

# 利用木糖和葡萄糖合成乙醇的新型重组大肠杆菌的研究

孙金凤 徐 敏 张 峰 王正祥\*

(江南大学生物工程学院 分子生物学研究室和工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

**摘 要:**利用 PCR 方法从运动发酵单孢菌染色体 DNA 扩增出乙醇合成途径的关键酶基因 *pdh*、*adhB*, 分别用 *tac* 启动子控制表达, 构建了可以在 *Escherichia coli* JM109 中表达的重组质粒 pKK-PA、pEtac-PA。初步的乙醇发酵结果表明, 在 *E. coli* 中只引入 *adhB* 基因不能拓宽其中的产乙醇途径, 引入 *pdh* 基因可以与宿主自身的 ADH 酶协同作用, 使碳流有效导向产乙醇方向。同时引入 *pdh*、*adhB* 基因可以在宿主 *E. coli* 中成功建立产乙醇途径。

**关键词:**重组大肠杆菌, 乙醇, 发酵

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2004) 05-0600-05

在微生物糖酵解过程中, 细胞将简单的己糖和戊糖代谢产生共同的中间产物丙酮酸, 然后再转化为各种发酵产物如乙醇、乳酸等。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 能够利用其天然的代谢途径分解己糖和戊糖, 产生酸性和中性产物如乳酸、CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> (甲酸)、乙酸、乙醇、琥珀酸等。但其缺乏有效代谢丙酮酸为乙醛的丙酮酸脱羧酶, 使得其乙醇合成能力十分微弱。运动发酵单孢菌 (*Zymomonas mobilis*) 能够利用葡萄糖产生仅有的产物乙醇和 CO<sub>2</sub>, 但不能利用木糖。丙酮酸脱羧酶 (PDC, E. C. 4. 1. 1. 1) 和乙醇脱氢酶 (ADH, E. C. 1. 1. 1. 1) 是 *Z. mobilis* 中乙醇生物合成途径的两个关键酶, 相应的编码基因 *pdh*、*adhB* 均已被克隆和测序<sup>[1~3]</sup>。*Z. mobilis* 的 PDC 对丙酮酸的 K<sub>m</sub> 值低于 *E. coli* 的任一竞争性酶, 因此, *Z. mobilis* 产乙醇基因在 *E. coli* 中的表达, 可使碳流有效导向产乙醇方向。将 *Z. mobilis* 的这两个基因结合在一起, 由一个 P<sub>lac</sub> 控制表达, 得到产乙醇人工操纵子 (*pet operon*)<sup>[4]</sup>, 并以此为基础构建了一系列重组质粒<sup>[5, 6]</sup>, 转化不同的大肠杆菌宿主得到了可有效产生乙醇的基因工程菌<sup>[7~9]</sup>。但 *pet* 操纵子因在构建过程中使用唯一 P<sub>lac</sub> 控制表达, 无法根据不同宿主细胞的代谢和遗传特征分别控制 *pdh* 和 *adhB* 基因的表达和表达水平; 乙醇发酵过程中也需要乳糖及其结构类似物的诱导。本研究用 P<sub>tac</sub> 分别控制 *pdh*、*adhB* 基因的表达, 构建了可以在 *E. coli* JM109 中表达的重组质粒。含 P<sub>tac</sub>-*pdh* 和 P<sub>tac</sub>-

*adhB* 的重组 *E. coli* 能够在无诱导物存在的情况下有效地利用葡萄糖和/或木糖生成乙醇。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

质粒 pUC18 购自上海生工生物工程技术有限公司; 质粒 pKK223-3 购自 NOVOGENE 公司; 质粒 pEtac 由本实验室沈 微博士构建<sup>[10]</sup>; 重组质粒 pKK-*pdh*、pKK-PA、pEtac-*adh*、pEtac-PA 为本研究中构建; pKK-*adh* 由本室先期构建和保存<sup>[11]</sup>。*E. coli* JM109 由本实验室保存。*Z. mobilis* ATCC31821 由澳大利亚新南威尔士大学 Rogers 教授馈赠。

### 1.2 工具酶和试剂

实验用各种 DNA 限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I、*Sal* I、*Bam* H I、碱性磷酸酶 CIAP 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自上海华美生物工程公司。柱式细菌基因组抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。质粒小量抽提试剂盒购自 Beyotime Biotechnology (江苏海门)。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、广范围蛋白质分子量标准为 Promega 公司产品。除特别注明外, 实验用各种试剂均为国产分析纯。

### 1.3 培养基和培养条件

大肠杆菌的培养采用 LB 培养基: 每升含有 10g 胰蛋白胨 (OXOID)、5g 酵母膏 (OXOID)、10g NaCl, 添加 1.5% 琼脂即为 LB 固体培养基。培养基中氨苄

**基金项目:**教育部骨干教师资助项目 (1696)

\* 通讯作者。Tel: 86-510-5879781; E-mail: zhengxiangw@yahoo.com

**作者简介:**孙金凤 (1972 -), 女, 江苏淮安人, 硕士, 讲师。现工作单位是淮阴工学院化学与生物工程系。

**收稿日期:** 2003-12-22, **修回日期:** 2004-03-18



青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan) 的终浓度分别为 100 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL。发酵培养基采用含有葡萄糖或木糖的 LB 培养基。37 $^{\circ}$ C 培养发酵。培养 *Z. mobilis* 的培养基:每升含有 100g 葡萄糖、2g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、5g 酵母膏。30 $^{\circ}$ C 培养。

#### 1.4 DNA 操作技术

*Z. mobilis* 染色体 DNA 提取和 DNA 片段胶回收、PCR 产物纯化参照华舜试剂盒操作说明。质粒 DNA 提取、DNA 的酶切、连接、转化、蛋白质 SDS-PAGE 等参考文献[12]进行。质粒 DNA 小量提取参照 Beyotime 试剂盒操作说明。

#### 1.5 *pdC*、*adhB* 基因和 P<sub>tac</sub>-*pdC* 片段的 PCR 扩增

根据 NCBI 公开的 *Z. mobilis* 中 *pdC*、*adhB* 基因的序列 (GenBank 登录序列号分别为 M15368 和 M15394) 以及本研究所构建的 pKK-*pdC* 序列,设计合成了下列引物,引物的下划线部分为人工置入的限制性位点。*pdC* 上游引物:5' GGGAATTCATGAGT-TACTACTGTCGGTAC 3'; 下游引物:5' GGCTCTCG-CAGTTATCGGICAAAGGCCAGCC 3'。*adhB* 上游引物:5' GGGAATTCATGGCTTCTTCAACTTTT 3'; 下游引物:5' ACCGGICGACAATATTTTTTGTITTTTGC 3'。P<sub>tac</sub>-*pdC* 上游引物:5' CCGTGAGATCCGGGCTTA 3'; 下游引物:5' CGCGGATCCGACCGCTTCTGC 3'。PCR 扩增时,使用 Taq DNA 多聚酶在 Biometra PCR 仪 (德国) 上进行。

#### 1.6 酶活测定

分别以重组质粒 pKK-*pdC*、pKK-*adh*、pKK-PA、pEtac-PA 转化 *E. coli* JM109。重组子用 LB 培养基振荡培养过夜,离心收集菌体,以磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 洗涤悬浮, French Pressure Cell Press 破壁。酶活测定参考文献[2,13]进行。丙酮酸脱羧酶 (PDC) 酶活测定时,加入辅酶焦磷酸硫胺素 (TPP) 和 MgCl<sub>2</sub> 作为辅助因子以及乙醇脱氢酶 (ADH, Sigma)。1 个酶活单位定义为在规定的条件下每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADH 所需的酶量。NADH 的变化通过测定 340nm 波长下吸光度值 (A<sub>340</sub>) 的变化来衡量。蛋白质浓度测定采用 Bradford 法<sup>[14]</sup>,以牛血清白蛋白 (Sigma) 作为标准。酶活计算公式<sup>[13]</sup>:  $\Delta A_{340} \times V / (6.22 \times b \times W) = U/mg$ 。 $\Delta A_{340}$  表示每分钟 340nm 处光密度的变化值;V 是酶活测定体系的体积 (mL);6.22 是 NADH 的毫摩尔吸光系数 mL/cm $\cdot$ mmol; b 是光径 (cm); W 是测定体系中含有的蛋白质质量 (mg)。

#### 1.7 SDS-PAGE

采用 5% 浓缩胶、12% 分离胶的不连续垂直板

电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色<sup>[12]</sup>。

#### 1.8 发酵试验

进行 37 $^{\circ}$ C 三角瓶发酵,250mL 三角瓶中发酵培养基装液量为 20mL。乙醇浓度采用气相色谱法测定,色谱参数为:进样温度 200 $^{\circ}$ C,检测温度 200 $^{\circ}$ C,柱温 140 $^{\circ}$ C。2m 不锈钢柱 (内径 3mm),采用沪产 401 白色有机担体。载气 N<sub>2</sub> 压力 0.2Mpa, H<sub>2</sub> 压力 0.1Mpa,空气压力 0.2Mpa。

## 2 结果

#### 2.1 *pdC*、*adhB* 基因和 P<sub>tac</sub>-*pdC* 片段的 PCR 扩增

以提取的 *Z. mobilis* 染色体 DNA 为模板,利用上述合成的相应引物,用 Taq DNA 聚合酶 PCR 扩增 *pdC*、*adhB* 基因,扩增出的片段大小与预计的大小一致,分别为 1.95 kb、1.3 kb。再以本研究构建的重组质粒 pKK-*pdC* 为模板,PCR 扩增 P<sub>tac</sub>-*pdC* 片段,大小为 2.3 kb 左右。

#### 2.2 重组质粒的构建和酶切鉴定

重组质粒 pKK-PA 与 pEtac-PA 的构建过程类似。为了方便操作,首先将 *pdC* 基因连接到克隆载体 pUC18 中。PCR 扩增出的 *pdC* 基因片段经纯化、胶回收后,用 EcoR I、Pst I 双酶切,在 T4 DNA 连接酶作用下与经同样双酶切并胶回收的 pUC18 载体连接,连接产物转化 *E. coli* JM109。在含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子,小量抽提质粒并进行验证。然后将 pUC-*pdC* 用 EcoR I、Pst I 双酶切并胶回收 *pdC* 片段,将该片段插入到 pKK223-3 载体中得到 pKK-*pdC*。再以 pKK-*pdC* 为模板 PCR 扩增带有 *tac* 启动子的 *pdC* 片段 P<sub>tac</sub>-*pdC*,该片段用 BamH I 酶切后,与经 BamH I 酶切并去磷酸化的 pKK-*adh* 连接,连接产物转化 *E. coli* JM109,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上得到的转化子进行质粒抽提,对重组质粒 pKK-PA 进行酶切验证。另外以 *Z. mobilis* 的染色体 DNA 作为模板 PCR 扩增 *adhB* 基因,经纯化、胶回收后以 EcoR I、Sal I 双酶切,并插入经同样双酶切胶回收的 pEtac 载体中得到 pEtac-*adh*。将上述扩增出的 P<sub>tac</sub>-*pdC* 片段,用 BamH I 酶切后,与经 BamH I 单酶切并去磷酸化的 pEtac-*adh* 连接,连接产物转化 *E. coli* JM109,在含有卡那霉素的 LB 平板上得到的转化子,进行质粒抽提,并对重组质粒 pEtac-PA 进行酶切验证。

对重组质粒 pKK-PA、pEtac-PA 酶切鉴定。pKK-PA、pEtac-PA 经 BamH I 酶切应该释放出 2.3 kb

的  $P_{tac}$ -*pdc* 片段。pKK-PA 经 *Sal* I 酶切、pEtac-PA 经 *Pst* I 酶切线性化, 预计片段大小分别为 8.1 kb 和 9.2 kb。酶切得到的片段大小与预计的片段大小相符, 表明 *pdc* 和 *adhB* 基因成功连接到载体 pKK223-3 和 pEtac 中。分别用 *EcoR* I、*Pst* I 酶切 pKK-PA 判断其中 *pdc* 和 *adhB* 基因的读框方向。若 *pdc* 和 *adhB* 基因的读框方向相同, *EcoR* I 酶切应得到 5.5 kb、2.6 kb 两个片段, *Pst* I 酶切应得到 6.55 kb、1.55 kb 两个片段。若 *pdc* 和 *adhB* 基因的读框方向相反, *EcoR* I 酶切应得到 7.6 kb、0.5 kb 两个片段, *Pst* I 酶切应得到 3.7 kb、4.4 kb 两个片段。同样, 用 *EcoR* I 酶切 pEtac-PA 可判断 *pdc* 和 *adhB* 基因的读框方向, 若二者同向, 应得到 6.9 kb、2.3 kb 两个片段; 若反向, 则 8.7 kb、0.5 kb 两个片段。酶切结果显示, pKK-PA、pEtac-PA 中 *pdc* 和 *adhB* 基因的读框方向均同向。

### 2.3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE

采用含有相应抗生素的 LB 培养基 40 mL, 将重组子 *E. coli* JM109 (pEtac-PA)、*E. coli* JM109 (pKK-*pdc*)、*E. coli* JM109 (pKK-*adh*)、*E. coli* JM109 (pKK-PA) 在 37 °C 振荡培养过夜, 离心收集菌体, 用 10 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 悬浮洗涤 3 次, French Pressure Cell Press 破壁。离心除去碎片, 取上清液 20  $\mu$ L, 加入 5  $\mu$ L 加样缓冲液 (5  $\times$ ), 混匀后煮沸 3 ~ 5 min, 离心取 15  $\mu$ L 上样。以 *E. coli* JM109 作为对照。

SDS-PAGE 结果 (图 1) 表明 *pdc* 和 *adhB* 基因在相应的重组菌中均得到了很好的表达, 分别在 60 kD、40 kD 附近出现了蛋白条带 (丙酮酸脱羧酶 PDC 的分子量为 60 kD, 乙醇脱氢酶 ADH 的分子量为 40 kD)。宿主菌 *E. coli* JM109 仅在 40 kD 附近有

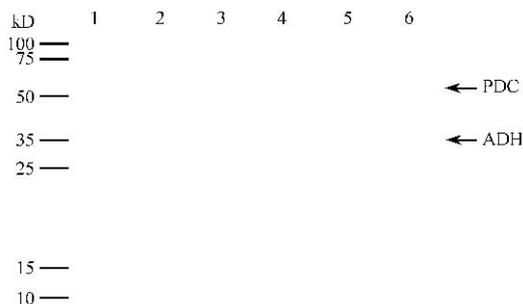


图 1 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinants' protein expressed in *E. coli* JM109

1. Molecular weight marker; 2. *E. coli* JM109 (pEtac-PA); 3. *E. coli* JM109 (pKK-*pdc*); 4. *E. coli* JM109 (pKK-*adh*); 5. *E. coli* JM109; 6. *E. coli* JM109 (pKK-PA).

很浅的条带。*E. coli* JM109 (pKK-*adh*) 仅在 40 kD 附近有一条明显的带, *E. coli* JM109 (pKK-*pdc*) 在 60 kD 附近有一条较浓的带。*E. coli* JM109 (pKK-PA)、*E. coli* JM109 (pEtac-PA) 分别在 60 kD 及 40 kD 位置有明显的条带。

### 2.4 重组子中 PDC、ADH 酶活测定

对重组菌中的 PDC 和 ADH 酶活进行了分析。*E. coli* JM109 (pKK-*pdc*) 中 PDC 酶活为 10.5 U/mg, *E. coli* JM109 (pKK-*adh*) 中 ADH 酶活为 3.79 U/mg, *E. coli* JM109 (pEtac-*adh*) 中 ADH 酶活为 3.17 U/mg, *E. coli* JM109 (pEtac-PA) 中 PDC 酶活为 6.95 U/mg, ADH 酶活为 3.29 U/mg。*E. coli* JM109 (pKK-PA) 中 PDC 酶活为 12.5 U/mg, ADH 酶活为 4.17 U/mg。*E. coli* JM109 中 ADH 酶活为 0.3 U/mg, PDC 酶活为零 (表 1)。酶活测定的结果进一步表明, *pdc*、*adhB* 基因在 pKK223-3 及 pEtac 载体中成功实现表达。

表 1 重组菌中 PDC 和 ADH 酶活

Enzymes	Specific activities/(U/mg)					
	JM109 (pKK- <i>pdc</i> )	JM109 (pKK- <i>adh</i> )	JM109 (pEtac- <i>adh</i> )	JM109 (pKK-PA)	JM109 (pEtac-PA)	JM109
PDC	10.5	0	0	12.5	6.95	0
ADH	0.3	3.79	3.17	4.17	3.29	0.3

### 2.5 重组菌的初步酒精发酵

采用含有葡萄糖和木糖的 LB 培养基作为发酵培养基进行重组菌的乙醇发酵。挑取各重组菌 *E. coli* JM109 (pEtac-PA)、*E. coli* JM109 (pKK-PA)、*E. coli* JM109 (pKK-*pdc*)、*E. coli* JM109 (pKK-*adh*) 及 *E. coli* JM109 单菌落接种于含有相应抗生素的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜作为种子液, 按 1% (V/V) 接种到发酵培养基。37 °C、200 r/min 振荡培养至对数生长期后期, 转移至 37 °C 培

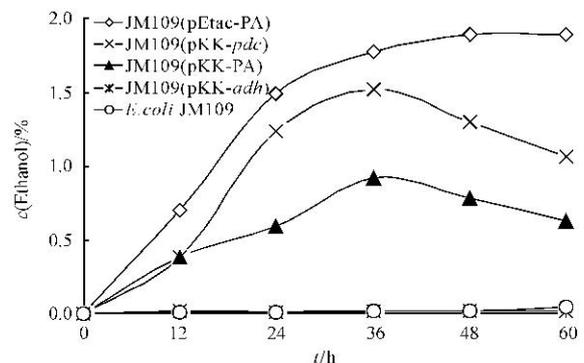


图 2 *E. coli* JM109 及其几种重组菌发酵葡萄糖生产酒精

Fig. 2 Ethanol formation of *E. coli* JM109 and its recombinants from glucose

养箱静止发酵。*E. coli* JM109、*E. coli* JM109 (pKK-*adh*) 发酵 5% 葡萄糖只能产生约 0.015% (V/V) 的微量乙醇。*E. coli* JM109 (pKK-*pd*c)、*E. coli* JM109 (pKK-PA)、*E. coli* JM109 (pEtac-PA) 发酵 5% 葡萄糖 36 h 分别产生 1.5%、1.0%、1.8% (V/V) 乙醇(图 2)。相似地,*E. coli* JM109 (pEtac-PA) 发酵 3.6% 木糖 36 h, 产生 1.28% (V/V) 乙醇。

### 3 讨论

*Pdc* 基因和 *adhB* 基因是 *Z. mobilis* 中乙醇生物合成途径的两个关键酶编码基因。本文研究了在 *E. coli* JM109 中分别只引入 *pd*c 基因或 *adhB* 基因时重组菌的乙醇发酵情况。结果显示,重组菌 *E. coli* JM109(pKK-*adh*) 仅能通过宿主自身固有的代谢途径产生极微量的乙醇,说明在 *E. coli* JM109 中只引入 *Z. mobilis* 的 *adhB* 基因不能拓宽其中的产乙醇途径。而引入产乙醇途径的丙酮酸脱羧酶基因 *pd*c 以及同时引入基因 *pd*c、*adhB* 可以将碳代谢流有效导向产乙醇方向。重组菌 *E. coli* JM109 (pKK-*pd*c)、*E. coli* JM109 (pKK-PA)、*E. coli* JM109 (pEtac-PA) 发酵 5% 葡萄糖产生 1.0%~1.9% (V/V) 乙醇。*E. coli* JM109 (pEtac-PA) 发酵 3.6% 木糖,产生 1.28% (V/V) 乙醇。在 *E. coli* 中只引入 *Z. mobilis* 的 *pd*c 基因只能使丙酮酸代谢流部分流向产乙醇方向,仅含有 *pd*c 基因的重组子是依赖宿主自身的 ADH 将乙醛还原和 NADH 氧化相偶联<sup>[14]</sup>。*E. coli* JM109(pKK-*pd*c) 可发酵 5% 葡萄糖产生 1.5% (V/V) 乙醇,其中由 *pd*c 基因编码的丙酮酸脱羧酶正是与 *E. coli* JM109 自身的乙醇脱氢酶协同作用,将碳流更多导向了产乙醇方向。

研究中还发现,*pd*c、*adhB* 基因的表达量过高会导致菌体生长减缓、产乙醇减少。以 pKK223-3 载体为基础, $P_{tac}$  控制下的 *pd*c 和 *adhB* 在 *E. coli* JM109 中得到高强表达,但乙醇产率和细胞生长都不理想。可能的原因是,*pd*c 和 *adhB* 在 *E. coli* JM109 中得到高强表达,一方面使代谢流流向三羧酸循环减少,细胞生长所需的物质和能量支撑减少;另一方面,用于还原乙醛为乙醇的 NADH 也相对减少,乙醇产率降低和对细胞有毒的乙醛在细胞内积累。在以 pEtac 载体为基础的 *pd*c、*adhB* 基因的表达中,由于在 pEtac 载体中安置有一个 *lacI* 基因,*pd*c、*adhB* 基因的表达水平较以 pKK223-3 为载体低(表 1),则乙醇产率和细胞生长明显改善。通过诱导 pEtac-PA 中的 *pd*c、*adhB* 基因高效表达,则乙醇产率下降,细胞

生长速度减慢(未发表数据)。可见,在乙醇重组菌的构建中,*pd*c 和 *adhB* 基因的适宜表达水平对乙醇形成和细胞生长是有益的。我们正在针对不同宿主细胞,确定 *pd*c 和 *adhB* 基因的最适表达水平,以及运用重组乙醇基因工程菌发酵木质纤维素水解物为乙醇的工艺研究。

### 参 考 文 献

- [1] Conway T, Osman YA, Konnan J I, et al. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 949 - 954.
- [2] Conway T, Sewell G W, Osman YA, et al. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 2591 - 2597.
- [3] Reynen M, Sahn H. Comparison of the genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 3310 - 3313.
- [4] Ingram L O, Conway T, Clark D P, et al. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 2420 - 2425.
- [5] Ingram L O, Conway T. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 397 - 404.
- [6] Alterthum F, Ingram L O. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 1943 - 1948.
- [7] Hespell R B, Wyckoff H, Dien B S, et al. Stabilization of pet operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4594 - 4597.
- [8] Dien B S, Hespell R B, Wyckoff H A, et al. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **23**: 366 - 371.
- [9] Dien B S, Nichols N N, Bryan P J O', et al. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, **84 - 86**: 181 - 196.
- [10] 沈 微,王正祥,唐雪明,等. 古细菌 *Pyrococcus furiosus* 嗜热  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌中的分泌表达. 中国酿造, 2003, (1): 12 - 14.
- [11] 谢丽萍, 诸葛健, 王正祥. 大肠杆菌中乙醇合成途径的构建. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2002, **21**: 116 - 119.
- [12] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [13] Stellmach B. 酶的测定方法. 钱嘉渊, 等译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [14] Ohta K, Beall D S, Mejia J P, et al. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2810 - 2815.

## Novel Recombinant *Escherichia coli* Producing Ethanol from Glucose and Xylose

SUN Jin-Feng XU Min ZHANG Feng WANG Zheng-Xiang\*

(Research Unit of Molecular Biology, School of Biotechnology, Southern Yangtze University and Key Laboratory of Industrial Biotechnology, MOE, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Genes *pdc* and *adhB* encoding essential ethanologenic enzymes in *Zymomonas mobilis* were amplified by using PCR technique. Recombinant plasmids pKK-PA, pEtac-PA were constructed in which genes *pdc* and *adhB* were placed under the control of *tac* promoter, respectively. Preliminary ethanol fermentation using the *E. coli* JM109 and its recombinants was carried out. The results indicated that introduction of *adhB* alone could not widen ethanologenic pathway in *E. coli* JM109. Introduction of *pdc* converted carbon flux to ethanologenic direction which was presumed to result from combined activities of pyruvate decarboxase from *Z. mobilis* and the native *E. coli* alcohol dehydrogenase. Introducing both *pdc* and *adhB*, ethanologenic pathway was successfully constructed in *E. coli*.

**Key words:** *Escherichia coli*, Ethanol, Fermentation

Foundation item: Outstanding Teacher Foundation, MOE (1696)

\*Corresponding author. Tel: 86-510-5879781; E-mail: zhengxiangw@yahoo.com

Received date: 12-22-2003

## 科学出版社《现代生命科学基础丛书》专辑

### 高级植物分子生物学

葛莘 编著 2004年7月出版 7-03-012478-2/Q.1337 定价:75元

本书论述了分子生物学与植物分子生物学简史、植物的基因组与基因组学、基因的结构、基因的表达与调控、基因的功能分析、植物细胞的信号转导、植物细胞的分化和器官发育、植物生物技术等内容,并附有植物学和分子生物学词汇。所有章节均先介绍基本知识和理论,然后讲述相关的专题。这些专题都是近年来植物分子生物学的重大突破,因此具有很高的科学意义和现实意义。同时,通过讲评经典的科学论文来达到能力培养的目的。本书图文并茂,适合作为大学高年级或研究生的教学参考书。

### 数量生态学

张金屯 著 2004年8月出版 7-03-012475-8/Q.1334 定价:48.00元

数量生态学的内容十分丰富。本书内容涉及到数量生态学的各个方面,包括过去半个世纪来有关数量生态学的主要发展,全面介绍现代数量生态学理论和方法,特别注重介绍国际上最常用的和近年来发展的新方法。全书反映了数量生态学发展的概貌,同时也展现了我国在这一领域的研究成果。对于有关学科的科技工作者和研究生,本书的内容已基本能够满足需要。书中所讲的方法,除植物生态学外,可以普遍应用于生物学、农学、林学、地理学、医药、环境科学等学科领域。

### 反刍动物营养学

冯仰廉 主编 2004年8月出版 7-03-013784-1/Q.1446 定价:78.00元

本书由国内反刍动物营养学领域的老中青专家编著,系统的总结了国内外在反刍动物营养研究的先进性和规律性成果。全书共10章,包括瘤胃微生物、瘤胃鱼瘤胃内容物的特性、能量与营养、蛋白质营养、碳水化合物营养、脂肪营养、矿物质营养、维生素营养、同位素示踪技术在反刍动物营养中的应用、反刍动物营养实验技术。内容充实而精练,理论联系实际,行文简洁流畅。可作为农业院校动物营养和饲料专业本科生和研究生的教材,还可供畜牧科技和畜牧管理人员参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:100717 北京东黄城根北街16号科学出版社科学分社,联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目,010-64012501

