

新型产乙醇重组菌利用葡萄糖和木糖的乙醇发酵*

孙金凤¹, 王正祥²

1(淮阴工学院, 生命科学与化学工程学院, 江苏淮安, 223001) 2(江南大学, 生物工程学院, 江苏无锡, 214036)

摘要 对构建得到的新型产乙醇重组菌 JM109(pEtac-PA)、947(pEtac-PA) 利用不同浓度葡萄糖或木糖的乙醇发酵进行了初步研究。结果表明, 重组菌的乙醇发酵受到发酵碳源的类型、发酵液中糖浓度、发酵培养基的装液量、发酵液的 pH 值、重组菌的宿主类型等多种因素的影响。以野生型菌株 *E. coli* 947 为宿主的重组菌 947(pEtac-PA) 发酵产乙醇的能力和乙醇得率均高于 JM109(pEtac-PA), 尤其是在装液量加大、高浓度糖发酵以及利用木糖发酵时更加明显。

关键词 产乙醇重组菌, 乙醇发酵, 葡萄糖, 木糖

从 2001 年起我国开始进行乙醇汽油推广使用计划试点, 并已获得初步成功。2006 年 5 月, 国家发改委计划在原有的 9 个试点省基础上, 将北京、上海、天津等中心城市纳入下一步推广范围。若以全国汽油年消费量 5 000 万 t 计算, 按照我国的国家标准, 乙醇汽油中燃料乙醇占 10%, 则需燃料乙醇 500 万 t (而实际上 2005 年我国的石油消费已经达到 3.2 亿 t), 要消化粮食 1 000 多万 t。有不少专家担心, 如果大规模用粮食生产燃料乙醇, 可能会影响我国粮食安全。

因此大规模的燃料乙醇生产要求开发丰富廉价的替代性原料, 自然界中最丰富的碳水化合物木质纤维素便是一种很好的替代性资源。利用木质纤维素原料生产乙醇实现商业化的主要技术难题在于开发合适的菌种。传统的乙醇发酵工业所采用的酵母菌和运动发酵单胞菌都不能发酵木糖或阿拉伯糖。自然界的一些细菌虽能发酵五碳糖, 但是其发酵产物中乙醇仅占很小的比例。人们通过代谢工程的手段构建能发酵六碳糖和五碳糖的产乙醇优良重组菌, 使之能够发酵葡萄糖、木糖或者阿拉伯糖产生酒精^[1]。

利用前期研究中构建得到的重组质粒 pEtac-PA^[3] 转化 *Escherichia coli* JM109 及前期研究中筛选得到的野生型菌株 *E. coli* 947^[3] 得到新型产乙醇重组菌 JM109(pEtac-PA)、947(pEtac-PA), 本文对重组菌的乙醇发酵进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

第一作者: 硕士, 副教授。

*教育部骨干教师资助项目 (No. 1696)

收稿日期: 2006-10-18

1.1.1 菌株与质粒

重组质粒 pEtac-PA、*E. coli* JM109、野生型菌株 *E. coli* 947^[3] 由江南大学生物技术重点实验室保存。以重组质粒 pEtac-PA 转化 *E. coli* JM109 及野生型菌株 *E. coli* 947, 在含有卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上筛选阳性转化子 (实验操作参照文献^[4] 进行), 得到重组菌 JM109(pEtac-PA)、947(pEtac-PA)。

1.1.2 培养基

发酵培养基采用含有不同浓度葡萄糖、木糖或葡萄糖和木糖混合糖的 LB 培养基 (重组菌的培养基中添加 Kan, 终浓度为 50 μg/mL)^[4], pH7.0 左右。培养基中添加 CaCO₃ 时, 添加的质量浓度为 0.5%。

1.2 方法

1.2.1 乙醇发酵试验

1.2.1.1 三角瓶发酵

250 mL 三角瓶中装液量分别为 20、100 mL。挑取相应菌株的单菌落接种于 LB 培养基中 (重组菌的培养基中添加 Kan), 37℃, 200 r/min 振荡培养过夜作为种子液, 接种量为 2%。接种后, 37℃、200 r/min 振荡培养过夜, 然后静止发酵。采用 IPTG 诱导时, IPTG 添加量为 100 μg/mL, 在振荡培养后期加入, 诱导 2 h。

1.2.1.2 5 L 发酵罐发酵

采用 KF-5 L 发酵罐 (韩国发酵株式会社) 对重组菌 947-(pEtac-PA) 的乙醇发酵进行初步放大试验, 培养基装液量为 3 L, 接种量为 2%, 添加 0.5% CaCO₃, 发酵温度 37℃。接种后先通无菌空气并搅拌 (转速为 460 r/min) 以增加溶氧便于菌体的大量增殖, 然后停止通气搅拌, 静止发酵。

1.2.2 乙醇含量测定

采用气相色谱法 (1490 气相色谱仪, 安捷伦科技

上海分析仪器有限公司)测定,色谱参数为:进样温度 200℃,检测温度 200℃,柱温 140℃。2 m 不锈钢柱(内径 3 mm),采用沪产 401 白色有机担体。载气(N_2)压力 0.2 MPa, H_2 压力 0.10 MPa, 空气 0.2 MPa。

1.2.3 pH 值测定

采用 320-S pH 计(METTLER TOLEDO 公司)测定。

1.2.4 糖浓度测定

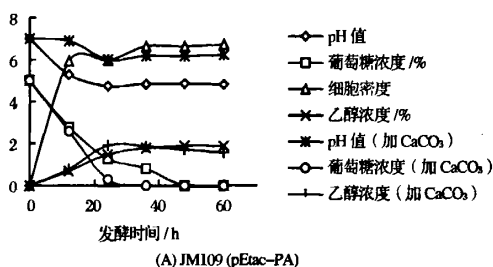
葡萄糖浓度测定采用 SBA 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)测定。木糖浓度测定采用苕黑酚法^[6]。

1.2.5 细胞密度测定

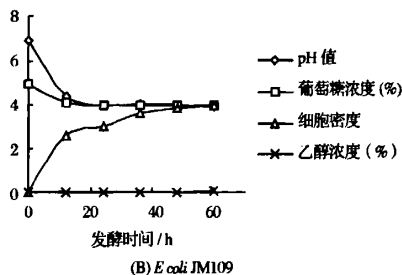
在 600 nm 波长下进行光电比浊测定,用吸光度值 OD_{600nm} 大小表示细胞密度的高低^[6]。

2 结果与分析

2.1 重组菌 JM109(pEtac-PA)利用葡萄糖和木糖



(A) JM109(pEtac-PA)



(B) *E. coli* JM109

图1 重组菌 JM109(pEtac-PA)及其宿主菌 *E. coli* JM109 乙醇发酵过程

乙醇浓度、pH 值、葡萄糖浓度及细胞密度(以 OD_{600nm} 表示)的变化

宿主菌 *E. coli* JM109 发酵 5% 葡萄糖仅能产生极微量的乙醇(0.04%, 乙醇浓度为体积分数, 下同), 如图 1B; 而重组菌 JM109(pEtac-PA)发酵 5% 葡萄糖 48 h 达到最大乙醇产率, 为 1.89%, 显著高于其宿主菌, 证明该重组菌中成功引入了乙醇生物合成途径。若在发酵液中添加 $CaCO_3$, 重组菌发酵 24 h 左右即可达到最大乙醇产率 1.92%, 为理论转化率(1 g 葡萄糖可产生 0.51 g 乙醇)的 59.5%。 $CaCO_3$ 的添加使得发酵时间显著缩短, 可能是由于加入的 $CaCO_3$ 部分中和了发酵产生的酸, 使得发酵液 pH 值相对稳定, 对菌体生长有利, 菌体浓度高, 则产乙醇能力大。

对照乙醇发酵过程菌体浓度、乙醇产率、pH 值及残糖的变化可以发现, JM109(pEtac-PA)比其宿主菌 *E. coli* JM109 的最终菌体浓度大, 残糖低, pH 值

的乙醇发酵

2.1.1 装液量为 20mL 时, 重组菌 JM109(pEtac-PA)利用 5% 葡萄糖的乙醇发酵

同样条件下对重组菌 JM109(pEtac-PA)及其宿主菌 *E. coli* JM109(作为对照)的乙醇发酵进行了研究。如图 1 所示, 重组菌 JM109(pEtac-PA)的耗糖主要发生在发酵前期的 24~36 h, 耗糖的同时伴随着乙醇产量的增加。发酵初期菌体大量增殖, 重组菌 JM109(pEtac-PA)最终达到的菌体浓度($OD_{600nm} = 6.734$)明显大于宿主菌 *E. coli* JM109($OD_{600nm} = 4.0$)。发酵前期发酵液的 pH 值显著下降, 到发酵后期基本保持稳定, 说明酸的产生集中在发酵前期, 可能是由于发酵初期菌体大量生长增殖, 需要消耗大量氧气, 造成供氧不足, 糖代谢的产物中就会有较多酸产生^[7]。在发酵液中添加 $CaCO_3$ 可以部分中和发酵过程产生的酸, 维持发酵液较高的 pH 值(始终在 pH6 以上)(图 1A)。

下降较小, 乙醇产率高。

2.1.2 装液量为 20mL 时, JM109(pEtac-PA)利用 5% 木糖的乙醇发酵

为了确定重组菌 JM109(pEtac-PA)的乙醇发酵是否受到 IPTG 诱导作用的影响, 在进行 5% 木糖的乙醇发酵试验时对于 IPTG 诱导和不诱导条件下的乙醇发酵结果进行了比较。添加 IPTG 诱导时, JM109(pEtac-PA)利用 5% 木糖发酵 36 h 达到最大乙醇产率(仅为 0.35%), 残留的木糖为 3.25%; 而同样条件下不加诱导物 IPTG 时, 发酵 36 h 达到最大乙醇产率为 1.78%, 为理论产率的 55.2%。结果表明, 添加 IPTG 诱导 *pdh*、*adhB* 基因的表达, 乙醇产率反而较低。这一结果进一步说明了 *pdh*、*adhB* 基因的表达量太高反而不利于乙醇的产生, 与以前的研究结果一致^[2]。因此在进一步的发酵试验中不添加

IPTG 诱导。

2.1.3 装液量为 100 mL 时, JM109(pEtac-PA) 利用葡萄糖和木糖的乙醇发酵

装液量为 100 mL 时, JM109(pEtac-PA) 发酵 5% 葡萄糖 48 h 达到最大乙醇产率(为 0.825%), 残糖 2.9%。发酵 5% 木糖 48 h 时达到最大乙醇产率(为 0.7%), 残糖为 3.12%。利用 5% 葡萄糖和 5% 木糖的混合糖发酵 48 h 达到最大乙醇产率为 0.764%, 残留的葡萄糖和木糖分别为 3% 和 4.44%。发酵 10% 葡萄糖, 36 h 时乙醇产率仅为 0.918%, 残糖为 7.65%; 发酵 48 h 时残糖仍高达 7.35%。

由以上结果可以看出, 利用葡萄糖和木糖混合糖的乙醇发酵过程中重组菌优先利用了混合糖中的葡萄糖。有资料报道, 戊糖发酵微生物会优先利用己糖和戊糖混合物中的己糖, 因此如果发酵时间不足, 则戊糖会有残留。试验结果与资料报道一致^[8]。在装液量加大为 100 mL 时乙醇产率降低, 残糖较高, 这可能是由于装液量加大后溶氧效果差, 导致菌体量不足而影响乙醇的产率。此外, 发酵培养基的糖浓度升高, 发酵产乙醇的产率降低, 残糖高, 这可能是由于细菌耐受高渗透压环境的能力比传统的酒精发酵酵母弱, 高浓度糖所造成的高渗透压环境对细菌的生长不利^[9]。

2.2 重组菌 947(pEtac-PA) 的乙醇发酵

2.2.1 装液量为 20 mL 时, 947(pEtac-PA) 利用葡萄糖和木糖的乙醇发酵

如图 2 所示, 培养基中不加 CaCO_3 时, 947(pEtac-PA) 利用 5% 葡萄糖发酵 36 h 达到最大乙醇产率 1.86%, 而添加 CaCO_3 时发酵 24 h 达到最大乙醇产率 1.96% (图 2A)。添加 CaCO_3 时 947(pEtac-PA) 发酵 5% 木糖 24 h 达到最大乙醇产率 2.21%, 而不加 CaCO_3 时发酵 36 h 仅产生 1.91% 乙醇(图 2B)。这一结果进一步说明, 在发酵培养基中添加 CaCO_3 可以显著缩短发酵时间。同时也说明了发酵液 pH 值的降低对乙醇发酵有很大影响。因此在进一步的乙醇发酵试验中, 发酵培养基中均添加 CaCO_3 。在同样条件下, 宿主菌 *E. coli* 947 分别利用 5% 葡萄糖和 5% 木糖的乙醇发酵结果显示, *E. coli* 947 只能产生极微量乙醇(分别为 0.02% 和 0.46%), 说明重组菌 947(pEtac-PA) 中乙醇生物合成途径成功引入。

947(pEtac-PA) 发酵 5% 葡萄糖和 5% 木糖的混合糖 36 h 达到最大乙醇产率 2.76%, 残留葡萄糖

0.21%, 残留木糖 3.21% (图 2C)。发酵 10% 葡萄糖 36 h 达到最大乙醇产率 3.4%, 残糖为 1.6% (图 2D)。结果同样表明, 乙醇发酵时重组菌优先利用了混合糖中的葡萄糖。

2.2.2 装液量为 100 mL 时, 947(pEtac-PA) 利用葡萄糖和木糖的酒精发酵

装液量为 100 mL 时, 947(pEtac-PA) 利用 5% 葡萄糖发酵 36 h 达到最大乙醇产率 2.83%, 残糖为 0.22%。发酵 5% 木糖 36 h 达到最大乙醇产率为 2.22%, 残糖为 0.6%。发酵 5% 葡萄糖和 5% 木糖的混合糖 36 h 达到最大乙醇产率为 2.43%, 残留的葡萄糖和木糖分别为 0.83%、4.15%。发酵 10% 葡萄糖 48 h 达到最大乙醇产率为 3.12%, 残糖为 3.7%。结果表明, 装液量加大时 947(pEtac-PA) 的乙醇发酵结果与装液量为 20 mL 时差别不太大。乙醇发酵结果均好于同样条件下 JM109(pEtac-PA) 的乙醇发酵。这可能是由于野生型菌株生长速度快, 可以达到较大的菌体浓度。另外, 发酵培养基中糖浓度升高时, 残糖也较高, 乙醇得率降低, 说明由野生型宿主菌构建得到的产乙醇重组菌的乙醇发酵同样受到高浓度糖的抑制。

2.2.3 重组菌 947(pEtac-PA) 的乙醇发酵初步放大试验

采用 5 L 发酵罐对重组菌 947(pEtac-PA) 的乙醇发酵进行初步放大试验。结果表明, 947(pEtac-PA) 发酵 5% 葡萄糖达到最大乙醇产率(2.07%)。发酵 10% 葡萄糖 48 h 产生 2.8% 乙醇。发酵 5% 木糖 48 h 产生 1.22% 乙醇。发酵 5% 葡萄糖和 5% 木糖的混合糖 48 h 产生 2.15% 乙醇。5 L 罐乙醇发酵初步放大试验的结果表明, 947(pEtac-PA) 的乙醇产率比三角瓶发酵有所降低。可能是由于根据三角瓶发酵而确定的初步放大试验的发酵条件并不适用于发酵罐试验, 如溶氧可能不足, 导致菌体浓度低, 且发酵副产物增多等等。

3 讨论

研究结果表明, 引入 *pdc*、*adhB* 基因的重组菌 JM109(pEtac-PA) 能够有效利用葡萄糖发酵产生乙醇, 发酵 5% 葡萄糖 36 h 可产生 1.8% 乙醇, 而宿主菌 *E. coli* JM109 发酵葡萄糖仅能产生极微量的乙醇。同样条件下, 野生型宿主菌 *E. coli* 947 仅能产生极微量的乙醇, 而重组菌 947(pEtac-PA) 可以有效利用葡萄糖、木糖发酵产生乙醇, 证明乙醇生物合成途径

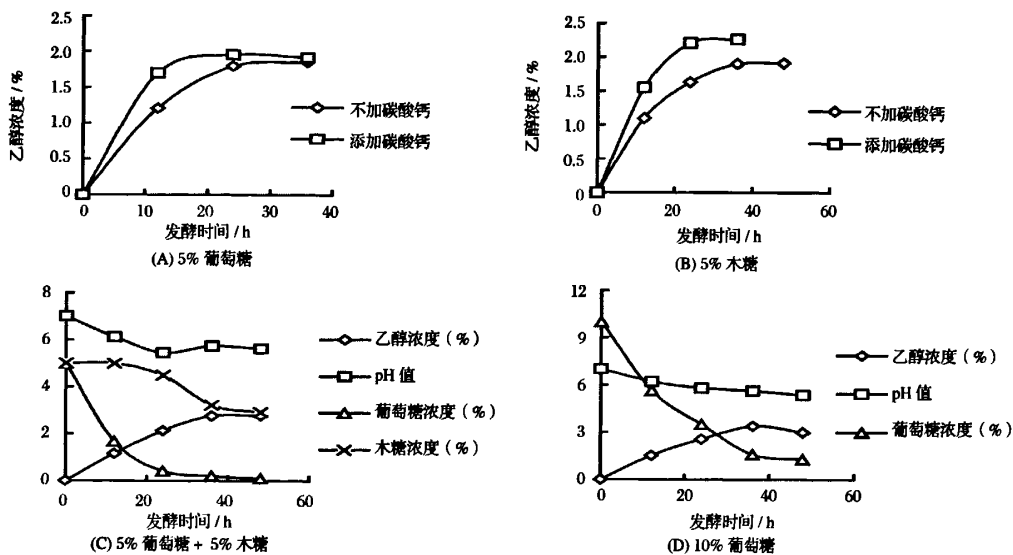


图2 重组菌 947(pEtac-PA)利用葡萄糖和木糖的乙醇发酵结果

在宿主菌 *E. coli* JM109、947 中成功引入^[2]。

根据本研究结果,乙醇发酵过程中发酵培养基的装液量、发酵碳源的类型、发酵培养基中糖浓度、发酵培养基的 pH 值、重组菌的宿主类型等因素均对乙醇产率具有一定影响。发酵过程中发酵液 pH 值的降低对于乙醇产率影响显著。在发酵液中添加 CaCO₃, 可以部分中和发酵产生的酸,维持发酵液的 pH 值相对稳定,有利于菌体生长,因而可以显著缩短发酵时间。在装液量加大时乙醇产率降低。同样装液量时,糖浓度提高,乙醇产率降低。发酵液 pH 值的降低、装液量加大(溶氧效果较差)、糖浓度提高(渗透压增大)最终都使得乙醇产率降低,原因可能是这些因素都会影响菌体的生长,导致菌体浓度降低。以野生型菌株 *E. coli* 947 为宿主的重组菌 947(pEtac-PA)发酵产乙醇的能力要高于以 *E. coli* JM109 为宿主的 JM109(pEtac-PA),尤其是在装液量加大、高浓度糖发酵、以及利用木糖发酵时更明显。这可能是由于野生型菌株生长速度较快,可以达到较大的菌体浓度,从而乙醇产率高。无论是重组菌 JM109(pEtac-PA)或 947(pEtac-PA)利用葡萄糖和木糖的混合糖进行发酵时,菌株均优先利用其中的葡萄糖,与资料报道一致^[8]。

重组菌 947(pEtac-PA)的 5L 发酵罐乙醇发酵初步放大试验结果要逊色于三角瓶发酵。三角瓶发酵时(装液量为 100mL),947(pEtac-PA)发酵 5% 葡萄糖最大乙醇产率为 2.83%。而上罐发酵时,947(pEtac-PA)发酵 5% 葡萄糖的最大乙醇产率为

2.07%。资料表明,合理的发酵工艺控制可以给微生物提供良好的环境,提高目标产品的生产水平,同时减少不需要的特别是有害的代谢副产物的积累。基因工程菌在构建时,通常都是采用摇瓶培养的方法比较其生产能力,这样得到的培养工艺一般并不直接适用于发酵罐,而且摇瓶的操作方式和提供的培养环境与发酵罐有很大的差别。因此对基因重组菌进行深入的发醇特性研究,对发酵过程加以优化,可以充分发挥其生产能力^[10]。因此对本研究中采用的新型产乙醇重组菌的乙醇发酵工艺参数进行优化,有望进一步提高其乙醇产率。

参 考 文 献

- 1 孙金凤,诸葛健,王正祥. 重组肠道细菌作为产乙醇生物催化剂的研究进展[J]. 工业微生物,2004,34(3): 44~48
- 2 孙金凤,徐敏,张峰,等. 利用木糖和葡萄糖合成乙醇的新型重组大肠杆菌的研究[J]. 微生物学报,2004,44(5): 600~604
- 3 孙金凤,诸葛健,王正祥. 有效利用木糖的肠道细菌的筛选,无锡轻工大学学报[J]. 2003,22(1): 21~24
- 4 (美) 萨姆布鲁克 J., 拉塞尔 著 D W., 黄培堂等译,分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社,2002. 96~99,1599
- 5 宁正祥主编. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社,1998. 21
- 6 沈萍,范秀容,李广武主编. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社,1999. 97~99
- 7 Ingram L O, Conway T. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recom-

- binant strains of *Escherichia coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(2): 397~404
- 8 Olsson L, Hahn-H Gerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production[J]. Enzyme and Microbial Technol, 1996, 18: 312~331
- 9 沈萍主编. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 80~81
- 10 李育阳主编. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 215

Ethanol Production of Novel Ethanologenic Recombinant Enteric Bacteria from Glucose and Xylose

Sun Jinfeng¹, Wang Zhengxiang²

1(School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223001, China)

2(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT In this article, ethanol production of recombinants *E. coli* JM109(pEtag-PA) and *E. coli* 947(pEtag-PA) at different concentrations of glucose and xylose or mixture of glucose and xylose was studied. Results indicated that *E. coli* 947(pEtag-PA) was efficient for ethanol fermentation from glucose and xylose. Fermentation was completed in 36h and the maximum ethanol yield were 87.4% and 68.7% of the theoretical, respectively, which were both much better than that of *E. coli* JM109(pEtag-PA). Ethanol production of the recombinants was influenced by various factors such as carbon source, sugar concentration, pH value, host type of the recombinants, etc.

Key words ethanologenic recombinants, ethanol fermentation, glucose, xylose

会
讯

2009年iba国际烘焙、糖果、巧克力及糕点博览会北京新闻发布会召开

2008年5月13日,2009年iba国际烘焙、糖果、巧克力及糕点博览会北京新闻发布会在北京皇家大饭店举行。德国联邦烘焙业联合会(ZVB)主席 Peter Becker 先生、德国联邦烘焙业联合会(ZVB)董事总经理 Eberhard Groebel 博士、德国手工业博览会公司(GHM)董事会主席 Mr. Reisbeck 先生分别致辞。

iba 是国际领先的烘焙、糖果及咖啡食品业贸易展会。60年来,3年一届的 iba 一直不断拓展其领导地位。上届于2006年iba在慕尼黑举行,期间共吸引来自144个国家的80 000名观众及1 000家来自世界各地的参展商。Iba 2009将于2009年10月3~10日在杜塞尔多夫举行。

iba 展品范围:从零部件到成套生产线等各类最新设备、机械于设施;冷藏、发酵与空调最新技术;各类原材料;IT硬件与软件;卫生设备与产品;零食小吃;咖啡相关设备与产品;资格认证相关产品与服务。iba致力服务所有规模的企业。它不仅适合工业级生产企业,各类中小型企业也能从中获取许多的发展助益。如有要求,iba可考虑合作举办相关展期特别活动。iba 2009将在展览同期举办一系列研讨交流活动,其中包括研讨论坛、iba Cup、德国烘焙学会研讨会和杜塞尔多夫地区烘焙厂考察。

作为iba 2009的主办机构,德国联邦烘焙业联合会(Central Association of German Bakers)将举办主题广泛的教育活动,向来自世界各地的观众介绍烘焙技术、质量管理及市场推广等各方面的发展现状,致力提升业界经营水平。

为满足旺盛的海外需求,德国联邦烘焙业联合会在德国烘焙业学院下设了国际烘焙学院(IBA)。IBA将为个别学员团体提供具有直接针对性的研讨培训课程,并通过专业翻译确保德国烘焙专业技术的准确传达。这些培训项目并非只面向世界各地烘焙与糖果行业的协会、组织和技术学院,同时还可为企业的合资格员工提供针对性的服务。而且,在达成适当协议的情况下,国际烘焙学院(IBA)专家还可在其国家举办这类研讨培训活动。学员在完成培训课程后可获得学院颁发的资格证书(参见www.akademie-baeckerhandwerk.de)。欲进一步了解以上提到的教育培训课程,请光临在iba 2009的“Zentralverband des Deutschen Baeckerhandwerks”展位。