

# 一株葡萄糖和木糖共发酵高效产乙醇重组运动发酵单胞菌的性能评价

冯全周, 李十中, 王莉, 李天成

清华大学核能与新能源技术研究院新能源所, 北京 100084

冯全周, 李十中, 王莉, 等. 一株葡萄糖和木糖共发酵高效产乙醇重组运动发酵单胞菌的性能评价. 生物工程学报, 2012, 28(1): 37-47.

Feng QZ, Li SZ, Wang L, et al. Evaluation on glucose-xylose co-fermentation by a recombinant *Zymomonas mobilis* strain. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 37-47.

**摘 要:** 木糖是木质纤维素原料水解液中的第二大组分, 木糖和葡萄糖的充分利用是有经济性地生产纤维素乙醇的关键。通过基因克隆手段构建了一株可以高效利用木糖产乙醇的重组运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* TSH01, 并进行了利用单糖溶液、混合糖溶液及玉米秸秆水解液发酵产乙醇效率的研究。结果表明, 利用单一葡萄糖或单一木糖溶液发酵时, 当糖浓度为 8%、发酵 72 h 后, 糖利用率分别为 100% 和 98.9%, 乙醇代谢收率分别为 87.8% 和 78.3%; 利用 8% 葡萄糖和 8% 木糖的混合溶液发酵时, 72 h 后, 葡萄糖和木糖的利用率分别为 98.5% 和 97.4%, 乙醇代谢收率为 94.9%。利用含 3.2% 葡萄糖和 3.5% 木糖的玉米秸秆水解液发酵 72 h 后, 葡萄糖和木糖的利用率分别为 100% 和 92.3%, 乙醇代谢收率为 91.5%。此外, 磷酸二氢钾对发酵过程中木糖利用率以及乙醇收率的提高有明显促进作用。

**关键词:** 重组运动发酵单胞菌, 木糖, 燃料乙醇, 木质纤维素

## Evaluation on glucose-xylose co-fermentation by a recombinant *Zymomonas mobilis* strain

Quanzhou Feng, Shizhong Li, Li Wang, and Tiancheng Li

Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Received:** March 11, 2011; **Accepted:** November 3, 2011

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2009AA10Z406), Ocean Public Welfare Scientific Research Project, State Oceanic Administration of the People's Republic of China (No. 201005031-2)

**Corresponding author:** Shizhong Li. Tel: +86-10-62772123; Fax: +86-10-80194050; E-mail: szli@tsinghua.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2009AA10Z406), 2010 年度海洋公益性行业科技专项经费项目 (No. 201005031-2) 资助。

**Abstract:** Co-fermentation of glucose and xylose is critical for cellulosic ethanol, as xylose is the second most abundant sugar in lignocellulosic hydrolysate. In this study, a xylose-utilizing recombinant *Zymomonas mobilis* TSH01 was constructed by gene cloning, and ethanol fermentation of the recombinant was evaluated under batch fermentation conditions with a fermentation time of 72 h. When the medium containing 8% glucose or xylose, was tested, all glucose and 98.9% xylose were consumed, with 87.8% and 78.3% ethanol yield, respectively. Furthermore, the medium containing glucose and xylose, each at a concentration of 8%, was tested, and 98.5% and 97.4% of glucose and xylose was fermented, with an ethanol yield of 94.9%. As for the hydrolysate of corn stover containing 3.2% glucose and 3.5% xylose, all glucose and 92.3% xylose were consumed, with an ethanol yield of 91.5%. In addition, monopotassium phosphate can facilitate the consumption of xylose and enhance ethanol yield.

**Keywords:** recombinant *Zymomonas mobilis*, xylose, ethanol, lignocellulose

在能源短缺和环境污染日益严重的背景下, 世界各国都在积极寻求发展可再生能源。生物质能普遍被认为是一种理想的替代能源, 特别是燃料乙醇<sup>[1-2]</sup>。包括农业和工业废弃物在内的木质纤维素是自然界中最为丰富的可再生资源, 因此是工业化生产燃料乙醇的理想底物<sup>[3-4]</sup>。纤维素和半纤维素都是碳水化合物的聚合体, 可以被水解为单糖。纤维素水解产物为葡萄糖; 而半纤维素水解产物较复杂, 主要是以木糖和葡萄糖为主的单糖<sup>[5]</sup>。所有这些水解产物中, 葡萄糖和木糖含量占绝大部分<sup>[6-7]</sup>。因此, 葡萄糖和木糖的高效充分转化是纤维素乙醇生产必须解决的关键问题, 引起了国内外的广泛关注。

自然界仅有少数细菌、酵母菌和真菌可发酵木糖产乙醇, 但这些天然菌株大多存在乙醇收率低、对水解物中低浓度抑制物敏感、乙醇耐受性低等问题。另一方面, 高产乙醇的菌株如酿酒酵母和运动发酵单胞菌等, 通常不能利用木糖。为此, 人们通过基因工程手段构建出一系列新的重组菌, 使其可以发酵木质纤维素水解液中的五碳糖产乙醇<sup>[8-13]</sup>。但重组菌株发酵速率慢, 中间代谢产物木糖醇积累的现象比较严重, 无法满足乙醇发酵工业化生产的要求。

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 乙醇发酵性能优良, 与目前乙醇发酵使用的酿酒酵母相比, 其高温耐受性好、发酵速度快, 有利于节省发酵过程发酵罐冷却能耗, 缩短生产周期<sup>[14]</sup>。此外, *Z. mobilis* 通过 ED 途径进行糖代谢, 是目前已知唯一通过 ED 途径厌氧代谢的微生物<sup>[15]</sup>。与酿酒酵母乙醇发酵的 EMP 不同, ED 途径中每分子葡萄糖只产生一分子 ATP, 这一低能态造成较低的细胞产量和更高的乙醇产量, 提高了乙醇对糖的收率, 有利于降低原料消耗。尽管 *Z. mobilis* 只能利用葡萄糖、蔗糖和果糖<sup>[16]</sup>, 但该种属模式菌株基因组测序已经完成, 遗传背景清晰, 是通过基因工程操作赋予五碳糖代谢途径的良好出发菌株, 已经取得很多研究进展<sup>[10-11, 17]</sup>。

本实验室基于 *Z. mobilis* 31821, 将木糖异构酶 (*xylA*)、木酮糖激酶 (*xylB*)、转醛醇酶 (*talA*) 和转酮醇酶 (*tktA*) 基因通过自行构建的质粒结合在一起, 构建了一株可以高效利用木糖发酵产乙醇的重组菌株 *Z. mobilis* TSH01。本文研究了该工程菌的最优发酵条件以及对玉米秸秆稀酸水解液的发酵效果, 为其应用于利用木质纤维素水解液发酵产乙醇提供了理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒以及引物

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  被选为质粒表达的受体菌, *E. coli* K-12 提供 *tktA*、*talA*、*xylA* 以及 *xylB* 基因<sup>[18]</sup>, 其培养基为 LB, 培养条件为 100 mg/L 氨苄青霉素, 37 °C; *Z. mobilis* ATCC 29191 提供 *Peno* 和 *Pgap* 启动子基因<sup>[19-20]</sup>; *Z. mobilis* 31821 作为宿主菌接收外源基因代谢木糖产乙醇; 质粒 pMD-18 Simple T 和 pBBR322 用来合成质粒 pMTM (表 1)。*Z. mobilis* 培养基为 RMG (10 g/L 酵母粉、2 g/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  以及各 20 g/L 的葡萄糖), 30 °C 静置培养。

表 1 本实验所用的菌株和质粒

Table 1 Strain and plasmid used in this study

Strain, plasmid	Relevant characteristics
<i>E. coli</i> K-12	<i>tktA</i> , <i>talA</i> , <i>xylA</i> , <i>xylB</i>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	
<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	<i>Peno</i> , <i>Pgap</i>
<i>Z. mobilis</i> 31821	
pMD-18 Simple T	Ori, Amp <sup>r</sup>
pBBR322	Tet <sup>r</sup>

### 1.2 pMTM-*talA*-*tktA*-*Pgap*-*xylA*-*Peno*-*xylB* 质粒的构建

克隆策略如图 1 所示, 首先, 分别以 Me-Ori-for 和 Me-Amp-rev 为上、下游引物, 从 pMD-18 Simple T 载体中扩增出氨苄青霉素 (Amp) 抗性基因及 Ori 复制子序列, 同时引入几个酶切位点和 *EZ*-Tn5 转座酶识别的 Me 序列; 再用引物 Tet-for 和 Tet-rev 从 pBBR322 质粒上扩增出四环素 (Tet) 抗性基因。分别将以上两个 PCR 产物进行 *Bam*H I + *Nco* I 双酶切, DNA 纯化后进行连接转化, 抗性筛选出正确的克隆质粒

pMTM。以 *Z. mobilis* ATCC 29191 基因组 DNA 为模板, *Peno*-for-*Nde* I 和 *Peno*-rev-*tktA* 为上、下游引物, 扩增得到 *Nde* I -*Peno*-3' 片段; 以 *E. coli* K-12 基因组 DNA 为模板, *tktA*-for、*tktA*-rev-*Bgl* II 为上、下游引物, 扩增得到 5'-*tktA*-*Bgl* II 片段。利用前者 3'端和后者 5'端的重叠序列 (表 2 斜体部分) 进行 overlap PCR, 得到 *Nde* I -*Peno*-*tktA*-*Bgl* II 操作子, 双酶切之后插入质粒 pMTM 之中, 得到质粒 pMTM-*tktA*。相同方法, 不同引物 (表 2) 得到另外 3 个操作子 *Bam*H I -*Pgap*-*talA*-*Bam*H I、*Nde* I -*Pgap*-*xylA*-*Bam*H I 和 *Xho* I -*Peno*-*xylB*-*Bam*H I。*Bam*H I 单酶切 *Bam*H I -*Pgap*-*talA*-*Bam*H I 之后非定向插入质粒 pMTM-*tktA*, 筛选获得正确的 pMTM-*talA*-*tktA* 质粒。*Nde* I + *Bam*H I 双酶切 *Nde* I -*Pgap*-*xylA*-*Bam*H I 后定向插入 pMTM-*talA*-*tktA* 质粒, 筛选到正确的 pMTM-*talA*-*tktA*-*Pgap*-*xylA* 质粒。最后一个 *Xho* I -*Peno*-*xylB*-*Bam*H I 操作子经 *Xho* I + *Bam*H I 双酶切后定向插入 pMTM-*talA*-*tktA*-*Pgap*-*xylA* 质粒之中, 筛选得到最终含有木糖代谢相关的 4 个基因的质粒: pMTM-*talA*-*tktA*-*Pgap*-*xylA*-*Peno*-*xylB*。

### 1.3 重组菌 *Z. mobilis* TSH01 的构建

用 *Apa* I 酶切质粒 pMTM-*talA*-*tktA*-*Pgap*-*xylA*-*Peno*-*xylB* 之后, 得到两端含有 Me 序列的目的基因的片段, 将其与转座酶 *EZ*-Tn5 混合, 室温反应 30~60 min, 形成转座复合体, 取 1  $\mu$ L 电转化进入 *Z. mobilis* 31821 感受态内, 电转化条件参照文献[22]。10 g/L 的四环素抗性 RMG 平板筛选, 挑取几个单菌落接种 RMGX (20 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖) 液体培养基中, 得到几株可以

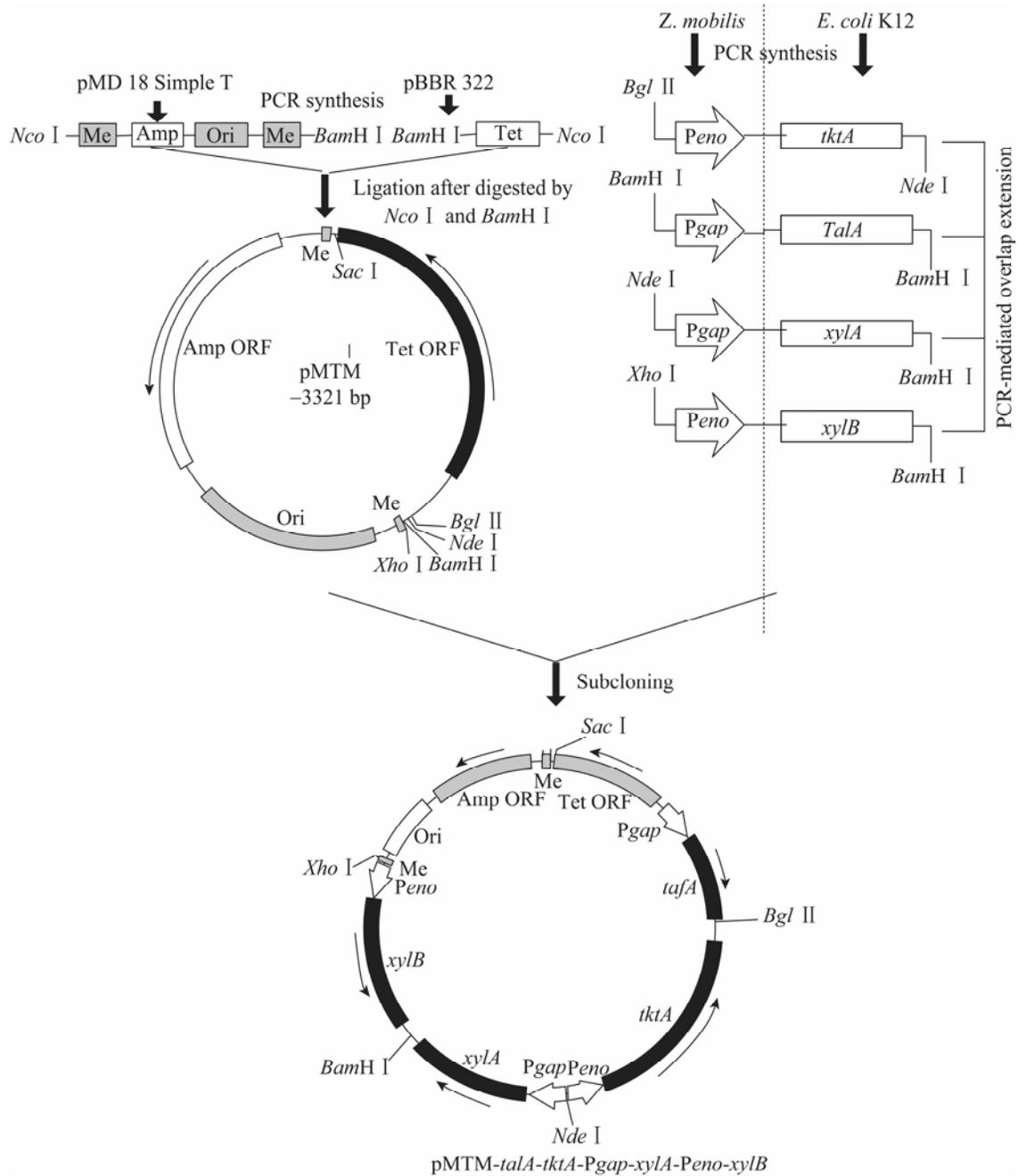


图 1 载体质粒 pMTM-talA-tktA-Pgap-xylA-Peno-xylB 的构建

Fig. 1 Construction of pMTM-talA-tktA-Pgap-xylA-Peno-xylB.

表 2 本实验所用引物

Table 2 Primer used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
Me-Ori-for	CGGGATCCCCGCTCG <u>AGATGTGTATAAGAGACAG</u> GGGCCCTACGGTTATCCACAGAATC
Me-Amp-rev	CATGCCATGGCGCTCT <u>AGATGTGTATAAGAGACAG</u> GGGCCCGACGAAAGGGCCTCGTGA
Tet-for	CATGCCATGGCATGGAGCTCATAAGAATGCGGCCGCTCAGGTCGAGGTGGCCCCGGCTC
Tet-rev	CGGGATCCGGAATTC <u>CATATGGAATTCAGATCTT</u> TCTCATGTTTGACAGCTTATCATC
Peno-for- <i>Nde</i> I	GGAATTCCATATGAAATCATTGGCAGCTGATGC
Peno-rev- <i>tktA</i>	<i>GCAAGCTCTTTACGTGAGGACATATCGAAACCTTTCTTAAAATCTT</i>
<i>tktA</i> -for	<i>ATGTCCTCACGTAAAGAGCTTGC</i>
<i>tktA</i> -rev- <i>Bgl</i> II	GAAGATCTTGTCAATACGCATATCGTGATGCA
Pgap-for- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCGTTTCGATCAACAACCCGAATCCTATCG
Pgap-rev- <i>talA</i>	<i>GTTTGATGCCGTCTAACTCGTTCATGTTTATTCTCCTAACTTATTAAG</i>
<i>talA</i> -for	<i>ATGAACGAGTTAGACGGCATCAAAC</i>
<i>talA</i> -rev- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCTGTACCGCATCCATACTGAGTG
Pgap-for- <i>Nde</i> I	GGAATTCCATATGGTTCGATCAACAACCCGAATCCTATCG
Pgap-rev- <i>xylA</i>	<i>CGAGCTGGTCAAAATAGGCTTGCAATGTTTATTCTCCTAACTTATTAAG</i>
<i>xylA</i> -for	<i>ATGCAAGCCTATTTGACCAGCTCG</i>
<i>xylA</i> -rev- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCATCGATCGTTCCTTAAAAAATGCC
Peno-for- <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGAAATCATTGGCAGCTGATGC
Peno-rev- <i>xylB</i>	<i>GCCAAGATCTATCCCGATATACATATCGAAACCTTTCTTAAAATCTT</i>
<i>xylB</i> -for	<i>ATGTATATCGGGATAGATCTTGGC</i>
<i>xylB</i> -rev- <i>Bam</i> H I	CGGGATCCATAACGATCTCCATATCTACCAGC

xxx: Me sequence; restriction enzyme sites are underlined; sequence in italic is overlapping region with another primer.

代谢木糖产乙醇的重组菌，选取其中一株代谢木糖速率最快的进行下步发酵验证，并将其命名为 *Z. mobilis* TSH01。

#### 1.4 发酵操作

取出冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内的 *Z. mobilis* TSH01, 用接种环将其接种于 50 mL RMGX 培养基中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置培养 1~2 d 至  $OD_{600}$  为 2~3 之间, 作为一级种子液; 取 1 mL 一级种子液接种于含 200 mL 培养基的 500 mL 三角瓶内,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧静

置培养 18 h 至  $OD_{600}$  约为 2, 可作为二级种子液。所有发酵实验均采用二级接种, 将 200 mL 二级种子液在 4 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清液, 加 50 mL 灭菌水使菌体重新悬浮, 接种于 2 L 的发酵罐进行发酵。发酵条件为: 120 r/min 搅拌, 不通空气进行厌氧发酵, 采用 2 mol/L 的 KOH 溶液调节发酵液的 pH。

玉米秸秆水解条件: 玉米秸秆粉碎后与 2% 稀硫酸混合, 固液比 1:10,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, 过

滤, 采用 CaO 过量中和, 过滤, 调 pH 至中性, 利用真空旋转蒸发仪浓缩备用。

## 1.5 分析

发酵液中的乙醇含量用气相色谱进行定量分析, 方法采用内标法, 内标物为正丙醇; 葡萄糖、木糖、乙酸、甲酸、糠醛用高效液相色谱进

行定量分析, 色谱柱使用 Aminex HPX-87H column (Bio-Rad USA) 离子交换柱, 流动相为 0.05 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 40 °C, 采用示差折光检测器 RID-20A (岛津公司), 检测器温度为 40 °C。

计算公式:

$$\text{乙醇代谢收率} = \frac{\text{实际乙醇产量 (g/L)}}{(\text{初始糖含量} - \text{残糖含量}) \times 0.51 \text{ (g/L)}} \times 100\% \text{ (可以反应菌种代谢途径的效率)}$$

$$\text{乙醇收率} = \frac{\text{实际乙醇产量 (g/L)}}{\text{初始糖含量} \times 0.51 \text{ (g/L)}} \times 100\% \text{ (可以反应菌种发酵底物产乙醇的整体效率)}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵条件的确定

为确定 *Z. mobilis* TSH01 的最佳发酵条件, 选取 40 g/L 的葡萄糖和 40 g/L 的木糖为发酵培养基的碳源, 设计两因子、两水平的正交试验, 研究温度 (30 °C 和 37 °C) 和 pH 值 (5 和 6) 对发酵结果的影响。表 3 为发酵验证结果, 较高 pH 条件下发酵有更高的葡萄糖利用率, 而且据报道<sup>[22]</sup>, 当胞内 pH 降低时, 会导致胞内有机酸处于未电离状态, 未电离状态的有机酸会对发酵产生抑制作用; 而且相同温度下, 当 pH 为 6 时, 无论是木糖利用率还是乙醇收率均比 pH 5 时要高; 当 pH 同为 6 时, 37 °C 发酵的木糖利用率和乙醇收率也比 30 °C 发酵时要高。37 °C 条件下, 控制 pH 为 6 的发酵具有最大的木糖利用率和乙醇收率, 分别为 98.5% 和 94.3%。为得到更高的乙醇收率, 因此 37 °C, pH 6 被选定为后续发酵条件。

### 2.2 纯糖发酵研究

图 2 为发酵培养基中可发酵糖分别为 8% 葡

萄糖、8% 木糖、8% 葡萄糖和 8% 木糖时, 糖利用以及乙醇生成随时间的变化趋势。该图表明, 单一糖组分发酵时, 葡萄糖的完全利用时间为 25 h, 利用速率为 3.06 g/(L·h) (5~14 h 为快速利用期, 利用速率为 6.8 g/(L·h)); 而木糖需要发酵 72 h 才能利用完毕 (无快速利用期), 利用速率为 1.01 g/(L·h)。混合发酵时, 葡萄糖完全利用需要 48 h, 利用速率为 1.41 g/(L·h) (16~36 h 为快速利用期, 利用速率为 2.55 g/(L·h)); 木糖发酵 72 h 后利用完毕, 利用速率为 1.05 g/(L·h) (32~48 h 为快速利用期, 利用速率为 2.54 g/(L·h))。单一糖组分发酵时, 虽然二者均可以被充分利用, 但是 *Z. mobilis* TSH01 对木糖的利用速率要明显低于葡萄糖的利用速率; 混合发酵时, 由于木糖代谢会产生木糖醇, 而木糖醇的存在会抑制菌体生长, 从而导致葡萄糖的利用速率降低<sup>[23]</sup>, 在 *Z. mobilis* 中, 木糖是经由运输葡萄糖的通道 Gif 进入细胞内的, 当葡萄糖存在时会抑制木糖的吸收, 而当葡萄糖下降到低浓度时会减少对木糖转运的抑制, 木糖便借助 Gif 通道以较快速度进入胞内进行代谢<sup>[21]</sup>。

表 3 不同温度和 pH 下 *Z. mobilis* TSH01 发酵产乙醇的结果Table 3 Fermentation<sup>a</sup> results for *Z. mobilis* TSH01 at different temperature and pH

Temperature (°C)	pH	Glucose consumed (%)	Xylose consumed (%)	Ethanol metabolic yield <sup>b</sup> (%)	Ethanol yield <sup>c</sup> (%)
30	5	100.0	87.8	85.7	84.7
30	6	98.9	92.4	91.6	87.6
37	5	94.7	96.2	90.7	86.0
37	6	98.6	98.5	94.3	92.9

<sup>a</sup>Fermentations performed in medium of 40 g glucose/L, and 40 g xylose/L, pH controlled using 2 mol/L KOH for 72 h.

<sup>b</sup>Ethanol produced divided by theoretical amount available from consumed glucose and xylose.

<sup>c</sup>Ethanol produced divided by theoretical from total amount of glucose and xylose.

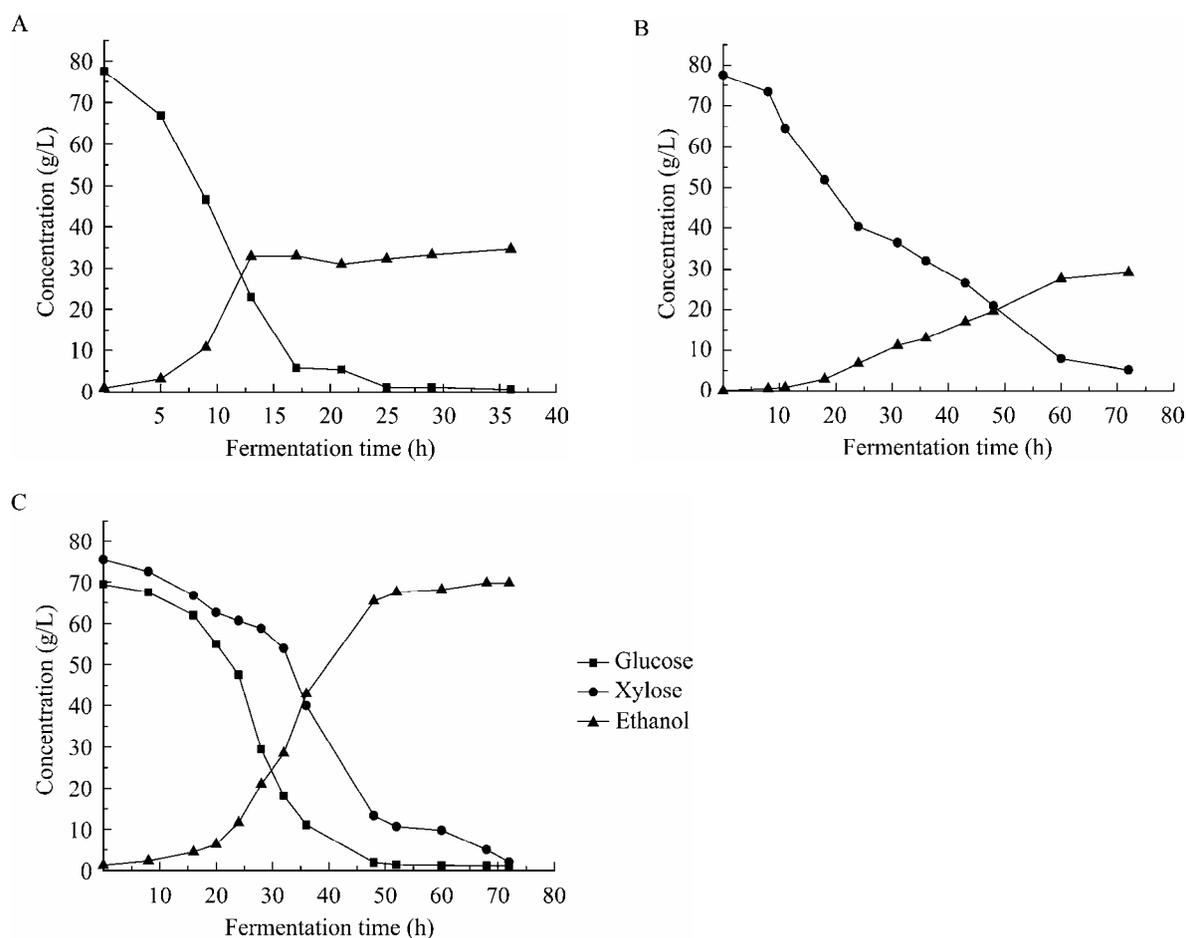


图 2 不同糖源溶液发酵过程中糖源消耗以及乙醇生成动力学曲线

Fig. 2 Fermentation of pure sugar. (A) Fermentation of 8% glucose. (B) Fermentation of 8% xylose. (C) Cofermentation of 8% glucose and 8% xylose.

表 4 计算并比较了 3 批发酵的糖利用率和乙醇收率。无论是单一组分发酵, 还是混合发酵, 糖利用率相差不大; 但是单一组分发酵时的乙醇收率要远小于混合发酵的, 木糖为唯一组分时尤为明显。这一现象的原因包括以下几方面<sup>[23]</sup>: 1) 外源基因导入引起的代谢负担增加; 2) 包括木糖醇、乙酸、乳酸、乙偶姻以及二羟基丙酮等副产物的生成; 3) 木糖醇的抑制; 而混合发酵引起乙醇收率增加的现象之前也有过报道<sup>[24]</sup>。根据图 2 和表 3 数据分析的对比结果可以大体推断: 在糖源进入胞内的运转机制上, 葡萄糖和木糖存在一定的竞争; 而低浓度的葡萄糖会促进木糖的胞内吸收。所以混合发酵则会提高发酵效率, 获得更高的乙醇收率。

### 2.3 玉米秸秆水解液发酵分析

作为生产燃料乙醇工程菌的目标发酵底物, 木质纤维素原料的水解液成分复杂, 包括一系列的糖分 (主要为葡萄糖和木糖) 和乙酸以及呋喃衍生物等抑制物。本实验室采用工业中玉米秸秆

的酸解工艺<sup>[25]</sup>得到水解液, 研究了 *Z. mobilis* TSH01 对玉米秸秆稀酸水解液的发酵效果。所制备玉米秸秆水解液中的成分如表 5 所示。

#### 2.3.1 水解液发酵结果

将得到的稀酸水解液过滤中和后进行浓缩, 补加葡萄糖使其与木糖浓度大体一致, 加入 10 g/L 酵母粉和 2 g/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 高温消毒后作为发酵培养基。发酵结果如图 3 所示, 发酵 24 h 葡萄糖基本消耗完全; 72 h 时木糖利用率为 92.3%; 以 72 h 为截点, 计算出乙醇代谢收率为 91.5%。发酵 0 h 取样, 测得乙酸、甲酸和糠醛的浓度分别为 10.5 g/L、1.5 g/L 和 1.1 g/L; 此外, 随着发酵进行过程上述 3 种物质浓度均会逐渐减低, 前两者的浓度降低与加碱有关系, 而后者浓度降低是因为菌体发酵过程中被代谢掉了。对比纯糖发酵实验, 普通稀酸水解液中所含的抑制物质对发酵影响不大, 因此说明, *Z. mobilis* TSH01 对普通稀酸水解液中的抑制物 (主要为 10 g/L 的乙酸) 具有良好的耐受性。

表 4 *Z. mobilis* TSH01 纯糖发酵产乙醇的结果

Table 4 Fermentation results for *Z. mobilis* TSH01 of pure suger

Batch	Glucose consumed (%)	Xylose consumed (%)	Ethanol metabolic yield (%)	Ethanol yield (%)
A	100.0		87.0	87
B		93.5	79.1	74
C	98.5	97.4	94.9	93

表 5 玉米秸秆稀酸水解液成分

Table 5 Components of corn stover hydrolysate

	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic acid	Formic acid	Furfural
Concentrations (g/L)	5.8	18.2	1.1	7.5	1.2	0.6

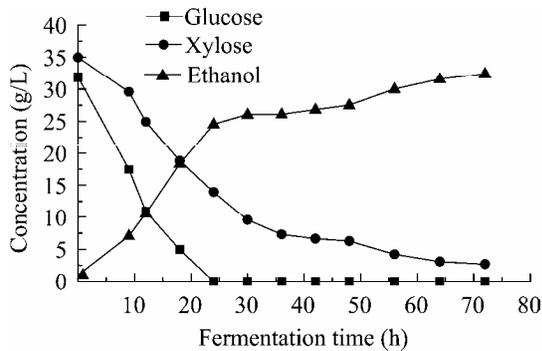


图3 玉米秸秆稀酸水解液发酵

Fig. 3 Fermentation of corn stover hydrolysate.

### 2.3.2 添加成分对发酵的影响

考虑到成本因素,木质纤维素水解液发酵产乙醇过程应该是添加物质越少越好,实验中除调控 pH 用 KOH 之外,外源添加物只有酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 于是我们通过发酵试验验证这两者对

糖利用和乙醇收率的影响 (图 4)。A 组实验为不添加酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  情况下,给水解液补充葡萄糖至浓度和木糖基本相当,灭菌后调控 pH 进行发酵。发酵 72 h 后,葡萄糖和木糖利用率分别为 98% 和 68.4%;乙醇代谢收率为 84.1%。B 组实验为添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  但不添加酵母粉情况下,后续操作发酵和 A 组实验一样。发酵 72 h 后,葡萄糖和木糖利用率分别为 98% 和 94.4%;乙醇代谢收率为 94.5%。B 组实验结果表明,酵母粉对糖利用率和乙醇收率基本上没有任何影响。再结合 A 组实验结果,可以得出结论:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对混合发酵木糖利用率和乙醇收率的提高有明显的促进作用,因为调控 pH 用的是 KOH,发酵液中已经存在  $\text{K}^+$ ,所以提升发酵效果的应该是  $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$  或者  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,此结论需要进一步验证。

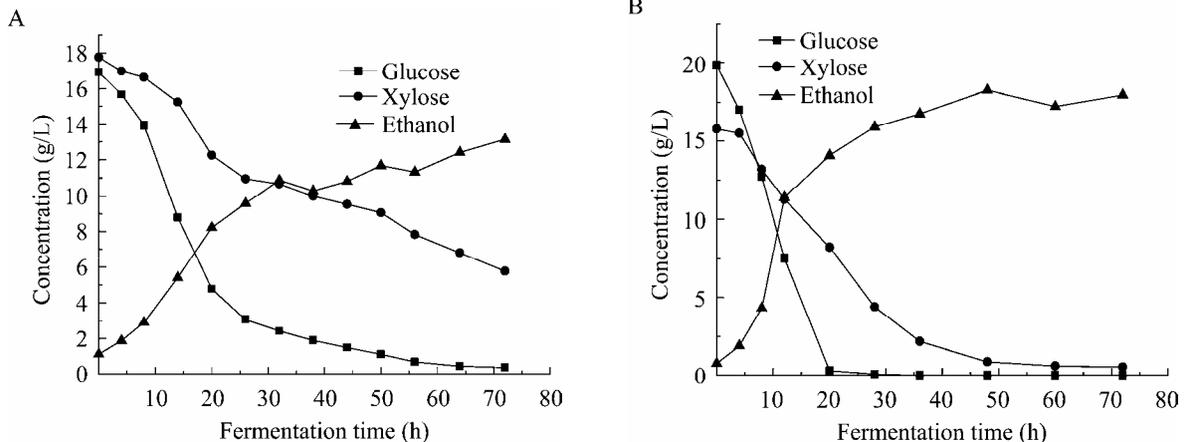


图4 添加成分对玉米秸秆水解液发酵的影响

Fig. 4 Effect of corn stover hydrolysate fermentation by additional components. (A) Without yeast extract and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . (B) With  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  but yeast extract.

## 3 结论

通过加强启动子对木糖代谢产乙醇基因的

调控,使每个基因均处于强启动子调控之下,避免单一或者几个蛋白对乙醇代谢途径的限制,构建了一株共发酵葡萄糖和木糖性能良好的基因

工程菌 *Z. mobilis* TSH01, 可同时高效利用葡萄糖和木糖产乙醇。*Z. mobilis* TSH01 的最优发酵条件为添加 0.2%  $K_2HPO_4$ 、pH 6.0、37 °C、厌氧发酵。单一糖溶液发酵时, 葡萄糖利用速率很高, 可以达到 3.06 g/(L·h), 而木糖利用速率相对较低, 为 1.01 g/(L·h); 当二者共发酵时, 葡萄糖利用速率降低, 而木糖利用速率有所提高, 而且当葡萄糖浓度降低到一定值后木糖出现一个快速消耗阶段, 该结果表明, *Z. mobilis* TSH01 代谢产乙醇的途径中, 葡萄糖和木糖在转运机制上存在竞争关系, 而低浓度的葡萄糖会减少对木糖吸收利用的抑制。当混合糖浓度为 16% (1:1), 葡萄糖和木糖的利用率分别为 98.5% 和 97.4%, 乙醇代谢收率高达 94.9%。其对玉米秸秆稀酸水解液 72 h 的发酵结果为: 葡萄糖和木糖的利用率分别为 100% 和 92.3%, 乙醇代谢收率为 91.5%。而且  $KH_2PO_4$  对发酵过程中木糖的利用以及乙醇收率提高有明显的促进作用。

*Z. mobilis* TSH01 对玉米秸秆稀酸水解液中的抑制物具有良好的耐受性, 而且发酵产乙醇效率很高; 发酵环境为厌氧环境, 无需搅拌, 可降低纤维素乙醇工业化生产成本, 具有很好的工业化应用前景。

## REFERENCES

- [1] Rostrup-Nielsen JR. Chemistry: making fuels from biomass. *Science*, 2005, 308(5727): 1421–1422.
- [2] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, 2007, 315(5813): 801–804.
- [3] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol*, 1997, 56(1): 1–24.
- [4] Chandrakant P, Bisaria VS. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Crit Rev Biotechnol*, 1998, 18(4): 295–331.
- [5] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30(5): 279–291.
- [6] Taniguchi M, Itaya T, Tohma T, et al. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*, 1997, 83(4): 364–370.
- [7] Kordowska-Wiater M, Targoński Z. Ethanol fermentation on glucose/xylose mixture by co-cultivation of restricted glucose catabolite repressed mutants of *Pichia stipitis* with respiratory deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Pol*, 2002, 51(4): 345–352.
- [8] Kötter P, Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 38(6): 776–783.
- [9] Moniruzzaman M, Dien BS, Skory CD, et al. Fermentation of corn fiber sugars by an engineered xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, 13(3): 341–346.
- [10] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, 267(5195): 240–243.
- [11] Deanda K, Zhang M, Eddy M, et al. Development of an arabinose fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(12): 4465–4470.
- [12] Dien BS, Hespell RB, Ingram LO, et al. Conversion of corn milling fibrous coproducts into ethanol by recombinant *Escherichia coli* strains KO11 and SL40. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, 13(6): 619–625.
- [13] Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, et al. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(8): 3381–3386

- [14] Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, et al. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, 108(3): 263–288.
- [15] Ad hoc panel of the board science and technology for international development. *Applications of biotechnology in traditional fermented foods*, Washington, DC: National Academies Press. 1992: 9–18.
- [16] Jeffries TW. Ethanol fermentation on the move. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 40–41.
- [17] Mohagheghi A, Evans K, Chou YC, et al. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl Biochem Biotech*, 2002, 98/100: 885–898.
- [18] Blattner FR, Plunkett G III, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453–1462.
- [19] Burnett ME, Liu J, Conway T. Molecular characterization of the *Zymomonas mobilis* enolase (eno) gene. *J Bacteriol*, 1992, 174(20): 6548–6553.
- [20] Conway T, Sewell GW, Ingram LO. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing, and identification of promoter region. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5653–5662.
- [21] Yanase H, Sato D, Yamamoto K, et al. Genetic engineering of *Zymobacter palmae* for production of ethanol from xylose. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(8): 2592–2599.
- [22] Reisch MS. Fuels of the future chemistry and agriculture join to make a new generation of renewable fuels. *Chem Eng News*, 2006: 3.
- [23] Kim IS, Barrow KD, Rogers PL. Kinetic and nuclear magnetic resonance studies of xylose metabolism by recombinant *Zymomonas mobilis* ZM4(pZB5). *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(1): 186–193.
- [24] Joachimsthal E, Haggett KD, Rogers PL. Evaluation of recombinant strains of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose media. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, 77/79(42): 147–157.
- [25] Zhang JQ, Sun YY, Guan FM, et al. The study of corn stover hydrolyzed by dilute acid. *J Cellul Sci Technol*, 2003, 10(2): 63–65.  
张继泉, 孙玉英, 关凤梅, 等. 玉米秸秆稀硫酸预处理条件的初步研究. *纤维素科学与技术*, 2002, 10(2): 32–3.