

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学

## 学位论文

### 玉米秸秆原料生物炼制生产谷氨酸的研究

肖雁秋

指导教师姓名: 胡凤仙 副教授 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2014-04-10 论文答辩日期: 2014-05-20

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席:

评 阅 人:

## 作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

## 玉米秸秆原料生物炼制生产谷氨酸的研究

### 摘要

谷氨酸是一种极为重要的大宗化学品，在多个领域都具有广泛的应用，目前谷氨酸市场逐步扩大，需求逐年上升。谷氨酸生产普遍以粮食性原料如玉米淀粉等进行生产，不仅成本较高，且不符合生态可持续发展的原则。利用来源广泛、价格低廉的木质纤维素原料进行谷氨酸发酵具有较大的发展前景。本文通过对不同的谷氨酸发酵菌种在发酵培养基中谷氨酸发酵性能进行比较，筛选出一株发酵性能较好的菌株 *Corynebacterium glutamicum* SIIM B460，该菌可以在预处理后未经脱毒的玉米秸秆水解液中较好的生长，进一步详细研究了木质纤维素预处理可能产生的抑制物对菌株生长及发酵的影响。选择了木质纤维素预处理及糖化过程中可能产生的十种典型抑制物，包括两种呋喃类衍生物，三种弱酸类物质和五种酚类抑制物，结果表明 *C. glutamicum* SIIM B460 对弱酸类抑制物具有极强的耐受性，在实验浓度范围内甲酸、乙酸、乙酰丙酸对菌株的生长及发酵都没有产生抑制作用；菌株对呋喃类抑制物耐受性也较强，与 5-HMF 相比，菌株对糠醛更为敏感；酚类抑制物中丁香醛、松柏醛、苯酚对菌株的抑制作用较强，香草醛及 4-羟基苯甲醛对菌株的抑制作用则相对较弱。经检测，玉米秸秆中含有生物素，且含量高于谷氨酸发酵所需的生物素亚适量水平，因而该菌株可以在水解液中很好的生长但不能产生谷氨酸。通过添加青霉素诱导，菌株可以利用玉米秸秆水解液发酵生产谷氨酸。在 30 °C，转速 200 rpm，pH 7.0，20% 尿素，添加 200 mg/L 青霉素诱导条件下，利用 15% 未脱毒玉米秸秆水解液进行发酵，经 80h 谷氨酸浓度可达 31 g/L，发酵性能与合成培养基相当。该研究结果为以价格低廉的木质纤维素原料进行谷氨酸发酵生产奠定了一定的基础。

**关键词：**玉米秸秆；谷氨酸；抑制物；*Corynebacterium glutamicum* SIIM B460

## Study on Glutamic Acid Fermentation Using Corn Stover as Raw Material through Biorefinery Technology

### Abstract

Glutamic acid is an important commodity chemical and is widely used in different areas such as food, pharmaceuticals. Currently, the market of glutamic acid is expanded gradually. The production of glutamic acid commonly used food-based raw materials such as corn starch. Not only the cost is high, but also it competes with the food and feed supply. Using the cheap and abundant lignocellulose biomass as the raw materials for glutamic production is a promising choice. In this thesis, several different glutamic acid fermenting strains were screened under different concentrations of corn steep liquor (CSL). *Corynebacterium glutamicum* SIIM B460 showed a better fermentability for glutamic acid production in synthetic fermentation medium and in the undetoxification corn stover hydrolysate. The effect of inhibitors derived from pretreatment operation on cell growth and fermentability of *C. glutamicum* SIIM B460 was investigated. Ten typical inhibitors were selected, including two furan derivatives, three weak acids, and five phenolic compounds. The strain shows a high tolerance to weak acids of acetic acid, formic acid and levulinic acid. The fermentation was slightly inhibited by furfural and 5-hydroxymethylfurfural at a relatively high concentration. Syringaldehyde, coniferyl aldehyde, and phenol were found to be the strong inhibitors for *C. glutamicum* SIIM B460, while 4-hydroxybenzaldehyde and vanillin were relatively weak inhibitors. Because corn stover contains excessive biotin for glutamic acid production, the strain is unable to produce glutamic acid without induction. Under the induction of 200 mg/L penicillin, the strain can produce 31 g/L glutamic acid using 15% solid undetoxification hydrolysate. The yield is similar to that using glutamic acid fermentation medium. This study provided a preliminary but important method for glutamic acid production from lignocellulose biomass with sound economic competitiveness.

**Keywords:** corn stover; glutamic acid; inhibitor; *C. glutamicum* SIIM B460

## 目录

前言 .....	1
第 1 章 文献综述 .....	2
1.1 谷氨酸概述 .....	2
1.2 谷氨酸的应用 .....	2
1.3 微生物发酵生产谷氨酸概述 .....	3
1.3.1 葡萄糖合成谷氨酸的代谢路径 .....	4
1.3.2 谷氨酸棒杆菌分泌谷氨酸的分子机制 .....	5
1.4 谷氨酸生产原料 .....	7
1.4.1 淀粉 .....	8
1.4.2 糖蜜 .....	8
1.4.3 木质纤维素原料 .....	8
1.5 利用木质纤维素原料发酵生产谷氨酸的工艺 .....	10
1.5.1 木质纤维素的预处理 .....	10
1.5.2 对预处理后物料的脱毒 .....	10
1.5.3 木质纤维素原料的糖化与发酵 .....	11
1.6 课题研究的内容与意义 .....	12
第 2 章 材料与方法 .....	13
2.1 实验材料 .....	13
2.1.1 实验试剂 .....	13
2.1.2 实验仪器 .....	14
2.1.3 菌种 .....	14
2.1.4 培养基 .....	15
2.2 培养方法 .....	15
2.2.1 菌种活化 .....	15
2.2.2 种子培养 .....	15
2.2.3 发酵培养 .....	15
2.2.4 菌种保藏 .....	15
2.3 玉米秸秆处理方法 .....	15
2.3.1 玉米秸秆预处理 .....	15
2.3.2 预处理后物料的生物脱毒 .....	16

2.3.3 水解液制作 .....	16
2.4 实验方法 .....	16
2.4.1 菌株的筛选 .....	16
2.4.2 谷氨酸棒杆菌的抑制物耐受性实验 .....	16
2.4.3 利用水解液发酵生产谷氨酸 .....	16
2.5 分析方法 .....	17
2.5.1 玉米秸秆水解液组分及添加抑制物浓度的测定 .....	17
2.5.2 糖浓度及谷氨酸含量的测定 .....	17
2.5.3 菌体量的测定 .....	17
2.5.4 生物素含量的测定 .....	17
第 3 章 结果与讨论 .....	19
3.1 谷氨酸棒杆菌的选育 .....	19
3.2 玉米秸秆水解液中 <i>C. glutamicum</i> SIIM B460 的生长及代谢 .....	21
3.2.1 已脱毒水解液中菌株的生长及代谢 .....	21
3.2.2 未脱毒水解液中菌株的生长及代谢 .....	23
3.3 水解液中生物素的测定 .....	24
3.4 青霉素诱导时水解液中菌株的生长及代谢 .....	25
3.4.1 不同青霉素添加时间时菌株的生长及代谢的影响 .....	25
3.4.2 青霉素诱导下不同培养基中菌株的生长及发酵情况 .....	28
3.5 <i>C. glutamicum</i> SIIM B460 的抑制物耐受性 .....	29
3.5.1 <i>C. glutamicum</i> SIIM B460 对呋喃类抑制物的耐受性 .....	30
3.5.2 <i>C. glutamicum</i> SIIM B460 对弱酸类抑制物的耐受性 .....	32
3.5.3 <i>C. glutamicum</i> SIIM B460 对酚类抑制物的耐受性 .....	36
3.5.4 多种抑制物共同作用下菌株的耐受性 .....	42
第 4 章 结论与展望 .....	44
4.1 结论 .....	44
4.1.1 菌株的筛选 .....	44
4.1.2 <i>Corynebacterium glutamicum</i> SIIM B460 的抑制物耐受性 .....	44
4.1.3 玉米秸秆水解液中谷氨酸的发酵 .....	45
4.2 展望 .....	45
参考文献 .....	46
致谢 .....	52

## 前言

谷氨酸是一种极为重要的大宗化学品，主要用于味精的生产，并可广泛应用于食品、化工、医药等行业。随着对谷氨酸及其衍生产物认识的增加，谷氨酸市场及需求在逐年上升。我国谷氨酸市场占全球份额超过 70%。传统的谷氨酸生产普遍使用玉米淀粉等粮食性原料进行发酵生产，不仅生产成本较高，且随着世界人口的剧增，粮食危机越来越严重，利用粮食原料进行大规模工业生产的局限性越来越大。

木质纤维素原料含量丰富，但并没有得到充分利用，生活中一般采用焚烧填埋等方法，不仅浪费资源，而且污染环境。利用生物质能源进行生物能源及生物炼制方面的研究逐渐成为人们关注的焦点。尽管已经有很多关于利用木质纤维素原料生产生物乙醇、乳酸及微生物油脂等方面的研究，但有关木质纤维素生产氨基酸的研究仍旧较少。因此利用木质纤维素进行谷氨酸的生产不仅能够解决环境问题，而且具有极大的商业价值。

本课题通过对实验室购买菌株的生长及发酵性能进行测定，筛选出一株发酵性能较好的菌株 *C. glutamicum* SIIM B460。该菌对预处理产生的三类抑制物具有较强的耐受性，可以在未经脱毒的玉米秸秆水解液中较好的进行生长。且在添加青霉素诱导下，*C. glutamicum* SIIM B460 可利用 15% 固含量未脱毒玉米秸秆水解液发酵产生 31 g/L 谷氨酸，谷氨酸产量及得率均能达到与合成培养基相当的水平。本研究结果为利用生物质原料进行谷氨酸生产的产业化打下良好的基础，并提供了有力的技术储备。

## 第 1 章 文献综述

### 1.1 谷氨酸概述

谷氨酸是一种非常重要的化学品，最初由德国 H.Ritthause 博士于 1866 年硫酸分解小麦面筋时分离得到<sup>[1]</sup>。谷氨酸是一种酸性氨基酸，在自然界中存在广泛，其中谷类蛋白质和海产品中含量较多。

由于谷氨酸分子内含有不对称的碳原子，因此存在右旋、左旋和外消旋体三种旋光异构体。天然存在于生物有机体中的谷氨酸，都是左旋谷氨酸<sup>[2]</sup>。

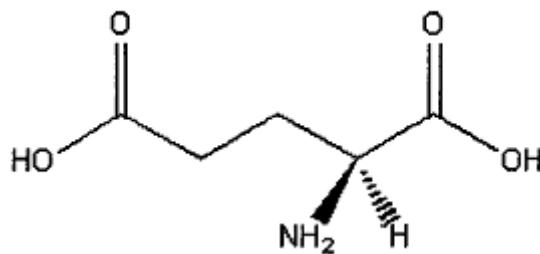


图 1.1 谷氨酸的结构式

Fig. 1.1 Configuration of glutamic acid

谷氨酸，又名麸酸，学名  $\alpha$ -氨基戊二酸，英文名 glutamic acid (GA)，分子式为  $C_5H_9NO_4$ ，分子量 147.13，是一种粉末状或鳞片状晶体，结构式如图 1.1 所示。L-谷氨酸结晶时性状稳定，在 160 ℃ 时加热可发生脱水，180 ℃ 发生消旋化，200 ℃ 升华，于 247-249 ℃ 时分解，20 ℃ 时溶解度 0.72，微溶于水，不溶于丙酮、乙醇等有机溶剂，密度为 1.538 g/cm<sup>3</sup>，等电点 3.22。

### 1.2 谷氨酸的应用

虽然谷氨酸不是人体必需的氨基酸，但作为构成蛋白质的常见氨基酸，谷氨酸可参与生物体中的多种化学反应，在机体代谢中占重要地位，不仅具有一定的营养价值，同时在食品、医药等多种行业具有广泛的应用，也具有较大的工业价值。多年来，谷氨酸都被广泛用作风味增强剂及生产一系列常用化学品<sup>[3]</sup>。当下谷氨酸已经成为世界上销量最大的氨基酸，其年产量已经超过 250 万吨<sup>[4]</sup>。

谷氨酸是味精合成的前体物质，谷氨酸钠是谷氨酸与碱反应生成的。谷氨酸钠作为一种鲜味增强剂，能够增强食品风味，同时经人体消化吸收，可参与机体代谢，有较高的营养价值<sup>[5]</sup>，同时应用于食品行业，还具有保鲜的功能。

谷氨酸可以应用于医药行业，它可作为营养物质，进入生物体的代谢途径。目前谷氨酸在临床治疗中已经作为多种药物得到应用，具有广泛的发展前景。谷氨酸能与血氨反应，形成谷氨酰胺，解除其产生的氨毒害；谷氨酸可以保护肝脏，能够用于肝昏迷的

治疗；由于谷氨酸是脑组织唯一可以氧化的氨基酸，因此可作为脑组织的补药，用于治疗精神衰弱、脑震荡等疾病，维持并改善脑组织机能<sup>[6,7]</sup>。

谷氨酸作为世界上产量最多的氨基酸，在工业中应用也较为广泛。谷氨酸可应用于日化行业，由于谷氨酸能增强血液循环，扩张血管，具有生发及防止脱发的功用，因此可用于制造生发剂<sup>[8]</sup>。谷氨酸还可以作为工业原料用于多种化工产品的生产，如聚谷氨酸和酰基谷氨酸钠等物质。聚谷氨酸可用于制造人造革及环保塑料，用于包装等用途，不仅性能优良，而且安全环保，可自然降解。由谷氨酸制造的表面活性剂，可生物降解，无毒低刺激，广泛用于日化产品的生产<sup>[9]</sup>。

除了上述功能之外，谷氨酸还被广泛应用于农业途径。如谷氨酸可与一些激素结合，用于植物的生长调节；还可用于运载微肥，促进植物的吸收等。

谷氨酸作为一种五碳氨基酸具有作为新型原料生产五碳聚合物的潜力，这种新型原料及其衍生物可以用于构建与顺丁烯二酸酐衍生的石油化工产品衍生物结构相似但功能不同的聚合物，如聚酰胺类和聚酯化合物。随着科技的进步，谷氨酸的应用领域会更加广阔，具有更大的发展前景<sup>[10]</sup>。

### 1.3 微生物发酵生产谷氨酸概述

1907 年，东京大学教授 Ikeda 开始研究海带中鲜味的成分，1908 年他成功分离并纯化出鲜味的基本组成味精<sup>[11]</sup>。1909 年 Ikeda 及一名企业家开始用酸水解谷物蛋白进行工业生产味精。由于这种方法的缺陷，味精产量受到了很大限制。直到二十世纪五十年代才出现更好的味精生产方法，其中一种是化学合成法，主要用于 1962 至 1973 年，利用氰乙烯可以合成谷氨酸晶体。1956 年，日本协和发酵工业公司的研究人员分离出一株微生物，能够分泌大量谷氨酸，这株微生物开始时被命名为谷氨酸微球菌之后被重命名为谷氨酸棒杆菌<sup>[12]</sup>。谷氨酸棒杆菌是一类杆状的革兰氏阳性菌，兼性厌氧。近年来，这种菌作为宿主菌不仅广泛用于氨基酸生产，在一些常用化合物如乳酸，琥珀酸等方面的生产也吸引了广泛关注，同时，它也能应用于分泌性蛋白的生产<sup>[13]</sup>。随着谷氨酸棒杆菌的全基因组 DNA 序列的确定，为了过量生产谷氨酸进行了大量分子改造及代谢工程的研究。随后，又有多种能够生产谷氨酸的菌株被发现并分离出来，如乳酸发酵短杆菌、黄色短杆菌等。随后利用细菌直接利用糖发酵生产谷氨酸的方法开始逐渐发展，并且发酵工艺水平不断提高，如今利用微生物发酵生产谷氨酸已经逐渐成为一项成熟的技术。目前发酵法生产的谷氨酸年产量已达到 200 万吨，并且，未来的谷氨酸需求还在以每年 3-4% 的速率提高，尤其是在发展中国家<sup>[14]</sup>。

我国自上世纪五六十年代开始进行发酵法生产谷氨酸的研究，而且在 1965 年成功利用发酵法工业生产味精，完成了由水解法向发酵法的转变。随后利用发酵法进行谷氨酸生产在全国范围内相继发展，目前我国的谷氨酸生产厂家已全部采取微生物发酵的方法。我国的谷氨酸发酵通常使用玉米淀粉等粮食性原料，糖酸转化率约为 60%<sup>[15]</sup>。

### 1.3.1 葡萄糖合成谷氨酸的代谢路径

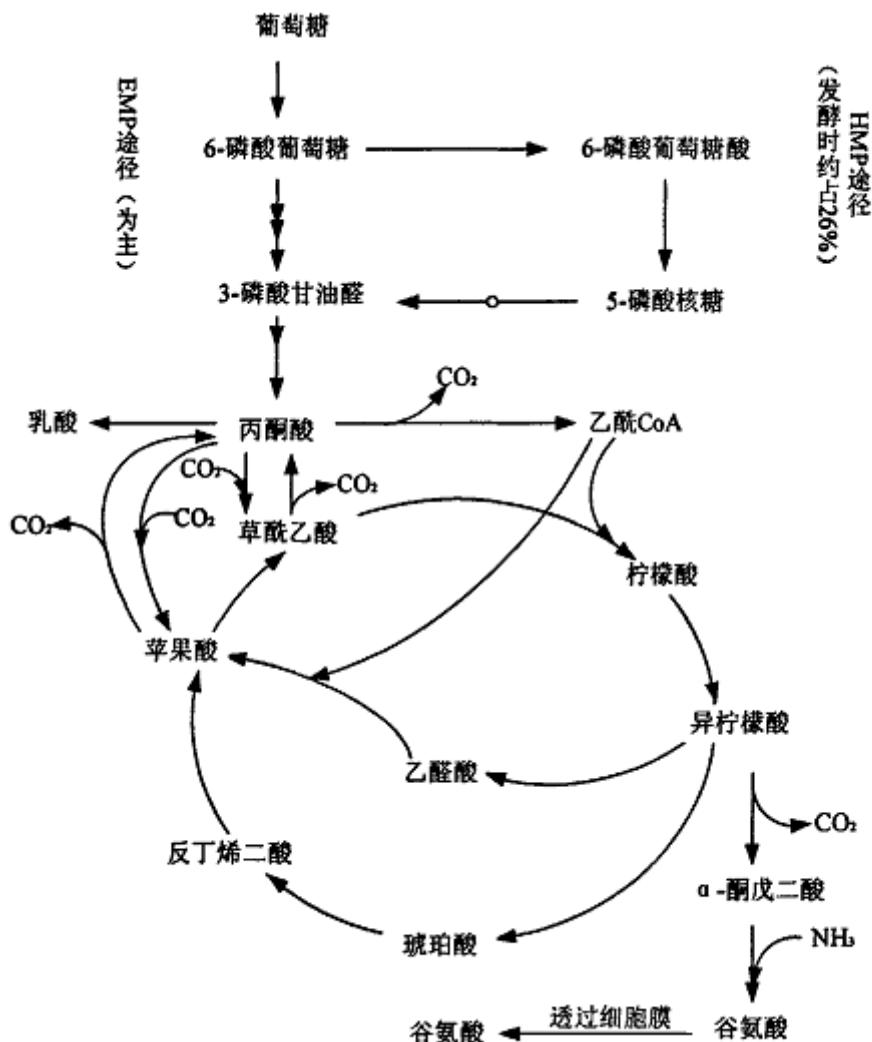


图 1.2 葡萄糖合成谷氨酸的代谢路径

Fig.1.2 Metabolic pathway of glutamic acid synthetic by glucose

图 1.2 为由葡萄糖合成谷氨酸所涉及的主要代谢路径, 包括糖酵解 (EMP 途径)、磷酸戊糖途径 (HMP 途径)、三羧酸循环 (TCA)、CO<sub>2</sub> 固定反应和乙醛酸循环<sup>[16]</sup>。

葡萄糖经 HMP 途径和 EMP 途径转变为丙酮酸并继而进入三羧酸循环 (TCA)，其中 EMP 途径占主要地位，TCA 循环中丙酮酸代谢为  $\alpha$ -酮戊二酸，然后由酶催化  $\alpha$ -酮戊二酸生成谷氨酸<sup>[17]</sup>。

在  $\text{CO}_2$  固定反应中主要涉及草酰乙酸羧化酶及苹果酸合酶, 二者催化  $\text{CO}_2$  固定由丙酮酸生成苹果酸。然后苹果酸经苹果酸脱氢酶催化生成草酰乙酸继而生成柠檬酸。在三碳化合物进入 TCA 循环时, 丙酮酸羧化酶 (PC) 及磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)发挥了重要作用, PEPC 缺陷型菌株可以通过摄取谷氨酸进行生长。谷氨酸合成菌株的酮戊二酸脱氢酶活性较低, 因此由于谷氨酸菌株在 TCA 循环中的缺陷, 乙醛酸循环因此发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。

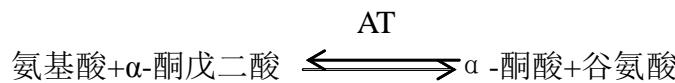
谷氨酸合成主要是通过氨同化实现的，有三条主要的酶反应，一条由谷氨酸脱氢酶

(GDH) 参与, 剩余的由谷氨酸合成酶 (GS) 和氨基转移酶 (AT) 参与<sup>[19]</sup>。

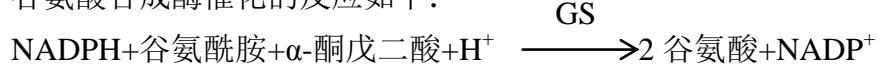
当氮源充足时, 谷氨酸主要由谷氨酸脱氢酶催化产生, 该酶为 NADPH 依赖型。其反应式为:



其他氨基酸则在转氨酶的催化下与  $\alpha$ -酮戊二酸反应生成谷氨酸:



谷氨酸合成酶催化的反应如下:



这三种反应在谷氨酸棒杆菌中同时存在, 但谷氨酸脱氢酶所催化的反应占主导地位<sup>[20]</sup>。

### 1.3.2 谷氨酸棒杆菌分泌谷氨酸的分子机制

尽管有多种菌都可以用于生产谷氨酸, 如 *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter* 等<sup>[21]</sup>, 但有关谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 分泌谷氨酸的研究是最为详细的。在正常的生理状态下, 谷氨酸棒杆菌无法生产谷氨酸<sup>[22]</sup>。谷氨酸分泌的机理普遍是基于谷氨酸的流出可以被多种影响细胞膜的处理方式诱导这一现象的观察。这些处理方式或是通过限制磷脂或其余膜组成的合成, 或是直接影响膜的状态。改变谷氨酸棒杆菌的细胞膜渗透性有以下几种方式: 生物素限量; 添加青霉素; 添加表面活性剂; 以及利用甘油缺陷型或油酸缺陷型菌株以限制磷脂合成<sup>[23-25]</sup>。谷氨酸棒杆菌的细胞壁拥有复杂的结构, 除了众所周知的内磷脂双分子层之外, 细胞膜还有一层由分枝菌酸构成的外脂质层, 并同样组成双层的结构。分枝菌酸是一种非常长的羟化脂肪酸 (在分枝杆菌中可达到 C<sub>90</sub>), 且仅存在于谷氨酸棒杆菌的细胞壁中<sup>[26]</sup>。由磷脂构成并有一些转运蛋白嵌入其中的细胞质膜包围着细胞壁, 且一层阿拉伯半乳聚糖-肽聚糖层则包围着细胞质膜。分枝菌酸通过与阿拉伯半乳聚糖酯化形成除细胞质膜之外的第二层脂质层。因此, 谷氨酸棒杆菌外层包含多种中性多糖 (主要有 D-半乳糖残基及阿拉伯半乳聚糖等)、蛋白质以及脂质<sup>[27,28]</sup>。当运输时, 氨基酸分子需要穿过细胞壁的不同层面, 因而意味着这成为谷氨酸分泌过程中的一个重要的限速步骤。

细胞质膜的磷脂质成分主要是由脂肪酸和甘油组成的, 磷脂的合成可以通过油酸缺陷型和甘油缺陷型菌株进行调节。青霉素可以引起 N-乙酰葡糖胺相关衍生物和磷脂的胞外分泌, 因此改变膜结构, 因此当谷氨酸棒杆菌合成谷氨酸后, 由于细胞膜结构不完整则不能维持大量的氨基酸<sup>[29]</sup>。当菌株培养于生物素充足的菌株中时, 谷氨酸的分泌可以通过添加由聚氧乙烯和饱和脂肪酸构成的表面活性剂实现。这些物质能够引起膜结构中不饱和脂肪酸程度上磷脂水平的降低。如今有研究测试了多种表面活性剂的效率且聚氧乙烯被证明为最能促进谷氨酸分泌的物质<sup>[30]</sup>。

生物素, 又称维生素 H, 即维生素 B<sub>7</sub><sup>[31]</sup>。生物素作为生长因子对生物机体而言是不可缺少的, 是脱氢、羧化和脱羧相关反应酶系的辅因子, 广泛参与机体代谢, 对谷氨酸发酵起重要作用<sup>[32]</sup>。

生物素可以影响糖降解速度<sup>[33]</sup>，当生物素过量时，糖降解速度的提高幅度高于丙酮酸氧化速度的涨幅，促使代谢流向乳酸生成。

生物素可以参与  $\text{CO}_2$  固定反应并影响乙醛酸循环，由于生物素限量时谷氨酸棒杆菌中异柠檬酸裂解酶几乎没有活性，该酶作为乙醛酸循环的关键酶，其失活导致乙醛酸循环关闭，因此促进谷氨酸的合成代谢<sup>[34]</sup>。

生物素对谷氨酸生产最重要的作用是影响谷氨酸棒杆菌细胞膜的渗透性。脂肪酸合成中的一个关键酶是乙酰  $\text{CoA}$  羧化酶，生物素是该酶的辅酶，因此可以影响脂肪酸合成，进而控制磷脂合成<sup>[35]</sup>。在控制生物素不足时，引起磷脂合成减少，致使细胞膜不完整通透性增加，并引起细胞变形，有利于谷氨酸的分泌。

工业生产中生物素主要是通过玉米浆、糖蜜等物质提供的，当培养基中生物素过剩时，谷氨酸棒杆菌无法分泌谷氨酸，只有当生物素限量时，谷氨酸棒杆菌才可以产生大量谷氨酸，因此妨碍了利用一些含生物素原料如糖蜜等进行发酵的发展，为此研究者们进行了大量努力<sup>[36]</sup>。当生物素过剩时，某些处理方法可以诱导谷氨酸棒杆菌中谷氨酸的过量生产，如添加脂肪酸酯表面活性剂如吐温 40、吐温 60；以及添加青霉素等  $\beta$ -内酰胺类抗生素；利用一些缺陷型菌株或添加抗分枝杆菌药物乙胺丁醇等方法<sup>[37]</sup>。这些处理都分别影响脂肪酸合成、肽聚糖合成以及包含分枝菌酸膜结构的合成进而影响谷氨酸棒杆菌细胞表面的结构。

尽管添加诱导物已经成为工业谷氨酸发酵过程中的核心技术，但诱导过量生产谷氨酸的分子机制长久以来一直都不甚明确。最初的假说是 1960 年提出的渗漏模型，该理论认为谷氨酸棒杆菌过量生产谷氨酸是由于细胞表面渗透性的增加促使产物分泌到胞外，解除胞内谷氨酸产生的反馈抑制，致使胞内代谢流向谷氨酸合成路径。但由于该假说不能解释这种仅仅针对谷氨酸的“泄露”且与浓度梯度对立而被推翻。随后的假说提出了谷氨酸生产细胞中存在一种活性转运机制能够把氨基酸运至胞外<sup>[38]</sup>。根据该假说，细胞膜中脂质状态的改变对谷氨酸发酵来说是必须的，但仅通过改变这一状态不能诱导谷氨酸分泌。因此研究的焦点开始关注于涉及脂质合成的基因<sup>[39]</sup>。因此，生物素对谷氨酸分泌的影响直接与其对脂肪酸合成的影响连接起来。

近年来随着 NCgl1221 基因的确定，其产物作为一种可能的谷氨酸运输蛋白，谷氨酸分泌的分子机制获得了重大进展<sup>[40]</sup>。一个有趣的发现是 NCgl1221 基因中仅仅一个特定的点突变就可以致使在不进行诱导处理时分泌谷氨酸。同时，在进行诱导处理时野生型菌株中 NCgl1221 基因的扩增可以促进谷氨酸的分泌，而当其受到破坏时谷氨酸停止分泌，并伴随胞内谷氨酸含量的升高。该基因编码的 NCgl1221 蛋白普遍被认为是一种机制敏感型通道<sup>[41]</sup>，在此基础上，提出了如下假设：生物素限量或添加入青霉素等诱导物时，由于抑制了油脂或肽聚糖等的合成而影响了膜张力，膜张力的改变诱导了 NCgl1221 基因产物构象的改变，而这反过来促使蛋白运输谷氨酸至胞外。

Shigu 和 Terui 1971 年报道了谷氨酸棒杆菌生产谷氨酸时酮戊二酸脱氢酶复合物 ODHC 酶活的改变<sup>[42]</sup>。ODHC 位于 TCA 循环和谷氨酸合成途径的节点处，Kinoshita 提

出谷氨酸棒杆菌生产谷氨酸是由 ODHC 活性调节的<sup>[43]</sup>，随后 Kawahara 及其同事发现在由生物素限量，添加吐温及添加青霉素诱导的谷氨酸过量生产时 ODHC 活性降低，普遍认为 ODHC 活性的降低对谷氨酸生产是必要的<sup>[44]</sup>。因此新模型的确立必须与 ODHC 活性的降低结合起来，所以尽管新模型似乎解释了诱导下谷氨酸分泌的分子机制，但对于解释谷氨酸棒杆菌生产谷氨酸的整个过程仍是不充分的。近来的研究在 ODHC 活性与谷氨酸生产之间建立了一种分子水平上的可能，一种新型的蛋白，OdhI，被认为是 ODHC 的调控子。未磷酸化状态的 OdhI 通过与 ODHC 的一个亚基 OdhA 结合，能够抑制 ODHC 的活性，而这种抑制作用可以被 PknG 催化的 OdhI 的磷酸化阻止，同时能够使 OdhI 去磷酸化的磷酸-丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶也已经被确定<sup>[45]</sup>。即使在诱导条件下，破坏 *odhI* 基因也能阻止谷氨酸的生产，表明在谷氨酸生产过程中，调节蛋白 OdhI 与 ODHC 活性间存在着密切关联。同时值得注意的是，蛋白质组学分析表明，传统上添加青霉素诱导谷氨酸生产的方法会极大的增加 OdhI 蛋白的含量<sup>[46]</sup>。这些结果证实了 ODHC 活性与谷氨酸生产之间联系的存在性，但值得注意的是，仅仅通过代谢调节降低 ODHC 的活性并不足以诱导谷氨酸的生产<sup>[47]</sup>。综合以上结果，目前的证据表明诱导手段如生物素限量，青霉素处理等与谷氨酸生产间存在一种联系，其机制为：诱导处理能够增强未磷酸化状态的调控蛋白 OdhI 的合成，进而抑制 ODHC 的活性，而这引起  $\alpha$ -酮戊二酸节点处代谢流的改变，促使碳代谢流向合成谷氨酸的方向。随后胞内积累的谷氨酸通过 NCgl1221 基因产物，一种可能的受膜张力改变激活的谷氨酸运输蛋白分泌至胞外培养基。而有关诱导处理为何并怎样引起 *odhI* 的过表达，以及 OdhI 磷酸化及去磷酸化所需要的条件还仍在研究过程中。

科学研究并不仅仅致力于探索谷氨酸的生产机制，还致力于对谷氨酸生产过程的优化。除了常用的诱导方法之外，直接流向谷氨酸的代谢流研究也在不断进行<sup>[48]</sup>。Chinen 等 2007 年发表了一种能够增加最大理论得率的新型代谢路径，谷氨酸棒杆菌合成谷氨酸时必须需要丙酮酸脱氢酶参与，该反应同时释放 CO<sub>2</sub>，但通过引入动物双歧杆菌中存在的磷酸转酮酶途径则可以跳过这一反应，通过抑制 CO<sub>2</sub> 的排放来增加谷氨酸产量<sup>[49]</sup>。Liu 等 2008 年报导野生型谷氨酸棒杆菌中利用 tac 启动子表达透明颤菌中编码血红蛋白的基因 *vgb* 能增加摇瓶及发酵罐培养时的谷氨酸产量，也许是由于血红蛋白对呼吸作用的增强<sup>[50]</sup>。

#### 1.4 谷氨酸生产原料

随着人们对谷氨酸功能研究的深入，近年来谷氨酸市场不断扩增，谷氨酸不仅仅作为味精用于调味工业，作为重要的化学中间体，谷氨酸在医药、化工等领域应用的比例也在不断提高。随着市场的扩大，降低生产成本成为提高谷氨酸市场竞争力的有力手段。对于谷氨酸生产成本来说，原料的选择至关重要，尤其是碳源占生产成本的主要部分。谷氨酸棒杆菌可以利用多种碳源进行谷氨酸生产，工业上主采用淀粉及糖蜜为底物。尽管有些研究表明可以利用乙醇、乙酸等其它物质为碳源生产谷氨酸<sup>[43]</sup>，但考虑到这些底

物与糖相比经济成本较高，不适宜于工业生产。

随着世界人口剧增以及粮食危机的加剧，玉米等粮食价格不断上涨，并且伴随着人们对环境问题的关注，谷氨酸发酵后期废水处理及能源消耗的成本也不断加大。为了我国谷氨酸生产的市场竞争力，必须寻求一种更为廉价的原料，发展新的生产工艺，才能在国际市场上获得生存的空间。

而如今鉴于人们环保意识的增强及可持续发展观念的提出，越来越多的目光逐渐开始关注谷氨酸发酵工业对环境的整体影响，如原料的应用及副产物的产生。一种利用秸秆等木质纤维素材料进行化学品生产的生物炼制技术开始吸引更多人的目光。与基于粮食为原料的淀粉类底物相比，木质纤维素原料来源广泛，价格低廉，以其为原料代替传统的粮食性原料进行谷氨酸生产，不仅节约成本，而且属于绿色生态技术，具有较大的发展前景，因此谷氨酸发酵与农业上的生物循环相整合成为坚持环境可持续发展的必要手段。

#### 1.4.1 淀粉

谷氨酸发酵的主要原料是葡萄糖，一般来自淀粉糖化液，可用的淀粉来源很多，如玉米、木薯、马铃薯、小麦等，玉米淀粉最为常用。谷氨酸生产菌一般不能直接利用淀粉，淀粉原料一般需经双酶法糖化为淀粉糖液后才能被谷氨酸棒杆菌利用，其主要成分为葡萄糖，并含少量低聚糖及麦芽糖。

1996 年陶志恒利用木薯粉水解液和葡萄糖母液混合进行谷氨酸发酵，不添加玉米浆时谷氨酸发酵产酸率达 7.75%，与米糖发酵一致，但每吨原料成本节约了 1887 元<sup>[51]</sup>。

2006 年谭平等利用陈粮大米为原料，糖化收率达 95%-98%，发酵转化率为 56%，产酸率达 10.3%，达到新米的谷氨酸发酵水平，但成本仅为新米的 65%<sup>[52]</sup>。

Yao 等 2009 年通过构建可在细胞表面表达  $\alpha$ -淀粉酶的重组型谷氨酸棒杆菌，在生物素限量条件下可直接利用可溶性淀粉发酵产生 19 g/L 谷氨酸<sup>[53]</sup>。

#### 1.4.2 糖蜜

糖蜜是制糖工业中产生的废料，为一种呈半流动态的黑褐色粘稠物质，可作为工业生产的原料。糖蜜主要分为甘蔗糖蜜及甜菜糖蜜等，一般在欧洲、南美及中国南方较为普遍。与葡萄糖相比，糖蜜成分复杂且其组分会随原料产地产生差异。且糖蜜中生物素含量较为丰富，因此发酵过程中需诱导处理否则会抑制谷氨酸的生产。

2007 年王瑶等利用糖蜜及葡萄糖的混合液进行谷氨酸发酵，当糖蜜比例为 30% 时，可产生 142.2 g/L 谷氨酸，达到以葡萄糖进行发酵水平，且成产成本降低 5%<sup>[54]</sup>。

#### 1.4.3 木质纤维素原料

谷氨酸生产会消耗大量的粮食，随着当今世界人口的加剧及日益严重的粮食危机，以粮食为原料进行的化学品生产逐渐受到限制，因此，对于这些化学品生产来说生物质原料可能成为碳源的有利代替物。生物质原料可以通过其来源划分为四类：来源最广的为林业废弃物，主要来自木材工业如造纸厂，锯木厂等；其次为市政固体垃圾；以及农业废弃物和能源作物<sup>[55]</sup>。

在这几种原料物质中，木质纤维素原料是全球生物质能源中含量最为丰富的。全球植物生物质产量中，木质纤维素原料超过 90%，产量高达  $200 \times 10^9$  吨每年，其中约有  $8-20 \times 10^9$  吨为较易利用的初级生物质。作为一种广泛来源于农林业废弃物的廉价碳源，木质纤维素原料目前并没有得到充分利用，当前其循环利用甚至成为生态问题。我国目前主要的生物质原料为农林业残留即木质纤维素原料，如农作物秸秆、木材、草类等。

木质纤维素主要由纤维素（40-50%），半纤维素（25-30%）及木质素（10-20%）构成，这三者占其干重的 90% 以上，其余则为一些蛋白、脂质及灰分等其它成分<sup>[56]</sup>。木质纤维素的组分随物种的变化而改变，如硬木木材和软木木材的组成间存在明显差异，硬木中纤维素和半纤维素含量占 78.8%，软木中则占 70.3%；软木中木质素含量为 29.2%，明显高于硬木中含量 21.7%<sup>[57]</sup>。纤维素是木质纤维素中最主要的成分，是由于  $\beta$ -1,4 糖苷键连接 D-葡萄糖形成的线性聚合物，纤维素分子间通过氢键相连使之成为高度有序的晶体结构，由于其中的糖苷键的方向及氢键的存在致使其很难分解，只有通过糖化即水解作用释放出游离的葡萄糖分子。半纤维素是一种短的，高度分支的己糖和戊糖的聚合物，具体说来，半纤维素含有木糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖等。半纤维素能与纤维素微纤维间形成氢键，因而使之更为稳定。与纤维素相比，半纤维素更易水解，软木中半纤维素主要是由甘露糖构成的，硬木和农业残留中则为木糖。木质素是由苯丙烷类前体合成的芳香族聚合物，其具体成分随来源而变化，一般充当连接及包被的作用，由于它使木质纤维素更难降解因而成为利用木质纤维素原料进行发酵生产的缺陷<sup>[58-60]</sup>。

目前，一些研究者致力于利用可再生能源进行有用化学品包括氨基酸的生产。2004 年美国可再生能源实验室把谷氨酸列为可利用生物质原料进行生产的最具附加值的 30 种化学品之一。为了增强谷氨酸棒杆菌对生物质原料及化学品工业生产过程中产生的副产物及废弃物的利用，使之利用木质纤维素生物质水解产生的戊糖如木糖、阿拉伯糖，人们对谷氨酸棒杆菌进行了一系列工程改造。

2006 年 Kawaguchi 等分别构建了携带 *E.coli* 中 *xylA* 及 *xylB*（分别编码木糖异构酶及木酮糖激酶）的谷氨酸棒杆菌重组菌株，可以在木糖为唯一碳源时进行生长<sup>[61]</sup>。

2008 年 Kawaguchi 等表明一株表达 *E.coli araBAD* 的菌株可以以阿拉伯糖为唯一碳源进行生长<sup>[62]</sup>。

2011 年 Schneider 等成功在乙胺丁醇诱导下利用携带 *E.coli araBAD* 基因的菌株利用阿拉伯糖生产谷氨酸，该谷氨酸棒杆菌可利用 500 mM 阿拉伯糖发酵产生 37 mM 谷氨酸，同等条件下该菌可利用 500 mM 葡萄糖发酵产生 40 mM 谷氨酸<sup>[63]</sup>。

2011 年 Gopinath 等构建了一株能利用戊糖的重组型谷氨酸棒杆菌，可以利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖等混合碳源总浓度为 42 g/L 的稻杆水解液为原料，在乙胺丁醇诱导下经 100 h 发酵生产了 14 g/L 谷氨酸<sup>[64]</sup>。

还有一种策略是构建能够分泌降解碳氢化合物的酶的微生物使之利用生物质原料进行有用化学品的生产。

Tsuchidate 等 2011 年构建了能分泌葡聚糖内切酶的重组谷氨酸棒杆菌，在吐温-40 诱导下可以以 15 g  $\beta$ -葡聚糖为底物，发酵 72 h 产生 178 mg/L 谷氨酸<sup>[65]</sup>。

1996 年 Nampoothiri 等用短杆菌利用蔗渣进行固体发酵生产谷氨酸，当蔗渣含水量在 85-90% 时谷氨酸获得最大得率，为 80 mg/g 干固体<sup>[66]</sup>。

2005 年 Das 等利用棕榈废料水解液进行谷氨酸发酵，在 pH 7.5, 30 °C 下发酵 48 h 最终得到 88 g/L 谷氨酸<sup>[67]</sup>。

2012 年 Tavakkoli 等利用椰枣废弃物进行谷氨酸发酵，并对发酵条件利用响应面法进行优化，最终在接种量 2%，底物浓度 25%，青霉素浓度 1 U/mL，种龄 10 h 时在 500mL 摆瓶中实际发酵产生 39.32 mg/mL 谷氨酸<sup>[68]</sup>。

## 1.5 利用木质纤维素原料发酵生产谷氨酸的工艺

以木质纤维素为原料进行谷氨酸发酵的工艺主要包括预处理、对预处理产生抑制物的脱除、糖化与发酵，以及产物的分离提取几个步骤。

### 1.5.1 木质纤维素的预处理

木质纤维素的稳定性使其成为工业生产的一个主要障碍，为了使之更易被酶解为葡萄糖得以被微生物利用，需要对其进行预处理。通俗的说，预处理是指利用物理、化学或生物的手段脱除木质素，破坏纤维素与半纤维素间的致密结构，得以使酶解效果有所提高。如果预处理强度不够就会影响酶解效果，但若预处理过强，则会产生可能会抑制微生物代谢的有毒性的化合物。

预处理方法一般包括物理法、化学法、物理化学法以及生物法。常用的物理法有高温分解、机械破碎等；化学法如利用酸、碱或有机溶剂进行处理等；物理化学法如氨纤维爆破、蒸汽爆破、热水预处理等；生物法则是利用一些微生物如白腐真菌等对木质纤维素原料进行降解<sup>[58]</sup>。

### 1.5.2 对预处理后物料的脱毒

木质纤维素经预处理后通常会产生一系列可能会影响接下来的糖化及发酵过程的化合物，如图1.3所示。这些抑制物一般分为呋喃类衍生物、弱酸类抑制物及酚类化合物三类。呋喃类抑制物主要包括5-羟甲基糠醛和糠醛，二者分别是由于己糖和戊糖脱水形成的。弱酸类抑制物中最常见的是甲酸、乙酸和乙酰丙酸，甲酸和乙酰丙酸主要是羟甲基糠醛裂解的产物，乙酸则主要是由半纤维素脱乙酰化形成的，甲酸也可以在高温及酸性环境下由糠醛形成。酸水解过程中木质素会分解成多种酚类化合物，由于不同原料中木质素甲基化程度的不同，因此这些酚类化合物的成分及含量随原料而变化<sup>[69]</sup>。这些抑制物的组分及含量随所用木质纤维素及预处理方法的不同而变化。已经有较多研究表明这些降解产物对乙醇发酵具有较大的抑制作用，因此为了取得更好的糖化及发酵效果，一般对预处理后物料进行脱毒。

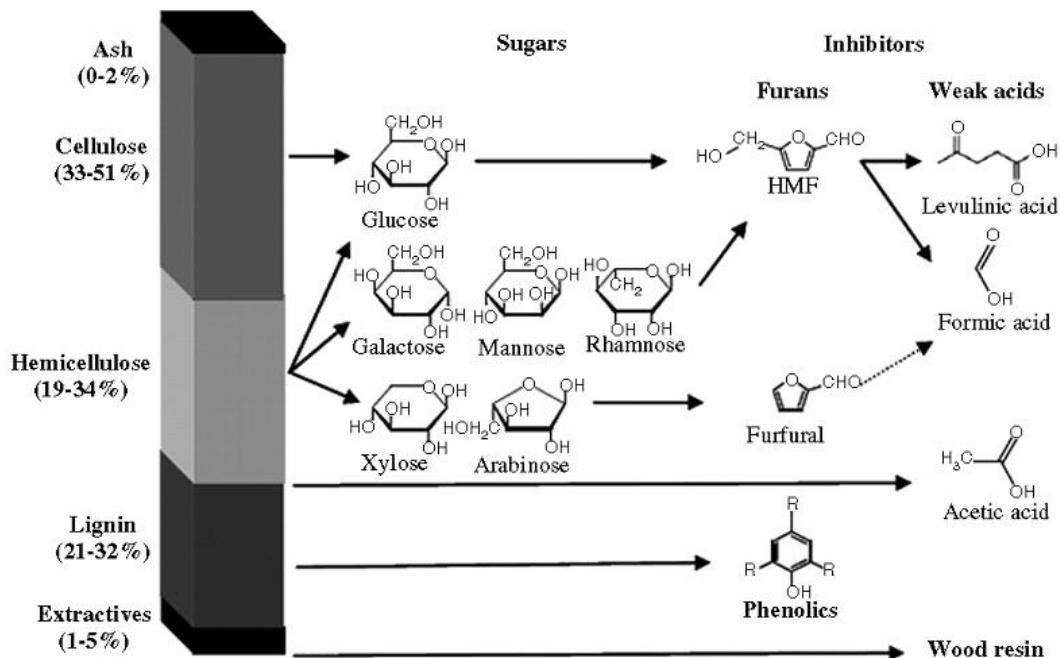


图1.3 木质纤维素的主要组成及主要水解衍生物

Fig.1.3 Average composition of lignocellulosic biomass and main derived hydrolysis products

常用的脱毒方法有很多，如水洗脱毒，真空蒸发，活性炭吸附或离子交换树脂等。但这些方法都有许多缺点，如用水量较大并产生大量废水，损失较多的木质纤维素固体及可发酵糖类，以及不能完全脱毒抑制物等。在这些常用脱毒方法中，最常用是水洗脱毒，在水洗及固液分离过程中，大量的木质纤维素固体损失，因此导致发酵产物的损失，并且大量的用水导致下游废水处理时成本的增加，同时预处理后物料的高含水量导致随后发酵过程中产物浓度的降低并增加分离成本。对一些挥发性抑制物如乙酸、糠醛等，可以通过真空蒸发的方法进行脱除，但此法会导致非挥发型抑制物浓度的增加。利用活性炭吸附或离子交换树脂进行吸附虽然也可以脱除部分抑制物，但成本较高，不适宜用于工业生产。生物脱毒是解决上述问题的一个有效选择，生物脱毒是指利用能够分泌过氧化物酶或漆酶的微生物对具有毒性的抑制物进行降解。生物脱毒具有较多的优点，如不损失纤维素固体，极大的降低水用量等，不过目前的生物脱毒方法一般仅适用于水解液体系，此时抑制物已经抑制了纤维素酶对纤维素的水解作用，且抑制物浓度被稀释，降低了降解速度，同时水解液中高浓度的还原糖也可能被消耗。较低的降解速度极大的限制了生物脱毒在实际生产中的应用。2010年Zhang等人利用一株从预处理后木质纤维素原料中分离出的特殊真菌*Amorphotheca resinae* ZN1，可以在预处理后玉米秸秆中以抑制物为唯一碳源快速生长且保持木质纤维素组分的完整<sup>[70]</sup>。

### 1.5.3 木质纤维素原料的糖化与发酵

预处理之后需要经过水解使木质纤维素原料中的聚合物转化为可被发酵利用的单糖。酸水解和酶水解是两种常用的水解方式，酸水解主要有稀酸水解和浓酸水解两种形式<sup>[71]</sup>。稀酸水解需要高温来破坏纤维素晶体结构，可能会形成高浓度的影响发酵的抑制

物，而浓酸水解则需要消耗大量酸液，不利于节约成本。与酸水解相比，利用纤维素酶进行水解能够选择性的把纤维素单一转化为葡萄糖，排除了其他副产物的干扰，而且由于酶水解是在一种较为温和的条件下 pH 4.8, 45-50 °C 左右进行，因此酶水解的成本也相对较低。酶水解不仅转化率较高，而且是一种环境友好型方法，因此得到了越来越多的应用及关注。由于谷氨酸发酵一般在 pH 7.0, 30-37 °C 左右进行，发酵条件和糖化条件不统一，因此需采用分步糖化发酵。其具体操作方法为：先对预处理后木质纤维素原料进行糖化，糖化后对糖化液进行离心，离心后取上清液进行发酵。

## 1.6 课题研究的内容与意义

谷氨酸作为世界上需求量最大的氨基酸，在多个领域都有着广泛的用途，其作为一种五碳氨基酸同时具有作为新型原料生产五碳聚合物的潜力，这种新型原料及其衍生物可以用于构建与顺丁烯二酸酐衍生的石油化工产品衍生物结构相似但功能不同的聚合物，如聚酯类及聚酰胺类化合物。然而工业生产谷氨酸的原料多为玉米淀粉等粮食性原料，不仅价格较高，而且随着世界人口加剧，粮食危机越来越严重，谷氨酸的生产成本不断增加。为了满足世界上日益增长的谷氨酸需求，提高我国谷氨酸市场的竞争力，必须降低谷氨酸发酵成本。因此，利用来源广泛价格低廉的木质纤维素原料进行谷氨酸发酵生产具有很大的前景及应用价值。目前已经有很多利用木质纤维素进行乙醇发酵及乳酸等化学品发酵的研究，但有关利用生物质原料生产谷氨酸的研究依然较少。尽管有许多研究者从代谢路径、分子机制等方面为利用木质纤维素原料发酵生产谷氨酸做出了努力，但没有研究展示利用木质纤维素工业化生产谷氨酸的潜在模式。

玉米秸秆作为一种常见的农业残留，广泛存在于我国各地，目前，我国玉米秸秆年产量已超过 2 亿吨<sup>[72]</sup>。但是，这些丰富的生物质原料，并没有得到充分的利用，而多是以焚烧的方式被解决。这种处理手段不仅不利于环境，并且导致了资源的极大浪费，如能以玉米秸秆为原料代替玉米等粮食原料进行谷氨酸这种用途广泛的大宗化学品生产，具有巨大的现实意义。

由于木质纤维素预处理过程中会产生多种衍生物，可能影响糖化过程并对微生物的发酵产生抑制作用，因此一般需进行脱毒处理，但脱毒过程效率较低，耗时较长，不利于工业生产，因而选用抑制物耐受性较高的菌株进行发酵生产可以从根本上解决抑制物对糖化及发酵的影响。

本文首先探索了合成培养基中进行谷氨酸生产的适宜条件，筛选出发酵性能较好的菌株。然后针对预处理过程可能产生的主要抑制物对菌株生长及发酵的影响进行研究。利用未经脱毒的玉米秸秆水解液成功发酵谷氨酸，且获得较高得率。这些工作对于利用木质纤维素生物炼制生产谷氨酸的工业化生产具有积极的意义。

## 第2章 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验试剂

研究过程中使用的主要试剂见表 2.1

表 2.1 实验试剂与材料

Table 2.1 Experimental reagent

试剂名称	规格	生产厂家
Glucose • H <sub>2</sub> O	AR	国药集团化学试剂有限公司
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
NaCl	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
琼脂	AR	北京普博欣生物科技有限公司
酵母提取物	AR	安琪酵母股份有限公司
蛋白胨	BR	上海化学试剂采购供应站中心化工厂
氢氧化钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
盐酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
MgSO <sub>4</sub>	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
MnSO <sub>4</sub>	AR	国药集团化学试剂有限公司
FeSO <sub>4</sub>	AR	国药集团化学试剂有限公司
尿素	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
玉米浆	BR	山东龙力生物科技股份有限公司
甘油	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
乙酰丙酸	AR	美国 Johnson Matthey
糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
香草醛	AR	阿拉丁试剂有限公司
丁香醛	AR	生工生物工程有限公司
四羟基苯甲醛	AR	生工生物工程有限公司
苯酚	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
松柏醛	AR	阿拉丁试剂有限公司
青霉素	AR	北京普博欣生物科技有限公司

---

纤维素酶	上海尤特尔生化有限公司
VitaFast Vitamin B7 试剂盒	德国拜发公司
玉米秸秆	河南郸城

---

### 2.1.2 实验仪器

研究过程中使用的主要仪器见表 2.2

表2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipments

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	BS223S	梅特勒有限公司
自动高温灭菌锅	YXQ-1S-75SII	上海博讯实业有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
大型气浴摇床	HZ-9310KB	太仓华利达实验设备有限公司
台式离心机	5418	Eppendorf
核酸蛋白分析仪	DU-800	Beckman
漩涡振荡器	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
生物传感自动分析仪	SBA-40D	山东省科学院生物研究所
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
超纯水纯化系统	Milli-QSynthesis	Millipore
高效液相色谱	LC-20AT	岛津
移液器	Research	Eppendorf
大型高速冷冻离心机	J-26	Beckman
pH 计	PHS-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
超声波清洗机	SB-5200D	宁波新芝生物科技有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo
5L 反应器	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司

### 2.1.3 菌种

*Corynebacterium glutamicum* SIIM B460(源自 *C. glutamicum* 9114)、*Corynebacterium glutamicum* SIIM B226(源自 *C. glutamicum* T<sub>6-13</sub>)、*Corynebacterium glutamicum* SIIM B457(源自 *C. glutamicum* FM-415)、*Corynebacterium glutamicum* SIIM B463(源自 *C. glutamicum* T<sub>6-13</sub>)、*Corynebacterium pekinense* SIIM B3(源自 *C. pekinense* 1.299)购于上海市工业微生物研究所菌种保藏中心(SIIM); *Corynebacterium glutamicum* CICC 20159 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。

### 2.1.4 培养基

活化培养基：酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 5 g/L，琼脂 17 g/L。氢氧化钠调节至 pH 7.0，115 °C 灭菌 20 min。

预培养培养基：葡萄糖 25 g/L，玉米浆 25 g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L，MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L，尿素 2.5 g/L，FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L，MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。氢氧化钠调节至 pH 7.0，115 °C 灭菌 20 min。

种子培养基：葡萄糖 25 g/L，玉米浆 5 g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L，MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L，尿素 2.5 g/L，FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L，MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。氢氧化钠调节至 pH 7.0，115 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基：葡萄糖 60 g/L，玉米浆 0.5 g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L，MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L，尿素 3 g/L，FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L，MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。氢氧化钠调节至 pH 7.0，115 °C 灭菌 20 min。

上述培养基中 FeSO<sub>4</sub>，MnSO<sub>4</sub> 极易氧化，需制成母液，浓度为 200 mg/L，经 0.22 μm 无菌滤膜过滤，MgSO<sub>4</sub> 配制为 120 g/L 母液，玉米浆配制为 300 g/L 母液，115 °C 灭菌 20 min。

玉米秸秆水解液：15% 固含量，15 FPU 玉米秸秆水解液，10000 rpm 离心 10 min，115 °C 灭菌 20 min，过滤，氢氧化钠调节至 pH 7.0

## 2.2 培养方法

### 2.2.1 菌种活化

取甘油管菌种接种至活化培养基上，于 30 °C 下培养 24 h。

### 2.2.2 种子培养

用竹签从活化培养基上挑取单菌落转接入装有 30 mL 预培养培养基的 250 mL 摆瓶中，于 30 °C，200 rpm 培养 10 h 左右；将经过预培养的菌液按 5% 转接入装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摆瓶，于 30 °C，200 rpm 培养 8 h 左右。

### 2.2.3 发酵培养

取培养好的种子液按接种量 5% 转接入合成发酵培养基或玉米秸秆水解液中，于 30 °C，200 rpm 培养，发酵过程中通过添加 20% 尿素调节 pH 7.0 左右。

### 2.2.4 菌种保藏

取 2.2.2 中在种子培养基中培养了 8 h 的种子液，与 60% 甘油 1:1 混合，摇匀后分别装入 2 mL 冻存管中，液氮冷冻后放入 -80 °C 冰箱中保藏。

## 2.3 玉米秸秆处理方法

### 2.3.1 玉米秸秆预处理

玉米秸秆经粉碎后清洗，然后于 105 °C 烘箱中烘干。烘干后的秸秆利用稀硫酸进行预浸，按固液比 2:1 向装有干秸秆的塑料箱内缓缓加入 5% (w/w) 的稀硫酸。将物料搅拌混匀后放入塑料袋密封，室温放置 18 h。

预浸后物料进行预处理步骤如下：把预浸后物料装入不锈钢物料收纳器中，把收纳器放入预处理反应器中，封闭反应器后通入蒸汽；当反应器内部温度达到 100 °C 时，

迅速打开排气阀以放出内部空气。当温度到达 190 ℃ 时, 内部压力为 1.2 Mpa 时, 维持 3 分钟, 并使温度维持在目标温度附近, 偏差不超过 2 ℃。预处理结束后, 打开排气阀迅速泄压至常压。从反应器中取出物料收纳器, 取出物料冷却后装入塑料袋放在 4 ℃ 保存备用。

### 2.3.2 预处理后物料的生物脱毒

将预处理后的物料用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH 至 5.5 左右, 取 20 mL 无菌水加入保存有 *Amorphotheca resinae* ZN1 的斜面中, 将孢子洗脱后接入 200 g 调好 pH 的物料中, 于室温下培养 3 天, 该物料即为脱毒所用的霉菌种子。然后将培养好的种子接入 pH 5.5 的物料中, 在 25 ℃ 培养 5-10 天, 接种量 10%。脱毒后物料放入冰箱中冷冻保存备用。

### 2.3.3 水解液制作

制作未脱毒水解液时, 直接取只经预处理的玉米秸秆; 若需脱毒水解液, 则取脱毒后物料。取少量物料样品于平皿中, 置于 105 ℃ 烘箱中烘干, 计算含水量。根据含水量计算糖化所需添加的水及纤维素酶, 使其固含量为 15%, 纤维素酶用量为 15 FPU/DM。然后于 5 L 反应器中进行酶解糖化, 温度 50 ℃, pH 4.8, 150 rpm, 糖化 48 h。DM 指木质纤维素干物质, FPU 指纤维素酶滤纸酶活。糖化结束后将糖化液于 10000 rpm 离心 10 min, 将上清倒入锥形瓶中于 115 ℃ 灭菌 20 min。灭菌后于超净工作台中进行无菌过滤, 所得滤液即为发酵所需水解液。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 菌株的筛选

通过向种子及发酵培养基中加入不同浓度玉米浆, 保持其余组分浓度不变(如 2.1.4 所示), 于 30 ℃, 200 rpm 条件下摇床中发酵, 每隔 4h 用 20% 尿素溶液调节 pH。观察其对菌株生长及产酸的影响, 确定各个菌株适宜的玉米浆浓度, 比较各菌在适宜条件下的发酵性能。

### 2.4.2 谷氨酸棒杆菌的抑制物耐受性实验

分别向发酵培养基中添加不同种类不同浓度的抑制物: 呋喃类抑制物中, 经测定, 添加糠醛 (furfural) 浓度分别为: 0、0.6、1、1.5、3 g/L; 5-羟甲基糠醛(5-HMF)浓度分别为 0、0.35、0.7、1.65、2.5 g/L; 对于弱酸类抑制物, 添加不同含量甲酸, 使培养基中浓度分别是 0、0.5、1、2、3、5 g/L; 添加乙酸钠经换算使培养基中乙酸的浓度分别达到 0、6、7.2、9.6、12、14.4 g/L; 乙酰丙酸的浓度则分别是 0、0.8、1.6、2.4、3.2、6.4 g/L; 酚类抑制物中, 苯酚浓度分别为 0、0.15、0.3、0.6、1.2 g/L; 香草醛浓度分别为 0、0.2、0.3、0.6、1.2 g/L; 丁香醛浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4 g/L; 松柏醛浓度分别为 0、0.15、0.3、0.6 g/L; 四羟基苯甲醛浓度分别为 0、0.15、0.3、0.6 g/L。在 30 ℃, 200 rpm 摆床中发酵。

### 2.4.3 利用水解液发酵生产谷氨酸

取 2.3.3 中灭菌过滤后的玉米秸秆水解液, 量取 30 mL 至已灭菌的 250 mL 摆瓶中,

用 NaOH 调节初始 pH 至 7.0 左右, 将 5% 种子液接种至水解液中, 于 30 °C, 200 rpm 摆床中发酵, 每 4 h 用 20% 尿素调节 pH 在 7 左右, 取样测 OD 后当 OD 值达到 5 时添加青霉素使浓度为 100 mg/L, 当 OD 升至 10 时再添加一次青霉素, 使青霉素添加总量为 200 mg/L。

青霉素溶液浓度为 50 mg/mL, 经 0.22 μm 无菌滤头过滤入 1.5 mL 无菌离心管中, 放入-20°C 冰箱中冷冻备用。

## 2.5 分析方法

### 2.5.1 玉米秸秆水解液组分及添加抑制物浓度的测定

培养基中添加抑制物的浓度及玉米秸秆水解液中各组分含量通过高效液相色谱进行分析。水解液中所含葡萄糖、木糖、甲酸、乳酸、乙酸、乙酰丙酸、糠醛、5-HMF 的浓度测定采用 RID-10A 示差检测器, Bio-rad Aminex HPX-87H 柱 HPLC 检测。所用流动相是 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 柱温 65 °C, 流速为 0.6 mL/min。测定合成培养基中添加抑制物时所用色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 柱, 检测器为 SPD-20A 紫外检测器, 柱温 35 °C。测定糠醛时, 采用等浓度洗脱, 流动相是 50% 乙腈, 检测器波长 220 nm, 流速 1 mL/min; 测定 5-HMF 时, 采用梯度洗脱, 流动相条件为: 0-15 min, 乙腈浓度由 5% 升至 100%; 15-20 min, 乙腈浓度则从 100% 降到 5%; 20-30 min, 维持乙腈浓度为 5% 不变, 流动相流速为 0.6 mL/min, 检测器波长为 230 nm。四羟甲基苯甲醛、苯酚、丁香醛检测时, 流动相为 30% 乙腈, 流速 1.0 mL/min, 检测器波长 270 nm。测定香草醛和松柏醛时, 用梯度洗脱的方法, A 相为 100% 的乙腈, B 相为 0.1% 的甲酸水溶液; 0-4 min, 流动相 B 浓度比例从 10% 增加到 35%; 5-20 min 比例则从 35% 降到 10%; 20-30 min, 则使流动相 B 在 10% 平衡, 检测器波长 230 nm, 流速 1.0 mL/min。

### 2.5.2 糖浓度及谷氨酸含量的测定

发酵样品中的谷氨酸及葡萄糖利用 SBA-40D 型生物传感自动分析仪测定, 发酵过程中取样后离心, 取上清液稀释 100 倍并用 0.22 μm 滤膜过滤, 仪器定标后向反应池迅速注入 25 μL 样品即可测定。

### 2.5.3 菌体量的测定

发酵过程中菌体量通过吸光度进行测定, 取 1 mL 发酵液, 13000 rpm 离心 5 min, 吸取上清用于测定葡萄糖及谷氨酸含量。向下层菌体中添加 1 mL 超纯水, 震荡使之成为菌悬液, 根据其浓度稀释不同倍数, 于 600 nm 处测定吸光度, 利用超纯水作为对照, 使 OD 值在 0.2-0.8 范围内为有效。

### 2.5.4 生物素含量的测定

玉米浆及玉米秸秆水解液中所含生物素浓度用 VitaFast Vitamin B7 检测试剂盒进行测定, 其原理是根据微生物的法, 对样品中含有的生物素总量进行定量检测。试剂盒中含有包被有生物素缺陷型菌株 *Lactobacillus plantarum* 的 96 孔微孔板、生物素检测培养基及生物素标准品。通过向微孔中加入标准培养基及不同浓度的生物素标准品溶液作为

对照,其余微孔中则加入培养基及不同稀释倍数的待测样品,在黑暗、37 °C 下培养 48 h。利用酶标仪于 630 nm 处读取结果,根据含量成梯度的生物素标样与细菌的生长强度形成关系并绘制标准曲线。根据公司提供的配套软件即可计算结果。

#### 2.5.4.1 样品提取

在测定玉米浆和玉米秸秆中的生物素含量时,先对样品进行酸解,其具体方法为:称取 1 g 玉米浆或烘干的玉米秸秆置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 1 mol/L 的硫酸,混匀。在 121 °C 高压下反应 30 min,反应结束后置于冰上使其迅速冷却,用 NaOH 调节 pH 至 4.5,准确加入超纯水至 40 mL。于超净台中用无菌滤头过滤至无菌离心管中,并进一步进行不同倍数的稀释。

水解液样品由于是玉米秸秆经过酸解及高温高压预处理,并经纤维素酶糖化为液体,因此可取 1 mL 水解液于 50 mL 离心管中定容至 40 mL,再根据需要进行进一步稀释。

#### 2.5.4.2 实验操作

取出试剂盒中的无菌水,生物素标准品及标准培养基各一瓶,放入无菌工作台紫外照射 20 min。打开无菌水,添加 2mL 至生物素标准品瓶中,摇匀,根据说明书稀释为 0-0.72 μg/L 6 个浓度梯度。

取出培养基瓶中的干燥剂,添加 10 mL 无菌水,盖好摇匀;95 °C 下水浴加热 5 分钟,期间保持震荡使其均匀;水浴完成后取出,放入冰盒中使其迅速冷却至室温;利用 0.2 μm 无菌滤膜将培养基过滤至无菌离心管中。

取出需要的微孔条,固定在微孔板框中,其余板条则立即放入之前的锡箔袋中,挤出空气,与干燥剂一起封好,放入 4 °C 冰箱中储存。

先吸取 150 μL 已过滤的培养基到微孔中,再吸取 150 μL 无菌水(用于空白对照)或生物素标准品或经稀释过滤后的无菌样品至已排序的微孔中,然后用粘合箔盖住所有孔板条:将粘合箔上的保护膜揭去后将粘合箔盖上微孔板,挤出起泡后使其充分与孔板粘合。放入锡箔袋中,在 37 °C 培养 48 小时。

测量时,将微孔板倒置在桌面上并平面震荡,以利于微生物在培养基中充分混合;然后将微孔板翻回向上放置在桌面上,从一角开始按对角线方向揭下粘合箔,同时注意用手按住微孔板,防止微孔板与箔粘合过紧导致撕扯时液体洒落。用枪头破坏板中液体表面的液泡,用酶标仪在 630 nm 处读取浑浊度。

#### 2.5.4.3 计算结果

在计算结果时使用公司提供的配套软件进行计算。

生物素 (μg/100 g)=样品在标线上读取的浓度×稀释倍数/样品重量 g(mL)

### 第3章 结果与讨论

#### 3.1 谷氨酸棒杆菌的选育

由于实验室先后购买了 *C. glutamicum* SIIM B460、*C. glutamicum* SIIM B226、*C. glutamicum* SIIM B457、*C. glutamicum* SIIM B463、*C. pekinense* SIIM B3 及 *C. glutamicum* CICC 20159 六株菌，这些菌株均为中国谷氨酸工业发展中的典型菌株，由上海天厨味精厂保存于上海工业微生物菌种保藏中心；研究首先对实验室所购的几种菌株进行了初步筛选，以探索其适宜的谷氨酸发酵条件并筛选出发酵性能较好的菌株。谷氨酸发酵中一个重要因素是生物素，由于生产谷氨酸的菌株一般为生物素缺陷型，因此谷氨酸发酵中需要添加生物素，生物素作为生长因子主要影响细胞膜通透性和菌体的代谢途径。生物素浓度对菌体生长和谷氨酸积累均有影响，大量合成谷氨酸需要菌体代谢异常化，实际所需要的生物素浓度比菌体生长的需要量低，即其浓度应保持在亚适量范围。工业生产时生物素一般是通过玉米浆提供的，因此本文首先通过探索种子及发酵培养基中适宜的玉米浆浓度以确定各菌株的适宜发酵条件并对各菌株的发酵性能加以比较，筛选出较适宜进行谷氨酸生产的菌株。经过查阅文献资料及进行预实验，实验首先选取种子培养基中玉米浆浓度为 5 g/L，发酵培养基中玉米浆浓度 0.5 g/L 进行菌株的初步筛选。

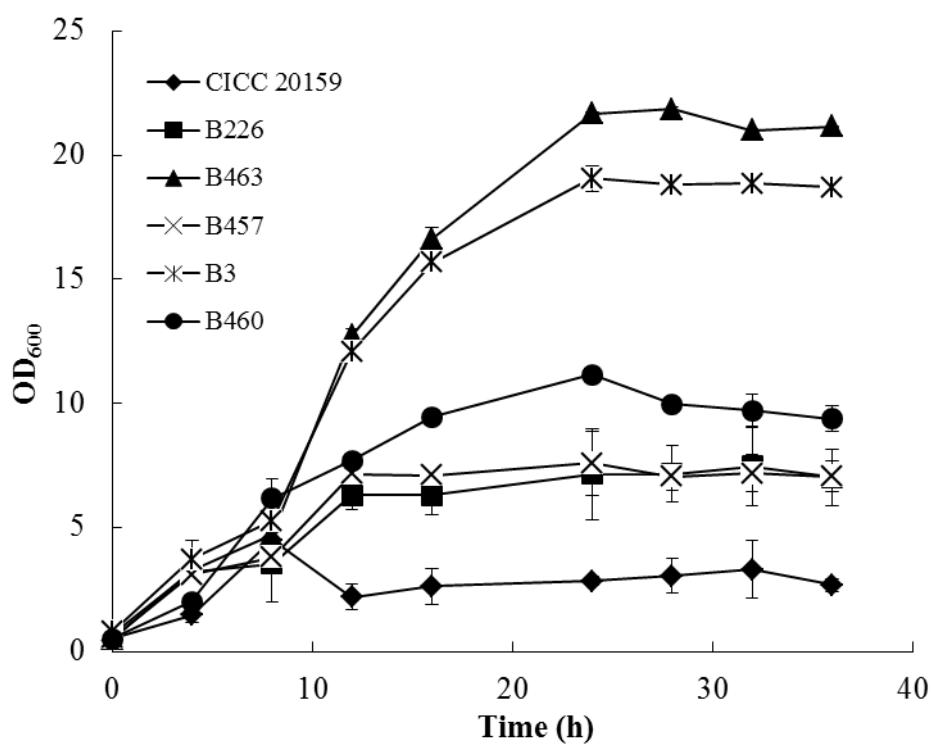


图 3.1 种子及发酵培养基中玉米浆分别为 5、0.5 g/L 时不同菌株的生长情况

Fig. 3.1 The growth of different strains when CSL is 5 g/L in seed culture, 0.5 g/L in SM

表 3.1 种子及发酵培养基中玉米浆分别为 5、0.5 g/L 时各菌株发酵 36h 时的代谢情况

Table 3.1 The GA at 36h for different strains when CSL is 5 g/L in seed culture, 0.5 g/L in SM

Strains	Glu (g/L)	GA (g/L)
CICC 20159	47.34	0.36
B226	33.52	6.46
B463	0.02	0.12
B457	32.78	7.28
B3	0.04	0.14
B460	6.82	15.34

注: Glu: 葡萄糖; GA: 谷氨酸

如图 3.1 和表 3.1 所示, 在种子培养基中玉米浆浓度为 5 g/L, 发酵培养基中玉米浆浓度 0.5 g/L 时, B463、B3 可极好的生长但不产酸; B226、B457 及 B460 均表现出一定的谷氨酸生产能力, B226 和 B457 在该条件下代谢缓慢, 发酵 36 h 后剩余残糖较多, B460 则表现出较好的谷氨酸生产能力; CICC 20159 则生长较差。由于 B226、B457 及 B460 在该条件下表现出一定的谷氨酸生产能力, 因此接下来主要对这三种菌株的适宜玉米浆条件进行了考察, 试图探索适宜谷氨酸发酵的合成培养基条件。

表 3.2 不同玉米浆浓度时 *C. glutamicum* SIIM B460 的生长及代谢Table 3.2 The influence of CSL to *C. glutamicum* SIIM B460

B460	A	B	C	D
CSL-seed <sup>a</sup> (g/L)	5	5	10	10
CSL-SM <sup>b</sup> (g/L)	0.5	1	0.5	1
OD <sub>600</sub> <sup>c</sup>	9.95	12.01	12.15	13.83
GA <sup>d</sup> (g/L)	18.73	18.15	17.65	17.93
Yield <sup>e</sup> (%)	45.04	43.52	41.11	41.02

a,b 分别指种子及发酵培养基中的玉米浆浓度; c 为 40h 时菌株在 600 nm 处的吸光度;

d 为谷氨酸; e 为发酵 40h 后的谷氨酸得率 (如无特别说明, 下同)

表 3.2 为种子培养基中添加的玉米浆浓度分别为 5 g/L、10 g/L; 发酵培养基中的玉米浆浓度分别为 0.5 g/L、1 g/L 时 *C. glutamicum* SIIM B460 发酵 40 h 时菌株的生长及发酵情况。如表所示, 在四种浓度梯度下, 该菌生长都较为稳定, 随着玉米浆浓度的提高, 菌体量逐渐增大, 但谷氨酸产量并没有提升反而有所降低。总体来说该菌发酵性能较为稳定, 利用发酵培养基发酵 40 h 谷氨酸浓度约为 20 g/L。种子培养基中玉米浆浓度 5 g/L, 发酵培养基中玉米浆浓度 0.5 g/L 时谷氨酸产量最高, 显微镜镜检发现菌体发生变形, 两端膨大, 由杆状变为花生状, 为适宜产酸的形态。因此后续实验中对该菌普遍采用种子培养基中玉米浆浓度 5 g/L, 发酵培养基中玉米浆浓度 0.5 g/L 进行实验。

表 3.3 为不同玉米浆浓度下 *C. glutamicum* SIIM B457 发酵 40 h 时的生长、谷氨酸产量及得率。实验表明, 培养基尤其是发酵培养基中玉米浆浓度的增加会加快菌株的生长

及代谢，但并不能促进谷氨酸的产生。当种子培养基中玉米浆浓度为 10 g/L，发酵培养基中玉米浆浓度为 0.5 g/L 时谷氨酸产量达到最大值，因此确定其为适宜 *C. glutamicum* SIIM B457 的发酵条件，其得率约在 40% 左右，但此结果仍略低于 *C. glutamicum* SIIM B460。

表 3.3 不同玉米浆浓度下 *C. glutamicum* SIIM B457 发酵 40 h 的谷氨酸产量

Table 3.3 The GA fermentation of *C. glutamicum* SIIM B457 in different CSL concentration

B457	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
CSL-Seed(g/L)	5	5	5	10	10	10	15	15	15	20
CSL-SM(g/L)	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5
OD <sub>600</sub>	6.61	11.08	17.71	11.72	13.19	18.56	12.51	15.69	18.07	12.90
GA(g/L)	7.28	14.34	11.42	17.66	15.26	12.44	12.07	16.06	9.81	8.85
Yield(%)	15.23	30.90	25.18	39.96	32.94	27.53	26.67	35.35	21.25	19.62

表 3.4 不同玉米浆浓度下 *C. glutamicum* SIIM B226 发酵 40 h 的谷氨酸产量

Table 3.4 The GA fermentation of *C. glutamicum* SIIM B226 in different CSL concentration

B226	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
CSL-Seed(g/L)	5	5	5	10	10	10	15	15	20	20
CSL-SM(g/L)	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	0.5	1
OD <sub>600</sub>	8.51	11.00	14.43	9.77	11.20	13.83	10.68	11.96	12.01	13.19
GA(g/L)	11.52	7.55	7.99	9.67	10.65	7.05	10.53	9.17	8.46	9.29
Yield(%)	29.37	20.31	20.16	24.81	27.38	16.72	26.85	24.08	21.71	24.40

表 3.4 为 *C. glutamicum* SIIM B226 在不同玉米浆浓度下的谷氨酸发酵情况，当种子培养基中玉米浆浓度为 5 g/L，发酵培养基中玉米浆浓度为 0.5 g/L 时谷氨酸产量达到最大值，但仅有 11 g/L 且与其余浓度相比较，谷氨酸产量没有太大优势，也许是菌株发酵性能弱于 B460 及 B457。

实验表明，培养基中玉米浆浓度过高会引起生物素过量，促使菌株大量生长并促使碳源流向乳酸而降低谷氨酸的产量，玉米浆浓度过低可能不利于菌株生长，降低代谢速率。综合比较起来，*C. glutamicum* SIIM B460 性能更稳定，发酵性能要优于其他菌株，其适宜产酸的玉米浆浓度为种子培养基中 5 g/L，发酵培养基中 0.5 g/L，因此后续实验中均采用该菌株进行实验。

### 3.2 玉米秸秆水解液中 *C. glutamicum* SIIM B460 的生长及代谢

#### 3.2.1 已脱毒水解液中菌株的生长及代谢

为了利用木质纤维素原料进行谷氨酸发酵，接下来实验研究了已脱毒玉米秸秆水解液中菌株的生长及代谢情况，实验结果如下图所示。

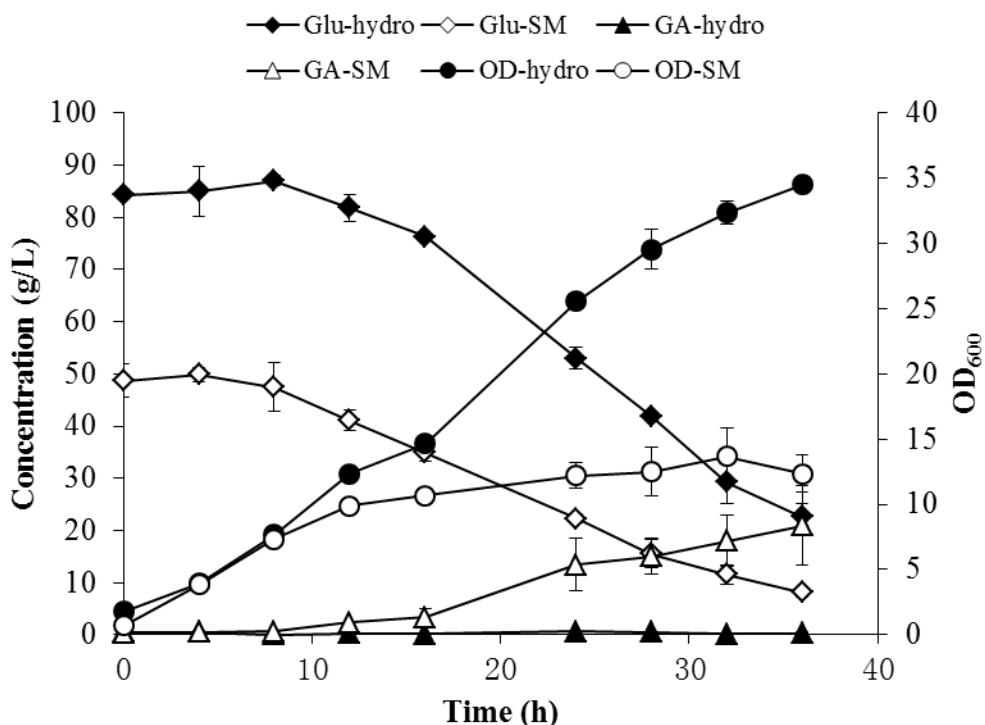


图 3.2 25% 脱毒水解液中 *C. glutamicum* SIIM B460 的生长及代谢情况

Fig. 3.2 The growth and metabolic of *C. glutamicum* SIIM B460 in the 25% detoxification corn stover hydrolysate

(注: glu/GA/OD-hydro 分别为水解液中的葡萄糖, 谷氨酸及生物量, SM 为合成培养基)

图 3.2 为 *C. glutamicum* SIIM B460 在固含量 25% 的已脱毒玉米秸秆水解液中菌株的生长及代谢情况, 由图可知, 菌株在水解液中生长极好, 菌体量远远高于合成培养基, 糖耗速度较快, 但没有谷氨酸产生, 镜检表明菌体形态较小较圆, 为不适宜产酸的类型。由于水解液中菌体量较高, 因此推测其中含有较丰富的营养物质如生物素等, 因此接下来又利用了不添加营养盐或玉米浆的纯水解液进行了实验。

图 3.3 为菌株在不添加盐离子及玉米浆的纯水解液和只添加其中一种营养元素的 25% 脱毒水解液中的生长及代谢情况。由图可知, 与添加了与合成培养基浓度相同营养元素的水解液相比, 不添加营养盐及玉米浆的纯水解液中菌株生长几乎不受影响, 菌体量较高, 可能是由于玉米秸秆水解液成分较为复杂, 含有菌株生长所需的无机盐及生长因子。因此后续过程中均采用不添加外源营养的纯水解液进行实验。

考虑到脱毒水解液中菌株生长状态优于合成培养基, 碳源几乎全部用于菌体生长而不进行谷氨酸发酵, 因此接下来尝试利用未脱毒水解液进行实验, 观察菌株在其中的代谢情况。

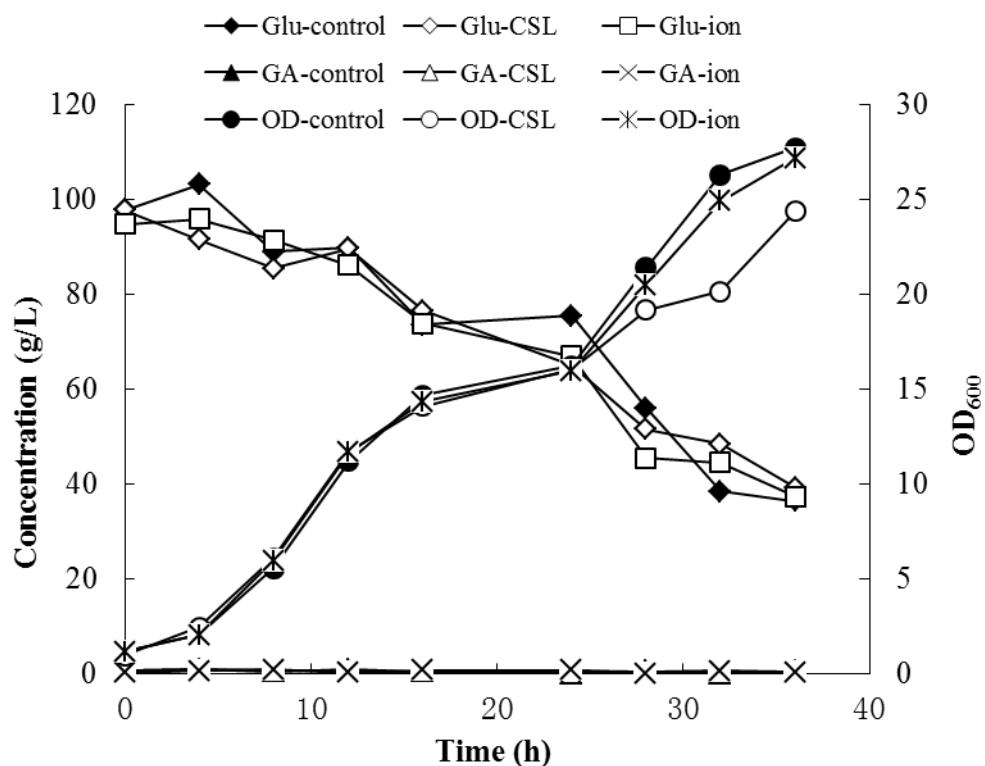


图 3.3 添加不同营养的脱毒水解液中菌株的生长及代谢

Fig. 3.3 The growth and metabolic of *C. glutamicum* SIIM B460 in the 25% detoxification CS hydrolysate at different nutrition conditions

(注: control 为不添加任何外源营养的水解液; CSL 为只添加与合成培养基等浓度的水解液; ion 为只添加与合成培养基等浓度营养盐的水解液)

### 3.2.2 未脱毒水解液中菌株的生长及代谢

图 3.4 为菌株在 15% 未脱毒水解液中的生长及代谢情况, 由图可知, 在 15% 未脱毒水解液中, 菌株生长出现约 36 h 的延滞期, 可能是由于未脱毒水解液中含有抑制物的缘故, 15% 未脱毒水解液的主要成分如表 3.5 所示, 主要抑制物为乙酸、糠醛及 5-羟甲基糠醛。虽然菌株表现出较长的延滞期, 但随后依然能够进行生长, 且后期菌体量明显高于合成培养基, 尽管菌株生长较好, 但与脱毒水解液中代谢类似, 依然没有谷氨酸产生。镜检观察得知菌株形态依然为不适宜产酸的形态, 因此推测是由于玉米秸秆水解液中生物素含量较高, 超出适宜谷氨酸发酵的生物素浓度。

表 3.5 15%未脱毒水解液组分

Table 3.5 The composition of 15% solid undetoxification hydrolysate

组分	Glucose	Xylose	Acetic acid	furfural	5-HMF
浓度(g/L)	60.44	19.45	3.72	0.80	0.53

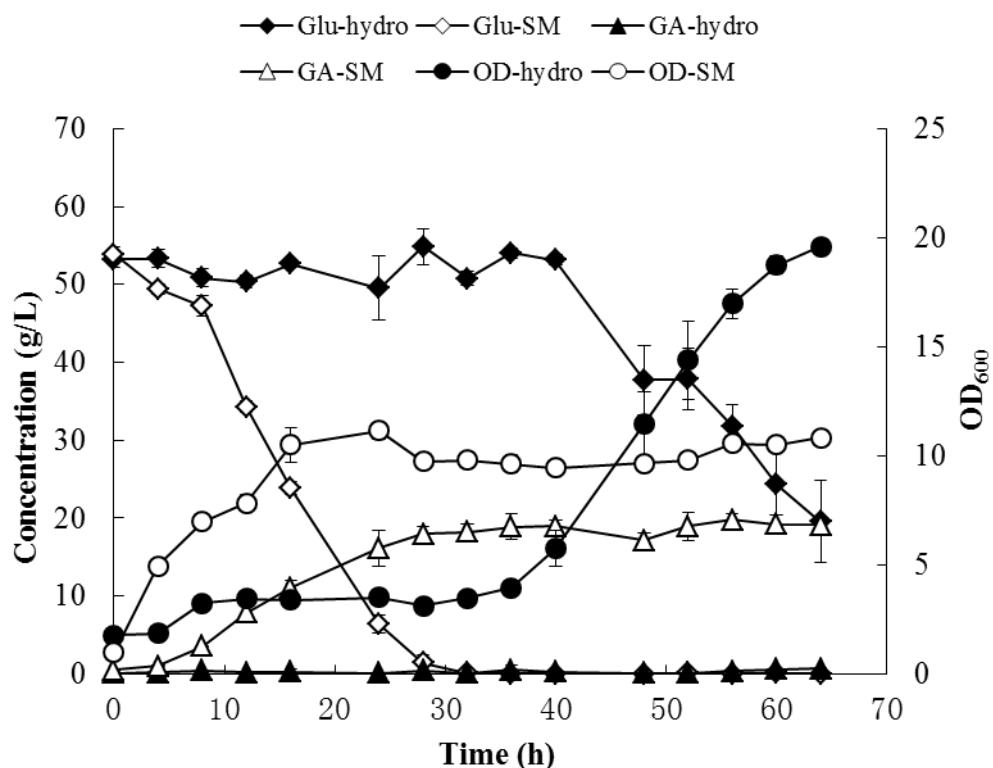


图 3.4 15%未脱毒水解液中菌株的生长及代谢

Fig. 3.4 The growth and metabolic of *C. glutamicum* SIIM B460 in 15% undetoxification corn stover hydrolysate

### 3.3 水解液中生物素的测定

为了确定是否是由于玉米秸秆水解液中生物素过量导致不进行诱导时没有谷氨酸产生, 实验利用生物素检测试剂盒对水解液中生物素的浓度进行了测定。

将实验所用玉米浆与水解液经稀释过滤处理后, 按照操作说明利用 VitaFast 生物素检测试剂盒测定其中的生物素含量, 该试剂盒是利用国标支持的微生物法对样品中的生物素进行测定。

经实验得出数据如表 3.6 所示, 根据标样结果利用软件进行对数拟合得出标准曲线, 并利用软件进行结果分析。

表 3.6 生物素试剂盒检测结果

Table 3.6 Results of biotin detection

	BLK*	S1*	S2	S3	S4	S5	P1*	P2*	P3*
Conc.( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	0	0.08	0.24	0.4	0.56	0.72			
OD <sub>630</sub>	0.031	0.081	0.336	0.380	0.533	0.583	0.313	0.201	0.369

\*BLK 指空白对照, S1-S5 为生物素标准品

\*P1 指 1g 玉米浆经酸解提取后再稀释 300 倍

\*P2 指 15%未脱毒水解液经 40 倍提取后再稀释 8 倍,

\*P3 指 15% 脱毒水解液经 40 倍提取后再稀释 8 倍

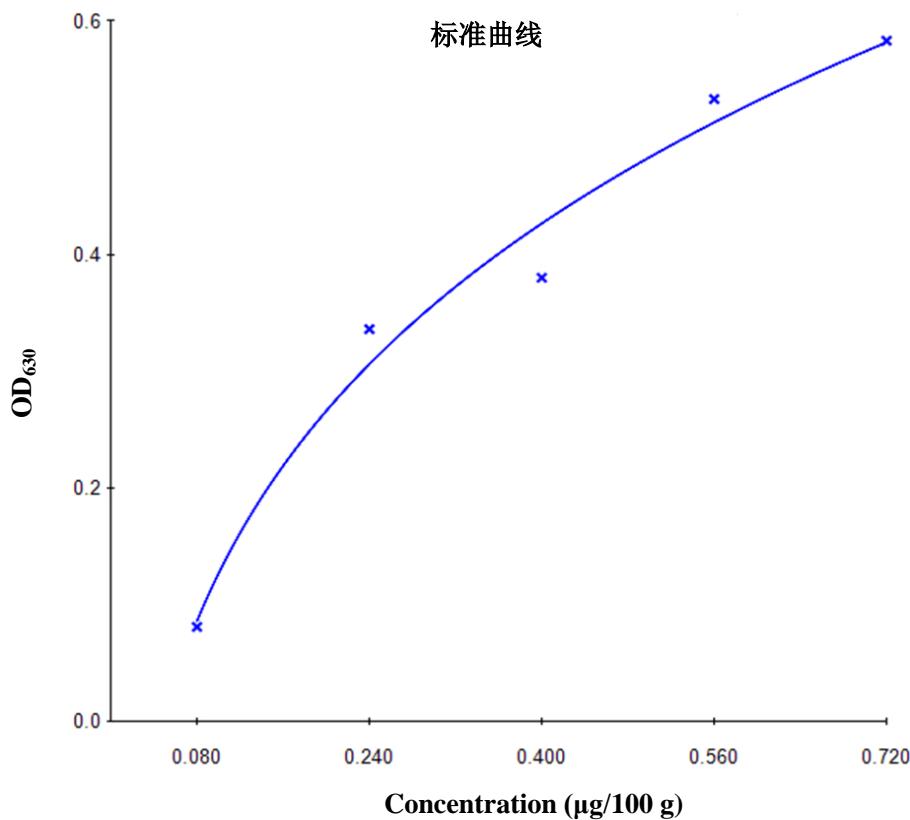


图 3.5 生物素检测标准曲线

Fig. 3.5 Standard curve of biotin

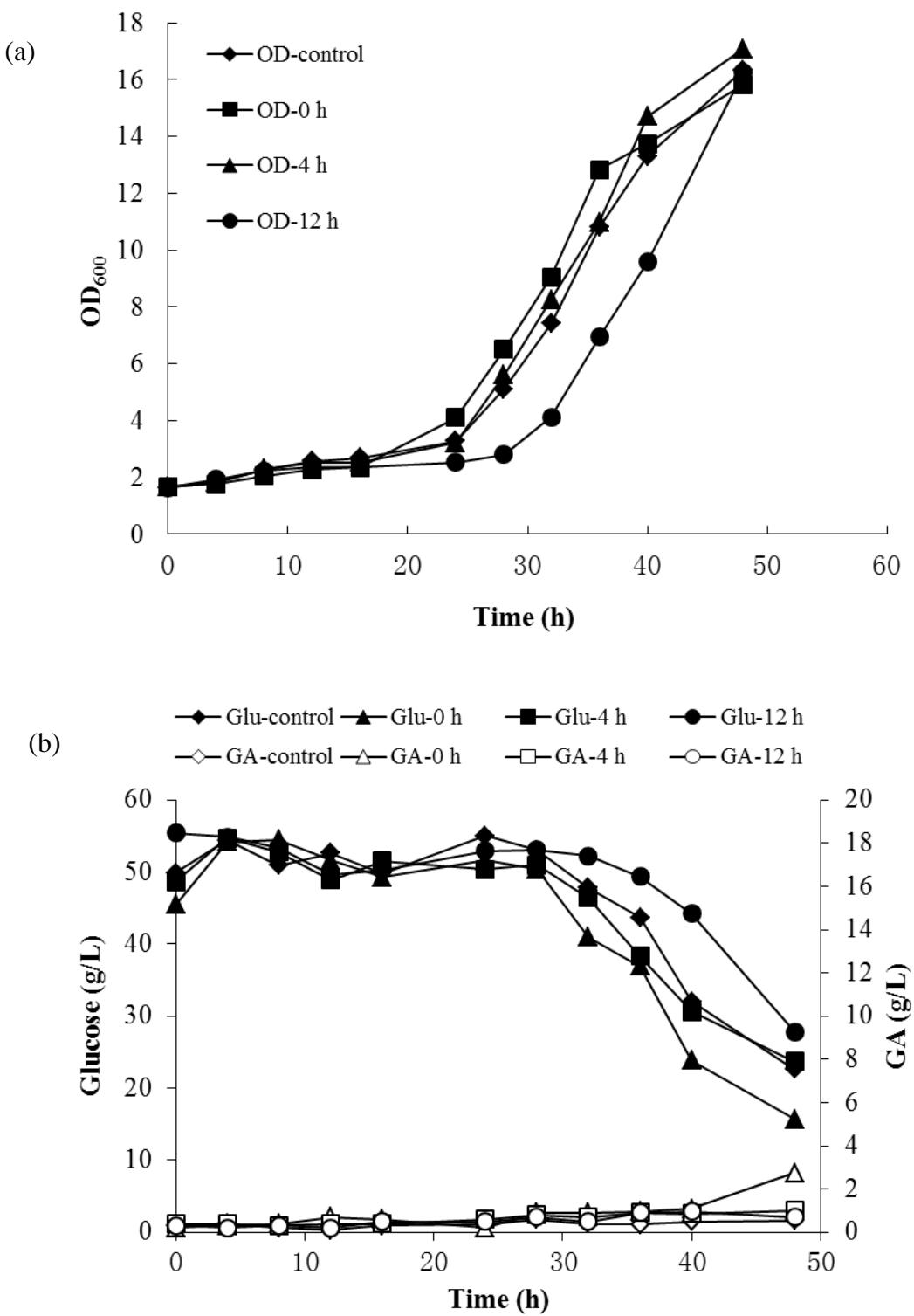
经软件计算玉米浆中所含生物素浓度为  $744 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; 15% 未脱毒玉米秸秆水解液中所含生物素浓度为  $11.85 \mu\text{g}/\text{L}$ ; 15% 脱毒玉米秸秆水解液中所含生物素浓度为  $23.7 \mu\text{g}/\text{L}$ 。虽然水解液中生物素含量较低, 但由于发酵培养基中仅添加  $0.5 \text{ g/L}$  玉米浆, 经换算, 含有  $0.5 \text{ g/L}$  玉米浆的发酵培养基中生物素浓度为  $0.372 \mu\text{g}/\text{L}$ , 而水解液是用作菌株发酵的培养基, 水解液中所含生物素远远高于发酵适宜的生物素含量并达到其 30 倍以上, 因此用水解液进行谷氨酸发酵时, 需添加青霉素进行诱导。

### 3.4 青霉素诱导时水解液中菌株的生长及代谢

#### 3.4.1 不同青霉素添加时间时菌株的生长及代谢的影响

为了使菌株能够分泌谷氨酸, 实验试图利用添加青霉素进行诱导处理。为了初步确定青霉素的添加时间, 实验通过在不同时间添加  $100 \text{ mg/L}$  青霉素进行实验。

图 3.6 为在培养的不同时间如  $4 \text{ h}$ 、 $12 \text{ h}$  添加青霉素的实验, 由图 3.6 (a) (b) 可知, 在菌株尚未开始生长时加入青霉素没有诱导谷氨酸产生, 反而可能会致使延滞期的增长, 虽然并不影响菌株后期的生长, 但不能诱导谷氨酸的分泌, 因此需调整青霉素的添加时间。



注: control 为不添加青霉素的水解液; 0、4、12 h 分别指青霉素添加时间 (下同)

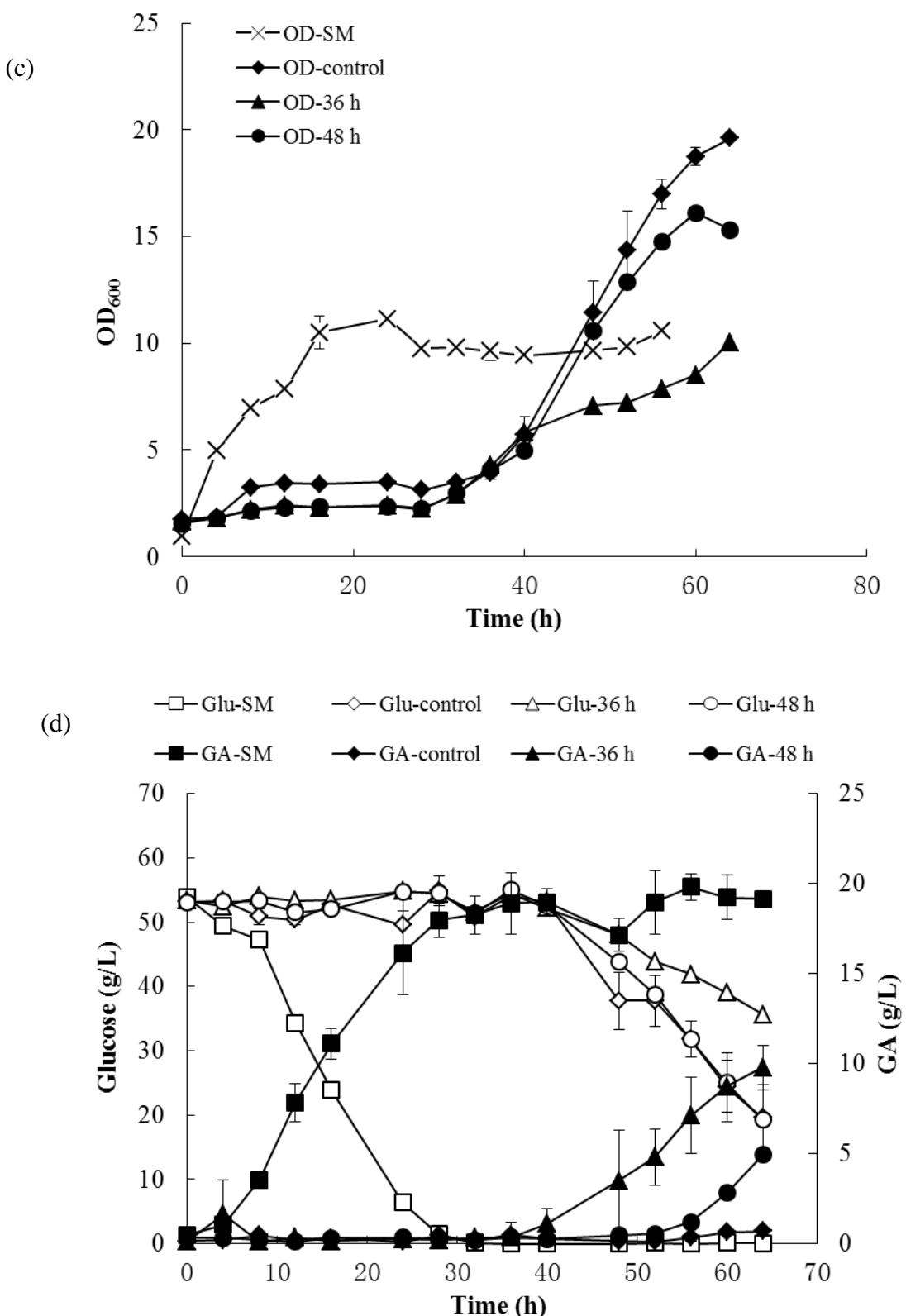


图 3.6 15%未脱毒水解液中不同青霉素添加时间对菌株的生长及代谢的影响

Fig. 3.6 Effect of the penicilin adding time on GA in *C. glutamicum* SIIM B460

如图 3.6 (c) (d) 中所示，在 36h 加入青霉素不仅能够在一定程度上抑制菌株的生长，并且能够明显诱导谷氨酸的产生，48h 添加青霉素则没有抑制菌株的生长，虽然有

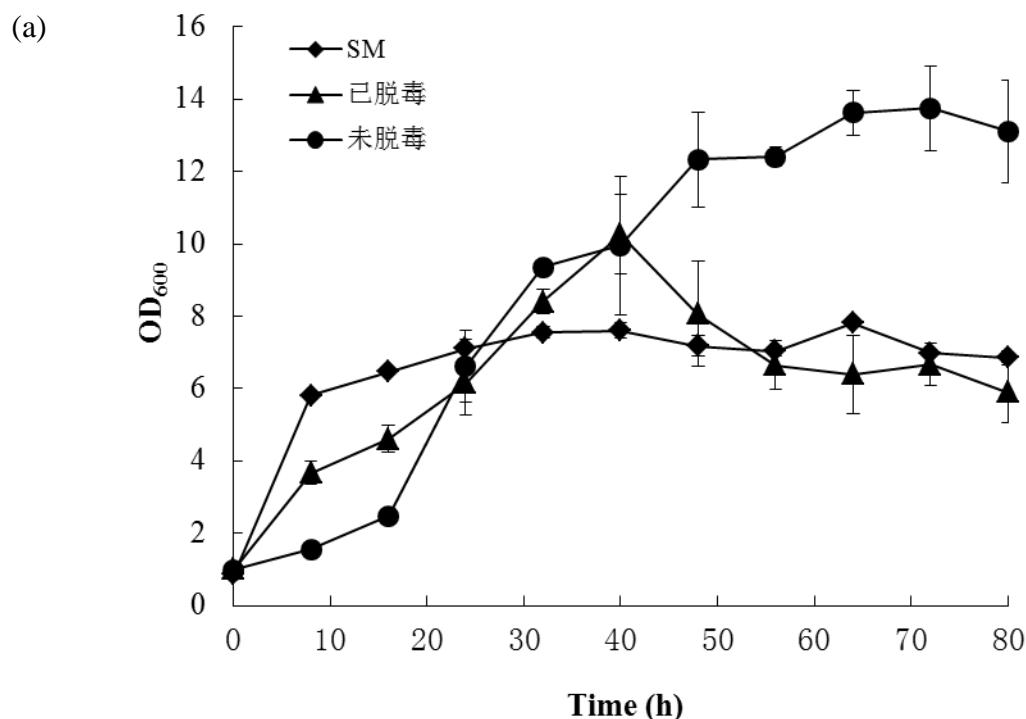
一定谷氨酸产生，但分泌量较少。

经过上述实验，因此推测青霉素的适宜添加时间约在指数初期左右；在开始或延滞期加入青霉素不能诱导谷氨酸产生，只会导致延滞期的增长，而当菌株生长进入指数后期后再添加青霉素则对菌株生长的抑制作用不大，也不利于诱导谷氨酸产生。

为了较好的控制水解液中菌株的生长及发酵，本文采用两步法添加青霉素，当 OD 达到 5 左右时添加 100 mg/L 青霉素，随后 OD 生长至 10 左右时再次进行添加。

### 3.4.2 青霉素诱导下不同培养基中菌株的生长及发酵情况

图 3.7 为青霉素诱导下 15% 脱毒及未脱毒水解液中菌株的生长及产酸情况。其中已脱毒水解液中在 16 h、32 h 分别添加 100 mg/L 青霉素；未脱毒水解液中在 24、40 h 分别添加 100 mg/L 青霉素。由图可知，菌株在水解液中都表现出较好的生长状态，未脱毒水解液中，菌株生长存在 20 h 左右的延滞期，但随后菌株的生物量高于合成培养基。通过在指数初期添加青霉素，菌株生长可慢慢进入稳定期，并诱导谷氨酸产生，发酵 80 h 后，谷氨酸产量达到 31 g/L，产量及得率均能达到与合成培养基相当的水平。这可能是由于，未脱毒玉米秸秆水解液中含有多种抑制物，因此抑制菌株的生长；但与合成培养基相比，水解液成分更加复杂，营养更丰富，更有利于菌体生长，在青霉素诱导下，菌株细胞壁合成受到抑制，促进谷氨酸的分泌，因此虽然有较长的延滞期但之后的生长及代谢都优于合成培养基。



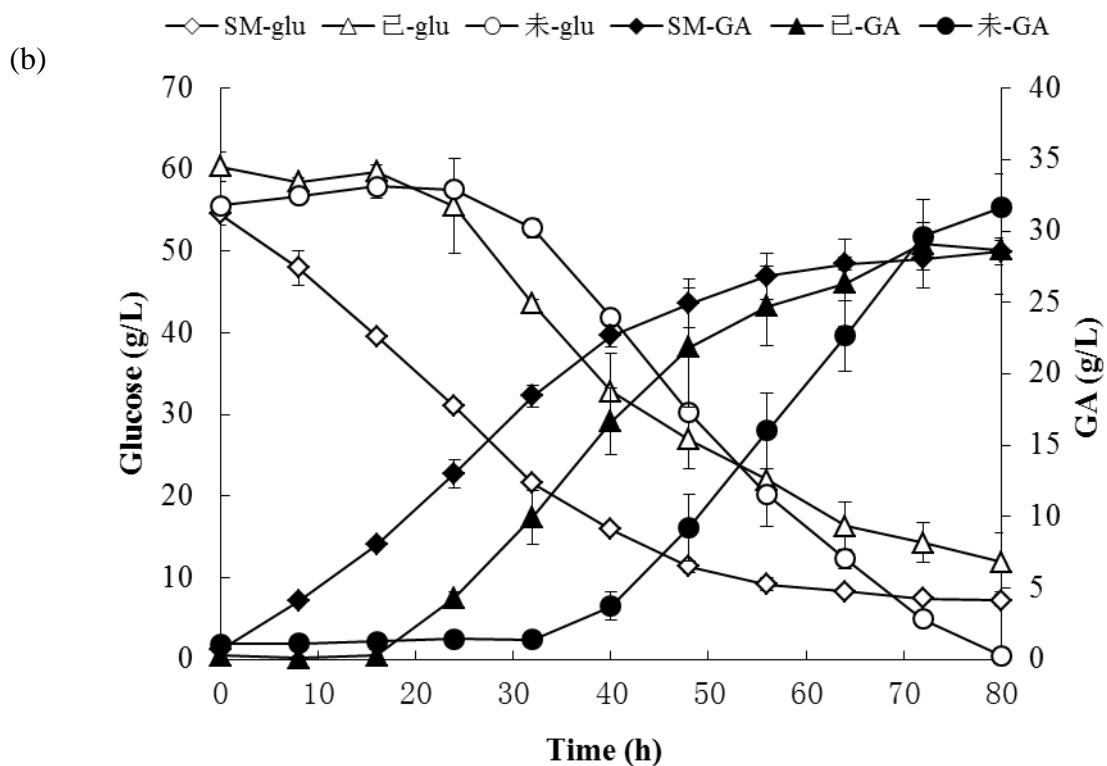


图 3.7 合成培养基和 15% 脱毒及未脱毒水解液中菌株的生长及代谢情况

Fig. 3.7 The growth and GA of the strain in the 15% solid corn stover hydrolysate or synthetic medium

以上结果表明 *C. glutamicum* SIIM B460 可利用未脱毒玉米秸秆水解液进行谷氨酸发酵，且发酵性能甚至略优于合成培养基。但可能是由于菌株对水解液环境较为敏感，菌株在未脱毒水解液中生长不稳定，且由于每批次水解液间抑制物浓度存在一定差异，菌株生长的延滞期不等。因此下一步可以通过对菌株进行驯化的手段使之适应未脱毒水解液环境，从而建立未脱毒水解液中菌株的稳定生长模式。

考虑到菌株在未脱毒水解液中表现出较好的生长能力，因此推测该菌株可能对木质纤维素预处理产生的抑制物具有较高的耐受性。为了更好的了解菌株性能，使之得到更好的利用，因此接下来对菌株的抑制物耐受性进行了测定。

### 3.5 *C. glutamicum* SIIM B460 的抑制物耐受性

对木质纤维素原料进行预处理时，一般会产生一些对菌株生长有抑制作用的降解物。其中包括：呋喃类抑制物糠醛及 5-羟甲基糠醛；弱酸类抑制物包括甲酸、乙酸、和乙酰丙酸等；酚类化合物如香草醛、丁香醛、四羟基苯甲酸、松柏醛、苯酚等。虽然可以通过脱毒的手段将这些抑制物脱除，但脱毒过程费时费力。因此选择一株对抑制物耐受性较强的菌株可以更好的解决问题。由于菌株可以在未脱毒玉米秸秆水解液中生长，因此实验考察了菌株 *C. glutamicum* SIIM B460 对预处理可能产生的十种抑制物的耐受性。

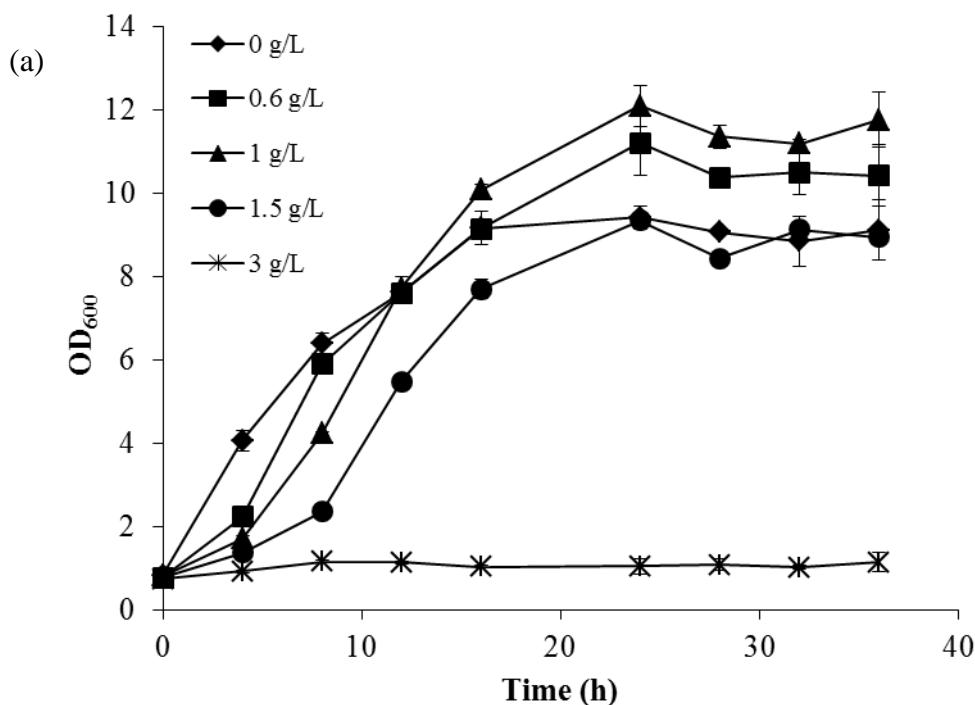
### 3.5.1 *C. glutamicum* SIIM B460 对呋喃类抑制物的耐受性

5-HMF 和糠醛分别是由己糖和戊糖脱水形成的, 一般普遍认为呋喃类抑制物是对乙醇发酵最主要的抑制物且糠醛的抑制作用强于 5-HMF, 当两者同时存在时, 能够产生协同作用。有关抑制物对乙醇发酵抑制机理的研究已经较为详细, 糠醛能够降低生长速率及乙醇产率, 且生长对其更为敏感。乙醇发酵过程中, 糠醛可代谢成糠醇, 在一定程度上代谢为糠酸。研究表明, 糠醛和 5-HMF 可以抑制酿酒酵母中醇脱氢酶 (ADH)、醛脱氢酶(ALDH)、丙酮酸脱氢酶(PDH)的活性。当培养基中加入呋喃类物质时会促进乙醛的分泌因而引起 NAD(P)H 的缺失。并且代谢流分析显示, 糠醛会影响糖酵解及 TCA 循环, 进而影响能量代谢。*S. cerevisiae* 中糠醛能引起氧自由基的积累, 液泡及线粒体膜受破坏, 染色质及肌动蛋白受损。总的来说, 呋喃类抑制物可以引起酵母细胞中能量的重新定向以弥补呋喃类物质及胞内 ATP 和 NAD(P)H 水平降低造成的伤害。

尽管有关呋喃类衍生物对乙醇发酵的抑制作用的研究已经很多, 但有关谷氨酸棒杆菌对抑制物耐受性方面的研究依然较少。

Sakai 等 2007 年利用一株重组菌 *C. glutamicum* R 在生长阻遏条件下生产乙醇, 其中指出, *C. glutamicum* 与一些酵母菌如 *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1200, *Candida shehatae* ATCC 22984 对糠醛和 5-HMF 具有类似的敏感度, 比一些菌株如 *Z. mobilis* ATCC 10988 等对糠醛更敏感, 随着糠醛和 5-HMF 浓度增加, 细胞生长明显受到抑制, 因此在生长阻遏的条件下抑制物对乙醇发酵的影响较小。

#### 3.5.1.1 *C. glutamicum* SIIM B460 对糠醛的耐受性



(注: 图中 0、0.6、1、1.5、3 g/L 分别指向合成培养基中添加的抑制物浓度, 图 a 为不同浓度糠醛的培养基中菌株的生长情况, 图 b 为不同浓度糠醛时菌株的糖耗及产酸情况, 下同)

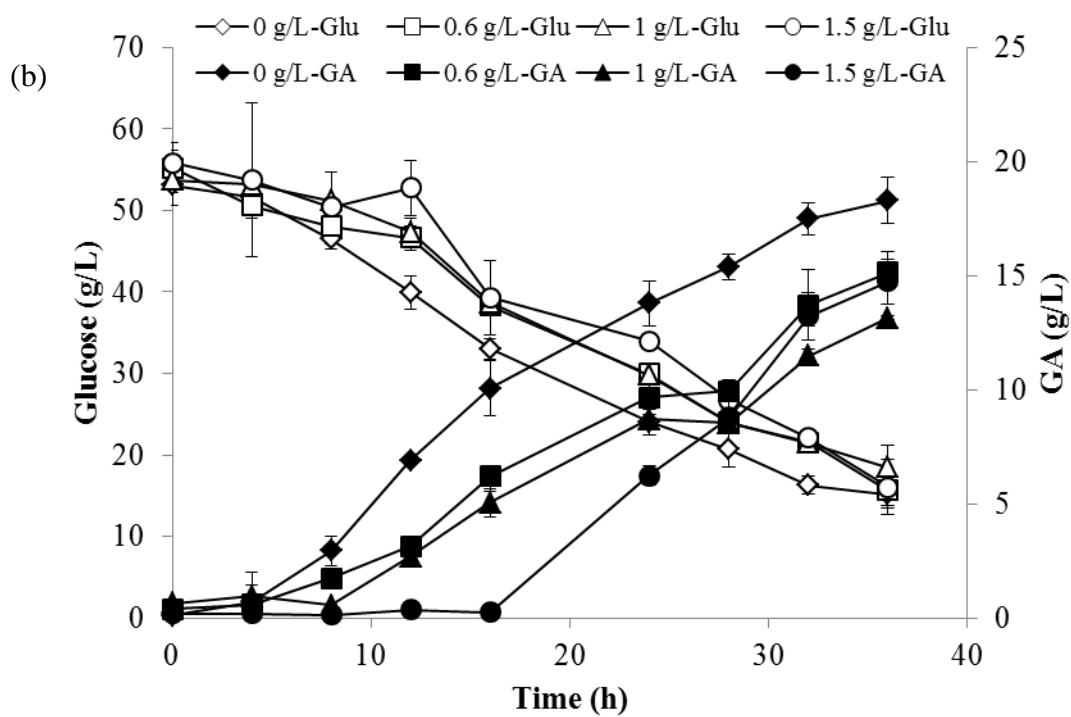
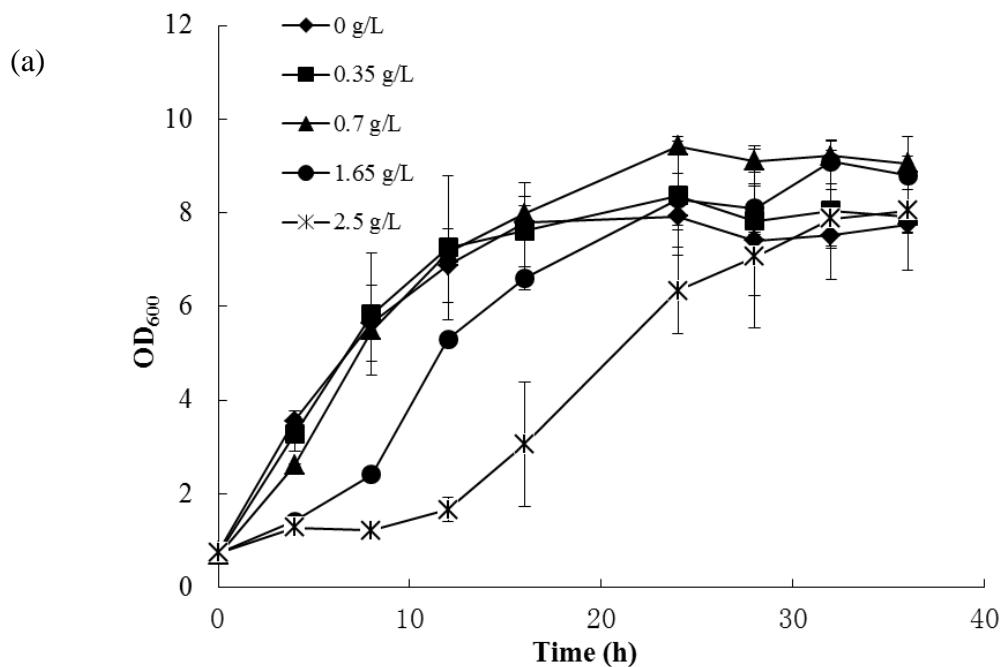
图 3.8 *C. glutamicum* SIIM B460 对糠醛的耐受性Fig. 3.8 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to furfural

图 3.8 为发酵培养基中糠醛浓度分别为 0、0.6、1、1.5 g/L 时菌株的生长及发酵情况。由图可知, 当糠醛浓度在 0-1.5 g/L 范围内时, 与不添加糠醛相比, 菌株生长不受抑制, 糠醛浓度为 3 g/L 时, 菌株不能生长。随着糠醛浓度的增加, 谷氨酸发酵受到微弱抑制, 得率逐渐降低。但由于玉米秸秆水解液中糠醛含量一般不超过 1 g/L, 因此菌株对水解液有较好的耐受性。

### 3.5.1.2 *C. glutamicum* SIIM B460 对 5-HMF 的耐受性



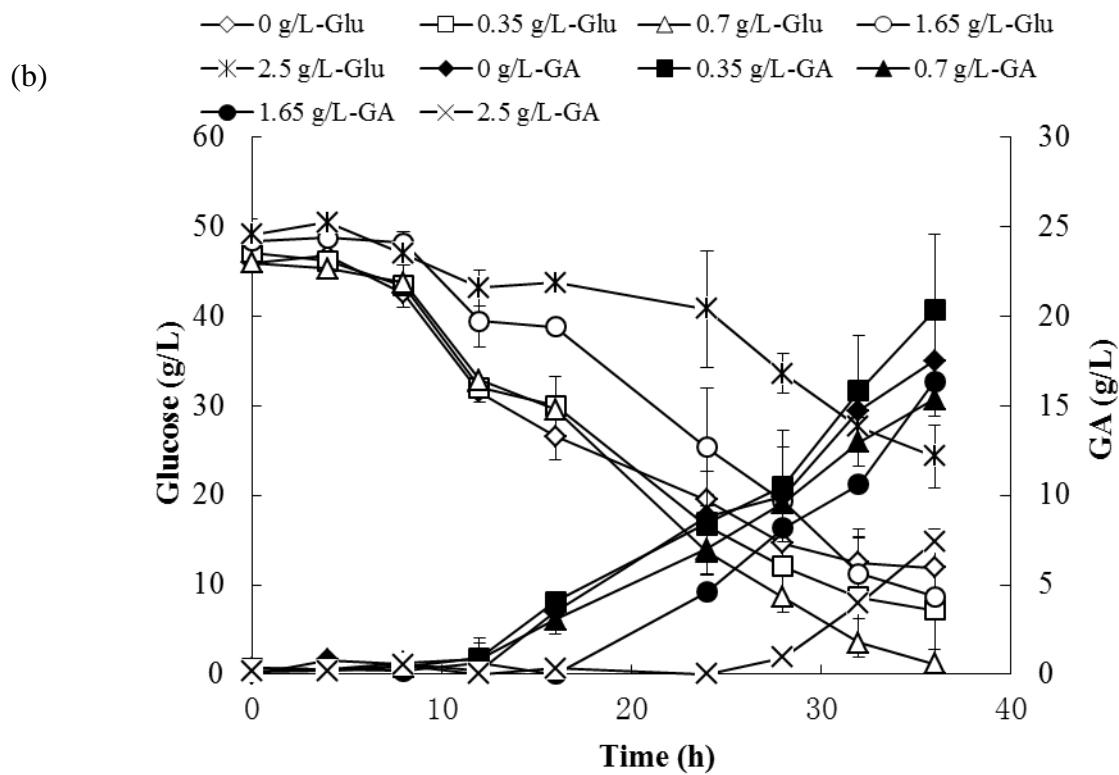


图 3.9 *C. glutamicum* SIIM B460 对 5-HMF 的耐受性

Fig. 3.9 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to 5-HMF

图 3.9 为发酵培养基中 5-羟甲基糠醛浓度为 0-2.5 g/L 时菌株的生长及发酵情况。与糠醛相比, 菌株对 5-HMF 的耐受性更强, 5-HMF 浓度在 0-1.65 g/L 时对菌株生长及产酸抑制作用不大; 浓度为 2.5 g/L 时 36 h 菌体生长虽然能达到与对照相当水平, 但生长出现延滞期, 且产酸受到严重抑制。但由于实验浓度范围较大, 菌株对抑制物的耐受浓度均高于实际木质纤维素预处理中所产生的呋喃类衍生物的浓度, 因此可以说菌株对呋喃类抑制物有较高的耐受性。

### 3.5.2 *C. glutamicum* SIIM B460 对弱酸类抑制物的耐受性

甲酸、乙酸、乙酰丙酸是木质纤维素水解液中最常见的弱酸类物质。乙酸是半纤维素脱乙酰化形成的, 而甲酸及乙酰丙酸则是 HMF 裂解的产物。甲酸也可以在高温酸性环境下由糠醛形成。

弱酸类抑制物可以通过减少生物量形成并降低乙醇得率来抑制酵母的发酵, 通过对酵母进行单一抑制及三种共同抑制表明弱酸类物质间不存在协同作用。弱酸类抑制物的影响一般表现为解偶联作用及胞内阴离子的积累。由于脂溶性的未解离的弱酸的可以穿过细胞质膜进入到细胞质, 因此对微生物的生长产生抑制作用。由于细胞质的中性环境, 弱酸发生解离, 进而降低细胞质 pH。水解液中未解离酸的浓度依赖于 pH, 因此 pH 是发酵过程中的关键因素。而根据胞内阴离子积累理论, 酸的阴离子在胞内被捕获, 促使未解离的酸继续进入胞内直至达到平衡。细胞质 pH 的降低是通过质膜上 ATP 酶来补偿的, ATP 酶通过消耗 ATP 把质子泵出胞内。为了维持胞内 pH, 必须有额外的 ATP 产生,

这是通过减少生物量的形成增加乙醇生产实现的。因此较低的弱酸浓度可以刺激乙醇的生产。但当弱酸浓度较高时，细胞质子泵能力耗尽，导致 ATP 和质子动力的损耗以及细胞质不可避免地酸化。

### 3.5.2.1 *C. glutamicum* SIIM B460 对甲酸的耐受性

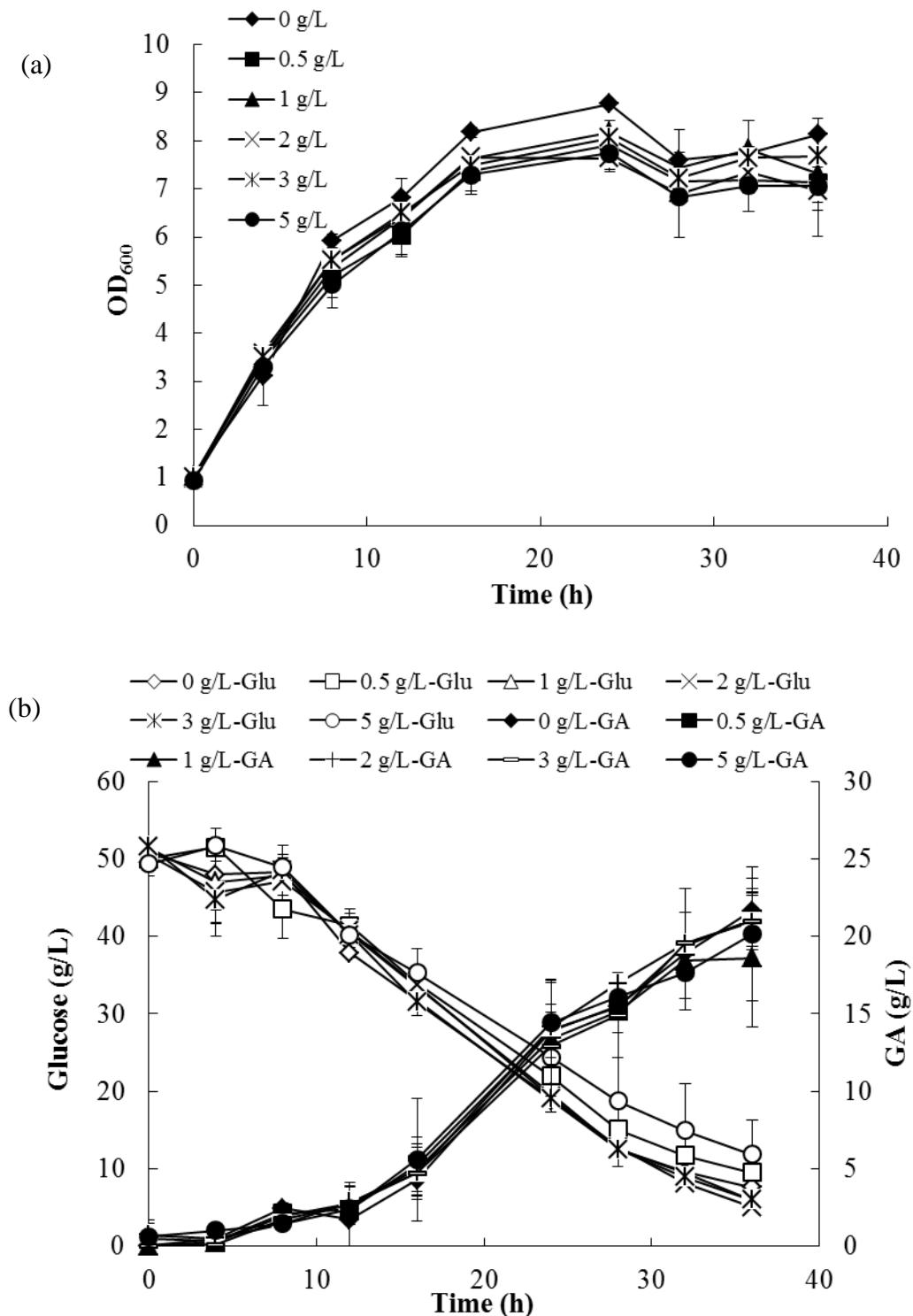


图 3.10 *C. glutamicum* SIIM B460 对甲酸的耐受性

Fig. 3.10 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to formic acid

图 3.10 为发酵培养基中甲酸浓度为 0-5 g/L 时菌株的生长及发酵情况。由图可知，在甲酸浓度为 0-5 g/L 范围内，随着甲酸浓度的升高，菌株的生长及产酸都没有受到抑制。说明菌株对甲酸具有很强的耐受性。

### 3.5.2.2 *C. glutamicum* SIIM B460 对乙酸的耐受性

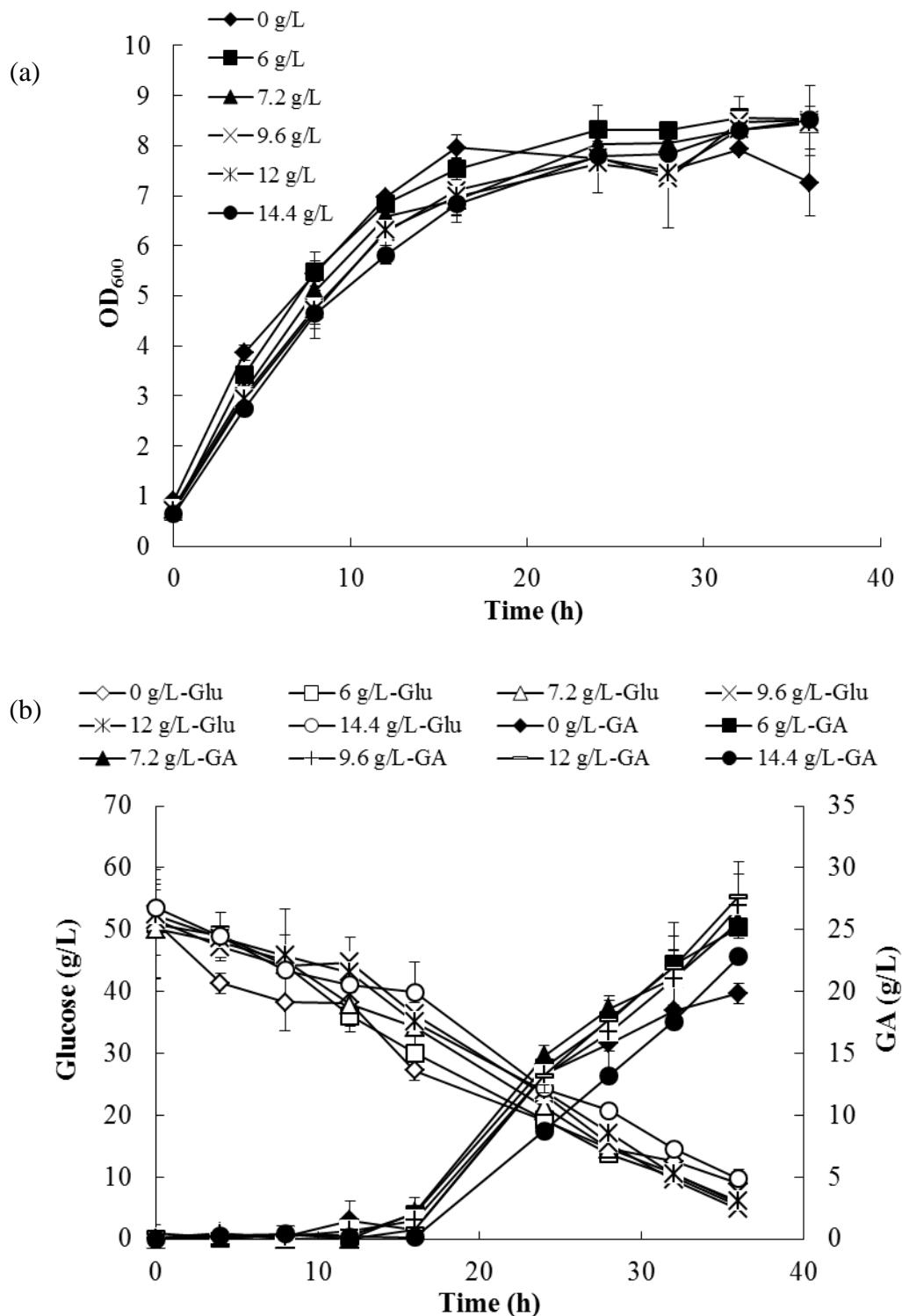


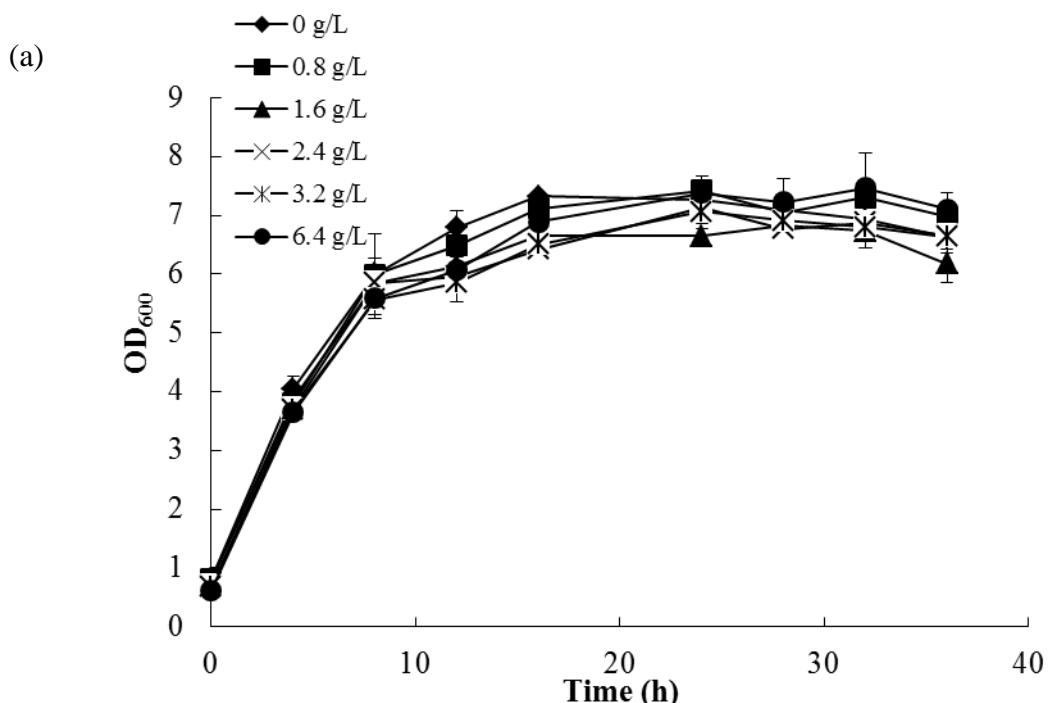
图 3.11 *C. glutamicum* SIIM B460 对乙酸的耐受性

Fig. 3.11 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to acetic acid

图 3.11 为发酵培养基中乙酸浓度为 0-14.4 g/L 时菌株的生长及发酵情况。由图可知，当乙酸浓度高达 14.4 g/L 时对菌株的生长及产酸依然没有明显的抑制作用，且乙酸的添加反而增加谷氨酸产量及得率，经检测乙酸在发酵过程中逐渐消耗，因此乙酸可能作为碳源参与谷氨酸代谢途径。Gerstmeir 等 2003 年指出当向葡萄糖基本培养基中加入乙酸时会在一定程度上降低谷氨酸棒杆菌的生长速率，且谷氨酸棒杆菌可以利用乙酸作为唯一或联合碳源。

### 3.5.2.3 *C. glutamicum* SIIM B460 对乙酰丙酸的耐受性

图 3.12 为发酵培养基中乙酰丙酸浓度为 0-6.4 g/L 时菌株的生长及发酵情况，与甲酸和乙酸类似，乙酰丙酸的添加也没有对菌株的生长及代谢产生明显影响，因此表明菌株对弱酸类抑制物具有极强的耐受性。



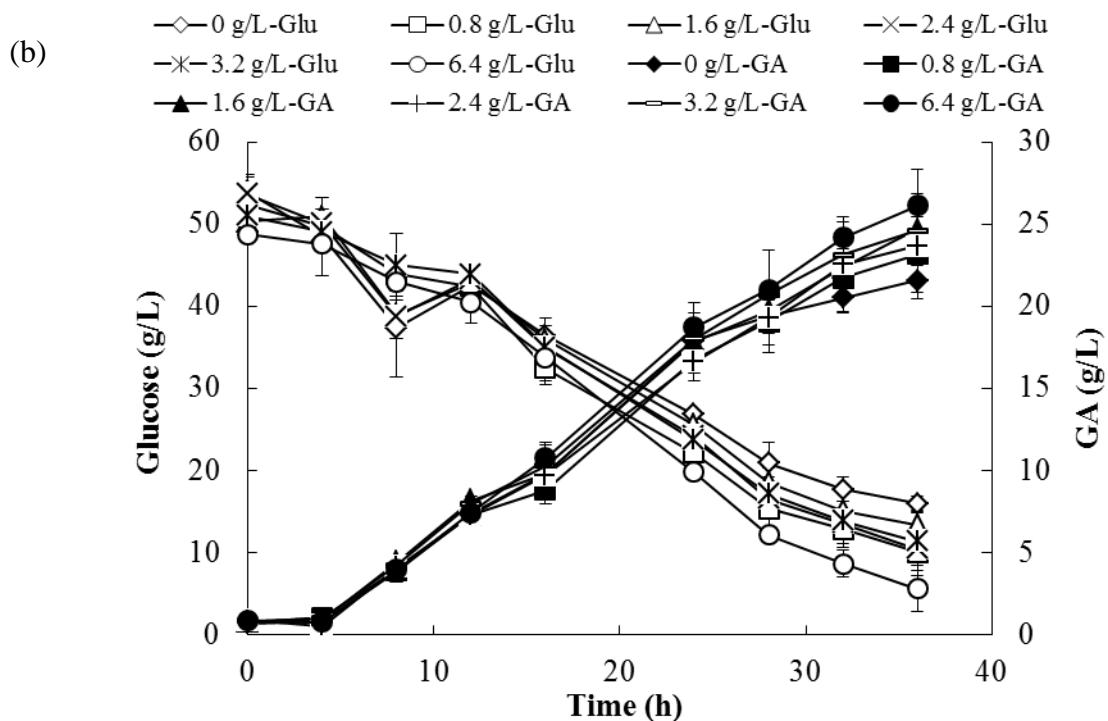


图 3.12 *C. glutamicum* SIIM B460 对乙酰丙酸的耐受性

Fig. 3.12 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to levulinic acid

### 3.5.3 *C. glutamicum* SIIM B460 对酚类抑制物的耐受性

由于木质素的分解及酸水解时碳水化合物的降解，会产生多种酚类化合物。由于不同来源生物质中木质素的甲基化程度以及在植物细胞壁中与纤维素及半纤维素结合键的不同，酚类化合物的数量和类型随原料的变化而变化。

在乙醇生产中，与呋喃类抑制物类似，酚类抑制物作用下，生物量、生长速率及乙醇产率都有所降低且远高于乙醇得率的降低水平。对于酿酒酵母来说，酚类化合物的分子量越低，抑制作用越强。同时，取代基的位置，如对位、邻位及原位，也影响化合物的毒性。如邻位会增强香草醛的毒性，而当甲氧基及羟基处于原位及对位时则不影响毒性。通过对功能基团如酚醛、酮、酸进行实验可以得出，酚类物质的疏水性也与酿酒酵母乙醇产率的降低有关。一般说来，醛及酮比酸的抑制作用强，而酸则强于醇类。酚类物质对酿酒酵母及其他真核微生物的抑制机理尚不完全清楚，这主要是由于其基团的多样性及难以进行定性及定量分析。酚类化合物可能作用于生物膜上，引起其完整性的丢失，因此影响其作为酶附着的基质及选择性屏障的能力。弱酚酸类化合物则可能通过对质子的运输破坏电化学梯度。

#### 3.5.3.1 *C. glutamicum* SIIM B460 对苯酚的耐受性

图 3.13 为苯酚浓度在 0-1.2 g/L 范围内菌株的生长及代谢情况，如图所示，随着苯酚浓度的添加，细胞生长不断减弱，谷氨酸产量不断降低。当苯酚浓度添加至 0.3 g/L 时，菌株的生长受到微弱抑制，0.6 g/L 则严重抑制产酸。上述结果说明菌株对苯酚较为敏感，但水解液中苯酚含量一般极低，远远低于 0.3 g/L，因此菌株可对水解液范围内的

苯酚具有较高的耐受性。

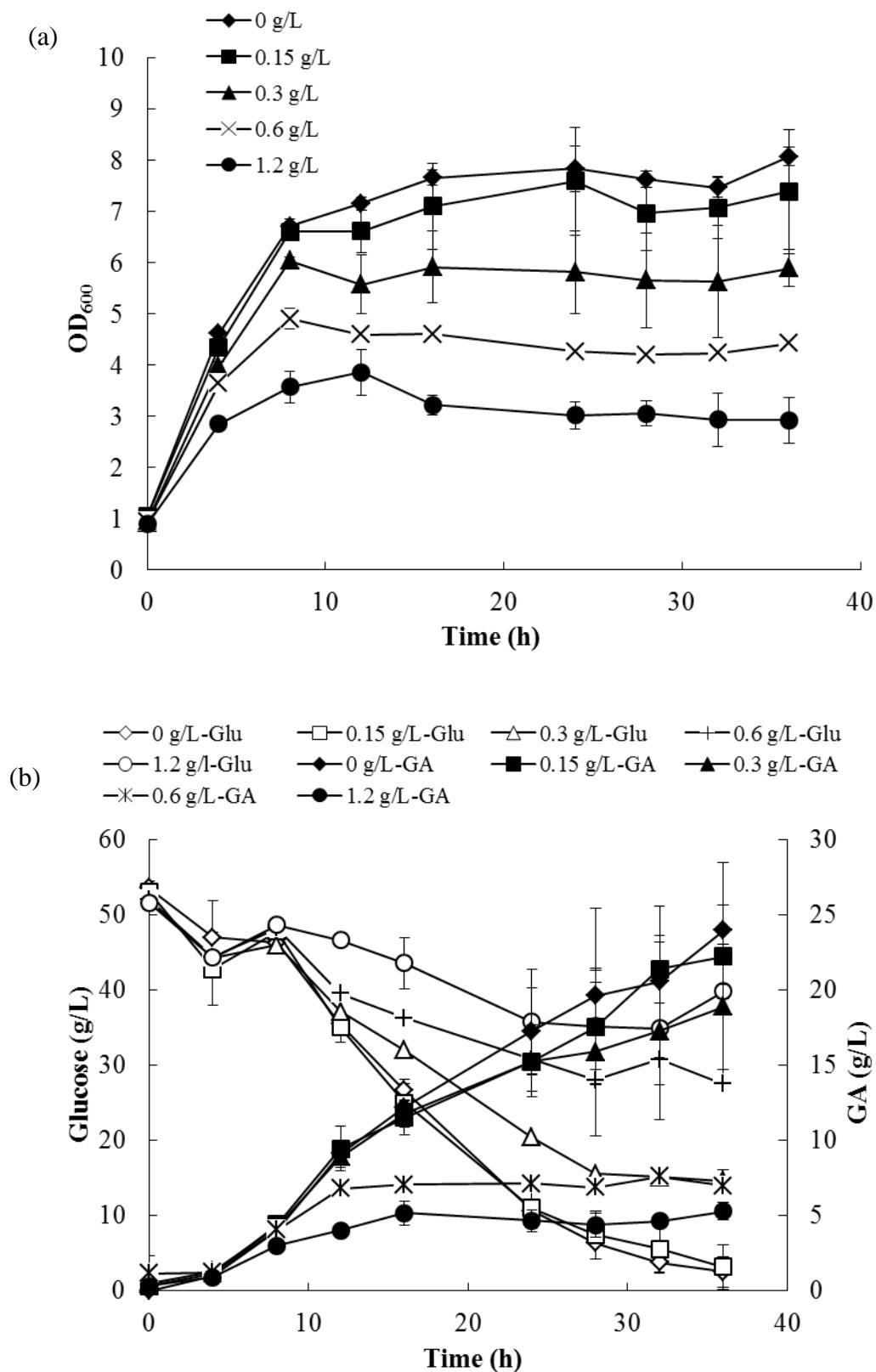


图 3.13 *C. glutamicum* SIIM B460 对苯酚的耐受性

Fig. 3.13 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to phenol

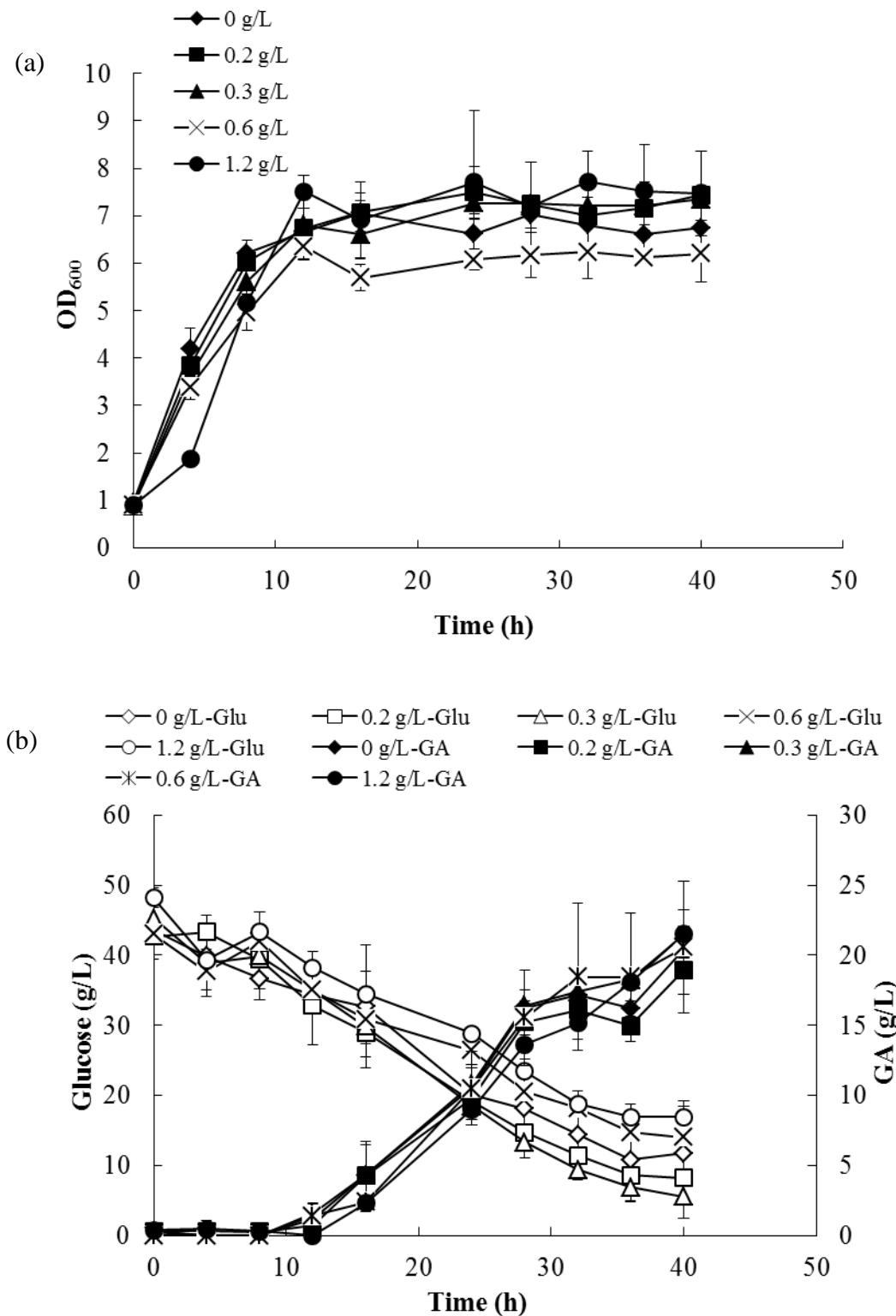
3.5.3.2 *C. glutamicum* SIIM B460 对香草醛的耐受性图 3.14 *C. glutamicum* SIIM B460 对香草醛的耐受性Fig. 3.14 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to vanillin

图 3.14 为香草醛浓度在 0-1.2 g/L 时菌株的生长及代谢情况, 由图可知, 菌株对香草醛表现出极高的耐受性, 当香草醛浓度为 1.2 g/L 时, 菌株的生长及发酵依然没有受

到抑制。

### 3.5.3.3 *C. glutamicum* SIIM B460 对丁香醛的耐受性

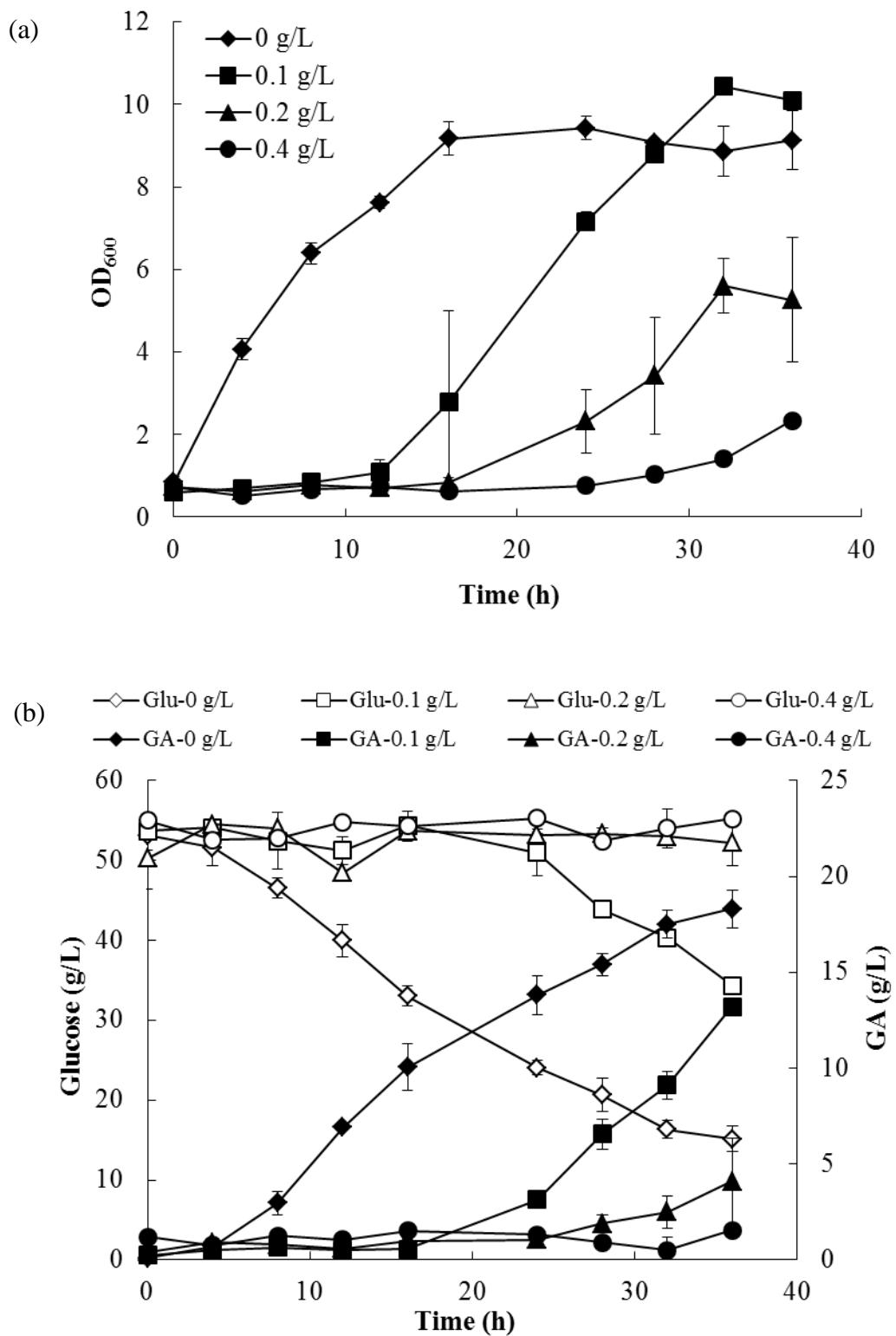


图 3.15 *C. glutamicum* SIIM B460 对丁香醛的耐受性

Fig. 3.15 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to syringaldehyde

图 3.15 为丁香醛浓度为 0-0.4 g/L 时菌株的生长及代谢情况, 如图所示, 菌株对丁

香醛极为敏感，其浓度仅为 0.1 g/L 时菌株生长即出现延滞期，且产酸即受到影响；浓度为 0.2 g/L 时则明显抑制菌株生长及谷氨酸生产。说明丁香醛对谷氨酸棒杆菌具有极强的抑制作用。

### 3.5.3.4 *C. glutamicum* SIIM B460 对松柏醛的耐受性

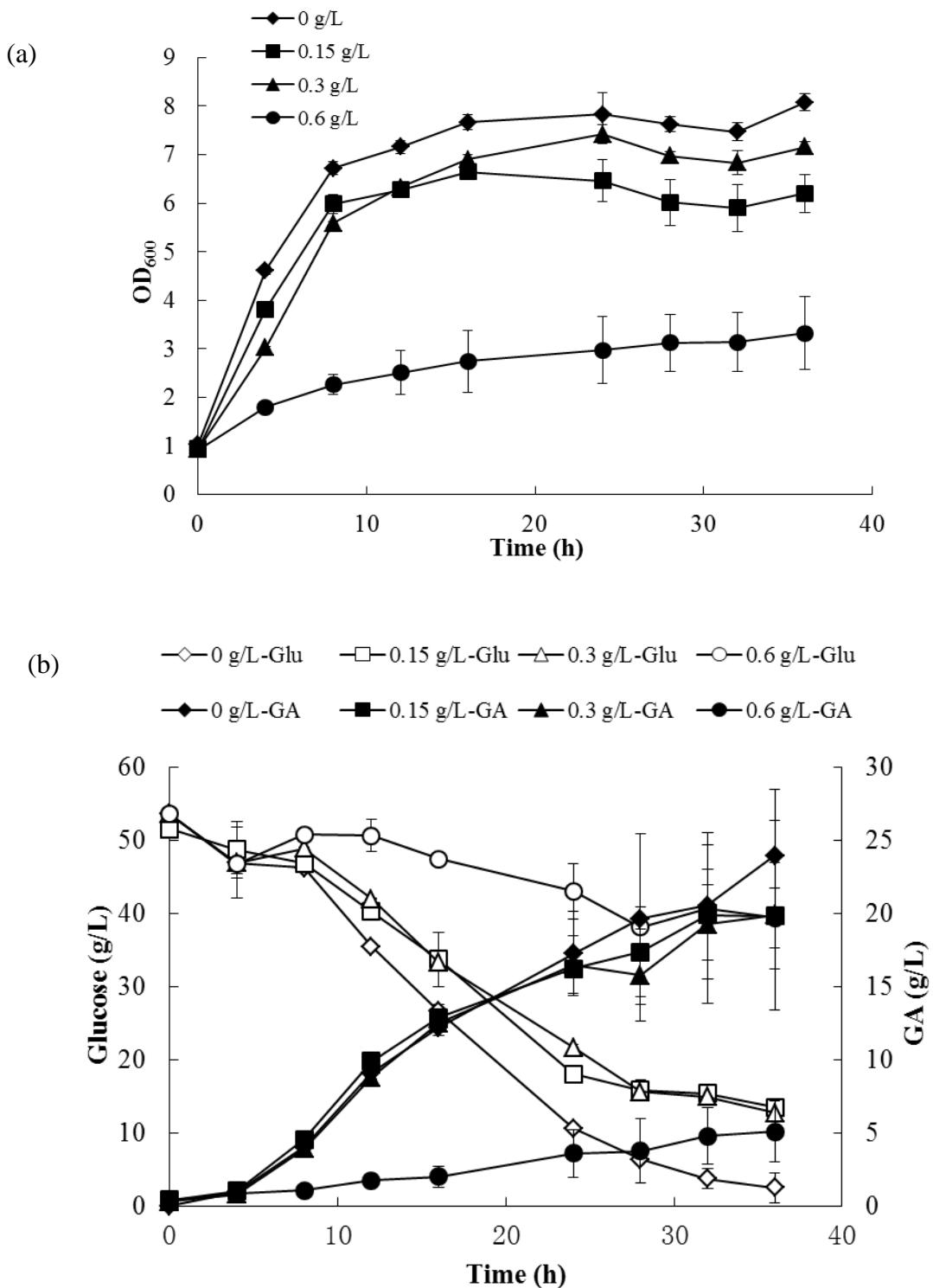


图 3.16 *C. glutamicum* SIIM B460 对松柏醛的耐受性

Fig. 3.16 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to coniferyl aldehyde

图 3.16 为松柏醛浓度为 0-0.6 g/L 时菌株的生长及发酵状况, 由图可知, 菌株对松柏醛也较为敏感。松柏醛浓度在 0-0.3 g/L 时对菌株生长及发酵的抑制作用较弱, 但当浓度为 0.5 g/L 时菌株就几乎不能生长, 代谢也受到明显抑制。

### 3.5.3.5 *C. glutamicum* SIIM B460 对 4-羟基苯甲醛的耐受性

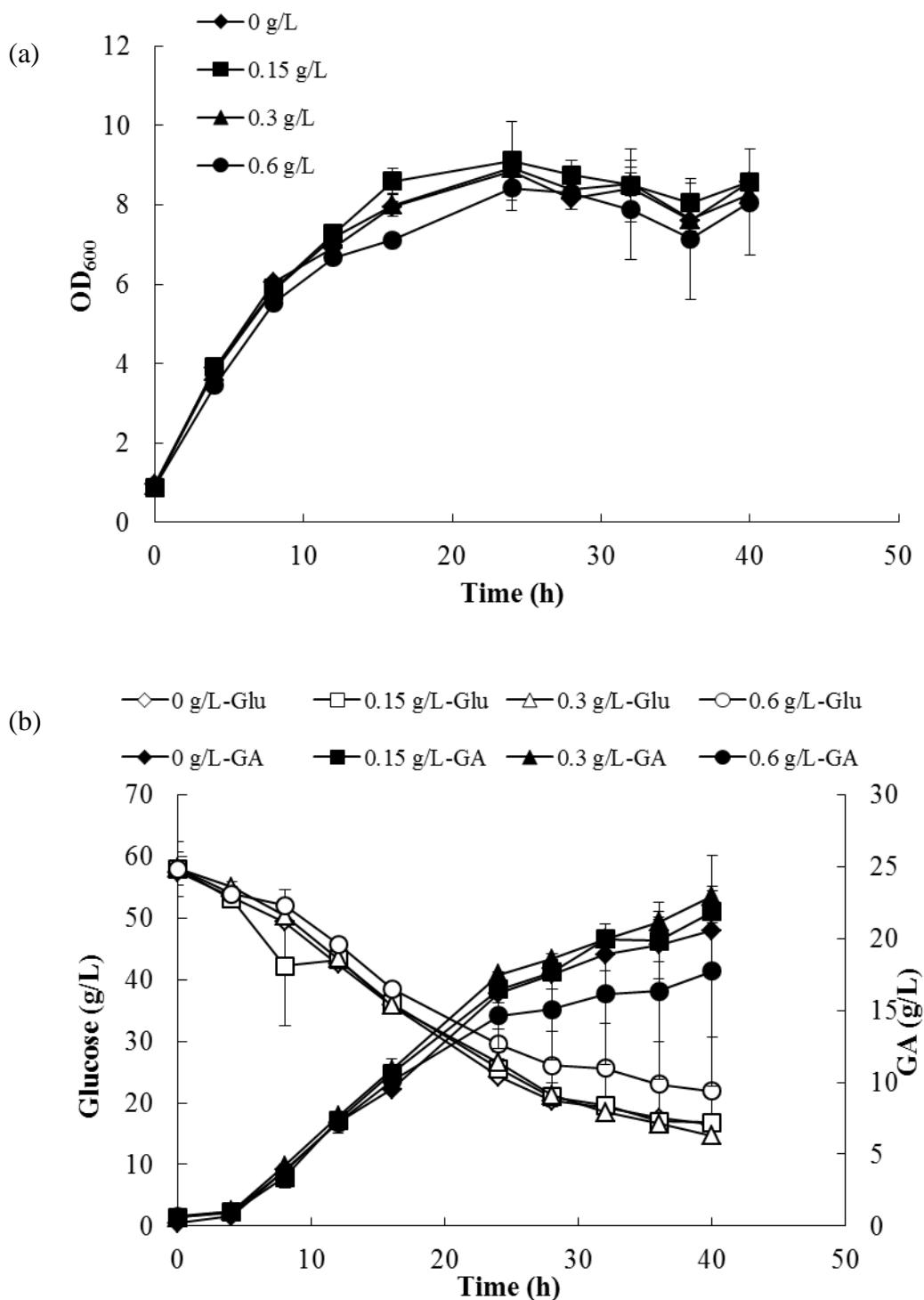


图 3.17 *C. glutamicum* SIIM B460 对 4-羟基苯甲醛的耐受性

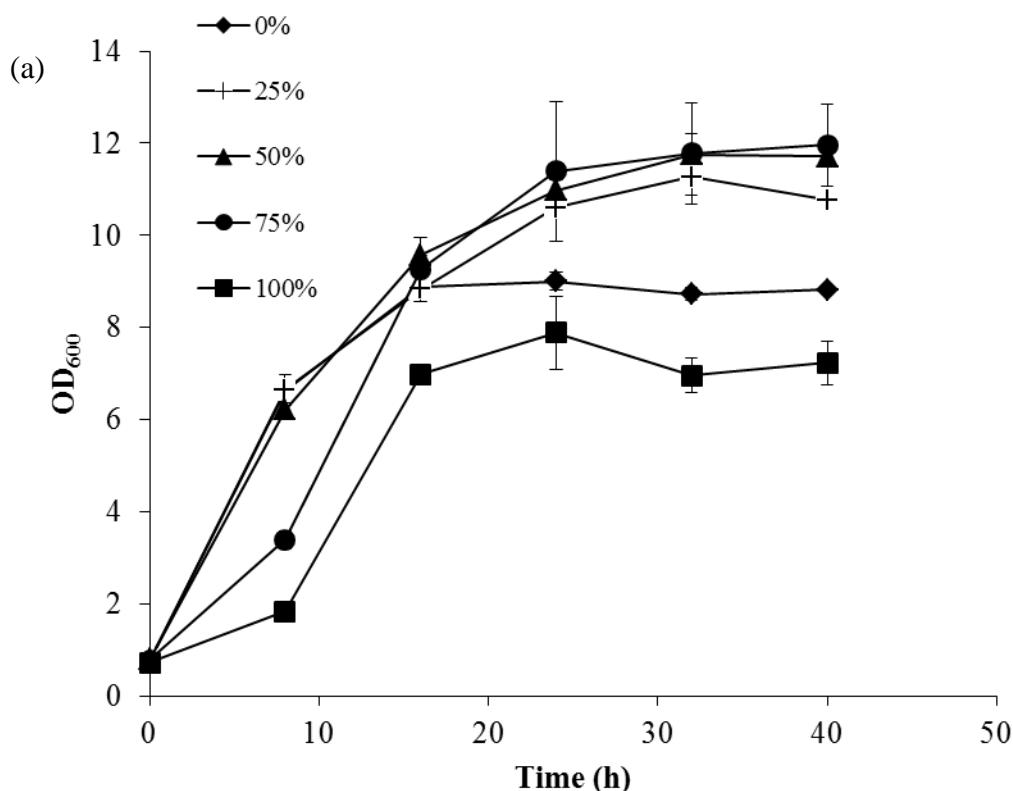
Fig. 3.17 The tolerance of *C. glutamicum* SIIM B460 to 4-hydroxybenzaldehyde

由图 3.17 可知, 菌株对四羟基苯甲醛也有一定耐受性, 当其浓度范围为 0-0.3 g/L 时, 菌株生长及谷氨酸发酵不受抑制, 当浓度增至 0.6 g/L 时, 谷氨酸产量受到微弱抑制但对生长影响不大, 说明该菌对四羟基苯甲醛耐受性较高。

由以上实验可得, *C. glutamicum* SIIM B460 对香草醛的耐受性最强, 其浓度为 1.2 g/L 时菌株的生长及产酸依然不受影响; 菌株对 4-羟基苯甲醛也具有较高的耐受性, 当其浓度为 0.6 g/L 时仍能较好的生长并产酸; 菌株对苯酚及松柏醛较为敏感, 在 0-0.3 g/L 范围内可以较好的生长并产酸, 但当浓度增加则会对生长及代谢产生较强的抑制; 该菌对丁香醛则极为敏感, 较低浓度时即表现出对生长及产酸较强的抑制作用。但由于木质纤维素水解液中酚类抑制物较少, 一般浓度均低于能对菌株产生抑制作用的浓度, 因此相对来说, 菌株对酚类物质也具有较高的耐受性。

### 3.5.4 多种抑制物共同作用下菌株的耐受性

以上实验考察了菌株对与处理过程中可能产生的多种抑制物的耐受性能, 但由于未脱毒玉米秸秆水解液中含有多种不同抑制物, 因此实验选取了几种水解液中含量较多或较有代表性的抑制物共同加入培养基模拟水解液环境, 考察其对菌株生长及代谢的影响。所用复合抑制物浓度分别为: 糠醛 0.8 g/L, 5-HMF 0.5 g/L, 乙酸 4g/L, 丁香醛、香草醛、4-羟基苯甲醛分别为 0.1 g/L, 并用不含抑制物的发酵培养基稀释至不同浓度梯度。



注: 100% 指添加上文所提多种浓度抑制物的合成培养基,

0-75% 指培养基中抑制物浓度分别为 100% 培养基的 0-75%

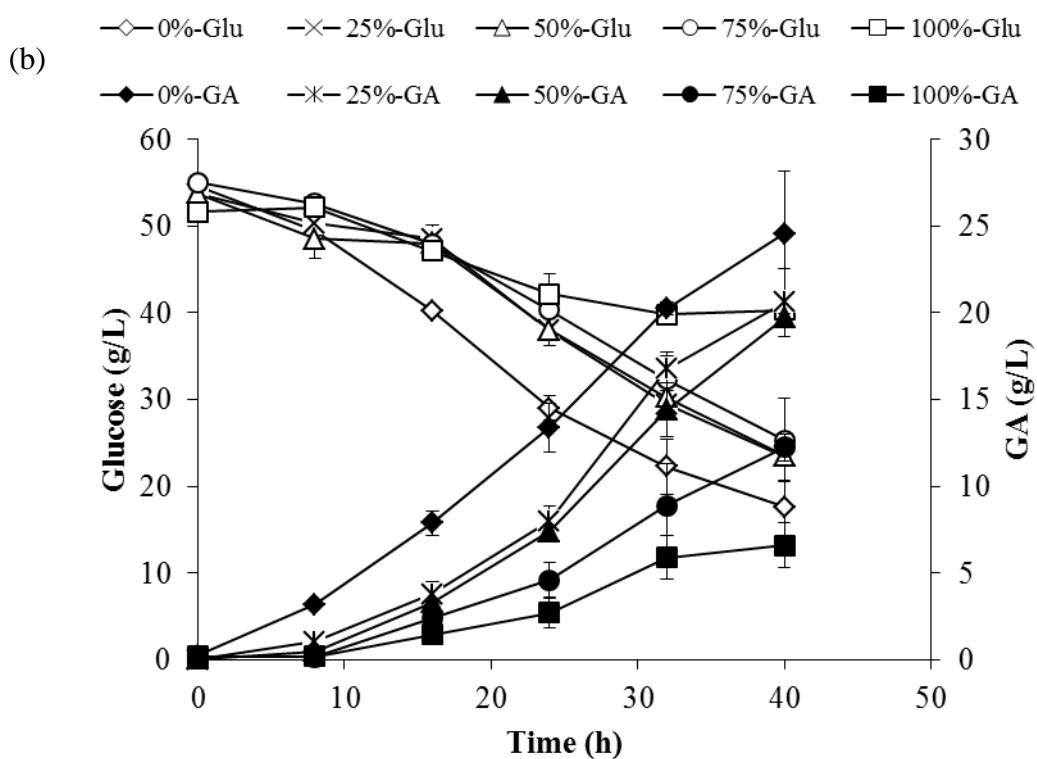


图 3.18 多种抑制物复合作用时菌株的生长及代谢情况

Fig. 3.18 Effects of growth and GA by *C. glutamicum* SIIM B460 in the SM adding inhibitors

由图 3.18 可知, 尽管菌株对单一抑制物具有较强的耐受性, 但在多种抑制物复合作用时, 其对菌株的抑制作用增强, 在模拟水解液环境下, 菌株的生长受到抑制, 出现延滞期且生物量降低, 糖耗及谷氨酸生成则明显受到抑制。当用不含抑制物的发酵培养基稀释至体积浓度 50% 时, 对菌株生长及产酸的抑制作用不明显。

以上结果表明, 菌株对抑制物环境普遍具有较高的耐受性, 因此接下来实验试图利用未脱毒玉米秸秆水解液进行谷氨酸发酵。由之前的实验可知, 在未脱毒水解液中尽管菌株生长存在一定延滞期, 但后期菌体依然可以较好的生长且优于合成培养基。镜检观察得知菌体形态为较小较圆的不适宜产酸形态, 根据查阅资料文献表明, 该状态是由于培养基中营养尤其是生物素过剩引起的, 因此实验试图利用添加青霉素破坏菌株细胞壁结构以促进谷氨酸分泌。

## 第 4 章 结论与展望

### 4.1 结论

谷氨酸作为一种应用极为广泛的大宗化学品，若利用较为常见的生物质原料玉米秸秆发酵获得，与传统的以淀粉等粮食性原料生产相比，具有较大的经济优势及环保效果。本文基于生物炼制的生产工艺，利用一株发酵性能较好的菌株 *Corynebacterium glutamicum* SIIM B460，该菌对木质纤维素预处理产生的抑制物具有较强的耐受性能，能够在未脱毒玉米秸秆水解液中可以较好的生长。由于玉米秸秆水解液中生物素含量高于发酵所需的生物素亚适量水平，因此需对其进行诱导处理，在青霉素诱导下，菌株可利用未脱毒玉米秸秆水解液发酵生产谷氨酸，且得率与合成培养基相当，具体结论如下。

#### 4.1.1 菌株的筛选

本文通过调节种子及发酵培养基中玉米浆的浓度，对实验室所购菌株的发酵性能进行比较并筛选。最终确定 *C. glutamicum* SIIM B460 为发酵性能较好的谷氨酸生产菌，其适宜的营养浓度为种子培养基中玉米浆浓度 5 g/L，发酵培养基中玉米浆浓度 0.5 g/L，经 36 h 发酵得率在 45% 左右。

#### 4.1.2 *Corynebacterium glutamicum* SIIM B460 的抑制物耐受性

本文所用菌株 *Corynebacterium glutamicum* SIIM B460 能够在脱毒玉米秸秆水解液中迅速生长，且生物量远远高于合成培养基，在不脱毒玉米秸秆水解液中由于存在一些抑制物，菌株生长表现出一定的延滞，但延滞期后菌株可以良好生长。

实验考察了菌株对预处理可能产生的十种抑制物的耐受性，结果表明实验表明菌株对木质纤维素预处理过程中产生的多种抑制物都具有较高的耐受性。菌株对弱酸类抑制物耐受性极强，实验浓度范围内均没有产生抑制作用，且乙酸等化合物的添加可能促进谷氨酸的生成，可能是其可以作为碳源参与谷氨酸代谢。菌株对呋喃类抑制物也有较高的耐受性，其中菌株对 5-HMF 的耐受性高于糠醛；随着糠醛的添加，谷氨酸得率不断降低，但并不影响生长，0-1.5 g/L 时，谷氨酸生产受到微弱抑制；3 g/L 即不能生长；5-HMF 浓度至 2.5 g/L 时，菌株产酸受到抑制但不影响生长。酚类抑制物中，菌株对香草醛耐受性最高，实验范围内无明显抑制作用；4-羟基苯甲醛对菌株抑制作用不大；松柏醛及苯酚对菌株生长有一定的抑制作用，高于 0.3 g/L 时菌株产酸受到微弱抑制；菌株对丁香醛极为敏感，存在较低浓度时即产生明显的抑制作用。但由于实验选取的抑制物浓度范围较高，菌株对抑制物的耐受程度基本上都高于水解液中的实际浓度，因此相对来说，菌株对三种抑制物都具有较高的耐受性。

当向合成培养基中添加与水解液中浓度相似的多种抑制物时，尽管单一抑制物浓度均低于菌株的耐受浓度，但依然对菌株生长及产酸产生抑制作用，可能是由于多种抑制物协同作用。因此由于水解液成分较为复杂及多种抑制物共同作用，菌株的生长及代谢

均出现一定的延滞。

#### 4.1.3 玉米秸秆水解液中谷氨酸的发酵

水解液中虽然菌株可以较好的生长，但在不进行诱导时，没有谷氨酸产生。结合菌株呈现出较小较圆大量繁殖的形态。通过利用生物素检测试剂盒对玉米浆及水解液中生物素进行检测，玉米浆中生物素含量为  $744 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，即含有  $0.5 \text{ g/L}$  玉米浆的发酵培养基中生物素浓度为  $0.372 \mu\text{g}/\text{L}$ ，而  $15\%$  未脱毒玉米秸秆水解液中所含生物素浓度为  $11.85 \mu\text{g}/\text{L}$ ，远高于发酵所需的生物素亚适量水平。因此导致水解液中谷氨酸无法分泌出胞外，碳源全部用于谷氨酸生长。

通过添加青霉素的方法可以诱导水解液中谷氨酸的生产，其具体添加方式应与菌体生长相结合，本文采用 OD 到达 5 和 10 时各添加一次青霉素使青霉素总浓度为  $200 \text{ mg/L}$ ，在此基础上，*C. glutamicum* SIIM B460 可利用  $15\%$  未脱毒玉米秸秆水解液发酵生产谷氨酸，谷氨酸浓度可达  $31 \text{ g/L}$ ，产量及得率均能达到甚至优于合成培养基水平。

## 4.2 展望

谷氨酸发酵虽然已经拥有较长的历史，但由于发酵工艺较为复杂，仍旧存在诸多不足。以来源广泛价格低廉的生物质原料代替传统的粮食性原料进行谷氨酸生产，不仅降低生产成本，而且节约粮食，保护环境，因此具有较大的发展前景。利用生物炼制工艺以木质纤维素原料进行常用化学品的生产，虽然在乙醇、乳酸等方面的研究已经较多，但有关木质纤维素发酵生产谷氨酸的研究依然较少。所以，若是能够利用木质纤维素进行工业生产谷氨酸，将会是谷氨酸发酵行业的重要革新。

在本研究中，由于未脱毒水解液中存在不同浓度的抑制物且不同预处理批次的物料间存在差异，菌株在未脱毒水解液中生长表现出一定的不稳定性，因此青霉素添加必须根据菌株生长而定。为了建立水解液中菌株生长的稳定模式及青霉素的稳定添加策略，通过对菌株进行长期驯化以使之在适应未脱毒水解液环境，因此有关菌株驯化的实验还需继续进行探索。

由于菌株对预处理可能产生的多种抑制物具有较强的耐受性，因此有关菌株对抑制物耐受及降解的机理也在进一步探索中，从分子生物学的角度对谷氨酸棒杆菌中抑制物代谢相关基因的进行挖掘并使之付诸应用也是接下来研究的目标。

## 参考文献

- [1] 王天贵, 王诗瑜, 张引沁. 葡萄糖发酵制取谷氨酸的研究进展. 平原大学学报. 2000, 17 (3): 89-90
- [2] 于信令. 味精工业手册. 北京: 中国轻工业出版社. 1995, 7-8
- [3] 于信令. 味精工业手册. 北京: 中国轻工业出版社. 1995, 42-46
- [4] Wang XY, Chen J, Quinn P. Reprogramming microbial metabolic pathways. *Subcellular Biochemistry*, 2012, 64: 261-281
- [5] 张伟国, 钱和. 氨基酸生产技术及其应用. 北京: 中国轻工业出版社. 1997, 54-55
- [6] 王远山, 徐建妙, 陈小龙. 药用氨基酸的应用及其生物催化与生物转化法生产. 中国现代应用药学杂志. 2005, 22(9): 825-828
- [7] 尚振铎. 复方谷氨酸治疗癫痫 20 例临床观察. 实用中西医结合杂志. 1997, 4: 383
- [8] 王多闻. 氨基酸系表面活性剂. 日用化学工业. 1983, 5: 27-29
- [9] 王帅. L-谷氨酸发酵高产菌选育及其发酵优化的研究. 硕士学位论文. 无锡: 江南大学. 2008
- [10] 陈咏竹, 孙启玲. Y-多聚谷氨酸的性质、发酵生产及其应用. 微生物学通报. 2004, 31(1): 122-126
- [11] Ikeda K. A production method of seasoning mainly consists of salt of L-glutamic acid. Japanese patent 14805. 1908.
- [12] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2004, 50(6): 331-343
- [13] Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Current Opinion in Microbiology*. 2006, 9(3): 268-274
- [14] Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104(1): 155-172
- [15] 刘苗. 应用基因组改组技术选育耐高温谷氨酸生产菌. 硕士学位论文. 无锡: 江南大学. 2009
- [16] 曹艳. 利用葡萄糖浓度在线控制系统提高谷氨酸发酵性能. 硕士学位论文. 无锡: 江南大学. 2009
- [17] 王欣. 谷氨酸生产菌种选育和高产条件的优化及生物素的测定. 硕士学位论文. 济南: 山东轻工业学院. 2011
- [18] Nakayama K. Lysine. In: Mao-Young M. (ed) *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon

- press Inc, Oxford. 1986, 607–620
- [19] Bormann EI, Kholy ER, Eikmanns BJ, Gutmann M, Sahm H. Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59 (7): 2329–2331
- [20] Tesch M, Graaf AA DE, Sahm H. In vivo fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(3): 1099–1109
- [21] Kikuchi M, Nakao Y. Glutamic acid. *Progress in Industrial Microbiology*. 1986, 24: 101-116
- [22] Shiio I, Otsuka SI, Takahashi M. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *Journal of Biochemistry*. 1962, 51(1): 56-62
- [23] Clement Y, Laneelle G. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *Journal of General Microbiology*. 1986, 132(4): 925-929
- [24] Nakao Y, Kikuchi M, Suzuki M, Doi M. Microbial production of glutamic acid by glycerol auxotrophs. I. Induction of glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from paraffins. *Agricultural Biology and Chemistry*. 1972, 36: 490-496
- [25] Kitano K, Sugiyama Y, Kanzaki T. L-Glutamate fermentation with acetic acid by an oleic requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. *Journal of Fermentation Technology*. 1972, 50: 182-191
- [26] Bayan N, Houssin C, Chami M, Leblon G. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology application. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104(1): 55-67
- [27] Puech V, Chami M, Lemassu A, Laneelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daffe M. Structure of the cell envelope of *Corynebacteria*: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology*. 2001, 147(5): 1365-1382
- [28] Eggeling L, Sahm H. The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2001, 92(3): 201-231
- [29] Hoischen C, Kramer R. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(6): 3409-3416
- [30] Naji B, Gehin G, Bonaly R. Structure of surfactants and glutamate efflux by *Corynebacterium glutamicum*. *Process Biochemistry*. 2000, 35(8): 759-764
- [31] 潘林, 孙建义. 生物素的生理功能及其分子作用机制. *中国饲料*. 2005, 6: 21-24

- [32] 刘汉林, 戚咸理, 贺建华等. 生物素及其营养应用. 饲料博览. 2003, 7: 17-19
- [33] 赵克勤, 谭平, 刘国平, 邹祖然. 味精生产中生物素的测定及控制. 中国调味品. 2006, 11: 30-33
- [34] 黄方一主编. 发酵工程. 武汉: 华中师范大学出版社. 2006, 130-134
- [35] 陈宁主编. 氨基酸工艺学. 北京: 中国轻工业出版社. 2011, 41-44
- [36] Chiaki S. History of glutamate production. American Journal of Clinical Nutrition. 2009, 90(3): 728-732
- [37] Radmacher E, Stansen KC, Besra GS, Alderwick LJ, Maughan WN, Hollweg G, Sahm H, Wendisch VF, Eggeling L. Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology. 2005, 151(5): 1359-1368
- [38] Clement Y, Escoffier B, Trombe MC, Laneelle G. Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. Journal of General Microbiology. 1984, 130(10): 2589-2594
- [39] Nampoothiri M, Hoischen C, Bathe B, Mockel B, Pfefferle W, Krumbach K, Sahm H, Eggeling L. Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. Applied and Environmental Microbiology. 2002, 58(1): 89-96
- [40] Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Applied and Environment Microbiology. 2007, 73(14): 4491-4498
- [41] Nottebrock D, Meyer U, Kramer R, Morbach S. Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiology Letters. 2003, 218(2): 305-309
- [42] Shigu H, Terui G. Studies on process of glutamic acid fermentation at the enzyme level. I. On the change of a-ketoglutaric acid dehydrogenase in the course of culture. Journal of Fermentation Technology. 1971, 49: 400-405
- [43] Kinoshita S. Glutamic acid bacteria. In: Demain AL, Solomon NA (eds) Biology of industrial microorganisms. Benjamin Cummings. London. 1985, 115-145
- [44] Kawahara Y, Takahashi Fuke K, Shimizu E, Nakamatsu T, Nakamori S. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 1997, 61(7): 1109-1112
- [45] Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. Journal of Biological Chemistry. 2006, 281(18): 12300-12307

- [46] Kim J, Fukuda H, Hirasawa T, Nagahisa K, Nagai K, Wachi M, Shimizu H. Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86 (3): 911-920
- [47] Kim J, Hirasawa T, Sato Y, Nagahisa K, Furusawa C, Shimizu H. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 81(6): 1097-1106
- [48] Kimura E. Metabolic engineering of glutamate production. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 2003, 79: 37-58
- [49] Chinen A, Kozlov YI, Hara Y, Izui H, Yasueda H. Innovative metabolic pathway design for efficient L-glutamate production by suppressing CO<sub>2</sub> emission. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2007, 103(3): 262-269
- [50] Liu Q, Zhang J, Wei XX, Ouyang SP, Wu Q, Chen GQ. Microbial production of L-glutamate and L-glutamine by recombinant *Corynebacterium glutamicum* harboring *Vitreoscilla* hemoglobin gene *vgb*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 77 (6): 1297-1304
- [51] 陶志恒.葡萄糖母液和木薯粉粗原料糖混合谷氨酸发酵试验. *江苏食品与发酵*. 1996, 1:24-25
- [52] 谭平. L-谷氨酸合成新工艺研究. 硕士学位论文. 长沙: 湖南大学. 2006
- [53] Yao WJ, Chu CL, Deng XZ. Display of  $\alpha$ -amylase on the surface of *Corynebacterium glutamicum* cells by using NCgl1221 as the anchoring protein, and production of glutamate from starch. *Archives of Microbiology*. 2009, 191(10): 751-759
- [54] 王瑶, 张银冰, 邓毛程. 流加混合碳源的谷氨酸发酵工艺研究. *食品与机械*. 2007, 23 (4): 30-33
- [55] Mustafa B. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52(2): 858-875
- [56] Wyman CE. Production of low cost sugars from biomass: progress, opportunities, and challenges. In: Overend RP, Chornet E (eds). *Biomass: a growth opportunity in green energy and value added products*. Pergamon Press, United Kingdom. 1999, 867-872
- [57] Balat M. Gasification of biomass to produce gaseous products. *Energy Source*. 2009, 31(6): 16-26.
- [58] Hamelinck CN, Van HG, Faaij APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*. 2005, 28(4): 384-410
- [59] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and

- biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9(16): 21-51.
- [60] Demirbas A. Heavy metal absorption onto agro-based waste materials: a review. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, 157(2-3): 220-229
- [61] Kawaguchi H, Vertes AA, Okino S, Inui M, Yukawa H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environment Microbiology*. 2006, 72(5): 3418-3428
- [62] Kawaguchi H, Sasaki M, Vertes AA, Inui M, Yukawa H. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 77(5): 1053-1062
- [63] Schneider J, Niermann K, Wendisch VF. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2011, 154(2-3): 191-198
- [64] Gopinath V, Meiswinkel TM, Wendisch VF, Nampoothiri KM. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 92(5): 985-996
- [65] Tsuchidate T, Tateno T, Okai N, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Glutamate production from  $\beta$ -glucan using endoglucanase-secreting *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90(3): 895-901
- [66] Nampoothiri KM, Pandey A. Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium sp*. *Biotechnology Letters*. 1996, 18(2): 199-204
- [67] Das K, Anis M, Mohd BMN. Azemi, Ismail N. Fermentation and recovery of glutamic acid from palm waste hydrolysate by Ion-exchange resin column. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005, 48(5): 551-555
- [68] Tavakkoli M, Hamidi-Esfahani Z, Azizi MH. Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, 5(1): 92-99
- [69] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hagerdal B, Liden G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(4): 340-349
- [70] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3:26
- [71] Taherzadeh MJ, Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from

lignocellulosic materials: a review. *BioResources*. 2007, 2(3): 472-99

[72] 韩鲁佳, 闫巧娟, 刘向阳等. 中国农作物秸秆资源及其利用现状. *农业工程学报*. 2002, 18 (5): 87-91

## 致谢

本文是在鲍杰教授的耐心指导下完成的。从论文的选题、研究方案的确定至毕业论文的审阅，鲍老师都投入了极大的精力与心血。在实验进入瓶颈阶段时，鲍老师总是及时给我帮助，助我顺利完成学业。鲍老师渊博的学识、敬业的精神以及严谨的治学态度都深深影响着我，使我受益匪浅。通过这三年的学习，不仅我的专业知识及技能有所提高，同时在分析及解决问题等方面的能力也有所提升。在此向鲍老师表示我衷心的感谢！

感谢导师胡凤仙老师在学习和生活中对我的指导和关心，胡老师的悉心教导和无私帮助使我克服了很多学习及生活中的障碍，使我能够保持乐观、积极的态度面对科研工作，帮助我顺利毕业。

感谢张健老师在研究方法及方案上给予的指导；感谢高秋强老师在实验期间对我的帮助。

感谢崔振阳、包艳文、何燕青、顾翰琦、张宏森、孟佼、王娟、刘婷等同学在实验中给予的帮助，感谢实验室其他的师兄师姐、师弟师妹和同学们对我实验和生活中的帮助，让我在一个温暖和谐的实验室中与你们一起度过这一段美好而充实的岁月。

感谢我的父母对我的养育之恩，感谢你们对我的爱护与包容，感谢你们对我的培养与支持，你们一直是我最有力的后盾。

最后向所有关心我的家人、老师、同学及朋友们表示衷心的感谢！