

燃料乙醇的代谢工程研究进展

尤 蓉

(华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

摘要: 乙醇是来自可再生资源的最有发展前景的液态燃料, 目前采用生物发酵法生产乙醇仍然是最重要的途径。利用代谢工程技术改造乙醇代谢网络、提高乙醇产量是生物工程科学家的研究重点。从扩展代谢途径和构建新的代谢途径等方面全面阐述了代谢工程技术在燃料乙醇生产中的应用。

关键词: 乙醇, 代谢工程, 扩展代谢途径, 构建新的代谢途径

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2645 (2005) 03-0113-04

Advances on Metabolic Engineering of Fuel Ethanol

YOU Rong

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: Ethanol is a renewable liquid fuel which has the most potential future. It is mostly produced by biofermentation. Many scientists pay attention to change ethanol metabolic network and increase ethanol productivity using the technology of metabolic engineering. This paper roundly illustrates that metabolic engineering is applied on fuel ethanol production from such as like extension of substrate use and design of new metabolic pathways.

Key words: Ethanol, Metabolic engineering, Extension of substrate use, Design of new metabolic pathway

酒精是一种应用广泛的有机化合物, 在国防工业、医药工业、食品卫生、化学工业等行业都有广泛的用途。所谓燃料酒精, 是指没有添加变性剂的、可以作为燃料使用的无水乙醇, 它具有和矿物质相似的燃烧性能。燃料酒精添加变性剂后, 与无铅汽油按一定的比例混配, 可以形成一种新型绿色燃料: 乙醇汽油。由于燃料乙醇的生产原料为玉米、薯干、糖蜜及植物秸秆等可再生的生物资源, 所以使用乙醇或乙醇汽油作为汽油的替代品, 不仅可以节省石油这种不可再生资源, 还可降低污染排放百分之二十以上。因此, 关于燃料乙醇的开发和研究在国内外都受到了重视, 各国政府都出台相应措施以实现能源的再生^[1,2]。

随着分子生物学技术的丰富和发展以及对代谢网络的日益了解, 代谢工程的内容也更加丰富, 代谢工程成为近年来发展很快的一个领域。不同学者对代谢工程的定义还不尽相同。Bailey^[3]曾把代谢工程解释为: 代谢工程是利用重组 DNA 技术通过操纵细胞的酶、转运及调控功能改善细胞的活动。而 Serphanopoulos^[4]则认为, 代谢工程是利用重组 DNA 技术通过对胞内特定生化反应进行修饰或导入新的生化反应而对产品的生成或细胞的性质进行定向改变。总的说来, 代谢工程是对细胞内代谢途径网络系统分析的基础上进行有目的地改变, 以更好地利用细胞代谢进行化学转化、能量转导合

* 通讯作者 Tel: 020-85211375-8317, E-mail: scnuyourong@126.com

收稿日期: 2004-07-30, 修回日期: 2004-09-24

超分子组装⁵，它的研究对象是代谢网络，最终的目的是改变代谢流，提高目的产物的产率。

传统的乙醇生产采用的菌种为酿酒酵母，由于乙醇对酵母细胞的毒性、酵母对底物利用的局限性以及大量副产物的生成等原因使得乙醇的产率不高，生产效率低下⁶。因此，为了提高乙醇的产率、改善细胞对乙醇的耐受性、拓宽底物利用范围和最大程度降低副产物的生成，采用代谢工程技术对乙醇代谢网络进行有目的的改造已成为世界范围内研究热点。由于乙醇为酵母代谢的初级代谢产物，细胞对于这些初级代谢途径具有极大的依赖性，如果采用改变原有的代谢流的代谢手段就会严重干扰细胞正常的生理生化过程，所以对于乙醇的生产主要采用的代谢工程手段有：代谢途径的扩展以及转移或构建新的代谢途径，并获得了重大进展和突破，在本文中综合性地论述这些方面的进展。

1 扩展代谢途径

代谢工程中可以通过引入外源基因扩展、延伸原来的代谢途径，产生新的末端代谢产物，提高产率，或者利用新的底物作为生物合成的原料。

在传统的酵母发酵生成酒精的流程中，酵母因缺乏水解淀粉的酶类不能直接利用淀粉，淀粉需先经过蒸煮、 α -淀粉酶液化、再经过糖化酶糖化变成葡萄糖后才能利用，发酵工艺复杂，能源消耗较大，因此采用代谢工程技术-扩展代谢途径直接构建能利用淀粉的酵母工程菌可简化工序和设备，减少能源消耗，降低成本，有良好的应用前景。Okumagai 等从巴斯德毕赤氏酵母中分离了一个不受乙醇阻遏的醇氧化酶基因(AOX1)启动子表达淀粉酶基因使 α -淀粉酶分泌量大大提高，高达25mg/L，这个工程菌可以有效地由淀粉直接发酵乙醇，以3%淀粉至少产生2%乙醇；中山大学罗进贤教授领导的科研小组克隆了黑曲霉糖化酶基因和细菌及带麦 α -淀粉酶并将这两种基因共同和分别转化酿酒酵母获得多株含双基因和单基因的酵母工程菌。在不同的酵母启动子、信号序列和终止位点的调控下， α -淀粉酶和糖化酶基因在构建的工程菌中高效表达，表达的酶都分泌到胞外，在20%~25%淀粉培养基中培养24h，构建的酵母工程菌可将其中的淀粉水解98%以上，产酒率在8%~10%^[7]。

酵母发酵生产乙醇的途径主要是通过丙酮酸来生成乙醇，其中丙酮酸脱羧酶(PDC)催化丙酮酸形成二氧化碳和乙醛，后者在乙醇脱氢酶(ADH)的作用下转变为乙醇，由于丙酮酸在整个途径中是个关键的节点，与诸多合成途径均有密切联系，因此通过强化表达细胞内PDC和ADH的活性来扩增目标途径，是构建高产乙醇工程菌的主要战略，而生长迅速、遗传背景清楚、能利用广范围地碳源底物的大肠杆菌没有这两种酶，因此，为了提高乙醇的产量，Imgram将运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶基因构成人工操纵子，插入到pUC载体上形成重组质粒并转化大肠杆菌中，该重组质粒以葡萄糖为原料在氨苄青霉素的存在下发酵产生34g/L乙醇^[8]；另外美国佛罗里达州立大学构建了一株染色体上整合有移动发酵单胞菌的和

adhB

基因的品质优良的大肠杆KO11，其在含有10%葡萄糖和8%木糖的发酵培养基上可分别获得54.4g/L和41.6g/L乙醇，这已经接近0.5g乙醇/g葡萄糖的理论产量^[9]，而且优化大

肠杆菌 KO11 工程菌株的各项研究仍在进行,其中包括改善操纵子的遗传稳定性以及进一步拓展工程菌发酵底物,使得 KO11 能够利用戊糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖等,大大降低了乙醇的生产成本^[10,11]。

2 转移或构建新的代谢途径

①转移代谢途径:在酵母发酵产生乙醇的过程中最主要的副产物就是甘油,而且生成甘油的碳源在整个发酵过程占据了4%。产生甘油的主要原因是在厌氧条件下,呼吸链不能起作用,这样使 NADH 还原成 NAD⁺ 的唯一途径就是通过甘油醇的形成,从而维持细胞内氧化还原电势的平衡。甘油的生物合成途径包括磷酸二羟丙酮在 3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)的催化下还原为 3-磷酸甘油,后者在 3-磷酸甘油酯酶的作用下脱磷形成甘油,其中有 GPD1 和 GPD2 两个基因编码的 3-磷酸甘油脱氢酶是限制性因素,但 GPD2 是最重要的部分。因此在筛选的 GPD2 *S. cerevisiae* 突变株在厌氧条件下甘油的生成量减少了40%,乙醇的生成量提高了8%。另外一种方法就是通过代谢工程的手段——转移代谢途径来降低甘油形成,方法是通过在氨基酸合成过程中改变辅助因子需求,其基本原理如下:在野生型的菌株中存在由 GDH1 编码的 NADPH 依赖型的谷氨酸脱氢酶催化完成的反应: α -酮戊二酸 + NH₄⁺ + NADPH → 谷氨酸 + NADP⁺;而在酒酵母中存在另外两种分别由 GDH2 和 GDH3 编码的依赖 NADH 的谷氨酸脱氢酶催化完成的反应: α -酮戊二酸 + NH₄⁺ + NADPH → 谷氨酸 + NAD⁺, 同时在酿酒酵母中存在另外一种合成谷氨酸的系统:2 α -酮戊二酸 + 谷氨酰胺 + NADH → 谷氨酸 + NAD⁺ (由 GLT1 编码的谷氨酸合酶催化), 谷氨酸 + NH₄⁺ + ATP → 谷氨酰胺 + ADP + Pi (由 GLN1 编码的谷氨酰氨合酶催化), 因此构建了一株敲除掉 GDH1, 但是过量表达 GDH2 或者是 GLT1 和 GLN1 的菌株 TN19, 结果乙醇的产率提高了10%, 甘油的产率降低了38%。因此在整个过程中强化铵盐的代谢流来达到提高乙醇产量的目的^[12]。

②构建新的代谢途径:酿酒酵母(*S. cerevisiae*)具有高产酒精和耐高浓度酒精的优点,但是底物利用的范围受到限制,而在木质纤维素等多聚物的水解液中含有大量的戊糖和己糖如木糖、甘露糖和阿拉伯糖等都不能被 *S. cerevisiae* 利用或者是利用效率低下,但是 *S. cerevisiae* 能利用木酮糖,如果培养基中存在细菌来源的木糖异构酶(将木糖直接转化为木酮糖),它们也能发酵木糖。酵母菌中的柄状毕赤酵母依赖木糖还原酶(XR)将木糖转化为木糖醇,木糖醇脱氢酶(XDH)将木糖醇转化为木酮糖,木酮糖激酶(XK)将木酮糖转化为5-磷酸木酮糖进入磷酸戊糖途径,但是这些酵母属的乙醇生产能力很低,而且对乙醇的耐受性也不理想。因此,有人构建了一组高拷贝的酵母菌-大肠杆菌穿梭重组质粒,获得的转化子能同时有效的将木糖和葡萄糖转化为乙醇,而且这些克隆的木糖代谢基因的表达不再需要木糖诱导,也不为葡萄糖所阻遏^[13]。

3 其他代谢工程手段

另外,还可以通过构建代谢旁路和改变能量代谢途径等代谢工程手段提高乙醇产率,如 Chen 等成功地通过导入血红蛋白基因,提高酿酒酵母的乙醇产量,血红蛋白是通过影响电子传递链间接影响线粒体的乙醛歧化而起作用的,这条途径产生的乙醇占

总产量的三分之一^[12]；另外为了改良 *S. cerevisiae* 乙醇发酵过程特性还包括提高酿酒酵母对木质纤维素水解物中酚抑制剂的抗性，将来自白色腐烂真菌地漆酶编码基因置在 *PGK1* 启动子地控制下，并转化酿酒酵母，结果表明，漆酶地过量表达赋予了克隆菌对木质纤维素水解物中酚抑制剂地高耐受性，从而改善了酿酒酵母由可再生原材料生产乙醇的产量^[14]。

总的说来，代谢工程技术是极具发展潜力的生物工程技术，在研究中取得生产乙醇的高效菌种，如 KO11、能够直接利用淀粉的酵母等，但这些高效菌种也面临一系列的问题：由于代谢网络的刚性导致优良性能片断丢失；由于环境等因素导致代谢流的改变而使得乙醇产量下降；底物利用的局限如自然界中大量的纤维二糖等依旧不能利用等等。虽然这些高效菌种还有待于更进一步驯化成熟，有待于在工业化生产中接受更严峻的挑战，但是代谢工程技术确实为燃料乙醇的生产提供了前所未有的发展机遇，将为人类实现清洁能源生产、环境保护等方面作出重大贡献。

参考文献

- [1] Kheshgi H S, Prince R C, Marland G. *Annu Rev Energy Environ*, 2000, **25**: 199 ~ 244.
- [2] Roca C, Olsson L. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **60**: 560 ~ 563.
- [3] Beiley J E. *Science*, 1997, **252**: 1668 ~ 1675.
- [4] Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J. *Metabolic engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press, 1998.
- [5] 张 蓓编著. 代谢工程. 天津: 天津大学出版社, 2003.
- [6] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 17 ~ 34.
- [7] 吴淑魁, 罗进贤, 陈海滨. 酿酒科技, 2004, **122** (2): 61 ~ 64.
- [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] Dien B S, Hespell R B, Wyckoff H A, *et al.* *Enzyme and Microb Technol*, 1998, **23**: 366 ~ 371.
- [11] Dien B S, Iten L B, Bothast R J. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **22**: 575 ~ 581.
- [12] Torben L N, Morten C K, Nielsen J, *et al.* *Metabolic Engineering*, 2000, **2**: 69 ~ 77.
- [13] Jeffries T W, Jin Y S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**: 495 ~ 509.
- [14] 张惠展编著. 途径工程. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.