

重组运动发酵单胞菌催化产山梨醇研究

摘要

本文研究目的是针对以葡萄糖和果糖为底物生产高附加值生物基化学品山梨醇和葡萄糖酸的过程建立具有竞争性的生物过程技术。将含有 *gfo* 基因的质粒 pHW20a-*gfo* 转入运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* ZM4)中构建基因工程菌 *Zymomonas mobilis* ZM4(pHW20a-*gfo*)，成功过表达葡萄糖果糖氧化还原酶(GFOR)。在摇瓶和 3 L 发酵罐培养中，基因工程菌中葡萄糖果糖氧化还原酶酶活比野生菌高出两倍多。分批发酵实验表明，单位发酵体积、单位细胞 GFOR 产率、单位底物 GFOR 产率分别为 2.59 U/ml, 0.70 U/mg 和 24.4 U/g。以葡萄糖和果糖为底物利用葡萄糖果糖氧化还原酶通过生物催化法生产山梨醇和葡萄糖酸，在催化反应中加入金属离子能够显著提高山梨醇和葡萄糖酸的产率并且显著降低副产物乙醇的生成量。在所选金属离子中， Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 对提高目标产物产率降低副产物生成量具有显著效果。 Zn^{2+} 能够抑制 Entner-Doudoroff 路径中合成乙醇所必需的大多数酶的活性，将乙醇的产量从 16.7 g/L 降低到 1.78 g/L，同时山梨醇的产率从 89%增加到接近 100%。 Ca^{2+} 具有双重作用，它不仅能够将山梨醇的产率提高到接近 100%，而且在反应体系中能形成葡萄糖酸钙沉淀增加葡萄糖酸的生成速率，并且易于将葡萄糖酸从山梨醇和葡萄糖酸混合溶液中分离出。同时，本课题对山梨醇及其副产物的分离纯化方法也进行了探索和研究。

关键词：重组运动发酵单胞菌；葡萄糖果糖氧化还原酶；山梨醇；金属离子；分离纯化

Sorbitol Production Using Recombinant *Zymomonas mobilis* Strain

Abstract

The primary goal of this research was to develop a competitive bioprocess technology enabling production of high value added intermediate building block chemicals such as sorbitol and gluconic acid from fructose and glucose. A recombinant *Zymomonas mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*) strain harboring the conjugation plasmid pHW20a-*gfo* was constructed and glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) was over-expressed. The productivity of GFOR enzyme in the new recombinant strain constructed is at least two folds greater than that in the wild strain at both flasks and 3-liter fermenters. The maximum GFOR yields achieved in terms of volumetric yield, cellular yield, and the yield based on glucose substrate under the experimental conditions used are 2.59 units per ml, 702.7 units per gram of cells, and 24.4 units per gram of glucose, respectively, in the batch cultures. A significant improvement of the bioconversion process for production of sorbitol and gluconic acid as target products from glucose and fructose was made by using divalent metal ions which reduced the ethanol yield drastically and significantly increased the yields of target products. Among several metal ions evaluated Zn^{2+} and Ca^{2+} are found to be the most effective ions in the yield enhancement of target products and the reduction of ethanol yield. The Zn^{2+} ion inhibits the Entner-Doudoroff pathway enzymes and it reduces the ethanol yield from 16.7 to 1.78 gram per liter and at the same time it increased the sorbitol yield to almost 100% from 89%. The Ca^{2+} ion shows dual effects. It not only enhanced the sorbitol yield to almost 100% but also formed calcium gluconate salt in the reaction system resulting in an increased rate of gluconate production and easy separation of gluconate from the mixture of sorbitol and gluconate. Besides, the separation method of sorbitol from the reaction mixture was tested.

Keywords: Recombinant *Zymomonas mobilis*; Glucose-fructose oxidoreductase; Sorbitol; Metal ion addition; Separation

目录

| | |
|---|----|
| 前言 | 1 |
| 第一章 文献综述 | 3 |
| 1.1 山梨醇的理化性质、应用及工业生产方式 | 3 |
| 1.2 葡萄糖酸 | 4 |
| 1.3 运动发酵单胞菌的生物特性 | 4 |
| 1.4 葡萄糖果糖氧化还原酶 | 4 |
| 1.5 葡萄糖果糖氧化还原酶生物催化产山梨醇 | 6 |
| 1.6 山梨醇分离纯化 | 9 |
| 1.7 生产山梨醇的其他微生物 | 9 |
| 1.8 生物法生产山梨醇、葡萄糖酸和其他副产物的工业前景 | 9 |
| 1.9 本课题的研究内容与意义 | 11 |
| 第二章 材料与方法 | 13 |
| 2.1 实验材料与设备 | 13 |
| 2.1.1 菌种 | 13 |
| 2.1.2 实验试剂 | 13 |
| 2.1.3 培养基 | 14 |
| 2.1.4 实验仪器 | 15 |
| 2.2 分析方法 | 16 |
| 2.2.1 菌体浓度的测定 | 16 |
| 2.2.2 菌体干重的测定 | 16 |
| 2.2.3 蛋白质含量的测定方法 | 17 |
| 2.2.4 GFOR 酶活测定方法 | 18 |
| 2.2.5 高效液相色谱法测定组分含量 | 19 |
| 2.3 <i>Zymomonas mobilis</i> 培养过程 | 19 |
| 2.3.1 菌种保藏方法 | 19 |
| 2.3.2 培养过程 | 20 |
| 2.3.3 不同培养基组成对菌体生长的影响 | 20 |
| 2.3.4 不同通气速率对菌体生长及 GFOR 酶活的影响 | 20 |
| 2.3.5 不同葡萄糖浓度对菌体生长及 GFOR 酶活的影响 | 21 |
| 2.3.6 不同 pH 值对菌体生长及 GFOR 酶活的影响 | 21 |
| 2.4 基因工程菌构建过程 | 21 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| 2.5 | GFOR 酶活测定过程 | 23 |
| 2.6 | 生物催化产山梨醇过程 | 23 |
| 2.7 | 山梨醇分离纯化过程 | 23 |
| 2.7.1 | 生物催化分离山梨醇过程 | 24 |
| 2.7.2 | 乙偶姻生成代谢路径分析 | 25 |
| 2.7.3 | 旋转蒸发分离出山梨醇 | 25 |
| 第三章 实验结果 | | 26 |
| 3.1 | <i>Z. mobilis</i> 培养条件优化 | 26 |
| 3.1.1 | <i>Z. mobilis</i> ZM4 培养基组成的优化 | 26 |
| 3.1.2 | 不同通气速率对 <i>Z. mobilis</i> ZM4 和 ZM6 生长的影响 | 29 |
| 3.2 | <i>Z. mobilis</i> 基因工程菌培养条件优化 | 29 |
| 3.2.1 | 不同通气速率对基因工程菌生长和 GFOR 酶活的影响 | 29 |
| 3.2.2 | <i>Z. mobilis</i> ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 和 ZM4 酶活的比较 | 31 |
| 3.2.3 | 不同葡萄糖浓度对 ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 生长和 GFOR 酶活的影响 | 32 |
| 3.2.4 | 不同 pH 对 ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 生长和 GFOR 酶活的影响 | 33 |
| 3.3 | ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 细胞催化产山梨醇 | 34 |
| 3.3.1 | 细胞反复冻溶后催化产山梨醇 | 34 |
| 3.3.2 | 金属离子对催化产山梨醇的影响 | 35 |
| 3.4 | 山梨醇的分离纯化 | 38 |
| 3.4.1 | 生物催化代谢葡萄糖酸 | 38 |
| 3.4.2 | 生物催化产山梨醇 | 39 |
| 3.4.3 | 乙偶姻生成代谢路径分析 | 39 |
| 3.4.4 | 乙偶姻产量提高实验 | 43 |
| 3.4.5 | 旋转蒸发分离山梨醇和乙醇、乙偶姻 | 44 |
| 第四章 结论与展望 | | 47 |
| 4.1 | <i>Z. mobilis</i> 培养条件优化 | 47 |
| 4.2 | <i>Z. mobilis</i> 基因工程菌培养条件优化 | 47 |
| 4.3 | ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 细胞催化产山梨醇 | 48 |
| 4.4 | 山梨醇的分离纯化 | 50 |
| 参考文献 | | 52 |
| 攻读硕士期间发表的文章 | | 57 |
| 致谢 | | 58 |

前言

由于以石油为基础的能源和化工产业具有不可持续性,为现有生产过程寻求基于以生物质为原料的可再生资源的新技术和新产品已迫在眉睫。我国是个农业大国,拥有大量的生物质资源,非常适合在这一领域开发以可再生资源为基础的新的生产过程以解决能源危机。山梨醇是美国能源部筛选的最具开发潜力的 12 个生物质来源关键中间体之一,而葡萄糖酸是最具开发潜力的 30 个关键中间体之一,都具有进行产业化应用的重要价值。

山梨醇用途广泛,其直接应用包括在食品工业上作为风味独特的甜味剂用在口香糖、甜点、糖果、冰激凌、糖尿病患者食品等,并可以用作增湿剂、质地成构剂、软化剂等。山梨醇的主要用途之一是作为维生素 C 的前体材料。以山梨醇作为生物炼制中间体,可以生产多种重要的取代石油化学品的材料和化学品;其主要衍生物包括异山梨醇、丙二醇、聚山梨醇脂肪酸酯、乳酸、甘油、多聚糖类等等。其中异山梨醇作为一个优良的耐高温聚乙烯酯(polyethylene terephthalate, PET)的共聚物具有重要的工业价值。

葡萄糖酸及其衍生物是重要的食品添加剂和工业中间体。葡萄糖酸钙极易被人体吸收并极少副作用。葡萄糖酸特别适用于金属和其它材料的表面清洗,是一种高级的表面清洗剂。并且以葡萄糖酸作为生物炼制中间体可以生产多种重要的取代石油化学品的材料和化学品。

目前山梨醇的工业生产技术是 50%的 D-葡萄糖浆催化加氢工艺。世界范围内 80%山梨醇通过间歇反应生成。在间歇工艺流程中,葡萄糖选择加氢反应在 70 个大气压下使用 3-6%的镍催化剂,或者在 50 个大气压下使用 14%镍催化剂的条件下进行,pH 为 5.0-6.0,反应温度为 120-150 °C。可以看出,化学法生产山梨醇是一个高耗能、回收成本高昂并产生环境污染的工艺。

葡萄糖酸是通过葡萄糖和其它含葡萄糖的原料氧化制备。工业生产方法有直接氧化法、铂催化氧化法、以及使用 *Aspergillus niger* 菌株的发酵法。目前的主要生产工艺是发酵法;发酵法的主要技术障碍是过程复杂、发酵条件严格、收率较低。这使得葡萄糖酸的生产成本偏高从而限制了葡萄糖酸的应用前景。

葡萄糖果糖氧化还原酶(Glucose-fructose oxidoreductase, GFOR)存在于运动发酵单胞菌细胞周质中,能够以葡萄糖和果糖为底物进行一个乒乓机制的酶催化反应。GFOR 首先把葡萄糖氧化为葡萄糖酸内酯,并且伴随着辅酶 NADP 被还原为 NADPH;随后 GFOR 以果糖为底物将果糖还原为山梨醇,NADPH 被氧化为 NADP。葡萄糖酸内酯在葡萄糖酸内酯酶(GL)的作用下转化为葡萄糖酸。这一过程中 NADPH 能够循环利用,无需额外的加入;并且反应简单,反应条件温和,无需高压设备,节约能源,并且对环境友好。

本课题的研究意义在于建立利用葡萄糖果糖氧化还原酶通过生物催化生产山梨醇和葡萄糖酸的方法,并使这一方法具有工业化应用的可行性。研究内容主要包括培养基

组成优化期望能够提高 GFOR 酶活和细胞浓度，缩短培养时间，降低培养细胞成本；构建基因工程菌提高 GFOR 酶活力单位，并对其培养条件进行优化以期能够提高 GFOR 酶活表达量，降低细胞培养过程成本；建立一种新的山梨醇生产方法，山梨醇产量能够达到 100%，并且克服已有方法的不足，能够将这一方法用于工业化生产山梨醇过程中；进行山梨醇分离纯化方面的研究，解决这一过程中的关键技术难题，建立科学、合理、高效，节能并能够用于工业化生产山梨醇及其副产物的分离纯化方法，进一步降低工业化过程中生产山梨醇的成本。

第一章 文献综述

1.1 山梨醇的理化性质、应用及工业生产方式

山梨醇(D-Sorbitol), 又称山梨糖醇, 其化学名为 1,2,3,4,5,6-己六醇, 分子式为 $C_6H_{14}O_6$, 相对分子质量为 182.17。天然的山梨醇存在于许多水果中, 如苹果(0.20-1.01 g / 100 g)、梨子(1.20-2.80 g / 100 g)、李子(0.60-2.01 g / 100 g)、桃子(0.50-1.25 g / 100 g)、樱桃(1.40 g / 100 g)、黑葡萄(0.20 g / 100 g)、浆果等^[1,2]。山梨醇在常温下有液体和固体两种状态: 液体山梨醇为 50%-70%的水溶液, 无色、无臭、味甜, pH 值为 6-7, 10%水溶液的旋光度 $[\alpha]_d^{20}$ 为-1.98°; 固体山梨醇为白色针状、片状、粒状结晶粉末, 极易溶于水, 味道清凉爽口, 甜度约为蔗糖甜度的 60%。山梨醇的化学性质相对稳定, 易溶于水, 不腐蚀、不燃烧、不挥发, 具有很强的吸湿性, 热稳定性比相应的糖高很多; 浓度高于 60%时具有抗微生物特性。

山梨醇用途广泛, 其直接应用包括在食品工业上作为风味独特的甜味剂用在口香糖、甜点、糖果、冰激凌、糖尿病患者食品等, 并可以用作增湿剂、质地成构剂、软化剂等^[1,3,4]。此外山梨醇的主要用途之一是作为维生素 C 的前体材料。山梨醇是生物炼制产业最具开发潜力的 12 个关键中间体之一^[5]。以山梨醇作为生物炼制中间体, 可以生产多种重要的取代石油化学品的材料和化学品。主要衍生物包括异山梨醇、丙二醇、聚山梨醇脂肪酸酯、乳酸、甘油、多聚糖类等等。其中异山梨醇作为一个优良的耐高温聚乙烯酯(Polyethylene Terephthalate, PET)的共聚物具有重要的工业价值。美国的 DuPont 和 Cargill 目前都正在进行异山梨醇的工业化开发^[6]。聚山梨醇脂肪酸酯(Sorbitan Fatty Acid Esters, SFAE) 是一类非离子性的亲油性表面活性剂^[7], 广泛应用于抗静电乳化剂、纺织软化剂、润滑剂、消泡剂、遮光剂、化妆品增湿剂等。丙二醇则是一个性能优良应用广泛的抗冷冻剂^[4]。

目前山梨醇的工业生产技术是 50%的 D-葡萄糖浆催化加氢工艺^[3,4,8,9,10,11]。世界范围内 80%山梨醇通过间歇反应生成。在间歇工艺流程中, 葡萄糖选择加氢反应在 70 个大气压下使用 3-6%的镍催化剂, 或者在 50 个大气压下使用 14%镍催化剂的条件下进行, pH 为 5.0-6.0, 反应温度为 120-150°C。在连续工艺流程, 反应在 180-200 个大气压和 140-170°C 的温度下进行, pH 为 6.0, 镍催化剂的浓度为 2%。催化剂在反应之后用重力沉降和过滤的方法回收。产品杂质通过离子交换色谱柱和活性碳柱过滤。加氢所用的氢气来自化石燃料如天然气、轻烃和轻油。因此, 必须配置制氢装置和储氢设备。最近, 铷催化剂被用来提高山梨醇的产率^[12]。可以看出, 化学法生产山梨醇是一个高耗能、回收成本高昂并产生环境污染的工艺。

1.2 葡萄糖酸

葡萄糖酸及其衍生物是重要的食品添加剂和工业中间体^[13]。葡萄糖酸钙极易被人体吸收并极少副作用，因此是最佳的补钙营养助剂之一。葡萄糖酸特别适用于金属和其它材料的表面清洗，是一种高级的表面清洗剂。葡萄糖酸是生物炼制产业最具开发潜力的 30 个关键中间体之一^[5]。以葡萄糖酸作为生物炼制中间体可以生产多种重要的取代石油化学品的材料和化学品。

葡萄糖酸是通过葡萄糖和其它含葡萄糖的原料氧化制备。工业生产方法有直接氧化法、铂催化氧化法、以及使用 *Aspergillus niger* 菌株的发酵法^[13, 14]。目前的主要生产工艺是发酵法；发酵法的主要技术障碍是过程复杂、发酵条件严格、收率较低。这使得葡萄糖酸的生产成本偏高从而限制了葡萄糖酸的应用前景。

1.3 运动发酵单胞菌的生物特性

运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)最早是从一些植物的发酵液中如龙舌兰属植物和甘蔗，以及坏掉的苹果酒和啤酒中分离出来的。在热带国家，运动发酵单胞菌广泛存在于含糖的果汁中。Swings 和 De Ley^[15]对运动发酵单胞菌的生物特性进行了广泛的研究。它属于革兰氏阴性菌，兼性厌氧，具有圆端肥粗的杆状细胞，单个或成对出现，具有鞭毛，能够运动但并不是其必要特性，尺寸大约为 $1.4\text{-}2.0\ \mu\text{m} \times 4.0\text{-}5.0\ \mu\text{m}$ ，较少成短链，在琼脂平板上生长较为缓慢。运动发酵单胞菌能够以蔗糖、葡萄糖和果糖为底物，不能广泛利用其他糖类和脂肪酸作为碳源；细胞内 DNA 中 G + C 的含量大约为 47.5-49.5%^[16]。

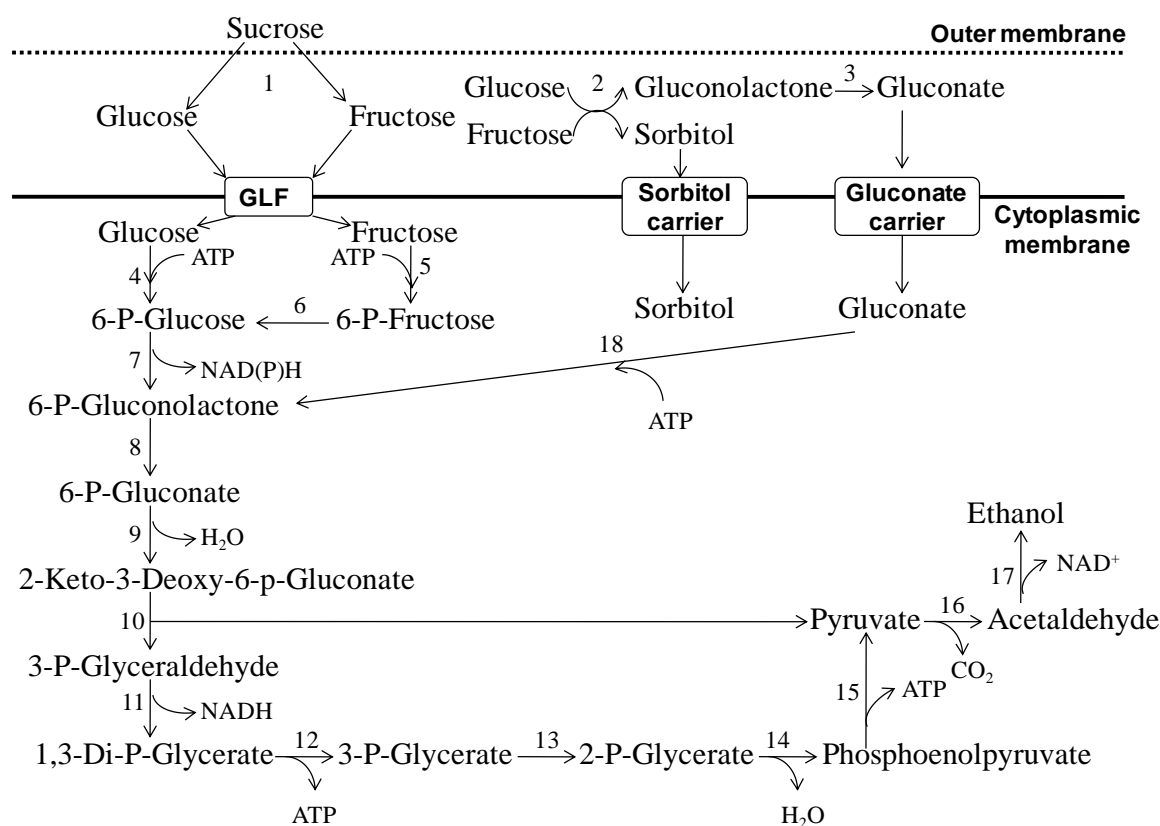
由于运动发酵单胞菌具有独特的生物化学方面的特性，其体内的代谢路径(Entner-Doudoroff pathway)已经得到广泛的研究(图 1.1)。运动发酵单胞菌能够利用 Entner-Doudoroff 代谢路径在厌氧的条件下把 1 mol 葡萄糖降解为 2 mol 乙醇和 2 mol 二氧化碳(见图 1.1)^[17, 18]。在这一过程中只消耗 1 个三磷酸腺苷(ATP)，并且只有 2%-5%的碳源用于细胞自身的生长^[15]。每个摩尔的葡萄糖转化为乙醇和二氧化碳的量可能随着培养条件的变化而变化。此外运动发酵单胞菌也能利用同样的方法将果糖降解，产生乙醇、二氧化碳以及自身组分物质^[15]。除了葡萄糖和果糖外，蔗糖是二糖中唯一能够被运动发酵单胞菌利用的碳源。蔗糖在果聚糖蔗糖酶的作用下被降解成葡萄糖和果糖，进而被运动发酵单胞菌进一步代谢或聚合成果聚糖^[19-24]。

在无氧的条件下运动发酵单胞菌代谢葡萄糖、果糖或蔗糖主要生成乙醇和二氧化碳；但在有氧的条件下能够生成少量的乙醛、醋酸盐、乳酸盐和乙偶姻^[25]。在厌氧的条件下，当培养基中同时含有葡萄糖和果糖时，运动发酵单胞菌能够生成山梨醇、葡萄糖酸、乙醇和二氧化碳^[26]。

1.4 葡萄糖果糖氧化还原酶

葡萄糖果糖氧化还原酶(Glucose-fructose oxidoreductase, GFOR)存在于运动发酵单

胞菌细胞周质中；它由四个相同的亚基聚合而成，每个亚基的分子量大约为 40 000 Da，紧密连接烟酰胺腺嘌呤核苷二磷酸(NADP)作为 GFOR 的辅酶；其最适 pH 为 6.4，最适温度为 39°C^[27, 28]。Kingston 等^[29]发现 GFOR 的结构与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶极为相似，推测这两种酶可能来源于同一个前体。



注：GLF，葡萄糖运输载体。编号对应的酶为：1. 果聚糖蔗糖酶；2. 葡萄糖果糖氧化还原酶；3. 葡糖酸内酯酶；4. 葡萄糖激酶；5. 果糖激酶；6. 6-磷酸葡萄糖异构酶；7. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶；8. 6-磷酸葡糖酸内酯酶；9. 6-磷酸葡糖酸脱水酶；10. 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡糖酸醛缩酶；11. 磷酸甘油醛脱氢酶；12. 磷酸甘油酸激酶；13. 磷酸甘油酸变位酶；14. 烯醇酶；15. 丙酮酸激酶；16. 丙酮酸脱羧酶；17. 乙醇脱氢酶；18. 葡糖酸激酶。

图 1.1 运动发酵单胞菌利用葡萄糖和果糖生成山梨醇、葡萄糖酸以及乙醇的代谢路径

Fig. 1.1 Mechanism of sorbitol, gluconate, and ethanol formation from glucose and fructose in *Z. mobilis*.

GLF, glucose facilitator. The enzyme code numbers are: 1. Levan sucrose; 2. Glucose-fructose oxidoreductase; 3. Gluconolactonase; 4. Glucokinase; 5. Fructokinase; 6. 6-P-Glucose isomerase; 7.

6-P-Glucose dehydrogenase; 8. 6-P-Gluconolactonase; 9. 6-P-Gluconate dehydratase; 10.

2-keto-3-deoxy-6-P-Gluconate aldolase; 11. 3-P-Glyceraldehyde dehydrogenase; 12. Phosphoglycerate kinase; 13. Phosphoglycerate mutase; 14. Enolase; 15. Pyruvate kinase; 16. Pyruvate decarboxylase; 17.

Alcohol dehydrogenase; and 18. Gluconate kinase.

Leigh 等^[30]首次正确地阐述了运动发酵单胞菌生产山梨醇和葡糖酸的代谢路径；他们推测可能有一个未知的辅助因子把两种酶连接在一起催化葡萄糖和果糖转化为葡糖酸和山梨醇。随后，Zachariou 和 Scopes^[27]提出运动发酵单胞菌所特有的葡萄糖果糖氧化还原酶能够把葡萄糖氧化为葡糖酸内酯，并且伴随着辅酶 NADP 被还原为 NADPH；随后 GFOR 以果糖为底物将果糖还原为山梨醇，NADPH 被氧化为 NADP。葡糖酸内酯在葡糖酸内酯酶(GL)的作用下转化为葡糖酸。生成的山梨醇和葡糖酸分别通过各自的运输载体进入细胞内。葡糖酸在葡糖酸激酶的作用下转化为 6-磷酸葡糖酸内酯进入 Entner-Doudoroff 代谢路径进一步被代谢；而山梨醇不被代谢存在于细胞内(图 1.1)。这一过程中 NADPH 能够循环利用，无需额外的加入。GFOR 催化反应的作用机制是一个典型的乒乓机制，首先葡萄糖在被转化为葡糖酸的过程中释放出 GFOR，然后 GFOR 将果糖还原成山梨醇^[31]。研究表明，GFOR 的生理学功能可能是当运动发酵单胞菌处在较高的渗透压的环境下对细胞的渗透压进行调节；如在高葡萄糖浓度中细胞自身为了生长，GFOR 能够利用底物生成山梨醇以抵抗环境的渗透压^[32]。

为了使细胞中的 GFOR 达到较高的活力，以提高山梨醇的产量，运动发酵单胞菌必须以葡萄糖为唯一碳源。GFOR 的酶活力随着葡萄糖浓度的增加而不断的增加；当以果糖为底物时 GFOR 酶活则较低，果糖对 GFOR 酶活具有一定的抑制作用；当葡萄糖果糖同时存在时，GFOR 酶活同样低于单独以葡萄糖为底物是的情况；其他物质对 GFOR 酶活没有诱导作用^[27]。通过分子生物学的方法，将编码 GFOR 的基因 *gfo* 进行克隆，在运动发酵单胞菌(*Z.mobilis*)体内进行过量表达，与野生菌相比 GFOR 酶活得到了极大提高^[28, 33]。然而将 *gfo* 基因在大肠杆菌(*E.coli*)中进行过表达时，大肠杆菌仅能够形成 GFOR 的前提(preGFOR)，并不能将 preGFOR 进一步加工形成成熟的 GFOR 蛋白^[34]。

因此目前生物法生产山梨醇主要通过以葡萄糖和果糖为底物，以 GFOR 作为催化剂，将底物转化为山梨醇和葡糖酸；其中 GFOR 或是以整细胞的形式或是以游离酶的形式。当 GFOR 以游离的形式生产山梨醇和葡糖酸时，其酶活将变得极不稳定，但是硫醇试剂、活性谷胱甘肽和尿素等能保护 GFOR 酶活^[35]。这可能与酶活性部位的半胱氨酸被氧化有关^[36]。

1.5 葡萄糖果糖氧化还原酶生物催化产山梨醇

在传统的分批发酵过程中，当以 150 g/L 葡萄糖和果糖的混合物为底物时，发酵过程中运动发酵单胞菌生成的主要产物是乙醇，而山梨醇的产量占底物质量的 11%^[26]。在这一过程中，生成的葡糖酸通过 Entner-Doudoroff 代谢路径，进一步代谢主要生成二氧化碳和乙醇。

利用 *Z.mobilis* 细胞进行生物催化产山梨醇时，葡萄糖和果糖都是通过葡萄糖转运载体(GLF)进入周质的。山梨醇形成后被一种特殊的载体从周质运输到细胞质。考虑在传统发酵过程中山梨醇的产量太低，Chun 和 Rogers^[37]发现了一个提高山梨醇产量的有效方法，即将培养好的运动发酵单胞菌 ZM4(ATCC 31821)菌株细胞离心浓缩，随后用 10%

(V/V)的甲苯进行渗透处理,其目的是将细胞内的大部分的可溶性辅助因子释放出来,而这些因子对于葡萄糖、果糖或葡萄糖酸通过 Entner-Doudoroff 代谢路径生成乙醇和二氧化碳以及其他代谢产物的整个过程来说是必需的。经过甲苯处理的细胞,通过 16h 的分批反应,山梨醇和葡萄糖酸的浓度分别能够达到 290 g/L 和 283 g/L;山梨醇和葡萄糖酸的产率接近 95%。在分批反应过程中,将经过甲苯处理的运动发酵单胞菌用藻酸钙进行固定化,用固定化后的细胞生产山梨醇和葡萄糖酸能够达到相同的效果,尽管固定化细胞在重复利用过程中酶活有所损失。Chun 和 Rogers^[37]利用固定化细胞进行了 125 h 连续的发酵,整个过程中山梨醇和葡萄糖酸的浓度维持在 80-85 g/L,并且产率分别为 7.6 g/(L·h)和 7.2 g/(L·h)。Scopes 等人将这一产山梨醇过程申请了专利^[38]。

Ichikana 等^[39]研究发现将运动发酵单胞菌细胞进行干燥处理,随后以葡萄糖和果糖为底物生物催化生产山梨醇和葡萄糖酸,发现山梨醇和葡萄糖酸的浓度达到很高,同时只有很少量的乙醇生成。这是因为在 Entner-Doudoroff 代谢路径中,负责把底物转化为乙醇的酶在干燥过程中已经失活,而 GFOR 和 GL 能仍然保持较高活性,这可以说明 GFOR 酶活比较稳定。

Rehr 等^[40]以葡萄糖作为单一碳源培养 *Z. mobilis* (ATCC 29191),收集细胞用于催化产山梨醇。在 600 g/L 的葡萄糖和果糖的等摩尔混和物水溶液中,运动发酵单胞菌将葡萄糖和果糖转化为山梨醇和葡萄糖酸,产量分别达到 240 g/L 和 210 g/L。通过对 7 种渗透剂处理的细胞进一步实验研究,十六烷基三甲基溴化胺(CTAB) 渗透处理效果最佳。Rehr 等^[40]进一步研究发现在所选的所有渗透剂中包括甲苯,运动发酵单胞菌经过这些试剂处理后,GFOR 酶活力不受影响;并且只需用浓度为 0.1% (w/v)的 CTAB 对细胞进行处理 10 min 就足以抑制乙醇的产生。在间歇反应条件下,用经过 CTAB 处理的游离细胞催化产山梨醇和葡萄糖酸山梨醇和葡萄糖酸的产率分别能够达到 98%和 99%。利用藻酸钙对经过渗透处理的细胞进行固定化,随后用聚乙烯亚胺和戊二醛进行硬化处理,GFOR 酶活有所损失。这主要是由于底物运输阻力增加或是在固定化过程中 GFOR 失活的原因,结果导致山梨醇和葡萄糖酸的产率有所下降。Rehr 等^[40]提出了用藻酸钙固定的细胞进行两步连续催化产山梨醇和葡萄糖酸,两者的产率都大于 98%。

Bringer-Meyer 和 Sahn^[41]发现了一种新的对运动发酵单胞菌进行渗透处理的方法,并将这一方法申请了专利。将运动发酵单胞菌细胞在-20℃下经过冻存渗透处理,随后在室温下解冻,经过这一渗透处理后细胞用来催化产山梨醇和葡萄糖酸,结果两者的产率都接近 100%。

为能够重复利用 GFOR 酶活催化产山梨醇和葡萄糖酸,不同的细胞固定化的方法被研究尝试用于生产。根据 Jang 等^[42]的研究,经过 CTAB 渗透处理运动发酵单胞菌细胞在藻酸钙固定化之前用戊二醛进行处理,随后用于生物转化过程能够得到一个很好的结果。随后,对固定化方法进行改进,即用 CTAB 渗透处理后的细胞在用藻酸钙对其固定化之前加入甘油和丙二醇,固定化的细胞珠硬度增加两倍。在经过 72h 的半连续催化反应后,GFOR 酶活损失率小于 10%^[43]。

另一方面, 将生物转化法生产山梨醇运用于工业生产中仍有一些显见的问题。其中一个主要的问题就是底物的成本, 特别是果糖。在这一方面, Ro 和 Kim^[44]将经过甲苯处理的 *Z.mobilis* 和蔗糖酶固定在壳聚糖和藻酸钙中, 以蔗糖为底物, 生物催化生产山梨醇和葡萄糖酸。研究发现, 共固定化酶的最适底物浓度为 200 g/L。在这一蔗糖浓度下, 以分批的方式进行生物转化, pH 6.0、45°C, 经过 22h, 蔗糖能够全部代谢, 山梨醇和葡萄糖酸的产率能够达到 93%。在连续反应过程中, 山梨醇和葡萄糖酸的产率能够达到 5.1 g/(L·h), 两者的得率能够达到 92%。并且在连续反应器中, 共固定化酶反应体系的活力能够保留 250 h。当将经过甲苯渗透处理的 *Z.mobilis* 和菊粉酶共固定化在藻酸钙中, 以葡萄糖和菊粉的混合物作为底物, 生物转化产山梨醇和葡萄糖酸的产率仅能够达到 44.4%^[45]。

目前对 *Z.mobilis* 细胞进行渗透处理的研究已经有很多。此外对不经过渗透处理的 *Z.mobilis* 的催化过程同样进行了研究。这是因为考虑到山梨醇和葡萄糖酸相对较低的市场价格, 要想实行工业化生产, 就必须降低成本、简化操作; 大部分关于利用 *Z.mobilis* 生产山梨醇和葡萄糖酸的方法都包含对细胞的渗透处理, 这样做虽然提高了产量, 但是同时也增加了成本。在用未处理过的游离 *Z.mobilis* ATCC29191 细胞以分批的方式进行生物催化生产山梨醇和葡萄糖酸, Silveira 等^[46]研究了起始葡萄糖和果糖浓度对产物产量的影响。当葡萄糖和果糖混和物的水溶液的浓度达到 650 g/L 时, 经过 8h 的生物转化过程, 山梨醇和葡萄糖酸产率都达到了 91%, 而且几乎没有乙醇产生。根据 Silveira 等^[46]的研究, 山梨醇和葡萄糖酸的产率随着底物浓度的增加而增加主要有两方面的原因: 一是在高的渗透压下细胞失去了活力; 二是高的底物浓度和产物浓度对 *Z.mobilis* 体内代谢路径中主要酶活的抑制作用, 导致底物更易于通过 GFOR / GL 路径代谢。对于进一步使山梨醇的生产更加经济可行, 还应该降低培养细胞所用培养基的成本。在细胞培养过程中, 用玉米浸出液(CSL)代替酵母浸膏能够得到较高的 GFOR 酶活用于生物转化过程。用 25 g/L 的 CSL 代替 5 g/L 的酵母浸膏, 培养基的成本能够降低 25-50%^[47]。

目前, 在超滤膜连续反应器中通过游离的 GFOR/GL 酶体系, 生物法生产山梨醇和葡萄糖酸的过程已经基本建立^[36, 48]。Gollhofer 等^[36]的研究表明, 游离细胞中的酶反应体系能够增加山梨醇和葡萄糖酸生产速率; 这主要由于消除了底物运输阻力。另一方面, 在运动发酵单胞菌体内 GFOR 酶活具有较高的稳定性; 然而游离的 GFOR 在其催化过程中容易失活。

Nidetzky 等^[49]发明了能连续生产山梨醇的中空纤维超滤膜反应器, 整个系统具有长期操作稳定性, 操作时长超过 250 h。具体反应条件为通过使用弱碱如三羟甲基氨基甲烷或咪唑调节 pH 值, 加入二硫苏糖醇来保护 GFOR 酶活, 反应温度用低于 30°C 避免 GFOR 酶受热失活。当稀释速率为 0.06 h⁻¹ 时, GFOR 浓度为 15 kU/L, 山梨醇生产速率能够达到 4.37 g/(L·h), 转化率接近 40%。Silva-Matinez 等^[48]对中空纤维超滤膜反应器进行了改进, 当稀释率为 0.04 h⁻¹, GFOR 浓度为 5 kU/L, 底物浓度为 3 mol/L 的条件下, 将底物转化为山梨醇和葡萄糖酸的转化率超过 85%。

1.6 山梨醇分离纯化

最后我们必须认识到产物的分离纯化,即得到最终产物山梨醇和葡萄糖酸,是十分重要的一个步骤。Chun 和 Roger^[37]研究发现通过一种以 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{H}_3\text{BO}_3$ 为洗脱液的阴离子交换树脂能够成功的实现产物的分离;但是这一方法操作成本太高,不能用于大规模工业生产,目前只能用于实验室规模研究。Silveira 等^[10]提出了一种通过使用选择性沉淀的有机溶剂如甲醇和乙醇,即将葡萄糖酸从溶液中沉淀出来,山梨醇仍然在溶液中,达到分离山梨醇和葡糖酸目的。Ferraz 等^[50]提出使用一个与生物反应器相配套的电解体系,即在葡糖酸的产生的同时来把它去除,山梨醇存在于体系中,达到分离的目的。

尽管这些方法最终山梨醇和葡萄糖酸的得率较高,但是这些方法只能限于实验室规模,由于成本及环境因素不能将其用于工业生产,我们必须寻找一种经济的、高效,低能耗,环境友好的适合工业化大规模生产的分离山梨醇和葡萄糖酸的方法。

1.7 生产山梨醇的其他微生物

除了运动发酵单胞菌以外,只有极少数微生物能够生产山梨醇。Vongsuvalert 和 Tani^[51]以及 Tani 和 Vongsuvalert^[52]利用博伊丁假丝酵母(*Candida boldinii*)生产山梨醇取得了较好的实验结果,但是这一生产过程生产体积较小,只适用与实验室规模。目前没有进一步的实验研究数据,难以判断这一方法能否适用于大规模生产山梨醇。

Duvnjak 等^[53,54]利用一株经过诱变的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859),以洋姜汁作为碳源,同时生产山梨醇和乙醇。但这一过程关键点在于获得洋姜汁并不是一个廉价的过程,因此它并不能廉价的生成山梨醇和乙醇。此外,在这一过程中需要高浓度的酵母浸膏来培养酿酒酵母,培养成本较高,增加了山梨醇的生产成本。并且在酿酒酵母以果糖为碳源用于生长的同时也消耗山梨醇;对于山梨醇和乙醇的分离没有进一步的研究。Hiroyuki 和 Izumori^[55]从无名假丝酵母(*Candida boldinii*)中鉴定了一株以 3:2 的比率将山梨糖还原为山梨醇和艾杜糖醇的菌株,但目前没有进一步的研究报道。

由以上研究发现,目前只有运动发酵单胞菌具有工业化生产山梨醇的潜力。

1.8 生物法生产山梨醇、葡萄糖酸和其他副产物的工业前景

为了能够将存在于运动发酵单胞菌中的 GFOR 和 GL 酶系用于工业化规模生产山梨醇和葡萄糖酸,有必要对生产的每一个环节进行认真细致的考虑。对于连续生产过程中,经过渗透处理和固定化的细胞用于生产过程具有极大的优点。这样可以使反应器变的不那么复杂。另一方面,经过长时间连续生产体系的稳定性是十分重要的,应避免频繁的生产生物催化剂。

利用未经渗透处理的 *Z.mobilis* 生产山梨醇和葡萄糖酸,这一生产过程需要不断培养细胞来提供 GFOR。因此对于整个生产过程的成本来说,这一过程的成本是十分关键的。如果能够用低成本的培养基来培养 *Z.mobilis*,培养过程中产生的乙醇可以补偿一些生产

费用。Silveira 等^[47]研究了两步法生产山梨醇、葡萄糖酸和乙醇的可行性，即在第一步培养细胞过程中用 CSL 作为廉价的维生素和氮源。在这一情况下，生物转化生产山梨醇则必须以分批的方式进行。

如果在生产过程中 GFOR 足够的稳定，利用纯化或是游离的 GFOR 生产山梨醇，可以减小反应器的大小，并且较高浓度的 GFOR 能够增加山梨醇的生产速率。另一方面，为了保护 GFOR 酶活，需要加入的酶稳定剂，控制 pH 值时需要而使用比较昂贵的碱如三羟甲基氨基甲烷或咪唑，以及为分离考虑在中空纤维超滤膜反应器中使用的昂贵的超滤膜都增加了山梨醇和葡萄糖酸生产过程的成本；并且山梨醇和葡萄糖酸生产量大，体积大，市场价格相对较低。

此外，山梨醇和葡萄糖酸的分离必须建立一个简单可行的方法。在解决或改进了利用运动发酵单胞菌通过生物催化法进行工业化生产山梨醇和葡萄糖酸的关键技术后，与底物成本相比产物的价格较低就成为工业化应用中的一个关键因素。这也可能使该技术的工业化变得不太实际^[47]。目前通过这一技术工业化生产山梨醇在一些国家或全世界的某些地区的可行性是存在的。例如，在欧洲，每吨粉末山梨醇的平均售价是 1500 美元，每吨 70%(w/w)山梨醇水溶液的平均售价是 450 美元，在南非和拉美等地区，其山梨醇主要依赖于进口，每吨 70%(w/v)的山梨醇溶液在当地的市场上售价范围为 900 美元到 1000 美元不等。在拉美地区，每吨 70%(w/v)葡萄糖浆和高果糖浆售价大约为 430 美元和 620 美元，其中高果糖浆中含有 55%(w/v)的果糖和 40%(w/v)的葡萄糖。因此从价格因素及目前生物法生产山梨醇的产量这两方面考虑，生物法生产山梨醇在一些地区是经济可行的。

在 1995-1997 年间，巴西的 Lorenz 公司对生物法生产山梨醇和葡萄糖酸很感兴趣。他们计算了年产 5000 吨的成本及经济可行性，产物仅仅计算山梨醇和副产物乙醇。在 1997 年年底，Lorenz 公司开始准备通过运动发酵单胞菌生物法生产山梨醇和葡萄糖酸，其生产过程关键技术主要由 Silveira 等建立的。这个项目年产山梨醇 10000 t，葡萄糖酸 8000 t 和副产物乙醇 7000 t。

另一方面，葡萄糖酸和葡萄糖酸盐的市场需求量只是山梨醇的 1/10。在 GFOR 和 GL 作用下，生成山梨醇和葡萄糖酸是等摩尔量的；即使通过改变用来调节 pH 值的碱的种类得到不同的葡萄糖酸盐来调节葡萄糖酸和山梨醇在市场上的需求量仍然是不现实的。解决这一问题的可行办法是与生产葡萄糖酸和葡萄糖酸盐相对应，生产不同的有机酸及相应的盐能够使得市场需求达到平衡。Satory 等^[56]首先对这一方案的可行性进行了研究，即利用不同的醛糖，如 D-木糖、D-半乳糖、D-麦芽糖和 D-乳糖，代替葡萄糖，在 GFOR 的作用下转化为相应的醛糖酸。最近，研究发现利用经过渗透处理的运动发酵单胞菌细胞，以 0.7 mol/L 的果糖和乳糖的混和溶液为底物，通过生物催化法能够生产乳糖酸。乳糖酸具有较好的市场潜力，因为它能用于医药行业、生产清洁剂和化妆品等。利用同样的方法生产艾杜糖酸或半乳糖酸值得进一步的研究；这两种酸可以用来生产维生素 C。

通过比较不同的能够生产山梨醇的微生物菌种发现,只有运动发酵单胞菌具有实现工业化生产山梨醇的潜力。通过生物催化法生产山梨醇具有反应条件温和,能耗少,无需高压设备,安全性好,对环境友好等优点,从发展情况来看,目前在一些国家和地区是具有可行的。

1.9 本课题的研究内容与意义

山梨醇是美国能源部筛选的 12 个最具开发潜力的生物质来源关键中间体之一,葡萄糖酸是最具开发潜力的 30 个关键中间体之一。从这两个关键中间体出发,可以得到多种在化学品和材料市场上具有广泛用途的中间产品。本课题的目标是开发一项对环境友好并具有足够经济竞争力的联产山梨醇和葡萄糖酸及其衍生物的生物过程平台技术,以取代现有的化学法生产技术。

本课题对 *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC31821)培养基组成进行了优化;通过培养基组成优化期望能够提高 GFOR 酶活和细胞浓度,缩短培养时间,以达到降低培养细胞成本的目的。通过比较 *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC31821)和 *Zymomonas mobilis* ZM6 (ATCC29191)对氧的需求情况,发现 ZM4 在厌氧的情况下生长较好,而 ZM6 在微氧的条件下生长较好,选择 ZM4 菌株用于生物转化生产山梨醇无需使用无菌空气以及空气传输设备,降低生产成本。

本课题对提高 GFOR 酶活进行了详细的研究。由于 GFOR 存在于运动发酵单胞菌细胞周质中并且为组成型酶,通过培养条件优化 GFOR 酶活力单位得到一定的提高。研究的重点应放在通过基因工程手段,来提高 GFOR 的表达量。本课题在实验室成功构建穿梭质粒 pHW20a 的基础上,将编码 GFOR 的 *gfo* 基因连接于该质粒上,成功构建了 pHW20a-*gfo* 质粒并将该质粒成功导入 *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC31821)和 *Zymomonas mobilis* ZM6 (ATCC29191)中,GFOR 得到了过表达。构建的基因工程菌中 GFOR 酶活是野生菌两倍多。并对两种基因工程菌需氧情况进行了研究,发现与野生菌相似,即构建的 *Z.mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*)在厌氧的条件下生长较好,而 *Z.mobilis* ZM6 (pHW20a-*gfo*)在微氧的条件下生长较好。选择 *Z.mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*)用于生物催化产山梨醇的研究,并对 *Z.mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*)培养条件进行了优化以期能够提高 GFOR 酶活表达量,降低细胞培养过程成本。

对于先前研究发现,现存的提高生物催化过程中山梨醇产量的方法存在众多缺点。例如用甲苯或是 CTAB 对运动发酵单胞菌进行渗透处理,两种处理剂价格相对较高,处理过程复杂,后续分离困难;用冻干的运动发酵单胞菌或是通过反复冻溶的方法对细胞进行渗透处理能够提高山梨醇产量,但冻干过程需要消耗大量能量,大大增加了生产过程成本;利用高浓度的葡萄糖果糖(650 g/L)生产山梨醇,过程简单,能够克服上述方法的不足,但工业生产所用原料无法达到如此高的糖浓度中。本课题的研究目的在于建立一种新的山梨醇生产方法,山梨醇产量能够达到 100%,并且克服上述方法中的种种不足,能够将这一方法用于工业化生产山梨醇过程中,使工业化生产山梨醇变得更加切实

可行。

目前对于下游工作，即山梨醇的分离纯化方面研究较少，已有的分离纯化方法仅限于实验室的研究，没有工业化的应用的可能性。本课题研究的目的在于解决这一过程中的关键技术难题，建立科学、合理、高效，节能并能够用于工业化生产山梨醇及其副产物的分离纯化方法，进一步降低工业化过程中生产山梨醇的成本。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料与设备

2.1.1 菌种

本课题研究过程中所用菌种及其来源见表 2.1。

表 2.1 质粒及菌种

Table 2.1 Plasmids and bacterial strains

| 质粒或菌种名称 | 质粒大小或菌种编号 | 质粒或菌种来源 |
|------------------------------|--------------|----------------------------------|
| pHW20a | 9913bp | 本实验室构建 |
| <i>E. coli</i> | DH5 α | Novagen |
| <i>E. coli</i> | S17-1 | Novagen |
| <i>Zymomonas mobilis</i> ZM4 | ATCC31821 | American Type Culture Collection |
| <i>Zymomonas mobilis</i> ZM6 | ATCC29191 | American Type Culture Collection |

2.1.2 实验试剂

本课题研究过程中所用试剂、规格及生产厂家见表 2.2。

表 2.2 试剂

Table 2.2 Reagents

| 试剂名称 | 规格 | 生产厂家 |
|---------------|----|---|
| D-Fructose | AR | Amresco Inc. |
| Sorbitol | AR | Amresco Inc. |
| Gluconic acid | AR | Amresco Inc. |
| K-MES | AR | Acros Organics |
| BSA | GC | Acros Organics |
| Tetracycline | AR | Sigma-Aldrich |
| NADH | AR | Sigma-Aldrich |
| Acetoin | AR | Sigma-Aldrich |
| Yeast Extract | AR | Oxoid Ltd Basingstoke Hampshire England |
| EDTA | AR | 上海美兴化工有限公司 |
| 考马斯亮蓝G-250 | AR | 上海朝瑞生物科技有限公司 |
| 丙三醇 | AR | 国药集团化学试剂有限公司 |

| | | |
|-------|----|--------------|
| 乙醇 | AR | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 葡萄糖 | AR | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 对硝基苯酚 | AR | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 蛋白胨 | AR | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 琼脂 | AR | 中国惠兴生化试剂有限公司 |
| 氢氧化钠 | AR | 上海振兴化工厂 |
| 氯化钠 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 硫酸铵 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 磷酸二氢钾 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 七水硫酸镁 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 七水硫酸锌 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 氯化钙 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 五水硫酸铜 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 七水硫酸铁 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 七水氯化钴 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 氯化镁 | AR | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 浓硫酸 | GR | 上海菲达工贸有限公司 |
| 盐酸 | GR | 上海菲达工贸有限公司 |
| 磷酸 | AR | 上海菲达工贸有限公司 |

2.1.3 培养基

培养 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* S17-1 所用培养基为 LB 培养基，培养基组成为：10 g/L 蛋白胨；5 g/L Yeast extract；10 g/L NaCl；pH 7.0；其中固体培养基加入 1.5% (w/v)的琼脂。

构建基因工程菌过程中培养 *Zymomonas mobilis* 所用的培养基为标准 RM 培养基，培养基组成为：20 g/L Glucose；10 g/L Yeast extract；2 g/L KH₂PO₄；pH 6.0。其中固体培养基加入 1.5% (w/v)的琼脂。

接入发酵罐的 *Zymomonas mobilis* 种子细胞培养基组成为：10 g/L Glucose；5 g/L (NH₄)₂SO₄；0.5 g/L MgSO₄·7H₂O；1 g/L KH₂PO₄；5 g/L Yeast extract；pH 6.0；其中固体培养基加入 1.5% (w/v)的琼脂。当种子为构建的基因工程菌时，种子培养过程中需要加入 20 μ g/mL Tetracycline，避免质粒丢失。

发酵罐中培养 *Zymomonas mobilis* 细胞所用的培养基组成为：100 g/L Glucose；5 g/L

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L KH_2PO_4 ; 5 g/L Yeast extract; pH 6.0。2 mol/L 的 NaOH 控制 pH; 葡萄糖和培养基的其他组分分开灭菌, 所配葡萄糖母液浓度为 500 g/L, 并在接种前与培养基的其他组分混合。

以上培养基灭菌条件为: 115°C, 20min。

2.1.4 实验仪器

本研究过程中所使用的主要仪器见表 2.3。

表2.3 实验仪器

Table 2.3 Experiment equipment

| 仪器名称 | 规格 | 生产厂家 |
|-----------|-------------------|---------------------|
| 电子天平 | BS423S | 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司 |
| 电子天平 | BS224 | 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司 |
| 立式压力蒸气灭菌器 | YXQ-LS-75S II | 上海博迅实业有限公司 |
| 恒温恒湿培养箱 | GHP-9160 | 上海一恒科技有限公司 |
| 落地恒温振荡摇床 | HZ-9311K | 太仓华利达有限公司 |
| 分光光度计 | 722N | 上海精科实业有限公司 |
| 核酸蛋白质分析仪 | DU-800 | Beckman 公司 |
| 超声波细胞破碎仪 | JY92- II | 宁波新芝生物科技有限公司 |
| 超声波清洗机 | KWT-100A | 科伟达超声波设备有限公司 |
| PCR 仪 | Mastercycler | Eppendorf 公司 |
| 小型高速冷冻离心机 | 5415R | Eppendorf 公司 |
| 小型高速离心机 | 5424 | Eppendorf 公司 |
| 移液器 | Research | Eppendorf 公司 |
| 微型摇床 | 5430 | Eppendorf 公司 |
| 高速冷冻离心机 | J-26 | Beckman 公司 |
| 恒温水槽 | SDC-6 | 宁波新芝生物科技有限公司 |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | DHG-9140A | 上海一恒科技有限公司 |
| 制冰机 | XB-70 | 宁波新芝生物科技有限公司 |
| 旋转蒸发仪 | RE-201D | 上海科兴仪器有限公司 |
| 超低温冰箱 | Forma-86C | Thermo 公司 |
| 冰箱 | BCD-239VC | 海尔公司 |
| pH 计 | PHS-3C | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 单人单面洁净工作台 | SW-CJ-1FD | 苏州苏洁净化设备有限公司 |
| 高效液相色谱 | LC-20AD | 岛津公司 |
| 气质色谱 | Agilent6820 | 安捷伦公司 |
| 超纯水纯化系统 | Milli-Q Synthesis | Millipore 公司 |

3L 四连发酵罐

Biotech-4BG

上海保兴生物设备工程有限公司

5L 发酵罐

FMG-5L

上海国强生化工程装备有限公司

2.2 分析方法

2.2.1 菌体浓度的测定

菌体浓度的测定采用分光光度计法，即在 600nm 下测定菌体的吸光度值；测定时以培养基作为空白对照，测定出菌体的吸光度值相对的代表菌体的浓度。

2.2.2 菌体干重的测定

表 2.4 细胞干重与 OD₆₀₀ 之间关系

Table 2.4 The relationship between dry cell weight and OD₆₀₀

| OD ₆₀₀ | 细胞干重(g/L) | 细胞干重(g/L) |
|-------------------|-----------|-----------|
| 1.22 | 0.51 | 0.42 |
| 2.71 | 0.91 | 0.95 |
| 5.44 | 1.51 | 1.66 |
| 7.62 | 2.31 | 2.23 |
| 8.46 | 2.77 | 2.79 |

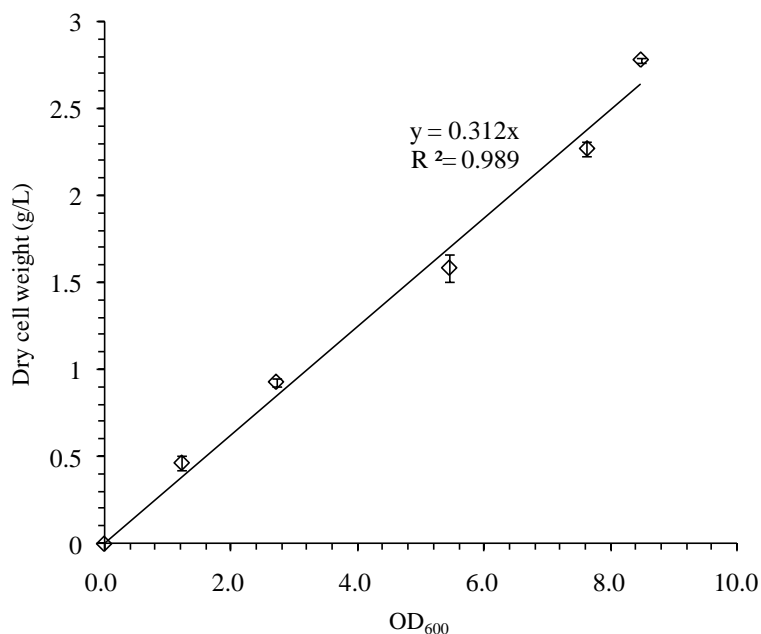


图 2.1 细胞干重与 OD₆₀₀ 之间标准曲线

Fig. 2.1 The standard curve between dry cell weight and OD₆₀₀

发酵罐培养菌体细胞，当菌体生长到对数期时，每隔 2h 取出一定量的菌体，测定此时菌体在 600nm 下的吸光度值；准确量取 20ml 菌液，10000 g，5min 离心，倒去上清液，蒸馏水洗涤悬浮细胞；整个过程重复 3 次，以洗去残留的培养基组分；随后将悬

浮细胞放于培养皿中，105°C 烘箱下烘至衡重，得细胞干重。

因此根据体积可以计算出细胞浓度，这样可得到吸光度值与菌体浓度的对应关系(表 2.4)。在对数期菌体成倍增长，连续取点后得出一组吸光度值与菌体浓度的对应关系，并且该组数据成线性关系，可以得到菌体吸光度值与菌体浓度的关系方程，可以通过该方程计算其他时刻的菌体浓度。根据表 2.4 数据，作出吸光度值与菌体浓度的标准曲线，测定时每个点重复测定两次，取平均值作图，见图 2.1。

2.2.3 蛋白质含量的测定方法

表 2.5 蛋白质标准曲线测定体系

Table 2.5 The determine system of protein standard curve

| BAS (μg) | Volume (μl) | K-MES buffer (μl) | Bradford (ml) | A ₅₉₅ | A ₅₉₅ |
|----------|-------------|-------------------|---------------|------------------|------------------|
| 0 | 0 | 200 | 2 | 0 | 0 |
| 2.5 | 5 | 195 | 2 | 0.094 | 0.093 |
| 5 | 10 | 190 | 2 | 0.184 | 0.204 |
| 7.5 | 15 | 185 | 2 | 0.252 | 0.323 |
| 10 | 20 | 180 | 2 | 0.423 | 0.380 |
| 12.5 | 25 | 175 | 2 | 0.519 | 0.502 |
| 15 | 30 | 170 | 2 | 0.605 | 0.610 |

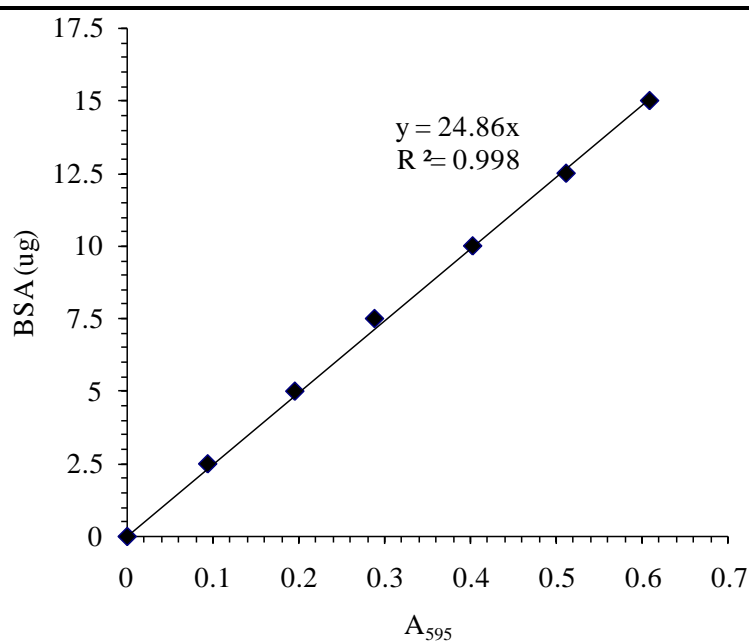


图 2.2 蛋白质含量标准曲线

Fig. 2.2 Standard curve of protein

蛋白质含量的测定采用 Bradford 法；在 595nm 下测定吸光度值，以 BSA 作为标准蛋白，标准曲线测定的体系及测定值见表 2.5。

根据表 2.5 作出的蛋白质含量标准曲线见图 2.2，测定时每个点重复测定两次，取平均值作图。

待测样品中蛋白质含量测定体系与上述过程基本相似；即根据样品的浓度，取一定量的样品，随后加入 K-MES buffer 补足 200 μ l，再加入 2ml 的 Bradford 工作液，混匀后 595nm 下测定吸光度值，根据标准曲线方程计算出待测样品中蛋白质含量。

2.2.4 GFOR 酶活测定方法

GFOR 酶活测定具体参考 Zachariou 和 Scope^[27]建立的测定方法。测定方法的原理为 GFOR 在葡萄糖和果糖存在的条件下能够将其转化为葡萄糖酸和山梨醇；其中产生的葡萄糖酸能够使体系的 pH 值下降；而对硝基苯酚水溶液显示黄色，其颜色随着 pH 的降低逐渐变淡；在催化反应体系中加入对硝基苯酚，作为指示剂，这一变化可以通过在 405nm 下测定吸光度值进行定量的表示。其中可用盐酸与对硝基苯酚之间的颜色变化关系来定量的测定出反应体系中葡萄糖酸的生成量，计算出 GFOR 酶活。

酶活具体测定过程分为标准曲线的测定和样品的测定两个部分。标准曲线测定体系及测定值见表 2.6。

表 2.6 GFOR 酶活标准曲线测定体系

Table 2.6 The determine system of GFOR enzyme standard curve

| HCl(μ mol) | HCl (μ l) | K-MES buffer (μ l) | 对硝基苯酚(ml) | A ₄₀₅ | A ₄₀₅ |
|-----------------|----------------|-------------------------|-----------|------------------|------------------|
| 0 | 0 | 40 | 4 | 0.407 | 0.393 |
| 0.02 | 4 | 36 | 4 | 0.372 | 0.378 |
| 0.04 | 8 | 32 | 4 | 0.344 | 0.353 |
| 0.06 | 12 | 28 | 4 | 0.318 | 0.325 |
| 0.08 | 16 | 24 | 4 | 0.287 | 0.301 |
| 0.10 | 20 | 20 | 4 | 0.266 | 0.264 |
| 0.12 | 24 | 16 | 4 | 0.236 | 0.241 |
| 0.14 | 28 | 12 | 4 | 0.220 | 0.210 |

根据表 2.6 算出吸光度降低的值，作出标准曲线见图 2.3，测定时每个点重复测定两次，取平均值作图。

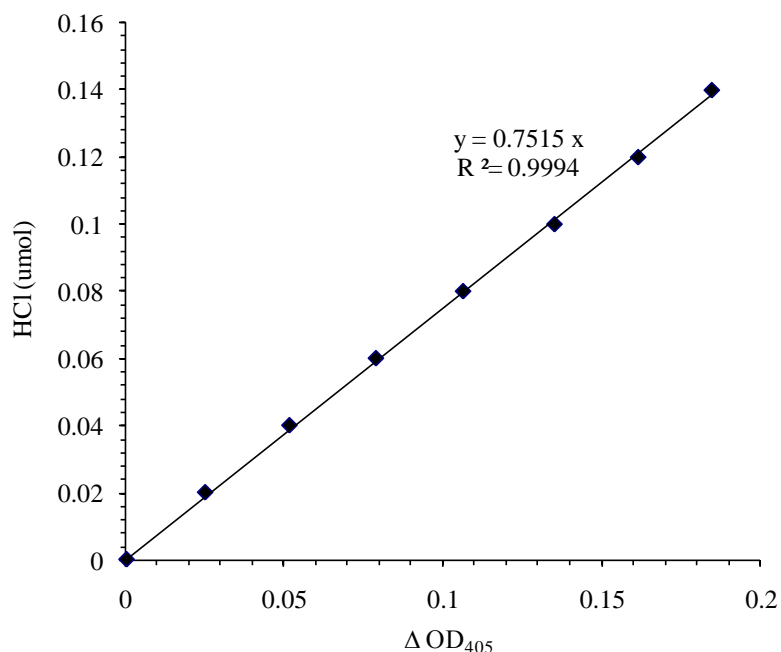


图 2.3 HCl 含量标准曲线

Fig. 2.3 Standard curve of hydrochloric acid

样品测定时所用反应体系为, 20 μl 的样品反应液, 加入 20 μl 的 K-MES buffer 和 4ml 的对硝基苯酚, 在 405nm 下测定吸光度值; 根据吸光度值计算出反应液中的葡萄糖酸的含量, 以计算出酶活。

2.2.5 高效液相色谱法测定组分含量

本课题研究过程中, 葡萄糖、葡萄糖酸、果糖、山梨醇、乙偶姻和乙醇含量的测定采用高效液相色谱法。高效液相色谱仪为日本岛津的 LC-20AD, 检测器为 RID-10A 示差检测器, 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱。检测过程的检测条件: 柱温为 65°C, 流动相为 0.005 mol/L 硫酸, 流速为 0.6 ml/min。

测定时首先作出每个样品的标准曲线, 即配制已知浓度的标准品, 进行梯度稀释, 经过 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进样, 根据液相色谱图可以得到该物质的出峰时间和峰面积, 根据峰面积及其对应的浓度作出标准曲线, 根据该标准曲线计算出待测样品中含量。

样品中组分含量的测定过程与标准品做法基本相似, 即对样品进行适当的稀释, 随后通过 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进样, 根据峰面积计算出样品中组分的含量。

2.3 *Zymomonas mobilis* 培养过程

2.3.1 菌种保藏方法

实验过程中, 菌种短期保存在琼脂平板培养基上, 长出单菌落的平板放于 4°C 冰箱保存, 保存时间约两周, 两周后需要对菌种进行挑单菌落从新转接于新的培养基中保存。

对于菌种长时间保存,则采用甘油冻存法,即将生长到对数中期的细胞与 60%的灭菌甘油进行 1:1 的混合,液氮速冻后放于 -80°C 超低温冰箱保存。

本课题研究中,为保证不同批次发酵实验的重复性,菌种采用甘油冻存法集中保存一批,每次发酵接种时拿出一管进行培养。

2.3.2 培养过程

从超低温冰箱中取出冻存的菌种,接入含有 10 g/L 葡萄糖的种子培养基中,培养条件为 30°C , 150 rpm。当菌体生长至对数中后期时,以 10%(v/v)接种量接入发酵罐中。接种前将待接种的菌体进行 8000 g, 2 min 离心,倒去上清,再用事先预留的培养基将菌体悬浮后,接入发酵罐中;培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L,培养条件为 30°C , 150 rpm, pH 6.0。培养过程中每隔两个小时取样测定菌体浓度,葡萄糖消耗情况和乙醇生成情况。

当菌体生长进入对数末期,即葡萄糖刚刚消耗完时,量取 20ml 菌液,8000 g, 2 min 离心,倒去上清, K-MES buffer 悬浮洗涤细胞;从复上述过程,细胞洗涤五次后,将其浓缩于 4ml 的 K-MES buffer 中,用于测定 GFOR 酶活。

2.3.3 不同培养基组成对菌体生长的影响

考察不同培养基组成对菌体生长影响实验时,所选培养基的组成为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 和 Yeast extract。

考察不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对菌体生长影响时,所选 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为 0 g/L、2 g/L、5 g/L、10 g/L;其它组分浓度为 0.5 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L Yeast extract。发酵过程培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L,培养条件为 30°C , 150 rpm, pH 6.0;整过实验过程具体操作见 2.3.2。

考察不同 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对菌体生长影响时,所选 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度分别为 0.25 g/L、0.5 g/L、1g/L、2g/L;其它组分浓度为 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L Yeast extract。发酵过程培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L,培养条件为 30°C , 150 rpm, pH 6.0;整过实验过程具体操作见 2.3.2。

考察不同 KH_2PO_4 浓度对菌体生长影响时,所选 KH_2PO_4 浓度分别为 0 g/L、1 g/L、2 g/L、4g/L;其它组分浓度为 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L Yeast extract。发酵过程培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L,培养条件为 30°C , 150 rpm, pH 6.0;整过实验过程具体操作见 2.3.2。

考察不同 Yeast extract 浓度对菌体生长影响时,所选 Yeast extract 浓度分别为 2.5 g/L、5 g/L、10 g/L、15g/L;其它组分浓度为 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L KH_2PO_4 。发酵过程培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L,培养条件为 30°C , 150 rpm, pH 6.0;整过实验过程具体操作见 2.3.2。

2.3.4 不同通气速率对菌体生长及 GFOR 酶活的影响

考察不同通气速率对菌体生长及 GFOR 酶活的影响实验时,选择通气速率为 0 vvm、0.21 vvm、0.42 vvm、0.83 vvm 和 1.67 vvm;发酵过程培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L,

培养条件为 30 °C, 150 rpm, pH 6.0; 整过实验过程具体操作见 2.3.2。

2.3.5 不同葡萄糖浓度对菌体生长及 GFOR 酶活的影响

考察不同葡萄糖浓度对菌体生长及 GFOR 酶活的影响实验时, 选择葡萄糖浓度为 50 g/L、100 g/L、150 g/L 和 200 g/L; 葡萄糖与培养基的其他组分分开灭菌; 葡萄糖母液浓度为 500 g/L; 发酵过程培养条件为 30 °C, 150 rpm, pH 6.0; 整过过程具体操作见 2.3.2。

2.3.6 不同 pH 值对菌体生长及 GFOR 酶活的影响

考察不同 pH 值对菌体生长及 GFOR 酶活的影响实验时, 选择 pH 为 4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、和 7.0; 发酵过程培养基中的葡萄糖浓度为 100 g/L, 培养条件为 30 °C, 150 rpm; 整过实验过程具体操作见 2.3.2。

2.4 基因工程菌构建过程

首先将 *Z.mobilis* ZM4 菌株接种于 RM 培养基中, 30°C 培养 20 小时。以 Qiagen DNeasy Tissue Kit 试剂盒(Valencia, CA, USA)提取基因组 DNA(详细步骤参照试剂盒说明书)。*Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821)中 *gfo* 全基因序列来源于 NCBI 基因组 DNA 数据库 (Access number: NC_006526)^[57]。用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物, 在正反向引物的两端分别引入 *EcoRI* 和 *XbaI* 两个酶切位点用于基因的克隆(表 2.7), 设计好的引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。通过 PCR 反应获得的 *gfo* 全基因, 经过 *EcoRI* 和 *XbaI* 两个限制性内切酶将 PCR 产物以及本实验室构建的 pHW20a 多拷贝穿梭质粒进行消化, 产生 *EcoRI* 和 *XbaI* 两个粘性末端; 随后用 T4 DNA 连接酶将两个 DNA 片段进行连接, 从而构建多拷贝表达载体 pHW20a-*gfo*, 详细结构见图 2.4。

表 2.7 *gfo* 引物及 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切位点

Table 2.7 The primer of *gfo* and *EcoRI* / *XbaI* sites

| 目标基因 | 引物名称 | 引物序列(5'→3') |
|------|-----------------|-----------------------------------|
| Gfo | <i>gfo</i> 正向引物 | CGGAATTCTCGAAATTAACGATCACCCAC |
| | <i>gfo</i> 反向引物 | GCTCTAGACCATGGTCAATAACCACCCTGACGG |

注: *gfo* 正向引物下划线部分为 *EcoRI* 识别序列, 反向引物下划线部分为 *XbaI* 识别序列。

利用 pHW20a 质粒上的 *lacZα* 筛选标记对克隆有 *gfo* 全基因的质粒 pHW20a-*gfo* 进行蓝白斑筛选; 并对筛选得到白色菌株内的质粒进行提取鉴定: 将 pHW20a-*gfo* 转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 并将转化后的菌液涂布于含有 25 μg/ml IPTG、50 μg/ml X-Gal 和 20 μg/ml 四环素的 LB 固体培养基平板上, 于 37 °C 培养 24 小时。将平板上长出的白色菌落接种于含有四环素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、220 rpm 培养 12 小时。使用 Omega plasmid mini kit 试剂盒提取质粒, 将提取的质粒使用限制性内切酶 *XbaI* 和

EcoRI 进行单、双酶切，并以提取质粒为模板使用 *gfo* 引物进行 PCR 反应。将获得的酶切产物以及 PCR 产物以 0.7% 琼脂糖核酸电泳进行分析，从而确认 *gfo* 全基因的亚克隆结果。

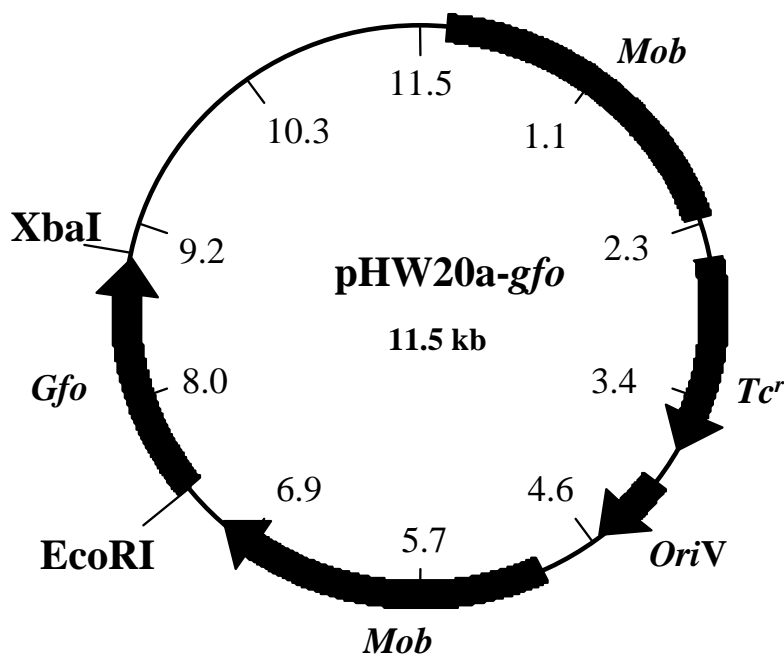


图 2.4 pHW20a-gfo 质粒图

Fig.2.4 The plasmid map of pHW20a-gfo

pHW20a-gfo 借助于接合转化辅助菌株 *E. coli* S17-1 转入 *Z. mobilis* ZM4 中：将筛选以及经过验证的 pHW20a-gfo 转化至接合转化辅助菌株 *E. coli* S17-1 感受态细胞中。将转化后的菌液转移至含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素的 LB 固体培养基平板上，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 小时。从平板上挑取单菌落并接种于含有四环素的 LB 液体培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220rpm 环境下培养 *E. coli* S17-1 (pHW20a-gfo)12 小时；随后，将菌液以 1%(v/v) 的接种量接种于含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素的 LB 培养基中，直至 OD_{600} 大约为 0.5 左右；同时，将 *Z. mobilis* ZM4 菌株用无菌牙签接种于 RM 培养基中，于 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养至 OD_{600} 大约为 0.4 左右。以无菌移液器各吸取两种菌液 0.5 ml 至无菌的 1.5 ml 离心管中，于室温下 10 000 g 离心 0.5 min。将上清液弃去，并以新鲜的 RM 培养基重新悬浮细胞。将重悬的细胞于室温，10 000 g 再次离心 0.5 min。将上清液弃去并将细胞重新用 50 μl 的 RM 培养基悬浮细胞。用无菌移液器吸取悬浮有两种细胞的 RM 培养基并转移至预先贴至 RM 固体培养基表面的 0.22 μm 无菌滤膜上，并将平板放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静止孵育 12 小时。将孵育 12 小时的细胞以及滤膜移至 2 mL RM 液体培养基中，并通过漩涡震荡混匀器重新悬浮细胞。用无菌移液器吸取 300 μL 菌悬液并均匀涂布于含有 20 $\mu\text{g/ml}$ 四环素以及 40 $\mu\text{g/ml}$ 萘啶酸的 RM 固体培养基平板上。将涂有菌悬液的平板倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静止孵育 48 小时；待培育 48 小时后，含有 pHW20a-gfo 质粒的 *Z. mobilis* ZM4

在带有双抗性平板上可长出肉眼可见的菌落。

2.5 GFOR 酶活测定过程

待运动发酵单胞菌生长至对数后期后，收集细胞，K-MES buffer (pH6.4)洗涤五次。细胞浓缩于 4 ml buffer 中，随后进行超声波细胞破碎 4 min 至菌液变得澄清。破碎过程中为避免酶受热失活，破碎过程在冰浴中进行，并且每间隔 10 秒后破碎 5 秒。破碎好的细胞经过 1 6000 g，20 min 离心收集上清，作为 GFOR 粗酶液用于酶活测定。

酶活测定条件：所用底物为 0.4 mol/L 葡萄糖和 0.8 mol/L 的果糖，酶活测定温度为 25°C，反应时间为 2 min，反应体系起始 pH 为 6.4。底物葡萄糖果糖用 K-MES buffer (pH 6.4)进行配制，保证反应体系 pH 为 6.4。酶活测定过程为：取 0.8 mol/L 葡萄糖和 1.6 mol/L 果糖混合液 100 μ l，加入 100 μ l GFOR 粗提液，反应 2 min，反应过程不断振荡，反应完成后，沸水浴 3 min，终止酶反应，随后进行 1 6000 g，20 min 离心，取上清测定生成的葡萄糖酸量，具体测定过程见 2.2.4。

一个 GFOR 酶活力单位定义为：25°C 下，单位时间内生成的葡萄糖酸的微摩尔数。

2.6 生物催化产山梨醇过程

本课题研究过程中，所选的生物催化反应条件为：反应温度 39 °C，反应底物浓度为 150 g/L 葡萄糖和 150 g/L 果糖，反应体系 pH 控制在 6.4，搅拌转速为 150 rpm。

培养运动发酵单胞菌所用的葡萄糖浓度为 100 g/L，培养条件为 30°C，pH 6.0，转速为 150 rpm，详细培养过程见 2.3.2。待细胞生长至对数后期后收集细胞，收集细胞时离心条件为 8000 g，5 min。离心完后取 20 g/L(干重)细胞用于催化产山梨醇。

本课题研究过程中衡量了细胞反复冻融这一处理方法对山梨醇产量的影响。细胞反复冻融具体过程为：离心收集的细胞放于 -20°C 冻存 12h，随后放于室温进行解冻 4h，完成后再重复一次。

本课题研究过程中发现一种能够提高山梨醇产量的新方法，即在反应体系中加入金属离子。这些金属离子为 Entner-Doudoroff 代谢路径中主要酶的抑制剂，从而避免葡萄糖或果糖通过 Entner-Doudoroff 途径代谢生成乙醇，使底物完全用于催化产山梨醇。本课题研究中衡量了 Zn^{2+} ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)， Ca^{2+} ($CaCl_2$)， Fe^{2+} ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)， Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)， Co^{2+} ($CoCl_2 \cdot 7H_2O$)和 Mg^{2+} ($MgCl_2$)对山梨醇产量的影响。

催化反应在 3L 发酵罐中进行，反应体系体积为 500ml。催化反应过程中反应速度快，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 控制 pH。催化反应以加入细胞开始计时，每隔一定时间取样分析葡萄糖和果糖消耗情况，葡萄糖酸、山梨醇和乙醇生成情况。

2.7 山梨醇分离纯化过程

目前关于山梨醇分离纯化方面的研究较少，已有的研究方法仅限于实验室研究，没

有工业化的可能性。生物催化产山梨醇反应后体系中主要组分为葡萄糖酸，山梨醇，调节 pH 所形成的盐，少量的乙醇，用于催化的细胞及从细胞中渗透出的蛋白质。葡萄糖酸为电解质，得到其纯品较为困难，大大增加了分离过程成本，使得山梨醇生产过程变得不切实可行。*Zymomonas mobilis* 体内存在 Entner-Doudoroff 代谢路径，葡萄糖酸在葡萄糖酸激酶的作用下能够进入该路径，进一步代谢为乙醇。因此可以通过 *Zymomonas mobilis* 将葡萄糖酸代谢为乙醇，最终通过旋转蒸发方法分离山梨醇和乙醇，这样大大简化了分离过程。本课题研究中设计的山梨醇分离纯化方案见图 2.5。

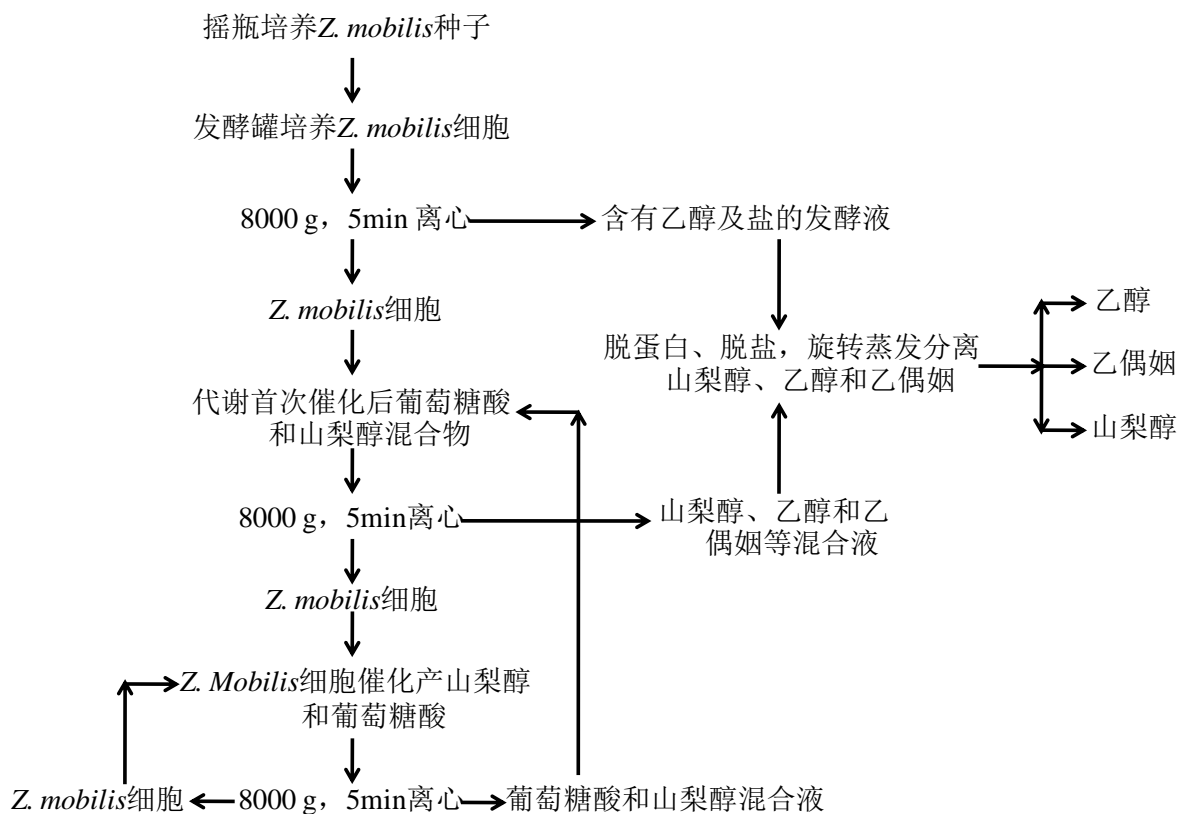


图 2.5 山梨醇分离纯化流程图

Fig. 2.5 The separation and purification flow chart of sorbitol

2.7.1 生物催化分离山梨醇过程

生物催化代谢葡萄糖酸反应条件为：反应温度 30°C，反应底物浓度为 100 g/L 葡萄糖酸和 100 g/L 山梨醇，反应体系 pH 控制在 6.0，搅拌转速为 150 rpm。

培养运动发酵单胞菌所用的葡萄糖浓度为 100 g/L，培养条件为 30 °C，pH 6.0，转速为 150 rpm，详细培养过程见 2.3.2。待细胞生长至对数后期后收集细胞，收集细胞时离心条件为 8000 g，5 min。离心完后取 10 g/L(干重)细胞用于生物催化代谢葡萄糖酸。

生物催化代谢葡萄糖酸的反应在 3 L 发酵罐中进行，反应体系体积为 500 ml。催化反应过程中，葡萄糖酸被代谢 pH 上升，采用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 控制 pH。催化反应以加入细胞开始计时，每隔一定时间取样分析葡萄糖酸代谢情况。

代谢完葡萄糖酸后，8000 g，5 min 离心分离反应液和细胞。反应液为山梨醇和乙

醇等的混合物，用于下一步的分离纯化过程；离心出的 *Z. mobilis* 细胞用于下一步的催化产山梨醇。生物催化产山梨醇条件为：反应温度 39°C，反应底物浓度为 100 g/L 葡萄糖和 100 g/L 果糖，反应体系 pH 控制在 6.4，搅拌转速为 150 rpm；反应过程所用细胞无需经过任何处理。催化反应在 3 L 发酵罐中进行，反应体系体积为 500 ml；用 14 mol/L 的 NaOH 控制 pH。催化反应以加入细胞开始计时，每隔一定时间取样分析葡萄糖和果糖消耗情况，葡萄糖酸、山梨醇和乙醇生成情况。

2.7.2 乙偶姻生成代谢路径分析

在利用 *Zymomonas mobilis* 代谢葡萄糖酸的过程中，除了生成乙醇外，还生成了乙偶姻。径主目前关于运动发酵单胞菌体内生成乙偶姻的研究较少，已有的研究中生成乙偶姻的代谢路要有三种。第一种为 Entner-Doudoroff 代谢路径中生成的丙酮酸在丙酮酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻^[58]；第二种为 Entner-Doudoroff 代谢路径中生成的乙醛在丙酮酸脱羧酶的作用下也可生成乙偶姻^[59]；第三种为 Entner-Doudoroff 代谢路径中生成的丙酮酸在丙酮酸脱氢酶和乙酰乳酸合成酶的作用下生成乙酰乳酸，乙酰乳酸在乙酰乳酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻^[60]。

为研究代谢葡萄糖酸过程中乙偶姻具体原因以及由哪条代谢路径生成，研究过程中设计了如下实验：

实验一：以 100 g/L 葡萄糖为底物加入运动发酵单胞菌进行代谢，催化反应条件与代谢葡萄糖酸的条件完全相同，每隔一段时间取样，观察是否有乙偶姻生成。

实验二：对运动发酵单胞菌进行超声波细胞破碎，破碎过程中进行冰浴以防止酶失活，利用破碎细胞液代谢葡萄糖酸，反应条件同生物催化代谢葡萄糖酸，每隔一段时间取样，葡萄糖酸代谢情况和乙偶姻生成量。

实验三：实验在小型 Eppendorf 振荡器上进行，在两个 1.5 ml 离心管中含有 5 g/L 葡萄糖酸和运动发酵单胞菌，其中一管中还含有 0.4 g/L 的 NADH。两个小管置于 30°C，1000 rpm 的振荡器上反应 10h，观察葡萄糖酸代谢情况和乙偶姻生成情况。

实验四：在运动发酵单胞菌代谢葡萄糖酸的过程中，每隔一段时间取样，取样后立即与 -80°C 甲醇 1: 1 混合，8000 g，-10°C，离心 5 min；取上清通过气质联用高效色谱分析是否含有乙酰乳酸的存在，以分析乙偶姻是否通过第三条代谢路径生成。

2.7.3 旋转蒸发分离出山梨醇

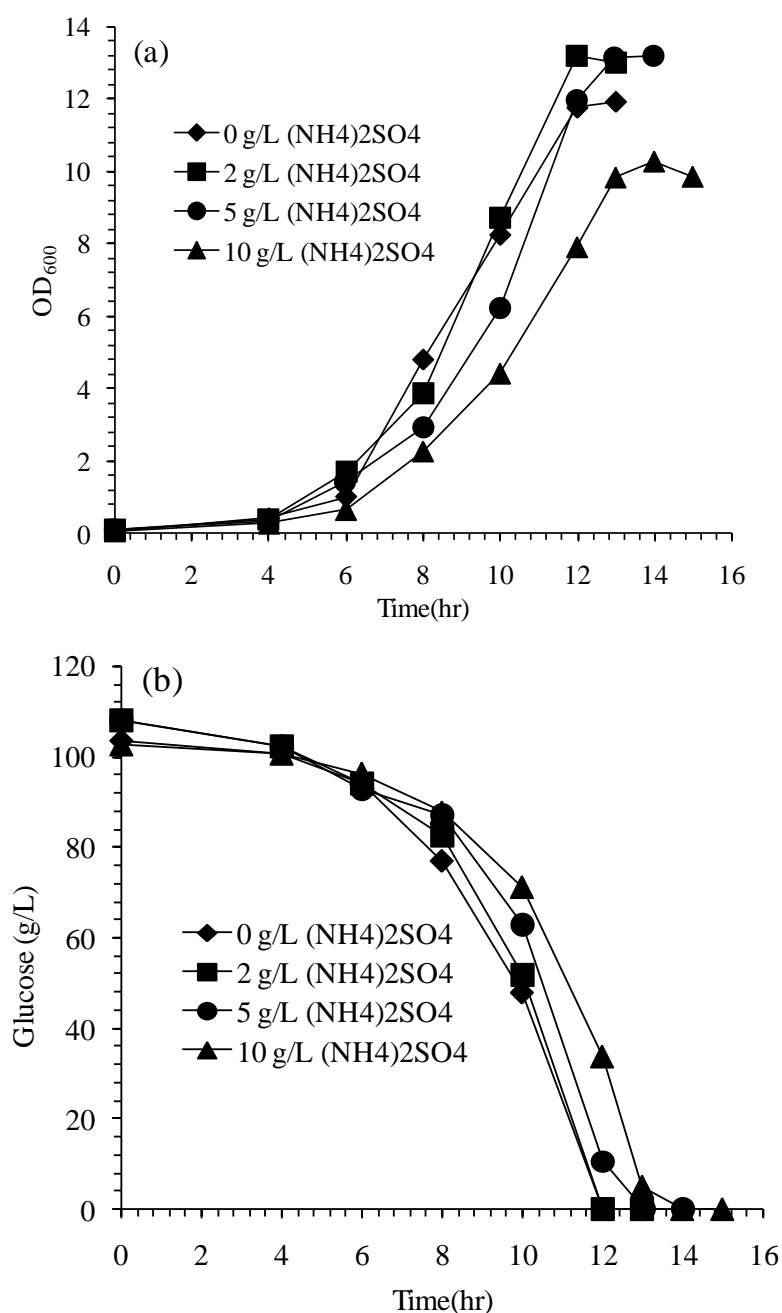
代谢完葡萄糖酸的山梨醇、乙偶姻和乙醇混合液通过旋转蒸发进行分离，所选的旋转蒸发温度分别为 70°C、75°C、80°C、85°C 和 90°C。蒸发过程中真空度为 0.08 Mpa，旋转蒸发时间在 4-15 min 范围内。蒸发完后用与蒸发前体积相等的超纯水溶解山梨醇来分析其中的量。

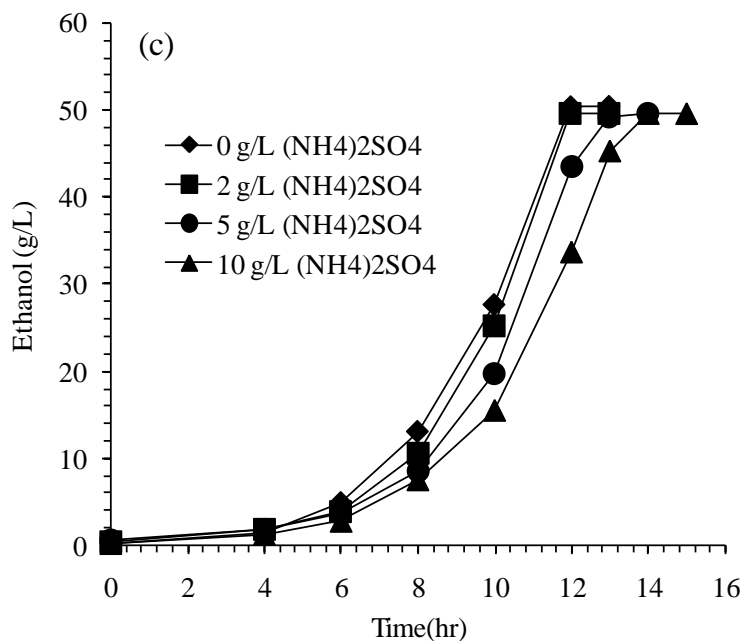
第三章 实验结果

3.1 *Z. mobilis* 培养条件优化

3.1.1 *Z. mobilis* ZM4 培养基组成的优化

不同硫酸铵浓度对菌体生长影响的实验结果见图 3.1。图 3.1(a)表明在 2 g/L 和 5 g/L 的硫酸铵下菌体生长较好，细胞产率均为 0.038 g/g；在 0 g/L 和 10 g/L 硫酸铵细胞产率分别为 0.036 g/g 和 0.031 g/g。在不同浓度的硫酸铵下，葡萄糖消耗情况和乙醇生成情况基本相似，见图 3.1(b)和 3.1(c)。





注：(a) 菌体生长情况；(b) 葡萄糖消耗情况；(c) 乙醇生成情况

图 3.1 不同硫酸铵浓度对 *Z. mobilis* ZM4 生长的影响

Fig. 3.1 Effect of different (NH₄)₂SO₄ concentration on *Z. mobilis* ZM4 growth. (a) The growth curve, (b) The glucose consumption curve, (c) The ethanol curve.

不同硫酸镁浓度对菌体生长影响实验结果见表 3.1。由细胞产率可以看出，七水硫酸镁浓度在 0.25-2 g/L 范围内变化时对菌体生长几乎没有影响，细胞产率均在 0.039 g/g 左右。但是如果培养基中不加入七水硫酸镁时，其生长则受到很大限制，细胞产率较低，仅为 0.010；需要 40h 才能将 100 g/L 的葡萄糖消耗完；代谢的葡萄糖主要用于生成乙醇。

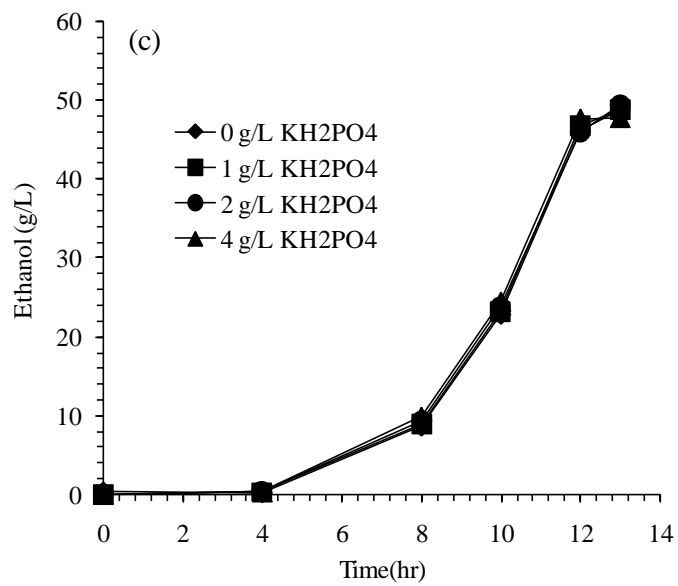
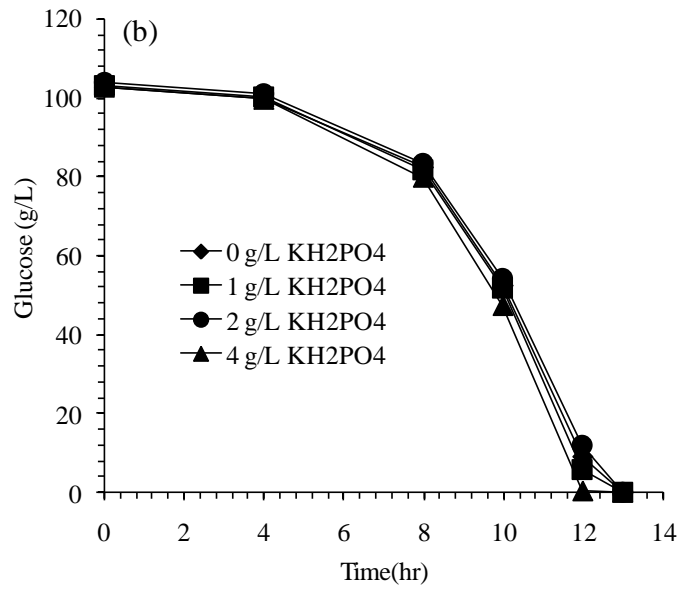
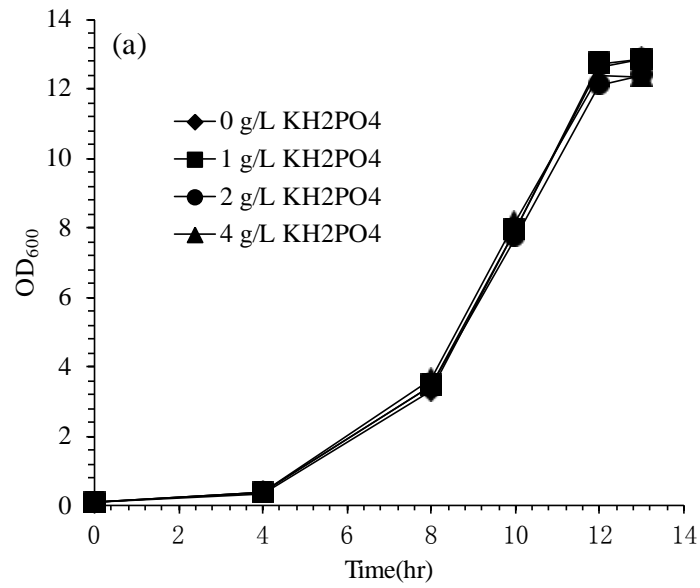
表 3.1 不同硫酸镁浓度下对 *Z. mobilis* ZM4 生长的影响

Table 3.1 Effect of different MgSO₄ · 7H₂O concentration on *Z. mobilis* ZM4 growth

| MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L) | 0 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 细胞产率, Y _{X/S} (g g ⁻¹) | 0.010 | 0.039 | 0.039 | 0.038 | 0.040 |
| 培养时间 (h) | 40 | 13 | 12 | 12 | 12 |

不同磷酸二氢钾浓度对菌体生长影响实验结果见图 3.2。图 3.2 表明磷酸二氢钾对菌体生长几乎没有影响，细胞产率均为 0.038。但是磷酸二氢钾对稳定发酵液 pH 具有一定作用，培养过程中仍然加入 1 g/L。

不同 Yeast extract 浓度对菌体生长影响实验结果见表 3.2。由表可知，细胞产率随着 Yeast extract 浓度的增加而不断增加。在菌体生长过程中，Yeast extract 是必须组分。培养基中没有 Yeast extract 时菌体不生长。



注：(a) 菌体生长情况；(b) 葡萄糖消耗情况；(c) 乙醇生成情况

图 3.2 不同磷酸二氢钾浓度对 *Z. mobilis* ZM4 生长的影响

Fig. 3.2 Effect of different KH_2PO_4 concentration on *Z. mobilis* ZM4 growth. (a) The growth curve, (b) The glucose consumption curve, (c) The ethanol curve.

表 3.2 不同 Yeast extract 浓度下对 *Z. mobilis* ZM4 生长的影响

Table 3.2 Effect of different Yeast extract concentration on *Z. mobilis* ZM4 growth

| Yeast extract (g l^{-1}) | 2.5 | 5 | 10 | 15 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 细胞产率, $Y_{X/S}$ (g g^{-1}) | 0.032 | 0.035 | 0.038 | 0.039 |
| 培养时间 (h) | 13 | 12 | 12 | 12 |

由于 GFOR 存在于细胞周质中，为组成型酶，其酶的表达与菌体生长息息相关；细胞产率较高时，相应的 GFOR 产率相对较高。因此从以上培养基组成优化实验结果来看，目前所用培养基：100 g/L Glucose, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L yeast extract, 有利于 GFOR 高表达。

3.1.2 不同通气速率对 *Z. mobilis* ZM4 和 ZM6 生长的影响

Z. mobilis 为兼性厌氧菌，不同的菌种对氧的需求并不相同^[15]。不同通气速率对菌体生长影响实验结果见表 3.3。对于 ZM4 来说，细胞在厌氧的条件下生长较快，生长速率为 0.46 h^{-1} ；细胞产率保持不变在 0.032 g/g 。相反 ZM6 在 0.21 vvm 下生长较快，生长速率为 0.43 g/L ，细胞产率为 0.32 g/g 。

表 3.3 不同通气速率对 *Z. mobilis* ZM4 和 ZM6 生长的影响

Table 3.3 Effect of aeration rate on *Z. mobilis* ZM4 and ZM6 growth in the batch culture medium.

| | | | | |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| ZM4 通气速率 (vvm) | 0 | 0.21 | 0.42 | 0.83 |
| 最大比生长速率, μ_m (h^{-1}) | 0.46 | 0.37 | 0.38 | 0.40 |
| 细胞产率, $Y_{X/S}$ (g g^{-1}) | 0.032 | 0.032 | 0.032 | 0.033 |
| 培养时间 (h) | 13 | 15 | 15 | 15 |
| ZM6 通气速率 (vvm) | 0 | 0.21 | 0.42 | 0.83 |
| 最大比生长速率, μ_m (h^{-1}) | 0.36 | 0.43 | 0.41 | 0.32 |
| 细胞产率, $Y_{X/S}$ (g g^{-1}) | 0.028 | 0.032 | 0.030 | 0.030 |
| 培养时间 (h) | 13 | 15 | 15 | 15 |

3.2 *Z. mobilis* 基因工程菌培养条件优化

3.2.1 不同通气速率对基因工程菌生长和 GFOR 酶活的影响

将 pHW20a-*gfo* 质粒分别导入 *Z. mobilis* ZM4 和 ZM6 中后，成功构建了基因工程菌

ZM4 (pHW20a-*gfo*)和 ZM6 (pHW20a-*gfo*)。考虑将来工业化应用, 首先衡量了不同通气速率对菌体生长和 GFOR 酶活的影响, 实验结果见表 3.4。实验结果表明与 ZM4 (pHW20a-*gfo*)相比 ZM6 (pHW20a-*gfo*)对氧更为敏感。ZM4 (pHW20a-*gfo*)在厌氧的条件下生长较好, 最大比生长速率 μ_m 为 0.35 h^{-1} , 细胞产率 $Y_{X/S}$ 为 0.038 g/g ; 而 ZM6 (pHW20a-*gfo*)在 0.21 vvm 下生长较好, 最大比生长速率 μ_m 为 0.48 h^{-1} , 细胞产率 $Y_{X/S}$ 为 0.035 g/g ; 这一实验结果与野生菌相似。但两基因工程菌种的 GFOR 比活不受通气速率的影响, 几乎相等。与 GFOR 有关的参数, 如单位体积 GFOR 比活 C_E , 单位细胞 GFOR 比活 $A_{E/X}$ 和单位葡萄糖 GFOR 产率 $Y_{E/S}$, ZM6 (pHW20a-*gfo*)比 ZM4 (pHW20a-*gfo*)高一些。这可能由于质粒 pHW20a-*gfo* 转入 ZM6 的效率比 ZM4 中的高一些, 数据见表 3.5。

表 3.4 不同通气速率对基因工程菌中 GFOR 酶活的影响

Table 3.4 Effect of aeration rate on GFOR productivity of the recombinant *Z. mobilis* strains

| | | | | |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| ZM4 (pHW20a- <i>gfo</i>) 通气速率 (vvm) | 0 | 0.42 | 0.83 | 1.67 |
| 最大比生长速率, $\mu_m (\text{h}^{-1})$ | 0.35 | 0.34 | 0.26 | 0.30 |
| 细胞产率, $Y_{X/S} (\text{g g}^{-1})$ | 0.038 | 0.037 | 0.036 | 0.037 |
| 单位体积 GFOR 比活, $C_E (\text{U ml}^{-1})$ | 2.62 ± 0.00 | 2.67 ± 0.01 | 2.48 ± 0.01 | 2.45 ± 0.02 |
| 单位蛋白 GFOR 比活, $A_E (\text{U mg}^{-1})$ | 4.48 ± 0.15 | 4.45 ± 0.13 | 4.42 ± 0.01 | 4.43 ± 0.04 |
| 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X} (\text{U mg}^{-1})$ | 0.60 ± 0.00 | 0.65 ± 0.01 | 0.64 ± 0.01 | 0.61 ± 0.01 |
| 单位葡萄糖 GFOR 产率, $Y_{E/S} (\text{U g}^{-1})$ | 23.4 ± 0.0 | 24.1 ± 0.0 | 23.3 ± 0.0 | 22.6 ± 0.2 |
| 培养时间 (h) | 15.5 | 17.5 | 18.0 | 18.0 |
| ZM6 (pHW20a- <i>gfo</i>) 通气速率 (vvm) | 0 | 0.21 | 0.42 | 0.83 |
| 最大比生长速率, $\mu_m (\text{h}^{-1})$ | 0.47 | 0.48 | 0.41 | 0.39 |
| 细胞产率, $Y_{X/S} (\text{g g}^{-1})$ | 0.031 | 0.035 | 0.034 | 0.034 |
| 单位体积 GFOR 比活, $C_E (\text{U ml}^{-1})$ | 2.73 ± 0.03 | 2.79 ± 0.01 | 2.79 ± 0.10 | 2.81 ± 0.06 |
| 单位蛋白 GFOR 比活, $A_E (\text{U mg}^{-1})$ | 4.45 ± 0.01 | 4.49 ± 0.06 | 4.49 ± 0.08 | 4.43 ± 0.12 |
| 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X} (\text{U mg}^{-1})$ | 0.88 ± 0.01 | 0.76 ± 0.00 | 0.80 ± 0.03 | 0.81 ± 0.02 |
| 单位葡萄糖 GFOR 产率, $Y_{E/S} (\text{U g}^{-1})$ | 26.9 ± 0.3 | 26.9 ± 0.1 | 27.0 ± 1.0 | 27.9 ± 0.6 |
| 培养时间 (h) | 17.5 | 19.5 | 19.5 | 19.5 |

表 3.5 *Z. mobilis* 菌株结合转化效率

Table 3.5 Transformation efficiency of *Z. mobilis* strains by transconjugation

| 质粒 | 菌株 | 转化效率 |
|--------------------|-----------------------|----------------------------------|
| pHW20a- <i>gfo</i> | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | $5.5\text{-}6.9 \times 10^{-5}$ |
| pHW20a- <i>gfo</i> | <i>Z. mobilis</i> ZM6 | $9.3\text{-}10.1 \times 10^{-5}$ |

由于 ZM4 (pHW20a-gfo)和 ZM6 (pHW20a-gfo)在 GFOR 酶活方面相差不大, 相比之下 ZM4 (pHW20a-gfo)更具有工业化应用的优势。这是由于 ZM4 (pHW20a-gfo)在厌氧条件下生长较好, 培养过程无需无菌空气以及使空气分布均匀所需的动力, 过程更加节能。因此本课题下面将 ZM4 (pHW20a-gfo)作为研究重点。

3.2.2 *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) 和 ZM4 酶活的比较

本课题分别比较了摇瓶培养和 3 L 发酵罐培养 ZM4 和 ZM4 (pHW20a-gfo)中的 GFOR 酶活, 实验结果见表 3.6。在摇瓶培养中, ZM4 (pHW20a-gfo)中单位体积发酵液中 GFOR 比活(C_E , U/mL)、单位粗蛋白中 GFOR 比活(A_E , U/mg)和单位细胞中 GFOR 比活($A_{E/X}$, U/mg)分别比野生菌 ZM4 提高了 2.3 倍、3 倍和 3.4 倍。

在 3 L 发酵罐中, ZM4 (pHW20a-gfo)中 C_E 值是野生菌种的 1.8 倍。在不同的培养方式中, 3 L 发酵罐中培养的 ZM4 (pHW20a-gfo)中 C_E 值比摇瓶中提高了 12 倍; 对于野生菌 ZM4, 3 L 发酵罐中培养的 C_E 值比摇瓶中提高了 16 倍。

摇瓶培养的细胞经过破碎, 离心获得的上清液, ZM4 (pHW20a-gfo)中单位蛋白含有的 GFOR 比活 A_E 是野生菌 ZM4 中的 3 倍多; 在 3 L 发酵罐中, ZM4 (pHW20a-gfo)中 GFOE 比活 A_E 是野生菌 ZM4 中的 1.7 倍多。无论是摇瓶培养还是 3 L 发酵罐培养, ZM4 (pHW20a-gfo)中 A_E 值保持基本不变, 均为 4.1 U/mg; 而野生菌 ZM4 中, 在 3 L 发酵罐中培养的 A_E 大概是摇瓶中的 1.7 倍。这可能是由于在基因工程菌中, GFOR 蛋白表达比较迅速, 以致不受培养基中葡萄糖浓度和培养方式的影响; 而在野生菌 ZM4 中, GFOR 表达与菌体的生长相关, 培养基中的葡萄糖浓度和培养条件的控制对 GFOR 酶活影响较大。

表 3.6 *Z. mobilis* ZM4 和 ZM4 (pHW20a-gfo)中 GFOR 酶活的比较

Table 3.6 Comparison of GFOR productivities between the wild *Z. mobilis* ZM4 and recombinant ZM4 (pHW20a-gfo) strains

| 摇瓶中 GFOR 产率 ^a | ZM4 | ZM4 (pHW20a-gfo) |
|---|---------------|------------------|
| 单位体积 GFOR 比活, C_E (U ml ⁻¹) | 0.09 ± 0.00 | 0.21 ± 0.00 |
| 单位蛋白 GFOR 比活, A_E (U mg ⁻¹) | 1.38 ± 0.02 | 4.10 ± 0.04 |
| 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X}$ (U mg ⁻¹) | 0.15 ± 0.00 | 0.51 ± 0.00 |
| 3L 发酵罐中 GFOR 产率 ^b | ZM4 | ZM4 (pHW20a-gfo) |
| 最大比生长速率, μ_m (h ⁻¹) | 0.44 ± 0.02 | 0.39 ± 0.06 |
| 细胞产率, $Y_{X/S}$ (g g ⁻¹) | 0.035 ± 0.000 | 0.035 ± 0.001 |
| 单位体积 GFOR 比活, C_E (U ml ⁻¹) | 1.45 ± 0.16 | 2.59 ± 0.01 |
| 单位蛋白 GFOR 比活, A_E (U mg ⁻¹) | 2.40 ± 0.28 | 4.17 ± 0.15 |
| 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X}$ (U mg ⁻¹) | 0.39 ± 0.04 | 0.70 ± 0.00 |
| 单位葡萄糖 GFOR 产率, $Y_{E/S}$ (U g ⁻¹) | 13.8 ± 1.6 | 24.4 ± 0.5 |
| 培养时间 (h) | 12.5 | 16.0 |

^a 葡萄糖浓度: 10 g l⁻¹; ^b 葡萄糖浓度: 100 g l⁻¹。

在 ZM4 (pHW20a-gfo)中, 3 L 发酵罐中培养的单位细胞中 GFOR 产率 $A_{E/X}$ 是摇瓶中的 1.4 倍; 在野生菌 ZM4 中, 3 L 发酵罐中 $A_{E/X}$ 值是摇瓶培养中的 2.6 倍。在 3 L 发酵罐中, 基因工程菌 ZM4 (pHW20a-gfo)中 $A_{E/X}$ 值是野生菌 ZM4 中的 1.8 倍; 在摇瓶中基因工程菌中 $A_{E/X}$ 值是野生菌中的 3.4 倍。

在 3 L 发酵罐中, 基因工程菌 ZM4 (pHW20a-gfo)中每克葡萄糖 GFOR 产率($Y_{E/S}$, U/g)是野生菌 ZM4 中的 1.8 倍。这表明在基因工程菌中将底物用于产 GFOR 的效率高于野生菌的效率。

野生菌 ZM4 和基因工程菌 ZM4 (pHW20a-gfo)发酵过程中菌体生长情况, 葡萄糖消耗情况, 乙醇生成情况见图 3.3; 培养过程在 3 L 发酵罐中进行。这一结果表明与基因工程菌 ZM4 (pHW20a-gfo)相比野生菌 ZM4 生长较快, 尽管最终的细胞浓度和乙醇生成几乎相等。从一定程度上来说, 这一结果主要原因是基因工程菌中的代谢负担比野生菌重, 如细胞生长, 质粒复制和 GFOR 酶的过表达。在 3 L 发酵罐中, 野生菌中的最大比生长速率是比基因工程菌中高出 11% (表 3.6)。

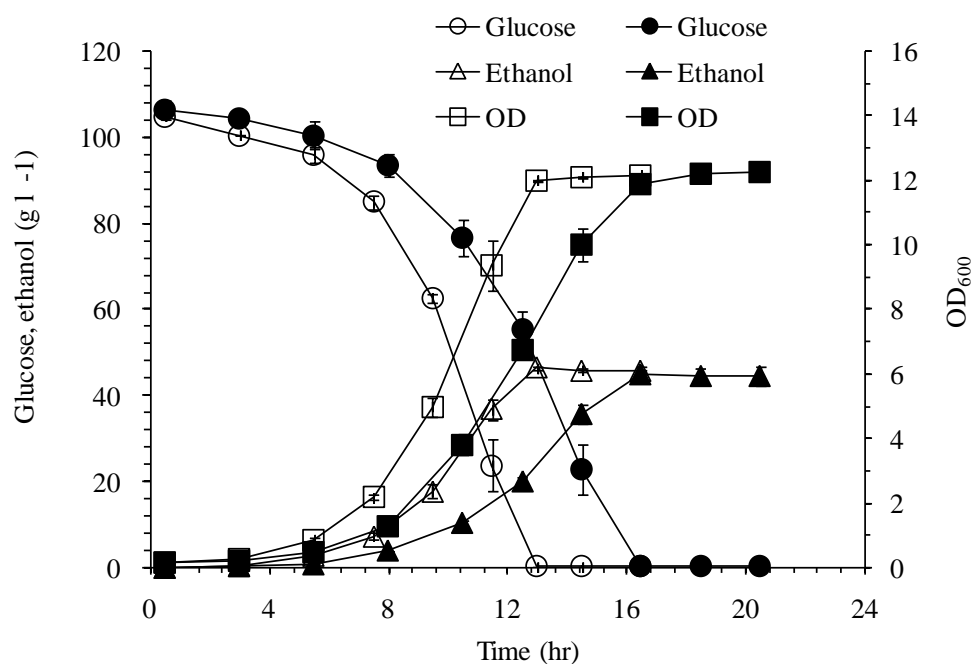


图 3.3 *Z. mobilis* ZM4(空心图标)和 ZM4 (pHW20a-gfo) (实心图标)发酵过程曲线

Fig. 3.3 Fermentation profiles for the wild *Z. mobilis* ZM4 strain (open legends) and the recombinant *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) (closed legends) strain.

3.2.3 不同葡萄糖浓度对 ZM4 (pHW20a-gfo)生长和 GFOR 酶活的影响

据已有的研究报道, 培养基中起始葡萄糖浓度对 GFOR 表达具有诱导作用^[27]。为了提高 GFOR 的产率, 本课题研究了培养基中不同的起始葡萄糖浓度对 GFOR 表达的影响。表 3.7 显示了在 3 L 发酵罐中, 起始葡萄糖浓度在 50-200 g/L 范围内变化时对运动发酵单胞菌中 GFOR 产率的影响。

当起始葡萄糖浓度在 50-100 g/L 范围内时, 菌体生长的最快, 最大比生长速率 μ_m 为 0.34 h^{-1} 。单位体积 GFOR 比活 C_E , 单位蛋白 GFOR 比活 A_E 和单位细胞 GFOR 比活 $A_{E/X}$ 随着起始葡萄糖浓度的增加而增加; 而 $Y_{X/S}$ 和 $Y_{E/S}$ 值却随着葡萄糖浓度的增加而减少。这些与 GFOR 产率相关的参数在起始糖浓度的影响下呈现相反的变化趋势。生物过程中最佳起始糖浓度的选择依赖于这些参数的优先性; 例如当 C_E 和 $A_{E/X}$ 值作为重点考虑时, 生物过程则应选择较高的起始糖浓度; 相反如果优先考虑 $Y_{E/S}$ 时, 生物过程则应选择较低的起始糖浓度。

表 3.7 起始葡萄糖浓度对 ZM4 (pHW20a-gfo) 中 GFOR 酶活的影响

Table 3.7 Effect of initial glucose concentration on GFOR productivity of the recombinant *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) strain in the batch culture medium

| 起始葡萄糖浓度 (g l^{-1}) | 50 | 100 | 150 | 200 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 最大比生长速率, $\mu_m (\text{h}^{-1})$ | 0.34 | 0.34 | 0.19 | 0.15 |
| 细胞产率, $Y_{X/S} (\text{g g}^{-1})$ | 0.054 | 0.035 | 0.026 | 0.017 |
| 单位体积 GFOR 比活, $C_E (\text{U ml}^{-1})$ | 1.37 ± 0.03 | 2.61 ± 0.02 | 2.75 ± 0.01 | 3.17 ± 0.01 |
| 单位蛋白 GFOR 比活, $A_E (\text{U mg}^{-1})$ | 3.84 ± 0.02 | 4.22 ± 0.01 | 4.32 ± 0.02 | 4.89 ± 0.10 |
| 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X} (\text{U mg}^{-1})$ | 0.55 ± 0.01 | 0.76 ± 0.01 | 0.72 ± 0.00 | 1.03 ± 0.00 |
| 单位葡萄糖 GFOR 产率, $Y_{E/S} (\text{U g}^{-1})$ | 29.6 ± 0.7 | 26.6 ± 0.2 | 18.8 ± 0.1 | 17.5 ± 0.1 |
| 培养时间 (h) | 12.5 | 16.5 | 22.5 | 52.5 |

3.2.4 不同 pH 对 ZM4 (pHW20a-gfo) 生长和 GFOR 酶活的影响

表 3.8 pH 对 ZM4 (pHW20a-gfo) 中 GFOR 酶活的影响

Table 3.8 Effect of pH on GFOR productivity of the recombinant *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-gfo) strain in the batch culture medium.

| pH | 5.0 | 5.5 | 6.0 | 6.5 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 最大比生长速率, $\mu_m (\text{h}^{-1})$ | 0.29 | 0.28 | 0.33 | 0.17 |
| 细胞产率, $Y_{X/S} (\text{g g}^{-1})$ | 0.037 | 0.039 | 0.035 | 0.027 |
| 单位体积 GFOR 比活, $C_E (\text{U ml}^{-1})$ | 2.50 ± 0.26 | 2.50 ± 0.02 | 2.45 ± 0.02 | 1.16 ± 0.01 |
| 单位蛋白 GFOR 比活, $A_E (\text{U mg}^{-1})$ | 4.40 ± 0.31 | 4.27 ± 0.20 | 4.23 ± 0.02 | 4.33 ± 0.01 |
| 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X} (\text{U mg}^{-1})$ | 0.64 ± 0.07 | 0.62 ± 0.01 | 0.66 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 |
| 单位葡萄糖 GFOR 产率, $Y_{E/S} (\text{U g}^{-1})$ | 23.8 ± 2.5 | 23.9 ± 0.2 | 23.5 ± 0.2 | 15.6 ± 0.1 |
| 培养时间 (h) | 17.5 | 16.5 | 16.5 | 18.5 |

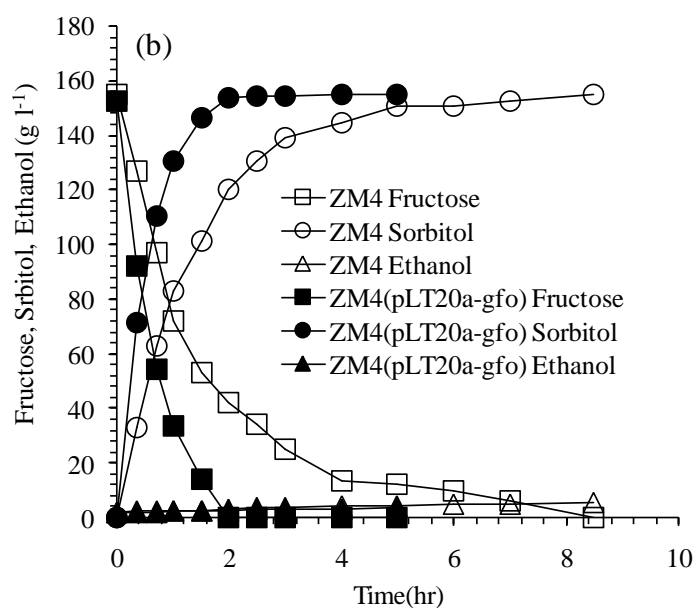
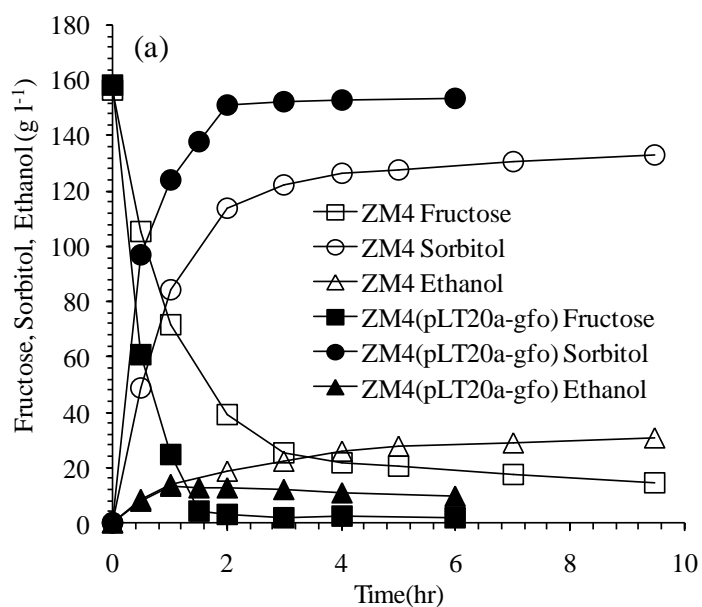
Z. mobilis 是从偏酸性的环境中分离出来的, pH 对菌体生长具有较大影响, 为提高

GFOR 酶活, 本课题对 ZM4 (pHW20a-gfo) 的生长 pH 进行了详细的研究, 实验结果见表 3.8。当培养基中的 pH 低于 4.0 或高于 7.0 时, ZM4 (pHW20a-gfo) 经过 72.5h 的培养不生长; 当培养基的 pH 控制在 5.0-6.0 时, 菌体生长较快, 有利于 GFOR 的表达; 在 pH 为 5.5-6.0 时, $Y_{X/S}$ 和 $Y_{E/S}$ 值达到最大。在 3 L 发酵罐中, 当体系的 pH 得到很好的控制, 在较高的糖浓度下, GFOR 酶活比摇瓶中高出至少一个数量级。

3.3 ZM4 (pHW20a-gfo) 细胞催化产山梨醇

3.3.1 细胞反复冻溶后催化产山梨醇

细胞经过反复冻溶后, ED 途径中关键酶的辅因子在这一过程中可能丢失, 导致酶失活; 或是细胞在反复冻溶过程中自身自溶, 其体内 ED 代谢路径无法工作。而 GFOR 酶活较为稳定, 酶活不受影响; 利用这一细胞催化产山梨醇, 大部分的底物葡萄糖和果糖通过 GFOR 转化为山梨醇, 而无法通过 ED 途径代谢为乙醇, 提高的山梨醇的产量。



注：(a) 细胞冻溶一次；(b) 细胞冻溶两次

图 3.4 细胞反复冻溶后催化产山梨醇

Fig. 3.4 Sorbitol production by permeabilized cells. (a) Cells frozen and thawed once, (b) Cells frozen and thawed twice.

图 3.4 (a)中为细胞经过一次反复冻溶后的实验结果，ZM4 (pHW20a-gfo)中山梨醇的产率为 97.5%，而对照菌株 ZM4 的山梨醇产率仅为 93.4%。由于基因工程中 GFOR 酶活较高，其山梨醇生成速率比野生菌快；ZM4 (pHW20a-gfo)催化反应过程仅需 2 h，而 ZM4 则需要 4 h。催化过程中，ZM4 (pHW20a-gfo)生成的乙醇量为 9.70 g/L，而野生菌 ZM4 则有 30.85 g/L；这表明，经过一次细胞反复冻溶后，仍然有大量的运动发酵单胞菌保持完整。

图 3.4(b)为细胞经过两次反复冻溶后的实验结果，ZM4(pHW20a-gfo)和 ZM4 中的山梨醇产率均达到 100%。ZM4(pHW20a-gfo)催化反应过程仅需 2 h，乙醇生成量为 3.69 g/L；而 ZM4 则需要 5 h，乙醇生成量为 5.51 g/L。这表明细胞经过两次反复冻溶后，山梨醇的产量得到了极大提高，并且产物中乙醇含量较低。

3.3.2 金属离子对催化产山梨醇的影响

本课题研究过程中，利用构建的基因工程菌 ZM4(pHW20a-gfo)，以等摩尔量的葡萄糖糖果糖(300 g/L)为底物，通过生物催化方法生产山梨醇。在研究过程中，建立了一种提高山梨醇产量的新方法，即向反应体系中加入二价金属离子，这些金属离子能够抑制 *Z.mobilis* 中 Entner-Doudoroff 途径的关键酶，改变代谢流方向即由生成乙醇的路径转为生成山梨醇的路径。这一方法无需对细胞进行任何处理，大大提高了山梨醇的产量。

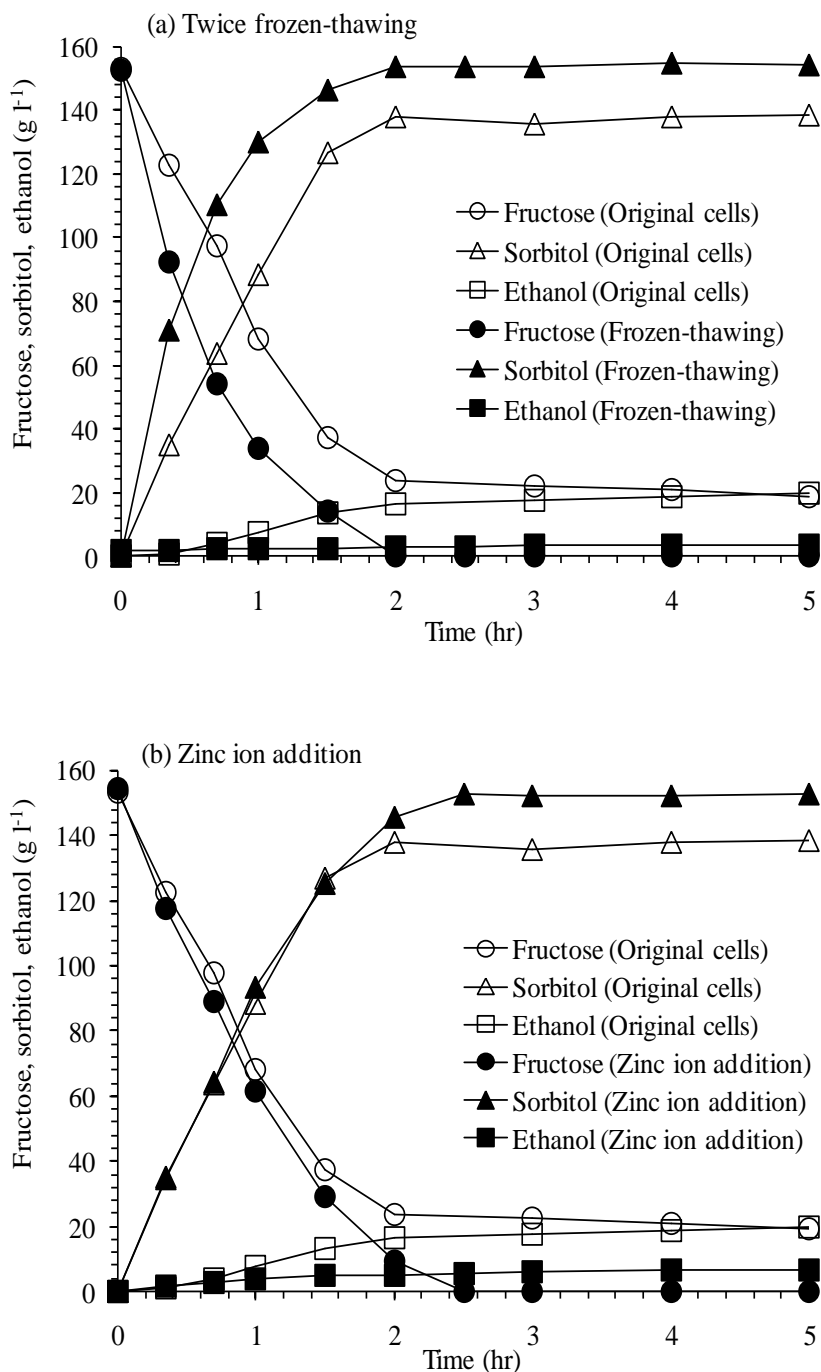
表 3.9 显示了不同浓度七水硫酸锌对基因工程菌 ZM4(pHW20a-gfo)生物转化葡萄糖和果糖为山梨醇和葡萄糖酸的影响。七水硫酸锌的浓度分别为 0, 0.1, 1.0 和 2.0 g/L。结果表明锌离子能够有效抑制乙醇生成，乙醇生成量降到了 10.7%；而山梨醇的产量提高了 16.5%，山梨醇的产率由原来的 89%提高到了接近理论水平(100%)。

表 3.9 不同浓度七水硫酸锌对 ZM4 (pHW20a-gfo)催化山梨醇和葡萄糖酸的影响

Table 3.9 Effect of ZnSO₄ ·7H₂O on the bioconversion of fructose and glucose to sorbitol and gluconic acid using recombinant ZM4 (pHW20a-gfo) cells

| ZnSO ₄ ·7H ₂ O (g l ⁻¹) | 0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 |
|---|-------|-------|-------|-------|
| 起始葡萄糖浓度 (g l ⁻¹) | 153.7 | 155.0 | 160.0 | 157.1 |
| 起始果糖浓度 (g l ⁻¹) | 153.5 | 154.7 | 158.5 | 158.9 |
| 山梨醇生成量 (g l ⁻¹) | 138.3 | 152.8 | 159.1 | 161.1 |
| 乙醇生成量 (g l ⁻¹) | 16.70 | 5.65 | 1.89 | 1.78 |
| 山梨醇产率 (%) | 89.0 | 97.6 | 99.3 | 100.3 |
| 山梨醇比生成速率, Q _{P/X} (g g ⁻¹ h ⁻¹) | 3.60 | 3.01 | 2.97 | 3.06 |
| 反应时间 (h) | 2.0 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |

图 3.5 显示了生物催化过程中山梨醇和乙醇生成的动态曲线；其中图 3.5(a)为细胞经过两次反复冻溶后实验结果，图 3.5(b)为反应体系加入 0.1 g/L 七水硫酸锌的实验结果，两者都以不经过任何处理的新鲜细胞催化结果作为对照。从实验结果来看，两种方法都有效的抑制了乙醇的生成，提高了山梨醇的产量。



注：(a) ZM4 (pHW20a-gfo)细胞反复冻溶后对催化产山梨醇的影响；(b) Zn²⁺对 ZM4 (pHW20a-gfo) 催化产山梨醇的影响

图 3.5 不同细胞处理方式催化产山梨醇实验结果比较

Fig. 3.5 Effects of zinc ion addition to the bioconversion bioreactor (Fig 3.5 b) and of permeabilized cells

(Fig 3.5 a) on production of sorbitol and ethanol using the recombinant *Z. mobilis* ZM4 (pHW20a-*gfo*) cells

表 3.10 显示了不同浓度无水氯化钙对基因工程菌 ZM4(pHW20a-*gfo*)生物转化葡萄糖和果糖为山梨醇和葡萄糖酸的影响。实验结果表明钙离子能够有效的抑制乙醇的生成，山梨醇的产率能够达到理论水平，即由原来的 89%增加到 98%-100%；相反乙醇的生成量随着钙离子浓度的增加而减少，即由对照的 16.70 g/L 减少到 0.14 g/L。但是山梨醇的比生成速率 $Q_{P/X}$ 随着钙离子的浓度增加而降低。

表 3.10 不同浓度无水氯化钙对 ZM4 (pHW20a-*gfo*)催化山梨醇和葡萄糖酸的影响

Table 3.10 Effect of CaCl_2 on bioconversion of fructose and glucose to sorbitol and gluconic acid using recombinant ZM4 (pHW20a-*gfo*) cells

| CaCl_2 (g l^{-1}) | 0 | 5 | 20 | 50 |
|---|-------|-------|-------|-------|
| 起始葡萄糖浓度 (g l^{-1}) | 153.7 | 158.1 | 158.7 | 152.7 |
| 起始果糖浓度 (g l^{-1}) | 153.5 | 159.3 | 158.9 | 150.4 |
| 山梨醇生成量 (g l^{-1}) | 138.3 | 157.9 | 158.1 | 153.2 |
| 乙醇生成量 (g l^{-1}) | 16.70 | 5.05 | 2.96 | 0.14 |
| 山梨醇产率 (%) | 89.0 | 98.0 | 98.4 | 100.8 |
| 山梨醇比生成速率, $Q_{P/X}$ ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) | 3.60 | 3.14 | 3.04 | 1.59 |
| 反应时间 (h) | 2.0 | 2.5 | 2.5 | 5.0 |

表 3.11 不同种类二价金属离子对 ZM4 (pHW20a-*gfo*)催化山梨醇和葡萄糖酸的影响

Table 3.11 Effects of divalent metal ions on bioconversions of fructose and glucose to sorbitol and gluconic acid using recombinant ZM4 (pHW20a-*gfo*) cells

| Divalent | Control | Cu^{2+} | Co^{2+} | Fe^{2+} | Mg^{2+} |
|---|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 金属离子浓度 (g l^{-1}) | 0 | 0.5 | 0.5 | 2.0 | 2.5 |
| 起始葡萄糖浓度 (g l^{-1}) | 153.7 | 160.1 | 160.4 | 156.1 | 158.2 |
| 起始果糖浓度 (g l^{-1}) | 153.5 | 159.1 | 159.5 | 156.8 | 158.1 |
| 山梨醇生成量 (g l^{-1}) | 138.3 | 161.0 | 158.8 | 154.5 | 156.6 |
| 乙醇生成量 (g l^{-1}) | 16.70 | 0.51 | 3.29 | 3.51 | 2.20 |
| 山梨醇产率 (%) | 89.0 | 100.1 | 98.5 | 97.4 | 97.9 |
| 山梨醇比生成速率, $Q_{P/X}$ ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) | 3.60 | 1.68 | 3.10 | 3.25 | 3.18 |
| 反应时间 (h) | 2.0 | 5.0 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |

除了 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 外，本课题还对 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 的作用进行了研究，实验结果见表 3.11。这四种金属离子都能够有效的抑制乙醇的生产，提高山梨醇的产率。

与对照相比, 这几种金属离子将乙醇生成量降低到了 3%-21% 的范围内, 山梨醇产量的提高类似于 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的作用。

3.4 山梨醇的分离纯化

3.4.1 生物催化代谢葡萄糖酸

葡萄糖酸为电解质, 将其分离出来成本相对较高。而葡萄糖酸在运动发酵单胞菌中葡萄糖酸激酶的作用下, 消耗 ATP 将葡萄糖酸转化为 6-磷酸葡萄糖酸; 后者进入 Entner-Doudoroff 途径进一步被代谢生成乙醇。因此考虑利用运动发酵单胞菌将葡萄糖酸转化为乙醇; 最终分离乙醇和山梨醇, 相对较为容易。

在这一思路的指引下, 形成了一些代谢葡萄糖酸的想法。想法之一, 以葡萄糖酸为底物代替葡萄糖酸来培养 ZM4 (pHW20a-*gfo*)。经过研究发现, ZM4 (pHW20a-*gfo*) 无法代谢葡萄糖酸, 用于自身生长。想法之二, 同时利用葡萄糖和葡萄糖酸培养 ZM4 (pHW20a-*gfo*), 实验结果发现, ZM4 (pHW20a-*gfo*) 优先利用葡萄糖; 当葡萄糖消耗后, 开始缓慢代谢葡萄糖酸。由于代谢葡萄糖酸时间较长; 且经过长时间的代谢后 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞损失严重, 无法继续离心收集细胞。想法之三, 和产山梨醇一样, 先利用葡萄糖培养 ZM4 (pHW20a-*gfo*), 培养后收集 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞, 先将细胞用于催化代谢葡萄糖酸; 代谢完后离心收集细胞用于催化产山梨醇。

利用 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞催化代谢葡萄糖酸实验结果见图 3.6。考虑到实际生产过程, 代谢过程中葡萄糖酸和山梨醇的量分别为 100 g/L。经过 30 h 的生物催化过程, 100 g/L 葡萄糖酸完全代谢; 过程中山梨醇的量由原先的 100 g/L 降低到了 83.73 g/L; 并且只有 24.64 g/L 的乙醇生成。这主要是在代谢葡萄糖酸的过程中产生了乙偶姻, 其生成量为 13.52 g/L。生物催化代谢葡萄糖酸过程比 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 培养过程代谢葡萄糖酸速度快, 这一方法较为可行。

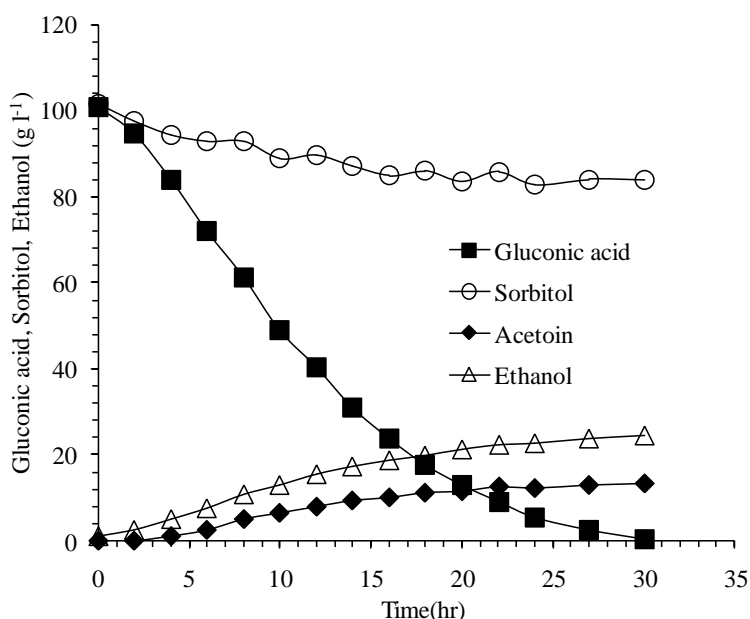


图 3.6 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 代谢葡萄糖酸过程动态曲线

Fig. 3.6 The bioconversion curve of gluconic acid by ZM4 (pHW20a-gfo)

3.4.2 生物催化产山梨醇

将代谢完葡萄糖酸后的反应液进行 10 000 g, 5min 离心, 分离细胞和上清液; 其中上清液用于进一步的分离纯化山梨醇, 细胞用于催化产山梨醇。考虑工业化生产过程中难以得到较高浓度的葡萄糖和果糖, 本次催化产山梨醇所用底物浓度分别为 100 g/L 葡萄糖和 100 g/L 果糖, 生物催化产山梨醇实验结果见图 3.7。

实验结果表明, 经过代谢葡萄糖酸后的 ZM4 (pHW20a-gfo)细胞, GFOR 酶活不受影响; 并且在催化过程中没有乙醇生成, 山梨醇的产率达到 100%。这可能是由于 ZM4 (pHW20a-gfo)细胞经过代谢葡萄糖酸过程后, Entner-Doudoroff 途径关键酶失去活性, 而 GFOR 酶活不受影响, 即代谢葡萄糖过程起到了一个对 ZM4 (pHW20a-gfo)进行预处理的作用, 提高了山梨醇的产量。

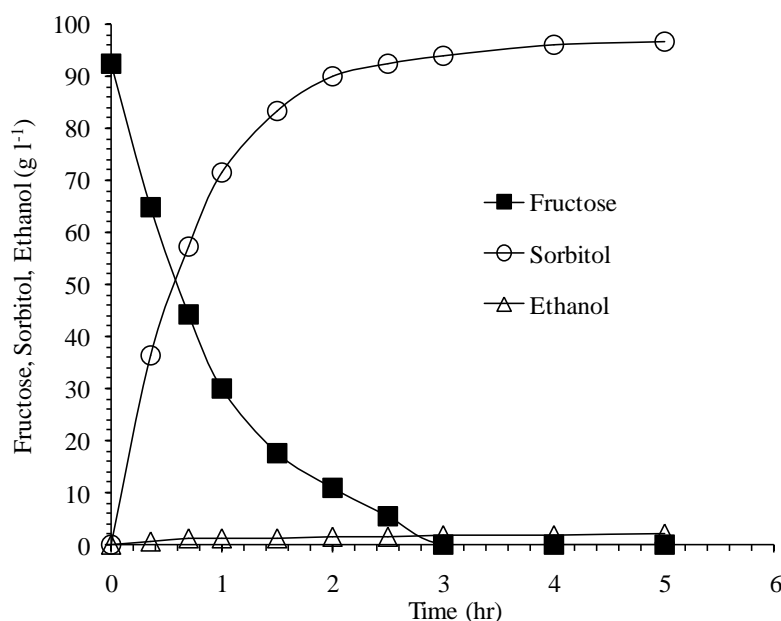


图 3.7 代谢葡萄糖酸后的 ZM4 (pHW20a-gfo)细胞催化产山梨醇

Fig. 3.7 Sorbitol production using bioconversion gluconic acid's cell

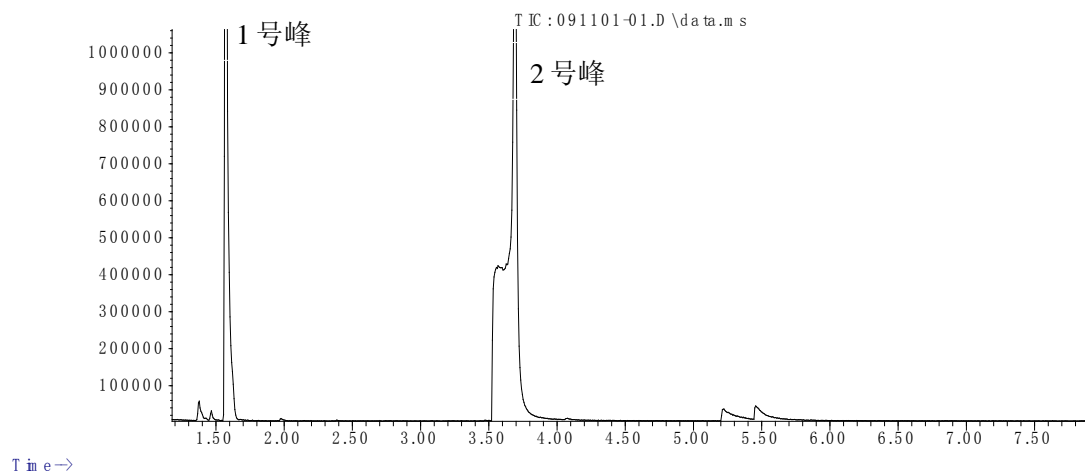
3.4.3 乙偶姻生成代谢路径分析

在代谢葡萄糖酸的过程中, 生成的乙醇比理论上少的多, 从液相色谱图中发现, 有一个和乙醇含量相当大小的峰。经过气质联用高效色谱分析发现, 代谢葡萄糖酸的过程中还生成了乙偶姻, 生成量见图 3.6。气质联用高效色谱分析结果见图 3.8, 其中 1 号峰为乙醇; 2 峰有些不规整, 但从峰的任意位置分析都为乙偶姻。

乙偶姻又名 3-羟基-2-丁酮, 外观为淡黄色液体或晶体; 可与乙醇、水、甘油溶混, 不溶于脂肪油和碳轻化合物, 此外乙偶姻具有强烈的奶油、脂肪、白脱样香气, 高度稀释后有令人愉快的奶香气。乙偶姻具有广泛的用途, 主要用作医药中间体, 食用香料,

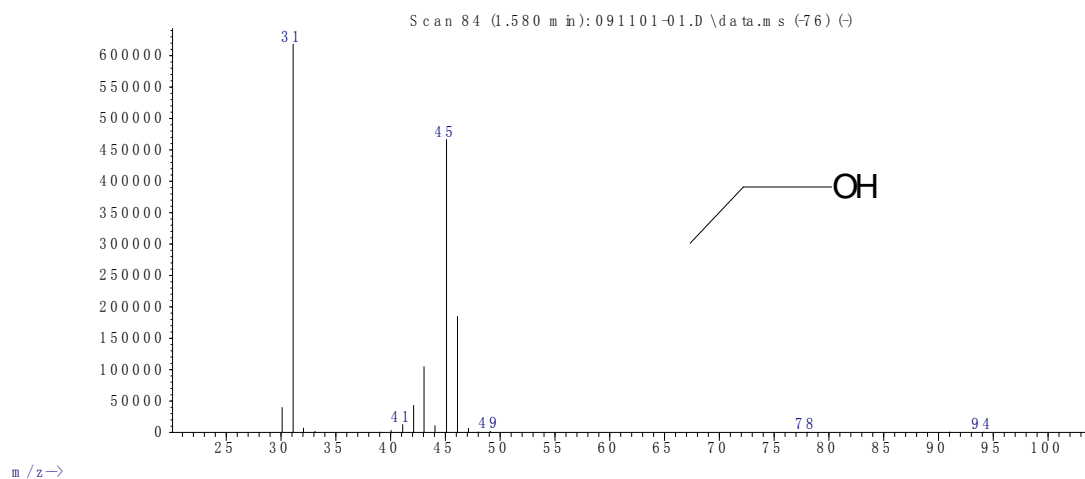
配置奶香型、肉香型、草莓香型香精，也可用于奶制品中。

Abundance



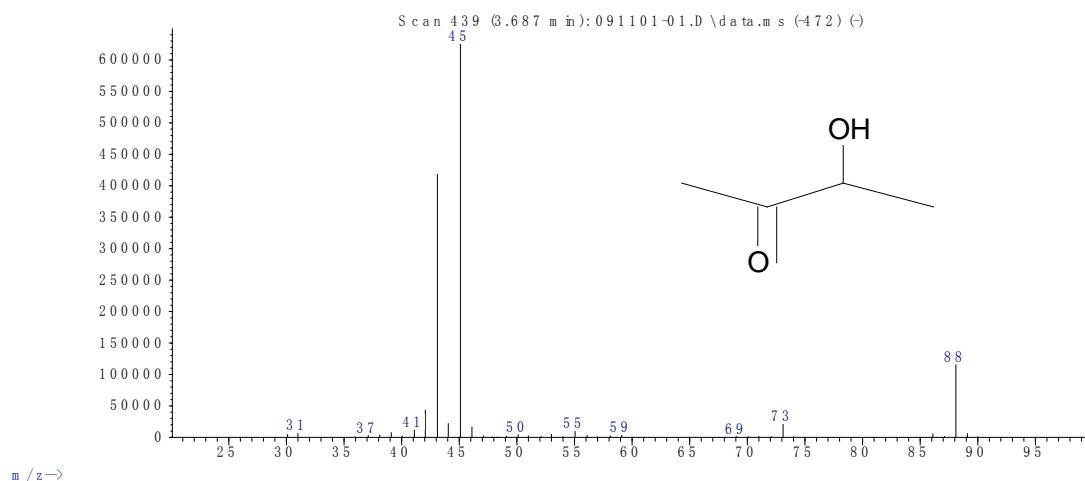
Time →

Abundance 1号峰



m/z →

Abundance 2号峰



m/z →

图 3.8 催化反应液高效气质联用色谱分析结果

Fig. 3.8 The analyse result of bioconversion liquid by gas chromatography-mass spectrometry

由于乙偶姻具有较高的市场价值，且在代谢葡萄糖酸过程中生成量较大，有必要对其形成机制进行详细的研究。首先进行了以 100 g/L 葡萄糖为底物的催化实验，观察 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞在催化代谢葡萄糖时是否有乙偶姻生成，实验结果见图 3.9。由图中可以看出葡萄糖经 3h 能够完全代谢，生成 42.16 g/L 的乙醇。整个催化葡萄糖过程中没有乙偶姻生成。

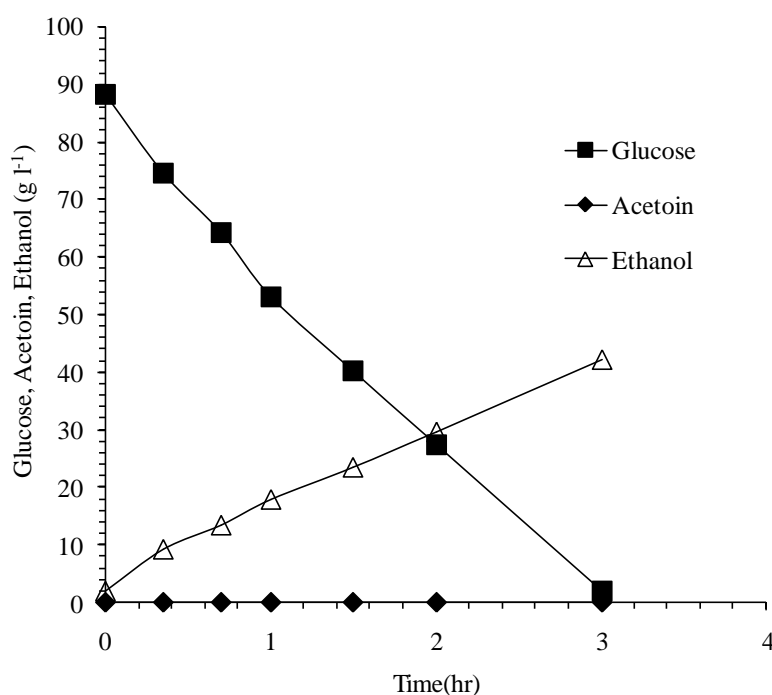


图 3.9 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 生物催化代谢葡萄糖过程

Fig. 3.9 Metabolize glucose by ZM4 (pHW20a-*gfo*)

与代谢葡萄糖酸所需 30h 的反应时间相比，代谢葡萄糖只需 3h。分析其中的原因可能有两种，其一是 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞跨膜运输葡萄糖酸的阻力比葡萄糖大的多以致代谢葡萄糖酸速度较慢；其二是通过对 Entner-Doudoroff 路径进行分析可知，与代谢葡萄糖相比，代谢葡萄糖酸过程中少产生了 1 mol 的 NAD(P)H，这主要是由 6-磷酸葡萄糖脱氢酶生成的。

将 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞进行破碎后催化代谢葡萄糖酸，观察代谢速度是否加快，实验结果见图 3.10。由图中可以看出，代谢葡萄糖酸的速度没有变快，并且经过 42h 的生物转化，仍然有 27.85 g/L 葡萄糖酸的残留；生成的乙醇和乙偶姻的量变化不大。这表明 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞代谢葡萄糖酸速度慢并非由于葡萄糖酸跨膜运输阻力大的原因。

随后进行如下验证实验，即在两个 1.5 ml 离心管中含有 5 g/L 葡萄糖酸和运动发酵单胞菌，其中一管中还含有 0.4 g/L 的 NADH。两个小管置于 30°C，1000rpm 的小型 Eppendorf 振荡器上反应 10h，观察葡萄糖酸代谢情况和乙偶姻生成情况，实验结果见表

3.12。

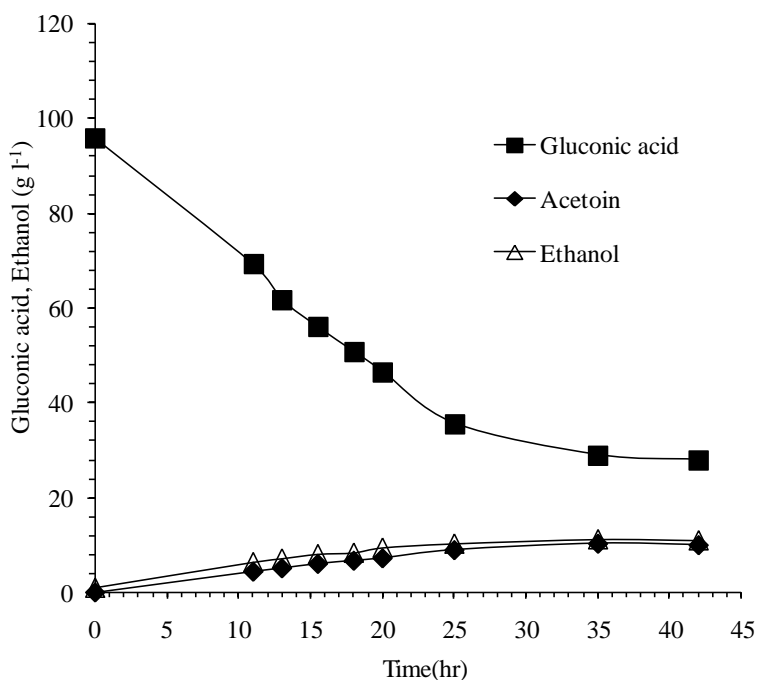


图 3.10 破碎的 ZM4 (pHW20a-gfo) 细胞生物催化代谢葡萄糖酸

Fig. 3.10 Bioconversion of gluconic acid using cracked ZM4 (pHW20a-gfo) cell

由表中可以看出，加入 NADH 后加快了葡萄糖酸的代谢速率；并且加入 NADH 后几乎没有乙偶姻生成。这一实验结果表明，与葡萄糖相比葡萄糖酸代谢速度慢的原因是由于缺乏还原力；并且由于缺乏还原力，导致 ZM4(pHW20a-gfo) 在代谢葡萄糖酸的过程中生成乙偶姻。

表 3.12 NADH 对 ZM4 (pHW20a-gfo) 代谢葡萄糖酸的影响

Table 3.12 The effect of NADH on the gluconic acid consumption by ZM4 (pHW20a-gfo)

| | 起始葡萄糖酸 (g/L) | 剩余葡萄糖酸 (g/L) | 生成乙偶姻 (g/L) | 生成乙醇 (g/L) |
|---------|--------------|--------------|-------------|------------|
| 不加 NADH | 5.49 | 0.18 | 0.36 | 0.81 |
| 加入 NADH | 5.48 | 0.02 | 0.01 | 0.94 |

对于 *Zymomonas mobilis* 中生成乙偶姻代谢路径主要有三种。第一种为 Entner-Doudoroff 代谢路径中生成的丙酮酸在丙酮酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻^[58]；第二种为 Entner-Doudoroff 代谢路径中生成的乙醛在丙酮酸脱羧酶的作用下也可生成乙偶姻^[59]；第三种为 Entner-Doudoroff 代谢路径中生成的丙酮酸在丙酮酸脱氢酶和乙酰乳酸合成酶的作用下生成乙酰乳酸，乙酰乳酸在乙酰乳酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻^[60]。其中第一和第二种路径可以被认为是一种代谢路径，即通过丙酮酸脱羧酶生成乙偶姻。为验证乙偶姻是否通过第三种代谢路径生成，进行了如下实验，即在运动发酵单胞菌代谢

葡萄糖酸的过程中,每隔一段时间取样,取样后立刻与-80°C 甲醇 1:1 混合,8000 g,-10°C,离心 5 min;取上清通过气质联用高效色谱分析是否含有乙酰乳酸的存在,以分析乙偶姻是否通过第三条代谢路径生成。气质联用高效色谱分析结果见图 3.11。进过分析后,没有发现含有乙酰基的特征峰出现,这在一定程度上降低了通过第三种代谢路径生成乙偶姻的可能性;但彻底排除该路径还需进一步的研究。

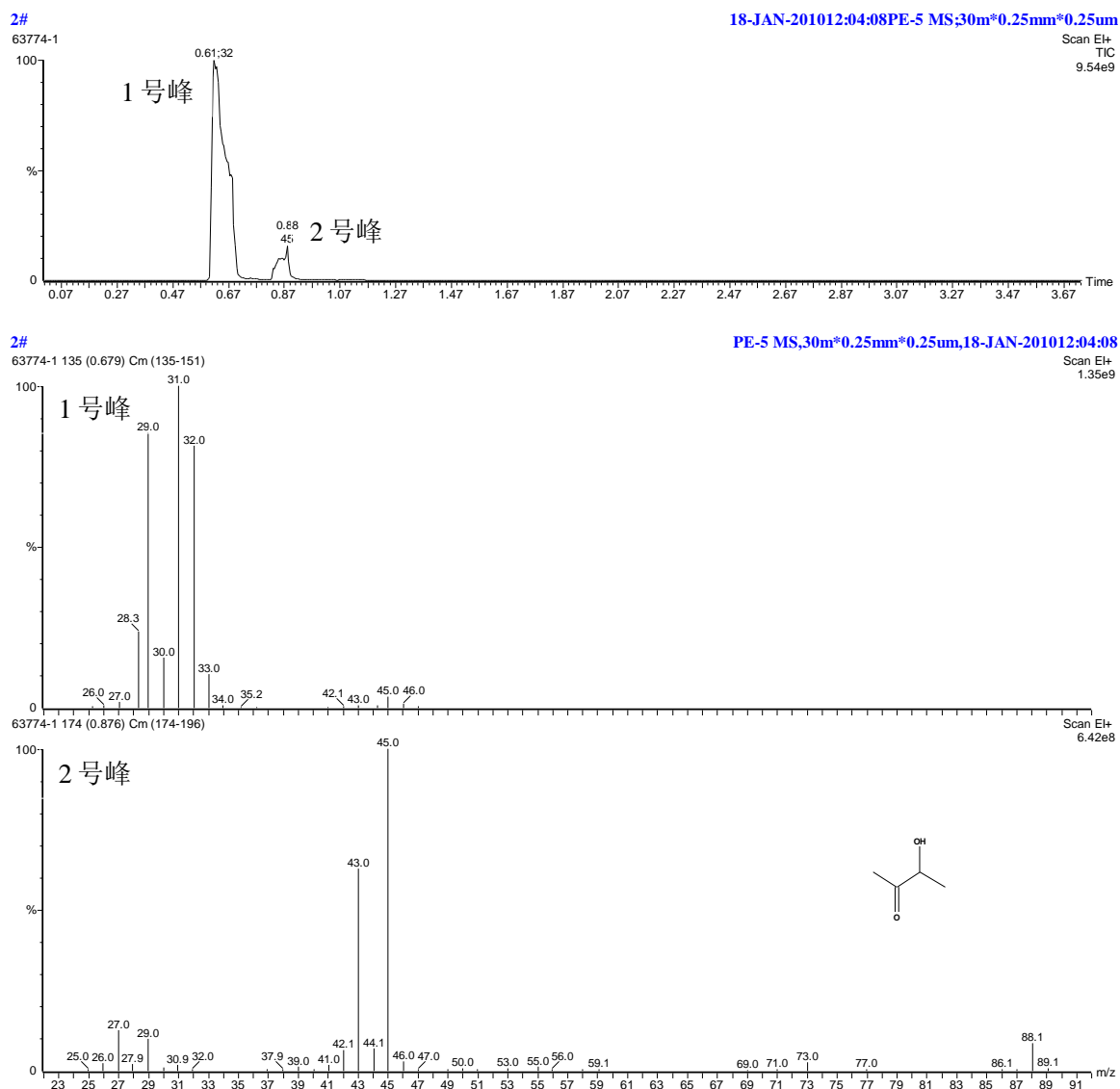


图 3.11 乙偶姻代谢路径高效气质联用色谱分析结果

Fig. 3.11 The analyse result of metabolic pathway of acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry

3.4.4 乙偶姻产量提高实验

为提高代谢葡萄糖酸过程中乙偶姻的生成量,本课题研究过程中对催化反应条件进行了优化;并考查了亚铁离子和钙离子对乙偶姻的生成是否有影响。

对于催化反应条件主要研究了不同 pH 值对 ZM4(pHW20a-gfo)细胞代谢葡萄糖酸生成乙偶姻的影响。实验结果见表 3.13。在 pH 为 5.0-6.5 范围内, ZM4(pHW20a-gfo)能够

代谢葡萄糖酸生成乙偶姻，且 pH 对乙偶姻生成几乎没有影响。当反应体系中 pH 高于 7.0 时，ZM4(pHW20a-gfo)不代谢葡萄糖酸；这可能由于在这一 pH 下 ZM4(pHW20a-gfo)细胞中大部分酶已经失活。

表 3.13 不同 pH 对 ZM4(pHW20a-gfo)细胞生成乙偶姻的影响

Table 3.13 The effect of different pH value on the production of acetoin by ZM4(pHW20a-gfo)

| pH | 5.0 | 6.0 | 6.5 | 7.0 |
|---------------|-------|-------|-------|-----|
| 葡萄糖酸消耗量 (g/L) | 108.5 | 107.7 | 110.8 | 0 |
| 乙偶姻产率 (g/g) | 0.14 | 0.12 | 0.13 | 0 |

表 3.14 FeSO₄·7H₂O 对 ZM4(pHW20a-gfo)细胞生成乙偶姻的影响

Table 3.14 The effect of FeSO₄·7H₂O on the production of acetoin by ZM4(pHW20a-gfo)

| FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L) | 0 | 5 | 10 | 20 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| 葡萄糖酸消耗量 (g/L) | 107.7 | 108.9 | 101.6 | 101.5 |
| 乙偶姻产率 (g/g) | 0.12 | 0.11 | 0.13 | 0.13 |

在考察金属离子对 ZM4(pHW20a-gfo)细胞代谢葡萄糖酸生成乙偶姻的影响时，分别考察了亚铁离子和钙离子，实验结果分别见表 3.14 和表 3.15。实验研究结果表明，亚铁离子和钙离子对乙偶姻的产量没有促进作用。对于提高乙偶姻的生成量，有待于进一步的研究。

表 3.15 CaCl₂ 对 ZM4(pHW20a-gfo)细胞生成乙偶姻的影响

Table 3.15 The effect of CaCl₂ on the production of acetoin by ZM4(pHW20a-gfo)

| CaCl ₂ (g/L) | 0 | 5 | 50 |
|-------------------------|-------|-------|----|
| 葡萄糖酸消耗量 (g/L) | 107.7 | 102.2 | 0 |
| 乙偶姻产率 (g/g) | 0.12 | 0.14 | 0 |

3.4.5 旋转蒸发分离山梨醇和乙醇、乙偶姻

据已有的研究报道，对于山梨醇的分离纯化，主要通过有机溶剂提取，这一过程投入成本高，有机溶剂回收困难，且由于山梨醇的市场价格决定这一方法无法应用。由于乙醇的沸点为 78.4 °C，乙偶姻的沸点为 148 °C，山梨醇的沸点为 296 °C；它们之间相差较大，因此可以考虑用旋转蒸发的方式进行分离。

经过催化代谢完葡萄糖酸的山梨醇、乙偶姻和乙醇混合液通过旋转蒸发进行分离，所选的旋转蒸发温度分别为 70 °C、75 °C、80 °C、85 °C 和 90 °C。蒸发过程中真空度为 0.08 Mpa，旋转蒸发时间在 4-15 min 范围内。蒸发完后用与蒸发前体积相等的超纯水溶解山梨醇来分析其中的量；蒸发后的流出液收集后分析其中的组分。

表 3.16 中给出了蒸发前后山梨醇、乙偶姻和乙醇含量的变化。实验结果表明旋转蒸

发能够有效的分离出山梨醇和乙偶姻、乙醇。经过旋转蒸发后山梨醇的收率仅有 87% 左右；这是由于旋转蒸发前体积为 4 mL，旋转蒸发后用了 4 mL 的超纯水进行了悬浮，这一过程无法准确定容，导致山梨醇有所稀释。

表 3.16 旋转蒸发分离纯化山梨醇

Table 3.16 Purification sorbitol by rotary evaporator

| 旋转蒸发温度 (°C) | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 蒸发前山梨醇 (g/L) | 81.61 | 81.61 | 81.61 | 81.61 | 81.61 |
| 蒸发前乙偶姻 (g/L) | 10.01 | 10.01 | 10.01 | 10.01 | 10.01 |
| 蒸发前乙醇 (g/L) | 10.32 | 10.32 | 10.32 | 10.32 | 10.32 |
| 蒸发后山梨醇 (g/L) | 71.83 | 71.64 | 71.12 | 71.06 | 69.10 |
| 蒸发后乙偶姻 (g/L) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 蒸发后乙醇 (g/L) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

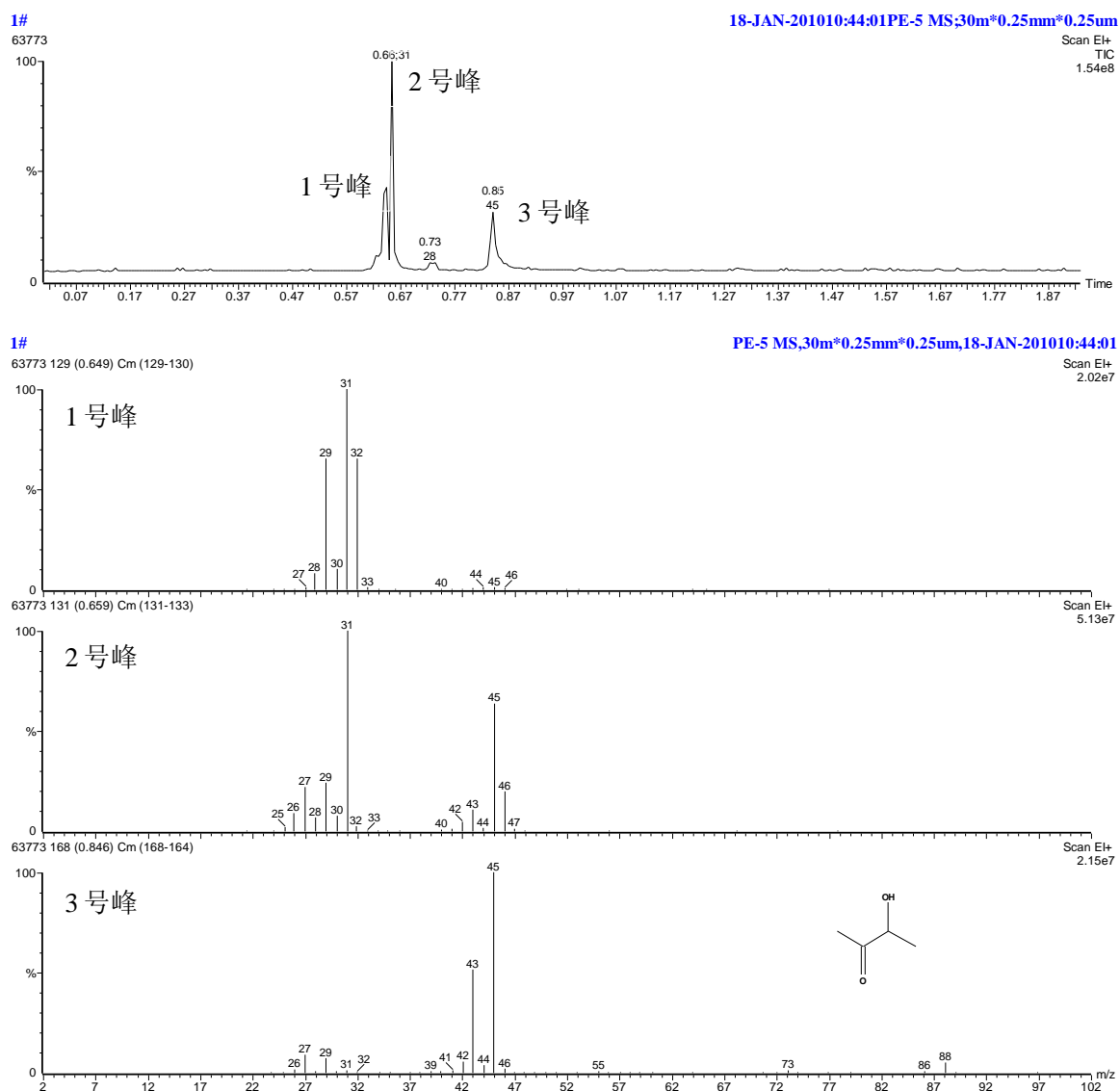


图 3.12 旋转蒸发流出液高效气质联用色谱分析结果

Fig. 3.12 The analyse result of outflow liquid from rotary evaporator by gas chromatography-mass spectrometry

通过高效气质联用色谱分析蒸发过程中的流出液组分，结果见图 3.12。其中主要组分为乙偶姻(图 3.12 中 3 号峰)和乙醇(图 3.12 中 2 号峰)，此外还含有微量的甲醇(图 3.12 中 1 号峰)。旋转蒸发后未经任何稀释的流出液中，乙偶姻、乙醇和甲醇含量大约分别为 2.06-7.33 g/L、5.23-9.02 g/L 和 0.23-0.98 g/L。微量甲醇可能是由代谢葡萄糖酸过程中生成；也有可能由山梨醇、乙偶姻或是乙醇在旋转蒸发过程中裂解生成。对于微量甲醇具体是由何种物质生成有待于进一步的研究。

对于旋转蒸发过程中的数据处理方法有待于进一步的优化。此外蒸发过程中乙醇和乙偶姻的分离；以及山梨醇溶液中的脱盐需要进一步的研究。

第四章 结论与展望

4.1 *Z. mobilis* 培养条件优化

由于 GFOR 存在于细胞周质中, 为组成型酶, 酶的表达主要与菌体生长相关, 而与其它因素如诱导条件等关联较小; 细胞产率较高时, 相应的 GFOR 产率相对较高。本课题研究过程中首先对 *Z. mobilis* 培养条件进行了优化, 主要集中在培养基组分和溶氧两个方面, 期望菌体生长较好达到提高 GFOR 酶活力单位, 降低培养过程成本的目的。

通过对 *Z. mobilis* 细胞培养基组成研究发现, Mg^{2+} 是必须组分, 如果培养基中缺乏 Mg^{2+} , 细胞无法达到较高的生长密度(表 3.1)。从培养基组成优化实验结果来看, 目前所用培养基: 100 g/L Glucose, 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L yeast extract, 有利于 GFOR 高表达。

本课题研究了不同通气速率对 *Z. mobilis* ZM4 和 ZM6 细胞生长的影响。目的是为了选择一个培养过程动力消耗少的菌株, 节省工业化生产过程中的成本。通过研究发现, 与 *Z. mobilis* ZM6 相比, ZM4 在厌氧条件下生长较好; 培养过程中无需无菌空气和使空气分布均匀的传动装置, 降低生产过程成本。

4.2 *Z. mobilis* 基因工程菌培养条件优化

本课题研究的重点主要集中在提高利用运动发酵单胞菌转化葡萄糖和果糖为山梨醇和葡萄糖酸的效率, 同时减少乙醇的生成。与乙醇相比山梨醇和葡萄糖酸的具有更多的附加值。因此通过构建基因工程菌来过表达 GFOR 具有十分重要的意义。

通过结合转化法成功构建了基因工程菌 ZM4 (pHW20a-*gfo*)和 ZM6 (pHW20a-*gfo*)。与野生菌相比基因工程菌中 GFOR 酶活提高了 2 倍多(表 3.6)。

本课题研究过程中, 首先衡量了不同通气速率对 ZM4 (pHW20a-*gfo*)和 ZM6 (pHW20a-*gfo*)生长和 GFOR 酶活的影响。研究发现 ZM4 (pHW20a-*gfo*)和 ZM6 (pHW20a-*gfo*)在 GFOR 酶活方面相差不大, 相比之下 ZM4 (pHW20a-*gfo*)更具有工业化应用的优势。这是由于 ZM4 (pHW20a-*gfo*)在厌氧条件下生长较好, 培养过程无需无菌空气以及使空气分布均匀所需的动力, 过程更加节能。并且培养过程中产生大量的二氧化碳, 能够保证培养过程严格厌氧。因此本课题下面将 ZM4 (pHW20a-*gfo*)作为研究重点。

为提高 GFOR 的表达量, 本课题对培养过程中的主要培养条件, 葡萄糖浓度和 pH 进行了研究。研究发现 ZM4 (pHW20a-*gfo*)中酶活随着培养基中起始糖浓度的增加而不断增加, 这与 Zachariou 和 Scopes^[27]的研究报道相符合。综合考虑本课题选择 100 g/L 葡萄糖用于发酵研究, GFOR 酶活产量较高。

Z. mobilis 是从偏酸性的环境中分离出来的, pH 对菌体生长具有较大影响, 本课题

对 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 的生长 pH 进行研究发现有利于 GFOR 的表达的最适 pH 在 5.5-6.0 范围内。

基于以上研究, ZM4 (pHW20a-*gfo*) 培养过程中主要参数的典型或最大值为: 细胞产率, $Y_{X/S}=0.054$ g/g; 最大比生长速率, $\mu_m = 0.35$ h⁻¹; 单位体积 GFOR 比活, $C_E = 3.17 \pm 0.01$ U/ml; 单位蛋白 GFOR 比活, $A_E = 4.48 \pm 0.15$ U/mg; 单位细胞 GFOR 比活, $A_{E/X} = 1.03 \pm 0.00$ U/mg; 单位葡萄糖 GFOR 产率, $Y_{E/S} = 29.6 \pm 0.66$ U/g。

4.3 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞催化产山梨醇

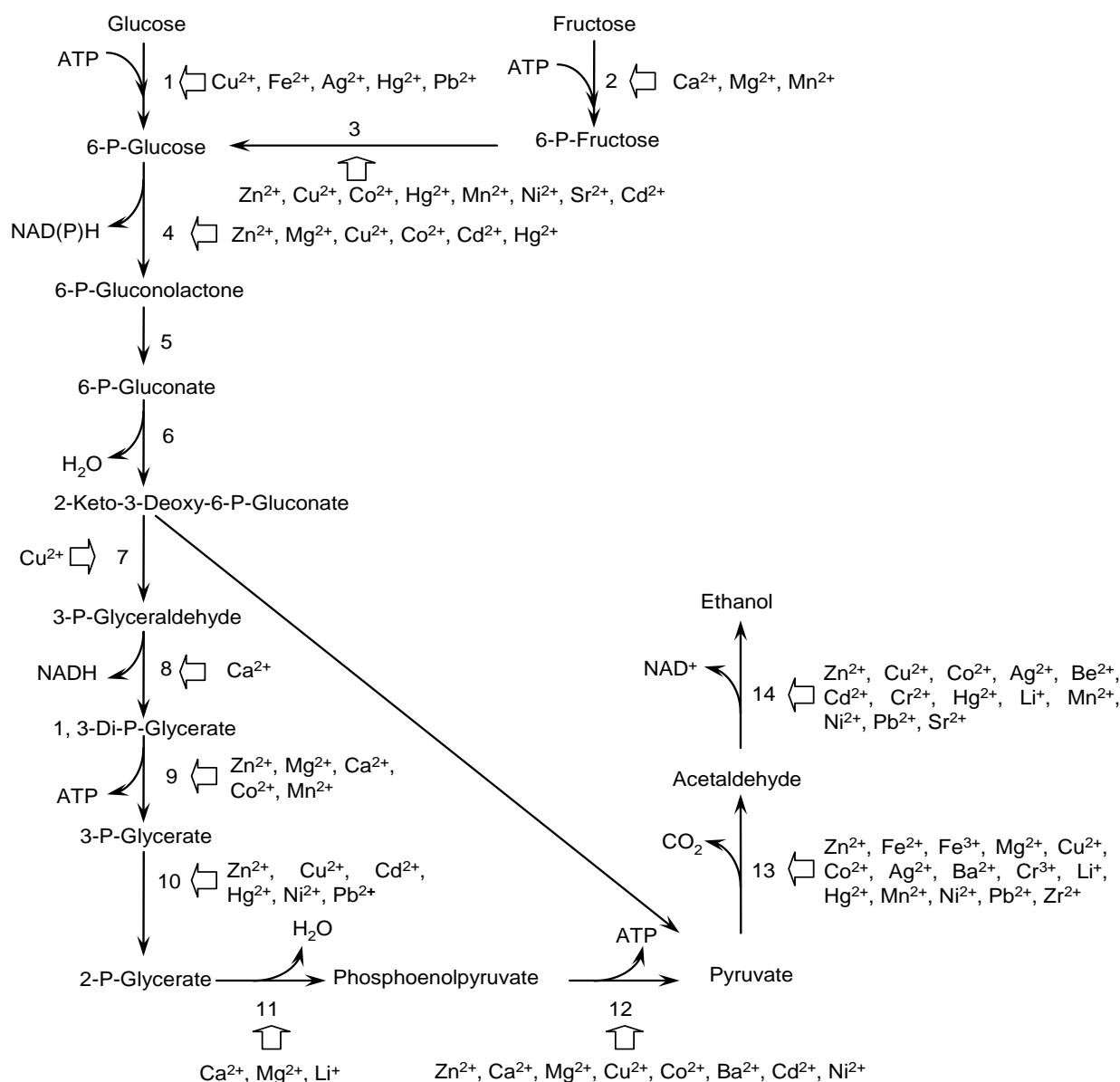
当利用 ZM4(pHW20a-*gfo*) 细胞转化葡萄糖和果糖为山梨醇和葡萄糖酸时, 细胞必须经过渗透处理, 敲断或抑制 Entner-Doudoroff 代谢路径中与乙醇生成相关的酶。否则大部分的葡萄糖和果糖将被转化为乙醇而非山梨醇。目前细胞渗透处理方法, 如用甲苯或 CTAB 处理, ZM4(pHW20a-*gfo*) 细胞干燥或是高渗透压下进行催化, 主要是破坏细胞壁, 使细胞壁更具渗透性; 使得细胞内的一些与乙醇生成相关的组分能够渗透到细胞外^[41]。而 GFOR 在这一处理过程中仍然保持较高的活性^[40]。但这一处理过程将导致很多问题, 如甲苯和 CTAB 等有害溶剂和破碎细胞组分难以除去, 细胞中渗透出的蛋白增加反应液下游分离困难, 并且处理过程需要消耗大量能量。

在 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞生物催化产山梨醇过程中, 本课题首先研究了一种改进的细胞反复冻溶的处理方法。研究发现经过一次冻溶后, ZM4(pHW20a-*gfo*) 中山梨醇的产率为 97.5%; 经过两次反复冻溶后, ZM4(pHW20a-*gfo*) 山梨醇的产率达到 100%, 没有乙醇生成。这一方法与以往研究方法相比较为简单, 先前研究过程中山梨醇反复冻溶时需要加入缓冲液, 并且处理过程复杂^[41]; 本课题研究中所采用的方法极其简单降低了生产过程能耗和成本。

本论文建立了一种新的提高山梨醇产率的方法, 即利用二价金属离子抑制 Entner-Doudoroff 代谢路径中与乙醇生成相关的酶。利用 Brenda Enzyme Database^[61], 我们详细研究了 Entner-Doudoroff 代谢路径中相关酶的金属离子抑制剂, 见图 4.1。这些金属离子包括 Zn²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、Ba²⁺、Ag²⁺、Be²⁺、Cd²⁺、Cr²⁺、Hg²⁺、Li⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺、Zr²⁺和 Sr²⁺; 另一方面, 这些金属离子均不能抑制 GFOR 的活性。表 3.9、3.10 和 3.11 显示了部分金属离子对生物催化产山梨醇和葡萄糖酸的影响。这一结果表明在生物催化反应过程中加入一定量的金属离子抑制乙醇生成, 提高山梨醇产量; 这一方法经济有效可行。这一新方法有效避免了以往研究方法所带来的问题, 如有毒溶剂和细胞碎片的除去, 避免细胞内的蛋白渗透以及处理过程的能耗等。

在已研究的金属离子中, 在抑制乙醇生成, 提高山梨醇产量方面, Zn²⁺最为有效, 即使在较低的浓度下(0.023 g/L Zn²⁺)。Ca²⁺能够和葡萄糖酸形成葡萄糖酸钙沉淀, 这样起到原位分离葡萄糖酸和山梨醇的作用。Ca²⁺的加入量可依据生成的葡萄糖酸的量而定, 葡萄糖酸形成沉淀后, 降低了反应体系中葡萄糖酸的量; 促使反应向正方向进行, 加快了 GFOR 形成葡萄糖酸和山梨醇的反应速率。因此用钙离子沉淀葡萄糖酸的方法与

生产山梨醇和葡萄糖酸的反应相结合，与先前相比山梨醇和葡萄糖酸的产率得到大大提高。当反应液中加入 50 g/L 的 CaCl_2 时，能够形成 0.45 mol/L 的葡萄糖酸钙，而在反应条件下即 40°C ，pH 5-6 时，葡萄糖酸钙浓度达到 0.29 mol/L 时就能够形成沉淀^[62]。对于通过葡萄糖钙原位分离葡萄糖酸这一方法需要进一步研究。此外加入 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 能够形成葡萄糖酸锌和葡萄糖酸钙，均为有用产物，不会增加下游的分离负担。



注：编号对应的酶为：1. 葡萄糖激酶；2. 果糖激酶；3. 6-磷酸葡萄糖异构酶；4. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶；5. 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶；6. 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶；7. 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖醛缩酶；8. 磷酸甘油醛脱氢酶；9. 磷酸甘油酸激酶；10. 磷酸甘油酸变位酶；11. 烯醇酶；12. 丙酮酸激酶；13. 丙酮酸脱羧酶；14. 乙醇脱氢酶。

图 4.1 Entner-Doudoroff 代谢路径中酶的金属离子抑制剂。

Fig. 4.1 Inhibition of enzymes in Entner-Doudoroff pathway by metal ions. The enzyme code numbers are: 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; and 14. Alcohol dehydrogenase.

4.4 山梨醇的分离纯化

葡萄糖酸为电解质，将其分离出来成本相对较高。而葡萄糖酸在运动发酵单胞菌中葡萄糖酸激酶的作用下，消耗 ATP 将葡萄糖酸转化为 6-磷酸葡萄糖酸；后者进入 Entner-Doudoroff 途径进一步被代谢生成乙醇。因此考虑利用运动发酵单胞菌将葡萄糖酸转化为乙醇；最终分离乙醇和山梨醇，相对较为容易。经过研究发现，先利用葡萄糖培养 ZM4 (pHW20a-*gfo*)，培养后收集 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞，先用于催化代谢葡萄糖；代谢完后离心收集细胞用于催化产山梨醇。这一实验思路切实可行。

ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞经过 30 h 的生物催化过程，能够将 100 g/L 葡萄糖酸完全催化代谢。代谢过程中产生了乙醇和乙偶姻。但这一过程中由于基因工程菌细胞壁上山梨醇脱氢酶的存在，山梨醇的量有少量的降低；在代谢葡萄糖酸的同时如何减少山梨醇的损失有待进一步研究。

将代谢完葡萄糖酸后的反应液进行 10 000 g, 5min 离心，分离细胞和上清液；其中上清液用于进一步的分离纯化山梨醇，细胞用于催化产山梨醇。经过代谢葡萄糖酸后的 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞，GFOR 酶活不受影响；并且在催化过程中没有乙醇生成，山梨醇的产率达到 100%。这一过程无需对 ZM4 (pHW20a-*gfo*) 细胞进行任何处理或是向反应液中加入金属离子，大大简化了催化过程，减轻了下流分离过程的负担，使得山梨醇的工业化生产更具可行性。

本课题在研究代谢葡萄糖酸过程中发现代谢葡萄糖酸时生成乙醇和乙偶姻两种物质，并且生成的乙偶姻量较大。随后对乙偶姻形成的原因和代谢路径进行了分析，发现形成乙偶姻的主要原因是 ZM4(pHW20a-*gfo*) 在代谢葡萄糖酸的过程中缺乏还原力；并且由于缺乏还原力导致葡萄糖酸代谢速度慢。

本课题对乙偶姻生成的代谢路径进行了一定的研究，研究结果显示乙偶姻可能是由于丙酮酸在丙酮酸脱羧酶的作用下生成。对于丙酮酸在丙酮酸脱氢酶和乙酰乳酸合成酶的作用下生成乙酰乳酸，乙酰乳酸在乙酰乳酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻，这一代谢路径从目前的实验结果仍无法排除，有待进一步的研究。

经过催化代谢完葡萄糖酸的山梨醇、乙偶姻和乙醇混合液通过旋转蒸发能够有效的分离出山梨醇和乙偶姻、乙醇。对于旋转蒸发过程中乙醇和乙偶姻的分离；以及山梨醇溶液中的脱盐需要进一步的研究。

综上所述，本课题对生物路线生产山梨醇关键技术瓶颈的研究，包括菌株的选择，

GFOR 酶活的提高、山梨醇产量的提高和山梨醇分离纯化方面等，为工业化生产山梨醇提供了重要的依据。

参考文献

- [1] Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E. and Kinneary, J. F., eds. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 12th ed., Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, 1996, pp. 1490, 1491.
- [2] Wrolstad, R. E. and Shallenberger, R. S. Free sugars and sorbitol in fruits-a compilation from the literature. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1981, 64: 91-103.
- [3] Albert, R., Strätz, A. and Vollheim, G. Die katalytische Herstellung von Zuckeralkoholen und deren Verwendung. *Chem. Eng. Technol.* 1980, 52: 582-587.
- [4] Vogel, R. Sorbitol In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2003, 34: 492-498.
- [5] National Renewable Energy Laboratory (NREL), Pacific Northwest National Laboratory (PNNL). Top value added chemicals from biomass Volume I: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Golden, CO 80401, 2004, USA.
- [6] Wood, A and Scott, A. Bioprocessing: reaping the benefits of renewable resources. *Chemical Week*. 2004, 166 (5): 15-17.
- [7] Giacometti, J., Milin, C., Wolf, N. and Giacometti F. Process for preparing nonionic surfactant sorbitan fatty acid esters with and without previous sorbitol cyclization. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44: 3950-3954.
- [8] Haidegger, E. The importance of hydrogenation in the processing of carbohydrates. *Starch*. 1977, 29: 430-435.
- [9] Phillips, M. A. Catalytic hydrogenation of glucose to sorbitol using a highly active catalyst. *Br. Chem. Eng.* 1963, 8: 767-769.
- [10] Silveira, M.M. and Jonas, R. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 118: 321-336.
- [11] Ferraz, H.C., Alves, T.L.M. and Borges, C.P. Coupling of an electrodialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells. *J. Membrane. Sci.* 2001 191:43-51.
- [12] Kusserow, B., Schimpf, S. and Claus, P. Hydrogenation of glucose to sorbitol over nickel and ruthenium catalysts. *Adv. Synthesis Catalysis*. 2003, 345:289-299.
- [13] Hustede, H., Haberstroh, H.J. and Schinzig, E. Gluconic Acid. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim 1989, 12: 449-456.
- [14] Milsom, P. and Meers, J. Gluconic and itaconic acids: In *comprehensive biotechnology*. Pergamon Press. 1985, 3: 681-700.

- [15] Swings, J. and De Ley, J. The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 1977, 41: 1-46.
- [16] Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L. and Tribe, D. E. Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1982, 23: 37-84.
- [17] McGill, D. J. and Dawes, E. A. Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. Biochem. J. 1971, 125: 1059-1068.
- [18] McGill, D. J., Dawes, E. A. and Ribbons, D. W. Carbohydrate metabolism and growth yield coefficients of *Zymomonas anaerobia*. Biochem. J. 1965, 97: 44, 45.
- [19] Doelle, H. W., Kirk, L., Crittenden, R., and Toh, H. *Zymomonas mobilis*-science and industrial application. Crit. Rev. Biotechnol. 1993, 13: 57-98.
- [20] Ait-Abdelkader, N., De Caro, A., Guzzo, J., Michel, G. P. F. and Baratti, J. C. The intracellular sucrose (SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. Biotechnol. Lett. 2000, 22: 461-467.
- [21] Bekers, M., Linde, R., Danilevich, A., Kaminska, E., Upite, D., Vigants, A. and Scherbaka, R. Sugar beet diffusion juice and syrup as media for ethanol and levan production by *Zymomonas mobilis*. Food Biotechnol. 1999, 13: 107-119.
- [22] Bekers, M., Ventina, E., Lankevics, J., Kaminska, E., Upite, D. and Vigants, A. Levan production by *Zymomonas mobilis* cells attached to plaited spheres. Acta Biotechnol. 1997, 17: 265-275.
- [23] Kannan, T. R., Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P. Influence of intra- and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on ethanol production and by-product formation. Biotechnol. Lett. 1997, 19: 661-664.
- [24] Kannan, T. R., Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. Enzyme Microb. Technol. 1998, 22: 179-184.
- [25] Shihui, Y., Timothy, J., Tschaplinski, Nancy, L.E., Sue, L.C., Stanton, L.M., Brian, H.D., Anthony, V.P., Miguel, R.J. and Steven, D.B. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. BMC Genomics. 2009, 34: 1-16.
- [26] Viikari, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20: 118-123.
- [27] Zachariou, M. and Scopes, R.K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol. 1986, 167: 863-869.
- [28] Loos, H., Voller, M., Rehr, B., Stierhof, Y.D., Sahm, H. and Sprenger, G.A. Localization of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 1991, 84: 211-216.

- [29] Kingston, R. L., Scopes, R.K. and Beker, E.N. The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective enzyme containing non-dissociable NAD. *Structure*. 1996, 4:1413-1428.
- [30] Leigh, D., Scopes, R. K. and Rogers, P. L. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 20: 413-415.
- [31] Hardman, M. J. and Scopes, R. K. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* 1988, 173: 203-209.
- [32] Loos, H., Krämer, R., Sahm, H. and Sprenger, G. A. 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.
- [33] Kanagasundaram, V. and Scopes, R.K. Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 1992, 174: 1439-1447.
- [34] Wiegert, T., Sahm, H. and Sprenger, G.A. Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 1996, 166: 32-41.
- [35] Sprenger, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 145: 301-307.
- [36] Gollhofer, D., Nidetzky, B., Fuerlinger, M. and Klaus D.K. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, 17: 235-240.
- [37] Chun, U.H. and Rogers, P.L. 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.
- [38] Scopes, R. K., Rogers, P. L. and Leigh, D. A. 1988, US patent 4,755,467.
- [39] Ichikawa, Y., Kitamoto, Y., Kato, N. and Mori, N.. Preparation of gluconic acid and sorbitol. 1989, European patent application. EP322, 723.
- [40] Rehr, B., Wilhelm, C. and Sahm, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 35: 144-148.
- [41] Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose. 1991, U.S. patent. 5,017,485.
- [42] Jang, K. H., Park, C. and Chun, U. H. Improvement of oxidoreductase stability of cetyltrimethyl-ammonium bromide permeabilized cells of *Zymomonas mobilis* through glutaraldehyde crosslinking. *Biotechnol. Lett.* 1992, 14: 311-316.

- [43] Jang, K. H., Jung, S. J., Chang, H. S. and Chun, U. H. Improvement of the process for sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilised in κ -carrageenan. *Process Biochem.* 1996, 31: 485-492.
- [44] Ro, H. and Kim, H. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 1991, 13: 920-924.
- [45] Kim, D. M. and Kim, H. S. 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.
- [46] Silveira, M.M., Wisbeck, E., Lemmel, C., Erzinger, G., Lopes da Costa, J.P., Bertasso, M. and Jonas, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 1999, 75: 99-103.
- [47] Silveira, M. M., Wisbeck, E., Hoch, I. and Jonas, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 55: 442-445.
- [48] Silva-Martinez, M., Haltrich, D., Novalic, S., Kulbe, K. D. and Nidetzky, B. Simultaneous enzymatic synthesis of gluconic acid and sorbitol: continuous process development using glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998, 70-72: 863-868.
- [49] Nidetzky, B., F rlinger, M., Gollhofer, D., Haug, I., Haltrich, D. and Kulbe, K. D. Simultaneous enzymatic synthesis of gluconic acid and sorbitol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1997, 63-65: 173-188.
- [50] Ferraz H.C., Alves T.L.M. and Borges C.P. Coupling of an electro dialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells. *J. Membrane Sci.* 2001, 191: 43-51.
- [51] Tani, Y. and Vongsuvanlert, V. Sorbitol production by a methanol yeast, *Candida Boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. *J. Ferment. Technol.* 1987, 65: 405-411.
- [52] Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. Characterization of D-sorbitol dehydrogenase involved in D-sorbitol production of a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52: 419-426.
- [53] Duvnjak, Z., Turcotte, G. and Duan, Z. D. Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 35: 711-715.
- [54] Duvnjak, Z., Turcotte, G. and Duan, Z. D. Production and consumption of sorbitol and fructose by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*

- 1991, 52: 527-537.
- [55] Hiroyuki, S. and Izumori, K. Reduction of L-sorbose by halotolerant yeast, *Candida famata* 234B. *Seibutsu Kogaku Kaishi*. 1994, 72: 299-304.
- [56] Satory, M., Fuerlinger, M., Haltrich, D., Kulbe, KD., Pittner, F. and Nidetzky, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Lett.* 1997, 19:1205-1208.
- [57] Seo, J.S., Chong, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Jung, C., Kim, J.J., Hong, J.H., Kim, H., Kim, J.H., Kil, J.I., Park, C.J., Oh, H.M., Lee, J.S., Jin, S.J., Um, H.W., Lee, H.J., Oh, S.J., Kim, J.Y., Kang, H.L., Lee, S.Y., Lee, K.J. and Kang, H.S. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23: 63-68.
- [58] Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylases of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces Carlsbergensis*. *Biocatalysis*, 1988, 1: 321-331.
- [59] Yong-Ge, W., Alan, K., Chang, P.F., Nixon, W.L. and Ronald, G.D. Mutagenesis at Asp27 of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*: Effect on its ability to form acetoin and acetolactate. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267: 6493-6500.
- [60] Lopez de Felipe, F.L., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. and Hugenholtz, J. Cofactor engineering: A novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J. Bacteriol.* 1998, 180: 3804-3808.
- [61] Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. and Schomburg, D. BRENDA, AMENDA and BRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37: D588-D592.
- [62] Bao, J., Koumatsu, K., Arimatsu, Y., Furumoto, K., Yoshimoto, M., Fukunaga, K. and Nakao, K. 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.

攻读硕士期间发表的文章

1. 鲍杰, 刘长俊, 董宏伟. 一种以金属离子对细胞进行预处理的山梨醇生产方法. 专利, 专利号: 200910056636.7.
2. 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. 专利, 专利号: 200910056639.0.
3. 鲍杰, 胡凤仙, 刘长俊. 一种生产山梨醇和葡萄糖酸盐的方法. 专利, 专利号: 200910199317.1.

致谢

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

鲍杰教授，胡凤仙，辛秀娟老师在实验中给了我精心的指导，在此表示衷心的感谢！

同时，实验过程中得到博士生董宏伟和楚德强在实验操作方面的细心指导，两位师兄勤奋、认真、细致，执着的科研作风给我留下了深刻的印象，受益匪浅，表示由衷的感谢！