

## 构建伴有 $\beta$ -葡萄糖苷酶表达的乙醇发酵大肠杆菌

张瑶, 罗紫臣, 高秋强, 鲍杰

华东理工大学生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

张瑶, 罗紫臣, 高秋强, 等. 构建伴有  $\beta$ -葡萄糖苷酶表达的乙醇发酵大肠杆菌. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1254-1267.  
Zhang Y, Luo ZC, Gao QQ, et al. Construction of an ethanologenic *Escherichia coli* strain with secretive expression of  $\beta$ -glucosidase. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1254-1267.

**摘要:** 研究构建能够分泌表达纤维素酶的产乙醇菌株, 实现降解木质纤维素生产乙醇的整合生物加工过程。文中通过克隆来自运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 的丙酮酸脱羧酶基因 *pdc* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB*, 并通过 Red 重组将二者整合到大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 基因组中, 首先构建了一株可以利用葡萄糖进行乙醇发酵的重组菌 *E. coli* P81。随后将来源于多粘芽胞杆菌 *Bacillus polymyxa* 1.794 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 在 *E. coli* P81 中进行了分泌表达, 得到了一株可以进行纤维二糖降解和乙醇发酵双重功能的重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*)。该菌胞外分泌  $\beta$ -糖苷酶活达到 84.78 mU/mL 菌液, 纤维二糖酶活达到了 32.32 mU/mL 菌液。该重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 以纤维二糖为碳源进行乙醇发酵, 乙醇得率达到了理论产率 55.8%, 而在葡萄糖和纤维二糖的共发酵中, 其乙醇产量达到了理论产率 46.5%。构建得到的此株整合生物加工大肠杆菌能够利用  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产乙醇, 为构建能利用木质纤维素分解产物生产燃料乙醇的高效、稳定生产用工程菌奠定了良好的基础。

**关键词:** 大肠杆菌, 乙醇发酵,  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 分泌表达, 整合生物加工

**Received:** March 16, 2013; **Accepted:** May 23, 2013

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB707406), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA022301), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2012M520850), the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Nos. WF0913005, WF1314036).

**Corresponding author:** Jie Bao. Tel: +86-21-64251799; E-mail: jbao@ecust.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB707406), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA022301), 中国博士后基金 (No. 2012M520850), 中央高校基本科研业务费专项资金 (Nos. WF0913005, WF1314036) 资助。

# Construction of an ethanologenic *Escherichia coli* strain expressing $\beta$ -glucosidase

Yao Zhang, Zichen Luo, Qiuqiang Gao, and Jie Bao

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** Constructing ethanologenic strains with cellulose activity is important to achieve consolidated bioprocessing of lignocellulose for ethanol production. In this study, we integrated the pyruvate decarboxylase gene *pdh* and alcohol dehydrogenase gene *adhB* from *Zymomonas mobilis* ZM4 into *Escherichia coli* JM109 by Red recombination method to generate recombinant strain *E. coli* P81 that could produce ethanol from glucose.  $\alpha$ -glucosidase gene *bglB* from *Bacillus polymyxa* 1.794 was cloned into the recombinant *E. coli* P81 and  $\beta$ -glucosidase was expressed to give a new recombinant strain *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) with dual functions of cellobiose degradation and ethanol production. The extracellular  $\beta$ -glucosidase activity was 84.78 mU/mL broth and the extracellular cellobiose activity of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) was 32.32 mU/mL broth. *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) fermented cellobiose to ethanol with a yield of 55.8% of the theoretical value, and when glucose and cellobiose were co-fermented, the ethanol yield reached 46.5% of the theoretical value. The construction of consolidated bioprocessing strain opens the possibility to convert cellobiose to ethanol in a single bioprocess.

**Keywords:** *Escherichia coli*, ethanol fermentation,  $\beta$ -glucosidase, secretive expression, consolidated bioprocessing

将纤维素酶生产、纤维素水解和乙醇发酵组合在一起进行纤维素乙醇的生产被称之为整合生物加工工艺 (Consolidated bioprocessing, CBP), 具备这 3 个功能的发酵菌种被称之为整合生物加工菌种, 这一工艺是木质纤维素生物炼制的重要方向之一<sup>[1-2]</sup>。在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 等传统乙醇生产菌株中采用表面展示 (Surface display) 纤维素酶或纤维小体, 从而构建纤维素乙醇 CBP 菌株是目前最主要的研究潮流<sup>[3]</sup>。Zhao 等<sup>[4-5]</sup>在酵母表面组装一系列不同功能的纤维小体, 获得能够代谢磷酸浸泡微晶纤维素 (PASC) 得到乙醇的两株重组菌 HZ1886(CipA3-EGII-CBHII-BGL1)和 HZ1885(CipA1-EGII-CBHII-BGL1), 此外, 通过在酿酒酵母表面装载来源于热纤维梭菌

*Clostridium thermocellum* 的纤维小体, 得到重组菌 *S. cerevisiae* strain L2612 能够利用 D-木糖生产乙醇。Kondo 等<sup>[6]</sup>在 *S. cerevisiae* 中表面展示了来源于棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *bglI*, Kotaka 等<sup>[7]</sup>在酿酒酵母表面展示了来自米曲霉 *Aspergillus oryzae* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶基因, 并以  $\beta$ -葡聚糖作为底物进行乙醇发酵, 转化率达到理论值的 69.6%。Ryu 等<sup>[8]</sup>则在大肠杆菌中导入乙醇路径, 同时表面展示来源于解纤维梭菌 *Clostridium cellulolyticum* 的 3 种纤维素酶, 以稀酸处理的玉米秸秆为底物获得乙醇。

在使用表面展示方法进行纤维素酶和纤维小体的表达时, 纤维素酶的分布局限于细胞表面, 酶量受限于表面的结合位点, 且与底物木

质纤维素的接触空间有限,不利于催化反应。同时,表面展示过程相对复杂,需要多种辅助蛋白并且跨膜分泌<sup>[9-10]</sup>。分泌表达纤维素酶也是一种重要的构建 CBP 菌株的思路,通过在生物体内构建新的分泌表达体系或者利用自有的分泌体系将纤维素酶分泌到胞外,进入反应体系水解纤维质。分泌表达的纤维素酶可以与底物充分接触,并随着发酵的进行,不断地在反应体系内积累,相应的催化能力也随之增强。同时分泌表达系统相对简单,可通过启动子的强弱和信号肽的种类来控制分泌能力的强弱,调整体系内各类纤维素酶的比例,形成良好的协同作用。

由于大肠杆菌遗传背景清楚、繁殖快、基因操作成熟,所以本文选用大肠杆菌为出发菌株。纤维素降解酶系是由外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶组成,其中  $\beta$ -葡萄糖苷酶可将纤维二糖水解生成葡萄糖,从而减少纤维二糖的积累及酶解过程的反馈抑制,是纤维素水解的最后一步。且相比纤维素酶和半纤维素酶作用的底物是不溶性的大分子, $\beta$ -葡萄糖苷酶的底物纤维二糖为可溶分子,容易精确测定,因此相比另外两类纤维素酶,更适于 CBP 菌株分泌表达的研究<sup>[11-14]</sup>。首先通过 Red 重组,将来源于运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 的丙酮酸脱羧酶基因 *pdh* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB* 整合到大肠杆菌 JM109 基因组,构建了一株可以进行乙醇发酵的菌株 *E. coli* P81。之后,选择将对纤维二糖具有较高专一性的来自多粘芽胞杆菌 *Bacillus polymyxa*  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglB*<sup>[15]</sup>克隆到 *E. coli* P81,构建得到一株能够分泌  $\beta$ -葡萄糖苷酶到胞外的重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*),实现了纤维二糖为碳源进行

乙醇发酵的整合生物加工。本工作为今后构建实用的纤维素酶分泌表达型的乙醇发酵 CBP 工程菌提供了研究基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒与菌株

本实验中所用的菌株和质粒如表 1 所示。其中 *Escherichia coli* JM109 作为基因 *pdh*、*adhB* 的整合宿主菌, *E. coli* DH5 $\alpha$  用于基因的克隆和筛选,运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4(ATCC 31821) 是基因 *pdh*、*adhB* 的来源菌株,多粘芽胞杆菌 *Bacillus polymyxa* 1.794 是基因 *bglB* 的来源菌株。

RM 培养基: 20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母浸出物、2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。SOC 培养基: 20 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母浸出物、0.5 g/L NaCl、2.5 mmol/L KCl、10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、20 mmol/L 葡萄糖。M9 基本培养基: 6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、3 g/L  $\text{K}_3\text{PO}_4$ 、0.5 g/L NaCl、1 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、2 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、0.1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 。

*Taq*、Primer STAR 聚合酶和 pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶购自 Fermentas 公司;质粒抽提、琼脂糖凝胶试剂盒购自上海捷瑞生物工程公司;PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程公司。Qiagen 基因组抽提试剂盒购自美国 Qiagen 公司;葡萄糖试剂盒购自上海科欣生物技术研究所以。

大肠杆菌 JM109、DH5 $\alpha$  的培养条件为 37  $^\circ\text{C}$ 、200 r/min,含有温敏质粒 pKD46、pCP20 时培养条件为 30  $^\circ\text{C}$ 、200 r/min。运动发酵单胞菌 ZM4 在 RM 培养基中 30  $^\circ\text{C}$  静置厌氧培养,多粘芽胞杆菌的培养条件为 37  $^\circ\text{C}$ 、220 r/min。

表 1 本实验中所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype and/or salient characteristics	Sources
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> JM109	RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, $\Delta(\text{lac-proAB})/\text{F}' [\text{traD36, proAB}^+, \text{lacIq, lacZ}\Delta\text{M15}]$	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F-, $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$ , $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$ , deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-,mk+), phoA, supE44, $\lambda^-$ , thi-1, gyrA96, relA1	Novagen
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Wild type strain, ATCC 31821	ATCC
<i>B. polymyxa</i> 1.794	Wild type strain, CGMCC 1.794	CGMCC
<i>E. coli</i> P8	JM109 $\Delta pfl::kan-P_{tac}-pdc-adhB$	This study
<i>E. coli</i> P81	JM109 $\Delta pfl::P_{tac}-pdc-adhB$	This study
<b>Plasmids</b>		
pGEX-4T-1	Template plasmid, carrying $P_{tac}$ promoter gene	Pharmacia
pUC19	Expression vector, used for <i>bglB</i> expression in <i>E. coli</i> p81	Novagen
pMD19-T	An easy cloning vector used for cloning genes <i>pdc</i> , <i>adhB</i> and $\text{Kn}^R$	TaKaRa
pKD4	Template plasmid, carrying kanamycin-resistance gene ( $\text{Kn}^R$ ) flanked by the recognition sites (FRT sites) of the yeast FLP recombinase in direct repeats	Biovector
pKD46	Helper plasmid, carrying bacteriophage $\lambda$ -Red recombinase genes under the control of arabinose-inducible ParaBAD promoter ( <i>araBp-gam-bet-exo</i> )	Biovector
pCP20	Helper plasmid, carrying FLP recombinase gene under the control of an temperature sensitive promoter	Biovector

实验中使用的卡那霉素和氨苄青霉素终浓度如无特别标明, 均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。发酵实验中种子在装有 5 mL LB 的试管内培养, 发酵在 250 mL 的锥形瓶中进行, 装液量为 50 mL。

## 1.2 基因 *pdc*、*adhB* 和 *bglB* 的克隆

运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* ZM4、多粘芽胞杆菌 *B. polymyxa* 1.794 和大肠杆菌的基因组使用 Qiagen 基因组抽提试剂盒提取。以 *Z. mobilis* ZM4 的全基因组为模板, 高保真酶 Primer STAR 为聚合酶扩增基因 *pdc*、*adhB*, 在 PCR 产物中加入 *r-Taq* 聚合酶 72  $^{\circ}\text{C}$  保温 20 min, 添加 A 尾

巴。以质粒 pGEX-4T-1 为模板克隆启动子  $P_{tac}$  后, 利用 Overlap PCR 将基因 *pdc*、*adhB* 连接到启动子  $P_{tac}$  下游, 得到质粒 T- $P_{tac}-pdc-adhB$ 。以质粒 pKD4 为模板, 根据丙酮酸甲酸裂解酶 *pflA*、*pflB* 的基因序列, 扩增两翼各包含一段长为 40 bp 的 *pfl* 基因两端序列的片段 *kan*。

以多粘芽胞杆菌 *B. polymyxa* 1.794 基因组为模板克隆  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglB*, 通过酶切连接到载体 pUC19, 并添加启动子  $P_{43}$  和信号肽 *NprB* 辅助其分泌表达, 构建质粒 pUC19- $P_{43}$ -*NprB-bglB*。

表 2 本实验中所用的引物序列

Table 2 Primers used in this study

Amplified fragments	Primer	Sequence (5'-3')
<i>pdc</i>	Pdc1	GGAATTCC <u>CATATG</u> AGTTATACTGTCGGTACCTA ( <i>Nde</i> I)
	Pdc2	ACGCG <u>TCGAC</u> TAGAGGAGCTTGTTAACAGG( <i>Sal</i> I)
<i>adhB</i>	Adh1	ACGCG <u>TCGAC</u> GAGGTTATAGCTATGGCTTCTTCAACTTT( <i>Sal</i> I)
	Adh2	TCCG <u>CTCGAG</u> TTTTCTGTTTTGAAATTAG ( <i>Xho</i> I)
<i>kan</i>	Kan1	CGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTCTTGAGCGA TTGTGTAGG
	Kan2	ACTCAATAAAGTTGCCGCTTACGGGGAAATTAGAACATT <u>CTCGAG</u> TTAA GGTTAACGG( <i>Xho</i> I)
<i>P<sub>tac</sub>-pdc-adhB</i>	Over1	GGGAATTCC <u>CATATG</u> GGGAGCTGTTGACAATTA( <i>Nde</i> I)
	Over2	GTACCGACAGTATAACTCATGAATACTGTTTCCTGTGTGA
	Over3	TCACACAGGAAACAGTATTCATGAGTTATACTGTCGGTAC
	Over4	CCG <u>CTCGAG</u> TTTTCTGTTTTGAAATTAGA( <i>Xho</i> I)
<i>kan-P<sub>tac</sub>-pdc-adhB</i>	Red1	CGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTCTTGAGCGA TGTGTAGG
	Red2	ACTCAATAAAGTTGCCGCTTACGGGGAAATTAGAACATTCTCGGTTAAGG TTAACGG
<i>bglB</i>	bgl1	CGGGATCCATGCGCAACTTGACCAAGAC ( <i>Bam</i> HI)
	bgl2	CCC <u>AAGCTT</u> TTAAAACCCGTTCTTCGCC ( <i>Hind</i> III)
	Jd1	ATACTGGGTCATTTACCTGC
	Jd2	CAATCCATCTTGTTCAATCA
	Jd3	ATAGTGATAGTCGGTTTTGC
	Jd4	CAGAATGAAGCGCGGAATAA

The underlined sections mean the restriction enzyme sequences indicated by the parentheses the end.

### 1.3 大肠杆菌 Red 重组及重组菌的筛选

在电转感受态细胞中加入总计 500 ng 的电转样品, 混匀, 冰浴 30 min 后转入 0.1 cm 预冷的电击杯, 用电转仪 (Gene PulserXell™, BIO-RAD) 电击转化, 电转条件为: 200 Ω, 25 μF, 2 000 V, 4~5 ms<sup>[16-18]</sup>。电击后立即加入 SOC 培养基, 37 °C、150 r/min 孵育 1 h 后, 涂布于含 25 μg/mL 含卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 培养(重组原理见图 1), 于含高浓度卡那霉素(100 μg/mL) 的 LB 抗性平板上复筛, 并通过菌落 PCR 鉴定、筛选。

抗性标记基因的消除: 将辅助质粒 pCP20 转入 Red 重组后的阳性菌株内, 30 °C 培养 8 h 后, 转接, 在 42 °C 培养 12 h, 消除质粒 pCP20。涂布于 LB 平板 37 °C 培养, 将长出的单菌落分别在 LB 与含氨苄青霉素、卡纳青霉素的 LB 平板上划线, 37 °C 培养 12 h, 获得对两种抗生素均敏感的克隆<sup>[19]</sup>。

### 1.4 β-葡萄糖苷酶活测定

粗酶液的制备: 培养 12 h 的菌株按 1% 接种量接种于 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 2, 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min,

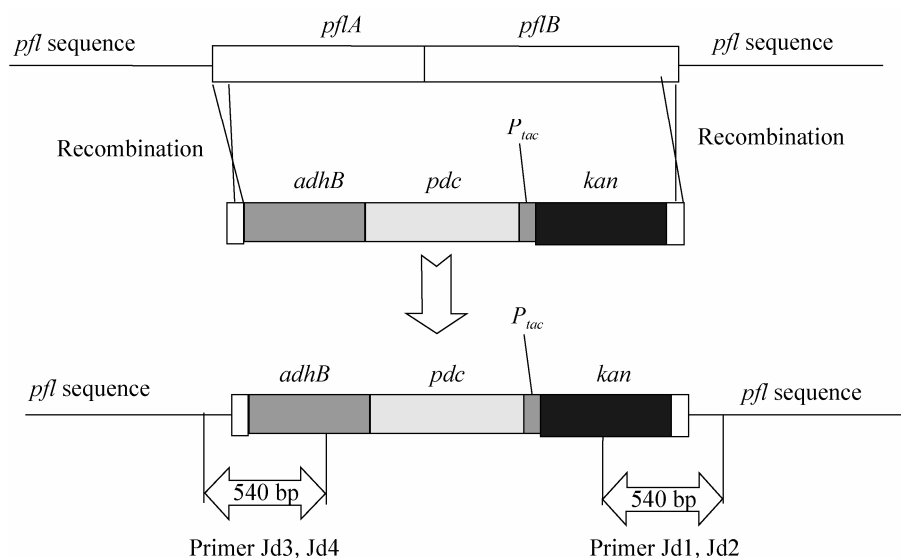


图1 Red重组方法在 *E. coli* 基因组上整合乙醇代谢途径基因 *pdc* 和 *adhB*

Fig. 1 Integration of ethanol fermentation pathway genes *pdc* and *adhB* into *E. coli* genome DNA by Red recombination method.

将上清冰浴，缓慢加入 55% 饱和度的研磨硫酸铵，同时不断搅拌，沉淀上清中的蛋白，10 000 r/min、4 °C 离心 10 min，去上清后用 1 mL 预冷的 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 溶解沉淀，即为发酵液粗酶液；将离心得到的菌体用预冷的 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 洗涤两次后，用 1 mL 柠檬酸缓冲液悬浮，超声破碎后，10 000 r/min、4 °C 离心，上清即为全细胞粗酶液；另取离心后所得的菌体，用超纯水洗涤 2 次后，加入含 20% (W/V) 蔗糖、0.5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  的 33 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液悬浮菌体，在室温孵育 10 min 后，8 000 r/min、4 °C 离心 8 min 去上清，随后加入超纯水悬浮菌体，室温孵育 10 min，8 000 r/min 4 °C 离心 8 min，上清即为周质粗酶液<sup>[20]</sup>；将制备周质粗酶液时离心所得的细胞超声破碎，10 000 r/min、4 °C 离心，上清即为细胞质粗酶液。

以对硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (pNPG) 作为底物测定  $\beta$ -糖苷酶酶活<sup>[21]</sup>。1 U 酶活定义为规定条件下 1 min 之内释放出 1  $\mu\text{mol}$  的对硝基苯酚所对应的酶量。在 2 mL 的反应体系中，先加入 0.8 mL 柠檬酸缓冲液 (100 mmol/L, pH 6.0) 以及 1 mL 8 mmol/L pNPG (由 50 mmol/L pH 6.0 柠檬酸缓冲液溶解)，37 °C 预热后加入 0.2 mL 的经过适当稀释的粗酶液，在 37 °C 条件下反应 10 min，加入 1 mL 的 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应，最后在 405 nm 处测定吸光度值 (酶空白为：1 mL 柠檬酸缓冲液+1 mL 8 mmol/L pNPG；底物空白为：1.8 mL 柠檬酸缓冲液+0.2 mL 粗酶液)。

以纤维二糖为底物测定纤维二糖酶的酶活。1U 纤维二糖酶活定义为规定条件下 1 min 催化纤维二糖生成 1  $\mu\text{mol}$  的葡萄糖所需的酶量<sup>[22]</sup>。在 2 mL 的反应体系中，先加入 1 mL 80 mmol/L

的纤维二糖 (由 100 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液溶解), 37 °C 预热后加入 1 mL 粗酶液, 37 °C 反应 1 h 后, 利用葡萄糖试剂盒测定生成的葡萄糖的量<sup>[23]</sup>。(酶空白: 1 mL 柠檬酸缓冲液+1 mL 纤维二糖; 底物空白: 1 mL 柠檬酸缓冲液+1 mL 粗酶液)。

### 1.5 发酵与分析

培养 12 h 的菌株按 1% 接种量接种于含有 50 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 培养到  $OD_{600}$  为 0.2<sup>[24]</sup>, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 37 °C、200 r/min 发酵培养。理论上, 1 分子的纤维二糖水解可得 2 分子的葡萄糖, 1 分子的葡萄糖代谢可产生 2 分子的乙醇, 据此转化纤维二糖、葡萄糖所产生乙醇的量, 为乙醇的理论产量, 而实际发酵中代谢所得乙醇与理论上消耗相同量糖产生的乙醇的比值, 为实际乙醇的得率, 即按照理论得率为 100% 计算的得率。发酵液中的乙醇含量和残余的葡萄糖、纤维二糖的浓度由高效液相色谱进行定量分析, 色谱柱 (LC-20AD) 使用 Aminex HPX-87H column

(Bio-Rad USA) 离子交换柱, 流动相为 5 mmol/L 的  $H_2SO_4$ , 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 65 °C, 采用示差折光检测器 RID-10A (岛津公司), 检测器温度为 40 °C。所有的样品在 10 000 r/min 离心 5 min 后, 上清经过 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌型乙醇发酵工程菌 *E. coli* 的构建与酶活测定

通过 PCR 克隆得到基因 *pdC*、*adhB*, 及含同源臂的 *kan* 基因, 并分别连接到质粒 pMD19-T 进行酶切鉴定。通过 Overlap PCR 将 *pdC-adhB* 连接到  $P_{tac}$  启动子下游, 得到片段  $P_{tac}$ -*pdC-adhB*, 随后插入含同源臂的 *kan* 基因中, 与载体 pMD19-T 连接, 构建得到质粒 pMD19-*kan-P\_{tac}*-*pdC-adhB* (图 2A)。将 PCR 克隆得到  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 连接到载体 pUC19, 得到质粒 pUC19- $P_{43}$ -*NprB-bglB* (图 2B)。

以质粒 pMD19-*kan-P\_{tac}*-*pdC-adhB* 为模板 PCR 扩增片段 *kan-P\_{tac}*-*pdC-adhB*, 经 *DpnI* 酶处理后电击转化到 *E. coli* JM109, 将片段 *kan-P\_{tac}*-

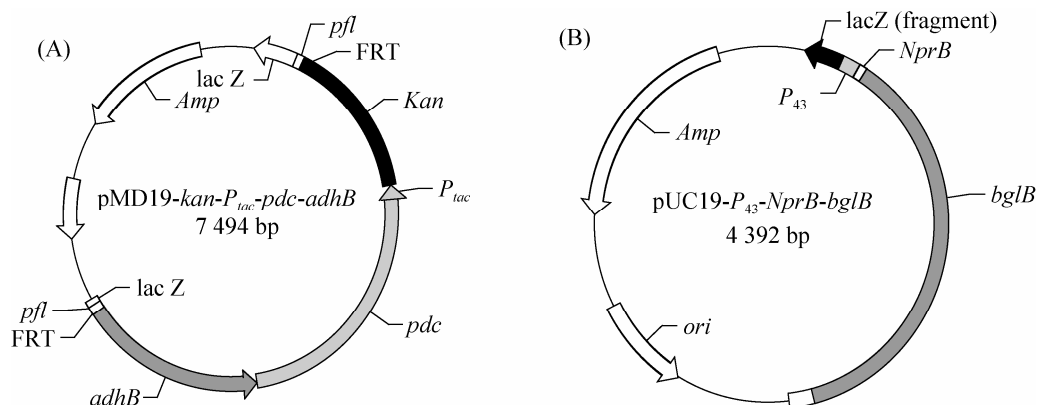


图 2 pMD19-*kan-P\_{tac}*-*pdC-adhB* 与 pUC19- $P_{43}$ -*NprB-bglB* 的质粒图谱

Fig. 2 Maps of plasmids. (A) pMD19-*kan-P\_{tac}*-*pdC-adhB*. (B) pUC19- $P_{43}$ -*NprB-bglB*.

*pdhB* 替换并整合到 JM109 基因组中丙酮酸甲酸裂解酶 *pflA*、*pflB* 基因的位点上。抽提重组菌的基因组,利用鉴定引物 Jd1、Jd2 和 Jd3、Jd4 (鉴定引物的位置见图 1) 进行 PCR 鉴定,PCR 片段大小正确,证明目标基因整合到基因组的靶定位点,将得到的重组菌记为 *E. coli* P8。

进一步在 *E. coli* P8 内导入辅助质粒 pCP20 消除抗性标记基因 *kan*,得到的阳性克隆只能在 LB 中生长。抽提重组菌的基因组,鉴定引物 Jd1、Jd2 进行 PCR 无法得到条带,而引物 Jd3、Jd4 进行 PCR 时得到正确的条带,证明染色体上卡纳青霉素标记基因已被删除,且辅助质粒 pCP20 也已消失,将得到的该重组菌记为 *E. coli* P81。将重组质粒 pUC19-*P<sub>43</sub>-NprB-bglB* 转入重组菌 *E. coli* P81,PCR 和酶切鉴定正确后,将所得的重组菌记为 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*)。

重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 分别以对硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (pNPG) 和纤维二

糖为底物对  $\beta$ -葡萄糖苷酶的  $\beta$ -糖苷酶活和纤维二糖酶活进行了测定。*E. coli* JM109 是本文中基因操作的原始菌株,而 *E. coli* P81 是整合乙醇途径后得到的改造菌株,为了明确重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的酶活和发酵特性,所以转入质粒 pUC19 后作为对照菌。将对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19) 和重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中培养,以 pNPG 为底物测定  $\beta$ -糖苷酶酶活,结果如图 3A 所示。重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 发酵液中  $\beta$ -糖苷酶活可以达到 3.62 mU/mL 菌液,周质空间的  $\beta$ -糖苷酶活为 81.16 mU/mL 菌液,细胞质的酶活为 20.98 mU/mL 菌液,对照菌 *E. coli* P81 (pUC19) 发酵液和周质空间的  $\beta$ -糖苷酶活分别为 0.07 mU/mL、0.36 mU/mL,*E. coli* JM109 (pUC19) 发酵液和周质空间的  $\beta$ -糖苷酶活分别为 0.03 mU/mL、0.7 mU/mL。

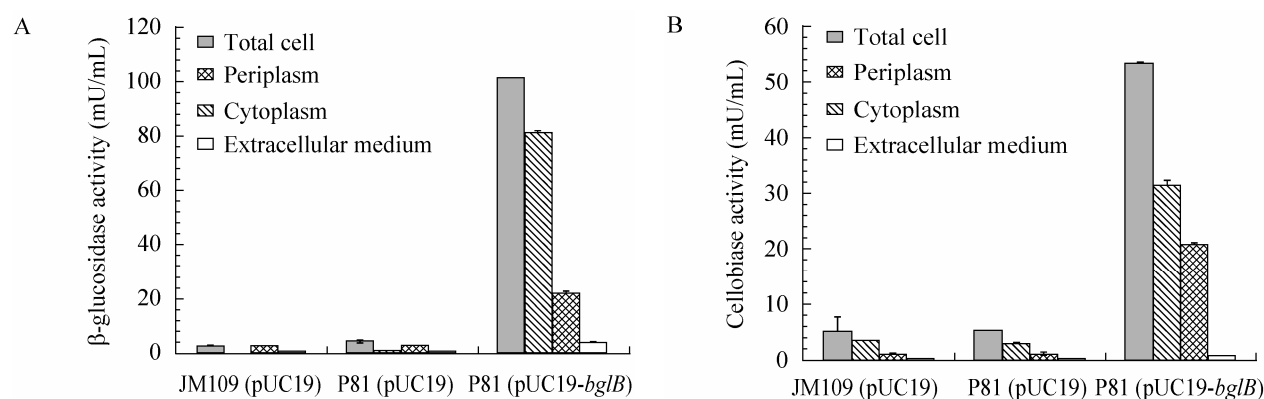


图 3 重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的  $\beta$ -糖苷酶和纤维二糖酶酶活测定

Fig. 3 The enzyme activity of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*). (A) The  $\beta$ -glucosidase activity of BglB. (B) The cellobiase activity of BglB. Culture conditions: 37 °C, 200 r/min. The protein in 20 mL supernatant broth were precipitated by using ammonium sulfate and redissolved in 1 mL 50 mmol/L citric acid buffer (pH 6.0) to give the crude enzyme solution. The glucosidase activities were determined using pNPG substrate at 37 °C for 10 min, the cellobiase activities were determined using cellobiose substrate at 37 °C for 1 h. Strains *E. coli* JM109 (pUC19) and *E. coli* P81 (pUC19) were used as control.



以纤维二糖为底物测定的纤维二糖酶活结果如图 3B 所示,重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 发酵液中纤维二糖酶活可以达到 0.80 mU/mL 菌液,周质空间的纤维二糖酶活为 31.54 mU/mL 菌液,细胞质的酶活为 20.76 mU/mL 菌液,对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19) 发酵液和周质空间的纤维二糖酶活分别为 0.05 mU/mL、3.18 mU/mL, *E. coli* P81 (pUC19) 发酵液和周质空间的纤维二糖酶活分别为 0.08 mU/mL、3.04 mU/mL。重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 所表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶大量存在于细胞的周质空间内,且重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的胞外酶活远高于对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19),这表明重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 中的 *bglB* 基因得到了高效的表达,且  $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌到了胞外。

## 2.2 纤维二糖为碳源的乙醇发酵

为检测重组菌对纤维二糖的利用能力,以纤维二糖为唯一碳源进行发酵实验。将 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 接种于含有 10 g/L 纤维二糖的 M9 基础培养基中,单一碳源发酵 48 h 后,结果如图 4 所示。对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19) 虽然由于种子培养基中的成分随转接进入发酵体系,菌体量略微增长,但由于对照菌不具备利用纤维二糖的能力,所以无法以纤维二糖为碳源生长。而 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 生长良好,48 h 时  $OD_{600}$  增长到了 1.9,代谢了 2.5 g/L 的纤维二糖,但三株菌都没有乙醇生成。在含纤维二糖的 M9 基础培养基中,重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 通过分泌表达

$\beta$ -葡萄糖苷酶代谢纤维二糖,以纤维二糖为碳源,可以正常的生长,但没有乙醇产生,推测可能是由于 M9 基础培养基的营养匮乏,重组菌可以生长但不适宜于其代谢生产乙醇。

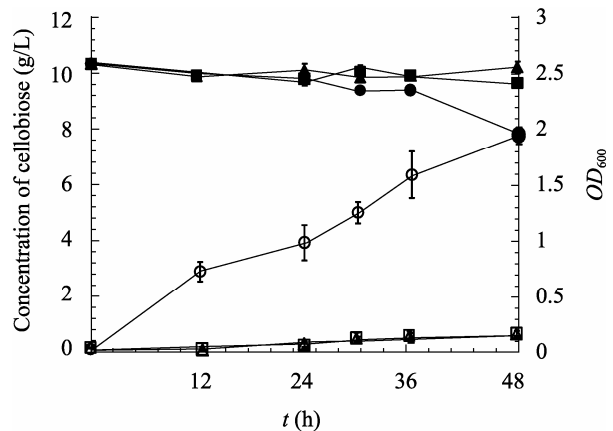


图 4 重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 以纤维二糖为唯一碳源的发酵

Fig. 4 Ethanol fermentation of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) in cellobiose as a sole carbon source. Cellobiose concentration: ( $\blacktriangle$ ) for *E. coli* JM109 (pUC19), ( $\blacksquare$ ) for *E. coli* P81 (pUC19), ( $\bullet$ ) for *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*); Growth condition: ( $\triangle$ ) for *E. coli* JM109 (pUC19), ( $\square$ ) for *E. coli* P81 (pUC19), ( $\circ$ ) for *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*). Culture conditions: 37 °C, 200 r/min. Strains *E. coli* JM109 (pUC19) and *E. coli* P81 (pUC19) were used as control.

为验证重组菌是否能够利用纤维二糖生产乙醇,在含纤维二糖的 LB 培养基中进行发酵实验。将重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 和两株对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19) 接种于到含有 10 g/L 纤维二糖的 LB 培养基中的培养,发酵 48 h 后结果见图 5A。对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19) 可以正常生长,但纤维二糖几乎没有利用,也没有乙醇产生。其中, *E. coli* JM109 (pUC19) 既没有利用纤

维二糖的能力,也没有导入产乙醇途径,所以可以利用 LB 培养基中的组分正常生长,但没有明显的乙醇产生。*E. coli* P81 (pUC19) 虽然导入了 *pdc-adhB* 途径,但无法利用纤维二糖, LB 培养基中的成分可支持菌体的生长,而不足以生产乙醇。而重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 发酵 48 h 后,代谢了 5.9 g/L 纤维二糖,产生 1 g/L 乙醇,达到了乙醇理论得率的 31.6%。*E. coli* P81 (pUC19) 与重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 在含纤维二糖的 LB 培养基中产乙醇的差异,说明重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 是以纤维二糖为碳源生产乙醇而非 LB 中的组分。重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 在含纤维二糖的 M9 基本培养基中进行培养时,其  $OD_{600}$  值仅为在含纤维二糖的 LB 中的  $OD_{600}$  值的一半,说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解产生的少量葡萄糖尚未能满足菌体正常的

生长所需,菌体处于“饥饿”中,所以葡萄糖被用于菌体的生长,而非被用于乙醇生产,所以没有乙醇生成。在整个发酵过程中没有检测到葡萄糖的存在,说明纤维二糖水解得到的葡萄糖迅速被重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 利用,避免了葡萄糖的大量积累,将体系中的葡萄糖浓度维持在较低水平。

重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 在发酵的中后期的纤维二糖代谢减慢,因此测定了重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 在不同时间的胞外相对纤维二糖酶酶活,结果如图 5B,在 30 h 时菌体生长量达到最大,而胞外纤维二糖酶酶活也最高,之后菌体的  $OD_{600}$  值开始下降,胞外的纤维二糖酶酶活也开始降低,原因可能是摇瓶培养中 *E. coli* 菌由于营养减少和发酵副产物增减,在 30 h 后逐渐失去活性。

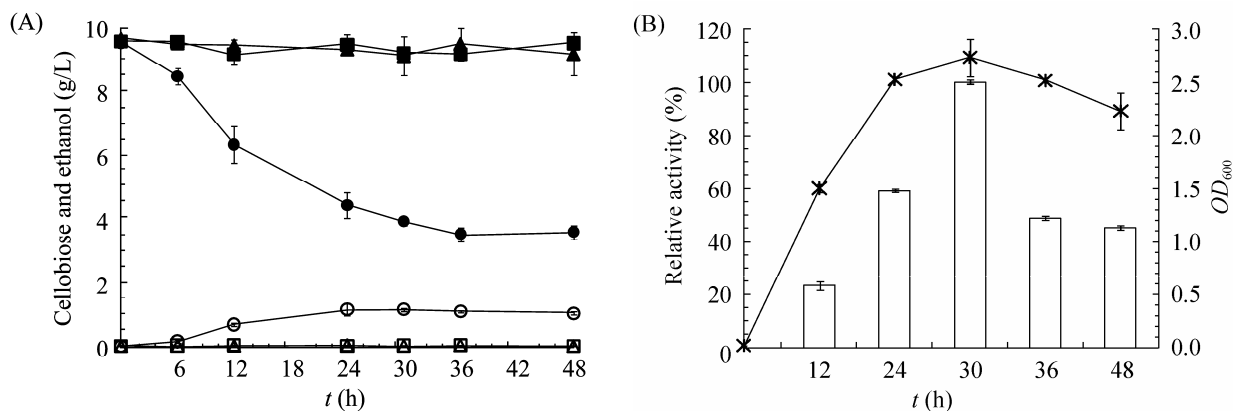


图 5 重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 发酵纤维二糖的结果和相对胞外纤维二糖酶活

Fig. 5 Ethanol fermentation of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) in the LB medium with 10 g/L cellobiose and the relative extracellular cellobiase activity. (A) Fermentation of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) in the LB medium with 10 g/L cellobiose, cellobiose concentration: (▲) for *E. coli* JM109 (pUC19), (■) for *E. coli* P81 (pUC19), (●) for *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*); ethanol concentration: (△) for *E. coli* JM109 (pUC19), (□) for *E. coli* P81 (pUC19), (○) for *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*). Strains *E. coli* JM109 (pUC19) and *E. coli* P81 (pUC19) were used as control. (B) The relative extracellular cellobiase enzyme activity and growth condition of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) in different time: (×) for growth condition.

为检验重组菌对纤维二糖的耐受性, 进行不同浓度纤维二糖的发酵实验。将重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 分别在含 10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L 和 50 g/L 纤维二糖的 LB 培养基中进行发酵培养, 发酵 48 h 后, 结果见表 3。随着纤维二糖浓度的升高,  $OD_{600}$  值也随之升高, 说明重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 对较高浓度的纤维二糖有着良好的耐受性, 并分别达到了乙醇理论得率的 31.6%、51.2%、55.8%、47.3% 和 44.7%。纤维二糖浓度的提高对重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的生长没有明显的不利影响, 并随着纤维二糖浓度的提高, 菌体量增加, 胞外酶也在积累, 纤维二糖的代谢量增加, 得到的乙醇也在逐步提高。虽然 30 g/L 纤维二糖时获得最高的乙醇理论得率, 但考虑到残余的纤维二糖较多, 所以后续仍选用 10 g/L 纤维二糖进行发酵实验。

表 3 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 利用不同浓度纤维二糖发酵乙醇

Table 3 Ethanol fermentation of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) in LB medium with different concentration of cellobiose

Initial cellobiose (g/L)	$OD_{600}$	Cellobiose consumed (g/L)	Ethanol yield (g/L)	Yield (%)
9.5	5.1	5.9	1.0	31.6
20.4	5.3	8.0	2.2	51.2
29.4	5.6	10.0	3.0	55.8
39.5	6.2	13.0	3.3	47.3
49.1	6.4	15.4	3.7	44.7

Fermentation results by *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) after 48 h at 37 °C, 200 r/min.

为检验葡萄糖的存在对重组菌利用纤维二糖生产乙醇的影响, 故进行葡萄糖和纤维二糖的共发酵实验。重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*)

在含有 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 纤维二糖的 LB 中共发酵培养 (图 6), 12 h 时, 葡萄糖几乎利用完全, 纤维二糖只代谢了 1.8 g/L, 发酵 48 h 后残余纤维二糖的浓度为 5.9 g/L, 代谢了 4.1 g/L 纤维二糖, 产生乙醇的浓度最高为 3.4 g/L, 达到了乙醇理论得率的 46.5%。与含 10 g/L 纤维二糖的 LB 中发酵 12 h 代谢 3.2 g/L 纤维二糖这一结果相比, 共发酵 12 h 只代谢了 1.8 g/L 纤维二糖, 代谢速率下降近 44%。分析由于葡萄糖、纤维二糖共发酵时, 葡萄糖作为  $\beta$ -葡萄糖苷酶催化纤维二糖的产物, 对  $\beta$ -葡萄糖苷酶形成了一定程度的反馈抑制, 降低了催化效率。但菌体没有出现二次生长的现象, 葡萄糖并未对纤维二糖的利用形成葡萄糖遏制, 实现了葡萄糖和纤维二糖同步代谢。

本文对大肠杆菌进行一系列的基因工程改造, 克隆了来自运动发酵单胞菌的高效乙醇生

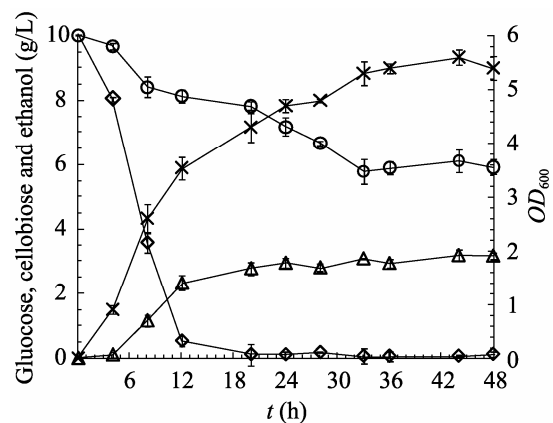


图 6 重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的纤维二糖与葡萄糖共发酵

Fig. 6 Ethanol co-fermentation of *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) in 10 g/L cellobiose and 10 g/L glucose. (x) for growth condition, ( $\diamond$ ) for glucose concentration, ( $\circ$ ) for cellobiose concentration, ( $\triangle$ ) for ethanol concentration.

产路径 *pdc-adhB*, 并置于启动子  $P_{tac}$  的控制之下。启动子  $P_{tac}$  是一个强启动子, 受到 IPTG 诱导时, 能加强基因的表达, 从而一定程度上消除整合到基因组上导致的拷贝数降低而引起的表达降低。通过 Red 重组将  $P_{tac}$ -*pdc-adhB* 整合到大肠杆菌 JM109 基因组的 *pflA*、*pflB* 位点, 在提高基因稳定性的同时敲除了乙醇生产的竞争路径。随即转入能够分泌表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因, 构建得到可代谢纤维二糖进行乙醇发酵的 CBP 重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*)。

重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 发酵液中  $\beta$ -糖苷酶活可以达到 3.62 mU/mL 菌液, 周质空间的  $\beta$ -糖苷酶活为 81.16 mU/mL 菌液, 总胞外  $\beta$ -糖苷酶活可以达到 84.78 mU/mL 菌液, 而发酵液中纤维二糖酶活可以达到 0.80 mU/mL 菌液, 周质空间的纤维二糖酶活为 31.54 mU/mL 菌液, 总胞外纤维二糖酶活可以达到 32.34 mU/mL 菌液, 远高于对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19) 的总胞外酶活。重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 在以纤维二糖为唯一碳源的 M9 中生长良好, 48 h 代谢了 2.5 g/L 的纤维二糖, 但没有乙醇产生。而在含 10 g/L 纤维二糖的 LB 中发酵 48 h 后, 代谢了 5.9 g/L 纤维二糖, 产生 1 g/L 乙醇, 达到了乙醇理论得率的 31.6%。在含 30 g/L 纤维二糖的 LB 发酵 48 h 后, 得到了最高的乙醇理论得率 55.8%。重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 在含有 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 纤维二糖的 LB 中进行共发酵培养, 12 h 时, 葡萄糖几乎利用完全, 发酵 48 h 代谢了 4.1 g/L 纤维二糖, 产生乙醇的浓度最高为 3.4 g/L, 达到了乙醇理论得率的 46.5%。

文中重组菌 *E. coli* P81 (pUC19-*bglB*) 的胞外  $\beta$ -糖苷酶酶活虽高于对照菌 *E. coli* JM109 (pUC19)、*E. coli* P81 (pUC19), 但  $\beta$ -葡萄糖苷酶的胞外量并不高, 目前尚不具备在生物炼制过程中的实用价值, 但本文的目的在于测试纤维素酶分泌表达型乙醇发酵整合生物加工细胞的概念是否可以实现。因此, 选择了蛋白分泌能力不强但容易进行基因工程操作的 *E. coli* 作为模型微生物。结果表明, 即使在较低的蛋白分泌条件下, 纤维素酶分泌表达型乙醇发酵工程菌仍然表现出了明显的整合生物加工能力, 即同时进行纤维二糖的降解和乙醇发酵。

本文中由于没有在发酵时控制 pH 值, 导致在发酵的后期  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性降低, 所以在后续的实验中考考虑发酵培养时控制 pH 值, 并采取增加分泌的手段提高 *E. coli* 的胞外酶活, 提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性, 增强对纤维二糖的代谢能力。此外仅单独添加了 3 种纤维素酶中的一种, 为了更高效地直接利用木质纤维素, 在后续的实验中将研究与另外两种纤维素酶的分泌共表达。

## REFERENCES

- [1] Lynd LR, Laser MS, Bransby D, et al. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(2): 169–172.
- [2] Zhang XZ, Zhang YH. One-step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant. *Eng Life Sci*, 2010, 10(5): 398–406.
- [3] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1207–1218.

- [4] Wen F, Sun J, Zhao HM. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1251-1260.
- [5] Sun J, Wen F, Si T, et al. Direct conversion of xylan to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying an engineered minihemicellulosome. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(11): 3837-3845.
- [6] Tokuhira K, Ishida N, Kondo A, et al. Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying beta-glucosidase on the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(3): 481-488.
- [7] Kotaka A, Bando H, Kaya M, et al. Direct ethanol production from barley beta-glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* beta-glucosidase and endoglucanase. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105(6): 622-627.
- [8] Ryu S, Karim MN. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(3): 529-542.
- [9] Xu LL, Shen Y, Bao XM. Progress and strategies on bioethanol production from lignocellulose by consolidated bioprocessing (CBP) using *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 870-879 (in Chinese).  
徐丽丽, 沈煜, 鲍晓明. 酿酒酵母纤维素乙醇综合加工 (CBP) 的策略及研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 870-879.
- [10] Petrenko V. Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5(8): 825-836.
- [11] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(1): 28-40.
- [12] Yukti B, Saroj M, Bisaria VS. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, 22(4): 375-407.
- [13] Shewale JG. beta-glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int J Biochem*, 1982, 14(6): 435-443.
- [14] Zhao Y, Liu WF, Mao AJ, et al. Expression, purification and characterization of gene beta-glucosidase in *Escherichia coli* from *Bacillus polymyxa*. *Chin J Biotech*, 2004, 20(5): 741-744 (in Chinese).  
赵云, 刘伟丰, 毛爱军, 等. 多粘芽胞杆菌 (*Bacillus polymyxa*) beta-葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析. *生物工程学报*, 2004, 20(5): 741-744.
- [15] Yuan XH. Optimization of beta-glucosidase producing strains and culture conditions, and the applied research application of beta-glucosidase [D]. Shandong: Shandong University, 2009 (in Chinese).  
袁晓华. beta-葡萄糖苷酶产生菌的筛选、培养条件优化及 beta-葡萄糖苷酶应用研究[D]. 山东: 山东大学, 2009.
- [16] Chen JN, Zhang W, Li T, et al. Optimization of metabolic pathways for bioconversion of lignocellulose to ethanol through genetic engineering. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(5): 593-598.
- [17] Kirill AD, Barry LW. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [18] Zhang X, Wen TY. Progress of Red recombination system for *E. coli* gene modification. *China Biotechnol*, 2008, 28(12): 89-93 (in Chinese).  
张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 89-93.
- [19] Cherepanov PP, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of F1p-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 1995, 158(1): 9-14.
- [20] Chen YC, Chen LA, Chen SJ, et al. A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from *Escherichia coli*.

- Biochem Eng J, 2004, 19(3): 211–215.
- [21] Yanase H, Yamamoto K, Sato D, et al. Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus*  $\beta$ -glucosidase gene. J Biotechnol, 2005, 118(1): 35–43.
- [22] Wang Y. Cloning and co-expression of genes heat-resistant endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase in *Bacillus subtilis*[D]. Shanghai: East China University Science Technology, 2012 (in Chinese). 王远. 耐热内切葡聚糖酶与 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆及其在枯草芽孢杆菌系统中的共表达[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [23] Gonzalez-candelas L, Aristoy MC, Polaina J, et al. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing  $\beta$ -glucosidase activity in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(12): 3173–3177.
- [24] Wang Z, Chen M, Xu Y. An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis* *pdh* and *adhB* genes for enhanced ethanol production from xylose. Biotechnol Lett, 2008, 30(4): 657–663.

(本文责编 陈宏宇)

### 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。