

微生物利用木糖

发酵L-乳酸代谢途径的研究

付晓芬¹, 江均平^{1,*}, 张杰¹, 龚霄²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094;

2. 西南大学食品学院, 重庆 400715)

摘要: 木糖广泛存在于林业及农业废弃物中, 利用木糖发酵生产 L-乳酸可有效利用再生资源。本文综述了自然界中不同微生物的木糖代谢途径, 分析了木糖代谢途径中关键酶及其作用, 并对木糖发酵 L-乳酸过程中应用的代谢工程进行了介绍。

关键词: 木糖, L-乳酸, 代谢工程

Study on metabolic pathway of L-lactic acid fermentation from xylose by microorganism

FU Xiao-fen¹, JIANG Jun-ping^{1,*}, ZHANG Jie¹, GONG Xiao²

(1. Institute of Agri-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Xylose is widespread in forest and agricultural residues. Xylose can be fermented to L-lactic acid which is an effective exploitation of renewable materials. In this paper, different xylose metabolic pathways of various microorganisms were summarized, based on which the key enzymes and their functions were analyzed. Finally, application and progress of metabolic engineering in fermenting L-lactic acid from xylose were briefly introduced.

Key words: xylose; L-lactic acid; metabolic engineering

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)08-0359-04

乳酸是世界上被公认的三大有机酸之一, 广泛存在于人体、动物体、植物和微生物中。乳酸作为添加剂被大量用于食品工业(如酿酒、糖果、糕点、罐头等), 此外, 还被广泛应用于医药、印刷、印染、制革、烤烟等领域。近年来, 随着环境污染问题日益严重, 探索利用 L-乳酸制造生物降解塑料、绿色包装材料和农用薄膜等, 引起了世界广泛关注。木糖广泛存在于林业及农副产业的木质废弃物中, 研究利用微生物转化木糖生产乳酸, 对物质再生资源的有效利用有着重要意义。目前, 作为工业生产菌株主要有根霉属和细菌中的乳酸菌属^[1]。但是, 随着对细菌发酵生产 L-乳酸优点的认识, 国内外对细菌发酵生产 L-乳酸的研究也越来越多。

1 木糖的代谢途径及其特点

虽然半纤维素的降解比较容易, 但其降解产物戊糖(主要是木糖)发酵产生乳酸则要比纤维素最终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(主要为米根霉), 真菌与细菌的木糖代谢途径不尽相同^[2]。

1.1 丝状真菌及酵母的木糖代谢途径

利用木糖的丝状真菌及酵母的木糖代谢途径, 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)^[2]。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, 丙酮酸再经 L-乳酸脱氢酶以 NADH 为辅酶还原为 L-乳酸。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, 经酵解形成乳酸(图 1)。

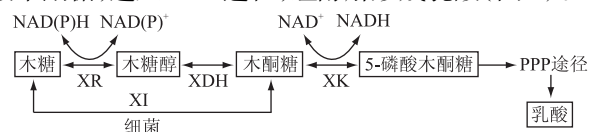


图 1 细菌与酵母菌的木糖代谢差异

收稿日期: 2008-11-12 * 通讯联系人

作者简介: 付晓芬(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程。

1.2 细菌的木糖代谢途径

与真菌(米根霉等丝状真菌及酵母菌)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-磷酸木酮糖进入磷酸转酮酶途径,进一步产生乳酸,见图2。

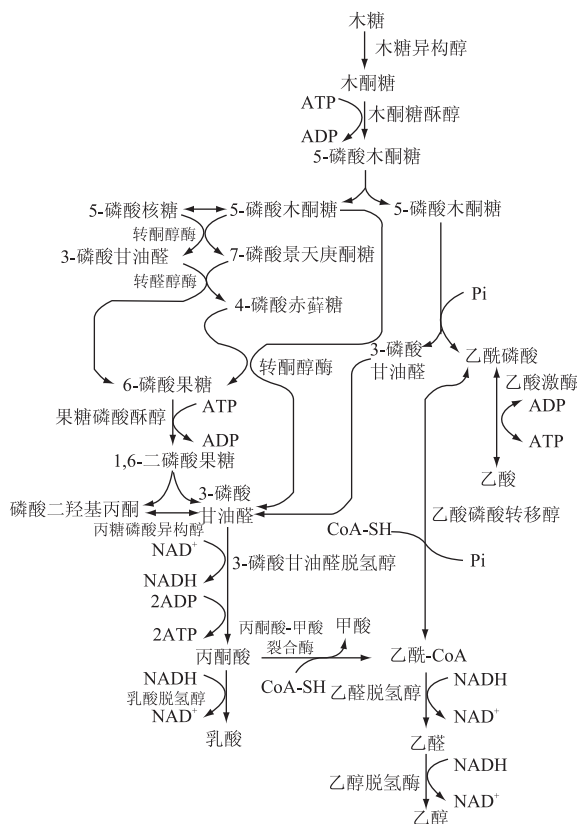


图2 细菌中木糖的代谢途径

通常认为,在乳酸菌中木糖只通过磷酸转酮酶(Phosphoketolase Pathway, PK)途径被代谢,并产生等摩尔的乳酸、二氧化碳和乙醇(或乙酸),其中产物乙醇和乙酸的比例取决于微生物中的氧化还原作用。K.Tanaka 等人^[3]研究发现,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)以D-木糖为唯一碳源生产乳酸时,除了有磷酸转酮酶途径以外,还发现该菌种具有另外一条途径能从木糖生产乳酸,而此途径代谢木糖的产物只有乳酸。根据了解,在*L.lactis* 乳杆菌中,木糖的代谢途径是可变的。当木糖的浓度小于5g/L,木糖在乳酸菌中是通过磷酸转酮酶途径代谢的,这一过程是催化5-磷酸木酮糖裂解为等摩尔体积的3-磷酸甘油醛和乙酰磷酸。因此利用戊糖产生乳酸的产量不会超过1.0mol/mol,而*L.lactis* IO-1(JCM7638)在高浓度D-木糖的条件下乳酸的产量往往高于此理论值。当木糖的浓度大于50g/L时,乳酸的产量大于1.0mol/mol,转酮醇酶和转醛醇酶活性增加,而磷酸转酮酶活性降低,木糖主要经过磷酸戊糖途径(Pentose Phosphate Pathway, PPP)进行代谢,3mol的5-磷酸木酮糖代谢最大产生5mol的3-磷酸甘油醛,结果是L-乳酸的产量增加而其他产物的产量减少。

然而,少量报道表明一些乳杆菌属

(*Lactobacillus*)种,如乳杆菌种 MONT4 几乎专门发酵特定的戊糖而生成乳酸^[4]。乳杆菌种 MONT4 中,戊糖不通过磷酸转酮酶途径异化,而只通过磷酸戊糖途径。但是相比于磷酸转酮酶途径代谢每摩尔戊糖2个ATP,磷酸戊糖途径3摩尔木糖产生5个ATP,这较低的ATP产量是戊糖发酵纯乳酸模式的乳酸细菌相对少的主要原因。

2 木糖乳酸代谢关键酶

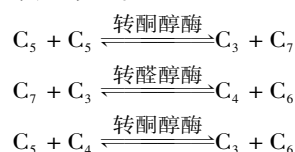
微生物在利用木糖合成L-乳酸的过程中将有多酶参与其中,但其中的几种酶在整个木糖代谢过程中起到了至关重要的作用,而且通过对这些关键酶的监测判断出木糖的代谢途径及影响木糖代谢的因素。

2.1 木糖异构酶

自然界中由木糖转化为木酮糖的代谢途径有两条:其一,木糖经依赖NADPH的木糖还原酶(xylose reductase)还原形成木糖醇,再由依赖NAD⁺的木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase)催化形成木酮糖。其二,木糖在木糖异构酶(xylose isomerase)的作用下直接转化形成木酮糖,而不需要任何辅助因子。同时,代谢途径下游的木酮糖激酶(xylulokinase)催化木酮糖磷酸化形成5-磷酸木酮糖的酶促反应也是木糖代谢的限速步骤之一^[5]。

2.2 转酮醇酶、转醛醇酶

转酮醇酶(Transketolase)和转醛醇酶(Transaldolase)是PPP途径上的关键酶。转酮醇酶和转醛醇酶通过下列3个反应把戊糖途径同糖酵解作用可逆地联系起来^[6]。



转酮醇酶只转移二碳单位,转醛醇酶只转三碳单位。二碳或三碳单位的供体为酮糖,其受体则为醛糖。首先,在转酮醇酶的催化下,一分子5-磷酸木酮糖转移两个碳单位给一分子5-磷酸核糖(在磷酸戊糖异构酶的作用下,由5-磷酸木酮糖转化而来),形成一分子7-磷酸景天庚酮糖和一分子3-磷酸甘油醛,接着在转醛醇酶的作用下,一分子7-磷酸景天庚酮糖转移三个碳单位给一分子3-磷酸甘油醛,形成一分子6-磷酸果糖和一分子4-磷酸赤藓糖,再在转酮醇酶的作用下,另一分子的5-磷酸木酮糖转移两个碳单位给4-磷酸赤藓糖,形成一分子3-磷酸甘油醛和一分子6-磷酸果糖。这样,三分子的5-磷酸木酮糖最终形成了两分子的6-磷酸果糖和一分子的3-磷酸甘油醛。6-磷酸果糖在果糖磷酸激酶的作用下被磷酸化为1,6-二磷酸果糖,然后在醛缩酶的催化下分裂为两分子丙糖磷酸,即二羟基丙酮磷酸和3-磷酸甘油醛,前者在丙糖磷酸异构酶的作用下,可转化为3-磷酸甘油醛。

2.3 磷酸转酮酶

按微生物发酵糖类过程中代谢途径和产物的不同,可将乳酸发酵分为同型乳酸发酵、异型乳酸发酵

和混合酸发酵。异型乳酸发酵菌缺乏 1,6-二磷酸果糖醛缩酶,因而利用磷酸转酮酶途径进行木糖发酵。这一途径的关键酶就是磷酸转酮酶。5-磷酸木酮糖被磷酸转酮酶裂解成 3-磷酸甘油醛(GAP)和乙酰磷酸(acetyl-P)。

2.4 乳酸脱氢酶

乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)以 NADH 为辅酶,能将丙酮酸转化为乳酸,是乳酸菌合成乳酸过程中的关键酶,在产 D, L-乳酸的乳杆菌中存在依赖于 NADH 的 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶,分别催化丙酮酸生成 D-乳酸和 L-乳酸。

李剑等^[7]筛选到一株产 D, L-乳酸的乳杆菌(*Lactobacillus* sp.) MD21,能在 48℃ 含 200g/L 葡萄糖的发酵液中快速生长并生产乳酸,72h 产量可达 140g/L 以上;并且初步分析了乳酸脱氢酶的序列及编码蛋白质的一级结构,对其功能进行了鉴定。

3 木糖代谢工程菌的研究

利用基因工程技术构建和改良菌株,提高它们对木糖的发酵能力在理论上是可行的,并且已经构建出重组菌株,为生物转化制取乳酸奠定了一定的理论基础。

构建高效产 L-乳酸基因重组菌是目前研究的热点,按照重组菌株自身酶系统的不同分为两类:一是改造已有菌种,利用基因工程手段将编码不同的酶基因导入同一发酵菌株内,使其增加新的底物利用能力,构建此类基因重组菌常用的宿主菌种有乳杆菌(*Lactobacillus*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等;二是选取原本不具备发酵能力,但易于基因工程改造,同时具有高蛋白表达量的菌株,导入关键酶的表达基因,使之具备生产 L-乳酸的能力,典型代表是大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[8]。

3.1 乳杆菌(*Lactobacillus*)为宿主的基因工程菌

通过糖分解代谢将糖转化为乳酸是乳酸菌的主要代谢途径^[9],并且乳酸菌由于其基因组很小,遗传背景清楚和代谢途径简单等特点而成为模式菌株。乳酸菌合成乳酸的代谢途径很早就受到了关注,国内外在其关键酶及其代谢途径改造方面开展了大量研究工作。

在产 D, L-乳酸的乳杆菌中存在依赖于 NADH 的 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶,分别催化丙酮酸生成 D-乳酸和 L-乳酸。*Lactobacillus helveticus* CNRZ32^[10]就是一种可以表达 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶的乳酸菌,并且分别产生 D-乳酸和 L-乳酸。用基因替代的方式构建了 2 株菌 GRL86 和 GRL89,其中 GRL86 菌株缺失了 *ldhD* 的启动子区域;GRL89 菌株不仅缺失了 *ldhD* 基因,并且增加了 L-LDH 基因的拷贝。结果发现这 2 个突变株仅能生产 L-乳酸,在产量上与原始菌株相同,L-LDH 的活性分别比原始菌株高出 53% 和 93%。此外,GRL89 的 L-乳酸产量还可以根据实验数据利用响应面法进行优化。

Lactobacillus johnsonii La1^[11]是一种益生菌,生长在牛奶中,将乳糖以 3:2 的比率分别转化为 D-乳酸

和 L-乳酸。将 D-乳酸脱氢酶基因从细胞中分离出来,敲除长度为 8bp 的基因片段使其功能失活,再通过同源重组的方式转入细胞。结果表明,改良后的菌株中 L-乳酸脱氢酶的活性有所降低,但仍然能充分地将丙酮酸转化为 L-乳酸,而次级代谢产物仅有少量增加。乳酸脱氢酶可以有效地控制丙酮酸的代谢流,并产生 NAD⁺,因此代谢途径转向次级代谢产物生成的可能性较小。

3.2 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为宿主的基因工程菌

由于乳酸菌不能在 pH < 4 的环境中生长,而中性环境会降低底物和产物的溶解性。*S.cerevisiae* 被认为是优良的耐酸菌,并可用于工业生产,因此研究人员尝试将改良酵母菌用于低 pH 环境下生产乳酸^[1]。

3.2.1 木糖异构酶基因工程菌的构建 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是传统的乙醇发酵生产菌株,由于没有专一性转化木糖为木酮糖的酶系,不能很好地利用木糖。目前已将自然界中利用木糖的两条途径引入了酿酒酵母,但只有 *Thermus thermophilus*^[12] 及 *Piromyces* sp^[13] 的木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中得到了活性表达。工程菌对木糖利用率并不高,尚不能达到工业生产要求,其中木糖的跨膜运输被认为是工程菌利用木糖的障碍之一。侯进^[14]等利用细胞表面工程(cell surface engineering)将木糖异构酶表达在酿酒酵母细胞表面,在细胞体外将木糖转化成较易运输并可被酿酒酵母直接利用的木酮糖,以绕过木糖运输困难的问题,从而提高酿酒酵母对木糖的利用。

3.2.2 乳酸脱氢酶在 *S.cerevisiae* 中的表达 在 *S.cerevisiae* 中,丙酮酸主要的流向是在丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶的作用下生成乙醇。倘若通过乳酸脱氢酶催化丙酮酸生成乳酸从而改变 NAD⁺ 产生途径,理论上可以替代乙醇发酵^[1]。Porro^[15]等人于 1999 年将牛的乳酸脱氢酶基因转入到 *Kluyveromyces lactis* 酵母细胞中进行表达,以提高乳酸的产量。LDH 基因进入 *K.lactis* 细胞改变其细胞代谢途径,唯一的丙酮酸脱羧酶基因被阻断。改良后的细胞使乳酸合成途径完全代替了乙醇合成途径,从而得到了 109g/L 的乳酸,转化速率为 0.91g/(L·h),每消耗 1mol 葡萄糖生成 1.9mol 乳酸。

3.3 大肠杆菌(*Escherichia coli*)为宿主的基因工程菌

E.coli 是目前基因工程中研究最广泛深入的模式菌株,其发酵底物广泛、所需营养简单,*E.coli* 含有利用木糖的所有必需酶,但发酵产乳酸能力很低,且副产物较多,将携带牛链球菌的 L-乳酸脱氢酶基因的质粒转化进大肠杆菌内构建而成的乳酸生产菌株^[16]。这些菌株携带有两个突变基因:丙酮酸甲酯裂解酶(*pfl*)和乳酸脱氢酶(*ldhA*)。*pfl* 基因突变抑制细胞产生乙酸、乙醇、甲酸等副产物,而 *ldhA* 基因突变抑制细胞产生 D-乳酸。染色体外 *ldh* 基因的表达恢复了突变体发酵生产 L-乳酸的能力,而且在厌

氧条件下这些菌株也能稳定的表达 *ldh* 编码质粒,能够很容易地发酵葡萄糖或木糖。

BS Dien^[17]等人还在上述改造菌株的基础上构建了降解物阻遏突变的乳酸生产菌株。磷酸转移酶系统(Phosphotransferase System, PTS)是一个与葡萄糖阻遏作用有关的多蛋白复合体,当葡萄糖存在的时候,其它的糖被阻止进入细胞,而且相关代谢基因的转录被抑制。降解物阻遏突变体的 IIBC^{Glc} 编码基因(*ptsG*)是断裂的,该基因可以消除 IIA^{Glc} 造成的间接的葡萄糖阻遏作用。这个突变也同样使葡萄糖不能通过 PTS 运输,而是在乳酸透性酶运输系统的作用下进入细胞进行水解和磷酸化。通过对大肠杆菌 PTS 突变体 *ptsG*⁻ 和出发菌株 *ptsG*⁺ 同步利用葡萄糖和木糖的研究,*ptsG*⁺ 菌株 FBR20 发酵了所有的葡萄糖,但只利用了 25% 的木糖,*ptsG*⁻ 菌株 FBR19 利用了所有的葡萄糖和 50%~55% 的木糖。实验除了对糖的消耗和乳酸的产量测定外,活细胞数目以及指示木糖代谢的木糖异构酶 XI 的活性也同样被检测,结果表明,木糖代谢基因在 *ptsG*⁻ 菌株中的高表达才是木糖高效转化成产物的原因。但由于乳酸的毒性或高盐浓度造成的环境压力形成了对木糖利用的抑制作用,导致木糖在 *ptsG*⁻ 菌株中也没有被完全利用。

4 展望

木质纤维素是世界上来源最广泛的可再生物质资源,而木糖的发酵转化与利用是纤维素产业发展的关键。因此,寻找发酵木糖的优良野生菌株、构建高效发酵木糖的基因工程菌成为研究热点。

目前,所获得的重组菌株距离商业化生产仍有相当大差距,生物质水解液中己糖、戊糖同步厌氧乳酸发酵技术仍然未能取得较大突破。因此,加强微生物木糖代谢机理的研究,进一步构建性能更加优良的工程菌,提高其乳酸生产性能,增强菌株在发酵过程中对抑制剂的耐受力,最终降低生产成本,这是将植物纤维原料生物转化生产乳酸技术投入商业化生产的迫切需求。在此基础上继续开展重组菌株的构建和微生物木糖代谢工程的研究,对植物纤维素原料生物转化生产乳酸具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 王海燕,刘 铭,王化军,曹竹安.乳酸生产中的微生物代谢工程[J].过程工程学报,2006,6(3):512~516.
- [2] 鲍晓明,高东,王祖农.木糖代谢工程菌的研究进展[J].生物工程学报,1998,14(7):355~358.
- [3] K Tanaka, A Komiyama, K Sonomoto, A Ishizaki, S J Hall, P F Stanbury. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 160~167.
- [4] Barre P. Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic pentose utilizing *Lactobacillus* from high temperature fermenting grape must[J]. Appl Bacteriol, 1978, 44, 125~129.
- [5] 沈煜,王颖,史文龙,刘向勇,鲍晓明.酿酒酵母工业菌株中 XI 木糖代谢途径的建立[J].中国生物工程杂志,2005,25(9):69~73.
- [6] 郑集,陈钧辉.普通生物化学[M].北京:高等教育出版社,1996:12.
- [7] 李剑,唐赞,梁凤来,等.D-乳酸脱氢酶基因克隆及其表达[J].微生物学报,2004,44(4):491~494.
- [8] 王靖,安明泉.木糖发酵菌种研究进展[J].化学与生物工程,2007,24(11):1~4.
- [9] Kleereb E M, Hugenholtz J. Metabolic Pathway Engineering in Lactic Acid Bacteria[J]. Curr Opin. Biotechnol, 2003, 14(2): 232~237.
- [10] Kyla - Nikkila K, Hujanen M, Leisola M, et al. Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure L- (+) -lactic Acid[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9):3835~3841.
- [11] Lapierre L, Germond J E, Ott A, et al. D - Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhD*) Inactivation and Resulting Metabolic Effects in the *Lactobacillus johnsonii* Strains La1 and N312[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9):4002~4007.
- [12] Walfridsson M, Bao X, Anderlund M, et al. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene which expresses an active xylose (glucose) isomerase[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(12): 4648~4651.
- [13] Marko K, Maurice T, Jasper D, et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. FEMS Yeast Res, 2005(5): 925~934.
- [14] 侯进,沈煜,鲍晓明.木糖异构酶在酿酒酵母表面表达及对木糖代谢影响的初步研究[J].生物加工过程,2006,4(1): 30~34.
- [15] Porro D, Bianchi M M, Brambilla L, et al. Replacement of a Metabolic Pathway for Large-scale Production of Lactic Acid from Engineered Yeasts[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 4211~4215.
- [16] Wyckoff HA, J Chow, TR Whitehead, et al. Cloning, sequence, and expression of the L- (+) lactate dehydrogenase of *Streptococcus bovis*[J]. Curr Microbiol, 1997, 34:367~373.
- [17] BS Dien, NN Nichols, RJ Bothast. Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. Industrial Microbiol [J]. Biotechnol, 2002(29):221~227.