

高乙醇转化率酿酒酵母工程菌株构建研究进展

吴婷婷 吴雪昌

(浙江大学生命科学院,杭州,310058)

摘 要 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)发酵产生乙醇的过程中,甘油的生成所消耗的碳源约占总碳源的4%~10%。减少甘油合成量可提高乙醇产率与碳源利用率。其主要策略是修饰或切除一步或多步代谢反应,或引入外源相关基因以改变碳流方向与碳流量,从而使反应向有利于生成更多乙醇而少生成甘油的方向进行。文中主要综述了近年来通过代谢工程手段阻断酿酒酵母甘油的合成或降低甘油的合成量,以提高乙醇发酵糖醇转化率的研究进展。

关键词 酿酒酵母,乙醇,甘油

随着社会能源供需矛盾的日益突出和环保要求的不断提高,燃料乙醇作为一种可再生的清洁替代能源越来越受到人们的重视^[1]。从2000年起,全球乙醇的总产量平均以每年18.5%的速度递增,2005年总量更高达108亿加仑^[2]。目前世界90%以上的乙醇是通过酿酒酵母以淀粉质或其他糖质原料发酵生产的^[3]。甘油是乙醇生产中主要副产物之一,甘油的生成因菌株、原料与工艺的不同会消耗4%~10%的总碳源^[4],如果这些碳源用来生成乙醇,每年全球无需增加原料投入可多产乙醇约13亿L^[3],这将大幅度提高乙醇生产的效率,产生可观的经济与社会效益。因此,构建少产副产物而高产乙醇率的酿酒酵母工程菌株是近年来的研究热点。

修饰或阻断一步或多步的代谢反应,引入外源相关基因以改变碳流方向与碳流量,是构建上述工程菌株的主要策略。其关键是要实现乙醇发酵中反应向有利于生成更多乙醇而少生成甘油的方向进行,从而提高酿酒酵母利用糖发酵生成乙醇的糖醇转化率。

文中就近年来通过基因工程或代谢工程手段阻断或削弱酿酒酵母的甘油合成,提高乙醇发酵转化率的研究进展进行了综述。

1 酿酒酵母甘油合成的生化机制与生理功能

酿酒酵母以葡萄糖为碳源,通过将磷酸二羟丙酮转化为3-磷酸甘油(G-3-P)与G-3-P的脱磷酸作用生成甘油。其中第1步反应由合成甘油的关键酶(GPD)所催化。GPD有2个同功酶,分别由基因GPD1和GPD2编码^[5,6],它们催化甘油的合成并伴随辅酶NADH氧化生成NAD⁺。虽然这2个同功

酶基因有很高的序列同源性,但它们的表达调控模式并不相同。GPD1主要由高渗透压诱导表达,它的作用是在高渗透压的条件下启动甘油的合成途径,以调节细胞内外的渗透平衡^[7~9]。GPD2在厌氧条件下被诱导,它对厌氧条件下的氧化还原反应的代谢平衡调控起到一定的作用^[9]。

酿酒酵母在氧充足的环境中,在由胞内NDE1、NDE2基因编码的NADH脱氢酶的作用下,通过呼吸链将NADH氧化为NAD⁺,产生足够的能量推动细胞物质代谢,细胞生长较为迅速,培养基中细胞数增长快。研究表明,在含高浓度糖的培养基和供养不足的乙醇发酵中,酿酒酵母的有氧呼吸作用受到一定程度的抑制,降低了酿酒酵母细胞氧化过剩的NADH的能力,从而使胞内还原型NADH有所积累。酿酒酵母选择甘油合成途径,消除胞内过剩的还原型NADH,每合成1mol甘油将会氧化1mol NADH。胞内甘油的合成反应是酿酒酵母细胞在无氧和高浓度糖环境条件下代替呼吸链氧化NADH为NAD⁺的替代途径,使酵母消耗在合成生物量和形成诸如琥珀酸、醋酸和丙酮酸等有机酸的过程中伴随NADH的生成,以解除胞内NADH与NAD⁺的失衡,维持细胞能量与物质代谢的平衡^[10]。研究发现,酵母胞内一定浓度甘油的积累,使酵母细胞对环境因高糖浓度而产生的高渗透压的抵御能力有所提高^[9,11]。酿酒酵母在含高浓度糖培养基中,以及在无氧条件下利用可发酵性糖产乙醇、CO₂、生成生物量与甘油等不同代谢途径之间的关系及参与反应的相关重要分子的质量平衡见图1。

2 阻断甘油的合成提高乙醇发酵产率的尝试

根据酿酒酵母菌株、培养基与工艺流程的不同,

第一作者:硕士研究生(吴雪昌老师为通讯作者)。

收稿日期:2006-04-17,改回日期:2006-06-20

乙醇发酵过程中会有 4%~10% 的碳源用于合成甘油^[4]。因此,研究者首先针对的是甘油合成途径的关键酶,通过构建 *GPD1*、*GPD2* 单基因敲除或 2 者均敲除的缺失突变体,开展了部分或全部阻断甘油的合成,以改变碳流方向与碳流量,从而提高乙醇发酵的产率的尝试。

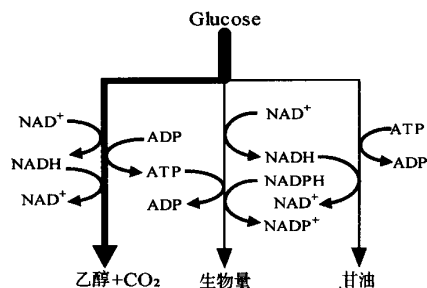


图1 酿酒酵母在厌氧条件下的主要代谢通路和辅酶因子与ATP的需求平衡^[12]

Björkqvist 等^[4]用葡萄糖浓度为 2% 的培养基在 5 L 发酵罐中研究了缺失 *GPD1* 或 *GPD2* 基因与该 2 种基因双缺失的酿酒酵母突变体在有氧条件下的生理学反应。研究表明,在有氧培养条件下,缺失 *GPD1* 或 *GPD2*(即单基因缺失)的菌株与亲本比较,生长速率略低,甘油产量较亲本分别减少了 69% 和 54%,生长发酵在 30 h 被完成,亲本与 2 种单基因缺失突变体的乙醇产率分别为 0.38、0.38 与 0.37(g 乙醇/g 葡萄糖)。而 *GPD1* 和 *GPD2* 双基因缺失突变体在有氧条件下的生长速率只有亲本的 50% 左右,且未检测到甘油,发酵 50 h 后的残余还原糖高于单基因缺失菌株,乙醇产率为 0.36(g 乙醇/g 葡萄糖)。由此可见,3 种缺失突变体的乙醇产率均未超过亲本。

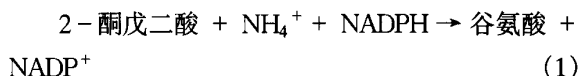
Valadi 等^[13]在 Björkqvist 的基础上,在葡萄糖浓度为 2% 的培养基中,对亲本与 3 种缺失突变体进行了厌氧连续发酵研究。2 种基因双缺失的酿酒酵母突变体无法在厌氧条件下生长,原因是没有可选择的途径将 NADH 氧化为 NAD⁺,从而造成胞内 NADH 的大量累积。对单基因缺失体与亲本的比较显示:缺失 *GPD1* 基因的突变体菌株的甘油产量略低于亲株,而缺失 *GPD2* 突变体菌株的甘油产量较亲本减少了 40%。亲本与 2 种单基因缺失突变体的乙醇产率分别为 0.34、0.34 与 0.37。缺失 *GPD2* 突变体菌株的乙醇产量虽然提升了约 8% (相对于底物的消耗),但是生长速率则较亲本下降了 45%,在厌氧条件下生长缓慢,延长了生长周期。也有研究者在 2 基

因双缺失突变体中引入其它的代谢途径来消耗 NADH 再生 NAD⁺,以求胞内 NADH/NAD⁺ 的平衡的同时提高乙醇的发酵产率,但结果并未达到预期目标^[14,15]。

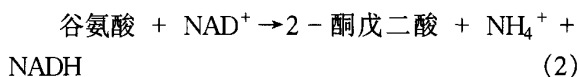
由此可见,单纯阻断甘油合成途径并不能有效地提高乙醇产率。

3 新增 NADH 需求与 ATP 消耗通路提高乙醇发酵产率

在乙醇工业生产中,铵(NH₄⁺)常被用作氮源。NH₄⁺ 通过细胞膜进入细胞质后与 2-酮戊二酸一起作为底物在特定酶的催化下合成谷氨酸。在酿酒酵母的野生型细胞中这一谷氨酸合成反应(1)是由 *GDH1* 编码的依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, Gdh1p)所催化:

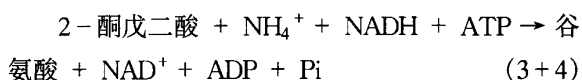
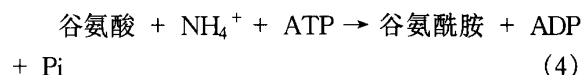
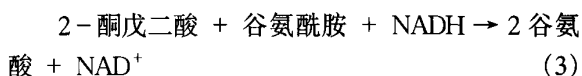


酿酒酵母胞内还存在 2 个编码谷氨酸脱氢酶的同功酶基因 *GDH2* 和 *GDH3*。Gdh2p 以 NADH 为辅酶因子,但反应方向与反应(1)相反,反应式见(2):



当使用其他氮源时,Gdh2p 催化的反应将会显得十分重要。如当谷氨酸作为氮源时,将利用反应(2)生成 NH₄⁺,以满足其他氨基酸合成反应对 NH₄⁺ 的需求^[16,17]。在一般细胞中,当以 NH₄⁺ 作为氮源时,Gdh2p 的活性只有 Gdh1p 的 1/70^[18]。而谷氨酸脱氢酶的同功酶基因 *GDH3* 的编码产物 *Gdh3p* 同样依赖于 NADPH,但 *Gdh3p* 的功能目前还不清楚^[19]。

酿酒酵母胞内还存在着另一条谷氨酸的合成途径。它由连锁反应(3)和(4)组成,分别由 *GLT1* 编码的谷氨酸合酶(glutamate synthase, Glt1p)和 *GLN1* 编码的谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, Gln1p)催化^[20]。在野生型细胞中 Glt1p 的活性只有 Gdh1p 活性的 1/80,所以,在普通的细胞中这一系统基本不发生作用,对 NH₄⁺ 的同化影响不大。



如果酵母中的 *GDH1* 基因被敲除,细胞将无法通过依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶同化 NH_4^+ 合成谷氨酸。由于其他有关途径的催化酶活性都太低,所以只有在 *GDH1* 被敲除的突变株中过表达 *GDH2* 或 *GLT1* 和 *GLN1*,才可能在合成谷氨酸的过程中将 NADH 转化为 NAD^+ ,由此与合成甘油的途径竞争性的利用辅酶 NADH。重组菌株由于发生反应(4)将需要大量的 ATP,因产生乙醇的过程是净生成 ATP 的过程,故大量 ATP 的消耗有利于反应向多生成乙醇的方向进行^[21]。

Nissen 等通过研究证实:敲除 *GDH1* 基因的酿酒酵母菌株,在厌氧条件下生长,通过减少过剩的 NADH 的形成和增加生物合成中 ATP 的消耗,甘油的形成减少且乙醇产率提升了 8%,但菌株的最大比生长速率与野生型的相比减少了 50%,其原因可能是替代 *GDH1* 合成谷氨酸的 *GDH2* 和 *GLT1* 的表达活性远低于 *GDH1*,使得谷氨酸合成速率降低^[3]。

在 *GDH1* 缺失的菌株中将 *PGK* 启动子插入 *GDH2* 基因上游而过量地表达 *GDH2*,得到菌株 TN22 (*gdh1* - Δ *PGK1p* - *GDH2*),其最大比生长速率高于野生型。在厌氧分批发酵条件下,菌株 TN22 的谷氨酸脱氢酶的活性是野生型的 10 倍;甘油的生成量减少但乙醇的产量并未增加,而生物量却增加了。可见,仅仅减少甘油的生成量并不一定会导致乙醇产量的增加^[3]。

Nissen 等又通过敲除 *GDH1* 且用启动子 *PGK* 过表达 *GLN1* 和 *GLT1* 的基因,构建了菌株 TN19 (*gdh1* - Δ *PGK1p* - *GLT1* *PGK1p* - *GLN1*),它与仅缺失 *GDH1* 的菌株相比的乙醇产量提高了 3%。过表达这 2 个基因基本维持了谷氨酸的正常合成,所以 TN19 菌株仍保持了野生型菌株 90% 以上的最大比生长速率,且与野生型菌株相比, TN19 的甘油产量下降 38%,乙醇产量增加了 10%。TN19 对 ATP 的需求有较大幅度的提高,细胞则通过增加朝向乙醇的代谢流量,从而多产 ATP 来满足高能耗需求。实验中 TN19 菌株的发酵时间略长于野生型菌株,但这一问题可以在工业生产中通过工艺优化来解决,对经济效益的提高并不构成严重的负面影响。

可见,增加 NADH 新需求以减少甘油的合成,同时与增加 ATP 消耗量相结合,有望较大幅度提高酿酒酵母乙醇发酵的产率^[3,21]。TN19 的成功构建在工业生产中具有广阔的应用前景。

4 引入异种基因提高乙醇产率

改变辅酶因子的需求可以缓解代谢网络中辅酶因子的不平衡,其有效途径是表达依赖辅酶的异种酶。这一策略的主要障碍是缺乏异种酶在宿主中表达与功能分析的有效的设计和预测方法。

Bro 等^[12]利用生物信息学手段(in silico)分析酿酒酵母的基因组水平代谢模型^[20],并对其基因组进行修饰,综合模拟与评估菌株的生物量和副产物的形成。这一模型对 708 个基因、584 条代谢途径、1 175 个反应^[20]进行建模后,提出了 10 条最有希望成功的策略,最后经过手动人工筛选,终于建立了一条可望实现的策略,成功构建了降低甘油产量提高乙醇产率的酿酒酵母工程菌株。

这一策略就是过表达依赖于 NADP^+ 的 *gapN* 基因,该基因编码链球菌的非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,以下简称 GAPN)^[22]。

在野生型的酿酒酵母体内,由依赖于 NAD^+ 的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(以下简称 GAPDH)和磷酸化激酶共同催化甘油醛-3-磷酸转化为 3-磷酸甘油酸,反应伴随 NADH 和 ATP 的生成见图 2。

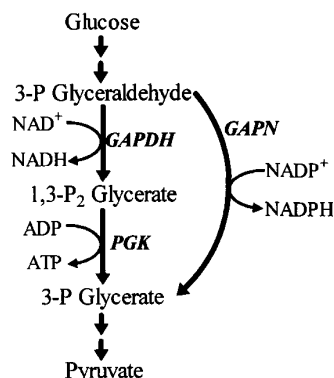


图 2 GAPN 催化的生化反应^[12]

这一反应是糖酵解过程中产生 NADH 的一步。由于催化酶的辅酶因子需求不同,通过表达 *gapN* 基因可以发生与胞内 GAPDH 的竞争作用,以减少胞内 NADH 的生成,从而减少甘油的产生。这一策略用乙醇的生成取代甘油的生成来消耗 NADH,实验结果与基因组水平的模型预测分析一致:葡萄糖转化为乙醇所再氧化的 NADH 的量与葡萄糖生成甘油消耗的 NADH 的量是相当的^[12]。

厌氧条件下重组菌的甘油流量减少了 40%,最大比生长速率并未受到影响。含 *gapN* 基因的工程菌株在以葡萄糖为碳源生长时的生物量变高,该工程菌与野生型菌株发酵结果比较显示:重组菌的乙醇产率提升了 3%,而乙酸、丙酮酸、琥珀酸的量并没有改变。尽管增加的乙醇产量在标准偏差范围之内,但是由于在厌氧生长条件下甘油产量的减少与乙醇产量的增加具有必然的联系,故乙醇产量的增加应是上述基因重组的结果。

5 展 望

综上所述,近年来通过减少酿酒酵母乙醇发酵过程中副产物甘油的量,以提高乙醇发酵产率的研究已经取得一定进展,但仍有诸多难点未解决,也未见生产规模应用的报道。

在乙醇工业化生产中,发酵用糖化醪的糖浓度一般在 20~28° Brix 间,已见报道的国外该类研究中,其培养基糖浓度低于这一范围。酿酒酵母在不同糖浓度环境中,其应激调节机制和甘油合成量会有所不同^[23],相应的糖醇转化率也会有所变化。通过代谢工程手段构建的工程菌株往往对环境因子变化的反应比较灵敏^[21]。糖浓度的高低是决定乙醇工业化生产效率的重要参数,在较高糖浓度(22° Brix 以上)条件下,具有优良的耐受极端环境遗传性能的酵母菌株,才能高水平地完成发酵任务。本实验室经 20 余年在该领域的研究积累,采用诱变,染色体组拆分、细胞与基因工程等技术体系的综合应用,成功构建了耐高温、耐高糖浓度、高转化率的酿酒酵母 Z001 系列工程菌株,与上海天之冠可再生能源有限公司和河南天冠集团合作,在其燃料乙醇生产基地南阳乙醇厂接受了发酵用糖化醪糖度 20~28° Brix、主发酵温度 33~38℃、生产乙醇 3 万余吨的工业化规模考验,与我国传统最优系列乙醇生产酿酒酵母菌株比较,转化率提高 3% 左右,取得较显著的经济与社会效益,目前正在进一步扩大应用。

基于国内外乙醇生产工艺现实条件,基因工程与其他途径综合运用,改造构建多种优良性能集于一“身”、并能应用于工业化生产的高转化率酿酒酵母是该研究领域的发展方向。

参 考 文 献

1 沈 煜,王 颖,鲍晓明,等. 酿酒酵母木糖发酵乙醇途径工程的研究进展[J]. 生物工程学报, 2003, 19 (5): 636

~641

- 2 <http://www.earth-policy.org/Updates/2005/Update49-data.htm> Ethanol's potential: looking beyond corn data. 2005
- 3 Nissen T L, Kielland Brandt M C, Nielsen J, et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation[J]. Metab Eng, 2000, 2 (1): 69~77
- 4 Björkqvist S, Ansell R, Adler L, et al. Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (1): 128~132
- 5 Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, et al. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14 (6): 4 135~4 144
- 6 Eriksson P, AndreÅ L, Ansell R, et al. Cloning and characterisation of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison to GPD1 [J]. Mol Microbiol, 1995, 17 (1): 95~107
- 7 Andre L, Hemming A, Adler L, et al. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) [J]. FEBS Lett, 1991, 286 (1~2): 13~17
- 8 Albers E, Larsson C, LideÅn G, et al. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (9): 3 187~3 195
- 9 Ansell R, Granath K, Hohmann S, et al. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation[J]. EMBO J, 1997, 16 (9): 2 179~2 187
- 10 Nissen T L, Schulze U, Nielsen J, et al. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol, 1997, 143 (1): 203~218
- 11 Larsson K, Ansell R, Eriksson P, et al. A gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Microbiol, 1993, 10 (5): 1 101~1 111
- 12 Bro C, Regenberg B, Forster J, et al. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production [J]. Metab Eng, 2005, 9:

1~10

- 13 Valadi H, Larsson C, Gustafsson L, et al. Improved ethanol production by glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50 (4) : 434~439
- 14 Nissen T L, Kielland Brandt M C, Nielsen J, et al. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*. Mutants impaired in glycerol synthesis[J]. Yeast, 2000, 16 (5):463~474
- 15 Anderlund M, Nissen T L, Nielsen J, et al. Expression of the Escherichia coli pntA and pntB genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (6) : 2 333~2 340
- 16 Miller S M, Magasanik B. Role of the NAD - linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Bacteriol, 1990, 172 (9) : 4 927~4 935
- 17 Miller S M, Magasanik B. Role of the complex upstream region of the GDH2 gene in nitrogen regulation of the NAD - linked glutamate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11 (12) : 6 229~6 247
- 18 Nissen T L, Schulze U, Nielsen J, et al. Flux distributions in anaerobic, glucose - limited continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol, 1997, 143 (1) : 203~218
- 19 Avendano A, Deluna A, Olivera H, et al. GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Bacteriol, 1997, 179 (17) : 5 594~5 597
- 20 Förster J, Famili I, Fu P, et al. Genomescale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network[J]. Genome Res, 2003, 13 (2) : 244~253
- 21 Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J, et al. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 64 (1) : 34~50
- 22 Boyd D A, Cvitkovitch D G, Hamilton I R, et al. Sequence, expression, and function of the gene for the non-phosphorylating, NADP dependent glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 1995, 177 (10) : 2 622~2 627
- 23 吴雪昌, 胡森杰, 钱凯先, 等. 酵母 HOG - MAPK 途径 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27 (3) : 247~252

Progress in Recombinant Construction of *Saccharomyces cerevisiae* for Improving Ethanol Production

Wu Tingting Wu Xuechang

(College of Life Sciences, Zhengjiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT A major problem about ethanol production by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* is that 4% to 10% of the carbon source may be converted to glycerol. Strains impaired glycerol synthesis would lead to increase yield of ethanol and efficiency of utilization of the carbon source. The major strategy is to interdict or manipulate the metabolism, or to express another gene in *S. cerevisiae* to redirect the carbon flux. This paper summarized the strategies and the research on impairing the glycerol synthesis and improving the ethanol production through metabolic engineering.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, glycerol

信息窗

美国利用生物传感技术检测食品毒素

美国农业部农业研究服务中心开发出生物传感技术。依靠此技术,可以检测火腿、牛奶和蛋类等食品中的抗热病毒。

美国科学家开发出的生物传感技术主要利用葡萄球菌和表面胞质基因共振 (SPR) 来检测毒素。SPR 利用光反射金属薄膜,这些膜上会附上毒素抗体分子。当这些分子粘合在包膜表面时,能改变光折射的路线,光强度的变化可以通过光感监测器监控,由此确认食品样品中含有多少毒素。

据介绍,生物传感技术可以检测单一食品样品中的几种细菌。科学家可以通过屏幕显示,检测和确认多种化学物残留,如兽药和农药等残留。