

分类号: Q815 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学 学位论文

呋喃醛抑制物的生物脱毒机理解析及  
在生物炼制发酵菌株上的实现

王霞

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 博士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2017. 2. 论文答辩日期: \_\_\_\_\_

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: 曲音波 教授

评 阅 人: 鲍晓明 教授

曲音波 教授

许 平 教授

杨世辉 教授

袁其朋 教授

## 作者声明

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

论文作者签名：

年 月 日

## 呋喃醛抑制物的生物脱毒机理解析及在生物炼制发酵菌株上的实现

## 摘要

糠醛、5-羟甲基糠醛是两种典型的呋喃醛抑制物，二者在木质纤维素预处理过程中分别由戊糖和己糖的降解产生，可对后续生物炼制发酵菌株的生长和发酵产生强烈的抑制作用。与酚类、有机弱酸类等抑制物相比，二者在预处理物料中的含量更高、抑制作用更强。因此，消除糠醛、5-羟甲基糠醛对发酵微生物的抑制作用被认为是木质纤维素生物炼制工艺的关键环节。借助某些特定的微生物在发酵前对预处理后物料中所含有的呋喃醛抑制物进行生物转化（“生物脱毒”）是缓解或消除抑制物抑制作用的有效方式，而使发酵微生物具备较高的呋喃醛抑制物转化性能或耐受性能也是提高生物炼制效率的重要研究课题。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 是在实验室前期工作中筛选得到的具有强大生物脱毒功能的生物脱毒菌株，该菌株已经在木质纤维素生物炼制生产乙醇、油脂、乳酸、柠檬酸、葡萄糖酸、木糖酸等产品的过程中得到了广泛应用并开始了产业化示范应用。本论文对 *A. resinae* ZN1 中呋喃醛抑制物的降解机理进行了研究。首先，采用定量 PCR 技术对 *A. resinae* ZN1 中与抑制物转化相关的 137 个基因在呋喃醛和呋喃醇胁迫下的转录水平进行了定量，证实 *A. resinae* ZN1 的多个醇脱氢酶、醛还原酶或醛酮还原酶可还原呋喃醛（糠醛、5-羟甲基糠醛）生成相应的呋喃醇（糠醇、羟甲基糠醇），而生成的呋喃醇在相应的醇脱氢酶、醛脱氢酶和氧化酶催化下进一步氧化生成相应的呋喃酸（糠酸、羟甲基糠酸）。其次，采用 RNA-Seq 技术在呋喃醛胁迫下对 *A. resinae* ZN1 进行了全基因转录水平分析，发现 *A. resinae* ZN1 除了可诱导胞内相关的氧化还原酶基因上调表达，还会诱导胞内与氧化还原力生成（三羧酸循环）和能量生成（呼吸链）相关的基因上调表达，以促进呋喃醛的降解转化。转录组中差异表达基因的分析表明，呋喃醛的降解还涉及物质转运、氧化胁迫应激反应等过程，这些生物学过程在 *A. resinae* ZN1 降解呋喃醛抑制物的过程中发挥了重要作用。

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 是纤维素乙醇发酵生产的主要工业菌株之一。*Z. mobilis* ZM4 自身可将低浓度的糠醛、5-羟甲基糠醛转化为相应的糠醇、羟甲基糠醇，但细胞自身的生长和代谢会受到呋喃醛抑制物的抑制。在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达与呋喃醛转化相关的基因，包括来自 *A. resinae* ZN1 的外源醛酮还原酶基因 ARZ\_13395\_T1 或来自 *Z. mobilis* ZM4 自身的醇脱氢酶基因 ZMO1771 时，*Z. mobilis* ZM4 转化呋喃醛的能力得到明显增强，并促进了菌体在玉米秸秆水解液中的细胞生长、葡萄糖消耗和乙醇生成。进一步在过表达 ZMO1771 的菌株中共表达与还原力（NADPH 或 NADH）供给相关的基因。由于 ZMO1771 编码蛋白以 NADPH 为辅因子，当共表达来自 *E. coli* 的转氢酶基因 *udhA* 时，可将胞内的 NADH 转化为 NADPH 用于 ZMO1771 对呋喃醛的转化，进一步提高了菌体对呋喃醛抑制物的转化能力。

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114-128 是在实验室前期工作中经玉米秸秆水解液长期驯化后得到的一株谷氨酸发酵菌株，具有明显高于野生菌株的呋喃醛抑制物耐受性能。为解析 *C. glutamicum* S9114-128 抑制物耐受性能增强的分子机理对其进行基因组重测序并对测序得到的相关突变基因进行功能验证分析。结果显示，位于两基因（CGS9114\_RS11050 和 CGS9114\_RS11055）间区的 SNP 突变使得葡萄糖转运相关基因 CGS9114\_RS11050 (*ptsI*) 上调表达，促进了葡萄糖向胞内的转运；葡萄糖转运的加快在促进葡萄糖代谢的同时也使得部分葡萄糖偏向乳酸生成；位于  $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶基因 CGS9114\_RS03450 (*odhA*) 处的单碱基缺失突变使得驯化菌株中的 TCA 循环代谢增强，谷氨酸积累下降。然而对于 *C. glutamicum* S9114-128 中观察到的代谢流偏移现象与抑制物耐受性能增强之间的联系还仍有待于进一步分析确认。

本论文针对呋喃醛抑制物对生物炼制微生物的抑制，提出了生物脱毒应对策略和高抑制物耐受型发酵菌株的应对策略。通过上述研究，阐明了生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 降解呋喃醛抑制物的分子生物学机理，并得到了与抑制物转化相关的关键作用基因；对乙醇发酵菌株 *Z. mobilis* ZM4 的呋喃醛抑制物转化进行了代谢工程改造，有效地提高了菌株对抑制物的耐受性能；对谷氨酸发酵菌株 *C. glutamicum* S9114-128 驯化菌株的基因组突变位点进行分析，初步解析了该发酵菌株抑制物耐受性能提高的分子机理。上述研究结果将为木质纤维素生物炼制的工业化推广和应用奠定理论基础。

**关键词：**木质纤维素；呋喃醛；生物脱毒；树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1；生物炼制发酵菌株

## Study on Biodetoxification Mechanism of Furan Aldehyde Inhibitors and the Construction Robust Biorefinery Fermenting Strains

### Abstract

Furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) are the two major furan aldehyde inhibitors derived from the over-degradation of pentose and hexose respectively during the lignocellulose pretreatment process, which can severely inhibit consequent microbial cell growth and fermentation metabolism. It is strongly required to fast and complete removal of furfural and HMF from pretreated lignocellulose for efficient biorefinery fermentation, owing to their high abundance and strong toxicity over phenolic and organic acid compounds. Biological detoxification method using specific microorganisms to convert furfural and HMF into non-toxic substances prior to fermentation process was proposed and considered as an efficient strategy to overcome the inhibition. Alternatively, development of robust fermenting strains with high tolerance to the furan aldehydes was another attractive method and has been the subject of extensive investigation.

*Amorphotheca resinae* ZN1 is a specific powerful biodetoxification fungus isolated in our previous work and has been practically applied for the high performance of ethanol, lipid, lactic acid, citric acid, gluconic acid and xylonic acid production. In order to identify the degradation mechanism of furan aldehydes in *A. resinae* ZN1, the real-time quantitative PCR (qRT-PCR) method was firstly applied to investigate the transcription levels of 137 putative genes involved in the degradation of inhibitors in *A. resinae* ZN1 under the stress of furfural and HMF, as well as the stress of their secondary metabolites, furfuryl alcohol and HMF alcohol. Several alcohol dehydrogenase genes and aldo-keto reductase/aldehyde reductase genes were found to be responsible for the furfural and HMF conversion to their corresponding alcohols. For the further conversion of the two furan alcohols to the corresponding acids, different alcohol dehydrogenase genes, aldehyde dehydrogenase gene, and oxidase genes were identified. In addition, the RNA-Seq technology was employed to analyze the genome-wide transcriptional response to furfural and HMF. *A. resinae* ZN1 triggered not only the expression of corresponding oxidoreductase genes, but also the expression of relevant genes involved in redox and cofactors regeneration (TCA cycle) and energy production (respiratory chain). The significantly differentially expressed genes also included genes related to transporters and oxidative stress response process which played important roles in response to furan aldehyde inhibitors in *A. resinae* ZN1.

*Zymomonas mobilis* ZM4 is an important industrial strain for cellulosic ethanol fermentation. Previous study showed that *Z. mobilis* ZM4 contains its native oxidoreductases to catalyze the reduction of furfural and HMF, but it can be still severely inhibited by furfural and (or) HMF. Over-expression of the exogenous aldo-keto reductase gene ARZ\_13395\_T1 from *A. resinae* ZN1, or over-expression of the endogenous alcohol dehydrogenase gene ZMO1771 from *Z. mobilis* ZM4, the conversion rate to both furfural and HMF by *Z. mobilis* ZM4 was significantly enhanced, and resulted in an accelerated cell growth and improved

ethanol productivity in corn stover hydrolysate. The *in vitro* enzymatic analysis confirmed that the ZMO1771 encoding enzyme is NADPH dependent for furfural and HMF reduction, the ethanol fermentation performance of *Z. mobilis* ZM4 was enhanced again by co-expression of the transhydrogenase gene *udhA* from *E. coli* with ZMO1771 by elevating the NADPH availability.

*Corynebacterium glutamicum* S9114-128 is a stable strain for glutamic acid production with high tolerance to furan aldehyde inhibitors evolved by a long-term evolutionary adaptation strategy using undetoxified corn stover hydrolysate. In order to determine the genetic changes responsible for the improved inhibitor tolerance in *C. glutamicum* S9114-128, the genome re-sequencing analysis was performed using the high-throughput sequencing technology. The study found that the intergenic mutation between gene CGS9114\_RS11050 and CGS9114\_RS11055 increased the transcriptional level of gene CGS9114\_RS11050 which involved in the transport of glucose in *C. glutamicum* S9114-128. The enhancement in sugar transport in *C. glutamicum* S9114-128 resulted in an accelerated glucose metabolism and also led to the flux distribution of glucose towards lactic acid production. However, the relationship between the reprogrammed pathways and the improved phenotype in *C. glutamicum* S9114-128 remained unclear and required further extensive study.

In order to overcome the inhibitory effects of furan aldehydes on microbial metabolism, the biodegradation method and the use of the robust fermenting strains were investigated in the thesis. Based on the studies above, the furan aldehydes degradation metabolism in *A. resinae* ZN1 was elucidated at the molecular level and the key candidate genes responsible for the inhibitors transformation was identified as well. With the rational genetic modification strategy, the tolerance to furan aldehyde inhibitors was effectively improved in *Z. mobilis* ZM4. The molecular mechanism of the enhanced inhibitor tolerance to furan aldehydes in adapted robust strain *C. glutamicum* S9114-128 was analyzed by the genome re-sequencing analysis. These results in present study will pave the way for the industrial development of lignocellulose biorefinery.

**Key words:** Lignocellulose; Furan aldehydes; Biodegradation; *Amorphotheca resinae* ZN1; Biorefinery fermenting strains

## 目录

第 1 章 前言 .....	1
1.1 木质纤维素资源生物炼制工艺概述 .....	1
1.1.1 我国木质纤维素资源现状分析 .....	1
1.1.2 木质纤维素生物质的结构性性质 .....	1
1.1.3 木质纤维素资源生物炼制工艺 .....	2
1.2 木质纤维素来源抑制物的形成及其抑制机理 .....	5
1.2.1 呋喃醛类抑制物的产生及其抑制机理 .....	5
1.2.2 有机弱酸类抑制物的产生及其抑制机理 .....	6
1.2.3 酚类抑制物的产生及其抑制机理 .....	6
1.3 木质纤维素来源抑制物的不同应对策略分析 .....	7
1.3.1 发酵前的脱毒处理 .....	7
1.3.2 发酵过程的合理调控 .....	9
1.3.3 高抑制物耐受型发酵菌株的构建 .....	10
1.4 本论文的立题依据和主要研究内容 .....	13
第 2 章 转录水平分析 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 对呋喃醛的转化机理 ..	15
2.1 引言 .....	15
2.2 材料与方法 .....	17
2.2.1 实验材料 .....	17
2.2.2 实验和分析方法 .....	17
2.3 结果与讨论 .....	23
2.3.1 糠醛、HMF 的生物降解 .....	23
2.3.2 基因组中筛选与呋喃醛降解相关的可能基因 .....	25
2.3.3 糠醛、HMF 处理下的 qRT-PCR 定量分析 .....	27
2.3.4 糠醇、羟甲基糠醇处理下的 qRT-PCR 定量分析 .....	30
2.3.5 糠醛、HMF 处理下的转录组 (RNA-Seq) 分析 .....	33
2.4 本章小结 .....	47
第 3 章 高呋喃醛抑制物耐受型 <i>Zymomonas mobilis</i> ZM4 菌株的构建 .....	49
3.1 引言 .....	49
3.2 材料与方法 .....	50
3.2.1 实验材料 .....	50
3.2.2 实验和分析方法 .....	55
3.3 结果与讨论 .....	57

3.3.1 过表达重组菌株的构建.....	57
3.3.2 重组菌株对呋喃醛抑制物的转化性能分析.....	59
3.3.3 ZMO1771 辅因子偏好性分析和共表达菌株的构建.....	66
3.3.4 共表达重组菌株对呋喃醛抑制物的转化性能分析.....	66
3.4 本章小结.....	69
第4章 水解液驯化突变株 <i>Corynebacterium glutamicum</i> S9114-128 的高抑制物耐受性分子机理解析.....	71
4.1 引言.....	71
4.2 材料与方法.....	72
4.2.1 实验材料.....	72
4.2.2 实验和分析方法.....	76
4.3 结果与讨论.....	79
4.3.1 野生菌株与驯化菌株的表型差异及基因组重测序.....	79
4.3.2 葡萄糖的转运及代谢与 <i>C. glutamicum</i> S9114-128 的表型改变.....	80
4.3.3 <i>odhA</i> 基因的相关突变与 <i>C. glutamicum</i> S9114-128 的表型改变.....	86
4.3.4 <i>clpX</i> 基因的缺失突变与 <i>C. glutamicum</i> S9114-128 的表型改变.....	87
4.3.5 <i>mcbR</i> 基因的非同义突变与 <i>C. glutamicum</i> S9114-128 的表型改变.....	90
4.4 本章小结.....	93
第5章 结论与展望.....	94
5.1 结论.....	94
5.2 创新点.....	95
5.3 展望.....	95
参考文献.....	97
博士期间研究成果.....	112
致谢.....	113

## 第 1 章 前言

随着社会经济的快速发展,人口的持续增长,人类对于能源及化学品的需求不断增加。当今社会,这些需求品主要来源于以石油为主的化石燃料炼制。化石燃料为非可再生资源,由于大规模的开采和不合理的利用已出现严重的供应不足。同时,化石燃料在使用过程中还会排放大量温室气体,导致气候变暖,破坏生态环境。为降低人类社会对化石燃料的过度依赖,世界各国都在积极探索寻找可再生资源。近年来,以生物质为原料替代化石燃料进行生物能源、生物燃料和生物基化学品的生产(“生物炼制”)已经开始受到人们越来越多的关注,并成为当代世界科学研究的重要领域。

所谓生物质是指通过光合作用而形成的各种有机体,包括动物、植物和微生物。按来源不同,可以将生物质分为林业资源、农业资源、生活污水和工业有机废水、城市固体废物和畜禽粪便等五大类<sup>[1]</sup>。在众多生物质资源中,木质纤维素是地球上现存最丰富的生物质资源。以木质纤维素为原料进行生物质产品生产的工艺流程主要包括原料预处理,酶解糖化,微生物发酵和产品分离纯化等。下面本章节将围绕木质纤维素资源生物炼制工艺进行相关阐述。

### 1.1 木质纤维素资源生物炼制工艺概述

#### 1.1.1 我国木质纤维素资源现状分析

木质纤维素是世界上储量最丰富,分布最广泛的可再生生物质资源。根据来源不同,木质纤维素主要包括农业废弃物(如农作物秸秆、稻壳、甘蔗渣等),林业废弃物(如伐木产生的枝叶、木屑等),能源作物(如甜高粱、甘蔗、甜菜等)和其他含纤维素的废弃物(如城市固体垃圾、废纸等)等。我国作为农业生产大国,木质纤维素资源主要来源于农作物废弃物,其中玉米秸秆、小麦秸秆和稻秆的储量最为丰富,约占农作物废弃物总量的 80%。相关数据分析显示,2010 年我国的农作物废弃物总量达 7.1 亿吨,其中玉米秸秆 2.9 亿吨,主要分布在黑龙江、山东、吉林、河南等地;稻秆 1.6 亿吨,主要分布在湖南、江西、江苏、湖北等地;小麦秸秆 1.1 亿吨,主要分布在河南、山东、河北、安徽等地<sup>[2]</sup>。预计到 2020 年,我国农作物秸秆储量将达到 8.4 亿吨,2030 年则可望达到 9.3 亿吨<sup>[3]</sup>。目前,这些农作物废弃物主要被用作动物饲料、农田肥料、造纸原料或直接作为燃料焚烧,尽管如此,仍有约 40% 的农作物废弃物可用于木质纤维素生物炼制。此外,第七届全国林业调查(2004-2008)数据显示我国拥有 1.95 亿公顷的林业资源,森林覆盖率达 20.36%。丰富的林业资源在采伐和加工过程中预计每年可产生约 1.97 亿吨的林业废弃物,是我国木质纤维素资源的第二大来源。与农作物废弃物不同,林业生物质资源主要集中于我国的东南、西南和东北地区,如广西、云南、黑龙江、内蒙古等省市<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 木质纤维素生物质的结构性质

木质纤维素是植物细胞壁的主要组成成分,主要由纤维素(33-51%)、半纤维素

(19-34%) 和木质素 (21-32%) 组成, 同时还包含少量的蛋白质、油脂和灰分 (图 1.1)。纤维素由 D-葡萄糖经  $\beta$ -1,4-糖苷键聚合而成, 是自然界中储量最丰富的碳水化合物。木质纤维素中纤维素与半纤维素、木质素、蛋白质及矿物分子紧密结合, 使木质纤维素具有抗解聚能力。在工业生产方面, 纤维素已被用于食品、化学品、化纤、动物饲料及造纸加工<sup>[5]</sup>。半纤维素是由五碳糖 (D-木糖、L-阿拉伯糖)、六碳糖 (D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖) 和糖醛酸 (D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸) 等组成的支链聚糖。与纤维素不同, 半纤维素的具体组成成分及各成分所占比例随植物种类的不同而不同。如软木类半纤维素中甘露糖、葡萄糖含量较高, 而硬木类半纤维素中木糖含量较高。同时, 软木类半纤维素的乙酰化程度通常要高于硬木类半纤维素<sup>[6]</sup>。与纤维素相比, 支链半纤维素更易于被水解转化。在工业生产方面, 半纤维素已被用于木糖和木糖醇的生产<sup>[7]</sup>。木质素是由 p-香豆醇、松柏醇和介子醇三类苯基丙烷结构单元经脱水聚合而形成的芳香类大分子复合物。木质素与纤维素、半纤维素共价连接可为植物细胞提供结构支撑, 增强植物细胞的机械强度, 利于抵抗外界不良环境的侵袭<sup>[8]</sup>。目前, 木质素降解产物如阿魏酸、香草醛和邻苯二酚已被用于生产除草剂、农药、塑料、家用产品、食品增香剂等<sup>[8, 9]</sup>。

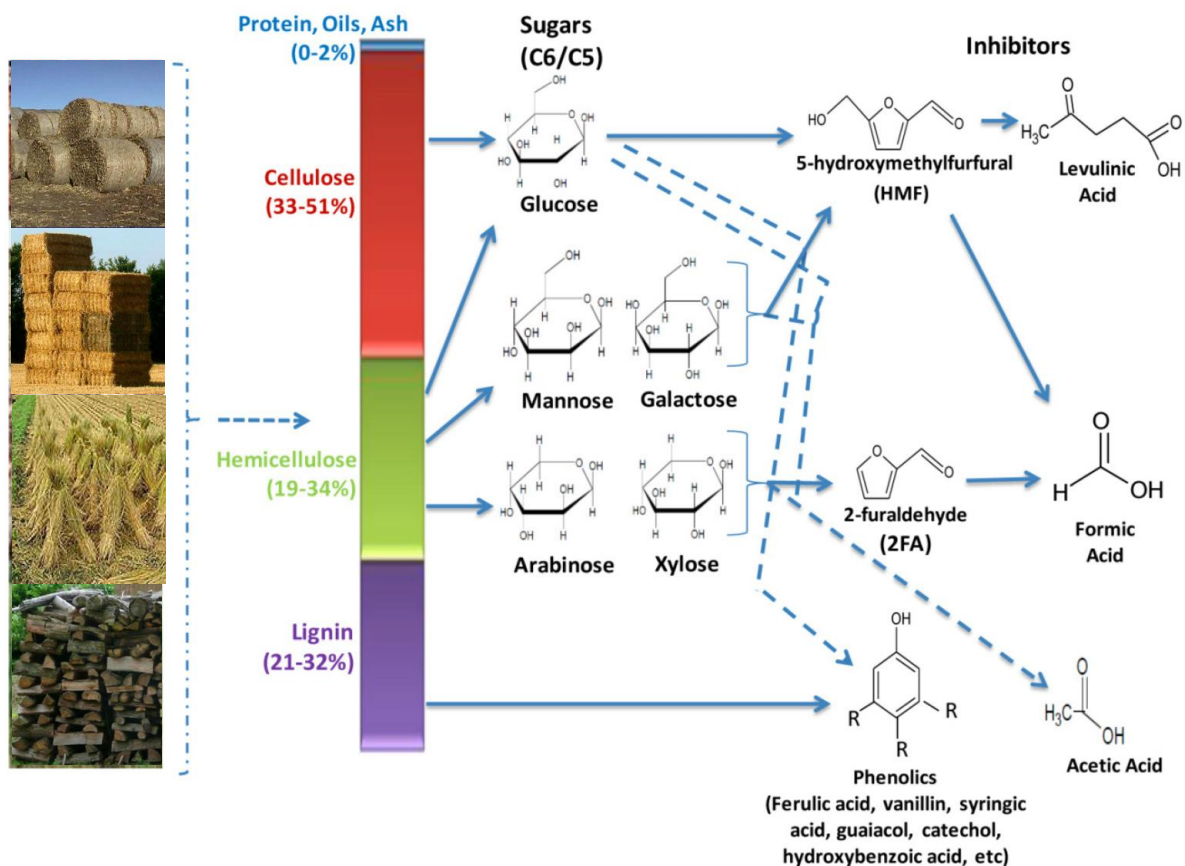


图 1.1 木质纤维素生物质主要结构组成及相应水解抑制物<sup>[10]</sup>

Fig. 1.1 Main components of lignocellulose biomass and generated hydrolysis inhibitory compounds

### 1.1.3 木质纤维素资源生物炼制工艺

生物炼制是以可再生生物质资源为原料, 利用生物转化技术和加工工艺生产燃料、

各种化学品和生物基材料的过程。以木质纤维素为原料的生物炼制过程主要包括原料预处理、脱毒、酶解糖化、微生物发酵和产品分离纯化等（如图 1.2）。

木质纤维素作为世界上储量最丰富的可再生生物质资源，其化学结构组成所特有的生物顽抗性是限制其进行后续生物转化的主要因素之一。对木质纤维素原料进行预处理操作可有效破坏纤维素、半纤维素与木质素之间致密的生物结构，有利于后续酶解糖化过程中纤维素酶与底物的结合，提高酶水解效率<sup>[11]</sup>。常用的木质纤维素预处理方法可分为下几种：物理方法，主要包括是机械粉碎、高温蒸煮、蒸汽爆破、微波处理、超临界水处理等，主要破坏木质素与半纤维素的结合层；化学方法，主要包括碱处理、酸处理、氧化剂处理以及有机溶剂处理等，可起到溶解脱去木质素的作用；生物方法，主要利用可降解木质素的微生物产生的相关酶实现木质素的专一性降解转化<sup>[12-14]</sup>。在实际生物炼制过程中可将上述某些方法进行组合使用，以达到更好的预处理效果。在众多预处理方法中，稀酸预处理是目前较为成熟，且被认为是一种最有希望实现工业化应用的木质纤维素预处理方法<sup>[15]</sup>。稀酸预处理主要使用稀硫酸（质量分数小于 4%），在高温 100-240 °C 下对木质纤维素原料进行预处理。稀酸预处理中高温高压的预处理条件可以将大部分的半纤维素酸解成可溶性糖，但对木质素的脱除效果不佳。

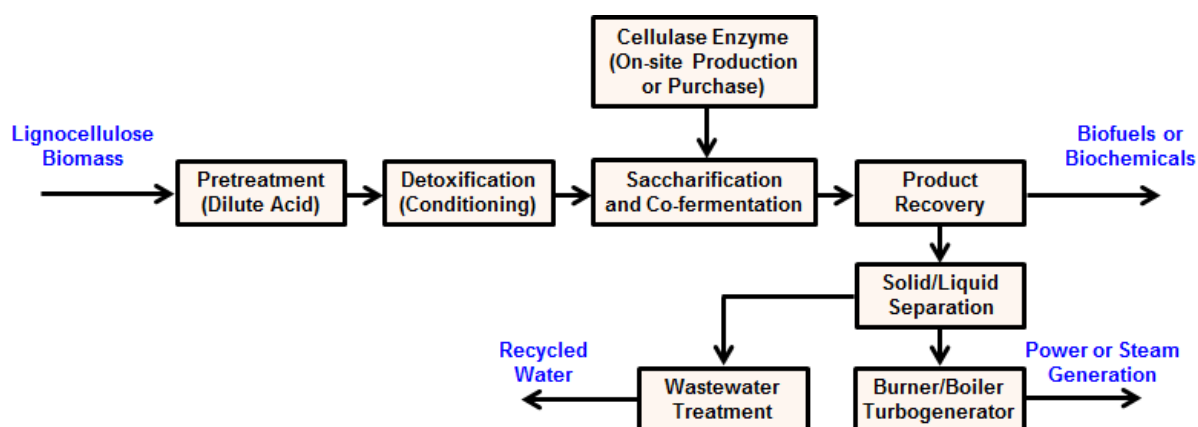


图 1.2 木质纤维素资源生物炼制过程<sup>[16]</sup>

Fig. 1.2 Biorefinery process from lignocellulose biomass

为解决传统稀酸预处理过程中产生的废水问题，同时满足后续生物质转化过程的高固含量需求，实验室前期工作中对传统稀酸预处理方法进行改进，开发建立了一种干式稀酸预处理技术<sup>[17]</sup>。该技术采用螺带式搅拌在自上而下通入蒸汽的方式下对物料进行搅拌混合，可将预处理物料的液固比由传统的 6:1-10:1 降低至 1:2，有效地减少了预处理过程中的新鲜水用量和酸用量，实现了预处理过程的零废水排放和低设备腐蚀。本论文研究中用到的预处理操作均采用干式稀酸预处理技术进行相应处理操作。

预处理操作，如稀酸预处理，在破坏木质纤维素致密的生物结构的同时，还会不可避免地造成纤维素、半纤维素与木质素的过度降解，产生多种抑制物，影响后续的糖化和微生物发酵过程<sup>[18]</sup>。对预处理后的木质纤维素原料进行脱毒处理是低成本高效木质纤

纤维素生物炼制工艺的关键环节，也是本论文研究的主要内容之一。对于预处理后的脱毒操作，后续章节将会对其进行详细展开论述，故本小节不再赘述。

尽管预处理可以得到一部分单糖，但大部分仍以多糖分子存在，因此，预处理后的木质纤维素原料需要进一步水解成单糖才能被微生物代谢发酵生产生物燃料或其他生物基化学品。目前水解工艺一般分为酸水解和酶水解，其中酶水解因条件温和、效率高以及无污染等优势，被认为是最具有发展前景的水解方法。纤维素的酶解依赖于纤维素酶。纤维素酶是多种酶的混合物，主要包括内切  $\beta$ -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4)、外切  $\beta$ -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.91) 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)<sup>[19]</sup>。半纤维素的酶解依赖于半纤维素酶。半纤维素的水解可以暴露出更多的纤维素，有助于纤维素与纤维素酶的结合，促进纤维素的水解<sup>[20]</sup>。目前半纤维素酶的研究主要侧重于木聚糖酶 (EC 3.2.1.8) 和  $\beta$ -D-木糖苷酶 (EC 3.2.1.37) 对木聚糖的水解，此外，葡萄糖醛酸苷酶、乙酰酯酶、半乳甘露聚糖酶、葡甘聚糖酶等也被用于半纤维素的酶解。自然界中可降解木质素并产生相应酶类的生物只占少数<sup>[21]</sup>，这类微生物所依赖的木质素降解酶系主要包括木质素过氧化物酶 (EC 1.1.1.4)、锰过氧化物酶 (EC 1.11.1.13) 和漆酶 (EC 1.10.3.2)。

发酵是木质纤维素生物炼制过程的核心技术，先进的发酵技术可以降低生产的物耗和能耗，降低炼制过程的生产成本。目前的发酵工艺主要包括直接微生物转化 (Direct microbial conversion, DMC)、分步糖化发酵 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF) 和同步糖化发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)<sup>[22]</sup>。直接微生物转化发酵利用一种微生物完成纤维素的糖化水解和发酵过程。该工艺设备要求简单，成本低，但发酵周期长。分步糖化发酵指木质纤维素先经水解糖化后再在另一反应器中进行发酵过程，同步糖化发酵则指水解糖化和发酵过程在同一反应器中连续进行。SHF 工艺可以保证糖化和发酵都能在各自最优的温度和 pH 条件下进行，但会存在葡萄糖反馈抑制问题。与 SSF 相比，SHF 中水解和发酵过程的分开进行还会使总反应周期加长，增加成本，同时增加污染的可能。而 SSF 的缺点在于酶糖化过程与微生物发酵过程的最适温度和 pH 不能同时满足。

在实际生物炼制工艺中，需要权衡上述各发酵方式的优缺点，选择合适的方式进行微生物发酵。其次，为了得到高浓度的发酵产品，降低后续产品的分离纯化成本，需要有目的地提高水解和发酵工段中木质纤维素原料的添加量，即固含量<sup>[23, 24]</sup>。然而，随着固含量的增加 ( $\geq 15\%$  固含量, w/w)，必然会导致反应体系中抑制物的含量增加，进一步使得预处理后的脱毒操作变得更为重要。固含量的增加还意味着反应体系中的含水量下降、粘度增加，会严重限制反应体系中的物料混合与传质传热。实验室前期工作中在传统生物反应器基础上开发了一种新型螺带桨搅拌式生物反应器，有效地解决了高固含量下的物料混合不均和传质传热受限等问题<sup>[25]</sup>。本论文研究中用到的水解糖化用生物反应器均采用螺带桨搅拌式生物反应器。

木质纤维素生物炼制产品包括生物燃料和其他生物基化学品，根据产品的不同下游分离纯化方法不尽相同。对于生物燃料如纤维素乙醇，发酵液主要经精馏及分子筛脱水

工艺进行产品的纯化和浓缩<sup>[16]</sup>；对于其他化学品如有机酸，发酵液主要经硫酸酸解或电渗析法将其中的有机酸盐转化为有机酸，低浓度有机酸经蒸发浓缩后得到最终的有机酸产品<sup>[26]</sup>。在产品分离纯化过程中会相应产生大量废水和主要成分为木质素的固体残渣，其中废水送入废水处理单元进行处理，木质素残渣送入固废焚烧单元进行产热发电。

## 1.2 木质纤维素来源抑制物的形成及其抑制机理

预处理操作是利用木质纤维素原料进行生物质产品生产的必要环节，但高温、高压等严格的预处理条件（如稀酸预处理）在破坏纤维素、半纤维素和木质素结构释放可发酵糖的同时，会不可避免地产生多种抑制物，影响后续的酶解过程<sup>[27]</sup>和微生物发酵过程<sup>[28, 29]</sup>。抑制物的产生随使用的生物质原料及预处理条件的不同而有所不同，但总体而言可分为三类，包括呋喃醛类、有机弱酸类和酚类（如图 1.1）。本小节将对这三类抑制物的产生过程与抑制机理进行详细阐述。

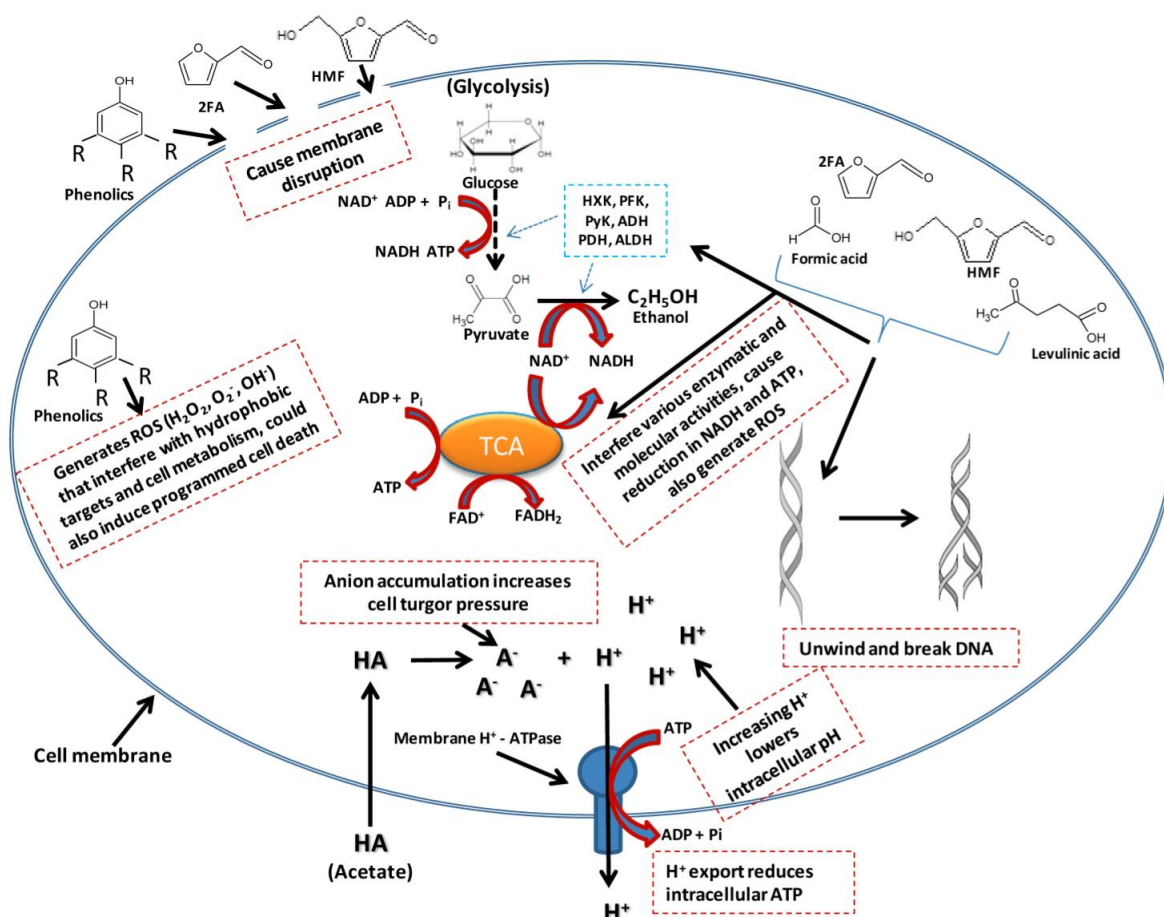


图 1.3 木质纤维素来源抑制物对产乙醇微生物细胞的抑制机理<sup>[10]</sup>

Fig. 1.3 A model of effects of lignocellulose-derived inhibitors to ethanologenic microbes

### 1.2.1 呋喃醛类抑制物的产生及其抑制机理

呋喃醛类抑制物主要指糠醛和 5-羟甲基糠醛（HMF），二者分别来自于预处理过程中五碳糖和六碳糖的过度降解（脱水反应）。与其他抑制物相比，呋喃醛类抑制物含量

较高、毒性较强,且能够与其他抑制物形成协同抑制作用,是近年来抑制物研究的热点,也是本课题研究的主要对象。

糠醛、HMF 会抑制微生物的生长,使延滞期延长,进而影响发酵产品(如生物乙醇等)的产率和产量。如图 1.3 所示,呋喃醛类抑制物的高疏水性会破坏细胞膜的完整性,影响细胞复制速率和 ATP 生成速率,使菌体生长延滞期延长<sup>[30]</sup>。进入胞内的糠醛、HMF 可作为诱变剂直接与双链 DNA 结合,使正常 DNA 双链断裂形成单链<sup>[31, 32]</sup>。以高浓度糠醛处理质粒,可导致质粒因插入、复制、缺失等原因使其大小发生改变<sup>[33]</sup>。除了直接与 DNA 结合影响 DNA 结构外,糠醛、HMF 还会直接抑制胞内中心碳过程中的相关作用酶,如糖酵解过程中的己糖激酶和甘油醛 3-磷酸脱氢酶<sup>[34]</sup>,乙醇发酵过程中的乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶和丙酮酸脱氢酶<sup>[35]</sup>等,降低胞内 NADH 和 ATP 的供给,进而影响菌体生长和乙醇生成。此外,呋喃醛抑制物的活性醛基官能团可导致酵母菌胞内活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)的积累,ROS 可损伤胞内 DNA、蛋白质、脂质及细胞骨架,严重时可导致细胞程序性死亡<sup>[36]</sup>。酵母及一些细菌发酵微生物在生长延滞期可依赖于 NAD(P)H 的还原反应将糠醛、HMF 还原为相应的低毒性的糠醇和羟甲基糠醇。应激由 ROS 导致的氧压力胁迫或生物转化呋喃醛抑制物生成相应的呋喃醇的生物学过程均需胞内 NAD(P)H 的参与,胞内 NAD(P)H 的大量消耗也会使 ATP 供给减少,导致菌体生长和微生物发酵受到显著影响<sup>[37]</sup>。

### 1.2.2 有机弱酸类抑制物的产生及其抑制机理

有机弱酸类抑制物主要有甲酸、乙酸、和乙酰丙酸。如图 1.1,甲酸、乙酰丙酸分别来源于可发酵糖脱水降解产物糠醛、HMF 的进一步降解转化,乙酸主要来源于半纤维素降解产物乙酰木聚糖的脱水转化。

如图 1.3 所示,有机弱酸主要以非解离形式渗透过细胞膜,由于胞内较高的 pH,有机弱酸一旦进入细胞即很快解离释放质子和阴离子<sup>[38]</sup>。有机弱酸的解离使胞内质子积累,pH 下降,使 pH 跨膜电势发生改变。为抵抗胞内 pH 的下降,质膜上的 ATP 酶需要在消耗 ATP 的条件下将质子不断泵出胞外,这一生物学过程会导致胞内用于菌体生长的 ATP 减少,使菌体生长和繁殖受到明显影响,但这一保护机制在低浓度有机弱酸条件下反而可以适当促进菌体的产醇发酵过程<sup>[39-41]</sup>。此外,有机弱酸解离释放的阴离子还会引起菌体细胞的膨压发生改变,影响菌体的正常生长<sup>[42]</sup>。甲酸由于分子量低,更易于扩散进入细胞,因而毒性强于乙酸和乙酰丙酸<sup>[43]</sup>。乙酸毒性较低但其含量往往最高,是有机弱酸类抑制物研究的主要关注对象。在酿酒酵母中的研究还发现,高浓度的乙酸也会引起胞内 ROS 的积累,使线粒体功能异常,最终导致细胞程序性死亡<sup>[44]</sup>。

### 1.2.3 酚类抑制物的产生及其抑制机理

酚类抑制物主要来源于生物质中木质素的降解转化。按官能团不同,酚类抑制物可分为酚酸、酚醇和酚醛三大类。代表性的酚酸有阿魏酸、香草酸、4-羟基苯甲酸和丁香酸等,酚醇有愈创木酚、儿茶酚(苯邻二酚)、香草醇等,酚醛有香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛等<sup>[8, 9]</sup>。与呋喃类抑制物类似,酚类抑制物可影响菌体的生长和发酵产品的

产率和产量。

由于酚类抑制物的种类较多且溶解性较低,缺少合适的定量或定性方法,使得与前两类抑制物相比,酚类抑制物的机理性研究还不完全清楚。一般认为,酚类抑制物可直接作用于生物膜,改变细胞膜中脂质和蛋白的比例,破坏细胞膜的完整性,使细胞膜通透性和细胞流动性增加,导致细胞膜的选择透过性屏障功能受损<sup>[45]</sup>。酚类抑制物同样可引起胞内 ROS 的积累,诱发 DNA 突变,破坏细胞骨架,导致细胞程序性死亡<sup>[46]</sup>。与相同浓度的糠醛、HMF 相比,酚类抑制物的毒性更强<sup>[47]</sup>。

尽管上述三类抑制物的具体抑制机理和毒性强度有所不同,但整体而言这三类抑制物均可引起发酵微生物在生理水平或代谢水平的明显变化,并伴随细胞活力和细胞发酵效率的明显下降。疏水性是决定抑制物毒性强弱的重要因素之一,且一般疏水性越强,毒性越强<sup>[30, 48-50]</sup>。木质纤维素水解液中除了含有上述三类主要的抑制物外,还含有无机盐离子等其他抑制物。与咪唑类、有机弱酸类和酚类抑制物不同,无机盐离子物质不是由于生物质原料自身的过度降解而产生,而是由于预处理过程中化学试剂的添加、或预处理及酶解过程中因设备的腐蚀而产生。考察不同盐离子浓度对酿酒酵母的影响,结果发现  $\text{CaCl}_2$  的毒性最强,其他依次为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl} > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4 > \text{KCl}$ <sup>[51]</sup>。

### 1.3 木质纤维素来源抑制物的不同应对策略分析

目前,已有很多方法用于克服预处理过程中产生的多种抑制物对发酵菌株的抑制作用,以实现木质纤维素资源的更高效利用。在发酵前对抑制物进行脱除处理、或利用发酵微生物自身将抑制物转化为低毒或无毒性的物质是最主要的两种应对策略。本小节将以咪唑醛抑制物为主,对上述抑制物应对策略进行详细论述。

#### 1.3.1 发酵前的脱毒处理

为避免木质纤维素来源抑制物对发酵微生物的抑制作用,首先考虑在发酵前对抑制物进行脱除处理(“脱毒”)。目前已报道的脱毒方法包括物理方法(水洗、加热蒸发、真空蒸发等)、化学方法(过碱处理、活性炭吸附、离子交换处理等)、生物方法(酶或微生物介导)或将上述方法混合使用<sup>[52-57]</sup>。生物脱毒法利用某些特定的微生物或(和)它们产生的酶作用于水解液中的抑制物,通过改变抑制物的结构,将其转化为低毒或无毒性的物质。与传统物理化学法相比,生物法具有处理条件温和、低能耗、无污染等众多优势,成为近年来抑制物脱除研究的热点。

##### 1.3.1.1 微生物法脱毒

许多微生物包括霉菌、细菌、酵母等自身具备降解或转化抑制物的能力,并已被用于木质纤维素水解液的脱毒处理。Palmqvist<sup>[58]</sup>等发现一株丝状白腐真菌 *Trichoderma reesei* 可降解柳木水解液中的咪唑醛、乙酸、苯甲酸等多种抑制物,但会同时消耗一定量的葡萄糖。Nichols<sup>[59]</sup>等分离得到一株脱毒真菌 *Coniochaeta ligniaria*, 该菌株可实现玉米水解液中的糠醛、HMF、酚醛和酚酸类抑制物的完全降解转化。Okuda<sup>[60]</sup>等考察了

一株嗜热细菌 *Ureibacillus thermosphaericus*, 该菌株可有效降解废木水解液中的糠醛、HMF 以及酚类抑制物, 同时只消耗约 5% 的可发酵糖。Hou-Rui<sup>[61]</sup>等报道了两株可代谢抑制物的酵母菌株 *Issatchenkia occidentalis* 和 *Iris orientalis*, 二者可降解甘蔗渣水解液中的糠醛、乙酸、愈创木酚等抑制物。

糠醛、HMF 为含有呋喃环的化合物, 具有不易被生物降解的性能。脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* 是目前已报道的可厌氧代谢糠醛的菌株。这类细菌可以以糠醛为唯一碳源生长, 并将糠醛转化为乙酸, 二氧化碳和 (或) 甲烷<sup>[62, 63]</sup>。糠醛、HMF 也可在有氧条件下转化为相应的糠醇、羟甲基糠醇, 或糠酸、羟甲基糠酸, 具有这类代谢功能的菌株包括很多细菌、酵母和部分霉菌, 如 *Pichia putida*<sup>[64]</sup>、*Aspergillus ascendens*<sup>[65]</sup>、*Escherichia coli*<sup>[66, 67]</sup>、*Saccharomyces cerevisiae*<sup>[65, 68]</sup>、*Cupriavidus necator*<sup>[69]</sup>、*Cupriavidus basilensis*<sup>[70]</sup>、*Amorphotheca resiniae*<sup>[71]</sup>等。需要指出的是, 大多数微生物只可将呋喃醛转化为低毒性的醇或酸, 部分微生物才可实现呋喃醛抑制物的完全降解转化。

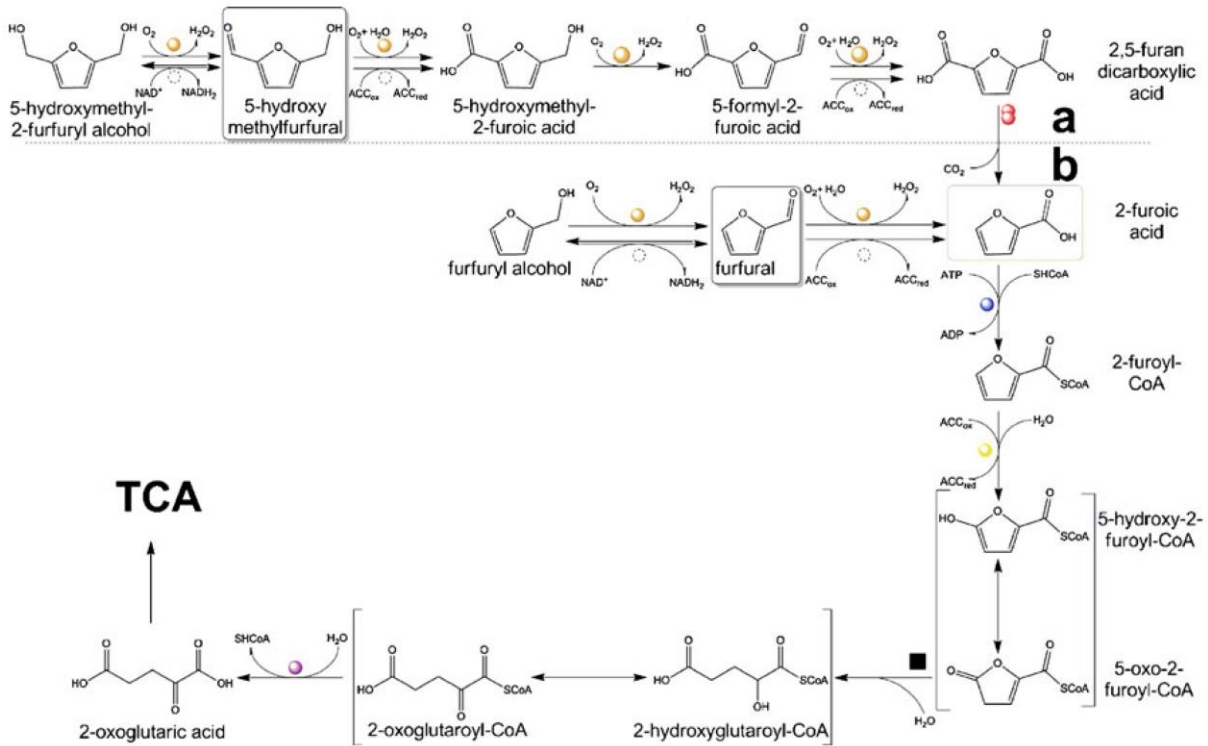


图 1.4 *Cupriavidus basilensis* HMF14 中 HMF(a)和糠醛(b)的代谢路径<sup>[72]</sup>

Fig. 1.4 Metabolic pathways of 5-hydroxymethylfurfural (a) and furfural (b) degradation in *Cupriavidus basilensis* HMF14

1969 年 Trudgill 在糠醛降解菌 *Pseudomonas putida* F2 中首次较为完整地提出了有氧条件下糠醛的降解代谢路径<sup>[73]</sup>, 并随后得到 Koenig 和 Andreesen<sup>[74]</sup>的进一步验证和补充。2010 年, Koopman 等人<sup>[75]</sup>则进一步在呋喃醛降解菌 *Cupriavidus basilensis* HMF14 中补充了 HMF 代谢路径 (图 1.4)。糠醛首先在糠醛脱氢酶的作用下氧化生成糠酸, 糠酸在糠酰-CoA 合成酶催化下与 CoA 连接。生成的糠酰-CoA 经糠酰-CoA 脱氢酶羟基化得到

5-羟-2-糠酰-CoA, 该烯醇式-CoA 异构化为含有内酯环的相应的酮。内酯环酮进一步水解开环, 再经一次酮醇异构化后得到  $\alpha$ -酮戊二酰-CoA,  $\alpha$ -酮戊二酰-CoA 经水解最后释放  $\alpha$ -酮戊二酸,  $\alpha$ -酮戊二酸经 TCA 循环完成彻底氧化分解(图 1.4a)。与糠醛降解类似, HMF 首先被氧化为相应的单羧酸, 随后进一步在特异性氧化酶 HmfH 的催化下, 氧化生成 2,5-呋喃二羧酸(FDCA)。FDCA 经脱羧反应脱掉一个羧基生成糠酸, 随后 HMF 降解与糠醛降解重合, 最终同样以  $\alpha$ -酮戊二酸的形式进入 TCA 循环(图 1.4b)。

### 1.3.1.2 酶法脱毒

酶法脱毒是另外一种生物脱毒方式。目前, 来源于白腐真菌, 如 *Trametes versicolor*、*Phenorchete chrysosporium*、*Cythus bulleri* 等的漆酶和过氧化物酶是酶法脱毒中使用到的主要酶制剂。漆酶和过氧化物酶可有效去除木质纤维素水解液中的酚类抑制物。Jönsson<sup>[76]</sup>等发现源自 *T. versicolor* 的漆酶和过氧化物酶可使柳木水解液中的低分子酚类物质氧化聚合, 有效地脱除了其中的酚类单体和酚酸类物质。Martin 等<sup>[77]</sup>证实了漆酶处理可有效脱除甘蔗渣水解液中约 80% 的酚类抑制物。与直接微生物脱毒法相比, 酶法脱毒条件温和, 催化效率更高, 但商品酶的成本较高, 不利于酶法脱毒的广泛应用。

尽管发酵前的脱毒处理可以有效地缓解或消除抑制物对后续发酵过程的影响, 但脱毒操作需要增加额外的反应器设备, 同时需要额外的脱毒时间, 会不可避免地导致整个生物炼制工艺流程的复杂化, 使纤维素产品的生产成本增加。另外, 脱毒操作还有可能导致可发酵糖的无义消耗, 影响后续的产品发酵生产。由于发酵微生物自身往往也具有可代谢或转化抑制物的能力, 如将醛类抑制物转化为低毒性的相应的醇或酸<sup>[59, 65, 78, 79]</sup>, 因此还可从以下两方面着手降低(消除)抑制物的抑制作用, 一是对发酵方式进行合理调控, 保证发酵微生物自身的抑制物代谢性能不受抑制, 二是对发酵微生物进行改造, 提高其对抑制物的降解和耐受性能。

## 1.3.2 发酵过程的合理调控

### 1.3.2.1 不同发酵模式的合理使用

受木质纤维素来源抑制物的影响, 在发酵起始阶段发酵微生物的细胞活力和发酵速率会受到明显抑制。如前所述, 由于发酵微生物自身可将呋喃醛和酚类抑制物转化为低毒性的物质, 因此保证发酵微生物的细胞活力和抑制物转化速率可有效改善抑制物的抑制作用。在批次发酵模式下可通过增加接种量、使用固定化细胞发酵、细胞循环再利用等方式来实现<sup>[80-82]</sup>。增加接种量可有效降低抑制物的影响, 但会使生产成本增加, 不利于大规模的工业应用; 将细胞循环再利用与增加接种量策略相结合可有效降低成本, 但该方法不适用于难以实现细胞分离的发酵过程, 如 SSF 过程。细胞包埋固定化可有效降低抑制物扩散进入固定化基质及细胞膜的速率, 为细胞提供相对低毒的生产环境, 提高发酵微生物在水解液中的发酵性能<sup>[83]</sup>, 但固定化细胞成本较高、同时在发酵过程中还存在细胞失活现象, 不利于固定化细胞发酵的工业化应用。

补料分批发酵可通过调整合适的流加速率使发酵微生物固有的抑制物转化能力不被抑制, 保证抑制物脱毒过程可以持续发生, 从而保持抑制物浓度始终处于较低水平<sup>[84]</sup>。

<sup>85]</sup>。为了使发酵速率最高，水解液流加速率应为不抑制菌体生长的最大可能流加速率，理想状态下应与微生物固有抑制物降解能力相等。目前已有相关实验通过测定微生物的二氧化碳释放速率<sup>[86, 87]</sup>，或测定发酵培养液中的葡萄糖浓度<sup>[88]</sup>等策略实现了补料流加速率的合理调控。Modig<sup>[89]</sup>等比较了批次发酵和补料分批发酵模式下酵母菌株的发酵性能。批次发酵时，水解液中糠醛转化完全，但有 50% 的 HMF 剩余，同时菌体发酵速率受到明显抑制；补料分批发酵时，糠醛、HMF 均转化完全，同时乙醇产率明显提高。

### 1.3.2.2 培养液中特定物质的添加

除了采用不同的发酵模式，还可以向培养基中额外添加某些特定的组分，以增强菌体对抑制物的耐受性，如向培养基中添加海藻糖、谷胱甘肽、多胺、含硫氨基酸等。呋喃醛抑制物可引起胞内 ROS 的积累，对菌体产生氧化胁迫。海藻糖的添加可保护细胞膜及胞内蛋白免受氧化胁迫的损害<sup>[90, 91]</sup>；谷胱甘肽作为胞内主要的还原剂可直接作用于氢氧自由基将其还原为水，外加谷胱甘肽可保护酵母免受 ROS 的氧化胁迫，增加酵母细胞对糠醛的耐受性<sup>[92]</sup>；多胺包括精胺、亚精胺、腐胺、尸胺等，是微生物细胞分裂增值的重要因子，多胺可与质膜、核糖体、DNA 等结合保护细胞免受外界的氧胁迫压力，向培养基中添加多胺物质可有效增强 *S. cerevisiae*、*E. coli* 等发酵微生物对糠醛、HMF 的耐受性<sup>[93, 94]</sup>。糠醛可诱导胞内含硫氨基酸，如半胱氨酸、甲硫氨酸等的生物合成上调表达，向培养基中添加 100  $\mu\text{M}$  的半胱氨酸或甲硫氨酸可提高 *E. coli* 对糠醛的耐受性<sup>[95]</sup>，但对 *S. cerevisiae* 无明显影响<sup>[96]</sup>。

尽管向培养基中添加特定物质可以提高发酵菌株对抑制物的耐受性，但该方法必然会导致生产成本的增加，这在一定程度上限制了其大规模的工业化应用。

### 1.3.3 高抑制物耐受型发酵菌株的构建

通过对发酵过程的合理调控可以允许发酵微生物直接利用未经脱毒处理的纤维素水解液进行发酵生产，但其发酵速率会严重受限于微生物自身对抑制物的转化能力或对抑制物的耐受性能。采用驯化策略或采用理性工程手段对微生物菌株进行改造可从根本上提高微生物对抑制物的耐受性，是目前最理想的应对抑制物的策略。

#### 1.3.3.1 适应性驯化策略

发酵微生物自身具有转化或代谢抑制物的能力，对微生物进行适应性驯化可有效提高发酵微生物对抑制物的转化性能或耐受性能<sup>[97, 98]</sup>。与发酵前的脱毒处理相比，使用驯化后的微生物进行发酵生产可大大缩短或直接免去脱毒操作，不仅能够降低脱毒成本，还可以防止脱毒过程中可发酵糖的无义损失。微生物适应性驯化过程可以采用摇瓶连续传代培养（图 1.5a），也可以采用恒化器连续培养（图 1.5b）；驯化培养液可以使用添加有单一抑制物或混合多种抑制物的合成培养基也可以使用不同浓度的木质纤维素水解液；当驯化菌株的生物量、葡萄糖消耗、产物积累或抑制物转化等参数在某一抑制物胁迫条件下趋于稳定时驯化终止。

驯化过程使菌株持续处于抑制物胁迫条件下，通过迭代的遗传变异和模拟自然选择过程，不断提高菌体对抑制物的耐受性能，使其能够在抑制物胁迫条件下存活生长并实

现稳定遗传。在含高浓度糠醛或 HMF 的合成培养基中对酵母菌株 *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 和 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 进行摇瓶连续传代培养，有效地提高了菌株转化抑制物的能力。对各菌株转接至少 100 次后，得到驯化菌株 *S. cerevisiae* 307-12H60 和 307-12H120 与 *P. stipitis* 307-10H60，可分别将 30 和 60 mM 的 HMF 快速转化为羟甲基糠醇；得到驯化菌株 *S. cerevisiae* 307-12-F40 可将 30 mM 的糠醛快速转化为糠醇<sup>[99]</sup>。同样采用摇瓶连续培养对 *S. cerevisiae* TMB3400 进行适应性驯化也得到了类似的结果。在驯化过程中逐级增加培养基中糠醛的浓度（从 3 mM 到 20 mM），在连续培养约 300 代后，驯化菌株在 17 mM 糠醛胁迫下的生长延滞期由野生菌株的 90 h 降低至 17 h，同时糠醛转化速率得到显著提高<sup>[100]</sup>。Martín 等<sup>[101]</sup>则采用恒化器在甘蔗渣水解液中对 *S. cerevisiae* TMB3001 进行连续培养，约 350 h 后有效地提高了菌株对糠醛、HMF 的转化速率，同时乙醇产率及乙醇得率（24 h）相应提高。除酵母菌株外，也有报道其他模式菌株如 *E. coli*<sup>[102, 103]</sup>、*Z. mobilis*<sup>[104-106]</sup>等采用适应性驯化策略成功提高了菌株对抑制物的耐受性能。对这些驯化菌株进行基因组重测序或转录水平、蛋白水平分析将有助于揭示导致抑制物耐受性提高的分子机理，并为构建其他抑制物耐受型菌株提供重要的参考信息<sup>[107-109]</sup>。

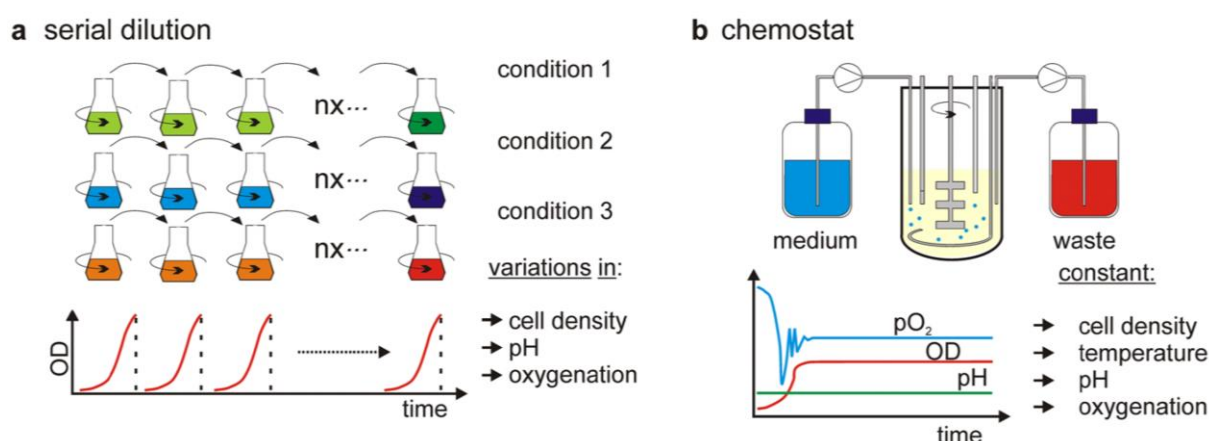


图 1.5 适应性驯化策略<sup>[98]</sup>

(a) 摇瓶连续传代培养；(b) 恒化器连续培养

Fig. 1.5 Adaptive evolution

(a) sequential serial passages in shake flasks; (b) continuous chemostat cultures

### 1.3.3.2 理性工程改造策略

适应性驯化策略是一种有效提高微生物对抑制物耐受性的方法，但该方法的一大缺点是其优势表型背后的分子机理不易挖掘，且难以完整植入到其他发酵微生物中。与此相反，理性工程改造策略依据已知的抑制物转化机制及微生物耐受机理，借助基因工程或代谢工程等手段对微生物进行有目的的改造，从而提高菌体对抑制物的转化能力或对抑制物的耐受性能。

如前所述，发酵微生物转化抑制物生成低毒或无毒性物质的速率是缓解抑制物毒性、

提高微生物发酵速率的关键因素。*S. cerevisiae*、*E. coli* 等发酵微生物可在非特异性的、依赖于 NAD(P)(H) 的醇脱氢酶 ADH<sup>[110-114]</sup>、醛还原酶 ARI 或醛酮还原酶 AKR<sup>[115-118]</sup>、醛脱氢酶 ALDH<sup>[119]</sup> 等氧化还原酶的催化下将高毒性的呋喃醛抑制物转化为低毒性的呋喃醇（糠醇、羟甲基糠醇）或呋喃酸（糠酸、羟甲基糠酸）。在 *S. cerevisiae* 中过表达氧化还原酶基因 *ADH1*、*ADH6* 或 *ALD6* 可有效增加菌体对糠醛和（或）HMF 的转化能力，提高 *S. cerevisiae* 在抑制物胁迫条件下的乙醇产率<sup>[112, 119-121]</sup>。在 *E. coli* 中过表达丙二醇还原酶基因 *fucO* 也得到了类似的结果<sup>[122, 123]</sup>。

对胞内与氧化还原力平衡相关的基因或路径进行工程改造也可增强菌体对呋喃醛抑制物的耐受性。呋喃醛的还原转化过程为依赖于 NAD(P)H 的反应过程，该过程可导致胞内还原力水平的显著下降<sup>[124]</sup>。戊糖磷酸途径是 *S. cerevisiae* 体内 NADPH 的主要来源，戊糖磷酸路径（PPP）中的作用基因 *ZWF1*、*GND1*、*RPE1* 和 *TKL1* 的缺失会使得菌体对呋喃醛抑制物的敏感性增加，导致延滞期延长；当过表达 PPP 路径中的 *ZWF1*（编码 PPP 路径中的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶）时可恢复菌株在高浓度（50 mM）糠醛条件下的细胞生长<sup>[125]</sup>；过表达 *TAL1*（编码 PPP 路径中的转醛醇酶）时可同样增强菌株对呋喃醛的耐受性<sup>[126]</sup>。分析认为 *ZWF1* 或 *TAL1* 的过表达可提供更多的还原力 NADPH 促进呋喃醛的还原，同时促进菌株的生长。*E. coli* 中还原酶基因 *yqhD* 和 *dkgA* 可依赖于 NADPH 进行糠醛、HMF 的还原，但该过程会与生长竞争 NADPH<sup>[127]</sup>，NADPH 的大量消耗会限制菌株的生长，当过表达促进 NADPH 生成的转氢酶基因 *pntAB* 时可部分恢复菌株在 1g/L 糠醛下的细胞生长<sup>[95]</sup>。

对抑制物处理下的发酵微生物进行转录水平或蛋白水平分析显示，呋喃醛抑制物可影响菌株的细胞膜生物合成、DNA 复制与修复、蛋白质生物合成、物质转运、转录调控等过程，针对这些生物学过程进行相应分子改造同样可有效地增强菌体对呋喃醛抑制物的耐受性。如呋喃醛可引起胞内 ROS 的积累，对菌株产生氧化胁迫，在 *S. cerevisiae* 中过表达与应激氧化胁迫相关的基因，如降解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的基因 *CTA1*、*CTT1*，谷胱甘肽 GSH 合成相关基因 *GSH1*、*GLR1*，均可有效增强菌体对呋喃醛的耐受性<sup>[92, 128]</sup>。其他已报道的类似的基因还有来自 *S. cerevisiae* 的 *YAP1* 调控子<sup>[129, 130]</sup>、*MSN2* 调控子<sup>[131]</sup>、膜蛋白 *ATRI* 与 *FLR1*<sup>[129]</sup>、组蛋白磷酸化酶基因 *PHO13*<sup>[132]</sup>、蛋白激酶基因 *SSK2*<sup>[133]</sup>、泛素-蛋白连接酶基因 *SIZ1*<sup>[134]</sup>、细胞膜表面糖蛋白编码基因 *FLO11*<sup>[135]</sup> 等，来自 *E. coli* 的 *acrR* 调控子<sup>[136]</sup>、胸苷酸合成酶基因 *thyA*<sup>[137]</sup>、未知功能的氧化还原酶基因 *ucpA*<sup>[122, 138]</sup> 等。

与呋喃醛抑制物相比，目前针对酚类抑制物或有机弱酸类抑制物的发酵微生物理性改造工作则相对较少。漆酶是可作用于酚类抑制物的酶，在前面内容中提到漆酶可用于发酵前的酶法生物脱毒。在 *S. cerevisiae* 中过表达外源白腐真菌 *T. versicolor* 的漆酶可增强菌体对松柏醛（1.25 mM）的转化能力，相应地提高菌体生长和发酵性能<sup>[139]</sup>。在酵母中过表达子囊真菌 *Melanocarpus albomyces* 的漆酶也得到了类似的结果<sup>[140]</sup>。*PAD1* 编码苯基丙烯酸脱羧酶，其过表达增强了酵母菌株对阿魏酸、肉桂酸的转化能力，可分别较原始菌提高 1.5 倍和 4 倍<sup>[141]</sup>。乙酸可以以未解离的形式进入细胞，在胞内释放质子引

起细胞酸化。*FPS1* 为酵母中编码质膜水油蛋白的基因，以插入失活的形式阻断 *FPS1* 的表达可减缓乙酸进入细胞的速率，降低乙酸对细胞的损伤<sup>[142]</sup>。分析研究显示乙酸可引起胞内氨基酸尤其是精氨酸、组氨酸和色氨酸的合成增加，增加胞内色氨酸的积累可明显增强菌体对乙酸的耐受性<sup>[143]</sup>。代谢组学研究显示乙酸可通过抑制 PPP 路径抑制可代谢木糖的 *S. cerevisiae* 对木糖的利用，导致 PPP 路径中间代谢产物的大量积累，过表达 PPP 路径中的转醛醇酶基因 *TAL1* 或转酮醇酶基因 *TKL1* 可增强菌体对乙酸的耐受性，提高乙醇发酵性能，其中过表达 *TAL1* 时在 30 mM 乙酸下的乙醇产率可较对照提高 1.7 倍<sup>[144]</sup>。

对发酵菌株进行理性改造是提高菌株对抑制物耐受性能的有效方法。要实现菌株的理性改造需要首先了解菌株对抑制物的降解及耐受机理，筛选得到与抑制物降解及耐受相关的基因是实现菌株理性改造的关键所在。目前，通过对发酵微生物菌株进行转录水平、蛋白水平或代谢水平分析已经为揭示抑制物耐受机理提供了大量的有用信息，未来还将继续提供更多更有用的信息。

#### 1.4 本论文的立题依据和主要研究内容

预处理操作是利用木质纤维素材料进行生物质产品生产的必要环节，严格的预处理条件在破坏纤维素结构的同时，不可避免地产生多种副产物，这些木质纤维素来源的抑制物问题一直是影响纤维素炼制工艺产业化的主要技术瓶颈问题之一。在这些抑制物中，糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）是两种具有代表性的呋喃类抑制物，分别来自于预处理过程中戊糖和己糖的进一步降解，与其他抑制物相比，二者含量较高、毒性较强，不仅会影响纤维素酶的水解、还会抑制发酵微生物的生长和生物质产品的生产。因此，针对上述呋喃醛抑制物问题，解析呋喃醛抑制物的降解和耐受机理，构建具有高呋喃醛抑制物耐受性的发酵微生物工程菌株是本论文研究的主要内容和主要目标，具体展开如下：

（1）转录水平解析生物脱毒真菌树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 对呋喃醛抑制物的降解机理。*A. resinae* ZN1 可将糠醛、HMF 转化为相应的低毒性的糠醇、羟甲基糠醇或糠酸、羟甲基糠酸。为解析 *A. resinae* ZN1 转化呋喃类抑制物的分子机理，本研究在添加不同呋喃类抑制物及其降解产物的条件下，借助两种不同的生物技术手段，荧光定量 PCR 技术和 RNA 测序技术，对 *A. resinae* ZN1 进行转录水平的定量分析，筛选鉴定与抑制物转化相关的关键基因（酶）。本研究结果不仅可以为 *A. resinae* ZN1 的木质纤维素生物脱毒应用提供理论支持，还将为后续高抗逆性工程菌株的构建工作提供重要的参考信息。

（2）在乙醇发酵菌株 *Zymomonas mobilis* ZM4 中过表达与抑制物转化相关的氧化还原酶基因，对发酵菌株进行理性改造，构建具有高呋喃醛耐受性的重组工程菌株。过表达的目的基因包括依据转录水平分析筛选自 *A. resinae* ZN1 的外源作用基因，和筛选自 *Z. mobilis* ZM4 自身的内源作用基因。在上述过表达基础上，进一步共表达与胞内氧化还原力供给相关的基因。本研究旨在得到同时具备高抑制物降解（耐受）性能和高乙

醇发酵性能的 *Z. mobilis* ZM4 重组工程菌株，省去脱毒操作，实现脱毒与发酵工艺的整合，降低纤维素乙醇的生产成本。

(3) 对一株经玉米秸秆水解液长期适应性驯化得到的高抑制物耐受型突变菌株 *Corynebacterium glutamicum* S9114-128 进行基因组重测序，解析该驯化菌株呋喃醛抑制物耐受性提高的分子机理。基于二代测序平台，对驯化菌株进行基因组重测序，对检测得到的突变相关基因进行过表达构建或缺失替换，鉴定筛选与抑制物耐受性提高相关的关键基因。本研究结果将为研究其他类型的驯化菌株以及构建其他抑制物耐受型发酵微生物工程菌株提供重要的参考依据。

## 第 2 章 转录水平分析 *Amorphotheca resinae* ZN1 对呋喃醛的转化机理

### 2.1 引言

利用木质纤维素进行生物质产品生产时需要首先对木质纤维素原料进行预处理，破坏其顽抗结构，以保证后续纤维素酶的水解和微生物发酵。然而严格的预处理条件不可避免地造成纤维素结构组分的过度降解，在释放可发酵糖的同时伴随产生多种抑制物<sup>[145]</sup>。糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）是其中两种具有代表性的呋喃类抑制物，分别来自于预处理过程中戊糖和己糖的过度降解，与其他抑制物相比，二者含量较高、毒性较强，不仅会影响纤维素酶的水解<sup>[27]</sup>、还会抑制微生物的生长和发酵性能，使最终的乙醇产率下降<sup>[28, 35, 37]</sup>。

缓解或消除糠醛、HMF 对发酵微生物的抑制作用是低成本高效纤维素乙醇生产的重要环节。在发酵前进行抑制物的脱除处理是克服抑制物影响的一种可行方式。目前很多方法，包括水洗、过碱石灰处理、离子交换、有机溶剂萃取等物理化学方法均可实现抑制物的脱除，但这些方法多会伴随大量废水的产生及可发酵糖的流失，导致生产成本的增加<sup>[52, 55]</sup>。生物脱毒方法利用某些特定的微生物或（和）它们产生的酶作用于水解液中的抑制物，通过改变抑制物的结构，将其转化为低毒或无毒性的物质。与传统物理化学法相比，生物法因其处理条件温和、低能耗、无废水、无污染等特点成为近年来呋喃醛抑制物脱除研究的热点<sup>[57, 146, 147]</sup>。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 是本实验室从玉米秸秆中自主筛选分离得到的一株生物脱毒真菌<sup>[71]</sup>。该菌株可实现几乎所有抑制物的脱除转化，并已被成功应用于乙醇、油脂、乳酸、葡萄糖酸等生物质化学品的高效发酵生产<sup>[71, 148-150]</sup>。实验室之前的研究工作中<sup>[151]</sup>从发酵代谢水平对 *A. resinae* ZN1 代谢糠醛、HMF 的性能进行了解析，并对其抑制物代谢路径进行了相关推测，认为该菌株与前面提到的 *C. basilensis* HMF14<sup>[75]</sup>代谢呋喃醛抑制物的方式相类似。如图 2.1，*A. resinae* ZN1 在无氧或有氧条件下首先将糠醛快速转化为低毒性的糠醇，在有氧条件下，糠醇进一步缓慢依次氧化为低浓度的糠醛和糠酸，糠酸与 CoA 连接生成糠酰-CoA，糠酰-CoA 经脱水开环后，水解释放  $\alpha$ -酮戊二酸，最终  $\alpha$ -酮戊二酸进入 TCA 循环完成彻底氧化分解。与糠醛降解相类似，HMF 快速转化为低毒性的羟甲基糠醇，在耗氧条件下进一步缓慢地依次氧化为 HMF、羟甲基糠酸和 2,5-呋喃二羧酸，2,5-呋喃二羧酸经脱羧反应生成糠酸，随后 HMF 降解与糠醛降解重合，最终同样以  $\alpha$ -酮戊二酸的形式进入 TCA 循环。*A. resinae* ZN1 降解糠醛、HMF 的过程中，将糠醛、HMF 转化为低毒性的糠醇、羟甲基糠醇或糠酸、羟甲基糠酸是降解的起始步骤（图 2.1 c, d），也是缓解或消除呋喃醛抑制作用的最关键步骤。在发酵代谢水平的基础上，进一步从基因水平解析 *A. resinae* ZN1 中呋喃醛、呋喃醇、呋喃酸三者相互转化的分子机理对抑制物脱除研究具有更重要的意义。

*C. basilensis* HMF14 是目前对于呋喃醛抑制物降解研究最清晰的菌株，但受研究方

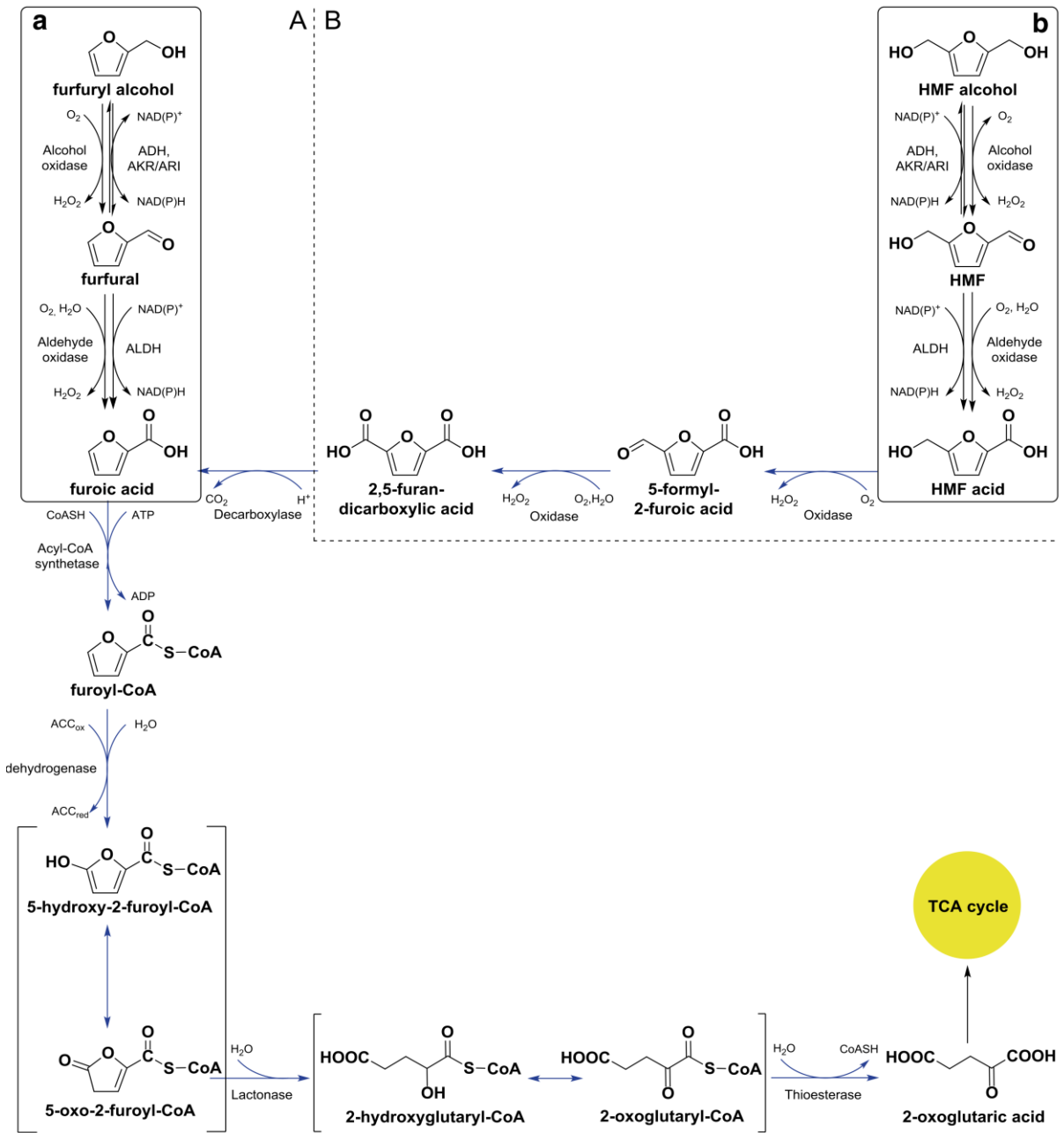


图 2.1 *A. resiniae* ZN1 中糠醛(A)和 HMF(B)的代谢路径

Fig. 2.1 Metabolic pathways of furfural (A) and HMF (B) degradation in *A. resiniae* ZN1. Solid boxes (a, b) were based on the previous experimental phenomena<sup>[151]</sup>. Blue arrows were adapted from Trudgill<sup>[73]</sup> and Koopman et al.<sup>[75]</sup>. ACC, acceptor, either oxidized (ox) or reduced (red); ADH, alcohol dehydrogenase; AKR, aldo-keto reductase; ARI, aldehyde reductase; ALDH, aldehyde dehydrogenase.

法（转座子突变体库筛选）的限制，仍未能完全掌握与呋喃醛降解转化相关的所有的基因信息<sup>[75]</sup>。本研究借助荧光定量 PCR 技术和 RNA-Seq 技术对呋喃醛抑制物胁迫下的 *A. resiniae* ZN1 进行转录水平的定量分析。结合代谢水平、基因水平和转录水平结果，本研究成功鉴定得到了 *A. resiniae* ZN1 中作用于抑制物降解转化的关键基因（酶），并对与抑制物降解转化相关的其他分子机制进行了详细解析。本研究从分子水平揭示了 *A.*

*resinae* ZN1 对糠醛、HMF 的降解机制, 该降解机制的解读不仅可以为 *A. resinae* ZN1 在木质纤维素生物炼制过程中的脱毒应用提供理论支持, 还将为后续高抗逆性工程菌株的理性改造提供重要的参考信息。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 实验材料

#### 2.2.1.1 实验菌株与主要试剂

树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 是实验室自主分离筛选得到的生物脱毒真菌, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), 保藏号 CGMCC 7452。 *A. resinae* ZN1 全基因组采用 Illumina HiSeq 2000 测序完成 (深圳华大基因科技有限公司), 并提交 GenBank, 登录号为 JZSE00000000。测序共计得到 18,830 个基因, 借助 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、KOG (Eukaryote clusters of orthologous groups)、Swiss-Prot、NR (Non-redundant protein database) 等数据库对其中 16,974 个基因编码蛋白完成相应的功能注释。

RNA 提取用试剂 RNAiso Plus 购自日本 TAKARA 公司, 反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 和定量试剂盒 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 均购自日本 TOYOBO 公司。糠醛、HMF、5-羟甲基糠醇购自上海德默医药科技有限公司, 糠醇购自国药集团化学试剂有限公司。其它生化试剂 (分析纯) 购自国药集团化学试剂有限公司或上海凌峰化学试剂有限公司。

#### 2.2.1.2 培养基与培养条件

*A. resinae* ZN1 活化采用固体 PDA 培养基, 组分为马铃薯 (煮沸过滤) 200 g/L、葡萄糖 20 g/L 和琼脂 20 g/L。 *A. resinae* ZN1 液体培养采用合成培养基, 包括无机盐培养基, 成分为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L, 自然 pH; 含碳源合成培养基, 成分为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L、酵母浸粉 1 g/L、葡萄糖 20 g/L、5 g/L 或 0 g/L。培养条件无特殊说明均采用 28 °C, 静置培养。

### 2.2.2 实验和分析方法

#### 2.2.2.1 呋喃醛抑制物的生物降解

取冻干粉保存的 *A. resinae* ZN1, 经 PDA 平板活化培养三代后转接入 PDA 斜面培养, 并于 4 °C 保存。取一管斜面保存的 *A. resinae* ZN1, 无菌水冲洗斜面, 获得浓度约  $4-5 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液。以 10% 的接种量转接入含葡萄糖 20 g/L 的合成培养基中, 静置培养获得种子培养液。以糠醛、HMF 为唯一碳源时, 种子培养 6 d, 收集菌膜, 无菌水冲洗两次去掉剩余的残糖, 将菌膜重悬于相同体积的无机盐培养基中, 10% 接种量下转接入含终浓度约 1 g/L 的糠醛或 HMF 的 30 mL 新鲜无机盐培养基中, 28 °C, 静置培养。以葡萄糖为碳源时, 种子培养 4 d, 打散菌膜后, 10% 接种量直接转接入含 1 g/L 的糠醛或 HMF 的 30 mL 含碳源合成培养基 (葡萄糖浓度为 5 g/L) 中。每隔一定时间取

两瓶培养液，干重法测定菌体生物量，同时取 1ml 上清保存于-20 °C 冰箱，用于后续葡萄糖及抑制物含量测定。上述发酵实验均进行至少 2 次生物学重复。

#### 2.2.2.2 分析方法

菌体生物量以细胞干重 (DCW) 表示，抽滤收集 30 mL 的 *A. resinae* ZN1 培养液，经去离子水水洗后 105 °C 下烘干至恒重 (约 12 h)，差重法计算得到细胞生物量。呋喃类衍生物含量采用 LC-20AT 型反相高效液相 HPLC 色谱仪 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 测定, HPLC 配置 SPD-20A UV 紫外检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (YMC, Tokyo, Japan)。糠醛、糠醇、糠酸检测以 50% 乙腈为流动相，流速为 1.0 mL/min，柱温 35 °C，检测波长 220 nm，保留时间为 5 min。HMF、羟甲基糠醇、羟甲基糠酸检测采用梯度洗脱，初始流动相为 5% 乙腈水溶液，0-15 min 乙腈含量由 5% 增至 100%；15-20 min 乙腈由 100% 降至 5%；20-30 min，乙腈含量恒定为 5%。流动相流速为 0.6 mL/min，柱温 35 °C，检测波长 230 nm。葡萄糖含量采用 SBA-40D 生物传感分析仪 (山东科学院) 测定。所有样品在分析前经适度稀释后使用 0.22 μm 滤膜过滤处理。

#### 2.2.2.3 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

*A. resinae* ZN1 种子培养液制备如上。将种子液转接入含 5 g/L 葡萄糖的含碳源合成培养基中，静置预培养 2 d，待长出较明显菌丝后，添加糠醛或 HMF，使终浓度约 1g/L。记添加抑制物的时刻为 0 h (对照)，收集培养 0 h 和 4 h 的菌体。将种子液转接入含 0 g/L 葡萄糖的含碳源合成培养基中，利用种子液中的残糖静置预培养 2 d，添加 1 g/L 的糠醇或羟甲基糠醇，同样记添加抑制物的时刻为 0 h (对照)，收集培养 0 h 和 48 h 的菌体。上述实验的实验组和对照组均设置 2 次生物学重复。取 50 mL 菌体培养液，4 °C，12,000 rpm 离心 10 min，无菌水冲洗三次，液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱备用。

取-80 °C 冰箱保存的菌体，液氮充分研磨后使用 RNAiso Plus 试剂进行 RNA 提取。RNA 质量和浓度经分光光度计 DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 检验测定。质检合格的 RNA 经反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 进行 cDNA 合成，5 倍稀释后保存于-20 °C 冰箱，一周内完成定量 PCR 分析。定量 PCR 反应使用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix，在 BioRad CFX 96 仪器 (BioRad, Hercules, CA, USA) 中完成。PCR 反应以 β-肌动蛋白基因 ARZ\_9569\_T1 为内参基因，以相同培养条件下 0 h 的菌体为对照，各基因转录水平经  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[152]</sup> 计算得到。定义差异表达倍数 Foldchange  $\geq 2.0$  为上调表达，Foldchange  $\leq 0.5$  为下调表达。

各抑制物降解相关基因的 PCR 扩增引物依据 *A. resinae* ZN1 基因组序列信息，由引物设计软件 Primer Premier 5 设计完成。引物长度 18 bp 到 25 bp (表 2.1)，扩增片段长度 120 bp-170 bp。定量前以梯度稀释的 cDNA 为模板对各引物进行效率验证，保证各引物效率处于 90%-110% 之间。qRT-PCR 反应体系包括无菌水 6.4 μL、SYBR Green Mix 10 μL、上下游引物各 0.8 μL、cDNA 模板 2 μL。反应条件如下：95 °C 预变性 60 s，95 °C 变性 15 s，55 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 30 s，循环 40 次后进行熔解曲线分析，每 5 s 升温 0.5 °C，温度由 65 °C 升至 95 °C 结束。

2.2.2.4 RNA-Seq 与 qRT-PCR 验证

*A. resinae* ZN1 种子培养液制备如上。将种子液转接入含 5 g/L 葡萄糖的含碳源合成培养基中,静置预培养 2 d,待长出较明显菌丝后,添加糠醛或 HMF,使其终浓度为 1 g/L。收集糠醛或 HMF 胁迫处理培养 4 h 的菌体,同时以不添加抑制物为对照。实验组和对照组分别设置 2 次生物学重复。取 50 mL 菌体培养液,4 °C, 12,000 rpm 离心 10 min,无菌水洗三次,液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱。

取液氮速冻保存的菌体,液氮研磨后使用 RNAiso Plus 试剂进行 RNA 提取。RNA 质量与完整性经 Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 检测。质检合格的 RNA 用于 RNA-Seq 和 qRT-PCR 验证。

RNA 经 Dynabeads<sup>®</sup> mRNA Purification Kit (Life tech., USA) 纯化后使用 Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life tech., USA) 进行 cDNA 文库构建。cDNA 测序使用 Life Tech Ion Proton 测序平台,由上海基研生物科技有限公司完成。以 *A. resinae* ZN1 基因组序列 (GenBank: JZSE000000000) 为参考基因组,借助 MapSplice 软件对测序结果进行序列比对。比对结果经 RPKM (reads per kilobase per million reads) 标准化<sup>[153]</sup>后使用 EBSeq 进行差异表达基因筛选。定义显著差异表达的阈值条件为差异表达倍数 Foldchange  $\geq 2.0$  (上调表达) 或  $\leq 0.5$  (下调表达),且错误发现率 (False Discovery Rate) FDR  $\leq 0.05$ 。基于基因注释数据库对显著差异表达基因进行 GO (Gene Ontology) 分类,采用 Fisher 检验对各 GO 进行显著性水平 (P-Value) 分析,得到差异表达基因所显著富集的生物学功能分类 (P-Value  $\leq 0.01$ )。

为验证 RNA-Seq 结果,选取 17 个不同功能不同表达量的基因进行 qRT-PCR 定量。各基因的引物见表 2.1。qRT-PCR 操作见 2.2.2.3 部分。

表 2.1 qRT-PCR 用引物汇总  
Table 2.1 Primers used for qRT-PCR

Gene ID	Primers sequence 5'-3'	
	Forward	Reverse
<b>Primers used for transcription and expression analysis</b>		
<b>ADH</b>		
ARZ_10052_T1	gccagacatcaaatccatgagc	tcgccatcaagtcaactaccaaac
ARZ_10290_T1	gccaaaggaacctaccaacg	accagccgcaacctcaatc
ARZ_1137_T1	gcagattgcgaaagccagtg	ctcgtcgtccgtcatcttcag
ARZ_13167_T1	acccgcaggaggaagatgtg	gtatcccacttggaacattcac
ARZ_13908_T1	aacactggttgcggtgtgatg	tcagatgggtcttcacgatgc
ARZ_1429_T1	accgttccttacctccaatca	catggggaactcttcgatgatg
ARZ_1478_T1	gggcttatctcaattattggattcc	cctcaatggctctgttcattctcc
ARZ_15335_T1	tggagggatggtgatagaag	tccagatcactaggcacgtac
ARZ_1542_T1	tggagattggattacctcaagtcc	agtaatgagcccagccctttg
ARZ_15626_T1	cagcagttgaagtgcctccg	gaattcttcagactcgaagatc
ARZ_15717_T1	ttaggtgctggcgggtaaagac	gctcaataaccacctcaacacca
ARZ_15727_T1	agccctgatctcaagaaagcc	ccgacgccaacagtaaccac
ARZ_15928_T1	gattggtgaagagggtaaaggagc	cagggaatctcctcctgtgtaac

---

ARZ_16054_T1	gcttgccattgtatcacccg	tccacaatagccttgctgc
ARZ_16075_T1	gacatcacgttccccatcatg	gccccaatcaactcttgacat
ARZ_1653_T1	ggcttcgtgttattgggtccg	catttggtgccaggcgagtc
ARZ_16562_T1	atggataggcattgttgctctg	gcaccagcttcctcgataaact
ARZ_17261_T1	cgtcgcccattccagtcatac	ccttgccaccctctatttctct
ARZ_17817_T1	ggcagtgatcggatcattgg	tcctatcctcgcacaaagcac
ARZ_4514_T1	ttgcattacggggaacctc	aactatcctgcccgaatgtc
ARZ_4549_T1	atcgctcgtattggaggtcttg	catctgtggcaatgaatctgtcc
ARZ_5226_T1	attgaaggaacaaagcacgtc	gaccaagttcacacctcgtc
ARZ_6335_T1	tgtactggagttgaatctgcctc	gcatcatcgtatgtattgcgtat
ARZ_9116_T1	accgcatgacgtttgacct	caatcagacatccattcgtat
ARZ_92_T1	caggagaagctgatcgatgac	ctgcgacaccaatgacgatg
ARZ_9386_T1	facgtgcggcaggatttcg	gacatgcttctccttctccgtg
ARZ_9803_T1	tgacaccgctgaggctattga	ttccagcatgagatcgtaacct
ARZ_10032_T1	attcgtgtgaactccattccc	cacttgccaaaaacacacatcc
ARZ_10048_T1	tcgttgagaagatgagtgtagcg	cgaatgtcctggtccagatgg
ARZ_10445_T1	agaagtacccaccaacctcc	ggaatcaggcagtcaccag
ARZ_10735_T1	ttgccaagagcgcagattag	ggttaatattgttgatggcaagatg
ARZ_11749_T1	tctttgagagagcgtgaacctgac	atctggcaatccgagaggtag
ARZ_12708_T1	gaaaggagcgtatgaaagacg	tctcgtcgtcgtcgtggtc
ARZ_12851_T1	tagctgctgagaacctgaatg	gagccagaggatgaagtgtgc
ARZ_13165_T1	cgttatctcaggagaggtgtctacc	gtcatagcgtcaggactctgttg
ARZ_14225_T1	gcaggcattgtggctattcg	gttcgtacaacaccgggacag
ARZ_14914_T1	cacatcaaggatgtcacggagg	cctttgctgacctgtaatgc
ARZ_15221_T1	cgtgtacttggtgacgagggc	aagcgttctgctgactgtgag
ARZ_16631_T1	cccaaccaccaagaacatc	gggagacagtatccaccatcaac
ARZ_17974_T1	attctacggcgacaagtcaaagg	ggttcgggagatcagagatcag
ARZ_18688_T1	agatcgtggcggaaactgaag	cgccatgacgatcaacagag
ARZ_2180_T1	ttggacgattggactactgtgtg	gccaacatagccctaactcgtgc
ARZ_3303_T1	gctggaacaggcgttcgtatc	gccactcttgcgacctcacc
ARZ_3412_T1	ccgaccatttactcggatgc	ctccacgacggaataactcg
ARZ_5014_T1	tcttgggaacggaatattacgtc	tatactctgagggttctctatcctc
ARZ_5127_T1	ggcattggaagagccgtagc	tctgagcactccgaaatcg
ARZ_5257_T1	tggaacatcctctatccg	gacatccatttccccattcg
ARZ_5925_T1	atcttctgctccagcgttgc	ccattgacctgatccag
ARZ_6148_T1	ggtgaaagcggagagaaccag	accgtctgcccattcaggtac
ARZ_6276_T1	tatcatcacggcatccatagcag	tgtgtcgtggaccaatcaac
ARZ_6334_T1	gagactgaggagtatcagtgagcg	catccaaccaccatcgacaac
ARZ_6568_T1	tgctggctagtagtttcgctatg	acctgctcgcgagatcggatg
ARZ_6769_T1	gtcagtttcccagttcctagac	cgagatggatgagatggctatg
ARZ_7751_T1	gagctggcggaggagtttg	gatcgtggctgtgtgtgatag
ARZ_8436_T1	tcaacatcacgtctggttgg	ctctctcgcgatccgatctctc
ARZ_9070_T1	catgatgatagcaccatcttaac	cattgtacgcaaagccgtataag
ARZ_9496_T1	cctagattcgcaagctacgagc	cccaccgtcgacattgagatc
ARZ_9792_T1	cggatatgctagatgaggtagtcg	ggtatggcgttaagggcttc
ARZ_5124_T1	gctgtggtcagcaggttaggtc	ccagggatcttcaagcagttg
ARZ_962_T1	gcttcaagagagaaaacatcgacg	tgtgtcgtcttcttaccctc
ARZ_11219_T1	gcactccaccatcaaggttaagg	ttgttccaagaccacgagcac
ARZ_11558_T1	ttgctcttgcatactcgacc	gccagtctgaccgattaatag

---

ARZ_1162_T1	cgatgctctcgcacatggaac	aatcctccagttcctcgcac
ARZ_12683_T1	cgagatacggcatgagtaaattg	cttgggtggggtttgattg
ARZ_12736_T1	tgccggttatgcacagtc	aactgcatcttggaaagtgttctg
ARZ_12928_T1	gctagtatcgtggcattcaaac	caataaggcccacatcgcag
ARZ_15224_T1	agcgtcaatgtcacgggatgt	cggctttggaggcgtttag
ARZ_15907_T1	gtgtctactctgaatcctggttg	aggtagtccatgcgtttcac
ARZ_15995_T1	atcatcactcggattggaacc	tggaaaccggaagccatctc
ARZ_17851_T1	atcaatctcagcggcatcatg	atgacaccgaattgtctc
ARZ_18719_T1	caggtgctggatggtcagaag	catcatgtcccaggcgaacc
ARZ_18811_T1	acacggtcgagaactggcag	tgacgagatattgatagagagg
ARZ_2579_T1	ggaactgtatacctgaaattgg	tgcttgaggtagcgtagatagg
ARZ_3164_T1	cggaaacggcgagaagaac	cccaagtgggacattagatagc
ARZ_3236_T1	cagcggatccttcacagtag	caagaggctctgcacgaaag
ARZ_3617_T1	tgtagtagatttccagaccgattg	gctaccatctgaacgaggcg
ARZ_6090_T1	gagccatcgtcaatgtcccac	tcagtgtgtaagcatgtaaccg
ARZ_6576_T1	aacgcagttgtgagaagtacgg	gcatcatagccttaccacag
ARZ_6619_T1	agttgcggaagcataacgatagag	ggctgagcattaacggtagc
ARZ_9528_T1	gccataacaatcctgcccc	gtttccatgacgagatcgc
<b>AKR/ARI</b>		
ARZ_10923_T1	cctgatctaccgtgaagaagaacg	gttgttcagcatcctgtccgtc
ARZ_13395_T1	gggacattgtgcaatggtgc	agaggcacgaaaccttctgtag
ARZ_14857_T1	ttcaacacgcagacggacatc	gcactcgtactcttggacagc
ARZ_14938_T1	agaagattggcggctcagtg	tcttcatcacctcatccgtcag
ARZ_1621_T1	tggatttccaactccaaggttc	caaaggacgagtagcggtagc
ARZ_16490_T1	acccaactctgtcagatcgg	ccctcaagttgcctttatcc
ARZ_17182_T1	ggtaactcaagtcgacgagc	cgtatgccagagcgacactg
ARZ_17370_T1	ctcaagccgattgccgatag	gccttcacgctgcataaac
ARZ_17920_T1	agtggaccaaggatagcatgac	gactagagcctcagcgtcttc
ARZ_3860_T1	tttgaatagcgttttgatgg	cataattctcatctgggctcgg
ARZ_7295_T1	aacagactatcgcacttctccag	ccagccattctctcagcg
ARZ_8147_T1	aggagatcgtggatttctgaagg	tgataactcaggaggcggagg
ARZ_13663_T1	cgagaagaacgcagactacacc	cttcttggtccagttggacagc
ARZ_137_T1	ttccgattaataatcaaggatgg	ttccgtgtctgtctgtcacc
ARZ_15150_T1	aaggctgctgggagttcg	tcgctggttgagggttg
ARZ_18349_T1	cttccatgccttcgctcattac	gtatcggaccctgtaactttgacc
ARZ_3141_T1	cagaacaagccatcattggc	gtgccgatgtttggtgagatg
ARZ_3976_T1	cgagacgacattgaaggtacttg	gttcccacagtgagagtcc
ARZ_7271_T1	ctacctcaacatggtgatctcg	ctccctgtgactccgtatttc
ARZ_7657_T1	gaccagagtgttagctgtgacg	atcttctcagacacctgaacc
ARZ_8367_T1	aactggtcaacgagggcaag	tgtccaatgcgtgtcgtgag
<b>ALDH</b>		
ARZ_10708_T1	cctcacgacatccccactac	cacgcaatagcaccgttactg
ARZ_11689_T1	gaattgccctttctgatctttg	ggctgtagatgctgtttggac
ARZ_12503_T1	gtgctcggatgggctgaag	gacgcggttggcagtgatg
ARZ_15082_T1	gtggaccgagacgctcaaac	aacgaccgctcccgtactct
ARZ_1535_T1	ggaacttcgtgaagccaacc	ggccagatagatcgggtgag
ARZ_15746_T1	ttggcactcctgtcattcgac	gttccctgtattcatgccgac
ARZ_18373_T1	gccgacaatcatcgaaacg	gtccagaccgaggtcctaacc

---

ARZ_3957_T1	accaaccgagcatcagaac	aagtagccttggagttatcgtagg
ARZ_494_T1	atggaccgatacgtctaaactc	ccgctcccgtactcttagtattg
ARZ_5090_T1	acgagcagctaaagcccaac	gtctcgggattctttaagcc
ARZ_5413_T1	cgaggaccgaggtagataag	ctttatcggcactgttctc
ARZ_6133_T1	tcaacagcagcaacgactcc	atfcacatggaccgccttagtc
ARZ_7774_T1	acaatgctgctgtgctgttc	cgtattggagttgggagacctg
ARZ_9159_T1	cgggtctttgtccagcgag	accttgaggcacgggtgagc
ARZ_9778_T1	gcaagttgacgtaggagcaatg	agggtcggttggaatagtgtc
ARZ_11723_T1	ggcgtcgtagcttcagcac	tcttctccactccgcatactc
ARZ_18463_T1	tgaagtgcggaagccaatag	cgagatgccagtcacacgc
ARZ_3707_T1	ctctcaaggctgctgtttcg	atgtcggcgtgaattatcgtc
ARZ_10838_T1	gccaagatcccgtcaggctac	gcgagtcaggtttcgtgta
ARZ_9969_T1	gaactccaagggtatgctaagag	tgaagattcagaccgaggctag

**Oxidase**

ARZ_11534_T1	acctcaagatcacggctacg	tgggcataaacgctgatacg
ARZ_14616_T1	gttgagactacatggcacagtctg	ccgcaacctcagggtcttaac
ARZ_17610_T1	aatagccgtggaggcgttg	gagattacgtccaatgtgccg
ARZ_5225_T1	ccgataaaccactgaccgatg	cccctgggactgcagagaag
ARZ_6129_T1	cacaggaaaaccgaggtcaac	tgtgtgccgtagaagaccag
ARZ_16765_T1	cgagggaacgtccacataag	tatttcggctgtgaaggcac
ARZ_18116_T1	gggagcggatgcatftgtg	cgtcgtgcaggtaatacaggag
ARZ_10839_T1	gccgacttatgcttcttctg	tccatcgtggttgagggtg
ARZ_12679_T1	actcgtcggttcccacgta	atggggacgaaatcgatctg
ARZ_17625_T1	ctctcggcttggaaaattct	atfgacaagtgtcgtgactactc
ARZ_15963_T1	ggagtcacgttgcccgataa	tctgccattgattcttgcc
ARZ_3499_T1	gtcctcatcctcggctctga	cgatgttccttcgttagttc
ARZ_16317_T1	tgatccagataccttcggtgatg	gccaggacatgcttggtac
ARZ_17995_T1	gttgattccgtcatgtctaccg	ggggatagtcacaccgtcgt
ARZ_18300_T1	tgttggttaccgctttgc	gacggagattgatgcgttgg
ARZ_6529_T1	atggcaatatggtatggctcag	ggagtgaggatccttgtgaatc

**Primers used for RNA-Seq validation**


---

ARZ_12961_T1	ccagcagacaagaagagctctaag	cacaacctccatcattcgtc
ARZ_16945_T1	aaggagggtccaagagaccag	agtctaacgcaactctgaacacc
ARZ_1967_T1	cacgtcgttgaagcagagatc	ttctcatccactgccttgaagc
ARZ_15318_T1	acaacctgatgagggcaag	tgacagcgaactgtgcttagc
ARZ_16911_T1	aacgaaagttgtctcactgg	aacggtaatagcagccttctaac
ARZ_18349_T1	cttccatgccttcgtcattac	gtatcggaccctgtaactttgacc
ARZ_17920_T1	agtggaccaaggatagcatgac	gactagagcctcgacggctctc
ARZ_16609_T1	aactacatcgtggttttgatc	cgtaaaagagctgttgggaga
ARZ_12437_T1	aagctgaagggaaaggcaag	atcaagcgaaccgagtc
ARZ_13395_T1	gggacattgtcaatgtgtc	agaggcacgaaacctctgtag
ARZ_8436_T1	tcaacatcacgtctggcttgg	ctctctcgtatccgatcattctc
ARZ_11045_T1	tccaccgttccctgcctac	ggagttgtagaaggagtgctgg
ARZ_16710_T1	cgggaagtatatccagacatacg	cttctccacatctggtggatc
ARZ_7663_T1	caggccagcacgttgctatac	caagtcgttagcttcagcggag
ARZ_15233_T1	cccgtctctctccaagtacc	aacatccttggcagttgacc
ARZ_16761_T1	cattccagatccgacctcg	ttccgatctcctcctactg
ARZ_18111_T1	cacgtagcagacctgtttgag	tgtgtgaaggaattgatgaacc

---

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 糠醛、HMF 的生物降解

本研究之前，已在发酵罐中对 *A. resinae* ZN1 进行糠醛、HMF 的降解性能分析，但由于菌体在搅拌桨及发酵罐罐壁处有严重的絮凝现象，无法对菌体的生长进行跟踪监测<sup>[151]</sup>。本研究中则采用摇瓶发酵培养，通过测定菌体干重定量 *A. resinae* ZN1 在抑制物降解过程中的生物量变化。

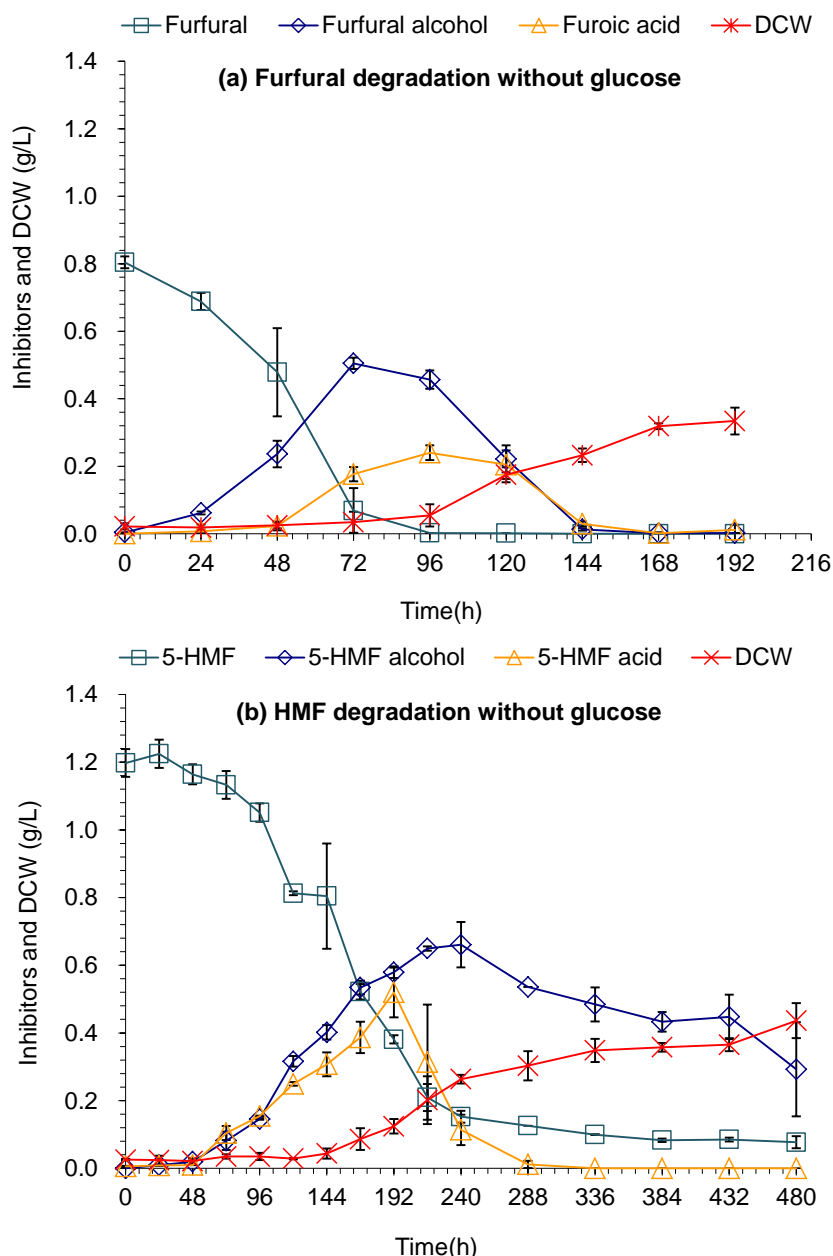


图 2.2 *A. resinae* ZN1 以糠醛 (a) 或 HMF (b) 为唯一碳源时的菌体生长与抑制物代谢

Fig. 2.2 Cell growth and degradation of furfural (a) or HMF (b) without glucose by *A. resinae* ZN1

在无机盐培养基中添加 1 g/L 的糠醛或 HMF，考察以糠醛、HMF 为唯一碳源时，*A. resinae* ZN1 的菌体生长和抑制物降解转化（图 2.2）。图 2.2a 显示，*A. resinae* ZN1 可

在 96 h 内将糠醛转化完全，之后菌体开始快速生长；随着糠醛的下降，糠醇与糠酸开始积累，分别在 72 h (0.51 g/L)、96 h (0.24 g/L) 达到最高，之后开始下降，144 h 后转化完全。HMF 的代谢与糠醛类似 (图 2.2b)：随 HMF 的下降，伴随羟甲基糠醇、羟甲基糠酸的积累，但代谢速率明显低于糠醛；与糠醛不同，HMF 转化约 1/2 时，*A. resiniae* ZN1 菌体开始快速生长，表明糠醛对 *A. resiniae* ZN1 的毒性强于 HMF。图 2.2 显示，*A. resiniae* ZN1 可以以糠醛、HMF 为唯一碳源生长，但菌体生长极为缓慢，甚至无法收集足够的菌体用于后续的 RNA 提取和转录水平分析。此外，由于 *A. resiniae* ZN1 是在葡萄糖、木糖等碳源存在的环境下进行实际的脱毒应用，于是进一步考察了 *A. resiniae* ZN1 在含碳源 (5 g/L 葡萄糖) 培养基中的糠醛、HMF 的降解。

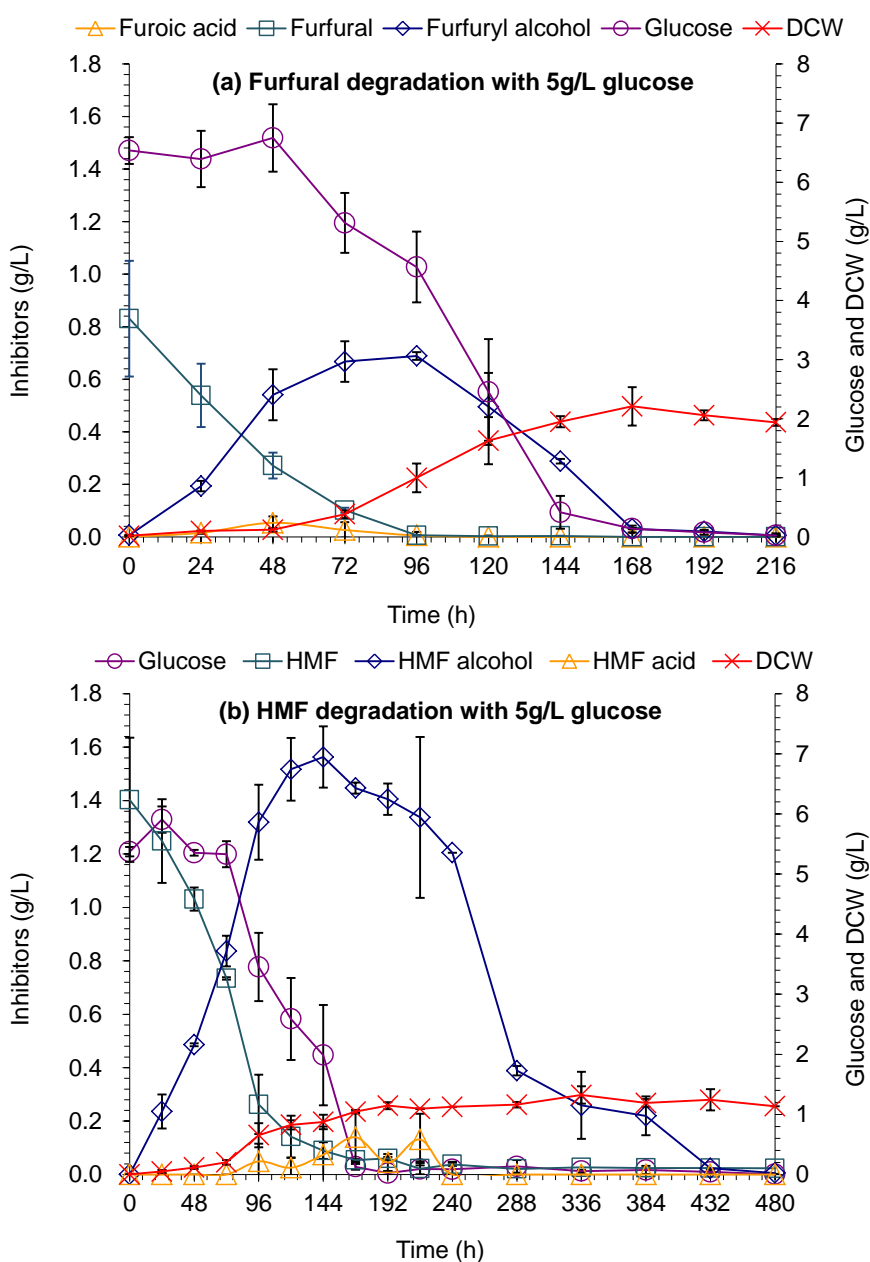


图 2.3 *A. resiniae* ZN1 在 5 g/L 葡萄糖存在条件下对糠醛 (a) 或 HMF (b) 的代谢和菌体生长  
Fig. 2.3 Cell growth and degradation of furfural (a) or HMF (b) with 5 g/L of glucose by *A. resiniae* ZN1

当以葡萄糖为碳源时, *A. resinae* ZN1 仍可将糠醛、HMF 转化为相应的糠醇、羟甲基糠醇, 但只有当糠醛、HMF 转化至较低水平时, 葡萄糖消耗与菌体生长开始加速, 该现象显示当葡萄糖与抑制物共同存在时, *A. resinae* ZN1 优先利用呋喃醛 (图 2.3)。与抑制物为唯一碳源时的抑制物降解实验相比, 当葡萄糖存在时, 糠醛向糠醇的转化速率不受影响, 仍可在 96 h 内完成, 但糠醇降解速率下降, 至 168 h 才转化完全, 较无糖培养滞后 24 h, 同时未检测到糠酸的明显积累。结果表明, 葡萄糖的存在并不影响糠醛向糠醇的转化速率, 但不利于糠醇向糠酸的进一步降解, 同时糠酸一旦生成即被迅速代谢转化。以葡萄糖为碳源时, *A. resinae* ZN1 最终生物量约为 1.9 g/L, 与抑制物为唯一碳源时的菌体生物量 (0.33 g/L) 相比有明显增加 (图 2.3a)。与糠醛降解不同, 葡萄糖的存在明显促进了 HMF 向羟甲基糠醇的转化, 但只有当葡萄糖几乎转化完全时, 羟甲基糠醇开始下降, 即葡萄糖的存在会同样抑制羟甲基糠醇向羟甲基糠酸的进一步降解 (图 2.3b)。以葡萄糖为碳源时, *A. resinae* ZN1 在添加 1 g/L HMF 条件下的生物量为 1.2 g/L, 同样较抑制物为唯一碳源时有明显增加。

糠醛、HMF 的摇瓶降解实验显示, *A. resinae* ZN1 将糠醛、HMF 首先快速地还原为相应的低毒性的糠醇、羟甲基糠醇, 二者进一步代谢, 经糠醛、HMF 氧化产生相应的糠酸、羟甲基糠酸, 得到的糠酸、羟甲基糠酸可继续代谢进入 TCA 循环完成完全降解转化。降解速率方面, 糠醛的转化明显快于 HMF, 葡萄糖的存在不影响糠醛向糠醇的转化速率, 但会明显促进 HMF 向羟甲基糠醇的生成。此外, 葡萄糖的存在会抑制呋喃醇的进一步氧化, 尤其是在羟甲基糠醇降解过程中, 只有当葡萄糖代谢完全时羟甲基糠醇才开始代谢。在降解糠醛、HMF 的过程中, *A. resinae* ZN1 将糠醛、HMF 转化为低毒性的糠醇、羟甲基糠醇或糠酸、羟甲基糠酸是降解的起始步骤, 也是缓解或消除呋喃醛抑制作用的关键步骤。

### 2.3.2 基因组中筛选与呋喃醛降解相关的可能基因

根据已报道的相关文献, 呋喃醛、呋喃醇、呋喃酸的相互转化过程是多种氧化还原酶参与的, 依赖于 NAD(P)H 的还原反应和依赖于 NAD(P)<sup>+</sup>的氧化反应<sup>[37, 72]</sup>。如图 2.1a, b 所示, 在无氧或有氧条件下 *A. resinae* ZN1 在依赖于 NAD(P)H 的醇脱氢酶 (ADH) 或醛酮还原酶/醛还原酶 (AKR/ARI) 的催化下将糠醛 (HMF) 快速还原为低毒性的糠醇 (羟甲基糠醇); 在有氧条件下, 糠醇 (羟甲基糠醇) 再次在 ADH 或 AKR/ARI 的作用下缓慢氧化为低浓度的糠醛 (HMF), 低浓度的糠醛 (HMF) 在醛脱氢酶 (ALDH) 的作用下进一步氧化生成糠酸 (羟甲基糠酸), 这两步氧化过程伴随还原型 NAD(P)H 的释放。由于在无氧条件下呋喃醛只能转化生成呋喃醇而没有呋喃酸的积累, 同时当增加通气量时可明显促进呋喃醇向呋喃酸的进一步氧化<sup>[151]</sup>, 因此认为以游离氧分子为底物的醇氧化酶或醛氧化酶也可能参与糠醇 (羟甲基糠醇) 向糠酸 (羟甲基糠酸) 的氧化。

为了证实上述推测, 本研究在 *A. resinae* ZN1 全基因组 (GenBank: JZSE00000000) 中对上述反应过程中涉及到的相关氧化还原酶基因进行分类筛选, 并借助荧光定量 PCR 技术在添加糠醛、HMF 及其衍生物糠醇、羟甲基糠醇的条件下对这些基因进行转录水

表 2.2 *A. resinae* ZN1 基因组中与糠醛、HMF 降解转化相关的基因Table 2.2 Genes involved in furfural and HMF degradation in *A. resinae* ZN1

Functional Categories	Annotation Description	Num.	Gene Symbols
<b>Alcohol dehydrogenase (ADH, totally 80 genes)</b>	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	27	ARZ_10052_T1; ARZ_10290_T1; ARZ_1137_T1; ARZ_13167_T1; ARZ_13908_T1; ARZ_1429_T1; ARZ_1478_T1; ARZ_15335_T1; ARZ_1542_T1; ARZ_15626_T1; ARZ_15717_T1; ARZ_15727_T1; ARZ_15928_T1; ARZ_16054_T1; ARZ_16075_T1; ARZ_1653_T1; ARZ_16562_T1; ARZ_17261_T1; ARZ_17817_T1; ARZ_4514_T1; ARZ_4549_T1; ARZ_5226_T1; ARZ_6335_T1; ARZ_9116_T1; ARZ_92_T1; ARZ_9386_T1; ARZ_9803_T1
	Short-chain dehydrogenase	31	ARZ_10032_T1; ARZ_10048_T1; ARZ_10445_T1; ARZ_10735_T1; ARZ_11749_T1; ARZ_12708_T1; ARZ_12851_T1; ARZ_13165_T1; ARZ_14225_T1; ARZ_14914_T1; ARZ_15221_T1; ARZ_16631_T1; ARZ_17974_T1; ARZ_18688_T1; ARZ_2180_T1; ARZ_3303_T1; ARZ_3412_T1; ARZ_5014_T1; ARZ_5127_T1; ARZ_5257_T1; ARZ_5925_T1; ARZ_6148_T1; ARZ_6276_T1; ARZ_6334_T1; ARZ_6568_T1; ARZ_6769_T1; ARZ_7751_T1; ARZ_8436_T1; ARZ_9070_T1; ARZ_9496_T1; ARZ_9792_T1
	Alcohol dehydrogenase, iron-type	2	ARZ_5124_T1; ARZ_962_T1
	Other alcohol dehydrogenase	20	ARZ_11219_T1; ARZ_11558_T1; ARZ_1162_T1; ARZ_12683_T1; ARZ_12736_T1; ARZ_12928_T1; ARZ_15224_T1; ARZ_15907_T1; ARZ_15995_T1; ARZ_17851_T1; ARZ_18719_T1; ARZ_18811_T1; ARZ_2579_T1; ARZ_3164_T1; ARZ_3236_T1; ARZ_3617_T1; ARZ_6090_T1; ARZ_6576_T1; ARZ_6619_T1; ARZ_9528_T1
<b>Aldehyde reductase, aldo-keto reductase (AKR/ARI, totally 21 genes)</b>	Aldo-keto reductase	12	ARZ_10923_T1; ARZ_13395_T1; ARZ_14857_T1; ARZ_14938_T1; ARZ_1621_T1; ARZ_16490_T1; ARZ_17182_T1; ARZ_17370_T1; ARZ_17920_T1; ARZ_3860_T1; ARZ_7295_T1; ARZ_8147_T1
	Aldehyde reductase	9	ARZ_13663_T1; ARZ_137_T1; ARZ_15150_T1; ARZ_18349_T1; ARZ_3141_T1; ARZ_3976_T1; ARZ_7271_T1; ARZ_7657_T1; ARZ_8367_T1
<b>Aldehyde dehydrogenase (ALDH, totally 20 genes)</b>	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	15	ARZ_10708_T1; ARZ_11689_T1; ARZ_12503_T1; ARZ_15082_T1; ARZ_1535_T1; ARZ_15746_T1; ARZ_18373_T1; ARZ_3957_T1; ARZ_494_T1; ARZ_5090_T1; ARZ_5413_T1; ARZ_6133_T1; ARZ_7774_T1; ARZ_9159_T1; ARZ_9778_T1
	Amino adipate-semialdehyde dehydrogenase	1	ARZ_11723_T1
	Salicylaldehyde dehydrogenase	2	ARZ_18463_T1; ARZ_3707_T1
	Betaine aldehyde dehydrogenase	1	ARZ_10838_T1
	Semialdehyde dehydrogenase	1	ARZ_9969_T1
<b>Oxidase (Totally 16 genes)</b>	Alcohol oxidase	5	ARZ_11534_T1; ARZ_14616_T1; ARZ_17610_T1; ARZ_5225_T1; ARZ_6129_T1
	Glucose oxidase	2	ARZ_16765_T1; ARZ_18116_T1
	Choline oxidase	2	ARZ_10839_T1; ARZ_12679_T1
	Cholesterol oxidase	1	ARZ_17625_T1
	Glyoxal oxidase	2	ARZ_15963_T1; ARZ_3499_T1
	Ent-kaurene oxidase	4	ARZ_16317_T1; ARZ_17995_T1; ARZ_18300_T1; ARZ_6529_T1

平定量分析。如表 2.2 所示, 共计筛选得到 137 个相关基因, 包括 80 个 *ADH* 基因、21 个 *AKR/ARI* 基因、20 个 *ALDH* 基因和 16 个氧化酶基因。

80 个 *ADH* 基因包括 27 个锌依赖的醇脱氢酶基因、31 个短链醇脱氢酶基因和 2 个铁依赖的醇脱氢酶基因, 除上述直接注释为醇脱氢酶的基因外还包括 20 个作用于 -CHOH 官能团的其他脱氢酶基因, 如甘油脱氢酶、山梨醇脱氢酶、丁二醇脱氢酶基因等。由于醇脱氢酶多是催化可逆反应的酶, 故认为这 80 个 *ADH* 基因可参与催化呋喃醛与呋喃醇之间的相互转化。21 个 *AKR/ARI* 基因包括 12 个醛酮还原酶基因和 9 个醛还原酶基因, 其中有 4 个基因还被同时注释为醇脱氢酶。ARZ\_10923\_T1 和 ARZ\_7295\_T1 为芳基醇脱氢酶基因, ARZ\_13663\_T1 和 ARZ\_14857\_T1 为 Zn 依赖的醇脱氢酶基因。与 *ADH* 基因相似, *AKR/ARI* 可作用于呋喃醛的还原也可作用于呋喃醇的氧化。20 个 *ALDH* 基因包括 15 个 NAD 依赖的醛脱氢酶基因, 5 个其他醛脱氢酶基因, 包括氨基己二酸-半醛脱氢酶基因, 水杨醛脱氢酶基因和甜菜碱脱氢酶基因。*ALDH* 基因被认为可作用于呋喃醛向呋喃酸的转化。16 个氧化酶基因包括 10 个作用于 -CHOH 的氧化酶基因和 4 个作用于 -CHO 的氧化酶基因, 这些氧化酶基因以游离氧分子为底物, 可以催化呋喃醇向呋喃醛的氧化或催化呋喃醛向呋喃酸的氧化。

### 2.3.3 糠醛、HMF 处理下的 qRT-PCR 定量分析

*A. resinae* ZN1 降解糠醛、HMF 的过程中首先将二者转化为相应的低毒性糠醇、羟甲基糠醇, 因此, 首先在添加 1 g/L 的糠醛或 HMF 的条件下考察相关基因的转录水平, 包括 80 个 *ADH* 基因和 21 个 *AKR/ARI* 基因 (图 2.4a)。糠醛处理下, 38 个 *ADH* 基因和 12 个 *AKR/ARI* 基因上调表达超过两倍, 同时有 1 个 *ADH* 基因下调表达; HMF 处理下, 12 个 *ADH* 基因和 10 个 *AKR/ARI* 基因上调表达超过两倍, 同时有 3 个 *ADH* 基因下调表达; 此外, 定量 PCR 结果显示在糠醛处理下上调表达的 50 个基因包含 HMF 处理下上调表达的 22 个基因 (表 2.3)。

依据 *A. resinae* ZN1 基因组功能注释, 上述 22 个上调表达基因包括 2 个 Zn 依赖的醇脱氢酶基因, NADH 依赖的醇脱氢酶基因 ARZ\_15626\_T1 和 NADPH 依赖的醇脱氢酶基因 ARZ\_4549\_T1, 在脱毒菌株 *Cupriavidus necator* JMP134 中也发现相应的 Zn 依赖的糠醛还原酶基因 *furX* 可用于糠醛的还原<sup>[69]</sup>; 6 个短链醇脱氢酶基因 ARZ\_10735\_T1、ARZ\_11749\_T1、ARZ\_14225\_T1、ARZ\_2180\_T1、ARZ\_7751\_T1 和 ARZ\_8436\_T1, 发酵菌株 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 在糠醛胁迫下可诱导胞内短链脱氢酶基因 Cbei\_3904 的上调表达, 同时 Cbei\_3904 的体外酶活显示该脱氢酶不仅可以以糠醛为底物还可作用于 HMF、苯甲醛、丁醛等其他醛类化合物<sup>[154, 155]</sup>; 2 个芳基醇脱氢酶基因 ARZ\_10923\_T1 和 ARZ\_7295\_T1, 这与 *S. cerevisiae* 中呋喃醛胁迫下差异上调表达的基因 *AAD4*、*AAD14* 为同一类基因<sup>[113, 156]</sup>。与酵母菌株应激呋喃醛抑制物的情况相类似<sup>[157, 158]</sup>, 糠醛、HMF 处理也可同样导致 *A. resinae* ZN1 中乙二醛还原酶基因 ARZ\_15150\_T1 的上调表达, 分别为 2.08 倍和 3.34 倍。此外, 2 个吡哆醛还原酶基因 ARZ\_3976\_T1 和 ARZ\_8367\_T1 也明显上调表达, 目前还未有相关文献报道吡哆醛还原酶可用于糠醛、

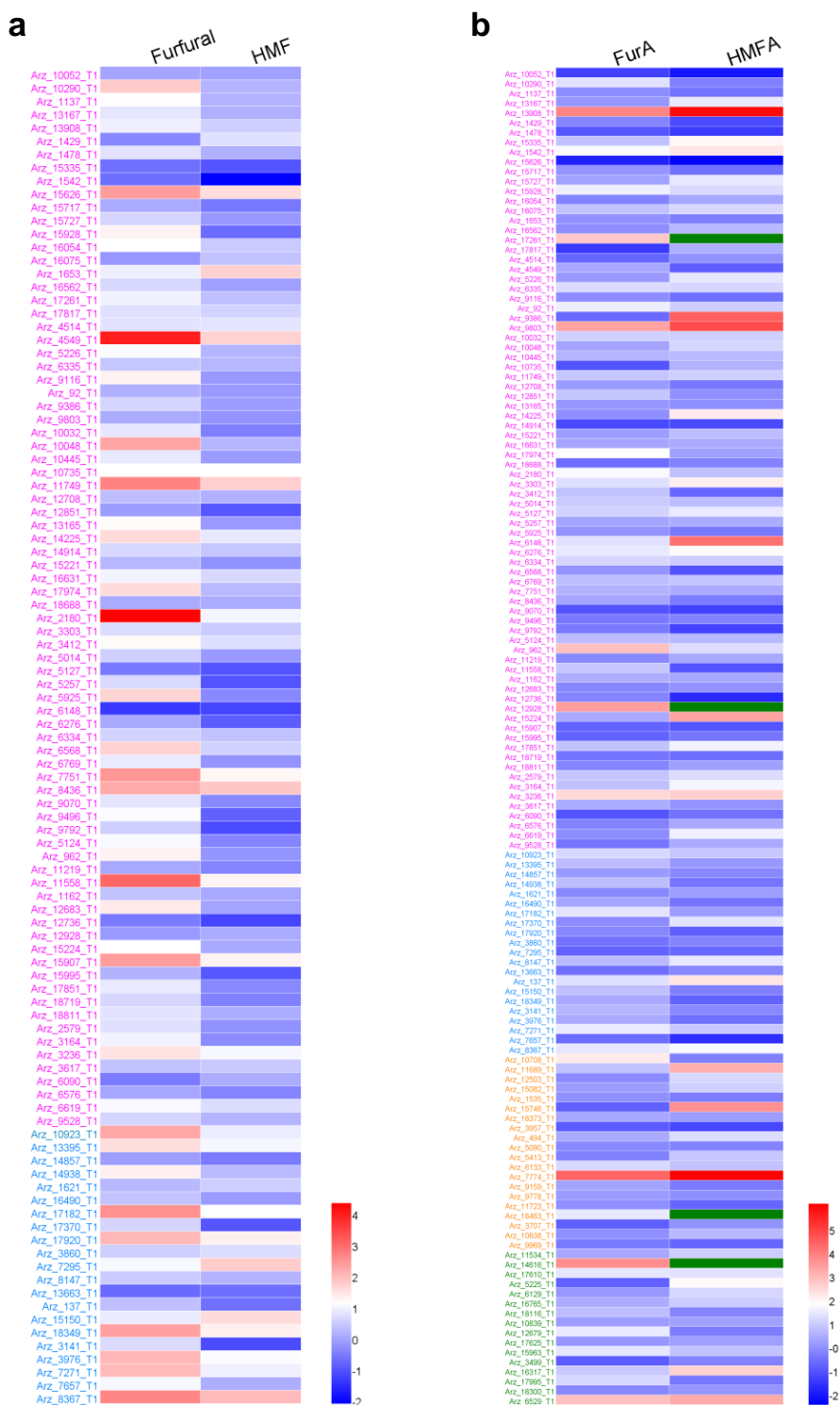


图 2.4 1 g/L 呋喃醛 (a) 或呋喃醇 (b) 处理条件下 *A. resiniae* ZN1 中相关基因的转录水平比较  
 Fig. 2.4 Comparison of transcription levels for selected relevant genes in *A. resiniae* ZN1 in response to (a) 1 g/L of furan aldehydes or (b) furan alcohols

Quantitative expression level for each gene is log<sub>2</sub> transformed from raw fold changes against that at 0 h. Red and blue indicates up-regulated and down-regulated expression as indicated by a color bar at the figure right. Expression data marked with green indicate significantly up-regulated (more than 200-fold) data. The different relevant genes are listed on the figure left and the color from top to bottom indicates different categories of genes: purple, *ADH* genes; blue, *AKR/ARI* genes; orange, *ALDH* genes; green, oxidase genes.

表 2.3 *A. resinae* ZN1 降解糠醛、HMF 过程中差异上调表达的基因Table 2.3 Genes up-regulated involving in both furfural and HMF degradation in *A. resinae* ZN1

Genes	Genes ID	Functional annotation	Foldchange		
			Furfural	HMF	
<b>ADH</b>	ARZ_15626_T1	Zn-dependent alcohol dehydrogenase, NAD-dependent alcohol dehydrogenase	5.84±3.95	3.33±0.57	
	ARZ_4549_T1	Zn-dependent alcohol dehydrogenase, NADP-dependent alcohol dehydrogenase	17.75±2.94	3.67±0.16	
	ARZ_1653_T1	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	2.15±1.10	3.71±0.86	
	ARZ_10735_T1	Short-chain dehydrogenase, levodione reductase	2.48±0.41	2.45±1.23	
	ARZ_11749_T1	Short-chain dehydrogenase	7.32±3.48	3.81±0.04	
	ARZ_14225_T1	Short-chain dehydrogenase, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	3.42±0.15	2.02±0.18	
	ARZ_2180_T1	Short-chain dehydrogenase, 2-(R)-hydroxypropyl-CoM dehydrogenase	22.84±2.24	2.27±0.13	
	ARZ_7751_T1	Short-chain dehydrogenase	6.23±2.04	2.66±0.26	
	ARZ_8436_T1	Short-chain dehydrogenase, gluconate 5-dehydrogenase	5.19±0.33	4.05±0.46	
	ARZ_11558_T1	(+)-neomenthol dehydrogenase	9.38±2.41	2.73±0.11	
	ARZ_15907_T1	Retinol dehydrogenase	5.87±2.33	2.79±0.44	
	ARZ_3236_T1	Histidinol dehydrogenase	3.19±0.31	2.30±0.74	
	<b>AKR/ARI</b>	ARZ_10923_T1	Aldo-keto reductase, putative aryl-alcohol dehydrogenase	5.31±0.60	2.09±0.08
		ARZ_7295_T1	Aldo-keto reductase, putative aryl-alcohol dehydrogenase	2.32±0.83	3.84±2.51
ARZ_13395_T1		Aldo-keto reductase	3.36±0.03	2.28±0.62	
ARZ_17920_T1		Aldo-keto reductase	4.60±2.56	2.82±0.23	
ARZ_17182_T1		Aldo-keto reductase, norsolorinic acid reductase	6.44±1.59	2.50±0.93	
ARZ_15150_T1		NADPH-dependent methylglyoxal reductase	2.08±0.40	3.34±0.16	
ARZ_18349_T1		Aflatoxin B1 aldehyde reductase	5.65±1.13	2.81±0.53	
ARZ_3976_T1		Pyridoxal reductase	4.64±1.60	2.42±0.24	
ARZ_8367_T1		Pyridoxal reductase	7.12±2.06	4.47±0.31	
ARZ_7271_T1	NAD/NADP-dependent indole-3-acetaldehyde reductase	4.48±0.48	2.17±0.43		

HMF 的还原。其他上调表达的基因还包括 3 个醇脱氢酶基因 (ARZ\_11558\_T1、ARZ\_15907\_T1 和 ARZ\_3236\_T1)、3 个醛酮还原酶基因 (ARZ\_13395\_T1、ARZ\_17920\_T1 和 ARZ\_17182\_T1) 和 2 个醛还原酶基因 (ARZ\_18349\_T1 和 ARZ\_7271\_T1)。

糠醛、HMF 处理下的转录定量结果显示, *A. resinae* ZN1 中多个非特异性的氧化还原酶可参与呋喃醛到呋喃醇的还原, 且在 HMF 处理下差异表达的基因 (22 个) 均在糠醛处理下差异表达, 表明糠醛与 HMF 可调控 *A. resinae* ZN1 中相同的基因用于呋喃醛的还原转化。糠醛和 HMF 处理下多个 *ADH* 和 *AKR/ARI* 基因的上调表达显示作用于-CHOH 的基因可能参与了糠醛、HMF 向糠醇、羟甲基糠醇的还原转化过程。

### 2.3.4 糠醇、羟甲基糠醇处理下的 qRT-PCR 定量分析

抑制物降解实验结果显示, *A. resinae* ZN1 可将糠醛、HMF 快速转化为相应的糠醇、羟甲基糠醇, 在有氧条件下生成的呋喃醇可进一步代谢经呋喃醛氧化生成相应的呋喃酸 (糠酸、羟甲基糠酸)。通常认为在呋喃类各衍生物中呋喃酸的毒性最低, 对菌体几乎无抑制作用, 因而可以将呋喃酸的生成认为是生物脱毒过程的结束<sup>[159]</sup>。而对于呋喃醇, 尽管其毒性已明显低于呋喃醛, 但对大多数发酵微生物而言仍具有一定的抑制毒性, 甚至明显强于相应的呋喃酸<sup>[160, 161]</sup>, 因而本研究继续对呋喃醇后续转化的分子机理进行了进一步研究。与研究呋喃醛转化相类似, 在直接添加糠醇、羟甲基糠醇的条件下同样借助定量 PCR 技术对 *A. resinae* ZN1 中的相关基因进行转录水平的定量分析。需要特别指出的是, 由于之前的发酵研究显示葡萄糖会抑制呋喃醇的进一步转化, 因而发酵培养在无糖的含碳源培养基中进行, 待利用种子培养基中的残糖预培养 2 天后添加 1 g/L 的糠醇或羟甲基糠醇, 收集抑制物处理培养 48 h 的菌体进行后续定量 PCR 分析, 如 2.2.2.3 所描述, 此时糠醇或羟甲基糠醇开始明显消耗。

如前面所述, 与呋喃醇进一步转化相关的基因包括 80 个 *ADH* 基因、21 个 *AKR/ARI* 基因、20 个 *ALDH* 基因和 16 个氧化酶基因, 前三类基因为依赖于 NAD(P)<sup>+</sup> 的氧化还原酶基因, 参与呋喃醇到呋喃醛到呋喃酸的氧化过程, 同时伴随有还原力 NAD(P)H 的生成, 氧化酶则以游离氧分子为底物催化呋喃醇到呋喃酸的氧化。图 2.4b 显示, 糠醇处理下, 29 个 *ADH* 基因、5 个 *AKR/ARI* 基因、5 个 *ALDH* 基因和 7 个氧化酶基因上调表达超过两倍, 同时有 3 个 *ADH* 基因下调表达; 羟甲基糠醇处理下, 30 个 *ADH* 基因、6 个 *AKR/ARI* 基因、8 个 *ALDH* 基因和 8 个氧化酶基因上调表达超过两倍, 有 6 个 *ADH* 基因、1 个 *AKR/ARI* 基因和 1 个 *ALDH* 基因下调表达。定量结果显示糠醇与羟甲基糠醇降解过程中差异表达的基因总数大致相当, 分别为 46 个和 52 个, 但其中只有部分基因为相同基因, 这与呋喃醛处理下的结果不同 (HMF 降解中上调表达的基因均在糠醛降解中上调表达)。但是, 在糠醇处理下上调表达超过 6 倍的基因同样在羟甲基糠醇下差异上调表达明显 (超过 6 倍)。

如表 2.4 所示, 糠醇、羟甲基糠醇处理下 Zn 依赖的丙醇脱氢酶基因 ARZ\_13908\_T1、ARZ\_17261\_T1 和 ARZ\_9803\_T1 差异上调明显, 且其中 ARZ\_17261\_T1 在羟甲基糠醇处理下上调超过 700 倍。组氨酸脱氢酶基因 ARZ\_3236\_T1 和丁二醇脱氢酶基因

表 2.4 *A. resinae* ZN1 降解糠醇、羟甲基糠醇过程中差异上调表达超过 6 倍的基因

Table 2.4 Genes up-regulated more than sixfold involving in furfuryl alcohol and (or) HMF alcohol degradation in *A. resinae* ZN1

Genes	Genes ID	Functional annotation	Foldchange	
			Furfuryl alcohol	HMF alcohol
<b>Furan Alcohols to Furan Aldehydes</b>				
<b>ADH</b>	<b>ARZ_13908_T1</b>	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, propanol-preferring	16.93 ± 2.23	70.66 ± 6.23
	<b>ARZ_17261_T1*</b>	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, propanol-preferring	7.93 ± 2.52	718.50 ± 112.23
	<b>ARZ_9803_T1</b>	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, propanol-preferring	12.15 ± 1.19	33.46 ± 3.60
	ARZ_9386_T1	Zn-dependent dehydrogenases, diacetyl reductase	-	26.21 ± 3.71
	ARZ_6148_T1	Short-chain dehydrogenase, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	-	21.55 ± 4.30
	ARZ_962_T1	Iron-dependent alcohol dehydrogenase, hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase	8.58 ± 0.42	-
	<b>ARZ_12928_T1*</b>	Butanediol dehydrogenase / diacetyl reductase	12.88 ± 3.19	208.74 ± 35.63
	ARZ_15224_T1	D-arabinitol 2-dehydrogenase	-	12.22 ± 0.60
	<b>ARZ_3236_T1</b>	Histidinol dehydrogenase	6.50 ± 1.89	7.27 ± 1.35
<b>Furan Aldehydes to Furan Acids</b>				
<b>ALDH</b>	ARZ_11689_T1	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase, succinate-semialdehyde dehydrogenase	-	10.30 ± 0.15
	ARZ_15746_T1	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase, succinate-semialdehyde dehydrogenase	-	14.82 ± 1.67
	<b>ARZ_7774_T1</b>	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	24.61 ± 5.15	78.80 ± 0.77
	ARZ_18463_T1*	Salicylaldehyde dehydrogenase	-	508.57 ± 14.95
<b>Oxidase</b>	<b>ARZ_14616_T1*</b>	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, Alcohol oxidase	15.10 ± 2.07	901.83 ± 192.99
	ARZ_16317_T1	Ent-kaurene oxidase	-	7.02 ± 0.93
	<b>ARZ_6529_T1</b>	Ent-kaurene oxidase	8.54 ± 0.13	11.20 ± 0.27

Bold genes are up-regulated (more than six-fold) response to both the two inhibitors, furfuryl alcohol and HMF alcohol.

\* Genes are significantly up-regulated (more than 200-fold) involving in HMF alcohol degradation.

- Relative expression means not up-regulated or up-regulated to relative lower level (less than six-fold).

ARZ\_12928\_T1 在呋喃醇处理下也均出现了明显的差异表达。在羟甲基糠醇处理下上调表达的 *ADH* 基因还有二乙酰还原酶基因 ARZ\_9386\_T1 (26.21 倍)、3-酰基还原酶基因 ARZ\_6148\_T1 (21.55 倍) 和阿拉伯醇脱氢酶基因 ARZ\_15224\_T1 (12.22 倍)。*ALDH* 类基因中依赖于  $\text{NAD}^+$  的醛脱氢酶基因 ARZ\_7774\_T1 在糠醇、羟甲基糠醇处理下分别上调 24.61 倍和 78.80 倍；羟甲基糠醇处理下上调表达的 *ALDH* 基因还包括 2 个  $\text{NAD}^+$  依赖的琥珀酸半醛脱氢酶基因 (ARZ\_11689\_T1 和 ARZ\_15746\_T1) 和 1 个水杨醛脱氢酶基因 (ARZ\_18463\_T1)。相关文献报道水杨醛脱氢酶具有底物广谱性, 可作用于芳香醛、二芳香醛等醛类物质, 但对脂肪醛无催化活性<sup>[162]</sup>。氧化酶基因中 ARZ\_14616\_T1 和 ARZ\_6529\_T1 出现明显差异上调表达。ARZ\_14616\_T1 编码葡萄糖-甲醇-胆碱脱氢酶, 与呋喃醛降解菌 *C. basileusis* HMF14 中的基因 *hmfH* 为同一类基因, *hmfH* 已被证实可催化糠醛、HMF 向相应呋喃酸的转化<sup>[75]</sup>; ARZ\_6529\_T1 编码贝壳杉烯氧化酶, 该酶可以以氧气为底物, 在还原力  $\text{NAD(P)H}$  参与下催化醇类化合物生成相应的醛、也可催化醛类物质生成相应的酸, 在羟甲基糠醇条件下同样明显上调表达的基因 ARZ\_16317\_T1 (7.02 倍) 也编码相同功能的蛋白。

呋喃醇处理下的转录水平定量 PCR 结果显示, 羟甲基糠醇处理下某些基因的转录表达上调达数百倍, 包括 2 个 *ADH* 基因 (ARZ\_17261\_T1 和 ARZ\_12928\_T1) 和 1 个 *ALDH* 基因 (ARZ\_18463\_T1) 和 1 个氧化酶基因 (ARZ\_14616\_T1), 明显高于糠醇处理下的转录水平结果。然而实际的抑制物降解实验数据却显示糠醇的降解速率明显高于羟甲基糠醇的降解速率 (图 2.2、2.3), 分析认为可能是由于这些氧化还原酶对羟甲基糠醇的底物亲和性较低, *A. resinae* ZN1 需要转录表达过多的酶才能完成羟甲基糠醇向羟甲基糠酸的氧化转化。

至此, 本研究借助定量 PCR 技术从转录水平解析了 *A. resinae* ZN1 降解糠醛、HMF 生成相应的呋喃醇以及呋喃酸的分子机理。糠醛、HMF 处理下多个相同的醇脱氢酶和醛酮还原酶/醛还原酶基因差异上调, *A. resinae* ZN1 通过调节这些基因的转录表达实现糠醛、HMF 向糠醇、羟甲基糠醇的还原转化; 在糠醇、羟甲基糠醇处理下同样也有多个醇脱氢酶、醛脱氢酶和氧化酶基因明显差异上调, 这些基因的上调表达将有助于 *A. resinae* ZN1 中呋喃醇向呋喃醛及呋喃酸的氧化转化。

转录定量结果很好的解释了 *A. resinae* ZN1 脱毒转化呋喃类抑制物的分子机理, 这将为研究其他生物脱毒菌株以及构建更高效脱毒菌株提供理论参考依据。该部分研究主要关注可直接催化转化呋喃类抑制物的相关氧化还原酶 (基因), 然而实际的生物脱毒过程是微生物体多方面共同协调作用的结果<sup>[157, 163, 164]</sup>。为了能够给 *A. resinae* ZN1 的生物脱毒应用提供更全面的理论支持, 并最终促进 *A. resinae* ZN1 生物脱毒性能的更好发挥, 本研究进一步采用 RNA-Seq 技术从全基因组层面对 *A. resinae* ZN1 进行转录组分析。需要指出的是, 由于木质纤维素中呋喃类抑制物主要为呋喃醛 (糠醛、HMF), 同时与呋喃醇 (糠醇、羟甲基糠醇) 及呋喃酸 (糠酸、羟甲基糠酸) 相比, 呋喃醛的毒性最强, 因而选取呋喃醛处理下的菌体进行 RNA-Seq 分析。

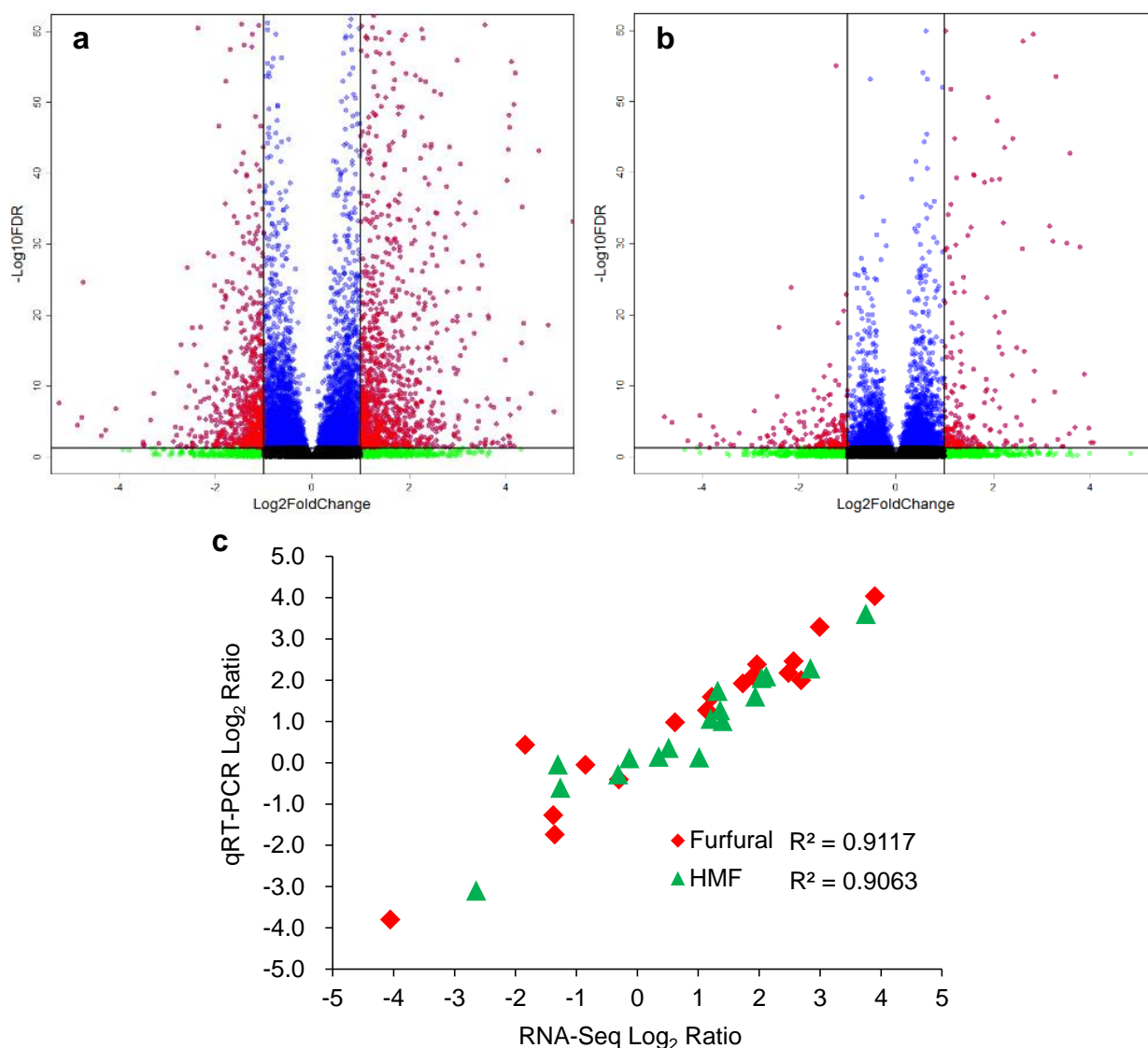


图 2.5 糠醛 (a) 或 HMF (b) 处理下 *A. resinae* ZN1 的全基因转录表达水平与 qRT-PCR 检验 (c)  
Fig. 2.5 Global profiling of gene expression changes in *A. resinae* ZN1 under the stress of furfural (a) or HMF (b) and the validation using qRT-PCR (c)

### 2.3.5 糠醛、HMF 处理下的转录组 (RNA-Seq) 分析

基于 RNA-Seq 技术, 本研究从全基因组水平考察了 *A. resinae* ZN1 降解呋喃醛抑制物的分子机制。选取呋喃醛处理 4 h 的菌体, 同时以不添加抑制物处理为对照, 以已测序完成的 *A. resinae* ZN1 基因组 (GenBank: JZSE00000000) 为参考基因组, 糠醛、HMF 处理下共检测到表达基因 18,349 个, 占全基因组大小的 97.4%。糠醛处理 4 h 时, 1,826 个基因出现显著差异表达变化 ( $FDR \leq 0.05$ ), 其中 1,131 个基因上调表达, 695 个基因下调表达 (图 2.5a); HMF 处理 4 h 时, 427 个基因出现显著差异表达变化 ( $FDR \leq 0.05$ ), 其中 236 个基因上调表达, 191 个基因下调表达 (图 2.5b)。对比糠醛、HMF 两种处理下的显著差异表达基因, 222 个基因在两种胁迫处理下均发生显著表达变化。为考察 RNA-Seq 数据的可靠性, 选取 17 个不同功能不同表达量的基因进行 qRT-PCR 定量分析

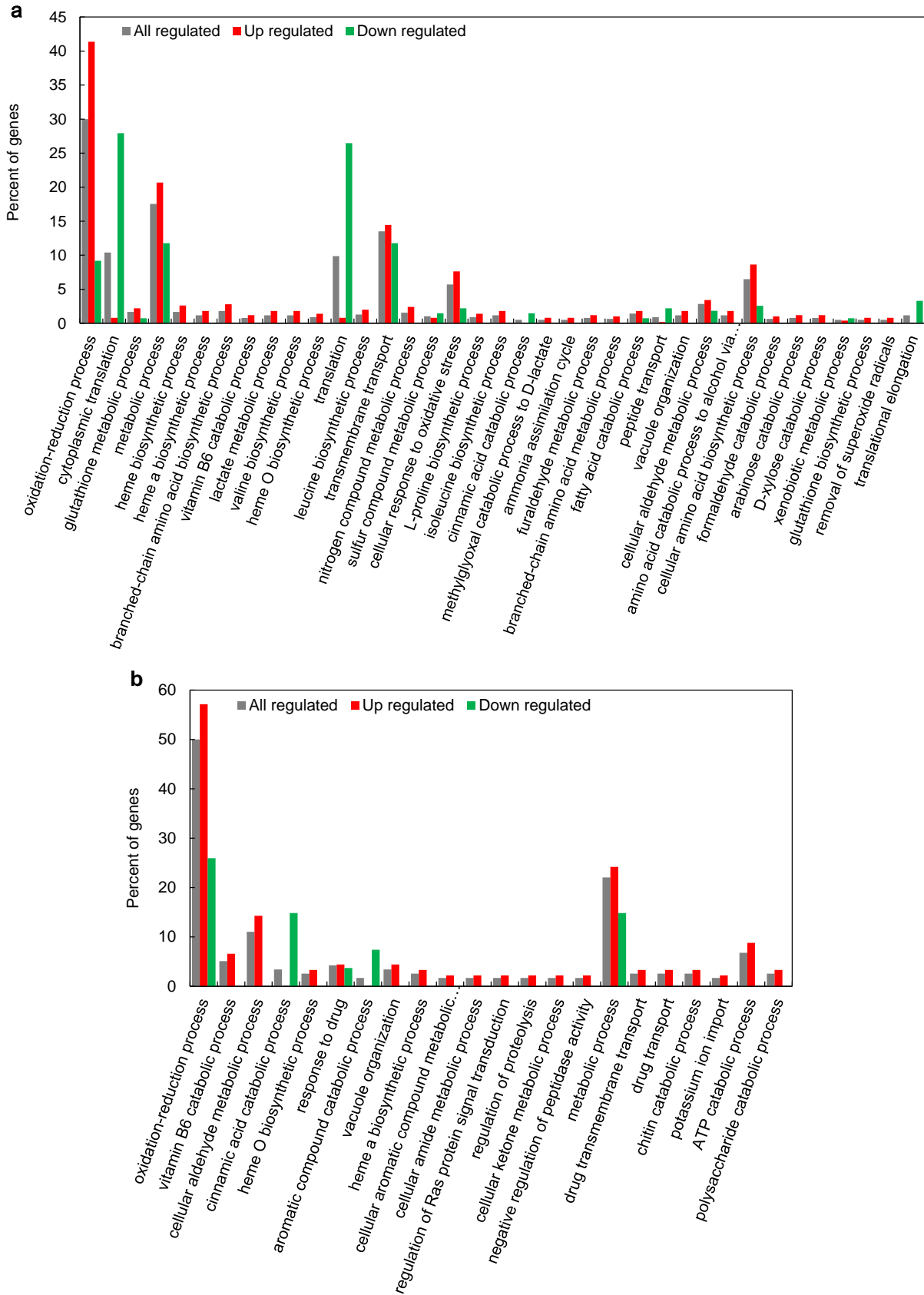


图 2.6 糠醛 (a) 或 HMF (b) 处理下差异表达基因的 GO 聚类分析

Fig. 2.6 Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes in response to furfural (a) or HMF (b). GO terms of the biological process were significantly enriched catalogues (P-value  $\leq 0.01$ )

验证。如图 2.5c 所示，糠醛、HMF 处理下的 qRT-PCR 结果与 RNA-Seq 结果均显示出很好的线性相关关系，相关性分别为 0.9117 和 0.9063，证明了 RNA-Seq 结果数据可靠，可以用于后续研究分析。

对差异表达基因进行 GO (Gene Ontology) 功能聚类分析，糠醛处理下上调表达基因主要涉及胞内氧化还原过程、物质代谢过程和物质跨膜转运过程等，下调表达基因则主要与胞内转录翻译过程相关；与糠醛类似，HMF 处理下差异表达基因主要参与胞内氧化还原过程和物质代谢过程 (图 2.6)。

### 2.3.5.1 糠醛、HMF 的降解与氧化还原过程

之前的研究中结合抑制物有氧降解和定量 PCR 实验得到，在降解呋喃醛的过程中 *A. resinae* ZN1 首先在醇脱氢酶 (ADH) 或醛酮还原酶/醛还原酶 (AKR/ARI) 的催化下，依赖于 NAD(P)H 将糠醛 (HMF) 快速地还原为相应的糠醇 (羟甲基糠醇)，生成的糠醇 (羟甲基糠醇) 进一步在 ADH 或 AKR/ARI 及醛脱氢酶 ALDH 的作用下经糠醛 (HMF) 氧化为相应的糠酸 (羟甲基糠酸)，除了上述依赖于 NAD(P)<sup>+</sup> 的氧化还原酶，该氧化反应还可在相关氧化酶的参与下以氧气为底物催化完成 (图 2.1)。在 RNA-Seq 结果中，我们首先对上述呋喃醛代谢路径进行了验证，并与定量 PCR 结果进行对比分析。

转录组结果显示共计有 29 个醇脱氢酶、19 个醛酮还原酶/醛还原酶、5 个醛脱氢酶和 5 个氧化酶基因在呋喃醛处理下发生显著差异表达 (表 2.5)。糠醛处理下，显著差异表达的 29 个醇脱氢酶基因中除芳基醇脱氢酶基因 ARZ\_17766\_T1 外，其他 28 个基因均显著上调表达超过 2 倍，其中 ARZ\_9955\_T1、ARZ\_14699\_T1、ARZ\_15626\_T1、ARZ\_4549\_T1 和 ARZ\_12306\_T1 上调表达超过 16 倍，分别为 25.91 倍、17.40 倍、20.60 倍、29.38 倍和 25.70 倍；显著差异表达的 19 个醛酮还原酶/醛还原酶基因除  $\alpha$ -酮胺还原酶基因 ARZ\_7657\_T1 外，其他均显著上调超过 2 倍，其中 ARZ\_8230\_T1、ARZ\_8367\_T1、ARZ\_3976\_T1 上调表达超过 16 倍，分别为 29.61 倍、16.90 倍和 16.38 倍；显著差异表达的 5 个醛脱氢酶基因则全部为显著上调表达，其中 ARZ\_18463\_T1 上调表达最高为 13.49 倍；显著差异表达的氧化酶基因中 3 个基因 ARZ\_974\_T1、ARZ\_17610\_T1 和 ARZ\_12679\_T1 显著上调表达，其他 2 个基因 (ARZ\_3221\_T1 和 ARZ\_11870\_T1) 显著下调表达。HMF 处理下，12 个醇脱氢酶基因显著上调表达，其中 ARZ\_15626\_T1、ARZ\_7295\_T1 和 ARZ\_17766\_T1 上调表达最高，分别为 57.96 倍、58.04 倍和 43.96 倍；11 个醛酮还原酶/醛还原酶基因显著上调表达，其中 ARZ\_8230\_T1 上调表达超过 22 倍，ARZ\_8367\_T1 和 ARZ\_3976\_T1 上调表达超过 9 倍；醛脱氢酶和氧化酶基因则未表现显著差异表达变化。

转录组 (RNA-Seq) 结果同样证实了在 *A. resinae* ZN1 中，糠醛、HMF 的还原转化是多个醇脱氢酶、醛酮还原酶或醛还原酶共同催化作用的结果。与 HMF 相比，糠醛处理下有更多的氧化还原酶基因显著差异上调表达，这与抑制物降解实验中观察到的糠醛的转化速率明显快于 HMF 的结果 (图 2.3) 相符。此外，转录组结果显示发生显著差异表达的与呋喃醛降解转化相关的醛脱氢酶和氧化酶基因较少，尤其是在 HMF 处理下未

表 2.5 糠醛、HMF 处理下与抑制物降解相关的基因的转录表达及与定量 PCR 结果的比较

Table 2.5 Transcriptional expression of oxidoreductase genes related to inhibitor degradation in response to furfural or HMF and the comparison with qRT-PCR data

Functional categories and gene names	Gene description	RNA-Seq <sup>a</sup>		qRT-PCR <sup>b</sup>	
		Furfural	HMF	Furfural	HMF
<b>Alcohol dehydrogenase</b>					
ARZ_9955_T1	Putative aryl-alcohol dehydrogenase	25.91	13.32	-	-
ARZ_17182_T1	Putative aryl-alcohol dehydrogenase	15.88	9.65	6.44±1.59	2.50±0.93
ARZ_14699_T1	Putative aryl-alcohol dehydrogenase	17.40	12.02	-	-
ARZ_18349_T1	Putative aryl-alcohol dehydrogenase	14.94	13.46	5.65±1.13	2.81±0.53
ARZ_15626_T1	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III	20.60	57.96	5.84±3.95	3.33±0.57
ARZ_1478_T1	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III	2.37	1.19	1.92±0.28	1.24±0.07
ARZ_1463_T1	Alcohol dehydrogenase isoenzyme type IV	2.06	1.23	-	-
ARZ_5124_T1	Alcohol dehydrogenase isoenzyme type IV	2.94	1.21	2.31±0.11	0.85±0.10
ARZ_962_T1	Alcohol dehydrogenase isoenzyme type IV	2.37	1.48	2.76±0.32	0.98±0.00
ARZ_14090_T1	Alcohol dehydrogenase isoenzyme type IV	3.61	1.65	-	-
ARZ_4549_T1	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase	29.38	14.76	17.75±2.94	3.67±0.16
ARZ_5207_T1	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase	2.32	1.03	-	-
ARZ_12306_T1	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase	25.70	13.89	-	-
ARZ_9133_T1	Bifunctional alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase	3.24	1.65	-	-
ARZ_92_T1	Bifunctional alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase	2.26	1.45	1.24±0.11	1.01±0.01
ARZ_6716_T1	Bifunctional alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase	2.87	1.65	-	-
ARZ_13703_T1	Sorbitol dehydrogenase	5.42	1.13	-	-
ARZ_16054_T1	Sorbitol dehydrogenase	2.13	0.75	2.45±0.08	1.56±0.18
ARZ_9265_T1	Sorbitol dehydrogenase	2.39	0.86	-	-
ARZ_15928_T1	Sorbitol dehydrogenase	5.61	1.20	2.78±0.10	0.68±0.00

ARZ_2372_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	10.73	4.74	-	-
ARZ_15863_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	3.44	1.16	-	-
ARZ_7295_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	5.65	58.04	2.32±0.83	3.84±2.51
ARZ_14938_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	2.65	1.34	2.79±0.65	1.35±0.12
ARZ_17645_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	2.60	0.90	-	-
ARZ_10923_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	8.34	5.08	5.31±0.60	2.09±0.08
ARZ_17370_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	2.68	1.19	1.69±0.16	0.56±0.06
ARZ_10657_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	2.60	2.72	-	-
ARZ_17766_T1	Putative aryl alcohol dehydrogenase	3.84	43.96	-	-
<b>Aldo-keto reductase/aldehyde reductase</b>					
ARZ_9073_T1	NADPH-dependent aldehyde reductase	3.05	1.43	-	-
ARZ_15150_T1	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase	3.00	1.72	2.08±0.40	3.34±0.16
ARZ_1375_T1	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase	2.59	1.62	-	-
ARZ_5033_T1	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase	3.18	2.15	1.43±0.15	1.43±0.15
ARZ_18026_T1	Putative xylose and arabinose reductase	2.34	1.27	-	-
ARZ_17678_T1	Putative xylose and arabinose reductase	2.07	1.23	-	-
ARZ_14857_T1	Putative xylose and arabinose reductase	2.19	1.22	1.06±0.21	0.78±0.05
ARZ_3328_T1	Putative xylose and arabinose reductase	6.71	4.69	-	-
ARZ_13395_T1	Putative xylose and arabinose reductase	3.91	2.50	3.36±0.03	2.28±0.62
ARZ_7271_T1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	8.66	1.70	4.48±0.48	2.17±0.43
ARZ_10682_T1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	8.71	1.76	-	-
ARZ_16592_T1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	2.77	2.52	-	-
ARZ_7657_T1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	4.57	6.86	2.31±0.02	1.21±0.04
ARZ_8230_T1	Putative pyridoxine 4-dehydrogenase	29.61	22.90	-	-
ARZ_8367_T1	Putative pyridoxine 4-dehydrogenase	16.90	9.41	7.12±2.06	4.47±0.31

ARZ_3976_T1	Putative pyridoxine 4-dehydrogenase	16.38	11.47	4.64±1.60	2.42±0.24
ARZ_17786_T1	Putative pyridoxine 4-dehydrogenase	10.81	5.59	-	-
ARZ_13164_T1	Putative pyridoxine 4-dehydrogenase	8.08	5.16	-	-
ARZ_17920_T1	Putative pyridoxine 4-dehydrogenase	7.97	4.34	4.60±2.56	2.82±0.23
<b>Aldehyde dehydrogenase</b>					
ARZ_18373_T1	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	4.52	1.47		
ARZ_14546_T1	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	2.44	1.93		
ARZ_6133_T1	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	3.40	1.24		
ARZ_11062_T1	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	3.17	0.86		
ARZ_18463_T1	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	13.49	1.57		
<b>Oxidase</b>					
ARZ_974_T1	Long-chain-alcohol oxidase	3.51	1.02		
ARZ_3221_T1	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, cellobiose dehydrogenase	0.29	0.73		
ARZ_11870_T1	Aryl-alcohol oxidase	0.41	0.93		
ARZ_17610_T1	Long-chain-alcohol oxidase	2.31	1.06		
ARZ_12679_T1	Choline dehydrogenase	2.35	1.57		

<sup>a</sup> RNA-Seq ratio of gene expression for the inhibitor treatment condition over control condition (without inhibitor) at 4 h. The red and green ratio value indicate significantly up-regulated (Foldchange  $\geq 2.0$ , FDR  $\leq 0.05$ ) and significantly down-regulated (Foldchange  $\leq 0.5$ , FDR  $\leq 0.05$ ), respectively.

<sup>b</sup> qRT-PCR ratio of gene expression for 4 h over 0 h inhibitor treatment condition. The red and green ratio value indicate up-regulated (Foldchange  $\geq 2.0$ ) and down-regulated (Foldchange  $\leq 0.5$ ), respectively; “-” indicates not detected.

检测到这两类基因发生显著差异表达变化, 分析认为这与 *A. resinae* ZN1 菌体收集时的培养时间有关。本次转录组研究选取抑制物处理 4 h 时进行样品收集, 此时菌体主要进行糠醛、HMF 向糠醇、羟甲基糠醇的转化, 几乎没有糠酸、羟甲基糠酸的生成和积累。

将 RNA-Seq 结果与之前的定量 PCR 结果进行对比分析。需要指出的是, 在与近缘菌株 *A. resinae* ATCC 22711 进行同源基因家族对比分析时发现, *A. resinae* ZN1 基因组中存在序列相似度高达 90% 以上的两个基因, 我们称之为基因对, 且这类基因总计约占 *A. resinae* ZN1 总基因 (18830 个) 的 72.2%。当采用定量 PCR 技术对这类基因 (如基因 ARZ\_4549\_T1 与 ARZ\_12306\_T1, 二者核酸序列相似度为 97.6%) 进行转录水平定量时, 由于没有合适的特异性引物, 无法分别对相似度如此高的两个基因进行分别定量, 因此只选取其中一个基因进行引物设计和定量分析。与定量 PCR 技术不同, RNA-Seq 技术则可以精确地实现两相似基因的转录水平定量。由于定量 PCR 技术与 RNA-Seq 技术的这种差异, 导致 RNA-Seq 结果中差异表达的基因约有一半没有对应的定量 PCR 结果 (表 2.5), 这部分基因主要是那些由于基因相似度太高而未被定量 PCR 定量分析的基因。然而, 又由于 RNA-Seq 结果显示在抑制物处理下基因对中两相似基因的转录水平相当, 因此, 尽管没有实现定量 PCR 结果与 RNA-Seq 结果的一一对应, 本研究仍然可以将二者进行对比分析。此外, 如前所述, 考虑抑制物处理时间的影响, 本研究只针对与呋喃醛向呋喃醇生成相关的醇脱氢酶和醛酮还原酶或醛还原酶基因进行定量 PCR 与 RNA-Seq 结果的对比分析。

如表 2.5 所示, RNA-Seq 结果与定量 PCR 结果整体上呈现了很好的对应关系。RNA-Seq 结果与定量 PCR 结果都显示糠醛诱导上调表达的基因明显多于 HMF 的诱导, 且 HMF 诱导上调表达的基因几乎均受到糠醛的诱导表达。醇脱氢酶基因 ARZ\_17182\_T1、ARZ\_18349\_T1、ARZ\_15626\_T1、ARZ\_4549\_T1、ARZ\_7295\_T1 和 ARZ\_10923\_T1, 以及醛酮还原酶/醛还原酶基因 ARZ\_3328\_T1、ARZ\_13395\_T1、ARZ\_8230\_T1 和 ARZ\_17786\_T1 在 RNA-Seq 结果和定量 PCR 结果中均显示受到糠醛、HMF 的诱导上调表达; 醇脱氢酶基因 ARZ\_5124\_T1、ARZ\_962\_T1、ARZ\_16054\_T1、ARZ\_15928\_T1 和 ARZ\_14938\_T1 在 RNA-Seq 结果和定量 PCR 结果中均显示只受到糠醛的诱导上调表达。对比分析显示, RNA-Seq 技术与定量 PCR 技术均可以实现抑制物降解相关关键基因的查找和筛选。

### 2.3.5.2 糠醛、HMF 的降解与葡萄糖代谢

呋喃醛降解实验显示, *A. resinae* ZN1 在降解呋喃醛的过程中首先将呋喃醛转化为低毒性的呋喃醇, 该转化过程为消耗还原力 NAD(P)H 的反应过程, 而生物体内 NAD(P)H 主要由葡萄糖代谢中的糖酵解路径、戊糖磷酸路径、三羧酸循环等提供。此外, 当抑制物与葡萄糖共同存在时, *A. resinae* ZN1 会优先利用培养基中的呋喃醛, 只有当呋喃醛转化至较低水平时, 葡萄糖才开始大量消耗。因此, 本小节考察了呋喃醛抑制物对 *A. resinae* ZN1 中葡萄糖代谢过程的影响。

糠醛处理下 *A. resinae* ZN1 的转录组结果 (表 2.6) 显示, 糖酵解路径中的己糖激酶

表 2.6 糠醛、HMF 处理下与葡萄糖代谢相关的基因的转录表达

Table 2.6 Transcriptional expression of genes related to glucose metabolism in response to furfural or HMF

Functional categories and gene names	Gene description	Expression <sup>a</sup>	
		Furfural	HMF
<b>Glycolysis and Gluconeogenesis</b>			
ARZ_773_T1	Hexokinase	0.40	0.81
ARZ_12961_T1	Fructose-1,6-bisphosphatase	2.21	0.92
ARZ_4407_T1	Fructose-1,6-bisphosphatase	2.44	1.12
<b>Glycerol metabolism</b>			
ARZ_9114_T1	NADH-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.45	0.94
<b>TCA cycle</b>			
ARZ_16974_T1	E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex	2.02	1.37
ARZ_11668_T1	Alpha subunit of succinyl-CoA ligase	5.96	1.47
ARZ_12480_T1	Alpha subunit of succinyl-CoA ligase	5.88	1.57
ARZ_15743_T1	Beta subunit of succinyl-CoA ligase	2.78	0.73
ARZ_1957_T1	Minor succinate dehydrogenase isozyme	2.38	0.99
ARZ_16736_T1	Minor succinate dehydrogenase isozyme	0.96	2.03
ARZ_4232_T1	Minor succinate dehydrogenase isozyme	2.38	1.01
ARZ_3292_T1	Minor succinate dehydrogenase isozyme	1.79	2.08
ARZ_18080_T1	Iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase	2.07	1.21
<b>Respiratory chain</b>			
ARZ_4530_T1	Heme A:farnesyltransferase	2.51	1.77
ARZ_4242_T1	Heme A:farnesyltransferase	4.90	1.98
ARZ_1967_T1	Heme A:farnesyltransferase	5.59	2.31
ARZ_17139_T1	Heme A:farnesyltransferase	11.83	2.58
ARZ_14892_T1	Heme A:farnesyltransferase	8.93	2.08
ARZ_12752_T1	Heme A:farnesyltransferase	5.53	0.71
ARZ_12287_T1	Heme A:farnesyltransferase	3.28	1.69
ARZ_15833_T1	Protein required for the hydroxylation of heme O to form heme A	3.41	1.31
ARZ_14906_T1	Protein required for the hydroxylation of heme O to form heme A	2.88	1.03
ARZ_13155_T1	Protein required for delivery of copper to Cox1p	2.18	0.89
ARZ_4258_T1	Copper metallochaperone that transfers copper to Sco1p and Cox11p	3.77	1.01
ARZ_1983_T1	Copper metallochaperone that transfers copper to Sco1p and Cox11p	3.16	1.03
ARZ_9830_T1	Subunit d of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase	2.01	1.10
<b>Heme biosynthetic process</b>			
ARZ_1468_T1	Aminolevulinatase	2.04	1.01
ARZ_5582_T1	Uroporphyrinogen III synthase	2.99	1.39
ARZ_7226_T1	Uroporphyrinogen III synthase	2.75	1.13
ARZ_7338_T1	Protoporphyrinogen oxidase	2.06	1.04
ARZ_8484_T1	Mitochondrial matrix iron chaperone	2.42	1.18
ARZ_12397_T1	Mitochondrial matrix iron chaperone	2.10	1.00

<sup>a</sup> The red and green ratio value indicate significantly up-regulated (Foldchange  $\geq 2.0$ , FDR  $\leq 0.05$ ) and significantly down-regulated (Foldchange  $\leq 0.5$ , FDR  $\leq 0.05$ ), respectively.

基因 ARZ\_773\_T1 (0.4 倍) 受到显著抑制下调表达, 该基因为糖酵解路径中的关键作用基因; 同时, 糖异生途径中的关键基因果糖二磷酸酶基因 ARZ\_12961\_T1 (2.21 倍) 和 ARZ\_4407\_T1 (2.44 倍) 受到显著诱导上调表达。这与抑制物降解实验中观察到的现象相符合, 即糠醛的存在会在一定程度上抑制 *A. resinae* ZN1 的葡萄糖代谢。转录结果显示, 戊糖磷酸路径中的限速基因葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 ARZ\_9744\_T1 和 ARZ\_13904\_T1 以及 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 ARZ\_11446\_T1 和 ARZ\_7395\_T1 均受到诱导上调表达, 但上调表达量均只有 1 倍多 (数据未展示), 即戊糖磷酸路径并未受到糠醛的显著影响。此外, 糠醛处理导致丙酮酸脱氢酶复合体 E1 组分  $\alpha$  亚基基因 ARZ\_16974\_T1 显著上调表达 (2.02 倍), 同时三羧酸循环中的琥珀酰-CoA 合成酶  $\alpha$  亚基基因 ARZ\_11668\_T1 (5.96 倍) 和 ARZ\_12480\_T1 (5.88 倍)、 $\beta$  亚基基因 ARZ\_15743\_T1 (2.78 倍) 以及琥珀酸脱氢酶基因 ARZ\_1957\_T1 (2.38 倍)、ARZ\_4232\_T1 (2.38 倍) 和 ARZ\_18080\_T1 (2.07 倍) 也表现显著诱导上调表达 (表 2.6)。转录组数据显示糠醛处理会诱导 *A. resinae* ZN1 中三羧酸循环相关基因的表达, 但几乎不影响乙醛酸循环相关基因的表达。

呼吸链是生物体内与葡萄糖代谢紧密相连的生物过程。转录组结果显示糠醛处理下与细胞色素 C 氧化酶和 ATP 酶相关的基因显著上调表达。催化血红素 B 生成血红素 O 的作用酶基因 ARZ\_4530\_T1 (2.51 倍)、ARZ\_4242\_T1 (4.90 倍)、ARZ\_1967\_T1 (5.59 倍)、ARZ\_17139\_T1 (11.83 倍)、ARZ\_14892\_T1 (8.93 倍)、ARZ\_12752\_T1 (5.53 倍) 和 ARZ\_12287\_T1 (3.28 倍), 催化血红素 O 生成血红素 A 的作用酶基因 ARZ\_15833\_T1 (3.41 倍) 和 ARZ\_14906\_T1 (2.88 倍), 负责铜离子向细胞色素 c 氧化酶转移的作用酶基因 ARZ\_13155\_T1 (2.18 倍)、ARZ\_4258\_T1 (3.77 倍) 和 ARZ\_1983\_T1 (3.16 倍), 以及 ATP 合酶基因 ARZ\_9830\_T1 (2.01 倍) 均显著上调表达超过 2 倍。此外, 由于血红素是细胞色素 C 氧化酶的重要辅基, 转录组结果还显示糠醛导致参与血红素从头合成相关的基因 ARZ\_1468\_T1 (2.04 倍)、ARZ\_5582\_T1 (2.99 倍)、ARZ\_7226\_T1 (2.75 倍)、ARZ\_7338\_T1 (2.06 倍) 及线粒体基质中相应的铁伴侣分子基因 ARZ\_8484\_T1 (2.42 倍)、ARZ\_12397\_T1 (2.10 倍) 显著诱导上调表达。

综合以上分析认为, 糠醛的存在在一定程度上会抑制葡萄糖的消耗, 但同时糠醛可诱导胞内与氧化还原力生成相关 (三羧酸循环) 的基因和与能量生成相关 (呼吸链) 的基因显著上调表达, 这些基因 (酶) 的上调表达可以为糠醛还原提供更多的还原力, 有助于维持体内的氧化还原稳态, 同时还能为菌体提供更多的能量用于抵御糠醛对细胞造成的损伤<sup>[124]</sup>。

对比糠醛处理下的转录组结果, HMF 的存在对葡萄糖的代谢影响很小, 除了三羧酸循环中的琥珀酸脱氢酶基因 ARZ\_16736\_T1 (2.03 倍) 和 ARZ\_3292\_T1 (2.08 倍) 表现显著上调表达外, 其他与葡萄糖代谢相关的基因几乎均未表现转录水平的显著变化。其次, 呼吸链中的基因中只有与细胞色素 C 氧化酶合成相关的基因 ARZ\_1967\_T1 (2.31 倍)、ARZ\_17139\_T1 (2.58 倍) 和 ARZ\_14892\_T1 (2.08 倍) 显著上调表达超过 2 倍。

以上分析表明 1 g/L 的 HMF 未能对 *A. resinae* ZN1 产生明显的抑制效果, 该结果从分子水平证实了相同浓度下 HMF 的毒性明显低于糠醛。

### 2.3.5.3 糠醛、HMF 与物质转运

转录组结果显示, 呋喃醛抑制物的添加不仅影响 *A. resinae* ZN1 的物质代谢过程, 还会影响物质的转运过程, 改变相关转运蛋白编码基因的转录水平。呋喃醛处理下共有 156 个转运蛋白基因发生显著差异表达, 这些转运蛋白主要包括转运蛋白超家族 MFS (Major Facilitator Superfamily)、ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白、P 型 ATP 酶转运蛋白、线粒体载体蛋白、氨基酸通透酶蛋白、寡肽转运蛋白等, 其中编码 MFS 和 ABC 转运蛋白的差异表达基因最多。表 2.7 展示了在呋喃醛处理下显著差异表达超过 4 倍的转运蛋白基因。糠醛处理下共 27 个转运蛋白基因差异表达超过 4 倍, 其中包括 16 个 MFS 转运蛋白基因和 2 个 ABC 转运蛋白基因。HMF 处理下则只有 7 个转运蛋白基因差异表达超过 4 倍, 其中包括 3 个 MFS 转运蛋白基因和 2 个 ABC 转运蛋白基因。

转录组结果显示糠醛处理下, MFS 转运蛋白基因 ARZ\_12615\_T1 显著上调表达 11.92 倍, 该基因编码 MFS 转运系统的 DH1A 家族蛋白, 该转运蛋白不仅与离子转运有关, 还参与有机羟基化合物的转运。*A. resinae* ZN1 中有相似功能的转运蛋白基因 ARZ\_3553\_T1 和 ARZ\_10974\_T1 分别显著上调表达 3.68 倍和 2.22 倍。降解实验显示 *A. resinae* ZN1 在降解糠醛过程中首先将糠醛迅速代谢为相应的糠醇, 因此猜想上述过表达基因可能与糠醇的转运有关。MFS 转运蛋白基因 ARZ\_13813\_T1 (4.00 倍)、ARZ\_16402\_T1 (7.62 倍)、ARZ\_8247\_T1 (4.12 倍)、ARZ\_8766\_T1 (16.72 倍) 显著上调表达超过 4 倍, 这 4 个基因均编码单羧酸通透酶。糠醛在有氧条件下可被菌体代谢氧化为相应的糠酸 (单羧酸), 猜想此类单羧酸转运基因可能与糠酸的转运相关。此外, 转录结果还显示 MFS 转运蛋白基因中与葡萄糖转运相关的基因发生显著差异表达, 其中低亲和葡萄糖转运蛋白基因 ARZ\_7753\_T1 (4.92 倍) 和 ARZ\_9797\_T1 (5.90 倍), 以及可转运葡萄糖的半乳糖通透酶基因 ARZ\_12681\_T1 (5.05 倍) 显著上调表达超过 4 倍, 同时质膜上调葡萄糖转运的高葡萄糖感受器蛋白基因 ARZ\_10823\_T1 (0.40 倍) 显著下调表达。与葡萄糖转运相关的基因的显著差异表达变化与之前的葡萄糖代谢 (糖酵解路径) 受抑制相映射。其他转运蛋白基因相关的生物过程还包括孢子壁合成、多胺转运、离子转运、氨基酸多肽转运等。与糠醛相比, HMF 处理下显著差异表达的转运蛋白基因较少, 包括与药物应激有关的 2 个 ABC 转运蛋白基因 ARZ\_198\_T1 (7.20 倍) 和 ARZ\_16455\_T1 (6.26 倍); 与离子转运有关的 2 个 MFS 转运蛋白基因 ARZ\_12937\_T1 (9.17 倍) 和 ARZ\_18182\_T1 (7.11 倍); 与多胺转运有关的  $\gamma$ -氨基丁酸通透酶基因 ARZ\_12379\_T1 (4.40 倍) 和多胺转运蛋白基因 ARZ\_11385\_T1 (0.19 倍); 与多胺稳态相关的 MFS 转运蛋白基因 ARZ\_412\_T1 (4.92 倍)。

由以上分析得到, 物质转运过程和转运蛋白在 *A. resinae* ZN1 降解糠醛、HMF 的过程中发挥重要作用。

表 2.7 糠醛、HMF 处理下转运蛋白编码基因的转录表达

Table 2.7 Transcriptional expression of transporter encoding genes in response to furfural or HMF

Functional categories and gene names	Gene description	Expression <sup>a</sup>	
		Furfural	HMF
<b>ABC transporter</b>			
ARZ_198_T1	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	8.38	7.20
ARZ_16455_T1	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	7.96	6.26
<b>Amino acid permease</b>			
ARZ_6665_T1	Plasma membrane transporter for choline, ethanolamine, and carnitine	0.25	0.92
ARZ_18137_T1	Low affinity methionine permease	5.56	0.78
ARZ_12379_T1	GABA (gamma-aminobutyrate) permease	5.37	4.40
<b>Major Facilitator Superfamily</b>			
ARZ_12452_T1	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily	4.80	1.86
ARZ_12937_T1	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily	1.89	9.17
ARZ_18182_T1	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily	1.52	7.11
ARZ_15752_T1	Plasma membrane protein of the major facilitator superfamily	5.43	1.06
ARZ_12615_T1	Putative transporter in the major facilitator superfamily	11.92	0.96
ARZ_14277_T1	Putative paralog of ATR1, drug resistance protein	4.87	1.06
ARZ_13813_T1	Protein with similarity to monocarboxylate permeases	4.00	1.95
ARZ_16402_T1	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases	7.62	3.65
ARZ_8247_T1	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases	4.12	1.75
ARZ_8766_T1	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases	16.72	1.66
ARZ_17260_T1	Putative dityrosine transporter of the major facilitator superfamily	16.86	1.81
ARZ_412_T1	Multidrug transporter of the major facilitator superfamily	5.52	4.92
ARZ_8414_T1	Multidrug transporter of the major facilitator superfamily	10.90	1.78
ARZ_4588_T1	Polyamine transporter of the major facilitator superfamily	5.95	1.13
ARZ_8259_T1	Permease of basic amino acids in the vacuolar membrane	5.05	1.76
ARZ_12681_T1	Galactose permease	5.05	2.30
ARZ_7753_T1	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	4.92	1.58
ARZ_9797_T1	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	5.90	1.36
<b>Glycosyltransferase sugar-binding region containing</b>			
ARZ_952_T1	Protein of unknown function	0.22	0.69
<b>Major intrinsic protein</b>			
ARZ_9798_T1	Putative protein of unknown function	4.07	2.31
<b>Mitochondrial carrier protein</b>			
ARZ_12969_T1	Mitochondrial inner membrane transporter	4.27	1.27
<b>Permease for cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin</b>			
ARZ_18430_T1	High affinity uridine permease, localizes to the plasma membrane	10.73	2.83
<b>P-type ATPase</b>			
ARZ_9440_T1	High affinity Ca <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> P-type ATPase	0.22	0.59
ARZ_12202_T1	High affinity Ca <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> P-type ATPase	0.09	0.95
<b>Sodium:solute symporter family</b>			
ARZ_11385_T1	Plasma membrane transporter for both urea and polyamines	1.15	0.19

<sup>a</sup> The red and green ratio value indicate significantly up-regulated (Foldchange  $\geq 2.0$ , FDR  $\leq 0.05$ ) and significantly down-regulated (Foldchange  $\leq 0.5$ , FDR  $\leq 0.05$ ), respectively.

### 2.3.5.4 糠醛、HMF 与氧化胁迫

酿酒酵母等微生物的研究结果显示,糠醛、HMF 可引起胞内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的积累,对菌体产生相应的氧化压力胁迫。ROS 包括过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、超氧阴离子 ( $\text{O}_2^-$ )、羟自由基 ( $\text{OH}^\cdot$ ) 等,可损伤胞内的 DNA、蛋白质、脂质及细胞骨架,严重时会导致细胞程序性死亡<sup>[36, 92]</sup>。*A. resinae* ZN1 的转录组结果显示,呋喃醛可诱导胞内与氧化胁迫应激相关的基因显著差异表达(表 2.8)。糠醛处理下,*A. resinae* ZN1 中与 ROS 降解相关的超氧化物歧化酶基因 (ARZ\_6047\_T1 和 ARZ\_2979\_T1) 及其转铜伴侣基因 (ARZ\_9920\_T1 和 ARZ\_18016\_T1)、细胞色素 C 过氧化物酶基因 (ARZ\_5135\_T1 和 ARZ\_14361\_T1)、巯基过氧化物酶基因 (ARZ\_6121\_T1)、硫氧还蛋白过氧化物酶基因 (ARZ\_7464\_T1)、谷氧还蛋白基因 (ARZ\_7080\_T1)、谷胱甘肽依赖型还原酶基因 (ARZ\_5744\_T1 和 ARZ\_323\_T1)、一氧化氮还原酶基因 (ARZ\_18586\_T1 和 ARZ\_12369\_T1) 以及与单线态氧耐受相关的 ABC 转运蛋白基因 (ARZ\_198\_T1 和 ARZ\_16455\_T1) 均显著上调表达超过 2 倍。其他与氧化应激相关的基因,如 NADPH 依赖型醌还原酶基因、ATP 依赖型 Lon 蛋白酶基因、铜金属伴侣基因、细胞色素 C 氧化酶伴侣基因等在糠醛处理下也被明显诱导表达。HMF 处理下,上述与氧化胁迫应激相关的基因,除与单线态氧耐受相关的 ABC 转运蛋白基因 (ARZ\_2780\_T1、ARZ\_198\_T1 和 ARZ\_16455\_T1) 显著上调表达外,其他基因均未表现显著差异表达变化。

谷胱甘肽是生物体内主要的抗氧化系统,可保护机体免受外界的氧化胁迫。在酵母体内过表达与谷胱甘肽合成相关的基因 *GSH1* 可增强菌体对糠醛的耐受性,提高乙醇产量<sup>[128, 165]</sup>。转录组结果显示(表 2.8),糠醛可导致 *A. resinae* ZN1 中与谷胱甘肽合成相关的基因明显上调表达。谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 (ARZ\_4583\_T1 和 ARZ\_12338\_T1) 是谷胱甘肽生物合成路径中的关键限速基因,转录组结果显示上述两基因分别显著上调表达 2.26 倍和 2.05 倍;谷胱甘肽还原酶基因 ARZ\_5067\_T1 显著上调表达 2.01 倍;羟酰谷胱甘肽水解酶基因 ARZ\_4492\_T1 和 ARZ\_13212\_T1 分别显著上调表达 2.42 倍和 2.28 倍(羟酰谷胱甘肽水解酶通过水解 S-乳酰谷胱甘肽可生成一分子谷胱甘肽)。*A. resinae* ZN1 中与谷胱甘肽合成相关的基因的显著上调表达有助于缓解糠醛对菌体产生的氧化胁迫压力。与糠醛不同,HMF 处理下上述与谷胱甘肽合成相关的基因均未表现显著差异表达变化,表明 1 g/L 的 HMF 未对菌体产生明显的氧化压力胁迫。

如前所述,还原力 NADPH 可作为呋喃醛还原反应的辅因子参与呋喃醛的降解转化。此外,NADPH 还可以作为谷胱甘肽还原酶或硫氧还蛋白还原酶的辅因子,在细胞应对 ROS 氧化胁迫中发挥重要作用。微生物体内 NADPH 主要来源于戊糖磷酸路径中葡萄糖 6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶所催化的反应,以及三羧酸循环中  $\text{NADP}^+$  依赖型异柠檬酸脱氢酶和苹果酸酶所催化的反应。在糠醛胁迫条件下对酵母基因缺失文库进行筛选发现,PPP 路径的相关基因 (*ZWF1*、*GND1*、*TKL1* 或 *RPE1*) 与糠醛耐受性有关,且当过表达 *ZWF1* (葡萄糖-6 磷酸脱氢酶) 时,菌株可在高浓度糠醛胁迫下生长<sup>[125, 166]</sup>。分析认为,*ZWF1* 的功能并非直接参与糠醛的还原转化,而是为机体提供足够的还原力

表 2.8 糠醛、HMF 处理下与氧化胁迫应激相关的基因的转录表达

Table 2.8 transcriptional expression of genes related to oxidative stress response in response to furfural or HMF

Functional categories and gene names	Gene description	Expression <sup>a</sup>	
		Furfural	HMF
<b>Response to oxidative stress</b>			
ARZ_6047_T1	Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase	2.36	1.92
ARZ_2979_T1	Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase	2.87	1.64
ARZ_9920_T1	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p	2.98	1.07
ARZ_18016_T1	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p	2.99	1.28
ARZ_5135_T1	Mitochondrial cytochrome-c peroxidase	3.07	1.44
ARZ_14361_T1	Mitochondrial cytochrome-c peroxidase	2.79	1.51
ARZ_6121_T1	Thiol peroxidase	2.42	1.11
ARZ_7464_T1	Mitochondrial peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity	2.23	1.69
ARZ_11629_T1	Thiol-specific peroxiredoxin	0.38	0.82
ARZ_7080_T1	Cytoplasmic glutaredoxin	2.13	0.94
ARZ_5744_T1	Glutathione-dependent oxidoreductase	3.00	1.25
ARZ_323_T1	Glutathione-dependent oxidoreductase	2.87	1.22
ARZ_18586_T1	Nitric oxide oxidoreductase	3.00	0.95
ARZ_12369_T1	Nitric oxide oxidoreductase	2.93	0.99
ARZ_9510_T1	NADPH-dependent quinone reductase	3.94	1.07
ARZ_5043_T1	NADPH-dependent quinone reductase	2.24	1.23
ARZ_1501_T1	NADPH-dependent quinone reductase	3.48	1.33
ARZ_1137_T1	NADPH-dependent quinone reductase	3.51	1.52
ARZ_10654_T1	NADPH-dependent quinone reductase	5.26	1.57
ARZ_10336_T1	NADPH-dependent quinone reductase	3.20	1.56
ARZ_4763_T1	ATP-dependent Lon protease	2.13	1.52
ARZ_13491_T1	ATP-dependent Lon protease	2.57	1.43
ARZ_9159_T1	Catalytic subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase	6.90	1.36
ARZ_672_T1	Catalytic subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase	6.15	1.16
ARZ_5251_T1	Catalytic subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase	3.65	1.10
ARZ_10708_T1	Catalytic subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase	4.81	1.17
ARZ_17771_T1	Cytosolic copper metallochaperone	2.29	0.96
ARZ_7227_T1	Flavin-linked sulfhydryl oxidase of the mitochondrial IMS	3.76	1.03
ARZ_5581_T1	Flavin-linked sulfhydryl oxidase of the mitochondrial IMS	3.95	1.13
ARZ_8287_T1	Protein that may act as a chaperone for cytochrome c oxidase subunits	2.35	1.06
ARZ_10374_T1	Protein that may act as a chaperone for cytochrome c oxidase subunits	2.55	1.14
ARZ_16124_T1	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	0.29	0.68
ARZ_2780_T1	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	1.71	2.91
ARZ_16455_T1	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	7.96	6.26
ARZ_198_T1	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	8.38	7.20
<b>Glutathione biosynthetic process</b>			

ARZ_4583_T1	Gamma glutamylcysteine synthetase	2.26	1.45
ARZ_12338_T1	Gamma glutamylcysteine synthetase	2.05	1.55
ARZ_5067_T1	Cytosolic and mitochondrial glutathione oxidoreductase	2.01	1.21
ARZ_4492_T1	Cytoplasmic glyoxalase II	2.42	1.00
ARZ_13212_T1	Cytoplasmic glyoxalase II	2.28	1.05
<b>NADPH generation</b>			
ARZ_5863_T1	Isocitrate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	2.33	1.13
ARZ_9592_T1	Malic enzyme	3.64	1.62
ARZ_18809_T1	Malic enzyme	4.93	2.02
ARZ_1224_T1	Malic enzyme	3.49	1.56

<sup>a</sup>The red and green ratio value indicate significantly up-regulated (Foldchange  $\geq 2.0$ , FDR  $\leq 0.05$ ) and significantly down-regulated (Foldchange  $\leq 0.5$ , FDR  $\leq 0.05$ ), respectively.

NADPH, 用于糠醛的降解转化和应对由糠醛引起的氧化胁迫。转录组结果显示, 糠醛处理下, 戊糖磷酸路径中生成 NADPH 的两作用基因葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 ARZ\_9744\_T1 (1.42 倍) 和 ARZ\_13904\_T1 (1.97) 以及 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 ARZ\_11446\_T1 (1.66 倍) 和 ARZ\_7395\_T1 (1.52 倍) 均受到诱导上调表达, 同时三羧酸循环中的异柠檬酸脱氢酶 (NADP<sup>+</sup>) 基因 ARZ\_5863\_T1 和苹果酸酶基因 (NADP<sup>+</sup>) ARZ\_9592\_T1、ARZ\_18809\_T1 和 ARZ\_1224\_T1 分别显著上调表达超过 2 倍(表 2.8); HMF 处理下, 苹果酸酶基因 ARZ\_18809\_T1 显著上调表达超过 2 倍。

综合以上分析认为, 呋喃醛的存在会对 *A. resinae* ZN1 产生相应的氧化胁迫压力, 且糠醛明显强于 HMF。 *A. resinae* ZN1 可通过调控胞内与氧化压力应激相关的基因的转录表达以缓解或减轻呋喃醛对机体造成的损伤。

### 2.3.5.5 糠醛、HMF 与转录翻译

抑制物降解实验显示糠醛的添加会明显抑制物菌体的生长, 当糠醛降解完全时菌体开始生长。与该实验现象相符, 转录结果显示糠醛处理下与 DNA 复制、蛋白翻译及核糖体合成组装过程相关的差异表达基因几乎全部表现为显著下调表达, 如表 2.9 所示。

糠醛处理下, 与 DNA 复制过程相关的差异表达基因共计 20 个, 除反转录酶基因 ARZ\_13198\_T1 (3.75 倍) 显著上调表达外, 其余基因均显著下调表达; 与蛋白翻译过程相关的差异表达基因共计 79 个, 除线粒体天冬氨酰-tRNA 合成酶基因 ARZ\_556\_T1 (2.40 倍) 和 ARZ\_16795\_T1 (2.26 倍) 以及 RNA 解旋酶基因 ARZ\_8131\_T1 (2.72 倍) 和 ARZ\_2590\_T1 (2.09 倍) 显著上调表达外, 其余基因均显著下调表达; 与核糖体合成组装过程相关的差异表达基因共计 31 个, 除与核糖体小亚基组装相关的铁硫蛋白基因 ARZ\_18080\_T1 (2.07 倍) 显著上调表达外, 其余基因均显著下调表达。糠醛处理下上述基因的显著下调表达影响了 *A. resinae* ZN1 菌体的正常生长。

与糠醛不同, HMF 处理下与 DNA 复制、蛋白翻译及核糖体合成组装过程相关的基因几乎均未表现显著差异表达变化, 这一结果再次证实, 同浓度下糠醛的毒性远高于 HMF。

表 2.9 糠醛处理下差异表达的与菌体生长相关的基因

Table 2.9 Differentially expressed genes related to cell growth in response to furfural

Biological process	Gene name <sup>a</sup>
<b>DNA replication</b>	ARZ_119_T1, ARZ_2420_T1, ARZ_16379_T1, ARZ_3198_T1, ARZ_16943_T1, ARZ_14478_T1, ARZ_15980_T1, ARZ_12860_T1, ARZ_4526_T1, ARZ_10871_T1, ARZ_9579_T1, ARZ_12690_T1, ARZ_15392_T1, ARZ_5041_T1, ARZ_13198_T1, ARZ_1214_T1, ARZ_6743_T1, ARZ_14788_T1, ARZ_5887_T1, ARZ_12739_T1
<b>Translation</b>	ARZ_703_T1, ARZ_15318_T1, ARZ_16966_T1, <b>ARZ_17083_T1</b> , ARZ_14553_T1, ARZ_15258_T1, ARZ_556_T1, ARZ_10740_T1, ARZ_16482_T1, ARZ_8131_T1, <b>ARZ_7003_T1</b> , ARZ_5786_T1, <b>ARZ_7034_T1</b> , <b>ARZ_4055_T1</b> , ARZ_2590_T1, <b>ARZ_253_T1</b> , <b>ARZ_16856_T1</b> , <b>ARZ_9692_T1</b> , ARZ_15030_T1, ARZ_15681_T1, ARZ_10159_T1, ARZ_4628_T1, ARZ_8907_T1, ARZ_9609_T1, ARZ_5418_T1, <b>ARZ_2128_T1</b> , <b>ARZ_1995_T1</b> , ARZ_5820_T1, ARZ_9743_T1, ARZ_7078_T1, <b>ARZ_13851_T1</b> , ARZ_365_T1, ARZ_251_T1, ARZ_2670_T1, ARZ_1941_T1, ARZ_3596_T1, <b>ARZ_10382_T1</b> , <b>ARZ_8049_T1</b> , ARZ_2256_T1, ARZ_16795_T1, ARZ_4217_T1, ARZ_16681_T1, ARZ_5573_T1, ARZ_5137_T1, <b>ARZ_15029_T1</b> , ARZ_6246_T1, ARZ_7235_T1, ARZ_1541_T1, ARZ_13184_T1, <b>ARZ_15772_T1</b> , <b>ARZ_12568_T1</b> , <b>ARZ_2668_T1</b> , ARZ_8629_T1, ARZ_17531_T1, ARZ_8348_T1, ARZ_14363_T1, ARZ_13180_T1, <b>ARZ_8294_T1</b> , ARZ_9829_T1, ARZ_15557_T1, ARZ_18442_T1, ARZ_9009_T1, <b>ARZ_9914_T1</b> , ARZ_13903_T1, ARZ_5057_T1, ARZ_71_T1, ARZ_2793_T1, ARZ_15650_T1, ARZ_9796_T1, ARZ_12132_T1, ARZ_7999_T1, ARZ_1878_T1, ARZ_13026_T1, ARZ_9319_T1, <b>ARZ_3715_T1</b> , ARZ_8637_T1, ARZ_2089_T1, ARZ_402_T1, ARZ_1996_T1
<b>Ribosome biosynthesis/assembly</b>	ARZ_7215_T1, <b>ARZ_17083_T1</b> , ARZ_5718_T1, <b>ARZ_7003_T1</b> , ARZ_4744_T1, <b>ARZ_7034_T1</b> , <b>ARZ_4055_T1</b> , <b>ARZ_253_T1</b> , ARZ_18080_T1, <b>ARZ_16856_T1</b> , <b>ARZ_9692_T1</b> , ARZ_15361_T1, ARZ_5595_T1, ARZ_2065_T1, ARZ_4740_T1, <b>ARZ_2128_T1</b> , <b>ARZ_1995_T1</b> , ARZ_5132_T1, ARZ_6860_T1, ARZ_14467_T1, <b>ARZ_13851_T1</b> , <b>ARZ_10382_T1</b> , <b>ARZ_8049_T1</b> , <b>ARZ_15029_T1</b> , <b>ARZ_15772_T1</b> , <b>ARZ_12568_T1</b> , <b>ARZ_2668_T1</b> , ARZ_17340_T1, <b>ARZ_8294_T1</b> , <b>ARZ_9914_T1</b> , <b>ARZ_3715_T1</b>

<sup>a</sup> Genes in bold indicate their encoding proteins or enzymes are involved in more than one biological process, genes in italic and roman indicate significantly up-regulated (Foldchange  $\geq 2.0$ , FDR  $\leq 0.05$ ) and significantly down-regulated (Foldchange  $\leq 0.5$ , FDR  $\leq 0.05$ ) genes, respectively.

## 2.4 本章小结

树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 是本实验室自主筛选分离得到的一株生物脱毒霉菌。对 *A. resinae* ZN1 进行呋喃醛抑制物降解实验分析显示，该菌株可将糠醛、HMF 首先快速地还原为相应的糠醇、羟甲基糠醇，在有氧条件下又进一步氧化为相应的糠酸、羟甲基糠酸，并最终进入 TCA 循环完成彻底氧化分解。其中，将呋喃醛转化为相应的呋喃醇或呋喃酸是抑制物降解转化的起始步骤，也是缓解或消除抑制物抑制作用的最关键步骤。基于此，本章研究借助荧光定量 PCR 技术和 RNA-Seq 技术对呋喃醛抑制物处理下的 *A. resinae* ZN1 进行转录水平分析，筛选鉴定可直接作用于抑制物转化的关键基因（酶），并对与抑制物毒性应激相关的生物学过程和相关基因进行整理分析，主要研究结论如下：

(1) 在合成培养基中添加 1 g/L 的糠醛或 HMF 对 *A. resinae* ZN1 进行抑制物摇瓶降解实验, *A. resinae* ZN1 可以以糠醛、HMF 为唯一碳源和能源生长; 当与葡萄糖共同存在时, 会优先利用培养基中的呋喃醛; 菌体生长测定显示同浓度下糠醛的毒性明显强于 HMF。在降解呋喃醛的过程中, 降解过程的起始步骤, 即呋喃醛向呋喃醇及呋喃酸的转化过程是缓解或消除呋喃醛对微生物抑制作用的最关键步骤。

(2) 采用定量 PCR 技术对从基因组中筛选得到的 137 个与抑制物降解相关的氧化还原酶基因进行转录水平分析, 呋喃醛处理下, 12 个醇脱氢酶基因和 10 个醛酮还原酶/醛还原酶基因差异上调表达, 初步认为与呋喃醛向呋喃醇的还原转化有关; 呋喃醇处理下, 9 个醇脱氢酶基因、4 个醛还原酶基因和 3 个氧化酶基因差异上调表达, 初步认为与呋喃醇向呋喃酸的还原转化有关。呋喃醇的进一步氧化过程可以在以 NAD(P)<sup>+</sup> 为辅因子的氧化还原酶的作用下催化完成, 也可以在相关氧化酶的参与下以氧气为底物催化完成。呋喃醛抑制物处理下差异表达的基因可作为目的基因用于抗逆性工程菌株的构建。

(3) 采用 RNA-Seq 技术在呋喃醛处理下对 *A. resinae* ZN1 进行全基因转录水平分析, 糠醛、HMF 处理下分别有 1826 个基因和 427 个基因显著差异表达, 这些差异表达基因主要涉及胞内氧化还原过程、物质代谢过程和物质跨膜转运过程。

(4) 转录组 (RNA-Seq) 结果显示多个醇脱氢酶和醛酮还原酶/醛还原酶基因在呋喃醛处理下显著差异上调表达, 这些差异表达基因在呋喃醛处理下的定量 PCR 结果中同样表现上调表达, 表明 RNA-Seq 技术与定量 PCR 技术均可以实现抑制物降解相关关键基因的查找和筛选。*A. resinae* ZN1 通过调控上述氧化还原酶基因的表达实现呋喃醛向呋喃醇的还原转化。同时, *A. resinae* ZN1 还可诱导胞内与氧化还原力生成 (三羧酸循环) 和能量生成 (呼吸链) 相关的基因显著上调表达, 为呋喃醛转化提供更多的还原力和能量。

(5) *A. resinae* ZN1 可通过调控相关的生物学过程, 如调节胞内物质转运过程、诱导与氧化胁迫应激相关的基因的表达, 抵御呋喃醛对菌体造成的损伤, 提高菌体对呋喃醛抑制物的耐受性。

(6) 糠醛的存在在一定程度上会抑制糖酵解路径中相关基因的表达, 影响葡萄糖的代谢; 糠醛的存在还会导致与 DNA 复制、蛋白翻译及核糖体合成组装过程相关的基因显著下调表达; HMF 处理下上述相关过程几乎不受影响。转录组结果证实同浓度下糠醛的毒性远高于 HMF 的毒性, 会显著抑制菌体的正常生长。

### 第 3 章 高呋喃醛抑制物耐受型 *Zymomonas mobilis* ZM4 菌株的构建

#### 3.1 引言

糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）是木质纤维素原料预处理过程中产生的两种主要的呋喃类抑制物，会影响后续的酶解和微生物发酵过程<sup>[72, 100]</sup>。在发酵前采用物理、化学或生物方法对抑制物进行脱除处理可以克服抑制物的影响<sup>[55, 145]</sup>，但该方式会不可避免的使操作流程复杂化，增加纤维素乙醇的生产成本。因此，更理想的纤维素乙醇生产工艺是使用具有高抑制物耐受性的发酵工程菌株，实现脱毒与发酵工艺的整合。

*S. cerevisiae*、*E. coli* 等其他可代谢呋喃醛的微生物的研究结果显示，将高毒性的呋喃醛抑制物转化为低毒性的呋喃醇（糠醇、羟甲基糠醇）或呋喃酸（糠酸、羟甲基糠酸）是微生物缓解抑制物抑制作用的主要方式，该过程主要由非特异性的、依赖于 NAD(P)（H）的氧化还原酶参与完成<sup>[110, 111, 167]</sup>。在 *S. cerevisiae* 中过表达氧化还原酶基因 *ADHI*<sup>[120, 126]</sup>、*ADH6*<sup>[121]</sup> 或 *ARI1*<sup>[116]</sup> 可提高菌体对糠醛、HMF 的转化速率，提高乙醇产率；在 *E. coli* 中抑制 NADPH 依赖的氧化还原酶基因 *yqhD* 和 *dkgA* 的表达<sup>[111]</sup> 或过表达 NADH 依赖的还原酶基因 *fucO*<sup>[122, 123]</sup> 可增强菌体对抑制物的耐受性。

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 是纤维素乙醇发酵生产的常用菌株之一。该菌株为革兰氏阴性兼性厌氧细菌，可以实现葡萄糖的快速消耗，得到与理论值相当的乙醇产率，还可耐受较高浓度（16%，vol/vol）的乙醇<sup>[168, 169]</sup>。除发酵生产乙醇外，*Z. mobilis* 还被改造用于生产山梨醇、葡萄糖酸、果聚糖、2,3-丁二醇、异丁醇等其他化学品。*Z. mobilis* 已被认为是未来木质纤维素生物炼制领域中非常具有工业化应用前景的优良发酵菌株<sup>[170, 171]</sup>。在以木质纤维素为原料进行乙醇发酵生产时，尽管 *Z. mobilis* 对乙醇具有很好的耐受性，但会受到发酵体系中抑制物，主要是糠醛、HMF 的抑制，影响乙醇发酵效率<sup>[50]</sup>。

目前已有相关研究显示，敲除 *Z. mobilis* 中的调控子基因 *hfq*（ZMO0347）可导致菌体对乙酸、香草醛、糠醛和 HMF 的耐受性下降<sup>[172]</sup>；对 *Z. mobilis* 中的 RNA 聚合酶亚基  $\sigma$  因子（ $\sigma^{70}$ ）编码基因 *rpoD* 进行适当的突变修饰可增强菌体对糠醛的耐受性<sup>[173]</sup>。Yang 等人借助转座子插入突变系统发现，组氨酸激酶编码基因（ZMO1162）的过表达或  $\sigma^{54}$  调节蛋白编码基因（ZMO0038）的插入失活可增强 *Z. mobilis* 33C 对糠醛的耐受性；1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶基因（ZMO1598 和/或 ZMO1234）或操纵子基因 ZMO0282、ZMO0282 和 ZMO0285 的插入失活，或负调控子基因 ZMO0281 的过表达可增强 *Z. mobilis* 8b 对糠醛的耐受性<sup>[174]</sup>。此外，Shui 等人在逐级提高糠醛浓度（1-3 g/l）的条件下，对 *Z. mobilis* 进行适应性驯化，获得一株对高浓度糠醛（3 g/l）具有很好耐受性的菌株<sup>[106]</sup>。糠醛胁迫下的转录结果显示 *Z. mobilis* 对抑制物的耐受性是细胞膜生物合成、呼吸链、DNA 复制与修复、蛋白质生物合成、物质转运和转录调控等生物学过程共同作用的结果<sup>[175]</sup>。尽管上述研究已经为 *Z. mobilis* 菌株的呋喃醛耐受性改造提供了可操

作的目的基因和实验策略,但构建高抑制物耐受型的 *Z. mobilis* 发酵菌株仍然还有很多工作有待于进一步挖掘和完成。

之前的研究显示, *Z. mobilis* 可将糠醛、HMF 还原为相应的糠醇、羟甲基糠醇<sup>[50]</sup>, 表明 *Z. mobilis* 自身存在相应的氧化还原酶可实现糠醛、HMF 的还原转化,但目前这类氧化还原酶基因还未得到相关鉴定和确认。本研究采用理性改造策略,在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达与呋喃醛抑制物转化相关的氧化还原酶基因,强化菌株自身对抑制物的还原能力,以提高 *Z. mobilis* ZM4 对抑制物的耐受性能和相应的乙醇发酵性能。基于之前对生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的转录水平分析,从 *A. resinae* ZN1 中筛选与呋喃醛还原转化相关的作用基因(外源目的基因);其次,对 *Z. mobilis* ZM4 自身全基因组信息进行阅读分析,克隆基因组中除与乙醇生成直接相关的其他所有醇脱氢酶和醛酮还原酶基因(内源基因),以上述筛选得到的相关基因为目的基因,借助穿梭载体 pHW20a 构建相应的过表达重组菌株,并在木质纤维素(玉米秸秆)水解液中对各重组菌株进行抑制物转化性能和乙醇发酵性能分析。此外,由于呋喃醛的还原转化为依赖于辅因子 NAD(P)H 的生物反应过程,因此还尝试在上述过表达重组菌株中共表达与辅因子生成相关的基因,以期通过辅因子的补给进一步提高菌株对抑制物的转化性能。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 实验材料

#### 3.2.1.1 实验菌株与主要原料及试剂

本研究中使用到的菌株及质粒见表 3.1。*A. resinae* ZN1 (CGMCC7452) 是实验室自主分离筛选得到的生物脱毒真菌。*Z. mobilis* ZM4 (ATCC31821) 购自美国模式培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, USA)。*E. coli* S17-1  $\lambda\pi$  用于 *Z. mobilis* ZM4 双亲本接合转化操作。*E. coli* BL21 (DE3) 用于目的基因编码蛋白的诱导表达和纯化操作。穿梭质粒 pHW20a 由本实验室构建<sup>[176]</sup>, 用于目的基因在 *Z. mobilis* ZM4 中的过表达。质粒 pET-28a (+) 用于目的基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的诱导过表达。

玉米秸秆于 2012 年秋季收获于中国河南省郸城县,收集以后的玉米秸秆经过清洗除尘、105 °C 烘干后,利用 SF-300 机械粉碎机降低颗粒尺寸,粉碎后的原料密封保存备用。玉米秸秆含有纤维素 38.72%、半纤维素 20.55%、木质素 26.51%、灰分 2.76%。纤维素酶 Youtell#6 (固体酶) 购自湖南尤特尔生物有限公司,纤维素酶的滤纸酶活为 145 FPU/g,纤维二糖酶活为 344 IU/g,蛋白含量为 90 mg/g 纤维素酶。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacterial DNA Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司。RNA 提取用试剂及反转录试剂盒见 2.2.1.1 部分。质粒小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司。分子操作用 TAKARA Primer STAR HS DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。分子操作用其他限制性内切酶和 T4 连接酶购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。蛋白纯化用镍柱填料 Ni Aogarse 6FF 购自上海业力生物科技有限公司。糠醛、HMF 购自上

表 3.1 本研究中用到的菌株、质粒和引物  
Table 3.1 Microbial strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Genotype	Sources/references
<i>A. resinae</i> ZN1	Wild-type strain	[71]
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Wild-type strain, ATCC31821	ATCC
<i>E. coli</i> K-12 substr. MG1655	Wild-type strain, F, $\lambda$ , ATCC 47076	ATCC
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> S 17-1 $\lambda$ $\pi$	<i>Pro, res<sup>-</sup>, mod<sup>+</sup></i> ; chromosomal integrated RP4, 2- <i>Tc::Mu-Km::Tn7</i> ; <i>Tp, sm</i>	[177]
Plasmids	Phenotype	Sources/references
pET-28a (+)	<i>Km<sup>r</sup>, ori</i> pMB1, T7 promoter/terminator	Novagen
pET-28a-ZMO1771	Butanol dehydrogenase gene ZMO1771 from ZM4 in pET-28a (+)	This study
pHW20a	<i>Tc<sup>r</sup>, mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZa</i> , MCS, and <i>oriV</i>	[176]
pHW20a- <i>Peno</i>	Enolase ( <i>eno</i> ) promoter from ZM4 in pHW20a	This study
pHW20a-ARZ_4549_T1	Zn-dependent alcohol dehydrogenase gene ARZ_4549_T1 from ZN1 in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a-ARZ_15626_T1	Zn-dependent alcohol dehydrogenase gene ARZ_15626_T1 from ZN1 in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a-ARZ_17182_T1	Aldo-keto reductase gene ARZ_17182_T1 from ZN1 in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a-ARZ_5033_T1	NADPH-dependent methylglyoxal reductase gene ARZ_5033_T1 from ZN1 in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a-ARZ_8367_T1	Pyridoxal reductase gene ARZ_8367_T1 from ZN1 in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a-ARZ_13395_T1	Aldo-keto reductase gene ARZ_4549_T1 from ZN1 in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i>	Reporter gene <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This stud
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0062	Putative aryl-alcohol dehydrogenase gene ZMO0062 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1696	Zn-binding alcohol dehydrogenase gene ZMO1696 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1722	Zn-binding alcohol dehydrogenase gene ZMO1722 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1771	Butanol dehydrogenase gene ZMO1771 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1993	Zn-binding alcohol dehydrogenase gene ZMO1993 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study

pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0976	Aldo-keto reductase gene ZMO0976 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1344	Aldo-keto reductase gene ZMO1344 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1673	Aldo-keto reductase gene ZMO1673 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1773	Aldo-keto reductase gene ZMO1773 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1984	Aldo-keto reductase gene ZMO1984 from ZM4 fused to <i>gfp</i> in pHW20a- <i>Peno</i>	This study
pHW20a-ZMO1771- <i>Pgap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>gap</i> ) promoter from ZM4 in pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1771	This study
pHW20a-ZMO1771- <i>pntAB</i>	Proton-translocating transhydrogenase gene <i>pntAB</i> from K-12 in pHW20a-ZMO1771- <i>Pgap</i>	This study
pHW20a-ZMO1771- <i>udhA</i>	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase gene <i>udhA</i> from K-12 in pHW20a-ZMO1771- <i>Pgap</i>	This study
pHW20a-ZMO1771-ZMO0367	Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene ZMO0367 from ZM4 in pHW20a-ZMO1771- <i>Pgap</i>	This study
pHW20a- <i>pntAB</i>	<i>PntAB</i> from K-12 with <i>gap</i> promoter from ZM4 in pHW20a	This study
pHW20a- <i>udhA</i>	<i>UdhA</i> from from K-12 with <i>gap</i> promoter from ZM4 in pHW20a	This study
<b>Primers</b>	<b>Forward and reverse sequences, respectively (5'-3')</b>	
<i>Peno</i> -F	ATAAGAATGCGGCCGCCTCGGCCATTGTCTATACTC	
<i>Peno</i> -R	CCGCTCGAGATCGAAACCTTTCTTAAAATC	
ARZ_4549_T1-F	CCGCTCGAGATGCAGAGGGTATTTAGTCTCACACA	
ARZ_4549_T1-R	CGGGGTACCTTACACGCCAAGCTCATCC	
ARZ_15626_T1-F	AAAACCTGCAGATGTCTGATATCAAATCCGAGCC	
ARZ_15626_T1-R	CGGGGTACCCTATAGAGTAAAGATGACTGACTTCCCA	
ARZ_17182_T1-F	AAAACCTGCAGATGCCTTTCCCACCCCC	
ARZ_17182_T1-R	CGGGGTACCTCAGTTGGGTCTTGGAGCG	
ARZ_5033_T1-F	CCGCTCGAGATGTCGGGAAAAGGAAAGACTG	
ARZ_5033_T1-R	AAAACCTGCAGTTAATGCTTAATCCCAGCTGC	
ARZ_8367_T1-F	CCGCTCGAGATGTCTGGCTTGACCCCC	
ARZ_8367_T1-R	AAAACCTGCAGTTACTGGTTCAGTTGGGCCT	
ARZ_13395_T1-F	CCGCTCGAGATGGCCAGCCTCACTATCAAT	





海德默医药科技有限公司, 咪唑、卡那霉素、四环素、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷、牛血清白蛋白 (BSA)、葡萄糖-6 磷酸、NADH、NADPH、NADP<sup>+</sup>均购自北京普博欣生物科技有限责任公司, 3-乙酰基吡啶 NAD<sup>+</sup>购自上海兰浚生物科技有限公司。其它生化试剂 (分析纯) 购自国药集团化学试剂有限公司或上海凌峰化学试剂有限公司。

### 3.2.1.2 培养基与培养条件

*A. resiniae* ZN1 培养见 2.2.1.2 部分。

*Z. mobilis* ZM4 原始菌株和重组菌株均培养于 RM 培养基 (葡萄糖 20 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L、酵母浸粉 10 g/L), 30 °C 静置培养。对于重组菌株需额外添加终浓度为 20 μg/mL 的四环素。

*E. coli* 菌株培养于 Luria-Bertani (LB) 培养基 (蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L 和 NaCl 10 g/L), 37 °C, 200 rpm 培养。根据需要添加终浓度为 20 μg/mL 的四环素或 50 μg/mL 的卡那霉素。

## 3.2.2 实验和分析方法

### 3.2.2.1 目的基因的扩增与重组菌株的构建

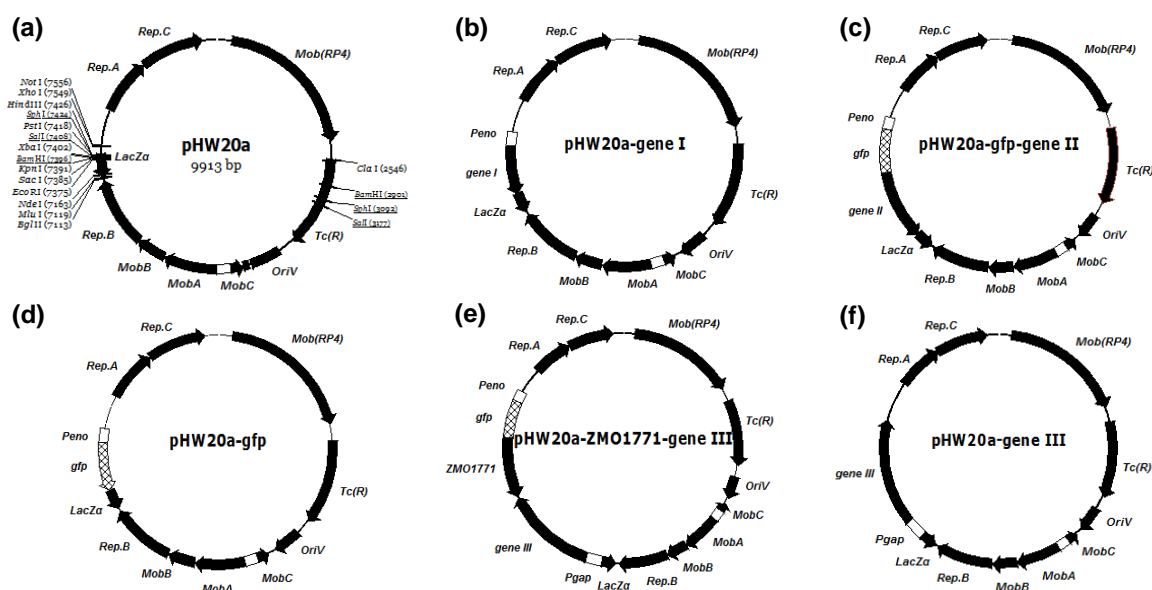


图 3.1 pHW20a (a) 及其他重组质粒 (b-f) 图谱

Fig. 3.1 Detailed maps of pHW20a (a) and other newly constructed plasmids (b-f) used in this study (b) pHW20a-gene I, harboring the *adh* or *akr/ari* gene cloned from *A. resiniae* ZN1; (c) pHW20a-*gfp*-gene II, harboring the *adh* or *akr* gene cloned from *Z. mobilis* ZM4 and the *gfp* gene; (d) pHW20a-*gfp*, harboring the *gfp* gene only; (e) pHW20a-ZMO1771-gene III, harboring ZMO1771 and another gene involved in NADPH generation; (f) pHW20a-gene III, harboring the gene involved in NADPH generation only.

*A. resiniae* ZN1 的 cDNA 制备见 2.2.2.3 部分。*E. coli* K12 与 *Z. mobilis* ZM4 的基因组 DNA 使用基因组提取试剂盒 TIANamp Bacterial DNA Kit 提取。用于扩增各目的基因的引物见表 2.1。重组质粒的构建见图 3.1。克隆自 *A. resiniae* ZN1 的外源性目的基因与

内源性启动子 *Peno* 连接后插入 pHW20a 中 (图 3.1b)。克隆自 *Z. mobilis* ZM4 的内源性目的基因以七个甘氨酸密码子为接头序列 (linker) 先与绿色荧光蛋白报告基因 *gfp* 进行融合扩增并与内源性启动子 *Peno* 连接后再插入到穿梭质粒 pHW20a 中 (图 3.1c)。此时以单一过表达报告基因 *gfp* 的质粒 (图 3.1d) 为对照质粒。为避免共表达基因间的相互影响, 在进行共表达菌株构建时, 与氧化还原力生成相关的基因与另一个内源性启动子 *Pgap* 连接后以与 ZMO1771 表达相反的方向插入到质粒中 (图 3.1e、f)。构建好的各重组质粒首先经  $\text{CaCl}_2$  法转化至 *E. coli* S17-1  $\lambda\pi$ , 再经接合转化的方式转化至 *Z. mobilis* ZM4<sup>[176]</sup>。

为进行醇脱氢酶基因 ZMO1771 的体外酶活测定, 将克隆自 *Z. mobilis* ZM4 的醇脱氢酶基因 ZMO1771 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 插入到表达质粒 pET-28a(+), 并经  $\text{CaCl}_2$  法转化至 *E. coli* BL21。重组质粒在目的基因起始密码子上游保留 N-端(His)<sub>6</sub>-标签。

### 3.2.2.2 玉米秸秆水解液的制备

水洗除尘后的玉米秸秆首先进行干式稀酸预处理, 条件为稀硫酸用量 2.5% (w/w, 基于干物料), 固液比 2:1 (w/w, 基于干物料), 转速 50 rpm, 175 °C 保留 5 分钟<sup>[17, 178]</sup>。预处理后的玉米秸秆 (15% , w/w, 基于干物料) 在 5 L 螺带式搅拌桨反应器中进行水解糖化, 纤维素酶用量 15 FPU/g 干物料, 50 °C, pH 4.8 水解 48 h。水解醪液在 10,000 rpm 条件下离心 10 分钟以除去不溶固体沉淀, 上清于 115 °C 灭菌 20 分钟, 滤纸过滤后保存于 4 °C 备用。在发酵操作阶段无需向水解液中添加任何营养物质。

### 3.2.2.3 *Z. mobilis* ZM4 重组菌株的发酵性能分析

挑取 RM 平板新鲜活化的菌落于装有 5 mL RM 培养基的 10 mL 试管中, 培养 20 h 后以 10% 接种量接种于新鲜的 50 mL RM 培养基中, 过夜培养作为种子培养液。以 10% 接种量将种子液二次转接入装有 50 mL RM 培养基或玉米秸秆水解液的 250 mL 摇瓶中进行发酵培养。RM 培养基中添加 2 g/L 的糠醛或 4 g/L 的 HMF (50% 致死率对应浓度)。30 °C 下静置培养, 期间间隔一定时间使用分光光度计 DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 在波长 600 nm 下进行吸光值测定, 记录菌体生长。同时取 1 mL 上清, 保存于 -20 °C 用于后续测定葡萄糖、乙醇、抑制物等物质的浓度。上述发酵实验分别进行至少 2 次生物学重复。

葡萄糖、乙醇及水解液中呋喃类衍生物含量采用 LC-20AD 型高效液相 HPLC 色谱仪 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 测定, HPLC 配置 RID-10A 型示差折光检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 HPX-87H 型色谱柱 (Bio-rad, Hercules, CA, USA)。流动相为 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流速 0.6 mL/min, 柱温 65 °C。合成培养基中呋喃类衍生物含量采用 LC-20AT 型反相高效液相 HPLC 色谱仪 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 测定, HPLC 配置 SPD-20A UV 紫外检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (YMC, Tokyo, Japan), 具体测定方法见 2.2.2.2 部分。所有样品在分析前经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤处理。

### 3.2.2.4 酶活测定

收集在 RM 中二次转接培养至对数中期的重组 *Z. mobilis* ZM4 菌株进行粗酶液提取

[179]。50 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤菌体两次后用 100 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 回悬菌体并进行超声破碎。超声条件为功率 300W, 工作 3 s, 间隔 6 s, 超声 20 次。超声破碎液于 4 °C, 12,000 rpm 条件下离心 20 min, 收集上清即为粗酶液。

收集在 LB 培养基中经 0.1 mM IPTG, 30 °C 诱导培养 8 h 的重组 *E. coli* BL21 菌体, 借助 His-tag 标签进行醇脱氢酶 ZMO1771 的纯化提取<sup>[180]</sup>。50 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤菌体两次后用 10 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 100 mL 回悬菌体并进行超声破碎。超声条件为功率 300W, 工作 5 s, 间隔 15 s, 超声 100 次。超声破碎液于 4 °C, 12,000 rpm 条件下离心 20 min。上清经 0.44 μm 滤膜过滤后加入提前经 10 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 10 mL 平衡好的 Ni 填料柱中, 待蛋白结合完成后用 20 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 5-10 mL 洗去未结合的蛋白, 最后用 500 mM 咪唑洗脱液 (pH 7.8) 洗脱和收集 ZMO1771 目标蛋白。

呋喃醛还原酶活性参考已发表的文献<sup>[118]</sup>, 通过使用分光光度计检测 30 °C 下 340 nm 处 NAD(P)H 的吸光值变化。定义 1 U 为每分钟转换 1 μM NAD(P)H 所需要的酶量。酶促反应在 100 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中进行, 添加 100 μM NAD(P)H、10 mM 糠醛或 HMF 和适量样品 (粗酶或纯酶酶液)。与 *gfp* 融合表达的呋喃醛降解作用基因的表达除了通过上述酶活检测外, 还借助荧光检测, 在激发光波长 488nm 下通过荧光显微镜 OLYMPUS BX51 (Tokyo, Japan) 观察菌体的荧光情况<sup>[181]</sup>。葡萄糖-6 磷酸脱氢酶 G6PDH 酶活和转氢酶 UdhA 和 PntAB 酶活使用分光光度计分别检测 30 °C 下 340nm 和 375nm 处 NADPH 的吸光值变化。G6PDH 酶促反应在 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中进行, 添加 200 mM KCl、1 mM NADP<sup>+</sup>、10 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM 葡萄糖-6 磷酸和适量粗酶液<sup>[182]</sup>。UdhA 和 PntAB 酶促反应在 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液中进行, 添加 2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM NADPH、1 mM 3-乙酰吡啶-NAD<sup>+</sup>和适量粗酶液<sup>[183]</sup>。蛋白含量测定以 BSA 为标准品, 采用 Bradford 法测定。

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 过表达重组菌株的构建

由于 *Z. mobilis* ZM4 自身可将糠醛、HMF 还原为相应的低毒性的糠醇、羟甲基糠醇, 但不能进一步氧化为相应的糠酸或羟甲基糠酸<sup>[50]</sup>, 因此当采用理性改造策略对 *Z. mobilis* ZM4 进行改造以提高 *Z. mobilis* ZM4 对呋喃醛抑制物的耐受性时, 首先考虑强化 *Z. mobilis* ZM4 转化呋喃醛生成呋喃醇的能力, 即可在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达与还原呋喃醛生成呋喃醇相关的氧化还原酶基因。

在之前的研究中, 借助定量 PCR 技术和 RNA-Seq 技术在呋喃醛处理下对生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 进行转录水平分析, 并从中筛选得到在糠醛、HMF 处理下均明显差异上调表达的基因, 这些基因可作为目的基因用于抑制物耐受型发酵工程菌株的构建。本研究中成功完成 6 个差异表达基因在 *Z. mobilis* ZM4 中的质粒过表达, 构建得到不同的过表达重组菌株。其中 ARZ\_4549\_T1 编码 NADPH 依赖型中链醇脱氢酶、

ARZ\_15626\_T1 编码线粒体醇脱氢酶、ARZ\_17182\_T1 编码芳基醇脱氢酶, ARZ\_5033\_T1 编码 NADPH 依赖型乙二醛脱氢酶、ARZ\_13395\_T1 编码木糖/阿拉伯糖还原酶、ARZ\_8367\_T1 编码吡哆醛还原酶。需要说明的是, 实际选取的克隆自 *A. resinae* ZN1 的基因超过 6 个, 但在过表达重组质粒进行接合转化时未能成功转化至 *Z. mobilis* ZM4 中, 如芳基醇脱氢酶编码基因 ARZ\_18349\_T1、ARZ\_10923\_T1 和 ARZ\_7295\_T1, 吡哆醛还原酶编码基因 ARZ\_3976\_T1 等。

表 3.2 荧光检测和粗酶酶活测定确认各目的基因在重组宿主菌中的表达

Table 3.2 Gene expression detection by fluorescence and enzyme assay of cell free extract in recombinant strains.

	Fluorescent Detection <sup>a</sup>	Activity (mU/mg crude protein)			
		Furfural + NADPH	HMF + NADPH	Furfural + NADH	HMF + NADH
ZM4(pHW20a) (Control)	-	24.48±1.65	11.17±0.69	118.01±0.66	114.41±2.22
ZM4(pHW20a-ARZ_4549_T1)	-	26.32±1.62	11.16±0.40	96.35±4.70	101.33±2.35
ZM4(pHW20a-ARZ_15626_T1)	-	23.64±2.23	11.45±0.15	49.73±59.12	86.79±1.92
ZM4(pHW20a-ARZ_17182_T1)	-	25.18±0.76	10.69±0.34	76.22±2.20	86.77±0.49
ZM4(pHW20a-ARZ_5033_T1)	-	28.29±1.14	11.92±0.29	184.82±4.15	134.86±1.05
ZM4(pHW20a-ARZ_8367_T1)	-	22.95±0.21	11.04±0.14	120.14±3.47	116.05±2.31
ZM4(pHW20a-ARZ_13395_T1)	-	48.98±6.52	45.98±4.09	102.72±1.44	104.25±3.60
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> ) (Control)	+	21.15±0.81	11.12±0.45	110.87±3.82	100.83±2.73
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0062)	+	24.53±0.99	14.82±0.05	175.22±9.91	135.51±6.61
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1696)	+	29.40±0.85	13.62±0.25	134.00±2.83	105.14±1.62
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1722)	+	23.87±0.87	12.24±0.00	104.51±2.69	99.40±6.91
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1771)	+	32.31±1.46	18.22±0.45	102.97±2.65	100.85±3.89
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1993)	+	22.16±0.00	11.62±0.00	115.46±0.00	101.64±4.96
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0976)	+	62.24±7.65	15.97±0.38	133.27±6.70	110.50±3.19
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1344)	+	21.64±0.00	12.34±0.45	108.83±2.80	94.19±4.76
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1673)	+	22.31±0.50	13.25±0.30	116.88±5.01	106.93±2.39
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1773)	+	21.66±0.49	11.89±0.29	134.06±4.86	107.71±3.24
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1984)	+	20.46±0.83	11.37±0.46	99.31±0.00	86.39±2.84

<sup>a</sup> +, fluorescence can be detected under fluorescence microscope; -, no fluorescence detected.

Standard deviations were derived from at least two independent determinations.

其次, 由于 *Z. mobilis* ZM4 自身具有可将呋喃醛还原为呋喃醇的醇脱氢酶或醛还原酶 (醛酮还原酶), 因此还对 *Z. mobilis* ZM4 基因组 (GenBank: AE008692) 中所有的醇脱氢酶和醛酮还原酶基因进行筛选分析, 共计得到 12 个候选作用基因, 包括七个醇脱氢酶基因 (ZMO0062、ZMO1236、ZMO1596、ZMO1696、ZMO1722、ZMO1771 和 ZMO1993) 和五个醛酮还原酶基因 (ZMO0976、ZMO1344、ZMO1673、ZMO1773 和 ZMO1984)。其中, 基因 ZMO1236 编码 ADHI, 基因 ZMO1596 编码 ADHII, 二者为乙

醇代谢直接参与基因, 在发酵产醇过程中始终处于较高的表达状态, 因此只选取其他 10 个基因插入质粒 pHW20a, 并转化至 *Z. mobilis* ZM4 中进行质粒过表达。

对构建得到的各重组菌株在 488 nm 下进行荧光镜检和呋喃醛还原酶酶活测定, 以确认各目的基因在宿主菌中的成功表达。如表 3.2 所示, 过表达 *gfp* 基因的各重组菌株均能正常检测到荧光, 反之则无。其次对于粗酶酶活测定, 过表达外源基因的重组菌株中除过表达基因 ARZ\_15626\_T1 的菌株酶活低于对照外, 其他菌株均较对照有不同程度的提高, 其中过表达基因 ARZ\_13395\_T1 的菌株以 NADPH 为辅因子时酶活提高最明显, 以糠醛为底物时提高 100%, 以 HMF 为底物时提高 312%; 过表达基因 ARZ\_5033\_T1 的菌株以 NADH 为辅因子时酶活提高明显, 以糠醛为底物时提高 57%, 以 HMF 为底物时提高 18%。过表达内源基因的重组菌株中除过表达基因 ZMO1984 的菌株酶活低于对照外, 其他菌株均较对照有不同程度的提高, 其中过表达基因 ZMO0976 的菌株以 NADPH 为辅因子时酶活提高最明显, 以糠醛为底物时提高 194%, 以 HMF 为底物时提高 44%; 过表达基因 ZMO0062 的菌株以 NADH 为辅因子时酶活提高明显, 以糠醛为底物时提高 58%, 以 HMF 为底物时提高 34%。

### 3.3.2 重组菌株对呋喃醛抑制物的转化性能分析

#### 3.3.2.1 单一抑制物条件下的抑制物转化性能

为了进一步确认各重组菌株对呋喃醛抑制物的转化性能, 将各重组菌株转接入添加 2 g/L 糠醛或 4 g/L HMF 的 RM 培养基中, 取培养至对数中期 (糠醛条件下培养 12 h、HMF 条件下培养 16 h) 的发酵液进行菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇生成和抑制物转化测定 (表 3.3)。

与对照菌株 (含空载质粒 pHW20a) 相比, 在添加糠醛或 HMF 的条件下, 过表达外源基因的重组菌株均未能表现更优的发酵性能, 除过表达基因 ARZ\_17182\_T1 或基因 ARZ\_5033\_T1 的重组菌株的发酵代谢性能与对照菌株略微相近外, 其他过表达菌株反而明显低于对照菌株。在 *A. resinae* ZN1 中受呋喃醛胁迫上调表达最显著的醇脱氢酶基因 ARZ\_4549\_T1 的过表达在各重组菌株中的发酵性能表现最差, 在糠醛胁迫下, 菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇生成、糠醛转化速率和转化率分别降低 47.22%、38.46%、35.71%、31.06% 和 26.97%; 在 HMF 胁迫下, 上述参数分别降低 37.93%、37.78%、41.18%、33.03% 和 29.45%。分析认为可能有以下几方面的原因导致这一现象: *A. resinae* ZN1 为真菌, *Z. mobilis* ZM4 为细菌, 真菌细胞结构及调控过程较细菌细胞更加复杂, 在简单的 RM 培养基条件下, *Z. mobilis* ZM4 的胞内环境不利于克隆自 *A. resinae* ZN1 的基因发挥正常的作用, 而未能发挥正常作用和功能的基因在 *Z. mobilis* ZM4 中转变成为一种代谢压力, 反而影响了菌株的正常生长和乙醇生成。其次, *A. resinae* ZN1 与 *Z. mobilis* ZM4 不同的生长温度、氧气需求以及 pH 环境也可能影响了过表达基因对呋喃醛抑制物的降解。

与对照菌株 (单一过表达报告基因 *gfp*) 相比, 过表达醇脱氢酶基因 ZMO1696、ZMO1722、ZMO1771 的重组菌株的抑制物转化性能得到较明显提升, 其中过表达基因 ZMO1771 的重组菌株的效果最好。在糠醛胁迫下三株重组菌的糠醛转化速率分别提高

表 3.3 重组菌株在 2 g/L 糠醛或 4 g/L HMF 胁迫下的发酵性能分析

Table 3.3 Fermentation performance of recombinant *Z. mobilis* ZM4 strains in response to 2 g/L of furfural or 4 g/L of HMF

Inhibitors	Recombinant strains	Growth rate (/h)	Glucose consumption rate (g/L/h)	Ethanol productivity (g/L/h)	Inhibitor conversion rate (mg/L/h)	Inhibitor degradation (%)
Furfural	ZM4(pHW20a)(control)	0.036±0.002	0.39±0.01	0.14±0.00	9.98±1.19	55.36±3.37
	ZM4(pHW20a-ARZ_4549_T1)	0.019±0.001	0.24±0.02	0.09±0.00	6.88±0.65	40.43±3.32
	ZM4(pHW20a-ARZ_15626_T1)	0.017±0.001	0.26±0.04	0.08±0.00	5.98±1.56	40.94±6.56
	ZM4(pHW20a-ARZ_17182_T1)	0.032±0.002	0.36±0.00	0.14±0.00	9.90±0.62	53.65±1.58
	ZM4(pHW20a-ARZ_5033_T1)	0.035±0.000	0.46±0.00	0.14±0.00	9.76±0.21	57.76±0.11
	ZM4(pHW20a-ARZ_8367_T1)	0.026±0.000	0.29±0.01	0.10±0.01	8.35±0.17	49.04±0.61
	ZM4(pHW20a-ARZ_13395_T1)	0.030±0.001	0.37±0.02	0.11±0.00	9.72±0.49	53.61±1.38
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> )(control)	0.030±0.000	0.40±0.05	0.11±0.00	9.42±0.76	54.32±2.98
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0062)	0.032±0.000	0.34±0.02	0.11±0.00	8.68±0.28	56.74±1.68
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1696)	0.034±0.000	0.36±0.02	0.12±0.00	9.82±0.27	63.97±1.37
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1722)	0.033±0.000	0.40±0.02	0.13±0.01	11.13±0.48	63.97±1.04
	<b>ZM4(pHW20a-<i>gfp</i>-ZMO1771)</b>	<b>0.032±0.002</b>	<b>0.38±0.02</b>	<b>0.12±0.00</b>	<b>12.62±0.16</b>	<b>66.89±1.99</b>
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1993)	0.030±0.001	0.41±0.00	0.12±0.00	9.31±0.18	49.90±1.08
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0976)	0.030±0.001	0.34±0.00	0.11±0.01	8.26±0.41	55.67±0.11
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1344)	0.032±0.000	0.38±0.00	0.13±0.00	8.44±0.21	49.79±0.65
	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1673)	0.026±0.001	0.31±0.00	0.09±0.02	7.77±0.21	50.36±1.33
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1773)	0.024±0.000	0.27±0.02	0.10±0.01	7.72±1.37	50.09±8.76	
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1984)	0.029±0.001	0.40±0.01	0.12±0.01	8.35±0.17	49.04±0.61	
HMF	ZM4(pHW20a)(control)	0.029±0.000	0.45±0.00	0.17±0.00	9.81±0.00	38.98±0.05
	ZM4(pHW20a-ARZ_4549_T1)	0.018±0.000	0.28±0.01	0.10±0.01	6.57±0.02	27.50±0.26
	ZM4(pHW20a-ARZ_15626_T1)	0.021±0.000	0.35±0.00	0.12±0.00	6.97±0.14	28.28±0.15

ZM4(pHW20a-ARZ_17182_T1)	0.028±0.000	0.42±0.01	0.17±0.00	9.22±0.34	36.54±1.18
ZM4(pHW20a-ARZ_5033_T1)	0.032±0.001	0.42±0.02	0.16±0.00	8.80±0.14	36.87±0.93
ZM4(pHW20a-ARZ_8367_T1)	0.018±0.000	0.33±0.01	0.10±0.01	6.42±0.17	25.96±0.89
ZM4(pHW20a-ARZ_13395_T1)	0.024±0.002	0.37±0.02	0.15±0.02	9.63±0.14	38.55±0.47
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> )(control)	0.026±0.000	0.40±0.00	0.14±0.01	8.74±0.54	36.29±1.74
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0062)	0.027±0.001	0.35±0.02	0.13±0.01	8.95±0.13	37.45±0.93
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1696)	0.031±0.001	0.40±0.00	0.13±0.01	10.42±0.50	43.43±1.00
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1722)	0.027±0.001	0.38±0.00	0.12±0.00	11.58±0.17	45.84±0.74
<b>ZM4(pHW20a-<i>gfp</i>-ZMO1771)</b>	<b>0.029±0.000</b>	<b>0.37±0.01</b>	<b>0.15±0.00</b>	<b>11.82±0.22</b>	<b>49.56±0.65</b>
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1993)	0.026±0.000	0.37±0.03	0.13±0.01	7.43±0.48	30.94±1.71
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0976)	0.029±0.000	0.43±0.00	0.15±0.00	8.82±0.34	33.96±1.21
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1344)	0.025±0.001	0.37±0.06	0.14±0.00	10.30±1.33	41.76±2.97
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1673)	0.022±0.001	0.34±0.01	0.13±0.00	7.23±0.06	27.69±0.41
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1773)	0.019±0.001	0.33±0.03	0.11±0.00	6.43±0.02	24.58±0.06
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1984)	0.025±0.000	0.33±0.00	0.14±0.00	9.67±0.43	39.97±1.52

In RM medium containing 2 g/L of furfural or 4 g/L of HMF at 30 °C. ZM4(pHW20a), containing the blank plasmid only, is the control strain for recombinants expressing exogenous genes; ZM4(pHW20a-*gfp*), expressing the reporter gene *gfp* only, is the control strain for recombinants expressing endogenous genes. The fermentation performance was detected at the mid-log phase, where 12 h for furfural and 16 h for HMF. Standard deviations were derived from at least two independent determinations.

4.25%、18.15%和 33.97%，转化率分别提高 17.77%、17.77%和 23.14%；HMF 胁迫下 HMF 转化速率分别提高 19.22%、32.49%和 35.24%，转化率分别提高 19.67%、26.32%和 36.57%。其他 7 株过表达重组菌株则均没有体现明显的抑制物转化优势。然而尽管上述三株重组菌株的抑制物转化率得到了明显提高，但由于提高的程度有限，各重组菌株除生长速率略有提高外，在葡萄糖消耗和乙醇生成速率方面均没有明显变化。

在之前的体外酶活研究中发现醛酮还原酶基因 ZMO0976 可依赖于 NADPH 进行糠醛、HMF 的还原<sup>[180]</sup>，同时，在本研究的粗酶酶活测定实验（表 3.2）中也显示过表达基因 ZMO0976 的重组菌株在以 NADPH 为辅因子时糠醛还原酶活和 HMF 还原酶活分别较对照菌株提高 194%和 44%。但在 RM 培养基发酵体系下，过表达 ZMO0976 的重组菌株并没能有效地提高菌株对抑制物的转化性能，这一现象显示体外酶活测定环境并不能完全反映胞内真实的酶催化反应环境。

### 3.3.2.2 15%固含量玉米秸秆水解液中的抑制物转化性能

表 3.4 重组菌株在玉米秸秆水解液中的糠醛、HMF 转化速率分析

Table 3.4 Furfural and HMF conversion rate of recombinant *Z. mobilis* strains in corn stover hydrolysate.

Recombinant strains	Furfural conversion rate (mg/L/h)		HMF conversion rate (mg/L/h)	
	12	24 h	12h	24 h
ZM4(pHW20a)(control)	14.37 ±3.94	18.62 ±0.72	1.28 ±0.69	2.90 ±0.13
ZM4(pHW20a-ARZ_4549_T1)	14.02 ±1.14	15.96 ±2.67	1.49 ±0.90	1.29 ±0.58
ZM4(pHW20a-ARZ_15626_T1)	13.02 ±0.88	15.96 ±1.09	1.91 ±0.06	2.05 ±0.12
ZM4(pHW20a-ARZ_17182_T1)	15.71 ±0.75	14.46 ±0.65	1.72 ±0.45	1.92 ±0.10
ZM4(pHW20a-ARZ_5033_T1)	19.98 ±0.23	21.39 ±0.14	2.38 ±0.60	2.85 ±0.35
ZM4(pHW20a-ARZ_8367_T1)	12.68 ±1.08	15.27 ±0.18	1.87 ±1.27	1.85 ±0.16
<b>ZM4(pHW20a-ARZ_13395_T1)</b>	<b>13.96 ±1.17</b>	<b>21.28 ±1.21</b>	<b>3.03 ±1.26</b>	<b>4.63 ±0.24</b>
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> ) (Control)	12.51 ±0.79	13.73 ±0.67	1.64 ±0.90	1.93 ±0.22
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0062)	12.86 ±1.11	11.85 ±0.74	0.97 ±0.04	0.56 ±0.01
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1696)	14.59 ±0.23	13.60 ±0.69	1.64 ±0.06	2.17 ±1.09
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1722)	14.90 ±3.52	13.52 ±2.08	1.81 ±0.76	2.12 ±0.24
<b>ZM4(pHW20a-<i>gfp</i>-ZMO1771)</b>	<b>21.89 ±1.41</b>	<b>16.74 ±0.53</b>	<b>2.78 ±0.48</b>	<b>2.76 ±0.01</b>
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1993)	13.40 ±0.19	13.76 ±0.61	1.14 ±0.47	1.19 ±0.08
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO0976)	14.16 ±1.74	12.72 ±0.06	0.51 ±0.03	1.16 ±1.00
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1344)	11.73 ±0.45	11.21 ±0.28	0.62 ±0.08	1.30 ±0.32
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1673)	15.38 ±0.25	11.93 ±1.07	0.52 ±0.20	2.48 ±0.03
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1773)	10.84 ±0.17	9.68 ±0.54	1.32 ±0.51	1.02 ±0.31
ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1984)	16.91 ±1.27	12.71 ±1.55	1.44 ±0.36	1.79 ±0.73

The corn stover hydrolysate contained 56.74 g/L of glucose, 24.80 g/L of xylose, 2.85g/L of acetic acid, 0.34 g/L of HMF and 0.62 g/L of furfural at 30 °C. Standard deviations were derived from at least two independent determinations.

尽管多数重组菌株,尤其是过表达外源基因的菌株,在单一添加糠醛或 HMF 的 RM 培养基中未体现明显的发酵优势,但考虑到真实的木质纤维素水解液的复杂性,因此进一步将各重组菌株在 15%固含量未脱毒的玉米秸秆水解液中进行发酵性能分析,该玉米秸秆水解液中含葡萄糖 56.74 g/L、木糖 24.80 g/L、乙酸 2.85 g/L、糠醛 0.62 g/L、HMF 0.34 g/L,同时也含有 4-羟甲基苯甲醛、香草醛和丁香醛等其他抑制物。表 3.4 展示了各重组菌株在发酵前 24 h (糠醛降解主要阶段) 内的抑制物转化情况。

与对照(含空载质粒 pHW20a)相比,过表达外源醛酮还原酶基因 ARZ\_13395\_T1 的重组菌株的糠醛、HMF 转化速率显著提高,其他过表达外源基因的重组菌株则未对抑制物转化起到有效的促进作用(表 3.4)。抑制物转化结果显示,尽管在发酵 12 h 时过表达基因 ARZ\_13395\_T1 的菌株的糠醛转化速率与对照相当,但 24 h 时较对照明显提高 14.52%;同时,发酵 12 h、24 h 时 HMF 转化速率分别提高 130.77%和 58.62%。糠醛、HMF 转化速率的加快,相应地提高了重组菌株在水解液中的生长、葡萄糖消耗和乙醇生成。如图 3.2 所示,发酵 36 h 时,重组菌株的生长、葡萄糖消耗和乙醇生成速率分别提高 41.67%、62.90%和 88.46%;发酵 48 h 时上述参数分别提高 6.67%、3.77%和 10.64%。

与对照菌株(单一过表达报告基因 *gfp*)相比,过表达内源醇脱氢酶基因 ZMO1771 的重组菌株的糠醛、HMF 转化速率显著提高,其他过表达内源性氧化还原酶基因的菌株,包括之前在 RM 培养基中有同样优势表型的过表达 ZMO1696 或 ZMO1722 的重组菌株,均未能有效地促进抑制物的转化(表 3.4)。抑制物转化结果显示,过表达基因 ZMO1771 时,糠醛转化速率在发酵 12 h、24 h 时分别提高 75.20%和 21.90%,HMF 转化速率则分别提高 75.00%和 47.47%。与 RM 培养基中的结果不同,糠醛、HMF 转化速率的加快,相应地提高了过表达菌株在水解液中的生长、葡萄糖消耗和乙醇生成。如图 3.3 所示,发酵 36 h 时,重组菌株的生长、葡萄糖消耗和乙醇生成速率分别提高 35.00%、78.79%和 100%,发酵 48 h 时相应分别提高 33.33%、74.14%和 100%。

与简单的合成培养基(RM 培养基)相比,过表达 ARZ\_13395\_T1 或过表达 ZMO1771 的重组菌株在水解液中的发酵性能较其他菌株具有更明显优势。分析认为这与水解液的组成成分复杂有关:水解液中除含有糠醛、HMF 等呋喃醛抑制物外,还含有酚醛及有机弱酸类等抑制物,这些抑制物的存在可与呋喃醛产生强烈的协同抑制作用,重组菌株在实现呋喃醛尤其是糠醛的快速转化的同时可有效地缓解或解除这种协同抑制作用。其次,复杂的水解液中含有丰富的氮源、矿物质等其他营养成分<sup>[184, 185]</sup>,这些组分在重组菌株转化呋喃醛的过程中可能发挥了积极的作用,正如在 *S. cerevisiae* 中的研究所显示的,营养丰富的培养基如复合培养基或高糖培养基都可影响菌株对抑制物的耐受性<sup>[68, 79]</sup>。鉴于此,在进行重组菌株的抑制物耐受性能评价时应以真实的木质纤维素水解液中的发酵结果为最终评价标准。

上述抑制物转化性能实验证实,来源于 *A. resinae* ZN1 的醛酮还原酶基因 ARZ\_13395\_T1 和来源于 *Z. mobilis* ZM4 的醇脱氢酶基因 ZMO1771 均可实现糠醛、HMF 的转化;当在发酵菌株 *Z. mobilis* ZM4 中分别过表达这两个基因时均可有效地增强菌株

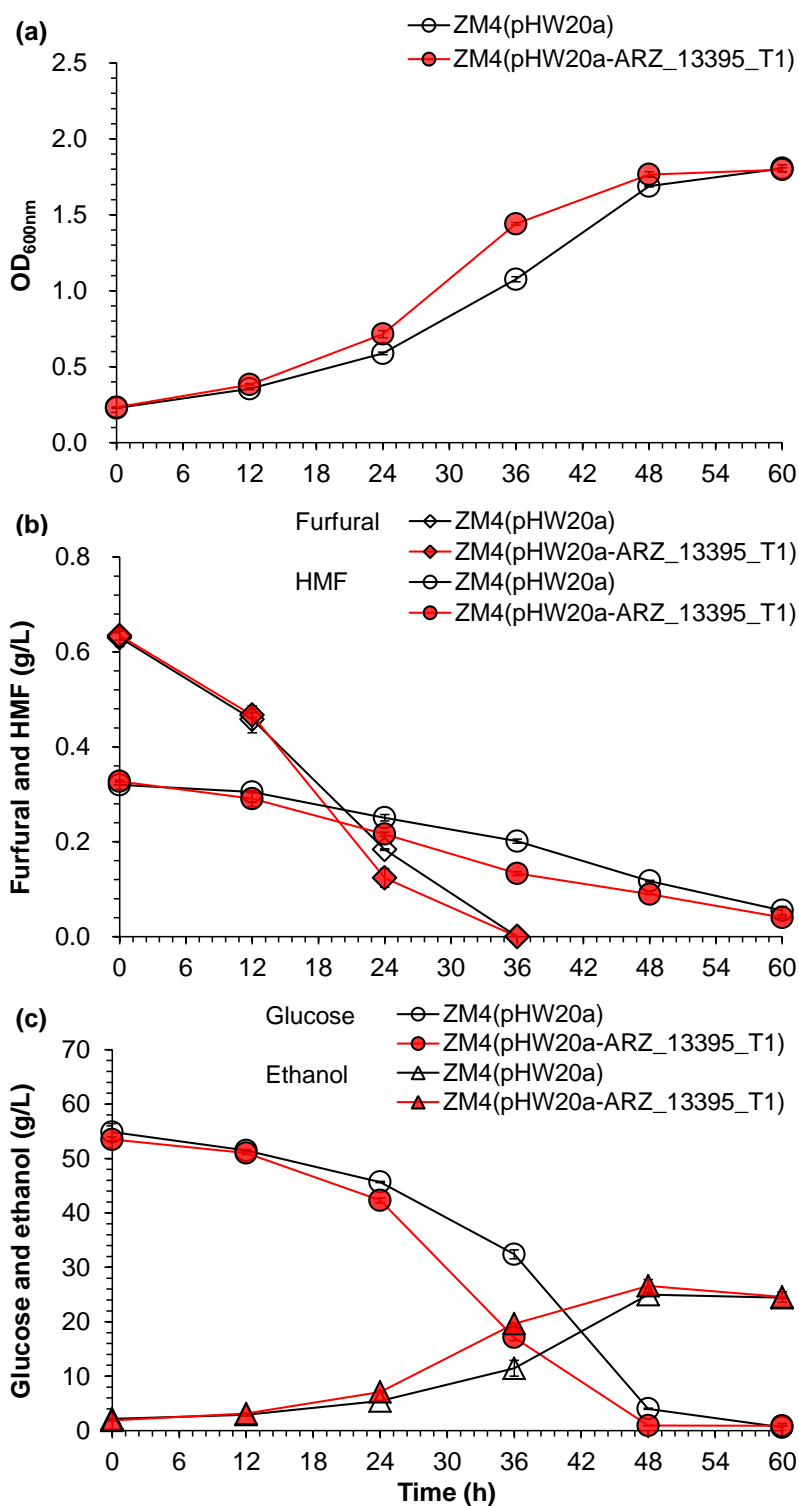


图 3.2 重组菌株 *Z. mobilis* ZM4(pHW20a-ARZ\_13395\_T1)和 ZM4(pHW20a)在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 3.2 Fermentation performance of the recombinants *Z. mobilis* ZM4(pHW20a-ARZ\_13395\_T1) and ZM4(pHW20a) in corn stover hydrolysate.

ZM4(pHW20a-ARZ\_13395\_T1), expressing gene ARZ\_13395\_T1; ZM4(pHW20a), containing the blank plasmid only. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Conversion of furan inhibitors. (c) Glucose consumption and ethanol production.

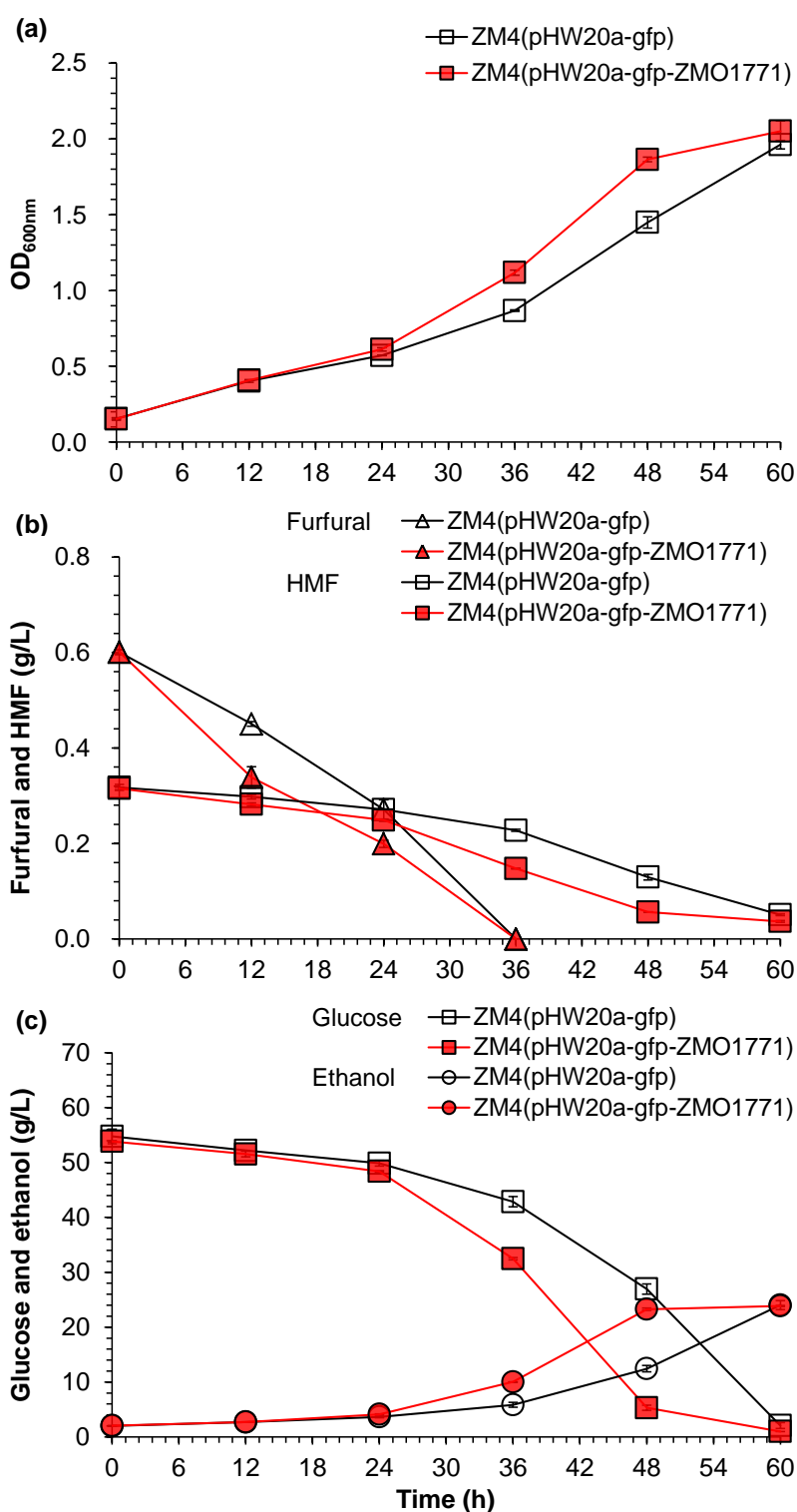


图 3.3 重组菌株 *Z. mobilis* ZM4(pHW20a-gfp-ZMO1771)和 ZM4(pHW20a-gfp)在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 3.3 Fermentation performance of the recombinants *Z. mobilis* ZM4(pHW20a-gfp-ZMO1771) and ZM4(pHW20a-gfp) in corn stover hydrolysate.

ZM4(pHW20a-gfp-ZMO1771), expressing gene ZMO1771 fused with the reporter gene *gfp*; ZM4(pHW20a-gfp), expressing the reporter gene *gfp* only. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Conversion of furan inhibitors. (c) Glucose consumption and ethanol production.

在玉米秸秆水解液中的发酵性能,且过表达内源 ZMO1771 的重组菌株效果更好。此外,由于呋喃醛的降解转化为 NADH 或 NADPH 参与的氧化还原反应,增加菌体内 NADH 或 NADPH 的供给或可进一步增强菌体对呋喃醛抑制物的转化性能。鉴于过表达 ZMO1771 的重组菌株的优良发酵性能,选取 ZMO1771 进行后续理性分子改造研究。

### 3.3.3 ZMO1771 辅因子偏好性分析和共表达菌株的构建

为进一步增强过表达基因 ZMO1771 的重组菌株对呋喃醛抑制物的转化性能,尝试在该重组菌株中共表达与 NAD(P)H 辅因子生成相关的基因,在进行进一步分子改造前需要首先对 ZMO1771 的辅因子偏好性进行确认。重组菌株的粗酶活测定结果(表 3.2)显示,以 NADH 为辅因子时,过表达基因 ZMO1771 的重组菌株与对照菌株无明显区别;以 NADPH 为辅因子时,重组菌株对糠醛、HMF 的还原活性较对照分别提高 53% 和 64%。在此基础上,进一步将 ZMO1771 在 *E. coli* BL21 中进行诱导表达和蛋白纯化,相应纯酶活测定结果显示,以 NADH 为辅因子时,未检测到相应的呋喃醛还原酶活性;以 NADPH 为辅因子时,糠醛、HMF 还原酶活性分别为 3.632 和 1.999 U/mg 纯蛋白。上述结果证实 ZMO1771 依赖于 NADPH 而非 NADH 进行呋喃醛的还原转化。因此,在进行共表达菌株构建时选取与 NADPH 生成相关的基因进行重组构建。

本研究中首先选取来源于 *E. coli* 的两个转氢酶基因 *pntAB* 和 *udhA*, *pntAB* 编码膜结合质子转位型转氢酶, *udhA* 编码可溶性非能量依赖型转氢酶。 *pntAB* 和 *udhA* 是迄今为止已报道的,在生物体内负责 NADH 与 NADPH 之间相互转化的两个转氢酶基因,其催化反应方程式为  $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}^{[183]}$ 。目前,相关文献报道显示二者均可催化 NADH 和 NADPH 的相互转化,催化反应的方向与宿主菌有关还与菌株的培养条件、环境胁迫干扰有关<sup>[186, 187]</sup>。鉴于以上分析,分别将 *pntAB* 和 *udhA* 与启动子 *Pgap* 连接后,以与 ZMO1771 表达方向相反的方向插入到重组质粒中,如图 3.1e 所示。对新构建的重组菌株进行相应粗酶活测定,以确认各基因的成功表达。*PntAB* 在共表达菌株和单一过表达菌株中的活性均为 0.037 U/mg 粗蛋白, *UdhA* 在共表达菌株和单一过表达菌株中的活性分别为 0.002 和 0.003 U/mg 粗蛋白。

其次选取克隆自 *Z. mobilis* ZM4 自身的内源葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 ZMO0367。葡萄糖 6-磷酸脱氢酶是 *Z. mobilis* ZM4 中 ED 代谢路径中的第一步反应作用酶,是胞内 NADPH 生成的主要来源。在 *S. cerevisiae* 中葡萄糖 6-磷酸脱氢酶是 PPP 路径的关键酶,过表达葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1* 可增强菌体对糠醛、HMF 的耐受性<sup>[125, 166]</sup>。类似的,将 ZMO0367 与启动子 *Pgap* 连接后,以与 ZMO1771 表达方向相关的方向插入到重组质粒中。需要指出的是,单一过表达 ZMO0367 的重组菌株未能成功构建,猜测认为可能是由于 ZMO0367 为 ED 路径的关键作用酶,强启动子 *Pgap* 调控下的 ZMO0367 单一过表达会对中心碳代谢过程产生较大影响。共表达菌株的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶酶活为 3.011 U/mg 粗蛋白,较对照(单一过表达基因 ZMO1771 菌株)提高 12%。

### 3.3.4 共表达重组菌株对呋喃醛抑制物的转化性能分析

将新构建的共表达重组菌株转接入添加 2 g/L 的糠醛或 4 g/L 的 HMF 的 RM 培养基

表 3.5 共表达重组菌株在 2 g/L 糠醛或 4 g/L HMF 胁迫下的发酵性能分析

Table 3.5 Fermentation performance of co-expression recombinant *Z. mobilis* ZM4 strains in response to 2 g/L of furfural or 4 g/L of HMF

Inhibitors	Recombinant strains	Growth rate (h)	Glucose consumption rate (g/L/h)	Ethanol productivity (g/L/h)	Inhibitor conversion rate (mg/L/h)	Inhibitor conversion (%)
Furfural	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1771)	0.022±0.000	0.32±0.01	0.10±0.00	10.92±2.08	72.15±9.26
	ZM4(pHW20a-ZMO1771- <i>pntAB</i> )	0.021±0.001	0.29±0.01	0.09±0.00	12.44±0.29	78.88±0.79
	<b>ZM4(pHW20a-ZMO1771-<i>udhA</i>)</b>	<b>0.020±0.000</b>	<b>0.33±0.05</b>	<b>0.08±0.00</b>	<b>13.08±2.28</b>	<b>83.16±6.62</b>
	ZM4(pHW20a-ZMO1771-ZMO0367)	0.019±0.000	0.29±0.03	0.10±0.01	11.85±0.92	71.46±2.36
HMF	ZM4(pHW20a- <i>gfp</i> -ZMO1771)	0.022±0.000	0.40±0.05	0.12±0.01	12.31±1.12	50.09±4.10
	ZM4(pHW20a-ZMO1771- <i>pntAB</i> )	0.026±0.002	0.41±0.01	0.14±0.01	13.92±0.87	58.42±2.73
	<b>ZM4(pHW20a-ZMO1771-<i>udhA</i>)</b>	<b>0.029±0.002</b>	<b>0.49±0.04</b>	<b>0.17±0.01</b>	<b>17.02±0.31</b>	<b>70.19±1.49</b>
	ZM4(pHW20a-ZMO1771-ZMO0367)	0.024±0.001	0.35±0.02	0.14±0.01	12.61±0.06	52.69±0.08

In RM medium containing 2 g/L of furfural or 4 g/L of HMF at 30 °C. The fermentation performance was detected at the mid-log phase, where 12 h for furfural and 16 h for HMF. Standard deviations were derived from at least two independent determinations.

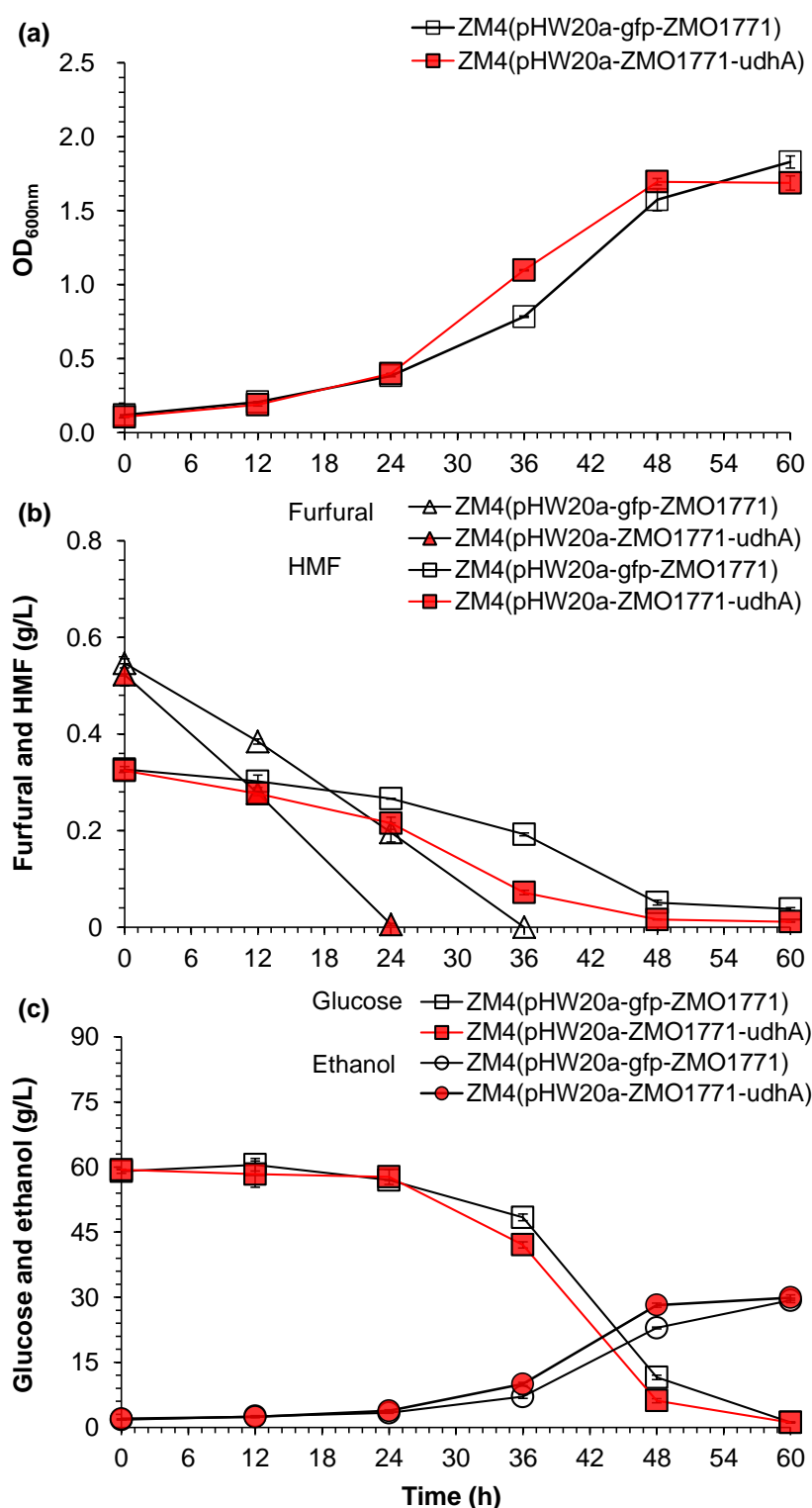


图 3.4 共表达重组菌株 *Z. mobilis* ZM4(pHW20a-ZMO1771-udhA)和 ZM4(pHW20a-gfp-ZMO1771)在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 3.4 Fermentation performance of the recombinants *Z. mobilis* ZM4(pHW20a-ZMO1771-udhA) and ZM4(pHW20a-gfp-ZMO1771) in corn stover hydrolysate. ZM4(pHW20a-ZMO1771-udhA), co-expressing gene *udhA* with ZMO1771; ZM4(pHW20a-gfp-ZMO1771), expressing gene ZMO1771 only. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Conversion of furan inhibitors. (c) Glucose consumption and ethanol production.

基中, 同样取培养至对数中期 (糠醛培养 12 h、HMF 培养 16 h) 的发酵液进行菌体生长、葡萄糖消耗、乙醇生成和抑制物转化测定 (表 3.5)。

以单一过表达基因 ZMO1771 的重组菌株为对照, 共表达基因 *udhA* 时有效增强了菌体对糠醛、HMF 的转化性能。糠醛胁迫下抑制物转化速率和转化率分别提高 19.78% 和 15.26%, HMF 胁迫下抑制物转化速率和转化率分别提高 38.26% 和 40.13%。此外, 在 HMF 胁迫下, 菌体生长、葡萄糖消耗和乙醇生成速率还相应增加 31.82%、22.50% 和 41.67%, 在糠醛胁迫下上述参数无明显变化。共表达基因 *pntAB* 的重组菌的抑制物转化性能较对照有略微提高, 但明显低于共表达基因 *udhA* 的菌株。共表达基因 ZMO0367 的重组菌株则和对照菌株无明显区别。单一抑制物胁迫下的发酵结果显示, 在 *Z. mobilis* ZM4 中, *udhA* 更倾向于生成 NADPH, 共表达基因 *udhA* 时可促进醇脱氢酶 ZMO1771 对糠醛、HMF 的转化。

进一步将共表达基因 *udhA* 的重组菌株在 15% 固含量的玉米秸秆水解液中进行培养, 考察共表达菌株在真实木质纤维素水解液中的抑制物转化性能。玉米秸秆水解液含葡萄糖 59.45 g/L、木糖 24.03 g/L、乙酸 3.21 g/L、糠醛 0.69 g/L、HMF 0.38 g/L 和少量酚类抑制物 (4-羟甲基苯甲醛、香草醛和丁香醛等)。如图 3.4 所示, 与单一过表达基因 ZMO1771 的重组菌株相比, 共表达菌株的糠醛、HMF 转化速率得到显著提高, 发酵 12 h 时糠醛转化率达到 46.98%, 较对照提高 58.40%, 发酵 24 h 时, 糠醛转化完全, 较对照菌株 (仍有 35% 糠醛剩余) 提前约 12 h; 发酵 48 h 时, HMF 基本转化完全, 对照菌株仍有 15% 的 HMF 剩余, 至发酵结束 (60h), 对照菌株仍有约 12% 的 HMF 剩余。抑制物转化速率的加快相应地促进了菌株的生长速率和乙醇产率。发酵 24 h 开始, 菌株生长明显加快, 发酵 36 h 时菌体生长、葡萄糖消耗和乙醇生成速率较对照分别提高 55.56%、60.00% 和 46.67%; 发酵 48 h 时相应提高 10.00%、12.12% 和 25.00%。此外, 图 3.4 还显示至发酵结束时, 共表达菌株的最大生物量和最终乙醇浓度与对照菌株相当, 即重组菌株发酵性能的提高主要是提高了菌株的生长速率和乙醇生成速率。

玉米秸秆水解液中的乙醇发酵性能分析显示, 在过表达基因 ZMO1771 的重组菌株中共表达克隆自 *E. coli* 的转氢酶基因 *udhA* 时可将胞内的 NADH 转化为 NADPH, 共表达菌株通过提高胞内 NADPH 的供给促进了 ZMO1771 对呋喃醛的转化。然而, 另一方面, *UdhA* 转化 NADH 生成 NADPH 时会与醇脱氢酶 ADHI 或 ADHII 催化生成乙醇过程竞争还原力 NADH, 导致共表达菌株在转化糠醛、HMF 的过程中在一定程度上阻碍乙醇的生成, 这也是造成发酵培养初期 (前 12 h) 共表达菌株的乙醇生成速率略低于对照菌株 (图 3.4c) 的原因。尽管如此, 共表达菌株的发酵分析得到, 对胞内相应氧化还原力的供给进行相关操作可进一步有效地增强发酵菌株 *Z. mobilis* ZM4 对抑制物的转化性能和乙醇生成性能。

### 3.4 本章小结

利用乙醇发酵菌株 *Z. mobilis* ZM4 进行纤维素乙醇生产时, 菌株会受到原料中糠醛、

HMF 的抑制,影响乙醇的发酵效率。本章研究针对呋喃醛抑制问题,采用理性工程策略对 *Z. mobilis* ZM4 进行改造。在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达内源或外源的与呋喃醛抑制物转化相关的氧化还原酶基因,强化菌株自身对抑制物的转化能力,提高了菌株对抑制物的耐受性能和相应的乙醇发酵性能。其次,在上述重组菌株中进一步共表达与辅因子生成相关的基因,通过调节胞内辅因子的供给进一步增强了菌体对抑制物的转化性能。本章主要研究结论如下:

(1) 在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达筛选自生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的外源的醛酮还原酶基因 ARZ\_13395\_T1, 或过表达克隆自 *Z. mobilis* ZM4 自身的内源的醇脱氢酶基因 ZMO1771 时,均可显著增强菌体转化糠醛、HMF 的能力,在 15%固含量玉米秸秆水解液中抑制物转化速率的加快,相应地促进了菌体的生长、葡萄糖消耗和乙醇生成。

(2) 体外酶活测定显示 ZMO1771 编码的醇脱氢酶以 NADPH 为辅因子进行糠醛、HMF 的还原转化。当在过表达 ZMO1771 的重组菌中进一步过表达来自 *E. coli* 的转氢酶基因 *udhA* 时, UdhA 可将胞内的 NADH 转化为 NADPH 促进 ZMO1771 对呋喃醛的转化。在 15%固含量玉米秸秆水解液中发酵 12 h 时,共表达菌株的糠醛、HMF 转化率分别较单一过表达基因 ZMO1771 的菌株提高 58.40%和 91.76%,发酵 24 h 时相应提高 54.26%和 80.55%。

## 第 4 章 水解液驯化突变株 *Corynebacterium glutamicum* S9114-128 的高抑制物耐受性分子机理解析

### 4.1 引言

预处理过程中产生的多种抑制物,包括呋喃醛类、有机弱酸类和酚类物质,会影响后续发酵微生物的生长和发酵过程<sup>[28, 29]</sup>。其中呋喃醛类抑制物,主要包括糠醛和 5-羟甲基糠醛 (HMF),因其含量较高、毒性较强,一直是近年来抑制物研究的重点之一。对发酵菌株进行理性改造,构建具有高抑制物耐受性的工程菌株,是解决抑制物问题的重要方式。对发酵微生物进行理性设计改造,需要首先理解和掌握微生物对抑制物的耐受机理。近年来转录组学、蛋白质组学、代谢组学等系统生物学手段已被广泛应用于揭示发酵微生物对抑制物的耐受机理<sup>[188-190]</sup>,尽管如此,目前对于此分子机理仍不是完全清楚,这在一定程度上限制了发酵微生物理性改造策略的应用。

在抑制物胁迫条件下对发酵微生物进行适应性驯化是获得高抑制物耐受性工程菌株的另外一种可行方式<sup>[97, 98]</sup>。与理性改造不同,驯化策略不需要掌握微生物对抑制物的耐受机理。但是,该策略的缺点是与优势表型对应的基因型不易掌握,同时不易将该优势表型完整转移到其他菌株中。目前,高通量测序(二代测序)技术的应用为揭示驯化菌株中基因型改变与表型改变间的联系提供了可能<sup>[191, 192]</sup>。

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 为革兰氏阳性菌株,常用于氨基酸,主要是谷氨酸和赖氨酸的生产。近年来也被用于生产燃料和其他化学品,包括乙醇、异丁醇、乳酸和琥珀酸等<sup>[193]</sup>。*C. glutamicum* 在以木质纤维素为原料进行氨基酸等生物质产品生产过程中同样会受到糠醛、HMF 的抑制<sup>[194]</sup>,但目前关于 *C. glutamicum* 对呋喃醛抑制物的降解及耐受机理的相关研究较少。Tsuge 等人研究发现,与 *E. coli*、*S. cerevisiae*、*Z. mobilis* 等发酵菌株不同, *C. glutamicum* 除了可将糠醛还原为相应的糠醇外,还可进一步将糠醛氧化为相应的糠酸<sup>[195]</sup>,当敲除 *C. glutamicum* 中的醇脱氢酶基因 *fudC* 时,糠醛还原生成糠醇的能力显著下降,但当过表达 *fudC* 时却未能有效提高菌体对糠醛的耐受性能<sup>[196]</sup>。Park 等人采用基因芯片技术对糠醛胁迫下的 *C. glutamicum* 进行转录水平分析,结果显示糠醛主要影响胞内氧化压力应激、葡糖糖代谢、呼吸链以及物质转运等生物学过程,当在 *C. glutamicum* 中过表达在糠醛胁迫下显著差异上调表达的通透酶基因 *cg1661* 时,糠醛耐受性得到明显提高<sup>[197]</sup>。

*C. glutamicum* S9114 是我国谷氨酸工业生产的常用菌株之一,其全基因组测序工作已于 2011 年完成<sup>[198]</sup>。实验室之前的研究工作中,通过在 15% 固含量玉米秸秆水解液(含糠醛 0.38 g/L、HMF 0.21 g/L)中对 *C. glutamicum* S9114 进行连续转接培养(128 天),得到一株具有高呋喃醛抑制物耐受性的驯化菌株,命名为 *C. glutamicum* S9114-128。为了揭示该驯化菌株抑制物耐受性增强的分子机理,本研究借助高通量测序技术对其进行基因组重测序,并对检测得到的突变位点相关基因进行相应功能验证,尝试筛选与抑制

物耐受性增强有关的关键基因。本研究工作可为将来研究其他类型的驯化菌株以及构建其他抑制物耐受型发酵微生物工程菌株提供重要的参考依据。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 实验材料

#### 4.2.1.1 实验菌株与主要原料及试剂

本研究中使用到的菌株及质粒见表 4.1。*C. glutamicum* S9114 购自上海工微所科技有限公司（原上海市工业微生物研究所）菌种保藏中心（Shanghai Industrial Microbiology Institute Tech., China）。*C. glutamicum* S9114-128 为源于 *C. glutamicum* S9114 的水解液驯化突变株，具有较高的呋喃醛抑制物耐受性。*E. coli* TOP10 用于基因克隆及质粒构建等基因操作。质粒 pTRCmob 用于目的基因在 *C. glutamicum* 中的过表达，自杀性质粒 pK18mobsacB 用于 *C. glutamicum* 中目的基因的敲除或替换，两质粒均由中国科学院天津工业生物技术研究所的孙际宾老师慷慨馈赠。

玉米秸秆于 2015 年秋季收获于中国内蒙古自治区临河区，收集以后的玉米秸秆经清洗除尘、105 °C 烘干后，利用 SF-300 机械粉碎机降低颗粒尺寸，粉碎后的原料密封保存备用。玉米秸秆含有纤维素 35.38%、半纤维素 24.62%、木质素 16.05%、灰分 3.47%。纤维素酶蔚蓝 LLC-4（液体酶）购自青岛康地恩生物集团，纤维素酶的滤纸酶活为 199.4 FPU/mL，纤维二糖酶活为 5,500 CBU/mL，蛋白含量为 75.85 mg/mL。

基因操作用酶制剂及相关试剂盒见 3.2.1.1 部分，RNA 提取、反转录及定量 PCR 用试剂及试剂盒见 2.2.1.1 部分。玉米浆购自山东龙力生物科技股份有限公司，卡那霉素购自北京普博欣生物科技有限责任公司，蔗糖购自上海泰坦科技股份有限公司。其它生化试剂（分析纯）购自国药集团化学试剂有限公司或上海凌峰化学试剂有限公司。

#### 4.2.1.2 培养基与培养条件

*C. glutamicum* 菌株固体培养使用 Luria-Bertani (LB) 培养基（蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、NaCl 10 g/L 和琼脂 15 g/L），30 °C 培养；液体培养使用合成培养基，30 °C，200 rpm 培养。培养过表达重组菌株时需要添加终浓度为 50 µg/mL 的卡那霉素。液体合成培养基包括以下三种：

预培养培养基：葡萄糖 25 g/L、玉米浆 25 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L、尿素 2.5 g/L、FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L、MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。起始 pH 用氢氧化钠调节至 pH 7.0。

种子培养基：葡萄糖 25 g/L、玉米浆 5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L、尿素 2.5 g/L、FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L、MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。起始 pH 用氢氧化钠调节至 pH 7.0。

发酵培养基：葡萄糖 60 g/L、玉米浆 0.5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L、尿素 3 g/L、FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L、MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。起始 pH 用氢氧化钠调节至 pH 7.0。

上述培养基中 FeSO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub> 极易氧化，需配制成母液，浓度为 400 mg/L，经 0.22 µm 无菌滤膜过滤后现配现用；MgSO<sub>4</sub> 配制为 120 g/L 母液，玉米浆配制为 300 g/L 母液。

*E. coli* 菌株培养于 Luria-Bertani (LB) 培养基（蛋白胨 10.0 g/L、酵母浸粉 5.0 g/L

表 4.1 本研究中用到的菌株、质粒和引物

Table 4.1 Microbial strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Genotype	Sources/ references
<i>C. glutamicum</i> S9114	Wild-type strain	SIMI
<i>C. glutamicum</i> S9114-128	Adapted strain from <i>C. glutamicum</i> S9114, high tolerance to furan aldehyde inhibitors	[199]
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>C. glutamicum</i> S9114-ΔRS14945	In-frame deletion of CGS9114_RS14945 in <i>C. glutamicum</i> S9114	This study
<i>C. glutamicum</i> S9114-RS14945 <sup>D47A</sup>	Replacement of CGS9114_RS14945 with CGS9114_RS14945 <sup>D47A</sup> in <i>C. glutamicum</i> S9114	This study
Plasmids	Phenotype	Sources/ references
pTRCmob	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle cloning vector, <i>Km<sup>r</sup></i> , <i>P<sub>trc</sub></i> , <i>RP4-mob</i> region instead of <i>lacI<sup>q</sup></i>	[200]
pK18mobsacB	<i>Km<sup>r</sup></i> ; suicide vector containing the <i>sacB</i> gene from <i>Bacillus subtilis</i>	[201]
pTRCmob-RS08730	CGS9114_RS08730 from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob	This study
pTRCmob-RS08730 <sup>228DEL6</sup>	CGS9114_RS08730 <sup>228DEL6</sup> from <i>C. glutamicum</i> S9114-128 in pTRCmob	This study
pTRCmob-RS03450	CGS9114_RS03450 from <i>C. glutamicum</i> S9114-128 in pTRCmob	This study
pTRCmob-RS11050	CGS9114_RS11050 from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob	This study
pK18mobsacB-ΔRS14945	Flanking regions of CGS9114_RS14945 from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pK18mobsacB, for gene knockout	This study
pK18mobsacB-RS14945 <sup>D47A</sup>	Flanking regions and CGS9114_RS14945 <sup>D47A</sup> from <i>C. glutamicum</i> S9114-128 in pK18mobsacB, for gene insert	This study
Primers	Forward and reverse sequences	
CGS9114_RS14945-F*	GTGGCTGCTAGCGCTC	
CGS9114_RS14945-R*	CTAAATTGAGTAGTCCGCAGG	
CGS9114_RS11055-F*	ATGGAAATGCTCGGCTAAATC	
CGS9114_RS08730-F*	CGCGGATCCATGGCACGTATGCAGGAA	
CGS9114_RS08730-R*	ACGCGTCGACCTACGCGGTCTTTTCTTCTG	

---

CGS9114_RS03450-F*	CGCGGATCCGTGAGCAGCGCTAGTACTTTC	
CGS9114_RS03450-R*	ACGCGTCTGACTTAAGCCTTGAAAGCCTCG	
CgS9114_03533-F	CGCGGATCCGTGCCACAGCAACCTAAGC	
CGS9114_RS11050-F	CCGGAATTCGTGGCTACTGTGGCTGATGTG	
CGS9114_RS11050-R*	ACGCGTCTGACTTAGACTGCTGCGTCGATCAC	
CGS9114_RS14945-Up-F	AAAACCTGCAGCATGCAGGTACAGGCATCAC	
CGS9114_RS14945-Up-R	TCCAGCAAGTCCACCATCAAGGAACACCAACAGCTTCAAGATACGACGAACTGTCTAAC	
CGS9114_RS14945-Down-F	TTGTCTATATTGGTGTTAGACAGTTCGTCGTATCTTGAAGCTGTTGGTGTTCCTTGATG	
CGS9114_RS14945-Down-R	CCCAAGCTTCCTTGGTCTTTACTGGGCAC	
<b>CGS9114_RS00955</b>	(F) CGCAACTCAACTTGACCTTCC	(R) CTAAGTGGAAAGGTCCAGCAC
<b>CGS9114_RS07940</b>	(F) GAAGACCCACTTGCTCTCGC	(R) TCGGCAGCATTGGACAGTC
<b>CGS9114_RS02860</b>	(F) AGATTGCTGATGAAATCCATGC	(R) CCGAACACCATAACGAGTGG
<b>CGS9114_RS09335</b>	(F) AGCAAATCGACTGGATCCG	(R) GTTGTCGTACCACACGTAAAGC
<b>CGS9114_RS06410</b>	(F) ACTTCGCGTTCCAGTTATCAC	(R) AGTGGCTCTTCGGAGTAAGC
<b>CGS9114_RS12105</b>	(F) ACATCGCAGCCATCTCCTTC	(R) ATGGTCTCGATTTTGAGGACG
<b>CGS9114_RS07465</b>	(F) AAGCGTGGCGTTATTTCTAC	(R) AGCGAACTGCCTCATTGG
<b>CGS9114_RS10055</b>	(F) AAGACGCTCCTGAAATCAAGTAC	(R) CGGACAGAGCGAAGCTTATC
<b>CGS9114_RS06460</b>	(F) AGATGGCTTCAACCCTGAGTC	(R) CCACGGCAATCTCAGTAACAC
<b>CGS9114_RS07055</b>	(F) GCGTGATTGTCACTGCCAC	(R) TCGATGCGCTTGTAAGTGTG
<b>CGS9114_RS06470</b>	(F) TCCAACAACACCGTGATCAAG	(R) GTTGAGGATGGATCCCATAGC
<b>CGS9114_RS06465</b>	(F) CAAACACCGTCAACACCATG	(R) CTGGAAGACATCTGCCAAGTC
<b>CGS9114_RS12100</b>	(F) AACTGTCCTGGACTCCGCTAG	(R) GACAGGACTGGAAGTTCAGTGTC
<b>CGS9114_RS12060</b>	(F) CACAGGTACGCAAGGAAGTTG	(R) GTAGGCACGACCGATGAGAG
<b>CGS9114_RS02700</b>	(F) CATGGGCGATTACCAGTGAG	(R) ACTCCAGAAAGCACGTCCATC
<b>CGS9114_RS07420</b>	(F) GCGTTTACTTCGTGAGTGAAATG	(R) TGGAATCGGAGAAACCAATAAC
<b>CGS9114_RS12025</b>	(F) CTAAGTAACCGTGGCATCACTG	(R) GGCATTGGATCGGAGTTTG

---

CGS9114_RS02730	(F) GGACAAAGCAACTGAGAAGCTC	(R) TCGTCAGCCCAGAACTTGG
CGS9114_RS03450	(F) AGCGACCGCTGAAGAGTTC	(R) TGCTTCCCATGCAACGAC
CGS9114_RS04935	(F) GTGTTGGACCTCTGAACAACG	(R) GCATTGGGCTGGAGTATGG
CGS9114_RS04940	(F) GCAAAGCTTGTTACCTCTCC	(R) CACAGCGGTCAGTGAATG
CGS9114_RS08765	(F) TGTTGGAAACCCAGCGAAC	(R) GAGATCGCACGGTTGTGATC
CGS9114_RS03745	(F) CGATATTGTGGTTCTCGATTCC	(R) GGACACGCCAATGAATAGGTC
CGS9114_RS11385	(F) TGACACCCGTGTTATCGAGG	(R) GAATGTTGTCTGGGCGAATG
CGS9114_RS09005	(F) GGCTTCCACTCCCTCAACTAC	(R) GGTGCTTAACAGCGGTGAAG
CGS9114_RS09010	(F) GCAAGGGCTCCATCTACATC	(R) ATCCAGGTTGACGGAGGTG
CGS9114_RS14945	(F) TGTTGCAGCAGTGTTAGAGCAC	(R) CCAGCAAGTCCACCATCAAG
CGS9114_RS08325	(F) CTCTACCCAGGTCTGAAGAACC	(R) TCGGCCAGACAGATTAGTTTG
CGS9114_RS06335	(F) GAAACCTTTGACACCAACAAGG	(R) AATCAGTGCGACCAAAGTGG
CGS9114_RS03400	(F) TCGATAAGCCTGCCTACCTG	(R) GGAGATCACTTCGTTGAACTCG
CGS9114_RS03195	(F) GCTGATTTCCGTGAGACCAC	(R) CTCTTCCTGTCCGATTGTACG
CGS9114_RS02665	(F) GTCACTCCAGATGCTGCTTACC	(R) ATGCGTTGAATGCGGAGAG
CGS9114_RS02660	(F) TGGACTACCAAGCAGACAAGTTAG	(R) CTGGAACCTTTGATGGATTTCGAG
CGS9114_RS11050	(F) AAGTGGTTTTGCTGACATGTGC	(R) CCGATGGAAACAAAGTCCAG
CGS9114_RS11055	(F) GGCAGTAGACATGATTTTCGCAG	(R) GCTGAGAACAGCAACTGTGAAAG
CGS9114_RS11060	(F) TTAACCGTGGCATCGAACAG	(R) ACCTGCAAGAGCACAGTCTCC
CGS9114_RS11065	(F) GGCAGCCTACCTCTTTGGTAC	(R) GCAGGGTAGCAATGGACAAC
CGS9114_RS11070	(F) TGAGTACGACGACGAAATCTTG	(R) GTCGGAGGTGACGGTAACTTC
CGS9114_RS14440	(F) CCTTCGTATTCACCTCCTTGC	(R) CTGCATTGGAACGGTAGTCG
16S rRNA	(F) ACATTGGGACTGAGACACGG	(R) CTCCAGGTACCGTCACCATAG

Asterisk indicate the primers used for mutation validation by Sanger sequencing. Bold indicate the primers used for qRT-PCR analysis. The underlined letters indicate the restriction sites.

和 NaCl 10.0 g/L), 37 °C, 200 rpm 培养。根据需要添加终浓度为 50 µg/mL 的卡纳霉素。

*C. glutamicum* 电转用培养基包括感受态培养基 (LB 培养基添加 3% 甘氨酸和 0.1% Tween 80)、SOC 培养基 (蛋白胨 20 g/L、酵母浸粉 5 g/L、NaCl 0.5 g/L、KCl 2.5 mM、MgCl<sub>2</sub> 10 mM、葡萄糖 20 mM) 和 LB 蔗糖培养基 (LB 培养基添加 10% 蔗糖)。

#### 4.2.2 实验和分析方法

##### 4.2.2.1 玉米秸秆水解液的制备

玉米秸秆水解液的制备过程见 3.2.2.2 部分, 在发酵实验操作前需向水解液中补加相应的营养盐, 包括玉米浆 0.5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.6 g/L、尿素 3 g/L、FeSO<sub>4</sub> 2 mg/L、MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L。起始 pH 同样用氢氧化钠调节至 pH 7.0。

##### 4.2.2.2 基因组重测序

*C. glutamicum* 基因组 DNA 提取使用基因组提取试剂盒 TIANamp Bacterial DNA Kit。全基因组重测序由 Illumina HiSeq 2500 测序平台完成。测序原始结果经 Trimmomatic (v0.32) 修剪过滤后使用 SPAdes (v3.5.0) 进行基因组组装拼接, 并借助 QUAST (v2.3) 对拼接结果进行评估。以已公布的 *C. glutamicum* S9114 基因组 (GenBank: AFYA00000000) 为参考基因组, 使用 BWA MEM (v0.7.12) 进行序列比对, Snippy (v2.9) 检测 SNP 及小的 INDEL (插入缺失), Breseq (v0.27.1) 鉴定大的结构变异 (大的序列缺失)。对检测到的突变位点分别进行相应的 PCR 扩增和 Sanger 测序验证, PCR 扩增用引物见表 4.1。

##### 4.2.2.3 *C. glutamicum* 电转感受态制备与电转条件

用竹签挑取 LB 固体培养基新鲜活化后的单菌落于装有 5 ml LB 液体培养基的试管中, 30 °C, 200 rpm 培养 12-16 h。转接上述培养好的菌液 1 mL 至 50 mL 感受态培养基中, 30 °C, 200 rpm 培养 3-4 h 至微微浑浊, OD<sub>600</sub> 约 0.3 左右。将培养获得的菌液转移至 50 mL 离心管中冰浴 15 min, 4 °C, 5,000 rpm 离心 10 min, 弃上清收集细胞。每离心管用 30 mL 预冷的 15% 甘油重悬细胞, 4 °C, 5,000 rpm 离心 10 min, 弃上清收集细胞, 重复甘油重悬步骤两次。15% 甘油 100 µL 重悬细胞, 分装至 1.5 mL 离心管中, 每管 50-60 µL。

取适量质粒与感受态细胞 (最好现制现用) 轻柔混匀, 冰浴放置 30 min。期间将洗净的泡于无水乙醇中的电转杯 (直径 1 mm) 置于超净台中, 开启通风、紫外灭菌 15 min。待电转杯中的乙醇挥发完全后, 将感受态细胞转移至电转杯中, 置于冰上冰浴 15 分钟后电转。电转参数为 2,000 V, 25 µF, 200 Ω。电转完成后立即加入 800 µL SOC 培养基, 同时立即放入 46 °C 水浴 6 min。将电转菌液于 30 °C, 100 rpm 培养 1.5-2 h (质粒过表达) 或 3-4 h (基因敲除或插入)。培养结束后离心浓缩菌体, 涂布于含卡那霉素 (50 µg/ml) 的固体 LB 平板中, 30 °C 培养 24 小时以上可长出转化子。

##### 4.2.2.4 目的基因的扩增与重组菌株的构建

为了考察增加胞内基因 CGS9114\_RS03450 或 CGS9114\_RS11050 的拷贝数对葡萄糖代谢及菌体抑制物耐受性的影响, 以驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 基因组为模板, 以 CGS9114\_RS03450-F 与 CGS9114\_RS03450-R、CGS9114\_RS11050-F 与 CGS9114\_

RS11050-R 为引物分别扩增得到相应目的基因。基因 CGS9114\_RS03450 借助酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I、基因 CGS9114\_RS11050 借助酶切位点 *Eco*R I 和 *Sal* I 分别插入穿梭质粒 pTRCmob。构建好的各重组质粒首先经  $\text{CaCl}_2$  法转化至 *E. coli* Top10，再经电转转化法（见 4.2.2.3 部分）转化至 *C. glutamicum* S9114 中。

为鉴定突变基因 CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup> 的功能，分别以野生菌株 *C. glutamicum* S9114 基因组和驯化菌株 S9114-128 基因组为模板，以 CGS9114\_RS08730-F 与 CGS9114\_RS08730-R 为引物分别扩增得到基因 CGS9114\_RS08730（野生型）和 CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup>（突变型），借助酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I，将两基因分别插入穿梭质粒 pTRCmob。构建好的各重组质粒首先经  $\text{CaCl}_2$  法转化至 *E. coli* Top10，再经电转转化法（见 4.2.2.3 部分）转化至 *C. glutamicum* S9114 或 S9114-RS14945<sup>D47A</sup> 中。

为了在野生菌株 *C. glutamicum* S9114 中引入突变型基因 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup>，需要首先在 *C. glutamicum* S9114 中敲除野生型基因 CGS9114\_RS14945，然后再在相同位点整合插入突变型基因 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup>（图 4.1）。具体操作过程如下：以野生菌株 *C. glutamicum* S9114 基因组为模板，以 CGS9114\_RS14945-Up-F 与 CGS9114\_RS14945-Up-R、CGS9114\_RS14945-Down-F 与 CGS9114\_RS14945-Down-R 为引物分别扩增得到待敲除基因 CGS9114\_RS14945 的上游和下游同源臂，将两基因片段融合扩增后经酶切位点 *Pst* I 和 *Hind* III 插入自杀性质粒 pK18mobsacB 中，构建得到敲除质粒 pK18mobsacB- $\Delta$ RS14945。将敲除质粒电转化至 *C. glutamicum* S9114 中，利用同源重组技术并在 10% 蔗糖筛选压力条件下筛选得到 CGS9114\_RS14945 基因缺失菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ RS14945（图 4.1a）。其次，以驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 基因组为模板，以 CGS9114\_RS14945-Up-F 与 CGS9114\_RS14945-Down-R 为引物扩增得到含有突变基因及其上游和下游同源臂的基因片段，经酶切位点 *Pst* I 和 *Hind* III 插入自杀性质粒 pK18mobsacB 中，构建得到插入质粒 pK18mobsacB-RS14945<sup>D47A</sup>。将构建好的插入质粒电转至基因缺失菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ RS14945 中，再次利用同源重组技术并在 10% 蔗糖筛选压力条件下筛选得到 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> 插入替换菌株 *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup>（图 4.1b）。

#### 4.2.2.5 *C. glutamicum* 重组菌株的发酵性能分析

取甘油管保存菌种接种至 LB 固体平板培养基，30 °C 培养 36 h。用竹签挑取新鲜活化后的单菌落于装有 30 mL 预培养培养基的 250 mL 摇瓶中，30 °C，200 rpm 预培养 12 h；以 5% 接种量将预培养液转接入装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中，相同培养条件下培养 8 h；以 5% 接种量将种子培养液转接入装有 30 mL 发酵培养基或 15% 固含量玉米秸秆水解液的 250 mL 摇瓶中，30 °C，200 rpm 进行发酵培养。发酵过程中每隔一段时间（4 h 或 8 h）添加适量 20% 的尿素，维持 pH 7.0 左右，同时取 1 mL 上清，保存于 -20 °C 用于后续培养液各组分含量测定。上述发酵实验进行至少 2 次生物学重复。

葡萄糖、谷氨酸、乳酸含量采用山东科学院的 SBA-40D 生物传感分析仪测定。吡喃类衍生物含量测定见 3.2.2.3 部分。所有样品在分析前经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤处理。

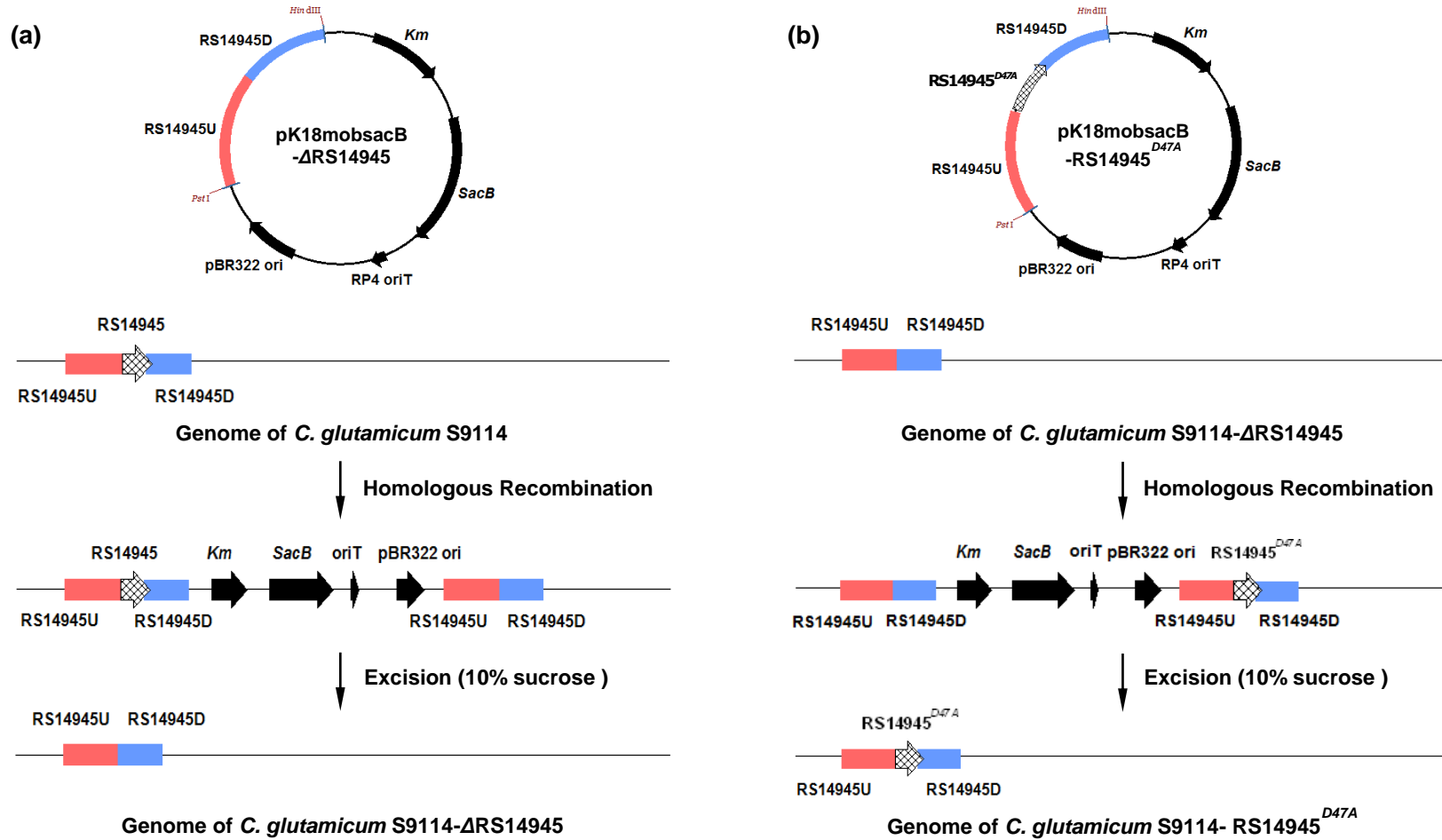


图 4.1 野生菌株 *C. glutamicum* S9114 中以基因 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> 替换基因 CGS9114\_RS14945 的构建过程

Fig. 4.1 The process for replacement of CGS9114\_RS14945 with CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> in the wild *C. glutamicum* S9114.

(a) Map of plasmid pK18mobsacB- $\Delta$ RS14945 and the construction of *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ RS14945 by deleting gene CGS9114\_RS14945 from the wild *C. glutamicum* S9114. (b) Map of plasmid pK18mobsacB-RS14945<sup>D47A</sup> and the construction of *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup> by inserting gene CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> in the newly constructed *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ RS14945.

## 4.2.2.6 qRT-PCR 实验

收集发酵培养基中培养 8 h 的 *C. glutamicum* 菌体。菌体收集、RNA 提取、反转录及 qRT-PCR 操作见 2.2.2.3 部分。qRT-PCR 用引物见表 4.1, PCR 反应以 16s rRNA 基因为内参基因。

## 4.3 结果与讨论

## 4.3.1 野生菌株与驯化菌株的表型差异及基因组重测序

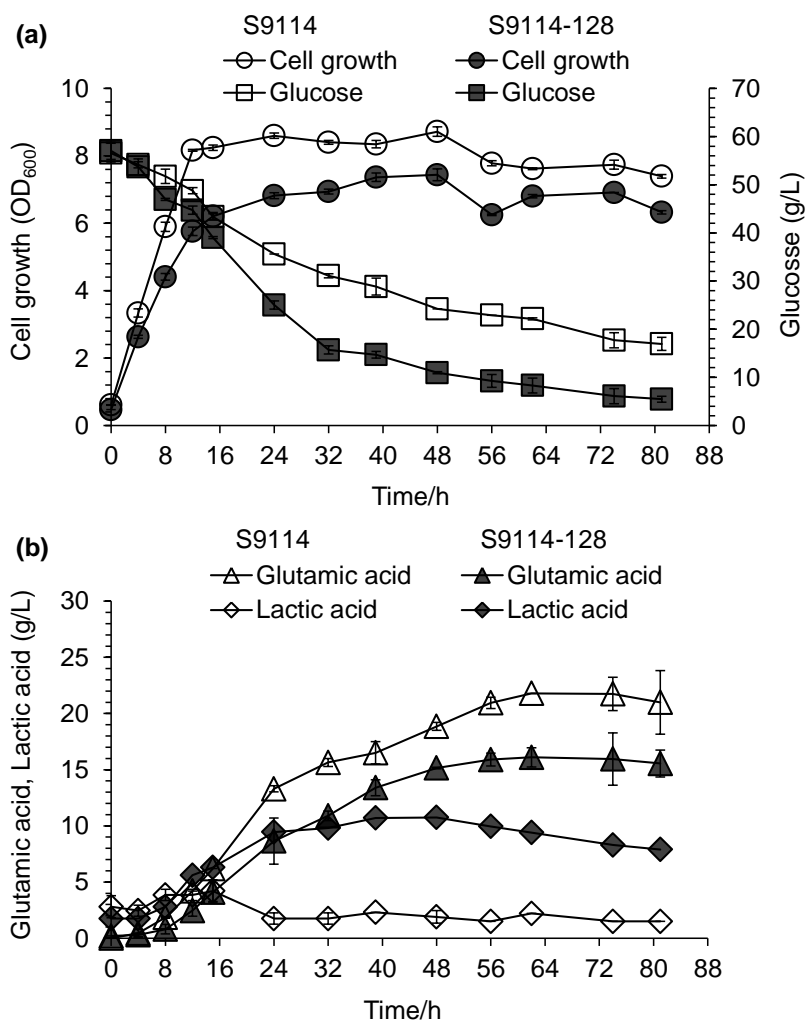


图 4.2 野生 *C. glutamicum* S9114 与驯化 *C. glutamicum* S9114-128 在发酵培养基中的发酵性能比较

Fig. 4.2 Fermentation performance comparison of the wild *C. glutamicum* S9114 and the adapted S9114-128 in fermentation medium.

(a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm and glucose consumption. (b) Glutamic acid and lactic acid production.

之前的研究显示, 与野生菌株 *C. glutamicum* S9114 相比, 水解液驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 对呋喃醛抑制物的耐受性得到明显增强, 添加抑制物 2 h 时, *C. glutamicum* S9114-128 对 1 g/L 的糠醛和 HMF 的转化率分别为 90.4% 和 63.8%, 较野生菌株分别提高 81.8% 和 76.1%<sup>[199]</sup>。为了进一步了解两菌株的表型差异, 在无抑制物肋

迫下的发酵培养基中对两菌株进行发酵培养。如 4.2.2.5 部分所述，将种子培养液转接至发酵培养基中，培养基中不添加任何抑制物，发酵结果如图 4.2 所示。

生长检测结果显示，驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 与野生菌株 *C. glutamicum* S9114 均可在 12 h 左右达到生长稳定期，但 *C. glutamicum* S9114-128 的最大生物量（OD600 约 7.0）明显低于 *C. glutamicum* S9114（OD600 约 8.5）。尽管 *C. glutamicum* S9114-128 的菌体量较低，但葡萄糖消耗速率明显高于野生菌株，发酵结束（81 h）时，*C. glutamicum* S9114-128 葡萄糖剩余 5.45 g/L，野生菌株则剩余 16.95 g/L（图 4.2a）。随着葡萄糖的快速消耗，谷氨酸开始大量积累。驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 在生成谷氨酸的同时会伴随产生大量乳酸，最高时可超过 10 g/L，而野生菌株在谷氨酸生成过程中乳酸积累很少（低于 4 g/L），且随着谷氨酸积累量的增加，乳酸不断下降，24 h 后维持在 2.5 g/L 以下。在谷氨酸积累过程中，*C. glutamicum* S9114-128 的谷氨酸产量始终低于野生菌株（图 4.2b）。鉴于发酵培养基中观察到的这一意外现象，认为 *C. glutamicum* S9114-128 经水解液长期驯化后代谢流可能发生偏移，流向乳酸生成方向的流量增加，流向谷氨酸积累及菌体生长方向的流量减少。

为更好地揭示导致野生菌株 *C. glutamicum* S9114 与驯化菌株 S9114-128 表型差异（本研究中意外观察到的可能的代谢流偏移现象和之前的研究中观察到的抑制物耐受性提高现象）的分子机理，本研究采用高通量测序技术，对驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 进行全基因组重测序，同时以野生菌株 S9114 为对照。重测序结果显示尽管在玉米秸秆水解液中经过了长达三个月的适应性驯化，驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 与原始菌株 S9114 基因型仍非常相似。*C. glutamicum* S9114-128 中共计得到 7 个突变位点。其中，五个突变位点为 SNP 突变，两个突变位点为缺失突变；五个 SNP 突变位点中，三个为同义突变，一个为非同义突变，一个位于基因间区（表 4.2）。以下将分别对上述两个缺失突变，一个非同义突变和一个基因间区突变相关的基因进行功能验证，其中两个缺失突变位点分别涉及  $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶基因 CGS9114\_RS03450 和酪蛋白水解蛋白（Clp）的 ATP 结合亚基 ClpX 基因 CGS9114\_RS08730，非同义 SNP 突变位点位于转录调控子 McbR 基因 CGS9114\_RS14945，基因间区 SNP 突变位点位于磷酸烯醇式丙酮酸蛋白磷酸转移酶基因 CGS9114\_RS11050 和 DeoR 家族转录调控子基因 CGS9114\_RS11055 之间。

#### 4.3.2 葡萄糖的转运及代谢与 *C. glutamicum* S9114-128 的表型改变

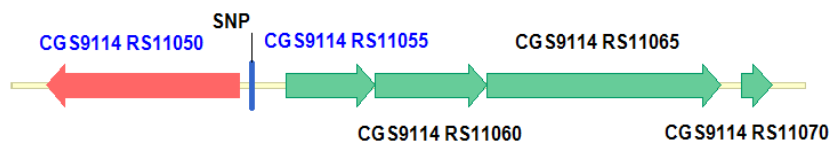


图 4.3 *C. glutamicum* S9114-128 基因组中 CGS9114\_RS11050 与 CGS9114\_RS11055 间区突变位点相关信息展示

Fig. 4.3 Information of the intergenic mutation between CGS9114\_RS11050 and CGS9114\_RS11055 in the genome of *C. glutamicum* S9114-128

表 4.2 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中的突变位点汇总Table 4.2 Mutations present in the adapted strain *C. glutamicum* S9114-128

Contigs	Position	Type	Reference	Allele	Protein Change <sup>a</sup>	Locus_tag <sup>b</sup>	Description
Contig05	156797	Deletion	AGGGGGGGA	AGGGGGGA	T42fs	<b>CGS9114_RS03450</b>	alpha-ketoglutarate decarboxylase
Contig07	154636	SNP	C	T	L32L	CGS9114_RS05445	hypothetical protein
Contig11	138150	Deletion	ATCCCACCGC AAGGCGGACG	AG	I228_R234delinsS	<b>CGS9114_RS08730</b>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
Contig12	10298	SNP	A	G	P477P	CGS9114_RS09335	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Contig16	15443	SNP	T	C	P335P	CGS9114_RS10900	RNA methyltransferase
Contig16	51170	SNP	T	C	Intergenic	<b>CGS9114_RS11050</b> <b>/CGS9114_RS11055</b>	intergenic,phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase/DeoR family transcriptional regulator
Contig32	15983	SNP	T	G	D47A	<b>CGS9114_RS14945</b>	transcriptional regulator McbR

<sup>a</sup> fs, short for frameshift; delins, short for deletion and insertion

<sup>b</sup> Bold genes indicate the genes selected for further analysis.

重测序结果显示基因 CGS9114\_RS11050 和基因 CGS9114\_RS11055 间区发生点突变 (T>C), 如图 4.3 所示。基因 CGS9114\_RS11050 编码磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统 (PTS) E1 组分磷酸烯醇式丙酮酸蛋白磷酸转移酶 (*ptsI*), 基因 CGS9114\_RS11055 编码 DeoR 家族转录调控子 (*fruR*)。相关文献显示, *C. glutamicum* S9114 中上述 DeoR 调控子负调控相邻五个基因的转录水平, 包括 CGS9114\_RS11050 (*ptsI*)、CGS9114\_RS11055 (*fruR*)、CGS9114\_RS11060 (1-磷酸果糖激酶基因, *pfkBI*)、CGS9114\_RS11065 (特异性果糖转运蛋白基因, *ptsF*) 和 CGS9114\_RS11070 (磷酸载体蛋白 HPr 激酶基因, *ptsH*) (图 4.3), 其中 *ptsI*、*ptsH* 与另外一个基因 CGS9114\_RS14440 (特异性葡萄糖转运蛋白基因, *ptsG*) 共同负责 *C. glutamicum* S9114 中葡萄糖的转运, *pfkBI* 和 *ptsF* 则与果糖转运相关<sup>[202, 203]</sup>。鉴于以上分析猜测 *C. glutamicum* S9114-128 中的基因间区突变可能与胞内葡萄糖代谢流偏移向乳酸生成有关。为验证上述观点, 选取上述与糖转运相关的 6 个基因以及中心碳代谢路径中的相关作用基因, 以发酵培养基中培养 8 h 的菌体 RNA 为模板进行转录水平分析 (表 4.3)。

以野生菌株为对照, 糖转运相关基因的转录定量结果显示 (表 4.3), 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中 DeoR 转录调控子基因 CGS9114\_RS11055 (*fruR*) 明显差异下调表达 (下调表达几乎为 0); 葡萄糖转运相关基因 CGS9114\_RS11050 (*ptsI*, 2.24 倍) 明显上调表达, CGS9114\_RS11070 (*ptsH*, 1.05 倍) 与 CGS9114\_RS14440 (*ptsG*, 1.00 倍) 表达量几乎不变; 果糖转运相关基因 CGS9114\_RS11060 (*pfkBI*) 与 CGS9114\_RS11065 (*ptsF*) 明显差异下调表达 (下调表达几乎为 0)。中心碳代谢相关基因的转录定量结果显示 (表 4.3), 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中糖酵解路径中的甘油醛三磷酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS09335 (2.23 倍), 戊糖磷酸路径中的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS06460 (2.02 倍)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS07055 (1.50 倍) 和转醛醇酶基因 CGS9114\_RS06465 (1.79 倍) 分别上调表达超过 1.5 倍; 同时, 乳酸合成路径中乳酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS02700 (2.21 倍) 明显上调表达超过 2 倍。

转录定量结果与之前的发酵实验结果 (图 4.2) 相符, 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中位于基因 CGS9114\_RS11050 和基因 CGS9114\_RS11055 间区的 SNP 突变可导致葡萄糖转运相关基因, 尤其是 CGS9114\_RS11050 (*ptsI*) 的明显上调表达, 促进葡萄糖向胞内的转运; 葡萄糖转运的加快不仅导致糖酵解路径以及戊糖磷酸路径中相关基因的上调表达, 还导致乳酸脱氢酶基因 (CGS9114\_RS02700) 的明显上调表达, 使得驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 在加快葡萄糖代谢的同时生成大量乳酸。基于以上分析认为驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中位于基因间区的突变是导致菌株葡萄糖代谢加快以及代谢流偏向乳酸生成的重要因素。此外, 本研究还进一步猜测 *C. glutamicum* S9114-128 中葡萄糖代谢的加快可以为呋喃醛抑制物的转化提供更多的还原力和能量, 即上述基因间区突变还与驯化菌株对呋喃醛抑制物的耐受性增强有关。为验证上述推论, 本研究将转录定量结果 (表 4.3) 中明显上调表达的葡萄糖转运基因 CGS9114\_RS11050 在野生菌株 *C. glutamicum* S9114 中进行质粒过表达, 并在发酵培养基和 15% 固含量玉米

表 4.3 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中与糖转运及中心碳代谢相关的基因的转录表达  
Table. 4.3 Transcriptional expression of relevant genes involved in sugar transport and central carbon metabolism in the adapted *C. glutamicum* S9114-128

Locus_tag	Product	Foldchange <sup>a</sup>
<b>Sugar transport</b>		
CGS9114_RS11050	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	2.24 ± 0.28
CGS9114_RS11055	Deor family transcriptional regulator	0.01 ± 0.00
CGS9114_RS11060	1-phosphofructokinase	0.01 ± 0.00
CGS9114_RS11065	Fructose/mannitol-specific enzyme II ABC component of PTS	0.01 ± 0.00
CGS9114_RS11070	Phosphocarrier protein hpr kinase	1.05 ± 0.15
CGS9114_RS14440	Glucose-specific enzyme II ABC component of PTS	1.00 ± 0.12
<b>Central carbon metabolism</b>		
CGS9114_RS00955	Hexokinase	1.34 ± 0.18
CGS9114_RS07940	Hexokinase	0.61 ± 0.08
CGS9114_RS02860	6-phosphofructokinase	1.30 ± 0.19
CGS9114_RS06410	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.05 ± 0.08
CGS9114_RS09335	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.23 ± 0.31
CGS9114_RS07465	Pyruvate kinase	0.99 ± 0.05
CGS9114_RS12105	Pyruvate kinase	1.01 ± 0.19
CGS9114_RS10055	Pyruvate dehydrogenase E1 component	1.23 ± 0.15
CGS9114_RS06460	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	2.02 ± 0.37
CGS9114_RS07055	6-phosphogluconate dehydrogenase	1.50 ± 0.05
CGS9114_RS06470	Transketolase	1.48 ± 0.08
CGS9114_RS06465	Transaldolase	1.79 ± 0.23
CGS9114_RS02700	Lactate dehydrogenase	2.21 ± 0.10
CGS9114_RS12060	Lactate dehydrogenase	0.44 ± 0.06
CGS9114_RS12100	Lactate dehydrogenase	0.97 ± 0.09
CGS9114_RS02730	Isocitrate dehydrogenase	1.54 ± 0.23
CGS9114_RS03450	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	2.05 ± 0.40
CGS9114_RS04935	Succinate dehydrogenase	1.49 ± 0.29
CGS9114_RS04940	Succinate dehydrogenase	1.66 ± 0.33
CGS9114_RS08765	Malate dehydrogenase	0.88 ± 0.05
CGS9114_RS11385	Malate dehydrogenase (quinone)	1.10 ± 0.15
CGS9114_RS09005	Isocitrate lyase	0.72 ± 0.19
CGS9114_RS09010	Malate synthase	0.43 ± 0.16
CGS9114_RS07420	Glutamate dehydrogenase	0.63 ± 0.04
CGS9114_RS12025	Glutamate dehydrogenase	0.25 ± 0.10

<sup>a</sup> The red and green ratio value indicate up-regulated (more than 1.5-fold) and down-regulated (less than 0.75-fold), respectively.

秸秆水解液中对构建得到的过表达重组菌株进行谷氨酸发酵性能分析和抑制物转化性能分析。玉米秸秆水解液含葡萄糖 53.77 g/L、木糖 31.72 g/L、乙酸 5.21 g/L、糠醛 0.43 g/L 和 HMF 0.46 g/L。

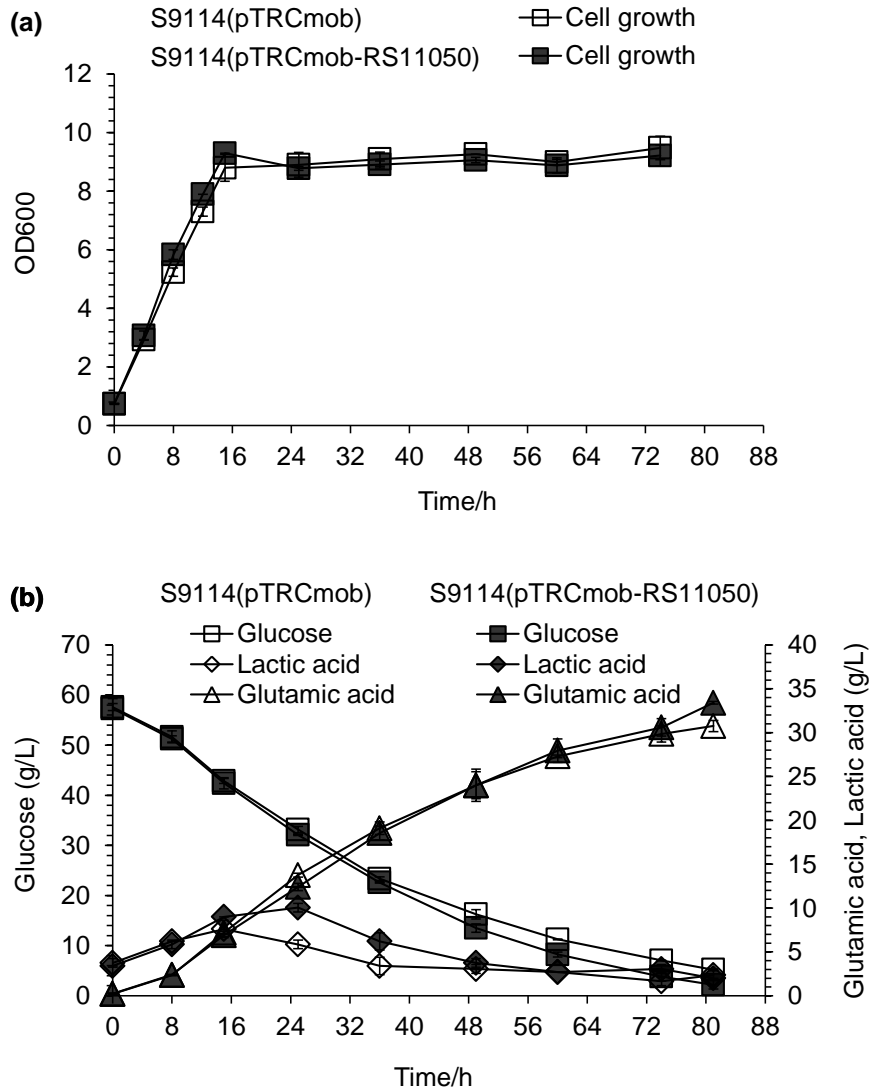


图 4.4 重组菌株 *C. glutamicum* S9114(pTRCmob) 与 S9114(pTRCmob-RS11050) 在发酵培养基中的发酵性能分析

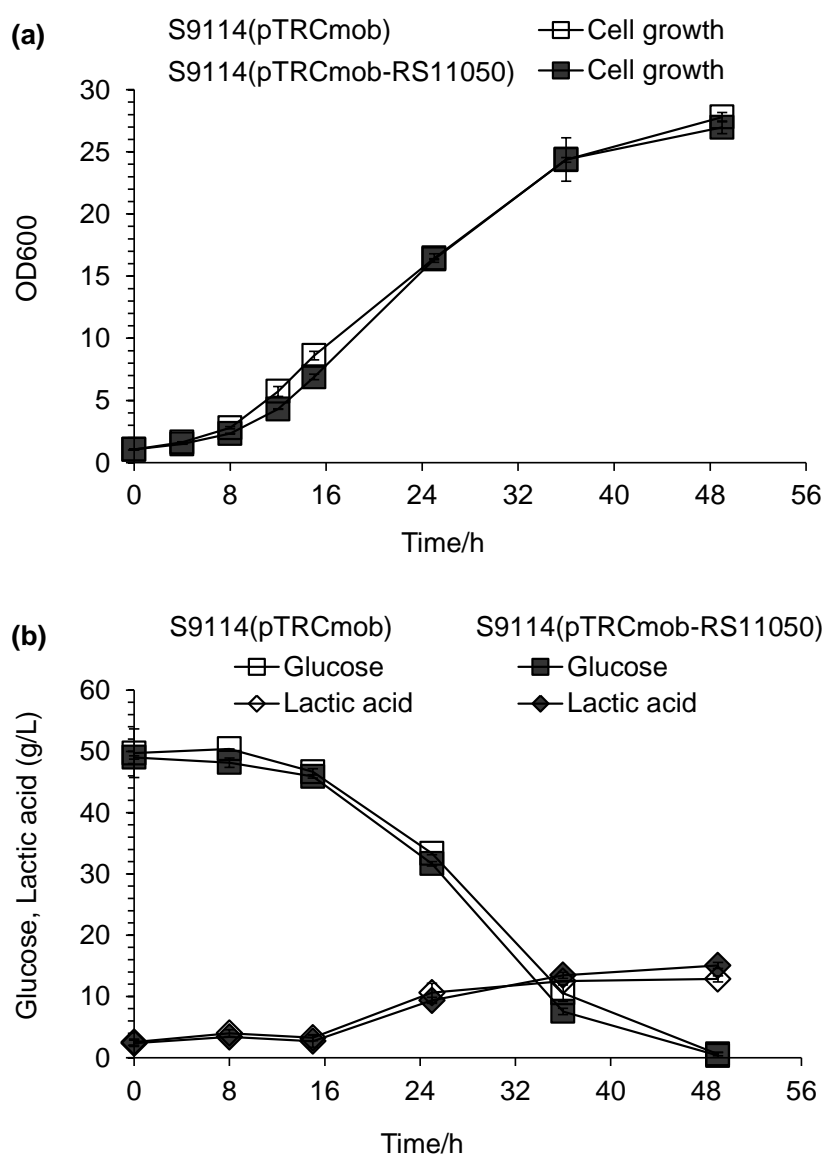
Fig. 4.4 Fermentation performance of the recombinant *C. glutamicum* S9114(pTRCmob) and S9114(pTRCmob-RS11050) in fermentation medium

*C. glutamicum* S9114(pTRCmob), containing the blank plasmid only; S9114(pTRCmob-RS11050), expressing gene CGS9114\_RS11050. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Glucose consumption and glutamic acid and lactic acid production.

图 4.4 展示了过表达重组菌株在发酵培养基中的发酵培养结果。菌体生长检测结果（图 4.4a）显示过表达基因 CGS9114\_RS11050 的重组菌株与对照菌株（含空载质粒）几乎没有区别。与对照菌株相比，发酵培养 36 h 后，过表达菌株的葡萄糖消耗速率加快，但加快程度并不明显，至发酵结束（81 h）时，过表达菌株的葡萄糖剩余 2.2 g/L，对照

菌株剩余 5.2 g/L；发酵过程中，过表达菌株与对照菌株的谷氨酸生成率几乎没有区别；在谷氨酸积累对数前期，过表达菌株的乳酸生成有明显增加，24 h 时达到最高约为 10.0 g/L，但随发酵时间延长，乳酸积累下降，48 h 时降至与对照菌株相当的水平，直至发酵结束（图 4.4b）。发酵培养基中的培养结果显示，单一过表达基因 CGS9114\_RS11050 可部分促进葡萄糖的代谢，但促进程度非常有限；单一过表达基因 CGS9114\_RS11050 时并不能引起葡萄糖代谢流明显偏向乳酸生成，同时也不会降低葡萄糖代谢流流向菌体生成。上述结果与之前的预期不相符，分析认为在驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中还有其他一个或多个基因与 CGS9114\_RS11050 共同作用引起葡萄糖代谢流的偏移。

图 4.5 展示了过表达重组菌株在玉米秸秆水解液中的发酵培养结果。过表达菌株与对照菌株（含空载质粒）在生长、葡萄糖消耗和抑制物转化方面几乎完全相同，表明单一过表达基因 CGS9114\_RS11050 并不能有效改善菌体对抑制物的耐受性。



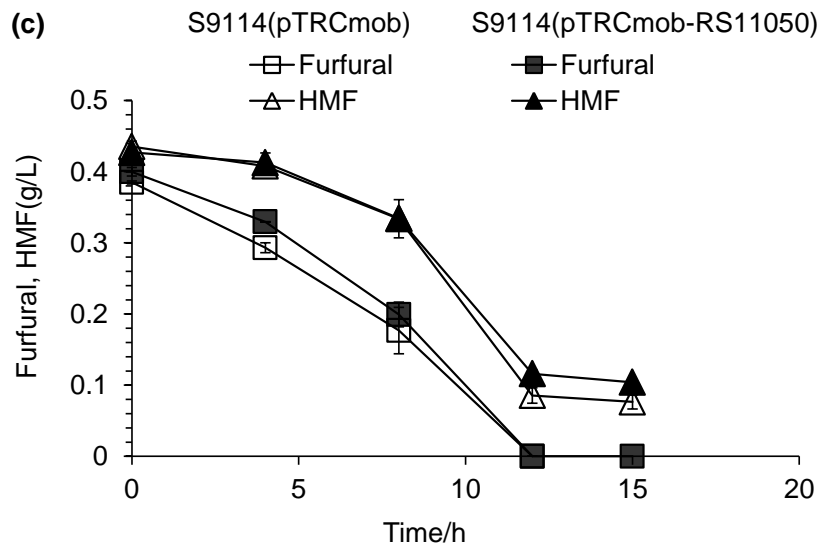


图 4.5 重组菌组 *C. glutamicum* S9114(pTRCmob)与 S9114(pTRCmob-RS11050)在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 4.5 Fermentation performance of the recombinant *C. glutamicum* S9114(pTRCmob) and S9114(pTRCmob-RS11050) in corn stover hydrolysate

*C. glutamicum* S9114(pTRCmob), containing the blank plasmid only; S9114(pTRCmob-RS11050), expressing gene CGS9114\_RS11050. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Glucose consumption and lactic acid production. (c) Conversion of furan inhibitors.

#### 4.3.3 *odhA* 基因的相关突变与 *C. glutamicum* S9114-128 的表型改变

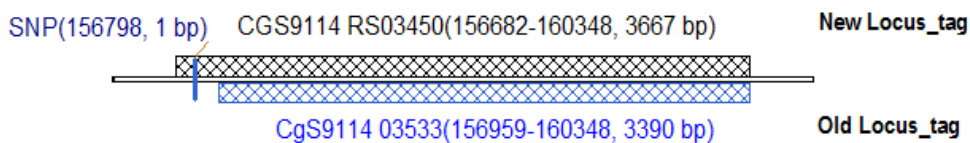


图 4.6 *C. glutamicum* S9114 基因组中 *odhA* 基因相关突变位点信息

Fig. 4.6 Information of the mutation related to the *odhA* gene in the genome of *C. glutamicum* S9114. CGS9114\_RS03450 is annotated as the *odhA* gene (pseudo) in the second genome annotation (New Locus\_tag); CgS9114\_03533 is annotated as the *odhA* gene in the first genome annotation (Old Locus\_tag); SNP represents the deletion mutation in *C. glutamicum* S9114-128.

重测序结果显示基因 CGS9114\_RS03450 在第 140 位发生碱基缺失突变（缺失一个碱基 G）。基因组注释信息显示 CGS9114\_RS03450 编码  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系（ODHC）中的 E1 组分， $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶（OdhA），但被标注为假基因（3667 bp）。需要特别指出的是，在 *C. glutamicum* S9114 基因组第一次功能注释信息（本研究主要依据第二次功能注释信息）中，编码 OdhA 的基因为 CgS9114\_03533，该基因为可编码正常功能蛋白的基因（3390 bp）。对比两次基因组功能注释信息（图 4.6）发现，若依据第一次注释信息（OdhA 由基因 CgS9114\_03533 编码），上述单碱基缺失突变位点位于 *odhA* 基因的上游区域（-160 区）；若依据第二次注释信息（OdhA 由基因 CGS9114\_RS03450 编码），

上述单碱基缺失突变位点位于 *odhA* 基因内部, 可将假基因突变为可编码正常功能蛋白的基因。

之前的研究显示, 谷氨酸生产菌株中 ODHC 活性与谷氨酸合成直接相关, ODHC 活性先天性地丧失或失活是谷氨酸生产菌株糖代谢的一个重要特征; 过表达 *odhA* 增加 ODHC 活性时不利于谷氨酸的积累<sup>[204]</sup>, 敲除 *odhA* 时则可促进谷氨酸的大量积累<sup>[205]</sup>。结合之前的发酵结果, 即驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 在合成培养基中的谷氨酸积累下降 (图 4.2), 推测认为 *C. glutamicum* S9114-128 中 *odhA* 基因位点处的单碱基缺失突变与菌株谷氨酸积累下降有关。

以发酵培养基中培养 8 h 的菌体 RNA 为模板, 对 TCA 循环、乙醛酸循环以及谷氨酸合成相关基因进行转录水平分析 (表 4.3)。结果显示, 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中 TCA 循环中的异柠檬酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS02730 (1.54 倍)、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS03450 (CgS9114\_03533) (2.05 倍) 和琥珀酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS04940 (1.66 倍) 分别上调表达超过 1.5 倍; 乙醛酸循环中的异柠檬酸裂解酶基因 CGS9114\_RS09005 (0.72 倍) 和苹果酸合酶基因 CGS9114\_RS09010 (0.43 倍) 分别下调表达; 谷氨酸合成路径中的谷氨酸脱氢酶基因 CGS9114\_RS07420 (0.63 倍) 和 CGS9114\_RS12025 (0.25 倍) 均差异下调表达。转录定量结果证实, *C. glutamicum* S9114-128 中 *odhA* 基因位点处的单碱基缺失突变导致乙醛酸循环代谢下降, TCA 循环代谢增强, 进而与谷氨酸合成路径竞争  $\alpha$ -酮戊二酸, 不利于谷氨酸的积累。然而, 由于分别以野生菌株与驯化菌株的 cDNA 为模板时, 均可以扩增得到基因 CgS9114\_03533 和基因 CGS9114\_RS03450 (图 4.6), 即未能从转录水平层面证实各菌株中 *odhA* 基因的真实转录本, 因而无法确定 *C. glutamicum* S9114-128 中 TCA 循环代谢的增强和谷氨酸合成的下降是由于 *odhA* 基因位点处的缺失突变导致 *odhA* 转录上调表达 (依据第一次注释信息) 所致, 还是由于缺失突变导致 *odhA* 编码蛋白活性改变 (依据第二次注释信息) 所致。尽管如此, 鉴于上述分析, 本研究推测认为 *C. glutamicum* S9114-128 中 *odhA* 基因位点处的单碱基缺失突变虽然不利于谷氨酸的积累但该缺失突变导致的 TCA 循环代谢的增强可能为菌株抵抗呋喃醛抑制物的胁迫提供了更多的还原力和能量, 增强了菌体对抑制物的耐受性。

综合以上分析, 本研究将突变基因 CGS9114\_RS03450 (3666 bp) 在野生菌株 *C. glutamicum* S9114 中进行质粒过表达, 并在 15% 未脱毒玉米水解液中对重组菌株进行发酵培养。发酵结果显示 (图 4.7) 过表达突变基因 CGS9114\_RS03450 的重组菌株与对照菌株在生长、葡萄糖消耗和抑制物转化方面几乎完全相同, 表明单一过表达该基因时同样不能有效增强菌株对呋喃醛抑制物的耐受性。

#### 4.3.4 *clpX* 基因的缺失突变与 *C. glutamicum* S9114-128 的表型改变

重测序结果显示基因 CGS9114\_RS08730 在第 683 位缺失 18 个碱基对, 相应的编码蛋白从第 228 位的异亮氨酸至 234 位的精氨酸变为一个丝氨酸, 记突变基因为 CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup>。基因组注释信息显示基因 CGS9114\_RS08730 编码胞内酪蛋

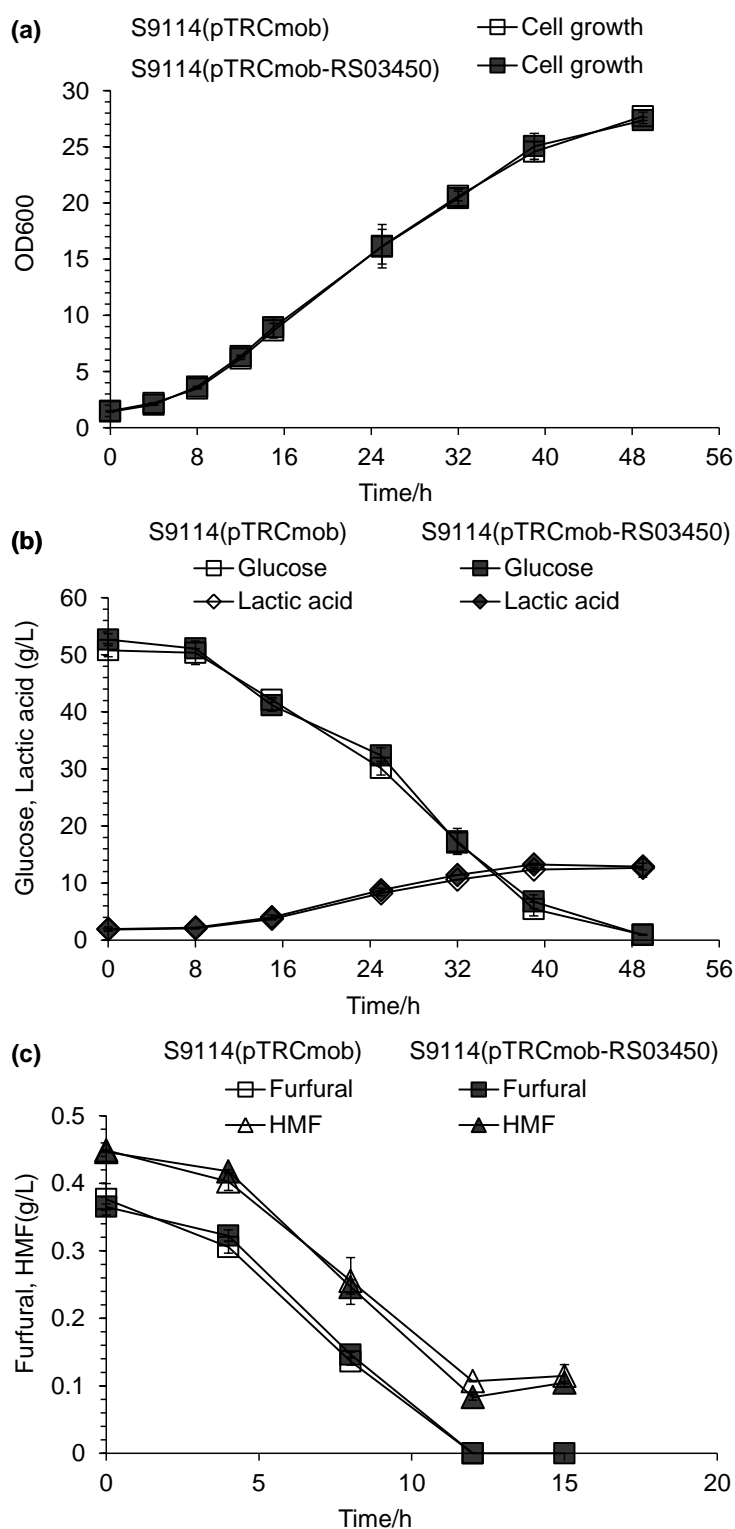
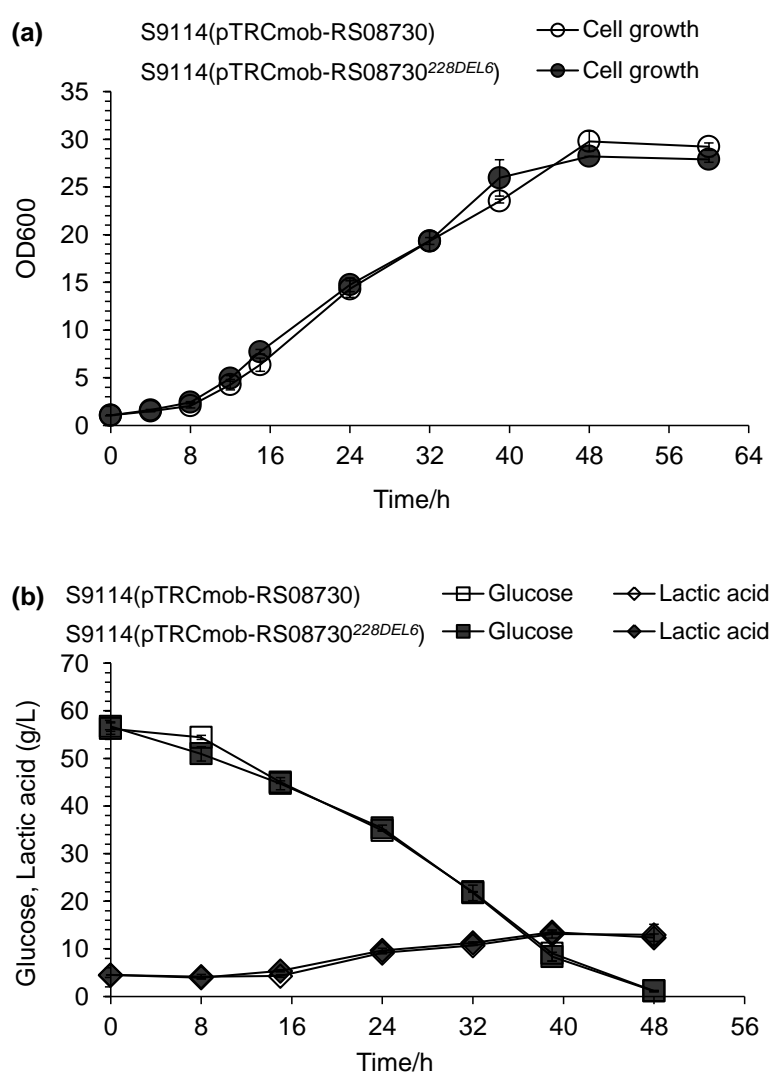


图 4.7 重组菌组 *C. glutamicum* S9114(pTRCmob)与 S9114(pTRCmob-RS03450)在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 4.7 Fermentation performance of the recombinant *C. glutamicum* S9114(pTRCmob) and S9114(pTRCmob-RS03450) in corn stover hydrolysate  
*C. glutamicum* S9114(pTRCmob), containing the blank plasmid only; S9114(pTRCmob-RS03450), expressing gene CGS9114\_RS03450. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Glucose consumption and lactic acid production. (c) Conversion of furan inhibitors.

白水解蛋白 (Clp) 的 ATP 结合亚基 ClpX。Clp 水解蛋白为胞内一种 ATP 依赖型蛋白水解酶, 通常由两个亚基组成, 一个亚基为酪蛋白酶 ClpP, 行使蛋白水解功能, 一个亚基为 Clp ATP 酶, 负责与 ATP 结合, 发挥 ATP 水解酶作用。目前已知微生物体内只有一种 ClpP 亚基, 但有五种不同的 Clp ATP 酶亚基, 分别为 ClpB、ClpC、ClpE、ClpL 和 ClpX<sup>[206, 207]</sup>。相关研究显示 Clp 水解蛋白主要用于降解微生物体内的异常或受损蛋白, 防止异常或受损蛋白在胞内的过量积累。Clp 水解蛋白的这种作用机制可在微生物应对外界压力胁迫方面发挥重要作用<sup>[207-209]</sup>。鉴于以上分析, 推测驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 对呋喃醛抑制物的耐受性提高可能与基因 *clpX* 的缺失突变有关。由于糠醛、HMF 可对微生物产生氧化胁迫, 损伤胞内蛋白, 引起胞内蛋白的错误折叠, 突变基因 CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup> 可能增强了 ClpXP 水解蛋白对受损蛋白的降解能力, 从而提高菌株对抑制物的耐受性能。



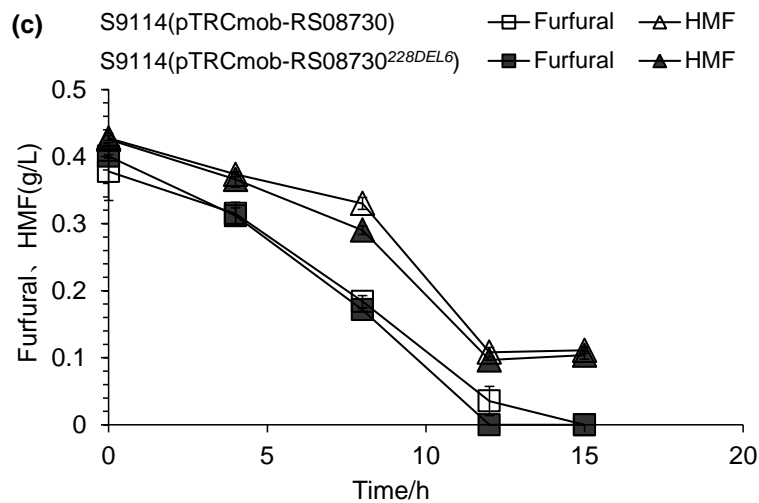


图 4.8 重组菌株 *C. glutamicum* S9114(pTRCmob-RS08730)与 S9114(pTRCmob-RS08730<sup>228DEL6</sup>)在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 4.8 Fermentation performance of the recombinant *C. glutamicum* S9114(pTRCmob-RS08730) and S9114(pTRCmob-RS08730<sup>228DEL6</sup>) in corn stover hydrolysate  
S9114(pTRCmob-RS08730), expressing gene CGS9114\_RS08730; S9114(pTRCmob-RS08730<sup>228DEL6</sup>), expressing gene CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup>. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Glucose consumption and lactic acid production. (c) Conversion of furan inhibitors.

为了验证上述观点,将野生型 CGS9114\_RS0873 与突变型 CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup> 分别在野生菌株 *C. glutamicum* S9114 中进行质粒过表达(见 4.2.2.4 部分),在 15% 未脱毒玉米秸秆水解液中对上述过表达重组菌株进行抑制物耐受性能分析。如图 4.8 所示,过表达 CGS9114\_RS08730 的重组菌株与过表达 CGS9114\_RS08730<sup>228DEL6</sup> 的重组菌株在生长、葡萄糖消耗和抑制物转化方面几乎完全相同。水解液中的发酵结果,分析认为驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 的抑制物耐受性增强可能不是由于 ClpX 突变所导致,或者说 ClpX 突变不是抑制物耐受性增强的关键因素。

#### 4.3.5 *mcbR* 基因的非同义突变与 *C. glutamicum* S9114-128 的表型改变

重测序结果显示基因 CGS9114\_RS14945 在第 140 位发生 SNP 突变(140A>C),相应的编码蛋白的第 47 位天冬氨酸变为丙氨酸(D47A),记突变基因为 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup>。基因组注释信息显示基因 CGS9114\_RS14945 编码转录调控子 McbR。相关研究显示转录调控子 McbR 至少对 45 个基因的转录表达起到负调控,且 45 个基因主要涉及含硫蛋白(甲硫氨酸、半胱氨酸等)的合成、硫酸盐还原和含硫物质的吸收与利用等<sup>[210, 211]</sup>。此外,对 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 的研究结果显示,糠醛胁迫下与含硫蛋白合成相关的基因明显上调表达,当向培养基中添加甲硫氨酸或半胱氨酸时可明显增强菌株对糠醛的耐受性<sup>[95, 96]</sup>。鉴于以上分析,推测驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 的抑制物耐受性提高可能与 *mcbR* 基因的非同义突变有关。突变基因 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> 可能降低了 McbR 对含硫蛋白合成的负调控,使含硫蛋白的合成得到增强,从而提高了菌株对呋喃醛抑制物的耐受性能。

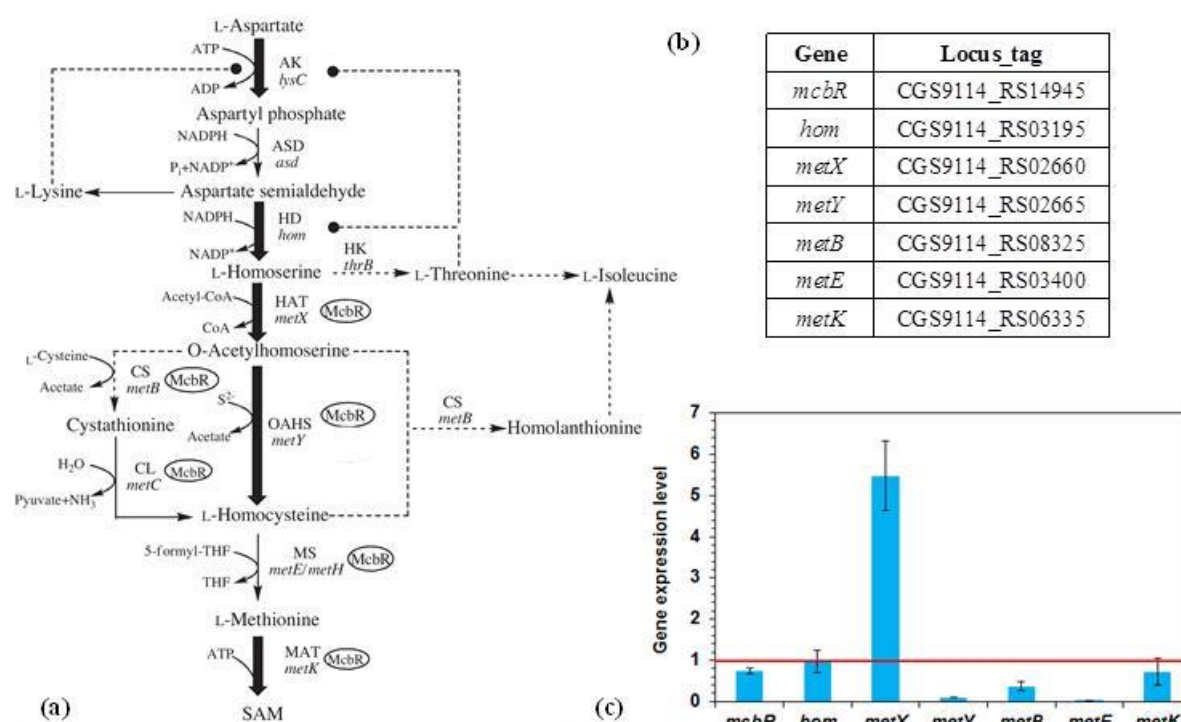


图 4.9 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的生物合成路径 (a) 及相关基因 (b) 以及驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中相关基因相对野生菌株 *C. glutamicum* S9114 的转录水平定量 (c)

Fig. 4.9 Pathway (a) and relevant genes (b) of S-adenosyl-L-methionine (SAM) biosynthesis and the transcriptional quantitation (c) of the genes in adapted *C. glutamicum* S9114-128 relative to wild *C. glutamicum* S9114

为了验证上述观点,首先对野生菌株 *C. glutamicum* S9114 和驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中的 *mcbR* 基因及受 *mcbR* 负调控的与甲硫氨酸合成相关的基因进行转录水平分析 (图 4.9)。以发酵培养基中培养 8 h 的菌体 RNA 为模板,驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 相对野生菌株 *C. glutamicum* S9114 的转录水平结果显示,基因 *mcbR* 下调表达 (0.74 倍),而受 *mcbR* 负调控的与甲硫氨酸合成相关的基因中只有基因 CGS9114\_RS02660 (高丝氨酸乙酰转移酶基因, *metX*) 明显上调表达超过 2 倍,其他基因则几乎全部下调表达。转录水平结果无法确认突变基因 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> 是否削弱了 McbR 对含硫蛋白合成的负调控,因而无法确认该突变基因在抑制物耐受性增强方面所可能发挥的作用。

其次,在野生菌株 *C. glutamicum* S9114 中构建以突变基因 CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> 替换野生基因 CGS9114\_RS14945 的重组突变菌株 *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup> (见 4.2.2.4 部分)。在 15% 未脱毒水解液中对上述重组菌株进行抑制物耐受性能分析,如图 4.10 所示。重组菌株 *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup> 与野生菌株 *C. glutamicum* S9114 在生长、葡萄糖消耗和抑制物转化方面几乎完全相同,且均明显低于驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128。

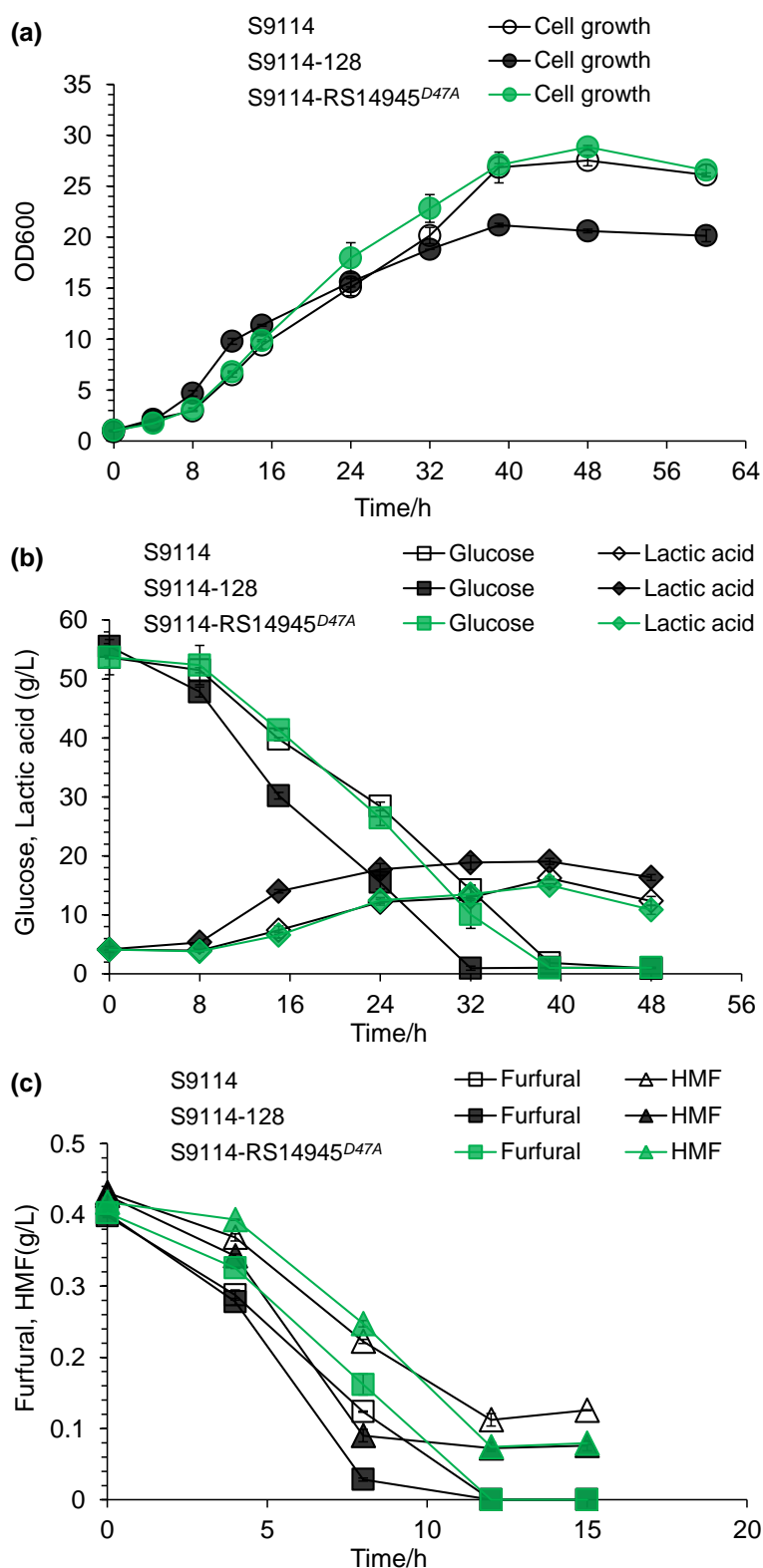


图 4.10 *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup> 在玉米秸秆水解液中的发酵性能分析

Fig. 4.10 Fermentation performance of *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup> in corn stover hydrolysate S9114, the wild strain; S9114-128, the adapted strain; S9114-RS14945<sup>D47A</sup>, gene CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup> from *C. glutamicum* S9114-128 replaced gene CGS9114\_RS14945 in *C. glutamicum* S9114. (a) Cell growth indicated by the OD value at 600 nm. (b) Glucose consumption and lactic acid production. (c) Conversion of furan inhibitors.

依据定量 PCR 结果与水解液发酵结果, 分析认为驯化菌株的抑制物耐受性增强可能不是由于 *McbR* 突变所导致, 或者说 *McbR* 突变不是抑制物耐受性增强的关键因素。此外, 本研究还将野生基因 *CGS9114\_RS0873* 与突变基因 *CGS9114\_RS08730<sup>228DEL</sup>* 分别在基因替换重组菌株 *C. glutamicum* S9114-RS14945<sup>D47A</sup> 中进行质粒过表达 (见 4.2.2.4 部分), 考察突变基因 *CGS9114\_RS08730<sup>228DEL</sup>* 与 *CGS9114\_RS14945<sup>D47A</sup>* 的组合对 *C. glutamicum* S9114 抑制物耐受性的影响。15% 未脱毒水解液中的发酵结果显示与野生菌株 *C. glutamicum* S9114 在生长、葡萄糖消耗和抑制物转化方面仍几乎完全相同, 且明显低于驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 (结果不再展示), 表明上述两突变基因的组合仍未能起到改善菌体抑制物耐受性能的作用。

#### 4.4 本章小结

在抑制物胁迫条件下对发酵微生物进行适应性驯化是获得高抑制物耐受性发酵工程菌株的一种可行方式。*C. glutamicum* S9114-128 是经水解液长期适应性驯化后 (128 天) 获得的一株具有高呋喃醛抑制物耐受性的产谷氨酸发酵菌株。本章研究通过对 *C. glutamicum* S9114-128 进行基因组重测序, 尝试筛选与抑制物耐受性增强有关的关键基因。本章主要研究结论如下:

(1) 合成培养基中的发酵结果显示, 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 与野生菌株 *C. glutamicum* S9114 的生长速率相近, 但最大生物量下降; 其次, 驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 的糖耗速率明显加快, 但谷氨酸积累减少, 同时乳酸积累增加。发酵结果表明 *C. glutamicum* S9114-128 经水解液长期驯化后代谢流发生偏移, 流向乳酸的流量增加, 流向谷氨酸的流量减少。

(2) 重测序结果显示驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中共计有 7 个突变位点。其中位于基因 *CGS9114\_RS11050* 和基因 *CGS9114\_RS11055* 间区的 SNP 突变使葡萄糖转运基因 *CGS9114\_RS11050* (*ptsI*) 上调表达, 促进了葡萄糖向胞内转运, 葡萄糖转运的加快在促进葡萄糖代谢的同时也使得部分葡萄糖流向乳酸生成。但当过表达基因 *CGS9114\_RS11050* 时并未引起胞内葡萄糖代谢流的明显偏移, 同时也未能有效地增强菌体对呋喃醛抑制物的耐受性。

(3)  $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶基因 *CGS9114\_RS03450* (*odhA*) 处的单碱基缺失突变使得驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中的 TCA 循环代谢增强, 谷氨酸积累下降。但当单一过表达基因 *odhA* 时未能有效增强菌体对抑制物的耐受性。此外, 基因功能验证分析实验还证实位于基因 *CGS9114\_RS08730* (*clpX*) 的碱基缺失突变与位于基因 *CGS9114\_RS14945* (*mcbR*) 的非同义 SNP 突变均不是驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 抑制物耐受性增强的关键因素。

(4) 本研究对驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 中的多个突变位点相关基因分别进行了相应的基因工程操作和功能验证实验, 但遗憾的是未能筛选得到与抑制物耐受性增强相关的关键基因。

## 第 5 章 结论与展望

### 5.1 结论

糠醛、HMF 是木质纤维素原料预处理过程中产生的两种主要的呋喃类抑制物，会严重影响后续的微生物生长和发酵过程。针对糠醛、HMF 的抑制问题，可在发酵前采用生物脱毒法对抑制物进行脱除处理，或是使用具有高呋喃醛抑制物耐受性的发酵微生物进行发酵生产。基于抑制物耐受机理对发酵微生物进行理性改造或在抑制物胁迫条件下对发酵微生物进行长期适应性驯化，是目前获得高抑制物耐受型发酵微生物的两种主要方法。基于此，本论文开展了以下研究工作：借助荧光定量 PCR 技术和 RNA-Seq 技术解析生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 降解转化呋喃醛抑制物的分子机理，并筛选得到与抑制物转化相关的关键基因（酶）；采用基因工程手段对乙醇发酵菌株 *Z. mobilis* ZM4 进行理性改造，强化菌株自身对呋喃醛抑制物的还原转化能力，提高了菌体对抑制物的耐受性能和相应的乙醇发酵性能；对一株经水解液长期驯化后的具有高呋喃醛抑制物耐受性的谷氨酸发酵菌株 *C. glutamicum* S9114-128 进行基因组重测序，解析该驯化菌株抑制物耐受性增强的分子机理，通过对突变位点相关基因的功能验证，尝试筛选与抑制物耐受性增强有关的关键基因（酶）。上述研究工作的主要结论如下：

（1）呋喃醛及呋喃醇处理下的定量 PCR 分析显示，*A. resinae* ZN1 可在多个醇脱氢酶和醛还原酶/醛酮还原酶的作用下将呋喃醛（糠醛、HMF）还原为相应的呋喃醇（糠醇、羟甲基糠醇），生成的呋喃醇在醇脱氢酶、醛脱氢酶的作用下经呋喃醛氧化生成相应的呋喃酸（糠酸、羟甲基糠酸），上述呋喃醇到呋喃酸的氧化过程还可以在相关氧化酶的参与下以氧气为底物催化完成。

（2）呋喃醛处理下，*A. resinae* ZN1 的全基因转录水平（RNA-Seq）分析显示，呋喃醛主要影响胞内氧化还原过程、物质代谢过程和物质跨膜转运过程。*A. resinae* ZN1 可诱导胞内相关氧化还原酶基因及与氧化还原力生成（三羧酸循环）和能量生成（呼吸链）相关的基因上调表达，用于呋喃醛的降解转化；*A. resinae* ZN1 还可通过调控相关生物学过程，如调节胞内物质转运过程、诱导与氧化胁迫应激相关的基因的表达，以抵御呋喃醛对菌体造成的损伤，提高菌体对呋喃醛抑制物的耐受性。

（3）*Z. mobilis* ZM4 自身具有可以将呋喃醛转换为呋喃醇的能力，通过在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达外源 *A. resinae* ZN1 的醛酮还原酶基因 ARZ\_13395\_T1，或过表达克隆自 *Z. mobilis* ZM4 自身的醇脱氢酶基因 ZMO1771 时，均可显著增强菌体还原转化糠醛、HMF 的能力，并相应地促进了菌体在抑制物胁迫下的生长、葡萄糖消耗和乙醇生成；当在过表达 ZMO1771 的重组菌中共表达来自 *E. coli* 的转氢酶基因 *udhA* 时，*udhA* 可将胞内的 NADH 转化为 NADPH 用于 ZMO1771 对呋喃醛的还原转化，进一步提高了菌体对呋喃醛抑制物的转化能力。

（4）对驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 进行基因组重测序并对突变位点基因进行功

能验证发现,经水解液长期适应性驯化后,驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 位于基因 CGS9114\_RS11050 和基因 CGS9114\_RS11055 间区的 SNP 突变使葡萄糖转运相关基因 CGS9114\_RS11050 (*ptsI*) 上调表达,促进了葡萄糖向胞内的转运,葡萄糖转运的加快在促进葡萄糖代谢的同时也使得部分葡萄糖流向乳酸生成;位于  $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶基因 CGS9114\_RS03450(*odhA*)处的单碱基缺失突变使得驯化菌株中的 TCA 循环代谢增强,谷氨酸积累下降。上述研究结果部分揭示了驯化菌株代谢流发生偏移的分子机理,但遗憾的是未能筛选得到与抑制物耐受性增强相关的关键基因。

## 5.2 创新点

(1) 借助定量 PCR 技术和 RNA-Seq 技术成功对 *A. resinae* ZN1 中糠醛、HMF 的降解及耐受机制进行了解读,该机制将不仅可以为 *A. resinae* ZN1 的木质纤维素生物脱毒应用提供理论支持,还可以为后续高抗逆性工程菌株的理性改造提供重要的参考信息。

(2) 本研究成功将外源脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的基因转入发酵微生物 *Z. mobilis* ZM4 中,并有效提高了菌株对抑制物的耐受性,其次本研究还成功鉴定了 *Z. mobilis* ZM4 中还原糠醛、HMF 的作用基因,醇脱氢酶基因 ZMO1771。

(3) 提高胞内氧化还原力 NAD(P)H 的供给可促进呋喃醛抑制物的还原转化,本研究成功将该机制应用于 *Z. mobilis* ZM4 中。在过表达 ZMO1771 的菌株中共表达 *E. coli* 的转氢酶基因 *udhA*,通过提高胞内 NADPH 的供给进一步促进了菌株对抑制物的转化能力。

(4) 通过对驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 进行基因组重测序发现,位于基因间区的突变可导致葡萄糖转运的加快,促进葡萄糖代谢,并使得驯化菌株的代谢流发生明显偏移。

## 5.3 展望

本论文针对木质纤维素炼制工艺中存在的呋喃醛抑制物抑制问题,分别从生物脱毒方面、发酵微生物理性改造方面和发酵微生物的长期适应性驯化方面进行了相关研究分析。本论文研究对于呋喃醛抑制物的抑制问题取得了一定的研究进展,可以为将来相关的工作提供参考依据,但仍然还有一些工作存在不足之处,有待于进一步深入研究:

(1) 对于采用定量 PCR 技术在 *A. resinae* ZN1 中筛选得到的与抑制物转化相关的基因,本研究只对其中的与呋喃醛向呋喃醇还原转化相关的醇脱氢酶基因、醛还原酶或醛酮还原酶基因在发酵菌株 (*Z. mobilis* ZM4) 中进行了功能验证,后续还需对与呋喃醇向呋喃酸氧化转化相关的氧化还原酶基因进行类似功能验证。

(2) 对于 *A. resinae* ZN1 在呋喃醛抑制物处理下的全基因转录水平 (RNA-Seq) 数据,本研究只分析了其中功能聚类显著的相关差异表达基因,对于其他的差异表达基因,尤其是差异下调表达基因,以及基因互作等问题还需进行相关深入研究分析。

(3) 本研究通过在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达与抑制物转化相关的基因和与胞内 NADPH 供给相关的基因,增强了菌体对抑制物的转化能力。目前的工作只进行了质粒过表达,并未整合到基因组中构建具有稳定遗传的发酵工程菌株,后续可在这一方面开展相关工

作。其次，由于菌体对抑制物的耐受性是多个生物学过程共同作用的结果，在将来的相关研究工作中还可以考虑将上述两种作用基因与其他相关基因，如转运基因等进行组合表达，以期进一步提高菌体对抑制物的耐受能力，真正实现脱毒与发酵工艺的整合。

(4) 通过对驯化菌株 *C. glutamicum* S9114-128 进行基因组重测序，部分揭示了引起驯化菌株代谢流发生偏移的基因，但未能筛选得到与抑制物耐受性增强相关的关键基因。分析认为驯化菌株抑制物耐受性增强是多个基因共同作用的结果。未来还有待于对 *C. glutamicum* S9114-128 进行更深入的研究，以期最终实现将驯化菌株的优良性能完整转移和应用于野生型菌株或其他发酵微生物中。

## 参考文献

- [1] Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51(7): 1412-1421.
- [2] Ji LQ. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 44: 561-575.
- [3] Chen W, Wu FW, Zhang JH. Potential production of non-food biofuels in China. *Renewable Energy*. 2016, 85: 939-944.
- [4] Yang J, Dai GH, Ma LY, et al. Forest-based bioenergy in China: Status, opportunities, and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013, 18: 478-485.
- [5] Malherbe S, Cloete TE. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2002, 1(2): 105-114.
- [6] Nimz HH. Wood-chemistry, ultrastructure, reactions. *Holz als Roh- und Werkstoff*. 1984, 42(8): 314-314.
- [7] Ebringerova A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*. 2006, 232: 1-12.
- [8] Adler E. Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Science and Technology*. 1977, 11(3): 169-218.
- [9] Zimmermann W. Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*. 1990, 13(2-3): 119-130.
- [10] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived Inhibitory compounds. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, 9(6): 598-612.
- [11] Octave S, Thomas D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*. 2009, 91(6): 659-664.
- [12] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4851-4861.
- [13] Silveira MHL, Morais ARC, Lopes AMD, et al. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *Chemsuschem*. 2015, 8(20): 3366-3390.
- [14] Canilha L, Chandel AK, Milessi TSD, et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, 8:
- [15] Redding A. Bioethanol production and dilute acid pretreatment of lignocellulosic materials:a Review. *Huanan Ligong Daxue Xuebao/journal of South China University of Technology*. 2012, 40(3): 1-9.
- [16] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and*

- Biosystems Engineering. 2016, 39(1): 133-140.
- [17] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.
- [18] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 17-24.
- [19] Margeot A, Hahn-Hägerdal B, Edlund M, et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20(3): 372-380.
- [20] Gócio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4775-4800.
- [21] Palonen H, Viikari L. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 86(5): 550-557.
- [22] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4744-4753.
- [23] Koppram R, Tomas-Pejo E, Xiros C, et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends in Biotechnology*. 2014, 32(1): 46-53.
- [24] Lopez-Linares JC, Romero I, Cara C, et al. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel*. 2014, 122: 112-118.
- [25] Zhang J, Chu DQ, 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.
- [26] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer l-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 803-810.
- [27] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3): 696-707.
- [28] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 66(1): 10-26.
- [29] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 25-33.
- [30] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 65(1): 24-33.
- [31] Hadi SM, Shahabuddin, Rehman A. Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation research*. 1989, 225(3): 101-106.
- [32] Janzowski C, Glaab V, Samimi E, et al. 5-hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*. 2000, 38(9): 801-809.

- [33] Khan QA, Hadi SM. Effect of furfural on plasmid DNA. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1993, 29(6): 1153-1160.
- [34] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1981, 11(11): 226-228.
- [35] Modig T, Liden G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 2002, 363: 769-776.
- [36] Allen SA, Clark W, McCaffery JM, et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3(5):
- [37] Almeida JRM, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund MF, et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 82(4): 625-638.
- [38] Pampulha ME, Loureirodias MC. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1989, 31(5-6): 547-550.
- [39] Viegas CA, Sá-Correia I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *Journal of General Microbiology*. 1991, 137(3): 645-651.
- [40] Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(4): 1004-1011.
- [41] Palmqvist E, Grage H, Meinander NQ, et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 63(1): 46-55.
- [42] Roe AJ, 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.
- [43] Walter A, Gutknecht J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *The Journal of membrane biology*. 1984, 77(3): 255-264.
- [44] Giannattasio S, Guaragnella N, Ždravčić M, et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Frontiers in Microbiology*. 2013, 4:
- [45] Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, et al. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*. 1994, 12(10): 409-415.
- [46] Mikulášová M, Vodný Š, Pekarovičová A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass*. 1990, 23(2): 149-154.
- [47] Pienkos PT, Zhang M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 2009, 16(4): 743-762.
- [48] Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 66(4):

- 203-210.
- [49] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanogenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 68(5): 524-530.
- [50] Franden MA, Pilath HM, Mohagheghi A, et al. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 99.
- [51] Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, et al. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106(2): 128-133.
- [52] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 77-9: 91-103.
- [53] Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, et al. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27(3-5): 240-247.
- [54] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, 91-3: 35-49.
- [55] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 2004, 93(1): 1-10.
- [56] Canilha L, Carvalho W, das Gracas M, et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: Hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008, 39(2): 333-336.
- [57] 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.
- [58] Zhang H, Qin X, Silva SS, et al. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 152(2): 199-212.
- [59] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 42(7): 624-630.
- [60] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Szengyel Z, et al. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 20(4): 286-293.
- [61] Wang P, Brenchley JE, Humphrey AE. Screening microorganisms for utilization of furfural and possible intermediates in its degradative pathway. *Biotechnology Letters*. 1994, 16(16): 977-982.
- [62] Brune G, Schoberth SM, Sahn H. Growth of a strictly anaerobic bacterium on furfural

- (2-furaldehyde). *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, 46(5): 1187-1192.
- [63] Boopathy R, Daniels L. Isolation and characterization of a furfural degrading sulfate-reducing bacterium from an anaerobic digester. *Current Microbiology*. 1991, 23(6): 327-332.
- [64] Koenig K, Andreesen JR. Molybdenum Involvement in Aerobic Degradation of 2-Furoic Acid by *Pseudomonas putida* Fu1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55(7): 1829-1834.
- [65] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, 87(2): 169-174.
- [66] Boopathy R, Bokang H, Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *Journal of industrial microbiology*. 1993, 11(3): 147-150.
- [67] Gutierrez T, Buszko ML, Ingram LO, et al. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98: 327-340.
- [68] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 53(6): 701-708.
- [69] Li Q, Metthew Lam LK, Xun L. *Cupriavidus necator* JMP134 rapidly reduces furfural with a Zn-dependent alcohol dehydrogenase. *Biodegradation*. 2011, 22(6): 1215-1225.
- [70] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, et al. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnology*. 2010, 3(3): 336-343.
- [71] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3(1): 26.
- [72] Wierckx N, Koopman F, Ruijssenaars HJ, et al. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 92(6): 1095-1105.
- [73] Trudgill PW. The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochemical Journal*. 1969, 113(4): 577-587.
- [74] Koenig K, Andreesen JR. Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(10): 5999-6009.
- [75] Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states of america*. 2010, 107(11): 4919-4924.
- [76] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied*

- Microbiology Biotechnology. 1998, 49(6): 691-697.
- [77] Martin C, Galbe M, Wahlbom CF, et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 2002, 31(3): 274-282.
- [78] Palmqvist E, Almeida JS, Hahn-Hagerdal B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. Biotechnology and Bioengineering. 1999, 62(4): 447-454.
- [79] Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004, 31(8): 345-352.
- [80] Chung IS, Lee YY. Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula. Biotechnology and Bioengineering. 1985, 27(3): 308-315.
- [81] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, et al. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. Process Biochemistry. 2004, 39(11): 1533-1542.
- [82] Purwadi R, Brandberg T, Taherzadeh MJ. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: Continuous cultivation with flocculating yeast. International Journal of Molecular Sciences. 2007, 8(9): 920-932.
- [83] Talebnia F, Niklasson C, Taherzadeh MJ. Ethanol production from glucose and dilute-acid hydrolyzates by encapsulated *S. cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. 2005, 90(3): 345-353.
- [84] Taherzadeh MJ, Millati R, Niklasson C. Continuous cultivation of dilute-acid hydrolysates to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2001, 95(1): 45-57.
- [85] Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. Enzyme and Microbial Technology. 2005, 37(2): 195-204.
- [86] Taherzadeh MJ, Niklasson C, Liden G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. Biotechnology and Bioengineering. 2000, 69(3): 330-338.
- [87] Rudolf A, Galbe M, Liden G. Controlled fed-batch fermentations of dilute-acid hydrolysate in pilot development unit scale. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004, 113: 601-617.
- [88] Nilsson A, Taherzadeh MJ, Liden G. On-line estimation of sugar concentration for control of fed-batch fermentation of lignocellulosic hydrolyzates by *Saccharomyces cerevisiae*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2002, 25(3): 183-191.
- [89] Modig T, Almeida JRM, Gorwa-Grauslund MF, et al. Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. Biotechnology and Bioengineering. 2008, 100(3): 423-429.
- [90] Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie Van Leeuwenhoek. 1990, 58(3): 209-217.
- [91] Alvarez-Peral FJ, Zaragoza O, Pedreno Y, et al. Protective role of trehalose during

- severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology-Sgm.* 2002, 148: 2599-2606.
- [92] Kim D, Hahn JS. Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generating Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology.* 2013, 79(16): 5069-5077.
- [93] Geddes RD, Wang X, Yomano LP, et al. Polyamine transporters and polyamines increase furfural tolerance during xylose fermentation with ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology.* 2014, 80(19): 5955-5964.
- [94] Kim SK, Jin YS, Choi IG, et al. Enhanced tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple lignocellulose-derived inhibitors through modulation of spermidine contents. *Metabolic Engineering.* 2015, 29: 46-55.
- [95] Miller EN, Jarboe LR, Turner PC, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology.* 2009, 75(19): 6132-6141.
- [96] Kanna M, Matsumura Y. Effect of low-concentration furfural on sulfur amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Japan Petroleum Institute.* 2015, 58(3): 165-168.
- [97] Portnoy VA, Bezdan D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution-harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011, 22(4): 590-594.
- [98] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution -- principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact.* 2013, 12: 64.
- [99] Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2005, 121: 451-460.
- [100] Heer D, Sauer U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial Biotechnology.* 2008, 1(6): 497-506.
- [101] Martin C, Marcet M, Almazan O, et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology.* 2007, 98(9): 1767-1773.
- [102] Yomano LP, York SW, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 1998, 20(2): 132-140.
- [103] Gonzalez R, Tao H, Purvis JE, et al. Gene array-based identification of changes that contribute to ethanol tolerance in ethanologenic *Escherichia coli*: Comparison of KO11 (Parent) to LY01 (resistant mutant). *Biotechnology Progress.* 2003, 19(2): 612-623.
- [104] Mohagheghi A, Linger J, Smith H, et al. Improving xylose utilization by recombinant *Zymomonas mobilis* strain 8b through adaptation using 2-deoxyglucose. *Biotechnology for Biofuels.* 2014, 7(1): 191-200.
- [105] Mohagheghi A, Linger JG, Yang SH, et al. Improving a recombinant *Zymomonas*

- mobilis* strain 8b through continuous adaptation on dilute acid pretreated corn stover hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8(55):
- [106] Shui ZX, Qin H, Wu B, et al. Adaptive laboratory evolution of ethanogenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99(13): 5739-5748.
- [107] Guerreiro JF, Mira NP, S á-Correia I. Adaptive response to acetic acid in the highly resistant yeast species *Zygosaccharomyces bailii* revealed by quantitative proteomics. *Proteomics*. 2012, 12(14): 2303-2318.
- [108] Hao XC, Yang XS, Wan P, et al. Comparative proteomic analysis of a new adaptive *Pichia stipitis* strain to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 34.
- [109] Dunn KL, Rao CV. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(11): 2228-2240.
- [110] Almeida JRM, Röder A, Modig T, et al. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 78(6): 939-945.
- [111] Miller EN, Jarboe LR, Yomano LP, et al. Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (*yqhD* and *dkgA*) in furfural-resistant ethanogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(13): 4315-4323.
- [112] Laadan B, Almeida JRM, R ålström P, et al. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2008, 25(3): 191-198.
- [113] 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.
- [114] Nilsson A, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hagerdal B, et al. Cofactor Dependence in Furan Reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in Fermentation of Acid-Hydrolyzed Lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(12): 7866-7871.
- [115] Gutierrez T, Ingram LO, Preston JF. Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1 - An enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 2006, 121(2): 154-164.
- [116] Liu ZL, Moon J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene*. 2009, 446(1): 1-10.
- [117] Sehnem NT, Machado Ada S, Leite FC, et al. 5-Hydroxymethylfurfural induces *ADH7* and *ARI1* expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2013, 133: 190-196.
- [118] Almeida JRM, Modig T, Röder A, et al. *Pichia stipitis* xylose reductase helps

- detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1(1): 12.
- [119] Park S-E, Koo HM, Park YK, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10): 6033-6038.
- [120] Ishii J, Yoshimura K, Hasunuma T, et al. Reduction of furan derivatives by overexpressing NADH-dependent Adh1 improves ethanol fermentation using xylose as sole carbon source with *Saccharomyces cerevisiae* harboring XR-XDH pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 97(6): 2597-2607.
- [121] Petersson A, Almeida JRM, 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.
- [122] Wang X, Yomano LP, Lee JY, et al. Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(10): 4021-4026.
- [123] Wang X, Miller EN, Yomano LP, et al. Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* strains engineered for the production of ethanol and lactate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(15): 5132-5140.
- [124] Ask M, Bettiga M, Mapelli V, et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 22.
- [125] Cunha JT, 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. *Bioresource Technology*. 2015, 191: 7-16.
- [126] Hasunuma T, Ismail KS, Nambu Y, et al. Co-expression of *TAL1* and *ADH1* in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. *J Biosci Bioeng*. 2014, 117(2): 165-169.
- [127] Visvalingam J, Hernandez-Doria JD, Holley RA. Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(3): 942-950.
- [128] Ask M, Mapelli V, Hock H, et al. Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials. *Microb Cell Fact*. 2013, 12: 87.
- [129] Alriksson Br, Horváth ISr. Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry* 2010, 45: 264-271.

- [130] Wallace-Salinas V, Signori L, Li YY, et al. Re-assessment of *YAP1* and *MCR1* contributions to inhibitor tolerance in robust engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting undetoxified lignocellulosic hydrolysate. *AMB Express*. 2014, 4: 56.
- [131] Sasano Y, Watanabe D, Ukibe K, et al. Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, 113(4): 451-455.
- [132] Fujitomi K, Sanda T, Hasunuma T, et al. Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. *Bioresource Technology*. 2012, 111: 161-166.
- [133] Kim H-S, Kim N-R, Kim W, et al. Insertion of transposon in the vicinity of *SSK2* confers enhanced tolerance to furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(2): 531-540.
- [134] Xiao H, Zhao H. Genome-wide RNAi screen reveals the E3 SUMO-protein ligase gene *SIZ1* as a novel determinant of furfural tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 78.
- [135] Nakagawa Y, Hasebe T, Ishiai M, et al. Forced expression of *FLO11* confers pellicle-forming ability and furfural tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014, 78(4): 714-717.
- [136] Luhe AL, Lim CY, Gerken H, et al. Furfural and hydroxymethylfurfural tolerance in *Escherichia coli* Delta *acrR* regulatory mutants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2015, 62(1): 32-36.
- [137] Zheng H, Wang X, Yomano LP, et al. Increase in Furfural Tolerance in Ethanologenic *Escherichia coli* LY180 by Plasmid-Based Expression of *thyA*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(12): 4346-4352.
- [138] Wang X, Miller EN, Yomano LP, et al. Increased Furan Tolerance in *Escherichia coli* Due to a Cryptic *ucpA* Gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(7): 2452-2455.
- [139] Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(3): 1163-1170.
- [140] Kiiskinen LL, Saloheimo M. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied & Environmental Microbiology*. 2004, 70(1): 137-144.
- [141] Larsson S, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 57(1-2): 167-174.
- [142] Zhang J-G, Liu X-Y, He X-P, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *FPS1* aquaglyceroporin gene. *Biotechnology Letters*. 2010, 33(2): 277-284.

- [143] Bauer BE, Rossington D, Mollapour M, et al. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *European Journal of Biochemistry*. 2003, 270(15): 3189-3195.
- [144] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10(1): 2.
- [145] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 16.
- [146] Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá Á, et al. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource Technology*. 2009, 100(24): 6378-6384.
- [147] Fonseca BG, de Oliveira Moutta R, de Oliveira Ferraz F, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38(1): 199-207.
- [148] Huang X, Wang Y, Liu W, et al. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(20): 9705-9709.
- [149] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-489.
- [150] Zhang HS, 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.
- [151] Ran H, Zhang J, Gao Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 51.
- [152] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001, 25(4): 402-408.
- [153] Oshlack A, Robinson MD, Young MD. From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biol*. 2010, 11(12): 220.
- [154] Zhang Y, Ujor V, Wick M, et al. Identification, purification and characterization of furfural transforming enzymes from *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Anaerobe*. 2015, 33: 124-131.
- [155] Zhang Y, Ezeji TC. Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 66.
- [156] Bajwa PK, Ho C-Y, Chan C-K, et al. Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* T2 cells upon exposure to hardwood spent sulphite liquor: comparison to

- acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013, 103(6): 1281-1295.
- [157] Ma M, Liu ZL. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4*, and *HSF1* as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2010, 11(1): 660.
- [158] Wang X, Ma MG, Liu ZL, et al. GRE2 from *Scheffersomyces stipitis* as an aldehyde reductase contributes tolerance to aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(15): 6671-6682.
- [159] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodegradation on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [160] Hu C, Zhao X, Zhao J, et al. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 2009, 100(20): 4843-7.
- [161] Huang C, Wu H, Smith TJ, et al. In vivo detoxification of furfural during lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnology Letters*. 2012, 34(9): 1637-1642.
- [162] Singh R, Trivedi VD, Phale PS. Purification and characterization of NAD<sup>+</sup>-dependent salicylaldehyde dehydrogenase from carbaryl-degrading *Pseudomonas* sp. strain C6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 172(2): 806-819.
- [163] Liu ZL. Genomics of yeast tolerance and in situ detoxification. *Microbial Stress Tolerance for Biofuels*: Springer, 2012: 1-28.
- [164] Taylor MP, Mulako I, Tuffin M, et al. Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. *Biotechnol J*. 2012, 7(9): 1169-1181.
- [165] Qiu Z, Deng Z, Tan H, et al. Engineering the robustness of *Saccharomyces cerevisiae* by introducing bifunctional glutathione synthase gene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015, 42(4): 537-542.
- [166] Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 71(3): 339-349.
- [167] Liu ZL, Moon J, Andersh BJ, et al. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 81(4): 743-753.
- [168] Zhang M, Eddy C. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*. 1995, 267(5195): 240.
- [169] 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. Technical report NREL/TP-5100-47764. Golden,

- Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2011:
- [170] Yang S, Fei Q, Zhang Y, et al. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology*. 2016, 9(6): 699-717.
- [171] He MX, Wu B, Qin H, et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 101.
- [172] Yang S, Pelletier DA, Lu T-YS, et al. The *Zymomonas mobilis* regulator *hfq* contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors. *BMC Microbiology*. 2010, 10(1): 135.
- [173] Tan FR, Dai LC, Wu B, et al. Improving furfural tolerance of *Zymomonas mobilis* by rewiring a sigma factor RpoD protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99(12): 5363-5371.
- [174] Yang S, Linger J, Franden MA, et al. Biocatalysts with enhanced inhibitor tolerance. USPTO: US9206445, 2015:
- [175] He MX, Wu B, Shui ZX, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1): 189-199.
- [176] Dong HW, Bao J, Ryu DDY, et al. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108(7): 1616-1627.
- [177] Simon R, Priefer U, Pühler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature Biotechnology*. 1983, 1(9): 784-791.
- [178] He YQ, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360-364.
- [179] Dong HW, Fan LQ, Luo Z, et al. Improvement of ethanol productivity and energy efficiency by degradation of inhibitors using recombinant *Zymomonas mobilis* (pHW20a-*fdh*). *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110(9): 2395-2404.
- [180] Agrawal M, Chen RR. Discovery and characterization of a xylose reductase from *Zymomonas mobilis* ZM4. *Biotechnology Letters*. 2011, 33(11): 2127-2133.
- [181] Tu Y, Gao Q, Bao J. Expression of Functional Genes in Lignocellulose-dependent Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*. 2013, 19(5): 811-816.
- [182] Qi H, Li S, Zhao S, et al. Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis. *PLoS One*. 2014, 9(4): e93815.
- [183] Sauer U, Canonaco F, Heri S, et al. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(8): 6613-6619.
- [184] Dien BS, Jung HJG, Vogel KP, et al. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*. 2006, 30(10): 880-891.

- [185] Le DM, Sorensen HR, Knudsen NO, et al. Biorefining of wheat straw: accounting for the distribution of mineral elements in pretreated biomass by an extended pretreatment-severity equation. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 141.
- [186] Jan J, Martinez I, Wang Y, et al. Metabolic engineering and transhydrogenase effects on NADPH availability in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 2013, 29(5): 1124-1130.
- [187] Yamauchi Y, Hirasawa T, Nishii M, et al. Enhanced acetic acid and succinic acid production under microaerobic conditions by *Corynebacterium glutamicum* harboring *Escherichia coli* transhydrogenase gene *pntAB*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 2014, 60(3): 112-118.
- [188] Lin FM, Qiao B, Yuan YJ. Comparative Proteomic Analysis of Tolerance and Adaptation of Ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to Furfural, a Lignocellulosic Inhibitory Compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(11): 3765-3776.
- [189] Yang J, Ding MZ, Li BZ, et al. Integrated phospholipidomics and transcriptomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced tolerance to a mixture of acetic acid, furfural, and phenol. *OMICS*. 2012, 16(7-8): 374-386.
- [190] Wang X, Li BZ, Ding MZ, et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. *OMICS*. 2013, 17(3): 150-159.
- [191] Oide S, Gunji W, Moteki Y, et al. Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81(7): 2284-2298.
- [192] Lessmeier L, Wendisch VF. Identification of two mutations increasing the methanol tolerance of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiology*. 2015, 15: 216.
- [193] Jojima T, Inui M, Yukawa H. *Biorefinery Applications of Corynebacterium glutamicum*. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [194] Sakai S, Tsuchida Y, Nakamoto H, et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(7): 2349-2453.
- [195] Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(20): 8675-8683.
- [196] Tsuge Y, Kudou M, Kawaguchi H, et al. FudC, a protein primarily responsible for furfural detoxification in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(6): 2685-2692.
- [197] Park HS, Um Y, Sim SJ, et al. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochemistry*. 2015, 50(3): 347-356.
- [198] Lv Y, Wu Z, Han S, et al. Genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* S9114, a strain for industrial production of glutamate. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193(21): 6096-6097.

- [199] Khushk I. Study on amino acids fermentability and inhibitor tolerance of *Corynebacterium glutamicum* strains using lignocellulose feedstock: [Doctor]. East China University of Science and Technology, 2016.
- [200] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, et al. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2007, 132(3): 273-279.
- [201] Xiong X, Wang X, Chen S. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(16): 5483-5491.
- [202] Tanaka Y, Okai N, Teramoto H, et al. Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *Microbiology*. 2008, 154(1): 264-274.
- [203] Ikeda M. Sugar transport systems in *Corynebacterium glutamicum*: features and applications to strain development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 96(5): 1191-1200.
- [204] Kim J, Hirasawa T, Sato Y, et al. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 81(6): 1097-1106.
- [205] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, et al. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(4): 1308-1319.
- [206] Alexopoulos JA, Guarne A, Ortega J. ClpP: A structurally dynamic protease regulated by AAA+ proteins. *Journal of Structural Biology*. 2012, 179(2): 202-210.
- [207] Hou XH, Zhang JQ, Song XY, et al. Contribution of ClpP to stress tolerance and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Basic Microbiology*. 2014, 54(11): 1222-1232.
- [208] Ambro L, Pevala V, Bauer J, et al. The influence of ATP-dependent proteases on a variety of nucleoid-associated processes. *Journal of Structural Biology*. 2012, 179(2): 181-192.
- [209] Baker TA, Sauer RT. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1823(1): 15-28.
- [210] Rey DA, Nentwich SS, Koch DJ, et al. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Molecular Microbiology*. 2005, 56(4): 871-887.
- [211] Kovaleva GY, Gelfand MS. Regulation of methionine/cysteine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and related genomes. *Mol Biol (Mosk)*. 2007, 41(1): 139-150.

## 博士期间研究成果

## 已发表的论文:

1. **Xia Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**. 2015, 8:136. (SCI IF=6.44, 对应本论文第二章内容)
2. **Xia Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. Enhancement of furan aldehydes conversion in *Zymomonas mobilis* by elevating dehydrogenase activity and cofactor regeneration. **Biotechnology for Biofuels**. 2017, 10:24. (SCIE IF=6.44, 对应本论文第三章内容)

## 准备发表的论文:

1. **Xia Wang**<sup>1</sup>, Imrana Khushk<sup>1</sup>, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. High-throughput sequencing reveals improved furan aldehydes tolerance of *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology Biotechnology**. In preparation. (对应本论文第四章内容)
2. **Xia Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. Genome-wide identification of candidate genes required for tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural in *Amorphotheca resinae* ZN1. **Biotechnology for Biofuels**. In preparation. (对应本论文第二章内容)

## 学术会议论文:

1. **Xia Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. Identification of metabolic pathways and key genes involved in biodegradation of furan derivatives from lignocellulose. **International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering**. 2013, Shanghai, China. (Poster)
2. **Xia Wang**, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biodegradation of furfural and HMF derived from lignocellulose pretreatment. **BEST Conference & International Symposium on Biotechnology and Bioengineering**. 2015, Taiwan, China. (Oral presentation, Outstanding Oral Presentation Award)

## 致谢

岁月如流，不知不觉间五年多的研究生生活已经接近尾声。这一路走来，我遇到了很多关心和帮助过我的老师、同学和朋友，有他们的支持和鼓励我才能顺利完成我的学业，在这里，我向他们致以我最真诚的谢意。

特别感谢我的导师鲍杰老师。感谢鲍老师在我的科研工作中所给予的悉心指导和帮助。从开始的课题选题与实验设计、到解读与应对实验过程中遇到的问题，到对实验结果进行分析与总结，再到最后的论文撰写与修改，是鲍老师一步步地教给我如何做一名合格的科研工作者。鲍老师渊博的专业学识、严谨的治学态度、缜密的思维方式以及精益求精的工作作风都将成为我科研道路上的方向标，指引我不断前行。在鲍老师身上我还看到了作为一位长者所具有的谦和、热情、正直与豁达的人生态度，这些都将深深影响着我，使我受益终身。在此，向鲍老师致以我最衷心的感谢。

感谢高秋强老师和张建老师在科研和生活中给予的无私帮助和鼓励。特别感谢高老师在实验过程中给我提出了许多宝贵的意见和建议，带给我许多启发。两位老师在工作中所表现出的认真、负责的工作态度也是我学习的榜样。

感谢给予我帮助、带给我温暖和陪伴的生物炼制课题组集体。特别感谢涂毅先生，曾经他是我的师兄，教会了我许多基本的科研操作技能，使我能够尽快地融入到科研工作中；现在他是我的家人，用爱、理解和包容继续支撑和鼓励着我。特别感谢易霞师姐，她是我科研中的伙伴，生活中的益友，还是我思想上的导师。感谢她的陪伴，感谢她教会我许多做人做事的方法和道理。感谢罗紫臣师兄、张瑶师姐、安瑞鑫、张鹏、高小创、周平平、邱忠洋。科研中的相互探讨、生活中的相互关心，是这个温暖的小集体的陪伴让忙碌的科研生活处处充满了乐趣。另外还要感谢课题组其他帮助过我的同学，包括何燕青师兄、顾翰琦师兄、冉红、刘阳、张宏森、王娟、刘刚、邵帅、侯伟亮、韩响身、张强、温经柏、姚瑞苗、谌泽宇、胡明珊、阚家伦等其他师兄师姐以及师弟师妹。感谢他们的帮助和陪伴。

感谢我的好朋友曾惠和王高磊。在开心高兴的日子可以有人分享，在难过落寞的日子可以有人倾述，感谢他们的出现让身处异乡的我不再孤单。感谢我的父母和哥哥姐姐，他们的关心、理解和支持是我一路走来的巨大动力，也是我前进道路上最坚实的后盾。