

学校代码：10251

学 号：030090403

華東理工大學

硕士学位论文

生物脱毒真菌 *Amorphotheca resinae*
ZN1 的生长特性及呋喃衍生物降
解途径确定的研究

专 业 生物化学与分子生物学

研究方向 生物质能源

姓 名 王晓凤

导 师 辛秀娟 鲍杰

定稿时间： 2012 年 4 月 10 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

生物脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的生长特性及呋喃衍生物降解途径确定的研究

王晓凤

指导教师姓名: _____
辛秀娟 副教授 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化学与分子生物学

论文定稿日期: 2012-4-10 论文答辩日期: 2011-5-23

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 张小希 高级工程师

评 阅 人: 李新良 研究员

钱江潮 研究员

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：

2012 年 月 日

生物脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的生长特性及呋喃衍生物降解途径确定的研究

摘要

木质纤维素在预处理过程产生的糠醛、羟甲基糠醛（5-HMF）等呋喃衍生物以及有机酸（甲酸、乙酸、乙酰丙酸等），对后续的酶水解和生物发酵会产生强烈的抑制。因此，将这些抑制物脱除即所谓的“脱毒”对正常的发酵是非常重要的，而呋喃衍生物对酿酒酵母的毒性最大，因此呋喃衍生物的脱除是各种抑制物中最受关注的一类。本实验室自主筛选的一株霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 可以有效地代谢呋喃衍生物。本文对该菌的生长特性以及其如何代谢呋喃衍生物做了相关研究。通过对 *A. resinae* ZN1 所能利用的碳源，各碳源对 *A. resinae* ZN1 生长的特性进行了详细的研究。发现，木质纤维素在预处理过程中产生的几大类发酵抑制物（包括呋喃衍生物、有机酸以及一些芳香族化合物）均可以作为真菌 *A. resinae* ZN1 的生长碳源，并对 *A. resinae* ZN1 降解糠醛和 5-羟甲基糠醛的途径进行了分析。我们通过发酵罐在线监测、定时取样并通过高效液相色谱定性定量对各代谢产物进行分析。本文提出的生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 转化糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解代谢途径可以简述为：糠醛首先快速地转化为毒性较低的糠醇；在有氧条件下，糠醇又再度生成不致对微生物产生危害的低浓度糠醛，糠醛继续氧化为糠酸。与糠醛降解路径类似，5-羟甲基糠醛也是首先生成对微生物毒性较小的 2,5-呋喃-二甲醇；2,5-呋喃-二糠醇在有氧条件下，再度生成不致对微生物产生危害的低浓度 5-羟甲基糠醛，然后继续氧化为 5-羟甲基糠酸。推测糠酸或 5-羟甲基糠酸可能继续进入 TCA 循环，进而完成糠醛和 5-羟甲基糠醛的完全降解。并且发现呋喃衍生物代谢转化的速度跟通气量的大小呈正相关，而且在糠醇的转化中，氧气是必须的。本文结果对将来加快生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 生物脱毒速率、改善木质纤维素生物转化的限速步骤提供了重要的实验依据。

关键词：生物脱毒； *Amorphotheca resinae* ZN1；糠醛；羟甲基糠醛；代谢转化；溶氧水平

Study of Growth Characteristics and Metabolic Mechanism of Furan Gegradation by the Biodetoxification Fungus *Amorphotheca resinae* ZN1

Abstract

The degradation products from lignocellulose pretreatment strongly inhibit the activities of cellulase enzymes and ethanol fermentation strains, thus the efficient removal of the inhibitor substances (“detoxification”) is the inevitable step for the biotransformation processes. Among the inhibitor substances, the furan derivatives including furfural and 5-hydromethylfurfural (5-HMF) are the major inhibitors. In this study, the biological detoxification of furfural and 5-HMF by a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, was studied and the metabolic pathways of furfural and 5-HMF were analyzed experimentally. This paper reported that *A. resinae* ZN1 can use much carbon source, and studied each carbon source for the biological virus-free fungi *A. resinae* ZN1 growth stimulative effect. Research found that the degradation products(including furan derivatives, organic acid and some aromatic compounds) from lignocellulose pretreatment can be as carbon sources for the growth of *A. resinae* ZN1. The metabolic pathways of furfural and 5-hydromethylfurfural were analyzed by means of fermentation tank on-line monitoring, regular sampling and high performance liquid chromatography (HPLC) quantitatively. The metabolic pathway of furfural and 5-HMF degradation in *A. resinae* ZN1 was described as follows: first, furfural was quickly transformed into the low toxic furfuryl alcohol; then the furfuryl alcohol was gradually transformed into the furfural again but at the low concentration at aerobic condition, which was not lethal to the growth of the microorganisms; furfural continued to be oxidized to furoic acid by *A. resinae* ZN1. Similarly, 5-HMF was quickly transformed into the furan-2,5-dimethanol (HMF alcohol); then the HMF alcohol was transformed into 5-HMF but at a low concentration at aerobic condition; followed by the transformation of 5-HMF to 5-hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid. It is estimated that furoic acid and 5-hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid were further degraded in the TCA cycle to complete the biological degradation of furfural and 5-HMF. The degradation was found to be closely related to the oxygen dissolution level. The present study provided the important experimental basis for speeding up the biodetoxification of furfural and 5-HMF by *A. resinae* ZN1 and the rate-limiting step in the lignocellulose biotransformation to ethanol.

Key Words: Biodetoxification; *Amorphotheca resinae* ZN1; furfural;
5-hydormethylfurfural (HMF); Metabolic mechanism; Dissolved oxygen level

目录

前言.....	1
第一章 文献综述.....	2
1.1 木质纤维素生物发酵生产燃料乙醇.....	2
1.1.1 预处理.....	2
1.1.2 水解.....	3
1.1.3 木质纤维素发酵.....	4
1.2 木质纤维素来源的抑制物.....	4
1.2.1 呋喃抑制物.....	6
1.2.2 酚醛类抑制物.....	7
1.2.3 有机酸类抑制物.....	8
1.2.4 重金属离子.....	9
1.2.5 几种抑制物的生物毒性“协同效应”.....	9
1.3 抑制物的脱除方法.....	10
1.3.1 物理方法.....	10
1.3.2 化学方法.....	10
1.3.3 物理化学联合方法.....	10
1.4 木质纤维素来源抑制物的生物降解.....	11
1.4.1 呋喃衍生物的共代谢.....	14
1.5 本论文的研究内容与意义.....	15
1.5.1 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 的生长特性研究.....	15
1.5.2 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 的呋喃降解途径的分析.....	15
第二章 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 的生长特性研究.....	17
2.1 前言.....	17

2.2 实验材料与仪器.....	17
2.2.1 实验试剂.....	17
2.2.2 实验仪器.....	18
2.2.3 原料.....	19
2.2.4 培养基.....	19
2.3 研究方法.....	19
2.3.1 形态特征鉴定.....	19
2.3.2 孢子悬液的制备.....	20
2.3.3 实验操作步骤.....	20
2.4 实验结果与讨论.....	20
2.4.1 形态特征鉴定结果.....	21
2.4.2 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 对各种抑制物的单独降解.....	21
2.4.2.1 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加各种单糖的生长特性.....	21
2.4.2.2 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加糠醛的生长特性.....	23
2.4.2.3 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加 5-羟甲基糠醛的生长特性.....	25
2.4.2.4 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加有机酸的生长特性.....	27
2.4.2.5 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加烃类有机物的生长特性.....	30
2.4.2.6 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加其它有机物的生长特性.....	31
第三章 生物脱毒真菌 <i>A. resinae</i> ZN1 的呋喃降解途径研究.....	39
3.1 前言.....	39
3.2 实验材料和仪器.....	39

3.2.1 试剂和仪器.....	39
3.2.2 培养基与菌种.....	40
3.2.2.1 脱毒菌株及培养.....	40
3.2.2.2 培养基.....	41
3.3 实验方法.....	41
3.3.1 孢子悬液的制备.....	41
3.3.2 实验方法.....	41
3.3.3 分析方法.....	41
3.4 实验结果和讨论.....	42
3.4.1 <i>A. resinae</i> ZN1 的糠醛代谢分析.....	42
3.4.2 <i>A. resinae</i> ZN1 的 5-羟甲基糠醛代谢分析.....	46
3.4.3 <i>A. resinae</i> ZN1 的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸混合抑制物的生物降解.....	49
3.4.4 <i>A. resinae</i> ZN1 降解糠醛和 5-羟甲基糠醛代谢路径的初步解析.....	51
3.4.5 乙酸的降解.....	52
第四章 结论与展望.....	54
4.1 总结.....	54
4.2 展望.....	55
参考文献.....	56
致谢.....	61
硕士期间发表论文.....	62

前言

随着世界经济的高速发展，各国对能源的依赖性也愈来愈强。现在，化石资源的枯竭是人类所必须面对的一个发展障碍^[1-2]。当前寻找新能源以替代化石燃料，已成为大家的共识。用木质纤维素为原料去生产燃料乙醇、生物柴油、氢气、沼气等生物燃料已经备受世界各国的广泛关注。这不仅是因为木质纤维素原料非常廉价、广泛且可再生，而且相对化石燃料来说，生物燃料是一种清洁能源，燃烧后的产物不会对环境造成很大的污染。

目前，由木质纤维素制备燃料乙醇的研究十分活跃，这一领域也已取得很多新进展。从木质纤维素制备生产生物乙醇的工艺主要包括：预处理、酶水解、微生物发酵、乙醇蒸馏-精馏-脱水。虽然现在利用木质纤维素生产燃料乙醇已经颇具规模化，但离真正的工业化生产尚有一段距离，这其中存在很多技术瓶颈。其中，木质纤维素的预处理技术的完善，是生产燃料乙醇过程中最为关键的一步。不仅因为，该环节占生产成本的 20% 以上，木质纤维素预处理过程中还会形成各种副产物，这些副产物对木质纤维素后续的酶水解、微生物生长以及代谢都有着至关重要的影响。因此，如何快速有效地去除这些预处理副产物，使木质纤维素燃料乙醇的生产快速，高效地进行是亟须解决的难题。本实验室已经成功筛选到一株，能有效地脱除木质纤维素预处理过程中产生的抑制物的霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，可以被有效的利用来进行预处理产物的生物脱毒。本文生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的生长特性，以及其对木质纤维素发酵产乙醇中影响最大、也最受关注的呋喃衍生物的代谢路径进行了详细的研究。本论文的研究目的在于，通过对霉菌 *A. resinae* ZN1 生长特性及其代谢呋喃衍生物的路径研究，为将来加快生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 生物脱毒效率、改善木质纤维素生物转化的限速步骤提供重要的实验依据。

第一章 文献综述

1.1 木质纤维素生物发酵生产燃料乙醇

纤维素是地球上数量最多的可再生资源,全球每年通过生物合成可再生性纤维素可以达到 1000 多亿 t,它的主要存在形式是木材、农作物秸秆等^[3]。纤维素的化学结构式可写为 $[C_6H_{10}O_5]_n$,相应的分子量为 $(162.4)n$,不同来源纤维素的聚合度差别很大,大致来说, n 为 $1000\sim 15000$ ^[4]。在生物量的结构中,半纤维素共价连接着纤维素和木质素,形成一个严密的晶体结构^[5]。纤维素生物质是一种潜在的低成本原料,通常含有 38%~50%的纤维素(一种线性大分子同聚物,由 D 型葡萄糖单元以 1,4 糖苷键连接起来的)、23%~32%的半纤维素(是由戊糖(D-木糖, L-阿拉伯糖),己糖(D-葡萄糖, D-甘露糖和 D-半乳糖)和糖醛酸等低分子量的多糖形成的不均匀聚合物组成的。半纤维素中最为丰富的是木聚糖。木聚糖是由木糖由 1,4 糖苷连接起来的)和 15%~25%的木质素(一种复杂的主要由酚类化合物-苯基丙烷结构单体通过 C-C 键构成的三维空间高分子化合物,分子通式为 $(C_6H_{11}O_2)_n$ 。木质素是异聚体,不能被水解成单糖,它在植物细胞壁中的作用主要是提供支持、阻隔、抵抗微生物和一些化学物质破坏细胞壁^[6-7],而且会在纤维素周围形成保护层,从而影响、阻碍纤维素酶以及一些化学品对纤维素的水解)。

20 世纪 70 年代,在爆发第一次石油危机后世界能源专家提出了生物质燃料的概念,目前很多国家都已经投入了大量的人力、物力资源对其进行研究。生物质是一种低碳燃料,它的含硫、含氮量都很低,同时灰份份额也较小,燃烧后 SO_2 、 NO_x 等气体和灰尘排放量比化石燃料要小得多,因此总体来说,生物质能是一种清洁、且可再生的燃料。并且它种类多样,主要包括燃料乙醇、生物柴油、沼气和生物氢能等种类,都属于可再生能源^[8]。燃料酒精主要通过植物发酵获得。目前可用来生产燃料酒精的原料种类很多,除了谷类、薯类、甘蔗、甜菜以及藻类外,还有生产乳酪和多种饮料后的废液、资源更丰富的农作物秸秆、植物纤维、林业的废料以及城市的有选择的垃圾等^[9]。木质纤维素原料通过微生物发酵制取燃料乙醇,关键技术包括下面几个^[10]:(1) 预处理:分解木质纤维素的晶体结构;(2) 酶水解:通过各种纤维素酶将纤维素解聚为葡萄糖;(3) 发酵:微生物利用糖为能源发酵生产燃料乙醇。

1.1.1 预处理

植物由于木质纤维素的结构复杂,使其形成保护屏障从而阻止细菌以及真菌对木质纤维素细胞的破坏。预处理木质纤维素生物质的目的在于,通过改变木质纤维素细胞壁结构,从而使纤维素酶更容易地水解纤维素。在木质纤维素的生物转化过程中,预处理是破坏木质纤维素致密结构、提高纤维素酶解效率的必须步骤^[11]。

预处理方法主要有：气爆法、液化热水（LHW）法、氨纤维膨胀（AFEX）法、酸煮法、石灰石法以及有机溶剂提取等^[11]，其中研究得最为透彻且应用最广泛的是稀酸预处理和蒸汽膨爆两种方式。

稀酸预处理是木质纤维素预处理的传统方式，早在 1819 年 Bracconet 第一次用硫酸处理木头并得到葡萄糖^[12]。稀酸预处理一般先采用稀硫酸（0.5%~3.0%）预浸原料，然后在在预处理反应器中 130~200℃ 条件下处理原料数分钟。稀酸预处理的优点：糖得率高、催化剂成本低以及易于中和。缺点：由于此种预处理方法需要高压、酸性环境，因此对设备要求比较高，此外副产物的形成也明显。

蒸汽膨爆预处理是在 1925 年首先由 W. H. Mason 提出的^[13]。蒸汽膨爆预处理，一般是在高温（200-300℃）条件下的预处理反应器中，高压使水分很快渗透到木质纤维素的内部，形成这种“湿”的生物质，然后通过蒸汽加热，以水分膨胀的剪切力快速爆破木质纤维素，从而破坏木质纤维素的复杂结构。处理时的时间，根据温度不同，一般是在 1-4 分钟。相对稀酸预处理，该工艺的优点是抑制物形成相对少，但也需要在高压高温条件下，因此也有对设备要求高的缺点。

木质纤维素是由半纤维素-纤维素-木质素共价连接形成一个晶体网格结构。纤维素表面覆盖着半纤维素和木质素，从而阻碍纤维素酶和化学药品对其进行降解^[5]。大多数的预处理方法均是关注如何去除这些障碍，从而使生物量能够被酶降解。稀硫酸预处理是最有前景的预处理方法。采用稀酸预处理时，一大部分的半纤维素被水解成水解液^[14-16]，而纤维素和大部分的木质素却不能被破坏。除了糖之外，水解中还包含酚类、有机酸类和醛类的降解产物。经稀酸预处理后，半纤维素可以被水解为己糖和戊糖，他们能够被可以利用己糖和戊糖的微生物进行共发酵，并将之转化为乙醇^[17-20]。

1.1.2 水解

经过预处理后，木质纤维素去除了木质素和一部分半纤维素，减少了纤维素的晶体结构，增加了酶和纤维素之间的接触面积，但纤维素和半纤维素还不能被微生物利用，必须进一步水解成相应的单体（糖）才能被利用。因此，酶水解的目标就是，将预处理后仍然存在的水不溶性固体颗粒中的多聚糖解聚成能被微生物利用的单糖。大部分木质纤维素预处理后，存在的这些多糖颗粒是纤维素。三种酶协同作用于纤维素的水解：1, 4-葡萄糖内切酶（EG, EC 3.1.2.4）作用位点在于纤维素长链中的内部；纤维二糖水解酶（CBH, EC 3.2.1.91）作用位点是在聚合物的末端，并且酶解后的产物为纤维二糖，纤维二糖并最终被葡萄糖苷酶（BG, EC 3.2.1.21）分解为两分子的葡萄糖分子^[17]。预处理后的木质纤维素水解过程需求的酶的使用量以及其较高的生产成本，已成为木质纤维素乙醇商业化的主要瓶颈。

1.1.3 木质纤维素发酵

纤维素经过预处理后发酵生产乙醇的方法主要有：直接发酵法、间接发酵法、混合菌种发酵法、同步糖化发酵法、非等温同时糖化发酵法(NSSF 法) 以及固定化细胞发酵法等^[21]。木质纤维素水解液发酵产燃料乙醇要求微生物在发酵体系中存在弱酸类、呋喃类以及酚类等抑制物的条件下，还能够利用己糖，包括葡萄糖，甘露糖，半乳糖，戊糖包括木糖，阿拉伯糖等木质纤维素经过处理后解聚后形成的糖。因此糖和抑制物浓度是影响发酵效果的两个重要因素。

1.2 木质纤维素来源的抑制物

目前，已经有采用各种各样的微生物对预处理后的水解液进行了很广泛的生物转化过程的研究^[5,22-30]。在现有的文献记载里，关于木质纤维素预处理后的水解液对酶水解的抑制程度等相关信息很贫乏^[31-33]。水解液中预处理后的降解产物的成分构成以及其浓度大小因预处理原料、化学反应过程、预处理反应时间、温度、压强、pH、氧化还原剂以及催化剂等预处理过程的相关参数的不同而不同^[5,23]。图 1.2 展示了生物量经稀酸预处理时形成降解产物的过程图解^[23,31,34-36]。在低 pH 的预处理条件下，纤维素和半纤维素降解为单糖，然后进一步降解为醛类和有机酸类物质。戊糖进一步降解形成糠醛，己糖进一步降解形成羟甲基糠醛。乙酸是半纤维素水解的初步产物。羧酸是糠醛和羟甲基糠醛进一步降解的产物。木质素降解产生很多种酚类物质，比如香兰素、丁香醛、水杨酸等^[23,25,33,34]。整个生物转化过程包括酶水解和生物转化过程。最常见的生化过程模式就是同步糖化发酵或者可以同步利用己糖和戊糖的共发酵过程。无论在任何一种模式中，预处理后的水解液或者固体基质都能被酶以及后续发酵的微生物利用，进行生物转化过程。无论是在同步糖化发酵或者共发酵过程中，水解液中的抑制物对酶水解反应以及微生物的活力都有很大的抑制作用。稀酸预处理的水解液对发酵过程的抑制作用在众多文献中都有记载^[22-24,27,35,36]。

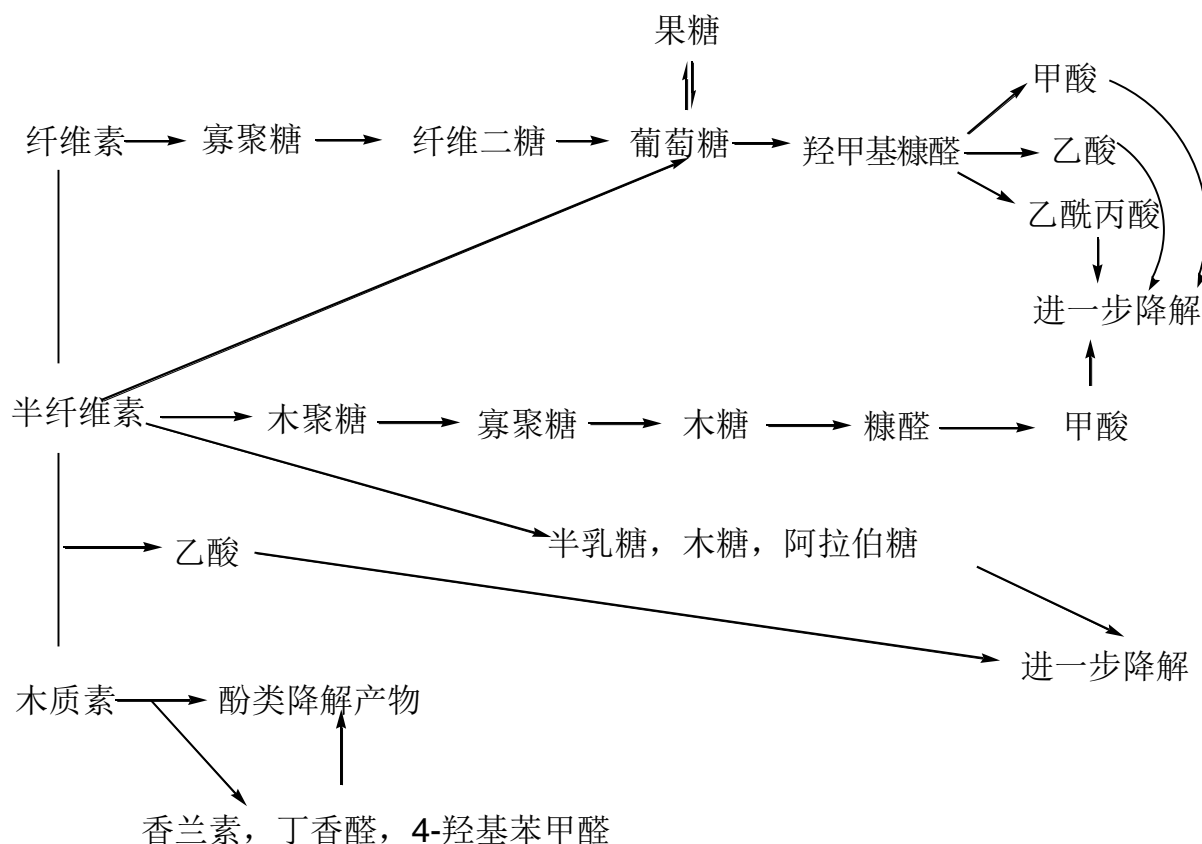


图 1.2 木质纤维素预处理后的降解产物。改编自参考文献^[23,31,34-36]。

Fig 1.2 Degradation products and their origin. Adapted from references sources^[23, 31, 34-36].

稀酸预处理后水解液的成分见表 1.2。水解液中糖的最主要的糖成分是木糖，它主要来自于很容易在稀酸环境下被酶水解的半纤维素^[5]。糠醛和羟甲基糠醛是水解液中释放出来的糖的降解产物。在所有的有机酸种类中，乙酸是最主要的成分。据报道，木质素降解产物香兰素和丁香醛是抑制酶水解反应和发酵微生物活力最强的抑制物^[22]。Kothari 等^[37]人的研究表明，水解液中的抑制物成分严重抑制木聚糖以及葡聚糖的解聚反应过程。

表 1.2 水解液成分

Table 1.2 Composition of pretreatment liquid

成分	浓度 (g/L)
纤维二糖	2.45
葡萄糖	21.80
木糖	74.08
半乳糖	12.35
阿拉伯糖	11.48
甘露糖	2.55
寡聚糖	
木聚糖	17.39
葡聚糖 (寡聚度大于 2)	2.82
糖降解产物	
羟甲基糠醛	2.00
糠醛	1.14
乙酸	13.23
甲酸	3.73
木质素降解产物	ug/L
香兰素	22.65
丁香	386.14

1.2.1 呋喃衍生物

戊糖在水解过程中分解形成了糠醛，它对细胞的作用取决于它在培养基中的浓度。糠醛主要影响微生物细胞生长速率和每分子ATP可以生成的生物量^[26]。Mohammad等对有氧及厌氧情况下的驯化酿酒酵母CBS 8066降解糠醛进行了研究^[28]，在有氧或者厌氧的分批发酵中，糠醛主要代谢为糠醇（产率约为70%），而且在指数期生长期代谢能力最强，稳定期较弱；糠醛使酵母的比生长速率和乙醇产率下降，而当糠醛完全代谢完后有所回升，但也达不到最初的生长速率。不论是在有氧发酵还是厌氧发酵的情况下，添加4g/L的糠醛后，二氧化碳的释放速率下降到原来的35%左右。由实验中的数据描述，二氧化碳释放速率的下降速度是由快到慢的，即在添加糠醛后最初的一段时间内，二氧化碳释放速率减少的很快，之后逐渐缓慢地下降。糠醛转化的主要产物是糠醇，产率约为70%，酿酒酵母CBS 8066指数期生长时的转化速率最大，有氧发酵时，糠醛的转化速率为0.6+0.03 g糠醛/g生物量/h。然而，稳定期的酵母细胞转化糠醛的能力却低的多，另外，他们还报道，糠醛的转化实验中还产生了先前曾有报道但尚未定性的新物质，研究者们通过质谱定性，得出了这些新物质是由糠醛和丙酮酸盐转化而来的。糠醛代谢转化除产

生糠醇外, 主要产物还有糠酸, 其次也产生了少量的糠偶姻和联呋喃甲酰。Roberto等曾经研究过, 当糠醛的浓度低于0.5g/L的时候, 对微生物细胞的生长表现为促进作用; 而当其浓度高于2g/L的时候, 对细胞的生长则表现为完全抑制^[38]。Delgenes等报道糠醛浓度为0.5g/L、1.0g/L、2.0g/L的时候, 将分别降低*P. stipitis*细胞生长达25%、47%、99%^[22]。Nigam发现当发酵培养基中糠醛浓度为0.25g/L时, 并不会降低乙醇得率和产率; 当浓度为1.5g/L时, 将影响微生物的生长, 而且乙醇得率和产率分别被减少了90.4%和85.1%^[39]。另外, 糠醛还会抑制酶解速率。当糠醛浓度在10g/L左右时, 木聚糖和葡聚糖的水解产率均下降9%^[37]。

己糖在水解过程中形成了产物羟甲基糠醛。Palmqvist 和 Hahn-Heagerdal 报道它的抑制作用和糠醛相似。羟甲基糠醛在纤维素水解液中的浓度一般比较低, 主要是因为纤维素中己糖的含量低, 水解过程中且只有很少量的己糖被分解, 此外, Palmqvist 等报道 5-羟甲基糠醛的活性比较高^[38]。Delgenes 等发现, 当 5-羟甲基糠醛在水解液中的浓度分别达到 0.5g/L、0.75g/L、1.5g/L 时, *P. stipitis* 细胞量的减少将达到 43%, 70% 和 100%^[22]。Martinez 等发现利用甘蔗渣水解液发酵产乙醇过程中, 当呋喃(糠醛和羟甲基糠醛)化合物浓度达 0.9g/L 时, *E. coli* 的生长和发酵都会受到影响^[40]。呋喃(糠醛和 5-羟甲基糠醛)抑制物对水解液毒性都有各自的作用, 但是当这两种抑制物与其他几种抑制物, 例如木质素降解产物酚类、芳香族化合物以及几种有机酸(甲酸, 乙酸和乙酰丙酸)共同存在时, 之间就会表现为协同毒性。Vogel-Lowmeier 等报道: 在木糖发酵过程中, 来自于酸水解液中的糠醛, 羟甲基糠醛和乙酸对 *Pachysolen tannophilus* 和 *P. stipitis* 的细胞生长都有抑制作用, 尤其对后者的影响更甚。他们还发现, 这些抑制物对木糖发酵菌种的抑制作用是极其复杂的, 并证明表现出的发酵抑制主要是因为这些抑制物之间的协同效应^[41]。羟甲基糠醛也抑制酶的水解作用, 当水解液中羟甲基糠醛的浓度在 5g/L 以上时, 木聚糖和葡聚糖的水解产率分别被降低 11% 和 14%^[37]。

1.2.2 酚醛类抑制物

大量的化合物(多糖、有机酸、醛类、酚类以及芳香族等)在木质纤维素水解过程中从木质素中释放出来。酚类化合物对微生物在木质纤维素水解液中的发酵过程有明显抑制效应, 并且这类物质具有最高的毒性。酚类造成微生物生物膜完整性破坏和分解, 因此就大大影响了生物膜作为选择性屏障和酶作用载体的能力, 结果就导致细胞生长和糖代谢都被降低^[38]。Parajo 等报道木质素的降解产物, 即使在很低浓度下, 对微生物的毒害作用比糠醛和羟甲基糠醛大。他们也报道在木头水解液中, 当香兰素浓度在 5 或 3.7g/L 时, *S. cerevisiae* 代谢木糖的能力则被完全抑制^[42]。从木糖到木糖醇的生物转化过程中, Villa 等发现酚类化合物浓度低到 0.1g/L 时, 既不影响木糖的消耗也不影响细胞生长和木糖醇的生成。但是当浓度高于这个值(0.2 到 4g/L)时, 它将严重抑制这些过程^[43]。

另外,当丁香醛的浓度达到 5g/L 时,它可以使葡聚糖以及木聚糖的水解产率分别下降 9%和 19%。当香兰素的浓度达到 4g/L 时,葡聚糖和木聚糖的水解产率将分别下降 10%和 9%。水解液中还含有多种酚类化合物,他们和水溶性的木质素均对酶水解反应和微生物转化过程产生抑制作用。在预处理后的过滤渣中,木质素跟纤维素酶相结合,这种现象被称为“非生产性相结合”(nonproductive binding),此时纤维素酶被不可逆地失活^[44,45]。这跟抑制作用不同,抑制对酶反应是非致死性地。据报道,木质素可以和纤维素酶形成木质素-纤维素酶的复合体^[44,46]。当水解液中水溶性的木质素浓度达到 5g/L 时,可使纤维素酶的酶活下降 15%以上。为了解除这种抑制,一般会使用表面活性剂^[37]。Yang 等发现表面活性剂可以吸附在可溶性的木质素上,从而阻止木质素与纤维素酶产生非生产性的结合^[5]。Errikson 等推测表面活性剂可能使木质素与微生物菌丝体结构之间产生疏水性相互作用,从而阻止木质素分子吸附到纤维素酶上^[44]。

1.2.3 有机酸类抑制物

木质纤维素在水解过程中还释放出酸基、丹宁酸、萜烯酸以及存在于纤维素中的乙酰基生成的乙酸,它们就构成了水解液中另一组抑制物形式。McMillan 发现相比木质素衍生物来说,这些物质对微生物的生长抑制作用要弱些^[47]。Lawford 等发现,当培养基中的 pH 比较低时,乙酸 ($pK=4.75$) 是以未解离的形式存在,且溶于脂,并且能够穿透细胞质膜。在微生物细胞内部, pH 在 7.4 左右,乙酸则以解离的形式存在,并且在在细胞质中积累,释放出质子 H。于是就导致细胞内部 pH 下降,且大大抑制了细胞活性,甚至造成细胞死亡^[48]。乙酸的毒性强弱主要取决于微生物的发酵条件。Van Zyl 等使用 *P. stipitis* 利用甘蔗渣半纤维素水解液来发酵生产乙醇,发现乙酸的抑制作用不仅跟其自身的浓度有关,而且还受氧浓度和培养基 pH 的影响。在 pH 6.5 时,乙酸浓度 4.5g/L,此时乙醇生成率开始降低。当乙酸浓度达 15g/L 时,乙醇的产率则减少到原来的 50%。而在 pH 为 5.1 的条件下,当乙酸浓度仅仅为 1g/L 的时候,就会使乙醇的产量下降 50%。当乙酸浓度达到 10g/L 时,乙醇的产量就下降到零^[49]。Felipe 等研究发现,当乙酸浓度为 1g/L 时,将使木糖到木糖醇的生物转化率增加,但当乙酸浓度上升到 3g/L 时,对发酵过程就会产生抑制作用^[50]。而若培养基中没有其它抑制物时,即使乙酸浓度达到 10g/L,依然会对乙醇的生成起促进作用^[25]。

有机酸对酶水解反应也有抑制作用。在稀酸预处理后的水解液中,乙酸是各种有机酸中浓度最高的一种。乙酸是由包含乙酰基团的半纤维素-木质素结构成分中被水解后形成的产物。另外,乙酸还可以由酸性环境中糠醛和羟甲基糠醛进一步降解形成^[23,45,51]。甲酸和乙酰丙酸也是糠醛和羟甲基糠醛的降解产物。研究发现,在甲酸、乙酸、乙酰丙酸等三种有机酸中,乙酸的抑制作用是最强的,且他们的抑制效果排序为:乙酸>甲酸>乙酰丙酸。当水解液中乙酸的浓度达到 5g/L 时,它对酶水解具有很强的抑制作用,此

时葡聚糖的水解产率降低超过 50% 以上。相比乙酸的抑制作用，甲酸的抑制效果相对弱些，但当其浓度达到 5g/L 时，葡聚糖的水解产率约下降 20%。乙酰丙酸对酶水解反应以及微生物转化过程均有抑制作用^[23,31,32]，在水解液中，其浓度较其他两种酸低很多。当水解液中乙酸浓度达 1g/L 以上时，葡聚糖和木聚糖的水解产率分别下降 10% 和 12%。当水解液中甲酸的浓度在 3.5g/L 左右时，葡聚糖和木聚糖的水解产率分别下降 10% 和 11%^[37]。

1.2.4 重金属离子

在水解液腐蚀水解设备的过程中，形成了很多重金属离子，比如铁离子、铬离子、镍离子以及铜离子等，并且这些金属离子对微生物代谢途径中的相关酶是有抑制作用的。Watson 等分析金属阳离子对参与木糖代谢过程中酶的活性影响，以及他们对 *P. tannophilus* 细胞生长的影响。为了达到研究目的，他们使用含有与水解液中金属阳离子的成分相同的合成培养基作为研究对象。当铜、镍、铬、铁离子在培养基中的浓度分别为 4、5、100 和 150 mg/L 时，微生物细胞的活性稍微下降。另一方面，当镍离子浓度为 100 mg/L 时，细胞活性降低了 60%^[52]。

1.2.5 几种抑制物的生物毒性“协同效用”

微生物能够耐受的每种抑制物的最大浓度无法检测，这是因为影响抑制作用的因子有很多因素，主要包括包括微生物种类、发酵过程条件、出现在培养基中的抑制物种类以及这些抑制物的毒性协同效应。Palmqvist 等发现，没有糠醛存在时，乙醇的生成会被培养基中乙酸（10g/L 时）促进。同样，在没有乙酸浓度为零时，2g/L 的糠醛浓度会促进乙醇的生成。然而，这两种抑制物同时存在时，则会严重影响微生物细胞生长速率、细胞量，以及乙醇得率^[25]。Zaldivar 等的研究证明，半纤维素水解液的毒性来自于各种抑制物（醇，醛和酸）的协同作用，而不是某一种化合物^[53]。Nigam 曾经以小麦纤维素水解液发酵生产乙醇，也曾从模拟的具有相同浓度的乙酸、糠醛、木质素衍生物的合成培养基中获取乙醇^[39]。在合成培养基中，乙醇得率和产率分别比水解液中低 74.4% 和 83%。

Palmqvist 等研究者报道，对于已知的抑制剂的混合抑制作用，纤维素酶的活力将下降 42%。全部的抑制剂对葡聚糖的水解抑制作用（高达 63%）比目前已知的所有抑制剂的抑制效果的叠加还强很多。这暗示着木质素的降解产物中大多数的酚类化合物在酶水解的过程中充当着主要的抑制剂角色^[26]。所有抑制剂的抑制效果并不是每个抑制剂抑制作用的直接叠加。抑制剂间的相互作用对纤维素酶水解过程的抑制效果并不是每一个抑制剂抑制效果的相加。混合糖（葡萄糖、木糖。纤维二糖）分别使葡聚糖的水解产率和木聚糖的水解产率下降 33% 和 98%^[37]。

1.3 抑制物的脱除方法

为了有效地利用半纤维素中的糖，在进行乙醇发酵生产前，将预处理后产生的发酵抑制物脱除是必须步骤。脱除抑制物的方法有很多种，包括物理、化学和生物三个方面，已经开始应用于脱除木质纤维素来源的抑制物。一种脱毒方法是否有效主要取决于木质纤维素的水解程度，以及后续所使用的发酵微生物的种类。因为每种水解液含有不同的抑制物成分，并且每种微生物对抑制物的耐受能力差别很大^[11]。

1.3.1 物理方法

通过真空蒸发方法来降低水解液中挥发性抑制物（乙酸，糠醛，以及香兰素等）的浓度是一种普遍使用的物理脱毒方法。不过这种方法也有缺点，就是在某种程度上增加了非挥发性抑制物（木质素衍生物）的浓度，从而增加了发酵的抑制程度。Silva 等利用真空蒸发的方法脱除水稻秆水解液中的抑制物，用木糖为底物发酵生产木糖醇，他们发现木糖醇发酵过程会因非挥发性抑制物的浓度升高而受阻碍，因为这些非挥发性抑制物对微生物的毒害非常强^[54]。

1.3.2 化学方法

化学方法就是在一定 pH 条件下，利用沉淀作用使抑制物浓度降低，然后再将 pH 调解到后续发酵需要的适宜范围。还有一种方法是用活性碳或者离子交换树脂来吸附抑制物，使其浓度降低。Marthinez 等报道使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将甘蔗渣水解液 pH 调节到 9.0，是一种非常有效的脱毒方法。在他们的试验中，将水解液从 25℃ 加热到 60℃ 后，更适合这种脱毒。因为此法可以脱除 51% 的呋喃类抑制物和 41% 的苯酚类抑制物，与此同时有 8.7% 的糖损失^[55]。在各种化学脱毒方法中，离子交换树脂的成本比较高，并不能应用于工业化。不过活性炭的成本比较低廉，并且具有较高的抑制物吸附能力。

1.3.3 物理化学联合方法

目前，还有许多物理与化学连用的方法应用于木质纤维素水解液的脱毒。Converti 等在利用几种酵母来生产木糖醇。他们发现，木质素降解产物和乙酸的存在大大阻碍了发酵过程的进行。为了纯化水解液以提高发酵效率，他们采用物理与化学方法的联合：最初，用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 到 10.0，然后用 H_2SO_4 再将 pH 调解到 5.5。接着，将活性炭加入到水解液中以吸附抑制物，最后再进行蒸发。他们联合了 pH 调节和活性炭吸附，对脱除木质素衍生物非常有效。活性炭降低了木质素衍生物的 95.4%，而蒸发的过程将使乙酸的浓度降低到 3g/l。乙酸的这种浓度范围，基本不会对微生物造成抑制。这个脱毒过程能够使从木糖向木糖醇的转化过程正常进行，并获得 0.41g/h 的生成速率和 0.63 g/g 的得率^[56]。

1.4 木质纤维素来源抑制物的生物降解

高温、强酸或强碱的预处理在破坏木质纤维素结构的同时，不可避免的生成了多种对后续酶解和微生物发酵过程具有强烈抑制作用的降解产物，主要包括有机酸类化合物、呋喃类化合物和酚类化合物^[54]，尤其以呋喃类的糠醛（furfural）和 5-羟甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural）对纤维素酶解和微生物发酵的抑制作用最强。因此，要实现木质纤维素的有效生物转化，必须对预处理后的原料进行脱毒处理。

目前常用的脱毒方法有水洗法^[42]、过碱化处理（Overliming）^[55]、活性炭或离子交换树脂吸附^[61]、真空蒸发^[11]、以及生物降解^[57]等。这些方法中具有实际应用价值的仅有水洗法和过碱化方法，但都存在着大量耗水和大量废水产生、物料损失严重、处理后物料高含水等严重问题^[59]。与其它脱毒方法相比，生物脱毒法条件温和、抑制物转化彻底、耗能低且废水少，而且脱毒后的物料可以直接进入乙醇发酵，但脱毒效率低^[60]是制约生物脱毒法广泛应用的核心问题。因此，得到一株能够高效降解各种抑制物的微生物是生物脱毒法的关键^[56]。

生物法脱毒就是指脱毒过程中使用一种（或多种）专门的酶或一种（或几种）微生物，使其作用于水解液中的抑制物。用 *Trametes versicolor* 产的漆酶和过氧化物酶共同作用于木头水解液，能增加糖耗和乙醇得率，这主要是因为这两种酶对弱酸和苯酚类化合物的降解^[54]。这些酶的脱毒机理很可能是低分子量苯酚化合物的氧化聚合反应。使用微生物来降解水解液中的抑制物是一种具有选择性的脱除抑制物的方法。Schneider 报道使用一种诱变的 *S. cerevisiae* 就可将水解液中的乙酸浓度从 6.8g/L 降低到 0.4g/L^[57]。事实上，生物脱毒法相对化学或物理脱毒法，条件温和，对设备要求不高，而且不会使其他物质损失或导致部分抑制物的浓度升高。并且采用生物脱毒法，可以使后续发酵连续进行。

糠醛及其衍生物由于含有呋喃环，不易受到代谢过程的破坏，表现出难以生物降解性能。1983年, Gerhard等曾从含有亚硫酸盐的连续发酵罐中分离出了一株能够转化糠醛的菌株 *Desulfovibrio* sp. F-1^[61]。该菌能够在限制无机盐、生长因子的含有糠醛的硫酸盐培养基中，利用糠醛作为唯一碳源和能源进行生长并繁殖，且主要发酵产物为乙酸，该菌还能将产物最终转化为甲烷和二氧化碳。*Desulfovibrio* sp. F-1还能够利用乙醇、乳酸盐、丙酮酸盐、延胡索酸盐以及细胞色素C作为碳源。这株菌能够在无机盐和生长因子受限制的硫酸盐培养基中，以糠醛作为唯一的碳源和能源生长，得率为1.6-1.8毫摩尔乙酸/毫摩尔糠醛。

Belay等对一株产甲烷球菌属的突变株 *Methanococcus deltae* LH 厌氧转化糠醛进行了研究^[62]，产甲烷球菌属 *Methanococcus deltae* LH 能够在充满 H₂-CO₂（体积比 80:20）的

含有各种浓度糠醛的厌氧环境中生长。在含有5mM到10mM浓度的糠醛培养基中，产甲烷球菌属*Methanococcus deltae* LH生长不受任何抑制，而在20mM到25mM的高浓度糠醛培养基中，生长受到抑制。产甲烷球菌属*Methanococcus deltae* LH能在48小时内完全转化糠醛，其主要产物是糠醇，另外还能生成甲烷和二氧化碳气体，这对厌氧发酵处理含有糠醛的污染物的工业很有应用价值。不过，该微生物的一个特点就是，不能以糠醛为唯一碳源及能源生长。然而，在所测试的其它产烷微生物中，其它产烷菌，如甲烷细菌属*Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg，甲烷八叠球菌属*Methanosarcina barkeri* 227，产甲烷球菌属*Methanococcus thermolithotrophicus*以及瘤胃甲烷短杆菌*Methanobrevibacter ruminantium* 等众多微生物却不能转化糠醛。

Nichols 等从被糠醛污染过的土壤中分离到了一种可以代谢呋喃衍生物、有机酸以及酚类化合物的真菌 *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616，可以把毒性强的糠醛以及 5-羟甲基糠醛转化为若毒性的相应的醇的形式，即糠醇和 2,5-呋喃二甲醇，然后再氧化为相应的酸，2,5-呋喃二羧酸最后也转化为糠酸，之后呋喃环裂解成可以进入 TCA 循环的物质，从而使得酵母的后续发酵生产乙醇得以进行^[63]。Joao 等发现呋喃衍生物的降解转化不但跟糠醛还原酶 FRR 以及醇脱氢酶 ADH1、ADH6、ADH7 有关，还跟木糖还原酶 XYL1 以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 ZWF1 显著相关^[64]。Akillioglu 等发现酵母细胞发酵产乙醇时，代谢转化发酵抑制物 5-羟甲基糠醛是最主要的代谢活动，其产物是 2,5-呋喃二甲醇，而糖的存在，能够促进 5-羟甲基糠醛的转化；另外氧气的存在，也能促进发酵毒物 5-羟甲基糠醛的转化速度^[65]。他们的研究结果也表明，低浓度的呋喃衍生物能够促进酵母细胞的生长，只有浓度过高时才会对细胞产生毒害作用。

近两年，荷兰Delft University of Technology的一个研究组对糠醛和5-羟甲基糠醛的代谢路径进行了较为深入的研究。Wierckx等从土壤中发现并利用5-羟甲基糠醛为唯一碳源富集培养分离获得的*Cupriavidus basilensis* HMF14能够代谢转化5-羟甲基糠醛和糠醛，但却不能利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖以及甘露糖^[70]，这为利用木质纤维素中大量糖类进行后续发酵既扫除了障碍，又保存了大量可利用的能源。*Cupriavidus basilensis* HMF14 除了能代谢转化5-羟甲基糠醛和糠醛外，还能利用葡萄糖酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、苯、甲苯以及苯酚，另外这株微生物还有一个众所周知的优势，就是它能高效地生产聚羟基脂肪酸酯。*Cupriavidus basilensis* HMF14 除了能够代谢5-羟甲基糠醛和糠醛外，还能以其它呋喃衍生物为唯一碳源，如糠醇和糠酸。作者们以小麦秸秆酸处理木质纤维素水解液做了研究，结果发现*Cupriavidus basilensis* HMF14 能完全转化水解液中的呋喃衍生物，它们研究发现糠醛的转化产物分别是糠醇和糠酸，糠酸是其氧化产物，也是最终进入细胞内部支持菌体生长的实体物质。Koopman等人发现，在这三种呋喃衍生物中，糠醛对微生物的毒性最大，因此在微生物转化糠醛时，首先将它快速

地转化为糠醇，从而使糠醛含量保持在一个低水平浓度范围内，然后再分批少量地通过将其氧化为糠醛作为过渡阶段，最终将其氧化为糠酸，通过细胞摄入，将糠酸大量地运输到细胞中，支持菌体生长，因此在这个过程中，糠醛、糠醇和糠酸是相互转化的，且这个过程中只能看到少量的糠酸积累。*Cupriavidus basilensis* HMF14只有将糠醛先快速地转化为糠醇，再进一步氧化为糠酸时，才进入菌体的指数生长阶段。

Boopathy^[68]九十年代时曾做过产烷微生物代谢含甲基的糠醛为糠醛的研究。他以产甲烷球菌属*Methanococcus* sp. B为代表，做了产烷微生物将5-甲基糠醛以及2-甲基糠醛转化为糠醛的研究工作。产甲烷球菌属*Methanococcus* sp. B以甲基糠醛作为主要的生长基质，并将其转化为糠醛，每1摩尔的甲基糠醛均被转化为1摩尔的糠醛，且产生了0.7摩尔的甲烷。Boopathy 研究发现，并不是所有的产烷微生物都能进行这样的反应。产烷微生物能够转化甲基糠醛的现象在厌氧处理产生含有甲基糠醛废水的造纸业以及燕麦生产加工的废水污染上很有应用价值。然而，产烷微生物却不能进一步转化糠醛为小分子物质，因此它们并不能将甲基糠醛完全代谢为可以进入三羧酸循环的小分子物质。

在众多木质纤维素预处理后的抑制物中，呋喃衍生物的生物降解最受关注。目前关于糠醛及其衍生物的生物降解途径的研究，多数还集中在好氧转化方面。醛基很活跃，有氧条件下，糠醛及其衍生物可由醛还原为相应的醇，如糠醛被还原为糠醇，同样 5-羟甲基糠醛被还原为 5-羟甲基糠醇；羟基也不稳定，在有氧气的环境中，也可由醇被氧化为醛的形式，再由醛继续氧化为相应的酸的形式。Felipe 等的研究中，就报道了四氢糠醇被氧化为四氢糠醛，继而再被氧化为四氢糠酸的系列反应^[50]。

呋喃衍生物是含有呋喃环的杂环化合物，在有氧条件下，环的裂解是杂环化合物整个生化反应的限速步骤。厌氧菌与好氧菌在生理方面有很大的差异，前者比后者的酶系统复杂很多。研究表明，相对于好氧微生物来说，厌氧微生物的代谢系统里有易于诱导、且种类多样的健全开环酶体系^[57]。因此，厌氧微生物基本上都拥有特殊的脱毒和利用难降解有机物的性能，而且厌氧菌体内的代谢系统还能将那些在有氧条件下很难转化的有机物进行生物化学反应。这些研究结果为糠醛及其衍生物等含呋喃环的化合物的厌氧降解提供了可能性。

Elaine 和 Knight^[57]从厌氧发酵的城市污水污泥中分离出了硝酸盐还原菌和产烷菌，发现这些微生物可以利用糠醛为唯一碳源和能源生长，在还原硝酸盐的条件下，糠醛的降解产物为 CO，在产甲烷的条件下，糠醛的降解产物为 CH₄ 和 CO₂。厌氧发酵时，在硫酸盐还原菌(*Desulfovibrio* sp.)的作用下，糠醛则被降解为乙酸^[53]，该菌在连续发酵时，能使糠醛浓度消耗到最低检出限 1 μmol/L 以下，当糠醛浓度高于 10 mmol/L 时，会抑制该菌的生长和糠醛的降解。厌氧发酵的具体代谢途径还不清楚，但和有氧降解不同，

Desulfovibrio sp. 降解糠醛的产物中却没有相应的 CoA 酯^[58], 而且产物为乙酸。该研究除了应用于废水处理方面以外, 对更深一步研究厌氧生物降解有毒化学物质方面的研究还有帮助。

Trudgill、Koenig 等人以 *Pseudomonas putida*(F2、Fu1)为代谢菌株进行了糠醇、糠醛、糠酸代谢途径的相关研究^[55,56]。有关糠酸降解的机理为: 首先在糠酰-coA 合成酶作用下形成 2-糠酰 CoA, 然后是在脱氢酶催化下生成 5-羟基 2-糠酰 coA, 其结合的氧来源于水的水解, 羟基化反应的催化酶多是以钼元素为辅因子的酶。*P.putida* (F2、Fu1)还可以糠醛、糠醇为反应底物, 经由糠酸和 2-糠酰-coA 途径进行降解。

Koopman^[67] 等人做了很多革兰氏阴性菌 *Cupriavidus basilensis* HMF14 关于呋喃衍生物代谢途径的研究工作, 他们通过建立筛选突变体转座子文库, 鉴定出了 *Cupriavidus basilensis* HMF14 菌株关于呋喃衍生物代谢途径涉及的基因, 并在假单胞菌 *Pseudomonas putida* 体内重构了呋喃衍生物包括糠醛和 5-羟甲基糠醛的代谢途径。在革兰氏阴性菌 *Cupriavidus basilensis* HMF14 体内, 糠醛和糠醇可以互相转化, 在醇脱氢酶以及辅因子 NAD⁺ 的作用下, 糠醇可以氧化为 2-糠醛; 而在醛还原酶以及辅酶 I NADH 的作用下, 糠醛就可以还原为糠醇。在醛脱氢酶以及辅因子 PMS/DCPIP (二氯酚靛酚) 的作用下, 糠醛就会氧化为糠酸, 在还原力 ATP 以及糠酰辅酶 A 合成酶的作用下, 结合一分子的 HSCoA, 糠酸就转化为 2-糠酰辅酶 A (2-Furoyl-CoA), 在依赖钼元素的糠酰辅酶 A 脱氢酶的作用下, 结合一分子水后, 2-糠酰辅酶 A (2-Furoyl-CoA) 就转化为 5-羟基-2-糠酰-辅酶 A, 再通过酮-醇互变异构化, 以及自发的内酯水解或者在一般的内酯水解酶的作用下, 5-羟基-2-糠酰-辅酶 A 又转化为 2-氧化戊二酸和辅酶 A, 2-氧化戊二酸最终进入 TCA 循环。对于 5-羟甲基糠醛而言, 5-羟甲基糠醛和 2,5-呋喃二甲醇也是可以互相转化的, 而且转化所需要的酶及辅因子同糠醛与糠醇的相互转化条件一样。5-羟甲基糠醛氧化为 5-羟甲基糠酸的条件也与糠醛的氧化为糠酸一致, 在氧化还原酶的作用下, 5-羟甲基糠酸氧化为 2,5-呋喃-二羧酸, 然后又在 2,5-呋喃-二羧酸脱羧酶的作用下, 2,5-呋喃-二羧酸脱去一个羧基, 转化为 2-糠酸, 之后的转化途径就与糠酸的一致了。

1.4.1 呋喃衍生物的共代谢

有些很难降解的化合物, 不能直接作为碳源或能源物质被微生物利用, 但当环境中存在其它可被利用的碳源或能源时, 这些化合物才能被利用, 这样的代谢过程称为共代谢作用。例如, Boopathy 等^[68]发现肠道细菌 *Genera Klebsieua, Enterobacter, Escherichia, Citrobacter, Edwardsiella, Proteus* 等虽然不能利用糠醛等作为唯一的碳源和能源, 但当培养基中有葡萄糖、蛋白胨等作为主要底物时, 能在短时间内(8 h)有氧或者无氧转化糠醛为糠醇, 5-羟甲基糠醛为 5-羟甲基糠醇。Belay 等人^[55] 在研究 *Methanococcus deltae*

△LH 转化呋喃醛时发现, 该菌并不能直接单独利用糠醛作为底物, 即该菌不能利用糠醛为唯一碳源进行生长繁殖, 但与其他物质一起作为能源时, 糠醛可以直接被转化且促进该菌生长。

目前关于共代谢的作用机理尚不是很清楚, 一些研究者认为, 有些杂环化合物表现为难降解的特点, 是因为微生物体内不存在可以直接降解它们的酶, 但当微生物在利用易降解的有机物时诱导产生了能够降解杂环化合物的酶, 进而促进了这些难降解化合物的生物代谢。微生物的共代谢作用能产生一些新的代谢途径^[70], 从而对含有多种有机污染物的共存体系就具有了较高的降解能力。共代谢作用在难降解的有毒有机污染物的脱除和污水处理方面具有重要作用。

在诸多的实验和生产实践中, 人们多次发现单株微生物不能完成或只能微弱地进行某些生物过程的代谢, 而必须依靠两种或两种以上的微生物共同培养完成。工业污染物大都含有多种复杂成分, 利用混合菌代谢不仅可以同时消除几种污染物, 而且对某些污染化合物来说, 单一菌种不能完全降解难降解的杂环化合物, 必须依靠混合菌群的共代谢来完成。例如, Boopathy 等人^[71]把硫酸盐还原菌 (*Desulfovibrio B*)和产甲烷细菌 (*Methanosarcina barkeri* 227)联合培养, 以糠醛为底物生产甲烷。硫酸盐还原菌 (*Desulfovibrio B*)可以以糠醛为能源进行生长, 代谢转化产物为乙酸; 产甲烷细菌 (*Methanosarcina barkeri* 227)则能以乙酸为底物, 将之进一步转化为甲烷气体。这样, 利用这种混合菌的联合培养, 能以很难降解的杂环化合物糠醛为唯一碳源和能源, 并最终将之转化为甲烷和二氧化碳气体, 这样既能除去了污染物, 又生产了生物质能源甲烷气体。在含有糠醛的污水中, 虽然 *Methanosarcina barkeri* 227 的生长被抑制, 但此时 *Desulfovibrio B* 能将糠醛转化为乙酸; 当 *Desulfovibrio B* 被抑制时, 糠醛就不能被降解, 这说明必须联合培养 *Desulfovibrio B* 和 *Methanosarcinabarkeri* 227 才能完成糠醛的完全降解。

1.5 本论文的研究内容与意义

1.5.1 生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的生长特性研究

霉菌 *A. resinae* ZN1 是本实验室, 从发霉的玉米秸秆中筛选出来的一株能降解木质纤维素预处理后产生的, 各种抑制物的生物脱毒真菌。本文通过对该菌株的培养, 了解其形态特征, 加深了对该菌株的认识。通过水洗, 除掉预处理后的玉米秸秆中各种能溶于水的成分, 然后分别单独添加各种糖、一系列不同浓度的发酵抑制物作为生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的唯一碳源, 研究了该菌的生长碳源谱。

1.5.2 生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的呋喃降解途径的分析

Zhang 等从稀酸预处理后的玉米秸秆中筛选到了一株脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1, 并对其做了分子生物学和微生物学鉴定, 而且在玉米秸秆发酵乙醇过程中得到了有效利用^[60]。本文的主要工作是以糠醛和 5-羟甲基糠醛作为唯一碳源对这一生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的抑制物代谢路径以及混合抑制物 (糠醛、5-羟甲基糠醛以及糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸) 的生物毒性协同作用进行了研究。本文的结果对将来加快生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 生物脱毒速率、改善木质纤维素生物转化的限速步骤以及基因改造工程菌、构建关键代谢酶等后续工作提供了重要的实验依据。

第二章 木质纤维素来源抑制物的生物降解

2.1 前言

经过各种理化或理化联合方式处理后的木质纤维素，通过纤维素酶的进一步水解，使之成为能被酿酒酵母发酵利用的水解液。而其中的各种有机酸类，呋喃类，苯酚类以及芳香族类抑制物对纤维素酶的活性、酿酒酵母菌株的生长以及代谢都有显著的抑制作用。目前应用最广泛的抑制物脱除的方法有：活性炭或离子交换树脂吸附脱除抑制物、强酸强碱调节 pH 并沉淀抑制物、真空蒸发易挥发抑制物，以及通过微生物生物转化抑制物。在众多脱毒方法中，生物脱毒方法条件最温和，对设备要求不高，且不形成新的抑制物，脱毒后即可直接进入乙醇发酵生产过程等优势。

因此筛选出能够快速有效降解各种抑制物的生物脱毒菌株，是实现木质纤维素生物质燃料生产经济性的关键步骤。本章内容为实现这一目标，针对能以糠醛、5-羟甲基糠醛以及乙酸等抑制物作为唯一碳源的生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1，对这些抑制物的代谢路径以及混合抑制物（糠醛、5-羟甲基糠醛以及糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸）的生物毒性协同作用进行了研究，另外本文还单独做了以乙酸为碳源的抑制物降解研究。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验试剂

所有本部分实验使用的试剂如表 2.2.1 所示。

表 2.2.1 试剂

Table 2.2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
木糖	BR	中国惠兴生化试剂有限公司
蔗糖	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
甘露糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
果糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
阿拉伯糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
半乳糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酰丙酸	AR	上海睿腾化工有限公司
糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠醛	AR	J&K CHEMICAL LTD.
4-羟基苯甲醛	CP	上海凌峰化学试剂有限公司
水杨酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
阿魏酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
苯酚	AR	上海菲达工贸有限公司
愈创木酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
芝麻酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
香兰素	AR	国药集团化学试剂有限公司
正十二烷	AR	国药集团化学试剂有限公司
煤油	CP	上海菲达工贸有限公司
agar	AR	国药集团化学试剂有限公司

2.2.2 实验仪器

所有本部分实验使用的仪器如表 2.2.2 所示。

表 2.2.2 仪器

Table 2.2.2 Experimental equipment

仪器名称	规格	生产厂家
大型气浴摇床	HZ-9310KB	华利达
电子天平	BS223S	梅特勒
显微镜	XSP-8C	上海精密仪器仪表有限公司
真空干燥箱	DZF-6050B	上海一恒科学仪器
隔水式恒温培养箱 D	隔水式恒温培养箱 D	上海一恒科学仪器
电热鼓风干燥箱 A	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化
冰箱（新飞）	BCD-219D	新飞
水浴恒温摇床 A	HZ-9212S	华利达
水浴恒温摇床 B	HZ-9212S	华利达

2.2.3 原料

高温稀酸预处理：用稀硫酸预浸粉碎后的秸秆，搅拌均匀放置过夜后放入反应器进行反应，稀酸浓度 1~5%w/w，预处理时间 1~15min，预处理温度为 160~240℃，得到预处理强度不同的各种秸秆；获得的秸秆放置于 4℃冰箱中保存以备后用。

2.2.4 培养基

PDA 培养基：取去皮马铃薯 200 g，切成小块，加水 1000 ml。煮沸 1h，用 8 层纱布过滤，然后补足失水至 1000 ml，并添加葡萄糖 20 g，琼脂粉 20 g。115℃ 灭菌 20 min。贮存备用。该培养基用于分离各种微生物，以及目标菌株的保存。

固体生物脱毒水洗物料：将预处理后的玉米秸秆充分水洗，水洗大致比例为初次水洗自来水：预处理玉米秸秆=10:1，再次水洗为：自来水：预处理玉米秸秆=10:1，三次、四次水洗比例为：自来水：预处理玉米秸秆=5:1。水洗过程中充分浸泡、搅拌、搓洗物料，保证将预处理秸秆中所有可溶物都完全去除。物料洗净烘干后，备用。

2.3 研究方法

2.3.1 形态特征鉴定

首先从低温冰箱里取出保存的菌种 PDA 平板，用新制作的 PDA 平板活化菌种，培养 5 天后，用接种环从活化菌株的 PDA 平板上挑取少量新鲜的菌丝于干净的玻片上。玻片上已经点有少量无菌水。风干后固定，用光学显微镜观察菌株的形态特征。

2.3.2 孢子悬液制备

每次按照需要,用无菌水洗下相应的孢子体积量。10 ml 孢子/支试管斜面,洗法是:每次用 5 ml 移液枪移取 5 ml 无菌水到试管斜面中,沿斜面倾斜方向左右摇动试管,如此摇动 80 次左右后,将孢子悬液倒入无菌小烧瓶中,依次方法,每支试管洗下孢子悬液 10 ml。每次洗下每一批实验所需的孢子悬液到同一个无菌小瓶中备用。

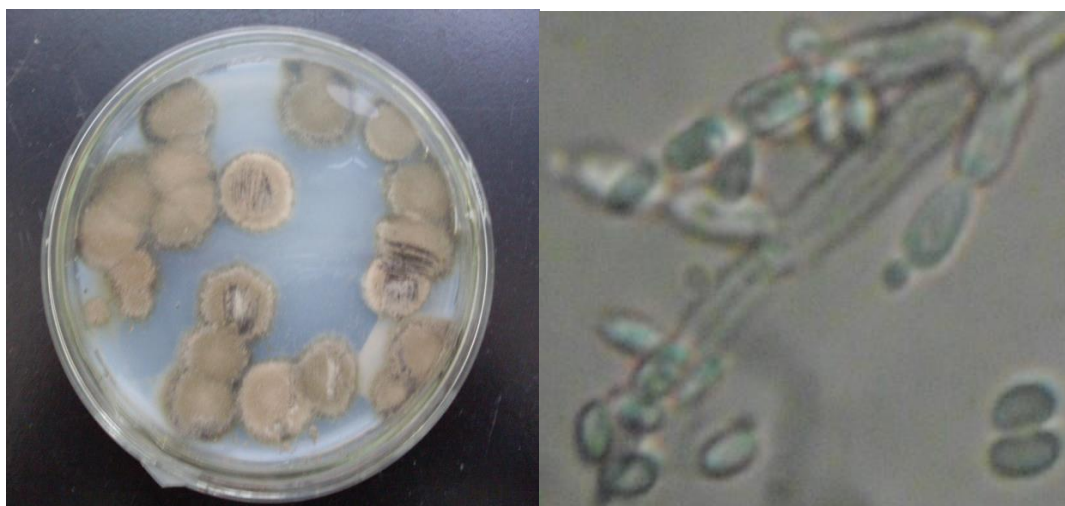
2.3.3 实验操作步骤

每次按照所需实验组数,分别称取 3 g 洗净并完全烘干的秸秆于贴有相应标签纸编号的 250 ml 三角烧瓶中,将相应量的碳源(各种单糖、糠醛、5-羟甲基糠醛、甲酸、乙酸、乙酰丙酸、正十二烷烃、煤油、香兰素、阿魏酸、水杨酸、4-羟基苯甲醛、苯酚、愈创木酚、芝麻酚)溶解到 10 ml 去离子水中(含水量约为 80%),然后分别加入到相应编号的烧瓶中。然后每瓶分别均匀加入 2 ml 已制备好的孢子悬液,用四层纱布包好瓶口后置于 25 °C 恒温培养箱中静止培养。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 形态特征鉴定结果

在 PDA 培养基中 *A. resiniae* ZN1 的生长生长状态和光学显微镜下的细胞结构分别如下图:



A. *A. resiniae* ZN1 在 PDA 平板上的生长状态 (25°C 静止培养 5 天) B. 普通光学显微镜下的细胞结构 (10 倍物镜 X10 倍目镜)

图 2.4.1 *A. resiniae* ZN1 在 PDA 平板上的生长状态和显微镜下的细胞结构

Figure 2.4.1 Growth performance of *A. resiniae* ZN1 on PDA plates and the microscopic cell structure

生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的形态特征：在 25℃ 恒温培养箱中培养一周，菌落直径可达 1 cm 左右。正面呈现深土黄色，小绒毛状，边缘有绒毛，反面呈深蓝色。培养基反面呈现深蓝色，当随着培养时间的延长，生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 分泌到培养基中的色素就越多，培养基背面所表现出来的颜色也越来越深，此时为蓝黑色。

在显微镜下可以看到菌丝有隔，菌隔中有类似绿色荧光物质，产囊体呈现螺旋式卷曲，产囊体下的菌丝包围形成子囊果，具有不整子囊菌纲真菌的形态特征，该菌所属子囊菌门 *Ascomycota* 子囊菌亚门 *Ascomycetes* 暗膜菌科 *Amorphothecaceae* *Amorphotheca* 属 *resinae* 种。

2.4.2 生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 对各种抑制物的单独降解

经过预处理后，玉米秸秆中抑制物主要有三种有机酸（甲酸、乙酸、乙酰丙酸）、两种呋喃衍生物（糠醛、5-羟甲基糠醛）以及芳香族化合物（4-羟基苯甲醛、香兰素等）。本论文的思路是采取固体脱毒的方法，即将生物脱毒真菌 *A. resinae* Z1 直接接入到经过预处理后并完全水洗过的玉米秸秆中培养，然后再分别添加一系列不同浓度的单一抑制物，并将他们放在 25 °C 恒温培养箱里统一培养，每天定时观察记录生物脱毒真菌 *A. resinae* Z1 的生长状况，并拍照。

2.4.2.1 生物脱毒真菌 *A. resinae* 在完全洗净的秸秆中单独添加各种单糖的生长特性

分别研究了葡萄糖、木糖、蔗糖、甘露糖、阿拉伯糖、果糖以及半乳糖等各种单糖对生物脱毒真菌 *A. resinae* 生长的促进作用，浓度均为 160 mg 糖/g 干秸秆，秸秆含水量调节到约为 80%，接入霉菌 *A. resinae* 的孢子悬液。

在完全洗净并烘干的玉米秸秆中分别添加葡萄糖、木糖、蔗糖、甘露糖、阿拉伯糖、果糖以及半乳糖等各种单糖作为霉菌 *A. resinae* 的碳源及能源，25 °C 恒温培养箱静止培养 9 天。实验结果见表 2.4.2.1 和图 6。从实验结果中可以看出，这七种糖都可以作为生物脱毒真菌 *A. resinae* 生长的碳源。不过总体来说，葡萄糖作为碳源时的生长效果最好，接种后的第二天即开始出现少量微弱的菌丝，到第三天的时候霉菌菌丝 *A. resinae* 已比较旺盛，菌丝密度也比较大，到第五天的时候菌丝达到最旺盛的状态，菌丝密度也最大，菌丝已经布满整个培养基的表面，第十天的时候菌丝开始出现消融的迹象。培养霉菌 *A. resinae* 期间，玉米秸秆培养基的含水量逐渐下降，当培养到第十天时，培养基表面已经变干。木糖作为碳源的效果仅次于葡萄糖，霉菌 *A. resinae* 也是第二天开始出现少量微弱的菌丝，到第四天的时候霉菌菌丝 *A. resinae* 比较旺盛，菌丝密度也比较大，同葡萄糖一样，也是在第五天的时候菌丝达到最旺盛的状态，密度也达到了最大值，菌丝开始布满整个培养基的表面，第十天的时候菌丝开始消融。蔗糖、甘露糖、阿拉伯糖以及

果糖作为霉菌 *A. resinae* 的碳源时，均是在第三天才开始少量微弱的菌丝，但甘露糖、阿拉伯糖和果糖到第五天的时候菌丝已经比较旺盛，菌丝密度也比较大，菌丝分布已经占了半个培养基表面。在这三种糖当中，甘露糖作为霉菌 *A. resinae* 碳源的效果更好一点，在霉菌 *A. resinae* 培养到第六天的时候，菌丝已经达到最旺盛状态，菌丝遍布整个培养基表面，菌丝密度达到最大值，同样在霉菌 *A. resinae* 培养到第十天的时候，菌丝开始消融。以果糖作为碳源时，在培养霉菌 *A. resinae* 到第七天的时候，菌丝达到最旺盛的状态，菌丝布满整个培养基表面，菌丝密度达到最大值。分别以蔗糖和阿拉伯糖作为碳源时，霉菌 *A. resinae* 的菌丝一直都没有达到最旺盛的状态，但用阿拉伯糖作为碳源培养 *A. resinae* 时，到第五天的时候菌丝达到比较旺盛的状态，菌丝的分布占了培养基表面的一半以上，第十天的时候菌丝开始消融。而添加蔗糖的秸秆培养霉菌 *A. resinae* 时，培养到第七天的时候菌丝才达到比较旺盛的状态，菌丝密度比较大。当用半乳糖作为碳源时，菌丝生长一直都很微弱，培养基表面也只有少量菌丝分布，到第十天的时候，菌丝开始消融。总体来说，这七种糖中，葡萄糖作为碳源时，生物脱毒真菌 *A. resinae* 的生长效果最好，木糖仅次于葡萄糖，半乳糖最差。

表 2.4.2.1 *A. resinae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加各种单糖的生长特性

Table 2.4.2.1 The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of various monose

含量 (160mg/g) 时间	葡萄糖	木糖	蔗糖	甘露糖	阿拉伯糖	果糖	半乳糖
第 1 天	-	-	-	-	-	-	-
第 2 天	+	+	-	-	-	-	-
第 3 天	++	+	+	+	+	+	-
第 4 天	++	++	+	+	+	+	+
第 5 天	+++	+++	+	++	++	++	+
第 6 天	+++	+++	+	+++	++	++	+
第 7 天	+++	+++	++	+++	++	+++	+
第 8 天	+++	+++	++	+++	++	+++	+
第 9 天	+++	+++	++	+++	++	+++	+
第 10 天	++	++	+	++	+	++	+

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面；孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。

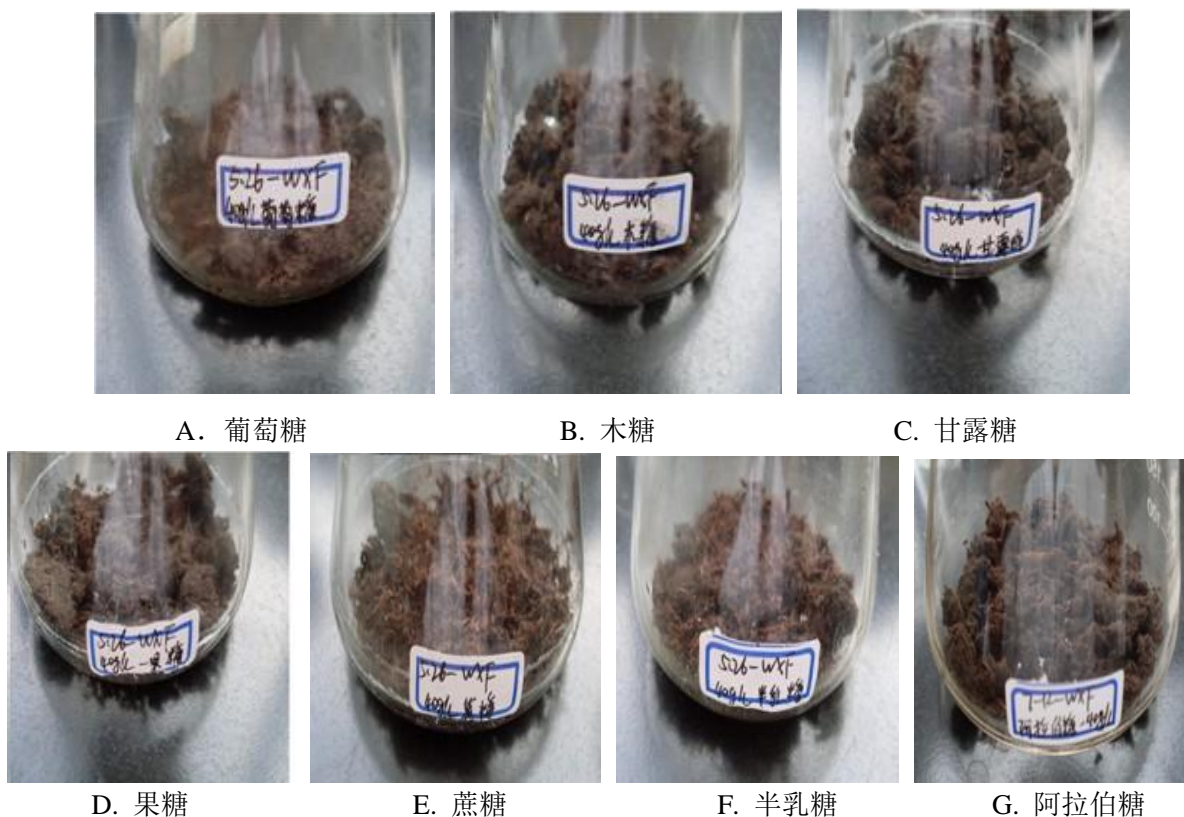


图 2.4.2.1 *A. resiniae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加各种单糖的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天; 接种量 10%; 所有的糖浓度都是 160 mg/g。)

Fig 2.4.2.1 The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of various monose (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; All the sugars were set at 160 mg/g)

2.4.2.2 生物脱毒真菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加糠醛的生长特性

木质纤维素预处理后产生的三大类抑制物中，呋喃衍生物（糠醛和 5-羟甲基糠醛）是最受关注的。霉菌 *A. resiniae* 能转化呋喃衍生物，就说明糠醛和 5-羟甲基糠醛可以作为霉菌 *A. resiniae* 生长的碳源。

在完全洗净烘干的玉米秸秆中分别添加溶有 3.87 mg/g、7.73 mg/g、11.6 mg/g、15.5 mg/g、19.3 mg/g、387 mg/g 等一系列不同浓度的糠醛溶液，调节秸秆含水量约为 80%，接入霉菌 *A. resiniae* 的孢子悬液，并将之培养在 25°C 的恒温培养箱里。每天定时观察并拍照，实验结果见表 2.4.2 和图 7。从表 2.4.2 可知，糠醛可以作为霉菌 *A. resiniae* 的生长碳源，糠醛浓度从 3.87 mg/g 干秸秆到 19.3 mg/g 干秸秆的范围内，生物脱毒真菌 *A. resiniae* 都能生长，当糠醛浓度较低时，在培养基表面第二天即有霉菌 *A. resiniae* 菌丝出现，第四天已经生长的比较旺盛，第五天时霉菌 *A. resiniae* 生长的已经非常旺盛，菌丝布满整个培养基表面，菌丝密度也达到最大值。但当生物脱毒真菌 *A. resiniae* 培养到第十天以

后，菌丝开始消融。培养霉菌 *A. resinae* 期间，培养基的含水量逐渐下降，培养霉菌 *A. resinae* 到第十天时，培养基表面已经变干。当糠醛浓度逐渐增大时，霉菌 *A. resinae* 的长势就越来越弱，当糠醛浓度超过 15.5 mg/g 干秸秆时，生物脱毒真菌 *A. resinae* 的长势只能达到比较旺盛的状态，菌丝分布约占整个培养基表面的一半，菌丝密度比较大。当培养基中糠醛浓度为 19.3 mg/g 干秸秆时，生物脱毒真菌 *A. resinae* 只能微弱地生长起来，菌丝密度也比较小。当培养基中糠醛浓度增加到 387 mg/g 干秸秆时，霉菌 *A. resinae* 完全不能生长起来，一直培养到第十天时，玉米秸秆培养基开始变干了，仍无霉菌 *A. resinae* 的菌丝出现。由此可见，低浓度的糠醛可以作为生物脱毒真菌 *A. resinae* 生长的碳源，高浓度时则抑制菌丝生长。

表 2.4.2.2 *A. resinae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加糠醛的生长特性

Table 2.4.2.2 The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of furfural

糠醛 (mg/g)	3.87	7.73	11.6	15.5	19.3	387
时间						
第 1 天	-	-	-	-	-	-
第 2 天	+	-	-	-	-	-
第 3 天	+	+	+	-	-	-
第 4 天	++	++	+	+	-	-
第 5 天	+++	+++	++	+	+	-
第 6 天	+++	+++	++	++	+	-
第 7 天	+++	+++	++	++	+	-
第 8 天	+++	+++	++	++	+	-
第 9 天	+++	+++	++	++	+	-
第 10 天	++	++	+	+	+	-

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。



图 2.4.2.2 *A. resiniae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加糠醛的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天; 孢子接种量 10%, 糠醛浓度依次是: 3.87 mg/g, 7.73 mg/g, 11.6 mg/g, 15.5 mg/g, 19.3 mg/g, 387 mg/g)

Fig 2.4.2.2 The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of furfural (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of furfural in turn 3.87 mg/g, 7.73 mg/g, 11.6 mg/g, 15.5 mg/g, 19.3 mg/g, 387 mg/g)

2.4.2.3 生物脱毒真菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加 5-羟甲基糠醛的生长特性

在完全洗净烘干的玉米秸秆中分别添加溶有 16.7 mg/g、33.3 mg/g、66.7 mg/g、100 mg/g、133 mg/g、166 mg/g 等一系列不同浓度的糠醛溶液, 调节秸秆含水量约为 80%, 接入霉菌 *A. resiniae* 的孢子悬液, 并将之培养在 25°C 的恒温培养箱里。每天定时观察并拍照, 实验结果见表 2.4.3 和图 8。从表 2.4.3 和图 8 中可以看出, 5-羟甲基糠醛也可以作为生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的碳源, 当 5-羟甲基糠醛浓度从 16.7 mg/g 到 66.7 mg/g 干秸秆时, 霉菌 *A. resiniae* 都能生长。当玉米秸秆中添加 5-羟甲基糠醛浓度为 16.7 mg/g 时, 培养生物脱毒真菌 *A. resiniae* 到第三天的时候, 培养基表面也开始出现霉菌 *A. resiniae* 的菌丝; 培养到第五天的时候, 菌丝长势比较旺盛, 菌丝遍布整个培养基表面的一半左右, 菌丝密度比较大; 当培养霉菌 *A. resiniae* 到第六天时, 菌丝长势很旺盛, 菌丝几乎布满整个培养基表面, 菌丝密度达到最大值; 当培养霉菌 *A. resiniae* 到第十天时, 霉菌 *A. resiniae* 菌丝开始消融。同样, 在培养霉菌 *A. resiniae* 期间, 玉米秸秆培养基的含水量逐

渐下降,到第十天时,培养基表面已经变干。当培养基中 5-羟甲基糠醛浓度达到 33.3 mg/g 干秸秆时,到第四天时培养基表面开始出现霉菌 *A. resinae* 的菌丝,到第六天时霉菌 *A. resinae* 长势比较旺盛,菌丝遍布培养基表面的一半左右,菌丝密度比较大;到第十天时,菌丝开始消融。当培养基中 5-羟甲基糠醛浓度为 33.3 mg/g 干秸秆时,整个培养过程,霉菌 *A. resinae* 的长势一直都没有达到最旺盛状态。当培养基中 5-羟甲基糠醛浓度达到 66.7 mg/g 干秸秆时,培养霉菌 *A. resinae* 期间,菌丝长势一直都很微弱,菌丝稀少,一直到第十天的时候,菌丝密度都很低。随着培养时间的延长,玉米秸秆培养基表面已开始变干。当玉米秸秆中 5-羟甲基糠醛的浓度增大到 100 mg/g 干秸秆时,霉菌 *A. resinae* 一直都没有长起来,培养到第十天时,秸秆培养基表面变干。由此可见,低浓度的 5-羟甲基糠醛可以作为生物脱毒真菌 *A. resinae* 生长的碳源,高浓度时则抑制菌丝生长。

表 2.4.2.3 霉菌 *A. resinae* 在完全洗净的秸秆中单独添加 5-羟甲基糠醛的生长特性

Table 2.4.2.3 The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of 5-hydormethylfurfural

5HMF(mg/g) 时间	16.7	33.3	66.7	100	133	166
第 1 天	-	-	-	-	-	-
第 2 天	-	-	-	-	-	-
第 3 天	+	-	-	-	-	-
第 4 天	+	+	-	-	-	-
第 5 天	++	+	+	-	-	-
第 6 天	+++	++	+	-	-	-
第 7 天	+++	++	+	-	-	-
第 8 天	+++	++	+	-	-	-
第 9 天	+++	++	+	-	-	-
第 10 天	++	+	+	-	-	-

注: - 无菌丝出现; + 有少量微弱菌丝出现; ++ 菌丝比较旺盛,菌丝密度比较大; +++ 菌丝最旺盛,菌丝密度最大,菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%, 25 °C 恒温静止培养 10 天。

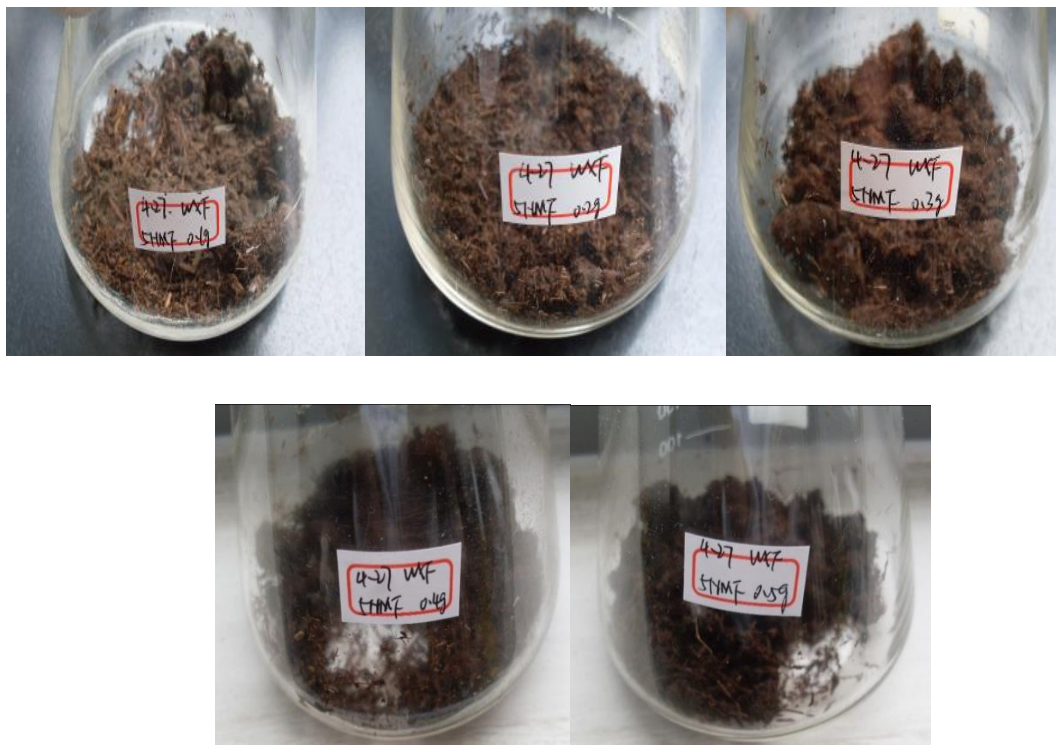


图 2.4.2.3 *A. resinae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加 5-羟甲基糠醛的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天; 孢子接种量 10%, 羟甲基糠醛浓度依次是: 16.7 mg/g, 33.3 mg/g, 66.7 mg/g, 100 mg/g, 133 mg/g, 166 mg/g)

Fig 2.4.2.3 The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of 5-hydroxymethylfurfural (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of 5-hydroxymethylfurfural in turn 16.7 mg/g, 33.3 mg/g, 66.7 mg/g, 100 mg/g, 133 mg/g, 166 mg/g)

2.4.2.4 生物脱毒真菌 *A. resinae* 在完全洗净的秸秆中单独添加有机酸的生长特性

玉米秸秆预处理后产生的有机酸(甲酸、乙酸、乙酰丙酸等)对后续的酿酒酵母发酵产乙醇的生产也有很大的抑制作用。在完全洗净烘干的玉米秸秆中分别添加溶有一系列浓度分别为 36.3 mg/g、72.7 mg/g、109 mg/g 干秸秆的甲酸溶液, 34.7 mg/g、52 mg/g、69.3 mg/g、104 mg/g 干秸秆的乙酸溶液, 283 mg/g 干秸秆的乙酰丙酸溶液, 调节秸秆含水量约为 80%, 接入霉菌 *A. resinae* 的孢子悬液, 并将之培养在 25°C 的恒温培养箱里。每天定时观察并拍照, 实验结果见表 2.4.4 和图 2.4.2.4。

从表 2.4.2.4 和图 2.4.2.4 可知, 当培养基中乙酸浓度为 34.7 mg/g 干秸秆时, 培养霉菌 *A. resinae* 到第五天时, 玉米秸秆培养基表面开始出现少量微弱的菌丝; 培养到第六天时, 菌丝长势比较旺盛, 菌丝密度比较大; 培养霉菌 *A. resinae* 到第八天时, 菌丝长势达到最旺盛的状态, 菌丝几乎遍布整个培养基的表面, 菌丝密度达到最大值; 当培养

霉菌 *A. resinae* 到第十天时, 菌丝开始消融。在培养霉菌 *A. resinae* 的期间, 培养基的含水量逐渐下降, 玉米秸秆表面慢慢变干。当培养基中乙酸浓度达到 52 mg/g 干秸秆时, 一直到第六天, 培养基表面才开始出现微弱的霉菌 *A. resinae* 的菌丝; 当培养到第八天时, 菌丝长势比较旺盛, 菌丝密度比较大, 但一直没有达到最大值; 培养霉菌 *A. resinae* 到第十天时, 菌丝开始消融, 培养基表面变干。当培养基中乙酸浓度增大到 69.3 mg/g 干秸秆时, 霉菌 *A. resinae* 的长势一直都很弱, 而且直到第七天时才开始出现少量且极其微弱的菌丝。但随着培养时间的延长, 玉米秸秆培养基中的含水量逐渐下降, 到第十天时培养基表面已经变干, 菌丝也在消融。当培养基中乙酸浓度增大到 104 mg/g 干秸秆时, 霉菌 *A. resinae* 完全不能生长, 此时的乙酸浓度就表现出了对霉菌 *A. resinae* 的生长抑制作用。乙酸的浓度梯度实验结果表明, 低浓度的乙酸能作为霉菌 *A. resinae* 的碳源, 促进其生长; 高浓度的乙酸则抑制霉菌 *A. resinae* 的生长。

从表 2.4.2.4 和图 2.4.2.4 可知, 甲酸也可以作为生物脱毒真菌 *A. resinae* 生长的碳源。当玉米秸秆培养基中添加甲酸的浓度为 36.3 mg/g 干秸秆时, 培养霉菌 *A. resinae* 到第五天的时候, 培养基表面开始出现少量微弱的霉菌菌丝, 菌丝密度比较小; 当培养霉菌 *A. resinae* 到第七天时, 菌丝长势比较旺盛, 培养基表面的菌丝密度比较大; 当培养霉菌 *A. resinae* 到第八天时, 霉菌 *A. resinae* 的长势达到最旺盛的状态, 玉米秸秆培养基表面几乎遍布 *A. resinae* 的菌丝, 霉菌 *A. resinae* 的菌丝密度达到最大值; 培养 *A. resinae* 到第十天时, 菌丝开始消融。培养霉菌 *A. resinae* 期间, 玉米秸秆培养基的含水量逐渐下降, 培养到第十天时, 培养基表面已经变干。当培养基中甲酸浓度增大到 72.7 mg/g 干秸秆时, 培养霉菌 *A. resinae* 一直到第七天时, 培养基表面才开始出现 *A. resinae* 的菌丝, 但培养期间, 霉菌 *A. resinae* 的长势一直都很微弱, 菌丝的量也很少, 随着培养基的含水量逐渐下降, 培养霉菌 *A. resinae* 到第十天时, 少量的菌丝也开始消融, 十天后玉米秸秆培养基表面已经变干。当培养基中甲酸的密度增大到 109 mg/g 干秸秆时, 培养霉菌 *A. resinae* 一直到第十天, 玉米秸秆培养基表面一直都没有出现霉菌 *A. resinae* 的菌丝。培养期间, 玉米秸秆培养基的含水量逐渐降低, 十天后, 培养基表面变干。甲酸的浓度梯度实验结果表明, 低浓度的甲酸能作为霉菌 *A. resinae* 的碳源, 促进其生长; 高浓度的甲酸则抑制霉菌 *A. resinae* 的生长。另外, 本部分实验还尝试了以乙酰丙酸为碳源培养霉菌 *A. resinae*。由于没有做浓度梯度试验, 且加入到玉米秸秆培养基中的乙酰丙酸浓度比较大 (283 mg/g), 培养霉菌 *A. resinae* 期间, 培养基表面一直都没有 *A. resinae* 的菌丝出现。这个实验结果说明, 高浓度的乙酰丙酸也是抑制生物脱毒真菌 *A. resinae* 生长的。

表 2.4.2.4 *A. resinae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加有机酸的生长特性

Table 2.4.2.4 The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the separately

additional of organic acid

含量 (mg/g) 时间	甲酸 (36.3)	甲酸 (72.7)	甲酸 (109)	乙酸 (34.7)	乙酸 (52)	乙酸 (69.3)	乙酸 (104)	乙酰丙酸 (283)
第 1 天	-	-	-	-	-	-	-	-
第 2 天	-	-	-	-	-	-	-	-
第 3 天	-	-	-	-	-	-	-	-
第 4 天	-	-	-	-	-	-	-	-
第 5 天	+	-	-	+	-	-	-	-
第 6 天	+	-	-	++	+	-	-	-
第 7 天	++	+	-	++	+	+	-	-
第 8 天	+++	+	-	+++	++	+	-	-
第 9 天	+++	+	-	+++	++	+	-	-
第 10 天	++	+	-	++	+	+	-	-

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。

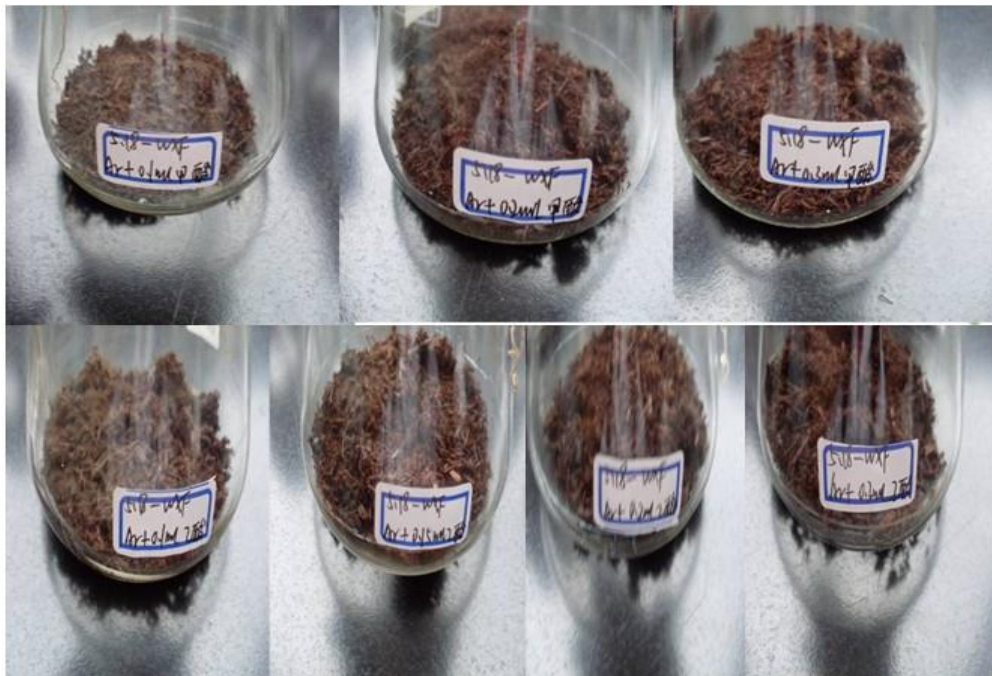


图 2.4.2.4 霉菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加有机酸的生长特性（25 °C 恒温培养箱培养 10 天；孢子接种量 10%，甲酸浓度依次是：36.3 mg/g, 72.7 mg/g, 109 mg/g；乙酸浓度依次是：34.7 mg/g, 52 mg/g, 69.3 mg/g, 104 mg/g；乙酰丙酸浓度：283 mg/g）

Fig 2.4.2.4 The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the separately

additional of organic acid(Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of formic acid in turn 36.3 mg/g, 72.7 mg/g, 109 mg/g; acetic acid: 34.7 mg/g, 52 mg/g, 69.3 mg/g, 104 mg/g; Levulinic acid: 283 mg/g)

2.4.2.5 生物脱毒真菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加烃类有机物的生长特性

曾有人在航空煤油里以及机场附近发现过生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的踪迹，这说明煤油或者其中的某种烃类物质可以作为霉菌 *A. resiniae* 的碳源。一般煤油和航空煤油的分子式都是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ (n 为 8~16)，只不过航空煤油更纯，杂质含量微乎其微。煤油是由含有多种不同碳原子数的烃类组成的混合物。本文研究了煤油以及正十二烷烃对霉菌 *A. resiniae* 的生长促进作用。

当玉米秸秆培养基中添加煤油的浓度为 267 mg/g 干秸秆时，培养霉菌 *A. resiniae* 到第六天时，培养基表面开始出现少量的 *A. resiniae* 菌丝，菌丝长势微弱，菌丝密度也很小；当培养 *A. resiniae* 到第九天时，菌丝密度增大了很多，菌丝长势稍微旺盛了一些，但没有达到最旺盛的状态；随着培养时间的延长，玉米秸秆培养基中的含水量逐渐降低，培养十天后，培养基表面开始慢慢变干，培养环境不再利于霉菌 *A. resiniae* 的生长。实验结果表明，煤油可以作为生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的碳源，供其生长。

以正十二烷烃为碳源培养霉菌 *A. resiniae*，当玉米秸秆培养基中添加的正十二烷烃的浓度为 247 mg/g 干秸秆时，培养霉菌 *A. resiniae* 到第六天时，培养基表面出现了少量的 *A. resiniae* 菌丝，菌丝长势微弱，菌丝密度很小；当培养 *A. resiniae* 直到第十天时，菌丝 *A. resiniae* 的长势一直都很弱，培养基表面菌丝也极其少量，整个培养基中菌丝密度很低，且随着培养时间的延长，玉米秸秆培养基中含水量也在不断下降，十天后培养基表面变干。随着培养基中正十二烷烃浓度的增加，霉菌 *A. resiniae* 的长势越来越弱。当十二烷烃的浓度增大到 988 mg/g 干秸秆时，生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的生长完全被抑制，培养期间，玉米秸秆培养基表面一直都无霉菌 *A. resiniae* 的菌丝出现。实验结果表明，低浓度的正十二烷烃也可以作为 *A. resiniae* 的碳源，高浓度时则抑制其生长。

表 2.4.2.5 霉菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加煤油和正十二烷的生长特性

Table 2.4.2.5 The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of Kerosene and Ndodecane

含量 (mg/g) 时间	煤油 (267)	十二烷 (247)	十二烷 (494)	十二烷 (741)	十二烷 (988)	十二烷 (1235)	十二烷 (1482)
第 1 天	-	-	-	-	-	-	-
第 2 天	-	-	-	-	-	-	-

第 3 天	-	-	-	-	-	-	-
第 4 天	-	-	-	-	-	-	-
第 5 天	-	-	-	-	-	-	-
第 6 天	+	+	-	-	-	-	-
第 7 天	+	+	+	-	-	-	-
第 8 天	+	+	+	+	-	-	-
第 9 天	++	+	+	+	-	-	-
第 10 天	++	+	+	+	-	-	-

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。

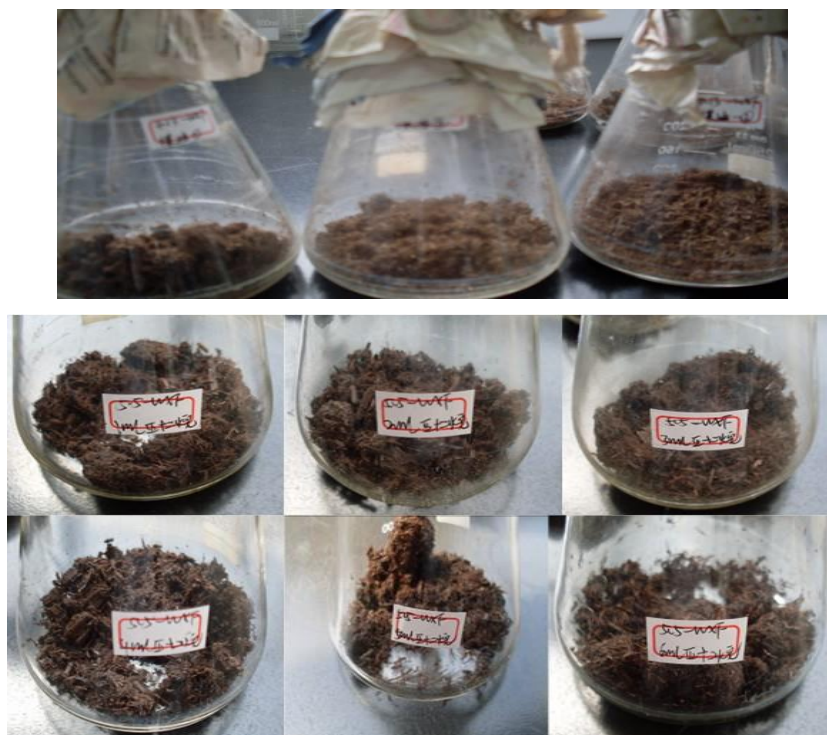


图 2.4.2.5 *A. resiniae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加煤油和正十二烷烃的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天；孢子接种量 10%，正十二烷浓度依次是：247 mg/g, 494 mg/g, 741 mg/g, 988 mg/g, 1235 mg/g, 1482 mg/g；煤油浓度：267 mg/g)

Fig 2.4.2.5 The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the separately additional of Kerosene and Ndocane(Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of dodecane: 247 mg/g, 494 mg/g, 741 mg/g, 988 mg/g, 1235 mg/g,1482 mg/g; karaffin oil: 267 mg/g)

2.4.2.6 生物脱毒真菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加其它有机物的生长特性

玉米秸秆预处理后产生的物质种类繁多，除了有机酸以及呋喃衍生物外，还产生了其它一些浓度较低的酚类及芳香族类化合物。因此，本实验还分别做了香兰素、阿魏酸、水杨酸、4-羟基苯甲醛、苯酚、愈创木酚以及芝麻酚等玉米秸秆预处理后可能含有的其他少量有机物的浓度梯度实验。

当玉米秸秆培养基中添加香兰素的浓度为 1.67 mg/g 时，培养生物脱毒真菌 *A. resinae* 到第三天时，培养基表面就开始出现少量 *A. resinae* 的菌丝了，此时菌丝密度比较低；当培养霉菌 *A. resinae* 到第四天时，菌丝 *A. resinae* 的长势已经比较旺盛，菌丝约遍布整个培养基表面的一半，菌丝密度比较大；当培养霉菌 *A. resinae* 到第六天时，菌丝 *A. resinae* 的长势达到最旺盛的状态，菌丝几乎布满整个培养基表面，菌丝密度达到最大值。但随着培养时间的延长，秸秆含水量一直都在下降，培养 *A. resinae* 到第十天时，培养基表面开始变干。培养基中含水量的骤减，对霉菌 *A. resinae* 的生长很不利，因此培养十天后，*A. resinae* 的菌丝开始逐渐消融。当增加培养基中香兰素的浓度为 3.33 mg/g 干秸秆时，培养 *A. resinae* 到第三天时，培养基表面也出现了少量的霉菌 *A. resinae* 的菌丝，只是此时菌丝长势微弱；当培养霉菌 *A. resinae* 到第五天时，玉米秸秆培养基表面霉菌 *A. resinae* 的菌丝已比较旺盛，菌丝约遍布整个培养基表面的一半左右，但直到培养的第 9 天，菌丝 *A. resinae* 的密度也没有达到最大值，且随着培养时间的延长，培养十天以后，培养基表面变干，菌丝开始消融。当增加香兰素的浓度到 5.0 mg/g 干秸秆时，培养霉菌 *A. resinae* 到第三天时，玉米秸秆培养基表面开始出现 *A. resinae* 的菌丝，长势跟前两组浓度的香兰素为碳源培养时相近，但在整个培养过程中，霉菌 *A. resinae* 的菌丝长势一直都很微弱，菌丝密度很低，培养十天后，培养基表面变干，菌丝开始消融。香兰素的浓度梯度实验结果表明，一定浓度范围内，霉菌 *A. resinae* 都能以其为碳源进行生长，且最初的长势相近，但高浓度的香兰素仍然表现出对生物脱毒真菌 *A. resinae* 的生长抑制作用。

表 2.4.2.6 a. *A. resinae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的香兰素的生长特性

Table 2.4.2.6 a. The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of vanillin

香兰素(mg/g)	1.67	3.33	5.0
时间			
第 1 天	-	-	-
第 2 天	-	-	-
第 3 天	+	+	+
第 4 天	++	+	+
第 5 天	++	++	+

第 6 天	+++	++	+
第 7 天	+++	++	+
第 8 天	+++	++	+
第 9 天	+++	++	+
第 10 天	++	+	+

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。



图 2.4.2.6 a. 霉菌 *A. resinae* 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的香兰素的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天; 孢子接种量 10%, 香兰素浓度: 1.67 mg/g, 3.33 mg/g, 5.0 mg/g)

Fig 2.4.2.6 a. The growth properties of *A. resinae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of vanillin (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of vanillin: 1.67 mg/g, 3.33 mg/g, 5.0 mg/g)

以一系列不同浓度的阿魏酸作为碳源添加到玉米秸秆培养基中，当阿魏酸的浓度分别为 0.833 mg/g 和 1.67 mg/g 干秸秆时，生物脱毒真菌 *A. resinae* 的长势完全相同，都是在培养霉菌 *A. resinae* 到第二天时，玉米秸秆培养基表面开始出现少量的菌丝，此时菌丝长势微弱，菌丝密度也较小；当培养到第七天时，霉菌 *A. resinae* 的菌丝达到比较旺盛的状态，菌丝约遍布整个培养基表面的一半左右，菌丝密度比较大；但随着培养时间的延长，培养基中的含水量逐渐下降，霉菌 *A. resinae* 的菌丝一直都没有达到最旺盛的状态，培养到第十天的时候，菌丝开始消融。当增加玉米秸秆培养基中阿魏酸的浓度到 3.33 mg/g 干秸秆时，培养生物脱毒真菌 *A. resinae* 到第三天时，培养基表面开始出现少量 *A. resinae* 菌丝，但此时菌丝长势微弱，菌丝密度较小；同前两组一样，当培养 *A. resinae* 菌丝到第七天时，菌丝密度已经比较大，菌丝长势比较旺盛，菌丝的分布约占培养基表面的一半左右；同样，随着培养时间的延长，玉米秸秆培养基中的含水量不断下降，到第十天时，培养基表面变干，菌丝开始消融。当阿魏酸的浓度在 5.0 mg/g 到 10.0 mg/g 干秸秆浓度之间，霉菌 *A. resinae* 的长势区别不大，当培养 *A. resinae* 到第八天时，菌丝的密度比较大，但都没有达到最大值状态。当阿魏酸的浓度增大到 20.0 mg/g 到 40.0

mg/g 干秸秆时, 菌丝的长势都很弱, 整个培养期间, 霉菌 *A. resiniae* 的菌丝一直都没有达到比较旺盛的状态, 菌丝密度也很小。同样, 培养 *A. resiniae* 到第十天时, 培养基表面变干, *A. resiniae* 的菌丝也开始消融。实验结果表明, 阿魏酸也能作为生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的碳源, 同样, 低浓度的阿魏酸表现为促进作用, 高浓度时则表现为抑制作用。

表 2.4.2.6 b. *A. resiniae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的阿魏酸的生长特性

Table 2.4.2.6 b. The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of ferulic acid

阿魏酸 (mg/g) 时间	0.833	1.67	3.33	5.0	10.0	20.0	40.0
第 1 天	-	-	-	-	-	-	-
第 2 天	+	+	-	-	-	-	-
第 3 天	+	+	+	+	-	-	-
第 4 天	+	+	+	+	+	+	-
第 5 天	+	+	+	+	+	+	-
第 6 天	+	+	+	+	+	+	+
第 7 天	++	++	++	+	+	+	+
第 8 天	++	++	++	++	++	+	+
第 9 天	++	++	++	++	++	+	+
第 10 天	+	+	+	+	+	+	+

注: - 无菌丝出现; + 有少量微弱菌丝出现; ++ 菌丝比较旺盛, 菌丝密度比较大; +++ 菌丝最旺盛, 菌丝密度最大, 菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%, 25 °C 恒温静止培养 10 天。



图 2.4.2.6 b. *A. resiniae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的阿魏酸的生长特性(25 °C 恒温培养箱培养 10 天; 孢子接种量 10%, 阿魏酸浓度: 0.833 mg/g, 1.67 mg/g, 3.33 mg/g, 5.0 mg/g, 10.0 mg/g, 20.0 mg/g, 40.0 mg/g)

Fig 2.4.2.6 b. The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of ferulic acid (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of ferulic acid: 0.833 mg/g, 1.67 mg/g, 3.33 mg/g, 5.0 mg/g, 10.0 mg/g, 20.0 mg/g, 40.0 mg/g)

当分别在玉米秸秆培养基中添加水杨酸、4-羟基苯甲醛以及苯酚作为碳源，分别添加的浓度为 1.67 mg/g、3.33 mg/g 干秸秆，实验结果见下表和图。从下表和图中可以看出，水杨酸、4-羟基苯甲醛以及苯酚都能作为生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的碳源，且这三种物质对霉菌 *A. resiniae* 的生长作用很相近。当分别添加水杨酸、4-羟基苯甲醛和苯酚的浓度均为 1.67 mg/g 干秸秆时，培养 *A. resiniae* 到第二天时，在玉米秸秆培养基表面即发现了少量的 *A. resiniae* 的菌丝，此时菌丝长势微弱，菌丝密度比较小；当培养 *A. resiniae* 到第五天时，培养基表面即有大量 *A. resiniae* 的菌丝，此时菌丝长势比较旺盛，菌丝约占整个培养基表面的一半左右，菌丝密度比较大；当培养霉菌 *A. resiniae* 到第六天时，*A. resiniae* 的菌丝长势达到最旺盛的状态，菌丝长且稠密，菌丝遍布整个培养基的表面，在整个培养期间菌丝密度达到最大值。随着培养时间的延长，玉米秸秆培养基中的含水量也在不断下降，培养 *A. resiniae* 十天后，培养基表面变干，菌丝开始消融。实验结果表明，水杨酸、4-羟基苯甲醛以及苯酚都能作为霉菌 *A. resiniae* 的碳源，同样，这些物质对 *A. resiniae* 的生长具有两方面的作用，低浓度时表现为促进作用，高浓度时则表现为抑制作用。

表 2.4.2.6 c. 霉菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的水杨酸、4-羟基苯甲醛、苯酚的生长特性

Table 2.4.2.6 c. The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of salicylic acid, 4-hydroxyl benzaldehyde and phenol

含量 (mg/g) 时间	水杨酸 (1.67)	水杨酸 (3.33)	4-羟基苯甲醛 (1.67)	4-羟基苯甲 醛 (3.33)	苯酚 (1.67)	苯酚 (3.33)
第 1 天	-	-	-	-	-	-
第 2 天	+	-	+	-	+	-
第 3 天	+	+	+	+	+	+
第 4 天	+	+	+	+	+	+
第 5 天	++	+	++	+	++	+

第 6 天	+++	++	+++	++	+++	++
第 7 天	+++	++	+++	++	+++	++
第 8 天	+++	++	+++	++	+++	++
第 9 天	+++	++	+++	++	+++	++
第 10 天	++	+	++	+	++	+

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。

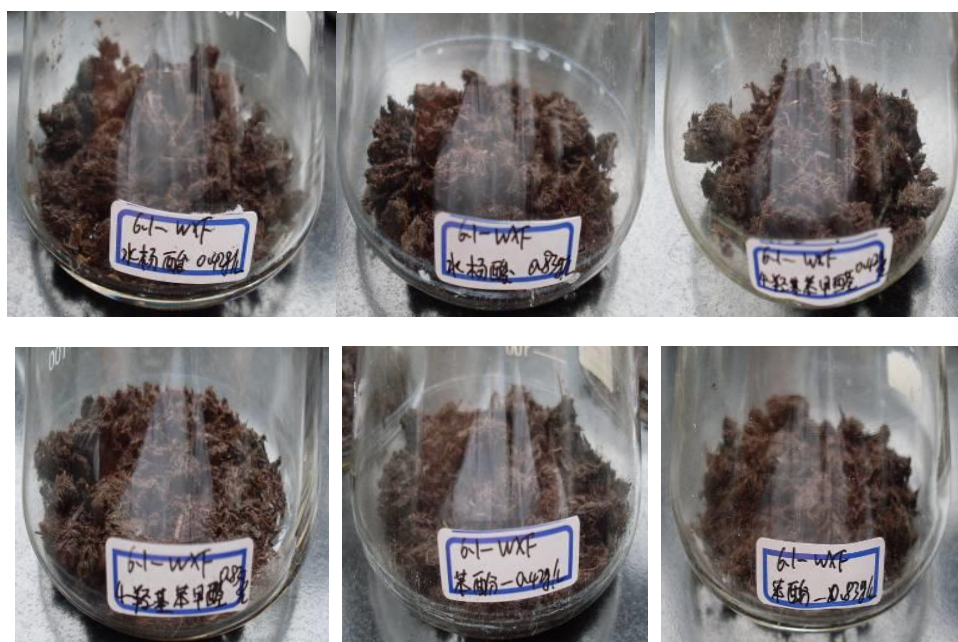


图 2.4.2.6 c. 霉菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的水杨酸、4-羟基苯甲醛、苯酚的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天；孢子接种量 10%，水杨酸浓度：1.67 mg/g, 3.33 mg/g；4-羟基苯甲醛浓度：1.67 mg/g, 3.33 mg/g；苯酚浓度：1.67 mg/g, 3.33 mg/g)

Fig 2.4.2.6 c. The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of salicylic acid, 4-hydroxyl benzaldehyde and phenol (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of salicylic acid: 1.67 mg/g, 3.33 mg/g; 4-hydroxyl benzaldehyde: 1.67 mg/g, 3.33 mg/g; phenol: 1.67 mg/g, 3.33 mg/g)

在玉米秸秆培养基中添加芝麻酚为碳源，当添加的芝麻酚的浓度为 1.67 mg/g 干秸秆时，培养霉菌 *A. resiniae* 到第二天时，即在秸秆培养基表面发现少量的霉菌 *A. resiniae* 的菌丝，此时菌丝长势微弱，菌丝短小，菌丝密度很低；当培养 *A. resiniae* 到第五天时，培养基表面即有大量 *A. resiniae* 的菌丝，菌丝长势比较旺盛，菌丝变长，菌丝的分布约占整个培养基表面的一半左右，菌丝密度比较大；当培养 *A. resiniae* 到第六天时，培养基表面长满了霉菌 *A. resiniae* 的菌丝，菌丝长势旺盛，菌丝更长更稠密，菌丝密度达到最大值。同样，随着培养时间的延长，玉米秸秆培养基中的含水量逐渐下降，培养 *A.*

resinae 到第十天时,培养基表面变干,菌丝开始消融。当增加芝麻酚的浓度到 3.33 mg/g 干秸秆时,培养 *A. resiniae* 到第三天时,在玉米秸秆培养基表面发现了少量霉菌 *A. resiniae* 的菌丝,此时菌丝长势微弱,菌丝少且短小,菌丝密度低;当培养 *A. resiniae* 到第六天时,培养基表面的 *A. resiniae* 菌丝较多,菌丝长势较旺盛,菌丝变长变稠密了一些,菌丝分布约占整个培养基表面的一半左右,菌丝密度比较大;当培养 *A. resiniae* 到第七天时,培养基表面即有大量 *A. resiniae* 的菌丝,菌丝长势最旺盛,菌丝更稠密,菌丝约遍布整个培养基表面,菌丝密度达到最大值。随着培养时间的延长,玉米秸秆培养基中的含水量一直在下降,当培养 *A. resiniae* 到第十天时,培养基表面的秸秆变干,菌丝开始消融。实验结果表明,芝麻酚也可以作为生物脱毒真菌 *A. resiniae* 的碳源,且对霉菌生长的作用有双向性,即低浓度时表现为促进生长,高浓度时抑制其生长,但只要在霉菌 *A. resiniae* 的生长耐受范围内,待高浓度的芝麻酚浓度降低后,依然可以很好地促进 *A. resiniae* 的生长。

在玉米秸秆培养基中添加愈创木酚为碳源,当添加的愈创木酚的浓度为 1.85 mg/g 干秸秆时,培养霉菌 *A. resiniae* 到第二天时,即在秸秆培养基表面发现少量的霉菌 *A. resiniae* 的菌丝,此时菌丝长势微弱,菌丝短小,菌丝密度很低;当培养霉菌 *A. resiniae* 到第五天时,培养基表面的 *A. resiniae* 的菌丝长势比较旺盛,菌丝变的比较长比较稠密,菌丝的分布约占整个培养基表面的一半左右,此时菌丝密度比较大;当培养霉菌 *A. resiniae* 到第六天时,玉米秸秆培养基表面的菌丝长的更长更稠密,菌丝约占满整个培养基表面,菌丝的密度达到最大值。随着培养时间的延长,玉米秸秆培养基中的含水量逐渐下降,当培养霉菌 *A. resiniae* 到第十天时,培养基表面的玉米架杆已经变干,菌丝开始消融。当增加愈创木酚的浓度到 3.70 mg/g 干秸秆时,培养霉菌 *A. resiniae* 到第二天时,培养基表面即发现少量 *A. resiniae* 的菌丝生长,此时菌丝比较短小且稀少,菌丝密度比较小;当培养霉菌 *A. resiniae* 到第六天时,培养基表面的 *A. resiniae* 的菌丝比较旺盛,菌丝变的比较长且比较稠密,菌丝的分布约占整个培养基表面的一半左右,菌丝密度比较大;当培养霉菌 *A. resiniae* 到第七天时,培养基表面 *A. resiniae* 的菌丝长势达到最旺盛的状态,菌丝变的更长更稠密,菌丝几乎遍布整个培养基表面,菌丝密度达到培养期间的最大值。随着培养时间的延长,玉米秸秆培养基中的含水量不断地在下降,当培养霉菌 *A. resiniae* 到第十天时,培养基表面的玉米秸秆已经变干,培养基含水量的大幅度下降不再利于 *A. resiniae* 菌丝的生长,菌丝开始消融。实验结果表明,愈创木酚也可以作为霉菌 *A. resiniae* 的碳源,且低浓度时表现为促进作用,高浓度时表现为抑制作用。当高浓度的愈创木酚的浓度降低时,依然可以很好地促进霉菌 *A. resiniae* 的生长。且与芝麻酚相比,愈创木酚对霉菌 *A. resiniae* 的生长作用更明显一点,生物脱毒真菌 *A. resiniae* 对愈创木酚的耐受性更好一些。

表 2.4.2.6 d. *A. resiniae* ZN1 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的芝麻酚、愈创木酚的生长特性

Table 2.4.2.6 d. The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of sesame phenol and guaiac-based phenol

时间 \ 含量(mg/g)	芝麻酚 (1.67)	芝麻酚 (3.33)	愈创木酚 (1.85)	愈创木酚 (3.70)
第 1 天	-	-	-	-
第 2 天	+	-	+	+
第 3 天	+	+	+	+
第 4 天	+	+	+	+
第 5 天	++	+	++	+
第 6 天	+++	++	+++	++
第 7 天	+++	+++	+++	+++
第 8 天	+++	+++	+++	+++
第 9 天	+++	+++	+++	+++
第 10 天	++	++	++	++

注：- 无菌丝出现；+ 有少量微弱菌丝出现；++ 菌丝比较旺盛，菌丝密度比较大；+++ 菌丝最旺盛，菌丝密度最大，菌丝布满整个培养基表面。孢子接种量 10%，25 °C 恒温静止培养 10 天。

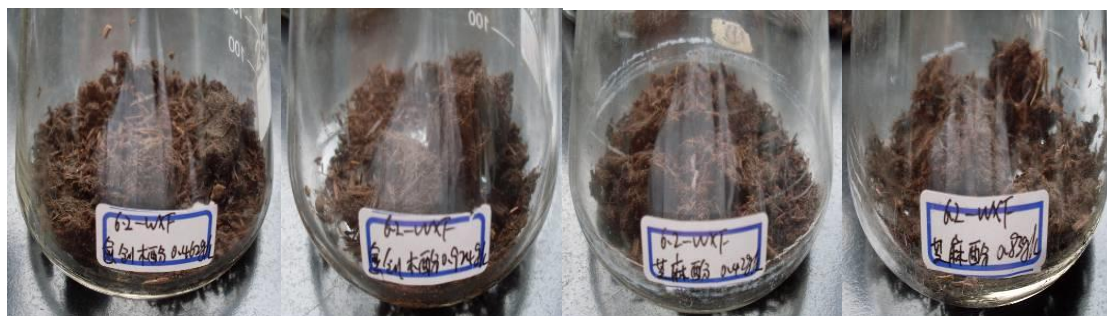


图 2.4.2.6 d. 霉菌 *A. resiniae* 在完全洗净的秸秆中单独添加不同浓度的芝麻酚、愈创木酚的生长特性 (25 °C 恒温培养箱培养 10 天；孢子接种量 10%，芝麻酚浓度：1.67 mg/g, 3.33 mg/g；愈创木酚浓度：1.85 mg/g, 3.70 mg/g)

Fig 2.4.2.6 d. The growth properties of *A. resiniae* ZN1 in the fully clean straw with the different concentration of sesame phenol and guaiac-based phenol (Cultured at 25 °C for 10 days in the static incubator; Inoculation amount at 10%; Concentration of sesame phenol: 1.67 mg/g, 3.33 mg/g; guaiac-based phenol: 1.85 mg/g, 3.70 mg/g)

第三章 *A. resiniae* ZN1 的糠醛和 5-羟甲基糠醛代谢途径的研究

3.1 前言

在生物转化木质纤维素原料的过程中，首先要通过高温、高压或强酸的预处理过程来打破木质纤维素原料自身的致密结构，增加纤维素的可酶解性，提高木质纤维素的酶解得率^[1]。但是在剧烈的预处理过程中，不可避免的生成了多种对后续生物转化具有抑制作用的木质纤维素降解产物，主要包括有机酸类化合物，呋喃类化合物和酚类化合物^[2]。在这些木质素的降解产物中，尤其以糠醛和 5-羟甲基糠醛对后续酶解和发酵微生物的抑制作用最强。因此，要实现木质纤维素的有效生物转化，必须对预处理后的原料进行脱毒处理。

目前常用于抑制物脱除的方法有活性炭或离子交换树脂吸附脱除，强碱调节 pH 并沉淀抑制物，真空蒸发，以及生物降解。与其他脱毒方法相比，生物脱毒方法条件温和，不形成新的抑制物，脱毒后可以直接进入乙醇发酵过程等优势。因此筛选出一种能够快速有效降解各种抑制物的微生物并利用其进行生物脱毒，是木质纤维素原料生物炼制产业中至关重要的一环。本实验室从自然界筛选得到一株能够在固态发酵的条件下快速降解木质纤维素降解产物（包括甲酸、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛等）的煤油霉菌，并命名为 *Amorphotheca resiniae* ZN1。为了更好地了解菌株生长特性以及其利用秸秆中各种物质生长情况，我曾经系统地研究过煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 菌株单独利用呋喃衍生物、各种有机酸、酚类化合物以及各种单糖等作为碳源时的利用情况^[64]。但是对于煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 代谢木质纤维素降解产物的机理并不清楚。本文通过唯一碳源实验，并检测相应代谢产物的方法初步确定了 *A. resiniae* ZN1 对糠醛的代谢机理，绘制出了 *A. resiniae* ZN1 对糠醛的代谢路径。

3.2 实验材料和仪器

3.2.1 试剂和仪器

表 3.1 试剂

Table 3.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
98%浓硫酸	CR	上海菲达工贸有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工厂
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
YEAST EXTRACT	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND

葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
琼脂粉	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
糠酸	CP	国药集团化学试剂有限公司
2,5-呋喃-二甲醇	AR	上海德默医药科技有限公司
糠醇	CP	国药集团化学试剂有限公司
5-羟甲基糠醛	AR	J&K CHEMICAL LTD.
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氯化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司

表 3.2 仪器

Table 3.2 Equipment

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科技
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
容声冰箱	SC-329GA	海尔公司
旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
洁净工作台	SW-CJ-1FD	上海博迅公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
反相高效液相色谱	LC-20AT	岛津
气相色谱	Agilent6820	安捷伦
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
四联发酵罐	Biotech-4BG	上海保兴生物设备工程有限公司

3.2.2 培养基与菌种

3.2.2.1 脱毒菌株及培养

脱毒菌种为本实验室筛选和保存的 *A. resinae* ZN1, 该菌的分子生物学和微生物学鉴定见文献^[60]。*A. resinae* ZN1 菌株在 PDA 试管斜面保存和传代。PDA 培养基的制备简述: 取去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水 1000 mL。煮沸 1 h, 用 8 层纱布过滤, 然后补足水至 1 L, 并添加葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 121 °C 灭菌 20 min, 贮存备用。该培养基为菌株的传代保存培养基。

发酵菌种的培养: 用无菌水从培养好的 PDA 斜面试管洗下孢子悬液, 然后按照 10% (v/v) 的接种量接入含有种子培养基的三角瓶中, 置于 28 °C 的恒温培养箱里静止培养 3 天。

3.2.2.2 培养基

种子培养基: KH_2PO_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, CaCl_2 0.5 g/L, Yeast Extract 1 g/L, glucose 40 g/L。

发酵培养基: KH_2PO_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, CaCl_2 0.5 g/L, Yeast Extract 1 g/L, glucose 20 g/L。灭菌后分别添加过滤除菌的糠醛 (约 0.6 g/L) 和 5-羟甲基糠醛 (约 0.07 g/L)。

无机盐培养基: KH_2PO_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, CaCl_2 0.5 g/L。灭菌后加入过滤除菌的糠醛 (约 0.6 g/L) 或者 5-羟甲基糠醛 (约 0.07 g/L)。

3.3 实验方法

3.3.1 孢子悬液的制备

每次按照需要, 用无菌水洗下相应的孢子体积量。试管斜面是培养 5 天的 PDA 斜面菌种, 10 mL 孢子/支试管斜面, 洗法是: 每次移取 5 mL 无菌水到试管斜面中, 沿斜面倾斜方向左右摇动试管, 如此摇动 80 次左右后, 将孢子悬液倒入无菌小烧瓶中, 依次方法, 每支试管洗下孢子悬液 10 mL。每次洗下每一批实验所需的孢子悬液到同一个无菌小瓶中备用。

3.3.2 实验方法

实验用培养基为上述发酵培养基, 装液量为 1 L, 温度 26 °C, 分别用 2 mol/L 的 H_2SO_4 和 NaOH 溶液控制 PH 为 5.5, 转速 100 rpm/min, 通气量分别为 0、0.46 vvm/min、0.93 vvm/min、1.85 vvm/min 等一系列通气量。定时取样并立即采用装有 0.2 μm 的过滤装置处理样品, 保存在 4 °C 备用。

3.3.3 分析方法

呋喃衍生物（包括糠醛、糠醇、糠酸、5-羟甲基糠醛以及 2,5-呋喃二甲醇）通过 RP-HPLC (Reversed-phase HPLC, LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A; Shimadzu, Kyoto, Japan)和 GC-MS (QP5000, Shimadzu, Agilent 19091S-433)进行定性分析，并用 RP-HPLC 进行定量分析。

RP-HPLC 的配置和工作条件为：YMC-Pack ODS-A 柱（LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A; Shimadzu, Toyoto, Japan），流动相流速 1 mL/min；进样量 20 μ L；柱温 35 $^{\circ}$ C，流动相为乙腈:超纯水=50:50；检测波长为：糠醛、糠醇和糠酸为 220 nm；5-羟甲基糠醛 284 nm；2,5-呋喃二甲醇 223 nm。

葡萄糖和乙酸是通过 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A; Shimadzu, Toyoto, Japan)测定的。HPLC 的配置和工作条件为：Bio-Rad HPX-87H 柱，流动相为 5 mmol/L 硫酸，柱温为 65 $^{\circ}$ C 流速为 0.6 mL/min。所有从发酵罐中取的样品，进样前均在 14,000 rpm/min 的条件下离心 7 min，并通过 0.22 μ m 的滤膜过滤。以上所有糠醛代谢过程均有两个重复实验。

3.4 结果与讨论

3.4.1 *A. resinae* ZN1 的糠醛代谢分析

为了更清楚地了解 *A. resinae* ZN1 生物脱除糠醛的代谢路径，也为了验证糠醛能否作为生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的唯一碳源，本研究采用了含糠醛的无糖无机盐离子培养基。种子扩培后用 500 ml 的无菌水洗菌膜两次，将洗去残糖的菌膜接种到含糠醛的无糖无机盐离子培养基中进行发酵，实验结果见图 3.4.1。从图 3.4.1 可以看出，糠醛可以作为 *A. resinae* ZN1 的唯一碳源及能源进行生长和发酵，在通气量为 0.91vvm 的供氧条件下，初始浓度约为 0.55 g/L 这的糠醛大约在 44 小时内被完全转化了。同时生成了糠醇和糠酸。

首先，糠醛快速地向糠醇转化，随后进一步转化为糠酸。对于微生物而言，糠醛对其生长的抑制作用最大，而糠醇的毒性稍弱，因此为了快速地“解毒”，*A. resinae* ZN1 首先快速地还原糠醛为低毒性的糠醇，然后再将之进一步氧化为糠酸。由于糠酸可以顺利进入后续的代谢步骤，糠酸积累不显著，并最终被完全代谢，在有氧状态下，*A. resinae* ZN1 不需要特殊的营养因子可以很好地降解糠醛。*A. resinae* ZN1 可以以少数几种无机盐作为营养代谢糠醛，表现出了与以往研究中脱毒菌种所不具有的独特性质^[51,71]。

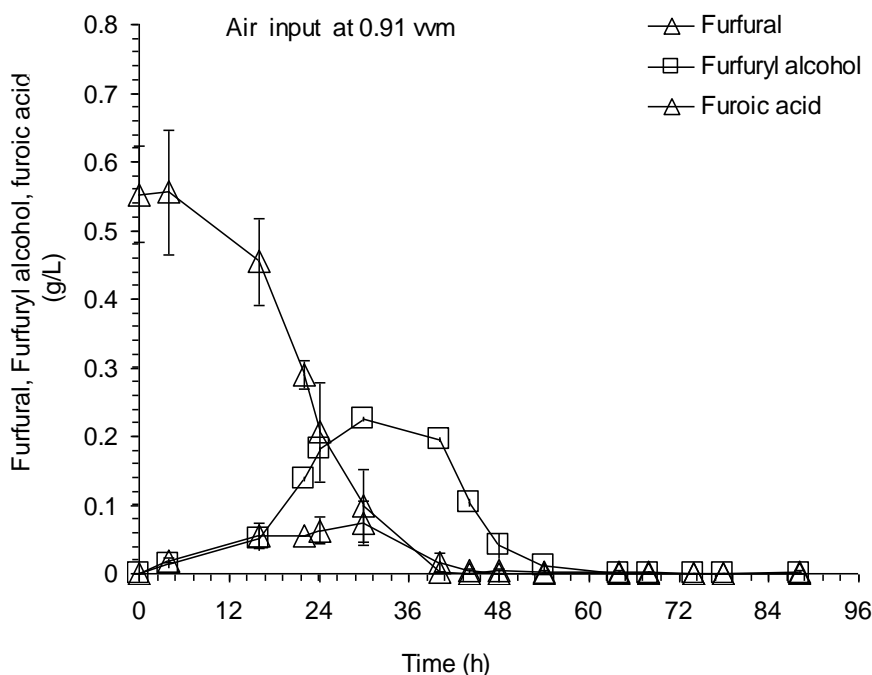


图 3.4.1 *A. resiniae* ZN1 以糠醛为唯一碳源的代谢转化。条件：20%接种量，26 °C，pH 5.5，100 转/分钟，通气量为 0.91 vvm。

Fig. 3.4.1 Metabolism of furfural as the sole carbon source by *A. resiniae* ZN1. Conditions: 20% inoculation, 26 °C, pH 5.5, 100 rpm/min, ventilation of 0.91 vvm.

溶氧水平对真菌的液体培养非常重要。本研究对不同溶氧水平的 *A. resiniae* ZN1 代谢糠醛的情况进行了考察，结果见图 3.4.2。

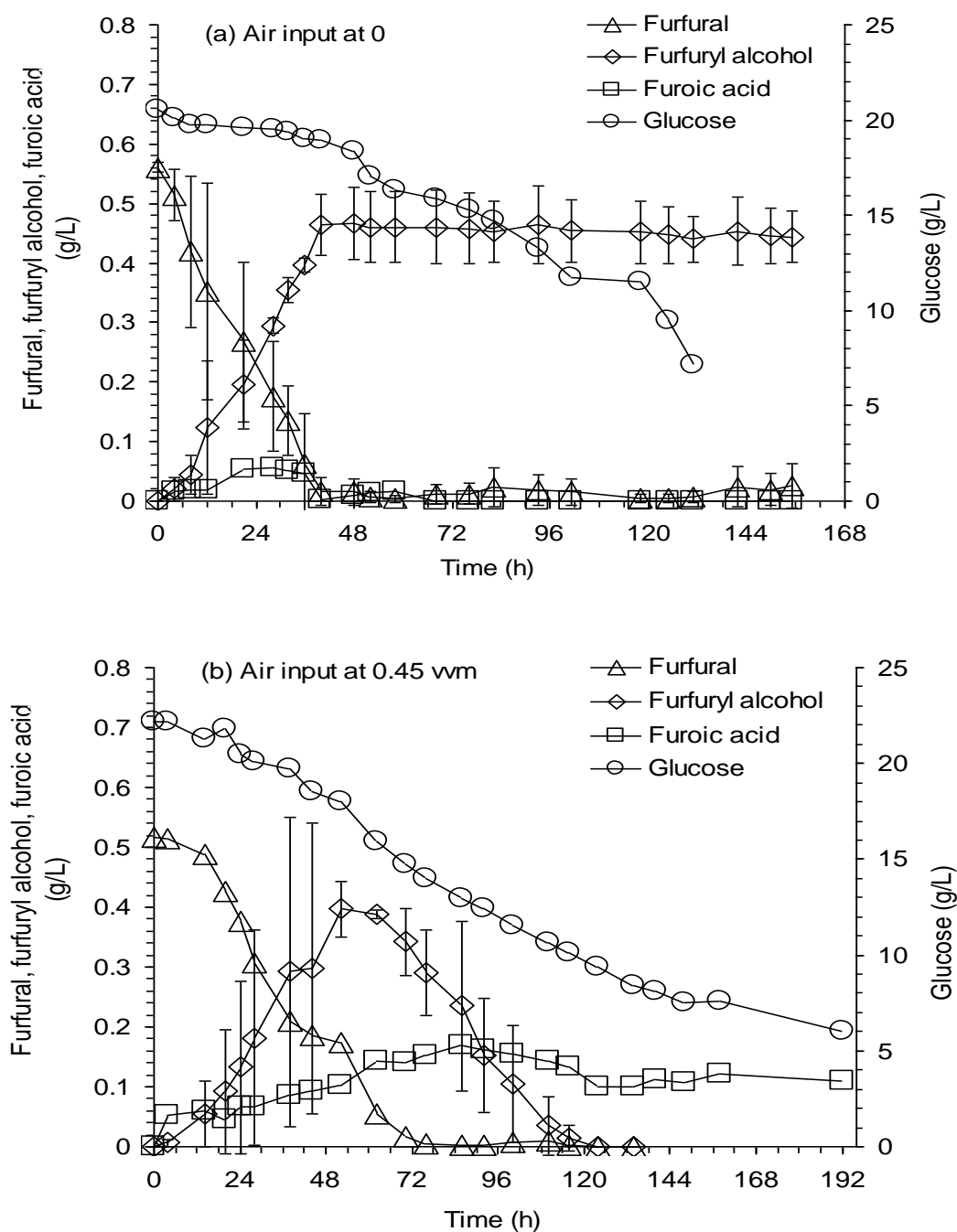
分析图 3.4.2(a)可知，厌氧状态下的糠醛转化和糠醇生成速率较慢，而且生成的糠醇几乎不向糠酸转化，也检测不到糠酸的积累。表明溶氧在糠醇向糠酸转化过程中起着至关重要的作用。图 3.4.2(a)还表明，在糠醛代谢完全之前葡萄糖几乎不消耗，而在糠醛被完全代谢后，葡萄糖的消耗速度大大加快，表明与葡萄糖相比，糠醛是 *A. resiniae* ZN1 的优先碳源。

分析图 3.4.2(b)可知，在较低的溶氧状态下 (0.45 vvm)，糠醛转化和糠醇生成速率显著增加，并出现有糠酸积累的阶段。这表明，糠醛可以首先快速转为毒性较低的糠醇，然后再氧化成为糠酸，而氧的存在是糠醇进一步快速氧化为糠酸的必要条件。在糠醛被完全转化前，葡萄糖有所消耗；当糠醛被完全转化为糠醇后，葡萄糖的消耗速度大大增加。

分析图 3.4.2(c)可知，在较高的溶氧水平下 (1.88 vvm)，糠醛的转化非常迅速，而由于高溶氧的存在，糠醇向糠酸的转化也更为快速；而且糠醇和糠酸积累的阶段持续时

间很短。高溶氧条件下的葡萄糖利用情况与低溶氧状态时相近。

上述实验结果表明,较高的溶氧不仅可以促进糠醇向糠酸的转化,而且有利于糠酸在胞内被彻底代谢为终产物。溶氧虽然不是 *A. resiniae* ZN1 进行糠醛降解的限制因素,但却是糠醇进一步向糠酸氧化的重要条件;溶氧可以显著影响糠醛降解的速率,尤其是糠醇向糠酸氧化以及糠酸后续代谢的速率。提高溶氧水平可以大大加快 *A. resiniae* ZN1 进行糠醛脱除的速率。



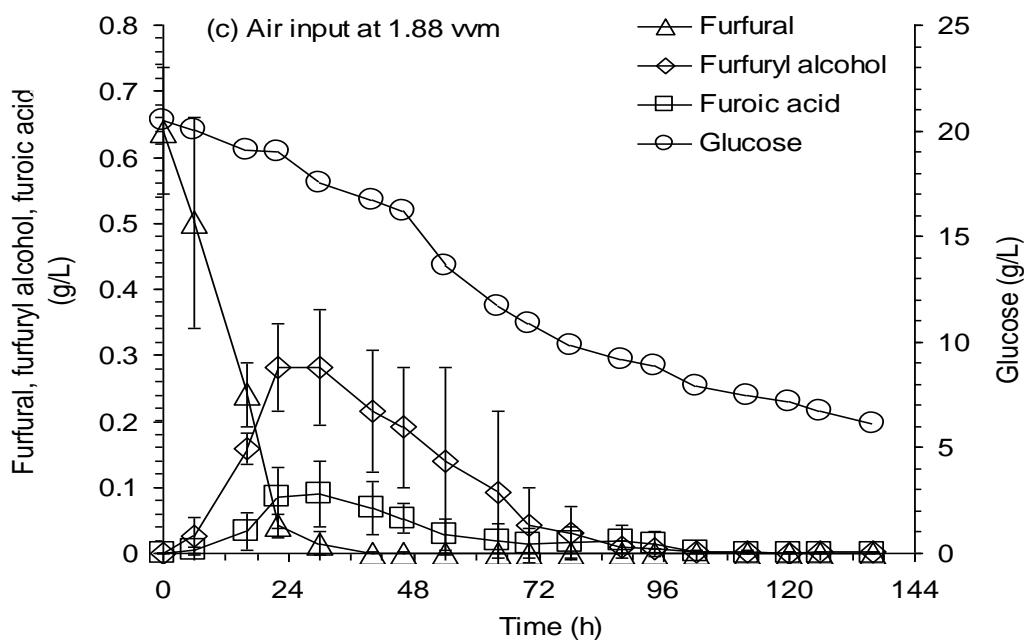


图 3.4.2 不同溶氧水平下 *A. resiniae* ZN1 对糠醛的代谢状况。条件：20%接种量，26 °C，pH 5.5，100 转/分钟。

Fig. 3.4.2 Influence of metabolic mechanism of furfural degradation by the kerosene fungus strain, *A. resiniae* ZN1 at different oxygen dissolved levels. Conditions: 20% incaution, 26 °C, PH 5.5, 100 rpm/min.

为了进一步确定溶氧在糠醛转化过程中的作用，本研究设计了一个两阶段通气法来研究溶氧对糠醛转化的影响，所用培养基为发酵培养基，成分如下：KH₂PO₄ 2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1 g/L, MgSO₄ ·7H₂O 1 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L, Yeast Extract 1 g/L, glucose 20 g/L。灭菌后添加过滤除菌的糠醛（约 0.6 g/L）。两阶段通气法是指在糠醛的转化过程中，以糠醛完全转化为界限，在此之前进行不通气的厌氧培养，之后则以 0.91 vvm 的通气量通入空气进行有氧培养（结果见图 3.4.3）。分析图 3.4.3 可知，厌氧培养时糠醛缓慢地向糠醇转化，在糠醛完全转化为糠醇并开始有氧培养时，糠醇开始向糠酸氧化。与图 3.4.2 不同的是，两阶段通气时糠酸的积累一直很少。原因可能是由于 *A. resiniae* ZN1 在长时间的厌氧生长状态下，细胞活力大大下降，即使重新开始通气进行有氧培养，糠醇的氧化速度依然很慢，糠酸的利用速度也很慢。该实验充分表明，有氧培养是提高细胞活力进而提高生物脱毒速率的有效途径。

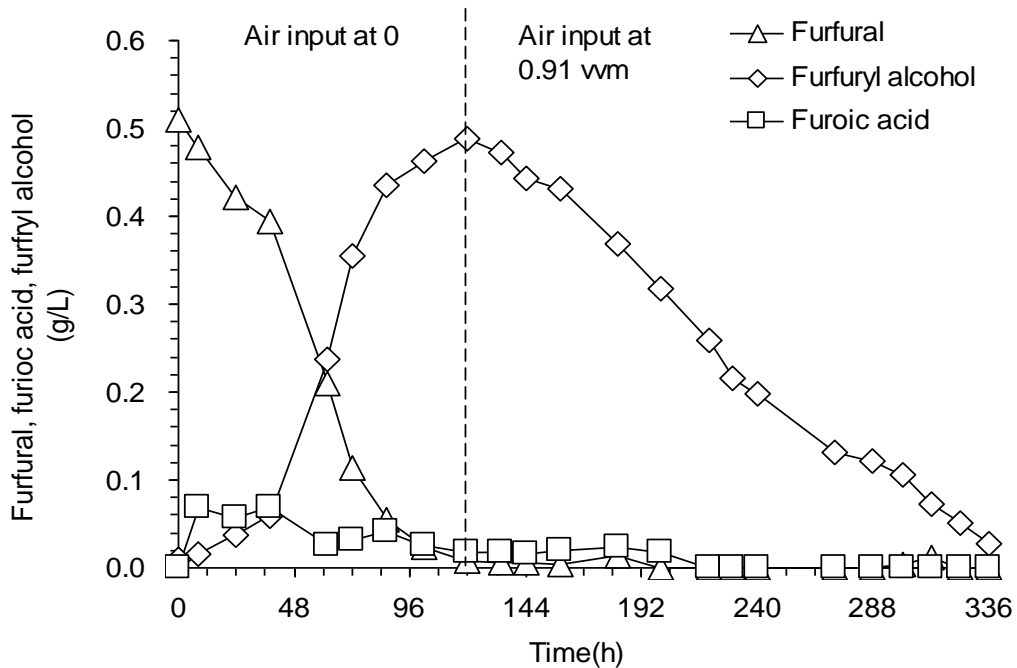


图 3.4.3 两阶段通气法对 *A. resiniae* ZN1 代谢糠醛的影响。条件：20%接种量，26 °C，pH 5.5, 100 转/分钟。

Fig. 3.4.3 Influence of metabolic mechanism of furfural degradation by *A. resiniae* ZN1 with the control method of the second stage. Conditions: 20% incaution, 26 °C, PH 5.5, 100 rpm/min.

3.4.2 *A. resiniae* ZN1 的 5-羟甲基糠醛代谢分析

5-羟甲基糠醛是另一个很重要的呋喃衍生物，其结构跟糠醛类似，对微生物的生长也有很强的抑制作用。这里采用与糠醛代谢相同的研究方法，在不同的溶氧水平下对 5-羟甲基糠醛的降解代谢途径进行研究，结果见图 3.4.4。

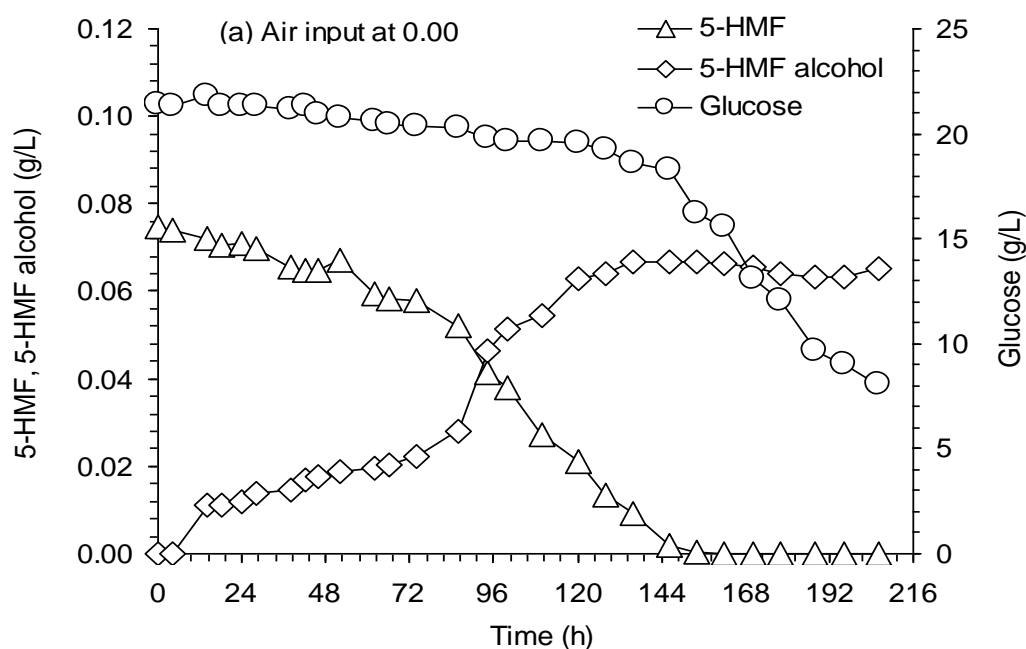
分析图 3.4.4(a)可知，在厌氧条件下，5-羟甲基糠醛能被 *A. resiniae* ZN1 代谢，并伴随着代谢产物 2,5-呋喃-二甲醇（5-羟甲基糠醇）的快速积累，直至 5-羟甲基糠醛被完全转化，之后 2,5-呋喃-二甲醇的浓度基本上不再变化。这说明厌氧条件下，*A. resiniae* ZN1 能够降解 5-羟甲基糠醛，并且生成对其生长几乎无抑制作用的呋喃衍生物 2,5-呋喃-二甲醇。与糠醛降解类似，在 5-羟甲基糠醛转化完全前，葡萄糖的浓度基本上保持不变。当 5-羟甲基糠醛被完全消耗后，葡萄糖的浓度开始下降，这说明在 5-羟甲基糠醛和葡萄糖共存时，*A. resiniae* ZN1 优先利用 5-羟甲基糠醛；而消除抑制物 5-羟甲基糠醛的毒性后，葡萄糖才被作为碳源。

分析图 3.4.4(b)可知，在低溶氧条件下（0.35 vvm），5-羟甲基糠醛的降解速率和代谢产物 2,5-呋喃-二甲醇的生成速率明显提高，且当 5-羟甲基糠醛被完全转化后，2,5-呋喃-二甲醇浓度也基本上不再变化。葡萄糖的代谢状况与厌氧状态类似，在 5-羟甲基糠

醛完全代谢之前，葡萄糖基本没有消耗，表明在低溶氧条件下，*A. resinae* ZN1 优先利用 5-羟甲基糠醛作为碳源和能源。

分析图 3.4.4(c)可知，在高溶氧条件下（1.25 vvm），5-羟甲基糠醛的降解速率和 2,5-呋喃-二甲醇的生成速率与低溶氧条件下的降解近似，即当抑制物 5-羟甲基糠醛被完全转化前，葡萄糖基本不消耗，当 5-羟甲基糠醛转化完全后，葡萄糖开始快速消耗，且随着溶解氧水平的升高，葡萄糖的浓度下降的更快。

综上所述，在不同的溶氧水平下，*A. resinae* ZN1 均能够有效降解抑制物 5-羟甲基糠醛，生成对其生长无明显抑制作用的产物 2,5-呋喃-二甲醇，且随着溶氧水平的提高，生物降解的速度越快；在抑制物与葡萄糖同时存在的情况下，*A. resinae* ZN1 优先利用 5-羟甲基糠醛，保留充足的碳源葡萄糖可以进行后续的发酵。



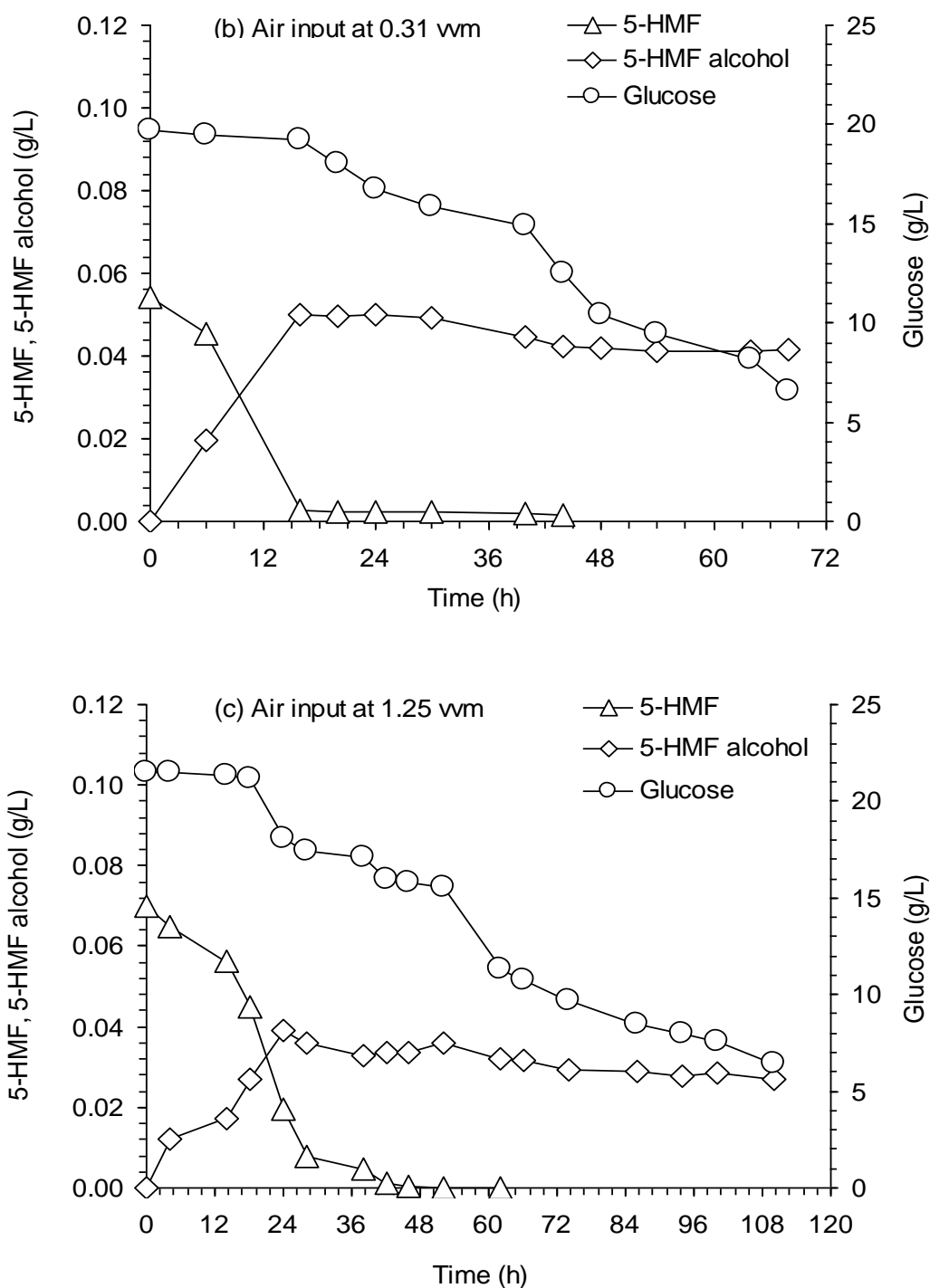


图 3.4.4 不同溶氧水平下 *A. resiniae* ZN1 对 5-羟甲基糠醛的代谢。条件：20%接种量，26 °C，pH 5.5，100 转/分钟。

Fig. 3.4.4 Influence of metabolic mechanism of HMF degradation by the kerosene fungus strain, *A. resiniae* ZN1 at different oxygen dissolved levels. Conditions: 20% incaution, 26 °C, pH 5.5, 100 rpm/min.

3.4.3 *A. resinae* ZN1 的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸混合抑制物的生物降解

图 3.4.5 描述了 *A. resinae* ZN1 对糠醛和 5-羟甲基糠醛混合物的生物降解情况。从图 3.4.5 可以看出，在较高溶氧水平（1.88 vvm）下，相比单一抑制物降解的情况，糠醛和 5-羟甲基糠醛的转化速度均有所下降；在糠醛和 5-羟甲基糠醛同时存在的情况下，糠醛降解的初始速率快于 5-羟甲基糠醛，但在短时间之后（约 12 小时）后者降解速率加快，两者降解速率趋于接近，直至完全降解。结果还表明，糠醛的降解产物糠醇浓度很低，但进一步的降解产物糠酸浓度却比单一的糠醛降解时高，原因可能是 2,5-呋喃二甲醇被 *A. resinae* ZN1 快速转化转化为糠酸。葡萄糖的消耗也与单一抑制物时不同，葡萄糖在糠醛完全转化前基本没有消耗，但却与 5-羟甲基糠醛的降解同时开始消耗。

两种呋喃类抑制物的混合物的降解情况与单一抑制物降解不同的原因可能是它们之间存在着协同效应，从而增加了对微生物的毒性。酿酒酵母可以在含有单一的糠醛或者 5-羟甲基糠醛的培养基上生长，但却不能在同时含有糠醛与 5-羟甲基糠醛两种混合抑制物的培养基上生长^[73]；Zaldivar^[74]等也报道过诱变的大肠杆菌也有类似的生物毒性协同效应。这或许是 *A. resinae* ZN1 降解糠醛和 5-羟甲基糠醛的混合抑制物时速度较慢的原因。

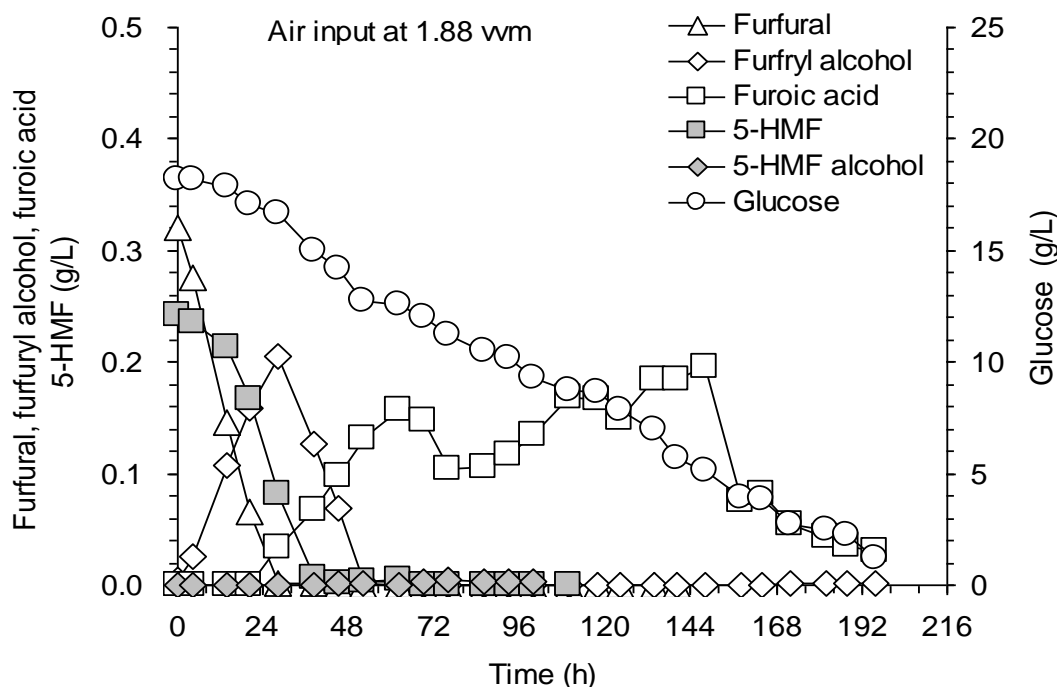


图 3.4.5 *A. resinae* ZN1 对糠醛和 5-羟甲基糠醛混合物的生物降解。条件：20%接种量，26 °C，pH 5.5，100 转/分钟，通气量 1.88 vvm。

Fig. 3.4.5 Influence of metabolic mechanism of furfural and 5-hydroxymethylfurfural degradation by *A. resinae* ZN1. Conditions: 20% inoculation, 26 °C, pH 5.5, 100 rpm/min, ventilation of 1.88 vvm.

图 3.4.6 描述了 *A. resinae* ZN1 对糠醛、5-羟甲基糠醛以及乙酸混合物的生物降解情况。从图 3.4.6 可以看出，在较高溶氧水平（1.88 vvm）下，相比单一抑制物降解的情况，糠醛和 5-羟甲基糠醛的转化速度均有所下降；在糠醛和 5-羟甲基糠醛同时存在的情况下，糠醛降解的初始速率快于 5-羟甲基糠醛，但在短时间之后（约 12 小时）后者降解速率加快，两者降解速率趋于接近，直至完全降解。而乙酸的降解速度似乎还加快了，这或许是混合抑制物降解的生物协同效应吧。结果还表明，糠醛的降解产物糠醇浓度很低，但进一步的降解产物糠酸浓度却比单一的糠醛降解时高，原因可能是 2,5-呋喃-二甲醇被 *A. resinae* ZN1 快速转化转化为糠酸。葡萄糖的消耗也与单一抑制物时不同，葡萄糖在糠醛完全转化前几乎没有消耗，但却与 5-羟甲基糠醛的降解同时开始消耗。

两种呋喃类抑制物和乙酸的混合物的降解情况与单一抑制物降解不同的原因可能是它们之间存在着协同效应，从而增加了对微生物的毒性。酿酒酵母可以在含有单一的糠醛或者 5-羟甲基糠醛的培养基上生长，但却不能在同时含有糠醛与 5-羟甲基糠醛两种混合抑制物的培养基上生长^[72]；Zaldivar^[74]等也报道过诱变的大肠杆菌也有类似的生物毒性协同效应。这或许是 *A. resinae* ZN1 降解糠醛和 5-羟甲基糠醛的混合抑制物时速度较慢的原因。

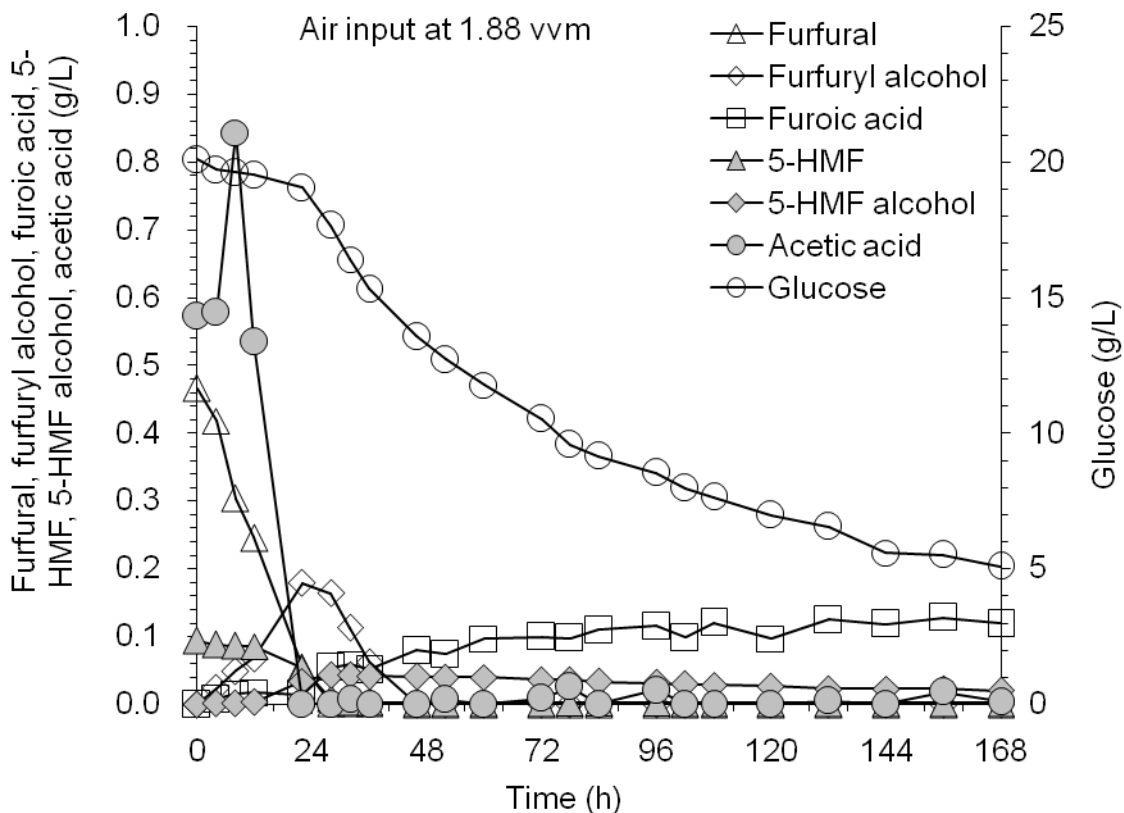


图 3.4.6 *A. resinae* ZN1 对糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸混合物的生物降解。条件：20%接种量，26°C，pH 5.5，100 转/分钟，通气量 1.88 vvm。

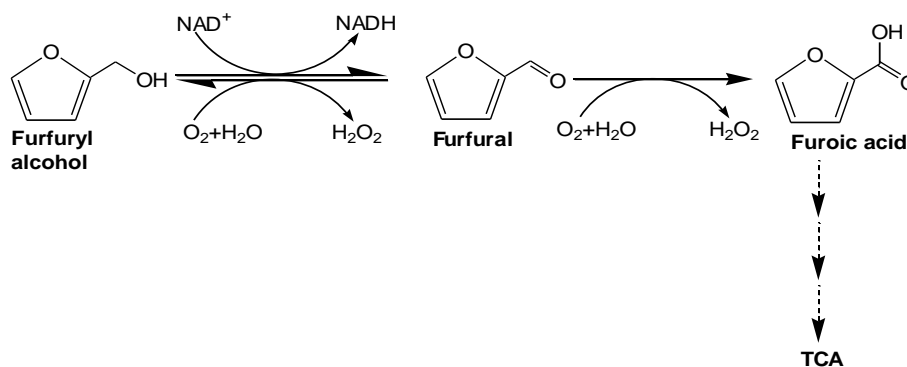
Fig. 3.4.6 Influence of metabolic mechanism of furfural、5-hydroxymethylfurfural and acetic acid degradation by *A. resinae* ZN1. Conditions: 20% incaution, 26 °C, pH 5.5, 100 rpm/min, ventilation of 1.88 vvm.

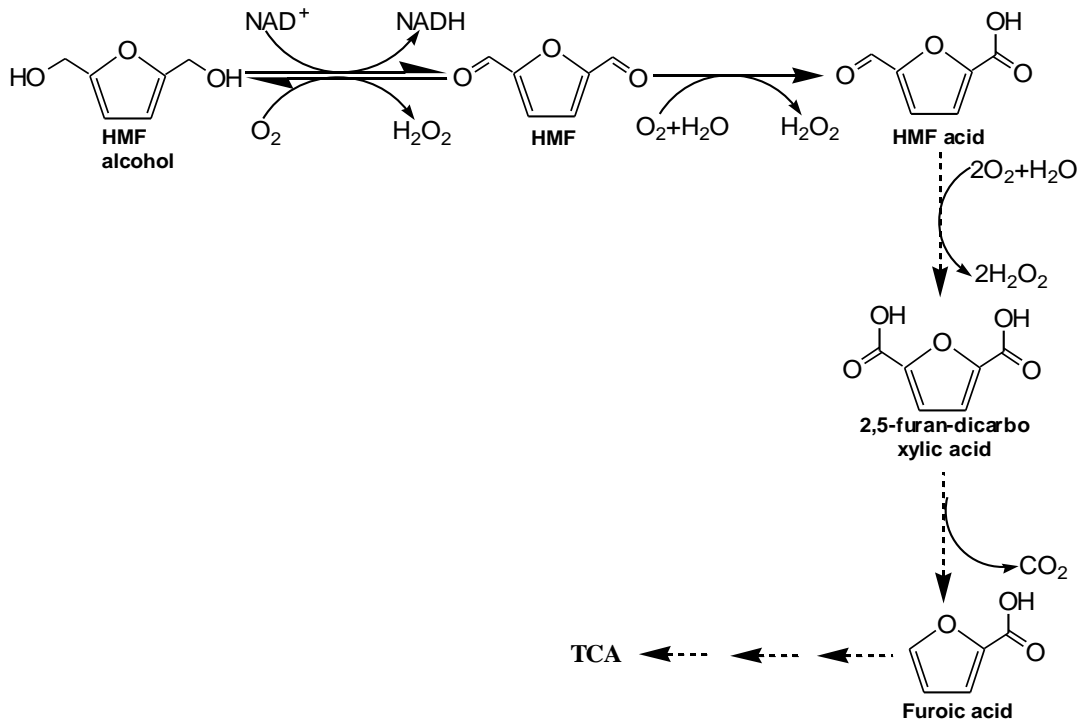
3.4.4 *A. resinae* ZN1 降解糠醛和 5-羟甲基糠醛代谢路径的初步解析

综合上述实验结果，本文对生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 转化糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解代谢途径进行了分析，结果见图 3.4.7。

糠醛首先在醛还原酶作用下快速地转化为毒性较低的糠醇；然后糠醇在醇脱氢酶作用下，再度生成不致对微生物产生危害的低浓度糠醛；然后，糠醛在醛脱氢酶作用下，继续氧化为糠酸。推测糠酸的进一步降解路径可能与 Koopman 等^[67]提出的 *Cupriavidus basilensis* HMF14 代谢路径，通过进入 TCA 循环完成糠醛和 5-羟甲基糠醛的完全降解，即糠酸在糠酰辅酶 A 合成酶的作用下，结合一分子的 HSCoA 转化为 2-糠酰辅酶 A (2-Furoyl-CoA)；在钼依赖糠酰辅酶 A 脱氢酶的作用下，结合一分子水后转化为 5-羟基-2-糠酰-辅酶 A；通过酮-醇互变异构化，以及自发的内酯水解或者在一般的内酯水解酶的作用下转化为 2-氧化戊二酸和辅酶 A，2-氧化戊二酸最终进入 TCA 循环。

5-羟甲基糠醛与糠醛的结构非常相似，其降解也与糠醛降解类似，即 5-羟甲基糠醛也是首先在醛还原酶作用下生成对微生物毒性较小的 2,5-呋喃-二甲醇 (HMF alcohol)，5-羟甲基糠醇在醇脱氢酶作用下，再度生成不致对微生物产生危害的低浓度 5-羟甲基糠醛；然后，5-羟甲基糠醛在醛脱氢酶作用下，继续氧化为 5-羟甲基糠酸 (HMF acid)。推测从 5-羟甲基糠酸至 TCA 循环的步骤也可能与 Koopman F^[67]等提出的 *Cupriavidus basilensis* HMF14 代谢路径相似，即 5-羟甲基糠酸在氧化酶作用下继续氧化为 2,5-呋喃-二羧酸，2,5-呋喃-二羧酸在脱羧酶作用下生成糠酸。糠酸再沿与糠醛同样的路径，最终进入 TCA 循环。



图 3.4.7 *A. resiniae* ZN1 的糠醛和 5-羟甲基糠醛生物降解路径Fig 3.4.7 Biodegradation pathway of furfural and HMF by *A. resiniae* ZN1

本研究发现, *A. resiniae* ZN1 的糠醛和 5-羟甲基糠醛生物降解路径与前人提出的细菌中的代谢途径基本一致^[67,75]。在本文的研究中,无论是厌氧状态还是有氧发酵,均发现糠醛和 5-羟甲基糠醛也是被 *A. resiniae* ZN1 的细胞摄取并且进行转化的,其转化产物分别是糠醇、糠酸以及 2,5-呋喃-二甲醇。考虑到糠醛和 5-羟甲基糠醛的高生物毒性, *A. resiniae* ZN1 首先是将其进行快速地还原为较弱生物毒性的糠醇和 2,5-呋喃-二甲醇,然后再进行氧化反应,将高毒性抑制物的浓度维持在不影响 *A. resiniae* ZN1 细胞正常生长的水平,这种脱毒方式被认为是经典的-非特异性的呋喃醛脱毒机制^[66]。中间产物糠醇的大量积累充当无毒性的底物泵,以供糠酸的氧化生成,糠酸是 *A. resiniae* ZN1 细胞进行生长的实际底物。在本文的各项实验中,糠酸的浓度一直都不高,说明糠酸被 *A. resiniae* ZN1 的细胞作为碳源以供生长繁殖所需。

3.4.5 乙酸的降解

众所周知,木质纤维素预处理后产生的抑制物中还有有机酸,乙酸是其中的代表。本文初步研究了生物脱毒真菌 *A. resiniae* ZN1 降解乙酸的路径,控制的条件跟糠醛转化时一致,结果见下图。由下图可知,在前 12h 内,乙酸和葡萄糖的浓度都有一个短暂升高的时间段 (0-12h),尤其是乙酸浓度的升高更明显(重复实验中结果与此一致),12h 后乙酸浓度的下降速度更快,24h 后乙酸几乎完全被转化。这可能是在接种后的前 12h

内, 霉菌 *A. resinae* ZN1 代谢葡萄糖进行生长时产生了乙酸, 同时还可能产生了一些可以转化乙酸的酶, 之后霉菌 *A. resinae* ZN1 就开始优先利用乙酸, 直至将乙酸完全消耗掉。乙酸被完全转化后, 葡萄糖的浓度才开始大幅度下降。在前 24h 内, 即乙酸大量存在的情况下, 葡萄糖的浓度变化并不大, 这就说明, 在抑制物乙酸和葡萄糖同时存在的情况下, 生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 是优先利用抑制物乙酸的, 这样既完全转化了抑制物乙酸, 同时又保留了大量的酿酒酵母发酵产乙醇时可以利用的碳源葡萄糖。

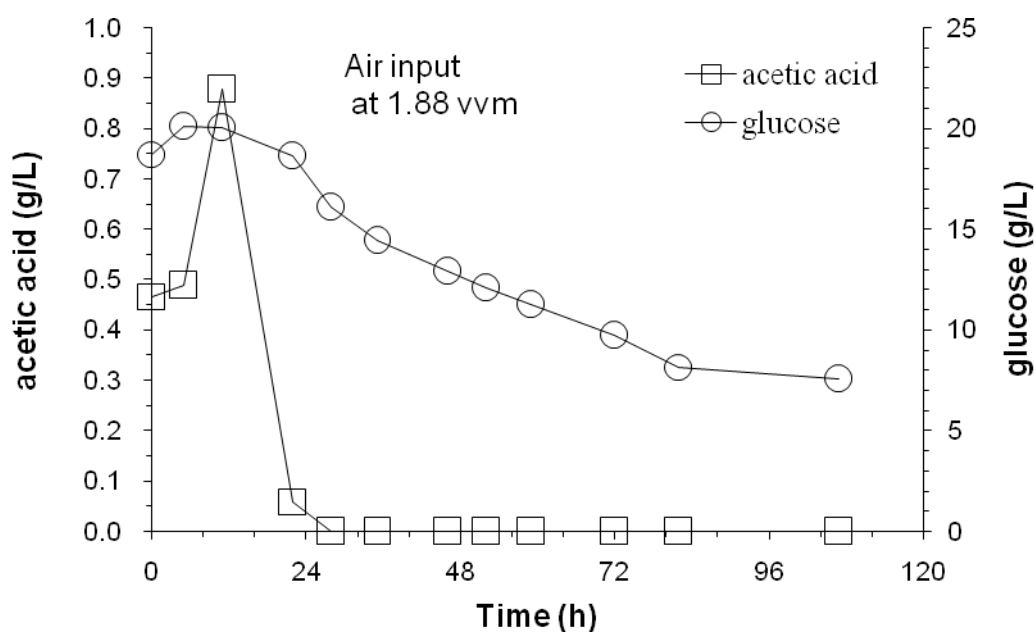


图 3.4.8 溶氧条件下 *A. resinae* ZN1 对乙酸的代谢状况。条件: 20%接种量, 26 °C, pH 5.5, 100 转/分钟。

Fig. 3.4.8 Influence of metabolic mechanism of acetic acid degradation by *A. resinae* ZN1. Conditions: 20% incaution, 26 °C, pH 5.5, 100 rpm/min.

第四章 结论与展望

4.1 总结

1 通过在完全水洗的玉米秸秆中单独添加唯一碳源的实验,可以确定生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 可以利用的碳源有葡萄糖、木糖、蔗糖、甘露糖、阿拉伯糖、果糖、半乳糖等单糖;还可以利用木质纤维素预处理后可能产生的各种抑制物(糠醛、5-羟甲基糠醛、甲酸、乙酸、乙酰丙酸、正十二烷烃、煤油、香兰素、阿魏酸、水杨酸、4-羟基苯甲醛、苯酚、愈创木酚、芝麻酚),并且研究了霉菌 *A. resinae* ZN1 能够利用这些抑制物作为碳源进行生长的大致浓度范围。研究结果表明,在 PDA 平板上、25℃ 培养箱里培养一周的 *A. resinae* ZN1 菌落,直径在 1 cm 左右。真菌 *A. resinae* ZN1 的形态特征为:正面是泥土色、微弱的绒毛状,平板背面是深蓝色,认为是霉菌 *A. resinae* ZN1 分泌到培养基中的黑色素。随着培养时间的延长,霉菌 *A. resinae* ZN1 分泌到培养基中的黑色素就越多,背面表现为蓝黑色。另外,在普通光学显微镜下可观察到菌丝有隔,呈现蓝绿色,这或许是有色素的原因。产囊体为螺旋式卷曲,产囊体下的菌丝包裹形成子囊果,显示该菌具有不整子囊菌纲真菌的形态特征。碳源生长谱实验表明,该菌可以利用多种糖(葡萄糖、木糖、蔗糖、甘露糖、阿拉伯糖、果糖以及半乳糖)、呋喃衍生物(糠醛、5-羟甲基糠醛)、各种有机酸(甲酸、乙酸、乙酰丙酸、水杨酸以及阿魏酸等)、各种酚类(苯酚、愈创木酚以及芝麻酚)、多种芳香族化合物以及正十二烷、煤油等作为唯一碳源进行生长繁殖。该部分的实验结果基本展示了生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 的生长特性,并大致了解了霉菌 *A. resinae* ZN1 对各种抑制物的耐受值,这对后续研究以抑制物作为唯一碳源进行代谢途径的探索工作做了铺垫。

2 本文还初步研究了生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 对呋喃衍生物(糠醛和 5-羟甲基糠醛)以及乙酸的降解路径。霉菌 *A. resinae* ZN1 在厌氧或者有氧状态下均可以很好地降解木质纤维素预处理后产生的呋喃抑制物糠醛和 5-羟甲基糠醛。本文提出的生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 转化糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解代谢途径跟前人提出的细菌中的代谢途径基本一致:糠醛首先快速地转化为毒性较低的糠醇,糠醇则再度生成不致对微生物产生危害的低浓度糠醛,糠醛继续氧化为糠酸。与糠醛降解类似,5-羟甲基糠醛也是首先生成对微生物毒性较小的 2,5-呋喃-二甲醇(HMF alcohol),5-羟甲基糠醇再度生成不致对微生物产生危害的低浓度 5-羟甲基糠醛;然后继续氧化为 5-羟甲基糠酸(HMF acid)。推测糠酸或 5-羟甲基糠酸可能继续进入 TCA 循环,进而完成糠醛和 5-羟甲基糠醛的完全降解。另外,本文还初步研究了生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 对乙酸的代谢路径,乙酸代谢转化过程中浓度先升高再下降,推测可能是葡萄糖转化过程中产生了乙酸,同时产生快速代谢乙酸的酶,之后乙酸就优先葡萄糖被很快地利用,从而节

省后续发酵碳源葡萄糖。本文结果对将来加快生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 生物脱毒速率、改善限速步骤提供了重要的实验依据。

4.2 展望

以木质纤维素为原料的生物燃料研究，尤其是生物乙醇和生物柴油，具有十分广阔的发展空间。因此，生物脱毒法更应该扩大应用范围，并将这种脱毒方法成功应用于不同种类的木质纤维素脱毒。深入研究生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 对每种抑制物的降解机理，本文中 *A. resinae* ZN1 对糠醛和羟甲基糠醛的降解代谢分析的结论只是初步的研究，深入的研究工作正在开展中，后续的工作不仅包括以玉米秸秆水解液为体系和玉米秸秆固体发酵验证本文结论，还将从分子生物学及酶学角度阐述 *A. resinae* ZN1 对糠醛和羟甲基糠醛的代谢路径。另外，后续工作还将研究木质纤维素预处理后发酵产乙醇的其它种类抑制物，包括有机酸、酚类以及一些芳香族类化合物。研究各种发酵抑制物的脱毒机理，从而提高生物脱毒法降解抑制物的速度，这样才具有工业生产应用的广适性。

参考文献

- [1] Campbell, CJ, Laherrere, JH. The end of cheap oil. *Sci. Am.* 1998,3: 78-83
- [2] Dien BS, Bothast RJ, Nichols NN, Cotta MA. The U.S. corn industry: an overview of current technology and future prospects. *Int Sugar J.* 2002, 104: 204-211
- [3] Limjm, Salidoal, Butcherdj. Phytoremediation of lead using India mustard (*Brassica juncea*) with EDTA and electrodiodes. *Micro-chemical Journal.* 2003, 76 (1) : 3-9
- [4] 陈洪章. 纤维素生物技术. 北京:化学工业出版社. 2005
- [5] Hendriks ATWM, and Zeeman G. *Bioresource Technology.* 2009,100, 10-18
- [6] Grabber, J. H. *Crop Science.* 2005, 45, 820-831
- [7] Kenji, I., Lam, T. B.-T., and Stone, B. A. *Plant physiology,* 1994, 104, 315-320
- [8] 熊璐璐. 新型代用能源-生物燃料. *广东化工.* 2006, 33 (9) : 32-34
- [9] Wymance. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. *Biotechnology Progress.* 2003, 19:254 - 262
- [10] 朱智楠. 木质纤维素来源发酵抑制物的生物降解以及光合发酵制氢. 华东理工大学图书馆, 2010, 6
- [11] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008, 78:211-220
- [12] Goldstein, I. S. Acid Processes for Cellulose Hydrolysis and Their Mechanisms. In E. J. Soltes (Ed.) *Wood and Agricultural Residues* New York, NY: Academic Press, Inc. 1983, (pp. 315-328)
- [13] Mason, WH. 1926. U.S. Patent #1,578,609
- [14] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. *Bioresource Technology.* 2005, 96, 673-686
- [15] Schell D, Farmer J, Newman M, McMillan, J. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2003,105, 69-85
- [16] Sun Y, Cheng J. *Bioresource Technology.* 2002, 83, 1-11
- [17] Bothast RJ, Nichols NN, Dien BS. *Biotechnology Progress.* 1999,15, 867-875
- [18] Ho N, Chen Z, Brainard A and Sedlak M. Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics. 1999, 163-192
- [19] Lebeau T, Jouenne T, Junter GA. *Enzyme and Microbial Technology.* 1997,21, 265-272
- [20] Wright J, Wyman C, Grohmann K. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 1988,18,

75-90

- [21] 魏巍, 常春, 马晓建. 纤维素转化为生物质燃料的研究进展. 安徽农业科学. 2009, 37 (18) : 8597-8599, 8674
- [22] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 1996,19: 220-225
- [23] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2004, 66, 10-26
- [24] Luo C, Brink D L, Blanch HW. *Biomass and Bioenergy.* 2002, 22, 125-138
- [25] Palmqvist E., Grage H., Meinander, N.Q., Hahn-Heagerdal, B., Main and interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng.* 1999,63, 46-55
- [26] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates.I: inhibition and detoxification. *Biosource Technology.* 2000, 74,17-24
- [27] Taherzadeh MJ, Eklund R, Gustafsson L, Niklasson C, Liden G. *Industrial and Engineering Chemistry Research.* 1997, 36, 4659-4665
- [28] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 1999, 87, 169-174
- [29] Oliva JM, Negro MJ, Sáez F, Ballesteros I, Manzanares P, González A, et al. *Process Biochemistry.* 2006, 41, 1223-1228
- [30] Sanchez B, Bautista J. *Enzyme and Microbial Technology.* 1988, 10, 315-318
- [31] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A, Alfani F. *Biotechnology Progress.* 2004, 20, 200-206
- [32] Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, McMillan JD. *Bioresource Technology.* 2008, 99, 8940-8948
- [33] Jing XY, Zhang X, Bao J. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2009, 159, 696-707
- [34] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. *Bioresource Technology.* 2000, 74, 25-33
- [35] Mes-Hartree M, Hogan C, Hayes RD, Saddler JN. *Biotechnology Letters.* 1983, 5, 101-106
- [36] Taherzadeh MJ, Niklasson C, Liden G. *Chemical Engineering Science.* 1997, 52, 2653-2659
- [37] Kothari UD, Lee YY. Inhibition Effects of Dilute-Acid Prehydrolysate of Corn Stover on Enzymatic Hydrolysis of Solka Floc. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011,165:1391-1405

- [38] Roberto IC, de Mancilha IM, Sato S. Influence of $k(L)a$ on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Bioprocess Engineering*. 1999, 21, 505-508
- [39] Nigam JN. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*. 2001, 87, 17-27
- [40] Parajo, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technol.* 1998, 66, 25-40
- [41] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, et al. Effects of $Ca(OH)_2$ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and bioengineering*. 2000, 69; 526-536
- [42] Vogel-Lowmeier, E.M., Sopher, C.R., Lee, H., Intracellular acidification as a mechanism for the inhibitors of xylose fermentation by yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 20, 75-81
- [43] Villa, P., Felipe, M.G.A., Rodriguez, R.C.L., Vitolo, M., Luis dos Reis, E., Silva, S.S., Napoles, A.I., Mancilha, I.M. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: *Esbes-2 European Symposium On. Biochemical Engineering Science, 2. Porto-Portugal, 1998*
- [44] Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002,31, 353-364
- [45] Yang B, Wyman CE. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, 94, 611-617
- [46] Berlin A, Balakshin M, Gilkes N, Kadla J, Maximenko V, Kubo S, et al. *Journal of Biotechnology*. 2006, 125, 198-209
- [47] McMillan, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Conversion of Hemicellulose Hydrolyzates to Ethanol*. American Chemical Society Symposium, Washington, DC, 1994, 292-324
- [48] Lawford, H.G., Rousseau, J.D. Improving fermentation performance of Recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998,70-72, 161-172
- [49] Van Zyl, C., Prior, B.A., du Preez, J.C., Acetic acid inhibition of DD-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb. Technol.* 1991,13, 82-86
- [50] Felipe, M.G.A., Veira, M.V., Vitolo, M., Mancilha, I.M., Roberto, I.C., Silva, S.S., Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Basic Microb.* 1995,35, 171-177
- [51] Jin F, Zhou Z, Kishita A, Enomoto H, Kishida H, Moriya T. *Chemical Engineering*

- Research and Design. 2007, 85, 201-206
- [52] Watson, N.E., Prior, B.A., Lategan, P.M., Lussi, M., Factors an acid treated bagasse inhibiting ethanol production from DD-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb Technol.* 1984, 6, 451-456
- [53] Jeonsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.O., Hahn-H€agerdal, B., Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49, 691-697
- [54] Silva, C.J.S.M., Roberto, I.C., Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Biotechnol.Tech.* 1999, 13, 743-747
- [55] Martinez, A., Rodriguez, M.E., Wells, M.L., York, S.W., Preston,J.F., Ingram, L.O., Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol. Progr.* 2001, 17, 287-293
- [56] Converti, A., Perego, P., Dominguez, J.M., Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolyzates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999, 82, 141-151
- [57] Schneider, H. Selective removal of acetic acid from hard woodspent sulfite liquor using a mutant yeast. *Enzyme Microb. Technol.*1996, 19, 94-98
- [58] Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresour Technol.* 2008, 99(17): 8042-8048
- [59] Dong H.W, Bao J. 2010. Biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical biology.* 5(6): 317-318
- [60] Zhang J, Zhu Z.N, Wang X.F, *et al.* Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology Biofuels.* 2010, 3:26
- [61] Brune G, Schoberth S.M, Sahn H. Growth of a strictly anaerobic bacterium on furfural (2-furaldehyde). *Appl Environ Microbio.*1983, 46(5):1187-1192
- [62] Belay N, Boopathy R, Voskuilen G. Anaerobic transformation of furfural by *Methanococcus deltae* (Delta) LH. *Appl Environ Microbio.* 1997, 63:2092-2094
- [63] Nichols N.N, Sharma L.N, Mowery R.A, *et al.* Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme Microb Technol.* 2008, 42:624-630
- [64] Almeida J.R.M, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund M.F, *et al.* Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.*

- 2009,82:625-638
- [65] Akillioglu H.G, Mogol B.A, Gokmen V. Degradation kinetics of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011, 28(12):1629-1635
- [66] Wierckx N, Koopman F, Luaine B, *et al.* Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnol.* 2010, 3(3):336-343
- [67] Koopman F, Wierckx N, Johannes H.W, *et al.* Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *PNAS.* 2010,107(11):4919-4924
- [68] Kerstin Koenig, Jan Remmer and Reesen. Xanthine Dehydrogenase and 2-Furoyl-Coenzyme A Dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Ful:Two Molybdenum-Containing Dehydrogenases of Novel Structural Composition. *Journal of Bacteriology.*1990,10, 172(10):5999-6009
- [69] Boopathy Ramaraj. Methanogenic Transformation of Methylfurfural Compounds to Furfural. *Applied and environmental microbiology.* 1996, 9(62): 3483-3485
- [70] Koenig K, and Andreesen JR. Molybdenum involvement in aerobic degradation of 2-furoic acid by *Pseudomonas putida* Ful. *Appl.Environ.Microbiol.* 1989, 55: 1829-1834
- [71] Boopathy RH, Bokang and Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *J.Ind.Microbiol.* 1993,5,11:147-150
- [72] Ramaraj Boopathy. Methanogenesis from Furfural by Defined Mixed Cultures. *Current Microbiology.* 2002,6, 44(6):406-410
- [73] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, *et al.* Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biothnol.* 2000, 53:701-708.
- [74] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L.O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol Bioeng.* 1999, 65:24-33
- [75] Nichols N.N, Mertens J.A. Identification and transcriptional profiling of *Pseudomonas putida* genes involved in furoic acid metabolism. *FEMS Microbiol Lett.* 2008, 284:52-57

致谢

本论文是在导师辛秀娟副教授和鲍杰教授的精心指导下完成的。辛老师，不但非常关心我的科研课题的进展，还从生活上和思想上关心我、教育我，她以和风细雨式的工作方法给予我敦敦教诲，在我失落时帮助我走出抑郁，对此我非常感谢！鲍老师渊博的学识、严谨的治学态度和精益求精的工作作风令我受益匪浅，本论文从选题到文章的完成都倾注了鲍老师太多的心血，在此我表示崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢在这三年的研究工作期间给予我无私帮助的张建老师、楚德强博士以及何燕青博士！感谢硕士期间，在我的工作和生活中给予帮助的胡凤仙老师以及赵凯、王玉梅、刘威、罗紫臣、国立浩、涂毅、冉红等同门师兄弟。感谢所有在我攻硕期间关心过我、帮助过我的师长和朋友！

最后，向一直支持我的家人表示衷心的感谢！

硕士期间发表论文

1. Zhang J, Zhu Z.N, Wang X.F, *et al.* Biodegradation of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology Biofuels*. 2010, 3:26
2. 王晓凤, 辛秀娟. 基因表达与 mRNA 结构的关系. *中国比较医学杂志*, 2010,6,20(6)
3. 王晓凤, 张建, 辛秀娟, 鲍杰. 煤油霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的糠醛代谢机理研究. 第五届全国研究生生物质能研讨会会议论文, 2011 年 10 月 9-11 日, 江苏南京
4. 王晓凤, 张建, 辛秀娟, 鲍杰. 生物脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的糠醛降解代谢分析. *生物工程学报*, 投稿中