

学校代码: 10251
学 号: 030120983

華東理工大學

硕 士 学 位 论 文

论文题目 高抗逆乳酸片球菌的代谢工程改造及其在

玉米秸秆原料生产 D-乳酸过程中的应用

学科专业 生物化工

研究方向 生物质能源

论文作者 张鹏

指导教师 叶勤 教授

定稿日期: 2014 年 04 月 14 日

分类号: Q814 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 学位论文

高抗逆乳酸片球菌的代谢工程改造及其在玉米秸秆原料
生产 D-乳酸过程中的应用

张鹏

指导教师姓名: 叶勤 教授 华东理工大学

鲍杰 教授 华东理工大学

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2015-4-14 论文答辩日期: 2015-6-2

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: 钟建江 教授

评 阅 人: 于洪巍 教授

夏小霞 研究员

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

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

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

高抗逆乳酸片球菌的代谢工程改造及其在玉米秸秆原料生产 D-乳酸过程中的应用

摘要

乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 是一株从木质纤维素发酵体系中筛选获得的高抗逆野生乳酸菌。该菌株能够利用高固体含量的干法稀酸预处理的玉米秸秆，通过同步糖化与发酵生产高浓度的混合 L-和 D-乳酸。本文以热敏性自杀质粒 pSET4E 为工具质粒，通过同源重组方法敲除了 *P. acidilactici* DQ2 编码 L-乳酸脱氢酶的基因 *ldh*，获得了一株生产光学纯 D-乳酸的工程菌株 *P. acidilactici* ZP26。该菌株能够利用葡萄糖生产光学纯度达 99.32% 的 D-乳酸。*ldh* 基因的敲除不影响菌株的生长特性、乳酸得率和对抑制物的耐受性，而葡萄糖代谢速率和乳酸发酵速率降低。

本文以干法稀酸预处理和生物脱毒后的玉米秸秆为原料，使用工程菌株 *P. acidilactici* ZP26 进行了 25% (w/w) 固体含量下的同步糖化与乳酸发酵。研究发现，抑制物降解和乳酸积累与生物脱毒时间密切相关，表明玉米秸秆原料中抑制物含量的减少是乳酸发酵性能提高的重要因素。*P. acidilactici* ZP26 利用脱毒 10 天的玉米秸秆产生极高发酵指标的 D-乳酸产品，D-乳酸终浓度、乳酸产率和乳酸得率分别是 77.78 g L^{-1} 、 $1.02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 66.06%。

本工作对玉米秸秆生产光学纯 D-乳酸具有重要意义。

关键词：乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici*；*ldh* 基因敲除；光学纯 D-乳酸；玉米秸秆

Metabolic Engineering of *Pediococcus acidilactici* with High Tolerance to Inhibitors for D-Lactic Acid Production Using Corn Stover Feedstock

Abstract

Pediococcus acidilactici DQ2, isolated from the lignocellulose fermentation system, is a wild lactic acid-producing strain with high resistance. Based on simultaneous saccharification and fermentation (SSF), *P. acidilactici* DQ2 could ferment the dry dilute acid pretreated corn stover and produce high titer D/L-lactic acid at high solids loading. A genetically modified strain, *P. acidilactici* ZP26 was constructed by the disruption of the gene *ldh* encoding L-lactate dehydrogenase in *P. acidilactici* DQ2 by homologous recombination method using the thermosensitive suicide plasmid pSET4E. *P. acidilactici* ZP26 produced optically pure D-lactic acid and the optical purity reached 99.32% using glucose as feedstock. It showed that the disruption of *ldh* had no influence on the cell growth, lactic acid yield and the tolerance to different inhibitors generated from the pretreatment of lignocellulose, while the glucose consumption and lactic acid productivity decreased.

The simultaneous saccharification and lactic acid fermentation by *P. acidilactici* ZP26 was carried out using the pretreated and detoxified corn stover as feedstock at 25% (w/w) solids loading. The study showed that inhibitor degradation and lactic acid accumulation were closely related to the detoxification time. Therefore the decrease of inhibitors in corn stover was the important factor which led to the promoted lactic acid fermentation. Optically pure D-lactic acid with extremely high fermentation parameters was produced by *P. acidilactici* ZP26 using the corn stover which detoxified for 10 days. And the D-lactic acid titer, productivity and yield reached 77.78 g L⁻¹, 1.02 g L⁻¹ h⁻¹, and 66.06%.

This work is much important for the production of optically pure D-lactic acid using corn stover.

Keywords: *Pediococcus acidilactici*; *Ldh* gene knockout; Optically pure D-lactic acid; Corn stover

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 乳酸概述.....	1
1.2 发酵产乳酸的原料.....	2
1.3 乳酸发酵菌株.....	2
1.4 乳酸菌利用木质纤维素原料生产乳酸.....	5
1.4.1 预处理.....	6
1.4.2 抑制物对发酵菌株的影响.....	7
1.4.3 针对抑制物的解决方法.....	8
1.4.4 酶水解与发酵.....	9
1.5 主要限制因素和解决策略.....	9
第 2 章 <i>P. acidilactici</i> DQ2 中 L-乳酸脱氢酶编码基因 <i>ldh</i> 的敲除.....	12
2.1 前言.....	12
2.2 实验材料.....	12
2.2.1 菌株、质粒和引物.....	12
2.2.2 酶、试剂和试剂盒.....	13
2.2.3 培养基和主要试剂.....	14
2.2.4 实验仪器.....	15
2.3 实验方法.....	16
2.3.1 敲除质粒 pSET4E- Δ <i>ldh</i> 的构建.....	16
2.3.2 <i>P. acidilactici</i> DQ2::pSET4E- Δ <i>ldh</i> 重组菌的获得.....	19
2.3.3 单双交换的筛选.....	19
2.3.4 敲除菌株的稳定性研究.....	21
2.3.5 敲除菌株的发酵性能.....	21
2.3.6 抑制物耐受性的比较.....	21
2.3.7 葡萄糖、乳酸的含量分析.....	22
2.4 结果与讨论.....	22
2.4.1 敲除质粒 pSET4E- Δ <i>ldh</i> 的构建.....	22

2.4.2	<i>P. acidilactici</i> DQ2::pSET4E- Δ <i>ldh</i> 重组菌株的鉴定	25
2.4.3	单双交换菌株的筛选	25
2.4.4	敲除菌株的稳定性研究	27
2.4.5	敲除菌株的发酵性能	28
2.4.6	抑制物耐受性的比较	31
2.5	本章小结	39
第 3 章 <i>P. acidilactici</i> ZP26 利用玉米秸秆生产光学纯 D-乳酸		41
3.1	前言	41
3.2	实验材料	41
3.2.1	菌株	41
3.2.2	酶及试剂	41
3.2.3	原料及培养基	42
3.2.4	实验仪器	42
3.3	实验方法	42
3.3.1	预处理、生物脱毒及磨浆处理	42
3.3.2	玉米秸秆的脱毒效果评价	43
3.3.3	<i>P. acidilactici</i> ZP26 利用玉米秸秆 SSF	43
3.3.4	利用玉米秸秆水解液驯化 <i>P. acidilactici</i> ZP26	44
3.3.5	葡萄糖、乳酸以及抑制物的含量分析	44
3.4	结果与讨论	45
3.4.1	预处理玉米秸秆的脱毒效果评价	45
3.4.2	<i>P. acidilactici</i> ZP26 利用玉米秸秆进行 SSF	47
3.4.3	利用玉米秸秆水解液驯化 <i>P. acidilactici</i> ZP26	50
3.4.4	驯化菌株与 <i>P. acidilactici</i> ZP26 的发酵性能比较	51
3.5	本章小结	53
第 4 章 结论与展望		54
参考文献		55
攻读硕士期间的研究成果		65
致谢		66

第 1 章 文献综述

1.1 乳酸概述

乳酸又名 2-羟基丙酸或 α -羟基丙酸，是一种自然存在的羟基羧酸，其广泛存在于动物、植物和微生物中。乳酸有两种旋光异构体，分别是 D-(-)-乳酸和 L-(+)-乳酸。

瑞典化学家舍勒于 1780 年首次从酸奶中提纯和得到乳酸。1808 年，瑞典化学家白则里在疲劳的肌肉中发现了乳酸。法国微生物学家巴斯德则于 1856 年发现，酸奶中的微生物能够产生乳酸。直至 1873 年，德国化学家威利森努斯确定了乳酸的分子结构。

由于乳酸有羟基和羧基，所以可以通过化学或者生物技术手段将其转化生成诸如丙酮酸、丙烯酸、1, 2-丙二醇和乳酸酯等用途广泛的化学品^[1]。因此，乳酸被视为一种主要的大宗化学品。乳酸传统上用作食品工业中的防腐剂（酸化剂）和风味增强剂，在化妆品工业中则用作乳化剂和保湿剂，在光学纯药物的合成中则作为中间体^[2, 3, 4]。目前，乳酸还有另外一个非常重要的用途就是化学合成聚乳酸（PLA），以此替代传统的石化基塑料制品，因此乳酸的需求量急剧增加^[5]。

PLA 是线性的脂肪族聚酯，其具有诸如可生物降解性、生物相容性、热塑性和较高的抗张强度等特性，这些特性使得 PLA 可用于食品和商品的包装以及餐具、组织再生的基质、药物运输系统、手术缝合线、骨科固定（例如韧带）等生物医用设备，也可用作农业塑料薄膜^[6, 7, 8]。

PLA 可分为聚 L-乳酸（PLLA）、聚 D-乳酸（PDLA）和聚 DL-乳酸（PDLLA），它们分别是 L-乳酸、D-乳酸、DL-乳酸的聚合物。其中，PLLA 和 PDLA 比 PDLLA 的价值更高，因为由一种构型的乳酸生成的聚乳酸物理性能和可降解性更优^[3]。在食品存储和医药工业中更倾向于用 L-乳酸的聚合物 PLLA，因为人体中只有 L-乳酸脱氢酶，而 D-乳酸对于人体代谢是有害的。因此，之前的研究大多集中于 L-乳酸的生产。PLLA 和 PDLA 的熔点均是 170 °C 左右，然而通用的塑料熔点则需要超过 185-190 °C^[9]。研究发现，PLLA 和 PDLA 的立构复合物（sc-PLA）熔点更高，比均聚物 PLLA 和 PDLA 约高 50 °C。相比均聚物而言，这种立构复合物材料的机械性能、热稳定性和水解耐受性更优^[10]。因此，聚合物级别的 D-乳酸颇具市场应用潜力。

目前，88% 的食品级纯度的乳酸市场价格是每吨 \$1,400–1,600，每年的需求量达到 130,000-150,000 t，预计在 2017 年达到 367,300 t，在 2020 年超过百万吨^[11]。

乳酸可以通过化学合成或者生物发酵途径生产得到。最常用的方法是基于乳腓的水解，然而化学合成只能得到外消旋的 DL-乳酸。而通过微生物发酵的方式能够得到光学纯的 L-乳酸或 D-乳酸。随着工业生物转化过程的发展，基于环境考虑，还有低的生产温度、低能耗和高纯度等因素，选择合适的微生物发酵产乳酸已经是乳酸生产的主要途径。目前，全球每年生产的 15 万吨乳酸中有 90% 是通过乳酸菌发酵得到的^[1]。

1.2 发酵产乳酸的原料

尽管每年有数百万美元的投入，PLA 的生产仍然受到高生产成本的约束^[12]。为了确保 PLA 能够与石化基塑料竞争市场，乳酸的价格应该在 $\$0.8 \text{ kg}^{-1}$ 或者更低^[8]。据报道，目前的原料成本超过了乳酸生产成本的 34%^[13]。从诸多方面来看，原材料在乳酸发酵的经济性和有效性方面起重要作用。

目前，用于 PLA 生产的乳酸绝大部分是以葡萄糖和农作物（主要是玉米）为底物生产得到，例如美国的 NatureWorks 公司和荷兰的 Purac 公司^[2]。然而，由于葡萄糖或淀粉等食品基的原料直接与食品供应链形成竞争，因此利用木质纤维素生物质作为廉价的可再生原料用于乳酸发酵有着非常吸引人的前景。

全球植物生物质中 90% 都是木质纤维素，每年产量接近 $200 \times 10^9 \text{ t}$ ，这其中 $8-20 \times 10^9 \text{ t}$ 是可获得的^[14]。木质纤维素是植物细胞壁的主要组成部分，也是地球上最丰富的可再生生物质。另外木质纤维素生物质也包含人类活动所产生的生物质废弃物（例如废纸）、农作物的副产物（例如麦秆和玉米秆）和工业废弃物（例如造纸污泥、木材工业废物）。木质纤维素普遍包含纤维素、半纤维素和木质素，在不同植物材料中纤维素、半纤维素和木质素的含量差别很大（如表 1.1）。纤维素是由 β -葡萄糖通过（1-4）糖苷键连接起来的均聚物，半纤维素是分枝状的，是由己糖（如葡萄糖和半乳糖）和戊糖（如木糖和阿拉伯糖）生成的异质类聚合物。其中半纤维素的组成在不同作物种类间差异很大，在单子叶植物中木糖是最主要的糖，而甘露糖是裸子植物（软木）中最主要的糖^[15]。木质素的组成非常复杂，大小约 1-100 kDa，其主要由酚类化合物构成^[16]。

表 1.1 不同种类植物木质纤维素的组成（w/w，基于干重）

Table 1.1 The composition of lignocellulose in different plants (w/w, based on dry weight)

	单子叶植物			裸子植物	被子植物
	甘蔗渣	麦秆	玉米秸秆	云杉	白杨
纤维素	36-45	38-48	36-41	40-44	43-49
半纤维素	25-28	23-29	26-30	19-21	18-24
木质素	17-20	13-19	16-21	25-29	23-29

1.3 乳酸发酵菌株

用于工业生产乳酸的菌株不仅需要具备转化廉价原料生成乳酸的能力，并且要求其营养的需求较低。另外，廉价的原料应该能够被有效转化成乳酸。为了最大程度地降低生产成本，用于发酵的微生物需要在乳酸生产中有很好的发酵能力。真菌和细菌是用于乳酸生产最广泛的微生物，其中，乳酸菌最常用于工业乳酸生产^[17]。

乳酸菌（LAB）是 G^+ 细菌，其不产孢子，也不能运动。乳酸菌包括球菌和杆菌，

涉及很多属, 诸如 *Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Oenococcus*、*Pediococcus*、*Streptococcus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus* 和 *Weissella* 等^[17]。

乳酸菌通过不同的代谢途径发酵不同的糖（戊糖和己糖），形成同型或者异型乳酸发酵（如图 1.1）。

同型乳酸发酵是只产乳酸作为末端产物的发酵类型，己糖是通过糖酵解（EMP）途径被利用，而戊糖是通过戊糖磷酸 PP/EMP 途径被利用。葡萄糖通过 EMP 途径产乳酸的理论得率是 1.0 g g^{-1} (2.0 mol mol^{-1})，而戊糖通过 PP/EMP 途径生成乳酸的理论得率是 1.0 g g^{-1} ($1.67 \text{ mol mol}^{-1}$)。只有少数几种野生型和工程改造菌株能够利用戊糖进行同型乳酸发酵，如 *E. mundtii* QU 25^[18, 19]和 *L. plantarum* $\Delta dhL1-xpk1::tkl/pCU-PXylAB$ ^[20, 21]。

在异型乳酸发酵中，葡萄糖通过磷酸转酮酶（PK）途径生成乳酸、 CO_2 和乙醇（或乙酸）。异型乳酸发酵菌株利用葡萄糖生成乳酸的理论得率只有 0.5 g g^{-1} (1.0 mol mol^{-1})。生成乙醇和乙酸的比例取决于细胞中的氧化还原电位。至于戊糖如木糖和阿拉伯糖的代谢，木酮糖 5-磷酸是普遍的中间代谢物，它接着通过 PK 途径被裂解为甘油醛 3-磷酸和乙酰磷酸。乙酰磷酸被代谢生成乙酸或者乙醇，而甘油醛 3-磷酸转化生成乳酸，因此戊糖通过 PK 途径生成乳酸的理论得率达到 0.6 g g^{-1} (1.0 mol mol^{-1})^[18, 22]。因此，EMP 和 PP 途径比 PK 途径更有效。

诸如 *Lactococci* 的同型乳酸发酵菌株在葡萄糖有限的条件下，利用其它糖生长或者在不适宜的 pH 和温度条件下会产生混合酸，除了乳酸外还有乙醇、乙酸和甲酸，比如 *L. lactis* 生长在麦芽糖、乳糖和半乳糖条件下就会产生混合酸^[4]。葡萄糖通过 EMP 途径代谢生成丙酮酸，但是与同型发酵不同的是丙酮酸部分被乳酸脱氢酶还原成乳酸，部分被丙酮酸甲酸裂解酶（PFL）转化成甲酸和乙酰- CoA 。在氧气存在的条件下，PFL 失活，丙酮酸代谢的替代途径被激活，通过丙酮酸脱氢酶（PDH）产生 CO_2 和乙酰- CoA ^[17]。另外，戊糖的浓度也会影响乳酸菌的代谢。有文献表明，当以木糖为唯一碳源时，木糖的初始浓度较高时，乳酸的得率也较高^[18, 23]。

乳酸菌生成乳酸的构型是由菌株的种属决定的，产生乳酸的立体专一性取决于编码 L-乳酸脱氢酶和/或 D-乳酸脱氢酶的基因及其相对表达水平。而且，乳酸消旋酶会影响 D-乳酸和 L-乳酸的平衡^[25]。有几种野生菌可以产生光学纯的 L-乳酸，诸如 *Enterococcus mundtii*^[18, 19]和 *Lactococcus lactis*^[26]。但是目前对生产 D-乳酸的微生物研究较少，已发现 *Lactobacillus delbrueckii*^[2]、*Sporolactobacillus inulinus*^[27, 28]、*Lactobacillus coryniformis*^[29] 可以产生光学纯的 D-乳酸。

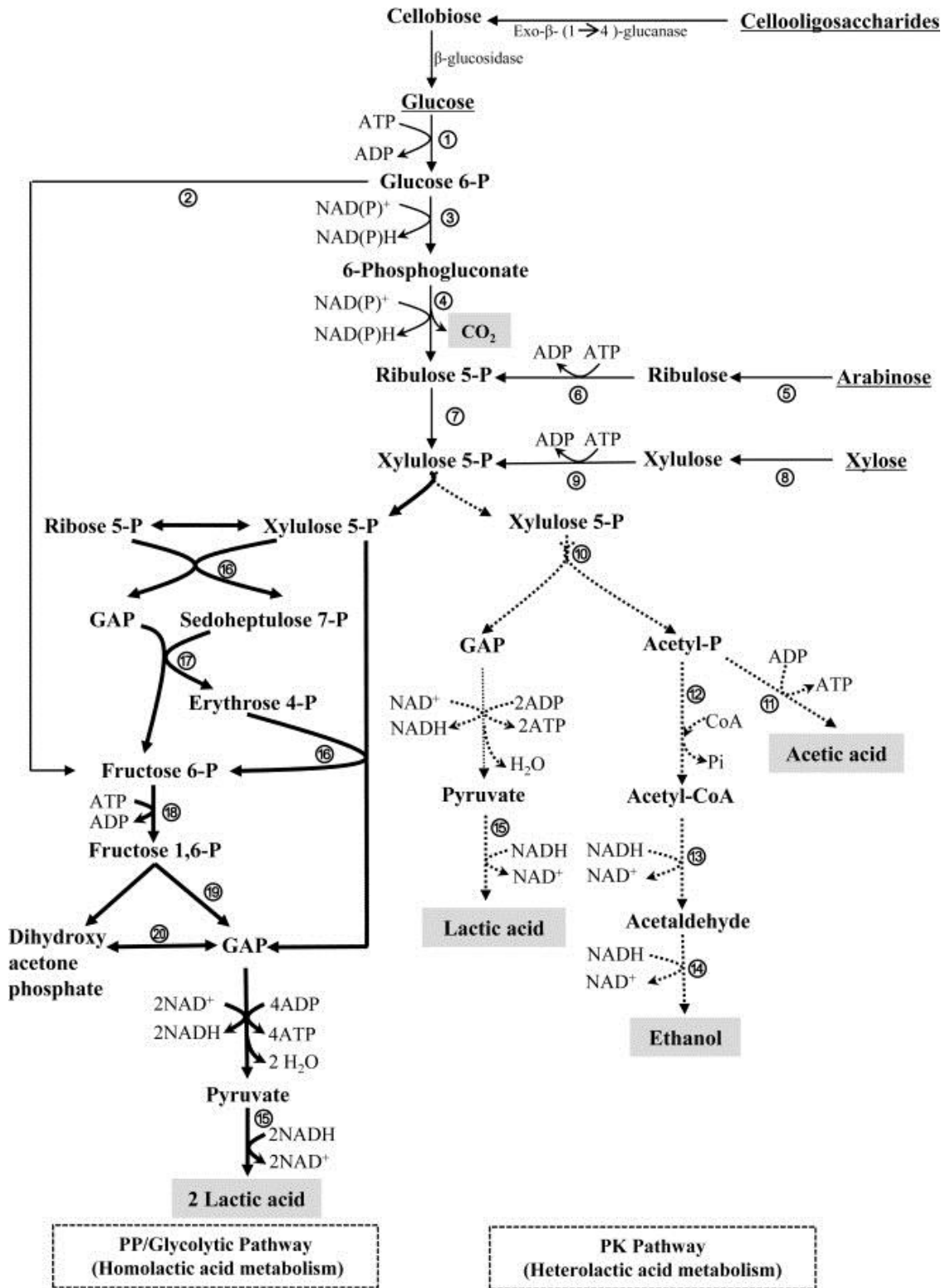


图 1.1 乳酸菌利用木质纤维素来源的糖（葡萄糖、木糖和阿拉伯糖）生成乳酸的代谢路径^[24]

Fig. 1.1 Pathways for lactic acid production from lignocellulose-derived sugars

(glucose, xylose, and arabinose) by lactic acid bacteria^[24]

图中涉及的酶：(1) 己糖激酶；(2) 葡萄糖 6-磷酸异构酶；(3) 葡萄糖 6-磷酸脱氢酶；(4) 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶；(5) 阿拉伯糖异构酶；(6) 核酮糖激酶；(7) 核酮糖 5-磷酸 3-差向异构酶；(8) 木

糖异构酶；(9) 木酮糖激酶；(10) 磷酸转酮酶；(11) 乙酸激酶；(12) 磷酸转乙酰酶；(13) 乙醛脱氢酶；(14) 乙醇脱氢酶；(15) 乳酸脱氢酶；(16) 转酮醇酶；(17) 转醛醇酶；(18) 果糖 6-磷酸激酶；(19) 果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶；(20) 磷酸丙糖异构酶。

目前乳酸菌在工业上的应用主要是作为食品发酵剂(如奶制品、腌菜、肉制品和酒)^[4]。与其它菌株相比较而言, 乳酸菌用于工业乳酸发酵有以下优势: (1) 除了一些致病链球菌, 乳酸菌被认为是一类 GRAS (普遍认为是安全的) 的菌株; (2) 乳酸菌是适应工业生产压力条件的微生物, 因为乳酸菌普遍耐酸(能够在 pH 5 甚至更低条件下生存), 同时还有较宽的最适生长温度范围(20-45 °C, 取决于种属)^[17]; (3) 乳酸菌的底物利用范围较广, 可以代谢很多的单糖(己糖和戊糖)和二糖^[30]; (4) 乳酸菌发酵糖类主要末端产物是乳酸, 乳酸菌生产乳酸的特点是高得率和高产率。

诸如酵母和大肠杆菌等微生物乳酸产量和得率偏低, 一般通过基因改造途径提高菌株的性能, 从而用于乳酸生产。酵母的营养需求较低, 可以在简单的合成培养基中生长, 与乳酸菌相比较而言能够耐受更低的 pH。Saitoh 等人在葡萄酒酵母的基因组上整合了 6 个牛的编码 L-乳酸脱氢酶的基因, 改造的菌株能够利用廉价的蔗汁培养基产光学纯度达到 99.9% 以上、乳酸浓度为 122 g L⁻¹ 的 L-乳酸^[31]。大肠杆菌 *E. coli* 能够生长在营养简单的无机盐培养基上, 而且, *E. coli* 的基因改造手法成熟、简单。Chang 等人改造了大肠杆菌 *E. coli* RR1, 其中一个工程菌株利用葡萄糖在 60 h 内产生 62.2 g L⁻¹ 的 D-乳酸, 另一个工程菌株则在 67 h 内产生 45 g L⁻¹ 的 L-乳酸^[32]。

芽孢杆菌和真菌也能够产乳酸。Patel 等人从土壤和间歇泉中分离到 *Bacillus* sp. strains 17C5 和 36D1, 通过同步糖化与发酵, 两株菌利用甘蔗渣生产 L-乳酸的最大产率达 0.60 g L⁻¹ h⁻¹^[22]。最常用的生产乳酸的真菌是米根霉。一般来说, 米根霉的营养需求较低, 但是菌丝形态和氧气供应会明显影响乳酸的生产。Guo 等人分离到的米根霉菌株 *R. oryzae* GY18 能够利用 120 g L⁻¹ 蔗糖产 97.5 g L⁻¹ L-乳酸, 该菌株在 72 h 内发酵玉米芯水解液的乳酸得率为 0.355 g g⁻¹ 玉米芯^[33]。

1.4 乳酸菌利用木质纤维素原料生产乳酸

利用乳酸菌生物转化木质纤维素生物质生产乳酸的潜力巨大, 但是目前仍然存在很多限制因素。一些乳酸菌可以发酵短链的纤维低聚糖和低聚木糖^[34-37]。然而, 目前为止还没有发现能够分解纤维素或者半纤维素的野生乳酸菌。因此, 木质纤维素原料的预处理和酶水解(纤维素和半纤维素水解成低聚糖/单糖)过程是必要的, 之后才能进行乳酸菌的发酵过程^[8, 17]。图 1.2 显示了乳酸菌利用木质纤维素生物质产乳酸的一般过程。

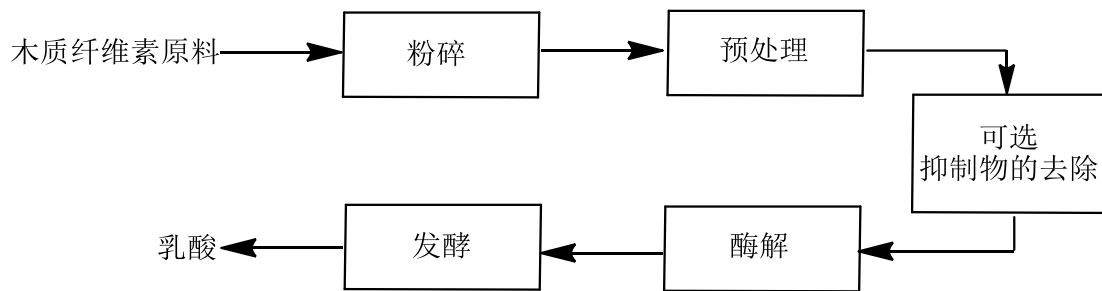


图 1.2 利用木质纤维素原料生产乳酸的一般过程

Fig. 1.2 The common process for lactic acid production using lignocellulose feedstock

1.4.1 预处理

不经过预处理的木质纤维素生物质不能进行有效酶解，因为结合在一起的纤维素、半纤维素和木质素具有很强的稳定性。因此，木质纤维素的预处理旨在去除木质素，将纤维素和半纤维素分开，部分解聚纤维素，增加材料的多孔性，从而有助于水解酶随后发挥水解作用。

目前，预处理方法包括传统的稀酸、蒸汽膨爆和碱预处理，以及最近出现的使用离子液体^[38]和微波^[39]的新方法。其中，稀酸预处理被认为是具有巨大商业应用潜力的预处理手段^[40-42]。稀酸预处理方法大多使用无机酸作为催化剂，这种方法能够完全水解半纤维素，而经过酶解的纤维素则可以直接用于发酵。稀酸预处理适用于如玉米秸秆的低木质素含量的木质纤维素生物质，因为稀酸预处理去除木质素的效果较差^[43]。稀酸预处理的主要缺点是较低固含量原料会导致大量酸性废水的产生，而且预处理后的固液分离又会造成可发酵单糖的损失，并且稀酸预处理产生的抑制物含量较高^[44]。为了克服这些缺点，有研究尝试在预处理时尽可能提高木质纤维素生物质的固含量，从而减少新鲜水的用量和废水的产生^[45-48]。本实验室开发的“干式”稀酸预处理方法能够将预处理时的固含量提高至 70% (w/w)^[47]。通过在预处理反应器中安装一个螺带式搅拌桨，提高反应器的传质和传热水平，改善了预处理效率，预处理过程中产生的抑制物减少了，提高了用于乙醇发酵时的产率和得率^[49]。

木质纤维素生物质的预处理通常有一个缺点，即产生一些抑制物，这些有毒化合物不仅会干扰酶的水解，还抑制发酵微生物的生长和发酵。已鉴定的稀酸预处理水解液有超过 35 种可能的抑制物^[50]，这些抑制物主要包括呋喃类、有机弱酸类和酚类。

呋喃类抑制物主要是糠醛和 5-羟甲基糠醛，它们分别源于戊糖和己糖的降解。单子叶植物中半纤维素的组成主要是木糖，而在软木类木质纤维素生物质的半纤维素中含有大量的甘露糖。因此，糠醛是单子叶植物木质纤维素预处理后含量最多的呋喃类化合物，而预处理的软木类木质纤维素中 5-羟甲基糠醛的浓度较高。

有机弱酸类抑制物主要包含乙酸、甲酸和乙酰丙酸。其中乙酸由半纤维素脱乙酰基产生，一般来说，乙酸浓度较高，可达 12g L^{-1} ^[51]。其它有机酸（诸如甲酸和乙酰丙酸）

是糖类的降解产物在进一步降解过程中产生的^[52],其中甲酸是糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解产物,而乙酰丙酸是 5-羟甲基糠醛的降解产物。

酚类抑制物种类繁多,由木质素降解产生,常见的有香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛、松柏醛、阿魏酸和肉桂酸等^[53]。

1.4.2 抑制物对发酵菌株的影响

研究木质纤维素来源抑制物对发酵菌株的影响,不仅要考察抑制物的含量,还需要探讨抑制物对发酵菌株的毒性机理。之前的研究发现,抑制物的毒性在不同微生物物种间差别较大,在不同亚种间也有差异。总的来说,抑制物对菌株生长的影响要比产物产率的影响更大。之前的研究大多集中在探讨抑制物对乙醇发酵菌株的影响,但对乳酸菌影响的报道较少。一般来说,这些抑制物影响整体的细胞生理,导致生存能力、乙醇得率和产率的降低^[51]。因此,可以通过已报道抑制物对乙醇发酵菌株的抑制机理推测抑制物对乳酸菌的影响。

糠醛和 5-羟甲基糠醛是乙醇发酵的主要抑制物,因为它们两个在木质纤维素水解液中的含量比较高,并且对乙醇发酵菌株的抑制作用很强^[54]。糠醛和 5-羟甲基糠醛破坏发酵菌株的细胞膜并干扰细胞内代谢^[55]。糠醛和 5-羟甲基糠醛进入菌体细胞后,其疏水基团会与胞内的很多酶结合,从而使这些酶失去与底物结合的能力,尤其是参与糖酵解的酶。在 *S. cerevisiae* 中,糠醛抑制了脱氢酶(如醇脱氢酶、醛脱氢酶和丙酮酸脱氢酶)的活性,从而对糖酵解途径产生抑制作用^[56]。5-羟甲基糠醛也抑制脱氢酶,但比糠醛的抑制效果弱^[57]。另外,糠醛还会抑制含硫氨基酸半胱氨酸和甲硫氨酸的同化吸收^[58]。糠醛还与活性氧(ROS)的增加相关^[59],而活性氧会对线粒体和液泡的膜、细胞骨架和染色质产生损伤。

预处理的木质纤维素生物质含有大量的有机弱酸,其抑制细胞生长,降低发酵产物的产率^[53]。多数未解离的酸通过细胞壁和细胞膜以被动扩散的方式进入细胞质,而发生解离的酸则不能进入细胞^[60]。细胞外 pH 的降低会导致平衡流向未解离形式的分子,因此增加了酸的被动扩散。由于细胞质的 pH 为中性,未解离形式的酸扩散到细胞质后会发​​生解离从而导致细胞内 pH 下降。为了保持细胞内 pH 的稳定,主动运输利于运输解离的酸,ATP 酶可以移除导致细胞内 pH 降低的自由质子^[61]。然而主动运输和 ATP 酶会消耗 ATP,因而限制了其它诸如细胞的生长和维持的需要能量的过程,从而引起(部分)抑制。由于 ATP 的限制,如果质子的扩散需求超出了细胞主动运输的能力,细胞内 pH 会一直下降,最终导致细胞死亡。

预处理过程会产生很多种酚类化合物,其分子量不同,极性和侧链基团也不同。侧链基团的数目、位置以及结构是构成酚类化合物抑制作用的主要因素^[62]。苯酚、对甲酚和其它酚类化合物能够增加 *E. coli* 和 *L. plantarum* 细胞膜的流动性,因此这些化合物更容易扩散通过细胞膜^[63]。由于细胞膜的改变,胞内钾的含量会明显下降。为了弥补这种影响,*E. coli* 细胞膜的脂肪酸组成发生变化,饱和脂肪酸含量更高。酚类也会抑制 *C. athensensis* 细胞内有些酶的活力,抑制诸如木糖醇等代谢途径^[64]。酚醛会导致细胞内

ROS 的形成,引起 DNA 的损伤^[65]。香草醛或者其他酚类化合物还会抑制酵母细胞的翻译水平^[66]。

以上研究都是关于单一木质纤维素来源抑制物对发酵菌株的影响,而预处理的木质纤维素中包含多种抑制物,有些抑制物的协同作用会增强其抑制作用,因此抑制物的毒性机理研究需要考虑多种抑制物的协同作用。Oliva 等人在 *K. marxianus* 的发酵中加入两种对发酵菌株生物量的生成有 25%抑制作用的抑制物。同时加入糠醛和 4-羟基苯甲醛、糠醛和儿茶酚基本没有协同作用。然而,儿茶酚和 4-羟基苯甲醛、香草醛和 4-羟基苯甲醛、香草醛和儿茶酚、香草醛和糠醛的同时添加则有很强的协同抑制^[67]。Tahezadeh 等人发现,对 *S. cerevisiae* CBS 8066 而言,5-羟甲基糠醛和糠醛有很强的协同作用,2 g L⁻¹ 的糠醛和 5-羟甲基糠醛的协同毒性比 4 g L⁻¹ 的糠醛或者 4 g L⁻¹ 的 5-羟甲基糠醛毒性都要强^[68]。

当然这些木质纤维素来源的抑制物对发酵菌株的影响并非都是负面的,某些抑制物对发酵产物的得率和产率有积极的促进作用。研究发现,一些抑制物对菌株生长的抑制较强,但基本不影响发酵产物的产率,从而提高了产物的得率。Palmqvist 等人发现 2 g L⁻¹ 糠醛提高了 *S. cerevisiae* 的乙醇得率^[69]。Tahezadeh 等人则发现,当未解离的乙酸浓度达到 3.3 g L⁻¹ 时, *S. cerevisiae* 的乙醇得率提高了 20%^[70]。Klinke 等人发现,添加诸如 10 mM 香草乙酮和 4-羟基苯甲醛等酚类化合物, *S. cerevisiae* 的乙醇得率提高 10%左右,然而乙醇产率有所降低^[71]。

1.4.3 针对抑制物的解决方法

为了得到尽可能多的可发酵糖,进而提高发酵产物的得率,实际工业过程需要高强度的预处理过程处理木质纤维素生物质。高强度的预处理过程不可避免地产生了高含量的抑制物。针对这个弊端,相应的策略有改善预处理过程减少抑制物的产生、利用各种手段除去抑制物、筛选或基因工程手段得到耐受抑制物的发酵菌株。

传统的抑制物去除的方法包括水洗、过碱中和、氨中和、离子交换吸收、溶剂萃取和活性炭处理等。然而,因为这些方法成本较高,很难用在工业上。而且,有些方法不仅消耗大量的用水,同时还会产生很多废水,并且还会导致细小的木质纤维素成分和可发酵糖的大量流失。生物脱毒的抑制物去除方法是近期发展起来的新方法,其机理是利用微生物将木质纤维素来源的抑制物降解成无毒或低毒的物质,如微生物将醛还原生成低毒性的醇或者将醛氧化生成低毒性的酸^[72]。这些衍生物对菌株生长和发酵的抑制是较弱的。由于能够完全脱除抑制物、较少量的糖损失、基本不产生废水等优势,生物脱毒方法被广泛应用到各类生物炼制领域^[73-75]。

研究发现的一些微生物已被用于木质纤维素来源抑制物的降解。López 等人发现, *Coniochaeta ligniaria* C8 NRRL 30616 能够有效降解玉米秸秆水解液中的糠醛、5-羟甲基糠醛、酚醛和有机弱酸。而且,该菌株在额外添加葡萄糖时能够完全降解糠醛和 5-羟甲基糠醛^[76, 77]。Palmqvist 等人发现, *Trichodenna reesei* 不仅降解蒸汽预处理柳条产生的抑制物,而且该菌株产生的纤维素酶能够降解纤维素^[78]。Okuda 等人则发现,嗜热菌

Ureibacillus thermosphaericus 在预处理的废屋木 (WHW) 水解液中会优先降解毒性较强的抑制物^[79]。Koopman 等人利用 *C. basilensis* 降解糠醛, 该菌株能够在 1.2 g L^{-1} 的糠醛浓度下生长, 7 h 将 0.34 g 糠醛降解生成糠醇和糠酸, 最终在 12 h 内将糠醇和糠酸转化为 2, 5-呋喃二羧酸。另外该菌株还可以降解乙酸等有机弱酸和芳香化合物如香草醛、愈创木酚和 4-羟基苯甲醛^[80]。本实验室筛选到一株丝状真菌 *Amorphotheca resiniae* ZN1, 其能够快速降解稀酸预处理木质纤维素的抑制物^[74]。与其它已经报道的生物脱毒菌株相比, *A. resiniae* ZN1 应用在木质纤维素脱毒方面有很多优势, 诸如无能源消耗、无废水产生、抑制物降解彻底。而且, 在用 *A. resiniae* ZN1 对木质纤维素原料进行脱毒时, 脱毒过程是在预处理后的固体原料上进行, 无需灭菌, 适用于诸如玉米秸秆、小麦秆等多种木质纤维素原料的脱毒。

微生物在抑制物胁迫环境中适应性进化从而实现抗性增强, 所以也可以通过驯化手段获得抑制物耐受菌株来解决木质纤维素生物炼制的抑制物问题。Huang 等人将 *Pichia stipitis* 在稀酸预处理的稻草水解液中驯化, 得到的一株耐受抑制物的菌株不论是发酵未脱毒水解液还是发酵过碱中和脱毒的水解液, 乙醇得率都可以达到最大理论得率的 87%^[81]。Koppram 等人通过相似的手段将 *S. cerevisiae* TMB3400 在添加 12 种抑制物的合成培养基以及云杉水解液中进行长期驯化, 得到了 3 株驯化菌株。这些驯化菌株厌氧培养在云杉水解液中时, 生长性能较原始菌株有很大提高, 葡萄糖的消耗加快 25-38%, 乙醇产率提高 32-50%^[82]。另外, 还可以通过基因工程手段获得抑制物抗性提高的菌株。有研究发现, 在 *S. cerevisiae* 中过表达与酚类抗性^[83]、呋喃醛抗性^[57]以及有机弱酸抗性^[84]相关酶的编码基因, 增强了对相应抑制物的抗性。

1.4.4 酶水解与发酵

预处理会破坏木质纤维素的结构, 随后的酶水解能够在很大程度上提高发酵效率。水解和发酵过程可以分步进行, 即分步水解和发酵 (SHF); 也可以同时进行, 即同步糖化与发酵 (SSF)。SHF 过程要求每个过程都在最佳条件下进行, 由于酶水解释放的高浓度糖会强烈反馈抑制水解酶的活力, 所以该过程需要更多的酶或者需要延长水解时间^[24]。SSF 是将水解和发酵过程在一个反应器中同样条件下进行的方法。与 SHF 相比较而言, SSF 只用一个反应器、节省了操作时间、反馈抑制作用降低、产率增加。然而水解和发酵都不能在各自最佳的条件下进行, 水解的最优条件通常是 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 低于 5.0, 而乳酸发酵的最优条件是 $37\text{-}43 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH5.0-7.0, 这是限制 SSF 效率的主要因素^[24]。另外, 水解酶的生产成本与原料相当, 这也是木质纤维素生物质生物转化过程经济性的主要制约因素^[85]。

1.5 主要限制因素和解决策略

乳酸菌利用木质纤维素原料发酵生产乳酸主要存在以下问题: (1) 木质纤维素的预处理过程通常会产生抑制发酵菌株的抑制物; (2) 预处理后的木质纤维素原料需要加入纤维素酶进行酶解, 纤维素酶的成本较高; (3) 预处理和酶水解过程产生葡萄糖、木糖

和阿拉伯糖等混合单糖,然而很多乳酸菌只能利用己糖,而一些能够利用戊糖的乳酸菌产乳酸得率较低,有些菌株还存在碳代谢抑制的问题^[18, 86]; (4) 很多乳酸菌产生的乳酸非光学纯,不符合 PLA 的生产要求; (5) 乳酸菌的营养需求复杂,这必然增加发酵成本。

问题 (1) 及相应的解决策略已在 1.4.1 和 1.4.2 中进行了详尽的阐述。

针对问题 (2) 的高成本纤维素酶问题,目前主要通过从乳酸菌中异源表达纤维素酶的途径来解决。目前为止尚未发现能够产生纤维素酶的野生型乳酸菌。通过在 *L. plantarum* 中异源表达内切纤维素酶(将基因克隆至质粒上或者将基因整合到基因组上),获得的重组纤维素酶菌株应用于青贮饲料^[87, 88]。*C. thermocellum* 的内切葡聚糖酶 Cel8A 成功在 *L. plantarum* $\Delta dhL1$ 中表达,该重组菌株可以利用纤维低聚糖(5-6 个葡萄糖的聚合物)生长^[8]。Morais 等人阐述了表达和分泌纤维素酶、木聚糖酶的重组 *L. plantarum* 具有应用于生物质(例如麦秆)生物转化的潜力^[89]。目前,重组乳酸菌降解纤维素的能力差别较大。一些重组乳酸菌降解纤维素的活力比天然的产生纤维素酶菌株 *C. thermocellum* 低 10-100 倍。值得一提的是诸如结晶纤维素的难降解多糖的有效水解,不仅取决于纤维素酶的用量,还需要考虑不同类型酶的混合比例。目前,重组乳酸菌的纤维素酶表达水平仍然未能达到工业生产的要求。

针对问题 (3) 中不能利用戊糖或戊糖发酵乳酸得率较低的问题,可以通过代谢工程手段对菌株的代谢途径进行改造。诸如 *L. pentosus*、*L. brevis*、*L. plantarum* 等乳酸菌通过 PK 途径代谢阿拉伯糖和木糖,从而产生等量的乳酸、乙酸或乙醇。在 *L. lactis* IO-1 中还存在另一条利用木糖的途径即 PP/EMP 途径,通过该途径利用木糖终产物只有乳酸^[23]。*L. lactis* IL 1403 不能利用木糖,Shinkawa 等人首先将 *L. lactis* IO-1 的 *xylRAB* 基因在 *L. lactis* IL 1403 中表达,随后敲除编码磷酸转酮酶的基因破坏 *L. lactis* IL 的 PK 途径,同时表达 *L. lactis* IO-1 的转酮醇酶基因强化了 PP 途径,该改造菌株利用木糖产乳酸的得率接近理论得率^[90]。同样对一株 *L. plantarum* 进行改造,改造菌株能够以更高的转化率发酵阿拉伯糖和木糖产 D-乳酸^[20, 21]。

另外,对于碳代谢抑制的问题,只有少数野生型和代谢工程菌株能够同时消耗不同的糖,如葡萄糖/纤维二糖^[19]、木糖/阿拉伯糖/葡萄糖^[91]和纤维二糖/葡萄糖/木糖^[92]。当然,可以通过微生物共培养的方式改善产物得率和糖的利用^[93, 94]。

针对问题 (4),主要通过敲除 D-乳酸脱氢酶或 L-乳酸脱氢酶的编码基因,也可以敲除消旋酶编码基因,最终实现光学纯乳酸的生产。野生型 *L. helveticus* CNRZ32 产 L-和 D-乳酸的外消旋混合物,Kyl ä-Nikkil ä 等人敲除编码 D-乳酸脱氢酶基因的启动子区域,得到的工程改造菌株只产 L-乳酸^[95]。Okano 等人敲除了 *L. plantarum* 的 L-乳酸脱氢酶编码基因,并用异源转酮醇酶编码基因取代磷酸转酮酶编码基因,得到能够利用木糖产生高得率光学纯 D-乳酸的工程菌株^[21]。

针对问题 (5),乳酸菌的发酵培养需要添加复杂的营养,这对于补充乳酸菌有限的氨基酸和维生素合成能力是非常必要的,然而该方式增加了发酵和产物纯化的成本。因

此，寻找廉价的、低杂质的营养添加物是乳酸菌高效发酵研究的一个热点^[7]。其它诸如共培养发酵菌株的策略和代谢工程途径是解决或者降低营养需求的额外手段。

乳酸用途广泛，其中一个非常重要的用途就是作为替代石化基塑料制品 PLA 的生产原料。乳酸菌利用廉价的木质纤维素原料产乳酸具有潜在的应用前景，然而目前仍然存在很多的问题和限制，尚未达到工业生产的要求。目前的实验室研究，总的策略是针对某一种特定的木质纤维素原料，通过诸如筛选、诱变和代谢工程多种途径获得耐受抑制物的高效纤维素乳酸发酵菌株，最后还需要建立针对这些菌株的有效乳酸生产过程。

第 2 章 *P. acidilactici* DQ2 中 L-乳酸脱氢酶编码基因 *ldh* 的敲除

2.1 前言

本实验室从木质纤维素发酵体系中筛选到一株能够耐受高温和木质纤维素来源抑制物的乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2^[96]。该菌株能够利用高固体含量的干法稀酸预处理的玉米秸秆进行同步糖化与发酵 (SSF) 生产高浓度乳酸。然而, 产生的乳酸是外消旋混合物, 其中约 2/3 是 L-乳酸, 1/3 是 D-乳酸。PLA 的生产需要光学纯的乳酸, 而 *P. acidilactici* DQ2 生产的外消旋乳酸不适合生产 PLA, 因此 *P. acidilactici* DQ2 的基因工程改造实为必要。

16S rRNA 分析发现, *P. acidilactici* DQ2 与已全基因组测序的 *P. acidilactici* DSM20284 同源性达 99.9%。*P. acidilactici* DSM20284 有 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶的编码基因 *ldh* 和 *ldhD*。另外在该菌株中没有编码乳酸消旋酶的基因。本实验在前期的工作中已经成功构建了适合 *P. acidilactici* DQ2 基因敲除的热敏性自杀质粒 pSET4E。基于 *P. acidilactici* DSM20284 的基因组序列, 通过同源重组方法成功敲除 *P. acidilactici* DQ2 的 *ldhD* 基因, 得到了工程菌株 *P. acidilactici* TY112, 该菌株利用葡萄糖能够产生光学纯的 L-乳酸 (L-乳酸的比例达到 99.88%)^[97], 说明该敲除系统适合于 *P. acidilactici* DQ2。值得一提的是, 该敲除系统不会在菌株的基因组中引入抗生素的抗性标记, 这便于菌株的后续改造。

本部分旨在通过同样的手段利用该敲除系统实现 *P. acidilactici* DQ2 *ldh* 基因的敲除, 从而得到能够生成光学纯 D-乳酸的菌株。同时, 本文为确认 *ldh* 基因的敲除对菌株的影响, 对敲除菌株进行了性能测试, 包括发酵性能 (生长性能和乳酸发酵性能)、对木质纤维素来源抑制物的耐受性。

2.2 实验材料

2.2.1 菌株、质粒和引物

本章实验所用的菌株、质粒和引物见表 2.1。

表 2.1 菌株、质粒及引物

Table 2.1 Strains, plasmids and primers

菌株 Strains	基因型 Genotype	来源 Sources
<i>E. coli</i> XLI-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>relA1</i>	Stored in the lab
<i>P. acidilactici</i> DQ2	Wild strain	Zhao et al. (2013)
<i>P. acidilactici</i> ZP26	<i>ldh</i> deficient strain	This work
<i>P. acidilactici</i> TY112	<i>ldhD</i> deficient strain	涂毅 (2013)
质粒 Plasmids	特性 Features	来源 Sources
pSET4E	<i>OriColE1/repA</i> Ts, <i>Em^r</i> , temperature sensitive plasmid	涂毅 (2013)
pSET4E- Δ <i>ldh</i>	<i>Em^r</i> , <i>ldh</i> knockout plasmid for <i>P. acidilactici</i> DQ2	This work
引物 Primers	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	
<i>Emr</i> -F	ggactagtagttatgcatcccttaacttac	
<i>Emr</i> -R	ggactagtgcacccatatttaaaagc	
up-F- <i>ldh</i>	aactgcagcctctgccgcgataatctc	
up-R- <i>ldh</i>	cgggatccttattagattatatttggccacc	
down-F- <i>ldh</i>	cgggatcctcattaaattatcaacgaaagcacc	
down-R- <i>ldh</i>	cggaattccacgtccgaccataagtag	
sc1-F	gagcgtcgattttgtgatgc	
sc1-R	gtgtcaagtgagatacctgaaccg	
sc2-F	cggttcaggtatctcacttgacac	
sc2-R	gatgttgcgattaatagatctcgg	
<i>ldh</i> -F	cgctcggtaatttttggc	
<i>ldh</i> -R	ggtgcttcggtgataaatttaatg	

注：下划线表示限制性内切酶位点，另外引物合成在上海捷瑞生物工程有限公司完成。

2.2.2 酶、试剂和试剂盒

本章实验用到的酶、试剂和试剂盒见表 2.2。

表 2.2 实验中用到的酶、试剂及试剂盒

Table 2.2 Enzymes, reagents and kits used in the experiment

酶	生产厂商	
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase	日本 Takara 公司	
T4 DNA Ligase	日本 Takara 公司	
Premix Taq [®] Version 2.0	日本 Takara 公司	
限制性内切酶	美国 Thermo Fisher 科技公司	
溶菌酶	北京普博欣生物科技有限公司	
试剂	规格	生产厂商
红霉素	5 g	北京普博欣生物科技有限公司
溴化乙锭(EB)		北京普博欣生物科技有限公司
牛肉粉	250 g	北京普博欣生物科技有限公司
琼脂粉	500 g	北京普博欣生物科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷(Tris)	500 g	北京普博欣生物科技有限公司
琼脂糖	100 g	法国 Biowest 公司
乙二胺四乙酸(EDTA)	100 g	Biosharp 生物科技有限公司
硼酸	500 g	Biosharp 生物科技有限公司
胰蛋白胨	500 g	英国 Oxoid 有限公司
酵母提取物	500 g	英国 Oxoid 有限公司
DL-苏氨酸	10 g	上海源聚生物科技有限公司
糠醛	250 mL	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠醛	100 g	上海德默医药科技有限公司
香草醛	100 g	美国 Aladdin 工业公司
4-羟基苯甲醛	100 g	上海生工生物工程有限公司
丁香醛	25 g	上海生工生物工程有限公司
试剂盒	规格	生产厂商
细菌基因组抽提试剂盒	50 次	美国 Omega 生物科技有限公司
质粒小量制备试剂盒	200 次	上海捷瑞生物工程有限公司
GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	100 次	上海捷瑞生物工程有限公司
PCR 产物纯化试剂盒	100 次	上海捷瑞生物工程有限公司
D-/L-乳酸检测试剂盒	50 次	爱尔兰 Megazyme 公司

注：其它试剂均购自上海凌峰化学试剂公司或上海国药化学试剂集团。

2.2.3 培养基和主要试剂

LB 培养基 (g L^{-1}): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 固体培养基需额外添加 15 g L^{-1} 的琼脂粉, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

LE 培养基: 在 LB 培养基基础上加入终浓度为 $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的红霉素。

MRS 培养基 (g L^{-1}): 葡萄糖 20, 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 4, 牛肉膏 8, 乙酸钠 3, 柠檬酸氢二铵 2, 磷酸氢二钾 2, 七水硫酸镁 0.2, 一水硫酸锰 0.05, 吐温 80 1 mL, 固体培养基同样添加 15g L^{-1} 的琼脂粉, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

MRSE 培养基: 在 MRS 培养基基础上加入终浓度为 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的红霉素。

简化 MRS 培养基 (g L^{-1}): 葡萄糖 20, 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 10, 乙酸钠 5, 柠檬酸氢二铵 2, 磷酸氢二钾 2, 七水硫酸镁 0.58, 一水硫酸锰 0.25, 固体培养基添加 15g L^{-1} 的琼脂粉, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

电转缓冲液 I (g L^{-1}): 蔗糖 205.374, 三水磷酸钾 1.864, 六水氯化镁 0.2032, 用浓盐酸调节 pH 至 7.5, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

电转缓冲液 II (g L^{-1}): 蔗糖 171, 甘油 150 mL, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

复苏液 (g L^{-1}): 蔗糖 171, 葡萄糖 20, 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 4, 牛肉膏 8, 乙酸钠 3, 柠檬酸氢二铵 2, 磷酸氢二钾 2, 七水硫酸镁 0.2, 一水硫酸锰 0.05, 吐温 80 1 mL, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

75% (v/v) 甘油: 300 mL 甘油加入 100 mL 超纯水中, $115 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

Tris-Cl 缓冲液 (pH 8.0): 1.21 g Tris 溶于水中, 之后用浓盐酸调节 pH 至 8.0, 加水定容至 1 L。

溶菌酶母液 (50 mg mL^{-1}): 0.25 g 溶菌酶干粉溶于 5 mL Tris-Cl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存, 用时需稀释 100 倍。

DL-苏氨酸溶液 (1 M): 0.4765 g DL-苏氨酸溶于 4 mL 水中, 同样过滤除菌。

$5\times\text{TBE}$ 贮存液 (g L^{-1}): Tris 54, 硼酸 27.5, 0.5 mol L^{-1} EDTA (pH 8.0) 20 mL, 用时需稀释 10 倍, 避光保存。

0.7% 琼脂糖凝胶: 0.7 g 琼脂糖加入 100 mL $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液中, 然后加入 $20 \mu\text{L}$ EB, 用微波炉加热 2 min, 倒入模具中。

红霉素母液 (50 mg mL^{-1}): 0.5 g 红霉素粉末溶于 10 mL 无水乙醇中, 溶解完全后过滤除菌, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

2.2.4 实验仪器

实验所用的仪器设备见表 2.3。

表 2.3 实验仪器

Table 2.3 Experimental instruments

仪器名称	型号	生产厂家
PCR 仪	Mastercycler	德国 Eppendorf 有限公司
DNA 电泳系统	EPS-100	上海天能科技有限公司
凝胶成像系统	FR-980	上海复日科技有限公司
电转仪	GenePulserXcell™	美国 Bio-rad 公司
核酸蛋白分析仪	DU-800	美国 Beckman 公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo Fisher 科技公司
台式冷冻离心机	5415D	德国 Eppendorf 有限公司
超纯水机	Milli-Q Synthesis	美国 Millipore 公司
低温水槽	JY92-II	宁波新芝生物科技公司
恒温水槽	HZQ-X100	上海一恒科学仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
立式振荡培养箱	HZ-2111KB	太仓华利达实验室设备公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
pH 计	PHS-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
电子天平	BS423S	瑞士 Mettler toledo 公司
自动灭菌锅	TOMY-SX-700	日本 Tomy Digital Biology 公司
HPLC	LC-20AD	日本岛津公司

注：HPLC (LC-20AD) 配备有 RID-10A 示差折光检测器和 Bio-rad Aminex HPX-87H 糖分析柱。

2.3 实验方法

2.3.1 敲除质粒 pSET4E- Δldh 的构建

图 2.1 是由 pSET4S 改造的质粒 pSET4E，该质粒是一种温度敏感型 *E. coli* -G⁺ 细菌宽宿主范围穿梭型质粒。该质粒在 *E. coli* 中 37 °C 可以正常复制，而在 G⁺ 细菌中是进行条件复制的，即在 28 °C 低温下可以复制，而在 37 °C 较高温度下不能复制。本实验室之前已经利用该热敏性质粒成功敲除了 *P. acidilactici* DQ2 的 *ldhD* 基因^[97]。

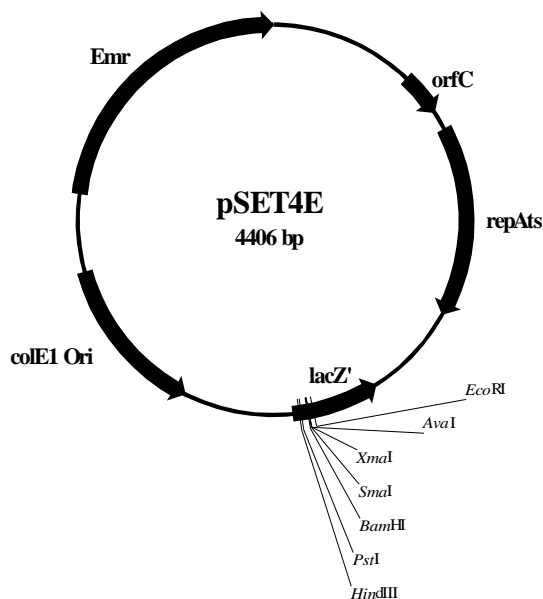


图 2.1 pSET4E 的质粒图谱

Fig. 2.1 The profile of plasmid pSET4E

敲除质粒 pSET4E- Δ ldh 的构建（见图 2.2）：通过 PCR 技术，分别扩增编码 L-乳酸脱氢酶的 *ldh* 基因的上下游大约 1 kb 大小的同源片段，按顺序分别克隆至质粒 pSET4E 的多克隆位点，从而得到敲除质粒 pSET4E- Δ ldh。

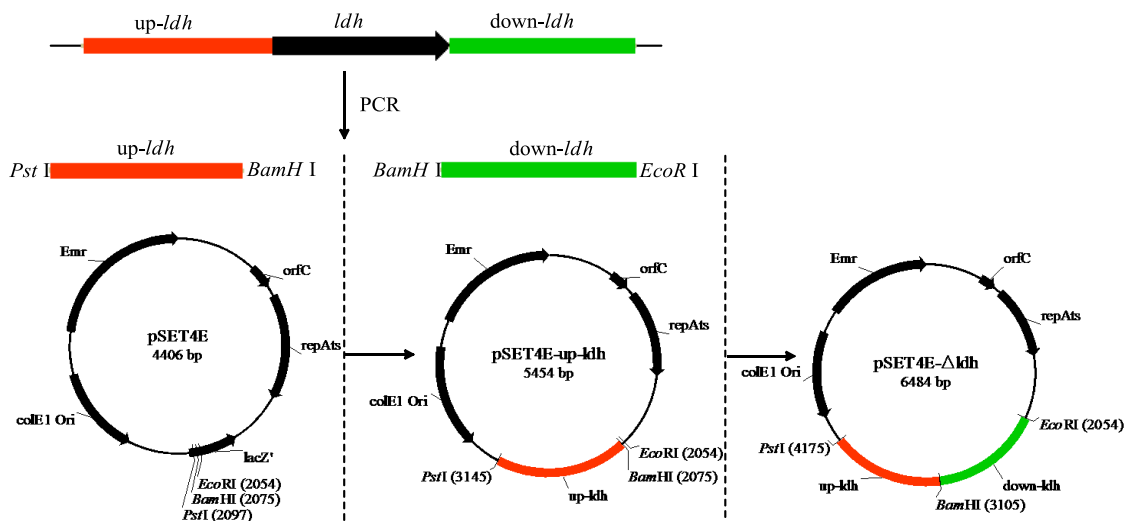


图 2.2 质粒 pSET4E- Δ ldh 的构建过程

Fig. 2.2 Construction of plasmid pSET4E- Δ ldh

根据模式菌株 *P. acidilactici* DSM20284 的基因组信息，设计两对引物 up-F-*ldh*、up-R-*ldh* 和 down-F-*ldh*、down-R-*ldh*，PCR 扩增 *P. acidilactici* DQ2 基因组上 *ldh* 基因的上下游序列 up-*ldh* (*ldh* 基因起始密码子上游的大约 1 kb 大小的序列) 和 down-*ldh* (*ldh*

基因终止密码子下游的大约 1 kb 大小的序列)。

PCR 扩增体系见表 2.4。

表 2.4 PCR 扩增体系

Table 2.4 PCR system

试剂名称	体积(μL)
5 \times PrimeSTAR [®] Buffer(5 mM Mg ²⁺ plus)	10.0
上游引物(10 μM)	1.0
下游引物(10 μM)	1.0
dNTP mixture(10 mM)	4.0
模版 DNA	0.5
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase	0.5
ddH ₂ O	33

PCR 扩增条件如下：94 °C 预变性 3 min，94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 70 s，30 个循环，72 °C 后延伸 10 min，用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测和确认 PCR 产物片段大小。如果其大小正确就用 PCR 产物纯化试剂盒纯化待用。

利用限制性内切酶 *BamH* I 和 *Pst* I 双酶切 PCR 纯化产物 *up-ldh* 和质粒 pSET4E。酶切产物经琼脂糖凝胶回收，之后将回收产物用 T4 DNA ligase 于 16 °C 过夜连接，将连接产物热激转化 *E. coli* XLI-blue，具体步骤如下：

- (1) 将 10 μL 连接产物加入制备好的 100 μL *E. coli* XLI-blue 的感受态细胞，混匀后置于冰上 30 min；
- (2) 将上述混合物于 42 °C 热激 90 s，再于冰上冷却 2 min；
- (3) 加入 LB 培养基 900 μL ，37 °C，100 rpm 培养 50 min；
- (4) 取 300 μL 上述培养液涂布于 LE 培养基平板，37 °C 培养。

待平板上长出单菌落，可将单菌落划线培养于 LE 培养基平板，通过菌落 PCR 技术，用引物 *up-F-ldh*、*up-R-ldh* 扩增 *up-ldh* 片段。对 PCR 鉴定为阳性的菌落，提取质粒进行酶切鉴定。通过 PCR 和酶切都鉴定为阳性的菌落，说明 *up-ldh* 片段成功克隆至质粒 pSET4E，将该质粒命名为 pSET4E-*up-ldh*。

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切下游片段 *down-ldh* 的 PCR 纯化产物和重组质粒 pSET4E-*up-ldh*。酶切产物经琼脂糖凝胶回收后用 T4 DNA ligase 于 16 °C 过夜连接，将连接产物热激转化 *E. coli* XLI-blue，通过 PCR 和酶切鉴定的阳性转化子说明 *down-ldh* 片段正确地克隆至重组质粒 pSET4E-*up-ldh*，该质粒之后用于敲除 *ldh* 基因，因此将该质粒命名为 pSET4E- Δ *ldh*。

2.3.2 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ ldh 重组菌的获得

由于 *P. acidilactici* DQ2 含有较厚的细胞壁, 质粒不能进入氯化钙法制备的感受态细胞。之前已经研究通过电转化的方式将质粒转入 *P. acidilactici* DQ2^[97], 相应的感受态细胞制备方法如下:

- (1) 从 MRS 培养基平板上接种一个 *P. acidilactici* DQ2 单菌落至 5 mL MRS 液体培养基中, 42 °C, 150 rpm 过夜培养;
- (2) 将培养液转接至含 40 mM DL-苏氨酸的 MRS 液体培养基中, 接种量为 10%, 42 °C, 150 rpm 培养至对数生长期, OD₆₀₀ 达到 1.0-1.2。之后的步骤都是在低温下进行;
- (3) 取 1 mL 上述培养液于灭菌的离心管中, 4 °C, 10,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 电转缓冲液 I, 混匀, 4 °C, 10,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 再用缓冲液 I 洗涤 1 次, 离心除去上清后加入 100 μ L 缓冲液 I 悬浮菌体, 再加入 10 μ L 2000 U mL⁻¹ 的溶菌酶溶液, 37 °C 处理 30 min;
- (4) 将溶菌酶处理过的菌体于 4 °C, 10,000 rpm 离心 5 min, 除去上清, 再次用缓冲液 I 洗涤 2 次, 与步骤 (3) 的操作一致, 最后用 500 μ L 电转缓冲液 II 悬浮菌体, 分装后存于 -20 °C 待用。

在冰上将 10 μ L 质粒 pSET4E- Δ ldh 与 80 μ L *P. acidilactici* DQ2 感受态细胞混合, 将混合液加入预冷的 1 mm 电击杯中, 在 2000 V, 200 Ω , 25 μ F 条件下电击, 将电击后的菌液加入 1 mL 预冷的复苏液中, 冰上放置 5 min, 之后于 28 °C 培养 2-3 h, 6000 rpm 离心 4 min, 除去 800 μ L 上清, 将剩下的培养液混匀后涂布 MRSE 培养基平板, 28 °C 培养, 待平板上长出单菌落, 用引物 up-F-ldh 和 down-R-ldh 进行菌落 PCR 验证, 鉴定为阳性的菌落即为重组子 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ ldh。

2.3.3 单双交换的筛选

第一次同源重组 (即单交换) 原理见图 2.3, 该步骤是通过同源片段将敲除质粒整合到基因组。具体操作如下: 将 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ ldh 单菌落接种至 5 mL MRSE 液体培养基中, 28 °C, 150 rpm 条件下培养 24 h 至稳定期, 在该温度下质粒可以正常复制, 该步骤使菌株中质粒的拷贝数尽可能多, 提高发生第一次同源重组 (即单交换) 的概率。之后以 1% 的接种量将上述培养液转接至 MRS 液体培养基中, 42 °C, 150 rpm 条件下培养 12 h 至对数中后期, 在该温度下质粒不能进行复制, 因此逐渐发生丢失, 从而提高单交换菌株的筛选效率。将菌液用生理盐水稀释 10⁶ 倍, 取 200 μ L 涂布至 MRSE 培养基平板, 42 °C 培养。待平板上长出单菌落后, 进行菌落 PCR 鉴定, 用引物 sc1-F 和 sc1-R 鉴定通过 up-ldh 重组的第一种单交换的形式, 引物 sc2-F 和 sc2-R 鉴定通过 down-ldh 重组的第二种单交换的形式 (见图 2.3)。

双交换即第二次同源重组的原理见图 2.3, 该步骤通过同源重组发生了剪切。

将单交换菌株的单菌落接种至 5 mL MRSE 液体培养基, 42 °C, 150 rpm 培养 12 h 至稳定期, 以 1% 的接种量将上述菌液转接到 MRS 液体培养基中, 28 °C, 150 rpm 培养 24 h 至稳定期, 该培养过程的目的是在低温下激活整合到基因组上的质粒片段发生滚环

复制, 从而通过同源重组发生剪切, 即发生双交换。之后同样以 1% 的接种量转接至 MRS 液体培养基中, 同样条件下培养 24 h, 最多转接 10 次, 直至筛选到发生基因敲除的菌株。收集每次培养的菌液, 用生理盐水稀释 10^6 倍后涂布在不含抗生素的 MRS 培养基平板上, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 用牙签挑取单菌落, 分别接种在 MRS 和 MRSE 培养基平板上, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养。对于在不含抗生素的培养基平板上可以生长, 而在含有抗生素的培养基平板上不能生长的菌株, 应该是发生第二次同源重组的菌株即双交换菌株。在双交换菌株中, 一种可能是回复突变的野生型菌株, 另一种就是敲除 *ldh* 基因的突变株 (见图 2.3)。

将双交换菌株接种至 MRS 液体培养基中, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm 培养, 提取基因组 DNA, 进行 PCR 验证。用引物 up-F-*ldh* 和 down-R-*ldh* PCR 扩增出约 2 kb 大小的产物 (含 up-*ldh* 和 down-*ldh*), 而用引物 *ldh*-F 和 *ldh*-R (用于扩增 *ldh* 基因) PCR 扩增不出相应大小产物时, 该菌株即为发生第二次同源重组 *ldh* 基因被敲除的菌株。

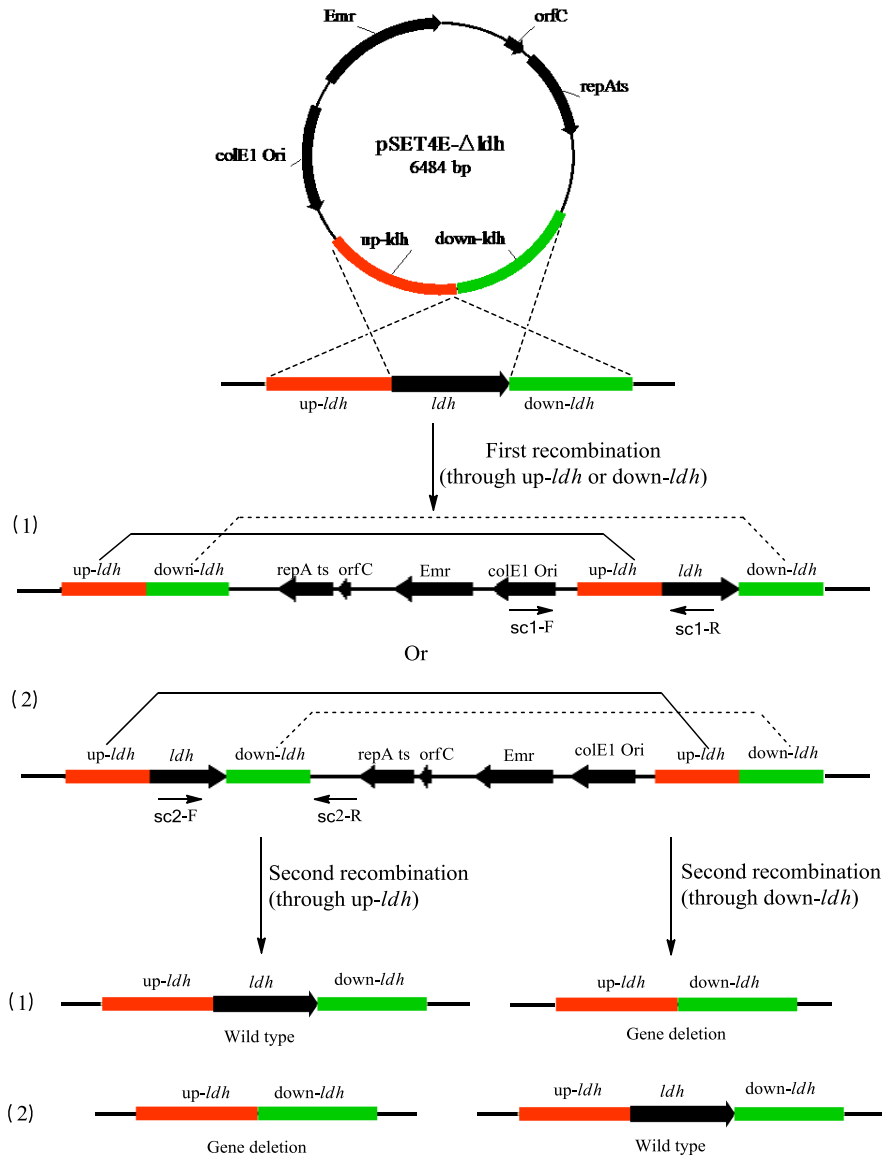


图 2.3 基于双交换利用热敏性质粒 pSET4E 敲除 *ldh* 基因

Fig. 2.3 Disruption of *ldh* gene by double-crossover utilizing thermosensitive plasmid pSET4E

2.3.4 敲除菌株的稳定性研究

敲除基因的菌株性能可能会不稳定, 所以本文将其在合成培养基中连续传代培养, 以稳定其代谢流。具体操作如下:

将 2 个工程改造菌株 *P. acidilactici* TY112 ($\Delta ldhD$) 和 *P. acidilactici* ZP26 (Δldh) 的-80 °C 冻存的甘油管分别接种至 20 mL 简化 MRS 液体培养基中, 42 °C, 150 rpm 培养 12 h, 该时间点菌株培养处于对数中后期, 菌株性能较好, 这时将菌株转接培养, 其性能不会出现退化。取样后 10,000 rpm 离心 5 min, 用核酸蛋白分析仪测定细胞生长量 OD₆₀₀, HPLC 测定发酵液中乳酸及葡萄糖浓度。以 10% 接种量转接至 20 mL 简化 MRS 液体培养基, 42 °C, 150 rpm 培养 12 h, 同样取样 10,000 rpm 离心 5 min, 测定细胞生长量 OD₆₀₀, 并检测发酵液中乳酸和葡萄糖浓度, 以这样的方式进行连续转接培养。待菌体生长量、乳酸浓度和葡萄糖浓度等参数趋于稳定的时候, 即可停止转接, 并于-80 °C 超低温保存发酵性能稳定的菌株。

2.3.5 敲除菌株的发酵性能

敲除 *ldh* 基因后, 一方面需要确认该基因的敲除是否能够实现光学纯 D-乳酸的生产, 另一方面要确认该基因的敲除对菌株的生长状态和发酵性能的影响, 同时与 *ldhD* 基因的敲除菌株进行比较。

取 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 -80 °C 甘油冻存管, 分别接种至 20 mL 简化 MRS 液体培养基, 42 °C, 150 rpm 培养 12 h, 然后以 10% 接种量分别转接至 50 mL 简化 MRS 液体培养基和添加 12 g L⁻¹ 碳酸钙的简化 MRS 液体培养基 (碳酸钙在发酵过程中有调节 pH 的作用, 防止发酵液过酸), 42 °C, 150 rpm 培养, 定时取样, 10,000 rpm 离心 5 min, 测定菌株的细胞生长量 OD₆₀₀, 检测发酵液的乳酸及葡萄糖浓度, 并且利用 D-/L-乳酸检测试剂盒测定 D-乳酸和 L-乳酸的含量。

2.3.6 抑制物耐受性的比较

木质纤维素发酵产乳酸的瓶颈之一是, 稀酸预处理过程会产生呋喃类、酚类和有机弱酸抑制物^[98, 99]。这些抑制物会抑制微生物的生长和产物发酵。因此, 筛选耐受抑制物的菌株是目前木质纤维素生物炼制的有效途径之一。

野生型菌株 *P. acidilactici* DQ2 耐受木质纤维素来源抑制物, 适合发酵玉米秸秆产乳酸。该菌株对两种呋喃类抑制物 (糠醛和 5-羟甲基糠醛) 有很强的耐受性, 对乙酸和甲酸的耐受性稍弱, 然而乙酸和甲酸的抑制效果应该主要是由 H⁺引起的。菌株对酚类化合物香草醛的耐受性很差, 在低浓度下菌株的生长和乳酸发酵就受到强烈抑制^[96]。

本文比较研究了野生型菌株 *P. acidilactici* DQ2 和工程改造菌株 *P. acidilactici* TY112、*P. acidilactici* ZP26 对抑制物的耐受性。考察了 7 种典型木质纤维素来源抑制物对菌株生长和发酵产酸的影响, 这 7 种抑制物包括呋喃类 (糠醛和 5-羟甲基糠醛)、有机弱酸 (甲酸和乙酸) 和酚类 (香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛)。这些抑制物的添加浓度参考了 *P. acidilactici* DQ2 的抑制物耐受性实验^[96]并进行了适当调整。呋喃类抑制物的添加终浓度分别为 2、4、6、8 g L⁻¹, 酚类的添加终浓度分别为 0.3、0.6、0.9、1.2 g L⁻¹。

对于有机弱酸类抑制物，为了消除 H^+ 的影响，本文选择用乙酸钠和甲酸钠探讨弱酸类对 *P. acidilactici* 的影响，乙酸钠的添加终浓度为 2.5、5.0、10、15 $g L^{-1}$ ，甲酸钠的添加终浓度为 0.74、1.48、2.96、4.44 $g L^{-1}$ 。需要说明的是，这些抑制物都是在培养基高温蒸汽灭菌后才加入的。

用简化 MRS 培养基 42 °C，150 rpm 培养的 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 种子液以 10% 接种量分别转接至 50 mL 添加不同含量抑制物的简化 MRS 培养基，42 °C，150 rpm 培养。需要说明的是，用于测定葡萄糖和乳酸浓度的组别需要额外添加 12 $g L^{-1}$ 碳酸钙，从而实时调节 pH。取 0 h 和 12 h 的样品，10,000 rpm 离心 5 min，测定细胞生长量 OD_{600} ，检测发酵液中乳酸及葡萄糖浓度，计算 12 h 的乳酸产率。

2.3.7 葡萄糖、乳酸的含量分析

所有样品通过 0.22 μm 滤膜过滤后进行分析测定各类物质的含量。

葡萄糖、乳酸的测定用的是 HPLC (LC-20 AD)，柱温 65 °C，流动相为 5 mM 的硫酸，流速为 0.6 $mL min^{-1}$ 。

2.4 结果与讨论

2.4.1 敲除质粒 pSET4E- Δldh 的构建

通过 PCR 技术，从 *P. acidilactici* DQ2 基因组扩增 *ldh* 基因的上下游同源臂 *up-ldh* 和 *down-ldh*，PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测，都只有一条带，而且大小约为 1 kb，与预期大小一致（见图 2.4），之后纯化回收 PCR 产物。

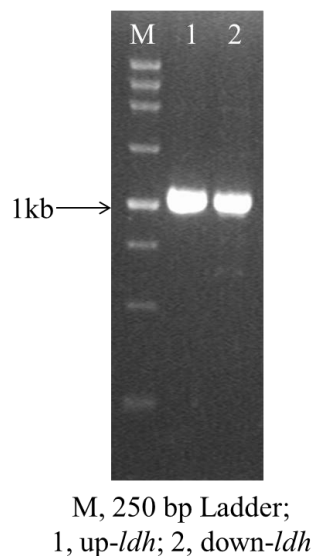
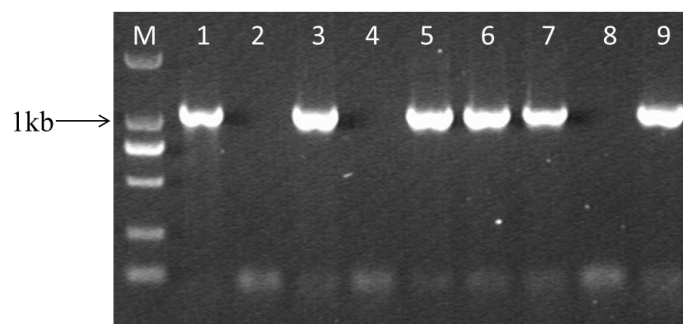


图 2.4 PCR 产物 *up-ldh* 和 *down-ldh*

Fig. 2.4 The fragment of *up-ldh* and *down-ldh* by PCR

首先将 *ldh* 基因的上游同源臂 *up-ldh* 克隆至质粒 pSET4E 上，构建重组质粒

pSET4E-up-*ldh*。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切 up-*ldh* 片段和 pSET4E, 酶切目标片段大小正确, 然后经琼脂糖凝胶回收, 产物用 T4 DNA ligase 连接并转化 *E. coli* XLI-blue, 涂布 LE 培养基平板。对平板上长出的转化子进行 PCR 验证, 用引物 up-F-*ldh* 和 up-R-*ldh* 扩增 up-*ldh* 片段, 结果见图 2.5。泳道 1 是以 *P. acidilactici* DQ2 基因组 DNA 为模板扩增 up-*ldh* 的阳性对照, 泳道 2-9 是 8 个转化子的菌落 PCR 验证。由图 2.5 可见, 3、5、6、7、9 号转化子扩增出约 1 kb 大小的片段。

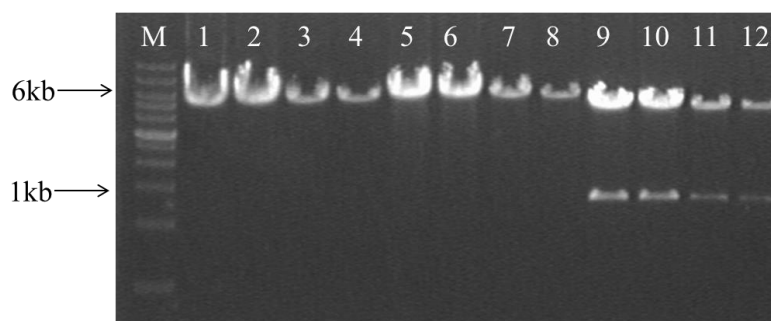


M, DL 2000; 1, 阳性对照;
2-9, 菌落PCR扩增up-*ldh*片段

图 2.5 菌落 PCR 验证

Fig. 2.5 Verification by colony PCR

之后选取了 3、5、6、7 号泳道对应的菌株提取质粒后进行酶切鉴定, 见图 2.6。这 4 个菌株中的质粒分别经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Pst* I 单酶切后都只有一条带, 大小在 5-6 kb 之间, 大小正确。经这两种酶双酶切后有两条带, 切下来较小的条带对应的是上游同源臂 up-*ldh*, 另一条带对应的则是 pSET4E, 大小也正确。因此, 质粒 pSET4E-up-*ldh* 构建成功。

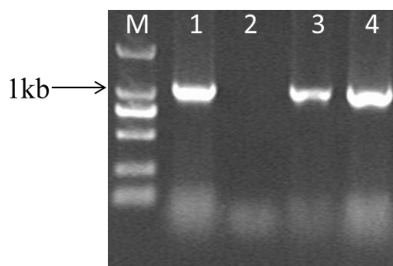


M, 500-12,000 bp Ladder; 1-4, *Bam*H I 单酶切;
5-8, *Pst* I 单酶切; 9-12, *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切

图 2.6 pSET4E-up-*ldh* 的酶切验证

Fig. 2.6 Digestion of the recombinant pSET4E-up-*ldh* by the restriction enzymes

将 *ldh* 的下游同源臂 *down-ldh* 克隆至 pSET4E-*up-ldh*, 构建敲除质粒 pSET4E- Δ *ldh*。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 *down-ldh* 片段的 PCR 纯化产物和质粒 pSET4E-*up-ldh*, 之后将酶切回收产物连接转化到 *E. coli* XLI-blue, 涂布 LE 培养基平板。通过菌落 PCR 技术, 用引物 *down-F-ldh* 和 *down-R-ldh* 扩增 *down-ldh* 片段以验证转化子 (见图 2.7)。泳道 1 以 *P. acidilactici* DQ2 基因组为模板扩增 *down-ldh* 的阳性对照, 泳道 2-4 是对 3 个转化子的菌落 PCR 验证, 3、4 号泳道对应的菌株能够扩增得到正确大小的片段。

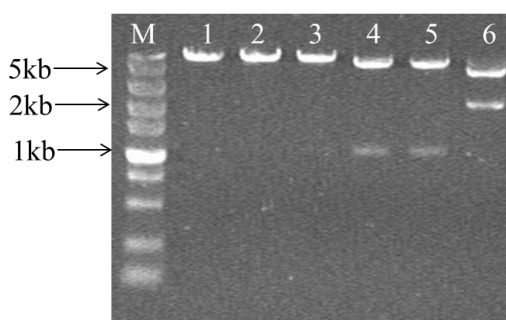


M, DL2000; 1, 阳性对照;
2-4, 菌落PCR扩增*down-ldh*

图 2.7 菌落 PCR 验证

Fig. 2.7 Verification of colony PCR

之后选取了 3 号转化子提取质粒后进行酶切鉴定, 见图 2.8。经限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Pst* I 单酶切的质粒都只有一条带, 大小也正确, 用 *Pst* I 和 *Bam*H I、*Bam*H I 和 *Eco*R I 以及 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切质粒也能得到正确大小的片段。因此, 敲除质粒 pSET4E- Δ *ldh* 构建成功。



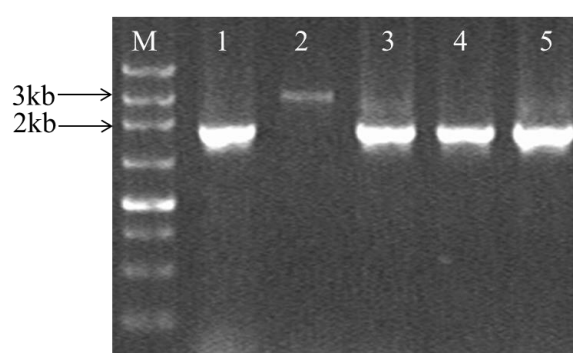
M, DL5000; 1、2、3, 分别用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I 单酶切; 4, 用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切; 5, 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切; 6, 用 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切

图 2.8 pSET4E- Δ *ldh* 的酶切验证

Fig. 2.8 Digestion of the recombinant pSET4E- Δ *ldh* by the restriction enzymes

2.4.2 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ *ldh* 重组菌株的鉴定

将构建成功的敲除质粒 pSET4E- Δ *ldh* 电击转化进入 *P. acidilactici* DQ2, 涂布 MRSE 培养基平板, 通过菌落 PCR 技术, 用引物 up-F-*ldh* 和 down-R-*ldh* 鉴定转化子, 结果见图 2.9。图中泳道 1 是阳性对照, 以质粒 pSET4E- Δ *ldh* 为模版, 只能扩增出 2 kb 大小的条带, 即上下游同源臂 up-*ldh* 和 down-*ldh*; 泳道 2 是以 *P. acidilactici* DQ2 为模版, 扩增出 3 kb 大小的条带, 即 *ldh* 基因及其上下游同源臂 up-*ldh* 和 down-*ldh*; 泳道 3-5 是以 3 个转化子为模板进行菌落 PCR, 扩增出 2 kb 和 3 kb 大小的 2 个条带, 3 kb 的条带不太明显, 这是由于 PCR 会优先扩增短片段。由此确定敲除质粒 pSET4E- Δ *ldh* 成功转化到了 *P. acidilactici* DQ2, 成功构建了 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ *ldh* 重组菌株。



M, DL5000; 1, 阳性对照;
2, *P. acidilactici* DQ2; 3-5, 菌落PCR扩增

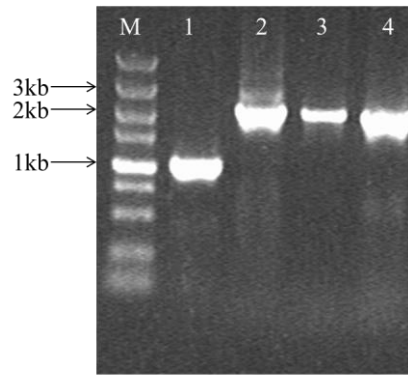
图 2.9 菌落 PCR 验证

Fig. 2.9 Verification by colony PCR

2.4.3 单双交换菌株的筛选

将 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ *ldh* 重组菌首先培养在 28 °C 低温, 该重组质粒在 28 °C 正常复制, 菌株中质粒的拷贝数增加, 从而提高第一次同源重组 (即单交换) 的概率。之后在 42 °C 高温下培养, 质粒不能复制, 发生丢失, 从而提高了单交换的筛选效率。用引物 sc1-F 和 sc1-R 验证通过 up-*ldh* 重组的第一种单交换的形式, 用引物 sc2-F 和 sc2-R 验证 down-*ldh* 重组的第二种单交换的形式 (见图 2.3)。

以 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ *ldh* 为模版进行了 PCR 扩增, 见图 2.10。用引物 *Emr*-F 和 *Emr*-R 扩增得到 *Emr* 基因, 用引物 up-F-*ldh* 和 down-R-*ldh* 扩增出 2 kb 和 3 kb 两个条带, 这与 2.4.2 部分保持一致, 用两对验证单交换的引物都可以扩增出约 2 kb 大小的条带。

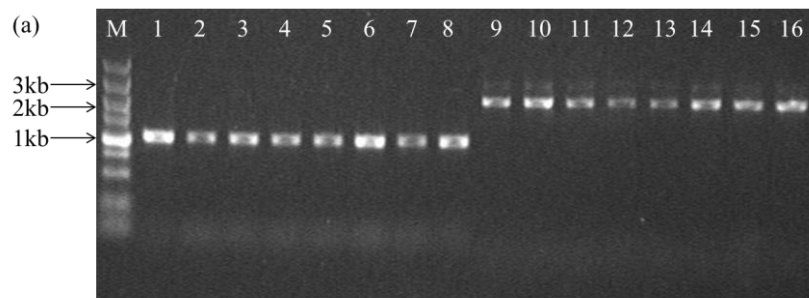


M, DL5000; 1, 用引物*Emr*-F和*Emr*-R扩增; 2, 用引物up-F-*ldh*和down-R-*ldh*扩增; 3, 用引物sc1-F和sc1-R扩增; 4, 用引物sc2-F和sc2-R扩增

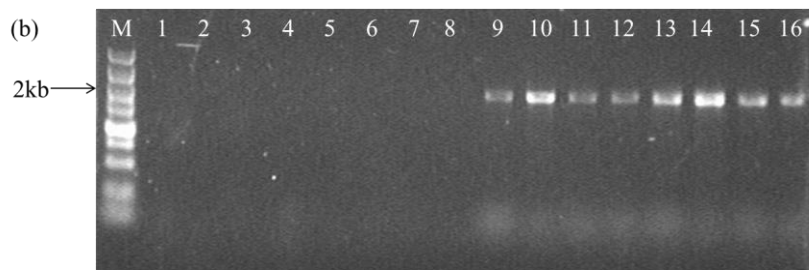
图 2.10 菌落 PCR 验证

Fig. 2.10 Verification by colony PCR

对 MRSE 培养基平板上长出的抗性单菌落进行单交换的鉴定，结果见图 2.11。用引物 *Emr*-F 和 *Emr*-R 能够扩增得到 *Emr* 基因，用引物 up-F-*ldh* 和 down-R-*ldh* 也扩增得到了 2 kb 和 3 kb 两个条带。用引物 sc1-F 和 sc1-R 进行 PCR 扩增，未扩增出条带，而用引物 sc2-F 和 sc2-R 能够扩增出约 2 kb 大小的片段，这与以 *P. acidilactici* DQ2::pSET4E- Δ *ldh* 为模版进行菌落 PCR 扩增的结果不同，因此确定这 8 个菌株都是发生单交换的菌株，是通过下游同源臂 down-*ldh* 发生重组的突变株。



M, DL5000; 1-8, 用引物*Emr*-F和*Emr*-R扩增; 9-16, 用引物up-F-*ldh*和down-R-*ldh*扩增



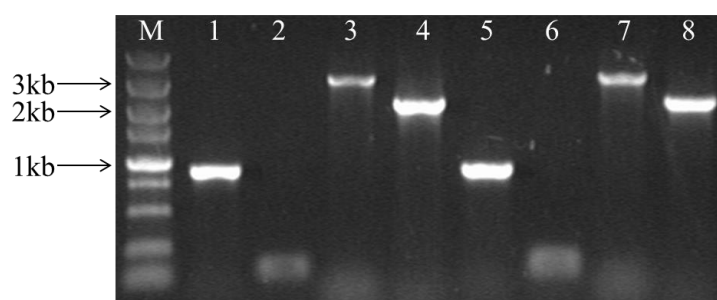
M, DL5000; 1-8, 用引物sc1-F和sc1-R扩增; 9-16, 用引物sc2-F和sc2-R扩增

图 2.11 单交换菌株的 PCR 验证

Fig. 2.11 Identification of the single crossover mutants by colony PCR

单交换菌株在 28 °C 低温下培养，激活整合到基因组上的质粒片段发生滚环复制，通过同源重组方式发生剪切，即发生双交换，该步骤可提高双交换的概率。

在 28 °C 培养一次的菌液中没有筛选到非抗性菌株，从培养两次的菌液中筛选到 2 株满足条件的菌株，编号分别为 26 号和 81 号，对其进行 PCR 验证（见图 2.12）。结果表明，以 26 号和 81 号菌株为模版时扩增不到 *ldh* 基因，而用引物 up-F-*ldh* 和 down-R-*ldh* 只扩增得到一条 2 kb 大小条带。由于 *ldh* 基因被敲除后，只能扩增到上下游同源臂 up-*ldh* 和 down-*ldh*，大小约为 2 kb。由此判断 26 号和 81 号菌株均为敲除 *ldh* 基因的菌株，都是通过上游同源臂 up-*ldh* 发生剪切的菌株。



M, DL5000; 1、5, 用引物*ldhD*-F和*ldhD*-R扩增;
2、6, 用引物*ldh*-F和*ldh*-R扩增; 3、7, 用引物up-F-*ldhD*和down-R-*ldhD*扩增;
4、8, 用引物up-F-*ldh*和down-R-*ldh*扩增; 1-4, 验证26号菌株; 5-8, 验证81号菌株

图 2.12 双交换菌株的 PCR 验证

Fig. 2.12 Identification of the double crossover mutants by PCR

将 26 号菌株命名为 *P. acidilactici* ZP26，该菌株已于 2013 年 12 月 31 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC），保藏登记号为 CGMCC NO.8665。*P. acidilactici* TY112 是 *ldhD* 基因被敲除的菌株，该菌株也保藏于 CGMCC，保藏登记号为 CGMCC NO.8664。

2.4.4 敲除菌株的稳定性研究

敲除基因的菌株发酵性能可能不太稳定，因此有必要将敲除基因的突变株在合成培养基中连续传代培养，以稳定其代谢流。*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 培养基中进行连续传代培养，确保每次转接前菌株处于对数生长期的良好生长状态。

图 2.13 (a) 是 *P. acidilactici* ZP26 转接 120 次的发酵表现。*P. acidilactici* ZP26 在前 60 次的转接培养中，12 h 时的生长参数 (OD_{600}) 和利用葡萄糖产乳酸的参数（葡萄糖和乳酸浓度）都不稳定，且产酸趋于减少。之后随着转接次数的增加，细胞生长量 OD_{600} 增加，产乳酸浓度也增加，残糖浓度减少。转接 90 次后，菌株的生长量趋于稳定， OD_{600} 达到 6 左右，发酵产酸能力也趋于稳定，残糖浓度和乳酸浓度分别是 7.5 g L^{-1} 和 10.0 g L^{-1} 左右。

图 2.13 (b) 是 *P. acidilactici* TY112 转接 100 次的发酵表现。与 *P. acidilactici* ZP26 不同, *P. acidilactici* TY112 在前期的转接中, 12 h 时利用葡萄糖产乳酸的参数(葡萄糖和乳酸浓度)都比较稳定, 没有大的波动。而转接 50 次后, 乳酸的生成趋于增加, 残糖趋于减少。转接 70 次后, 菌株发酵产酸参数趋于稳定, 残糖浓度和乳酸浓度分别是 8.8 g L^{-1} 和 10.5 g L^{-1} 左右。生长参数 (OD_{600}) 始终变化较大, 分析可能的原因是, 该工程改造菌株与野生型 *P. acidilactici* DQ2 和工程改造菌株 *P. acidilactici* ZP26 相比而言更容易絮凝, 最终导致菌体浓度测定不能真实反映菌体浓度。

由以上结果看出, 2 株基因工程菌株 *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 培养基中经过多次的连续转接后, 菌体生长和发酵性能趋于稳定。

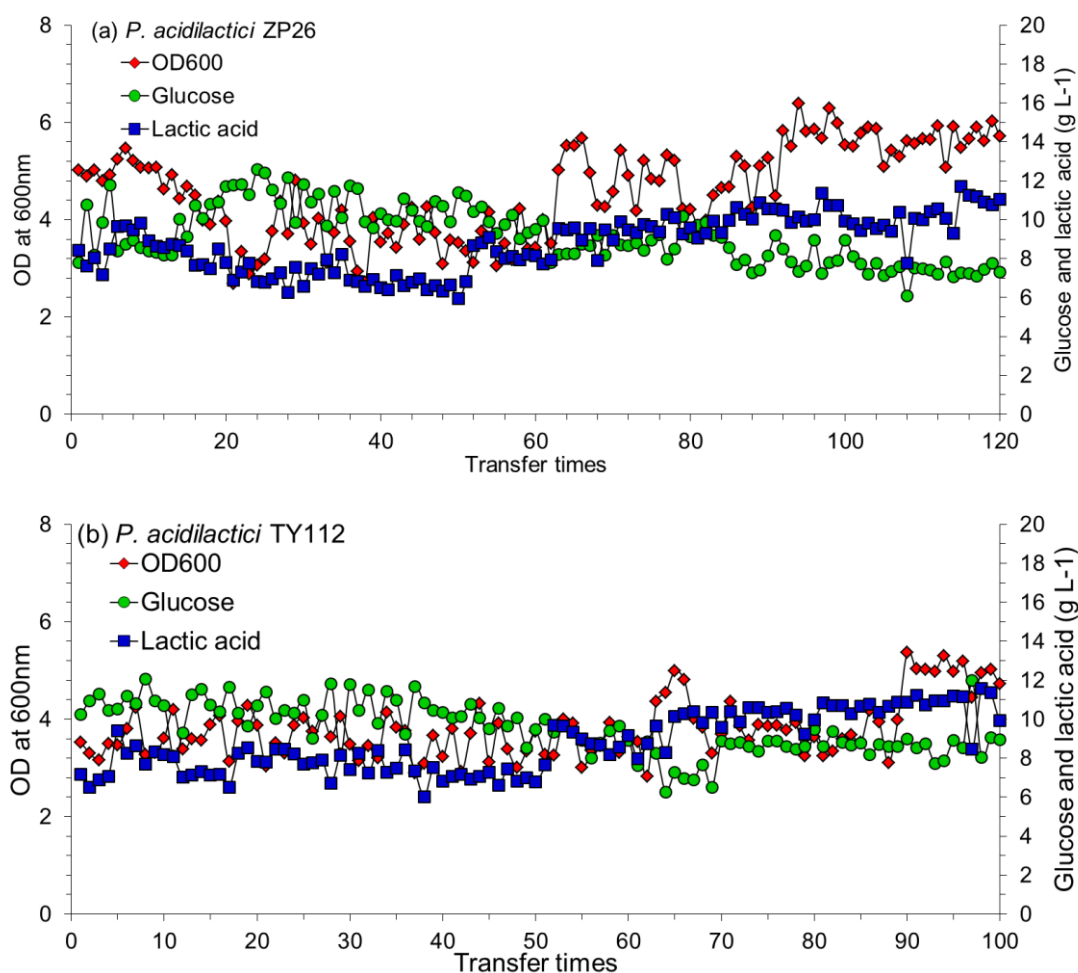


图 2.13 *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 培养基中连续转接的发酵性能

Fig. 2.13 Fermentation performance of the engineering strains *P. acidilactici* ZP26 and *P. acidilactici* TY112 by continuous transfer in the simplified MRS medium

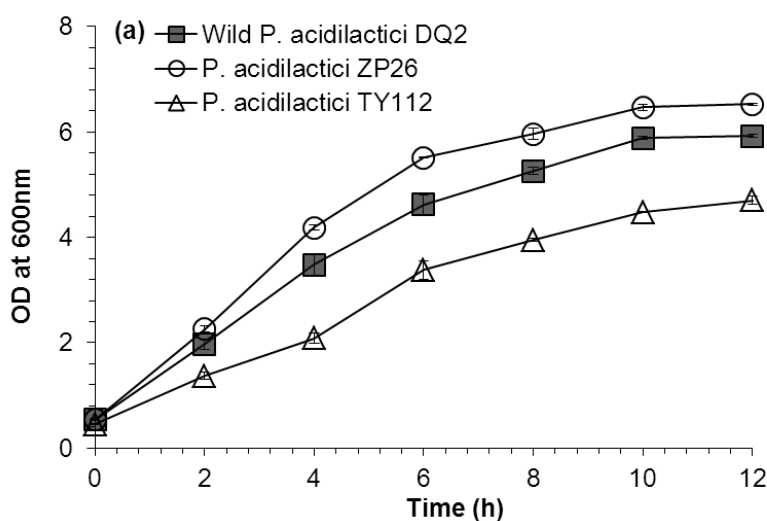
2.4.5 敲除菌株的发酵性能

为了确认敲除 *ldh* 基因对菌株的影响, 本文比较研究了 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 的发酵性能。

图 2.14 (a) 是 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 培养基中的生长情况。*P. acidilactici* ZP26 的最大细胞生长量 OD_{600} 为 6.53, *P. acidilactici* DQ2 为 5.93, *P. acidilactici* ZP26 的生长比野生菌株 *P. acidilactici* DQ2 略好, 说明 *ldh* 基因的敲除基本不影响菌株的生长。另一株工程菌株 *P. acidilactici* TY112 的最大细胞生长量 OD_{600} 为 4.70, 与野生型菌株相比较而言要差的多, *ldhD* 基因的敲除影响了菌株的生长。

图 2.14(b)和 2.14(c)是 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 培养基中的葡萄糖消耗和乳酸生成情况。结果表明, *P. acidilactici* DQ2 的葡萄糖消耗速率最快, 在 10 h 完全消耗完; *P. acidilactici* ZP26 的葡萄糖消耗速率较慢, 12 h 时仍有 2.14 g L^{-1} 残糖; *P. acidilactici* TY112 的葡萄糖消耗速率相对最慢, 12 h 时仍有 3.09 g L^{-1} 残糖。*P. acidilactici* DQ2 的乳酸生成也最快, 8 h 后乳酸浓度基本不变, *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸浓度在 12 h 达到最大值。*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在 12 h 的乳酸产率分别为 $1.49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、 $1.10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 $1.17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 乳酸得率分别为 85.04%、82.31% 和 95.36%。因此, *ldh* 和 *ldhD* 基因的敲除虽然降低了菌株的葡萄糖消耗速率和乳酸产率, 但未降低乳酸得率。

图 2.14 (d) 是利用 D-/L-乳酸检测试剂盒检测了 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 发酵 12 h 的 D-乳酸和 L-乳酸的含量。野生型菌株 *P. acidilactici* DQ2 产生乳酸中 L-乳酸占 61.01%, D-乳酸占 38.98%, 乳酸的光学纯度为 22.03%。*P. acidilactici* ZP26 D-乳酸含量可以达到 99.66%, 几乎没有 L-乳酸产生, 乳酸的光学纯度达到 99.32%。与之前的研究保持一致^[97], *ldhD* 基因敲除菌株 *P. acidilactici* TY112, 几乎不产 D-乳酸, 乳酸的光学纯度达到 99.89%, *ldhD* 基因的敲除导致菌株产光学纯 L-乳酸。



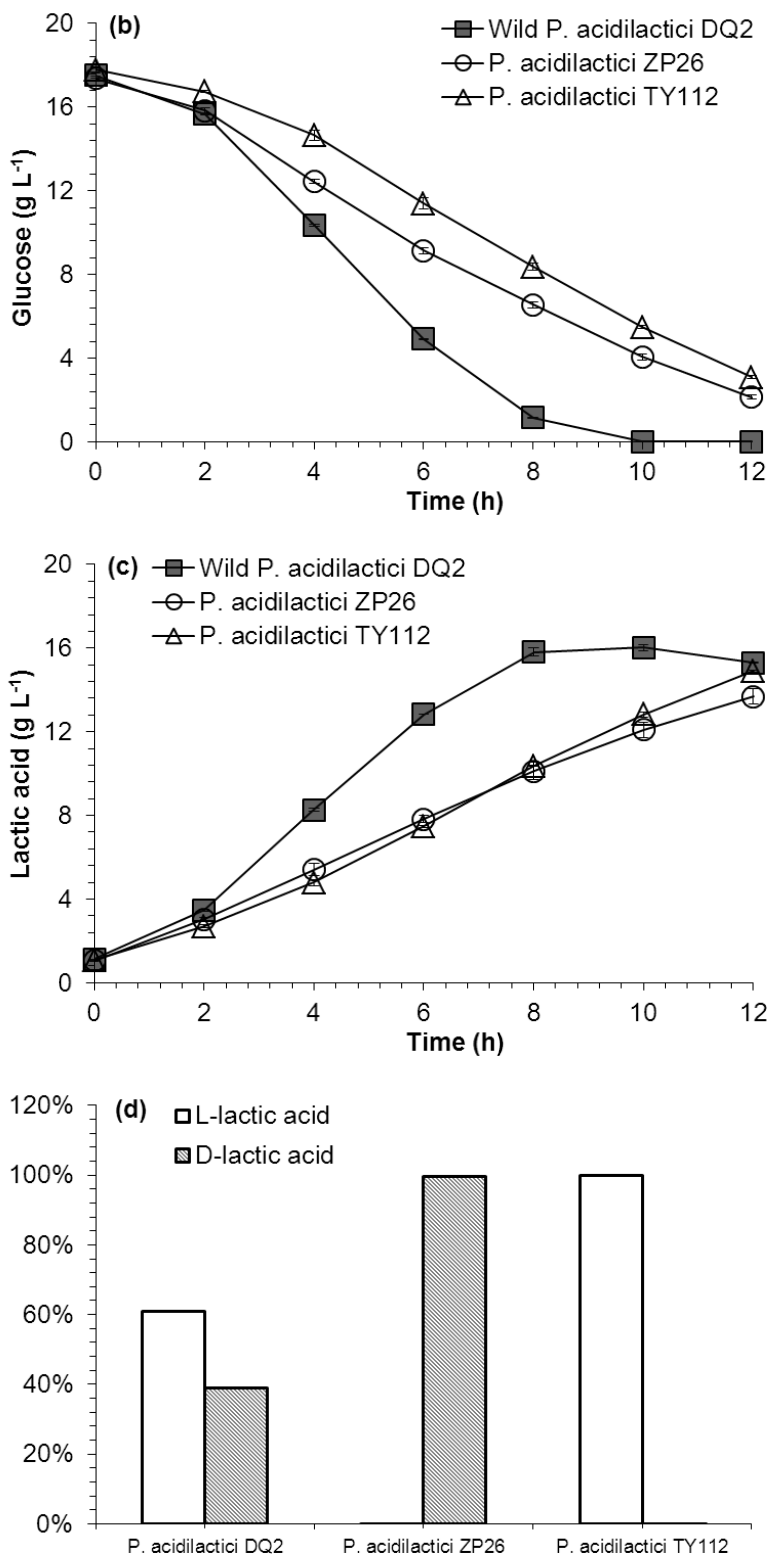


图 2.14 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 中的发酵性能

Fig. 2.14 Fermentation performance of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112 in the simplified MRS medium

2.4.6 抑制物耐受性的比较

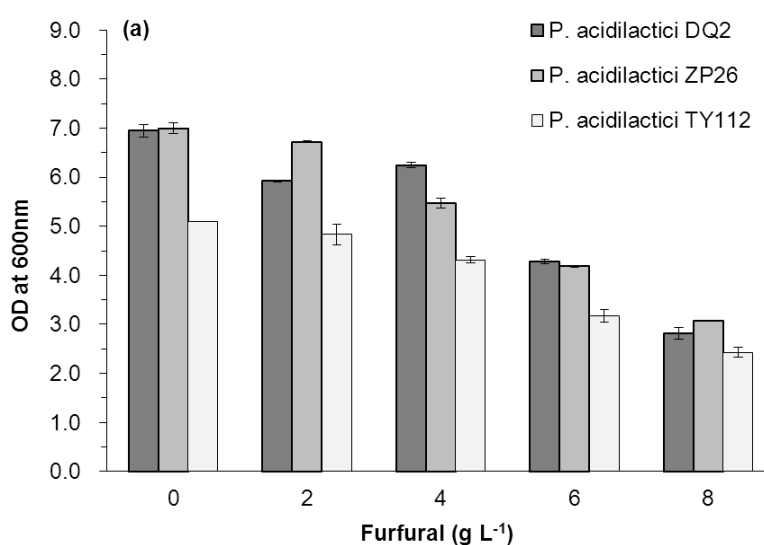
本研究旨在用工程改造菌株发酵玉米秸秆生产光学纯乳酸，因此有必要考察改造菌株对木质纤维素来源抑制物的耐受性。同时，为了确认 *ldh* 和 *ldhD* 基因的敲除对菌株抑制物耐受性的影响，本研究比较研究了 *P. acidilactici* DQ2 和两株基因敲除菌株 *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 对 7 种木质纤维素来源典型抑制物的耐受性。基于 3 株 *P. acidilactici* 在不添加抑制物的 MRS 培养基中最大细胞浓度和乳酸浓度均在 12 h 左右，所以抑制物耐受性选择评价 12 h 时的细胞生长量 OD_{600} 和乳酸产率。

(1) *P. acidilactici* 对呋喃类抑制物的耐受性

图 2.15 显示了 3 种 *P. acidilactici* 对糠醛的耐受性，其中，图 a 显示了抑制物对生长的影响，图 b 是对乳酸产率的影响。

从图 a 可以看出，随着糠醛浓度从 0 g L^{-1} 逐渐提高至 8 g L^{-1} ，3 株 *P. acidilactici* 的生长都逐渐变差。糠醛浓度为 8 g L^{-1} 时 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的细胞生长量 OD_{600} 分别只有对照组的 40.56%、43.79%、47.61%。

从图 b 可以看出，3 株 *P. acidilactici* 在一定的糠醛浓度下乳酸产率有所提高。糠醛浓度为 6 g L^{-1} 时，*P. acidilactici* DQ2 的乳酸产率是对照的 107.94%。浓度为 4 g L^{-1} 时，*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别是对照的 121.15%、107.02%。在乙醇发酵研究中也有类似现象，*S. cerevisiae* 在 2 g L^{-1} 的糠醛浓度下乙醇得率有所提高^[69]。而当糠醛浓度达到最大的 8 g L^{-1} 时，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别只有对照的 61.06%、71.30%、45.98%，3 株 *P. acidilactici* 的乳酸产率都有较大幅度的减少。因此，低浓度的糠醛有提高乳酸产率的作用，高浓度的糠醛会降低乳酸产率。



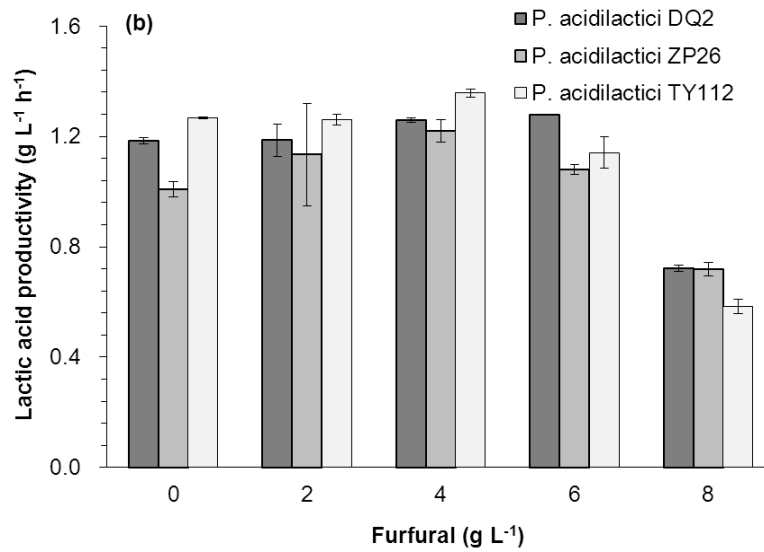


图 2.15 糠醛对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.15 The influence of furfural on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

图 2.16 显示了 3 种 *P. acidilactici* 对 5-羟甲基糠醛的耐受性，其中，图 a 显示了抑制物对生长的影响，图 b 是对乳酸产率的影响。

从图 a 可以看出，5-羟甲基糠醛对 3 株 *P. acidilactici* 生长的影响与糠醛类似，3 株 *P. acidilactici* 的生长随着抑制物浓度的增加逐渐变差。8 g L⁻¹ 5-羟甲基糠醛胁迫下，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的 OD₆₀₀ 分别是对照组的 54.27%、57.71% 和 46.59%。

从图 b 可以看出，低浓度的 5-羟甲基糠醛也可以提高乳酸产率。6 g L⁻¹ 5-羟甲基糠醛胁迫下，*P. acidilactici* DQ2 的乳酸产率是对照的 106.88%。4 g L⁻¹ 5-羟甲基糠醛胁迫下，*P. acidilactici* ZP26 的乳酸产率是对照的 108.18%。2 g L⁻¹ 5-羟甲基糠醛胁迫下，*P. acidilactici* TY112 的乳酸产率是对照的 102.41%。最高浓度 8 g L⁻¹ 5-羟甲基糠醛胁迫下，乳酸产率受到很大的影响，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别是对照的 74.53%、84.29%、60.92%，但是与同浓度的糠醛相比受到的抑制作用较弱。

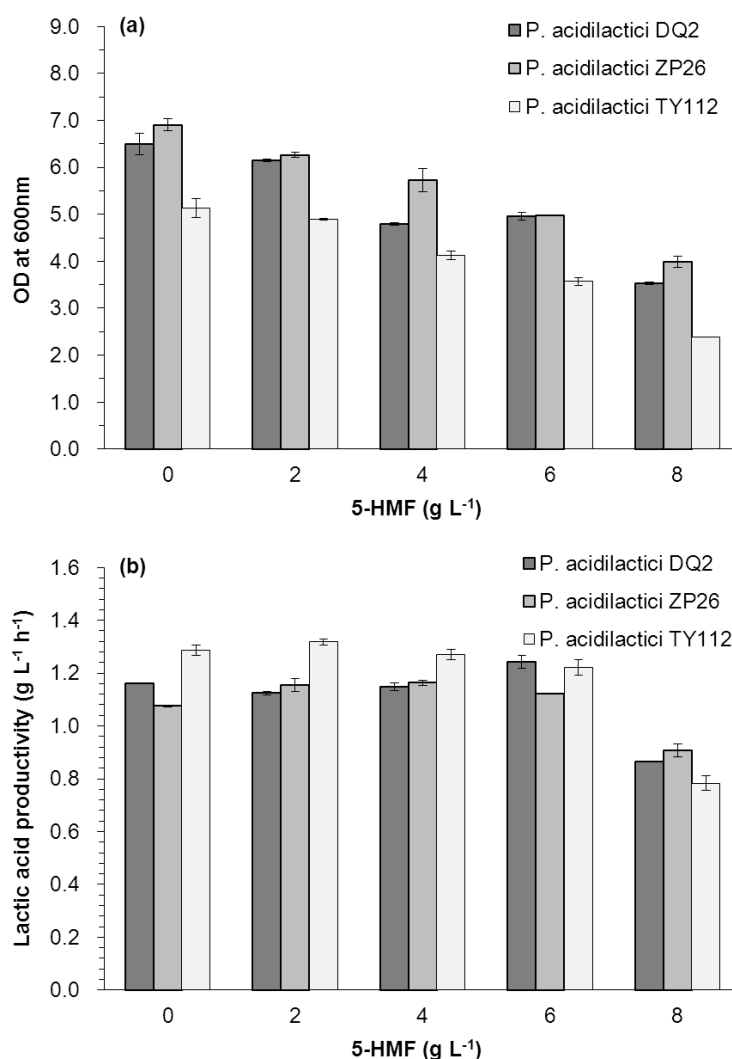


图 2.16 5-羟甲基糠醛对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.16 The influence of 5-HMF on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

综合来看,3株 *P. acidilactici* 耐受糠醛和 5-羟甲基糠醛的能力相当,说明 *ldh* 和 *ldhD* 的敲除并不影响菌株耐受糠醛和 5-羟甲基糠醛的能力。6 g L⁻¹ 糠醛和 5-羟甲基糠醛基本不影响 3 株 *P. acidilactici* 的乳酸产率。但是,乙醇发酵微生物则不能耐受这么高浓度的糠醛和 5-羟甲基糠醛。有文献报道,3.0 g L⁻¹ 糠醛和 5-羟甲基糠醛就会导致乙醇发酵菌株的死亡^[100, 101]。

(2) *P. acidilactici* 对弱酸类抑制物的耐受性

考察乙酸耐受性时,在简化 MRS 培养基中添加的是乙酸钠,以排除 H⁺ 的影响。然而简化 MRS 培养基中本来就添加 5 g L⁻¹ 的乙酸钠,乙酸钠主要起到抑制杂菌污染的作用,因此乙酸钠对菌株的生长和产酸的影响可能较小。在该实验中,对照组培养基中不添加乙酸钠。

图 2.17 (a) 显示了乙酸钠对 *P. acidilactici* 生长的影响,图 2.17 (b) 则显示了乙酸

钠对乳酸产率的影响。

从图 a 可以看出, 乙酸钠对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 生长的影响都很小, 对 *P. acidilactici* TY112 影响稍大。15 g L⁻¹ 乙酸钠胁迫下, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的 OD₆₀₀ 分别是对照组的 93.77%、89.93%、66.73%。

从图 b 可以看出, 乙酸钠对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* TY112 的乳酸产率影响较小, 最高浓度 15 g L⁻¹ 乙酸钠胁迫下乳酸产率分别是对照的 95.83%、80.22%。*P. acidilactici* ZP26 在没有乙酸钠存在时乳酸产率反而较低, 12 h 还有残糖, 添加乙酸钠后乳酸产率增加, 在最高浓度的乙酸钠胁迫下乳酸产率是对照的 138.32%。由此说明, 乙酸钠促进了乳酸的生产。

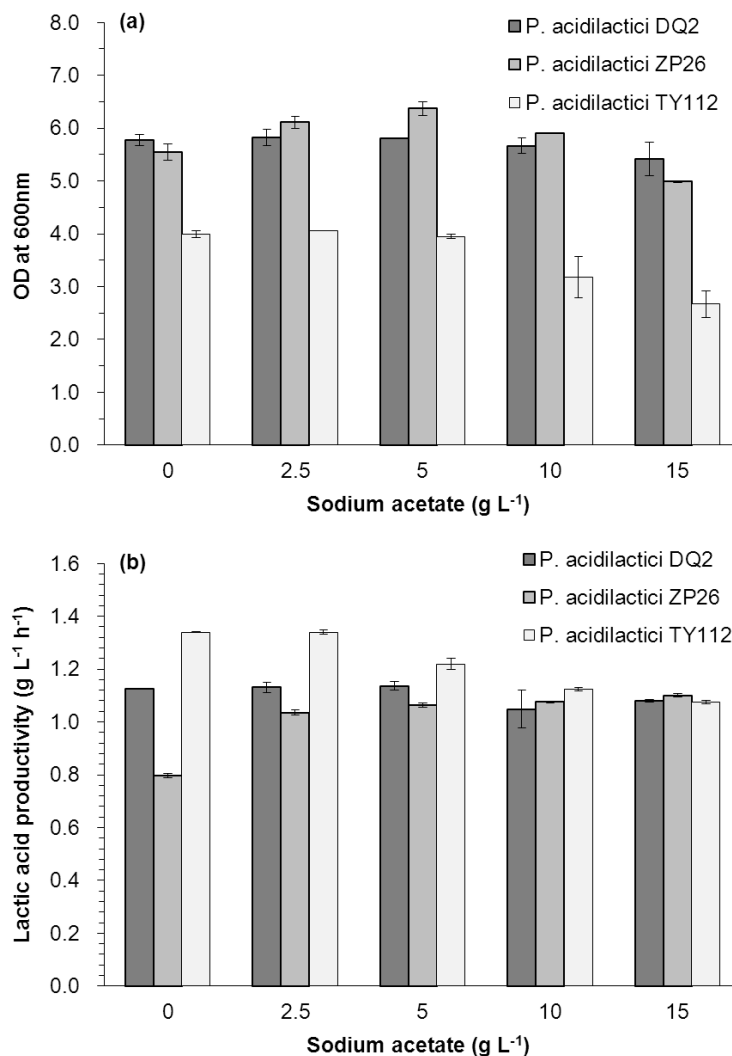


图 2.17 乙酸钠对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.17 The influence of sodium acetate on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

同样为消除 H^+ 的影响, 本研究在考察甲酸耐受性时在简化 MRS 培养基中添加了甲酸钠。图 2.18 (a) 显示了甲酸钠对 3 株 *P. acidilactici* 生长的影响, 图 2.18 (b) 显示了甲酸钠对乳酸产率的影响。

从图 a 可以看出, 随着甲酸钠浓度的增加, 3 株 *P. acidilactici* 的生长逐渐变慢。最高浓度 4.44 g L^{-1} 甲酸钠胁迫下, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的 $OD_{600\text{nm}}$ 分别是对照组的 55.82%、53.04% 和 51.47%。

从图 b 可以看出, 在不同浓度的甲酸钠胁迫下, 3 株 *P. acidilactici* 的乳酸产率基本不受影响。在最高浓度甲酸钠胁迫下, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别是对照的 110.31%、102.49% 和 85.88%。

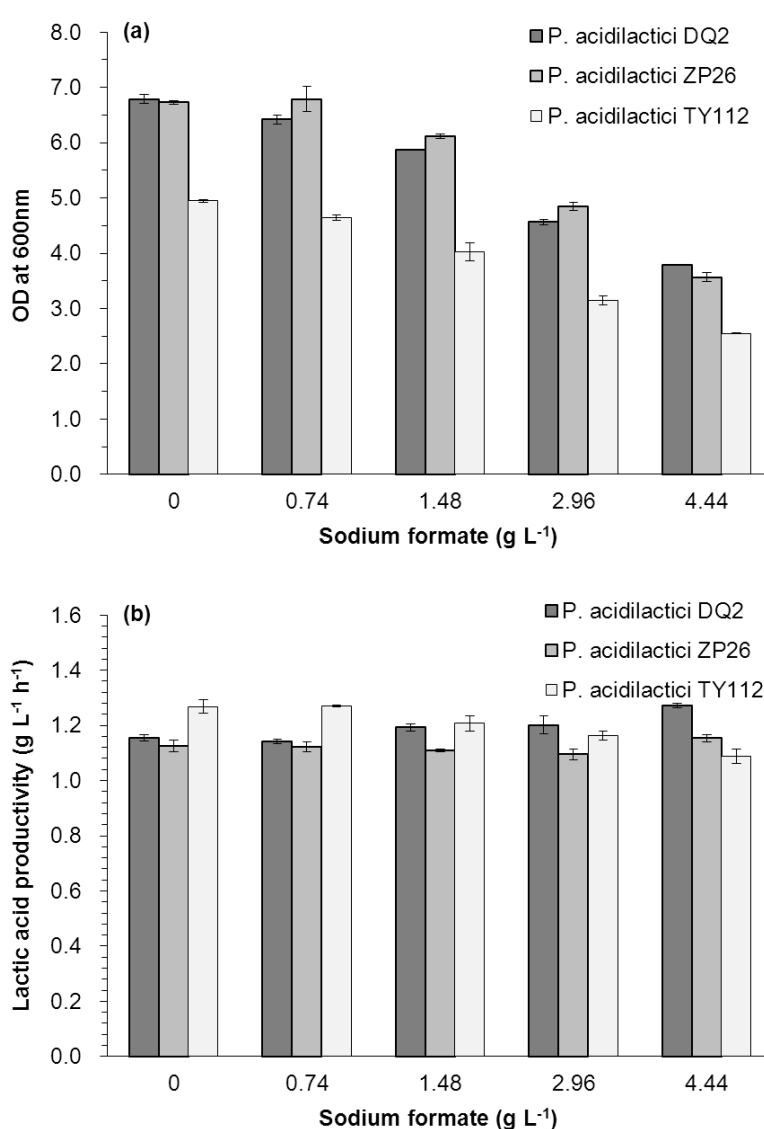


图 2.18 甲酸钠对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.18 The influence of sodium formate on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

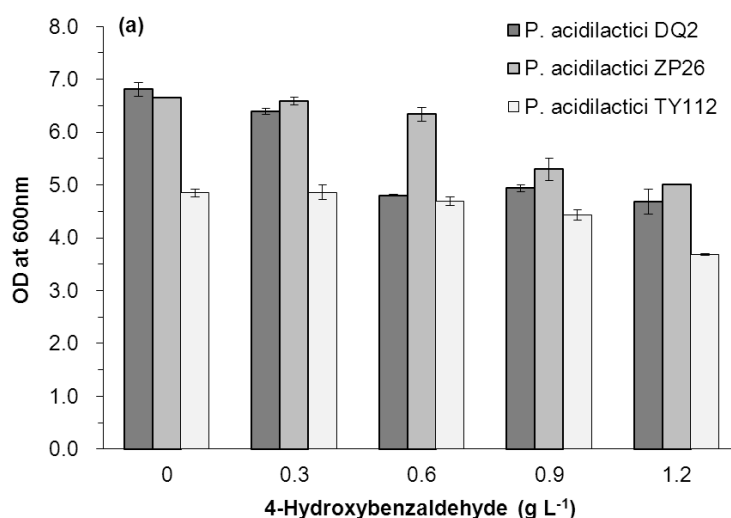
由以上结果可以看出, 3 株 *P. acidilactici* 对弱酸类抑制物的耐受性相似, 说明 *ldh* 和 *ldhD* 的敲除并不影响菌株对甲酸和乙酸的耐受性。有一点不同之处是 *P. acidilactici* ZP26 在缺乏乙酸钠时生长和产酸能力均较差。3 株 *P. acidilactici* 能够耐受较高浓度的乙酸。相对于乙酸, 3 株 *P. acidilactici* 的生长受甲酸的影响较大, 而乳酸产率受到的影响较小。

(3) *P. acidilactici* 对酚类抑制物的耐受性

图 2.19 显示了 3 株 *P. acidilactici* 对 4-羟基苯甲醛的耐受性, 其中, 图 a 显示了抑制物对菌株生长的影响, 图 b 显示了对乳酸产率的影响。

从图 a 可以看出, 随着 4-羟基苯甲醛浓度的增加, 3 株 *P. acidilactici* 的生长逐渐变差。在最高浓度 1.2 g L^{-1} 4-羟基苯甲醛胁迫下, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的 OD_{600} 分别是对照组的 68.82%、75.38% 和 75.91%。

从图 b 可以看出, 不同浓度 4-羟基苯甲醛基本不影响 3 株 *P. acidilactici* 的乳酸产率。最高浓度 4-羟基苯甲醛胁迫下, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别是对照的 93.51%、108.70% 和 83.49%。



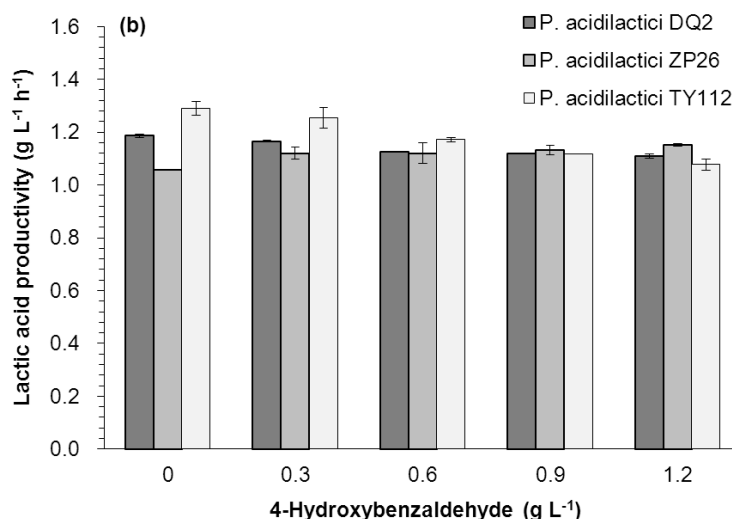


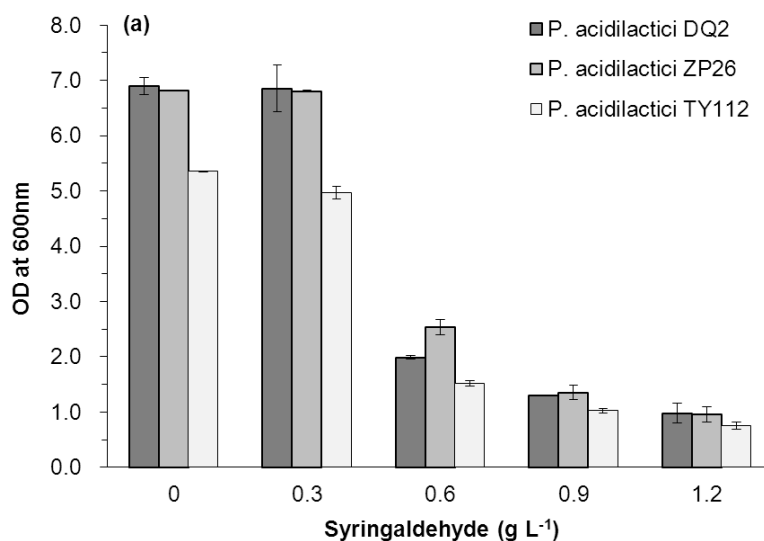
图 2.19 4-羟基苯甲醛对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.19 The influence of 4-hydroxybenzaldehyde on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

图 2.20 显示了 3 种 *P. acidilactici* 对丁香醛的耐受性，其中，图 a 显示了丁香醛对菌体生长的影响，图 b 显示了丁香醛对乳酸产率的影响。

由图 a 可以看出，0.3 g L⁻¹ 低浓度的丁香醛基本不影响 *P. acidilactici* 菌株的生长，当丁香醛浓度增加到 0.6 g L⁻¹ 时，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的 OD₆₀₀ 分别是对照组的 28.83%、37.23%和 28.36%，菌株的生长受到强烈抑制。

由图 b 发现，0.3 g L⁻¹ 低浓度的丁香醛基本也不影响菌株的乳酸产率，而当抑制物浓度增加至 0.6 g L⁻¹ 时，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别是对照组的 10.94%、0%和 12.66%，*P. acidilactici* 的产酸受到强烈抑制。



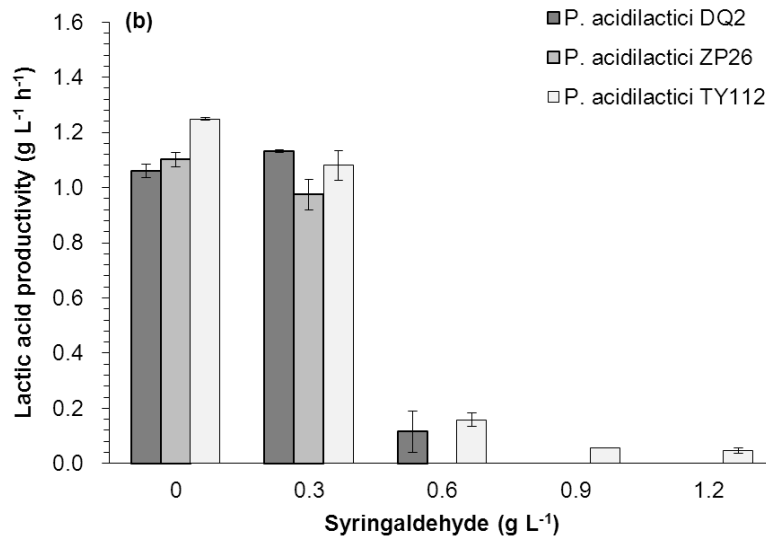


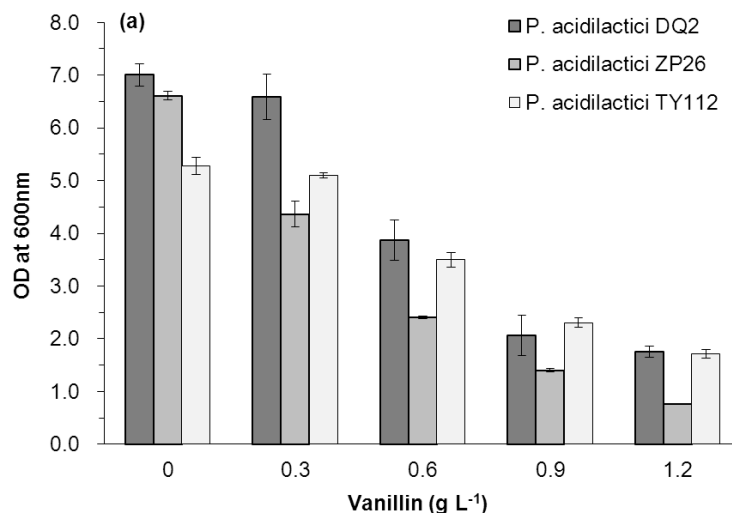
图 2.20 丁香醛对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.20 The influence of syringaldehyde on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

图 2.21 显示了 3 株 *P. acidilactici* 对香草醛的耐受性，其中，图 a 显示香草醛对菌体生长的影响，图 b 显示香草醛对乳酸产率的影响。

由图 a 可以看出，随着香草醛浓度的增加，3 株 *P. acidilactici* 的生长逐渐变慢。最高浓度 1.2 g L⁻¹ 香草醛胁迫下，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的 OD₆₀₀ 分别是对照组的 24.99%、11.64%和 32.52%，说明香草醛强烈抑制了 *P. acidilactici* 菌株的生长。

图 b 显示 0.3 g L⁻¹ 低浓度的香草醛对 3 株 *P. acidilactici* 的乳酸产率影响较小，而当香草醛浓度增加至 0.6 g L⁻¹，*P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 的乳酸产率分别是对照组的 33.44%、22.22%和 27.15%，说明菌株的产酸受到很强的抑制。



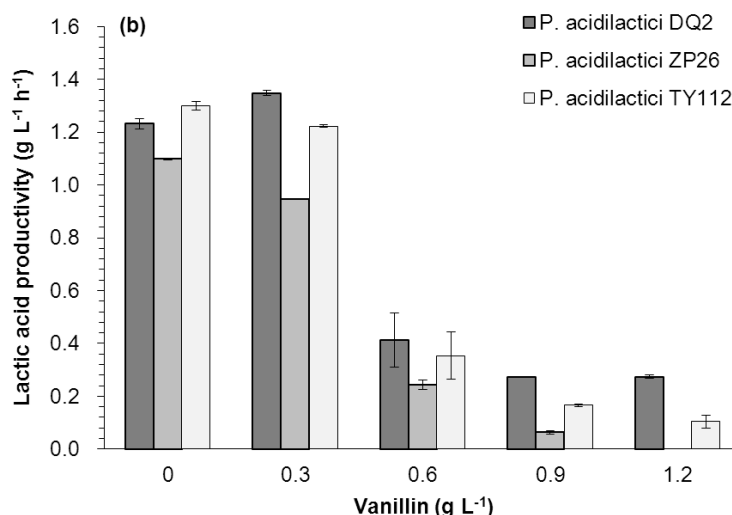


图 2.21 香草醛对 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 生长和乳酸产率的影响

Fig. 2.21 The influence of vanillin on cell growth and lactic acid productivity of the strains *P. acidilactici* DQ2, *P. acidilactici* ZP26, and *P. acidilactici* TY112

由以上结果可以看出, 3 株 *P. acidilactici* 对 3 种酚类抑制物的耐受性相似, 说明 *ldh* 和 *ldhD* 的敲除并不影响菌株对这 3 种酚类的耐受性。相比较而言, 3 株 *P. acidilactici* 对丁香醛的耐受性最差, 香草醛其次, 对 4-羟基苯甲醛的耐受性最强。

总之, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 对 7 种木质纤维素来源的典型抑制物耐受性相似, 说明 *ldh* 和 *ldhD* 的敲除并不影响 *P. acidilactici* 对抑制物的耐受性。

总体看来, 3 株 *P. acidilactici* 可以耐受高浓度的呋喃类抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛, 还可以耐受很高浓度的乙酸。最高浓度 4.44 g L^{-1} 甲酸钠对乳酸产率还基本无影响。3 株 *P. acidilactici* 对酚类抑制物的耐受性则较弱, 特别是丁香醛和香草醛, 0.6 g L^{-1} 丁香醛和香草醛较大程度地影响了乳酸产率。

2.5 本章小结

- (1) 本研究通过同源重组方法, 借助热敏性敲除系统成功敲除了 *P. acidilactici* DQ2 L-乳酸脱氢酶编码基因 *ldh*, 得到的菌株命名为 *P. acidilactici* ZP26。
- (2) 工程改造菌株 *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 在简化 MRS 培养基中多次连续转接培养后生长和发酵性能趋于稳定。
- (3) *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 利用葡萄糖分别产生光学纯的 D-乳酸和 L-乳酸, 乳酸的光学纯度分别达到 99.32%、99.89%, 说明基因敲除发挥了作用。*ldh* 基因的敲除基本不影响菌株的生长, 但是 *ldhD* 基因的敲除在一定程度上减慢了菌株的生长。另外, 虽然 *ldh* 和 *ldhD* 基因的敲除减慢了菌株利用葡萄糖和产乳酸的速率, 但不会导致乳酸得率的降低。

- (4) *ldh* 和 *ldhD* 基因的敲除不影响菌株对抑制物的耐受性。野生菌株 *P. acidilactici* DQ2 以及两株基因工程菌株 *P. acidilactici* ZP26、*P. acidilactici* TY112 都可以耐受高浓度的呋喃类抑制物糠醛和 5-羟甲基糠醛。3 株 *P. acidilactici* 可以耐受很高浓度的乙酸，最高测试浓度 4.44 g L^{-1} 的甲酸钠对乳酸产率基本无影响。然而 3 株 *P. acidilactici* 对酚类抑制物的耐受性较弱，特别是丁香醛和香草醛。

第 3 章 *P. acidilactici* ZP26 利用玉米秸秆生产光学纯 D-乳酸

3.1 前言

玉米秸秆是一种非常丰富的木质纤维素原料，它是在玉米收获之后得到的废弃生物质。在之前的 20 多年，随着我国玉米种植面积不断扩大，玉米秸秆产量也持续增加。2010 年我国玉米产量达到 17,725 万 t，以 1.25 的草谷比系数计算（即 1 kg 玉米可获得 1.25 kg 秸秆），当年的玉米秸秆产量达到 22,156 万 t，约占我国农作物秸秆总产量的 28.57%^[102]。

作为一种木质纤维素原料，预处理是玉米秸秆生物炼制的必要环节，因为预处理过程可以破坏玉米秸秆的结构。本实验室建立了干式稀酸预处理方法，提高了预处理时木质纤维素的固体含量（固含量高达 70% (w/w)），从而减少了新鲜水的用量和废水的产生^[47]。另外，本实验室还在预处理反应器中安装了一个螺带式搅拌浆，以此提高反应器的传质和传热水平，改善了预处理的效率，降低了产生抑制物的含量^[49]。

之前已经对野生菌株 *P. acidilactici* DQ2 利用玉米秸秆生产乳酸的条件进行了研究。研究主要针对菌株同步糖化与发酵（SSF）产乳酸的预糖化时间、温度、pH、接种量、固含量等参数进行了研究和优化^[96]。所用的玉米秸秆原料首先经过干式稀酸预处理，之后利用本实验室筛选得到的菌株 *A. resinae* ZN1 进行生物脱毒降解预处理过程产生的抑制物^[74]。然而并没有研究 *A. resinae* ZN1 的生物脱毒过程对 *P. acidilactici* DQ2 发酵产乳酸的影响。

工程改造菌株 *P. acidilactici* ZP26 能够发酵葡萄糖产光学纯 D-乳酸。为了实现该工程菌株高效利用玉米秸秆产光学纯 D-乳酸，本研究拟采取两种手段来应对玉米秸秆预处理过程中产生的抑制物。一方面利用 *A. resinae* ZN1 对预处理玉米秸秆进行生物脱毒以用作 *P. acidilactici* ZP26 SSF 的原料，主要探究该生物脱毒过程对菌株发酵产酸的影响；另一方面通过驯化工程手段提升 *P. acidilactici* ZP26 在未脱毒预处理玉米秸秆水解液中的发酵表现，以期省去抑制物的去除过程，节约成本。

3.2 实验材料

3.2.1 菌株

P. acidilactici ZP26（见表 2.1）。

A. resinae ZN1（CGMCC 7452）由本实验室分离筛选。

3.2.2 酶及试剂

纤维素酶 Youtell #6，购自湖南岳阳尤特尔生化有限公司，根据 NREL 实验室分析程序 LAP-006^[103]测得其滤纸酶活为 135 FPU g⁻¹，根据 Sharma 等人的方法^[104]测得其纤维二糖酶活为 344 CBU g⁻¹。

福林酚，购自上海生工生物工程有限公司。

没食子酸 (AR), 购自阿拉丁试剂公司。

如无特殊说明, 其它试剂均购自上海凌峰化学试剂公司或上海国药化学试剂集团。

3.2.3 原料及培养基

玉米秸秆购自中国河南郸城, 收获于 2011 年秋。

PDA 培养基: 200 g 剥皮并切成薄片的马铃薯加入 1 L 去离子水中, 煮沸 30 min, 过滤之后加入 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂粉, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

用于 SSF 的营养盐: 即简化 MRS 培养基葡萄糖以外的所有成分, 胰蛋白胨 10 g L⁻¹, 酵母提取物 10 g L⁻¹, 乙酸钠 5g L⁻¹, 柠檬酸氢二铵 2g L⁻¹, 磷酸氢二钾 2g L⁻¹, 七水硫酸镁 0.58 g L⁻¹, 一水硫酸锰 0.25 g L⁻¹。

3.2.4 实验仪器

实验所用的仪器设备见表 3.1。

表 3.1 实验仪器

Table 3.1 Experimental instruments

仪器名称	型号	生产厂家
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
洗衣机	XQS75-Y928	海尔公司
粉碎机	SF	上海科太粉碎设备厂
纤维测定仪	ANKOM220	美国 ANKOM 公司
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
磨浆机	DSX-32S	江苏启东市东盛化工机械厂
发酵罐	BIOTECH-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
HPLC	LC-20AT	日本岛津公司

注: HPLC (LC-20AT) 是反相色谱, 配备有 SPD-20A UV 检测器和 YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (日本东京维美希公司)。其它用到的一些仪器设备见表 2.3。

3.3 实验方法

3.3.1 预处理、生物脱毒及磨浆处理

玉米秸秆经自来水洗净后置烘箱中于 105 °C 烘干至恒重, 然后用粉碎机粗粉, 最后存于密封袋中备用。用纤维分析法检测玉米秸秆中纤维素和半纤维素含量分别为 36.18% 和 19.83%。

为了便于玉米秸秆的后期酶解和发酵, 本研究用实验室建立的干式稀酸预处理方法处理玉米秸秆。在烘干粉碎的玉米秸秆中加入一定浓度的稀硫酸, 固液比为 2/1 (w/w), 硫酸用量为 2.5 g/100 g 干物料, 搅拌混匀后装于塑料袋中, 18-25 °C 放置 12 h。在预处理过程中, 将 2,100 g 预浸后的玉米秸秆 (含 1,400 g 干物料和 700 g 稀硫酸) 倒入预处理反应器中, 同时开动反应器的螺带式搅拌浆, 最后将转速调整为 50 rpm。关闭所有的

放气阀，打开蒸汽阀，从而使蒸汽喷射到玉米秸秆上。在此期间，短暂开启放气阀释放反应器中的惰性气体。温度达到 175 °C 后保持 5 min。之后关闭蒸汽供应，打开放气阀快速释放反应器中的蒸汽，最后从反应器的底部放出玉米秸秆。

用两步酸碱法^[105, 106]测得预处理后的玉米秸秆纤维素和半纤维素含量分别为 40.60% 和 2.07%。

为了消除预处理过程产生的抑制物对发酵菌株的影响，本研究采用了实验室建立的固态生物脱毒方法^[74]。具体过程如下：预处理的玉米秸秆用 20% (w/w) 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液调节至 pH 5.5，之后将一支 *A. resinae* ZN1 的 PDA 固体斜面接种到约 200 g 玉米秸秆物料中，于 28 °C 静置培养 7 d 作为生物脱毒的种子。之后将该种子以 10% (w/w) 的接种量接种至经 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液处理的预处理玉米秸秆物料中，于 28 °C 培养 1、3、5、7、10 d，到指定时间后将其冻存于 -20 °C 待用。

与其它的在水解液中进行生物脱毒的方式不同，*A. resinae* ZN1 的生物脱毒是在固态培养的模式下进行，即将 *A. resinae* ZN1 直接接种在固态的预处理玉米秸秆上进行生物脱毒。因为氧的供应很充足，所以这种固态培养更适合丝状真菌 *A. resinae* ZN1 脱除预处理玉米秸秆中的抑制物。该脱毒方式不需耗能，也不产废水。

同时，为了强化纤维素酶的水解效率，将不同脱毒时间的玉米秸秆物料含水率调节至 70% 左右，用磨浆机进行磨浆处理，以减小物料粒径。

3.3.2 玉米秸秆的脱毒效果评价

通过测定预处理以及经过 *A. resinae* ZN1 脱毒的玉米秸秆物料中各类抑制物含量，以评价生物脱毒的效果。具体操作如下：用 200 mL 去离子水浸提 20 g 预处理或者脱毒的玉米秸秆，置于 500 mL 三角瓶中，40 °C，180 rpm 下震荡 2 h，以确保抑制物尽可能溶于水中。取样，10,000 rpm 离心 5 min，测定上清液中 6 种主要抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸、4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的浓度（本研究未测定甲酸的浓度）。

另外，通过福林酚法测定玉米秸秆物料中的可溶性总酚含量^[107]。具体操作如下：将约 400 mg 玉米秸秆物料加入 80 mL 95% 的甲醇中，置于 500 mL 三角瓶中，40 °C，100 rpm 振荡 12 h。取样，12,000 rpm 离心 5 min，取 500 μL 上清置于试管中（以 95% 甲醇为对照），再加入 1 mL 15% (v/v) 的福林酚 (FC) 试剂，漩涡振荡，最后加入 4 mL 1M Na_2CO_3 溶液，室温反应 2 h，在 765 nm 测定吸光值。配制没食子酸标样，在 765 nm 下测定吸光值，制作没食子酸的标准曲线。

3.3.3 *P. acidilactici* ZP26 利用玉米秸秆 SSF

种子液的培养：将 *P. acidilactici* ZP26 的 -80 °C 超低温甘油冻存管接种至 20 mL 简化 MRS 培养基，42 °C，150 rpm 培养 12 h 至对数期，再以 10% 的接种量转接至 200 mL 简化 MRS 培养基，培养 8 h 至对数期后期。

在装备有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行 SSF^[108]。固含量设定为 25% (w/w)，SSF 过程分为两个阶段，预糖化阶段和实际的同步糖化发酵阶段。用 15 FPU g^{-1} DM 的纤维素酶 Youtell #6 进行玉米秸秆的预糖化过程，条件为 50 °C，pH 4.8，150 rpm，6 h

之后将温度降到 45 °C，再加入营养盐和种子液，调节 pH 5.5，转速维持 150 rpm，同步糖化发酵过程开始。在整个同步糖化发酵过程中，流加 5 M NaOH 和 4 M H₂SO₄ 控制 pH。定期取样，10,000 rpm 离心 5 min，检测上清中葡萄糖和乳酸浓度。

工程改造菌株 *P. acidilactici* ZP26 利用预处理玉米秸秆 SSF 产乳酸，依据下列公式计算乳酸得率：

$$\text{乳酸得率} = \frac{[\text{Lac}]_f \times V_f - [\text{Lac}]_0 \times V_0}{f \times W_{\text{CS}} \times 1.111 \times 1.0} \times 100\%$$

该乳酸得率是基于玉米秸秆物料中纤维素转化生成乳酸的得率，其中 [Lac]_f 和 [Lac]₀ 分别代表发酵结束和开始时的乳酸浓度 (g L⁻¹)，V_f 和 V₀ 分别代表发酵结束和开始时的发酵体系体积 (L)，W_{CS} 代表发酵所用玉米秸秆物料的干重 (g)，f 则代表干的玉米秸秆物料中纤维素的含量 (g g⁻¹)，1.111 代表了纤维素转化生成葡萄糖的转换因子，1.0 代表基于葡萄糖生物转化生成乳酸的质量比计算的葡萄糖到乳酸的转换因子。

3.3.4 利用玉米秸秆水解液驯化 *P. acidilactici* ZP26

在装配有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中制备预处理玉米秸秆水解液。不同固含量的预处理玉米秸秆用 15 FPU g⁻¹ DM 的纤维素酶 Youtell #6 糖化 48 h，条件是 50 °C，pH 4.8。将得到的水解液于 10,000 rpm 离心 10 min，取上清，之后在 115 °C 高温蒸汽灭菌 20 min，灭菌后过滤。在该水解液中补足简化 MRS 培养基中除葡萄糖以外的营养盐，并调节 pH 6.25 (简化 MRS 的 pH)，待驯化过程用。

菌株的驯化：将 *P. acidilactici* ZP26 的 -80 °C 超低温甘油冻存管接种到 20 mL 简化 MRS 培养基，42 °C，150 rpm 培养 12 h，之后以 10% 的接种量转接至 20 mL 5% 固含量水解液，42 °C，150 rpm 培养 12 h，取样后 10,000 rpm 离心 5 min，测定细胞生长量 OD₆₀₀ 和上清中的葡萄糖和乳酸浓度。之后以同样的方法转接，培养 12 h 后同样取样测定 OD₆₀₀ 和发酵液中的葡萄糖和乳酸浓度。当菌株生长参数 OD₆₀₀、发酵产酸参数残糖浓度和乳酸浓度保持基本稳定 (一般至少 20 次转接培养)，即为驯化菌株。

驯化菌株与 *P. acidilactici* ZP26 的对比：将驯化菌株与 *P. acidilactici* ZP26 -80 °C 冻存的甘油管接种至 20 mL 简化 MRS 培养基中，42 °C，150 rpm 培养 12 h，以 10% 接种量分别转接至 20 mL 简化 MRS 培养基和 10% 固含量水解液 (测定葡萄糖和乳酸浓度的组别需要添加 CaCO₃ 控制 pH)，42 °C，150 rpm 培养，定期取样，10,000 rpm 离心 5 min，测定细胞生长量 OD₆₀₀ 和上清中的葡萄糖和乳酸浓度。

3.3.5 葡萄糖、乳酸以及抑制物的含量分析

所有样品通过 0.22 μm 滤膜过滤后分析测定各类物质的含量。

葡萄糖和乳酸的测定方法如 2.3.7，乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛的测定方法与之相同。用反相 HPLC (LC-20AT) 测定 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的浓度，柱温为 35 °C，检测器波长为 270 nm，采用梯度洗脱方法，流动相为 100% 的乙腈和 0.1% 的甲酸水溶液，流动相设置：0-4 min，乙腈和甲酸溶液浓度配比从 10% 增加到 35%；5-20 min，

乙腈和甲酸溶液浓度配比从 35% 降到 10%；20-30 min，乙腈和甲酸溶液浓度配比维持在 10%，流速 1 mL min^{-1} 。

3.4 结果与讨论

3.4.1 预处理玉米秸秆的脱毒效果评价

(1) 呋喃醛的降解

预处理玉米秸秆中呋喃醛类抑制物糠醛和 5-羟甲基糠醛分别源于戊糖和己糖的降解。图 3.1 显示了玉米秸秆中糠醛和 5-羟甲基糠醛在脱毒过程中的含量变化。未脱毒玉米秸秆中糠醛和 5-羟甲基糠醛的含量分别是 $3.82 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 和 $2.60 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 。随着 *A. resinae* ZN1 接入预处理玉米秸秆，物料中的糠醛先快速降解，脱毒 1 d 后糠醛降解 35.86%。而 5-羟甲基糠醛降解稍慢，脱毒 1 d 后 5-羟甲基糠醛只降解 13.08%。而且，脱毒 5 d 物料中糠醛和 5-羟甲基糠醛都降解完全。本实验室之前研究了 *A. resinae* ZN1 单独降解糠醛和 5-羟甲基糠醛的能力^[109]。研究发现，在有氧条件下糠醛和 5-羟甲基糠醛被转化生成相应的醇和酸，而且醇和酸会继续降解；在无氧条件下糠醛和 5-羟甲基糠醛只被转化为醇，而且醇不再被转化为酸。因此，玉米秸秆中的糠醛和 5-羟甲基糠醛是被 *A. resinae* ZN1 降解为低毒的醇和酸。

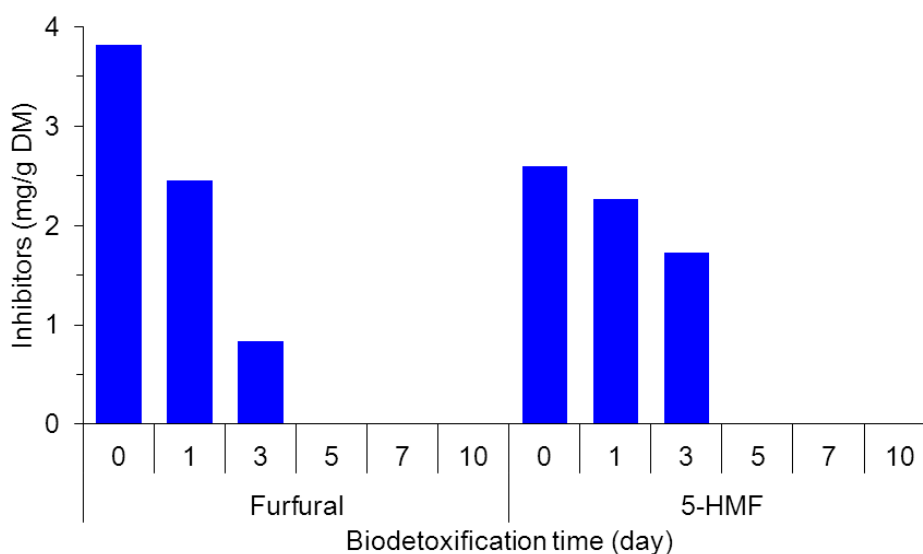


图 3.1 预处理玉米秸秆在脱毒过程中糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解

Fig. 3.1 The degradation of furfural and 5-HMF in the detoxification process of pretreated corn stover

(2) 乙酸的降解

半纤维素脱乙酰基过程中产生了乙酸，通常浓度很高^[51]。图 3.2 显示了玉米秸秆物料中乙酸在脱毒过程中的含量变化。预处理玉米秸秆物料中乙酸的含量很高，达到 $15.50 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 。脱毒 1 d 后含量基本不变，之后开始快速降解，在脱毒 5 d 的物料中已经检

测不到乙酸。

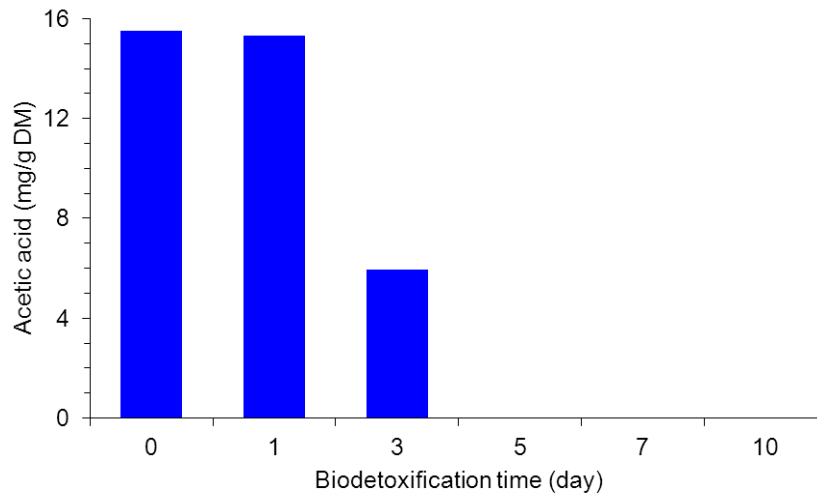


图 3.2 预处理玉米秸秆在脱毒过程中乙酸的降解

Fig. 3.2 The degradation of acetic acid in the detoxification process of pretreated corn stover

(3) 酚类的降解

酚类化合物是在木质素的降解过程中产生的。图 3.3 显示了玉米秸秆物料中几种酚醛在脱毒过程中的含量变化。

预处理后的玉米秸秆物料中 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的含量分别为 $0.49 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 、 $1.84 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 和 $3.01 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 。在脱毒过程中，4-羟基苯甲醛在脱毒 3 d 仍有 $0.23 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ ，之后其含量保持不变。然而，丁香醛和香草醛的含量在脱毒前 3 d 基本不变，仍有 $1.68 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 和 $3.07 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ 。脱毒 5 d 后，丁香醛和香草醛的降解加快，降解量分别达 36.41% 和 44.85%。随着脱毒时间的延长，丁香醛和香草醛继续降解。但是在脱毒 10 d 的玉米秸秆物料中，丁香醛和香草醛还没有降解完全。

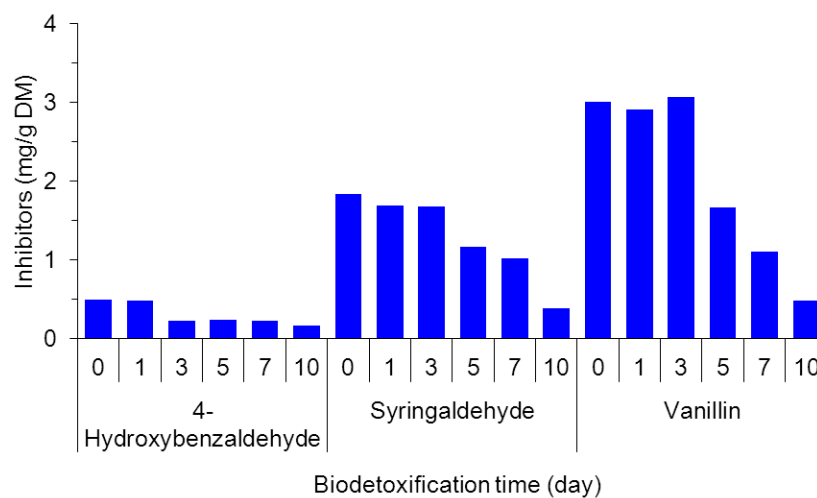


图 3.3 预处理玉米秸秆在脱毒过程中酚醛的降解

Fig. 3.3 The degradation of phenolic aldehyde in the detoxification process of pretreated corn stover

仅测定上述 3 种酚醛抑制物，并不能代表玉米秸秆物料中酚类抑制物的整体水平。因此，本研究还通过福林酚法测定了玉米秸秆物料中的可溶性总酚含量（见图 3.4）。未脱毒时玉米秸秆物料中总酚含量为 $36.93 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ ，随着脱毒过程的进行，总酚含量逐渐减少，脱毒 10 d 时总酚含量为 $29.99 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ ，降解量达到 18.79%。

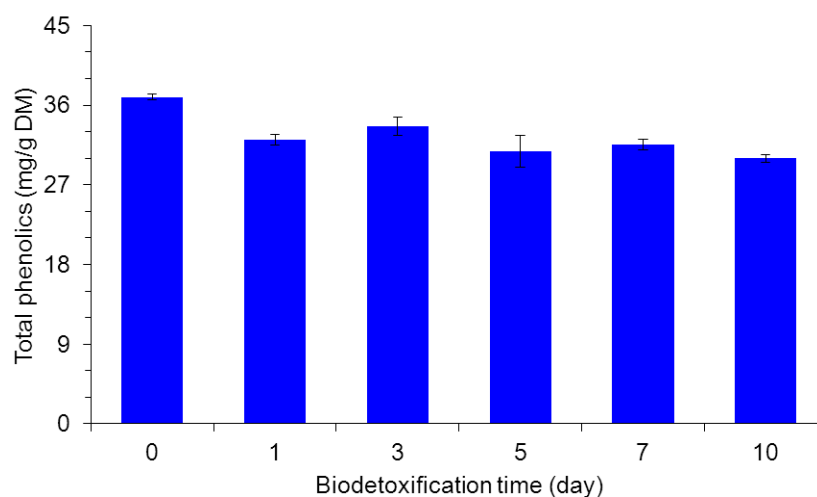


图 3.4 预处理玉米秸秆脱毒过程中总酚的降解

Fig. 3.4 The degradation of total phenolics in the detoxification process of pretreated corn stover

综上所述，预处理玉米秸秆中的 6 种抑制物含量不同，但都能够被 *A. resinae* ZN1 降解，然而它们发生降解的时间和程度不同。糠醛、5-羟甲基糠醛以及含量最高的乙酸在脱毒 5 d 时就降解完全。丁香醛和香草醛在脱毒 3 d 时含量仍基本不变，随着脱毒时间的延长降解加快，在脱毒 10 d 时仍有残余。4-羟基苯甲醛的含量最低，在脱毒前期有所减少，之后基本不再变化。另外，总酚含量随着脱毒时间的延长有所降低。

3.4.2 *P. acidilactici* ZP26 利用玉米秸秆进行 SSF

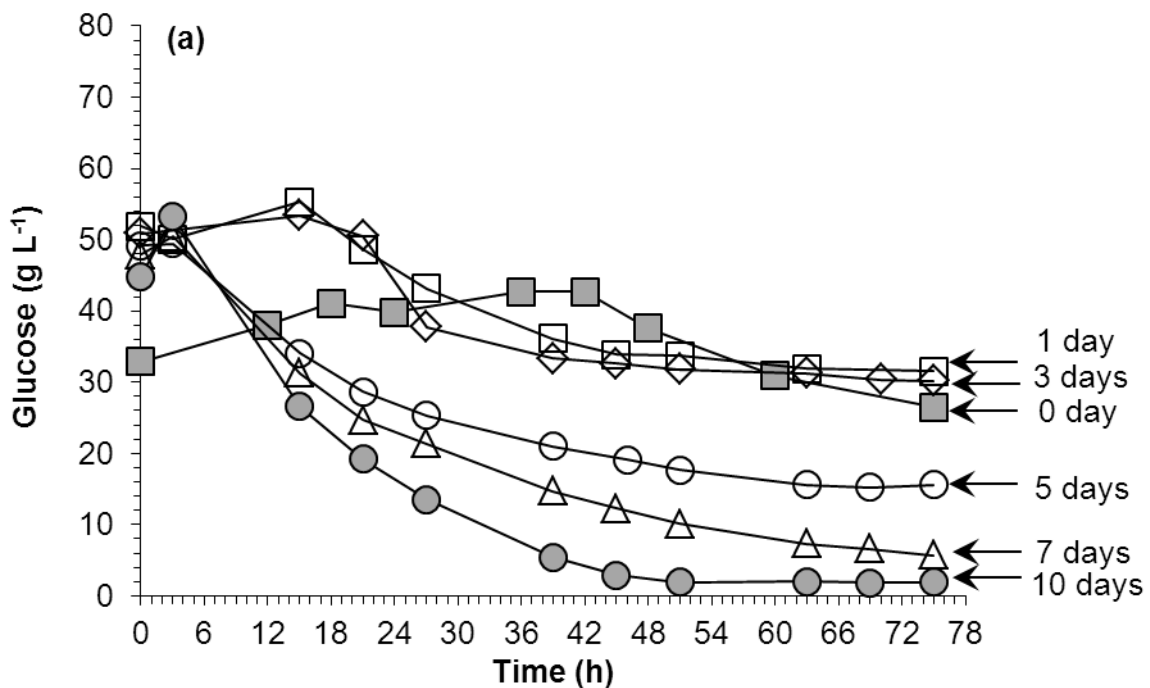
P. acidilactici ZP26 利用不同脱毒时间的预处理玉米秸秆 SSF 生产光学纯 D-乳酸，以此评价 *A. resinae* ZN1 的生物脱毒过程对乳酸发酵的影响。SSF 的结果见图 3.5，其中，图 a 显示了 SSF 过程中葡萄糖浓度的变化，图 b 则是 SSF 过程中 D-乳酸浓度的变化。

从图 3.5 可以看出，未脱毒的预处理玉米秸秆的 SSF，物料的酶解糖化效果较差，预糖化 6 h 时葡萄糖只有 32.85 g L^{-1} ，接入种子液后乳酸的生产也出现很长的停滞，SSF 36 h 后乳酸才开始积累，发酵 75 h 时仍有 26.49 g L^{-1} 残糖，D-乳酸的终浓度、产率和得率分别为 25.91 g L^{-1} 、 $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 17.53%。

利用脱毒 1 d 的预处理玉米秸秆进行 SSF 时，物料的糖化效果提高很多，预糖化 6 h 时葡萄糖浓度为 51.90 g L^{-1} 。乳酸生产的延滞期明显缩短，发酵 75 h 时虽仍有 31.51 g L^{-1} 残糖，D-乳酸的终浓度则提高很多，为 44.50 g L^{-1} ，相应的乳酸产率和得率分别为 $0.57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 33.13%。随着所用物料脱毒时间延长至 3 d、5 d、7 d 和 10 d，*P. acidilactici* ZP26

利用葡萄糖的速率加快，乳酸的生成也加快，最终的 D-乳酸浓度也逐渐提高。

P. acidilactici ZP26 利用脱毒 10 d 的物料 SSF 时，50 h 左右残糖已接近 0，D-乳酸的终浓度、产率和得率分别为 77.78 g L^{-1} 、 $1.02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 66.06%。目前为止，只有少数几个利用木质纤维素生物质生产光学纯 D-乳酸的例子，然而产生乳酸的量较少，产率和得率也较低。*L. coryniformis* subsp. *torquens* ATCC 25600 利用纤维素 SSF 时，最优条件下产生 D-乳酸的得率达到 0.89 g g^{-1} 纤维素，此时的乳酸产率达到 $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^[29]。该菌株利用未经处理的瓦楞纸板残渣进行 SSF，D-乳酸的浓度和产率分别为 12.1 g L^{-1} 和 $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ，仅有 44.2% 的聚糖转化成乳酸^[110]。而该菌株利用碱预处理的废旧纸板 SSF，D-乳酸的浓度和产率分别为 23.4 g L^{-1} 和 $0.48 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^[111]。同型乳酸发酵菌株 *L. delbrueckii* 利用纸浆进行 SHF 时能够得到 36.3 g L^{-1} 的 D-乳酸，产率为 $1.01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ，总得率为 0.38 g g^{-1} 。而通过 SSF 方式利用纸浆最高乳酸总得率为 0.48 g g^{-1} 。利用玉米秸秆 SHF 和 SSF 时，最高乳酸总得率分别是 0.41 g g^{-1} 和 0.58 g g^{-1} 。这里总得率指的是产生的乳酸与总的生物质的比值^[112]。



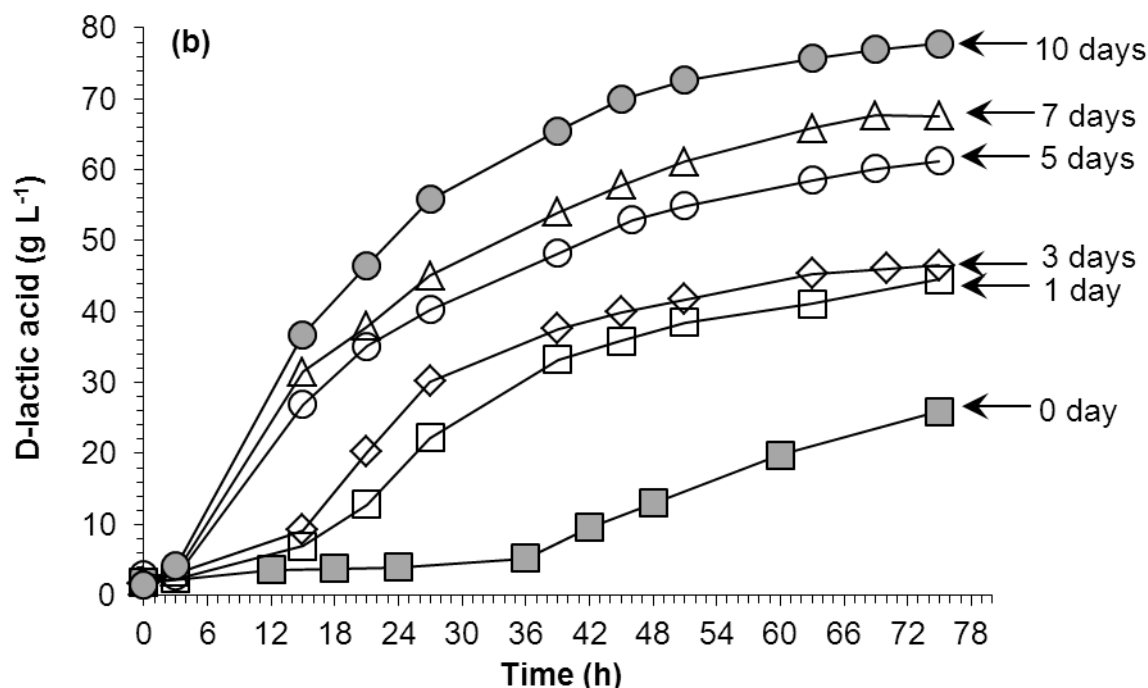


图 3.5 *P. acidilactici* ZP26 利用不同脱毒时间的预处理玉米秸秆同步糖化与发酵生产 D-乳酸

Fig. 3.5 SSF for D-lactic acid production by *P. acidilactici* ZP26 using the pretreated corn stover which detoxified different time

以上结果表明, *A. resinae* ZN1 的生物脱毒过程对于 *P. acidilactici* ZP26 利用玉米秸秆生产高浓度 D-乳酸来说很重要, 而且足够长的脱毒时间才能保证产生高浓度 D-乳酸。

综合 *P. acidilactici* ZP26 利用玉米秸秆 SSF 产乳酸的实验结果、3.4.1 部分的对不同脱毒时间玉米秸秆的脱毒评价和 2.4.6 部分的菌株抑制物耐受性进行分析。*P. acidilactici* ZP26 利用未脱毒的预处理玉米秸秆物料 SSF, 由于该物料中各类抑制物含量最高, 而不同抑制物之间可能存在协同效应^[67, 68], 因此导致菌株的发酵受到严重影响。同时需要注意的是由于糠醛含量高, 导致纤维素酶的糖化效果也很差。在菌株的抑制物耐受性实验中高浓度的糠醛和 5-羟甲基糠醛会抑制乳酸的发酵, 当预处理玉米秸秆物料脱毒 1 d、3 d 后, 糠醛和 5-羟甲基糠醛都逐渐降解, 导致对菌株的抑制作用减弱, 发酵产酸效果得到提升。在菌株的抑制物耐受性实验中低浓度的丁香醛和香草醛强烈抑制菌株的生长和产酸, 在脱毒 5 d 物料中, 糠醛和 5-羟甲基糠醛进一步降解完全, 丁香醛和香草醛加速降解 (分别降解 36.41%、44.85%), 对菌株的抑制作用进一步减弱, 发酵产酸增加。脱毒 5 d 后物料中已经不存在糠醛和 5-羟甲基糠醛。与脱毒 5 d 的玉米秸秆物料相比, 脱毒 7 d、10 d 的物料中丁香醛和香草醛的含量更低, 菌株受到的抑制作用更弱, 发酵产乳酸效果更好。

当然, 并不能排除其它因素引起乳酸发酵效果的提升, 有可能是预处理玉米秸秆在脱毒过程中其他一些抑制物的降解导致发酵产酸增加, 也可能是 *A. resinae* ZN1 在生物脱毒过程中产生的诸如氨基酸、维生素等生长因子促进了 *P. acidilactici* ZP26 发酵产酸。

3.4.3 利用玉米秸秆水解液驯化 *P. acidilactici* ZP26

由于 *P. acidilactici* ZP26 利用 25% 固体含量 (w/w) 未脱毒预处理玉米秸秆 SSF 产乳酸效果很差, 而利用生物脱毒的预处理玉米秸秆产乳酸效果有很大提升。除了这种生物脱毒方法, 本研究考虑尝试通过适应性进化的手段, 即驯化途径, 提高菌株利用预处理玉米秸秆产乳酸的能力。因此, 本研究将 *P. acidilactici* ZP26 在预处理玉米秸秆水解液中进行连续转接驯化。

本研究选择了 5% 固含量 (w/w) 的预处理玉米秸秆水解液驯化 *P. acidilactici* ZP26, 考虑到在 5% 固含量 (w/w) 水解液中菌株受到的抑制作用较弱, 生长和产酸不会受到很大影响。当菌株在更高固含量 ($\geq 10\%$) 水解液中连续转接培养几次后, 菌株的性能受到极大影响, 这可能是因为抑制物含量较高, 糖浓度也高。

图 3.6 是 *P. acidilactici* ZP26 在 5% 固含量 (w/w) 玉米秸秆水解液中连续转接培养的菌体生长、残糖和产酸情况。第一次转接培养 12 h 后, 菌株细胞生长量 OD_{600} 为 5.29, 葡萄糖浓度和乳酸浓度分别为 10.88 g L^{-1} 和 8.43 g L^{-1} 。第二次转接培养 12 h 后, OD_{600} 为 4.23, 葡萄糖浓度和乳酸浓度分别为 12.87 g L^{-1} 和 7.30 g L^{-1} , 菌株的生长和产酸受到的影响增大。之后随着转接次数增加至 19 次, OD_{600} 为 3.59, 葡萄糖浓度和乳酸浓度分别为 14.19 g L^{-1} 、 5.96 g L^{-1} , 菌株生长始终在变差, 葡萄糖消耗和产乳酸也减少。转接 20 次后菌株 OD_{600} 增加至 4.62, 葡萄糖浓度和乳酸浓度分别为 12.83 g L^{-1} 和 7.93 g L^{-1} , 菌株的生长和发酵能力开始提高。之后随着转接次数的增加, 菌株的细胞生长量 OD_{600} 逐渐增加, 葡萄糖消耗和产乳酸也不断增加, 转接 40 次后, OD_{600} 、葡萄糖浓度和乳酸浓度趋于稳定。将第 67 次的转接培养液稀释后涂布在 MRS 平板上, 取平板上长出的较大单克隆培养并进行超低温保存, 作为驯化菌株。

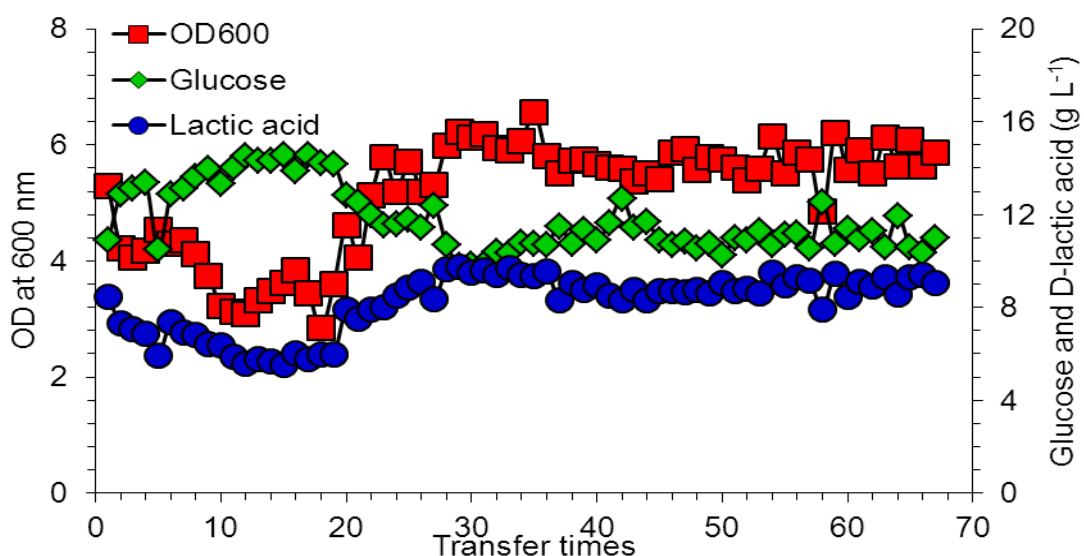


图 3.6 *P. acidilactici* ZP26 利用 5% 固含量预处理玉米秸秆水解液进行驯化

Fig. 3.6 Adaptive evolution of *P. acidilactici* ZP26 using 5% solids loading (w/w) pretreated corn stover hydrolysate

3.4.4 驯化菌株与 *P. acidilactici* ZP26 的发酵性能比较

比较驯化菌株和 *P. acidilactici* ZP26 在合成培养基和玉米秸秆水解液中的生长和发酵性能，以此评价 *P. acidilactici* ZP26 在玉米秸秆水解液中的驯化效果。

图 3.7 是 *P. acidilactici* ZP26 及其驯化菌株在简化 MRS 培养基中生长和发酵产乳酸的情况。结果表明，驯化菌株和 *P. acidilactici* ZP26 的生长基本同步，培养 24 h 后 OD₆₀₀ 分别为 6.82 和 6.39，葡萄糖消耗和乳酸生成也基本同步，培养 24 h 后乳酸浓度分别为 15.17 g L⁻¹、14.70 g L⁻¹。由此说明驯化菌株和 *P. acidilactici* ZP26 在合成培养基的生长和发酵性能相当，上述驯化方式并没有改变菌株在合成培养基的发酵性能。

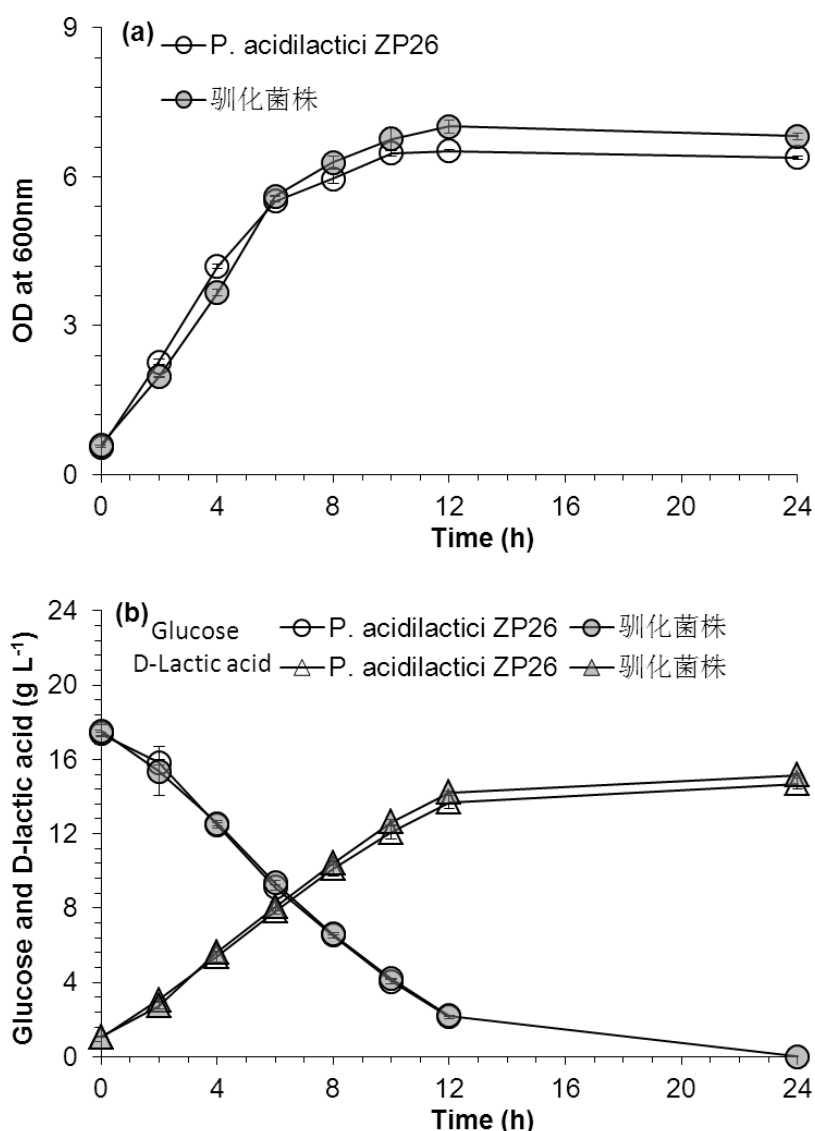


图 3.7 驯化菌株和 *P. acidilactici* ZP26 在简化 MRS 培养基中的发酵性能

Fig. 3.7 Fermentation performance of the adaptive strain and *P. acidilactici* ZP26 in the simplified MRS medium

本研究在 5% 固含量 (w/w) 玉米秸秆水解液中驯化工程菌株 *P. acidilactici* ZP26, 因此考虑用更高固含量的水解液来评价驯化的效果, 因此选择了 10% 固含量 (w/w) 玉米秸秆水解液。图 3.8 是 *P. acidilactici* ZP26 及其驯化菌株在 10% 固含量 (w/w) 玉米秸秆水解液的生长和产酸情况。结果表明, 驯化菌株在水解液中的生长始终优于 *P. acidilactici* ZP26, 培养 48 h 后驯化菌株和 *P. acidilactici* ZP26 的 OD₆₀₀ 分别为 5.78 和 4.31。驯化菌株在培养 48 h 时就没有残糖, 发酵结束时乳酸浓度为 27.81 g L⁻¹。 *P. acidilactici* ZP26 在培养 24 h 时葡萄糖浓度为 20.51 g L⁻¹, 之后葡萄糖基本不再消耗, 乳酸的生成情况与之类似, 发酵结束时乳酸浓度只有 15.72 g L⁻¹。

因此, 驯化菌株与 *P. acidilactici* ZP26 相比, 在 10% 固含量 (w/w) 预处理玉米秸秆水解液中生长和发酵性能要好很多, 说明这种在玉米秸秆水解液中进行连续转接培养的驯化方式能够提升 *P. acidilactici* ZP26 在水解液中的发酵性能。

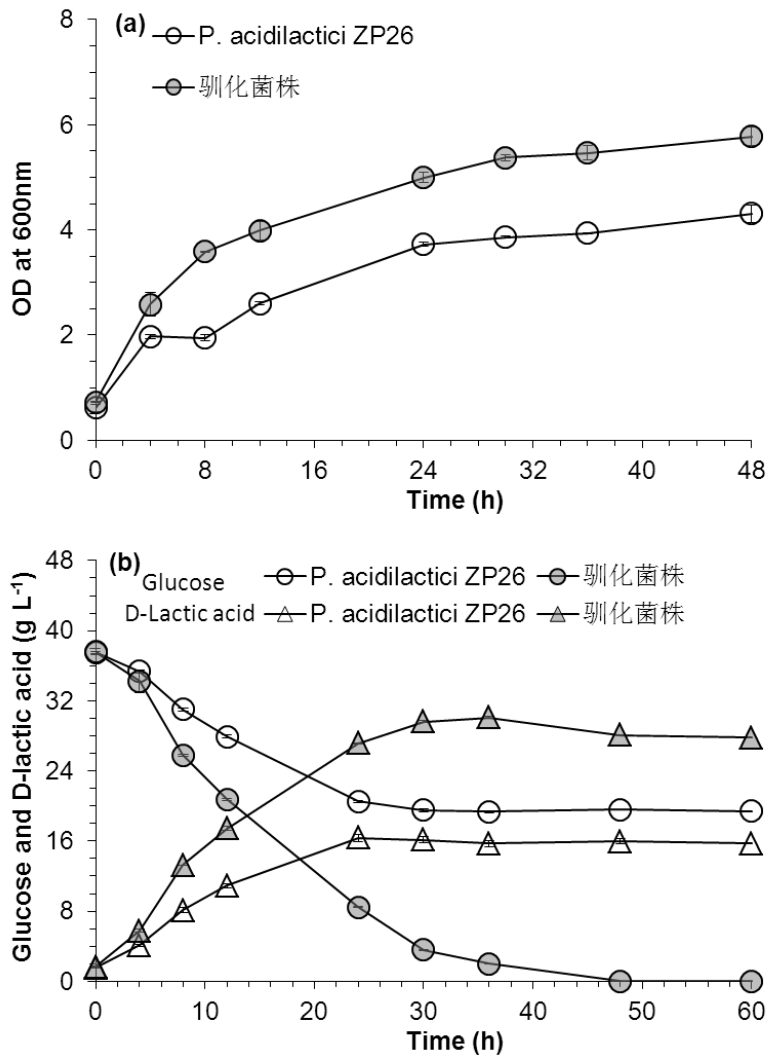


图 3.8 驯化菌株和 *P. acidilactici* ZP26 在 10% 固含量预处理玉米秸秆水解液中的发酵性能

Fig. 3.8 Fermentation performance of the adaptive strain and *P. acidilactici* ZP26 in 10% solids loading pretreated corn stover hydrolysate

3.5 本章小结

- (1) *P. acidilactici* ZP26 利用 25% 固含量 (w/w) 未脱毒预处理玉米秸秆 SSF 产 D-乳酸的效果很差, 乳酸浓度、产率和得率分别是 25.91 g L^{-1} 、 $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 17.53%。用 *A. resinae* ZN1 对预处理玉米秸秆物料进行生物脱毒。随着所用物料脱毒时间的延长, 菌株发酵产乳酸的效果逐渐提升。*P. acidilactici* ZP26 利用脱毒 10 d 的物料能够产生高浓度的光学纯 D-乳酸, 乳酸浓度、产率和得率分别为 77.78 g L^{-1} 、 $1.02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 66.06%。这说明 *A. resinae* ZN1 对预处理玉米秸秆物料进行生物脱毒是必要的, 而且, 只有保证足够长的脱毒时间, 才利于 *P. acidilactici* ZP26 发酵产生高浓度光学纯 D-乳酸。
- (2) *A. resinae* ZN1 对预处理玉米秸秆物料进行生物脱毒过程, 物料中不同抑制物在不同时间发生不同程度的降解, 这可能是导致 *P. acidilactici* ZP26 SSF 产乳酸效果随着脱毒时间的延长而提高的主要原因。当然, 也可能是因为 *A. resinae* ZN1 生长过程中释放的一些生长因子促进了 *P. acidilactici* ZP26 的发酵。
- (3) 通过在预处理玉米秸秆水解液中进行连续转接培养的驯化方式, 大大提高了 *P. acidilactici* ZP26 对预处理玉米秸秆体系的耐受性, 提升了菌株利用预处理玉米秸秆产乳酸的能力。

第 4 章 结论与展望

本研究利用热敏性敲除系统通过同源重组方法敲除了 *P. acidilactici* DQ2 的编码 L-乳酸脱氢酶的 *ldh* 基因, 通过工程改造的基因敲除突变株命名为 *P. acidilactici* ZP26。 *P. acidilactici* ZP26 能够利用葡萄糖产光学纯度为 99.32% 的 D-乳酸。 *ldh* 基因的敲除基本不影响菌株的生长, 但减慢了葡萄糖消耗速率和乳酸的产率, 对乳酸得率则基本没有影响。本研究还发现 *ldh* 和 *ldhD* 基因的敲除基本不影响菌株对抑制物的耐受性。

预处理玉米秸秆物料经过 *A. resinae* ZN1 生物脱毒, 对于 *P. acidilactici* ZP26 利用其产高浓度光学纯 D-乳酸非常必要, 而且只有保证足够长的脱毒时间才利于 *P. acidilactici* ZP26 发酵产高浓度乳酸。 *P. acidilactici* ZP26 利用 25% 固含量 (w/w) 脱毒 10 天的预处理玉米秸秆 SSF, 乳酸的终浓度、产率和得率分别达到 77.78 g L^{-1} 、 $1.02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 和 66.06%。预处理玉米秸秆物料中不同抑制物在不同脱毒时间发生不同程度的降解, 这可能是导致 *P. acidilactici* ZP26 发酵产酸效果提升的主要原因。

然而, 基因工程菌株 *P. acidilactici* ZP26 不能利用木糖产乳酸, 因为其缺乏木糖异构酶和木酮糖激酶。在玉米秸秆中, 木糖是除了葡萄糖外最主要的糖, 其是构成半纤维素的主要单糖。因此, 本课题后续的研究考虑异源表达木糖异构酶和木酮糖激酶, 实现菌株对木糖的利用, 以期得到更高产量的乳酸。

在预处理玉米秸秆水解液中连续转接培养 *P. acidilactici* ZP26, 可以显著提高菌株对预处理玉米秸秆体系的耐受性, 菌株利用其产乳酸的能力也得到提升。然而, 驯化菌株还未能利用高固体含量预处理玉米秸秆生产高浓度 D-乳酸。若利用高固体含量预处理玉米秸秆能够产生高浓度 D-乳酸, *A. resinae* ZN1 的生物脱毒过程就不再必要, 从而节约了成本。之后考虑在更高固体含量的玉米秸秆水解液中驯化菌株或者采用其它的方式提高菌株对高固体含量预处理玉米秸秆的耐受性。

参考文献

- [1] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*. 2008, 26(2): 100-108
- [2] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013, 31(6): 877-902
- [3] Tashiro Y, Kaneko W, Sun Y, Shibata K, Inokuma K, Zendo T, Sonomoto K. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89(6): 1741-1750
- [4] Papagianni M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2012, 3(4): 1-8
- [5] Auras RA, Lim LT, Selke SEM, Tsuji H. Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications. Wiley. 2010, DOI: 10.1002/9780470649848
- [6] Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, 101(22): 8493-8501
- [7] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 74(3): 524-534
- [8] Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85(3): 413-423
- [9] Spinu M, Jackson C, Keating MY, Gardner KH. Material design in poly (lactic acid) systems: block copolymers, star homo- and copolymers, and stereocomplexes. *Journal of Macromolecular Science*. 1996, 33(10): 1497-1530
- [10] Ikada Y, Jamshidi K, Tsuji H, Hyon SH. Stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactides). *Macromolecules*. 1987, 20(4): 904-906
- [11] Christopher LP, Kapatral V, Vaisvil B, Emel G, Deveaux LC. Draft genome sequence of a new homofermentative, lactic acid-producing *Enterococcus faecalis* isolate, CBRD01. *Genome Announcements*. 2014, 2(2): e00147-14
- [12] Pacheco A, Talaia G, Sá-Pessoa J, Bessa D, Gonçalves MJ, Moreira R, Paiva S, Casal M, Queirós O. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. *FEMS Yeast Research*. 2012, 12(3): 375-381
- [13] Åkerberg C, Zacchi G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic

acid from wheat flour. *Bioresource Technology*. 2000, 75(2): 119-126

[14] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 69(6): 627-642

[15] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2003, 30(5): 279-291

[16] Toledano A, García A, Mondragon I, Labidi J. Lignin separation and fractionation by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 2010, 71(1): 38-43

[17] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26(2-4): 87-107

[18] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Hanada K, Shibata K, Sonomoto K. Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(5): 1892-1895

[19] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Shibata K, Sonomoto K. Isolation and characterisation of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89(4): 1039-1049

[20] Okano K, Yoshida S, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Homo-D-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(15): 5175-5178

[21] Okano K, Yoshida S, Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Improved production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation genes and redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(24): 7858-7861

[22] Patel MA, Ou MS, Harbrucker R, Aldrich HC, Buszko ML, Ingram LO, Shanmugam KT. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(5): 3228-3235

[23] Tanaka K, Komiyama A, Sonomoto K, Ishizaki A, Hall SJ, Stanbury PF. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 60(1-2): 160-167

[24] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from

- lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011, 156(4): 286-301
- [25] Goffin P, Deghorain M, Mainardi JL, Tytgat I, Champomier-Vergès MC, Kleerebezem M, Hols P. Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187(19): 6750-6761
- [26] Laopaiboon P, Thani A, Leelavatcharamas V, Laopaiboon L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology*. 2010, 101(3): 1036-1043
- [27] Zhao B, Wang L, Li F, Hua D, Ma C, Ma Y, Xu P. Kinetics of D-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(16): 6499-6505
- [28] Zheng L, Bai Z, Xu T, He B. Glucokinase contributes to glucose phosphorylation in D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2012, 39(11): 1685-1692
- [29] Yáñez R, Moldes AB, Alonso JL, Parajó JC. Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnology Letters*. 2003, 25(14): 1161-1164
- [30] Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1983, 49(3): 209-224
- [31] Saitoh S, Ishida N, Onishi T, Tokuhiko K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(5): 2789-2792
- [32] Chang DE, Jung HC, Rhee JS, Pan JG. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(4): 1384-1389
- [33] Guo Y, Yan Q, Jiang Z, Teng C, Wang X. Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010, 37(11): 1137-1143
- [34] Adsul M, Khire J, Bastawde K, Gokhale D. Production of lactic acid from cellobiose and celotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(15): 5055-5057
- [35] de Vos WM, Kleerebezem M, Kuipers OP. Expression systems for industrial gram-positive bacteria with low guanine and cytosine content. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997, 8(5): 547-553
- [36] Kowalczyk M, Cocaign-Bousquet M, Loubiere P, Bardowski J. Identification and

- functional characterisation of cellobiose and lactose transport systems in *Lactococcus lactis* IL1403. *Archives of Microbiology*. 2008, 189(3): 187-196
- [37] Ohara H, Owaki M, Sonomoto K. Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, 101(5): 415-420
- [38] Dadi AP, Varanasi S, Schall CA. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, 95(5): 904-910
- [39] Ma H, Liu WW, Chen X, Wu YJ, Yu ZL. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource Technology*. 2009, 100(3): 1279-1284
- [40] Lloyd TA, Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1967-1977
- [41] Hsu TC, Guo GL, Chen WH, Hwang WS. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4907-4913
- [42] Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, Dudgeon D. 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. NREL: Golden, CO; 2011
- [43] van der Pol EC, Bakker RR, Baets P, Eggink G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(23): 9579-9593
- [44] Dong H, Bao J. Metabolism: biofuel via biodegradation. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6: 316-318
- [45] Linde M, Jakobsson EL, Galbe M, Zacchi G. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2008, 32(4): 326-332
- [46] Sassner P, Mårtensson CG, Galbe M, Zacchi G. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*. 2008, 99(1): 137-145
- [47] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488
- [48] Modenbach AA, Nokes SE. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—a review. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109(6): 1430-1442
- [49] He Y, Zhang L, Zhang J, Bao J. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7:

1

- [50] Luo C, Brink DL, Blanch HW. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 2002, 22(2): 125-138
- [51] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 25-33
- [52] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(4): 340-349
- [53] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, 24(3-4): 151-159
- [54] Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, Berhow MA, Kurtzman CP, Gorsich SW. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004, 31(8): 345-352
- [55] Quéneur M, Hamelin J, Barakat A, Steyer JP, Carrère H, Trably E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012, 37(4): 3150-3159
- [56] Modig T, Lidén G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 2002, 363: 769-776
- [57] Petersson A, Almeida JR, Modig T, Karhumaa K, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *ADH6* gene conveys HMF tolerance. *Yeast*. 2006, 23(6): 455-464
- [58] Miller EN, Jarboe LR, Turner PC, Pharkya P, Yomano LP, York SW, Nunn D, Shanmugam KT, Ingram LO. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanogenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(19): 6132-6141
- [59] Allen SA, Clark W, McCaffery JM, Cai Z, Lanctot A, Slininger PJ, Liu ZL, Gorsich SW. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 2
- [60] Axe DD, Bailey JE. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995, 47(1): 8-19
- [61] Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Effect of benzoic acid on metabolic

fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 1992, 8(7): 501-517

[62] Larsson S, Quintana-Sánchez A, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, 617-632

[63] Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 97(1): 104-113

[64] Zhang J, Geng A, Yao C, Lu Y, Li Q. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. *Bioresource Technology*. 2012, 121: 369-378

[65] Feron VJ, Til HP, de Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, van Bladeren PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1991, 259(3-4): 363-385

[66] Iwaki A, Ohnuki S, Suga Y, Izawa S, Ohya Y. Vanillin inhibits translation and induces messenger ribonucleoprotein (mRNP) granule formation in *Saccharomyces cerevisiae*: application and validation of high-content, image-based profiling. *PLoS One*. 2013, 8(4): e61748

[67] Oliva JM, Ballesteros I, Negro MJ, Manzanares P, Cabañas A, Ballesteros M. Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*. 2004, 20(3): 715-720

[68] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 53(6): 701-708

[69] Palmqvist E, Grage H, Meinander NQ, Hahn-Hägerdal B. 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

[70] Taherzadeh MJ, Niklasson C, Lidén G. Acetic acid—friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? *Chemical Engineering Science*. 1997, 52(15): 2653-2659

[71] Klinke HB, Olsson L, Thomsen AB, Ahring BK. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 81(6): 738-747

[72] Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance

- mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2: 26
- [73] Huang X, Wang Y, Liu W, Bao J. 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
- [74] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26
- [75] Liu W, Wang Y, Yu Z, Bao J. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 13-18
- [76] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, van Walsum GP, Dien BS, Iten LB. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 42(7): 624-630
- [77] López MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J, Bothast RJ. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(1): 125-131
- [78] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Szengyel Z, Zacchi G, Røezey K. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 20(4): 286-293
- [79] Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106(2): 128-133
- [80] Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, Ruijsenaars HJ. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*. 2010, 107(11): 4919-4924
- [81] Huang CF, Lin TH, Guo GL, Hwang WS. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. 2009, 100(17): 3914-3920
- [82] Koppram R, Albers E, Olsson L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5: 32
- [83] 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

- [84] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, Yoshimura K, Ishii J, Kondo A. 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: 2
- [85] Olson DG, McBride JE, Shaw AJ, Lynd LR. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23(3): 396-405
- [86] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, 6: 613-624
- [87] Bates EE, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Huckle J, Laurie JI, Mann SP. Expression of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55(8): 2095-2097
- [88] Rossi F, Rudella A, Marzotto M, Dellaglio F. Vector-free cloning of a bacterial endo-1,4- β -glucanase in *Lactobacillus plantarum* and its effect on the acidifying activity in silage: use of recombinant cellulolytic *Lactobacillus plantarum* as silage inoculant. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001, 80: 139-147
- [89] Moraš S, Shterzer N, Grinberg IR, Mathiesen G, Eijsink VG, Axelsson L, Lamed R, Bayer EA, Mizrahi I. Establishment of a simple *Lactobacillus plantarum* cell consortium for cellulase-xylanase synergistic interactions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(17): 5242-5249
- [90] Shinkawa S, Okano K, Yoshida S, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Improved homo L-lactic acid fermentation from xylose by abolishment of the phosphoketolase pathway and enhancement of the pentose phosphate pathway in genetically modified xylose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 91(6): 1537-1544
- [91] Wang L, Zhao B, Liu B, Yu B, Ma C, Su F, Hua D, Li Q, Ma Y, Xu P. Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. Strain. *Bioresource Technology*. 2010, 101(20): 7908-7915
- [92] Sasaki M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 81(4): 691-699
- [93] Taniguchi M, Tokunaga T, Horiuchi K, Hoshino K, Sakai K, Tanaka T. Production of L-lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 66(2): 160-165
- [94] Cui F, Li Y, Wan C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(2): 1831-1836

- [95] Kylä-Nikkilä K, Hujanen M, Leisola M, Palva A. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(9): 3835-3841
- [96] Zhao K, Qiao Q, Chu D, Gu H, Dao TH, Zhang J, Bao J. 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
- [97] 涂毅. 木质纤维素依赖型乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 中外源功能基因的表达以及基因敲除. 华东理工大学硕士学位论文. 2013
- [98] Saeman JF. Kinetics of wood saccharification-hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1945, 37(1): 43-52
- [99] Beck MJ. Factors affecting efficiency of biomass fermentation to ethanol. *Biotechnology & Bioengineering Symposium*. 1986, 17: 617-627
- [100] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 17-24
- [101] 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
- [102] 吕开宇, 仇焕广, 白军飞, 徐志刚. 中国玉米秸秆直接还田的现状与发展. *中国人口·资源与环境*. 2013, 23(3)
- [103] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. LAP-006. NREL: Golden, CO; 1996
- [104] Sharma S, Sandhu DK, Bagga PS. Physical characterization of isozymes of endo- β -1,4-glucanase and β -1,4-glucosidase from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 1991, 63: 99-104
- [105] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42618. NREL: Golden, CO; 2008
- [106] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42623. NREL: Golden, CO; 2008
- [107] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999, 299: 152-178
- [108] Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G, Bao J. Simultaneous saccharification and

ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4): 718-728

[109] Ran H, Zhang J, Gao Q, Lin Z, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 51

[110] Y áñez R, Alonso JL, Parajó JC. Study on the suitability of untreated corrugated cardboard for D-lactic acid production by SSF using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Afinidad*. 2005, 62(518): 295-301

[111] Y áñez R, Alonso JL, Parajó JC. D-Lactic acid production from waste cardboard. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2005, 80(1): 76-84

[112] Zhang Y, Vadlani PV. D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013, 36(12): 1897-1904

攻读硕士期间的研究成果

专利申请:

[1] 鲍杰, 张鹏, 涂毅, 高秋强, 张建. 一种基于同源重组的乳酸片球菌 DQ2 的无标记基因敲除方法. 申请号: 201510006121.1

致谢

在本论文的完成过程中，我收获颇多，不仅学到了一些作为生物专业研究人员所需的基本技能，更重要的是认识到在这个领域从业所需的科学精神和基本素养。

在这期间得到了很多人的帮助，首先要感谢的是我的指导老师叶勤教授和鲍杰教授。叶老师在研究生招生时选择了我，从而有幸进入生物反应器工程国家重点实验室，之后才有机会进入鲍老师的研究团队学习。在我课题方向的选择上，鲍老师就给了我很高的自由度，因此有幸可以涉及从上游菌株的改造到下游的发酵工程研究。在课题研究过程中，鲍老师鼓励我做科研要有自己的想法。而对于遇到的问题，鲍老师都会给予及时指导，并提出非常好的意见，因此在这三年中课题研究才会比较顺利。在与鲍老师的接触中我看到了作为一个生物研究者的严谨和细致，同时也认识到自己的不足，仍然需要不断努力。在这里我要衷心地感谢他，祝愿鲍老师以及家人幸福安康，在学术上有更大的突破。

感谢实验室的高秋强老师和张建老师。高老师在我的课题研究中付出了很多的心血，提出了很多宝贵的意见。张老师在实验中也经常给予关心以及提示，在生活上也给予帮助。祝愿他们以及他们的家人幸福快乐，在科研上有更好的研究发表。

感谢涂毅师兄在我刚进入实验室时教会我基本的实验操作和技能。万丈高楼平地起，如果没有掌握这些基本的技术，我的实验研究是开展不起来的。衷心祝愿他工作顺利，生活顺心。

特别要感谢实验十八楼 1301 室这个小集体，他们给予我家的温暖，让我得以在异乡度过这充实的三年。易老师在实验和生活中都给予我很多帮助，从她身上学到了很多，工作时的较真和努力，为人处事的智慧和哲学。感谢王霞和安瑞鑫，与其称她们为师姐，可能同伴这个词更恰当，每当我在课题或者生活上有不顺心的时候，她们都会和我沟通并开导我。从罗子臣师兄身上我学到了为人的豁达。感谢邱忠洋和高小创在生活中的陪伴和实验中的帮助，有他们在生活中多了很多乐趣。

还要感谢何燕青、顾翰琦师兄，张宏森、雷成、刘克、刘刚、孙娇娥以及其他的师弟师妹们在实验生活中给予我的帮助，谢谢他们陪我度过了令人难忘的研究生生涯。

最后要感谢我的父母，是他们的支持和培养让我能够在外地安心读书，丰富自己的人生，他们让我明白父母永远是儿女最坚实的后盾。在踏入社会之际，我会努力尽到一个儿子的责任，做他们的后盾和依靠。

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共

页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____