

运动发酵单胞菌共表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶发酵甘薯生产乙醇*

王广珺 何明雄 张义正**

(四川大学生命科学学院, 四川省分子生物学与生物技术重点实验室 成都 610064)

摘要 运动发酵单胞菌是乙醇发酵的极佳菌种, 但其所能利用的发酵底物范围狭窄, 不能利用淀粉作为发酵底物. 为增加其利用底物的范围使其能够水解淀粉, 本研究构建了3种表达淀粉酶的运动发酵单胞菌菌株: 1) *Zymomonas mobilis* (pAmyE)表达 α -淀粉酶; 2) *Z. mobilis* (pGA)表达葡萄糖淀粉酶; 3) *Z. mobilis* (pAmyGA)共同表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶. DNS法测定淀粉酶活显示, 每种转化菌株的胞外淀粉酶活性均高于胞内, 且两种淀粉酶共表达的酶活高于这两种淀粉酶单独表达的酶活之和, 说明这两种淀粉酶能够协同作用降解淀粉. 对于重组菌株*Z. mobilis* (pAmyGA), 约59.3%的淀粉酶活性都在胞外检测到. 用淀粉含量高且耐贮存的徐薯18匀浆加少量葡萄糖作为培养基直接用上述3个菌株发酵生产乙醇. 结果显示, 共表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的重组菌株*Z. mobilis* (pAmyGA)的乙醇产量为54.7 g/L, 达到了理论值的83.2%, 表明本研究得到了能够直接高效利用淀粉生产乙醇的运动发酵单胞菌的菌株. 图5 表1 参20

关键词 运动发酵单胞菌; 乙醇发酵; 甘薯; α -淀粉酶; 葡萄糖淀粉酶; 共表达
CLC TK63 : TQ920.1

Co-expression of α -amylase and Glucoamylase in *Zymomonas mobilis* and Direct Ethanol Production from Sweet Potato*

WANG Guangjun, HE Mingxiong & ZHANG Yizheng**

(Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis* is one of the best ethanol producers found in nature, however, this ethanologenic bacterium cannot hydrolyze starch abundantly existed in nature because of its narrow spectrum of fermentable carbohydrates. In this research, three genetic recombined strains were constructed to express amylolytic enzymes: (1) α -amylase expressing strain *Z. mobilis* (pAmyE), (2) glucoamylase expressing strain *Z. mobilis* (pGA) and (3) α -amylase and glucoamylase co-expressing strain *Z. mobilis* (pAmyGA). Most of the enzyme activity was detected in the medium, and the enzyme activity of amylolytic enzyme in co-expression strain was higher than the sum of each enzyme expressed individually, suggesting there was combined effect between α -amylase and glucoamylase in the hydrolysis of starch. For recombinant strain *Z. mobilis* (pAmyGA), 59.5% of the enzyme activity was detected in the extracellular fraction. Using the raw material of sweet potato xushu 18 with high starch content and good storage character and adding 5 g/L of glucose as medium, the direct ethanol production was determined via fermentation of the three recombined *Z. mobilis* strains. The results revealed that the recombinant *Z. mobilis* (pAmyGA) exhibited the highest level of ethanol production, 54.7 g/L ethanol in 3.5 days, which was 83.2% of the theoretical yield. Fig 5, Tab 1, Ref 20

Keywords *Zymomonas mobilis*; ethanol production; sweet potato; α -amylase; glucoamylase; co-expression
CLC TK63 : TQ920.1

近年来, 随着世界能源短缺情况及环境污染问题的

收稿日期: 2012-02-13 接受日期: 2012-03-31

*国家自然科学基金项目 (No. 30871344) 和国家科技部支撑计划项目 (No. 2007BAD78B04) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30871344) and the National Key Technology R & D Program of Ministry of Science and Technology of China (No. 2007BAD78B04)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yizhang@scu.edu.cn)

加剧, 生物燃料作为一种清洁能源将会发挥重要作用. 生物乙醇就是这样一种优良的替代能源, 其综合效益激发了人们对其生产成本和效率的深入研究, 以期获得高效发酵的菌株、低成本的底物和最佳的发酵条件. 运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 是一种革兰氏阴性菌, 而且被认为是一种较有潜力的燃料乙醇生产菌株, 与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和其他燃料乙醇基因工程菌相

比,它具有一些生理和代谢上的突出优势:乙醇产量和乙醇耐受性高、对糖的吸收效率高以及生物质产量低^[1-3]。运动发酵单胞菌可通过Entner-Doudoroff (ED) 途径快速代谢葡萄糖、果糖及蔗糖,然而由于这种较窄的发酵底物范围,使其不能降解自然界中广泛存在的复杂的多糖。

淀粉是在自然界中广泛存在的碳源,很多植物如马铃薯、甘薯、木薯和玉米等植物的淀粉含量都非常丰富,这些都是用于乙醇发酵的潜在底物^[4]。甘薯 (Sweet potato) 不仅是重要的饲料和工业原料作物,而且所含淀粉比例高,所含的氮源也很丰富,很适合作为燃料乙醇的生产原料。我国是世界上最大的甘薯生产国,甘薯是我国第七大作物,每年的产量超过1亿吨^[5]。利用甘薯生产燃料乙醇对于保障国家的能源安全具有重要意义。

目前已经建立的利用淀粉作为底物发酵生产乙醇的方法有两种:一种是将*Z. mobilis*和降解淀粉的酶类或者细菌混合进行发酵^[6-7];另一种则是利用遗传改造的方法,将分解淀粉的相关基因引入*Z. mobilis*中。后者由于其较低的乙醇发酵成本无疑将会是未来发展的方向。目前已经有几个淀粉降解相关基因引入*Z. mobilis*中,例如*Bacillus licheniformis*的 α -淀粉酶基因^[8]、*Aspergillus niger*的葡萄糖淀粉酶基因^[9]、*Xanthomonas albilineans*的 β -淀粉酶基因^[10],以及*Aspergillus awamori*的葡萄糖淀粉酶基因^[11]。

若要尽可能提高在发酵中淀粉的利用效率,就需要淀粉最大限度地降解成为*Z. mobilis*所能利用的葡萄糖,这个过程需要 α -淀粉、 β -淀粉、葡萄糖淀粉酶等酶的共同作用。之前的研究都只在*Z. mobilis*中表达了一种淀粉水解酶,这些菌株都不能高效利用淀粉产生乙醇。本研究中,我们在*Z. mobilis* CICC 10225中同时引入了来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 α -淀粉基因和来源于泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 的葡萄糖淀粉酶基因,构建了新的*Z. mobilis* CICC 10225 (pAmyGA) 重组菌株,并利用该菌株进行了甘薯发酵乙醇的实验。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养基

E. coli JM109和*Bacillus subtilis* WB500为本实验室保存。*Z. mobilis* CICC 10225购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC), 本实验室保存。pGA0, 本实验室构建, 提供*Aspergillus awamori*的葡萄糖淀粉酶基因的编码区。广宿主载体pBBR1MCS-2由Dr. Michael E. Kovach惠赠^[12]。RMG培养基 (1%酵母粉, 0.2% KH₂PO₄, 2%葡萄糖)。

1.2 载体构建

以运动发酵单胞菌总DNA为模板, 用引物Ppdc-F1+Ppdc-R和Ppdc-F2+Ppdc-R分别扩增出*Ppdc*启动子片段*Ppdc1*和*Ppdc2*; 用引物130-F+130-R1和130-F+130-R2分别扩增出*zmo130*基因的信号肽序列130 (1)和130 (2)。分别以枯草芽孢杆菌总DNA和质粒pGA0为模板, 用引物AmyE-F+AmyE-R和GA-F+GA-R分别扩增出 α -淀粉酶*AmyE*基因 (2 162 bp) 和葡萄糖淀粉酶*GA*基因 (1 920 bp)。

将*Ppdc1*、130 (1)和*AmyE*片段等摩尔混合作为模板, 引物Ppdc-F1+AmyE-R进行重叠PCR, 得到 α -淀粉酶基因表达单元*Ppdc-130-AmyE*。将*Ppdc2*、130 (2)和*GA*片段等摩尔混合作为模板, 引物Ppdc-F2+ GA-R进行重叠PCR, 得到葡萄糖淀粉酶基因表达单元*Ppdc-130-GA*。PCR采用高保真PCR聚合酶KOD-FX (东洋纺), 程序为94 °C预变性2 min, 98 °C 30 s, Tm温度-5 °C退火30 s, 68 °C延伸时间为30 s/kb, 30个扩增循环后68 °C延伸10 min。

载体pBBR1MCS-2和DNA片段*Ppdc-130-AmyE*分别用*Bam*HI酶切回收, T4 DNA连接酶连接, 所得载体命名为pAmy。载体pBBR1MCS-2和DNA片段*Ppdc-130-GA*分别用*Xba*I酶切回收, T4 DNA连接酶连接得到载体pGA。将上述两片段同时接入pBBR1MCS-2, 构建出载体pAmyGA。

载体pBBR1MCS-2和DNA片段*Ppdc-130-AmyE*分别用*Bam*HI酶切回收, T4 DNA连接酶连接, 所得载体命名为pAmy。载体pBBR1MCS-2和DNA片段*Ppdc-130-GA*分别用

表1 引物序列及扩增片段

Table 1 Primers sequence used for construction of recombinant plasmids

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Sequences	扩增片段 Fragment amplified
Ppdc-F1	CGGGATCCTTACGCTCATGATCGC	<i>Ppdc</i> 启动子 Promotor <i>Ppdc</i>
Ppdc-F2	CGTCTAGATTACGCTCATGATCGC	
Ppdc-R	AACCGCGGACTTTATCATTGCTTACTCCATATAT	
130-F	ATATATGGAGTAAGCAATGATAAAAGTCCCGCGTTTCATC	<i>zmo130</i> 分泌信号肽序列 Signal peptide <i>zmo130</i>
130-R1	TTGAATCGTTTGCAAACATATGAGCTGAAACGCTTTGAGAAAGG	
130-R2	AGAAGAGATCGGAACGACATATGAGCTGAAACGCTTTGAGAAAGG	
AmyE-F	CTCAAAGCGTTTCAGTCTCATATGTTTGCAAAACGATTCAAAAC	α -淀粉酶基因 α -amylase gene
AmyE-R	CATCATTAATCATCTTCCAGGG GGATCCGC	
GA-F	CTCAAAGCGTTTCAGTCTCATATGTCGTTCCGATCTCTCT	葡萄糖淀粉酶基因 Glucoamylase gene
GA-R	CTACCGCCAGGTGTCAGTCTCTAGAGC	

*Xba*I酶切回收, T4 DNA连接酶连接得到载体pGA. 将上述两片段同时接入pBBR1MCS-2, 构建出载体pAmyGA.

1.3 运动发酵单胞菌的电转化

挑取*Z. mobilis* ATCC 10225单菌落培养于5 mL RMG培养基中, 得到菌液全部接种于100 mL RMG培养基中, 培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为0.3~0.4. 于4 ℃、6 000 r/min 10 min收集菌体, 用10 mL 10%甘油清洗菌体, 于4 ℃、6 000 r/min 10 min收集菌体, 重复清洗一次, 将收集到的菌体悬浮于2 mL 10%甘油中, 感受态制备完成.

将1 μg 质粒与200 μL *Z. mobilis*电击感受态混合后在2 500 V、250 Ω 、50 μF 条件下电击, 电击后把菌液迅速转移至3 mL RMG培养基中静止恢复3 h, 取100 μL 菌液涂布于含氯霉素(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的平板, 3 d左右出现转化子. 挑取阳性克隆菌落PCR验证, 得到转化子*Z. mobilis* (pAmy)、*Z. mobilis* (pGA)和*Z. mobilis* (pAmyGA).

1.4 淀粉酶酶活测定

分别挑取*Z. mobilis* (pAmy)、*Z. mobilis* (pGA)和*Z. mobilis* (pAmyGA)重组子于RM培养基中30 ℃培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 至2.0. 离心所得上清为细胞外液, 收集菌体并进行超声破碎, 得到细胞内液. 分别将0.1 mL胞内和胞外与0.1 mL 0.5%可溶性淀粉混合, 在30 ℃反应10 min, 置于冰上停止反应. 加入0.2 mL DNS (3,5-二硝基水杨酸5 g, 苯酚1 g, 亚硫酸钠0.25 g, 酒石酸钠100 g 溶解在250 mL 0.5 mol/L NaOH中, 加水定容至500 mL), 540 nm下测定吸光值. 1个酶活单位即为上述条件下产生1 mg的还原糖所用的酶量. 含有空载体的转化子*Z. mobilis* (pBBR1MCS-2)作为对照.

1.5 发酵培养基制备

本实验采用的甘薯品种为徐薯18, 甘薯干磨碎后, 按照一定比例加水调浆, 加入葡萄糖5 g/L, 分装后于115 ℃灭菌15 min, 冷却后接入菌体, 发酵温度为30 ℃.

1.6 粗淀粉含量测定

粗淀粉含量的测定采用兰-爱农法^[13].

1.7 还原糖测定

参照GB5009.7-85食品中还原糖的测定.

1.8 乙醇浓度测定

采用气相色谱法. 以正丙醇为内标, 氢火焰离子化检测

器, GDX103填充柱, 柱箱温度150 ℃, 检测器温度250 ℃, 进样器250 ℃, 进样量3 μL .

2 结果

2.1 淀粉酶表达载体的构建

用于在*Z. mobilis*中表达外源基因的载体pBBR1MCS-2是一种在革兰氏阴性菌中的广宿主载体, 经研究证明, 该载体在*Z. mobilis*中具有良好的稳定性, 至少能够在50代中保持稳定^[11]. *Ppdc*是*Z. mobilis*丙酮酸脱羧酶基因的组成型强启动子, 能够高水平的表达所调控的基因^[14]. 通过融合PCR成功构建了*Bacillus subtilis*的 α -淀粉基因和*Aspergillus awamori*的葡萄糖淀粉酶表达单元, 并将这2个独立的表达单元分别和共同连接在载体pBBR1MCS-2上, 构建出载体pAmy、pGA和pAmyGA(图1). 载体pAmy、pGA能够在*Z. mobilis*中分别表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶, 载体pAmyGA能够在*Z. mobilis*中同时表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶, 所有的淀粉酶都来源于*Z. mobilis*的zmo130信号肽的定位下分泌到胞外.

2.2 淀粉酶表达载体转化*Z. mobilis*及转化子的鉴定

通过电转化将载体pBBR1MCS-2、pAmy、pGA和pAmyGA转入*Z. mobilis*中, 分别挑取阳性克隆用引物AmyE-F和AmyE-R, 以及GA-F和GA-R进行菌落PCR验证转化子, 结果如图2所示, 能够扩增出正确的AmyE基因和GA基因即为正确的*Z. mobilis*转化子. 至此, 我们得到了3个表达淀粉酶的*Z. mobilis*重组菌株: 1) *Z. mobilis* (pAmy)表达 α -淀粉酶; 2) *Z. mobilis* (pGA)表达葡萄糖淀粉酶; 3) *Z. mobilis* (pAmyGA)共同表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶; *Z. mobilis* (pBBR1MCS-2)作为对照菌株.

为了验证AmyE基因和GA基因在*Z. mobilis*中的表达情况, 将得到的*Z. mobilis*重组子接种于含有卡那霉素200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的RM培养基中, 生长至 $D_{600\text{ nm}}$ 约为2.0. 每种转化子各取300 μL 并分离胞内和胞外部分, 并分别进行SDS-PAGE和Native-PAGE. 结果如图3所示: 重组子*Z. mobilis* (pAmy)正确表达了AmyE基因($M_r 72 \times 10^3$); 重组子*Z. mobilis* (pGA)正确表达了GA基因($M_r 67 \times 10^3$); 重组子*Z. mobilis* (pAmyGA)同时表达了AmyE基因和GA基因. 从Native-PAGE的图中可以看出, 所表达的淀粉酶都具有活性.

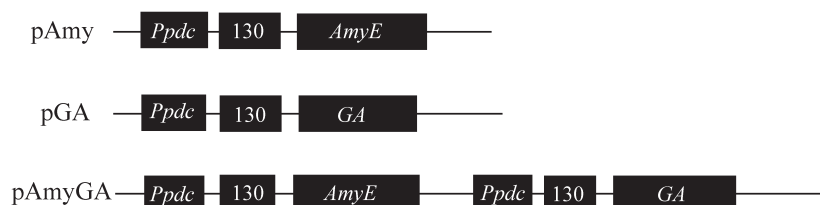
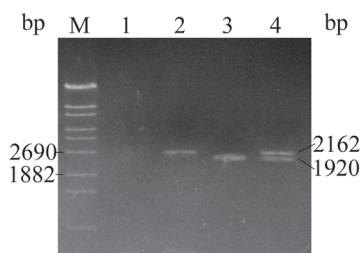


图1 淀粉酶表达元件示意图

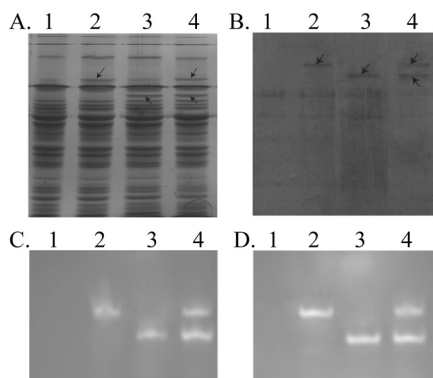
Fig. 1 Construction of pAmy, pGA and pAmyGA

图2 菌落PCR验证*Z. mobilis*转化子Fig. 2 Colony PCR of the *Z. mobilis* transformants

M: Marker λ EcoT14; 1: *Z. mobilis* (pBBR1MCS-2); 2: *Z. mobilis* (pAmy); 3: *Z. mobilis* (pGA); 4: *Z. mobilis* (pAmyGA)

2.3 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶在*Z. mobilis*中的共表达

为了进一步定量测定各个*Z. mobilis*转化子胞内和胞外的淀粉酶活性,用DNS法对各个菌株各部分的淀粉酶活性分别进行了测定。测定结果(图4)显示,信号肽zmo130能够将其所引导的淀粉酶不同程度地转运到胞外,60.1%的 α -淀粉酶活性和47.3%的葡萄糖淀粉酶活性都是在胞外检测到的。且对转化子*Z. mobilis* (pAmyGA)的测定结果显示, α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶共同表达的活性(胞内37.8 U/L,胞外56.7 U/L)大于 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶分别表达活性之和(胞内30.7 U/L,胞外39.3 U/L),且胞外部分检测到的淀粉酶活性(56.7 U/L)占总淀粉酶活性(94.5 U/L)的59.3%。

图3 *Z. mobilis*转化子AmyE基因和GA基因的表达情况Fig. 3 Expression of AmyE and GA in *Z. mobilis* transformants

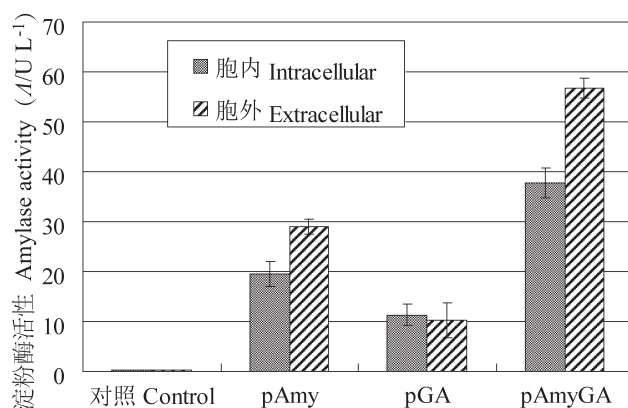
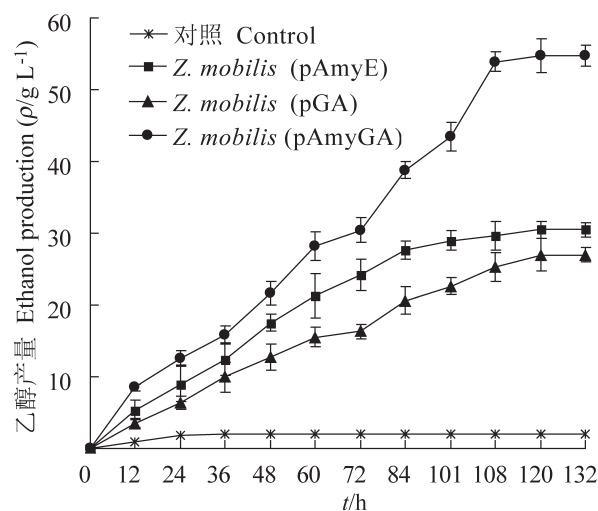
1: *Z. mobilis* (pBBR1MCS-2); 2: *Z. mobilis* (pAmy); 3: *Z. mobilis* (pGA); 4: *Z. mobilis* (pAmyGA).

A: 胞内部分的SDS-PAGE电泳; B: 胞外部分的SDS-PAGE电泳; C: 胞内部分的Native-PAGE电泳; D: 胞外部分的Native-PAGE电泳

A: SDS-PAGE gel of intracellular fractions; B: SDS-PAGE gel of extracellular fractions; C: Native-PAGE gel of intracellular fractions; D: Native-PAGE gel of extracellular fractions

2.4 利用甘薯匀浆发酵产生乙醇

将上述稀释的甘薯匀浆中加入5 g/L的葡萄糖后,按7%的接种量分别接种*Z. mobilis* (pBBR1MCS-2)、*Z. mobilis* (pAmyE)、*Z. mobilis* (pGA)和*Z. mobilis* (pAmyGA),每隔12 h取样测定乙醇产量。经过132 h的发酵,*Z. mobilis* (pAmyE)和

图4 *Z. mobilis*淀粉表达菌株胞内和胞外淀粉酶活性的测定Fig. 4 Distribution of α -amylase in different genetically engineered *Z. mobilis* strains图5 *Z. mobilis*淀粉酶表达菌株发酵乙醇产量Fig. 5 Ethanol production from sweet potato by engineered *Z. mobilis* expressing amylase

mobilis (pGA)分别获得了30.5 g/L和27.1 g/L的乙醇产量,而*Z. mobilis* (pAmyGA)的乙醇产量最高,为54.7 g/L(图5),远高于另外2个菌株,甘薯淀粉的转化率约为83.2%。结果说明, α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶共同作用降解淀粉的能力高于这2种淀粉酶分别作用时降解淀粉的能力。

3 讨论

在*Z. mobilis*发酵淀粉产生乙醇的过程中,淀粉这样的大分子是很难通过细胞膜进入细胞质中的,因此,淀粉水解酶的分泌过程就显得格外重要。本研究采用了 $phoC$ (酸性磷酸酶前体)基因zmo130的信号肽^[15]。zmo130信号肽属于II型分泌途径,细菌的II型分泌系统由至少12种不同的基因产物构成,组成了一个多蛋白复合体,该蛋白复合体横穿膜间质,可以直接将蛋白质通过形成的通道分泌到细胞外^[16]。

经以往的研究测定,目前广泛栽培的甘薯品种——徐薯

18的淀粉酶含量和酶活性在整个储存期的变化不明显,表现出了很好的淀粉耐储藏性^[18],作为发酵产生乙醇的原料,非常具有优势。本实验采用新收获一个月的徐薯18,匀浆后测定了其中淀粉和还原糖的浓度。淀粉含量为26.3%,还原糖含量为0.15%,基本与之前的研究一致。将甘薯匀浆稀释2.5倍,即发酵时采用400 g/L的原料浓度,淀粉含量为106.2 g/L。

本实验中含有淀粉酶的*Z. mobilis*三个菌株*Z. mobilis* (pAmyE)、*Z. mobilis* (pGA)和*Z. mobilis* (pAmyGA)在只有甘薯匀浆为底物的发酵条件下都不能生长并起始发酵,这可能是由于徐薯18的还原糖含量非常少,为0.15%,稀释2.5倍的发酵液中仅为0.06%,因此接种后培养基中几乎没有可利用的碳源促使*Z. mobilis*转化子产生淀粉酶,也就不能够降解淀粉,因此需要在发酵前在甘薯匀浆中加入5 g/L的葡萄糖。

对于 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶协同作用水解淀粉,以前的研究者已经取得很大的进展,主要集中在对马铃薯淀粉水解的研究上,并初步掌握了 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶协同作用的本质。即 α -淀粉酶无差别地切割 α -1,4糖苷键,从这个位置将大分子的淀粉切割为很多片段,为葡萄糖淀粉酶不断提供新的非还原末端,提高了葡萄糖淀粉酶的底物浓度;同时葡萄糖淀粉酶切割 α -1,4糖苷键和 α -1,6糖苷键,不断消耗 α -淀粉酶的产物,将 α -淀粉酶切割出的小片段进一步水解为葡萄糖。因此,无论是在对淀粉的水解效率还是水解时间上, α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶组成的淀粉双酶切体系对淀粉水解效率明显优于单酶体系^[17]。本实验的结果也说明了 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶能够协同作用较为彻底地降解淀粉。

目前,利用运动发酵单胞菌水解淀粉生产乙醇的研究主要为将*Z. mobilis*和降解淀粉的酶类或者细菌混合进行发酵,而将淀粉水解相关基因引入运动发酵单胞菌的研究则较少,所有的研究仅将一种淀粉酶转化运动发酵单胞菌,不能高效快速地水解淀粉生产乙醇^[8-9]。本实验首次使运动发酵单胞菌表达具有协同作用的2个淀粉酶组成的淀粉双酶切体系,能够在4 d内以83.2%的效率将甘薯淀粉转化为葡萄糖,转化效率较高。

燃料乙醇发酵主要考虑的因素是用廉价的材料和较低成本的原料处理过程获得高转化率的乙醇^[19]。徐薯18是我国广泛栽培的品种,该品种具有产量高、淀粉含量高、耐贮存和淀粉含量在储存期变化不明显的特点,非常适合作为发酵生产燃料乙醇。本项研究说明,徐薯18全粉的匀浆产物足以支持*Z. mobilis*的乙醇生产。除了较高的淀粉含量之外,徐薯18所含的氮源也非常丰富,可以支持*Z. mobilis*的生长。本实验中甘薯淀粉转化为乙醇的效率为理论值的83.2%,这也说明甘薯中没有对*Z. mobilis*发酵产生抑制的物质,这大大优于以木质纤维素作为原料的乙醇发酵^[20]。

4 结论

运动发酵单胞菌*Z. mobilis* CICC 10225 (pAmyGA)能够同时表达 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶,该菌株能够高效降解和利用淀粉,乙醇产量达到54.7 g/L,达到了理论值的83.2%。由于甘薯成本低,并且其水解物不抑制乙醇生产,因此利用*Z. mobilis* CICC 10225 (pAmyGA)进行乙醇发酵为生产实践提供了理论依据。

References

- 1 Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, Lawford HG. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, **108**: 263~288
- 2 Rogers PL, Lee KJ, Tribe DE. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration. *Adv Biochem Eng*, 1982, **23**: 27~84
- 3 Swings J, Ley JD. The biology of *Zymomonas*. *Bacterial Rev*, 1977, **41** (1): 1~46
- 4 Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotech Adv*, 2008, **26** (1): 89~105
- 5 Zhang L, Liu Q, Wang Q. Sweetpotato in China. In: Loebenstein G, Thottappilly G. The Sweetpotato. The Netherlands: Springer Dordrecht, 2009. 325~357
- 6 Reddy OVS, Basappa SC. Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis*: synergism and limitations. *Biotechnol Lett*, 1996, **18** (11): 1315~1318
- 7 Carlos MA, Guillermo RC, Faustino S, Danley ASC. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett*, 1999, **21** (3): 249~252
- 8 Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B, Baratti J. Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis* α -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol*, 1990, **153** (3): 219~225
- 9 Skotnicki ML, Warr RG, Goodman AE, Lee KJ, Rogers PL. High productivity ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. *Biochem Soc Symp*, 1983, **48**: 53~86
- 10 Su P, Delaney SF, Rogers PL. Cloning and expression of a β -glucosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol*, 1989, **9** (2): 139~152
- 11 He MX, Feng H, Bai F, Li Y, Liu X, Zhang YZ. Direct production of ethanol from raw sweet potato starch using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Afr J Microbiol Res*, 2009, **3** (11): 721~726
- 12 Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM,

- Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, **166** (1): 175~176
- 13 Wu GF (吴国峰), Li GQ (李国全), Ma YQ (马永强). 工业发酵分析. Beijing: China Light Industry Press (北京: 中国轻工业出版社), 1980
- 14 Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J Bacteriol*, 1987, **169** (3): 949~954
- 15 Linger JG, Adney WS, Darzins A. Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76** (19): 6360~6369
- 16 Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol*, 2001, **40** (2): 271~283
- 17 Fujii M, Homma T, Taniguchi M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **32** (7): 910~915
- 18 Tao X (陶向), Zhang YW (张勇为), Jiang YS (姜玉松), Wang HY (王海燕), Zhang YZ (张义正). Changes in root starch contents of sweet potato cultivars during storage. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (5): 741~744
- 19 Aggarwal NK, Nigam P, Singh D, Yadav BS. Process optimization for the production of sugar for the bioethanol industry from sorghum, a non-conventional source of starch. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, **17** (4): 411~415
- 20 Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol*, 2000, **74** (1): 25~33