

代谢木糖产乙醇的酿酒酵母工程菌研究进展

张金鑫 田 沈 刘继开 张亚珍 杨秀山*

(首都师范大学 生命科学学院 北京 100037)

摘 要: 随着能源价格的持续上涨,使用木质纤维素生产燃料乙醇已具有重要的实践意义。木糖是多数木质纤维素水解产物中含量仅次于葡萄糖的一种单糖,传统乙醇生产菌株酿酒酵母不能利用木糖,这为使用以木质纤维素为原料发酵生产乙醇带来了困难。多年以来人们试图通过基因工程和细胞融合等方法对其进行改造使其能够代谢木糖生产乙醇。本文主要介绍这方面的研究进展。

关键词: 酿酒酵母,木糖,乙醇,基因工程,细胞融合

Progress of Engineered *Saccharomyces cerevisiae* of Xylose Metabolism and Fermentation for Ethanol Production

ZHANG Jin-Xin TIAN Shen LIU Ji-Kai ZHANG Ya-Zhen YANG Xiu-Shan*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract: With the constant rise of energy price, it has a great practical meaning of using lignocellulose to produce ethanol. Xylose is a kind of monosaccharide whose content is only less than glucose in most lignocellulosic hydrolysates. There is some difficulty of producing ethanol from lignocellulose by the traditional ethanol production strain *Saccharomyces cerevisiae*, because it cannot metabolize xylose. People have tried to use genetic engineering technology and cell fusion method to modify *Saccharomyces cerevisiae* to make it metabolize xylose and produce ethanol for many years. This review introduced the progress in this field.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Xylose, Ethanol, Genetic engineering, Cell fusion

石油价格的持续上涨和温室效应引起的全球变暖,使得人们越来越重视可再生能源的开发和利用。生物质能便是一种重要的可再生能源,以生物质为原料生产燃料乙醇具有广阔的发展空间。长期以来,人们利用淀粉和糖类发酵生产乙醇。这些原料成本较高,大大限制了生物质燃料乙醇产业的发展。在全球每年光合作用生产的高达 1500 亿吨~2000 亿吨的生物质中 80% 以上为木质纤维素类物

质,它十分廉价且容易获得,因此以木质纤维素为原料生产燃料乙醇,具有重要的实践意义。

木质纤维素是纤维素、半纤维素和木质素等的聚合物。利用酸解或酶解的方法可将木质纤维素转化为大量的五碳糖(木糖和阿拉伯糖)和六碳糖(葡萄糖、半乳糖和甘露糖)。木糖在大多数木质纤维素水解物中是含量仅次于葡萄糖的一种单糖,可达 30%。分析表明,充分利用木质纤维素原料中的木

糖发酵生产乙醇能使乙醇产量在原有基础上提高 25%^[1]。所以, 如何通过对已有菌株进行改造使其能高效利用木糖产乙醇已成为使木质纤维素资源得以充分利用的关键问题之一。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为工业上生产乙醇的优良菌株, 多年以来人们试图通过基因工程和细胞融合等方法对其进行改造使之能够代谢木糖生产乙醇。本文主要介绍这方面的研究进展。

1 木糖的代谢

木糖进入微生物细胞后首先要转化为其异构体木酮糖以便进入戊糖磷酸途径(PPP)。自然界中木糖

转化为木酮糖的途径有两条。在某些细菌中, 通过木糖异构酶(Xylose isomerase, XI)直接将木糖转化为木酮糖。在可利用木糖的酵母菌中, 木糖首先在木糖还原酶(Xylose reductase, XR)作用下被还原为木糖醇(Xylitol), 再在木糖醇脱氢酶(Xylitol dehydrogenase, XDH)作用下生成木酮糖(Xylulose)。木酮糖再经木酮糖激酶(Xylulose kinase, XK)作用生成 5-磷酸木酮糖(Xylulose-5-phosphate), 由此进入戊糖磷酸途径(PPP)。PPP 途径的中间产物 6-磷酸葡萄糖和 3-磷酸甘油醛通过糖酵解途径生成丙酮酸, 丙酮酸在缺氧条件下被丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶脱羧还原为乙醇(图 1)。

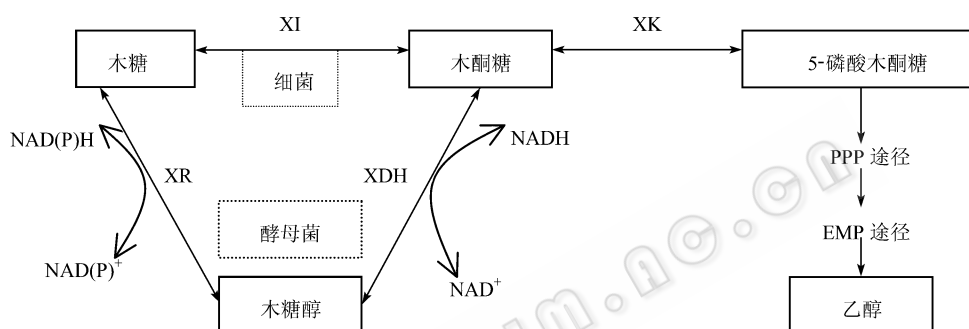


图 1 细菌和酵母的木糖代谢途径

Fig. 1 Xylose metabolic pathway in bacterium and yeasts

2 应用基因工程技术构建重组酿酒酵母发酵木糖生产乙醇

2.1 引入木糖向木酮糖转化途径

酿酒酵母不能发酵木糖, 但能发酵其异构体木酮糖, 因此构建利用木糖产乙醇的重组酿酒酵母有两个策略: 一是在酿酒酵母中克隆并表达天然利用木糖酵母菌的两个基因, 即木糖还原酶基因 *XYL1* 和木糖醇脱氢酶基因 *XYL2*; 二是在酿酒酵母中克隆并表达木糖异构酶基因 *XYLA*。

在酿酒酵母中同时表达木糖还原酶基因(*XYL1*)和木糖醇脱氢酶基因(*XYL2*)可使酿酒酵母获得利用木糖的能力。但是, Kötter 等^[2]进行了深入研究, 在厌氧条件下使用表达树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)*XYL1*, *XYL2* 的酿酒酵母转化子 pRD1 进行批式发酵实验, 当木糖浓度为 21.7 g/L 时, 乙醇产量只有 0.07 g/g, 乙醇体积产率仅为 0.07 g/(L·h), 而木糖醇产量为 0.46 g/g, 木糖被转化成了大约等摩尔的

木糖醇和乙醇(表 1)。这主要是因两种氧化还原酶所需的辅因子不平衡而引起的。*P. stipitis* 的木糖还原酶可分别以 NADH 和 NADPH 为辅酶, 但对 NADPH 的亲合力大。而木糖醇脱氢酶(XDH)只有利用 NAD⁺才能使木糖醇氧化为木酮糖。在厌氧条件下, 因 NAD⁺不能再生而导致胞内氧化还原不平衡而使木糖醇积累并向胞外分泌。人们曾试图通过改变菌种的遗传背景而使木糖代谢过程中细胞内氧化还原状态维持平衡, 如在敲除 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因(*ZWF1*)或 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因(*GDN1*)的酿酒酵母中同时超表达外源 *XYL1*、*XYL2* 及自身的木酮糖激酶基因(*XKS1*), 分别构建了重组酿酒酵母 TMB3255 和 TMB3008, 其乙醇产率均显著提高。在敲除 *ZWF1* 基因构建的工程菌 TMB3255 中, 最高乙醇产量达 0.41 g/g, 木糖醇产量最低为 0.05 g/g, 但这些突变同时降低了木糖的吸收速率^[3]。Watanabe 等^[4]通过对 *P. stipitis* 的 XDH 进行定点诱变, 得到了一个对 NADP⁺亲和力提高 4500 倍且催

化效率与野生型 XDH 相当的酶。最近证明, 当此酶与 *P. stipitis* 野生型 XR 共表达于 *S. cerevisiae*, 混糖发酵时, 与同时表达 *P. stipitis* 野生型 XR 和 XDH 的重组菌相比, 木糖醇的分泌减少了 86%, 乙醇产量增加了 41%, 达 0.46 g/g^[5]。有研究发现, *XYL1* 与 *XYL2* 相对表达水平的变化也影响最终代谢产物的形成^[6]。Eliasson^[7]等指出, 建立在动力学模型基础上的模拟数据显示三种酶活 XR/XDH/XK 比值为 1: 10: 4 时, 木糖醇的积累最少。基于这一理论, 我研究组正将 *XYL2* 和 *XKS1* 分别置于不同强度的启动子控制下并通过诱导型启动子人为控制 *XYL1* 的表达量, 试图通过优化三种酶的酶活水平减少木糖醇的积累增加乙醇产量^[8]。

在酿酒酵母中引入木糖异构酶基因(*XYLA*)是使其获得代谢木糖能力的又一途径。该基因曾先后从大肠杆菌等多种细菌中克隆得到, 并分别连接于酵母组成型启动子下, 转化于酿酒酵母中。但各种来源的 *XYLA* 基因在酿酒酵母中均没有得到活性表达。直到 Walfridsson^[9]等克隆高温细菌 *Thermus thermophilus* 的木糖异构酶基因并首次在酿酒酵母中得到活性表达。但该重组菌株表达的 XI 的最适温度为 85℃, 在乙醇发酵的常规温度(30℃)时, 其活性仅为最适条件下酶活的 4%。在此基础上 Lonn 等^[10]用易错 PCR 方法对 *T. thermophilus* 的 *XYLA* 进行定向改造, 试图解决 XI 最适温度过高的问题, 但效果仍不理想。Kuyper 等^[11]将一种厌氧真菌 *Piromyces* sp. E2 的木糖异构酶基因 *XYLA* 首次在酿酒酵母中高水平活性表达, 但此重组菌以木糖为单一碳源生长缓慢。经过对表达 *XYLA* 的酿酒酵母进行进化工

程改造, 获得了能在木糖上厌氧生长并产乙醇的菌株 RWB-202-AFX^[12]。为了进一步提高乙醇产率, 除了表达 *XYLA* 基因, Kuyper 等^[13]又将从木糖转化到糖酵解中间产物所需的全部基因均过量表达, 同时将酿酒酵母的醛糖还原酶基因 *GRE3* 敲除以减少木糖醇产生而得到重组菌 RWB217, 其利用木糖产乙醇能力可达 0.43 g/g, 乙醇产生速度达到 0.46 g/(g · h) (表 1)。由于通过木糖异构酶将木糖转变为木酮糖仅需要一步反应且不需任何辅酶, 所以这一路径的开拓是十分有意义的。

2.2 下游代谢途径的改造

木酮糖激酶(xylulokinase, XK)催化木酮糖转化为 5-磷酸木酮糖, 处于木糖代谢物进入 PPP 的节点, 是提高木糖代谢向下游进行的关键酶。酿酒酵母本身具有该酶, 但表达量不大。研究表明在表达 *P. stipitis* 的 *XYL1*、*XYL2* 的同时超表达自身木酮糖激酶基因(*XKS1*)的重组酿酒酵母, 木糖利用水平和乙醇得率都有所提高^[14]。Johansson 等^[15]人研究发现, 对超表达 *XKS1* 和 *XYL1*、*XYL2* 的两株重组酿酒酵母, 乙醇产量得以增加, 但同时木糖总消耗量也大幅降低了 50%。这被认为是因过量的木酮糖激酶使胞内的 ATP 水平大大降低, 从而对细胞生长产生了毒性。Jin 等^[16]将 *P. stipitis* 的木酮糖激酶基因(*XYL3*)在其自身启动子控制下适度表达于已表达 *P. stipitis* 的 *XYL1* 和 *XYL2* 的酿酒酵母中, 构建出重组菌 FPL-YSX3, 其细胞生长状况较好且木糖醇积累明显减少乙醇产量增加, 这证明适量表达 *XYL3* 是需要的。

表 1 几种重组酿酒酵母木糖厌氧发酵和乙醇生产情况

Table 1 Performance of several recombinant *S. cerevisiae* strains in the production of ethanol from xylose in anaerobic fermentation experiments

菌种 Strains	木糖 (g/L) Xylose	乙醇产量 (g/g) Ethanol yield	乙醇体积产率 [g/(L · h)] Volumetric ethanol productivity	木糖醇产量(g/g) Xylitol yield
pRD1	21.7	0.07	0.07	0.46
TMB3008	50	0.38	0.27	0.13
TMB3255	50	0.41	0.29	0.05
FPL-YSX3	40	0.12	0.01	0.27
RWB202-AFX	20	0.42	/	0.02
RWB217	20	0.43	/	0.06
TMB3050	50	0.29	/	0.23
TMB3057	50	0.33	0.13	0.22

5-磷酸木酮糖进入 PPP 途径后, 需要在转酮酶(transketolase, TKL)和转醛酶(transaldolase, TAL)作用下进一步转化。酿酒酵母自身具有木酮糖代谢的下游酶系, 但其活性较低, 也限制了木糖代谢向下游进行而影响乙醇的产生。Walfridsson 等^[17]在研究含有转酮酶和转醛酶以及木糖还原酶, 木糖醇脱氢酶等基因的重组酿酒酵母利用木糖的情况时发现, 超表达转醛酶基因(*TAL1*)可以增强重组菌株对木糖的利用并加快重组菌的生长。Karhumaa 等^[18,19]构建的重组酿酒酵母 TMB3050 和 TMB3057, 这两株菌都在表达 *P. stipitis* 的 *XYL1*、*XYL2* 基础上过表达 *TKL1*、*TAL1* 和 *XKS1*, 它们的过表达明显增加了重组菌在木糖上生长的速度和乙醇产量。这证明木糖代谢下游流向乙醇生成方向的强化也是需要的。

3 原生质体融合的方法构建发酵木糖的酵母工程菌

原生质体融合技术克服了细胞壁的天然屏障, 排除了细胞接合型的限制, 可实现多基因重组, 也是提高酵母菌发酵木糖产乙醇能力的重要方法。Kordowska 等^[20]得到了树干毕赤酵母和酿酒酵母的融合子。融合子耐乙醇性能高于亲本毕赤酵母, 但融合子发酵木糖产乙醇的速率小于毕赤酵母。Dziuba E 与 Chmielewska J^[21]以酿酒酵母(*D₄₃*)与休哈塔假丝酵母(ATCC 58779), 嗜鞣管囊酵母(ATCC 32691 和 ATCC 60392)进行了原生质体融合, 融合子 120 h 能完成对木糖的发酵。Chmielewska J^[22]后来又获得了酿酒酵母(*D₄₃*)与毕赤酵母(ATCC 58376)的属间融合子, 融合子发酵木糖产乙醇量与亲株毕赤酵母 (0.389 g/g)相当, 但木糖醇的产量比亲株低 40% 多, 并且木糖发酵的周期由 10 d 缩短至 7 d。发酵葡萄糖与木糖质量比为 7:3 的混合糖时, 7 d 后乙醇产量达到 0.377 g/g, 木糖醇产量为 0.038 g/g。毛华等^[23]获得了树干毕赤酵母和酿酒酵母的融合子。融合子厌氧发酵木糖以及共发酵木糖-葡萄糖能力均明显优于亲株, 其耐受乙醇的最大浓度也比亲株提高了一个百分点。张明等^[24]获得了酿酒酵母(PW218)和粟酒裂殖酵母(PW232)的属间融合子, 融合子 F10 利用葡萄糖、木糖及两种糖混合液产乙醇的能力大大高于两亲株; 融合子 F2 对葡萄糖、木糖及两种糖混合液的发酵能力亦较两亲株高, 其中利

用木糖产乙醇的量分别比亲株 PW218 和 PW232 提高了 1.38 倍和 2.65 倍。钟桂芳等^[25]通过属间融合获得了休哈塔假丝酵母和高温酿酒酵母的融合子。融合子能在 45℃ 下发酵木糖生产乙醇, 所产乙醇体积分数为 1.675%, 转化率为 68.8%。其在兼性厌氧条件下发酵木糖、葡萄糖混合糖的能力优于亲株, 且与亲株比较, 融合子乙醇耐受能力提高了 1%。我研究组曾用 PEG、Ca²⁺诱导酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母进行融合, 得到了一株融合子 F1, 其发酵 50 g/L 木糖 96 h, 乙醇产量为 0.062 g/g, 是嗜鞣管囊酵母亲株的 2.8 倍, 发酵 30 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖的混合糖 72 h, 木糖醇产量为 0.44 g/g, 是理论产率的 43.56%, 比嗜鞣管囊亲株高 4 倍, 乙醇产量也达到 9.52 g/L。

4 总结与展望

以木质纤维素为原料生产乙醇, 其关键之一是开发出能有效利用各种糖类高效生产乙醇的微生物菌种。人们通过对酿酒酵母进行基因工程改造和细胞融合, 已经构建出能够代谢葡萄糖和木糖产乙醇的酵母菌。但这些菌株还存在着不少问题, 比如乙醇产量低, 副产物较多, 以及融合子性能不稳定等。人们正在对酿酒酵母进行进一步改造以提高其利用木糖生产乙醇的能力。比如对其细胞膜上的转运体进行改造, 以提高细胞摄取木糖的能力。或者通过进化工程及驯化手段对重组酵母或融合子进一步改良。也可以将自然筛选到的能高效利用木糖并耐受抑制物的野生酵母菌株与酿酒酵母等进行原生质体融合, 以期改良菌种的生产性能。

随着能源价格持续上涨和因温室气体过量排放而导致的全球变暖趋势的愈演愈烈, 利用木质纤维素材料生产燃料乙醇已成为世界各国研究的热点。相信随着研究的深入, 必将有性能更优良的木糖代谢工程菌应用于燃料乙醇的生产。

参考文献

- [1] Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose and prehydrolyzate. *J Appl Microbiol*, 2001, **90**(2): 208–215.
- [2] Kötter P, Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **38**:

- 776–783.
- [3] Jeppson M, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, *et al.* Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *J Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 1604–1609.
- [4] Watanabe S, Kodaki T, Makino K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and Increase of thermostability by the introduction of structural zinc. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 10340–10349.
- [5] Watanabe S, Saleh AA, Pack SP, *et al.* Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. *J Journal of Biotechnology*, 2007, **130**(3): 316–319.
- [6] 鲍晓明, 高 东, 王祖农, 等. 木糖代谢基因表达水平对酿酒酵母重组菌株产物形成的影响. *生物工程学报*, 1997, **13** (4): 355–361.
- [7] A Eliasson, JHS Hofmeyr, S Pedler, *et al.* The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *J Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **29**: 288–297.
- [8] 刘继开, 田 沈, 张亚珍, 等. 代谢木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母的构建. *可再生能源*, 2007, **25**(1): 13–16.
- [9] Walfridsson M, Bao AM, Lilius G, *et al.* Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* *XYLA* gene which expresses an active xylose(glucose) isomerase. *J Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4648–4651.
- [10] Lonn A, Gardonyl M, Hahn-Hagerdal B, *et al.* Cold adaptation of xylose isomerase from through random PCR mutagenesis. *J Eur J Biochem*. 2002, **269**(1): 157–163.
- [11] Kuyper M, Harhangi HR, Stave AK, *et al.* High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *J FEMS Yeast Res*, 2003, **4** : 69–78.
- [12] Kuyper M, Winkler AA, VanDijken JP, *et al.* Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *J FEMS Yeast Res*, 2004, **4**: 655–664.
- [13] Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, *et al.* Metabolic engineering of a xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *J FEMS Yeast Res*, 2005, **5**: 399–409.
- [14] Peter R, Mervi H, Merja P. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. *J FEMS Microbiology Letters*, 2000, **190**: 39–43.
- [15] Johansson B, Christensson C, Hobley T, *et al.* Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *J Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4249–4255.
- [16] Jin YS, Ni H, Laplaza JM, *et al.* Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *J Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 495–503.
- [17] Walfridsson M, Hallbom J, Penttilla M, *et al.* Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains over expressing the *TKLI* and *TALI* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *J Appl Environ Microbiol*, 1995, **62**: 4184–4190.
- [18] Karhumaa K, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *J Yeast*, 2005, **22**: 359–368.
- [19] Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Hagerdal B, *et al.* High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbial Biotechnol*, 2007, **73**: 1039–1046.
- [20] Kordowska WM, Targonski Z. Application of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* karyoductants to the production of ethanol from xylose. *J Acta Microbiol Pol*, 2001, **50**(3-4): 291–299.
- [21] Dziuba E, Chmielewska J. Fermentative activity of somatic hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* or *pachysolen tannophilus*. *J Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2002, **5**(1): 1–12.
- [22] Chmielewska J. Selected biotechnological features of hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Yamadazyma stipitis*. *J Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2003, **6**(1): 1–13.
- [23] 毛 华, 曲音波, 高培基, 等. 酵母属间原生质体融合改进菌株木糖发酵性能. *生物工程学报*, 1996, **12**: 157–162.
- [24] 张 明, 王元君, 潘仁瑞. 酿酒酵母和粟酒裂殖酵母属间融合和融合子特性. *真菌学报*, 1996, **15**(3): 204–209.
- [25] 钟桂芳, 傅秀辉, 孙君社. 发酵木糖生产酒精的研究进展及其应用前景. *微生物学杂志*, 2004, **24**(1): 42–45.