

工程微生物发酵褐藻碳水化合物生产乙醇：生物乙醇开发新方向

Fermenting brown algal carbohydrates into ethanol with engineered microorganisms: A new horizon for bioethanol production

杨官品^{1,2}, 李斐斐¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学 海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)04-0088-08
doi: 10.11759/hyxx20130307002

生物质(biomass)是生产生物燃油和日用品的天然可再生资源。用生物质生产燃油和日用品有助于解决粮食、环境、能源等重大问题。遗传育种、生物技术、化学加工、工程技术等领域的技术进步和整合,正在逐步使利用生物质生产燃油和日用品成为可能。其中,最具代表意义的是发酵生物质生产乙醇。攀升的油价和保护化石燃料资源的压力,使人们力图用工程微生物发酵生物质生产生物燃油和日用品,遗传工程修饰和改造工业微生物,规模化开发多样生物质^[1-2]。玉米和甘蔗可做工业用,但“食物-燃油”忧虑(concerns)可能终结这一路径。木质纤维素来源丰富,但处理木质纤维素释放单糖,成本高,环境压力大^[3-5]。因此,需要全新思路和策略开发利用非木质纤维素生物质,海洋大型褐藻是新希望。

褐藻具备生产燃油和日用化学品理想海洋生物质的突出优点:不占用耕地、不使用肥料、不使用淡水。这些都是其他生物质的致命弱点。栽培褐藻可克服有关土地利用的担忧,避免对食物供给的冲击。褐藻已有悠久栽培,用于提取褐藻胶、甘露醇、食用或做动物饲料、肥料和各种多聚物原料。世界上许多国家都栽培褐藻,年产1500万t左右^[6]。褐藻不含木质素,其多糖可通过简单研磨、舂碾等溶解于水,发酵前不需耗能的前处理。有报告称每公顷可年产59t干褐藻生物质,每单位干褐藻生物质产0.254单位乙醇^[6]。按照这样的估计,每公顷可年产19000L乙醇,比甘蔗高约2倍,比玉米高约5倍^[7]。用包括

各种藻(algae)在内的海洋生物质生产乙醇已引起广泛重视^[8]。利用海洋藻类生物质生产乙醇克服了陆生生物质相关的问题,且单位面积产量更高(本文中藻类指那些大规模栽培或可采集大型海藻,如海带等,不含微藻)。

1 遗传工程改良工业酿酒酵母发酵木质纤维素水解物生产乙醇

2008年,全世界生产了约870亿L生物燃油,相当于德国当年消耗量。但这些生物燃油都是用食用碳水化合物如玉米淀粉和甘蔗糖生产的。这引起人们对净能源(net energy)获得、温室气体效应(greenhouse gas effects)、燃油生产-食物、饲料和纤维生产用地竞争、燃油生产-生态系统功能维持用地竞争的担忧。发酵非食用植物组分(木质纤维素)生产乙醇将使人们绕过这些担忧^[7]。

木质纤维素(lignocellulose)由纤维素(cellulose)、半纤维素(hemicelluloses)和木质素(lignin)构成。纤维素是平行排列的多聚纤维二糖(cellobiose)构成的结晶体。半纤维素是由阿拉伯糖(arabinose),乳糖(galactose),葡萄糖(glucose),甘露糖(mannose)和木

收稿日期: 2013-03-07; 修回日期: 2013-08-26

基金项目: 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所开放课题

作者简介: 杨官品(1963-),男,湖北荆州人,教授,博士生导师,主要从事海洋生物方面的研究,电话: 0532-82031636, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

糖(xylose)等构成的分支多糖,还含有乙酸(acetic acid),糖醛酸(glucuronic acid),阿魏酸(ferulic acid)等成分。根据单糖成分,半纤维素可分为木聚糖(xylan),甘露聚糖(mannan),葡聚糖(glucan),糖醛酸木聚糖(glucuronoxylan),阿拉伯聚糖(arabinoxylan)等。纤维素排列较紧密,水解较难;而半纤维素的单糖多样、糖链短、分支、非结晶,水解比纤维素容易。木质素结构和成分发杂,与纤维素和半纤维素结合紧密,水解最难。纤维素多用酶法水解,而半纤维素多用稀酸水解,木质素多用碱水解^[9]。

发酵木质纤维素生产乙醇被认为是纤维素生物乙醇最主要研究内容^[10]。但木质纤维素不能直接发酵成乙醇,必须进行前期处理,降解成纤维二糖、纤维三糖(cellotriose)、纤维四糖(cellotetrose)等混合物构成的纤维糊精(cellodextrin)、木糖、葡萄糖等简单糖后才能发酵成乙醇。来源不同种类植物的木质纤维素水解产物存在区别,但一般含有约70%纤维糊精和葡萄糖和约30%的木糖^[11]。将这些水解产物转换成生物乙醇需要有效利用纤维糊精、木糖和葡萄糖的微生物^[5, 12]。

因缺少木糖同化途径,工业酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)能发酵葡萄糖,但不能发酵木糖。但酿酒酵母经戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)可以将戊糖(pentose)转换成丙酮酸(pyruvate),利用五碳糖。毕赤酵母(新修订名 *Scheffersomyces stipitis*)含木糖还原酶(xylose reductase, XR)和木酮糖脱氢酶(xylitol dehydrogenase, XDH)基因,是自然界已发现的最有效的木糖发酵菌^[13-14],但它不是成熟的工业酵母。如果将毕赤酵母的 XR 和 XDH 基因转入酿酒酵母,就能将木糖导入 PPP 途径,赋予酿酒酵母发酵木糖能力^[15-16]。酿酒酵母存在内源木酮糖激酶(xylulokinase, XK)基因,其过表达或导入毕赤酵母木酮糖激酶基因,都能显著改善酿酒酵母木糖发酵能力^[17-19]。但长期努力获得的工程酿酒酵母达不到毕赤酵母发酵木糖、工程酿酒酵母发酵葡萄糖生产乙醇的产量、发酵效率和乙醇耐受度,不符合工程酿酒酵母标准。XR 更多利用 NADPH 而 XDH 只能利用 NAD⁺, NADPH 与 NADH 因缺少酶难以相互转换。这会导致细胞内氧化还原态不平衡、木酮糖积累、木糖发酵效率低^[20-21]。另外,微生物优先发酵葡萄糖,被消耗完之前抑制其他糖发酵。葡萄糖发酵积累的乙醇,会加剧乙醇耐受度问题。

毕赤酵母(*Pichiapastoris*, 新修订名 *Scheffersomyces stipitis*)不是成熟工业酵母,但能利用木糖合成乙醇。酿酒酵母是成熟的工业酵母,但不能利用木糖。将毕赤酵母木糖代谢基因整合到酿酒酵母染色体上,使酿酒酵母获得利用木糖合成乙醇能力。同时引入正常和突变的木糖还原酶基因,使 NADPH 和 NADH 平衡利用。将来源链孢霉(*Neurospora crassa*)的纤维二糖转运蛋白和β-葡萄糖苷酶基因整合到酿酒酵母染色体上,使酿酒酵母获得细胞内降解纤维二糖生成葡萄糖、代谢纤维二糖和木糖生成乙醇的能力,并克服了酵母优先利用葡萄糖,积累木糖的缺陷,提高了酿酒酵母乙醇耐受度和乙醇发酵效率。木质纤维素经前期处理获得纤维二糖和木糖,利用遗传工程改良酿酒酵母就能发酵木质纤维素生产乙醇(图 1)。但木质纤维素前期处理困难,对环境影响大,木质纤维素目前不是最理想乙醇生产物质。

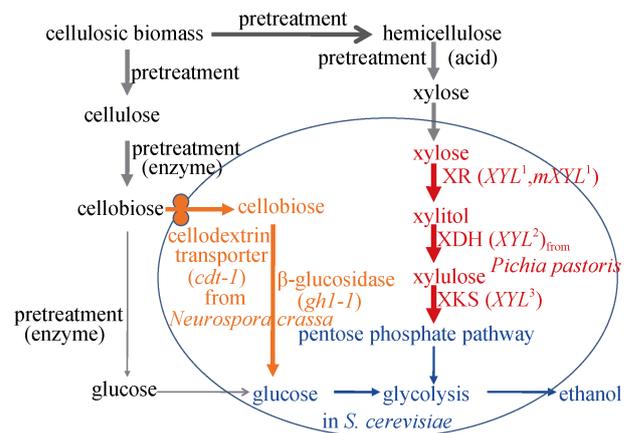


图 1 遗传工程改良酿酒酵母发酵木质纤维素水解物生产乙醇代谢通路

葡萄糖和木糖同步发酵有望克服葡萄糖抑制问题,而纤维二糖和木糖同步发酵能克服葡萄糖抑制问题,同时也能发酵木质纤维素水解产物生产乙醇,因为木质纤维素水解产物主要是纤维糊精(纤维二糖为主)、木糖和葡萄糖(少量),纤维二糖可进一步降解为葡萄糖。但是,实现这一目标,必须首先解决纤维糊精向酿酒酵母细胞内转运的问题。纤维素分解真菌链孢霉(*Neurospora crassa*)具有纤维糊精转运系统和β-葡萄糖苷酶^[22],但不是工业微生物。将链孢霉纤维糊精转运系统(例如, cellodextrin transporter 1)和β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase)基因转入已转入毕赤酵母 XR、XDH 和 XK(将木糖导入戊糖磷酸途径)基因的工程酿酒酵母(存在内源β-葡萄糖苷酶),就能实现葡

葡萄糖和木糖同步发酵、纤维二糖和木糖同步发酵，将木质纤维素水解产物发酵成乙醇。另外，同时转入原始 XR 和突变 XR 基因，以使细胞内氧化还原态平衡，减少木酮糖积累，提高发酵效率。原始 XR 更多利用 DADPH，而突变 XR 更多利用 NADH，这样，细胞内氧化还原态平衡，木糖醇积累减少。另外，在质粒上表达β-葡萄糖苷酶，利用质粒多拷贝特点，控制β-葡萄糖苷酶活性和纤维二糖降解成葡萄糖速度，克服葡萄糖限制，实现葡萄糖和木糖同步发酵。木质纤维素水解产物含有少量葡萄糖。获得的工程酿酒酵母优先利用这些葡萄糖后就转入同步发酵纤维二糖和木糖，获得了发酵木质纤维素水解产物生产乙醇的理想产量和发酵效率^[23]。这是利用工程工业酿酒酵母发酵木质纤维素水解产物生产乙醇最成功的例子。

将自然界木质纤维素利用基因资源导入成熟工业微生物，已取得木质纤维素水解产物发酵生产乙醇的较理想效果，但将木质纤维素转化成生物乙醇，最大的限制是木质纤维素的前期处理。这是目前最大的限制。这种限制不在技术，而在前期处理的经济成本和环境压力。回避了“粮食-燃油”冲突，发酵木质纤维素生产乙醇仍存在成本和环境限制。

2 遗传工程改良非工业细菌发酵褐藻碳水化合物生产乙醇

褐藻碳水化合物有褐藻酸(alginate)、甘露醇(mannitol)和葡聚糖(glucan)。其中，褐藻的葡聚糖又称昆布多糖(laminarin)或就是纤维素。褐藻酸是多聚甘露糖醛酸(mannuronate, M)模块、多聚古洛糖醛酸(guluronate, G)模块、或两者混合模块组成的线性多聚糖醛酸(polyuronic acid)，占干重 20%~40%^[24]。发

酵甘露醇和昆布多糖生产乙醇已有报道^[25-27]。

很多细菌降解、同化利用褐藻酸，但已有工业细菌不能发酵褐藻酸。褐藻酸分解细菌合成褐藻酸裂解酶(alginate lyases, Alys)，经内解聚β消除反应(endolytic β-elimination reaction)解聚褐藻酸，形成寡聚褐藻酸，再经寡聚褐藻酸裂解酶(oligoalginate-lyase, Oal)外解聚，形成不饱和单体并变构成脱氧赤鲜己酮糖醛酸(4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH)，DEH 还原酶(DehR)还原 DEH，形成酮脱氧葡萄糖醛酸(2-keto-3-deoxy-D-gluconate, KDG)，KDG 进入恩-杜氏途径(Netner Doudoroff pathway)，KDG 激酶(KdgK)和 KDG-6-磷酸醛缩酶(KDG-6-P aldolase, KDGPA/Eda)将其代谢成丙酮酸和甘油醛-3-磷酸，同化利用褐藻酸^[28-30]。鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)经褐藻酸结合蛋白(alginate-binding proteins)和 ATP 结合框转运体(ATP binding cassette transporters, ABC transporters)形成的超级通道吸收利用褐藻酸^[31-32]。

鞘氨醇单胞菌具有坑洞结构。褐藻酸结合蛋白和 ATP 结合框转运蛋白组成转运褐藻酸通道。进入细胞后，外褐藻酸裂解酶和内褐藻酸裂解酶分解褐藻酸形成不饱和糖醛酸，自动变构成脱氧赤鲜己酮糖醛酸后，被还原成酮脱氧葡萄糖醛酸，最后经恩-杜氏途径代谢成丙酮酸。用来源运动发酵单胞菌(*Zymomonasmobilis*)的丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶基因和来源鞘氨醇单胞菌的启动子构建重组质粒，并调整基因拷贝数，使鞘氨醇单胞菌平衡表达两个基因，获得代谢丙酮酸生成乙醇的能力(图 2)。但鞘氨醇单胞菌不是成熟工业细菌，遗传操作工具少，遗传工程改良困难，发酵效能难以提高。

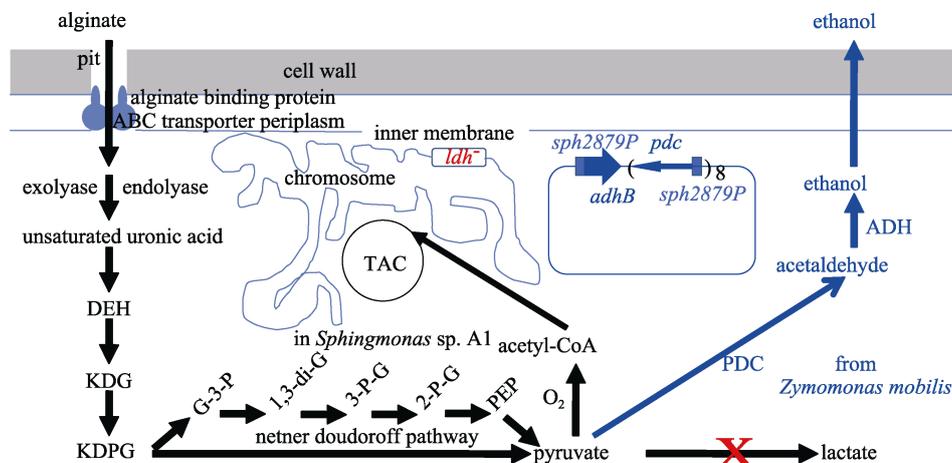


图 2 遗传工程改良鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)发酵褐藻酸生产乙醇代谢途径

能代谢到丙酮酸,就有希望经遗传工程改良合成各种需要的物质,包括乙醇。从丙酮酸开始,只要丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC)和乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ADH)两种酶作用,就能生成乙醇。乳酸是乙醇发酵的主要副产物。只要将乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)基因敲除,就能消除乙醇发酵副产物。运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)能厌氧发酵单糖生产乙醇,其代谢途径简单,代谢副产物少,乙醇产率高,具有工业细菌潜力。将运动发酵单胞菌的 PDC 和 ADH 基因转入鞘氨醇单胞菌,可构建发酵褐藻酸生产乙醇途径。Takeda 等^[33]在质粒载体上表达 ADH 基因和串联的 PDC 基因,构建了发酵褐藻酸生产乙醇的遗传工程修饰鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp. A1)。但是,鞘氨醇单胞菌缺乏常规工业发酵条件适用性,不具备完善遗传操作工具,缺少大肠杆菌遗传操作方便性和工业发酵适用性。这将限制快速遗传操作鞘氨醇单胞菌,优化其发酵性能,减少发酵副产物^[1]。

3 遗传工程改良大肠杆菌发酵褐藻碳水化合物生产乙醇

从基因元件考虑,遗传工程改良成熟工业大肠杆菌发酵褐藻碳水化合物生产乙醇最合理。微生物发酵单位重葡聚糖和甘露醇分别产 0.08 和 0.12 单位重乙醇^[6]。但目前还没有发酵褐藻酸的工业微生物。发酵葡聚糖和甘露醇生产乙醇,也达不到发酵葡萄糖生产乙醇的效率。例如,酿酒酵母发酵糖海带(*Laminaria saccharina*; 现修订为 *Saccharina latissima*)葡聚糖仅产约 0.45% 体积乙醇^[25]。发酵甘露醇生产乙醇还产生过剩还原当量(reducing equivalent),使细胞内氧化还原态失衡。因为甘露醇经甘露醇脱氢酶氧化成果糖后进入恩-杜氏途径,代谢成乙醇。而甘露醇氧化同时也生成 NADH,造成细胞内氧化还原态失衡。只有在微氧环境中,或在转氢酶作用下还原 NADP⁺,使电子分流,才能再生 NAD⁺,克服这一问题,可多数微生物没有转氢酶,因而不能在无氧环境下发酵甘露糖生产乙醇^[26]。微氧环境中,棕榈发酵菌(*Zymobacter palmae*)发酵单位重甘露醇仅产生 0.38 单位重乙醇^[26]。细菌和酵母都能发酵葡聚糖和甘露醇。棕榈发酵菌可同时发酵极北海带(*Laminaria hyperborea*, 现修订为 *Saccharina hyperborea*)葡聚糖和甘露醇,单位体积极北海带葡聚糖和甘露醇产生约 1.6% 单位体积乙醇^[26-27]。如果能实现褐藻酸与葡

聚糖、甘露醇同步发酵,不仅增加了发酵糖总量,实现褐藻全部糖的利用,而且发酵褐藻酸消耗还原当量,可平衡甘露醇发酵导致的细胞内氧化还原态失衡^[34]。

大肠杆菌可代谢甘露醇和葡萄糖。在最成熟工业大肠杆菌中构建发酵褐藻酸生产乙醇的途径,可实现褐藻碳水化合物同步发酵。大肠杆菌已用来发酵生产一系列产物,如乙醇、聚酮化合物(polyketides)、植物天然产物、脂肪酸乙酯、烷烃(alkanes)、丙二醇(propanediol)和丁二醇(butanediol)等^[34]。因此,在大肠杆菌中构建了发酵褐藻酸生产乙醇途径就相当于在大肠杆菌中构建了发酵褐藻碳水化合物生产乙醇途径,也为发酵褐藻碳水化合物生产生物乙醇和其他日用品搭建了基础平台。

构建大肠杆菌发酵褐藻酸生产乙醇途径第一个目标就是胞外分解褐藻酸成为单糖或寡糖的酶系。有很多细菌都能分解褐藻酸,但分解产物多是寡糖而不是单糖。因此,只要将褐藻酸分解成寡糖就算实现了第一个目标。假交替单胞菌 SM0524(*Pseudoalteromonas* sp. SM0524)合成 32kD、能分解褐藻酸多聚 M 或多聚 G 模块、形成二到四聚糖的胞外褐藻酸裂解酶(alginate lyase, Aly)^[35]。大肠杆菌抗原 43 (antigen 43, Ag43)可自主转运到胞外。Ag43 前体有信号肽区域(signal peptide, SP)、 α (乘客)结构域、 β (载体)结构域和结构域间间隔。成熟时, α 、 β 结构域形成聚合体并粘附(无共价结合)在大肠杆菌表面。Ag43 已被开发成细菌抗原和蛋白表面展示系统^[36]。将 Ag43 的信号肽、Aly、部分 α 结构域、 β 结构域组合成融合蛋白, Wargacki et al. (2012)^[34]成功在大肠杆菌中表达了假交替单胞菌 SM0524 的 Aly,并完全分泌到培养基。融合 Aly 可以将褐藻酸降解成 2~5 个糖单体的褐藻酸寡糖(oligoalginate)。

将褐藻酸降解成褐藻酸寡糖,大肠杆菌必须先将其转运到细胞内才能利用。因此,构建大肠杆菌发酵褐藻酸生产乙醇的目标就是转运褐藻酸寡糖。尽管很多细菌都能降解褐藻酸,但仅在鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)发现褐藻酸结合蛋白(alginate-binding proteins)和 ATP 结合框转运体(ATP binding cassette transporters, ABC transporters)形成的超级通道,能将褐藻酸转运到细胞质中^[37]。这是一个庞大的系统,向大肠杆菌引入这一系统非常困难,也从来没有尝试过。但是,菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)果胶寡糖(oligopectin)转运系统简单得多,

只有 ABC 转运体(TogMNAB)蛋白和同向转运体(TogT)^[38]。果胶(pectin)和褐藻酸有相似性,而果胶寡糖转运系统在细菌中广泛存在。因此,在降解褐藻酸的细菌中可能存在相似的转运系统。通过生物信息学搜寻,Wargacki 等^[34]在灿烂弧菌 12B01 (*Vibrio splendidus* 12B01)基因组序列(AAMR00000000)中发现一区域可能编码相似的系统,但用常规方法克隆这一区域比较困难。Wargacki 等^[34]构建了该细菌的 fosmid 文库,经功能筛选获得一约 36 kb 片段,该片段编码褐藻酸寡糖转运和分解的所有蛋白,包括大肠杆菌本身也存在的 KDGK 和 KDGPA 编码基因。逐个删除基因后进行功能验证,最后阐明了该片段编码基因的功能。为了更有效地转运和代谢褐藻酸寡糖,Wargacki 等^[34]搜寻基因组序列,在上述片段两侧发现一些辅助褐藻酸转运和深度降解的基因,扩增后与分离的片段组合在一起,发现褐藻酸代谢效率得到显著提升。最后,Wargacki 等^[34]将褐藻酸裂解酶、转运、分解等基因通过同源重组方式全部整合在大肠杆菌染色体上,使大肠杆菌获得了代谢褐藻酸的能力。

假交替单胞菌 SM0524(*Pseudoalteromonas* sp.

SM0524)来源褐藻酸裂解酶基因与大肠杆菌抗原 43 (antigen 43, Ag43)部分区域(信号肽、部分 α 结构域和 β 结构域)编码序列融合,整合到大肠杆菌染色体中,使大肠杆菌表达并完全分泌褐藻酸裂解酶,使褐藻酸降解成褐藻酸寡糖。将来源灿烂弧菌 12B01(*Vibrio splendidus* 12B01)转运、降解褐藻酸寡糖的操纵子连同其两侧辅助基因整合到大肠杆菌染色体上,使大肠杆菌获得转运和进一步降解褐藻酸寡糖的能力。将来源运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶吉亚尼整合到大肠杆菌染色体上,使褐藻酸降解产物能发酵成乙醇。为减小醋酸等副产物合成,通过同源重组,使大肠杆菌丧失醋酸、丁酸、甲酸等合成能力。组合这些遗传工程改良措施,使成熟的工业发酵大肠杆菌获得发酵褐藻酸生产乙醇的能力(图 3)。因为大肠杆菌本身能发酵甘露醇和葡聚糖,遗传工程改良大肠杆菌能发酵所有褐藻碳水化合物生产乙醇。将甘露醇转化成果糖的甘露醇脱氢酶具有 NAD^+ 利用偏好,会导致洗淘氧化还原太失衡,但引入的褐藻酸转运和降解途径能利用 NADH,使甘露醇发酵效能提高。

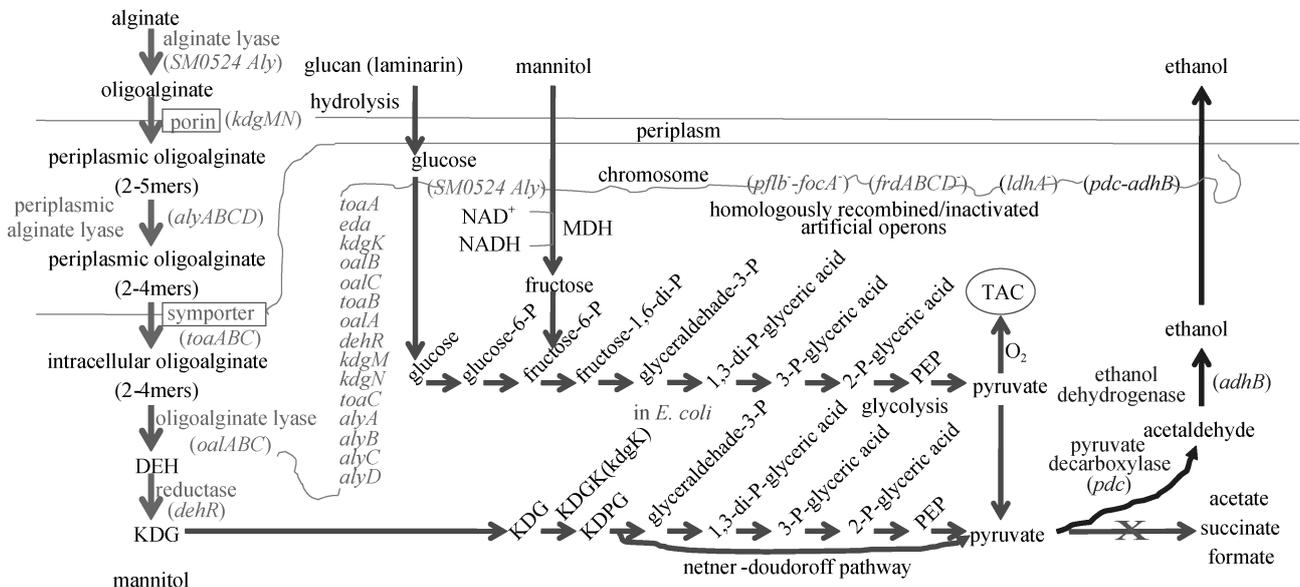


图 3 遗传工程改良大肠杆菌发酵褐藻主要碳水化合物生产乙醇代谢通路

到这里,经遗传工程修饰的成熟的工业大肠杆菌就能在无氧条件下同步发酵褐藻酸、甘露醇和葡聚糖(海带等褐藻全部碳水化合物)生产乙醇。为进一步提高乙醇生产效率,Wargacki 等^[34]又将运动发酵单胞菌(*Zymomonasmobilis*)丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, Pdc)和乙醇脱氢酶 B(alcohol dehy-

drogenase B, AdhB)基因^[39]整合到大肠杆菌染色体上。为减少发酵副产品,如乳酸等,他们失活了大肠杆菌的相关基因。

优化条件下,获得的工程大肠杆菌在 25~30℃ 发酵褐藻模拟糖组分(5 褐藻酸:8 甘露醇:1 葡萄糖)能获得 20 g/L 或 2.4%(V/V)的乙醇产率。当发酵海带

(*Laminaria japonica*, 现调整为 *Saccharina japonica*) 碳水化合物时产生约 4.7%(V/V)乙醇。这一浓度已达到最近报道的用酿酒酵母发酵纤维氨化膨胀(ammonia fiber expansion, AFEX)处理的玉米秸秆木质纤维素获得的乙醇浓度(40 g/L 或 5.1%, V/V)^[40]。这相当于每单位重生物质产约 0.281 单位重乙醇, 或每单位重总糖(褐藻酸、甘露醇、葡聚糖)产约 0.41 单位重乙醇, 达到理论产量的 80%以上。另外, 83%的乙醇是在 48 h 内产生的, 产率是 0.64 g/(L·h)。糖消耗比是 0.5 mol 甘露醇 : 1mol 褐藻酸。大肠杆菌可以代谢甘露醇和葡萄糖, 但褐藻酸同步发酵增加了乙醇浓度。因此, 褐藻酸发酵有助于修复甘露醇发酵导致的氧化还原状态失衡。发酵海带碳水化合物仍有低浓度(2g/L)乳酸积累, 这可能是甲基乙二醛途径(methylglyoxylate pathway)导致的现象^[41]。

4 适应生物乙醇生产的褐藻(主要是海带)育种策略

生物乙醇可整合到现有燃油系统, 添加量可达 10%。如改良发动机, 添加量可高达 85%^[42]。2007 年, 我国海带栽培面积约 400 km², 总产约 80 万 t/hm² (干重), 平均每公顷 20.5t/hm²。褐藻理论产量 59t/hm²^[34]。我国栽培海带每公顷产量只有理论值的 35%, 提高单位面积产量还有巨大空间。种间杂交结合系统选育培育的品种(如 901)产量增加 70%^[43], 商业栽培的杂交海带(如东方 2 号、东方 3 号)单位面积产量提高 50% ~ 60%^[44-45], 单位面积产量只有理论值的一半左右。

大幅度提高单位面积产量将越来越困难, 但大幅提高单位面积光能转化率空间巨大。海带是冷水性藻, 尽管在我国栽培多年, 其栽培海域水温超过其自然群体海域水温, 也形成了次生野生群体(栽培海带在栽培海域形成的群体, 生长势弱), 但我国的海带栽培没有利用夏季高温季节的丰富光能。如果能培育耐高温或喜高温海带, 改变栽培模式, 实现全年、多轮、跨夏季栽培, 单位面积产量肯定会显著提高。另外, 我国采用倒挂式浮绳网栽培模式, 海带最敏感的生长点接近海面, 藻体顶端接受的光能随生长逐步减少。如果能培育耐强光品种, 或耐弱光, 或即耐强光也适应弱光的品种, 单位面积产量也能显著提高。目前, 我国只有辽宁、山东和福建(小部分)近海栽培海带。增加栽培总面积是提高总产量的根本出路。不论是耐高温, 还是耐低温, 不论是抗强

光, 还是耐弱光海带品种, 都能有效增加海带总栽培面积, 延长栽培季节, 提高单位面积光能转化率, 有利于形成褐藻乙醇产业。

过去, 海带遗传改良基本上围绕产量提高和抗逆性, 没有涉及生化组分改良(可比拟作物品质改良)。但一度提出高糖(或富糖, 指葡聚糖)和低(甘露)醇品种培育目标。现在工程大肠杆菌可发酵褐藻全部碳水化合物生产乙醇。适应生物乙醇生产海带生物质只要增加产量、改善抗逆性、增加栽培面积、改变栽培模式就行。实现与养殖动物的协调发展, 结合水质改良和环境修复, 即可获得褐藻生物质, 也可以产生环境效益和生态效益。大幅提高海带总产量也将为就业、农民增收做出显著贡献。

我国有海带栽培面积约 400 km², 略小于胶州湾面积(446 km²)。如果达到理论年产量, 即 59t/hm², 按每单位重褐藻生物质生产 0.254 单位重乙醇计算, 每公顷每年可生产乙醇 1.9 万 L。这样, 一个胶州湾可年产 7.6 亿 L 乙醇, 是 2010 年我国年燃油消耗量(约 90 亿 L)的 1/118。将 5%燃油替换成生物乙醇, 只需要用 6 个胶州湾面积海域栽培海带, 并达到理论产量。这不到我国海域面积(约 300 万 km²)的千分之一。最为关键的是, 栽培海带不需淡水、不需土地、不使用化肥, 对解决当前人口、环境、能源等重大问题具有特殊意义。

5 结语

海带是不可多得的适用生物乙醇生产的生物质。我国是最大规模栽培海带的国家, 也是海带生物学研究和遗传育种强国。尽管在遗传工程修饰成熟工业微生物发酵褐藻碳水化合物生产乙醇方面我国已落后他国, 但我国有丰富的褐藻生物质资源。重视源头技术开发、倡导发酵褐藻碳水化合物生产乙醇, 有望使我国跻身发酵褐藻生物质生产乙醇国家前列。

参考文献:

- [1] Alper H, Stephanopoulos G. Engineering for biofuels: Exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7: 715-723.
- [2] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels[J]. Nature, 2008, 454: 841-845.
- [3] Hellmann F, Verburg P H. Impact assessment of the

- European biofuel directive on land use and biodiversity[J]. *J Environ Manage*, 2010, 91: 1389-1396.
- [4] Melillo J M, Reilly J M, Kicklighter D W, et al. Indirect emissions from biofuels: How important[J]. *Science*, 2009, 326: 1397-1399.
- [5] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315: 801-804.
- [6] Roesijadi G, Jones S B, Snowden-Swan L J, et al. Macroalgae as a biomass feedstock: A preliminary analysis[M]. USA: Pacific Northwest National Laboratory. 2010.
- [7] Somerville C, Youngs H, Taylor C, et al. Feedstocks for lignocellulosic biofuels[J]. *Science*, 2010, 329: 790-792.
- [8] Waltz E. Biotech's green gold[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 15-18.
- [9] Mussatto S I, Teixeira J A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes[M]. Méndez-Vilas A. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Spain: Formatex Research Center. 2010.
- [10] Wyman C E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25: 153-157.
- [11] Carroll A, Somerville C. Cellulosic biofuels[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 165-182.
- [12] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. *Science*, 2006, 311: 484-489.
- [13] Balagurunathan B, Jonnalagadda S, Tan L, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 27-33.
- [14] Jeffries T W, Grigoriev I, Grimwood J, et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 319-326.
- [15] Kötter P, Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 38: 776-783.
- [16] Tantirungkij M, Nakashima N, Seki T, et al. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 75: 83-88.
- [17] Ho N W Y, Chen Z, Brainard A P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 1852-1859.
- [18] Jin Y S, Ni H, Laplaza J M, et al. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylose kinase activity[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 495-503.
- [19] Toivari M H, Aristidou A, Ruohonen L, et al. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylose kinase (XKS1) and oxygen availability[J]. *Metab Eng*, 2001, 3: 236-249.
- [20] Verduyn C, van Kleef R, Frank J, et al. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*[J]. *Biochem J*, 1985, 226: 669-677.
- [21] Rizzi M, Harwart K, Bui-Thanh N A, et al. A kinetic study of the NAD⁺-xylose dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*[J]. *J Ferment Bioeng*, 1989, 67: 25-30.
- [22] Galazka J M, Tian C, Beeson W T, et al. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production [J]. *Science*, 2010, 330: 84-86.
- [23] Ha S J, Galazka J M, Kim S R, et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation[J]. *PANA*, 2011, 108: 504-509.
- [24] Kim H S, Lee C G, Lee E Y. Alginate lyase: structure, property, and application[J]. *Biotechnology and Bio-process Engineering*, 2011, 16: 843-851.
- [25] Adams J M, Gallagher J A, Donnison I S. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments[J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21: 569-574.
- [26] Horn S J, Aasen I M, Østgaard K. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000(a), 24:

- 51-57.
- [27] Horn S J, Aasen I M, Østgaard K. Ethanol production from seaweed extract[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000(b), 25: 249-254.
- [28] Ochiai A, Yamasaki M, Mikami B, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of an exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens* strain C58, a member of polysaccharide lyase family 15[J]. *Acta Cryst F*, 2006, 62: 486-488.
- [29] Preiss J, Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria. II. The enzymatic reduction of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid[J]. *J Biol Chem*, 1962, 237: 317-321.
- [30] Wong T Y, Preston L A, Schiller N L. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 289-340.
- [31] Murata K, Kawai S, Mikami B, et al. Superchannel of bacteria: Biological significance and new horizons[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72: 265-277.
- [32] Takase R, Ochiai A, Mikami B, et al. Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2010, 1804: 1925-1936.
- [33] Takeda H, Yoneyama F, Kawai S, et al. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria[J]. *Energy Environ Sci*, 2011, 4: 2575-2581.
- [34] Wargacki A J, Leonard E, Win M N, et al. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae[J]. *Science*, 2012, 335: 308-313.
- [35] Li J W, Dong S, Song J, et al. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524[J]. *Mar Drugs*, 2011, 9: 109-123.
- [36] Kjærgaard K, Hasman H, Schembri M A, et al. Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184: 4197-4204.
- [37] Hashimoto W, Kawai S, Murata K. Bacterial super-system for alginate import/metabolism and its environmental and bioenergy applications[J]. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1: 97-109.
- [38] Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Reverchon S. Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937 [J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 41: 1125-1132.
- [39] 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.
- [40] Lau M W, Dale B E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST)[J]. *PNAS*, 2009, 106: 1368-1373.
- [41] Yomano L P, York S W, Shanmugam K T, et al. Deletion of methylglyoxal synthase gene (mgsA) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*[J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 1389-1398.
- [42] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83: 1-11.
- [43] Zhang Q, Tang X, Cong Y, et al. Breeding of an elite *Laminaria* variety 90-1 through inter-specific gametophyte crossing[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19: 303-311.
- [44] Li X, Liu J, Cong Y, et al. Breeding and trial cultivation of Dongfang No. 3, a hybrid of *Laminaria* gametophyte clones with a more than intraspecific but less than interspecific relationship[J]. *Aquaculture*, 2008, 280: 76-80.
- [45] Li X, Cong Y, Yang G, et al. Trait evaluation and trial cultivation of Dongfang no.2, the hybrid of a male gametophyte clone of *Laminaria longissima* (Laminariales, Phaeophyta) and a female one of *L. japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19: 139-151.

(本文编辑: 康亦兼)