

# 合成乙醇重组乳杆菌的研究\*

夏子芳 王正祥\*\*

(工业生物技术教育部重点实验室和江南大学生物工程学院 无锡 214122)

**摘要:**将含有 *Zymomonas mobilis* 乙醇合成途径的关键酶基因的片段 *P<sub>tac</sub>-pdc* 和 *P<sub>tac</sub>-adhB*, 分别/同时接入 pHY300PLK 以及 pBBR1MCS-5 载体中, 得到了 pHY-PA、pBBR-PA 等重组质粒, 分别转化入几株乳杆菌。在 42℃ 下进行乙醇发酵试验, 结果表明, 在 *Lactobacillus plantarum* CICIM B0080 中同时引入基因 *pdc*、*adhB* 有效地将碳代谢流导向了产乙醇方向, 重组菌 B0080 (pHY-PA) 发酵 6.7% 葡萄糖 60h 分别产生 0.4% (V/V) 乙醇, 为原始菌 B0080 的 67 倍, 而将 *pdc*、*adhB* 基因同时引入 *L. amylovorus* B0112 和 *L. acidophilus* B0068, 能检测到相当于原始菌 2 倍的乙醇产出。在重组菌发酵过程中, 仍有大量的乳酸产出, 在引入产乙醇基因的同时敲除乳酸脱氢酶基因, 将有可能使乳杆菌的代谢流向更有效地转向产乙醇途径。

**关键词:** 乳杆菌, 乙醇, *P<sub>tac</sub>-pdc*, *P<sub>tac</sub>-adhB*

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2007)05-0934-05

## Recombinant *Lactobacilli* for Ethanol Production\*

XIA Zi-Fang WANG Zheng-Xiang\*\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Wuxi 214122)

**Abstract:** Recombinant plasmids pHY-PA, pBBR-PA were constructed in which genes *pdc* and *adhB* were placed under the control of *tac* promoter, respectively, and had successfully expressed in *Escherichia coli*. Then these recombinant plasmids were electroporated into *Lactobacillus* strains for ethanol production. Preliminary ethanol fermentation using these *Lactobacillus* strains and their recombinants was carried out using 42℃ as fermentation temperature. The results indicated that introducing *pdc* and *adhB*, ethanologenic pathway was successfully constructed in *L. plantarum* CICIM B0080. 0.4% (V/V) ethanol was detected at the end of fermentation with 6.7% glucose, and that is 67-fold as the wild-type B0080. Two-fold of ethanol production was detected in *L. amylovorus* B0112 (pHY-PA) and *L. acidophilus* B0068 (pBBR-PA). Introducing both *pdc* and *adhB*, and meanwhile knock-outing the lactate dehydrogenase gene may better convert carbon flux to ethanologenic direction.

**Key words:** *Lactobacillus*, Ethanol, *P<sub>tac</sub>-pdc*, *P<sub>tac</sub>-adhB*

乳杆菌是一类革兰氏阳性兼性厌氧菌, 适宜生长温度高达 40℃ ~ 50℃, 能在较低的 pH 和较高盐浓度的环境下生长; 其中大多数能够代谢包括五碳糖和六碳糖在内的多种糖类, 能产生具有抑菌或杀菌作用的细菌素, 在发酵生产中能起到抑制其他细菌的作用。同时, 乳杆菌是目前基于酵母菌的乙醇发酵中的主要污染菌<sup>[1,2]</sup>, 与酵母竞争性利用培养基中的碳源和各种营养成分, 其代谢产物能影响酵母的生长, 以致酒精产量的降低; 但这也从另一个侧面反映出乳杆菌能够适应乙醇发酵过程中的生

产条件。因此, 对乳杆菌的代谢途径进行改造, 有望获得新型乙醇发酵菌株。另一方面, 乳杆菌作为发酵乳制品的主要生产菌种, 适量乙醇的产出有利于食品风味的改善, 能与酸类物质形成特有的香味, 给人以提神刺激的感受<sup>[3]</sup>; 发酵乳制品中的微量乙醇能促进消化腺机能增强, 刺激肠胃蠕动, 促进有机体的代谢<sup>[4,5]</sup>。

乳杆菌中, 代谢产生的大量丙酮酸经乳酸脱氢酶(LDH; 1.1.1.27)催化而转化为乳酸, 通过强化细胞内的丙酮酸脱羧酶(PDC; EC 4.1.1.1)和乙醇脱氢酶(ADH; EC 1.1.1.1)的活性来扩增目标途径, 是

\* 新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-04-9704)

\*\* 通讯作者 E-mail: zwxwang@sytu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-19, 修回日期: 2007-04-02

构建产乙醇乳杆菌的主要策略。本研究以已实现在 *E. coli* 中表达的重组质粒 pEtac-PA<sup>[6]</sup>为基础,构建了 pHY-PA、pBBR-PA 系列质粒。在此基础上构建乳杆菌重组菌,探索重组乳杆菌的乙醇合成能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

植物乳杆菌( *Lactobacillus plantanum* )CICIM B0080、噬淀粉乳杆菌( *L. amylovorus* ) B0112、嗜酸乳杆菌( *L. acidophilus* ) B0068,克隆宿主菌大肠杆菌( *Escherichia coli* )JM109,由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心( CICIM-CU ,<http://cicim-cu.sytu.edu.cn> )保藏。本研究中所使用及构建的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Strain or plasmid	Characteristics and description	Source or reference
Strains		
<i>Lactobacillus plantanum</i> B0080	Wild-type strain	Isolated from pickle fermentation facility
<i>L. amylovorus</i> B0112	Wild-type strain , capable of raw starch degrading	[ 7 ]
<i>L. acidophilus</i> B0068	Wild-type strain , low pH tolerance	CICIM-CU
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning strain	CICIM-CU
Plasmids		
pEtac-PA	Kan <sup>r</sup> ; harboring <i>pd</i> c and <i>adh</i> B that were placed under the control of <i>tac</i> promoter , respectively	[ 6 ]
pHY300PLK	Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> ; <i>E. coli</i> - <i>Bacillus</i> sp. shuttle vector	CICIM-CU
pHY- <i>pd</i> c	Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> ; harboring <i>Ptac</i> - <i>pd</i> c	This work
pHY- <i>adh</i>	Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> ; harboring <i>Ptac</i> - <i>adh</i> B	This work
pHY-PA	Ampr , Tetr ; harboring both <i>Ptac</i> - <i>pd</i> c and <i>Ptac</i> - <i>adh</i> B	This work
pBBR1MCS-5	Gm <sup>r</sup> ; board-host-range vector	CICIM-CU
pBBR-PA	Gm <sup>r</sup> ; harboring both <i>Ptac</i> - <i>pd</i> c and <i>Ptac</i> - <i>adh</i> B	This work

### 1.2 培养基和培养条件

乳杆菌的培养采用 MRS 培养基( 每升含有 10g 牛肉膏 ,10g 蛋白胨 ,5g 酵母抽提物 ,20g 葡萄糖 ,1g 吐温 80 ,2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ,5g 乙酸钠 ,2g 柠檬酸二铵 ,0.2g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O ,0.05g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ,pH 6.2 ~ 6.5 )。在 42℃ 静置培养 24h ~ 48h。含 1.3% 琼脂的固体 MRS 培养基( 含相应抗生素 )用于转化子的筛选和计数。大肠杆菌的培养使用 LB 培养基( 每升含有 10 g 胰蛋白胨、5g 酵母浸提物、10g NaCl ) ,37℃ 下培养。含 1.3% 琼脂的培养基( 含相应抗生素 )用于转化子的筛选。

### 1.3 酶与试剂

牛小肠碱性磷酸酶( CIAP )、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶和蛋白质分子量标准均为晶美生物工程有限公司产品 ;胶回收试剂盒为上海华瞬生物技术有限公司产品。其他试剂药品为国产或进口的分析纯和生化试剂。

### 1.4 DNA 操作技术

DNA 片段胶回收、产物纯化用华舜试剂盒进行。质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化等参照文献 [ 8 ]进行。

### 1.5 转化方法

乳杆菌的电转化按照文献 [ 9 ]进行。大肠杆菌的转化按照文献 [ 8 ]进行。

### 1.6 酶活测定

重组子用 MRS 培养基培养过夜 ,离心收集菌体 ,以磷酸盐缓冲液( pH 6.5 )洗涤悬浮 ,超声波破壁。酶活测定参照文献 [ 6 ]进行。

### 1.7 发酵试验

以含有 6.7% 葡萄糖的 MRS 培养基为发酵培养基 ,250mL 三角瓶中装液量为 50mL ,每瓶加入 2g CaCO<sub>3</sub> ,发酵于 42℃ 下进行。发酵液中葡萄糖和乳酸含量用生物传感仪测定。乙醇浓度采用气相色谱法测定 ,色谱参数为 :汽化室温度 200℃ ,检测器

(FID)温度 260℃,传输线温度 130℃。载气  $N_2$  压力 58.8kPa,流量 2mL/min,助燃气空气流量 400mL/min;燃气  $H_2$  流量 47mL/min。顶空瓶平衡温度:70℃,平衡时间 30min。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

在本实验室先期构建的质粒 pEtac-PA<sup>[6]</sup> 的基础

上,构建 pHY-*pdc*、pHY-*adh*、pHY-PA 和 pBBR-PA。首先以 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切质粒 pEtac-PA,同时回收 *Ptac-pdc*(约 2.3kb)和 *Ptac-adh*(约 1.6kb)片段。将前者插入 pHY300PLK 的 *Bam*HI 位点,得到 pHY-*pdc*;将后者插入以 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切的 pHY300PLK 载体,得到 pHY-*adh*;再将 *Ptac-pdc* 片段插入 pHY-*adh* 的 *Bam*HI 位点,得到 pHY-PA(图 1)。采用相似方法构建获得重组质粒 pBBR-PA。

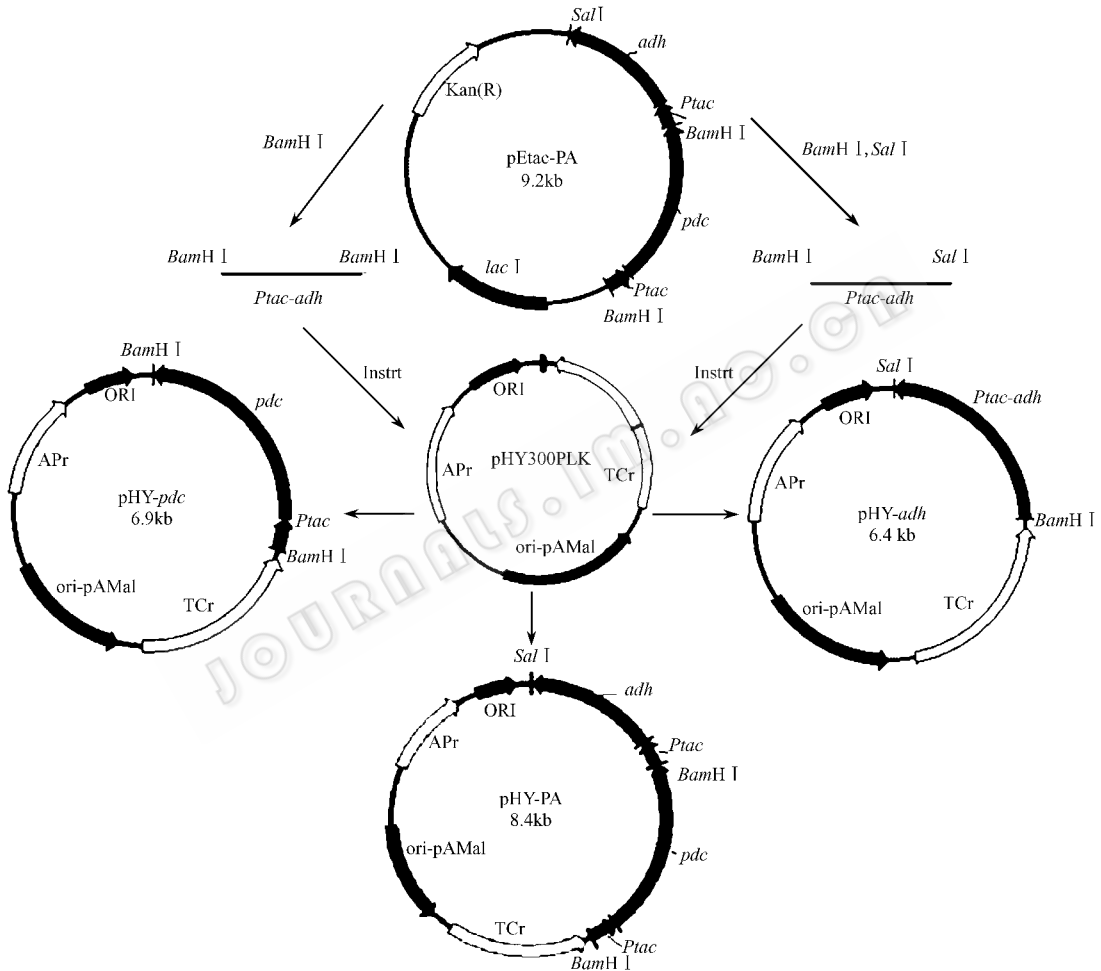


图 1 重组质粒 pHY-*pdc*、pHY-*adh*、pHY-PA 的构建过程

### 2.2 重组乳杆菌 PDC、ADH 酶活测定

对重组菌中的 PDC 和 ADH 酶活进行了测定(表 2)。酶活测定的结果表明,*pdc*、*adhB* 基因在 *L. plantanum* B0080 中成功实现表达。对 *L. acidophilus* B0068、*L. amylovorus* B0112 及其相应重组菌进行 PDC 和 ADH 酶活测定,结果同样表明:重组菌的 PDC 和 ADH 酶活均相对于其原始菌株有所提高(表 2),*pdc*、*adhB* 基因在这两株乳杆菌中同样实现了表达。

### 2.3 重组菌的初步酒精发酵

挑取各重组菌及原始菌单菌落接种于 10mL 含有相应抗生素的 MRS 培养基中,42℃ 静置培养过夜后,将其作为种子液,以 1% (V/V) 接种到 50mL 含约 6.7% 葡萄糖的 MRS 培养基,其中加入了 2g  $CaCO_3$ ,42℃ 静止发酵。发酵 6.7% 葡萄糖 60h:*L. plantanum* B0080、B0080 (pHY-*pdc*) 只能产生约 0.006% (V/V) 的乙醇,重组菌 B0080 (pHY-*adh*)、B0080 (pHY-PA) 分别产生 0.33%、0.4% (V/V) 乙醇(图 2)。

表 2 重组菌中 PDC 和 ADH 酶活

Enzymes	Specific activities ( U/mg )							
	<i>L. plantanum</i>				<i>L. acidophilus</i>		<i>L. amylovorus</i>	
	B0080	B0080( pHY- <i>pd</i> c )	B0080( pHY- <i>adh</i> )	B0080( pHY-PA )	B0068	B0068( pBBR-PA )	B0112	B0112( pHY-PA )
PDC	0.1582	0.2038	0.2730	0.3071	0.3842	0.7268	0.0514	0.3011
ADH	0.3230	0.3460	2.7302	3.3163	0.0988	0.4906	0	0.5018

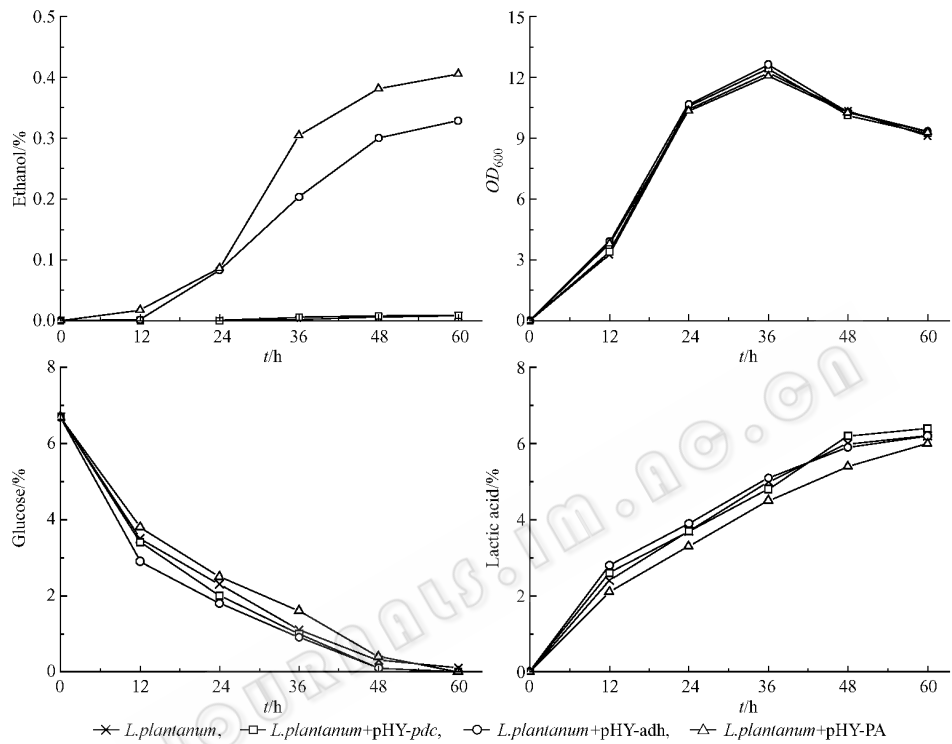


图 2 *Lactobacillus plantanum* 及重组菌的酒精发酵

根据酶活测定和乙醇发酵试验结果 ,各重组菌的 PDC 的酶活为原始菌的 1.3 ~ 1.9 倍 ,重组菌的乙醇产量和 ADH 酶活成正相关 :B0080 ( pHY-*pdc* )和原始菌相近 ,只能产生约 0.006% ( V/V )的微量乙醇 ,在 B0080 ( pHY-*adh* ) B0080 ( pHY-PA )中能检测到约为原始菌 10 倍的 ADH 酶活 ,同时两重组菌发酵 6.7% 葡萄糖 60h 分别产生 0.33%、0.4% ( V/V )乙醇( 图 2 );且 B0080 ( pHY-PA )的乙醇产量比 B0080 ( pHY-*adh* )略高 ,说明在 *L. plantanum* B0080 中同时引入基因 *pdc*、*adhB* 最有效地将碳代谢流导向了产乙醇方向。

*L. acidophilus* B0068、*L. amylovorus* B0112 发酵 6.7% 葡萄糖 60h 仅产生  $0.6 \times 10^{-5}$  ( V/V )乙醇 ,而重组菌 B0068 ( pBBR-PA ) B0112 ( pHY-PA )分别合成  $1.2 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times 10^{-5}$  ( V/V )的乙醇。

3 讨论

乳杆菌能代谢多种糖类 ,能在较为严峻的环境下生长 ,是发酵产乙醇的合适改造候选菌。但在乳杆菌中 ,代谢产生的大量丙酮酸都经乳酸脱氢酶( LDH ; 1.1.1.27 )的催化而转化为乳酸 ,仅有极少量的乙醇经异型乳酸发酵产生。将“ 产乙醇基因 ”引入乳杆菌是构建产乙醇的乳杆菌的主要策略。

本研究中三菌株的最适生长温度约为 42℃ ,适于目前发酵工厂中普遍使用的发酵培养温度 ,同时 ,较高的发酵温度有利于乙醇的收集亦可防止染菌 ;且三菌株各具特点 ,具有重要的工业应用价值和使用潜力。其中菌株 *L. plantanum* B0080 分离自蔬菜发酵工厂 ,生长速度快 ,代谢旺盛。本文研究了在该菌株中分别引入 *pdc* 基因和/或 *adhB* 基因时 ,重组菌的乙醇发酵情况、酶活测定和乙醇发酵

试验结果说明:在 *L. plantanum* B0080 中同时引入基因 *pdh*、*adhB* 最有效地将碳代谢流导向了产乙醇方向。菌株 *L. amylovorus* B0112 于 1981 年由 Nakamura<sup>[7]</sup>报道,能够利用多种碳源且具有生淀粉降解能力;菌株 *L. acidophilus* B0068 能够适应酸性的培养环境,其最适生长 pH 为 4.5,自身代谢产生的乳酸不易抑制菌体生长,且较低的 pH 环境有利于该菌株的纯培养不易染其他杂菌。将 *pdh* 基因和 *adhB* 基因同时引入上述两菌株:检测到的乙醇为原始菌的 2 倍。我们还考察了重组菌 *L. amylovorus* B0112(pHY-PA)直接利用 4% 玉米淀粉合成乙醇的情况:发酵终了能检测到 0.083%(V/V)的乙醇产出,而原始菌 B0112 仅产生  $0.6 \times 10^{-5}$ (V/V)乙醇。

本研究还发现,重组菌的丙酮酸代谢主要还是流向产乳酸途径,我们正进一步设计,在引入 *pdh* 和 *adhB* 基因的同时,利用同源重组敲除乳酸脱氢酶基因,打断乳杆菌中由丙酮酸代谢产生乳酸这一主流代谢途径,以期获得乙醇高产重组乳杆菌。另一

方面,若利用本研究所构建的重组乳杆菌进行乳制品单一菌种发酵,产生的乙醇有利于改善乳品的口感,不至于掩盖乳酸菌发酵的风味,又能刺激肠胃蠕动,促进新陈代谢。

### 参考文献

- [1] Narendranath N V, Hynes S H, Thomas K C, et al. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**: 4158 ~ 4163.
- [2] Kelly A S, Timothy D L. J Ind Microbiol Biotechnol, 2004, **31**: 401 ~ 408.
- [3] 杨具田. 草与畜, 1996, **1**: 37 ~ 39.
- [4] 刘振民, 骆承庠. 食品工业, 2000, **1**: 21 ~ 23.
- [5] 李 华, 丘 文, 周广祥. 中国奶牛, 2000, **1**: 53 ~ 55.
- [6] 孙金凤, 徐 敏, 张 峰, 等. 微生物学报, 2004, **44**(5): 600 ~ 604.
- [7] Nakamura L K. Int J Syst Bacteriol, 1981, **31**: 56 ~ 63.
- [8] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Tpompsom K, Collins M A. J Microbiol Methods, 1996, **26**: 73 ~ 79.