

分类号: _____ 密级: _____

UDC: _____

华

东 理 工 大 学

学 位 论 文

基于纤维素酶分泌表达型乙醇发酵 *E. coli* 工程菌的构建

张瑶

指导教师姓名: _____ 鲍杰教授、华东理工大学

申请学位级别: _____ 硕士 _____ 专业名称: _____ 生物化工 _____

论文定稿日期: _____ 论文答辩日期: _____

学位授予单位: _____ 华东理工大学 _____

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: (姓名、职称)

评 阅 人: (姓名、职称)

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

β-葡萄糖苷酶分泌表达型乙醇发酵 *E. coli* 工程菌的构建

摘要

由于化石燃料的日益枯竭和环境问题，利用微生物将可再生资源转化为清洁能源越来越受重视，而其中燃料乙醇因其优越的性能，有望成为未来替代石油的能源，而生产纤维素乙醇的经济性是产业化的关键。

本文克隆了来自运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 的丙酮酸脱羧酶基因 *pdh* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB*，并通过 Red 重组将二者整合到大肠杆菌 JM109 基因组中。随后将来源于多粘芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* 1.794 的 β-葡萄糖苷酶基因 *bglB* 在 *E. coli* P81 中进行了分泌超表达，得到重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)。其胞外 β-糖苷酶酶活达到 82.6 mU/g protein，纤维二糖酶活达到了 25.8 mU/g protein。该重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 以纤维二糖为碳源进行乙醇发酵，乙醇得率达到了理论产率 60.9%，而在葡萄糖和纤维二糖的共发酵中，其乙醇产量达到了理论产率 45.4%。本实验获得的此株能够利用纤维素生产乙醇的 CBP 大肠杆菌，为构建能利用木质纤维素分解产物生产燃料乙醇的高效、稳定的生产用工程菌奠定了良好的基础。

关键字： 大肠杆菌，乙醇发酵，β-葡萄糖苷酶，分泌表达，CBP

Construction of CBP ethanologenic *E. coli* cells with secreted β -glucosidase expression

Abstract: Recently, the production of clean energy from renewable resources has gained more attention because of the increasing depletion of fossil fuels and environmental concerns, and the because of the superior performance of fuel ethanol, bioethanol was regarded as the competitive potential alternative energy of oil, and the economical efficiency of cellulosic ethanol is the key to the industrialization.

Here we cloned pyruvate decarboxylase gene *pdh* and alcohol dehydrogenase gene *adhB* from *Zymomonas mobilis* ZM4, then the two genes were integrated into *Escherichia coli* JM109 genome by Red recombination system and named the strain *E. coli* P81. The beta-glucosidase gene *bglB* from *Bacillus polymyxa* 1.794 was secretively expressed in the recombinant strain, and named the strain *E. coli* P81(pUC19-*bglB*). The extracellular glucosidase activity and the extracellular cellobiase activity of the recombinant strain reached 82.6 mU/g protein and 25.8 mU/g protein, respectively. The recombinant strain *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) fermented cellulose to produce ethanol and reached theoretical yield 60.9%, and the co-fermentation of glucose and cellobiose to produce ethanol reached theoretical yield 45.4%. This *E. coli* CBP strain constructed above successfully converted cellobiose to bioethanol, that laid a foundation of constructing a highly efficient and stable CBP strain for converting lignocellulose to fuel ethanol.

Key words: *E. coli*, ethanol fermentation, beta-glucosidase, secretive expression, CBP

目 录

目 录	III
前言	V
第 1 章 文献综述	1
1.1 生物乙醇概述	1
1.1.1 开发生物乙醇的意义	1
1.1.2 生物乙醇的历史和现状	1
1.2 木质纤维素	2
1.2.1 木质纤维素的概述	2
1.2.2 木质纤维素的组成	3
1.3 纤维素酶	4
1.3.1 β -葡萄糖苷酶	5
1.3.2 β -葡萄糖苷酶活力的测定方法	5
1.4 木质纤维质的利用	6
1.4.1 木质纤维素的代谢工艺	6
1.4.2 整合生物加工工艺	7
1.4.3 常见的 CBP 构建菌	7
1.5 常见的乙醇路径	9
1.6 课题研究的意义与内容	12
第 2 章 材料与方法	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 菌株与载体	14
2.1.2 主要试剂	14
2.1.3 实验仪器	15
2.1.4 培养基, 主要溶液的配制	15
2.2 实验及分析方法	17
2.2.1 基因组 DNA 的提取	17
2.2.2 PCR 扩增	17
2.2.3 目的基因的克隆	19
2.2.4 表达系统的构建	21
2.2.5 基因 <i>pdc</i> 和 <i>adhB</i> 活性的定性检测	21
2.2.6 Red 重组	22

2.2.7 SDS-PAGE	24
2.2.8 酶活的测定	24
2.2.9 发酵条件	25
第 3 章 实验结果	26
3.1 基因 <i>pdh-adhB</i> 的克隆	26
3.1.2 乙醛指示平板	27
3.1.3 蛋白质电泳	28
3.2 Red 重组	29
3.2.1 重组相关质粒的构建	29
3.3.2 Red 重组	30
3.4 重组菌 <i>E. coli</i> P81(pUC19- <i>bglB</i>)的构建	31
3.5 重组菌 <i>E. coli</i> P81(pUC19- <i>bglB</i>)的酶活测定	31
3.5.1 乙醛指示平板定性检验	31
3.5.2 重组菌 <i>E. coli</i> P81(pUC19- <i>bglB</i>)的 AdhB 酶活测定	32
3.5.3 胞外酶活测定	32
3.6 纤维二糖为碳源的乙醇发酵	33
3.6.1 以纤维二糖为唯一碳源的发酵	33
3.6.2 重组菌 <i>E. coli</i> P81(pUC19- <i>bglB</i>)发酵纤维二糖生产乙醇	34
3.6.3 纤维二糖的浓度对发酵的影响	36
3.6.4 葡萄糖对纤维二糖代谢的影响	38
第 4 章 讨论与展望	40
参考文献	41
致谢	46

前言

当今社会，由于人口的膨胀和社会的迅猛发展，日益严峻的能源短缺和环境问题是国际社会存在的普遍问题，正在困扰或者威胁着许多国家的发展。而另一方面，木质纤维质具有来源广泛、可再生、成本低的优点，是唯一能够连续生、规模可控、可存储、可运输的全能性能源，但利用率却不高，对环境也造成了一定的污染，因此，利用木质纤维质生产可再生能源的研究和开发成为了热点问题。其中，生物乙醇由于其具有高热值、燃烧充分、改善燃油品质等被液体能源产品所期望的特性而倍受青睐，同时它还具有易降解、方便安全运输、可再生和含硫量低等环境友好的特性，是非常理想的化石燃料的未来替代品。然而，制约生物乙醇工业应用和大规模生产的主要问题是成本问题，而其中的纤维素酶的成本占据了很大部分，有时可达成成本的二分之一。

为了增加单位产值，降低成本，减少来自添加纤维素酶的成本，人们探索将纤维素酶的生产、纤维素的水解和水解产物发酵整合于一步，即通过乙醇发酵 CBP 工艺来处理木质纤维质，而具备这三个功能的发酵菌种被称之为整合生物加工菌种。大肠杆菌遗传背景清楚，繁殖快，基因操作成熟，所以选用大肠杆菌为构建乙醇发酵 CBP 菌株的出发菌株，通过将能够分泌超表达纤维素酶基因转入所选菌种，将纤维素酶分泌表达达到体系中，完成 CBP 工艺。

本课题首先在大肠杆菌中构建了高效产乙醇路径。通过 Red 重组，将运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 的丙酮酸脱羧酶基因 *pdh* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB* 整合到大肠杆菌 JM109 基因组，命名为 *E. coli* P81。之后又在前一步构建所得的重组菌内，引入 β -葡萄糖苷酶基因，使其可以代谢纤维二糖。克隆了对纤维二糖底物具有较高专一性的多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 到 *E. coli* P81，构建了一株能够分泌 β -葡萄糖苷酶到胞外的重组菌，实现了纤维二糖为碳源进行乙醇发酵的整合生物加工。为今后得到实用的纤维素酶分泌表达型的乙醇发酵 CBP 工程菌提供了研究基础。

第 1 章 文献综述

1.1 生物乙醇概述

1.1.1 开发生物乙醇的意义

随着当今世界人口的迅速不断扩张和产业的繁荣增长，全球对各种自然资源的需求不断增长，主要的能源需求仍然是传统的化石燃料，如石油，煤和天然气^[1]。专家预计全球可供开采的石油储备会在未来的 50 年内枯竭，天然气还可用 75 年，而煤碳可供使用 200-300 年，人类正面临着严峻的能源危机^[2]。同时，化石燃料的使用大幅增加了温室气体和工厂废弃物的排放，导致了生态环境不断恶化。另一方面，石油燃料在全球分布不均匀，例如中东占有全世界石油储量的 63%，是主要的石油供应方，受到经济、地理、地缘政治和环境保护等诸多因素的影响，对国家经济的健康发展和能源安全带来巨大的威胁。所以全世界厉行能源节约和加强常规能源升级、开发的同时，改变当前的能源消费结构，发展清洁的可再生能源，保障国家石油安全，保护赖以生存的自然环境，向能源多元化和可再生清洁能源时代过渡，已经是迫在眉睫。

涉及各类替代燃料，从生物可在生原料中生产适合运输的液体生物燃料有着其特定的优势。首先，生物燃料可以兼容目前交通基础设施。其次，生物燃料来自可再生生物量，并且在世界范围内广泛分布，并相对化石燃料和核燃料分布更均匀。再次，发展生物质能源产业，可以促进农村经济的发展，延伸生产链条，拓宽生产领域，增加农民收入，改善农村的环境状况。最后，随着技术的发展，生物燃料的生产成本在稳步下降。凭借这些优势，生物燃料正在成为一项很有前景的方法^[3]。

其中，燃料乙醇是最常用的生物燃料，一直被认为是一种合适的化石燃料替代能源^[4]，它不单是一种性能优良的燃料，而且可作为混合燃料的添加剂，是很好的燃油品质改善剂。由于生物乙醇是含氧化合物（35%的氧含量），可以被用于与汽油、柴油混合，作为混合燃料提升其氧含量，因而能够更好地氧化的烃类，并减少温室气体的量排放到大气中^[5]，同时它能够有效的减少柴油发动机中的颗粒排放。乙醇掺入汽油后，使抗暴性能变好，这样可以提高发动机的压缩比，从而提高热效率，改善汽车的经济性，且相比普通汽油更安全。当使用10%燃料乙醇的乙醇汽油，可使汽车尾气中一氧化碳、碳氢化合物分别减少30.8%和13.4%，二氧化碳的排放量下降3.9%，含硫气体的排放也减少，降低对环境的污染、减少温室气体的排放。用于轻型车辆最常见的掺混方式就是E85，即包含85%的生物乙醇和15%的汽油^[6]。

1.1.2 生物乙醇的历史和现状

利用微生物发酵生物质原料生产的燃料乙醇作为一种清洁的可再生能源，已经引起

了人们的高度重视，其中美国和巴西在发展燃料乙醇工业方面走在了世界的前列。巴西政府自1975年推行“乙醇汽油计划”，燃料乙醇产业发展良好，以廉价的甘蔗为主要原料，且产品结构合理，基本做到了“吃干榨净”，巴西全部使用乙醇汽油作为汽车燃料，是世界上重要的燃料乙醇生产和消费国。20世纪70年代末，美国制定了“乙醇发展计划”，开始大力的推广车用乙醇汽油，美国燃料乙醇的原料95%是玉米，2012年的产量已经超过2亿多吨，是世界上最大的燃料乙醇生产国，并且美国农业部和能源部计划，到2030年生物燃料将替代30%的车用汽油消费需求。燃料乙醇在欧洲史后起之秀，2003后才开始发展策划，并制定了一个远景计划，到2030年欧盟运输燃料的四分之一来自生物燃料^[7-9]。

而我国的燃料乙醇起步较晚，但通过制定了《燃料乙醇及车用乙醇汽油“十一五”发展专项规划》等一系列措施，燃料乙醇产业发展迅速，2007年之前主要利用陈化粮生产燃料乙醇，2007年之后增加薯类和甘蔗作为原料，到2009年，我国燃料乙醇的总产量170万千升，已成为继美国、巴西之后的世界第三大燃料乙醇生产国。到2020年，燃料乙醇的产量将达到一千万吨^[10]。

1.2 木质纤维素

1.2.1 木质纤维素的概述

生物为生物质（biomass，希腊语，意为生物、生命+质量）一词指来源于生物资源的植物、动物和微生物形成的非化石的和生物降解的有机物质^[11]。它是植物和树在生长过程中，太阳能通过光合作用以化学能的形式储存起来，通过直接和间接地燃烧就可以释放出来的一种资源。木质纤维素是地球陆生生态系统中最为丰富的可再生资源，全球每年的产量估计为 1.3×10^{10} Mt，相当于 7×10^9 公吨煤燃烧所释放的能量，能够满足世界上三分之二的能源总需求^[12]，是非常有前景的生物质资源。每年农业来源或其它来源的木质纤维素原料大约在1.8亿吨左右，包括玉米皮、玉米棒、玉米芯、小麦秆、水稻秆、棕榈叶等，均含有不同量的纤维素组份，可以为对环境友好的新材料提供用之不竭的原料^[13]。

但是，这些木质纤维素资源不但没有得到良好的开发利用，而且一些其不当处置还对生态环境造成了污染。每年全世界大约会产生约 3×10^9 t谷类作物废弃物、 5.4×10^8 t种植作物废料、 1.6×10^8 t豆类作物废弃物和 1.4×10^7 t吨油脂类作物废料^[14]。此外，全世界每年产出约 6×10^8 t棕榈油树，但仅仅有十分之一被利用制备棕榈油和棕榈核油，剩下的生物质如棕榈油树的空果、干、叶、核、纤维和制备棕榈油所剩的研磨渣等被当作废弃物扔掉。同时，全世界每年有大量的秸秆等就地焚烧、农产品加工所得的废物被排放到环境中、城市中有机垃圾被丢弃等等。根据国家农业部的数据，我国每年产生的秸秆资源达 6×10^8 t，其中约有一半被消耗于薪柴燃烧，其余均被就地焚烧^[15]，不但使生物质没有得到很好的利用，而且焚烧产生的浓烟和有毒气体对气候和生态等造成严重的污染。目前

利用木质纤维素的利用和转化对解决目前的世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题都具有重要的意义。

1.2.2 木质纤维素的组成

桑切斯等对生物质资源进行分类,将生产燃料乙醇的木质纤维材料分为 6 个组:农作物残余物(甘蔗、甘蔗渣,小麦、大麦、玉米秸秆,稻草,稻壳,甜高粱渣,和纸浆),硬木(白杨和白杨),软木(松树和云杉),纤维素废料(新闻纸,废办公纸和再生纸污泥),草本生物质(苜蓿草,柳枝稷,芦苇,沿海狗牙根和梯牧草),和城市固体废物(MSW) [16-17]。

木质纤维素主要来源于植物细胞壁,其主要构成成分为纤维素(38%-50%)、半纤维素(17%-32%)和木质素(15%-30%)。这三种成分相互紧密结合,结构紧致,其总质量约占植物体总质量的 80% 以上 [18]。

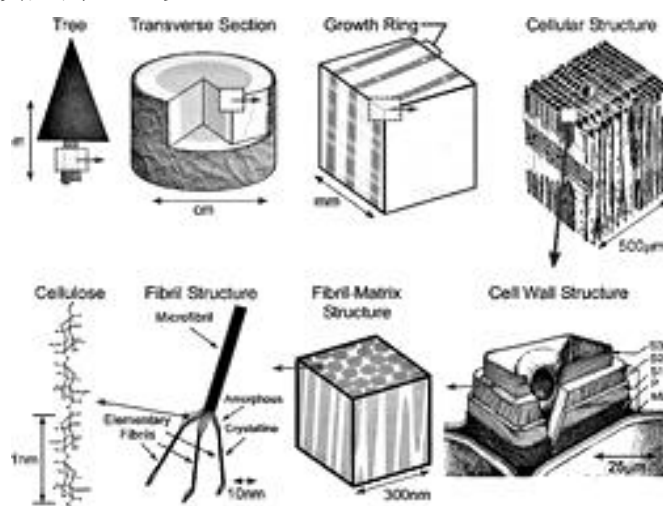


图 1.1 木质纤维素

Fig. 1.1 lignocellulose

纤维素 (cellulose) 是由一种由 1000-10000 个 β -D-吡喃型葡萄糖单元,经 β -(1,4)糖苷键连接而成的同聚多糖,分子量在 50000-400000 之间,不溶于水及一般有机溶剂。纤维二糖是纤维素最小的重复单元,可以被转化为葡萄糖残基,相邻和相近的葡萄糖残基的分子之间和分子内形成了氢键网络。

半纤维素(hemicellulose)是由几种不同类型的单糖构成的异质多聚体,由六碳糖(D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖)和五碳糖(D-阿拉伯糖、D-木糖)、糖酸等组成的异聚多糖。半纤维素硬木中半纤维素主要包含木聚糖,木聚糖在木质组织中占总量的 50%,它结合在纤维素微纤维的表面,相互连接,构成了坚硬的细胞相互连接的网络,而软木中则主要包含葡甘聚糖。

木质素是由四种醇单体(对香豆醇、松柏醇、5-羟基松柏醇、芥子醇)形成的一种复杂酚类聚合物。从化学观点来看,木质素是由高度取代的苯基丙烷单元随机聚合而成的高分子,与纤维素和半纤维素仪器形成植物骨架的主要成分。并具有增强细胞壁及黏

合纤维使细胞相连的作用。由于木质素的组成与性质相对复杂，并具有极强的活性，所以难以被动物所消化，通常在土壤中转化为腐殖质^[19-20]。

果胶物质（pectic substances）也是细胞壁的组成成分，是由半乳糖醛酸组成的多聚体，胞间层基本上是由果胶物质组成，它可以使相邻的细胞粘合在一起。

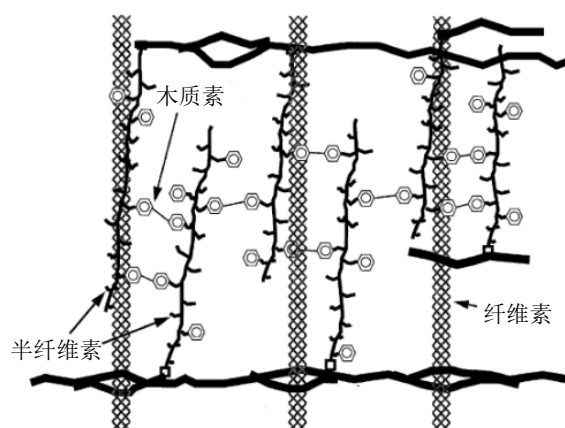


图 1.2 木质纤维素的组成[21]

Fig. 1.2 The composition of the lignocellulosic

[21] Badal C. Saha. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2003) 30: 279-291

1.3 纤维素酶

最密集的生物乙醇生产阶段过程的糖化和发酵步骤。在乙醇的生产过程中，围绕的总成本的 16% 归因于中的酶糖化步骤，而发酵成本计数为 15%。它是已知的成本可以通过实施先进的技术，减少酶的生产，酶水解和发酵过程^[21]。

纤维素链的互动与半纤维素，和木质素屏蔽纤维素/半纤维素束形成的木质素 - 碳水化合物复合体。这种复杂的结构阻碍纤维质解聚成可发酵的糖。因此，必须通过执行预处理步骤前不溶性生物质的酶由纤维素酶水解。通常情况下，纤维素酶有三种不同类型的酶，即内切葡聚糖酶（Endoglucanase, EC 3.2.1.4），外切葡聚糖酶(Exoglucanase, EC3.2.1.91)， β -葡萄糖苷酶（ β -Glucosidase, EC 3.2.1.21）。内切葡聚糖酶的攻击长链的纤维素，并产生更短的纤维寡糖。该外切葡聚糖酶攻击纤维素链的非还原端部，释放纤维二糖，由 β -葡萄糖苷酶进一步作用于纤维寡聚糖和纤维二糖，转化成葡萄糖，^[22-24]产物可见图 1.3。

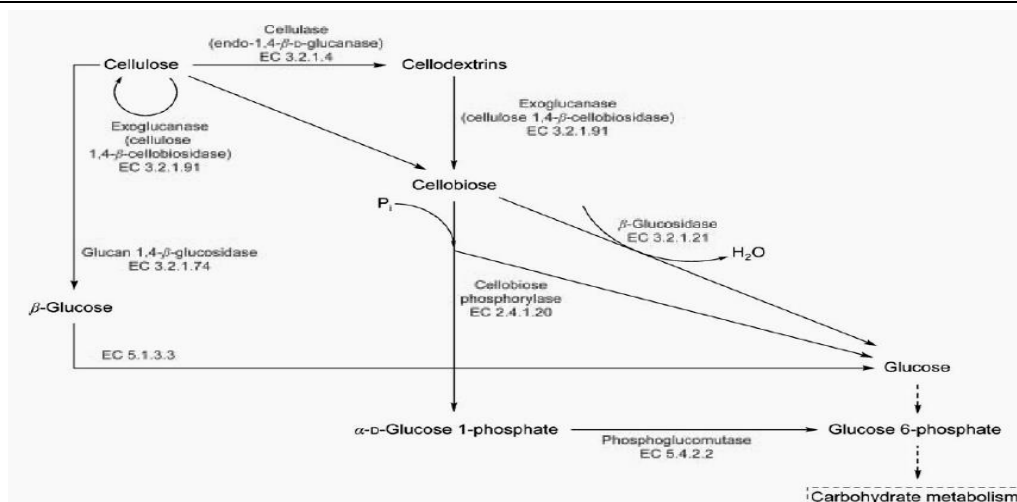


图 1.3 木质纤维质的代谢

Fig. 1.3 Wood fibrous metabolism

1.3.2 β-葡萄糖苷酶

β-葡萄糖苷酶 (β-glucosidase)，它属于纤维素酶类，是一种能够水解芳香基或烃基与糖原子团之间的糖苷键生成葡萄糖的酶。根据其底物的特异性，可以分为三种，1、芳香基的β-葡萄糖苷酶，作用于含芳香基团的葡萄糖苷；2、真正的纤维二糖酶，水解纤维二糖和短链的纤维寡糖生成葡萄糖，是在纤维素酶水解纤维素的过程中关键的一步；3、有广泛底物范围的β-葡萄糖苷酶，多数的β-葡萄糖苷酶属于这一类^[25]。

1837年，Liebig和Wohler首次在苦杏仁中发现此酶^[26]。后来的研究发现，β-葡萄糖苷酶存在于自然界中，它可以来源于动物、植物、微生物，微生物生物类群包括原核生物、真核生物、古细菌三个界，共几十个属，几百个种β-葡萄糖苷酶，如原核微生物来源的有脑膜脓毒性黄杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*)、约氏黄杆菌(*Flavobacterium johnsonae*)、多粘芽孢杆菌等，真核生物来源的有清酒酵母(*Candida peltata*)、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)等^[27]，β-葡萄糖苷酶参与生物体的糖代谢，对维持生物体正常生理功能起着重要作用。但植物来源的β-葡萄糖苷酶活性远比微生物来源要低，所以目前的研究主要集中在微生物上。

不同来源的β-葡萄糖苷酶由于其结构和组成不同而差异很大其相对分子量一般在40-250 kDa之间。β-葡萄糖苷酶的最适温度在30-110 °C之间都有分布，而大部分β-葡萄糖苷酶的最适pH都在酸性范围，并且变化不大，但最适pH可以超过7.0，而且对酸碱有着较强的耐受性^[28]，几乎所有的β-葡萄糖苷酶对底物的糖基部分结构的专一性较差，能裂解C-O键、C-S键、C-N键，C-F键等，但在所有底物中，β-葡萄糖苷酶对纤维二糖的活性最强。

1.3.2 β-葡萄糖苷酶活力的测定方法

目前对于β-葡萄糖苷酶活性测定方法很多，概括起来主要有荧光法、分光光度法等。的测定方法^[29-31]主要有3种：

一是分光光度法, 也称Barush和Swiain 法, 以水杨苷作底物, 将水杨苷裂解为水杨醇和 β -D-葡萄糖, 酶解产物用4-氨基安替比林作显色剂, 使释放出来的水杨醇显色, 再用分光光度法比色测定, 或者对所产生的葡萄糖碘量法加以测定;

二是荧光法, 利用伞形酮(7-羟基香豆素)与4-甲基伞形酮具强烈荧光的特点, 以4-甲基伞形酮的 β -D-葡萄糖苷作为底物, 经 β -葡萄糖苷酶作用, 专一地分解为无荧光的底物, 以此测定酶活, 此荧光法灵敏度高且快速。

三是以可用对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)为底物进行酶解, 底物水解后释放出来的对硝基苯可直接在400--420 nm之间比色进行测定

1.4 木质纤维质的利用

1.4.1 木质纤维素的代谢工艺

木质纤维素的晶体结构非常复杂, 为纤维素乙醇加工过程增加了困难, 一般情况下可以通过生物质的预处理, 部分水解木质素和半纤维素, 破坏纤维素结晶结构。在此基础上, 通过糖化酶对纤维素和半纤维素进行水解, 并由微生物对己糖、戊糖进行乙醇发酵, 完成纤维素乙醇生产过程^[32]。

以木质纤维素为原料生产燃料乙醇, 可根据生产工艺特点可分为4类: 1、分段水解与发酵(SHF), 2、同步糖化和发酵(SSF), 3、同步糖化共发酵(SSCF), 4、整合生物加工工艺(CBP)。

分段水解与发酵(Segments of hydrolysis and fermentation, SHF)工艺流程主要特点是纤维素水解、己糖及戊糖发酵分开进行。但是该工艺中葡萄糖等产物对纤维素酶反馈抑制比较严重, 导致纤维素酶的使用效率较低, 增加纤维素酶成本, 其次, 采用不同的菌种分别发酵五碳糖和六碳糖, 不利于乙醇浓度的积累, 提高乙醇回收时的能耗。

同步糖化发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 就是将糖化和发酵这两个不同的工艺过程在同一个生物反应器中同时进行, 组合后的工艺, 大为简化了糖化和发酵过程。由于工艺中生物反应器中的单体糖浓度始终保持在较低的水平, 糖对酶催化反应的抑制作用得到了有效的控制, 从而加快了糖化的速率, 同时降低感染杂菌的可能, 提高产物收率。

同步糖化共发酵 (Simultaneous saccharification and cofementation, SSCF)是指纤维素水解与己糖和戊糖发酵过程同时进行的工艺。SSCF工艺相比SSF更进一步, 纤维素酶水解与六碳糖、五碳糖发酵同时进行, 不但有助于缓解葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制作用, 节省设备投资费用, 而且利于发酵液中乙醇的积累, 提高发酵液中最终的乙醇浓度, 降低乙醇回收单元中乙醇蒸馏的能耗, 从而大幅度降低乙醇生产成本。但SHF、SSF和SSCF工艺的前提是必须建立另外的纤维素酶和半纤维素酶的生产工艺^[33-35]。

整合生物加工工艺(Consolidated bioprocessing, CBP)是将纤维素酶的生产、纤维素的水解和水解产物发酵整合于一步的工艺, 具备这三个功能的发酵菌种被称之为整合生物

加工菌株 (CBP strain)。整合生物加工工艺不但具有同步糖化共发酵的诸多优点, 同时整合生物加工菌株可以生产纤维素酶, 这大大的降低了生产成本^[36]。

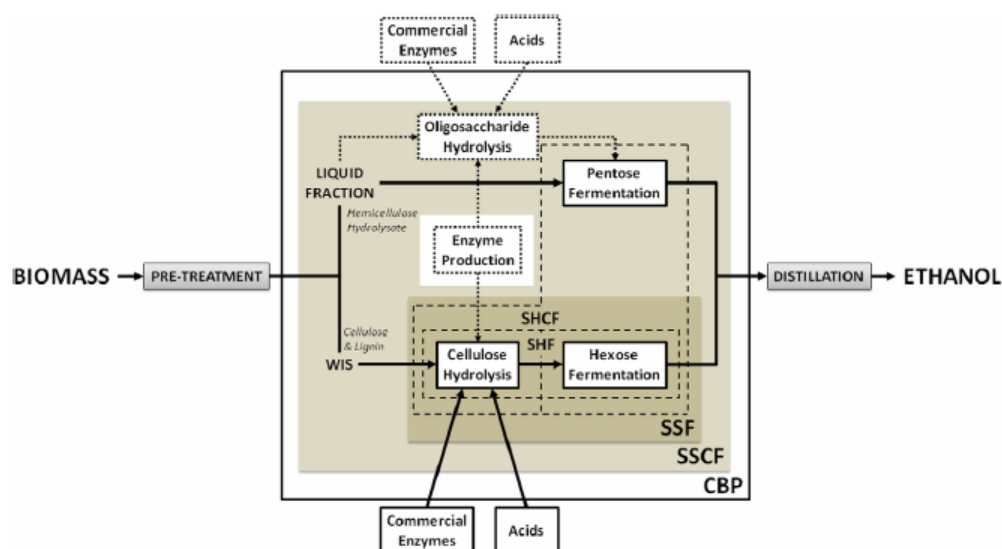


图1.4 四种木质纤维素为原料生产燃料乙醇的工艺

Fig. 1.4 Four lignocellulosic raw materials to produce fuel ethanol process

1.4.2 整合生物加工工艺

利用木质纤维素生产乙醇时, 由于乙醇的单价并不高, 而乙醇收益与原料的成本及生产成本相比, 差值非常小, 所以必须降低生产工艺的成本, 而生产成本中约有二分之一的来自纤维素酶的成本^[37]。因此, 整合生物加工工艺可以减少纤维素酶的使用, 有效的降低生产成本。据初步地估算, CBP 生产乙醇的成本约为 SSCF 工艺的 1/4。

CBP 菌株需要具有以下特性: 1、可以高水平的过量表达重组活性纤维素酶, 2、可以分泌或在细胞外膜上展示具有活性的纤维素酶, 使纤维素酶可以水解不溶性纤维素, 3、可以产生多种纤维素酶并可以发挥最大协同作用进行水解, 4、生物体具备将纤维素水解所得的可溶性糖转运到细胞内的系统, 5、为纤维素酶的合成提供足够的 ATP。

CBP 工程菌的构建有三种策略, 1、改造自身拥有产乙醇路径的菌株, 添加各种纤维素酶基因 (如酿酒酵母^[38]); 2、利用本身可以代谢纤维素的菌株, 加入外源的产乙醇路径, 产生生物乙醇 (如克雷伯氏菌^[39]); 3、在不具有纤维素利用能力和乙醇路径的工程菌或工业安全微生物中同时加入纤维素酶基因和产乙醇的代谢途径 (如大肠杆菌)^[40] 枯草芽胞杆菌)^[41]。

1.4.3 常见的 CBP 构建菌

酵母酿酒

酵母酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 酵母菌作为传统的乙醇生产菌株, 历史悠久, 发酵工艺成熟, 乙醇得率较高, 一直是乙醇发酵研究中的重点微生物。它有许多优良的生产性能, 它有以下几个有利的方面: 1、被公认为食品安全 GRAS (Generally

Regarded As Safe)的微生物, 2、在发酵葡萄糖生产乙醇时, 能过获得较高的乙醇得率和较快的生产速率, 3、对乙醇和其他抑制物有较高的耐受性, 4、可以厌氧条件下发酵, 有着较好的生长能力等^[42], 这些优点使得酿酒酵母成为适合整合生物加工研究的微生物。但它也存在着一定的不足, 它发酵速率较慢且有较多的副产物生成。人们采用表面展示来将酿酒酵母构建为 CPB 工程菌。Zhao 等^[43-44]在酵母表面组装一系列不同功能的纤维小体, 获得能够代谢磷酸浸泡微晶纤维素 (PASC) 得到乙醇的两株重组菌 HZ1886 (CipA3-EGII-CBHII-BGL1)和 HZ1885(CipA1-EGII-CBHII-BGL1), 此外, 通过在酿酒酵母表面装载来源于 *Clostridium thermocellum* 的纤维小体, 得到重组菌 *S. cerevisiae* strain L2612 能够利用 D-木糖生产乙醇。Kondo 等^[45]在 *S. cerevisiae* 中表面展示了来源于 *Aspergillus aculeatus* 的 β -葡萄糖苷酶 *bgl I*, Kotaka 等^[46]在酿酒酵母表面展示了米曲霉 *Aspergillus oryzae* 的 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶基因, 并以 β -葡聚糖作为底物进行乙醇发酵, 转化率达到理论值的 69.6%。

大肠杆菌

大肠杆菌 (*E. coli*) 是研究微生物的模式菌株, 在用于构建纤维质 CPB 工程菌时有以下几个有利的方面。这些特性包括: 1、生长快速, 可以很快得到高产量和所需的产品, 2、基因组序列已知, 并且有着相当成熟的基因工程技术, 发达的发酵工艺, 3、发酵底物利用范围较为广泛, 可以代谢木质纤维素中的五碳糖(木糖和阿拉伯糖)、六碳糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖和果糖)以及糖醛酸(半乳糖醛酸、葡糖醛酸)等^[36]。原生大肠杆菌代谢不仅戊糖, 但也己糖, 这些糖在一个共同发酵容器能够在适当条件下。例如, 最佳的葡萄糖/木糖比或最佳水平的氧在培养基中。最终, 酶可以生产, 糖化, 发酵合作在一个单一的反应器中进行, 从而降低了成本生产生物乙醇。。Ryu^[47]等人在大肠杆菌中导入乙醇路径, 同时表面展示来源于 *Clostridium cellulolyticum* 的三种纤维素酶, 以稀酸处理的玉米秸秆为底物获得乙醇。

枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌是隶属于芽孢杆菌属, 是可以生成孢子的革兰氏阳性细菌^[48]。枯草芽孢杆菌在用于构建纤维质 CPB 工程菌时拥有众多优点: 1、枯草芽孢杆菌被美国食品和药物管理局 (FDA) 认可的安全微生物, 不具有致病性, 在工业上安全, 2、具有非常高的蛋白分泌的能力, 3、生长速度非常快, 4、营养需求非常低, 并能够耐受很高浓度盐和溶剂, 5、, 可以产生大量的多糖降解酶, 如 α -淀粉酶, 支链淀粉酶, 果胶酸裂解酶, β -1, 4-内切葡聚糖酶, β -1,3-1, 4-内切葡聚糖酶, 和内切-1,4- β -木聚糖酶等水解纤维质, 6、能够利用可溶性戊糖 (C5) 和己糖 (C6) 糖, 包括葡萄糖, 果糖, 半乳糖, 木糖, 甘露糖, 纤维二糖等, 7、基因组 DNA 的序列已知和有效的重组 DNA 技术和成熟的发酵技术]。枯草芽孢杆菌是一个适宜的 CBP 工艺的平台, 很有潜力。

运动发酵单胞菌

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 是革兰氏阴性的产乙醇细菌, 微好氧生长, 是唯

一通过ED途径厌氧发酵葡萄糖的微生物^[49]。*Z. mobilis*存在广泛，在坏掉的啤酒、苹果酒、梨酒、发酵的龙舌汁、棕榈汁、含糖的果汁及蜂蜜中均可以发现，尤其在热带国家的一些发酵植物果汁中很常见。由于只把很少量的一部分葡萄糖同化作为构造细胞用。约98%的葡萄糖发酵生成乙醇，只有2%作为碳源。

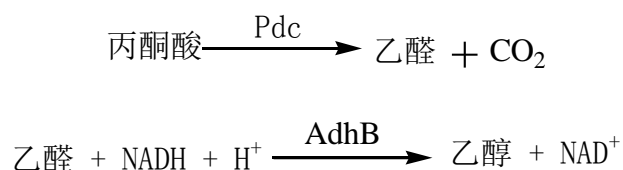
用于构建纤维质 CPB 工程菌时拥有众多优点：*Z. mobilis*，因为其能发酵葡萄糖和果糖产生接近理论得率的乙醇而被广为研究。与酵母菌相比，*Z. mobilis* 具有以下优点^[50]：1、*Z. Mobilis* 对葡萄糖的吸收速率和产乙醇速率均比较高；2、产生物量少；3、具有很高的乙醇耐受力并能耐高渗透压；4、在厌氧的条件下发酵，无需控制加氧，减少投入；5、易于基因操作。但用于大规模乙醇生产，仍有一些限制因素：(1) 野生型 *Z. mobilis* 的底物范围窄，可以发酵葡萄糖、果糖、蔗糖等六碳糖产乙醇，但不能利用五碳糖或纤维素、半纤维素和淀粉等复杂的碳水化合物多聚体生产乙醇；(2)副产物比较多，如山梨醇，3-羟基丁酮、甘油、乙醛及乙酸等；为了解决这些问题，研究者将包含丙酮酸脱羧酶基因 *pdc* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB* 的 *pet* 操作子，转移到碳源范围较广的微生物中，如大肠杆菌，产生新的产乙醇工程菌株。Brestic-Goachet、Okamoto 等^[51]等^[52]尝试在运动发酵单胞菌中表达内切葡聚糖酶的基因 *celZ* 和羧甲基纤维素酶(CMCase)活性的基因 *ACM1*，但大部分重组内切酶在胞质空间中积累，目前该菌株没有在发酵纤维素产乙醇方面作过尝试。

其他细菌和真菌如热纤梭菌*Clostridiumthermocellum*、克雷伯氏杆菌*Klebsiella oxytoca*、瑞氏木霉及粗糙脉孢菌*Neurospora crassa*等均有作为统合生物加工的载体的研究报道。

1.5 常见的乙醇路径

自然界中，包括某些梭菌(*Clostridium sp.*)在内的多种微生物都能代谢产生乙醇，但酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等酵母菌和兼性厌氧细菌运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)则是目前乙醇生产菌的主要开发对象。*Z. mobilis* 因为其能发酵葡萄糖和果糖产生接近理论得率的乙醇而被广为研究。

Z. mobilis 是唯一已知的利用 ED (Entner-Doudoroff) 途径，代谢葡萄糖得到乙醇的细菌。*Zymomonas mobilis* 的 ED 途径包括丙酮酸脱羧酶(Pdc)和乙醇脱氢酶 (Adh)系统。在乙醇发酵时，磷酸化的葡萄糖进入 ED 途径，在丙酮酸脱羧酶的脱羧作用下生成乙醛，继而在乙醇脱氢酶的作用下还原成乙醇^[53]。



Ingram 等 1987 年第一次成功地将运动发酵单胞菌高效产乙醇双酶基因(*pdc* 和 *adhB*) 转化到 *E. coli* 菌株, 构建出产乙醇重组菌, 随后整合乙醇发酵途径到丙酮酸甲酸裂解酶 *pfl* 位点, 改造得到高效产乙醇工程菌 KO4、KO11^[54-55]。Yomano 等通过随机地插入转座子到基因组的方法得到的重组菌 LY60^[56], 而 Kim 等通过化学诱变方法, 筛选到大肠杆菌内源途径产乙醇的突变菌株 SE2378^[57], 均为高效乙醇发酵菌株。

利用运动发酵单胞菌高效产乙醇基因改变细胞的代谢途径, 是目前产乙醇工程菌构建的主流趋势。然而, 大肠杆菌自身具有乙醇代谢途径, 丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)可将代谢中心产物丙酮酸转化成乙酰-CoA 和甲酸, 2 分子的乙酰-CoA 被转化成一分子的乙醇同时消耗 2 分子的 NADH, 为了维持整个代谢氧化平衡, 大肠杆菌同时产生一分子的乙酸和 ATP^[58]。

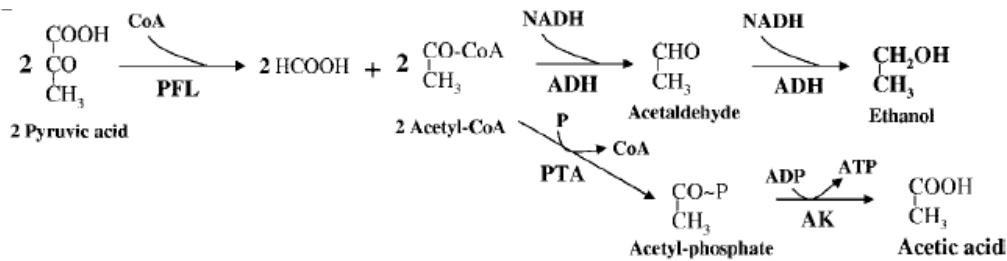


图 1.5 大肠杆菌自有乙醇生产路径

Fig. 1.5 Native pathway for ethanol production in *E. coli*. ADH, alcohol dehydrogenase E; PFL, pyruvate formate-lyase; PTA, phosphotransacetylase; AK, acetate kinase;

Kim 等利用大肠杆菌 $\Delta ldhA \Delta pflB$ 突变株为出发菌株, 通过乙基甲烷磺酸化学诱变, 筛选到一株能在无氧条件下生长的产乙醇菌株 SE2378, 该菌丙酮酸脱氢酶 *pdh* 复合体发生突变, 在厌氧条件下其活性得到了很大的提升, 和乙醇脱氢酶 *adhE* 一起构建了一条新的利用丙酮酸生产乙醇的路径如图, 并得到了较高的乙醇产量。在无氧的条件下, 该菌株发酵木糖和葡萄糖产率能达到理论值的 82%, 最高产率达到 2.249 乙醇/g 细胞。

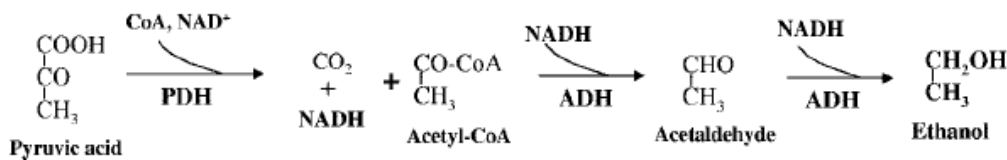


图 1.6 重组菌 SE2378 中的乙醇生产路径

Fig. 1.6 Proposed pathway for ethanol production in *E. coli* strain SE2378. ADH, alcohol dehydrogenase E; PDH, pyruvate dehydrogenase.

1.6 课题研究的意义与内容

燃料乙醇一直被认为是一种合适的化石燃料替代能源，它不单是一种性能优良的燃料，而且可作为混合燃料的添加剂，是很好的燃油品质改善剂。由于生物乙醇是含氧化合物（35%的氧含量），因而能够更好地氧化的烃类，并减少温室气体的量排放到大气中^[5]，同时它能够有效的减少柴油发动机中的颗粒排放。乙醇掺入汽油后，使抗暴性能变好，这样可以提高发动机的压缩比，从而提高热效率，改善汽车的经济性，且相比普通汽油更安全。并减少汽车尾气中一氧化碳、碳氢化合物、二氧化碳和含硫气体的排放也减少，降低对环境的污染、减少温室气体的排放。

然而，在国际上成熟的生物乙醇工艺中，巴西以廉价的甘蔗为主要原料，美国燃料乙醇的原料 95% 是玉米，中国 2007 年之前主要利用陈化粮生产燃料乙醇，2007 年之后增加薯类和甘蔗作为原料。中国众多的人口与稀少的耕地之间的矛盾尖锐，中国提出生物能源不与人争地的口号。另一方面，自然界中存在着大量作为农林业废料的木质纤维素，来源广泛并且可再生。而生物乙醇的价值相比生物质原料和生产工艺的耗费相比并不多，为了能够将生物乙醇产业化，必须控制成本。

而将纤维素酶生产、纤维素水解和乙醇发酵组合在一起进行纤维素乙醇的生产被称之为整合生物加工工艺(Consolidated bioprocessing, CBP)，可以减少添加纤维素酶的成本。人们尝试在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 等传统乙醇生产菌株中表面展示纤维素酶或纤维小体，构建利用纤维素的产乙醇 CBP 菌株。

表面展示纤维素酶和纤维小体时，纤维素酶的分布局限于细胞表面，酶量受限于表面的结合位点，且与底物木质纤维素的接触空间有限，不利于催化反应。同时，表面展示过程相对复杂，需要多种辅助蛋白并且跨膜分泌^[8-9]。分泌表达纤维素酶也是一种重要的构建 CBP 菌株的思路，通过在生物体内构建新的分泌表达体系或者利用自有的分泌体系将纤维素酶分泌到胞外，进入反应体系水解纤维质。分泌表达的纤维素酶可以与底物充分的接触，并随着发酵的进行，不断的在反应体系内积累，相应的催化能力也随之增强。同时分泌表达系统相对简单，可通过启动子的强弱和信号肽的种类来控制分泌能力的强弱，调整体系内各类纤维素酶的比例，形成良好的协同作用。

纤维素降解酶系是由外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶组成，其中 β -葡萄糖苷酶可将纤维二糖水解生成葡萄糖，从而减少纤维二糖的积累及酶解过程的反馈抑制，是纤维素水解的最后一步。且相比纤维素酶和半纤维素酶作用的底物是不溶性的大分子， β -葡萄糖苷酶的底物纤维二糖为可溶分子，容易精确测定，因此相比另外两类纤维素酶，更适于 CBP 菌株分泌表达的研究。

由于大肠杆菌遗传背景清楚，繁殖快，基因操作成熟，所以本研究选用大肠杆菌为出发菌株。首先通过 Red 重组，将运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 的丙酮酸脱

羧酶基因 *pdc* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB* 整合到大肠杆菌 JM109 基因组，构建了一株可以进行乙醇发酵的 *E. coli* P81 菌。之后，选择对纤维二糖底物具有较高专一性的多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因 *bglB*^[14]克隆到 *E. coli* P81，构建了一株能够分泌 β -葡萄糖苷酶到胞外的重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)，实现了纤维二糖为碳源进行乙醇发酵的整合生物加工。本工作为今后得到实用的纤维素酶分泌表达型的乙醇发酵 CBP 工程菌提供了研究基础。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与载体

本实验中所用的菌株和质粒如表 1 所示。其中 *E. coli* JM109 作为基因 *pdC*、*adhB* 的整合宿主菌，*E. coli* DH5 α 用于基因的克隆和筛选，*Z. mobilis* ZM4(ATCC 31821)用于基因 *pdC*、*adhB* 的克隆，*B. polymyxa* 1.794 用于基因 *bglB* 的克隆。

表 2.1 本实验中所用的菌株和质粒

Table 2.1 Microbial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype and/or salient characteristics	Source/reference
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, $\Delta(\text{lac-proAB}) / F^{\prime} [\text{traD36, proAB}^+, \text{lacIq, lacZ}\Delta\text{M15}]$	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1	Grant et al. (1990)
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Wild type strain, ATCC 31821	Purchased from ATCC
<i>B. polymyxa</i> 1.794	Wild type strain, CGMCC 1.794	Purchased from CGMCC
<i>E. coli</i> P8	JM109 <i>pfl::kan-P_{tac}-pdC-adhB</i>	In this study
<i>E. coli</i> P81	JM109 <i>pfl::P_{tac}-pdC-adhB</i>	In this study
Plasmids		
pGEX-4T-1	Template plasmid, carrying <i>P_{tac}</i> promoter gene	Pharmacia
pUC19	Expression vector, used for <i>bglB</i> expression in <i>E. coli</i> p81	Yanisch-Perron et al. (1985)
pMD19-T	An easy cloning vector used for cloning genes <i>pdC</i> , <i>adhB</i> and Kn^{R}	Purchased from Takara
pKD4	Template plasmid, carrying kanamycin-resistance gene (Kn^{R}) flanked by the recognition sites (FRT sites) of the yeast FLP recombinase in direct repeats	Datsenko et al. (2000)
pKD46	Helper plasmid, carrying bacteriophage λ -Red recombinase genes under the control of arabinose-inducible ParaBAD promoter (<i>araBp-gam-bet-exo</i>)	Datsenko et al. (2000)
pCP20	Helper plasmid, carrying FLP recombinase gene under the control of an temperature sensitive promoter	Peter et al. (1995)

2.1.2 主要试剂

Taq、Primer STAR 聚合酶、T₄DNA 连接酶和 pMD19-T 载体购自 Takara 公司(Takara Biotechnology Co. Ltd.,Japan); 限制性内切酶购自 Fermentas 公司(Vilnius Lithuania); Qiagen 基因组抽提试剂盒购自美国 Qiagen 公司(Valencia, CA, USA); 质粒抽提、琼脂糖凝胶试剂盒购自上海捷瑞生物工程公司; PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程公司; 葡萄糖试剂盒购自上海科欣生物技术研究所以; 引物合成与测序分别在上海捷瑞生物工程有限公司以及北京六合华大基因股份有限公司完成。

2.1.3 实验仪器

实验中所用到的主要实验仪器如表 2.2。

表 2.2 主要实验仪器

Table 2.2 Experimental instruments

仪器名称	规格	生产厂家
真空干燥箱	DZF-6050B	上海一恒科学仪器
核酸蛋白质分析仪	DU-800	Beckman 公司
微型摇床	5430	Eppendorf 公司
Eppendorf 台式冷冻离心机	5415D	Eppendorf 公司
PCR 仪	Mastercycler	Eppendorf 公司
电转仪	GenePulserXcell™	Bio-rad 公司
超纯水机	Milli-Q Synthesis	Millipore 公司
海尔冰箱	BCD-239VC	海尔公司
超声波破碎仪	JY92-II	宁波新芝生物科技
低温水槽	SDC-6	宁波新芝生物科技
三孔电热恒温水槽	DK-8D	上海一恒科学仪器有限公司
隔水式恒温培养箱 C	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
Beckman 大型超高速离心机	J-26	Beckman 公司
蛋白电泳系统	EPS-300	Bio-Rad 公司
-80 °C 冰箱	Forma-86C	Thermo 公司
凝胶成像系统	FR-980	复日科技
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
电子天平	BS223S	梅特勒
DNA 电泳系统	EPS-100	Bio-rad 公司
水平摇床	TS-2	
HPLC(自动示差检测)	LC-20AD	岛津公司
制冰机	XB-70	宁波新芝生物技术有限公司
自动高温灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博迅实业有限公司
漩涡混合器	QL-901	江苏海门市其林贝尔公司
手掌型离心机	LX-100	江苏海门市其林贝尔公司
气浴摇床	SHZ-82	太仓华利达有限公司

2.1.4 培养基，主要溶液的配制

LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母浸出物、10 g/L NaCl

RM 培养基: 20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母浸出物、2 g/L KH_2PO_4 。

大肠杆菌感受态细胞制备的培养基: 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母浸出物、10 g/L NaCl、10 mM MgSO_4 、10mM 葡萄糖。

SOB 培养基: 20 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母浸出物、0.5 g/L NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl_2 。

SOC 培养基: SOB 培养基培养加入 20 mM 葡萄糖。

M9 基本培养基: 6 g/L Na_2HPO_4 、3 g/L K_3PO_4 、0.5 g/L NaCl、1 g/L NH_4Cl 、2 mM MgSO_4 、0.1 mM CaCl_2 。

氨苄青霉素储存液: 将 5 g 氨苄青霉素粉末溶于 50 mL 去离子水中, 搅拌至完全溶解后定容到 100 mL, 随后用无菌的 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤除菌, 分装后避光储存于 -20°C 。

卡纳青霉素储存液: 浓度与配制方法见氨苄青霉素储存液的制备。

5 \times 硼酸-Tris 缓冲溶液 (TBE): 称取 27.5 g 硼酸、54 g Tris 碱溶解于 500 mL 去离子水, 加入 20 mL 0.5M EDTA, 加入去离子水定容 1 L, 使用时稀释 10 倍。

0.7%的琼脂糖凝胶: 称取 0.7 g 琼脂糖, 加入 100 mL 0.5 \times TBE 缓冲液, 20 μL 的 EB 溶液, 摇晃后放入微波炉加热 2.5 min 后取出, 灌胶。

希夫试剂: 取 0.1 g 碱性品红溶于 70 mL、 50°C 的温水中, 搅拌溶解后加入 1 mL 的浓盐酸, 摇匀后定容 100 mL, 过夜放置后溶液由红色变为无色。

乙醛指示平板: 200 mL 的 LB 培养基冷却至不烫手后, 加入 0.3 mL 希夫试剂、200 μL 的 Kan, 952 μL 的 IPTG, 0.6 mL 乙醇。

蛋白电泳溶液:

2 M Tris-HCl (pH8.8) 储存液: 称取 121 g Tris base 加入 300 mL 去离子水溶解, 搅拌后缓慢加入 20 mL (11.8M) 浓盐酸, 继续搅拌至完全溶解, 加水定容至 500 mL, 4°C 冰箱保存。

100 g/L SDS: 称取 10 g SDS 加入 100 mL 去离子水, 超声溶解后, 4°C 冰箱保存。

75% (v/v) 甘油: 量取分析纯甘油 75 mL, 加入去离子水 25 mL, 搅拌至完全甘油溶解, 4°C 冰箱保存。

10 g/L 溴酚蓝溶液: 称取 500 mg 溴酚蓝加入 50 mL, 搅拌溶解后棕色玻璃试剂瓶内, 4°C 冰箱保存。

4 \times 分离胶缓冲液 (100 mL): 加入 75 mL 2M Tris-HCl (pH8.8)、4 mL 10% SDS, 加入去离子水定容 100 mL, 4°C 冰箱保存。

4 \times 浓缩胶缓冲液 (100 mL): 加入 50 mL 1M Tris-HCl (pH6.8)、4 mL 10% SDS, 加入去离子水定容 100 mL, 4°C 冰箱保存。

100 g/L 过硫酸铵溶液 (AP): 称取 5g 过硫酸铵, 溶解于去离子水, 定容 50 mL, 4

$^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

5×样品缓冲液 (100 mL): 依次加入 50 mL 75% (v/v) 甘油, 20 mL 100 g/L SDS 溶液, 10 mL 10 g/L 溴酚蓝溶液, 5 mL 2 M Tris-HCl, 5 mL 巯基乙醇, 9 mL 超纯水, 混合后在 4°C 冰箱保存。

4×蛋白质电泳缓冲溶液 (1000 mL): 称取 15 g Tris 碱、72 g 甘氨酸和 5 g SDS 溶解于去离子水超声溶解, 定容 1000 mL。

蛋白质漂洗液:

考马斯亮蓝试剂配制: 称取考马斯亮蓝 G250 100 mg 溶于 50 mL 乙醇(95%)中, 随后加入 100 mL 85% 磷酸, 并用水定容至 1000 mL, 用 Whatman1 号滤纸过滤。

纤维二糖溶液 (80 mM): 称取 0.6846 g 纤维二糖于烧杯, 加入 15-20 mL 柠檬酸缓冲溶液 (pH=6.0), 使其溶解, 定容于 25 mL, 在 4°C 保存。

100 mM 柠檬酸缓冲液: 称取 21 g 的柠檬酸, 溶于 1 000 mL 超纯水中, 配制为 100 mM 柠檬酸溶液。称取 29.4 g 的柠檬酸钠, 溶于 1 000 mL 超纯水中, 配制为 100 mM 柠檬酸钠溶液。量取 190 mL 柠檬酸和 810 mL 柠檬酸钠溶液配制得到 100 mM 柠檬酸缓冲溶液。

pNPG 溶液(2.4 mg/mL): 称取 0.0482 g 的 pNPG, 溶解于柠檬酸缓冲溶液, 定容于 20 mL, 在 4°C 保存。

0.5M Na_2CO_3 : 称取 2.65 g 无水 Na_2CO_3 粉末, 溶解于超纯水, 定容于 50 mL。

100 mM 磷酸钾缓冲溶液 (pH=7.5): 称取 1.36 g 的 KH_2PO_4 , 溶于 100 mL 超纯水中, 配制为 100 mM KH_2PO_4 溶液。称取 17.9 g 的 Na_2HPO_4 , 溶于 100 mL 超纯水中, 配制为 100 mM Na_2HPO_4 溶液。量取 420.5 mL Na_2HPO_4 和 79.5 mL KH_2PO_4 溶液配制得到 100 mM 磷酸钾缓冲溶液。

10 mM NADH 溶液: 称取 0.0345 g NADH 粉末, 溶于超纯水, 定容于 5 mL。

2.2 实验及分析方法

2.2.1 基因组 DNA 的提取

运动发酵单胞菌 ZM4 在 RM 培养基中 30°C 静置厌氧培养, 多粘芽孢杆菌 *B. polymyxa* 1.794 和大肠杆菌 37°C , 220 r/min 培养后收集菌体使用 Qiagen 细菌基因组抽提试剂盒提取基因组, 具体操作步骤见 E.Z.N.A.Bacterial DNA Kit 说明书。使用上海捷瑞的质粒小量制备试剂盒和 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行质粒抽提和胶回收, UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 具体操作步骤见试剂盒所附说明书。

2.2.2 PCR 扩增

根据扩增的目的 DNA 的序列, 使用引物设计软件 Primer 5.0 设计引物, (引物序列如表 2.3), 购买得到引物首先在 4°C 、10 000 r/min 离心 5 min, 将引物粉末离心到管

底。根据引物合成单说明加入灭菌的超纯水溶解引物分泌，配成 10 μM，后 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 将溶液离心到管底，保存于 -20 °C 冰箱中保存。

表 2.3 本实验中所用的引物序列
Table 2.3 Primers used in this study

Amplified fragments	Primer	Sequence (5'-3')	
<i>pdc</i>	Pdc1	GGAATTCC CATATG AGTTATACTGTCGGTACCTA (<i>Nde</i> I)	
	Pdc2	ACGCG TCTGACT AGAGGAGCTTGTTAACAGG (<i>Sal</i> I)	
<i>adhB</i>	Adh1	ACGCG TCTGAC GAGGTTATAGCTATGGCTTCTTCAACTTT (<i>Sal</i> I)	
	Adh2	TCCG CCTCGAG TTTTCTGTTTTGAAATTAG (<i>Xho</i> I)	
<i>kan</i>	Kan1	CGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTCTTGAG CGATTGTGTAGG	
	Kan2	ACTCAATAAAGTTGCCGCTTTACGGGGAAATTAGAACATT CCTCGAGTT AAGGTTTAAACGG (<i>Xho</i> I)	
<i>P_{tac}-pdc-adhB</i>	Over1	GGGAATTCC CATATG GGAGCTGTTGACAATTA (<i>Nde</i> I)	
	Over2	GTACCGACAGTATAACTCATGAATACTGTTTCTGTGTGA	
	Over3	TCACACAGGAAACAGTATTCATGAGTTATACTGTCGGTAC	
	Over4	CCG CCTCGAG GTTTTCTGTTTTGAAATTAGA (<i>Xho</i> I)	
<i>kan-P_{tac}-pdc-adhB</i>	Red1	CGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTCTTGAG CGATGTGTAGG	
	Red2	ACTCAATAAAGTTGCCGCTTTACGGGGAAATTAGAACATTCTCGGTTAA GGTTTAAACGG	
	Jd1	ATACTGGGTCATTTACCTGC	
	Jd2	CAATCCATCTTGTTCATCA	
	Jd3	ATAGTGATAGTCGGTTTTGC	
	Jd4	CAGAATGAAGCGCGGAATAA	
	<i>bglB</i>	bgl1	CG GGATCC ATGCGCAACTTGACCAAGAC (<i>Bam</i> H I)
		bgl2	CCC AAGCTT TTTAAAACCCGTTCTTCGCC (<i>Hind</i> III)

基因 *pdc* 和 *adhB* 的克隆：以运动发酵单胞菌(ZM4)的全基因组为模板，Pdc1、Pdc2 为引物(PCR 体系见表 2.4)，*pdc* 的 PCR 条件为：94 °C 30 s，62 °C 55 s，72 °C 2 min，29 个循环；72 °C 10 min。同样以运动发酵单胞菌(ZM4)的全基因组为模板，Adh1、Adh2 为引物，扩增基因 *adhB*，PCR 的条件为：94 °C 30 s，55 °C 55 s，72 °C 1 min20 s，29 个循环；72 °C 10min。PCR 产物加入 r-*Taq* 聚合酶 72 °C 保温 20 min，添加 A 尾巴。PCR 反应结束后，取 2 μL 样品在 0.7% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

表 2.4 PCR 扩增体系

Table 2.4 Composition of PCR

试剂名称	用量
Forward primer(10 μM)	2μL
Reverse primer(10 μM)	2μL
dNTP mixture(2.5 Mm/each)	4μL

模板 DNA	1μL
Primer STAR HS	
DNA Polymerase(2.5 U/μL)	10μL
ddH2O	30.5μL
5Primer STAR buffer(Mg ²⁺ plus)	0.5μL
Total volume	up to 50μL

启动子 P_{tac} 的克隆：以质粒 pGEX-4T-1 为模板，Over1、Over2 为引物，克隆启动子 P_{tac} ，PCR 的条件为：94 °C 30 s，62 °C 55 s，72 °C 30 s.29 个循环；72 °C 10 min。

重叠延伸 Overlap PCR 流程：以质粒 pGEX-4T-1、pUC19-*pdc-adhB* 为模板，Over1、Over2 和 Over3、Over4 为引物，扩增片段启动子 P_{tac} 和 O-*pdc-adhB*，并纯化、鉴定。以 PCR 产物基因片段 P_{tac} 和 O-*pdc-adhB* 为模板，反应体系见，先不加如引物，进行 4-5 个循环后，再加入引物 Over1、Over4，进行余下的循环，总循环为 33 到 35 个。PCR 反应接收后，加 A 尾巴，取 2 μL 样品在 0.7%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

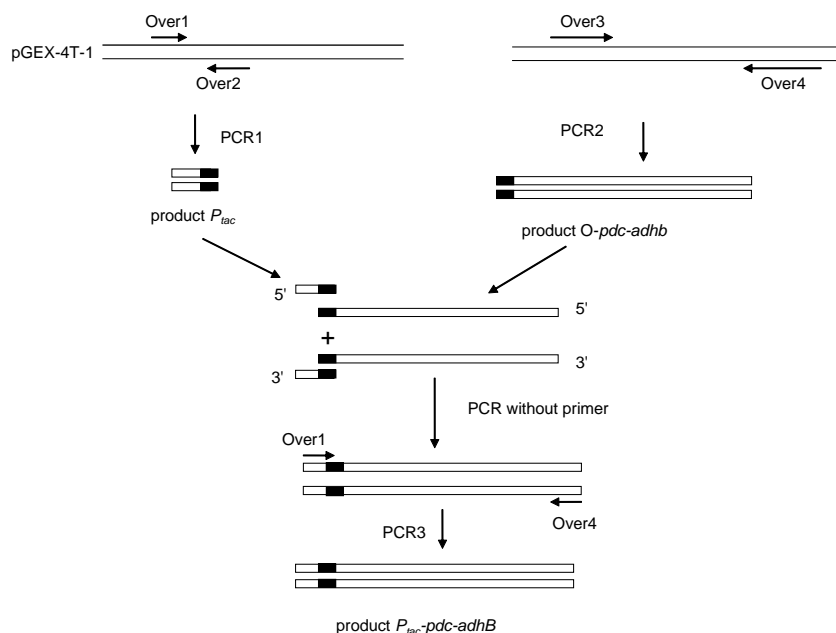


图 2.1 Overlap PCR 原理

Fig. 2.1 Theory of overlap PCR

2.2.3 目的基因的克隆

PCR 产物经过 PCR 纯化后，加入相应的限制性内切酶酶切，根据说明书选择合适的酶缓冲液，37 °C 酶切 2 h，酶切体系见表 2.5，经由切胶回收后，与克隆载体 pMD19-T 或经相应酶切的 pUC19 载体做连接，连接体系如表 2.6 或表 2.7，16 °C 连接 8-12 h。

表 2.5 双酶切体系

试剂名称	用量
载体/PCR 产物	20 μL
双酶切 buffer	4 μL

限制性内切酶 A	2 μL
限制性内切酶 B	2 μL
无菌超纯水	22 μL
Total volume	50 μL

表 2.6 克隆载体 pMD19-T 与 pUC19 的连接体系

Table 2.6 The ligation system

pMD19-T Vector		pUC19 Vector	
试剂名称	用量	试剂名称	用量
目的基因	V μL	目的基因	4 μL
pMD19-T Vector	1 μL	pUC19 Vector	8-V μL
Solution I	5 μL	T4 DNA ligase	1 μL
		T4 DNA ligase buffer	1 μL
Total volume	10 μL	Total volume	10 μL

将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞内，大肠杆菌感受态细胞的制备和转化方法如下所示。

大肠杆菌感受态细胞的制备：

- 1、取在 -80°C 冰冻保存的菌种，用划线法接种大肠杆菌于 LB 固体平板，于 37°C 培养过夜；
- 2、第二天，从平板上挑取单个菌落，接种至含有 5 mL LB 培养液的试管中， 37°C 振荡培养过夜。
- 3、次日取菌液 1 mL 接种至含有 200 mL LB 富集培养基的 1000 mL 烧瓶中， 37°C 、200 r/min 震荡培养约 2-3 h；
- 4、当菌落 600nm OD 值达到 0.4-0.6 时，将烧瓶取出放置冰上 10~15 min；
- 5、在无菌条件下把菌液倒入 200 mL 预冷离心管中， 4°C 、2000g 离心 10 min；
- 6、弃上清，加 20 mL 预冷的 0.1 M CaCl_2 到离心管中洗涤菌体，悬浮， 4°C 、2000g 离心 10 min，重复 2 次；
- 7、弃上清，加入 2 mL 冰预冷的 0.1M 的 CaCl_2 ，重悬浮菌体，并加入 40 μL DMSO，混匀冷却 15 min 后，再加入 40 μL DMSO，混匀冷却 15 min；
- 8、在 1.5 mL EP 管内每管分装 100 μL ，并迅速放入液氮中冻结，保存于 -80°C 低温冰箱中备用。

大肠杆菌的热击转化：

- 1、将大肠杆菌感受态细胞从 -80°C 冰箱中取出，放在冰上融化（一般需时 20 min）；
- 2、将待转的样品如质粒、连接产物加入感受态中，在冰上放置 30 min；
- 3、将混合物在 42°C 水浴锅中热击 90 s 后取出，在冰上冷却 2 min；
- 4、加入 900 μL 的 LB 液体培养基，在 37°C 摇床 100 r/min 培养 50 min；
- 5、取 300 μL 菌液涂布于平板。

含有携带目的基因的亚克隆质粒 pUC19 或 pMD19-T, 可以通过涂布于 LIXA 平板, 平板中含有 Xgal、Amp、IPTG, 进行蓝白斑筛选。如果目的基因插入到了质粒 pUC19 或 pMD19-T 的多克隆位点, 则会导致内源 α -肽失活, 使 β -半乳糖苷酶失活, 得到白色菌落, 否则菌株呈蓝色。挑选白色菌落接种于 LB 液体培养基, 培养 12 h 后, 通过 PCR 和酶切鉴定。鉴定的酶切体系为: 限制性内切酶 1 μ L, 模板 DNA 5 μ L, 酶切 buffer 2 μ L, 加入 ddH₂O 补足 10 μ L, 在 37 °C 酶切 1 h 后, 取 2 μ L 样品在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

表 2.7 PCR 鉴定体系

Table 2.7 PCR system for identification

	Forward	Reverse	模板	premix Taq	ddH ₂ O
试剂名称	primer(10 μ M)	primer(10 μ M)	DNA	Polymerase	O
用量	1 μ L	1 μ L	1 μ L	10 μ L	7 μ L
Total volume	up to 20 μ L				

2.2.4 表达系统的构建

将得到的阳性菌株, 在 LB 中 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后, 抽提质粒, PCR、酶切鉴定, (鉴定体系如表 2.7)。利用内切酶 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切处理质粒 T-*pdC-adhB* 和质粒 pET28a, 胶回收后, 16 °C 连接过夜后, 转化到感受态细胞 *E. coli* BL21 内, 涂布于 LB 固体培养基, 37 °C 恒温培养, 将所得的菌落划线培养, 并抽提质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定。

将克隆 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB*, 通过酶切连接到载体 pUC19, 并添加启动子 P_{43} 和信号肽 *NprB* 辅助其分泌表达, 构建质粒 pUC19- P_{43} -*NprB-bglB*, 转入感受态细胞 DH5a 内, 并进行 PCR 和酶切鉴定。

2.2.5 基因 *pdC* 和 *adhB* 活性的定性检测

希夫试剂可以与醛类发生反应显色, 原理见图 2.6, 乙醛指示平板中加入了希夫试剂和诱导剂 IPTG, 用于检测生物体所产生醛酶的表达^[60]。在本实验中, 当检测菌生长于乙醛指示平板上时, 含有 *pdC* 基因的重组菌能编码丙酮酸脱羧酶, 催化丙酮酸转化为乙醛, 而乙醛则与希夫试剂作用生成紫红色物质, 使重组菌菌落显紫红色, 而不含有丙酮酸脱羧酶基因的原始菌株则不显色。同样的, 含有 *adhB* 基因的重组菌可编码乙醇脱氢酶, 催化乙醇转化为乙醛, 乙醛则与希夫试剂作用生成紫红色物质, 使重组子菌落显紫红色, 而不含有乙醇脱氢酶基因的原始菌株则不显色。将重组菌和对照菌涂布在一块乙醛指示平板上, 37 °C 培养 48 h。

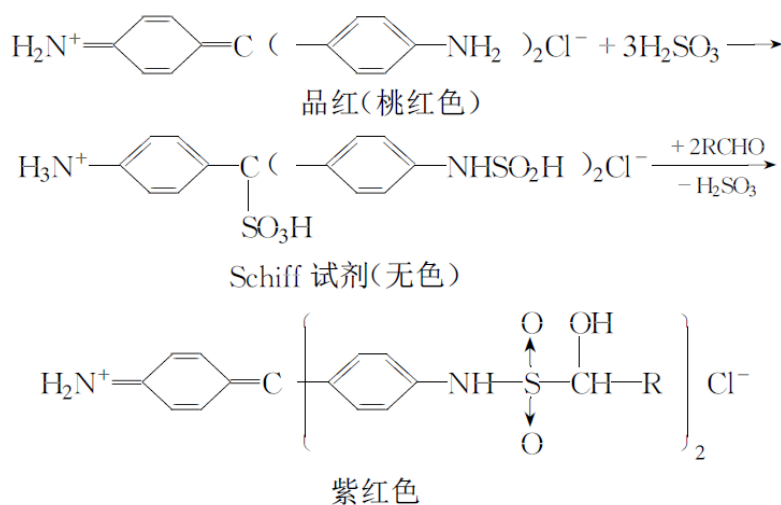


图 2.6 希夫试剂显色原理

Fig. 2.6 The theory of Schiff reagent

2.2.6 Red 重组

Red 重组的原理：Red 重组系统是一种可以在基因组染色体水平上进行分子克隆操作的技术。 λ 噬菌体有 3 个基因 *gam*、*bet*、*exo*，分别可编码 Exo、Beta、Gam 3 种蛋白质，促进 DNA 链的互补结合，同时抑制体内核酸外切酶的活性，抑制外源基因的降解。在这 3 种蛋白质的保护作用下，染色体 DNA 可以通过两翼较短的同源序列与一段线性 DNA 片段实现高频重组，使外源基因片段整合到染色体上，同时染色体相对应的序列被置换敲除，这一技术现已用于外源基因在宿主染色体上的定向整合、染色体上特定序列的敲除和回收。

电转感受态细胞的制备：含有 Red 辅助质粒的菌株 *E. coli* JM109/pKD46 接种于 SOB 培养基(含氨苄青霉素)，30⁰C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2，加入 L-阿拉伯糖至终浓度为 30 mM，30⁰C、200 r/min 诱导培养 1 h 后。收集菌液在冰上预冷 10 min 后，用预冷的 10% 甘油离心洗涤 3 次，加入 1 ml 10% 甘油悬浮，每管分装 100 μ l^[61]。

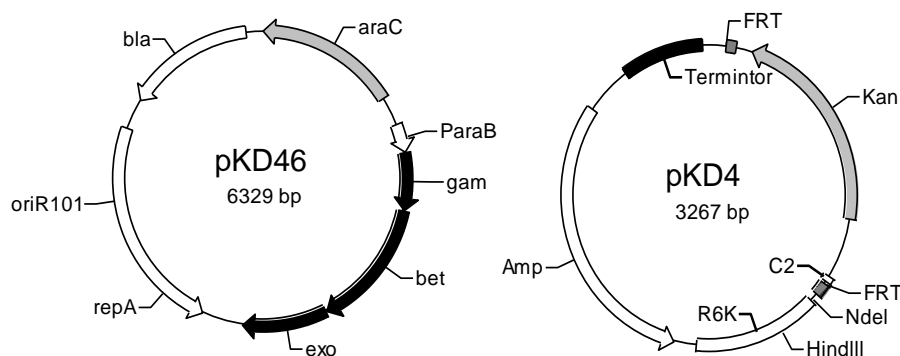


图 2.7 质粒 pKD46 和质粒 pKD4 的图谱

Fig. 2.1 (a) The map of recombinant plasmid pKD46

(b) The map of recombinant plasmid pKD4

电转样品的制备：PCR 产物在 PCR 回收试剂盒纯化后，*Dpn* I 酶 37 °C 处理 2 h，切胶回收，即为所需样品。

在感受态细胞中加入总计 500 ng 的电转样品，混合，冰浴 30 min 后转入 0.1 cm 预冷的电击杯，用电转仪(BIO-RAD)电击转化，电转条件：200 Ω, 25 μF, 2 000 V, 4~5 ms^[62]。电击后立即加入 900 μl SOC 培养基，37 °C, 150 r/min 孵育 1 h 后，取 500 μl 涂布于含 25 μg/μL 的卡那霉素的 LB 平板上，37 °C 培养至长出单菌落。挑取该单菌落在含高浓度卡那霉素(100 μg/μL)的 LB 抗性平板上复筛，长出的菌落利用鉴定引物 Jd1 和 Jd2、Jd3 和 Jd4(若引物表中有需在此处说明一下)进行菌落 PCR 鉴定、筛选。将阳性克隆在 LB(含氨苄青霉素)平板划线并提取质粒、基因组，并以基因组为模板以 Red1 和 Red2 为引物 PCR 鉴定。

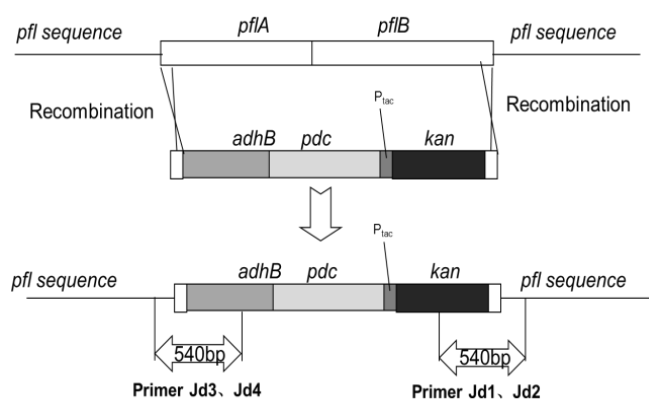


图 2.4 基因 *kan-pdc-adhB* 的重组原理图

Fig. 2.4 Flow diagram of intergating gene *kan-pdc-adhB*.

标记基因的消除：将辅助质粒 pCP20 转入 Red 重组后的阳性菌株内，30 °C 培养 8 h 后，转接到 LB 培养基中，42 °C 培养过夜，消除质粒 pCP20。LB 平板划线 37 °C 培养，将长出的单菌落分别在 LB、含氨苄青霉素、卡纳青霉素的 LB 上划线，37 °C 过夜培养，获得对两种抗生素均敏感的克隆^[63]。利用鉴定引物 Jd1 和 Jd2、Jd3 和 Jd4 鉴定阳性菌株，利用乙醛指示平板筛选有酶活的菌株。

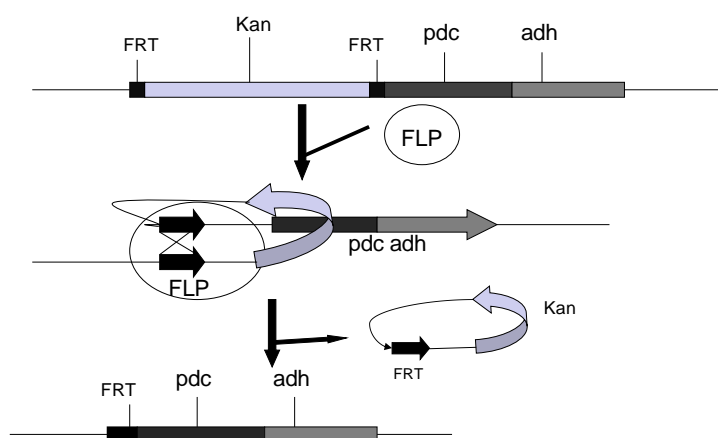


图 2.5 FLP 重组酶机理

Fig. 3 Principle of FLP recombinase

2.2.7 SDS-PAGE

采用 Bradford 法检测蛋白浓度。

标准曲线的测定：分别量取 0、5、5、10、10、15、15、20、20、25、25、30、30、35、35、40、40 μL 标准 BSA 溶液于 17 个试管中，加入超纯水至 0.2 mL，然后在各试管中加入 2 mL 的 Bradford 工作液，充分混匀，待 2 min 后于 1 h 内测定 595 nm 处的吸光值。根据所测数据绘制标准工作曲线，如图 1。样品分析：取一定量的样品，根据样品适当稀释确保测定值在标准曲线以内，在混匀后 5~20min 内测定 595nm 处吸光值，根据标准曲线和稀释倍数计算样品中的蛋白质浓度。

SDS-PAGE

取适量大肠杆菌菌液 12 000 r/min 离心 10 min，去上清后加入 100 μL 1 \times SDS Loading Buffer，移液器吹打沉淀使细胞悬浮，100 $^{\circ}\text{C}$ 甘油浴 3 min，离心后取 20 μL 上清上样进行 SDS-PAGE 电泳分析。SDS-PAGE 的条件为 70 V 恒压下电泳 30 min 后，140 V 恒压电泳 80 min。电泳结束后剥胶，加入考马斯亮蓝过夜静置染色，回收染色液，利用脱色液脱色 1 h，观察条带，拍照。

SDS-PAGE 所用的蛋白 Maker 为 Unstained Molecular Weight Marker(KDa):116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4。

2.2.8 酶活的测定

adhB 的酶活测定

过夜培养的重组菌按 1%接种量接种于培养基中，30 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 培养至 $OD_{600}=0.2$ 时，加入终浓度 1 mM IPTG，继续培养 3 h。取 10 ml 菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 4 min，收集菌体，使用 50 mM(pH 7.5) PBS 缓冲液洗涤 3 次，然后用 1 ml 100 mM(pH 7.0)PBS 缓冲液悬浮沉淀，超声波破碎后，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min，上清即为粗酶液。

在 950 μl 100 mM(pH 7.0)PBS 缓冲液中加入 20 μl 40%乙醛、20 μl 粗酶液，预热 1 min 后加入 10 μl 10 mM NADH(其中：酶空白为：970 μl 100 mM(pH 7.0)PBS 缓冲液加入 20 μl 40%乙醛和 10 μl 10 mM NADH；底物空白为：970 μl 100 mM(pH 7.0)PBS 缓冲液加入 20 μl 粗酶液和 10 μl 10 mM NADH)，利用 Beckman coulter DU800 核酸蛋白分析仪配有低温水浴锅恒温 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应，使用光程为 1cm 的石英比色皿在 340 nm 处测定其吸光度的变化值，从而计算生成 NADH 的反应速度。从所得数据中选取反应初始阶段线性较好的区域回归成线性方程，按照如下公式计算酶活 (Unit/ μL)。并用 Bradford 法测定粗酶液中蛋白质的含量，算出酶活^[64]。

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

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

bgIB 酶活力的测定

粗酶液的获得：过夜培养的菌株按 1% 接种量接种于培养基中， 37°C ， 200 r/min 培养至 OD_{600} 为 2 时， $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min，将上清冰浴，缓慢加入 55% 饱和度的研磨硫酸铵同时搅拌，沉淀上清中的蛋白， $10\,000 \text{ r/min}$ ， 4°C 离心 10 min，去上清后用 1 ml 预冷的 50 mM 的柠檬酸缓冲液(TISAB B)(pH 6.0)溶解沉淀，即为胞外粗酶液。粗酶液中蛋白质含量采用 Bradford 法测定，以 BSA 为标准蛋白。

以对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)作为底物测定糖苷酶酶活^[65]：测定条件如下：在 2 mL 的反应体系中，先加入 0.8 mL 柠檬酸缓冲液 TISAB B (100 mM, pH=6.0) 以及 1 mL 8 mM pNPG(50 mM, pH=6.0 柠檬酸缓冲液溶解)， 37°C 预热后加入 0.2 mL 的经过适当稀释的粗酶液，在 37°C 条件下反应 10 min，加入 1 mL 浓度为 0.5 M 的 Na_2CO_3 来终止反应，最后在 405 nm 条件测定吸光度值(其中：酶空白为：1 ml 8 mM pNPG 加入 1 ml TISAB B 缓冲液，底物空白为：1.8 ml TISAB B 缓冲液加入 0.2 ml 粗酶液)。1 单位的酶活(U)定义为在规定条件下在 1 min 之内释放出 $1 \mu\text{mol}$ 的对硝基苯酚所对应的酶量。

以纤维二糖为底物测定纤维二糖酶的酶活：在 2 mL 的反应体系中，先加入 1 ml 80 mM 的纤维二糖(由 100 mM pH=6.0 的柠檬酸缓冲液溶解)， 37°C 预热后加入 1 ml 粗酶液， 37°C 条件下反应 1 h 后，利用葡萄糖试剂盒测定生成的葡萄糖的量^[66]。(其中酶空白：1 ml 柠檬酸缓冲液+1 ml 纤维二糖、底物空白：1 ml 粗酶液+1 ml 柠檬酸缓冲液)1 单位的酶活(U)定义为在规定条件下每分钟释放出 $1 \mu\text{mol}$ 的葡萄糖所对应的酶量。

2.2.9 发酵条件

过夜培养的菌株按 1% 接种量接种于含有 50 ml 培养基的 250ml 锥形瓶中 37°C 、 200 r/min 培养到 $OD_{600}=0.2$ 时^[67]，加入终浓度为 1 mM IPTG， 37°C 、 200 r/min 发酵培养。发酵液中的乙醇含量和残余的葡萄糖、纤维二糖的浓度由高效液相色谱进行定量分析，色谱柱(LC-20AD)使用 Aminex HPX-87H column (Bio-Rad USA)离子交换柱，流动相为 5 mM 的 H_2SO_4 ，流速为 0.6 mL/min ，柱温为 65°C ，采用示差折光检测器 RID-10A (岛津公司)，检测器温度为 40°C 。所有的样品在 $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min 后，上清经过 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤处理。

第 3 章 实验结果

3.1 基因 *pdc-adhB* 的克隆

取超低温冻存 *Z. mobilis* ZM4 经平板活化和纯化后，挑取一个单菌落接入 RM 液体培养基，30 °C 培养 24h 后，提取其基因组 DNA，取 0.2 μL 后 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测（见图 3.1）。

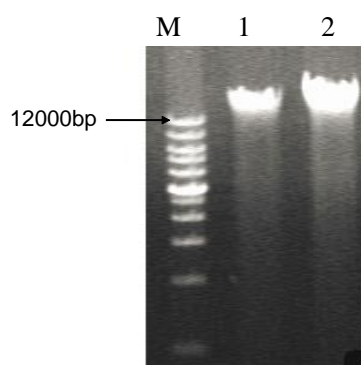


图 3.1 *Z. mobilis* ZM4 基因组

Fig. 3.1 The genomic DNA extracted from *Z. mobilis* ZM4. Lane 1-2: genome DNA.

以 *Z. mobilis* ZM4 的基因组为模板扩增得到基因 *pdc*、*adhB*，连接到载体 pMD19-T，得到重组质粒 T-*pdc*、T-*adhB*，其质粒图谱见图 3.2，转入 *E. coli* DH5α，涂布于 LIXA 平板，通过蓝白斑筛选，选择白色的菌落划线培养，抽提质粒进行 PCR 和酶切鉴定后，取 0.2 μL 后 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测，电泳结果见图 3.3。

通过内切酶 Nde I 和 Sal I 对重组质粒 T-*pdc* 进行双酶切，用同样的酶处理表达载体 pET28a 后，进行胶回收，获得酶切片段，后将 *pdc* 连接到 pET28a，得到质粒 pET28a-*pdc*，转入 *E. coli* BL21 的感受态中，进行 PCR 和酶切鉴定。将所得阳性克隆接种于 LB 液体培养基中，抽提得到质粒 pET28a-*pdc*，通过 Sal I、Xho I 对重组质粒 T-*adhB* 和 pET28a-*pdc* 进行双酶切，进行胶回收，获得酶切片段，后将 *adhB* 连接到 pET28a-*pdc*，得到质粒 pET28a-*pdc-adhB*，转入 *E. coli* BL21 的感受态中，进行 PCR 和酶切鉴定。

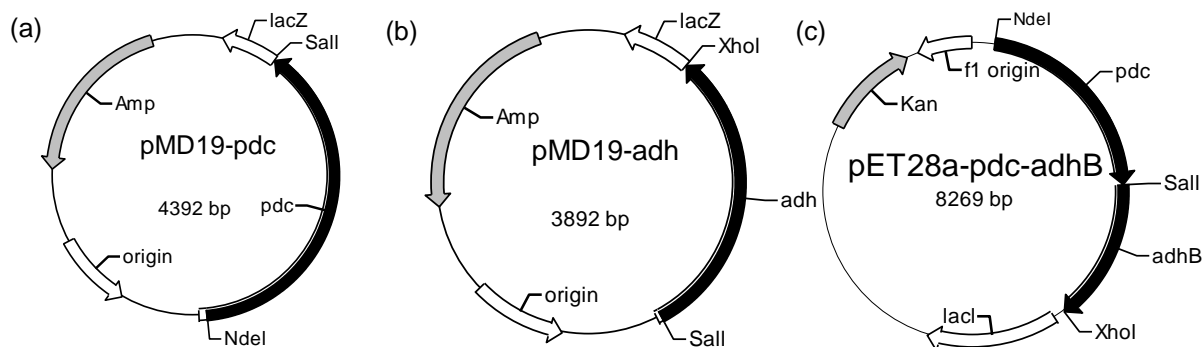


图 3.2 质粒 T-*pdc*、T-*adhB* 与 pET28a-*pdc-adhB* 的图谱

Fig. 3.2 The maps of T-*pdc*、T-*adhB* and pET28a-*pdc-adhB*. a: T-*pdc*, b: T-*adhB* c: pET28a-*pdc-adhB*.

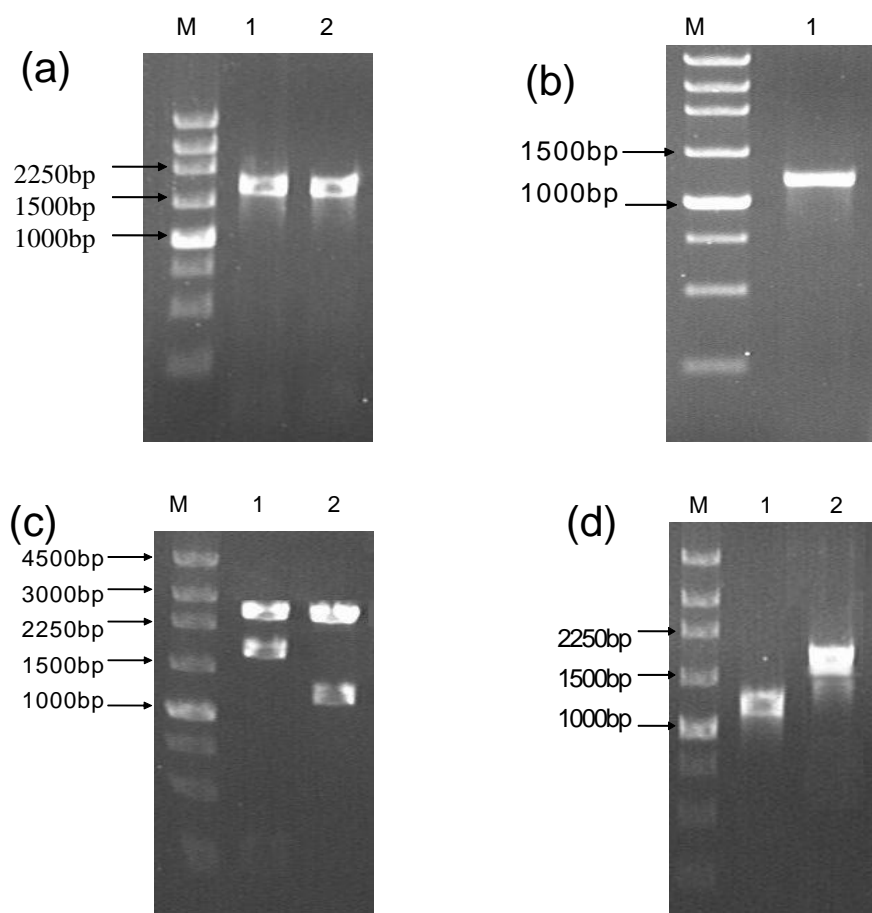


图 3.3 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

Fig.3.3 PCR and restriction analysis of recombinant plasmids. a: PCR of *pdc*; b: PCR of *adhB*; c: Digestion results of plasmid *T-pdc*、*T-adhB*, lane 1 for *T-pdc* with *NdeI* and *SalI*, lane 2 for *T-pdc* with *SalI* and *XhoI*; d: PCR of plasmid *pET28a-pdc-adhB*, lan1 for *pdc*, lan2 for *adhB*.

3.1.2 乙醛指示平板

将对照菌 *E.coli* BL21(pET28a)、重组菌 *E.coli* BL21(pET28a-*pdc*)、*E.coli* BL21(pET28a-*pdc-adhB*)在乙醛指示平板 37 °C 划线培养 24 h, 结果如图 3.4 所示, 重组菌 *E.coli* BL21(pET28a-*pdc*)、*E.coli* BL21(pET28a-*pdc-adhB*)中的基因 *pdc* 和 *adhB* 通过乙醛指示平板中的 IPTG 进行诱导, 表达了丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶, 与乙醛指示平板中的希夫试剂反应, 菌落呈红色。而非重组菌 *E.coli* BL21(pET28a)中也有基因 *adh*, 但表达量很少, 菌落呈白色, 微显红色, 但与重组菌的颜色对比明显, 而这种颜色的差异证明了表达的 Pdc、AdhB 是有活性的。

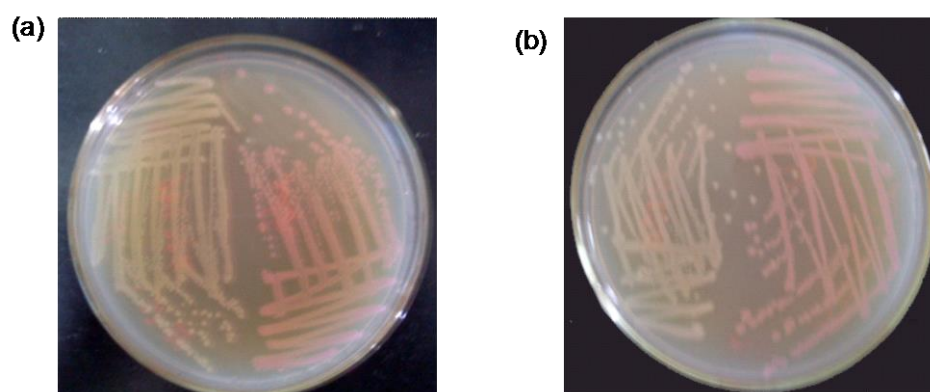


图 3.4 乙醛指示平板的定性检验。

Fig. 3.4 Acetaldehyde to indicate the results of the tablet. a: strains containing the recombinant plasmid the plasmids the pET28a (left) and pET28a-pdc (right); b: strains containing the recombinant plasmid the pET28a (left) and the the pET28a-pdc-adhB (right).

3.1.3 蛋白质电泳

将培养 12 h 的对照菌 *E. coli* BL21(pET28a)、重组菌 *E. coli* BL21(pET28a-pdc)、*E. coli* BL21(pET28a-pdc-adhB), 按照 1% 的接种量, 转接到 20 mL 的 LB 液体培养基中 200 r/min、37 °C 培养 2h, 培养至 $OD_{600}=0.2$ 时, 加入 IPTG 至 1 M, 继续 200 r/min、37 °C 培养 4h 后, 收集菌体, 进行蛋白质电泳。结果如图 3.5 所示, 其中基因 *pdc* 表达的蛋白预计为 60kDa, *E. coli* BL21/pET28a-pdc-adh、*E. coli* BL21/pET28a-pdc 在 60 kDa 附近有较强的表达。*adhB* 表达的蛋白质预计为 38kDa, *E. coli* BL21/pET28a-pdc-adhB 在 38 kDa 有明显的表达。说明我们构建的的质粒 *E. coli* BL21(pET28a-pdc-adhB) 中的基因 *pdc*、*adhB* 的表达的 Pdc、AdhB 大小

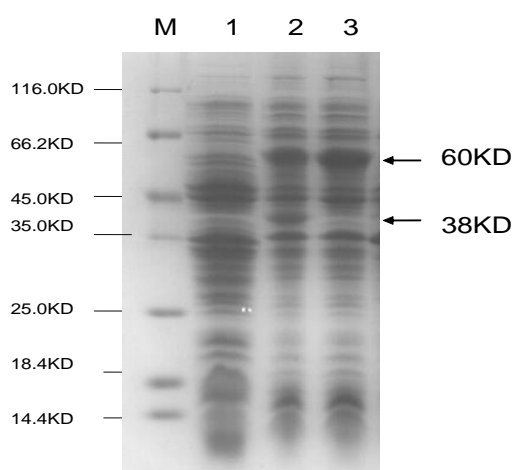


图 3.5 重组大肠杆菌的 SDS-PAGE 电泳分析表达蛋白产物。

Fig. 3.5 SDS-PAGE electrophoresis analysis of recombinant *Escherichia coli* expression of the protein product. M: protein markers; lane 1 for whole protein of *E. coli* BL21 (pET28a); ;lane 2 for the whole protein of *E. coli* BL21 (pET28a-pdc-adhB); lane 3 for whole protein of *E. coli* BL21 (pET28a-pdc).

3.2 Red 重组

3.2.1 重组相关质粒的构建

通过 Overlap PCR 将 PET 操作子 (*pdc-adhB*) 连接到 P_{tac} 启动子之后, 连接到 T 载体, 受到 P_{tac} 启动子的控制。对质粒 T-*tac-pdc-adhB* 进行 PCR、和单双酶切的鉴定, 所得结果如图 3.6。PCR 片段 $P_{tac-pdc-adhB}$ 的 PCR 产物约为 3 100 bp, 大小正确。分别用 *Nde* I -*Sal* I, *Nde* I -*Xho* I 双酶切, 大小正确。

以辅助质粒 pKD4 为模板, Kan1、Kan2 为引物, PCR 克隆得到含同源臂的 *kan* 基因, 连接到质粒 pMD19-T, 得到质粒 T-*kan*, 质粒图谱见图 3.5a, 并进行 PCR 和酶切鉴定。克隆的片段为 1.7kb, PCR 和酶切结果正确。将 $P_{tac-pdc-adhB}$ 插入质粒 T-*kan* 后, 得到质粒 T-*kan-P_{tac-pdc-adhB}*, 质粒图谱见图 3.5b, 对其进行 PCR、酶切鉴定, 结果见图 3.7。

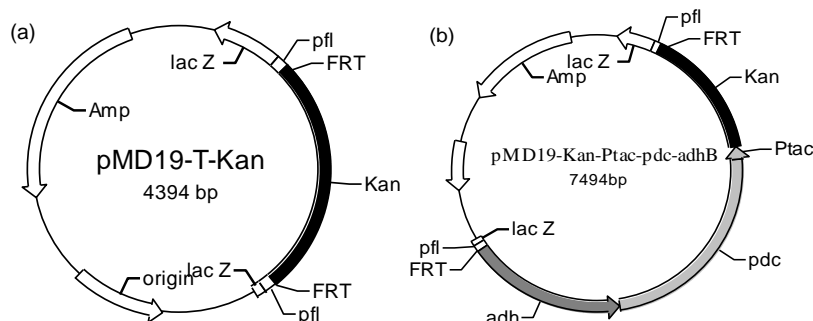


图 3.6 质粒 T-*kan* 与 T-*kan-P_{tac-pdc-adhB}* 的图谱

Fig. 3.6 Map of plasmid: (a) T-*kan*; (b) T-*kan-P_{tac-pdc-adhB}*.

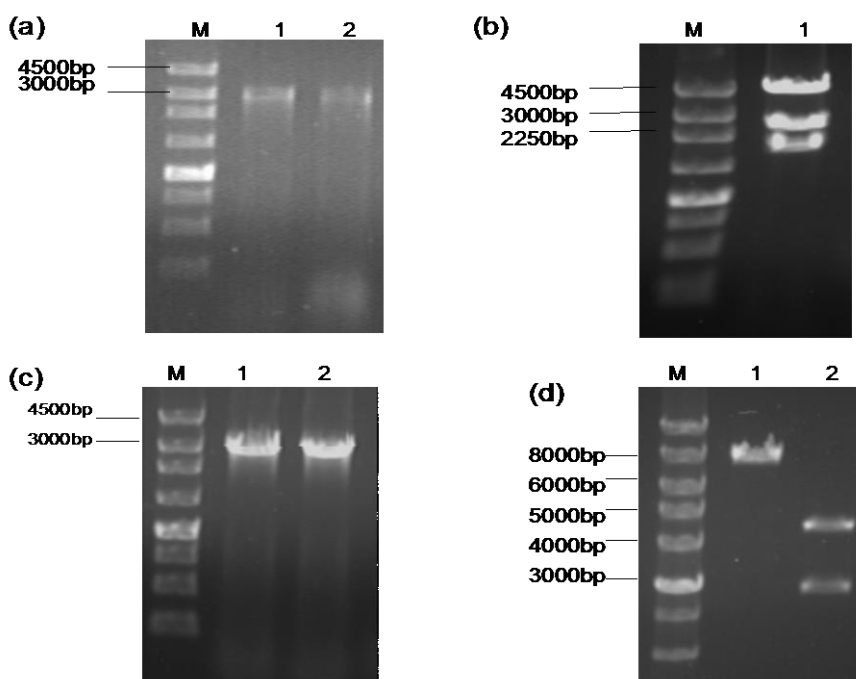


图 3.7 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 3.7 PCR and restriction analysis of recombinant plasmids. a: PCR of T- $P_{tac-pdc-adhB}$, lane 1、2 for PCR of *pdc-adhB*; b: Digestion results of plasmid T-*kan*; c: PCR of T-*kan-P_{tac-pdc-adhB}*, lane 1、2 for PCR of *pdc-adhB*; d: Digestion results of plasmid T-*kan-P_{tac-pdc-adhB}*, lane 1 for digestion with *Eco*RI, lane 2 for digestion with *Nde*I and *Xho*I.

3.3.2 Red 重组

以质粒 T-*kan-P_{tac}-pdc-adhB* 为模板 PCR 扩增片段 *kan-P_{tac}-pdc-adhB*, PCR 回收后, 经 *Dpn* I 酶处理后胶回收, 即为电转 DNA 样品。电击转化到 *E. coli* JM109, 将片段 *kan-P_{tac}-pdc-adhB* 替换并整合到 JM109 的基因组中丙酮酸甲酸裂解酶 *pflA*、*pflB* 基因的位点。抽提重组菌的基因组、质粒, 利用鉴定引物 Jd1、Jd2 和 Jd3、Jd4(鉴定引物的位置见图 2.4)进行 PCR 鉴定, 结果如图 3.8。在转化的菌株中抽提不出质粒(图 3.8 b), 并且阳性克隆能在含卡那霉素的 LB 平板上生长, 而不能在含氨苄青霉素的 LB 平板上生长, 证明辅助质粒 pKD46 已经消除。鉴定 PCR 片段大小正确(图 3.8 c), 且以基因组为模板 PCR 克隆片段 *pdc-adhB*, 结果如图 3.8 d, 大小正确, 证明目标基因整合到基因组的靶定位点, 将得到的重组菌记为 *E. coli* P8。

进一步在 *E. coli* P8 内导入辅助质粒 pCP20 消除抗性标记基因 *kan*, 得到的阳性克隆不能再含卡那霉素和氨苄青霉素的 LB 平板上生长, 只能在无抗性的 LB 中生长。抽提重组菌的基因组, 鉴定引物 Jd1、Jd2 进行 PCR 无法得到条带, 而引物 Jd3、Jd4 进行 PCR 时得到正确的条带, 证明染色体上卡那青霉素标记基因已被删除, 且辅助质粒 pCP20 也已消失, 将得到的该重组菌记为 *E. coli* P81。

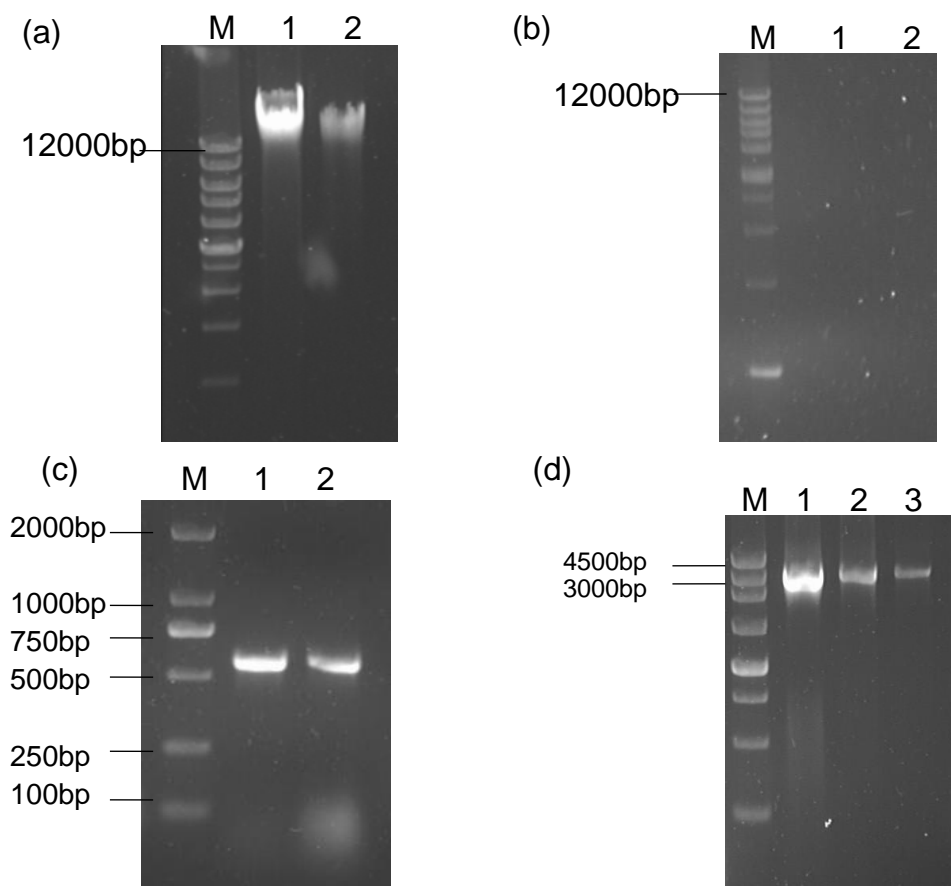


图 3.8 整合重组菌的鉴定结果

Fig. 3.8 Identification of integration of recombinant bacteria. a: the genome of *E. coli* P81; b: plasmid of *E. coli* P81; c: Identification of PCR; d: PCR of genome of *E. coli* P81, lane 1 for PCR of plasmid T-kan-*P_{tac}-pdc-adhB*, lane 2、3 for PCR of genome of *E. coli* P81.

3.4 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的构建

基因 *bglB* 的克隆：根据 NCBI 所公布的多粘芽孢杆菌 β-葡萄糖苷酶基因 (*bglB*) (Genebank Id:142581)的 CDS 序列设计引物 Bgl1、Bgl2，以多粘芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* 1.794 基因组为模板，克隆 β-葡萄糖苷酶基因 *bglB*。PCR 反应结束后，取 2 μL 样品在 0.7%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

将基因 *bglB* 连接到表达载体 pUC19，并添加启动子 *P₄₃* 和信号肽 *NprB*，构建得到质粒 pUC19-*P₄₃-NprB-bglB*，质粒图谱见图 3.9 a。并将质粒质粒 pUC19-*P₄₃-NprB-bglB* 转入重组菌 *E. coli* JM109 P81，提取质粒，进行 PCR 鉴定，并利用 *Hind* III 来进行单酶切鉴定，利用 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定，结果见图 3.9 b c。基因 *P₄₃-NprB-bglB* 的大小约为 1 500 bp，其单酶切产物为 4300bp 左右，双酶切产物为 1500bp (*P₄₃-Npr-bglB*) 和 2680bp (pUC19)，大小均正确。

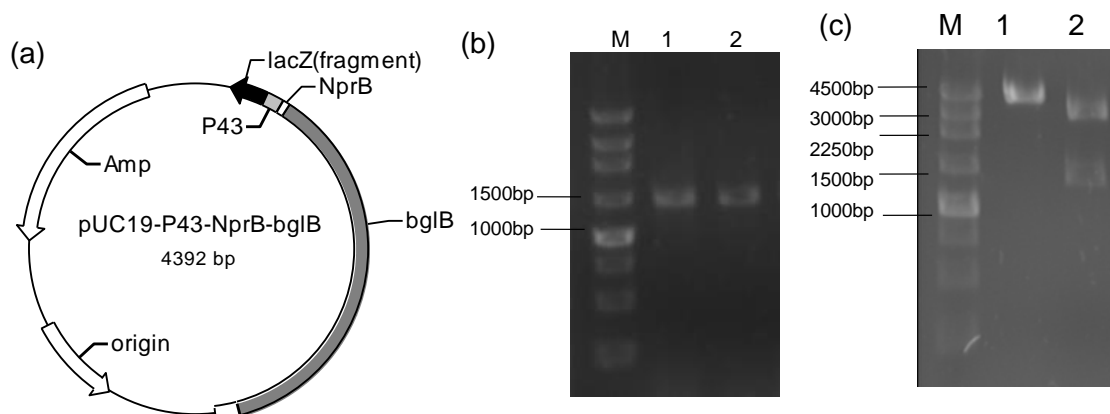


图 3.9 pUC19-*P₄₃-Nprb-bglB* 的质粒图谱和鉴定

Fig. 3.9 Plasmid map and indentification of pUC19-*P₄₃-Nprb-bglB*. a: Map of pUC19-*P₄₃-Nprb-bglB*; b: PCR of pUC19-*P₄₃-Nprb-bglB*, lane 1、2 for PCR of *bglB*; c: digestion of pUC19-*P₄₃-Nprb-bglB*, lane 1 for single enzyme with *Hind* III, lane 2 for double enzyme with *Hind* III and *Bam*H I.

3.5 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的酶活测定

3.5.1 乙醛指示平板定性检验

为了验证整合到大肠杆菌基因组上的 *pdc-adhB* 的活性，将 *E. coli* JM109(pUC19)和 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的菌落分别接种于乙醛指示平板上，37 °C 培养 24 h，结果如图 3.10 所示，重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的菌落相比对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)明显的红色，这说明重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)中的 *pdc-adhB* 得到了很好的表达。

同时观察到重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的菌落更大，这是由于 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在整合 *pdc-adhB* 的同时，敲除了丙酮酸甲酸裂解酶基因，进而敲除了

甲酸生产路径，减少了有机酸的生产。同时由于导入 *pdc-adhB* 的乙醇生产路径，并添加了强启动子 *P_{tac}*，所以对其他有机酸如乙酸等的生产的路径形成了强力的竞争，也减少了副产物有机酸的生产。所以 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)培养时的 pH 值要高于的 *E. coli* JM109(pUC19)的 pH 值，生长状况也要优于 *E. coli* JM109(pUC19)。

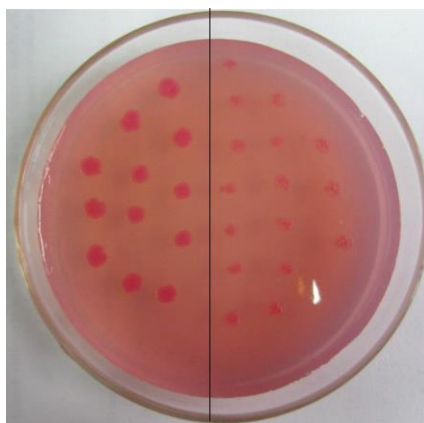


图 3.10 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的定性酶活检验

Fig. 3.10 The qualitative enzyme activity test of Recombinant bacteria *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*), strains of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) (left), strains of *E. coli* JM109(pUC19) (right).

3.5.2 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的 AdhB 酶活测定

测定重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)中 *adhB* 的酶活时，将 *E. coli* P81 JM109(pUC19)、*E. coli* P81 P81、*E. coli* P81 (pUC19)、*E. coli* P81(pUC19-*bglB*)接种于 LB 培养基中培养，分析其胞内酶活。结果见表 3.1，重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)酶活可以达到 0.58 U mg^{-1} ，对照 *E. coli* P81 P81、*E. coli* P81 (pUC19)的酶活分别为 0.5 U mg^{-1} 、 0.54 U mg^{-1} ，高于空白对照 JM109/pUC19 的酶活 0.33 U mg^{-1} 。这证明基因 *adhB* 整合到基因组后，实现了有效的表达。

表 3.1 重组菌中 AdhB 的酶活

Table 3.1 The enzyme activity of *adhB* in recombinant bacteria

菌株	酶活/ (U mg^{-1} 蛋白质)
<i>E. coli</i> JM109/pUC19	0.33
<i>E. coli</i> P81	0.5
<i>E. coli</i> P81 P81(pUC19)	0.54
<i>E. coli</i> P81(pUC19- <i>bglB</i>)	0.58

3.5.3 胞外酶活测定

重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)分别以对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)为底物对胞外糖苷酶酶活和以纤维二糖为底物对胞外纤维二糖酶活进行了测定。JM109 是本文中基因操作的原始菌株，而 *E. coli* P81 是转入乙醇途径后得到的改造菌株，为了明确重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的酶活和发酵特性，所以转入质粒 pUC19 后作为对照菌。

将对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19) 和重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中培养, 以 pNPG 为底物测定胞外 β -糖苷酶酶活, 结果如图 3.11 a 所示。重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 胞外糖苷酶酶活可以达到 82.6 mU/g protein (相应粗酶液中的总蛋白量), 远高于对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19) 的酶活 2.5 mU/g protein、14 mU/g protein。

以纤维二糖为底物测定纤维二糖酶酶活, 结果如图 3.11 b 所示, 重组菌 P81(pUC19-*bglB*) 的胞外纤维二糖酶酶活可以达到 25.8 mU/g protein, 远高于对照 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19) 的酶活 2.4 mU/g protein、7.2 mU/g protein, 表明重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 中的 *bglB* 基因得到了高效的表达, 且 β -葡萄糖苷酶分泌到了胞外。

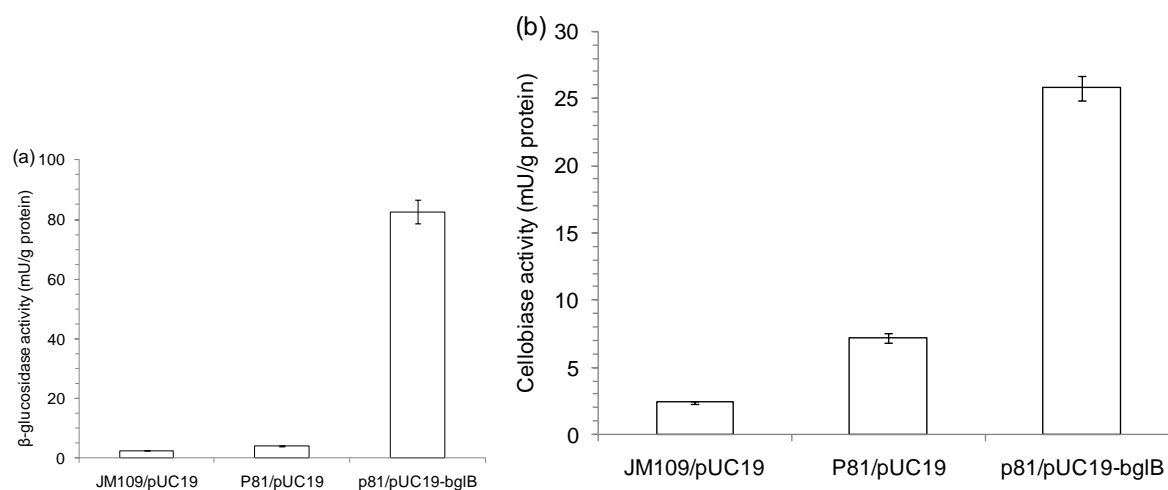


图 3.11 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 的胞外 β -糖苷酶和纤维二糖酶酶活测定

Fig. 3.11 The extracellular enzyme activity of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*). (a) The β -glucosidase activity of BGLB, (b) the cellobiase activity of BGLB. Culture conditions: 37 °C, 200 r/min. The protein in 20 mL supernatant broth were precipitated by using ammonium sulfate and redissolved in 1 mL 50 mM citric acid buffer(pH6.0) to give the crude enzyme solution. The glucosidase activities were determined using pNPG substrate at 37 °C for 10 min, the cellobiase activities were determined using cellobiose substrate at 37 °C for 1 h. Strains *E. coli* JM109(pUC19) and *E. coli* P81(pUC19) were used as control.

3.6 纤维二糖为碳源的乙醇发酵

3.6.1 以纤维二糖为唯一碳源的发酵

虽然大肠杆菌拥有催化纤维二糖的基因和转运体系, 但在大肠杆菌进化的过程中代谢纤维二糖的能力丢失了, 其中几个重要基因正常状况下处于沉睡状态, 所以大肠杆菌在正常情况下无法利用 β -糖苷纤维二糖作为碳源物质和能源物质。

为检测重组菌对纤维二糖的利用能力, 以纤维二糖为唯一碳源进行发酵实验。将

E. coli JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19-*bglB*)接种于含有 10 g/L 的纤维二糖的 M9 基础培养基中进行单一碳源发酵, 48 h 后, 结果如图 3.12 所示。对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)虽然由于种子培养基中的成分随转接进入发酵体系, 菌体量略微增长, 但由于对照菌不具备利用纤维二糖的能力, 所以无法在以纤维二糖为碳源生长。而 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)生长良好, 48 h 时 OD_{600} 增长到了 1.9, 代谢了 2.5 g/L 的纤维二糖, 但三株菌都没有乙醇生成。

将 3 株菌在显微镜下观察, 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的菌体呈正常的细长的棒状, 而对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)则呈矮短、粗壮形态。不能利用纤维二糖的对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)在以纤维二糖为唯一碳源的培养基培养时, 面临严重的生存压力, 菌株的形态开始改变, 菌体内的沉默基因会开始表达, 使其能够适应外部环境。所以这两株对照菌如果继续培养, 可能会出现快速增长, 并开始代谢纤维二糖的现象。

重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)通过分泌表达 β -葡萄糖苷酶代谢纤维二糖, 以纤维二糖为碳源, 可以正常的生长, 但没有乙醇产生, 推测可能是由于 M9 基础培养基的营养匮乏, 重组菌可以生长但不适宜于其代谢生产乙醇。

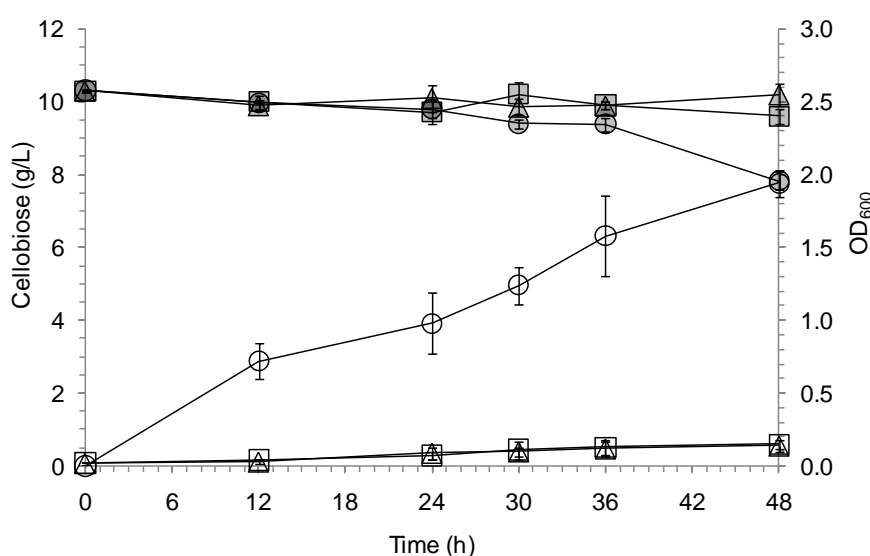


图 3.12 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)以纤维二糖为唯一碳源的发酵

Fig. 3.12 The fermentation of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) in cellobiose as a sole carbon source. Cellobiose concentration: (▲) for *E. coli* JM109(pUC19), (■) for *E. coli* P81(pUC19), (●) for *E. coli* P81(pUC19-*bglB*); Growth condition: (Δ) for *E. coli* JM109(pUC19), (□) for *E. coli* P81(pUC19), (○) for *E. coli* P81(pUC19-*bglB*). Culture conditions: 37 °C, 200 rpm. Strains *E. coli* JM109(pUC19) and *E. coli* P81(pUC19) were used as control.

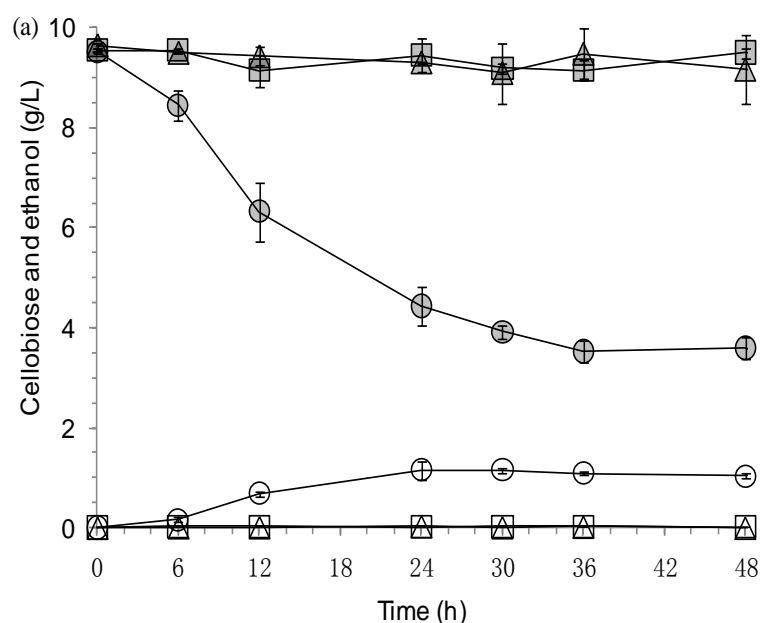
3.6.2 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)发酵纤维二糖生产乙醇

为验证重组菌是否能够利用纤维二糖生产乙醇, 在以含纤维二糖的 LB 培养基中进

行发酵实验。将重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)和两株对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)接种于到含有 10 g/L 纤维二糖的 LB 培养基中的培养,发酵 48 h 后结果见图 3.13 a。对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)可以正常生长,但纤维二糖几乎没有利用,也没有乙醇产生。*E. coli* JM109(pUC19)既没有利用纤维二糖的能力,也没有导入高效的产乙醇途径,所以可以利用 LB 培养基中的组分正常的生长,但没有明显的乙醇产生。*E. coli* P81(pUC19)虽然导入了 *pdg-adhB* 途径,但无法利用纤维二糖, LB 培养基中的成分可支持菌体的生长,而不足以生产乙醇。

而重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在发酵 48 h 后,代谢了 5.9 g/L 纤维二糖,产生 1 g/L 乙醇,达到了乙醇理论得率的 33.9%。重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在含纤维二糖的 M9 基本培养基中可以正常生长,但完成整个 CBP 过程得到乙醇需要更优的营养条件,而对照菌 *E. coli* P81(pUC19)没有乙醇生产,说明重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)是以纤维二糖为碳源生产乙醇而非 LB 中的组分。在整个发酵过程中没有检测到葡萄糖的存在,说明纤维二糖水解得到的葡萄糖迅速被重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)利用,避免了葡萄糖的大量积累,将体系中的葡萄糖浓度维持在较低水平。

重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在发酵的中后期的纤维二糖代谢减慢,因此测定重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在不同时间的胞外相对纤维二糖酶酶活,结果如图 3.13 b,在 30 h 时菌体生长量达到最大,而胞外纤维二糖酶酶活也最高,之后菌体的 OD_{600} 值开始下降,胞外的纤维二糖酶酶活也开始降低,原因可能是摇瓶培养中 *E. coli* 菌由于营养减少和发酵副产物增减,在 30 小时后逐渐失去活性。



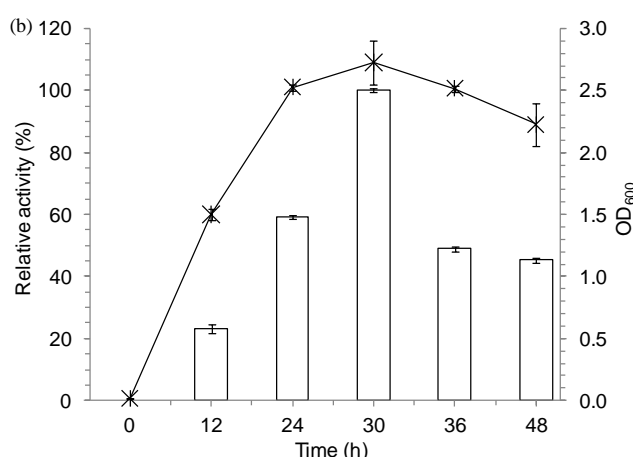


图 3.13 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)发酵纤维二糖的结果和相对胞外酶活

Fig. 3.13 The fermentation of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) in the LB medium with 10 g/L cellobiose and the relative extracellular cellobiase activity. (a) Fermentation of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) in the LB medium with 10 g/L cellobiose, cellobiose concentration: (▲) for *E. coli* JM109(pUC19), (■) for *E. coli* P81(pUC19), (●) for *E. coli* P81(pUC19-*bglB*); ethanol concentration: (Δ) for *E. coli* JM109(pUC19), (□) for *E. coli* P81(pUC19), (○) for *E. coli* P81(pUC19-*bglB*). Strains *E. coli* JM109(pUC19) and *E. coli* P81(pUC19) were used as control.(b) The relative extracellular cellobiase enzyme activity and growth condition of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) in different time: (×) for growth condition.

3.6.3 纤维二糖的浓度对发酵的影响

在有些文献中，改造后的大肠杆菌对纤维二糖表现出了较差的耐受性，在较高浓度的纤维二糖条件下其生长受到了影响，为检验重组菌对纤维二糖的耐受性，在不同浓度纤维二糖培养基中进行发酵实验。

将重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)分别在含 10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L 纤维二糖的 LB 培养基中进行发酵培养，发酵 60 h 后，结果见图 3.14。随着纤维二糖浓度的升高， OD_{600} 值也随之升高，说明重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)对高浓度的纤维二糖有着良好的耐受性。

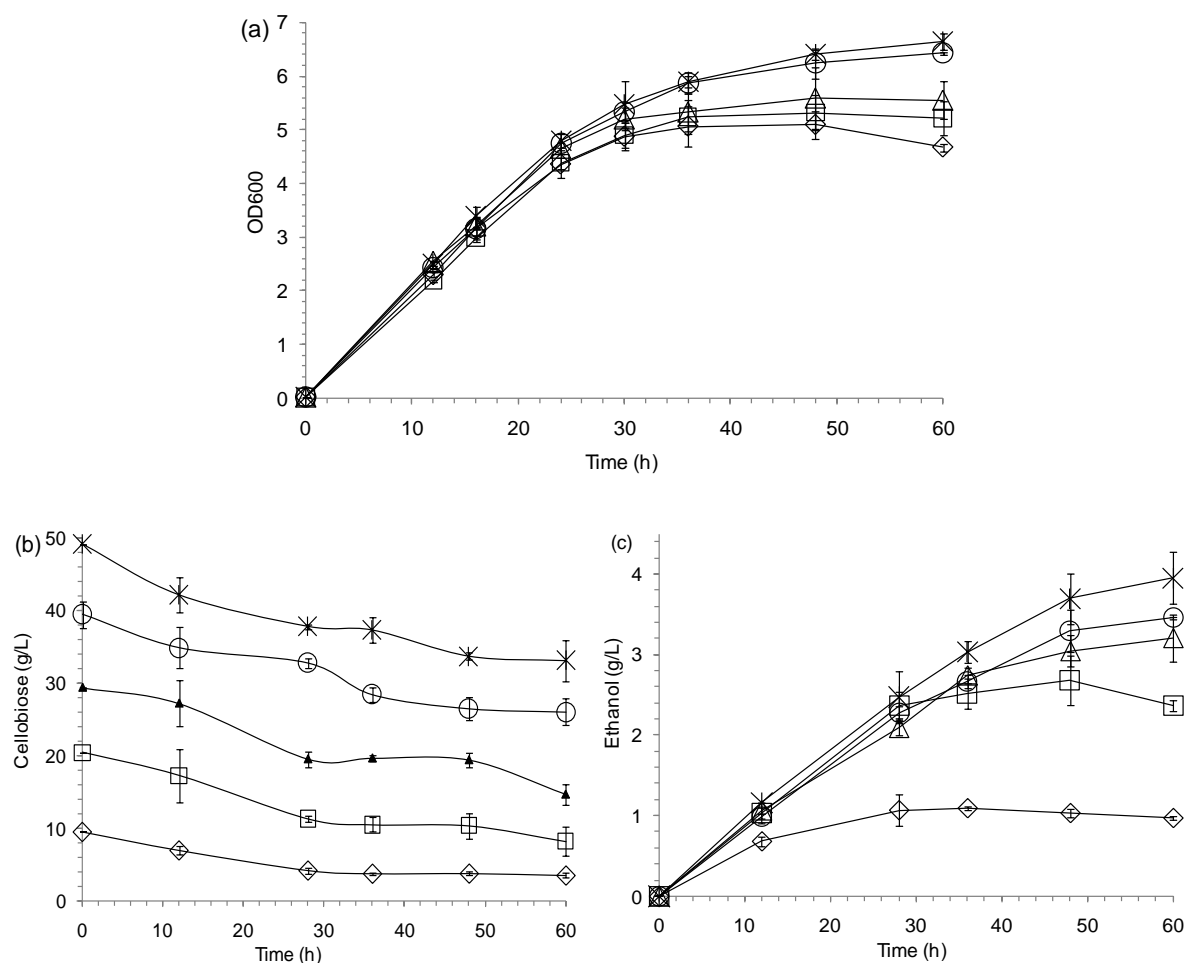


图 3.14 重组菌 *E. coli* (P81/pUC19-*bglB*) 不同浓度的纤维二糖发酵实验

Fig. 3.14 Recombinant bacteria *E. coli* (P81/pUC19-*bglB*) fermented 60 h in LB medium with different concentration of cellobiose. a: growth condition; b: cellobiose concentration; b: ethanol concentration. The symbol: (×) for 50 g/L of cellobios; (O) for 40 g/L of cellobiose; (△) for 30 g/L of cellobiose; (□) for 20 g/L of cellobiose; (◇) for 10 g/L cellobiose.

在发酵 48 h 时其乙醇产量分别达到了乙醇理论得率的 36.2%、54.5%、60.9%、50.7%、47.9%，见表 3.2。纤维二糖浓度的提高对重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 的生长没有明显的不利影响，并随着纤维二糖的浓度的提高，菌体量增加，胞外酶也在积累，纤维二糖的代谢量增加，得到的乙醇也在逐步提高。虽然 30g/L 纤维二糖时获得最高的乙醇理论得率，但考虑到残余的纤维二糖较多，所以后续仍选用 10 g/L 纤维二糖进行发酵实验。

表 3.2 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) 利用不同浓度纤维二糖发酵乙醇

Table 3.2 Fermentation of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) in LB medium with different concentration of cellobiose

Initial cellobiose (g/L)	OD_6	Cellobiose consumed (g/L)	Ethanol yield (g/L)	Yield
9.5	5.1	5.7	1.0	36.2%
20.4	5.3	8.0	2.2	54.5%

29.4	5.6	10.0	3.0	60.9%
39.5	6.2	13.0	3.3	50.7%
49.1	6.4	15.4	3.7	47.9%

Fermentation results by *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) after 48 h at 37 °C, 200 r/min.

3.6.4 葡萄糖对纤维二糖代谢的影响

为检验葡萄糖的存在对重组菌利用纤维二糖生产乙醇的影响,故进行葡萄糖和纤维二糖的共发酵实验。重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在含有 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 纤维二糖的 LB 中共发酵培养(结果如图 3.14), 12 h 时, 葡萄糖几乎利用完全, 纤维二糖只代谢了 1.8 g/L, 发酵 48 h 后残余纤维二糖的浓度为 5.9 g/L, 代谢了 4.1 g/L 纤维二糖, 产生乙醇的浓度最高为 3.4 g/L, 达到了乙醇理论得率的 45.4%。与含 10 g/L 纤维二糖的 LB 中发酵 12 h 代谢 3.2 g/L 纤维二糖这一结果相比, 共发酵 12 h 只代谢了 1.8 g/L 纤维二糖, 代谢速率下降近 44%。分析由于葡萄糖、纤维二糖共发酵时, 葡萄糖作为 β -葡萄糖苷酶催化纤维二糖的产物, 对 β -葡萄糖苷酶形成了一定程度的反馈抑制, 降低了催化效率。但菌体没有出现二次生长的现象, 葡萄糖并未对纤维二糖的利用形成葡萄糖遏制, 实现了葡萄糖和纤维二糖同步代谢。

同时实验中发现, *E. coli* P81(pUC19)和重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的生长情况要远好于对照菌 *E. coli* JM109(pUC19) (具体的数值本文中并未列出)。通过测定发酵液的 pH 值发现, 对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)的 pH 值迅速降低, 在 10 h 时降低到 4.0, 并在此后维持在此 pH 值附近, 而 *E. coli* P81(pUC19)和重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的 pH 值降低较慢, 保持在 5.0 附近, 说明敲除丙酮酸甲酸裂解酶基因, 导致酸的积累量减少, 菌体生长更好, 这一点, 在前文中的发酵实验中也有所体现, 但在本实验中最为明显, 同时也与前文中乙醛指示平板实验的结果相对应。由于本实验在摇瓶中进行, 并未控制 pH 值, 随着发酵的进行, 有机酸的积累, pH 值不断的降低, 已经超出了 β -葡萄糖苷酶催化的最适 pH 值, 所以反应体系内 pH 值也可能影响了胞外 β -葡萄糖苷酶的活性, 导致发酵后期胞外 β -葡萄糖苷酶的催化能力下降, 纤维二糖的代谢速度降低, 所以后续的实验应当考虑控制 pH 值。

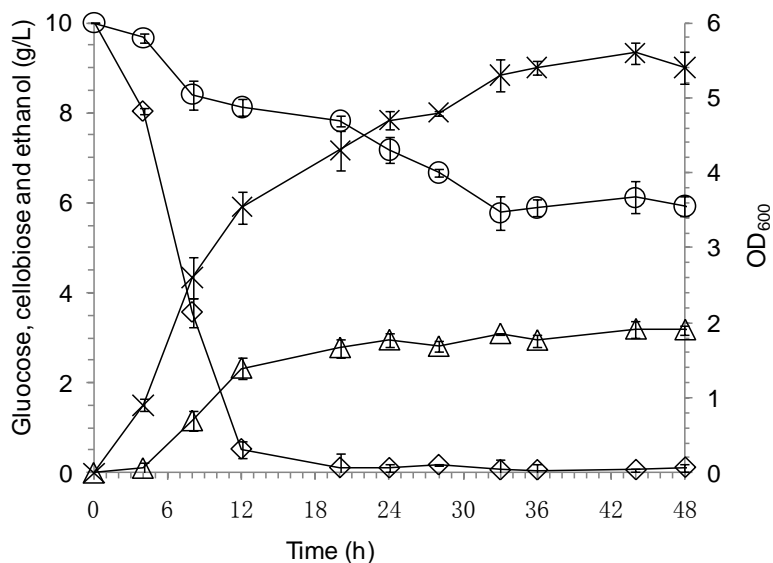


图 3.13 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的纤维二糖与葡萄糖共发酵结果

Fig. 13 Co-fermentation of *E. coli* P81(pUC19-*bglB*) in 10 g/L cellobiose and 10 g/L glucose: (x) for growth condition, (◇) for glucose concentration, (○) for cellobiose concentration, (△) for ethanol concentration.

第 4 章 讨论与展望

本文对大肠杆菌进行一系列的基因工程改造，克隆了来自运动发酵单胞菌的高效乙醇生产路径 *pdc-adhB*，并置于启动子 P_{tac} 的控制之下。启动子 P_{tac} 是一个强启动子，受到 IPTG 诱导时，能加强基因的表达，从而一定程度上消除整合到基因组上导致的拷贝数降低而引起的表达降低。通过 Red 重组将 P_{tac} -*pdc-adhB* 整合到大肠杆菌 JM109 基因组的 *pflA*、*pflB* 位点，在提高基因稳定性的同时敲除了乙醇生产的竞争路径。随即转入能够分泌表达的 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因，构建得到可代谢纤维二糖进行乙醇发酵的 CBP 重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)。

重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的胞外糖苷酶酶活可以达到 82.6 mU/g protein，胞外纤维二糖酶活可以达到 25.8 mU/g protein，远高于对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)的胞外酶活。重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在以纤维二糖为唯一碳源的 M9 中生长良好，48 h 代谢了 2.5 g/L 的纤维二糖，但没有乙醇产生。而在含 10 g/L 纤维二糖的 LB 中发酵 48 h 后，代谢了 5.9 g/L 纤维二糖，产生 1 g/L 乙醇，达到了乙醇理论得率的 33.9%。在含 30 g/L 纤维二糖的 LB 发酵 48 h 后，得到了最高的乙醇理论得率 60.9%。重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)在含有 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 纤维二糖的 LB 中进行共发酵培养，12 h 时，葡萄糖几乎利用完全，发酵 48 h 代谢了 4.1 g/L 纤维二糖，产生乙醇的浓度最高为 3.4 g/L，达到了乙醇理论得率的 45.4%。

本文中重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)的胞外糖苷酶酶活虽高于对照菌 *E. coli* JM109(pUC19)、*E. coli* P81(pUC19)，但 β -葡萄糖苷酶的胞外量确实非常低，目前尚不具备在生物炼制过程中的实用价值，但本文的目的在于测试纤维素酶分泌表达型乙醇发酵整合生物加工细胞的概念是否可以实现。因此，本文选则了蛋白分泌能力不强但容易进行基因工程操作的 *E. coli* 作为模型微生物。结果表明，即使在很低的蛋白分泌条件下（重组菌 *E. coli* P81(pUC19-*bglB*)发酵液的蛋白质含量仅为 24.4 mg/L），纤维素酶分泌表达型乙醇发酵工程菌仍然表现出了明显的整合生物加工能力，即同时进行纤维二糖的降解和乙醇发酵。

本文中由于没有在发酵时控制 pH 值，导致在发酵的后期 β -葡萄糖苷酶的活性降低，所以在后续的实验中考考虑发酵培养时控制 pH 值，并采取增加分泌的分泌的手段提高 *E. coli* 的胞外酶活，提高 β -葡萄糖苷酶的活性，增强对纤维二糖的代谢能力。此外本文中仅单独添加了三种纤维素酶中的一种，为了更高效的直接利用木质纤维素，在后续的实验研究中研究另外两种纤维素酶的分泌表达，并尝试采用具有较强分泌表达能力的微生物如枯草芽孢杆菌、酿酒酵母等微生物作为宿主菌进行工程改造，以期实现纤维素酶的高分泌表达和在生物炼制中的应用。

参考文献

- [1] 朱跃钊, 卢定强, 贾红华. 木质纤维素预处理技术研究进展. 生物加工过程. 2004, 2 (4) : 11-16.
- [2] Campbell C J, Laherrere JH, The end of cheap oil. *Scientific American*. 1998, 3: 78-83.
- [3] Kim JS, Chu PS, Kim JW, et al. Production of bioethanol from lignocellulose: Status and perspectives in Korea. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4801-4805.
- [4] Liu K, Lin XH, Yue J, et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4952 - 4958.
- [5] Singh A, Pant D, Nicholas E. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 2010 5003-5012.
- [6] Demain AL, Newcomb M, Wu JH. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005, 69(1):124-154.
- [7] Gnansounou E, Dauriat A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4980-4991.
- [8] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *SCIENCE*. 2007, 315: 803-807.
- [9] 荣波. 发展生物能源的现实意义和长远价值. 科技情报开发与经济. 2006, 19:147-148.
- [10] [Socco CR, Vandenberghe LPS, Medeiros ABP. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4820-4825.
- [11] Fang X, Shen Y, Zhao J. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4814-4819.
- [12] Liu K, Lin XH, Yue J, et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4952-4958.
- [13] [Weng YH, Wei HJ, Tsai TY, et al. Separation of furans and carboxylic acids from sugars in dilute acid rice straw hydrolyzates by nanofiltration. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4889-4894
- [14] 邹仪明. 植物纤维化学 (第二版). 北京: 中国轻工业出版社. 1995, 152-154.
- [15] 郭德宪, 曹健, 鲍宇茹. 利用生物技术降解纤维素的研究进展, 郑州工程学院学报, 2001, 22 (3) : 82-86
- [16] Cardona C.A, Quintero J.A, Paz I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4754-4766.

-
- [17] Sánchez, OJ, Cardona CA, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 2008, 99: 5270–5295.
- [18] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 506–577.
- [19] Allard G De Ruyck J, Maniatis K. An externally fired evaporative gas turbine cycle for small scale biomass CHP production. In: Chartier P *et al* (eds) *Proceedings of the 9th European Bioenergy conference*, Pergamon, Oxford. 1996
- [20] Saha BC. Alpha-L-arabinofuranosidases-biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *BIotech Adv.* 2000, 18:403-423
- [21] KW Lin, MR Ladisch, DM Schaefer, CH Noller, V. Lechtenberg, GT Tsao. Review on effect of pretreatment on digestibility of cellulosic materials. 1981.102-106
- [22] [22] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, *et al.* Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents. *Biotech. Bioeng.* 1990, 36:275-287.
- [23] Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, *et al.* Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2005, 16(5): 577–583.
- [24] Hahn-Hägerdal B, Wahlbom CF, Gardonyi M, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2001, 73: 53–84.
- [25] Bauer M W, Bylina E J, Swanson R V, *et al.* Comparison of a beta-glucosidase and a beta Mannosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*, Purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis. *The Journal of Biological Chemistry.* 1996, 271(39):23749-23755.
- [26] 宛晓春. 水果风味及风味酶的研究[D].无锡轻工大学, 1992.
- [27] Schmid G, Wandrey C. Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase (β -glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414. *Biotechnol Bioeng.* 1987, 30:571-585.
- [28] Rajoka M. Double mutants of *Cellulomonas biazotea* for production of cellulases and hemicellulases following growth on straw of a perennial grass. *World J microbial Biotechnol.* 2005, 21(6-7):1063-1066.
- [29] Baumann H, Pigman W. In the carbohydrates. New York:Academic Press. 1957, 562-564.
- [30] Mahadevan PR. Eberhart B. Glucosidase and exo-gluconases. *Archives of Biochemistry.* 1964, 108:22-29.
- [31] 王华夫,游小青. 茶叶中葡萄糖苷酶活性的测定. *中国茶叶.* 1996, 3:16-17.
- [32] Yu C. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresource Technology.* 2010, 101: 4952-4958.
- [33] 姚秀清,张全. 植物纤维原料发酵生产燃料乙醇研究进展 *可再生能源*第29卷第2期

2011, 4月

- [34] Girio FM, Fonseca C, Carneiro F, et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010,101:4775-4800.
- [35] Cardona A, Quintero JA, Paz IC. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4754-4766.
- [36] Zhang XZ, Zhang YH. One-step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant. *Eng. Life Sci*. 2010, 5: 398–406.
- [37] Y H.. Zhang P, Reviving the carbohydrate economy via multi-product biorefineries. *Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2008, 35:367–375.
- [38] Kotaka A, Bando H, Kaya M, *et al*. Direct ethanol production from barley beta-glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* beta-glucosidase and endoglucanase. *Biosci Bioeng*. 2008, 105: 622–627.
- [39] Golias H, Geoffrey JD, Grant S, *et al*. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*. 2002, 96: 155–168.
- [40] Zhou S, Ingram LO. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulase. *Biotechnol. Lett*. 2001, 23:1455-1462.
- [41] Zhang XZ, Zhang P. Industrially-safe recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis* strains for one-step ethanol production from pretreated biomass. *Division of Biochemical Technology*, 2010, 385.
- [42] 徐丽丽, 沈煜, 鲍晓明. 酿酒酵母纤维素乙醇综合加工 (CBP) 的策略及研究进展. *生物工程学报*. *Chin J Biotech*. 2010, 25: 26(7): 870–879.
- [43] Wen F, Sun J, Zhao HM. Yeast Surface Display of Trifunctional Minicellulosomes for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 1251–1260.
- [44] Sun J, Wen F, Si T, Xu JH, *et al*. Direct Conversion of Xylan to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Displaying an Engineered Minihemicellulosome. *Appl Environ Microbiol*. 2012, 78:3837-3845.
- [45] Tokuhiro K, Ishida N, Kondo A, *et al*. Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying beta-glucosidase on the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008. 9: 481-488.
- [46] Kotaka A, Bando H, Kaya M, *et al*. Direct ethanol production from barley beta-glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* beta-glucosidase and endoglucanase. *J Biosci*

- Bioeng, 2008. 105: 622-627.
- [47] Ryu S, Karim MN. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91: 529-542.
- [48] Georg A, Sprenger. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with sortie scenic routes. *FEMS Microbiol Lett*. 1996, 145:301-307.
- [49] 武志强,运动发酵单胞菌丙酮酸脱羧酶基因克隆及表达特性研究.南开大学.2004.
- [50] 张晓梅, 遗传改造*Zymomonas mobilis*代谢木糖及木糖醇产生机制的研究[D]. 山东大学, 2009.
- [51] Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B, *et al*. Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J Gen Microbiol*. 1989, 135:893-902.
- [52] Okamoto T, Yamano S, Ikeaga H, *et al*. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994, **42**(4): 563-568.
- [53] 洪浩舟,马瑞强,张颖,等. 产乙醇重组大肠杆菌的研究进展.中国农业科技导报. 2009,11(4):29-33.
- [54] Ohta K, Beall DS, Mejia JP, *et al*. Genetic Improvement of *Escherichia coli* for Ethanol Production:Chromosomal Integration of *Zymomonas mobilis* Genes Encoding Pyruvate Decarboxylase and Alcohol Dehydrogenase II . *Appl Environ Microbiol*. 1991, 57:893-900.
- [55] Ingram LO, Conway T, Clark DP, *et al*. Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental microbiology*. 1987, 10:2420-2425.
- [56] Yomano LP, York SW, Zhou S, *et al*. Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnol*. 2008, 30:2097-2103.
- [57] Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT. Construction of an *Escherichia coli* K-12 Mutant for Homoethanogenic Fermentation of Glucose or Xylose without Foreign Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(6):1766-1773.
- [58] Kim Y, Ingram L O, Shanmugam KT. Construction of an *Escherichia coli* K-12 Mutant for Homoethanogenic Fermentation of Glucose or Xylose without Foreign Genes. *Appl. Environ. Microbiol*. 2007, 1766-1771.
- [59] Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT. Construction of an *Escherichia coli* K-12 Mutant for Homoethanogenic Fermentation of Glucose or Xylose without Foreign Genes. *Appl. Environ. Microbiol*. 2007, 73(6): 1766-1771.
- [60] 刘康美, 杨晓慧, 苏毅严. 希夫试剂配制方法的探讨. 西安联合大学学报, 2004, 7(5): 50-52.

- [61] Kirill AD ,Barry LW. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [62] Peter PC, Wilfried W. Gene disruption in *Escherichia coli*:Tc^R and Km^R cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene, 1995, 158: 9-14.
- [63] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 89-93.
- [64] Wang Z, Chen M, Xu Y. An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis* *pdc* and *adhB* genes for enhanced ethanol production from xylose. Biotechnology, 2008, 30: 657-663.
- [65] 王远. 耐热内切葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及其在枯草芽孢杆菌系统中的共表达[D], 华东理工大学, 2012.
- [66] Gonzalez-candelas L, Aristoy M.C, Polaina J, et al. Cloning and Characterization of Two Genes from *Bacillus polymyxa* Expressing β -Glucosidase Activity in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(12): 3173-3177.
- [67] Wang Z, Chen M, Xu Y. An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis* *pdc* and *adhB* genes for enhanced ethanol production from xylose. Biotechnology, 2008, 30: 657-663.

致谢

本论文是在导师鲍杰教授的辛勤指导下完成的，他在学术上严谨求实，工作上兢兢业业，为我的实验和论文付出了很多心血。在此向鲍老师表达我真挚的谢意！

感谢高秋强老师和罗紫臣师兄对我实验和生活方面的帮助。

感谢王远师姐、涂毅、王霞等同学的帮助，没有他们对实验的付出，没有我们的共同协作和努力，我的工作就不可能有快速的进展！相信这段紧张却又快乐的研究经历会给我们每个人留下美好的回忆。

同时特别感谢我的父母对我的养育之恩，以及一直以来对我的鼓励和帮助，使我顺利完成学业。

最后还要向所有关心我的老师、同学、亲戚、朋友表示衷心的感谢！