

学校代码：10251

学 号：Y30161126

# 華東理工大學

## 碩 士 学 位 论 文

论文题目：木质纤维素生物质中 B 族维生素  
的微生物提取及其发酵应用

学科专业：发酵工程

研究方向：生物炼制

论文作者：李莉

指导教师：鲍杰 教授

定稿日期：2019 年 04 月 09 日

分类号: TQ466.2 密级: \_\_\_\_\_

UDC: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学

## 学位论文

木质纤维素生物质中 B 族维生素  
的微生物提取及其发酵应用

李莉

指导教师姓名: 鲍杰 教授

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2019.04.09 论文答辩日期: 2019.05.22

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: 储 炬 教授

评 阅 人: 高旻天 教授

洪 枫 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\_\_\_\_\_①\_\_\_\_\_（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ①  可以公开
- ②  3年后公开
- ③  10年后公开
- ④  不公开

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

学位论文作者签名： 李莉

指导教师签名： 鲍杰

2019年 05 月 25 日

2019年 05 月 25 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： 李莉

2019年 05 月 25 日



## 木质纤维素生物质中 B 族维生素的微生物提取及其发酵应用

## 摘要

木质纤维素生物炼制研究长期关注的重点在于克服预处理、脱毒、糖化与发酵等工艺过程的技术障碍，鲜有关注于木质纤维素中存在的丰富 B 族维生素及其有效利用。在生物炼制加工链中提取 B 族维生素可以提高产品附加值，实现木质纤维素生物物质的高值化利用。另一方面，充分利用秸秆水解液中的 B 族维生素，促进纤维素底物的生物基化学品发酵，同时减少外源维生素的添加，大幅降低发酵成本，展现与淀粉底物发酵过程相比的优越性。

本文第一部分研究了木质纤维素生物物质中生物素的微生物提取及其在谷氨酸发酵中的应用。木质纤维素生物物质中含有较高浓度的生物素，可以在干法生物炼制过程得到有效的保留。以含有极高生物素的玉米叶水解液（179.2  $\mu\text{g/L}$ ）为底物，比较不同的生物素缺陷菌株的生物素富集能力，发现 *Corynebacterium glutamicum* 具备最强的生物素富集能力；之后通过对编码生物素转运蛋白的基因簇 *bioYMN* 的质粒表达和基因组整合，得到一株对生物素具有快速吸收能力的工程菌株 *C. glutamicum* S9114-pH36mob-*bioYMN*。以该重组菌株作为微生物提取的工作菌株，收集得到的细胞提取物生物素含量为 303.8 mg/kg，大幅度高于酵母提取物（YE, ~2 mg/kg）、糖蜜（~1 mg/kg）和玉米浆（CSL, ~0.75 mg/kg）等商业用营养添加剂。该生物素营养添加剂应用于谷氨酸发酵，可以完全取代纯生物素和 CSL。这是首次从木质纤维素原料中提取生物素并应用于谷氨酸发酵的研究。

本文第二部分研究了木质纤维素生物物质原料中 B 族维生素对 L-乳酸发酵的促进。维生素是许多发酵的重要营养物质，*Pediococcus acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸生产的关键 B 族维生素是 VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub>。在利用玉米秸秆水解液中应含有的丰富 B 族维生素基础上，在补加少量 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 至玉米秸秆水解液中后，L-乳酸得率和发酵速率进一步提高。本研究的木质纤维素生物物质中 B 族维生素利用为生物炼制工艺中发酵效率的提高提供了新的解决方案。

综上所述，本文实现了木质纤维素生物物质中 B 族维生素的微生物提取及其对生物基化学品发酵的促进（谷氨酸、L-乳酸），确定了一条利用微生物转运途径从生物物质原料中提取并生产类似于酵母提取物（YE）、玉米浆（CSL）等含有极高生物素营养添加剂的新工艺，从而促进了生物炼制工艺中的发酵效率。

**关键词：**木质纤维素生物物质；B 族维生素；生物素转运蛋白 BioYMN；谷氨酸；L-乳酸

## Microbial Extraction of Vitamins B from Lignocellulosic Biomass and Their Fermentation Applications

### Abstract

The long-term focus of lignocellulosic biorefinery is on overcoming the technical barriers in the process, such as pretreatment, detoxification, saccharification and fermentation and so on. Few studies concerned the high content of vitamins B in lignocellulosic biomass and their effective utilization. On one hand, the extraction of vitamins B during the biorefinery chain can improve the added value of the product and further achieve the high utilization of lignocellulosic biomass. On the other hand, the full applications of vitamins B in the straw hydrolysate not only promote the fermentation of bio-based chemicals based on the cellulose as substrate, but also reduce the addition of exogenous vitamins. The fact greatly reduces the fermentation cost and exhibits superiority compared with the fermentation process of the starch substrate.

The first part of thesis studied the microbial extraction of biotin from lignocellulosic biomass and its application in glutamic acid fermentation. High content of biotin in lignocellulosic biomass could be reserved during the dry biorefinery process. Compared with different biotin auxotrophic strains, *Corynebacterium glutamicum* S9114 was found to have the strongest ability of biotin accumulation and could effectively extract biotin from corn leaves hydrolysate (179.2  $\mu\text{g/L}$  biotin). Subsequently, a recombinant strain *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) having a rapid absorption ability to biotin was obtained by plasmid expression and genome integration of the gene cluster *bioYMN* encoding biotin transporter. *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) was as the starting strain to extract biotin from the corn leaves hydrolysate and cells were harvested. The content of intracellular biotin was about 303.8 mg/kg, which was much higher than commercial fermentation nutrient additives, such as yeast extract (YE,  $\sim 2$  mg/kg), molasses ( $\sim 1$  mg/kg) and corn steep liquor (CSL,  $\sim 0.75$  mg/kg). The biotin nutrient additives were successfully applied in glutamic acid fermentation to replace pure biotin and CSL. This was the first report on microbial extraction of biotin from lignocellulose feedstocks and production of nutrient additives with extremely high biotin content from biorefinery plants.

In the second part of thesis studied the vitamins B in lignocellulose biomass facilitating cellulosic L-lactic acid fermentation. Vitamins B are important nutrients for many microbial fermentations. Vitamins B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, and B<sub>5</sub> were the key vitamins in L-lactic acid production using the bacterium *Pediococcus acidilactici* ZY271. The vitamins B in the corn stover hydrolysate

partly fulfilled the vitamins B requirements of *P. acidilactici* ZY271 in L-lactic acid production. Therefore, supplementation of the specific vitamins B (such as VB<sub>3</sub> and VB<sub>5</sub>) into corn stover hydrolysate led to the further increase of cellulosic L-lactic acid productivity. This study provided a new solution for enhancement of biorefinery fermentation efficiency by utilization of vitamin B compounds in lignocellulose biomass.

In conclusion, this study achieved the microbial extraction of vitamins B in lignocellulosic biomass and their promotion in bio-based chemicals fermentation (glutamic acid, L-lactic acid). A new process for extracting and producing nutrient additives similar to YE, CSL was found and utilization of vitamins B in lignocellulose biomass provided a new solution for enhancement of biorefinery fermentation efficiency.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass; vitamins B; biotin transporter BioYMN; glutamic acid; L-lactic acid

## 目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制.....	1
1.1.1 预处理.....	1
1.1.2 脱毒.....	3
1.1.3 糖化和发酵.....	3
1.2 B 族维生素概述.....	4
1.2.1 B 族维生素性质及功能.....	4
1.2.2 B 族维生素的检测.....	6
1.2.3 B 族维生素对生物基化学品发酵的促进.....	6
1.2.4 B 族维生素在干法生物炼制工艺中的保留.....	7
1.3 微生物对生物素的吸收机制.....	8
1.4 微生物生产谷氨酸概述.....	9
1.4.1 谷氨酸的结构和性质.....	9
1.4.2 谷氨酸生产.....	9
1.4.3 生物素对谷氨酸发酵的影响.....	10
1.5 乳酸概述.....	10
1.5.1 乳酸的结构和性质.....	11
1.5.2 乳酸发酵菌株.....	11
1.5.3 乳酸的应用.....	12
1.5.4 营养素对纤维素乳酸生产的影响.....	12
1.6 本文立题依据和主要研究内容.....	13
第 2 章 玉米叶中生物素的提取及在谷氨酸发酵中的应用.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 材料与方法.....	16
2.2.1 菌株、质粒及引物.....	16
2.2.2 培养基、培养条件.....	16
2.2.3 原料、酶和试剂.....	20
2.2.4 工程菌株的构建.....	20
2.2.5 适应性驯化.....	25
2.2.6 干法生物炼制工艺.....	25
2.2.7 生物素提取和生物素提取物的制备.....	26
2.2.8 谷氨酸发酵.....	26

2.2.9 生物素的检测 .....	27
2.2.10 分析方法 .....	27
2.3 结果与讨论 .....	27
2.3.1 玉米秸秆不同部位的生物素含量 .....	27
2.3.2 生物素提取菌株的选择 .....	29
2.3.3 工程菌株对生物素的吸收能力 .....	30
2.3.4 生物素提取工艺的放大 .....	32
2.3.5 生物素提取物的制备 .....	35
2.3.6 生物素提取物的进一步验证 .....	35
2.3.7 生物素提取物在谷氨酸生产中的实用性 .....	37
2.4 本章小结 .....	39
第 3 章 木质纤维素生物质中 B 族维生素在 L-乳酸发酵中的促进 .....	41
3.1 引言 .....	41
3.2 材料与方法 .....	41
3.2.1 原料、酶和试剂 .....	41
3.2.2 菌株、培养基 .....	42
3.2.3 干法生物炼制工艺 .....	42
3.2.4 <i>P. acidilactici</i> ZY271 种子液培养 .....	43
3.2.5 B 族维生素对 L-乳酸发酵的影响 .....	43
3.2.6 样品、发酵产物和细胞生长分析检测 .....	43
3.3 结果与讨论 .....	43
3.3.1 乳酸菌进行乳酸发酵过程中对 B 族维生素的需求 .....	43
3.3.2 玉米秸秆水解液中 B 族维生素对 L-乳酸发酵的影响 .....	45
3.3.3 15% CSH 中外源添加特定的 B 族维生素促进纤维素 L-乳酸的生产 .....	46
3.4 本章小结 .....	48
第 4 章 结论与展望 .....	49
4.1 结论 .....	49
4.2 展望 .....	50
附录 I 仪器设备 .....	65
硕士期间取得成果 .....	66
致谢 .....	67



## 第1章 文献综述

化石燃料是当前的主要能源，随着人口密度的不断增长、全球经济的发展以及不可再生的化石燃料的急剧消耗，不但使得这些资源日益匮乏，而且随之带来各种环境问题，如环境污染和温室效应等。这些因素亟待人类发掘新的可持续可再生能源。近年来，木质纤维素生物质是已知的可以满足人类低能耗及化学品高需求的可再生资源<sup>[1]</sup>。

### 1.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素三种聚合物组成，也含有少量的灰分、乙酰基、矿物质、无机化合物和蛋白质等组分（图 1.1）<sup>[2,3]</sup>。纤维素和半纤维素通过氢键和共价键连接，彼此相互缠绕，并被木质素紧密包裹，形成复杂顽抗的非均匀三维结构。纤维素是由  $\beta$ -1,4-糖苷键将 D-葡萄糖亚基连接而成的同多糖，分子内/间氢键使得纤维素的结构极为致密，是植物细胞壁的主要结构组分<sup>[4]</sup>。与纤维素不同，半纤维素是由木聚糖、葡甘露聚糖、阿拉伯木聚糖以及半乳甘露聚糖等几种杂聚糖形成的不规则结构，这些杂聚糖主要由戊糖（木糖和阿拉伯糖）、己糖（甘露糖、葡萄糖和半乳糖）及乙酰化糖亚基组成<sup>[3]</sup>。木质素是由松柏醇、p-香豆醇和芥子醇三种酚类单体构成的一类芳香族化合物<sup>[5]</sup>，这几种酚类单体主要由紫丁香基、愈创木基和对羟苯基亚基组成<sup>[6]</sup>，为植物组织和个体纤维提供抗性，使细胞壁具有刚性。表 1.1 所示，不同种类、来源的木质纤维素生物质中的各组分有所差异<sup>[7]</sup>，一般纤维素约 30-50%，半纤维素约 20-40%，木质素约 15-25%<sup>[8,9]</sup>。

NREL（National Renewable Energy Laboratory）将生物炼制定义为：生物炼制工艺是结合了生物质转化过程以及设备工艺来进行燃料、能源和生物基化学品等的生产工艺。由于原料和工艺的差异，生物炼制可以分为以下 4 种类型<sup>[10]</sup>：（1）木质纤维素生物炼制，通过含有纤维素的生物质进行的生物炼制过程；（2）全作物炼制，利用农作物进行的生物炼制过程；（3）绿色炼制，利用草、绿色植物和绿色作物等天然含水原料生产多种产品的过程；（4）热化学生物炼制，通过热化学方法将生物质进行转化，再由生物方法将其转化为各种生物基化学品。木质纤维素生物炼制主要包括：预处理、生物脱毒、酶水解糖化和发酵。

#### 1.1.1 预处理

生物质中纤维素、半纤维素和木质素之间构成致密结构和顽抗性，阻碍了纤维素和半纤维素的降解，难以实现生物质的转化利用。而预处理过程对改变生物质颗粒、结构和化学组成至关重要，是木质纤维素生物炼制过程的关键步骤<sup>[11,12]</sup>，可使生物质能够易于向可发酵性单糖进行转化。高效的预处理技术具有以下特点<sup>[13]</sup>：（1）降低生物质颗粒；（2）降低不利于微生物生长的抑制物；（3）能耗低；（4）催化剂使用成本低；（5）操作成本低。

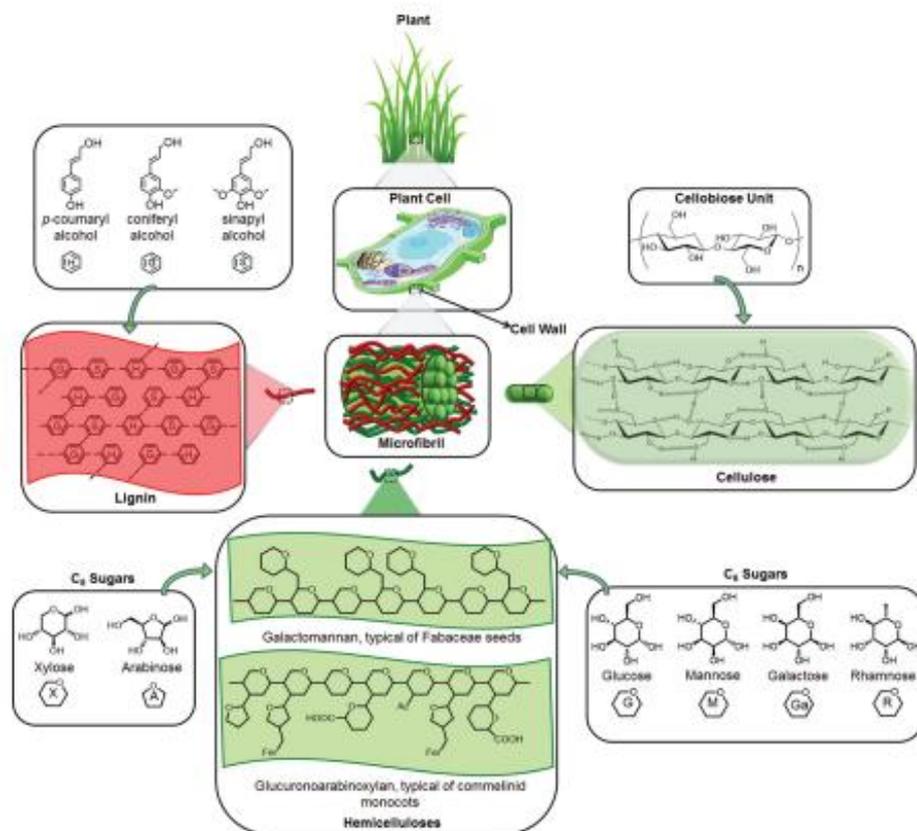
图 1.1 木质纤维素生物质的结构和组分<sup>[3]</sup>

Fig. 1.1 Main structure and components of lignocellulose biomass

表 1.1 木质纤维素生物质的种类和组分 (%) <sup>[7]</sup>

Table 1.1 Species and components (%) of lignocellulose biomass

Biomass	Celulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Switchgrass	5-20	30-50	10-40
Miscanthus	38-40	18-24	24-25
General grasses	25-40	25-50	10-30
Municipal solid waste	33-49	9-16	10-14
Newspapers	40-55	25-40	18-30
Corn cob	42-45	35-39	14-15
Corn stover	38-40	24-26	7-19
Sugarcane bagasse	42-48	19-25	20-42
Rice straw	28-36	23-28	12-14
Wheat straw	33-38	26-32	17-19
Barley straw	31-45	27-38	14-19
Sweet sorghum bagasse	34-45	18-27	14-21
Oat straw	31-37	27-38	16-19
Rye straw	33-35	27-30	16-19
Rice husk	25-35	18-21	26-31
Softwood	27-30	35-40	25-30
Hardwood	20-25	45-50	20-25

过去几十年,人们已经开发了多种预处理方式,常用的方法主要有物理法(机械破碎、微波处理、超声波处理和高能电子辐射法等)、化学法(酸预处理、碱预处理等)、物理化学法(蒸汽爆破预处理和氨纤维爆破(AFEX)预处理等)、生物预处理和结合预处理等<sup>[14]</sup>。其中,酸预处理方式是使木质纤维素原料得到高糖得率的主要预处理方式<sup>[15]</sup>。

本课题组于 2011 年研发了一种新型生物炼制技术-干式稀酸预处理技术<sup>[16]</sup>。对是传统的稀酸预处理进行改进,将未经过水洗的木质纤维素生物质在螺带式搅拌桨的反应器中实现了物料、稀酸与蒸汽的高度混合,将预处理物料的液固比由传统稀酸预处理的 6:1~10:1 降低至 1:2,预处理后的物料固含量可达 60% (w/w),降低了对反应器的腐蚀,整个预处理过程无废水产生,且预处理后产生了各种抑制物,有利于物料的长期高密度储存。同时,半纤维素得到高效转化,得到的木糖能够稳定存在于预处理后物料中,基本无损失。

### 1.1.2 脱毒

尽管预处理过程能够有效破坏木质纤维素之间的紧密结构,提高了纤维素酶对木质纤维素的酶解效率。但是,高强度的预处理往往会使纤维素、半纤维素和木质素进一步降解从而产生三大类抑制物<sup>[17,18]</sup>: 呋喃衍生物(5-羟甲基糠醛(5-HMF)和糠醛)、弱酸类(乙酸、乙酰丙酸和甲酸)和酚类化合物(香草醛和丁香醛等)。由于生物质的种类和预处理方式的不同,抑制物的成分和浓度有所区别<sup>[19]</sup>。

这些抑制物会抑制糖化过程的酶活及后续发酵过程微生物的生长和生产,因此,这些抑制物的高效脱除是木质纤维素生物质得以进一步利用转化的必要步骤,此过程为脱毒。传统的脱毒方式有物理法(水洗和活性炭吸附等)、化学法(离子交换和过碱中和等)和生物法(生物降解和酶催化等)三种<sup>[19-21]</sup>。与物理和化学法相比,具备低耗能、条件温和以及降解高效等优势微生物对抑制物的脱除方式更加绿色和经济,越来越备受关注。

本课题组在预处理后的生物质物料中筛选出一株能够高效优先降解抑制物的生物脱毒菌株,树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1<sup>[22]</sup>。脱毒过程中无需添加任何新鲜水和营养物质,只需要通气,无废水产生。由于脱毒过程优先利用呋喃醛等抑制物,然后利用物料中的葡萄糖、木糖等可发酵性糖,因此,只需合理控制脱毒时间,就可实现抑制物的高效脱除,并保留大量的可发酵性单糖。

### 1.1.3 糖化和发酵

在微生物利用木质纤维素进行发酵生产之前,需要将经过预处理和生物脱毒后的物料进行水解糖化,将纤维素和半纤维素进一步降解为大量可发酵性单糖,然后被微生物利用并转化为燃料及各种生物基化学品。糖化过程有化学法和酶催化两种方式,与化学催化相比,酶水解方式得率更高,能够避免单糖的过度降解。

利用木质纤维素生产燃料及各种生物基化学品的发酵方式主要有两种:分步糖化与发酵(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)和同步糖化与发酵(Simultaneous

Saccharification and Fermentation, SSF)。SHF 是将糖化与发酵分开进行, 首先将预处理和生物脱毒后的物料通过纤维素酶水解, 得到含有大量可发酵性单糖的糖化液, 然后向其中接入微生物进行发酵, 优势在于糖化与发酵均可在最优条件下进行<sup>[23]</sup>, 但是不足之处在于, 糖化阶段产生大量单糖如葡萄糖, 高糖对纤维素酶具有反馈抑制作用, 对微生物产生底物抑制作用, 这不仅降低酶解效率, 而且减弱了微生物的发酵性能<sup>[24,25]</sup>。SSF 是将糖化与发酵工艺结合, 在纤维素酶的催化下木质纤维素原料降解为可发酵性单糖供微生物发酵利用, 实现边糖化边发酵的同步进行。SSF 的实现需要考虑多种因素, 如最适温度、pH 等, 优势是糖化与发酵在同一个生物反应器中进行, 极大地降低了生产成本, 避免高糖浓度对纤维素酶的抑制和对菌体生长生产的不利影响, 缩短发酵周期<sup>[26]</sup>, 但是, 木质纤维素糖化工段和微生物发酵工段的最优条件需要进行不断调整, 使其达到最佳的发酵水平<sup>[29]</sup>。

## 1.2 B 族维生素概述

### 1.2.1 B 族维生素性质及功能

B 族维生素包括硫胺素 (thiamine, VB<sub>1</sub>)、核黄素 (riboflavin, VB<sub>2</sub>)、烟酸 (nicotinic acid, VB<sub>3</sub>)、泛酸 (pantothenic acid, VB<sub>5</sub>)、吡哆醇 (pyridoxine, VB<sub>6</sub>)、生物素 (biotin, VB<sub>7</sub>)、叶酸 (folic acid, VB<sub>9</sub>)、氰钴胺素 (cyanocobalamin, VB<sub>12</sub>) 和肌醇, 它们均是水溶性维生素, 是生物机体内参与各种生化反应、物质代谢的辅酶<sup>[27-29]</sup>。B 族维生素由生物活性相似但化学成分不同的化合物组成, 可以以自由形式存在。它们在动物和部分微生物中无法合成, 因此必须从外界获得, 一般植物体内可以合成各种维生素。生物机体对维生素的需求不高, 但却是必不可少的。

硫胺素又称 VB<sub>1</sub>, 在生物体内可作为硫胺素焦磷酸 (TPP) 的辅酶, 易氧化, 具有酸稳定性, 广泛存在于酵母、胚芽、瘦肉、肝脏、蔬菜、即食谷物等<sup>[30,31]</sup>。生物机体中游离的硫胺素浓度很低, 许多细菌、真菌和植物可以合成硫胺素<sup>[32,33]</sup>。

核黄素又称 VB<sub>2</sub>, 黄色的晶体结构, 具有酸稳定性、可耐热, 在生物机体中以黄素单核苷酸 (FMN) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 的形式存在, 作为一些氧化还原酶的辅酶, 参与体内很多氧化还原反应。并且与蛋白部分结合, 在许多细胞中游离态的存在形式很低。核黄素广泛存在于动植物中, 在牛奶、水果、蔬菜等也有较高含量, 植物和许多微生物在体内可以合成。目前, 核黄素主要通过革兰氏阳性菌 *Bacillus subtilis* 和半球菌 *Ashbya gossypii* 的微生物发酵生产<sup>[34]</sup>。

烟酸又称 VB<sub>3</sub>, 属吡啶维生素, 物理性质稳定, 是生物体中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>, 辅酶 I) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP<sup>+</sup>, 辅酶 II) 的前体, 参与各种酶促氧化还原反应<sup>[35]</sup>。烟酸在自然界广泛存在, 其中, 酵母、花生、豆类、谷类、动物肝脏、肉类、茶叶和咖啡中的含量更高<sup>[35,36]</sup>, 在新陈代谢、DNA 修复以及神经系统中发挥重要作用。

泛酸又称 VB<sub>5</sub>，是分布广泛的有机酸，是 CoA 和磷酸泛酰巯基乙胺的组成成分。其中，CoA 是细胞中泛酸的主要辅酶形式<sup>[37]</sup>。目前，仅发现了泛酸的 d-异构体，且大多数都是与 CoA 的结合形式存在，游离形式很少<sup>[38]</sup>。在酵母、小麦、花生、米糠、豌豆、蛋、肝中的含量丰富，尤其是蜂王浆中。泛酸是糖类、脂肪等转变成能量必不可少的物质。

吡哆醇又称 VB<sub>6</sub>，在生物体内的存在形式是磷酸酯，磷酸吡哆醛（PLP）和磷酸吡哆胺是它的活性形式，作为氨基酸代谢、脂肪酸代谢中多种酶的主要辅酶<sup>[39-41]</sup>。细菌、真菌和植物中可以合成吡哆醇，而包括人类在内的大多数动物对吡哆醇的需求来源于饮食，因为他们无法合成这种重要的微量营养素，其中，蔬菜、谷物、豆类、坚果、葵花籽、蘑菇等含量丰富<sup>[42,43]</sup>。目前，吡哆醇主要通过化学合成方式生产，广泛应用于食品和制药工业<sup>[44-46]</sup>。

生物素又称 VB<sub>7</sub>、维生素 H 或 CoR<sup>[47]</sup>，是一种单羧酸，较好的水溶性、醇溶性物质，不溶于亲脂性有机溶剂<sup>[48]</sup>。生物素具有优良的热稳定性，但易被碱和过氧化物等破坏<sup>[47,48]</sup>。生物素的八种异构体中只有天然存在的 d-生物素具有生物活性<sup>[47,49]</sup>。生物素以游离形式存在于细胞质中作为植物细胞的储备池或以结合形式存在于细胞器中作为多种酶促羧化反应的辅酶，在糖异生、氨基酸代谢和脂肪酸合成中发挥重要作用<sup>[27,50,51]</sup>。生物素的主要来源是蛋制品、酵母、肝脏、肾脏和花生<sup>[47-51]</sup>，在各种农作物生物物质、水果中也有发现，如小麦、玉米、马铃薯、甜菜、甘蔗糖蜜和葡萄等<sup>[52,53]</sup>。目前，商业用生物素主要通过化学合成方式生产，微生物合成生产生物素的方式仍在继续努力<sup>[54,55]</sup>，可应用于化妆品、生物基化学品生产（如谷氨酸、赖氨酸等）。

叶酸又称 VB<sub>9</sub>，黄色晶体，酸碱可溶，不溶于有机溶剂，对酸、光和温度敏感，四氢叶酸是叶酸的辅酶（CoF）形式。细菌、真菌和植物体内可以合成叶酸，而包括人类在内的大多数动物对叶酸的需求来源于饮食或肠胃微生物，因为他们自身无法合成叶酸。目前叶酸主要通过自然界和化学合成<sup>[56]</sup>。叶酸是生物体许多生化反应的重要物质，主要以离子的形式存在，促进细胞增殖、脑功能调节物质的合成，也被用作靶向治疗和诊断的重要载体。

氰钴胺素又称 VB<sub>12</sub>，是一种钴胺素化合物，水溶性、醇溶性物质，在生物体内有 2 种辅酶形式，主要的辅酶形式是 5'-脱氧腺苷钴胺素，另一种辅酶形式是甲基钴胺素。氰钴胺素主要由某些细菌和古细菌合成，但在植物和动物中无法合成，因此，氰钴胺素合成细菌（包括古细菌）是食物中氰钴胺素的来源<sup>[57]</sup>。而细菌（包括古细菌）合成的氰钴胺素主要积累在食物链中较高捕食性生物的体内，所以动物源性的食物是氰钴胺素的主要来源，如肉类、牛奶、蛋制品、鱼类等<sup>[58]</sup>。氰钴胺素的工业大规模生产方式主要通过微生物发酵进行<sup>[59]</sup>。

肌醇又叫环己六醇，分子式与葡萄糖类似，天然存在许多异构体，广泛存在于自然界，水果和豆类中含量丰富。

### 1.2.2 B 族维生素的检测

B 族维生素是生物机体维持生命活动必需的营养物质,在各种代谢中发挥重要作用。因此,一种简单、快速、有效的定量检测这些组分的方法是相当重要的。

目前,水溶性 B 族维生素的检测方法主要有微生物检测、色谱技术、毛细管酶反应、电化学分析法、酶联免疫吸附检测以及生物传感器<sup>[60]</sup>。虽然色谱技术是检测维生素的理想选择,但其提取方法长和维生素对光的敏感性,结果难以准确可靠。

B 族维生素的微生物检测原理是基于微生物的正常生长对特定 B 族维生素的需求<sup>[61-63]</sup>。微生物对 B 族维生素的活性产生生物反应,对天然和合成的 B 族维生素的检测均适用,国际官方机构认为此法是高效检测 B 族维生素的黄金标准。

本研究中检测 VB<sub>7</sub> 采用的是 VitaFast Kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany),即通过检测生物素营养缺陷型菌株 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 在不同生物素含量下的细胞生长来检测生物素,符合国际标准<sup>[60]</sup>。

生物素以外的其他几种 B 族维生素的检测是在上海动物植物和食品检验检疫技术中心 (<http://spzx.shciq.gov.cn/>) 进行,其检测方法主要基于标准方法,方差系数 (CV) <10%。VB<sub>1</sub> 含量的检测基于荧光分析方法<sup>[63]</sup>,VB<sub>2</sub> 和 VB<sub>9</sub> 含量的检测基于对核黄素和叶酸需求的 *L. casei* ATCC 7469 的细胞生长<sup>[64-66]</sup>,VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 含量的检测基于对烟酸和泛酸需求的营养缺陷型菌株 *L. plantarum* ATCC 8014 的细胞生长<sup>[66,67]</sup>,VB<sub>6</sub> 含量的检测基于对吡哆醇依赖性的菌株 *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 的细胞生长<sup>[68]</sup>,VB<sub>12</sub> 含量的检测基于对钴胺素依赖性的菌株 *L. leichmannii* ATCC 7830 的细胞生长<sup>[66,69]</sup>。

### 1.2.3 B 族维生素对生物基化学品发酵的促进

目前,诸多生物基化学品的工业生产过程采用糖质原料,而菌体生长生产所需的氨基酸、无机盐、多肽等营养物质通常由 YE、蛋白胨、CSL 和糖蜜等营养素提供,这些营养素除了提供糖质原料中缺乏的以上营养成分之外,还提供菌体对某些生长因子 (B 族维生素) 的需求。

酵母细胞<sup>[70]</sup>对几种 B 族维生素都有较高的需求,如肌醇、泛酸、生物素以及硫胺素,它们对菌体的生长和发酵相当有益。泛酸<sup>[71]</sup>是乙酰-CoA 的一部分,参与许多生化反应,促进脂质合成,因此提高酵母对乙醇的耐受性。生物素也是许多酶的辅因子,这些酶参与氨基酸代谢、糖代谢、脂肪酸合成和能量代谢过程等,生物素的吸收与储存对维持酵母细胞的生长和乙醇生产有利<sup>[70,2,73]</sup>。肌醇<sup>[74]</sup>也是酵母细胞生长和生产所必需的生长因子,能够提高菌体细胞的生存能力以及对乙醇的耐受性。Svetlana Nikolic 等<sup>[75]</sup>发现添加一定浓度的泛酸钙、生物素以及肌醇促进了细胞生长和乙醇浓度的提高。Tomas Brandberg 等<sup>[76]</sup>在发酵体系中补加 7.5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 20 mg/L 生物素后使乙醇生产速率维持在一个较高的水平,生产速率提高了 20 倍。Katarzyna Kotarska 等<sup>[77]</sup>发现在以糖蜜为碳源进行高浓度乙醇发酵过程中,泛酸钙和硫胺素的添加降低了产物的氧化。

Ruiz-Barba 等<sup>[78]</sup>研究发现 *L. plantarum* 是吡哆醇、烟酸和对氨基苯甲酸营养缺陷型菌株。Sunhoon Kwon 等<sup>[79]</sup>以 *L. rhamnosus* 为出发菌株,研究了生物素、吡哆醇、对氨

基苯甲酸、烟酸、硫胺素、泛酸及核黄素等生长因子对乳酸发酵的影响,发现这几种生长因子对乳酸发酵均有促进作用,并且发现泛酸是乳酸发酵最重要的成分,而生物素对乳酸发酵的影响较小。Li 等<sup>[80]</sup>发现生物素、硫胺素能够促进 *L. delbrueckii* 的生长,提高了乳酸的产量。Qiu 等<sup>[81]</sup>以 *L. paracase* 为发酵菌株,发现发酵体系中生物素的添加使乳酸产量提高了 42.77%,糖酵解和同源乳酸发酵途径均得到加强。

Ke-Quan Chen 等<sup>[82]</sup>以 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 为发酵菌株,葡萄糖液为碳源,发酵体系中添加的 150  $\mu\text{g/L}$  生物素对琥珀酸发酵具有显著的促进效果。谷氨酸发酵生产<sup>[83-85]</sup>过程中,生物素的主要作用是作为乙酰-CoA 的辅酶,它能够影响磷脂的合成,从而促进谷氨酸生产菌细胞膜的通透性,同时也影响菌体的代谢途径。因此,发酵初始需要“亚适量”的生物素浓度(2~5  $\mu\text{g/L}$ ),既有利于菌体生长,也能有效促进谷氨酸的分泌<sup>[85]</sup>。此外,生物素也广泛应用于赖氨酸<sup>[86,87]</sup>、精氨酸<sup>[88]</sup>、琥珀酸<sup>[89]</sup>等生物基化学品生产中。

目前,工业生产中的生物素需求通常来自 CSL、糖蜜等生物素添加剂或纯生物素的添加。李等<sup>[90]</sup>测定了各种工业用生物素营养素中的生物素含量,其中,工业级淀粉糖化液中的生物素浓度约 1.246  $\mu\text{g/L}$ ,工业级 CSL 中的生物素浓度约 248.18  $\mu\text{g/L}$ ,工业级糖蜜中的生物素浓度约 1,790.53  $\mu\text{g/L}$ 。

木质纤维素原料中维生素等营养成分目前鲜有研究,本研究主要在于木质纤维素生物质中丰富的 B 族维生素的提取及在生物基化学品中的应用。利用廉价的生物质进行各种生物基化学品的生产,一定程度上减少了工业中玉米浆及糖蜜的添加,同时降低了生产成本。

#### 1.2.4 B 族维生素在干法生物炼制工艺中的保留

由 1.1 所述,本课题组自主研发的干法生物炼制技术包括干酸预处理、固态生物脱毒、高固含量酶解糖化和微生物发酵四个工段。Wen 等<sup>[53]</sup>等利用玉米秸秆水解液进行谷氨酸发酵生产中发现,经过干法生物炼制技术加工的生物质原料中仍保留有高浓度的生物素,其抑制了谷氨酸的分泌,并统计了其他 B 族维生素在生物炼制链中的保留情况。

除了玉米秸秆,其他生物质原料如稻草、麦秆、甘蔗渣和芦苇中也含有相当高浓度的生物素。玉米秸秆中的生物素在经过水洗后,由于其极好的水溶性,损失过半。经过干式稀酸预处理后,生物素含量几乎与预处理前的生物素含量一致,基本得到保留。由于玉米叶质体中需要更多的生物素作为乙酰-CoA 羧化酶在脂肪酸合成中的辅因子,玉米叶中的生物素含量显著高于玉米秸秆。除了生物素以外,生物质原料中还含有其他 B 族维生素,由于 B 族维生素极好的水溶性对生物质原料的水洗过程会损失大量的维生素,硫胺素、核黄素、烟酸、泛酸、吡哆醇、叶酸和钴胺素的损失率分别为 67%、48%、38%、22%、44%、8%和 14%。考虑到各种 B 族维生素的物理化学性质及代谢功能,高温高压的干式稀酸预处理过程使得硫胺素和核黄素的结合态形式打开,烟酸、泛酸、吡哆醇和叶酸显著降低。固态生物脱毒和水解均是比较温和的物理过程,对 B 族维生素基本无影响。

Han 等<sup>[91]</sup>尝试使用不经过水洗除尘的木质纤维素生物质, 直接进行干法生物炼制加工, 通过快速调节预处理过程的酸用量, 实现了预处理效率的稳定性, 并且保留了大量的水溶性物质。干法生物炼制技术在生物质加工过程的零废水排放, 得到了高维生素浓度的木质纤维素水解液, 为本研究奠定了基础。

除了耐酸耐高温的生物素, 其他几种 B 族维生素在干酸预处理过程均有不同程度的损失, 但是得到保留的相应维生素依旧可以对微生物的生长代谢以及产品发酵发挥积极作用。充分利用木质纤维素生物质中的 B 族维生素, 将对木质纤维素生物炼制糖平台的产业化产生巨大的积极作用

### 1.3 微生物对生物素的吸收机制

生物素以游离形式存在于细胞质中作为植物细胞的储备池或以结合形式存在于细胞器中作为多种酶促羧化反应的辅酶, 在糖异生、氨基酸代谢和脂肪酸合成中发挥重要作用<sup>[27,50,51]</sup>。1949 年 Goldberg 和 Sternbach<sup>[92]</sup>开发了生物素的化学合成法, 1967 年 Del Campillo-Campbell A 等<sup>[93]</sup>以 *Escherichia coli* K-12 为生产菌株, 提出并开发了生物素的生物合成途径。目前, 由于生物素生物合成途径缺乏有效的方法, 生物素的生产依赖于化学合成途径<sup>[94]</sup>, 每年全球在饲料、食品和药品等行业对生物素的需求量达到数百吨<sup>[95]</sup>。

哺乳动物无法合成生物素, 却能有效地从环境中吸收生物素, 尽管许多细菌、古细菌和植物都能够吸收和合成生物素, 但从环境中摄取维生素可以将更多的能量提供到自身的生长生产上。

Lichstein 等<sup>[96,97]</sup>研究发现在外源葡萄糖条件下, *L. arabinosus* 通过活性转运体积累生物素于细胞内。Waller 等<sup>[98,99]</sup>研究了生物素在 *L. plantarum* 中的转运和积累。Rogers 等<sup>[100]</sup>和 Kosugi<sup>[101]</sup>等发现 *S. cerevisiae* 对生物素的吸收特性等。Schneider 等<sup>[102]</sup>首次研究了 *C. glutamicum* 对生物素的吸收特性以及转运机制。大多数细胞在对生物素的需求过程中已经进化出了特异性的转运蛋白, 以促进生物素进入细胞, 即使它们具有必要的生物合成途径。

钠依赖性多种维生素转运蛋白和单羧酸转运蛋白 1 参与哺乳动物细胞对生物素的摄取<sup>[103]</sup>。生物素营养缺陷型 *S. cerevisiae* 和 *Schizosaccharomyces pombe* 对生物素的吸收依赖于质子同向转运蛋白<sup>[104]</sup>。Entcheva 等<sup>[105]</sup>发现 *bioM* 和 *bioN* 的突变导致 *Sinorhizobium meliloti* 对生物素吸收减少, 而这两个基因的产物与原核钴转运蛋白中的两个组分 CbiO 和 CbiQ 具有相似性, 因此提出 *bioMN* 可编码生物素转运蛋白。比较基因组分析表明, *S. meliloti* 中与 *bioMN* 相邻的 *bioY* 更可能编码该转运蛋白。*BioY* 基因广泛存在于细菌和古细菌基因组中, 只有少数 *bioY* 基因与 *bioMN* 相关<sup>[106]</sup>。Guille n-Navarro 等<sup>[107]</sup>表明, *Rhizobium etli* 中 *bioY* 和 *bioM* 的突变导致其对生物素吸收的减少。

这种转运蛋白由基因 *bioM*、*bioN* 和 *bioY* 基因组成的基因簇 *bioYMN* 编码而构成生物素转运系统<sup>[102]</sup>。*BioYMN* 蛋白在原核生物中构成三联生物素转运蛋白, *BioMN* 与原核生物中介导金属、氨基酸和维生素吸收相关的转运模块相似, 而基因组背景分析发

现, 只有三分之一的 *bioY* 与 *bioMN* 相关联, 这构成了一种广泛存在的能量耦合因子 (energy-coupling factor, ECF) 转运蛋白式生物素转运系统<sup>[108]</sup>。ECF 转运蛋白构成一种特殊功能的 ATP 结合盒, 它们由底物特异性跨膜蛋白 (S 亚基, BioY)、含 ATP 结合盒的 ATP 酶 (A 亚基, BioM) 和有利于复合物组装的稳定保守又普遍存在的跨膜蛋白 (T 亚基, BioN) 组成<sup>[95,109]</sup>。动力学分析结果, BioY 为高通量转运蛋白, 在 BioMN 存在下转化为高亲和力的生物素转运系统, 并且证明这种高亲和力转运对功能性 ATP 酶具有依赖性。BioM、BioN 和 BioY 蛋白在异源宿主中形成稳定的复合物, 促进生物体从外界吸收生物素满足自身需求。

## 1.4 微生物生产谷氨酸概述

### 1.4.1 谷氨酸的结构和性质

谷氨酸 (Glutamic acid, 谷氨酸), 又称  $\alpha$ -氨基戊二酸, 是酸性氨基酸, 分子式为  $C_5H_9NO_4$ , 相对分子量 147.13, 结构式如图 1.2。

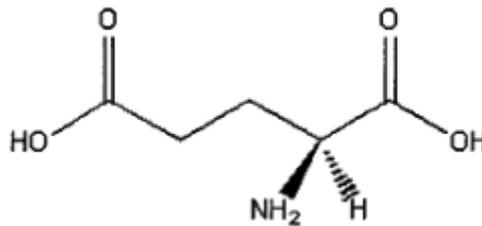


图 1.2 谷氨酸结构式

Fig. 1.2 Structural formula of glutamic acid

谷氨酸是无色结晶体, 相对密度为 1.538 (20°C), 熔点是 202~203°C。其分子内含有 1 个碱性氨基和 2 个酸性羧基, 是两性电解物质, 等电点为 3.22, 溶解度对温度和 pH 敏感<sup>[110]</sup>。由于酸碱性离子的存在, 谷氨酸的化学性质比较活泼, 可以发生多种反应, 包括成盐、脱羧、茚三酮等反应, 还可生成谷氨酸盐酸盐<sup>[110]</sup>。谷氨酸分子中的不对称碳原子使得谷氨酸具有三种异构体: 左旋、右旋和外消旋。

### 1.4.2 谷氨酸生产

1866 年德国 H.Ritthausen 在小麦面筋水解时分离得到一种酸性氨基酸, 命名为谷氨酸<sup>[111]</sup>; 1908 年日本 Kikunae Ikeda 在研究海带鲜味时提取出谷氨酸; 1910 年日本的味之素企业采用面筋水解生产谷氨酸; 1954 年日本多田和中山成功采用微生物发酵生产谷氨酸。

1956 年日本木下祝郎首次分离得到一株微生物菌株, 后来命名为谷氨酸生产菌<sup>[112-114]</sup>, 是革兰氏阳性菌, 兼性厌氧, 非致病性土壤细菌<sup>[115]</sup>, 广泛用于 L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-苯丙氨酸<sup>[116]</sup>、L-苏氨酸<sup>[117]</sup>、L-色氨酸<sup>[118]</sup>, 丝氨酸、精氨酸<sup>[119]</sup>等氨基酸的生产, 同时其工程菌株也用于生产多种生物基化学品、燃料等<sup>[120]</sup>。

目前, 谷氨酸广泛应用于食品、制药和其他工业, 年生产规模约  $3 \times 10^6$  t<sup>[53]</sup>, 且谷氨酸的需求每年以约 6% 的速率增长。我国的氨基酸生产始于 1922 年, 主要是通过酸水解面筋生产味精 (谷氨酸钠); 1965 年通过微生物发酵法成功生产味精。此后, 味精的生产基本采用淀粉质或糖蜜进行工业发酵, 极大地降低了生产成本, 糖酸转化率约 60%, 已逐步接近国际领先水平。

#### 1.4.3 生物素对谷氨酸发酵的影响

谷氨酸分泌的关键在于, 微生物在发酵期间其细胞膜在结构和功能上会发生特异性的变化, 使细胞膜变成有利于谷氨酸向细胞膜外通透的状态, 实现谷氨酸积累型细胞的转变。谷氨酸的生产菌株主要有 *Corynebacterium*、*Nocardia*、*Brevibacterium*、*Arthrobacter* 等<sup>[121]</sup>, 以糖质原料作为碳源的菌株均为生物素缺陷型菌株, 以生物素为生长因子。

很多研究报道了 *C. glutamicum* 的谷氨酸分泌机制<sup>[122,123]</sup>。*C. glutamicum* 在正常状态下无法分泌谷氨酸, 主要是由于细胞膜的磷脂含量限制了谷氨酸的分泌。目前, 主要通过生物素限制<sup>[84]</sup>、添加吐温 40<sup>[124]</sup>和添加青霉素<sup>[125]</sup>等方式诱导菌体生产谷氨酸。

生物素作为生长因子, 是生物机体必不可少的营养物质, 是参与多种羧化反应的辅因子<sup>[27]</sup>。在谷氨酸发酵中, 生物素的作用是作为磷脂合成途径中乙酰-CoA 羧化酶的辅酶, 破坏细胞结构, 促进 *C. glutamicum* 细胞膜的通透性, 影响菌体的代谢<sup>[84,126,127]</sup>。由于合成谷氨酸所需的生物素浓度低于菌体生长对生物素的需求, 因此必须控制生物素浓度, 即生物素“亚适量” (2~5  $\mu\text{g/L}$ ) 水平。如果生物素过量, 则菌体大量生长, 阻碍谷氨酸的分泌; 如果生物素不足, 则谷氨酸生产菌的细胞生长受限, 从而影响谷氨酸的生产 and 分泌。

谷氨酸发酵过程中, 外源生物素的添加通常有两种方式: (1) 直接添加化学合成的纯生物素; (2) 添加具有高生物素含量的营养添加剂, 如 CSL、糖蜜和 YE。CSL 和糖蜜是农作物的副产物, 被精制并广泛用于发酵工业, YE 通常用于实验室规模的发酵, 其中的生物素主要来自谷物, 因为酵母无生物素合成途径, 是生物素缺陷型菌株, 只能从环境中吸收生物素<sup>[27]</sup>。

本研究中的谷氨酸发酵对生物素的需求来自于生物素添加剂, 这种生物素添加剂通过新型的细胞提取工艺由木质纤维素生物质中提取, 并进一步通过高温酸解等步骤制备的, 这种物质已经成功应用于谷氨酸生产中, 其中的生物素作用完全可以媲美 CSL、糖蜜和 YE 等营养添加剂。

## 1.5 乳酸概述

由于许多不同的性质, 乳酸是一种重要的工业产品, 主要用于制药, 化妆品, 化学以及食品工业等。由于其在酸奶和奶酪生产中的关键作用, 约 70% 的乳酸用于食品生产<sup>[128]</sup>。另外, 乳酸是生产绿色、生物可降解聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 聚合物的单体, 这种新型聚合材料被广泛应用于包装、纤维和泡沫的原料<sup>[129]</sup>。

1780 年瑞典化学家 Carl Wilhelm Scheele 首次从酸奶中发现并分离出乳酸；1789 年 Lavoisier 将这种成分命名为“酸性乳液”，成为乳酸术语的核心起源；1857 年 Pasteur 发现乳酸是某些微生物的发酵代谢产物；1873 年，德国化学家 Wislicenus 确定了乳酸的分子结构；1881 年法国科学 Frémy 通过微生物发酵工艺在美国首次工业化生产乳酸<sup>[130]</sup>。

乳酸的生产主要有化学合成和微生物发酵两种途径，与化学合成相比，微生物发酵生产乳酸具有低成本、相对较低温度、低能耗和高纯度等优势，因此，微生物生产乳酸是主流。近年来，全世界生产的乳酸约 90 % 来自微生物发酵生产<sup>[131]</sup>。

乳酸的价格因在不同领域的应用而有所区别，2011 年的乳酸价格在 \$1.30-\$2.30/kg 间波动，而目前乳酸价格在 \$3.0-\$4.0/kg 间波动，一般来讲，乳酸的价格依赖于生产用的淀粉和糖原料的价格<sup>[132]</sup>。2016 年全球对乳酸的需求约 1,220.0 kt，年增长率为 16.2%，预计 2025 年的需求量将达到 1,960.1 kt。导致乳酸需求不断增长主要因素之一是全球越来越关注绿色环保，使得更多的产品采用生物可降解材料<sup>[132]</sup>。

### 1.5.1 乳酸的结构和性质

乳酸（又名 2-羟基丙酸）的分子式为  $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ，相对分子量为 90.08，是自然界分布最广泛的有机酸，是具有手性碳原子的最简单的羟基羧酸。因此，乳酸主要的对映体形式有：D/L-型，分别由 D/L-乳酸脱氢酶（D/L-LDH）催化转化丙酮酸而产生（图 1.3）。



图 1.3 L-/D-型乳酸结构式

Fig. 1.3 Structural formula of L-/D-lactic acid

乳酸纯品是无色液体，而工业用为无色至浅黄色液体，相对密度为  $1.2060 \text{ g/cm}^3$  ( $25/4^\circ\text{C}$ )，熔点为  $18^\circ\text{C}$ ，沸点为  $122^\circ\text{C}$  (2 KPa)。乳酸的化学反应是由理化性质决定的，包括 (1) 水介质中的酸特性；(2) 羧基和羟基的存在使其具有化学反应多功能性，如氧化、酯化、缩合反应等；(3) C2 的不对称光学活性。

### 1.5.2 乳酸发酵菌株

乳酸发酵菌株主要有细菌、酵母、蓝细菌及藻类等几种微生物，然而 90% 乳酸的生产与乳酸菌有关，主要是因为乳酸菌具有优于其他菌株的竞争优势：(1) 革兰氏阳性菌，耐酸耐气候，非需氧；(2) 生长温度与 pH 范围广泛；(3) 副产物少，是糖发酵的主要甚至唯一产物；(4) 高产量，高产率<sup>[128,133,134]</sup>。

本课题组的前期工作筛选的到一株能够高产乳酸的菌株 *P. acidilactici* DQ2<sup>[133]</sup>，Yi 等<sup>[135]</sup>通过分别敲除 *P. acidilactici* DQ2 中的 D-/L-乳酸脱氢酶基因 (*ldhD/L*)，得到了 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZP26 和 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY112，光学纯度分别为 99.32% 和 99.89%。Qiu 等<sup>[136,137]</sup>将木糖代谢途径分别构建至 *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 基因组，得到了共发酵 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和共发

酵 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY15, 光学纯度分别为 99.60% 和 99.2%。本研究采用的乳酸生产菌株是 *P. acidilactici* ZY271。

### 1.5.3 乳酸的应用

乳酸具有广泛的工业应用, 它是一种高附加值生物基化学产品, 每年在市场中占据的份额都在不断提高。近年来, 在环境、生态和医学领域的应用突出, 尤其是作为结构单元分子。

在食品工业中, 乳酸作为各种形式的添加剂, 主要以 L-乳酸的异构形式存在, 可作为酸化剂、调味剂和乳化剂等。在制药工业中, 乳酸应用于化妆品、软膏、保湿剂和控释药物等的生产。在化学工业中, 可用于有机溶剂和结构单元分子<sup>[138]</sup>的生产。近年, 为了解决日益严重的环境问题, 乳酸成为生产绿色环保包装、器皿等具有可再生和可生物降解性质的聚乳酸 (PLA) 的重要单体<sup>[139]</sup>, PLA 被认为是最有前途的可生物降解塑料之一。

目前乳酸的另一个有前景的应用领域是医疗领域, 主要用于组织再生、手术缝合、骨折固定、软骨修复和口腔等外科手术, 这些用途已经得到美国食品和药物管理局 (FDA) 的批准<sup>[140,141]</sup>。PLA 及其共聚物在临床常见使用, 主要是因为它们极高的生物相容性和安全性。

### 1.5.4 营养素对纤维素乳酸生产的影响

近年来, 乳酸的应用更加广泛, 尤其是聚乳酸产业的不断发展, 人类对乳酸的需求越来越高。目前, 全世界产生的乳酸中约 90% 来自微生物发酵生产<sup>[131]</sup>, 而菌体的生长和发酵性能主要依赖于发酵培养基中的营养成分。

发酵用原料和营养需求的成本占据乳酸生产过程总成本的很大部分<sup>[142,143]</sup>。工业中, 乳酸的微生物生产常用菌株为乳酸菌, 对氨基苯甲酸、多肽、核苷酸、维生素、脂肪酸、矿物质、碳水化合物、氨基酸等营养成分均有极高需求<sup>[144]</sup>。Mills 等<sup>[145]</sup>人发现乳酸菌维持细胞生长最主要的氮源来源是氨基酸、多肽以及蛋白质。有文献表明, 乳酸菌是几种维生素和氨基酸的营养缺陷型菌株<sup>[146]</sup>。

Jensen 等<sup>[147]</sup>和 Niven 等<sup>[148]</sup>发现奶酪生产菌株 *L. lactis* 对氨基酸具有复杂的需求, 大多数菌株对谷氨酸 (Glu)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、甲硫氨酸 (Met) 和缬氨酸 (Val) 都是必不可少的。Juillard 等<sup>[149]</sup>发现牛奶中的 *L. lactis* 的生长必需氮源。Fernández 等<sup>[150]</sup>发现 Leu、Met 和甘氨酸 (Gly) 对 *P. pentosaceus* 至关重要。Rogosa 等<sup>[151]</sup>研究了 *lactobacilli* 的营养需求, 强调氨基酸和维生素对细胞生长的重要性。

为了满足复杂的营养需求, YE 常作为发酵培养基中提供这些营养素的复合营养源<sup>[152-154]</sup>, 尤其是维生素和氨基酸<sup>[155]</sup>。YE 主要是酵母细胞的自溶物, 包含各种营养成分, 如维生素、氨基酸、肽、核酸和微量元素等<sup>[156]</sup>。Amrane 等<sup>[157]</sup>推测培养基中 YE 的主要贡献是提供嘌呤碱基、嘧啶碱基以及 B 组维生素。叶酸、泛酸、烟酸、吡哆醇以及核黄素是维持 *L. casei* 生长必需的 B 族维生素<sup>[151,158]</sup>。Cheng 等<sup>[159]</sup>认为 YE 是有效生产乳酸的最佳添加剂的原因在于其中的 B 族维生素。尽管 YE 是一种高效的营养添加剂, 但 YE

昂贵的价格阻碍了其在工业乳酸生产中的大量使用。原料成本是乳酸经济生产的主要因素之一，对乳酸生产进行的经济分析中，发现 YE 是最大的成本贡献者，占总生产成本的约 38%<sup>[160]</sup>。

因此，有很多研究表明采用农业原料尤其是木质纤维素生物质原料取代成本较高的糖原料和 YE 进行微生物乳酸生产，如玉米秸秆、玉米芯、硬木浆和木薯等，具有以下特点<sup>[161-163]</sup>：（1）资源丰富，价格低廉，可再生；（2）碳水化合物含量高，可替代成本较高的糖原料；（3）营养成分复杂，包括氨基酸、金属离子、维生素、脂类及灰分等；（4）与淀粉原料相比，木质纤维素生物质的利用能够尽可能降低全球的生存压力。另外，本课题组研究发现玉米秸秆中含有丰富的 B 族维生素，结合诸多关于 B 族维生素对乳酸菌的重要性的报道，若能综合利用生物质中的 B 族维生素，减少甚至无需生产过程中外源提供的营养添加剂（如 YE）的添加，在一定程度上降低了乳酸的生产成本。

## 1.6 本文立题依据和主要研究内容

木质纤维素生物质是自然界广泛存在的、可再生的碳水化合物，且容易获得，价格低廉，为了解决全球经济、能源问题，木质纤维素生物质在生物燃料以及大宗生物基化学品生产中的应用更加广泛。由于生物质原料结构的特异性，衍生出传统的生物炼制技术对其进行利用前处理，目的是可以破坏木质纤维素的紧密结构，高效转化为微生物利用的可发酵性单糖，然而，传统的工艺会产生大量工业废水、且高浓度的酸用量导致生物反应器寿命的缩短、固含量低等弊端，而本课题组自主研发的干法生物炼制技术包括干酸预处理、固态生物脱毒、酶水解糖化与发酵几个工段，极大地降低了预处理阶段的酸用量，进而降低了对预处理反应器的腐蚀；显著提高了预处理后原料的固含量，实现了乙醇、乳酸等燃料和生物基化学品的高指标发酵（发酵速率快、发酵得率高和发酵产量高）；更重要的是，整个干法生物炼制过程低能耗、零废水产生。

目前，人们的关注重点主要在于木质纤维素生物质原料在生物炼制过程需要克服的技术障碍，如破坏木质纤维素的结构以提高纤维素的应用、抑制物的脱除和耐受性、高固含量糖化和半纤维素衍生的戊糖/己糖的共发酵利用等，而对木质纤维素中丰富的营养成分在细胞生长和发酵中的应用极少有研究。

在本课题组先前的研究中，发现玉米秸秆中含有丰富的生物素，这对生物素缺陷型菌株如 *C. glutamicum* 在谷氨酸生产中极为有利，然而，过高的生物素含量抑制了谷氨酸的分泌，进一步发现生物素等 B 族维生素在干法生物炼制中能够得到极好的保留。因此，本研究旨在将这些高含量的生物素从生物质原料中提取甚至极大程度地综合应用这些 B 族维生素至各种大宗生物基化学品生产需求中，将是工业生产的一大突破。

本研究的主要内容有以下几个方面：

（1）通过拆分工艺选择高含量生物素的生物质部位以作为提取的基质，并研究该生物质中的生物素在干法生物炼制各个工段中的保留情况，然后从几株营养缺陷型菌株中选

择一株对生物素具有高吸收能力的菌株对生物质中生物素的进行提取 (*C. glutamicum* S9114)。

(2) 为了进一步提高并加强微生物细胞对生物质中生物素的吸收能力和吸收速率, 从基因水平研究生物素转运机制, 并在该菌株中过表达和整合编码该生物素转运蛋白的基因簇 *bioYMN*, 构建工程菌株, 确定生物素微生物提取的微生物。

(3) 进行生物素的微生物提取, 制备富含生物素的细胞提取物, 应用于对生物素极度需求的大宗生物基化学品生产中, 如谷氨酸等。

(4) 为了将木质纤维素生物质原料中包括生物素在内的所有的 B 族维生素以及其他营养成分的充分应用, 分别在合成培养基和玉米秸秆水解液中通过单一缺失 B 族维生素研究本课题组成功构建的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 在进行发酵生产过程对 B 族维生素及其他营养成分的需求, 这打开了木质纤维素生物质中 B 族维生素在纤维素发酵中应用的新视野。

## 第 2 章 玉米叶中生物素的提取及在谷氨酸发酵中的应用

### 2.1 引言

d-生物素（维生素 B<sub>7</sub>）是水溶性 B 族维生素之一，可作为羧化反应的辅酶。生物素在谷氨酸<sup>[84,126]</sup>、赖氨酸<sup>[86]</sup>、精氨酸<sup>[88]</sup>、琥珀酸<sup>[89]</sup>、乙醇<sup>[70,164,165]</sup>等生产中具有重要的影响。生物素的化学生产过程通常需要多个步骤产生 d-生物素的手性异构体，通过发酵生产生物素的微生物或从蛋、酵母、肝等直接提取的成本较高<sup>[27]</sup>。当生物素应用于发酵，通常采用外源生物素添加剂，其中外源生物素添加剂主要分为两种：（1）直接加入化学合成的纯生物素<sup>[166,167]</sup>；（2）添加具有高生物素含量的商业用营养添加剂，例如糖蜜、CSL 和 YE。糖蜜和 CSL 作为农作物的副产品被生产并广泛用于发酵工业。YE 通常用于实验室规模的发酵生产，生物素的最终来源是谷物，因为酵母无生物素生物合成途径，只能从外界环境中吸收生物素<sup>[27]</sup>。

与谷物相比，玉米秸秆、麦秆和稻草等农作物中含有丰富的生物素<sup>[53]</sup>。它在植物细胞中的存在形式有两种：游离态形式和结合态形式。其中结合态形式的生物素可作为代谢反应中羧化酶的辅因子，例如氨基酸分解代谢、脂肪酸合成和碳水化合物糖异生作用<sup>[27]</sup>；细胞溶质中游离态形式的生物素可作为植物细胞的储备池。由于叶质体中的脂肪酸合成途径<sup>[52]</sup>需要更多的生物素作为乙酰-CoA 羧化酶的辅因子，因此玉米叶中含有更多的生物素<sup>[53]</sup>。

为了将经过生物炼制的玉米叶生物质中尽可能地提取生物素，预处理步骤对破坏木质纤维素结构以及结合态生物素的连接至关重要<sup>[51]</sup>。此外，预处理和脱毒过程应不产生废水，避免水溶性 B 族维生素的大量损失。由于生物素具有热稳定性和耐酸性，干酸预处理是一种有效的方法，不仅实现生物素的保留，而且得到易于酶水解的木质纤维素原料<sup>[53]</sup>。因此，可从玉米叶水解液中进行生物素的提取。早期研究报道了很多利用生物素营养缺陷型菌株如 *S. cerevisiae*<sup>[100,101]</sup>、*L. plantarum*<sup>[98]</sup>和 *C. glutamicum*<sup>[102]</sup>从合成培养基中吸收生物素。然而，至今尚未有报道利用微生物从木质纤维素水解液中提取丰富的生物素的研究。

本部分主要研究了玉米叶生物质在干酸预处理、生物脱毒和酶水解后保留的生物素的微生物提取及对谷氨酸生产的应用。首先分析了 *S. cerevisiae* DQ1, *S. cerevisiae* DQ1 XH7, *C. glutamicum* S9114 和 *Trichosporon cutaneum* 四株生物素营养缺陷型菌株对生物素的吸收能力，发现 *C. glutamicum* S9114 具有很强的生物素吸收能力。编码生物素转运蛋白的基因簇 *bioYMN* 通过表达质粒 pH36mob-*bioYMN* 在 *C. glutamicum* S9114 中过表达，甚至将 *bioYMN* 整合到 *C. glutamicum* S9114 的基因组中，构建了两株工程菌株，以强化细胞对生物素的吸收能力和吸收速率。检测细胞内的生物素含量比常用的 CSL、糖蜜和 YE 高两个数量级，并且进行酸解后得到的富含生物素的细胞提取物应用于谷氨酸发酵过程中，可完全取代纯生物素和 CSL。从木质纤维素生物质原料中提取生物素的工

艺和从生物炼制工艺生产具有极高生物素含量的营养添加剂并应用于生物基化学品生产都是前所未有的创新。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 菌株、质粒及引物

本章实验所用的菌株、质粒及引物均列于表 2.1 中。构建表达质粒和整合质粒所用的载体分别为大肠杆菌 *E. coli* DH 5 $\alpha$  和 *E. coli* pK18mobsacB, 均保存于本实验室。*C. glutamicum* S9114<sup>[53]</sup> 购于上海工业微生物研究所 (Shanghai Industrial Institute of Microorganism, SIIM, <http://www.gsy-siim.com/>), 注册编号 B460, 同时也保存于中国工业菌种保藏中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC, <http://www.china-cicc.org/>), 注册编号 20935。

生物素缺陷菌株 *S. cerevisiae* DQ1<sup>[168]</sup> 保存于中国普通微生物保藏中心 (China General Microorganism Collection Center, CGMCC), 注册编号 2528。生物素缺陷菌株 *S. cerevisiae* XH7<sup>[169]</sup> 具有木糖代谢途径, 保存于 Yeast extract peptone dextrose medium (YPD 培养基) 中。生物素缺陷菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271<sup>[170]</sup> 保存于中国农业菌种保藏中心 (Agricultural Culture Collection of China, ACCC, <http://www.accc.org.cn/>)。

*A. resiniae* ZN1<sup>[22]</sup> 室本实验室自行筛选出的一株可用于生物固态脱毒的霉菌, 保存于 CGMCC, 注册编号 7452。

### 2.2.2 培养基、培养条件

培养基:

(1) Luria-Bertani (LB) 液体培养基: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 0.5% 氯化钠。固体平板是向 LB 液体培养基中加入 1.7% 琼脂粉。起始 pH 用氢氧化钠调节至 7.0。

(2) 预种子培养基: 25 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L 磷酸二氢钾, 0.6 g/L 硫酸镁, 2.5 g/L 尿素, 2.0 mg/L 硫酸亚铁, 2.0 mg/L 硫酸锰, 25 g/L CSL。起始 pH 用氢氧化钠调节至 7.0。

(3) 种子培养基: 25 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L 磷酸二氢钾, 0.6 g/L 硫酸镁, 2.5 g/L 尿素, 2.0 mg/L 硫酸亚铁, 2.0 mg/L 硫酸锰, 5 g/L CSL。起始 pH 用氢氧化钠调节至 7.0。

(4) 合成培养基 (SM): 20 g/L 葡萄糖, 2 g/L 磷酸二氢钾, 1 g/L 七水合硫酸镁, 1 g/L 硫酸铵, 1 g/L 酵母提取物。

(5) YPD 培养基: 20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母提取物。

(6) Potato-Dextrose-Agar (PDA) 培养基: 土豆洗净削皮, 并切成薄片, 称取 200 g 至 1 L 去离子水中煮沸 30 min, 然后八层纱布过滤除去固体残渣, 并将过滤得到的上清液定容至 1 L, 最后向其中添加 20 g 葡萄糖和 15 g 琼脂粉, 用于培养 *A. resiniae* ZN1。

表 2.1 菌株、质粒和引物

Table 2.1 Strains, plasmids and primers

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Biodetoxification fungus isolated in our lab	[22]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DQ1	Biotin-deficient	[168]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> XH7	Biotin-deficient	[169]
<i>Trichosporon cutaneum</i> ACCC 20271	Biotin-deficient	[170]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> S9114	Biotin-deficient	Purchased from SIIM
<i>C. glutamicum</i> S9114 (pH36mob- <i>bioYMN</i> )	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring <i>bioYMN</i> expression plasmid pH36mob- <i>bioYMN</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> S9114 $\Delta$ CGS9114_RS02700:: <i>(H36-bioYMN)</i>	Integration of <i>H36-bioYMN</i> into <i>CGS9114_RS02700</i> locus of <i>C. glutamicum</i> S9114 genome	This study
Plasmids	Characteristics	Sources
pTRCmob	Shuttle expression vector, <i>P<sub>trc</sub></i> promoter, Km <sup>r</sup>	[171]
pH36mob	Expression vector, <i>P<sub>h36</sub></i> promoter	This study
pH36mob- <i>bioYMN</i>	Expression vector containing <i>bioYMN</i> gene cluster	This study
pK18mobsacB	Mobilizable vector for integration, Km <sup>r</sup> , sacB	[172]
pK18mobsacB- $\Delta$ CGS9114_RS02700:: <i>(H36-bioYMN)</i>	Plasmid for integration of the expression cassette <i>H36-bioYMN</i>	This study
Primers	Sequences (5'–3')	
<i>bioYMN</i> -F	<u>GAATTCTTGTGTAACACTGTTCAGGTGTAT</u>	
<i>bioYMN</i> -R	<u>TCTAGATTAATCGCCGGCACCA</u>	
<i>H36-bioYMN</i> -F	<u>ATTTTTTCTCCCCGTCAACCACCATCAAACAGGA</u>	
<i>H36-bioYMN</i> -R	<u>CAACAACCTGAAAGGGCTACCGCTTCTGCGTTCTGATTTAATCTGTAT</u>	
CGS9114_RS02700-up-F	<u>ACAGCTATGACATGATTACGCGCCGAAAACCTGCTGTCTAT</u>	
CGS9114_RS02700-up-R	<u>GGTGGTTGACGGGGAGAAAAAATG</u>	

---

Primers	Sequences (5'-3')
<i>CGS9114_RS02700-down-F</i>	<u>GCAGAAGCGGTAGCCCTTTCAGTTGT</u>
<i>CGS9114_RS02700-down-R</i>	TTGCATGCCTGCAGGTGGCGAAGCCGAGGAAGACA
<i>CGS9114_RS02700-F</i>	AGGATAAAAGACCTCATCGAAACC
<i>CGS9114_RS02700-R</i>	TTCCCAATCCGATGCTTTT
<i>bioYMN-F'</i>	TTTGCTGTTCCCTGGCACTCG
<i>bioYMN-R'</i>	GACTTCCTTCACCGTGGCTAATT

---

注：单下划线表示酶切位点；双下划线表示 overlapPCR 的同源序列；Km<sup>r</sup> 表示卡那霉素抗性。

(7) *C. glutamicum* S9114 感受态制备培养基 (NCM): 17.4 g/L 磷酸氢二钾, 11.6 g/L 氯化钠, 5 g/L 葡萄糖, 5 g/L 蛋白胨, 1 g/L 酵母提取物, 0.3 g/L 柠檬酸三钠, 0.05 g/L 七水合硫酸镁, 91.1 g/L 山梨醇, 11.1 g/L DL-苏氨酸, 35.9 g/L 甘氨酸, 0.11 % Tween 80。

(8) LB-Kanamycin (LK) 培养基: 灭菌后的 LB 液体/固体培养基冷却至 50 °C 左右, 向其中加入 50 mg/mL 卡那霉素母液, 使卡那霉素终浓度为 50 µg/mL, 温度过高会使卡那霉素失效。此培养基为筛选携带表达/整合质粒的阳性重组菌株。

(9) SOC 培养基: 20 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 0.5 g/L 氯化钠, 2.5 mM 氯化钾, 10 mM 氯化镁, 20 mM 葡萄糖。

(10) LB-Glucose (LBG) 培养基: 1% 蛋白胨, 0.5% 氯化钠, 0.5% 酵母提取物, 2% 葡萄糖, 用于筛选同源单交换成功的阳性菌。

(11) LB-Sucrose (LBS) 固体平板: 1% 蛋白胨, 0.5% 氯化钠, 0.5% 酵母提取物, 10% 蔗糖, 1.7% 琼脂粉, 用于筛选同源双交换成功的阳性菌。

以上所有培养基均在高压灭菌锅中 115 °C 下灭菌 20 min。

试剂:

(1) 生物素母液 (100 mg/L): 称取 10 mg 纯生物素固体粉末完全溶解于 100 mL 超纯水中, 并定容至 100 mL 容量瓶中, 最后通过 0.22 µm 滤膜以除菌。

(2) TBE 贮存液 (5×): 54 g/L Tris, 20 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0), 27.5 g/L 硼酸, 溶解混合均匀后避光贮存。

(3) TBE 缓冲液 (1×): 电泳用缓冲液, 将 TBE 贮存液 (5×) 用去离子水稀释 5 倍。

(4) 琼脂糖凝胶 (1.2%): 称取 1.2 g 琼脂糖固体粉末加至 250 mL 摇瓶中, 向其中加入 100 mL TBE 缓冲液 (1×), 然后加入 20 µL 核酸染料, 微波炉加热 2 min, 将溶解均匀的液体倒入凝胶模具中, 室温放置 30 min。

(5) Tris-Cl 缓冲液 (pH 8.0): 将 121 mg Tris 完全溶解于超纯水中, 利用浓盐酸调节 pH 8.0, 并加超纯水定容到 100 mL 容量瓶中。

(6) 溶菌酶母液 (1 mg/mL): 称取 1 mg 溶菌酶固体完全溶解于 1 mL Tris-Cl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 并通过 0.22 µm 滤膜以除菌。

(7) 卡那霉素母液 (50 mg/mL): 称取 500 mg 卡那霉素固体粉末完全溶解于 10 mL 超纯水中, 并定容至 10 mL 容量瓶中, 最后通过 0.22 µm 滤膜以除菌。

(8) 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液: 称取 11.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 固体完全溶解于 1 L 超纯水中, 并定容至 1 L 容量瓶中, 最后通过 0.22 µm 滤膜进行抽滤以除菌。

(9) 10% 甘油 (w/w): 称取 50 g 甘油加至 450 g 超纯水中, 混合均匀后, 通过 0.22 µm 滤膜进行抽滤以除菌。

培养条件:

*C. glutamicum* S9114、*C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 和 *C. glutamicum* S9114 ΔCGS9114\_RS02700:: (H36-bioYMN) 在 60% (v/v) 甘油中保存, 挑取适当菌液划 LB/LK 平板, 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 挑取各平板上大小适中的单菌落接种至装有 30 mL

预种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 12 h; 然后, 5% 的接种量转接至装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 8 h。其中, *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 的预种子培养基和种子培养基中均需加入 30  $\mu$ L 卡那霉素母液 (50 mg/mL), 防止质粒在传代过程中丢失。

*S. cerevisiae* DQ1 在 30% (v/v) 甘油中保存, 然后 2 mL 菌液全部接种至装有 20 mL SM 培养基的 100 mL 摇瓶中, 30 °C, 150 rpm 恒温摇床中培养 18 h。

*S. cerevisiae* XH7 在 30% (v/v) 甘油中保存, 然后 2 mL 菌液全部接种至装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中, 30 °C, 150 rpm 恒温摇床中培养 12 h。

*T. cutaneum* ACCC 20271 在 60% (v/v) 甘油中保存, 2 mL 菌液全部接种至装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中, 30 °C, 150 rpm 恒温摇床中培养 12 h, 然后以 10% 的接种量转接至装有新鲜 YPD 培养基的摇瓶中, 在 30 °C, 150 rpm 条件下于恒温摇床中培养 24 h。

### 2.2.3 原料、酶和试剂

玉米秸秆收获于 2016 年, 产自中国山东潍坊。玉米秸秆晒干后, 将茎和叶分开, 并分别通过 10 mm 筛子的锤式粉碎机进行粉碎、筛分。玉米叶生物质中的组分根据 NREL 方案 LAP-002 和 LAP-005 测定<sup>[173,174]</sup>, 测得玉米叶中含有纤维素 26.9%, 木聚糖 20.0%, 木质素 17.9%, 灰分 12.4%, 其中各组分基于干重计算。

纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购自中国北京 Novozymes 公司。滤纸酶活根据 NREL 方案 LAP-006 测得 203.2 FPU/mL, 纤维二糖酶活根据 Ghose 方法测得 4,900 CBU/mL, Bradford 方法测得蛋白浓度为 87.3 mg/mL。

高保真聚合酶 PrimeSTAR HS DNA 购自 TaKaRa 生物工程公司 (Japan); 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购于 Fermentas 公司 (Vilnius, Lithuania); 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自天根生化科技有限公司 (中国, 上海); 凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和质粒小抽提试剂盒均购自捷瑞生物公司 (中国, 上海); 核酸染料购自天能生物 (中国, 上海); 卡那霉素 (Kanamycin, Km) 购自麦克林生化科技有限公司 (中国, 上海); d-生物素购自中国上海的阿拉丁试剂有限公司 (中国, 上海), 纯度 >98%; CSL 购自西王集团有限公司 (中国, 山东邹平); 生物素测定培养基和乳酸杆菌培养基购自 Difco 有限公司 (NJ, USA); 其他分析级化学试剂均购自凌峰化学试剂有限公司 (中国, 上海)。所用常见仪器设备见附录 I。

### 2.2.4 工程菌株的构建

#### (1) 基因组和质粒抽提

细菌基因组 DNA 的提取根据细菌基因组 DNA 抽提试剂盒的操作步骤进行, 质粒的提取根据质粒小抽提试剂盒的操作步骤进行。

#### (2) PCR 反应条件

50  $\mu$ L PCR 反应体系: 25  $\mu$ L 5 $\times$ 高保真聚合酶 PrimeSTAR HS DNA, 1  $\mu$ L 100  $\mu$ M F 引物, 1  $\mu$ L 100  $\mu$ M R 引物, 1  $\mu$ L 100 ng DNA 模板, 最后补水 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L 体系。

PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s (Taq DNA 聚合酶) /15 s (PrimeSTAR HS DNA), 延伸 72 °C, 30 个循环, 72 °C 再延伸 5 min, 4 °C 冰箱保存。其中, 退火温度视引物长度而定, 延伸时间视扩增片段大小而定, 一般 1 min/kb。PCR 结束后采用 1.2 % 的琼脂糖凝胶电泳进行检测是否扩增成功。

### (3) 电泳

配制 1.2% 的琼脂糖凝胶, 电泳槽中加入 TBE 缓冲液 (1×), 将样品与 10×loading buffer 混合均匀, 然后上样, 在 120 V 恒压条件下电泳 25 min, 凝胶成像仪上观察电泳结果并保存。

### (4) PCR 产物和质粒的酶切反应

酶切反应和连接的体系和条件参照产品使用操作步骤进行。

酶切反应体系 (100 μL): 50 μL 质粒/PCR 产物, 20 μL 2×buffer, 限制性内切酶各 1 μL, 最后补水 ddH<sub>2</sub>O 至 100 μL 体系。

酶切反应 (100 μL) 条件: 在 37 °C 的水浴锅中反应 4.5 h。

酶切后的产物此阿勇凝胶回收试剂盒 (上海捷瑞生物公司) 进行纯化并回收, 操作根据说明实施。

### (5) 感受态细胞的制备

*E.coli* 感受态细胞的制备方法如下:

① *E.coli* 用 60% (v/v) 的甘油保存, 挑取菌液划 LB 平板, 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 挑取平板上大小适中的单菌落接种至装有 5 mL LB 培养基的 25 mL 试管中, 37 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 12 h。

② 然后, 用移液枪取 200 μL ① 中的 *E.coli* DH5α 培养液转接至装有 5 mL LB 培养基的 25 mL 试管中, 37 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 2 h, 使细胞 OD<sub>600</sub> 在 0.5~0.6。

③ 将步骤②中的 *E.coli* DH5α 培养液以及 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液置于冰上 10 min, 并将离心机设置 4 °C。

④ 将上述步骤③中冰置的 *E.coli* DH5α 培养液分装至 1.5 mL 离心管中, 在 4 °C, 5000 rpm 条件下离心 5 min, 弃去上清。

⑤ 向④中的残留菌体的离心管中加入 800 μL 的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液, 将菌体重悬震荡, 混合均匀, 4 °C, 5000 rpm 条件下离心 5 min, 弃去上清, 此步骤重复两次。

⑥ 向残留菌体的离心管中加入 100 μL 的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液, 即为大肠杆菌感受态细胞, 4 °C 保存备用或 -80 °C 超低温冷冻冰箱贮存。

*C. glutamicum* S9114 感受态细胞的制备方法如下:

① 挑取 LB 平板上大小适中的 *C. glutamicum* S9114 单菌落转接至装有 5 mL LB 液体培养基的 25 mL 试管中, 30 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 12~16 h。

② 然后将 5 mL *C. glutamicum* S9114 菌液全部转接至装有 50 mL NCM 培养基的 100 mL 摇瓶中, 30 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 3~4 h, 检测细胞生长, 使 OD<sub>600</sub> 达到 0.7 左右。

③ 将②中的 *C. glutamicum* S9114 菌液置于冰上 15 min, 然后分装至 50 mL 离心管中, 4 °C, 5000 rpm 高速离心机中离心 10 min, 弃去上清, 收集细胞。

④ 向③中的 50 mL 离心管中分别加入 30 mL 冰置的 10% (w/w) 无菌甘油进行重悬洗涤, 4 °C, 5000 rpm 高速离心机中离心 10 min, 弃去上清, 收集细胞, 此步骤重复三次。

⑤ 最后向收集的细胞中加入 200  $\mu$ L 冰置的 10% (w/w) 甘油进行重悬, 并分装至 1.5 mL 离心管中 (50~60  $\mu$ L/管), 4 °C 保存备用或-80 °C 超低温冷冻冰箱贮存。

#### (6) 质粒构建和转化

所有的质粒和引物列于表 2.1 中, 引物的合成和测序工作均由上海捷瑞生物公司进行。

表达质粒的构建及转化:

pH36mob 是由质粒 pTRCmob<sup>[195]</sup>改造后的质粒, 此为基因簇 *bioYMN* 在 *C. glutamicum* S9114 基因组进行过表达所用的质粒。强启动子 *H36* 由上海捷瑞生物公司合成, 然后进一步将 *E.coli* DH5 $\alpha$  载体的原始质粒 pTRCmob 中的启动子 *Trc* 替换为强启动子 *H36*, 构建了含有强启动子 *H36* 的质粒 pH36mob(上海捷瑞生物公司)。图 pk18mobsacB 是携带 *Km'*、*mob* 和 *sacB* 的自杀型穿梭质粒, 用于将 *bioYMN* 整合至 *C. glutamicum* S9114 基因组中。

以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板, *bioYMN*-F 和 *bioYMN*-R 为引物, PCR 扩增, 然后电泳及测序, 得到完整的 *bioYMN* 基因簇片段 (1,972 bp)。采用限制性内切酶 *EcoR*I 和 *Xba*I 对 *bioYMN* 基因簇和质粒 pH36mob 分别进行双酶切, 并将两部分回收产物通过 T4 DNA ligase 连接。最后通过化学转化法将构建的表达质粒转化至 *E.coli* DH5 $\alpha$  中, 方法如下:

① 将上述质粒和 PCR 产物连接物置于冰上, 加入 1.5  $\mu$ L Solution III (Solution III 的添加量为连接体系的 10%), 并加入制备好的 100  $\mu$ L *E.coli* 感受态细胞。

② 将步骤①中的混合液置于冰上 30 min, 同时打开水浴锅, 设置温度 42 °C。

③ 将②中冰置后的混合物于 42 °C 水浴锅中热激 90 s, 立即取出并置于冰上 2 min。然后, 在无菌操作工作台内立即加入 890  $\mu$ L LB 培养基, 37 °C, 200 rpm 恒温摇床中孵育 1 h。

④ 取③中孵育的菌液 300~400  $\mu$ L 涂布于 LK 平板, 在 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h。

⑤ 挑取 LK 平板上的单菌落划线于新的 LK 平板, 观察并挑取单菌落, Taq 酶进行菌落 PCR 验证。对菌落 PCR 鉴定为阳性的单菌落进行质粒提取, 然后分别单酶切和双酶切提取的质粒。菌落 PCR 和单双酶切结果鉴定均为阳性的菌落即证明 *bioYMN* 基因簇成功克隆至 pH36mob 质粒中, 该质粒命名为 pH36mob-*bioYMN* (图 2.1a)。

整合质粒的构建:

将编码生物素转运蛋白的基因簇 *bioYMN* 整合至 *C. glutamicum* S9114 的基因组, 整

合的 *C. glutamicum* S9114 靶位点选择 *CGS9114\_RS02700* (编码乳酸脱氢酶), 整合质粒的构建方式根据 HB-infusion™ Seamless Cloning Kit (HanBio, shanghai, China)进行。

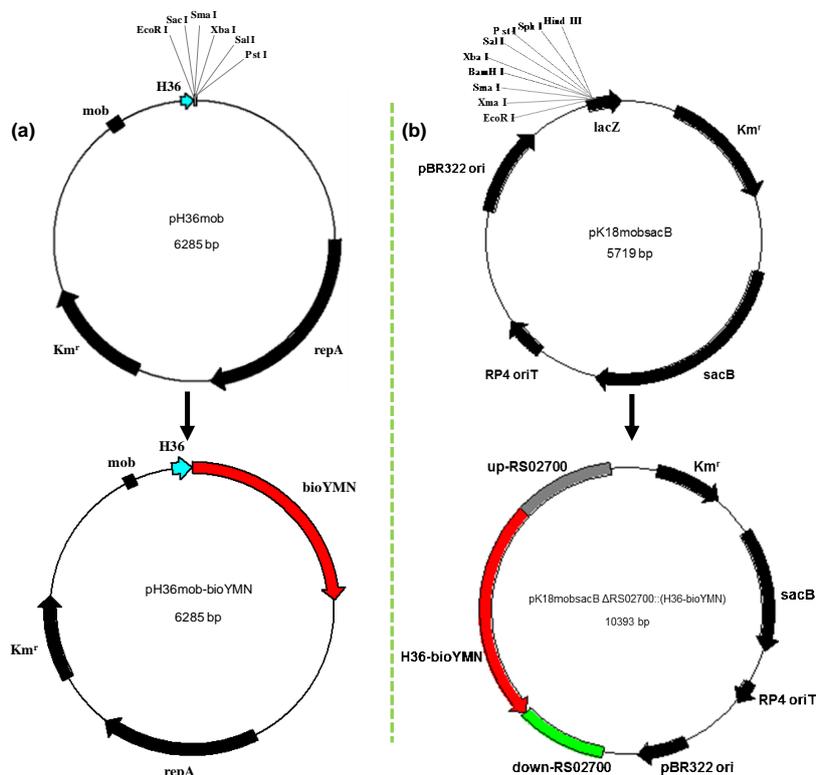


图 2.1 原始质粒及分别携带不同 *bioYMN* 表达框的质粒 (a 和 b) 图谱

Fig. 2.1 Detailed maps of original plasmids and other expression plasmids harboring different *bioYMN* cluster (a and b)

(a) pH36mob, 携带 *H36* 启动子的表达质粒; pH36mob-*bioYMN*, 携带表达框 *bioYMN* 的表达质粒; (b) pK18mobsacB, 携带 *Km<sup>r</sup>*, *mob* 和 *sacB* 的自杀型穿梭质粒; pK18mobsacB  $\Delta$ RS02700::*(H36-bioYMN)*, 携带表达框 up-*RS02700*-*H36-bioYMN*-down-*RS02700* 的整合质粒

以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板, *CGS9114\_RS02700*-up-F 和 *CGS9114\_RS02700*-up-R 为引物, PCR 扩增得到的产物结合凝胶电泳和测序进行验证, 得到 *RS02700* 基因的上游 1,000 bp 片段 (up-*CGS9114\_RS02700*, 上游同源臂); *CGS9114\_RS02700*-down-F 和 *CGS9114\_RS02700*-down-R 为引物, PCR 扩增得到的产物结合凝胶电泳和测序进行验证, 得到 *CGS9114\_RS02700* 基因的下游 1,000 bp 片段 (down-*CGS9114\_RS02700*, 下游同源臂); 以表达质粒 pH36mob-*bioYMN* 为模板, *H36-bioYMN*-F 和 *H36-bioYMN*-R 为引物, PCR 扩增得到的产物结合凝胶电泳和测序进行验证, 得到 *H36-bioYMN* 片段 (目的片段)。然后, OverlapPCR 将上游同源臂 up-*RS02700*、目的片段 *H36-bioYMN* 和下游同源臂 down-*CGS9114\_RS02700* 融合为表达框 up-*CGS9114\_RS02700*-*H36-bioYMN*-down-*CGS9114\_RS02700*。

检测表达框与 pK18mobsacB 浓度, 根据汉恒无缝克隆说明的操作步骤, 将片段、质粒、酶以及超纯水按照一定顺序及比例混合, 酶切位点选择 EcoRI 和 SalI, 在 50 °C 水浴锅中无缝连接 1 h, 所有菌体涂布于 LK 平板, 37 °C 恒温培养箱培养。观察并挑取单

菌落, Taq 酶进行菌落 PCR 验证, 结合测序结果, 两者鉴定均为阳性的单菌落, 则是成功将 *up-CGS9114\_RS02700-H36-bioYMN-down-CGS9114\_RS02700* 插入至穿梭型质粒 *pk18mobsacB*, 得到整合质粒, 命名为 *pK18mobsacB-ΔRS02700:: (H36-bioYMN)* (图 2.1b)。

(7) 工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (*pH36mob-bioYMN*) 和 *C. glutamicum* S9114 *ΔCGS9114\_RS02700:: (H36-bioYMN)* 的获得

转化质粒进入 *C. glutamicum* S9114 感受态细胞, 表达质粒和整合质粒的电转化操作一致。

① 将新鲜制备的 *C. glutamicum* S9114 感受态细胞置于冰上, 向其中加入 10 μL 预冷质粒 (浓度相对较高), 并缓慢将细胞与质粒混合均匀。

② 设定电转仪 (Gene Pulser Xcell, Biorad) 转化参数: 2,200 V, 25 μF, 200 Ω, 5 ms, 将上述混合均匀的感受态细胞/质粒转移至预冷的 1 mm 的电击杯中, 电击一次。然后立即向电击后的混合液中加入 800 μL SOC 液体培养基, 并混合均匀, 立即在 46 °C 水浴锅中热激 6 min, 取出置于冰上 2 min。

③ 将热激后菌液在 30 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 1~2 h, 最后将全部菌体涂布至含有 50 μg/mL 的 LK 平板上, 在 30 °C 恒温培养箱中进行培养。

基因的敲除与整合 (图 2.2):

① 同源单交换筛选

挑取平板上的单菌落进行菌落 PCR, 并结合测序鉴定正确后, 确定成功进行第一轮单交换。然后, 60% (v/v) 的甘油保存菌种至 -80 °C 超低温冰箱。

② 同源双交换筛选

将第一轮单交换成功的菌体接种至 LBG 液体培养基中, 30 °C, 200 rpm 恒温摇床中培养 8~12 h, 然后稀释不同梯度 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) 的菌液涂布于含有 10% 蔗糖的 LBS 固体平板上, 30 °C 恒温培养箱中进行培养。

LBS 平板上生长的单菌落分为两种情况, 一种是可能在含有卡那霉素抗性的 LK 培养基中继续生长, 也就是发生回复突变; 另一种是成功将目的基因整合至宿主菌的基因组上, 因此需要进一步进行验证。

挑取 LBS 固体平板上的单菌落涂布于含有卡那霉素抗性的 LK 固体平板上, 同时同一单菌落对应于 LK 固体平板的位置涂布于 LBS 固体平板上, 30 °C 恒温培养箱中进行培养。选取 LK 固体平板上不能生长的却对应 LBS 固体平板上生长的单菌落, 并提取基因组, 通过引物 *CGS9114\_RS02700-F/R* 和 *bioYMN-F'/R'* 进行 PCR 验证, 并结合测序进行验证, 两种方法验证均正确的菌落即为成功进行第二轮交换的菌株, 也就是成功整合 *bioYMN* 至 *C. glutamicum* S9114 基因组的菌株。

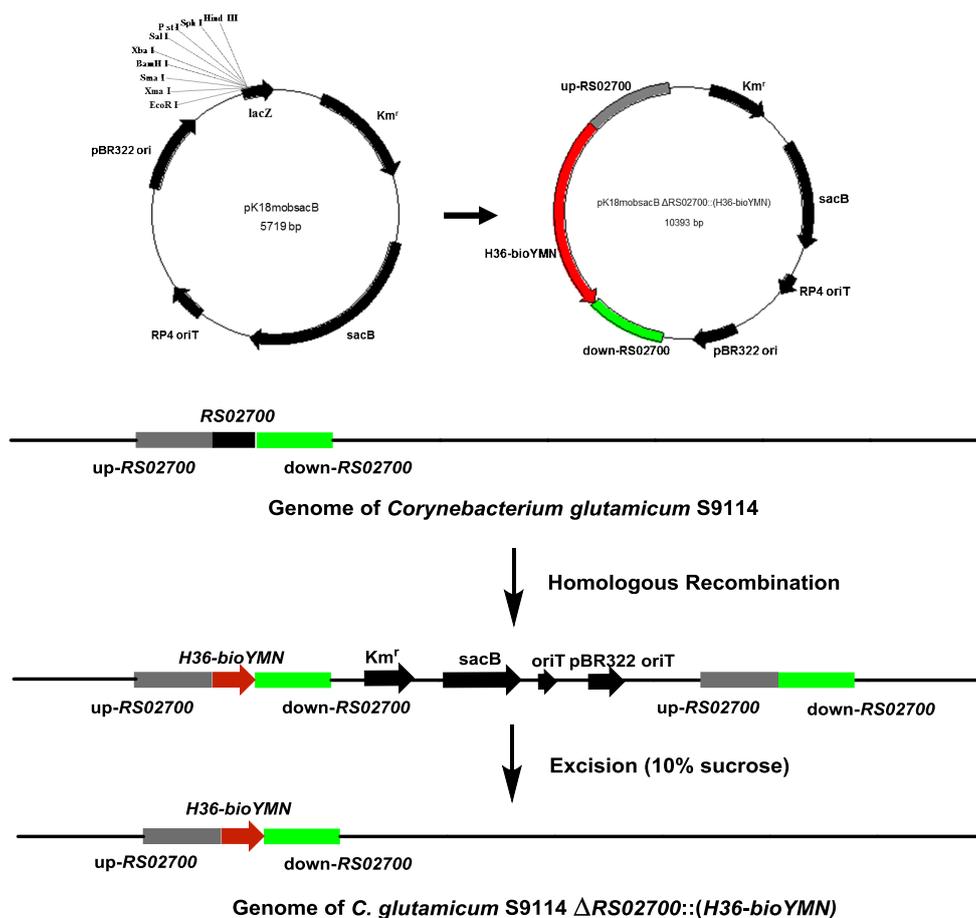


图 2.2 *bioYMN* 整合至 *C. glutamicum* S9114 基因组的 *CGS9114\_RS02700* 位点处的同源重组过程  
 Fig. 2.2 The homologous recombination process of *bioYMN* integration into the *CGS9114\_RS02700* locus of *C. glutamicum* S9114 genome

### 2.2.5 适应性驯化

对工程菌株 *C. glutamicum* S9114  $\Delta CGS9114\_RS02700::(H36-bioYMN)$  进行短期的适应性驯化，在装有 30 mL 15% 玉米叶水解液的 250 mL 摇瓶中不断转接进行。每 12 h 以 10% (v/v) 的接种量将上一代菌体培养液转接至新鲜的 15% 玉米叶水解液中，30 °C，200 rpm 条件下培养。培养过程中采用 20% (w/w) 尿素溶液/300 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液以调节培养液中因菌体生长代谢导致变化的 pH 环境。

### 2.2.6 干法生物炼制工艺

#### (1) 干式稀酸预处理

根据 Zhang 等<sup>[16]</sup>和 Han 等<sup>[91]</sup>方法将玉米叶进行干酸预处理，生物质中大量的半纤维素在稀酸催化下被降解成木糖，同时打破木质纤维素的结构。简言之，玉米叶与稀硫酸 (6%，基于干重) 以 2:1 (w/w) 比例混合加到螺旋式搅拌桨的 15 L 预处理反应器中，预处理条件是 50 rpm，175 °C，5 min，预处理后物料的固含量约 50% (w/w)，且此过程零废水产生。

#### (2) 固态生物脱毒 (静态)

预处理后的玉米叶物料根据 Zhang 等<sup>[22]</sup>方法通过 *A.resinae* ZN1 菌株进行生物脱毒以脱除抑制物。首先, 20% (w/w)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节预处理物料的 pH 至 5.5; 然后, 接种 10% (w/w) 的 *A.resinae* ZN1 脱毒种子, 并混合均匀; 最后, 将混合均匀的物料加入到密封式收纳箱中, 常温条件脱毒 7 d, 且此过程零废水产生。

### (3) 15% (w/w) 玉米叶水解液 (CLH) 制备<sup>[168]</sup>

15% (w/w) 玉米叶水解液在 5 L 发酵罐中制备, 预处理和固态生物脱毒后的物料由纤维素酶水解, 纤维素酶 Cellic CTec 2.0 添加量为 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干物质, 50 °C, pH 4.8, 150 rpm 下水解糖化 48 h。水解液浆利用超速离心机在 10,000 rpm, 10 min 条件下进行离心, 以除去不溶性物质, 上清进行高压灭菌并过滤, 并检测其中的葡萄糖和木糖浓度。

#### 2.2.7 生物素提取和生物素提取物的制备

*S. cerevisiae* DQ1、*S. cerevisiae* XH7 和 *T. cutaneum* ACCC 20271 种子液以 10% (v/v) 接种量分别转接至装有 30 mL 15% (w/w) 玉米叶水解液摇瓶中, 并加有 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  调节 pH, 然后分别在 30 °C, 180 rpm 和 200 rpm 下进行生物素提取实验, 两个平行。*C. glutamicum* S9114 和工程菌株根据 Wen 等<sup>[65]</sup>方法进行培养, 然后, 以 10% (v/v) 接种量将种子液分别转接至装有 30 mL 15% 玉米叶水解液摇瓶中, 并加有 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  调节 pH, 在 30 °C, 200 rpm 下进行生物素提取, 两个平行。在接种之前, 向 15% (w/w) 玉米叶水解液中补加 5 M NaOH 以维持最适的 pH 7.0, 菌体生长过程中间隔补加 20% 的无菌尿素溶液以维持最适的 pH 7.0。间隔取样, 并于 15,000 g 下离心 5 min, 上清液用于检测细胞外生物素和葡萄糖, 菌体沉淀用于检测细胞生长和细胞内生物素浓度。

然后, 将生物素提取工艺放大至 3 L 发酵罐 (Biotech-3BG-4, Baoxing Co., China) 中进行, 提取条件为 30 °C, 600 rpm, 1.4 vvm 通气率。整个体系为 1 L 15% (w/w) 玉米叶水解液, 加入 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液, 10% (v/v) 的接种量, 通过自动补料装置补加 20% (w/v) 的氨水溶液维持恒定的 pH 7.0。生物素提取结束后, 将培养液在 10,000 rpm 高速离心机中离心 10 min, 收集细胞。以 10% (w/w) 的细胞含量将收集的细胞与 3% (w/w) 的硫酸溶液混合均匀, 在 121 °C 下酸解 30 min。酸解后的混合液在 15,000 g 下离心 5 min 以除去不溶性的杂质, 上清液则为富含生物素的细胞提取物, 以用于对生物素高需求的生物基化学品的生产。

#### 2.2.8 谷氨酸发酵

谷氨酸发酵是在装有 1 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中进行, 10% (v/v) 接种量, 发酵条件是 30 °C, 1.4 vvm, 通过自动补料装置补加 20% (w/v) 的氨水溶液维持发酵过程中的 pH 7.0, 溶氧 (DO) 通过不断调节通气率维持在 10%~40% 之间, 谷氨酸生产过程中溶氧影响乳酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的活性, 从而影响主产物谷氨酸和副产物乳酸的生产。因此调节发酵过程中的溶氧有利于促进谷氨酸生产, 降低乳酸副产物。

发酵培养基包含 120 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6 g/L 七水合硫酸镁, 2.5 g/L 尿素, 2.0 mg/L 硫酸亚铁, 2.0 mg/L 无水硫酸锰和生物素提取物。玉米浆和纯生物素分别

在谷氨酸发酵中提供生物素，验证生物素的细胞提取物的功能。

### 2.2.9 生物素的检测

生物素的测定根据国标 (GB 5009.259-2016) 和 Wen 等<sup>[65]</sup>方法，通过检测生物素缺陷型菌株 *L. plantarum* ATCC 8014 在不同生物素浓度下的细胞生长 ( $OD_{550}$ )，检测样品中的生物素的含量。原理是在一定的浓度范围内，*L. plantarum* ATCC 8014 的生长与胞内生物素的含量呈线性关系，由此可检测出 *C. glutamicum* S9114 细胞中的生物素含量。

样品准备：(1) 固体沉淀样品 (菌体/木质纤维素生物质) 用 3% (w/w)  $H_2SO_4$  在 121 °C 下酸解 30 min，然后上清液通过 5 M NaOH 溶液中和至 pH 5~7 之间用于细胞内生物素检测；(2) 液体样品 (细胞外上清液) 在中和后直接用于细胞外生物素的检测。所有的样品使用超纯水进行稀释保证检测的生物素浓度在 0.8~3.2  $\mu g/L$  之间。

生物素缺陷型菌株 *L. plantarum* ATCC 8014 用 60% (v/v) 甘油保存，挑取适当菌液划 *Lactobacilli* 固体平板，37 °C 恒温培养箱培养 24~36 h，挑取单菌落继续转接至 *Lactobacilli* 固体平板，重复两次。然后，挑取单菌落转接至装有 20 mL *Lactobacilli* 液体培养基的 100 mL 摇瓶中，37 °C 恒温培养箱静置培养 16~20 h，800 $\times g$  离心收集细胞，并用 0.85% NaCl 溶液反复洗涤 3 次，弃去上清液。最后，用超纯水将细胞稀释，使  $OD_{550}$  约 0.18 用于生物素测定。

将 1 mL 不同生物素含量的生物素溶液 (用超纯水稀释) 和 1 mL 生物素测定培养基加入试管中，制备浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10  $\mu g/L$  的生物素标准品，同时将 1 mL 稀释的样品溶液和 1 mL 生物素测定培养基加入到其他试管中，其中生物素浓度维持 0.02~0.08  $\mu g/L$  的范围内。在每个试管中加入 50  $\mu L$   $OD_{550}$  约 0.18 的 *L. plantarum* ATCC 8014 菌液，振荡器混合均匀，然后将试管在 37 °C 下培养 22 h。吸取 200  $\mu L$  培养液加入 96 孔板中，使用 Microplate Reader Epoch 2 (BioTek, Winooski, VT, USA) 在 550 nm 处检测光密度。根据生物素标准曲线检测样品的生物素含量，所有试管做两个平行。

### 2.2.10 分析方法

葡萄糖和谷氨酸通过 SBA-90D 生物传感分析仪 (Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan, Shandong, China) 测定。乙酸、木糖、糠醛和 5-羟甲基糠醛 (HMF) 通过高效液相色谱 (LC-20AD pump, RID-10A refractive index detector, Shimadzu, Kyoto, Japan) 检测，色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，柱温 65 °C，流动相为 5 mM  $H_2SO_4$ ，流速为 0.6 mL/min。细胞生长通过分光光度计 Beckman Coulter DU800 (Beckman, Brea, CA, USA) 在 600 nm ( $OD_{600}$ ) 下测定光密度，制作干细胞重量 (DCW) 与细胞生长 ( $OD_{600}$ ) 的标准曲线。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 玉米秸秆不同部位的生物素含量

前期研究工作表明，玉米秸秆中含有丰富的生物素，由于高生物素的存在，导致木质纤维素体系中谷氨酸分泌的抑制<sup>[53]</sup>。因此，本研究大胆的提出将木质纤维素生物质中

丰富的生物素提取出来,选择的原料为玉米秸秆。为了选择最佳的部位进行生物素的提取,首先将玉米秸秆的茎和叶进行拆分,检测比较了玉米秸秆不同部位的生物素含量(图 2.3)。木质纤维素生物质需要经过苛刻的干法生物炼制工艺才能应用于各种生物基化学品的生产中,因此,生物素在整个生物炼制过程中的稳定性至关重要的。

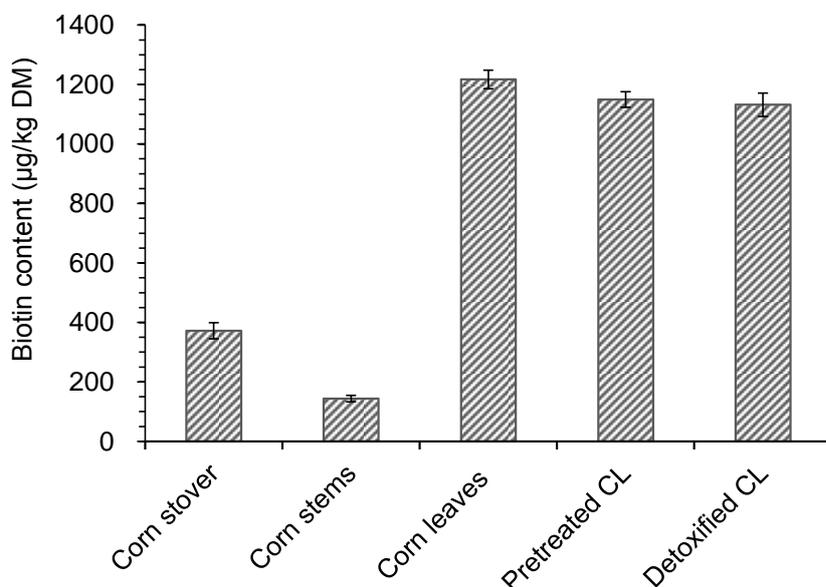


图 2.3 玉米秸秆中的生物素分布以及在生物炼制工艺中的稳定性

Fig. 2.3 Biotin distribution in corn stover and its stability during biorefining chain

玉米叶 ( $1,217.4 \pm 31.2 \mu\text{g/kg DM}$ ) 中的生物素含量显著高于玉米茎 ( $143.9 \pm 11.2 \mu\text{g/kg DM}$ ) 以及玉米茎叶混合 ( $371.6 \pm 27.1 \mu\text{g/kg DM}$ ) 中的生物素含量, 约为茎中生物素的 8.5 倍, 茎叶混合中生物素的 3 倍。这些结果表明具有极高生物素含量的玉米叶物质是进行生物素提取的优异原料。

生物素在植物细胞中的存在形式有两种: 游离态和结合态<sup>[51]</sup>。在玉米叶中, 仅约 60% 的生物素以游离形式存在, 并且可以水洗掉<sup>[53]</sup>, 因此需要干酸预处理来破坏结合态的生物素的连接和木质纤维素结构。

检测干法生物炼制工艺前后玉米叶中的生物素基本维持恒定。预处理前的玉米叶中的生物素含量为  $1,217.4 \pm 31.2 \mu\text{g/kg DM}$ , 预处理后的玉米叶中的生物素含量为  $1,149.5 \pm 26.2 \mu\text{g/kg DM}$ , 生物脱毒后的玉米叶中的生物素含量为  $1,132.0 \pm 39.1 \mu\text{g/kg DM}$ , 经过预处理和生物脱毒后的玉米叶通过纤维素酶酶解制备的 15% (w/w) 玉米叶水解液中的生物素含量  $179.2 \mu\text{g/L}$ , 相当于  $1,015.5 \mu\text{g/kg DM}$ 。

预处理后的玉米叶中含有纤维素 26.1%, 木聚糖 3.6%, 葡萄糖  $20.0 \text{ mg/g DM}$ , 寡聚葡萄糖  $13.4 \text{ mg/g DM}$ , 木糖  $68.7 \text{ mg/g DM}$ , 寡聚木糖  $31.8 \text{ mg/g DM}$ , 乙酸  $11.2 \text{ mg/g DM}$ , HMF  $9.9 \text{ mg/g DM}$ , 糠醛  $5.7 \text{ mg/g DM}$ 。预处理前后的玉米叶中生物素含量具有略微差异, 主要是因为预处理后物料中的抑制物对生物素测定菌株 *L. plantarum* ATCC 8014

细胞生长的影响，导致了预处理前后生物素含量的微小波动。

由于抑制物对生物素测定菌株产生负面影响，因此采用脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 对预处理后玉米叶物料进行固态生物脱毒，以实现多种抑制物的高效脱除。固态生物脱毒过程中无废水产生。生物脱毒后，通过检测发现玉米叶中的生物素含量为  $1132.0 \pm 39.1 \mu\text{g}/\text{kg DM}$ ，与预处理后玉米叶中的生物素含量基本保持一致，而乙酸、5-HMF 和糠醛这 3 种主要抑制物均完全降解，但预处理过程中释放的大部分木糖和葡萄糖基本保留，并未观察到纤维素的降解，这是因为固态生物脱毒过程条件温和，除了优先高效利用抑制物外，维持合适的脱毒时间，不会对其他营养物质产生负面影响。

酶解后得到的 15% (w/w) 固含量的玉米叶水解液中含有葡萄糖  $38.1 \text{ g/L}$ ，生物素  $179.2 \mu\text{g/L}$ ，相当于  $1,015.5 \mu\text{g}/\text{kg DM}$ ，与预处理后和生物脱毒后玉米叶中的生物素含量相比，约有 10% 的损失。这些结果表明，玉米叶中高含量的生物素在干法生物炼制工艺中能够有效地保留，提取生物素的优异底物。

### 2.3.2 生物素提取菌株的选择

生物素营养缺陷型菌株具有从环境中吸收生物素的能力，Wen 等<sup>[53]</sup>研究发现 *C. glutamicum* S9114 对生物素具有吸收能力。为了寻找一株对生物素具有强吸收能力的菌株，本研究选择了 4 株生物素营养缺陷型菌株对玉米叶水解液中的生物素进行提取，并比较它们对生物素的吸收能力，选择的 4 株菌株分别是 *S.cerevisiae* DQ1、*S.cerevisiae* XH7、*T. cutaneum* ACCC 20271 和 *C. glutamicum* S9114。

菌体细胞内的生物素浓度和细胞生长如图 2.4a 所示。生物素浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) 通过细胞内生物素含量 ( $\mu\text{g}/\text{g DCW}$ ) 和细胞干重浓度 ( $\text{g/L}$ ) 的乘积计算得到，反映了全细胞中来自细胞外环境的总生物素的含量。

与其他 3 株菌株相比，在相同的培养时间，*C. glutamicum* S9114 在 15% (w/w) 玉米叶水解液中具有更好的细胞生长和更高的细胞干重。在接种 1 h 后，4 株菌株的细胞生长均处于低水平状态，但是，与 *S.cerevisiae* DQ1 ( $6.1 \mu\text{g/L}$ )、*S.cerevisiae* XH7 ( $7.2 \mu\text{g/L}$ ) 和 *T. cutaneum* ACCC 20271 ( $6.9 \mu\text{g/L}$ ) 相比，*C. glutamicum* S9114 对生物素具有更好的吸收能力，细胞内的生物素含量为  $31.0 \mu\text{g/L}$ 。*C. glutamicum* S9114 的生物素提取率随细胞的生长而增加，在 24 h 细胞内生物素浓度达到最高，为  $88.1 \mu\text{g/L}$ ，此时的生物素提取率为 49.2%，细胞生长 ( $\text{OD}_{600}$ ) 为 27.8。这些结果表明 *C. glutamicum* S9114 不但在低细胞生长下对生物素具有较好的吸收能力，而且随着细胞生长也具有更高的生物素提取率。

此外，图 2.4b 表明，随着 *C. glutamicum* S9114 细胞内生物素的不断积累，15% (w/w) 玉米叶水解液中的生物素浓度也相应地降低，且显著低于其他 3 株菌株中相应的细胞外生物素浓度，这表明玉米叶水解液中更多的生物素被 *C. glutamicum* S9114 吸收至细胞内，并且在生物素提取过程中，细胞内外的总生物素浓度基本维持守恒。这些结果清楚地表明。因此，*C. glutamicum* S9114 是从玉米叶水解液中提取生物素的优良菌株，且具有较高的生物素吸收能力和较快的细胞生长。

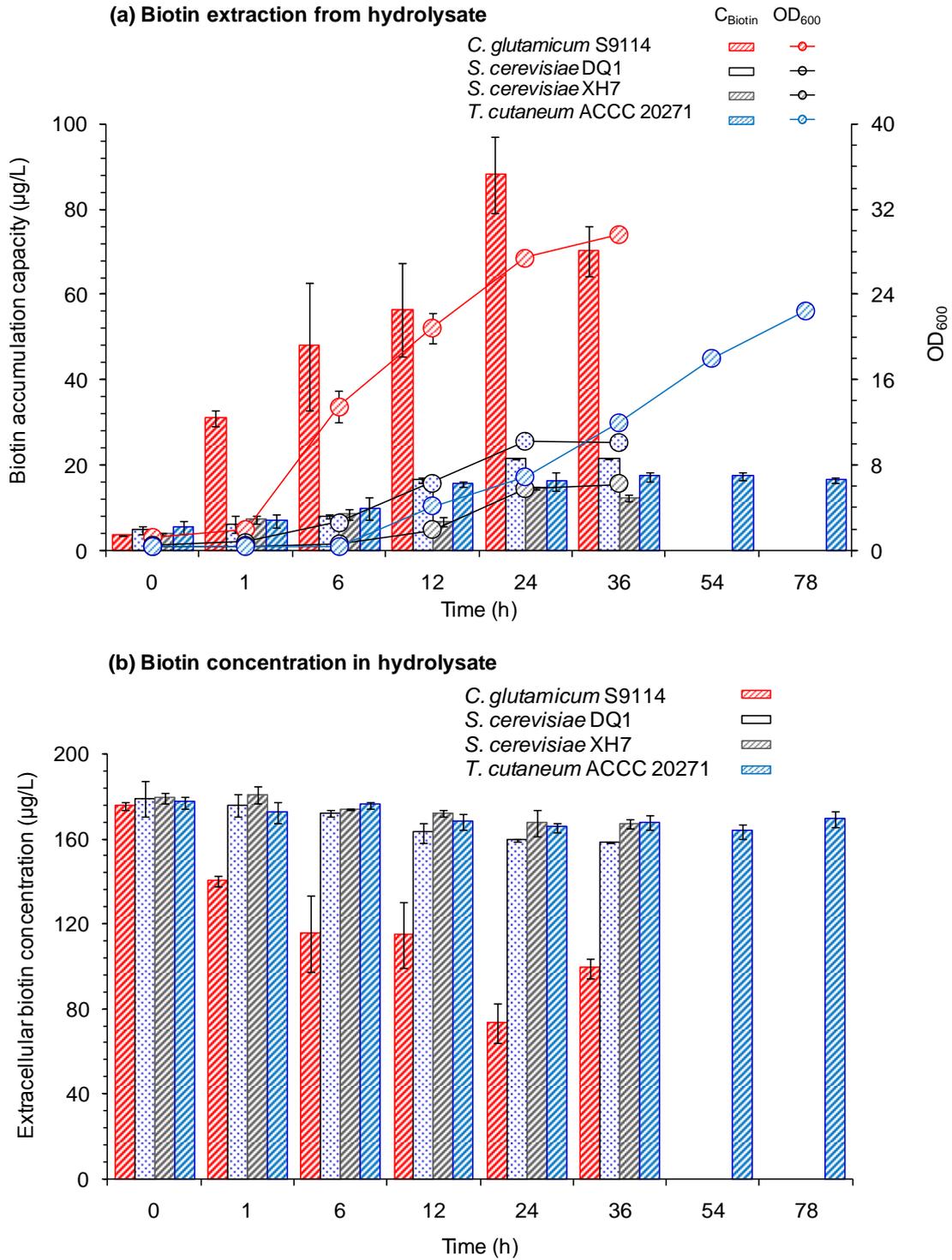


图 2.4 4 株生物素缺陷型菌株对玉米叶水解液中生物素的提取

Fig. 2.4 Biotin extraction from corn leaves hydrolysate by 4 different biotin auxotrophic strains

(a) 生物素提取 (细胞内浓度); (b) 玉米叶水解液中生物素浓度。生物素提取在装有玉米叶水解液的摇瓶中进行; 生物素吸收浓度定义为细胞内的生物素含量 (µg/g DCW) 与细胞干重 (g/L) 的乘积

### 2.3.3 工程菌株对生物素的吸收能力

与其他菌株相比, *C. glutamicum* S9114 对生物素表现出显著的吸收能力, 然而, 15%

(w/w) 玉米叶水解液中仍残留约 50% 的生物素。

因此, 为了进一步加强 *C. glutamicum* S9114 对生物素的吸收, 进一步研究发现, *C. glutamicum* S9114 将生物素吸收至细胞内的分子机制, 主要依赖于基因簇 *bioYMN* 编码生物素转运蛋白<sup>[102]</sup>, 该转运系统促进细胞对生物素的吸收。然后, 分别在 *C. glutamicum* S9114 中过表达 *bioYMN* 以及将 *bioYMN* 整合至 *C. glutamicum* S9114 中, 得到两株工程菌株, 即 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 和 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*)。

对工程菌株 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*) 在 15% (w/w) 玉米叶水解液中进行了短期适应性驯化。最后, 将 3 株菌株 *C. glutamicum* S9114、*C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 和 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*) 分别以 10% (v/v) 接种量转接至装有 30 mL 玉米叶水解液的 250 mL 摇瓶中, 测定生物素的吸收能力 (图 2.5)。

结果表明, 3 株菌株的细胞生长与糖耗基本无明显差异, 但是, 与亲本菌株 *C. glutamicum* S9114 相比, 工程菌株对生物素的吸收能力和吸收速率均有所提高。尤其是过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*), 对生物素的吸收能力显著提高, 且生物素吸收速率显著加快, 在接种 1 h 时, 虽然细胞生长 ( $OD_{600}=1.96$ ) 不显著, 但是细胞内的生物素浓度达到最高 132.7  $\mu$ g/L, 生物素提取率为 75.6%; 而 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*) 对生物素的吸收能力和生物素吸收速率仅略有提高, 并没有 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 显著, 在 24 h 时细胞内的生物素浓度最高 (图 2.5a)。

过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 在 1 h 内对生物素快速吸收后, 继续进行生物素的提取, 发现细胞内高生物素浓度仅维持约 2 h, 随着指数期 (3 h) 的到来, *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 细胞内的生物素浓度开始出现下降, 这可能是由于细胞处于分裂期间细胞溶质中游离生物素从细胞内释放。

此外, 图 2.5b 表明, 随着过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 细胞内生物素的不断积累, 15% (w/w) 玉米叶水解液中的生物素浓度也相应地降低, 在 1 h 时降至最低 50.7  $\mu$ g/L, 这表明 15% (w/w) 玉米叶水解液中更多的生物素进一步被过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 吸收至细胞内, 并且在生物素提取过程中, 细胞内外的总生物素浓度基本维持守恒。因此, 选择过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) 进行生物素的提取, 是从玉米叶生物质中提取生物素的优良菌株, 且具有较高的生物素吸收能力、较快的吸收速率和较快的细胞生长, 这不仅缩短了生物素提取的时间, 更提高了生物素提取率。

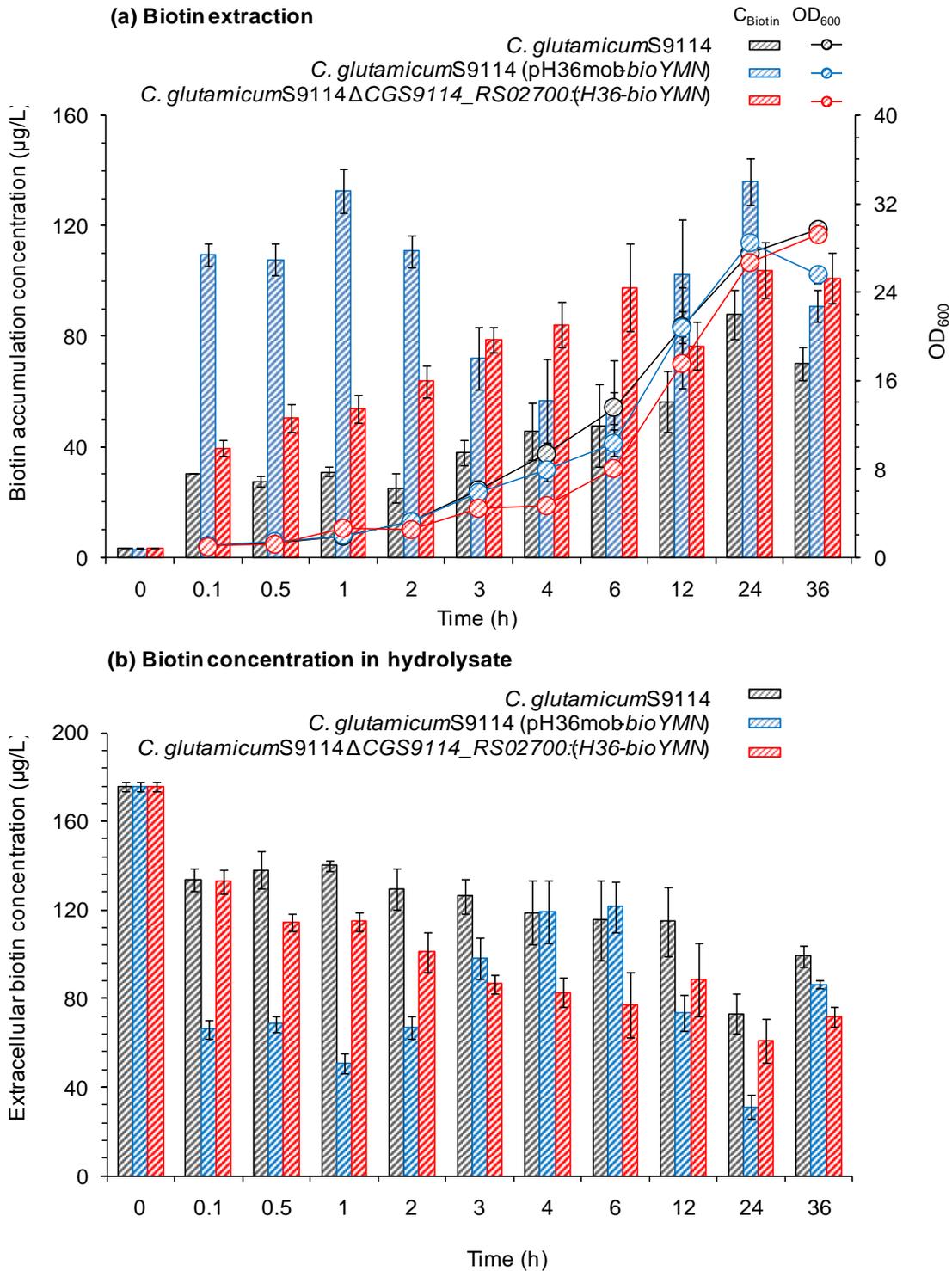


图 2.5 *C. glutamicum* S9114 和重组菌株对玉米叶水解液中生物素的提取。

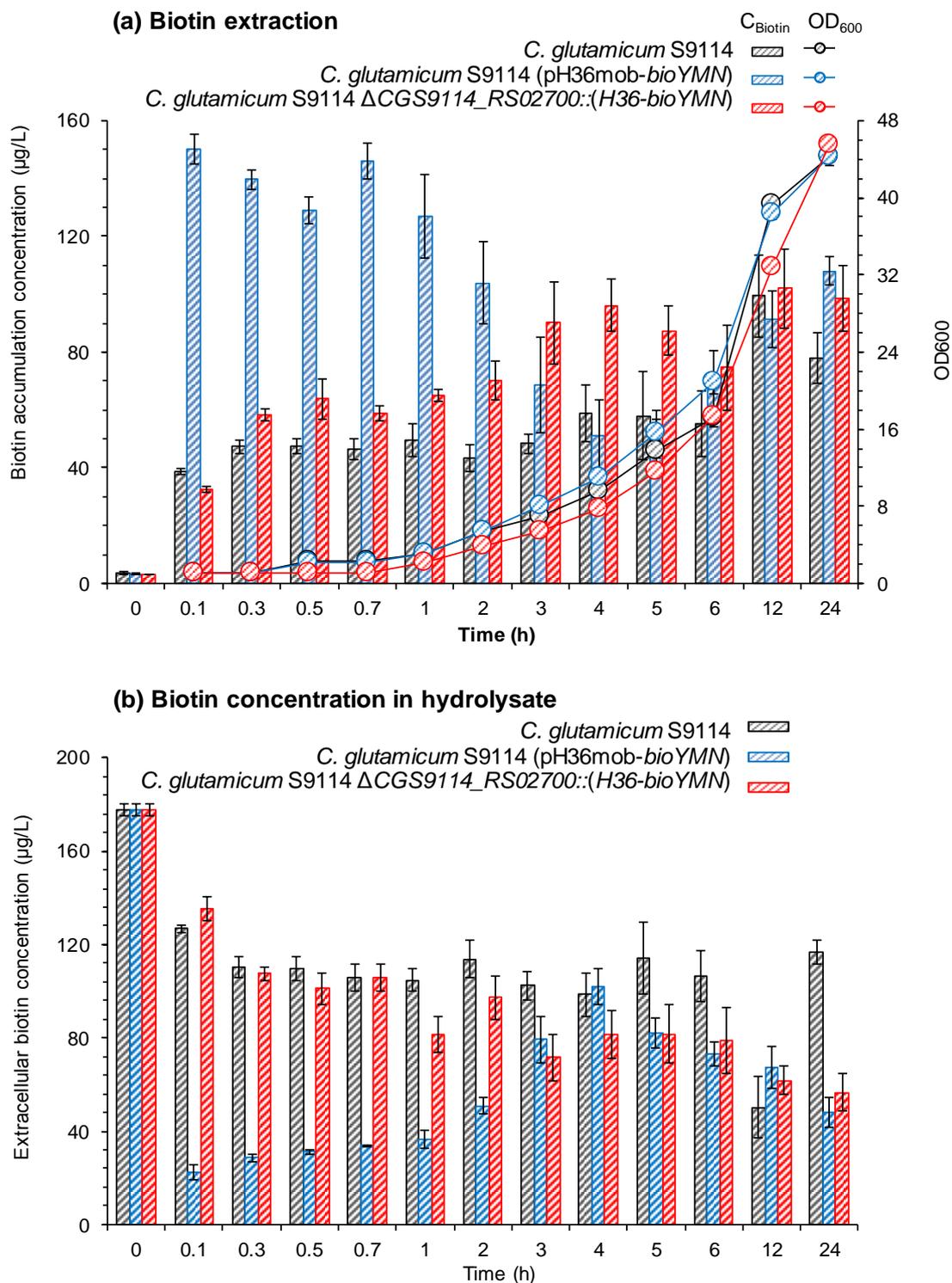
Fig. 2.5 Biotin extraction from corn leaves hydrolysate in flasks by *C. glutamicum* S9114 and two recombinant strains. (a) Biotin extraction; (b) Biotin concentration in hydrolysate

(a) 生物素提取（细胞内浓度）；(b) 玉米叶水解液中生物素浓度。生物素提取在装有玉米叶水解液的摇瓶中进行

### 2.3.4 生物素提取工艺的放大

本课题的主要目的是为了将玉米叶生物质中大量的生物素提取出来并应用至各种

对生物素必需的生物基化学品的生产中，因此，为了制备这种富含生物素的提取物，需要将整个生物素提取工艺进行放大来提取更多的生物素。所以，我们将 *C. glutamicum* S9114 和工程菌株对生物素的提取工艺在 3 L 发酵罐中进行放大，进一步验证重组菌株对生物素的吸收能力（图 2.6）。



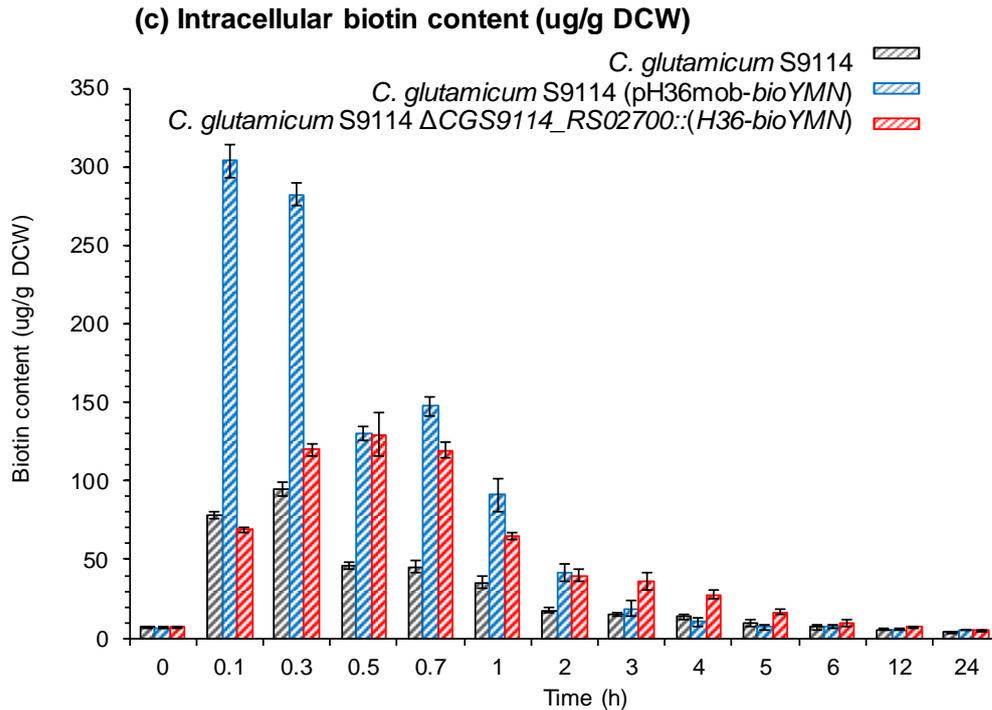


图 2.6 *C. glutamicum* S9114 和重组菌株在 3 L 发酵罐中对玉米叶水解液中生物素的提取

Fig. 2.6 Biotin extraction from corn leaves hydrolysate in 3 L fermentor by *C. glutamicum* S9114 and two recombinant strains

3 L 发酵罐中的结果表明, 3 株菌株对生物素的吸收效果均显著优于摇瓶, 主要是因为 *C. glutamicum* 对氧气的需求较高, 而放大工艺所使用的反应器与摇瓶条件相比具有较好的氧传递系统, 使得细胞生长更佳快速。图 2.6a 反映出 3 株菌株的细胞生长基本一致,  $OD_{600}$  达到 45 左右, 显著高于摇瓶中细胞生长。

与摇瓶中生物素吸收效果相比, 3L 发酵罐的供氧效果显著, 亲本菌株 *C. glutamicum* S9114 细胞生长更快。12 h 时, *C. glutamicum* S9114 细胞生长 ( $OD_{600}$ ) 达到 39.4, 此时细胞内的生物素浓度达到最高 99.4  $\mu\text{g/L}$ , 生物素提取率为 55.5%。如果此时收获细胞, 细胞内生物素含量为 5,563.8  $\mu\text{g/kg DCW}$  (图 2.6c), 是 YE 中生物素含量 (~2 mg/kg) 的 2~3 倍。

而过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 在 3 L 发酵罐中对生物素的吸收效果比起摇瓶有所提高。接种 0.1 h (6 min) 后, 过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 的细胞生长 ( $OD_{600}=1.96$ ) 不显著, 但是细胞内的生物素浓度高达 150.2  $\mu\text{g/L}$  (图 2.6a), 同时测定相应的细胞外的生物素浓度, 发现随着过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 细胞内生物素的不断积累, 15% (w/w) 玉米叶水解液中的生物素浓度在 0.1 h (6 min) 内从 179.2  $\mu\text{g/L}$  急剧下降至 22.4  $\mu\text{g/L}$  (图 2.6b), 此时的生物素提取率达到最高 83.8%, 比摇瓶中的生物素提取率显著提高。

同样继续维持过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 对生物素

的吸收,发现细胞内高生物素浓度仍维持约 2 h,随着指数期(3 h)的到来,细胞内的生物素含量开始出现下降,这与摇瓶中的现象一致。

与亲本菌株 *C. glutamicum* S9114 相比,工程菌株 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*)仅表现出相对较好的生物素吸收能力,远远不如过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*) (图 2.6a)。这可能是由于过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)中表达质粒的强自我复制能力产生高拷贝数的 *bioYMN*,而工程菌株 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*)中的 *bioYMN* 拷贝数较少,高拷贝数的 *bioYMN* 促进了生物素转运体在细胞内得作用,即更有效地促进细胞对生物素的吸收,从而显著提高了生物素的提取率。

这些结果表明,携带高拷贝表达质粒的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)对玉米叶生物质中的生物素具有最强的生物素吸收和最高的生物素提取率,是对玉米叶水解液中的生物素进行提取的优选菌株。

### 2.3.5 生物素提取物的制备

由于过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)对生物素的快速吸收和极高的生物素提取率,选择该菌株对玉米叶生物质中的生物素进行提取,并制备生物素提取物。从 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)对生物素的吸收现象分析(图 2.6a),细胞收获时间选择接种后 0.1 h (6 min),菌体对葡萄糖的消耗可忽略不计。

检测此时的细胞内的生物素含量为 150.2  $\mu$ g/L,生物素提取率为 83.8%,换算至细胞干重,生物素含量为 303.8 mg/kg DCW (图 2.6c),约为 YE 中生物素含量( $\sim$ 2 mg/kg)的 150 倍,糖蜜中生物素含量( $\sim$ 1 mg/kg)的 300 倍和 CSL 中生物素含量( $\sim$ 0.75 mg/kg)的 420 倍。然后将收集到的细胞根据材料与方法中 2.2.7 制备生物素提取物。

从细胞生长( $OD_{600}$ )和细胞干重之间的关系,种子引入的细胞干重仅为 0.49 g/L,可忽略不计,因此在生物素提取工艺中,细胞收获后,15% (w/w)玉米叶水解液中几乎所有葡萄糖都被保留,并且可以将它继续作为其他生物基化学品生产的底物。将来可以采用固定化细胞技术进行富含生物素的细胞的收集,这可有效地降低细胞离心所花费的高成本。

这些结果表明,生物炼制过程中的这种生物素提取工艺将玉米叶生物质中的生物素(1.2 mg/kg DM)浓缩了 250 倍至工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)细胞中,并得到了一种高生物素的细胞提取物,在工业中对生物素高需求的生物基化学品中具有真正的适用性。

### 2.3.6 生物素提取物的进一步验证

为了验证该生物素的细胞提取物的功能,本研究将其在谷氨酸发酵中进行验证及应用,即以优势工业发酵菌株 *C. glutamicum* S9114 作为谷氨酸发酵的模式菌株,来进一步证明富含高生物素的细胞提取物的实用性。

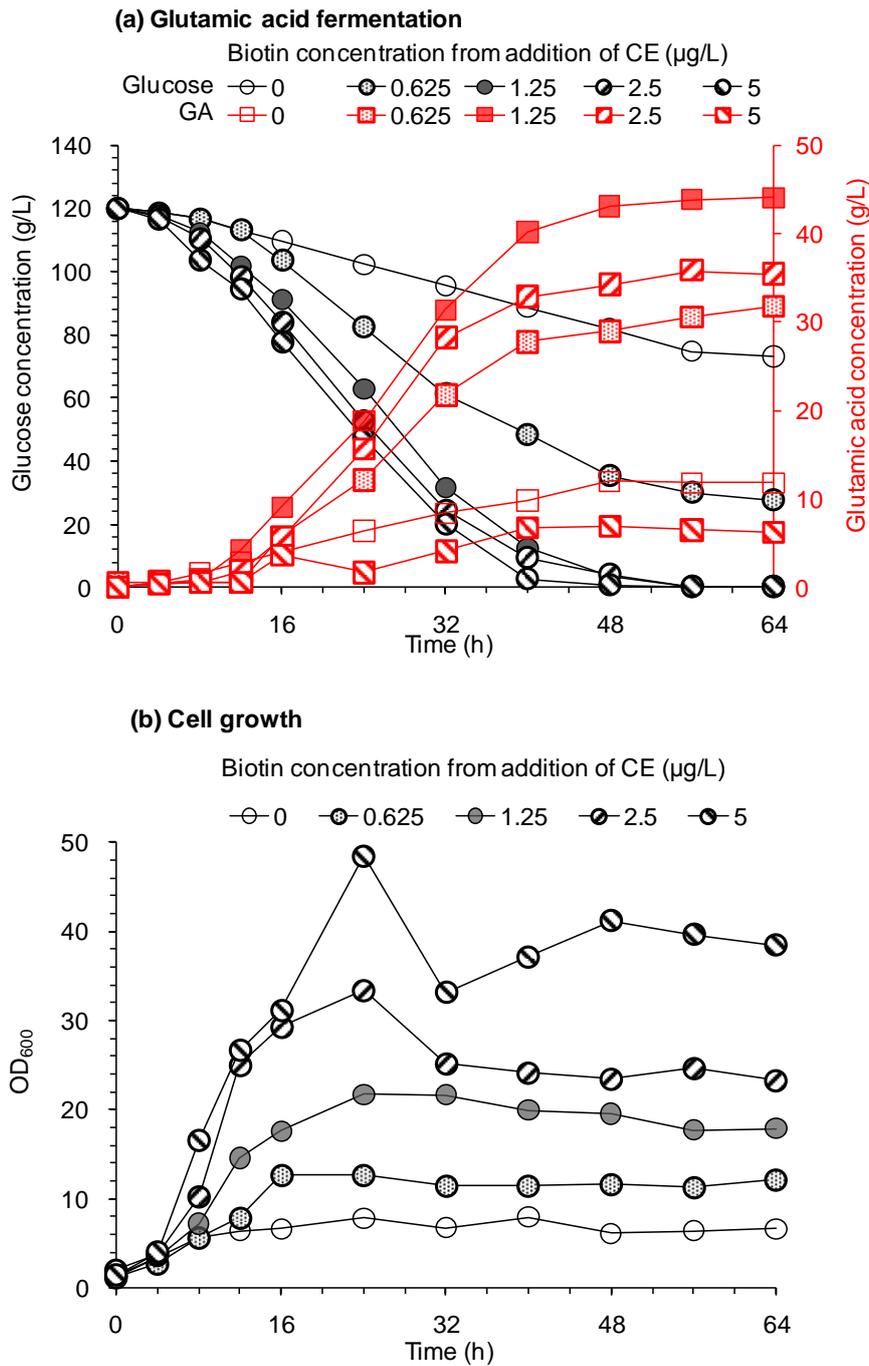


图 2.7 生物素细胞提取物 (CE) 在谷氨酸生产的应用

Fig. 2.7 The application of cell extract (CE) on glutamic acid fermentation process

(a) 谷氨酸发酵; (b) 细胞生长。富含生物素的细胞酸解后以 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5  $\mu\text{g/L}$  的浓度梯度添加至谷氨酸发酵中

将该生物素的细胞提取物应用于谷氨酸发酵工艺的主要原因是, *C. glutamicum* S9114 在进行谷氨酸发酵时对培养基中生物素浓度的很敏感: 生物素缺乏会限制 *C. glutamicum* S9114 细胞的生长, 从而影响谷氨酸的生产; 但生物素过量会抑制 *C. glutamicum* S9114 细胞中谷氨酸的分泌。只有当发酵培养基中的生物素浓度为“亚适量”水平 (2~5  $\mu\text{g/L}$ ) 时才有利于 *C. glutamicum* S9114 对谷氨酸的分泌<sup>[84,175]</sup>。

根据生物素的细胞提取物中的生物素含量，在谷氨酸发酵中设置不同生物素浓度梯度，整个发酵培养体系除了 *C. glutamicum* S9114 种子液中引入的微量生物素浓度（0.6  $\mu\text{g/L}$ ）之外，未曾从其他试剂或营养盐引入外源生物素。

图 2.7 显示，当添加生物素的细胞提取物使得发酵体系中生物素浓度为 5  $\mu\text{g/L}$ （实际的生物素浓度为 5.6  $\mu\text{g/L}$ ）时，葡萄糖消耗和细胞生长最快（葡萄糖在 48 h 内快速耗尽，最高  $\text{OD}_{600}$  为 41.2），但谷氨酸浓度仅为 6.9 g/L，因为生物素浓度过高，抑制了谷氨酸的分泌。随着降低生物素的细胞提取物的添加使得发酵体系的生物素浓度为 2.5  $\mu\text{g/L}$ （实际的生物素浓度为 3.1  $\mu\text{g/L}$ ），葡萄糖的消耗明显缓慢下来，56 h 内消耗尽，最终  $\text{OD}_{600}$  为 23.6，谷氨酸浓度达到 35.8 g/L。进一步调整生物素的细胞提取物的添加，当降低生物素的细胞提取物的添加使得发酵体系的生物素浓度降为 1.25  $\mu\text{g/L}$ （实际的生物素浓度为 1.85  $\mu\text{g/L}$ ）时，在 56 h 时得到最高谷氨酸浓度 44.1 g/L，此时  $\text{OD}_{600}$  为 17.9；当降低生物素的细胞提取物的添加使得发酵体系的生物素浓度降至 0.0625  $\mu\text{g/L}$ （实际的生物素浓度为 0.6625  $\mu\text{g/L}$ ）甚至不添加生物素的细胞提取物时，葡萄糖利用速率和细胞生长受到限制，从而影响谷氨酸的生产。尤其是在不添加任何生物素添加剂时，仅依赖于种子中引入的微量生物素（0.6  $\mu\text{g/L}$ ），发酵 64 h 时仍残留大量的葡萄糖（73.2 g/L），谷氨酸浓度仅为 11.8 g/L。这表明生物素细胞提取物的不同添加量导致的不同生物素浓度梯度，对 *C. glutamicum* S9114 的细胞生长（ $\text{OD}_{600}$ ）、葡萄糖消耗和谷氨酸分泌具有明显的影响。这与文献报道谷氨酸生产现象相似<sup>[84,175]</sup>，即过量的生物素抑制谷氨酸的分泌，生物素的缺乏会限制细胞生长，只有“亚适量”的生物素水平（2~5  $\mu\text{g/L}$ ）才有利于谷氨酸的生产。

这些结果清楚地反映，工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN) 来自玉米叶生物质中的提取物可作为谷氨酸发酵过程中的生物素添加剂。

### 2.3.7 生物素提取物在谷氨酸生产中的实用性

工业中谷氨酸生产常用玉米浆（CSL）作为生物素的营养添加剂，为了进一步验证该生物素提取物能够作为对生物素具有高需求的工业中生物基化学品生产中的营养添加剂的实用性，这里选择 CSL、生物素提取物和纯生物素作为谷氨酸生产过程中的营养添加剂。谷氨酸生产过程中分别添加适当浓度的 CSL、生物素提取物和纯生物素使得发酵体系中的生物素浓度同为 1.25  $\mu\text{g/L}$ ，此时相应的 CSL、生物素提取物和纯生物素的添加量分别为 1.67 g/L、4.11 mg/L 和 1.25  $\mu\text{g/L}$ （图 2.8）。

空白组指的是不添加纯生物素和任何生物素添加剂、仅依赖于种子液中 CSL 中的微量生物素浓度（0.6  $\mu\text{g/L}$ ）进行谷氨酸生产，最终谷氨酸产量为 11.8 g/L（图 2.8a）。与空白相比，谷氨酸发酵体系中分别添加 CSL、生物素提取物和纯生物素的产量分别为 46.3 g/L、44.1 g/L 和 42.1 g/L，发酵速率基本无明显差异。空白组的细胞生长（ $\text{OD}_{600}$ ）仅为 7 左右，在 64 h 时葡萄糖仍残留 73.2 g/L（图 2.8b）。这些结果表明 CSL、生物素提取物和纯生物素在促进谷氨酸生产上具有基本相同的效果。

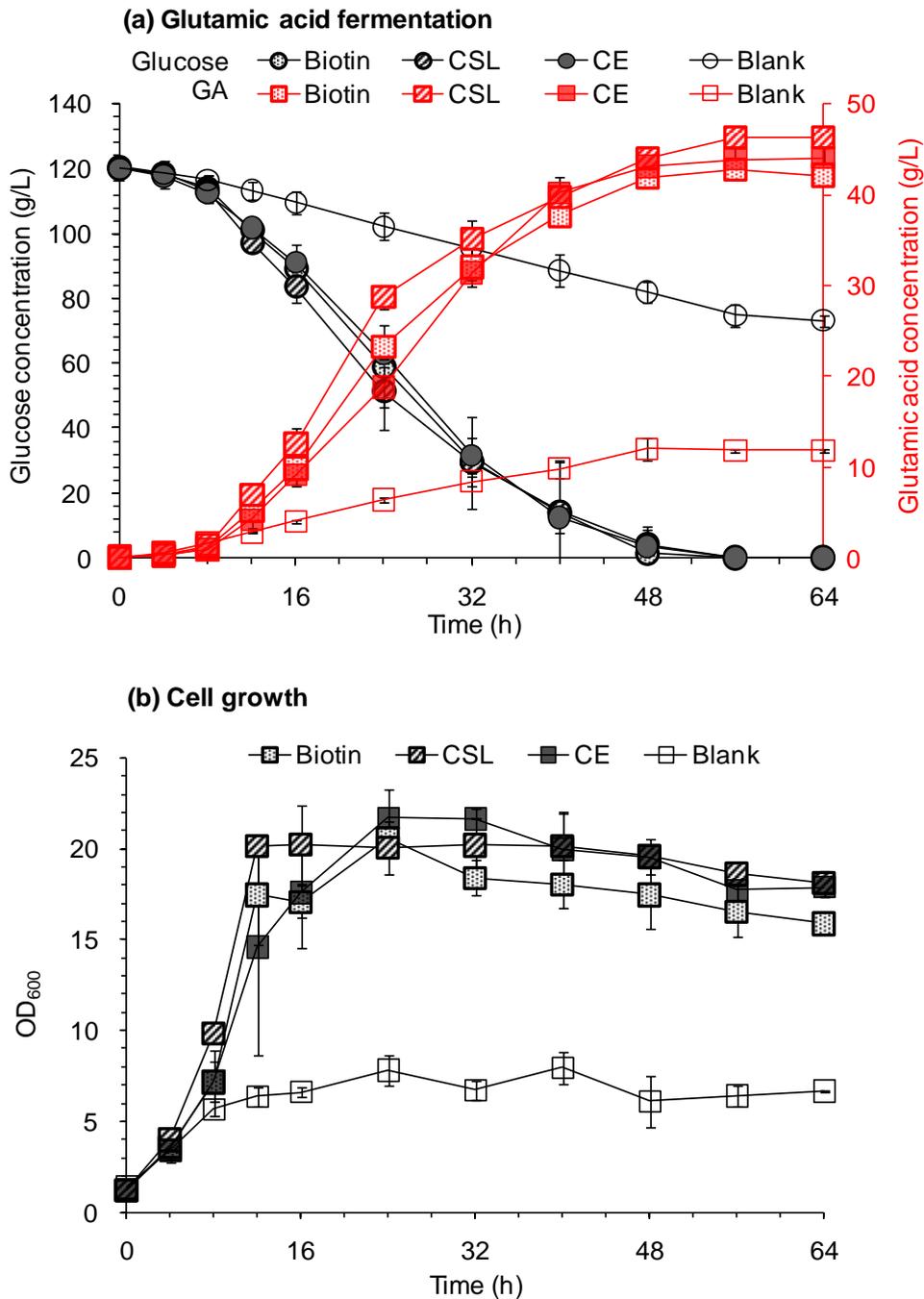


图 2.8 CE、CSL 和纯生物素在谷氨酸发酵生产中的对比。

Fig. 2.8 Comparison of cell extract (CE) to corn steep liquor (CSL) and pure biotin in glutamic acid fermentation process

(a) 谷氨酸发酵; (b) 细胞生长。以 1.25 μg/L 生物素浓度添加 CE、CSL 和纯生物素至谷氨酸发酵体系中

进一步分析发现，在添加了 CSL 的谷氨酸发酵中，由于 CSL 中丰富的氨基酸和其他营养素的存在，使得 *C. glutamicum* S9114 具有相对更快的细胞生长，更高的谷氨酸浓度 (46.3 g/L) 和得率 (0.440 g 谷氨酸/g 葡萄糖)；添加了 CE 的谷氨酸发酵中，谷氨酸

浓度和得率分别为 44.1 g/L 和 0.415 g 谷氨酸/g 葡萄糖；而在添加纯生物素的谷氨酸发酵中，谷氨酸浓度和得率最低，分别为 42.1 g/L 和 0.395 g 谷氨酸/g 葡萄糖，这主要是由于发酵培养基中除了种子液引入的微量营养物质外并未外源引入任何氨基酸和盐等营养物质。与文献相比<sup>[127]</sup>，本研究中较低的谷氨酸浓度可能是因为所用的发酵罐系统的氧传递在谷氨酸生产过程中并不完美。这些结果表明，富含生物素的细胞添加剂可以替代谷氨酸发酵等工业发酵过程中所用的纯生物素和 CSL。由于不同制造商和批次产品的 CSL 中的生物素含量不断波动，而纯生物素的价格高，因此从生物炼制过程的木质纤维素原料中提取生物素和制备富含生物素的细胞添加剂在工业具有无可限量的潜力。

玉米叶生物质中生物素的微生物提取工艺，是基于生物素在本课题组的干法生物炼制工艺的保留而开发的一种微生物提取的新型工艺，整个微生物提取过程仅持续 6 min。而后制备的富含生物素的细胞提取物，由于仅在生物素水平上进行了检测，后续可对其中的其他营养物质（其他 B 组维生素、各种氨基酸、核苷酸、多肽等）进行检测并分析，使其能够更广泛应用于各种生物基化学品生产中的综合性营养添加剂。

## 2.4 本章小结

对玉米秸秆的茎和叶进行拆分，采用微生物法（生物素缺陷型菌株 *L. plantarum* ATCC 8014）分别检测两部分的生物素含量，结果发现玉米叶中含有极高浓度的生物素，这是因为叶质体中的脂肪酸合成途径<sup>[64]</sup>需要更多的生物素作为乙酰-CoA 羧化酶的辅因子。由于生物素的耐高温和耐酸碱性质，经过生物炼制过程，玉米叶中的生物素含量基本无损失。通过探究四株生物素缺陷型菌株（*S.cerevisiae* DQ1, *S.cerevisiae* XH7, *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *C. glutamicum* S9114）对生物素的富集能力的探究，发现工业中谷氨酸发酵用模式菌株 *C. glutamicum* S9114 是从玉米叶水解液中提取生物素的优良菌株，且具有较高的生物素积累能力和较快的细胞生长。

为了加强 *C.glutamicum* S9114 对生物素的吸收能力，研究了菌体将生物素吸收至细胞内的分子机制，主要依赖于基因簇 *bioYMN* 编码的生物素转运蛋白，成功构建了两株工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)（携带高拷贝的表达质粒）和 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*)（整合 *bioYMN* 至 *C. glutamicum* S9114 基因组）。

将 *C. glutamicum* S9114、*C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)和 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*)分别在摇瓶中进行生物素的富集，结果发现，工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)对生物素具有瞬时吸收的特性，即在接种至 15% (w/w) 玉米叶水解液后 6 min，细胞对生物素的提取率就达到 83.8%。然后收集菌体，并通过酸解方式得到富含生物素的细胞提取物，其中生物素含量为 303.8 mg/kg DCW，约为 YE 中生物素含量（~2 mg/kg）的 150 倍，糖蜜中生物素含量（~1 mg/kg）的 300 倍和 CSL 中生物素含量（~0.75 mg/kg）的 420 倍。

为了验证该生物素的细胞提取物的功能，本研究将其在谷氨酸发酵中进行验证及应用。发现通过在发酵培养基中添加不同量的生物素细胞提取物，不断调整发酵体系中的生物素浓度，其谷氨酸生产的表现与正常的谷氨酸现象一致：过量的生物素抑制谷氨酸的分泌，生物素的缺乏会限制细胞生长，只有“亚适量”的生物素水平（2~5  $\mu\text{g/L}$ ）才有利于谷氨酸的生产。为了进一步验证其功能性，生物素细胞提取物对谷氨酸生产的促进同 CSL 和纯生物素具有基本相同的效果：相应的谷氨酸产量分别为 44.1 g/L（生物素提取物）、46.3 g/L（CSL）和 42.1 g/L（纯生物素）。本研究的生物素提取物可以替代谷氨酸等工业发酵过程中所用的纯生物素和 CSL。从生物炼制过程的木质纤维素原料中提取生物素和制备富含生物素的细胞添加剂在工业具有无可限量的潜力。

## 第 3 章 木质纤维素生物质中 B 族维生素在 L-乳酸发酵中的促进

### 3.1 引言

木质纤维素生物质是未来生产大型生物燃料和生物基化学品的最佳选择，例如聚乳酸（PLA）的生产。生物炼制过程包括预处理、生物脱毒、糖化和发酵。但是，在此以往，人们的关注的重点在于生物炼制过程所需要克服的技术障碍，例如破坏木质纤维素的结构以提高纤维素的应用<sup>[16,176]</sup>、抑制物的脱除和耐受性、高固含量糖化和半纤维素衍生的戊糖的共发酵利用。目前，鲜有研究涉及木质纤维素中丰富的营养组分在细胞生长和发酵中的应用。

木质纤维素生物质中除了包含纤维素、半纤维素和木质素以外，还含有其他营养物质，它们在植物细胞生长和代谢过程中合成<sup>[177]</sup>。我们先前的研究表明玉米秸秆、麦秆和稻秆等木质纤维素生物质在收获、晒干、收集、储存，甚至强烈的预处理之后仍含有一定量的 B 族维生素<sup>[53]</sup>。由于传统的木质纤维素生物炼制工艺中的水洗除尘工段几乎洗去了所有的可溶性组分，很少有人将关注重点放在木质纤维素中的营养物质上，如 B 族维生素的存在<sup>[53,91,178]</sup>，如，固含量为 5%~20% (w/w) 的传统稀酸预处理将维生素从木质纤维素颗粒中除去；稀碱预处理、有机溶剂和离子等其他预处理技术中，预处理后的水洗步骤产生大量废水，并将大量可溶性的维生素 B 除去。然而，我们实验室新开发的干式稀酸预处理和生物脱毒（DryPB）工艺无水洗步骤，避免了水溶性营养物质的损失<sup>[169]</sup>。因此，木质纤维素生物质中的 B 族维生素被很好的保留。迄今为止，木质纤维素生物质中的 B 族维生素在纤维素发酵中的应用还未有报道。

本研究采用一株工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 打开了木质纤维素生物质中 B 族维生素在纤维素发酵中应用的新视野。我们知道，L-乳酸是生物可降解聚乳酸的单体，且 L-乳酸发酵对营养需求很高，包括对 B 族维生素的需求。我们检测了合成培养基以及玉米街水解液中的 B 族维生素，发现玉米秸秆中的 B 族维生素可以部分满足 L-乳酸发酵的需求。当分别在玉米秸秆水解液中适当外源添加 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub>，L-乳酸的产量和得率几乎可以达到同时添加了酵母提取物和蛋白胨等丰富营养物质的合成培养基同样的水平。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 原料、酶和试剂

玉米秸秆收获于 2016 年，产自中国内蒙通辽。组分测定方法见 2.2.3，其中含有纤维素 31.2%，木聚糖 22.3%，木质素 20.8%，灰分 6.2%，其中各组分均基于干重计算。

所用纤维素酶见 2.2.3，糖化酶 GA-L-NEW 由中国吉林节能科购得，它的酶活为 103,900 WU/mL。

本研究中用于种子培养的 YE 购自 Oxoid 有限公司（Hampshire, UK），所有氨基酸和核苷酸均购自源聚生物技术有限公司（中国，上海），所有 B 族维生素化合物均购自

国药集团化学试剂有限公司（中国，上海），其他分析级化学试剂购自凌峰化学试剂有限公司（中国，上海）。所用常见仪器设备见附录 I。

### 3.2.2 菌株、培养基

#### (1) 菌株

生物脱毒用菌株树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 见 2.2.2。

L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611) 通过在 *P. acidilactici* TY112 (CGMCC 8664) 中构建木糖利用途径得到，可共发酵利用多种单糖，尤其是己糖（葡萄糖和半乳糖）和戊糖（阿拉伯糖、甘露糖和木糖）。

#### (2) 培养基

① 种子培养基（MRS 培养基）<sup>[133]</sup>：20 g/L 葡萄糖，10 g/L 酵母提取物，2 g/L 无水乙酸钠，2 g/L 磷酸氢二钾，2 g/L 柠檬酸氢二铵，0.58 g/L 七水硫酸镁，0.25 g/L 一水硫酸锰，20 g/L 琼脂粉用于制备固体平板。

② 合成培养基<sup>[179]</sup>：55 g/L 葡萄糖，17 g/L 木糖

营养盐：5 g/L 无水乙酸钠，2 g/L 磷酸氢二钾，2 g/L 柠檬酸氢二铵，0.58 g/L 七水硫酸镁，0.25 g/L 一水硫酸锰。

氨基酸：L-甘氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-甲硫氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、L-色氨酸、L-丙氨酸、DL-脯氨酸、DL-赖氨酸、L-组氨酸、L-半胱氨酸和 L-精氨酸分别添加 250 mg/L。

维生素：1,070 μg/L 盐酸硫胺素 (VB<sub>1</sub>)，495 μg/L 核黄素 (VB<sub>2</sub>)，9,840 μg/L 烟酸 (VB<sub>3</sub>)，2,370 μg/L 泛酸钙 (VB<sub>5</sub>)，939 μg/L 盐酸吡哆醇 (VB<sub>6</sub>)，18.3 μg/L 生物素 (VB<sub>7</sub>)，585 μg/L 叶酸 (VB<sub>9</sub>) 和 58.4 μg/L 肌醇。

核苷酸：114.2 mg/L 鸟嘌呤盐酸盐和 143.1 mg/L 腺嘌呤硫酸盐。

### 3.2.3 干法生物炼制工艺

#### (1) 干式稀酸预处理

玉米秸秆的干式稀酸预处理方法见 2.2.6。

#### (2) 固态的快速生物脱毒

预处理后的物料通过 *A. resinae* ZN1 菌株进行生物脱毒以脱除抑制物。首先，20% (w/w) Ca(OH)<sub>2</sub> 调节预处理物料的 pH 至 5.5；然后，接种 10% (w/w) 的 *A. resinae* ZN1 脱毒种子，并混合均匀；最后，将混合均匀的物料加入到 15 L 的螺带式搅拌生物脱毒反应器中，在 28 °C，1.0 vvm 的条件下，每隔 12 h 以 50 rpm 的速率搅拌 1~2 min 进行固态脱毒 72 h。

#### (3) 15% 玉米秸秆水解液 (CSH) 制备

15% CSH 制备方法见 2.2.6。

15% CSH 中含有葡萄糖 54.1 g/L，木糖 16.9 g/L，糠醛 0 g/L，5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 0 g/L，乙酸 1.1 g/L。

### 3.2.4 *P. acidilactici* ZY271 种子液培养

*P. acidilactici* ZY271 菌株贮存在-80 °C 超低温冷冻冰箱中，种子培养方法如下。取一只 60% (v/v) 甘油管保存的 *P. acidilactici* ZY271 至室温，将其全部菌液接种于含有 20 mL MRS 液体培养基的 100 mL 摇瓶中，42 °C，150 rpm 恒温摇床中培养 12 h，此为一级种子。将一级种子液按 10% (v/v) 的接种量转接至含有 MRS 液体培养基的摇瓶中，同样条件在恒温摇床中培养 5 h，此为二级种子液<sup>[192]</sup>。*P. acidilactici* ZY271 种子培养过程中需要加入 1% (v/v) 的糖化酶，为了避免菌体生长过程的絮凝<sup>[180]</sup>。

将二级种子液以 10% 接种量转接至装有 20 mL 合成培养基或 15% CSH 的 100 mL 摇瓶和装有 1 L 15% CSH 的 3 L 发酵罐(Biotech 3BG-4, Baoxing Co., China)中。其中，L-乳酸发酵过程添加 0.6 g CaCO<sub>3</sub>/g 葡萄糖进行 pH 调节。摇瓶发酵在 42 °C，150 rpm 恒温摇床中进行，3 L 发酵罐发酵在 42 °C，150 rpm 条件下进行。

### 3.2.5 B 族维生素对 L-乳酸发酵的影响

本实验所用的合成培养基来自魏的研究<sup>[193]</sup>。实验方法采用单因素缺失即在合成培养基或 15% CSH 中单一缺失某一种 B 族维生素以验证 *P. acidilactici* ZY271 对 B 族维生素的需求。以添加了所有 B 族维生素 (VB<sub>1</sub>/VB<sub>2</sub>/VB<sub>3</sub>/VB<sub>5</sub>/VB<sub>6</sub>/VB<sub>7</sub>/VB<sub>9</sub>/肌醇) 的合成培养基或 15% CSH 为对照，过程需间隔一定时间取样。

### 3.2.6 样品、发酵产物和细胞生长分析检测

B 族维生素基于相应营养缺陷型菌株的细胞生长测定<sup>[53]</sup>。摇瓶或发酵罐中取出的样品在 12,000 rpm 下离心 5 min 后取上清，稀释适当倍数，并通过 0.22 μm 滤膜以除去杂菌。其中，葡萄糖、木糖、L-乳酸和抑制物浓度通过 HPLC (LC-20AD pump, RID-10A refractive index detector, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行检测，所使用的色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，柱温 65 °C，流动相为 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，流速为 0.6 mL/min。

3 L 发酵罐中的细胞生长的表征通过平板菌落计数。将稀释了一定倍数的发酵液涂布于 MRS 琼脂平板上，42 °C 恒温培养箱中培养 48 h，并计算 CFU (Colony-Forming Units, 菌落形成单位)。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 乳酸菌进行乳酸发酵过程中对 B 族维生素的需求

Klotz 等人研究，B 族维生素是乳酸菌生产乳酸时关键的营养需求<sup>[156]</sup>，为了验证单一 B 族维生素的缺失对乳酸菌发酵性能的影响，本研究采用本实验室的一株产 L-乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 作为模式菌株，在合成培养基<sup>[179]</sup>中分别缺失一种 B 族维生素的方法来确定 B 族维生素是否是影响乳酸发酵的关键营养以及影响乳酸发酵的关键性 B 族维生素 (图 3.1)。

合成培养基的组成包含乳酸菌生长生产所需的碳源、氮源、营养盐、碱基以及 B 族维生素。与工业常用的合成培养基 (MRS 培养基) 比较，本实验使用的合成培养基成分

中不包含 YE 和蛋白胨这两种主要氮源,而是通过添加适当浓度的 20 种氨基酸、B 族维生素和碱基进行弥补需求。其中, B 族维生素的添加浓度是依据 Klotz 等<sup>[156]</sup>研究检测的 10 g/L YE 中的各种 B 族维生素的含量。对照组为加入了全部的 B 族维生素。

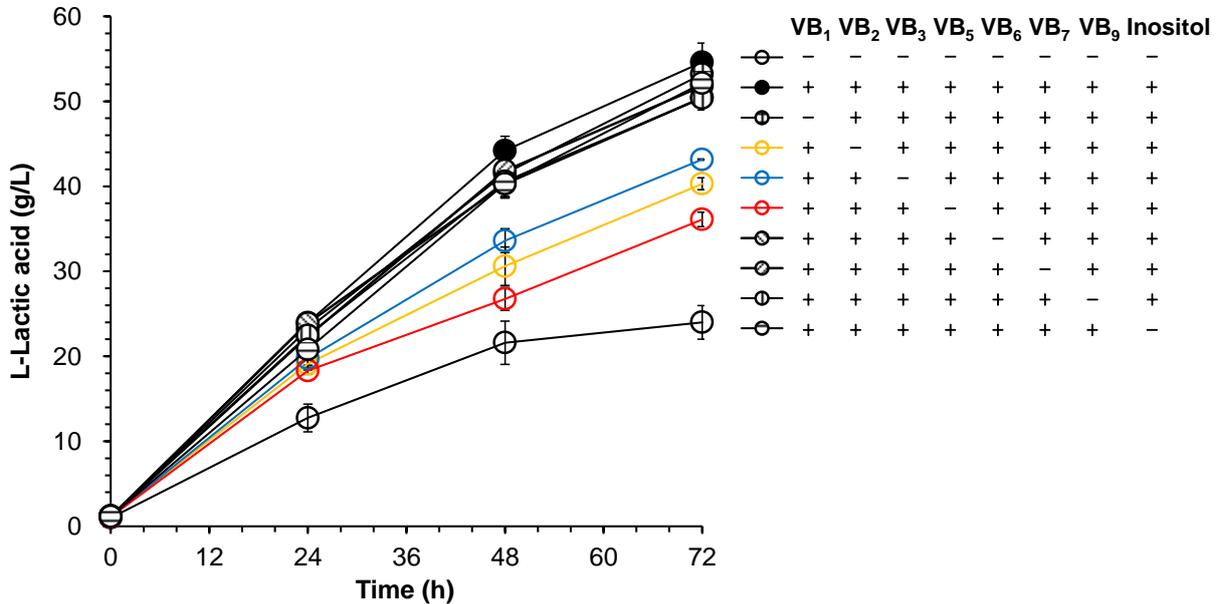


图 3.1 合成培养基中单一缺失 B 族维生素的 L-乳酸发酵

Fig. 3.1 L-lactic acid fermentation in synthetic medium with vitamin B deficiency

**Blank:** 无 B 族维生素的添加; **Full:** 添加所有的 B 族维生素, 即 954  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>1</sub>, 495  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>2</sub>, 9,840  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>3</sub>, 2,170  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>5</sub>, 772  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>6</sub>, 18.3  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>7</sub>, 583  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>9</sub> 和 58.4  $\mu\text{g/L}$  肌醇; +: 添加; -: 缺失

培养基: 见 3.2.2 合成培养基

发酵条件: 10%接种量, 42 °C 和 150 rpm, 摇瓶发酵

图 3.1 所示, 与添加了全部 B 族维生素的 L-乳酸产量 (54.6 g/L) 相比较, 未添加 B 族维生素的乳酸产量仅 24.0 g/L, 表明 B 族维生素是 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸生产的必须营养。合成培养基中分别单一缺失 VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 的乳酸产量分别为 40.3 g/L、43.2 g/L 和 36.1 g/L, 比添加全部 B 组维生素的 L-乳酸产量 (54.6 g/L) 分别降低了 26.2%、20.9% 和 33.9%。而合成培养基中分别单一缺失 VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 和肌醇的乳酸产量分别为 53.2 g/L、50.5 g/L、51.8 g/L、50.4 g/L 和 52.2 g/L, 和对照组 L-乳酸产量 (54.6 g/L) 相比, 并没有明显的降低。

这些结果表明, 乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 在 L-乳酸生产过程中对 B 族维生素具有高的需求。同时, VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 是 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸生产的关键性 B 族维生素, 且对 VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 和肌醇的需求不高。

在早期的文献报道中也有类似的结果, VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 不但对 *P. acidilactici* 的细胞生长和乳酸生产极其重要, 而且, 在其他乳酸菌中, 如 *L. plantarum*<sup>[181]</sup>、*L. casei*<sup>[181,182]</sup>、

*L. acidophilus*<sup>[181]</sup>、*L. leichmannii*<sup>[183]</sup>、*L. buchneri*<sup>[183]</sup>、*L. brevis*<sup>[183]</sup>、*L. hilgardii*<sup>[183]</sup>、*Sporolactobacillus inulinus*<sup>[156]</sup>、*Streptococcus liquefaciens*<sup>[181]</sup>、*P. cerevisiae*<sup>[183]</sup>中同样至关重要。VB<sub>5</sub> 是 CoA 和酰基载体蛋白 (ACP) 的重要组成成分，是蛋白质合成和脂肪酸合成的重要部分<sup>[184]</sup>。VB<sub>2</sub> 和 VB<sub>3</sub> 分别是 FAD 和 NAD 辅酶的重要前体，作为乳酸脱氢酶的辅助因子，NADH 直接影响乳酸的产生<sup>[185]</sup>。

### 3.3.2 玉米秸秆水解液中 B 族维生素对 L-乳酸发酵的影响

木质纤维素生物质中含有高浓度的 B 族维生素<sup>[53]</sup>，可以作为对维生素需求较高的生物及基化学品生产的外源添加物质。因此，利用 *P. acidilactici* ZY271 在 15% CSH 中进行 L-乳酸生产。同样单一缺失某一种 B 族维生素，验证 15% CSH 中 B 族维生素对 *P. acidilactici* ZY271 的影响 (图 3.2)。

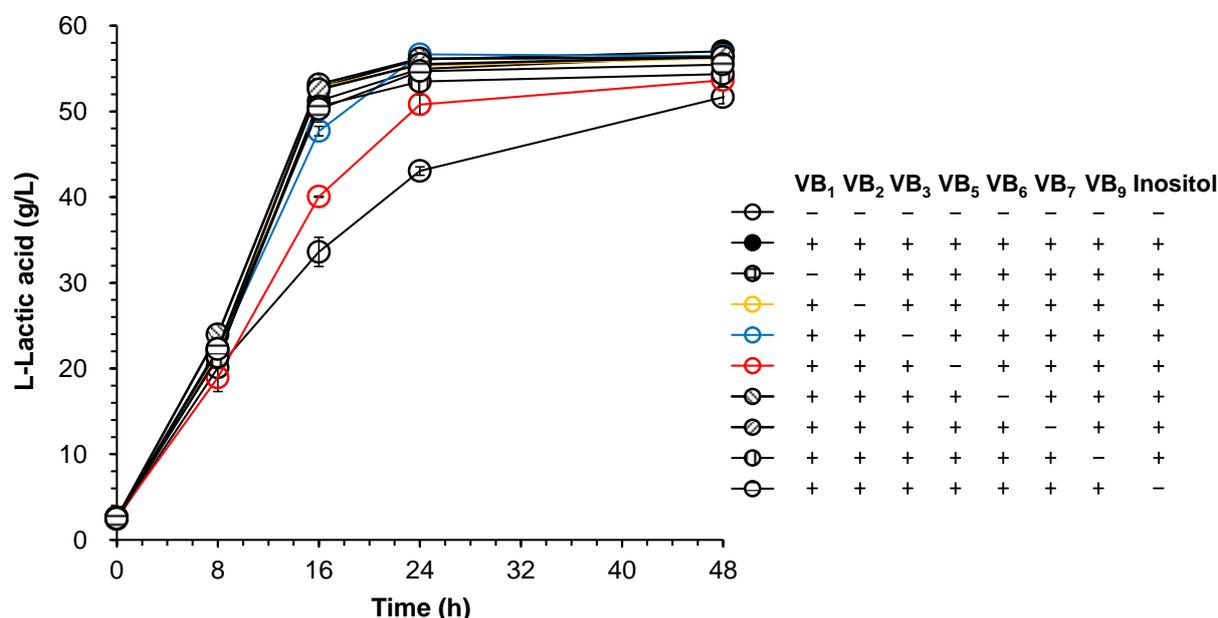


图 3.2 玉米秸秆水解液中单一缺失 B 族维生素的 L-乳酸发酵

Fig. 3.2 L-lactic acid fermentation in corn stover hydrolysate with vitamin B deficiency  
**Blank:** 无 B 族维生素的添加; **Full:** 添加所有的 B 族维生素, 即 954 μg/L VB<sub>1</sub>, 495 μg/L VB<sub>2</sub>, 9,840 μg/L VB<sub>3</sub>, 2,170 μg/L VB<sub>5</sub>, 772 μg/L VB<sub>6</sub>, 18.3 μg/L VB<sub>7</sub>, 583 μg/L VB<sub>9</sub> 和 58.4 μg/L 肌醇; +: 添加; -: 缺失

培养基: 15% 玉米秸秆水解液 (54.1 g/L 葡萄糖, 16.9 g/L 木糖, 265 μg/L VB<sub>1</sub>, 1,420 μg/L VB<sub>2</sub>, 738 μg/L VB<sub>3</sub>, 30 μg/L VB<sub>5</sub>, 63 μg/L VB<sub>6</sub>, 59 μg/L VB<sub>7</sub>, 4 μg/L VB<sub>9</sub>), 5 g/L 无水乙酸钠, 2 g/L 磷酸氢二钾, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.58 g/L 七水硫酸镁, 0.25 g/L 一水硫酸锰

发酵条件: 10%接种量, 42 °C 和 150 rpm, 摇瓶发酵

由图 3.2 的结果, 在同样的糖浓度 (15% CSH: 54.1 g/L 葡萄糖+16.9 g/L 木糖; 合成培养基: 55 g/L 葡萄糖+17 g/L 木糖) 条件下, 未添加 B 族维生素的 15% CSH 摇瓶发酵在 48 h 后 L-乳酸产量为 51.7 g/L, 约为未添加 B 族维生素的合成培养基摇瓶中 L-乳酸产量 (48 h 的 L-乳酸浓度 21.6 g/L) 的 2.4 倍, 这个结果表明, CSH 中丰富的 B 族

维生素部分弥补了 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸生产时对维生素 B 的需求, 而玉米秸秆水解液中的这些维生素 B 能够减少 YE、蛋白胨和玉米浆等外源营养物质的添加。

表 3.1 玉米秸秆水解液中 B 族维生素的含量  
Table 3.1 Vitamin B content in corn stover hydrolysate

Components	Control ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>[156]</sup>	Corn stover hydrolysate ( $\mu\text{g/L}$ )
Thiamine (VB <sub>1</sub> )	954	265
Riboflavin (VB <sub>2</sub> )	495	1,420
Niacin (VB <sub>3</sub> )	9,840	738
Pantothenate (VB <sub>5</sub> )	2,170	30
Pyridoxine (VB <sub>6</sub> )	772	63
Biotin (VB <sub>7</sub> )	18	59
Folic acid (VB <sub>9</sub> )	583	4

Control<sup>[156]</sup>: Klotz 等人研究的含有 10 g/L YE 中的 B 族维生素含量。

当 B 族维生素全添加至 15% CSH 中, L-乳酸浓度 (57.0 g/L) 在 24 h 内达到最高, 生产率为 2.34 g/L h, 显著高于合成培养中 B 族维生素全添加时的生产率 (72 h 生产率为 0.76 g/L h), 这表明 15% CSH 中除了丰富的维生素 B 外, 仍含有其他未知的营养物质促进 L-乳酸的发酵。

与 B 族维生素全添加的发酵相比, 在 15% CSH 中分别单一缺失 VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 和肌醇对 L-乳酸的生产率和得率基本无影响。然而, 在 15% CSH 中分别单一缺失 VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 的 L-乳酸产量分别为 56.2 g/L, 56.5 g/L 和 53.7 g/L, 无显著的降低, 此现象明显不同于在合成培养基中的结果。在整个发酵过程中, VB<sub>2</sub> 的缺失对 L-乳酸的产率无任何影响。为了解释这一现象, 我们检测了 15% CSH 中 B 族维生素的含量, 并将其列于表 3.1 中。表 3.1 数据看出, CSH 中的 VB<sub>2</sub> 含量为 1,420  $\mu\text{g/L}$ , 是合成培养基中 VB<sub>2</sub> (495  $\mu\text{g/L}$ ) 的 3 倍多, 因此, 完全可以弥补 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸发酵对 VB<sub>2</sub> 的需求, 不需外源添加; CSH 中的 VB<sub>3</sub> 含量为 738  $\mu\text{g/L}$ , 比合成培养基中 VB<sub>3</sub> (9,840  $\mu\text{g/L}$ ) 低了一个数量级, 然而, 却基本可以弥补 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸发酵对 VB<sub>3</sub> 的需求, 但是生产速率稍微缓慢; CSH 中的 VB<sub>5</sub> 含量为 30  $\mu\text{g/L}$ , 比合成培养基中 VB<sub>5</sub> (2370  $\mu\text{g/L}$ ) 低了两个数量级, 无法弥补高浓度乳酸发酵对 VB<sub>5</sub> 的需求, 因此, 在进行高浓度纤维素 L-乳酸发酵生产过程中仍需要外源添加适当浓度 VB<sub>5</sub>。

### 3.3.3 15% CSH 中外源添加特定的 B 族维生素促进纤维素 L-乳酸的生产

在合成培养基和 15% CSH 摇瓶实验的结果发现, VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 是 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸发酵的关键 B 族维生素, 而 CSH 中含有丰富的营养物质, 尤其是 *P. acidilactici* ZY271 对 B 族维生素的需求。

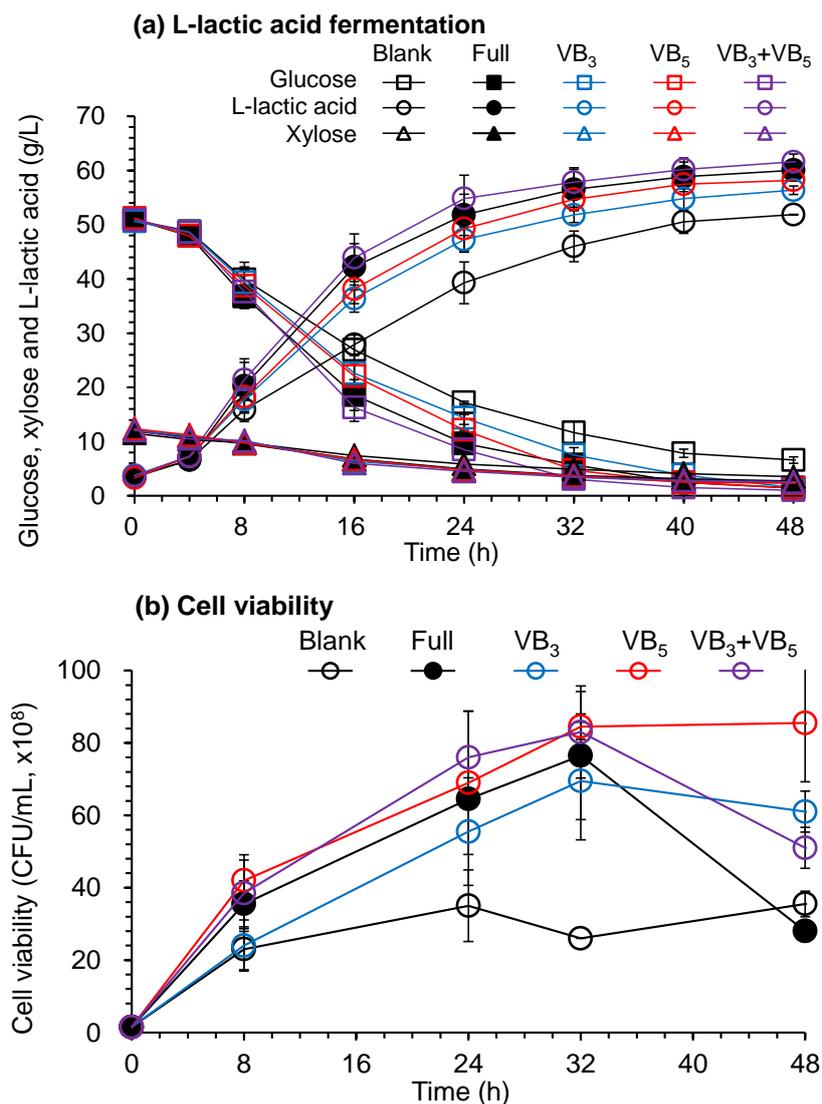


图 3.3 在 15% CSH 补加特定 B 族维生素的纤维素 L-乳酸发酵

Figure. 3.3 Cellulosic L-lactic acid fermentation using corn stover feedstock with supplementation of specific vitamins B compounds

(a) L-乳酸发酵; (b) 细胞生长; **Blank**, 不添加 B 族维生素; **Full**, 添加所有的 B 族维生素, 即 954  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>1</sub>, 495  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>2</sub>, 9,840  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>3</sub>, 2,170  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>5</sub>, 772  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>6</sub>, 18.3  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>7</sub>, 583  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>9</sub> 和 58.4  $\mu\text{g/L}$  肌醇; **VB<sub>3</sub>**: 在 **Blank** 中仅补加 VB<sub>3</sub>, 9,102  $\mu\text{g/L}$ ; **VB<sub>5</sub>**, 在 **Blank** 中仅补加 VB<sub>5</sub>, 2140  $\mu\text{g/L}$ ; **VB<sub>3</sub>+VB<sub>5</sub>**, 在 **Blank** 中同时补加 VB<sub>3</sub> (9,102  $\mu\text{g/L}$ ) 和 VB<sub>5</sub> (2140  $\mu\text{g/L}$ )

培养基: 15% 玉米秸秆水解液 (54.1 g/L 葡萄糖, 16.9 g/L 木糖, 265  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>1</sub>, 1,420  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>2</sub>, 738  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>3</sub>, 30  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>5</sub>, 63  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>6</sub>, 59  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>7</sub>, 4  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>9</sub>), 5 g/L 无水乙酸钠, 2 g/L 磷酸氢二钾, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.58 g/L 七水硫酸镁, 0.25 g/L 一水硫酸锰

发酵条件: 10%接种量, 42 °C 和 150 rpm, 3 L 发酵罐

进一步向 15% CSH 中仅外源添加两种维生素 B (9,102  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>3</sub> 和 2140  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>5</sub>)。图 3.3 结果所示, 发酵 48 h 后, 仅外源添加 VB<sub>3</sub> 的 L-乳酸浓度提高了 8.7% (从 51.9 g/L

提高至 56.4 g/L); 仅外源添加 VB<sub>5</sub> 的 L-乳酸浓度提高了 12.1% (从 51.9 g/L 提高至 58.2 g/L)。这非常接近 Full 组的 L-乳酸浓度 (60.0 g/L)。在 15% CSH 中同时外源添加 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 时的对 L-乳酸生产有所促进。这些结果表明, 利用玉米秸秆水解液进行 L-乳酸发酵性能的实现不需要补加除 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 以外的其他 B 族维生素。

木质纤维素生物质中含有高浓度的 B 族维生素, 氨纤维膨胀 (AFEX)<sup>[177]</sup> 和本课题组的干法生物炼制技术<sup>[169]</sup> 有效地保留了生物质原料中大量的 B 族维生素。这些 B 族维生素在纤维素发酵中发挥重要作用, 如生物质原料中的 VB<sub>7</sub> 可阻断谷氨酸的分泌<sup>[53]</sup>。本部分研究表明, 木质纤维素生物质中的 B 族维生素有效促进了 L-乳酸发酵和一定程度上减少了高成本的外源生物素添加剂的添加。在 L-乳酸发酵中补加特定的 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 可进一步提高 L-乳酸发酵得率和速率, 因此, 可替代 YE、蛋白胨等复杂营养素。

外源补加的 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 是化学合成生产, 其成本分别为 \$9.1/kg (≥99% 纯度, 中国产, www.1688.com) 和 \$13.9/kg (≥99% 纯度, 中国产, www.1688.com), 在纤维素 L-乳酸发酵中的添加微量, 分别为 148 g VB<sub>3</sub>/t L-乳酸和 35 g VB<sub>5</sub>/t L-乳酸, 这在一定程度上降低了 L-乳酸在营养添加上的成本。

这些结果表明, CSH 中的 B 族维生素可以促进 L-乳酸的发酵生产, 同时, 在纤维素 L-乳酸发酵生产中添加微量的 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 可以替代/降低工业中成本较高的营养源 (YE/蛋白胨) 的添加。因此, 可以进一步研究木质纤维素中丰富的 B 族维生素在其他生物基化学品中的应用。

### 3.4 本章小结

B 族维生素是乳酸菌生产乳酸时关键的营养需求, 首先在合成培养基中通过单一 B 族维生素的缺失方法, 发现乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 在 L-乳酸生产过程中对 B 族维生素具有高的需求。同时, VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 是 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸生产的关键性 B 族维生素, 且对 VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 和肌醇的需求不高。然而, 同样的方法应用于 15% CSH 中, 分别单一缺失 VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 的 L-乳酸终产量基本无显著变化。为了对这一现象进行解释, 本研究检测了 15% CSH 中 B 族维生素的含量, 主要是因为 VB<sub>2</sub> 含量丰富, 完全可以弥补 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸发酵对 VB<sub>2</sub> 的需求, 不需外源添加; VB<sub>3</sub> 含量 (738 μg/L) 虽然比合成培养基中 VB<sub>3</sub> (9,840 μg/L) 低了一个数量级, 然而, 却基本可以弥补 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸发酵对 VB<sub>3</sub> 的需求, 但是生产速率稍微缓慢; VB<sub>5</sub> 含量 (30 μg/L) 很低, 无法弥补高浓度乳酸发酵对 VB<sub>5</sub> 的需求, 因此, 在进行高浓度纤维素 L-乳酸发酵生产过程中仍需要外源添加适当浓度 VB<sub>5</sub>。此外, 15% CSH 中除了丰富的维生素 B 外, 仍含有其他未知的丰富营养物质促进 L-乳酸的发酵速率显著快于合成培养基。

在 L-乳酸发酵的放大体系中, 向 CSH 中仅外源添加适当浓度的 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 可以实现高 L-乳酸的发酵生产, 同时, 在纤维素 L-乳酸发酵生产中添加微量的 VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 可以替代/降低工业中成本较高的营养源 (YE/蛋白胨) 的添加。

## 第 4 章 结论与展望

### 4.1 结论

先前的研究中,发现玉米秸秆中含有丰富的 B 族维生素,尤其是核黄素(VB<sub>2</sub>)、烟酸(VB<sub>3</sub>)和生物素(VB<sub>7</sub>)等。目前对木质纤维素原料中维生素等营养成分的方向鲜有研究,某些文章侧重点并不是研究木质纤维素原料在生物基化学品生产过程中减少营养盐及生长因子的添加,只是可以从文章中看出,直接利用生物质原料水解液,不添加任何营养也可以获得高浓度的生物及化学品。生物素对生物素缺陷型菌株比如谷氨酸棒杆菌的谷氨酸发酵具有很实际的应用,本研究主要探究了木质纤维素生物质组分中生物素等 B 族维生素成分在预处理、生物脱毒过程的保留,这些化合物对谷氨酸发酵和乳酸发酵的影响。以下是本研究的主要结论和创新之处:

(1) 将玉米秸秆结构进行茎和叶的拆分,发现玉米叶生物质中具有远比玉米茎更高的生物素,达到  $1,217.4 \pm 31.2 \mu\text{g}/\text{kg DM}$ 。且经过生物炼制各个工段(预处理、生物脱毒、酶解糖化)后,玉米叶生物质中的生物素浓度基本得到保留,基本无损失,玉米叶生物质是生物素提取工艺开展的优异原料。

(2) 选择了 4 株菌株,即 *S.cerevisiae* DQ1、*S.cerevisiae* XH7、*T. cutaneum* ACCC 20271 和 *C. glutamicum* S9114 对玉米叶生物质中的生物素进行吸收尝试,通过分别检测细胞内的生物素浓度和细胞外(玉米秸秆水解液)的生物素浓度,发现 *C. glutamicum* S9114 具有较高的生物素吸收能力和较快的细胞生长,是进行玉米叶生物质中生物素提取的优良菌株。

(3) 为了强化 *C. glutamicum* S9114 对生物素的吸收,发现菌体对生物素的吸收依赖于基因簇 *bioYMN* 编码的生物素转运体。然后,成功构建了两株工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)和 *C. glutamicum* S9114  $\Delta\text{CGS9114\_RS02700}::(\text{H36-}i\text{bioYMN})$ 。过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-*bioYMN*)具有最强的生物素吸收能力和最高的生物素提取率,是制备生物素提取物的优选菌株。商品用生物素多采用化学合成途径生产,而通过微生物提取法得到高含量生物素提取物的创新工艺打开了生物素生产途径的新篇章。

(4) 为了验证生物素提取物的实用性,将其在谷氨酸发酵中进行应用。在谷氨酸生产中,CSL、生物素提取物和纯生物素具有基本相同的效果,可以完全取代生物基化学品工业生产中所需的生物素营养添加剂。

(5) *P. acidilactici* ZY271 在 L-乳酸生产过程中对 B 族维生素具有高的需求。同时,VB<sub>2</sub>、VB<sub>3</sub> 和 VB<sub>5</sub> 是 *P. acidilactici* ZY271 进行 L-乳酸生产的关键性 B 族维生素,且对 VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 和肌醇的需求不高。

(6) 玉米秸秆生物质中不仅含有丰富的营养物质,高浓度的 B 族维生素完全弥补了 *P. acidilactici* ZY271 对 VB<sub>2</sub> 的需求,基本满足 *P. acidilactici* ZY271 对 VB<sub>3</sub> 的需求,VB<sub>5</sub> 不

足。

(7) 木质纤维素生物质中生物素的提取工艺、生物素提取物以及木质纤维素生物质中丰富 B 族维生素在生物基化学品生产中的应用是前所未有的突破,这在工业生产降低生产成本上意义重大。

## 4.2 展望

本研究主要对木质纤维素生物质中 B 族维生素的提取和应用进行了一系列的探究,通过微生物吸收法成功将生物素提取的工艺,成功制备出可以完全取代生物素营养添加剂的生物素提取物。此外,我们也发现了乳酸发酵对 B 族维生素的高需求,并成功将木质纤维素生物质中丰富的 B 族维生素应用于乳酸发酵。然而,仍然存在着很对需要改进和深入研究的问题。

(1) 过表达的工程菌株 *C. glutamicum* S9114 (pH36mob-bioYMN)对生物素的吸收速率显著优于工程菌株 *C. glutamicum* S9114  $\Delta$ CGS9114\_RS02700::(*H36-bioYMN*),其原因除了基因在细胞中的高拷贝差异外,整合靶位点的选择也是其中一个主要原因,接下来的工作可以尝试更换一个或几个重要代谢路径的靶位点,提高整合菌株对生物素的吸收能力。

(2) 在生物素提取工艺过程中,由于细胞在接种几分钟内就被收取,而生物物质水解液中的碳源、氮源、营养物质等均未被利用。接下来的工作可以将该细胞收取工艺采用固定化细胞方式,然后将细胞收取后的高糖高营养的水解液继续进行其他生物基化学品的生产,如乙醇生产等。

(3) 生物素提取物除了在谷氨酸发酵中成功应用,后续仍可以将其在其他工业生产中进行广泛应用,如赖氨酸生产、乙醇发酵等。

(4) 寻找其他菌株,将木质纤维素生物质中的其他 B 族维生素通过类似的微生物吸收的方式进行提取,并在相应的生物基化学品、燃料等工业生产中应用。

(5) 木质纤维素生物质中除了含有丰富的 B 族维生素,还含有其他丰富的营养物质、金属离子、矿物质等成分,未来的工作可以进一步发掘这些化合物在乙醇发酵、氨基酸生产等其他生物基化学品的作用。

(6) 完善生物素的细胞提取物的制备工艺,保证各种氨基酸、核苷酸、多肽等物质的保留,使其能够成为更广泛应用于各种生物基化学品生产中的综合性营养添加剂。

## 参考文献

- [1] De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*. 2018, 247: 1144-1154.
- [2] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*. 2004, 106(1263): 147-150.
- [3] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015, 6(25): 4497-4559.
- [4] van Wyk JPH. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends Biotechnology*. 2001, 19(5): 172-177.
- [5] Fuqaha AH. Sustainable lignin fractionations with ultrafiltration. *Italic*. 2011.
- [6] Gall DL, Ralph J, Donohue TJ, et al. Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017, 45: 120-126.
- [7] Zabed H, Sahu J, Suely A, Boyce A, et al. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2017, 71: 475-501.
- [8] Cherubini F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51(7): 1412-1421.
- [9] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38(4): 522-550.
- [10] Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(2): 137-145.
- [11] Gu H, An R, Bao J. Pretreatment refining leads to constant particle size distribution of lignocellulose biomass in enzymatic hydrolysis, *Chemical Engineering Journal*. 2018, 352: 198-205.
- [12] Ponnusamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential, *Bioresource technology*. 2019, 271: 462-472.
- [13] De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*. 2018, 247: 1144-1154.
- [14] Chen H, Liu J, Chang X, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-

- value chemicals. *Fuel Processing Technology*. 2017, 160: 196–206.
- [15] Lee JY, Li P, Lee J, et al. Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2013, 127: 119–125.
- [16] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480–4488.
- [17] Landaeta R, Aroca G, Acevedo F, et al. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Applied Energy*. 2013, 120: 124–130.
- [18] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(4): 340–349.
- [19] Jonsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103–112.
- [20] Ko JK, Um Y, Park YC, et al. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99(10): 4201–4212.
- [21] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 16.
- [22] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocelluloses pretreatment using a newly isolated fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [23] Paulova L, Patakova P, Branska B, et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. 2015, 33(6): 1091–1107.
- [24] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, et al. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 42: 30–39.
- [25] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25(4): 184–192.
- [26] Tomás-Pejo E, Oliva JM, Olsson L. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 100(6): 1122–1131.
- [27] Alban C, Job D, Douce R. Biotin metabolism in plants. *Annual Review of Plant*

- Physiology and Plant Molecular Biology. 2000, 51: 17-47.
- [28] Halvin K, Nisamedtinov I, Paalme T, Comparison of different extraction methods to determine free and bound forms of B-group vitamins in quinoa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, 406(28): 7355–7366.
- [29] Hu Y, Wu H, Yin X, et al. Rapid and interference-free analysis of nine B-group vitamins in energy drinks using trilinear component modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data. *Talanta*. 2018, 180: 108–119
- [30] Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, et al. *Handbook of vitamins*. New York. CRC Press. 2001.
- [31] Kerns JC, Gutierrez JL. Thiamin, American Society for Nutrition. *Advances in Nutrition*. 2017, 8: 395–397.
- [32] Settembre E, Begley TP, Ealick SE. Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003, 13(6):739–747.
- [33] Fitzpatrick TB, Thore S. Complex behavior: from cannibalism to suicide in the vitamin B<sub>1</sub> biosynthesis world. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014, 29: 34–43.
- [34] Schwechheimer SK, Park EY, Revuelta JL, et al. *Biotechnology of riboflavin*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016, 100(5): 2107–2119.
- [35] Hageman GJ, Stierum RH. Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutation Research-Fundamental and Molecular of Mutagenesis*. 2001, 475(1-2): 45-56.
- [36] Kobayashi M, Shimizu S. Nicotinic acid and nicotinamide. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*. 1999, 57(10): 2211-7.
- [37] Abiko Y. Metabolism of coenzyme A. In *Metabolism of Sulphur Compounds Metabolic Pathways*. Academic Press. 1975, 1-25.
- [38] Ragaller V, Lebzien P, Su ðekum K-H, et al. Pantothenic acid in ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2011, 95(1): 6-16.
- [39] Horrobin DF. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1993, 57(5 Suppl): 732S-736S; discussion 736S-737S.
- [40] Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annual Review of Biochemistry*. 2004, 73: 383–415.
- [41] Phillips RS. Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes. *Biochemical ET Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2015, 1854(9): 1167–1174.
- [42] Fitzpatrick TB, Amrhein N, Kappes B, et al. Two independent routes for de novo vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis: not that different after all. *The Biochemical Journal*. 2007, 407(1): 1–13.
- [43] Clase CM, Ki V, Holden RM. Water-soluble vitamins in people with low glomerular filtration rate or on dialysis: A review. *Seminars in dialysis*. 2013, 26(5): 546-567.

- [44] Pauling H, Weimann BJ. Vitamin B6. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 1996, 27: 530–540.
- [45] di Salvo ML, Contestabile R, Safo MK. Vitamin B6 salvage enzymes: mechanism, structure and regulation. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)*. 2011, 1814(11): 1597–1608.
- [46] Eggersdorfer M, Laudert D, L'Éinois U, et al. One hundred years of vitamins - a success story of natural sciences. *Angewand TE Chemie-International Edition*. 2012, 51(52): 12960–12990.
- [47] Combs GF. *The Vitamins, Fundamentals Aspects in Nutrition and Health*, 3rd ed. Elsevier Academic Press. 2008.
- [48] Halver JE. The vitamins. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish Nutrition*, 3rd ed. Academic Press. 2002, 61–141.
- [49] Higdon J. *An Evidence-Based Approach to Vitamins and Minerals: Health Benefits and Intake Recommendations*. Thieme, Stuttgart, Germany. 2003.
- [50] Baldet P, Alban C, Axiotis S, et al. Characterization of biotin and 3-methylcrotonyl-coenzyme a carboxylase in higher plant mitochondria. *Plant Physiology*. 1992, 99: 450–5.
- [51] Baldet P, Alban C, Axiotis S, et al. Localization of free and bound biotin in cells from green pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993, 303(1): 67–73.
- [52] Rawsthorne S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*. 2002, 41(2): 182–196.
- [53] Wen J, Xiao Y, Liu T, et al. Rich biotin content in lignocelluloses biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 132.
- [54] Cronan JE. Biotin and lipoic acid: synthesis, attachment, and regulation. *EcoSal Plus*. 2014, 6.
- [55] Cronan JE. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2018, 47: 60–66.
- [56] Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, et al. Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, 93: 419–430.
- [57] Scheider Z, Stroiński A. Biosynthesis of vitamin B12. In: Scheider Z et al (eds) *Comprehensive B12*. Walter de Gruyter Germany. 1987, 93–110.
- [58] Watanabe F, Bito T. Vitamin B12 sources and microbial interaction. *Experimental Biology & Medicine*. 2018, 243: 148–158.
- [59] Martens JH, Barg H, Warren M, et al. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 58(3): 275–285.
- [60] Zhang H, Lan F, Shi Y, et al. A “three-in-one” sample preparation method for simultaneous determination of B-group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast® kits.

- Food Chemistry. 2014, 153: 371–377.
- [61] Kapil B, Mahesh K, Vipin S, et al. Microbiological assay for vitamin B. International Research Journal of Pharmacy, 2012, 3(2): 74–82.
- [62] Livaniou E, Costopoulou D, Vassiliadou I, et al. Analytical techniques for determining biotin. Journal of Chromatography A. 2000, 881(1–2): 331–343.
- [63] MacBride DE, Wyatt C. Evaluation of a modified AOAC determination for thiamin and ribofavin in foods. Journal of Food Science. 1983, 48(3): 748–750.
- [64] Koontz JL, Phillips KM, Wunderlich KM, et al. Comparison of total folate concentrations in foods determined by microbiological assay at several experienced US commercial laboratories. Journal of AOAC International. 2005, 88(3): 805–813
- [65] Massey V. The chemical and biological versatility of ribofavin. Biochemical Society Transactions. 2000, 28: 283–296
- [66] Bell JG. Microbiological assay of vitamins of the B groups in foodstuffs. Lab Practice. 1974, 23: 235–242.
- [67] Walsh JH. Wyse BW, Hansen RG. A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. Journal Food Biochemistry. 2007, 3(4): 175–189.
- [68] Ollilainen V, Finglas PM, van den Berg H, et al. Certification of B-group vitamins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>) in four food reference materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001, 49(1): 315–321.
- [69] Shaw W, Bailey G. Evaluation of two vitamin B<sub>12</sub> assay kits and *L. leichmannii* bioassay. Clinical Biochemistry. 1974, 7: 320–325.
- [70] Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, et al. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology. 2002, 60(1-2): 67–72.
- [71] Kotarska K, Czuprynski B, Kłosowski G. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. Journal of Food Engineering. 2006, 77(4): 965–971.
- [72] Wu H, Ito K, Shimoi H. Identification and characterization of a novel biotin biosynthesis gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. 2005, 71(11): 6845–6855.
- [73] Qi K, Xia X, Zhong J. Enhanced anti-oxidative activity and lignocellulosic ethanol production by biotin addition to medium in *Pichia guilliermondii* fermentation. Bioresource Technology. 2015, 189: 36–43.
- [74] Furukawa K, Kitano H, Mizoguchi H, et al. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2004, 98(2): 107–113.

- [75] Nikolic S, Mojovic L, Rakin M, et al. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*. 2009, 88(9): 1602–1607.
- [76] Brandberg T, Karimi K, Taherzadeh MJ, et al. Continuous Fermentation of Wheat-Supplemented Lignocellulose Hydrolysate With Different Types of Cell Retention. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 98(1): 80-90.
- [77] Kotarska K, Czuprynski B, Kłosowski G. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. *The Journal of Food Engineering*. 2006, 77(4): 965–971.
- [78] Ruiz-Barba JL, Jimenez-Diaz R. Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *The Journal of Applied Bacteriology*. 1994, 76(4): 350–355.
- [79] Kwon S, Lee PC, Lee EG, et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26(2-4): 209–215.
- [80] Li J, Gao N, Li F. Effect of vitamin on lactic acid fermentation of *Lactobacillus delbrueckii* and its optimization. *Mod Food Science Technology*. 2001, 17: 63–67
- [81] Qiu H, Xu G, Zhuang Y, et al. Effects of vitamins on cell activity and metabolic pathway activity of lactic acid bacteria. *Journal of East China of University and Science. Technology*. 2007, 33: 330–335.
- [82] Chen KQ, Li J, Ma J, et al. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresource Technology*. 2011, 102(2): 1704–1708.
- [83] Gopinath V, Meiswinkel TM, Wendisch VF, et al. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 92(5): 985–996.
- [84] Shiio I, Otsuka SI, Takahashi M. Effect of Biotin on the Bacterial Formation of Glutamic acid. *The Journal of Biochemistry*. 1962, 51: 56-62.
- [85] Hasegawa T, Hashimoto KI, Kawasaki H, et al. Changes in Enzyme Activities at the Pyruvate Node in Glutamate-Overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 105(1): 12-19.
- [86] Coello N, Montiel E, Concepcion M, et al. Optimisation of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*. 2002, 85: 207-211
- [87] Ko YT, Chipley JR. Role of biotin in the production of lysine by *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbioscience*. 1984, 40: 161-171.
- [88] Park SH, Kim HU, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*

- for L-arginine production. *Nature Communication*. 2014, 5: 4618.
- [89] Chen K, Li J, Ma J, Jiang M, et al. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresource Technology*. 2000, 102(2): 1704-1708.
- [90] 李红波, 贺玉明, 俞建良, 等. 谷氨酸生产中生物素含量的检测. *中国酿造*. 2013, 32:7.
- [91] Han X, Bao J. General Method to Correct the Fluctuation of Acid Based Pretreatment Efficiency of Lignocellulose for Highly Efficient Bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6(3): 4212–4219.
- [92] Goldberg MW, Sternbach LH. Synthesis of biotin. US patent. 1949, 2489235.
- [93] Del Campillo-Campbell A, Kayajanian G, Campbell A, et al. Biotin-requiring mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 1967, 94(6): 2065–2066.
- [94] Ikeda M, Miyamoto A, Mutoh S, et al. Development of Biotin-Prototrophic and – Hyperauxotrophic *Corynebacterium glutamicum* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(15): 4586–4594.
- [95] Finkenwirth F, Kirsch F, Eitinger T. A versatile *Escherichia coli* strain for identification of biotin transporters and for biotin quantification. *Bioengineered*. 2014, 5(2): 129–132.
- [96] Lichstein HC, Ferguson RB. On the permeability of *Lactobacillus arabinosus* to biotin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1958, 233(1): 243-244.
- [97] Lichstein HC, Waller JR. Factors affecting the accumulation of biotin by *Lactobacillus arabinosus*. *Journal Bacteriology*. 1961, 81: 65-69.
- [98] Waller JR, Lichstein HC. Biotin transport and accumulation by cells of *Lactobacillus plantarum*. I. General properties of the system. *Journal of Bacteriology*. 1965, 90(4): 843-852.
- [99] Waller JR., Lichstein HC. Biotin transport and accumulation by cells of *Lactobacillus plantarum*. II. Kinetics of the system. *Journal of Bacteriology*. 1965, 90(4): 853-856
- [100] Rogers TO, Lichstein HC. Characterization of the biotin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 1969,100(2): 557-564.
- [101] Kosugi A, Koizumi Y, Yanagida F, et al. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000, 89: 90-93.
- [102] Schneider J, Peters-Wendisch P, Stansen KC, et al. Characterization of the biotin uptake system encoded by the biotin-inducible *bioYMN* operon of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiology*. 2012, 12: 6.
- [103] Zempleni J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annual Review of Nutrition*. 2005, 25: 175-196.
- [104] Stolz J. Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from

- Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 2003, 20(3): 221-231.
- [105] Entcheva P, Phillips DA, Streit WR. Functional Analysis of *Sinorhizobium meliloti* Genes Involved in Biotin Synthesis and Transport. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(6): 2843–2848.
- [106] Rodionov DA, Mironov AA, Conservation of the Biotin Regulon and the *BirA* Regulatory Signal in *Eubacteria* and *Archaea*. *Genome Research*. 2002, 12(10): 1507–1516.
- [107] Guille ñ-Navarro K, Araiza G, Garcia-de Los Santos G, et al. The *Rhizobium etli* *bioMNY* operon is involved in biotin transport. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 250(2): 209–219.
- [108] Hebbeln P, Rodionov DA, Alfandega A, et al. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The United States of America*. 2007, 104(8): 2909–2914.
- [109] Azhar A, Booker GW, Polyak SW. Mechanisms of Biotin Transport. *Analytical Biochemistry*. 2015, 4: 4.
- [110] 陈宁, 氨基酸工艺学, 北京: 中国轻工业出版社. 2001, 127-131.
- [111] Ikeda K. A production method of seasoning mainly consists of salt of L-glutamic acid. Japanese patent. 148051908.
- [112] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation-Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1957, 50(6): 193-205.
- [113] Udaka S. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *Journal Bacteriology*. 1960, 79: 754-755.
- [114] Liebl W. *Corynebacterium*—Nonmedical. prokaryotes. 2006, 796-818.
- [115] Woo HM, Park JB. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal Biotechnology*. 2014, 180: 43–51
- [116] Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104(1-3): 155–172.
- [117] Kumagai H. Microbial production of amino acids in Japan. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 2000, 69: 71–85.
- [118] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 2005, 69(1): 1–8
- [119] Utagawa T. Production of arginine by fermentation. *Journal of Nutrition*. 2004, 134(10): 2854S–2857S.

- [120] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels — *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23(4): 631–640.
- [121] Kumar R, Vikramachakravarthi D, Pal P. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification. *Chemical Engineering and Processing*. 2014, 81: 59–71.
- [122] Clement Y, Laneelle G. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *Journal of General Microbiology*. 1986, 132(4): 925-929.
- [123] Nakao Y, Kikuchi M, Suzuki M, Doi M. Microbial production of glutamic acid by glycerol auxotrophs. I. Induction of glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from paraffins. *Agricultural Biology and Chemistry*. 1972, 36: 490-496.
- [124] Takinami K, Yoshii H, Tsuru H, et al. Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Part III: Biotin-Tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1965, 29: 351-359.
- [125] Nara T, Samejima H, Kinoshita S. Effect of penicillin on amino acid fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1964, 28: 120-124.
- [126] Takinami K, Yamada Y, Okada H. Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-Glutamic acid fermentation: Part IV biotin content of growing cells of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1966, 30(7): 674–682.
- [127] Cao Y, Duan Z, Shi Z. Effect of biotin on transcription levels of key enzymes and glutamate efflux in glutamate fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2014, 30(2): 461-468.
- [128] Martinez FAC, Balciunas EM, Salgado JM, et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, 30(1): 70–83.
- [129] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 877-902.
- [130] Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014, 7(2): 222-229.
- [131] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119(1): 10–18.
- [132] Bidy MJ, Scarlata C, Kinchin C. Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential. Golden CO 80401. 2016.

- [133] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481–489.
- [134] Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004, 7(2): 167–179.
- [135] Yi X, Zhang P, Sun J, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer  $L$ - and  $D$ -lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121.
- [136] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer  $D$ -lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369–1376.
- [137] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic  $L$ -lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 9–15.
- [138] Lee JW, Kim HU, Choi S, et al. Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22(6): 758–767.
- [139] Yang S, Madbouly SA, Schrader JA, et al. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications. *Green Chemistry*. 2015, 17(1): 380–393.
- [140] Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, et al. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced Drug Delivery Review*. 2016, 107: 153–162.
- [141] Lanao RPF, Jonker AM, Wolke JGC, et al. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Engineering Part B-Review*. 2013, 19(4): 380–390.
- [142] Sikder J, Roy M, Dey P, et al. Techno-economic analysis of a membrane-integrated bioreactor system for production of lactic acid from sugarcane juice. *Biochemical Engineering Journal*. 2012, 63: 81–87.
- [143] González MI, Álvarez S, Riera F, et al. Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*. 2007, 80(2): 553–561.
- [144] Sriphochanart W, Skolpap W, Jenö M, et al. Douglas. Effect of amino acid requirements on the growth and lactic acid production of *Pediococcus acidilactici* culture. *African Journal of Microbiology Research*. 2011, 5(22): 3815-3822.
- [145] Mills OE, Thomas TD. Nitrogen sources for growth of *Lactis streptococci* in milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*. 1981, 16(1): 43-55.
- [146] Deguchi Y, Morishita T. Nutritional Requirements in Multiple Auxotrophic Lactic Acid

- Bacteria: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 1992, 56(6): 913–918
- [147] Jensen PR, Hammer K. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59(12): 4363-4366.
- [148] Niven GW, Knight DJ, Mulholland F. Changes in the concentrations of free amino acids in milk during growth of *Lactococcus lactis* indicate biphasic nitrogen metabolism. *Journal of Dairy Research*. 1998, 65(1): 101-107.
- [149] Juillard V, Le Bars D, Kunji ERS, et al. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61(8): 3024-3030.
- [150] Fernández PAA, Saguir FM, de Nadra MCM. Effect of amino acids and peptides on growth of *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Latin American applied research*. 2003, 33(3): 225-229.
- [151] Rogosa M, Franklin JG, Perry KD. Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* spp. *Journal of General Microbiology*. 1961, 25: 473-482.
- [152] Aeshlimann A, Stockar UV. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1990, 32(4): 398–402.
- [153] Mehaia MA, Cheryan M. Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. *Enzyme and Microbial Technology*. 1991, 13(3): 257–261.
- [154] Roy D, Goulet J, LeDuy A. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1986, 24(3): 206–213.
- [155] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, et al. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 2005, 96(1): 63–67.
- [156] Klotz S, Kuenz A, Prusse U. Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green chemistry*. 2017, 19(19): 4633-4641.
- [157] Amrane A, Prigent Y. Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model: relevance for nitrogen source and preculture assessment. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1994, 40(5): 644-649.
- [158] Ledesma OV, De Holgado AP, Oliver G, et al. A synthetic medium for comparative

- nutritional studies of *Lactobacilli*. The Journal of Applied Bacteriology. 1977, 42(1): 123-133.
- [159] Cheng P, Muller S, Bajpai R, et al. Lactic acid production from enzyme thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. Journal of Industrial Microbiology. 1991, 7(1): 27-34.
- [160] Tejayadi S, Cheryan M. Lactic acid from cheese whey permeate: Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. Applied Microbiology & Biotechnology. 1995, 43(2): 242-248.
- [161] Akao S, Nagare H, Maeda M, et al. Combined use of sugars and nutrients derived from young maize plants for thermophilic L-lactic acid fermentation. Industrial Crops and Products. 2015, 69: 440-446.
- [162] Vidal BC, Dien BS, Ting KC, et al. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion: a review. Applied and Biochemical Biotechnology. 2011, 164: 1405-1421.
- [163] Li J, Sun J, Wu B, et al. Combined utilization of nutrients and sugar derived from wheat bran for D-Lactate fermentation by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. Bioresource Technology. 2017, 229: 33-38.
- [164] Nikolic S, Mojovic L, Rakin M, et al. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Fuel. 2009, 88(9): 1602-1607.
- [165] Qi K, Xia X, Zhong J. Enhanced anti-oxidative activity and lignocellulosic ethanol production by biotin addition to medium in *Pichia guilliermondii* fermentation. Bioresource Technology. 2015, 189: 36-43.
- [166] Seki M. Biological significance and development of practical synthesis of biotin. Medicinal Research Reviews. 2006, 26(4): 434-482.
- [167] Zhong Z, Wu X, Chen F. Recent Progresses in Total Synthesis of (+)-Biotin. Chinese Journal of Organic Chemistry. 2012, 32(10): 1792-1802.
- [168] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. Biotechnol. Bioengineering. 2010, 105: 718-728.
- [169] Liu G, Zhang Q, Li H, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. Biotechnol. Bioengineering. 2018, 115: 60-69.
- [170] Wang J, Gao Q, Zhang H, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. Bioresource Technology. 2016, 218: 892-901.
- [171] Yim S, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene

- expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110: 2959-2969.
- [172] Wang Y, Cao G, Xu D, et al. A novel *Corynebacterium glutamicum* L-glutamate exporter. *Applied and Environmental Microbiology.* 2018, 84(6):e026091-17.
- [173] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of ash in biomass. NREL/TP-510-42622. National Renewable Energy. 2005.
- [174] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory. Golden CO. 2012.
- [175] Eggeling L, Krumbach K, Sahm H. L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 2001, 3(1): 67-68.
- [176] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology.* 2005, 96(18): 1959-1966.
- [177] Lau MW, Bals BD, Chundawat SPS, et al. An integrated paradigm for cellulosic biorefineries: utilization of lignocellulosic biomass as self-sufficient feedstocks for fuel, food precursors and saccharolytic enzyme production. *Energy & Environmental Science.* 2012, 5(5): 7100-7110.
- [178] Han X, Hong F, Liu G, et al. An approach of utilizing water-soluble carbohydrates in lignocellulose feedstock for promotion of cellulosic L-lactic acid production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2018, 66(39): 10225-10232.
- [179] 魏成香. 玉米秸秆原料干法生物炼制生产手性乳酸和木糖酸研究. 硕士学位论文. 上海: 华东理工大学. 2018.
- [180] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology.* 2015, 198: 803-810.
- [181] Ford JE, Perry KD, Briggs CAE. Nutrition of lactic acid bacteria isolated from the rumen. *Journal of general microbiology.* 1958, 18(1): 273-284.
- [182] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, et al. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology.* 2005, 96: 63-67.
- [183] Du Plessis LDW. The microbiology of South African winemaking. Part V: Vitamin and amino acid requirements of lactic acid bacteria from dry wines. *South African Journal of Agricultural Science.* 1963, 6: 485-494.
- [184] Yao C, Chou J, Wang T, et al. B. Pantothenic acid, vitamin C, and biotin play important roles in the growth of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology.* 2018, 9: 1194.
- [185] Chan PC, Bielski BHJ. Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamid

adenine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*. 1974, 249: 1317-1319.

## 附录 I 仪器设备

名称	型号	生产厂家
紫外可见分光光度计	Biomate-3S	Thermo Scientific
高速冷冻离心机	Avanti J-26	Beckman Coulter, Inc.
立式震荡培养箱	HZ-2111KB	江苏太仓华利达
超声波脱气机	SB-5200D	宁波新芝生物
台式离心机	5418	Eppendorf
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo Scientific
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
隔水式培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒-托利多
高压蒸汽发生器	DZF4.5C	上海蒸源机电设备
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
高压蒸汽灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博讯实业有限公司
磨浆机	DSX-32S	江苏启东市东盛化工机械厂
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏太仓华利达
隔水式恒温培养箱	HZ-9310K-3S	江苏太仓华利达
超净工作台	SW-CJ-1D	沪净净化
锤式粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
生物反应器	BIOTECH-3BG-5L	上海保兴生物
pH 电极	G301K	苏州汉星分析传感器有限公司
溶氧电极	InPro 6800	瑞士梅特勒-托利多
生物传感分析仪	SBA-90	山东省科学院生物研究所
高效液相色谱	LC-20AD 示差检测器	日本岛津公司
高效液相色谱	LC-20AT 紫外检测器	日本岛津公司
超声波细胞粉碎机	JY92-IIN	宁波新芝生物
PCR 仪	T110	美国 BioRad 公司
核酸电泳仪	Tanon EPS100	上海天能科技
凝胶成像系统	Tanon 1600	上海天能科技
酶标仪	Epoch 2	BioTek, Winooski

## 硕士期间取得成果

## 已接收论文:

Xushen Han<sup>1</sup>, **Li Li**<sup>1</sup>, Jie Bao\*. **Microbial extraction of biotin from lignocellulose biomass and its application on glutamic acid production.** Bioresource Technology. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121523>. (对应本论文第二章)

## 投稿中论文:

Xushen Han<sup>#</sup>, **Li Li**<sup>#</sup>, Chengxiang Wei, Jian Zhang, Jie Bao\*. **Rich vitamins B in lignocellulose biomass facilitates L-lactic acid fermentation.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. (对应本论文第三章)

## 致谢

时间如白驹过隙，三年的研究生生涯即将结束。在这期间，实验室的老师们、同学们对我帮助甚多。

首先，我由衷地感谢我的导师，鲍杰老师。鲍老师视野开阔，学识渊博，严谨求实，思维缜密，实事求是，是一位真正的学术研究者，对生物炼制领域具有独到的见解和视野。本论文中几个研究课题的完成都离不开鲍老师的谆谆指导，尤其在遇到实验难题时，不断地为我提供新的思路 and 方案，慢慢地提高了自己发现问题，分析问题，解决问题的能力。衷心地感谢鲍老师在科研道路上对自己的鼓励、帮助和鞭挞，祝愿鲍老师和其家人万事如意，幸福安康。

其次，感谢张建老师和高秋强老师在实验中和生活上的帮助，感谢他们对我的课题提出的宝贵的建议，祝愿他们及其家人幸福快乐，事业蒸蒸日上。

感谢韩响身师兄，他亦是一个对科研倾注热情的科研工作者，严谨，踏实，细致，睿智，豁达，开启了我的研究生科研道路，一步步指导我，教会我基本的实验技能和操作。所谓万丈高楼平地起，如果没有这些，所有的研究无法真正开展。除了科研，生活上也离不开师兄的殷切关心，衷心祝愿他前途一片光明，工作顺利，生活美满。

感谢温经柏师兄在自己科研上的帮助和关心，带领自己走进分子生物学的广阔天地，并能够独当一面；感谢侯伟亮师兄、谌泽宇师兄、魏成香师兄、邱忠洋师兄、周平平师姐在实验中的无私帮助；感谢我的同窗柳云龙、颜钊、赵瞭、董维涛和金慈三年的培伴与同行。感谢实验室的所有成员对自己三年的关心和包容。

最后要感谢我的父母，衷心地、诚挚地。是他们的支持与鼓励才能够让我心无旁骛地完成如今的学业，是他们的理解与宽容才能使我不断地成长，是他们的无私与付出才能使我能够一直坚定不移地走下去。感谢父母的陪伴，感谢父母给予我的一切。

李莉

2019年4月1日 于上海

# 卷 内 备 考 表

本卷情况说明

本卷共 陆拾柒 页

立卷人\_\_\_\_\_

检查人\_\_\_\_\_

立卷时间\_\_\_\_\_