

产乙醇运动发酵单胞菌的研究进展

蔺玉萍¹ 张木清^{1*} 陈柏铨²

(¹ 农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室 福州 350002)

(² 中国科学院广州能源研究所 广州 510070)

摘 要 运动发酵单胞菌作为天然生产乙醇的主要微生物之一,具有特殊的 Entner-Doudoroff 途径和其他一些特殊的糖代谢和能量代谢方式,因此具有乙醇产率高和乙醇耐受力强的显著特点。通过简述运动发酵单胞菌的糖代谢和能量代谢、乙醇和高渗透压等耐性及其遗传改造三方面的研究进展,阐明其应用于燃料乙醇生产的巨大潜力。

关键词 运动发酵单胞菌,乙醇,Entner-Doudoroff 途径

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0472-06

近年来,常规能源如石油、煤炭等日益减少,能源短缺已成为制约人类生存与发展的严重障碍。生物乙醇作为燃料利用的综合效益激发人们对其生产成本和效率进行研究,以期获得高效发酵菌株、低成本底物和最佳发酵条件。

自然界中,包括某些梭菌(*Clostridium* sp.)在内的多种微生物都能代谢产生乙醇,但酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等酵母菌和兼性厌氧细菌运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)则是目前乙醇生产的主要开发对象。与酵母菌相比,*Z. mobilis* 具有以下优点^[1] (1)吸收糖效率高,乙醇产率高 (2)产生物量少 (3)乙醇耐受力强 (4)发酵时无需控制加氧 (5)耐高渗透压 (6)易于基因操作。尽管有这些优良特性,*Z. mobilis* 仍没有取代酵母菌用于大规模乙醇生产,其主要限制因素为 (1)它不能将纤维素、半纤维素和淀粉等复杂的碳水化合物多聚体转化为乙醇 (2)产生副产物,如山梨醇、3-羟基丁酮、甘油、乙醛及乙酸等 (3)产生胞外果聚糖。为了解决这些问题,研究者已对 *Z. mobilis* 进行过大量的遗传改造。例如,从一些微生物中克隆的几种相关水解酶基因已转移到 *Z. mobilis* 中^[2,3],通过传统的变异和筛选方式,也已获得具有优良发酵性能且无副产物产生的突变株。另外, *pef*(Production of ethanol)操作子是由 *Z. mobilis* 中的 *pdh*(丙酮酸羧化酶基因)和 *adhE*(乙醇脱氢酶 II 基因)融合构建而成的,经转移到碳源范围较广的微生物中,产生新的产乙醇工程菌株。早在 20 世纪初,人们已陆续从一些酒精饮料中分离并鉴定 *Z. mobilis*,通过对 *Z. mobilis* 的糖代谢和能量代谢、乙醇和高渗透压等耐性及其遗传改造进行简要的评述,阐明其应用于燃料乙醇生产的巨大潜力。

1 *Z. mobilis* 的糖代谢和能量代谢

1.1 糖的吸收和转运^[4]

Z. mobilis 通过 Entner-Doudoroff 途径(ED 途径)利用葡萄

糖、果糖和蔗糖(并不是所有的菌株都能利用蔗糖)产生乙醇,每代谢 1 分子葡萄糖或果糖仅产生 1 分子的 ATP,产能低,因而采取无需消耗能量的促进扩散(Facilitated transport)方式转运葡萄糖和果糖。葡萄糖转运载体(GLF)经鉴定与真核生物的转运载体以及细菌的同向转运系统有极大的相似性,并且与葡萄糖($K_m=2 \sim 4\text{mmol/L}$)、甘露糖(8mmol/L)、木糖和果糖(40mmol/L)的亲合力逐渐降低。

蔗糖的降解涉及以下 3 种酶:胞外果聚糖蔗糖酶(LEV U,也称为 SAC B,产生果聚糖和葡萄糖)、胞外蔗糖酶(SAC C,也称为 INV B,产生葡萄糖和果糖)和胞内蔗糖酶(SAC A,也称为 INV A)。 *Z. mobilis* ZM4S 是一不能在蔗糖培养基上生长的突变株,它缺少 LEV U 和 SAC C,但仍具有 SAC A。由此可见, SAC A 水解蔗糖的效率极低,当其单独存在时, *Z. mobilis* 则不能利用蔗糖^[5]。LEV U 和 SAC C 具有大量相同的氨基酸残基,其基因在染色体上构成基因簇,这两种基因可能具有相同的起源。这两种蛋白质没有许多其他向外转运的蛋白质所具有的信号肽。经鉴定,发现有两个基因可能参与该特异的蛋白质转运系统,但转运的具体方式还不清楚。

葡萄糖果糖氧化还原酶(GFOR)是 *Z. mobilis* 特有的一种酶, NADP⁺ 为其辅酶,其成熟的酶蛋白位于周质空间。它将葡萄糖转化为葡萄糖酸内酯,而将果糖转化为山梨醇。葡萄糖酸内酯经葡萄糖酸内酯酶(GNL)转化为葡萄糖酸。这两种酶是周质空间的主要组分,约占该空间总蛋白的 20%~30%。

葡萄糖经某一假定的葡萄糖载体进入细胞,具体方式还不清楚,然后完全降解为乙醇和乙醛。但是 *Z. mobilis* 不能以葡萄糖作为唯一碳源,可能是因为 *Z. mobilis* 不能利用该碳源形成 6-磷酸果糖或其他糖异生化合物,从而不能形成细胞壁。因此, GFOR 的主要生理作用在于产生山梨醇(一种兼性溶质,与 *Z. mobilis* 的耐糖性有关)。

基金项目:国家攻关先导项目(2002BA544C)

* 通讯作者。Tel 86-591-83789177, Fax 86-591-83768242, E-mail: zmqing@163.com

作者简介:蔺玉萍(1979-),女,山东莱芜人,硕士研究生,目前从事运动发酵单胞菌改良的研究。E-mail: linyys@163.com

收稿日期:2004-09-21,修回日期:2005-01-10

1.2 Entner-Doudoroff 途径和糖代谢的调控^[4]

Z. mobilis 通过 ED 途径的中间代谢产物与部分的 EMP 途径、PPP 途径和 TCA 循环相连(图 1)。2-酮-3-脱氧-6-葡糖酸(KDPG)经 2-酮-3-脱氧-6-葡糖酸醛缩酶(EDA)转化为丙酮酸和 3-磷酸甘油醛。3-磷酸甘油醛可由 EMP 途径中相应的一系列酶的作用转化为丙酮酸,产生 2 分子 ATP 和 1 分子 NADH。*Z. mobilis* 具有活性较低的转酮酶(TKT)、5-磷酸核糖异构酶和 5-磷酸核糖差向异构酶,可催化 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛转化为 5-磷酸核酮糖和 4-磷酸赤藓糖,为核苷酸、维生素、氨基酸和细胞壁的合成提供碳架,但未检测到 PPP 途径中的转醛酶^[6]。*Z. mobilis* 具有独特的丙酮酸脱氢酶复合体(PDHC),它只在严格厌氧的条件下发挥作用,虽然表现

出的对丙酮酸的亲和力与丙酮酸脱羧酶(PDC)的相似,但仍无法与 PDC 抗衡。*Z. mobilis* 缺乏完整的 TCA 循环,一些酶可将柠檬酸转化为 α -酮戊二酸。TCA 循环的回补反应是由磷酸烯醇式丙酮酸经磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PPC)催化产生草酰乙酸或丙酮酸经苹果酸酶(ME)催化产生苹果酸来完成。

Z. mobilis 具有特异的糖代谢与调控方式。它可将 95% 以上的葡萄糖转化为等摩尔的乙醇和 CO_2 ,而只有约 2% ~ 2.6% 的碳源用于细胞生长。ED 途径的酶占细胞总蛋白的 50%,并且每一个与糖降解有关的基因都是高效表达。因此,对转录物的调控和酶活性调节好象并不是糖代谢调控的主要方式,但多顺反子 mRNA 不同的稳定性似乎在保证不同酶在化学计量上的关系中起关键作用。对碳水化合物吸收

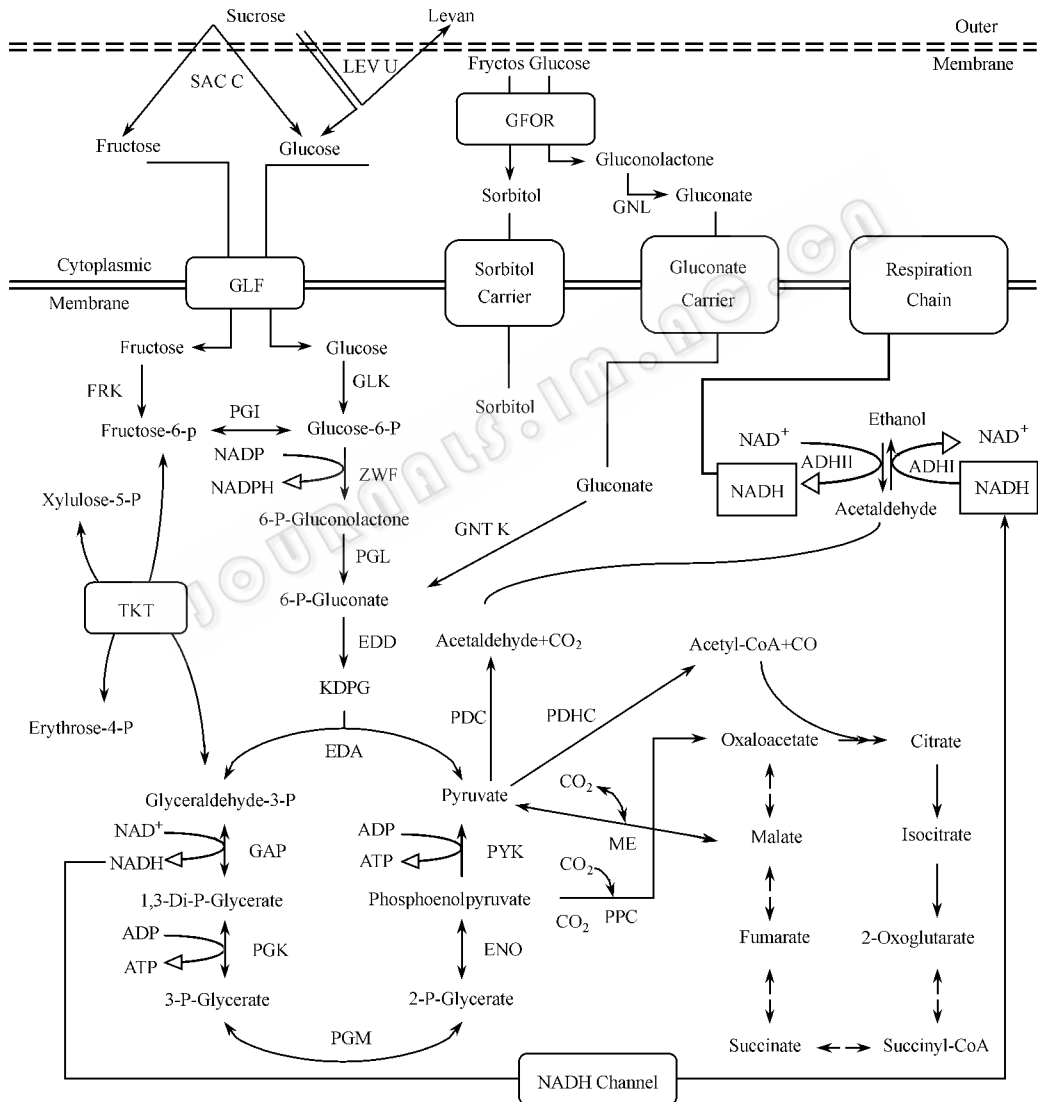


图 1 *Zymomonas mobilis* 的主要代谢途径

Fig. 1 Major metabolic pathways in *Zymomonas mobilis*

Abbreviations (in alphabetical order): ADH, alcohol dehydrogenases I and II; EDA, 2-keto-3-deoxy-gluconate aldolase; EDD, 6-phosphogluconate dehydratase; ENO, enolase; FRK, fructokinase; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFOR, glucose-fructose oxidoreductase; GLF, glucose facilitator; GLK, glucokinase; GNL, gluconolactonase; GNT K, gluconate kinase; KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; LEV U, levansucrase; ME, malic enzyme; PDC, pyruvate decarboxylase; PDHC, pyruvate dehydrogenase complex; PGI, phosphogluconate isomerase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGL, phosphogluconolactonase; PGM, phosphoglyceromutase; PPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PYK, pyruvate kinase; SAC C, extracellular sucrase (INV B, invertase B); TKT, transketolase; ZWF, glucose 6-phosphate dehydrogenase (zisch © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>)

系统 (GLF) 糖激酶——葡萄糖激酶 (GLK) 和果糖激酶 (FRK) 生长于果糖时的磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 以及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (ZWF) 这 4 个可能的调控点进行了检测, 发现糖降解代谢流主要是由 ZWF 活性控制的。可是, GLF 和 GLK 对糖代谢流的控制也有作用。

1.3 能量代谢、呼吸链和副产物的形成

Z. mobilis 的同化作用和异化作用的相关性很微弱, 这使得异化作用所产生的能量只有一小部分用于细胞生长, 而能量产生率也不受能量利用率的影响, 在能量流通中无严格的调控机制, 因而表现出能量非偶联生长。这种现象普遍存在于细菌中, 并伴随着其他一些与生长无关的能量消耗机制。这也正是细菌能大量产生一些小分子物质 (如乙醇、乙醛和乳酸等) 的原因所在。

Z. mobilis 是兼性厌氧微生物。目前, 有关呼吸链组成和电子传递路径的信息还很少。*Z. mobilis* 的呼吸链存在细胞色素 *b_c* 和 *d*, 以及辅酶 Q10。NADH、NADPH、葡萄糖以及抗坏血酸均可作为内侧翻外膜囊泡 (Inside-out (ISO) membrane vesicles) 细胞膜内侧外翻, 形成小囊泡的形式, 以用于研究呼吸链中的电子供体。虽然 Kalnenieks 等^[7] 研究发现 *Z. mobilis* 有一个具有氧化磷酸化活性的呼吸链分支系统。但是在有氧条件下, 生物量并未明显增加, 并且无巴斯德效应, 这在一定程度上可推知氧化磷酸化不起作用, 或者影响程度较小, 或者只是某种程度上在快速生长的细胞中才起作用。另一方面, 已证明在 *Z. mobilis* 无生长的细胞和膜囊泡中存在氧化磷酸化。

产生乙醇的最后一步反应是: 乙醛 + NADH + H⁺ ↔ 乙醇 + NAD⁺, 由乙醇脱氢酶 (ADH) 的两个同工酶 ADH I (即 ADH A) 和 ADH II (ADH B) 催化。ADH I 催化乙醛还原反应。ADH II 氧化乙醇比还原乙醛的速度快, 且其最适 pH 值呈碱性。可能存在一个 NADH 从 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP) 到 ADH 的直接通道, 从而使 ADH 反应倾向于乙醇合成。利用金粉标记抗体进行电子显微镜观察发现 ADH I (而不是 ADH II) 与 GAP 形成超分子复合物, 支持了存在 NADH 通道这一假说。乙醛与乙醇之间氧化还原反应的效应是 NADH 从 ED 糖降解途径穿梭到呼吸链, 从而保证了 NADH 在 ADH 反应和呼吸链间的弹性分配, 而 ADH II 的作用就是氧化乙醇产生乙醛并为呼吸链提供 NADH^[8]。

利用氰化物研究有氧条件下生长的 *Z. mobilis*, 发现氰化物抑制其呼吸作用但能促进其生长^[9], 进一步的研究表明在膜囊泡系统中氰化物抑制 ADH II 的活性。NADH 氧化酶受到更快的抑制但抑制程度较 ADH II 小。整个细胞呼吸作用受抑制的时程类似于 NADH 氧化酶, 但几乎是完全被抑制, 同时细胞内 NADH 浓度升高。在含有 200 μmol/L 氰化物的有氧分批发酵物中检测到抗氰化物的 ADH II 活性, 并伴随着呼吸链的突发。由此可推断与细胞膜相连的呼吸链, 而不是 ADH II, 使得整个细胞对氰化物具有敏感性, 而抗氰化物的 ADH II 是呼吸链在有氰化物存在时所必需的, 是 *Z. mobilis* 对氰化物的适应性反应, 相当于其他细菌中的末端氧

化酶的感应现象^[10]。整个呼吸链的具体的生理功能还需要进一步研究。

NAD(P)H 氧化酶位于 *Z. mobilis* 的细胞膜上, 另外还有过氧化氢酶、超氧化物歧化酶以及过氧化物酶。由于通过呼吸链的电子传递与氧化磷酸化是不偶联的, 产生的 NAD(P)H 可直接被 NAD(P)H 氧化酶消耗掉, 从而使副产物如乙醛、3-羟基丁酮和乙酸累积。在有氧条件下, 乙醛的产生是由于 NADH 氧化酶活力的提高导致由 ADH 催化乙醛还原为乙醇所需的 NADH 的获得量减少而造成的。*Z. mobilis* 没有氧化乙醛形成乙酸的醛氧化酶, 不断提高烯丙醇浓度筛选出 ADH 活性降低的突变株, 其乙醛产生量升高。

2 *Z. mobilis* 的乙醇和高渗透压耐性机理

Z. mobilis 具有耐性强的特性, 这与其特殊的细胞膜组成及组分的变化有密切关系。在 *Z. mobilis* 的细胞膜上, 磷脂主要有磷脂酰乙醇胺, 双磷脂酰甘油, 磷脂酰甘油和卵磷脂 (磷脂酰胆碱) 其中磷脂酰乙醇胺的含量最丰富, 顺-11-十八碳烯酸是最丰富的脂肪酸, 其他的脂肪酸还有豆蔻酸、棕榈酸、十七烷酸^[11] 和 C19 环丙烷脂肪酸^[11]; 另外还存在一类特殊的五环三萜烯类脂——类何伯烷。在无乙醇存在条件下, 类何伯烷占细胞脂质总量的 30% (质量浓度)。当乙醇浓度或生长温度升高时, *Z. mobilis* 细胞膜上磷脂与脂肪酸的各组分相对比例发生变化, 且膜蛋白含量也增加, 以抵消乙醇或温度对膜流动性的不良影响。研究表明^[12], 顺-11-十八碳烯酸和类何伯烷的含量并不随乙醇浓度的升高而明显增加, 但它们在 *Z. mobilis* 中的高水平组成含量是否有利于其耐受高浓度的乙醇还有待进一步确定。

类何伯烷的合成是 *Z. mobilis* 代谢系统的一个重要分支。参与类何伯烷合成的鲨烯何伯烷环化酶 (SHC) 基因已克隆, 并经鉴定其上游序列, 发现 5 个 ORF (开放阅读框), 所编码的蛋白质与其他萜类物质 (类胡萝卜素和类固醇) 合成途径以及糖基转移与修饰作用的一些酶具有相似性, 表明这些蛋白质可能参与类何伯烷和其中间产物以及含糖支链的合成^[13]。葡糖胺和环戊醇半体分别通过糖苷键和醚键与细菌何伯烷呋喃醇 (bacteriohopanetetrol, 类何伯烷的一种) 相连^[14], Vincent 等^[15] 利用氘 (²H) 标记研究发现 N-乙酰-D-葡糖胺是葡糖胺或环戊醇半体的共同前体。

Z. mobilis 能耐受高浓度的糖 (可达 200g/L 葡萄糖), 与之相比, *Z. mobilis* 对盐比较敏感, 在含有 20g/L NaCl 的液体培养基中没有菌株可以生长。当细胞处于高浓度的糖 (包括 *Z. mobilis* 不能代谢的糖) 环境时, 山梨醇可通过某一需能系统 (图 1) 转运到细胞膜内积累高达 1mol/L, 以抵消由外部高渗透压造成的有害效应。有一突变株生长于蔗糖时不产生山梨醇, 研究发现它缺少 GFOR。只有当另外加入山梨醇时, 才能在 1mol/L 蔗糖培养基中生长。然而, 山梨醇不能保护细胞免受盐胁迫, 因为即便加入山梨醇, 它们也不能在 NaCl 浓度高于 20g/L 的培养基上生长。

Swings 和 De Leu^[16] 报道 *Z. mobilis* 可生长的 pH 范围为

3.50~7.50,在 pH3.5 条件下可生长的菌株数为 43%,根据作者进行“pH 对 *Z. mobilis* ATCC29191 乙醇产量及动力学参数的影响”的研究发现,初始 pH 4.5 条件下,发酵 100g/L 葡萄糖,最终乙醇浓度可达 36.7g/L,与最佳 pH6.5 时的 41.8g/L 相差不大,表明 *Z. mobilis* ATCC29191 具有一定的耐酸潜力。通过定向培育和紫外线诱变筛选出一可在 pH3.3 条件生长的菌株,该菌株在初始 pH 为 3.5 条件下,残糖量为 9.8g/L,对照为 11.2g/L,乙醇产量为 36.7g/L,对照则为 32.5g/L。通过菌种改良获得更耐盐、耐乙醇、耐高温等耐性强的菌株,对于提高乙醇产量,降低生产成本也具有重要意义。有关耐酸机理的研究尚无报道。

3 *Z. mobilis* 的遗传工程改造

纤维素、半纤维素和淀粉作为一个巨大的可再生糖类资源库,广泛存在于甜菜、蔗渣和秸秆等农业副产物以及玉米、木薯和甜高粱等农产品中。而野生型 *Z. mobilis* 只能以葡萄糖、果糖和蔗糖作为生产乙醇的底物。为了获得利用这些低成本原料且乙醇产率高的 *Z. mobilis* 菌株,研究者们已将其其他微生物中相关的水解酶基因转移到 *Z. mobilis* 中。表 1 列

出了编码扩大碳源利用范围所需酶基因转移到 *Z. mobilis* 的情况。

外源基因在 *Z. mobilis* 中克隆与表达系统正逐步完善。克隆外源基因的载体可分为 3 类,即广宿主质粒、穿梭载体和改良的广宿主质粒。虽然 *Z. mobilis* 可以作为 RP1、RP4、R68 等广宿主质粒的受体,但这些载体在 *Z. mobilis* 中通常不稳定。研究表明,来源于广宿主质粒 RSF1010 的克隆载体,比来源于 RP4 的质粒拷贝数高且更稳定^[17]。*Z. mobilis* 本身携带的低分子量质粒也可作为 *Z. mobilis* 的克隆载体。它们经与小的 *E. coli* 质粒,如 pACYC184 和 pBR325 融合产生新的穿梭载体。一些已知的 *E. coli* 片段有助于质粒的稳定性^[17]。R 质粒通过接合作用从 *E. coli* 或 *P. aeruginosa* 转移到 *Z. mobilis*。据报道,R 质粒能以高接合率转移到抗生素敏感型突变株 CP4.45 中。除了接合作用外,还可以通过利用原生质体或 CaCl₂ 的方法将质粒 DNA 导入 *Z. mobilis*,但这些方法较为复杂且耗时。Liang 等^[17]通过更简便的电转化法将 pKT230 导入 *Z. mobilis* 中,转化效率达 $(9.0 \pm 1.8) \times 10^3 / \mu\text{g}$ 质粒 DNA。目前的许多质粒 DNA 的转化都是采用此方法。

表 1 外源基因在 *Zymomonas mobilis* 中的表达

Table 1 Heterologous genes expressed in *Zymomonas mobilis*

Substrate	Gene coding	Source	Reference
Starch	α -Amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	19
	Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	20
Cellulose	Endo- β -1,4-gluconase	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	21
	Endo- β -1,4-gluconase	<i>Bacillus subtilis</i>	22
	Endo- β -1,4-gluconase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23
	β -glucosidase	<i>Xanthomonas albilineans</i>	24
	Carboxymethylcellulase	<i>Acetobacter xylinum</i>	25
Raffinose	α -galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	26
Lactose	β -galactosidase	<i>E. coli</i>	26, 27, 28
	Lacpermease	<i>E. coli</i>	27
Xylose	Xyloseisomerase	<i>Xanthomonas campestris</i>	29
	Xylulokinase	<i>X. campestris</i>	29
	Xylosepermease	<i>X. campestris</i>	29
	Xyloseisomerase	<i>E. coli</i>	6
	Xylulokinase	<i>E. coli</i>	6
	Transaldelase	<i>E. coli</i>	6
	Transkelolase	<i>E. coli</i>	6
	Mannose	Phosphomannose isomerase	<i>E. coli</i>
Arabinose	L-arabinose isomerase	<i>E. coli</i>	30
	L-ribulokinase	<i>E. coli</i>	30
	Transaldelase	<i>E. coli</i>	30
	L-ribulose-5-phosphate epimerase	<i>E. coli</i>	30
	Transkelolase	<i>E. coli</i>	30

如何提高外源基因的表达与活性水平是构建高性能 *Z. mobilis* 工程菌的关键。虽然已经建立了包括如上所述的质粒载体在内的许多载体,但是由于野生型 *Z. mobilis* 具有多种抗生素抗性,限制了许多以抗性基因表达作为筛选标记的广宿主质粒作为载体。另一方面,基因整合系统可提高外源基因的表达,但因工程菌株的不稳定性、其强大的修复系统以及相关的基因转移方法效率低等而很难建立。目前, *lacZ*^[31]、*inaZ*(冰核化基因)^[32]和 *gfp*(绿色荧光蛋白基因)^[33]

等用于基因转录和启动子功能分析的报告基因,以及 *Z. mobilis* 中可作为交换或基于同源整合工具的特异的移动因子,如 IS Zm1068(类似于 IS5)^[34]和一些转座子如 Tn5、Tn501 和小 Mu 噬菌体等^[35],均可用于载体的构建,为建立基因整合系统提供了新的手段。

对 *Z. mobilis* 的改造,就整体而言,研究者们试图从代谢工程学的角度,通过遗传改造的一些方法,实现对代谢流的度量与控制,从而提高工程菌的性能。例如,为代谢半纤维

素水解后释放的戊糖,需要将所缺乏的戊糖代谢途径的酶基因导入 *Z. mobilis* (表 1)。ZM4(pZB5) CP4(pZB5) ATCC39676(pZB4L) ATCC39676(pZB186) ATCC39676(pZB301) ATCC31821(pZB5)和 AX101 等便是携带了戊糖代谢途径的 *Z. mobilis* 工程菌株^[2,36]。对 ATCC31821(pZB5)进一步改造产生的 AX101^[37],其基因组整合了代谢木糖和阿拉伯糖所需酶基因,该工程菌株更耐酸,对其发酵稀释的玉米秸秆酸解物的性能的研究表明乙醇产量达 85%(W/W)^[38]。

4 结论

燃料乙醇的应用对新能源开发和环境改善具有潜在的巨大作用。生物乙醇工业有效利用纤维素类物质并从中获利的前景也是乐观的。*Z. mobilis* 作为乙醇产率高的天然微生物,具有巨大的开发潜力。从以上综述可以看出,关于 *Z. mobilis* 的碳源和能量的代谢网络,耐性和遗传改造的研究已经全面展开。随着生物化学和分子生物学研究技术(如¹³C-NMR 和³¹P-NMR、同源基因和异源基因的克隆与表达、基因整合系统等)的不断发展,构建可直接利用纤维素类等农业副产物高效生产乙醇的优良 *Z. mobilis* 工程菌的前景越来越光明。就基础理论研究而言,*Z. mobilis* 所具有的一些特殊的糖代谢和能源代谢方式,如糖吸收(GLF) GFOR、类何伯烷的合成以及 ADH II 介导的 NADH 在糖降解途径与呼吸链间的穿梭,虽然是其代谢的微细环节,但可能与其耐性和能量耗散有密切关系,是改造 *Z. mobilis* 的理论依据。就 *Z. mobilis* 在乙醇生产的应用而言,从代谢工程学的角度出发,通过加入或修饰一些性能,如对乙醇和抑制物的耐性,水解纤维素或半纤维素,耐热性,简化所需营养成分补给和糖转运等,选择性地提高其性能,为实际生产提供更优良的菌株。但这仅仅是乙醇生产工艺中的发酵这一个环节,现阶段,乙醇所带来的能量效应甚至还不能补足乙醇生产过程的能耗。因此,为实现乙醇作为新能源的真正价值,还需要从降低能耗的角度出发,对其生产工艺进行改进。总之,从基因调控的水平上将新加入的代谢途径与原有的代谢途径协调、提高外源基因的表达水平以及相应生产工艺的智能与模式化控制等将是今后研究的重点问题。与国外的研究相比,国内对该菌的研究刚刚起步,国外诸多的研究数据已经为我们提供了很好的依据,*Z. mobilis* 作为优良的产乙醇菌值得我们的关注。

参 考 文 献

- [1] Rogers P L, Lee K J, Skotnicki M L, et al. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv Biochem Eng*, 1982, **23**: 27 - 84.
- [2] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 17 - 34.
- [3] Lee R L, Paul J W, Willem H Z, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(3): 506 - 577.
- [4] Sprenger G A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **145**: 301 - 307.
- [5] Ait-Abdelkader N, De Caro A, Guzzo J, et al. The intracellular sucrose(SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. *Biotechnol Lett* 2000, **22**(6): 461 - 467.
- [6] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, **267**: 240 - 243.
- [7] Kalnieniks U, Galinina N, Bringer-Meyer S, et al. Membrane D-lactate oxidase in *Zymomonas mobilis*: evidence for a branched respiratory chain. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **168**(1): 91 - 97.
- [8] Kalnieniks U, Galinina N, Toma M M, et al. Ethanol cycle in an ethanologenic bacterium. *FEBS Lett*, 2002, **522**: 6 - 8.
- [9] Kalnieniks U, Galinina N, Toma M M, et al. Cyanide inhibits respiration yet stimulates aerobic growth of *Zymomonas mobilis*. *Microbiology-UK*, 2000, **146**(6): 1259 - 1266.
- [10] Kalnieniks U, Toma M M, Galinina N, et al. The paradoxical cyanide-stimulated respiration of *Zymomonas mobilis*: cyanide sensitivity of alcohol dehydrogenase(ADH II). *Microbiology-SGM*, 2003, **149**(7): 1739 - 1744.
- [11] Vega M I, Cuenca M D, Rodriguez E, et al. Identification of heptadecanoic and C19 cyclopropane fatty acids in the lipid fraction of *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology*, 2000, **41**(4): 305 - 306.
- [12] Robert A M, Michael J P, William F F, et al. The effect of ethanol and oxygen on the growth of *Zymomonas mobilis* and the levels of hopanoids and other membrane lipids. *Current Microbiology*, 1997, **35**: 124 - 128.
- [13] Perzl M, Reipen I G, Schmitz S, et al. Cloning of conserved genes from *Zymomonas mobilis* and *Bradyrhizobium japonicum* that function in the biosynthesis of hopanoid lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1393**(1): 108 - 118.
- [14] Chiara J L, de Gracia I S, Bastida A. Synthesis of the aminocyclopentitol moieties of the hopanoids of *Zymomonas mobilis* and *Anacystis montana*. *Chemical Communications*, 2003, **15**: 1874 - 1875.
- [15] Vincent S P, Sinay P, Rohmer M. Composite hopanoid biosynthesis in *Zymomonas mobilis*: N-acetyl-D-glucosamine as precursor for the cyclopentane ring linked to bacteriohopanetetrol. *Chemical Communications*, 2003, **6**: 782 - 783.
- [16] Swings J, De L J. The biology of *Zymomonas mobilis*. *Bacterial Rev*, 1977, **41**: 41 - 46.
- [17] Conway T, Byun M O, Ingram L O. Expression Vector for *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**(2): 235 - 241.
- [18] Liang C C, Lee W C. Characteristics and transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid pKT230 by electroporation. *Bioprocess Engineering*, 1998, **19**(2): 81 - 85.
- [19] Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B, et al. Transfer and expression of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol*, 1990, **153**: 219 - 225.
- [20] Skotnicki M L, Warr R G, Goodman A G, et al. High-productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. *Biochem Soc Symp*, 1983, **48**: 53 - 86.

- [21] Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B, *et al.* Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 893 – 902.
- [22] Yoon K H, Park S H, Pack M Y. Transfer of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase gene into *Zymomonas anaerobia*. *Biotechnol Lett*, 1988, **10**: 213 – 216.
- [23] André L, Douglas E E, Charles C. Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1988, **49**(3): 363 – 366.
- [24] Su P, Liu C Q, Lucas R J, *et al.* Simultaneous expression of genes encoding endoglucanase and β -glucosidase in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**: 979 – 984.
- [25] Okamoto T, Yamano S, Ikeaga H, *et al.* Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**(4): 563 – 568.
- [26] Yanase H, Masuda M, Tamaki T, *et al.* Expression of *Escherichia coli* alpha galactosidase and lactose permease genes in *Zymomonas mobilis* and its raffinose fermentation. *J Ferm Bioeng*, 1990, **70**: 1 – 6.
- [27] Yanase H, Kurii J, Tomomura K. Fermentation of lactose by *Zymomonas mobilis* carrying a Lac⁺ recombinant plasmid. *Journal of Fermentation Technology*, 1988, **66**(4): 409 – 415.
- [28] Lodge J, Fear J, Busby S, *et al.* Broad host range plasmids carrying the *Escherichia coli* lactose and galactose operons. *FEMS Lett*, 1992, **95**: 271 – 276.
- [29] Liu C Q, Goodman A E, Dunn N W. Expression of cloned *Xanthomonas* xylose catabolic genes in *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, 1988, **7**(1): 51 – 70.
- [30] Picataggio S K, Zhang M, Eddy C K, *et al.* Genetically engineered microorganisms ferment pentoses to alcohol. *Trends in Food Science & Technology*, 1997, **8**(7): 249.
- [31] Mackenzie K F, Tyrrell C, Aldrich H C, *et al.* Expression of *Zymomonas mobilis adhB* (encoding alcohol dehydrogenase II) and *adhB-lacZ* operon fusions in recombinant *Z. mobilis*. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 4577 – 4582.
- [32] Drains C, Vartholomatos G, Panopoulos N J. The ice nucleation gene from *Pseudomonas syringae* as sensitive gene reporter for promoter analysis in *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 273 – 277.
- [33] Eugenia D, Anastasia C, Anna I K, *et al.* Use of a green fluorescent protein gene as a reporter in *Zymomonas mobilis* and *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **201**: 221 – 227.
- [34] Galeros M, Pappas K M, Beletsiotis E, *et al.* ISZm1068: an IS-like insertion element from *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol*, 2001, **175**(5): 323 – 333.
- [35] Pappas K M, Galani I, Typas M A. Transposon mutagenesis in *Zymomonas mobilis*. *J Appl Microbiol*, 1997, **82**: 379 – 388.
- [36] Dien B S, Cotta M A, Jeffries T W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **63**: 258 – 266.
- [37] 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. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **98**: 885 – 898.
- [38] Mohagheghi A, Dowe N, Schell D, *et al.* Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(4): 321 – 325.

Research progress of ethanologenic *Zymomonas mobilis*

LIN Yu-ping¹ ZHANG Mu-qing^{1*} CHEN Bai-quan²

(¹ Key Lab of Eco-Physiology and Genetic Improvement for Sugarcane under Ministry of Agriculture, Fujian Agricultural & Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(² Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

Abstract: *Zymomonas mobilis* is one of the natural ethanologenic microbes. With the unique Entner-Doudoroff pathway and some other special pathways of glycolytic and energetic metabolism, *Z. mobilis* has remarkable characters of higher rate of ethanol production and higher tolerance to ethanol. Glycolytic and energetic metabolism, tolerances (e.g., to ethanol, osmotic stress, etc.) and genetic improvements of *Z. mobilis* are reviewed to elucidate the huge potential of *Z. mobilis* in fuel ethanol production.

Key words: *Zymomonas mobilis*, Ethanol, Entner-Doudoroff pathway