

# 微生物产木糖醇的研究进展及应用前景

怀文辉 何秀萍 张博润\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**关键词:** 微生物, 木糖醇, 研究进展

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-066-04

木糖醇是一种五碳多元醇,是木糖代谢的正常中间产物。它有以下理化及生物学性质:其甜度与蔗糖相当;具有较大的溶解热;加热不易变性变色;被人体利用时不需要胰岛素的促进作用,在体内可促进胰岛素的少量分泌;用于静脉滴注时,血液中的丙酮酸、乳酸以及葡萄糖的含量会有所下降,肝糖元则有增加;无细

胞毒性,可透过细胞膜成为组织的营养等。这些特性使得木糖醇具有重要的应用价值。木糖醇作为甜味剂,口感清凉,而且可以预防龋齿;作为食品添加剂,可延长

---

\* 通讯联系人。

**收稿日期:** 1999-05-31, **修回日期:** 1999-09-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

食品的保鲜期;木糖醇是糖尿病患者的理想的辅助治疗剂和营养甜味剂<sup>[1,2]</sup>。目前木糖醇的工业生产主要是化学加氢法,但该法工艺复杂、收率低、生产成本低,限制了木糖醇的大规模生产<sup>[3]</sup>。通过微生物发酵法生产木糖醇则可以克服上述不足,因而受到重视,本文对该方面的研究进展作一简要综述。

## 1 以木糖为原料发酵生产木糖醇

**1.1 菌株筛选、基因克隆及工程菌构建** 随着人们对微生物生理及代谢研究的深入,发现在自然界中存在一些微生物具有发酵木糖的能力,而木糖醇是其主要中间代谢产物<sup>[4]</sup>。木糖代谢的第一步是由木糖还原酶催化生成木糖醇,木糖醇随后被氧化为木酮糖,木酮糖磷酸化后即进入磷酸戊糖途径和糖酵解途径。参与木糖代谢途径的主要酶的基因已被发现并被克隆<sup>[5]</sup>,从而导致构建木糖醇高产工程菌成为研究的热点。

**1.1.1 发酵木糖生产木糖醇的优良菌株的筛选** 利用自然筛选方法,已从细菌、酵母菌及丝状真菌中发现能将木糖转化为木糖醇的菌株。在细菌中, *A.liquaefaciens*, *M. smegmatis* 及 *Corynebacterium* sp. 等种属可将木糖转化为木糖醇。Izumori 等人发现 *M. smegmatis* 将木糖转化为木糖醇的能力较强,转化率达 40%<sup>[5]</sup>。一些真菌也能发酵木糖产生木糖醇,例如 *P. albertensis*<sup>[6]</sup>。人们发现一些酵母菌是最有效的木糖醇生产菌。主要研究的种属有 *Candida*, *Pachysolen* 和 *Debaromyces* 等。Gong 等人研究了数十株酵母将木糖转化为木糖醇的能力,发现 *Candida* 酵母转化能力较强,可获得 10%~15% (w/v) 的产量。*Saccharomyces* 属以及 *Schizosaccharomyces* 属也具有一定的转化能力<sup>[7]</sup>。Barbosa 等人从 44 株酵母菌中筛选到发酵木糖生产木糖醇的优良菌株,可获得 0.27g/g/h 的产率,产量达到理论值的 84.5%<sup>[8]</sup>。一些研究者采用诱变方法选育发酵木糖生产木糖醇的优良菌株,并取得一些可喜结果<sup>[9]</sup>。

**1.1.2 基因克隆及发酵木糖产木糖醇工程菌的构建** 虽然近年来已经筛选出了一些发酵木糖生产木糖醇的高产菌,但利用筛选的高产菌发酵木糖生产木糖醇仍然存在一些局限。一是作为原料的木糖来源仍需纯化;二是自然筛选到的微生物在代谢木糖时形成的木糖醇是过渡性的中间产物,易被细胞中的木糖醇脱氢酶氧化生成木酮糖,然后进入糖酵解途径,致使木糖醇的分泌量降低;三是有些木糖醇产生菌对人体而言具有抗

原性甚至毒性,而不宜作为食品及医药的发酵菌。啤酒酵母应用于食品发酵已有几千年的历史,符合食品安全性的要求,这对于采用生物技术生产木糖醇作为食品级产品十分重要。与其它木糖发酵菌相比,啤酒酵母还具有其它一些优点,如生活力强、对木糖溶液中的抑制剂耐受力强,不经过脱毒即可以发酵木质纤维素的水解物,并且有高效的厌氧糖酵解能力,因此,啤酒酵母被选作理想的木糖醇生产菌。采用基因工程技术将木糖还原酶基因克隆到啤酒酵母中高效表达,提高木糖还原酶的专一性,从而增加了木糖醇的有效生产力<sup>[10]</sup>。更有效的做法是消除 3-磷酸-甘油脱氢酶基因,这样可以防止在甘油产生过程中 NADH 的消耗<sup>[11]</sup>。Tohru Suzuki 等人用 PCR 方法获得 D-木糖还原酶基因,亚克隆到质粒 pUC19 中,构建了以 *E. coli* 为受体的工程菌,工程菌能将木糖转化为木糖醇。虽然 *E. coli* 不宜用于生产作为食品和药品的木糖醇,但对于基因表达、酶性质以及蛋白质工程等的研究具有重要意义<sup>[12]</sup>。

**1.2 发酵木糖生产木糖醇的发酵条件的优化研究** 影响木糖醇生产的因素很多,研究表明培养基成分及培养条件对发酵生产木糖醇影响较大。

**1.2.1 培养基成分:碳源**,即发酵液中木糖的起始浓度对木糖醇的产生有明显影响。高浓度木糖可以促进木糖向木糖醇的转化,但浓度超过 30% 时则又对木糖醇生产不利。除了木糖作为形成木糖醇的底物外,为了再生木糖还原所消耗的辅酶,提供能量,伴随木糖还原的同时还需要有辅助性底物。研究表明葡萄糖、乙酸及乙醇等均可作为辅助性底物。但在厌氧条件下,乙醇不能被 *S. cerevisiae* 利用,所以要在有氧条件下生产木糖醇。另外,在限制氧供给条件下积累的乙酸将对细胞有毒害作用。提高体系的 pH 值或增加供氧量可以消除此毒害作用,但产量将会降低。葡萄糖是理想的辅助性碳源。但研究证明只有在葡萄糖大部分被消耗后木糖醇才开始大量产生,此时实际是利用生成的乙醇为辅助底物。葡萄糖与木糖竞争使用细胞的转运系统,葡萄糖与此转运机构的亲和力远高于木糖,因而木糖转化对葡萄糖的浓度很敏感。

氮源的种类对于木糖醇的产率影响较大。尿素加少量的酵母粉或酪蛋白水解物作为氮源可得到较高的木糖醇产量。*C. guilliermondii* 发酵谷物秸秆水解物时,以硫酸铵和麸皮为氮源,可使木糖消耗 90% 而木糖醇

浓度达到 39.3g/L。在以有机物作为氮源时,由于提高了 *C. shehatae* 的木糖醇脱氢酶的水平,可获得较高的木糖醇产量,Dahiya 研究了多种氮源的作用,以醋酸铵和酵母粉为氮源时分别得到木糖醇的最大产量为 16.7g/L 和 30.6g/L。酵母粉因富含维生素与氨基酸而促进酵母菌的生长。酵母菌形成并积累木糖醇需要限制菌的生长,木糖醇作为次生代谢物存在。因此酵母粉或其它氮源的浓度不宜太高,否则只利于生长而不利木糖醇的积累。另外,C:N 的比例对发酵木糖生产木糖醇也有影响,高的 C/N 比值利于酵母菌形成多元醇<sup>[13]</sup>。

培养基的其它成分对发酵木糖生产木糖醇也有一定影响,如一些微量元素。

**1.2.2 培养条件对发酵木糖生产木糖醇的影响:**氧对于发酵木糖生产木糖醇的影响最为明显。迄今为止,人们对微生物的木糖代谢途径及其生化及生理作用还不完全清楚。在有氧条件下,细胞增殖快;而在厌氧条件下,木糖向木糖醇的转化率高。通过降低通氧量实验证明,*P. tannophilus*, *C. guilliermondii* 等均提高了木糖醇的产量。与通氧量相关的搅拌速度对发酵木糖生产木糖醇也有明显影响。如以 *C. guilliermondii* 发酵木糖时,转速由 200r/min 增加到 300r/min 时,木糖醇产量提高,而增加到 400r/min 时,木糖醇积累下降。

发酵时的 pH 值对发酵木糖生产木糖醇也有较大的影响,但对于不同的菌株,其产木糖醇的最适 pH 值也有所不同。如 *C. shehatae* 发酵木糖产木糖醇的最适 pH 值为 3.5~4。*C. tropicalis* 发酵木糖产木糖醇的最佳 pH 值为 2.5。

温度对酵母菌的生长、代谢及发酵能力都有影响。虽然大多数酵母的最适生长温度为 20℃~30℃,但研究表明,随着温度的上升,酵母转化木糖的能力有所提高。例如 Du Preez 等人发现 *C. shehatae* 在温度从 22℃ 升到 36℃ 时产木糖醇能力提高。

另外,培养基中木糖的起始浓度是一个重要指标,对木糖醇的形成有重大影响。高浓度的木糖可以促进木糖的消耗而提高了木糖醇的生成速度。加大发酵反应器中的酵母细胞浓度也可以使木糖的转化速度加快,木糖醇的产量提高,除了优化上述条件,采用分批发酵方法有利于提高木糖醇的产量。Roca E 等人利用固定化技术,用藻酸钙盐作为支持物,通过凝胶截留固定细胞,增加了细胞浓度,底物连续通过柱反应器,提

高了单位体积的产量<sup>[14]</sup>。

## 2 以葡萄糖为原料发酵生产木糖醇的研究

尽管以木糖为原料生产木糖醇的微生物发酵法取得较大进展,但底物来源受到较大限制。而葡萄糖在自然界则比较丰富,若能以葡萄糖为发酵底物,则必然会极大的促进木糖醇的大规模生产。

**2.1 混合发酵法** 葡萄糖来源广泛,价格较低,有很多人即尝试发酵葡萄糖生产木糖醇。但是自然界中尚未发现可以直接发酵葡萄糖产生木糖醇的微生物。混合发酵法是解决这个困难的尝试之一。它是利用三种具有不同代谢功能的微生物以葡萄糖为出发底物,分三步进行发酵。第一步由 *D. hansenii* 发酵葡萄糖,产生 D-阿拉伯糖醇;第二步由 *A. suboxydans* 将 D-阿拉伯糖醇氧化为 D-木酮糖;最后由 *C. guilliermondii* 将木酮糖被还原为木糖醇。经过三步发酵,从葡萄糖到木糖醇的转化率为 11.6%。这种三步连续发酵法,每步作用需要 2~5d,而且为了下一步发酵的顺利进行,必须经过灭菌以及去除细胞等步骤,耗时长,产量低而副产品产量高,纯化难度大<sup>[15]</sup>。

**2.2 直接发酵葡萄糖生产木糖醇的基因工程菌的构建** 如上所述,迄今尚未发现可以直接发酵葡萄糖产木糖醇的微生物,但是综合分析已知的微生物的代谢途径可知,有两条途径可将葡萄糖转化为木糖醇:一条途径是某些酵母菌可将葡萄糖经过磷酸己糖途径转化为 5-磷酸-核酮糖;利用细菌的 5-磷酸-核酮糖-3-差向异构酶将其异构化为 D-木酮糖-5-磷酸;再利用酵母菌的激酶及木糖醇脱氢酶最后将 D-木酮糖-5-磷酸转化为木糖醇。另外一条途径是利用耐高渗酵母菌将葡萄糖转化为 D-阿拉伯糖醇,再由具有阿拉伯糖醇脱氢酶的细菌将 D-阿拉伯糖醇转化为木酮糖;然后由酵母菌的木糖醇脱氢酶将木酮糖转化为木糖醇。随着基因工程技术的发展,人们很自然地想到可以将催化由葡萄糖起始生成木糖醇的途径整合到一株菌中,利用这种工程菌可以直接发酵葡萄糖生产木糖醇,这样既可以减少反应步骤,简化工艺,又可以利用价廉易得的葡萄糖作底物。因而开始引起人们的重视,这方面的研究已成为一个研究热点。构建发酵葡萄糖经过阿拉伯糖醇为中间产物,由其脱氢而实现木糖醇形成的工程菌的研究尚未有报道。本实验室根据利用耐高渗酵母菌将葡萄糖转化为 D-阿拉伯糖醇,再由具有阿拉伯

糖醇脱氢酶的细菌将 D-阿拉伯糖醇转化为木酮糖;然后由酵母菌的木糖醇脱氢酶将木酮糖转化为木糖醇的途径,分别克隆阿拉伯糖醇脱氢酶基因和木糖醇脱氢酶基因,后经过原生质体融合手段,企图构建直接发酵葡萄糖产生木糖醇工程菌,目前已取得可喜进展。

### 3 有待研究解决的问题及应用前景

以基因工程的手段构建工程菌来生产木糖醇,比起其它方法有很大的优越性,但也存在一些问题需要解决。由葡萄糖到木糖醇的代谢途径比较复杂,而木糖醇通常会被微生物代谢掉,所以构建工程菌的工作较为复杂,除了要引入阿拉伯糖醇脱氢酶基因,还需要表达木糖醇脱氢酶基因,抑制或消除木酮糖激酶的基因的活性,以保证高效转化葡萄糖。另外,由于代谢途径的改变,打乱了受体菌原有的生理及代谢状态,因而生产条件的优化也是需要解决的问题。还有工程菌的稳定性也需要保证。尽管如此,利用构建的基因工程菌直接发酵葡萄糖生产木糖醇将是很有希望的方法,成功的工程菌将大大降低木糖醇的生产成本,使木糖醇能够更广泛地应用于食品及医疗卫生事业,产生更大的经济意义及社会意义。

### 参 考 文 献

[1] 凌关庭. 食品添加剂手册. 北京: 化工出版社, 1989.

- [2] 尤 新. 中国食品添加剂. 1996, 2: 15.
- [3] Hyvonen L, Koivistoinen P, Voirol F. *Adv Food Res*, 1982, 28: 373~403.
- [4] Onishi H, Suzuki T. *Agric Biol Chem*, 1966, 30: 1139~1144.
- [5] Yokoyama S, Suzuki T, Kawai K *et al.* *J Ferment. Bioeng.*, 1995, 80: 603~605.
- [6] Dahiya J S. *Can J Microbiol*, 1991, 37: 14~18.
- [7] Gong C S, Claypool T A, McCracken L D *et al.* *Biotech Bioeng*, 1983, 25: 85~89.
- [8] Barbosa M F S, de Medeiros M B, de Mancilha I M *et al.* *J Indust Microbiol*, 1988, 3: 241~251.
- [9] Chen L F, Gong C S. *J Food Sci*, 1985, 50: 226~228.
- [10] Hallborn J, Walfridsson M, Airaksinen U *et al.* *Bio / Technol*, 1991, 9: 1090~1095.
- [11] Liden G, Walfridsson M, Ansell R *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 3894~3896.
- [12] Suzuki T, Yokoyama S I, Kinoshita Y *et al.* *J Bioscience Bioeng*, 1999, 87(3): 280~284.
- [13] Onishi H, Suzuki T, Onchi T. *Agric Biol Chem*, 1980, 44: 1829~1834.
- [14] Silva S S, Felipe M G, Mancilha I M. *Appl Biochem Biotechnol*, 1998, 70~72: 331~339.
- [15] Onishi H, Suzuki T. *Appl Microbiol*, 1969, 18(6): 1031~1035.