

乙烯的直接生物合成

孙芝兰, 陈以峰

江苏省农业科学院农业生物技术研究所 江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014

孙芝兰, 陈以峰. 乙烯的直接生物合成. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1431-1440.

Sun ZL, Chen YF. Direct biosynthesis of ethylene. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1431-1440.

摘要: 乙烯是世界上需求最大的化工原料, 随着石油资源的日益枯竭和原油价格的不断攀升, 生物乙烯迎来了重大发展机遇。文中主要比较两条生物乙烯合成途径——生物乙醇脱水制备乙烯途径 (即间接途径) 和生物乙烯的直接合成途径, 重点论述了直接合成途径和途径中关键酶的性质、利用微生物直接合成生物乙烯的基因工程策略、工程化制造生物乙烯的前景及成功事例, 并指出直接合成生物乙烯替代石化乙烯具有较大的市场潜力。

关键词: 生物乙烯, 直接合成, 微生物, 基因工程

Direct biosynthesis of ethylene

Zhilan Sun, and Yifeng Chen

Key Laboratory of Agrobiolology of Jiangsu Province, Institute of Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: Ethylene is the most widely used petrochemical feedstock globally. The development of bio-ethylene is essential due to limited fossil fuels and rising oil prices. Bio-ethylene is produced primarily by the dehydration of ethanol, but can alternatively be directly produced from ethylene biosynthesis pathways in plants, algae, or microorganisms by using cheap and renewable substrates. This review addressed the biosynthesis of ethylene in plants and microorganisms, the characterization of key enzymes, genetic engineering strategies for ethylene biosynthesis in microorganisms, and evaluated its perspective and successful cases toward the industrial application. The direct production of bio-ethylene from a biological process in situ is promising to supplement and even replace the petrochemical ethylene production.

Keywords: bio-ethylene, direct biosynthesis, microorganism, genetic engineering

Received: May 29, 2013; **Accepted:** August 19, 2013

Supported by: The Start-up Funds of Introduced Talent in Jiangsu Academy of Agricultural Science (No. 00512), Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (No. CX12 (3041)), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20130712).

Corresponding author: Yifeng Chen. Tel: +86-25-84390756; Fax: + 86-25-84390297; E-mail: yifchen@hotmail.com

江苏省农科院引进人才启动经费 (No. 00512), 江苏省农业科技自主创新基金 (No. CX12 (3041)), 江苏省自然科学基金 (No. BK20130712) 资助。

乙烯可用于生产聚乙烯、氯乙烯、聚苯乙烯、乙醇、丙醛、环氧乙烷及其衍生物等，是合成塑料、纤维、橡胶等的基本化工原料^[1]。目前世界上大多数国家通过石脑油、乙烷、丙烷、瓦斯油等裂解制备乙烯，但是随着石油资源的日益枯竭和原油价格的不断攀升，乙烯成本也与日剧增，并且随着化工、能源、材料等乙烯衍生物产业的发展，乙烯的供需矛盾也日益突出，这就为生物乙烯的发展带来巨大的契机。

生物乙烯是以生物质为原料，通过生物体的代谢活动直接或间接合成乙烯^[2-3]。传统上生物乙烯的合成主要通过微生物发酵降解生物质生成乙醇，再在催化剂作用下脱水生成乙烯^[4]。目前乙醇脱水制乙烯是获得生物乙烯的主要方法，虽已实现产业化，但还存在生产能力低、规模小、价格高及生产工艺不合理等问题，因此目前国内外的研究多集中在如何降低原料——生物乙醇的成本及优化生产工艺上。生物乙烯还可以由生物体以有机物或简单的 CO₂ 为原料直接合成，这也是近几年新发展起来的新型生物乙烯合成途径，因其还未实现工业化尚未引起足够的重视。但它具有投入低、产物纯度高、低碳环保等优势，已展现出较强的生命力，本文主要针对这一新型生物乙烯合成途径展开论述，重点讨论乙烯直接生物合成的生物学基础及工程化生产生物乙烯的基因工程策略及成功事例，对进一步降低生物乙烯合成成本并最终取代石化乙烯具有重要的指导意义。

1 生物乙烯合成途径

1.1 传统生物乙烯制备途径

传统生物乙烯是由乙醇脱水生成，生物乙醇来自微生物对葡萄糖等还原糖的糖酵解作用，而葡萄糖则来自蔗糖、淀粉或纤维素的水解作用^[5-6]。目前主要以玉米等粮食作物为原料来生产生物乙

醇，这已经出现了生物能源制造与粮食消费之间的竞争。在粮食转化乙醇被叫停之后，将植物秸秆中的纤维素、半纤维素等降解为五碳糖和六碳糖供微生物发酵成为未来生物乙醇生产的主要模式。由山东大学曲音波教授牵头完成的玉米芯废渣制备纤维素乙醇技术与应用项目，使纤维素乙醇生产成本接近了粮食乙醇。在该技术基础上，山东龙力公司率先在国际上建成了 3 000 t/年玉米芯纤维素乙醇的中试装置和万吨级示范装置，50 000 t/年纤维燃料乙醇项目也于 2012 年获得了国家发展改革委员会核准。高温条件下乙醇脱水反应易生成乙醚和乙醛等副产物，从而降低乙烯的产量，因此开发不同的催化剂以尽可能地降低反应温度，是生物乙烯高效合成的保证^[7]。目前工业上应用最成熟的催化剂为活性氧化铝，其稳定性好、寿命长，但也存在进料空速低，整体能耗高等不足^[8]。在原有的催化剂基础上进行改良发展了一系列新型催化剂如沸石筛催化剂 SAPO、HZSM-5 和杂多酸催化剂等，它们的性能都优于前者，但还不能完全满足商业化的需要，需进一步改进。

与石油裂解制备乙烯相比，生物乙醇脱水制备乙烯技术有突出的优势^[1]：1) 原料来自生物质，可再生；2) 反应条件温和，乙烯纯度高；3) 工艺简单，装置能耗低，所需设备少；4) CO₂ 排放少，环境友好；5) 不受资源的限制。虽然乙醇脱水制备乙烯已经实现了工业化生产，但鉴于我国的特殊国情，粮食转化生物乙醇已被叫停，尽管低成本的非粮乙醇具有较大的市场潜力^[9]，但还存在价格高、规模小等问题。而且乙醇脱水反应催化剂性能不高、规模偏小、工艺过程不合理、能耗高等生产技术难题还有待解决。

1.2 新型生物乙烯合成途径-生物乙烯的直接合成

利用代谢工程手段将乙烯合成途径引入微生物

物中, 以有机物或简单的 CO_2 为原料直接合成乙烯是近几年新发展起来的新型生物乙烯合成途径, 虽然还未实现产业化, 但已显示其较强的生命力。微量乙烯广泛存在于植物、微生物和动物体中^[10-12]。植物体中以 ACS (ACC synthase, ACC 合酶) 和 ACO (ACC oxidase, ACC 氧化酶) 为关键酶, 以甲硫氨酸为前体合成乙烯^[13]。微生物中乙烯合成路线有两条: 以假单胞菌 *Pseudomonas* 等为代表的 EFE 途径 (以 ethylene-forming enzyme, 乙烯形成酶为关键酶) 和 KMBA (2-酮-4-甲基硫代丁酸) 途径 (详见下文)^[14-16]。其中前一条途径可以高效地合成乙烯, 产率可达 10^{-7} nL/(cell·h), 是 KMBA 途径的 500~1 000 倍^[17], 因此将假单胞菌 *Pseudomonas* 中的 *efe* 转入酵母菌、霉菌、蓝细菌等工程菌株中, 利用它们高效的表达系统生产生物乙烯, 其技术路线切实可行。

利用微生物直接生成生物乙烯有诸多优势: 1) 无需反应设备、催化剂等, 设备投资小; 2) 装置能耗低; 3) 没有副产物, 纯度高; 4) CO_2 排放量少, 蓝细菌等自养菌还可以通过光合作用固定空气中的 CO_2 将其转化为乙烯, 易做到低碳环保。目前已在蓝细菌集胞藻属 *Synechocystis*、木霉 *Trichoderma*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中实现了乙烯的异源合成, 最高乙烯合成速率为 $5\ 650\ \mu\text{L}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ^[3, 18-19]。虽然还未达到工业化生产的需求, 但是随着代谢工程原理和技术的不断创新, 结合代谢网络分析构建最适宜乙烯生产的技术路径, 可使乙烯理论生产值大大提高, 例如 Larsson 等认为 *S. cerevisiae* 经优化后理论值将提高到 12 mol 乙烯/10 mol 葡萄糖。

2 乙烯合成的生物学基础

2.1 植物合成乙烯

在高等植物中, 乙烯的生物合成前体为甲硫氨

酸 (Methionine), 其直接前体为 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)。甲硫氨酸在 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (S-Adenosylmethionine synthetase, SAMS) 的催化下与 ATP 生成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM), 随后 SAM 经 ACS 催化生成 5'-甲硫基核糖 (5'-methylthioribose, MTR) 和 ACC, 前者通过甲硫氨酸循环再生成甲硫氨酸, 而 ACC 则在 ACO 的催化下氧化生成乙烯 (图 1A)^[20-21]。乙烯的生成量主要由 ACS 和 ACO 的活性大小决定的^[22-23], ACS 是乙烯合成途径的限速酶, 是以磷酸吡哆醛为辅基的酶, AVG (Aminoethoxy vinylglycin, 氨基乙氧基乙烯基甘氨酸)、AOA (Aminooxyacetic acid, 氨基氧乙酸) 对其活性有强烈的抑制作用。ACO 为组成型酶, ACC 到乙烯的转化不是乙烯生成的限速步骤, 但它是需要氧气的氧化反应, 因此解偶联剂 (DNP) 以及自由基清除剂能抑制乙烯的生成。外源乙烯对乙烯生物合成的作用具有两重性: 既能自我催化, 又能自我抑制。乙烯首先与细胞膜受体结合, 随后经 MAPK 级联途径和转录级联途径传导信号进而产生乙烯响应。拟南芥中乙烯受体有 5 个: ETR1、ERS1、ETR2、ERS2 和 EIN4, 作者率先观察到 ETR1 定位在内质网膜上^[24], 后续的工作初步证实 ETR2、ERS1 也定位在内质网膜上^[25-26]。作者对乙烯的内质网信号转导途径进行了详细研究发现乙烯信号转导中采用了负调控机制。正常条件下乙烯受体呈活化状态以维持传递蛋白 CTR1 活性, 从而抑制乙烯响应; 存在高浓度乙烯时, 乙烯结合使受体失活, 相应的 CTR1 失活而传递蛋白 EIN2 活化, 启动 EIN3/EIL 以及 ERF 转录因子表达, 从而引发乙烯响应^[27-29]。由此可以看出, 高等植物中乙烯合成反应及调控十分复杂, 既需要 ACS 和 ACO 的共同作用, 并且 ACS 和 ACO 的活性易受环境的影响, 稳定性

差，又需要乙烯信号转导途径的反馈调节。这给利用高等植物的乙烯合成系统生产化工原料乙烯带来困难。而微生物合成乙烯途径简单（见下文），仅仅导入乙烯形成酶就能利用微生物本身的代谢途径生成乙烯，操作简单，易控制。因此利用微生物乙烯形成酶构建乙烯合成途径制造生物乙烯前景广阔。

2.2 微生物合成乙烯

自 1940 年 Biale 首次报道微生物也能合成乙烯以来，大量有关于微生物合成乙烯的研究陆续展开。能合成乙烯的微生物多是土壤微生物，主要包括细菌、酵母菌、霉菌和一些海洋藻类等^[8]。

例如大肠杆菌能以甲硫氨酸为底物合成乙烯^[30]，青枯假单胞菌、丁香假单胞菌能利用蛋白胨、葡萄糖醛酸、谷氨酸或延胡羧酸为底物合成乙烯^[31]。能合成乙烯的酵母菌种类较少，主要有酿酒酵母、裂殖酵母和隐球酵母等，其他种类则鲜见报道。Chalutz 等发现在振荡培养条件下，低浓度磷酸盐或桔皮培养基能激活青霉菌合成少量乙烯，并且乙烯合成量与木质素水解速率呈正相关^[32]。除此之外海洋藻类如绿藻和红藻在外源添加吲哚-3-乙酸时也能合成相当量的乙烯^[33]。

微生物合成乙烯的途径主要有两条：一条是以甲硫氨酸为前体（图 1B），通过转氨作用生成 2-

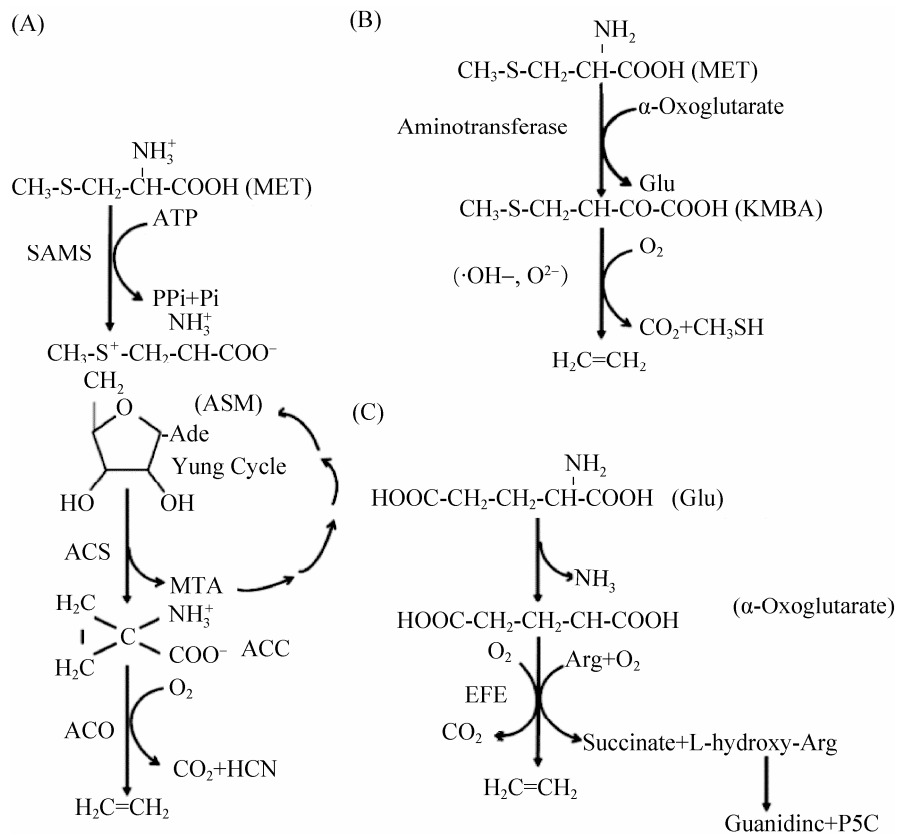


图 1 高等植物和微生物中的乙烯合成途径

Fig.1 Biosynthetic pathways to ethylene in higher plants and microbiology.

酮-4-甲基硫代丁酸 (KMBA) 后被氧化裂解为乙烯, 这一途径的最后一步氧化反应生成乙烯, 其转化效率较低, 因此对其研究较少。另一条则是以谷氨酸为前体 (图 1C), 通过脱氨作用生成 α -酮戊二酸后作为乙烯形成酶的底物合成乙烯, 青霉菌及丁香假单胞菌都采用这一途径^[15-16]。丁香假单胞菌中乙烯形成酶 (Ethylene forming enzyme, EFE) 相对分子量为 42 kDa, 为单体蛋白, 等电点为 5.9, 同时催化两个反应使 α -酮戊二酸生成乙烯和琥珀酸盐, 产物摩尔比为 2 : 1。在主反应也就是乙烯形成反应中 1 分子 α -酮戊二酸被氧化生成 1 分子乙烯和 3 分子 CO_2 , 在副反应中, α -酮戊二酸和 L-精氨酸被氧化生成琥珀酸盐、 CO_2 和 L-羟基精氨酸, L-羟基精氨酸又被进一步转化为胍类和 L-D1-pyrroline-5-carboxylate (P5C)^[34], 总反应式为 $3\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 + \text{O}_2 + \text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2 \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_4 + 7\text{CO}_2 + \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4 + 3\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_5\text{N}_3 + \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$, 酶活性为 660 nmol 乙烯/(mg·min)。丁香假单胞菌中 *efe* 基因位于内源质粒 pPSP1 中^[35], 编码 350 个氨基酸, 序列比对显示, EFE 与植物中其他 α -酮戊二酸依赖的双加氧酶同源性较低, 序列一致性仅为 15%, 但是其功能区域则相对保守, 其包含两个保守的组氨酸残基 His₁₈₉ 和 His₂₆₈ 作为铁离子络合位点, 另外还有两个保守的氨基酸残基 Asp₁₉₁ 和 Arg₂₇₇ 对酶的催化活性至关重要。微生物中 EFE 的活性依赖于 L-精氨酸、 α -酮戊二酸、 Fe^{2+} 和 O_2 , 而对于其他 α -酮戊二酸依赖酶来说, L-精氨酸并不作为协同底物。

2.3 其他可能的乙烯合成途径

哺乳动物也能合成少量的乙烯, Ram Chandra 和 Spencer 研究发现健康人体呼出的气体中乙烯含量是空气中乙烯含量的 3~4 倍, 并且吸烟者呼出的气体中乙烯量为 120 $\mu\text{g}/\text{h}$ 远远多于未吸烟者 (0.91 $\mu\text{g}/\text{h}$)^[36]。1985 年 Dennis 等报道了在大鼠肝

脏中发生的通过 KMBA 合成乙烯的现象^[37]。另外一些自然灾害如火山爆发、森林火灾中也有乙烯的释放, 只是乙烯的释放量随着燃烧木材的材质、种类不同而有很大的差别。

3 利用工程菌株直接合成生物乙烯的研究策略及工程化成功案例

3.1 利用假单胞菌合成生物乙烯

将来源于细菌的乙烯形成酶转入工程菌株中, 利用它们高效的表达系统直接生产生物乙烯, 是获得化工原料乙烯的新的研究策略。到目前为止丁香假单胞菌中的 *efe* 已被克隆并成功转入大肠杆菌、假单胞菌、木霉、酿酒酵母和蓝细菌中并使重组菌株乙烯释放量明显提升^[38-41, 3]。在大肠杆菌中过表达 *efe*, 尽管表达量很高占细胞总蛋白的 30%, 但是它们多数形成包涵体, 酶活性很低, 乙烯形成量也较少。为了进一步提高乙烯合成量, Ishihara 等构建宽宿主质粒载体 pMEFE1 (携带 *efe*) 并重新转入丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 中, 重组菌株比原始菌株酶活性增加 41 倍^[39]。2010 年 Wang 等将 *efe* 通过基因重组整合入恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* KT2440 的 16S rDNA 位点, 当整合 5 个拷贝 *efe* 时, 重组菌株 *P. putida* DC3 乙烯合成速率达到 53.8 mg/(g·h)。为继续增加拷贝数, 将携带 *efe* 的质粒载体 pBBR1MCS2 转入 *P. putida* DC3 中, 乙烯合成速率达到 80.2 mg/(g·h), 由此可见增加 *efe* 在重组菌中的拷贝数有助于提升乙烯的合成量^[13]。重组菌中乙烯合成的动力学曲线显示: 在对数早期乙烯合成速率达到峰值为 15 mg/(L·h), 随后乙烯合成速率下降, 当对数后期添加葡萄糖时, 乙烯合成速率又迅速增至 21.3 mg/(L·h)。可见在假单胞菌中, 葡萄糖是乙烯合成的限制因素。除此之外氧气也是乙烯合成的限制因子, 增加反应器转速或者空气流速都能提高乙烯的合成

速率。

3.2 利用木霉合成生物乙烯

2008年 Tao 等将 *efe* 整合入绿色木霉菌 *Trichoderma viride* 的染色体中, 最大乙烯合成速率为 1 059.7 nL/(L·h)。 *T. viride* 中乙烯合成速率同样受碳源和氮源的影响, 纤维素能高效诱导乙烯合成而重组菌株以羧甲基纤维素钠和乳糖为碳源时, 乙烯合成速率明显下降, 另外以蛋白胨为氮源时也能高效诱导乙烯合成, 这是首次利用木霉合成生物乙烯的报道^[40]。随后 2011年 Chen 等将克隆自丁香假单胞菌的 *efe* 转入里氏木霉菌 *Trichoderma reesei* 中, *efe* 表达量增加, 乙烯合成量也相应增加, 以稻草秸秆为碳源时, 乙烯合成速率达到最高为 4 012 nL/(L·h)^[18]。 *Trichoderma* 为丝状真菌, 富含完整的纤维素酶系, 包括纤维二糖水解酶、纤维素内切酶和 β -葡萄糖苷酶等, 能将纤维素水解为葡萄糖, 这也就暗示 *Trichoderma* 能利用丰富的农业废弃物如秸秆来合成生物乙烯^[18]。

3.3 利用酵母菌合成生物乙烯

酵母菌作为细胞工厂已被广泛用于生产药物蛋白、酶制剂、生物能源等。 Pirkov 等将丁香假单胞菌的 *efe* 转入 *S. cerevisiae* 的代谢网络中, 使不合成乙烯的酿酒酵母以葡萄糖为有机碳源实现了大量的乙烯合成, 乙烯的产量为 (320±90) μg 乙烯/g 葡萄糖^[3]。为了提高酿酒酵母中乙烯的产量, 2011年 Larsson 等通过对酿酒酵母代谢流分析从而提出了一些改进措施: 乙烯的合成反应是 NAD (P) 依赖的氧化还原过程, NAD (P) 辅因子的平衡会影响乙烯的合成量。乙烯合成的底物之一精氨酸来源于谷氨酸盐脱氨的产物 α -酮戊二酸, 而谷氨酸脱氨反应由谷氨酸脱氢酶 (GDH) 催化。酵母细胞中存在两类谷氨酸脱氢酶 (NADP 依赖型和 NAD 依赖型), NADPH 的补充主要来自于磷酸戊糖途径, 该途径形成大量的 CO_2 , 会损失过量的

碳源, 因此缺失 NADP-GDH 或者过表达 NAD-GDH 原理上能够增加乙烯的合成量^[42]。 Larsson 等分析表明 *S. cerevisiae* 中将 NADP-GDH 替换为 NAD-GDH 可使乙烯理论转化值提高 7%, 另外, 外源添加脯氨酸使 P5C 更多地流向谷氨酸, 理论上也能提高乙烯的产量 (由 7.8 mol 乙烯/10 mol 葡萄糖增至 12 mol 乙烯/10 mol 葡萄糖)^[42]; 另外一个策略是尽可能多地提供 α -酮戊二酸, 如果以谷氨酸替代铵盐作为氮源, 在谷氨酸脱氢酶的作用下将合成大量的 α -酮戊二酸, 优化后的乙烯产量理论值将提高到 8.7 mol 乙烯/10 mol 葡萄糖 (即 135 mg 乙烯/g 葡萄糖)^[42]。 Pirkov 等证实以谷氨酸为氮源, 乙烯产量可从最初的 (320±90) μg 乙烯/g 葡萄糖提高到 (890±160) μg 乙烯/g 葡萄糖^[3], 但尽管如此, 其产量仍然远远低于理论计算值, 利用酵母菌生产生物乙烯仍然有很大的上升空间。

3.4 利用蓝细菌合成生物乙烯

与木霉和酵母菌相比, 利用蓝细菌直接合成乙烯的研究较早, Fukuda 课题组将携带有 *efe* 的穿梭载体 pUC303 转入蓝细菌聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 中, 使其获得高效合成乙烯的能力, 但是随着细胞的分裂, 质粒载体和染色体易发生同源重组造成乙烯合成速率急剧下降^[43]。 2003年 Ogawa 课题组将 *efe* 转入集胞藻 *Synechocystis* 中, 重组菌最高乙烯合成速率为 451 $\mu\text{L}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 同样地 *Synechocystis* 中乙烯合成速率、合成量都不稳定^[41]。研究发现当 N、P、S 的含量增加 5 倍时, 乙烯最高合成速率能迅速增至 2 500 $\mu\text{L}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 以上, 既然培养基中的组分严重影响乙烯的合成能力, 在生产中为实现乙烯的持续高效合成, 一般采用半连续发酵方式生产生物乙烯, 即在细胞生长的稳定期乙烯合成收到抑制时, 反应器转速减缓, 更换为新鲜的培养基继续培养, 如此反复几个周

期以维持乙烯的高效合成能力。为解决 *efe* 在 *Synechocystis* 体内不稳定的缺陷, Jianping Yu 课题组将 *efe* 突变修饰后重新转入 *Synechocystis* 中, 提高了酶的稳定性及表达水平使其碳代谢流发生巨大转变, 高达 5.5% 固定的碳流向乙烯合成途径, 甚至超过了流向三羧酸循环的碳, 最高乙烯合成速率为 $5\ 650\ \mu\text{L}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ($7\ 125\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$), 并且能持续稳定的合成^[19]。目前已报道的微藻/蓝细菌生产其他石化产品的产量为异丁醇 $3\ 500\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 、异丁醛 $6\ 200\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 、生物柴油 $3\ 420\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。工程改造菌株 *Synechocystis* 生产的生物乙烯的产量高于目前已报道的其他石化产品, 暗示 *Synechocystis* 有潜力作为细胞工厂将吸收的 CO_2 高效转化为乙烯。蓝细菌中乙烯合成速率最高为 $7\ 125\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 远远高于木霉 ($5.059\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$) 和酵母 ($529.65\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$) 中的合成速率。除了合成效率高之外, *Synechocystis* 为自养菌可以通过光合作用将空气中的 CO_2 变为乙烯, 既可以减少温室效应又能大量合成乙烯, *Synechocystis* 还可以利用海水培养基, 因此可在海湾或海滩培养从而节省大量的陆地和淡水资源^[19]。

3.5 利用代谢工程手段优化生物乙烯的合成

由上文所述, 植物和微生物中由两个不同的代谢路线合成生物乙烯, 植物中以 S-腺苷甲硫氨酸为底物, 而微生物中主要以 α -酮戊二酸和精氨酸为底物。Larsson 等将这两条途径引入酿酒酵母中, 通过对乙烯代谢网络数学建模、生物/化学催化反应的计算模拟提出一些可优化乙烯合成的研究策略^[42]: 将植物中的乙烯形成酶引入酵母菌后, ACS 的副产物甲硫腺苷同样可以进入甲硫氨酸循环重新生成甲硫氨酸, 甲硫氨酸循环中裂解生成的腺苷还可以和 5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (PrPP) 生成 AMP。甲硫氨酸循环的最后一步反应为 4-甲基-2-氧代丁酸酯转氨生成甲硫氨酸, 供体氨基酸

的再生为谷氨酸的转氨作用, 而谷氨酸的再生是由谷氨酸脱氢酶以 NADPH 为辅因子来实现的。ACC 氧化反应中乙烯的形成需要抗坏血酸盐作为辅因子, 而酵母菌中抗坏血酸盐/脱氢抗坏血酸盐的氧化还原耦合也可能是通过 NADPH 来平衡的。酵母菌中 NADPH 和 PrPP 均来自于磷酸戊糖途径, 因此我们推测在酵母菌中强化磷酸戊糖途径以提供更多的 NADPH 和 PrPP 可能是提高乙烯合成产量的重要策略之一。将微生物中的乙烯形成酶引入酵母菌后, 宿主菌以 α -酮戊二酸和精氨酸为底物合成乙烯, 反应中副产物为琥珀酸盐 (柠檬酸循环的中间产物)、胍和 P5C, 其中 P5C 是脯氨酸合成的中间体, 但酵母菌中 P5C 到脯氨酸的转化速率偏低, 因此通过添加外源的脯氨酸, 使 P5C 转而合成谷氨酸则可能提高乙烯的合成。利用微生物中 *efe* 来合成乙烯, 乙烯的生成除了与中心代谢途径 (糖酵解途径、磷酸戊糖途径、柠檬酸循环) 密切相关, 也受精氨酸和脯氨酸合成的影响, 而它们总体来说都是以 NAD (H) 或 NADP (H) 为辅因子的氧化还原反应, 由此推测调节这些辅因子的平衡从而节省更多的能量将会显著提高乙烯的产量。

4 环境中乙烯的降解

乙烯是重要的化工原料, 同时也是污染气体之一, 工程化生产乙烯不可避免将面临工作环境乙烯浓度过高的问题。在动物体内, 乙烯可以氧化生成环氧乙烷^[44]。环氧乙烷是一种烷化剂, 它能攻击 DNA 碱基上的亲核部分而使 DNA 发生损伤, 增加染色体畸变和姐妹染色单体交换的概率。流行病学的研究也表明, 环氧乙烷能增加患乳腺癌、淋巴瘤和血癌的风险。空气中的乙烯可通过化学、物理和生物方法转化与降解: 乙烯是化学活性分子, 可被大气中的氧化剂转化为 CO_2 和 H_2O

(如 O_2 、 O_2^- 、 O_3 、 NO 、 $OH\cdot$ 等)^[45]，而一些植物与土壤微生物也能降解乙烯，尽管降解速率比化学反应低很多。土壤一直以来被认为是大气中乙烯的沉降槽，大气中的乙烯被土壤吸附后可被土壤中的细菌和真菌转化利用，转化率与土壤中温度、湿度、溶氧量及微生物群体分布有极大的关系。另外乙烯是重要的植物激素，因此外源乙烯也可以被植物摄取进而被转化生成环氧乙烷和乙二醇。总之，通过土壤和植物的多重吸收降解作用从而有可能稀释局部大气中存在的高浓度乙烯。

5 展望

乙烯是我国需求量最大的化工原料，随着能源危机的加剧，石化乙烯的成本也急剧增加。如何降低生产成本，利用生物体直接合成乙烯已引起人们的广泛关注。微生物因其生长繁殖快、代谢途径简单、生产高效易控制等特点，一直用来生产包括燃料、药物、塑料、纤维在内的各种化工原料。将微生物来源的乙烯形成酶转入工程菌株如木霉、酿酒酵母、蓝细菌中，利用微生物的代谢网络已实现乙烯的异源合成，但是乙烯的产量与理论计算值还有较大差距，还远远不能满足生产实际的需要，结合工程学家和生物学家的优势一方面设计更加合理的生物反应器、优化培养条件以尽可能低地降低生产成本，另一方面结合代谢工程手段对现有菌株进行改造，提高乙烯合成量将是我们未来的研究焦点。提高乙烯合成量的一个研究策略是通过同源重组或质粒载体转化增加 *efe* 在重组菌中的拷贝数从而尽可能提高乙烯形成酶的活性，二是研究 EFE 的催化结构与活性关系，然后通过分子设计手段提高 EFE 的催化活性；最后通过分析工程菌株的碳代谢通路，利用代谢工程手段辅助设计更加合理的乙烯合成路线以尽可能去除菌株本身对碳的储存，从而实现

乙烯合成的最大化是最有潜力可以大幅度提高生物乙烯合成量的策略。

REFERENCES

- [1] Jia BY, Du P, Du FG, et al. Development and prospect of bioethylene. *Contemp Chem Ind*, 2011, 40(10): 1071–72 (in Chinese).
贾宝莹, 杜平, 杜风光, 等. 生物乙烯发展状况及展望, 2011, 40(10): 1071–1072.
- [2] Hu Y, Zhan N, Dou C, et al. Selective dehydration of bio-ethanol to ethylene catalyzed by lanthanum-phosphorous-modified HZSM-5: influence of the fusel. *Biotechnol J*, 2010, 5(11): 1186–1191.
- [3] Pirkov I, Albers E, Norbeck J, et al. Ethylene production by metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2008, 10(5): 276–280.
- [4] Haro P, Ollero P, Trippe F. Technoeconomic assessment of potential processes for bio-ethylene production. *Fuel Process Technol*, 2013, 114: 35–48.
- [5] Hu TG, Cheng KK, Zhang JA, et al. Research progress of catalytic dehydration of bio-ethanol into ethylene. *Modern Chem Ind*, 2007, 27(2): 96–99 (in Chinese).
胡铁刚, 程可可, 张建安, 等. 生物乙醇催化制备乙烯的研究进展. 现代化工, 2007, 27(2): 96–99.
- [6] Fan C, Qi K, Xia XX, et al. Efficient ethanol production from corn cob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. *Bioresour Technol*, 2013, 136: 309–5.
- [7] Fan D, Dai DJ, Wu HS. Ethylene formation by catalytic dehydration of ethanol with industrial considerations. *Materials*, 2012, 6(1): 101–115.
- [8] Hu Y, Li H, Huang H, et al. Development progress and industrialization of bio-ethylene. *Modern Chem Ind*, 2009, 29(1): 6–9 (in Chinese).
胡焱, 李慧, 黄和, 等. 生物乙烯开发进展与产业化. 现代化工, 2009, 29(1): 6–9.

- [9] Chang JJ, Ho FJ, Ho CY, et al. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 19–31.
- [10] Schlink K. Gene expression profiling in wounded and systemic leaves of *Fagus sylvatica* reveals up-regulation of ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant Biol (stuttg)*, 2011, 13(3): 445–452.
- [11] Fukuda H, Ogawa T, Tanase S. Ethylene production by micro-organisms. *Adv Microb Physiol*, 1993, 35: 275–306.
- [12] Li Q, Csanády GA, Kessler W, et al. Kinetics of ethylene and ethylene oxide in subcellular fractions of lungs and livers of male B6C3F1 mice and male fischer 344 rats and of human livers. *Toxicol Sci*, 2011, 123(2): 384–398.
- [13] Wang JP, Wu LX, Xu F, et al. Metabolic engineering for ethylene production by inserting the ethylene-forming enzyme gene (efe) at the 16S rDNA sites of *Pseudomonas putida* KT2440. *Bioresour Technol*, 2010, 101(16): 6404–6409.
- [14] Lin ZF, Zhong SL, Grierson D. Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot*, 2009, 60(12): 3311–3336.
- [15] Qadir A, Hewett EW, Long PG, et al. A non-ACC pathway for ethylene biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol Tec*, 2011, 62(3): 314–318.
- [16] Wang KLC, Li H, Ecker JR. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell Online*, 2002, 14(suppl 1): S131–S151.
- [17] Goto M, Ishida Y, Takikawa Y, et al. Ethylene production by the kudzu strains of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola causing halo blight in *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26(1): 141–150.
- [18] Chen X, Liang Y, Hua J, et al. Overexpression of bacterial ethylene-forming enzyme gene in *Trichoderma reesei* enhanced the production of ethylene. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(1): 96–106.
- [19] Ungerer J, Tao L, Davis M, et al. Sustained photosynthetic conversion of CO₂ to ethylene in recombinant *cyanobacterium Synechocystis* 6803. *Energ Environ Sci*, 2012, 5(10): 8998–9006.
- [20] An FY, Guo HW. Molecular mechanism of ethylene signal transduction. *Chin Bull Bot*, 2006, 23 (5): 531–542 (in Chinese).
安丰英, 郭红卫. 乙烯信号转导的分子机制. *植物学通报*, 2006, 23 (5): 531–542.
- [21] Yung KH, Yang SF, Schlenk F. Methionine synthesis from 5-methylthioribose in apple tissue. *Biochem Bioph Res Commun*, 1982, 104(2): 771–777.
- [22] Jan Kępczyński, Ewa Kępczyńska. Manipulation of ethylene biosynthesis. *Acta Physiol Plant*, 2005, 27(2): 213–220.
- [23] Yim W, Seshadri S, Kim K, et al. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant Physiol Bioch*, 2013, 67C: 95–104.
- [24] Chen YF, Randlett MD, Findell JL, et al. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 19861–19866.
- [25] Chen YF, Etheridge N, Schaller GE. Ethylene signal transduction. *Ann Bot-London*, 2005, 95(6): 901–915.
- [26] Chen YF, Shakeel SN, Bowers J, et al. Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 24752–24758.
- [27] Chen YF, Gao Z, Kerris RJ, et al. Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2010, 5(1): e8640.
- [28] Gao Z, Wen CK, Binder BM, et al. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2008, 283(35): 23801–23810.
- [29] Gao Z, Chen Y-F, Randlett MD, et al. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in

- ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34725–34732.
- [30] Hahm DH, Kwak MY, Bae M, et al. Effects of dissolved oxygen tension on microbial ethylene production in continuous culture. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(7): 1146–1147.
- [31] Ince JE, Knowles CJ. Ethylene formation by cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 1986, 146(2): 151–158.
- [32] Plettner I, Steinke M, Malin G. Ethene (ethylene) production in the marine macroalga *Ulva (Enteromorpha) intestinalis* L. (Chlorophyta, Ulvophyceae): effect of light—stress and co-production with dimethyl sulphide. *Plant Cell Environ*, 2005, 28(9): 1136–1155.
- [33] Primrose SB. Ethylene and agriculture: the role of the microbe. *J Appl Microbiol*, 1979, 46(1): 1–25.
- [34] Arshad M, Frankenberger WT. Ethylene: Agricultural Resources and Applications. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002: 78.
- [35] Nagahama K, Yoshino K, Matsuoka M, et al. Ethylene production by strains of the plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous genes for the ethylene-forming enzyme. *Microbiology*, 1994, 150(9): 2309–2313.
- [36] Ram Chandra G, Spencer M. A micro apparatus for absorption of ethylene and its use in determination of ethylene in exhaled gases from human subjects. *Biochim Biophys Acta*, 1963, 69: 423–425.
- [37] Feerman DE, Cederbaum AI. Ethylene production from alpha-keto-4-thiomethylbutyric acid by isolated rat liver cells, suspension medium, and perfusates in the absence and presence of iron. *J Free Radic Biol Med*, 1985, 1(2): 155–162.
- [38] Ishihara K, Matsuoka M, Inoue Y, et al. Over expression and *in vitro* reconstitution of the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae*. *J Ferment Bioeng*, 1995, 79(3): 205–211.
- [39] Ishihara K, Matsuoka M, Ogawa T, et al. Ethylene production using a broad-host-range plasmid in *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas putida*. *J Ferment Bioeng*, 1996, 82(5): 509–511.
- [40] Tao L, Dong H J, Chen X, et al. Expression of ethylene-forming enzyme (EFE) of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in *Trichoderma viride*. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 80(4): 573–578.
- [41] Takahama K, Matsuoka M, Nagahama K, et al. Construction and analysis of a recombinant *Cyanobacterium* expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the psbAI locus. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(3): 302–305.
- [42] Larsson C, Snoep JL, Norbeck J, et al. Flux balance analysis for ethylene formation in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *IET Syst Biol*, 2011, 5(4): 245–251.
- [43] Sakai M, Ogawa T, Matsuoka M, et al. Photosynthetic conversion of carbon dioxide to ethylene by the recombinant cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, which harbors a gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae*. *J Ferment Bioeng*, 1997, 84(5): 434–443.
- [44] Bolt HM. The carcinogenic risk of ethene (ethylene). *Toxicol Pathol*, 1998, 26(3): 454–456.
- [45] Atkinson R, Arey J. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmos Environ*, 2003, 37(suppl 2): 197–219.

(本文责编 陈宏宇)