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 5.4 Plasmid map of pHW20a-*fdh* and agarose gel electrophoresis graph for its identification
Lane M, marker (wide range 500 bp-12 kb); lane 1, pHW20a-*fdh* (XbaI, 11.1 kb); lane 2, pHW20a-*fdh* (XbaI & BglII, 1.4 kb & 9.7 kb); lane 3, pHW20a (XbaI & BglII, 9.7 kb); lane 4, *Pgap-fdh* (XbaI & BglII, 1.4 kb); lane 5, *FDH1* PCR products with pHW20a-*fdh* as the template (1.1 kb); lane 6, *FDH1* PCR products with pET-28a-*fdh1* as the template (1.1 kb); lane 7, *Pgap* PCR products with pHW20a-*fdh* as the template (0.3 kb); lane 8, *Pgap* PCR products with *Z. mobilis* ZM4 chromosome as the template (0.3 kb).

由图 5.4分析可以初步断定，*Pgap-fdh*表达元件已经借助于XbaI和BglII两个酶切位点被克隆至pHW20a穿梭质粒中。新构建的表达质粒命名为pHW20a-*fdh*。为了进一步确认质粒的构建结果，在随后的研究中将该质粒转化至运动发酵单胞菌中，并通过FDH酶活的测定对质粒和重组菌的构建做进一步的确认。

5.3.1.2 *FDH1*表达质粒pHW20a-*fdh*的转化及重组菌的鉴定

参考本章材料与方法之5.2.2.5将*FDH1*基因表达质粒pHW20a-*fdh*通过结合转移转化至运动发酵单胞菌ZM4野生菌株中。通过RMNT抗性平板的筛选以及划线培养，挑取单菌落按照材料与方法之5.2.1.4对菌株进行培养和保存。部分菌体细胞同时以Omega Plasmid Mini Kit抽取质粒DNA。以来源于大肠杆菌DH5α (pHW20a-*fdh*) 的质粒为对照，通过NdeI和BglII双酶切反应和*FDH1*基因的PCR对筛选重组菌质粒进行鉴定（图 5.5）。

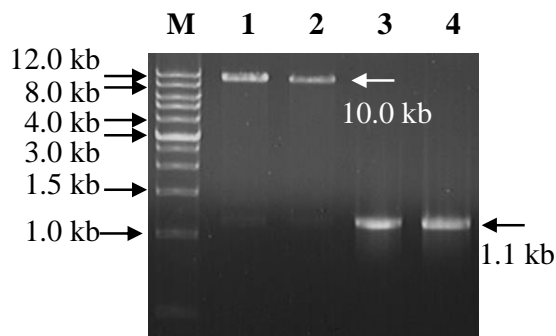


图 5.5 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 鉴定之琼脂糖核酸电泳图

Fig. 5.5 Agarose gel electrophoresis graph of identifying *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*fdh*)
Lane M, marker (wide range 500 bp-12 kb); lane 1, pHW20a-*fdh* from *Z. mobilis* ZM4 transformants (NdeI & BglII, 10.0 kb & 1.1 kb); lane 2, pHW20a-*fdh* from *E. coli* DH5 α recombinants (NdeI & BglII, 10.0 kb & 1.1 kb); lane 3, *FDHI* PCR products with pHW20a-*fdh* from *Z. mobilis* ZM4 transformants as the template (1.1 kb); lane 4, *FDHI* PCR products with pHW20a-*fdh* from *E. coli* DH5 α recombinants as the template (1.1 kb).

根据图 5.5分析可以初步推测, *FDHI*表达质粒pHW20a-*fdh*极可能已经转化至运动发酵单胞菌ZM4菌株中。为了进一步确认质粒构建和转化结果, 在随后的发酵过程研究中, 将对重组菌胞内的NAD⁺-依赖型FDH酶活做进一步确认。按照本章5.2.2.10之方法进行运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌的发酵培养, 并按照材料与方法之5.2.2.6制备细胞裂解液以5.5.2.7之所述方法测定NAD⁺-依赖型FDH比酶活。

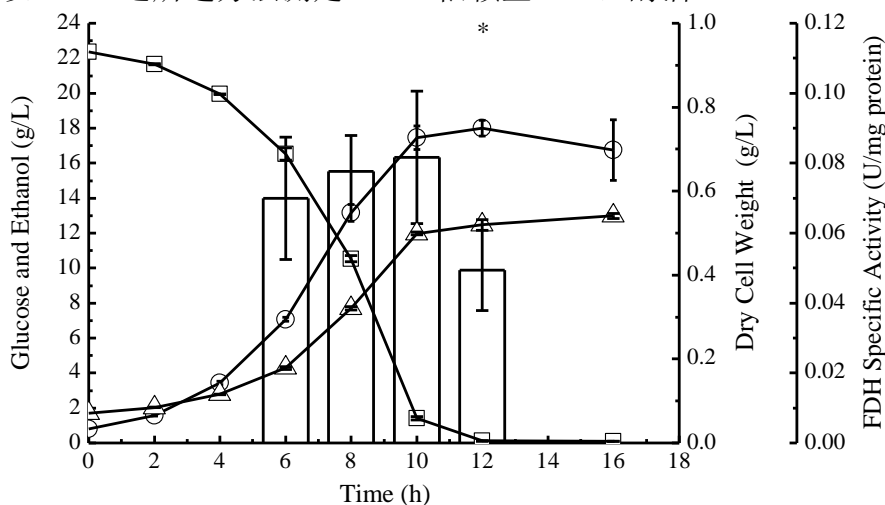


图 5.6 基因重组菌运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 胞内FDH酶活分析

Fig. 5.6 FDH activity analysis of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*fdh*) recombinant strain
Squares, glucose; triangles, ethanol; circles, dry cell weight; columns, FDH specific activity; star, significant difference analyzed by *t*-test ($P < 0.05$).

由图 5.6分析可知, 通过在整个发酵过程中对重组菌细胞裂解液的FDH酶活测定发现, FDH的比活在葡萄糖完全耗竭前始终保持在较为稳定的水平, 这与文献报道*gap*基因在运动发酵单胞菌中组成型表达相一致。当菌体细胞生长至稳定期即葡萄糖完全耗竭时 (12 h), FDH的酶活开始显著降低。此结果亦与文献报道之*gap*基因在葡萄糖基质耗竭时停止转录相一致。由于酶活对相应基因转录水平的反应具有延迟效应, 因此在发酵 12 h时FDH比酶活才表现出降低趋势。以FDH纯酶的酶活数据 (101.2 U/mg protein) 及在发酵时间为 10 h时重组菌胞内FDH比活数据 (0.08 ± 0.02 U/mg protein) 计算可知, 重组菌胞内表达之FDH约占细胞可溶性蛋白的0.08%。该基因的表达水平明显低于运动发酵单胞菌ZM4胞内*gap*基因的表达水平 (*gap*基因编码蛋白的表达水平可以占胞内可溶性

蛋白的5%)。重组菌细胞中*FDH1*基因在*gap*启动子调节下表现出如此低的酶活水平,这很有可能是由于异源基因在运动发酵单胞菌菌株中表达的翻译效率较低所致(包括密码子偏好型、mRNA的稳定性、以及受到mRNA或者编码序列二级结构的影响等因素)。

5.3.2 *FDH1*基因表达对运动发酵单胞菌甲酸代谢及甲酸耐受性的促进作用

按照本章材料与方法之5.2.2.10,通过在培养基中加入不同浓度的甲酸钠,并以运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a)为对照菌株,研究*FDH1*基因的表达对运动发酵单胞菌乙醇发酵以及甲酸耐受性的影响。当发酵培养至10 h时,取样分析细胞浓度(OD_{600nm})、葡萄糖浓度、乙醇浓度和甲酸浓度等相关发酵变量。以培养基接种后甲酸的浓度为横坐标,以培养于不含甲酸培养基的两菌株的细胞干重分别为100%,绘制甲酸对菌株生长的抑制曲线(见图 5.7),其中发酵过程中葡萄糖和甲酸的消耗以及乙醇的生成等相关信息统计于表 5.3。

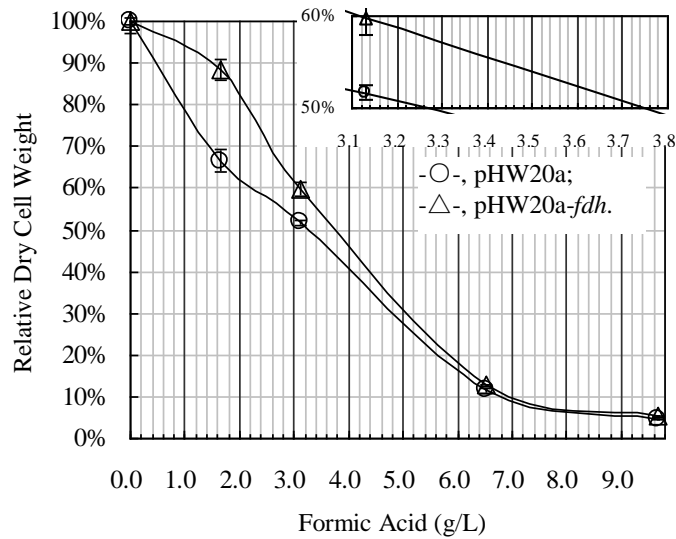


图 5.7 *FDH1*表达对运动发酵单胞菌ZM4菌株甲酸耐受性能的促进作用

Fig. 5.7 The improvement on formic acid tolerance by expressing *FDH1* in *Z. mobilis* ZM4. Closed Triangles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*fdh*); white circles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). The inhibition curves of two strains were simulated with the triplicate independent experiments data and the standard deviation was indicated by the error bar. The half inhibition concentrations of formic acid to two strains were read accordingly.

表 5.3 表达*FDH1*基因对运动发酵单胞菌ZM4菌株乙醇发酵的改善

Table 5.3 Improvements on ethanol fermentation by expressing *FDH1* in *Z. mobilis* ZM4

| Strains | Formic acid (g/L) | ΔDCW (g/L) | ΔGlucose ^a (g/L) | ΔFormic acid ^a (g/L) | ΔEthanol (g/L) | Y _{ethanol} ^T (%) |
|---|-------------------|------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| <i>Z. mobilis</i> ZM4 (pHW20a) | 0.00 | 0.90±0.01 | -21.03±0.38 | — | 10.39±0.08 | 96.89±0.98 |
| | 1.67 | 0.59±0.03 | -22.31±0.62 | 0 | 10.65±0.21 | 93.61±0.74 |
| | 3.13 | 0.44±0.01 | -22.35±0.24 | 0 | 10.80±0.17 | 94.71±0.51 |
| | ^b 6.51 | 0.15±0.15 | -21.21±0.44 | 0 | 10.22±0.06 | 94.50±1.40 |
| | 9.66 | 0.00±0.00 | -2.63±1.90 | 0 | 0.48±0.00 | — |
| <i>Z. mobilis</i> ZM4 (pHW20a- <i>fdh</i>) | 0.00 | 0.75±0.02 | -22.25±0.01 | — | 10.76±0.29 | 99.20±1.90 |
| | 1.67 | 0.63±0.02 | -21.99±0.01 | -0.48±0.00 | 11.20±0.01 | 99.90±0.15 |
| | 3.13 | 0.37±0.07 | -20.15±0.62 | -0.35±0.11 | 10.66±0.35 | 103.16±0.01 |
| | ^b 6.51 | 0.06±0.00 | -20.96±0.74 | -0.35±0.07 | 10.70±0.46 | 100.28±0.87 |
| | 9.66 | 0.00±0.00 | -0.70±0.25 | -0.05±0.09 | 0.69±0.06 | — |

^a The minus signs indicate the component consumed during the fermentation period;

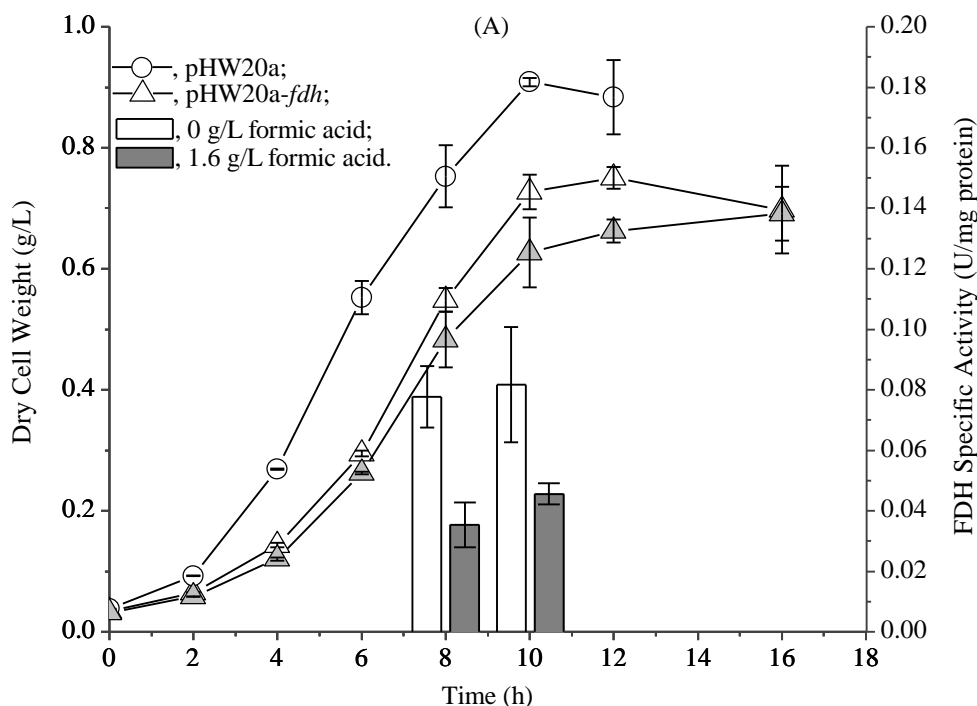
^b The shadowed data were determined at the 24-h fermentation time when glucose was completely consumed.

图 5.7所示之结果可知, 与对照菌株运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 相比, *FDH1* 基因表达在一定程度上提高了运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌对甲酸的耐受性, 其甲酸的半数抑制浓度 ($IC_{50}=3.74$ g/L) 比对照株的数值 ($IC_{50}=3.27$ g/L) 提高了约 0.47 g/L。同时根据表 5.3中信息发现, 通过*FDH1*基因的表达, 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌具有了一定的甲酸代谢能力, 当葡萄糖完全消耗完毕时, 其发酵过程中乙醇的最终收率可达100%左右, 比对照组高约8.5~16.6%, 基本上接近或超过乙醇发酵的理论收率。推究该现象可能是由于*FDH1*基因表达重组菌在代谢甲酸的过程中可能借助于FDH耦合的NADH再生体系生成了一部分NADH, 从而促进来源于酵母提取物的部分碳源以及接种过程中引入的部分代谢中间产物向乙醇的转化所致。为了证实该结论, 在随后的研究分别研究了运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 和运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 两菌株细胞内的NAD⁺/NADH辅酶的差异, 以及甲酸的添加对运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌胞内的NAD⁺/NADH辅酶浓度的影响。

5.3.3 NADH再生体系在运动发酵单胞菌中的建立及对胞内NADH水平的改善

为了确认NADH再生体系在ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌细胞内的建立及其对胞内NAD⁺/NADH水平的影响, 随后以不含有甲酸的YPMAG20发酵培养基为对照, 通过在此培养基中添加甲酸从而形成了NADH再生体系。通过将重组菌在两种不同的培养基中进行培养, 并将生长至对数和对数末期的细胞按照本章材料与方法之5.2.2.11对胞内NAD⁺和NADH辅因子进行抽提及浓度测定。同时, 将来源于YPMAG20发酵培养基培养之运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 胞内NAD⁺和NADH等相关数据列于图 5.8进行比较。

根据图 5.8 (A)分析可知, 培养于YPMAG20培养基中的*FDH1*基因重组菌, 其细胞裂解液FDH比酶活单位为0.08 U/mg protein, 大约为来源于甲酸培养基细胞 (约为0.04 U/mg protein) 的两倍。虽然运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌中*FDH1*基因以组成型表达的*gap*基因启动子进行调控表达, 然而甲酸明显的抑制了*FDH1*基因的表达水平。由此可见, 甲酸可能会对运动发酵单胞菌中一些基因的表达产生显著的影响。



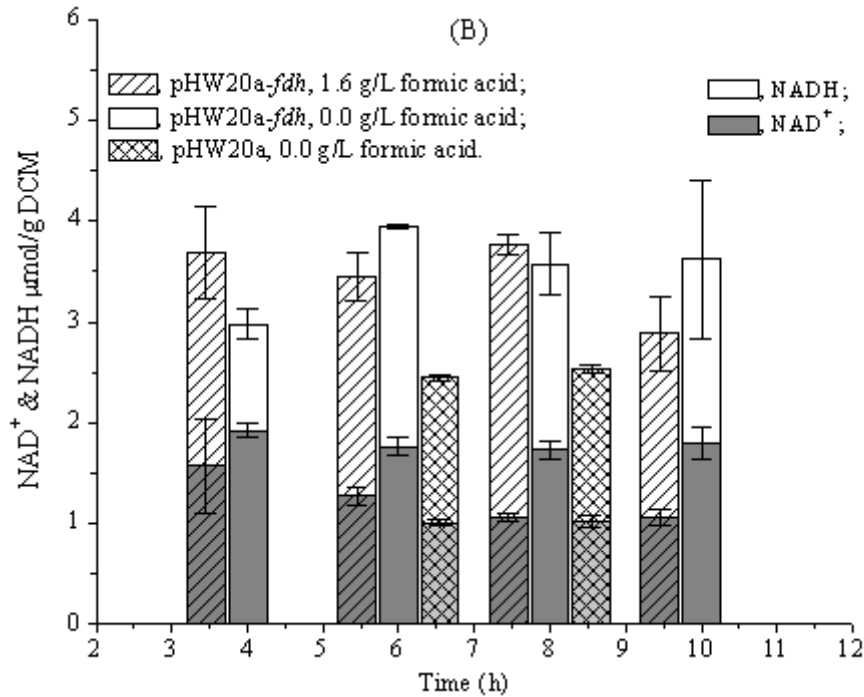


图 5.8 NADH再生体系的建立及对运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-fdh) 胞内NADH水平的改善

Fig. 5.8 The establishment of NADH regeneration system in *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh) and its improvement on NADH level in the recombinant cells

(A), Triangles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh); circles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a); columns, FDH specific activities. Shadowed symbols, the detected parameters of the strain incubated in the presence of 1.6 g/L formic acid; white symbols, the detected parameters of the strains incubated without formic acid. (B), Grey columns, NAD⁺; white columns, NADH; columns with strips, the NAD⁺/NADH detected in *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh) incubated with the presence of formic acid; columns without patterns, the NAD⁺/NADH detected in *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh) incubated without formic acid; columns with grids, the NAD⁺/NADH detected in *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a) incubated without formic acid.

将运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 和ZM4 (pHW20a-fdh) 两种菌株置于相同的发酵体系中进行培养, 并对处于对数期的胞内NAD⁺和NADH浓度进行测定(图 5.8)。运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 菌株胞内的NAD⁺/NADH代谢池(NAD⁺/NADH pool)约为2.5 μmol/g DCW, 其大小仅为重组菌胞内NAD⁺/NADH代谢池(4.0 μmol/g DCW)的5/8左右。在不含有甲酸的培养基中运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a) 菌株的生长速度、最终细胞浓度以及NAD⁺/NADH代谢池大小均与ZM4 (pHW20a-fdh) 菌株具有明显差异。由此可见, *FDHI*这一外源基因的表达不仅对菌体的生长产生了影响, 另外对于宿主胞内NAD⁺/NADH代谢池的大小也产生了扰动。然而, 相同培养条件下两菌株胞内NADH/NAD⁺比值却表现出了相似性(对照菌株约为1.46, 工程菌株约为0.97)。由此可见, 虽然*FDHI*基因在重组菌中进行了有效的表达, 然而由于缺乏甲酸这一NADH再生体系的反应底物, 因此并不会对宿主细胞内的氧化还原水平产生显著的影响。

虽然在不同培养条件下, 重组菌胞内的NAD⁺/NADH代谢池大小未见显著差异(均约为4.0 μmol/g DCW), 然而NAD⁺/NADH这一比值却发生了显著的变化。在甲酸培养基中生长的运动发酵单胞菌ZM4(pHW20a-fdh)菌株, 其胞内NAD⁺/NADH比值约为1.84, 比培养于YPMAG20培养基中的重组菌胞内NADH浓度有了明显的提高。由此可以推断, 通过*FDHI*基因在运动发酵单胞菌中的表达及甲酸培养基中的发酵培养, 实现了NADH再生体系在重组菌中的建立, 并有效的增大了宿主胞内NADH在NAD⁺/NADH代谢池中所占的比重, 实现了宿主细胞内还原势的增强。

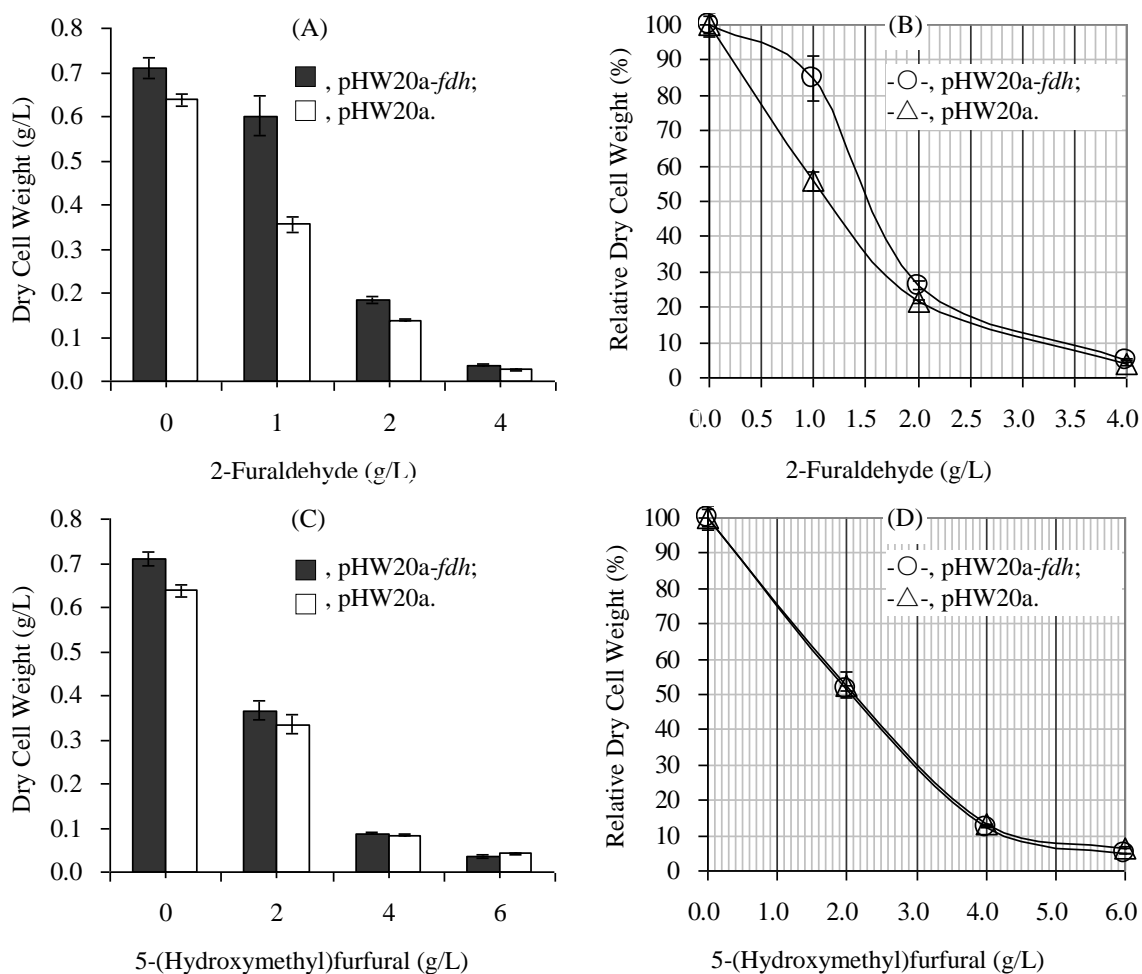


图 5.9 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-fdh) 耐受呋喃类抑制物的性能评价

Fig. 5.9 Evaluation of the improved furan inhibitors tolerances of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh). Grey columns and circles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh); white columns and triangles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). The maximum cell densities of two strains grown in the medium only with 1.6 g/L formic acid at the 10h fermentation time were regarded as 100% and the relative cell densities with the addition of other inhibitors with different concentration were calculated respectively.

5.3.4 NADH再生体系对运动发酵单胞菌呋喃类抑制物耐受性能改善作用的评价

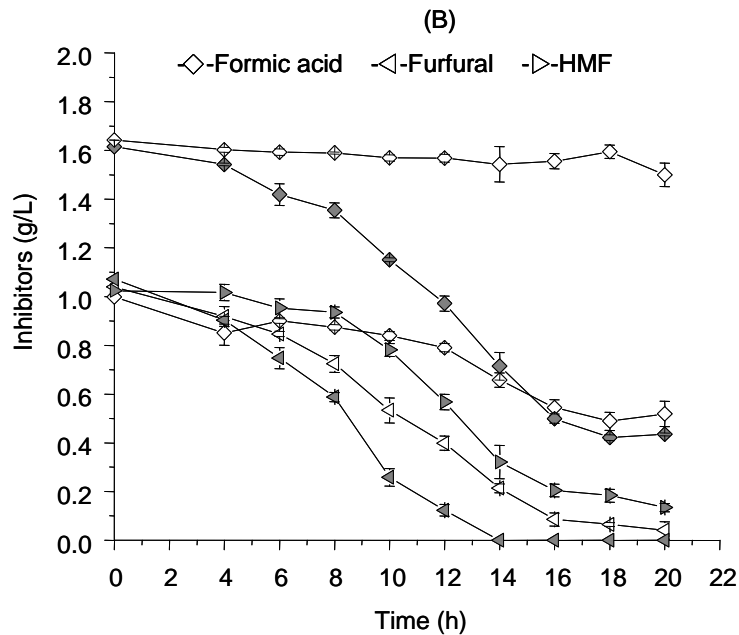
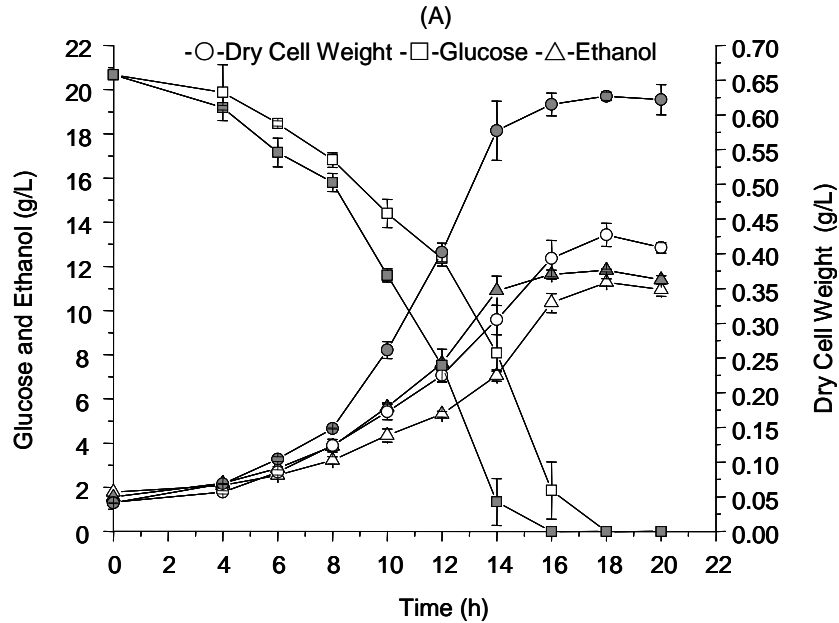
根据以往文献报道, 在乙醇发酵菌株代谢呋喃类抑制物的过程中, 其中转化为糠醇和羟甲基糠醇的代谢途径涉及了各种醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase) 介导的醛基还原反应^[311, 315]。为了验证本研究建立之NADH再生体系对运动发酵单胞菌耐受呋喃类抑制物性能的影响, 随后的研究中通过在YPMAG20发酵培养基中添加甲酸及呋喃类抑制物, 分别考察糠醛和5-羟甲基糠醛对重组菌生长的抑制作用。在发酵培养10 h时, 以不含有呋喃类抑制物对照组的细胞浓度为100%, 分别绘制呋喃抑制物对两菌株的抑制曲线。(图 5.9)。

由图 5.9之结果分析可知, NADH再生体系的建立并未改善宿主菌株对5-羟甲基糠醛的耐受性 (对两种菌株的半数抑制浓度均约为2.10 g/L); 而NADH再生体系的建立将糠醛对运动发酵单胞菌的半数抑制浓度从1.15 g/L提高至1.50 g/L。由此可见, NADH再生体系的建立, 可以在一定程度上提高运动发酵单胞菌对糠醛的耐受性。推测两菌株对5-羟甲基糠醛耐受性相近的原因可能是由于运动发酵单胞菌参与5-羟甲基糠醛代谢反应的相关酶对NADH或该抑制物的亲和能力较弱所致。由于运动发酵单胞菌代谢糠醛和5-

羟甲基糠醛的代谢途径尚不明晰，因此以上种种猜测亦需要在随后的研究中进行解答。

5.3.5 NADH再生体系对运动发酵单胞菌代谢甲酸和呋喃类化合物的促进作用

为了研究和确认 *FDHI* 基因重组菌在甲酸、糠醛和5-羟甲基糠醛等抑制物共存体系中的发酵性能，本研究在 YPMAG20 合成培养基中添加浓度等同于 CSH30 的以上各类抑制物（其中糠醛和5-羟甲基糠醛的浓度均为 1.0 g/L，甲酸浓度约为 1.6 g/L）。每隔4小时取样测定发酵液中的细胞浓度 (OD_{600nm})、葡萄糖浓度、乙醇浓度和各抑制物的浓度。同时，本实验以含有空质粒的运动发酵单胞菌 ZM4 (pHW20a) 菌株作为对照，通过提取测定两种菌株胞内 NAD^+ 和 $NADH$ 的浓度，从而对 *FDHI* 基因表达后 $NADH$ 再生体系对运动发酵单胞菌代谢呋喃类抑制物能力的影响进行分析（图 5.10）。



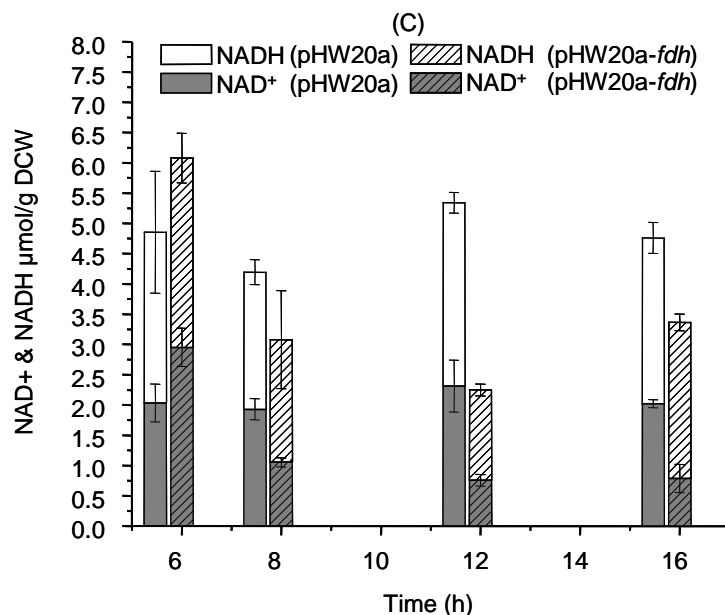


图 5.10 NADH再生体系对运动发酵单胞菌代谢呋喃类化合物的促进作用

Fig. 5.10 The strengthened furan compounds metabolisms in

Z. mobilis ZM4 (pHW20a-fdh) with established NADH regeneration system

(A) and (B), white symbols stands for *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a) and grey symbols stands for *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh). (C), the columns with stripes, the NADH and NAD⁺ detected in the cells of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh); the open columns, the NADH and NAD⁺ detected in the cells of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a).

根据实验结果可知, *FDHI*基因重组菌在相同的发酵条件下其生长情况明显优于对照菌株。当发酵进入平台期时, *FDHI*基因重组菌的最大细胞浓度 (0.63 ± 0.01 g/L) 约为对照菌株 (0.43 ± 0.02 g/L) 的1.46倍。与对照菌相比, 在整个发酵过程中重组菌在葡萄糖消耗速率、乙醇发酵速率和菌体生长速率上均有明显优势。由此可见, 甲酸脱氢酶的表达及其耦联的辅酶再生体系可以通过增强运动发酵单胞菌胞对抑制物的代谢而提高菌体对抑制物的抗逆性。然而发酵过程中, 两菌株的乙醇最终得率未见显著区别, 该现象一方面可能是由于运动发酵单胞菌具有较强的抗逆性能, 即在现有的抑制物种类和较低的浓度下, 运动发酵单胞菌自身仍然可以在一定程度上解除抑制物的部分抑制并保持一定的乙醇发酵能力, 从而借助高效的ED代谢途径而将葡萄糖底物缓慢的转化为乙醇并维持较高的收率。

通过研究两种菌株对三种抑制物的代谢发现, 两种菌株在发酵前期即已对糠醛和甲酸的代谢速度表现出显著的差异, 即重组菌单位细胞的代谢性能表现出明显的优势 (此时两菌株的细胞量并未有显著差异)。由此可以推断, 运动发酵单胞菌及重组菌对甲酸和糠醛的代谢过程, 相关代谢途径对NADH和NAD⁺表现出更强的依赖性。当发酵过程至10-h时, 在菌体浓度仅为 0.26 ± 0.01 g/L DCW的情况下, *FDHI*基因重组菌消耗的甲酸已经累计达到0.46 g/L, 这与表 5.2重组菌在1.67 g/L甲酸培养基中发酵10 h时甲酸消耗量相当。当发酵结束后 (即葡萄糖完全消耗完毕时), *FDHI*基因重组菌累计消耗甲酸1.18 g/L, 明显大于仅含甲酸抑制物培养基中重组菌的甲酸消耗量。以上结果表明, 在含有其它三种抑制物的情况下, 重组菌消耗甲酸性能得到了大大的提高。同时, 糠醛和甲酸消耗曲线的相关性, 也从另一方面暗示糠醛可能作为NADH的受体促进了NADH和NAD⁺之间的相互转化, 从而增强了重组菌对甲酸的代谢。而由于甲酸代谢所产生的NADH又反过来促进了重组菌对糠醛的代谢。另外, 两菌株在5-羟甲基糠醛的代谢速率上也有一定的显著差异。分析图 10 (A)和(B)可知, 两菌株发酵过程中5-羟甲基糠醛代

谢速率上的差异均在发酵8小时之后，即两菌体的细胞浓度已有显著差异之时。根据上述现象分析可知，NADH再生体系的引入并未对单位细胞代谢5-羟甲基糠醛的能力产生显著的影响。重组菌中5-羟甲基糠醛的代谢速率之所以得以加快，主要是由于发酵液中重组菌的细胞浓度比对照组明显增大所致。该现象也与图 5.9 (C)和(D)中两菌株对5-羟甲基糠醛耐受性没有显著区别相一致。

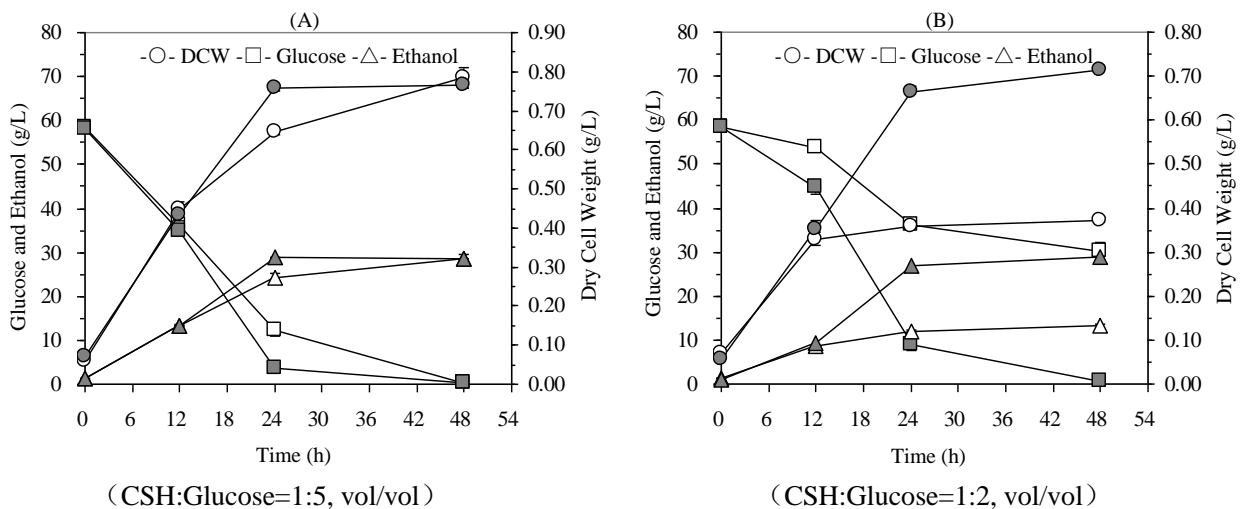
根据图 5.10 (C)之结果分析可知，在前16 h发酵过程中，培养对照菌株的发酵培养基中的糠醛尚未消耗尽，相对应对照菌株的胞内NADH/NAD⁺始终维持在较为稳定的水平（分别为：1.44±0.67、1.19±0.21、1.47±0.18和1.35±0.08）；而表达*FDHI*基因的重组菌，其胞内NADH/NAD⁺的比值伴随着糠醛消耗不断的提高（分别为：1.00±0.18、1.50±0.30、1.98±0.20和3.51±1.08）。当重组菌发酵培养基中的糠醛完全消耗殆尽时（16 h），胞内NADH与NAD⁺的比值为对照菌株的2.6倍。虽然目前尚无法解释重组菌细胞中NAD⁺/NADH代谢池减小的原因，但其发酵过程中甲酸持续快速消耗和NADH所占比重逐步加大与糠醛快速消耗的相关性，应可以部分证实NADH再生促进糠醛代谢以及糠醛代谢借助NADH消耗反馈促进甲酸代谢的积极作用。

5.3.6 在玉米秸秆水解液体系中*FDHI*基因表达对运动发酵单胞菌发酵性能的改善

5.3.6.1 对*FDHI*基因重组菌在不同浓度水解液中的发酵性能研究

由于玉米秸秆水解液中除甲酸和呋喃类抑制物，还包括各种芳香型抑制物及大量的乙酸等有机酸抑制物，这些抑制物尤其是高浓度乙酸的存在会对于乙醇发酵菌株的生理代谢和乙醇发酵产生严重的抑制作用。为了实现重组菌株在水解液中的发酵，并探讨甲酸代谢途径及NADH再生体系对运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-*fdh*) 重组菌在水解液中发酵性能的影响，本论文随后将CSH30以相同葡萄糖浓度的无菌溶液进行梯度稀释，从而获得抑制物浓度等同于20%，15%，10%和5%固含量的玉米秸秆水解液发酵基质。按照本章材料与方法之5.2.2.13所述方法，将重组菌和对照菌接种于水解液中，并隔时取样测定相关发酵变量（图 5.11）。

图 5.11中各组数据表明，在玉米秸秆水解液发酵体系中，当水解液所占比例小于2/3 (vol/vol) 时两种菌株开始能够代谢葡萄糖并进行乙醇发酵。在能够进行乙醇发酵的各组体系中，*FDHI*基因重组菌的生长和葡萄糖代谢均比对照菌株有不同程度的增强。其中在水解液与葡萄糖溶液体积混合比为2:1的水解液中，重组菌和对照菌株的生长和代谢均受到了极为严重的抑制。当水解液的稀释比由1:1逐步增大至1:3时，两菌株的生长状态和乙醇发酵性能开始逐步改善。



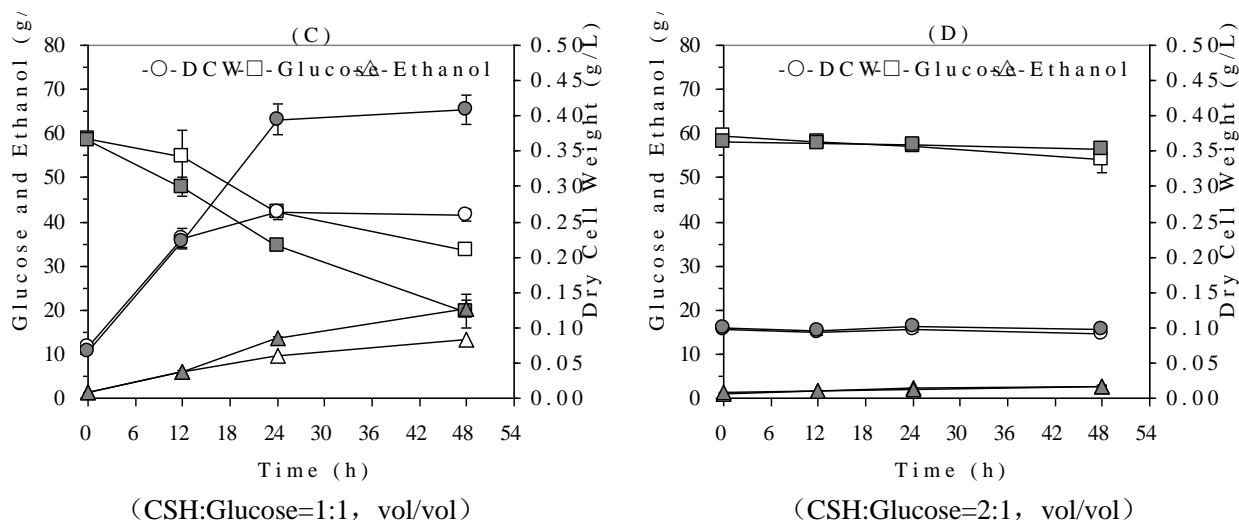


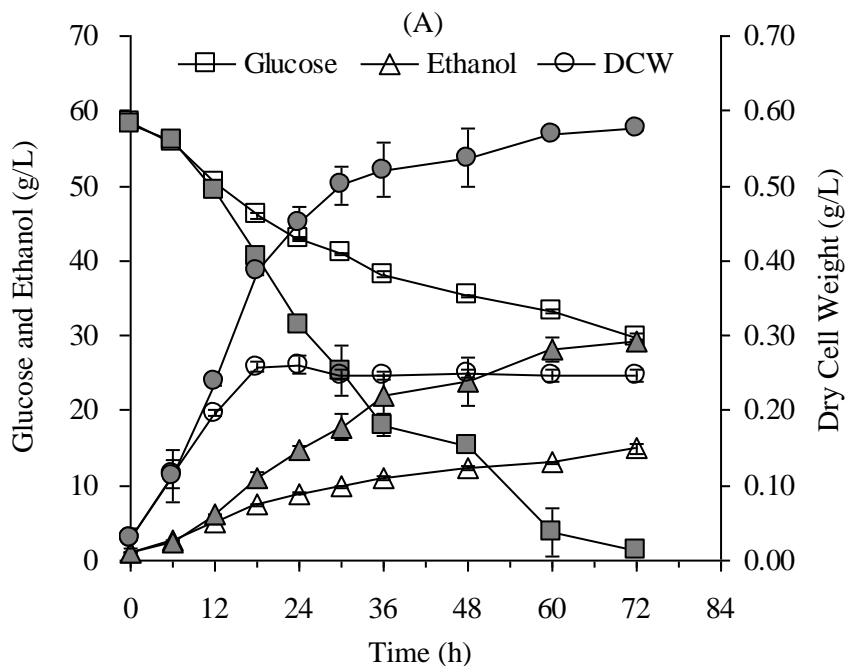
图 5.11 运动发酵单胞菌重组菌在不同浓度水解液中发酵性能的改善

Fig. 5.11 The improved fermentation performances of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*fdh*) in the diluted CSH at different concentrations

Grey symbols stands for *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*fdh*) and white symbols stands for *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). (A), the fermentation with the diluted CSH30 at the ratio of 1/5; (B), the dilution ratio of 1/2; (C), the dilution ratio of 1/1; (D), the dilution ratio of 2/1. The data of triplicate independent experiments were shown with standard deviation indicated by the error bars.

5.3.6.2 水解液体系中FDHI表达对运动发酵单胞菌发酵和抑制物代谢性能的改善

在前期研究中，确定 *FDHI* 表达菌株可以在 50% CSH30 的发酵基质中维持生长和代谢。随后在该发酵体系中，对重组菌的抑制物代谢规律以及 NADH 再生体系对菌株生长和发酵性能的影响进行研究（图 5.12）。



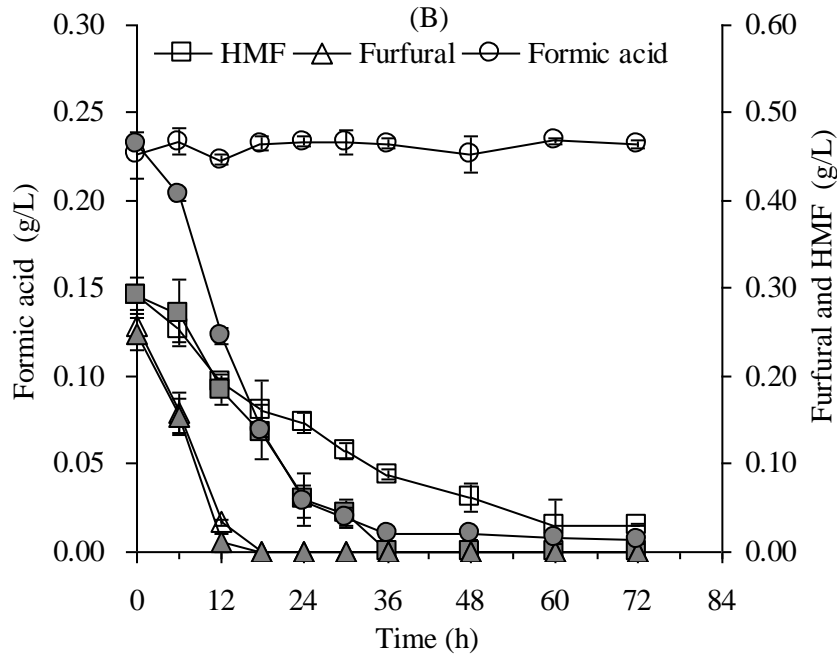


图 5.12 运动发酵单胞菌重组菌在50% (vol/vol) 玉米秸秆水解液中的发酵研究

Fig. 5.12 The fermentation performance of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh) in 50% (vol/vol) CSH. Grey symbols stands for *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh) and white symbols stands for *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). The data of triplicate independent experiments were shown with standard deviation indicated by the error bars.

由图 5.12 分析可知，表达 *FDHI* 基因重组菌的糠醛和 5-羟甲基糠醛代谢能力与对照菌株相比表现出一定的优势。当发酵进行至第 18 小时，对照菌株的生长可能由于甲酸和其它抑制物的浓度没有得到有效的降低，因此菌体的生长已经停滞。而重组菌可能由于甲酸、呋喃类化合物以及其它未知抑制物的代谢或胞内还原力水平的提高，在随后的 24 小时发酵过程中表现出持续生长的状态。发酵至 72 h 时，重组菌发酵体系中的葡萄糖基本已经被完全消耗完毕；重组菌发酵最终的菌体浓度 (0.58 ± 0.00 g/L) 比对照菌株 (0.25 ± 0.01 g/L) 高出约一倍；此时的乙醇收率达到最大值 (48.37% , g ethanol/g glucose) 为对照菌株乙醇收率的 (23.61% , g ethanol/g glucose) 的 2.1 倍。

由于糠醛在 50% CSH30 中的含量较低 (约 0.13 g/L)，因此在较短的发酵时间内两菌株就可以有效的代谢该抑制物。而另一方面，可能由于 *FDHI* 基因重组菌生长状态的显著改善，因此两菌株代谢 5-羟甲基糠醛的速率随之表现出了显著的差异，这与图 5.10 (B) 中之现象相符。

5.3.7 NADH 再生体系对运动发酵单胞菌耐受芳香族抑制物性能的促进作用

为了解释较低甲酸和呋喃抑制物浓度下，野生菌代谢受到严重抑制而重组菌发酵性能却明显改善的现象，本研究以 4-羟基苯甲醛作为芳香族抑制物的代表化合物初步探讨 NADH 再生体系在改善菌株耐受该类抑制物的作用。在含有 1.6 g/L 甲酸的 YPMAG20 培养基中，通过添加不同浓度的 4-羟基苯甲醛，观察其对重组菌和对照菌的抑制作用 (图 5.13)。

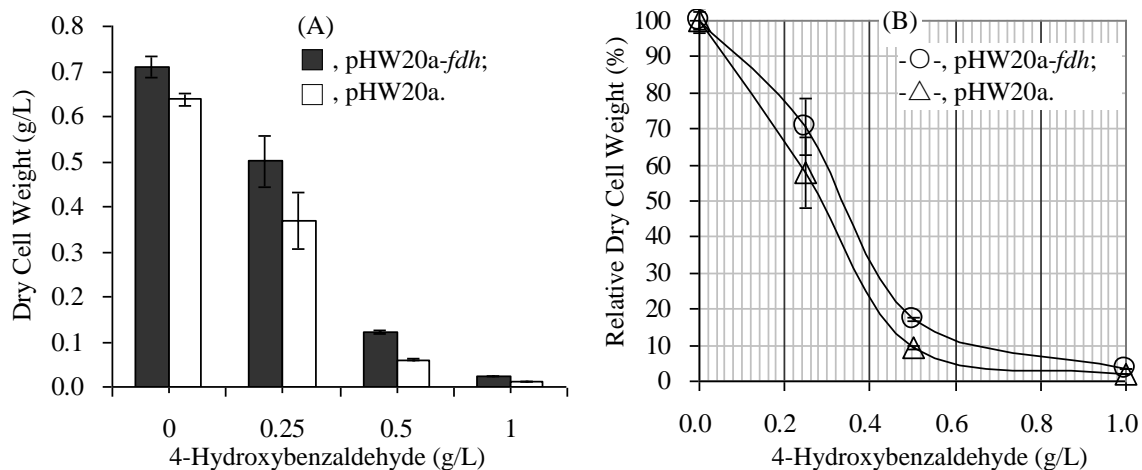


图 5.13 运动发酵单胞菌ZM4 (pHW20a-fdh) 耐受4-羟基苯甲醛性能的评价

Fig. 5.13 Evaluation of improved 4-Hydroxybenzaldehyde tolerance of *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh). Grey columns and circles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-fdh); white columns and triangles, *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a). The maximum cell densities of two strains grown in the medium only with 1.6 g/L formic acid at the 10 h fermentation time were regarded as 100% and the relative cell densities with the addition of other inhibitors with different concentration were calculated respectively.

实验数据表明, 当在运动发酵单胞菌细胞中建立NADH再生体系后, 4-羟基苯甲醛对运动发酵单胞菌的半数抑制浓度从0.29 g/L提高至0.34 g/L。该结果表明, 重组菌借助于NADH再生体系的建立对该抑制物的耐受性也有加强。由此推测, NADH再生体系不仅仅改善了发酵菌株对呋喃类抑制物的代谢或耐受, 而且在促进运动发酵单胞菌对芳香族抑制物的耐受性上亦有可能发挥着重要的作用。由于运动发酵单胞菌对芳香族抑制物的代谢途径尚未见到相关报道, 因此以上猜测亦需要在随后研究过程中做进一步探讨。

5.4 小结

作为廉价碳源来源之一的玉米秸秆水解液, 虽然其发酵基质中含有大量丰富的可利用糖分, 然而抑制物的存在大大限制其作为发酵基质直接应用于乙醇发酵过程中。本学位论文通过将来源于酵母的 *FDHI* 基因借助于 pHW20a 质粒在运动发酵单胞菌中进行了表达, 首次实现了甲酸代谢途径在运动发酵单胞菌中的建立。通过 NAD^+ 和 NADH 的提取和测定, 确认了 NADH 再生体系在运动发酵单胞菌重组菌中的建立, 从而获得了一个用于研究 NADH 对改善运动发酵单胞菌耐受和代谢呋喃类抑制物的重组菌株。通过对重组菌在含有抑制物培养基中的发酵研究, 证实该菌株不仅可以通过代谢甲酸而增强对甲酸的耐受性, 而且还可通过 NADH 再生体系增强该菌株对呋喃类抑制物的耐受性和 (或) 代谢性能。通过玉米秸秆水解液的发酵研究, 发现重组菌在相同的发酵条件下, 其发酵结束时的细胞量和乙醇产量均比对照菌株高一倍左右。重组菌代谢呋喃抑制物的能力也比对照菌株有了明显的改善。通过本研究证实, 借助于代谢工程手段通过构建抑制物代谢途径以及调节细胞内的辅酶水平可以有效的增强运动发酵单胞菌在水解液等恶劣环境下的发酵和生长性能。

本研究通过 *FDHI* 基因的表达, 在运动发酵单胞菌细胞内建立了甲酸代谢途径和 NADH 再生体系。甲酸代谢途径及 NADH 再生体系的建立, 对改善重组菌代谢甲酸和呋喃类抑制物的性能及其耐受性产生了一些积极的影响。但由于时间的限制以及分析的局限性, 对于运动发酵单胞菌代谢抑制物的相关途径以及 NADH 对生长和抑制物代谢的改善机理研究仍然留有相当多的疑点, 对于某些实验现象的解释也仅仅限于猜测未能得到充分的实验数据给予支持。在随后的研究工作中, 希望能够针对以上种种不足给予针对性的分析和研究, 从而获得一些突破性的研究成果。

第六章 结论与展望

6.1 结论

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 由于其高效的乙醇发酵性能和独特的代谢途径, 因而在生物炼制过程中具有极其重要的研究和应用价值。由于生物炼制过程的特殊性及其菌株自身代谢的特殊性, 在生物能源和生物基化学品的生产过程中不可避免的遇到了一些问题。代谢工程是对微生物代谢特性进行改造的有力工具, 但由于运动发酵单胞菌现有基因操作体系的缺陷, 因此严重的阻碍相关研究在该菌株中的开展。通过对运动发酵单胞菌原有基因操作体系、菌株基本生理代谢、生物炼制过程工艺以及菌株基因工程改造等方面的研究, 本学位论文得出以下结论并有所创新:

6.1.1 运动发酵单胞菌基因操作体系的改进

本论文在研究之初, 在Conway和Ingram等人构建的运动发酵单胞菌可移动质粒的基础上, 通过对原有质粒结构单元的优化以及外源功能基因的重组, 从而获得了一个高效率、方便和运用灵活的运动发酵单胞菌穿梭质粒——pHW20a。借助该质粒, 实现了不同来源基因在运动发酵单胞菌中的表达。同时, 通过对pHW20a及其衍生质粒转化效率的研究, 确认质粒分子量大小对接和转化效率具有重要的影响。

6.1.2 PEPCase在运动发酵单胞菌代谢中的作用

通过在运动发酵单胞菌表达来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株的苹果酸脱氢酶编码基因 (*mdh*), 首次实现了该菌株不完整TCA循环缺失途径的部分回补。通过对运动发酵单胞菌 (pHW20a-*mdh*) 菌株MDH酶活的测定、野生菌株*ppc*基因转录水平的分析以及草酰乙酸和*ppc*表达水平对该菌株生长调控的研究, 确认*ppc*基因在运动发酵单胞菌的合成代谢中具有极其重要的作用, 揭示了运动发酵单胞菌不同于一般微生物的代谢特点。通过本研究, 初步确认*ppc*基因通过转录水平的变化调控了运动发酵单胞菌的碳代谢和能量代谢, 并在其非耦联生长中起着重要的作用。

6.1.3 运动发酵单胞菌重组菌应用于山梨醇生物制备过程的研究

通过*gfo*过表达重组菌的发酵研究, 揭示了运动发酵单胞菌限制基因过量表达的潜在因素。同时, 通过运用*gfo*过表达重组菌细胞和金属离子抑制剂, 山梨醇生物制备的转化率以及反应效率得到显著的提高, 从而获取一个有效的生物制备山梨醇的工艺。

6.1.4 运动发酵单胞菌甲酸代谢途径和NADH再生体系的构建及其在玉米秸秆水解液发酵中的应用

通过pHW20a质粒将*FDHI*基因在运动发酵单胞菌中进行表达, 从而在该菌株中构建了甲酸代谢途径和NADH再生体系, 并确认它们在改善运动发酵单胞菌对甲酸和呋喃抑制物耐受性或(和)代谢的作用。通过玉米秸秆水解液体系的发酵和代谢研究, 证实*FDHI*基因表达对运动发酵单胞菌生长和乙醇发酵性能的改善作用。最后, 本研究还揭示NADH再生体系的建立, 对改善运动发酵单胞菌耐受芳香族抑制物等方面亦可能发挥着积极的作用。

6.2 展望

以代谢工程手段研究和改造微生物, 从而获得符合工业要求并具有实际应用价值的菌株是代谢工程的研究方向之一。纵观运动发酵单胞菌的研究历程以及本学位论文的研究结果, 在运动发酵单胞菌的代谢研究和基因改造方面仍然任重道远。即使本论文在个别问题上基于前人的研究成果有所进展, 但其中仍然还有许多不足之处:

首先, 作为运动发酵单胞菌的基因操作体系方面。虽然本章已经构建了一个接合转

化效率进一步提高的质粒，但是质粒的DNA分子量仍然偏大。随后的研究过程中，质粒必须功能基因的合理设计是有效降低质粒大小的手段之一。通过对编码蛋白构效关系的深入分析，可以对编码基因的序列进行全新的设计，从而获得简短的编码核苷酸序列以及功能增强的蛋白分子。这对于进一步降低工具质粒DNA分子量和提高转化效率是非常有意义的。另外，目前我们只得到了一个穿梭质粒，然而对于代谢工程研究而言，高效的同源重组操作体系是满足该菌株代谢工程研究的必须工具。在运动发酵单胞菌体系建立起相关的基因操作体系，无疑是非常重要的。

其次，通过*mdh*基因的表达，虽然部分回补了运动发酵单胞菌不完整的TCA循环，但就*mdh*基因表达引起转化效率降低的具体原因仍然未能给予合理的解释。此外，*ppc*基因在运动发酵单胞菌代谢中作用的研究才刚刚起步，该基因参与非耦联生长的推断仍然缺少一些论据的支持。通过进一步研究运动发酵单胞菌胞内ATP溢出通量(或胞内ATP浓度)与*ppc*基因表达水平的关系、*ppc*基因转录和表达的调控机制以及*ppc*低水平转录的生理意义等方面的深入探讨，希望将本研究遗留的问题给予合理的解释。

另外，虽然在山梨醇生物制备的研究上取得了一些进展，然而该结果离生物炼制过程的应用还有一定的差距。目前最要的问题是，基于葡萄糖等发酵基质制备GFOR酶制剂(包括细胞)的得率仍然很低。大部分基质由于运动发酵单胞菌的非耦联生长转化为了乙醇这一廉价的化学品。开展运动发酵单胞菌非耦联生长以及*gfo*基因过表达和表达后修饰等调控机制的深入研究，将能有效的解决以上关键问题。

最后，目前对于运动发酵单胞菌代谢抑制物的途径以及NADH改善重组菌耐受(或代谢)抑制物的机理仍然所知有限。另外，建立乙酸代谢途径的研究在博士论文阶段虽然有所进展，然而由于时间的原因，该代谢途径还未能能在运动发酵单胞菌中建立起来。在随后的研究中，希望在以上方向中取得突破，从而获取一种能够代谢水解液中各类化合物(包括抑制物)的工程菌株。

综上所述，微生物细胞中所需代谢途径的建立和强化以及无用代谢途径的弱化和删除作为代谢工程的研究范畴，只有将其研究不断深入才有可能构建一个高效的微生物细胞工厂服务于生物炼制过程，真正实现“绿色生物化工过程”。

参考文献

- [1] A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. F. Jr., Jason P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, and T. Tschaplinski. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 2006, 311: 484-489
- [2] B. E. Wood and L. O. Ingram. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58: 2103-2110
- [3] S. Behera, R. C. Mohanty, and R. C. Ray. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. *Appl. Energy* 2010, 87: 2352-2355
- [4] C. van Zyl, B. A. Prior, S. G. Kilian, and J. L. Kock. D-xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 1989, 135: 2791-2798
- [5] K. Karhumaa, B. Wiedemann, B. Hahn-Hagerdal, E. Boles, and M. F. Gorwa-Grauslund. Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microb. Cell Fact.* 2006, 5: 18
- [6] M. X. He, H. Feng, F. Bai, Y. Li, X. Liu, and Y. Z. Zhang. Direct production of ethanol from raw sweet potato starch using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2009, 3: 721-726
- [7] H. Lawford, J. Rousseau, and J. Tolan. Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001, 91-93: 133-146
- [8] J. McMillan, M. Newman, D. Templeton, and A. Mohagheghi. Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999, 79: 649-665
- [9] J.-J. Allias, E. F. Torres, and J. Baratti. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on *Jerusalem artichoke* juice. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, 29: 778-782
- [10] B. S. Dien, M. A. Cotta, and T. W. Jeffries. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63: 258-266
- [11] H. Yanase, K. Yamamoto, D. Sato, and K. Okamoto. Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus* β -glucosidase gene. *J. Biotechnol.* 2005, 118: 35-43
- [12] S. Romero, E. Merino, F. Bolivar, G. Gosset, and A. Martinez. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 5190-5198
- [13] R. Balusu, R. M. Paduru, G. Seenayya, and G. Reddy. Production of ethanol from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19 in submerged fermentation: screening of nutrients using Plackett-Burman design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 117: 133-141
- [14] T. K. Ng, A. Ben-Bassat, and J. G. Zeikus. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41: 1337-1343
- [15] P. Tailliez, H. Girard, R. Longin, P. Beguin, and J. Millet. Cellulose fermentation by an asporogenous mutant and an ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 1989, 55: 203-206
- [16] A. M. Lopez-Contreras, P. A. Claassen, H. Mooibroek, and W. M. De Vos. Utilisation of saccharides in extruded domestic organic waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000, 54: 162-167
- [17] L. Zertuche and R. R. Zall. A study of producing ethanol from cellulose using *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Bioeng. 1982, 24: 57-68
- [18] M. Inui, H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertes, and H. Yukawa. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2004, 8: 243-254
- [19] Y.-Z. Zou, K. Qi, X. Chen, X.-L. Miao, and J.-J. Zhong. Favorable effect of very low initial $K_L a$ value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. J. Biosci. Bioeng. 2010, 109: 149-152
- [20] J. Zaldivar, A. Martinez, and L. O. Ingram. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 2000, 68: 524-530
- [21] I. Voss and A. Steinbuchel. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, 55: 547-555
- [22] F. Xue, B. Gao, Y. Zhu, X. Zhang, W. Feng, and T. Tan. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. Bioresour. Technol. 2010, 101: 6092-6095
- [23] C. Yoo, S. Y. Jun, J. Y. Lee, C. Y. Ahn, and H. M. Oh. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresour. Technol. 2010, 101: S71-S74
- [24] L. Y. Zhu, M. H. Zong, and H. Wu. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. Bioresour. Technol. 2008, 99: 7881-7885
- [25] X. Zhao, S. Wu, C. Hu, Q. Wang, Y. Hua, and Z. K. Zhao. Lipid production from *Jerusalem artichoke* by *Rhodospiridium toruloides* Y4. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010, 37: 581-585
- [26] S. Fakas, S. Papanikolaou, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, and G. Aggelis. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. J. Appl. Microbiol. 2008, 105: 1062-1070
- [27] S. Ozmihci and F. Kargi. Comparison of different mixed cultures for bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and light fermentation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010, 37: 341-347
- [28] Z. Kadar, T. de Vrije, G. E. van Noorden, M. A. Budde, Z. Szengyel, K. Reczey, and P. A. Claassen. Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Appl. Biochem. Biotechnol. 2004, 113-116: 497-508
- [29] I. A. Panagiotopoulos, R. R. Bakker, M. A. Budde, T. de Vrije, P. A. Claassen, and E. G. Koukios. Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: a comparative study. Bioresour. Technol. 2009, 100: 6331-6338
- [30] C. N. Lin, S. Y. Wu, and J. S. Chang. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. Bioresour. Technol. 2009, 100: 3298-3301
- [31] P. Izak, K. Schwarz, W. Ruth, H. Bahl, and U. Kragl. Increased productivity of *Clostridium acetobutylicum* fermentation of acetone, butanol, and ethanol by pervaporation through supported ionic liquid membrane. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008, 78: 597-602
- [32] V. V. Zverlov, O. Berezina, G. A. Velikodvorskaya, and W. H. Schwarz. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of

- hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 71: 587-597
- [33] N. Qureshi, B. C. Saha, and M. A. Cotta. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2007, 30: 419-427
- [34] T. C. Ezeji, N. Qureshi, and H. P. Blaschek. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007, 18: 220-227
- [35] J. Li, J. B. Zhao, M. Zhao, Y. L. Yang, W. H. Jiang, and S. Yang. Screening and characterization of butanol-tolerant micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010, 50: 373-379
- [36] Y. Jiang, C. Xu, F. Dong, Y. Yang, W. Jiang, and S. Yang. Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metab. Eng.* 2009, 11: 284-291
- [37] C. Ren, Y. Gu, S. Hu, Y. Wu, P. Wang, Y. Yang, C. Yang, S. Yang, and W. Jiang. Identification and inactivation of pleiotropic regulator *CcpA* to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metab. Eng.* 2010, 12: 446-454
- [38] Y. Gu, J. Li, L. Zhang, J. Chen, L. Niu, Y. Yang, S. Yang, and W. Jiang. Improvement of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* via expression of the *talA* gene encoding transaldolase from *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2009, 143: 284-287
- [39] Y. Liu, W. Liao, and S. Chen. Co-production of lactic acid and chitin using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* cultured on cull potatoes and glucose. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 105: 1521-1528
- [40] R. H. Maas, R. R. Bakker, M. L. Jansen, D. Visser, E. de Jong, G. Eggink, and R. A. Weusthuis. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 78: 751-758
- [41] L. P. Huang, T. Dong, J. W. Chen, and N. Li. Biotechnological production of lactic acid integrated with fishmeal wastewater treatment by *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2007, 30: 135-140
- [42] C. Nolasco-Hipolito, T. Matsunaka, G. Kobayashi, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L-(+)-lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. *J. Biosci. Bioeng.* 2002, 93: 281-287
- [43] K. Melzoch, J. Votruba, V. Habova, and M. Rychtera. Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate. *J. Biotechnol.* 1997, 56: 25-31
- [44] D.-M. Kim and H.-S. Kim. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from *Jerusalem artichoke* and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and inulinase. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 39: 336-342
- [45] A. Chatzifragkou, D. Dietz, M. Komaitis, A. P. Zeng, and S. Papanikolaou. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, 107: 76-84
- [46] X. Chen, D. J. Zhang, W. T. Qi, S. J. Gao, Z. L. Xiu, and P. Xu. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63: 143-146
- [47] Y. P. Liu, P. Zheng, Z. H. Sun, Y. Ni, J. J. Dong, and L. L. Zhu. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour. Technol.* 2008, 99: 1736-1742
- [48] P. Zheng, J. J. Dong, Z. H. Sun, Y. Ni, and L. Fang. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour. Technol.* 2009, 100: 2425-2429

- [49] I. Meynial-Salles, S. Dorotyn, and P. Soucaille. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 99: 129-135
- [50] G. Z. Ye, M. Jiang, J. Li, K. Q. Chen, Y. L. Xi, S. W. Liu, P. Wei, and P. K. Ouyang. Isolation of NH_4^+ -tolerant mutants of *Actinobacillus succinogenes* for succinic acid production by continuous selection. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 20: 1219-1225
- [51] J. Yu, Z. Li, Q. Ye, Y. Yang, and S. Chen. Development of succinic acid production from corn cob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 37: 1033-1040
- [52] H. Wu, Z. M. Li, L. Zhou, and Q. Ye. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 7837-7843
- [53] L. P. Vandenberghe, C. R. Soccol, F. C. Prado, and A. Pandey. Comparison of citric acid production by solid-state fermentation in flask, column, tray, and drum bioreactors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 118: 293-303
- [54] S. Ali. Application of kaolin to improve citric acid production by a thermophilic *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73: 755-762
- [55] H. Ikram-Ul, S. Ali, M. A. Qadeer, and J. Iqbal. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresour. Technol.* 2004, 93: 125-130
- [56] A. Crolla and K. J. Kennedy. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. *J. Biotechnol.* 2004, 110: 73-84
- [57] B.-F. He, T. Nakajima-Kambe, T. Ozawa, and T. Nakahara. Production of D-malate and D-citramalate by *Arthrobacter pascens* DMDC12 having stable citraconase. *Process Biochem.* 2000, 36: 407-414
- [58] H. Mooibroek, N. Oosterhuis, M. Giuseppin, M. Toonen, H. Franssen, E. Scott, J. Sanders, and A. Steinbuchel. Assessment of technological options and economical feasibility for cyanophycin biopolymer and high-value amino acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 77: 257-267
- [59] W. R. Kenealy, Y. Cao, and P. J. Weimer. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 44: 507-513
- [60] I. Pirkov, E. Albers, J. Norbeck, and C. Larsson. Ethylene production by metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2008, 10: 276-280
- [61] H. Fukuda, T. Ogawa, and S. Tanase. Ethylene production by micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 1993, 35: 275-306
- [62] H. Weingart and B. Volksch. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars *in vitro* and *in planta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63: 156-161
- [63] X. Chen, Y. Liang, J. Hua, L. Tao, W. Qin, and S. Chen. Overexpression of bacterial ethylene-forming enzyme gene in *Trichoderma reesei* enhanced the production of ethylene. *Int. J. Biol. Sci.* 2010, 6: 96-106
- [64] S. B. Primrose and M. J. Dilworth. Ethylene production by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1976, 93: 177-181
- [65] K. Nagahama, K. Yoshino, M. Matsuoka, M. Sato, S. Tanase, T. Ogawa, and H. Fukuda. Ethylene production by strains of the plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous genes for the ethylene-forming enzyme. *Microbiology* 1994, 140 (Pt 9): 2309-2313
- [66] H. T. Freebairn and I. W. Buddenhagen. Ethylene production by *Pseudomonas Solanacearum*. *Nature* 1964, 202: 313-314
- [67] H. Weingart, B. Volksch, and M. S. Ullrich. Comparison of ethylene production by *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 1999, 89: 360-365

- [68] B. Kamm and M. Kamm. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64: 137-145
- [69] P. L. Rogers, Y. J. Jeon, K. J. Lee, and H. G. Lawford. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007, 108: 263-288
- [70] H. Yanase. *Zymomonas*. In K. R. Richard (ed.), *Encycl. Food Microbiol.* Elsevier, Oxford 1999, vol. 2365-2372
- [71] P. Rogers, K. Lee, M. Skotnicki, and D. Tribe. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1982, 23: 37-84
- [72] H. Sahm, S. Bringer-Meyer, and G. Sprenger. The genus *Zymomonas* *The Prokaryotes* 2006, 5: 201-221
- [73] N. F. Millis. A study of the cider-sickness *Bacillus*-a new variety of *Zymomonas anaerobia*. *J. Gen. Microbiol.* 1956, 15: 521-528
- [74] J.-P. Bela ĩh and J. C. Senez. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 1965, 89: 1195-1200
- [75] P. Lindner. Garungsstudien iber Pulque in Mexiko. *Bericht des Westpreussischen Botanisch-Zoologischen Vereins* 1928, 50: 253-255
- [76] J. L. Shimwell. Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium sp. nov.*) producing alcoholic fermentation of glucose. *J. Inst. Brew.* 1937, 43: 501-509
- [77] A. J. Kluyver and W. H. Hoppenbrouwers. Ein Merkwurdiges Garungsbakterium: Lindner's *Termobacterium mobile*. *Arch. Mikrobiol.* 1931, 2: 245-260
- [78] A. J. Kluyver and K. V. Niel. Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Centr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II* 1936, 94: 369-403
- [79] J. L. Shimwell. Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium sp. nov.*) producing alcoholic fermentation of glucose. *J. Inst. Brewing* 1937, 43: 507-509
- [80] J. L. Shimwell. *Saccharomonas*, a proposed new genus for bacteria producing a quantitative alcoholic fermentation of glucose. *J. Inst. Brew.* 1950, 56: 179-182
- [81] M. Coton, J. Laplace, and E. Coton. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005, 40: 152-157
- [82] J. Swings and J. De Ley. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 1977, 41: 1-46
- [83] J. D. Ley and J. Swings. Phenotypic description, numerical analysis, and proposal for an improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1976, 26: 146-157
- [84] B. S. Montencourt. *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. *Biol. Ind. Microorganisms* 1985, 6: 261-289
- [85] J. E. Shvinka, L. M. Pankova, I. N. Mezbarde, and L. J. Licis. Hydrogen peroxide production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989, 31: 240-245
- [86] M. Coton, J.-M. Laplace, Y. Auffray, and E. Coton. Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis subsp. francensis subsp. nov.*, isolated from French cider. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, 56: 121-125
- [87] J. Swings, K. Kersters, and J. D. Ley. Taxonomic position of additional *Zymomonas mobilis* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1977, 27: 271-273
- [88] M. L. Skotnicki, K. J. Lee, D. E. Tribe, and P. L. Rogers. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41: 889-893
- [89] J. S. Seo, H. Chong, H. S. Park, K. O. Yoon, C. Jung, J. J. Kim, J. H. Hong, H. Kim, J. H. Kim, J. I. Kil, C. J. Park, H. M. Oh, J. S. Lee, S. J. Jin, H. W. Um, H. J. Lee, S. J. Oh, J. Y. Kim, H. L. Kang, S. Y. Lee, K. J. Lee, and H. S. Kang. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23: 63-68

- [90] M. Zhang, C. Eddy, K. Deanda, M. Finkelstein, and S. Picataggio. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 1995, 267: 240-243
- [91] A. Mohagheghi, N. Dowe, D. Schell, Y.-C. Chou, C. Eddy, and M. Zhang. Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnol. Lett.* 2004, 26: 321-325
- [92] F. Dickens. Mechanism of carbohydrate oxidation. *Nature* 1936, 138: 1057
- [93] F. Dickens and G. E. Glock. Direct oxidation of glucose-6-phosphate by animal tissues. *Nature* 1950, 166: 33
- [94] D. B. M. Scott and S. S. Cohen. Enzymatic formation of pentose phosphate from 6-phosphogluconate. *J. Biol. Chem.* 1951, 188: 509-530
- [95] J. de Ley and S. Cornut. Direct oxidation of glucose by *Aerobacter sp.* *Nature* 1951, 168: 515-516
- [96] S. S. Cohen and R. Raff. Adaptive enzymes in the estimation of gluconate, D-arabinose, and D-ribose. *J. Biol. Chem.* 1951, 188: 501-508
- [97] S. S. Cohen. Gluconokinase and the oxidative path of glucose-6-phosphate utilization. *J. Biol. Chem.* 1951, 189: 617-628
- [98] J. M. Wiame and M. Doudoroff. Oxidative assimilation by *Pseudomonas saccharophila* with C¹⁴-labeled substrates. *J. Bacteriol.* 1951, 62: 187-193
- [99] S. E. Egan, R. Fliege, S. Tong, A. Shibata, J. Richard E. Wolf, and T. Conway. Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *J. Bacteriol.* 1992, 174: 4638-4646
- [100] N. Entner and R. Y. Stanier. Studies on the oxidation of glucose by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 1951, 62: 181-186
- [101] N. Entner and M. Doudoroff. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.* 1952, 196: 853-862
- [102] M. Gibbs and R. D. Demoss. Anaerobic dissimilation of C¹⁴-labeled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. *J. Biol. Chem.* 1954, 207: 689-694
- [103] T. Conway, R. Fliege, D. Jones-Kilpatrick, J. Liu, W. O. Barnell, and S. E. Egan. Cloning, characterization and expression of the *Zymomonas mobilis eda* gene that encodes 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase of the Entner-Doudoroff pathway. *Mol. Microbiol.* 1991, 5: 2901-2911
- [104] T. Liu, Y. Shen, Q. Liu, and B. Liu. The unique Entner-Doudoroff (ED) glycolysis pathway of glucose in archaea. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2008, 48: 1126-1131
- [105] N. Peekhaus and T. Conway. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1998, 180: 3495-3502
- [106] R. Zablony and D. G. Fraenkel. Glucose and gluconate metabolism in a mutant of *Escherichia coli* lacking gluconate-6-phosphate dehydrase. *J. Bacteriol.* 1967, 93: 1579-1581
- [107] J. M. Pouyssegur and F. R. Stoeber. The common degradative pathway for hexuronates in *Escherichia coli* K 12. Purification, properties and individuality of 2-keto-3-deoxy-6-phospho-D-gluconate aldolase. *Eur. J. Biochem.* 1971, 21: 363-373
- [108] R. Fliege, S. Tong, A. Shibata, K. W. Nickerson, and T. Conway. The Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58: 3826-3829
- [109] J. K. Wang, E. E. Dekker, N. D. Lewinski, and H. C. Winter. Physical and chemical evidence for the trimeric subunit structure of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 1981, 256: 1793-1800
- [110] E. L. Murray and T. Conway. Multiple regulators control expression of the

- Entner-Doudoroff aldolase (*Eda*) of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2005, 187: 991-1000
- [111] T. Conway. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol. Rev. 1992, 9: 1-27
- [112] C. Parker, W. O. Barnell, J. L. Snoep, L. O. Ingram, and T. Conway. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. Mol. Microbiol. 1995, 15: 795-802
- [113] J. Liu, W. O. Barnell, and T. Conway. The polycistronic mRNA of the *Zymomonas mobilis glf-zwf-edd-glk* operon is subject to complex transcript processing. J. Bacteriol. 1992, 174: 2824-2833
- [114] P. Weisser, R. Krämer, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. J. Bacteriol. 1995, 177: 3351-3354
- [115] W. O. Barnell, J. Liu, T. L. Hesman, M. C. O'Neill, and T. Conway. The *Zymomonas mobilis glf, zwf, edd, and glk* genes form an operon: localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region. J. Bacteriol. 1992, 174: 2816-2823
- [116] A. A. DiMarco and A. H. Romano. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49: 151-157
- [117] H. Doelle. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1982, 15: 20-24
- [118] H. W. Doelle. Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1982, 14: 241-246
- [119] R. K. Scopes and D. R. Bannon. Kinetic analysis of the activation of *Zymomonas mobilis* glucokinase by phosphate. Biochim. Biophys. Acta 1995, 1249: 173-179
- [120] R. K. Scopes, V. Testolin, A. Stoter, K. Griffiths-Smith, and E. M. Algar. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 1985, 228: 627-634
- [121] B. Zembruski, P. Chilco, X. L. Liu, J. Liu, T. Conway, and R. Scopes. Cloning, sequencing, and expression of the *Zymomonas mobilis* fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases. J. Bacteriol. 1992, 174: 3455-3460
- [122] T. L. Hesman, W. O. Barnell, and T. Conway. Cloning, characterization, and nucleotide sequence analysis of a *Zymomonas mobilis* phosphoglucose isomerase gene that is subject to carbon source-dependent regulation. J. Bacteriol. 1991, 173: 3215-3223
- [123] L. I. Sly and H. W. Doelle. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in cell free extracts of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 1968, 63: 197-213
- [124] R. K. Scopes. Allosteric control of *Zymomonas mobilis* glucose-6-phosphate dehydrogenase by phosphoenolpyruvate. Biochem. J. 1997, 326: 731-735
- [125] J. L. Snoep, N. Adman, L. P. Yomano, H. V. Westerhoff, T. Conway, and L. O. N. Ingram. Control of glycolytic flux in *Zymomonas mobilis* by glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. Biotechnol. Bioeng. 1996, 51: 190-197
- [126] R. K. Scopes. 6-Phosphogluconolactonase from *Zymomonas mobilis*: an enzyme of high catalytic efficiency. FEBS Lett. 1985, 193: 185-188
- [127] R. K. Scopes and K. Griffiths-Smith. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 6-phosphogluconate dehydratase from *Zymomonas mobilis*. Anal. Biochem. 1984, 136: 530-534
- [128] H. C. Ryu, S. Y. Park, S. H. Lee, and J. S. Kim. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis* ZM4. Acta

- Cryst. 2010, 66: 471-473
- [129] R. K. Scopes. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis*. *Anal. Biochem.* 1984, 136: 525-529
- [130] A. Pawluk, R. K. Scopes, and K. Griffiths-Smith. Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase. *Biochem. J.* 1986, 238: 275-281
- [131] T. Conway, G. W. Sewell, and L. O. Ingram. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing, and identification of promoter region. *J. Bacteriol.* 1987, 169: 5653-5662
- [132] T. Conway and L. O. Ingram. Phosphoglycerate kinase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing, and localization within the *gap* operon. *J. Bacteriol.* 1988, 170: 1926-1933
- [133] H. Yanase, J. Fujimoto, M. Maeda, K. Okamoto, K. Kita, and K. Tonomura. Expression of the extracellular levansucrase and invertase genes from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62: 1802-1805
- [134] M. E. Burnett, J. Liu, and T. Conway. Molecular characterization of the *Zymomonas mobilis* enolase (*eno*) gene. *J. Bacteriol.* 1992, 174: 6548-6553
- [135] P. Steiner, M. Fussenegger, J. E. Bailey, and U. Sauer. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase gene in *Escherichia coli*. *Gene* 1998, 220: 31-38
- [136] A. D. Neale, R. K. Scopes, R. E. Wettenhall, and N. J. Hoogenraad. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1987, 169: 1024-1028
- [137] B. Bräu and H. Sahm. Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 1986, 144: 296-301
- [138] T. C. Hoppner and H. W. Doelle. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1983, 17: 152-157
- [139] S. Bringer-Meyer, K. L. Schimz, and H. Sahm. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* 1986, 146: 105-110
- [140] T. Conway, Y. A. Osman, J. I. Konnan, E. M. Hoffmann, and L. O. Ingram. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* 1987, 169: 949-954
- [141] D. Dobritzsch, S. König, G. Schneider, and G. Lu. High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*: implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 20196-20204
- [142] X. Y. Pei, K. M. Erixon, B. F. Luisi, and F. J. Leeper. Structural insights into the prereaction state of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biochemistry* 2010, 49: 1727-1736
- [143] S. Kinoshita, T. Kakizono, K. Kadota, K. Das, and H. Taguchi. Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985, 22: 249-254
- [144] P. Zikmanis, R. Krūce, L. Auziņa, and V. Bankovsky. N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl) adenine inhibits the alcohol dehydrogenase activity in cell-free extracts of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 1992, 158: 203-207
- [145] C. Wills, P. Kratofil, D. Londo, and T. Martin. Characterization of the two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981, 210: 775-785
- [146] K. F. Keshav, L. P. Yomano, H. J. An, and L. O. Ingram. Cloning of the *Zymomonas*

- mobilis* structural gene encoding alcohol dehydrogenase I (*adhA*): sequence comparison and expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1990, 172: 2491-2497
- [147] A. D. Neale, R. K. Scopes, J. M. Kelly, and R. E. H. Wettenhall. The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterisation and physiological roles. Eur. J. Biochem. 1986, 154: 119-124
- [148] P. J. O'Mullan, S. E. Buchholz, T. Chase, and D. E. Eveleigh. Roles of alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis* (ZADH): characterization of a ZADH-2-negative mutant. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995, 43: 675-678
- [149] U. Kalnenieks, N. Galinina, and M. Toma. Physiological regulation of the properties of alcohol dehydrogenase II (ADH II) of *Zymomonas mobilis*: NADH renders ADH II resistant to cyanide and aeration. Arch. Microbiol. 2005, 183: 450-456
- [150] P. Rellos and R. K. Scopes. Polymerase chain reaction-based random mutagenesis: production and characterization of thermostable mutants of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase-2. Protein Expr. Purif. 1994, 5: 270-277
- [151] H. An, R. K. Scopes, M. Rodriguez, K. F. Keshav, and L. O. Ingram. Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. J. Bacteriol. 1991, 173: 5975-5982
- [152] P. Tse, R. K. Scopes, and A. G. Wedd. Iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*: isolation of apoenzyme and metal dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111: 8703-8706
- [153] K. F. Mackenzie, T. Conway, H. C. Aldrich, and L. O. Ingram. Expression of *Zymomonas mobilis adhB* (encoding alcohol dehydrogenase II) and *adhB-lacZ* operon fusions in recombinant *Z. mobilis*. J. Bacteriol. 1989, 171: 4577-4582
- [154] T. Conway, G. W. Sewell, Y. A. Osman, and L. O. Ingram. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 1987, 169: 2591-2597
- [155] U. Neveling, R. Klasen, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. Purification of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Zymomonas mobilis* and identification and sequence analysis of the corresponding genes. J. Bacteriol. 1998, 180: 1540-1548
- [156] U. Neveling, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. Exceptional characteristics of heterotetrameric ($\alpha_2\beta_2$) E1p of the pyruvate dehydrogenase complex from *Zymomonas mobilis*: expression from an own promoter and a lipoyl domain in E1 β . FEMS Microbiol. Lett. 1999, 177: 117-121
- [157] M. J. Hardman and R. K. Scopes. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Biochem. 1988, 173: 203-209
- [158] D. Gollhofer, B. Nidetzky, M. Fuerlinger, and K. D. Kulbe. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. Enzyme Microb. Technol. 1995, 17: 235-240
- [159] V. Kanagasundaram and R. K. Scopes. Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 1992, 174: 1439-1447
- [160] M. Zachariou and R. K. Scopes. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol. 1986, 167: 863-869
- [161] S.-J. Lee, M. Saleemuddin, T. Scheper, H. Loos, and H. Sahm. A fluorometric fiber-optic biosensor for dual analysis of glucose and fructose using glucose-fructose-oxidoreductase isolated from *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 1994, 36: 39-44
- [162] H. Loos, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Glucose-fructose oxidoreductase, a periplasmic enzyme of *Zymomonas mobilis*, is active in its precursor form. FEMS Microbiol. Lett.

- 1993, 107: 293-298
- [163] H. Loos, M. Völler, B. Rehr, Y. D. Stierhof, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Localisation of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 1991, 84: 211-216
- [164] G. S. Erzinger, M. M. Silveira, M. Vitolo, and R. Jonas. Determination of glucose-fructose oxidoreductase activity in whole cells of *Zymomonas mobilis*. World J. Microbiol. Biotechnol. 1996, 12: 22-24
- [165] T. Wiegert, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 1996, 166: 32-41
- [166] V. Kanagasundaram and R. Scopes. Isolation and characterization of the gene encoding gluconolactonase from *Zymomonas mobilis*. Biochim. Biophys. Acta 1992, 1171: 198-200
- [167] N. A ĩ-Abdelkader, A. De Caro, J. Guzzo, G. P. F. Michel, and J. C. Baratti. The intracellular sucrase (*SacA*) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. Biotechnol. Lett. 2000, 22: 461-467
- [168] P. O'Mullan, M. Szakacs-Dobozi, and D. E. Eveleigh. Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. Biotechnol. Lett. 1991, 13: 137-142
- [169] P. J. O'Mullan, T. Chase, and D. E. Eveleigh. Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992, 38: 341-346
- [170] P. Gunasekaran, G. Mukundan, R. Kannan, S. Velmurugan, N. A ĩ-Abdelkader, E. Alvarez-Macarie, and J. Baratti. The *sacB* and *sacC* genes encoding levansucrase and sucrase form a gene cluster in *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 1995, 17: 635-642
- [171] V. Senthilkumar, J. Rajendhran, S. Busby, and P. Gunasekaran. Characterization of multiple promoters and transcript stability in the *sacB*–*sacC* gene cluster in *Zymomonas mobilis* Arch. Microbiol. 2009, 191: 529-541
- [172] R. Kannan, G. Mukundan, N. A ĩ-Abdelkader, V. Augier-Magro, J. Baratti, and P. Gunasekaran. Molecular cloning and characterization of the extracellular sucrase gene (*sacC*) of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 1995, 163: 195-204
- [173] R. G. Crittenden and H. W. Doelle. Identification and characterisation of the extracellular sucraes of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676) Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 41: 302-308
- [174] V. Senthilkumar, S. J. W. Busby, and P. Gunasekaran. Serine substitution for cysteine residues in levansucrase selectively abolishes levan forming activity. Biotechnol. Lett. 2003, 25: 1653-1656
- [175] L. Preziosi, G. P. F. Michel, and J. Baratti. Characterization of sucrose-hydrolyzing enzymes of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 1990, 153: 181-186
- [176] K.-H. Jang, K.-B. Song, C. Kim, B. Chung, S. Kang, U.-H. Chun, R. Choue, and S.-K. Rhee. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 2001, 23: 339-344
- [177] S. K.B., J. H.K., and R. S.-K. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). Biochim. Biophys. Acta 1993, 1173: 320-324
- [178] E. W. Lyness and H. W. Doelle. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 1983, 5: 345-350
- [179] D. Goldman, N. Lavid, A. Schwartz, G. Shoham, D. Danino, and Y. Shoham. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase J. Biol. Chem. 2008, 283: 32209-32217
- [180] S. Bringer-Meyer and H. Sahm. Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989, 31: 529-536
- [181] K. D. Barrow, J. G. Collins, R. S. Norton, P. L. Rogers, and G. M. Smith. ³¹P nuclear

- magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. J. Biol. Chem. 1984, 259: 5711-5716
- [182] J. P. Mejia, M. E. Burnett, H. An, W. O. Barnell, K. F. Keshav, T. Conway, and L. O. Ingram. Coordination of expression of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: a simple hypothesis based on mRNA stability. J. Bacteriol. 1992, 174: 6438-6443
- [183] J. B. Russell and G. M. Cook. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. Microbiol. Rev. 1995, 59: 48-62
- [184] T. Fuhrer, E. Fischer, and U. Sauer. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. J. Bacteriol. 2005, 187: 1581-1590
- [185] L. Viikari and D. R. Berry. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. Critical Rev. Biotechnol. 1988, 7: 237-261
- [186] C. W. Jones and H. W. Doelle. Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 35: 4-9
- [187] N. Arfman, V. Worrell, and L. O. Ingram. Use of the *tac* promoter and *lacI^q* for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 1992, 174: 7370-7378
- [188] G. M. Cook and J. B. Russell. Energy-spilling reactions of *Streptococcus bovis* and resistance of its membrane to proton conductance. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 1942-1948
- [189] U. Kalnenieks. Physiology of *Zymomonas mobilis*: some unanswered questions. Adv. Microb. Physiol. 2006, 51: 73-117
- [190] G. A. Sprenger. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol. Lett. 1996, 145: 301-307
- [191] Y. A. Osman, T. Conway, S. J. Bonetti, and L. O. Ingram. Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: enzyme and metabolite levels during batch fermentation. J. Bacteriol. 1987, 169: 3726-3736
- [192] E. M. Algar and R. K. Scopes. Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 1985, 2: 275-287
- [193] L. Reyes and R. K. Scopes. Membrane-associated ATPase from *Zymomonas mobilis*: purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1068: 174-178
- [194] J. B. Russell. The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2007, 13: 1-11
- [195] A. Stouthamer. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. Antonie Van Leeuwenhoek 1973, 39: 545-565
- [196] H. G. Lawford and N. Stevnsborg. Pantothenate limitation does not induce uncoupled growth of *Zymomonas* in chemostat culture. Biotechnol. Lett. 1986, 8: 345-350
- [197] T. Bauchop and S. R. Elsdon. The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. J. Gen. Microbiol. 1960, 23: 457-469
- [198] M. Futai and H. Kanazawa. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches. Microbiol. Rev. 1983, 47: 285-312
- [199] A. Lazdunski and J. P. Belaich. Uncoupling in bacterial growth: ATP pool variation in *Zymomonas mobilis* cells in relation to different uncoupling conditions of growth. J. Gen. Microbiol. 1972, 70: 187-197
- [200] P. Zikmanis, R. Kruce, and L. Auzina. Molar growth yields of *Zymomonas mobilis* on glucose after the transition from anaerobic to aerobic continuous growth. Acta Biotechnol. 1999, 19: 69-75
- [201] P. F. Gomez and L. O. Ingram. Cloning, sequencing and characterization of the alkaline phosphatase gene (*phoD*) from *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 1995, 125: 237-245

- [202] T. Karunakaran and P. Gunasekaran. Characterization of *Zymomonas mobilis* alkaline phosphatase activity in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 1992, 25: 41-45
- [203] T. Karunakaran and P. Gunasekaran. Cloning and expression in *Escherichia coli* of an alkaline phosphatase (*phoA*) gene from *Zymomonas mobilis*. *Curr. Microbiol.* 1992, 25: 291-295
- [204] A. Nipkow, B. Sonnleitner, and A. Fiechter. Effect of carbon dioxide on growth of *Zymomonas mobilis* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985, 21: 287-291
- [205] Y. A. Osman and L. O. Ingram. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J. Bacteriol.* 1985, 164: 173-80
- [206] U. K. Veeramallu and P. Agrawal. The effect of CO₂ ventilation on kinetics and yields of cell-mass and ethanol in batch cultures of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 1986, 8: 811-816
- [207] H. W. Doelle and A. N. McGregor. The effect of high ethanol and CO₂ concentrations on the ultrastructure of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1983, 17: 44-48
- [208] N. Brestic-Goachet, P. Gunasekaran, B. Cami, and J. Baratti. Transfer and expression of broad host range plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 1987, 9: 13-18
- [209] D.-W. Cho, P. L. Rogers, and S. F. Delaney. Construction of a shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989, 32: 50-53
- [210] M. L. Skotnicki, D. E. Tribe, and P. L. Rogers. R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 40: 7-12
- [211] N. Misawa and K. Nakamura. Nucleotide sequence of the 2.7 kb plasmid of *Zymomonas mobilis* ATCC10988. *J. Biotechnol.* 1989, 12: 63-70
- [212] N. Misawa, T. Okamoto, K. Nakamura, K. Kitamura, H. Yanase, and K. Tonomura. Construction of a new shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 1986, 50: 3201-3203
- [213] G. M. Browne, M. L. Skotnicki, A. E. Goodman, and P. L. Rogers. Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. *Plasmid* 1984, 12: 211-214
- [214] Y. J. Jeon, C. J. Svenson, and P. L. Rogers. Over-expression of xylulokinase in a xylose-metabolising recombinant strain of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 244: 85-92
- [215] V. C. Carey, S. K. Walia, and L. O. Ingram. Expression of a lactose transposon (Tn951) in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, 46: 1163-1168
- [216] A. E. Goodman, A. T. Strzelecki, and P. L. Rogers. Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 1984, 1: 219-228
- [217] P. Weisser, R. Kramer, and G. Sprenger. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 4155-4161
- [218] S. Yang, M. L. Land, D. M. Klingeman, D. A. Pelletier, T.-Y. S. Lu, S. L. Martin, H.-B. Guo, J. C. Smith, and S. D. Brown. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance *loci* in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107: 10395-10400
- [219] S. Yang, D. Pelletier, T.-Y. Lu, and S. Brown. The *Zymomonas mobilis* regulator *hfq* contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors. *BMC Microbiol.* 2010, 10: 135
- [220] A. Varsaki, A. S. Afendra, G. Vartholomatos, G. Tegos, and C. Drainas. Production of ice nuclei from two recombinant *Zymomonas mobilis* strains employing the *inaZ* gene of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnol. Lett.* 1998, 20: 647-651
- [221] P. Su, S. F. Delaney, and P. L. Rogers. Cloning and expression of a β -glucosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J.*

- Biotechnol. 1989, 9: 139-152
- [222] T. Conway, M. O. K. Byun, and L. O. Ingram. Expression vector for *Zymomonas mobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53: 235-241
- [223] M. O. K. Byun, J. B. Kaper, and L. O. Ingram. Construction of a new vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*. J. Ind. Microbiol. 1986, 1: 9-15
- [224] G. A. Sprenger, M. A. Typas, and C. Drainas. Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. World J. Microbiol. Biotechnol. 1993, 9: 17-24
- [225] K. Tonomura, T. Okamoto, M. Yasui, and H. Yanase. Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis* Agr. Biol. Chem. Tokyo 1986, 50: 805-808
- [226] A. T. Strzelecki, A. E. Goodman, and P. L. Rogers. Stability of a *lac* operon in *Zymomonas mobilis* in batch and continuous culture. J. Biotechnol. 1986, 3: 197-205
- [227] H. Yanase, T. Kotani, M. Yasuda, A. Matsuzawa, and K. Tonomura. Metabolism of galactose in *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 35: 364-368
- [228] T. Okamoto, S. Yamano, H. Ikeaga, and K. Nakamura. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 42: 563-568
- [229] N. Misawa, T. Okamoto, and K. Nakamura. Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 1988, 7: 167-177
- [230] H. Yanase, K. Nozaki, and K. Okamoto. Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 2005, 27: 259-263
- [231] A. T. Strzelecki, A. E. Goodman, and P. L. Rogers. Behavior of the IncW plasmid *Sa* in *Zymomonas mobilis*. Plasmid 1987, 18: 46-53
- [232] A. T. Strzelecki, A. E. Goodman, R. G. Cail, and P. L. Rogers. Behavior of the hybrid plasmid pNSW301 in *Zymomonas mobilis* grown in continuous culture. Plasmid 1990, 23: 194-200
- [233] P. Su, S. F. Delaney, and P. L. Rogers. Kinetics of plasmid transformation in *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 1988, 8: 317-320
- [234] P. Su and A. E. Goodman. High frequency transformation of *Zymomonas mobilis* by plasmid DNA. J. Biotechnol. 1987, 6: 247-258
- [235] H. Honda, T. Saito, S. Iijima, and T. Kobayashi. Molecular cloning and expression of a β -glucosidase gene from *Ruminococcus albus* in *Escherichia coli*. Enzyme Microb. Technol. 1988, 10: 559-562
- [236] N. Misawa and K. Nakamura. Expression and stability of a β -glucosidase gene of *Ruminococcus albus* in *Zymomonas mobilis*. Agr. Biol. Chem. Tokyo 1989, 53: 723-727
- [237] R. J. Lucas, R. A. Austen, and N. W. Dunn. Cloning of genes encoding endoglucanases from a cellulolytic *Xanthomonad*. J. Biotechnol. 1987, 6: 83-90
- [238] M. Reynen, I. Reipen, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Construction of expression vectors for the gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis*. Mol. Gen. Genet. 1990, 223: 335-341
- [239] H. Yanase, T. Kotani, and K. Tonomura. Transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid DNA. Agr. Biol. Chem. Tokyo 1986, 50: 3139-3144
- [240] A. T. Strzelecki, A. E. Goodman, P. L. Rogers, and J. M. Watson. Cloning and expression of a *Bacillus* α -glucosidase gene in *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* and *Pseudomonas putida*. J. Biotechnol. 1993, 29: 189-203
- [241] J. Ruhrmann, G. A. Sprenger, and R. Kramer. Mechanism of alanine excretion in recombinant strains of *Zymomonas mobilis*. Biochim. Biophys. Acta 1994, 1196: 14-20
- [242] I. Uhlenbusch, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57: 1360-1366
- [243] O. D. Delgado, C. M. Abate, and F. Siñeriz. Construction of an integrative shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 1995, 132: 23-26

- [244] K. Deanda, M. Zhang, C. Eddy, and S. Picataggio. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 4465-4470
- [245] D. Baumler, K. Hung, J. Bose, B. Vykhodets, C. Cheng, K.-C. Jeong, and C. Kaspar. Enhancement of acid tolerance in *Zymomonas mobilis* by a proton-buffering peptide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006, 134: 15-26
- [246] C. J. Liu, H. W. Dong, J. J. Zhong, D. D. Y. Ryu, and J. Bao. Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. *J. Biotechnol.* 2010, 148: 105-112
- [247] U. Kalnenieks, N. Galinina, M. M. Toma, J. L. Pickford, R. Rutkis, and R. K. Poole. Respiratory behaviour of a *Zymomonas mobilis adhB::kan^f* mutant supports the hypothesis of two alcohol dehydrogenase isoenzymes catalysing opposite reactions. *FEBS Lett.* 2006, 580: 5084-5088
- [248] N. Brestic-Goachet, P. Gunasekaran, B. Cami, and J. Baratti. Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis* α -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 1990, 153: 219-225
- [249] G. A. Sprenger. Approaches to broaden the substrate and product range of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* by genetic engineering. *J. Biotechnol.* 1993, 27: 225-237
- [250] H. Yanase, M. Masuda, T. Tamaki, and K. Tonomura. Expression of *Eschericia coli* alpha galactosidase and lactose permease genes in *Zymomonas mobilis* and its raffinose fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* 1990, 70: 1-6
- [251] E. Malvessi, S. Carra, M. M. da Silveira, and M. A. Z. Ayub. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono-delta-lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. *Biochem. Eng. J.* 2010, 51: 1-6
- [252] H. Loos, R. Kramer, H. Sahm, and G. A. Sprenger. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J. Bacteriol.* 1994, 176: 7688-7693
- [253] J. A. Vignoli, M. A. P. C. Celligoi, and R. S. F. Silva. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochem.* 2006, 41: 240-243
- [254] R. Jonas and M. Silveira. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 118: 321-336
- [255] B. Nidetzky, M. F rlinger, D. Gollhofer, R. K. Scopes, D. Haltrich, and K. D. Kulbe. Improved operational stability of cell-free glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient synthesis of sorbitol and gluconic acid in a continuous ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 53: 623-629
- [256] B. Rehr, C. Wilhelm, and H. Sahm. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 35: 144-148
- [257] S. Bringer-Meyer and H. Sahm. Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose. U.S. patent 1991, 5,017,485
- [258] U. H. Chun and P. L. Rogers. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, 29: 19-24
- [259] L. Viikari. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 19: 252-255
- [260] K. D. Barrow, J. G. Collins, D. A. Leight, P. L. Rogers, and R. G. Warr. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 20: 225-232
- [261] S. C. Park, A. Kademi, and J. C. Baratti. Alcoholic fermentation of cellulose hydrolysate

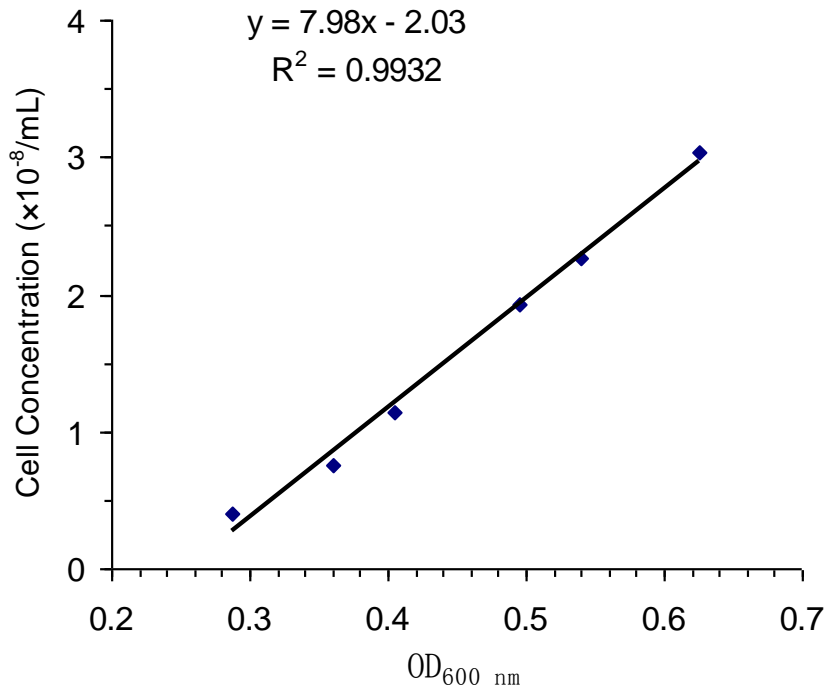
- by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 1993, 15: 1179-1184
- [262] A. Kademi and J. Baratti. Batch fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on cellulose hydrolysate. Biotechnol. Lett. 1996, 18: 643-648
- [263] S. G. N. Grant, J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs Into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 4645-4649
- [264] R. Simon, U. Priefer, and A. Pühler. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Nat. Biotech. 1983, 1: 784-791
- [265] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 1985, 33: 103-119
- [266] J. G. Sutcliffe. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1979, 43: 77-90
- [267] M. E. Kovach, P. H. Elzer, H. D. Steven, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 1995, 166: 175-176
- [268] S. E. Luria and M. Delbruck. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 1943, 28: 491-511
- [269] H. J. J. v. Vuuren and L. Meyer. Production of ethanol from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 1982, 4: 253-256
- [270] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- [271] J. C. S éz-Miranda, L. Saliceti-Piazza, and J. D. McMillan. Measurement and analysis of intracellular ATP levels in metabolically engineered *Zymomonas mobilis* fermenting glucose and xylose mixtures. Biotechnol. Prog. 2006, 22: 359-368
- [272] S. Park, P. Cotter, and R. Gunsalus. Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. J. Bacteriol. 1995, 177: 6652-6656
- [273] B. 施特尔马赫. [钱嘉渊译]. 酶的测定方法 (1st). 中国轻工业出版社. 北京 1992.
- [274] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254
- [275] Y. Song, X. S. Xu, and Y. J. Yan. Stability of recombinant *Zymomonas mobilis* 31821 (pZB5). Ann. Microbiol. 2005, 55: 261-265
- [276] E. Scherzinger, M. M. Bagdasarian, P. Scholz, R. Lurz, B. Rückert, and M. Bagdasarian. Replication of the broad host range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid-encoded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81: 654-658
- [277] V. Haring, P. Scholz, E. Scherzinger, J. Frey, K. Derbyshire, G. Hatfull, N. S. Willetts, and M. Bagdasarian. Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82: 6090-6094
- [278] M. W. Mather, L. M. McReynolds, and C.-A. Yu. An enhanced broad-host-range vector for gram-negative bacteria: avoiding tetracycline phototoxicity during the growth of photosynthetic bacteria. Gene 1995, 156: 85-88
- [279] D.-M. Miao, Y. Honda, K. Tanaka, A. Higashi, T. Nakamura, Y. Taguchi, H. Sakai, T. Komano, and M. Bagdasarian. A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF1010. Nucleic Acids Res. 1993, 21: 4900-4903
- [280] K. M. Derbyshire and N. S. Willetts. Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic analysis of its origin of transfer. Mol. Gen. Genet. 1987, 206: 154-160

- [281] B. R. Glick. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol. Adv.* 1995, 13: 247-261
- [282] W. E. Bentley, N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H. Davis, and D. S. Kompala. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 1990, 35: 668-681
- [283] W. Thomas, S. Hermann, and A. S. Georg. Expression of the *Zymomonas mobilis gfo* gene for NADP-containing glucose: fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*—formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein. *Eur. J. Biochem.* 1997, 244: 107-112
- [284] R. A. Musrati, M. Kollárová N. Mernik, and D. Mikulášová Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen. Physiol. Biophys.* 1998, 17: 193-210
- [285] P. Minarik, N. Tomaskova, M. Kollarova, and M. Antalík. Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.* 2002, 21: 257-265
- [286] W. H. Murphey, C. Barnaby, F. J. Lin, and N. O. Kaplan. Malate dehydrogenases. II. Purification and properties of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, and *Escherichia coli* malate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 1967, 242: 1548-1559
- [287] M. H. O'Leary. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Annu. Rev. Plant Biol.* 1982, 33: 297-315
- [288] B. J. Eikmanns, M. T. Follettie, M. U. Griot, and A. J. Sinskey. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol. Gen. Genet.* 1989, 218: 330-339
- [289] U. Sauer and B. J. Eikmanns. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29: 765-794
- [290] A. E. Goodman, P. L. Rogers, and M. L. Skotnicki. Minimal medium for isolation of auxotrophic *Zymomonas* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44: 496-498
- [291] C. K. Lam, P. O'Mullan, and D. E. Eveleigh. Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 39: 305-308
- [292] H. Maruyama, R. L. Easterday, H.-C. Chang, and M. D. Lanes. The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate I. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 1966, 241: 2405-2412
- [293] 王静岩, 朱圣庚, and 徐长法. 生物化学 (第三版). 高等教育出版社. 北京 2002.
- [294] M. M. Silveira, E. Wisbeck, C. Lemmel, G. Erzinger, J. P. da Costa, M. Bertasso, and R. Jonas. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 1999, 75: 99-103
- [295] G. S. Erzinger and M. Vitolo. *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006, 129-132: 787-794
- [296] M. d. Barros, M. A. P. C. Celligoi, J. A. Vignoli, and L. H. M. Vargas. Influence of ultrasound on sorbitol release by *Zymomonas mobilis* grown on high sucrose concentration. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2006, 49: 371-374
- [297] A. Chang, M. Scheer, A. Grote, I. Schomburg, and D. Schomburg. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37: D588-D592
- [298] J. Bao, K. Koumatsu, Y. Arimatsu, K. Furumoto, M. Yoshimoto, K. Fukunaga, and K. Nakao. A kinetic study on crystallization of calcium gluconate in external loop airlift column and stirred tank for an immobilized glucose oxidase reaction with crystallization. *Biochem. Eng. J.* 2003, 15: 177-184
- [299] C. E. Wyman. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 1994, 50: 3-15
- [300] P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, and P. Stroeve. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem.*

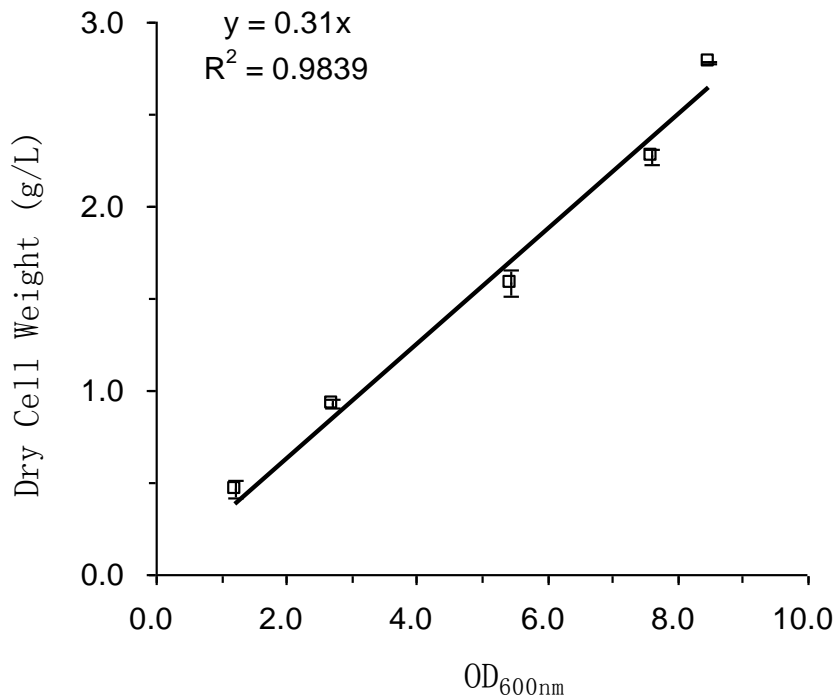
- Res. 2009, 48: 3713-3729
- [301] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4851-4861
- [302] R. Torget, M. E. Himmel, and K. Grohmann. Dilute sulfuric acid pretreatment of hardwood bark. *Bioresour. Technol.* 1991, 35: 239-246
- [303] A. Esteghlalian, A. G. Hashimoto, J. J. Fenske, and M. H. Penner. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Technol.* 1997, 59: 129-136
- [304] L. da Costa Sousa, S. P. S. Chundawat, V. Balan, and B. E. Dale. "Cradle-to-grave" assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opin. Biotech.* 2009, 20: 339-347
- [305] E. Palmqvist and B. Hahn-Hägerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 2000, 74: 25-33
- [306] S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, and N.-O. Nilvebrant. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 24: 151-159
- [307] T. A. Clark and K. L. Mackie. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1984, 34: 101-110
- [308] J. P. Delgenes, R. Moletta, and J. M. Navarro. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 19: 220-225
- [309] S. Yang, K. Pappas, L. Hauser, M. Land, G. Chen, G. Hurst, C. Pan, V. Kouvelis, M. Typas, and D. Pelletier. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27: 893-894
- [310] V. N. Kouvelis, E. Saunders, T. S. Brettin, D. Bruce, C. Detter, C. Han, M. A. Typas, and K. M. Pappas. Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *J. Bacteriol.* 2009, 191: 7140-7141
- [311] J. Almeida, A. Röder, T. Modig, B. Laadan, G. Lidén, and M.-F. Gorwa-Grauslund. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 78: 939-945
- [312] A. Petersson, J. a. R. M. Almeida, T. Modig, K. Karhumaa, B. a. Hahn-Hägerdal, M. F. Gorwa-Grauslund, and G. Lidén. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* 2006, 23: 455-464
- [313] N. Wierckx, F. Koopman, L. Bandounas, J. H. De Winde, and H. J. Ruijsenaars. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microb. Biotechnol.* 2010, 3: 336-343
- [314] Z. Hou-Rui, Q. Xiang-Xiang, S. S. Silva, B. F. Sarrouh, C. Ai-Hua, Z. Yu-Heng, J. Ke, and X. Qiu. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009, 152: 199-212
- [315] F. Koopman, N. Wierckx, J. H. d. Winde, and H. J. Ruijsenaars. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010 107: 4919-4924
- [316] M. Ni, L. Fan, J. Zhao, S. Li, Y. Hua, and W. He. Presented at the Proceedings of International Symposium on Bioprocess and Biosystems Engineering, Shanghai, China 2009: 97
- [317] J. Zhang, D. Chu, J. Huang, Z. Yu, G. Dai, and J. Bao. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring

- bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, 105: 718-728
- [318] S. J. Berr ós-Rivera, G. N. Bennett, and K.-Y. San. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metab. Eng.* 2002, 4: 217-229
- [319] H. Schütte, J. Flossdorf, H. Sahm, and M.-R. Kula. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 1976, 62: 151-160
- [320] M. R. Leonardo, Y. Dailly, and D. P. Clark. Role of NAD in regulating the *adhE* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1996, 178: 6013-6018
- [321] C. Bernofsky and M. Swan. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal. Biochem.* 1973, 53: 452-458
- [322] B. Adney and J. Baker. Measurement of cellulase activities. Chemical Analysis and Testing Task Laboratory: analytical Procedure (LAP). Office of Energy Efficiency and Renewable Energy by Midwest Research Institute. Kansas City, Missouri. 2008.
- [323] V. O. Popov and V. S. Lamzin. NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* 1994, 301: 625-643
- [324] J. R. Andreesen and L. G. Ljungdahl. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 1974, 120: 6-14
- [325] V. I. Tishkov and V. O. Popov. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc)* 2004, 69: 1252-1267
- [326] Z.-H. Huang, M. Liu, B.-G. Wang, Y.-P. Zhang, and Z.-A. Cao. Formate dehydrogenase and its application in cofactor NADH regeneration. *Chin. J. Process Eng.* 2006, 6: 1011-1016

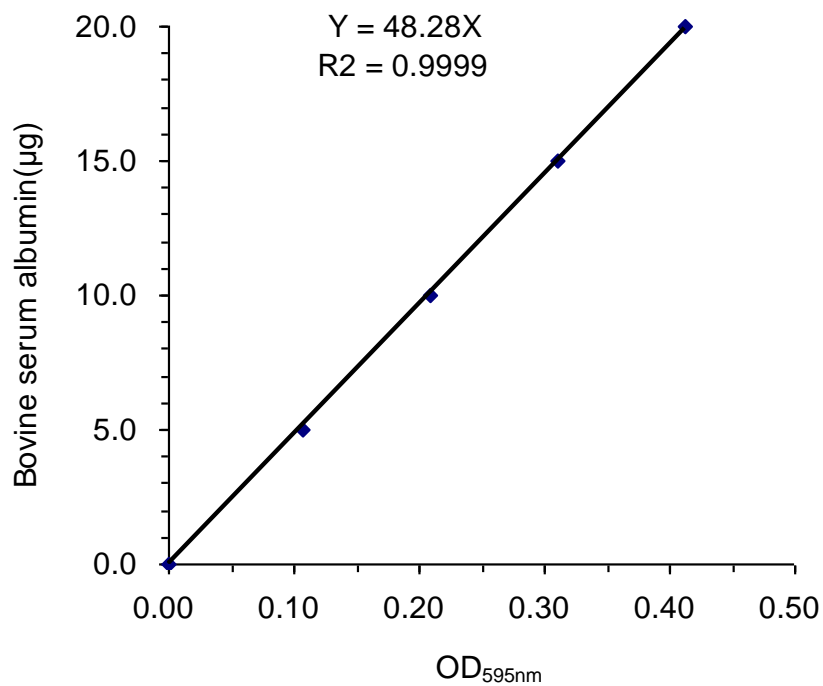
附 录



附图 1 运动发酵单胞菌ZM4细胞浓度与600 nm细胞光密度关系图
Appendix Fig. 1 The relationship between *Z. mobilis* ZM4 cell concentration and its optical density at 600 nm

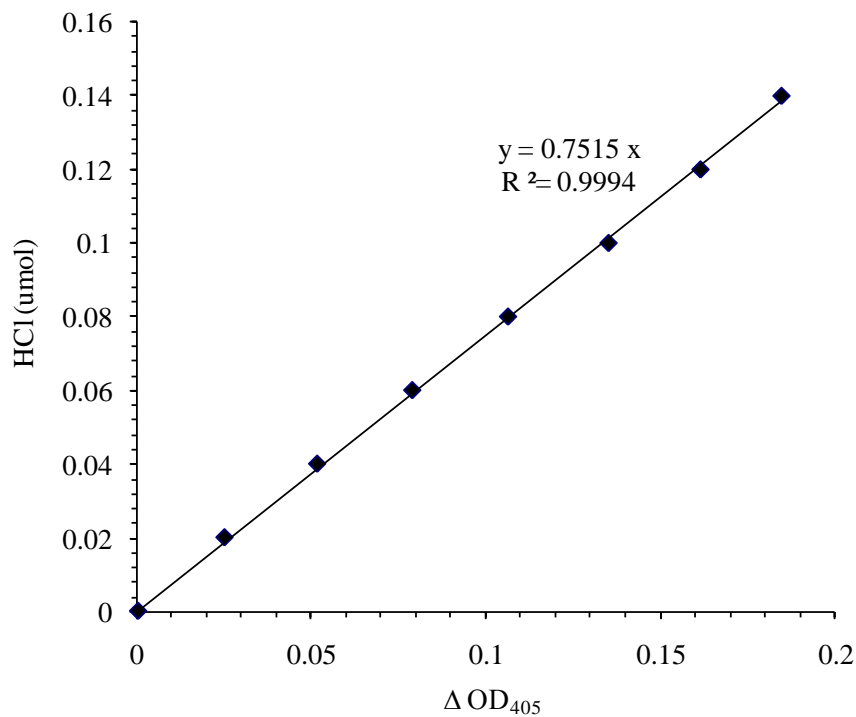


附图 2 运动发酵单胞菌细胞干重与光密度关系曲线
Appendix Fig. 2 The relationship between *Z. mobilis* ZM4 dry cell weight and its optical density at 600 nm



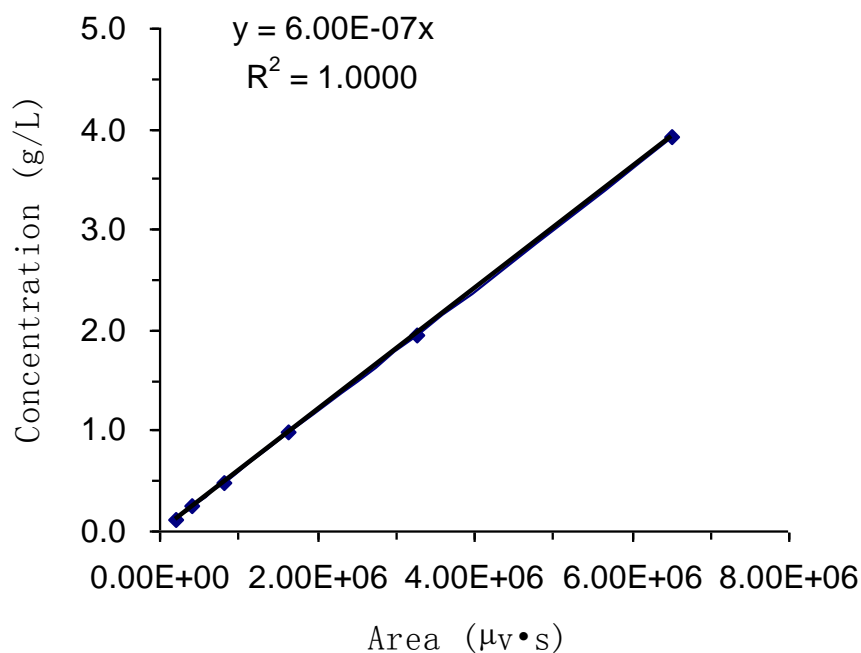
附图 3 Bradford法测定蛋白质标准曲线

Appendix Fig. 3 The standard curve of protein concentration determined by Bradford method

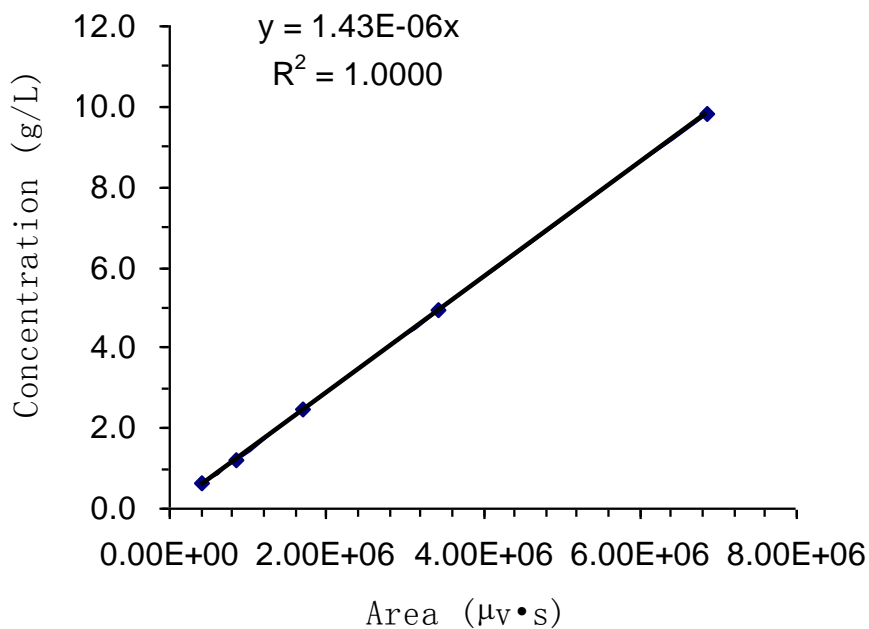


附图 4 HCl 含量标准曲线

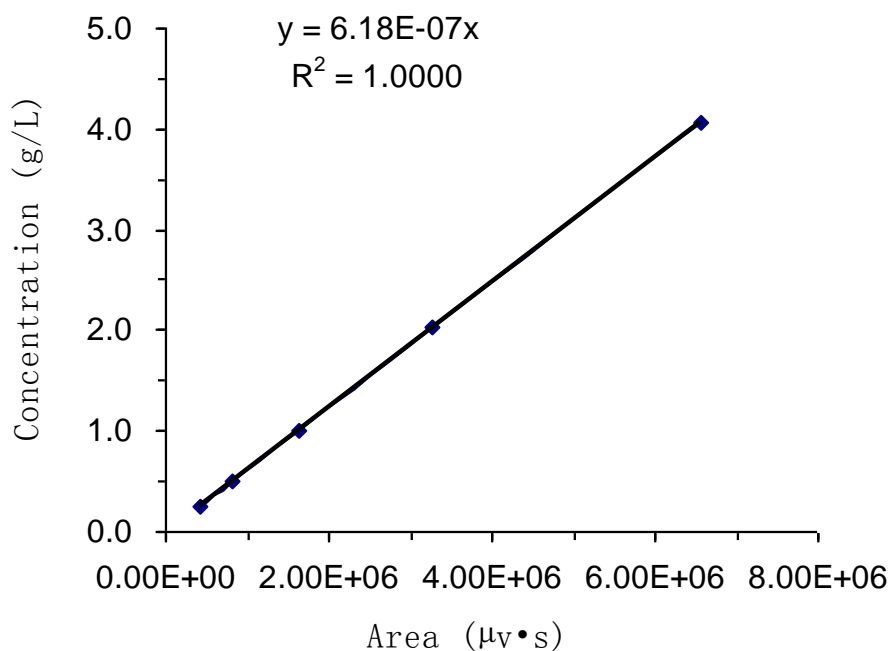
Appendix Fig. 4 Standard curve of hydrochloric acid



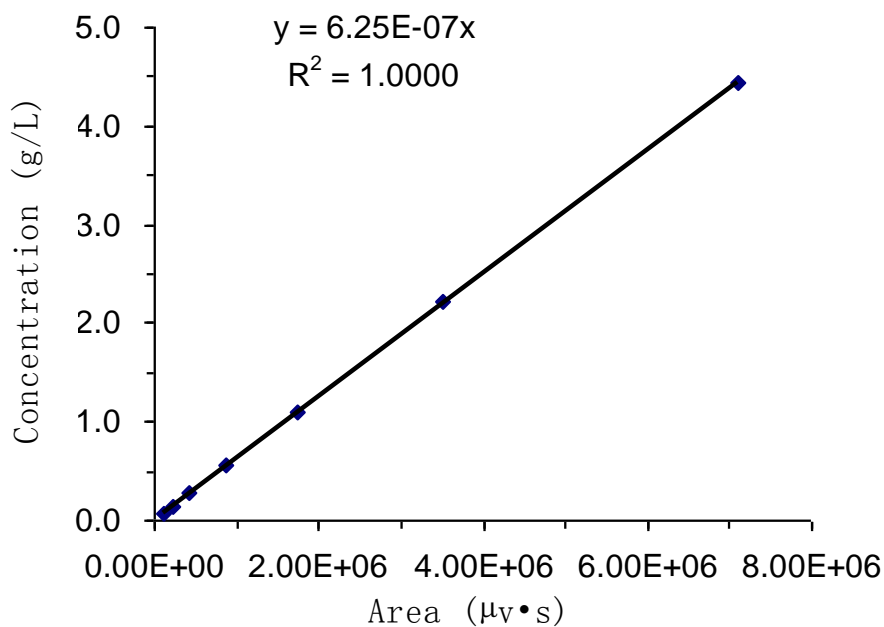
附图 5-1 葡萄糖高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-1 HPLC standard curve of glucose



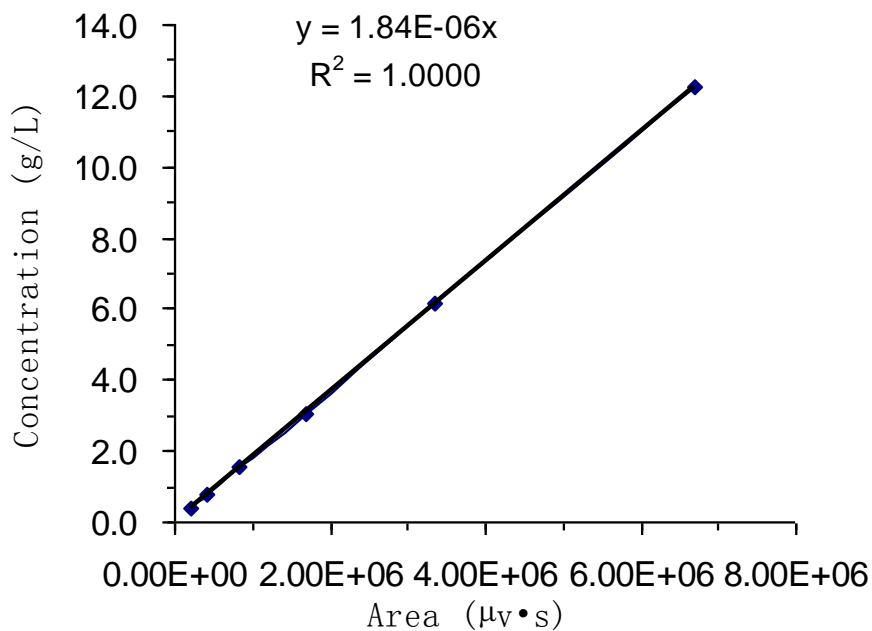
附图 5-2 乙醇高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-2 HPLC standard curve of ethanol



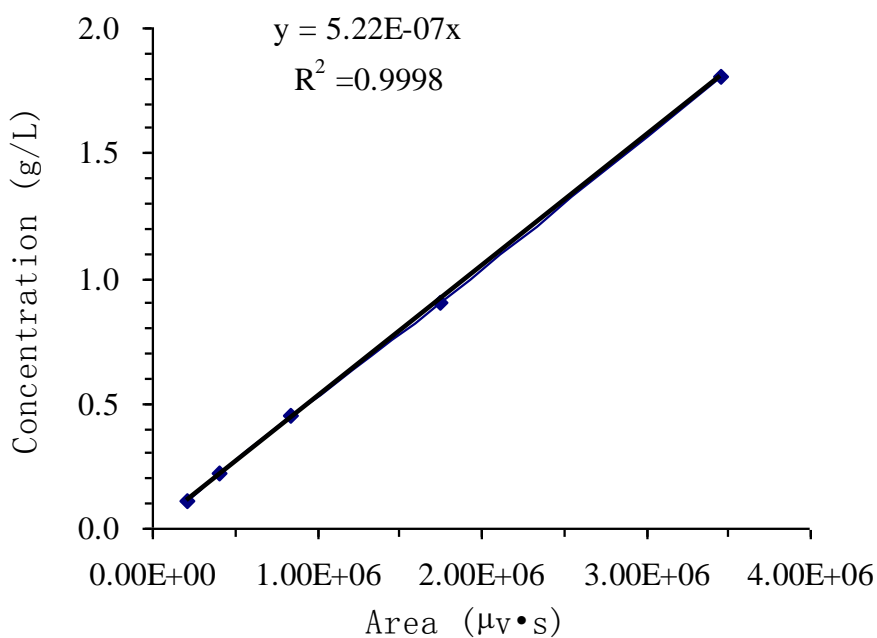
附图 5-3 果糖高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-3 HPLC standard curve of fructose



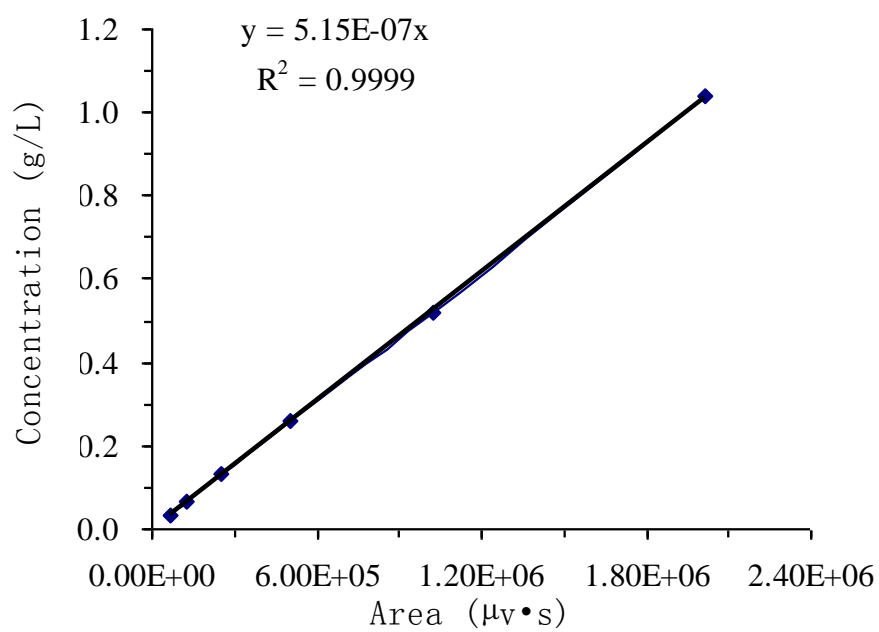
附图 5-4 山梨醇高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-4 HPLC standard curve of sorbitol



附图 5-5 甲酸高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-5 HPLC standard curve of formic acid



附图 5-6 糠醛高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-6 HPLC standard curve of furfural



附图 5-7 羟甲基糠醛高效液相色谱标准曲线
Appendix Fig. 5-7 HPLC standard curve of HMF

CGAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTCGGTTCAGGGCAGGGTCGTTAAATAGCCGCTTATGTCTAT
TGCTGGTTTACCGGTTTATTGACTACCGGAAGCAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAG
GCCAGTTTGCTCAGGCTCTCCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATCCAGCCGACCAGGCT
TTCCACGCCCGCGTGCCTCCATGTCGTTTCGCGCGGTTCTCGGAAACGCGCTGCCGCGTTTCG
TGATTGTCACGCTCAAGCCCGTAGTCCCGTTCGAGCGTTCGCGCAGAGGTCAGCGAGGGCGCGG
TAGGCCCCGATACGGCTCATGGATGGTGTTCGGGTTCGGGTGAATCTTGTTGATGGCGATATGGAT
GTGCAGGTTGTGCGGTGTCGTGATGCACGGCACTGACGCGCTGATGCTCGGCCGAAGCCAAGCCC
AGCGCAGATGCGGTCTCAATCGCGCGCAACGTCCTCCGCGTTCGGGCTTCTCTCCCGCGCGGAA
GCTAACAGCAGGTGATAGGTCTTGTTCGGCTTCGGAACGGGTGTTGCCGTGCTGGGTTCGCCAT
CACCTCGGCCATGACAGCGGGCAGGGTGTTCGCTCGCAGTTCGTGACGCGCACGTGACCCAG
GCGCTCGGTCTTGCTTGTCTGTCGGTGATGTAATTCACCGCTCCGCGAAGTCGCTCTTCTTG
ATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGCAATCACGCGCACCCCCGGCCGTTTATAGCGGCTAAAA
AAGTCATGGCTCTGCCCTCGGGCGGACCACGCCCATCATGACCTTGCCAAGCTCGTCTGCTTC
TCTTCGATCTTCGCCAGCAGGGCGAGGATCGTGGCATCACCGAACCGCGCCGTGCGCGGGTTCG
TCGGTGAGCCAGAGTTTCAGCAGGCCGCCAGGCGGCCAGGTCGCCATTGATGCGGGCCAGC
TCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGACGCCCGTGATTTTGTAGCCCTGGCCGACGGCCAGCAGGT
AGGCCGACAGGCTCATGCCGGCCGCCGCCCTTTTCTCAATCGCTCTTCGTTTCGTCTGGAAG
GCAGTACACCTTGATAGGTGGGCTGCCCTTCTGGTTGGCTTGGTTTCATCAGCCATCCGCTTGC
CCTCATCTGTTACGCCGGCGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTGAGCACCG
CCAGGTGCGAATAAGGGACAGTGAAGAAGGAACACCCGCTCGCGGGTGGGCTACTTCACCTA
TCCTGCCCGGCTGACGCCGTTGGATACACCAAGGAAAGTCTACACGAACCCTTTGGCAAATC
CTGTATATCGTGCGAAAAAGGATGGATATACCGAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGCAGGG
TTATGCAGCGGAAAAGCGCTGCTTCCCTGCTGTTTTGTGGAATATCTACCGACTGGAAACAGGC
AAATGCAGGAAATTAAGTGAAGTGAAGGGACAGGGCAGAGACGATGCCAAAGAGCTACACCGA
CGAGCTGGCCGAGTGGGTTGAATCCCGCGCGGCCAAGAAGCGCCGGCGTGATGAGGCTGCGG
TTGCGTTCTGCGGGTGAGGGCGGATGTCGAGGCGGCGTTAGCGTCCGGCTATGCGCTCGTCA
CCATTTGGGAGCACATGCGGGAAACGGGGAAAGGTCAAGTTCTCCTACGAGACGTTCCGCTCGC
ACGCCAGGCGGCACATCAAGGCCAAGCCCGCCGATGTGCCCGCACCGCAGGCCAAGGCTGCG
GAACCCGCGCCGGCACCCAAGACGCCGGAGCCACGGCGGCCGAAGCAGGGGGGCAAGGCTG
AAAAGCCGGCCCCCGCTGCGGCCCGACCGGCTTACCTTCAACCCAACACCGGACAAAAAG
GATCTACTGTAATGGCGAAAATTCACATGGTTTTGACAGGGCAAGGGCGGGGTTCGGCAAGTCGG
CCATCGCCGCGATCATTGCGCAGTACAAGATGGACAAGGGGCAGACACCCTTGTGCATCGACA
CCGACCCGTTGAACGCGACGTTTCGAGGGCTACAAGGCCCTGAACGTCCGCCGGCTGAACATCA
TGGCCGGCGACGAAATTAAGTTCGCGCAACTTCGACACCCTGGTTCGAGCTGATTGCGCCGACCA
AGGATGACGTGGTGATCCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCCACAGGTG
CGTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATG
GTCGTCTACCTGCCTGGACAGCATGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGC
GAGAAGAATCATAATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCC
CAGCGCTCGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGG
ACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCAT
GTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACG
CAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTACCCCTG
GATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGCCCTTTCGCGGATATCGTCCATTC
CGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCG
CACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCCTGCTCGCTTCGCTACT
TGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGA
CGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCA
CCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGT
GGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGGCGC
GGCGGTGCTCAACGGCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTTCGCATAAGGG
AGAGCGTTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCGGGTGGGCGCGGGG
CATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGG
CAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTC
GCTTGGCGTATTCGGAATCTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAA
CGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTG
CTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCAT
CGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCT
TCAAGGATCGCTCGCGGCTTACCAGCCTAATTCGATCACTGGACCCTGATCGTACGGCG

ATTTATGCCGCCTCGGGCAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGGCGCCGCCCTATAACC
TTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAC
CATGAACGATCTGATAGAGAAGGGTTTGTCTGGGTGCGGTGGCTCTGGTAACGACCAGTATCCCC
ATCCCGGCTGGCCGTCCTGGCCGCCACATGAGGCATGTTCCGCGTCCTTGCAATACTGTGTTTA
CATAAGTCTATCGCTTAGCGGAAAGTTCTTTTACCCTCAGCCGAAATGCCTGCCGTTGCTAGAC
ATTGCCAGCCAGTGCCCGTCACTCCCGTACTAAGTGTACGAAACCCCTGCAATAACTGTCACGC
CCCCCTGCAATAACTGTCACGAAACCCCTGCAATAACTGTCACGCCCCCAAACCTGCAAACCCA
GCAGGGGCGGGGGCTGGCGGGGTGTTGGAAAAATCCATCCATGATTATCTAAGAATAATCCACT
AGGCGCGGTTATCAGCGCCCTTGTGGGGCGCTGCTGCCCTTGCCCAATATGCCCGGCCAGAGGC
CGGATAGCTGGTCTATTCGCTGCGCTAGGCTACACACCGCCCCACCCTGCGCGGCAGGGGGA
AAGGCGGGCAAAGCCCGCTAAACCCACACCAAACCCCGCAGAAATACGCTGGAGCGCTTTTA
GCCGCTTTAGCGGCCTTTCCCCCTACCCGAAGGGTGGGGGCGCGTGTGCAGCCCCGCAGGGCC
TGCTCGGTCGATCATTACGCCCAGGCTCATCCTTCTGGCGTGGCGGCAGACCGAACAAGGCGC
GGTCGTGGTCGCGTTCAAGGTACGCATCCATTGCCGCCATGAGCCGATCCTCCGGCCACTCGCT
GCTGTTACCTTGGCCAAAATCATGGCCCCACCAGCACCTTGCCTTGTTCGTTCTTGCGC
TCTTGCTGCTGTTCCCTTGCCCGCACCCGCTGAATTTCCGGCATTGATTGCGGCTCGTTGTTCTTC
GAGCTTGGCCAGCCGATCCGCCGCTTGTGCTCCCCCTAACCATCTTGACACCCCATTTGTTAAT
GTGCTGTCTCGTAGGCTATCATGGAGGCACAGCGGCGCAATCCCGACCCTACTTTGTAGGGGA
GGGCGCACTTACCGGTTTCTTTCGAGAAACTGGCCTAACGGCCACCCTTCGGGCGGTGCGCT
CTCCGAGGGCCATTGCATGGAGCCGAAAAGCAAAGCAACAGCGAGGCAGCATGGCGATTTAT
CACCTTACGGCGAAAACCGGCAGCAGGTTCGGGCGGCCAATCGGCCAGGGCCAAGGCCGACTA
CATCCAGCGCAAGGCAAGTATGCCCGGCATGGATGAAGTCTTGACGCCGAATCCGGGCA
CATGCCGGAGTTCGTCGAGCGGCCCGGACTACTGGGATGCTGCCGACCTGTATGAACGCGC
CAATGGGCGGCTGTTCAAGGAGGTGCAATTTGCCCTGCCGTCGAGCTGACCCTCGACCAGCA
GAAGGCGCTGGCGTCCGAGTTCGCCAGCACCTGACCGGTGCCGAGCGCTGCCGTATACGCT
GGCCATCCATGCCGGTGGCGGCGAGAACCCGCACTGCCACCTGATGATCTCCGAGCGGATCAA
TGACGGCATCGAGCGGCCCGCGCTCAGTGGTTCAAGCGGTACAACGGCAAGACCCCGGAGA
AGGGCGGGGCACAGAAGACCGAAGCGCTCAAGCCCAAGGCATGGCTTGAACAGACCCCGCA
GGCATGGGCCGACCATGCCAACCAGGCAATTAGAGCGGGTGGCCACGACGCCCGCATTGACCA
CAGAACACTTGAGGCGCAGGGCATCGAGCGCCTGCCCGGTGTTACCTGGGGCCGAACGTGG
TGGAGATGGAAGGCCGGGGCATCCGCACCGACCGGGCAGACGTGGCCCTGAACATCGACACC
GCCAACGCCAGATCATGACTTACAGGAATACCGGGAGGCAATAGACCATGAACGCAATCGA
CAGAGTGAAGAAATCCAGAGGCATCAACGAGTTAGCGGAGCAGATCGAACCGCTGGCCAGA
GCATGGCGACTGGCCGACGAAGCCCGCAGGTCATGAGCCAGACCCAGCAGGCCAGCGAG
GCGCAGGCGGCGGAGTGGCTGAAAGCCCAGCGCCAGACAGGGGGCGGCATGGGTGGAGCTGG
CCAAAGAGTTGCGGGAGGTAGCCCGGAGGTGAGCAGCGCCGCGCAGAGCGCCCGGAGCGC
GTCGCGGGGGTGGCACTGGAAGCTATGGCTAACCGTGATGCTGGCTTCCATGATGCCTACGGTG
GTGCTGTGATCGCATCGTTGCTCTTGTCTGACCTGACGCCACTGACAACCGAGGACGGCTCGA
TCTGGCTGCGCTTGGTGGCCCGATGAAGAACGACAGGACTTTGCAGGCCATAGGCCGACAGCT
CAAGGCCATGGGCTGTGAGCGCTTCGATATCGGCGTCAGGGACGCCACCACCGGCCAGATGAT
GAACCGGGAATGGTCAGCCGCCGAAGTGCTCCAGAACACGCCATGGCTCAAGCGGATGAATGC
CCAGGGCAATGACGTGTATATCAGGCCCGCCGAGCAGGAGCGGCATGGTCTGGTGTGTTGGA
CGACCTCAGCGAGTTTACCTGGATGACATGAAAGCCGAGGGCCGGGAGCCTGCCCTGGTAGT
GGAAACCAGCCCAGAAACTATCAGGCATGGGTCAAGGTGGCCGACGCCGAGGCCGGTGAAC
TTCGGGGGAGATTGCCCGGACGCTGGCCAGCGAGTACGACGCCGACCCGGCCAGCGCCGAC
AGCCGCCACTATGGCCGCTTGGCGGGCTTACCAACCGCAAGGACAAGCACACCACCCGCGCC
GGTATCAGCCGTGGGTGCTGCTGCGTGAATCCAAGGGCAAGACCGCCACCCTGGCCCGGCG
CTGGTGCAGCAGGCTGGCCAGCAGATCGAGCAGGCCAGCGGCAGCAGGAGAAGGCCCGCAG
GCTGGCCAGCCTCGAACTGCCGAGCGGCAGCTTAGCCGCCACCAGGCGCACGGCGCTGGACG
AGTACCGCAGCGAGATGGCCGGGCTGGTCAAGCGCTTCGGTGATGACCTCAGCAAGTGCAGCT
TTATCGCCGCGCAGAAGCTGGCCAGCCGGGGCCGAGTGCCGAGGAAATCGGCAAGGCCATG
GCCGAGGCCAGCCAGCGCTGGCAGAGCGCAAGCCCGGCCACGAAGCGGATTACATCGAGCG
CACCGTCAGCAAGGTATGGGTCTGCCAGCGTCCAGCTTGCCTGGGCGGAGCTGGCACGGGC
ACCGGCACCCCGCCAGCGAGGCATGGACAGGGGGCGGGCCAGATTTACGATGTAGTGTGCTTGC
TTGGTACTCACGCTGTTATACTATGAGTAGATCTACGCGTCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGT
ACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCAT
CAGGCGCCATTCCGCTTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC
GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG

GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATC
 CTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG
 AAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGG
 GGTGCCTAATGAGTGAGCTACTCGAGGCGGCCCACTCACGCACAGAAGGGGGTTTTATGGAA
 TACGAAAAAAGCGCTTCAGGGTCCGGTCTACCTGATCAAAAAGTGACAAGGGCTATTGGTTGCC
 GGTGGCTTTGGTTATACGTCAAACAAGGCCGAGGCTGGCCGCTTTTCAGTCGCTGATATGGCCA
 GCCTTAACTTGACGGCTGCACCTTGTCTTGTCCGCGAAGACAAGCCTTTTCGGCCCCGGCA
 AGTTTCTCGGTGACTGATATGAAAGACCAAAAAGGACAAGCAGACCCGGCGACCTGCTGGCCAG
 CCCTGACGCTGTACGCCAAGCGCGATATGCCGAGCGCATGAAGGCCAAAGGGATGCGTCAGCG
 CAAGTTCTGGCTGACCGACGACGAATACGAGGCGCTGCGCGAGTGCTGGAAGAAGCTCAGAG
 CGGCGCAGGGCGGGGGTAGTGACCCCGCCAGCGCCTAACCAACTGCCTGCAAAGGAGGC
 AATCAATGGCTACCCATAAGCCTATCAATATTCTGGAGGCGTTCGCAGCAGCGCCGCCACCGCT
 GGAATACGTTTGGCCAAACATGGTGGCCGGTACGGTTCGGGGCGCTGGTGTGCGCCGGTGGTGC
 CGGTAAATCCATGCTGGCCCTGCAACTGGCCGCACAGATTGCAGGCGGGCCGGATCTGCTGGA
 GGTGGGCGAACTGCCACCGGCCCGGTGATCTACCTGCCCGCCGAAGACCCGCCACCGCCAT
 TCATCACCGCCTGCACGCCCTTGGGGCGCACCTCAGCGCCGAGGAACGGCAAGCCGTGGCTGA
 CGGCCTGCTGATCCAGCCGCTGATCGGCAGCCTGCCAACATCATGGCCCCGGAGTGGTTTCGA
 CGGCCTCAAGCGCGCCGCGAGGGCCGCGCCTGATGGTGTGACACGCTGCGCCGGTTCGA
 CATCGAGGAAGAAAACGCCAGCGGCCCATGGCCAGGTCATCGGTTCGCATGGAGGCCATCGC
 CGCCGATAACGGGTGCTCTATCGTGTTCCTGCACCATGCCAGCAAGGGCGCGGCCATGATGGGC
 GCAGGCGACCAGCAGCAGGCCAGCCGGGGCAGCTCGGTACTGGTCGATAACATCCGCTGGCA
 GTCTACCTGTGCGAGCATGACCAGCGCCGAGGCCGAGGAATGGGGTGTGGACGACGACCAGC
 GCCGGTCTTCGTCCGCTTCGGTGTGAGCAAGGCCAACTATGGCGCACCGTTCGCTGATCGGTG
 GTTCAGGCGGCATGACGGCGGGGTGCTCAAGCCCGCCGTGCTGGAGAGGCAGCGCAAGAGCA
 AGGGGGTGCCCCGTGGTGAAGCCTAAGAACAAGCACAGCCTCAGCCACGTCCGGCACGACCC
 GGCGCACTGTCTGGCCCCCGCCTGTTCCGTGCCCTCAAGCGGGGCGAGCGCAAGCGCAGCA
 AGCTGGACGTGACGTATGACTACGGCGACGGCAAGCGGATCGAGTTCAGCGGCCCGGAGCCG
 CTGGGCGCTGATGATCTGCGCATCCTGCAAGGGCTGGTGGCCATGGCTGGGCCTAATGGCCTAG
 TGCTTGGCCCGGAACCAAGACCGAAGGCGGACGGCAGCTCCGGCTGTTCTTGAACCCAAG
 TGGGAGGCCGTCACCGCTGAATGCCATGTGGTCAAAGGTAGCTATCGGGCGCTGGCAAAGGAA
 ATCGGGGCAGAGGTGATAGTGGTGGGGCGCTCAAGCACATACAGGACTGCATCGAGCGCCTT
 TGGAAGGTATCCATCATCGCCAGAATGGCCGCAAGCGGCAGGGGTTTCGGCTGCTGTCCGAG
 TACGCCAGCGACGAGGCGGACGGGCGCCTGTACGTGGCCCTGAACCCCTTGATCGCGCAGGCC
 GTCATGGGTGGCGGCCAGCATGTGCGCATCAGCATGGACGAGGTGCGGGCGCTGGACAGCGA
 AACCGCCCGCCTGCTGCACCAGCGGCTGTGTGGCTGGATCGACCCCGGCAAAACCGGCAAGG
 CTTCCATAGATACCTTGTGCGGCTATGTCTGGCCGTCAGAGGCCAGTGGTTCGACCATGCGCAA
 GCGCCGCCAGCGGGTGC GCGAGGCGTTGCCGAGCTGGTTCGCGCTGGGCTGGACGGTAACCG
 AGTTCGCGGCGGGCAAGTACGACATCACCCGGCCAAAGGCGGCAGGCTGACCCCCCCTACTT
 ATTGTAACAAGACATTTTTATCTTTTATATTCAATGGCTTATTTTCCTGCTAATTGGTAATACCAT
 GAAAAATACCATGCTCAGAAAAGGCTTAACAATATTTTGA AAAATTGCCTACTGAGCGCTGCCG
 CACAGCTCCATAGGCCGCTTTCCTGGCTTTGCTTCCAGATGTATGCTCTTCTGCTCC

附图 6 pHW20a质粒序列及描述

Appendix Fig. 6 The complete sequence of pHW20a. and description

Incomplete *traI* CDS, 732-174; *orfX* CDS, 729-770; *traJ* CDS, 1138-767; *oriT* (RP4), 1139-1505; *traK* CDS, 1506-1910; incomplete *traL* CDS, 1910-2167; *mobC* CDS, 4746-4462; *oriT* (RSF1010), 4747-4944; *mobA* CDS, 4945-7074; *ob* CDS, 5693-6106; *oriV* (RSF1010), 4045-4529; *repB* CDS, 6103-7074; *repA* CDS, 8035-8874; *repC* CDS, 8861-9712; *Ptc'*, 2526-2610; *tc'* CDS, 2611-3801; *lacZa* CDS, 7496-7124. The *repA*, *repB*, and *repC* genes encode proteins participating in the replication of pHW20a and they constitute the *mob* gene from RSF1010 with *oriT*. The *mobA*, *mobB*, and *mobC* encode proteins necessary for the mobilization of pHW20a. *OriV*, designate the plasmid replication region. The *TraI*, *traJ*, *traK*, *traL*, and *oriT* constitute the *mob* gene of RP4. *OriT*, from RSF1010 and RP4 for transfer replication.

博士期间研究成果

研究论文:

1. **Hong-Wei Dong**, Liqiang Fan, Jian-Jiang Zhong, Jie Bao. 2010. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for formic acid utilization and NADH regeneration in corn stover hydrolasate fermentation. **Metabolic Engineering, In preparation**
2. **Hong-Wei Dong**, Jie Bao, Dewey D. Y. Ryu, Jian-Jiang Zhong. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. **Biotechnology & Bioengineering, Accepted**
3. **Hong-Wei Dong** & Jie Bao. 2010. Biofuel via biodetoxification. **Nature Chemical Biology**. 6: 316-318
4. Changjun Liu #, **Hong-Wei Dong** #, Jian-Jiang Zhong, Dewey DY Ryu, Jie Bao. 2010. Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. **Journal of Biotechnology**. 148:105-112 (# 共同第一作者)

申请专利:

1. 鲍杰, 董宏伟, 刘长俊 一种构建 GFOR 过表达质粒提高山梨醇产量的方法。申请日: 2009.08.19。申请号: **200910056639.0**
2. 鲍杰, 刘长俊, 董宏伟 一种以金属离子对运动发酵单胞菌细胞进行细胞预处理的山梨醇生产方法。申请日: 2009.08.19。申请号: **200910056636.7**

会议摘要:

1. **Hong-Wei Dong**, Li-Qiang Fan, Chen-Yun Gao, Ning Wang, Jie Bao, Jian-Jiang Zhong. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for formic acid utilization and NADH regeneration in corn stover hydrolasate fermentation. The Asian Congress on Biotechnology 2011 (ACB-2011), May 11-15, 2011, Shanghai, China (**accepted for oral presentation**)
2. **Hong-Wei Dong**, Jie Bao, Dewey D. Y. Ryu, Jian-Jiang Zhong. An improved gram-negative broad-host-range vector for *Zymomonas mobilis* transformation with high transconjugation efficiency. 2010 KSBB Spring Meeting and International Symposium, April 15-16, 2010, Seongnam-City, Korea
3. **Hong-Wei Dong**, Zi-Chen Luo, Chang-Jun Liu, Jie Bao, Jian-Jiang Zhong. A tool vector system for *Zymomonas mobilis* with high transconjugation efficiency. The 15th Symposium of Young Asian Biochemical Engineer's Community (YABEC 2009), December 18-20, 2009, Xiamen, China (**Best Poster Presentation Award**)
4. **Hong-Wei Dong**, Zi-Chen Luo, Chang-Jun Liu, Jie Bao, Jian-Jiang Zhong. An improved gram-negative broad host vector for *Zymomonas mobilis* stransformation. The 3rd International Conference on Bio-, Environ-, Nano- Technologies and Electro-Engineering (ICBENT's 2009), December 15-17, 2009, Shanghai, China

致 谢

本论文系在导师钟建江和鲍杰两位教授的悉心指导下完成。两位导师对科学真理孜孜不倦探索的精神不断熏陶着我。五年的博士学位攻读历程，无处不凝结着两位导师的心血。两位导师对科学研究严谨的态度和学术生活的正直精神时刻影响着我的科研观和人生观。本论文从选题到实验过程和结果，从科研论文的准备到博士论文的撰写和修改，折射着两位老师的汗水和智慧。尤其在选题和科研论文准备阶段，两位导师从实验可行性的论证到写作文法及文章逻辑，随时给我指导，使我犹如醍醐灌顶。修道立德，得恩于师。在此，谨向两位导师表示最衷心的感谢和崇高的敬意！

同时，我也要感谢孙谧教授、王跃军副研究员和于建生副教授曾经对我的教导和培养。没有他们的指引，我不可能一窥生物技术这广阔的研究领域。饮水思源，感谢三位导师的培养和教导。感谢华东理工大学药学院的段梅莉副教授、生物工程学院的辛秀娟副教授和胡凤仙副教授三位老师在实验和生活上的大力帮助。同时也感谢上海交通大学的缪晓玲副教授和喻宝吾小姐两位老师在课题上的指导和（或）生活等方面的帮助。

感谢刘长俊在本论文第四章实验上的相互配合与合作以及罗子臣和高臣云两位同学分别在第二章和第五章给予的实验协助。同时也感谢在这五年多博士生涯中曾给予指导的孙国新博士、章文贤副教授、徐军伟博士、雍阳春博士、翟丹丹博士、周欣等师兄师姐。感谢曾我一起在朝夕相处给予支持和帮助的周文文博士、张燎原博士以及齐凯、林锦霞、黄松燕、张建、楚德强、荆新云、魏振华、刘建明、李英波、高臣云、王凝、周忠新、周潭澈、邹韞智、赵凯、国立浩、何燕青、刘如明、安克红、刘威、赵蔚和王远等师弟师妹。

在研究论文的撰写和发表过程中，美国加利福尼亚大学戴维斯分校的Dewey D. Y. Ryu在论文的组织、撰写、修改和发表上提出了许多宝贵意见并倾注了大量心血，再次向Ryu教授严谨的态度和大力帮助表示崇高的敬意和深深的感谢。此外，还要感谢美国佛罗里达大学L. O. Ingram教授馈赠的pLOI93质粒、澳大利亚新南威尔逊大学的Peter Rogers教授馈赠的*Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC 31821)菌株、中国科学院植物生理生态研究所杨晟教授慷慨赠送的*Zymomonas mobilis* ZM8 (ATCC10988)菌株以及华东理工大学大学生工学院范立强副教授慷慨提供的pET-28a(+)-*fdhI*质粒。

感谢父母和岳父母对我生活和研究工作的关心和支持。岳父虽然罹患癌症仍然隐瞒病情使我专心于学业；母亲虽然常年疾患缠身，却叮嘱我专心于自己的课题。对于父母们的良苦用心，使我深深感动并有愧于为人子女却无法膝下尽孝。另外我还要感谢我的哥嫂，他们的支持和对父母的悉心照料，使我得以全身心的投入博士学位的攻读过程中。最后，我要感谢我的爱人陈卓女士。她的出现使博士阶段的学习变得不再枯燥，学术和思想上的交流使我更加钟爱于生命科学这广阔的天地。没有她的关心、理解和支持我亦不可能全身心的投入研究和论文的撰写工作中。

谨以此文献给曾经所有关心、支持和帮助过我的所有善良的人！

董宏伟

二零一零年十月 于华东理工大学