

酿酒酵母木糖发酵酒精途径工程的研究进展

沈煜 王颖 鲍晓明* 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 途径工程(Pathway engineering)被称为第三代基因工程,改变代谢流向,开辟新的代谢途径是途径工程的主要目的。利用途径工程理念,对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)代谢途径进行理性设计,以拓展这一传统酒精生产菌的底物范围,使其充分利用可再生纤维质水解物中的各种糖分,是酿酒酵母酒精途径工程的研究热点之一。这里介绍了近年来酿酒酵母以木糖为底物的酒精途径工程的研究进展。

关键词 途径工程,木糖,酒精,酿酒酵母

中图分类号 TQ92 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)05-0636-05

途径工程是利用分子生物学原理,分析细胞代谢网络,通过合理设计的 DNA 重组,完成细胞特性改造的应用性学科^[1]。途径工程在分析代谢途径的基础上,定性地改变细胞内代谢流走向,调整原有代谢网络,进而提高特定代谢物的产量。外源基因的准确导入及其编码蛋白的稳定表达,可以拓展细胞内现有代谢途径的延伸路线,以获得新的生物活性物质或者优良的遗传特征^[2,3]。

发展可再生清洁能源、保护生态环境已成为人类必须面对的两大课题,燃料酒精被公认为最有发展前景的可再生清洁能源之一。汽油中添加 10%~15% 酒精的复合燃料——汽油醇(Gasohol),是良好的无铅汽油,在一些欧美国家已经开始使用这种燃料。2001 年 4 月国家计委决定十五期间将在大中城市逐步推广使用车用乙醇汽油(汽油醇)这一政策的出台必将给燃料酒精的发展带来极大的商机。目前,国内外均以淀粉质和糖蜜为原料生产酒精,底物成本在生产总成本中占有很大的比例,在欧美发达国家为 40% 左右^[4],而在中国这一数值高达 60%~70%。因此开发用于燃料酒精生产的廉价原材料是这一能源领域研究的主要方向之一。地球上最丰富的可再生资源——木质纤维素,是光合作用产物,充分将其中可利用成分转化为燃料酒精,不仅可以提供清洁能源,而且有利于推动太阳光能的转化利用,同时促进大气中 CO₂ 的循环^[1],减少由矿物燃料燃烧造成的 CO₂ 净排放。木糖是半纤维素的主要组成部分,在植物纤维材料水解液中占 30% 左右,是继葡萄糖之后自然界中最丰富的糖分^[4,5],以木糖为底物转化酒精的研究,是酒精途径工程的热点之一。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是传统的酒精生产菌株,具备良好的工业生产性状^[4,6],其全序列已测定,遗传操作技术也已经成熟^[7]。但是,酿酒酵母由于缺乏木糖代谢途径最初将木糖转化为木酮糖的酶而不能利用木糖。酒精代谢属于初级代谢,大部分反应为多数微生物相同的公共代谢途径,因此拓展酿酒酵母对木糖的利用只需加入有限的几种酶,反应即可实现^[1]。自然界中由木糖转化为木酮糖的代谢途径有两条,其一,在某些真菌中,在木糖还原酶(Xylose reductase, XR)和木糖醇脱氢酶(Xylitol dehydrogenase, XDH)的共同作用下完成, XR 和 XDH 分别需要 NADPH 和 NAD⁺ 作为辅酶;其二,在某些细菌中,通过木糖异构酶(Xylose isomerase, XI)直接转化为木酮糖。酿酒酵母具有木酮糖代谢的完整酶系^[8,9],木酮糖经过木酮糖激酶(Xylulokinase, XK)磷酸化生成 5-磷酸木酮糖,而进入磷酸戊糖途径(PPP),然后以中间产物 6-磷酸葡萄糖和 3-磷酸甘油醛进入酵解途径(EMP),最终在厌氧条件下生成酒精。通过途径工程理念,对酿酒酵母代谢途径进行理性设计,使其具有共发酵葡萄糖和木糖产生酒精的能力,提高酒精得率,是当前转化木质纤维素类生物质生产燃料酒精的研究热点之一^[2,10,11]。

酿酒酵母木糖酒精发酵途径工程的研究主要从三个方面展开:①引入木糖的代谢途径,包括木糖向木酮糖的转化以及强化下游代谢流向酒精生成的方向;②木糖的运输系统;③其他与木质纤维素材料发酵生产酒精相关的代谢途径改造。

1 木糖代谢途径的引入

酒精发酵涉及的是细胞正常生理生化过程的基础代谢

收稿日期 2003-01-16,修回日期 2003-04-02。

基金项目 国家自然科学基金委员会与中国节能投资公司联合研究基金资助项目(No. 50273019)。

* 通讯作者。 Tel 86-531-8364384-8105; Fax 86-531-8565610; E-mail bxm@sdu.edu.cn

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

途径, 阻断基础代谢途径势必导致细胞代谢异常甚至死亡。因此初级代谢的途径工程通常采用代谢流扩增和底物谱拓展的所谓“加法战略”, 而尽量避免实施途径阻断和基因敲除的“减法战略”操作^[1]。基于这一理论基础, 在酿酒酵母中重组表达糖代谢的相关酶基因, 引入木糖代谢途径是主要的研究方向。

1.1 木糖向木酮糖的转化

从木糖向木酮糖的两条转化途径, 均在酿酒酵母中进行过尝试。许多研究表明^[10-14], 在酿酒酵母中同时表达真菌的木糖还原酶基因(*XYL1*)和木糖醇脱氢酶基因(*XYL2*)可以使酿酒酵母获得利用木糖的能力。Kotter^[12]的研究表明, 在厌氧条件下, 带有 *Pichia stipitis* 来源的 *XYL1*、*XYL2* 的酿酒酵母转化子将木糖转化成了大约等摩尔的木糖醇和乙醇, 推测在重组酿酒酵母中表达的 XR 和 XDH 所需辅助因子不平衡是酒精产生受到限制的原因之一。Ligthelm 等^[13]进一步证明木糖醇随氧气的下降而增加。由于缺氧条件下不能使 NAD^+ 再生, 加入电子受体则可以阻止木糖醇的产生, 同时使乙醇生成量有所提高^[14]。酶学研究显示, 代谢过程中还原乙偶姻或者糖醛需要 $NADH$, 因此在木质纤维素水解物中含有糖醛或者加入乙偶姻将有利于木糖的乙醇发酵^[15]。虽然某些菌中的木糖还原酶可以利用 $NADPH$ 、 $NADH$ 两种还原型辅酶, 但动力学研究表明, XR 与 $NADPH$ 的亲合力大^[16,17], 结果仍然会引起 $NADH$ 的积累。Vandeska 等^[18]发现 *Candida bofilinii* 的 XR 利用 $NADH$ 比利用 $NADPH$ 作辅酶时有更高的活性, 但后继工作尚未见报道。Metzger 等^[19]将从 *Thermoanaerobium brockii* 的乙醇脱氢酶基因中得到的 $NADP$ 识别序列引入 *XYL2*, 试图改变 XDH 对 NAD 的特异性需求。突变的酶可以利用 NAD 和 $NADP$, 并且两者的表现 K_m 相同。在木糖基本培养基上, 带有突变的 *XYL2* 和 *XYL1* 共同表达的酿酒酵母转化子能够生长。Anderlund 等^[20]将 XR 和 XDH 两种酶的基因用一小段 DNA 连接在一起, 在酿酒酵母中成功得到具有双功能酶活性融合蛋白的活性表达, 因为两者之间的距离很短, 可以使木糖还原酶有更高的几率结合利用 $NADH$ 作为辅酶。这种重组酵母和分别表达 XR 和 XDH 单体的菌株相比, 木糖醇产生率降低 11.3%, 而乙醇得率升高了 20.3%。本课题组^[10]的研究显示, 不同的基因表达水平对木糖发酵产物有重要的影响。在木糖摇瓶发酵实验中, XR/XDH 酶活比值为 0.06 的菌株, 共消耗木糖 3.25g, 与 XR/XDH 比值较高的菌株相比, 不产生木糖醇, 甘油及乙酸盐等副产物较少, 但乙醇的产量却较高。

引入细菌木糖异构酶基因(*xylA*)是使酿酒酵母转化木糖为木酮糖的又一途径。细菌的木糖异构酶因不需要任何辅助因子, 最初被认为是构建利用木糖酿酒酵母代谢工程菌株的便利途径。早期多个工作组将多种来源的木糖异构酶克隆表达达到酿酒酵母中, Rene 等甚至从重组酵母中得到外源 *xylA* 基因正确大小的蛋白产物^[21], 但均没有得到活性表达^[22,23]。可能的原因有: ①细菌和酵母最适 pH 不同, ②酶折叠不正确, ③后期翻译模式不合适^[22]。直到 1996 年,

Walfridsson 等^[23]选择与真核生物亲缘关系更近的古细菌——嗜热细菌 *Thermus thermophilus* 的木糖异构酶基因(*xylA*), 首次在酿酒酵母中得到了活性表达。他们将 *T. thermophilus* 的 *xylA* 置于酿酒酵母 *PGK1* 启动子控制下, 用附加体质粒作载体, 转化酿酒酵母, 重组酶的最高酶活温度为 85℃, 远高于酿酒酵母的生长发酵温度, 但重组菌株不能利用木糖为唯一碳源生长, 但是, 限氧条件发酵可以消耗木糖而得到乙醇、乙酸和木糖醇。随后, 同一研究小组的 Lonn 等^[24]用易错 PCR 方法对 *T. thermophilus* 的 *xylA* 进行定向改造, 试图解决 XI 最适反应温度过高的问题, 但效果仍不理想。突变株 XI 最适反应温度降至 60℃, 但其热稳定性却大大降低。本课题组^[25]采用 PCR 技术, 克隆得到嗜热细菌 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 木糖异构酶基因 *xylA*, 并在酿酒酵母 H158 中得到活性表达, 其最高酶活条件是 85℃、pH 7.0, 在接近酵母生长温度的 30℃ 和 40℃ 时, 其相对酶活分别下降 3.7% 和 11%, 这一工作为进一步在酿酒酵母中建立新的木糖代谢途径打下了基础。另外, 直接向酒精发酵液中添加细菌木糖异构酶制剂^[26], 是促使木糖向木酮糖的转化的又一方式, 且效果较好, 但成本偏高, 不具有实际应用意义。

总之, 酿酒酵母所缺乏的木糖到木酮糖转化的两条途径, 均通过代谢途径工程, 在酿酒酵母中进行尝试。来自亲缘关系近的其他酵母菌株的 *XYL1* 及 *XYL2* 基因表达没有障碍, 也得到可以发酵木糖产生酒精的工程菌株, 其酒精得率不高是今后需要攻破的难点。解决 XR 和 XDH 辅助因子不能相偶联而造成的氧化还原不平衡可能是这一难点的突破口。XI 不需要任何辅助因子, 但其来源于亲缘关系较远的细菌, 目前, 只有少数高温细菌来源的 *xylA* 能在酿酒酵母中得到活性表达, 但由于 XI 重组酶的最适温度和 pH 偏高, 且在常温下酶活偏低, 使所构建的工程菌株均不能很好地发酵木糖产生酒精。选择在较低 pH 和较低温度下高活力的木糖异构酶仍然是这一领域今后努力的主要方向之一。

1.2 下游代谢流向酒精生成方向的强化

在酿酒酵母中引入木糖到木酮糖代谢途径, 仍不能很好地发酵木糖产生酒精, 暗示木糖到乙醇整个代谢途径上的其他环节有障碍。推测可能的限制因素有二: 一是 PPP 途径中的转酮酶(*TKL*)和转醛酶(*TAL*), 二是催化木酮糖代谢第一步的木酮糖激酶(*XKS1*)。酿酒酵母本身含有这些酶, 但酶活较低。提高代谢途径中某个关键酶的活力, 以得到高产的末端产物, 是途径工程的又一个策略^[1]。

Walfridsson 等^[27]在研究含有转酮酶和转醛酶以及木糖还原酶、木糖醇脱氢酶基因的酿酒酵母重组菌株利用木糖的影响时发现, 超表达 *TKL1* 基因对木糖的利用影响不大, 而 *TAL1* 基因的超表达可以增强重组菌株对木糖的利用, 同时超表达 *TKL1* 和 *TAL1* 基因的重组酿酒酵母菌株利用木糖的能力仅略强于仅提高转醛酶活性的菌株。这一结果表明, 转醛酶对木糖代谢的影响较大。本课题组^[10]在表达 *XYL1* 和 *XYL2* 的酿酒酵母重组菌株中超表达 *TKL1* 和 *TAL1*, 改造后

的重组菌株在以木糖为唯一碳源的平板上生长良好,其状况优于未超表达 *TKL1* 和 *TAL1* 的菌株。

近年来,木酮糖激酶(XK)作为另一个木糖代谢途径中的关键酶成为多个工作小组的研究热点。Eliasson 等人^[28]在酿酒酵母中超表达木酮糖激酶基因(*XKS1*)后,以木酮糖为底物进行乙醇发酵,乙醇得率上升了 85%,已接近理论得率,但不同的宿主背景,乙醇得率不同,表明宿主背景对木糖代谢也有相当大的影响。Richard 等^[9]研究了酿酒酵母在葡萄糖和木酮糖上的生长,其速率比是 15,而一般酵母在葡萄糖和木酮糖上的生长速率比在 0.75 至 4 之间,超表达 *XKS1* 的酿酒酵母这一比率为 6,已接近其他酵母,乙醇得率亦高于出发菌株,证实了 *XKS1* 在代谢途径和乙醇发酵中的重要地位。Jeppsson 等^[29]的研究表明,超表达 *XKS1* 的重组菌株,XK 活性在仅有葡萄糖时测试不到,但加入木酮糖后,酶活显著提高,认为木酮糖对 XK 有诱导作用。虽然同时表达来自 *P. stipitis* 的 *XYL1*,*XYL2* 并超表达自身 *XKS1* 的重组酿酒酵母,木糖利用和乙醇得率都有所提高^[9,30],表达 *T. thermophilus* 的 *xylA* 并超表达自身 *XKS1* 的重组酿酒酵母虽不能利用木糖生长但可以发酵木糖产生乙醇^[31],但是重组菌株对木糖的利用率和乙醇产量都不够理想。Jin 等^[32]克隆了 *P. stipitis* 的木酮糖激酶基因(*XYL3*),在其自身的启动子控制下表达于酿酒酵母,认为同一来源的外源基因可能对发酵有利,结果表明,重组菌株木酮糖消耗增长了 3 倍。

提高外源基因在重组酿酒酵母中的稳定性是工程菌工业应用价值的重要指标之一,Eliasson 等^[33]将来自 *P. stipitis* 的 *XYL1*、*XYL2* 以及内源 *XKS1*(由 *PGK1* 启动子控制)一起整合到酿酒酵母 CEN.PK 113-7A 的染色体的 *HIS3* 位置,构建了酿酒酵母 TMB3001。此菌株外源基因的稳定性有所提高,且发酵效果与用附加体质粒表达同样 3 个基因的重组菌株没有大的区别。

相对于处于更下游的 *TKL1* 和 *TAL1*,*XKS1* 对木糖代谢途径更加重要,因而,目前大量的工作围绕其展开。在已表达 *XYL1* 和 *XYL2* 或者 *xylA* 的酿酒酵母菌株中超表达 *XKS1*,对重组菌株进行横向、纵向的比较分析,以期有进一步发现,是目前本实验室的工作重点之一。

2 木糖的运输系统

木糖的跨膜运输被认为是木糖利用的另一个障碍,而且可能是较为重要的限制因素。尽管酿酒酵母不代谢木糖,但 Busturia 等人^[34]的研究表明,木糖可以通过葡萄糖的非专一性运输系统进入细胞,但该系统对木糖的亲合力远低于对葡萄糖的。同时,质膜运输在木质纤维素水解物中其他糖的利用过程中也起着很重要的作用^[35]。

Zyl 等^[36]在研究木糖转运时指出,葡萄糖对木糖的转运和利用有阻遏作用,木糖利用率在利用棉籽糖作为共底物时,比利用葡萄糖作共底物时要高。Wahlborn 等^[37]发现,当木糖在培养基中所占比例增加或者其稀释率增加时木糖的吸收将有所增加,表明木糖运输仍然是木糖利用的关键问

题。近来 Hamacher 等^[38]的研究得出相反的实验结果。去除所有 18 种戊糖转运相关基因后,细胞丧失了吸收和利用木糖生长的能力,但是,超表达木糖转运蛋白基因并没有得到预计的在厌氧条件下利用木糖生长加快或者厌氧条件下木糖发酵速率提高等结果,因而认为,木糖的吸收对木糖的代谢流量的影响是有限的。

这一领域,国内外的研究均相对较少,有望成为新的研究热点,并取得新的突破。

3 其他与木质纤维素材料发酵生产酒精相关的代谢途径改造

阻断不重要的途径以减少碳向其他副产物流失,或者改变辅酶氧化态和还原态的比例,也是提高乙醇得率的措施之一。超表达 *XKS1* 的酿酒酵母,缺失 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,6-磷酸海藻糖合成酶以及 6-磷酸海藻糖磷酸化酶基因,可以使发酵木酮糖的乙醇得率提高 20% 到 30%^[28];去除磷酸葡萄糖异构酶基因的启动子,使其酶活降低,可以使乙醇得率上升 15%^[28]。在表达 *T. thermophilus* 的 *xylA* 并超表达自身 *XKS1* 的重组酿酒酵母中缺失醛糖还原酶基因,可将木糖醇产生量减少 2 倍^[31]。

提高酿酒酵母对木质纤维素水解物中酚抑制剂的抗性也是利用途径工程技术改良酿酒酵母的内容之一。将来自 *Trametes versicolor* 的漆酶基因在 *PGK1* 启动子控制下在酿酒酵母中表达,结果提高了由可再生原材料生产乙醇的产量^[39]。

此外,利用细胞融合技术也是赋予酿酒酵母木糖代谢基因的一种措施。毛华等^[40]和 Kordowska 等^[41]先后用能发酵木糖的毕赤氏酵母和高耐抑制物能力的酿酒酵母,通过原生质体融合技术进行属间融合,得到了能发酵木糖的酵母融合子,耐酒精性能高于亲本毕赤氏酵母,但融合子发酵木糖产生乙醇的速率小于毕赤氏酵母。

4 展 望

酿酒酵母木糖发酵酒精途径工程研究进行了 20 多年。尽管某些方面还需要改进,但是,从生物质原料生产燃料,高效转化木质纤维素水解物中的糖类,因其良好的应用前景,从未减慢过它发展的步伐。随着酿酒酵母全序列的得到以及 DNA 重组技术的飞速发展,途径工程变得更加理性化,通过选择合适的受体菌株、进一步加强分子水平的代谢工程菌株改造以及后期同步发酵技术的改进,我们相信,不久的将来,必将有实用的木糖代谢工程酿酒酵母用于燃料酒精的生产。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHANG H Z(张惠展). *Metabolic Engineering* 1st ed, China Light Industry Press, 2002
- [2] YU J Y(郁竟怡), YANG S L(杨胜利). *Metabolic Engineering, Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 1996, 12(2):

- [3] Simon O ,Lisbeth O ,Jens N. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000 **64** (1) : 34 - 50
- [4] Zaldivar J ,Nielsen J ,Oslsson L. Fuel ethanol production from lignocelluloses : a challenge for metabolic engineering and process integration . *Appl Microbiol Biotechnol* 2001 **56** :17 - 34
- [5] Rodney J B ,Nancy N ,Bruce S D. Fermentations with new recombinant organisms . *Biotechnol Prog* 1999 **15** 867 - 875
- [6] Lisbeth O ,Jens N. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae* : utilization of industrial media . *Enzyme and Microbiol Technology* 2000 **26** :785 - 792
- [7] Goffeau A ,Barrell B G ,Bussey B *et al.* Life with 6000 genes . *Science* 1996 **274** (5287) :546 ,563 - 567
- [8] Yu S ,Jeppsson H ,Hahn-Hagerdal B. Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains . *Appl Microbiol Biotechnol* 1995 **44** 314 - 320
- [9] Peter R ,Mervi H ,Merja P. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism . *FEMS Microbiology Letters* ,2000 , **190** 39 - 43
- [10] BAO X M (鲍晓明) ,GAO D (高东) ,QU Y B (曲音波) *et al.* Effect on product formation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing different levels of xylose metabolic genes . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) ,1997 **13** (4) :225 - 231
- [11] Aristos A ,Penttila M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization . *Curr Opin Biotechnol* 2000 **11** (2) :187 - 198
- [12] Kotter P ,Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* . *Appl Microbiol Biotechnol* 1993 **38** 776 - 783
- [13] Lighthelm M E ,Prior B A ,du Preez J C. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol . *Appl Microbiol Biotechnol* 1988 **28** 63 - 68
- [14] Bruinenberg P M ,de Bot P H M ,Scheffers W A *et al.* The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts . *Eur J Microbiol Biotechnol* 1983 **18** 287 - 292
- [15] Wahlborn C F ,Hahn-Hagerdal B. Furfural 5-hydroxymethyl furfural , and action act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* . *Biotechnology and Bioengineering* 2002 **78** (2) :172 - 178
- [16] Bruinenberg P M ,de Bot P H M ,Scheffers W A *et al.* NADH-linked aldose reductase : the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts . *Appl Environ Microbiol* 1984 **19** 252 - 260
- [17] Verduyn C ,van Kleef R ,Scheffers W A *et al.* Properties of the NAD(P)H dependent xylose reductase from the fermenting yeast *Pichia stipitis* . *Biochem Journal* 1985 **226** 669 - 677
- [18] Vandeska E ,Uzmanova S ,Jeffries T W *et al.* Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rate . *J Ferment Bioeng* 1995 **80** 513 - 519
- [19] Metzger M H ,Hollenbrg C P. Amino acid substitutions in the yeast *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase coenzymebinding domain affect the coenzyme specificity . *Eur J Biochem* 1995 **228** 50 - 54
- [20] Anderlund M ,Radstrom P ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Expression of bifunctional enzymes with xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* alters product formation during xylose fermentation . *Metabolic Engineering* 2001 **3** (3) :226 - 235
- [21] Rene A ,Martin W ,Cornelis P H. The fermentation of xylose——an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast . *Appl Microbiol Biotechnol* 1989 **30** 351 - 357
- [22] Dumsday G J ,Jones K ,Pamment N B. Recombinant organisms for ethanol production from hemicellulosic hydrolyzates——a review of recent progress . *Aust Biotechnol* 1997 **7** :285 - 295
- [23] Walfridsson M ,Xiaoming B ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene , which expresses an active xylose (glucose) isomerase . *Appl Microbiol Biotechnol* 1996 **62** :4648 - 4651
- [24] Lonn A ,Gardonyl M ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Cold adaptation of xylose isomerase from through random PCR mutagenesis . *Eur J Biochem* 2002 **269** (1) :157 - 163
- [25] BAO X M (鲍晓明) ,GAO D (高东) ,WANG Z N (王祖农) . Expression of xylose isomerase gene (xylA) in *Saccharomyces cerevisiae* from *Clostridium thermohydrosulfuricum* . *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) ,1999 **39** (1) :49 - 54
- [26] Chandrakant P ,Bisaria V S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase . *Appl Microbiol Biotechnol* 2000 **53** 301 - 309
- [27] Walfridsson M ,Hallborn J ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase . *Appl Environ Microbiol* 1995 **61** : 4648 - 4651
- [28] Eliasson A ,Boles E , Hahn-Hagerdal B *et al.* Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* . *Appl Microbiol Biotechnol* , 2000 **53** :376 - 382
- [29] Helena J ,Shiyuan Y ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Xylulose and glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat culture . *Appl Microbiol Biotechnol* 1996 **3** :1705 - 1709
- [30] Nancy W Y H ,Zhengdao C ,Adam P *et al.* Genetically engineered *saccharomyces* yeast capable of effective cofermmentation of glucose and xylose . *Appl Microbiol Biotechnol* 1998 **3** :1852 - 1859
- [31] Traff K L ,Otero C R ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of expressing the *xylA* and *XKS1* genes . *Appl Microbiol Biotechnol* 2001 **67** (12) :5668 - 5674
- [32] Yongsu J ,Sharon J ,Thomas W J *et al.* Molecular cloning *XYL3* (D-xylulokinase) from *Pichia stipitis* and characterization of its physiological function . *Appl Microbiol Biotechnol* 2002 **68** (3) :1232 - 1239
- [33] Eliasson A ,Christensson C ,Hahn-Hagerdal B *et al.* Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1* , *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures . *Applied and Environmental Microbiology* 2000 **66** (8) :3381 - 3386
- [34] Busturia A ,Lagunas R. Catabolite inactivation of the glucose transport

- 379 – 385
- [35] Spencer M I. Transport of sugars in yeast : Implications in the fermentation of lignocellulosic material . *Bioresour Technol* ,1994 ,**50** : 51 – 57
- [36] van Zyl W H ,Eliasson A ,Hahn-Hagerdal B *et al* . Xylose utilization by recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources . *Appl Microbiol Biotechnol* ,1999 , **52** : 829 – 833
- [37] Wahlbom C F , Eliasson A ,Hahn-Hagerdal B *et al* . Intracellular fluxes in a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations . *Biotechnol Bioeng* 2001 ,**72**(3) 286 – 296
- [38] Hamacher T ,Becker J ,Hahn-Hagerdal B *et al* . Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization . *Microbiology* 2002 ,**148**(Pt9) 2783 – 2788
- [39] Simona L ,Pierre C ,Leif J J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase . *Applied and Environmental Microbiology* ,2001 ,**67**(3) :1163 – 1170
- [40] MAO H(毛华) ,QU Y B(曲音波) ,GAO P J(高培基) *et al* . Improvement of xylose fermentation by intergeneric protoplast fusion of *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* . *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) ,1995 ,**12**(Supplement) :157 – 162
- [41] Kordowska W M , Targonski Z. Application of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* karyoductants to the production of ethanol from xylose . *Acta Microbiol Pol* ,2001 ,**50**(3 – 4) 291 – 299

Progress in the Pathway Engineering of Ethanol Fermentation from Xylose Utilising Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

SHEN Yu WANG Ying BAO Xiao-Ming* QU Yin-Bo

(State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

Abstract Pathway engineering was the third generation of gene engineering. Its main goals were to change metabolic flux and open a new metabolic pathway in organism. Application of recombinant DNA methods to restructure metabolic networks can improve production of metabolite and protein products by altering pathway distributions and rates. Ethanol is the most advanced liquid fuel because it is environmentally friendly. Enhancing fuel ethanol production will require developing lower-cost feedstock , and only lignocellulosic feedstock is available in sufficient quantities to substitute for corn starch. Xylose is the major pentose found in lignocellulosic materials and after glucose the most abundant sugar available in nature. Recently a lot of attentions have been focused on designing metabolic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in order to expand the substrate of ethanol fermentation , because it is a traditional ethanol producing strain and has wonderful properties for ethanol industry. However , it can not utilize xylose but convert the isomer , xylulose. Many attempts are based on introducing the genes in the pathway of xylose metabolism. The further research includes overexpressing the key enzyme or decreasing the unimportant flux. The sugars in lignocellulose hydrolysates , therefore , could be efficiently utilized. Here , we describe the ethanol pathway engineering progress in ethanol fermentation from xylose with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* .

Key words pathway engineering , xylose , ethanol , *Saccharomyces cerevisiae*

Received : 01-16-2003

This work was supported by Grants from both the National Natural Sciences Foundation of China and China Energy Conservation Investment Corporation(No. 50273019)

* Corresponding author. Tel 86-531-8364384-8105 ; Fax 86-531-8565610 ; E-mail : bxm@sdu.edu.cn