

## 以蔗糖为底物利用重组大肠杆菌合成甘露醇

陈艳 田康明 李玉 王正祥 路福平\*

(天津科技大学 生物工程学院 工业微生物教育部重点实验室 天津 300457)

**摘要:**【目的】异型发酵乳酸菌可利用胞内产生的甘露醇脱氢酶将果糖高效转化为甘露醇，但果糖作为底物相对昂贵，不利于工业化生产。为了降低生产成本，必须选择廉价的底物。蔗糖相对便宜，并且大量存在于自然界中，能够被重组大肠杆菌利用产生甘露醇。蔗糖水解酶(Sucrose hydrolase)和甘露醇脱氢酶(Mannitol dehydrogenase)是发酵生产甘露醇中催化蔗糖转化成甘露醇的关键酶，构建蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶共表达菌株并进行相关研究是本文的主旨。【方法】利用 PCR 方法分别从植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)基因组 DNA 中获得 *sacA* 和 *mdh* 基因，得到大小分别为 1 502 bp 和 1 032 bp 的目的基因，经序列分析后将其连接到表达载体 pET-28a(+)上，得到重组表达载体 pET28a-*sacA-mdh*。将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中，并用 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达情况并测定其酶活。【结果】SDS-PAGE 显示表达蛋白的大小亚基分子量分别为 55.1 kD 和 37.8 kD，与预期分子量一致，实现 *sacA* 和 *mdh* 基因的表达。蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶酶活分别为 25.78 U/mL 和 14.56 U/mL。对重组菌株 BL21(DE3)/pET28a-*sacA-mdh* 进行发酵条件优化，甘露醇质量浓度达到 45.19 g/L，总糖转化率为 37.66%。【结论】与乳酸菌利用蔗糖发酵生产甘露醇相比，产量提高了 6 倍，且具有发酵周期短、稳定性高等优点，菌株的成功构建为甘露醇工业化生产奠定了基础。

**关键词:** 蔗糖水解酶，甘露醇脱氢酶，基因克隆，大肠杆菌

## Mannitol biotransformation from sucrose with recombinant *Escherichia coli*

CHEN Yan TIAN Kang-Ming LI Yu WANG Zheng-Xiang LU Fu-Ping\*

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [Objective] Heterofermentative lactic acid bacteria (LAB) can convert fructose to mannitol efficiently using the intracellular mannitol dehydrogenase enzyme, but fructose as a substrate is relatively expensive and not suitable for industrial production. In order to reduce cost, inexpensive substrates must be selected. Sucrose, abundantly in nature, is relatively cheap and can be used by recombinant *Escherichia coli* to produce mannitol. Sucrose hydrolase and mannitol dehydrogenase are

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021502)

\*通讯作者: Tel: 86-22-60600160; ✉: lfp@tust.edu.cn

收稿日期: 2014-01-20; 接受日期: 2014-04-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-17

the key enzymes to convert sucrose into mannitol. This paper was focused on the construction of sucrose hydrolase and mannitol dehydrogenase co-expression strain. [Methods] The target genes *sacA* and *mdh*, 1 502 bp and 1 032 bp respectively, were derived from the *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. The genes were cloned into the expression vector pET-28a(+), resulting in the generation of the recombinant expression vector pET-28a-*sacA-mdh*, which was transformed into the *E. coli* BL21. The expression of the target protein was analysed by SDS-PAGE and the enzyme activity measurement. [Results] SDS-PAGE showed that the molecular weight of the expressed protein was 55.1 kD and 37.8 kD, respectively, which was consistent with the expected molecular weight, demonstrating the expression of genes *sacA* and *mdh*. The enzyme activity of sucrose hydrolase and mannitol dehydrogenase was 25.78 U/mL and 14.56 U/mL, respectively. The concentration of mannitol reached 45.19 g/L and the conversion was 37.66% after optimizing the fermentation conditions. [Conclusion] Compared with the mannitol production by LAB fermentation using sucrose, the yield was increased six-fold, with the advantages of short fermentation period and high stability. The successful construction of recombinant strain laid the foundation for the industrial production of mannitol.

**Keywords:** Sucrose hydrolase, Mannitol dehydrogenase, Gene cloning, *E. coli*

甘露醇是一种天然的六碳糖醇,具有甜度适宜、热量低、无毒副作用等特性,被广泛应用于医药、食品、化工等领域<sup>[1]</sup>。目前国内甘露醇的生产方法主要有两种:天然提取法和化学催化法。化学催化法将果糖转化成甘露醇和山梨醇,由于产率较低,且有大量副产物山梨醇的产生,给甘露醇的分离纯化带来了困难。采用生物转化制备甘露醇主要是以果糖为底物,在甘露醇脱氢酶的作用下生成甘露醇,具有反应选择性高、反应条件温和、不副产山梨醇、且收率高等优点,故而微生物转化法将成为甘露醇生产的主要趋势<sup>[2]</sup>。乳酸菌,尤其是异型乳酸菌的甘露醇脱氢酶更易于转化果糖生成甘露醇<sup>[3]</sup>,但果糖作为底物相对昂贵,蔗糖相对便宜,能够被微生物利用产生甘露醇更具有生产前景。2006年,Saha<sup>[4]</sup>研究了以 *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 为发酵菌株,利用糖蜜和果糖糖浆的混合物(总糖浓度为 150 g/L,果糖:葡萄糖为 4:1)生产甘露醇,产量可达 104 g/L。Korakli 等和 Niklas von W. 都分离或筛选出可高产甘露醇的乳酸菌<sup>[5-6]</sup>,采用的碳源多为果糖-葡萄糖混合物或糖蜜-果糖浆混合液,产量较高,但均含有果糖的参与,且发酵周期较长,导致生产成本较高,不利于工业化生产。2010年,金红星等<sup>[7]</sup>以蔗糖为原料用明串珠菌

发酵生产甘露醇,但是甘露醇产量仅有 7.31 g/L。2009年,王芳<sup>[8]</sup>将甘露醇脱氢酶在大肠杆菌中克隆及表达,以果糖为底物,果糖既用于能量代谢又用于甘露醇的转化,转化率较低。因此,寻找廉价的底物进行生物转化生产甘露醇,是当今面临的主要问题。蔗糖是质优价廉的原料,分解后主要产生果糖基,对于那些经由果糖转化得到目的产物的生产工艺来说是优选的底物。因此,有效利用蔗糖中的聚合果糖和大肠杆菌的细胞工厂生物转化生产甘露醇,无疑是比较可行的路线之一。当前,随着基因工程技术的迅速发展,通过合成甘露醇生产过程所需的多种酶来大量合成甘露醇已成为可能。

本研究利用 PCR 方法从植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和布氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*) 基因组 DNA 中获得蔗糖水解酶(*sacA*)基因和甘露醇脱氢酶(*mdh*)基因,将 *sacA* 和 *mdh* 串联到表达载体 pET28a(+)上,转化大肠杆菌,构建重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-*sacA-mdh*, 利用蔗糖为底物合成甘露醇。在发酵中,蔗糖在蔗糖水解酶作用下生成等量的葡萄糖和果糖,葡萄糖用于能量代谢,而果糖可以在代谢中更多的转化为甘露醇,从而提高了甘露醇的转化率。而且利用大肠杆菌发酵生产甘露醇,具有发酵

周期短、稳定性高等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 布氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*) 筛选自沈阳市大东区家庭自制酸菜; 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、克隆表达载体 pET-28a(+) 均为本实验室保存。

**1.1.2 培养基和培养条件:** MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉浸膏 10, 酵母提取物 5, 葡萄糖 20, 柠檬酸三铵 2, 乙酸钠 5, 磷酸氢二钾 2, 硫酸镁 0.50, 硫酸锰 0.05, 吐温 80 1 mL, pH 6.2–6.4。用于培养植物乳杆菌和布氏乳杆菌, 37 °C 静置培养。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, pH 7.0, 固体培养基添加 20 g 琼脂, 用于大肠杆菌培养, 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养。固体和液体培养基在需要时添加卡那霉素至 50 mg/L。

**1.1.3 试剂:** 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、甲基乙二胺(TEMED)、卡那霉素(Kanamycin)、还原型辅酶 I 二钠盐(NADH) 购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Solution I 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* I 和 *Hind* III 购自 TaKaRa 公司; DNA 分子量标准、纯化 DNA 片段的琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒和蛋白质分子量标准等均购自上海生物工程有限公司; PCR 引物由北京华大基因技术有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 植物乳杆菌和布氏乳杆菌基因组 DNA 的制备:** 按 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)操作步骤提取植物乳杆菌和布氏乳杆菌总基因组 DNA。质粒的提取方法参照文献[8]所述方法进行。

**1.2.2 PCR 扩增:** 根据 GenBank 报道的 *Lactobacillus plantarum* 中蔗糖水解酶基因(*sacA*, GenBank ID CP006033.1, locus\_tag: Lp16\_0171) 全序列和 *Lactobacillus buchneri* 中甘露醇脱氢酶基因(*mdh*, GenBank ID CP003043.1, locus\_tag: LBUCD034\_2338) 全序列进行引物设计, 引物设计见表 1。

以提取的 *Lactobacillus plantarum* 总基因组 DNA 为模板, 以 P1、P2 为引物, 扩增 *sacA* 基因。反应体系: DNA 模板(100 mg/L) 1  $\mu$ L, 引物 P1 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 引物 P2 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L, 总体积 50  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

以提取的 *Lactobacillus buchneri* 总基因组 DNA 为模板, 以 P3 和 P4 为引物扩增 *mdh* 基因。反应体系: DNA 模板(100 mg/L) 1  $\mu$ L, 引物 P3 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 引物 P4 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L, 总体积 50  $\mu$ L。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 PCR 反应引物  
Table 1 PCR primers

引物 Primers	基因 Genes	序列 Sequences (5'→3')	限制性内切酶 Restrictions	长度 Sizes (bp)
P1	<i>sacA</i>	CGCGGATCCATGATATGGAATCGTAAAACC	<i>Bam</i> H I	32
P2	<i>sacA</i>	CGAGCTCTCATTTAATTTTGGTTTCATTG	<i>Sac</i> I	29
P3	<i>mdh</i>	CGAGCTCATGAAAGCACTCGTATTTACTGG	<i>Sac</i> I	30
P4	<i>mdh</i>	CCCAAGCTTTGGCTGGCGGTTTCCTCATTATTT	<i>Hind</i> III	34

**1.2.3 原核表达载体 pET28a-sacA-mdh 的构建:** 用限制酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切扩增到的蔗糖水解酶基因片段, 同时用限制酶 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切扩增到的甘露醇脱氢酶基因片段, 然后将酶切片段连接到载体 pET28a(+) 上生成共表达质粒 pET28a-sacA-mdh, 转化到宿主细胞大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 通过卡那霉素抗性平板筛选转化子, 然后对转化子质粒分别用 PCR 和双酶切法进行鉴定。其中, 共表达质粒 pET28a-sacA-mdh 的图谱如图 1 所示, 通过限制性酶切位点 *Sac* I 连接蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶基因。

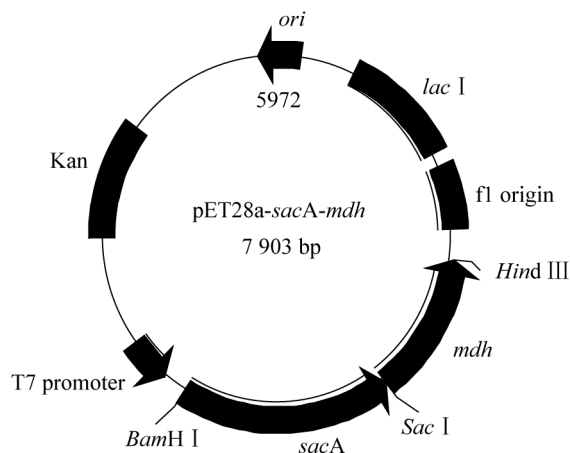


图 1 重组质粒示意图

Figure 1 The sketch map of recombinant plasmid pET28a-sacA-mdh

**1.2.4 目的蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 分析:** 将重组质粒 pET28a-sacA-mdh 转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中, 同时用载体质粒 pET28a(+) 转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 作为对照。分别挑取单菌落接种到 5 mL LB 培养基中(含有 50 mg/L Kan), 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 按 1% 接种量转接于装有 30 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中继续培养至  $OD_{600}$  达 0.6–1.0, 加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 °C 诱导振荡培养 6 h 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 冷冻离心收集菌体, SDS-PAGE 分析重

组蛋白的表达。分离胶的浓度为 10%, 浓缩胶的浓度为 5%, 考马斯亮蓝染色。

**1.2.5 酶活的测定:** 诱导后离心收集菌体沉淀, 悬浮于乙酸钠缓冲液(pH 5.3)中超声处理破碎细胞。破碎后悬浮液 6 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。超声条件: 工作时间 3 s, 间歇 4 s, 共超声 30 min, 裂解频率 55 Hz。

蔗糖水解酶酶活的测定参见文献[9]所述方法测定。

甘露醇脱氢酶酶活的测定参见文献[10]所述方法测定。

**1.2.6 甘露醇检测方法:** 糖的利用率和产物测定使用高效液相色谱法(HPLC)进行分析<sup>[3]</sup>。糖和甘露醇的测定使用 TSK-GEL Amide-80 色谱柱, 柱温维持在 80 °C, 流动相为乙腈:水=90:10 (体积比), 以 1 mL/min 的流速进行洗脱。使用示差折光检测器进行分析, 通过对比保留时间进行定性和定量分析。为了进一步确定产物, 利用发酵得到的甘露醇进行 LC-MS 分析。LC-MS 检测分析条件为: 色谱柱: TSK-GEL Amide-80, 柱温: 80 °C, 流速 1 mL/min, 流动相: 乙腈:水=90:10 (体积比)。先根据甘露醇的分子量(182.17 g/mol)设定扫描质量范围 100–500, 负离子模式, 检测甘露醇标准品, 再根据标准品的信号大小设置 SIM 碰撞诱导解离参数, 进样量为 50  $\mu$ L 检测发酵样品。

**1.2.7 重组菌合成甘露醇发酵条件的优化:** 最佳发酵时间、pH、底物浓度的确定。挑取重组大肠杆菌单菌落接种到 5 mL 卡那霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 按 1% 的接种量转接到 50 mL 含卡那霉素(50 mg/L)的新鲜 LB 液体培养基中, 培养菌体达到  $OD_{600}$  为 0.8 左右后, 添加浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 同时添加不同浓度底物蔗糖(60、90、120、150、180 g/L), 并调节发酵液的 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)于 25 °C 进行诱导, 每隔一段时间取样(4、6、8、10、12、16 h), 测定样品中甘露醇的含量, 确定最佳的发酵时间、pH 值、底物浓度。

最佳底物添加方式的确定:菌体生长同前面所述,在最佳诱导时机时分别按以下方式进行诱导剂和底物的添加,蔗糖终浓度均为 120 g/L。方法 A:加入 15 mL 520 g/L 的底物蔗糖,0.1 mmol/L 的 IPTG,25 °C 诱导培养 10 h,取样检测;方法 B:先加入 10 mL 520 g/L 的底物蔗糖和 0.1 mmol/L 的 IPTG,25 °C 诱导培养 5 h 后再添加 5 mL 520 g/L 的蔗糖,培养 5 h,取样检测。方法 C:先加入 7.5 mL 520 g/L 的底物蔗糖和 0.1 mmol/L 的 IPTG,25 °C 诱导培养 5 h 后再添加 7.5 mL 520 g/L 的蔗糖,培养 5 h,取样检测。方法 D:先加入 5 mL 520 g/L 的底物蔗糖和 0.1 mmol/L 的 IPTG,25 °C 诱导培养 3 h 后再添加 5 mL 520 g/L 的蔗糖,培养 4 h 后补加 5 mL 520 g/L 的蔗糖,继续培养 3 h,取样检测。比较 4 种底物添加方式对甘露醇产量的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶共表达体系的构建及鉴定

分别以植物乳杆菌和布氏乳杆菌 DNA 为模板,按照 1.2.2 方法用引物 P1、P2、P3、P4 分别进行 PCR 扩增。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现,在 1.5 kb 和 1.0 kb 附近分别有特异性的单一 DNA 条带与目的基因片段大小一致。将 PCR 产物与

pMD19-T Simple Vector 连接后委托北京华大基因有限公司进行测序,经过比对,PCR 产物与 GenBank 中的 *sacA* 和 *mdh* 基因序列一致。

将扩增出的蔗糖水解酶基因(1 502 bp, Sucrose hydrolase)和甘露醇脱氢酶基因(1 032 bp, Mannitol dehydrogenase)片段插入到表达载体 pET28a(+)上,生成质粒 pET28a-*sacA-mdh*,重组质粒 pET28a-*sacA-mdh* 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,小片段为 2 500 bp 左右目的基因,大片段为 5 500 bp 左右的 pET-28a(+)载体,以及进行了 PCR 验证(图 2),均验证正确,表明目的基因已插入到 pET-28a(+)载体上。

### 2.2 目的蛋白的表达及酶活分析

将重组菌 BL21(DE3)/pET28a-*sacA-mdh* 与对照菌 BL21(DE3)/pET-28a 在 37 °C 摇床过夜培养,按 1% 的接种量转接于 50 mL 含卡那霉素的液体培养基中,37 °C、200 r/min 摇床振荡培养,当菌体密度  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 之间时,加入 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L),25 °C 继续培养 6 h,离心收集菌体沉淀,悬浮于乙酸钠缓冲液(pH 5.3)中,超声处理破碎细胞。破碎后悬浮液 6 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,经 SDS-PAGE 分析结果。由图 3 可知,与对照菌株相比较,BL21(DE3)/pET28a-*sacA-mdh*

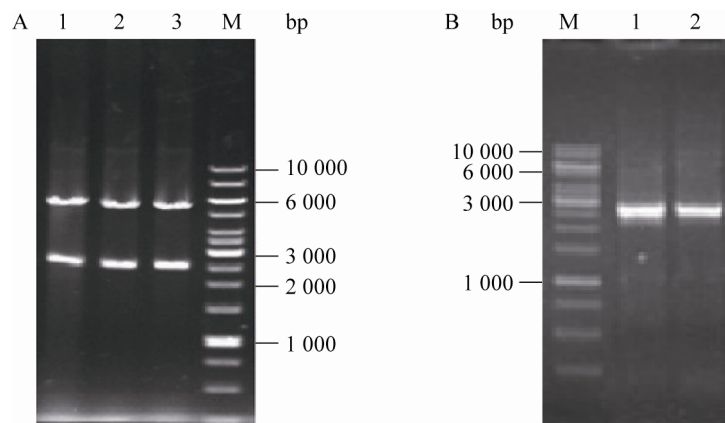


图 2 重组质粒 pET28a-*sacA-mdh* 酶切及 PCR 验证电泳图

Figure 2 Agarosegel electrophoresis of digesting recombinant vector with restriction enzyme and PCR analysis of recombination plasmid

Note: M: 1 kb DNA ladder; A: 1–3: pET28a-*sacA-mdh*/*Bam*H I /*Hind* III; B: 1–2: pET28a-*sacA-mdh*/PCR.

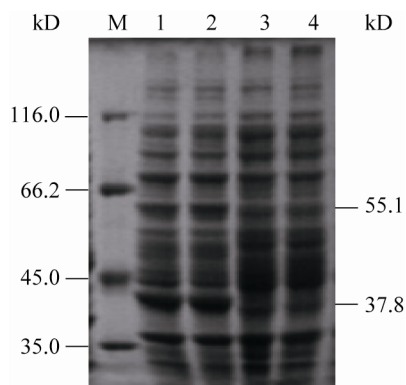


图3 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

**Figure 3 SDS-PAGE analysis of protein in expression**

Note: M: Protein molecular weight marker; 1–2: Recombinant bacteria strains induced with IPTG; 3–4: Reference bacteria strains induced with IPTG.

菌株在 55.1 kD 和 37.8 kD 附近出现两条明显的特异蛋白带, 两条带的大小与预测一致。说明 *sacA* 和 *mdh* 在大肠杆菌中获得了成功表达。

同时对重组菌株 pET28a-*sacA-mdh*/BL21 的产酶情况进行了分析, 蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶酶活达到 25.78 U/mL 和 14.56 U/mL。

**2.3 利用 HPLC 法和质谱检测甘露醇**

HPLC 法进行甘露醇产量分析表明, BL21(DE3)/pET28a-*sacA-mdh* 作为酶源在整个发酵体系中可以与底物蔗糖反应生成甘露醇, 产量达到 37.13 g/L。而对照组反应体系中, 底物的量几乎没有变化, 且没有预期产物的生成。基本可以判定构建的基因工程菌可以作用于底物蔗糖并生成甘露醇。为了进一步确定所生成的产物是甘露醇, 我们应用 LC-MS 对发酵产物进行质谱分析。分析结果如图 4 所示, 根据甘露醇的结构及分子量, 设置扫描质量范围为 100–500, 在负离子模式下, 得到发酵液中产物的离子峰为  $m/z$ : 205.0 (M-Na), 与甘露醇标准品完全一致。

**2.4 重组菌合成甘露醇发酵条件的优化**

**2.4.1 发酵时间对甘露醇产量的影响:** 由于 IPTG 对菌体有一定的毒性, 添加浓度过大会抑制细菌的生长, 影响产物的合成。当菌体的浓度  $OD_{600}$  达

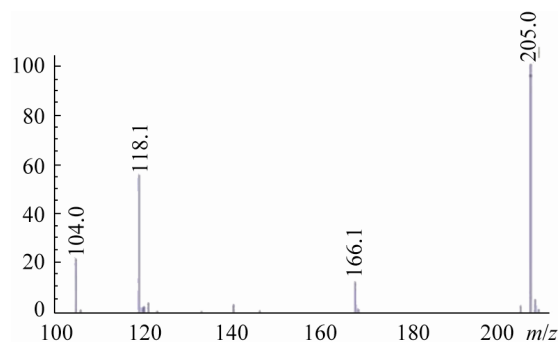


图4 发酵产物的质谱分析

**Figure 4 MS analysis of the fermentation product**

到 0.8 左右时, 添加 0.1 mmol/L 的 IPTG, 使产量最佳。

确定了最佳诱导时机后, 对产物的发酵时间进行进一步确定。如图 5 所示, 在菌体浓度达到  $OD_{600}$  为 0.789 时加入一定浓度的诱导剂, 诱导 10 h 后, 产物已接近峰值, 虽然随着发酵时间的延长, 产量仍有所增加, 但幅度明显变小, 而且长时间的发酵不仅浪费能源, 同时也会造成副产物的积累和产物甘露醇的损失, 故确定最佳诱导时间为 10 h, 产量可达 38.34 g/L, 与乳酸菌发酵生产甘露醇相比, 大大缩短了发酵时间。

**2.4.2 pH 对甘露醇产量的影响:** 发酵培养基初始

pH 对甘露醇产量的影响结果如图 6 所示, 初始 pH 过低时, 抑制了菌体的生长代谢, 从而对底物的利用率降低, 因此甘露醇产量明显减少。当初始 pH

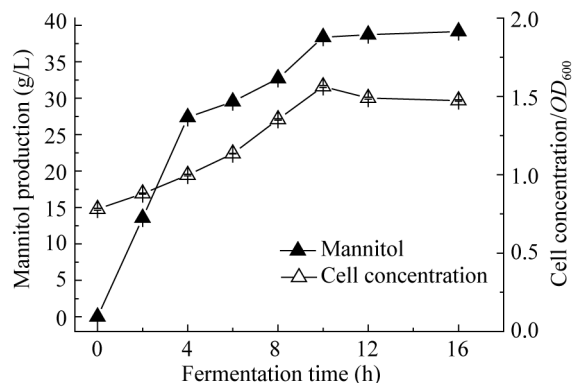


图5 发酵时间对甘露醇产量的影响

**Figure 5 Effect of fermentation time of mannitol production**

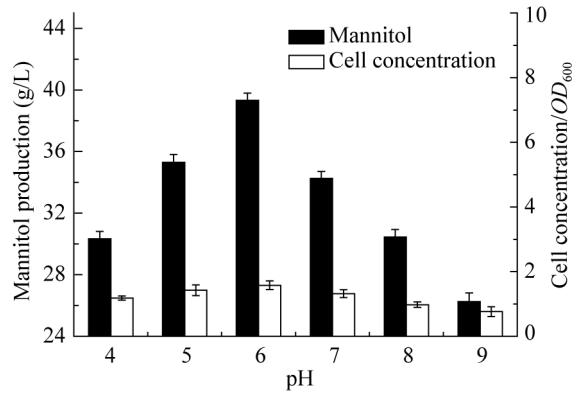


图6 pH对甘露醇产量的影响

Figure 6 Effect of pH of mannitol production

较高时,菌体的生长代谢相对旺盛,更多的底物进入磷酸戊糖代谢途径转化为乳酸和乙酸,其中由蔗糖代谢产生的果糖可能更多的进入能量代谢途径,而没有转化为甘露醇,致使甘露醇的产量有所减少。因此我们选择初始 pH 6.0 作为发酵蔗糖产甘露醇的最优初始值。

**2.4.3 底物浓度对甘露醇产量的影响:**不同底物浓度对甘露醇产量的影响结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出,随着糖总浓度的增加,甘露醇的浓度并没有相应的增大,在糖总浓度为 120 g/L 时,获得最大甘露醇的积累。糖总浓度增加,发酵培养基中的总碳源和底物量增加,一般来讲,对菌体的生长是有利的,但是糖浓度过高,会对菌体的生长产生抑制作用,从而影响甘露醇的产量。蔗糖会在蔗糖水解酶的作用下生成等量的果糖和葡萄糖,只有果糖会转化成甘露醇,葡萄糖只是用来大量、迅速的繁殖菌体,当糖浓度过高时,菌体生长到一定时期会停止生长,会有大量的葡萄糖剩余,从而影响甘露醇的转化率。因此,综合甘露醇产量及转化率考虑,选择糖浓度为 120 g/L 时最佳,甘露醇含量为 42.66 g/L,转化率为 35.55%。

**2.4.4 底物添加方式对甘露醇产量的影响:**分批培养时,在菌体的生长稳定期剩余葡萄糖、蔗糖浓度均较高,说明初始蔗糖浓度可适当降低,以提高转化效率。采用方法 A 进行发酵实验,在发酵开始一次性添加蔗糖浓度达到 120 g/L,发酵结束后甘

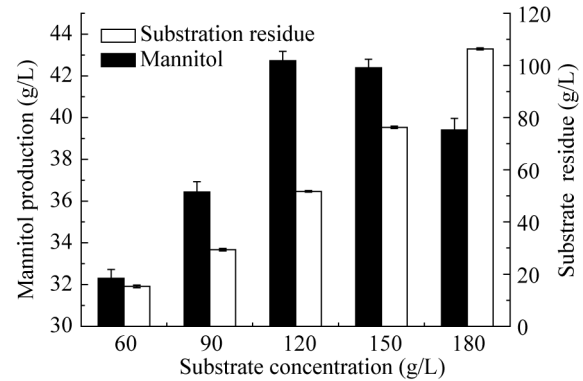


图7 底物浓度对甘露醇产量的影响

Figure 7 Effect of substrate concentration of mannitol production

露醇产量仅为 41.17 g/L,说明初始蔗糖浓度过高有可能对菌的生长产生抑制,为此我们采取分批补加蔗糖的方式进行发酵生产甘露醇,由图 8 可以看出,采用方法 B、C、D 3 种方式进行实验,初始蔗糖浓度越低,菌体生长越旺盛,甘露醇产量越高,蔗糖的添加方式可以采用“按需添加”。实验结果表明,分 3 次补加蔗糖,菌体生长最旺盛且甘露醇产量最高,说明菌体的生长与甘露醇的合成呈现正相关性,若能延长对数生长期,可以提高菌体量和甘露醇产量。因此,维持发酵过程中蔗糖浓度在 40 g/L 左右是有利于甘露醇合成的最佳浓度,产量可达 45.19 g/L,转化率为 37.66%,而利用野生型布氏乳杆菌,以蔗糖为底物,尽管优化了发酵条件,生成甘露醇的产量也仅有 7.63 g/L,与其相比,甘露醇产量提高了 6 倍,更有利于甘露醇的工业化生产。

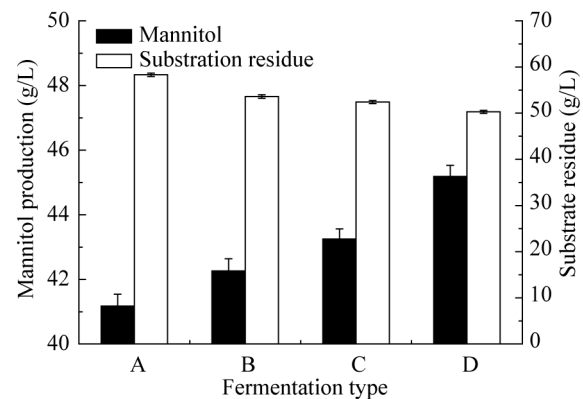


图8 底物添加方式对甘露醇产量的影响

Figure 8 Effect of fermentation type for mannitol production



### 3 讨论

目前,微生物法生产甘露醇的菌株大多数为乳酸菌,Huhne等<sup>[11]</sup>观察到一些乳酸菌最大的生长速率是葡萄糖和果糖的摩尔比在1:2时。由于果糖比葡萄糖贵得多,在微生物生产甘露醇过程中,用葡萄糖作为辅助因子的能源,加入的果糖被严格地转化成甘露醇,因此,果糖成为乳酸菌发酵生产甘露醇的必需品,但是果糖价钱较贵,而蔗糖相对便宜,并且大量存在于自然界中,因此,以蔗糖为底物生产甘露醇更有经济效益,大大降低了生物转化法生产甘露醇的成本,有望实现工业化生产。本研究中,通过将蔗糖水解酶基因和甘露醇脱氢酶基因以酶切位点连接的方式串联到表达载体pET28a(+)上转化大肠杆菌,构建了一株蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶基因共表达菌株。根据SDS-PAGE得出的蛋白大小与预测分子量一致,证明已经实现了目的基因的表达,对酶活性进行了检测,蔗糖水解酶和甘露醇脱氢酶酶活达到25.78 U/mL和14.56 U/mL,王芳<sup>[8]</sup>也研究了将甘露醇脱氢酶在大肠杆菌中克隆及表达,检测到甘露醇脱氢酶酶活仅为9.32 U/mL,本实验酶活比其高出56.22%,更有利于甘露醇的生产。研究发现,野生菌株存在产酶活性低、产酶种类复杂等原因,不利于生产应用。相比于野生菌株,大肠杆菌原核表达菌株的优势在于其生长迅速,能在短时间内就达到较高的酶活<sup>[12]</sup>。对重组菌株进行发酵条件的优化,确定发酵条件为:在菌体生长到 $OD_{600}$ 为0.8时,调节pH为6.0,同时添加0.1 mmol/L IPTG和底物蔗糖,25 °C诱导培养10 h,利用HPLC法对甘露醇含量进行了测定,产量可达45.19 g/L,转化率为37.66%。其中底物蔗糖的添加方式为分批添加3次,维持发酵过程中较低的蔗糖浓度,因为基质浓度过高时造成的菌体生长抑制和酶活抑制,进而导致蔗糖利用率不高的现象,采用分批添加底物的方式,使原料得到最大程度的利用并获得最大产出的甘露醇。

乳酸细菌发酵生产甘露醇的能力仍然偏低,要使产甘露醇的乳酸菌走向实际应用,必须对他们的

甘露醇脱氢酶进行深入的研究,从分子水平上了解其催化反应机制,并对其结构进行改造以提高生产甘露醇的能力<sup>[13]</sup>。寻找质优价廉的底物是微生物法生产甘露醇的关键,有效利用蔗糖中的聚合果糖和大肠杆菌的细胞工厂生物转化生产甘露醇,无疑是比较可行的路线之一。今后还应从整个己糖代谢途径考虑,应用代谢工程手段对乳酸细菌代谢途径进行改造,可能会是实现甘露醇工业发酵的最终手段。

### 参考文献

- [1] Saha BC, Racine FM. Biotechnological production of mannitol and its applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 879-891.
- [2] 张晓卿. 微生物转化制备甘露醇的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2004.
- [3] Saha BC, Racine FM. Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 553-560.
- [4] Saha BC. A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(4): 676-680.
- [5] Korakli K, Schwarz E, Wolf G, et al. Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis*[J]. Advances in Food Sciences, 2000, 22: 1-4.
- [6] Niklas W, Mervi H, Matti L. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(11): 1207-1213.
- [7] 金红星, 史建波, 成文玉. 以蔗糖为原料明串珠菌发酵生产甘露醇[J]. 生产与科研经验, 2011, 37(2): 91-94.
- [8] 王芳. 甘露醇发酵及甘露醇脱氢酶的克隆表达[D]. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2009.
- [9] 陈冰, 林轩, 梁诗莹. 蔗糖酶水解蔗糖的研究[J]. 湛江师范学院学报, 1997, 18(2): 57-60.
- [10] Ortiz ME, Fornaguera MJ, Mozzi F. *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(4): 991-999.
- [11] Huhne K, Axelsson L, Holck A, et al. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* LB674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains[J]. Microbiology, 1996, 142(Pt6): 1437-1448.
- [12] Baek H, Lee YB, Hyun HH. Molecular cloning and sequence analysis of a mannitol dehydrogenase gene and isolation of *mdh* promoter from *Candida magnoliae*[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(8): 1089-1094.
- [13] 林谦. 乳酸细菌甘露醇脱氢酶研究进展[J]. 科技传播, 2010, 19: 104-105.