

# 发酵五碳糖和六碳糖产乙醇的细菌研究进展\*

李学凤 田 沈 潘亚平 杨秀山\*\*

(首都师范大学生物系 北京 100037)

**摘要:** 农作物废弃物中含有大量木质纤维素, 经预处理或水解后能得到各种糖类的混合物, 这些糖包括五碳糖和六碳糖(混合糖)。文中报道了国内外近 20 年来在利用细菌发酵混合糖产乙醇方面的研究进展。重点介绍了几种重组大肠杆菌 *Escherichia coli* 和运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 利用混合糖产乙醇的特性。

**关键词:** 产乙醇细菌, 五碳糖, 重组菌

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0101-05

## DEVELOPMENT OF ETHANOL PRODUCTION FROM PENTOSE AND HEXTOSE BY BACTERIUM

LI Xue-Feng TIAN Shen PAN Ya-Ping YANG Xiu-Shan

(Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037)

**Abstract:** There are abundant of lignocelluloses in agricultural wastes. And it can provide a variety of sugars involve pentose and hexose through pretreatments or hydrolyzation of these lignocelluloses. This review summarized the current status of bioethanol production by bacteria, and compared the productivity of some kinds of ethanologenic bacteria such as recombinant *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*.

**Key words:** Ethanologic bacteria, Pentose, Recombinant

木质纤维素是一种非常有吸引力的工业制乙醇的原料, 它主要来源于农作物废弃物, 包含 35% ~ 50% 的纤维素, 20% ~ 35% 的半纤维素和 10% ~ 15% 的木质素<sup>[1]</sup>, 其水解产物中富含大量的糖类, 包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖等混合糖。其中六碳糖较容易经微生物酵解生成乙醇, 而占总糖量 10% ~ 40% 的木糖则不能被充分利用。因此, 如果找到一种能利用混合糖产乙醇的工程菌, 理论上则可以提高乙醇产量的 25%。

### 1 可用于乙醇发酵生产的细菌及糖代谢途径

许多细菌可代谢六碳糖生产乙醇。在细菌发酵时葡萄糖代谢途径除糖酵解途径(Embden-Meyrhoff, EM)外, 还有 Entner-Doudorof (ED) 途径。能从每 mol 葡萄糖发酵产生 1mol 以上乙醇的细菌包括芽孢杆菌、运动发酵单胞菌、螺旋菌、解淀粉杆菌、明串珠菌、耐热厌氧菌、嗜温菌等。其中最有价值的是运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)。

*Z. mobilis* 最早发现于非洲等热带地区的果酒中, 50 年代早期, Gibbs 和 DeMoss 发现 *Z. mobilis* 在厌氧条件下主要通过 ED 途径代谢葡萄糖。*Z. mobilis* 可以发酵葡萄糖、

\* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题资助项目 (No. 2002AA514010)

联系人 Tel: 010-68902330

收稿日期: 2003-03-12, 修回日期: 2003-04-30

果糖、蔗糖等六碳糖产乙醇，但不能利用五碳糖。磷酸化的葡萄糖经 ED 途径产生丙酮酸，再经丙酮酸脱羧酶脱羧生成乙醛，继而在乙醇脱氢酶的作用下由 NADH 还原形成乙醇。与酵母菌相比，*Z. mobilis* 的生长速率、底物消耗速率、产物生成速率都较高，而细胞产率则较低，乙醇耐受性较强，该菌是大规模乙醇生产的潜在菌种。

有些细菌、酵母菌以及真菌也可代谢木糖产乙醇。能利用木糖产乙醇的细菌主要有：*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus polymyxa*, *Aerobacter indologens* 等，它们在产乙醇的同时还会产生 2, 3-丁二醇和各种有机酸等副产物，乙醇的转化率较低。厌氧嗜热菌及混合培养的 *C. thermocellum* 和 *C. thermosaccharolyticum* 能直接利用纤维素和半纤维素生产乙醇、乳酸和乙酸，其中后者可以从 1g 纤维素产 0.57 克乙醇<sup>[2]</sup>。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 也可以代谢五碳糖和六碳糖。五碳糖的代谢主要是通过磷酸戊糖途径并与 ED 途径相偶联。六碳糖的代谢主要通过糖酵解途径完成。其代谢产物包括一些醛类、醇类、和有机酸，乙醇只是其中很小部分。但 *E. coli* 含有代谢五碳糖的磷酸戊糖途径中的整套基因和酶，因此在木糖发酵和混合糖发酵产乙醇的研究中也有一定的研究价值。

## 2 基因技术的应用

近年来，国内外许多研究者都致力于构建能代谢五碳糖和六碳糖的高效产乙醇的基因重组菌。构建重组菌的主要目的是尽可能的扩大重组菌的底物范围，提高糖利用率。研究思路主要从两个方面入手：一是将戊糖代谢途径引入只能代谢六碳糖的良好的产乙醇菌种中；二是将高效产乙醇关键酶引入能代谢混合糖但乙醇产量较低的菌种中。在发酵混合糖产乙醇的重组细菌研究中，使用最多的菌是 *Z. mobilis* 和 *E. coli*。*E. coli* 厌氧发酵产乙醇的得率虽然很低，但它含有代谢木糖成乙醇的几个关键酶及基因 (表 1)。乙醇形成的最后阶段是由丙酮酸脱羧酶 (PDC) 和乙醇脱氢酶 II (ADH II) 催化完成的，它们可以选择性的将丙酮酸转化成乙醇并产生大量的 NAD<sup>+</sup>。*E. coli* 缺乏 PDC, ADH II 的水平又较低，因此不能很好的发酵木糖产生乙醇。*Z. mobilis* 则具有较强的 PDC-ADH II 系统，但没有同化木糖的酶。因此在这两种菌间构建基因重组菌理论上可以达到扩大底物范围及提高乙醇产量的目的。构建基因重组菌的主要方法是构建质粒、染色体整合、突变和诱变等。

表 1 *E. coli* 和 *Z. mobilis* 中产乙醇途径中的关键酶及其基因

功能分类	名称	基因	ORF 长度	来源
木糖利用酶	木糖异构酶 (Xylose isomerase)	<i>xyiA</i>	1334bp	<i>E. coli</i>
	木酮糖激酶 (xylulokinase)	<i>xyiB</i>	1454bp	<i>E. coli</i>
磷酸戊糖途径中的酶	转醛酶 (transaldolase)	<i>talB</i>	950bp	<i>E. coli</i>
	转酮酶 (transketolase)	<i>tklA</i>	1994bp	<i>E. coli</i>
丙酮酸—乙醇途径中的酶	丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase)	<i>pdh</i>	1706bp	<i>Z. mobilis</i>
	乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase II)	<i>adh II</i>	1151bp	<i>Z. mobilis</i>

## 3 发酵混合糖的基因工程细菌

**3.1 重组 *Z. mobilis*** 按照第一种研究思路，1995 年，Zhang 等人成功的构建了由木糖异构酶、木酮糖激酶、转酮酶、转醛酶催化的木糖代谢途径并将此途径引入了 *Z. mob-*

ilis<sup>[3]</sup>。这个木糖代谢途径可以将木糖转化为 ED 途径的主要中产物从而进入 ED 途径。质粒 pZB5 就是带有这 4 种木糖代谢基因的载体, 带有这种质粒的 *Z. mobilis* 可以同时发酵葡萄糖和木糖成乙醇, 如 *Z. mobilis* CP4 (pZB5) 和 *Z. mobilis* ZM4 (pZB5)。

*Z. mobilis* CP4 (pZB5) 以木糖 (25g/L) 为唯一碳源时, 其最大生长速率为 OD = 0.057/h, 乙醇产量为理论值的 86% (表 2)。Deanda 等 1996 年构建了一种能够发酵阿拉伯糖的菌种 *Z. mobilis* ATCC39676 (pZB186)<sup>[4]</sup>; 他们从 *E. coli* 中克隆了编码 L-阿拉伯糖异构酶、核酮糖激酶、磷酸核酮糖差向异构酶、转醛酶、转酮酶 5 个基因, 并在组成型启动子的调控下转入 *Z. mobilis* 中。*Z. mobilis* 39676 在以阿拉伯糖 (25g/L) 为唯一碳源时, 乙醇产量为理论值的 98%。随后, Chou 等 1997 年构建了一种能代谢木糖和阿拉伯糖的 *Z. mobilis* 重组菌 206C (PZB301)。它含有代谢木糖、阿拉伯糖和磷酸戊糖途径中的 7 个基因, 发酵葡萄糖 (30g/L)、木糖 (30g/L)、阿拉伯糖 (20g/L) 混合糖的乙醇产量为理论值的 82% ~ 84%<sup>[5]</sup>。

在 *Z. mobilis* CP4 构建后不久, 又构建出了两种 *Z. mobilis* 重组菌。一种是将质粒 pZB4L 转入 *Z. mobilis* ATCC39676 中。该菌种接种于硬木水解产物中连续发酵 149d 后, 分离出一突变株, 可耐受 50% (v/v) 水解产物中 0.75% (w/v) 的乙酸。该突变菌接种于含有 0.4% ~ 1.0% (v/v) 乙酸的合成水解产物培养基中进行发酵试验, 其乙醇产量为理论值的 94% ~ 96%。该菌种已初步应用于同步糖化发酵工艺中。另一种新重组 *Z. mobilis* 是由 Joachimsthal 等在 1999 年构建的 *Z. mobilis* ZM4 (pZB5), 该菌具有高乙醇产量和高乙醇耐受性的优点。它发酵葡萄糖和木糖含量分别为 65g/L 的混合糖 (pH5.0, 30℃) 时, 可在 48h 产生乙醇 62g/L, 其产量为 0.46g/g<sup>[6]</sup>。但由于这些菌种木糖代谢基因在质粒载体中, 因此就不得不在培养基中加入抗生素, 这将增加生产成本。Zhang 等人在 1999 年报道了将木糖利用基因成功转入 *Z. mobilis* 染色体中的实例。

**3.2 重组 *E. coli*** 重组产乙醇 *E. coli* 的构建主要是按照第二种研究思路, 即将高效产乙醇菌种中乙醇代谢途径的关键酶基因引入其中。Ingram 等人于 1987 年用 *Z. mobilis* 中的 *pdh* 和 *adhB* 基因构建了 *pet* (production of ethanol) 操纵子<sup>[8]</sup>。该操纵子导入 *E. coli* 中表达 *pet* 基因可以大大提高菌种的乙醇产量。*E. coli* KO11 就是带有 *pet* 操纵子的一种染色体整合菌。在厌氧条件下, 该菌可发酵半纤维素水解产物中的几乎所有糖成分, 其乙醇生产能力较高 (表 2), 对于一般的木质纤维素水解产物中的抑制物 (如乙酸等) 具有相对较高的耐受性。KO11 是仅有的少数几种能有效利用阿拉伯糖产乙醇的菌种之一。Barbosa, Dien, 及 Moniruzzaman 等先后对 *E. coli* KO11 发酵松树蒸汽预处理水解产物、玉米纤维酸水解产物、和 AFEX 处理的玉米纤维的产乙醇能力进行了测试, 其乙醇产量为理论值的 80% ~ 92% (表 2)。因此 *E. coli* KO11 一直被认为是近来用于发酵混合糖产乙醇的微生物中最为理想的菌种之一。但是, *E. coli* KO11 在葡萄糖和木糖共同存在时总是优先利用葡萄糖, 在一些情况下木糖发酵水平很低。Lindsay 等人于 1995 年, 用磷霉素 (fosfomycine) 作为选择剂分离出了 KO11 的磷霉素抗性突变株 SL28 和 SI40, 这两种突变菌有能力发酵所有被测试的糖, 且发酵时间更短, 发酵更完全, 乙醇产量也比亲本高。SL28 和 SI40 都能在 60h 内发酵 120g/L 木糖产 60g/L 乙醇, 比 KO11 在相同条件下多产乙醇 20%<sup>[13]</sup>。

表2 几种能够共同代谢五碳糖和六碳糖细菌的乙醇产量比较 (X-木糖, G-葡萄糖, A-阿拉伯糖)

菌种	底物 (糖起始浓度 g/L)	最大乙醇浓度 (g/L)	体积产量 (g/L.h)	乙醇产量 (%理论值*)
<i>Z. mobilis</i> CP4 (pZB5) <sup>[3]</sup>	X25	11.0	0.57	86
<i>Z. mobilis</i> CP4 (pZB5) <sup>[3]</sup>	G25, X25	24.2	0.81	95
<i>Z. mobilis</i> ZM4 (pZB5) <sup>[6]</sup>	G65, X65	62.0	1.29	90
<i>Z. mobilis</i> ATCC39676 (pZB186) <sup>[4]</sup>	G25, X25	21.42	—	84
<i>Z. mobilis</i> ATCC39676 (pZB301) <sup>[5]</sup>	G30, X30, A20	33.5	0.82-0.65	82~84
<i>Z. mobilis</i> CP4 (pZB5) <sup>[7]</sup>	玉米纤维酸水解产物	22.6	1.04	88
<i>E. coli</i> KO11 <sup>[9]</sup>	X80	41.6	0.87	102*
<i>E. coli</i> KO11 <sup>[10]</sup>	松树蒸汽预处理产物	32.0	0.67	85
<i>E. coli</i> KO11 <sup>[11]</sup>	玉米纤维酸水解产物	34.7	1.16	80
<i>E. coli</i> KO11 <sup>[12]</sup>	玉米纤维 AFEX 水解产物	27.1	1.05	92

\* 木糖、葡萄糖的乙醇产量理论值为 0.51 g/g, # 由于营养物质代谢产乙醇

1989年, Alterthum 和 Ingram 等构建了带有 *pet* 操纵子的质粒 pLOI297<sup>[14]</sup>, 并将该质粒转入一系列 *E. coli* ATCC 菌种中, 分离并筛选出了高效产乙醇菌种 ATCC11303 (pLOI297), 其最大乙醇产量在 37℃时为 50g/L, 在 42℃时为 25g/L, 在同步糖化发酵中乙醇产量为理论值的 84%。它能耐受 10.7g/L 的乙酸, 而乙醇产量不受影响。Dien 等于 1998 年又将质粒 pLOI297 转入 *E. coli* FMJ39 中, 经过进一步的分离和驯化得到了菌株 FBR3。 *E. coli* FMJ39 在厌氧条件下由于乳酸脱氢酶和丙酮酸甲酸裂解酶的活性受到抑制, 所以不能生长, 而它与 pLOI297 的重组则恢复了菌株在厌氧条件下的生长能力, 因为 *pet* 基因的表达为丙酮酸产乙醇途径中提供源源不断的 NAD<sup>+</sup>。FBR3 不同于其它的质粒重组菌, 在厌氧条件下, 不用加入抗生素也能够保持质粒, 且乙醇产量很高。它在转代 17 次以后仍能发酵 9.5% (w/v) 的木糖, 乙醇产量为理论值的 90%, 平均 97.4% ± 3.5% 的细胞仍带有质粒, 但在好氧条件下, 质粒很快就会消失。FBR3 在分别含有 10% (w/v) 阿拉伯糖、葡萄糖、木糖以及这 3 种糖的混合糖培养基中的发酵实验表明, 其乙醇生产能力高于 KO11, 它可以在 70~80h 内完全发酵, 乙醇产量为理论值的 90%~91%, 最大乙醇浓度为 4.38%~4.66% (w/v)。随后, Bruce 等于 2000 年又将质粒 pLOI297 转入 *E. coli* DC1368 和 NZN111 中, 构建了两株新的 *E. coli* 重组菌 FBR4 和 FBR5。在厌氧条件下且不含抗生素的木糖培养基中连续转代 10 次后, 93% 的 FBR4 和 95% 的 FBR5 仍含有质粒。经重复转代的菌株可以在 60h 内完全发酵 10% (w/v) 的木糖, 乙醇产量为理论值的 86%~92%, 最大乙醇浓度为 3.9%~4.2% (w/v)。

**3.3 其它** 除 *E. coli* 和 *Z. mobilis* 外, 还有一些其它产乙醇细菌的相关报道。如重组 *Klebsiella oxytoca* P2, 其优点是发酵速度较快, 产 33g/L 乙醇所需要的时间比 *Saccharomyces pastorianus*, *Kluyveromyces marxianus* 以及 *Z. mobilis* 等都要少<sup>[15]</sup>, 但它的乙醇产量 (最大 36g/L) 则比这些菌种略低一些, 这反映了它的低乙醇耐受性。

## 4 发展前景

由于木质纤维素的廉价多产, 燃料乙醇的清洁安全, 乙醇燃料在交通运输业中将有极大的应用价值。近 20 多年来, 不少科学工作者在这方面做出了许多杰出贡献。研究者们一直在努力使重组菌用于大规模生产, *Z. mobilis* 的重组菌株, 如 *Z. mobilis* ATCC39676 (pZB4L) 已应用于同步糖化和发酵工艺中, *Z. mobilis* 的染色体整

合菌株也在批次发酵中得到重复使用,但离生产上的实际应用还相差较远。目前,在生物质制取乙醇的发酵工艺中仍存在许多的困难和障碍,这些障碍主要包括:(1)菌种底物范围的进一步扩大;(2)乙酸耐受性的提高;(3)乙醇耐受性的提高;(4)基因稳定性的提高;(5)减少副产物(醛类、酮类)对发酵的影响;(6)发酵工艺(如细胞固定化、同步糖化发酵、两步法发酵等)的改良和创新等。另外,现在所研究的木质纤维素产乙醇的发酵工艺大多处于实验室测试阶段,还没有进入产业化阶段,如何成功的将这一技术转化为可以造福人类的直接生产力,仍需要更加深入的研究。

### 参考文献

- [1] Wyman C E. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, **45/46**: 897 ~ 915.
- [2] 鲍晓明, 高东, 王祖农. *生物工程学报*, 1998, **14** (4): 355 ~ 358.
- [3] Zhang M, Eddy C, Deanda K, *et al.* *Science*, 1995, **267**: 240 ~ 243.
- [4] Deanda K, Zhang M, Eddy M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4456 ~ 4470.
- [5] Chou Y, Zhang M, Mohaghegui A, *et al.* *Chemical Abstracts*, 1997, May: 4 ~ 8.
- [6] Joachimsthal E, Haggel K D, Rogers P L. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, **77** ~ 79: 147 ~ 158.
- [7] Bothast R J, Nichols N N, Dien B S. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**: 875.
- [8] Ingram L O, Conway T, Clark D P, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 2420 ~ 2425.
- [9] Ohta K, Beall D S, Mejia J P, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 893 ~ 900.
- [10] Barbosa M F S, Beck M J, Fein J E, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**: 204 ~ 214.
- [11] Dien B S, Hespell R B, Ingram L O, *et al.* *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, **13**: 619 ~ 625.
- [12] Moniruzzaman M, Dien B S, Skory C D, *et al.* *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, **13**: 341 ~ 346.
- [13] Lindsay S E, Bothast R J, Ingram L O. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **43** (1): 70 ~ 75.
- [14] Alterthum F, Ingram L O. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 1943 ~ 1948.
- [15] Golias H, Dumsday G J, Stanley G A, *et al.* *J Biotechnol*, 2002, **96** (2): 155 ~ 168.