

学号：Y30140965

论文题目：氧化葡萄糖酸杆菌的抑制物耐受性及
全糖转化探究

学科专业：生物化工

研究方向：木质纤维素生物炼制

论文作者：姚瑞苗

指导教师：鲍杰 教授

定稿日期：2017 年 05 月 11 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

氧化葡萄糖酸杆菌的抑制物耐受性及全糖转化探究

姚瑞苗

指导教师姓名:

鲍杰 教授

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2017.5.11 论文答辩日期: 2017.5.16

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 张惠展

评 阅 人: 方翎 费强

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_____①_____（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：姚瑞苗

指导教师签名：鲍杰

2017年5月18日

2017年5月18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：姚瑞苗

2017年5月18日

氧化葡萄糖酸杆菌的抑制物耐受性及全糖转化探究

摘要

微生物利用木质纤维素水解液生产生物化学品的过程中, 面临多种障碍。首先, 木质纤维素生物炼制过程中的预处理步骤会产生多种抑制物, 严重影响发酵过程中的菌株生长和发酵效率。其次, 半纤维素来源的多种单糖, 如木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖等通常不能被发酵菌株高效利用, 最终造成碳源浪费。本研究发现 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 不仅对木质纤维素来源的抑制物具有很好的耐受性, 而且能够将木质纤维素来源的各种已知单糖高效转化为目标产品。本文分别从这两个方面对该菌进行了深入的探究。

本文第一部分对 *G. oxydans* DSM 2003 抑制物耐受性和其耐受机理进行了探究。首先, 发现 *G. oxydans* DSM 2003 在抑制物胁迫下具有优秀的葡萄糖酸发酵性能。本文通过全细胞催化证实该菌将葡萄糖氧化成葡萄糖酸的速率和效率基本不受抑制物影响, 且其主要原因在于该过程的关键酶—葡萄糖脱氢酶有极强的抑制物耐受能力。其次, *G. oxydans* DSM 2003 在高抑制物含量玉米秸秆水解液中生长时延滞期很短, 其主要原因在于该菌能够将醛类抑制物快速转化为低毒的酸或醇。DNA 芯片结果显示, 在醛类抑制物转化过程中, *G. oxydans* DSM 2003 中大量具有醛类抑制物转化潜力的基因显著上调表达。这些基因可做为其它生物炼制微生物耐受性改造的基因元件资源。探究 *G. oxydans* DSM 2003 的抑制物耐受机理会为生物脱毒菌株和生物炼制发酵菌株抑制物抗逆性改进提供重要的信息和路径。

本文第二部分发现 *G. oxydans* DSM 2003 具有罕见的全糖转化能力, 能够有效地将木质纤维素来源的所有已知单糖氧化为相应的糖酸。这些糖酸均携带羟基羧酸基团, 可用作水泥缓凝剂等精细化工产品。木质纤维素水解后获得的混合单糖经过 *G. oxydans* DSM 2003 进行全糖转化后, 获得的混合糖酸不经分离就可以直接作为水泥缓凝剂使用。这一特性不仅显著提高了木质纤维素中的各种单糖的利用率, 也降低了发酵废水中的残糖含量和废水处理的负担。

综上所述, *G. oxydans* DSM 2003 中葡萄糖脱氢酶极强的耐受能力和该菌对醛类抑制物的快速转化能力使得该菌在含高浓度抑制物的水解液中保持良好发酵性能; 该菌具备将木质纤维素来源的各种单糖氧化为糖酸的能力, 可对玉米秸秆水解液进行全糖转化。

关键词: 木质纤维素; 氧化葡萄糖酸杆菌; 抑制物; 糖酸; 全糖转化

Study of the Inhibitor Tolerance and Complete Sugars Conversion of

Gluconobacter oxydans DSM 2003

Abstract

There are two major barriers on the bioconversion of lignocellulose-derived sugars to the target products. Firstly, various inhibitors (aldehyde and organic acid compounds) produced in pretreatment process significantly inhibit the cell growth and fermentation efficiency. Secondly, Hemicellulose-derived sugars usually could not be effectively used by fermenting microorganisms. In this thesis, *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 was found to be tolerant to the inhibitors and capable of converting all the lignocellulose-derived sugars to the target products effectively. Then the two excellent characteristics of *G. oxydans* DSM 2003 were investigated in detail.

In the first part of the thesis, the tolerance of *G. oxydans* DSM 2003 to inhibitors as well as the tolerance mechanism were investigated. *G. oxydans* DSM 2003 showed excellent gluconic acid fermentation performance under the stress of inhibitors. According to the whole cell catalysis experiment, the gluconic acid production rate could not be effected by any of the inhibitors, which was due to the high inhibitors tolerance of the key enzyme (glucose dehydrogenase). *G. oxydans* DSM 2003 also showed strong adaptive ability in high inhibitor content corn stover hydrolysate, because of its quick conversion ability of aldehyde inhibitors. Meanwhile, during the conversion of aldehyde inhibitors, many genes encoding oxidoreductases potentially responsible to inhibitor conversion were significantly up-regulated. These genes will serve as an important gene device library for inhibitor tolerance engineering of robust strains. Understanding the mechanisms of high tolerance of *G. oxydans* DSM 2003 could pave the ways to the further modification on biodegradation and biorefining fermentation strains.

In the second part of the thesis, *G. oxydans* DSM 2003 was found capable of oxidating all kinds of lignocellulose-derived sugars to the corresponding acids. These sugar acids can be used as cement retarder additives, because they have hydroxy-carboxylate group. We found the mixed sugars in corn stover hydrolysate could completely converted to a mixture of acids, which can be used as cement retarder additives without separation. This not only makes full use of the sugars from lignocellulose, but also effectively decreases the residual sugars in waste water which would further reduce the treatment cost.

In conclusion, the quick conversion ability of aldehyde inhibitors and the high tolerance

of the glucose dehydrogenase to the inhibitors lead to the excellent gluconic acid fermentation performance of *G. oxydans* DSM 2003 in the freshly pretreated corn stover hydrolysate. Complete sugar conversion in corn stover hydrolysate was realized by this strain.

Key words: lignocellulose; *Gluconobacter oxydans* DSM 2003; inhibitor; sugar acids; complete sugar conversion

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物质.....	1
1.2 生物炼制.....	3
1.3 木质纤维素来源的抑制物和抑制机理.....	4
1.3.1 呋喃类.....	4
1.3.2 酚类.....	5
1.3.3 弱酸类抑制物.....	5
1.4 抑制物的脱除.....	6
1.5 发酵菌株抑制物抗逆性能提升策略.....	7
1.5.1 抑制物耐受性驯化.....	8
1.5.2 抑制物抗逆性菌株基因工程改造.....	8
1.6 葡萄糖酸概述.....	10
1.6.1 葡萄糖酸的性质和用途.....	10
1.6.2 葡萄糖酸生产.....	11
1.7 论文主要研究内容.....	12
第 2 章 产葡萄糖酸菌株 <i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003 对木质素来源 抑制物抗逆性研究.....	13
2.1 引言.....	13
2.2 材料与方法.....	14
2.2.1 原材料和酶.....	14
2.2.2 菌种及细胞培养.....	14
2.2.3 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 粗膜蛋白提取及酶活测定.....	15
2.2.4 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 胞内葡萄糖脱氢酶的克隆、表达及酶活性分析.....	15
2.2.5 木质纤维素预处理、脱毒、糖化.....	16
2.2.6 DNA 芯片样品制备及数据分析.....	17
2.2.7 糖类, 葡萄糖酸抑制物分析.....	18
2.3 结果与讨论.....	18
2.3.1 抑制物胁迫下 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 通过发酵和全细胞催化产葡萄糖酸.....	18
2.3.2 葡萄糖酸合成途径中相关酶的抑制物耐受性能分析.....	24
2.3.3 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 对醛类抑制物的降解特性及相关酶的挖掘.....	31
2.3.4 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 抑制物耐受性驯化.....	38

2.4 本章小结.....	41
第 3 章 <i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003 木质纤维素水解液全糖转化 .	43
3.1 背景.....	43
3.2 材料与方法.....	43
3.2.1 原材料和试剂.....	43
3.2.2 菌株与培养基.....	43
3.2.3 细胞培养.....	44
3.2.4 木质纤维素预处理、脱毒、糖化.....	44
3.2.5 水泥添加剂性能测试.....	44
3.2.6 醛糖和酸分析.....	45
3.3 结果与讨论.....	45
3.3.1 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 对单一糖的利用.....	45
3.3.2 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 对木质纤维素来源混合糖的利用.....	47
3.3.3 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 在玉米秸秆水解液中的发酵.....	48
3.3.4 KGA 生成的避免.....	49
3.4 本章小结.....	51
第 4 章 葡萄糖氧化酶对糖化的影响.....	53
4.1 背景.....	53
4.2 材料与方法.....	53
4.2.1 原材料与试剂.....	53
4.2.2 制备磷酸处理微晶纤维素 (PASC)	53
4.2.3 甲苯胺蓝测过氧化氢.....	54
4.2.4 分析方法.....	54
4.3 结果及讨论.....	54
4.3.1 GOD 对微晶纤维素酶水解的影响.....	54
4.3.2 GOD 对纤维素糖化抑制因素探究.....	56
4.4 本章小结.....	57
第 5 章 结论与展望.....	58
5.1 结论和创新点.....	58
5.2 展望.....	59
参考文献.....	60
致谢	73

第 1 章 文献综述

随着人类社会的发展和人口的增长,粮食和能源需求激增,给我们带来前所未有的压力。加上不可再生的化石能源储量有限,更加使得能源短缺和能源安全问题变得日益严重。由化石能源使用导致的环境污染和温室效应也严重影响人类生存。在这样一个严峻的形势下,以储量丰富、且可再生的生物质为原料进行燃料和化学品生产,即生物炼制技术得到了广泛的关注。本章围绕生物炼制过程的各个环节进行综述。

1.1 木质纤维素生物质

木质纤维素是目前世界上储量最为巨大的可再生资源,可以经过一系列的生物炼制过程被转化为糖类,然后经过微生物发酵或者酶催化进一步生成生物燃料或者其他生物制品。这不仅缓解了目前全球性的粮食危机和能源危机,也对全球变暖、环境污染等问题有积极的作用^[1, 2]。由此木质纤维素被认为是一种极具潜质的可持续性资源。下面具体介绍木质纤维素的来源和成分。

木质纤维素来源广泛,主要包括林业木本原料、农业废弃物、草本、市政固体废弃物等等^[3]。林业木本类原料包括松柏、裸子植物等软木和柳树、山杨、白杨、橡树等硬木。农业废弃物主要包括玉米秸秆、小麦秸秆、大米秸秆和甘蔗渣等^[4]。其中,玉米秸秆在中国占到所有木质纤维素总量的 40%以上。林业木本原料与农业废弃物相比木质素含量较高且灰分极少^[5],但是农业废弃物的半纤维比木本植物高出了 25%到 35%^[3]。草本牧草主要包括多年生的柳枝稷和快速生长的芒草竹。市政固体废弃物包括废纸、生活垃圾、以及纸浆等^[6]。此外海洋藻类也可以被当做生物炼制的生产原料^[7]。

如图 1.1 所示,木质纤维素主要由纤维素、木质素、半纤维素三种物质构成^[8]。纤维素与半纤维素是木质纤维素的主要成分,二者相互缠绕并被木质素包裹,三者通过共价键和氢键紧密链接,从而形成强韧的、顽抗性的结构^[9, 10]。纤维素由葡萄糖分子组成^[8]。半纤维素则是由 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖等己糖, D-木糖、L-阿拉伯糖等戊糖,以及 D-葡萄糖酸、D-半乳糖酸、甲基半乳糖酸等糖醛酸组成。其中木糖是主要成分^[11]。木质素是由芳香族化合物组成的坚硬的聚合物,由三种酚类单体组成,分别是羟苯基类、愈创木酚基类、丁香基类^[12]。这三类物质的分类依据是苯环上的官能团^[11]。如表 1.1 所示,不同来源的木质纤维素中纤维素,木质素,半纤维素含量有较大的差异^[13]。

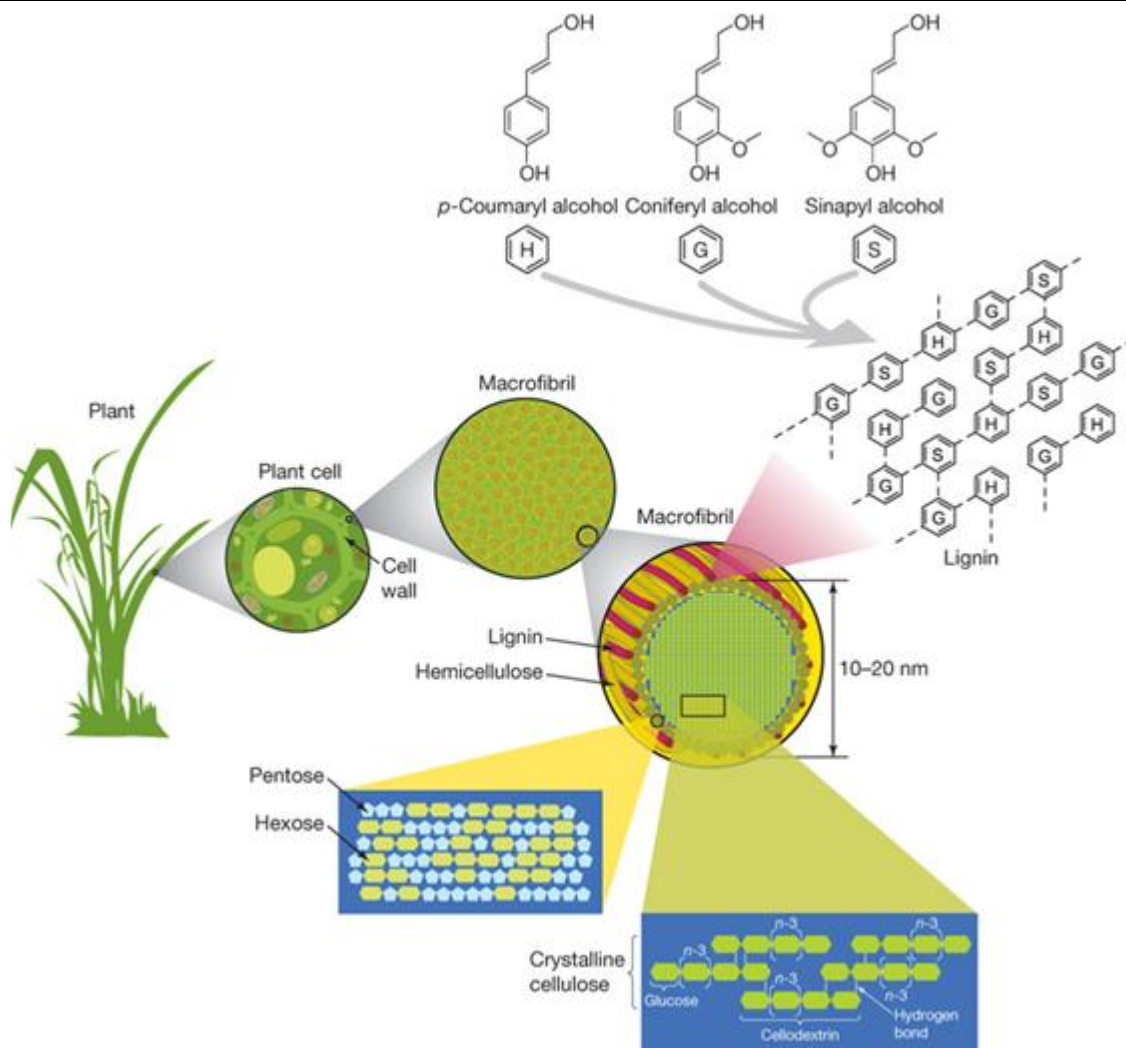


图 1.1 木质纤维素的结构示意图^[8]

Fig. 1.1 Schematic structure of lignocellulose

表 1.1 不同来源木质纤维素组分^[13]

Table 1.1 Compositions of different lignocelluloses sources

Lignocellulosic materials	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Hardwoods stems	40-55	24-40	18-25
Softwood stems	45-50	25-35	25-35
Nut shells	25-30	25-30	30-40
Corn cobs	45	35	15
Grasses	25-40	35-50	10-30
Paper	85-99	0	0-15
Wheat straw	30	50	15
Sorted refuse	60	20	20
Leaves	15-20	80-85	0
Cotton seed hairs	80-95	5-20	0
Newspaper	40-55	25-40	18-30
Waste papers from chemical pulps	60-70	10-20	5-10
Primary wastewater solids	8-15	NA ^b	24-29
Swine waste	6.0	28	NA ^b
Solid cattle manure	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Coastal Bermuda grass	25	35.7	6.4
Switch grass	45	31.4	12.0

1.2 生物炼制

生物炼制是一种结合木质纤维素生物质转化过程和设备工艺，由木质纤维素生物质生产燃料和化学品的过程。该技术类似于石油炼制是从原油生产各种燃料和石油产品。生物炼制目前已经发展了三代^[1]。第一代以粮食性生物质为原料进行产品生产，技术发展成熟；第二代是以来源于农林业废弃物等木质纤维素为原料进行产品生产。第三代生物炼制以微藻为原料。第二代生物炼制由于不使用粮食作为底物，因此能够缓解粮食危机，同时还能减少农林业废弃物燃烧造成的环境污染。以木质纤维素为原料的生物化学途径的生物炼制主要可以分为以下相继的四个步骤：第一，预处理，该步骤通过破坏木质纤维素顽抗性结构使得半纤维素和纤维素释放出来，使其更易于被酶解为单糖。第二，糖化，该步骤通过纤维素酶将纤维素降解为葡萄糖。第三，发酵，该步骤将前两步产生的糖通过微生物发酵生产生物燃料或者化学品。第四，分离纯化产品^[10]。

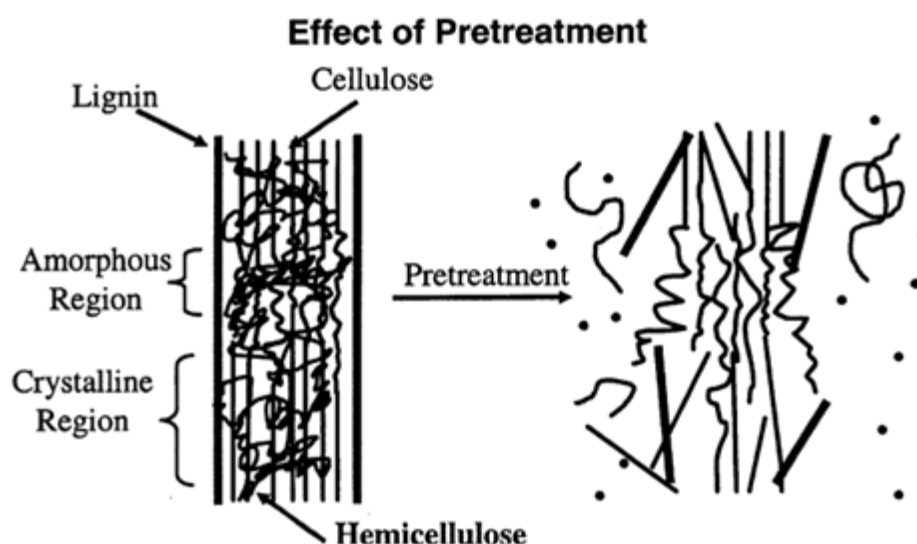


图 1.2 木质纤维素预处理原理图示^[14]

Fig. 1.2 Schematic representation of lignocellulosic pretreatment

预处理是整个生物炼制中的第一步，也是最核心的一步，更是成本最高的一步，其原理如图 1.2 所示^[14]。预处理影响着生物炼制过程中包括木质纤维素原料选择、物料粒径降低、糖化、发酵、产品回收、发酵残渣回收、副产品生成在内的多个主要方面^[15]。预处理方法有物理化学法（气爆、微波辐射、高压处理、水热预处理），化学法（酸预处理、碱预处理、离子液体预处理），生物法（微生物预处理、酶解辅助预处理）^[16,11]。化学法是所有方法中得率最高、成本最低的方法^[17]。化学预处理中的稀酸预处理由于能够使得 80%-90%半纤维素转化为单糖（L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-木糖、D-甘露糖）^[18]和可溶性寡糖^[19,20]，使得少量的木质素溶解并降解，而使纤维素更易被酶水解^[20]，因此得到了美国国家可再生能源实验室（NREL）的青睐^[21]。Zhang 等在稀酸预处理的基础上将固液比从常规预处理中的 1:6-1:10^[22]提高到 2:1^[23]，并创新使用螺带式浆搅拌混合预

处理过程中大量的固体物料、少量稀酸溶液以及过热蒸汽^[24]，从而形成了独特的干式稀酸预处理技术。这一技术（1）使得预处理过程中的蒸汽消耗明显降低；（2）不产生含酸的废水；（3）产生的高固含量物料使得后续高固含量发酵成为可能。

糖化过程将经预处理的木质纤维素降解为可以用来发酵的糖，这一过程被认为是生物炼制过程的技术和经济瓶颈^[25]。目前水解的方法包括化学法和生物法。生物水解法条件温和，可避免单糖进一步降解，且较化学法得率更高。但极大的成本和酶加量也是该技术要面对的问题^[26]。半纤维素经稀酸预处理可降解为单糖和可溶寡糖。纤维素降解为葡萄糖是在三种纤维素酶，即内切-1-4- β -葡聚糖酶或称羧基甲基纤维素酶（EC 3.2.1.4），外切葡聚糖酶或称纤维二糖水解酶（EC 3.2.1.91）， β -葡糖苷酶（EC 3.2.1.21）协同作用下进行的^[27,28]。另外近年发现的一些可溶性单加氧酶（LPMOs）也会通过氧化机制随机切断纤维素链，促进纤维素的降解。某些 LPMOS 已被加入商品纤维素酶中^[29]。除了高效的纤维素酶，反应器设计对生物法进行的糖化也尤为重要。Zhang 等在进行高固含量糖化时，采用螺带式搅拌桨能极好的实现物料与酶的混合，达到提高酶解效率的目的^[30]。

1.3 木质纤维素来源的抑制物和抑制机理

预处理过程往往需要极为剧烈的条件才能打破木质纤维素的顽抗性结构。但是剧烈的条件会将木质素降解，将由纤维素水解产生的葡萄糖，半纤维素水解产生木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖和一些糖醛酸进一步的转化，从而形成酚类、呋喃类、弱酸类三大类抑制物^[31]。这些物质会抑制糖化效率，影响后续微生物发酵，对整个生物炼制的转化率产生抑制。下面逐一对每种抑制物的来源和抑制机理进行阐述。

1.3.1 呋喃类

呋喃类化合物主要包括糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）以及二者对应的酸和醇。糠醛来源于木糖、阿拉伯糖等五碳糖，5-羟甲基糠醛来源于半乳糖、甘露糖、葡萄糖等六碳糖^[32,33]。糠醛的毒性往往高于 5-羟甲基糠醛，且更易于挥发。

呋喃类物质可从各方面影响发酵菌体。糠醛对菌体的影响中最为显著的外在特征在于会使得菌体的延滞期增长，从而影响发酵效率^[34]。在体外糠醛可以将双链 DNA 转变为单链 DNA，这样的转变在含有三个以上腺嘌呤和胸腺嘧啶的位点更为突出^[36]。糠醛在低浓度时，可以通过片段删除降低质粒的尺寸；在高浓度糠醛存在时，会通过复制插入等方式增加质粒的尺寸^[37]。糠醛还可以引起酿酒酵母胞内活性氧的积累，从而破坏线粒体和液泡膜、肌动蛋白细胞骨架以及染色体^[38]。Miller 等发现糠醛会引起硫同化受阻^[39]从而阻碍细胞生长。糠醛和 HMF 还会极大的抑制中心碳代谢中丙酮酸脱氢酶以及乙醇生产相关的醇脱氢酶、醛脱氢酶的酶活，从而最终影响乙醇的产量^[40]。糠酸和糠醇都会引起 *E. coli* 细胞膜的损伤，但糠醛并没有这种影响^[41]。此外，菌体对糠醛的转化虽然有利于菌体降低糠醛毒性，但也会产生负面影响。厌氧条件下酿酒酵母在延滞期将糠醛还原为毒性较低的糠醇，这一过程消耗 NAD(P)H 产生 NAD(P)⁺。这会跟与菌体生长

相关的甘油醇的合成过程竞争 NADH 从而导致菌体合成大幅降低。在好氧的条件下，糠醛浓度较高时，酿酒酵母会将一部分糠醛还原，一部分氧化。这一过程使细胞由有氧呼吸转变为有氧和发酵混合呼吸，最终影响菌体的生长^[35]。

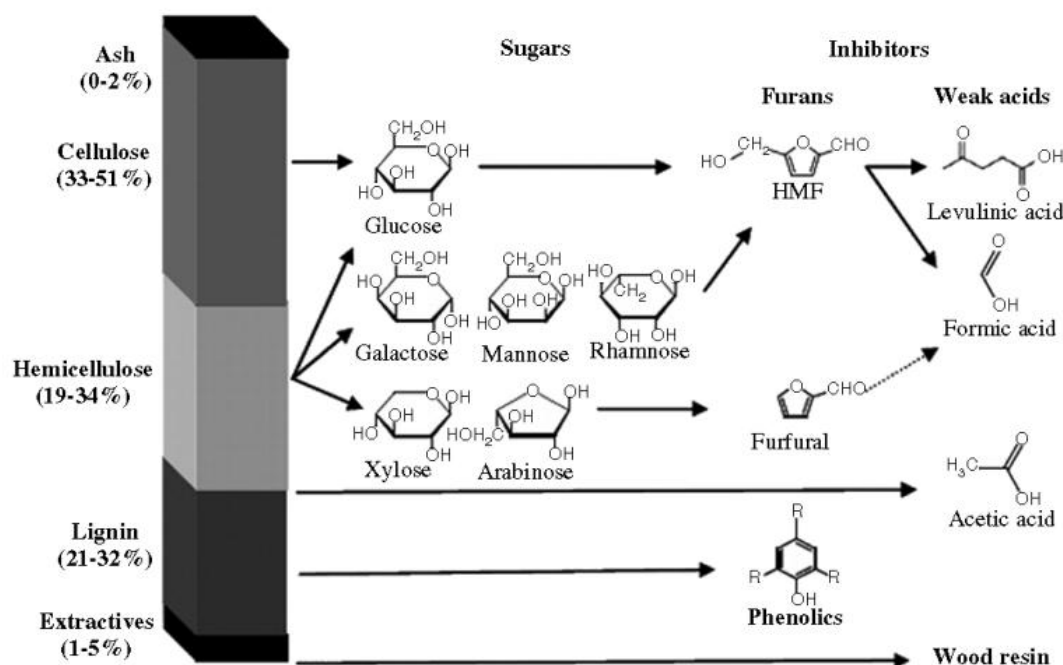


图 1.3 木质纤维素结构及其衍生抑制物示意图^[31]

Fig. 1.3 Schematic representation of lignocellulosic composition and the derived inhibitor compounds.

1.3.2 酚类

酚类化合物来源于木质素的分解，包括 4-羟基苯甲醛、对羟基苯乙酮、香草酮、丁香醛、乙酰丁香酮、4-羟基苯甲酸、香草醛、香草酸、丁香酸、苯酚、儿茶酚、氢醌等等^[42]。不同来源的木质纤维素其甲基化程度以及其与半纤维素和纤维素的连接方式不同，因此水解液中酚类抑制物的含量和种类取决于木质纤维素的来源^[43]。

酚类抑制物通常被认为会破坏细胞膜的完整性，从而影响细胞膜作为选择性屏障的作用。Klinke 等发现，在酿酒酵母中，对于包括醛酮酸在内的一系列酚类化合物，其疏水性与其对乙醇产率的抑制直接相关^[45]。Zaldivar 等发现芳香酸可以导致 *E. coli* 细胞膜的渗漏，芳香醛并没有这样的作用^[44, 41]。研究表明，酚类抑制物还会破坏 *E. coli* 细胞膜上的钾离子梯度并影响细胞膜的稳定性^[46]，阻碍基因的转录和翻译^[47]，导致胞内活性氧的积累并致使酿酒酵母线粒体碎片化^[48]。

值得注意的是无论是呋喃类还是酚类化合物都包括毒性极强的醛类抑制物。醛类抑制物往往会使核酸变性，蛋白质交联^[49]。此外醛类物质转化也与胞内重要的辅因子 NAD(P)H 相关，因此也会间接的对胞内代谢产生影响，最终影响生长和产品生产。

1.3.3 弱酸类抑制物

甲酸、乙酸、乙酰丙酸是常见的来源于木质纤维素的弱酸。其中甲酸和乙酰丙酸来源于 5-羟甲基糠醛的降解，乙酸来源于半纤维素的去乙酰化作用。在酸性高温的条件下

糠醛也可以进一步降解为甲酸^[50]。通常三者的抑制作用是甲酸>乙酰丙酸>乙酸，原因是甲酸的分子量更小，且乙酸的疏水性更强，从而导致二者相较乙酸更易于透过细胞膜^[49]。

弱酸类抑制物产生抑制的原因主要来自于质子解耦联和离子积累两个方面。质子解耦联是指未解离的弱酸在通过细胞膜后，由于胞内高的 pH 而在胞内解离产生阴离子和质子。为了维持胞内正常的质子水平，细胞消耗 ATP 将质子转运出细胞。最终导致细胞能量损失而不能进行正常的生物合成影响菌体生长^[51]。阴离子的积累会导致细胞内渗透压的增加，最终影响多种生物大分子的活性^[52]。

Cherrington 等发现甲酸会对各种生物大分子，尤其是 DNA、谷氨酸、天冬氨酸的合成产生负面影响^[53]，其中谷氨酸和天冬氨酸是多种氨基酸合成的前体物质。Guo 等发现有机酸还会使得酵母细胞处于氧化胁迫之中^[54]。

上述三种抑制物不仅单独作用会产生抑制现象，不同种抑制物协同作用时产生的抑制现象更为明显。当呋喃类抑制与酚类抑制物共同作用时^[41]，乙酸、糠醛以及酚类化合物协同作用时均要强于单独作用产生的抑制^[55]。

1.4 抑制物的脱除

如前所述，各种抑制物会从糖化、发酵中的方方面面影响从木质纤维素到产品的转化，所以克服抑制物及其产生的抑制作用势在必行。目前一般从三个方面考虑这个问题^[56]：第一，尽量降低预处理过程中形成的抑制物的量；第二，发酵前或发酵期间对经预处理的物料进行脱除抑制物处理；第三，对发酵菌株进行抑制物抗逆性驯化或者抑制物耐受性基因工程改造从而提高发酵菌株的抑制物耐受性。

首先随着木质纤维素来源以及预处理方法条件的不同抑制物的含量会有所不同^[57]。Zhang 等发现干式稀酸预处理法物料中的抑制物会随着酸用量加大、温度升高、预处理时间延长而升高^[24]，所以在预处理的过程中需要选择合适的条件既能破坏木质纤维素结构，又能避免过多的抑制物生成。

对预处理物料进行抑制物脱除也是克服抑制物的重要策略。目前研究的脱毒方法主要包括物理法、化学法以及生物法三个方面，也有人将这几个方法结合使用。物理法中常见的方法是蒸发、加热、水洗。化学法中常见的有液固交换法（沉淀法、活性炭吸附、离子交换、硅藻土吸附），液液交换法（乙酸乙酯交换、超临界流体交换、三烷基胺交换）和化学试剂添加法（碱中和、还原剂添加）^[58]。蒸发法仅适用于脱除较易挥发的抑制物，例如乙酸、糠醛、香草醛等等^[59]。水洗法直接有效但是会产生大量的废水。化学交换法的成本较低，但是会增加后续分离的难度。水洗和化学交换都会产生可用于发酵的糖的损失。生物脱毒因条件温和、抑制物降解彻底、成本低等优点受到关注。生物脱毒包括酶法脱毒和微生物脱毒。

酶法脱毒的本质即将具有抑制物降解功能的微生物中负责抑制物降解的酶提取出来进行预处理物料的脱毒。目前研究的比较多的是白腐真菌中的漆酶和过氧化物酶。Jonsson 等用 *Trametes versicolor* 分泌的漆酶和过氧化物酶分别处理未脱毒物料，两种酶

都可以改善产品发酵效率，其中漆酶具有移除酚类化合物的作用^[60]。Saravanakumar 等将来自 *Trametes versicolor* 的漆酶进行固定使得该酶具有了更好的 pH 和热稳定性，并且能很好的降解呋喃类和酚类抑制物^[61]。此外 *Cyathusc stercoreus* 也被用来进行漆酶生产。与其他的生物脱毒方法相比，漆酶脱毒具有底物特异性较高、脱毒效率高等优点，但是成本较为昂贵。

微生物脱毒是指利用细菌或者真菌将抑制物转变为低毒化合物或者彻底降解的过程。目前已经发现了大量的脱毒微生物，但是其中一部分脱毒微生物是通过在合成培养基中加入抑制物进行筛选和研究的。当将其应用于抑制物成分复杂的真实木质纤维素物料中，这些微生物的脱毒效力会大大降低。另一部分脱毒微生物是通过在真实的、含有大量抑制物的水解液中进行筛选和研究的，这些脱毒微生物往往在实体木质纤维素物料中也表现出很好的脱毒性能。另外各个研究对脱毒时间点的选择也不尽相同，主要分为在酶水解前脱毒，在酶水解后的水解液中脱毒，在发酵时同步脱毒。

据报道，*Ureibacillus thermosphaericus* 可以将废木水解液中的糠醛、5-羟甲基糠醛、酚类化合物有效的降解，并且仅消耗 5%的可用于发酵的糖。*Coniochaeta ligniaria* C8 可以将多种不同来源的木质纤维素预处理液中的各种的抑制物比较彻底的降解。*Aspergillus nidulans* FLZ10 可以降解呋喃类、弱酸类抑制物，而且不利用发酵用糖，因此该报道将脱毒与同步糖化发酵一起进行。Schneider 等利用突变的酿酒酵母选择性的除去了硬木水解液中的乙酸。*Trichoderma reesei* 被发现可以高效的降解云杉木水解液和柳树水解液中的各种抑制物，但是会消耗 35%的发酵用糖^[62]。

从以上的报道来看，除了较好的抑制物降解能力，减少发酵用糖的消耗也是选择脱毒菌株和脱毒条件必须考虑的内容。Zhang 等筛选得到能够降解各种抑制物的 *Amorphotheca resiniae* ZN1，该菌可直接用于脱除经过稀酸预处理的固体物料中的抑制物。同时由于该菌株不具备降解纤维素的能力，因此在脱毒过程中仅利用抑制物和预处理过程中产生的少量单糖进行生长。此外相比糖类碳源，该菌株优先利用抑制物进行生长，因此通过适当的控制脱毒时间可以减少其对可用于发酵的糖类的消耗^[63]。

1.5 发酵菌株抑制物抗逆性能提升策略

引入专门的脱毒微生物进行预处理物料中抑制物的脱除固然有很多的优点，但是也会产生很多弊端，如产生额外的脱毒时间、消耗可用于发酵的单糖或者引入其他潜在的危害。例如 Zhang 等利用 *Amorphotheca resiniae* ZN1 脱除抑制物时^[63]，要使抑制物脱除彻底需要延长脱毒时间，这会导致木糖损失。反之若要减少木糖损失就要缩短脱毒时间，从而导致了抑制物脱除不彻底。如果能够提高发酵菌株自身的抑制物耐受能力就可以省去专门的脱毒步骤或者降低对脱毒步骤的严格要求。因此发酵菌株具有较强的抑制物耐受能力意味着可以节省脱毒步骤所需消耗的时间，以及减少脱毒步骤中脱毒菌株对可发酵糖的消耗。常用的提高发酵菌株抑制物耐受性能的方法包括驯化和基因工程改造。

1.5.1 抑制物耐受性驯化

驯化是一种非常简单实用的提高发酵菌株抑制物耐受性的方法。发酵菌株抑制物耐受性驯化就是让微生物在含有抑制物的环境中进行生长,以逐步增强其抑制物耐受能力,最终通过随机突变以及抑制物环境筛选来得到基因组上的相关基因发生了改变的、遗传性状稳定的抑制物抗逆性发酵菌株。Shui 等通过将 *Zymomonas mobilis* 在糠醛和乙酸浓度逐渐提高的合成培养基中驯化,使该菌获得了极强的抑制物耐受性。通过对该驯化菌株进行随意扩增多态 DNA 分析发现了多个基因组上的突变位点^[64]。Daniel 等通过将 *Saccharomyces cerevisiae* 在含有乙酸和不含乙酸的合成培养基上间或转接,并不断提高培养基中乙酸浓度,最终得到了稳定的、发生了基因组突变的乙酸抗逆菌株^[65]。另外由于木质纤维素水解液中抑制物成分复杂,通过在未经脱毒的木质纤维素水解液中进行驯化的方式可以同时提升发酵菌株对多种抑制物的耐受性,甚至是改善发酵菌株对整个水解液体系的适应能力。例如 Qureshi 等通过将 *S. cerevisiae* DQ1 在固含量为 15% (w/w) 的经过干式稀酸预处理的未经脱毒的玉米秸秆水解液中进行驯化,使得该菌株在 30% (w/w) 固含量水解液中获得了远高于原始菌株的生长和发酵性能^[66]。该文作者认为由于不同的物料和预处理方式会产生不同的抑制物,因此从一种来源的木质纤维素水解液中驯化得来的抗逆性菌株未必能在另一种来源的木质纤维素水解液中表现出很好的抗逆性^[66]。

1.5.2 抑制物抗逆性菌株基因工程改造

通过基因工程改造定向提高菌株抑制物抗逆性时,靶基因的选择往往跟某种耐受机理相关。目前抗逆性菌株对呋喃类、酚类、弱酸类抑制物的耐受机理以及相应的分子改造都有一定的进展。

(1) 呋喃醛和酚醛转化相关的基因工程改造

由于呋喃类和酚类抑制物中毒性最强的抑制物均是其对应的醛类抑制物,所以这两类抑制物耐受菌株的抗逆性研究主要集中在提高发酵菌株的醛类抑制物转化能力上,即将醛类抑制物转化为对应的低毒的酸或醇的能力。通常的做法是将具有转化能力的酶的编码基因在发酵菌株中进行过表达。常见的将醛类转化为醇的酶包括依赖 NAD(P)H 的醇脱氢酶、醛还原酶、醛酮还原酶以及作用于 C-OH 的氧化还原酶等;将醛类氧化为相应的酸的酶包括依赖 NAD(P)的醛脱氢酶和以氧气为电子受体的醛氧化酶等。此外漆酶和过氧化物酶也被用于酚类化合物的氧化降解。

一些氧化还原酶对呋喃醛和酚醛的转化均有作用,例如来源于酿酒酵母的醇脱氢酶 ADH6 可以将 HMF 和香草醛还原为相应的醇^[67,68],醇脱氢酶 ADH7 则可以将糠醛和香草醛还原为相应的醇^[69]。醛脱氢酶 ALD6 可以将呋喃醛类抑制物转化为呋喃酸^[70],也可以通过提供还原力加快酿酒酵母对香草醛的转化,尽管该酶不能直接催化香草醛氧化^[68]。过表达这些基因可以提高发酵菌株对相应抑制物的耐受能力。由于酚类化合物会抑制基因转录和翻译,因此相较于呋喃类抑制物应格外注意选择有较强酚类抑制物耐受能力的启动子^[68]。否则过表达的基因难以有效的转录、表达,并起到增强抑制物转化的作用。

醛类抑制物的转化常常伴随着细胞内还原力的消耗或者生成。通常在厌氧发酵中，醛类被微生物还原为醇，消耗 NAD(P)H，使得胞内还原力不足，从而影响菌体的其他代谢以致菌体生长受阻。所以提高发酵菌株抑制物转化能力时也要考虑胞内的 NAD(P)H 的平衡。例如 Dong 等在 *Zymomonas mobilis* 中过表达异源的来自酿酒酵母的甲酸脱氢酶，在降解甲酸的同时产生 NADH 也可以为将呋喃醛还原为呋喃醇补给还原力^[71]。Wang 等将负责催化呋喃醛还原为呋喃醇的醇脱氢酶和负责在胞内进行 NADH 和 NAD(P)H 相互转化的转氢酶基因 (udhA) 在 *Zymomonas mobilis* 中进行过表达，实现了抑制物降解的同时，胞内用于生长的 NADPH 也能维持在较高的水平^[72]，从而提高了该菌的糠醛耐受能力。即便是仅仅过表达能够提供还原力的酶也会提高发酵菌株醛类抑制物的抗逆性，例如过表达 PPP 途径中的第一个酶 zwf1 会提高胞内 NADPH 的量，从而增强菌株的抑制物耐受能力^[73]。Miller 等发现过表达某些起醛类转化作用的酶虽然会提高菌株的抑制物降解能力，但是反而最终降低了菌株的抑制物耐受能力。原因是这些酶对 NADPH 具有很低的 K_m 值，使得醛类的转化消耗了过多用于生长的 NADPH。所以将这些基因进行缺失突变反而会提高菌株对醛类抑制物的耐受能力^[74]。值得庆幸的是在抑制物胁迫下，这些基因在原始菌株中也是下调表达的，这就为这些需要沉默表达的基因提供了筛选方法。Wang 等综合考虑了以上因素，在大肠杆菌中过表达了依赖 NADH 的乳醛还原酶 (fucO) 和功能不明的氧化还原酶(ucpA)的编码基因，缺失突变了依赖 NADPH 的醇脱氢酶 (yqhD) 的编码基因，并整合到基因组中形成了重组菌株 XW129 (LY180 Δ yqhD ackA::PyadC'fucO-ucpA)，该重组菌在甘蔗渣半纤维素水解液中显示出明显改善的生长特性及糠醛降解能力^[75]。

(2) 其他呋喃类、酚类抑制物耐受机理及基因工程改造

除了转化外还存在一些其他的耐受机理以及相应的分子改造。Wang 等发现酿酒酵母体内的脯氨酸具有清除胞内活性氧的作用，肌醇会影响脂质组成和细胞膜完整性，弥补抑制物造成的细胞膜变化，将这两种物质的编码基因分别过表达会同时增强 *Saccharomyces cerevisiae* 对呋喃类、酚类、弱酸类抑制物的耐受性^[76]。Ryan 等发现聚胺（胍丁胺、脯胺、尸胺）能够与胞内带负电荷的物质（核酸等）结合并保护其不受呋喃类抑制物的损伤。将聚胺转运体进行过表达会提高 *E. coli* 的糠醛耐受能力^[77]。将 RNA 结合蛋白的编码基因 lsm6 在酿酒酵母中过表达也会提高该菌对糠醛、乙酸和硫酸阴离子的耐受能力。Luhe 等发现将 *E. coli* 中外排泵 AcrAB-TolC 的阻遏基因进行缺失突变可以提高其糠醛和 5-羟甲基糠醛耐受能力^[78]。Glebes 等发现将分子伴侣 GroESL 的编码基因进行过表达可以提高 *E. coli* 的糠醛耐受性，原因是该蛋白能够稳定糠醛胁迫下易发生变化的蛋白^[79]。

(3) 弱酸抑制物耐受性机理及基因工程改造

乙酸是木质纤维素水解液中含量最高的弱酸类抑制物，也是研究的比较广范的抑制物。乙酸抗逆性的机理主要有三种：降解；通过其他代谢降低乙酸产生的毒性；阻止乙酸进入细胞内。

降解主要是指将乙酸通过 TCA 循环彻底代谢。Fukaya 等发现柠檬酸合成酶, 琥珀酰-CoA 乙酰-CoA 转移酶, TCA 循环酶合成调控子这三个蛋白的编码基因组成的基因簇与 *A. aceti* 108 乙酸的耐受性的关系紧密^[80]。另外乌头酸酶和 TCA 循环上的其他酶在乙酸胁迫下表达均上调, 将乌头酸酶在 *A. aceti* 中进行过表达会明显提高该菌的乙酸耐受性^[81]。

降低胞内乙酸产生的毒性主要是通过降低细胞酸化, 即消除胞内多余的质子进行的。Booth 等发现 K^+ / H^+ 逆向运输蛋白、 Na^+ / H^+ 逆向运输蛋白都可以将质子运出胞内^[82]。谷氨酸盐脱羧消耗质子, 脱氨中和质子都能起到降低胞内质子数量的作用^[83]。

通过转运体泵出胞内乙酸也是乙酸的重要耐受机制。Nakano 等发现在 *A. aceti* 中过表达假定的 ABC 转运体可以提高菌株乙酸耐受能力^[84]。在有些醋酸菌如 *A. pasteurianus* 中这类转运的能量是由质子动势而非 ATP 产生的, 此时膜上依赖 PQQ 的醇脱氢酶能够提供这种质子动势为转运提供能量。

细胞膜修饰以及在外膜形成多糖或者保护壳都会阻止乙酸进入细胞内部。Hanada 等发现细胞膜上的磷脂酰胆碱能够降低乙酸细胞向内部扩散^[85]。Yuk 等发现经驯化的 *E. coli* O157:H7 中软脂肪酸 (C16:0) 的量大大增加, 但是环丙烷基脂肪酸 C19:0 cyc 减少^[86]。Deeraksa 等发现 *A. pasteurianus* 通过在细胞外形成多糖保护壳, 提高了其对乙酸的耐受^[87]。

1.6 葡萄糖酸概述

1.6.1 葡萄糖酸的性质和用途

葡萄糖酸隶属醛糖酸, 是一种易溶于水、不溶于非极性溶液、不挥发、没有气味、没有腐蚀性、无毒无害、温和的有机酸^[88]。葡萄糖酸在植物、水果、大米、蜂蜜、葡萄、苹果、大肉、酒醋等食物中广泛的存在, 并与其它有机酸一样参与了许多机体代谢^[88]。

葡萄糖酸具有广泛的用途, 可被用于食品、制药、卫生、建筑等行业^[89]。在食品行业, 葡萄糖酸所谓食品添加剂具有凝固、蓬松、助色、防腐、保鲜等作用^[89]。在制药行业, 葡萄糖酸镁、钙、铁被用来进行相应的矿物补充。卫生领域中, 葡萄糖酸卓越的螯合二价铁和三价铁的能力, 使其被用来进行地表水中有害含氯物质的移除^[90]。在建筑领域, 葡萄糖酸由于其携带的羟基羧基基团可以被作为水泥添加剂来延缓水泥的凝固^[91], 也可以增强水泥在极端环境的抵抗力和稳定性。

由于与食品、制药行业相比水泥缓凝剂对葡萄糖酸卫生等级要求更低, 使利用农林业废弃物替代淀粉和蔗糖生产葡萄糖酸成为可能^[92]。另外由于基础设施建设日益加速, 水泥需求量逐年增加, 至 2012 年水泥年产量已达 21 亿吨, 葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂的需求量也在 250 万到 500 万吨^[93], 所以很有商业价值。

葡萄糖酸是一种羟基羧酸类缓凝剂, 其缓凝原理在于其羟基 (-OH) 能够在水化过程中与 $3CaO \cdot SiO_2$ 水化表面形成的富 SiO_2 层中 O_2^- 形成氢键, 或与水结合, 从而在

$3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ 与水中间形成了稳定的保护层, 阻碍其水化。而葡萄糖酸中的羧基可以与 Ca^{2+} 形成比较稳定的络合物, 这样就使得 $\text{Ga}(\text{OH})_2$ 的溶解度大大增加, 推迟了其达到饱和浓度及析出结晶的时间, 即延缓了水泥的凝固^[94]。此外 Nalet 等发现水泥缓凝剂分子末端集团对缓凝效力的影响极大, 为硫酸~羧基<磷酸基和羟基<羟基羧酸^[95]。可见羟基羧酸集团在水泥缓凝中起到了决定性的作用。

1.6.2 葡萄糖酸生产

葡萄糖酸可由化学或者生物法将 β -D-葡萄糖 C1 上的醛基氧化为相应的羧基制得。化学法昂贵的催化剂及催化剂钝化以及一些浸出问题使得该方法有较大的局限^[89]。利用生物技术方法以葡萄糖为底物生产葡萄糖酸, 包括传统的微生物液体深层发酵以及极具潜力的固定细胞发酵^[96]和酶催化^[97]。丝状真菌和醋酸菌被用于葡萄糖酸的生产发酵。

(1) 黑曲霉生产葡萄糖酸

用于葡萄糖酸生产的丝状真菌中, 黑曲霉 *Aspergillus niger* 已经被用于以淀粉和蔗糖为原料的葡萄糖酸商业化生产。也被用于以甘蔗渣, 糖蜜, 甜菜糖蜜, 废纸浆, 玉米秸秆水解液等农林业废弃物为底物, 替代淀粉蔗糖等粮食性原料生产葡萄糖酸, 并取得很高的得率^[98]。

A. niger 合成葡萄糖酸是通过葡萄糖氧化酶进行的, 该酶为存在于细胞壁上的含有两个 FAD 辅基的糖蛋白, 能在氧气参与下将葡萄糖氧化产生葡萄糖内脂和过氧化氢^[99]; 葡萄糖内脂自发或者酶解为葡萄糖酸, 过氧化氢被过氧化氢酶降解。葡萄糖氧化酶已经被用于葡萄糖定量检测生物传感器^[100], 纤维素漂白^[101], 过氧化氢制备等领域^[102]。

(2) 氧化葡萄糖酸杆菌生产葡萄糖酸

氧化葡萄糖酸杆菌是醋酸菌中比较合适的葡萄糖酸生产发酵菌株。氧化葡萄糖酸杆菌具有大量的膜结合的脱氢酶, 使其能够将葡萄糖和其他醛糖快速氧化, 为自身生长提供能量, 并降低 pH 制造适合自己生长的环境。这也是该菌能够在混合培养基中具有很好的生长性能的原因。氧化葡萄糖酸杆菌的这一特性已经使其被制成生物传感器, 用于检测木质纤维水解液中的混合糖含量^[103]。氧化葡萄糖酸杆菌中将葡萄糖氧化为葡萄糖酸的酶有两个, 一个是膜结合依赖 PQQ 的葡萄糖脱氢酶 (mGDH)。一个是存在于细胞内依赖 NADP^+ 可溶性的葡萄糖脱氢酶 (sGDH)。在氧化葡萄糖酸杆菌中, 将葡萄糖氧化产生葡萄糖酸, 主要是在生长的第一个阶段由膜结合的葡萄糖脱氢酶催化的。如 *Gluconobacter oxydans* 621H 在葡萄糖培养基中, 生长分为两个阶段。在生长阶段 I, 90% 的葡萄糖在细胞周质中直接被氧化为葡萄糖酸。而对于剩下的被细胞吸收葡萄糖而言, 9% 被磷酸化为 6-磷酸葡萄糖, 91% 被胞内的葡萄糖脱氢酶氧化为葡萄糖酸。胞外的葡萄糖酸也可以部分的被转运至细胞内。对于胞内的葡萄糖酸 70% 被氧化为 5-KGA, 30% 被磷酸化为 6-磷酸葡萄糖酸。在生长阶段 II, 87% 的葡萄糖酸在细胞周质中被直接氧化为 2-KGA, 13% 可被转运进入细胞内, 然后完全转化为 6-磷酸葡萄糖酸^[104]。可见葡萄糖酸的生成在第一阶段就已经完成。

mGDH 将 D-葡萄糖氧化为葡萄糖内脂, 并在辅酶 PQQ 的帮助下将由葡萄糖得到的

电子传递至呼吸链的末端氧化酶，最终为能量生成提供质子梯度。葡萄糖内脂则自发或者被酶解为葡萄糖酸^[105, 106]。在 *Gluconobacter oxydans* 中，该酶还具有氧化 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-甘露糖的活性^[107]，也意味着该菌可以将木质纤维素水解液中几乎所有的单糖全部利用。氧化葡萄糖酸杆菌细胞膜上还存在山梨醇脱氢酶可以将葡萄糖酸进一步氧化为 5-d-酮基-葡萄糖酸，存在葡萄糖酸-2-脱氢酶可以将葡萄糖酸进一步氧化为 2-d-酮基-葡萄糖酸^[108]。

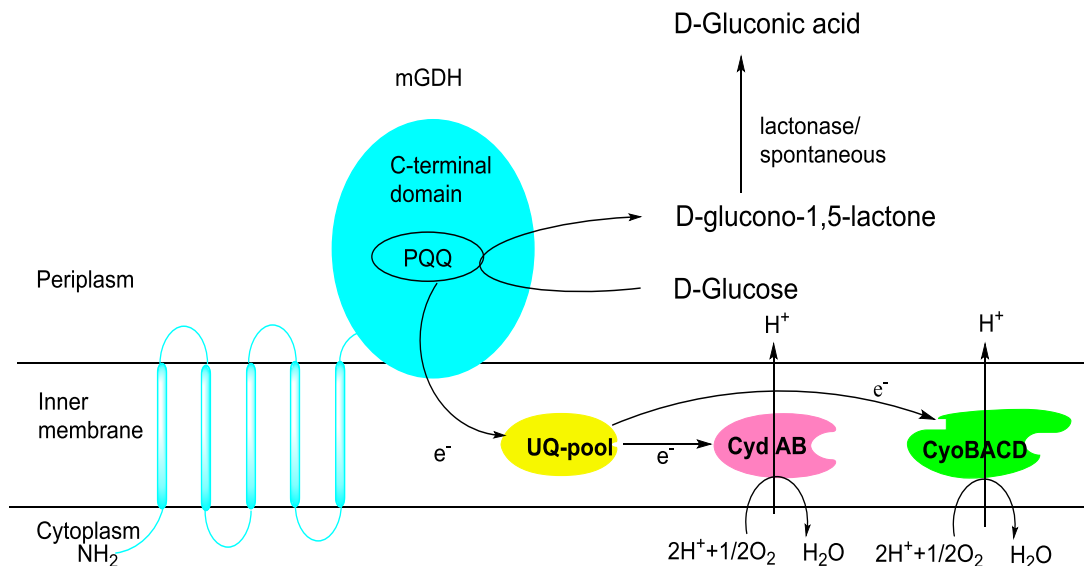


图 1.4 *Gluconobacter oxydans* 中 mGDH 耦合呼吸链催化葡萄糖酸合成原理^[109, 107]

Fig.1.4 The mechanism of D-gluconic acid production catalyzed by mGDH coupling with respiratory chain in *G. oxydans* DSM 2003

1.7 论文主要研究内容

本文研究了木质纤维来源抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 生长和葡萄糖酸发酵的影响。发现在抑制物胁迫下该菌有两个突出的抑制物耐受特点，一个是生长延滞期极短，另一个是葡萄糖酸生成发酵性能好。针对这两个特点本文分别进行了机理上的探索。通过抑制物降解实验和 DNA 芯片技术解释了延滞期的问题并找出了大量与抑制物转化相关的基因；通过抑制物胁迫下进行全细胞催化和葡萄糖酸合成关键酶活性检测以及产酸相关基因转录水平分析找出该菌葡萄糖酸发酵性能好的原因。随后为了进一步提高 *G. oxydans* DSM 2003 对各种抑制物的耐受性，对其在含有高浓度抑制物的玉米秸秆水解液中进行了长期驯化。本文还考察了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源的各种已知单糖的利用情况，实现了玉米秸秆水解液的全糖转化。主要内容包括以下几个方面：

- (1) 探究 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源抑制物耐受性及耐受机制；
- (2) 利用 DNA 芯片技术挖掘 *G. oxydans* DSM 2003 中负责醛类抑制物转化的关键酶，以期从分子水平解析 *G. oxydans* DSM 2003 的抑制物降解路径。
- (3) 对 *G. oxydans* DSM 2003 进行玉米秸秆水解液的长期驯化，以提高其抑制物耐受能力。

(4) 考察 *G. oxydans* DSM 2003 对玉米秸秆水解液中的已知单糖转化能力，并对玉米秸秆水解液进行全糖转化。

(5) 初步探究了 *Aspergillus niger* 中葡萄糖氧化酶 (GOD) 对纤维素糖化过程的影响。

第 2 章 产葡萄糖酸菌株 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 对木质素来源抑制物抗逆性研究

2.1 引言

预处理过程能够打破木质纤维素原料的致密结构,使其更好地被纤维素酶水解为便于微生物利用的单糖。但该过程不可避免的产生多种抑制物,这些抑制物主要分为三大类,分别是弱酸类,呋喃类以及酚类^[110]。弱酸类物质会在胞内解离为质子与阴离子,质子会引起质子解耦联造成能量损失,阴离子的积累则会为蛋白的活性及稳定性和菌体代谢带来负面影响^[52]。呋喃醛、酚醛会致使氧自由基积累^[48],对蛋白质, DNA 等胞内生物大分子以及细胞膜造成损伤。醛类的转化会导致胞内氧化还原力失衡,影响菌体正常代谢^[111]。酚类化合物还会影响细胞膜稳定性,使其失去细胞屏障作用^[46]。因此这些抑制物会抑制发酵菌株的胞内代谢和关键酶的活性,最终影响发酵菌株生长和发酵效率。那么将这些抑制物移除或者选择利用抑制物耐受型强的发酵菌株成为利用木质纤维素生产大宗化学品的关键。

葡萄糖酸盐可以作为水泥缓凝剂使用,其市场需求量巨大^[112,91]。由木质纤维素生产的葡萄糖酸盐具备商品水泥缓凝剂性能要求,因此具有较好的产业化价值^[113]。*G. oxydans* DSM 2003 是一株革兰氏阴性菌,其膜上具备多种脱氢酶,可以氧化多种醛糖^[114, 115]。本实验室之前的研究发现, *G. oxydans* DSM 2003 在利用玉米秸秆水解液发酵生产葡萄糖酸的过程中表现出良好的发酵性能。其使用的 30% (w/w) 高固含量玉米秸秆水解液是经干式稀酸预处理后的玉米秸秆在位生物脱毒 36 h 后酶解糖化所得。该水解液由于制备体系固含量高、物料脱毒时间短,因此依然存在大量的可溶性酚类抑制物^[116],对很多的产品的发酵会产生严重抑制^[117, 118]。而 *G. oxydans* DSM 2003 在该水解液体系中能快速进入生长、产酸状态,并且最高葡萄糖酸得率达到 91%,浓度达到 102.1g/L^[113]。此外,固含量为 15% (w/w) 和 20% (w/w) 的未脱毒水解液由于未经任何脱毒处理,因此抑制物含量很高,会极大的抑制发酵菌株的生长^[92, 117, 118]。*G. oxydans* DSM 2003 在该水解液中不经历明显延滞期即可快速进入对数生长状态,并获得极高的葡萄糖酸得率^[113]。而同为葡萄糖酸生产菌株的 *A. niger* SIIM M276, 在 20% (w/w) 的未脱毒水解液中至少需要 48 h 以上的延滞期才能生长^[92]。微生物油脂酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271^[120] 和乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* TY112/ ZP26^[117] 均需要 36 h 以上的延滞期。乙醇生产菌株 *Zymomonas mobilis* ZM4 即便在抑制物含量更低的 15% (w/w) 固含量未脱毒水解液中也需 12 h 的延滞期^[72]。*Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 和 PE-2 在抑制物含量相近的木质纤维素水解液中表现出 10~20 h 的延滞期^[73]。通常延滞期的长短被用来表征发酵菌株对抑制物的耐受性强弱^[119]。可见 *G. oxydans* DSM 2003 对来源于木质纤维素的抑制物具有极强的耐受性,理解这一耐受机理会为其他生物脱毒菌株和生物炼

制发酵菌株改进提供重要的线索。

本研究首先通过全细胞催化实验考察了抑制物的存在对 *G. oxydans* DSM 2003 将葡萄糖氧化为葡萄糖酸速率和效率的影响。为了进一步解析 *G. oxydans* DSM 2003 在在抑制物胁迫下良好的葡萄糖酸合成性能, 本研究考察了不同抑制物存在时葡萄糖脱氢酶的活性及葡萄糖酸生成路径中相关酶的转录水平。其次, 为了探索 *G. oxydans* 快速适应木质纤维素水解液体系的机制, 本文考察了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源单一抑制物的降解能力。并借助 DNA 芯片技术对 *G. oxydans* DSM 2003 进行了抑制物胁迫下的转录组分析, 以期从分子水平解析 *G. oxydans* DSM 2003 的抑制物降解路径, 挖掘 *G. oxydans* DSM 2003 降解抑制物过程中的关键基因。另外, 为了提高 *G. oxydans* DSM 2003 对各种抑制物的整体耐受能力及对木质纤维素体系的适应能力, 本文在未脱毒水解液中进行了 *G. oxydans* DSM 2003 的长期适应性进化培养。

2.2 材料与方法

2.2.1 原材料和酶

玉米秸秆从两个地方收集: 用于摇瓶发酵的秸秆, 于 2012 年秋天, 采自中国河南郸城县。用于生物反应器发酵的玉米秸秆, 于 2014 年的秋天, 收自中国河南南阳市。玉米秸秆经水洗除去泥土、石块、金属等无机大颗粒物, 并由锤式破碎机碾磨至可以透过 10 mm 的网眼。玉米秸秆的组分通过 NREL 实验室的两步酸水解法进行测定^[121, 122]。用于摇瓶发酵的玉米秸秆包括: 38.72% 的纤维素, 20.55% 的半纤维素, 26.51% 的木质素, 2.76% 的灰分。用于反应器发酵的玉米秸秆包括: 35.78% 的纤维素, 19.36% 的半纤维素, 28.36% 的木质素, 3.56% 的灰分。以上组分均以干重为基准 (w/w)。

4-羟基苯甲醛 (HBA)、丁香醛、香草醛购自生工生物工程有限公司 (中国, 上海)。糠醛、5-羟甲基糠醛 (HMF) 购自上海德默医药科技有限公司 (中国, 上海)。商品纤维素酶 Youtell #7 购自湖南岳阳的尤特儿生物化学有限公司 (中国, 湖南)。吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。NADPNa₂ 购自 biosharp 有限公司 (中国, 上海)。乙酸购自 Sinopharm 化学试剂有限公司 (中国, 上海)。葡萄糖, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, NaOH, H₂SO₄ 等其他化学品均为分析试剂级别, 购自凌峰化学试剂有限公司 (中国, 上海)。

2.2.2 菌种及细胞培养

G. oxydans DSM 2003 购自德国微生物菌种保藏中心 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, German, Braunschweig)。其合成培养基包括种子培养基和发酵培养基, 成分如下:

(1) 种子培养基: 山梨醇 80 g/L, 酵母粉 20 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.5 g/L。

(2) 发酵培养基: 葡萄糖 80 g/L, 酵母粉 20 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.5 g/L。

G. oxydans DSM 2003 种子培养方法为：将保存于 -80°C 的 *G. oxydans* DSM 2003 甘油冻存管接种于装有 50 mL 的种子培养基的 250 mL 摇瓶，培养 24 h。培养条件为 220 rpm, 30°C 。然后 10%(v/v)的接种量接种于不同的发酵体系中。

G. oxydans DSM 2003 静息细胞被用于进行全细胞催化葡萄糖氧化生产葡萄糖酸^[123]，其制备方法为将种子液以 10%接种于 900 mL 种子培养基，培养 12 h。培养条件为通气量 2.5 vvm, 500 rpm, 30°C 。之后 4°C , $2500\times\text{g}$, 20 min 离心收集细胞。用 1 L 浓度为 40 mM, pH 6 的磷酸钾缓冲液 (KPB) 相同离心条件洗涤两次后，再次离心收集，并用 40 g/L 纯葡萄糖溶液将 OD_{600} 调整至 10 以备用。整个过程在冰上进行。

脱毒菌株 *Amorphotheca resinae* ZN1 是本实验室之前分离得到的^[63]，现保存于中国北京的中国普通微生物保藏中心 (CGMCC)，注册号为 7452。*A. resinae* ZN1 被培养在 potato-dextroseagar (PDA)培养基上 (该培养基含 200 g/L 的马铃薯提取液，20 g/L 的葡萄糖以及 15 g/L 的琼脂)。将上述 *A. resinae* ZN1 PDA 斜面接入经预处理的玉米秸秆物料上， 28°C 培养 5 天可以得到固体种子。之后再以 10% (w/w) 的接种量接入待脱毒的物料中。

2.2.3 *G. oxydans* DSM 2003 粗膜蛋白提取及酶活测定

G. oxydans DSM 2003 粗膜蛋白的提取根据 Meyer 等的报道进行^[123]。将种子液以 10% (v/v) 接入 45 mL 种子培养基，培养 OD_{600} 至 0.8~1.2。取 400 mL 上述培养物于 $7000\times\text{g}$, 4°C ，离心 10 min 收集细胞。用 60 mL 磷酸钾缓冲液 (40 mM, pH 7) 重悬并超声破碎细胞 (超声 5 s, 停 15 s, 总计 17 次, 400 W)。然后 $150000\times\text{g}$, 4°C ，超速离心 1.5 h，收集沉淀并用 60 mL (40 mM, pH 7) 磷酸钾缓冲液洗涤一次，将上述沉淀用 13 mL buffer W (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8, 1%体积比的 TritonX-100) 重悬，并在冰上放置 30 min。 $150000\times\text{g}$, 4°C 超速离心，上清即为 *G. oxydans* 粗膜蛋白。

膜结合的葡萄糖脱氢酶 (mGDH) 酶活，是以吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 为电子受体进行分析的。在设定的浓度的糠醛，5-羟甲基糠醛，香草醛，丁香醛，4-羟基苯甲醛的胁迫下，用包含 mGDH 的 *G. oxydans* DSMZ 2003 粗膜蛋白催化葡萄糖产葡萄糖酸。并根据葡萄糖酸的生成评价酶活。1 mL 的总催化体系中含 6 mM 葡萄糖，5 mM 的吩嗪硫酸甲酯 (PMS)，1.16 mg/mL 的蛋白，40 mM 的磷酸钾缓冲液(PBK)，pH 为 7。反应条件为：在 25°C 催化 5 min 后 65°C 灭活 10 min。在以上催化条件下，以每分钟每 mg 蛋白催化产生的葡萄糖酸的 μM 数来评价酶活，以不加任何抑制物的对照为基准计算相对酶活。

2.2.4 *G. oxydans* DSM 2003 胞内葡萄糖脱氢酶的克隆、表达及酶活性分析

编码依赖 NADP^+ 的葡萄糖脱氢酶 (sGDH) 的基因通过聚合酶链技术进行扩增。其中 (5'-ATGCCTGCCCTTACAAAGA-3') 和 (5'-TTACGAGGACCAGTTGTTTTTCG-3') 分别作为正向和反向引物，*G. oxydans* DSM 2003 的基因组作为模版。PCR 产物被插入载体 pET28a(+)中，然后转化 *E. coli* BL21，构建了 *E. coli* BL21::pET28a(+)-GOX2015 重组菌株。将重组菌株在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养 10 h 后，以 10%

(v/v) 接种量接入新鲜的含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8, 用 0.25 μM 的 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 诱导, 4 h 后收集菌体, 用 50 mL 的 Binding Buffer (20 mM 磷酸钠, 0.5 M 氯化钠, 10 mM 咪唑, pH 8) 重悬菌体, 并在 400 W 超声破碎 4.3 min (超 5 s 停 15 s, 超 13 次), 离心取上清。将上清过滤后, 在 4°C 加进 Ni Aogarose 6FF resin 柱中 (中国, 上海, Aogma), 并用 30 mL 的 Elution Buffer (20 mM 磷酸钠, 0.5 M 氯化钠, 500 mM 咪唑, pH 8) 洗脱, 即得纯化的 GDH 酶。

依赖 NADP^+ 的葡萄糖脱氢酶的活性测定以 NADP 为辅因子。1 mL 的总反应体系中含: 5 mM 葡萄糖, 5 mM NADP , 3.25 μg 纯化 sGDH, 0.1 mM 磷酸钠缓冲液 (pH=8)。反应条件为 25°C 催化 5 min 后 95°C 灭活 10 min。以在以上催化条件下, 以每分钟每 mg 蛋白催消耗的葡萄糖的 μM 数来评价酶活, 以不加任何抑制物的对照为基准计算相对酶活。

2.2.5 木质纤维素预处理、脱毒、糖化

玉米秸秆的预处理方法是干式烯酸预处理 (DDAP)^[124], 简单来说就是将粉碎的玉米秸秆和 5% (w/w) 稀硫酸溶液在固液比 2:1 (w/w) 的比例下一起加入具有单螺旋叶轮的反应器中, 其中硫酸用量为 2.5g 每 100g 干玉米秸秆。预处理条件为 175°C, 50 rpm, 处理 5 分钟^[124]; 由此得到的物料固含量在 50% 左右。用于生物反应器发酵的经预处理的玉米秸秆含 37.24% 的纤维素, 8.21% 的半纤维素, 5.86% 的灰分, 抑制物含量为每 g 干物料含 18.43 mg 的乙酸, 0.23 mg 的香草醛, 0.67 mg 的丁香醛和 0.18 mg 4-羟基苯甲醛, 5.64 mg 的糠醛, 3.54 mg 的 5-羟甲基糠醛。用于在摇瓶中发酵的经预处理的玉米秸秆含 39.47% 的纤维素, 6.80% 的半纤维素, 6.57% 的灰分, 抑制物的含量为每 g 干物料含 16.65 mg 的乙酸, 1.27 mg 的香草醛, 0.67 mg 的丁香醛, 0.18 mg 的 4-羟基苯甲醛, 5.13 mg 的糠醛, 3.38 mg 的 5-羟甲基糠醛。

脱毒: 经预处理的玉米秸秆用 20% (w/w) 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 悬浮液进行中和, 并将培养好的 *A. resiniae* ZN1 种子以 10% (w/w) 接入经中和的玉米秸秆中。用于生物反应器发酵的玉米秸秆在 15 L 反应器中进行, 脱毒条件为 28°C, 通气量 1 vvm, 脱毒进行 36 h^[116]。用于在摇瓶中发酵的玉米秸秆在静态的带盖子的容器中脱毒 7 天, 脱毒温度为室温。

糖化: 糖化在装有螺带式浆的 5L 发酵罐中进行, 纤维素酶加量均为 15 FPU 每 g 干玉米秸秆 (DM), 糖化条件为 50°C, pH 4.8, 搅拌转速 150 rpm。糖化 48 h 后玉米秸秆水解液。水解液经离心除去残渣, 上清灭菌 (115°C, 20 min) 后, 经滤纸过滤, 置于 4°C 备用。

(1) 用于摇瓶发酵的水解液成分如下:

新鲜预处理玉米秸秆水解液 (未脱毒玉米秸秆水解液) 成分为: (a) 固含量为 15% (w/w) 的水解液含 58.36 g/L 的葡萄糖, 27.9 g/L 的木糖, 0.726 g/L 的糠醛, 0.356 g/L 5-羟甲基糠醛, 0.006 g/L 的香草醛, 0.172 g/L 的丁香醛, 0.02 g/L 的 4-羟基苯甲醛, 2.973

g/L 的乙酸; (b) 固含量为 20% (w/w) 的水解液含 78.2 g/L 的葡萄糖, 39.2 g/L 的木糖, 0.681 g/L 的糠醛, 0.492 g/L 的 5-羟甲基糠醛, 0.009 g/L 的香草醛, 0.226 g/L 的丁香醛, 0.032 g/L 的 4-羟基苯甲醛, 3.891 g/L 乙酸。(c) 30%固含量含 85.523 g/L 的葡萄糖, 42.110 g/L 的木糖, 0.505g/L 的糠醛, 0.397 g/L 的 5-羟甲基糠醛, 0.010 g/L 的香草醛, 0.276 g/L 的丁香醛, 0.0407 g/L 的 4-羟基苯甲醛, 4.205 g/L 乙酸。

脱毒的玉米秸秆水解液成分如下: (a) 固含量为 15%的玉米秸秆水解液含 55.70 g/L 葡萄糖, 29.7 g/L 木糖, 0.052 g/L 糠醛, 0.082 g/L 5-羟甲基糠醛, 0.001 g/L 香草醛, 0.203 g/L 丁香醛, 0.001 g/L 4-羟基苯甲醛, 0.862 g/L 乙酸; (b) 20% (w/w) 固含量的水解液含 82.4 g/L 的葡萄糖, 23.9 g/L 的木糖, 0.124 g/L 的糠醛, 0.151 g/L 的 5-羟甲基糠醛, 0.003 g/L 的香草醛, 0.236 g/L 的丁香醛, 0.013 g/L 的 4-羟基苯甲醛, 2.296 g/L 的乙酸。

(c) 30%固含量含的 104.980 g/L 的葡萄糖, 23.677 g/L 的木糖, 0.1558g/L 的糠醛, 0.0565g/L 的 5-羟甲基糠醛, 0.0025g/L 的香草醛, 0.2461 g/L 的丁香醛, 0.0168 g/L 的 4-羟基苯甲醛, 3.3274 g/L 乙酸。

(2) 用于发酵罐发酵的玉米秸秆水解液成分如下:

15%固含量新鲜预处理玉米秸秆水解液(未脱毒玉米秸秆水解液)含 54.49 g/L 的葡萄糖, 23.53 g/L 木糖, 3.24 g/L 乙酸, 0.20 g/L 的 5-羟甲基糠醛, 0.31 g/L 的糠醛;

15%固含量脱毒玉米秸秆水解液含 62.72 g/L 的葡萄糖, 23.88 g/L 的木糖, 1.09 g/L 的乙酸, 0.02 g/L 的 5-羟甲基糠醛, 0.07 g/L 的糠醛;

2.2.6 DNA 芯片样品制备及数据分析

DNA 芯片的菌体样品制备过程为, 将 *G. oxydans* DSM 2003 种子液 10% (v/v) 接种于含 900 mL 山梨醇培养基的 1 L 生物反应器中, 培养条件为通气量 2.5 vvm, 搅拌转速 500 rpm, 30°C, pH 5.5, 培养至 OD₆₀₀ 为 5。之后再分别以 10% (v/v) 接种量接入预混有 1.2 g/L 糠醛, 1.5 g/L 5-羟甲基糠醛, 0.8 g/L 香草醛, 0.9 g/L 丁香醛, 0.8 g/L 4-羟基苯甲醛, 2.5 g/L 乙酸的发酵培养基中, 培养条件为 220 rpm, 30°C。发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 装液量 50 mL。培养 4 h 后 4°C, 10000 rpm, 10 min 收集菌体, 然后以少量的培养液轻轻吹打菌体使其重悬, 液氮速冻后-80°C 保存。

Gluconobater oxydans DSM 2003 的全 RNA 使用购自 Ambion 公司的 RiboPure™-Bacteria Kit 试剂盒 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) 提取。RNA 的浓度和质量分别通过 NanoDrop ND-1000 分光光度仪(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)检测 OD_{260/280} 和凝胶电泳进行检测和验证, OD_{260/280} 的值在 1.7 到 2.1 之间, 凝胶电泳有清晰的 28S 和 18S rRNA 条带被认为质量合格。*Gluconobater oxydans* DSM 2003 的 DNA 芯片由中国北京的 CapitalBio 公司根据 NCBI 上 *Gluconobater oxydans* 621H 的编码序列设计探针并由 Agilent (Santa Clara, CA, USA)原位合成 2 张 8*15K 规格芯片 (8 个独立点阵, 每个点阵包括约 15,000 个探针)。芯片上设置质控, 包括管家基因、阳性对照、阴性对照、外标探针。提取的 RNA 经过反转录形成 cDNA 后, 进一步经 Cy3-dCTP 荧光染料标记, 然后与探针杂交。表达谱芯片杂交扫描后的图片经 FeatureExtraction

软件处理得到原始数据，然后利用安捷伦科技有限公司(Santa Clara, CA, USA)的 GeneSpring V12 对原始数据进行归一化以及质量控制，最终计算基因表达差异和统计学显著性 p 值。当荧光强度(Foldchange)大于或者小于 1.5，且 P -value 小于 0.05 时被认为是显著差异表达。

2.2.7 糖类，葡萄糖酸抑制物分析

葡萄糖的分析是利用生化分析仪 SBA-40D 进行的（山东省科学院，济南，山东，中国）。葡萄糖酸的分析是通过 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行的，柱子为 Shodex Rspak JJ50-4D column (Showa Denko, Tokyo, Japan)，流动相为 12 mM NaHCO_3 ，流速为 0.5 mL/min，柱子温度为 40°C。

乙酸是通过装有 HPX-87H 柱子 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 进行检测的。流动相为 5 mM 的硫酸，流速为 0.6 mL/min，柱温为 65°C。

呋喃和酚类化合物用装有 YMC-Pack ODS-A 柱子 (YMC, Kyoto, Japan) 的 HPLC (UV/Vis detector SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 在 35°C 进行检测。糠醛、糠酸、糠醇的检测用 50% (v/v) 的乙腈水溶液做流动相，流速 1.0 mL/min，检测波长为 220 nm。5-羟甲基糠醇、5-羟甲基糠醛、5-羟甲基糠酸、酚类化合物的分析均采用梯度测定法。5-羟甲基糠醇、5-羟甲基糠酸、5-羟甲基糠醛的测定方法如下：流动相由两个独立的泵泵入，A 泵为纯水，B 泵为乙腈，开始时总流速为 0.6 mL/min，A、B 泵的各占 95%和 5%，检测波长为 230 nm。乙腈从开始的 5%在 15 min 内涨至 100%，在 5 min 内再降至 5%，维持 10 min。酚类化合物（香草醛、丁香醛、香草醇、香草酸、丁香醇、4-羟基苯甲酸、丁香酸、4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲醇）的分析方法如下：流动相由两个独立的泵泵入（A 泵和 B 泵），A 泵为 0.1%的甲酸，B 泵为 100%的乙腈。两者总流速为 1.0 mL/min，检测波长为 270 nm。初始比例为甲酸和乙腈分别为 90%和 10%。乙腈从初始的 10%在 4 min 内升至 35%，在 35%维持 11 min，然后在 5 min 内从 35%降至 10%，在 10%维持 10 min。

2.3 结果与讨论

2.3.1 抑制物胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 通过发酵和全细胞催化产葡萄糖酸

(1) *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆水解液发酵产葡萄糖酸

本文首先对 *G. oxydans* DSM 2003 在真实玉米秸秆水解液中的发酵特性进行了进一步验证。水解液为 15% (w/w) 新鲜预处理玉米秸秆水解液（未脱毒水解液），15%固含量的脱毒玉米秸秆水解液被设置为对照。结果如图 2.1 所示 *G. oxydans* DSM 2003 在两种水解液中均经历 4 h 延滞期就开始生长。这意味着虽然未脱毒水解液中存在各种可以延缓 *G. oxydans* DSM 2003 生长的抑制物，但是 *G. oxydans* DSM 2003 很好的克服了这些抑制并快速进入对数生长期，这与本实验室之前对该菌在 15%、20%固含量未脱毒水解液中无明显延滞期的结果一致^[113]。图 2.1b 显示，虽然 15%固含量未脱毒水解液中

细胞生长速率低于对照,但是葡萄糖酸产率并没有受到影响,二者同时在 16 h 达到最大值,得率分别为 95%, 93%。未脱毒水解液中最终产品浓度低于对照的主要原因是初始葡萄糖浓度较低。也就是说在未脱毒水解液中, *G. oxydans* DSM 2003 能够快速进入生长,并保证葡萄糖酸合成不受抑制物影响,这说明该菌具备极强的抑制物耐受能力。

(2) 单一抑制物胁迫对 *G. oxydans* DSM 2003 发酵产葡萄糖酸的影响

为了进一步考察单一抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 发酵产葡萄糖酸的影响。本研究选择 6 种典型木质纤维素来源的抑制物作为模型抑制物,包括两种呋喃醛(糠醛、5-羟甲基糠醛),三种酚醛(丁香醛、香草醛、4-羟基苯甲醛,分别代表丁香基类、羟苯基类、愈创木酚基类三种木质素单体)以及一种弱酸类抑制物(乙酸)。图 2.2 为菌体生长进入稳定期时的产酸和生长数据。*G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸合成和菌体生长在抑制物胁迫下表现出不同的特性。当糠醛, 5-羟甲基糠醛, 丁香醛, 香草醛, 4-羟基苯甲醛, 乙酸浓度分别为 0.5 g/L, 0.5 g/L, 0.5 g/L, 0.5 g/L, 0.5 g/L, 2.5 g/L 时,其对生长的抑制分别为 18%, 9%, 20%, 17%, 23%, 40% (图 2.2a), 对产酸的抑制仅有 2%, 1%, -3%, 9.7%, 18%, 1% (图 2.2b)。上述抑制物浓度接近或者低于 20% 固含量未脱毒水解液中的抑制物含量(见材料与方法 2.2.5)。这说明 20% 固含量未脱毒水解液所含抑制物浓度范围内的呋喃类, 酚类, 弱酸类抑制物单一作用时虽然对 *G. oxydans* DSM 2003 最终的生长产生了一定的影响,但是对葡萄糖酸合成影响极小,这为 *G. oxydans* DSM 2003 在 15% 未脱毒水解液中较好的产酸表现提供了解释。更高抑制物浓度胁迫下,即 2g/L 的糠醛, 2g/L 的 5-羟甲基糠醛, 2g/L 的丁香醛, 1g/L 的 4-羟基苯甲醛, 1g/L 的香草醛, 10g/L 的乙酸对生长的抑制分别达到了 92%, 76%, 47%, 37%, 56%, 71% (图 2.2a), 对产酸的抑制分别是 52%, 7%, 12%, 7%, 9%, 12% (图 2.2b)。可见高浓度的呋喃类, 酚类, 弱酸类抑制物均会显著影响 *G. oxydans* DSM 2003 的生长,但是对葡萄糖酸合成的抑制要小的多。其中 2g/L 的糠醛, 1.5 g/L 的 4-羟基苯甲醛对生长产生了几乎致死性的抑制,才使得产酸影响颇大。而其他抑制物对产酸的都很小。这说明单一抑制物胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 依然能保持很好的产酸性能。

(3) 抑制物胁迫下利用 *G. oxydans* DSM 2003 全细胞催化产葡萄糖酸

为了进一步考察这些抑制物对葡萄糖酸合成过程的影响,我们利用 *G. oxydans* DSM 2003 静息细胞在抑制物胁迫下进行了全细胞催化纯葡萄糖氧化生成葡萄糖酸,以排除细胞生长以及调控对产酸的影响。静息细胞量被控制在正常发酵稳定期时细胞量的 1/3-1/5,即 OD₆₀₀ 为 1,这一细胞浓度在发酵对数前期就能够达到^[113],因此在整个常规发酵过程中的大部分时间里菌体量都能够达到这一浓度。实验结果如图 2.3 所示,OD₆₀₀ 为 1 的 *G. oxydans* DSM 2003 静息细胞在 1 g/L 及 2 g/L 的糠醛(图 2.3 a), 1 g/L 及 2 g/L 5-羟甲基糠醛(图 2.3b), 2.5 g/L 及 7.5 g/L 的乙酸(图 2.3c), 0.25 g/L 及 0.5 g/L 的香草醛(图 2.3d), 0.5 g/L 及 1.0 g/L 的 4-羟基苯甲醛(图 2.3e), 0.5 g/L 及 1.0 g/L 丁香醛(图 2.3 f) 胁迫下与不加任何抑制物的对照产酸情况基本一致。这说明单一抑制物对葡萄糖酸合成过程几乎没有影响。这为 *G. oxydans* DSM 2003 在抑制物胁迫下极好的产酸

性能提供了解释。

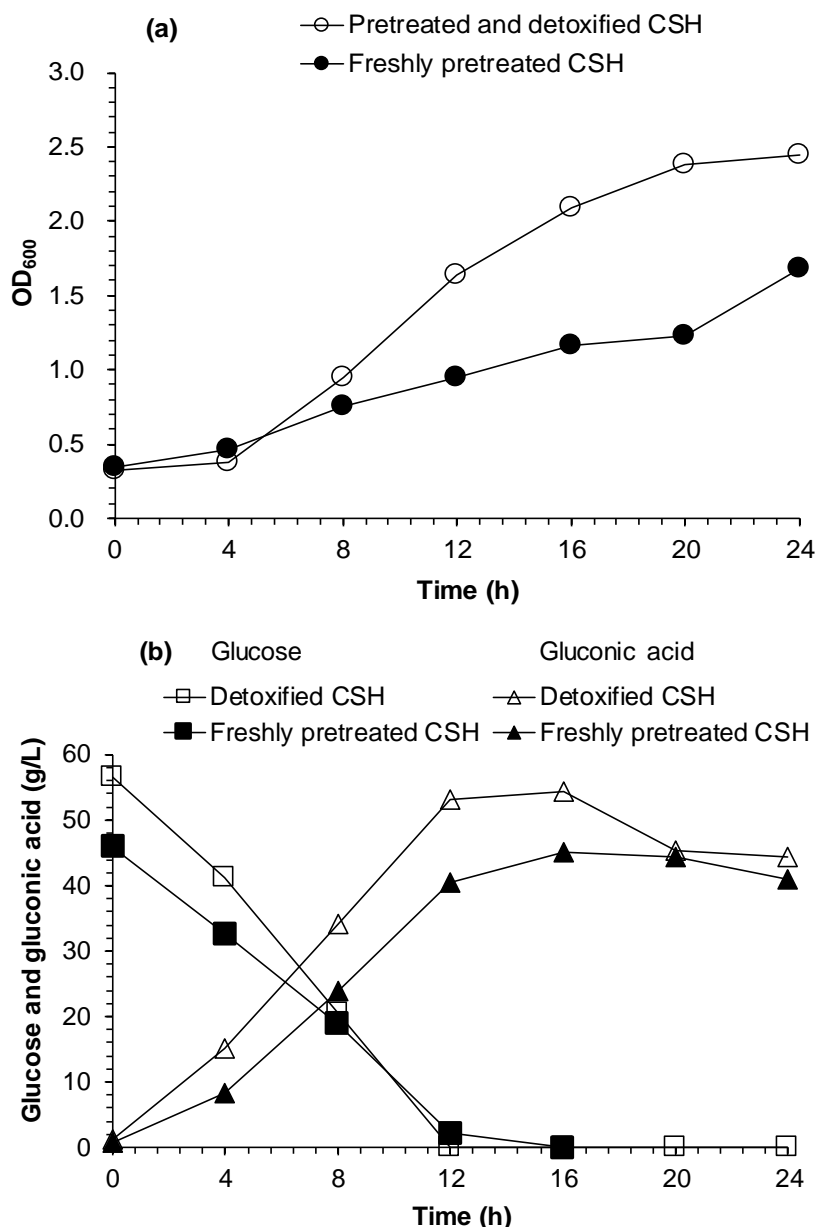


图 2.1 发酵罐中 *G. oxydans* DSM 2003 利用脱毒与未脱毒水解液玉米秸秆水解液发酵产葡萄糖酸
(a) 细胞生长; (b) 葡萄糖酸生成。实验在 3 L 发酵罐中进行, 装液量 1 L, 通气量 2.5 vvm, 温度 30°C, pH 5.5, 转速 500 rpm, 接种量 10%。

Fig. 2.1 Gluconic acids fermentation of *G. oxydans* DSM 2003 in fermentors using detoxified and freshly pretreated (without detoxified) corn stover hydrolysates (a) Cell growth; (b) Gluconic acid generation. Conditions: 30°C, pH 5.5, 500 rpm, 2.5 vvm, inoculum size 10% (v/v), solids loading 15% (w/w). 1 L liquid in 3 L fermenters.

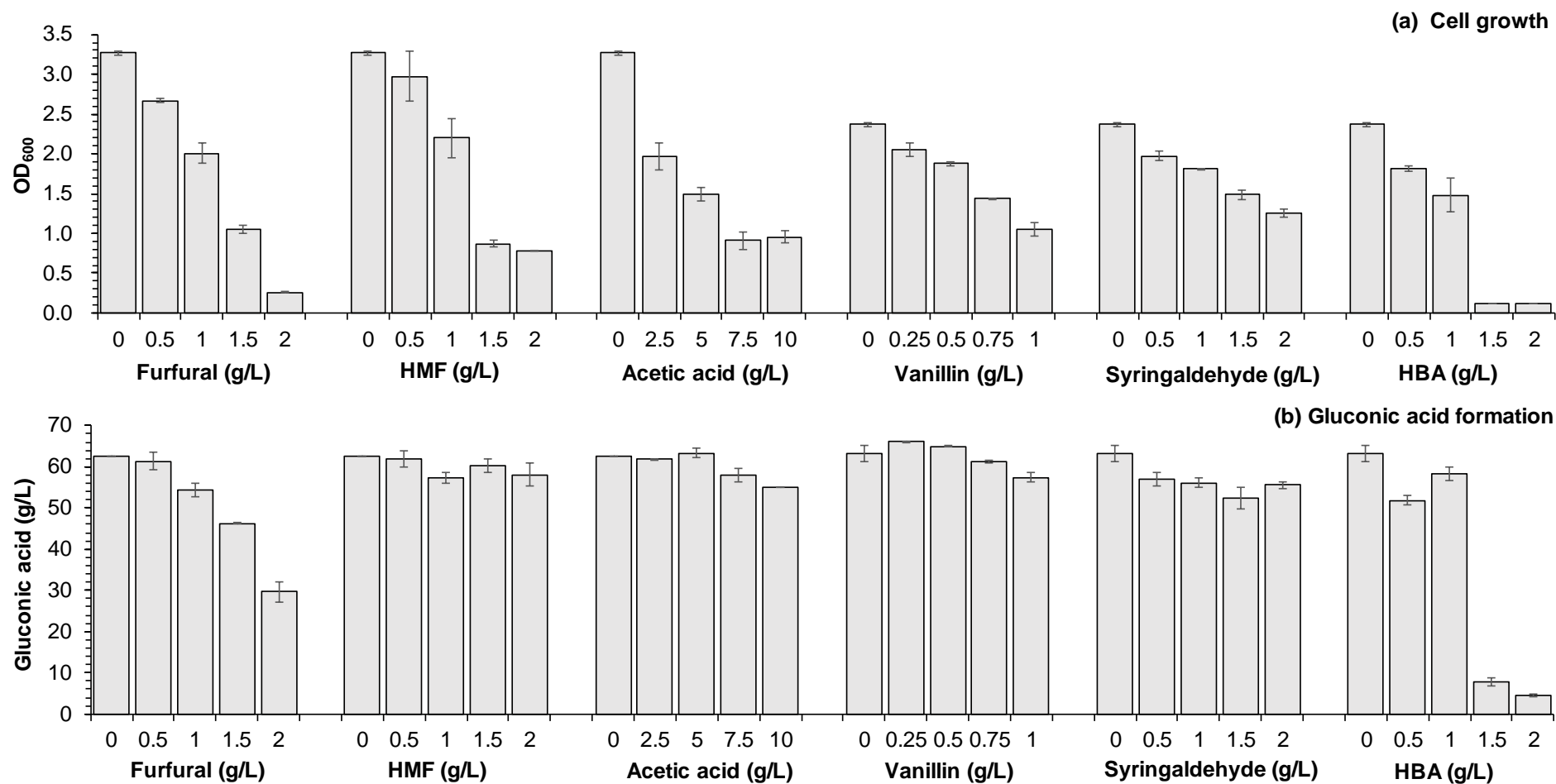


图 2.2 不同抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 生长和葡萄糖酸生成的影响 (a) 细胞生长; (b) 葡萄糖酸生成。实验在 250 mL 摇瓶中进行, 装液量 50 mL, 实验条件为温度 30°C, 转速 220 rpm, pH 5~6, 每 4 h 通过 5 M 氢氧化钠调节一次 pH。

Fig. 2.2 The cell growth and the gluconic acid production performance of *G. oxydans* DSM 2003 under the stress of inhibitors

(a) Cell growth; (b) Gluconic acid generation.

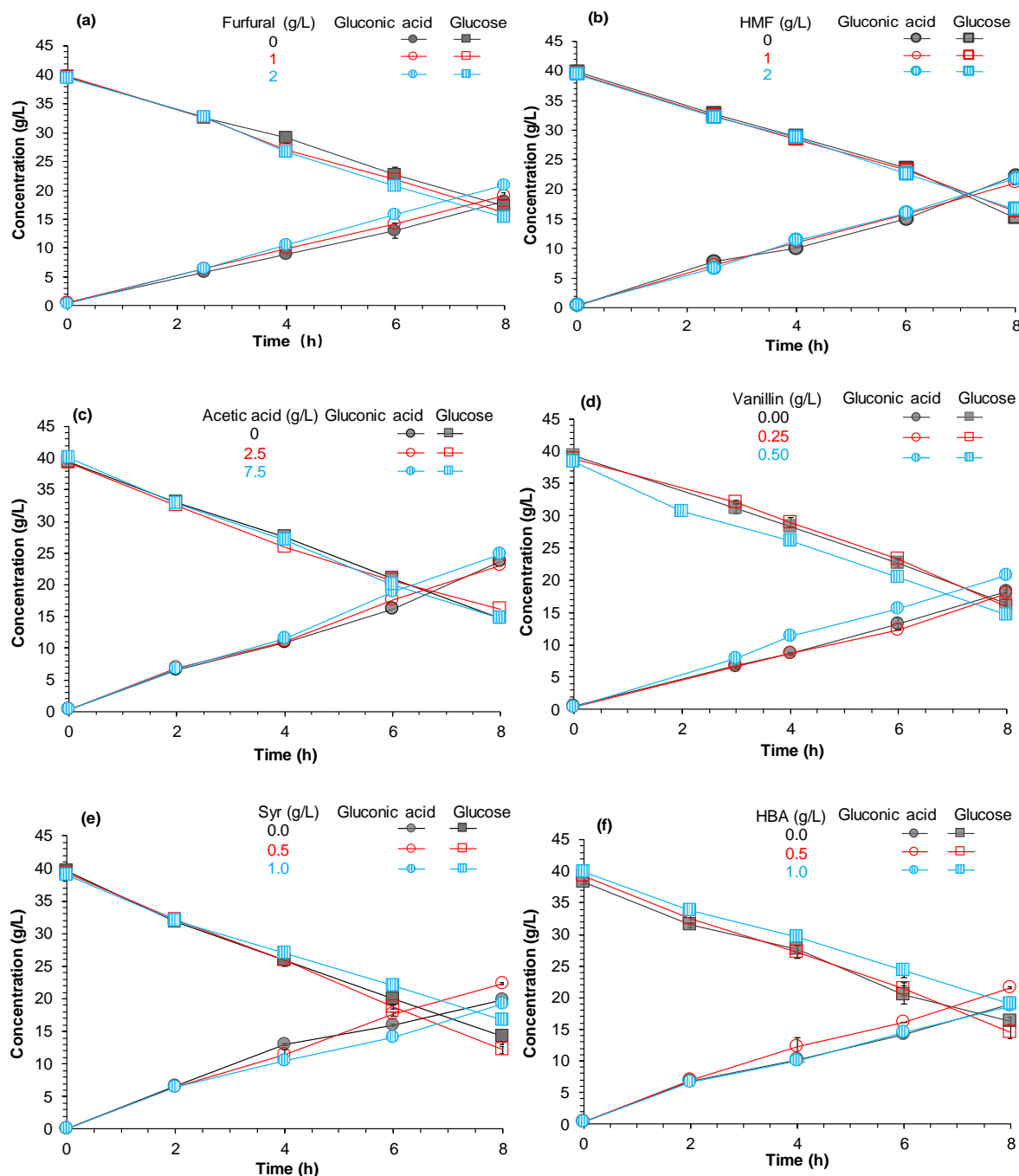


图 2.3 不同抑制物胁迫下利用 *G. oxydans* DSM 2003 全细胞催化纯葡萄糖生成葡萄糖酸

(a) 糠醛胁迫; (b) HMF 胁迫; (c) 乙酸胁迫; (d) 香草醛胁迫; (e) 丁香醛胁迫; (f) 4-羟基苯甲醛胁迫; 实验在 250 mL 的摇瓶中进行, 装液量 50 mL, 催化条件为温度 30°C, 转速 220 rpm, pH 5~6, 初始 OD₆₀₀ 为 1, 每 4 h 通过 5 M 氢氧化钠调节一次 pH。

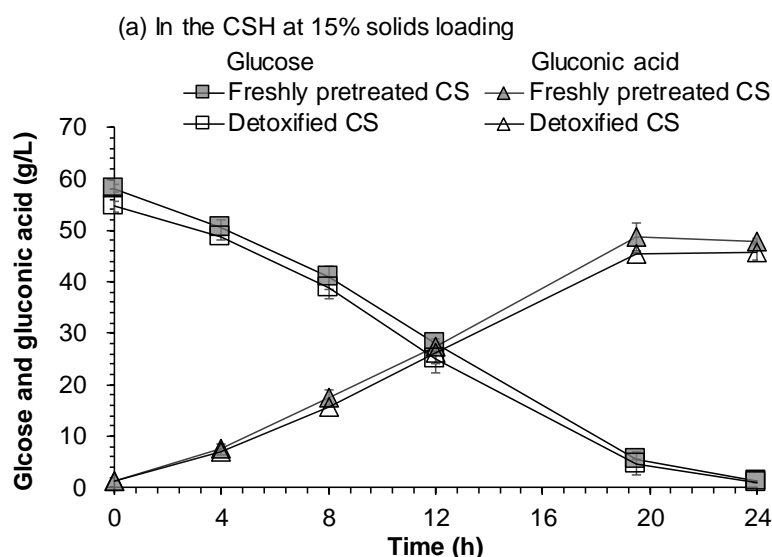
Fig. 2.3 Gluconic acid production catalyzed by whole-cell of *G. oxydans* under the stress of inhibitors.

(a) Furfural; (b) HMF; (c) Acetic acid; (d) Vanillin; (e) Syringaldehyde; (f) HBA; The well pretreated resting cells were inoculated to 250 mL flask containing 45 mL of 40 g/L pure glucose solution premixed with the individual inhibitor compounds at desired concentration with a inoculum size of 10% (v/v). The catalyze was carried out at 30°C, pH 5.5, 220 rpm for 8 h.

而单一抑制物胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 的发酵实验 (图 2.2) 中, 高浓度抑制物对产葡萄糖酸的抑制应该源自其对细胞生长的抑制而导致的参与葡萄糖酸合成菌体的减少。

(4) 利用 *G. oxydans* DSM 2003 全细胞催化玉米秸秆水解液产葡萄糖酸

由于真实的玉米秸秆水解液的抑制物成分更加复杂^[127], 且抑制物间还存在协同抑制的情况^[41, 126]。我们同样在固定 *G. oxydans* DSM 2003 生物量的 OD₆₀₀ 为 1 的前提下, 以未脱毒玉米秸秆水解液 (CSH) 为底物进行了催化实验, 并以经生物脱毒的 CSH 做对照, 来考察该菌产酸过程对复杂成分抑制物的耐受能力。本研究分别选取了固含量为 15%、20%、30% 的经生物脱毒与未经脱毒的三组玉米秸秆水解液。如材料与amp;方法所示 15% (w/w)、20% (w/w) 30% (w/w) 固含量脱毒水解液中的抑制物已经基本完全移除, 而相应的新鲜预处理玉米秸秆水解液 (未脱毒水解液) 中依然存在大量的呋喃类, 酚类和弱酸类抑制物, 且 15% (w/w), 20% (w/w), 30% (w/w) 未脱毒水解液的抑制物含量随着固含量的增加而增加。催化结果如图 2.4 所示, 在 15% (w/w) 固含量水解液中, *G. oxydans* DSM 2003 在未脱毒水解液中生产葡萄糖酸速率反而略快于脱毒水解液 (图 2.4a)。在 20% (w/w) 固含量水解液中, 催化前期 *G. oxydans* 在未脱毒水解液中的产酸略强于脱毒水解液, 催化后期在两种水解液中基本一致 (图 2.4b)。在 30% (w/w) 固含量水解液中, *G. oxydans* DSM 2003 在未脱毒水解液中的产酸速率也略大于脱毒水解液 (图 2.4 c)。固含量大于 20% (w/w) 的未脱毒水解液中含有很高浓度的抑制物, 使得大部分发酵菌株不能进行生长和产品生产^[128, 63, 117]。但 *G. oxydans* DSM 2003 的静息细胞在未脱毒水解液中催化产葡萄糖酸的速率反而均略强于脱毒水解液, 这说明 *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸合成过程对未脱毒水解液里的多种抑制物及其产生的协同作用有极强的耐受能力, 这为 *G. oxydans* DSM 2003 在高抑制物含量未脱毒水解液中极好的产酸性能提供了解释。



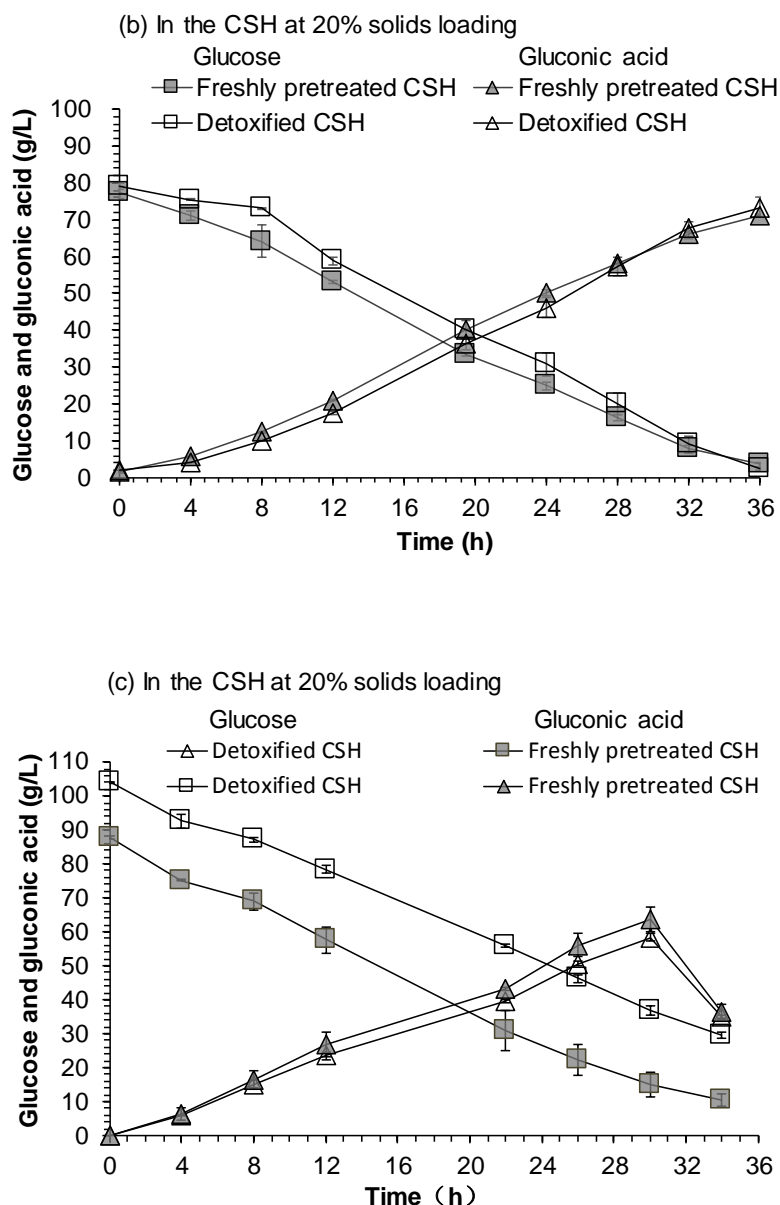


图 2.4 利用 *G. oxydans* DSM 2003 全细胞催化 detoxified 与未 detoxified 玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸

(a) 15%固含量玉米秸秆水解液；(b) 20%固含量玉米秸秆水解液；(c) 30%固含量实验在 250 mL 的摇瓶中进行，装液量 50 mL，催化条件为：温度 30 °C，转速 220 rpm，pH 5~6，初始 OD₆₀₀ 为 1，每 4 h 通过 5 M 氢氧化钠调节一次 pH。

Fig. 2.4 Whole-cell catalysis for gluconic acids production by *G. oxydans* DSM 2003 using detoxified and freshly pretreated (without detoxified) corn stover hydrolysates

(a) 15% solids loading; (b) 20% solids loading; (c) 30% solids loading. The well pretreated resting cells were inoculated to 250 mL flask containing 45 mL of corn stover hydrolysate with a inoculum size of 10% (v/v). The catalyze was carried out at 30°C, pH 5.5, 220 rpm.

2.3.2 葡萄糖酸合成途径中相关酶的抑制物耐受性能分析

本节进一步从酶学水平和转录水平探究抑制物胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 良好产酸性能的机理。*G. oxydans* DSM 2003 生产葡萄糖酸主要是通过 mGDH 耦合呼吸链在胞外直接氧化葡萄糖进行的^[129-131, 123]。与乙醇，乳酸，赖氨酸，谷氨酸等产品生成需要中

心碳代谢或者胞内代谢途径的参与不同,葡萄糖向葡萄糖酸的生物转化只与膜蛋白葡萄糖脱氢酶以及细胞膜上的呼吸链相关,并未参与细胞内部的复杂代谢活动,这使得产酸过程相对不易受其他胞内代谢的扰动^[123]。所以要探究 *G. oxydans* DSM 2003 产葡萄糖酸过程强抑制物耐受性机理,就首先需要了解细胞膜上葡萄糖酸合成相关酶的抑制物耐受能力。针对这个问题,本文一方面考察了产酸关键酶葡萄糖脱氢酶的抑制物耐受能力;另一方面在抑制物胁迫下检测了产酸相关酶编码基因的转录水平,希望借此判断这些酶的生物合成是否受到抑制物的影响;

(1) 抑制物对葡萄糖酸合成关键酶葡萄糖脱氢酶酶活的影响

之前抑制物胁迫下的全细胞催化证实,在固定细胞量的前提下,抑制物的存在不会影响 *G. oxydans* DSM 2003 将葡萄糖氧化为葡萄糖酸的速率和效率,这说明了 *G. oxydans* DSM 2003 中葡萄糖酸合成过程极强的抑制物耐受能力。本文接下来希望从酶学水平对该现象进行解释。

葡萄糖脱氢酶直接催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸内酯,是葡萄糖酸合成中最为关键的酶。*G. oxydans* DSM 2003 中存在两种葡萄糖脱氢酶催化葡萄糖酸的产生。一种是膜结合的 PQQ 依赖型葡萄糖脱氢酶 (mGDH),一种是胞内可溶的 NADP⁺依赖型葡萄糖脱氢酶 (sGDH)。mGDH 能在胞外将 90%以上的葡萄糖氧化为葡萄糖酸,起到最为主要的葡萄糖酸合成作用。而 sGDH 在胞内完成葡萄糖氧化,产生的葡萄糖酸大部分被磷酸化后用于生长,对于产酸仅起到微弱的作用^[108]。现对 *G. oxydans* DSM 2003 产葡萄糖酸关键酶 mGDH 的抑制物耐受性能进行考察。

在 *G. oxydans* DSM 2003 细胞膜上的酶系中, mGDH 是唯一催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸的酶^[134, 135]。因此本文直接提取 *G. oxydans* DSM 2003 的全部膜蛋白,并用该粗蛋白催化葡萄糖产葡萄糖酸,然后以葡萄糖酸的生成速率表征粗酶酶活。实验条件和相对酶活性的计算方法如材料与方法 2.2.3 所示。结果如图 2.5A 所示:即使在高浓度呋喃类抑制物糠醛 (2 g/L) 和 5-羟甲基糠醛 (2 g/L) 胁迫下, mGDH 的酶活力下调不超过 6%。在三种酚类抑制物胁迫下,高浓度的香草醛(0.5g/L)、4-羟基苯甲醛 (1g/L)、丁香醛 (0.5 g/L) 对 mGDH 酶活性的抑制不超过 10%。高浓度乙酸 (7.5 g/L) 对 mGDH 酶活性的抑制不超过 7% (图 2.5A)。在较低浓度糠醛 (1 g/L), 5-羟甲基糠醛 (1 g/L), 丁香醛 (0.5 g/L), 4-羟基苯甲醛 (0.5 g/L), 香草醛 (0.25 g/L), 乙酸 (2.5 g/L) 胁迫下, mGDH 酶活性的抑制程度更低。这一结果显示了 mGDH 对抑制物超强的耐受能力。事实上,如材料与方法 2.2.5 所示即使是固含量高达 25%的未脱毒水解液中糠醛, 5-羟甲基糠醛, 香草醛, 丁香醛, 4-羟基苯甲醛, 乙酸的含量分别仅为 0.67 g/L, 0.5 g/L, 0.01 g/L, 0.32 g/L, 0.04 g/L, 7.5 g/L。而经过生物脱毒后这些抑制物就分别降到了 0 g/L, 0 g/L, 0 g/L, 0.002 g/L, 0.25 g/L, 1.6 g/L。结合单一抑制物对 mGDH 酶活性的影响程度,我们可以得出即使是未脱毒水解液中的抑制物对该酶活性的影响也非常小,而脱毒水解液中如此低的抑制物浓度根本不足以对该酶产生影响。

这与之前抑制物胁迫下的全细胞催化结果一致。说明 mGDH 极强抑制物耐受性，是 *G. oxydans* 中葡萄糖酸合成过程不受抑制物影响的基础，也是本质原因。

(2) 抑制物对葡萄糖酸生产相关酶系转录水平的影响

对于原核生物而言，基因表达的调控主要发生在转录水平，也就是说转录水平往往在很大程度上决定着该基因编码蛋白的生物合成量。本研究利用 DNA 芯片技术对抑制物胁迫下的葡萄糖酸合成相关基因的转录水平进行了检测。希望以此了解抑制物对这些酶合成的影响。

在 *G. oxydans* DSM 2003 中，葡萄糖酸的合成主要是通过 mGDH 耦合呼吸链在胞外直接催化葡萄糖进行的^[129-131, 123]。具体过程如下（详见图 1.4），mGDH 以 PQQ 为辅因子催化葡萄糖氧化为葡萄糖酸内酯，并将呼吸链上的泛醌还原为醌醇^[130]，醌醇进一步被细胞色素末端氧化酶 *bo₃/bd* 氧化，最终形成质子梯度产生 ATP^[129]。辅酶 PQQ 在葡萄糖氧化时接受电子被还原为 PQQH₂，在泛醌还原时又给出电子再生为 PQQ^[109]。葡萄糖内脂则可自发或者由内酯酶水解为葡萄糖酸。

鉴于以上产酸过程，产酸直接相关的酶及辅酶包括 mGDH，辅酶 PQQ，辅酶 Q，细胞色素 *bo₃*，细胞色素 *bd*。根据 NCBI 注释及相关文献，mGDH 的编码基因为 GOX0265^[132]。辅酶 PQQ 的合成是在 PQQspA/B/C/D/E，以及 *tldD* 的协作下完成的^[133]，其编码基因分别是 GOX0987，GOX0986，GOX0985，GOX0984，GOX0983，GOX1104。辅酶 Q 的合成蛋白的编码基因为 GOX0746，cytochrome *bo₃ oxidase* 由 CyoA/B/C/D/E 亚基组成，其编码基因分别为 GOX1911，GOX1912，GOX1913，GOX1914，GOX1864。Cytochrome *bd complex B/A* 的编码基因分别为 GOX0278，GOX0279。

根据 DNA 芯片数据（表 2.1），玉米秸秆水解液中含有最高的三种主要抑制物糠醛，HMF，乙酸并没有使得上述酸合成相关基因出现显著下调表达。这说明这三种抑制物均不会通过抑制产酸相关基因的转录而影响相应酶的生物合成。酚类化合物对这些产酸相关酶编码基因的转录水平产生了不同的影响。mGDH 的编码基因在香草醛，4-羟基苯甲醛胁迫下均下调表达。辅酶 PQQ 合成相关的 PQQE、PQQD、PQQC 蛋白的编码基因在三种酚类胁迫下也均下调表达。但是呼吸链末端氧化酶 Cytochrome *bd complex B/A* 以及 PQQA 的编码基因的转录水平在这三种酚类胁迫下均明显上调。这样该菌有可能通过提高呼吸链的强度加速氧化型 PQQ 的再生，克服由于转录水平抑制造成的 PQQ 合成减少。此外，如材料与方法 2.2.5 所示，即使固含量为 25% 未经脱毒玉米秸秆水解液中香草醛，4-羟基苯甲醛含量也不到本转录水平研究所用的抑制物浓度的 1/10，丁香醛仅为 1/3。水解液中这样低的酚类抑制物浓度对产酸相关酶转录水平的影响应该更为有限。

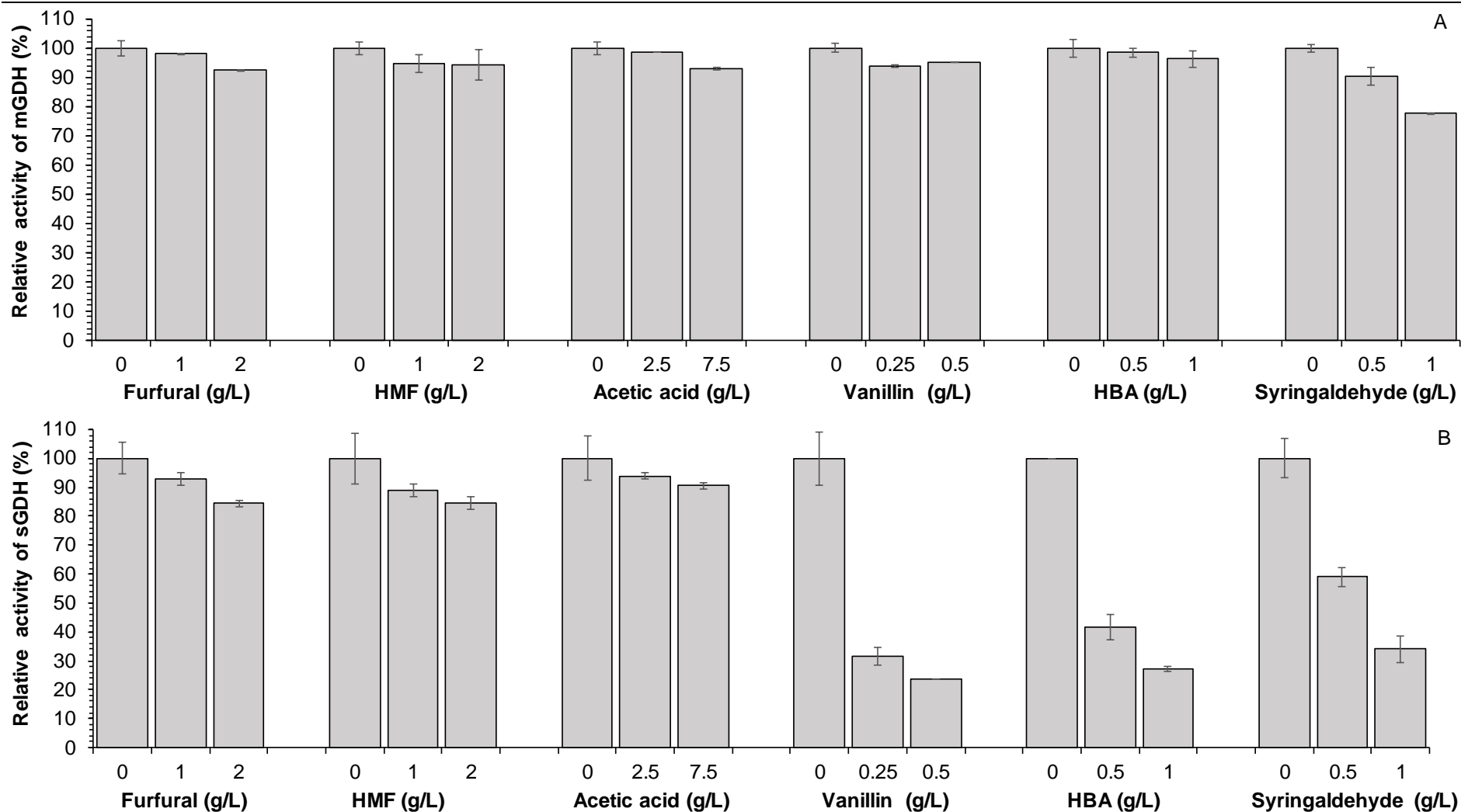


图 2.5 *G. oxydans* DSM 2003 中葡萄糖脱氢酶的抑制物耐受能力 (A) 膜结合葡萄糖脱氢酶 (mGDH); (B) 依赖 NADP 的葡萄糖脱氢酶(sGDH)。

Fig. 2.5 Inhibitor tolerance of glucose dehydrogenase of *G. oxydans* DSM 2003. (A) mGDH; (B) sGDH

该结果说明来源于玉米秸秆水解液的呋喃类以及弱酸类抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 产酸相关酶的转录水平几乎没有影响；而酚类化合物虽然对这些基因的转录水平产生了不同的影响，但是也有可能凭借自身调节克服了相关抑制。考虑到酚类化合物在水解液中极低的含量，真实水解液中抑制物对这些基因转录的影响甚至可忽略。总之木质纤维素来源抑制物通过抑制产酸相关基因的转录从而影响相关酶的生物合成的可能性极小。因此葡萄糖酸的合成不会因为相关酶的合成受阻而受到影响。

(3) NADP 依赖型葡萄糖脱氢酶 (sGDH) 抑制物耐受性

虽然 sGDH 在 *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸合成中起到的作用微乎其微，但因其也具备催化产葡萄糖酸的能力，本文探究了抑制物对 sGDH 酶活性及其编码基因转录水平的影响。本文利用基因芯片技术对 sGDH 的编码基因在抑制物胁迫下的转录情况进行了考察，结果表明抑制物在转录水平上均对 GDH 的编码基因没有明显影响(表 2.1)。

为了考察 sGDH 对抑制物的耐受能力，本研究将其编码基因 GOX2015 在 *E. coli* BL21 中进行过表达，并用 Ni 柱纯化。用纯化的 sGDH 催化葡萄糖产葡萄糖酸，以葡萄糖的消耗表征酶活。为了便于和 mGDH 进行对比，抑制物的浓度设置与 mGDH 一致。在高浓度呋喃类抑制物糠醛 (2 g/L) 和羟甲基糠醛 (2 g/L) 胁迫下 GDH 的酶活力被抑制了 16%。在酚类胁迫下 sGDH 酶活性受到更大影响。0.5 g/L 香草醛将 sGDH 酶活性抑制了 76%，1.0 g/L 的 4 羟基苯甲醛将 sGDH 酶活性抑制了 58%，1.0 g/L 丁香醛将 sGDH 酶活性抑制了 41%。7.5 g/L 的乙酸抑制了 12% (图 2.5B)。可见 sGDH 对抑制物的耐受性非常差，与 mGDH 形成了鲜明的对比。这很有可能与 sGDH 的辅因子是与醛类抑制物降解相关的 NADP 有关，而 mGDH 的辅因子是与抑制物降解无关的 PQQ，这为我们筛选抑制物耐受酶类提供了思路。

以上结果说明，木质纤维素来源抑制物对于葡萄糖酸合成相关酶的生物合成和关键酶活性的影响都非常有限。这两点为 *G. oxydans* DSM 2003 抑制物胁迫下良好的产酸性提供了分子层面的解释。

表 2.1 抑制物胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 中葡萄糖酸合成相关基因的转录水平
Table 2.1 Transcriptional level of gluconic acid synthesis related genes under the stress of inhibitors.

	locus_tag	protein	Furfural		HMF		Acetic acid	
			FC ^a	P-value	FC	P-value	FC	P-value
Glucose dehydrogenase	GOX0265	mGDH	-1.33	0.08	-1.14	0.15	+1.21	0.00
	GOX2015	GDH	-1.35	0.02	-1.28	0.06	-1.22	0.19
Ubiquinone biosynthesis protein	GOX0746	UbiH	-1.35	0.01	-1.29	0.30	-1.07	0.30
Cytochrome bo3 oxidase	GOX1864	CyoE	-1.13	0.05	-1.12	0.62	+1.07	0.03
	GOX1914	CyoD	-1.32	0.03	-1.11	0.02	-1.21	0.01
	GOX1913	CyoC	+1.26	0.05	-1.08	0.03	-1.21	0.23
	GOX1912	CyoB	-1.17	0.05	+1.05	0.84	+1.01	0.54
	GOX1911	CyoA	-1.37	0.01	-1.22	0.02	-1.25	0.15
Cytochrome bd complex B/A	GOX0278	CydA	+1.23	0.01	+1.20	0.07	-1.08	0.26
	GOX0279	CydB	+1.23	0.06	+1.23	0.66	+1.05	0.05
Coenzyme PQQ synthesis protein	GOX0983	PQQspE	-1.20	0.11	-1.27	0.23	+1.11	0.15
	GOX0984	PQQspD	-1.13	0.05	+1.15	0.44	-1.04	0.31
	GOX0986	PQQspB	+1.02	0.83	+1.10	0.96	+1.01	0.27
	GOX0987	PQQspA	+1.56	0.05	+1.84	0.21	+1.26	0.01
	GOX0985	PQQspC	-1.30	0.00	+1.30	0.17	-1.06	0.36
	GOX1104	TldD protein	+1.15	0.09	+1.15	0.34	-1.12	0.07

	locus_tag	protein	Vanillin		Syringaldehyde		HBA	
			FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
Glucose dehydrogenase	GOX0265	mGDH	-4.22	0.20	-1.14	0.40	-1.52	0.00
	GOX2015	GDH	+1.43	0.22	-1.17	0.10	-1.44	0.01
Ubiquinone biosynthesis protein	GOX0746	UbiH	-1.99	0.02	-1.21	0.03	-1.21	0.01
Cytochrome bo3 oxidase	GOX1864	CyoE	-1.30	0.96	+1.00	0.24	+1.10	0.12
	GOX1914	CyoD	-1.57	0.60	-1.08	0.48	-1.11	0.01
	GOX1913	CyoC	-1.50	0.92	-1.01	0.37	+1.04	0.66
	GOX1912	CyoB	+1.34	0.95	-1.01	0.24	+1.11	0.29
	GOX1911	CyoA	-1.48	0.99	-1.00	0.26	+1.08	0.46
Cytochrome bd complex B/A	GOX0278	CydA	+5.46	0.00	+1.74	0.00	+2.18	0.00
	GOX0279	CydB	+4.91	0.00	+1.64	0.01	+1.95	0.00
Coenzyme PQQ synthesis protein	GOX0983	PQQspE	-2.52	0.00	-1.47	0.05	-1.89	0.00
	GOX0984	PQQspD	-2.06	0.01	-1.36	0.05	-1.34	0.00
	GOX0986	PQQspB	+1.21	0.95	+1.01	0.65	+1.16	0.22
	GOX0987	PQQspA	+1.89	0.07	+1.48	0.20	+1.53	0.02
	GOX0985	PQQspC	-1.83	0.00	-1.62	0.02	-1.80	0.00
	GOX1104	TldD protein	+1.13	0.02	+1.17	0.17	+1.25	0.00

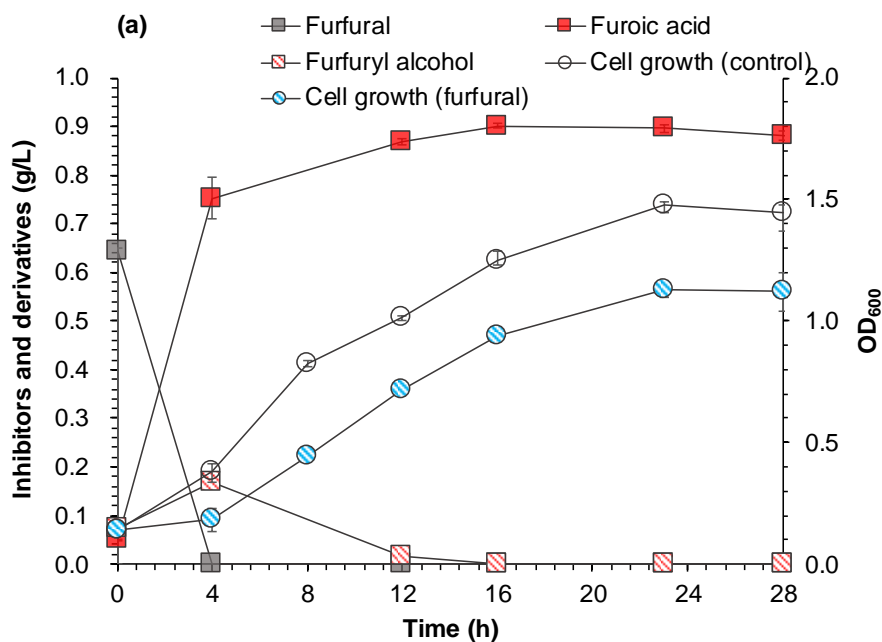
^a FC, Fold change; Red indicates up-regulated expression (positive number) with more than 1.5-fold change ; Green indicates down-regulated expression (negative number) with more than 1.5-fold change.

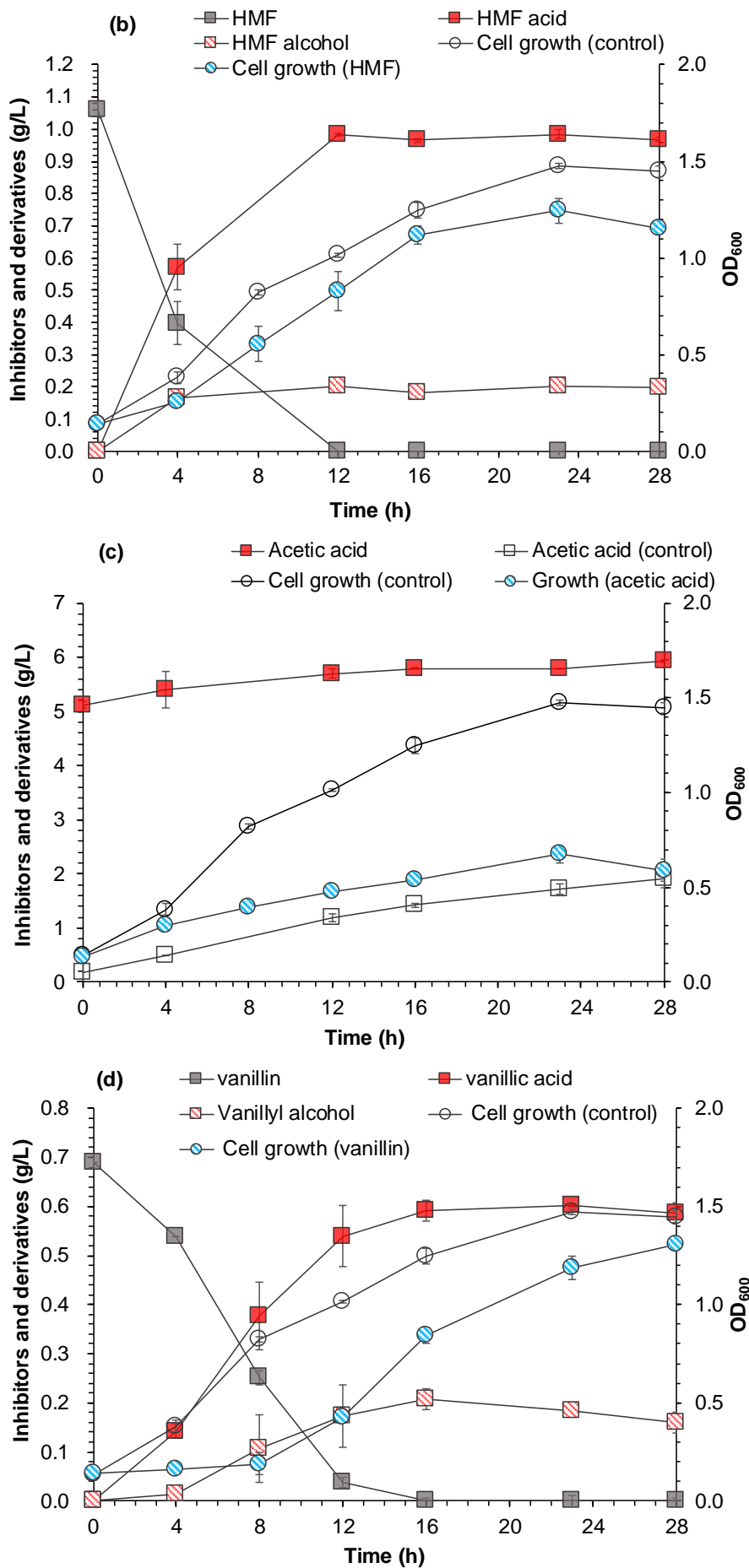
2.3.3 *G. oxydans* DSM 2003 对醛类抑制物的降解特性及相关酶的挖掘

根据本文 2.3.1 中 *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆水解液发酵产葡萄糖酸的实验结果以及本实验室之前的研究结果，我们得出 *G. oxydans* DSM 2003 具有强大的抑制物耐受能力，能够在含高浓度抑制物的玉米秸秆水解液中不经延滞期便快速进入生长，即对未脱毒玉米秸秆水解液体系有很好适应能力。

(1) *G. oxydans* DSM 2003 对抑制物的降解

考虑到微生物对抑制物的耐受通常是通过对其有效、快速的降解实现^[137, 138, 125]，本研究接着进行了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源抑制物的降解转化实验，以考察 *G. oxydans* DSM 2003 对这些抑制物的降解能力，及其与菌体自身生长之间的联系。在抑制物浓度不足以对生长产生严重抑制，且高于真实水解液中含量的双重限定下，抑制物浓度最终分别被定为 0.65 g/L 糠醛，1.1 g/L 5-羟甲基糠醛，0.9 g/L 丁香醛，0.7 g/L 香草醛，0.6 g/L 4-羟基苯甲醛，5 g/L 乙酸。结果显示，*G. oxydans* DSM 2003 可以将糠醛快速转化为相应的酸和醇，并最终将其完全氧化为糠酸（图 2.6a）；可将 5-羟甲基糠醛，香草醛，4-羟基苯甲醛快速转化为相应的醇和酸，并最终将每种醛类物质的大部分氧化为相应的酸，少部分还原为醇（图 2.6b, d, f）。该菌也可将丁香醛较为缓慢的还原为相应的醇（图 2.6e）。同时对于所有的醛类抑制物，*G. oxydans* DSM 2003 在将其彻底或者部分转化后，就度过延滞期进入与未加抑制物的对照生长速率几乎相同的对数期（图 2.6a, b, d, e, f）。这一方面说明 *G. oxydans* DSM 2003 可以通过将醛类快速转化为毒性较低的醇或酸来缩短延滞期并快速进入生长状态，另一方面也说明这些醇和酸作为抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 生长的影响极小。





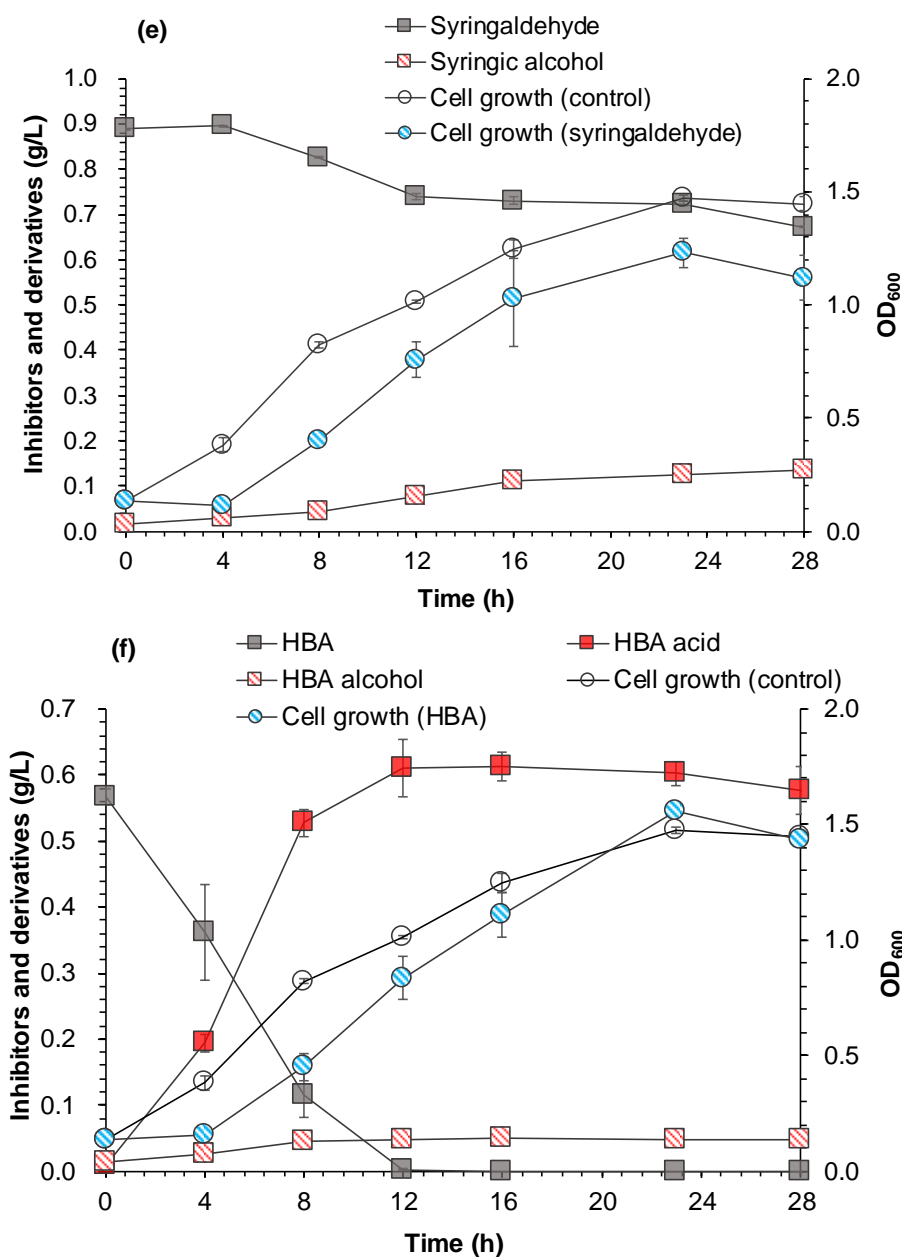


图 2.6 *G. oxydans* DSM 2003 对不同抑制物的降解性能

(a) 糠醛降解；(b) 5-羟甲基糠醛降解；(c) 乙酸降解；(d) 香草醛降解；(e) 丁香醛降解；(f) 4-羟基苯甲醛降解。发酵实验在 250 mL 摇瓶中进行，装液量 50 mL，实验条件为温度 30°C，转速 220 rpm，pH 5~6，每 4 h 通过 5 M 氢氧化钠调节一次 pH。对照为发酵培养基不加抑制物。

Fig. 2.6 Inhibitor degradation behaviors of *G. oxydans* DSM 2003.

(a) Furfural ; (b) HMF; (c) Acetic acid;(d) Vanillin; (e) Syringaldehyde; (f) HBA; Substrate: fermentation medium containing the individual inhibitor compound at desired concentration; The control do not contain any inhibitors. Condition: 30°C, pH 5~6, 220 rpm, 10% (v/v) of inoculum size, 50 mL liquid in 250 mL flask.

对于弱酸类抑制物，乙酸不仅不能被降解，还会作为副产物被额外的合成(图 2.6c)。

虽然乙酸胁迫下没有产生额外的延滞期，但是菌体生长速率始终低于对照（图 2.6c），这与乙酸不能被降解而持续性的产生抑制作用相关。这也就解释了 *G. oxydans* DSM 2003 生长速率低于脱毒水解液的现象。

总之，*G. oxydans* 能够极快的将引起延滞期的醛类物质转化为相应的、对该菌生长几乎没有影响的酸和醇，并借此快速进入生长对数期。考虑到发酵罐比摇瓶有更好的供氧和 pH 控制能力，使菌体的生长和活性更好，因此能更快的转化醛类。且根据材料与方法 2.2.5，水解液中醛类抑制物总和并不多。这就解释了在发酵罐中，*G. oxydans* 在高达 20% (w/w) 固含量的未脱毒玉米秸秆水解液中进行发酵时没有出现明显延滞期现象。这么短的延滞期在目前所有的具有抑制物耐受能力的发酵菌株中都十分罕见。

本文利用 DNA 芯片技术进行了抑制物胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 的转录组分析，发现大量具有醛类抑制物转化潜力的氧化还原酶编码基因显著上调。这可能是该菌在应对抑制物胁迫时通过自身调节大量合成抑制物转化相关酶，以提高自身的抑制物转化能力的机制。下面对这些基因及其表达蛋白的功能进行总结。

(2) 醛类抑制物转化相关基因

负责醛类抑制物转化的酶通常具有广泛的底物特异性。将醛类还原为相应的醇，或者催化反向反应的酶类一般均以 NAD(P)H 为辅酶，包括醇脱氢酶 (ADH)、醛酮还原酶、醛还原酶以及作用于 C-OH 基团的氧化还原酶；而需要氧气参与的醛氧化酶和依赖 NAD(P)⁺ 的醛脱氢酶 (ALDH) 则可能将醛类氧化为相应的酸^[125]。本文利用 DNA 芯片技术找出在不同抑制物胁迫下上调的上述具有抑制物转化潜力的酶的编码基因。

在糠醛胁迫下转录水平上调的基因中五个醇脱氢酶 (GOX1187, GOX2215, GOX2088, GOX0855, GOX0854)，一个酮还原酶 (GOX2594)，三个可以作用于 C-OH 基团的氧化还原酶 (GOX1199, GOX1168, GOX1857) 具有将糠醛转化为糠醇或反向催化的潜力。两个醛脱氢酶 (GOX0499, GOX1122) 具有将糠醛氧化为糠酸的潜力。此外还有功能不明确的两个脱氢酶，一个氧化还原酶以及 29 个假定基因在糠醛胁迫下上调表达。这些基因有可能在糠醛的转化中起到作用（图 2.7a）。

5-羟甲基糠醛的胁迫下，除了与糠醛存在下一致上调的五个醇脱氢酶和一个酮还原酶外，两个作用于 C-OH 基团的氧化还原酶 (GOX1857, GOX1271)，一个酮醇氧化酶 (GOX2658) 也上调表达，这些酶具有将糠醛还原为糠醇的潜力。另外两个与糠醛一致上调的醛脱氢酶 (GOX0499, GOX1122) 具有将 5-羟甲基糠醛转化为酸的潜力（图 2.7b）。在 HMF 胁迫下有 33 个上调的假定基因其中 22 个与糠醛一致。

在香草醛胁迫下具有将香草醛转化为相应的醇潜力的转录水平上调的基因包括八个醇脱氢酶 (GOX1432, GOX1187, GOX2215, GOX0855, GOX0854, GOX2676, GOX0865, GOX2181)，三个酮还原酶 (GOX2594, GOX0476, GOX0849)，两个短链脱氢酶 (GOX0458, GOX1538)，七个作用于 C-OH 的氧化还原酶的编码基因 (GOX1899,

GOX1199, GOX1139, GOX0644, GOX0478, GOX0319, GOX1458)。在香草醛胁迫下具有将香草醛转化为香草酸或催化反向反应潜力的转录水平上调的基因包括一个醛氧化酶 (GOX0653) 和 5 个醛脱氢酶 (GOX1712, GOX2110, GOX2376, GOX0499, GOX1122)。42 个假设基因以及功能不明的两个脱氢酶、一个氧化还原酶在香草醛胁迫下上调表达, 这些基因可能具有转化香草醛的作用 (图 2.7e)。

在丁香醛胁迫下, 有三个醇脱氢酶 (GOX2215, GOX2088, GOX0855), 一个醌还原酶 (GOX2594), 三个作用于 C-OH 的氧化还原酶 (GOX1271, GOX1199, GOX0319) 的编码基因上调表达。这些酶具有将丁香醛转化为丁香醇的潜力 (图 2.7d)。此外还有作用基团未知的两个脱氢酶和一个氧化还原酶以及 19 个假设基因在丁香醛的胁迫下上调表达, 这些基因编码蛋白可能催化丁香醛转化为丁香醇。

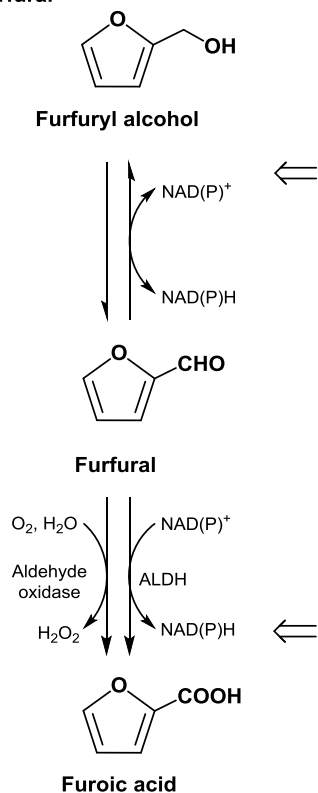
在 4-羟基苯甲醛的胁迫下, 有四个醇脱氢酶 (GOX1187, GOX2215, GOX0855, GOX2181), 六个作用于 C-OH 基团的氧化还原酶 (GOX0502, GOX1168, GOX1199, GOX1899, GOX1458, GOX1170), 一个醌还原酶 (GOX2594) 的编码基因上调表达。这些酶具有将醛转化醇的潜力 (图 2.7c)。succinate-semialdehyde dehydrogenase 的编码基因 GOX1122 也上调表达, 该酶可能催化 4-羟基苯甲醛到 4-羟基苯甲酸。此外还有作用于未知基团的一个脱氢酶和一个氧化还原酶以及 34 个假设基因在 4-羟基苯甲醛的胁迫下上调表达, 这些基因编码的蛋白可能催化 4-羟基苯甲醛到醇的转化。

在三种酚醛胁迫下上调的九个醇脱氢酶中有四个至少在两种酚醛胁迫下上调表达, 分别是 GOX1187, GOX2215, GOX0855, GOX2181, 其中 GOX2215 在三种酚类胁迫下均上调表达。在三种酚醛胁迫下上调的十个氧化还原酶的编码基因中有 4 个在至少两种酚醛胁迫下上调表达, 分别是 GOX1199, GOX1899, GOX1458, GOX0319, 其中 GOX1199 在三种酚类胁迫下均上调表达。在三种酚醛胁迫下上调的三个醌还原酶中, GOX2594 在三种酚醛胁迫下均上升。

在五种醛类抑制物胁迫下均上调表达的基因为一个醇脱氢酶的编码基因 GOX2215, 一个醌还原酶的编码基因 GOX2594, 以及作用基团不明的一个脱氢酶的编码基因 GOX0572 和一个氧化还原酶的编码基因 GOX1271。此外还有六个假定基因 GOX0667, GOX0661, GOX0490, GOX2471, GOX2699, GOX1925 在五种醛的胁迫下均上调表达。

这些基因这不仅从分子水平解析 *G. oxydans* 的抑制物降解路径, 也为其它生物炼制微生物耐受性改造提供了基因元件资源。

(a) Furfural

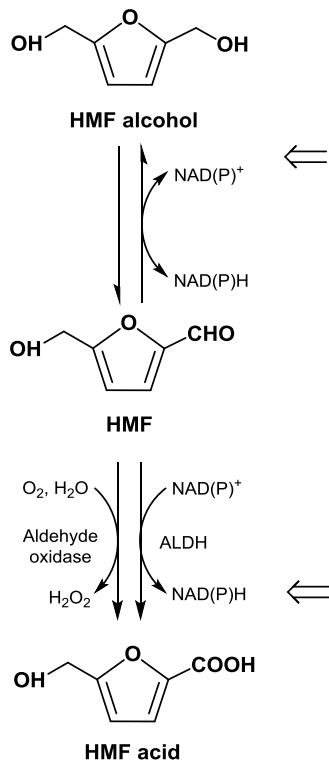


ADH:	GOX1187 (1.80), GOX2088 (1.55), GOX2215 (1.86) , GOX0854 (1.92), GOX0855 (1.97)
Quinone reductase:	GOX2594 (2.72)
Oxidoreductase:	GOX1168 (1.60), GOX1199 (2.37)

Dehydrogenase:	GOX0572 (1.82) , GOX1849 (1.71),
Oxidoreductase:	GOX1271 (1.92)
Hypothetical protein:	GOX0235 (2.38), GOX0422 (2.66), GOX0490 (1.85) , GOX0568 (2.03), GOX0661 (1.69) , GOX0667 (5.97) , GOX0828 (2.31), GOX0886 (2.05), GOX1183 (2.09), GOX1185 (2.09), GOX1197 (2.26), GOX1339 (2.42), GOX1344 (2.80), GOX1510 (2.07), GOX1841 (2.31), GOX1925 (1.91) , GOX2028 (2.01), GOX2075 (2.09), GOX2216 (2.17), GOX2361 (2.22), GOX2437 (2.06), GOX2471 (1.81) , GOX2485 (2.22), GOX2534 (2.28), GOX2538 (2.13), GOX2602 (2.02), GOX2686 (2.04), GOX2699 (1.72) , GOX2733 (2.25),

ALDH:	GOX0499 (2.27), GOX1122 (1.81)
-------	---------------------------------------

(b) HMF

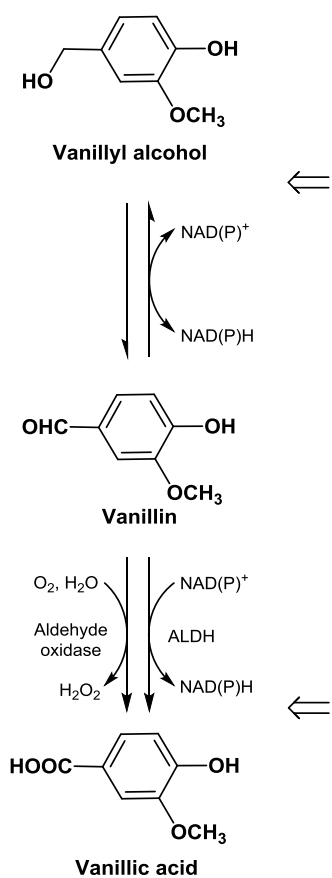


ADH:	GOX0854 (1.81), GOX0855 (2.10), GOX1187(2.86), GOX2088 (1.55), GOX2215 (1.85)
Quinone reductase:	GOX2594 (2.64)

Dehydrogenase:	GOX0572 (1.64)
Oxidoreductase:	GOX1271 (1.93)
Hypothetical protein:	GOX0235 (2.14), GOX0422 (3.09), GOX0490 (1.77) , GOX0661 (1.61) , GOX0667 (4.55) , GOX0828 (2.34), GOX0886 (3.08), GOX1016 (2.31), GOX1031 (2.50), GOX1183 (2.59), GOX1185 (2.46), GOX1339 (2.60), GOX1344 (2.96), GOX1385 (2.30), GOX1510 (2.79), GOX1530 (2.12), GOX1925 (2.86) , GOX2028 (2.16), GOX2075 (2.25), GOX2361 (2.26), GOX2429 (2.28), GOX2471 (2.00) , GOX2530 (2.19), GOX2531 (2.13), GOX2534 (2.73), GOX2538 (2.49), GOX2551 (2.11), GOX2580 (4.37), GOX2602 (2.30), GOX2643 (2.40), GOX2655 (2.94), GOX2686 (2.51), GOX2699 (2.26)

ALDH:	GOX0499 (2.17), GOX1122 (1.62)
-------	---------------------------------------

(c) Vanillin

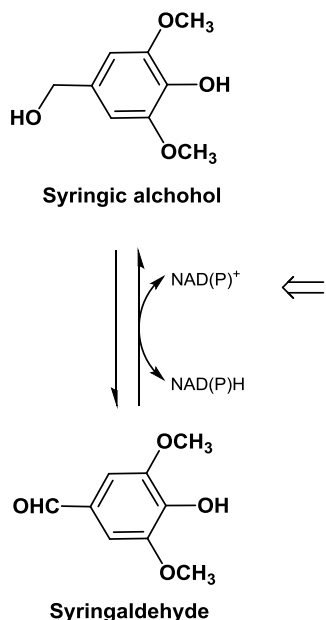


ADH:	GOX0854 (2.23), GOX0855 (2.15), GOX0865 (2.06), GOX1187 (2.65), GOX1432 (3.69), GOX2181 (1.67), GOX2215 (3.04) , GOX2676 (2.90)
SDR:	GOX0458 (2.49), GOX1538 (3.12)
Quinone reductase:	GOX0476 (1.94), GOX0849 (3.14), GOX2594 (6.44) , GOX0319 (2.74), GOX0478 (2.39), GOX0644 (2.21), GOX1139 (4.02), GOX1199 (2.02), GOX1458 (1.82), GOX1899 (2.04)

Dehydrogenase:	GOX1849 (4.15), GOX0572 (5.68)
Oxidoreductase:	GOX1271 (3.30)
Hypothetical protein:	GOX0235 (5.45), GOX0294 (4.68), GOX0318 (3.03), GOX0329 (3.38), GOX0337 (5.07), GOX0489 (7.19), GOX0490 (4.32) , GOX0511 (5.47), GOX0568 (4.82), GOX0661 (8.61) , GOX0667 (15.7) , GOX0734 (4.62), GOX0797 (3.53), GOX0827 (5.76), GOX0828 (10.48), GOX0880 (8.81), GOX1006 (3.05), GOX1185 (4.47), GOX1234 (4.23), GOX1278 (3.03), GOX1326 (4.15), GOX1339 (5.19), GOX1344 (3.55), GOX1534 (3.00), GOX1618 (3.47), GOX1633 (3.77), GOX1634 (12.01), GOX1841 (7.05), GOX1869 (3.28), GOX1910 (4.22), GOX1925 (2.52) , GOX2028 (3.01), GOX2059 (4.20), GOX2083 (3.00), GOX2216 (3.47), GOX2246 (3.18), GOX2361 (3.61), GOX2437 (3.24), GOX2453 (3.42), GOX2461 (3.01), GOX2471 (1.83) , GOX2534 (3.10), GOX2699 (2.71)

Aldehyde oxidase:	GOX0653 (3.76)
ALDH:	GOX0499 (2.47), GOX1122 (4.77) , GOX1712 (2.44), GOX2110 (3.21), GOX2376(2.10)

(d) Syringaldehyde



ADH:	GOX0855 (1.63), GOX2088 (1.76), GOX2215 (1.78) ,
Quinone reductase:	GOX2594 (2.86)
Oxidoreductase:	GOX0319 (2.26), GOX1199 (1.66)

Dehydrogenase:	GOX0572 (1.85) , GOX1849 (1.66),
Oxidoreductase:	GOX1271 (1.69)
Hypothetical protein:	GOX0198 (2.28), GOX0235 (2.21), GOX0318 (2.16), GOX0318 (2.16), GOX0490 (1.55) , GOX0536 (5.13), GOX0568 (2.14), GOX0661 (2.01) , GOX0667 (5.43) , GOX0667 (5.43) , GOX0828 (2.55), GOX0880 (2.64), GOX1634 (3.53), GOX1925 (2.21) , GOX1925 (2.21), GOX2059 (2.47), GOX2060 (2.45), GOX2471 (1.64) , GOX2699 (2.09) ,

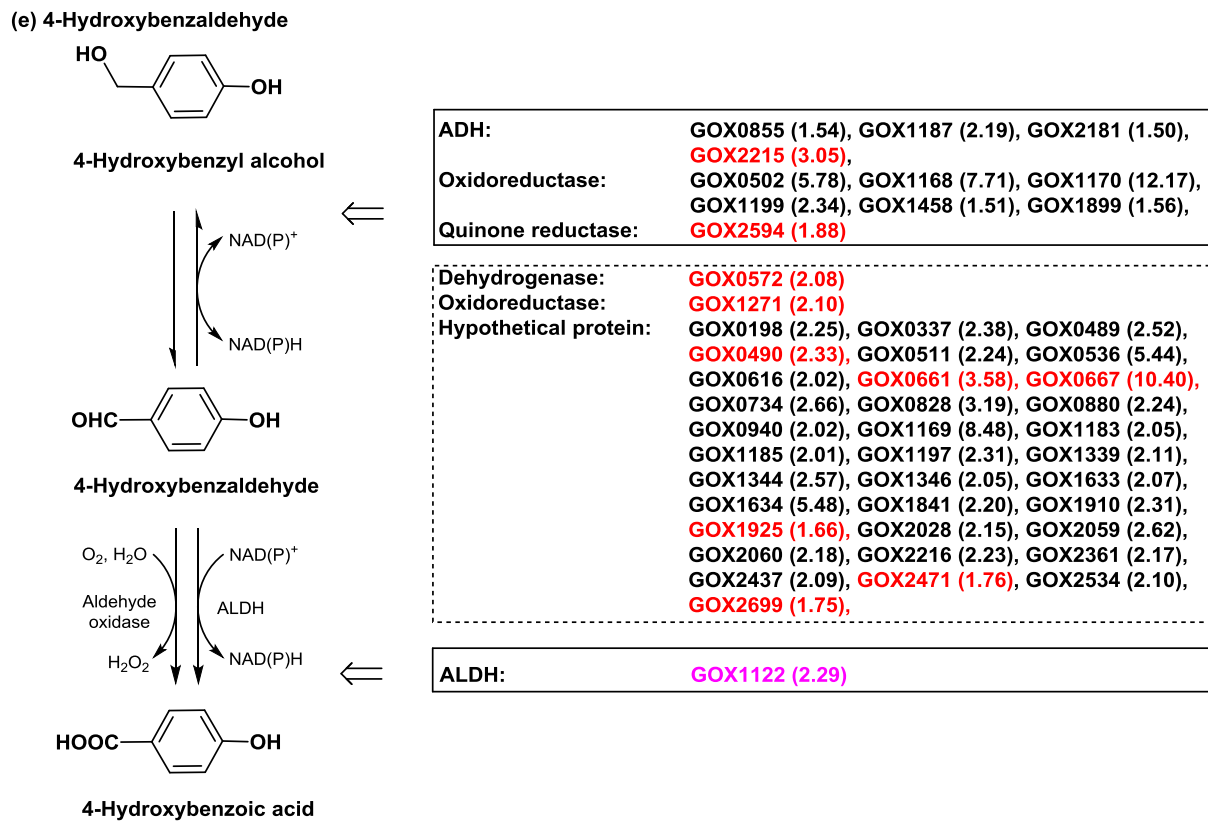


图 2.7 *G. oxydans* DSM 2003 对醛类抑制物的转化途径及相关酶的编码基因

(a) 糠醛转化途径；(b) 5-羟甲基糠醛转化途径；(c) 4-羟基苯甲醛转化途径；
(d) 丁香醛转化途径；(e) 香草醛转化途径。

虚线框内的基因具有抑制物转化潜力，但具体转化功能尚不明确。红色标志的基因在五种醛类抑制物胁迫下均显著上调表达；紫色标志的基因在除丁香醛外的其他四种醛类中均显著上调表达。

Fig. 2.7 The predicted aldehydes conversion pathways and the related genes of *G. oxydans* DSM 2003

(a) Furfural; (b) HMF; (c) 4-hydroxybenzaldehyde; (d) Syringaldehyde; (e) Vanillin.

ADH: alcohol dehydrogenase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; SDR: short chain dehydrogenase

2.3.4 *G. oxydans* DSM 2003 抑制物耐受性驯化

根据 2.3.3 中 *G. oxydans* DSM 2003 对六种模式抑制物降解特性及其对生长的影响可知，该菌能够极快的降解各种毒性极高的醛类抑制物，从而使得自身极快的度过延滞期进入生长状态。但是乙酸等物质由于不能被降解，始终抑制着 *G. oxydans* 菌体的生长速率，最终导致参与催化葡萄糖酸合成的细胞量下降，影响发酵效率。鉴于这一现象，本研究在新鲜预处理玉米秸秆水解液（未脱毒玉米秸秆水解液）中对 *G. oxydans* DSM 2003 进行了长期驯化，期望提高其对木质纤维素来源的各种抑制物的整体耐受能力。

(1) *G. oxydans* DSM 2003 抑制物抗逆性驯化

通常通过驯化会得到两种抑制物耐受菌株：一种是在诱导型，一种是组成型。诱导型指驯化的过程中某些与抑制物耐受性相关的酶由于抑制物的存在而被诱导，表现出一定的酶活性。当抑制物消失，酶活性消失，即菌株耐受性消失，这意味着这样的菌株具

有不稳定性。组成型抑制物耐受相关的酶的编码基因发生变化，这样得到的菌株具有相当的稳定性。为了得到组成型抑制物耐受菌株，本研究采取了将 *G. oxydans* 在含大量抑制物的未脱毒水解液和含极少量抑制物的脱毒水解液中进行交替驯化的策略。原因是组成型菌株在未脱毒水解液中不须经过诱导就具备抑制物耐受能力；而在经历了脱毒水解液驯化的诱导型失去优势，需要在未脱毒水解液中经历一定的时间的诱导才能具备耐受能力。这样在未脱毒水解液中，组成型菌株就比诱导型菌株更具有生长优势，在一代代的驯化中被富集挑选出来。

G. oxydans DSM 2003 在 84 代之前仅在未脱毒水解液中驯化，84 代以后在脱毒与未脱毒水解液中交替驯化。每 24 h 转接一次并取样，图 2.8 展示了驯化过程中 *G. oxydans* DSM 2003 在未脱毒水解液中的产酸量、残糖量、菌体生长的情况。由图可知随着驯化的进行 *G. oxydans* DSM 2003 的生长和产酸得到明显改善，并已经基本趋于稳定。

本研究接着在 15% 固含量新鲜处理的玉米秸秆水解液（未脱毒水解液）中，对经驯化的 *G. oxydans* DSM 2003 进行了发酵性能测定，对照为原始菌株。结果如图 2.9 所示，在相同的未脱毒水解液中，驯化菌株的延滞期缩短，生长速率加快，这可能意味着该驯化菌株不仅能够将引起延滞期的醛类物质更加快速的降解，同时对乙酸等不能被降解且抑制菌体生长速率的抑制物耐受能力加强。此外驯化菌株对木糖的转化速率明显加快，将发酵终止时间由 72 h 缩短到 36 h。这可能与菌体生长改善引起参与发酵的菌体量增加有最直接的关系。驯化菌株对葡萄糖的转化速率没有明显改善，则可能与发酵体系除催化剂（菌体）外的其他限制（如氧气，pH）相关，即葡萄糖的氧化速率已经达到其他某项限制因素的极限。

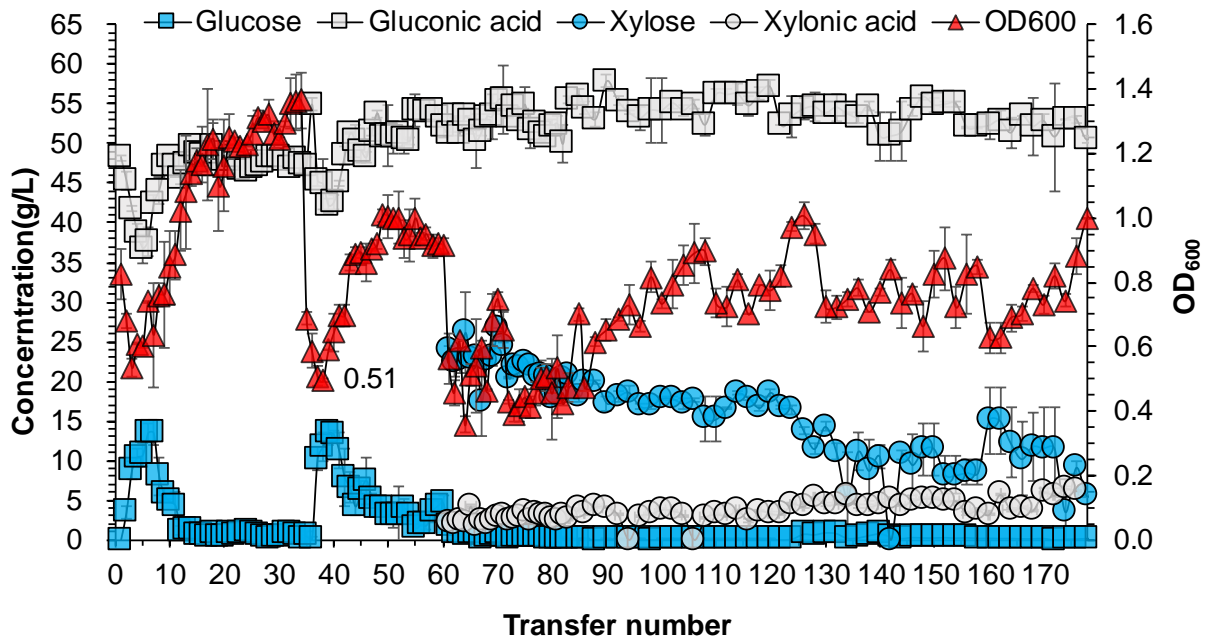


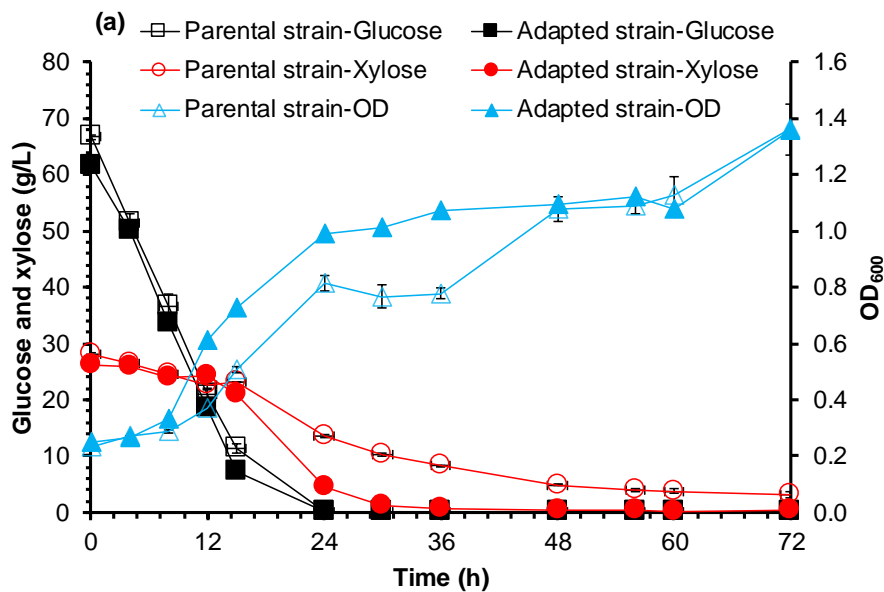
图 2.8 *G. oxydans* DSM 2003 在新鲜玉米秸秆水解液中的适应性长期驯化

水解液中预先加入 8g/L 碳酸钙（即 1/4 葡萄糖物质的量）调节 pH，驯化 12 h 后再加入 5 M 氢氧化钠将 pH 调至 5~6。驯化在 100 mL 摇瓶中进行，装液量 1/5。每 24 h 进行一次转接。

Fig. 2.8 Time course profile of the evolutionary adaptation of *G. oxydans* DSM 2003 in freshly pretreated (without detoxified) corn stover hydrolysates

Conditions: 30°C, 220 rpm, the inoculum size 20% (v/v), solids loading 15% (w/w). 20 mL liquid in 100 mL flask.

(2) *G. oxydans* DSM 2003 驯化菌株发酵性能



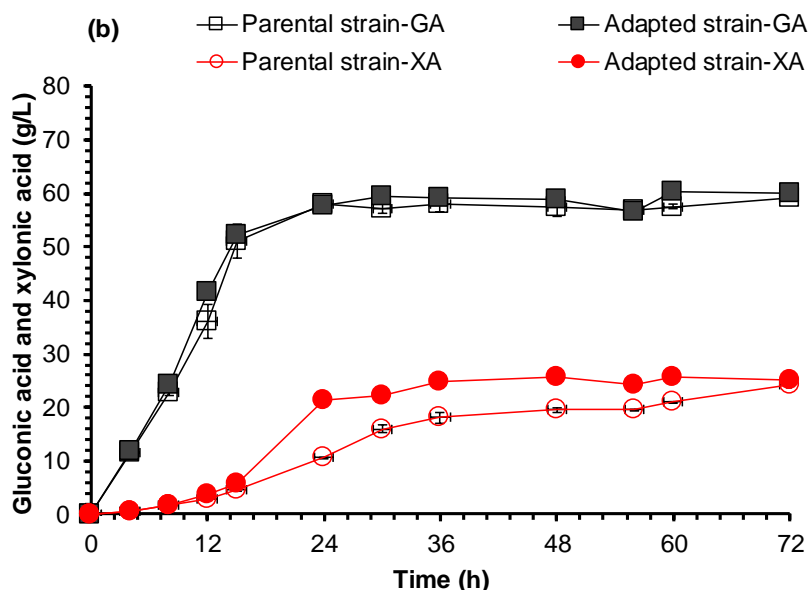


图 2.9 *G. oxydans* DSM 2003 驯化菌株在新鲜预处理玉米秸秆水解液中的发酵性能发酵实验在 250 mL 摇瓶中进行，装液量 50 mL，实验条件为温度 30°C，转速 220 rpm，pH 5~6，每 4 h 通过 5 M 氢氧化钠调节一次 pH。

Fig. 2.9 The fermentation performance of the adapted *G. oxydans* DSM 2003 in freshly pretreated (without detoxified) corn stover hydrolysates

Conditions: 30°C, pH 5~6, 250 rpm, inoculum size 10% (v/v), solids loading 15% (w/w). 50 mL liquid in 250 mL flask.

2.4 本章小结

本章考察了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源抑制物耐受性，并对其中的耐受机制进行了探索。得出以下结论。

本研究发现在木质纤维素来源的抑制物胁迫下，*G. oxydans* 生长受到一定抑制，但是仍具有很好的葡萄糖酸发酵性能。通过全细胞催化实验，发现在固定菌体量的前提下抑制物不会影响 *G. oxydans* 将葡萄糖氧化为葡萄糖酸的速率和效率，且葡萄糖合成关键酶——葡萄糖脱氢酶极强的抑制物耐受能力是其主要原因。通过对 *G. oxydans* 中产葡萄糖酸相关酶的转录水平进行分析，发现各种抑制物对葡萄糖酸生成路径中相关酶生物合成的影响极为有限，因而不大可能因为相关酶的合成受阻而影响葡萄糖酸的合成。

其次，通过抑制物降解实验，发现该菌能够将毒性极强的醛类抑制物快速转化为毒性较低的醇和酸，这可能是 *G. oxydans* DSM 2003 在高抑制物含量的未脱毒玉米秸秆水解液中的延滞期很短的主要原因。本文通过基因芯片技术对 *G. oxydans* 进行了抑制物胁迫下的转录组分析，发现大量具有醛类抑制物转化潜力的氧化还原酶编码基因显著上调。这些基因不仅从分子水平解析 *G. oxydans* DSM 2003 的抑制物降解路径，也为其它生物炼制微生物耐受性改造提供了基因元件资源。

另外，在新鲜玉米秸秆水解液（未脱毒）中进行的 *G. oxydans* DSM 2003 长期适应性进化培养使 *G. oxydans* 对抑制物耐受能力大幅增强，提高了其在水解液体系中的细胞生长速率和木糖转化速率。在固含量为 15% 的新鲜玉米秸秆水解液（未脱毒）中，驯化菌株 36 h 即可完成发酵，原始菌株需要 72 h。驯化菌株将发酵时间缩短为原始菌株的一半，提高了发酵效率，降低了生产成本。

第 3 章 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 木质纤维素水解液全糖转化

3.1 背景

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素三种物质组成。木质素是一类复杂的芳香聚合物。纤维素由葡萄糖聚合而成，可被纤维素酶降解为葡萄糖、纤维二糖、葡寡糖等。半纤维素由己糖（D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖），戊糖（D-木糖、L-阿拉伯糖），和各种糖醛酸等组成，聚合度低，无结晶结构，在稀硫酸预处理过程中容易水解为可溶性单糖和寡糖^[11]。

大部分微生物通常只可以利用由木质纤维素水解得到的葡萄糖，而将来源于半纤维素的含量相当可观的其它糖浪费^[139-142]。据 NREL 报道，玉米秸秆中来源于半纤维素的四种单糖（D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-半乳糖）平均占玉米秸秆水解产生可溶性单糖总量 43%^[143]。另外有些种类的木质纤维素中的半纤维素含量还要高于玉米秸秆（大约 20%左右），如水生植物中的水葫芦，草本植物中的百慕大草，以及树木中的白杨，其半纤维素含量分别达到了木质纤维素总重的 55%，40%，32%。这意味着来源于半纤维素的单糖含量更高^[1447]。所以如果这些糖不能加以利用，不仅造成浪费而且增加废水的化学需氧量（COD），最终对环境造成负担。

G. oxydans 细胞膜上存在大量的脱氢酶可以将多种醛糖氧化，但该菌目前仅被应用于以葡萄糖为底物生产 5-酮基-d-葡萄糖酸^[145,146]，2-酮基-d-葡萄糖酸^[147]和葡萄糖酸，以及个别报道的以木糖为底物生产木糖酸^[3]。未见该菌利用其它醛糖糖生产产品。

本章主要考察了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维来源各种已知单糖（D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-半乳糖）的利用情况，探究了其在模拟玉米秸秆水解液的合成培养基及真实水解液中的全糖转化能力。

3.2 材料与方法

3.2.1 原材料和试剂

玉米秸秆于 2015 年的秋天收获自中国内蒙古临河。玉米秸秆初步处理及干重基础上的组分测定方法见 2.2.1，该原料含 35.38%的纤维素，24.62%的半纤维素。

L-阿拉伯糖购自北京华威锐科化工有限公司（中国，北京），D-甘露糖购自九鼎化学有限公司（中国，上海），D-半乳糖购自麦克林生物化学有限公司（中国，上海）。葡萄糖酸钠买自山东西王糖业有限公司（中国，山东）。商品纤维素酶 Youtell #7、葡萄糖、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 NaOH 、 H_2SO_4 等酶和化学品试剂参见 2.2.1。

3.2.2 菌株与培养基

G. oxydans DSM 2003 来源参见 2.2.2。 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta\text{ga-2-dh}$ 工程菌株为

敲除 *G. oxydans* DSM 2003 中膜结合的依赖 PQQ 的葡萄糖酸-2-脱氢酶的编码基因 (*ga-2-dh*)。

本研究用到的合成培养基有以下几种：

1) 种子培养基：山梨醇 80 g/L，酵母粉 20 g/L， KH_2PO_4 1.5 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 g/L。

2) 发酵培养基（用于 *G. oxydans* DSM 2003 在不同单一碳源中发酵实验）：L-阿拉伯糖（甘露糖，半乳糖）40 g/L，酵母粉 10 g/L， KH_2PO_4 1.5 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 g/L，该实验设置的对照组为上述发酵培养基中不添加任何单糖。

3) 模拟玉米秸秆水解液培养基：93.4 g/L 葡萄糖，42.5 g/L 木糖，3 g/L 半乳糖，6.8 g/L 阿拉伯糖，3 g/L 甘露糖，酵母粉 20 g/L， KH_2PO_4 1.5 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 g/L。

3.2.3 细胞培养

1) 用于全细胞催化的静息细胞制备制备参见 2.2.2

2) 单一糖发酵实验种子制备

为了避免种子培养物中的残留的山梨醇对单一碳源发酵时菌体生长产生影响。本研究将对数期 *G. oxydans* 种子液离心后用 0.85% 生理盐水洗涤，并用不含山梨醇的种子合成培养基重悬至 OD_{600} 为 3-4，再以 10% 接种如不同碳源的发酵培养基中。

3.2.4 木质纤维素预处理、脱毒、糖化（见 2.2.5）

3.2.5 水泥添加剂性能测试

2-酮基-D-葡萄糖酸的制备自纯品葡萄糖发酵，当葡萄糖酸全部转化为 2-酮基-D-葡萄糖酸，发酵结束。离心去除菌体，取上清进行添加剂性能测试。

本研究选择凝结时间和净浆流动度两个指标来表征水泥添加剂的性能。凝结时间以及稠度测定所用的仪器是购自上海路达实验仪器有限公司的维卡仪（中国，上海）。在凝结实验测定前需要确定基准水泥和水的比例，以使其达到中国国标 GB/T 1346-2011 规定的标准稠度，即稠度试针在 30 s 内在水泥浆中下沉 34 ± 1 mm。凝结时间测定方法如下：将去离子水和 500 g 基准水泥以经过标准稠度步骤确定的比例加入水泥净浆搅拌机（NJ-160, 无锡建筑工业有限公司，中国，江苏），并在特定的程序下进行搅拌。搅拌步骤为低速 2 min（桨叶公转速度为 62 rpm，自传为 140 rpm），停 15 s，再高速搅拌（公转 125 rpm，自传 285 rpm）2 min。然后将水泥浆倒入圆锥形试模（底面直径 75 mm，顶面直径 65 mm，高 40 mm），处理后放入养护箱，温度 20°C，湿度 95% 及以上。然后开始测初凝与终凝时间，并以水与水泥接触的时间定为测定起始时间。初凝时间（min）为养护的水泥达到在初凝试针与试模水泥表面接触后自由落体试针探入试模内部 36 ± 1 mm 的状态的时间。测完后将水泥块上下面翻转，并随即放入养护箱。终凝时间（min）为终凝试针开始在水泥块表面不留痕迹的状态的时间。

净浆流动度测定依据中国国标 GB/T 17671-1999 进行测定。方法如下，将 300 g 基

准水泥, 87 mL 去离子水, 以及 0.03% 的水泥缓凝剂一起加入水泥净浆搅拌机, 低速搅拌后将水泥倒入光滑玻璃板上的截锥圆模 (底面直径 75 mm, 顶面直径 60 mm, 高 50 mm), 刮平后快速拿开, 30 s 后测量辐射状水泥相互垂直的两个直径并求平均值, 即为净浆流动度 (mm)。

3.2.6 醛糖和酸分析

D-葡萄糖, D-木糖, L-阿拉伯糖, D-甘露糖, D-半乳糖的分析是通过 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行的, 柱子为 HPX-87P (Bio-rad, Hercules, CA, USA), 柱温 80°C, 流动相为经过灭菌的超纯水, 流速为 0.6 mL/min。D-葡萄糖酸, D-木糖酸, 2-酮基-D-葡萄糖酸(2-KGA)通过 HPLC (LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行分析, 柱子为 HPX-87H (Bio-rad, Hercules, CA, USA), 柱温 55°C, 流动相为 5 mM H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 210 nm。

L-阿拉伯糖, D-甘露糖, D-半乳糖酸的定性分析采用 Agilent LC-MS 系统进行, 该系统由 Agilent 1200 高效液相色谱和 Quadrupole LC-MS 6120 detector 组成。HPLC 柱子为 Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5- μ m particle size)。流动相为 10 mM 甲酸胺 (A 泵) 和乙腈 (B 泵), 泵入梯度设置为: 甲酸和乙腈开始以 8:2 泵入, 在 4 min 内乙腈升至 90%, 保持 6 min, 然后在 2 min 内降至 20%, 保持 3 min。流速 0.6 mL/min, 温度 25 °C。检测物的负离子化由电喷雾离子化源 (ESI) 进行。

3.3 结果与讨论

3.3.1 *G. oxydans* DSM 2003 对单一糖的利用

之前的报道已证明 *G. oxydans* DSM 2003 可将葡萄糖与木糖氧化产生相应的酸, 本组研究主要涉及 *G. oxydans* DSM 2003 对来源于半纤维素的 L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-甘露糖的利用。结果如图 3.1a 所示, 当以 L-阿拉伯糖, D-半乳糖, D-甘露糖以及木糖四种糖分别作为单一的碳源, *G. oxydans* DSM 2003 的生长情况要强于不加任何糖的对照。这说明这几种糖都可以参与 *G. oxydans* DSM 2003 的生长。且阿拉伯糖和木糖相较于甘露糖与半乳糖更有利于菌体的生长。

本文接着探究了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源单一糖的转化能力。结果如图 3.1b 所示, 该菌株可以很好的将半乳糖, 阿拉伯糖, 甘露糖三种糖在 72 h 内全部转化, 转化速率依次为半乳糖>阿拉伯糖>甘露糖。Peters 等发现 *G. oxydans* 621H 细胞膜上催化葡萄糖, 半乳糖, 阿拉伯糖, 甘露糖, 木糖氧化的酶为 mGDH^[106]。根据 BRENDA, 来自其他微生物上依赖 PQQ 的 GDH 可将以上单糖氧化为 L-阿拉伯糖内脂, D-甘露糖内脂, D-半乳糖内脂。

本研究利用 LCMS 对转化产物进行定性分析, 取 *G. oxydans* 对单一糖的利用实验中 72 h 的样品进行检测, 此时三种单糖均已转化完全 (3.1b)。LCMS 检测结果显示, 当阿拉伯糖, 半乳糖, 甘露糖分别做底物时, 转化产物在保留时间分别为在 3.013 min,

3.009 min, 3.019 min 处, 丰度最高的分子量分别为 165, 195, 195 (表 3.1), 这与 L-阿拉伯糖酸、D-甘露糖酸, D-半乳糖酸阴离子的分子大小一致。也就是说 *G. oxydans* 也可以将阿拉伯糖, 半乳糖, 甘露糖氧化为相应的内酯, 然后自发或由内酯酶水解为相应的酸。

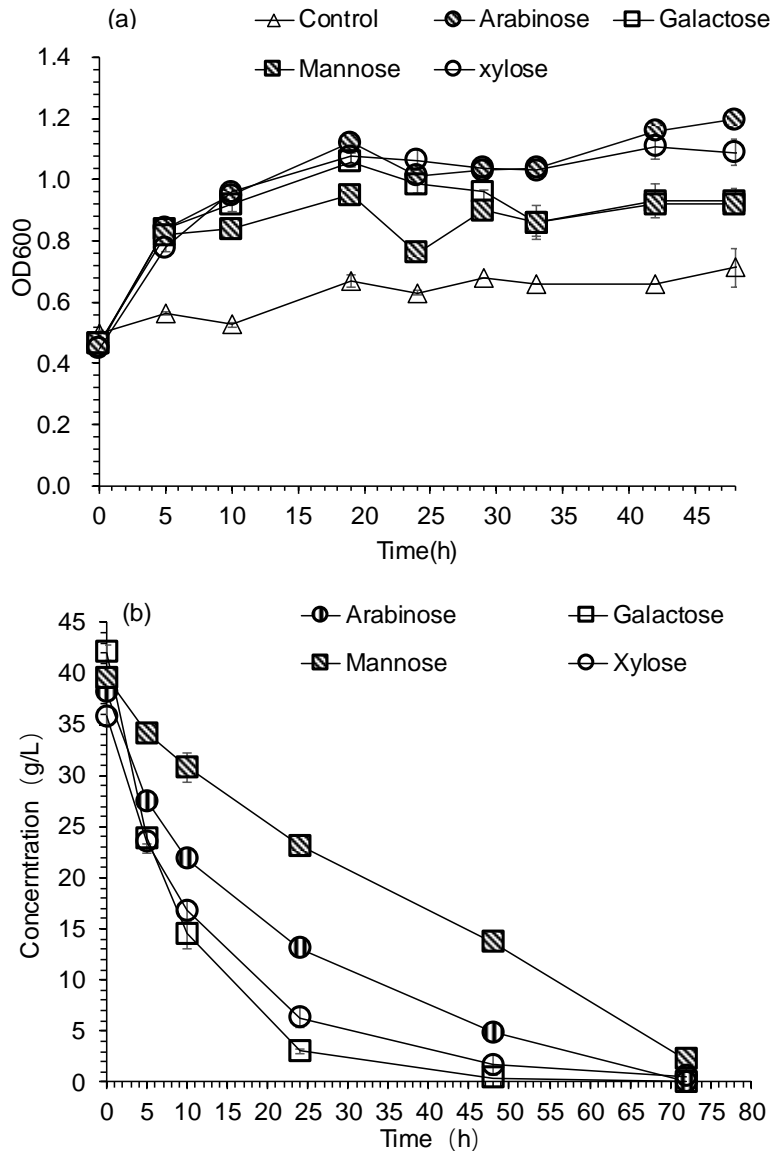


图 3.1 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源单糖的利用

(a) 细胞生长; (b) 单糖转化。培养基为发酵培养基, 实验在 250 mL 摇瓶中进行, 装液量 50 mL, 实验条件温度 30°C, 转速 220 rpm, pH 5~6, 每 4 h 通过 5 M 氢氧化钠调节一次 pH。

Fig. 3.1 The utilization of the derived lignocellulose-derived sugars by *G. oxydans*.DSM 2003

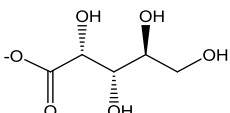
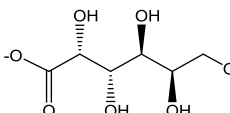
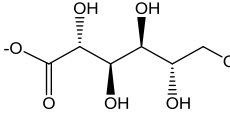
(a) Cell growth; (b) Sugar conversion.

The well pretreated *G. oxydans*.DSM 2003 seeds were inoculated to fermentation medium containing different individual sugars. Conditions: 30°C, pH 5~6, 220 rpm, the inoculum size 10% (v/v), 50 mL liquid in 250 mL flask.

表 3.1 利用 LCMS 分析 *G. oxydans* DSM 2003 对 L-阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖的转化产物

Table 3.1 LCMS analysis of the product transformed from L-arabinose, D-galactose, D-mannose by

G. oxydans DSM 2003

Compound	Structure	RT (min)	MW
L-Arabinonate		3.013	165.1
D-Galactonate		3.009	195.1
D-Mannonate		3.019	195.1

3.3.2 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源混合糖的利用

上述研究表明当 L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-半乳糖分别作为唯一的碳源时，*G. oxydans* DSM 2003 可以利用其生长并将其转化。但是对于混合碳源，由于起到主要转化功能的 mGDH 对不同的底物选择性相差极大^[123]，导致 *G. oxydans* DSM 2003 对不同的单糖具有不同的利用顺序和转化效率。此时比较不易利用的糖可能在发酵终了也不能被利用。

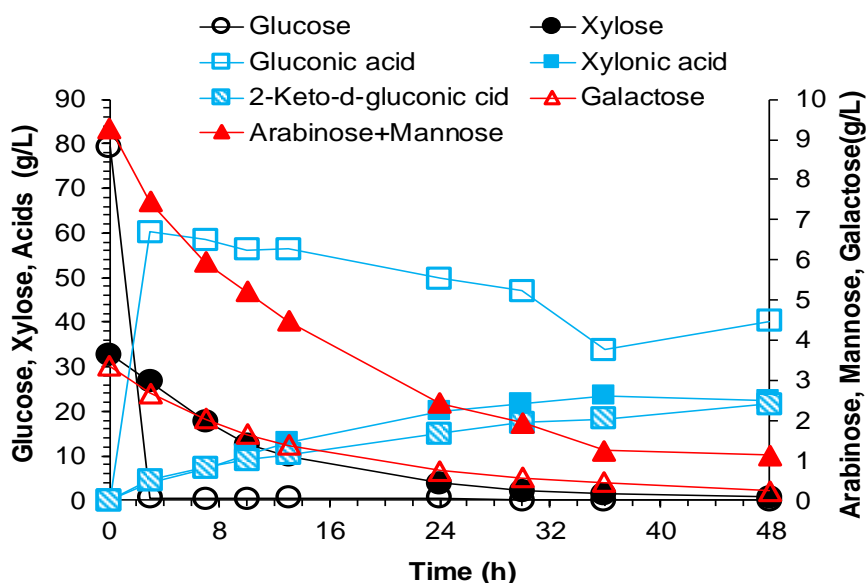


图 3.2 *G. oxydans* DSM 2003 在模拟玉米秸秆水解液合成培养基中的全细胞催化

实验在 3 L 发酵罐中进行，装液量 1 L。实验条件为通气量 2.5 vvm，搅拌转速 800 rpm，pH 4.8，温度 30°C，初始 OD₆₀₀ 为 1。

Fig. 3.2 The whole-cell catalysis performance of *G. oxydans* DSM 2003 in synthetic medium simulating corn stover hydrolysate

The experiment was carried out at 35°C, pH 4.8, 800 rpm with an inoculum size of 10% (v/v), in a 3 L bioreactor containing 900 mL of simulated hydrolysate medium.

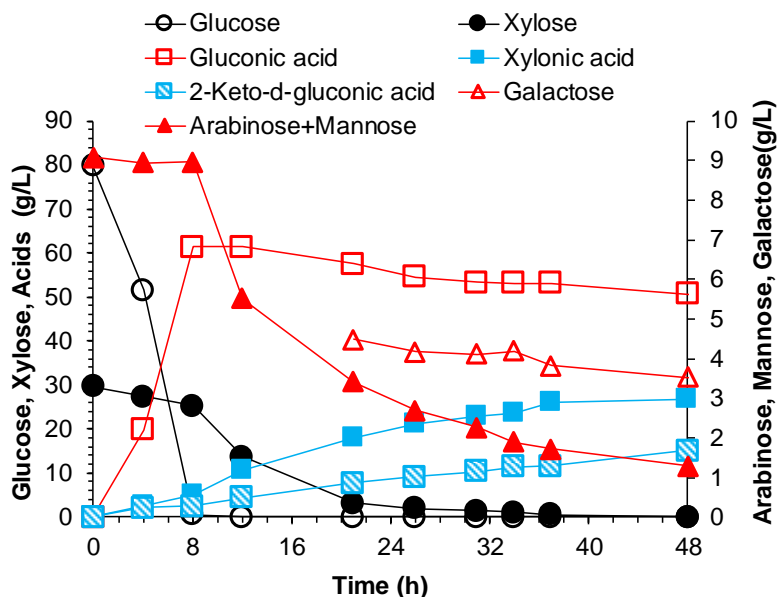


图 3.3 *G. oxydans* DSM 2003 在模拟玉米秸秆水解液合成培养基中的发酵

实验在 3 L 发酵罐中进行，装液量 1 L。实验条件为通气量 2.5 vvm，搅拌转速 800 rpm，pH 4.8，温度 30°C。

Fig. 3.3 The fermentation performance of *G. oxydans* DSM 2003 in synthetic medium simulating corn stover hydrolysate

The experiment was carried out at 35°C, pH 4.8, 800 rpm with an inoculum size of 10% (v/v), in a 3 L bioreactor containing 900 mL of simulated hydrolysate medium.

在以成分复杂的真实玉米秸秆水解液为底物之前，本研究首先进行了 *G. oxydans* DSM 2003 以模拟玉米秸秆水解液的合成培养基为底物的催化和发酵实验。结果如图 3.2 所示，当 *G. oxydans* DSM 2003 利用模拟水解液进行全细胞催化时，静息细胞（OD₆₀₀ 为 3.5）可在 48h 内将几乎所有单糖转化完全。当 *G. oxydans* 利用模拟水解液进行发酵时，48h 内葡萄糖，木糖，阿拉伯糖和甘露糖相继被耗完，半乳糖转化微弱（图 3.3）。在两个实验中葡萄糖最终均被转化为葡萄糖酸（GLA）和酮基葡萄糖酸(KGA)。

3.3.3 *G. oxydans* DSM 2003 在玉米秸秆水解液中的发酵

接下来进行 *G. oxydans* DSM 2003 在固含量 30% (w/w) 的玉米秸秆水解液中的发酵实验。玉米秸秆的预处理，脱毒，糖化参如图 3.4 所示，发酵进行 72 h，葡萄糖、木糖全部耗完，阿拉伯糖和甘露糖余下不到 10%，半乳糖和在合成培养基中一样几乎没有消耗。也就是说除少量半乳糖外，*G. oxydans* DSM 2003 可以将高固含量玉米秸秆水解液中的醛糖几乎全部消耗(图 3.4)，实现水解液体系全糖转化生产糖酸。

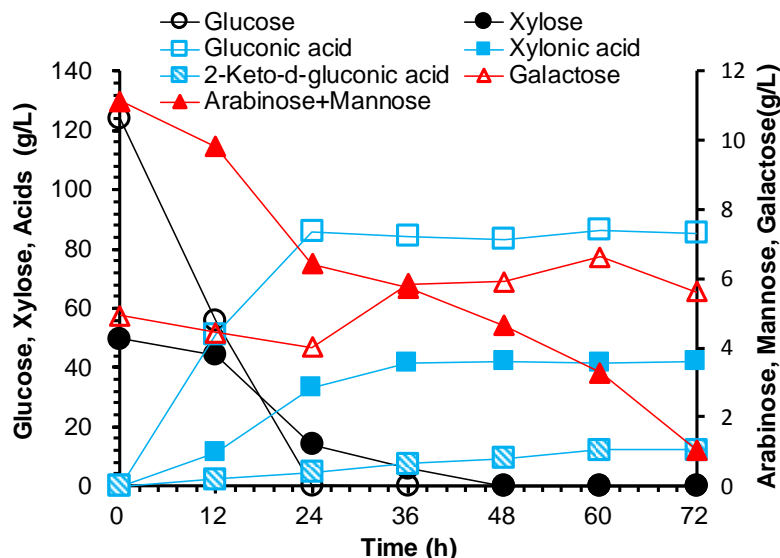


图 3.4 *G. oxydans* DSM 2003 在玉米秸秆水解液中的发酵

反应在装有 Rushton 桨叶的 5 L 发酵罐中进行，装液量 3 L；发酵条件为 pH 4.8，温度 35°C，通气量 2.5 vvm，搅拌转速 500 rpm，接种量 10%。

Fig. 3.4 The fermentation performance of *G. oxydans* DSM 2003 in corn stover hydrolysate

The experiment was carried out at 35°C, pH 4.8, 500 rpm with an inoculum size of 10% (v/v), in a 5 L bioreactor equipped with a Rushton impeller containing 3 L of hydrolysate slurry at 30% solids loading.

3.3.4 KGA 生成的避免

(1) KGA 的水泥缓凝性能

上述转化均会不同程度的产生 KGA，以下对 2-KGA 作为水泥缓凝剂的性能进行了鉴定，对照为购买的葡萄糖酸，空白为不加任何缓凝剂。结果如表 3.2 所示，2-KGA 作为水泥缓凝剂其初凝和终凝时间均远小于葡萄糖酸，而其净浆流动性几乎与不加任何缓凝剂的空白一样。说明 2-酮基-D-葡萄糖酸 (2-KGA) 虽不会造成负面影响，但缓凝效果远不如葡萄糖酸。那么就可以肯定在发酵过程中要杜绝葡萄糖酸转化为 2-酮基-D-葡萄糖酸，以防由于葡萄糖酸的流失造成产品作为水泥缓凝剂的作用下降。

表 3.2 2-酮基-D-葡萄糖酸作为水泥缓凝剂的性能测试

Table 3.2 Assay of sodium 2-keto-gluconate as cement retarder additives

	缓凝时间		静浆流动性
	初凝时间 (min)	终凝时间 (min)	直径 (mm)
空白	160	201	209
样品	184	249	205
对照	226	296	252

(2) *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 对模拟水解液中单糖的利用

本研究试图利用敲除了膜结合葡萄糖酸-2-脱氢酶基因 (*ga-2-dh*) 的工程菌株 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 来解决这个问题。*G. oxydans* DSM 2003 中山梨醇脱氢酶和葡萄糖酸-2-脱氢酶分别催化葡萄糖酸产 5-KGA 和 2-KGA。将 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-$

2-dh 发酵 pH 5.5 设定在 5.5，可以避免催化 5-KGA 生成的山梨醇脱氢酶的最佳反应条件 (pH 为 3-4)。

G. oxydans DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 首先利用模拟玉米秸秆水解液的合成培养基进行发酵实验。发酵进行至 48 h 时，阿拉伯糖和甘露糖能得到较好的转化，而半乳糖同原始菌株一样均转化较少。没有出现葡萄糖酸转化为其他化合物和 2-酮基-D-葡萄糖酸生成的迹象 (图 3.6)。

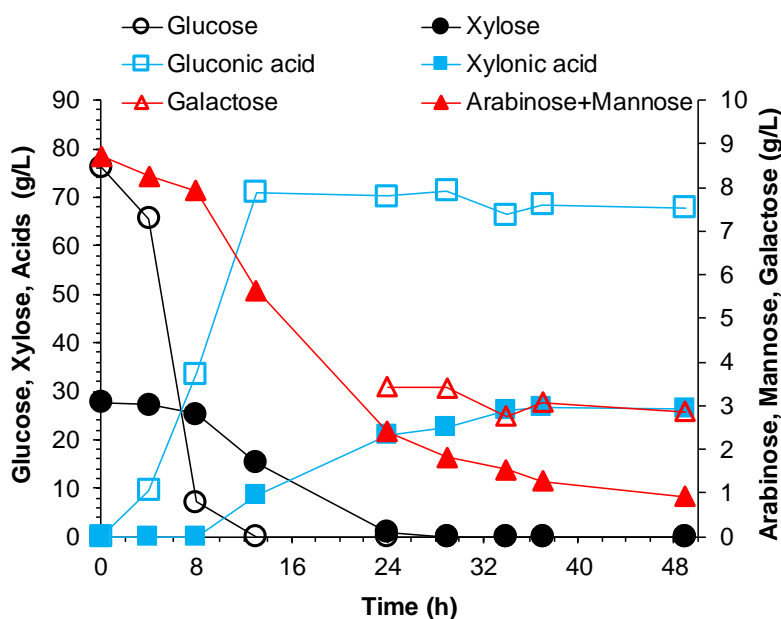


图 3.5 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 在模拟玉米秸秆水解液中的发酵

反应在 3 L 发酵罐进行，装液量 1 L。发酵条件为 pH 5.5，温度 30°C，通气量 2.5 vvm，搅拌转速 800 rpm。

Fig. 3.5 The fermentation performance of *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ in synthetic medium simulating corn stover hydrolysate.

The experiment was carried out at 30°C, pH 5.5, 800 rpm with an inoculum size of 10% (v/v), in a 3 L bioreactor containing 900 mL of simulated hydrolysate medium.

(3) *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 对玉米秸秆水解液中单糖的利用

接着利用 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 以真实玉米秸秆水解液为原料进行了发酵。玉米秸秆水解液经过 60 h 快速生物脱毒，固含量为 25% (w/w)。物料的预处理，脱毒可糖化如 2.2.5 中材料与与方法所述。发酵 80 h 后葡萄糖完全耗完，木糖、阿拉伯糖和甘露糖转化速率明显比 *G. oxydans* DSM 2003 慢。半乳糖基本没耗。发酵后期葡萄糖酸有所降低，没有 2-KGA 生成，但发现疑似 5-KGA 的浓度随着发酵的进行逐渐增长 (图 3.6)。

鉴于 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 在水解液中最终 OD₆₀₀ 没有超过 1，Zhang 等报道的 *G. oxydans* DSM 2003 原始菌株在几乎同样的发酵条件下能达到 2 左右。认为 *G. oxydans* DSM 2003 菌体生长不佳直接导致了最终糖类转化效率降低^[113]。

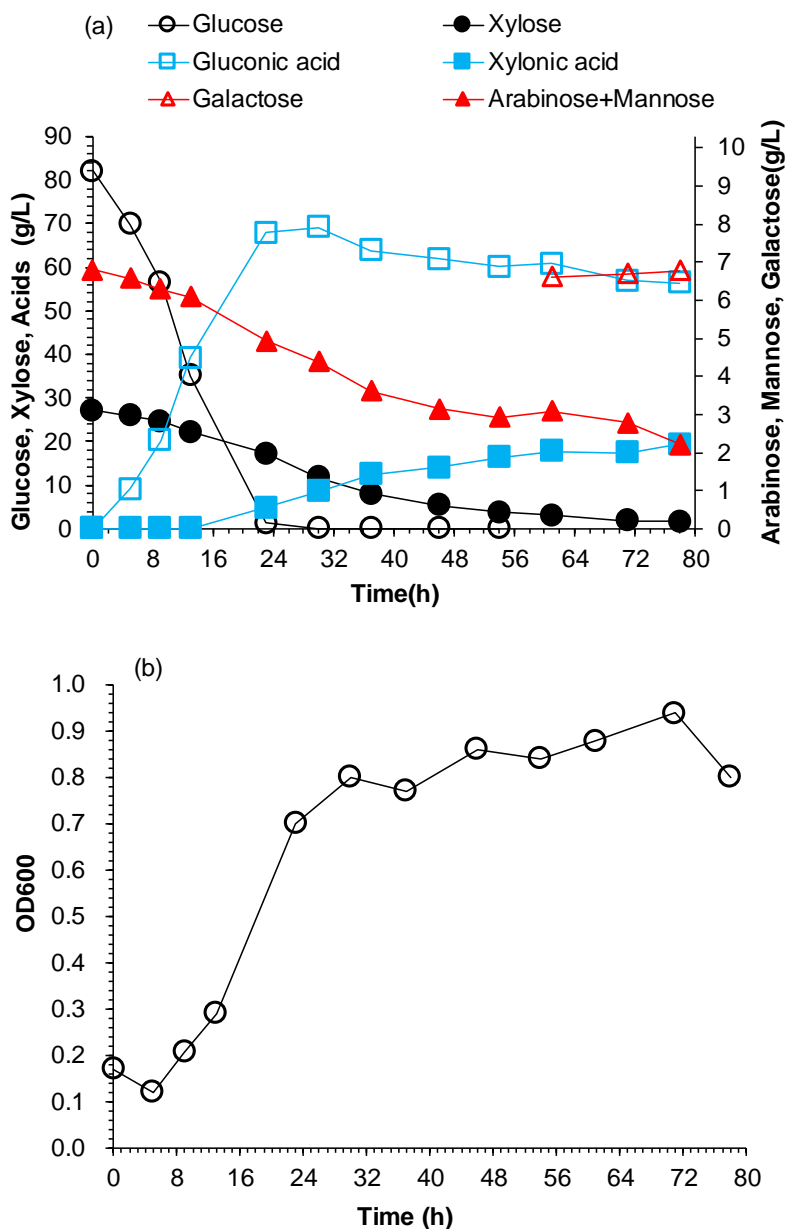


图 3.6 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 在玉米秸秆水解液中的发酵

(a) 糖转化; (b) 菌体生长。反应在 3L 发酵罐进行, 装液量 1 L, 发酵条件为 pH 5.5, 温度 30 °C, 通气量 2.5 vvm, 搅拌转速 500 rpm。

Fig. 3.6 The fermentation performance of *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ in corn stover hydrolysate. (a) Sugars conversion; (b) Cell growth. The experiment was carried out at 30°C, pH 5.5, 800 rpm with an inoculum size of 10%(v/v), in a 3 L bioreactor containing 1 L of hydrolysate at 30% solids loading.

3.4 本章小结

本研究发现 *G. oxydans* DSM 2003 具有罕见的全糖转化能力, 能够有效地将木质纤维素中所有已知单糖氧化为相应的酸, 即葡萄糖氧化为葡萄糖酸, 木糖氧化为木糖酸, 阿拉伯糖氧化为阿拉伯糖酸, 甘露糖氧化为甘露糖酸, 半乳糖转化为半乳糖酸。这些糖酸均携带羟基羧酸基团, 可以直接作为水泥缓凝剂等精细化学品使用。木质纤维素水解后获得的混合单糖经过 *G. oxydans* DSM 2003 进行全糖转化后, 获得的混合糖酸不经分

离就可以直接作为水泥缓凝剂使用^[113]。这不仅使得由木质纤维素经过各种生物炼制过程产生的单糖被充分利用,也能够有效的降低最终废水中的 COD,减少废水排放和循环使用前的处理成本。这和利用木质纤维素进行乙醇^[142],柠檬酸^[141],乳酸^[139]等产品生产时,如不对发酵菌株进行分子工程改造就只消耗葡萄糖,并产生高 COD 废水^[139]相比具有明显优势。

G. oxydans DSM 2003 在催化产酸的过程中会将葡萄糖进一步氧化生成水泥缓凝性能较差的酮基葡萄糖酸。本研究利用 *G. oxydans* DSM 2003 $\Delta ga-2-dh$ 工程菌株来克服这一问题。该工程菌株虽然有效的克服了葡萄糖酸的进一步氧化,但是由于生长不佳也导致醛糖转化受阻。计划对该工程菌株进行水解液适应性驯化,以期改善其生长能力。

第 4 章 葡萄糖氧化酶对糖化的影响

4.1 背景

纤维素的降解是由各种纤维素酶协同进行的。当纤维素处于紧密的晶体结构时，比较不易降解。近年来发现一些氧化还原酶能够通过氧化的方式来随机裂解组成纤维素的链状葡萄糖聚合物，并降低纤维素的结晶程度，从而有利于其他的纤维素酶进一步作用^[149]。这些酶包括一些可溶性单加氧酶^[150]。纤维二糖氧化酶也被发现具有促进纤维素降解的作用^[151]。

黑曲霉中的葡萄糖氧化酶在氧气存在下可将葡萄糖氧化为葡萄糖酸，并生成过氧化氢。该过程与单加氧酶催化底物氧化的方式接近。催化产物过氧化氢在一定条件下也具有降低纤维素结晶程度的作用^[152]。鉴于 Zhang 等利用 *Aspergillus niger* SIIM M276 进行以玉米秸秆水解液为原料的葡萄糖酸发酵时，取得了极高的基于葡萄糖的葡萄糖酸得率（94.9%），本研究推测这与该菌含有的葡萄糖氧化酶对水解液中纤维素的彻底降解而产生了更多的葡萄糖有关。

纤维素酶与葡萄糖氧化酶的协同作用被用于多个领域，如以羧甲基纤维素为底物的过氧化氢生产^[153]，棉花的生物抛光和漂白^[101]。但都不涉及纤维素糖化效率。本研究的目的在于验证葡萄糖氧化酶对于纤维素酶催化的纤维素水解过程的影响。最终期望为 *Aspergillus niger* 以木质纤维素为原料进行同步糖化发酵提供依据。

4.2 材料与方法

4.2.1 原材料与试剂

微晶纤维素购自上海昌为医药辅料技术有限公司（中国，上海）；葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶（catalase）均购买自 sigma 公司（St. Louis, MO, USA）；甲苯胺蓝试剂买自上海迈坤有限公司（中国，上海）；NaOH，商品纤维素酶 Youtell #7 参考 2.2.1。

4.2.2 制备磷酸处理微晶纤维素（PASC）

本研究所使用的 PASC 制备自微晶纤维素，制备过程始终在 250ml 的离心杯中进行，方法如下：

- 1) 用 3 mL 去离子水与 1.0 g 微晶纤维素轻轻混匀；
- 2) 加入 50 mL 预冷的浓磷酸，直至均匀混合成为糊状物，全程冰上进行。
- 3) 将上述磷酸混合的微晶纤维素冰浴 1 h，每 10 min 进行一次充分的混合。
- 4) 将 150 mL 预冷的去离子水加入离心杯，边加边进行充分搅拌。
- 5) 4°C，6000 rpm，离心 20 min 收集沉淀后，加入 200 mL 去离子水同样的离心条件下洗涤 4 次。

6) 用 2mL 的 2 M 碳酸氢钠中和上述洗涤过的沉淀中的磷酸, 以调节 pH。

7) 用 100 mL 的去离子水重悬微晶纤维素以进行洗涤, 然后离心。重复数次直至将其重悬以后 pH=5-7。然后按照固含量要求加入适量去离子水重悬磷酸处理微晶纤维素, -4°C 保存。

4.2.3 甲苯胺蓝测过氧化氢

根据 Sunil 等报道利用甲苯胺蓝法检测过氧化氢^[154], 方法如下:

取 3ml $0.2 \times 10^{-6} \sim 14 \times 10^{-6}$ 的过氧化氢放入 10ml 试管, 1ml 2% KI, 1ml 2M HCl, 搅至黄色出现, 然后加入 0.5ml 0.01% 的甲苯胺蓝和 2M 2ml 乙酸钠, 在 628nm 测定吸光度。

4.2.4 分析方法

葡萄糖酸和葡萄糖的分析是通过 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行的。进行葡萄糖酸分析的柱子为 Shodex Rspak JJ50-4D column (Showa Denko, Tokyo, Japan), 柱温 40°C, 流动相为 12 mM NaHCO₃, 流速为 0.5 mL/min。进行葡萄糖分析的柱子为 HPX-87H (Bio-rad, Hercules, CA, USA), 柱温 65°C, 流动相为 12 mM NaHCO₃, 流速为 0.6 mL/min。

4.3 结果及讨论

4.3.1 GOD 对微晶纤维素酶水解的影响

为了探究 GOD 对纤维素酶水解过程的影响, 本研究首先固定 PASC 的固含量 (1% (w/w)) 和纤维素酶的酶载量 (4 FPU/g DW), 然后改变 GOD 的加量, 进行观察。水解程度用葡萄糖与葡萄糖酸物质的量的总和表示。结果如图 4.1a 所示, 水解进行 24 小时后, GOD 对 PASC 的酶水解起到抑制作用, 且随着 GOD 加量的升高抑制作用更加明显, 这与预期完全相反。水解进行 72 h 后整体抑制现象减弱, 在高浓度 GOD 存在下抑制现象依然存在 (图 4.1b), 低浓度 GOD 的存在对 PASC 的糖化结果起到略微促进的作用。

鉴于上述结果, 现保持较低 GOD 酶载量, 将纤维素酶酶载量增加至 10 FPU/g DW, PASC 固含量保持不变, 依然为 1% (w/w)。结果如图 2 所示, 添加 1 U/g DW 的 GOD 使得 PASC 的糖化在 72h 上升了 13%。

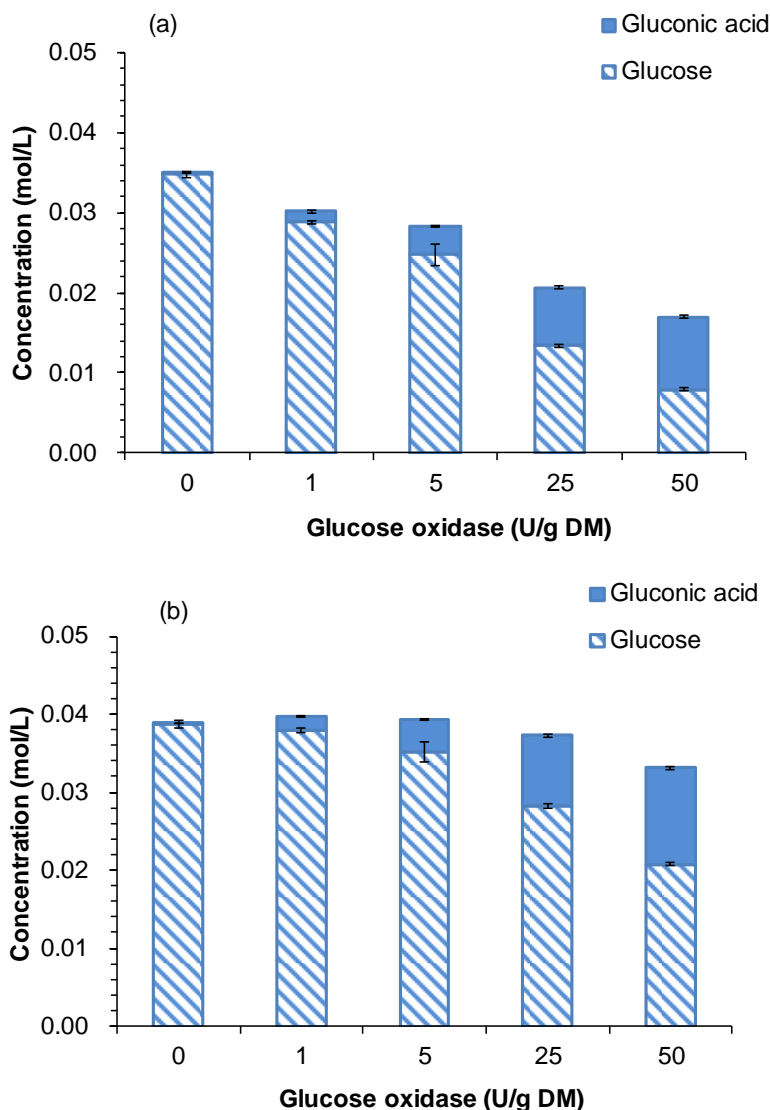


图 4.1 GOD 添加量对磷酸处理微晶纤维素 (PASC) 酶水解的影响

(a) 24 h 糖化结果; (b) 72 h 糖化结果。反应总体积为 20 mL。利用终浓度为 0.05 M 的柠檬酸缓冲液来稳定 pH。反应条件为 50°C, 150 rpm, pH4.8。水解在水浴摇床中进行。

Fig. 4.1 The effected of GOD addition dosage on the saccharification of PASC

(a) 24 h; (b) 72 h.

Conditions: 50°C, 150 rpm, pH 4.8, the solids loading 1% (w/w), 20 mL liquid in 100 mL flask, cellulose dosage 4 FPU/g DW.

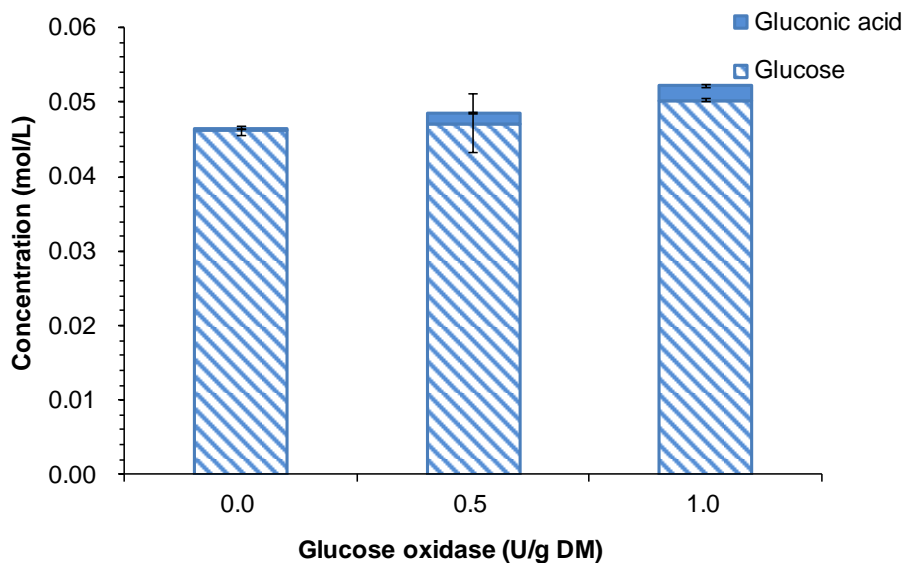


图 4.2 低 GOD 添加量对磷酸处理微晶纤维素 (PASC) 酶水解的影响

Fig. 4.2 The effect of GOD at low addition dosage on the saccharification of PASC

Conditions: 50°C, 150 rpm, pH 4.8, the solids loading 1% (w/w), 20 mL liquid in 100 mL flask, cellulose dosage 10 FPU/g DW.

4.3.2 GOD 对纤维素糖化抑制因素探究

上述实验表明, GOD 低浓度时对 PASC 酶水解过程有促进作用; 高浓度时, 产生抑制作用。GOD 催化葡萄糖产生过氧化氢和葡萄糖酸。葡萄糖酸会使 pH 降低, 直至脱离纤维素酶最佳催化范围。本研究首先考察过氧化氢和 pH 对酶解的影响, 一共设置 5 组实验, 第一组为对照组, 仅添加纤维素酶; 第 2-5 组为实验组, 第二组添加纤维素酶和 GOD, 第三组添加纤维素酶、GOD、过氧化物酶以消除或者减少过氧化氢的影响。第四组添加纤维素酶、GOD 并用 5M 氢氧化钠调节 pH, 以消除或者减少 pH 降低造成的影响。第五组添加纤维素酶、GOD、过氧化物酶并调节 pH, 以期同时消除或降低二者的影响。磷酸处理微晶纤维素 (PASC) 的固含量均为 1.24% (w/w), 纤维素酶的酶载量为 5 FPU/g DW, GOD 酶载量为 50 U/g DW。第三、五组每 8h 添加一次过氧化氢酶, 酶加量以催化过氧化氢降解完全为准。甲苯胺蓝法被用于测定剩余的过氧化氢。第四、五组每 8h 调节一次 pH, 调至 pH4.8。反应条件同 4.3.1。72 h 的糖化结果如图 4.3 所示, 首先调节 pH 并没有对糖化有显著影响, 说明 pH 对酶解的影响不大。而在已经加入纤维素酶和 GOD 的基础上加入过氧化氢酶使得糖化结果极大的被抑制, 这说明过氧化氢的存在对糖化不起抑制作用, 否则消除后, 应该会促进糖化进行; 同时调节 pH 并加入过氧化氢酶会使得糖化抑制比单独加入过氧化氢酶更加严重。第三组和第五组的葡萄糖酸的生成比其他几组要高的多, 可见过氧化氢会抑制 GOD 的酶活。也就是说随着过氧化氢酶的加入, 水解体系中过氧化氢含量降低, 葡萄糖酸生成增加, PASC 的糖化被极大抑制。Yuan 等发现过氧化氢会促进纤维晶体去晶体化^[152], 从而促进酶解的进行。Norkran

等发现葡萄糖酸会抑制纤维二糖酶的活性^[1]。也就是说加入过氧化氢酶后上升的葡萄糖酸阻碍了 PASC 的糖化。

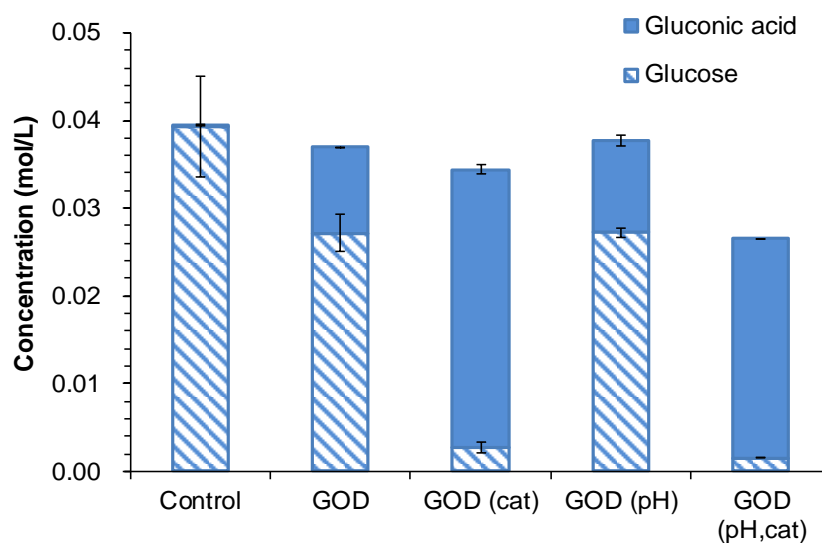


图 4.3 过氧化氢和 pH 降低对磷酸处理微晶纤维素（PASC）糖化的影响

Fig. 4.3 The effect of hydrogen peroxide and pH on PASC saccharification.

Conditions: 50°C, 150 rpm, pH 4.8, the solids loading 1% (w/w), 20 mL liquid in 100 mL flask, cellulose dosage 10 FPU/g DW.

4.4 本章小结

低浓度葡萄糖氧化酶（GOD）对经磷酸预处理的微晶纤维素糖化具有一定的促进作用，但高浓度 GOD 对糖化具有抑制作用。分析 GOD 产生抑制的原因时，发现通过添加过氧化氢酶消除 GOD 催化产物过氧化氢会使抑制现象更加严重。可能的原因有两个，一个糖化体系中过氧化氢浓度降低直接减弱了其纤维素的去晶体作用；另一个是过氧化氢浓度降低使得其对 GOD 的抑制消除，产生了更多的葡萄糖酸，高浓度的葡萄糖酸抑制了纤维素酶的活性。这意味着以黑曲霉作为发酵菌株进行同步糖化产葡萄糖酸会因为葡萄糖酸对纤维素酶极强的抑制作用而无法实现。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论和创新点

微生物利用木质纤维素水解液生产生物化学品的过程中, 面临多种障碍。首先, 木质纤维素生物炼制过程中的预处理步骤会产生多种抑制物, 严重影响发酵过程中的菌株生长和发酵效率。其次, 半纤维素来源的多种单糖通常不能被发酵菌株有效利用, 导致碳源浪费。本研究发现 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 不仅对木质纤维素来源的抑制物具有很好的耐受性, 而且能够将木质纤维素来源的各种已知单糖高效转化为目标产品。本文考察了 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 的抑制物的耐受性。并通过抑制物胁迫下进行全细胞催化、葡萄糖脱氢酶活性分析、产葡萄糖酸相关基因转录水平分析, 转录组分析以及抑制物降解性能分析对 *G. oxydans* DSM 2003 的耐受机理进行探究。通过长期驯化, 提高该菌的抑制物耐受性。本文还考察了 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源的各种已知醛糖的转化能力。得出以下结论:

(1) 本研究发现在木质纤维素来源的抑制物胁迫下, *G. oxydans* DSM 2003 生长受到一定抑制, 但是仍具有很好的葡萄糖酸发酵性能。一方面, 通过全细胞催化实验, 发现抑制物的存在不会影响 *G. oxydans* DSM 2003 静息细胞将葡萄糖氧化为葡萄糖酸的速率和效率, 而葡萄糖合成关键酶葡萄糖脱氢酶极强的抑制物耐受能力是其主要原因。另一方面, 由 DNA 芯片结果推测, 各种抑制物对葡萄糖酸生成路径中相关酶生物合成的影响有限, 因而不会因为相关酶的合成受阻影响葡萄糖酸的合成。

(2) 本研究发现 *G. oxydans* DSM 2003 在高抑制物含量的未脱毒玉米秸秆水解液中的延滞期很短。通过抑制物转化实验发现, 该菌能够将毒性极强的醛类抑制物快速转化为毒性较低的醇和酸是这一现象的主要原因。

(3) 本文首次利用基因芯片技术对氧化葡萄糖酸杆菌在抑制物胁迫下进行了转录组分析, 发现大量具有醛类抑制物转化潜力的氧化还原酶编码基因显著上调, 这些基因不仅从分子水平解析 *G. oxydans* DSM 2003 的抑制物降解路径, 也为其它生物炼制微生物耐受性改造提供了基因元件资源。

(4) 本研究在未脱毒水解液中对 *G. oxydans* DSM 2003 进行长期驯化, 得到了稳定的 *G. oxydans* DSM 2003 抑制物耐受菌株。利用未脱毒水解液进行发酵性能比较, 发现该菌株比原始菌株表现出更快的生长速度, 更短的延滞期, 以及更快的木糖转化速率。

(5) 本文发现 *G. oxydans* DSM 2003 可将木质纤维素水解液中的各种已知醛糖转化为相应的糖酸。这些糖酸均携带羟基羧酸基团, 可以直接作为水泥缓凝剂。木质纤维素水解后获得的混合单糖经过 *G. oxydans* 进行全糖转化后, 获得的混合糖酸不经分离就可以直接作为水泥缓凝剂使用。这一特性不仅显著提高了木质纤维素中的各种单糖的利用

率，也降低了发酵废水中的残糖含量和废水处理的负担。

(6) 在探索 *Aspergillus niger* 中葡萄糖氧化酶 (GOD) 对磷酸处理的微晶纤维素 (PASC) 糖化过程的影响时发现：低浓度 GOD 对 PASC 糖化具有一定的促进作用，高浓度 GOD 具有抑制作用，且抑制作用源自 GOD 的催化产物葡萄糖酸。

5.2 展望

对于本研究探索的问题还有许多值得探讨的地方：

(1) 本研究发现乙酸会抑制 *G. oxydans* DSM 2003 的生长速率，驯化菌株生长速率的提升很有可能与该菌对乙酸耐受性提高有关。后期实验可对驯化菌株的乙酸耐受能力进行考察以验证这一推测，并从分子角度剖析驯化菌株的乙酸耐受机理。

(2) 驯化菌株在水解液中具有更好的木糖转化能力，除了菌体生长变好产生更多参与催化的菌体外，也可能与 mGDH 表达量上升或其编码基因突变有关。后期可以通过全细胞催化，在细胞量相同的情况下比较驯化菌株和原始菌株的木糖转化能力，若驯化菌株木糖转化能力更佳，则可对驯化前后菌株中 mGDH 转录水平进行比较并对其编码基因进行测序分析。

(3) 在对 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 抑制物耐受机理的探究中，发现同为葡萄糖脱氢酶，依赖 PQQ 的 mGDH 有很强的抑制物耐受能力，依赖 NADP 的 sGDH 耐受能力极差，如果能够将这两种酶对抑制物耐受性能差异的原因找出，将为各种酶的定向改造以及菌株筛选提供线索。

(4) 本研究发现 *G. oxydans* DSM 2003 可以利用玉米秸秆水解液中的各种单糖，但是对葡萄糖以外的其他单糖转化速率较慢，导致整体发酵速率降低。若能将糖酸转化关键酶 mGDH 进行突变或过表达，使该菌具有更好的单糖氧化能力，就能提高木质纤维素水解液的发酵效率。

参考文献

- [1] Balan V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *Isrn Biotechnol.* 2014, 2014(3)
- [2] Demirbas A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. *Energy Sources Part A Recovery Utilization & Environmental Effects.* 2007, 30(1): 27-37
- [3] Limayem A, Ricke S C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science.* 2012, 38(4): 449-467
- [4] Kim S, Dale B E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy.* 2004, 26(4): 361-375
- [5] Zhu J Y, Pan X J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology.* 2010, 101(13): 4992-5002
- [6] Hu G, Heitmann J A, Rojas O J. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *Bioresources.* 2008, 3(1): 270-294
- [7] Rodolfi L, Chini Z G, Bassi N, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering.* 2009, 102(1): 100-112
- [8] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature.* 2008, 454(7206): 841-845
- [9] Wyk J P H V. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in Biotechnology.* 2001, 19(5): 172-177
- [10] Del Rio J C, Marques G, Rencoret J, et al. Occurrence of naturally acetylated lignin units. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2007, 55(14): 5461-5468
- [11] Valdivia M, Galan J L, Laffarga J, et al. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microbial Biotechnology.* 2016, 9(5): 585-594
- [12] Fuqaha A H. Sustainable lignin fractionations with ultrafiltration. *Italic.* 2011
- [13] Ye S, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology.* 2002, 83(1): 1-11
- [14] Hsu T A, Ladisch M R, Tsao G T. Alcohol from cellulose. *Chem. Technol.; (United States).* 1980, 10(5): 315-319
- [15] Yang B, Wyman C E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts and Biorefining.* 2008, 2(1): 26-40

- [16] Ranjithkumar M, Ravikumar R, Sankar M K, et al. An effective conversion of cotton waste biomass to ethanol: A critical review on pretreatment processes. *Waste and Biomass Valorization*. 2016, 8: 57-68
- [17] Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresource Technology*. 2006, 96(18): 2026-2032
- [18] Sun Y, Cheng J J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2005, 96(14): 1599-1606
- [19] Gorhmann K, Torget R W, Himmel M E. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 1986, 15(15): 59-80
- [20] Grohmann K, Himmel M, Rivard C, et al. Chemical-mechanical methods for the enhanced utilization of straw. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 1984, 14(14): 137-157
- [21] Wooley R, Ruth M, Sheehan J, et al. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis current and futuristic scenarios. Office of Scientific and Technical Information Technical Reports, 1999
- [22] Lloyd T A, Wyman C E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2006, 96(18): 1967-1977
- [23] Zhang J, Wang X S, Chu D Q, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488
- [24] He Y, Zhang L, Zhng J, et al. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1)
- [25] Taha M, Foda M, Shahsavari E, et al. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 38: 190
- [26] Hashem M, Abel-Basset R, Ali E H. Recycling the rice straw into biofuel "ethanol" by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii*. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2013, 15(4): 709-721
- [27] Nigam P S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*. 2013, 3(3): 597-611
- [28] Sukumaran R K, Singhanian R R, Pandey A. Microbial cellulases: production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2005, 64(11): 832-844
- [29] Hemsworth G R, Johnston E M, Davies G J, et al. Lytic Polysaccharide Monooxygenases

- in Biomass Conversion. Trends in Biotechnology. 2015, 33(12): 747-761
- [30] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 2010, 105(4): 718-728
- [31] Almeida J R, Modig T, Petersson A, 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
- [32] Ulbricht R J, Northup S J, Thomas J A. A Review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Parenteral Solutions. Fundamental and Applied Toxicology. 1984, 4(5): 843-853
- [33] Dunlop A P. Furfural formation and behavior. Industrial and Engineering Chemistry Research. 1948, 40(2): 204-209
- [34] Li Q, Metthew Lam L K, Xun L. Cupriavidus necator JMP134 rapidly reduces furfural with a Zn-dependent alcohol dehydrogenase. Biodegradation. 2011, 22(6): 1215-1225
- [35] Horvath I S, Franzen C J, Taherzadeh M J, et al. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. Applied and Environmental Microbiology. 2003, 69(7): 4076-4086
- [36] Taherzadeh M J, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/or acetic acid. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2000, 90(4): 374-380
- [37] Khan Q A, Hadi S M. Effect of furfural on plasmid DNA. Biochemistry and Molecular Biology International. 1993, 29(6): 1153-1213
- [38] Allen S A, Clark W, Mccaffery J M, et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels. 2010, 3(1): 2
- [39] Miller E N, Jarboe L R, Turner P C, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. Applied and Environmental Microbiology. 2009, 75(19): 6132-6141
- [40] Modig T, Liden G, Taherzadeh M J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. Biochemical Journal. 2002, 363: 769-776
- [41] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering. 1999, 65(1): 24-33

- [42] Guo H, Zhang B, Qi Z, et al. Inside Cover: Valorization of lignin to simple phenolic compounds over tungsten carbide: Impact of lignin structure. *Chemsuschem*, 2017, 10
- [43] Perez J, Muñozdorado J, Rubia T D L, et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 2002, 5(2): 53-63
- [44] Fitzgerald D J, Stratford M, Gasson M J, et al. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 97(1): 104-113
- [45] Klinke H B, Olsson L, Thomsen A B, et al. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: Wet oxidation and fermentation by yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 81(5): 738-747
- [46] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 68(5): 524-530
- [47] Iwaki A, Ohnuki S, Suga Y, et al. Vanillin inhibits translation and induces messenger ribonucleoprotein (mRNP) granule formation in *saccharomyces cerevisiae*: application and validation of high-content, image-based profiling. *Plos One*. 2013, 8(4)
- [48] Nguyen T T, Iwaki A, Ohya Y, et al. Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, 117(1): 33-38
- [49] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, 24(4): 151-159
- [50] Verduyn C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1991, 60(3): 325-353
- [51] Verduyn C, Postma E, Scheffers W A, 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(7): 501-517
- [52] Roe A J, Mclaggan D, Davidson I, et al. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180(4): 767-772
- [53] Cherrington C A, Hinton M, Chopra I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990, 68(68): 69-74
- [54] Guo Z, Olsson L. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids

- present in lignocellulosic hydrolysate. *Fems Yeast Research*. 2014, 14(8): 1234-1248
- [55] Nigam J N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*. 2001, 87(1): 17-27
- [56] Taherzadeh M J, Niklasson C, Lidén G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 69(3): 330-338
- [57] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering and biotechnology*. 2007, 108(108): 41-65
- [58] Jonsson L J, Alriksson B, Nilvebrant N O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 1-10
- [59] Parajo J C, Dominguez H, Dominguez J M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 21(1): 18-24
- [60] Jonsson L J, Palmqvist E, Nilvebrant N O, 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
- [61] Saravanakumar T, Park H S, Mo A Y, et al. Detoxification of furanic and phenolic lignocellulose derived inhibitors of yeast using laccase immobilized on bacterial cellulosic nanofibers. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*. 2016, 134: 196-205
- [62] 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
- [63] Zhang J, Zhu Z N, Wang X F, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26
- [64] Shui Z X, 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): 5739-5748
- [65] Gonzalez-Ramos D, Gorter de Vries A R, Grijseels S S, et al. A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. *Biotechnol Biofuels*. 2016, 9: 173
- [66] Qureshi A S, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioresource Technology*. 2015, 189: 399-404

- [67] Petersson A, Almeida J R, Modig T, et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*. 2006, 23(6): 455-464
- [68] Wang X, Liang Z, Jin H, et al. Identification and functional evaluation of the reductases and dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* involved in vanillin resistance. *BMC Biotechnology*. 2016, 16(1): 1-9
- [69] 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): 7631-7638
- [70] Park S E, Koo H M, Park Y K, 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): 6033-6038
- [71] Dong H W, Fan L Q, 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): 2395-2404
- [72] Wang X, Gao Q, Bao J. Enhancement of furan aldehydes conversion in *Zymomonas mobilis* by elevating dehydrogenase activity and cofactor regeneration. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, 10: 24
- [73] Cunha J T, Aguiar TQ, Romani A, 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. *Bioresour Technol*. 2015, 191: 7-16
- [74] Miller E N, Jarboe L R, Yomano L P, et al. Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (yqhD and dkgA) in furfural-resistant ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(13): 4315-4323
- [75] Lindahl L, Genheden S, Eriksson L A, et al. Sphingolipids contribute to acetic acid resistance in *Zygosaccharomyces bailii*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 113(4): 744-753
- [76] Wang X, Bai X, Chen D F, et al. Increasing proline and myo-inositol improves tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to the mixture of multiple lignocellulose-derived inhibitors. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8(1): 1-13
- [77] Geddes R D, Wang X, Yomano L P, 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): 5955-5964

- [78] Luhe A L, Lim C Y, Gerken H, et al. Furfural and hydroxymethylfurfural tolerance in *Escherichia coli* Δ acrR regulatory mutants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2015, 62(1): 32-36
- [79] Glebes T Y, Sandoval N R, Reeder P J, et al. Genome-Wide Mapping of Furfural Tolerance Genes in *Escherichia coli*. *Plos One*. 2014, 9(1)
- [80] Fukaya M, Takemura H, Okumura H, et al. Cloning of genes responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(4): 2096-2104
- [81] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *Fems Microbiology Letters*. 2004, 235(2): 315-322
- [82] Booth I R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*. 1985, 49(49): 359-378
- [83] Lu P, Ma D, Chen Y, et al. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. *Cell Research*. 2013, 23(5): 635-644
- [84] Nakano S, Fukaya M, Horinouchi S. Putative ABC Transporter Responsible for Acetic Acid Resistance in *Acetobacter aceti*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(1): 497-505
- [85] Hanada T, Kashima Y, Kosugi A, et al. A gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Acetobacter aceti* and some properties of its disruptant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2001, 65(12): 2741-2748
- [86] Yuk H G, Marshall D L. Influence of acetic, citric, and lactic acids on *Escherichia coli* O157:H7 membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance in simulated gastric fluid. *Journal of Food Protection*. 2005, 68(4): 673-679
- [87] Deeraksa A, Moonmangmee S, Toyama H, et al. Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, polE, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Microbiology*. 2005, 151(12): 4111-4120
- [88] Ramachandran S, Fontanille P, Pandey. A, et al. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2): 185-195
- [89] Canete-Rodriguez A M, Santos-Duenas I M, Jimenez-Hornero J E, et al. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*. 2016, 51(12): 1891-1903
- [90] Ahuja D K, Bachas L G, Bhattacharyya D. Modified Fenton reaction for trichlorophenol dechlorination by enzymatically generated H₂O₂ and gluconic acid chelate. *Chemosphere*. 2007, 66(11): 2193-2200

- [91] Ma S H, Li W F, Zhang S B, et al. Influence of sodium gluconate on the performance and hydration of Portland cement. *Construction and Building Materials*. 2015, 91: 138-144
- [92] Zhang H, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 211-219
- [93] Li N, Ma D, Chen W. 6. Projection of cement demand and analysis of the impacts of carbon tax on cement industry in china. *Energy Procedia*. 2015, 75: 1766-1771
- [94] Tan H B, Ma B G, Ke K, et al. Mechanism of preferential adsorption of carboxylic-vinyl copolymer, hydroxy carboxylate and sulfonation - polyol in cement hydration process. *Advanced Materials Research*. 2011, 194-196: 1035-1040
- [95] Nalet C, Nonat A. Effects of functionality and stereochemistry of small organic molecules on the hydration of tricalcium silicate. *Cement and Concrete Research*. 2016, 87: 97-104
- [96] Singh O V, Jain R K, Singh R P. Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2003, 78: 208-212
- [97] Blandino A, Macias M, Cantero D. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel. *Process Biochemistry*. 2001, 36(7): 601-606
- [98] Cañete-Rodríguez A M, Santos-Dueñas I M, Jiménez-Hornero J E, et al. Gluconic acid: properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*. 2016, 51(12): 1891-1903
- [99] Witteveen C F, Veenhuis M, Visser J. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58(4): 1190-1194
- [100] Luong J H T, Glennon J D, Gedanken A, et al. Achievement and assessment of direct electron transfer of glucose oxidase in electrochemical biosensing using carbon nanotubes, graphene, and their nanocomposites. *Microchimica Acta*. 2016, 184(2): 369-388
- [101] Hao L, Wang R, Zhang L, et al. Utilizing cellulase as a hydrogen peroxide stabilizer to combine the biopolishing and bleaching procedures of cotton cellulose in one bath. *Cellulose*. 2014, 21(1): 777-789
- [102] Lopez C, Cavaco-Paulo A. In-situ enzymatic generation of hydrogen peroxide for bleaching purposes. *Engineering in Life Sciences*. 2008, 8(3): 315-323
- [103] Tkac J, Gemeiner P, Svitel J, et al. Determination of total sugars in lignocellulose hydrolysate by a mediated *Gluconobacter oxydans* biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 2000,

420(1): 1-7

[104] Hanke T, Noh K, Noack S, et al. Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(7): 2336-2348

[105] Yuan J, Wu M, Lin J, et al. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnology*. 2016, 16(1): 42

[106] Yamada M, Elias M, Matsushita K, et al. *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1647(2): 185-192

[107] Peters B, Mientus M, Kostner D, et al. Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(14): 6397-6412

[108] Yuan J, Wu M, Lin J, et al. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnol*. 2016, 16(1): 42

[109] Yamada M, Elias M D, Matsushita K, et al. *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2003, 1647: 185-192

[110] Mills T Y, Sandoval N R, Gill R T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2(1): 26

[111] Sarvari Horvath I, Franzen C J, Taherzadeh M J, et al. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(7): 4076-4086

[112] Li N, Ma D, Chen W. Projection of cement demand and analysis of the impacts of carbon tax on cement industry in China. *Energy Proc*. 2015, 75:1766–1771

[113] Zhang H, Liu G, Zhang J, et al. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresour Technol*. 2016, 219: 123-131

[114] Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002, 60(3): 233-242

[115] Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology*. 2005, 23(2): 195

- [116] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodegradation on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnol Biofuels*. 2016, 9: 19
- [117] Yi X, Zhang P, Sun J, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121
- [118] Qureshi A S, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioresour Technol*. 2015, 189: 399-404
- [119] Ma M, Liu Z L. 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
- [120] Wang J, Gao Q, Zhang H, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresour Technol*. 2016, 218: 892-901
- [121] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42618. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2006
- [122] Sluiter. A, Hames. B, Ruiz. R, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL/TP-510-42623. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008
- [123] Meyer M, Schweiger P, Deppenmeier U. Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013, 97(8): 3457-3466
- [124] Zhang J, Wang X S, Chu D Q, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresour Technol*. 2011, 102(6): 4480-4488
- [125] Wang X, Gao Q, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. *Biotechnol Biofuels*. 2015, 8: 136
- [126] Mussatto S I, Roberto I C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour Technol*. 2004, 93(1):

1-10

[127] Zhang J, Zhu Z N, 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: 26

[128] Zhou P P, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresour Technol*. 2017, 224: 563-572

[129] Richhardt J, Luchterhand B, Bringera S, et al. Evidence for a key role of cytochrome bo₃ oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*. 2013, 195 (18): 4210–4220

[130] Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, et al. Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J Biochem*. 1989, 105(4): 633-637.

[131] Anthony C. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004, 428(1): 2-9

[132] Zhu K, Lu L, Wei L, et al. Modification and evolution of *Gluconobacter oxydans* for enhanced growth and biotransformation capabilities at low glucose concentration. *Mol Biotechnol*. 2011, 49(1): 56-64

[133] Wang P, Xia Y, Li J, et al. Overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes affects l-sorbose production in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 112: 70-77

[134] Peters B, Mientus M, Kostner D, et al. Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013, 97(14): 6397-6412

[135] Hanke T, Noh K, Noack S, et al. Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Environ Microbiol*. 2013, 79(7): 2336-2348

[136] Tanaka Y, Anraku Y, Futai M. *Escherichia coli* membrane D-lactate dehydrogenase. Isolation of the enzyme in aggregated form and its activation by Triton X-100 and phospholipids. *J Biochem*. 1976, 80(4): 821-830

[137] Liu Z L, Ma M, Song M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009, 282(3): 233-244

[138] Liu Z L, 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

[139] Yi X, Zhang P, Sun J, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121

[140] Zhang H, Liu G, Zhang J, et al. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 123-131

[141] Zhou P P, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresour Technol*. 2017, 224: 563-572

[142] Qureshi A S, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioresour Technol*. 2015, 189: 399-404

[143] Humbird D, Davis R, Tao L, et al. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover, NREL/TP-5100-47764. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2011

[144] Klass D L. Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals. 1998, 29(12): 1028-1037

[145] Yuan J, Wu M, Lin J, et al. Enhancement of 5-keto-d-gluconate production by a recombinant *Gluconobacter oxydans* using a dissolved oxygen control strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 122(1): 10-16

[146] Yuan J, Wu M, Lin J, et al. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnology*. 2016, 16(1)

[147] Li K, Mao X, Liu L, et al. Overexpression of membrane-bound gluconate-2-dehydrogenase to enhance the production of 2-keto-d-gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. *Microbial Cell Factories*. 2016, 15(1): 1-10

[148] Tan H B, Ma B G, Ke K, et al. Mechanism of Preferential Adsorption of Carboxylic-Vinyl Copolymer, Hydroxy Carboxylate and Sulfonation - Polyol in Cement Hydration Process. *Advanced Materials Research*. 2011, 194-196: 1035-1040

[149] Horn S J, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5(1): 45

- [150] Hemsworth G R, Davies G J, Walton P H. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013, 23(5): 660-668.
- [151] Bao W, Renganathan V. Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *Febs Letters*. 1992, 302(1): 77-80
- [152] Yuan Z, Long J, Zhang X, et al. Intensification effect of peroxide hydrogen on the complete dissolution of lignocellulose under mild conditions. *Rsc Advances*. 2016, 6(47): 41032-41039
- [153] Lopez C, Cavaco-Paulo A. In-situ enzymatic generation of hydrogen peroxide for bleaching purposes. *Engineering in Life Sciences*. 2008, 8(3): 315-323
- [154] Sunil K, Narayana B. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008, 81(4): 422-426

致谢

一晃三年过去了，回首自己的硕士生涯，感觉非常的充实，学到了很多的东西，在各个方面也有不同的进步。尤其是在写毕业论文的时候，对研一的研究内容又做了一次回顾，为当时自己的科研能力和表达能力汗颜，如果是现在的自己一定能做的更好，我想这就是进步。这要感谢在三年中给予我帮助和支持的老师和同学们。

首先，尤其要感谢的是我的导师鲍杰教授，本论文研究工作的方方面面都得到了他非常悉心的指导。鲍老师勤奋忘我的敬业精神和事实求是的科研态度令我终生难忘，他诲人不倦的教导方式使我受益良多。在此，向尊敬的鲍老师致以衷心的感谢和敬意。

其次，要感谢高秋强老师和张健老师。两位老师为我在科研工作中遇到的各种问题给予了宝贵的建议，在文章的修改工作中也提供了极大帮助。还要特别感谢我的师兄张宏森博士，他的课题与的我交集颇多，在整个研究工作中提供了最大的帮助和建议。另外感谢王娟、王霞、易霞、周平平、侯伟亮、邱忠洋、邵帅、刘刚等各位师兄师姐和温经柏、韩昀身、张强以及实验室其他同学们的支持、帮助和鼓励。

卷 内 备 考 表

本卷情况说明

本卷共 74 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____

