

基因组改组及其在木质纤维素水解液乙醇发酵菌种选育中的应用展望

张作阳 田 沈 孟繁艳 闫 飞 李丰田 杨秀山*

(首都师范大学 生命科学学院 北京 100048)

摘 要: 能高效代谢木质纤维素水解液中的可发酵糖、同时可耐受/分解发酵抑制剂的菌种, 是利用木质纤维素为原料生产燃料乙醇技术的关键。基因组改组技术是近些年发展起来的一项新型育种技术, 该技术已运用于食品和医药行业菌种的改良。本文综述了基因组改组技术的原理、方法、特点、及其运用, 并对其在木质纤维素水解液乙醇发酵菌种选育方面的应用进行了展望。

关键词: 基因组改组, 育种, 乙醇发酵, 木质纤维素

Genome Shuffling and Its Prospect for Strain Improvement in Ethanol Production from Lignocellulosic Hydrolysates

ZHANG Zuo-Yang TIAN Shen MENG Fan-Yan YAN Fei
LI Feng-Tian YANG Xiu-Shan*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Commercial production of bioethanol from lignocellulosic hydrolysates requires efficient fermenting strains. The abilities of the strain to converting all types of sugars in the hydrolysate to ethanol in high yield and to effectively tolerating/metabolizing inhibitors are necessary. Genome shuffling is a novel method for breeding, and it has been applied in pharmaceutical and food industry. This review summarized the technique of genome shuffling including principle, process, applications and its prospect for strains improvement in ethanol production from lignocellulosic hydrolysates.

Keywords: Genome shuffling, Breeding, Ethanol fermentation, Lignocellulose

随着人类对化石燃料的不断使用, 化石能源储量日益减少、环境受到不断破坏。开发清洁的可再生能源对缓解能源紧张、减少环境污染具有重要意义。利用木质纤维素等生物质原料生产燃料乙醇, 从而替代石油等化石燃料的研究受到人们的广泛关注。木质纤维素水解液中含有可供微生物发酵生产

乙醇的糖类(以葡萄糖和木糖为主), 同时也存在着抑制微生物发酵的化合物如糠醛等。因此发酵菌种的选育工作主要集中在微生物木糖利用和毒性物质耐受/代谢的问题上。

目前, 对木质纤维素水解液乙醇发酵菌种的改造方法主要有: 通过驯化或诱变对现有菌种进行改

进; 利用现代分子生物学手段从遗传物质和代谢途径上对菌株进行改良, 如基因工程、细胞融合、代谢工程等。尽管已先后构建出一些改良菌株, 但其性能仍不能达到工业生产的要求, 因此, 开发更为有效的育种技术来构建性能更加优良的菌株是木质纤维素制取燃料乙醇商业化的当务之急。

基因组改组技术是近些年发展起来的一种高效简便的育种手段, 该技术已初步应用于菌种的选育。本文主要介绍了基因组改组技术的相关信息, 并对其在木质纤维素水解液乙醇发酵菌种选育方面的应用进行了展望, 以期能运用该技术促进木质纤维素乙醇发酵菌种的选育。

1 基因组改组技术

基因组改组技术(Genome shuffling)由 Stephen 等在 2000 年时提出^[1], 该技术结合了传统的育种手段和细胞融合技术, 为微生物育种提供了一种新的方法。作为进化工程的重要组成部分, 这种技术将分子定向进化的对象从某些基因扩展到整个基因组, 可以在更广的范围内对目的菌种的性状进行优化组合。

1.1 原理与方法

1.1.1 原理: 基因组改组是通过有性繁殖有效模拟自然进化的过程, 通过“递推原生质体融合”(Recursive fusion)的方法使几个亲本多次重组, 基因组发生重排, 从而得到复杂的表型, 使生物体的性状快速提高^[2]。

1.1.2 方法: 基因组改组的过程主要由构建初始突变体库、递推原生质体融合、融合后代的筛选 3 部分组成。

1) 构建初始突变体库。首先对需要改进的菌株进行传统的物理化学诱变, 从中筛选出性状提高的突变体, 构建突变体库, 并作为后续原生质体融合的亲本。

2) 递推原生质体融合。以突变的菌株为亲本进行原生质体融合, 再生后的菌株被制成原生质体以同样的方法再次进行融合, 如此重复几次, 完成首轮融合^[3]。之后, 通过定向筛选, 将目的性状提高的子代作为亲本, 进行下一轮融合。如此重复, 直至得到性能优良的目的菌株。与传统育种过程中每代 2

个亲本的进程相比, 基因组改组通过“递推原生质体融合”的方法允许多个亲本交叉^[2]。2001 年, Zhang 等^[3]以 *Streptomyces fradiae*(弗氏链霉菌)为材料验证了该技术的可行性, 试验表明通过两轮基因组改组即能达到通过 20 轮传统诱变育种得到的菌株性能, 且改组后的菌株性能优于诱变得到的菌株。

3) 融合后代的筛选。对融合子的有效筛选是基因组改组的关键也是难点。很多菌株缺乏相对直接的筛选标记, 此外融合后会得到大量的子代, 因此需要建立快速有效的筛选方法。对于一些产酶的菌株可以采用较为直观的方法, 如水解圈法、灿烂绿法、琼脂平板法等进行初筛, 再对初筛获得的优良菌株进行较精细的复筛。对于其它菌株可以采用对某些条件的耐受性进行筛选, 但对于一些生产周期长的产胞内次级代谢产物的菌株, 仍没有有效的筛选方法。目前已经开发了一些应用于 DNA 改组的高通量筛选方法, 如: 荧光激活细胞分类法(Fluorescence activated cell sorting, FACS)等^[4], 这些方法集计算机控制、自动化操作、高灵敏度检测、数据自动采集和处理于一体, 可以实现快速、微量、灵敏和大规模的筛选。对于基因组改组而言, 一些学者依靠 96 孔板结合微板分光光度计进行高通量筛选(High through-put screening, HTS), 同时大量光谱也成为非常灵敏的高通量分析仪器, 通过串联质谱提供精确的化学数据^[5], 但高通量筛选技术还有待于进一步开发。

1.2 基因组改组技术的特点

基因组改组技术以 30 多年前建立的原生质体融合技术为基础^[6], 同时结合了 DNA 改组中多亲本交叉的优势^[3]。改组过程中只需经过一次诱变, 避免了菌种因长期使用诱变剂而导致的自身抗性增强, 产生“疲劳效应”^[7]。之后进行的递推式多轮原生质体融合每代有 2 个以上的亲本参与^[2], 增大了参与重组的遗传信息量, 避免了杂交育种通常每代只允许 2 个亲本杂交、多样性小^[2]的缺点; 与常规的原生质体融合相比其基因转移和重组率得到了提高。改组过程不需要基因序列数据或代谢网络信息^[6], 可以同时改变全部基因组的不同位点; 并且与只改造某些基因的新型育种方法相比, 通过多次重组, 可促进群体内部个体间遗传信息交流^[8]。

1.3 微生物育种中的应用

1.3.1 基因组改组在原核微生物选育中的应用: 基因组改组技术是以细菌为模型建立的, 并被应用于制药、食品等行业所需菌种改良的研究中, 可提高菌种代谢产物的产量, 改进菌种的环境耐受性, 增加菌种的遗传多样性等。

1) 提高菌种代谢产物产量。通过对普那霉素生产菌 *Streptomyces pristinaespiralis* 进行基因组改组, Bo Xu 等^[9]获得了一株性能优良的改组菌株, 该菌株与诱变后产量最高的亲本 M-156 和原始亲本 CGMCC 0957 相比, 产量分别提高了 89.4% 和 145.9%。运用传统的紫外诱变结合一种微效价高通量筛选方法, Guo-li Gong 等^[10]对埃博霉素生产菌 *Sorangium cellulosum* 进行改组, 使其埃博霉素产量提高了 0.5~2.5 倍。枯草芽孢杆菌 DCO12 具有纤溶酶活性, 梁惠仪等^[11]以 4 株诱变菌株作为直接亲本, 采用电融合的方法进行两次多亲本的全基因组改组, 结合亲本灭活筛选方法, 共筛选出两株酶活显著提高并能稳定遗传的菌株, 其酶活比亲本菌株提高了 4~5 倍, 最高达 2710 IU/mL。

此外, Hiroyuki Hida 等^[12]用基因组改组技术快速提高了 HCA 链霉菌(*Streptomyces* sp. HCA)U121 的 HCA 产量。Zhu Hui 等^[13]对那他霉素产生菌 *Streptomyces gilvosporeus* 进行基因组改组, 显著提高了其产量。徐波等^[14]将该技术应用于稀有放线菌替考游动放线菌 S II A01-11-25, 通过三轮改组使其子代替考拉宁产量提高, 菌株已应用于中试生产。陈涛等^[15]也改组了一株核黄素生产菌 *Bacillus subtilis* 24/pMX45, 并成功提高了其核黄素产量。

2) 改进菌种环境耐受性。王玉华等^[16]采用紫外线与亚硝基胍两种方法诱变干酪乳杆菌, 改组后双灭活筛选融合子, 获得了 4 株可以在原始菌株无法生存的 pH 条件(pH 3.4)下生长的改组菌; 在 pH 3.8 的条件下, 改组菌株产酸量为原始菌株的 2.4 倍。MingHua Dai 等^[17]利用改组技术成功提高了 PCP 降解菌株 *S. chlorophenolicum* 的 PCP 耐受和降解能力, 改组后的菌株可以在含 6 mmol/L~8 mmol/L PCP 的平板上生长, 某些菌株甚至可以完全降解 3 mmol/L PCP, 而亲本的 PCP 耐受度不超过 0.6 mmol/L。

研究表明基因组改组技术可以综合提高菌体的

性能, 改组菌株在目的性状改进的同时其他方面的能力也有可能随之改进, 如于雷等^[18]应用基因组改组提高鼠李糖乳杆菌的耐糖能力和 L-乳酸的产量。

1.3.2 基因组改组在真核微生物选育中的应用: 基因组改组技术在真核微生物选育中的应用相对于原核微生物来说起步较晚, 但也取得了一定成果。林峻等^[19]以碱性脂肪酶产生菌扩展青霉(*Penicillium expansum*) FS8486 和溜曲霉(*Aspergillus tamaraii*) FS2132 为出发菌株, 经过两轮基因组改组, 得到数株优良子代。其中一株碱性脂肪酶酶活较出发菌株 FS8486 提高 317%。该实验不仅通过扩展青霉自身的突变来改进特性, 还通过其他菌种(溜曲霉)的加入来改进性能。在提高子代酶活的同时还丰富了子代的遗传多样性。通过对子代及亲本的 RAPD 多态性分析说明基因组改组可有效提高子代菌株的遗传多样性。Zhao Kai 等^[20]以紫杉醇产生菌树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*)为研究对象, 采用薄层层析、高效液相色谱和质谱分析筛选重组子。通过 4 轮基因组重组得到 3 株稳定遗传的紫杉醇高产菌株, 其中一株改组菌株 F4-26 的发酵液中紫杉醇含量比原始出发菌株 NCEU-1 提高了 64.41%, 比突变后的亲本提高了 31.52%~44.72%。李立风等^[21]利用灭活亲本的筛选方法通过两轮改组提高了酱油曲霉的酶活。

2 基因组改组技术应用于木质纤维素水解液乙醇发酵菌种选育

可用于木质纤维素乙醇发酵的微生物包括细菌、真菌及酵母属的多种酵母菌。其中, 酵母的应用最为广泛。酵母菌是工业上生产乙醇的优良菌株, 与其他微生物相比具有较高的乙醇耐受力, 不易污染, 并具有发酵速度快, 副产物少等优势, 因此成为育种的首选对象。

一些学者也开始将该技术用于酵母菌的改良中, Wei pinying 等^[22]对一株产酒精克鲁威假丝酵母(*Candida krusei*)GLS60 进行了四轮改组, 得到乙酸耐受性和乙醇产率好于亲本的子代 S4-3, 同时该菌的多种选择压耐受性也得到了改进。王灏等^[23]通过紫外诱变获得了 4 株耐高温、耐乙醇的酿酒酵母突变体, 以这些突变体为出发菌株, 经过 2 轮改组获

得了耐高温和乙醇性能都较好的子代。经过 35°C 发酵测试,子代 R24 的发酵液中,最高乙醇浓度为 12.93%(W/V),比原始出发菌株提高了近 5%。陆筑凤等^[24]也利用改组技术成功获得了耐高温和耐酒精的酿酒酵母子代,其最高温度和乙醇耐受可分别达 46°C 和 16%(V/V)。

虽然基因组改组技术已被应用于诸多领域,但其在木质纤维素水解液乙醇发酵菌种选育方面的应用却鲜有报道。我研究组也在进行木质纤维素水解液发酵菌种改良的研究,在对目的菌株的原生质体制备、再生条件进行摸索和优化的同时进行亲本耐毒性和木糖发酵的测试,以期建立一套可行的筛选方法。该方法将不仅用于改组天然菌株,还可用于改组一些能利用木糖又能耐受抑制剂但效果一般的重组酵母或原生质体融合子。目前已经得到的酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母的原生质体融合子,其发酵葡萄糖和木糖的性能均高于双亲,且乙醇耐受性较好,以其作为亲本进行基因组改组,进一步提高其毒性物质耐受性,以期能应用于木质纤维素水解液的乙醇发酵。由于基因组改组技术具有育种周期短,重组频率高等特点,可以使菌种性能显著提高,所以在应用于木质纤维素水解液乙醇发酵菌种选育之后,必定会使该领域有所突破。

3 总结与展望

以木质纤维素为原料生产乙醇是解决能源和环境问题的经济环保有效的途径,而能否得到代谢木糖且耐受发酵抑制物质的菌种则是简化流程,降低成本的关键。研究人员尝试使用各种方法改良菌种,以期能在工业生产中发挥作用。基因组改组技术作为一种有效的菌种改良技术为微生物菌种选育提供了新的方法,同时具有操作简便,育种周期短等优势。可以利用该技术改进天然微生物的性能,例如引入其他菌种的耐毒基因,改进原本可以代谢木糖的菌种;也可以用来改进一些未达到理想效果的基因工程重组菌株或原生质体融合产物,使其性能改善并最终用于生产。

随着科技的发展,各种快速筛选方法的出现必将促进基因组改组技术的应用,选育出更加适合工业生产的菌种并最终在木质纤维素水解液乙醇发酵

工业化生产上得到应用。

参考文献

- [1] Del Cardayré SB, Tobin MS, Willem PC, *et al.* Evolution of whole cells and organisms by recursive sequence recombination. International Patent Application No. WO 00/04190., 2000.
- [2] Giudici P, Solieri L, Andrea MP, *et al.* Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **66**(6): 622–628.
- [3] Zhang YX, Perry K, Victor A, *et al.* Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, **415** (6872): 644–646.
- [4] Joo H, Arisawa A, Lin ZL, *et al.* A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chemistry and Biology*, 1999, **6**(10): 699–706.
- [5] Stutzman-Engwall K, Conlon S, Fedechko R, *et al.* Engineering the *aveC* gene to enhance the ratio of doramectin to its CHC-B2 analogue produced in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **82**(3): 359–369.
- [6] Petri R, Schmidt-Dannert C. Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, **15** (4): 298–304.
- [7] 张彭湃. 微生物菌种选育技术的发展与研究进展. 生物学教学, 2005, **30**(9): 3–5.
- [8] Del Cardayré SB. Natural Products. Totowa: Humana Press, 2005, pp.107–125.
- [9] Xu B, ZH Jin, Wang HZ, *et al.* Evolution of *Streptomyces pristinaespiralis* for resistance and production of pristinamycin by genome shuffling. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80** (2): 261–267.
- [10] Gong GL, Sun X, Liu XL, *et al.* Mutation and a high-throughput screening method for improving the production of Epothilones of *Sorangium*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34** (9): 615–623.
- [11] 梁惠仪, 郭 勇. 全基因组重排育种技术提高豇豆蚜酶菌产酶量. 中国生物工程杂志, 2007, **27**(10): 39–43.
- [12] Hiroyuki Hida, Takashi Yamada, Yasuhiro Yamada. Genome shuffling of *Streptomyces* sp. U121 for improved production of hydroxycitric acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **73** (6): 1387–1393.
- [13] Zhu H, Jin ZH, Cen PL. Natamycin-producing strain breeding by genome shuffling. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi*, 2006, **31**(12): 739–742.
- [14] 徐 波, 王明蓉, 夏 永, 等. 应用基因组重排育种新方法筛选替考拉宁高产菌. 中国抗生素杂志, 2006, **31**(4): 237–242.
- [15] 陈 涛, 王靖宇, 周世奇, 等. 基因组改组及代谢通量

- 分析在产核黄素 *Bacillus subtilis* 性能改进中的应用. 化工学报, 2004, 55(11): 1843–1848.
- [16] Wang YH, Li Y, Pei XL, *et al.* Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*, 2007, **129** (3): 510–515.
- [17] Dai MH, Shelley DC. Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(4): 2391–2397.
- [18] 于雷, 雷霆, 裴晓林, 等. 应用基因组改组选育耐糖 L-乳酸高产菌株. 食品科学, 2007, **28**(9): 369–373.
- [19] 林峻, 施碧红, 施巧琴, 等. 基因组改组技术快速提高扩展青霉碱性脂肪酶产量. 生物工程学报, 2007, **23**(4): 672–676.
- [20] Zhao K, Ping WX, Zhang LN, *et al.* Screening and breeding of high taxol producing fungi by genome shuffling. *Science in China Series C Life Sciences*, 2008, **51**(3): 222–231.
- [21] 李立风, 潘力, 彭昶, 等. 基因组改组: 几株同源酱油曲霉的多亲株电融合育种. 中国调味品, 2006, **7**: 14–18.
- [22] Wei PY, Li ZL, He P, *et al.* Genome shuffling in the ethanologenic yeast *Candida krusei* to improve acetic acid tolerance. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2008, **49**: 113–120.
- [23] 王灏, 王航, 孟春, 等. 基因组改组技术选育耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的研究. 微生物学通报, 2007, **34** (4): 705–708.
- [24] 陆筑凤, 李超, 王昌禄, 等. Genome shuffling 技术选育高耐性酿酒酵母. 酿酒科技, 2008, **7**: 23–25.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>