

学校代码：10251
学 号：010120177

華東理工大學

博 士 学 位 论 文

论文题目 酚醛抑制物生物脱毒的分子生物学
解析及其关键基因元器件库的构建

学科专业 发酵工程

研究方向 生物能源

论文作者 易霞

指导教师 鲍杰 教授

定稿日期：2016年4月19日

分类号: Q815 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

酚醛抑制物生物脱毒的分子生物学解析及其关键基因

元器件库的构建

易霞

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

申请学位级别: 博士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2016年4月19日 论文答辩日期: 2016年5月30日

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: 2016年6月3日

答辩委员会主席: 周志华 研究员

评 阅 人: 洪 枫 研究员

李 春 教授

田朝光 研究员

杨 琛 研究员

周志华 研究员

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：易霞

2016年5月31日

指导教师签名：鲍杰

2016年5月31日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

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

酚醛抑制物生物脱毒的分子生物学解析及其关键基因元器件库的构建

摘要

酚醛抑制物是木质纤维素生物炼制过程的预处理步骤产生的主要抑制物之一，其主要源于木质素的过度降解，其代表性化合物包括隶属 *p*-羟基苯基类的 4-羟基苯甲醛、丁香基类的丁香醛和愈创木酚基类的香草醛。与呋喃类（糠醛和 5-羟甲基糠醛）和弱酸类（乙酸、甲酸和乙酰丙酸）抑制物不同，种类较多的酚醛抑制物难挥发且水溶性较差，其芳香环结构致使其降解缓慢。因此，酚醛抑制物是纤维素酶和发酵微生物的主要抑制物。生物脱毒是一种全新的脱毒概念，被认为是未来生物炼制过程不可或缺的步骤，其主要思路是利用具有生物降解能力的微生物转化木质纤维素预处理过程产生的抑制物。目前，对呋喃醛和有机酸生物脱毒机理的研究比较清楚。酚醛抑制物因为水溶性差而难以精确定量，因此其生物脱毒机理报道较少。本研究采用 RNA-Seq 技术和 DNA 芯片技术，对生物炼制菌株树脂枝孢霉菌 (*Amorphotheca resinae* ZN1) 和运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis* ZM4) 的酚醛抑制物代谢途径和耐受机制进行了解析；对酚醛抑制物生物脱毒关键基因进行了筛选，并在运动发酵单胞菌进行了酚醛抑制物代谢途径的强化改造，初步测试了酚醛抑制物生物脱毒与纤维素乙醇发酵的整合生物加工菌株的能力；主要依据转录组数据，构建了细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类和弱酸类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库。

第一部分，为了探究专司生物脱毒的丝状真菌 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的机制，本研究通过 RNA-Seq 技术考察了 *A. resinae* ZN1 脱毒酚醛抑制物生成酚酸和酚醇的转录组。结果发现，534 个、1576 个和 1261 个基因分别在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛转化过程中显著差异表达。GO 分析发现，氧化还原和转运是 *A. resinae* ZN1 脱毒酚醛抑制物的主要生物学过程。基于推测的 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢途径，本研究发现醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶和醛还原酶是 *A. resinae* ZN1 还原酚醛抑制物产醇代谢途径的关键酶，醛脱氢酶是 *A. resinae* ZN1 氧化酚醛抑制物产酸代谢途径的关键酶。

第二部分，为了探究产乙醇细菌 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的机制，本研究通过 DNA 芯片技术考察了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物产醇的转录组。结果发现，442 个、67 个和 306 个基因分别在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下显著差异表达。还原、转运和调控是 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的主要分子机制。本研究鉴定了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的 72 个关键基因，其中包括酚醛抑制物胁迫下均显著差异上调表达的 ZMO1116 (Oxidoreductase) 和 ZMO1885 (NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase)。同时，本研究通过基因组图谱定位发现，在至少 2 种酚醛抑制物胁迫下显著差异上调表达的 272 个基因涉及 36 个基因簇，560 个显著差异下调

表达的基因涉及 63 个基因簇。

第三部分, 为了考察生物脱毒关键基因转化酚醛抑制物的能力, 本研究通过遗传工程强化改造了底盘微生物 *Z. mobilis* ZM4。通过强化 *Z. mobilis* ZM4 自身的酚醛抑制物还原代谢途径和重构酚醛抑制物氧化代谢途径, 本研究尝试提高 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。结果表明, *Pseudomonas putida* KT2440 来源的 NAD⁺ 依赖型的醛脱氢酶 (PP_2680) 显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。PP_2680 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液发酵 24 h 的乙醇浓度、乙醇产率和乙醇得率分别较对照菌株提高 63.7%、100.0% 和 106.3%。PP_2680 蛋白在离体条件下不具备还原能力, 但是其依赖 NAD(P)⁺ 氧化 4-羟基苯甲醛、香草醛、糠醛和 5-羟甲基糠醛生成 4-羟基苯甲酸、香草酸、糠酸和 2,5-呋喃二甲醛。但是, PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 活体条件下虽然提高了醛类抑制物转化和纤维素乙醇发酵的能力, 但是未能氧化酚醛和呋喃醛产生相应的酸。而且, PP_2680 (NAD⁺-ALDH) 和 ZMO1696 (NADH-ADH) 共表达间接证明了辅因子回补是 PP_2680 提高 *Z. mobilis* ZM4 醛类抑制物转化和纤维素乙醇发酵能力的重要原因。一个意外的发现是, PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的异源表达提高了 ED 途径的醇脱氢酶和氧化磷酸化过程 H⁺ 转运 ATPase、焦磷酸酶和细胞色素 bd 复合体编码基因的表达水平。

第四部分, 针对木质纤维素来源抑制物生物脱毒菌株理性改造的必要性, 本研究提出构建木质纤维素来源抑制物的生物脱毒关键基因元器件库。主要依据抑制物胁迫条件下的转录组数据, 本研究构建了细菌 (*B. subtilis*、*C. beijerinckii*、*C. glutamicum*、*E. coli*、*L. brevis*、*P. putida*、*T. pseudethanolicus* 和 *Z. mobilis*)、酵母 (*Pichia stipites* 和 *S. cerevisiae*) 和霉菌 (*A. resiniae*) 的酚类、呋喃类和弱酸类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库。研究发现, 酚类抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及氧化还原、转运和调控; 呋喃类抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及氧化还原、转运、调控和氧化胁迫; 乙酸生物脱毒的关键基因主要涉及中心碳代谢、转运和调控; 成分复杂的木质纤维素水解液体系除了涉及转运和调控外, 还涉及其他多方面的生物学过程。同时, 基于构建的基因元器件库, 本研究推测了 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径, 揭示了酚醛抑制物氧化产酸 (诸如原儿茶酸和 3-O-甲基没食子酸) 途径是 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的关键代谢节点。

综上所述, 本研究从分子生物学水平解析了生物炼制脱毒菌株和发酵菌株转化酚醛抑制物的机制, 测试了经代谢强化改造的 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的能力, 构建了细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类和弱酸类生物脱毒的关键基因元器件库。本研究为生物炼制菌株的抑制物生物脱毒改造和发酵性能强化提供了重要的基因元器件库和整合生物加工平台。

关键词: 木质纤维素生物炼制; 酚醛抑制物; 生物脱毒; 树脂枝孢霉菌; 运动发酵单胞菌

Analysis of biotransformation mechanism of phenolic aldehyde inhibitors and the construction of the key gene device library

Abstract

Phenolic aldehydes derived from the pretreatment step of biorefinery processing chain include 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin, representing *p*-hydroxyphenyl (H), syringyl (S), and guaiacyl (G) groups, respectively. These compounds are one of the three major inhibitor groups generated from lignocellulose pretreatment, furans, weak organic acids, and phenolics. Different from furan aldehydes (furfural and 5-hydroxymethylfurfural) and weak acids (acetic acid, formic acid, and levulinic acid), phenolic aldehydes contain numerous sub-groups, behave poor water solubility, and are slowly biodegraded due to the aromatic rings. As an indispensable procedure, biotransformation is a novel idea for inhibitor removal by the unique microorganisms with the strong inhibitor degradation and tolerance. The biotransformation mechanism of furan aldehydes and weak acids are well studied in the previous works. However, biotransformation of phenolic aldehydes are rarely concerned. In the thesis, the metabolic pathway and tolerance mechanism of phenolic aldehydes for the filamentous biotransformation fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 and the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4 were elucidated using RNA-Seq and DNA microarray; the key genes relating to phenolic aldehydes biotransformation was screened and expressed in *Z. mobilis* ZM4, and it also investigated the phenolic aldehydes conversion and ethanol fermentability of the consolidated bioprocessing strain; finally, according to transcriptome and proteome data, the key gene device library relating to bacteria, yeast, and fungus were constructed for the biotransformation of phenolics, furans, and weak acids inhibitors.

In the first part, it aimed at elucidating the molecular mechanism of phenolic aldehyde inhibitors conversion into their acids and alcohols for *A. resinae* ZN1. Based on RNA-Seq technique, it developed the transcriptome of phenolic aldehydes conversion of *A. resinae* ZN1. 534, 1576, and 1261 genes were differentially expressed during the conversion of 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin, respectively. Oxidoreduction and transport were the main biological process during phenolic aldehydes conversion for *A. resinae* ZN1 by GO analysis. According to the predicted metabolic pathway of phenolic aldehyde inhibitors, alcohol dehydrogenase, aryl-alcohol dehydrogenase, and aldehyde reductase were the key enzymes for the reduction pathway of phenolic aldehydes, and aldehyde dehydrogenase was in charge of the oxidation of phenolic aldehydes.

In the second part, it carried out the transcriptome using DNA microarray under the stress of phenolic aldehydes for *Z. mobilis* ZM4 to make the bioconversion mechanism clear.

442, 67, and 306 genes differentially expressed under the stress of 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin, respectively. Reduction, transport, and regulation were the main mechanism of phenolic aldehyde inhibitors conversion for *Z. mobilis* ZM4. It identified 72 key genes relating to the reduction of phenolic aldehydes for *Z. mobilis* ZM4, including ZMO1116 encoding oxidoreductase and ZMO1885 encoding NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase significantly differentially expressed under the three phenolic aldehydes stress. According to genome map location, 272 differentially up-regulated and 560 differentially down-regulated genes involved with 36 and 63 gene clusters under the stress of at least two phenolic aldehyde inhibitors, respectively.

In the third part, it developed the robustness engineering in chassis *Z. mobilis* ZM4 to investigate the key genes relating to phenolic aldehyde conversion. It tried to strengthen the nature reduction pathway and reconstruct the oxidation pathway in *Z. mobilis* ZM4 in order to improve phenolic aldehyde inhibitors conversion and cellulosic ethanol productivity. It found that the NAD⁺-ALDH (PP_2680) from *P. putida* KT2440 obviously improved phenolic aldehyde inhibitors conversion and cellulosic ethanol fermentation. Compared with the control, ethanol titer, ethanol productivity, and ethanol yield were separately increased by 63.7%, 100.0%, and 106.3% in 15% (w/w) solid content corn stover at 24 h. The purified protein PP_2680 oxidized furfural, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, furfural, and 5-hydroxymethylfurfural into 4-hydroxybenzoate, vanillate, furoic acid, and 2,5-furandicarboxaldehyde in vitro. There was no phenolic acid and furan acid in fermentation system, although PP_2680 obviously improved aldehyde inhibitor conversion and cellulosic ethanol fermentation. The co-expression of NAD⁺-ALDH (PP_2680) and NADH-ADH (ZMO1696) improved aldehyde inhibitor conversion and cellulosic ethanol fermentability, and the indirect proof of cofactor anaplerotic reaction may mainly lead to fermentability improvement for PP_2680. Unexpectedly, heterologous expression of PP_2680 gene in *Z. mobilis* ZM4 improved the gene expression level of alcohol dehydrogenase of ED pathway and H⁺ transport ATPase in oxidative phosphorylation.

In the fourth part, it focused on the construction of the device library of the key genes relating to lignocellulos-derived inhibitors biotransformation in order to provide synthetic biology tools for the inhibitor robustness engineering. According to transcriptome and proteome data under inhibitor stress, it constructed the device library of key genes for phenolics, furans, and weak acids biotransformation for the bacteria (including *B. subtilis*, *C. beijerinckii*, *C. glutamicum*, *E. coli*, *L. brevis*, *P. putida*, *T. pseudethanolicus*, and *Z. mobilis*), yeast (including *Pichia stipites* and *S. cerevisiae*), and filamentous fungus (*A. resinae*). It found that the key genes of phenolics biotransformation mainly involved with oxidoreduction, transport, and regulation; the key genes of furans biotransformation involved in oxidoreduction,

transport, regulation, and oxidation stress; the key genes of weak acid biotransformation involved with central carbon metabolism, transport, and regulation; lignocellulose hydrolysate-tolerance mainly involved with transport and regulation, except for the versatile biological process for its complex components. Based on the constructed device library of the key genes for inhibitor biotransformation, it predicted the ultimate degradation pathway of phenolic aldehydes in *Z. mobilis* ZM4 and found that the oxidation of phenolic aldehydes into phenolic acids (such as procatechuic acid and 3-*O*-methylgallate) was the key metabolic branch point.

Conclusively, it intensively analyzed the biotransformation mechanism of phenolic aldehyde inhibitors of the biotransformation and fermentation strains at molecular biology level. It investigated phenolic aldehyde inhibitors detoxification and ethanol fermentation for the robustness engineering strain *Z. mobilis* ZM4. It constructed the device library of the key genes for the biotransformation of phenolics, furans, and weak acids for bacteria, yeast, and fungus. This study would provide the synthetic biology gene device library and the consolidated bioprocess engineering platform for the inhibitor conversion robustness and fermentability strengthening.

Key words: Lignocellulose biorefinery; Phenolic aldehyde inhibitors; Biotransformation; *Amorphotheca resinae*; *Zymomonas mobilis*

目录

第一章 前言	1
1.1 木质纤维素生物质资源与结构	1
1.2 木质纤维素的生物炼制	2
1.3 木质纤维素来源的抑制物及其抑制机理	4
1.4 抑制物脱毒的生物技术策略	7
1.4.1 微生物脱毒	7
1.4.2 酶法脱毒	8
1.4.3 驯化菌株脱毒	8
1.4.4 工程改造菌株脱毒	9
1.5 纤维素乙醇发酵	10
1.6 立项依据和研究意义	14
1.7 本论文的主要研究内容	15
第二章 脱毒真菌树脂枝孢霉菌转化酚醛抑制物的转录组	17
2.1 引言	17
2.2 材料与方法	17
2.2.1 菌株和试剂	18
2.2.2 培养基和菌株培养	18
2.2.3 基于 RNA-Seq 的转录组	18
2.2.4 qRT-PCR 实验	19
2.2.5 HPLC 和 GC-MS 分析	19
2.3 结果与讨论	20
2.3.1 <i>A. resiniae</i> ZN1 转化酚醛抑制物的转录组	20
2.3.2 酚醛抑制物对中心碳代谢的影响	23
2.3.3 酚醛抑制物的氧化还原代谢途径	25
2.3.4 加氧酶与酚醛抑制物转化	32
2.3.5 漆酶与酚醛抑制物转化	32
2.3.6 转运与酚醛抑制物转化	34
2.4 本章小结	39
第三章 生物炼制菌株耐受酚醛抑制物的行为机制解析	40
3.1 引言	40
3.2 材料与方法	41

3.2.1 细菌、质粒和试剂	41
3.2.2 菌株培养	44
3.2.3 乳酸脱氢酶的离体酶活实验	44
3.2.4 qRT-PCR 实验	45
3.2.5 DNA 芯片实验	45
3.2.6 HPLC 和 GC-MS 分析	46
3.3 结果与讨论	46
3.3.1 酚醛抑制物影响乳酸脱氢酶的活性	46
3.3.2 酚醛抑制物影响乙醇发酵	47
3.3.3 <i>Z. mobilis</i> ZM4 在酚醛抑制物胁迫下的转录组	51
3.3.4 酚醛抑制物影响 <i>Z. mobilis</i> ZM4 的 ED 产能途径	58
3.3.5 <i>Z. mobilis</i> ZM4 转化酚醛抑制物的代谢途径	59
3.3.6 转运与酚醛抑制物转化	62
3.3.7 调控与酚醛抑制物转化	67
3.4 本章小结	69
第四章 运动发酵单胞菌耐受酚醛抑制物的实现	70
4.1 引言	70
4.2 材料与方法	70
4.2.1 菌株、质粒和培养基	70
4.2.2 酶和试剂	71
4.2.3 水解液的制备	77
4.2.4 菌株构建	77
4.2.5 酶活测定	79
4.2.6 PP_2680 基因整合 <i>Z. mobilis</i> ZM4 染色体	80
4.2.7 qRT-PCR 实验	81
4.2.8 HPLC 和 GC-MS 分析	81
4.3 结果与讨论	82
4.3.1 <i>Z. mobilis</i> 重组菌株转化醛类抑制物的能力	82
4.3.2 <i>Z. mobilis</i> 重组菌株发酵纤维素乙醇	87
4.3.3 PP_2680 的离体酶活	91
4.3.4 辅因子回补与 PP_2680 基因表达	92
4.3.5 PP_2680 基因表达对 <i>Z. mobilis</i> ZM4 生长和产能的影响	97
4.3.6 PP_2680 基因整合 <i>Z. mobilis</i> ZM4 染色体	99
4.4 本章小结	102
第五章 木质纤维素来源抑制物生物脱毒关键基因元器件库构建	103

5.1 引言	103
5.2 抑制物生物脱毒关键基因元器件库构建的依据	103
5.3 酚类抑制物生物脱毒关键基因元器件库	104
5.4 呋喃类抑制物生物脱毒关键基因元器件库	114
5.5 乙酸生物脱毒关键基因元器件库	116
5.6 木质纤维素水解液抗逆关键基因元器件库	124
5.7 <i>Z. mobilis</i> ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径	125
5.8 本章小结	129
主要结论和研究展望	132
创新点	134
参考文献	135
攻读博士学位期间发表论文情况	161
致谢	162

第一章 前言

随着经济的不断发展,以石油为主的不可再生化石资源的消耗日益增加,这严重制约了可持续经济的发展。而且,化石燃料的燃烧严重破坏了生态环境,雾霾天气已成为亟待解决的问题。因此,生物能源和生物炼制成为工业生物技术研究 and 产业化开发的重点领域。为了阐明本研究要解决的关键科学问题,本章节主要综述了木质纤维素生物质资源与结构、木质纤维素的生物炼制、木质纤维素来源的抑制物及其抑制机理、抑制物脱毒的生物技术策略、纤维素乙醇发酵。

1.1 木质纤维素生物质资源与结构

木质纤维素是指植物干物质,即所谓的木质纤维素生物质,是储量丰富且价格低廉的可持续资源。木质纤维素原料包括木材废弃物、草类、森林废弃物、农业废弃物和城市固体废弃物等。其中,农业废弃物是储量最丰富的生物质资源。美国诸如玉米秸秆、玉米芯、小麦、黑麦和大麦秸秆等纤维素生物质达 1.2 亿吨,预计能够生产 50 亿加仑的乙醇^[1]。我国储量最多的农作物废弃物是玉米秸秆(约 3.5 亿吨),其次是小麦秸秆(2.0 亿吨)、油籽作物秸秆(0.6 亿吨)、豆类秸秆(0.3 亿吨)和块茎秸秆(0.2 亿吨)。其中,储量最多的玉米秸秆、水稻秸秆和小麦秸秆约占总农作物废弃物的 80%^[2]。就生物燃料乙醇生产而言,木质纤维素生物质原料资源包括秸秆、麻类、树枝、落叶和林业边角料等。由此可见,农作物秸秆,尤其是玉米秸秆,是生物燃料生产的重要资源。

如图 1.1 所示,木质纤维素的主要组成部分是纤维素(20-50%干重)、半纤维素(15-35%)和木质素(10-30%)^[3]。而且,还包括少量的小结构蛋白、脂类和灰分。其中,纤维素、半纤维素和木质素共同形成了致密的网络结构。

纤维素分子是 D-葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的多聚体,每个纤维素多聚体是由大约 10,000 个分子组成的链状结构^[4]。晶体纤维素结构致密,其分子间和分子内存在氢键或范德华作用力。纤维素是储量最丰富的多糖,因此用纤维素生产生物基产品一直是研究的热点。

仅次于纤维素含量的半纤维素,由戊糖(木糖和阿拉伯糖)和己糖(葡萄糖、半乳糖和甘露糖)组成。其中,半纤维素骨架中 70%的木糖被乙酰化,木糖和甘露糖分别是草类和软木类半纤维素的主要糖类。而且,除了以上糖组分外,半纤维素结构还包括糖醛酸、阿魏酸和香豆素等非糖组分^[5]。

木质素是 *p*-香豆醇、松柏醇和介子醇三种主要酚类单元组成的复杂结构,约 1-100 kDa^[6]。其中,最简单的组成模块是 *p*-羟基苯基类(H),其苯环分子上的 4'位碳和 1'位碳分别有一个羟基和侧链基团,单体化的 *p*-羟基苯基类化合物的 1'

位碳一般是羧基基团、羟基基团和醛基基团。*p*-羟基苯基类的 3'位碳甲氧基化即形成木质素的第二个组成模块愈创木酚基类 (G), *p*-羟基苯基类的 3'位和 5'位碳均甲氧基化则是木质素的第三个组成模块丁香基类 (S)。草类木质素中含量最多的是 *p*-羟基苯基类化合物, 硬木和软木中的愈创木酚基类化合物含量较多, 丁香基类化合物在硬木中的含量较多。尽管目前对木质素的研究较多, 但是木质素分子结构复杂, 所以木质素精细模块的分子结构仍不清楚^[7]。

农业废弃物和林业废弃物是木质纤维素生物质资源的主要来源, 不同种类的生物质原料的木质纤维素化学组分也不同^[8]。例如, 玉米秸秆的纤维素、半纤维素和木质素分别是 35.1-39.5%、20.7-24.6%和 11.0-19.1%, 小麦秸秆的纤维素、半纤维素和木质素分别是 35.0-39.0%、22.0-30.0%和 12.0-16.0%^[9, 10]。

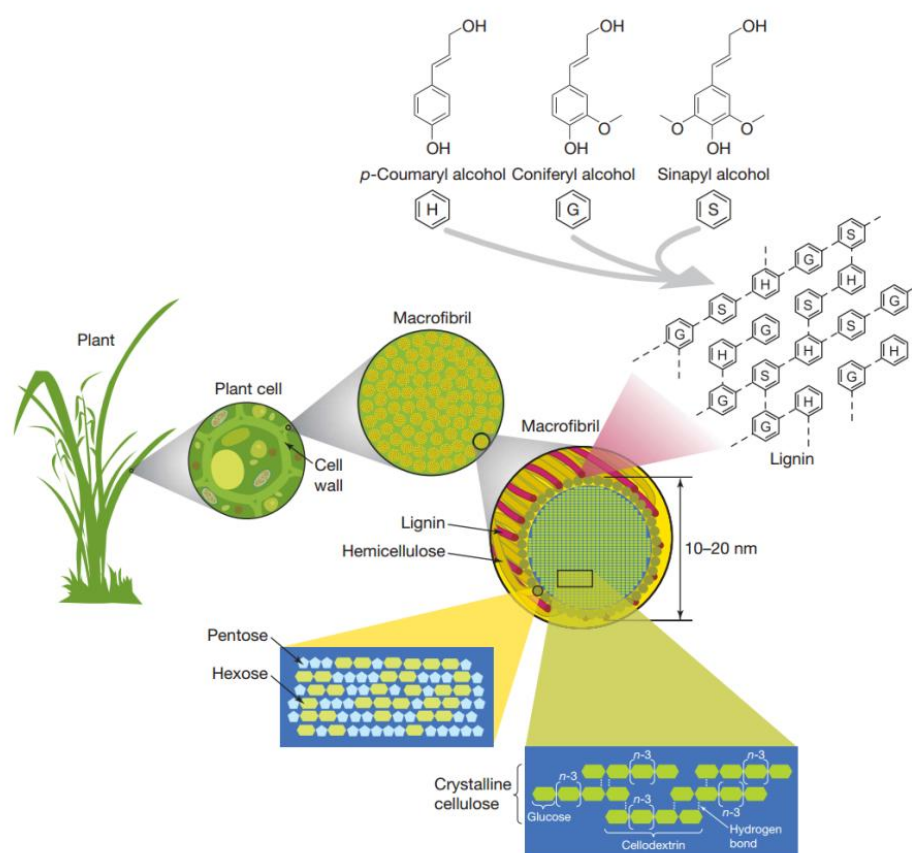


图 1.1 木质纤维素的结构^[3]

Fig. 1.1 Structure of lignocellulose.

1.2 木质纤维素的生物炼制

植物中碳的利用旨在替代原油和天然气, 生物炼制概念由此应用而生^[11]。生物炼制是新型经济产业的新型工艺, 其通过预处理和酶水解等生物平台将生物质转化为可发酵的糖, 进而通过糖平台技术转化为高附加值的大宗化学品, 诸如燃料乙醇和生物柴油等新型能源, 精细化学品、化妆品和药物等分子物质, 聚乳酸

等复合材料的原料，还有诸如糠醛等生物基化学品。因此，由木质纤维素转化的可持续生物燃料、生物化学制品和生物材料是生物炼制的重要内容。生物炼制工艺包括原料前处理、预处理与脱毒、纤维素酶在位生产、糖化与发酵、产品纯化、废水处理、木质素残渣燃烧发电、产品储存以及公用工程等步骤（图 1.2）^[12]。

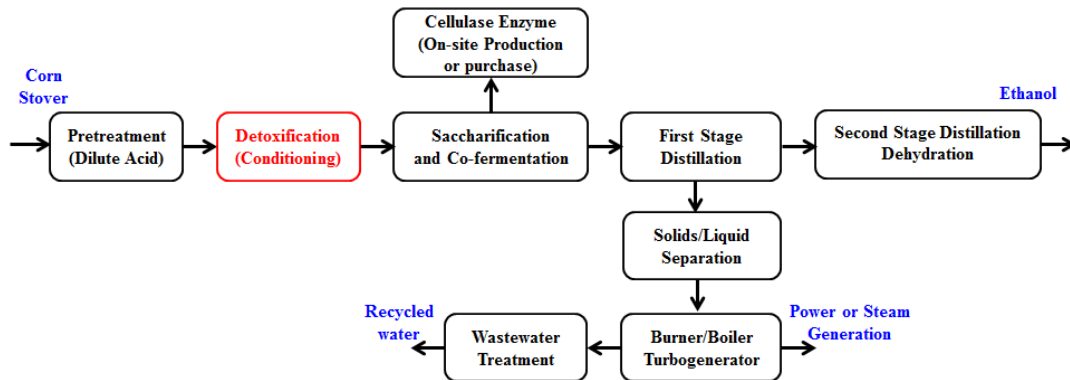


图 1.2 玉米秸秆生产纤维素乙醇的生物炼制过程^[12]

Fig. 1.2 Biorefinery process of cellulosic ethanol from corn stover feedstock

木质纤维素糖化是生物炼制过程的主要限制因素^[13]。因此，预处理过程是木质纤维素生物炼制过程的必需环节，其旨在破坏木质纤维素难降解的超分子结构，是纤维素和半纤维素水解的先决条件。同时，预处理过程使纤维素形成纤维素酶易于吸附的结构形式。理想的预处理方法必须满足以下几点要求：（1）减少抑制物的产生，以减轻或杜绝抑制物对酶解和发酵的抑制；（2）减少酶解过程的酶用量；（3）防止预处理环节的糖损失；（4）可以回收木质素和能够转化为有价值副产物的其他化合物；（5）减少能耗^[14]。到目前为止，诸如稀酸、稀碱、蒸汽膨爆、中性热水、离子液体、微波以及生物途径等预处理方法相继被开发利用。其中，稀酸水解速度快且容易操作，是商业化规模生产纤维素乙醇等生物燃料的首选预处理方法^[15, 16]。

稀酸预处理的木质纤维素生物质原料中，90%的纤维素可以被纤维素酶水解^[17]。纤维素转化成葡萄糖需要3种纤维素酶（Cellulase），内切葡聚糖酶（Endo-1,4- β -D-glucanohydrolase, EC3.2.1.4）从纤维素链的中间切断 β -1,4-糖苷键形成多个具有还原末端和非还原末端的短纤维素链，外切葡聚糖纤维二糖水解酶（ β -1,4-glucan cellobiohydrolase, EC3.2.1.91）从纤维素链的还原或非还原末端切割产生纤维二糖分子，而 β -葡糖苷酶（ β -glucosidase, EC3.2.1.21）将纤维二糖转化成葡萄糖^[18]。有些细菌和真菌分泌纤维素酶，但主要是内切葡聚糖酶和外切葡聚糖纤维二糖酶^[19]。

半纤维素和木质素通过非共价键和共价键与纤维素紧密连接在一起，其含量和分布对木质纤维素水解液的酶解均有影响^[20]。半纤维素和木质素很大程度阻碍了糖化过程纤维素酶与纤维素结合，最终导致较低的酶解速率。而且，酶与木

木质素的无效结合也制约纤维素的水解。木质素和半纤维素的去除了能够增加木质纤维素原料的孔隙度和可接触表面积，从而减少酶与木质素的无效结合。因此，半纤维素和木质素的去除了能够明显提高木质纤维素原料的糖化。很多预处理研究致力于去除半纤维素和木质素，以降低木质纤维素的难降解性。半纤维素是由 β -1,4-木聚糖苷键连接而成的分支多聚体，其含量最多的组分是木聚糖。当然，半纤维素的彻底降解需要多种木聚糖酶的参与。芳香多聚体木质素是由非酚和酚组分组成的非糖组分，不能用于后期的发酵。木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶都具备转化木质素的催化活性。其中，木质素过氧化物酶降解非酚基团，锰过氧化物酶通过脂的过氧化物反应作用于酚和非酚木质素单元，漆酶将木质素的酚单元和酚类化合物氧化成自由基。预处理的生物质通过酶解产生诸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖和岩藻糖等可发酵的糖^[21]。

糖化过程可产生可发酵的糖，通过发酵即可得到乳酸和乙醇等纤维素产品。依据糖化和发酵步骤是否同步进行，可以将发酵分为分步糖化与发酵 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF) 和同步糖化与发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)。整合生物加工 (Consolidated bioprocess, CBP) 是指将分泌纤维素酶的发酵微生物同时应用于糖化过程和发酵过程^[22]。

1.3 木质纤维素来源的抑制物及其抑制机理

纤维素燃料的高效生产高度依赖于生物质中可发酵糖的高效发酵。稀酸条件下，经高温处理的木质纤维素在水解过程中不仅产生了可发酵的糖，同时也会形成和释放一些抑制化合物 (图1.3)，主要包括呋喃类 (糠醛和5-羟甲基糠醛)、弱酸类 (甲酸、乙酸和乙酰丙酸) 和酚类化合物 (4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛)^[23]。木糖在高温高压条件下降解成糠醛^[24]。同样，戊糖降解也会产生5-羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural, HMF)。糠醛和HMF进一步降解产生甲酸^[24, 25]。乙酰丙酸也源于HMF降解^[24]。木质素降解产生酚类化合物^[26-28]，也有研究发现碳水化合物降解期间也会产生酚类化合物^[29]。当然，除了以上主要的3类抑制物外，木质纤维素预处理原料中还可能存在其他抑制物，诸如在芒草和柳枝稷水解液检测到了甲基甘油醛抑制物^[30]。总之，木质纤维素来源的抑制物种类与生物质的来源和种类有关，而且也与木质纤维素生物质的处理方式有关，诸如木质纤维素水解液的灭菌过程也会使抑制物的浓度增加^[31]。

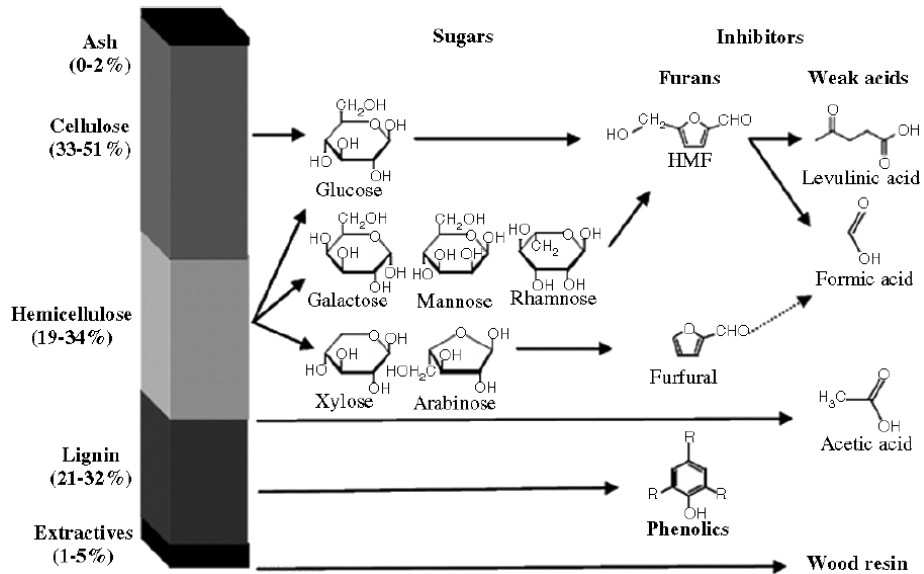


图1.3 木质纤维素生物质组分及其主要水解产物^[23]

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

酚类化合物源于木质素的降解。木质纤维素来源的酚类化合物种类很多，按照甲氧基和官能团的不同，木质纤维素来源的酚类抑制物主要分为 3 类：(1) *p*-羟基苯基类 (*p*-Hydroxyphenyl, H)：诸如4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲酸和4-羟基苯甲醇；(2) 丁香基类 (Syringyl, S)：诸如丁香醛、丁香酸和丁香醇；(3) 愈创木酚基类 (Guaiacyl, G)：诸如愈创木酚、香草醛、香草酸、香草醇、阿魏酸和松柏醛。酚醛抑制物的毒性最强，4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛是模型酚类化合物^[32, 33]。酚类化合物的水溶性较差，其定性定量比较困难，因此其代谢途径的相关研究也较少。尽管已经发现酚类化合物抑制糖化过程纤维素酶酶活的抑制和发酵过程的菌体生长和产物积累^[34, 35]。木质素衍生物对纤维素酶的抑制最强^[36]。对于酿酒酵母*S. cerevisiae* NRRL Y-1536 或木糖发酵酵母424A (LNH-ST) 而言，当以 Avicel®PH101 作为纤维素酶的催化底物时，酚类是所有抑制物中对酶解和浓缩过滤液发酵抑制程度最强的化合物^[37]。诸如香草醛、丁香醛、肉桂酸和4-羟基苯甲酸等酚类化合物还抑制内切和外切纤维素酶水解纤维素，同时还抑制β-葡萄糖苷酶水解纤维二糖^[38]。在纤维素乙醇生产过程中，酚类化合物是纤维素酶和发酵微生物的抑制剂^[39]。酚醛抑制物直接影响发酵菌株的乙醇发酵，酚酸和酚醇化合物通过影响菌体生长而间接影响乙醇发酵。如图1.4所示，酚醇能够进入生物膜，最终破坏作为选择透过性屏障和酶的产生部位的膜的完整性^[40]。酚类化合物对木质纤维素水解液发酵过程存在强烈抑制，低分子量的酚类化合物的毒性最强^[41, 42]。然而，酚类化合物的抑制机理尚不清楚，主要是因为缺乏精确性和定量分析酚类化合物的方法。目前，诸多酚类化合物抑制机理的研究大都采用高于实际水解液体系的酚类化合物浓度，而且大都添加单一酚类抑制物^[42, 43]。酚类化合物的水溶性有限，其溶解性依赖于液体的组分。

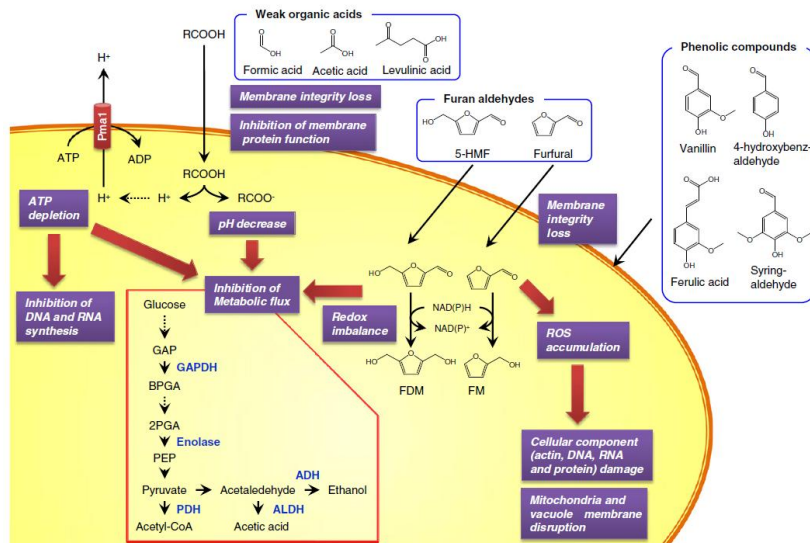


图 1.4 木质纤维素来源的抑制物对酿酒酵母的抑制机理推测

Fig. 1.4. Schematic representation of a presumed inhibition mechanism of lignocellulose-derived inhibitors in *S. cerevisiae*^[22].

预处理过程产生的糠醛和5-羟甲基糠醛会减慢菌体的比生长速率^[44, 45]、细胞生物量、ATP得率^[46]、乙醇体积产率^[45]和乙醇比生产速率^[46]。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 代谢5-羟甲基糠醛的速率比糠醛慢，这很可能是因为5-羟甲基糠醛的膜通透性较差，从而导致菌株生长出现较长的延滞期^[47]。而且，*S. cerevisiae* 将5-羟甲基糠醛还原为5-羟甲基糠醇，这说明*S. cerevisiae*转化糠醛和5-羟甲基糠醛的机理类似^[48]。Franden等人发现，糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸混合后不会产生协同抑制，但是经稀酸预处理的玉米秸秆水解液中的糠醛和5-羟甲基糠醛确实影响了 *Z. mobilis* 的生长^[49]。因此，复杂水解液体系中的其他抑制物很可能赋予呋喃类的抑制毒性。目前，有关糠醛和5-羟甲基糠醛的抑制机理研究较多。研究发现，*Z. mobilis* 8b在发酵期间能够转化糠醛生成相应的糠醇^[49]。基于DNA条码和 DNA 芯片的突变文库，Skerker 等人聚类分析了 *Z. mobilis* ZM4 耐受呋喃类抑制物的相关基因^[29]。1.0 g/L 糠醛不影响 *Z. mobilis* 的 ED 产能途径，但是涉及细胞壁/细胞膜生物发生、代谢和转录相关的433个基因在糠醛胁迫下显著差异表达^[50]。

木质纤维素来源的弱酸类主要包括甲酸、乙酸和乙酰丙酸，其抑制发酵菌株的生长和发酵。脂溶性的非解离弱酸扩散至质膜进而抑制菌体生长，流入胞内的解离弱酸也抑制菌体生长^[51-53]。胞质中 pH 的中和也会造成酸解离，最终导致胞质 pH 值降低^[54]。如图1.4所示，目前用解偶联和胞内阴离子积累解释弱酸的抑制机理^[55]。(1) 根据解偶联理论，弱酸进入胞内导致胞内的 pH 值降低，ATP 的消耗将质子泵出胞外，而质膜 ATPase 可以中和降低的 pH^[56]。在高的酸浓度条件下，细胞丧失了泵出质子的能力，最终造成ATP耗尽、质子动力势耗散和胞

质酸化^[57]。然而,以葡萄糖为底物时,疏脂性的乙酸、丙酸和甲酸阴离子形式不会跨越质膜^[58]。(2)根据阴离子积累理论,酸的阴离子形式在胞内积累,非解离酸则扩散至胞外,直到胞内 pH 再次达到平衡^[59]。目前,对乙酸抗逆机理的研究比较深入,诸如 *Z. mobilis* 的突变株 ACR 在乙酸胁迫下涉及蛋白质合成、糖酵解和 ATP 合成等多方面的生物学过程,是复杂的动态变化过程^[60, 61]。

1.4 抑制物脱毒的生物技术策略

尽管温和的预处理条件会减少抑制物的产生,但是为了得到高转化得率的可发酵的糖,实际的工业过程仍然需要剧烈的高温高压条件处理木质纤维素原料。因此,抑制物问题是生物炼制领域亟待解决的瓶颈问题。目前,可以借助物理、化学或生物的方法彻底去除抑制物,诸如水洗、过碱中和、氨中和、离子交换吸附、溶剂萃取和活性炭处理^[19, 62, 63]。但是,以上方法均会消耗大量的新鲜用水和排放大量的污水,同时也会造成木质纤维素精细颗粒和可发酵糖的损失^[64]。生物脱毒是利用微生物降解或转化抑制物的一种新的脱毒方法^[65-68]。通常,生物降解是指微生物将复杂有机物转化为结构简单的化合物或完全分解有机物的过程^[69]。如果微生物彻底分解有机物并释放出CO₂和H₂O,则称之为终极降解(Ultimate degradation)。与生物降解不同,生物转化是通过微生物代谢改变化合物的分子结构,同时生成新化合物。与其他脱毒方法相比较,生物脱毒过程反应条件温和、抑制物去除彻底、可发酵糖损失和废水排放均较少^[65, 66, 70]。目前,主要通过微生物脱毒、酶法脱毒、驯化菌株脱毒、工程改造菌株脱毒等4种生物技术策略实现抑制物脱毒的目标^[71]。

1.4.1 微生物脱毒

微生物脱毒是用具备抑制物降解或转化能力的微生物对木质纤维素来源的抑制物进行脱毒,以此提高生物燃料的发酵速率。用于微生物脱毒的菌株可以分为2类,一类是专司生物脱毒的脱毒微生物,另一类是兼具生物脱毒能力和发酵能力的发酵微生物。(1)专司生物脱毒的脱毒微生物:在生物炼制过程中,脱毒工段是用脱毒微生物对预处理的木质纤维素进行脱毒,以解除预处理过程产生的抑制物对后续糖化和发酵过程的抑制。目前发现了很多脱毒微生物,诸如木糖毕赤酵母(*Pichia stipites*)^[72]、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum* CX1)^[65]、西方伊萨酵母(*Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097)^[73]、树脂枝孢霉菌(*Amorphotheca resinae* ZN1)^[66-68]、云芝(*Trametes versicolor*)^[74]和子囊壳真菌(*Coniochaeta ligniaria* NRRL30616)^[75]等。另外,目前发现的脱毒细菌主要涉及贪酮菌属(*Cupriavidus basilensis* HMF14)^[76]、脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、产吡啶黄杆菌(*Flavobacterium indologenes*)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)和金黄节杆菌(*Arthrobacter aurescens*)^[77]等。(2)兼具生物脱毒和发酵能力的发酵微生物:这些微生物自身

具备转化和耐受木质纤维素来源抑制物的能力，诸如产乙醇的酿酒酵母 (*S. cerevisiae* CBS8066)^[78]。

醛类抑制物是生物炼制过程的主要抑制物^[79]。典型的生物脱毒微生物可以将高毒性的醛类抑制物氧化或还原为低毒的酸或者醇^[80, 81]，从而减轻酚醛抑制物对发酵微生物的生长和产物积累的直接抑制。但是，破坏菌体膜结构的酚醇仍然间接影响菌株的发酵速率^[82]，同时也间接消耗生物燃料合成所需的能量^[83, 84]。当然，呋喃醛和酚醛的氧化产物呋喃酸和酚酸对细胞也存在低毒抑制^[85]。但是，呋喃酸和酚酸能够进入中心碳代谢途径，最终实现醛类抑制物的终极降解。目前，诸如 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 等生物炼制的发酵微生物仅能还原呋喃醛或酚醛抑制物生成相应的醇，而将醛类抑制物氧化产酸的发酵微生物较少，因此无法实现木质纤维素来源醛类抑制物的终极降解。

1.4.2 酶法脱毒

酶法脱毒是用粗酶液或纯化的生物酶制剂直接脱毒预处理的木质纤维素原料。与其他生物脱毒方法相比较，酶法脱毒有以下优势：(1) 反应条件温和 (pH 5.0)，脱毒成本较低；(2) 可以在菌株非最适生长温度的较高温度条件下实现高效脱毒；(3) 催化效率高，较微生物脱毒方法速度快。当然，酶法脱毒的脱毒过程温浴时间较长。而且，商业化酶的成本较高。

目前，真菌来源的漆酶和过氧化物酶是酶法脱毒应用较多的酶制剂。漆酶和过氧化物酶可以氧化木质纤维素来源抑制物中分子量较低的酚类化合物^[86]，诸如云芝 (*T. versicolor*)^[74, 86, 87]和假丝酵母 (*Candida shehatae*)^[88]都可以作为漆酶和过氧化物酶的菌株来源。

1.4.3 驯化菌株脱毒

驯化是目前工业上广泛使用的提高产物得率和降低生产成本的生物技术。生物炼制过程的菌株驯化，一般是在添加一种或多种一定浓度抑制物的合成培养基或真实木质纤维素水解液体系连续传代，直到驯化菌株的某一特定发酵性能（诸如菌体浓度、葡萄糖消耗、产物积累或抑制物转化）趋于稳定。驯化实验操作简单，驯化周期因菌株和实验需求而异。驯化发酵菌株能够实现生物炼制过程的在位生物脱毒，因此有望实现抑制物脱毒和产物发酵的整合生物加工。

目前，驯化手段已逐步应用至生物炼制菌株的脱毒研究。在含乙酸的培养基上驯化 *Z. mobilis* ZM4 得到乙酸抗性菌株 *Z. mobilis* ZM6014，该菌株在添加 1.0 % (w/v) 乙酸、5.0% (w/v) 葡萄糖和 5.0% (w/v) 木糖合成培养基 (pH 5.0) 的乙醇得率为 93.4%^[89]。通过实验室进化得到的驯化突变株 *Z. mobilis* ZMF3-3 在 3.0 g/L 糠醛胁迫下的乙醇得率是 94.8%，而野生型 *Z. mobilis* ZM4 的乙醇得率仅是 9.9%^[90]。通过驯化途径提高 *S. cerevisiae* 耐受糠醛、乙酸和酚类抑制物的重要策略^[91-93]。

1.4.4 工程改造菌株脱毒

目前, 细菌的酚类抑制物抗逆研究较少, 主要集中在黄酶、漆酶和醛脱氢酶等氧化酶。黄酶^[94]、漆酶^[95]和醛脱氢酶^[96-99]均是酚醛类化合物转化的重要氧化酶。其中, 醛脱氢酶将糠醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛氧化成相应的酸^[96-99]。对酵母酚类抑制物的抗逆研究最多的是中链脱氢酶 (ADH6 和 ADH7), 该类酶属于肉桂醇脱氢酶家族的还原酶, 可以将高毒的香草醛还原成低毒的香草醇^[100, 101]。霉菌来源的酚类抑制物转化途径主要涉及酰基醛脱氢酶、酰基醇脱氢酶、酰基醇氧化酶和香草醇氧化酶。黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 来源的酰基醛脱氢酶和酰基醇脱氢酶对 4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲醇、香草醛和香草醇均有活性^[98, 102]。过氧化物酶是木质素裂解的关键酶, 其催化过程所需 H_2O_2 可以由 *P. chrysosporium* 和担子菌侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 的酰基醇氧化酶提供。酰基醇氧化酶隶属胞外 FAD 结合的氧化酶家族, 其催化多种芳香醇的 α -碳羟基氧化脱氢和生成 H_2O_2 的反应, 其不仅氧化 4-羟基苯甲醇和香草醇生成相应的酸^[103, 104], 也氧化醛类化合物^[103, 105, 106]。诸如刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*) 来源的酰基醇氧化酶能够氧化 5-羟甲基糠醛^[107]。简青霉 (*Penicillium simplicissimum*) 来源的香草醇氧化酶对香草醇和 4-羟基苯甲醇具有催化活性, 不仅生成了相应的醛, 更重要的是生成木质纤维素降解所需的 H_2O_2 ^[108-110]。

细菌的呋喃类抑制物抗逆研究, 主要涉及氧化还原酶 FucO、YqhD、ucpA 和 pntAB^[81, 84, 93, 111-113]。研究发现, 降低 yqhD 和 dkgA 的表达水平或增强 pntAB 的表达水平均可以提高 *E. coli* 的糠醛耐受性^[84, 114]。而且, 调控子 YqhC 也是 *E. coli* 耐受糠醛的重要基因, 其调控糠醛耐受的关键基因 yqhD 和 dkgA^[115]。同时, 醇脱氢酶^[116, 117]、丁醇脱氢酶^[118]、SDR 和 AKR^[118, 119]、糠醛还原酶^[120]、5-羟甲基糠醛氧化酶^[121]、硫醇糖基转移酶^[122]和胸腺嘧啶核苷酸合酶^[123]均能够提高细菌对糠醛的耐受性。同时, 转运蛋白^[83, 124, 125]、转录因子^[126]、分子伴侣^[127]、调控因子 LysR^[75, 128, 129]和 IrrE^[113]均不同程度提高了细菌对糠醛的耐受性。Glebes 等人通过基因组筛选比较策略, 发现了 *E. coli* MG1655 耐受糠醛的新基因 *ahpC*、*yhjH*、*rna* 和 *dicA*^[130]。酵母的糠醛抗逆工程改造研究, 主要涉及醇脱氢酶^[131-137]、醛还原酶^[114, 138]、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶^[139]、过氧化氢酶^[140]、木糖还原酶^[72]、兼具 3-甲基正丁醛还原酶和 NADPH 依赖型甲基甘油醛还原酶活性的 GRE2^[141, 142]和 NADPH 依赖型的还原酶^[143]均能够提高酵母的糠醛耐受能力。而且, 研究发现, 谷胱甘肽合成酶^[144]、谷胱甘肽还原酶^[145]、转录激活子 Msn2^[146]和转录因子 SFP1^[147]的编码基因过表达均显著提高酿酒酵母对糠醛的耐受性。除了氧化还原酶和转录调控子外, 酵母对糠醛的抗逆研究还涉及 E3 SUMO 蛋白连接酶^[148]和絮凝相关蛋白^[149]。

细菌的乙酸抗逆研究发现, 乙酸激酶和乙酰CoA合酶^[150-153]均与乙酸代谢有

关。此外，乙酸代谢和耐受相关的蛋白还包括 Na^+/H^+ 反向转运蛋白蛋白 (ZMO0119)^[60]、SrtN 去乙酰基酶 Ms-SrtN 和 PatA 乙酰基转移酶 Ms-PatA^[154]。细菌乙酸抗逆相关的调控子主要包括碳储存调控子 *csrA*^[155]、RamA和RamB^[156, 157]、*rpoB*和*rpoS*^[150]、TonB依赖型受体^[158]等。其中，对RamA和RamB调控子的研究较多。目前研究发现，能够提高酵母乙酸抗逆性的功能蛋白主要涉及苹果酸酶^[159]、胞质球体支架蛋白 WHI2 和磷酸酶 PSR1^[160]、转录/翻译机器^[161]、细胞色素C氧化酶伴侣蛋白 COX20^[162]和高乙酸耐受调控子 HAA1^[163]。

到目前为止，已经发现了一些细菌来源的木质纤维素水解液抗逆相关的基因，诸如 N-乙基马来酰亚胺还原酶 NemA 和调控子 YafC^[164]。Skerker 等人将一个未知功能蛋白的编码基因 (ZMO1875) 过量表达在 *Z. mobilis* ZM4，芒草水解液中的乙醇比速率显著提高了 2.4 倍^[29]。酿酒酵母 (*S. cerevisiae* BY4741) 的 mRNA 剪接相关蛋白 (Bud31)、THO/TREX 复合体亚单位 (Hpr1)、细胞周期蛋白激酶 (Pho85)、肌动蛋白 (Vrp1)、未知功能蛋白 (Ygl024w)、固醇异构酶 (Erg2)、RAVE 复合体亚单位 (Rav1)、RNA 聚合酶 II 亚单位 (Rpb4)、焦磷酸合成酶 (Prs3) 和外周膜区域亚单元蛋白 (Vma8) 均与酵母耐受水解液相关^[165]。PRS3 提高了 *S. cerevisiae* CCUG53310 和 PE-2 的乙醇发酵能力，RPB4 和 ZWF1 提高了乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛胁迫下的乙醇发酵能力^[166]。

由此可见，基于遗传工程的木质纤维素来源抑制物抗逆菌株改造途径已经取得了较为理想的结果。

1.5 纤维素乙醇发酵

乙醇是重要的微生物发酵产物和常见的化工原料之一。将乙醇作为添加剂添加在汽油，或作为替代物与汽油混合的混合燃料即为乙醇汽油。乙醇汽油混合燃料的出现有效改善了汽油的性能，同时降低了 CO 和碳氢化合物等尾气污染物。通常，工业上通过发酵途径生产乙醇，即用微生物（如黑曲霉）或合成酶糖化处理薯类（如甘薯和马铃薯）和谷物等淀粉含量较高的作物，之后用微生物发酵由淀粉转化的单糖（如葡萄糖）生产乙醇。乙醇生产的发酵原料局限于粮食和经济作物，易造成粮食供给不足和生产成本偏高等问题。通过酸解或酶解途径，研究人员将廉价纤维素转化成戊糖（如木糖和阿拉伯糖）和己糖（如葡萄糖、半乳糖和甘露糖）。利用葡萄糖和木糖等纤维素和半纤维素的水解产物发酵生产乙醇的工业化发展的新技术，称之为第二代生物乙醇技术。基于木质纤维素转化的二代生物乙醇生产，推动了生物炼制的发展^[167]。与合成生物燃料的生产不同，二代生物乙醇通过生物途径生产^[168]。能够用于纤维素乙醇发酵的菌株很多，诸如传统的 *S. cerevisiae* 和 *Z. mobilis*，还有重组 *Escherichia coli* 和嗜热纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 等。以上菌株生产纤维素乙醇各具特点，野生型 *S. cerevisiae* 和野生型 *Z. mobilis* 能够发酵木质纤维素水解后的单糖（如葡萄糖、

果糖和蔗糖), 但是不能利用戊糖(如木糖), 并且发酵副产物较多。*C. thermocellum* 具有良好的木质纤维素降解能力, 但是高温发酵条件导致耗能偏高, 而且该菌株的乙醇耐受能力较差。野生型 *E. coli* 一般不产乙醇, 需要引入乙醇合成途径的相关基因, 因此对分子生物技术的依赖程度较高。基于以上乙醇发酵菌株产乙醇的特点, 提高乙醇产率需要明确纤维素乙醇生产菌株的代谢途径。

运动发酵单胞菌 (*Z. mobilis* ZM4) 是优良的产乙醇细菌, 是有望面向产业化应用的纤维素乙醇发酵的工业菌株之一^[169-172]。该菌株 G⁻, 兼性厌氧, 其具备工业菌株的一般特性, 诸如低生物量、能够利用多种己糖、高乙醇产率和得率、高乙醇耐受性等。其中, 高乙醇耐受性是 *Z. mobilis* ZM4 菌株高产乙醇的重要前提条件之一。在连续培养和分批培养过程中, *Z. mobilis* ZM4 菌株的乙醇耐受性分别高达 85 g/L (11%, v/v) 和 127 g/L (16%, v/v)^[173]。研究发现, *Z. mobilis* ZM4 的高乙醇抗逆机理涉及翻译和核糖体生物发生等多方面的生物学过程^[50, 174]。而且, 从合成生物学的角度来讲, *Z. mobilis* ZM4 也具备合成生物学底盘微生物的基本特征, 诸如生长所需的营养和底物成分较为简单; 能够利用大部分己糖, 改造菌株能够利用木糖, 因此可以高效利用木质纤维素物质来源的糖; 较高的糖代谢效率是乙醇高产的保证; 发酵操作过程简单, 因此利于简化操作、降低成本和扩大生产规模; 对高浓度葡萄糖和高浓度乙醇的耐受性; 遗传操作稳定; 对预处理过程中的抑制物具有一定的耐受性^[175]。

Z. mobilis ZM4 缺乏 EMP (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) 途径的果糖 6-磷酸激酶, 也缺乏 TCA 循环 (Tricarboxylic acid cycle) 途径的 α -酮戊二酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶, 还缺乏乙醛酸循环的异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶, 同时磷酸戊糖途径也缺乏转酮醇酶活性^[172, 176]。所以, *Z. mobilis* 在厌氧条件下通过 ED (Entner-Doudoroff) 途径代谢葡萄糖产能和产乙醇(图 1.5)。在 ED 途径中, 1 分子的葡萄糖生成 2 分子丙酮酸, 净生成 1 分子 ATP 和 2 分子 NADH。由此看来, *Z. mobilis* 菌株的产能水平较低。从酶学催化角度来看, 丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶是 *Z. mobilis* ZM4 高效产乙醇的关键酶。其中, 更为关键的酶是丙酮酸脱羧酶, 该酶的活性比酵母的丙酮酸脱羧酶活性高^[177]。因此, 通过基因工程手段, 将 *Z. mobilis* 的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶的编码基因表达在其他宿主以实现产乙醇途径, 诸如阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* JV)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis* JV) 和菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*)^[178]、链霉菌 (*Streptomyces lividans* TK24)^[179]、大肠杆菌 (*E. coli* TC4)^[180] 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* KT2440)^[181]。与 *E. coli* 不同, 在 *Z. mobilis* 的 ED 途径中, 丙酮酸脱羧酶 (PDC) 催化丙酮酸生成乙醛的过程是非氧化过程。

到目前为止, *Z. mobilis* 的纤维素乙醇发酵体系已逐步建立。*Z. mobilis* 在 31 °C 和 pH 5.13 发酵蔗糖蜜的最大乙醇得率达 59.59%^[182]。整合了 *E. coli* 磷酸

甘露糖异构酶 (*manA*) 编码基因的 *Z. mobilis* ATCC29192 突变株, 共发酵甘露糖和葡萄糖 36 h 的乙醇理论得率达 91%^[183]。*Z. mobilis* 8b 的高浓度细胞发酵实验发现, 木糖比消耗速率与木糖消耗速率密切相关^[184]。*Z. mobilis* 8b 发酵 17.5% (w/w) 和 20.0% (w/w) 固含量的酸预处理玉米秸秆水解液, 纤维素和木糖的转化率分别是 80.1% 和 77.9%, 乙醇浓度分别是 63.0 g/L 和 69.0 g/L^[185]。*Z. mobilis* 8b 经玉米秸秆水解液驯化的 *Z. mobilis* SS3 突变株发酵 25% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的乙醇得率是 75.5%, 较 *Z. mobilis* 8b 提高 18.0%^[91]。酸耐受突变株 *Z. mobilis* ZMA7-2 发酵食品废弃物 44 h 的乙醇浓度和乙醇得率分别是 99.78 g/L 和 0.50 g/g^[186]。

而且, *Z. mobilis* 菌株也可以进行木质纤维素体系的 SSF。*Z. mobilis* CP4 发酵 30% (w/w) 固含量的甘蔗渣, 最大乙醇浓度和体积产率达 60.0 g/L^[187]。*Z. mobilis* ZM4 在摇瓶进行芒果树叶子的 SSF, 得到 1.21 g/L 乙醇^[188]。经 2-脱氧葡萄糖驯化的 *Z. mobilis* ZM4 (7[#]菌株), 能够利用 20% (w/w) 固含量玉米秸秆一半的木糖^[90]。Gu 等人发现, 在 5 L 生物反应器中, *Z. mobilis* ZM4 发酵 30% (w/w) 固含量的玉米芯残渣得到 54.42 g/L 纤维素乙醇^[189]。

运动发酵单胞菌生产纤维素乙醇需要解决两个问题, 即木糖利用问题和抑制物耐受问题。

Z. mobilis ZM4 能够高效发酵葡萄糖和果糖等己糖, 但是不能利用木糖和阿拉伯糖等戊糖, 然而木糖是生物质原料的主要碳源成分。因此, 戊糖利用问题是 *Z. mobilis* ZM4 菌株生产纤维素乙醇的研究热点之一。Zhang 等人将穿梭载体 pACYC184 与 *Z. mobilis* ATCC10988 的一个 2.7 kb 的内源质粒嵌合连接构建了表达载体 pZB186, 再将 *Peno-tal/tktA* (3.0 kb) 片段和 *Pgap-xylA/xylB* (4.1 kb) 片段与 pZB186 重组得到 pZB5 重组质粒, 最终实现了 *Z. mobilis* CP4 利用木糖的代谢途径^[169]。Deanda 等人用同样的方法, 将 *E. coli* B/r 来源的 *Pgap-araBAD* 片段 (4.4 kb) 和 *Peno-tal/tktA* (3.0 kb) 片段与载体 pZB186 重组, 最终实现了 *Z. mobilis* ATCC39676 利用木糖和阿拉伯糖产乙醇的代谢途径^[170]。为了得到遗传性状稳定的木糖和阿拉伯糖发酵菌株, Mohagheghi 等人将木糖和阿拉伯糖利用的 7 个基因整合至 *Z. mobilis* 基因组, 得到的 *Z. mobilis* AX101 突变菌株能够依次利用葡萄糖、木糖和阿拉伯糖产乙醇^[171]。Dunn 和 Rao 通过基因工程手段实现了 *Z. mobilis* ZM4 利用木糖^[190, 191]。而且, 通过驯化途径也可以得到高效利用木糖产乙醇的 *Z. mobilis* 菌株。Mohagheghi 等人用 2-脱氧葡萄糖驯化 *Z. mobilis* ZM4, 筛选得到的 7[#] 菌株对木糖的利用较驯化前提高 100%^[90]。因此, 基于遗传代谢工程的木糖代谢途径改造已经为 *Z. mobilis* 的纤维素乙醇发酵建立了木糖利用的方法学模板。

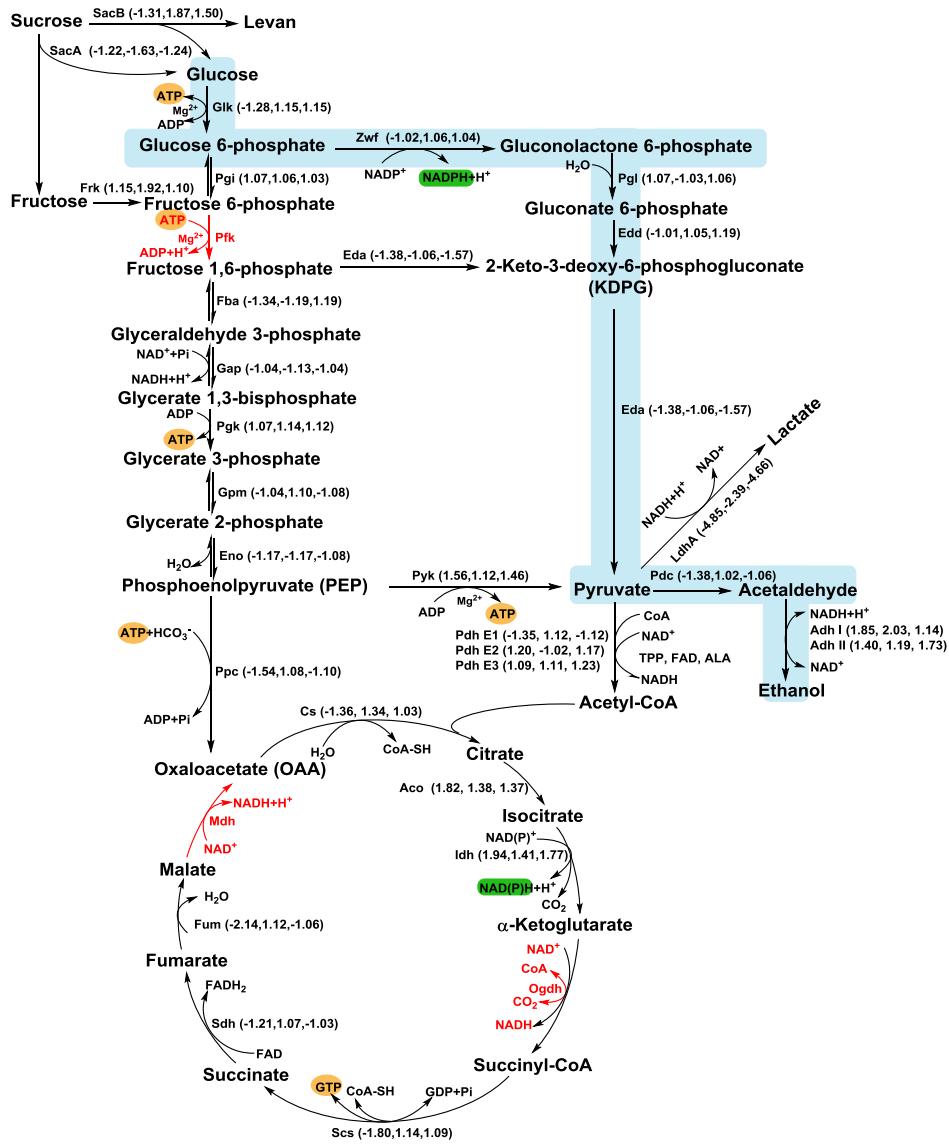


图 1.5 *Z. mobilis* ZM4 的 ED 途径

橙色标识腺嘌呤三腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 和鸟嘌呤三腺苷 (Guanosine triphosphate, GTP), 绿色标识还原力 NADPH, 蓝色标识 ED 途径。酶的缩写如下: 蔗糖酶 (SacA or SacB)、果糖激酶 (Frk)、己糖激酶 (Glk)、葡萄糖磷酸异构酶 (Pgi)、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶 (Zwf)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (Pgl)、葡萄糖酸 6-磷酸脱水酶 (Edd)、2-脱水-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶 (Eda)、丙酮酸脱羧酶 (Pdc)、醇脱氢酶 (Adh)、磷酸果糖激酶 (Pfk)、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (Fba)、甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (Gap)、磷酸甘油酸激酶 (Pkg)、磷酸甘油酸变位酶 (Gpm)、磷酸烯醇式丙酮酸水合酶 (Eno)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Ppc)、苹果酸脱氢酶 (Mdh)、柠檬酸合酶 (Cs)、乌头酸酶 (Aco)、异柠檬酸脱氢酶 (Idh)、 α -酮戊二酸脱氢酶 (Ogdh)、琥珀酰-CoA 合成酶 (Scs)、琥珀酸脱氢酶 (Sdh)、延胡索酸水合酶 (Fum)。正数和负数表示 *Z. mobilis* ZM4 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的上调和下调基因的表达水平。红色虚线表示 *Z. mobilis* ZM4 基因组缺失的酶。

Fig. 1.5 ED pathway of *Z. mobilis* ZM4.

Colored orange are adenosine triphosphate (ATP) and guanosine triphosphate (GTP), and colored green and colored blue are reducing power and ED pathway, respectively. The abbreviated enzymes indicate the following: SacA and SacB (Sucrase), Frk (Fructokinase), Glk (Glucokinase), Pgi (Phosphoglucose isomerase), Zwf (Glucose 6-phosphate dehydrogenase), Pgl (6-Phosphogluconolactonase), Edd (Phosphogluconate dehydratase), Eda (2-Keto-3-deoxy-phosphogluconate aldolase), Pdc (Pyruvate decarboxylase), Adh (Alcohol dehydrogenase), Pfk (Phosphofructokinase), Fba (Fructose 1,6-bisphosphate aldolase), Gap (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), Pkg (Phosphoglycerate kinase), Gpm (Phosphoglycerate mutase), Eno (Enolase), Ppc (Phosphoenolpyruvate carboxylase), Mdh (Malate dehydrogenase), Cs (Citrate synthase), Aco (Aconitate hydratase), Idh (Isocitrate dehydrogenase), Ogdh (α -Oxoglutarate dehydrogenase), Scs (Succinyl-CoA ligase), Sdh (Succinate dehydrogenase), Fum (Fumarate hydratase). The positive and the negative numbers indicate the gene expression level of *Z. mobilis* ZM4 under the stress of 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin, respectively. Red dashed lines mean the missing enzymes from *Z. mobilis* ZM4.

抑制物问题是纤维素乙醇生物炼制领域亟待解决的瓶颈问题之一。木质纤维素来源的弱酸类、呋喃类和酚类抑制物的毒性与其疏水性相关。通常，疏水性越强，毒性越强。4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、糠醛和 5-羟甲基糠醛的疏水性依次减弱，醛类抑制物不会破坏细胞膜的完整性，但是直接影响菌体的生长和发酵。同时，醛类抑制物与核酸和蛋白质的化学反应性也会造成醛类抑制物对菌体的部分毒性^[79]。4-羟基苯甲酸、阿魏酸、香草酸、糠酸、丁香酸、乙酸、乙酰丙酸和甲酸的疏水性依次减弱，弱酸类抑制物主要影响菌体的生长，但不会影响菌体的酵解和能量的生成^[85]。愈创木酚、儿茶酚、松柏醇、香草醇和糠醇的疏水性依次减弱，醇类抑制物会破坏菌体细胞膜的完整性，因此直接影响菌体的生长^[82]。

对于 *Z. mobilis* ZM4 而言，醛类抑制物是影响纤维素乙醇生产的主要抑制物。而且，酚醛的毒性是糠醛和 5-羟甲基糠醛的 2 倍多。*Z. mobilis* ZM4 对预处理过程中产生的乙酸^[158]和酚酸^[189]等抑制物的耐受能力较强。在糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下，4-羟基苯甲醛影响 *Z. mobilis* ATCC10988 发酵葡萄糖，0.5 g/L 4-羟基苯甲醛使细胞生物量和乙醇产率分别减少 16% 和 21%^[43]。单独添加糠醛，或者混合添加糠醛与乙酸，均不会影响 *Z. mobilis* ZM4 的生长。但是一旦将糠醛与酚类抑制物混合，糠醛则意外产生了毒性^[49]。由此可见，酚醛抑制物不仅自身抑制生物炼制过程的糖化和发酵，同时，酚醛抑制物的存在也增加了自身低疏水性的呋喃类抑制物的毒性。

1.6 立项依据和研究意义

木质纤维素来源的抑制物问题一直是 *Z. mobilis* ZM4 高效生产纤维素乙醇的主要瓶颈问题之一。单独添加糠醛、乙酸、或糠醛和乙酸的混合物均不会影响 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长和乙醇积累^[49, 61]。目前对糠醛和弱酸的抗逆机理研究比较深入，而且 *Z. mobilis* ZM4 对酚酸有较好的耐受性^[189]。但是，目前对酚醛抑制物的研究较少。

酚类化合物种类较多，其较差的水溶性导致定性和定量分析困难，因此其代谢途径的相关研究也较少。其中，较低浓度的酚醛抑制物严重抑制 *Z. mobilis* ZM4 糖化过程的纤维素酶酶活和发酵过程的菌体生长和乙醇积累。因此，提高酚醛抑制物转化是实现 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的整合生物加工的有效途径，是降低纤维素乙醇生产成本和实现纤维素乙醇规模化生产的策略之一。

1.7 本论文的主要研究内容

本论文以木质纤维素来源酚醛抑制物的转化作为研究对象，以 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的整合生物加工作为研究目标，基于转录组技术解析专司生物脱毒的丝状真菌 *A. resinae* ZN1 和产乙醇细菌 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的分子生物学过程，募集酚醛抑制物转化的重要酶，推测酚醛抑制物转化的代谢途径，为 *Z. mobilis* ZM4 耐受酚醛抑制物的理性改造提供合成生物学工具。基于遗传工程，通过强化 *Z. mobilis* ZM4 自身的酚醛抑制物还原代谢途径和重构酚醛抑制物氧化代谢途径，尝试提高酚醛抑制物的转化能力，以期实现酚醛抑制物转化和纤维素乙醇发酵的整合生物加工；主要基于转录组数据，募集木质纤维素来源抑制物转化的关键基因，构建细菌、酵母和霉菌的抑制物生物脱毒的关键基因元器件库(图 1.6)。本研究的主要内容包括以下 4 个方面：

(1) 基于 RNA-Seq 技术，解析专司生物脱毒的丝状真菌 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的分子生物学过程，鉴定酚醛抑制物转化的关键酶，推测酚醛抑制物转化的代谢途径。

(2) 基于 DNA 芯片技术，解析 *Z. mobilis* ZM4 耐受酚醛抑制物的行为机制，鉴定酚醛抑制物转化的关键酶，推测酚醛抑制物转化的代谢途径。

(3) 基于遗传工程，预期强化 *Z. mobilis* ZM4 自身的酚醛抑制物还原代谢途径和重构自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径，提高 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的能力，最终实现 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的整合生物加工。

(4) 主要基于转录组数据，构建细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类、弱酸类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库。

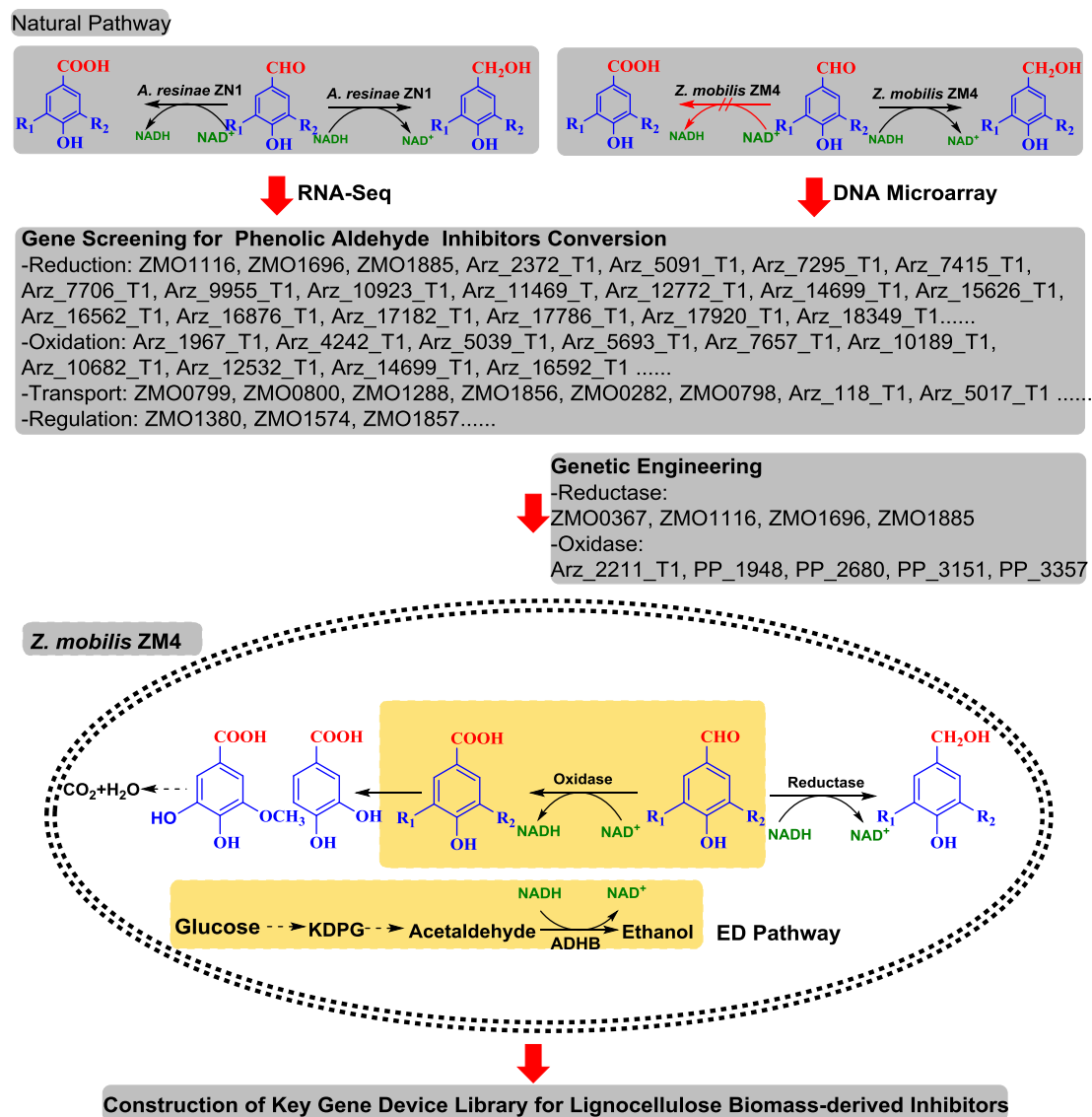


图 1.6 本论文的研究流程

Fig. 1.6 Flowchart of this paper.

第二章 脱毒真菌树脂枝孢霉菌转化酚醛抑制物的转录组

2.1 引言

预处理过程是生物炼制过程的必需环节。但是，预处理过程在释放可发酵的糖的同时也产生了影响菌体生长和产物发酵的呋喃类（糠醛和 5-羟甲基糠醛）、弱酸类（乙酸、甲酸和乙酰丙酸）和酚类抑制物（4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛）。目前，呋喃类^[119, 139, 192]和弱酸类抑制物^[151, 193]对生物炼制过程的抑制机理已逐步阐明。但是，种类较多的酚类抑制物的水溶性较差，其定量定性比较困难，因此其相关代谢途径尚不清楚。酚类抑制物不仅抑制糖化过程纤维素酶的酶活^[35, 36]，同时也抑制发酵过程的菌体生长和纤维素乙醇积累^[46, 191]。目前发现的相对含量较高且抑制效果显著的模型酚类抑制物主要包括 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛等酚醛抑制物^[32, 33]。优化预处理条件、脱毒抑制物和理性改造抑制物高抗逆菌株的途径常用于抑制物的去除^[46, 63, 71]。其中，高温高压是保证可发酵糖高得率的前提条件，因此优化预处理条件始终不能避免抑制物的产生。而且，依赖于分子技术的高抗逆菌株的理性改造周期较长。生物脱毒因反应条件温和、抑制物去除彻底、低糖损失和低废水排放等优点而备受生物炼制领域的青睐^[65, 66, 70]。目前，酵母^[65, 72, 73]、云芝^[74]、子囊壳真菌^[75]和细菌^[76, 77]等微生物均可用于生物炼制过程的生物脱毒工段。但是大部分研究都是关于呋喃类的生物脱毒，而对酚醛抑制物的脱毒研究较少。

专司生物脱毒的树脂枝孢霉菌 (*Amorphotheca resinae* ZN1)，是本实验室从玉米秸秆分离的已全基因组测序的丝状真菌。该菌株能够快速转化糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛和香草醛等木质纤维素来源的抑制物，因此其固态培养方式实现了零耗能和零废水排放的抑制物脱毒新指标^[66-68]。到目前为止，*A. resinae* ZN1 转化糠醛和 5-羟甲基糠醛的分子机制已研究得比较清楚^[67, 68]。而且，本课题组 *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛生成相应的酚酸和酚醇^[194]。但是，*A. resinae* ZN1 转化酚类化合物的分子机制仍不清楚。

本章旨在解析 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的分子生物学过程。通过 RNA-Seq 技术，本研究解析了 *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的转录组。基于基因组和转录组平台，本研究鉴定了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的关键酶，同时推测了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢途径。霉菌具有较为完整的催化酶系，因此本研究将为生物炼制领域抑制物抗逆菌株的理性改造提供合成生物学工具。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株和试剂

A. resinae ZN1 (CGMCC7452) 由本实验室分离^[66]。酵母浸粉购自 Oxoid (Hampshire, UK)。Trizol 试剂购自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒和 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自 TOYOBO CO., LTD. (Torobo Co., Osaka, Japan)。4-羟基苯甲醛和丁香醛购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 香草醛购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。N,O-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺硅烷试剂购自 REGIS Technologies, Inc. (Morton Grove, IL 60053, USA)。其他分析级化学试剂均购自国药集团化学试剂上海有限公司。

2.2.2 培养基和菌株培养

用马铃薯葡萄糖培养基 (Potato dextrose agar, PDA) 活化 *A. resinae* ZN1 甘油冻存管。PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 15.0。种子培养基 (g/L): KH_2PO_4 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, CaCl_2 0.5, 酵母浸粉 1.0, 葡萄糖 20.0。发酵培养基含有 5.0 g/L 葡萄糖, 其他组分与种子培养基相同。

A. resinae ZN1 转化酚醛抑制物的实验在有氧条件下进行。用 10 mL 无菌生理盐水洗涤 1 支 *A. resinae* ZN1 斜面, 将洗涤的孢子悬液接种至 200 mL 种子液。种子液预培养 2 d 后, 用两层无菌纱布过滤种子液。并按照 10% 的接种量 (v/v) 将种子液接种至分别添加 0.1 g/L 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的发酵培养基, 于 28 °C 静置培养 12 h, 收集菌体并液氮速冻, 置于 -80 °C Thermo Forma-86C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, Ohio, USA) 用于 RNA 提取实验。

2.2.3 基于 RNA-Seq 的转录组

本研究将添加酚醛抑制物的实验组作为处理组, 不添加酚醛抑制物的实验组作为非处理组(对照组)。用液氮研磨速冻的 *A. resinae* ZN1 菌体, 再用 Trizol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取总 RNA。本研究通过甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并通过 DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter, Inc.) 检测 RNA 的浓度和纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8-2.1$)。经质检合格的 RNA 用于 RNA-Seq 测序实验和实时定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 实验。RNA-Seq 实验的处理组和非处理组均设置 2 个生物学重复。

用 Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Lifetech) 构建 cDNA 文库, 并用 Agilent Bioanalyzer 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 进行定量评价。用 Proton Sequencing 对 cDNA 文库进行测序。测序样品包裹在 OneTouch 2, 根据 Ion PI™ Template OT2 200 Kit (Lifetech) 制备阳性模板微粒 Ion PI™ Ion Sphere™ Particles, 在 OneTouch 2 ES 富集样品。混合富集后的微粒 Ion PI™ Ion Sphere™ Particles, 并点样至 P1v2 Proton Chip, 用 Ion PI Sequencing 200 Kit (Lifetech) 和

Proton测序仪测序。先用 Fast-TQ 软件规范化处理序列标签 (Reads)，之后通过 Fast-QC 软件评估数据的质量。用 1000 bp 末端序列标签的链特异参数和最大距离参数法，用 Bowtie 软件 (V 0.12.7) 将 RNA-Seq 的标签序列 (Reads) 映射至 *A. resiniae* ZN1 的基因组序列 (JZSE00000000)。用中位预测法进行 RPKM (Reads Per Kilobases per Millionreads) 的分析。edgeR (v3.0.2) 用于计算基因的差异表达。阈值为倍数变化 (Foldchange) ≥ 2.0 或 Foldchange ≤ -2.0 ，定义为差异表达基因。错误发现率 (False Discovery Rate, FDR) ≤ 0.001 ，且阈值为倍数变化 ≥ 2.0 或 Foldchange ≤ -2.0 ，定义为显著差异表达基因。用 Gene Ontology (GO) 进一步分析差异表达基因的生物学功能。

2.2.4 qRT-PCR 实验

为了评价 RNA-Seq 数据的可靠性，本研究通过 qRT-PCR 技术验证 *A. resiniae* ZN1 转化酚醛抑制物的转录组数据。用 Primer 5.0 软件设计 qRT-PCR 的引物，12 个目标基因主要涉及戊糖磷酸途径 (Pentose phosphate pathway, PPP) 和木糖代谢途径 (表 2.1)。用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒 (Torobo Co., Osaka, Japan) 反转录合成 cDNA 的第一条链。再以此为模板，采用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Torobo Co., Osaka, Japan)，通过 CFX96TM Real-Time System C10000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 进行 qRT-PCR。PCR 反应条件如下：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 2 min，55 °C 退火 30 sec，72 °C 延伸 30 sec。qRT-PCR 用 SYBR 荧光染料标记，内参是 Actin (Arz_12286_T1)。

表 2.1 qRT-PCR 引物

Table 2.1 Primers for qRT-PCR

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Arz_99_T1	GCTATCATGAACGGTCTCGCTG	GAACGTGAGACAGGGCAGACAG
Arz_771_T1	AAGGCTCTTGCCTTGCAAGAT	TCATCCACCACAATCATGGGAT
Arz_1621_T1	TGATCATCGACCTGCTCCGATA	CTCCGCAAGCTTCAGGAGAGT
Arz_4254_T1	CCCGAGTCTACGAGCGAATTAA	TCCCACAAAACATCAACCTTCG
Arz_4835_T1	CCCCAGGGACACGATAGCTCTA	GGTAGCTTGGAAGGGGATCTT
Arz_6146_T1	TACGGAGGGAACCCTGTACTGG	ACCAGAAGCAACACGGAGGAAG
Arz_9246_T1	GCCCAGGACTTCTGCTACAAG	ATCTCGGCCTGCTTGACGATGT
Arz_9744_T1	GCGATGGAGCGACCTATTTCTT	GCCATATTGACCGATGATGACG
Arz_11538_T1	TTGCTTGTCTCCCTCAAGGAG	ATCCTCGAGGAACTGCTCCTTG
Arz_12286_T1	TGGACCAGAACTGAGCGAAGA	AACATTCAGGGGCTTCAAACG
Arz_13958_T1	CACCACATTCCTCATGTCGAC	GCCGTTCTTGTAGCAGAGCATG
Arz_15588_T1	AGTTGGAGACAGCTCTCCAGC	TTGAAAGCCAAGTGGACTTCCC
Arz_18006_T1	ATCCCAAATTCGTCAAGGAGG	GCCATCTTTGATATCAGCGGAT

2.2.5 HPLC 和 GC-MS 分析

通过高压液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 和气

相色谱 (Gas Chromatography-Mass Spectrometer, GC-MS) 对 12 h 的转录组样品进行酚醛抑制物及其转化产物的定性定量分析。用配置示差检测器 RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 Aminex HPX-87H 柱子 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC 分析葡萄糖。柱温 65 °C, 流动相是 5 mM H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min。用配置 YMC-Pack ODS-A 柱子 (Tokyo, Japan) 的反向 HPLC (SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 检测 4-羟基苯甲醛、丁香醛、香草醛及其转化产物, 柱温 35 °C。通过梯度洗脱的方法确认醛类抑制物的转化情况, 具体参数设置为: 1-4 min, 用 10: 90 (v/v) 的乙腈和 0.1% 甲酸水溶液洗脱; 4-20 min, 用 35: 65 (v/v) 的乙腈和 0.1% 甲酸水溶液洗脱; 之后用 10: 90 (v/v) 的乙腈和 0.1% 甲酸水溶液洗脱 10 min, 检测波长为 270 nm, 进样量为 20 μL。

A. resinae ZN1 培养 12 h 的样品经 12,000 g 离心 5 min, 用 EYELA N-1001 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司) 悬蒸样品以除去样品中的水分, 之后用乙腈溶解沉淀, 并用 N,O-双 (三甲基硅基) 三氟乙酰胺硅试剂 (Morton Grove, IL 60053, USA) 衍生处理样品^[195, 196]。用配置 HP-5-MS 柱子 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 的 Agilent 6890 GC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 检测样品。温度参数设置如下: 初温 8 °C, 维持 3 min; 以 8 °C/min 的升温速率升温至 80 °C, 维持 4 min; 以 8 °C/min 的升温速率, 升温至终温 280 °C。进样量为 1 μL, 在无分流条件下检测样品。

2.3 结果与讨论

2.3.1 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的转录组

本课题组的前期研究发现, *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物产生相应的酚酸和酚醇^[194]。本研究通过 HPLC 和 GC-MS 检测了 *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的产物, 确认发酵 12 h 产生了相应的酚酸和酚醇 (GC-MS 未能检测到丁香醇) (表 2.2)。因此, 本研究选择 *A. resinae* ZN1 发酵 12 h 的样品进行 RNA-Seq 实验。

表 2.2 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的产物

Table 2.2 Metabolic products of phenolic aldehyde inhibitors by *A. resinae* ZN1

Substrate	Products	Molecular formula	Molecular weight	Retain time (min)
4-Hydroxybenzaldehyde	4-Hydroxybenzoate	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	282.11	18.937
	4-Hydroxybenzyl alcohol	C ₁₃ H ₂₄ O ₂ Si ₂	268.13	16.522
Syringaldehyde	Syringate	C ₁₅ H ₂₆ O ₅ Si ₂	254.10	20.396
Vanillin	Vanillate	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂	312.12	18.445
	Vanillyl alcohol	C ₁₄ H ₂₆ O ₃ Si ₂	298.14	19.240

基于 RNA-Seq 技术, 本研究考察了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的分子

机制。本研究首先通过 qRT-PCR 技术考察了 RNA-Seq 数据的可靠性。结果发现, 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的 12 个基因的 qRT-PCR 结果与 3 种酚醛胁迫下的 RNA-Seq 数据的相关性分别是 0.46、0.86 和 0.81 (图 2.1)。除了 Arz_4835_T1 基因的表达量存在较大差异外, qRT-PCR 数据与 RNA-Seq 数据的相关系数符合相关系数范围 (-0.48~+0.93)^[197]。由此说明, 本研究的 RNA-Seq 数据可信, 可以用于后续研究。

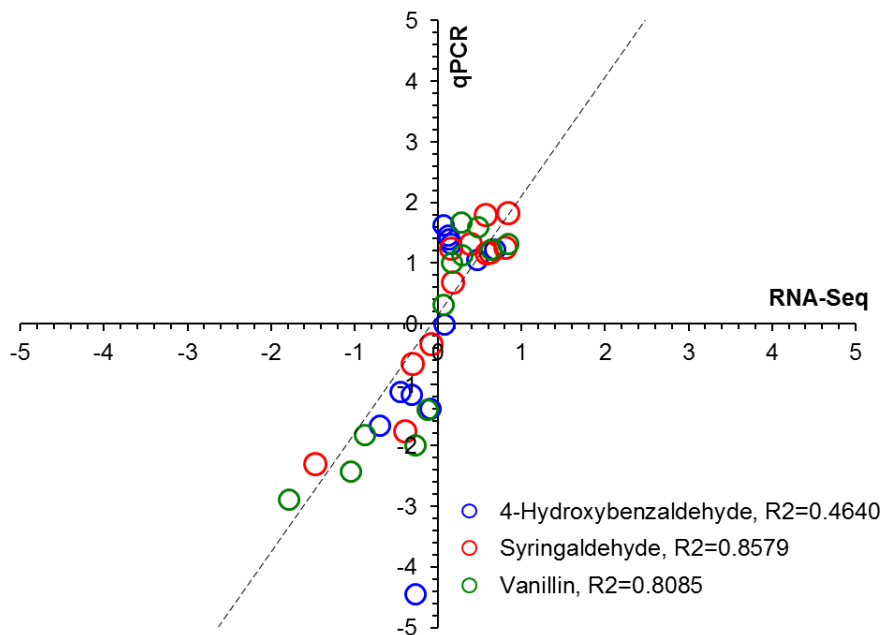


图2.1 基于RNA-Seq和qRT-PCR技术的*A. resinae* ZN1基因表达水平比较

RNA-Seq和qRT-PCR技术的表达数据均以 \log_2 转化 (\log_2 , 处理/对照), 并取RNA-Seq与qPCR对数 \log_2 的比值

Fig. 2.1 Comparison of gene expression levels of *Z. mobilis* ZM4 between RNA-Seq and qRT-PCR. The gene expression ratios of both RNA-Seq data and qRT-PCR data for 20 genes were \log_2 transformed in base 2 (\log_2 , treatment/control), and the RNA-Seq \log_2 ratio values were plotted against the qRT-PCR \log_2 values.

通过比较非处理组 (不添加酚醛抑制物) 和处理组 (添加酚醛抑制物) 的转录组信息, 本研究解析了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的基因表达情况。通过与非处理组的序列标签比较, 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛处理组的 RNA-Seq 结果与基因组序列的映射率 (Mapping rate) 分别是 64.85%、74.25% 和 76.25%。由此说明本研究的 RNA-Seq 数据质量较好, 可以用于后续分析

依据 2.2.3 定义的显著差异表达基因的阈值, 本研究解析了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的转录组。研究发现, *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛的过程中, 显著差异上调表达和显著差异下调表达基因分别是 295 个和 239 个; 丁香醛转化过程中, 分别有 733 个和 843 个; 香草醛转化过程中, 分别有 657 个和 604 个 (图 2.2)。

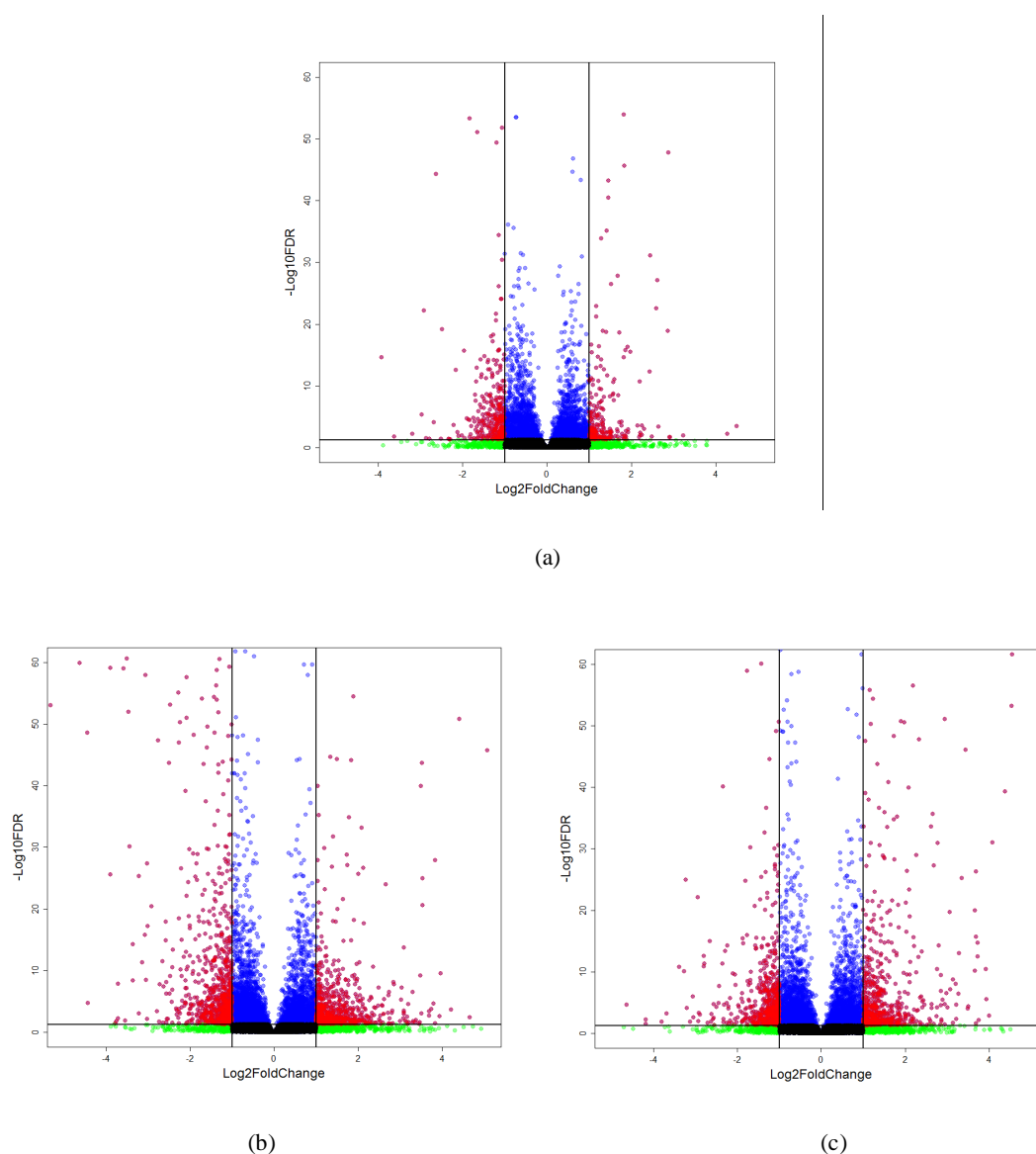


图 2.2 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的差异表达基因的火山图

Y 轴是 FDR 的负 log (以 10 为底), X 轴是酚醛抑制物转化相关基因表达差异倍数的负对数 (以 2 为底)。FDR ≤ 0.001 时, 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛转化过程中分别有 534、1576 和 1261 个基因差异表达。红色和蓝色分别表示显著差异上调表达和显著差异下调表达的基因。(a) 4-羟基苯甲醛; (b) 丁香醛; (c) 香草醛。

Fig. 2.2 Volcano plot of overall gene-based differential expression results for three treatments with phenolic aldehydes and untreated (each dot corresponds to a gene). The Y-axis corresponds to the negative log (base 10) of FDR while the X-axis corresponds to the negative log (base 2) of the fold change for difference in expression when cells were stimulated with phenolic aldehydes. There were 534, 1576, and 1261 differentially expressed genes according to an adjusted FDR ≤ 0.001 (blue dots). Red and blue dot indicate the differentially expressed up-regulated genes and down-regulated genes, respectively. (a) 4-Hydroxybenzaldehyde; (b) Syringaldehyde; (c) Vanillin.

GO (Gene Ontology) 功能分析发现, 氧化还原过程和转运是 *A. resinae* ZN1 转化 3 种酚醛抑制物过程中富集度最高的生物学过程 (图 2.3), 其次还涉及代谢过程、芳香化合物代谢和肉桂酸代谢的生物学过程。

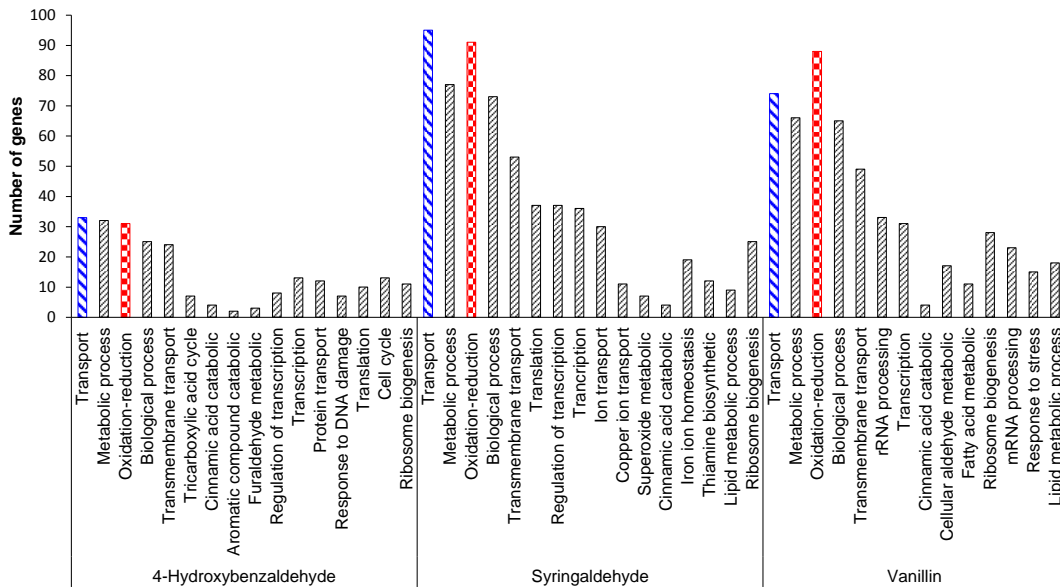


图 2.3 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的生物学过程的 GO 分析

Fig. 2.3 GO analysis on biological process during phenolic aldehyde inhibitors conversion by *A. resinae* ZN1.

2.3.2 酚醛抑制物对中心碳代谢的影响

在有氧条件下, *A. resinae* ZN1 先转化酚醛抑制物, 后同化葡萄糖^[194]。因此, 根据转录组数据, 本节解析了酚醛抑制物对 *A. resinae* ZN1 中心碳代谢途径的影响 (图 2.4)。

A. resinae ZN1 转化酚醛抑制物的过程中, 乳酸脱氢酶编码基因 (Arz_14536_T1) 在 4-羟基苯甲醛转化过程中显著差异上调表达 2.49 倍, 醇脱氢酶的编码基因 (Arz_16562_T1) 在香草醛转化过程中显著差异上调表达 2.07 倍。丁香醛转化过程中, 磷酸甘油酸变位酶 (Arz_1445_T1 和 Arz_5109_T1) 和乳酸脱氢酶 (Arz_6689_T1、Arz_9645_T1 和 Arz_14536_T1) 的编码基因均显著差异上调表达 2 倍多。由此可见, 4-羟基苯甲醛和香草醛基本不影响 EMP (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) 途径的基因表达, 而且 EMP 途径的部分酶编码基因反而被丁香醛诱导。

很有意思的是, 木糖激酶 (Arz_13958_T1) 和转酮酶 (Arz_9833_T1) 的编码基因在 *A. resinae* ZN1 转化丁香醛和香草醛的过程中显著差异上调表达 2 倍多。而且, 4-羟基苯甲醛不影响磷酸戊糖途径的基因表达。

A. resinae ZN1 转化 4-羟基苯甲醛过程中, TCA 循环 (Tricarboxylic acid cycle) 的柠檬酸合酶 (Arz_15753_T1)、异柠檬酸脱氢酶 (Arz_4883_T1 和

Arz_15969_T1)、琥珀酰-CoA 合成酶 (Arz_3530_T1、Arz_16173_T1 和 Arz_16239_T1) 的编码基因均显著差异上调表达 2 倍多。柠檬酸合酶 (Arz_2134_T1、Arz_6928_T1 和 Arz_8361_T1) 和琥珀酸-CoA 合成酶 (Arz_10191_T1) 的编码基因在丁香醛转化过程中也显著差异上调表达,但是柠檬酸合酶 (Arz_15753_T1) 的编码基因显著下调表达。柠檬酸合酶 (Arz_15753_T1)、异柠檬酸脱氢酶 (Arz_9076_T1)、琥珀酸-CoA 合成酶 (Arz_10191_T1 和 Arz_16239_T1) 和琥珀酸脱氢酶 (Arz_16736_T1) 的编码基因在香草醛转化过程中均显著差异上调表达 2 倍。由此可见,除了柠檬酸合酶 (Arz_10191_T1),酚醛抑制物基本不影响 TCA 循环相关催化酶的基因表达。而且,3 种酚醛抑制物也不影响乙醛酸循环相关酶的基因表达。

总之,0.1 g/L 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛基本不抑制 *A. resiniae* ZN1 的中心碳代谢,反而诱导了部分催化酶编码基因的表达。

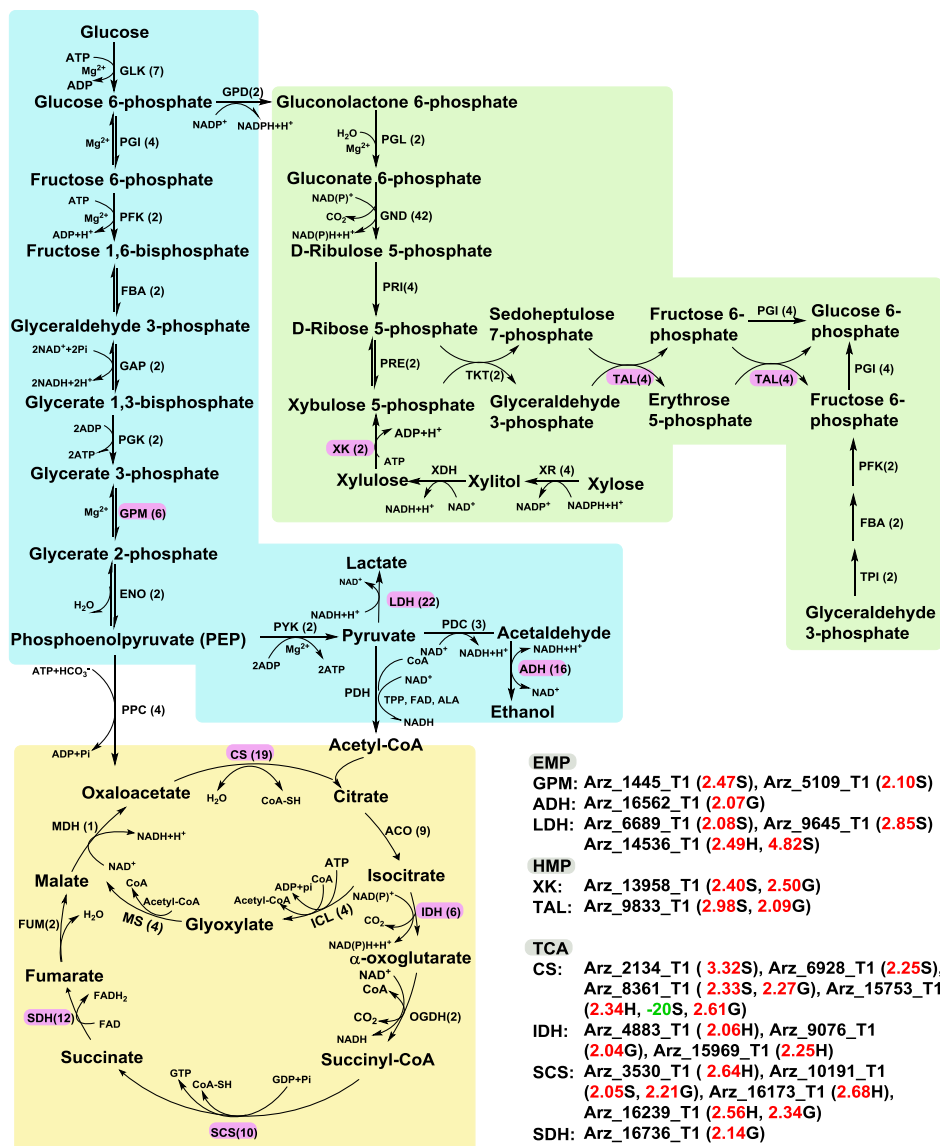


图 2.4 酚醛抑制物对 *A. resiniae* ZN1 中心碳代谢的影响

紫色标识酚醛抑制物转化过程中显著差异表达的酶。H、S 和 G 分别代表 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛。红色和绿色数字分别代表显著差异上调和显著差异下调表达的基因。蓝色、黄色和绿色分别表示 EMP、TCA 和 HMP 途径。缩写酶后括号中的数字表示编码基因的个数。酶的缩写名称如下：丙酮酸激酶 (PYK)、丙酮酸脱羧酶 (PDC)、醇脱氢酶 (ADH)、甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAP)、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA)、5-磷酸核酮糖差向异构酶 (PRE)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、琥珀酰-CoA 合成酶 (SCS)、磷酸丙糖异构酶 (TPI)、磷酸果糖激酶 (PFK)、磷酸甘油酸变位酶 (GPM)、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (PGL)、6-磷酸葡萄糖酸-1-脱氢酶 (GND)、磷酸葡萄糖异构酶 (PGI)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PPC)、木糖还原酶 (XR)、木糖醇脱氢酶 (XDH)、木酮糖激酶 (XK)、柠檬酸合酶 (CS)、乳酸脱氢酶 (LDH)、苹果酸合酶 (MS)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、葡萄糖激酶 (GLK)、 α -酮戊二酸脱氢酶 (OGDH)、戊糖磷酸异构酶 (PRI)、乌头酸酶 (ACO)、烯醇式酶 (ENO)、延胡索酸水化酶 (FUM)、异柠檬酸脱氢酶 (IDH)、异柠檬酸裂合酶 (ICL)、转醛醇酶 (TAL) 和转酮醇酶 (TKT)。

Fig. 2.4 Influence on central carbon metabolism pathway of phenolic aldehydes in *A. resiniae* ZN1. Colored purple indicate the genes influenced by phenolic aldehydes, respectively. H, S, and G stand for 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin, respectively. Numbers colored red and colored green means the expression level of up-regulated genes and down-regulated genes. Blue, yellow, and green indicate EMP, TCA, and HMP, respectively. The numbers in bracket after the abbreviated enzymes indicate the encoding gene numbers. The abbreviated enzymes was the following: PYK (Pyruvate kinase), PDC (Pyruvate decarboxylase), ADH (Alcohol dehydrogenase), GAP (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), FBA (Fructose 1,6-bisphosphate aldolase), PRE (5-Phosphate ribulose epimerase), SDH (Succinate dehydrogenase), SCS (Succinyl-CoA synthetase), TPI (Triose-phosphate isomerase), PFK (Phosphofructokinase), GPM (Phosphoglycerate mutase), PGK (Phosphoglycerate kinase), PGL (6-Phosphogluconolactonase), GND (6-Phosphogluconate dehydrogenase), PGI (Phosphoglucose isomerase), PPC (Phosphoenolpyruvate carboxylase), XR (Xylose reductase), XDH (Xylitol dehydrogenase), XK (Xylulose kinase), CS (Citrate synthase), LDH (Lactate dehydrogenase), MS (Malate synthase), MDH (Malate dehydrogenase), GLK (Glucokinase), OGDH (α -oxoglutarate dehydrogenase), PRI (5-Phosphoribose isomerase), ACO (Aconitase), ENO (Enolase), FUM (Fumarase), IDH (Isocitrate dehydrogenase), ICL (Isocitrate lyase), TAL (Transaldolase), and TKT (Transketolase).

2.3.3 酚醛抑制物的氧化还原代谢途径

一般来说, 酚醛抑制物的典型生物转化途径是将酚醛抑制物还原或氧化成低毒的酚醇或酚酸^[80, 81]。基于 HPLC 和 GC-MS, 本研究鉴定了 4-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲醇、丁香酸、丁香醇、香草酸和香草醇。由此可见, 氧化代谢和还原代

谢途径是 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的主要分子机制。基于 *A. resinae* ZN1 的基因组注释和转录组数据，本研究推测了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢途径（图 2.5）。

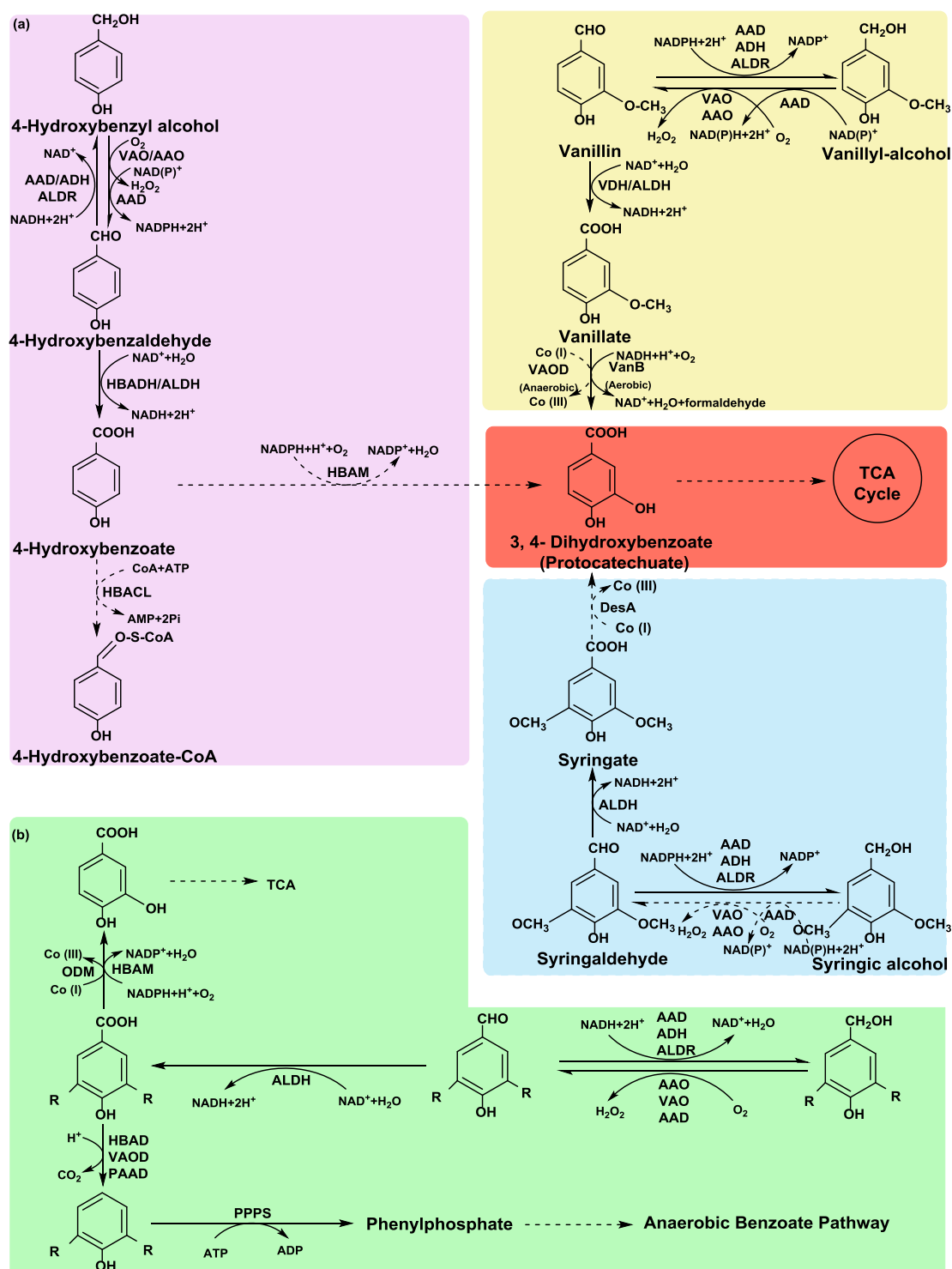


图 2.5 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢途径

R 代表甲氧基。(a) 推测的 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛代谢途径；(b) 推测的酚醛抑制物代谢途径的一般途径。酶的缩写如下：酰基醇脱氢酶 (AAD)、酰基醇氧化酶 (AAO)、醇脱氢酶 (ADH)、醛脱氢酶 (ALDH)、醛还原酶 (ALDR)、4-羟基苯甲醛脱氢酶 (HBADH)、

4-羟基苯甲酸-3-单加氧酶 (HBAM)、4-羟基苯甲酸-CoA 连接酶 (HBACL)、4-羟基苯甲酸脱羧酶 (HBAD)、*O*-去甲基化酶 (ODM)、苯基丙烯酸脱羧酶 (PAAD)、丁香酸 *O*-去甲基化酶 (DesA)、苯基磷酸合酶 (PPPS)、香草醛脱氢酶 (VDH)、香草醇氧化酶 (VAO)、香草酸 *O*-去甲基化酶 (VAOD) 和香草酸单加氧酶 (VanB)。

Fig. 2.5 The predicted phenolic compounds degrading pathway.

Colored orange and colored green indicate energy ATP and reducing power. R stands for methoxyl group. (a) The predicted metabolic pathway of 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin. (b) The predicted common metabolic pathway of phenolic aldehydes. The abbreviated enzymes were the following: AAD (Aryl-alcohol dehydrogenase), AAO (Aryl-alcohol oxidase), ADH (Alcohol dehydrogenase), ALDH (Aldehyde dehydrogenase), ALDR (Aldehyde reductase), HBADH (4-Hydroxybenzaldehyde dehydrogenase), HBAM (4-Hydroxybenzoate 3-monooxygenase), HBACL (4-Hydroxybenzoate-CoA ligase), HBAD (4-Hydroxybenzoate decarboxylase), ODM (*O*-demethylase), PAAD (Phenylacrylic acid decarboxylase), DesA (Syringate *O*-demethylase), PPPS (Phenylphosphate synthase), VDH (Vanillin dehydrogenase), VAO (Vanillyl-alcohol oxidase), VAOD (Vanillate *O*-demethylase), and VanB (Vanillate monooxygenase).

2.3.3.1 *A. resiniae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛

4-羟基苯甲醛还原为 4-羟基苯甲醇：*A. resiniae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛的过程中，7 个醇脱氢酶编码基因 (Arz_5226_T1、Arz_7415_T1、Arz_7706_T1、Arz_10198_T1、Arz_11469_T1、Arz_14914_T1 和 Arz_16876_T1) 差异上调表达 2 倍多，其中 Arz_10198_T1、Arz_11469_T1 和 Arz_14914_T1 显著差异表达了 (表 2.3)。酰基醇脱氢酶编码基因 (Arz_2372_T1) 差异上调表达 2.63 倍。黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 的酰基醇脱氢酶还原 4-羟基苯甲醛生成 4-羟基苯甲醇^[102]。由此推测，醇脱氢酶和酰基醇脱氢酶参与 *A. resiniae* ZN1 还原 4-羟基苯甲醛的代谢过程。

4-羟基苯甲醛氧化为 4-羟基苯甲酸和原儿茶酸：*A. resiniae* ZN1 有 4 个 4-羟基苯甲醛脱氢酶编码基因 (Arz_494_T1、Arz_1535_T1、Arz_10620_T1 和 Arz_15082_T1)，但是均未差异表达，而醛脱氢酶 (Arz_18373_T1) 显著差异上调表达 2.0 倍 (表 2.3)。4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶的编码基因 Arz_9067_T1 差异上调表达 2.68 倍。4-羟基苯甲醛脱氢酶、苯甲醛脱氢酶和醛脱氢酶将 4-羟基苯甲醛氧化成 4-羟基苯甲酸^[98, 196]。研究也发现，4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶催化 4-羟基苯甲酸生成原儿茶酸^[198]。由此推测，醛脱氢酶替代特异的 4-羟基苯甲醛脱氢酶催化 4-羟基苯甲醛的氧化代谢，生成的 4-羟基苯甲酸在 4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶作用下生成原儿茶酸。

由此推测，*A. resiniae* ZN1 的醇脱氢酶和酰基醇脱氢酶参与了 4-羟基苯甲醛的还原代谢途径，醛脱氢酶参与了 4-羟基苯甲醛的氧化产酸代谢途径。

2.3.3.2 *A. resinae* ZN1 转化香草醛

香草醛还原为香草醇：*P. chrysosporium* 来源的醇脱氢酶和酰基醇脱氢酶还原香草醛生成香草醇^[100, 102]。*A. resinae* ZN1 转化香草醛的过程中，9 个醇脱氢酶的编码基因 Arz_5091_T1、Arz_7415_T1、Arz_7706_T1、Arz_11469_T1、Arz_12676_T1、Arz_12772_T1、Arz_15626_T1、Arz_16562_T1 和 Arz_16876_T1 分别差异上调表达 2.31 倍、6.75 倍、5.49 倍、6.01 倍、2.18 倍、4.24 倍、8.81 倍、2.07 倍和 2.17 倍，其中 Arz_7415_T1、Arz_7706_T1、Arz_11469_T1、Arz_12772_T1 和 Arz_15626_T1 显著差异表达（表 2.3）。7 个酰基醇脱氢酶编码基因 Arz_7295_T1、Arz_9955_T1、Arz_10923_T1、Arz_14699_T1、Arz_17182_T1、Arz_17786_T1 和 Arz_18349_T1 显著差异上调表达 12.63 倍、7.19 倍、3.24 倍、6.87 倍、4.31 倍、3.20 倍和 8.41 倍，其中 Arz_2372_T1 和 Arz_17920_T1 分别上调表达 4.87 倍和 2.87 倍。由此推测，醇脱氢酶和酰基醇脱氢酶参与了 *A. resinae* ZN1 还原香草醛的代谢过程。

香草醇氧化为香草醛：香草醇氧化酶和酰基醇氧化酶在好氧条件下氧化香草醇生成香草醛^[199-202]。*A. resinae* ZN1 转化香草醛的过程中，4 个香草醇氧化酶编码基因 (Arz_5225_T1、Arz_6129_T1、Arz_9132_T1 和 Arz_10038_T1) 均未差异表达。酰基醇氧化酶编码基因 Arz_11870_T1 显著差异上调表达 2.96 倍。醛还原酶 (EC1.1.1.2) 也能够氧化香草醇生成香草醛^[203-205]。5 个醛还原酶 Arz_1967_T1、Arz_4242_T1、Arz_10682_T1、Arz_14699_T1 和 Arz_18349_T1 分别显著差异上调表达 2.21 倍、3.74 倍、2.27 倍、6.87 倍和 8.41 倍，其中 Arz_7657_T1 和 Arz_16592_T1 分别上调表达 3.96 倍和 2.28 倍。因此，本研究推测酰基醇氧化酶和醛还原酶参与了香草醇到香草酸的氧化。Shimizu 等人发现，*P. chrysosporium* 快速还原香草醛生成香草醇，但是香草醇一旦生成会很快再次被氧化成相应的醛^[206]。

香草醛氧化为香草酸：香草醛脱氢酶和醛脱氢酶均能够氧化香草醛生成香草酸^[99, 207]。*A. resinae* ZN1 转化香草醛的过程中，2 个香草醛脱氢酶的编码基因 Arz_1736_T1 和 Arz_3707_T1 均未显著差异表达。4 个醛脱氢酶编码基因 Arz_5693_T1、Arz_9969_T1、Arz_15425_T1 和 Arz_15746_T1 分别差异上调表达 2.09 倍、2.03 倍、2.13 倍和 3.98 倍，其中 Arz_9969_T1 和 Arz_15425 显著差异表达（表 2.3）。由此推测，醛脱氢酶参与了香草醛氧化为香草酸的氧化代谢途径。

由此推测，*A. resinae* ZN1 的醇脱氢酶和酰基醇脱氢酶参与了香草醛的还原代谢途径，醛脱氢酶参与了香草醛的氧化产酸代谢途径。

2.3.3.3 *A. resinae* ZN1 转化丁香醛

目前对丁香醛的代谢途径鲜见报道，本研究根据 *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基

苯甲醛和香草醛的代谢途径推测了丁香醛的代谢途径。

丁香醛还原为丁香醇：依据 4-羟基苯甲醛和香草醛还原为醇的转化途径，本研究推测醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶和醛还原酶参与了丁香醛还原产醇的代谢途径。4 个醇脱氢酶编码基因 Arz_3624_T1、Arz_5193_T1、Arz_9103_T1 和 Arz_12772_T1 在 *A. resinae* ZN1 转化丁香醛的过程中分别显著差异上调表达 2.58 倍、5.00 倍、4.12 倍和 3.82 倍(表 2.3)。2 个酰基醇脱氢酶编码基因 Arz_14699_T1 和 Arz_18349_T1 也差异上调表达 2.40 倍和 2.14 倍，其中 Arz_18349_T1 显著差异表达。3 个醛还原酶编码基因 Arz_4242_T1、Arz_14699_T1 和 Arz_18349_T1 差异上调表达 2.59 倍、2.40 倍和 2.14 倍，其中 Arz_4242_T1 和 Arz_14699_T1 显著差异上调表达。基于 HPLC，本研究检测到 *A. resinae* ZN1 还原丁香醛产生丁香醇。因此推测，醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶和醛还原酶参与了丁香醛还原为丁香醇的代谢过程。

丁香醛氧化为丁香酸：*A. resinae* ZN1 转化丁香醛的过程中，4 个醛脱氢酶编码基因 Arz_5039_T1、Arz_5693_T1、Arz_10189_T1 和 Arz_12532_T1 分别差异上调表达 2.64 倍、2.11 倍、2.64 倍和 2.61 倍，其中 Arz_5039_T1 显著差异表达。由此推测，醛脱氢酶参与了 *A. resinae* ZN1 氧化丁香醛产生丁香酸的代谢过程。*Sphingomonas* sp. 14DN61 来源的 NAD⁺ 依赖型醛脱氢酶 (*phnN*) 氧化丁香醛生成相应的酸^[99]。而且，丁香酸在丁香酸 *O*-去甲基化酶的作用下生成原儿茶酸^[201]。*A. resinae* ZN1 没有特异的丁香酸 *O*-去甲基化酶，但是 2 个非特异的 *O*-去甲基化酶编码基因 Arz_5787_T1 和 Arz_7698_T1 分别差异上调表达 2.06 倍和 2.01 倍。由此推测，醛脱氢酶参与丁香醛氧化为丁香酸的代谢途径，非特异的 *O*-去甲基化酶参与丁香酸生成原儿茶酸的代谢途径。

在酚醛抑制物转化过程中，苯基丙烯酸脱羧酶（又称为肉桂酸脱羧酶）和羧基还原酶的编码基因均显著差异表达。（1）苯基丙烯酸脱羧酶：4 个苯基丙烯酸脱羧酶编码基因 Arz_10438_T1、Arz_10440_T1、Arz_16710_T1 和 Arz_16712_T1 均差异下调表达 2.37-9.41 倍。Clausen 等人发现苯基丙烯酸脱羧酶能够催化酚醛代谢^[208]，因此本研究推测苯基丙烯酸脱羧酶参与 3 种酚醛抑制物的转化。（2）羧基还原酶 (EC1.1.1.184)：香草醛转化过程中，2 个羧基还原酶编码基因 Arz_11558_T1 和 Arz_11891_T1 分别差异上调表达 4.80 倍和 5.23 倍。羧基还原酶还原苯甲醛生成相应苯甲醇^[209]，因此本研究推测苯基丙烯酸脱羧酶和羧基还原酶参与了酚醛抑制物的转化。*A. resinae* ZN1 的 4 个羧酸还原酶 (EC1.2.99.6) 编码基因在 3 种酚醛抑制物转化过程中均未显著差异表达(约上调表达 0.83-1.25 倍)。而且，黄质氧化酶 (EC1.17.3.2) 能够氧化香草醛和 4-羟基苯甲醛产生相应的酚酸^[210]，但是本研究发现 *A. resinae* ZN1 的 2 个黄质氧化酶 (Arz_8388_T1 和 Arz_13138_T1) 在酚醛抑制物转化过程中并未差异表达。

表 2.3 *A. resiniae* ZN1 转化酚醛抑制物的关键基因Table 2.3 The key genes for phenolic aldehyde inhibitors conversion by *A. resiniae* ZN1

Enzyme	Gene	4-Hydroxybenzaldehyde			Syringaldehyde			Vanillin		
		Foldchange	<i>p</i> -value	FDR	Foldchange	<i>p</i> -value	FDR	Foldchange	<i>p</i> -value	FDR
Aryl-alcohol oxidase	Arz_11870_T1	1.31	0.44	0.68	3.08	0.00	0.01	2.96	0.00	0.01
	Arz_2372_T1	2.63	0.04	0.15	1.66	0.28	0.44	4.87	0.00	0.01
	Arz_7295_T1	1.18	0.62	0.82	1.56	0.14	0.27	12.63	0.00	0.00
	Arz_9955_T1	1.46	0.15	0.36	1.35	0.26	0.42	7.19	0.00	0.00
	Arz_10923_T1	1.14	0.27	0.52	1.51	0.00	0.00	3.24	0.00	0.00
Aryl-alcohol dehydrogenase	Arz_14699_T1	1.82	0.00	0.00	2.40	0.00	0.00	6.87	0.00	0.00
	Arz_17182_T1	1.23	0.31	0.56	1.00	1.00	1.00	4.31	0.00	0.00
	Arz_17786_T1	0.69	0.15	0.35	0.83	0.47	0.63	3.20	0.00	0.00
	Arz_17920_T1	0.57	0.06	0.18	0.76	0.34	0.51	2.87	0.00	0.01
	Arz_18349_T1	1.90	0.06	0.19	2.14	0.03	0.07	8.41	0.00	0.00
Alcohol dehydrogenase	Arz_3624_T1	1.00	0.97	1.00	2.58	0.00	0.00	1.17	0.36	0.54
	Arz_5091_T1	0.84	0.61	0.81	1.05	0.85	0.92	2.31	0.01	0.05
	Arz_5193_T1	0.96	0.85	0.95	5.00	0.00	0.00	0.67	0.19	0.35
	Arz_5226_T1	2.01	0.13	0.32	1.93	0.15	0.27	1.84	0.10	0.22
	Arz_7415_T1	3.43	0.00	0.02	1.89	0.13	0.25	6.75	0.00	0.00
	Arz_7706_T1	2.85	0.00	0.01	1.12	0.72	0.84	5.49	0.00	0.00
	Arz_9103_T1	0.89	0.64	0.83	4.12	0.00	0.00	0.69	0.17	0.31
	Arz_10198_T1	2.97	0.00	0.00	0.88	0.33	0.49	1.19	0.36	0.54
	Arz_11469_T1	2.33	0.00	0.00	1.50	0.00	0.01	6.01	0.00	0.00
	Arz_12676_T1	0.69	0.33	0.59	1.28	0.45	0.61	2.18	0.02	0.07
Arz_12772_T1	1.96	0.07	0.21	3.82	0.00	0.00	4.24	0.00	0.00	

	Arz_14914_T1	4.44	0.00	0.00	0.26	0.13	0.25	-2.62	0.22	0.38
	Arz_15626_T1	1.28	0.43	0.67	1.76	0.07	0.16	8.81	0.00	0.00
	Arz_16562_T1	1.55	0.12	0.31	1.21	0.52	0.67	2.07	0.00	0.01
	Arz_16876_T1	2.80	0.01	0.04	1.24	0.59	0.73	2.17	0.02	0.07
Aldehyde dehydrogenase	Arz_5039_T1	1.35	0.08	0.22	2.64	0.00	0.00	1.57	0.02	0.05
	Arz_5693_T1	1.58	0.28	0.53	2.11	0.08	0.17	2.09	0.09	0.21
	Arz_9969_T1	0.92	0.47	0.71	1.29	0.06	0.14	2.03	0.00	0.00
	Arz_10189_T1	1.09	0.98	1.00	2.64	0.31	0.48	1.38	0.57	0.72
	Arz_12532_T1	1.34	0.32	0.57	2.61	0.00	0.01	1.20	0.56	0.72
	Arz_15425_T1	1.30	0.18	0.40	1.62	0.01	0.04	2.13	0.00	0.00
	Arz_15746_T1	1.59	0.56	0.78	1.34	0.75	0.85	3.98	0.01	0.03
	Arz_18373_T1	2.00	0.00	0.00	0.82	0.25	0.41	0.67	0.02	0.07
Aldehyde reductase	Arz_1967_T1	1.26	0.02	0.10	1.71	0.00	0.00	2.21	0.00	0.00
	Arz_4242_T1	1.58	0.00	0.00	2.59	0.00	0.00	3.74	0.00	0.00
	Arz_7657_T1	2.53	0.35	0.60	0.98	1.00	1.00	3.96	0.09	0.20
	Arz_10682_T1	0.78	0.00	0.01	1.06	0.45	0.61	2.27	0.00	0.00
	Arz_14699_T1	1.82	0.00	0.00	2.40	0.00	0.00	6.87	0.00	0.00
	Arz_16592_T1	2.32	0.18	0.40	1.14	0.88	0.94	2.28	0.12	0.25
	Arz_18349_T1	1.90	0.06	0.19	2.14	0.03	0.07	8.41	0.00	0.00
O-demethylase	Arz_5787_T1	1.25	0.46	0.70	2.06	0.02	0.05	1.69	0.08	0.18
	Arz_7698_T1	1.56	0.09	0.25	2.01	0.01	0.03	1.20	0.63	0.77
4-Hydroxybenzoate 3-monooxygenase	Arz_9067_T1	2.68	0.08	0.24	2.41	0.13	0.25	1.76	0.32	0.50

注：表达倍数的正负分别表示基因上调表达和下调表达。

Note: The positive and negative foldchange indicate the up-regulated and down-regulated expressed genes, respectively.

2.3.4 加氧酶与酚醛抑制物转化

微生物通过上游途径将酚醛抑制物转化为儿茶酚、原儿茶酚和苯基 CoA 等关键的中心代谢产物，之后通过下游途径切割带有芳香环的中心代谢产物，最终转化成乙酰 CoA、琥珀酰 CoA 和丙酮酸等能够进入中心碳代谢的产物^[211]。也就是说，酚醛抑制物的转化包括氧化酶羟化芳香环（即上游途径）和双加氧酶切割芳香环（即下游途径）。

表 2.4 是 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物过程中芳香环羟化和切割途径的加氧酶编码基因的表达情况。在 *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的过程中，专司芳香环羟化的双加氧酶编码基因分别上调表达，其中 Arz_11134_T1 上调表达 1.66 倍、1.15 倍和 1.34 倍，Arz_14980_T1 上调表达 1.29 倍、1.18 倍和 0.94 倍。芳香化合物单加氧酶的编码基因在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的转化过程中也上调表达，其中 Arz_2808_T1 上调表达 0.92 倍、0.73 倍和 2.21 倍，Arz_9304_T1 上调表达 1.89 倍、1.31 倍和 1.79 倍。

专司芳香环切割的 I 型和 III 型双加氧酶编码基因在酚醛抑制物转化过程中也存在差异表达。在 4-羟基苯甲醛转化过程中，I 型双加氧酶编码基因 Arz_800_T1、Arz_9887_T1、Arz_11644_T1 和 Arz_17156_T1 分别显著差异上调表达 108.18 倍、3.56 倍、2.25 倍和 3.19 倍，Arz_14875_T1 上调表达 1.40 倍。在丁香醛转化过程中，Arz_9887_T1、Arz_11644_T1、Arz_14875_T1 和 Arz_17156_T1 分别上调表达 0.64 倍、0.71 倍、1.37 倍和 0.98 倍，而 Arz_800_T1 显著差异下调表达 3.66 倍。在香草醛转化过程中，Arz_800_T1 和 Arz_14875_T1 分别显著差异上调表达 4.11 倍和 2.68 倍，Arz_9887_T1、Arz_11644_T1 和 Arz_17156_T1 分别上调表达 1.85 倍、1.79 倍和 1.61 倍。由此说明，I 型双加氧酶参与了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢途径。

2.3.5 漆酶与酚醛抑制物转化

漆酶是一种含酮的多酚氧化酶，是生物炼制领域的重要酶^[212]。Jönsson 等人研究发现，云芝 (*Trametes versicolor*) 来源的漆酶将酚类化合物氧化成能够与较大分子化合物耦合的低毒基团^[86]。目前已发现，漆酶氧化 4-羟基苯甲醛^[213]、丁香醛^[214]和香草醛^[215]。氧气是漆酶行使氧化功能的必要条件^[216]，而且某些真菌来源的漆酶可以被甲氧基酚酸诱导^[217]。Cassland 等人发现，将 *T. versicolor* 的漆酶编码基因 (*lcc2*) 在酿酒酵母异源表达后显著提高了酿酒酵母转化酚类化合物的速率^[95]。*A. resinae* ZN1 有 8 个漆酶编码基因(表 2.4)。很有意思的是，*A. resinae* ZN1 转化丁香醛的过程中，4 个漆酶编码基因 Arz_138_T1、Arz_2211_T1、Arz_6758_T1 和 Arz_13526_T1 分别差异上调表达 2.15 倍、2.91 倍、2.93 倍和 3.36 倍，其中 Arz_6758_T1 显著差异表达。由此推测，漆酶也参与 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢过程。

表 2.4 加氧酶和漆酶编码基因在酚醛抑制物转化过程中的表达

Table 2.4 Expression of oxygenase and laccase encoding genes during phenolic aldehyde inhibitors conversion

Enzyme	Gene	4-Hydroxybenzaldehyde			Syringaldehyde			Vanillin		
		Foldchange	p-value	FDR	Foldchange	p-value	FDR	Foldchange	p-value	FDR
Aromatic compound monooxygenase	Arz_2808_T1	0.92	0.68	0.86	0.73	0.08	0.17	2.21	0.00	0.00
	Arz_9304_T1	1.89	0.06	0.20	1.31	0.46	0.62	1.79	0.06	0.14
Aromatic ring hydroxylating dioxxygenase	Arz_11134_T1	1.66	0.05	0.17	1.15	0.66	0.79	1.34	0.46	0.64
	Arz_14980_T1	1.29	0.47	0.70	1.18	0.64	0.77	0.94	0.99	1.00
Type I intradiol dioxxygenase	Arz_800_T1	108.18	0.00	0.00	-3.66	0.00	0.00	4.11	0.00	0.00
	Arz_9887_T1	3.56	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	1.85	0.00	0.00
	Arz_11644_T1	2.25	0.00	0.00	0.71	0.00	0.00	1.79	0.00	0.00
	Arz_14875_T1	1.40	0.05	0.17	1.37	0.06	0.14	2.68	0.00	0.00
	Arz_17156_T1	3.19	0.00	0.00	0.98	0.72	0.83	1.61	0.00	0.00
Type III extradiol dioxxygenase	Arz_16246_T1	1.28	0.00	0.01	0.56	0.00	0.00	0.57	0.00	0.00
	Arz_8403_T1	0.77	0.10	0.26	1.99	0.00	0.00	0.64	0.01	0.03
Laccase	Arz_138_T1	0.70	0.40	0.64	2.15	0.08	0.17	-3.71	0.00	0.01
	Arz_2211_T1	1.31	0.48	0.71	2.91	0.01	0.02	1.18	0.69	0.82
	Arz_6758_T1	1.09	0.68	0.86	2.93	0.00	0.00	-2.21	0.00	0.00
	Arz_8403_T1	0.77	0.10	0.26	-1.99	0.00	0.00	0.64	0.01	0.03
	Arz_13122_T1	1.06	0.69	0.87	0.91	0.55	0.70	1.13	0.26	0.43
	Arz_13526_T1	1.51	0.48	0.71	3.36	0.04	0.10	0.81	0.70	0.82
	Arz_15164_T1	1.53	0.00	0.00	0.69	0.00	0.00	0.81	0.00	0.00
	Arz_16246_T1	1.28	0.00	0.01	0.56	0.00	0.00	0.57	0.00	0.00

注：表达倍数的正负分别表示基因上调表达和下调表达。

Note: The positive and negative foldchange indicate the up-regulated and down-regulated expressed genes, respectively.

2.3.6 转运与酚醛抑制物转化

改变有毒物质的靶标、失活有毒物质、减少有毒物质的吸收和主动外排有毒物质, 是生物细胞应对有毒物质的常见机制^[218]。转运是芳香化合物降解的主要机制之一^[219]。其中, 主动外排属于真菌的 ATP 结合盒超家族 (ATP Binding cassette, ABC) 和主要促进转运超家族 (Major facilitator superfamily, MFS)^[220, 221]。ABC 和 MFS 均是跨越质膜将胞质内的有毒物质运出胞外达到脱毒目的转运蛋白, 不同的是, MFS 依赖质子/ Na^+ 化学梯度, 而 ABC 依赖能量 ATP ^[222]。*A. resinae* ZN1 在转化 3 种酚醛抑制物的过程中, 涉及差异表达的基因有 ABC 转运蛋白、药物/代谢转运蛋白家族 (Drug/metabolite transporter family, DMT)、单价离子: 质子反向转运蛋白 (Monovalent cation: proton antiporter-2 family, CPA2)、MFS、多药抗性蛋白 (Multidrug resistance protein, MDR)、核酸碱基: 离子同向转运蛋白 (Nucleobase: cation symporter-2 family, NCS2)、大电导机械敏感性离子通道家族 (Large conductance mechanosensitive ion channel family, MscI)、磷酸转移酶系统 (Phosphotransferase system, PTS)、质子依赖型寡肽转运蛋白家族 (Proton-dependent oligopeptide transporter family, POT) 和 P 型 ATPase 家族 (P-type ATPase superfamily, P-ATPase) 等 (表 2.5)。其中, 涉及差异表达基因数最多的转运蛋白是 ABC 和 MFS, 这说明 ABC 和 MFS 转运蛋白参与了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢过程。

丁香醛转化过程中, 有 7 个 ABC 编码基因 *Arz_674_T1*、*Arz_2780_T1*、*Arz_4339_T1*、*Arz_8647_T1*、*Arz_9181_T1*、*Arz_9332_T1* 和 *Arz_16560_T1* 分别显著差异上调表达 2.36 倍、4.39 倍、2.16 倍、2.05 倍、2.15 倍、3.72 倍和 2.26 倍。香草醛转化过程中, 5 个 ABC 转运蛋白的编码基因 *Arz_198_T1*、*Arz_2780_T1*、*Arz_4339_T1*、*Arz_9332_T1* 和 *Arz_16455_T1* 显著差异上调表达 3.34 倍、6.42 倍、2.09 倍、6.16 倍和 2.38 倍。但是, *A. resinae* ZN1 转化 4-羟基苯甲醛过程中未涉及 ABC 转运蛋白编码基因的显著差异表达。由此推测, ABC 转运蛋白参与了 *A. resinae* ZN1 转化丁香醛和香草醛的代谢过程。

表 2.5 转运蛋白编码基因在酚醛抑制物转化过程中的表达

Table 2.5 Expression of the transporter encoding genes during phenolic aldehyde inhibitors conversion

Transporter	Gene	4-Hydroxybenzaldehyde			Syringaldehyde			Vanillin		
		Foldchange	<i>p</i> -Value	FDR	Foldchange	<i>p</i> -Value	FDR	Foldchange	<i>p</i> -Value	FDR
ATP Binding cassette	Arz_198_T1	1.55	0.00	0.00	1.69	0.00	0.00	3.34	0.00	0.00
	Arz_674_T1	1.15	0.40	0.65	2.26	0.00	0.00	1.36	0.05	0.13
	Arz_2780_T1	1.31	0.08	0.23	4.39	0.00	0.00	6.42	0.00	0.00
	Arz_4339_T1	1.14	0.64	0.83	2.16	0.00	0.02	2.09	0.00	0.02
	Arz_8647_T1	0.98	0.81	0.93	2.05	0.00	0.00	1.51	0.00	0.00
	Arz_9181_T1	1.12	0.38	0.63	2.15	0.00	0.00	1.51	0.00	0.00
	Arz_9332_T1	1.19	0.18	0.40	3.72	0.00	0.00	6.16	0.00	0.00
	Arz_16455_T1	1.10	0.52	0.75	1.70	0.00	0.00	2.38	0.00	0.00
	Arz_16560_T1	1.62	0.05	0.17	2.26	0.00	0.01	1.85	0.01	0.04
Drug/metabolite transporter family	Arz_1357_T1	2.53	0.00	0.01	1.80	0.04	0.10	4.21	0.00	0.00
	Arz_5017_T1	8.33	0.01	0.06	3.91	0.13	0.25	7.30	0.02	0.05
	Arz_9935_T1	2.74	0.12	0.31	3.71	0.04	0.10	2.79	0.22	0.38
Monovalent cation: proton antiporter-2 family	Arz_593_T1	0.97	0.85	0.95	1.01	1.00	1.00	2.53	0.00	0.00
Major facilitator superfamily	Arz_118_T1	0.46	0.00	0.00	2.35	0.00	0.00	2.69	0.00	0.00
	Arz_422_T1	2.34	0.24	0.49	2.36	0.24	0.39	1.71	0.34	0.51
	Arz_684_T1	2.00	0.00	0.02	0.86	0.69	0.81	1.29	0.27	0.44
	Arz_1145_T1	1.39	0.36	0.61	2.57	0.00	0.00	1.86	0.03	0.09
	Arz_1357_T1	2.53	0.00	0.01	1.80	0.04	0.10	4.21	0.00	0.00
	Arz_2184_T1	1.91	0.05	0.17	2.35	0.01	0.03	2.80	0.00	0.01
	Arz_2611_T1	1.03	0.99	1.00	2.62	0.00	0.01	1.28	0.31	0.48
	Arz_3353_T1	1.87	0.00	0.00	1.23	0.08	0.18	2.25	0.00	0.00

Arz_3393_T1	0.95	0.69	0.87	0.63	0.00	0.00	-2.02	0.00	0.00
Arz_3446_T1	2.26	0.04	0.13	2.32	0.03	0.08	1.95	0.05	0.12
Arz_3632_T1	1.51	0.17	0.38	2.12	0.01	0.04	2.13	0.00	0.02
Arz_4324_T1	1.21	0.70	0.87	-3.30	0.03	0.09	0.86	1.00	1.00
Arz_4524_T1	1.43	0.60	0.80	2.51	0.16	0.29	1.66	0.38	0.56
Arz_5017_T1	8.33	0.01	0.06	3.91	0.13	0.25	7.30	0.02	0.05
Arz_5022_T1	1.08	0.74	0.90	-2.15	0.00	0.01	0.60	0.05	0.12
Arz_5840_T1	0.59	0.16	0.38	-3.02	0.00	0.01	0.75	0.29	0.46
Arz_5873_T1	3.59	0.03	0.12	3.65	0.03	0.08	3.95	0.03	0.09
Arz_6542_T1	1.72	0.66	0.85	4.10	0.10	0.20	2.35	0.36	0.54
Arz_6742_T1	0.66	0.05	0.17	2.07	0.00	0.00	2.49	0.00	0.00
Arz_6955_T1	1.53	0.04	0.15	0.77	0.28	0.44	2.25	0.00	0.00
Arz_7677_T1	2.29	0.91	0.98	7.56	0.37	0.54	3.15	0.67	0.81
Arz_7753_T1	0.63	0.06	0.19	2.43	0.00	0.00	1.55	0.07	0.16
Arz_8110_T1	0.86	0.91	0.98	2.72	0.10	0.21	2.66	0.08	0.18
Arz_8477_T1	1.00	1.00	1.00	-5.69	0.03	0.09	-2.12	0.31	0.49
Arz_8616_T1	0.85	0.72	0.88	9.84	0.00	0.00	9.63	0.00	0.00
Arz_8826_T1	6.04	0.00	0.00	1.72	0.01	0.03	10.86	0.00	0.00
Arz_8944_T1	1.02	0.82	0.94	1.57	0.00	0.00	2.84	0.00	0.00
Arz_9045_T1	0.92	0.83	0.94	1.47	0.01	0.03	2.69	0.00	0.00
Arz_9061_T1	1.10	0.84	0.95	0.72	0.65	0.78	-2.61	0.08	0.18
Arz_9518_T1	1.76	0.63	0.83	10.39	0.00	0.01	0.26	0.30	0.47
Arz_9531_T1	1.07	0.85	0.96	1.48	0.35	0.51	2.21	0.04	0.11
Arz_9935_T1	2.74	0.12	0.31	3.71	0.04	0.10	2.79	0.22	0.38
Arz_9942_T1	2.21	0.01	0.03	2.94	0.00	0.00	2.27	0.00	0.01

Arz_9956_T1	0.85	0.51	0.74	2.01	0.00	0.01	1.06	0.84	0.92
Arz_10332_T1	-2.07	0.01	0.03	0.96	0.94	0.98	1.52	0.12	0.25
Arz_10434_T1	0.88	0.64	0.83	1.54	0.16	0.29	-2.20	0.01	0.03
Arz_10569_T1	1.20	0.13	0.33	1.49	0.00	0.01	2.55	0.00	0.00
Arz_10936_T1	1.89	0.03	0.10	2.36	0.00	0.00	2.08	0.01	0.03
Arz_11180_T1	2.06	0.11	0.28	0.66	0.66	0.79	-2.18	0.36	0.53
Arz_11252_T1	-4.35	0.22	0.46	1.29	0.96	0.99	1.57	0.70	0.83
Arz_11336_T1	2.08	0.85	0.95	3.97	0.42	0.59	4.03	0.55	0.71
Arz_12147_T1	0.99	0.97	1.00	-3.14	0.00	0.00	-2.54	0.00	0.00
Arz_12229_T1	0.86	0.51	0.74	3.29	0.00	0.00	1.55	0.03	0.08
Arz_12615_T1	1.25	0.82	0.94	3.11	0.05	0.13	3.12	0.06	0.15
Arz_12937_T1	0.75	0.38	0.63	0.81	0.52	0.68	2.64	0.01	0.02
Arz_13313_T1	-2.12	0.43	0.68	1.11	0.93	0.97	0.41	0.40	0.58
Arz_13422_T1	1.64	0.04	0.13	1.59	0.05	0.12	2.69	0.00	0.00
Arz_13423_T1	0.97	0.99	1.00	0.92	0.80	0.89	-2.50	0.00	0.00
Arz_13539_T1	0.72	0.09	0.25	2.06	0.00	0.00	1.52	0.01	0.02
Arz_13591_T1	4.16	0.61	0.81	0.00	1.00	1.00	4.35	0.75	0.86
Arz_13697_T1	2.54	0.00	0.00	1.26	0.12	0.23	1.42	0.02	0.06
Arz_15018_T1	1.80	0.16	0.37	11.14	0.00	0.00	12.62	0.00	0.00
Arz_15297_T1	1.03	0.98	1.00	1.21	0.89	0.95	3.54	0.29	0.46
Arz_15424_T1	0.62	0.00	0.00	-2.27	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00
Arz_16436_T1	2.14	0.48	0.72	2.91	0.21	0.36	6.08	0.00	0.01
Arz_16437_T1	1.97	0.30	0.55	2.59	0.14	0.27	1.21	0.61	0.76
Arz_16611_T1	1.12	1.00	1.00	6.62	0.60	0.74	0.00	1.00	1.00
Arz_16613_T1	-6.62	0.04	0.14	-13.73	0.01	0.04	-2.45	0.14	0.28

	Arz_16718_T1	0.84	0.46	0.70	0.87	0.54	0.69	-2.11	0.00	0.01
	Arz_16778_T1	0.91	0.59	0.80	1.74	0.00	0.00	2.11	0.00	0.00
	Arz_16926_T1	0.88	0.37	0.63	0.85	0.26	0.42	-2.24	0.00	0.00
	Arz_18019_T1	0.00	0.53	0.76	2.38	0.75	0.85	0.13	0.70	0.83
	Arz_18085_T1	0.81	0.05	0.17	0.51	0.00	0.00	-3.01	0.00	0.00
	Arz_18182_T1	0.74	0.21	0.44	1.40	0.15	0.28	3.64	0.00	0.00
	Arz_18739_T1	0.72	0.59	0.80	3.72	0.01	0.03	1.98	0.31	0.48
Multidrug resistance protein	Arz_5426_T1	2.73	0.07	0.21	4.51	0.01	0.02	3.55	0.01	0.05
Nucleobase: cation symporter-2 family	Arz_14834_T1	1.54	0.04	0.14	2.25	0.00	0.00	1.54	0.05	0.13
	Arz_12970_T1	1.36	0.21	0.44	2.04	0.00	0.01	1.34	0.14	0.28
Large conductance mechanosensitive ion channel	Arz_11837_T1	1.13			2.19	0.00	0.00			
			0.58	0.80				1.98	0.00	0.00
Phosphotransferase system	Arz_1169_T1	1.67	0.03	0.13	2.69	0.00	0.00	1.99	0.01	0.04
	Arz_2763_T1	1.57	0.00	0.00	3.31	0.00	0.00	2.03	0.00	0.00
	Arz_9347_T1	2.14	0.00	0.00	1.94	0.00	0.01	1.37	0.14	0.28
	Arz_11136_T1	0.99	1.00	1.00	1.85	0.77	0.87	2.32	0.81	0.91
	Arz_13292_T1	2.49	0.34	0.59	1.49	0.82	0.90	0.33	0.41	0.59
	Arz_17438_T1	1.73	0.22	0.45	2.14	0.08	0.17	1.47	0.32	0.49
Proton-dependent oligopeptide transporter	Arz_9652_T1	1.86	0.00	0.00	1.28	0.06	0.13	2.10	0.00	0.00
P-type ATPase superfamily	Arz_9283_T1	1.27	0.63	0.83	2.14	0.12	0.24	3.57	0.01	0.02
Purine permease	Arz_14834_T1	1.54	0.04	0.14	2.25	0.00	0.00	1.54	0.05	0.13
Sodium/proline symporter	Arz_9472_T1	2.55	0.41	0.66	6.95	0.08	0.17	3.46	0.29	0.46

A. resinae ZN1 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的过程中, 分别涉及显著差异表达的 MFS 编码基因数分别是 18 个、38 个和 42 个。相对于 ABC 转运蛋白而言, 3 种酚醛抑制物的转化涉及显著差异表达基因数最多的转运蛋白是 MFS。MFS 编码基因 Arz_5017_T1、Arz_5873_T1、Arz_7677_T1、Arz_9942_T1、Arz_11336_T1、Arz_16436_T1 和 Arz_26613_T1 在 3 种酚醛抑制物转化过程中均显著差异表达。其中, 编码 MFS 转运蛋白的基因 Arz_15018_T1 在丁香醛和香草醛转化过程分别显著差异上调表达 11.14 倍和 12.62 倍。

由此推测, 转运蛋白参与了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的代谢过程。

2.4 本章小结

专司生物脱毒的丝状真菌 *A. resinae* ZN1 在有氧条件下转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛生成相应的酚酸和酚醇。基于该现象, 本研究通过 RNA-Seq 技术, 考察了 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的转录组, 鉴定了酚醛抑制物转化的关键酶, 推测了醛类抑制物转化的代谢途径。本章的主要研究结论如下:

(1) 534 个、1576 个和 1261 个基因分别在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛转化过程中显著差异表达, 氧化还原和转运是 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的主要生物学过程。

(2) 醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶和醛还原酶是 *A. resinae* ZN1 还原酚醛抑制物产醇代谢途径的关键酶, 醛脱氢酶是酚醛抑制物氧化产酸代谢途径的关键酶。

(3) 转运是 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的另一个重要机制, ABC 和 MFS 是醛类抑制物转化的主要转运蛋白。

第三章 生物炼制菌株耐受酚醛抑制物的行为机制解析

3.1 引言

木质纤维素降解产生的酚类化合物是木质纤维素预处理过程的主要抑制物之一,其抑制糖化过程纤维素酶的酶活,还影响发酵过程菌株的生长和产物积累^[34, 35]。酚类化合物种类较多且水溶性较差,定性定量分析困难,因此其代谢途径尚不清楚。按照甲氧基和官能团的不同,酚类化合物可以分为 *p*-羟基苯基类(诸如 4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲酸和 4-羟基苯甲醇等)、丁香基类(诸如丁香醛、丁香酸和丁香醇等)和愈创木酚基类(诸如愈创木酚、香草醛、香草酸、香草醇、阿魏酸和松柏醛等)。其中,4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛是模型酚类化合物^[33]。醛类抑制物的毒性与其疏水性相关,疏水性越强,毒性越强。芳香醛的疏水性比呋喃醛高,其毒性至少是呋喃醛的 2 倍^[79]。到目前为止,呋喃醛^[119, 139, 192]和弱酸^[151, 193]的抑制机理已比较清楚,但是酚醛的抑制机理报道较少。

在生物炼制领域,乳酸和乙醇是利用木质纤维素原料生产的产量最大和应用最广的生物炼制产品。乳酸菌 (*Pediococcus acidilactici*)^[223]和运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)^[169-172]是生物炼制领域常用的纤维素乳酸和纤维素乙醇工业化生产的菌株。

光学纯聚合级 L-和 D-乳酸的最重要最大宗的工业应用是可生物降解聚乳酸的生产^[224, 225]。在乳酸生产过程中,储量丰富的廉价木质纤维素原料替代了传统的碳源,切实解决了乳酸生产的底物成本问题^[226]。目前,一些野生型菌株或工程改造菌株均可以生产光学纯纤维素乳酸^[227-230]。但是,光学纯聚合级纤维素乳酸生产仍然未能实现高产率和高得率的发酵目标^[231]。*P. acidilactici* DQ2 是本课题组分离自玉米秸秆发酵醪液的一株耐受高温和抑制物的产乳酸细菌,其发酵 30% (w/w) 玉米秸秆产生 100.0 g/L D-乳酸和 L-乳酸的外消旋乳酸^[232]。*P. acidilactici* TY112^[233]和 *P. acidilactici* ZP26^[234]是 *P. acidilactici* DQ2 的工程改造菌株,其生产的光学纯 L-乳酸和 D-乳酸完全满足工业聚合级纤维素乳酸的需求。而且,工程改造菌株与野生型菌株的最大乳酸得率和抑制物耐受性相当。*P. acidilactici* 生产纤维素乳酸的最大瓶颈问题是其对木质纤维素来源的酚醛抑制物的耐受性较差,尤其丁香醛和香草醛^[234]。而且,目前对乳酸菌的酚醛抑制物抗逆研究鲜见报道。

产乙醇细菌 *Z. mobilis* ZM4 是木质纤维素生物炼制领域最具产业化生产潜力的产乙醇菌株之一^[169, 235]。通过基因工程手段,*Z. mobilis* ZM4 生产纤维素乙醇的木糖利用瓶颈问题已逐步解决^[169-171],但是抑制物耐受的瓶颈问题仍然制约着

纤维素乙醇的生产。*Z. mobilis* ZM4 自身对乙酸^[61]和酚醛^[189]的耐受性较好。Delgenes 等人考察了 *Z. mobilis* ATCC10988 在糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的发酵情况, 结果发现, 0.5 g/L 4-羟基苯甲醛强烈抑制葡萄糖的发酵^[43]。单独添加糠醛并不抑制 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长和乙醇积累, 同时添加糠醛和乙酸也不会出现协同抑制^[49]。而且, 最低浓度的香草醛和丁香醛破坏酶的疏水位点, 进而导致 *Z. mobilis* CP4 (pZB5) 的乙醇得率减少 1/3^[32, 46, 234]。由此可见, 酚醛抑制物对菌体的生长和乙醇发酵存在抑制。目前对 *Z. mobilis* 菌株的乙醇^[236]、乙酸^[174]和糠醛^[50]的耐受性研究已见报道, 而对其耐受酚醛抑制物的研究较少, 所以 *Z. mobilis* ZM4 菌株耐受酚醛抑制物的分子机制仍不清楚。

本研究旨在考察 *P. acidilactici* 和 *Z. mobilis* ZM4 耐受酚醛抑制物的分子生物学过程。针对酚醛抑制物强烈抑制 *P. acidilactici* 生长和纤维素乳酸积累的现象^[234], 本研究通过离体酶活和实时定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术进一步考察了酚醛抑制物对 *P. acidilactici* 乳酸脱氢酶的影响。其次, 本研究通过 HPLC 和 GC-MS 考察 *Z. mobilis* ZM4 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的能力。同时, 本研究通过 DNA 芯片技术考察了 *Z. mobilis* ZM4 耐受酚醛抑制物的转录组, 鉴定了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的关键酶, 推测了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的代谢途径。

3.2 材料与方法

3.2.1 细菌、质粒和试剂

本研究涉及的菌株和质粒见表 3.1。*Z. mobilis* ZM4 (ATCC31821) 购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA, USA)。

限制性内切酶和连接酶等酶制剂购自 Fermentas UAB (Vilnius, LT)。TAKARA PrimerStar® MAX DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。质粒提取、DNA 凝胶回收、PCR 产物纯化和回收试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司。酵母浸粉、RNA 提取和 qRT-PCR 相关试剂、4-羟基苯甲醛、丁香醛、香草醛和硅烷化试剂见 2.2.1 部分。4-羟基苯甲酸、丁香酸和香草酸购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。用于蛋白纯化的镍柱 Ni Aogarose 6FF (AOGMA) 购自上海业力生物科技有限公司。咪唑、丙酮酸钠、卡那霉素、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside, IPTG)、小牛血清 (Bovine serum albumin, BSA)、NADH 购自北京普博欣生物科技有限责任公司。邻苯二甲酸氢钾购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司。其他分析级化学试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

表 3.1 菌株、质粒和引物

Table 3.1 Strains, plasmids, and primers

Strains	Genotype	Reference
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hds</i> _B (R _B ⁻ m _B), <i>gal</i> (λ c I 857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7 gene1</i>), <i>dcm</i> (DE3)	Stored in the lab
<i>P. acidilactici</i> DQ2	Wild-type	[232]
<i>P. acidilactici</i> ZP26	Mutant with <i>ldh</i> disrupted	Stored in the lab
<i>P. acidilactici</i> TY112	Mutant with <i>ldhD</i> disrupted	Stored in the lab
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Wild-type	Purchased from ATCC
Plasmids	Description	
pET28a (+)	<i>LacI</i> , expression vector, pBR322 origin, f1 origin, T7 terminator, Kan ^r , His ₆ -N	Stored in the lab
pET28a (+)- <i>ldh</i>	expressed <i>ldh</i> in pET28a (+)	
pET28a (+)- <i>ldhD</i>	expressed <i>ldhD</i> in pET28a (+)	
Primers	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
HMPREF0623_0998	CGGGATCCATGAAGGGAATGGATATTATG	CCGCTCGAGTTATTTGTCTTGTTTTTCAGC
HMPREF0623_0321	CGGGATCCATGAAGATTATTGCTTATGGAA	CCCAAGCTTTTAGTCAAACCTTAACCTTCATTCTTT
HMPREF0623_0998	CGGTGTTGGTACTGCATTGATG	TGTCGTTCAAACCATATTCGCC
HMPREF0623_0321	TATCGTTGGGAACCAGACATCG	TACCTTTGCGCCAAATCCTTTA
HMPREF0623_r0003	GTCCATGCCGTAACGATGATT	CTTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
ZMO0152	TCTGACCCCGAAAGATCGCA	GATGACGTCTTCGACGCGCT
ZMO0177	TCGGTTACACCGACGAACCC	ACAACGCGAGCCAGCTTACC
ZMO0179	AGAATTCCGCCATATTGCGG	AGGCACTGACATCCAAGGCC
ZMO0367	TTCGACGGTCTGCGAGCTT	TTCGTCACGAACAGCGTTGG
ZMO0368	GTCACGACCATTGCCAAGGG	TCATCACCAGGTTCCGCCAGC

ZMO0369	AACGCATTATTTCTGGCCCCG	CAAGCTGAACGGAACGCCTT
ZMO0387	GTTTCCGCCGCGTTTCTATC	CAAGCTGAACGGAACGCCTT
ZMO0543	GGCGTGAAGGCGCTGATAAA	TCCGGTGAGCAAACAAAGGC
ZMO0544	GCGGTATTGGTATCGCACCG	CTTCCCCAGCGATATCCGGT
ZMO0567	TCGGATGAAGAGAATGCCGC	CGCAGAAACACCGGCAATAA
ZMO0569	ACCCTTAAACGGCTGCAACG	GCCCCAAACCAGCAAGGTTA
ZMO0997	GGTATCACCCCGACGTCAGC	GTGCCGTGATTTTTGCGACA
ZMO1237	TTTTCACGGGACATCAGGCC	TCCGGCATTCTTTTCCAGC
ZMO1307	ATCGGCATGATTGGCAAAGC	ATGAGATAAGCCGCACCCCC
ZMO1360	CCCAACCCTGATCGAATGCT	ACAGGCTTACGGCTGTTGGC
ZMO1478	CTGGCGATCATAAACGCACG	CGATGGAGGCTTCGGTTTCA
ZMO1496	TGTTACCCGGTTGGTTCGGT	TAGTCGTGCGGAAAAACGGC
ZMO1596	AAAGAAGGCGCAGAAGCCAC	TCAGCAAGAAGCGGCACATC
ZMO1608	ACCACGATTGCTGACCTCGC	TCTTCGATGCGCATCAGCTG
ZMO1963	CGCTTGGCTGGTTCTTCAGG	ATGTTGCCTCATTAGCGCCG

注：下划线表示酶切位点。

Note: Underline indicates the digestion site.

3.2.2 菌株培养

E. coli BL21 培养在含 10.0 g/L 蛋白胨、5.0 g/L 酵母浸粉和 10.0 g/L NaCl 的 LB (Luria-Bertani) 培养基。携带 pET28a (+) 质粒的 *E. coli* BL21 培养在添加 5.0 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基, 37 °C, 200 rpm 振荡培养。

P. acidilactici 培养在简化 MRS (Man-Rogosa-Sharp) 培养基。简化 MRS 培养基 (g/L) 组分为: 葡萄糖 20.0、蛋白胨 10.0、酵母浸粉 10.0、C₆H₁₄N₂O₇ 2.0、C₂H₃O₂Na 5.0、MgSO₄·7H₂O 0.58、K₂HPO₄ 2.0和MnSO₄·H₂O 0.25^[232]。将 *P. acidilactici* 甘油冻存管在 MRS 培养基活化 2 次, 最后按照10%的接种量将活化的 *P. acidilactici* 接种至添加抑制物的 50 mL 简化 MRS 培养基, 并于42 °C 和150 rpm振荡培养6 h后收集菌体, 用作 qRT-PCR 实验的RNA提取。

Z. mobilis ZM4 培养在含 20.0 g/L 葡萄糖、2.0 g/L KH₂PO₄ 和 10.0 g/L 酵母浸粉的 RM (Rich medium) 培养基, 并于 30 °C 静置培养。依据前期进行 *Z. mobilis* ZM4 的酚醛抑制物抑制浓度区间 (2.5 mM、5.0 mM、7.5 mM、10.0 mM) 实验结果, 本研究最终以 5.0 mM 中间抑制浓度作为酚醛抑制物发酵和转录组数据的研究浓度。在 RM 液体培养基分别添加终浓度为 5 mM 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛, 用于 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的发酵实验。按照 10%的接种量接种, 定期取样。对于 DNA 芯片实验的样品制备, 按照 10%的接种量接种, 将菌体浓度为 2.0 (OD₆₀₀) 的 *Z. mobilis* ZM4 种子培养物接种至分别添加终浓度为 5 mM 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的 RM 培养基, 于 30 °C 静置培养 4 h, 收集菌体, 并立即用液氮速冻菌体, 用作转录组实验和 qRT-PCR 实验。对于酚醛抑制物的转运实验, 接种和培养方法与发酵实验相同, 取样时间为 0 h 和 24 h。12,000 rpm 离心 5 min, 上清液直接用于 HPLC 检测。细胞沉淀先超声破碎 (超声 5 sec, 间隔 15 sec, 超声 10 次), 之后于 12,000 rpm 离心 5 min, 上清液用于 HPLC 检测。

3.2.3 乳酸脱氢酶的离体酶活实验

首先通过离体酶活实验考察酚醛抑制物对乳酸脱氢酶的影响。本研究首先构建了 *E. coli* BL21::pET28a (+)-*ldh* 和 *E. coli* BL21::pET28a (+)-*ldhD* 重组菌株, 之后通过镍柱纯化了 L-乳酸脱氢酶 (L-LDH) 和 D-乳酸脱氢酶 (D-LDH)。最后考察了 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛对 L-乳酸脱氢酶 (L-LDH) 和 D-乳酸脱氢酶 (D-LDH) 酶活的影响。

E. coli BL21::pET28a (+)-*ldh* 和 *E. coli* BL21::pET28a (+)-*ldhD* 培养在 100 mL 含 5 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基, 并于 37 °C 和 200 rpm 振荡培养至菌体浓度为 0.5 (OD_{600nm})。于 30 °C 用终浓度为 0.1 mM IPTG 诱导 *E. coli* BL21::pET28a (+)-*ldh* 和 *E. coli* BL21::pET28a (+)-*ldhD* 至 6 h。收集菌体, 用 PBS (Phosphate buffer saline) (pH 8.0) 洗涤菌体 3 次, 于 4 °C, 10,000 g 离心 5 min。用 100 mL 10

mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 重悬并破碎菌体 (超声破碎的具体参数为: 工作 5 sec, 间隔 15 sec, 超声 98 次)。用 10 mL 10 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 平衡预装好填料的柱子, 并将经 0.44 μm 滤膜过滤的超声破碎菌体上清液加入平衡好的柱子。PP_2680 重组蛋白的羧基末端含有 6 个组氨酸序列标签而结合至镍柱, 用 20 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 洗脱未结合的蛋白, 最后用 500 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 洗脱和收集 PP_2680 目标蛋白。

按照 Wrba^[237]的方法测定乳酸脱氢酶的酶活, 在 200 μL 50 mM 咪唑邻苯二甲酸氢钾反应缓冲体系 (pH 7.0) 分别加入 1 mM 丙酮酸钠、1 mM NADH、适量的酶和终浓度为 1.2 g/L 4-羟基苯甲醛、0.6 g/L 丁香醛和 0.6 g/L 香草醛。用等体积的 500 mM 咪唑洗脱液代替酶液的实验组作为对照组, 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 之后立即于冰上终止反应。最后, 用 HPLC 检测乳酸的浓度。

3.2.4 qRT-PCR 实验

通过 qRT-PCR 技术, 本研究考察了酚醛抑制物对 *P. acidilactici* 乳酸脱氢酶编码基因表达水平的影响, 同时还验证了 *Z. mobilis* ZM4 转录组数据的可靠性。

通过 qRT-PCR 技术, 本研究考察了 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛对 *P. acidilactici* 乳酸脱氢酶编码基因表达水平的影响。具体操作见 2.2.4 部分。用 Primer 5.0 软件设计 *ldh*、*ldhD* 和内参 16S rRNA (HMPREF0623_r0003) 的引物 (表 3.1)。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 sec。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析目标基因的表达水平^[238]。

通过 qRT-PCR 验证 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的转录组数据的可靠性。具体操作见 2.2.4 部分。PCR 反应程序与 *P. acidilactici* 相同, 退火温度是 62 $^{\circ}\text{C}$, 内参是 16S rRNA 基因 ZMOr003。qRT-PCR 实验的引物见表 3.1。

3.2.5 DNA 芯片实验

本研究用 4 \times 44 K 点阵的 Agilent Technologies DNA 芯片 (Santa Clara, CA, USA) 进行酚醛抑制物胁迫下的转录组实验, 芯片杂交实验由北京博奥晶典生物技术有限公司完成。将添加酚醛抑制物的实验组作为处理组, 不添加酚醛抑制物的实验组作为非处理组 (即对照组), 处理组和非处理组均设置 3 个生物学重复。

用 Invitrogen Trizol 试剂盒 (Carlsbad, CA, USA) 提取 *Z. mobilis* ZM4 的总 RNA。用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE 19810, USA) 测定 RNA 样品的 OD_{260/280} 值 (OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8-2.1), 以此确认 RNA 样品的纯度和浓度。用甲醛变性琼脂糖凝胶检测 RNA 样品的完整性, 再用 RNA 6000 Nano Lab-on-a-Chip 试剂盒和 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 毛细管电泳进一步

确认 RNA 的完整性, 只有 RNA 的完整性数值大于 6.0 时才能用于后续研究。依据 *Z. mobilis* ZM4 的基因组注释, 用 Agilent eArray 设计 *Z. mobilis* ZM4 的 2005 个基因的探针。

接着是 RNA 扩增、标记和杂交。首先, 以 100 ng 总 RNA 为模板, 用 T7 寡聚 (dT) 和含 T7 RNA 聚合酶启动子序列 CbcScript 逆转录酶 (北京博奥晶典) 合成双链 cDNA。通过 Klenow 酶, 用 Cy3-dCTP 荧光染料标记从双链 cDNA 扩增的纯化 cRNA, 之后与探针杂交^[239]。

最后是芯片数据可视化和数据分析过程。用 GeneSpring V12 软件 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 对 DNA 芯片数据进行整理、规范化和质控分析。本研究将 ≥ 2 和 ≤ -2 倍数变化 (Foldchange) 和假设检验 p -值 (Probability value, p -value) 小于 0.05 作为显著差异表达基因筛选的阈值^[240], 定义 ≥ 2 和 ≤ -2 倍数变化为差异表达。用 CLUSTER 3.0 软件的 Adjust Data 功能, 对酚醛抑制物胁迫下的基因表达数值进行 Log2 对数转化和取中位值的归一化处理^[241]。本研究用 Java Treeview (Stanford University, Stanford, CA, USA) 进行 DNA 芯片数据的可视化分析。

3.2.6 HPLC 和 GC-MS 分析

用 HPLC 定量分析样品的葡萄糖消耗、丙酮酸消耗、乳酸生成、酚醛抑制物及其转化产物。具体检测参数见 2.2.5 部分。

用 GC-MS 定性分析 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的产物。样品处理和具体检测参数见 2.2.5 部分。

3.3 结果与讨论

3.3.1 酚醛抑制物影响乳酸脱氢酶的活性

本研究通过 qRT-PCR 考察了酚醛抑制物在转录水平对 *P. acidilactici* 乳酸脱氢酶编码基因 (*ldh/ldhD*) 表达水平的影响 (图 3.1)。结果表明, 4-羟基苯甲醛胁迫下, *ldhD* 和 *ldh* 基因分别显著差异下调表达 3.79 倍和 1.77 倍。丁香醛胁迫下, *ldhD* 和 *ldh* 基因分别显著差异下调表达 75.23 倍和 1.49 倍。香草醛胁迫下, *ldhD* 和 *ldh* 基因分别显著差异下调表达 101.89 倍和 1.80 倍。由此可见, 酚醛抑制物影响乳酸脱氢酶编码基因的表达, 尤其是丁香醛和香草醛强烈抑制 *ldhD* 基因的表达。

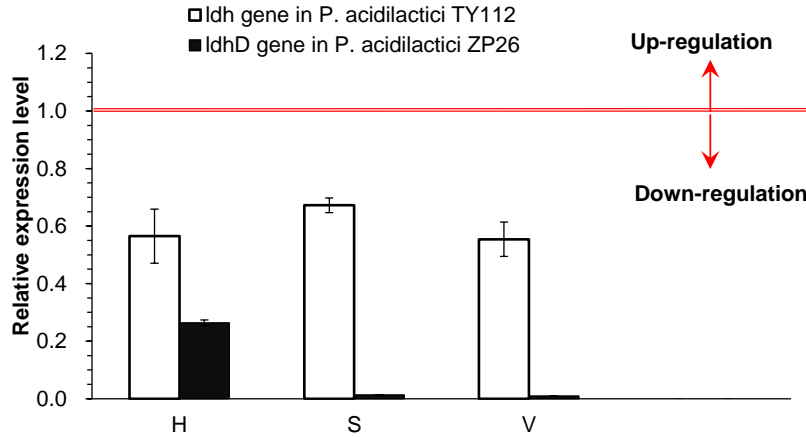


图 3.1 *P. acidilactici* 乳酸脱氢酶编码基因在酚醛抑制物胁迫下的表达

相对表达量是处理组和非处理组的表达倍数的比值。

Fig. 3.1 Expression of *ldh* and *ldhD* genes of the engineered *P. acidilactici* strains under the stress of phenolic aldehyde inhibitors.

Fold change (increase or decrease) from the ratio of the treated and the untreated was used to indicate the relative expression level.

乳酸脱氢酶催化丙酮酸生成乳酸。前期研究发现，酚醛抑制物强烈抑制 *P. acidilactici* 的乳酸积累^[234]。因此，本研究推测酚醛抑制物抑制了乳酸脱氢酶的酶活。本研究通过离体酶活实验考察了酚醛抑制物对乳酸脱氢酶的影响。结果表明，1.2 g/L 4-羟基苯甲醛、0.6 g/L 丁香醛和 0.6 g/L 香草醛胁迫下，D-乳酸的浓度分别是对照组的 11.8%、11.4%和 12.2%，L-乳酸的浓度分别是对照的 0.01%、5.3%和 12.7%（如图 2）。由此可见，酚醛抑制物抑制乳酸脱氢酶的酶活。

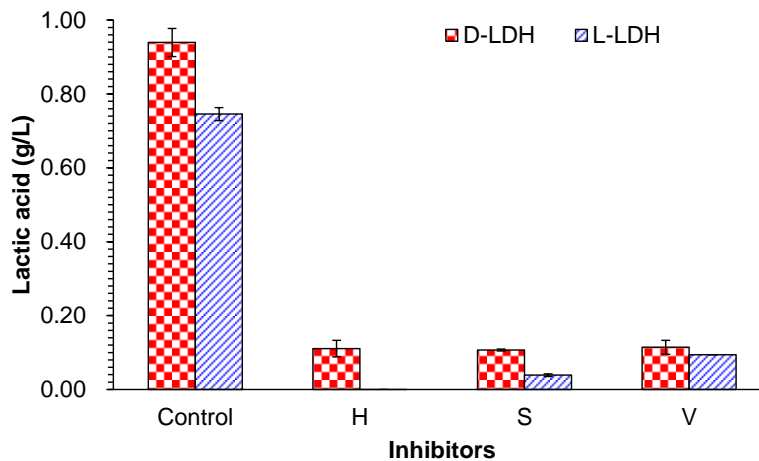


图 3.2 酚醛抑制物对乳酸脱氢酶酶活的影响

H、S 和 V 分别代表 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛。

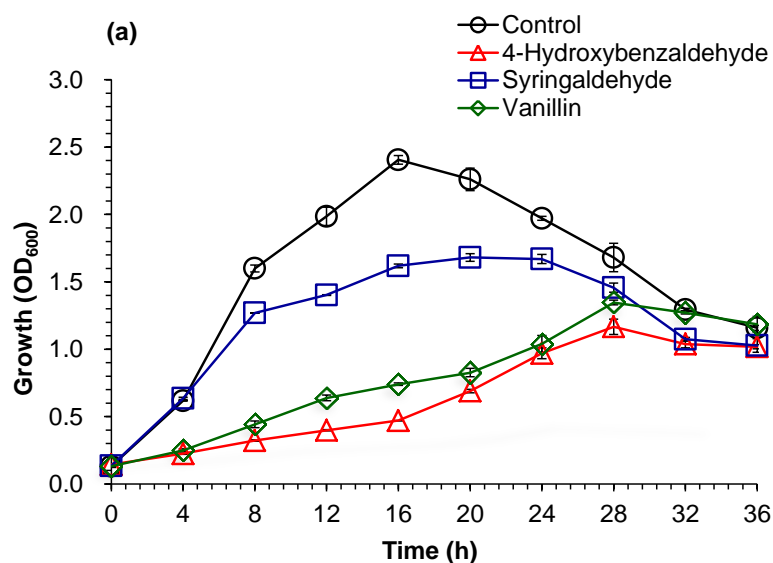
Fig. 3.2 Influence on lactate dehydrogenase activity of phenolic aldehyde inhibitors.

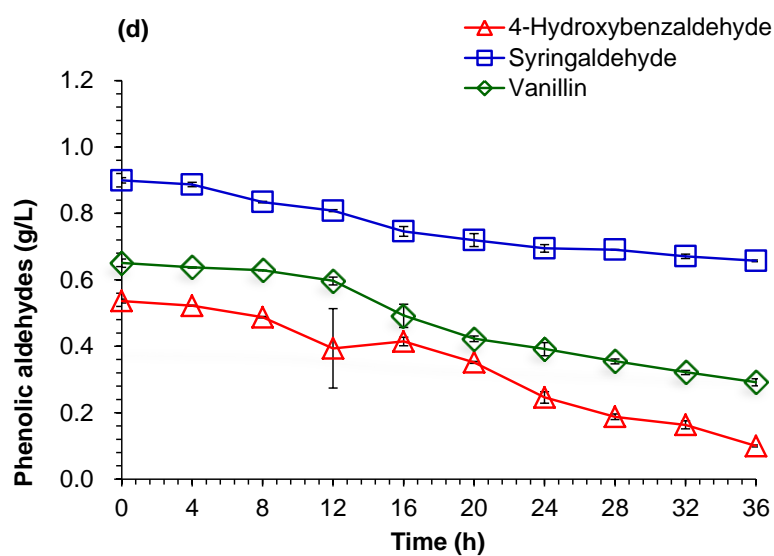
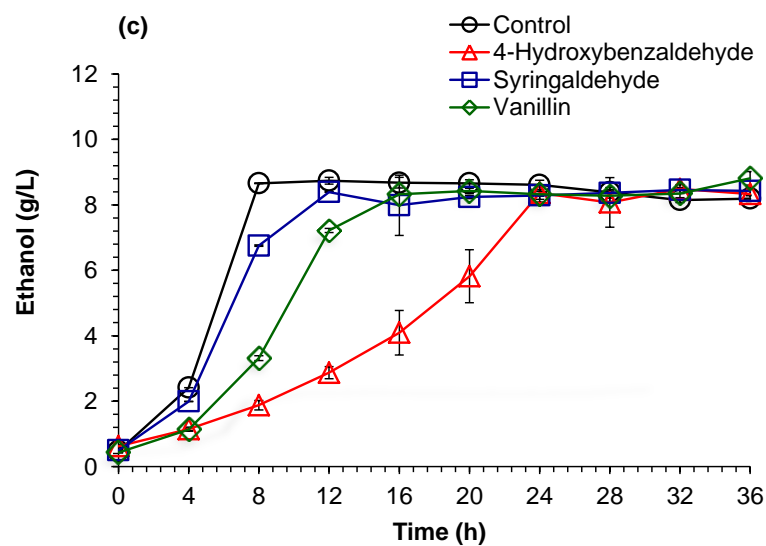
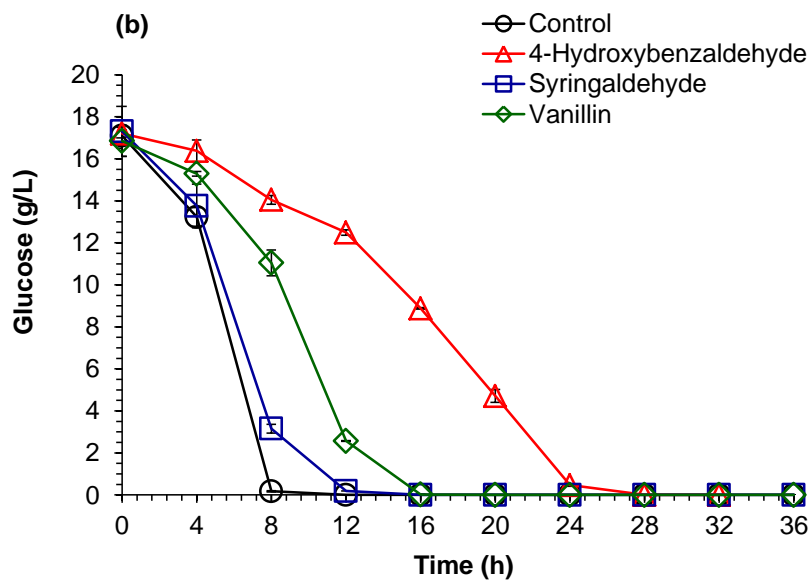
H, S, and V indicate 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and vanillin, respectively.

3.3.2 酚醛抑制物影响乙醇发酵

本研究首先在分别添加 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的 RM 合成培养基考察 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的情况。与不添加酚醛抑制物的对照组相比较, 发酵 16 h, *Z. mobilis* ZM4 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的菌体生长较对照减少 80.5%、32.8% 和 69.3% (图 3.3a)。不添加酚醛抑制物时, *Z. mobilis* ZM4 在发酵 8 h 彻底消耗完葡萄糖, 此时的乙醇浓度达最大值 (8.7 g/L)。添加 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛时, *Z. mobilis* ZM4 在发酵 12 h、16 h 和 24 h 达最大乙醇浓度 (8.4 g/L)。而且, 与对照组的最大乙醇产率 (0.73 g/L/h) 相比较, 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的最大乙醇产率分别降低至 0.24 g/L/h、0.70 g/L/h 和 0.61 g/L/h (图 3.3b, 3.3c)。显然, 4-羟基苯甲醛对 *Z. mobilis* ZM4 的毒性抑制最强。

HPLC 结果表明, *Z. mobilis* ZM4 将 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛转化为相应的酚醇, 而且不再继续转化酚醇 (图 3.3d-e)。同时, 研究发现, *Z. mobilis* ZM4 不能代谢酚酸化合物 (图 3.3f)。发酵 36 h, 80% 的 4-羟基苯甲醛和 70% 的香草醛分别转化为 4-羟基苯甲醇和香草醇, 但是丁香醛的转化速度较慢。随着酚醛抑制物还原为酚醇, 菌体生长和乙醇积累逐渐增加。可见, 酚醛抑制物转化为酚醇确实提高了 *Z. mobilis* ZM4 的乙醇发酵能力。





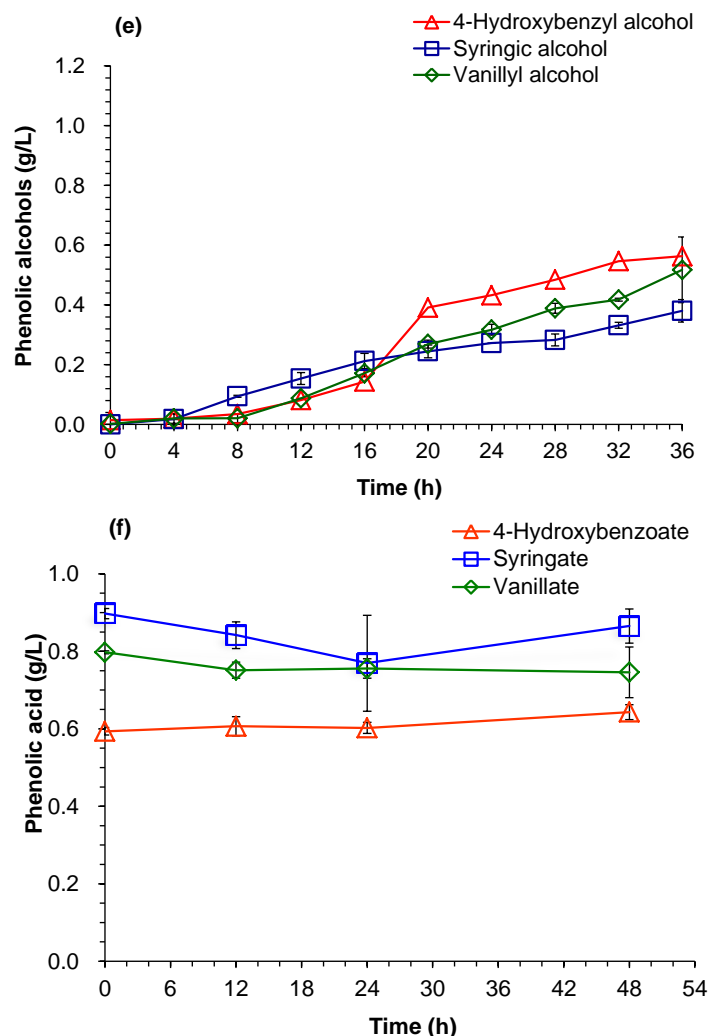


图 3.3 酚醛抑制物对 *Z. mobilis* ZM4 发酵的影响

(a) 细胞生长；(b) 葡萄糖消耗；(c) 乙醇浓度；(d) 酚醛转化；(e) 酚醇生成；
(f) 酚酸转化。

Fig. 3.3 Influence on fermentability of phenolic aldehyde inhibitors on *Z. mobilis* strain ZM4. (a) Growth as measured by optical density at 600 nm (OD_{600nm}); (b) Glucose consumption; (c) Ethanol titer; (d) Conversion of phenolic aldehydes; (e) Formation of phenolic alcohols; (f) Conversion of phenolic acids.

通过 GC-MS，本研究确认了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的产物酚醇，而且 *Z. mobilis* ZM4 不能继续转化酚醇（表 3.2）。

表 3.2 基于 GC-MS 确认 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的代谢产物

Table 3.2 Metabolic products of phenolic aldehydes for *Z. mobilis* ZM4 by GC-MS.

Phenolic compounds	Molecular formula	Molecular weight	Retain time (min)
4-Hydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_2$	122.04	12.128
4-Hydroxybenzyl alcohol	$C_{13}H_{24}O_2Si_2$	268.13	19.457
Syringaldehyde	$C_9H_{10}O_4$	182.06	19.549
Syringic alcohol	$C_9H_{12}O_4$	184.07	20.401
Vanillin	$C_8H_8O_3$	152.05	14.136
Vanillyl alcohol	$C_8H_{10}O_3$	154.06	15.229

3.3.3 *Z. mobilis* ZM4 在酚醛抑制物胁迫下的转录组

酚醛抑制物强烈抑制了 *P. acidilactici* 的菌体生长、乳酸积累和乳酸脱氢酶的活性。因此, *P. acidilactici* 耐受酚醛抑制物的抗逆研究同时涉及菌株和乳酸脱氢酶。考虑到 *Z. mobilis* ZM4 可以作为合成生物学的底盘微生物的优势, 本研究决定通过 DNA 芯片先考察 *Z. mobilis* ZM4 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的转录组。

为了确认 DNA 芯片数据的可信性, 本研究通过 qRT-PCR 技术考察了 20 个碳代谢相关的基因在酚醛抑制物胁迫下的表达。结果表明, 除了香草醛胁迫下的一个基因 (ZMO0179) 有较小的误差外, 其他基因的 qRT-PCR 结果与 DNA 芯片结果吻合(图 3.4)。通常, qRT-PCR 比较灵敏, 所以 qRT-PCR 的数据结果较 DNA 芯片偏高。由此说明, 本研究的 DNA 芯片数据可信, 可以用于后续分析。

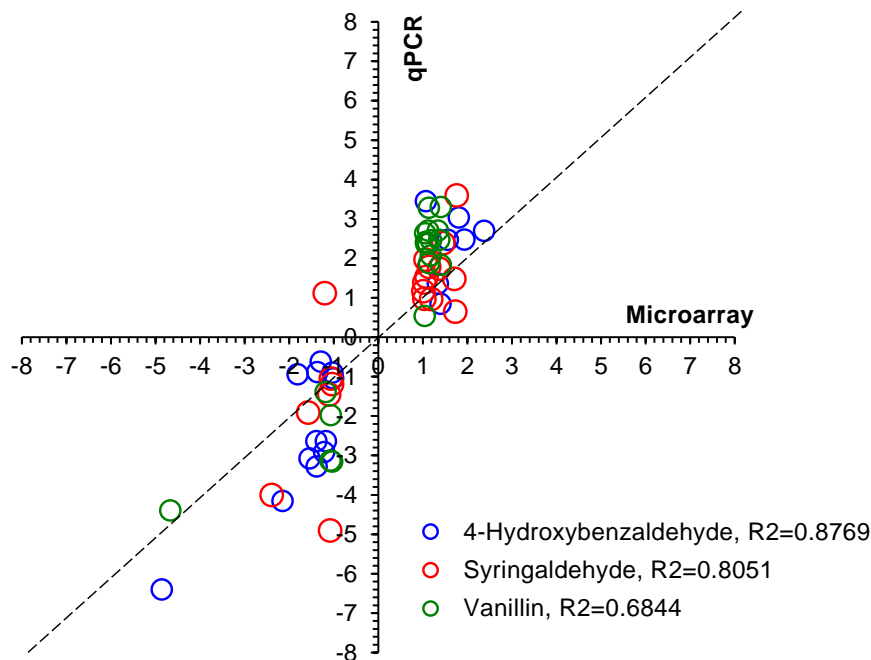


图3.4 基于DNA芯片和qRT-PCR比较*Z. mobilis* ZM4在酚醛抑制物胁迫下的的基因表达

DNA芯片和qRT-PCR的20个基因的表达量比值, 是基于以2为底数的对数转化 (\log_2 , 处理组/对照组), DNA芯片数据的对数值与qRT-PCR数据的 \log_2 相比较。

Fig. 3.4 Comparison of gene expression levels of *Z. mobilis* ZM4 between DNA microarray and qRT-PCR under the stress of phenolic aldehyde inhibitors.

The gene expression ratios of both DNA microarray data and qRT-PCR data for 20 genes were log transformed in base 2 (\log_2 , treatment/control), and the microarray \log_2 ratio values were plotted against the qRT-PCR \log_2 values.

本研究用 *Z. mobilis* ZM4 菌株的 2020 个基因片段考察 3 种模型酚醛抑制物胁迫下的转录组。用 CLUSTER 3.0 软件进行层次聚类分析发现, *Z. mobilis* ZM4 在 4-羟基苯甲醛胁迫下分别有 143 个和 299 个基因显著差异上调表达和显著差异下调表达, 丁香醛胁迫下分别有 16 个和 51 个基因, 香草醛胁迫下分别有 111

个和 195 个基因（图 3.5）。由此可见，4-羟基苯甲醛胁迫下的显著差异表达基因最多（442 个），香草醛次之（306 个），丁香醛与不添加酚醛的对照组相当（仅 67 个）。生物学过程解析发现，以上基因更多涉及还原、转运和调控。而且，该实验的对照组和实验组的生物学重复较好，误差小。本研究鉴定了 72 个代表性的酚醛抑制物耐受基因，这些基因至少在 2 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异上调表达（表 3.3）。

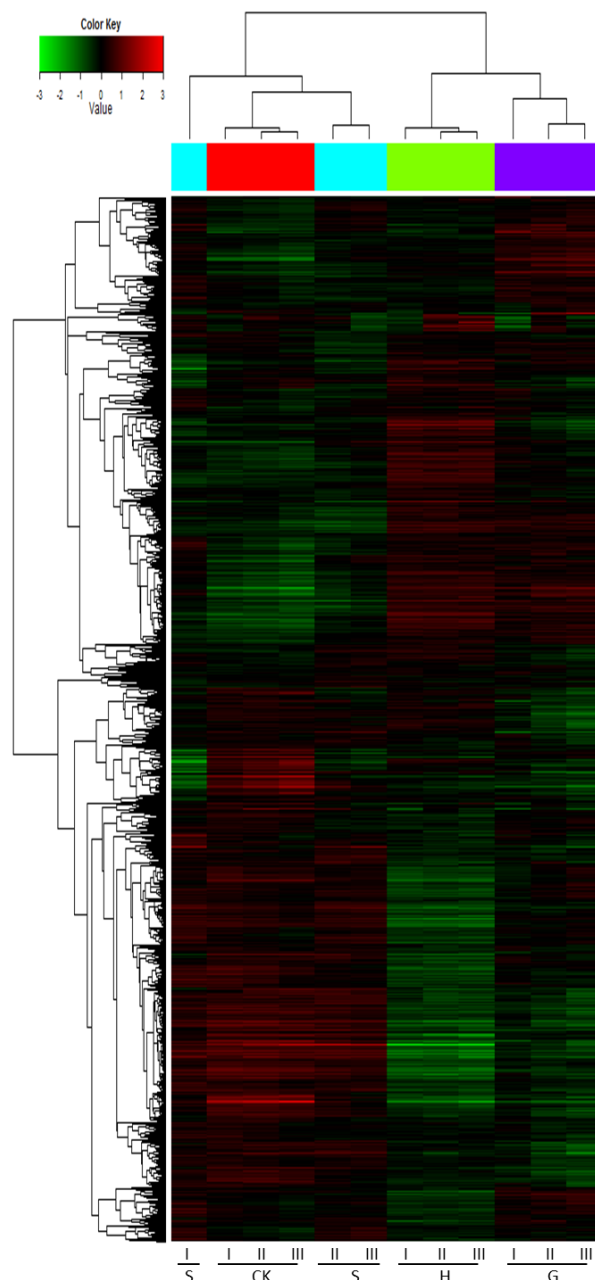


图3.5 *Z. mobilis* ZM4在酚醛抑制物胁迫下的转录组

基于 \log_2 转化的基因表达水平。红色、绿色和黑色分别表示上调、下调和正常调控表达。字母H、G和S分别代表了 p -羟基苯基类的4-羟基苯甲醛、愈创木酚基类的香草醛和丁香基类的丁香醛，CK是不添加酚醛抑制物的对照组。用罗马数字标记DNA芯片实验的每个处理的生物学重复。

Fig. 3.5 Transcriptome of *Z. mobilis* ZM4 under the stress of phenolic aldehyde inhibitors. Gene expression levels were clustered based on log2 transformation. Colored red, green, or black represents up-, down-, or normally regulated expression, respectively. H, G, and S, each stands for, 4-hydroxybenzaldehyde representing *p*-hydroxyphenyl (H) group, vanillin representing guaiacyl (G) group, and syringaldehyde representing syringyl (S) group, respectively. CK stands for a non-phenolic aldehyde-treated control. Biological replications of each treatment for the DNA microarray experiment were marked in Roman numeral.

其中, 4-羟基苯甲醛和香草醛胁迫涉及的显著差异表达基因最多, 且基因表达情况类似。但是, 丁香醛胁迫下的差异表达基因与 4-羟基苯甲醛和香草醛截然不同, 可能原因是甲氧基取代。研究发现, 甲氧基正位取代增加了香草醛的毒性, 而侧位和对位的甲氧基和羟基取代不影响酚醛抑制物的毒性^[32]。香草醛和丁香醛是在 4-羟基苯甲醛的结构基础上分别多了 1 个和 2 个甲氧基, 而且 2 个甲氧基的取代结构能够为正位有毒甲氧基取代腾出空间, 由此减轻了丁香醛的毒性。Tran 和 Chamber 证实了芳香环上的甲氧基取代数量与毒性密切相关, 其发现丁香醛是木质素来源的模式化合物中毒性相对较弱的抑制物, 这意味着额外的甲氧基取代减轻了酚醛抑制物的毒性^[242]。

图 3.6 是本研究通过基因组图谱解析的 *Z. mobilis* ZM4 在酚醛抑制物胁迫下的基因簇。研究发现, 包含 36 个基因簇的 272 个基因显著差异上调表达。另外一个包含 63 个基因簇的 560 个基因在酚醛抑制物胁迫下显著差异下调表达。

上调表达的 36 个基因簇中, 在 3 种酚醛胁迫下均显著差异上调表达的基因涉及氨基酸代谢 (ZMO1499)、碳水化合物代谢 (ZMO0493)、能量代谢 (ZMO1116)、遗传信息加工/环境信息加工/细胞加工/生物体系统 (ZMO0282、ZMO0283、ZMO0799 和 ZMO0800), 还有一些未知功能的生物学过程 (ZMO0020、ZMO0021、ZMO0798、ZMO1380、ZMO1437 和 ZMO1885)。其中, 基因簇中至少有一个基因在 3 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异上调表达的基因簇包括: (1) ZMO0020 和 ZMO0021; (2) ZMO0282 和 ZMO0283; (3) ZMO0798、ZMO0799、ZMO0800 和 ZMO0801; (4) ZMO1116 和 ZMO1117; (5) ZMO1499、ZMO1500、ZMO1501 和 ZMO1502; (6) ZMO1883、ZMO1884 和 ZMO1885。

下调表达的 63 个基因簇中, 在 3 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异下调表达的基因涉及碳水化合物代谢 (ZMO1237)、遗传信息加工/环境信息加工/细胞加工/生物体系统 (ZMO0286、ZMO0999、ZMO1579、ZMO1750 和 ZMO1815), 还有一些未知功能的生物学过程 (ZMO0026、ZMO0090、ZMO0190、ZMO1215、ZMO1288、ZMO1289、ZMO1574、ZMO1856、ZMO1857、ZMO1864 和 ZMO2030)。其中, 至少有一个基因在 3 种酚醛胁迫下均显著差异下调表达的基因簇包括: (1) ZMO0285 和 ZMO0286; (2) ZMO0998 和 ZMO0999; (3) ZMO1236 和 ZMO1237; (4) ZMO1288 和 ZMO1289; (5) ZMO1577、ZMO1578 和 ZMO1579; (6) ZMO1748、ZMO1749 和 ZMO1750; (7) ZMO1856 和 ZMO1857 (表 3.3)。

表 3.3 *Z. mobilis* ZM4 的耐受基因在至少 2 种酚醛抑制物胁迫下的表达Table 3.3 Tolerance genes of *Z. mobilis* ZM4 against at least two phenolic aldehydes identified by gene expression analysis

Category	Locus	Product	Expression*		
			H	G	S
Amino Acid Metabolisms	ZMO0200	Anthranilate phosphoribosyltransferase	2.88	2.38	
Amino Acid Metabolisms	ZMO1303	Pyrroline-5-carboxylate reductase	2.35	2.23	
Amino Acid Metabolisms	ZMO1499	Phosphoribosyl-ATP diphosphatase	3.46	3.91	2.17
Amino Acid Metabolisms	ZMO1500	Imidazole glycerol phosphate synthase subunitHisF	2.92	2.93	
Amino Acid Metabolisms	ZMO1501	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino) methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	2.30	2.10	
Amino Acid Metabolisms	ZMO1502	Imidazole glycerol phosphate synthase subunitHisH	2.14	2.25	
Carbohydrate Metabolism	ZMO0493	Glutamine synthetase, type I	2.80	3.21	2.52
Carbohydrate Metabolism	ZMO0759	Hydroxyacylglutathione hydrolase	2.66	2.66	
Carbohydrate Metabolism	ZMO0788	Gluconate 2-dehydrogenase	2.73	2.69	
Carbohydrate Metabolism	ZMO0833	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	2.06	2.14	
Energy Metabolism	ZMO0003	Adenylylsulfate kinase	2.40	2.01	
Energy Metabolism	ZMO0004	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	3.39	2.31	
Energy Metabolism	ZMO0005	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	3.09	2.13	
Energy Metabolism	ZMO1116^a	Oxidoreductase	2.53	3.60	2.47
Lipid Metabolism	ZMO1222	3-oxoacyl-ACP reductase	2.73	2.11	
Metabolism of Cofactors and Vitamins	ZMO0006	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	3.09	2.05	
Metabolism of Cofactors and Vitamins	ZMO0474	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	2.71	2.34	
Metabolism of Cofactors and Vitamins	ZMO1132	Lipoyl synthase	2.17	2.33	
Metabolism of Cofactors and Vitamins	ZMO1190	Bifunctional phosphopantothenoylecysteine decarboxylase /phosphopantothenate synthase	2.42	2.41	
Metabolism of Cofactors and Vitamins	ZMO1544	Cobalt chelatase, pCobS small subunit	2.84	2.01	
Metabolism of Other Amino acids	ZMO1309	Leucyl aminopeptidase	2.33	2.03	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO0074	Hypothetical protein	5.02	3.61	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO0143^b	ATP binding cassette superfamily	2.11	2.00	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO0282	RND family efflux transporter subunit MFP	6.05	7.14	2.55

<i>Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems</i>	ZMO0283	<i>Hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family transporter</i>	5.92	6.59	2.63
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO0472	rpsU-divergently transcribed protein	3.03	2.55	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO0486	Hypothetical protein	2.76	2.41	
<i>Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems</i>	ZMO0799	<i>ABC-2 type transporter</i>	2.35	3.64	2.17
<i>Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems</i>	ZMO0800	<i>ABC transporter</i>	2.23	3.99	2.19
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO0801	Secretion protein HlyD family protein	2.09	3.59	
<i>Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems</i>	ZMO0965	<i>Efflux pump membrane protein</i>	2.08	5.02	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1253	Cytochrome C biogenesis protein	2.76	2.45	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1254	Redoxin domain-containing protein	2.28	2.12	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1527	Acriflavin resistance protein	2.75	2.11	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1528	Acriflavin resistance protein	4.24	3.28	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1530	KpsF/GutQ family protein	3.34	2.13	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1601	Ribonuclease H	2.08	2.13	
Genetic/Environmental/Cellular Process/Organismal Systems	ZMO1727	Aminotransferase	3.02	2.09	
Unassigned	ZMO0020	Hypothetical protein	3.08	2.14	2.36
Unassigned	ZMO0021	Hypothetical protein	3.11	2.89	2.38
Unassigned	ZMO0073	CBS domain-containing protein	5.98	4.13	
Unassigned	ZMO0157	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenaseNAD-binding protein	2.28	2.22	
Unassigned	ZMO0268	Hypothetical protein	2.32	2.70	
Unassigned	ZMO0270	Hypothetical protein	2.41	2.91	
Unassigned	ZMO0384	Hypothetical protein		2.89	2.07
Unassigned	ZMO0388	Hypothetical protein		2.30	2.15
Unassigned	ZMO0391	Hypothetical protein		2.76	2.22
Unassigned	ZMO0440	Hypothetical protein	2.25	2.36	
Unassigned	ZMO0683	Csy2 family CRISPR-associated protein	2.55	2.47	
Unassigned	ZMO0757	TPR repeat-containing protein	2.02	2.92	
Unassigned	ZMO0758	Isochorismatase hydrolase	2.41	2.55	
Unassigned	ZMO0763	Tetratricopeptide domain-containing protein	2.48	2.01	
<i>Unassigned</i>	ZMO0798	<i>NodT family RND efflux system outer membranelipoprotein</i>	2.27	4.58	2.54
Unassigned	ZMO0844	Sporulation domain-containing protein	2.32	2.09	
Unassigned	ZMO1334	Hypothetical protein	4.11	2.96	

Unassigned	<i>ZMO1346</i>	Hypothetical protein	2.23	2.39	
Unassigned	<i>ZMO1380</i>	AraC family transcriptional regulator	5.17	2.60	2.21
Unassigned	<i>ZMO1386</i>	Hypothetical protein	3.44	2.39	
Unassigned	<i>ZMO1391</i>	Diacylglycerol kinase catalytic region	2.42	2.69	
Unassigned	<i>ZMO1399</i>	Fatty acid hydroxylase	3.94	2.98	
Unassigned	<i>ZMO1406</i>	Alpha/beta hydrolase	3.94	2.26	
Unassigned	<i>ZMO1437</i>	Lysine exporter protein	3.72	2.42	2.81
Unassigned	<i>ZMO1529</i>	<i>RND family efflux transporter subunit MFP</i>	2.54	2.32	
Unassigned	<i>ZMO1576</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	3.77	2.17	
Unassigned	<i>ZMO1602</i>	Hypothetical protein	2.77	2.17	
Unassigned	<i>ZMO1696</i>	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	2.46	2.94	
Unassigned	<i>ZMO1821</i>	Hypothetical protein	3.62	4.26	
Unassigned	<i>ZMO1880</i>	Hypothetical protein	2.58	2.90	
Unassigned	<i>ZMO1885</i>	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	11.37	3.33	2.67
Unassigned	<i>ZMO1984</i>	Aldo/keto reductase	3.87	2.06	
	<i>ZZM4_0133</i>	Hypothetical protein	2.39	2.75	
	<i>pzmob1_p38</i>	Hypothetical protein	2.29	2.02	

注：*指至少2倍或更高倍数的上调表达，H、G和S分别表示 *p*-羟基苯基类的 4-羟基苯甲醛、愈创木酚基类的香草醛和丁香基类的丁香醛。^a 粗体是指还原酶的相关基因。^b 加粗斜体是指转运蛋白相关的功能基因。

Note: Asterisk indicates the expression levels with at least 2-fold or greater increase in response to phenolic aldehyde functional *p*-hydroxyphenyl group (H), guaiacyl group (G), and syringyl group (S), represented by 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, and syringaldehyde, respectively. ^a Bolded indicates reductase related functional genes. ^b Bolded italic indicates transporter related functional genes.

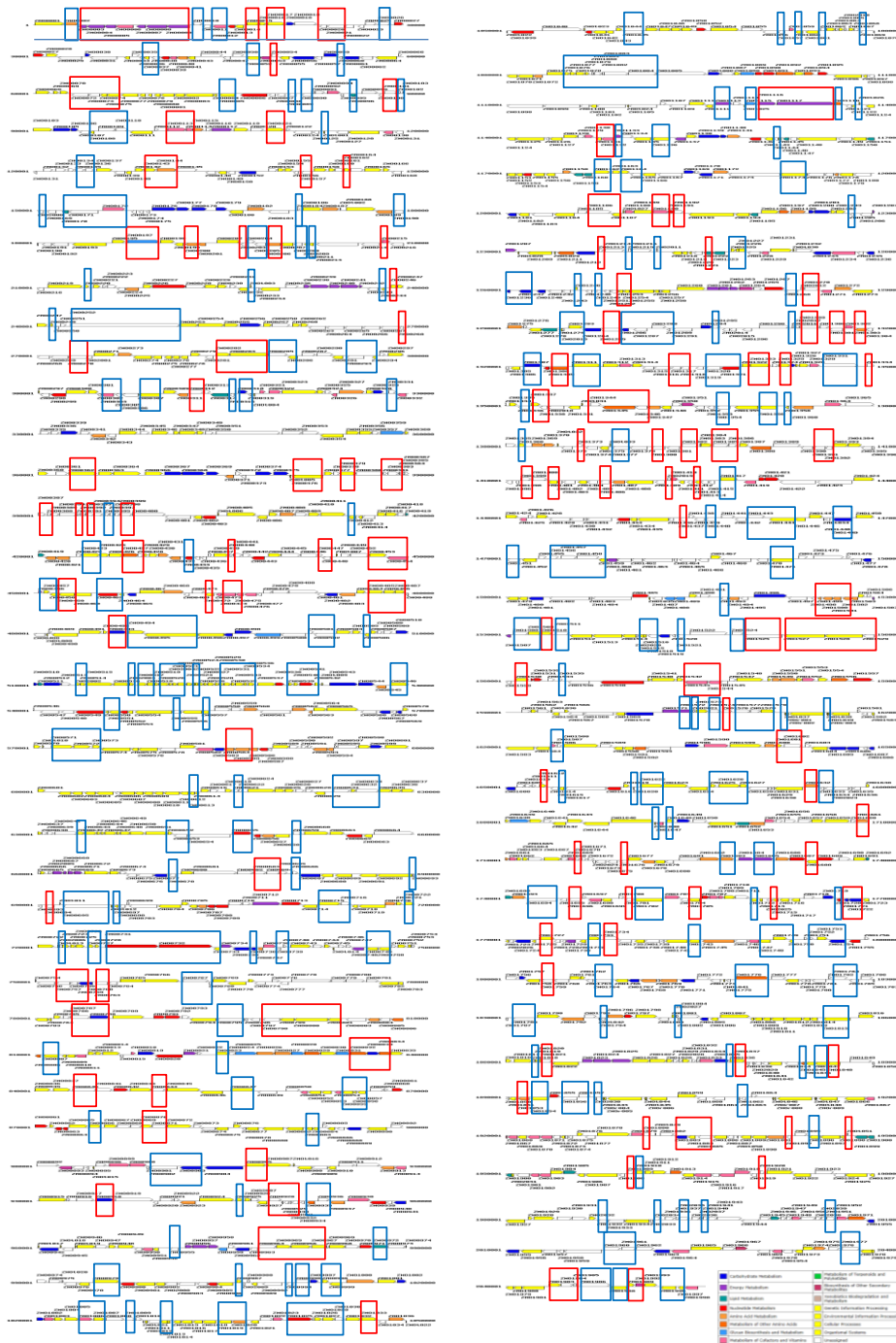


图 3.6 *Z. mobilis* ZM4 在酚醛抑制物胁迫下的基因组图谱

分别用红色和蓝色框表示显著差异上调表达和显著差异下调表达的基因和基因簇。基因组图谱中的1998个基因源于KEGG数据库。彩色码表示注释基因的功能分类。

Fig. 3.6 Genome map of *Z. mobilis* strain ZM4 showing expression profiling under the stress of phenolic aldehyde inhibitors. Genes and gene clusters shown significantly up-regulated expressions were boxed in red, and those significantly down-regulated expressions boxed in blue. The genome map representing 1998 genes was adapted from KEGG database. A colored code indicating annotated gene functional categories is also attached.

3.3.4 酚醛抑制物影响 *Z. mobilis* ZM4 的 ED 产能途径

由 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的实验可以看出, 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛不同程度影响了 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长、葡萄糖消耗和乙醇生成(图 3.3a, 3.3b, 3.3c)。因此, 本研究从转录水平解析了酚醛抑制物对 *Z. mobilis* ZM4 的 ED 产能途径的影响(图 1.5)。

葡萄糖激酶 (Glc) 磷酸化葡萄糖生成葡萄糖 6-磷酸, 后者在葡萄糖 6-磷酸-1-脱氢酶 (Zwf) 作用下进一步转化成葡萄糖酸内酯 6-磷酸。4-羟基苯甲醛胁迫下, 葡萄糖激酶 (Glc) 和葡萄糖 6-磷酸-1-脱氢酶 (Zwf) 的编码基因 ZMO0369 和 ZMO0367 分别下调表达 1.28 倍和 1.02 倍。而丁香醛和香草醛胁迫下, *glc* 和 *zwf* 基因则上调表达 1 倍多。也就是说, 4-羟基苯甲醛抑制了 *Z. mobilis* ZM4 的 ED 途径的前两步酶催化反应 (Glc 和 Zwf)。因此, 4-羟基苯甲醛胁迫下的葡萄糖利用速率会减慢, 进而影响菌体生长, 这与图 3.1a 和图 3.1c 所示的结果相符。KDPG 醛缩酶 (Eda) 是 ED 途径的关键酶, 其编码基因在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下分别下调表达 1.38 倍、1.06 倍和 1.57 倍。由此可见, 3 种酚醛抑制物抑制了 KDPG 醛缩酶编码基因 ZMO0997 的表达。

磷酸烯醇式丙酮酸激酶 (Pyk) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Ppc) 均催化磷酸烯醇式丙酮酸。 *pyk* (ZMO0152) 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下分别上调表达 1.56 倍、1.12 倍和 1.46 倍。 *ppc* (ZMO1496) 在 4-羟基苯甲醛和香草醛胁迫下分别下调表达 1.54 倍和 1.10 倍, 但是该基因在丁香醛胁迫下上调表达 1.08 倍。由此分析, 4-羟基苯甲醛和香草醛影响磷酸烯醇式丙酮酸的流量分配。 *pyk* (ZMO0152) 在 3 种酚醛抑制物胁迫下均上调表达 1 倍多, 由此推测磷酸烯醇式丙酮酸的流量更多分配至丙酮酸的生成。但是, 丙酮酸的代谢流最终流向乳酸、乙醇和乙酰-CoA。

乳酸脱氢酶 (LDH) 的编码基因 (ZMO0256、ZMO0157、ZMO1237 和 ZMO1883) 在 4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛胁迫下均显著差异下调表达。其中, ZMO1237 基因在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下分别显著差异下调表达 4.85 倍、2.39 倍和 4.66 倍, ZMO0256 分别下调表达 1.23 倍、1.89 倍和 1.65 倍。由此说明乳酸脱氢酶对酚醛抑制物敏感, 尤其是 4-羟基苯甲醛。而且, 从酚醛抑制物胁迫下的基因表达情况来看, 3 种酚醛抑制物抑制了丙酮酸到乳酸的流量分配。

丙酮酸脱羧酶 (Pdc) 编码基因 ZMO1360 在 4-羟基苯甲醛和香草醛胁迫下分别下调表达 1.38 倍和 1.06 倍, 但是在丁香醛胁迫下上调表达 1.02 倍。由此可见, 4-羟基苯甲醛和香草醛抑制了丙酮酸脱羧酶 (Pdc) 编码基因的表达。由此可以解释 3 种酚醛抑制物胁迫下的实验组在发酵 12 h 的乙醇产率比对照组低的实验现象(图 3.1c)。很有意思的是, 醇脱氢酶 (AdhB) 编码基因 ZMO1236 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下 1.85 倍、2.03 倍和 1.14 倍, ZMO1596 分别上调

表达 1.40 倍、1.19 倍和 1.73 倍。由此可见，丙酮酸经醇脱氢酶不同程度增强表达后产生的乙醇的量也随之产生了差异。

本研究还考察了 3 种酚醛抑制物对 *Z. mobilis* ZM4 不完整 TCA 循环的影响。在 TCA 循环中，5mM 4-羟基苯甲醛抑制柠檬酸合酶 (ZMO1963)、琥珀酰辅酶 A (ZMO0567)、琥珀酸脱氢酶 (ZMO0569) 和延胡索酸脱氢酶 (ZMO1307) 等编码基因均下调表达 1 倍多。但是，香草醛和丁香醛反而诱导以上编码基因的表达。而且，3 种酚醛抑制物均诱导顺乌头酸水合酶编码基因 (ZMO0543) 的表达。在同样不完整的戊糖磷酸途径 (Hexose Monophosphate Pathway, HMP) 途径中，3 种酚醛抑制物也影响了转酮酶、核酮糖磷酸 3-差向异构酶、磷酸异构酶和核糖磷酸激酶的编码基因 ZMO0176、ZMO0018、ZMO1200 和 ZMO1519 的表达水平。除 ZMO1200 外，ZMO0176、ZMO0018 和 ZMO1519 在香草醛胁迫下均上调表达，ZMO0018 和 ZMO1519 在 4-羟基苯甲醛胁迫下均下调表达，但是以上基因在丁香醛胁迫下均上调表达。就整体而言，3 种酚醛抑制物对 *Z. mobilis* ZM4 不完整的 TCA 和 HMP 途径的相关编码基因存在影响。

总之，3 种酚醛抑制物在转录水平上影响了葡萄糖激酶 (Glc) 和 KDPG 醛缩酶 (ZMO0997) 编码基因的表达，由此影响 *Z. mobilis* ZM4 代谢葡萄糖的能力。其中，3 种酚醛抑制物对乳酸脱氢酶和丙酮酸脱羧酶编码基因的表达水平存在抑制，但是不同程度诱导了醇脱氢酶 (Adh) 编码基因的表达。因此，3 种酚醛抑制物胁迫下，乙醇仍然是 *Z. mobilis* ZM4 的主要末端产物，只是 ED 产能代谢途径相关酶的编码基因在酚醛抑制物胁迫下的表达水平出现差异，最终导致乙醇浓度的不同 (图 3.1c)。

3.3.5 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的代谢途径

基于代谢数据库 (KEGG、UM-BBD、MetaCyc、Enzyme、BIGG、BRENDA 和 metaTIGER)、基因组注释信息、转录组数据和发酵实验结果，本研究推测了 *Z. mobilis* ZM4 转化 3 种酚醛抑制物的代谢途径 (图 3.7)。

Z. mobilis ZM4 只能还原酚醛抑制物生成相应的酚醇，而且不再继续转化酚醇 (图 3.3d, 3.3e)。本研究推测，还原酶是 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的重要酶。在诸多显著差异表达的基因中，ZMO1116 (Oxidoreductase) 和 ZMO1885 (NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase) 在 3 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异上调表达。在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下，ZMO1116 分别显著差异上调表达 2.53 倍、2.47 倍和 3.60 倍，ZMO1885 分别显著差异上调表达 11.37 倍、2.67 倍和 3.33 倍。诸如 NAD⁺结合 2-羟酸脱氢酶 (ZMO0157)、葡萄糖酸 2-脱氢酶 (ZMO0788)、UDP-N-乙酰烯醇丙酮酰葡糖氨还原酶 (ZMO0833)、3-草酰-(酰基载体蛋白) 还原酶 (ZMO1222)、氧化还原域蛋白 (ZMO1254)、吡咯啉-5-羧酸还原酶 (ZMO1303)、脂肪酸羟化酶 (ZMO1399)、短链脱氢酶/还原酶 SDR (ZMO1576)、Zn 结合醇脱氢酶 (ZMO1696) 和醛/酮还原酶 (ZMO1984) 等还原

酶的编码基因至少在 2 种酚醛抑制物胁迫下显著差异上调表达 2 倍多。还有一些未知功能蛋白的编码基因, 诸如 ZMO0020、ZMO0021、ZMO0074、ZMO0268、ZMO0270、ZMO0384、ZMO0388、ZMO0391、ZMO0440、ZMO0486、ZMO1334、ZMO1346、ZMO1386、ZMO1602、ZMO1821、ZMO1880、ZZM4_0133 和 pzmob1_p38 至少在 2 种酚醛抑制物胁迫下显著差异上调表达。由此推测, 以上还原酶及未知功能蛋白参与了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的代谢过程。

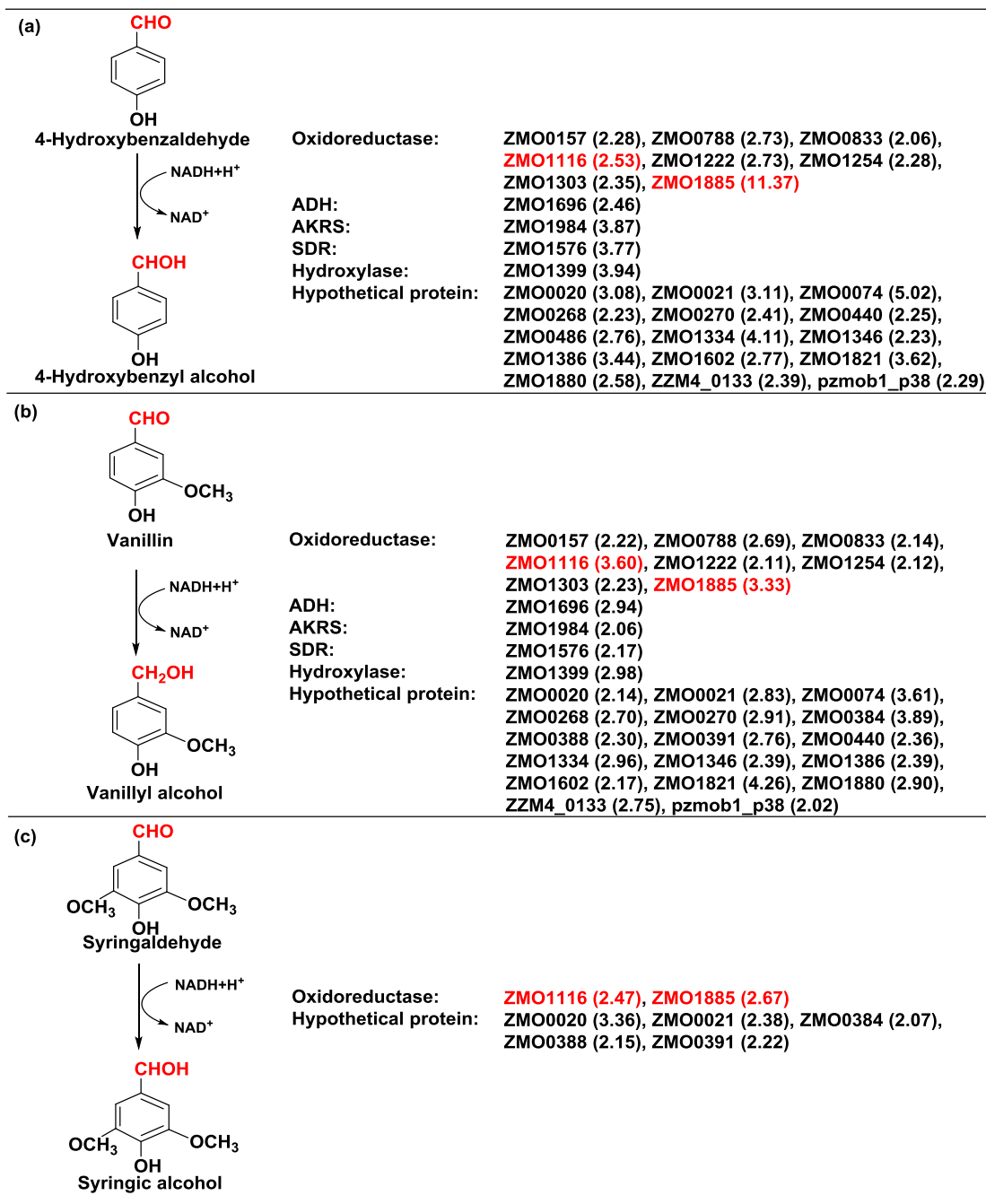


图 3.7 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的代谢途径

(a) 4-羟基苯甲醛还原; (b) 香草醛还原; (c) 丁香醛还原。酚醛抑制物还原以 NADH 作为辅因子。标记为红色的基因是在 3 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异上调表达的基因。

Fig. 3.7 The predicted conversion pathways of phenolic aldehydes in *Z. mobilis* ZM4.

(a) Reduction of 4-hydroxybenzaldehyde; (b) Reduction of vanillin; (c) Reduction of syringaldehyde into the corresponding phenolic alcohols by candidate genes using NADH as a cofactor. Genes colored red indicate the most significant shared by all three phenolic aldehydes.

依据 *Z. mobilis* ZM4 的基因组注释信息, ZMO1116 编码了谷氨酸合酶。基于 NCBI 数据库的蛋白质序列比对分析, ZMO1116 的蛋白序列与巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 来源的二氢嘧啶脱氢酶 (Dihydropyrimidine dehydrogenase) 的同源性达 66%, 与海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima* MSB8) 来源的 NADH 依赖型的氧化还原酶的同源性达 36% (图 3.8)。由此推测, ZMO1116 具备氧化还原酶的活性。而且, ZMO1116 蛋白的特异位点含有混合簇蛋白 (Hybrid cluster protein, HCP) 超家族的 Fe-S₄_20 蛋白活性位点 (25-137 bp), 还含有 NAD 结合位点 (153-197 bp)。非特异位点的活性位点包括 NADB_Rossmann 超家族的 NAD/FAD 依赖型的氧化还原酶 (COG3380) 和嘧啶核苷-二硫化物氧化还原酶 (Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase), 还包括中链脱氢酶 (Medium chain reductase/dehydrogenase, MDR) 超家族的葡萄糖脱氢酶 (Glucose dehydrogenase) 的活性位点 (153-213 bp)。

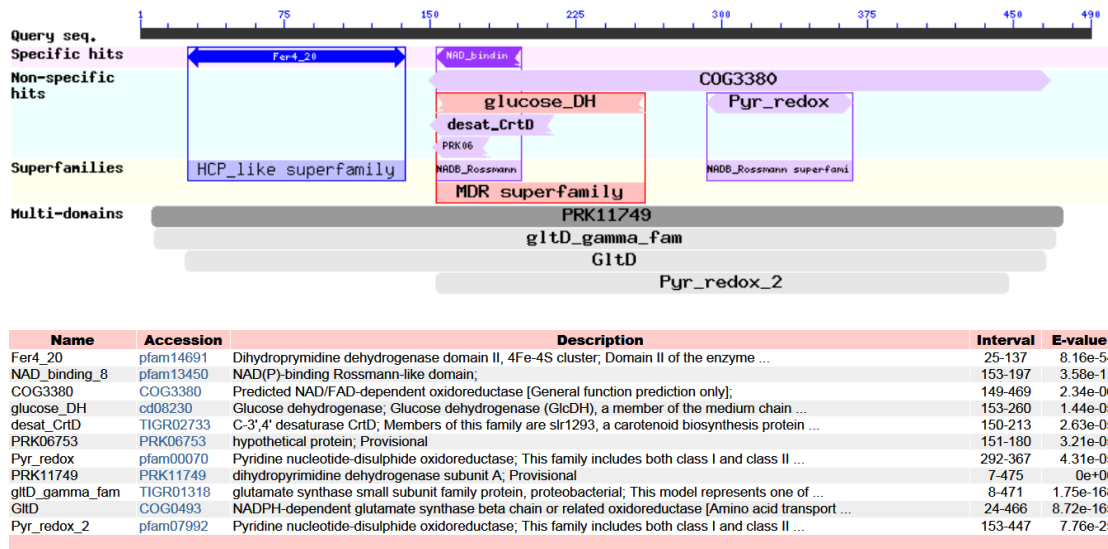


图 3.8 ZMO1116 蛋白同源性分析

Fig. 3.8 Homology analysis of ZMO1116 protein

依据 *Z. mobilis* ZM4 的基因组注释信息, ZMO1885 编码了 NADH: Flavin 氧化还原酶/NADH 氧化酶。基于 NCBI 数据库的蛋白质序列比对发现, ZMO1885 的氨基酸序列与氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 来源的黄酶 Gye 的同源性达 70%, 与类鼻疽杆菌 (*Burkholderia Pseudomallei*) 来源的 N-乙基马来酰亚胺还原酶 (N-Ethylmaleimidine Reductase) 和 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas Putida*) 来源的异型生物物质还原酶 (Xenobiotic Reductase) 的同源性达 48% (图 3.9)。而且, 从蛋白结构来看, ZMO1885 蛋白具有活性位点、底物结合位点和

FMN 结合位点。ZMO1885 的活性位点与 FMN 结合的黄酶类似。而且, ZMO1885 蛋白对 4-羟基苯甲醛的催化机理已经阐明^[94]。由此推测, ZMO1885 参与了酚醛抑制物的转化。

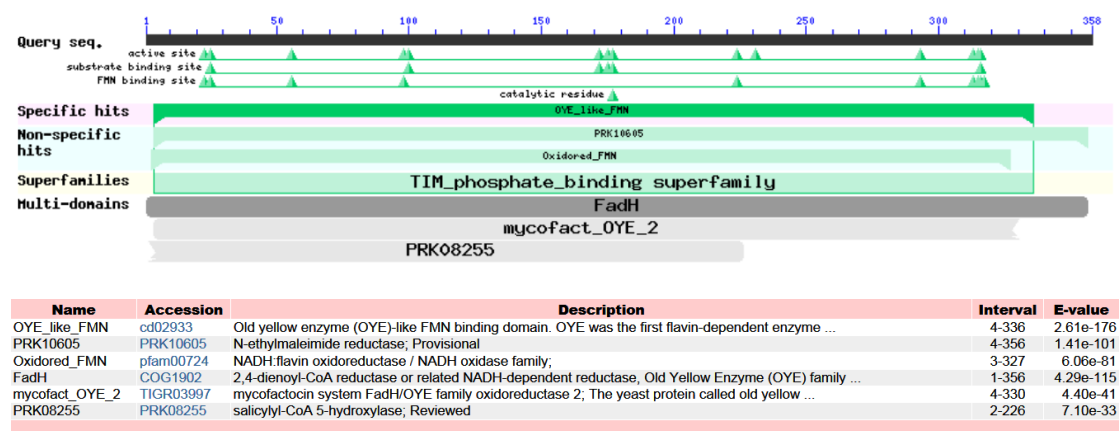


图 3.9 ZMO1885 蛋白同源性分析

Fig. 3.9 Homology analysis of ZMO1885 protein

3.3.6 转运与酚醛抑制物转化

Z. mobilis ZM4 还原酚醛抑制物生成相应的酚醇, 所以本研究首先考察了 *Z. mobilis* ZM4 对酚类抑制物的转运。如图 3.10 所示, 发酵 0 h 和 24 h, 高毒性的酚醛抑制物 and 低毒性的酚醇抑制物均不会在 *Z. mobilis* ZM4 细胞内积累。由此推测, 酚醛抑制物转运至 *Z. mobilis* ZM4 细胞内进行还原, 还原产物酚醇一旦产生则及时泵出 *Z. mobilis* ZM4 胞外。

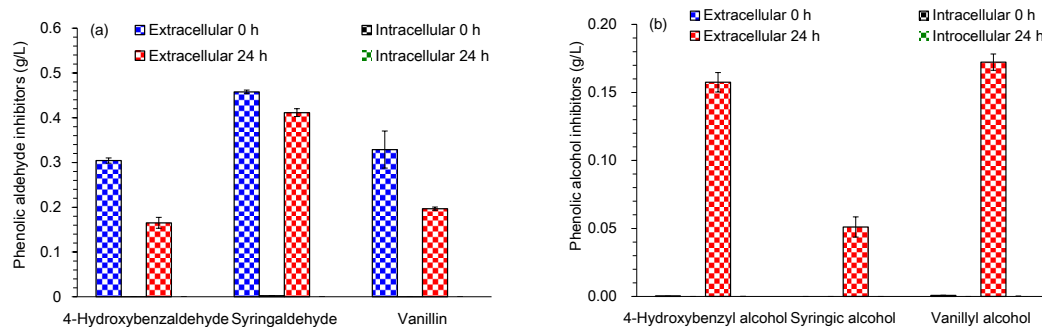


图 3.10 *Z. mobilis* ZM4 转运酚类抑制物

(a) 酚醛抑制物转运; (b) 酚醇抑制物转运。

Fig. 3.10 Transport of phenolic compounds in *Z. mobilis* ZM4.

(a) Transport of phenolic aldehyde inhibitors; (b) Transport of phenolic alcohol inhibitors.

活细胞的外排系统是胞外有毒化合物和胞内有害中间代谢产物脱毒的最有效的机制。*Z. mobilis* ZM4 有 5 种转运蛋白, 分别是 ABC 转运蛋白家族 (ATP binding cassette superfamily, ABC)、多药和有毒化合物外排家族 (Multidrug and toxic compound extrusion family, MATE)、主要协同转运蛋白超家族 (Major facilitator superfamily, MFS)、耐药节结化细胞分化 (Resistance nodulation cell

division family, RND) 和小多药抗性蛋白家族 (Small multidrug-resistance family, SMR) (图 3.11)。酚醛抑制物胁迫下的转录组解析发现,除了 MATE 转运蛋白,其他转运蛋白蛋白的编码基因均涉及显著差异表达,尤其是 ABC 转运蛋白、MFS 转运蛋白和 RND 转运蛋白的编码基因。隶属腺苷三磷酸 (ATP)-结合盒 (ABC) 超家族的 ZMO0799 和 ZMO0800 基因在 3 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异下调表达 (表 3.4)。另外, RND 转运蛋白编码基因 ZMO0282 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下分别显著差异上调表达 6.05 倍、2.55 倍和 7.14 倍,ZMO0798 显著差异上调表达 2.27 倍、2.54 倍和 4.58 倍。为了限制胞内有毒物质的浓度, G^- 细菌能够减少通道,以此形成低渗透性的屏障^[243], 诸如 MFS 转运蛋白编码基因 ZMO1288 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下分别显著差异下调表达 4.07 倍、4.18 倍和 3.44 倍, ZMO1856 显著差异下调表达 4.40 倍、2.44 倍和 3.30 倍。

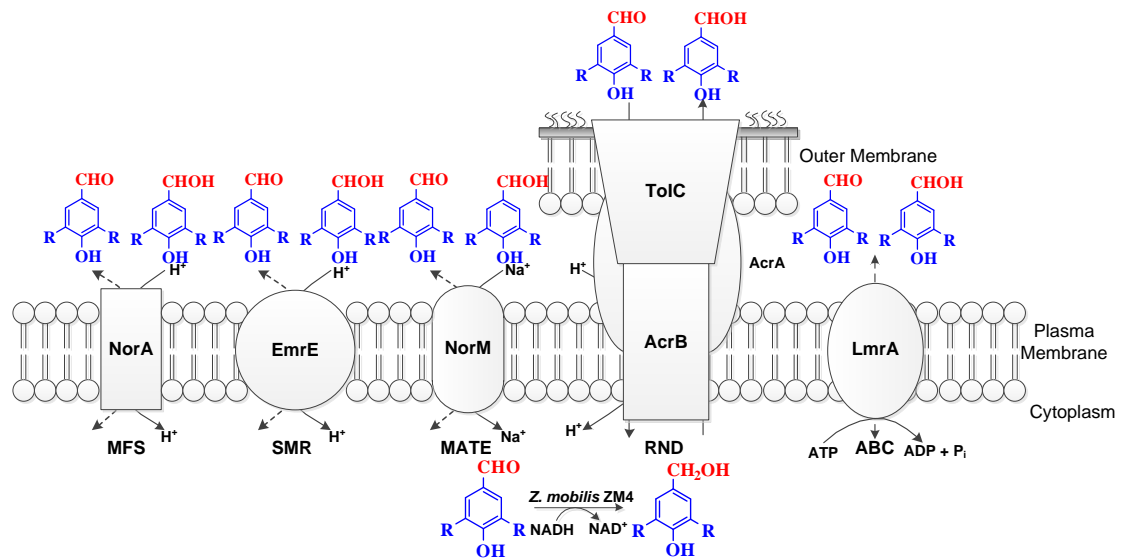


图 3.11 *Z. mobilis* ZM4 转运酚类抑制物的转运蛋白^[222]

R 代表酚醛的甲氧基。

Fig. 3.11 Transporters for the transport of phenolic inhibitors.

R indicates the methoxyl group.

在 5 种转运蛋白中,仅 ABC 转运蛋白耗能,其转运糖、蛋白、氨基酸和有毒药物等。而且, RND 泵是 G^- 细菌最常见的转运蛋白,其对菌体耐受胞外有毒物质和泵出胞内有毒物质来说非常重要。同时, RND 泵分布在 G^- 细菌的整个细胞膜,利于减少外膜的透过性,是 G^- 细菌耐受有毒物质的有效机制^[222, 244]。在酵母中也发现了很多与糠醛和 5-羟甲基糠醛转化相关的转运蛋白编码基因,诸如 ABC 转运蛋白编码基因和其他药物和毒素转运蛋白编码基因^[126]。因此,本研究推测 RND 对 *Z. mobilis* ZM4 转化和耐受酚醛抑制物来说很重要。

表 3.4 *Z. mobilis* ZM4 的转运蛋白编码基因在酚醛抑制物胁迫下的表达

Table 3.4 Expression of the gene encoding the transporter proteins under the stress of phenolic aldehydes

Transporter	Gene	4-Hydroxybenzaldehyde			Syringaldehyde			Vanillin		
		Foldchange	<i>p</i> -value	Regulation	Foldchange	<i>p</i> -value	Regulation	Foldchange	<i>p</i> -value	Regulation
	ZMO0111	1.01	0.87	up	1.03	0.80	down	1.11	0.43	up
	ZMO0143	2.11	0.00	up	1.30	0.03	up	2.00	0.00	up
	ZMO0183	1.15	0.05	down	1.13	0.28	up	1.18	0.23	up
	ZMO0230	1.67	0.01	down	1.12	0.42	down	1.64	0.03	down
	ZMO0254	1.05	0.52	up	1.19	0.29	up	1.01	0.95	up
	ZMO0255	1.21	0.04	up	1.21	0.23	up	1.15	0.17	up
	ZMO0260	1.25	0.14	down	1.22	0.27	down	1.64	0.04	down
	ZMO0275	1.31	0.11	down	1.15	0.12	down	1.10	0.33	down
	ZMO0416	1.21	0.04	up	1.01	0.62	down	1.04	0.68	up
	ZMO0425	1.49	0.00	down	1.23	0.01	down	1.10	0.20	down
ABC	ZMO0458	1.21	0.01	down	1.11	0.01	down	1.05	0.38	up
	ZMO0571	1.27	0.09	down	1.18	0.47	up	3.06	0.00	down
	ZMO0572	1.29	0.01	down	1.19	0.45	up	2.69	0.00	down
	ZMO0799	2.35	0.00	up	2.17	0.00	up	3.64	0.00	up
	ZMO0800	2.23	0.00	up	2.19	0.00	up	3.99	0.00	up
	ZMO0910	1.10	0.16	down	1.23	0.02	down	1.02	0.78	up
	ZMO0981	1.20	0.05	down	1.02	0.89	down	1.02	0.86	up
	ZMO1017	1.03	0.79	up	1.06	0.68	up	1.49	0.04	up
	ZMO1029	2.59	0.00	down	1.03	0.90	up	1.11	0.37	down
	ZMO1030	2.01	0.00	down	1.04	0.84	down	1.26	0.09	down
	ZMO1047	1.40	0.01	up	1.21	0.02	up	1.10	0.07	up

	ZMO1048	1.31	0.05	up	1.26	0.08	up	1.58	0.03	up
	ZMO1049	1.64	0.01	up	1.48	0.06	up	1.83	0.01	up
	ZMO1050	1.51	0.03	up	1.30	0.28	up	1.44	0.05	up
	ZMO1355	1.94	0.00	down	1.04	0.70	up	1.04	0.74	down
	ZMO1462	1.67	0.00	up	1.37	0.14	down	1.28	0.01	up
	ZMO1512	1.57	0.03	down	1.02	0.91	down	1.39	0.04	down
	ZMO1588	1.62	0.00	down	1.77	0.01	down	1.37	0.00	down
	ZMO1590	1.47	0.00	up	1.21	0.32	down	1.16	0.25	up
	ZMO1790	1.48	0.00	down	1.10	0.17	up	1.06	0.44	up
	ZMO1846	1.41	0.02	down	1.51	0.01	down	1.81	0.01	down
MATE	ZMO0214	1.55	0.00	down	1.04	0.81	down	1.13	0.21	down
	ZMO1639	1.06	0.22	up	1.53	0.00	down	1.07	0.09	up
	ZMO0052	2.03	0.00	down	1.49	0.01	down	2.50	0.00	down
	ZMO0099	1.67	0.01	down	1.08	0.62	up	1.33	0.04	down
	ZMO0494	7.08	0.00	down	1.28	0.02	down	3.65	0.00	down
	ZMO0566	1.62	0.01	down	1.16	0.35	down	1.33	0.05	down
	ZMO0581	1.16	0.18	down	1.04	0.79	down	1.37	0.03	up
	ZMO0966	1.61	0.00	up	1.44	0.01	up	3.99	0.00	up
MFS	ZMO1001	1.31	0.04	down	1.05	0.47	up	1.57	0.01	down
	ZMO1111	1.02	0.76	down	1.05	0.60	up	1.36	0.03	up
	ZMO1196	1.66	0.01	up	1.13	0.28	up	1.80	0.01	up
	ZMO1288	4.07	0.00	down	4.18	0.00	down	3.44	0.00	down
	ZMO2018	1.05	0.15	up	1.49	0.01	down	1.07	0.23	down
	ZMO1452	1.09	0.40	down	1.69	0.00	up	1.06	0.61	up
	ZMO1457	5.27	0.00	down	1.72	0.01	down	4.24	0.00	down

	ZMO1577	1.88	0.04	down	2.93	0.01	down	2.97	0.01	down
	ZMO1856	4.40	0.00	down	2.44	0.00	down	3.30	0.00	down
	ZMO1977	1.99	0.00	up	1.26	0.13	up	1.71	0.00	up
	ZMO0282	6.05	0.00	up	2.55	0.00	up	7.14	0.00	up
	ZMO0285	1.78	0.00	down	2.52	0.00	down	1.69	0.00	down
	ZMO0287	1.15	0.06	down	1.10	0.17	up	1.14	0.06	down
	ZMO0778	1.51	0.02	down	1.07	0.47	down	1.05	0.70	up
	ZMO0779	1.07	0.66	up	1.23	0.22	up	1.68	0.02	up
	ZMO0780	1.15	0.34	up	1.18	0.37	up	1.89	0.01	up
RND	ZMO0797	1.25	0.00	down	1.01	0.88	down	1.16	0.42	up
	ZMO0798	2.27	0.00	up	2.54	0.00	up	4.58	0.00	up
	ZMO0964	1.77	0.00	up	1.38	0.05	up	4.80	0.00	up
	ZMO1429	1.41	0.04	up	1.94	0.01	up	1.83	0.01	up
	ZMO1430	1.43	0.02	up	1.93	0.01	up	1.54	0.02	up
	ZMO1525	2.42	0.00	up	1.43	0.11	up	1.74	0.00	up
	ZMO1529	2.54	0.00	up	1.05	0.84	down	2.32	0.01	up
	ZMO1599	1.30	0.05	down	1.16	0.03	down	1.00	0.95	down
SMR	ZMO0108	2.22	0.00	down	1.40	0.01	down	2.25	0.00	down
	ZMO0697	3.20	0.00	down	1.20	0.00	down	2.87	0.00	down

注：红色和绿色分别表示显著差异上调表达和显著差异下调表达的基因。

Note: Colored red and green indicate the differentially up-regulated and down-regulated genes, respectively.

3.3.7 调控与酚醛抑制物转化

依据基因组注释信息发现, *Z. mobilis* ZM4 的调控子种类多样, 诸如 LysR 型调控子、AraC 型调控子、GntR 型调控子、TetR 型调控子、AsnC 型调控子、MarR 型调控子、Fis 型调控子和两组分信号转导系统 (Two-component regulatory systems, TCRS) 等。研究发现, 酚醛抑制物胁迫下涉及显著差异表达的调控子包括 LysR、AraC、GntR 和 MarR 调控子 (表 3.5)。4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下, AraC 型调控子编码基因 ZMO1380 分别差异上调 5.17 倍、2.21 倍和 2.60 倍, 其中 4-羟基苯甲醛和香草醛胁迫下显著差异表达; GntR 型调控子编码基因 ZMO1854 分别下调表达 1.49 倍、2.29 倍和 2.40 倍; MarR 型调控子编码基因 ZMO0054 分别上调表达 2.12 倍、1.24 倍和 1.18 倍。LysR 型调控子的 4 个编码基因涉及差异下调表达, 诸如 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下 ZMO1336 分别下调 1.06 倍、2.04 倍和 1.10 倍; ZMO1574 下调 3.51 倍、2.01 倍和 2.30 倍; ZMO1733 分别下调表达 2.04 倍、1.22 倍和 1.95 倍; ZMO1857 分别显著下调表达 2.47 倍、2.67 倍和 3.83 倍。

调控子是一套复杂的蛋白质-DNA-RNA 聚合酶作用机器, 其以激活子或阻遏子形式参与酚醛抑制物的转化, 并通过 RNA 聚合酶促进或抑制 DNA 转录^[245]。因此, 本研究推测 LysR、AraC、GntR 和 MarR 调控子参与了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的代谢过程。

表 3.5 *Z. mobilis* ZM4 的调控子编码基因在酚醛抑制物胁迫下的表达

Table 3.5 Expression of the regulator encoding genes under the stress of phenolic aldehyde inhibitors

Regulator	Gene	4-Hydroxybenzaldehyde			Syringaldehyde			Vanillin		
		Foldchange	<i>p</i> -value	Regulation	Foldchange	<i>p</i> -value	Regulation	Foldchange	<i>p</i> -value	Regulation
AraC	ZMO1380	5.17	0.00	Up	2.21	0.09	up	2.60	0.00	up
AsnC	ZMO0023	1.46	0.00	down	1.20	0.01	down	1.52	0.02	down
Fis	ZMO1126	1.12	0.41	Up	1.09	0.51	up	1.45	0.04	up
GntR	ZMO1854	1.49	0.01	down	2.29	0.00	down	2.40	0.00	down
	ZMO1944	1.14	0.19	down	1.04	0.63	up	1.42	0.01	down
LysR	ZMO0050	1.09	0.28	Up	1.20	0.22	down	1.46	0.02	down
	ZMO0471	1.57	0.00	Up	1.21	0.01	up	1.52	0.00	up
	ZMO0675	1.44	0.00	Up	1.14	0.02	up	1.33	0.01	up
	ZMO0774	1.15	0.09	down	1.07	0.48	down	1.27	0.20	down
	ZMO0781	1.18	0.01	down	1.02	0.84	up	1.03	0.76	up
	ZMO1206	1.40	0.01	down	1.27	0.01	down	1.34	0.00	down
	ZMO1336	1.06	0.62	up	2.04	0.01	down	1.10	0.47	up
	ZMO1574	3.51	0.00	down	2.01	0.00	down	2.30	0.00	down
	ZMO1733	2.04	0.00	down	1.22	0.32	down	1.95	0.01	down
	ZMO1793	1.15	0.04	up	1.44	0.02	down	1.96	0.00	down
	ZMO1857	2.47	0.02	down	2.67	0.02	down	3.83	0.01	down
MarR	ZMO0054	2.12	0.00	up	1.24	0.03	up	1.18	0.23	up
	ZMO0940	1.18	0.06	up	1.06	0.69	up	1.01	0.88	up
TetR	ZMO0281	1.83	0.00	up	1.08	0.41	up	1.57	0.03	up
	ZMO0963	1.27	0.05	up	1.21	0.01	up	1.59	0.00	up
	ZMO1547	1.94	0.00	up	1.17	0.02	up	1.98	0.02	down
TCRS	ZMO1405	1.24	0.00	up	1.03	0.59	up	1.03	0.46	down
	ZMO1177	1.16	0.04	up	1.02	0.71	up	1.16	0.06	up

3.4 本章小结

酚醛抑制物是木质纤维素预处理过程产生的主要抑制物之一,其抑制了糖化过程纤维素酶的酶活,同时还抑制发酵菌株的菌体生长和产物积累。本研究通过 DNA 芯片技术考察了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的转录组。本章的主要研究结论如下:

(1) 酚醛抑制物(尤其是丁香醛和香草醛)强烈抑制 *P. acidilactici* 乳酸脱氢酶的活性。为了更清楚地阐明 *P. acidilactici* 耐受酚醛抑制物的分子生物学机制,后续研究将开展 *P. acidilactici* 耐受酚醛抑制物的转录组。

(2) *Z. mobilis* ZM4 将 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛转化成相应的酚醇,并且不再继续转化酚醇。而且, *Z. mobilis* ZM4 不能转化酚酸。4-羟基苯甲醛对 *Z. mobilis* ZM4 的乙醇发酵抑制程度最强,香草醛次之,丁香醛最弱。高毒性的酚醛抑制物转化为低毒性酚醇化合物的还原代谢途径提高了 *Z. mobilis* ZM4 的生长和乙醇发酵能力。

(3) *Z. mobilis* ZM4 转化 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的过程中,分别有 442 个、67 个和 306 个基因显著差异表达。其中,在 4-羟基苯甲醛胁迫下,显著差异上调表达和显著差异下调表达的基因分别是 143 个和 299 个;在丁香醛胁迫下,分别是 16 个和 51 个;在香草醛胁迫下,分别是 111 个和 195 个。由此可见,4-羟基苯甲醛胁迫下的差异表达基因最多,香草醛次之,丁香醛最少。还原、转运和调控是 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的主要生物学过程。

(4) 本研究推测了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的代谢途径,鉴定了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的关键还原酶,诸如 ZMO0157、ZMO0788、ZMO0833、ZMO1116、ZMO1222、ZMO1254、ZMO1303、ZMO1399、ZMO1576、ZMO1696、ZMO1885 和 ZMO1984 等。其中, ZMO1116 和 ZMO1885 在 3 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异上调表达。

(5) 酚醛抑制物及其还原产物酚醇均不会在 *Z. mobilis* ZM4 细胞内积累。诸如 MFS 转运蛋白(如 ZMO0052、ZMO0494、ZMO1288、ZMO1457 和 ZMO1856); SMR 转运蛋白(如 ZMO0108 和 ZMO0697); ABC 转运蛋白(ZMO0143、ZMO0799 和 ZMO0800) 和 RND 外排泵(如 ZMO0282、ZMO0798 和 ZMO1529) 是 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的关键转运蛋白。

(6) 酚醛抑制物胁迫下的显著差异上调表达和显著差异下调表达基因的分别涉及 36 个和 63 个基因簇。这些基因簇包括诸如 ZMO1116-ZMO1117 和 ZMO1883-ZMO1884-ZMO1885 等具有还原功能的基因簇,还包括诸如 ZMO0282-ZMO0283 和 ZMO0798-ZMO0799-ZMO0800-ZMO0801 等具有转运蛋白活性的基因簇,这些基因簇是酚醛抑制物抗逆改造的重要合成生物学工具。

第四章 运动发酵单胞菌耐受酚醛抑制物的实现

4.1 引言

酚醛抑制物是生物炼制过程产生的主要抑制物之一，其严重抑制糖化过程纤维素酶的酶活，同时也抑制发酵过程的菌体生长和产物积累。木质纤维素来源的酚类化合物种类较多，其中，4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛是模型酚类抑制物^[32, 33]。

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis* ZM4) 是最重要的木质纤维素产乙醇菌株之一，其具有高乙醇得率、高乙醇耐受性和可遗传操作等优点^[169]。糠醛、乙酸、糠醛和乙酸的混合物、酚酸均不抑制 *Z. mobilis* ZM4 的生长和乙醇发酵，但是极低浓度的酚醛抑制物会明显抑制 *Z. mobilis* ZM4 的生长和发酵^[49, 158, 189]。酚醛抑制物还原为酚醇或氧化为酚酸的代谢途径均能实现酚醛抑制物的生物脱毒，最终实现酚醛抑制物转化与纤维素乙醇发酵的整合生物加工。研究发现，*Z. mobilis* ZM4 将酚醛抑制物还原为酚醇的生物脱毒过程的确在一定程度上提高了 *Z. mobilis* ZM4 的生长和乙醇积累^[246]。但是，破坏细胞膜完整性的酚醇化合物仍然间接抑制发酵菌株的生长和产物积累^[82]。酚醛抑制物氧化产酸的代谢途径是理想的生物脱毒途径，因为酚酸能够进入中心碳代谢，最终实现酚醛抑制物的终极降解。

本研究以 *Z. mobilis* ZM4 作为底盘微生物，旨在鉴定酚醛抑制物转化的关键基因，最终实现酚醛抑制物转化与纤维素乙醇发酵的整合生物加工。本研究尝试强化 *Z. mobilis* ZM4 自身的酚醛抑制物还原代谢途径和重构 *Z. mobilis* ZM4 自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径，以期提高 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇发酵的能力。基于代谢数据库、基因组注释和转录组数据，本研究募集和筛选了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的关键氧化酶和还原酶。基于遗传工程，本研究借助穿梭载体 pHW20a，构建了系列 *Z. mobilis* ZM4 酚醛抑制物转化菌株，并在真实玉米秸秆水解液体系考察了 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。

4.2 材料与amp;方法

4.2.1 菌株、质粒和培养基

本研究涉及的菌株见表 4.1。*A. resinae* ZN1 (CGMCC7452) 由本实验室分离。*E. coli* S17-1 $\lambda\pi$ (ATCC47055)、*P. putida* KT2440 (ATCC47054) 和 *Z. mobilis* ZM4 (ATCC31821) 均购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA, USA)。*E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存。用于 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株研

究的穿梭载体 pHW20a 由本实验室构建^[247, 248]。用于基因融合表达的 pET28a (+) 和打靶质粒构建的 pUC19 均购自宝生物 (大连) 有限公司。

E. coli BL21、*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* S17-1 λ π 培养在含 10.0 g/L 蛋白胨、5.0 g/L 酵母浸粉和 10.0 g/L NaCl 的 LB (Luria-Bertani) 培养基。携带 pET28a (+) 融合表达质粒的 *E. coli* BL21 培养在含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基。携带 pUC19 打靶质粒的 *E. coli* DH5 α 培养在含 20 μ g/mL 四环素和 25 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基。携带 pHW20a 重组质粒的 *E. coli* S17-1 λ π 培养在含 20 μ g/mL 四环素的 LB 培养基。

A. resinae ZN1 用于扩增漆酶编码基因 Arz_2211_T1, 具体培养方法见 2.2.2 部分。*P. putida* KT2440 用于扩增 PP_1948、PP_2680、PP_3151 和 PP_3357 基因, 将其培养在 LB 培养基。*Z. mobilis* ZM4 用于扩增 ZMO0367、ZMO1116、ZMO1696 和 ZMO1885 基因, 将其接种在含 20.0 g/L 葡萄糖、2.0 g/L KH₂PO₄ 和 10.0 g/L 酵母浸粉的 RM (Rich medium) 合成培养基 (pH 6.0), 于 30 $^{\circ}$ C 静置培养。

本研究首先在玉米秸秆水解液体系评价 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株的发酵能力, 之后在分别添加单一糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的 RM 合成培养基考察目的基因表达对单一醛类抑制物的转化能力。本研究的所有发酵实验均进行 3 个重复。

4.2.2 酶和试剂

基因操作的限制性内切酶、连接酶和高保真酶等酶制剂及基因操作相关试剂盒见 3.2.1 部分。按照 Adney 和 Baker^[249] 以及 Ghose^[250] 的方法, 尤特尔 6 号纤维素酶 (湖南岳阳尤特尔生化公司) 的滤纸酶活和纤维二糖酶活分别是 135 FPU/g 和 344 IU/g。并按照 Bradford 方法^[251], 测得尤特尔 6 号纤维素酶的蛋白浓度是 90 mg/g。四环素和萘啶酸购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)。还原型 NAD(P)H 和氧化型 NAD(P)⁺ 均购自北京普博欣生物科技有限责任公司。糠醛和 5-羟甲基糠醛 (HMF) 购自上海德默医药科技有限公司。qRT-PCR 相关试剂见 2.2.1 部分, 其他试剂见 3.2.1 部分。

表 4.1 菌株、质粒和引物

Table 4.1 Strains, plasmids, and primers.

Strains	Genotype	Reference
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (R _B ⁻ m _B), <i>gal</i> (λ c I 857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7 gene1</i>), <i>dcm</i> (DE3)	Stored in the lab
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Stored in the lab
<i>E. coli</i> S17-1 λ π	<i>recA pro hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrated into the chromosome	Purchased from ATCC
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Wild-type	Purchased from ATCC
<i>Z. mobilis</i> ZM4 Δ ZMO1237::Tc	Mutant with Tc integrated in <i>Z. mobilis</i> ZM4 genome by disrupting ZMO1237	This work
<i>Z. mobilis</i> ZM4 Δ ZMO1237::Tc-PP_2680	Mutant with Tc and PP_2680 integrated in <i>Z. mobilis</i> ZM4 genome by disrupting ZMO1237	This work
<i>P. putida</i> KT2440	Wild-type	Purchased from ATCC
<i>A. resinae</i> ZN1	Wild-type	[66]
Plasmids	Description	
pHW20a	Tc ^r , <i>mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZ</i> α , MCS and <i>oriV</i>	[247, 248]
pHW20a-ZMO0367	Express ZMO0367 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-ZMO1116	Express ZMO1116 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-ZMO1696	Express ZMO1696 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-ZMO1885	Express ZMO1885 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-Arz_2211_T1	Express Arz_2211_T1 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-PP_1948	Express PP_1948 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-PP_2680	Express PP_2680 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work

pHW20a-PP_3151	Express PP_3151 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pHW20a-PP_3357	Express PP_3357 in <i>Z. mobilis</i> ZM4	This work
pET28a (+)	<i>Kan^r</i> , <i>lacI</i> , MCS and <i>ori</i>	Stored in the lab
pUC19	<i>Amp^r</i> , <i>lacZα</i> , MCS and <i>ori</i> ,	Stored in the lab
pUC19-ZMO1237Up-Tc-ZMO1237Down	<i>Amp^r</i> , <i>lacZα</i> , MCS and <i>ori</i> , cloning ZMO1237Up-Tc-ZMO1237Down	This work
pUC19-ZMO1237Up-Tc-PP_2680-ZMO1237Down	<i>Amp^r</i> , <i>lacZα</i> , MCS and <i>ori</i> , cloning ZMO1237Up-Tc-PP_2680-ZMO1237Down	This work
Primers	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
ZMO0367	AAA <u>ACTGCAGATGACAAATACCGTTTCGACG</u>	CGGGGTACCTCAGTCATACCAAGTTACTCCATC
ZMO1116	CCC <u>AAGCTTATGGCGCAAATAAAAATGCTG</u>	CGGGGTACCTCAGGCAAAAACAGCTTTCTTTT
ZMO1696	CCC <u>AAGCTTATGCGCGCCATAGGTTATC</u>	CGGGGTACCTTAGAAGCCTTCTAAGACGATTTTA
ZMO1885	CCC <u>AAGCTTATGCCTAGCTTGTTGATCCCA</u>	CGGGGTACCTCAATCCCCAAGCAAAGGATAA
Arz_2211_T1	AAA <u>ACTGCAGATGGTTTCGTTAGGGTTTAA</u>	CCGGAATTCCTAAATCATTCCATTACCATATCT
PP_1948	AAA <u>ACTGCAGATGGCGGTATTTGCCAGTGA</u>	CGGGGTACCTCAAATGCGGATGATGGTTCG
PP_2680	CCC <u>AAGCTTATGATCTACGCACAACCCGG</u>	CGGGGTACCTTAGAAGAAGCCCAGCGGAT
PP_2680*	CG <u>CGGATCCATGATCTACGCACAACCCGG</u>	CCC <u>AAGCTTTTAGAAGAAGCCCAGCGGAT</u>
PP_3151	AAA <u>ACTGCAGATGAGCGCGATCAGCAGC</u>	CGGGGTACCTCAGTTACGGTCCAGCCACAC
PP_3357	CCC <u>AAGCTTATGTTGCAGGTGCCTTTGC</u>	CGGGGTACCTAGATGGGATAGTGACGCGG
ZMO1237Up**	CCC <u>AAGCTTTAGCCTTGGGCTTTTAAAGCCTTT</u>	ATGATAAGCTGTCAAACATGAGACACCCTCTTGAA AAGTTTTTTGAAG
Tc**	AACTTTTCAAGAGGGTGTCTCATGTTTGACAGCTT ATCATCGATAAGC	CTAGTCTAGATCAGGTTCGAGGTGGCCCG
ZMO1237Down**	CGGGGTACCTAGACAAGCGACAATTAACCTTTTGA AGAT	CGAGCTCGGTGACTACCTTTTGTGATATATCTCGG A
PP_2680**	CTAGTCTAGAAATGATCTACGCACAACCCGG	CGGGGTACCTTAGAAGAAGCCCAGCGGAT

ZMO1237**	ATGCGCGTCGCAATATTC	CTAAACAAGCGCATCCGG
ZMO1237 (Homologous region)**	CGAATTGAATGATGATCTGACTCC	GGTGTCTTTCACTTCGATCGTATG
ZMO0030***	CCAGATCAGGTGGTCGAGCATTT	ATCGGGATCACGGCAATAAACAG
ZMO0062***	TCAGGGAAATACCGTTCCGAAGC	TCCTTTTGAGACCTCATCCAGCG
ZMO0152***	AGCCAAAGAACTCATCAAAGGTC	TTCAACACCGAGGTCACCACGAG
ZMO0177***	GTGAACCACAAAGACCTGACCGC	ACGAACGATACCGATTTTCTGCT
ZMO0178***	CGGTCGCAGCCGTTGTCGGTGGT	TGAGCAGCGAGGAAGGTATTAGC
ZMO0179***	TGATGGCGGGTTTTCTGCTTTTG	TCGTTACAGAGGACCAACTATT
ZMO0238***	CGAGCGCCTATCGCCAATATGTA	GGTCAGCGTCGACTTTTGTTCGT
ZMO0239***	ATTGGCTCAGTATCGCGAAATGG	AACTGCGGCTGCTTCAGAAGTTC
ZMO0240***	ATGATGCTTCTTCTGGTGCGATT	GGACGTGCATTTTCAAGCATAG
ZMO0241***	CGTGATGTGCAGGAAATTTTGCA	CTGAATACGACGAGCAGACCAA
ZMO0242***	GGCAGGTCATATGCCTACCATGA	TTTTCGTTGATTTAGCAAAGCC
ZMO0256***	TTTTTCGAAAAGGCAAGTGGTGG	CCTGATGAACGTACGATAGCGG
ZMO0347***	CATGTTGCAAGGTGAAATTGCCG	GCTGCACTGTTGAAACCGCATGT
ZMO0367***	GTTTGAAGGGGCAATCGCTG	AACTTTCAAACCGCATCAT
ZMO0368***	CGGTGGCGTGCCCTGCTATGT	ATGAGACAAAGAAACGCTGG
ZMO0369***	TGGTGTTATCACTATTCTTGGTC	GTCTTCAAGTCTGTCAAGCGGAG
ZMO0482***	CGTCCTTGCCGCCGCTGCCTTGA	ATTGAGGTCTTCTATCCCACAGC
ZMO0543***	AAATGGTTGCGGCCTTTTCAATC	CAATCGGCTCTGCCAGTTTTACCT
ZMO0544***	TTGCAACCATGAATTTGAACGGC	AAAGATCGCATGTCCGGTGGC
ZMO0569***	CAGCCGCATTATAGGGGTCATGC	TATAAAGGGAAGGGCGTTGCAGC
ZMO0667***	TCTTGCGCTTCGTCTTTTCGTCG	CCTGCTAGAAAAGCAGGCGAGGC
ZMO0668***	GTAGCGTTTTTCGCTGGCTTCCTT	AAGACCCAAAAGTTCAGCAGCGG
ZMO0671***	GAAGCTGAAGCGATCATCGAACG	CAATCTGTTCCGGTCGCCATTTTC
ZMO0689***	ACCCGTTACTTGCTGGGTGAAGA	AAGCGCATCTGCCAAATAATACG

ZMO0712*** GTATCTGTTGCTTGCGGCCTCAA
ZMO0759*** CTGCCTCCCGAAACAAAGGTCTA
ZMO0760*** AGCTGCCAAAACTGATTGACGG
ZMO0956*** ATCTGTTCCCTGCCATGGTTCTGC
ZMO0957*** TTTTACGGTCAATTTTATGGGGA
ZMO0958*** AAGGGGTTACATATTGCGATGCC
ZMO0997*** CTTTGCTTCCAGGTGTTGCTAAT
ZMO1113*** TCCTGTCCAAGGTCGAAGGTTG
ZMO1212*** GCTGACCAGTATTACAGTGCCGT
ZMO1236*** TGCCAAGAATGTTTTCAACGCCA
ZMO1237*** GAAGTGATCGAGACCAGCGACAT
ZMO1240*** ACAAGGCTGAAACCGCCGCTAAA
ZMO1307*** CAAGAAAAGCGATGGCGTGGTTA
ZMO1335*** CGGACAGGAAACCACGTTTATT
ZMO1360*** GGGGTCACATTGGTTGGTCCGTT
ZMO1380*** CTCACGTTGATAGATTCCGTCCG
ZMO1478*** TAGCGGTGCTGAACTGGTCTCCT
ZMO1481*** TCTTCGGTGGAATTATGCGTTGC
ZMO1496*** TTTAATGCCATTCTGTGCGAGCC
ZMO1507*** AGAAGCCAGCGATTTACCTGCGA
ZMO1571*** ATGGGCGACGTTATTGATGGCAC
ZMO1572*** GTTGTTGCGGTTTGGACGCCTAT
ZMO1574*** ATGCTTGGGAATTTGAAAAAGCG
ZMO1596*** GATGTCAATCAACACGACGGCTG
ZMO1608*** TTCGGTGCTAACGCTATCCTCGG
ZMO1721*** CGTTTTGCTTATGGCAAAGACGG
GCAATCCATGTCCATTCCCGAAA
CCGTTTTTGTCAAGGCCTGATTAT
CTTGTCACCGGCCTGCAATAACT
CTGATAAACGATAAAGGCGGCAC
CGACCTGATCTTACGGGTGAATT
CGCCAGAAAAGCTGTCACATCTT
TCAGGGCAGGTAAACCACCGATA
GCATGAACAGCAATCGCCCATAG
TGCTGGAGATAGAAAGGCAAAGG
TTTTGGCAGCATCTTCGTTTTTC
GAGGTAAGCCTTTTTTTGCCC
ATCTTGACACCATCATAACGGCG
GTCCGGTCAGGATTTTACCGGAC
CCACCTGTTACTTCATCCAGCCG
CATCTGAGCGACTTCCTGAGCCG
ACCTCGGAATAGCCCAGCATAAA
CAGGCCATTTATAAGAAGCCAGT
CATTGTTGCCTTCTAACCGGACG
CGCTTTCATGGGTGCCATATTTG
GAACTGCCCCAGCCTTCGATCTT
GCGGAGCAAGCCGTAAACGGTAT
GGATACCAACACCGCAAGAACGG
CAAGCCATCAAGACAGGCATTCC
ATCGTTGACGGAAACCATCGGGG
CCAACATAACGGTAAAGCGGGAG
CAGAAGGTGCTGCCAAACCGATA

ZMO1722***	GTTTCAACAGGGGTCGGGGCAGT	AAGCCCGATTCCACCGAGACCAA
ZMO1766***	TTCGTTACAGGCCATCAGCTAT	GCAGATGAATACGGTCATCATCC
ZMO1771***	CACAGGATTGGGCAACCCATATG	TGATTTTGCAACAGCGAAGGGAG
ZMO1835***	GGATAAAGCCATTGTCGGGGAAG	TGTCTTCCCAATTTTTTCGGGGTT
ZMO1857***	GAAGCGTCAGGTAATAGCCGTGG	TGTTCAGGCACGCTGGCAATTAA
ZMO1868***	GGCTGTTAAGCTGGATAGGCCGA	CGCCAGATATCCAGCCAATCAGC
ZMO1883***	TTAGATGTCTTTGCGCAGGAGCC	GGATTAGTCGTGGCGGCAATATG
ZMO1955***	CTTGTCGCAACGGGAAGTCCTTT	CCAAGACCAATACCCGGGAAAAT
ZMO1993***	TGTTTACGGCAATGCAAGTGGCC	ATAATCAATAAGGCGCGGACGGC
ZMOr003***	TCATCGTTTACGGCGTGGACTAC	GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC

注：1 个、2 个和 3 个星号分别表示 PP_2680 融合表达、PP_2680 基因整合 *Z. mobilis* ZM4 染色体、qRT-PCR 实验的引物。下划线表示酶切位点。

Note: One, two, and three asterisks indicate the primers for PP_2680 fusion expression, integration into *Z. mobilis* ZM4 chromosome, and qRT-PCR assay, respectively. The underline indicates the digestion site.

4.2.3 水解液的制备

小麦秸秆于 2012 年收获于河南郸城。用 2.5% H_2SO_4 (w/w, H_2SO_4 /玉米秸秆干重) 于 175 °C 处理玉米秸秆 5 min^[252]。15% (w/w) 固含量的玉米秸秆于 50 °C 和 pH 4.8 在生物反应器中糖化 48 h, 每克干玉米秸秆用 15.0 FPU 的纤维素酶。

4.2.4 菌株构建

本研究设计了 2 个方案预期理性改造酚醛抑制物抗逆的 *Z. mobilis* ZM4 菌株, 即强化 *Z. mobilis* ZM4 自身的酚醛抑制物还原代谢途径和重构 *Z. mobilis* ZM4 自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径。对于强化酚醛抑制物还原代谢途径的策略, 主要依据 *Z. mobilis* ZM4 在酚醛抑制物胁迫下的转录组数据, 选择至少在 2 种酚醛抑制物胁迫下均显著差异表达的基因, 诸如 ZMO1116、ZMO1696 和 ZMO1885。葡萄糖 6-磷酸脱氢酶与酵母耐受糠醛和香草醛相关^[139, 253], 因此本研究选择了 *Z. mobilis* ZM4 自身的 ZMO0367 (*zwf*)。对于重构酚醛抑制物氧化途径的策略, 主要考察专司生物降解的代谢底盘微生物 *P. putida* KT2440 的醛脱氢酶 (PP_2680、PP_3151 和 PP_3357)^[254]。研究发现, *Acinetobacter calcoaceticus* 来源的苯甲醛脱氢酶对 4-羟基苯甲醛和香草醛存在氧化活性^[255]。因此, 本研究同时选择了 *P. putida* KT2440 的苯甲醛脱氢酶 (PP_1948)。云芝 (*Trametes versicolor* PRL572) 来源的漆酶编码基因 (*lcc2*) 的异源表达显著提高了 *S. cerevisiae* CEN.PK113-17A 转化酚类化合物的能力^[95], 因此本研究还选择了 *A. resiniae* ZN1 的漆酶编码基因 *Arz_2211_T1*。

引物序列见表 4.1。按照天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取 *Z. mobilis* ZM4 和 *P. putida* KT2440 的基因组 DNA。以 *Z. mobilis* ZM4 的基因组 DNA 作为模板扩增 ZMO0367、ZMO1116、ZMO1696 和 ZMO1885 基因, 以 *P. putida* KT2440 的基因组 DNA 作为模板扩增 PP_1948、PP_2680、PP_3151 和 PP_3357 基因。用 2.2.2 部分的发酵培养基培养 *A. resiniae* ZN1, 并用 Trizol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 提取总 RNA。反转录过程见 2.2.4 部分。以反转录的 cDNA 为模板, 扩增 *Arz_2211_T1* 基因。将以上目标基因与穿梭载体 pHW20a 重组, 并通过 CaCl_2 法将重组质粒转化至 *E. coli* S17-1 $\lambda\pi$, 最后通过接合转化方法将 pHW20a 重组质粒转化至 *Z. mobilis* ZM4^[247, 256] (图 4.1)。

本研究将 pET28a (+) 用作融合表达载体。以 *P. putida* KT2440 的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 PP_2680 基因片段。用 *Bam* H I 和 *Hind* III 消化载体 pET28a (+) 和 PP_2680, 构建 *E. coli* BL21::pET28a (+)-PP_2680, 并以携带空载质粒的重组菌株 *E. coli* BL21::pET28a (+) 作为对照。重组菌株于 37 °C 培养于 100 mL 含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基, 200 rpm 振荡培养至菌体浓度为 0.5 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$), 之后于 30 °C 用终浓度为 0.1 mM IPTG 诱导 *E. coli* BL21::pET28a (+)-PP_2680 至 6 h。蛋白纯化方法见 3.2.3 部分。

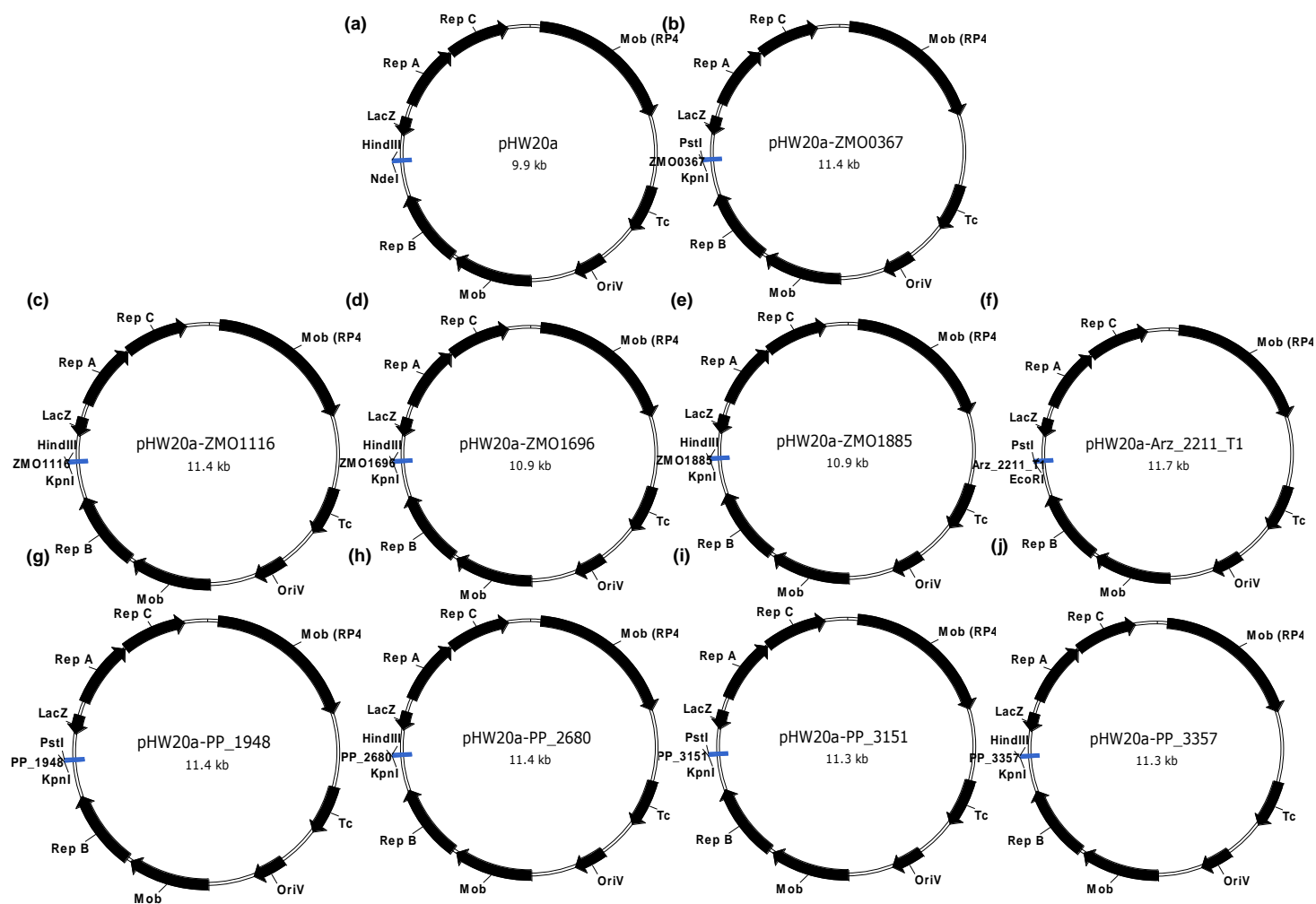


图4.1 酚醛抑制物转化基因的表达质粒构建

(a) pHW20a; (b) pHW20a-ZMO0367; (c) pHW20a-ZMO1116; (d) pHW20a-ZMO1696; (e) pHW20a-ZMO1885; (f) pHW20a-Arz_2211_T1; (g) pHW20a-PP_1948; (h) pHW20a-PP_2680; (i) pHW20a-PP_3151; (j) pHW20a-PP_3357

Fig. 4.1 Expression plasmid construction of the functional genes relating to the conversion of phenolic aldehyde inhibitors.

(a) pHW20a; (b) pHW20a-ZMO0367; (c) pHW20a-ZMO1116; (d) pHW20a-ZMO1696; (e) pHW20a-ZMO1885; (f) pHW20a-Arz_2211_T1; (g) pHW20a-PP_1948; (h) pHW20a-PP_2680; (i) pHW20a-PP_3151; (j) pHW20a-PP_3357.

4.2.5 酶活测定

将二次转接的 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株培养至对数期，收获菌体用作粗酶酶活测定。用 100 mM PBS (pH 7.0) 洗涤菌体两次，并超声破碎菌体（超声的具体参数为：超声1 sec，间隔3 sec，超声8次）。于4 °C将超声破碎菌体于12,000 rpm 离心5 min，并用0.44 μm滤膜过滤上清液。过滤的上清液即为重组菌株的粗酶液，用于粗酶酶活测定。

ZMO0367重组菌株的酶活测定按照Banerjee和Fraenkel^[257]的方法进行。1 mL 反应体系包括 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、0.18 mM NADP⁺、1mM D-葡萄糖 6-磷酸和适量的酶。一个酶活单位定义为：在25 °C，每分钟还原1 μmol NADP⁺ 所用的酶量。

ZMO1116、ZMO1696、ZMO1885和PP_1948重组菌株的粗酶酶活测定按照 Abd E-Mawla等人^[258]的方法进行。简言之，200 μL 反应体系包括0.1 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5)、0.329 mM 香草醛、2.25 mM NADH 和20 μL 粗酶液，混匀后于 30 °C 反应 30 min，再用 10 μL 3M 三氯乙酸溶液终止反应，用HPLC评价香草醛的转化，以此评价ZMO1116、ZMO1696和ZMO1885重组菌株的酶活。同时，以苯甲醛代替香草醛作为底物测定PP_1948重组菌株的粗酶酶活。一个单位酶活定义为：在30 °C，每分钟转化1 μmol 香草醛或苯甲醛所用的酶量。

Arz_2211_T1 重组菌株的酶活测定按照Nagai等人^[259]的方法进行。1 mL反应体系包括1 mM ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))、McIlvaine 缓冲液 (pH 4.0) 和适量粗酶液。于30 °C 反应20 min，加入100 μL 5% 三氯乙酸终止反应，并于 420 nm 检测吸收峰的增加值。一个单位漆酶酶活性定义为：在30 °C，在100 μL 反应体系中，每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量。

PP_2680、PP_3151和PP_3357重组菌株的粗酶酶活测定按照Liu等人^[260]和 Park等人^[192]的方法进行。1 mL反应体系包括 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0)、0.4 mM 二硫苏糖醇 (DTT)、5 mM MgCl₂、0.4 mM NAD⁺、10 mM 酚醛抑制物和适量的粗酶。一个单位醛脱氢酶和香草醛脱氢酶的酶活性定义为：在30 °C，每分钟还原1 μmol NAD(P)⁺ 所需要的酶量。

按照 Liu 等人^[260]和 Park 等人^[192]的方法测定 PP_2680 蛋白的离体酶活。具体操作如下：(1) 氧化反应：与 PP_2680、PP_3151 和 PP_3357 重组菌株的粗酶酶活测定方法相同，用适量的 PP_2680 纯化蛋白溶液催化反应。(2) 还原反应：1 mL 反应体系包括 70 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2)、0.4 mM NAD(P)H、10 mM 醛类抑制物（糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛）和适量的 PP_2680 纯化蛋白溶液。反应 1 min, 用 DU800 核酸/蛋白分析仪 (Beckman Coulter, Inc. S. Kraemer Boulevard Brea, CA, USA) 于 30 °C 和 340 nm 考察辅酶的变化情况。

所有的酶活测定实验重复三次，用 Bradford 方法测定蛋白浓度^[251]。

4.2.6 PP_2680 基因整合 *Z. mobilis* ZM4 染色体

通过 PCR，从 *Z. mobilis* ZM4 的基因组扩增 ZMO1237 的上游同源臂 ZMO1237Up (469 bp) 和下游同源臂 ZMO1237Down (701 bp)，从 *P. putida* KT2440 扩增 PP_2680，从质粒 pHW20a 扩增四环素抗性基因 Tc 和启动子 Plac。通过融合 PCR 技术，融合 ZMO1237Up 和四环素抗性基因 Tc 片段，同时融合 PP_2680 和 Plac。重组 pUC19 与 ZMO1237Up，之后与 ZMO1237Down 重组，得到打靶质粒骨架 pUC19-ZMO1237Up-Tc-ZMO1237Down。重组 PP_2680 和 Plac-2680 分别与 pUC19-ZMO1237Up-Tc-ZMO1237Down 重组，得到打靶质粒 pUC19-ZMO1237Up-Tc-PP_2680-ZMO1237Down 和 pUC19-ZMO1237Up-Tc-Plac-PP_2680-ZMO1237Down。通过 PCR、酶切和测序确认打靶质粒的序列，打靶质粒经 *Hind* III 线性化后进行电击转化。

将二次转接的 *Z. mobilis* ZM4 培养至对数早期 ($OD_{600nm}=0.3-0.4$)，并于 4 °C 和 6 000 rpm 离心 5 min，收集菌体，用预冷的无菌 10% (v/v) 甘油洗涤菌体 3 次，电击转化前用 90 μ L 预冷的 10% (v/v) 无菌甘油重悬菌体。将 10 μ L 线性化打靶质粒与 90 μ L *Z. mobilis* ZM4 感受态细胞轻轻混匀，转移至预冷的 1 mm 电击杯 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，冰浴 2 min，之后在电转化仪 (Bio-Rad Gene Pulser XcellTM) 电击转化样品。电击转化参数为 25 μ F，200 Ω ，2.0 kV^[261]。加入 900 μ L 30 °C 预热的 RM 培养基，于 30 °C 静置复苏 16 h。将电击转化液涂布于含 20 μ g/mL 四环素的 RM 平板，于 30 °C 培养 48-96 h。最后用 ZMO1237、ZMO1237Up 上游 55 bp 和 ZMO1237Down 下游 52 bp 的同源臂两侧的引物、PP_2680 引物鉴定整合子。具体的筛选流程见图 4.2。

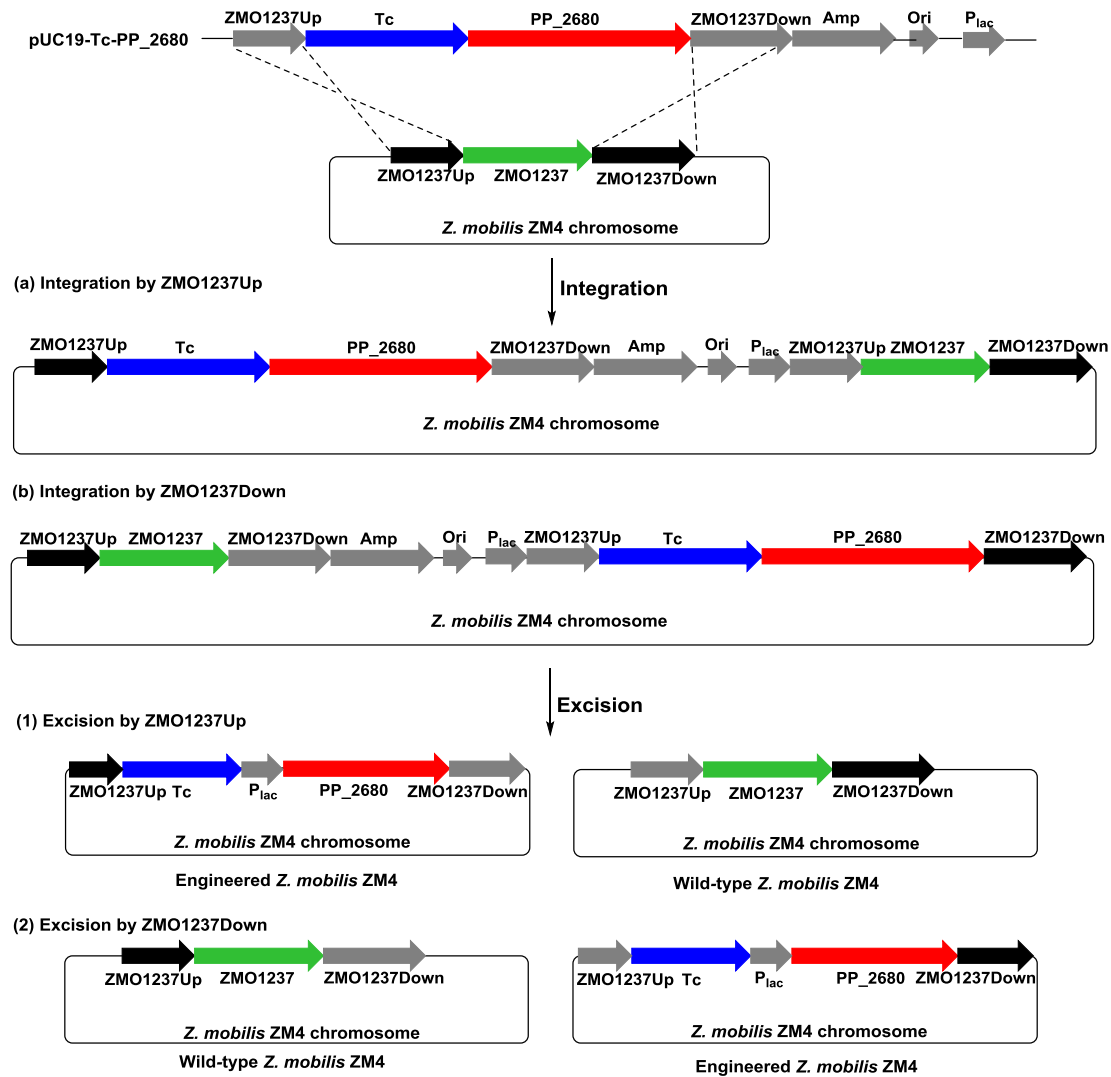


图 4.2 PP₂₆₈₀ 整合 *Z. mobilis* ZM4 染色体的筛选流程图

Fig 4.2 Screening flowchart of PP₂₆₈₀ integration into the chromosome of *Z. mobilis* ZM4.

4.2.7 qRT-PCR 实验

通过 qRT-PCR 技术,本研究旨在考察 PP₂₆₈₀ 的异源表达对 *Z. mobilis* ZM4 的 ED 代谢途径等方面的影响。按照 10% 接种量,将 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a 和 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a-PP₂₆₈₀ 重组菌株的种子培养物接种至 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液,培养至 12 h 收集菌体。qRT-PCR 实验的具体操作见 2.2.4 部分。用 Primer 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物 (表 4.1)。PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 2 min, 54 °C 退火 30 sec, 72 °C 延伸 30 sec。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目标基因的表达水平^[238]。

4.2.8 HPLC 和 GC-MS 分析

样品经 10,000 rpm 离心 5 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤即可用于 HPLC 分析。用配置 Aminex HPX-87H 柱子 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC (LC-20 AD, 示差检测器 RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 检测葡萄糖、乙醇、糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸,柱温 65 °C, 流动相是 5 mM H₂SO₄, 流速是 0.6 mL/min,

进样量为 20 μL 。

参考 2.2.5 部分的方法检测 3 种酚醛抑制物及其转化产物。用等浓度洗脱方法检测糠醛、糠醇和糠酸，流动相为 50% 的乙腈，流速 1.0 mL/min，检测器波长 220 nm。用梯度洗脱法检测 5-羟甲基糠醛、5-羟甲基糠醇和 5-羟甲基糠酸，流速为 0.6 mL/min，检测波长为 230 nm，梯度洗脱方法设置为：0-15 min，乙腈和超纯水的浓度配比从 5% 增加至 100%；15-20 min，乙腈和超纯水的浓度配比从 100% 降至 5%；20-30 min，用 5% 的乙腈平衡柱子。

GC-MS 检测参考 2.2.5 部分的方法确认 PP_2680 蛋白催化醛类抑制物的产物。

4.3 结果与讨论

4.3.1 *Z. mobilis* 重组菌株转化醛类抑制物的能力

按照 Dong 等人^[247, 248]的方法，获得 ZMO0367、ZMO1116、ZMO1696、ZMO1885、Arz_2211_T1、PP_1948、PP_2680、PP_3151 和 PP_3357 的 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株，并将仅携带空载质粒 pHW20a 的重组菌株 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a 作为对照菌株。本研究首先通过酶活测定确认以上目的基因的表达情况（表 4.2）。

研究发现，ZMO1116、ZMO1696 和 ZMO1885 重组菌株对香草醛的催化速率分别是 0.112、0.125、0.023 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ，相对于 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a 对照菌株催化香草醛的效率 (0.017 $\mu\text{mol}/\text{min}$) 而言，以上 3 个重组菌株催化香草醛的速率分别提高了 558.82%、635.29% 和 35.28%。ZMO0367、Arz_2211_T1、PP_1948 和 PP_3357 重组菌株的比酶活分别较对照菌株提高了 191.26%、12.92%、13.79% 和 41.05%。PP_2680 重组菌株对 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的酶活分别较对照菌株提高了 93.75%、277.78% 和 4.76%，PP_3151 重组菌株的粗酶酶活较对照菌株分别提高了 137.50%、218.52% 和 23.81%。由此可见，以上目的基因在 *Z. mobilis* ZM4 成功表达。

为了确认 *Z. mobilis* 重组菌株转化醛类抑制物的能力，本研究将 10 个重组菌株接种至分别添加 2.0 g/L 糠醛、4.0 g/L 5-羟甲基糠醛、5 mM (0.6 g/L) 4-羟基苯甲醛、5 mM (0.9 g/L) 丁香醛和 5 mM (0.8 g/L) 香草醛的 RM 培养基。表 4.3 是 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株在分别添加呋喃醛和酚醛抑制物的 RM 合成培养基的乙醇发酵情况。

表 4.2 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株的粗酶酶活
Table 4.2 Crude enzyme activity of *Z. mobilis* ZM4 recombinants.

Gene	Product	Substrate	Enzyme activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Control		Vanillin	0.017
ZMO1116	Oxidoreductase	Vanillin	0.112
ZMO1696	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	Vanillin	0.125
ZMO1885	NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase	Vanillin	0.023
Gene	Product	Substrate	Specific activity (U/mg)
Control		D-Glucose 6-phospate	0.103
ZMO0367	Glucose 6-phosphate dehydrogenase	D-Glucose 6-phospate	0.300
Control		ABTS	0.356
Arz_2211_T1	Laccase	ABTS	0.402
Control		Benzaldehyde	0.116
PP_1948	Benzaldehyde dehydrogenase	Benzaldehyde	0.132
Control		4-Hydroxybenzaldehyde	0.032
		Syringaldehyde	0.027
		Vanillin	0.063
PP_2680	NAD ⁺ Aldehyde dehydrogenase	4-Hydroxybenzaldehyde	0.062
		Syringaldehyde	0.102
		Vanillin	0.066
PP_3151	NAD ⁺ Aldehyde dehydrogenase	4-Hydroxybenzaldehyde	0.076
		Syringaldehyde	0.086
		Vanillin	0.078
Control		Vanillin	0.095
PP_3357	Vanillin dehydrogenase	Vanillin	0.134

糠醛和 5-羟甲基糠醛胁迫下, *Z. mobilis* ZM4 重组菌株的抑制物转化均较对照菌株慢。总体看来, 糠醛胁迫下, ZMO0367 重组菌株的葡萄糖消耗较对照菌株提高了 4.53%, PP_2680 和 PP_3357 重组菌株的乙醇产率分别较对照菌株提高了 4.0% 和 8.0%。5-羟甲基糠醛胁迫下, ZMO1885、PP_2680 和 PP_3357 重组菌株的乙醇产率分别较对照菌株提高了 5.88%、17.65% 和 11.76%。由此可见, 本研究构建的 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株转化呋喃醛的能力较差。分析原因是因为, 糠醛和 5-羟甲基糠醛对 *Z. mobilis* ZM4 的抑制较弱^[49], 因此 *Z. mobilis* ZM4 的流量完全分配至末端产物乙醇的积累, 无需额外分配至呋喃醛的转化。

4-羟基苯甲醛胁迫下, 摇瓶发酵 12 h, ZMO0367、ZMO1696、ZMO1885、Arz_2211_T1、PP_1948、PP_2680 和 PP_3151 重组菌的抑制物转化分别提高了 25.98%、193.51%、71.17%、81.14%、51.51%、83.36% 和 36.03%, 乙醇产率分别提高了 43.48%、26.09%、165.22%、21.74%、26.09%、43.48% 和 113.04%。由此可见, 以上目标基因的表达确实提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化 4-羟基苯甲醛和发酵葡萄糖产乙醇的能力。其中, ZMO1696 重组菌株对 4-羟基苯甲醛的转化能力最强。

丁香醛胁迫下, 摇瓶发酵 12 h, ZMO0367、ZMO1116、ZMO1696、ZMO1885、Arz_2211_T1、PP_1948、PP_2680、PP_3151 和 PP_3357 重组菌株的抑制物转化分别提高 9.10%、59.92%、37.49%、63.45%、104.31%、43.92%、45.57%、13.25% 和 8.86%, 但是乙醇产率几乎未提高。由此可见, 以上目的基因的表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化丁香醛的能力, 但是较 4-羟基苯甲醛的转化慢。本研究的前期研究发现, 5 mM 丁香醛对野生型 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长和乙醇发酵的抑制较弱^[246]。4-羟基苯甲醛和丁香醛对 *Z. mobilis* ZM4 的抑制最强, 丁香醛的 2 个甲氧基的侧链取代赋予了丁香醛对 *Z. mobilis* ZM4 较低的抑制毒性。丁香醛基本不抑制 *Z. mobilis* ZM4 的生长和发酵, 因此 *Z. mobilis* ZM4 先同化最容易利用的葡萄糖碳源, 而不会先转化丁香醛抑制物。

香草醛胁迫下, 摇瓶发酵 12 h, 除了 PP_3151, ZMO0367、ZMO1116、ZMO1696、ZMO1885、Arz_2211_T1、PP_1948、PP_2680 和 PP_3357 重组菌的香草醛转化率分别提高 8.84%、7.70%、201.85%、91.30%、10.13%、114.98%、208.42% 和 118.12%, 乙醇产率分别提高了 23.53%、17.65%、9.80%、13.73%、3.92%、13.73%、21.57% 和 118.12%。其中, PP_2680 和 ZMO1696 重组菌株对香草醛的转化最快, 但是, PP_2680 和 ZMO1696 重组菌株的乙醇产率并没有随着香草醛的转化而提高。

由此可见, 以上重组菌株对单独添加的酚醛抑制物的转化能力较强, 而对单独添加的糠醛和 5-羟甲基糠醛的转化能力没有提高。

表 4.3 *Z. mobilis* 重组菌株在添加单一醛类抑制物的 RM 培养基的乙醇发酵能力

Table 4.3 Fermentability of *Z. mobilis* recombinants in RM medium amended with single aldehyde inhibitor.

Inhibitors	Recombinants	Growth (OD ₆₀₀)	Glucose consumption (g/L)	Ethanol productivity (g/L/h)	Inhibitor conversion (%)
Furfural	ZM4::pHW20a	0.58±0.00	8.61±0.35	0.25±0.00	83.77±0.74
	ZM4::pHW20a-ZMO0367	0.58±0.00	9.00±1.13	0.19±0.06	76.81±2.35
	ZM4::pHW20a-ZMO1116	0.51±0.02	6.75±0.88	0.23±0.01	79.51±0.76
	ZM4::pHW20a-ZMO1696	0.56±0.01	7.85±0.24	0.24±0.00	75.58±0.15
	ZM4::pHW20a-ZMO1885	0.50±0.01	7.36±0.93	0.23±0.01	79.44±0.25
	ZM4::pHW20a-Arz_2211_T1	0.50±0.01	6.80±0.06	0.24±0.01	79.50±0.97
	ZM4::pHW20a-PP_1948	0.54±0.02	7.21±0.29	0.24±0.02	80.22±1.03
	ZM4::pHW20a-PP_2680	0.53±0.04	7.65±0.31	0.26±0.01	75.06±2.72
	ZM4::pHW20a-PP_3151	0.50±0.01	6.74±1.08	0.24±0.01	80.59±0.53
	ZM4::pHW20a-PP_3357	0.55±0.01	7.75±0.13	0.27±0.00	80.34±0.02
5-Hydroxymethylfurfural	ZM4::pHW20a	0.41±0.01	6.90±0.17	0.17±0.00	28.91±2.80
	ZM4::pHW20a-ZMO0367	0.38±0.00	6.61±0.21	0.17±0.00	26.11±1.47
	ZM4::pHW20a-ZMO1116	0.39±0.00	6.33±0.24	0.16±0.01	23.87±0.01
	ZM4::pHW20a-ZMO1696	0.37±0.00	5.45±0.17	0.16±0.02	19.10±1.93
	ZM4::pHW20a-ZMO1885	0.40±0.01	5.75±0.18	0.18±0.01	21.22±0.23
	ZM4::pHW20a-Arz_2211_T1	0.39±0.01	5.92±0.32	0.16±0.04	23.30±1.53
	ZM4::pHW20a-PP_1948	0.36±0.00	6.09±0.69	0.17±0.00	19.40±1.26
	ZM4::pHW20a-PP_2680	0.36±0.00	5.32±0.05	0.20±0.01	20.03±2.32
	ZM4::pHW20a-PP_3151	0.32±0.01	5.25±0.17	0.17±0.00	18.23±4.25
	ZM4::pHW20a-PP_3357	0.41±0.01	6.16±0.11	0.19±0.01	24.08±1.13
4-Hydroxybenzaldehyde (H group)	ZM4::pHW20a	0.49±0.00	5.98±0.18	0.23±0.02	11.24±0.17
	ZM4::pHW20a-ZMO0367	0.49±0.07	8.26±0.83	0.33±0.05	14.16±0.18
	ZM4::pHW20a-ZMO1116	0.48±0.02	8.84±0.97	0.25±0.07	12.05±0.19
	ZM4::pHW20a-ZMO1696	0.51±0.01	7.85±0.42	0.29±0.00	32.99±2.10

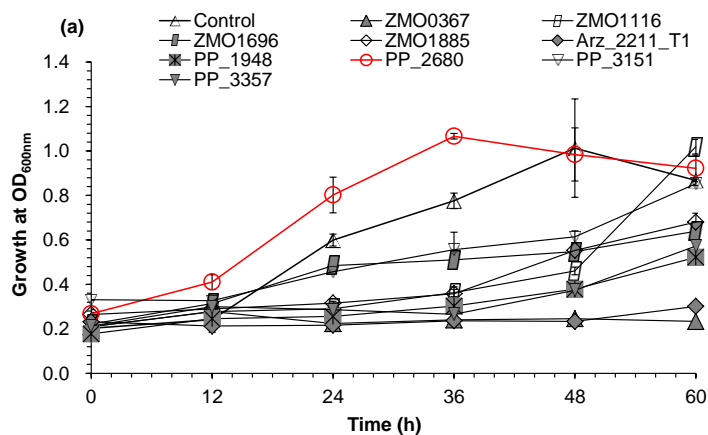
	ZM4::pHW20a-ZMO1885	0.48±0.00	10.10±0.01	0.61±0.00	19.24±2.09
	ZM4::pHW20a-Arz_2211_T1	0.46±0.01	7.25±0.29	0.28±0.03	20.36±0.14
	ZM4::pHW20a-PP_1948	0.50±0.00	6.31±0.60	0.29±0.02	17.03±2.67
	ZM4::pHW20a-PP_2680	0.59±0.01	4.15±0.86	0.33±0.01	20.61±1.12
	ZM4::pHW20a-PP_3151	0.48±0.02	7.50±0.89	0.49±0.03	15.29±0.88
	ZM4::pHW20a-PP_3357	0.46±0.02	8.60±0.28	0.26±0.00	11.07±1.77
Syringaldehyde (S group)	ZM4::pHW20a	1.20±0.02	17.45±0.53	0.59±0.00	12.75±1.73
	ZM4::pHW20a-ZMO0367	1.21±0.08	17.91±0.21	0.64±0.02	13.91±1.46
	ZM4::pHW20a-ZMO1116	1.10±0.01	17.05±0.67	0.62±0.01	20.39±0.56
	ZM4::pHW20a-ZMO1696	1.11±0.00	18.60±0.04	0.65±0.02	17.53±2.30
	ZM4::pHW20a-ZMO1885	1.15±0.01	17.57±0.00	0.61±0.03	20.84±0.30
	ZM4::pHW20a-Arz_2211_T1	1.35±0.05	16.18±0.27	0.57±0.05	26.05±1.89
	ZM4::pHW20a-PP_1948	1.15±0.05	17.15±0.22	0.64±0.00	18.35±6.65
	ZM4::pHW20a-PP_2680	0.97±0.09	16.64±1.32	0.63±0.01	18.56±3.54
	ZM4::pHW20a-PP_3151	1.00±0.17	17.56±0.44	0.65±0.01	14.44±2.51
ZM4::pHW20a-PP_3357	1.37±0.01	17.16±0.17	0.66±0.01	13.88±0.93	
Vanillin (G group)	ZM4::pHW20a	0.63±0.00	14.41±0.26	0.51±0.01	7.01±1.40
	ZM4::pHW20a-ZMO0367	0.74±0.06	16.28±0.04	0.63±0.06	7.63±1.60
	ZM4::pHW20a-ZMO1116	0.76±0.00	15.86±0.81	0.60±0.05	7.55±0.21
	ZM4::pHW20a-ZMO1696	0.69±0.03	16.23±0.68	0.56±0.07	21.16±0.43
	ZM4::pHW20a-ZMO1885	0.69±0.02	15.54±0.08	0.58±0.04	13.41±0.41
	ZM4::pHW20a-Arz_2211_T1	0.64±0.06	13.97±0.43	0.53±0.01	7.72±0.82
	ZM4::pHW20a-PP_1948	0.71±0.03	13.48±0.54	0.58±0.01	15.07±2.94
	ZM4::pHW20a-PP_2680	0.23±0.01	12.47±0.11	0.62±0.00	21.62±1.83
	ZM4::pHW20a-PP_3151	0.51±0.04	18.60±0.19	0.60±0.01	6.94±0.47
ZM4::pHW20a-PP_3357	0.71±0.06	14.86±0.22	0.55±0.01	15.29±0.49	

4.3.2 *Z. mobilis* 重组菌株发酵纤维素乙醇

为了确认目标基因的功能，本研究用 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液考察了 *Z. mobilis* 重组菌株的发酵能力。该玉米秸秆水解液含 56.14 g/L 葡萄糖、24.65 g/L 木糖、3.44 g/L 乙酸、0.75 g/L 糠醛、0.37 g/L 5-羟甲基糠醛、0.02 g/L 4-羟基苯甲醛、0.20 g/L 丁香醛和 0.36 g/L 香草醛。图 4.3 是 *Z. mobilis* 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液体系的纤维素乙醇发酵情况。

图 4.3a 是 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的生长情况。发酵 12 h，除了 Arz_2211_T1 重组菌株的菌体浓度较对照菌株 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a 低（是对照菌株的 88.38%），其他重组菌株的菌体浓度均较对照菌株高。其中，PP_2680、PP_3151 和 ZMO1696 重组菌株在发酵 12 h 的菌体浓度分别是对照菌株的 1.70 倍、1.35 倍和 1.30 倍。发酵 24 h，仅 PP_2680 重组菌株的菌体浓度较对照菌株高。由此可见，PP_2680 重组菌株在该玉米秸秆水解液体系的生长优于所有 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株，即 PP_2680 的表达促进了 *Z. mobilis* ZM4 的生长。

图 4.3b 是 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的葡萄糖消耗情况。摇瓶发酵 12 h，ZMO0367、PP_2680 和 PP_3151 重组菌株的葡萄糖消耗分别是对照菌株的 1.49 倍、2.02 倍和 1.22 倍。发酵 24 h，ZMO1696、PP_2680 和 PP_3151 重组菌株的葡萄糖消耗分别是对照菌株的 1.19 倍、2.09 倍和 1.21 倍。发酵 36 h，仅 PP_2680 重组菌株的葡萄糖消耗较对照菌株快，其是对照菌株的 1.57 倍。发酵 48 h，PP_2680 重组菌株和对照菌株的残糖分别为 2.02 g/L 和 24.70 g/L。由此可见，PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的成功表达明显提高了葡萄糖的消耗速率。



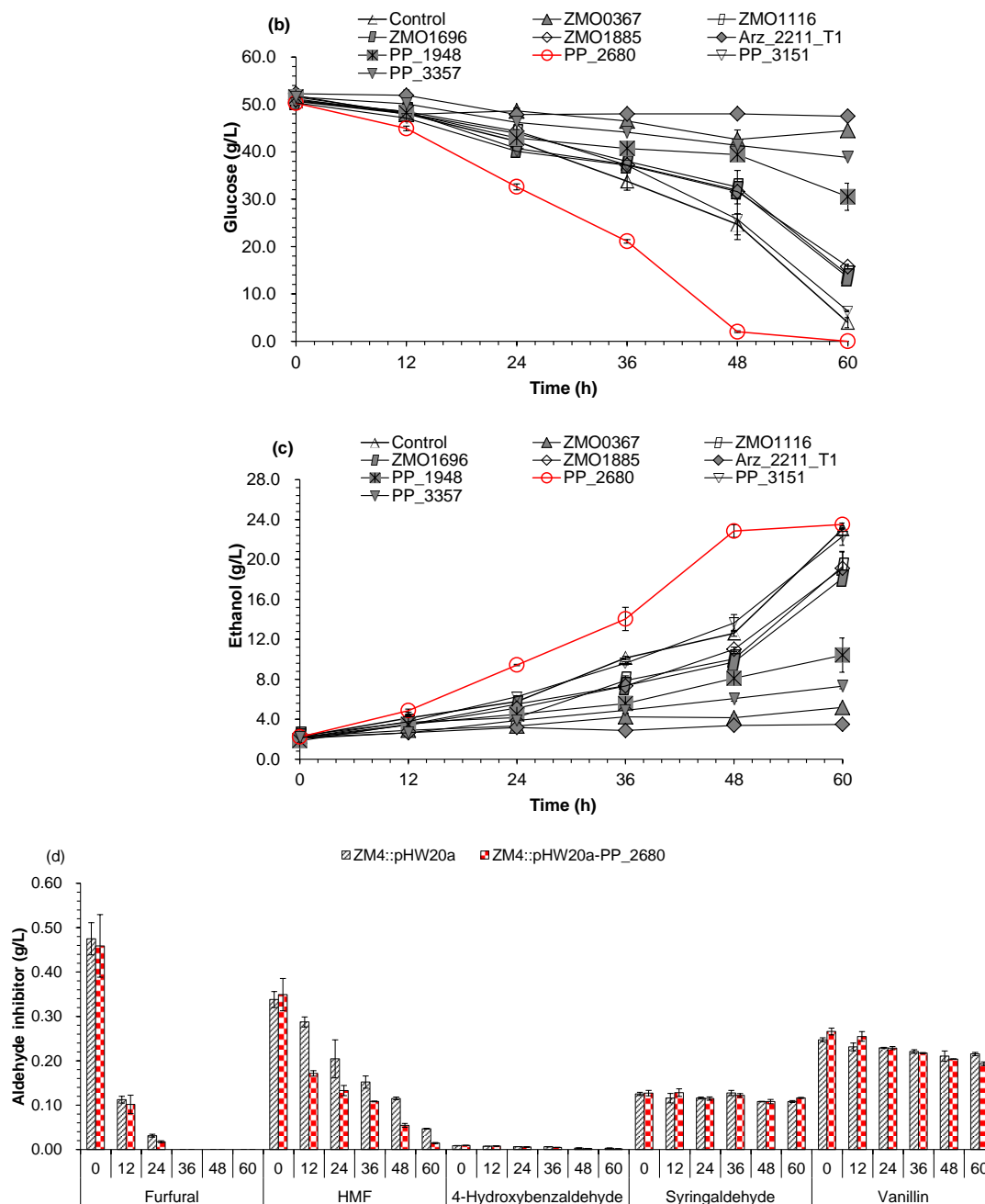


图 4.3 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株发酵纤维素乙醇

(a) 菌体生长; (b) 葡萄糖消耗; (c) 乙醇浓度; (d) 醛类抑制物转化。

Fig. 4.3 Cellulosic ethanol fermentability of *Z. mobilis* ZM4 recombinants in corn stover hydrolysate.

(a) Cell growth; (b) Glucose consumption; (c) Ethanol titer; (d) Conversion of aldehyde inhibitors.

图 4.3c 是 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的乙醇浓度。发酵 12 h、24 h、36 h 和 48 h 的乙醇浓度分别较对照菌株提高了 17.96%、63.72%、38.56% 和 81.35%。由此可见，PP_2680 基因在 *Z. mobilis* ZM4 的成功表达提高了乙醇发酵能力。由表 4.4 可见，PP_2680 重组菌株发酵 12 h 的乙醇产

率和乙醇得率分别较对照菌株提高了 37.50%和 42.13%，发酵 24 h 分别较对照菌株提高了 100.00%和 106.32%，发酵 36 h 分别较对照菌株提高了 50.00%和 50.91%，发酵 48 h 分别较对照菌株提高了 95.46%和 100.62%，发酵 60 h 分别较对照菌株提高了 2.86%和 3.12%。由此可见，PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的成功表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇浓度、乙醇产率和乙醇得率等发酵性能。

本研究还考察了 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a-PP_2680 重组菌株转化醛类抑制物的能力（图 4.3d）。一个很有意思的发现是，PP_2680 重组菌株在发酵 12 h 开始转化糠醛和 5-羟甲基糠醛，而且糠醛转化较快。发酵 24 h，酚醛抑制物开始转化，4-羟基苯甲醛的转化明显快于对照菌株。PP_2680 重组菌株发酵 24 h、36 h、48 h 和 60 h 的 4-羟基苯甲醛转化率分别较对照菌株提高了 17.46%、24.77%、32.52% 和 57.31%。发酵 60 h，PP_2680 对香草醛的转化也较对照菌株快。但是，PP_2680 重组菌株对丁香醛的转化不明显。由此可见，PP_2680 重组菌株对呋喃醛和酚醛均具有催化活性。但是，通过 GC-MS，本研究未能在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的发酵样品中检测到呋喃酸和酚酸。

由以上菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇积累和抑制物转化的发酵结果可见，PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的成功表达促进了 *Z. mobilis* ZM4 在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的醛类抑制物转化和纤维素乙醇发酵的能力。

如图 4.3 和表 4.4 所示，PP_2680 重组菌株在真实玉米秸秆水解液体系确实提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。分析可能原因如下：（1）醛类抑制物的毒性：疏水性越高，毒性越强，酚醛抑制物的疏水性较呋喃醛高，其毒性至少是呋喃醛的 2 倍^[79]。因此，单独添加呋喃醛和酚醛时，*Z. mobilis* ZM4 重组菌株优先转化毒性最强的酚醛抑制物，而对呋喃醛的转化较慢。（2）抑制物的协同抑制效应：糠醛和 5-羟甲基糠醛单独存在均不会影响 *E. coli* LY01 和 *Z. mobilis* ZM4 的生长和乙醇发酵，但是如果与其他抑制物同时存在时，多种抑制物协同作用使糠醛意外产生了抑制毒性^[49,79]。因此，PP_2680 在玉米秸秆水解液中同时发挥了呋喃醛和酚醛抑制物的转化作用，由此解除了醛类抑制物的抑制和提高了纤维素乙醇的发酵。

表 4.4 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的发酵能力Table 4.4 Fermentability of *Z. mobilis* ZM4 recombinants in 15% (w/w) solid content corn stover hydrolysate.

Gene	12 h		24 h		36 h		48 h		60 h	
	Productivity (g/L·h)	Yield (%)	Productivity (g/L·h)	Yield (%)	Productivity (g/L·h)	Yield (%)	Productivity (g/L·h)	Yield (%)	Productivity (g/L·h)	Yield (%)
Control	0.156±0.002	7.236±0.026	0.147±0.012	13.602±1.290	0.219±0.013	30.515±2.068	0.216±0.012	40.007±2.635	0.347±0.005	80.325±1.968
ZMO0367	0.051±0.011	2.298±0.520	0.043±0.014	3.884±1.380	0.054±0.004	7.356±0.444	0.039±0.006	7.018±1.304	0.048±0.004	10.908±0.636
ZMO1116	0.110±0.005	5.033±0.256	0.075±0.024	6.912±2.234	0.153±0.013	21.109±1.857	0.160±0.008	29.347±1.477	0.282±0.024	64.788±5.652
ZMO1696	0.109±0.016	5.048±0.767	0.140±0.008	12.909±0.702	0.144±0.002	20.033±0.142	0.158±0.025	29.180±4.787	0.266±0.007	61.561±1.284
ZMO1885	0.114±0.021	5.265±0.944	0.128±0.010	11.769±1.057	0.147±0.009	20.290±1.022	0.187±0.007	34.425±1.658	0.285±0.026	65.570±5.460
Arz_2211_T1	0.049±0.000	2.198±0.047	0.046±0.007	4.170±0.555	0.023±0.003	3.049±0.287	0.028±0.001	4.944±0.040	0.024±0.001	5.357±0.054
PP_1948	0.137±0.059	6.252±2.673	0.111±0.007	10.091±0.612	0.103±0.002	14.139±0.312	0.130±0.010	23.718±1.825	0.143±0.035	32.535±7.961
PP_2680	0.220±0.003	10.285±0.033	0.300±0.011	28.064±0.530	0.328±0.027	46.056±4.589	0.430±0.017	80.274±1.825	0.355±0.001	82.835±1.248
PP_3151	0.134±0.035	6.259±1.557	0.171±0.004	15.989±0.213	0.207±0.005	28.990±0.514	0.240±0.019	44.676±3.072	0.336±0.014	78.418±4.000
PP_3357	0.038±0.031	1.757±1.432	0.071±0.010	6.458±0.818	0.076±0.008	10.325±1.301	0.081±0.006	14.742±1.233	0.086±0.004	19.480±1.313

4.3.3 PP₂₆₈₀ 的离体酶活

本研究借助 pET28a (+) 载体融合表达了 PP₂₆₈₀ 基因，旨在通过离体酶活确认其催化活性。通过镍柱纯化，发现 PP₂₆₈₀ 蛋白约 55 kDa 大小（图 4.4）。

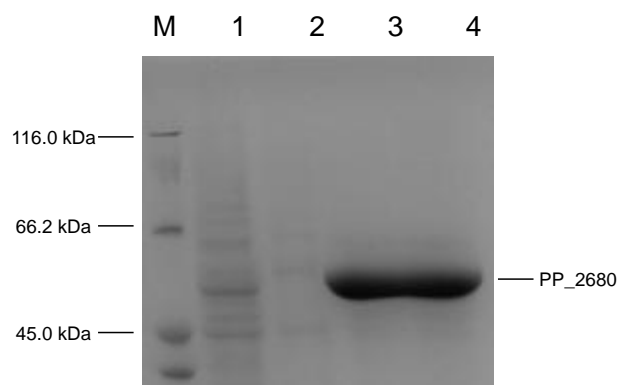


图 4.4 纯化 PP₂₆₈₀ 的 SDS-PAGE

泳道 M: 蛋白 Marker; 泳道 1: 0.1 mM IPTG 诱导的粗蛋白; 泳道 2: 20 mM 咪唑洗脱液; 泳道 3-4: 500 mM 咪唑洗脱液

Fig. 4.4 SDS-PAGE of the purified PP₂₆₈₀ protein

Lane M: Protein Marker; Lane 1: crude protein with 0.1 mM IPTG induced; Lane 2: the eluent by 20 mM imidazole buffer; Lane 3-4: the eluent by 500 mM imidazole buffer.

实验结果表明，以 NAD(P)H 作为辅因子时，纯化 PP₂₆₈₀ 蛋白对 5 种醛类抑制物没有催化活性。以 NAD⁺ 作为辅因子时，PP₂₆₈₀ 蛋白离体催化糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的比酶活分别是 0.172、0.245、0.162、0.216 和 0.127 U/mg（表 4.5）。以 NADP⁺ 作为辅因子，PP₂₆₈₀ 蛋白离体催化糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的比酶活是 0.114、0.325、0.086、0.279 和 0.140 U/mg。由此发现，PP₂₆₈₀ 具备氧化活性，但不具备还原活性。

表 4.5 纯化 PP₂₆₈₀ 蛋白的离体酶活

Table 4.5 Enzyme activity of the purified PP₂₆₈₀ protein in vitro.

Substrate	NAD ⁺		NADP ⁺	
	Enzyme activity	Specific activity	Enzyme activity	Specific activity
	(U/mL)	(U/mg)	(U/mL)	(U/mg)
Furfural	0.002	0.172	0.002	0.114
5-Hydroxymethylfurfural	0.004	0.245	0.005	0.325
4-Hydroxybenzaldehyde	0.002	0.162	0.001	0.086
Syringaldehyde	0.003	0.216	0.004	0.279
Vanillin	0.002	0.127	0.002	0.140

通过 GC-MS 分析, 本研究确认 PP_2680 蛋白在离体条件下以 NAD^+ 作为辅因子将糠醛、4-羟基苯甲醛和香草醛氧化成相应的酸, 同时也能够氧化 5-羟甲基糠醛形成 2,5-呋喃二甲醛 (2,5-Furandicarboxaldehyde) (表 4.6)。本研究的离体酶活实验进一步确认了 PP_2680 不具备还原酚醛抑制物的能力, 仅具备氧化醛类抑制物的能力。已有研究发现, 醛脱氢酶能够氧化糠醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛产生相应的酸^[96-99]。

表 4.6 基于 GC-MS 鉴定 PP_2680 蛋白离体催化醛类抑制物的产物

Table 4.6 Identification of catalyzing products of aldehyde inhibitors by the purified PP_2680 protein in vitro by GC-MS

Substrates and products	Molecular formula	Molecular weight	Retain time (min)
4-Hydroxybenzaldehyde	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Si}$	194.08	13.62
4-Hydroxybenzoate	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Si}_2$	282.12	18.97
Syringaldehyde	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	182.06	15.65
Syringate*	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	198.18	9.50
Vanillin	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Si}$	224.09	17.00
Vanillate	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Si}_2$	312.12	21.50
Furfural	$\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$	96.08	2.50
Furoic acid	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Si}$	184.06	7.64
5-Hydroxymethylfurfural	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	126.03	9.55
2,5-Furandicarboxaldehyde	$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_3$	124.02	5.75

注: 星号表示用 HPLC 检测。

Note: Asterisk indicates the data by HPLC.

4.3.4 辅因子回补与 PP_2680 基因表达

由图 4.3 可见, PP_2680 明显提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力, 但是 PP_2680 的表达并未氧化酚醛或呋喃醛产生相应的酚酸或呋喃酸。这与最初的酚醛抑制物氧化产酸的实验设计相悖, 因此, PP_2680 提高 *Z. mobilis* ZM4 纤维素乙醇发酵能力的原因未知。

本研究首先推测辅因子回补与 PP_2680 提高 *Z. mobilis* ZM4 纤维素乙醇发酵能力有关。(1) PP_2680 回补 ED 产能途径的辅因子: NAD^+ 依赖型醛脱氢酶 (PP_2680) 的表达产生 NADH, NADH 依赖型醇脱氢酶 (ZMO1596) 还原乙醛生成乙醇的催化过程产生 NAD^+ , 以此形成一个闭合的辅因子回补途径; (2) PP_2680 回补 *Z. mobilis* ZM4 自身还原酚醛抑制物所需的 NADH 辅因子: NAD^+ 依赖型的醛脱氢酶 (PP_2680) 的表达产生 NADH, *Z. mobilis* ZM4 自身依赖 NADH 还原酚醛抑制物, 以此形成了另一个闭合的辅因子回补途径 (图 4.5)。

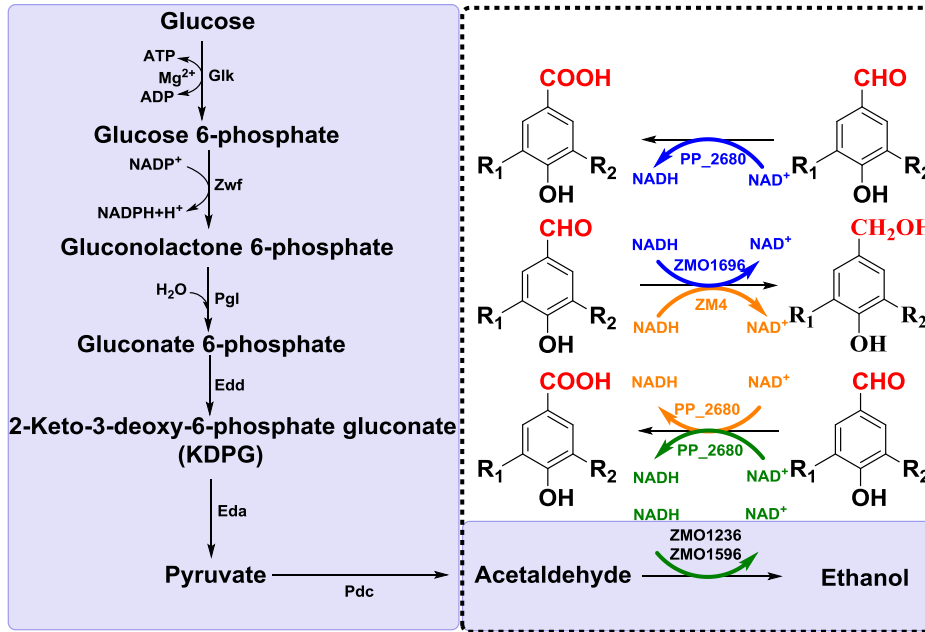


图 4.5 PP_2680 表达的辅因子回补反应

Fig. 4.5 Cofactor anaplerotic reaction for PP_2680 expression

为了证明推测的辅因子回补的正确性，本研究共表达 ZMO1696 (NADH-ADH)和 PP_2680 (NAD⁺-ALDH)基因。由图 4.3 可见，ZMO1696 重组菌株在 15% (w/w) 玉米秸秆水解液发酵体系未提高 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。因此，辅因子在该实验设计中是唯一的变量。

本研究将 ZMO1696 克隆至 PP_2680 的下游，并选择用 *Z. mobilis* ZM4 自身的 Peno 启动子，构建了 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a-PP_2680-ZMO1696 重组菌株。图 4.6 是 PP_2680-ZMO1696 共表达菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的纤维素乙醇发酵结果。该玉米秸秆水解液含 51.94 g/L 葡萄糖、22.74 g/L 木糖、4.02 g/L 乙酸、0.46 g/L 糠醛、0.28 g/L HMF、0.02 g/L 4-羟基苯甲醛、0.15 g/L 丁香醛和 0.03 g/L 香草醛。

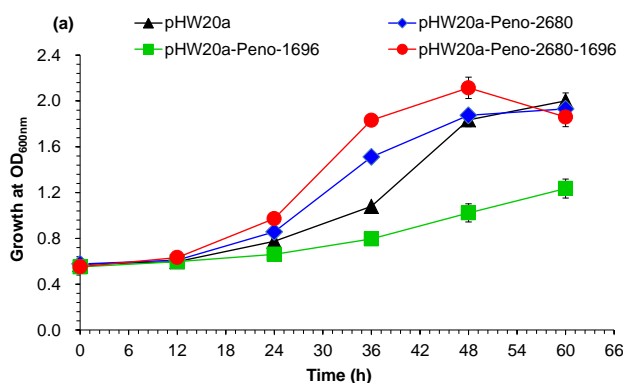
图 4.6a 是 PP_2680-ZMO1696 共表达菌株的生长情况。实验结果表明，发酵 12 h, PP_2680-ZMO1696 共表达菌株的生长分别较 PP_2680 重组菌株、ZMO1696 重组菌株和对照菌株的菌体生长提高 13.42%、47.09%和 25.51%；发酵 48 h, 分别提高 21.18%、130.42%和 69.68%。由此可见，PP_2680-ZMO1696 共表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长，其较 PP_2680 单独表达的促进作用更显著。本研究推测 PP_2680-ZMO1696 和 PP_2680 重组菌株的生长较对照菌株快的原因是因为 NADH 的增加，因为 Kalnenieks 等人发现 NADH 增加能够增加 *Z. mobilis* ZM4 的 ADH II (ZMO1596)对氧气的耐受性^[262]。而且，本研究也推测 PP_2680 和 ZMO1696 共表达后因为辅因子回补，ZMO1696 不再与 *Z. mobilis* ZM4 竞争 NADH 而发挥了还原活性。醛类抑制物转化加速，*Z. mobilis* ZM4 生长变快。

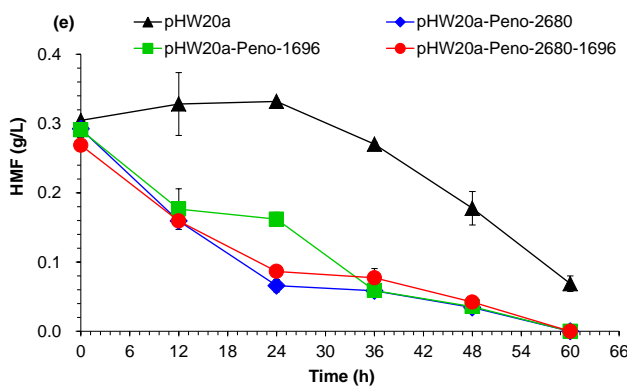
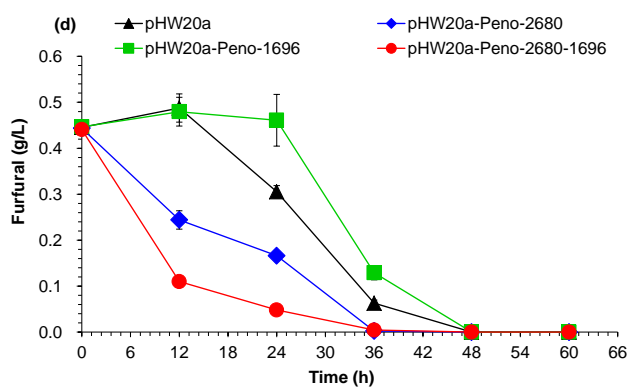
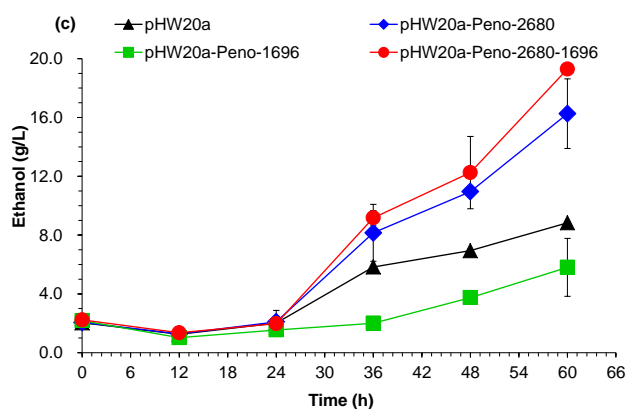
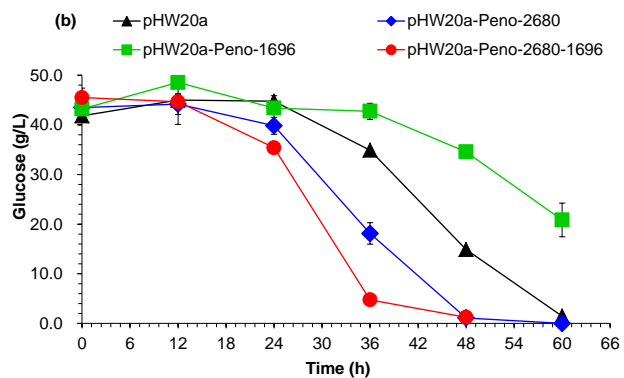
图 4.6b 是 PP_2680-ZMO1696 共表达菌株的葡萄糖消耗情况。发酵 24 h,

PP_2680-ZMO1696 和 PP_2680 重组菌株的葡萄糖消耗分别是 10.12 g/L 和 3.67 g/L，但是 ZMO1696 重组菌株和对照菌株均未消耗葡萄糖；发酵 36 h，PP_2680-ZMO1696 和 PP_2680 重组菌株的葡萄糖消耗分别是 40.76 g/L 和 25.36 g/L，ZMO1696 重组菌株和对照菌株的葡萄糖消耗分别是 0.47 g/L 和 9.16 g/L；发酵 48 h，PP_2680-ZMO1696 和 PP_2680 重组菌株基本彻底消耗完葡萄糖，但是 ZMO1696 重组菌株和对照菌株的葡萄糖消耗分别是 8.64 g/L 和 29.15 g/L。显然，PP_2680-ZMO1696 共表达菌株的葡萄糖消耗速率明显快于 PP_2680 重组菌株、ZMO1696 重组菌株和对照菌株。

图 4.6c 是 PP_2680-ZMO1696 共表达菌株的纤维素乙醇积累情况。发酵 24 h，PP_2680-ZMO1696、PP_2680、ZMO1696 和对照菌株的乙醇积累均比较低，且差异不大，分别是 1.97 g/L、2.10 g/L、1.54 g/L 和 2.02 g/L。发酵 36 h，以上重组菌株的乙醇浓度分别是 9.17 g/L、8.15 g/L、2.01 g/L 和 5.83 g/L；发酵 48 h，分别是 12.25 g/L、10.96 g/L、3.75 g/L 和 6.94 g/L；发酵 60 h，分别是 19.29 g/L、16.26 g/L、5.81 g/L 和 8.84 g/L。由此可见，NAD⁺依赖型的醛脱氢酶 (PP_2680) 和 NADH 依赖型的醇脱氢酶 (ZMO1696) 在 *Z. mobilis* ZM4 共表达后的乙醇积累较 PP_2680 和 ZMO1696 重组菌株的乙醇积累量高，尤其是比 ZMO1696 重组菌株和对照菌株高很多。实验结果表明，在整个发酵过程中，ZMO1696 的乙醇浓度最低。分析原因，可能是因为 ZMO1696 的表达与 *Z. mobilis* ZM4 的乙醇生成和酚醛抑制物还原竞争 NADH。

图 4.6d-h 是呋喃醛和酚醛抑制物的转化情况。PP_2680-ZMO1696 共表达菌株转化糠醛和 4-羟基苯甲醛的速度最快，PP_2680 重组菌株次之，ZMO1696 重组菌株和对照菌株最慢。





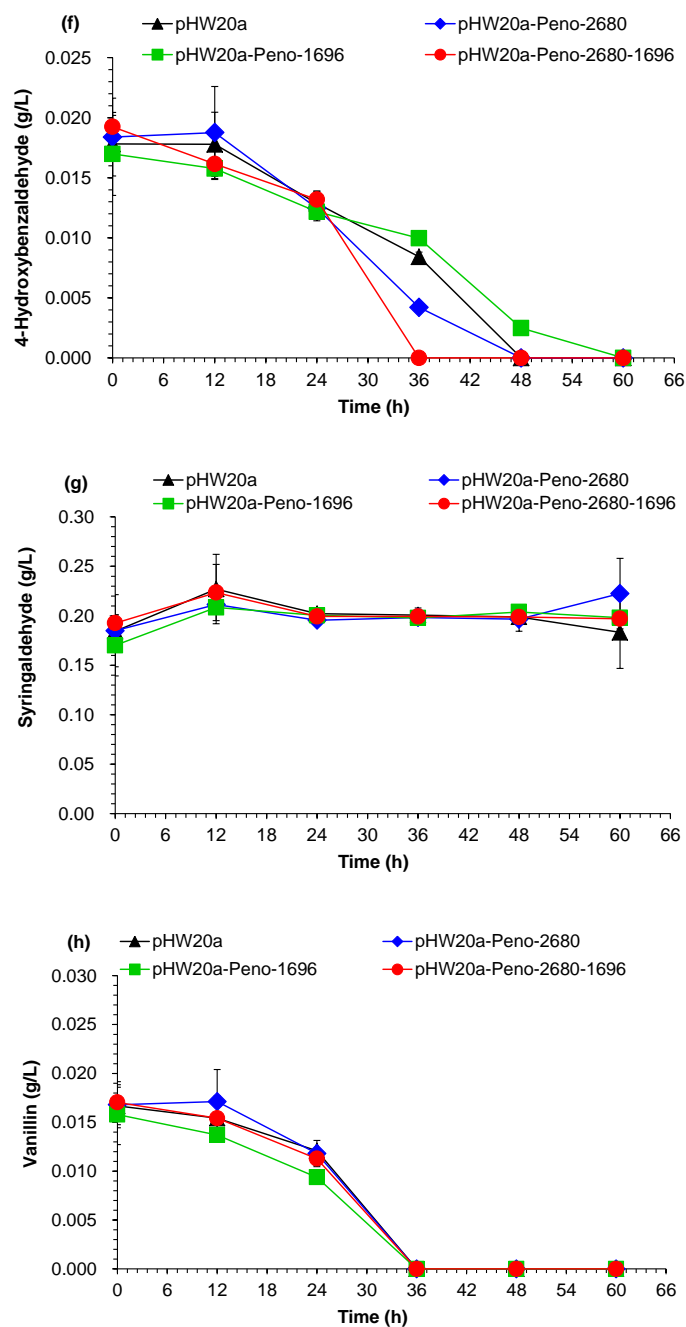


图 4.6 PP_2680 和 ZMO1696 共表达菌株的纤维素乙醇发酵

(a) 菌体生长; (b) 葡萄糖消耗; (c) 乙醇浓度; (d) 糠醛转化; (e) HMF 转化; (f) 4-羟基苯甲醛转化; (g) 丁香醛转化; (h) 香草醛转化。

Fig. 4.6 Fermentability of *Z. mobilis* ZM4::pHW20a-PP_2680-ZMO1696 recombinant in corn stover hydrolysate.

(a) Growth; (b) Glucose consumption; (c) Ethanol titer; (d) Furfural conversion; (e) 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) conversion; (f) 4-Hydroxybenzaldehyde conversion; (g) Syringaldehyde conversion; (h) Vanillin conversion.

由图 4.6 可见,共表达 PP_2680 和 ZMO1696 基因确实提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。如图 4.3 所示, NAD⁺依赖型的 PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 异源表达后显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力, 而 NADH 依赖型的 ZMO1696 的表达不起作用。但是, ZMO1696 与 PP_2680 共表达, 实现了 NAD⁺和 NADH 的回补, 使 ZMO1696 和 PP_2680 同时分别发挥了酚醛抑制物的还原和氧化活性。由此推测, PP_2680 的表达为 *Z. mobilis* ZM4 的乙醛和酚醛还原提供 NADH。因此, 辅因子回补是 PP_2680 发挥活性的关键因素。但是, PP_2680 催化什么底物形成辅因子回补途径仍然不清楚。

4.3.5 PP_2680 基因表达对 *Z. mobilis* ZM4 生长和产能的影响

PP_2680 基因的异源表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 的菌体生长、葡萄糖消耗和乙醇产率 (图 4.3)。本研究通过 qRT-PCR 技术主要考察了 PP_2680 表达对 *Z. mobilis* ZM4 中心碳代谢、甲基甘油醛代谢、氧化磷酸化和酚醛抑制物还原等关键酶的影响。用于重组菌株培养的玉米秸秆水解液组分见 4.3.1。

表 4.7 PP_2680 基因表达对 *Z. mobilis* ZM4 代谢的影响

Table 4.7 Influence on the metabolism by PP_2680 expression in *Z. mobilis* ZM4

Product	EC number	Gene	Expression
ED pathway			
Glucokinase	2.7.1.1.	ZMO0369	0.92±0.09
Glucose 6-phosphate 1-dehydrogenase	1.1.1.363	ZMO0367	1.18±0.37
6-Phosphogluconolactonase	3.1.1.31	ZMO1478	0.88±0.02
Phosphogluconate dehydratase	4.2.1.12	ZMO0368	1.12±0.25
KDPG aldolase	4.1.2.14	ZMO0997	1.22±0.30
Pyruvate decarboxylase	1.2.1.4	ZMO1360	1.23±0.18
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ZMO1236	1.58±0.25
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ZMO1596	1.50±0.19
Oxidative phosphorylation			
NADH dehydrogenase	1.6.99.3	ZMO1113	1.15±0.14
Succinate dehydrogenase	1.3.5.1	ZMO0569	1.15±0.13
		ZMO0956	1.44±0.20
Ubiquinol-cytochrome c reductase	1.10.2.2.	ZMO0957	1.26±0.28
		ZMO0958	0.83±0.01
		ZMO0238	1.26±0.20
		ZMO0239	0.59±0.14
		ZMO0240	0.45±0.04
F-type H ⁺ -transporting ATPase	3.6.3.14	ZMO0241	0.88±0.04
		ZMO0242	0.85±0.02
		ZMO0667	0.93±0.33
		ZMO0668	2.69±0.21
		ZMO0671	2.02±0.04

Inorganic diphosphatase	3.6.1.1	ZMO1507	1.64±0.32
Polyphosphate kinase	2.7.4.1	ZMO0712	0.40±0.01
Cytochrome bd complex	1.10.3.14	ZMO1571	1.68±0.10
TCA Cycle			
Citrate synthase	2.3.3.1	ZMO1835	0.88±0.13
Aconitate hydratase	4.2.1.3	ZMO0543	0.83±0.09
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.41	ZMO0544	0.88±0.23
Succinyl-CoA ligase	6.2.1.4	ZMO1481	0.79±0.07
Succinate dehydrogenase	1.3.5.1	ZMO0569	0.86±0.20
Fumarate hydratase	4.2.1.2	ZMO1307	0.81±0.25
Phosphoenolpyruvate carboxylase	4.1.1.31	ZMO1496	1.23±0.20
NADH-Dependent oxidoreductase			
NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	1.6.99.2	ZMO1335	0.66±0.05
NADP-aryl-alcohol dehydrogenase	1.1.1.90	ZMO0062	0.65±0.09
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ZMO1696	0.56±0.19
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ZMO1722	0.87±0.17
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ZMO1993	0.57±0.17
Glucose-fructose oxidoreductase	1.1.99.28	ZMO0689	0.93±0.16
Dihydropyrimidine dehydrogenase	1.3.1.1	ZMO1116	0.78±0.00
NADH: flavin oxidoreductase	1.6.99.1	ZMO1885	0.96±0.44
Methylglyoxal metabolism			
Virulence protein		ZMO0030	0.78±0.11
Glyoxalase	4.4.1.5	ZMO0760	0.79±0.02
Extradiol dioxygenase	1.13.11.-	ZMO1721	0.68±0.14
Hydroxyacid dehydrogenase	1.1.1.272	ZMO1883	0.86±0.27
Hydroxyacylglutathione hydrolase	3.1.2.6	ZMO0759	0.84±0.02
Pyruvate metabolism related			
Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	ZMO0256	0.84±0.19
Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	ZMO1237	0.64±0.01
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	ZMO1212	0.75±0.17
Fructose 1,6-bisphosphatase	2.7.1.90	ZMO0482	0.69±0.18
Fructose-bisphosphate aldolase	4.1.2.13	ZMO0179	0.84±0.03
Phosphoglycerate mutase	5.4.2.11	ZMO1240	0.71±0.18
Enolase	4.2.1.11	ZMO1608	0.78±0.16
Pyruvate kinase	2.7.1.40	ZMO0152	0.79±0.06
Biotin utilization related			
Biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] synthetase	6.3.4.15	ZMO1868	0.80±0.13
Regulation			
Magnesium transporter CorA		ZMO1766	0.80±0.11
LysR family transcriptional regulator		ZMO1574	1.02±0.11
LysR family transcriptional regulator		ZMO1857	0.76±0.10
AraC family transcriptional regulator		ZMO1380	0.84±0.00
RNA chaperone Hfq		ZMO0347	0.60±0.05

PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的异源表达明显提高了 ED 途径的醇脱氢酶编码

基因的表达（表 4.7）。其中，醇脱氢酶编码基因 ZMO1236 和 ZMO1596 分别上调表达 1.58 倍和 1.50 倍。ADH I (ZMO1236) 和 ADH II (ZMO1596) 是 *Z. mobilis* ZM4 产乙醇的关键酶，均具备乙醛还原为乙醇的能力。O'Mullan 等人发现，ADH I 对 *Z. mobilis* ZM4 的早期生长来说很重要；ADH II 是 *Z. mobilis* ZM4 对乙醇胁迫有响应的蛋白，其表达量随着乙醇的积累而不断增加^[263]。ADH I (ZMO1236) 和 ADH II (ZMO1596) 表达量的提高，意味着 PP_2680 的异源表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 生长和产醇能力。

PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的异源表达明显提高了氧化磷酸化过程的 F-型 H⁺转运 ATPase 编码基因 (ZMO0668 和 ZMO0671) 的表达（表 4.7）。F-型 H⁺转运 ATPase，即 ATP 合酶 (ATP synthase, EC3.6.3.14)，是 *Z. mobilis* 水解 ATP 的酶^[264]。ZMO0668 和 ZMO0671 分别编码了 F-型 H⁺转运 ATPase 的 α 和 β 亚基，PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 异源表达后分别上调表达 2.69 倍和 2.02 倍。Rutkis 等人研究发现，H⁺转运的 ATPase 与生物合成反应相结合，其控制了 *Z. mobilis* 的好氧生长和葡萄糖消耗速率^[265]。H⁺转运 ATPase 通过快速为糖酵解提供 ADP 而为 ED 途径提供较高的酵解流量，同时为弱的偶联呼吸系统提供较高的磷酸化潜力，从而使 H⁺转运 ATPase 生成 ATP。解偶联生长不仅是 *Z. mobilis* 的厌氧生长的内部特征，也是厌氧微生物进行低效率好氧生长的特征。因此，由 ZMO0668 和 ZMO0671 显著上调表达推测其提高了 ATP 能量的转化率。而且，*Z. mobilis* ZM4 呼吸链的焦磷酸酶 (ZMO1507) 和细胞色素 bd 复合体 (ZMO1571) 编码基因也分别上调表达 1.64 倍和 1.68 倍。由此可见，PP_2680 的表达提高了氧化磷酸化过程部分基因的表达。

依据 Brenda 数据库中，极端嗜热古菌 (*Sulfolobus tokodaii*) 来源的醛脱氢酶 (EC1.2.1.3) 对 3-磷酸甘油醛^[266]和琥珀酸半醛^[267]均具有催化活性。因此，本研究推测 PP_2680 通过催化甘油醛 3-磷酸和琥珀酸半醛，并以此途径为 *Z. mobilis* ZM4 的生长、酚醛还原、乙醇发酵和氧化磷酸化过程提供 NADH。

4.3.6 PP_2680 基因整合 *Z. mobilis* ZM4 染色体

通过同源重组，本研究将 PP_2680 基因整合至 *Z. mobilis* ZM4 的基因组。到目前为止，本研究仅筛选到未融合启动子的 PP_2680 整合子 *Z. mobilis* ZM4 Δ ZMO1237::Tc-PP_2680，但是还未能筛选到融合启动子的 Plac-PP_2680 整合子（图 4.7）。

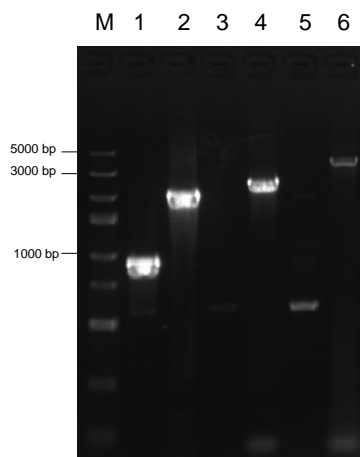


图 4.7 PP_2680 整合子基因组 DNA 的 PCR 鉴定

泳道 M: DNA Marker; 泳道 1、3、5: ZMO1237; 泳道 2: 野生型 *Z. mobilis* ZM4 同源臂两侧的片段; 泳道 4: 突变株 *Z. mobilis* ZM4 Δ ZMO1237::Tc 同源臂两侧的片段; 泳道 6: 突变株 *Z. mobilis* ZM4 Δ ZMO1237::Tc-PP_2680 同源臂两侧的片段。

Fig. 4.7 Identification of PP_2680 integrant using genome DNA by PCR.

Lane M: DNA Marker; Lane 1, 3, and 5: ZMO1237; Lane 2: Homologous flanking fragment in wild *Z. mobilis* ZM4; Lane 4: Homologous flanking fragment in mutant *Z. mobilis* ZM4 Δ ZMO1237::Tc; Lane 6: Homologous flanking fragment mutant *Z. mobilis* ZM4 Δ ZMO1237::Tc-PP_2680.

本研究首先考察了 PP_2680 整合子在添加单一酚醛抑制物的 RM 合成培养基的产乙醇能力 (表 4.8)。结果发现, 4-羟基苯甲醛胁迫下, PP_2680 整合子的菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇产率较野生型 *Z. mobilis* ZM4 提高了 11.54%、17.04% 和 9.04%; 丁香醛胁迫下, 以上参数分别提高了 11.30%、14.45% 和 5.47%; 香草醛胁迫下, 以上参数分别提高了 12.90%、17.85% 和 25.90%, 而酚醛抑制物的转化均未提高。由此发现, PP_2680 整合至 *Z. mobilis* ZM4 基因组存在本底表达, 并且其参与了 *Z. mobilis* ZM4 的葡萄糖代谢, 而不是酚醛抑制物的转化。

本研究还考察了 PP_2680 整合子在玉米秸秆水解液的纤维素乙醇发酵情况。15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液含有 59.45 g/L 葡萄糖、26.07 g/L 木糖、8.01 g/L 乙酸、0.33 g/L 5-羟甲基糠醛、0.73 g/L 糠醛、0.01 g/L 4-羟基苯甲醛、0.11 g/L 丁香醛和 0.23 g/L 香草醛。与野生型菌株相比较而言, *Z. mobilis* ZM4 Δ ZMO1237::Tc-PP_2680 整合子在成分复杂的水解液的抑制物转化和乙醇发酵能力并没有提高, 推测原因可能是因为缺乏启动子。

表 4.8 PP_2680 整合 *Z. mobilis* ZM4 基因组的整合子发酵
Table 4.8 Fermentability of *Z. mobilis* ZM4 integrant of PP_2680.

Inhibitor/Corn stover hydrolysate	Strains	Growth (OD ₆₀₀)	Glucose consumption (g/L)	Ethanol productivity (g/L/h)	Inhibitors conversion (%)
4-Hydroxybenzaldehyde	<i>Z. mobilis</i> ZM4	0.26±0.01	2.23±0.94	1.77±0.14	0.01±0.01
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc	0.19±0.00	2.22±0.04	1.46±0.08	0.01±0.01
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc-PP_2680	0.29±0.01	2.61±0.63	1.94±0.43	0.01±0.0
Syringaldehyde	<i>Z. mobilis</i> ZM4	1.15±0.10	14.19±0.05	8.41±0.51	0.06±0.00
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc	1.22±0.02	16.74±1.52	8.92±0.15	0.13±0.00
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc-PP_2680	1.28±0.00	16.24±1.51	8.87±0.24	0.01±0.00
Vanillin	<i>Z. mobilis</i> ZM4	0.31±0.02	5.49±1.97	3.05±0.57	0.06±0.00
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc	0.25±0.00	4.49±0.99	2.06±0.44	0.01±0.00
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc-PP_2680	0.35±0.04	6.47±0.82	3.84±0.30	0.06±0.00
15% (w/w) solid content corn stover hydrolysate	<i>Z. mobilis</i> ZM4	0.29±0.01	15.11±0.98	0.36±0.09	ND
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc	0.33±0.01	14.06±0.95	0.38±0.07	ND
	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ΔZMO1237::Tc-PP_2680	0.18±0.02	7.14±2.38	0.18±0.01	ND

注：ND 指未检测。

Note: ND indicates no detection.

为了得到含启动子的 PP_2680 整合菌株, 本研究通过优化线性化打靶质粒片段的浓度、电击转化参数和孵育时间, 但是始终未能筛选到含启动子的 PP_2680 整合菌株。

4.4 本章小结

本章节旨在鉴定酚醛抑制物转化的关键基因。通过遗传工程, 本研究强化了 *Z. mobilis* ZM4 自身的酚醛抑制物还原代谢途径和重构了 *Z. mobilis* ZM4 自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径, 旨在提高 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的能力, 最终实现酚醛抑制物转化与纤维素乙醇发酵的整合生物加工。本章的主要研究结论如下:

(1) *P. putida* KT2440 来源的 NAD⁺ 依赖型醛脱氢酶 (PP_2680) 显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。*Z. mobilis* ZM4::pHW20a-PP_2680 重组菌株发酵 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液的菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇浓度、乙醇产率、乙醇得率和抑制物转化均较对照菌株显著提高。其中, 发酵 24 h 的乙醇浓度、乙醇产率和乙醇得率分别较对照菌株提高 63.7%、100.0 和 106.3%。即, PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的异源表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。

(2) 在离体条件下, PP_2680 蛋白仅具备氧化能力, 其将 4-羟基苯甲醛、香草醛、糠醛和 5-羟甲基糠醛氧化为 4-羟基苯甲酸、香草酸、糠酸和 2,5-呋喃二羧醛。

(3) 一个意外的发现是, PP_2680 虽然提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力, 但是并没有氧化酚醛或呋喃醛产生酚酸或呋喃酸。PP_2680 (NAD⁺-ALDH) 和 ZMO1696 (NADH-ADH) 共表达证明了辅因子代谢回补是 PP_2680 提高醛类抑制物转化和纤维素乙醇发酵的原因之一。而且, PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的异源表达提高了 ED 途径的醇脱氢酶 (ZMO1236 和 ZMO1596)、氧化磷酸化过程的 H⁺ 转运 APTase (ZMO0667 和 ZMO0671)、焦磷酸酶 (ZMO1507) 和细胞色素 bd 复合体 (ZMO1571) 的表达。因此, 本研究推测 PP_2680 的异源表达提高了 *Z. mobilis* ZM4 的生长, 进而提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。但是, PP_2680 的催化机理仍然不清楚。

第五章 木质纤维素来源抑制物生物脱毒关键基因元器件库构建

5.1 引言

生物质转化为可发酵的糖的典型过程包括预处理和酶解。考虑到商业化规模生产纤维素生物燃料的可行性，稀酸水解方法是较为理想的预处理方法^[16]。但是，稀酸预处理过程不仅释放可发酵的糖，同时也产生强烈抑制菌株生长和产物发酵的抑制物^[32, 46, 268]。植物水解液一般含有60多种抑制化合物，其中，强烈抑制菌株生长和产物积累的呋喃类、弱酸类和酚类是主要的抑制物^[32, 42, 46]。目前，有3种方法能够解决生物炼制的抑制物问题，诸如降低预处理强度、抑制物脱毒和提高发酵菌株的抑制物耐受性^[46, 63, 71]。预处理旨在获得最大得率的可发酵的糖，因此通过降低预处理强度减少抑制物的策略显然不可行。抑制物脱毒是保证生物炼制过程正常进行的必需工段。在所有的抑制物脱毒方法中，生物脱毒过程因反应条件温和、抑制物去除彻底、可发酵糖损失和废水排放较少等优点而倍受生物炼制领域的青睐^[66, 70, 269]。但是，脱毒工段无疑增加了生物炼制过程的成本。因此，通过基因工程手段提高发酵菌株的耐受性是解决抑制物问题的理想方案。

目前，在植物水解液中驯化菌株和基于遗传工程理性改造菌株，均能提高发酵菌株的抑制物耐受性^[60, 89, 193]。驯化虽然能够得到抑制物耐受菌株，但是驯化菌株的遗传性状不稳定。目前，遗传工程改造途径是提高发酵菌株抑制物耐受性的重要手段。基于合成生物学，在生物炼制发酵菌株组合现有的抑制物代谢途径，是实现抑制物彻底脱毒的理想策略。因此，募集抑制物生物脱毒的关键基因，是合成生物学的首要任务。

本章节旨在构建木质纤维素来源抑制物生物脱毒的关键基因元器件库。基于抑制物转化实验、代谢途径、抑制物胁迫条件下的转录组和蛋白质组数据，本研究募集了木质纤维素来源抑制物生物脱毒的关键基因，构建了细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类和弱酸类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库。基于构建的抑制物生物脱毒的关键基因元器件库，本研究以运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis* ZM4) 为例推测了酚醛抑制物终极降解的代谢途径。因此，本研究将为生物炼制发酵菌株的抑制物抗逆改造提供合成生物学工具，这对提高生物炼制过程的效率和降低生物炼制过程的成本来说具有重要的意义。

5.2 抑制物生物脱毒关键基因元器件库构建的依据

基于抑制物转化实验、代谢途径、转录组和蛋白质组数据（主要依据转录组数据），本研究预期构建细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类和弱酸类生物脱毒关键基因元器件库。依据抑制物转化产物的类型，以 Brenda、MetaCyc 和 UM-BBD

等代谢数据库的代谢途径为主, 根据抑制物胁迫条件下的转录组和蛋白质组的基因或蛋白的显著差异表达量, 募集和筛选抑制物生物脱毒的关键基因, 最终构建抑制物生物脱毒的关键基因元器件库。

5.3 酚类抑制物生物脱毒关键基因元器件库

很有意思的是, 芳香化合物降解相关的基因通常以操纵元或基因簇的形式存在^[211]。而且, 降解基因附近毗邻转运蛋白编码基因和调控基因, 前者专司芳香化合物的吸收, 后者编码特异调控子。依据芳香化合物的降解途径^[211, 270], 本研究推测酚醛抑制物的分解代谢是降解基因、转运基因和调控基因共同表达的结果 (图 5.1)。通常, 微生物在无氧条件下将酚醛抑制物还原成相应的酚醇^[49, 246], 在好氧条件下将酚醛抑制物氧化成相应的酚酸^[197]。因此, 如图 5.1 所示, 优化降解基因、转运基因和调控基因的表达是酚醛抑制物转化的主要改造策略。本研究基于酚醛抑制物降解实验、代谢途径、转录组和蛋白质组数据, 构建了细菌、酵母和霉菌的酚类抑制物生物脱毒关键基因元器件库 (表 5.1)。

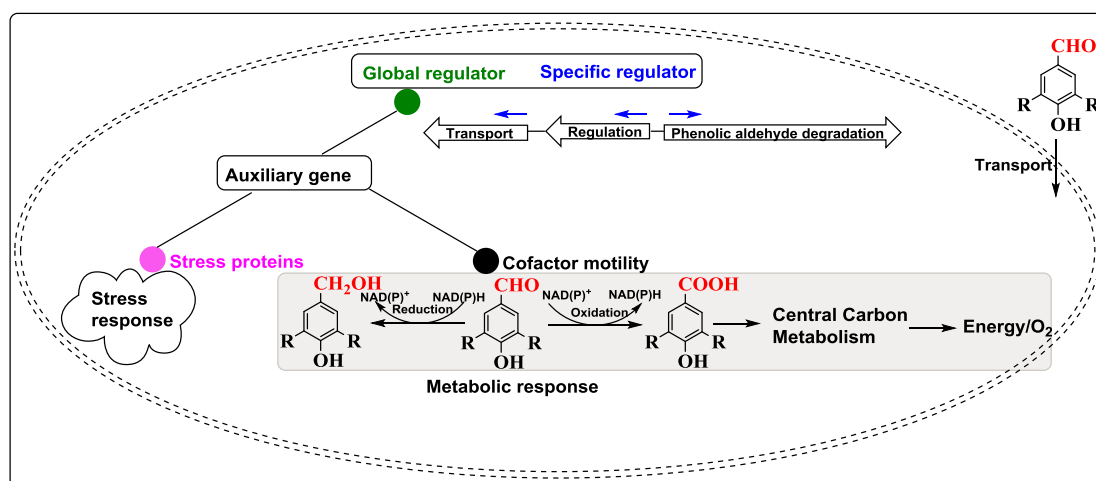


图 5.1 酚类抑制物生物脱毒的代谢工程^[270]

R 代表甲氧基。

Fig. 5.1 Metabolic engineering of biotransformation of phenolic inhibitors.

R indicates methoxyl group.

目前, 通过转录组和蛋白质组技术不断鉴定了一系列酚醛抑制物转化相关的氧化还原酶、转运蛋白和特异/全局调控系统。到目前为止, 基于转录组和蛋白质组的酚类抑制物研究主要涉及 4-羟基苯甲醛、丁香醛、香草醛、甲酚、阿魏酸、水杨酸、苯酚、儿茶酚、松柏醛, 其中对香草醛的研究较多。基于组学的研究发现, 系列醇脱氢酶、醛酮还原酶、氧化还原酶和短链脱氢酶是 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的关键酶^[246]。醛脱氢酶是 *P. putida* KT2440 氧化香草醛的关键酶^[254]。研究发现, 酰基醇脱氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和黄酶参与了酵母转化松柏醛的代谢过程^[271]。氧化还原和抗氧化是 *S.*

Cerevisiae NAN-27 转化和耐受香草醛的主要机制^[272]。本研究基于 RNA-Seq 技术发现,醇脱氢酶、醛还原酶和酰基醇脱氢酶是丝状脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 还原酚醛抑制物生成酚醇的关键酶,醛脱氢酶是 *A. resinae* ZN1 氧化酚醛抑制物产生酚酸的关键酶。酰基醇脱氢酶和酰基醇氧化酶参与了酚醇氧化为酚醛的催化反应,但是酚醇一经生成很快会氧化成相应的醛^[206]。目前,通过遗传工程,已证明了酰基醇脱氢酶还原酚醛抑制物产生酚醇^[273, 274],醛脱氢酶是酚醛抑制物氧化产酸的重要酶^[98, 99, 275, 276]。同时,酰基醇脱氢酶^[273, 274, 277-281]、醇脱氢酶^[204, 205]、酰基醇氧化酶^[104, 282-285]和香草醇氧化酶^[108, 110, 200, 286]也能够氧化酚醇。因此,基于转录组和蛋白质组数据,本研究发现氧化还原是酚醛抑制物生物脱毒的主要途径。其中,氧化途径是实现酚醛抑制物终极降解的关键节点,而且醛脱氢酶是催化酚醛抑制物产酸的关键酶。

转运是微生物转化和耐受酚醛抑制物的重要分子机制。ABC和MFS是微生物的主要转运蛋白^[162]。按照转运过程中能量来源的不同,可以将转运蛋白分为初级转运蛋白和次级转运蛋白。ATP水解、光子吸收、电子流、底物脱羧或甲基转移反应等生理过程释放的能量均可供初级转运蛋白发挥转运活性所利用^[287],诸如ABC转运蛋白;次级转运蛋白则依赖待转运物质在细胞膜内外浓度的差异所产生的电化学渗透势发挥转运活性,诸如MFS^[288, 289]。基于组学的研究发现,ABC、MFS、RND和SMR均参与了 *Z. mobilis* ZM4还原酚醛抑制物的代谢过程^[246]。ABC转运蛋白和芳香化合物孔蛋白是 *P. putida* KT2440氧化香草醛的关键转运蛋白^[254]。而且,ABC转运蛋白对短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis* ATCC367) 耐受阿魏酸来说也很重要^[290]。本研究通过RNA-Seq技术发现, MFS和ABC转运蛋白是 *A. resinae* ZN1转化酚醛抑制物的关键转运蛋白。由此可见,转运是酚醛抑制物转化的另一个重要机制。

研究发现,芳香化合物的降解调控发生在转录水平^[245, 291, 292]。由图5.1可以看出,酚醛抑制物转化过程涉及全局调控和特异调控。常见的参与酚类化合物转化的调控子有LysR家族调控子、IclR家族调控子、AraC/XylS家族调控子、GntR型调控子、TetR/MarR/Fnr型调控子、两组分调控子系统、XylR/NtrC型转录调控子,其中LysR家族调控子和AraC/XylS家族调控子是较为典型的激活调控子,IclR家族调控子是典型的阻遏子^[245]。基于转录组学发现,AraC、GntR、LysR和MarR调控子参与了 *Z. mobilis* ZM4还原酚醛抑制物的代谢过程^[246]。Pca调控元对 *P. putida* KT2440氧化香草醛来说很重要^[254]。分子伴侣和转运调控子对短乳杆菌 (*L. brevis* ATCC367) 耐受阿魏酸来说很重要^[290]。

总体来看,氧化还原、转运和调控是微生物转化和耐受酚类抑制物的关键机制。

表 5.1 酚类抑制物生物脱毒关键基因元器件库

Table 5.1 The device library of the key genes for the biodegradation of phenolic inhibitors

Enzyme	Gene	Strain
Phenolic aldehyde + NADH + H ⁺ → Phenolic alcohol + NAD ⁺	ZMO1696 ^Δ [This study]	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
Alcohol dehydrogenase	Arz_3624_T1; Arz_5091_T1; Arz_5193_T1; Arz_5226_T1; Arz_7415_T1; Arz_7706_T1; Arz_9103_T1; Arz_10198_T1; Arz_11469_T1; Arz_12676_T1; Arz_12772_T1; Arz_14914_T1; Arz_15626_T1; Arz_16562_T1; Arz_16876_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
	YCR102C	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
	YAL061W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Aldehyde reductase	Arz_1967_T1; Arz_4242_T1; Arz_7657_T1; Arz_10682_T1; Arz_14699_T1; Arz_16592_T1; Arz_18349_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Aldo/keto reductases	ZMO1984	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
Aryl-alcohol dehydrogenase	YDL243C	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
	YFL056C	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
	YJR155W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Arsenate reductase	Arz_2372_T1; Arz_7295_T1; Arz_9955_T1; Arz_10923_T1; Arz_14699_T1; Arz_17182_T1; Arz_17786_T1; Arz_17920_T1; Arz_18349_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
	YPR200C	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
Glutathione peroxidase	YBR244W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Glyoxylate reductase	YPL113C	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	YGR192C	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
Hexadecenal dehydrogenase	YMR110C	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}

Hydroxylase	ZMO1399	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
Hydroxydehydrogenase	YML131W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
NADPH-Glutathione reductase	YPL091W	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
NADPH- α -keto amide reductase	YDL124W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
NAD(P)-arabinose dehydrogenase	YMR041C; YBR149W	
Oxidoreductase	ZMO0157; ZMO0788; ZMO0833; ZMO1116 ^{Δ[This study]} ; ZMO1222; ZMO1254; ZMO1303; ZMO1885 ^{Δ[This study]}	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
Short-chain dehydrogenases/reductases	ZMO1576	
Xylose and arabinose reductase	YJR096W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Phenolic alcohol + NAD(P)H \rightarrow Phenolic aldehyde + NAD(P) ⁺		
Aryl-alcohol oxidase	Arz_11870_T1	
Aryl-alcohol dehydrogenase	Arz_2372_T1; Arz_7295_T1; Arz_9955_T1; Arz_10923_T1; Arz_14699_T1; Arz_17182_T1; Arz_17786_T1; Arz_17920_T1; Arz_18349_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Phenolic aldehyde + NAD(P) ⁺ \rightarrow Phenolic acid + NAD(P)H		
Aldehyde dehydrogenase	YPL061W; YOR374W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Aldehyde dehydrogenase	Arz_5039_T1; Arz_5693_T1; Arz_10189_T1; Arz_12532_T1; Arz_15425_T1; Arz_15746_T1; Arz_18373_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Acetyl-CoA synthetase	PP_4487	
Aldehyde dehydrogenase	PP_0545 ^{Δ[This study]} ; PP_2680 ^{Δ[This study]} ; PP_3151 ^{Δ[This study]} ; PP_5258	
Benzaldehyde dehydrogenase	PP_1948	<i>P. putida</i> KT2440 ^{[254]***}
Beta-ketoacyl CoA thiolase	PP_1377	
Bifunctional aldehyde dehydrogenase	PP_3270	
3-Carboxy- <i>cis</i> , <i>cis</i> -muconate cycloisomerase	PP_1379	
4-Carboxymuconolactone decarboxylase	PP_1381	

Coniferyl aldehyde dehydrogenase	PP_5120	
4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	PP_2554	
4-Hydroxybenzoate 3-monooxygenase	PP_3537	
3-Oxoadipate CoA-transferase	PP_3951; PP_3952	
3-Oxoadipate enol-lactonase	PP_1380	
Protocatechuate 3,4-dioxygenase	PP_4656	
Vanillin dehydrogenase	PP_3357 ^Δ [This study]	
Phenolic acid decarboxylation (Salicylic acid → ? + CO ₂)		
Phenolic acid decarboxylase (BsdA)	bsdB-D ^{ΔΔ} [294]	<i>B. subtilis</i> 168 ^{[294]*, ***}
Transport during phenolic aldehyde conversion		
ABC	ZMO0143; ZMO0571; ZMO0572; ZMO0799; ZMO0800; ZMO1029; ZMO1030	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
	Arz_198_T1; Arz_674_T1; Arz_2780_T1; Arz_4339_T1; Arz_8647_T1; Arz_9181_T1; Arz_9332_T1; Arz_16560_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Acetate permease	PP_1743	
Aromatic compound-specific porin	PP_3739	<i>P. putida</i> KT2440 ^{[254]***}
BenF-like porin	PP_1383	
Benzoate transport protein	PP_1376	
Concentrative nucleoside transporter family	Arz_15297_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Drug/metabolite transporter family	Arz_1357_T1; Arz_5017_T1; Arz_9935_T1	
MFS	ZMO0052; ZMO0494; ZMO0966; ZMO1288 ^Δ [246]; ZMO1457; ZMO1577; ZMO1856	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}

	Arz_118_T1; Arz_422_T1; Arz_1145_T1; Arz_1357_T1; Arz_2184_T1; Arz_2611_T1; Arz_3353_T1; Arz_3446_T1; Arz_3632_T1; Arz_4524_T1; Arz_5017_T1; Arz_5873_T1; Arz_6542_T1; Arz_6742_T1; Arz_6955_T1; Arz_7677_T1; Arz_7753_T1; Arz_8110_T1; Arz_8826_T1; Arz_8944_T1; Arz_9045_T1; Arz_9531_T1; Arz_9935_T1; Arz_9942_T1; Arz_9956_T1; Arz_10569_T1; Arz_10936_T1; Arz_11180_T1; Arz_11336_T1; Arz_12229_T1; Arz_12615_T1; Arz_12778_T1; Arz_12937_T1; Arz_13422_T1; Arz_13539_T1; Arz_13591_T1; Arz_13697_T1; Arz_15018_T1; Arz_15297_T1; Arz_15507_T1; Arz_16436_T1; Arz_16437_T1; Arz_16455_T1; Arz_16611_T1; Arz_16778_T1; Arz_17169_T1; Arz_18019_T1; Arz_18182_T1; Arz_18739_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
	PP_3740	<i>P. putida</i> KT2440 ^{[254]***}
RND	ZMO0282; ZMO0285; ZMO0798; ZMO0964; ZMO1525; ZMO1529	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
SMR	ZMO0108; ZMO0697	
"Full size"ABC transporter	YDR011W	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
Integral membrane protein	YGR213C	
Mitochondrial inner membrane protein	YPR125W	
H ⁺ antiporter regulated by Yap1p	YBR008C (FLR1) ^{ΔΔ[271]}	
Monocarboxylate permease	MCH2 ^{ΔΔ[296]}	<i>S. cerevisiae</i> BY4742 ^{[296]*}
Monovalent cation:proton antiporter-2	Arz_11706_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Multidrug resistance protein	Arz_5426_T1	
Nucleobase: cation symporter-2 family	Arz_12970_T1	
Phosphotransferase system (PTS)	Arz_1169_T1; Arz_2763_T1; Arz_9347_T1; Arz_11136_T1; Arz_13292_T1; Arz_17438_T1; Arz_17913_T1	
Proton-dependent oligopeptide transporter	Arz_9652_T1	

P-type ATPase superfamily	Arz_9283_T1; Arz_9440_T1; Arz_9767_T1	
Putative mediator of drug efflux	YHR048W	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
Putative substrate-H ⁺ antiporter	YML116W (ATR1) ^{ΔΔ[271]}	
Purine permease	Arz_14834_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[This study]**}
Sodium/proline symporter	Arz_9472_T1	
Vacuolar "full size" ABC transporter	YDR135C	Commercial baker's yeast ^[271]
Transport under phenolic acid stress		
ABC-type maltose transport system	LVIS-2254; LVIS-2255; LVIS-2256	
ABC-type Mn ²⁺ /Zn ²⁺ transport	LVIS-0472	
Acyl carrier protein	LVIS-2213; LVIS-0934	
Amino acid transporter	LVIS-0113; LVIS-1879; LVIS-2212	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^{[290]*}
D-xylose proton-symporter	LVIS-2025	
Na ⁺ /H ⁺ antiporter	LVIS-0199; LVIS-2141; LVIS-2211	
Permease	LVIS-1730; LVIS-1917	
PurR and YtrA for transport	opuAA; opuAB; opuAC; pbuX; yfiY; yhaQ; ytrB-F; yvrC; pyrP	<i>B. subtilis</i> 168 ^{[294]*, ***}
Zinc-dependent metalloprotease	LVIS-1455	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^{[290]*}
Regulation during phenolic aldehyde conversion		
APC/cyclosome regulation protein	SDS24	<i>S. cerevisiae</i> BY4742 ^{[296]*}
AraC family transcriptional regulator	ZMO1380	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
Catalase A	YDR256C	
Cytoplasmic glutaredoxin; thioltransferase	YDR513W	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Cytosolic catalase T	YGR088W	
GntR family transcriptional regulator	ZMO1854	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
Glutathione peroxidase	YKL026C	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Glutathione S-transferase	YLL060C	Commercial baker's yeast ^{[271]*}

Heat shock protein of HSP70 family	YAL005C	
LysR family transcriptional regulator	ZMO1336; ZMO1574; ZMO1733; ZMO1857	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[This study]*}
MarR family transcriptional regulator	ZMO0054	
Mitochondrial manganese superoxide dismutase	YHR008C	<i>S. cerevisiae</i> NAN-27 ^{[272]**}
Mitochondrial peroxiredoxin	YBL064C	
Pca regulon regulatory protein	PP_1375	<i>P. putida</i> KT2440 ^{[254]***}
Small heat shock protein (sHSP)	HSP42	<i>S. cerevisiae</i> BY4742 ^{[296]*}
Transcriptional activator	YML007W (YAP1)	Commercial baker's yeast ^{[271]*}
Regulation under phenolic acid stress		
BirA	bioI; bioA; bioB; bioD; bioF; bioW; lipA	
Catabolite control protein A CcpA	acoR; acaA; bglP; bglH; yxiE; citM; yflN; cstA; glpF; glpK; gntR; gntK; gntP; gntZ; levD-G; sacC; licA-C; licH; licR; rbsR; rbsK; rbsA-D	
Catabolite control protein A-not CcpA	mmsA (lolA)	
Ferric uptake regulation protein Fur	dhbB; dhbE	
Heat-inducible transcription repressor HrcA	groEL; groES; dnaJ; hrcA; dnaK; hrcA; groEL; groES	<i>B. subtilis</i> 168 ^{[294]*, ***}
HTH-type transcriptional regulator IolR	iolB-I; sacA; sacP; dhaS; cah; luxS; phoP; phoR; yacA; ydfN; ydfO; yerA; yezG; yfhJ; yfjD-E; yhaA; yhaS; yhdP; yhzC; ykcA; ykoM; ylbP; yocJ; yodB-D; yojF; yppQ; yqaR; yqkE; yrbE; yrhO; ysfE; ytdI; ytwI; yunF; yusZ; yvgN; htrB (yvtA); ywdA; ywfl; ywlF; ywnA-B; ywnF; ywsB-C; yxlA; yvaB; yybR	
Molecular chaperone (Small hsp)	LVIS-0112	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^{[290]*}
RNA polymerase sigma-37 factor (sigma B)	csbC; csbD; ctc; dps; gsiB; gspA; gtaB	
RNA polymerase sporulation sigma factor	katX; rsbR; ybyB; ycbP; ycdF	<i>B. subtilis</i> 168 ^{[294]*, ***}
RNA polymerase ECF -type sigma factor W	yceC-D; yceH; ydaD-E; ydaT; ydaP; ydbD; yfkM; yflH; yflT; ygxB;	

	yhdF; yhdN; yjgB-D; ykzA; yocK; yoxC	
Regulatory protein spx	yraA; ysnF; hemH; iolS; mecA; msrA; nfrA; ywcH; tpx; trxA; yhfK; yhfJ; spx (yjbD); yjbG-H; yrzG; yuaE; ywrO; yfiC; yfjR; yugJ; ywnF; yitW; pepF; yojG; yhcX; ytzB	
RNA polymerase sigma-30 factor (sigmaH)	ytxG-H; yvaA; yvgN; yvyD; ywsB; ywzA; yxaB; yxkO; yycD	
RNA polymerase sigma-37 factor (sigmaB)	ydaD-E; ydaG; ydaP; ysnF; yflT; gsiB; gtaB; ohrB; yfkM; gspA; yhdN; yceH; dps; csbD; ybyB; ywsB; yflG-H; yvgN; yvyD; ywzA; yxaB; katE	
Peroxide operon regulator PerR	ahpC; ahpF; katA; mrgA	
pyr and ytrABCDEF for transcription regulation	pyrR; ytrA	
RelA (CodY, TnrA, GlnR, sigma B/sigma H)	urea; ureB; ureC; ytzB; ytzE; yvyD	
Regulatory protein spx	gabD; ykuN; ykuO-P; nfrA; spx (yjbD); trxA-B; tpx; msrA; hemH; iolS; mecA; zwf; citZ; yfjR; yhfK; yhdQ; yjbG-I; yqiG; yraA; yrzF; yrzG; yuaE; yugJ; ywrO; yxeI-P	
Sulfur-limitation	cysK; yrrT; mtn; yrhA; yrhB; ytlI	
Transcriptional regulator	LVIS-0936	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^{[290]*}
Transcriptional regulator CtsR	clpC; clpE; clpP; ctsR; mcsA-B; lonA; radA; yacK	<i>B. subtilis</i> 168 ^{[294]*, ***}
Transcriptional regulator of PadC	padC; yveF-G	
Metabolism during phenolic aldehyde conversion		
Glycogen phosphorylase	GPH1 ^{ΔΔ[296]}	
Hexokinase isoenzyme 1	HXK1	
Resistance protein	SNG1 ^{ΔΔ[296]}	<i>S. cerevisiae</i> BY4742 ^{[296]*}
Trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase	TSL1	
Tetrameric phosphoglycerate mutase	GPM2	
Metabolism under phenolic acid stress		

Fructose biphosphate aldolase	NCgl2673 (Fba) $\Delta\Delta$ [293]	
Fructose 1,6-bisphosphatase	NCgl0976	
Fumarate hydratase	NCgl0967	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^[293] ***
Fumarylpyruvate hydrolase	NCgl2919	
Fumarase	LVIS-0714	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^[290] *
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	NCgl1526	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^[293] ***
Glycine cleavage system H protein	LVIS-1951	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^[290] *
Glutamate dehydrogenase (NADP1)	NCgl1999	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^[293] ***
GTP pyrophosphokinase relA	atpA-I	<i>B. subtilis</i> 168 ^[294] *, ***
Isocitrate lyase	NCgl2248	
Malate dehydrogenase	Ncgl2297	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^[293] ***
Malolactic enzyme	LVIS-2203	
NADPH: quinone reductase	LVIS-0076	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^[290] *
Peroxioredoxin	LVIS-0086	
Phosphoenolpyruvate carboxykinase GTP	NCgl2765	
Phosphoglycerate mutase	NCgl0390	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^[293] ***
2-Phosphoglycerate dehydratase	Cgl0935	
Phenolic acid decarboxylase	LVIS-0213	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^[290] *
PurR, PyrR, and RelA	purB-F; purH; purK-N; purQ; purS; pyrAA; pyrAB; pyrB-F; pyrK; prs	<i>B. subtilis</i> 168 ^[294] *, ***
Short-chain alcohol dehydrogenase	LVIS-0378	<i>L. brevis</i> ATCC367 ^[290] *
Transketolase	NCgl1512	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^[293] ***
yoaDCB for metabolism of carbohydrates	ackA; yoaB-D	
yqeGH-aroD-yqeIJKLM	aroD; yqeG-K; yqeL-M	<i>B. subtilis</i> 168 ^[294] *, ***

注: 1 个、2 个和 3 个星号分别表示 DNA 芯片、RNA-Seq 和蛋白质组, 1 个和 2 个三角符号分别代表过量表达或基因敲除证明了基因功能的基因。Note: One, two, and three asterisks indicate DNA Microarray, RNA-Seq, and proteomics. One and two triangles indicate the identified gene by overexpression or disruption. .

5.4 呋喃类抑制物生物脱毒关键基因元器件库

呋喃类抑制物是生物炼制领域的主要抑制物之一,包括糠醛和 5-羟甲基糠醛(HMF),其强烈抑制发酵菌株的菌体生长和产物积累。到目前为止,呋喃类对发酵菌株的抑制机理已研究得比较清楚^[46-47]。和酚醛抑制物一样,呋喃醛生物脱毒的常规途径也包括氧化产酸代谢途径和还原产醇代谢途径(图 5.2)。而且,抗氧化胁迫、转运和调控是呋喃醛转化的重要机制。基于转录组和蛋白质组数据,本研究构建了细菌、酵母和霉菌的呋喃类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库(表 5.2)。

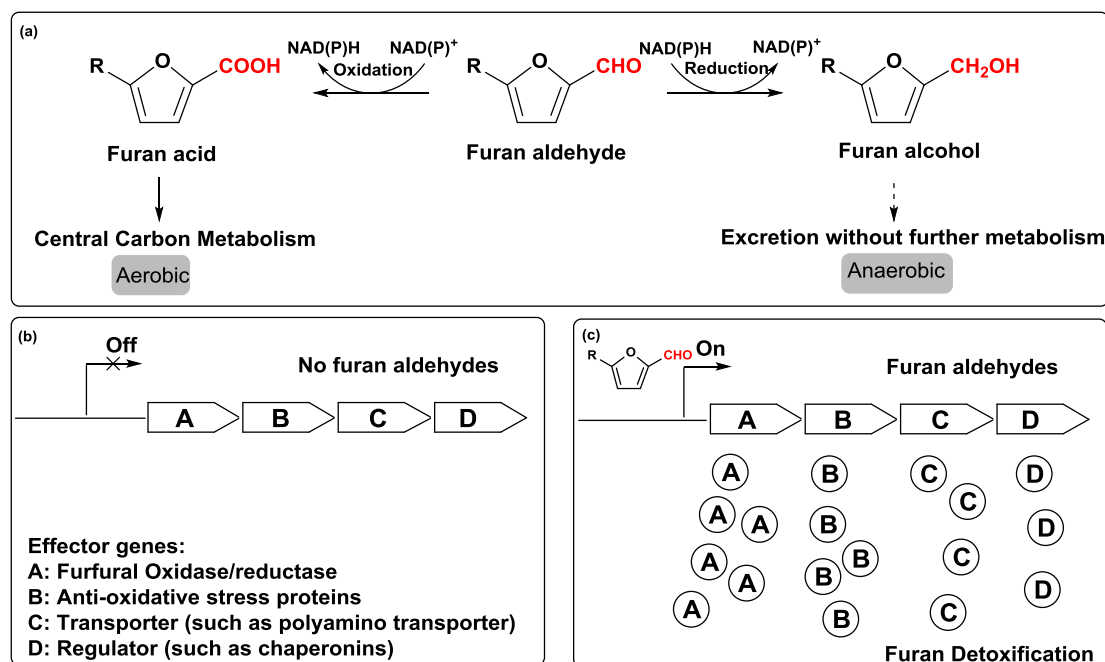


图 5.2 呋喃类抑制物生物脱毒系统的整合策略^[297]

糠醛响应启动子和多效应基因整合至染色体。糠醛存在时,操纵子未激活,效应物也不表达。呋喃醛激活启动子,进而启动效应基因表达。效应基因的表达旨在减轻呋喃醛的毒性。R 代表羟甲基。(a) 呋喃醛生物脱毒的常规途径;(b) 不添加呋喃醛,效应基因关闭;(c) 添加呋喃醛,效应基因表达。

Fig. 5.2 The integrated biotransformation system of furans. The integration of the furan aldehydes responsive promoter and multiple effector genes into the chromosome. The operon is inactive and effector genes are not expressed, and furan aldehydes activating the responsive promoter induce the expression of effector genes. The expression of effector genes contributes to the toxicity of furan aldehydes. R indicates hydroxymethyl group. (a) The common biotransformation pathway of furan aldehydes; (b) The expression of effector genes without furan aldehydes; (c) The expression of effector genes with furan aldehydes.

到目前为止,基于转录组和蛋白质组的糠醛和 5-羟甲基糠醛生物脱毒的机制研究主要涉及细菌、酵母和霉菌。研究发现,还原酶对 *Z. mobilis* ZM4 还原糠醛

来说很重要^[50]。腺苷酰硫酸还原酶、氢酶和黄酶参与了 *C. thermocellum* ATCC27405 转化糠醛的代谢过程^[298]。*T. pseudethanolicus* 39E 还原糠醛过程中主要涉及硫氧还蛋白、FAD/NAD⁺ 依赖型氧化还原酶、吡啶核苷硫酸还原酶和 Fe-S 蛋白等^[118]。醇脱氢酶是工业 *S. cerevisiae* 还原糠醛的关键酶^[299]。*S. cerevisiae* T2 还原糠醛主要涉及酰基醇脱氢酶、NADPH 依赖型甲基甘油醛还原酶、NADPH 依赖型氧化还原酶、硫还原蛋白过氧化物酶和甘油脱氢酶, 5-羟甲基糠醛转化则涉及醇脱氢酶和酰基醇脱氢酶^[300]。醇脱氢酶 (ADH7)、醛还原酶 (ARI1)、含黄素单核苷酸的 NADPH 依赖型的氧化还原酶 (OYE3)、3-甲基丁醇还原酶和 NADPH 依赖型甲基甘油醛还原酶 (GRE2) 和醛还原酶 (ALD4) 是 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 还原 5-羟甲基糠醛的关键酶^[126]。醇脱氢酶、醛/酮还原酶和醛还原酶是丝状脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 还原呋喃醛抑制物产生呋喃醇的关键酶, 醛脱氢酶和氧化酶是 *A. resinae* ZN1 氧化呋喃醛抑制物产生呋喃酸的关键酶^[68]。通过遗传工程, 已经证明了醇脱氢酶^[116, 135, 259, 301, 302]和 FuO/FFR 还原酶^[111, 117-120, 303]是还原呋喃醛的关键酶, 醛脱氢酶^[96, 97, 100, 138, 141, 192, 304]、酰基醇氧化酶^[76, 107, 305]和 5-羟甲基糠醛氧化酶^[121]具备氧化糠醛和 5-羟甲基糠醛生成相应的呋喃酸的催化活性。而且, 呋喃醛抑制物转化与还原力再生密切相关, 诸如 yqhD^[84]、pntAB 和 sthA^[83]、lpcA^[127]、ZWF1^[139]、ADH1^[72, 301]和 fdh^[248]。

热激蛋白 HSP 和 GrpE 分别是 *C. thermocellum* ATCC27405^[298]和 *C. beijerinckii* NCIMB8052^[308]转化糠醛的重要胁迫蛋白。硫氧还蛋白 (Trx1p 和 Trx2p)、热激蛋白 (Hsp12p) 和超氧化物歧化酶 (Sod1p) 是工业酿酒酵母还原糠醛的重要胁迫蛋白^[299]。超氧化物歧化酶 (Sod1p)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Gpx2p)、硫氧还蛋白 (Trx1p)、奎宁氧化还原酶 (Qor1p) 和过氧化氢酶 (CaT1p) 是 *P. stipitis* Y7-1 糠醛胁迫下的主要胁迫蛋白^[306]。亮氨酸拉链转录因子 (Yap1、Yap5 和 Yap6) 在 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 转化 5-羟甲基糠醛的过程中显著差异表达^[126]。遗传工程相继发现 Yap1^[37, 126]、groESL^[127]、SIZ1^[269]、GSH1/GLR1^[145]和 GCSGS^[144]等胁迫耐受相关蛋白对菌株耐受呋喃醛来说很重要。

膜转运蛋白对 *Z. mobilis* ZM4 转化和耐受糠醛来说很重要^[50]。转运是 *E. coli* LY180 耐受糠醛胁迫的重要机制^[83]。ABC 转运蛋白、外排泵和 MFS 转运蛋白是 *C. glutamicum* ATCC13032 转化和耐受糠醛的重要机制^[307]。ABC 转运蛋白和硫酸盐转运蛋白是 *C. thermocellum* ATCC27405 转化糠醛的重要转运蛋白^[298], 而 ABC 和 MATE 是 *C. beijerinckii* NCIMB8052 转化糠醛的重要转运蛋白^[308]。*T. pseudethanolicus* 39E 的糠醛转化涉及 P-型 ATPase、RND 外排泵、IV 型分泌系统和磷酸转移酶系统 (PTS) 等转运蛋白^[118]。ABC 转运蛋白 (Pdr1 和 Pdr3) 是 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 转化 5-羟甲基糠醛的主要转运蛋白^[126]。通过遗传改造发现, 多胺转运蛋白对微生物转化和耐受糠醛来说很重要^[124]。

就调控而言, ArsR 调控子分别参与了 *C. glutamicum* ATCC13032 耐受糠醛的生理过程^[307]。氧化还原反应的转录阻遏子 rex 是 *C. thermocellum* ATCC27405 转化糠醛的重要调控子^[298]。*C. beijerinckii* NCIMB8052 转化糠醛的过程中涉及很多调控子, 诸如 GroES、MerR、GntR、MarR 和 XRE 等^[308]。*T. pseudethanolicus* 39E 的糠醛转化涉及的调控蛋白有分子伴侣和 DeoR 调控子等^[118]。RPN4 是 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 刺激蛋白小体基因表达的转录因子^[126]。通过遗传工程, 已相继鉴定了 yafC^[112]、irrE^[113, 128]、Msn2^[146]、YqhC^[115]、rpn4^[126]、LysR^[309]、psfB/psfF^[75]和 σ^{70} ^[310]等操纵子与呋喃醛转化和耐受有关。

总体来看, 呋喃醛抑制物转化主要涉及氧化还原、抗氧化胁迫、转运和调控。

5.5 乙酸生物脱毒关键基因元器件库

乙酸是生物炼制过程的另一类抑制物, 其源于半纤维素的去乙酰化, 其严重抑制生物炼制菌株的生长和发酵。当菌体以乙酸为唯一碳源生长时, 乙酸利用过程包括乙酸吸收和乙酸代谢, 后者涉及乙酰辅酶 A 的激活和乙醛酸循环回补。乙酸激活的关键酶包括乙酸激酶 (Acetate kinase, ACK)、磷酸转乙酰基酶 (Phosphotransacetylase, PTA)、乙醛酸循环的异柠檬酸裂合酶 (Isocitrate lyase, ICL) 和苹果酸合酶 (Malate synthase, MS)。当然, 转运和调控也参与了乙酸代谢。乙酸代谢的工程改造, 主要涉及以下 2 个方面: (1) 通过改变细胞膜和细胞壁的组分阻止乙酸进入胞内; (2) 降低胞内乙酸的浓度: 一是通过 H^+ -ATPase 泵将乙酸泵出胞内或者通过氨基酸代谢的脱羧过程利用胞内的 H^+ , 二是通过中心碳代谢途径代谢醋酸根 (图 5.3)。本研究基于蛋白质组和转录组, 构建了细菌和酵母的乙酸抗逆基因元器件库 (表 5.3)。

表 5.2 呋喃类抑制物生物脱毒关键基因元器件库

Table 5.2 The device library of the key genes for the biodegradation of furan inhibitors

Enzyme	Gene	Strain
Furan aldehyde + NADH + H ⁺ → Furan alcohol + NAD ⁺		
Adenylylsulfate reductase	Cthe_2535	<i>C. thermocellum</i> ATCC27405 ^{[318]*, **}
Alcohol dehydrogenase	Arz_1653_T1; Arz_2180_T1; Arz_3236_T1; Arz_4549_T1; Arz_7751_T1; Arz_8436_T1; Arz_10735_T1; Arz_11558_T1; Arz_11749_T1; Arz_14225_T1; Arz_15626_T1; Arz_15907_T1;	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[68]****}
	Adh1p; Adh2p; Adh4p; Adh5p; Adh6p	Industrial strain <i>S. cerevisiae</i> ^{[299]***}
	Cbei_1464	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Aldo/keto reductase	Arz_1621_T1; Arz_3860_T1; Arz_7295_T1; Arz_8147_T1; Arz_10923_T1; Arz_13395_T1; Arz_14857_T1; Arz_14938_T1; Arz_16490_T1; Arz_17182_T1; Arz_17370_T1; Arz_17920_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[68]****}
	Teth39_1597 ^{Δ[118]}	<i>T. pseudethanolicus</i> 39E ^{[118]***}
Aldehyde reductase	Arz_13663_T1; Arz_137_T1; Arz_15150_T1; Arz_18349_T1; Arz_3141_T1; Arz_3976_T1; Arz_7271_T1; Arz_7657_T1; Arz_8367_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[68]****}
Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	Cbei_0068	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Catalase	cg0310	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^{[307]*}
DSBA oxidoreductase	Cbei_2058	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
FAD linked oxidase domain protein	Cbei_0312	
Glutathione peroxidase	Cbei_0389	
Hydrogenase, Fe-only	Cthe_0430	<i>C. thermocellum</i> ATCC27405 ^{[318]*, **}
NADH dehydrogenase (ubiquinone)	Cthe_0428	

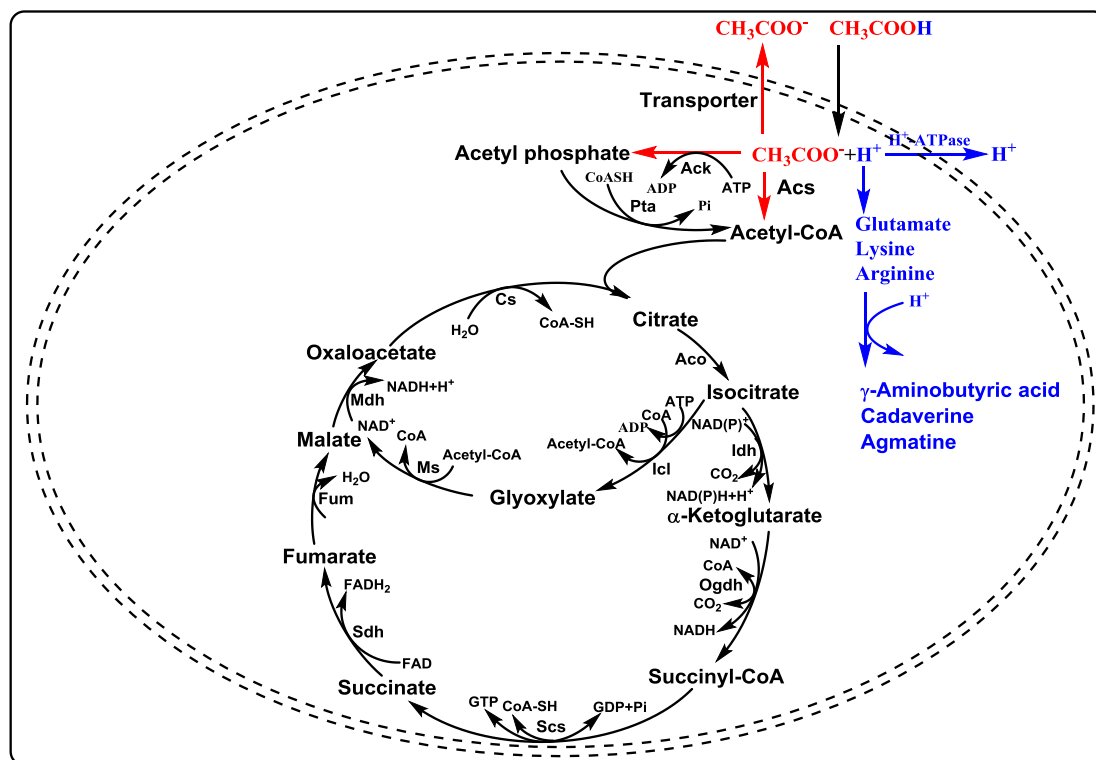
NADPH-dependent FMN reductase	Cbei_3354	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Nitroreductase	Cbei_3948	
Oxidoreductases	AAD4; AAD14; AAD16; GRE2; OYE3; PRX1; GCY1	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Redoxin domain protein	Cbei_2680	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Ribonucleoside-diphosphate reductase	Cbei_0194; Cbei_0195	
Ribonucleoside triphosphate reductase	ZMO1025 Cbei_2522	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[50]*}
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	Cbei_3904	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Predicted butanol dehydrogenase	Teth39_1597 (BdhA) ^{Δ[118]}	<i>T. pseudethanolicus</i> 39E ^{[118]***}
Sulfite reductase (hemoprotein)	cg3118	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^{[307]*}
Thioredoxin	cg3299	
Thioredoxin reductase	Cbei_2681	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^[308]
Furan alcohol + NAD(P)H → Furan aldehyde + NAD(P) ⁺		
Alcohol dehydrogenase	Arz_962_T1; Arz_3236_T1; Arz_6148_T1; Arz_9386_T1; Arz_9803_T1; Arz_12928_T1; Arz_13908_T1; Arz_15224_T1; Arz_17261_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[68]****}
Furan aldehyde + NAD(P) ⁺ → Furan acid + NAD(P)H		
Aldehyde dehydrogenase	Arz_7774_T1; Arz_11689_T1; Arz_15746_T1; Arz_18463_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[68]****}
Oxidase	Arz_6529_T1; Arz_14616; Arz_16317_T1	<i>A. resinae</i> ZN1 ^{[68]****}
Transport during furan aldehyde conversion		
ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport	cg2678	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^{[307]*}
ABC transporter related	Cbei_3693; Cbei_3300	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^[308]
Additional arsenite efflux pump or related permease	cg1661 ^{Δ[307]}	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^{[307]*}

Large conductance mechanosensitive channel	cg1001	
MATE efflux family protein	Cbei_2222	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Membrane protein	ZMO0055	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[50]*}
Multidrug resistance	ICT1; Hsf1; PDR5; PDR15; SNQ2; RSB1; TPO1; TPO4; YOR1	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^[302]
Oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase subunit	Cthe_2962; Cthe_2963	<i>C. thermocellum</i> ATCC27405 ^{[318]*, **}
Permease of the major facilitator superfamily	cg3399 ^{Δ[307]}	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^{[307]*}
Putative integral membrane transport protein	cg0501	
Putative galactoside ABC transporter	Cbei_3298	
Phosphotransferase system PTS	Cbei_2907	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Secretion protein HlyD family protein	Cbei_2923	
Sulfate ABC transporter	Cthe_2532; Cthe_2533; Cthe_2531	<i>C. thermocellum</i> ATCC27405 ^{[318]*}
Type II secretion system protein E	Cbei_4218	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*, **}
Transporter	Teth39_0231; Teth39_0278; Teth39_0282; Teth39_0333; Teth39_0334; Teth39_1033; Teth39_1765; Teth39_2232	<i>T. pseudethanolicus</i> 39E ^{[118]***}
	ampG; araF; argT; aroP; artI-J; artM; artP-Q; blc; btuF; cusA-B; cycA; cysA; dcuC; dctA; emrA; gabP; glpT; glpF; gltI-K; hisP; hisJ; hisM; kgtP; livH; lysP; manX; mdtM; mglA-C; mntH; mtlA; mtr; nagE; narK; narU; nikA-E; pstA-C; pstS; proV-W; proX; pitA; ssuA; ssuC; sbp; sufA; sufC-D; tauA-C; thiP-Q; tyrP; xylE; yahN	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}
Regulation during furan aldehyde conversion		
Bacterial ArsR regulatory protein	cg1032	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^{[307]*}
Chaperonin GroEL	Cbei_0329	
Chaperone protein DnaJ	Cbei_0831	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Co-chaperonin GroES	Cbei_0328	

DEAD/DEAH box helicase	ZMO1417	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[50]*}
DNA repair ATPase	ZMO1536	
DNA replication, recombination, modification, and repair	aidB; fliA; recG; mhB; yjiD	<i>E. coli</i> LY180 ^[83]
DNA repairing	DOI1; MAG1; Pdr1; Pdr3; RAD16; RPN4 ^{ΔΔ[126]} ; Yap1; Yap5; Yap6	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^{[126]*}
GntR regulatory protein	Cbei_1885	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
Heat shock protein Hsp	Cthe_3125	<i>C. thermocellum</i> ATCC27405 ^{[298]*}
Heat shock protein GrpE	Cbei_0829	
MarR family transcriptional regulator	Cbei_2838	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
MerR family transcriptional regulator	Cbei_3973	
Molecular chaperone DnaK	Cbei_0830	
Oxidative stress response	(ADH7; ALD4; ARI1; GRE2; OYE3; Pdr1; Pdr3; Yap1, 5, 6) ^{ΔΔ[126]}	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^{[126]*}
Proteins related to stress responses	Sod1p; Gpx2p; Trx1p; Qor1p; Cat1p	<i>P. stipitis</i> Y7-1 ^{[306]***}
Regulatory function	adiY; ArcA; ArgR; BirA; bolA; cadC; cbl; CR; crl; cspG; CysB; DcuR; evgS; fis; flhC; FlhDC; FliA; galS; hcaR; His; MetJ; metR; NagC; pdhR; PhoB; PhoP; phoU; PurR; RpoH; RpoN; RpoS; rssB; RutR; SF sbmC; sdiA; suhB	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}
Redox-sensing transcriptional repressor rex	Cthe_0422	<i>C. thermocellum</i> ATCC27405 ^{[318]*, **}
Stress response	Act1p; Hsp12p; Kar2p; Lsp1p; Rps3p; Sod1p; Ssb1p; Ssb2; Ssc1p; Ssz1p; Trx1p; Trx2p; Stm1p; Pkc1p; Rho1p; Pho2p; Zeo1p	Industrial strain <i>S. cerevisiae</i> ^{[299]***}
Transcriptional regulator	Teth39_0115; Teth39_0150; Teth39_0757; Teth39_1109; Teth39_1292; Teth39_1392; Teth39_1796	<i>T. pseudethanolicus</i> 39E ^{[118]***}
Two component transcriptional regulator	Cbei_2951	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 ^{[308]*}
XRE family transcriptional regulator	Cbei_3616	
Metabolism during furans aldehyde conversion		

Amino acid biosynthesis and metabolism	argA-D; argG; aroH; aroL; asnA; cysM; dadA; dadX; dapB; idcC; metA-C; metL; tyrB; ilvA; ilvC-D; ilvM; trpD-E; thrA-C; sdaB	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}
Amino acid metabolism	AGP1; LYS9; LEU9	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Carbohydrate metabolism	Teth39_0611; Teth39_0744; Teth39_1512	<i>T. pseudethanolicus</i> 39E ^{[118]***}
Carbon compound metabolism	acnB; aldB; amyA; dhaK-L; fucO; gcd; tauD; treF; xdhA-B; ygjG	
Central intermediary metabolism	aceA-B; aldA; acnA; cysC; cysH-I; cysN; cysQ; dcyD; dkgA; fumA-B; gabD; gloA; glpK; glpD; mqo; poxB; pykF; pyrH; ppa; sdhA-D; tktA	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}
EMP/PPP/TCA	Aco1p; Adh1p; Adh3p; Adh4p; Adh6p; Cit1p; Eno1p; Fum2p; Glk1p; Gnd1p; Gre2p; Idh1p; Idh2p; Mdh1p; Tal1p; Tdh1p; Pfkfb3p	<i>P. stipitis</i> Y7-1 ^{[306]***}
Energy metabolism	aceE-F; ackA; atpC; cyoA-E; fdoG-H; frmA; hypB-C	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}
Fatty acid and phospholipid metabolism	accB-C; fadI	
Glycerol biosynthesis	Gpd1p; Hor2p; Rhr2p	Industrial strain <i>S. cerevisiae</i> ^{[299]***}
Glyoxylate cycle	CIT2; ICL1; MLS1	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Nucleotide biosynthesis and metabolism	carA-B; guaB; pyrB; purD; purE-F; purH; purK; purN; pyrD-E; xdhC	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}
PPP	Gnd1p; Tal1p; TK11p	Industrial strain <i>S. cerevisiae</i> ^{[299]***}
TCA cycle	Aco1p; Aco2p; Cit1p; Idh1p; Mah1p	
Cytoplasmic transhydrogenase	SthA ^{Δ[83]}	
Proton-translocating transhydrogenase	PntAB ^{Δ[83]}	<i>E. coli</i> LY180 ^{[83]*}

注：1 个、2 个和 3 个星号分别表示 DNA 芯片、RNA-Seq、蛋白质组和 qRT-PCR。1 个和 2 个三角符号分别代表过量表达或基因敲除证明了基因功能的基因。Note: One, two, three, and four asterisks indicate DNA Microarray, RNA-Seq, proteomics, and qRT-PCR, respectively. One and two triangles indicate the identified gene by overexpression or disruption.

图5.3 乙酸代谢途径^[150, 311-312]

ACK: 乙酸激酶; ACS: 乙酰-CoA合酶; PTA: 磷酸转乙酰基酶。其他缩写酶名称见图1.5。

Fig. 5.3 The predicted acetic acid metabolism pathway.

ACK: Acetate kinase; ACS: Acetyl-CoA synthetase; PTA: Phosphotransacetylase. The other abbreviated enzymes were noted in Fig. 1.5.

细菌代谢乙酸的研究，目前主要集中在乙酰-CoA合成酶和乙酸激酶。还涉及葡萄糖脱氢酶、去乙酰基酶、转乙酰基酶、转运蛋白和调控子等方面的抗逆研究。基于组学发现，柠檬酸合酶 (ZMO1963) 和甘油醛3-磷酸脱氢酶 (ZMO1905) 对 *Z. mobilis* ZM4 (ACR) 耐受乙酸的生理过程来说很重要^[61]。醇脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶和转酮酶参与了 *E. coli* O157: H7 代谢乙酸的过程^[309]。而且，乙酸激酶、柠檬酸合酶、富马酸水合酶、甘油醛3-磷酸脱氢酶、异柠檬酸裂解酶、苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶等中心碳代谢相关的酶均参与了 *C. glutamicum* ATCC13032 代谢乙酸的过程^[314]。基于遗传工程发现，乙酸激酶^[152, 315]、乙酰-CoA合酶^[150, 152]、葡萄糖脱氢酶^[153]和苹果酸酶^[159]均参与了乙酸代谢。由此可见，乙酸代谢与中心碳代谢偶联。

基于组学发现，外膜蛋白是 *E. coli* O157: H7 代谢乙酸的重要蛋白^[313]。Bajwa 等人^[299]发现, *S. cerevisiae* T2 的氨基酸转运蛋白、高亲和性的无机磷酸转运蛋白、低亲和性葡萄糖转运蛋白、多胺转运蛋白和核黄素转运蛋白参与了乙酸代谢。基于遗传工程发现，高亲和性磷吸收 ABC 转运蛋白 (pstSCAB)^[316]和 Na^+/H^+ 反向转

运蛋白 (ZMO0119)^[60]参与了乙酸代谢。

基于组学发现, 酰基硫酸酶调控子和 AraC 型调控子参与了 *E. coli* O157: H7 代谢乙酸的过程^[313]。 *S. cerevisiae* T2 的转录因子 YAP1、NAD-依赖型脱乙酰酶 (HST2)、细胞壁合成相关的调控子 (SMI1)、调控蛋白 (MIG2)和转录调控蛋白 (ASH1) 也参与了乙酸代谢^[299]。基于遗传工程发现, 细胞质球状支架蛋白/磷酸化酶 (WHI2/PSR1)^[147]、细胞色素氧化酶伴侣 (COX20)^[166]、LuxR 型转录调控子 (RamA)^[156]、RNA 聚合酶 β 亚基/RNA 聚合酶胁迫响应因子 (rpoB/rpoS)^[150]、高乙酸耐受调控子 (HAA1)^[167]、RNA 伴侣 (hfq)^[60]、小 RNA 结合蛋白 (csrA)^[155]、SrtN 去乙酰酶/PatA 乙酰基转移酶 (Ms-SrtN/Ms-PatA)^[154]、TonB 依赖型受体 (TonB)^[61]、转录调控子 (RamB)^[157]、转录/转译机器 (RTC3/ANB1)^[165]等均与乙酸代谢有关。

由此可见, 乙酸代谢涉及中心碳代谢、转运和调控等多个方面。

表 5.3 乙酸生物脱毒关键基因元器件库

Table 5.3 The device library of the key genes for the the biotodetoxification of acetic acid.

Enzyme	Gene	Strain
Acetate metabolism		
Acetate kinase	ack	
Isocitrate lyase	aceA	<i>C. glutamicum</i>
Malate synthase	aceB	ATCC13032 ^{[314]*}
Phosphate acetyltransferase	pta	
Cytoplasmic glutaredoxin		
Ferro-O ₂ -oxidoreductase	FET3	<i>S. cerevisiae</i> ^{[161]*}
Glyoxylate reductase	GOR1	
Alcohol dehydrogenase II	ADH2	
Transport for acetate stress		
Ammonium transporter	MEP3	
High-affinity inorganic phosphate transporter	PHO84	
low-affinity glucose transporter	HXT1	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Polyamine transporter	TPO2	
Riboflavin transporter	MCH5	
Na ⁺ /H ⁺ antiporter	ZMO0119 ^{Δ[60]}	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[60]*}
Acetate transporter required for normal sporulation	ADY2	
Component of the translocase of the outer membrane	TOM5	
High-affinity Pi transporter and low-affinity manganese transporter	PHO84	<i>S. cerevisiae</i> ^{[161]*}
Na ⁺ /Pi cotransporter, active in early growth phase	PHO89	
Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase	YAT1	
Proline permease	PUT4	
Spore-specific water channel	AQY1	
Regulation for acetate stress		

AP-1-like transcriptional factor YAP1	YAP1	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Arylsulfatase regulator	asIB	<i>E. coli</i> O157: H7 ^{[313]*}
CheD, stimulates methylation of MCP proteins	ZMO0080	<i>Z. mobilis</i> ZM4 (ACR) ^{[61]*, ***}
Probable sigma ⁵⁴ modulation protein	yhbH	<i>E. coli</i> O157: H7 ^{[313]*}
Putative AraC-type regulatory protein	yhiW; yhiX	
Regulation protein of cell wall synthesis	SMI1	
Regulatory protein	MIG2	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Transcriptional regulatory protein	ASH1	
Copper metallochaperone	COX17	
Daughter cell-specific secreted protein	DSE2	
Major cell wall mannoprotein	TIP1	
Mannose-containing glycoprotein	CIS3	
Non-essential glycogen phosphorylase	GPH1	<i>S. cerevisiae</i> ^{[161]*}
Translation elongation factor eIF-5A	ANB1 ^{Δ[161]}	
Protein similar to cyclin-dependent kinase inhibitors	SPL2	
Protein involved in RNA metabolism	RTC3 ^{Δ[161]}	
Putative protein of unknown function	YIL057C	

注：1 个、2 个和 3 个星号分别表示 DNA 芯片、RNA-Seq 和蛋白质组。1 个三角符号代表通过基因敲除证明了基因功能的基因。

Note: One, two, and three asterisks indicate DNA Microarray, RNA-Seq, and proteomics, respectively. One triangle indicates the identified genes by disruption.

5.6 木质纤维素水解液抗逆关键基因元器件库

真实植物水解液抑制物成分复杂,而且,抑制物之间还存在协同抑制。因此,木质纤维素水解液抗逆机制的探讨比较复杂。目前,木质纤维素水解液抗逆的组学研究主要涉及*Z. mobilis* ZM4、*E. coli* K12、*C. thermocellum* ATCC27405和*S. cerevisiae* T2。表5.4是本研究基于组学构建的木质纤维素水解液抗逆基因元器件库。

基于转录组学数据分析,*Z. mobilis* ZM4 在芒草和柳枝稷水解液胁迫下的差异表达基因主要隶属外排泵 (ZMO1429、ZMO1430、ZMO1431 和 ZMO1432)、谷胱甘肽相关蛋白 (ZMO0759、ZMO0760、ZMO1722、ZMO1723、ZMO1874 和 ZMO1875)、膜蛋白 (ZMO0101、ZMO0192、ZMO0846、ZMO0975、ZMO1391、ZMO1490、ZMO1590 和 ZMO1715) 和调控蛋白 (ZMO0100、ZMO0774 和 ZMO1404)^[29]。过量表达 HxIR 调控蛋白编码 (ZMO0100)、LysR 调控蛋白 (ZMO0774)、醇脱氢酶 (ZMO1722) 和推演蛋白 (ZMO1875) 的编码基因发现,ZMO1875 显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 发酵纤维素乙醇的能力。在氨纤维爆破预处理的玉米秸秆水解液,*E. coli* K12 的中心碳代谢、转运、调控、乙酸胁迫、乙醇胁迫和渗透压胁迫等生理过程均有显著响应^[317]。*C. thermocellum* ATCC 27405

在杨树或柳枝稷水解液胁迫下的共同特点是转运蛋白和调控蛋白的显著响应^[318, 319]，只是转运蛋白和调控蛋白的类型不同。在硬木水解液胁迫下，除了氧化磷酸化、转录调控和胁迫响应外，*S. cerevisiae* T2 还涉及酵解和磷酸戊糖途径、细胞周期、蛋白质合成等诸多方面^[300]。

通过遗传工程，N-乙基马来酰亚胺还原酶 (*nemA*) 编码基因的过量表达提高了 *E. coli* LY180 发酵纤维素乙醇的能力^[168]，肌动蛋白 (*Vrp1*)、周期素依赖型激酶 (*Pho85*)、V-ATPase (*Vma8*)、mRNA 剪接蛋白 (*Bud31*)、吡咯磷酸合成酶 (*PRS3*)、RNA 聚合酶 II (*RPB4*)、胆固醇异构酶 (*Erg2*)、THO/TREX 复合体 (*Hpr1*)、RAVE 复合体 (*Rav1*) 和未知功能蛋白 (*Ygl024w*) 编码基因的表达提高了 *S. cerevisiae* BY4741 发酵水解液的能力^[165, 166]。转录因子 SFP1 也提高了 *S. cerevisiae* YC1 的乙醇发酵能力^[147]。

由此可见，与单一抑制物胁迫的转录组结果相比较，成分复杂的水解液胁迫条件的转录组涉及更多生理过程的响应。但是整体来看，转运和调控是不同木质纤维素水解液胁迫的共同响应机制。

5.7 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径

由酚类、呋喃类和弱酸类抑制物生物脱毒关键基因元器件库可以看出，抑制物生物脱毒过程涉及菌体生理的全局响应，诸如氧化还原、转运、调控和氧化胁迫等。其中，氧化还原是醛类抑制物转化的重要分子机制。酚醛抑制物强烈抑制糖化过程的纤维素酶酶活，同时也抑制发酵过程的菌体生长和乙醇发酵。因此，实现酚醛抑制物的终极降解是理想的完全脱毒策略。*Z. mobilis* ZM4 自身只能将高毒性的酚醛抑制物还原为低毒的酚醇，而且该酚醛抑制物还原途径确实提高了 *Z. mobilis* ZM4 发酵纤维素乙醇的能力。但是，酚醇因为破坏菌体细胞膜的完整性而仍然间接影响 *Z. mobilis* ZM4 发酵纤维素乙醇。因此，酚醛抑制物氧化产酸途径是实现终极降解的前提。基于 Prather 和 Martin^[321]组合现有途径的合成代谢途径策略，本研究推测了 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径(图 5.5; 表 5.5)。

表 5.4 木质纤维素水解液抗逆关键基因元器件库

Table 5.4 The device library of the key genes for lignocellulose hydrolysate tolerance

Enzyme	Gene	Strain
Oxidoreductase under hydrolysate stress		
Class III alcohol dehydrogenase	ZMO1722 ^{Δ[30]}	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[30]****}
Aldehyde Dehydrogenase	Cthe_2238	
Dihydroorotate dehydrogenase	Cthe_0948	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}
Iron-containing alcohol dehydrogenase	Cthe_0101; Cthe_0423	
Transport under hydrolysate stress		
ABC transporter	Cthe_1018; Cthe_1019; Cthe_1605; Cthe_1821; Cthe_2573	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}
Efflux	ZMO1429; ZMO1430; ZMO1431; ZMO1432	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[30]****}
Major facilitator superfamily	Cthe_1202	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}
Membrane	ZMO0101; ZMO0192; ZMO0846; ZMO0975; ZMO1391; ZMO1490; ZMO1590; ZMO1715	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[30]****}
	CSG2; EMC30; ERG2; ERG4; ERG5; SUR1; TSC3	<i>S. cerevisiae</i> ^{[30]****}
Phosphate ABC transporter	Cthe_1603; Cthe_1604	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[318]*, **}
Sulfate ABC transporter	Cthe_2531; Cthe_2532	
Transporter	aaeAB; acrAB; arsRBC; bcr; cirA; cusABCF; emrAB; fepA; fsr; gntU; guaB; mdtEFG; mdtM; mdtlj; mtlA; srlA-B; srlE; sugE; yjiG-H	<i>E. coli</i> K-12 ^{[317]*}
Regulation under hydrolysate stress		
HxlR family transcriptional regulator	ZMO0100 ^{Δ[30]}	
LysR family transcriptional regulator	ZMO0774	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[30]****}
RNA polymerase, sigma-24 subunit	ZMO1404	

Regulator	AFT2; ARG82; DAL81; GAL11; GTR2; HT21; NBP2; REF2; REG1; RPN4; STB5; YAP1	<i>S. cerevisiae</i> ^{[30]****}
Regulation	fliC-D; fliZ; marA; marR	<i>E. coli</i> K-12 ^{[317]*}
Redox-sensing transcriptional repressor rex	Cthe_0422	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[318]**}
Sporulation transcription factor Spo0A	Cthe_3087	
AbrB family transcriptional regulator	Cthe_2100	
Accessory gene regulator B	Cthe_1310	
Cell envelope-related transcriptional attenuator	Cthe_3102	
Regulation of transcription	CLN3; CDC39; EGD1; SUB1; MPT5	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Stress response under hydrolysate stress		
Stress response	DDR2	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Acetate stress	gadXW; hdeAB; metA; osmY; pfkB; slp	<i>E. coli</i> K-12 ^{[317]*}
Ethanol stress	srlABDE; ibpAB; pspABCDE	
Osmotic stress	betAB; otsAB; prop; yhcN	
Glutathione related	ZMO0759; ZMO0760 ^{Δ[30]} ; ZMO1723; ZMO1874; ZMO1875 ^{Δ[30]}	<i>Z. mobilis</i> ZM4 ^{[30]****}
Metabolism under hydrolysate stress		
Acetate kinase	Cthe_1028	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}
Alpha-ribazole phosphatase	Cthe_3153	
Amino acid metabolism	alaA; amtB; ansB; argC; asnAB; aspA; avtA; cysCND; cysPUWAM; cysHIJ; cysG; gdhA; glnA; glnK; gltB; ilvE; metQIN; metFLB; metC; metRE; serAC; trpEDCBA	<i>E. coli</i> K-12 ^{[317]*}
ATP synthase	Cthe_2602; Cthe_2603; Cthe_2604; Cthe_2605; Cthe_2606; Cthe_2607; Cthe_2608; Cthe_2609	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}

Central carbon metabolism	argA-D; argI; argF; artJ; citC-F; edd; frmA; frmR; gadB-C; gntK; hcp; pspD; srlD; yhjX	<i>E. coli</i> K-12 ^{[317]*}
ech hydrogenase, subunit EchD	Cthe_3021	
Enolase Non-oxidative PPP pathway	Cthe_0143	
4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur	Cthe_3019	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}
Formate acetyltransferase	Cthe_0505	
Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	Cthe_0349	
Glycolysis and pentose phosphate pathway	ADH1; ADH2; ADH5; ALD3; CDC19; FBA1; GND1; PFK2; PGI1; PDC1; TPI1	<i>S. cerevisiae</i> T2 ^{[300]*}
Hydrogenase accessory protein HypB	Cthe_3017; Cthe_3018; Cthe_3013	
L-lactate dehydrogenase	Cthe_1053	
[NiFe] hydrogenase maturation protein HypF	Cthe_3016	
NADH-ubiquinone oxidoreductase	Cthe_3020	
NADH/Ubiquinone/plastoquinone ATP synthase	Cthe_3024	
Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase	Cthe_2796	
Phosphate acetyltransferase	Cthe_1029	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405 ^{[319]**}
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	Cthe_2874	
Phosphofructokinase	Cthe_0347	
Phosphoglycerate mutase	Cthe_2449	
Pyruvate/ketoisovalerate oxidoreductase	Cthe_2794	
Pyruvate, phosphate dikinase	Cthe_1308	
Redox-sensing transcriptional repressor rex	Cthe_0422	

注：1 个、2 个和 3 个星号分别表示 DNA 芯片、RNA-Seq、蛋白质组和 DNA 条形码。1 个三角符号分别代表过量表达证明了基因功能。Note: One, two, three, and four asterisks indicate DNA Microarray, RNA-Seq, proteomics, and DNA barcodes, respectively. One triangle indicates the identified gene by overexpression.

酚醛抑制物氧化产酸途径是实现 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的第一步反应 (图 5.5)。而且, 酚醛抑制物只有进入丙酮酸代谢才能实现所谓的终极降解。其中, 原儿茶酸和 3-*O*-甲基没食子酸是 4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛实现终极降解的前体产物。推测的 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径中, 醛脱氢酶 (包括特异的香草醛脱氢酶和 4-羟基苯甲醛脱氢酶)、4-羟基苯甲酸-3-单加氧酶、香草酸 *O*-去甲基化酶 (厌氧)、香草酸单加氧酶 (好氧)、原儿茶酸 4,5-双加氧酶、四氢叶酸依赖型 *O*-去甲基化酶、2-羟基-4-羧基粘糠酸半醛脱氢酶、2-吡喃酮-4,6-二羧酸水解酶、草酰甲基反丁烯二酸互变异构酶和水合酶、4-羟基-4-甲基-2-酮戊二酸醛缩酶均源于生物降解菌株 *Sphingobium* sp. SYK-6^[322] 和代谢底盘菌株 *P. putida* KT2440^[323] (表 5.5)。

到目前为止, 本研究仅通过 *P. putida* KT2440 来源的醛脱氢酶 (PP_2680) 实现了酚醛抑制物转化与纤维素乙醇发酵的整合生物加工。但是, PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的表达并未实现酚醛抑制物的氧化产酸。因此, 募集和筛选酚醛抑制物氧化产酸的基因是实现酚醛抑制物终极降解的首要任务。

5.8 本章小结

主要基于转录组数据, 本章节构建了细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类和弱酸类生物脱毒的关键基因元器件库。本章的主要研究结论如下:

(1) 主要基于转录组数据, 本研究构建了细菌 (*B. subtilis*、*C. beijerinckii*、*C. glutamicum*、*E. coli*、*L. brevis*、*P. putida*、*T. pseudethanolicus* 和 *Z. mobilis*)、酵母 (*Pichia stipites* 和 *S. cerevisiae*) 和霉菌 (*A. resinae*) 的酚类、呋喃类、弱酸类生物脱毒的关键基因元器件库。研究发现, 酚类抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及氧化还原、转运和调控, 呋喃类抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及氧化还原、氧化胁迫、转运和调控, 乙酸生物脱毒的关键基因主要涉及中心碳代谢、转运和调控, 成分复杂的木质纤维素水解液体系则涉及多方面的生物学过程, 但是转运和调控是不同种类木质纤维素水解液胁迫的共同抗逆机制。

(2) 基于构建的酚类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库, 本研究推测了 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径。研究发现, 酚醛抑制物氧化产酸途径是 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的关键代谢节点。

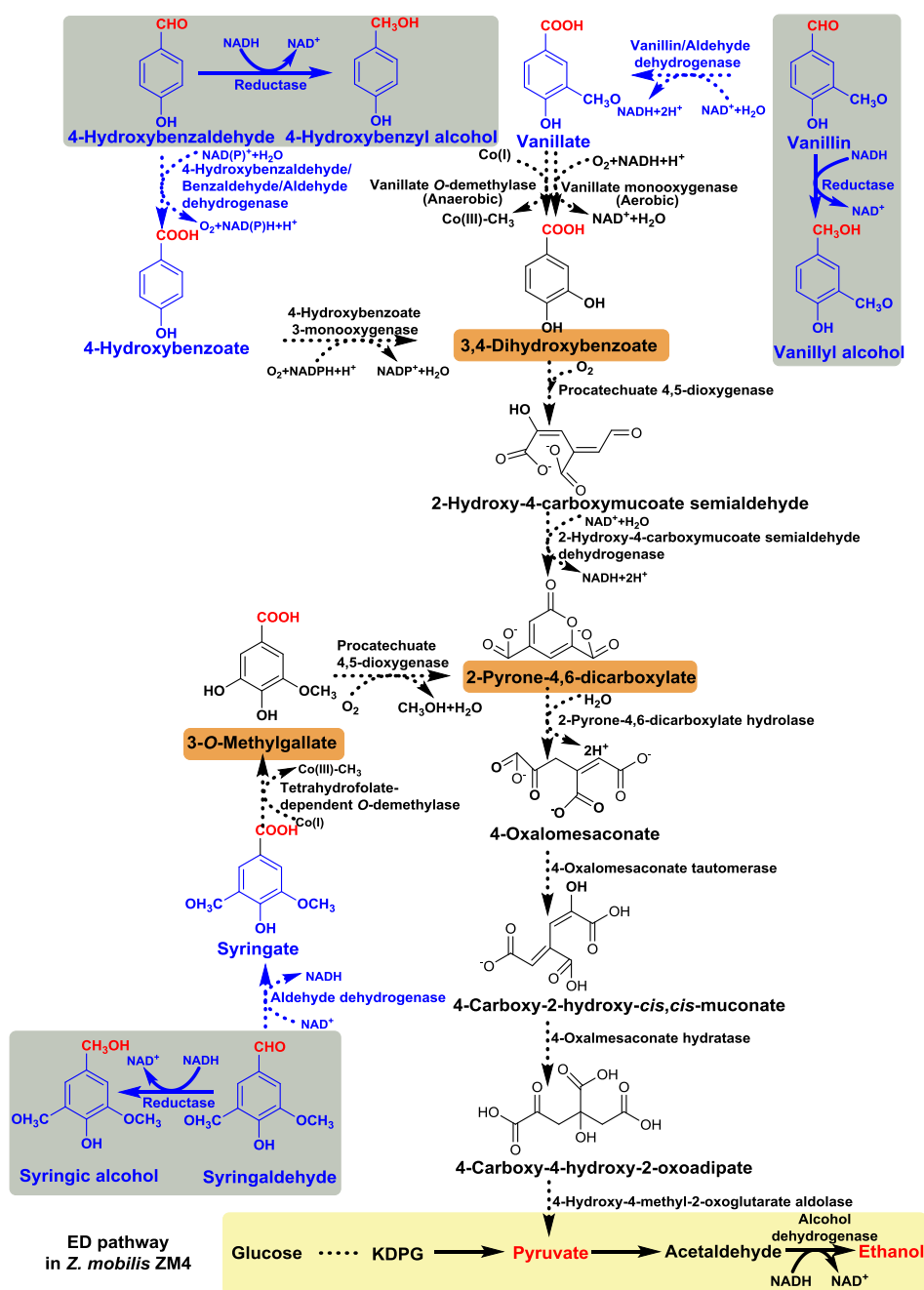


图 5.5 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物

实心箭头和灰色阴影表示 *Z. mobilis* ZM4 存在的代谢途径, 虚线箭头表示 *Z. mobilis* ZM4 缺失的代谢途径, 虚线直线表示省略的途径, 黄色阴影表示 *Z. mobilis* ZM4 的 ED 产能途径。

Reductase 指图 3.7 中酚醛转化的关键还原酶。

Fig. 5.5 The predicted ultimate degradation pathway of phenolic aldehydes for *Z. mobilis* ZM4. Plain arrow and grey shadow area indicate the existing metabolic pathway in *Z. mobilis* ZM4; dashed arrow indicates the nonexistent pathway in *Z. mobilis* ZM4; dashed line and yellow shadow area indicate the omitted pathway and ED pathway in *Z. mobilis* ZM4, respectively.

Reductases refer to the key enzyme for phenolic aldehydes reduction in Fig. 3.7.

表 5.5 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的关键酶

Table 5.5 The predicted key enzymes for the ultimate degradation of phenolic aldehydes in *Z. mobilis* ZM4.

Enzyme	Target gene	Source
Benzaldehyde dehydrogenase	PP_1948	<i>P. putida</i> KT2440
Vanillin dehydrogenase	PP_3357	<i>P. putida</i> KT2440
Aldehyde dehydrogenase	PP_0545, PP_2487, PP_2585, PP_2589, PP_2680, PP_2694, PP_3151, PP_3463, PP_3646, PP_3948, PP_5258, PP_5278, PP_5372, SLG_RS03570, SLG_RS03750, SLG_RS03840, SLG_RS04620, SLG_RS04675, SLG_RS05595, SLG_RS05875, SLG_RS10085, SLG_RS13405, SLG_RS13470, SLG_RS13805, SLG_RS13810, SLG_RS14020, SLG_RS18880	<i>P. putida</i> KT2440 <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
4-Hydroxybenzoate 3-monooxygenase	PP_3537, SLB_RS08320	<i>P. putida</i> KT2440
Vanillate monooxygenase (aerobic)	PP_1925, PP_2772, PP_3529, PP_3573, ZMO1170, SLG_RS01875, SLG_RS05520, SLG_RS17230	<i>P. putida</i> KT2440 <i>Z. mobilis</i> ZM4
Vanillate <i>O</i> -demethylase (anaerobic)	AB006079	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
Protocatechuate 4,5-dioxygenase	PP_2518, SLG_RS00865, SLG_RS01635, SLG_RS06125, SLG_RS18585	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
2-Hydroxy-4-carboxymuocate semialdehyde dehydrogenase	AB035122, M34835	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
PDC hydrolase	SLG_RS06155, SLG_RS15495	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
4-Oxalomesaconate tautomerase	SLG_RS05680, SLG_RS06150	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
4-Oxalmesaconate hydratase	SLG_RS06130	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
4-Hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	SLG_RS09400	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
Tetrahydrofolate-dependent <i>O</i> -demethylase	AB110975, AB186750	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
Protocatechuate 4,5-dioxygenase	PP_2518, SLG_RS00865, SLG_RS01635, SLG_RS06125, SLG_RS18585	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6

主要结论和研究展望

主要结论

本研究以酚醛抑制物的生物脱毒为研究对象,通过 RNA-Seq 技术和 DNA 芯片技术解析了专司生物脱毒的丝状真菌 *A. resinae* ZN1 和产乙醇细菌 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的分子机制;基于遗传工程,通过强化 *Z. mobilis* ZM4 自身具备的酚醛抑制物还原代谢途径和重构 *Z. mobilis* ZM4 自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径,实现了 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物和发酵纤维素乙醇的整合生物加工;主要基于转录组数据,构建了细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类和弱酸类生物脱毒的关键基因元器件库。主要研究结论如下:

(1) 基于 RNA-Seq 技术,本研究发现氧化还原和转运是 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的主要分子机制。醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶和醛还原酶是 *A. resinae* ZN1 还原酚醛抑制物产醇代谢途径的关键酶,醛脱氢酶是 *A. resinae* ZN1 氧化酚醛抑制物产酸代谢途径的关键酶。ABC 转运蛋白和 MFS 转运蛋白是 *A. resinae* ZN1 转化酚醛抑制物的主要转运蛋白。因此,本研究为生物炼制菌株的理性改造提供了合成生物学工具。

(2) *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物产生相应的酚醇,而且不能继续转化酚醇。基于 DNA 芯片技术,还原、转运和调控是 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物产生酚醇的主要分子机制。通过基因组图谱定位发现,272 个差异上调表达基因和 560 个差异下调表达基因分别涉及 36 个基因簇和 63 个基因簇。本研究鉴定了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的关键酶,推测了 *Z. mobilis* ZM4 还原酚醛抑制物的代谢途径。*Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物机理的阐明,将有利于 *Z. mobilis* ZM4 耐受酚醛抑制物的理性改造。

(3) 通过遗传工程,本研究尝试强化 *Z. mobilis* ZM4 自身具备的酚醛抑制物还原代谢途径和重构 *Z. mobilis* ZM4 自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径,以此提高 *Z. mobilis* ZM4 转化酚醛抑制物的能力。研究发现, *P. putida* KT2440 来源的 NAD⁺依赖型醛脱氢酶 (PP_2680) 显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力。*Z. mobilis* ZM4::pHW20a-PP_2680 重组菌株在 15% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液发酵 24 h 的乙醇浓度、乙醇产率和乙醇得率分别较对照菌株提高了 63.7%、100.0% 和 106.3%。PP_2680 蛋白在离体条件下仅具备氧化能力,其依赖 NAD(P)⁺ 氧化 4-羟基苯甲醛、香草醛、糠醛和 5-羟甲基糠醛生成 4-羟基苯甲酸、香草酸、糠酸和 2,5-呋喃二甲醛。但是,PP_2680 虽然提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力,但是并未氧化酚醛和呋喃醛产生相应的酸。共表达 PP_2680 (NAD⁺-ALDH) 和 ZMO1696 (NADH-ADH) 发现,辅因子回补是 PP_2680 提高 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇能力的重要原因。一个意外的发现是,PP_2680 在 *Z. mobilis* ZM4 的异源表达提高了醇脱氢酶 (ZMO1236 和 ZMO1596) 和 H⁺ 转运 ATPase (ZMO0667 和 ZMO0671) 编码基因的表达。因此,本研究推测 PP_2680 因为提高了 *Z. mobilis* ZM4 的

生长实现了醛类抑制物转化和纤维素乙醇发酵的整合生物加工。但是, PP_2680 的催化机理仍然不清楚。

(4) 主要基于转录组数据, 本研究构建了细菌 (*B. subtilis*、*C. beijerinckii*、*C. glutamicum*、*E. coli*、*L. brevis*、*P. putida*、*T. pseudethanolicus* 和 *Z. mobilis*)、酵母 (*Pichia stipites* 和 *S. cerevisiae*) 和霉菌 (*A. resinae*) 的酚类、呋喃类、弱酸类生物脱毒的关键基因元器件库。研究发现, 酚醛抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及氧化还原、转运和调控; 呋喃类抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及氧化还原、氧化胁迫、转运和调控; 弱酸类抑制物生物脱毒的关键基因主要涉及中心碳代谢、转运和调控; 成分复杂的木质纤维素水解液体系则涉及多方面的生物学过程, 转运和调控是不同种类木质纤维素水解液共同抗逆机制。同时, 本研究推测了 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径。木质纤维素来源抑制物生物脱毒的关键基因元器件库的构建, 将为生物炼制菌株的抑制物代谢工程改造提供合成生物学工具。同时, *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物的代谢途径推测, 将为生物炼制领域其他发酵菌株的抑制物物理性工程改造提供方法学依据。

研究展望

(1) 通常, 提高抑制物转化关键基因的表达水平即可提高菌株耐受抑制物的能力。本研究仅考察了酚醛抑制物胁迫下显著差异上调表达的基因, 而显著差异下调表达的基因和基因簇也是酚醛抑制物抗逆菌株理性改造的宝贵资源。

(2) 本研究初步的实验设计是在 *Z. mobilis* ZM4 重构其自身缺失的酚醛抑制物氧化产酸途径。PP_2680 的表达虽然显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力, 但是其仅在离体条件下氧化醛类抑制物产酸。因此, 后续研究将为 *Z. mobilis* ZM4 终极降解酚醛抑制物产酸代谢途径募集基因。

(3) 通过同源重组方法, 本研究筛将不含启动子的 PP_2680 基因整合至 *Z. mobilis* ZM4 的染色体, 仅实现了 PP_2680 较低水平的本底表达。因此, 后续研究将继续筛选含启动子 PP_2680 基因的 *Z. mobilis* ZM4 整合子。

(4) 木质纤维素水解液成分复杂, 抑制物问题是酚类、呋喃类和弱酸类等多种抑制物聚集后产生的抑制效果。本研究仅探讨了 *Z. mobilis* ZM4 耐受酚醛抑制物的机理, 后续研究很有必要将此方法学模板应用至生物炼制领域其他发酵菌株的抑制物抗逆研究。

创新点

(1) 基于RNA-Seq技术和DNA芯片技术, 本研究解析了专司生物脱毒的丝状真菌 *A. resinae* ZN1和产乙醇细菌 *Z. mobilis* ZM4转化酚醛抑制物的生物学过程, 鉴定了酚醛抑制物转化的关键酶, 推测了酚醛抑制物转化的代谢途径。本研究清楚了解了2株生物炼制菌株代谢酚醛抑制物的分子机制, 使酚醛抑制物抗逆的 *Z. mobilis* ZM4代谢工程改造更加有的放矢, 也为生物炼制领域其他发酵菌株的抑制物工程改造提供了合成生物学工具和建立了方法学平台。

(2) 基于遗传工程, 通过强化 *Z. mobilis* ZM4 自身具备的酚醛抑制物还原代谢途径和重构 *Z. mobilis* ZM4 自身缺失的酚醛抑制物氧化代谢途径, 发现 *P. putida* KT2440 来源的 NAD⁺依赖型醛脱氢酶 (PP_2680) 提高了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的能力, 实现了 *Z. mobilis* ZM4 转化醛类抑制物和发酵纤维素乙醇的整合生物加工。

(3) 本研究主要基于转录组数据募集了细菌、酵母和霉菌的酚类、呋喃类、弱酸类抑制物生物脱毒的关键基因元器件库, 为生物炼制领域木质纤维素来源抑制物抗逆菌株的理性改造提供了合成生物学工具。

参考文献

- [1] Kim TH, Kim TH. Overview of technical barriers and implementation of cellulosic ethanol in the U.S. *Energy*. 2014, 66: 13-19.
- [2] Ji LQ. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 44: 561-575.
- [3] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454(7206): 841-5.
- [4] Klemm D, Heublein B, Fink HP, et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005, 44(22): 3358-93.
- [5] Sun XF, Sun R, Fowler P, et al. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53(4): 860-70.
- [6] Toledano A, García A, Mondragon I, et al. Lignin separation and fractionation by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 2010, 71(1): 38-43.
- [7] Vanholme R, Demedts B, Morreel K, et al. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*. 2010, 153(3): 895-905.
- [8] Reddy N, Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends in Biotechnology*. 2005, 23(1):22-7.
- [9] Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. 2012, 37(1): 19-27.
- [10] Limayem Alya, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38: 449-467.
- [11] Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(2): 137-45.
- [12] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Journal Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016, 39(1): 133-40.
- [13] Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*. 2007, 25(7): 759-61.
- [14] Silveira MH, Morais AR, da Costa Lopes AM, et al. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. *ChemSusChem*. 2015, 8(20): 3366-90.
- [15] Wyman CE. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology*. 1994, 50: 3-16.

- [16] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1959-66.
- [17] Gong CS, Cao NJ, Du J. et al. Ethanol production from renewable resources. in: G.T. Tsao (Ed.), *Recent Progress in Lignocellulose Conversion*, Springer Verlag, 1999, p207-241.
- [18] Parisi F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1989, 38: 53-87.
- [19] Keshwani DR, Cheng JJ. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. *Bioresource Technology*. 2009, 100(4): 1515-23.
- [20] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4851-61.
- [21] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2003, 30(5): 279-91.
- [22] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(6): 1207-18.
- [23] Almeida João RM, Modig Tobias, Petersson Anneli, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(4): 340-349.
- [24] Dunlop AP. Furfural formation and behavior. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 1948, 40 (2): 204-209.
- [25] Ulbricht RJ, Sharon J, Thomas J. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parental solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1984, 4: 843-853.
- [26] Bardet M, Robert DR, Lundqvist K. On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood. *Svensk Papperstidning-nordisk*. 1985, 6: 61-67.
- [27] Lapierre C, Rolando C, Monties B. Characterization of poplar lignins acidolysis products: capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung*. 1983, 37(4): 189-198.
- [28] Sears KD, Beelik A, Casebier RL, et al. Southern pine prehydrolyzates: characterization of polysaccharides and lignin fragments. *Journal of Polymer Science*. 1971, 36: 425-443.
- [29] Popoff T, Theander O. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chemica Scandinavica*. 1976, 30: 397-402.
- [30] Skerker JM, Leon D, Price MN, et al. Dissecting a complex chemical stress: chemogenomic profiling of plant hydrolysates. *Molecular Systems Biology*. 2013, 9: 674.
- [31] Serate J, Xie D, Pohlmann E, et al. Controlling microbial contamination during

- hydrolysis of AFEX-pretreated corn stover and switchgrass: effects on hydrolysate composition, microbial response and fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 180.
- [32] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 66(1): 10-26.
- [33] Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*. 2007, 71(1): 1-15.
- [34] Larsson S, Quintana-Sainz A, Reimann A, et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 84-86: 617-632.
- [35] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 159: 696-707.
- [36] Li Y, Qi B, Wan Y. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 324-30.
- [37] Kim D, Hahn JS. Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(16): 5069-77.
- [38] Ximenes Eduardo, Kim Youngmi, Mosier Nathan, et al. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010, 46(3-4): 170-176.
- [39] Oliva-Taravilla A, Tomás-Pejó E, Demuez M, et al. Phenols and lignin: Key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase. *Journal of Biotechnology*. 2015, 218: 94-101.
- [40] Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, et al. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *TIBTECH*. 1994, 12: 409-415.
- [41] Buchert J, Puls J, Poutanen K. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1989, 20/21: 309-318.
- [42] Clark T, Mackie KL. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1984, 34: 101-110.
- [43] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996, 19(3): 220-225.

- [44] Boyer LJ, Vega K, Klasson, et al. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 1992, 3 (1): 41-48.
- [45] Navarro AR. Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: mathematical models. *Current Microbiology*. 1994, 29: 87-90.
- [46] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 17-24.
- [47] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, 24(3-4): 151-159.
- [48] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 53(6): 701-8.
- [49] Franden MA, Pilath HM, Mohagheghi A, et al. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 99.
- [50] He MX, Wu B, Shui ZX, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1): 189-99.
- [51] Axe DD, Bailey JE. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995, 47: 8-19.
- [52] Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, et al. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1990, 136: 405-412.
- [53] Warth AD. Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988, 54 (8): 2091-2095.
- [54] Pampulha ME, Loureiro-Dias MC. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989, 31: 547-550.
- [55] Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992, 73: 363-370.
- [56] Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 1992, 8: 501-517.
- [57] Imai T, Ohono T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61: 3604-3608.
- [58] Casal M, Cardoso H, Leão C. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 1996, 142: 1385-1390.

- [59] Rottenberg H. The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles, and vesicles. *Methods in Enzymology*. 1979, 55: 547-569.
- [60] Yang S, Land ML, Klingeman DM, et al. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, 107(23): 10395-400.
- [61] Yang S, Pan C, Hurst GB, et al. Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. *Frontiers in Microbiology*. 2014, 5: 246.
- [62] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, et al. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2004, 39(11): 1533-1542.
- [63] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, 91-93: 35-49.
- [64] Dong H, Bao J. Metabolism: biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6(5): 316-8.
- [65] Huang X, Wang Y, Liu W, et al. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(20): 9705-9.
- [66] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. 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(47): 26.
- [67] Ran H, Zhang J, Gao Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 51.
- [68] Wang X, Gao Q, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 136.
- [69] 王家玲, 李顺鹏, 黄正. 环境微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2003, p171.
- [70] Liu W, Wang Y, Yu Z, et al. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118(4): 13-18.
- [71] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011, 31(1): 20-31.

- [72] Almeida JR, Modig T, Röder A, et al. *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1(1): 12.
- [73] Fonseca BG, Moutta Rde O, Ferraz Fde O, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38(1): 199-207.
- [74] Kapoor RK, Rajan K, Carrier DJ. Applications of *Trametes versicolor* crude culture filtrates in detoxification of biomass pretreatment hydrolyzates. *Bioresource Technology*. 2015, 189: 99-106.
- [75] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 42(7): 624-630.
- [76] Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, 107(11): 4919-24.
- [77] López MJ, Nichols NN, Dien BS, et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(1): 125-31.
- [78] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, 87(2): 169-74.
- [79] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 65(1): 24-33.
- [80] Booth IR, Ferguson GP, Miller S, et al. Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochemical Society transactions*. 2003, 31 (Pt 6): 1406-8.
- [81] Jarboe LR. YqhD: a broad-substrate range aldehyde reductase with various applications in production of biorenewable fuels and chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89: 249-257.
- [82] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 68(5): 524-30.
- [83] Miller EN, Jarboe LR, Turner PC, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfuras simulation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75: 6132-6141.
- [84] Miller EN, Jarboe LR, Yomano LP, et al. Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase

genes (*yqhD* and *dkgA*) in furfural-resistant ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75: 4315-4323.

[85] Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 66(4): 203-10.

[86] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 49(6): 691-697.

[87] Guo X, Cavka A, Jönsson LJ, et al. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12: 93.

[88] Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*. 2007, 98(10): 1947-50.

[89] Agrawal M, Wang Y, Chen RR. Engineering efficient xylose metabolism into an acetic acid-tolerant *Zymomonas mobilis* strain by introducing adaptation-induced mutations. *Biotechnology Letters*. 2012, 34(10): 1825-32.

[90] Shui ZX, Qin H, Wu B, et al. Adaptive laboratory evolution of ethanologenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99(13): 5739-48.

[91] Jang Y, Lim Y, Kim K. *Saccharomyces cerevisiae* strain improvement using selection, mutation, and adaptation for the resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitor for ethanol production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014, 24(5): 667-74.

[92] Almario MP, Reyes LH, Kao KC. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110(10): 2616-23.

[93] Wang X, Li BZ, Ding MZ, et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. *OMICS*. 2013, 17(3): 150-9.

[94] Müller A, Hauer B, Rosche B. Asymmetric alkene reduction by yeast old yellow enzymes and by a novel *Zymomonas mobilis* reductase. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 98(1): 22-9.

[95] Cassland P, Jönsson LJ. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, 52: 393-400.

[96] Jo JE, Mohan Raj S, Rathnasingh C, et al. Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes

3-Hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 81(1): 51-60.

[97] Raj S, Rathnasingh C, Jung W, et al. A novel NAD⁺-dependent aldehyde dehydrogenase encoded by the *puuC* gene of *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2010, 15: 131-138.

[98] Nakamura T, Ichinose H, Wariishi H. Cloning and heterologous expression of two aryl-aldehyde dehydrogenases from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 394(3): 470-5.

[99] Peng X, Shindo K, Kanoh K, et al. Characterization of *Sphingomonas* aldehyde dehydrogenase catalyzing the conversion of various aromatic aldehydes to their carboxylic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 69(2): 141-50.

[100] Larroy C, Parés X, Biosca JA. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 2002, 269(22): 5738-45.

[101] Nguyen TT, Iwaki A, Izawa S. The ADH7 Promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is Vanillin-Inducible and Enables mRNA Translation Under Severe Vanillin Stress. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6: 1390.

[102] Yang DD, François JM, de Billerbeck GM. Cloning, expression and characterization of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain BKM-F-1767. *BMC Microbiology*. 2012, 12: 126-138.

[103] Guillán F, Martínez AT, Martínez MJ. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal Biochemistry/FEMS*. 1992, 209(2): 603-11.

[104] Hernández-Ortega A, Ferreira P, Martínez AT. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 93(4): 1395-410.

[105] Varela E, Jesús Martínez M, Martínez AT. Aryl-alcohol oxidase protein sequence: a comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, 1481(1): 202-8.

[106] Ferreira P, Hernández-Ortega A, Herguedas B, et al. Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochemical Journal*. 2010, 425(3): 585-93.

[107] Carro J, Ferreira P, Rodríguez L, et al. 5-hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxigenase. *FEBS Journal*. 2015, 282(16): 3218-29.

- [108] de Jong E, van Berkel WJ, van der Zwan RP, et al. Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 1992, 208(3): 651-7.
- [109] van den Heuvel RHH, Laane C, van Berkel WJH. Exploring the biocatalytic potential of vanillyl-alcohol oxidase by site-directed mutagenesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2001, 343: 515-520.
- [110] Jin J, Mazon H, van den Heuvel RH, et al. Covalent flavinylation of vanillyl-alcohol oxidase is an autocatalytic process. *FEBS Journal*. 2008, 275(20): 5191-200.
- [111] Wang X, Miller EN, Yomano LP, et al. Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* strains engineered for the production of ethanol and lactate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(15): 5132-40.
- [112] Seo HM, Jeon JM, Lee JH, et al. Combinatorial application of two aldehyde oxidoreductases on isobutanol production in the presence of furfural. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2016, 43(1): 37-44.
- [113] Wang X, Miller EN, Yomano LP, et al. Increased furan tolerance in *Escherichia coli* due to a cryptic *ucpA* gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(7): 2452-5.
- [114] Zhao X, Tang J, Wang X, et al. YNL134C from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity for detoxification of furfural derived from lignocellulosic biomass. *Yeast*. 2015, 32(5): 409-22.
- [115] Turner PC, Miller EN, Jarboe LR, et al. YqhC regulates transcription of the adjacent *Escherichia coli* genes *yqhD* and *dkgA* that are involved in furfural tolerance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38(3): 431-9.
- [116] Kang C, Hayes R, Sanchez EJ, et al. Furfural reduction mechanism of a zinc-dependent alcohol dehydrogenase from *Cupriavidus necator* JMP134. *Molecular Microbiology*. 2012, 83(1): 85-95.
- [117] Li Q, Metthew Lam LK, Xun L. *Cupriavidus necator* JMP134 rapidly reduces furfural with a Zn-dependent alcohol dehydrogenase. *Biodegradation*. 2011, 22(6): 1215-25.
- [118] Clarkson SM, Hamilton-Brehm SD, Giannone RJ, et al. A comparative multidimensional LC-MS proteomic analysis reveals mechanisms for furan aldehyde detoxification in *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 165.
- [119] Zhang Y, Ujor V, Wick M, et al. Identification, purification and characterization of furfural transforming enzymes from *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Anaerobe*. 2015, 33: 124-31.

- [120] Guti rez T, Ingram LO, Preston JF. Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LY01--an enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 2006, 121(2): 154-64.
- [121] Dijkman WP, Fraaije MW. Discovery and characterization of a 5-hydroxymethylfurfural oxidase from *Methylovorus* sp. strain MP688. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80(3): 1082-90.
- [122] Liu YB, Chen C, Chaudhry MT, et al. Enhancing *Corynebacterium glutamicum* robustness by over-expressing a gene, *mshA*, for mycothiol glycosyltransferase. *Biotechnology Letters*. 2014, 36(7): 1453-9.
- [123] Zheng H, Wang X, Yomano LP, et al. Increase in furfural tolerance in ethanologenic *Escherichia coli* LY180 by plasmid-based expression of *thyA*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(12): 4346-52.
- [124] Geddes RD, Wang X, Yomano LP, et al. Polyamine transporters and polyamines increase furfural tolerance during xylose fermentation with ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80(19): 5955-64.
- [125] Luhe AL, Lim CY, Gerken H, et al. Furfural and hydroxymethylfurfural tolerance in *Escherichia coli* Δ acrR regulatory mutants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2015, 62(1): 32-6.
- [126] Ma M, Liu ZL. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover YAP1, PDR1, PDR3, RPN4, and HSF1 as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2010, 11: 660.
- [127] Glebes TY, Sandoval NR, Reeder PJ, et al. Genome-wide mapping of furfural tolerance genes in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014, 9(1): e87540.
- [128] Earl AM, Mohundro MM, Mian IS, et al. The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *Journal of Bacteriology*. 2002, 184(22): 6216-24.
- [129] Hua Y, Narumi I, Gao G, et al. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 306(2): 354-60.
- [130] Glebes TY, Sandoval NR, Gillis JH, et al. Comparison of genome-wide selection strategies to identify furfural tolerance genes in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(1): 129-40.
- [131] Jayakody LN, Horie K, Hayashi N, et al. Improvement of tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hot-compressed water-treated cellulose by expression of ADH1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 94(1): 273-83.

- [132] Laadan B, Almeida JR, Rådström P, et al. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2008, 25(3): 191-8.
- [133] Laadan B, Wallace-Salinas V, Carlsson ÅJ, et al. Furaldehyde substrate specificity and kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase 1 variants. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13: 112.
- [134] Ma M, Wang X, Zhang X, et al. Alcohol dehydrogenases from *Scheffersomyces stipitis* involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(18): 8411-25.
- [135] Petersson A, Almeida JR, Modig T, et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*. 2006, 23(6): 455-64.
- [136] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10(1): 2.
- [137] Hasunuma T, Ismail KS, Nambu Y. Co-expression of TAL1 and ADH1 in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, 117(2): 165-9.
- [138] Bowman MJ, Jordan DB, Vermillion KE, et al. Stereochemistry of furfural reduction by a *Saccharomyces cerevisiae* aldehyde reductase that contributes to in situ furfural detoxification. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(15): 4926-32.
- [139] Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 71(3): 339-49.
- [140] Alriksson B, Horváth I S, Jönsson L J. Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry*. 2010, 45(2): 264-271.
- [141] Liu ZL, Moon J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene*. 2009, 446(1): 1-10.
- [142] Moon J, Liu ZL. Engineered NADH-dependent GRE2 from *Saccharomyces cerevisiae* by directed enzyme evolution enhances HMF reduction using additional cofactor NADPH. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012, 50(2): 115-20.

- [143] Heer D, Heine D, Sauer U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(24): 7631-8.
- [144] Qiu Z, Deng Z, Tan H, et al. Engineering the robustness of *Saccharomyces cerevisiae* by introducing bifunctional glutathione synthase gene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015, 42(4): 537-42.
- [145] Ask M, Mapelli V, Höck H, et al. Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12: 87.
- [146] Sasano Y, Watanabe D, Ukibe K, et al. Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, 113(4): 451-5.
- [147] Chen Y, Sheng J, Jiang T, et al. Transcriptional profiling reveals molecular basis and novel genetic targets for improved resistance to multiple fermentation inhibitors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 9.
- [148] Nakagawa Y, Hasebe T, Ishiai M, et al. Forced expression of FLO11 confers pellicle-forming ability and furfural tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*. 2014, 78(4): 714-7.
- [149] Westman JO, Mapelli V, Taherzadeh MJ, et al. Flocculation causes inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* for second-generation bioethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80(22): 6908-18.
- [150] Bergman JM, Wrands M, Hughes D. Acetate availability and utilization supports the growth of mutant sub-populations on aging bacterial colonies. *PLoS One*. 2014, 9(10): e109255.
- [151] Lin H, Castro NM, Bennett GN, et al. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 71(6): 870-4.
- [152] Rina Barak, Walid N. Abouhamad, et al. Both Acetate Kinase and Acetyl Coenzyme A Synthetase Are Involved in Acetate-Stimulated Change in the Direction of Flagellar Rotation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180(4): 985-988.
- [153] Kannisto MS, Mangayil RK, Shrivastava-Bhattacharya A, et al. Metabolic engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for removal of *Clostridium butyricum* growth inhibitors produced from lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 198.
- [154] Hayden JD, Brown LR, Gunawardena HP, et al. Reversible acetylation regulates acetate and propionate metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 2013, 159(Pt9):

1986-99.

[155] Wei B, Shin S, LaPorte D, et al. Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *Journal of Bacteriology*. 2000, 182(6): 1632-40.

[156] Cramer A, Gerstmeir R, Schaffer S, et al. Identification of RamA, a novel LuxR-type transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 2006, 188(7): 2554-67.

[157] Gerstmeir R, Cramer A, Dangel P, et al. RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 2004, 186(9): 2798-809.

[158] Yang S, Franden MA, Brown SD, et al. Insights into acetate toxicity in *Zymomonas mobilis* 8b using different substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 140.

[159] dos Santos MM, Gombert AK, Christensen B, et al. Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ¹³C-labeled substrates. *Eukaryotic Cell*. 2003, 2(3): 599-608.

[160] Chen Y, Stabryla L, Wei N. Improved acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the WHI2 gene identified through inverse metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, 82(7): 2156-66.

[161] Hasunuma T, Sakamoto T, Kondo A. Inverse metabolic engineering based on transient acclimation of yeast improves acid-containing xylose fermentation and tolerance to formic and acetic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(2): 1027-38.

[162] Kumar V, Hart AJ, Keerthiraju ER, et al. Expression of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Chaperone Gene (COX20) Improves Tolerance to Weak Acid and Oxidative Stress during Yeast Fermentation. *PLoS One*. 2015, 10(10): e0139129.

[163] Meijnen JP, Randazzo P, Foulqui é-Moreno MR, et al. Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 5.

[164] Shi A, Zheng H, Yomano LP, et al. Plasmid expression of *nema* and *yafC** increased resistance of ethanologenic *Escherichia coli* LY180 to nonvolatile side products from dilute acid treatment of sugarcane bagasse and artificial hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, 82(7): 2137-45.

[165] Pereira FB, Guimarães PM, Gomes DG, et al. Identification of candidate genes for yeast engineering to improve bioethanol production in very high gravity and lignocellulosic biomass industrial fermentations. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4(1): 57.

- [166] Cunha JT, Aguiar TQ, Roman íA, et al. Contribution of PRS3, RPB4 and ZWF1 to the resistance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors. *Bioresource Technology*. 2015, 191: 7-16.
- [167] Schubert C. Can biofuels finally take center stage? *Nature Biotechnology*. 2006, 24(7): 777-84.
- [168] Tijmensen MJA, Faaij APC, Hamelinck CN, et al. Exploration of the possibilities for production of Fischer Tropsch liquids and power via biomass gasification. *Biomass Energy*. 2002, 23: 129-152.
- [169] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*. 1995, 267(5195): 240-3.
- [170] Deanda K, Zhang M, Eddy C, et al. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62(12): 4465-70.
- [171] Mohagheghi A, Evans K, Chou YC, et al. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98(1): 885-98.
- [172] Seo JS, Chong H, Park HS, et al. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature biotechnology*. 2005, 23(1): 63-8.
- [173] Panesar PS, Marwaha SS, Kennedy JF. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006, 81(81): 623-635.
- [174] Yang S, Pan C, Tschaplinski TJ, et al. Systems biology analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 ethanol stress responses. *PLoS One*. 2013, 8(7): e68886.
- [175] 张今, 施维, 姜大志, 等. 合成生物学与合成酶学. 北京: 科学出版社, 2011, p227.
- [176] Yang S, Pappas KM, Hauser LJ, et al. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nature biotechnology*. 2009, 27(10): 893-4.
- [177] Neale AD, Scopes RK, Wettenhall RE, et al. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 1987, 169(3): 1024-8.
- [178] Piriya PS, Vasan PT, Padma VS, et al. Cellulosic Ethanol Production by Recombinant Cellulolytic Bacteria Harboring *pdc* and *adh II* Genes of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Research International*. 2012, 2012: 817549.
- [179] Lee JS, Chi WJ, Hong SK, et al. Bioethanol production by heterologous expression of *Pdc* and *AdhII* in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(13): 6089-97.
- [180] Ohta K, Beall DS, Mejia JP, et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate

decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, 57: 893-900.

[181] Nikel PI, de Lorenzo V. Robustness of *Pseudomonas putida* KT2440 as a host for ethanol biosynthesis. *Nature Biotechnology*. 2014, 31(6): 562-71.

[182] Maiti B, Rathore A, Srivastava S, et al. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90(1): 385-95.

[183] Yanase H, Miyawaki H, Sakurai M, et al. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 94(6): 1667-78.

[184] Sarks C, Jin M, Sato TK, et al. Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 73.

[185] Schell DJ, Dowe N, Chapeaux A, et al. Accounting for all sugars produced during integrated production of ethanol from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 205: 153-8.

[186] Ma K, Ruan Z, Shui Z, et al. Open fermentative production of fuel ethanol from food waste by an acid-tolerant mutant strain of *Zymomonas mobilis*. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 295-302.

[187] dos Santos Dda S, Camelo AC, Rodrigues KC, et al. Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 161(1-8): 93-105.

[188] Das SP, Ravindran R, Deka D, et al. Bioethanol production from leafy biomass of mango (*Mangifera indica*) involving naturally isolated and recombinant enzymes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 43(7): 717-34.

[189] Gu HQ, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112: 1770-82.

[190] Dunn KL, Rao CV. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(15): 6897-905.

[191] Dunn KL, Rao CV. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(11): 2228-40.

- [192] Park SE, Koo HM, Park YK, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10): 6033-8.
- [193] Yang S, Pelletier DA, Lu TY, et al. The *Zymomonas mobilis* regulator *hfq* contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors. *BMC Microbiology*. 2010, 10: 135.
- [194] 冉红. *Amorphotheca resinae* ZN1 对木质纤维素来源的芳香醛代谢路径的实验研究 [D]. 华东理工大学, 2014.
- [195] Klinke HB, Ahring BK, Schmidt AS, et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*. 2002, 82(1): 15-26.
- [196] Varga E, Klinke HB, Réczey K, et al. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 88(5): 567-74.
- [197] Etienne W, Meyer MH, Peppers J, et al. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *Biotechniques*. 2004, 36 (4): 618-620.
- [198] Huang Y, Zhao KX, Shen XH, et al. Genetic and biochemical characterization of a 4-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 78(1): 75-83.
- [199] Mattevi A, Fraaije MW, Mozzarelli A, et al. Crystal structures and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: the shape of the active-site cavity controls substrate specificity. *Structure*. 1997, 5(7): 907-920.
- [200] Fraaije MW, Veeger C, van Berkel WJ. Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. Evidence for the production of 4-hydroxycinnamyl alcohols from 4-allylphenols. *European Journal of Biochemistry*. 1995, 234(1): 271-7.
- [201] Kasai D, Masai E, Miyauchi K, et al. Characterization of the gallate dioxygenase gene: three distinct ring cleavage dioxygenases are involved in syringate degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187(15): 5067-5074.
- [202] Romero E, Ferreira P, Martínez AT, et al. New oxidase from *Bjerkandera arthroconidial* anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1794(4): 689-97.
- [203] Wermuth B, Münch JD, von Wartburg JP. Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1977, 252(11): 3821-3828.
- [204] Ditlow CC, Holmquist B, Morelock MM, et al. Physical and enzymatic properties of a class II alcohol dehydrogenase isozyme of human liver: pi-ADH. *Biochemistry*. 1984, 23(26):

6363-6368.

[205] Wagner FW, Parés X, Holmquist B, et al. Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: chi-ADH. *Biochemistry*. 1984, 23(10): 2193-2199.

[206] Shimizu M, Yuda N, Nakamura T, et al. Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics*. 2005, 5(15): 3919-31.

[207] Mitsui R, Hirota M, Tsuno T, et al. Purification and characterization of vanillin dehydrogenases from alkaliphile *Micrococcus* sp. TA1 and neutrophile *Burkholderia cepacia* TM1. *FEMS Microbiology Letters*. 2010, 303(1): 41-7.

[208] Clausen M, Lamb CJ, Megnet R, et al. PAD1 encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1994, 142(1): 107-12.

[209] Matsuura K, Nakayama T, Nakagawa M, et al. Kinetic mechanism of pulmonary carbonyl reductase. *Biochemical Journal*. 1988, 252(1): 17-22.

[210] Panoutsopoulos GI, Beedham C. Kinetics and specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase towards substituted benzaldehydes. *Acta Biochimica Polonica*. 2004, 51: 649-663.

[211] Fuchs G, Boll M, Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, 9(11): 803-816.

[212] Roth S, Spiess AC. Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015, 38(12): 2285-313.

[213] Salony, Mishra S, Bisaria VS. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 71(5): 646-53.

[214] Frasconi M, Favero G, Boer H, et al. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1804(4): 899-908.

[215] Ben Younes S, Mechichi T, Sayadi S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(4): 1033-42.

[216] Zoppellaro G, Sakurai T, Huang H. A novel mixed valence form of *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with dioxygen to give a peroxide intermediate bound to the trinuclear center. *Journal of Biochemistry*. 2001, 129(6): 949-53.

[217] Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin.

Journal of Basic Microbiology. 2001, 41(3-4): 185-227.

[218] Ernst R, Kueppers P, Stindt J, et al. Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps--first come, first served? FEBS Journal. 2010, 277(3): 540-9.

[219] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? Applied Microbiology and Biotechnology. 2012, 95(1): 77-89.

[220] Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clinical Microbiology Reviews. 2009, 22(2): 291-321.

[221] Sá-Correia I, dos Santos SC, Teixeira MC, et al. Drug: H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. Trends in Microbiology. 2009, 17(1): 22-31.

[222] Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Advanced Drug Delivery Reviews. 2005, 57(10): 1486-513.

[223] Berlec A, Strukelj B. Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering. Recent Patents on Biotechnology. 2009, 3: 77-87.

[224] Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. Bioresource Technology. 2010, 101(22): 8493-501.

[225] Sawai H, Na K, Sasaki N. Membrane-integrated fermentation system for improving the optical purity of D-lactic acid produced during continuous fermentation. Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry. 2011, 75(12): 2326-32.

[226] Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. Biotechnology Advances. 2011, 29(6): 930-9.

[227] Xue Z, Wang L, Ju J, et al. Efficient production of polymer-grade L-lactic acid from corn stover hydrolyzate by thermophilic *Bacillus* sp. strain XZL4. Springerplus. 2012, 1: 43.

[228] Ouyang J, Ma R, Zheng Z, et al. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. Bioresource Technology. 2013, 135: 475-80.

[229] Zhang Y, Vadlani PV. D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2013, 36(12): 1897-904.

[230] Bai Z, Gao Z, He B, et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on the growth and D-lactic acid production of *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2015, 38(10): 1993-2001.

[231] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology. 2000, 26(2-4): 87-107.

- [232] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-9.
- [233] 涂毅. 木质纤维素依赖型 *Pediococcus acidilactici* DQ2 中外源功能基因的表达及敲除 [D]. 华东理工大学, 2013.
- [234] 张鹏. 高抗逆乳酸片球菌的代谢工程改造及其在玉米秸秆原料生产 D-乳酸 [D]. 华东理工大学, 2015.
- [235] Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, et al. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007, 108: 263-88.
- [236] He MX, Wu B, Shui ZX, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under ethanol stress. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5(1): 75.
- [237] Wrba A, Jaenicke R, Huber R, et al. Lactate dehydrogenase from the extreme thermophile *Thermotoga maritima*. *European Journal of Biochemistry*. 1990, 188(1): 195-201.
- [238] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods*. 2001, 25(4): 402-8.
- [239] Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nature Biotechnology*. 2006, 24(9): 1140-50.
- [240] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995, 57(57): 289-300.
- [241] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, 95(25): 14863-8.
- [242] Tran AV, Chambers RP. Red oak wood-derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Biotechnology Letters*. 1985, 7(1): 841-846.
- [243] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003, 67(4): 593-656.
- [244] Segura A, Molina L, Fillet S, et al. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23(3): 415-21.
- [245] Tropel D, van der Meer JR. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 2004, 68(3): 474-500.

- [246] Yi X, Gu H, Gao Q, et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8:153.
- [247] Dong HW, Bao J, Ryu DD, et al. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108(7): 1616-27.
- [248] Dong HW, Fan LQ, Luo Z, et al. Improvement of ethanol productivity and energy efficiency by degradation of inhibitors using recombinant *Zymomonas mobilis* (pHW20a-*fdh*). *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110(9): 2395-404.
- [249] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. Technical Report NREL/TP-510-42628. Golden, Colorado: NREL, 1996.
- [250] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [251] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.
- [252] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488.
- [253] Nguyen TT, Kitajima S, Izawa S. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, 118(3): 263-9.
- [254] Simon O, Klaiber I, Huber A, et al. Comprehensive proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the flavor compound vanillin. *Journal of Proteomics*. 2014, 109: 212-27.
- [255] Chalmers RM, Fewson CA. Purification and characterization of benzaldehyde dehydrogenase I from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochemical Journal*. 1989, 263: 913-919.
- [256] Simon R, Prierer U, Pühler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature Biotechnology*, 1983, 1(9): 784-791.
- [257] Banerjee S, Fraenkel DG. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* and from a "high-level" mutant. *Journal of Bacteriology*. 1972, 110(1): 155-160.
- [258] Abd E-Mawla AM, Beerhues L. Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta*. 2002, 214(5): 727-33.
- [259] Nagai M, Sato T, Watanabe H, et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically

- different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 60(3): 327-335.
- [260] Liu ZL, Moon J, Andersh BJ, et al. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 81(4): 743-53.
- [261] Zou SL, Hong JF, Wang C, et al. Construction of an Unmarked *Zymomonas mobilis* Mutant Using a Site-Specific FLP Recombinase. *Food Technology and Biotechnology*. 2012, 50(4): 406-411.
- [262] Kalnenieks Uldis, Galinina Nina, Toma Malda M. Physiological regulation of the properties of alcohol dehydrogenase II (ADH II) of *Zymomonas mobilis*: NADH renders ADH II resistant to cyanide and aeration. *Archives of Microbiology*, 2005, 183: 450-455.
- [263] O'Mullan PJ, Buchholz SE, Chase Jr T, et al. Roles of alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis* (ZADH): characterization of a ZADH-2-negative mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, 43: 675-678.
- [264] Reyes L, Scopes RK. ATPase from *Zymomonas mobilis*: purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991, 1068: 174-178.
- [265] Rutkis R, Galinina N, Strazdina I, et al. The inefficient aerobic energetics of *Zymomonas mobilis*: identifying the bottleneck. *Journal of Basic Microbiology*. 2014, 54(10):1090-7.
- [266] Liu T, Hao L, Wang R, et al. Molecular characterization of a thermostable aldehyde dehydrogenase (ALDH) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Extremophiles*. 2013, 17(1): 181-90.
- [267] Kuznetsova E, Proudfoot M, Sanders SA, et al. Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29(2): 263-79.
- [268] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 25-33.
- [269] Xiao H, Zhao H. Genome-wide RNAi screen reveals the E3 SUMO-protein ligase gene SIZ1 as a novel determinant of furfural tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 78.
- [270] Dáz E, Jiménez JJ, Nogales J. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013, 24(3): 431-42.
- [271] Sundström L, Larsson S, Jönsson LJ. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in the resistance to phenolic fermentation inhibitors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 161(1-8): 106-15.
- [272] Shen Y, Li H, Wang X, et al. High vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces*

cerevisiae strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014, 41(11): 1637-45.

[273] Nishimura M, Kohno K, Nishimura Y, et al. Characterization of two isozymes of coniferyl alcohol dehydrogenase from *Streptomyces* sp. NL15-2K. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*. 2011, 75(9): 1770-7.

[274] Uthoff S, Steinbüchel A. Purification and characterization of an NAD⁺-dependent XylB-like aryl alcohol dehydrogenase identified in *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(24): 8743-52.

[275] Giebułtowicz J, Wolinowska R, Szybor A, et al. Salivary aldehyde dehydrogenase: activity towards aromatic aldehydes and comparison with recombinant ALDH3A1. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2009, 14(7): 2363-72.

[276] Alka K, Ryan BJ, Dolly JO, et al. Substrate profiling and aldehyde dismutase activity of the Kvβ2 subunit of the mammalian Kv1 potassium channel. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010, 42(12): 2012-8.

[277] MacKintosh RW, Fewson CA. Benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase II from *Acinetobacter calcoaceticus*. Substrate specificities and inhibition studies. *Biochemical Journal*. 1988, 55(2): 653-61.

[278] Biegert T, Altenschmidt U, Eckerskorn C, et al. Purification and properties of benzyl alcohol dehydrogenase from a denitrifying *Thauera* sp. *Archives of Microbiology*. 1995, 163(6): 418-23.

[279] Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H. Biotransformation of eugenol to ferulic acid by a recombinant strain of *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(9): 4315-21.

[280] Landete JM, Rodríguez H, de Las Rivas B, et al. Characterization of a benzyl alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 2008, 56(12): 4497-503.

[281] Peng X, Taki H, Komukai S, et al. Characterization of four *Rhodococcus* alcohol dehydrogenase genes responsible for the oxidation of aromatic alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 71(6): 824-32.

[282] Farmer VC, Henderson MEK, Russell JD. Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochemical Journal*. 1960, 74(2): 257-262.

[283] Muheim A, Waldner R, Leisola MSA, et al. An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1990, 12(3): 204-209.

[284] Asada Y, Watanabe A, Ohtsu Y, et al. Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioscience*

- Biotechnology, & Biochemistry. 1995, 59(7): 1339-1341.
- [285] Michalski C, Mohagheghi H, Nimtz M, et al. Salicyl alcohol oxidase of the chemical defense secretion of two chrysomelid leaf beetles. Molecular and functional characterization of two new members of the glucose-methanol-choline oxidoreductase gene family. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283(28): 19219-28.
- [286] van den Heuvel RH, van den Berg WA, Rovida S, et al. Laboratory-evolved vanillyl-alcohol oxidase produces natural vanillin. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(32): 33492-500.
- [287] Dimroth P. Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, 1318(1-2): 11-51.
- [288] Maloney PC. Microbes and membrane biology. *FEMS Microbiology Reviews*. 1990, 7(1-2): 91-102.
- [289] Maloney PC. The molecular and cell biology of anion transport by bacteria. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1992, 14(11): 757-62.
- [290] Winkler J, Kao KC. Transcriptional analysis of *Lactobacillus brevis* to N-butanol and ferulic acid stress responses. *PLoS One*. 2011, 6(8): e21438.
- [291] D áz E, Ferr ández A, Prieto MA, et al. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 2001, 65(4): 523-69.
- [292] Gerischer U. Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2002, 4(2): 111-21.
- [293] Qi SW, Chaudhry MT, Zhang Y, et al. Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis via fructose-1,6-bisphosphatase. *Proteomics*. 2007, 7(20): 3775-87.
- [294] Duy NV, M äder U, Tran NP, et al. The proteome and transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* in response to salicylic acid. *Proteomics*. 2007, 7(5): 698-710.
- [295] Tam le T, Eymann C, Albrecht D, et al. Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*. 2006, 8(8): 1408-27.
- [296] Park EH, Kim MD. Genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* genes regulated by vanillin. *Journal of Microbiology Biotechnology*. 2015, 25(1): 50-6.
- [297] Nieves LM, Panyon LA, Wang X. Engineering Sugar Utilization and Microbial Tolerance toward Lignocellulose Conversion. *Frontiers Bioengineering Biotechnology*. 2015, 3: 17.

- [298] Wilson CM, Yang S, Rodriguez M Jr, et al. *Clostridium thermocellum* transcriptomic profiles after exposure to furfural or heat stress. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 131.
- [299] Lin FM, Qiao B, Yuan YJ. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(11): 3765-76.
- [300] Bajwa PK, Ho CY, Chan CK, et al. Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* T2 cells upon exposure to hardwood spent sulphite liquor: comparison to acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013, 103(6): 1281-95.
- [301] Kinoshita S, Kakizono T, Kadota K, et al. Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1985, 22(4): 249-254.
- [302] Laadan B, Almeida JR, Rådström P, et al. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2008, 25(3): 191-8.
- [303] Zheng H, Wang X, Yomano LP, et al. Improving *Escherichia coli* FucO for furfural tolerance by saturation mutagenesis of individual amino acid positions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(10): 3202-8.
- [304] Moon J, Liu ZL. Direct enzyme assay evidence confirms aldehyde reductase function of Ydr541cp and Ygl039wp from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2015, 32(4): 399-407.
- [305] Trudgill PW. The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochemical Journal*. 1969, 113(4): 577-87.
- [306] Hao XC, Yang XS, Wan P, et al. Comparative proteomic analysis of a new adaptive *Pichia stipitis* strain to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 34.
- [307] Park HS, Um Y, Sang JS, et al. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochemistry*. 2015, 50(3): 347-356.
- [308] Zhang Y, Ezeji TC. Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 66.
- [309] Nichols NN, Lunde TA, Graden KC, et al. Chemotaxis to furan compounds by furan-degrading *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(17): 6365-8.
- [310] Tan FR, Dai LC, Wu B, et al. Improving furfural tolerance of *Zymomonas mobilis* by rewiring a sigma factor RpoD protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99(12): 5363-71.

- [311] Barak R, Abouhamad WN, Eisenbach M. Both acetate kinase and acetyl coenzyme A synthetase are involved in acetate-stimulated change in the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180(4): 985-8.
- [312] Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2005, 69(1): 12-50.
- [313] Arnold CN, McElhanon J, Lee A, et al. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183(7): 2178-86.
- [314] Hayashi M, Mizoguchi H, Shiraishi N, et al. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*. 2002, 66(6): 1337-44.
- [315] Chan SH, Nørregaard L, Solem C, et al. Acetate kinase isozymes confer robustness in acetate metabolism. *PLoS One*. 2014, 9(3): e92256.
- [316] Sorger-Herrmann U, Taniguchi H, Wendisch VF. Regulation of the pstSCAB operon in *Corynebacterium glutamicum* by the regulator of acetate metabolism RamB. *BMC Microbiology*. 2015, 15: 113.
- [317] Schwalbach MS, Keating DH, Tremaine M, et al. Complex physiology and compound stress responses during fermentation of alkali-pretreated corn stover hydrolysate by an *Escherichia coli* ethanologen. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(9): 3442-57.
- [318] Wilson CM, Rodriguez M Jr, Johnson CM, et al. Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated Populus and switchgrass. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 179.
- [319] Linville JL, Rodriguez M Jr, Brown SD, et al. Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* Populus hydrolysate-tolerant mutant strain shows increased cellular efficiency in response to Populus hydrolysate compared to the wild type strain. *BMC Microbiology*. 2014, 14: 215.
- [320] Linville JL, Rodriguez M Jr, Land M. Industrial robustness: understanding the mechanism of tolerance for the Populus hydrolysate-tolerant mutant strain of *Clostridium thermocellum*. *PLoS One*. 2013, 8(10): e78829.
- [321] Prather KL, Martin CH. De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008, 19(5): 468-74.
- [322] Masai E, Kamimura N, Kasai D, et al. Complete genome sequence of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived biaryls and monoaryls. *Journal of Bacteriology*. 2012, 194(2): 534-5.
- [323] Belda E, van Heck RG, Lopez-Sanchez MJ, et al. The revisited genome of

Pseudomonas putida KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environmental Microbiology*. 2016. doi:10.1111/1462-2920.13230.

攻读博士学位期间发表论文情况

已发表的论文

1. **Yi X**, Gu H, Gao Q, Liu ZL, Bao J^{*}. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. **Biotechnol Biofuels**. 2015, 8: 153. (SCI IF=6.04, 对应本论文第三章)
2. **Yi X**¹, Zhang P¹, Sun J, Tu Y, Gao Q, Zhang J, Bao J^{*}. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. **J Biotechnol**. 2015, 217: 112-121. (SCI IF=2.74, 对应本论文第三章)

待发表的论文

1. **Yi X**, Gao Q, Bao J^{*}. Contribution of oxidation pathway of NAD⁺-ALDH to the biotransformation of phenolic aldehydes in *Zymomonas mobilis*. **Bioresour Technol**. (对应本论文第四章)
2. **Yi X**, Gao Q, Bao J^{*}. Transcriptional profiles of biodegradation performance of phenolic aldehyde inhibitors by *Amorphotheca resinae* ZN1 by RNA-Seq. **Biotechnol Biofuels** (对应本论文第二章)
3. **Yi X**, Gao Q, Bao J^{*}. Construction of the key gene device library for the biotransformation of the lignocellulose-derived inhibitors. **J Biotechnol**. (对应本论文第五章)

学术会议论文

1. **Yi X**, Gao Q, Bao J^{*}. Resistant mechanism of *Zymomonas mobilis* against phenolic compounds produced during the lignocellulosic feedstocks pretreatment. **International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering**. 2013, Shanghai, China. (Oral presentation)
2. **Yi X**, Gao Q, Bao J^{*}. Transcriptome analysis on biodegradation of phenolic inhibitors from dilute acid pretreated lignocellulose by the detoxification fungus *Amorphotheca resinae* ZN1. **2015 20th BEST International Conference on Biotechnology and Bioengineering**. 2015, Taiwan, China. (Oral presentation)

致谢

首先，我要感谢鲍杰老师。鲍老师谦恭厚德，博学笃行，为人师表。在学习上，鲍老师严谨的治学态度、渊博的专业学识和务实的创新精神时刻激励着我。在生活中，鲍老师正直、善良、平静而有风度的教育智慧和生活态度，使我领悟了很多道理。在此，我要向鲍老师致以最诚挚的感谢。

其次，我要感谢张建老师和高秋强老师给我的无私帮助。张建老师勤奋务实、积极进取的工作态度是我学习的榜样。高秋强老师执着的探索精神和温婉的处世之道使我受益匪浅。

我要感谢罗紫臣、涂毅、张瑶和王霞给我的帮助。在此，我尤其要感谢坚韧细腻、豁达包容的王霞，由衷地感谢她给我的帮助和陪伴。我要感谢顾翰琦和何燕青，感谢你们给我的帮助和鼓励。我要感谢王娟、张宏森、雷成、刘刚、孙娇娥和张鹏，感谢能和你们一起走来和一起成长。我要感谢高小创、侯伟亮、邱忠洋、邵帅、周平平、韩昀身、温经柏、姚瑞苗和张强给我的帮助。我尤其要感谢张鹏、高小创、周平平 and 邱忠洋，谢谢你们给我无比宁静和温暖的陪伴。最后，我还要感谢谌泽宇、胡明珊、阚家伦、魏成香、周奇圣和金慈。

最后，我要特别感谢我的父母们，是您们，让我一直坚强和坚持着！我要格外感谢我的先生，是你，让我相信有爱就有一切！我更要感谢我的孩子，是你，让我更加相信成长是快乐的！

卷 内 备 考 表

本 卷 情 况 说 明

本卷共 壹佰陆拾贰 页

立 卷 人 _____

检 查 人 _____

立卷时间 _____