

# 木糖发酵酒精代谢工程的研究进展

刘巍峰<sup>1</sup>, 张晓梅<sup>1</sup>, 陈冠军<sup>1</sup>, 刘春朝<sup>2</sup>

1. 山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100;

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

**摘要:** 木糖发酵是生物转化木质纤维素产生酒精及其他化工产品最为重要的一环, 但自然界中缺少能将上述生物质有效转化为乙醇的微生物菌种. 近年来, 根据代谢工程原理, 利用基因工程技术对酵母和细菌进行遗传改造, 或将木糖代谢途径引入传统的酒精发酵菌酿酒酵母及高酒精产生菌运动发酵单胞菌中, 从而拓展其底物利用范围; 或使原本可以利用多种糖底物的细菌获得选择性产生酒精的能力, 构建了各种不同类型的木糖发酵重组菌株. 虽然这些重组菌株在木糖转化酒精方面均显示出良好的应用前景, 但仍存在诸多问题. 有必要在对木糖代谢调控机制深入系统研究的基础上, 进一步改造现有菌株, 并结合生化工程技术对重组菌株发酵条件进行优化, 以实现高效生物转化木质纤维素原料制取乙醇. 本工作介绍了近年来代谢工程改造微生物菌种发酵木糖生产酒精的研究进展.

**关键词:** 木糖; 酒精; 代谢工程; 酿酒酵母; 细菌

**中图分类号:** Q817      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2006)01-0138-06

## 1 前言

20世纪70年代的石油危机及当今世界对能源需求的急剧增长, 加快了人们寻找开发燃油替代能源的步伐. 作为传统的生物发酵产品和潜力巨大的燃料, 乙醇已被公认为是最有发展前景的可再生清洁能源之一. 从减少温室气体排放和环境保护角度出发, 欧盟国家已建议生物燃料的使用到2005年要占整个运输燃料消耗的2%, 而到2010年, 这一数值要到达5.75%<sup>[1]</sup>. 我国2001年就在大中城市中开始逐步推广使用乙醇汽油(乙醇占10%~15%), 这给燃料乙醇的开发及工业化生产带来前所未有的发展机遇. 传统的乙醇发酵生产主要以淀粉质和糖蜜为原料, 原料成本在生产总成本中占有很大的比例, 在一定程度上限制了整个乙醇工业的发展. 与淀粉质原料不同, 木质纤维素是世界上最为丰富的生物质资源, 每年的总产量约占所有生物质资源的50%, 目前大多数此类物质没有得到很好的利用. 因此, 利用木质纤维素为主的可再生生物质资源, 生产可再生能源具有重要的经济与社会意义. 木糖是半纤维素的主要组成单糖, 在植物纤维材料水解液中含量可达到30%, 可以说木糖的有效利用是生物质资源成功工业化转化的关键.

对自然界可以利用木糖的微生物代谢途径研究发现, 木糖进入菌体细胞后首先在木糖还原酶(Xylose Reductase, XR)和木糖醇脱氢酶(Xylitol Dehydrogenase, XDH)的作用下转化为木酮糖. 在某些细菌中, 木糖异构酶(Xylose Isomerase, XI)可以直接将木糖转化为木酮糖.

木酮糖经过木酮糖激酶(Xylulokinase, XK)磷酸化生成5-磷酸木酮糖后可以进入磷酸戊糖途径(PPP), 最终以中间产物6-磷酸葡萄糖和3-磷酸甘油醛进入糖酵解途径生成酒精. 传统的用于乙醇发酵生产的微生物(酿酒酵母和运动发酵单胞菌等)能很好地利用葡萄糖, 且乙醇发酵率高, 乙醇耐受力强, 但均缺少利用木糖的能力. 因此, 从20世纪80年代开始, 人们便尝试利用代谢工程手段改造酵母菌或细菌来发酵木糖等五碳糖生产酒精, 并取得了很大进展, 获得了不少具有应用前景的工程菌株<sup>[2,3]</sup>. 本工作将介绍以酿酒酵母和细菌为初始菌株进行酒精代谢工程改造的研究进展.

## 2 酵母菌的木糖代谢工程改造

对酵母菌的木糖代谢改造主要集中在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 菌种改造涉及木糖跨膜运输、吸收利用、磷酸戊糖途径、糖酵解及胞内氧化还原状态的维持等多个方面.

### 2.1 木糖运输

木糖的跨膜运输被认为是酿酒酵母和树干毕赤氏酵母(*Pichia stipitis*)利用木糖最主要的障碍之一. 在酿酒酵母中, 木糖的吸收主要是通过高亲和力的葡萄糖运输因子HXT4, HXT5, HXT7和Gal2介导进行的, 因此, 葡萄糖的存在可以强烈抑制木糖发酵酵母菌株对木糖的吸收<sup>[4,5]</sup>. Hamacher等<sup>[6]</sup>研究发现, 当酵母菌自身所有18种单糖运输因子被去除后, 即使含有完整木糖代谢

收稿日期: 2005-04-13, 修回日期: 2005-06-06

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(编号: 2004C13719700); 山东省自然科学基金资助项目(编号: 2004B302011)

作者简介: 刘巍峰(1971-), 男, 山东省青岛市人, 博士, 副教授, 生化与发酵工程专业, Tel: 0531-88365278, E-mail: weifliu@sdu.edu.cn.

途径的酵母工程菌也不能在含木糖的培养基上生长,说明木糖在酿酒酵母中的跨膜运输依赖于葡萄糖运输系统. 对天然利用木糖的 *Pichia stipitis* 研究发现, 它含有两个动力学性质完全不同的木糖运输系统, 其中低亲和力的运输系统为木糖和葡萄糖所共享, 而高亲和力的运输系统却是木糖特异性的<sup>[7]</sup>, 但这种运输系统的性质还未被最终确定. 相信对此新运输系统的深入研究将有利于提高目前酿酒酵母木糖代谢工程菌对木糖的高效利用.

## 2.2 木糖向木酮糖的转化及磷酸戊糖途径改造

早在 1991 年, Kotter 等<sup>[8,9]</sup>将树干毕赤氏酵母的木糖还原酶(XYL1)与木糖醇脱氢酶(XYL2)转移到酿酒酵母中使其表达, 得到的酵母转化子可以在有氧条件下利用木糖并产生木糖醇. 但研究发现, XYL1 与 XYL2 相对表达水平的变化可以影响最终代谢产物的形成<sup>[10]</sup>; 随着 XYL2 表达量的进一步提高, 则会导致木酮糖的累积分泌, 从而显示在这些转化重组酵母中, 木酮糖激酶的活性在一定程度上成为木糖代谢的限速步骤.

木酮糖激酶是木糖代谢途径中的一个关键酶, 酿酒酵母自身的表达活性很低. 众多对木糖代谢途径中木酮糖激酶改造的研究发现, 虽然在一些不同遗传背景的酿酒酵母菌株中过量表达 *P. stipitis* 的 XYL1, XYL2 及酿酒酵母自身 XKS1, 可以在 36 h 内产生较高产量的乙醇(50 g/L)<sup>[11]</sup>, 但也有许多报道发现, XKS1 的过量表达仅在好氧条件下可以提高木糖的利用率; 而在非通氧条件下, 虽然可以提高转化菌株的最终乙醇产量, 但木糖的总消耗量却下降 50%~80%<sup>[12]</sup>, 其中一个可能的原因就是厌氧条件下, 过量表达的木酮糖激酶对木酮糖无限制的磷酸化催化在某种程度上耗尽了胞内 ATP, 从而引起细胞生长的毒害. 因此, 木酮糖激酶的表达必须维持在一个既能保证木糖被有效利用, 又不对细胞生长造成损害的适宜水平. Walfridsson 等<sup>[13]</sup>曾提出增加非氧化 PPP 途径可以抑制由于过量表达 XYL1 与 XYL2 而引起的木糖醇过量积累. 随后的研究发现, 虽然过量表达转酮醇酶(Transketolase)造成转化酵母对木糖利用的下降, 但转醛醇酶(Transaldolase)的过量表达的确可以增加转化酵母对木糖的利用. 最近, Karhumaa 等<sup>[14]</sup>利用一株过量表达嗜热细菌 *Thermus thermophilus* XI 基因、XK 基因及众多非氧化磷酸化途径酶基因的酵母菌株, 研究了这些不同基因表达状态对木糖利用的影响, 结果发现酿酒酵母对木糖的有效利用不仅依赖于从木糖到木酮糖的有效转化, 也依赖于非氧化磷酸化途径对木酮糖的进一步有效代谢.

## 2.3 有氧呼吸与氧化还原平衡对木糖代谢的影响

早期的研究发现, 木糖还原酶对辅酶因子 NADPH

的亲合力远远高于对 NADH 的亲合力, 但随后的木糖醇脱氢酶却需要以 NAD<sup>+</sup>为辅因子, 两步催化反应所需辅因子的不同被认为是缺氧条件下木糖代谢效率低下及木糖醇累积的一个主要原因. 因此, 降低胞内 NADPH 的相对水平, 并促进 NAD<sup>+</sup>因子的再生是木糖代谢改造酿酒酵母, 使其有效利用木糖、减少木糖醇积累所必需的<sup>[15]</sup>. 人们曾试图通过改变菌种的遗传背景, 从而使木糖代谢过程中细胞内的氧化还原状态维持一个平衡状态, 如把过量表达 XKS1 的酵母转化子中的 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)敲除, 可以显著地提高乙醇的产率, 但由于胞内 NADPH 的减少, 这些突变同时也降低了木糖的吸收速率<sup>[16]</sup>. Anderlunt 等<sup>[17]</sup>通过 XR 与 XDH 的融合表达以增加木糖还原酶结合利用 XDH 产生 NADH 的几率. 结果表明, 得到的酵母转化子与分开表达 XR 和 XDH 的工程菌株相比, 木糖醇产率降低 11.3%, 而乙醇得率提高 20.3%. Watanabe 等<sup>[18]</sup>通过对树干毕赤氏酵母的 XDH 酶进行定点诱变, 得到了一个对 NADP(+)亲和力提高 4500 倍、且催化效率与野生型酶以 NAD(+)辅因子效率相当的突变体酶, 但此突变型酶在胞内的生理活性及对木糖代谢的影响还有待进一步研究.

研究发现, 不论天然利用木糖酵母菌株还是遗传改造的酵母菌株, 只能在有氧条件下利用木糖, 但乙醇的产生则需要厌氧条件. 进一步的分析发现, 线粒体电子传递产生 ATP 并再生 NAD<sup>+</sup>是酵母菌有效代谢木糖及生成酒精所必需的, 因此, 酿酒酵母发酵木糖产生酒精工业化应用一个最大的现实障碍就是保证工程菌株能在厌氧条件下利用木糖生长. Eliasson 等<sup>[19]</sup>在 2002 年首次报道重组酵母 TMB3001 在葡萄糖存在和厌氧条件下可以利用木糖产生酒精, 但酒精产率很低; Sonderegger 等<sup>[20]</sup>在 2003 年采用逐步限氧和限葡萄糖的连续发酵方式产生酒精, 通过进化工程(Evolution engineering)最终分离得到能在厌氧条件下代谢木糖, 但不产生酒精的菌株, 或不能厌氧利用木糖生长但能高效产生酒精的菌株, 但这两类菌株的遗传背景变化均不清楚. 根据上述研究结果, 从商业角度出发, 可以采用在葡萄糖培养基厌氧发酵后, 再采取有限氧发酵模式利用剩余木糖, 从而达到高效转化木糖的目的.

除了代谢工程改造酿酒酵母外, 自然界中还存在其他一些酵母菌种可以直接利用木糖发酵产生酒精, 如嗜柔管囊酵母、休哈塔假丝酵母及树干毕赤酵母等, 而且这些菌株对木质纤维素原料水解液也表现出很好的发酵酒精商业应用潜力. 国内通过细胞固定化或原生质体融合技术对此类菌株的木糖发酵特性进行了研究与改

进,木糖及半纤维素水解液乙醇发酵浓度可以提高到 20 g/L<sup>[21,22]</sup>.

### 3 运动发酵单胞菌木糖代谢的代谢工程改造

属于厌氧型细菌的运动发酵单胞菌是自然界中迄今为止唯一已知的将丙酮酸脱羧酶及乙醇脱氢酶与独特的 Enter-Doudoroff(ED)糖酵解途径相偶联高效产生乙醇的微生物. 与传统的用于乙醇发酵生产的微生物如酿酒酵母相比,运动发酵单胞菌具有如下几个优点:(1)酒精产量接近理论最大值(约 97%),酒精产量比酵母菌高 5%~10%,产率比酵母菌高近 5 倍,且发酵生物量相对较低;(2)高酒精耐受力,耐受酒精浓度可达 16% ( $\varphi$ );(3)产物专一性高,生长营养要求简单. 此外,与酿酒酵母一样,运动发酵单胞菌也是公认的安全菌株 (GRAS—generally regarded as safe),发酵菌体生物量可以简单处理后作为动物饲料或肥料使用,而且以淀粉质为原料,基于运动发酵单胞菌的酒精生产工业化试验也已成功进行. 但与酿酒酵母相似,运动发酵单胞菌的底物利用范围有限,除葡萄糖、果糖和蔗糖外,由于自身缺少必要的代谢途径而使其无法利用木质纤维素水解产生的木糖等戊糖成分,从而限制了其在酒精发酵生产的应用. Zhang 等<sup>[23]</sup>在 1995 年首次成功地将与木糖代谢相关的 4 个基因转化到运动发酵单胞菌中,并且成功地得到了表达. 其中木糖异构酶基因(xylA)和木酮糖激酶基因(xylB)负责将木糖转化成磷酸戊糖途径的重要的中间物木酮糖-5-磷酸,转酮醇酶基因(tktA)和转醛醇酶基因(talB)负责将木酮糖-5-磷酸转化成 ED 途径的中间物,从而使木糖被吸收利用并生成乙醇. 获得的转化菌株 CP4(pZB5)可在以木糖为唯一碳源的培养基上生长,并且乙醇产量达到了理论产率的 86%;而对于木糖和葡萄糖各为 25 g/L 的混合碳源,经 30 h 发酵,两种糖的发酵转化率都可达到 95%. 根据最新专利报道, Mohagheghi 等<sup>[24]</sup>又将发酵木糖和阿拉伯糖所需的 7 个基因整合到运动发酵单胞菌染色体上的特异位点—乳酸脱氢酶基因(ldh)中,获得了一株稳定的整合重组菌株 AX101,在赋予新菌株发酵利用木糖和阿拉伯糖能力的同时,也减少了副产物乳酸的生成.

在通过构建工程菌株发酵木质纤维素类生物质水解液生产酒精的尝试中,一个需要解决的问题就是工程菌株对水解液中众多抑制因子,尤其是乙酸的耐受性问题. Lawford 等<sup>[25]</sup>曾将携带木糖代谢相关基因的质粒 pZB4L 转入运动发酵单胞菌 ATCC39767,接种于经预

处理的北美鹅掌楸木中连续培养,并不不断增加木糖水解稀释液,使其含量由最初接种时的 10% ( $\varphi$ ) 达到培养末期的 50% ( $\varphi$ ); 培养 149 d 后,分离得到一突变菌株,其在含 0.4%~1.0% ( $\varphi$ ) 乙酸的培养基中发酵的乙醇产量达到了理论值的 94%~96%. 目前,此菌种已初步在同步糖化发酵中得到应用. AX101 同样存在着乙酸耐受度低的问题,此菌株在培养 160 代后仍能发酵木糖和阿拉伯糖,但 Mohagheghi 等<sup>[24]</sup>发现 AX101 在连续培养时,当乙酸浓度超过 4.5 g/L,就因其代谢速率开始减缓而累积木糖. 最近, Mohagheghi 等<sup>[26]</sup>新构建了木糖代谢途径基因染色体整合的重组菌株 8b,该菌株在谷物秸秆稀酸水解液中发酵乙醇产量可达 85%,且可以耐受发酵液中 16 g/L 的乙酸,显示出良好的应用前景. 已有的相关研究显示,抑制因子耐受性问题的解决,可以从驯化筛选抗乙酸工程菌株及发酵前去除水解液中的乙酸两个途径入手.

### 4 大肠杆菌木糖代谢产生乙醇的遗传工程改造

大肠杆菌可利用的碳源广泛,其中包括六碳糖和五碳糖(木糖和阿拉伯糖). 但由于大肠杆菌缺少高活力的乙醇产生酶系,而且糖酵解过程产生的副产物较多(主要为有机酸). 上世纪 80 年代, Ingram 等<sup>[27]</sup>用运动发酵单胞菌中的高活力丙酮酸脱氢酶(PDC)和乙醇脱氢酶基因(ADHII)构建了 PET 操纵子,并将该操纵子导入大肠杆菌中表达,结果大肠杆菌工程菌株的乙醇产量得到了极大的提高. Beall 等<sup>[28]</sup>发现转化有 pLOI297(含 PET 操纵子)的 B 系大肠杆菌在 80 g/L 木糖培养基和 42 °C 发酵条件下,最终乙醇产率可达到 0.72 g/(L·h),而乙醇耐受力可达到 53~56 g/L. 国内最近也有类似工作的报道,但还处于起步阶段<sup>[29]</sup>.

Ohta 等<sup>[30]</sup>于 1991 年将上述两个基因进一步整合到 B 系大肠杆菌 ATCC11303 染色体上的丙酮酸甲酸裂解酶基因(pfl)座位中,在获得这两个基因高水平表达的同时,也消除了此酶对丙酮酸的竞争作用,从而加大了乙醇途径的代谢流向. 经过对初始整合菌株的系列诱变和筛选后,最终获得的大肠杆菌工程菌株(KO11)转化葡萄糖和木糖成乙醇的产量分别达到了理论值的 103%~106%. 由于 KO11 同时含有琥珀酸脱氢酶基因缺陷,所以最终发酵产物中的琥珀酸含量仅为含质粒重组菌株的 5%. 进一步研究发现, KO11 对蒸汽预处理的松树水解产物及玉米纤维水解产物进行发酵,乙醇产量可以达到理论值的 80%~82%. 但由于 KO11 的最适生长

pH 和温度分别是 6.5 与 35 °C, 而木质纤维素类物质预处理时所用的来自 *T. reesei* 的纤维素酶作用最适 pH 与温度分别为 4.6 和 55 °C, 所以实行同步糖化发酵(SSF)过程还存在一定困难<sup>[31]</sup>. 同时, 许多实验结果显示, 构建的大肠杆菌酒精发酵菌株在无机盐基本培养基中, 发酵木糖的酒精产率在很大程度上受细胞有限生长的限制. Underwood 等<sup>[32]</sup>的研究则表明, 通过遗传改造增加胞内谷氨酸含量, 或直接在培养基中补加渗透压保护剂均可以增加细胞生长量及酒精产率. Yomano 等<sup>[33]</sup>于 1998 年筛选出一株突变株 LY01, 其在 140 g/L 木糖培养基上发酵木糖的时间可以从 120 h 缩短到 96 h, 并且可以耐受木质纤维素水解产物中的多种生长抑制因子如糠醛、乙酸、乙醇和有机酸等, 但菌株的突变性质不清楚.

Hespell 等<sup>[34,35]</sup>则利用一种可以对外源乙醇产生途径进行厌氧选择的大肠杆菌 FBR 来保证发酵过程中重组菌株的稳定性. FBR 因为缺失丙酮酸甲酸裂解酶(pfl)和乳酸脱氢酶(ldh)而无法还原丙酮酸和循环糖酵解产生的 NADH, 因此在无氧条件下不能生长. 将编码 PET 操纵子的 pLOI297 转化到 FBR 中, 不仅重建了发酵途径, 而且可实现发酵过程中对重组菌株的选择, 其中一株重组菌株 FBR5 在 36~60 h 内即可完全发酵木糖, 最终酒精产量达到 0.46~0.51 g/g (乙醇/木糖). 最近, Nichols 等<sup>[36]</sup>还构建了一系列磷酸烯醇式丙酮酸-葡萄糖磷酸转移酶系统(*ptsG*<sup>-</sup>)缺陷型菌株, 这些菌株由于 *ptsG* 的缺失使大肠杆菌主动运输葡萄糖的途径受到阻碍, 从而解除了发酵过程中葡萄糖的阻遏效应, 使突变菌株可以同时利用阿拉伯糖、葡萄糖和木糖.

## 5 展望

半纤维素是纤维质原料的重要组成部分之一, 如何有效利用半纤维素是生物量全利用的关键之一. 以木质纤维素为原料生产乙醇, 其关键之一就是具有能有效利用各种糖底物, 且高效产生乙醇的微生物菌种. 由于这样的菌种在自然界中并不存在, 所以人们转向利用代谢工程原理, 通过分子遗传改造相关菌株来获得能在厌氧条件下高效代谢发酵葡萄糖、木糖及其他各种戊糖的工程菌株. 上述研究结果表明这一设想在理论上是可行的, 并且也获得了各种类型的重组菌株, 但在实践中仍存在很多需要解决的问题. 对酵母菌而言, 已有重组菌株在木糖发酵过程中仍存在以下问题: 绝对依赖于通氧或可共代谢碳源的存在; 乙醇产生效率较低, 且通常有较高含量木糖醇产生; 重组菌株的构建多以实验室菌株为主, 而工业用菌株的改造报道则较少等. 对细菌的代谢工程

而言, 虽然与酵母菌相比具有较高的发酵温度, 但其最适 pH 一般接近中性, 还不适合同步糖化发酵过程; 同时, 各种重组工程菌株所用实验发酵条件, 如培养基组成、糖源组合及接种方式不同, 因此发酵结果缺少系统的比较. 另外, 对纤维质原料水解液中各种生长抑制因子的耐受性及低营养要求的适应性是重组细菌工程菌进入商业化应用必须解决的一个问题, 而这一问题的最终解决除进一步通过进化工程手段筛选目标菌株, 还同时依赖于从工程角度研究适合纤维质原料的预处理策略.

不论酵母菌还是细菌, 要实现代谢工程改造的最终目标, 还需要在现有基础上, 利用当今生物学领域的一些最新技术, 如微阵列分析、转录组学、蛋白质组学及自动定向进化等, 从整个基因组水平深入研究木糖代谢的调控网络及机制, 找出影响木糖代谢, 尤其是厌氧条件下影响木糖发酵的各种因子, 通过结合生化工程技术, 平衡这些因子在细胞内的变化, 以实现最大效率的木糖乙醇转化. 同时, 还可以将上述代谢工程理念应用于自然界中其他一些独特性状的菌株, 以拓展改造菌株范围, 如直接改造某些能在高温下降解纤维素的嗜热细菌或革兰氏阳性细菌、树干毕赤酵母等, 在它们已有的某些独特性状基础上, 进一步提高乙醇转化效率. 相信对上述菌株的深入改造以及相关同步发酵技术的研究改进, 对最终实现直接利用木质纤维素生产乙醇具有深远而重大的意义.

### 参考文献:

- [1] Roca C, Olsson L. Increasing Ethanol Productivity during Xylose Fermentation by Cell Recycling of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 60: 560-563.
- [2] Dien B S, Cotta M A, Jeffries T W. Bacteria Engineered for Fuel Ethanol Production: Current Status [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 63: 258-266
- [3] 徐勇, 范一民, 勇强, 等. 木糖发酵重组菌研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(6): 58-63.
- [4] Buziol S, Becker J, Baumeister A, et al. Determination of *in vivo* Kinetics of the Starvation-induced Hxt5 Glucose Transporter of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Res.*, 2002, 2: 283-291.
- [5] Meinander N Q, Hahn-Hagerdal B. Influence of Cosubstrate Concentration on Xylose Conversion by Recombinant, XYL1-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: A Comparison of Different Sugars and Ethanol as Cosubstrate [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 63: 1959-1964.
- [6] Hamacher T, Becker J, Gardonyi M, et al. Characterization of the Xylose-transporting Properties of Yeast Hexose Transporters and Their Influence on Xylose Utilization [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 2783-2788
- [7] Hahn-Hagerdal B, Wahlbom C F, Gardonyi M, et al. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Utilization [J]. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2001, 73: 53-84.
- [8] Kotter P, Amore R, Hollenberg C P, et al. Isolation and

- Characterization of the *Pichia stipitis* Xylitol Dehydrogenase Gene, *XYL2*, and Construction of a Xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* Transformant [J]. *Curr. Genet.*, 1990, 18: 493–500.
- [9] Amore R, Kotter P, Kuster C, et al. Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent Xylose Reductase-encoding Gene (*XYL1*) from the Xylose-assimilating Yeast *Pichia stipitis* [J]. *Gene*, 1991, 109: 89–97.
- [10] Bao X M, Gao D, Qu Y B, et al. Effect on Product Formation in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Expressing Different Levels of Xylose Metabolic Genes [J]. *Chin. J. Biotechnol.*, 1997, 13: 225–231.
- [11] Krishnan M S, Ho N W Y, Tsao G T. Fermentation Kinetics of Ethanol Production from Glucose and Xylose by Recombinant *Saccharomyces* 1400 (pLNH33) [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1999, 77/79: 373–388.
- [12] Johansson B, Christensson C, Hobbey 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.
- [13] Walfridsson M, Hallborn J, Penttila M, et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressing the *TKL1* and *TAL1* Genes Encoding the Pentose Phosphate Pathway Enzymes Transketolase and Transaldolase [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 4184–4190.
- [14] Karhumaa K, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund M F. Investigation of Limiting Metabolic Steps in the Utilization of Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Using Metabolic Engineering [J]. *Yeast*, 2005, 22(5): 359–368.
- [15] Richard P, Verho R, Putkonen M, et al. Production of Ethanol from L-Arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* Containing a Fungal L-Arabinose Pathway [J]. *FEMS Yeast Res.*, 2003, 3: 185–189.
- [16] 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.
- [17] Anderlund M, Radstrom P, Hahn-Hagerdal B, et al. Expression of Biofunctional Enzymes with Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activity in *Saccharomyces cerevisiae* Alters Product Formation during Xylose Fermentation [J]. *Metab. Eng.*, 2001, 3: 226–235.
- [18] 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]. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 10340–10349.
- [19] Eliasson A, Christensson C, Wahlbom C F, et al. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in Mineral Medium Chemostat Cultures [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 66: 3381–3386.
- [20] Sonderegger M, Sauer U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 1990–1998.
- [21] 刘健, 陈洪章, 李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究 [J]. *工业微生物*, 2001, 31(2): 36–37.
- [22] 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 [J]. *生物工程学报*, 1996, 12: 157–162.
- [23] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis* [J]. *Science*, 1995, 267: 240–243.
- [24] Mohagheghi A, Evans K, Chou Y C, et al. Cofermentation of Glucose, Xylose, and Arabinose by Genomic DNA-integrated Xylose/Arabinose Fermenting Strain of *Zymomonas mobilis* AX101 [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, 98: 885–898.
- [25] Lawford H G, Rousseau J D, Mohagheghi A, et al. Fermentation Performance Characteristics of a Prehydrolyzate-adapted Xylose-fermenting Recombinant *Zymomonas* in Batch and Continuous Fermentations [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1999, 77: 191–204.
- [26] Mohagheghi A, Dowe N, Schell D, et al. Performance of a Newly Developed Integrant of *Zymomonas Mobilis* for Ethanol Production on Corn Stover Hydrolysate [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26: 321–325.
- [27] Ingram L O, Conway T, Clark D P, et al. Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53: 2420–2425.
- [28] Beall D S, Ohta K, Ingram L O. Parametric Studies of Ethanol — Production from Xylose and Other Sugars by Recombinant *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, 38: 296–303.
- [29] 谢丽萍, 诸葛健, 王正祥. 大肠杆菌中乙醇合成途径的构建 [J]. *无锡工业大学学报*, 2002, 21(2): 116–119.
- [30] Ohta K, Beall D S, Mejia J P, et al. Genetic Improvement of *Escherichia coli* for Ethanol Production: Chromosomal Integration of *Zymomonas mobilis* Genes Encoding Pyruvate Decarboxylase and Alcohol Dehydrogenase II [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 893–900.
- [31] Asghari A, Bothast R J, Doran J B, et al. Ethanol Production from Hemicellulose Hydrolysates of Agricultural Residues Using Genetically Engineered *Escherichia coli* Strain KO11 [J]. *J. Ind. Microbiol.*, 1996, 16: 42–47.
- [32] Underwood S A, Buszko M L, Shanmugam K T, et al. Lack of Protective Osmolytes Limits Final Cell Density and Volumetric Productivity of Ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during Xylose Fermentation [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70: 2734–2740.
- [33] Yomano L P, York S W, Ingram L O. Isolation and Characterization of Ethanol-tolerant Mutants of *Escherichia coli* KO11 for Fuel Ethanol Production [J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 20: 132–138.
- [34] Hespell R B, Wyckoff H, Dien B S, et al. Stabilization of Pet Operon Plasmids and Ethanol Production in *Escherichia coli* Strains Lacking Lactate Dehydrogenase and Pyruvate Formate-lyase Activities [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 4594–4597.
- [35] Dien B S, Hespell R B, Wyckoff H A, et al. Fermentation of Hexose and Pentose Sugars Using a Novel Ethanologenic *Escherichia coli* Strain [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, 23: 366–371.
- [36] Nichols N N, Dien B S, Bothast R J. Use of Catabolite Repression Mutants for Fermentation of Sugar Mixtures to Ethanol [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56: 120–125.

## Metabolic Engineering for Improving Ethanol Fermentation of Xylose by Yeasts and Bacteria

LIU Wei-feng<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-mei<sup>1</sup>, CHEN Guan-jun<sup>1</sup>, LIU Chun-zhao<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China;

2. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Efficient fermentation of xylose constitutes a major part of successful bioconversion of lignocellulosic biomass for ethanol and other important chemical production, but there is no natural microorganism suitable for efficiently transforming the renewable lignocellulosic materials. For the last two decades, many improvements have been made in the metabolic engineering of yeasts and bacteria including *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli* for the fermentation of xylose to selectively produce ethanol through introducing either xylose metabolic genes or ethanol production genes into the above hosts and a serial of recombinant strains have since been constructed. Although some of them have shown great promise for industrial exploitation, there still remain a lot of problems to be addressed. It seems necessary to make further improvements on the present strains on the basis of systematically learning more about the factors that control xylose metabolism. It also requires that the fermentation of recombinant strains be maximally optimized through biochemical engineering to achieve the bioconversion of lignocellulosic biomass into ethanol with high efficiency. The present review tries to outline some major efforts for developing microbial strains to efficiently ferment xylose to ethanol through metabolic engineering.

**Key words:** xylose; ethanol; metabolic engineering; *Saccharomyces cerevisiae*; bacteria