

木糖代谢工程菌的研究进展

鲍晓明 高 东 王祖农

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 木糖广泛存在于农副产业及林产业的木质废弃物中,利用微生物转化木糖产生乙醇的研究,对生物质再生资源的全利用有着重要意义。本文介绍了木糖代谢工程菌的研究进展和策略。

关键词 木糖利用 乙醇 代谢工程 生物质再生资源

学科分类号 Q 81

木质纤维材料是地球上最丰富的可再生资源,广泛存在于农副产业及林产业的木质废弃物,以及以农产品、林产品为原料的工业(如造纸业)废弃物中,是巨大的再生资源。木质纤维素主要成分为纤维素、半纤维素及木质素三部分,由于组成上的多样性,使生物量的全利用成为植物原料再生性能源开发的关键。

半纤维素是多种糖分的非结晶异质多聚体,许多植物材料半纤维素的主要成分是木聚糖,它是由 D-木糖组成骨架, L-阿拉伯糖组成侧链。由于半纤维素结构及组成的混杂性,且聚合度较低,因而降解比纤维素容易得多,采用热或酸解即可使半纤维素降解为单糖或寡糖,木糖是其中主要成分之一,因而对木糖生物转化的研究是充分开发利用半纤维素的基础^[1]。

1 木糖的代谢途径

虽然半纤维素多聚体的降解比较容易,但其降解产物戊糖(主要是木糖)发酵产生乙醇则要比纤维素的降解产物葡萄糖的发酵困难得多。自然界存在着某些天然利用木糖的微生物,包括细菌、酵母菌和丝状真菌,真菌与细菌的木糖代谢途径不尽相同。

利用木糖的酵母及丝状真菌的木糖代谢途径,首先是在依赖 NADPH 的木糖还原酶(Xylose reductase, XR)的作用下还原木糖为木糖醇,随后在依赖 NAD⁺ 的木糖醇脱氢酶(Xylitol dehydrogenase, XDH)作用下氧化形成木酮糖,再经木酮糖激酶(Xylulokinase)磷酸化形成 5-磷酸木酮糖,由此进入磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway, PPP)。PPP 途径的中间产物 6-磷酸葡萄糖及 3-磷酸甘油醛通过酵解途径形成丙酮酸,丙酮酸或是经丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶脱羧还原为乙醇;或是在好氧的条件下,通过 TCA 循环及呼吸链彻底氧化成 CO₂^[2,3]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)因缺乏木糖转化为木酮糖的酶,而不能利用木糖,但可以利用木糖的异构体——木酮糖。在酿酒酵母菌中木酮糖也是先磷酸化形成 5-磷酸木酮糖,进入 PPP 途径,经酵解形成乙醇^[4]。

与真菌(酵母菌及丝状真菌)的木糖代谢途径不同,细菌的木糖代谢途径是通过木糖异构酶直接转化木糖形成木酮糖,该酶不需要辅酶的参与,随后同样在木酮糖激酶的作用下磷酸化形成 5-磷酸木酮糖进入 PPP 途径,但与 PPP 途径偶联的是 ED 途径,通过 ED 途径产生乙醇^[5]。

2 利用木糖酿酒酵母代谢工程菌的构建

酿酒酵母(*S. cerevisiae*)是食品及化工工业的最佳生产菌株,广泛应用于酒类生产中。它具有许多

山东省自然科学基金资助项目。

收稿日期:1998-04-09,修回日期:1998-07-08。

优良特性 (i) 在厌氧条件下可以良好地生长发酵 (ii) 发酵葡萄糖有较高的乙醇得率 (iii) 对一些生长抑制因子如乙酸、糠醛等具有较高的抗性, 而这些生长抑制因子往往存在于木质纤维材料的水解物中; (iv) 较高的乙醇耐受性 (v) 被公认为 GRAS (Generally regarded as safe) 微生物。但酿酒酵母不能直接利用木糖。目前通过代谢工程手段构建能利用木糖的酿酒酵母重组菌株, 以尽可能对木质纤维材料生物量全利用的研究十分活跃。

根据酿酒酵母不能利用木糖, 但能利用木酮糖的代谢特点, 构建利用木糖的酿酒酵母代谢工程菌株, 有两个策略, 一是在酿酒酵母菌中克隆并表达天然利用木糖真菌的 2 个基因, 即木糖还原酶基因 XYL1 和木糖醇脱氢酶基因 XYL2; 二是在酿酒酵母菌中克隆并表达细菌的木糖异构酶基因 *xylA*, 目的均是在酿酒酵母菌中引入转化木糖形成木酮糖的代谢途径, 然后进一步代谢木酮糖产生乙醇。此外, 毛华等人^[6]利用原生质体融合技术进行属间融合, 得到能发酵木糖产生乙醇的酵母菌融合子。

2.1 表达 XYL1, XYL2 基因木糖酿酒酵母工程菌的构建

木糖还原酶基因 XYL1 已从 3 株毕赤酵母菌 (*Pichia stipitis*) CBS57, CBS5774 和 CBS6054 中克隆得到并测序^[7-9], 该基因的开放阅读框架为 954bp, 编码 318 个氨基酸。 *P. stipitis* 木糖还原酶的天然状态为二聚体形式, 推测分子量为 76kDa (2x38kDa)^[9,10]。 *P. stipitis* 的木糖还原酶可以分别以 NADH 和 NADPH 为辅酶, 但对 NADPH 的亲合力大, $K_m(\text{NADPH})$ 为 0.0032 而 $K_m(\text{NADH})$ 为 0.04^[10]。木糖醇脱氢酶基因 XYL2 从 *P. stipitis* CBS5774 克隆得到^[11,12]并测序, 该基因的开放阅读框架为 1089bp, 编码 363 个氨基酸, 其天然状态为二聚体形式, 分子量为 63kDa (2x32kDa)^[13]。 *P. stipitis* 木糖醇脱氢酶依赖 NAD^+ 为受氢体。

将 *P. stipitis* 的基因 XYL1 和基因 XYL2 克隆于多拷贝载体在酿酒酵母启动子如 PGK、ADHI 或在其自身的启动子下, 均可以在酿酒酵母菌中得到较高的酶活表达。但所构建的表达 XYL1 和 XYL2 的酿酒酵母重组菌株, 尚不能发酵木糖产生乙醇, 消耗少量木糖主要被还原为木糖醇以及其他副产物^[2,9,11,12]。这被认为是反应平衡常数的特点所致, XR 的酶促反应, $\text{木糖} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{木糖醇} + \text{NADP}^+$ 的平衡常数 K_{eq} 为 $5.75 \times 10^9 \text{ mol/L}$, XDH 的酶促反应, $\text{木糖醇} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{木酮糖} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 的 K_{eq} 为 $6.9 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$, 表明这两步可逆反应倾向形成木糖醇^[10,13]。此外, 两步反应的辅酶 (NADPH 和 NAD^+) 不能偶联, 造成细胞内氧化还原失衡, 也是引起木糖醇积累的原因之一。

2.2 酿酒酵母 PPP 途径酶基因超表达对利用木糖的影响

仅仅表达 XYL1 和 XYL2 基因尚不能使酿酒酵母重组菌株发酵木糖产生乙醇, 推测是木糖到乙醇整个代谢途径上的其他环节有障碍。转酮酶 (Transketolase, TKL) 和转醛酶 (Transaldolase, TAL) 是 PPP 途径上的关键酶, 酿酒酵母菌含有这两种酶, 但酶活较低^[14]。转酮酶是组成酶, 已从酿酒酵母中克隆得到 2 个转酮酶的基因 TKL1 和 TKL2^[15-17]。研究结果表明 TKL1 对木酮糖的代谢影响较大^[18]。酿酒酵母的转醛酶基因 TAL1 也已克隆得到^[19]。酿酒酵母菌株在木酮糖上生长时大量积累 7-磷酸景天庚酮糖, 这一结果暗示着转醛酶是酿酒酵母通过 PPP 途径代谢木酮糖的限制因素^[14,19]。

Schaaff-Gerstenschlager 等人^[18]将酿酒酵母的转酮酶基因 TKL1 和转醛酶基因 TAL1 克隆于酵母多拷贝载体 GS42, 2 个基因均在自身的启动子下表达。在超表达 TKL1、TAL1 基因的酿酒酵母重组菌株中 2 种酶活均提高 10~15 倍。Walfridsson 等人^[2]在研究转酮酶及转醛酶对含有 XYL1 和 XYL2 基因酿酒酵母重组菌株利用木糖发酵的影响时发现, 超表达 TKL1 基因对利用木糖影响不大, TAL1 基因的超表达可以增强重组菌株对木糖的利用。这些结果进一步验证转醛酶是酿酒酵母重组菌株代谢木糖以及野生菌株代谢木酮糖的限制因素。Walfridsson 等人^[2]的结果显示虽然高效表达 XYL1、XYL2 和 TAL1 等基因的酿酒酵母, 可以加强重组酿酒酵母菌株对木糖的利用, 但木糖消耗的增加主要表现在木糖醇得率的提高, 依然没有乙醇产生。

为了解决木糖醇积累问题, 本课题组^[20]将 *Pichia stipitis* 的 XYL1 和 XYL2 基因, 分别置于不同的

启动子控制下,得到不同的 XYL1、XYL2 重组质粒,所得酿酒酵母转化子表现出不同的外源基因表达水平,使木糖还原酶与木糖醇脱氢酶(XR/XDH)的比活力变化范围在 0.06~17.5 之间。为了加强对木糖的利用,促使木糖代谢流向乙醇形成的方向,在含有 XYL1 和 XYL2 基因的酿酒酵母转化子中,又引入转酮酶 TKL1 基因及转醛酶 TAL1 基因,使酿酒酵母转化子在原有基础上超表达转酮酶及转醛酶活性。同时具有 XYL1 和 XYL2 以及超表达基因 TAL1、TKL1 的酿酒酵母转化子可以在木糖为唯一碳源的平板上生长。摇瓶发酵实验结果表明当 XR/XDH 比值为 0.06 时,产物中检测不到木糖醇,其他的副产物如甘油、乙酸盐等也有所下降,而乙醇得率却有所提高。

木酮糖激酶催化木酮糖磷酸化形成 5-磷酸木酮糖也是木糖代谢的限速步骤之一,编码木酮糖激酶的基因(XYK)已从酿酒酵母^[21]克隆得到,这些研究工作多为美国普度大学的 Ho 研究小组完成,他们直至 1995 年底才在美国专利文献中报道了该基因序列^[22],该研究小组的工作表明在含有 XYL1 和 XYL2 基因的酿酒酵母中超表达 XYK 基因可以提高酿酒酵母发酵木糖的乙醇得率。但由于得到了专利保护,使酿酒酵母的木酮糖激酶基因 XYK 使用受限。

2.3 表达细菌木糖酶基因 *xylA* 酿酒酵母工程菌的研究

木糖转化为木酮糖的另一途径是通过细菌的木糖异构酶,该酶一步完成木糖向木酮糖的转化,并且不需要任何辅助因子,因而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。编码该酶的基因 *xylA* 曾先后从 *E. coli*、*Actinoplanes missouriensis*、*Bacillus subtilis*、*Clostridium thermosulfurogenes* 和 *Lactobacillus pentosus* 克隆得到,上述不同来源的 *xylA* 基因分别克隆于酿酒酵母菌的 GAL1、PDC1、PGK1 和 ADH1 启动子下,转化于酿酒酵母菌中,但以上各种来源的 *xylA* 基因在酿酒酵母菌中均没有得到活性表达。

由于 *Thermus thermophilus* 的木糖异构酶基因 *xylA* 在茄科植物细胞中得到表达(个人通讯),本课题组采用 PCR 技术从该菌克隆得到 *xylA* 基因。转化酿酒酵母,首次成功地在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达^[23]。为了使木糖代谢流向乙醇形成的方向,在酵母转化子中又引入磷酸戊糖途径中的转酮酶基因 TKL 及转醛酶基因 TAL1,同时表达 *xylA* 和超表达 TAL1 基因、TKL1 基因的酿酒酵母工程菌株可以在木糖为唯一碳源的平板上生长,摇瓶发酵实验结果表明,该工程菌株可以发酵木糖形成 1.3g/L 乙醇。这一结果表明在酿酒酵母菌中建立了一条新的木糖代谢途径。

3 利用木糖细菌代谢工程菌株的构建

利用代谢工程手段构建发酵木糖的细菌工程菌株的工作已在多种细菌中展开,如 *Erwinia chrysanthemi*、*E. coli*、*Klebsiella oxytoca*、*K. plauti* 和 *Zymomonas mobilis*,根据细菌的代谢特点,其构建策略有二,一是将产生乙醇的关键酶基因转移到可以利用木糖的菌株中,二是将木糖代谢途径引入良好的乙醇产生菌中,如 *E. coli* 含有利用木糖的所有必需酶,但对糖厌氧发酵形成的产物很复杂,有乳酸、乙酸、琥珀酸和甲酸,而乙醇只是产物中很少的一部分。在乙醇形成的最后阶段是由丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase, PDC)和乙醇脱氢酶 II(Alcohol dehydrogenase II, ADH II)催化完成的,*E. coli* 缺乏 PDC,而且 ADH II 的水平较低,不能很好地发酵木糖产生乙醇。相反,*Z. mobilis* 具有较强的 PDC-ADH II 系统,但没有同化木糖的酶。Ohta 等人^[24]将 *Z. mobilis* 的 PDC 基因 *pdh* 和 ADH II 基因 *adhB* 引入 *E. coli* 中,重组菌株表现出较好的发酵木糖产生乙醇的能力。但产物中仍有不少的副产物,此外,*E. coli* 对乙醇及纤维材料水解物中毒性因子的耐受性较差,这些缺点不适合用于工业生产。

与 *E. coli* 不同,*Z. mobilis* 具有对乙醇及纤维材料水解物中毒性因子较高的耐受性,是较好的乙醇产生菌。但由于缺乏同化木糖的代谢途径而不能利用木糖。Zhang^[5]在 *Z. mobilis* 中同时表达 *E. coli* 的木糖异构酶基因(*xylA*)、木酮糖激酶基因(*xylB*)、转醛酶基因(*tal*)和转酮酶基因(*tklA*)。将这 4 个基因分 2 组(*xylA* 和 *xylB*, *tal* 和 *tklA*)组成 2 个操纵子,分别置于 *Z. mobilis* 自身的 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子和烯醇酶启动子下,并将这 2 个操纵子构建成 1 个质粒,含有这种质粒的 *Z. mobilis* 重组菌株可以发酵木糖产生乙醇,得率为 0.44g/g。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

利用微生物发酵转化木糖产生乙醇,是当前的研究热点之一。随着对木糖代谢工程菌研究的深入进行,必将得到实用的木糖代谢工程菌株,对人类充分利用生物质再生资源具有潜在的价值,完全符合可持续发展战略的要求。

参 考 文 献

- 1 Hahn-Hagerdal B, Hallborn J, Olsson L *et al.* In :Saddler *et al* eds, Bioconversion of Forest and Agriculture Plant Residues. CAB International, Wallingford, Untied Kingdom, 1993, pp. 231~290
- 2 Walfridsson M, Hallborn J, Penttilla M *et al.* Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 4184~4190
- 3 Hahn-Hagerdal B, Jeppsson H, Skoog K *et al.* Enzyme Microb Technol, 1994, **16**: 933~943
- 4 Gong C S, Maun C M, Tsao G T *et al.* Biotechnol letters, 1981, **3**: 77~82
- 5 Zhang M, Eddy C, Deanda K *et al.* Science, 1995, **267**: 240~243
- 6 毛 华、曲音波、高培基等, 生物工程学报, 1995, **12** 增刊: 157~162
- 7 Takuma S, Nakashima N, Tantirungkij M *et al.* Appl biochem Biotechnol, 1991, **28-29**: 327~340
- 8 Amore R, Kotter P, Kuester C *et al.* Gene, 1991, **109**: 89~98
- 9 Hallborn J, Walfridsson M, Airaksinen U *et al.* Bio/Technology, 1991, **9**: 1090~1095
- 10 Rizzi M, Erlemann P, Bui-Thanh N A *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1988, **29**: 148~154
- 11 Kotter P, Amore R, Hollenberg C P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, **84**: 2585~2589
- 12 Tantirungkij M, Nakashima N, Seki Y *et al.* J Ferment Bioeng, 1993, **75**: 83~88
- 13 Rizzi M, Harwart K, Erlemann P *et al.* J Ferment Bioeng, 1989, **67**: 20~24
- 14 Senac T, Hahn-Hagerdal B. Appl Environ Micribiol, 1991, **57**: 1701~1706
- 15 Fletcher T S, Kwee I L, Nakada T *et al.* Biochemistry, 1992, **31**: 1892~1896
- 16 Sundstrom M, Lindqvist Y, Schneider G *et al.* J Biol Chem, 1993, **268**: 24346~24352
- 17 Schaaff-Gerstenschlager I, Mannhaupt LG, Vetter I *et al.* Eur J Biochem, 1993, **188**: 597~603
- 18 Schaaff-Gerstenschlager I, Miosga T, Zimmermann F K. Biores Technol, 1994, **50**: 59~64
- 19 Schaaff I, Hohmann S, Zimmermann F K. European J Biochem, 1990, **188**: 597~603
- 20 鲍晓明, 高 东, 曲音波等, 生物工程学报, 1997, **13**(4): 355~361
- 21 Ho N W Y, Chang S-F. Enzyme Microb Technol, 1989, **11**: 417~421
- 22 Ho N W Y, Patent Application. PCT/US 94/12861(International Application Number),Wo. 1995, 95/13362(International publication number)
- 23 鲍晓明, 高 东, 王祖农. 微生物学报, 1998, **38**(6)
- 24 Ohta K, Beall D S, Meija J P *et al.* Appl Environ Microbiol 1991, **57**: 893~900

Progress in Metabolic Engineering of Xylose Utilising Recombinant Strains

Bao Xiaoming Gao Dong Wang Zunong

(Dept. of Microbiol., State Key Lab. of Microbial Technol., Shandong University Jinan 250100)

Abstract Xylose is widespread in the lignocellulosic waste of agricultural and forest products. Xylose can be used as substrates for microbial fermentation to ethanol. It is significant in the utilization of renewable lignocellulosic material. In this paper, we describe the strategies of xylose metabolic engineering and sum up the progress in construction of xylose utilisation recombinant strains.

Key words Xylose utilization, ethanol, metabolic engineering, renewable lignocellulosic material