

# 嗜热厌氧产乙醇杆菌乙醇代谢途径的初步研究

蒋宇<sup>1</sup>, 邵蔚蓝<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 214036, 江苏, 无锡)

(2. 南京师范大学生命科学院, 210097, 江苏, 南京)

**[摘要]** 以乙醇产量和细胞密度的提高为目标, 从碳源和氮源入手, 对嗜热厌氧产乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 的培养基作了初步优化以提高乙醇代谢途径中的关键酶的得率, 便于提纯. 葡萄糖浓度的提高对乙醇的产生有明显的诱导作用, 但当葡萄糖浓度高于 2%, 乙醇产量反而下降. 酵母粉对乙醇产量没有促进作用, 单纯提高酵母粉浓度对细胞密度无显著影响, 而同时提高葡萄糖和酵母粉浓度至 2.0%,  $OD_{600}$  最高可达 2.0. 2% 葡萄糖, 0.5% 酵母粉对单位细胞乙醇产量的诱导效果最佳. *T. ethanolicus* JW200 粗酶液中未检测到丙酮酸脱氢酶的活性, 经亲和柱 Cibacron Blue-3GA 部分纯化, 在 NAD 洗脱蛋白中检测到辅酶 A 依赖型乙醇脱氢酶的活性, 表明辅酶 A 依赖型乙醇脱氢酶是该菌乙醇代谢途径中的关键酶, 它和乙醇脱氢酶共同作用, 将乙酰辅酶 A 转化成乙醇.

**[关键词]** 嗜热厌氧产乙醇杆菌, 辅酶 A 依赖型乙醇脱氢酶, 葡萄糖, 酵母粉, 乙醇

**[中图分类号]** Q939.1, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2005)03-0069-05

## Primary Study on Ethanol Production Pathway in *Thermoanaerobacter ethanolicus*

Jiang Yu<sup>1</sup>, Shao Weilan<sup>1,2</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, 214036, Wuxi, China)

(2. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

**Abstract:** In order to induce the key enzymes of ethanol production pathway in *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 for purification, the paper optimized the medium to increase the ethanol and cell yields. Final ethanol production was obviously enhanced when increasing concentration of glucose, but no progress was detected when glucose reached higher than 2%. No greater ethanol production or cell biomass was observed if simply increase concentration of yeast extract. The maximum  $OD_{600}$  reached 2.0 when increasing glucose and yeast extract to 2.0%. The best ethanol induction medium contained 2.0% glucose and 0.5% yeast extract. Cell-free extracts were prepared from *T. ethanolicus* JW200, and no pyruvate decarboxylase activity was detected in it. After partially purified by affinity chromatography Cibacron Blue-3GA, CoA-acylating aldehyde dehydrogenase activity was detected in NAD elution proteins. The results indicated CoA-acylating aldehyde dehydrogenase was the key enzyme in ethanol production pathway of *T. ethanolicus* JW200, which convert acetyl-CoA to aldehyde, and then to ethanol by alcohol dehydrogenase.

**Key words:** *Thermoanaerobacter ethanolicus*, CoA-acylating aldehyde dehydrogenase, glucose, yeast extract, ethanol

## 0 引言

嗜热厌氧细菌通常能直接利用一些廉价的底物, 如纤维素、半纤维素以及淀粉<sup>[1]</sup>, 是一种有很大开发

收稿日期: 2005-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170511).

作者简介: 蒋宇, 女, 1978—, 博士研究生, 主要从事微生物基因工程的学习与研究. E-mail: biojiangyu@163.com

通讯联系人: 邵蔚蓝, 女, 1958—, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物分子生物学的教学与研究. E-mail: wlshao@jssmail.com.cn

潜力的生产工业乙醇的微生物.随着全球油价的持续攀升,对嗜热厌氧细菌乙醇代谢途径的研究有着深远的经济意义和科学意义.

嗜热厌氧产乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 是从热泉区分离得到的嗜热厌氧杆菌,能在 37 ~ 78 °C, pH 4.4 ~ 9.8 范围生长,最适生长条件是 69 °C, pH 5.8 ~ 8.5, 是产乙醇能力最强的极端微生物.该菌底物范围广,能广泛利用五碳糖和六碳糖,乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、丙酮酸和淀粉,不能利用纤维素.当底物浓度小于 1% 时,以乙醇和 CO<sub>2</sub> 为主要发酵产物<sup>[2]</sup>.

常用的乙醇生产菌的乙醇代谢途径以酿酒酵母和运动发酵单孢菌为代表,后者通过丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶将丙酮酸转化成乙醇<sup>[3]</sup>.细菌中还存在另外一条乙醇代谢途径,其中辅酶 A 依赖型乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶是乙醇代谢途径关键酶,比如大肠杆菌<sup>[4]</sup>.嗜热细菌中的乙醇代谢途径以 *Clostridium thermocellum* 和 *Thermoanaerobacter brockii* 之类的细菌为代表,前者只含 I 型乙醇脱氢酶 (Primary alcohol dehydrogenase, P-ADH),而后者同时含 I 型乙醇脱氢酶和 II 型乙醇脱氢酶 (Secondary alcohol dehydrogenase, S-ADH)<sup>[5]</sup>, I 型乙醇脱氢酶和 II 型乙醇脱氢酶以分别对正醇类和异醇类的强亲合力为区别. Bryant 等人 80 年代初从天然菌株中提纯并分析了和 II 型乙醇脱氢酶<sup>[5,6]</sup>, I 型乙醇脱氢酶已被克隆<sup>[7]</sup>.

本文从碳源和氮源入手,以乙醇产量和细胞密度的提高为目标对嗜热厌氧产乙醇杆菌做了初步培养基优化以提高乙醇代谢途径中的关键酶的得率,便于提纯;并分析了嗜热厌氧产乙醇杆菌乙醇代谢途径中的关键酶,初步拟定了该菌的乙醇代谢途径.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

嗜热厌氧产乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 (ATCC 31550) 由美国佐治亚大学微生物系 J. Wiegel 实验室惠赠.

### 1.2 主要试剂

乙酰辅酶 A、NAD、NADH 购自 Roche 公司;二硫苏糖醇、叠氮钠、乙醇脱氢酶 ADH、半胱氨酸盐酸盐、所有维生素购自上海生工生物工程技术有限公司;亲和柱填料 Cibacron Blue-3GA、刃天青购自 Sigma 公司.

### 1.3 培养基和培养条件

嗜热厌氧产乙醇杆菌基本培养基配方 (ATCC 1190): 0.15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.42% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O; 0.05% NH<sub>4</sub>Cl; 0.05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.018% MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0.2% 酵母粉 (Oxoid); 0.8% 葡萄糖; 0.5 mL/L 维生素溶液<sup>[8]</sup>; 5 mL/L Wolfe's Modified Mineral Elixir<sup>[8]</sup>; 1 mL/L 0.1% Resazurin; 40 μL/L 还原剂.

还原剂配方: NaOH (0.2 mol/L) 200.0 mL; Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O 2.5 g; Cysteine HCl · H<sub>2</sub>O 2.5 g. NaOH 煮沸同时充 N<sub>2</sub>, 稍冷却加 Na<sub>2</sub>S 和 Cysteine, 密封后高压灭菌, 121 °C, 20 min.

培养基煮沸充氮排氧, 稍冷却加还原剂, 分装预先充氮的厌氧菌培养管或血清瓶, 密封灭菌. 用无菌注射器按 1% 接种在厌氧菌培养管活化 - 70 °C 保藏菌种, 69 °C 静置培养.

### 1.4 细胞密度

培养过程中用注射器取样, 用分光光度计在 600 nm 处读数. 为排除氧指示剂的读数干扰, 操作熟练后培养基里可以不加刃天青指示剂.

### 1.5 乙醇产量测定

培养基中乙醇浓度的测定采用气相色谱法, 安捷伦 1490 气相色谱仪, φ3 × 1 不锈钢柱, 沪产 401 有机担体 (规格 GC60 ~ 80 目), 载气: 氮气, 柱温 140 °C, 检测器温度 200 °C, 进样温度 200 °C.

### 1.6 培养基的部分优化

#### 1.6.1 糖浓度对乙醇产量的影响

在基本培养基中依次加入葡萄糖至终浓度 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.6%, 2.0%, 2.4%, 2.8%, 平行培养 40 h, 分别在 20 h, 30 h, 40 h 取样测定细胞密度, 并测定培养 40 h 培养基乙醇终浓度.

#### 1.6.2 碳源和有机氮源对乙醇产量的影响

为研究基本培养基中的葡萄糖和酵母粉的含量和比例对乙醇产量的影响, 分 4 组实验: 1% 葡萄糖, 无氮数据

0.5% 酵母粉;1% 葡萄糖,2% 酵母粉;2% 葡萄糖,0.5% 酵母粉;2% 葡萄糖,2% 酵母粉. 平行培养 40 h,分别在 20 h,30 h,40 h 取样测定细胞密度,并测定培养 40 h 培养基乙醇终浓度.

### 1.7 嗜热厌氧产乙醇杆菌的固体培养

在不含还原剂和葡萄糖的优化培养基里加 2.5% 的琼脂粉,121 ℃,40 min 高压灭菌后在厌氧工作台 (Shellab 公司) 里加无菌还原剂和葡萄糖,待指示剂颜色退去后分装预先灭菌的厌氧管每管 4 mL 和厌氧瓶,凝固后密封 4 ℃ 保存. 铺平板前将活化后的菌液和厌氧管中融化的 4 mL 培养基在厌氧台里混匀,均匀地平铺在预先铺好底层培养基的厌氧瓶里,65 ℃ 倒置培养 48 h.

### 1.8 柱层析和乙醇代谢途径关键酶的酶活测定

#### 1.8.1 丙酮酸脱羧酶的测定

细胞培养至对数生长期后期至平衡期冰浴停止培养,4 ℃,8 000 r/min,10 min 离心收集细胞. ddH<sub>2</sub>O 洗涤细胞 2 次,用 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0,1 mmol/L DTT,0.02% NaN<sub>3</sub> 重悬细胞. 高压细胞破碎仪破碎细胞,1.2 × 10<sup>5</sup> kPa,2 次. 粗酶液 14 000 r/min,4 ℃,离心 1 h,取上清用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl pH8.0,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L DTT,0.02% NaN<sub>3</sub>) 透析.

酶活测定标准步骤:2 mL 缓冲液含 25 mmol/L MOPS (pH 6.5),1 mmol/L 焦磷酸硫胺素,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 mmol/L NADH;加透析后粗酶液 40 μL,50 ℃,平衡 30 min;加底物丙酮酸钠至终浓 6 mmol/L,50 ℃,反应 30 min;冰浴迅速中止反应,补加 NADH 3 mmol/L,分装两个比色杯各 1 mL,一份加入乙醇脱氢酶 (300 U/mg) ADH 3 U/mL,另一份加入等体积 ddH<sub>2</sub>O 为空白对照,室温反应 30 min;分光光度计 340 nm 处读数,计算相对于空白对照的下降值. 以 1 μmol/min 还原 NADH 为一个酶活单位.

以运动发酵单孢菌丙酮酸脱羧酶的大肠杆菌重组菌粗酶液作阳性对照,酶活测定步骤同上.

#### 1.8.2 亲和层析

亲和柱填料 Cibacron Blue-3GA 用去离子水溶胀过夜后装柱,用缓冲液 A 平衡 8~10 个柱体积. 透析后粗酶液上柱,0.5 mL/min,缓冲液 A 洗涤 8~10 个柱体积将未结合的蛋白彻底洗净. 在 2 个柱体积缓冲液 A 中加入 4 mmol/L 的 NAD 洗脱. 亲和柱可用 2 mol/L NaCl 清洗并保存.

#### 1.8.3 辅酶 A 依赖型乙醛脱氢酶的测定

亲和柱 NAD 洗脱蛋白 70% 硫酸铵沉淀,后用 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.5),1 mmol/L 二硫苏糖醇,0.02% 叠氮钠,20% 甘油透析;-20 ℃ 冰冻保存.

酶活测定标准体系:1 mL 标准体系含 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),0.5 mmol/L NADH,5 mmol/L 二硫苏糖醇,0.5 mmol/L 乙酰辅酶 A,亲和柱 NAD 洗脱蛋白 100 μL,60 ℃ 反应 30 min,冰浴终止反应,分光光度计 340 nm 处读数,计算相对于空白对照的下降值. 空白对照加等体积的 ddH<sub>2</sub>O 代替底物乙酰辅酶 A. 以 1 μmol/min 的速率还原 NADH 为一个酶活单位.

## 2 结果

### 2.1 糖浓度对细胞密度和乙醇产量的影响

根据预实验,在基本培养基中加入葡萄糖至终浓 1% 和 3%,平行培养,分别在 20 h,30 h,40 h,50 h 取样测定细胞密度和培养基乙醇含量,确定代谢产物乙醇累积至平衡的最短培养时间为 40 h,故确定优化实验的培养时间为 40 h.

如图 1 所示,糖浓度的增加对乙醇产量的提高有明显的诱导作用,但对细胞密度基本没有影响. 当葡萄糖浓度是 2% 时,乙醇产量最高. 当葡萄糖浓度继续增高,乙醇产量又开始回落.

### 2.2 碳源和有机氮源对细胞密度和乙醇产量的影响

如图 2 所示,合适的碳氮比对细胞密度有很大的影响. 以 1% 葡萄糖为碳源,单纯的将酵母粉从 0.5% 提高到 2%,并没有提高细胞密度,可能是由于碳氮比的失调造成的;同样对乙醇产量的提高也没有贡献,因此酵母粉不能诱导乙醇的产生.

万方数据

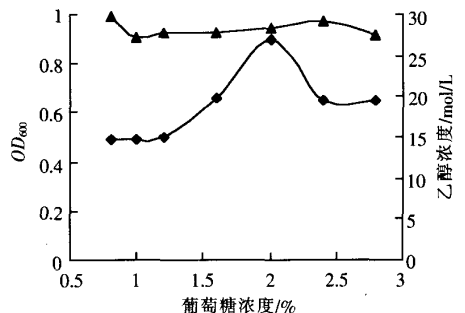


图 1 糖浓度对细胞密度和乙醇产量的影响

—▲— 细胞密度, —●— 乙醇浓度

而单纯提高糖浓,也不会提高细胞密度,但能诱导乙醇的产生.同时提高葡萄糖和酵母粉的浓度,能大幅提高细胞密度,培养基乙醇的终浓也达到最高,而从图 3 可以看出这部分的乙醇是由于细胞密度的提高而贡献的.以乙醇产量除以最高细胞密度作为纵坐标,也就是将每个细胞的产乙醇量进行比较,2% 葡萄糖,0.5% 酵母粉能达到乙醇产量的最佳诱导效果.

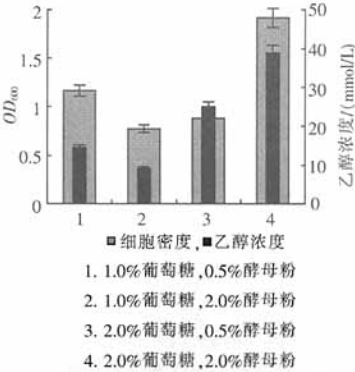


图 2 葡萄糖和酵母粉浓度对细胞密度和乙醇产量的影响

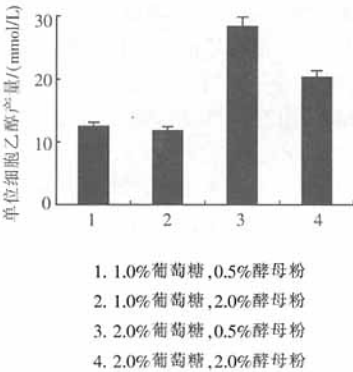


图 3 葡萄糖和酵母粉浓度对单位细胞乙醇产量的影响

2.3 嗜热厌氧产乙醇杆菌的固体培养

根据培养基优化的结果,2% 葡萄糖,2% 酵母粉最有利于细胞生长,故采用此培养基作固体培养.采用双层培养法可有效避免因高温下培养基表面脱水严重导致的表面菌落生长不稳定,也可避免冷凝水对表面菌落生长的干扰,能获得稳定的单菌落.36 h 即可看到透明的单菌落(图 4),培养基表面菌落较浅表层菌落生长快速,菌落直径最大可达 1.5 mm.

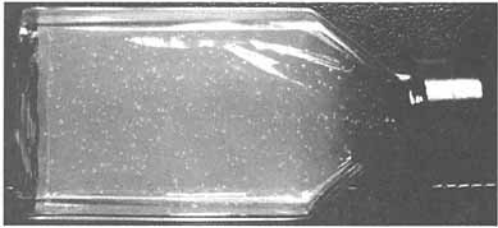


图 4 嗜热厌氧产乙醇杆菌的固体培养

2.4 乙醇代谢途径关键酶的酶活检测

由于粗酶液中蛋白种类很多,且含部分不能用透析去除的细胞破碎液中的天然底物,有关 NAD/NADH 氧化还原的酶对酶活测定有干扰,所以先用 NADH 平衡至本身的天然底物耗尽后,再加底物丙酮酸并补加 NADH,高温下反应;由于购买的 ADH 是常温酶,故加 ADH 后的第二步反应在常温下进行,空白对照不加 ADH,加等体积的 ddH<sub>2</sub>O.我们在粗酶液中未检测到丙酮酸脱羧酶的活性,而同时我们能测到阳性对照运动发酵单孢菌的丙酮酸脱羧酶的酶活为 0.36 U/mg.由此证明嗜热厌氧产乙醇杆菌中不存在丙酮酸脱羧酶.

我们尝试直接用粗酶液测定乙醛脱氢酶的酶活未成功,因为受到其它有关 NAD/NADH 氧化还原的酶的干扰. Cibacron Blue-3GA 是一种以染料为配基的填料,能结合核酸辅助因子、脱氢酶、激酶、限制性内切酶、白蛋白、干扰素等.用 NAD 能特异性洗脱所有以 NAD/NADH 作为辅酶的蛋白.根据这个原理,乙醛脱氢酶能被结合,且能被 NAD 洗脱.我们在 NAD 洗脱蛋白中检测到乙醛脱氢酶的酶活为 0.23 U/mg,由此可见乙醛脱氢酶是该菌乙醇代谢途径中的关键酶.

3 讨论

嗜热厌氧杆菌是产乙醇能力最强的极端微生物,它的乙醇代谢途径是不同于常用的乙醇生产菌,如酿酒酵母和运动发酵单孢菌.常温细菌,以运动发酵单孢菌为例,丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶是乙醇代谢途径中的关键酶,它们能将丙酮酸直接转化成乙醛,再转化成乙醇<sup>[3]</sup>.但迄今为止,还未在嗜热菌中发现过丙酮酸脱羧酶.因此,热稳定性的丙酮酸脱羧酶仍然是现今科学界的研究热点.根据本文的实验结果和 Bryant 等人的研究结果<sup>[5,6]</sup>,我们可以推测嗜热厌氧产乙醇杆菌的乙醇代谢途径的关键酶是辅酶 A 依赖型乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶,它们能将乙酰辅酶 A 转化成乙醛,再生成乙醇.这条途径也是嗜热细菌乙醇代谢的典型途径.

万方数据

由于无法在培养过程中利用粗酶液直接跟踪乙醛脱氢酶的酶活,我们以乙醇终产量和细胞密度的提高为目标对培养基进行初步优化,以确定高乙醇产量的诱导条件,进而提高乙醇代谢途径中的一系列关键酶的得率,便于提纯。结果表明,高糖对乙醇的产生有明显的诱导作用,但高于2%乙醇产量又开始回落,可能此时代谢主要转向有机酸的产生。酵母粉对乙醇的产生没有促进作用,但对细胞密度的提高有明显作用。据报道,酵母粉对嗜热厌氧产乙醇杆菌的生长有着不可替代的作用<sup>[2]</sup>。丙酮酸脱羧酶的酶活是用间接测定下一步乙醇脱氢酶的活性来测定的,而乙醇脱氢酶和辅酶A依赖型乙醛脱氢酶的酶活的测定又是介于NAD/NADH的氧化还原,故受到其它和NAD/NADH相关酶的干扰,因此,在粗酶液中直接测定丙酮酸脱羧酶和乙醛脱氢酶的活性比较困难。本文用亲和柱部分纯化粗酶液进行酶活测定获得成功。本文的研究结果为对其进行进一步深入研究奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] Lovitt R W, Shen G J, Zeikus J G. Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*[J]. J Bacteriol, 1988, 170(6): 2809—2815.
- [2] Weigel J, Ljungdahl L G. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen nov, sp nov, a new, extremely thermophilic, anaerobic bacterium[J]. Arch Microbiol, 1981, 128(2): 343—348.
- [3] Hopper T C, Doelle H W. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production[J]. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1983, 17(1): 152—157.
- [4] Jones P W, Turner J M. A model for the common control of enzymes of ethanolamine catabolism in *Escherichia coli*[J]. J Gen Microbiol, 1984, 130(5): 849—860.
- [5] Ben-Bassat A, Zeikus J G. *Thermobacteroides acetoethylicus* gen nov and spec nov, a new chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium[J]. Arch Microbiol, 1981, 128(2): 365—370.
- [6] Bryant F, Weigel J, Ljungdahl L G. Purification and properties of primary and secondary alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(3): 460—465.
- [7] Bryant F, Ljungdahl L G. Characterization of an alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* active with ethanol and secondary alcohols[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1981, 100(6): 793—799.
- [8] Holt P J, Williams R E, Jordan K N, et al. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the primary alcohol dehydrogenase gene from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 190(1): 57—62.
- [9] Freier D, Mothershed LR, Weigel J. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW 20[J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(2): 204—211.

[责任编辑:孙德泉]