

学校代码：10251  
学 号：Y10150174

# 華東理工大學

## 博 士 学 位 论 文

论文题目 生物炼制发酵微生物的呋喃醛和酚醛

---

抑制物脱毒机制和应用研究

---

学科专业 发酵工程

---

研究方向 木质纤维素生物炼制

---

论文作者 周平平

---

指导教师 鲍杰 教授

---

定稿日期：2019 年 05 月 29 日

分类号: Q815 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学 学位论文

生物炼制发酵微生物的呋喃醛和酚醛  
抑制物脱毒机制和应用研究

周平平

指导教师姓名:

鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2019.05.29 论文答辩日期: 2019.05.28

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 钟建江 教授

评 阅 人: 孙际宾 研究员

许 平 教授

万印华 研究员

李炳志 教授

陈国强 教授

# 华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

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

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

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

学位论文作者签名：周平平

2019年05月29日

指导教师签名：鲍杰

2019年5月29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：周平平

2019年5月29日

## 生物炼制发酵微生物的呋喃醛和酚醛抑制物脱毒机制和应用研究

### 摘要

预处理是木质纤维素生物炼制过程的核心环节,该过程中产生的主要抑制物呋喃醛和酚醛对后续酶解糖化环节中纤维素酶的水解效率及发酵环节中发酵菌株的生长代谢均会产生严重的抑制作用。因此,有效脱除呋喃醛和酚醛类抑制物是木质纤维素生物炼制得以高效完成的关键。生物脱毒是通过特定微生物的代谢将毒性抑制物进行降解或转化的一种抑制物脱除方式。采用专司生物脱毒的微生物在发酵前对抑制物进行脱除的方式被认为是一种有效的抑制物脱除策略,但该方法彻底脱除醛类抑制物所需时间较长,从而导致部分可发酵糖特别是木糖等半纤维素来源单糖的损失。实现醛类抑制物彻底脱除的同时有效保留可发酵单糖的一种优化生物脱毒策略是,强化生物炼制发酵菌株的抑制物降解或转化能力并在发酵阶段完成残余醛类抑制物的彻底脱除,从而实现高效的木质纤维素生物炼制发酵。本论文首先将一种干法生物脱毒工艺拓展应用至木质纤维素柠檬酸的生产过程中,然后对两株高抑制物耐受型生物炼制发酵菌株 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 和 *Corynebacterium glutamicum* S9114 脱除呋喃醛和酚醛抑制物的分子生物学机制和对生物炼制效率的提升进行了解析,最后利用生物炼制发酵菌株 *C. glutamicum* S9114 进行了生物燃料脂肪烃的合成尝试。

第一部分对工业柠檬酸生产菌株 *Aspergillus niger* SIIM M288 利用生物脱毒的玉米秸秆原料生产高浓度柠檬酸进行了研究。树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 是本实验室前期研究工作中筛选到的一株专司抑制物脱除的生物脱毒菌株,在木质纤维素干法生物炼制工艺的脱毒环节中占据重要地位,该脱毒方法已成功应用至木质纤维素乙醇、油脂、乳酸、葡萄糖酸和木糖酸等产品的生物炼制加工生产过程中。*A. niger* SIIM M288 对玉米秸秆水解液中存在的呋喃醛和酚醛等抑制物比较敏感,导致该菌株在含有抑制物的玉米秸秆水解液中不能正常生长和发酵。利用 *A. resinae* ZN1 将预处理后玉米秸秆原料中的呋喃醛和酚醛抑制物脱除后,*A. niger* SIIM M288 可在脱毒玉米秸秆水解液中实现高指标柠檬酸发酵。对柠檬酸发酵过程中的多种发酵参数如培养基组分、发酵温度、初始 pH 及诱导剂等优化后,最终在 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中发酵得到的柠檬酸浓度达 100.0 g/L,基于葡萄糖的得率为 94.1%,不仅达到了工业上柠檬酸分离纯化的浓度标准,也为木质纤维素柠檬酸的工业化生产提供了十分重要的可行性参考依据。

第二部分对氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* DSM 2003 转化呋喃醛和酚醛抑制物的分子生物学脱毒机制进行了研究。本章节利用 DNA 芯片技术考察了该菌株分别在糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、香草醛及丁香醛胁迫下的转录组。结果显示,醛类抑制物不仅会诱导 *G. oxydans* DSM 2003 细胞内及细胞膜上多个与醛类抑制物转化相关的氧化还原酶编码基因的上调表达,还会引起细胞内戊糖磷酸途径和细胞膜上呼吸链相关基

因的上调表达, 进而促进呋喃醛和酚醛的降解转化。此外, 醛类抑制物的转化还涉及大量转运蛋白编码基因的响应, 这些转运体可能与进入 *G. oxydans* DSM 2003 胞内的醛类抑制物的转化过程相关。本章研究结果中与醛类抑制物转化相关的细胞膜结合型脱氢酶的挖掘, 为高抗逆生物炼制发酵微生物的构建提供一种新的代谢工程改造思路。

第三部分对谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛抑制物的分子生物学过程进行了研究。本章节通过定量 PCR 技术对该菌株基因组中可能与醛类抑制物转化相关的 93 个基因分别在糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、香草醛及丁香醛胁迫下的转录水平进行了定量分析。*C. glutamicum* S9114 可以迅速将呋喃醛和酚醛转化为相应的醇和酸, 呋喃醇和酚醇会继续转化为相应的呋喃酸和酚酸。qRT-PCR 结果显示有多个醇脱氢酶、醛脱氢酶及氧化还原酶参与了呋喃醛和酚醛的转化。从定量结果中筛选出一些重要基因在 *C. glutamicum* S9114 中进行过表达验证, 结果显示在呋喃醛和酚醛胁迫下均显著差异上调表达的醇脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS01115* 和 *CGS9114\_RS10340*, 醛脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS04340* 对五种典型醛类抑制物的转化均有促进作用。本章节研究结果对提升生物炼制发酵菌株对多种醛类抑制物的综合耐受能力具有重要参考价值。

第四部分对细菌微生物的脂肪烃合成路径进行了初步的构建和评价。木质纤维素生物炼制工艺已成功应用至诸如乙醇和油脂等生物燃料的合成中, 而烃类化合物作为另一种更具附加值和生产潜力的生物燃料也受到越来越多的关注。本论文将来自细长聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 的长链脂酰-ACP 还原酶的编码基因及脂肪醛脱羧基酶的编码基因进行密码子优化后, 在 *Escherichia coli* BL21 及 *C. glutamicum* S9114 中分别进行了脂肪烃合成路径的构建。重组 *E. coli* 合成以十五烷和十七烯为主的直链脂肪烃, 多种促进脂肪烃合成的策略考察结果显示增加长链脂酰-ACP 还原酶蛋白的可溶性表达水平及阻断胞内脂肪酸的氧化路径均可以促进脂肪烃的合成。重组 *C. glutamicum* 则可以合成一些碳链长度超过 23 的超长链烃, 推测其超长链烃的合成路径与该菌株胞内的脂肪酸代谢及分枝菌酸合成代谢路径相关。

综上所述, 针对不同生物炼制发酵菌株应对呋喃醛和酚醛类抑制物的差异表现, 本论文采取不同的生物脱毒研究策略, 实现了木质纤维素的高效生物炼制及高抑制物耐受型发酵菌株的拓展应用。本论文将干法生物脱毒工艺成功应用至木质纤维素柠檬酸生产中, 完成了木质纤维素柠檬酸的高指标发酵; 阐明了两株高抑制物耐受型发酵菌株 *G. oxydans* DSM 2003 和 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛的分子生物学机制, 筛选并鉴定得到了与醛类抑制物转化相关的关键基因; 利用高抑制物耐受菌株 *C. glutamicum* S9114 合成了超长链烃, 并对其超长链烃的合成路径进行了推测。本论文的研究结果为木质纤维素生物炼制工艺的产业化推广和应用奠定了理论基础。

**关键词:** 木质纤维素生物炼制; 呋喃醛; 酚醛; 生物脱毒; 生物炼制发酵微生物

## Analysis of Detoxification Mechanism of Furan and Phenolic Aldehyde Inhibitors of Biorefinery Fermenting Strains and Its Extended Applications

### Abstract

Pretreatment is the core step of lignocellulose biorefinery process. Furan aldehydes and phenolic aldehydes are the two major inhibitor groups derived from lignocellulose pretreatment, which harshly inhibit not only the hydrolysis efficiency of cellulase in the enzymatic saccharification step but also the fermentation metabolism of microbes in the fermentation step. Therefore, the effective removal of furan aldehyde and phenolic aldehyde inhibitors is the prerequisite condition for highly efficient utilization of lignocellulose. Biological detoxification method is a kind of way to degrade or convert the toxic inhibitors by the metabolism of microorganisms. A biot detoxification method using specific microorganisms to remove aldehyde inhibitors prior to fermentation step was considered as an efficient strategy. However, the complete removal of aldehyde inhibitors by this method requires a long time and then leads to the loss of fermentable sugars such as the xylose from hemicellulose. To the completely remove of aldehyde inhibitors, effectively hold of fermentable sugars and then achieve the highly efficient lignocellulose biorefinery, an optimized biological detoxification strategy was proposed that strengthen the inhibitors degradation or conversion ability of biorefinery fermenting strains. In this thesis, the dry biot detoxification process was applied for the lignocellulose citric acid fermentation firstly. Then the molecular biot detoxification mechanism of furan and phenolic aldehydes were elucidated in two biorefinery fermenting strains *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 and *Corynebacterium glutamicum* S9114 with high inhibitor tolerance. Finally, the synthesis pathway of fatty hydrocarbon was constructed in *C. glutamicum* S9114.

The first part was study on the lignocellulose citric acid production in biot detoxified corn stover by a widely applied industrial strain *Aspergillus niger* SIIM M288. *Amorphotheca resiniae* ZN1 is a specific robust biot detoxification fungus isolated from our previous study which playing important role in the dry lignocellulose detoxification process. This biot detoxification method has been successfully applied for the production of lignocellulose ethanol, lipid, lactic acid, gluconic acid and xylonic acid. No obvious cell growth and citric acid accumulation were observed when using the freshly pretreated corn stover hydrolysate as the substrate because the *A. niger* SIIM M288 was highly sensitive to the existence of furan and phenolic aldehyde inhibitors in the corn stover hydrolysate. After the removal of these inhibitors from the pretreated corn stover by *A. resiniae* ZN1, *A. niger* SIIM M288 was able to achieve high concentration citric acid fermentation in the biot detoxified lignocellulose system. Various fermentation parameters such as the component of the medium, temperature, initial pH and inducer were tested and only minimum regulation was required during the fermentation. Citric acid at the titer of 100.0 g/L with the yield of 94.1% based on glucose were obtained in the 25% (w/w) solid content detoxification corn stover hydrolysate, reaching the separation and purification standard of industrial citric acid fermentation and also providing a very important

feasibility basis for the industrial production of lignocellulosic citric acid.

The second part elucidated the molecular biotransformation mechanism of furan and phenolic aldehyde inhibitors of *G. oxydans* DSM 2003. The DNA microarray of *G. oxydans* DSM 2003 was carried out under the stress of furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), 4-hydroxybenzaldehyde (HBA), vanillin and syringaldehyde, respectively. The results showed that furan and phenolic aldehydes triggered not only the expression of corresponding intracellular and cell membrane bound oxidoreductase genes but also the expression of relevant genes involved in intracellular pentose phosphate pathway (PPP) and membrane bound respiratory chain, promoting the conversion of furan and phenolic aldehydes. In addition, a large number of transporter protein encoded genes were also significantly up-regulated expression, which might played an important role in the conversion process of aldehyde inhibitors on the intracellular space. The mining of membrane bound dehydrogenases will provide a new idea for construction of high inhibitor tolerance biorefinery fermenting strains.

The third part analyzed the conversion mechanism of furan and phenolic aldehydes in *C. glutamicum* S9114. The real-time quantitative PCR (qRT-PCR) method was applied to investigate the transcription levels of 93 putative genes involved in the conversion of aldehydes under the stress of furfural, HMF, HBA, vanillin and syringaldehyde. *C. glutamicum* S9114 could quickly convert furan and phenolic aldehydes into corresponding alcohols and acids, the corresponding alcohols then continue to be converted into furan acids and phenolic acids. The qRT-PCR results showed that several alcohol dehydrogenase genes, aldehyde dehydrogenase genes and oxidoreductase genes were responsible for the conversion of furan and phenolic aldehydes. Some significant up-regulation genes were over-expressed in *C. glutamicum* S9114. The conversion rate of five aldehydes was significantly enhanced by the over-expression of alcohol dehydrogenase gene *CGS9114\_RS01115* and *CGS9114\_RS10340*, aldehyde dehydrogenase *CGS9114\_RS04340* which up-regulated expression under both furan aldehyde and phenolic aldehyde inhibitors. The above results have important reference value for improving the comprehensive tolerance ability of biorefinery fermenting microorganisms to various aldehydes inhibitors.

The fourth part was the preliminary studies on the synthesis pathway construction and evaluation of fatty hydrocarbon in bacterial microorganisms. Lignocellulose biorefinery process has been successfully applied for the synthesis of the biofuels such as ethanol and lipid, while hydrocarbon is another biofuel with greater added value and potential for production, and the current research on the synthesis of fatty hydrocarbons by microbial using lignocellulose has attracted more attention. In this thesis, the long-chain acyl-(acyl-carrier-protein) reductase gene and aldehyde decarbonylation gene from *Synechococcus elongatus* PCC7942 were codon optimized and overexpressed in *Escherichia coli* BL21 and *C. glutamicum* S9114. The linear fatty hydrocarbons consisted mainly of pentadecane and heptadecene were formed by the recombinant *E. coli*. Various strategies to promote the production of fatty hydrocarbon were investigated and the results showed that increasing the solubility of long-chain acyl-(acyl-carrier-protein) reductase protein and blocking the oxidation pathway of fatty acid all could

promote the synthesis of fatty hydrocarbon. Interestingly, the recombinant *C. glutamicum* S9114 could synthesize the very long chain hydrocarbon ( $C \geq 23$ ), and the synthesis pathway of very long chain hydrocarbon in *C. glutamicum* S9114 was speculated to be involved with the fatty acid and mycolic acid synthesis pathways.

Overall, in view of the different performances of different biorefinery fermenting strains response to the furan and phenolic aldehydes, different biotransformation strategies were adopted accordingly in order to achieve the efficient lignocellulose biorefinery and the extended application of the high inhibitor tolerance fermenting strains. In this thesis, the dry biotransformation process was successfully applied for the production of lignocellulose citric acid and achieved the goal of high titer fermentation. The molecular detoxification mechanism of furan aldehyde and phenolic aldehyde inhibitors in two biorefinery fermenting strains *G. oxydans* DSM 2003 and *C. glutamicum* S9114 were elucidated. Key genes responsible for the conversion of aldehydes were selected and identified. The biorefinery fermenting strain *C. glutamicum* S9114 was firstly used as host bacterium for long chain fatty hydrocarbon synthesize and its synthesis pathway was also speculated. The thesis provides a theoretical foundation for the industrialization and application of lignocellulose biorefinery process.

**Keywords:** Lignocellulose biorefinery; Furan aldehydes; Phenolic aldehydes; Biotransformation; Biorefinery fermenting strains

## 目录

|  |    |
|--|----|
| 第 1 章 前言 .....   | 1  |
| 1.1 木质纤维素资源及生物炼制 .....                                   | 1  |
| 1.1.1 木质纤维素资源现状及结构 .....                                 | 1  |
| 1.1.2 木质纤维素生物炼制 .....                                    | 2  |
| 1.2 木质纤维素来源抑制物的形成及抑制机理 .....                             | 4  |
| 1.2.1 呋喃醛类抑制物的产生及其抑制机理 .....                             | 5  |
| 1.2.2 酚醛类抑制物的产生及其抑制机理 .....                              | 6  |
| 1.2.3 有机弱酸类抑制物的产生及其抑制机理 .....                            | 6  |
| 1.3 微生物对木质纤维素来源抑制物的脱毒 .....                              | 7  |
| 1.3.1 微生物对呋喃醛类抑制物的转化机理 .....                             | 8  |
| 1.3.2 微生物对酚醛类抑制物转化机理 .....                               | 9  |
| 1.3.3 微生物对有机弱酸类抑制物转化机理 .....                             | 11 |
| 1.4 生物基产品的合成 .....                                       | 11 |
| 1.4.1 木质纤维素柠檬酸合成 .....                                   | 12 |
| 1.4.2 烃类化合物的合成 .....                                     | 12 |
| 1.5 本论文立题依据及主要研究内容 .....                                 | 15 |
| 第 2 章 黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> 利用生物脱毒玉米秸秆生产柠檬酸 ..... | 17 |
| 2.1 引言 .....   | 17 |
| 2.2 材料与方法 .....  | 18 |
| 2.2.1 原料 .....   | 18 |
| 2.2.2 酶和试剂 .....   | 18 |
| 2.2.3 菌种和培养方法 .....                                      | 18 |
| 2.2.4 原料预处理和生物脱毒 .....                                   | 20 |
| 2.2.5 玉米秸秆水解液制备 .....                                    | 20 |
| 2.2.6 玉米秸秆水解液组分测定 .....                                  | 20 |
| 2.2.7 柠檬酸得率计算 .....                                      | 21 |
| 2.3 结果与讨论 .....  | 21 |
| 2.3.1 <i>A. niger</i> SIIM M288 对木质纤维素来源抑制物的耐受 .....     | 21 |
| 2.3.2 生物脱毒玉米秸秆水解液中氮源和无机盐组分对柠檬酸发酵的影响 .....                | 24 |
| 2.3.3 高浓度柠檬酸发酵过程中的发酵参数的优化 .....                          | 27 |
| 2.3.4 利用生物脱毒玉米秸秆水解液进行柠檬酸放大发酵 .....                       | 29 |
| 2.4 本章小结 .....   | 30 |
| 第 3 章 氧化葡萄糖酸杆菌 <i>Gluconobacter oxydans</i> 降解呋喃醛和酚醛的转   |    |

|   |    |
|---|----|
| 录组分析 .....  | 32 |
| 3.1 引言 .....  | 32 |
| 3.2 材料与方法 .....   | 33 |
| 3.2.1 实验菌株和试剂 .....   | 33 |
| 3.2.2 培养基和菌株培养方法 .....  | 33 |
| 3.2.3 呋喃醛和酚醛抑制物的耐受及降解实验 .....   | 33 |
| 3.2.4 分析方法 .....  | 33 |
| 3.2.5 DNA 芯片实验 .....  | 34 |
| 3.3 结果与讨论 .....   | 35 |
| 3.3.1 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 对呋喃醛和酚醛类抑制物的耐受及转化 .....                  | 35 |
| 3.3.2 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 在呋喃醛和酚醛类抑制物胁迫下的转录组 .....                 | 38 |
| 3.3.3 呋喃醛和酚醛在 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 中的转化路径 .....                     | 41 |
| 3.3.4 呋喃醛和酚醛的转化对葡萄糖代谢的影响 .....  | 45 |
| 3.3.5 呋喃醛和酚醛类的转化与物质转运 .....   | 52 |
| 3.4 本章小结 .....  | 53 |
| 第 4 章 谷氨酸棒状杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 降解呋喃醛和酚醛的<br>转录水平分析 ..... | 54 |
| 4.1 引言 .....  | 54 |
| 4.2 材料与方法 .....   | 55 |
| 4.2.1 实验菌株和试剂 .....   | 55 |
| 4.2.2 培养基和菌株培养方法 .....  | 58 |
| 4.2.3 呋喃醛和酚醛抑制物的耐受和降解实验 .....   | 58 |
| 4.2.4 重组质粒构建 .....  | 59 |
| 4.2.5 感受态制备和阳性克隆子的筛选 .....  | 60 |
| 4.2.6 重组菌株的抑制物转化性能分析 .....  | 60 |
| 4.2.7 分析方法 .....  | 60 |
| 4.2.8 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验 .....   | 61 |
| 4.3 结果与讨论 .....   | 66 |
| 4.3.1 <i>C. glutamicum</i> S9114 对呋喃醛和酚醛类抑制物的耐受和降解 .....                  | 66 |
| 4.3.2 呋喃醛和酚醛胁迫下 <i>C. glutamicum</i> S9114 的 qRT-PCR 定量分析 .....           | 69 |
| 4.3.3 过表达重组 <i>C. glutamicum</i> 菌株对呋喃醛和酚醛的转化 .....                       | 76 |
| 4.4 本章小结 .....  | 79 |
| 第 5 章 细菌微生物中脂肪烃合成路径的构建与初步评价 .....   | 81 |
| 5.1 引言 .....  | 81 |
| 5.2 材料与方法 .....   | 82 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.2.1 实验菌株和试剂.....                                    | 82  |
| 5.2.2 培养基及培养条件.....                                   | 82  |
| 5.2.3 目的基因扩增及重组质粒构建.....                              | 89  |
| 5.2.4 感受态制备及阳性克隆子的筛选.....                             | 90  |
| 5.2.5 RED 重组.....                                     | 90  |
| 5.2.6 SDS-PAGE.....                                   | 91  |
| 5.2.7 脂肪烃的提取与 GC-MS 检测.....                           | 91  |
| 5.3 结果与讨论.....  | 91  |
| 5.3.1 <i>E. coli</i> 中脂肪烃合成路径的构建.....                 | 91  |
| 5.3.2 <i>E. coli</i> 重组菌脂肪烃合成产量的提升.....               | 93  |
| 5.3.3 <i>C. glutamicum</i> S9114 中脂肪烃合成路径的构建.....     | 98  |
| 5.3.4 <i>C. glutamicum</i> S9114 重组菌中长链脂肪烃合成路径推测..... | 98  |
| 5.4 本章小结.....   | 100 |
| 第 6 章 结论与展望.....                                      | 102 |
| 6.1 结论.....   | 102 |
| 6.2 创新点.....  | 103 |
| 6.3 展望.....   | 103 |
| 参考文献.....   | 105 |
| 附录 I 主要试剂.....  | 120 |
| 附录 II 密码子优化后基因序列.....                                 | 122 |
| 学术成果.....   | 123 |
| 致谢.....   | 124 |

## 第 1 章 前言

当今社会活动所需要的大部分能源和材料产品均来自化石燃料的炼制。随着全球社会经济的不断发展,人类需求的逐渐增加,以煤炭和石油等为主的不可再生化石燃料资源的过度消耗不仅会带来日益凸显的环境污染问题,而且可能引发新一轮的能源危机,进而严重制约我国社会经济可持续发展的战略目标。木质纤维素作为世界上储量最为丰富的可再生资源受到广泛关注,是替代化石燃料的绝佳选择之一。通过预处理、脱毒、糖化及发酵等生物炼制过程,木质纤维素原料中的纤维素和半纤维素降解为可供微生物发酵的糖类,进而产生诸如乙醇、丁醇、柴油、烃等生物燃料以及柠檬酸、葡萄糖酸、谷氨酸、乳酸等大宗有机酸产品。利用可再生资源替代不可再生的化石资源是基础研究,也是当前应用科学和工业上不断追求的一种重要的新型策略。针对木质纤维素生物炼制过程中出现的科学问题,本章节主要从木质纤维素资源及生物炼制、木质纤维素来源抑制物的形成及其抑制机理、微生物对木质纤维素来源抑制物的脱毒以及重要生物基化学品的合成等方面进行了综述。

### 1.1 木质纤维素资源及生物炼制

#### 1.1.1 木质纤维素资源现状及结构

木质纤维素是全球范围内分布最广,存储量最高且价格低廉的一种可再生资源。木质纤维素资源主要包括农业废弃物(如农作物秸秆和蔗渣等)、林业废弃物(如森林抚育,间伐作业及家具制造行业产生的零散木材、残留的树枝、树叶及木屑等)、专门的能源作物(如芒草、柳枝稷等)及部分城市固体垃圾等<sup>[1]</sup>。我国作为农业生产大国,粮食产量居世界第一,每年伴随产生的农作物废弃物的产量也居世界首位,因此农业废弃物成为我国木质纤维素资源的第一大来源。在我国农作物废弃物中,玉米秸秆、稻秆和小麦秸秆的储量最为丰富,其中玉米秸秆占比约为 32.5%,稻秆占比约为 25.1%,小麦秆占比约为 18.3%,棉秆占比约 3.1%,另外油料作物占比约 4.4%<sup>[2]</sup>。2015 年我国农作物废弃物的总产量已达到 9.31 亿吨,如果这些废弃物能够利用生物化学方法全部转化为生物燃料乙醇或者利用快速高温分解的方式全部生成生物油脂,可以产生 0.44 亿吨的生物乙醇或者 1.31 亿吨的生物油脂,从而取代 0.26 亿吨的汽油或者 0.58 亿吨的柴油<sup>[3]</sup>。因此,农作物废弃物的资源化利用变得至关重要,目前我国农作物废弃物的资源化利用基本形成以肥料化利用为主,饲料化、燃料化稳步推进,基料化、原料化为辅的综合利用格局。虽然目前全国的农作物秸秆的综合利用率已超过 82%,但是仍有超过 15%的秸秆就地焚烧,引起资源浪费及环境污染,因此用于生物炼制生产高附加值产品的部分依旧前景广阔。

木质纤维素作为植物细胞壁的主要组成部分,从图 1.1 可以看出,其结构组分主要包含纤维素(33-51%干重),半纤维素(19-34%干重)和木质素(21-32%干重)以及少量的无机化合物、蛋白质、果胶及灰分等<sup>[4]</sup>。纤维素是一种通过 $\beta$ -1,4-糖苷键将 D-葡萄

糖单体聚合而成的线性同聚多糖，每个纤维素多聚体由约 300-15,000 个分子构成<sup>[5]</sup>。由于分子间和分子内大量氢键或范德华力的存在使纤维素晶体结构致密，不易被纤维素酶破坏，从而为木质纤维素结构的完整性做出巨大贡献。半纤维素是通过 $\beta$ -1,4 木聚糖苷键由五碳糖（主要是 D-木糖，L-阿拉伯糖）、六碳糖（主要是 D-葡萄糖，D-甘露糖，D-半乳糖）、糖醛酸（主要是 D-葡萄糖醛酸，D-半乳糖醛酸）及少量的 L-鼠李糖、L-岩藻糖等组成的支链异质多聚糖<sup>[5]</sup>。每个半纤维素多聚体由大约 70-200 个分子构成。虽然半纤维素的组分相比纤维素更为复杂，但是并未形成致密的晶体结构，因而更容易被水解转化。木质素则是一种水不溶性的非糖聚合物，主要是由 p-香豆醇、松柏醇和介子醇三类苯基丙烷结构单元经脱水聚合而形成的芳香类大分子复合物。

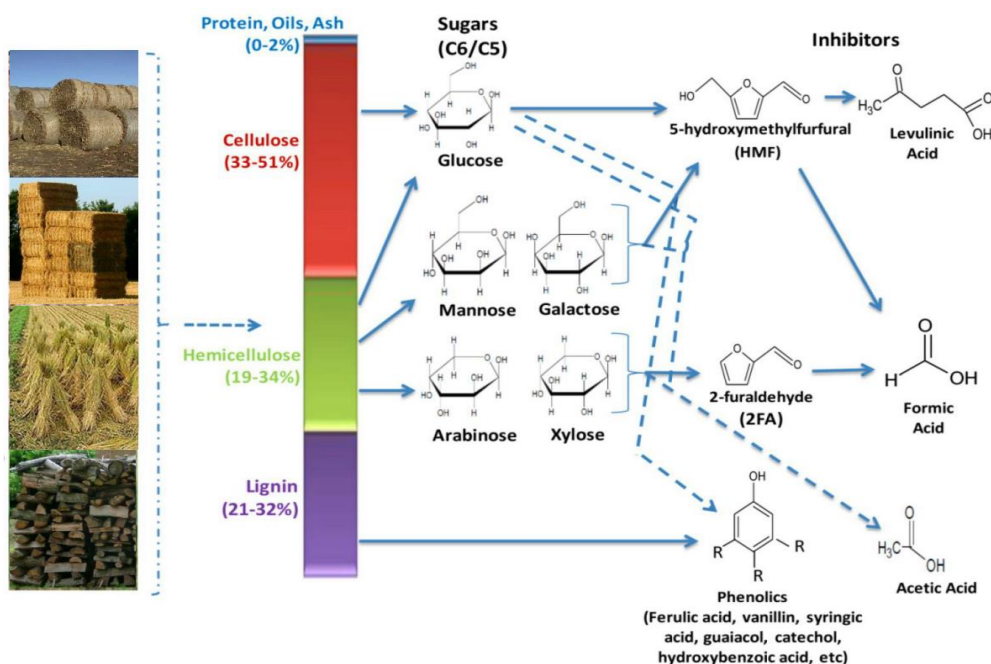


图 1.1 木质纤维素生物质的主要组分及其水解产生的相关抑制化合物<sup>[4]</sup>

Fig. 1.1 Main components of lignocellulose biomass and corresponding inhibitory compounds generated by hydrolysis<sup>[4]</sup>

### 1.1.2 木质纤维素生物炼制

木质纤维素生物炼制旨在以自然界中可再生的木质纤维素资源取代以石油为主的不可再生化石资源，生产品种丰富的生物燃料、化学品及生物基材料等<sup>[6]</sup>。如图 1.2 所示，木质纤维素生物炼制过程的基本环节主要包括原料的预处理、脱毒、糖化、微生物发酵和产品的分离纯化等<sup>[7]</sup>。

预处理作为木质纤维素生物炼制工艺中最为重要且必不可少的一个环节，可以将纤维素、半纤维素及木质素之间原本致密的结构破坏掉，使其变得疏松多孔，增加纤维素酶与纤维素的结合效率，从而提升糖化环节中纤维素酶的水解效率<sup>[8, 9]</sup>。一种理想的预处理方法应具备以下条件<sup>[10]</sup>：（1）减少对酶解糖化和微生物发酵环节有抑制作用的化合物的产生；（2）提高纤维素酶与底物的结合效率，节约酶解糖化步骤中纤维素酶的用量；（3）降低预处理过程中糖的损失；（4）能够回收木质素或者可以进一步转化为有附加值

副产物的其他化合物；(5) 降低能耗的使用。目前预处理的方法主要包括物理法、物理-化学法、化学法及生物法<sup>[11]</sup>。物理法主要包括机械粉碎、液态热水处理及高能辐射等；物理-化学法主要包括蒸汽爆破预处理、氨纤维膨爆预处理 (AFEX) 和水热高温预处理等；化学法主要包括碱法预处理、稀酸预处理、亚硫酸盐预处理、过氧化物预处理和有机溶剂预处理等；生物法主要是使用一些能够产生木质素降解酶的微生物如白腐菌、褐腐菌、软腐菌等降解纤维素原料中的木质素<sup>[10]</sup>。在上述多种预处理方法中，稀酸预处理是目前应用最为广泛并且最有希望实现工业化应用的一种预处理方式<sup>[12]</sup>。该预处理方式优点明确：(1) 预处理强度大，效率高，有效破坏木质纤维素的致密结构；(2) 酸的价格低廉可以降低预处理过程的成本；(3) 半纤维素酸解成木糖及其它多种糖类的效率高；(4) 改变木质素结构。但是也存在一定的缺陷：(1) 预处理过程中会产生大量的废水，增加后期废水处理成本，并且不利于后续进行高固含量的木质纤维素原料的微生物发酵；(2) 大量酸液的使用对设备的腐蚀严重，提高了设备成本；(3) 高预处理强度使得预处理过程中产生较多具有抑制作用的小分子化合物。针对上述常规稀酸预处理过程中的缺陷，本实验室在前期的研究工作中开发出一种优势明显的干式稀酸预处理技术<sup>[13, 14]</sup>。该预处理过程在 20 L 预处理反应器中进行，独特的螺带式搅拌桨能够充分混合大量的固体物料，少量的酸液和过热的蒸汽<sup>[15]</sup>。同时该预处理方式将常规稀酸预处理中物料的液固比由传统的 6:1-10:1<sup>[16]</sup>降低至 1:2，有效减少了预处理过程中的新鲜水的用量及酸用量，降低了对设备的腐蚀度，实现了预处理过程中的零废水排放，较为彻底的解决了常规稀酸预处理中的缺陷。

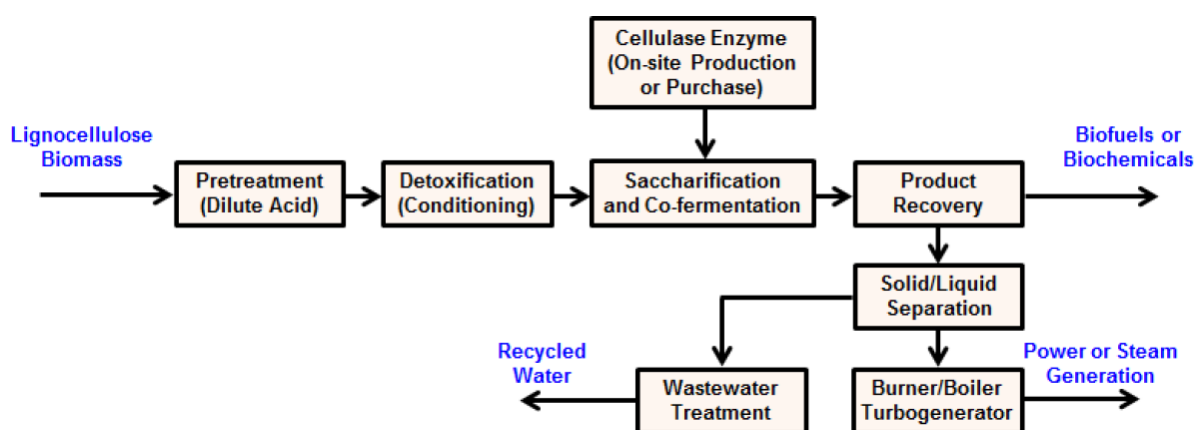


图 1.2 木质纤维素生物质的生物炼制过程<sup>[7]</sup>

Fig. 1.2 The biorefinery process of lignocellulose biomass<sup>[7]</sup>

脱毒是木质纤维素生物炼制工艺中预处理环节之后的一个重要环节。预处理过程中产生的种类繁多的抑制物，不仅会抑制纤维素酶的酶解效率，还会对发酵环节中微生物的生长和发酵性能产生明显的抑制作用<sup>[17]</sup>。将预处理过程中产生的具有毒性的抑制物从木质纤维素原料中脱除的过程，称为“脱毒”，抑制物的脱除是木质纤维素原料高效利用的关键所在。针对不同微生物对抑制物的耐受能力的差异可选择不同的抑制物应对策略，详细请见 1.3。

水解糖化环节是木质纤维素生物炼制过程中对木质纤维素进行生物转化的一个限

速步骤<sup>[18]</sup>。在经过预处理和(或)脱毒处理的木质纤维素原料用于微生物发酵环节之前,一般需要经过一个水解糖化阶段,目的是将木质纤维素中的纤维素水解为葡萄糖,及一些多糖解聚成可供微生物发酵利用的单糖。糖化的过程一般可以通过酸水解或者酶水解的方式来实现,酸水解的优点主要在于耗时短,缺点是水解产生的单糖会进一步酸解产生抑制物。而酶水解是一种目前应用比较广泛的方法,其主要优点是水解效率比较高,反应条件温和,水解产生的单糖一般不会继续降解,缺点在于酶的成本较高,水解耗时较长。酶水解过程中参与的纤维素酶一般包括三种:内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(EG, Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4),作用于纤维素链的内部产生多个具有还原末端及非还原末端的短的纤维素链;纤维素水解酶(CBH, Cellobiohydrolases; EC 3.2.1.91)即外切 $\beta$ -葡聚糖酶,作用于纤维素链的末端产生纤维二糖; $\beta$ -葡糖苷酶(BG,  $\beta$ -Glucosidases; EC 3.2.1.21),将纤维二糖转化为两分子的葡萄糖<sup>[19]</sup>。半纤维素酶主要包括内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶(1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8)及 $\beta$ -D-木糖苷酶(1,4- $\beta$ -D xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37)<sup>[20]</sup>。木质素降解相关酶系主要包括过氧化物酶(oxidase; EC 1.11.1.7),锰过氧化物酶(manganese peroxidase; EC 1.11.1.13)以及漆酶(Laccase/p-diphenol: dioxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2)等<sup>[21]</sup>。半纤维素和木质素可以与纤维素紧密结合,进而抑制了纤维素酶与纤维素的结合效率及纤维素的水解效率。半纤维素酶与木质素酶的利用可以水解半纤维素及木质素从而释放暴露出更多的纤维素,进而提高纤维素酶的水解效率。经干式稀酸预处理后的原料中绝大部分的半纤维素已经被酸解成为木糖和少量的半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖等,商品化纤维素酶中含有的半纤维素酶如木聚糖酶能够将预处理后原料的残余的小部分半纤维素和寡糖进行水解。

微生物发酵是木质纤维素生物炼制中重要环节。经过预处理、脱毒、糖化步骤后木质纤维素产生的可发酵的糖,可供微生物发酵生产多种生物质制品。根据酶解糖化步骤与发酵步骤是否同步,发酵方式可以分为微生物直接转化(Direct microbial conversion, DMC)、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)<sup>[22]</sup>。微生物直接转化发酵一般是一些能够分泌纤维素酶的菌株(多数是真菌),可以完成从纤维素的糖化水解和发酵的全过程。分步糖化与发酵是指先通过商品化的纤维素酶将预处理脱毒后的木质纤维素原料在发酵罐中酶解糖化一定的时间后进行固液分离,液体部分用于后续微生物的发酵。同步糖化发酵则是木质纤维素的酶解糖化和微生物发酵在同一个发酵罐中连续进行,先加入商品化的纤维素酶糖化一段时间后,不用固液分离,直接接入发酵微生物进行发酵。

## 1.2 木质纤维素来源抑制物的形成及抑制机理

在木质纤维素原料预处理操作过程中会产生种类繁多的小分子化合物,这些小分子化合物不仅会抑制纤维素糖化步骤中纤维素酶的水解效率<sup>[23]</sup>,也会对多种生物炼制发酵菌株的生长代谢及产物生成等产生严重的抑制作用<sup>[24-27]</sup>。由于预处理步骤是木质纤维素原料生物炼制过程中不可或缺的重要环节,因而这些抑制物的存在是所有生物炼制发酵

菌株利用木质纤维素原料过程中必须面对的问题。抑制物的种类和含量会随着纤维素原料种类和预处理条件的不同而变化，主要分为三大类，包括呋喃醛类，酚类和弱酸类化合物（如图 1.3），下面将针对这三大类化合物的产生及抑制机理进行阐述。

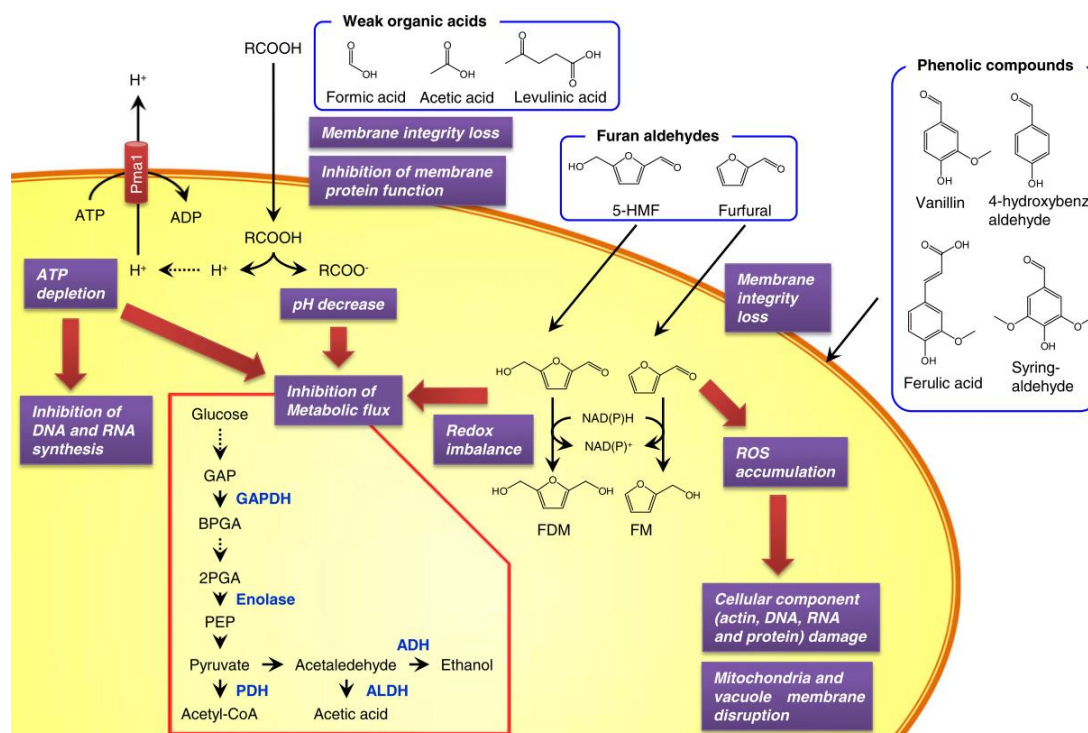


图 1.3 木质纤维素来源抑制物对微生物细胞的抑制机理<sup>[28]</sup>

Fig. 1.3 The inhibition mechanisms of lignocellulose-derived inhibitors to microbe<sup>[28]</sup>

### 1.2.1 呋喃醛类抑制物的产生及其抑制机理

糠醛和 5-羟甲基糠醛（HMF）是两种最典型的呋喃醛类抑制物，分别来源于预处理过程中戊糖及己糖在酸性环境中的脱水作用<sup>[29]</sup>。糠醛和 5-羟甲基糠醛在预处理后的木质纤维素原料中的含量一般相对较高，且能够与其他类型的抑制物产生协同抑制作用<sup>[30]</sup>，因而成为木质纤维素生物炼制过程中的主要毒性化合物。

糠醛和 HMF 对多种微生物的生长和代谢都会产生抑制作用，其中最直接的表现是增加了发酵菌株的生长延滞期，如黑曲霉 *Aspergillus niger* 在玉米秸秆水解液中有超过 48 h 的延滞期<sup>[26]</sup>；酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 在松木水解液中延滞期大约 12 h<sup>[24]</sup>；乳酸发酵菌株菊糖芽孢乳杆菌 *Sporolactobacillus inulinus*<sup>[25]</sup>和乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici*<sup>[31]</sup>在玉米秸秆水解液中发酵时均有超过 20 h 的延滞期；油脂酵母 *Trichosporon cutaneum* 在玉米秸秆水解液中发酵产油脂时也会产生 48 h 的延滞期<sup>[27]</sup>。除了对生长的抑制引起的代谢产物的产量和得率下降的机制外，糠醛和 5-HMF 也会对一些微生物代谢产物生成路径中的关键酶的酶活产生抑制，例如，呋喃醛可以直接抑制中心碳代谢及产物合成路径中相关酶的酶活，如中心碳代谢中己糖激酶，甘油醛-3-磷酸脱氢酶<sup>[32]</sup>，酿酒酵母 *S. cerevisiae* 乙醇生产路径中的丙酮酸脱氢酶，乙醛脱氢酶和醇脱氢酶<sup>[33, 34]</sup>，乳酸片球菌 *P. acidilactici* 产乳酸过程中的乳酸脱氢酶<sup>[25]</sup>，黑曲霉 *A. niger* 产葡萄糖酸等糖酸过程中的葡萄糖氧化酶<sup>[26]</sup>，油脂酵母 *T. cutaneum* 产油脂或者谷氨酸棒状杆菌

*Corynebacterium glutamicum* 产琥珀酸过程中的苹果酸脱氢酶等<sup>[35,36]</sup>。此外,如图 1.3 所示,呋喃醛的疏水性结构还会破坏微生物细胞膜的完整性;进入胞内的呋喃醛则会引起细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累,而 ROS 含量的增加会进而引起线粒体,液泡膜,肌动蛋白细胞骨架和细胞核染色体的损伤;呋喃醛还可以与双链 DNA 结合使其降解为单链结构,相关蛋白和 RNA 的合成也会受到抑制<sup>[37-39]</sup>;糠醛和 5-HMF 被降解为相应的醇类代谢产物的过程中还会竞争细胞正常代谢的辅酶,从而破坏细胞内辅酶系统的平衡。

### 1.2.2 酚醛类抑制物的产生及其抑制机理

酚类抑制物来源于预处理过程中木质素的过度降解。根据甲基化程度及功能基团(醛基,醇基,酸基及其它)的不同可以将酚类抑制物分为三大类:愈创木酚类(Guaiacyl, G),包括香草醛,香草醇,香草酸,松柏醛,愈创木酚及阿魏酸等;羟基类(*p*-Hydroxyphenyl, H),包括 4-羟基苯甲醛(HBA),4-羟基苯甲醇及 4-羟基苯甲酸等;丁香基类(Syringyl, S),包括丁香醛,丁香醇及丁香酸等。其中最具典型的三种化合物是 4-羟基苯甲醛,香草醛和丁香醛。虽然酚醛类化合物在物料中的含量比较低,但是与同等含量的呋喃醛相比较其毒性更强<sup>[40]</sup>,因此也是木质纤维素原料中的主要抑制物。

酚类化合物的水溶性一般相对较差,其定性定量分析比较困难,因此其抑制机制目前研究较少。与呋喃醛的抑制机制相似,酚醛类抑制物也会引起胞内 ROS 积累, DNA 发生突变,并破坏细胞骨架从而引起细胞死亡<sup>[41]</sup>,以及破坏细胞膜的完整性,影响细胞膜作为选择性屏障和酶基质的能力<sup>[42-44]</sup>。三种典型酚醛化合物的毒性强弱对于不同的菌株也不尽相同,对于酿酒酵母 *S. cerevisiae*, 运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 及大肠杆菌 *Escherichia coli* 来说,低分子量的 4-羟基苯甲醛对这几株菌的毒性最强,丁香醛毒性最弱<sup>[30, 45, 46]</sup>。Klinke 等<sup>[46]</sup>及 Palmqvist 等人<sup>[34]</sup>推测这几种酚醛类抑制物的毒性强弱机制可能与化合物的分子量、疏水性及甲氧基的数目和位置相关。但是这种机制可能并不是一种适用于所用微生物的毒性机制,抑制物的毒性强弱与微生物自身的结构及代谢有紧密的联系。

### 1.2.3 有机弱酸类抑制物的产生及其抑制机理

甲酸,乙酸及乙酰丙酸是三种最具代表性有机弱酸类抑制物。其中,甲酸和乙酰丙酸均来源于木质纤维素中游离六碳糖的脱水产物 5-羟甲基糠醛的进一步降解,甲酸还可以在高温酸性环境中由五碳糖的脱水产物糠醛降解产生,乙酸则在半纤维素的脱乙酰化反应过程中形成<sup>[4]</sup>。由于乙酸在木质纤维素原料中的含量一般较高,因而成为有机弱酸类抑制物中的主要研究对象。

有机弱酸类抑制物对微生物生长及代谢的抑制机制目前主要被认为是解偶联和阴离子积累的共同作用<sup>[47]</sup>。解偶联机制认为,未解离的亲脂性有机酸从培养基中扩散进入细胞内,而细胞质偏中性的高 pH 使得进入胞内的酸迅速解离产生质子和阴离子<sup>[48]</sup>,质子在胞内的积累会降低胞内 pH 值,使细胞跨膜电势发生改变。由于菌体自身的平衡机制,细胞膜上的 ATP 酶会消耗 ATP 将细胞内的质子泵至细胞外来调节细胞内 pH 降低

带来的影响,而 ATP 的消耗扰乱了正常的细胞代谢和生理活性。培养基是一个具有缓冲能力的体系,其体积远远大于细胞体积,这种渗透作用不会引起胞外 pH 发生变化,从而产生解偶联效应。阴离子积累理论认为,进入胞内的酸解离后在细胞内积累的阴离子会引起细胞渗透问题,增加细胞的膨压,从而影响细胞的生长<sup>[49]</sup>。此外, Giannattasio 等<sup>[50]</sup>人在研究乙酸对酿酒酵母的抑制机制中发现,乙酸也会引起细胞内 ROS 的积累。

### 1.3 微生物对木质纤维素来源抑制物的脱毒

木质纤维素体系中抑制物的种类及含量与木质纤维素原料的种类及预处理条件紧密相关。一般为了木质纤维素原料的高效资源化利用,会使用较高的预处理强度使木质纤维素原料尽可能释放出更多可供微生物发酵的糖,与此同时原料中的抑制物含量也会升高。对糖化和微生物发酵步骤产生抑制作用的抑制物是生物炼制过程中的一个关键问题。目前应对木质纤维素来源毒性抑制物的策略多种多样<sup>[17,51]</sup>,依据毒性抑制物脱除过程中使用试剂及材料的不同,脱毒方法可以分为生物法、化学法和物理法;依据抑制物脱除时期的不同,脱毒方法可以分为发酵前抑制物的脱除(专门增加一个脱毒环节,微生物法脱毒及酶法脱毒)以及发酵过程中抑制物的脱除(发酵过程调控、高抑制物耐受生物炼制发酵菌株构建)。其中物理化学方法一般多用于发酵前的脱毒阶段,诸如广泛应用的水洗、蒸发(物理方法),过碱中和、溶剂萃取、活性炭吸附、离子交换吸附(化学方法)等方法<sup>[51-58]</sup>。物理化学法的优点是脱毒速度较快,但是缺点也十分明显,如抑制物的去除不彻底,消耗大量的新鲜水并产生大量的废水,造成部分可发酵糖的损失,增加生物炼制过程中的能耗及成本等。

生物法脱毒是一种依赖于自身具备抑制物降解或者转化能力的微生物将木质纤维素原料中的毒性抑制物脱除的方式<sup>[59,60]</sup>。与物理化学方法相比,生物法脱毒具有诸多的优势,例如减少了昂贵的加工材料的使用、反应条件比较温和、抑制物去除较为彻底、可发酵糖的损失较少、能耗低、无污染<sup>[57,58,61,62]</sup>等。一般来讲,生物降解是指通过微生物可以将具有复杂结构的化合物转化为结构简单的化合物后或将其完全分解同化吸收至微生物自身代谢体系中并释放出  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  (终极降解)。生物转化则是通过微生物代谢改变化合物的分子结构,将毒性较强的化合物转化为毒性较弱的新化合物。具备抑制物脱毒能力的微生物可以分为两类:一种是专司生物脱毒的菌株,该类型的微生物一般不具备生产大宗化学品或者高附加值产品的能力,因而常用于发酵前的脱毒环节专门用于抑制物脱除;第二种是兼具抑制物脱毒能力与大宗化学品/高附加值产品生产能力的生物炼制发酵菌株。专司生物脱毒菌株的应用一般需要在发酵前专门增加一个设备进行生物脱毒,增加了生物炼制过程的时间以及能耗成本,而且有可能在此过程中产生其他无用的副产物。为了避免密集的加工环节及节省生物炼制的时间及能耗成本,更好的解决方案是采用对抑制物具有较强耐受或者降解转化能力的生物炼制发酵菌株,或者通过驯化、代谢工程改造的方式增加发酵菌株对抑制物的耐受或者降解转化能力。有多种具备抑制物降解能力的微生物可用于木质纤维素的抑制物脱毒<sup>[63]</sup>,包括真菌类,如丝状

白腐真菌 *Trichoderma reesei*<sup>[52, 64]</sup>等; 酵母类, 如 *Issatchenkia occidentalis*、*Iris orientalis*<sup>[65]</sup>、*Pichia stipites*<sup>[66]</sup>、*Pichia putida*<sup>[67]</sup>、*T. cutaneum* CX1<sup>[68]</sup>及 *S. cerevisiae*<sup>[69]</sup>等; 细菌类, 如嗜热细菌 *Ureibacillus thermosphaericus*<sup>[70]</sup>、假单胞菌不动杆菌 *Acinetobacter sp.*<sup>[71]</sup>等。针对木质纤维素生物炼制过程中的最主要抑制物, 以下简要介绍微生物对呋喃醛类、酚醛类及有机弱酸类抑制物的脱毒机理。

### 1.3.1 微生物对呋喃醛类抑制物的转化机理

微生物对呋喃类抑制物的脱毒机制主要包括氧化还原、抗氧化胁迫、转运及调控等<sup>[72-74]</sup>。其中最主要的机制是通过氧化还原反应将高毒性的呋喃醛氧化成低毒性的酸或(和)还原成低毒性的醇, 产生的酸或被进一步降解进入微生物的中心碳代谢实现呋喃类的终极降解。Trudgill<sup>[75]</sup>, Koenig 和 Andreesen<sup>[76]</sup>, Koopman 等人<sup>[77]</sup>在 *Pseudomonas putida* 和 *Cupriavidus basilensis* 中提出了较为完整的糠醛和 HMF 的终极降解代谢路径。如图 1.4 所示, 糠醛首先会在还原酶的催化下产生糠醇及在脱氢酶或者氧化酶的催化下氧化产生糠酸, 糠酸在糠酰-CoA 合成酶的作用下生成糠酰-CoA, 后者经糠酰-CoA 脱氢酶的催化产生 5-羟-2-糠酰-CoA, 该产物继续被异构化为相应的内酯环酮, 内酯环酮会进一步水解开环, 经酮醇异构化产生 $\alpha$ -酮戊二酰-CoA, 该产物再经过水解作用释放出 $\alpha$ -酮戊二酸, 最终进入 TCA 循环彻底被氧化分解。与糠醛降解路径相似, HMF 首先也会被还原为相应的醇以及被氧化为相应的酸, 5-羟甲基糠酸在特异性氧化酶 HmfH 的作用下, 继续氧化产生 2,5-呋喃二羧酸 (FDCA), FDCA 经过脱羧反应后生成糠酸, 糠酸的降解与糠醛的降解路径重合, 最终同样以 $\alpha$ -酮戊二酸的形式进入 TCA 循环中完成 HMF 的终极降解。除上述微生物外, 还有少数微生物体内也可能存在呋喃醛的终极降解路径, 如树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1<sup>[59, 60, 74]</sup>能够以糠醛和 5-羟甲基糠醛为唯一碳源生长; Nichols<sup>[78]</sup>报道真菌 *Coniochaeta ligniaria* 可以将呋喃醛和 5-羟甲基糠醛完全降解转化; 脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*<sup>[79, 80]</sup>能够在厌氧条件下代谢糠醛, 并以糠醛为唯一碳源下生长。

与呋喃醛的终极降解路径脱毒机制相比, 大部分微生物是通过氧化还原反应将呋喃醛转化为毒性较低的醇或(和)酸降低醛的毒性达到脱毒目的的。特别在一些发酵菌株中, 如张等人<sup>[26]</sup>报道黑曲霉 *A. niger* 可以将糠醛、HMF 还原为相应的糠醇和 5-羟甲基糠醇; Hong-Sil Park 等人<sup>[72]</sup>报道了对 *C. glutamicum* ATCC13032 在糠醛胁迫下全基因组的基因转录水平进行了研究, 结果显示糠醛胁迫与 *C. glutamicum* 中氧化应激、SOS 反应和厌氧呼吸代谢链代谢的遗传反应有关, 此外还有大量氧化还原酶的响应。Yota Tsuge 等人<sup>[81, 82]</sup>报道了氧气对 *C. glutamicum* ATCC13032 转化糠醛产生糠酸有促进作用, NADPH 依赖型的醇脱氢酶 Cgl0331 (FudC) 在 *C. glutamicum* ATCC13032 将糠醛降解成糠醇中发挥重要作用。氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 可以将糠醛、HMF 主要氧化成相应的酸, 也有少量的醇的产生<sup>[83, 84]</sup>。*S. cerevisiae* 中的醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶、NADPH 依赖型甲基甘油醛还原酶、NADPH 依赖型氧化还原酶、硫还原蛋白过氧化物酶和甘油脱氢酶是还原糠醛的关键酶<sup>[85, 86]</sup>, 醇脱氢酶、酰基醇脱氢酶、醛还原酶、

含黄素单核苷酸的 NADPH 依赖型的氧化还原酶、3-甲基丁醇还原酶和 NADPH 依赖型甲基甘油醛还原酶是还原 HMF 的关键酶<sup>[87]</sup>。 *E. coli*<sup>[88, 89]</sup>、 *Z. mobilis*<sup>[90]</sup> 可以通过还原酶将糠醛还原为糠醇。

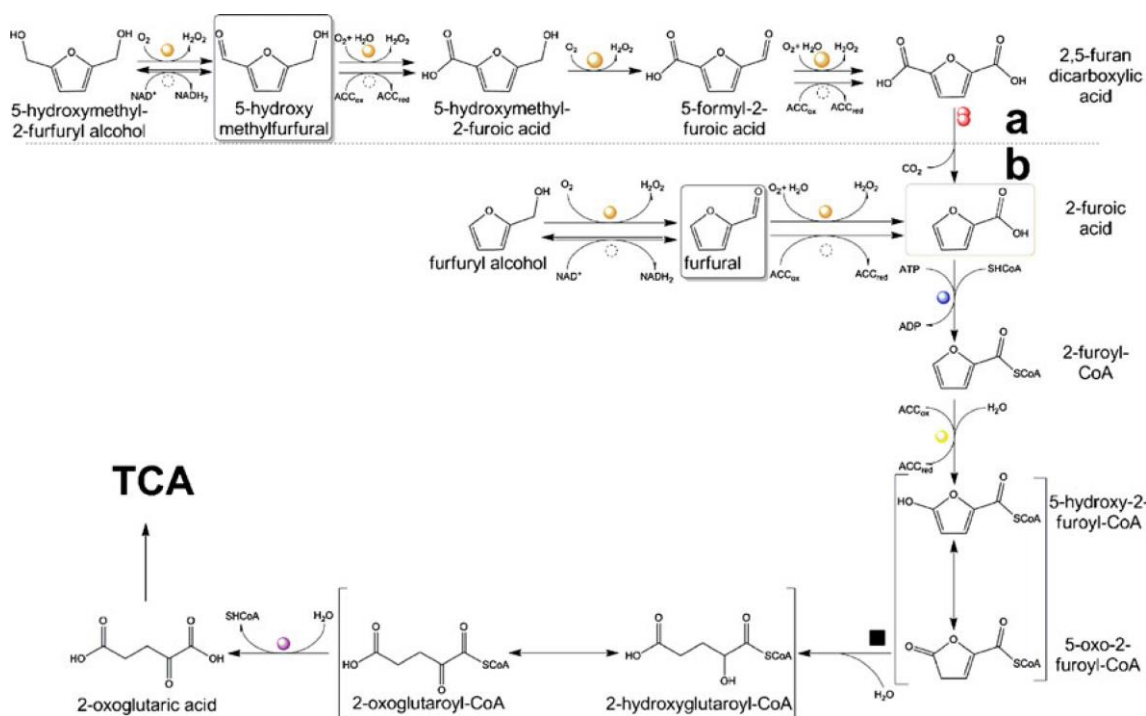


图 1.4 *Cupriavidus basilensis* HMF14 降解糠醛和 5-羟甲基糠醛的代谢路径<sup>[77]</sup>

Fig. 1.4 Metabolic pathways of furfural and 5-hydroxymethylfurfural degradation in *Cupriavidus basilensis* HMF14<sup>[77]</sup>

### 1.3.2 微生物对酚醛类抑制物转化机理

酚类化合物是芳香烃环上的氢被羟基取代的一类芳香族化合物，是木质纤维素来源中另一类主要的抑制物。由于酚类化合物自身的疏水结构及低水溶性的特点，一般专司生物脱毒菌株降解转化酚类化合物需要比呋喃类抑制物的脱毒更长的时间，这样就增加了脱毒环节的时间成本，通过快速脱毒的方式在木质纤维素物料中残留的酚醛类化合物对后续的微生物发酵菌株的影响仍十分巨大<sup>[60, 91, 92]</sup>。

微生物对酚类化合物的脱毒机制与呋喃醛的脱毒机制相似，主要包括氧化还原，转运及调控等<sup>[45, 93, 94]</sup>。其中脱毒的主要机制在于通过氧化还原反应将高毒性的呋喃醛氧化成低毒性的酸或（和）还原成低毒性的醇，氧化产生的酸或被进一步降解进入微生物的中心碳代谢从而实现芳香化合物的终极降解。少部分微生物具备芳香族化合物的终极降解能力，例如 Shen 等人<sup>[95-97]</sup>曾报道革兰氏阳性细菌谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* 能够利用多种木质素代谢衍生的芳香族化合物作为唯一碳源生长，如 4-羟基苯甲醛，香草醛，香草酸，阿魏酸，香豆酸，肉桂酸等。如图 1.5 所示，*C. glutamicum* 体内可能具备四条不同的芳香族化合物的开环代谢途径，包括原儿茶酸开环途径、脱碳酸途径、苯甲酰-CoA 还原途径以及龙胆酸开环途径<sup>[95-103]</sup>。其中香草醛在该菌株中的代谢路径研究的较多，如图 1.5 所示，4-羟基苯甲醛和香草醛通过微生物的氧化还原作用产生相应的 4-羟

基苯甲醇、香草醇、4-羟基苯甲酸和香草酸，4-羟基苯甲醛和香草酸在脱甲基酶的作用下产生原儿茶酸（3,4-二羟基苯酸），接着在原儿茶酸-3,4 双加氧酶的催化下原儿茶酸发生邻位开环，开环产物在一系列水解酶、水合酶以及醛缩酶的作用下，生成琥珀酰-CoA 和乙酰 CoA 进入 TCA 循环，完成 4-羟基苯甲醛和香草醛在 *C. glutamicum* 中的终极降解。此外，一些油脂生产菌株如 *T. cutaneum*<sup>[104]</sup>、*Rhodococcus rhodochrous*<sup>[105, 106]</sup> 也可以利用 4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲酸、香草酸等为唯一碳源生产油脂；*Burkholderia cepacia* 能够利用香草醛、香草酸、原儿茶酸、阿魏酸等作为唯一碳源进行生长<sup>[107]</sup>，从而推测这些微生物中也可能存在酚醛的终极代谢路径。

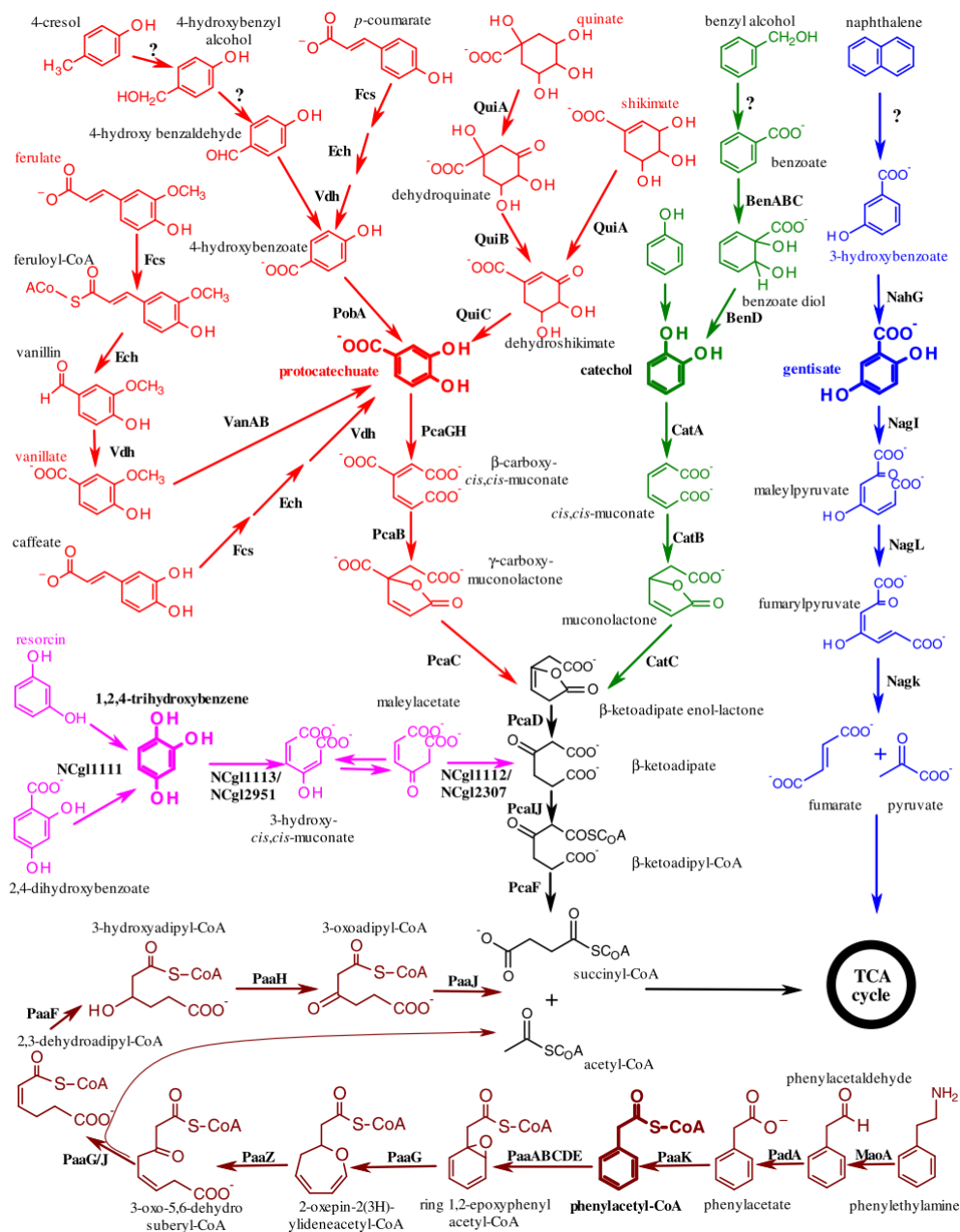


图 1.5 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 降解芳香族化合物的代谢路径<sup>[96]</sup>

Fig. 1.5 Metabolic pathways of phenolic compounds degradation in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032<sup>[96]</sup>

对大多数微生物来说,芳香族化合物的微生物脱毒机制仍主要依赖于微生物中的氧化还原反应,通过将酚醛转化为低毒的醇和酸完成,如黑曲霉 *A. niger* 可以将 4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛还原为相应的低毒性的醇类产物<sup>[26]</sup>;革兰氏阴性细菌氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* 主要将香草醛及 4-羟基苯甲醛氧化成香草酸和 4-羟基苯甲酸,也有通过还原反应产生香草醇和 4-羟基苯甲醇的存在<sup>[83, 108, 109]</sup>;树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 可以将木质纤维素来源典型酚醛转化为响应的酚醇和酚酸<sup>[110]</sup>,醇脱氢酶、醛还原酶和酰基醇脱氢酶是 *A. resiniae* ZN1 还原酚醛生成酚醇的关键酶,醛脱氢酶是 *A. resiniae* ZN1 氧化酚醛产生酚酸的关键酶<sup>[111]</sup>; *Z. mobilis* ZM4 通过将酚醛还原为酚醇脱毒,醇脱氢酶、醛酮还原酶、氧化还原酶、短链脱氢酶是 *Z. mobilis* 还原酚醛产生酚醇的关键酶<sup>[45]</sup>;酰基醇脱氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和黄酶参与了 *S. cerevisiae* 转化松柏醛的代谢过程<sup>[112]</sup>;氧化还原和抗氧化是 *S. cerevisiae* NAN-27 转化和耐受香草醛的主要机制<sup>[94]</sup>。负责香草醛氧化为香草酸的香草醛脱氢酶在 *C. glutamicum*<sup>[113-115]</sup>、*Pseudomonas* sp. strain HR199<sup>[116-118]</sup>、*P. putida* KT2440<sup>[119, 120]</sup>、*Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116<sup>[121]</sup>、*Rhodococcus*<sup>[122]</sup>、*Sphingomonas paucimobilis*<sup>[123]</sup>中通过转录组学及遗传工程手段被报道和验证过。酚醛的毒性基团主要为其醛基基团<sup>[39, 45, 124]</sup>。此外,在以漆酶及过氧化物酶为主的酶法脱毒中,酶制剂的来源主要集中在 *Trametes versicolor*<sup>[125, 126]</sup>、*Phenorchete chrysosporium*、*Cythus bulleri*、*Candida shehatae*<sup>[127]</sup>中,漆酶和过氧化物酶主要应用于木质纤维素体系中酚类的脱除<sup>[125, 128]</sup>。

### 1.3.3 微生物对有机弱酸类抑制物转化机理

有机弱酸类是木质纤维素来源的第三大类抑制物,其毒性机理与呋喃类和酚类相差较大,因而微生物对有机弱酸类的脱毒机制也与呋喃类和酚类的脱毒机制不同。微生物中的有机弱酸类的脱毒机制主要通过乙酸吸收与代谢完成。乙酸在微生物中的代谢与中心碳代谢相偶联,其关键酶是乙酰辅酶 A 合成酶及乙酸激酶,合成的乙酰-CoA 进入 TCA 循环,并且参与乙醛酸循环。基于转录组学的相关研究,与中心碳代谢相关的乙酸激酶、柠檬酸合酶、富马酸水合酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、异柠檬酸裂解酶、苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶等酶参与了 *C. glutamicum* ATCC13032 的乙酸代谢<sup>[129]</sup>; 3-磷酸甘油醛脱氢酶以及柠檬酸合酶在 *Z. mobilis* ZM4 的乙酸耐受机制中发挥重要作用<sup>[130]</sup>;醇脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶和转酮酶参与了 *E. coli* 中的乙酸代谢<sup>[131]</sup>;乙酰丙酸在 *E. coli* 中的代谢则是生成乙酰丙酸辅酶 A,再被裂解成甲酰-CoA 和乙酰-CoA 后进入 TCA 代谢循环<sup>[132]</sup>。

## 1.4 生物基产品的合成

生物基产品是指利用可再生的木质纤维素资源合成的材料、化学品和能源等<sup>[133]</sup>。生物基产品主要包括大宗化学品如有机酸等,生物燃料如乙醇、脂肪烃、生物柴油等,生物基材料如生物可降解塑料等。下面对有机酸类的柠檬酸及生物燃料类的脂肪烃的合成进行详细阐述。

### 1.4.1 木质纤维素柠檬酸合成

柠檬酸是一种重要有机酸，其应用十分广泛，用在饮料和食品行业中作为酸味添加剂的柠檬酸占据全球柠檬酸总消耗量的 70%左右，用在医药行业中的柠檬酸约占 12%，用在其他方面如金属表面处理和清洁剂、润滑剂、螯合剂、动物饲料和增塑剂等约占 18%左右。基于柠檬酸的广泛应用，其全球年产量及需求量都十分巨大，2018 年全球柠檬酸年产量已达 120 万吨，并且仍以每年 3.5%-4.0%的速度在增加<sup>[134, 135]</sup>。柠檬酸是我国年产量最高的一种有机酸，每年生产的柠檬酸约为 60 万吨，其中 70%以上用于出口<sup>[136]</sup>。柠檬酸的生产工艺除了从柠檬，菠萝及柑橘等水果中提取天然柠檬酸外，还可以通过化学反应或微生物法合成，其中微生物发酵法在柠檬酸生产工艺中占据主要地位。自然界中包括真菌、酵母及少数细菌等多种多样的微生物都可以用来发酵生产柠檬酸<sup>[137-139]</sup>。其中黑曲霉 *A. niger* 是工业上柠檬酸生产的优势菌株，利用该菌株发酵柠檬酸具有诸多优势，如柠檬酸得率高、副产物少、发酵调控简便及多种糖类利用等<sup>[140]</sup>。

工业上柠檬酸生产主要以粮食淀粉作为原料发酵得到，例如以玉米淀粉作为原料生产获得的柠檬酸浓度可达 150-200 g/L，因此传统的柠檬酸发酵工艺将以大量粮食的消耗为代价<sup>[134, 141]</sup>。利用资源丰富、廉价易得的可再生原料发酵生产柠檬酸可降低其生产成本。多种廉价农工废弃物<sup>[136, 142-144]</sup>可用于柠檬酸生产，如啤酒糟废弃物<sup>[145-148]</sup>、苹果渣<sup>[149, 150]</sup>、咖啡豆荚<sup>[151]</sup>、玉米芯<sup>[152]</sup>、葡萄渣<sup>[153]</sup>、橘子废弃物<sup>[154]</sup>和菠萝废弃物<sup>[155]</sup>等。在这些可再生原料中，木质纤维素原料由于其资源丰富性和实用性成为可持续柠檬酸生产原料中最重要的一项。而目前以木质纤维素资源为原料生产柠檬酸的研究均尚处于实验室阶段，其主要瓶颈之一就是无法积累高浓度的纤维素柠檬酸，纤维素对柠檬酸的得率偏低，不具备工业应用的价值，例如张建安<sup>[156]</sup>报道黑曲霉 Van Tieghem (*A. niger* VanTieghem 购自中科院微生物所) 利用麦草纤维素水解液(麦草经过复杂的碱-氧-蒽醌蒸煮后制得纤维素，再经纤维素酶水解获得水解液)为原料，30 °C 发酵 104 h 得到质量浓度为 10.5 g/L 的柠檬酸，基于麦草的得率为 60.8%；Khosravi-Datani 和 Zoghi<sup>[143]</sup>比较了不同预处理条件下的甘蔗渣包括酸处理、碱处理、尿素处理等方式，25%固含量的甘蔗渣补充糖蜜后利用黑曲霉 *A. niger* ATCC 9142 进行 SSF，添加 4% (v/w) 的甲醇，初糖浓度 18% (w/w)，30 °C 发酵 5 天产生 34 g/L 柠檬酸，得率约为 34%；Hang 和 Woodams<sup>[152]</sup>利用 *A. niger* NRRL 2001 在玉米芯原料中固态发酵产 250 g 柠檬酸/kg 玉米芯，得率低于 50%。从这些报道可以得出，黑曲霉在相对环境较差的木质纤维素环境中很难实现高浓度的柠檬酸积累，这与木质纤维素体系中组分的复杂性是分不开的，因此利用木质纤维素原料进行柠檬酸发酵在未来还有很多未知性。发酵液中柠檬酸浓度高于 100 g/L 对降低后期分离和浓缩成本是至关重要的，因而目前利用木质纤维原料生产柠檬酸和基于粮食消耗的工业柠檬酸的生产相比依然有很大的差距。

### 1.4.2 烃类化合物的合成

烃类化合物作为化石燃料的主要组成部分，在整个能源系统中占据十分重要的地位<sup>[157]</sup>，依据其碳链长度的不同可以分为短链烃 (C2-C5)、中链烃 (C6-C12)、长链烃 (C13-

C22) 及超长链烃 (C23-C32)。碳链的长度也决定了烃类化合物的主要用途, 例如天然气的主要成分为 C1-C4 链长的烃, 汽油的主要成分是 C4-C9 链长的烃, 航空燃料的主要成分是 C8-C16 链长的烃, 柴油的主要成分是 C10-C18 链长的烃, 润滑油的主要成分则是 C16-C30 链长的烃类化合物<sup>[158]</sup>。除此之外, 烃类化合物在动物、植物及微生物的生态和生理方面也具有重要功能, 例如在动物细胞中, 烃类化合物对神经系统具有重要的调节与保护作用<sup>[159]</sup>; 在植物细胞中, 烃与表皮蜡质层的合成相关, 少量烃类即可保护植物表皮细胞并减少其水分的蒸发<sup>[160]</sup>; 在微藻细胞中, 烃可以作为胞内环氧化物和其它脂质体合成的中间体<sup>[161]</sup>; 在微生物细胞中, 细胞内合成的烃是细胞壁组分的一部分<sup>[162]</sup>, 胞外产生的烃与细胞表面荚膜的形成相关, 可以保护处在高浓度酸性条件下的细胞<sup>[163]</sup>。综上所述, 在哺乳动物、昆虫、鸟和植物等高等真核生物中经新陈代谢产生的疏水性的烃类化合物分子具有抗干燥、防水、神经保护及信号传递的功能, 微生物中产生的烃类化合物可以有效的保护细胞并促进微生物的生长<sup>[157, 164]</sup>。目前, 商业上烃类化合物的制备主要通过石油蒸馏 (150-275 °C) 的方式进行, 石油蒸馏后会产生一种组分超过 1000 种物质的复杂体系, 主要成分包含碳链长度在 C6-C16 的直链烷烃、支链烷烃和环烷烃等饱和烷烃<sup>[165]</sup>。这种烃类化合物的生产方式不仅会消耗大量的石油资源, 还会在生产过程释放二氧化碳促进全球变暖并造成严重的环境污染。因此, 为了减少对不可再生的化石资源的过度依赖, 寻找一种可持续的烃类化合物的生产方法迫在眉睫<sup>[166]</sup>。

利用微生物产烃的方式是当前研究的热点, 以微生物作为宿主进行产烃的明显优势:

(1) 相较于植物、动物等高等真核生物, 微生物细胞生长速率较快, 因而能够缩短烃类化合物的生产周期<sup>[167]</sup>; (2) 微生物可以利用农业废弃物等可再生资源进行发酵, 实现烃类化合物的可持续生产<sup>[168]</sup>; (3) 微生物生产烃类化合物的过程对环境污染较少。目前利用微生物法合成烃类化合物的研究不仅包括利用具有天然产烃能力的微生物合成<sup>[162]</sup>, 更多的是通过代谢工程手段在自身不具产烃能力的一些模式微生物诸如 *E. coli*<sup>[157, 169-173]</sup>、*S. cerevisiae*<sup>[158, 174-177]</sup>和 *Yarrowia lipolytica*<sup>[178-180]</sup>等中引入外源的产烃路径进行异源产烃, 有时也会涉及到多种微生物共发酵的模式产烃<sup>[181]</sup>。

自然界中能够天然合成烃类化合物的微生物多种多样<sup>[162, 182]</sup>, 诸如蓝藻类的细长聚球藻 *Synechococcus elongatus*<sup>[183]</sup>、灰色念珠藻 *Nostocmuscorum*<sup>[184]</sup>、布朗葡萄藻 *Botryococcus braunii*<sup>[159]</sup>、土壤蓝藻 *Microcoleus vaginatus*<sup>[185]</sup>; 真菌类的树脂枝孢霉 *Cladosporiumresinae*<sup>[186]</sup>、粉红粘帚霉 *Gliocladiumaureum*<sup>[162]</sup>、出芽短梗霉 *Aerobasidium pullulans var melanogenum*<sup>[187]</sup>、巴斯德汉逊酵母 *Debaryomyceshansenii*<sup>[188]</sup>等; 细菌类的硫酸盐还原细菌 *Sulfate-reducing bacteria*<sup>[162]</sup>、沙雷马里诺癣菌 *Serratiamarinorubrum*<sup>[189]</sup>、栖黑海弧菌 *Vibrio ponticu*<sup>[189]</sup>、弗尼斯弧菌 *Vibrio furnissii*<sup>[190, 191]</sup>、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*<sup>[192]</sup>等。虽然上述具备天然产烃能力的微生物中大部分的产烃量都很低 (不足细胞干重的 10%)<sup>[162]</sup>, 但是其中也存在两种产烃量较高的微生物, 一种是弗尼斯弧菌 *V. furnissii* (烃产量约占细胞干重的 60%), 另外一种为布朗葡萄藻 *B. braunii* (产烃量可达其细胞干重的 75%)<sup>[161, 193]</sup>。此外, 微生物合成的烃类化合物的种类及碳链长度的分布

也不一致,合成的烃类化合物碳链的长短可能也与烃类的分泌相关。微生物中合成的碳链长度在 C25-C35 的烃类化合物主要留在细胞内,而一些链长较短的烃类化合物(例如巴氏梭菌 *Clostridium pasteurianum* 产的 C19-C21 链长的烃及脱硫弧菌 *Desulfovibrio desulfuricans* 产的 C16-C18 链长的烃)则容易分泌至细胞外<sup>[163]</sup>。

微生物合成烃类化合物的机制可以分为直链烃、支链烃及挥发性的非甲烷类烃的合成<sup>[162]</sup>。其中,支链烃类的合成路径常见于 *Sarcina lutea* 中<sup>[194]</sup>,合成路径与头-头缩合(Head-to-head condensation)路径相关,一般产生的烃类化合物的碳原子数是微生物细胞内含量最为丰富的脂肪酸碳原子数目的两倍左右<sup>[195]</sup>。挥发性的非甲烷合成中常见的包括乙烯、异丁烯及异丙酮等的合成<sup>[162]</sup>。直链烃类化合物的合成路径研究的较多,主要包括延伸-脱羧(Elongation-decarboxylation)路径<sup>[196, 197]</sup>以及头-头缩合(Head-to-head condensation)路径<sup>[192, 194]</sup>。综述所述,直链烃类化合物的合成与微生物中的脂肪酸代谢路径紧密相关,如图 1.6 所示,与脂肪酸相关的代谢产烃路径可以分为三条:以细胞内游离脂肪酸作为前体时, Akhtar 等<sup>[171]</sup>将来源于海鱼分枝杆菌 *Mycobacterium marinum* 的羧酸还原酶(Arboxylate reductase, CAR)引入 *E. coli* 中,将脂肪酸脱羧转化为相应的脂肪醛,进而在来源于蓝藻的脂肪醛脱羧基酶(Aldehyde oxygenase (deformylating), ADO)的作用下产生烷烃或者烯烃;以脂酰-ACP 为底物时, Schirmer 等<sup>[157]</sup>和 Cao 等<sup>[169]</sup>将来源于蓝藻的长链脂酰-ACP 还原酶(Long-chain acyl-(acyl-carrier-protein) reductase, AAR)引入 *E. coli* 中,将脂酰-ACP 还原为脂肪醛,进而在 ADO 作用下产生烷烃,再经过整体代谢网络路径上的代谢工程改造,以分批发酵的方式得到目前相关研究中最高的烃类化合物的产量 1.3 g/L;以脂酰-CoA 为前体时, Choi 等<sup>[172]</sup>将来源于乙酰丁酸梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 的脂酰-CoA 还原酶(Fatty acyl-CoA reductase, ACR)及来源于拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的脂肪醛脱羧基酶 CER1 引入 *E. coli* 中,产生短链烃。此外,以脂肪酸合成路径为基础还能合成其他相关的生物燃料如脂肪醇、脂肪酮和酯类等<sup>[198-200]</sup>。

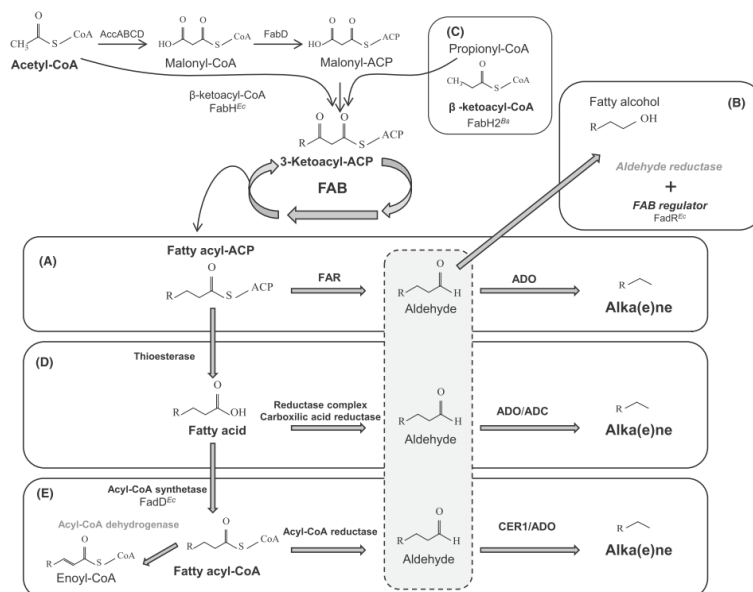


图 1.6 微生物中烃类化合物的不同合成路径<sup>[182]</sup>

Fig. 1.6 Different synthesis pathways of hydrocarbons in microorganisms<sup>[182]</sup>

Jiménez-Díaz 等<sup>[182]</sup>对近年来在蓝藻、*E. coli*、酵母及其它微生物中的代谢工程改造方法进行了综述。通过代谢工程改造的方式提升微生物中直链烃的合成中，其改造策略主要从以下几个方面考虑：1、促进前体物质的合成，如以脂酰 ACP 作为前体物质时，通过代谢工程手段，敲除 *E. coli* 中的脂酰-CoA 合成酶基因 *fadD*，过表达 ACC 的四个亚基和来源于加州月桂 *Umbellulariacalifornica* 的酰基-ACP 硫脂酶编码基因 *tes*，促进脂肪酸合成或者阻断脂肪酸降解的 $\beta$ -氧化路径<sup>[172]</sup>，如过表达转录调控子 *fadR* 及醛还原酶 *yqhD*<sup>[201]</sup>；2、碳通量的再分配，包括阻断副产物的产生，例如通过敲除基因簇 *pta-ackA* 或者过表达乙酰-CoA 合成酶编码基因 *acs* 减少副产物乙酸的生成，使更多的代谢流流向目标产物<sup>[169]</sup>；3、增加细胞中氧化还原力的供应<sup>[169]</sup>；4、改变宿主细胞种类也会影响烃类化合物的产生。

### 1.5 本论文立题依据及主要研究内容

呋喃醛（糠醛和 5-羟甲基糠醛）和酚醛（4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛）是木质纤维素生物炼制过程的两大类主要抑制物，对生物炼制工艺中酶解糖化环节及微生物发酵环节均会产生严重的抑制作用。因此，呋喃醛和酚醛类抑制物的脱除是木质纤维素原料进行高效生物炼制的关键。针对呋喃醛和酚醛类抑制物对生物炼制发酵微生物带来的毒性抑制，本论文采取不同的生物脱毒应对及研究策略以提升木质纤维素生物炼制效率。针对抑制物耐受性较差型发酵菌株的木质纤维素生物炼制，本论文借助专门的脱毒微生物在发酵前对木质纤维素原料中的抑制物进行脱除；而对呋喃醛和酚醛类抑制物耐受性较强的生物炼制发酵菌株，本论文对其抑制物耐受及生物脱毒的分子生物学机制进行了解析，为高抑制物耐受型生物炼制发酵微生物的改造及生物炼制效率的提升提供了重要的可参考信息。本论文的主要研究内容主要包括以下四个方面：

(1) 将木质纤维素干法生物脱毒工艺应用至木质纤维素柠檬酸的生产中。选用一株在工业上普遍应用的柠檬酸生产菌株 *A. niger* SIIM M288，考察其对木质纤维素体系的适应能力以及对木质纤维素来源典型抑制物的耐受能力。以提高木质纤维素柠檬酸的发酵浓度及得率为目标，对预处理玉米秸秆原料采取合适的生物脱毒应对策略及发酵参数的优化，以达到工业上柠檬酸分离纯化的浓度标准，为发酵微生物进行高效木质纤维素生物炼制提供重要的参考依据。

(2) 基于 DNA 芯片技术，考察生物炼制发酵菌株氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* DSM 2003 转化糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛等木质纤维素来源的五种典型醛类抑制物的转录组。对 *G. oxydans* DSM 2003 转化呋喃醛和酚醛的生物脱毒机制进行解析，筛选与醛类抑制物转化相关的关键基因，为生物炼制领域中高抑制物耐受发酵菌株的代谢工程构建提供重要的改造思路。

(3) 基于 qRT-PCR 定量技术解析生物炼制发酵菌株谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛抑制物的分子生物学过程。筛选并鉴定 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛及酚醛类抑制物过程中的关键酶，推测其转化呋喃醛和酚醛抑制物的分子生物

学路径。综合分析该菌株对五种典型呋喃醛和酚醛抑制物的转化过程，为应对多种抑制物的高抑制物耐受型发酵菌株的构建提供重要的基因储备。

(4) 在细菌发酵微生物中进行新型生物燃料脂肪烃的合成路径构建及初步评价研究。将来源于细长聚球藻 *S. elongatus* PCC7942 的长链脂酰-ACP 还原酶及脂肪醛脱羧基酶构建至 *E. coli* 及 *C. glutamicum* S9114 中进行脂肪烃的生产，以提升脂肪烃的产量为目标，对多种促进脂肪烃合成的策略进行评价和研究，为后续木质纤维素脂肪烃的合成提供重要的参考依据。

## 第 2 章 黑曲霉 *Aspergillus niger* 利用生物脱毒玉米秸秆生产柠檬酸

### 2.1 引言

柠檬酸是一种在食品、饮料、制药、化妆、农业、建筑和化学工业等行业中可用作食品及饮料的酸味添加剂、清洁剂、润滑剂、增塑剂及水泥缓凝剂等的重要有机酸<sup>[136]</sup>。基于其广泛应用，柠檬酸的年产量和需求量都十分巨大，全球柠檬酸总需求量约为 110 万吨/年，2018 年全球柠檬酸的总生产力接近 120 万吨，中国约占 50%，每年生产的柠檬酸 70% 以上用于出口。目前工业上主要以粮食或者糖蜜为原料进行柠檬酸的生产，寻求廉价的可再生资源作为原料可以降低柠檬酸生产的成本。

目前已有多种廉价的原料例如啤酒废弃物、苹果渣、咖啡壳、玉米芯、葡萄果渣、橘子废弃物和菠萝废弃物等在替代以淀粉或者果糖为底物的柠檬酸发酵中被广泛研究<sup>[136, 142, 144]</sup>。木质纤维素原料由于其丰富性和实用性成为柠檬酸生产原料中最重要的一个选项。但是，利用木质纤维素原料为底物得到的柠檬酸浓度一般较低并且伴随着高废水量的产生，例如 Hang 和 Woodams<sup>[152]</sup>报道 *A. niger* NRRL 2001 在玉米芯中进行固态发酵时生产了 250 g 柠檬酸/kg 玉米芯，柠檬酸得率不超过 50%；Zhang 等人<sup>[156]</sup>利用 *A. niger* van Tieghem 在麦草纤维素水解液（麦草经过复杂的碱-氧-蒽醌蒸煮后制得纤维素，再经纤维素酶水解获得水解液）中进行柠檬酸发酵，产生了 10.5 g/L 柠檬酸，基于麦草的柠檬酸得率约为 60.8%；Khosravi-Datani 和 Zoghi<sup>[143]</sup>比较了包括酸处理、碱处理、尿素处理等不同预处理条件下的甘蔗渣，25%（w/w）固含量的甘蔗渣补充糖蜜后利用 *A. niger* ATCC 9142 进行同步糖化发酵，添加 4%（v/w）的甲醇，初糖浓度 18%（w/w），30 °C 发酵 5 天产生 34 g/L 柠檬酸，得率约为 34%。从这些报道可以得出，*A. niger* 在相对环境较差的木质纤维素环境中很难实现高浓度的柠檬酸积累，与基于粮食消耗的工业柠檬酸的生产间还有很大的差距。利用木质纤维素原料生产柠檬酸的前景堪忧，迫切需要提升木质纤维素体系柠檬酸的发酵产量。

本章节研究旨在利用工业柠檬酸发酵菌株黑曲霉 *A. niger* SIIM M288 以木质纤维素原料玉米秸秆为底物进行高浓度柠檬酸的发酵，以期实现高于 100 g/L 柠檬酸的积累并维持较高的柠檬酸得率，由于 100 g/L 柠檬酸通常被认为是工业柠檬酸生产中的最低可分离浓度，对降低后期分离、浓缩及纯化成本是至关重要的。木质纤维素生物炼制过程中的干式稀酸预处理、生物脱毒以及高固含量糖化等<sup>[13-15, 60, 202, 203]</sup>方法已经成功应用至高浓度乙醇<sup>[204]</sup>，乳酸<sup>[205-208]</sup>和葡萄糖酸<sup>[26, 209]</sup>的发酵中，本章节研究将典型木质纤维素生物炼制工艺中的干法生物脱毒工艺应用至木质纤维素柠檬酸发酵中，为木质纤维素柠檬酸发酵的产业化提供了重要的可参考依据，同时也为农作物秸秆的高效转化及解决环境问题起到良好的示范作用。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 原料

摇瓶发酵实验中使用的玉米秸秆来自中国河南省周口市郸城县, 2012 年秋收获。发酵罐实验中使用的玉米秸秆来自中国内蒙古巴彦淖尔市, 2015 年秋收获。玉米秸秆收集后首先进行粗粉碎, 然后经水洗除去泥沙、石子和金属, 而后于 105 °C 烘干至恒重。使用 SF-300 锤式机械粉碎机将烘干后的玉米秸秆粉碎, 然后用直径为 10 mm 筛网进行筛选, 得到的秸秆颗粒保存于密封袋中封存备用。经过上述前处理工段的玉米秸秆的组分通过 ANKOM 220 纤维素分析仪 (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA) 测得。摇瓶发酵实验中经过前处理的玉米秸秆含有 32.1% 纤维素, 20.6% 半纤维素, 26.5% 的木质素, 4.4% 灰分 (w/w, 基于干物料), 发酵罐发酵实验中经过前处理的玉米秸秆含有 35.7% 纤维素, 22.8% 半纤维素, 15.7% 木质素, 3.6% 灰分 (w/w, 基于干物料)。其中, 原料的含水量通过在 105 °C 烘箱烘干后测得。

### 2.2.2 酶和试剂

固态纤维素酶 Youtell #6 购自湖南尤特尔生化有限公司。该纤维素酶的滤纸酶活为 135 FPU/g 干物质 (DM), 依据 NREL 中的方法测定<sup>[210]</sup>; 纤维二糖的酶活为 344 CBU/g DM, 依据 Ghost 中方法测定<sup>[211]</sup>; 蛋白含量为 90 mg/g DM, 依据 Bradford 方法测定<sup>[212]</sup>。

本章节研究使用到的试剂见附录 I。

### 2.2.3 菌种和培养方法

*A. niger* SIIM M288 购自上海工微所科技有限公司 (Shanghai Industrial Microbiology Institute Tech. Co., Ltd, SIIM, 中国, 上海)。*A. resiniae* ZN1 (CGMCC 7452) 是本实验室前期研究中从自然界中筛选获得, 是专门对预处理后木质纤维素原料进行生物脱毒的菌株<sup>[60]</sup>。该菌株在中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbial Collection Center, CGMCC) 中保藏登记。

本章节研究中使用的四种培养基包括:

(1) PDA (potato-dextrose-agar) 固体培养基: 200 g 马铃薯煮沸过滤后的汁液另加 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂, 加去离子水定容至 1000 mL 于 115 °C 灭菌 20 min 后制备成平板及斜面, 保藏于 4 °C。

(2) 种子培养基: 一水葡萄糖 70 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 2.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2.4 × 10<sup>-4</sup> g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.1 × 10<sup>-3</sup> g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6.5 × 10<sup>-3</sup> g/L, MnCl<sub>2</sub> 3.6 × 10<sup>-3</sup> g/L。

(3) 合成发酵培养基: 一水葡萄糖 100 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 2.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2.4 × 10<sup>-4</sup> g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.1 × 10<sup>-3</sup> g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6.5 × 10<sup>-3</sup> g/L, MnCl<sub>2</sub> 3.6 × 10<sup>-3</sup> g/L。

(4) 玉米秸秆水解液发酵培养基 (表 2.1): 利用预处理后未经生物脱毒或者经过 *A. resiniae* ZN1 静态脱毒 7 天后的玉米秸秆制备的水解液。对 15% 和 25% (w/w) 固含量

的预处理及生物脱毒后的玉米秸秆酶解糖化制备了①, ②和④三种类型的玉米秸秆水解液, 通过对 25% (w/w) 固含量的预处理后未经生物脱毒的玉米秸秆酶解糖化制备了③玉米秸秆水解液。其中①, ②和③用于摇瓶发酵, ④用于发酵罐发酵。此外, 向玉米秸秆水解液中额外补充营养成分与合成发酵培养基中除葡萄糖之外的组分相同, 包括  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $2.4 \times 10^{-4}$  g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1.1 \times 10^{-3}$  g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $6.5 \times 10^{-3}$  g/L,  $\text{MnCl}_2$   $3.6 \times 10^{-3}$  g/L。探究营养元素对柠檬酸发酵影响的实验中, 玉米秸秆水解液中营养物质的添加量以注释为准。

表 2.1 本章节研究使用的玉米秸秆水解液

Table 2.1 The corn stover hydrolysate used in the study of this chapter

| 培养基组分 | ① 15% 脱毒<br>CSH (g/L) | ② 25% 脱毒<br>CSH (g/L) | ③ 25% 未脱毒<br>CSH (g/L) | ④ 25% 脱毒<br>CSH (g/L) |
|-------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| 葡萄糖   | 48.1                  | 104.5                 | 68.7                   | 99.7                  |
| 木糖    | 6.5                   | 22.9                  | 34.1                   | 26.3                  |
| 糠醛    | -                     | -                     | 1.1                    | -                     |
| HMF   | -                     | 0.05                  | 0.8                    | -                     |
| 乙酸    | 1.4                   | 3.5                   | 7.8                    | 1.7                   |
| 甲酸    | -                     | -                     | 2.5                    | -                     |
| 乙酰丙酸  | -                     | -                     | 1.4                    | -                     |
| HBA   | -                     | -                     | 0.02                   | -                     |
| 香草醛   | -                     | -                     | 0.4                    | -                     |
| 丁香醛   | -                     | -                     | 0.2                    | -                     |

-表示未检测到。

*A. niger* SIIM M288 孢子悬液保存在 30% (w/w) 甘油浓度的冻存管中,  $-80^\circ\text{C}$  保存。从保藏的甘油管中取出约 300  $\mu\text{L}$  涂布于 PDA 平板上,  $28^\circ\text{C}$  倒置培养 72 h。待平板长满黑色孢子, 用接种环取一环孢子划线接种至 PDA 斜面, 棉花封口,  $28^\circ\text{C}$  静置培养 5-7 天。培养好的斜面可在  $4^\circ\text{C}$  保存, 但一般不超过 7 天。用无菌水从培养好的斜面洗下孢子, 使用血球计数板对孢子数目计数, 并用无菌水调节孢子数目约为  $2-3 \times 10^6$  个孢子/mL, 然后以 10% (v/v) 接种量接种至含有 200 mL 种子培养基的 1 L 三角瓶中,  $28^\circ\text{C}$ , 200 rpm, 培养 36 h。种子培养完成后, 对于摇瓶发酵实验, 将种子液按照 10% (v/v) 转接量接入到含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 根据特定的实验设置发酵条件, 发酵过程仅调节初始 pH, 200 rpm 发酵 168 h, 所有的摇瓶试验都有重复对照。对于发酵罐发酵实验, 将种子液按照 10% (v/v) 转接量接入含有 1 L 玉米秸秆水解液发酵培养基的 3 L 发酵罐中,  $33^\circ\text{C}$ , 250-400 rpm, 通气量 1.0-2.0 vvm, 发酵 192 h。发酵罐的初始 pH 使用 5 M NaOH 溶液调节至 6.0 左右, 整个发酵过程不调节 pH, 发酵罐实验也设置至少两次重复。

*A. resinae* ZN1 孢子悬液保存在 30% (w/w) 甘油浓度的冻存管中,  $-80^\circ\text{C}$  保存。取 200  $\mu\text{L}$  涂布于 PDA 平板上,  $28^\circ\text{C}$  倒置培养约 72 h 后划线接种至 PDA 斜面,  $28^\circ\text{C}$  培养 3 天, 然后将长满孢子的斜面保藏于  $4^\circ\text{C}$  备用。

## 2.2.4 原料预处理和生物脱毒

玉米秸秆的预处理方法依据 Zhang 等<sup>[13]</sup>和 He 等<sup>[14, 202]</sup>。粉碎后的玉米秸秆原料的预处理反应在 20 L 预处理反应器中进行。首先将玉米秸秆原料与 5% (w/w) 的稀硫酸, 依据固液比 2:1 (w/w) 一起填入预处理反应器中, 50 rpm 搅拌 3 min。然后通入蒸汽压力, 于  $175 \pm 1$  °C、压力 2.4 MPa、转速 50 rpm, 维持 5 min。预处理后的物料固含量约为 50% (w/w), 整个预处理过程中并无废水产生。摇瓶发酵实验中使用的预处理后玉米秸秆物料含有 35.5% (w/w) 纤维素, 6.8% (w/w) 半纤维素。发酵罐发酵实验中使用的预处理后玉米秸秆物料组分包含 37.3% (w/w) 纤维素, 5.9% (w/w) 半纤维素。组分测定结果都是基于干物质的量, 通过两步酸解法<sup>[213]</sup>测得。

玉米秸秆原料的生物脱毒方法主要依据 He 等<sup>[203]</sup>和 Zhang 等<sup>[60]</sup>。本章节研究使用静态固态生物脱毒的方法, 首先用 20% (w/w) 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  将预处理后的玉米秸秆物料中和至 pH 5.0-6.0 后进行磨浆处理。将 *A. resiniae* ZN1 斜面首先接种至预处理及磨浆后的玉米秸秆中室温培养 4-5 天用作固体种子, 然后将培养好的固态种子按照 10% (w/w) 接种至预处理及磨浆后的玉米秸秆物料中, 28 °C, pH 4.8-5.5, 湿度为 60% 的条件下静置 4-7 天, 直至除去 90% 的糠醛和 HMF。经过生物脱毒后的玉米秸秆原料保存于 4 °C 备用。

## 2.2.5 玉米秸秆水解液制备

玉米秸秆原料的糖化在带有螺旋搅拌桨的 5 L 发酵罐(保兴生物设备工程有限公司, 上海) 中进行<sup>[15]</sup>。糖化过程中, 首先将 121 °C 灭菌 20 min 后的预处理后的玉米秸秆原料和无菌水按照一定的比例(需要制备的水解液固含量) 加入发酵罐, 按照 15.0 FPU/g DM 添加纤维素酶 (Youtell #6), 50 °C, 150 rpm, pH 5.0 条件下糖化 48 h。糖化过程中 pH 的控制通过添加 5 M NaOH 溶液或 4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液实现。糖化后的水解液经过 10,000 rpm 离心 10 min, 上清再经过灭菌滤纸过滤后所得玉米秸秆水解液保存于 4 °C 保存备用。

## 2.2.6 玉米秸秆水解液组分测定

葡萄糖、木糖、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙酰丙酸利用日本岛津公司(日本, 京都) 的高效液相色谱 HPLC (LC-20AD, 示差检测器 RID-10A) 进行浓度测定, 层析柱为 AminexHPX-87H (300 mm × 7.8 mm) (Bio-rad, 美国, Hercules)。液相色谱的测定条件为: 柱温 65 °C, 流动相为 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流动相流速为 0.6 mL/min。糠醛、HMF、香草醛、丁香醛和 HBA 均利用日本岛津公司(日本, 京都) 的反相高效液相色谱 (LC-20AT, UV/VIS 检测器 SPD-20A) 进行, 层析柱为 YMC-Pack ODS-A (YMC, 日本, 东京)。流动相为 50% 的乙腈, 流速 1.0 mL/min, 检测器波长 220 nm。所有的样品都离心去除细胞和不溶性物质, 然后用直径为 0.22  $\mu\text{m}$  滤纸过滤稀释至合适浓度后用于液相分析。

总氮含量通过碱性过硫酸钾消化氧化 UV-分光光度法测定, 氨氮含量依据苯酚次氯酸法测定<sup>[215]</sup>。玉米秸秆水解液中的 Zn, Fe, Cu, Mn, Mg, P 和 K 等营养元素的含量通过电感耦合等离子体原子发射光谱仪 ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry) 测定。在使用 ICP-AES 检测前, 利用微波消化法将 25% (w/w)

固含量脱毒玉米秸秆水解液稀释十倍后进行微波消化预处理, 120 °C 消化 30 min 后使用<sup>[214]</sup>。然后使用 ICP-MS Agilent 725ES (美国, 加利福尼亚州), CCD 检测器, 仪器参数为射频功率 1.2 kW, 载气 1.5 L/min, 辅助气体流量 1.5 L/min, 喷雾流量 0.75 L/min, 15 rpm, 35 s 样品停留时间, 10 s 稳定时间。

### 2.2.7 柠檬酸得率计算

柠檬酸基于葡萄糖的得率是指柠檬酸实际生成量与葡萄糖理论生成的柠檬酸量的比值的百分数。

$$\text{柠檬酸得率公式, 柠檬酸得率 (\%)} = \frac{[CA] \times V - [CA]_0 \times V_0}{[Glu]_0 \times V_0} \times \frac{M_{[Glu]}}{M_{[CA]}} \times 100\%$$

其中,  $[CA]$  和  $[CA]_0$  表示发酵结束和开始时的柠檬酸浓度 (g/L),  $V$  和  $V_0$  分别表示发酵结束和开始时的发酵体积 (L),  $[Glu]_0$  发酵开始时的葡萄糖浓度 (g/L),  $M_{[Glu]}/M_{[CA]}$  (0.9375) 是葡萄糖转化为柠檬酸的化学计量的换算系数。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 *A. niger* SIIM M288 对木质纤维素来源抑制物的耐受

使用的工业柠檬酸发酵菌株黑曲霉 *A. niger* SIIM M288 来源于本实验室之前的柠檬酸发酵菌株筛选工作<sup>[216]</sup>。本章节首先考察了 *A. niger* SIIM M288 在 25% (w/w) 固含量脱毒与 25% (w/w) 固含量未脱毒玉米秸秆水解液中的柠檬酸发酵性能。结果如图 2.1 所示, 在未脱毒的玉米秸秆水解液中, *A. niger* SIIM M288 无法正常生长, 葡萄糖未被消耗, 也没有柠檬酸的积累。而在 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中经过发酵 168 h 后柠檬酸浓度达到 85.2 g/L, 基于葡萄糖的柠檬酸得率为 76.4%。推测 *A. niger* SIIM M288 可能对未脱毒玉米秸秆水解液中含有的抑制物比较敏感, 菌株的生长、糖耗和产酸可能都受到了木质纤维素来源抑制物的抑制作用。

为进一步明确 *A. niger* SIIM M288 受到的抑制物的影响, 接下来考察了该菌株在木质纤维素来源单一抑制物胁迫下的细胞干重, 糖耗速率和柠檬酸生产情况 (图 2.2)。本研究选取木质纤维素来源的八种典型抑制物, 包括两种呋喃醛类化合物包括糠醛和 HMF, 三种弱酸类抑制物包括乙酸、甲酸和乙酰丙酸以及三种酚醛类化合物包括香草醛、丁香醛和 HBA<sup>[43]</sup>。八种典型抑制物的浓度梯度范围的选择依据真实玉米水解液中抑制物的实际含量而定。

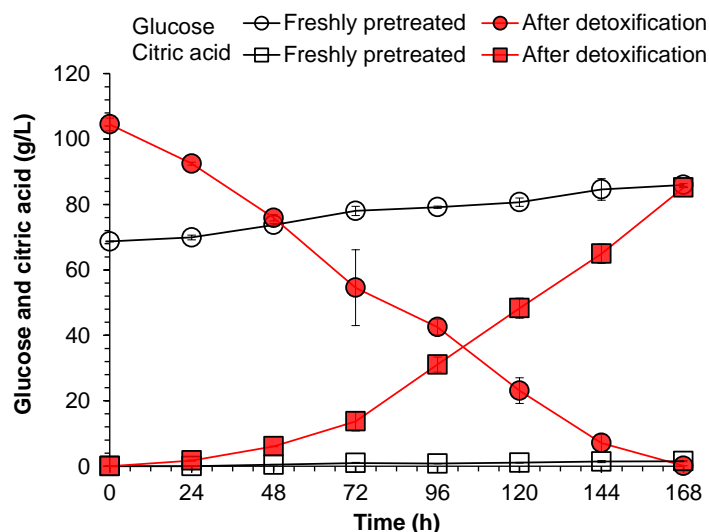


图 2.1 *A. niger* SIIM M288 在脱毒和未脱毒玉米秸秆水解液中的柠檬酸发酵

发酵条件: 33 °C, 初始 pH 6.0, 200 rpm, 10% (v/v) 接种量, 50 mL 25% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液/250 mL 摇瓶。“Freshly pretreated”表示预处理后的玉米秸秆不经过抑制物脱除步骤制备的 25% (w/w) 固含量未脱毒玉米秸秆水解液, “After detoxification”表示预处理后的玉米秸秆经过抑制物脱除步骤制备的 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液。

Fig. 2.1 Citric acid fermentation of *A. niger* SIIM M288 in the corn stover hydrolysate with and without inhibitor removal

Conditions: 33 °C, initial pH 6.0, 200 rpm, 10% (v/v) inoculation ratio, 50 mL 25% (w/w) solids content corn stover hydrolysate/250 mL flask. “Freshly pretreated” indicates the corn stover hydrolysate prepared from the freshly pretreated corn stover without inhibitor removal step. “After detoxification” indicates the corn stover hydrolysate prepared from the pretreated corn stover with inhibitor removal step.

25% (w/w) 固含量未脱毒的玉米秸秆水解液中呋喃醛类抑制物的含量为 1.1 g/L 糠醛和 0.8 g/L HMF。图 2.2a 结果显示, 糠醛对 *A. niger* SIIM M288 的毒性最强, 在 0.5 g/L 时即可使柠檬酸的产量降低 90.7%, 菌体的干重和葡萄糖消耗速率随着糠醛浓度的增加也逐渐被显著抑制, 2 g/L 糠醛条件下菌体几乎无法生长。图 2.2b 显示, HMF 对 *A. niger* SIIM M288 的毒性低于糠醛, 0.5 g/L HMF 使柠檬酸的产量降低 54.2%, 1.0 g/L HMF 使柠檬酸的产量降低 70.5%。而菌体干重和葡萄糖消耗速率受 HMF 的影响较低, 3.0 g/L HMF 添加量下, 细胞干重和糖耗速率仅被抑制 15.1% 和 22.1%。由 2.2a-b 得到, 两种呋喃醛类抑制物对 *A. niger* SIIM M288 的柠檬酸的积累均产生了显著抑制。

25% (w/w) 固含量未脱毒的玉米秸秆水解液中含有 7.8 g/L 乙酸, 2.5 g/L 甲酸和 1.4 g/L 乙酰丙酸。如图 2.2c 所示, 7.2 g/L 乙酸处理下, 柠檬酸产量下降 48.9%。图 2.2d 显示 2 g/L 甲酸使柠檬酸产量降低 72.9%, 3 g/L 甲酸使柠檬酸产量降低 74.7%。图 2.2e 结果显示, 通常情况下被认为是弱抑制物的乙酰丙酸对柠檬酸的生成产生了显著的抑制, 0.8 g/L 的乙酰丙酸即可抑制柠檬酸产量降低 67.2%, 1.6 g/L 乙酰丙酸添加量下几乎完全抑制了柠檬酸的生产。由 2.2c-e 得到, 弱酸类抑制物相对于呋喃醛的毒性较弱, 虽然对菌株的柠檬酸积累有显著抑制作用, 但是菌体干重和葡萄糖消耗速率受到的影响较低。

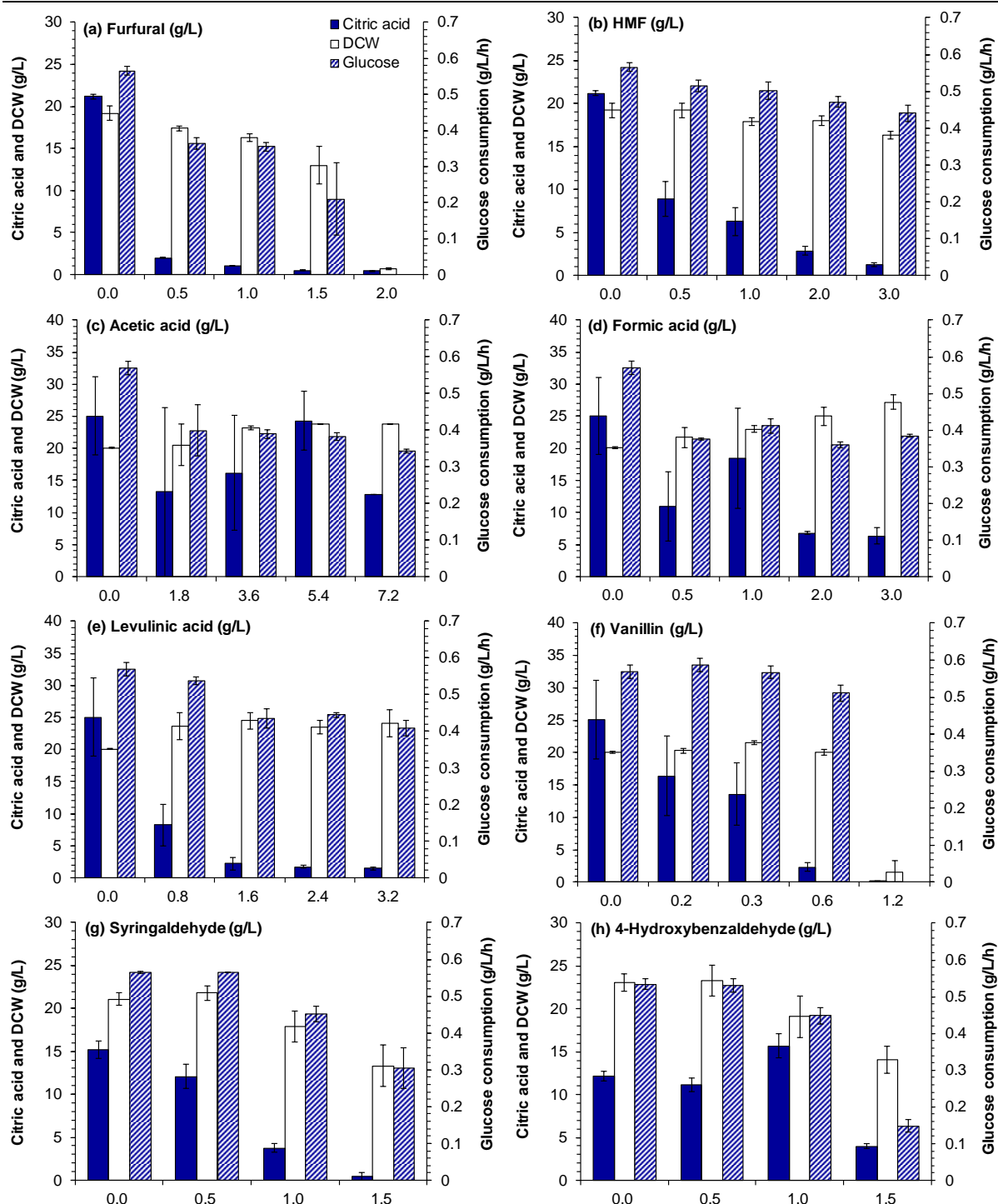


图 2.2 单一抑制物对 *A. niger* SIIM M288 细胞干重、柠檬酸产量和糖耗速率的影响

(a) 糠醛; (b) 5-羟甲基糠醛; (c) 乙酸; (d) 甲酸; (e) 乙酰丙酸; (f) 香草醛; (g) 丁香醛; (h) 4-羟基苯甲醛。发酵条件: 28 °C, 初始 pH 6.0, 200 rpm, 10% (v/v) 接种量, 50 mL 发酵合成培养基/250 mL 摇瓶, 发酵 168 h。

Fig. 2.2 Effects of individual inhibitor on dry cell weight, citric acid production and glucose consumption rate of *A. niger* SIIM M288

(a) Furfural; (b) HMF; (c) acetic acid; (d) formic acid; (e) levulinic acid; (f) vanillin; (g) syringaldehyde; (h) 4-hydroxybenzaldehyde. Conditions: 28 °C, initial pH 6.0, 200 rpm, 10% (v/v) inoculation ratio, 50 mL synthetic medium/250 mL flask, 168 h.

25% (w/w) 固含量未脱毒的玉米秸秆水解液中含有 0.4 g/L 香草醛, 0.2 g/L 丁香醛和 0.02 g/L HBA。图 2.2f 表明香草醛毒性较强, 0.3 g/L 香草醛使得柠檬酸产量被抑制 45.7%, 0.6 g/L 香草醛使得柠檬酸产量被抑制 90.6%。图 2.2g 显示, 丁香醛的毒性比香草醛低, 1.0 g/L 香草醛使得柠檬酸产量被抑制 75.3%。图 2.2h 显示, HBA 在三种酚醛类物质中属于毒性较弱的一种抑制物, 1.5 g/L HBA 使得柠檬酸产量被抑制 67.3%。由 2.2f-h 得到, 虽然玉米秸秆水解液中的酚醛抑制物含量不高, 但是较低酚醛类抑制物浓度即可对 *A. niger* SIIM M288 的柠檬酸生产有较为显著的抑制作用。

综上所述, *A. niger* SIIM M288 对八种典型单一抑制物的耐受性实验结果表明, *A. niger* SIIM M288 的菌体干重和葡萄糖消耗速率受到抑制物的影响较低, 抑制物对柠檬酸积累的抑制作用显著。相同浓度添加量下, 菌株对弱酸类化合物耐受性最强, 其次是呋喃醛类抑制物和酚醛类抑制物。结合未脱毒玉米秸秆水解液中的抑制物的实际含量, 推测 *A. niger* SIIM M288 在 25% (w/w) 未脱毒玉米秸秆水解液中无法进行正常生长并积累柠檬酸的主要原因是水解液中呋喃醛、酚醛以及弱酸类等多种醛类抑制物的存在, 此外, 水解液中多种抑制物的同时存在可能还会产生协同抑制作用。因此, 提前将预处理后的玉米秸秆原料中的抑制物脱除对 *A. niger* SIIM M288 积累高浓度柠檬酸至关重要。

### 2.3.2 生物脱毒玉米秸秆水解液中氮源和无机盐组分对柠檬酸发酵的影响

通常情况下, *A. niger* 发酵生产柠檬酸的培养基中除了碳源外, 还需要含有一定的氮源和无机盐等用于促进微生物的生长及柠檬酸的积累。本章节对 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中的含氮量, 以及包括 P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu 等元素的含量进行了定量测定及分析, 并与合成发酵培养基中的营养成分理论添加量进行了比较。

表 2.2 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液和合成发酵培养基中元素含量比较

Table 2.2 Comparison of elemental content between 25% (w/w) biodetoxified corn stover hydrolysate and synthetic medium

| Component                   | Synthetic medium (g/L) | Corn stover hydrolysate (g/L) |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| <b>Nutritional elements</b> |                        |                               |
| N                           | 2.5                    | 0.47                          |
| P                           | 0.72                   | 0.17                          |
| K                           | 0.57                   | 0.12                          |
| <b>Divalent metal ions</b>  |                        |                               |
| Ca <sup>2+</sup>            | 0                      | 1.7                           |
| Mg <sup>2+</sup>            | 2.4×10 <sup>-2</sup>   | 8.4×10 <sup>-1</sup>          |
| Fe <sup>2+</sup>            | 1.3×10 <sup>-5</sup>   | 4.0×10 <sup>-2</sup>          |
| Mn <sup>2+</sup>            | 1.6×10 <sup>-3</sup>   | 1.0×10 <sup>-2</sup>          |
| Zn <sup>2+</sup>            | 2.5×10 <sup>-4</sup>   | 2.4×10 <sup>-3</sup>          |
| Cu <sup>2+</sup>            | 6.1×10 <sup>-5</sup>   | 1.0×10 <sup>-3</sup>          |

25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液组分还包括 104.5 g/L 葡萄糖, 22.9 g/L 木糖, 3.5 g/L 乙酸, 0.05 g/L 5-羟甲基糠醛。

25% (w/w) of the pretreated and biodetoxified corn stover with the composition of 104.5 g/L of glucose, 22.9 g/L of xylose, 3.5 g/L of acetic acid, and 0.05 g/L of HMF.

如表 2.2 所示, 25% (w/w) 固含量生物脱毒玉米秸秆水解液中的各元素含量与合成培养基中的理论添加量相比, 除了 N, P, K 以外的二价金属离子 ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) 的含量是充足的。接下来通过向水解液中添加额外的氮源及无机盐等营养组分考察对柠檬酸发酵的影响。

25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中磷和钾的含量分别仅为合成培养基中磷和钾含量的 1/4 或 1/5 (表 2.2)。磷和钾的含量在 25% (w/w) 脱毒水解液中均未达到合成培养基的添加标准, 通过向玉米秸秆水解液中补充磷酸盐, 考察水解液中磷和钾含量不足时对 *A. niger* SIIM M288 发酵生产柠檬酸的影响。发酵结果如表 2.3 所示, 向 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中补充 2.5 g/L  $KH_2PO_4$  后, 柠檬酸的产量并未显示明显的改变, 添加  $KH_2PO_4$  时产 92.0 g/L 的柠檬酸, 基于葡萄糖的柠檬酸得率为 87.4%, 不添加  $KH_2PO_4$  条件下产 92.7 g/L 柠檬酸, 得率为 81.8%。该结果表明 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中自身含有的磷和钾的含量虽未达到合成培养基中磷和钾的添加标准, 但也已满足 *A. niger* SIIM M288 生产柠檬酸的发酵需求, 因而不需再向脱毒玉米秸秆水解液中额外补充磷酸盐。

培养基中氮的含量对柠檬酸的生长发酵也至关重要,  $NH_4^+$  是 *A. niger* 生长和发酵的最适氮源, 随着  $NH_4^+$  的消耗, pH 逐渐降低, *A. niger* 可进入柠檬酸生产阶段。通过苯酚次氯酸法测定 25% (w/w) 玉米秸秆脱毒水解液中的氨氮含量为  $7.5 \times 10^{-3}$  g/L, 通过碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中的总氮含量为 0.5 g/L。如表 2.2 所示, 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中氮的含量大约仅为合成培养基中氮含量的 0.25 倍。通过向 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中添加不同浓度梯度的  $NH_4Cl$ , 考察玉米秸秆水解液中的氮源对柠檬酸发酵的影响。发酵结果如表 2.3 所示, 当添加 1.0 g/L  $NH_4Cl$  时, 与不添加  $NH_4Cl$  的对照组相比, 柠檬酸浓度从 36.6 g/L 提升至 74.6 g/L。但是当添加的  $NH_4Cl$  的量从 1.0 g/L 继续增加至 4.0 g/L 的过程中, 柠檬酸的产量, 糖耗速率和柠檬酸得率都逐渐降低。说明 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中的氮含量对于柠檬酸发酵来说是不足的, 因而仍需向玉米秸秆水解液中添加少量的氮源 (约 1.0 g/L 的  $NH_4Cl$ ) 促进柠檬酸的积累。

微量金属离子对于 *A. niger* 发酵生产柠檬酸具有重要的影响, 金属离子  $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  与柠檬酸生产代谢的 TCA 循环中的相关酶的酶活有关, 二价金属离子  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  对于微生物的生长是必不可少的<sup>[46,217]</sup>。通过检测 25% (w/w) 脱毒玉米秸秆水解液中金属离子的含量 (表 2.2), 可以看出  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  五种金属离子在水解液中的含量是充足的。向 25% (w/w) 脱毒玉米秸秆水解液中补充  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $MnCl_2$  等二价金属离子 (表 2.3), 发酵结果显示柠檬酸的产量反而下降。添加五种金属离子时, 柠檬酸浓度为 71.6 g/L, 基于葡萄糖的得率为 65.9%, 而不补充五种金属离子的玉米秸秆水解液中发酵时, 柠檬酸产量可达 90.4 g/L, 基于葡萄糖的得率达到 80.4%。结果说明 25% (w/w) 脱毒玉米秸秆水解液自身含有的上述二价金属元素含量已经满足柠檬酸的发酵需求, 不需再向其额外添加无机盐。

表 2.3 高葡萄糖玉米秸秆水解液额外添加营养元素后 *A. niger* SIIM M288 的发酵表现

Table 2.3 Nutrients addition on citric acid fermentation performance in high glucose containing corn stover hydrolysate

| Nutrients                       | Amount<br>(g/L)        | Glucose consumption<br>(g/L/h) | Citric acid titer<br>(g/L) | Citric acid yield<br>(%) |
|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0                      | 0.55±0.02                      | 92.73±4.03                 | 81.79±0.04               |
|                                 | 2.5                    | 0.55±0.03                      | 91.96±4.98                 | 87.38±0.07               |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 0                      | 0.24±0.01                      | 36.64±2.36                 | 36.93±0.03               |
|                                 | 1.0                    | 0.44±0.08                      | 74.62±14.05                | 70.32±0.13               |
|                                 | 2.0                    | 0.33±0.01                      | 55.49±1.39                 | 52.60±0.02               |
|                                 | 3.0                    | 0.28±0.01                      | 47.62±1.67                 | 45.75±0.02               |
|                                 | 4.0                    | 0.20±0.01                      | 33.54±0.93                 | 32.59±0.01               |
| MnCl <sub>2</sub>               | 0                      | 0.50±0.03                      | 84.01±5.37                 | 83.07±0.07               |
|                                 | 0.9 × 10 <sup>-3</sup> | 0.52±0.01                      | 87.76±1.59                 | 86.34±0.03               |
|                                 | 1.8 × 10 <sup>-3</sup> | 0.51±0.01                      | 84.91±1.48                 | 85.89±0.02               |
|                                 | 2.7 × 10 <sup>-3</sup> | 0.52±0.01                      | 87.34±2.27                 | 85.65±0.03               |
|                                 | 3.6 × 10 <sup>-3</sup> | 0.50±0.01                      | 84.45±0.12                 | 83.91±0.04               |
|                                 | 4.5 × 10 <sup>-3</sup> | 0.52±0.01                      | 87.05±0.60                 | 86.68±0.02               |
| Full divalent ions              | 0                      | 0.54±0.01                      | 90.44±2.28                 | 80.36±0.02               |
|                                 | Full ions              | 0.43±0.01                      | 71.63±2.53                 | 65.96±0.03               |

“Full divalent ions”组分包括与合成培养基中相同的金属元素添加量 (g/L): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.4 × 10<sup>-4</sup>; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.1 × 10<sup>-3</sup>; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6.5 × 10<sup>-3</sup>; MnCl<sub>2</sub>, 3.6 × 10<sup>-3</sup>。发酵条件: 33 °C, 初始 pH 6.0, 10% (v/v) 接种量, 50 mL 玉米秸秆水解液/250 mL 摇瓶, 发酵 168 h。The “Full divalent ions” indicates the addition of inorganic salts to the same composition in synthetic medium including (g/L): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.4 × 10<sup>-4</sup>; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.1 × 10<sup>-3</sup>; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6.5 × 10<sup>-3</sup>; MnCl<sub>2</sub>, 3.6 × 10<sup>-3</sup>. Fermentation conditions: 33 °C, initial pH 6.0, 10% (v/v) inoculation ratio, fermentation time 168 h.

另外, 在五种二价金属离子中, Mn<sup>2+</sup>缺乏是柠檬酸转运至培养基中的关键。细胞膜上的柠檬酸通透酶只能转运柠檬酸-Mn<sup>2+</sup>螯合物, 但是只有 Mn<sup>2+</sup>不足时, 柠檬酸才会运输至细胞外<sup>[141]</sup>。因此针对五种金属离子中的 Mn<sup>2+</sup>设置不同的添加浓度梯度, 验证向玉米秸秆水解液中添加不同的 Mn<sup>2+</sup>浓度对柠檬酸发酵的影响。发酵结果如表 2.3 所示, 当 MnCl<sub>2</sub> 浓度梯度为 0-4.5 mg/L 时, 柠檬酸的产量和转化率都几乎没有变化, 少量的添加 Mn<sup>2+</sup>, 并未影响柠檬酸的发酵。说明玉米秸秆水解液中的 Mn<sup>2+</sup>确实已经满足柠檬酸的要求, 未来可考虑通过向培养基中添加螯合剂减少培养基中的 Mn<sup>2+</sup>含量考察对柠檬酸的发酵的影响。

综上所述, 用于摇瓶发酵的 25% (w/w) 玉米秸秆脱毒水解液中含有丰富的磷, 钾以及一些二价金属离子, 因此在利用该原料进行柠檬酸的发酵时不需额外添加营养元素, 少量氮源的补充即可实现高浓度柠檬酸的积累。

### 2.3.3 高浓度柠檬酸发酵过程中的发酵参数的优化

基于工业实践的要求，为了提高木质纤维素柠檬酸的发酵浓度，本研究在摇瓶中对初始葡萄糖浓度、发酵温度、培养基初始 pH 以及诱导剂的添加等发酵参数进行了优化。

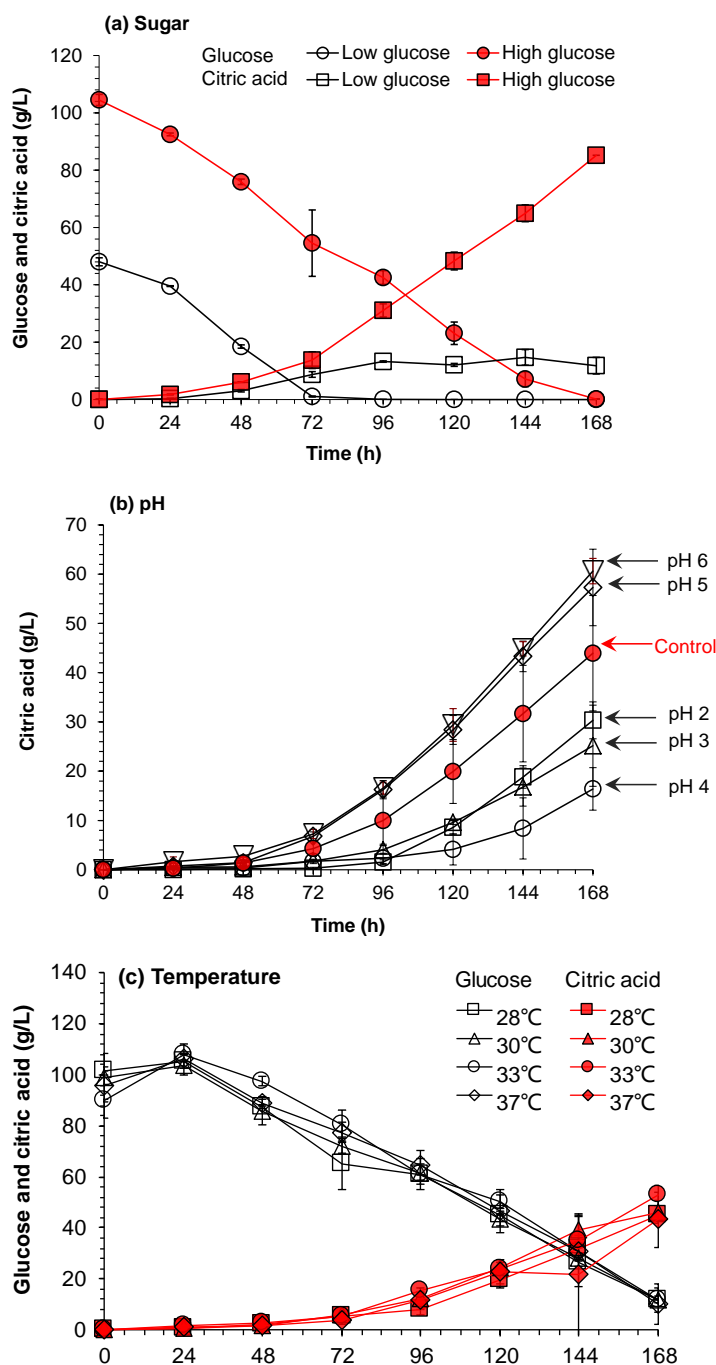


图2.3 (a) 初始葡萄糖浓度, (b) 初始 pH 和 (c) 发酵温度对 *A. niger* SIIM M288在玉米秸秆水解液中柠檬酸发酵的影响

发酵条件: 200 rpm, 10% (v/v) 接种量, 50 mL 脱毒玉米秸秆水解液/250 mL 摇瓶。

“Control” 表示未对脱毒玉米秸秆水解液的 pH 进行调节, pH≈4.8。

Fig. 2.3 Effects of (a) initial glucose concentration, (b) initial pH and (c) fermentation temperature on citric acid fermentation of *A. niger* SIIM M288 in corn stover hydrolysate

Conditions: 200 rpm, 10% (v/v) inoculation ratio, 50 mL biotreated corn stover hydrolysate/250 mL flask. “Control” indicates the pH of the biotreated corn stover hydrolysate was not adjusted, pH≈4.8.

### 2.3.3.1 葡萄糖浓度对发酵的影响

*A. niger* 发酵生产柠檬酸的过程中, 较高的葡萄糖浓度对维持较高的碳氮比 (C/N) 是必要的, 而较高的 C/N 对是高浓度柠檬酸生产的基础<sup>[141,218]</sup>。如图 2.3a 所示, 通过考察不同葡萄糖初始浓度对 *A. niger* SIIM M288 生产柠檬酸的影响发现, 在高固含量的脱毒玉米秸秆水解液中, 初糖浓度为 104.5 g/L 时, 柠檬酸浓度达 85.2 g/L, 基于葡萄糖的得率为 76.4%; 在低固含量的脱毒玉米秸秆水解液中, 初糖浓度为 48.1 g/L 时, 柠檬酸浓度仅为 11.8 g/L, 基于葡萄糖的得率为 23.0%。以上可以看出高于 50 g/L 的初始葡萄糖浓度是高浓度柠檬酸的积累的先决条件。

### 2.3.3.2 初始 pH 和发酵温度对柠檬酸发酵的影响

*A. niger* 的最适生长 pH 范围一般为 5.0-6.0, 而柠檬酸积累的最适 pH 一般为 2.0-2.5<sup>[219]</sup>。培养基中的初始 pH 会影响糖酵解途径的代谢流及柠檬酸的跨膜转运<sup>[136]</sup>。随着菌体的生长, 培养基中氮源的消耗, 培养基的 pH 会逐渐下降, 当降至最适宜柠檬酸生成的 pH 时, 柠檬酸开始大量积累。因而, 一般柠檬酸的发酵过程中只需对初始 pH 值进行考察即可, 发酵过程中不需要调节 pH。与合成培养基相比, 玉米秸秆水解液的组分较为复杂, 该发酵体系可能具有更强的缓冲能力, 因而有必要对 *A. niger* 利用玉米秸秆水解液发酵的最适初始 pH 进行考察。结果如图 2.3b 所示, 当初始 pH 为 2.0-4.0 时, 随着初始 pH 的增加, 柠檬酸的产量反而逐渐降低, 推测其原因可能是, 在这个 pH 范围内, 虽然不适宜菌体的生长, 但是初始 pH 越低越接近柠檬酸积累的 pH, 所以柠檬酸的相对产量更高一些。当初始 pH 为 4.0-6.0 时, 柠檬酸产量逐渐增加, 这个 pH 范围适宜菌体的生长, 菌体首先在水解液中生长, 消耗  $\text{NH}_4^+$ , 随之 pH 降低, 柠檬酸开始积累。当初始 pH 为 6.0 时, 获得最高的柠檬酸产量 66.3 g/L, 转化率为 65.0%。

如图 2.3c 所示, 在 28 °C 至 37 °C 的温度梯度范围内, 温度对 *A. niger* 的柠檬酸的生产的影响并不大, 利用脱毒玉米秸秆水解液发酵生产柠檬酸的最佳发酵温度为 33 °C。

### 2.3.3.4 诱导剂对柠檬酸发酵的影响

甲醇和乙醇通常被作为诱导剂用在柠檬酸的发酵中。甲醇的主要作用是抑制微生物细胞壁蛋白的合成及作为柠檬酸合成酶的诱导物, 乙醇一般作为碳源并且可以增加细胞膜的通透性<sup>[220]</sup>。在 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中考察了甲醇或乙醇的添加对 *A. niger* SIIM M288 发酵积累柠檬酸的影响。如图 2.4 的结果所示, 在脱毒水解液中添加甲醇和乙醇对 *A. niger* SIIM M288 发酵生产柠檬酸并无促进作用。推测可能玉米秸秆水解液中含有一些组分具有类似诱导剂的功能, 因此, 以脱毒玉米秸秆为原料进行柠檬酸发酵时也无需向其添加额外的诱导剂组分。

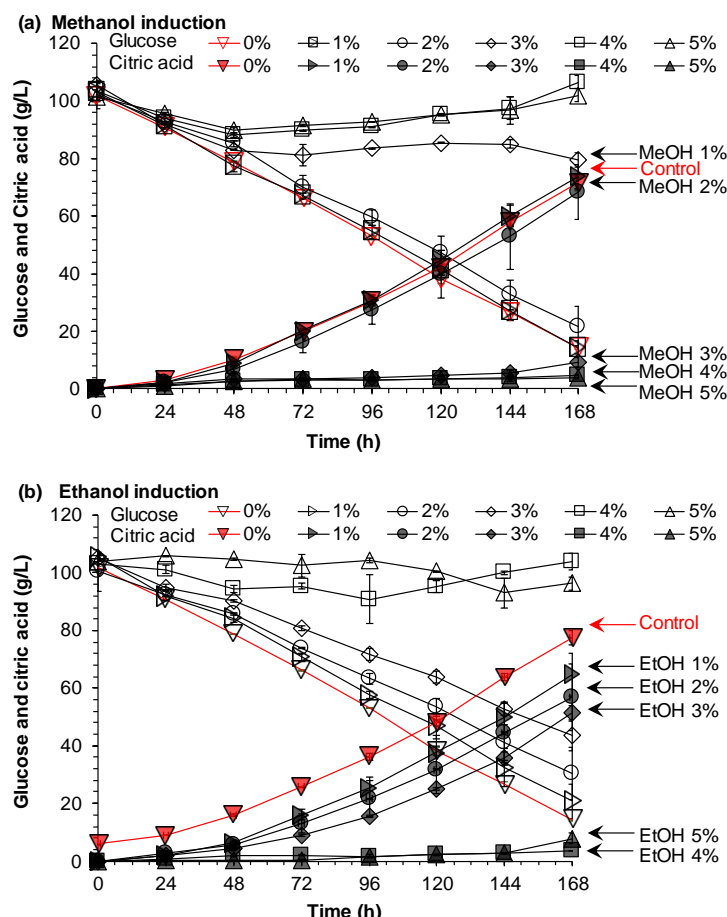


图2.4 *A. niger* SIIM M288在玉米秸秆水解液中添加 (a) 甲醇或 (b) 乙醇作为诱导剂时的柠檬酸发酵

发酵条件：33 °C，初始 pH 6.0，200 rpm，10% (v/v) 接种量，50 mL 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液/250 mL 摇瓶。空心图例表示培养基中葡萄糖浓度，实心图例表示培养基中柠檬酸浓度。“Control”表示不添加甲醇和乙醇作为诱导剂的玉米秸秆水解液。

Fig. 2.4 Citric acid fermentation of *A. niger* SIIM M288 in corn stover hydrolysate under the induction of (a) methanol or (b) ethanol

Conditions: 33 °C, initial pH 6.0, 200 rpm, 10% (v/v) inoculation ratio, 50 mL 25% (w/w) solids content biodetoxified corn stover hydrolysate/250 mL flask. Open legends indicate glucose concentration, closed legends indicate citric acid concentration. “Control” indicates the original hydrolysate without methanol and ethanol addition.

### 2.3.4 利用生物脱毒玉米秸秆水解液进行柠檬酸放大发酵

上述柠檬酸发酵实验均在摇瓶中完成，为了更好的与工业柠檬酸生产相对比，本研究接下来在3 L 发酵罐中以25% (w/w) 脱毒玉米秸秆水解液为原料进行了柠檬酸的扩大发酵 (图2.5)。整个发酵过程中只调节初始发酵 pH，发酵过程的 pH 不进行调控，经过 48 h 的发酵，pH 值迅速从6.0降至2.5，然后保持在1.5-2.0之间，经过192 h 的发酵，柠檬酸发酵浓度达到100.0 g/L，基于葡萄糖的柠檬酸得率为94.1%，细胞干重达15.8 g/L 发酵液。而摇瓶实验中最好的发酵结果是92.7 g/L 柠檬酸，转化率为81.8%。因此说明在3 L 发酵罐中完成了柠檬酸的放大发酵，达到了高指标柠檬酸发酵的目标。

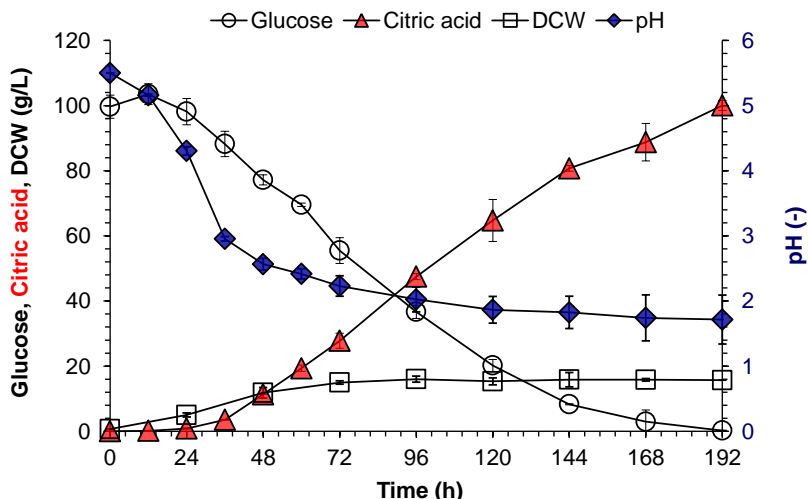


图2.5 *A. niger* SIIM M288利用25% (w/w) 固含量生物脱毒后的玉米秸秆水解液在3 L 发酵罐中的柠檬酸发酵

发酵条件: 33 °C, 初始 pH 6.0, 250 rpm-400 rpm, 10% (v/v) 接种量, 1 L 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液/3 L 发酵罐。

Fig. 2.5 Citric acid fermentation in 3 L fermentor using corn stover hydrolysate prepared from biodetoxified at 25% (w/w) solids content

Conditions: 33 °C, initial pH 6.0, 250 rpm-400 rpm, 10% (v/v) inoculation ratio, 1 L 25% (w/w) solids content biodetoxified corn stover hydrolysate/3 L fermentor.

此外, 在发酵过程中发现一个有趣的现象, 在发酵后期柠檬酸的高合成速率与葡萄糖的低消耗速率并不同步。推测有三个原因可能与此现象相关, (1) *A. niger* 自身可以生成糖化酶, 发酵前期高浓度的葡萄糖可以被糖化酶转化为二聚糖或者三聚糖等低聚寡聚糖<sup>[221, 222]</sup>, 在发酵后期 pH 维持在2.0时玉米秸秆水解液中的寡糖又可被糖化酶水解成可供发酵微生物利用的单糖进而产生柠檬酸; (2) *A. niger* 是一种可以进行多糖利用的菌株<sup>[223, 224]</sup>, 玉米秸秆水解液中除葡萄糖外还含有木糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖等糖类, 在发酵后期葡萄糖消耗殆尽解除了葡萄糖抑制作用后, *A. niger* 可能通过利用水解液中的多种糖类生成了柠檬酸; (3) 玉米秸秆水解液中含有较多的离子组分, 如柠檬酸钙盐的溶解度除了与温度相关外还与酸度相关, pH 的降低可以增加柠檬酸钙的溶解度, 因此推测可能是水不溶的柠檬酸钙盐在发酵后期 pH 值比较低的条件下转化为可溶性的柠檬酸盐, 增加了检测到的柠檬酸浓度。

## 2.4 本章小结

本章节将木质纤维素干法生物脱毒工艺成功拓展应用至木质纤维素柠檬酸的生产过程中。与其他木质纤维素柠檬酸发酵结果相比, 本研究利用 *A. niger* SIIM M288 以生物脱毒玉米秸秆为原料发酵得到的柠檬酸浓度达到了工业柠檬酸生产中的最低可分离浓度, 为以木质纤维素原料生产柠檬酸的产业化提供了重要的可行性参考依据, 同时也为干法生物脱毒的拓展应用提供了有力证明。本章节研究的主要结论如下:

(1) 工业柠檬酸发酵菌株 *A. niger* SIIM M288 在未经脱毒的玉米秸秆水解液中无

法正常的生长和产酸，主要原因是预处理后的玉米秸秆中含有的呋喃醛和酚醛类等抑制物对菌株的生长、糖耗和柠檬酸的积累有显著抑制作用。为实现木质纤维素高指标柠檬酸发酵，本研究利用专司生物脱毒的菌株树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 将预处理玉米秸秆中的抑制物进行脱除处理；

(2) 对经过生物脱毒处理的 25% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液中的多种元素含量进行了测定，与合成培养基中的营养成分的理论添加量相比，25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中的无机盐含量已经满足柠檬酸发酵的需求，除了补加 1.0 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为氮源外，无需向 25% (w/w) 脱毒玉米秸秆水解液中再额外添加诸如  $\text{K}^+$ 、 $\text{P}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  等离子组分。

(3) 以脱毒玉米秸秆水解液作为培养基，对 *A. niger* SIIM M288 生产柠檬酸过程中的多种发酵参数包括培养基初始葡萄糖浓度、发酵温度、初始 pH 和诱导剂等进行优化。结果显示，*A. niger* SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中进行高指标柠檬酸发酵的最优发酵参数为：初糖浓度高于 50 g/L 葡萄糖、33 °C、初始 pH 6.0 及不添加诱导剂。

(4) 在 3 L 发酵罐中进行了木质纤维素柠檬酸生产的放大发酵，结果显示，在 25% (w/w) 固含量脱毒水解液玉米秸秆水解液中，添加 1.0 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，33 °C，初始 pH 6.0，发酵 168 h，最终得到 100.0 g/L 柠檬酸，基于葡萄糖的柠檬酸得率达到 94.1%，达到了实际工业柠檬酸生产中的最低可分离浓度标准。

### 第 3 章 氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 降解呋喃醛和酚醛的转录组分析

#### 3.1 引言

预处理是生物炼制工艺中的核心环节,该步骤可以破坏木质纤维素的顽抗结构进而促使酶解糖化环节释放出更多可供微生物发酵利用的单糖。但是预处理过程中会不可避免的产生种类繁多的小分子化合物(通常被称为抑制物)<sup>[53]</sup>,以糠醛和 5-羟甲基糠醛(HMF)为代表的呋喃醛类抑制物以及以 4-羟基苯甲醛(HBA)、香草醛和丁香醛为代表的酚醛类抑制物是木质纤维素生物炼制过程中产生的多种抑制物的主要组分。呋喃醛和酚醛类抑制物不仅会抑制酶解糖化环节中纤维素酶的水解效率<sup>[23]</sup>,还会显著抑制发酵微生物的能量再生、细胞内与中心碳代谢相关的酶蛋白的合成和活性<sup>[25, 26, 30, 32-36, 42, 225]</sup>,进而引起发酵微生物的生长延滞甚至死亡,降低目标产品的生成<sup>[24-27, 31]</sup>。因此,多种抑制物的彻底脱除是高效进行木质纤维素生物炼制的键。

在发酵前利用专司生物脱毒的树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 通过快速脱毒的方式可以将呋喃醛类抑制物完全降解<sup>[59, 60, 74]</sup>。与传统的物理、化学等脱毒方法相比,该生物脱毒方式具有反应条件温和、无含抑制物废水产生、适合高估含量生物炼制等诸多优势。但是,由于酚醛类抑制物具有水溶性较差、疏水性较高等特点,造成 *A. resinae* ZN1 对酚醛抑制物的降解速率较慢,经过快速脱毒后木质纤维素原料中残留的酚醛类抑制物会对一些酚醛类抑制物耐受能力较差的微生物的发酵产生较强的抑制作用,如上述研究中 *A. niger* SIIM M288 利用经过长时间生物脱毒彻底脱除多种抑制物后的木质纤维素原料才能实现高指标的柠檬酸发酵;延长 *A. resinae* ZN1 的生物脱毒时间可以提升 *P. acidilactici* 利用木质纤维素原料发酵时的乳酸产量<sup>[31]</sup>等。虽然延长脱毒时间可以实现多种抑制物的彻底脱除,但是会造成半纤维素来源单糖的损失。因此,筛选出对多种类型抑制物的耐受能力较强的发酵微生物在发酵阶段实现抑制物的彻底脱除,甚至利用同步脱毒、糖化与发酵策略取代发酵前的生物脱毒环节是提高木质纤维素生物炼制效率的一个有效策略。

*G. oxydans* 是一株工业上用于葡萄糖酸生产的革兰氏阴性菌,其细胞膜上富含丰富的脱氢酶系,可以将多种醛类物质不完全氧化为酮或酸<sup>[226]</sup>。本实验室前期研究工作中发现该菌株在含有抑制物的木质纤维素水解液中发酵时几乎不存在生长延滞期,能够迅速将木质纤维素体系中含有的多种糖转化为相应的糖酸<sup>[209, 227]</sup>,表明 *G. oxydans* 是一株对木质纤维素体系耐受性较强的生物炼制发酵微生物。从分子水平解析一些抑制物耐受能力较强的发酵菌株的抑制物耐受机制,可以为提升其它抑制物耐受能力较差的发酵微生物的抑制物耐受能力提供重要的参考价值。除了 Buchert<sup>[83]</sup>和 Zhou<sup>[84]</sup>等人曾经报道过 *G. oxydans* 能够将糠醛、HMF、HBA、香草醛等抑制物氧化还原产生相应的醇和酸类产物外,目前关于 *G. oxydans* 转化呋喃醛和酚醛抑制物的分子生物学机制的研究较少。

本章节旨在通过 DNA 芯片技术, 解析生物炼制发酵微生物 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛的生物脱毒机制, 对呋喃醛和酚醛转化过程中发挥作用的关键基因进行挖掘。为抑制物降解基因元器件库的构建以及对多种抑制物具有鲁棒稳定性的发酵菌株的合理代谢工程改造提供有价值的基因资源。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 实验菌株和试剂

*G. oxydans* ATCC 621H 购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC, USA, Manassas), *G. oxydans* DSM 2003 购自德国微生物菌种保藏中心 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Braunschweig)。

本章节研究中使用到的实验试剂见附录 I。

### 3.2.2 培养基和菌株培养方法

*G. oxydans* 培养过程中使用的培养基包括: (1) 种子培养基 (g/L): 山梨醇 80, 酵母浸提物 20,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5; (2) 发酵合成培养基 (g/L): 葡萄糖 80, 酵母浸提物 20,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5。

取 2 mL 在  $-80^\circ\text{C}$  保存的 *G. oxydans* 冻存管, 全部接入含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 于  $30^\circ\text{C}$ , 220 rpm 培养 24 h 后作为种子液以用于后续发酵实验接种。

### 3.2.3 呋喃醛和酚醛抑制物的耐受及降解实验

*G. oxydans* DSM 2003 对五种典型醛类抑制物的耐受实验通过向发酵培养基中分别添加 0-2.0 g/L 糠醛, 0-2.0 g/L HMF, 0-2.0 g/L HBA, 0-1.0 g/L 香草醛或 0-2.0 g/L 丁香醛。以 10% (v/v) 接种量将种子液转接至含有 50 mL 发酵合成培养基的 250 mL 三角摇瓶中,  $30^\circ\text{C}$ , 220 rpm, pH 5.0-6.0 培养, 发酵过程的 pH 调节通过定时补加 5 M NaOH 调节。接种等量的无菌水替代种子液的培养基作为对照实验, 所有的实验均有两个重复。

*G. oxydans* DSM 2003 对五种典型醛类抑制物的降解实验通过向发酵培养基中分别添加 0.7 g/L 糠醛, 1.0 g/L HMF, 0.6 g/L HBA, 0.7 g/L 香草醛或者 0.9 g/L 丁香醛完成。以 10% (v/v) 接种量将种子液转接至含有 50 mL 发酵合成培养基的 250 mL 三角摇瓶中,  $30^\circ\text{C}$ , 220 rpm, pH 5.0-6.0 培养, 发酵过程的 pH 调节通过定时补加 5 M NaOH 调节。接种等量的无菌水替代种子液的培养基作为对照实验, 所有的实验均有两个重复。

### 3.2.4 分析方法

葡萄糖浓度使用山东省农科院的 SBA-40D 生化分析仪 (济南) 测定。葡萄糖酸浓度使用日本岛津公司 (京都) 的高效液相色谱 (LC-20AD, UV/VIS 检测器 SPD-20A) 测定, 色谱柱型号为 Aminex HPX-87H (Bio-rad, 美国, Hercules), 柱温  $55^\circ\text{C}$ , 检测器波长 210 nm, 流动相为 5 mM 硫酸, 流速 0.4 mL/min。

糠醛、HMF、HBA、香草醛、丁香醛及其代谢产物利用日本岛津公司 (日本, 京都) 的反相高效液相色谱 (LC-20AT, UV/VIS 检测器 SPD-20A) 进行, 层析柱为 YMC-Pack ODS-A (YMC, 日本, 东京)。等梯度洗脱测定糠醛, 糠醇和糠酸的方法: 流动相为 50%

的乙腈, 流速 1.0 mL/min, 检测器波长 220 nm。用梯度洗脱方法测定 HMF, 羟甲基糠醇和羟甲基糠酸时, Pump B 是 100%乙腈, Pump A 是超纯水溶液, Pump B 参数设置为 5%, 流速 0.6 mL/min, 检测波长为 230 nm, 梯度洗脱方法设置为: 0-15 min, 乙腈和超纯水的浓度配比从 5%增加到 100%; 15-20 min, 乙腈和超纯水的浓度配比从 100%降到 5%; 20-30 min, 一直用浓度配比为 5%的乙腈和超纯水溶液平衡。用梯度洗脱方法测定香草醛, HBA, 丁香醛及其代谢产物香草酸, 香草醇, 4-羟基苯甲酸, 4-羟基苯甲醇, 丁香酸和丁香醇时, Pump B 是 100%乙腈, Pump A 是 0.1%的甲酸水溶液, Pump B 参数设置为 10%, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm, 梯度洗脱方法设置为: 0-4 min, 乙腈和甲酸溶液的浓度配比从 10%增加到 35%; 5-20 min, 乙腈和甲酸溶液的浓度配比从 35%降低到 10%; 20-30 min, 一直用浓度配比为 10%的乙腈和甲酸溶液平衡。所有的样品都离心去除细胞和不溶性物质, 然后用直径为 0.22  $\mu\text{m}$  滤纸过滤后用于 HPLC 分析。

### 3.2.5 DNA 芯片实验

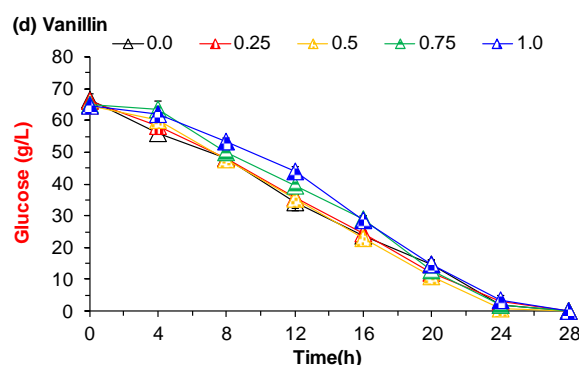
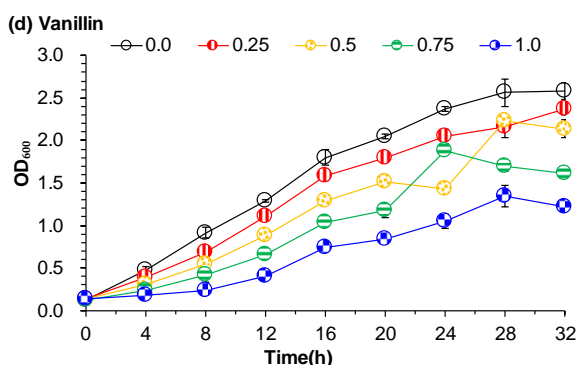
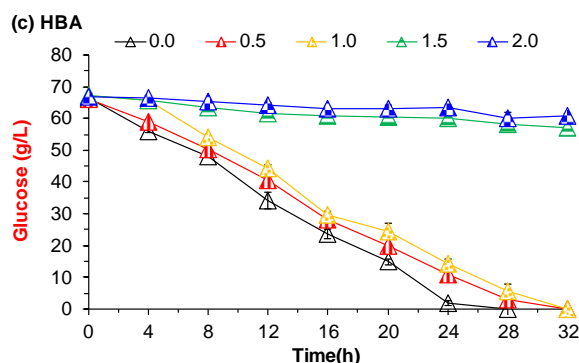
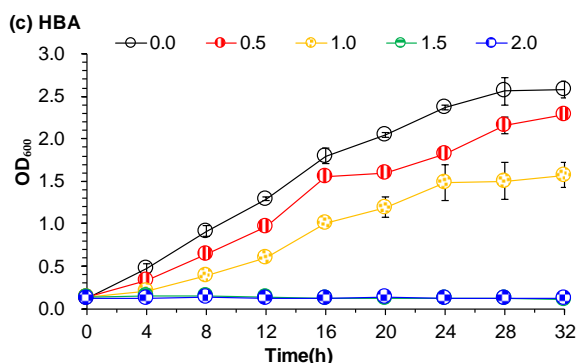
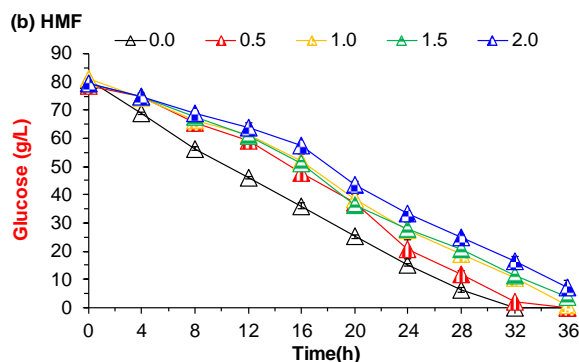
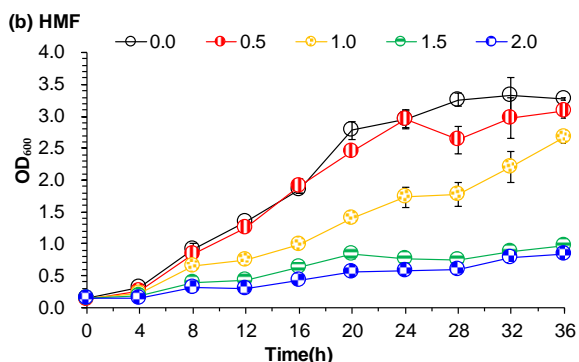
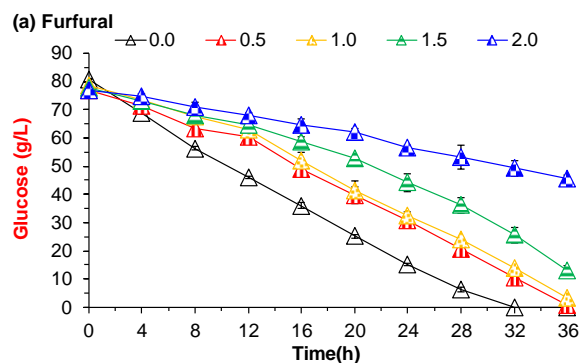
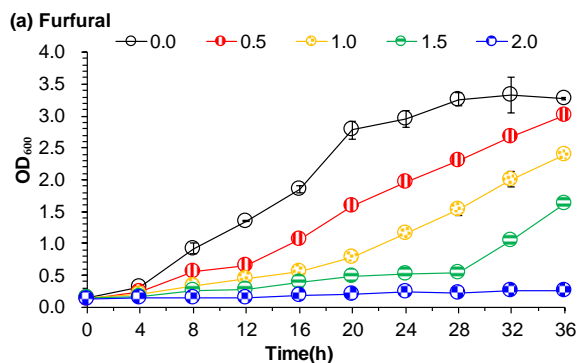
将从甘油管活化过一次的种子培养基以 10% (v/v) 接种量接种于含有 900 mL 山梨醇培养基的 3 L 发酵罐 (保兴生物设备工程有限公司, 中国, 上海) 中, 培养条件为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 500 rpm, 通气量 2.5 vvm, pH 5.5, pH 通过自动添加 5 M NaOH 调节, 培养至 OD 600 为 5.0。将培养好的种子液以 10% (v/v) 接种量接入分别预混有 1.2 g/L 糠醛, 1.5 g/L HMF, 0.8 g/L HBA, 0.8 g/L 香草醛, 0.9 g/L 丁香醛的 50 mL 发酵培养基/250 mL 摇瓶中。在 30  $^{\circ}\text{C}$ , 220 rpm 培养 4 h 后于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 10,000 rpm 条件下离心 10 min 收集菌体, 去除上清液后经液氮速冻后在 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存, 用作 DNA 芯片实验, 每组三个重复。

本研究中使用 8  $\times$  15 K 点阵的 Agilent Technologies DNA 芯片 (Santa Clara, CA, USA) 进行 *G. oxydans* DSM 2003 在呋喃醛及酚醛胁迫下的转录组实验, 芯片杂交实验由 CapitalBio (北京博奥晶典生物技术有限公司, 中国, 北京) 完成。其中对照组为不添加抑制物的非处理组, 实验组为添加抑制物的处理组, 对照组和实验组均设置三个生物学重复。芯片杂交使用的探针依据 *Gluconobacter oxydans* 621H 的全基因组 (NCBI GeneBank accession number CP000009.1) 设计。*G. oxydans* DSM 2003 的总 RNA 使用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 提取。RNA 样品的质量使用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 检测, RNA 浓度使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE 19810, USA) 检测。RNA 的完整性通过甲醛变性琼脂糖凝胶实验检测。RNA 的扩增、标记和杂交过程依据 Agilent miRNA Microarray Protocol (Agilent Technologies) 完成, 主要步骤为 RNA 经逆转录酶反转录合成双链 cDNA 后, 再经 Cy3-dCTP 荧光染料标记, 然后与探针杂交<sup>[228]</sup>。表达谱芯片杂交的扫描图片由 Agilent Microarray Scanner (G2565CA) 完成, 扫描后的图片经 FeatureExtraction 软件处理得到原始数据, 然后利用安捷伦科技有限公司 (Santa Clara, CA, USA) 的 GeneSpring V12 对原始数据进行归一化以及质量控制, 最终计算基因表达差异和统计学显著性 p 值。本研究将倍数 (Foldchange) 大于等于 2.0 或者小于等于 -2.0 且 p\_值 (Probability value, p\_value) 小于 0.05 作为显著差异表达基因筛选的阈值。

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛类抑制物的耐受及转化

本小节研究在添加单一抑制物的发酵合成培养基中考察了呋喃醛和酚醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的生长、葡萄糖消耗及葡萄糖酸的生成的影响。选取的五种典型的木质纤维素来源醛类抑制物包括糠醛，HMF，HBA，香草醛和丁香醛，添加的抑制物的浓度依据真实玉米秸秆水解液体系中的抑制物的含量<sup>[27]</sup>。



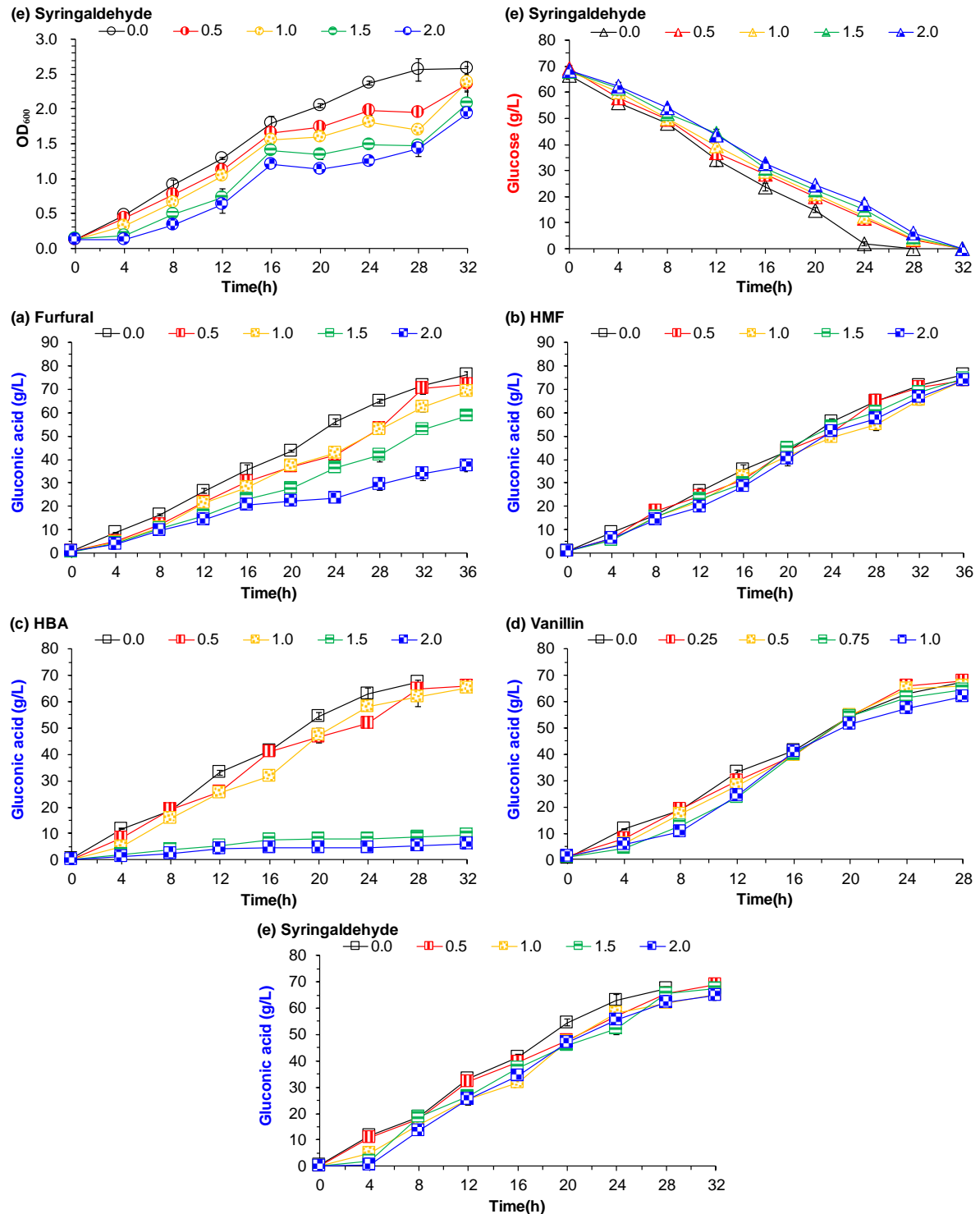


图 3.1 单一呋喃醛或酚醛对 *G. oxydans* DSM 2003 生长、葡萄糖消耗和葡萄糖酸生成的影响 (a) 糠醛; (b) 5-羟甲基糠醛; (c) 4-羟基苯甲醛; (d) 香草醛; (e) 丁香醛。发酵条件: 30 °C, 220 rpm, pH 5-6, 10% (v/v) 接种量, 50 mL 发酵合成培养基/250 mL 摇瓶。黑色 Y 轴标题: 生长量 (OD<sub>600</sub>); 红色 Y 轴标题: 葡萄糖浓度; 蓝色 Y 轴标题: 葡萄糖酸浓度。

Fig. 3.1 Effects of individual furan aldehydes or phenolic aldehydes on cell growth, glucose consumption and gluconic acid production of *G. oxydans* DSM 2003

(a) Furfural; (b) HMF; (c) HBA; (d) vanillin; (e) syringaldehyde. Condition: 30 °C, 220 rpm, pH 5-6, 10% (v/v) of inoculation ratio. 50 mL of fermentation synthetic medium/250 mL flask. Black Y-axis title: Cell growth (OD<sub>600</sub>); Red Y-axis title: glucose concentration; Blue Y-axis title: gluconic acid concentration.

如图 3.1 所示, 基于两种呋喃醛的抑制作用, 糠醛的毒性明显高于 HMF, 随着糠醛和 HMF 浓度的增加, *G. oxydans* DSM 2003 生长延滞期也逐渐增加。2.0 g/L 的糠醛产生了致死现象, 此时的葡萄糖消耗和葡萄糖酸得率分别减少了 60.0%和 42.2%; 2.0 g/L 的 HMF 对生长抑制作用明显但没有引起菌株的死亡, 此时菌株的葡萄糖消耗和葡萄糖酸的得率几乎没有受到抑制。基于三种酚醛的抑制作用, 香草醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的毒性最强, HBA 次之, 丁香醛的毒性最弱。随着酚醛抑制物浓度的增加, 菌株的生长速率也逐渐降低。1.5 g/L 以上的 HBA 能够引起菌株的死亡, 菌株的葡萄糖的消耗和葡萄糖酸的生成也完全停止; 1.0 g/L 以内的香草醛或者 2.0 g/L 以内的丁香醛对菌株的葡萄糖消耗和葡萄糖酸得率几乎没有抑制作用。从上述实验结果可以得出, *G. oxydans* DSM 2003 的生长对呋喃醛和酚醛类抑制物均比较敏感, 随着抑制物浓度增加, 菌株的生长速率逐渐降低, 而葡萄糖的消耗和葡萄糖酸的生成与生长的偶联性较低, 只有当醛类抑制物对菌株的生长产生了致死作用时, 葡萄糖的消耗和葡萄糖酸的生成才会受到较大的影响, 说明 *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸发酵对呋喃醛和酚醛的耐受能力较强。

为了探究 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛抑制物耐受性较强的机制, 通过向合成培养基中添加确定浓度的单一抑制物, 考察了 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛抑制物的降解转化现象 (图 3.2)。如图 3.2a 所示, 0.7 g/L 的糠醛在 4 h 转化完, 18.4% 的糠醛还原为糠醇, 81.5% 的糠醛氧化产生糠酸, 随后糠醇继续降解完全最终全部生成了糠酸。如图 3.2b-d 结果显示, 1.0 g/L HMF, 0.6 g/L HBA, 0.7 g/L 香草醛在 12 h 基本降解完全, 产生的醇类产物约占总产物的 7-23%, 产生的酸类产物约占 77-93%。与糠醛的转化现象不同的是, 没有检测到 5-羟甲基糠醇, 4-羟基苯甲醇和香草醇的进一步转化。图 3.2e 结果显示, 丁香醛的降解速率缓慢, 0.9 g/L 的丁香醛经过 24 h 仅有 16.0% 被转化为相应的丁香醇, 没有丁香酸的产生。对五种醛类抑制物的降解转化来说, 除丁香醛外, *G. oxydans* DSM 2003 对糠醛、HMF、HBA、香草醛的转化机制主要是通过将醛类抑制物转化至低毒的酸类产物完成的。另外, 糠醛的转化机制中还存在糠醇向糠酸的转化 (通过产生少量的糠醛作为中间代谢产物)。

呋喃醛和酚醛抑制物的转化对 *G. oxydans* DSM 2003 生长的影响结果如图 3.2 所示, 与不添加抑制物的对照组相比, 虽然呋喃醛和酚醛抑制物的添加抑制了菌株的生长, 但是当醛类抑制物被完全转化 (糠醛胁迫下) 或被转化至一个较低的浓度 (HMF, HBA, 香草醛和丁香醛) 时, 菌株的生长延滞被解除, 而后微生物开始迅速生长。虽然 *G. oxydans* DSM 2003 的生长和葡萄糖酸生成之间的偶联性不强 (仅在能够引起菌株死亡的高抑制物浓度条件下, *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸得率才会受到较大的影响), 但这是建立在菌株可以在含有抑制物的培养基中解除生长延滞能够生长的基础上。而该菌株对呋喃醛和酚醛抑制物的降解转化是生长延滞解除的关键, 因此解析 *G. oxydans* DSM 2003 的呋喃醛和酚醛抑制物的转化机制具有重要意义。

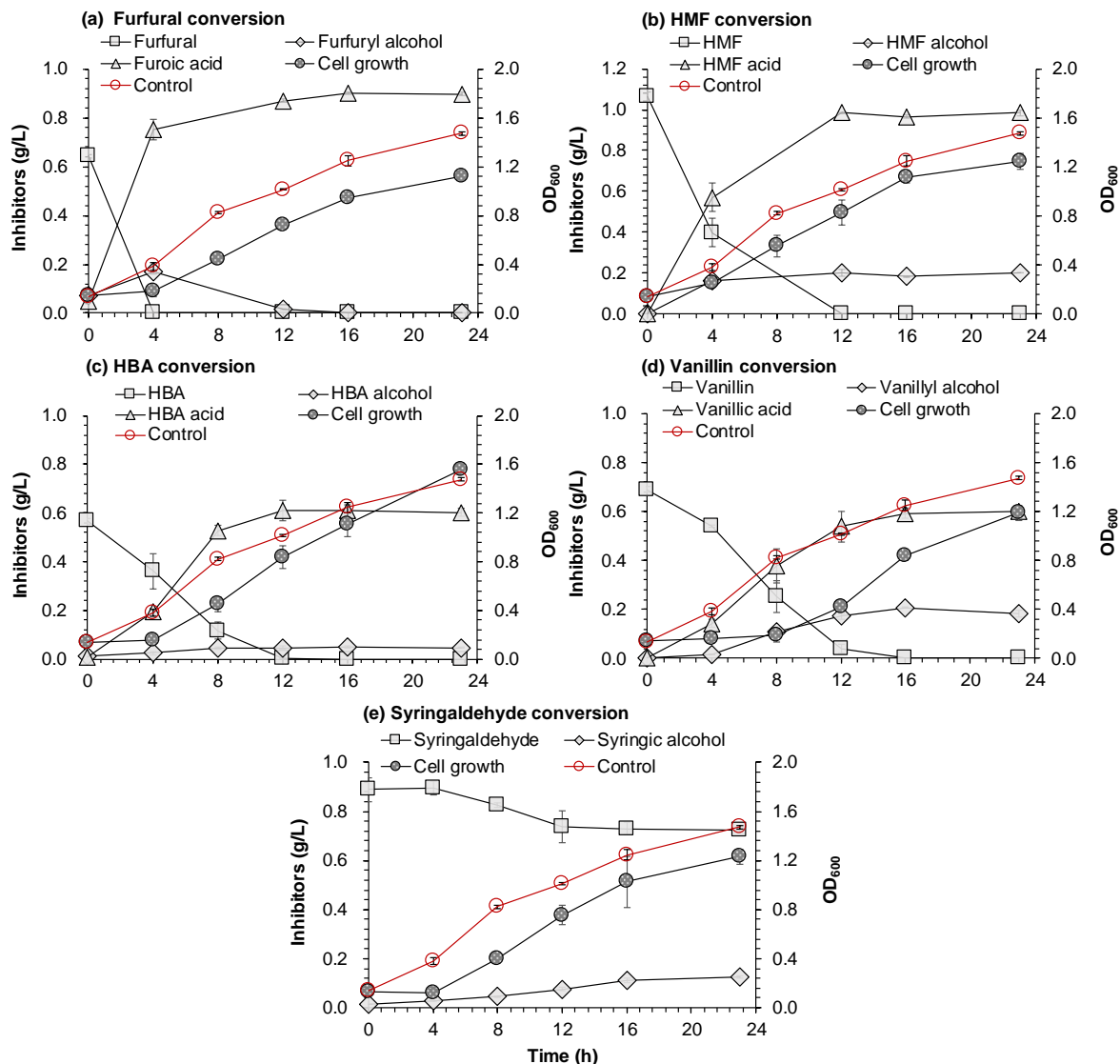


图 3.2 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛的转化

(a) 糠醛 0.7 g/L; (b) 5-羟甲基糠醛 1.0 g/L; (c) 4-羟基苯甲醛 0.6 g/L; (d) 香草醛 0.7 g/L; (e) 丁香醛 0.9 g/L。发酵条件: 30 °C, 220 rpm, pH 5-6, 10% (v/v) 接种量, 50 mL 合成发酵培养基/250 mL 摇瓶。“Control”表示无抑制物添加的对照组中 *G. oxydans* DSM 2003 的生长, “Cell growth”表示有单一抑制物添加的实验组的 *G. oxydans* DSM 2003 的生长。

Fig. 3.2 Conversion of furan aldehydes and phenolic aldehydes in *G. oxydans* DSM 2003

(a) Furfural 0.7 g/L; (b) HMF 1.0 g/L; (c) HBA 0.6 g/L; (d) vanillin 0.7 g/L; (e) syringaldehyde 0.9 g/L.

Condition: 30 °C, 220 rpm, pH 5-6, 10% (v/v) of inoculation ratio, 50 mL synthetic fermentation medium/in 250 mL flask. “Control” indicates cell growth of *G. oxydans* DSM 2003 without aldehyde addition, “Cell growth” indicates cell growth of *G. oxydans* DSM 2003 with individual aldehyde addition.

### 3.3.2 *G. oxydans* DSM 2003 在呋喃醛和酚醛类抑制物胁迫下的转录组

为了从分子水平解析 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛的转化机制, 本研究利用 DNA 芯片技术考察了在两种呋喃醛 (糠醛和 HMF) 和三种酚醛 (HBA、香草醛和丁香醛) 胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 的转录组。DNA 芯片原始数据已经提交至 NCBI 的 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库中, 编号为 GSE125739 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE125739>)。

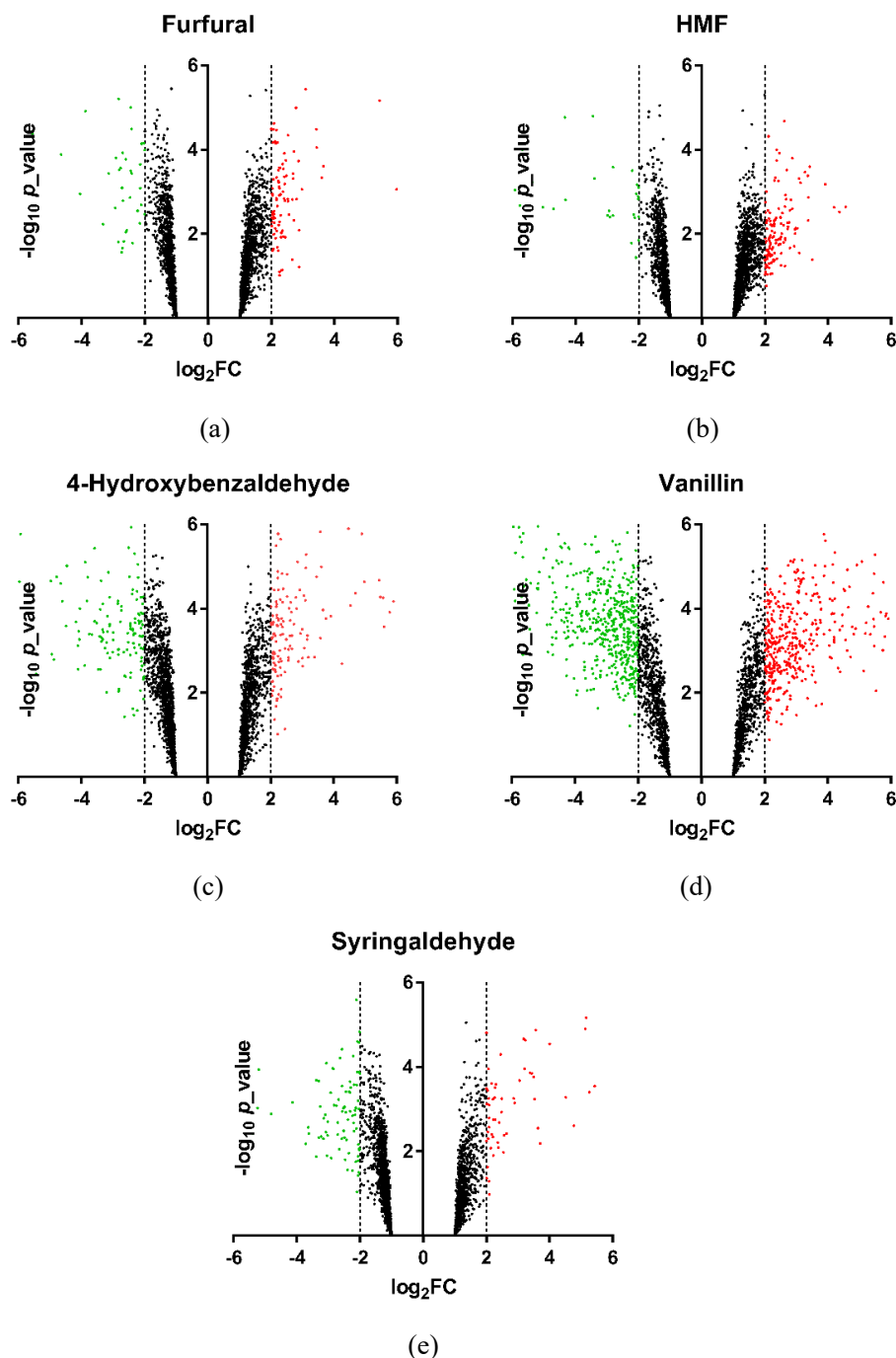


图 3.3 *G. oxydans* DSM 2003 在呋喃醛和酚醛抑制物处理下显著差异表达基因的火山图  
 (a) 糠醛; (b) 5-羟甲基糠醛; (c) 4-羟基苯甲醛; (d) 香草醛; (e) 丁香醛。X 轴是基因表达差异倍数的负对数 (以 2 为底)。Y 轴是 P 值的负 log (以 10 为底)。红色和绿色的点分别代表显著差异上调和显著差异下调表达的基因。

Fig. 3.3 Volcano plot of overall gene-based differential expression results for treatments with furan and phenolic aldehydes and untreated (each dot corresponds to a gene) of *G. oxydans* DSM 2003

(a) Furfural; (b) HMF; (c) 4-hydroxybenzaldehyde; (d) vanillin; (e) syringaldehyde. The X-axis corresponds to the negative log (base 2) of the fold change while the Y-axis corresponds to the negative log (base 10) of corrected P value. Red and green dot indicate the differentially expressed up-regulated genes and down-regulated genes, respectively.

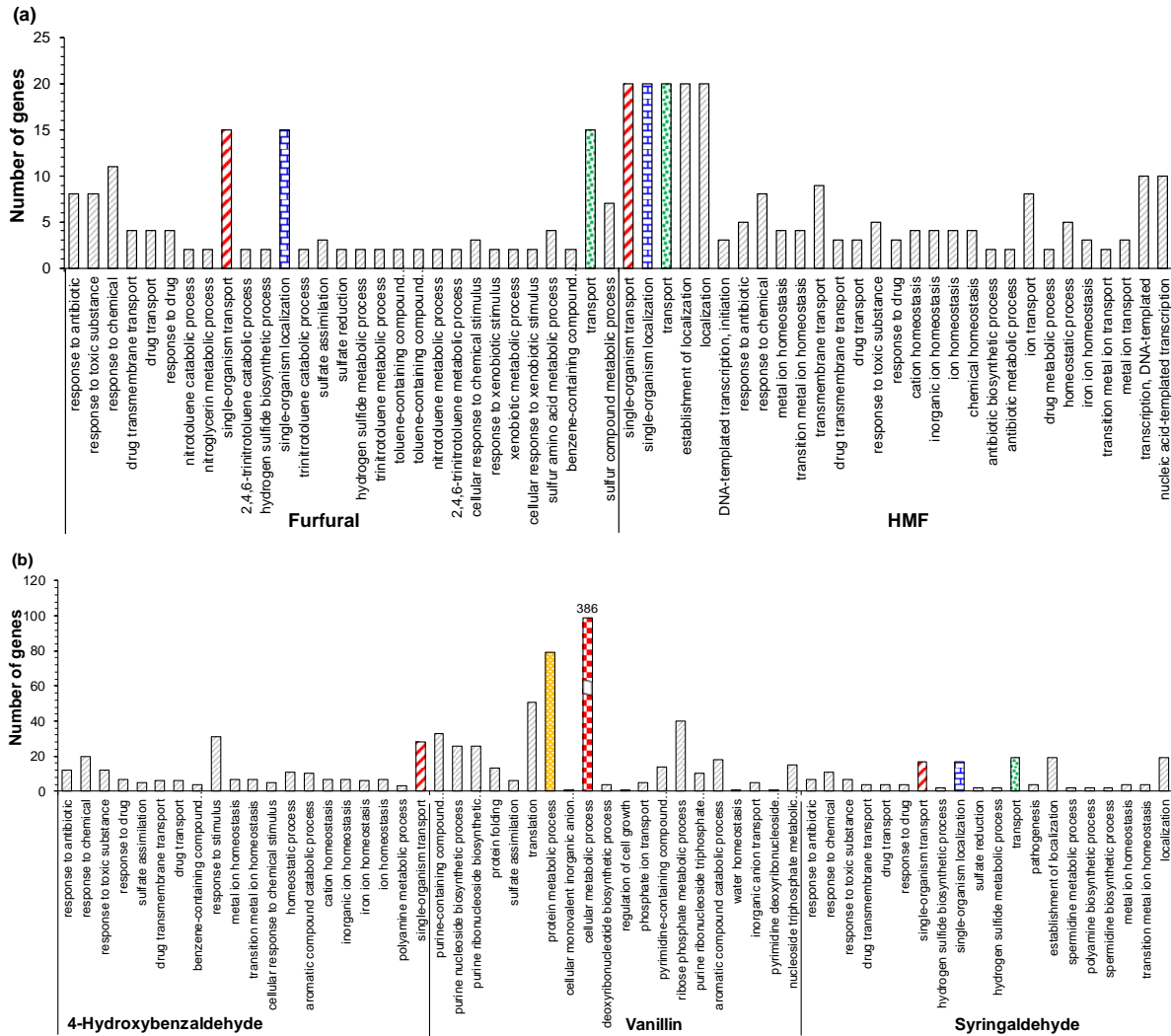


图 3.4 呋喃醛和酚醛处理下 *G. oxydans* DSM 2003 中显著差异表达基因的 GO 聚类分析

(a) 糠醛和 5-羟甲基糠醛；(b) 4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛。X 轴表示显著富集到的生物过程中的 GO 条目，Y 轴表示基因数量。

Fig. 3.4 Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes in response to furan and phenolic aldehydes

(a) Furfural and HMF; (b) HBA, vanillin and syringaldehyde. X-axis represents the top GO terms of the biological process were significantly enriched catalogues ( $p\text{-Value} \leq 0.05$ ). Y-axis represents the count of genes.

转录组实验以 *G. oxydans* 621H 的基因组 (GenBank: CP000009.1) [229] 作为模板设计探针，对 *G. oxydans* DSM 2003 全基因组水平上的 2664 个基因的转录水平进行了分析，以 3.2.5 中定义的筛选显著差异表达基因的阈值为标准进行抑制物胁迫下响应基因的筛选。*G. oxydans* DSM 2003 在呋喃醛和酚醛抑制物处理下显著差异表达基因如图 3.3 所示，与不添加抑制物的对照组相比，糠醛胁迫下分别有 85 个和 57 个基因显著差异上调和显著差异下调表达；HMF 胁迫下分别有 128 个和 43 个基因显著差异上调或下调表达；HBA 胁迫下有 147 个和 159 个基因显著差异上调或下调表达；香草醛胁迫下有 445 个和 577 个基因显著差异上调或下调表达；丁香醛胁迫下有 58 个和 103 个基因显著差异上调或下调表达。

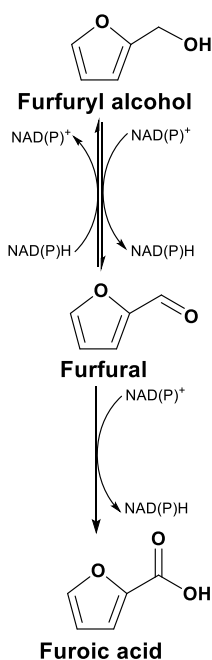
对转录组中在呋喃醛和酚醛胁迫下响应的显著差异表达基因进行 GO (Gene Ontology) 功能分析如图 3.4 所示, 在糠醛、HMF、HBA、丁香醛胁迫下富集度最高的生物学过程 (Biological Process, BP) 包括物质转运及定位等过程, 在香草醛胁迫下富集度最高的生物学过程包括物质代谢过程、芳香族化合物的催化过程以及核糖磷酸的代谢过程等。此外, 在细胞组分 (cellular components, CC) 类别中富集度最高的类别中除了包括细胞 (cell)、细胞部分 (cell part) 外还有膜组分 (membrane) 以及细胞膜 (membrane part) 类别; 在分子功能 (molecular functions, MF) 类别中富集度最高的类别包括结合分子功能 (binding)、催化活性功能 (catalytic activity) 及转运活性功能 (transporter activity) 类别。在呋喃醛和酚醛胁迫下, 物质代谢过程、转运和定位是富集度最高的三个生物学过程, 结合呋喃醛和酚醛对 *G. oxydans* 生长和产葡萄糖酸的影响及其抑制物降解转化现象, 以下主要分析了 *G. oxydans* 中醛类抑制物代谢转化过程, 葡萄糖代谢过程及物质转运过程。

### 3.3.3 呋喃醛和酚醛在 *G. oxydans* DSM 2003 中的转化路径

*G. oxydans* DSM 2003 通过氧化还原反应将呋喃醛和酚醛类抑制物转化为低毒的酸或者醇类产物来解除醛类抑制物对菌株的生长抑制。基于 *G. oxydans* DSM 2003 的基因组注释以及转录组数据, 筛选并挖掘了醛类抑制物转化过程中负责的相关基因并推测了该菌株中五种醛类抑制物在分子水平上的转化路径 (图 3.5)。

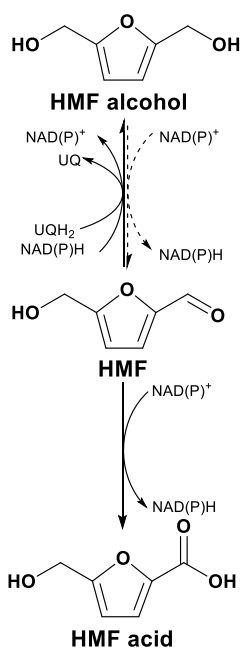
如图 3.5a 所示, 在糠醛胁迫下有 4 个氧化还原酶编码基因显著差异上调表达两倍以上, 其中一个 NADPH 依赖型的醌还原酶编码基因 *W826\_RS0100105* 和一个链烯还原酶 (alkene reductase) 编码基因 *W826\_RS0100830* 可能参与了糠醛还原为糠醇的反应, 一个琥珀酸半醛脱氢酶编码基因 *W826\_RS0100815* 可能参与了糠醛氧化为糠酸的反应。如图 3.5b 所示, 在 HMF 胁迫下, 有 6 个氧化还原酶编码基因显著差异上调表达两倍以上, 其中, 3-磷酸甘油醇脱氢酶编码基因 *W826\_RS0102845*, 2-肌醇脱氢酶编码基因 *W826\_RS0108840*, 3-磷酸甘油酸脱氢酶编码基因 *W826\_RS0111880*, NADPH 依赖型的醌还原酶编码基因 *W826\_RS0100105* 和一个链烯还原酶 (alkene reductase) 编码基因 *W826\_RS0100830* 可能参与了 HMF 还原为 5-羟甲基糠醇的过程, 琥珀酸半醛脱氢酶编码基因 *W826\_RS0100815* 可能参与了 HMF 氧化为 5-羟甲基糠酸的过程。有三个基因 *W826\_RS0100105*、*W826\_RS0100830* 和 *W826\_RS0100815* 在糠醛和 HMF 胁迫下均发生显著差异上调表达, 其中 *W826\_RS0100105*、*W826\_RS0100830* 对糠醛、HMF 还原为糠醇和羟甲基糠醇中发挥作用, *W826\_RS0100815* 在糠醛、HMF 氧化为糠酸和羟甲基糠酸中发挥作用。

## (a) Furfural conversion



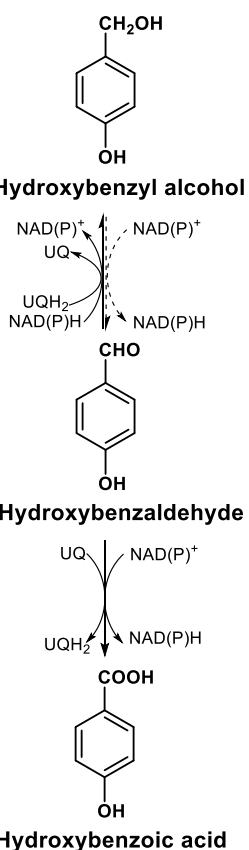
**ADH:**  
**W826\_RS0100105 (2.72)**  
**W826\_RS0100830 (3.43)**  
**ALDH:**  
**W826\_RS0100815 (2.27)**  
**Other oxidoreductase:**  
**W826\_RS0108890 (2.37)**

## (b) HMF conversion



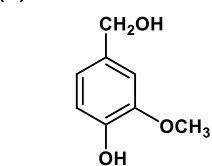
**ADH:**  
**W826\_RS0100105 (2.65),**  
**W826\_RS0100830 (3.42),**  
**W826\_RS0102845 (2.10),**  
**W826\_RS0108840 (2.86),**  
**W826\_RS0111880 (2.13)**  
**ALDH:**  
**W826\_RS0100815 (2.18)**

## (c) HBA conversion

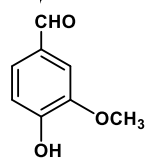
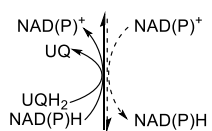


**ADH:**  
**W826\_RS0108230 (3.05), W826\_RS0108840 (2.19),**  
**W826\_RS0100830 (5.78), W826\_RS0108755 (12.17)**  
**ALDH:**  
**W826\_RS0111485 (2.29), W826\_RS0108745 (7.71)**  
**Other oxidoreductase:**  
**W826\_RS0110195 (2.34), W826\_RS0105635 (2.08),**  
**W826\_RS0110615 (3.11), W826\_RS0101290 (2.10),**  
**W826\_RS0108890 (2.34)**

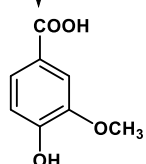
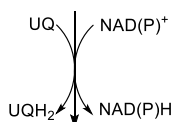
(d) Vanillin conversion



Vanillyl alcohol



Vanillin



Vanillic acid

**ADH:**

**W826\_RS0100105 (6.44)**, **W826\_RS0108230 (3.05)**, **W826\_RS0108840 (2.66)**, **W826\_RS0100830 (7.63)**, **W826\_RS0102845 (2.15)**, W826\_RS0110490 (3.54), W826\_RS0102810 (3.14), **W826\_RS0102840 (2.23)**, W826\_RS0105345 (2.81), W826\_RS0106015 (3.12), W826\_RS0107180 (3.13), **W826\_RS0109170 (4.20)**, W826\_RS0110065 (2.16), W826\_RS0111205 (3.69), W826\_RS0111995 (2.48), W826\_RS0111660 (2.90)

**ALDH:**

**W826\_RS0111485 (4.77)**, W826\_RS0100815 (2.47), W826\_RS0107700 (2.44), W826\_RS0109870 (2.10), W826\_RS0110280 (3.21), W826\_RS0100400 (2.49), W826\_RS0111570 (4.02)

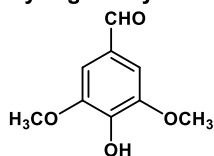
**Aldehyde oxidase:**

W826\_RS0106020 (3.77)

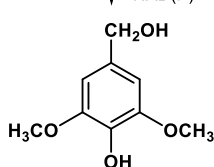
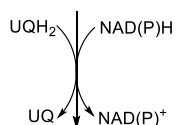
**Other oxidoreductase:**

**W826\_RS0110195 (3.02)**, **W826\_RS0105635 (5.68)**, **W826\_RS0110615 (8.81)**, **W826\_RS14555 (3.20)**, W826\_RS0101290 (3.30), W826\_RS0112535 (2.74), **W826\_RS0108890 (2.02)**, **W826\_RS0110240 (4.16)**, W826\_RS0100310 (2.39), W826\_RS0102895 (2.06), W826\_RS0105975 (2.21), W826\_RS0109970 (2.04), W826\_RS0112390 (2.90), W826\_RS0110650 (2.89), W826\_RS0110495 (2.12), W826\_RS0108195 (2.88)

(e) Syringaldehyde conversion



Syringaldehyde



Syringyl alcohol

**ADH:**

**W826\_RS0100105 (2.86)**, **W826\_RS0100830 (3.21)**

**Other oxidoreductase:**

**W826\_RS0112535 (2.26)**, **W826\_RS0110615 (2.04)**, **W826\_RS14555 (2.08)**

图 3.5 呋喃醛和酚醛在 *G. oxydans* DSM 2003 中的转化路径

(a) 糠醛; (b) HMF; (c) HBA; (d) 香草醛; (e) 丁香醛。虚线表示推测可能存在的反应。红色的基因表示在两种呋喃醛或者至少两种酚醛胁迫下显著差异上调表达两倍以上基因; 黑色的基因表示仅在相应的醛类抑制物的转化中发挥作用的基因; 加粗的基因表示定位于细胞膜上的基因。

Fig. 3.5 Furan and phenolic aldehydes conversion pathways of *G. oxydans* DSM 2003

(a) Furfural; (b) HMF; (c) HBA; (d) vanillin; (e) syringaldehyde. Dashed line represents the hypothetical reaction. Genes in red color, the differentially expressed more than two-folds under two furan aldehydes or at least two phenolic aldehydes; black, the differentially expressed more than two-folds only by the corresponding aldehyde; bold, the membrane bound genes.

如图 3.5c-e 所示,在酚醛胁迫下,分别有 11,40 和 5 个氧化还原酶编码基因在 HBA、香草醛和丁香醛的胁迫下发生显著差异上调表达。在至少两种酚醛胁迫下发生显著差异上调表达的基因包括 5 个醇脱氢酶编码基因: 3-磷酸甘油醇脱氢酶编码基因 *W826\_RS0108230*, 2-肌醇脱氢酶编码基因 *W826\_RS0108840*, 脱氢酶 *W826\_RS0110195*, NADPH 依赖型的醌还原酶编码基因 *W826\_RS0100105* 和链烯还原酶编码基因 *W826\_RS0100830* 在, 可能参与了酚醛还原为酚醇的反应; 一个醛脱氢酶编码基因 *W826\_RS0111485*, 可能参与了酚醛氧化为酚酸的过程; 6 个氧化还原酶编码基因: *W826\_RS0101290*、*W826\_RS0105635*、*W826\_RS0108890*、*W826\_RS0110615*、*W826\_RS0112535* 和 *W826\_RS14555*。在五种醛类抑制物的转化过程中, 香草醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的毒性抑制作用更强, 引起的 *G. oxydans* DSM 2003 基因响应数目也是最多的, 推测微生物在面对毒性更强的抑制物时会调动更多的基因来抵制醛类带来的毒性压力。

*G. oxydans* DSM 2003 转化呋喃醛和酚醛的现象相似, 分子水平上诱导表达的基因也有交集。一个 NADPH 依赖型的醌还原酶编码基因 *W826\_RS0100105* 在糠醛、HMF, 香草醛和丁香醛胁迫下分别显著差异上调 2.72, 2.65, 6.44, 2.86 倍; 一个链烯还原酶编码基因 *W826\_RS0100830* 在糠醛、HMF, 香草醛、丁香醛和 HBA 胁迫下分别显著差异上调 3.43, 3.42, 7.63, 3.21 和 5.78 倍, 这两个基因可能在呋喃醛和酚醛的转化中均发挥了重要作用。通过 NCBI 中氨基酸序列比对分析结果发现 *W826\_RS0100105* 和 *W826\_RS0100830* 编码的氨基酸序列均与锌依赖型的醇脱氢酶氨基酸序列相似, 说明这两个基因可能在呋喃醛和酚醛还原为呋喃醇和酚醇的过程中发挥了重要作用。

基于 *G. oxydans* DSM 2003 (NCBI GeneBank accession number AITY00000000.1) 和 *G. oxydans* 621H (NCBI GeneBank accession number CP000009.1) 的基因组信息, 上述在呋喃醛或酚醛胁迫下发生显著差异上调表达的基因中, 有 9 个基因编码的氧化还原酶定位于细胞膜上, 其中 4 个基因包括 *W826\_RS0102840* (编码甘油醇脱氢酶大亚基), *W826\_RS0102845* (编码甘油醇脱氢酶小亚基), *W826\_RS0110195* (编码脱氢酶)、*W826\_RS0109170* (编码乳酸脱氢酶) 在文献中被报道过<sup>[244]</sup>; 另外 5 个基因包括 *W826\_RS0100105* (编码 NADPH: 醌还原酶)、*W826\_RS0105635* (编码 NAD(FAD)依赖型的脱氢酶)、*W826\_RS0110615* (编码 NADP 依赖型的脱水酶)、*W826\_RS14555* (编码氧化还原酶) 和 *W826\_RS0110240* (编码氧化还原酶) 也编码细胞膜结合型蛋白。在这些显著差异上调表达的膜蛋白编码基因中, *W826\_RS0100105*, *W826\_RS0102840*, *W826\_RS0102845*, *W826\_RS0109170*, *W826\_RS0110615* 和 *W826\_RS14555* 可能与呋喃醛和酚醛还原产生相应的呋喃醇和酚醇过程相关; *W826\_RS0110195*、*W826\_RS0105635* 和 *W826\_RS0110240* 可能与呋喃醛和酚醛氧化产生相应的呋喃酸和酚酸的过程相关。与细胞内可溶性的氧化还原酶相比, 这些细胞膜结合型的氧化还原酶在 *G. oxydans* DSM 2003 降解转化呋喃醛和酚醛的分子路径中可能发挥着更为重要的功能, 因为细胞膜氧化还原酶比细胞内的氧化还原酶能够更快的接触到培养基中的抑制物组分, 并且不需要

抑制物转运至细胞内。而细胞中可溶性的氧化还原酶作用的发挥需要醛类抑制物进入细胞内才能完成，产生的代谢产物还需要再次排出细胞。因此利用细胞膜上的氧化还原酶转化呋喃醛和酚醛的机制能够促进微生物对醛类抑制物的脱除。上述筛选出的重要氧化还原酶编码基因可以作为抑制物耐受基因元器件库的一个重要组成部分，为高抗逆生物炼制发酵微生物的理性改造提供重要的基因储备。

### 3.3.4 呋喃醛和酚醛的转化对葡萄糖代谢的影响

*G. oxydans* 具有两种在空间上分离的葡萄糖代谢路径：（1）90%以上的葡萄糖被细胞膜结合型的葡萄糖脱氢酶（mGDH）氧化为葡萄糖酸内酯（通过自发反应生成葡萄糖酸），葡萄糖氧化过程产生的电子直接传递给泛醌（UQ），UQ 接着被还原为泛醇（UQH<sub>2</sub>），在两个末端泛醇氧化酶（cytochrome *bo*<sub>3</sub> 和 cytochrome *bd*）的作用下，UQH<sub>2</sub> 被氧化为 UQ 并将电子传递给分子氧<sup>[229, 230]</sup>（图 3.6）；（2）10%的葡萄糖进入胞内代谢，其中 90%以上被胞内的葡糖糖脱氢酶氧化，其余的葡萄糖进入胞内的中心碳代谢路径（图 3.7）。由于 *G. oxydans* 缺乏糖酵解（EMP）途径中的限速酶即磷酸果糖激酶以及三羧酸循环中的琥珀酸脱氢酶的编码基因，使得该菌株的 EMP 和 TCA 循环不完整，因此只能依赖细胞内完整的戊糖磷酸途径（PPP）和 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸途径（EDP）途径进行葡萄糖的分解代谢<sup>[230, 231]</sup>。

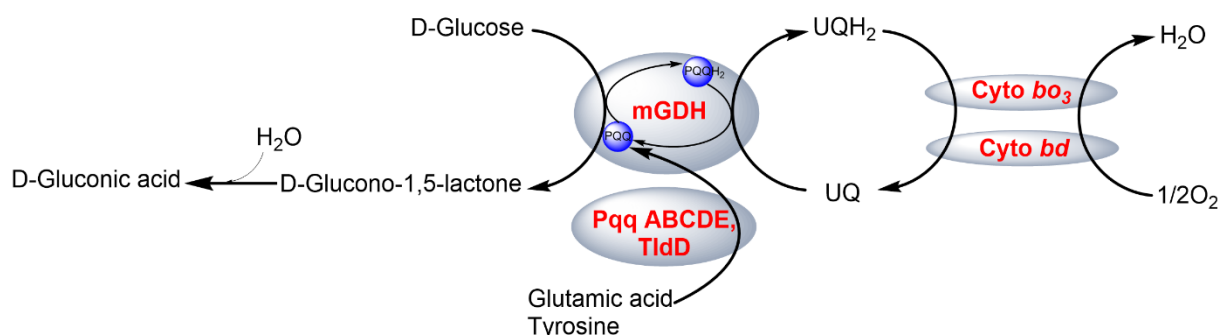


图 3.6 *G. oxydans* 中细胞膜结合型的葡萄糖氧化呼吸链

Fig. 3.6 The membrane-bound sugar-oxidizing respiratory chain of *G. oxydans*

细胞周质空间中细胞膜结合型的葡萄糖氧化呼吸链如图 3.6 所示，吡咯喹啉醌是 PQQ（Pyrroloquinoline quinone）是 mGDH 的辅因子，PQQ 的生物合成操纵子包括 *pqqABCDE* 和 *tldD* 基因。与葡萄糖氧化呼吸链及辅因子合成酶相关的编码基因的转录水平变化如表 3.1 所示，除香草醛外相关基因的转录水平基本不受糠醛、HMF、HBA 和丁香醛的影响，mGDH 编码基因 *W826\_RS0112255* 在香草醛胁迫下显著下调 4.22 倍，另一方面，负责接收电子传递给氧的末端细胞色素 *bd* 泛醌氧化酶的两个编码基因 *W826\_RS0112320* 和 *W826\_RS0112325* 在香草醛胁迫下分别显著差异上调表达 5.5 倍和 4.9 倍。末端氧化酶编码基因的转录上调表达，可能促进辅因子 PQQ 的再生，从而弥补 mGDH 下调表达带来的葡萄糖酸生产速率的下降。另外，从图 3.1 中香草醛胁迫下稳定的葡萄糖酸生成也可以得出，mGDH 的酶活可能足够高，所以虽然香草醛胁迫下 mGDH 的转录水平下降引起的酶蛋白合成量的降低也并未对葡萄糖的氧化速率产生抑制。

表 3.1 *G. oxydans* 中周质空间中葡萄糖氧化相关基因在抑制物胁迫下的转录水平Table 3.1 Transcriptional fold change of the genes in relevant to glucose oxidation under the stress of inhibitors in *G. oxydans*

| Genes and the encoding proteins | Furfural   |                 | HMF        |                 | HBA         |                 | Vanillin     |                 | Syringaldehyde |                 |
|---------------------------------|------------|-----------------|------------|-----------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
|                                 | Foldchange | <i>p</i> -value | Foldchange | <i>p</i> -value | Foldchange  | <i>p</i> -value | Foldchange   | <i>p</i> -value | Foldchange     | <i>p</i> -value |
| W826_RS0112255, mGDH            | -1.33      | 0.08            | -1.14      | 0.20            | -1.52       | 0.00            | <b>-4.22</b> | 0.00            | -1.14          | 0.39            |
| W826_RS14655, PqqA              | 1.56       | 0.05            | 1.84       | 0.01            | 1.53        | 0.02            | 1.89         | 0.01            | 1.48           | 0.20            |
| W826_RS0103475, PqqB            | 1.02       | 0.83            | 1.10       | 0.40            | 1.16        | 0.22            | 1.21         | 0.13            | 1.01           | 0.65            |
| W826_RS0103470, PqqC            | -1.30      | 0.00            | 1.30       | 0.06            | -1.80       | 0.00            | -1.83        | 0.00            | -1.62          | 0.02            |
| W826_RS0103465, PqqD            | -1.13      | 0.05            | 1.15       | 0.04            | -1.34       | 0.00            | <b>-2.06</b> | 0.00            | -1.36          | 0.05            |
| W826_RS0103460, PqqE            | -1.20      | 0.11            | -1.27      | 0.02            | -1.89       | 0.00            | <b>-2.52</b> | 0.00            | -1.47          | 0.05            |
| W826_RS0111380, TldD            | 1.15       | 0.09            | 1.15       | 0.02            | 1.25        | 0.00            | 1.13         | 0.41            | 1.17           | 0.17            |
| W826_RS0109905, CyoA            | -1.37      | 0.01            | -1.22      | 0.11            | 1.08        | 0.46            | -1.48        | 0.01            | -1.00          | 0.26            |
| W826_RS0109900, CyoB            | -1.17      | 0.05            | 1.05       | 0.70            | 1.11        | 0.29            | 1.34         | 0.11            | -1.01          | 0.24            |
| W826_RS0109895, CyoC            | 1.26       | 0.05            | -1.08      | 0.60            | 1.04        | 0.66            | -1.50        | 0.05            | -1.01          | 0.37            |
| W826_RS0109890, CyoD            | -1.32      | 0.03            | -1.11      | 0.31            | -1.11       | 0.01            | -1.57        | 0.07            | -1.08          | 0.48            |
| W826_RS0110150, CyoE            | -1.13      | 0.05            | -1.12      | 0.36            | 1.10        | 0.12            | -1.30        | 0.01            | 1.00           | 0.24            |
| W826_RS0112320, CydA            | 1.23       | 0.01            | 1.20       | 0.00            | <b>2.18</b> | 0.00            | <b>5.46</b>  | 0.00            | 1.74           | 0.00            |
| W826_RS0112325, CydB            | 1.23       | 0.06            | 1.23       | 0.01            | 1.95        | 0.00            | <b>4.91</b>  | 0.00            | 1.64           | 0.01            |

HMF: 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde

HBA: 4-Hydroxybenzaldehyde

注：表达倍数的正负分别表示基因上调表达和基因下调表达。基因表达倍数发生 2 倍以上变化的显著上调和显著下调基因分别被加粗并标注红色或者绿色显示。

Note: The positive and negative fold changes indicate the up- and down- regulation of the genes, respectively. The genes with more than two-fold change of up- or down- regulation were marked in bold with red or green.

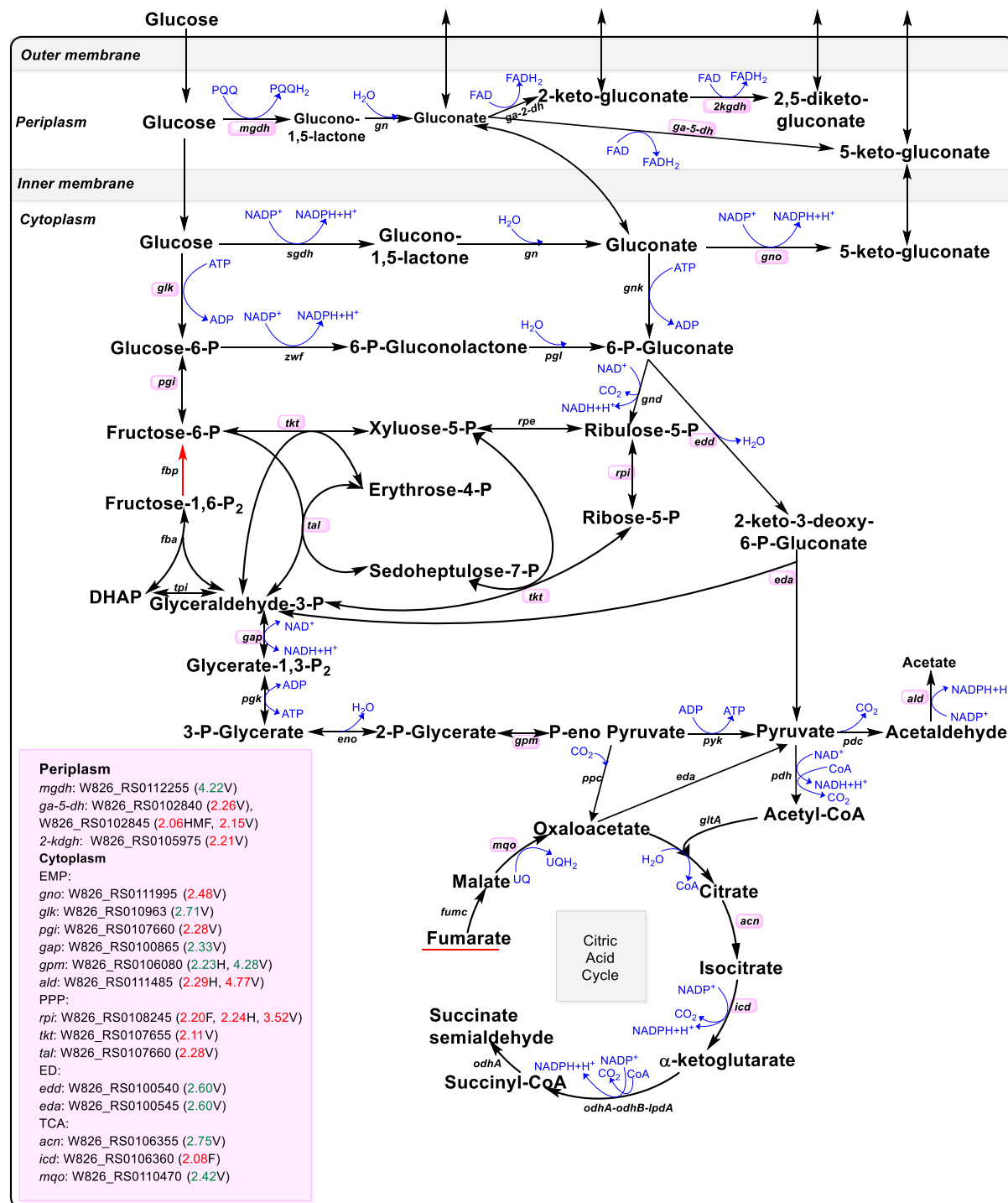


图 3.7 呋喃醛和酚醛对 *G. oxydans* DSM 2003 葡萄糖代谢的影响

代谢路径中标注紫色背景基因表示在呋喃醛或酚醛抑制物胁迫下发生显著差异表达的基因，紫色色块中展示了相关差异表达基因转录水平上的差异表达倍数，F、HMF、H、V 和 S 分别表示糠醛、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛，红色和绿色数字分别表示显著差异上调或者下调表达的倍数。缩写的基因编码的酶的名称如下：细胞膜结合型的葡萄糖脱氢酶 (mGDH)、葡萄糖酸内酯酶 (Gn)、2-葡萄糖酸脱氢酶 (Ga-2-DH)、5-葡萄糖酸脱氢酶 (Ga-5-DH/GNO)、2-酮基葡萄糖酸脱氢酶 (2-KDGH)、葡糖激酶 (Glc)、磷酸葡萄糖异构酶 (PGI)、果糖 1,6 二磷酸酶 (FBP)、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA)，磷酸丙糖异构酶 (TPI)，3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP)、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、烯醇式酶 (ENO)、磷酸甘油酸变位酶 (GPM)、丙酮

酸激酶 (PYK)、丙酮酸脱羧酶 (PDC)、乙醛脱氢酶 (ALD)、葡萄糖酸激酶 (GNK)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (ZWF)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (PGL)、6-磷酸葡萄糖酸-1-脱氢酶 (GND)、3-磷酸核酮糖异构酶 (RPE)、5-磷酸核糖异构酶 (RPI)、转酮醇酶 (TKT)、转醛醇酶 (TAL)、磷酸葡萄糖酸脱水酶 (EDD)、KDPG 醛缩酶 (EDA)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PPC)、丙酮酸脱氢酶 (PDH)、柠檬酸合酶 (GltA)、乌头酸水合酶 (ACN)、异柠檬酸脱氢酶 (ICD)、琥珀酸转移酶 (ODHA)、延胡索酸酶 (FUMC)、苹果酸酶 (MQO)。

Fig. 3.7 Influence on glucose metabolism pathway of furan and phenolic aldehydes in *G. oxydans* DSM 2003

Genes with purple background in the pathway indicate the genes were significantly differentially expressed by furan or phenolic aldehydes. F, HMF, H, V and S stand for furfural, 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, and syringaldehyde, respectively. Numbers colored red and colored green means the expression level of up-regulated genes and down-regulated genes. The abbreviated enzymes are the following: Membrane bound glucose dehydrogenase (mGDH), NAD(P)-dependent glucose 1-dehydrogenase (sGDH), Gluconolactonase (Gn), Gluconate 2-dehydrogenase (Ga-2-DH), Gluconate 5-dehydrogenase (Ga-5-DH), 2-Ketogluconate dehydrogenase (2-KDGH), Gluconate 5-dehydrogenase (GNO), Glucokinase (Glk), Phosoglucose isomerase (PGI), Fructose 1, 6-bisphosphatase (FBP), Fructose-bisphosphate aldolase (FBA), Triosephosphate isomerase (TPI), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP), Phosphoglycerate kinase (PGK), Enolase (ENO), Phosphoglycerate mutase (GPM), Pyruvate kinase (PYK), Pyruvate decarboxylase (PDC), Acetaldehyde dehydrogenases (ALD), Gluconokinase (GNK), Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (ZWF), 6-Phosphogluconolactonase (PGL), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (GND), Ribulose-phosphate 3-epimerase (RPE), Ribose 5-phosphate isomerase (RPI), Transketolase (TKT), Transaldolase (TAL), Phosphogluconate dehydratase (EDD), KDPG aldolase (EDA), Phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC), Pyruvate dehydrogenase (PDH), Citrate synthase (GltA), Aconitate hydratase (ACN), Isocitrate dehydrogenase (ICD), Dihydropyridoxylsuccinyltransferase (ODHA), Fumarase (FUMC), Malate:quinone oxidoreductase (MQO).

图 3.7 中呋喃醛和酚醛对 *G. oxydans* DSM 2003 细胞内葡萄糖代谢途径相关基因的转录水平的影响结果显示, 除香草醛外, 糠醛、HMF、HBA 和丁香醛对细胞内葡萄糖代谢路径的影响均不大。葡萄糖氧化路径中的 5-磷酸葡萄糖脱氢酶 (GNO) 编码基因 *W826\_RS0111995* 在香草醛胁迫下显著差异上调表达 2.48 倍。ED 途径中的关键酶磷酸葡萄糖酸脱水酶 (EDD) 的编码基因 *W826\_RS0100540*, 和 KDPG 醛缩酶 (EDA) 的编码基因 *W826\_RS0100545* 在香草醛胁迫下, 均显著差异下调表达 2.60 倍。与 *G. oxydans* DSM 2003 生长紧密相关的 PPP 途径中的关键酶的编码基因在呋喃醛和酚醛胁迫下呈现上调表达的现象, RPI 编码基因 *W826\_RS0108245* 在糠醛、HBA 和香草醛胁迫下分别显著差异上调表达 2.20, 2.23 和 3.52 倍; TKT 编码基因 *W826\_RS0107655* 和 TAL 编码基因 *W826\_RS0107660* 在香草醛胁迫下分别显著差异上调表达 2.11 和 2.28 倍。结果显示, 毒性较强的香草醛可以通过诱导菌株中可以产大量还原力的 PPP 途径中相关基因的显著上调表达, 为细胞的代谢合成提供大量还原力, 用来抵抗用于耐受和降解转化醛类抑制物所消耗掉的还原力, 维持细胞内的氧化还原力的稳态结构, 从而缓解香草醛带来的毒性作用。

表 3.2 呋喃醛和酚醛转化过程中相关转运蛋白编码基因的转录表达水平

Table 3.2 Transcriptional expression of the transporter encoding genes during the conversion process of furan and phenolic aldehydes

| Transporter         | Gene           | Furfural    |                 | HMF         |                 | HBA          |                 | Vanillin     |                 | Syringaldehyde |                 |
|---------------------|----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
|                     |                | FC          | <i>p</i> -value | FC          | <i>p</i> -value | FC           | <i>p</i> -value | FC           | <i>p</i> -value | FC             | <i>p</i> -value |
| ABC transporter     | W826_RS0108260 | <b>2.16</b> | 0.00            | <b>2.17</b> | 0.00            | <b>2.37</b>  | 0.00            | <b>3.61</b>  | 0.00            | <b>2.08</b>    | 0.00            |
|                     | W826_RS0108250 | <b>2.08</b> | 0.00            | <b>2.09</b> | 0.00            | <b>2.23</b>  | 0.00            | <b>3.31</b>  | 0.00            | 1.97           | 0.00            |
|                     | W826_RS0108810 | 1.43        | 0.01            | <b>2.14</b> | 0.01            | 1.36         | 0.01            | 1.61         | 0.05            | -              | -               |
|                     | W826_RS0106070 | 1.72        | 0.01            | 1.67        | 0.05            | <b>2.13</b>  | 0.00            | <b>5.85</b>  | 0.00            | -              | -               |
|                     | W826_RS0108255 | 1.86        | 0.00            | 1.77        | 0.00            | <b>2.20</b>  | 0.00            | <b>3.66</b>  | 0.00            | 1.88           | 0.00            |
|                     | W826_RS0112005 | 1.63        | 0.01            | 1.77        | 0.01            | <b>2.12</b>  | 0.00            | <b>2.24</b>  | 0.01            | 1.59           | 0.01            |
|                     | W826_RS0110185 | 1.36        | 0.00            | 1.09        | 0.39            | <b>2.80</b>  | 0.00            | <b>3.13</b>  | 0.00            | 1.48           | 0.01            |
|                     | W826_RS0112020 | 1.66        | 0.01            | 1.74        | 0.01            | 1.88         | 0.01            | <b>2.16</b>  | 0.00            | 1.49           | 0.02            |
|                     | W826_RS0113710 | -1.03       | 0.63            | -1.08       | 0.24            | 1.52         | 0.00            | <b>2.47</b>  | 0.00            | 1.24           | 0.01            |
|                     | W826_RS0113700 | 1.06        | 0.51            | 1.01        | 0.94            | 1.65         | 0.00            | <b>3.23</b>  | 0.00            | 1.53           | 0.00            |
| MFS transporter     | W826_RS0110310 | <b>5.43</b> | 0.00            | <b>2.33</b> | 0.00            | <b>27.61</b> | 0.00            | <b>7.53</b>  | 0.00            | 1.32           | 0.09            |
|                     | W826_RS0104060 | 1.98        | 0.00            | <b>2.37</b> | 0.00            | 1.52         | 0.00            | 1.47         | 0.00            | 1.50           | 0.00            |
|                     | W826_RS0111925 | 1.78        | 0.00            | <b>2.11</b> | 0.00            | 1.85         | 0.00            | <b>2.61</b>  | 0.00            | 1.62           | 0.00            |
|                     | W826_RS0102475 | 1.83        | 0.00            | 1.49        | 0.02            | <b>4.47</b>  | 0.00            | <b>2.67</b>  | 0.00            | <b>4.00</b>    | 0.00            |
|                     | W826_RS0110500 | 1.75        | 0.01            | 1.67        | 0.09            | 1.31         | 0.06            | <b>3.22</b>  | 0.00            | 1.43           | 0.11            |
|                     | W826_RS0102795 | 1.11        | 0.04            | 1.09        | 0.53            | 1.16         | 0.00            | <b>2.16</b>  | 0.00            | 1.59           | 0.00            |
|                     | W826_RS0112710 | 1.69        | 0.01            | <b>3.12</b> | 0.00            | -1.20        | 0.10            | <b>-2.75</b> | 0.00            | 1.16           | 0.12            |
| RND transporter     | W826_RS0102000 | <b>2.86</b> | 0.00            | <b>2.65</b> | 0.00            | <b>11.71</b> | 0.00            | <b>9.15</b>  | 0.00            | <b>8.34</b>    | 0.00            |
|                     | W826_RS0102005 | <b>3.66</b> | 0.00            | <b>3.27</b> | 0.00            | <b>17.85</b> | 0.00            | <b>14.83</b> | 0.00            | <b>8.92</b>    | 0.00            |
|                     | W826_RS0101995 | <b>2.46</b> | 0.00            | <b>2.06</b> | 0.00            | <b>11.03</b> | 0.00            | <b>7.85</b>  | 0.00            | <b>7.77</b>    | 0.00            |
| Glycosyltransferase | W826_RS0108760 | -1.26       | 0.01            | -1.10       | 0.16            | <b>7.48</b>  | 0.00            | -1.14        | 0.27            | -1.30          | 0.01            |
|                     | W826_RS0102665 | 1.16        | 0.27            | 1.13        | 0.34            | <b>2.89</b>  | 0.00            | <b>4.62</b>  | 0.00            | 1.64           | 0.03            |
|                     | W826_RS0112625 | 1.34        | 0.06            | 1.04        | 0.82            | <b>2.68</b>  | 0.00            | <b>7.83</b>  | 0.00            | 1.90           | 0.00            |

|  |                |                |      |             |      |             |       |             |             |             |      |
|--|----------------|----------------|------|-------------|------|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|------|
|  | W826_RS0110525 | 1.09           | 0.13 | -1.02       | 0.89 | -1.12       | 0.18  | <b>2.42</b> | 0.00        | 1.01        | 0.93 |
|  | W826_RS0111490 | 1.68           | 0.00 | 1.52        | 0.04 | 1.42        | 0.01  | <b>2.51</b> | 0.00        | 1.32        | 0.06 |
| Aminotransferase                             | W826_RS0106285 | <b>2.53</b>    | 0.00 | 1.50        | 0.14 | <b>2.86</b> | 0.00  | <b>2.71</b> | 0.00        | 1.83        | 0.00 |
|  | W826_RS0105185 | 1.03           | 0.69 | -1.19       | 0.18 | 1.92        | 0.00  | <b>3.65</b> | 0.00        | 1.18        | 0.14 |
|  | W826_RS0106210 | 1.15           | 0.08 | 1.06        | 0.56 | 1.53        | 0.00  | <b>2.89</b> | 0.00        | -1.03       | 0.82 |
|  | W826_RS0104240 | 1.44           | 0.00 | 1.61        | 0.00 | 1.52        | 0.00  | <b>2.12</b> | 0.00        | 1.39        | 0.01 |
|  | W826_RS0102260 | 1.06           | 0.46 | -1.07       | 0.56 | 1.04        | 0.67  | <b>2.57</b> | 0.00        | 1.13        | 0.17 |
|  |                | W826_RS0105710 | 1.34 | 0.05        | 1.34 | 0.02        | -1.07 | 0.08        | <b>2.44</b> | 0.00        | 1.04 |
| Other transferase                            | W826_RS0111400 | 1.24           | 0.35 | 1.13        | 0.62 | 1.40        | 0.24  | <b>2.07</b> | 0.03        | 1.21        | 0.46 |
|  | W826_RS0105525 | 1.02           | 0.84 | -1.05       | 0.33 | 1.64        | 0.00  | <b>2.05</b> | 0.00        | 1.27        | 0.00 |
|  | W826_RS0106280 | <b>2.72</b>    | 0.00 | 1.56        | 0.01 | <b>3.45</b> | 0.00  | <b>3.09</b> | 0.00        | <b>2.12</b> | 0.00 |
|  | W826_RS0101000 | 1.21           | 0.04 | 1.39        | 0.10 | 1.74        | 0.00  | <b>2.01</b> | 0.00        | 1.51        | 0.03 |
|  | W826_RS0113715 | -1.06          | 0.42 | -1.18       | 0.05 | 1.33        | 0.01  | <b>2.24</b> | 0.00        | 1.08        | 0.31 |
|  | W826_RS0111485 | -1.05          | 0.48 | -1.22       | 0.03 | 1.34        | 0.01  | <b>2.09</b> | 0.00        | 1.15        | 0.12 |
|  | W826_RS0110025 | 1.33           | 0.00 | 1.16        | 0.38 | 1.48        | 0.00  | <b>2.36</b> | 0.00        | 1.27        | 0.16 |
|  | W826_RS0107705 | 1.24           | 0.16 | -1.04       | 0.83 | 1.10        | 0.33  | <b>3.76</b> | 0.00        | 1.32        | 0.02 |
| Outer membrane channel protein               | W826_RS0110320 | <b>2.30</b>    | 0.00 | 1.24        | 0.10 | <b>7.15</b> | 0.00  | <b>2.33</b> | 0.00        | 1.01        | 0.92 |
|  | W826_RS0105410 | 1.50           | 0.00 | 1.20        | 0.22 | <b>3.61</b> | 0.00  | 1.89        | 0.00        | <b>3.23</b> | 0.00 |
|  | W826_RS0111955 | -1.02          | 0.78 | -1.22       | 0.15 | -1.27       | 0.01  | <b>2.32</b> | 0.00        | 1.11        | 0.13 |
| ATPase                                       | W826_RS0106065 | <b>2.11</b>    | 0.00 | <b>2.55</b> | 0.00 | <b>3.12</b> | 0.00  | <b>4.17</b> | 0.00        | <b>3.56</b> | 0.00 |
|  | W826_RS0107445 | 1.03           | 0.65 | -1.24       | 0.03 | 1.61        | 0.00  | <b>3.22</b> | 0.00        | 1.12        | 0.09 |
|  | W826_RS0113705 | 1.22           | 0.02 | 1.16        | 0.08 | 1.71        | 0.00  | <b>3.09</b> | 0.00        | 1.49        | 0.00 |
| Sodium:proton antiporter                     | W826_RS14450   | 1.29           | 0.24 | -1.00       | 1.00 | -1.38       | 0.19  | <b>2.64</b> | 0.01        | -1.02       | 0.91 |
| L-fucose:H <sup>+</sup> symporter permease   | W826_RS0106430 | 1.71           | 0.03 | 1.89        | 0.01 | <b>2.45</b> | 0.00  | <b>2.81</b> | 0.01        | 1.91        | 0.01 |
| Permease                                     | W826_RS0110330 | 1.90           | 0.01 | <b>2.29</b> | 0.01 | <b>2.22</b> | 0.00  | <b>2.83</b> | 0.00        | 1.97        | 0.01 |
| Ferrous iron transporter B                   | W826_RS0104890 | -1.03          | 0.75 | -1.27       | 0.23 | <b>3.06</b> | 0.00  | <b>6.65</b> | 0.00        | <b>2.21</b> | 0.00 |
| Low-affinity inorganic phosphate transporter | W826_RS14860   | 1.60           | 0.11 | 2.44        | 0.02 | -           | -     | -           | -           | -           | -    |
| Magnesium transporter                        | W826_RS0108895 | <b>2.24</b>    | 0.00 | 1.24        | 0.17 | 1.92        | 0.01  | 1.85        | 0.01        | 1.29        | 0.10 |

|  |                |             |      |             |      |             |      |             |      |             |      |
|--|----------------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| Multidrug resistance protein A         | W826_RS0102480 | <b>2.53</b> | 0.00 | <b>2.43</b> | 0.00 | <b>6.74</b> | 0.00 | <b>4.12</b> | 0.00 | <b>5.16</b> | 0.00 |
| Nicotinamide riboside transporter PnuC | W826_RS0101760 | 1.17        | 0.06 | 1.02        | 0.82 | <b>2.15</b> | 0.00 | -1.79       | 0.02 | 1.17        | 0.24 |
| Ammonium transporter                   | W826_RS0102275 | 1.55        | 0.01 | <b>2.04</b> | 0.01 | 1.08        | 0.34 | 1.55        | 0.07 | 1.22        | 0.36 |
| Cation transporter                     | W826_RS0112525 | 1.43        | 0.02 | 1.55        | 0.05 | 1.49        | 0.01 | <b>2.11</b> | 0.01 | 1.69        | 0.03 |

HMF: 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde

HBA: 4-Hydroxybenzaldehyde

FC: Foldchange

注：表达倍数的正负分别表示基因上调表达和基因下调表达。基因表达倍数发生 2 倍以上变化的显著上调和显著下调基因分别被加粗并标注红色或者绿色显示。

Note: The positive and negative fold changes indicate the up- and down- regulation of the genes, respectively. The genes with more than two-fold change of up- or down- regulation were marked in bold with red or green.

### 3.3.5 呋喃醛和酚醛类的转化与物质转运

显著差异表达基因的 GO 富集结果显示呋喃醛和酚醛抑制物除了引起细胞物质代谢过程相关基因的响应,还会影响物质转运过程。相关研究也曾报道减少抑制物等毒性物质的吸收以及将毒性物质主动排出细胞外的机制也是微生物应对毒性抑制物的常见机制<sup>[96, 183, 232]</sup>,而这种机制的运行需要转运系统的参与。

如表 3.2 所示,在呋喃醛和酚醛胁迫下共有 55 个转运蛋白编码基因显著差异上调表达,主要包括 ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白, MFS(Major facilitator superfamily)、RND(Resistance-nodulation-division)转运蛋白家族、糖基转移酶、氨基酸/核酸转移酶、外膜通道蛋白、ATP 酶、铜转运 P 型 ATP 酶、钠质子反向转运蛋白、L-岩藻糖同向透性酶、铁转运蛋白、低亲和力无机磷酸盐转运蛋白、镁转运蛋白、多药抗性蛋白、烟酰胺核糖转运蛋白、氨转运蛋白、阳离子转运蛋白等。其中,显著差异上调表达种类最多的为 ABC 转运体、MFS 转运体、RND 转运体以及各种转移酶,特别是 RND 转运蛋白在五种典型醛类抑制物中均显著差异上调表达,推测此类转运蛋白在呋喃醛和酚醛抑制物的转化过程中发挥重要作用。

在糠醛和 HMF 转化过程中共同显著差异上调表达的基因包括 2 个 ABC 转运体编码基因 *W826\_RS0108260* 和 *W826\_RS0108250*; 1 个 MFS 转运体编码基因 *W826\_RS0110310*; 3 个 RND 转运体编码基因 *W826\_RS010200*、*W826\_RS0102005* 和 *W826\_RS0101995*; 1 个 ATP 酶编码基因 *W826\_RS0106065*; 另外还有 1 个多药抗性蛋白编码基因 *W826\_RS0102480*。因而推测上述转运体在呋喃醛的转化中发挥了重要作用。

在至少两种酚醛转化过程中显著差异上调表达的基因包括 6 个 ABC 转运体编码基因 *W826\_RS0108260*、*W826\_RS0108250*、*W826\_RS0106070*、*W826\_RS0108255*、*W826\_RS0112005* 和 *W826\_RS0110185*; 2 个 MFS 转运体编码基因 *W826\_RS0110310* 和 *W826\_RS0102475*; 3 个 RND 转运体编码基因 *W826\_RS010200*、*W826\_RS0102005* 和 *W826\_RS0101995*; 2 个糖基转移酶编码基因 *W826\_RS0102665* 和 *W826\_RS0112625*; 1 个氨基转移酶编码基因 *W826\_RS0106285*; 1 个 CCA tRNA 核苷酸转移酶编码基因 *W826\_RS0106280*; 2 个跨膜通道蛋白编码基因 *W826\_RS0110320* 和 *W826\_RS0105410*; 1 个 ATP 酶编码基因 *W826\_RS0106065*; 1 个 L-岩藻糖: 质子同向透性酶编码基因 *W826\_RS0106430*; 1 个透性酶编码基因 *W826\_RS0110330*; 1 个铁转运蛋白编码基因 *W826\_RS0104890*; 1 个多药抗性蛋白编码基因 *W826\_RS0102480*。推测 ABC 转运体、MFS 转运体和 RND 转运体在 HBA、香草醛和丁香醛的转化过程中发挥了重要作用。

此外,上述一些转运体编码基因在多种呋喃醛和酚醛抑制物的转化过程中都显著差异上调表达了 2 倍以上,在五种醛类抑制物转化过程中上调的基因包括 1 个 ABC 转运体编码基因 *W826\_RS0108260* 在糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛转化过程中分别上调表达 2.16, 2.17, 2.37, 3.61 和 2.08 倍; 3 个 RND 转运体编码基因 *W826\_RS0102000* 上调 2.86, 2.65, 11.71, 9.65 和 8.43 倍, *W826\_RS0102005* 上调 3.66, 3.27, 17.85, 14.83 和 8.92 倍, *W826\_RS0101995* 上调 2.46, 2.06, 11.03, 7.85 和 7.77 倍; 1 个 ATP 酶编码

基因 *W826\_RS0106065* 上调 2.11, 2.55, 3.12, 4.17 和 3.56 倍; 1 个多药抗性蛋白编码基因 *W826\_RS0102480* 上调 2.53, 2.43, 6.74, 4.12 和 5.16 倍。在四种典型醛类抑制物的转化后也有一些转运体共同显著差异上调表达, 诸如 ABC 转运体编码基因 *W826\_RS0108250*, MFS 转运体编码基因 *W826\_RS0110310* 和糖基转移酶编码基因 *W826\_RS0106280* 等。这些在多种醛类抑制物转化过程中显著表达的转运蛋白可能对五种典型醛类抑制物的转化都十分重要。

### 3.4 本章小结

具有高抑制物耐受性的生物炼制发酵微生物 *G. oxydans* DSM 2003 能够将呋喃醛和酚醛抑制物转化为相应的醇和酸类产品。本章节研究利用 DNA 芯片技术, 考察了该菌株转化五种呋喃醛和酚醛抑制物过程的转录组, 解析了 *G. oxydans* DSM 2003 对五种典型醛类抑制物的生物脱毒机制。本章节研究的主要结论如下:

(1) 呋喃醛和酚醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的生长影响较大, 对其葡萄糖消耗和葡萄糖酸的生成的影响较低。该菌株可以将糠醛、HMF、HBA 和香草醛转化为相应的醇和酸类产品, 其中呋喃酸和酚酸是醛类抑制物的主要转化产物, 丁香醛仅能被转化为丁香醇。呋喃醛和酚醛抑制物转化至低毒的代谢产物的过程可以解除醛类抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 带来的生长延滞。

(2) 在 *G. oxydans* DSM 2003 转化呋喃醛和酚醛抑制物的转录组中, 分别有 142 个、171 个、306 个、1002 个和 161 个基因在糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛转化过程中显著差异表达, 主要涉及了 *G. oxydans* DSM 2003 中的物质代谢和转运等生物学过程。

(3) 多个显著差异上调表达的氧化还原酶编码基因参与了 *G. oxydans* DSM 2003 对呋喃醛和酚醛抑制物的降解转化反应。其中定位于细胞膜上的醇脱氢酶是呋喃醛和酚醛还原代谢过程中的关键酶, 定位于细胞膜上的醛还原酶是呋喃醛和酚醛产酸氧化代谢过程中的关键酶。一个 NADPH 依赖型的醌还原酶编码基因 *W826\_RS0100105* 和一个链烯还原酶编码基因 *W826\_RS0100830* 在多种呋喃醛和酚醛胁迫下均显著差异上调表达, 推测这两个基因参与了多种醛类抑制物的还原。

(4) 在五种典型呋喃醛和酚醛抑制物中, 仅香草醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖代谢途径中关键酶的转录水平影响较大, 香草醛可以引起 PPP 途径中关键酶编码基因的显著差异上调表达以及 ED 途径中关键酶编码基因的显著差异下调表达, 以促进香草醛的转化。

(5) *G. oxydans* DSM 2003 转化呋喃醛和酚醛过程中, 有多个转运蛋白的参与。其中, 1 个 ABC 转运体编码基因 *W826\_RS0108260*, 3 个 RND 转运体编码基因 *W826\_RS0102000*、*W826\_RS0102005* 和 *W826\_RS0101995*, 1 个 ATP 酶编码基因 *W826\_RS0106065* 以及 1 个多药抗性蛋白编码基因 *W826\_RS0102480* 在五种典型醛类抑制物的转化过程中均显著差异上调表达, 推测这些转运蛋白参与了五种典型醛类抑制物在胞内的转化过程。

## 第 4 章 谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 降解呋喃醛和酚醛的转录水平分析

### 4.1 引言

呋喃醛和酚醛类抑制物是限制木质纤维素高效生物炼制的两大类主要抑制物。应对木质纤维素来源抑制物的多种策略中,除了在发酵前将抑制物进行有效脱除外,在发酵过程中利用发酵微生物实现多种抑制物的降解转化是另外一种更为重要的抑制物应对策略。通过驯化、诱变或合理代谢工程改造的方式可以提升发酵微生物对抑制物的耐受能力,其中对发酵菌株进行理性改造是提高菌株对抑制物耐受性能的一种有效方法。基于微生物对抑制物的降解及耐受机理,筛选得到与抑制物耐受及降解相关的基因是实现菌株理性改造的关键所在。

目前,通过对发酵微生物菌株进行转录水平、蛋白水平或代谢水平分析已经为揭示抑制物耐受机理提供了大量的有用信息。发酵微生物对呋喃醛和酚醛两类抑制物的耐受机理具有相似性,主要涉及降解转化、抗氧化胁迫、转运及调控等方面<sup>[94]</sup>,降解转化是微生物对呋喃醛和酚醛类抑制物耐受机理中的关键。微生物对呋喃醛和酚醛的降解过程涉及到多种酶的参与,例如醇脱氢酶、醛/酮还原酶、醛还原酶、醛脱氢酶和氧化酶是 *A. resinae* ZN1 降解糠醛和 HMF 路径中的关键酶<sup>[74]</sup>;醇脱氢酶、醛还原酶、酰基醇脱氢酶、NADPH 依赖型甲基甘油醛还原酶、NADPH 依赖型氧化还原酶、硫还原蛋白过氧化物酶和甘油脱氢酶等在发酵微生物 *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* 和 *E. coli* 转化呋喃醛至呋喃醇的过程中发挥重要作用<sup>[73, 85, 86, 90, 233, 234]</sup>;腺苷酰硫酸还原酶、氢酶和黄酶在 *C. thermocellum* 转化糠醛中发挥作用<sup>[235]</sup>;硫氧还蛋白、FAD/NAD<sup>+</sup>依赖型氧化还原酶、吡啶核苷酸还原酶和 Fe-S 蛋白在 *T. pseudethanolicus* 39EATCC27405 还原糠醛的过程中发挥作用<sup>[236]</sup>。微生物对酚醛的降解转化机制也有少数报道,如醇脱氢酶、醛/酮还原酶、氧化还原酶和短链脱氢酶在 *Z. mobilis* ZM4 还原 4-羟基苯甲醛,香草醛和丁香醛产生相应的酚醇中发挥重要作用<sup>[45]</sup>;醛脱氢酶是 *P. putida* 氧化香草醛至香草酸中的关键酶<sup>[237]</sup>;酰基醇脱氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和黄酶参与了 *S. cerevisiae* 转化松柏醛的过程<sup>[112]</sup>。综上所述,微生物对呋喃醛和酚醛的降解转化机制相似,利用微生物中重要的氧化还原酶将呋喃醛和酚醛转化为低毒的代谢产物是关键步骤。

*C. glutamicum* 是一种生物素缺陷型的革兰氏阳性菌株,也是一类生长迅速的高 GC 含量的好氧土壤微生物,工业上广泛应用于生物基化学品如谷氨酸盐,赖氨酸,乙醇,异丙醇,乳酸和琥珀酸等的生产<sup>[238]</sup>。与 *E. coli*、*S. cerevisiae* 和 *Z. mobilis* 等发酵菌株主要通过还原醛类抑制物的机制不同,*C. glutamicum* 可以将醛类抑制物转化为醇和酸类产物,例如 Tsuge 等人<sup>[81, 82]</sup>曾报道 *C. glutamicum* ATCC13032 可以将糠醛转化为糠醇和糠酸,氧气对糠醛转化为糠酸有促进作用,NADPH-依赖型的锌-醇脱氢酶在 *C. glutamicum* 转化糠醛产生糠醇中发挥重要作用;Park 等人<sup>[72]</sup>通过基因芯片技术转录水平

分析 *C. glutamicum* 耐受糠醛机制, 发现糠醛对胞内葡萄糖代谢、物质转运、氧化压力应激及呼吸链等生物学过程都有影响, 其中也有大量的氧化还原酶的显著差异上调表达; Shen 等<sup>[95, 96, 99]</sup>报道过 *C. glutamicum* ATCC13032 能够将多种芳香族化合物如香草醛, 香草酸, 阿魏酸, 香豆酸和 4-羟基苯甲酸降解并同化进入菌体的中心碳代谢途径; 香草醛脱氢酶在 *C. glutamicum* ATCC13032 转化香草醛产生香草酸中至关重要<sup>[114]</sup>。

木质纤维素原料中存在的多种抑制物可能具有协同抑制作用, 挖掘对木质纤维素来源多种醛类抑制物降解转化过程中都能够起作用的关键基因, 对于构建高抑制物耐受生物炼制发酵微生物十分重要。本章节研究通过 qRT-PCR 定量技术, 解析生物炼制发酵微生物 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛的机理, 筛选与鉴定了参与呋喃醛和酚醛转化的关键酶, 并推测 *C. glutamicum* S9114 转化五种典型醛类抑制物的分子生物学代谢途径。为抑制物降解基因元器件库的构建以及适用于生物炼制的鲁棒稳定性发酵微生物的合理代谢工程改造提供了有价值的基因资源。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 实验菌株和试剂

本章节研究中使用及构建的菌株及质粒见表 4.1。

*C. glutamicum* S9114 购自上海工微所科技有限公司 (Shanghai Industrial Microbiology Institute Tech. Co., Ltd, SIIM, 中国, 上海), 编号为 SIIM B460, 于中国工业微生物菌种保藏管理中心保存的编号为 CICC 20935 的 *C. glutamicum* CICC 20935 同源。*C. glutamicum* S9114 全基因组序列在 GenBank 中的编号为 AFYA00000000<sup>[239]</sup>。质粒 pTRCmob 由孙际宾老师 (中国科学院天津工业生物技术研究所) 慷慨馈赠, 用于目的基因在 *C. glutamicum* 中的过表达。质粒 pEFTUmob 是通过将  $P_{eftu}$  启动子替换至  $P_{trc}$  启动子后所得表达质粒, 用于在 *C. glutamicum* 中的过表达。*E. coli* BL21 (DE3) 用于表达质粒的构建及筛选工作。

卡那霉素购自北京普博欣生物科技有限责任公司。RNA 提取使用的 Trizol (RNAiso Plus) 试剂购自日本 TAKARA 公司, 反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 及定量试剂盒 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 均购自日本 TOYOBO 公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacterial DNA Kit 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。质粒小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒等购自上海捷瑞生物工程有限公司。基因片段扩增使用 TAKARA Primer STAR Max DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。其他限制性内切酶及 T4 连接酶均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。无缝克隆试剂盒 HB-infusion<sup>TM</sup> 购自汉恒生物科技 (上海) 有限公司。其他相关试剂见附录 I。

表 4.1 本章节研究中使用到的菌株, 质粒及引物

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

| Strains                    | Genotype   | Sources/references |
|----------------------------|--|--------------------|
| <i>C. glutamicum</i> S9114 | Wild-type strain   | SIIM               |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)  | F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)   | Novagen            |
| Plasmids                   | Phenotype  | Sources/references |
| pTRCmob                    | <i>E. coli-C. glutamicum</i> shuttle cloning vector, <i>Km<sup>r</sup></i> , <i>P<sub>trc</sub></i> , <i>RP4-mob</i> region instead of <i>lacI<sup>a</sup></i> | [240]              |
| pEFTUmob                   | Insert a promoter <i>P<sub>eftu</sub></i> at the back of promoter <i>P<sub>trc</sub></i> in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS04750           | <i>CGS9114_RS04750</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | [82]               |
| pEFTUmob-RS00855           | <i>CGS9114_RS00855</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | [114]              |
| pEFTUmob-RS01115           | <i>CGS9114_RS01115</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS09375           | <i>CGS9114_RS09375</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS09725           | <i>CGS9114_RS09725</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS04340           | <i>CGS9114_RS04340</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS00260           | <i>CGS9114_RS00260</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS11975           | <i>CGS9114_RS11975</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS10340           | <i>CGS9114_RS10340</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS02715           | <i>CGS9114_RS02715</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS09230           | <i>CGS9114_RS09230</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS11565           | <i>CGS9114_RS11565</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| pEFTUmob-RS06005           | <i>CGS9114_RS06005</i> from <i>C. glutamicum</i> S9114 in pTRCmob  | This study         |
| Primers                    | Forward and reverse sequences  |                    |
| CGS9114_RS04750-F          | gtaccggggatcctctagaGTGAGTATCTCAGTAAAGCACTACA   |                    |
| CGS9114_RS04750-R          | ccaagcttgcctgcagCTAAACCGCTTCAACCTCAG   |                    |
| CGS9114_RS00855-F          | gtaccggggatcctctagaGTGACCACAACATTTTCTGGAA  |                    |
| CGS9114_RS00855-R          | ccaagcttgcctgcagTTAGCTGCGCTTGATGCC   |                    |

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| CGS9114_RS01115-F | GCTCTAGAAatgactgtgcagaattcacc                          |
| CGS9114_RS01115-R | AAA <u>ACTGCAG</u> Gttagacattttgagctcctggga            |
| CGS9114_RS09375-F | GCTCTAGAAatggtgtgccagagttgaatcg                        |
| CGS9114_RS09375-R | AAA <u>ACTGCAG</u> Gctagtgcgcgatgccgc                  |
| CGS9114_RS09725-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGCCACCAAAGTCGCC          |
| CGS9114_RS09725-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TCAGTCGCGGGGACG            |
| CGS9114_RS04340-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGTCTGATCAGCTATTAAGTATTGT |
| CGS9114_RS04340-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TAACCGTTGTAGACCTTGGG       |
| CGS9114_RS00260-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGACCACTGCTGCACCC         |
| CGS9114_RS00260-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TTAGTAGCGAATTGCCACAC       |
| CGS9114_RS11975-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGAGCAAGAAAATCCGCC        |
| CGS9114_RS11975-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TTAGTTACGCACCTCAAACCTTC    |
| CGS9114_RS10340-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> GTGACTCAGCAAGAACTTCGC      |
| CGS9114_RS10340-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TTAGTTTTGAACTGGTGCCAG      |
| CGS9114_RS02715-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGTTTCAATCTATTAATCCCACTAC |
| CGS9114_RS02715-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TTATGCTCCAATCGAAAAAGTT     |
| CGS9114_RS09230-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGGTCGCAGCGGCG            |
| CGS9114_RS09230-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> CTAGTACTTCAGCAACTCTGACACGA |
| CGS9114_RS11565-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGAAAAAGCATGCGATTATTATC   |
| CGS9114_RS11565-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TTAAATTTGGTGGCGAAACG       |
| CGS9114_RS06005-F | gtaccggggatcct <u>ctaga</u> ATGGTTTCCCGTAGGGGTT        |
| CGS9114_RS06005-R | ccaagcttgcagc <u>ctgcag</u> TTATAGAAGGAGTCCGGCACC      |

---

下划线表示限制性酶切位点。

The underlined letters indicate the restriction sites.

#### 4.2.2 培养基和菌株培养方法

*C. glutamicum* S9114 生长和发酵的培养基包括：(1) LB 琼脂培养基 (g/L)：酵母浸提物 5，蛋白胨 10，NaCl 5，琼脂 15；(2) 预培养培养基 (g/L)：葡萄糖 25，玉米浆 25， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5， $\text{MgSO}_4$  0.6，尿素 2.5， $\text{FeSO}_4$  0.002， $\text{MnSO}_4$  0.002；(3) 种子培养基 (g/L)：葡萄糖 25，玉米浆 5， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5， $\text{MgSO}_4$  0.6，尿素 2.5， $\text{FeSO}_4$  0.002， $\text{MnSO}_4$  0.002；(4) 发酵培养基 (g/L)：葡萄糖 60，玉米浆 0.5， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5， $\text{MgSO}_4$  0.6，尿素 2.5， $\text{FeSO}_4$  0.002， $\text{MnSO}_4$  0.002，所有的培养基均于 115 °C 灭菌 20 min。其中玉米浆配制 300 g/L 母液， $\text{MgSO}_4$  配制为 120 g/L 母液，115 °C 灭菌 20 min 后备用。 $\text{FeSO}_4$  和  $\text{MnSO}_4$  极易氧化，需现配现用，先制备成 200 mg/L 的母液，0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤后备用。

取 *C. glutamicum* S9114 甘油管，在 LB 固体平板划线 30 °C 倒置静置培养 36 h。挑取一个单菌落转接至含有 30 mL 预培养培养基的 250 mL 三角摇瓶中，30 °C，200 rpm，pH 7.0 培养 10 h。然后以 5% (v/v) 接种量转接至含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角摇瓶中，30 °C，200 rpm，pH 7.0 培养 8 h。培养好的种子液用于所有后续的发酶实验的接种。

*C. glutamicum* S9114 电转用培养基包括：(1) 感受态培养基 (g/L)： $\text{K}_2\text{HPO}_4$  17.4，NaCl 0.5，葡萄糖 5，蛋白胨 5，YE 1，柠檬酸三钠 0.3， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05，山梨醇 91.1，Tween 80 1.1，DL-苏氨酸 11.1，甘氨酸 35.9，pH 7.2；(2) SOC 培养基 (g/L)：蛋白胨 20，YE 5，NaCl 0.5，KCl 0.19， $\text{MgCl}_2$  0.95，葡萄糖 3.6。

*E. coli* 菌株在 LB 液体培养基中于 37 °C，200 rpm 过夜培养。依据需要添加终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡纳霉素。

#### 4.2.3 呋喃醛和酚醛抑制物的耐受和降解实验

*C. glutamicum* S9114 的抑制物耐受实验通过向发酵培养基中分别添加不同浓度梯度的醛类抑制物进行。以 5% (v/v) 接种量将种子液转接至含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角摇瓶中，其中发酵培养基按照实验要求事先添加不同浓度梯度的抑制物，于 30 °C，200 rpm，pH 7.0 培养，发酵过程的 pH 调节通过定时补加 20% (v/v) 尿素调节。发酵 36 h 时取 1 mL 样品 12,000 rpm 离心 5 min，沉淀和上清分别用于  $\text{OD}_{600}$  及谷氨酸的检测。不添加醛类抑制物的样品作为对照实验，所有实验均有两个重复。

*C. glutamicum* S9114 对五种典型醛类抑制物的降解实验通过向发酵培养基中分别添加 1.0 g/L 糠醛，0.7 g/L HMF，0.3 g/L HBA，0.2 g/L 香草醛或者 0.2 g/L 丁香醛。以 10% (v/v) 接种量将种子液转接至含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角摇瓶中，30 °C，200 rpm，pH 7.0 培养，发酵过程的 pH 调节通过定时补加 20% (v/v) 尿素调节。定期取样，用于抑制物浓度及产物浓度的检测。其中接种等量的无菌水替代种子液的培养基作为对照实验。所有的实验均有两个重复。

4.2.4 重组质粒构建

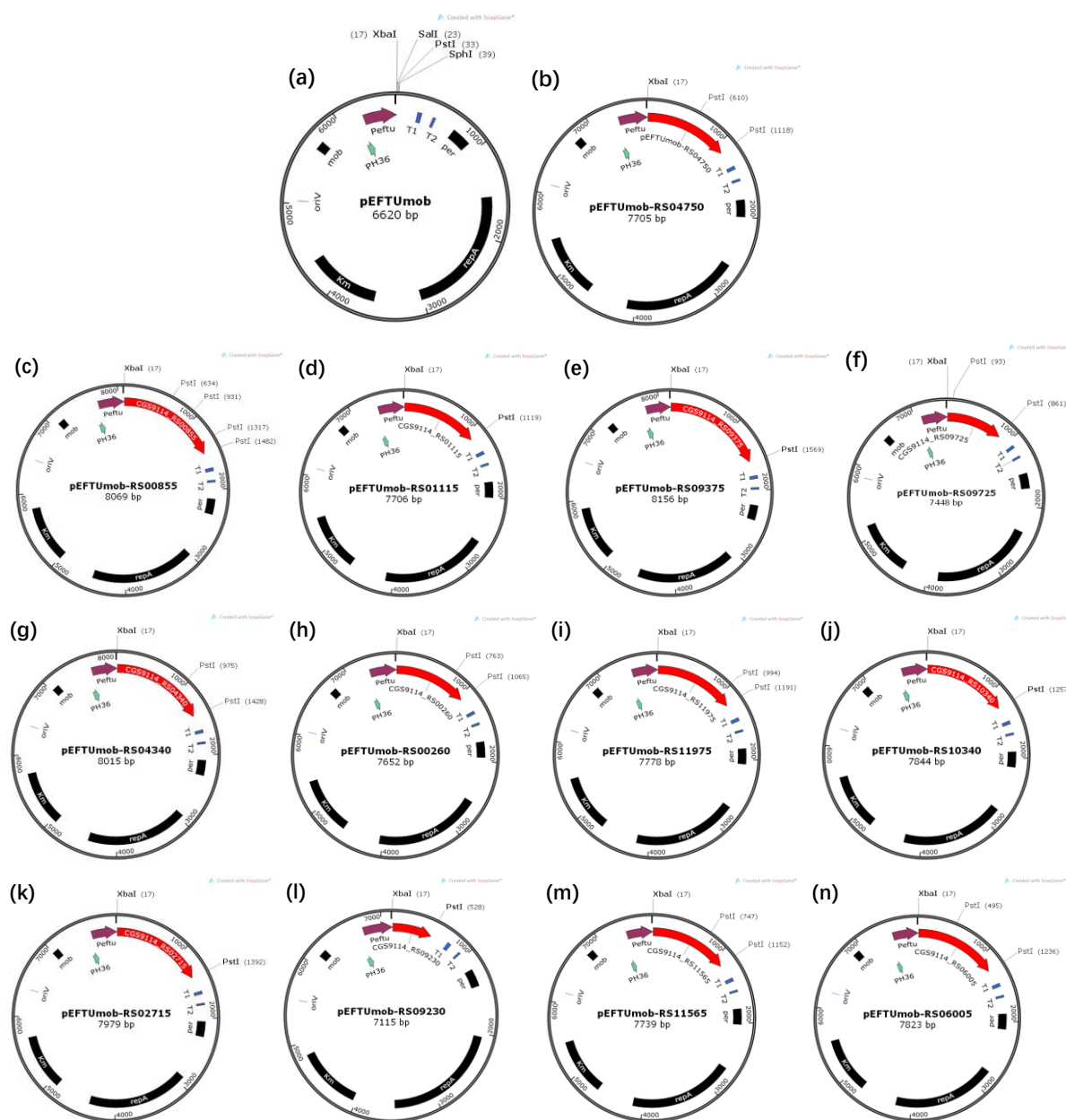


图 4.1 pEFTUmob 及其它含有醛类抑制物转化基因的表达质粒图谱

Fig. 4.1 pEFTUmob and other recombinant expression plasmids construction of the functional genes relating to the conversion of aldehyde inhibitors

- (a) pEFTUmob; (b) pEFTUmob-RS04750; (c) pEFTUmob-RS00855; (d) pEFTUmob-RS01115; (e) pEFTUmob-RS09375; (f) pEFTUmob-RS09725; (g) pEFTUmob-RS04340; (h) pEFTUmob-RS00260; (i) pEFTUmob-RS11975; (j) pEFTUmob-RS10340; (k) pEFTUmob-RS02715; (l) pEFTUmob-RS09230; (m) pEFTUmob-RS11565; (n) pEFTUmob-RS06005.

重组表达质粒的构建过程中，由于质粒 pEFTUmob 上可用的酶切位点较少，因此主要通过无缝连接的方式，将从 *C. glutamicum* S9114 基因组序列克隆的基因片段插入至利用 *Xba* I 和 *Pst* I 进行双酶切进行线性化处理质粒 pEFTUmob 中（图 4.1）。

#### 4.2.5 感受态制备和阳性克隆子的筛选

用枪头从 LB 固体培养基上挑取新鲜培养好的 *C. glutamicum* 单菌落接种于含有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 30 °C, 200 rpm 培养 12-16 h。然后取 1 mL 培养好的菌液转接至 50 mL 感受态培养基中, 30 °C, 200 rpm 培养 3-4 h 至微微浑浊, 检测 OD<sub>600</sub> 约 0.3 左右。将培养好的菌液转移至 50 mL 离心管中冰浴 15 min, 4 °C, 5,000 rpm 离心 10 min, 弃上清。向每支 50 mL 离心管加入 30 mL 预冷的 10% (w/w) 甘油重悬细胞, 4 °C, 5,000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 甘油重悬步骤重复两次。最后向每支 50 mL 离心管加入 600 μL 10% (w/w) 甘油重悬细胞, 以每管 90 μL 分装至 1.5 mL 离心管中, 现配现用为佳, 也可于 -80 °C 中保存备用。

取适量质粒与感受态细胞轻柔的混匀, 于冰浴静置 30 min。期间将预先洗干净并且在无水乙醇中浸泡 30 min 以上的直径 1 mm 的电转杯 (Bio-rad, 美国, Hercules) 置于超净台中, 开启通风、紫外灭菌 15 min。待电转杯中的乙醇挥发完全后, 将电转杯用一次性塑料手套密封好于冰浴中静置 30 min。然后将混合有质粒的感受态细胞转移至电转杯中, 立刻进行电转, 电转参数为 2,000 V, 25 μF, 200 Ω。电转完成后将混合液转移至含有 800 μL SOC 培养基的 1.5 mL 离心管中, 并立即于 46 °C 水浴 6 min, 然后于 30 °C, 100 rpm 培养 1.5-2 h。培养结束后离心浓缩菌体, 涂布于含卡那霉素 (50 μg/mL) 的固体 LB 平板中, 30 °C 培养 36 小时即可进行菌落 PCR 验证。

#### 4.2.6 重组菌株的抑制物转化性能分析

取保存在甘油管中的菌种涂布于 LB 或者 LK (含有 50 μg/mL 含卡那霉素) 平板培养基上, 30 °C 倒置培养 36 h。用枪头挑取新鲜活化后的单菌落于装有 5 mL 预培养培养基的试管中, 30 °C, 200 rpm 预培养 12 h; 以 5% (v/v) 接种量将预培养液转接入装有 10 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中, 30 °C, 200 rpm 培养 8 h; 用培养基调整每瓶菌种的 OD 至相同状态, 然后以 5% (v/v) 接种量将种子培养液转接入含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C, 200 rpm 进行发酵培养。发酵过程中每隔 4 h 或 8 h 添加适量 20% 的尿素, 维持培养基 pH 7.0 左右, 同时取 1 mL 上清, 保存于 -20 °C 用于后续培养液各组分含量测定。上述发酵实验进行至少两次生物学重复。

#### 4.2.7 分析方法

发酵过程中的细胞生长通过吸光度进行测定, 取 1 mL 发酵液, 12,000 rpm 离心 5 min, 吸取上清稀释后用 0.22 μm 滤膜过滤后于 -20 °C 保存, 用于后续利用生化分析仪或者高效液相色谱法测定葡萄糖及谷氨酸浓度测定。离心后的下层菌体中添加 1 mL 超纯水, 震荡使之成为菌悬液, 根据其浓度稀释不同倍数, 于 600 nm 处测定吸光度, 利用超纯水作为对照。细胞生长通过分光光度计 DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 测定。葡萄糖和谷氨酸的含量采用 SBA-40D 生物传感分析仪 (山东科学院) 测定。所有样品在分析前经适度稀释后使用 0.22 μm 滤膜过滤处理。

抑制物及其代谢产物的分析方法详见 3.2.4 部分。

#### 4.2.8 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验组为向种子培养基中分别添加 1.5 g/L 糠醛, 1.5 g/L HMF, 1.0 g/L HBA, 1.0 g/L 香草醛或者 0.1 g/L 丁香醛实现。没有添加抑制物的摇瓶作为对照实验, 其中两种呋喃醛处理的实验组培养 4 h 收集样品, 三种酚醛处理的实验组培养 8 h 时收集样品, 于 8,000 rpm 4 °C 离心 5 min, 尽量去除上清液, 然后将菌体液氮冷冻后保存于 -80 °C 备用。所有实验均有三个重复。

取于 -80 °C 中保存的菌体, 用液氮充分研磨后用 RNAiso Plus (Trizol, TAKARA, Otsu, Japan) 试剂进行 RNA 提取。RNA 的完整性通过凝胶电泳检测, RNA 的质量和浓度通过分光光度计 BioMate 3S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 测定。经质检合格的 RNA 使用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 进行反转录合成 cDNA, 10 倍稀释后保存于 -20 °C 冰箱。qRT-PCR 反应使用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 使用 Bio-Rad CFX 96 仪器 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 完成。PCR 反应以 16S rDNA 编码基因 *CGS9114\_RS11955* 作为内参基因, 以相同培养条件下不添加抑制物培养收集的菌体作为对照, 各基因转录水平经  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算得到<sup>[241]</sup>。定义差异表达倍数 Foldchange  $\geq 2.0$  为显著差异上调表达, Foldchange  $\leq 0.5$  为显著差异下调表达。

选取的降解相关基因的 PCR 扩增引物通过 Primer Premier 5 软件设计完成, 基因序列基于 *C. glutamicum* S9114 的全基因组序列信息。引物长度 17 bp 到 25 bp (表 4.2), 扩增片段长度 80 bp-180 bp。进行定量 PCR 反应前, 首先以经过梯度稀释的 Cdna 作为模板对各引物进行效率验证, 并保证各引物效率处于 90%-110% 之间。qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L 包含无菌水 6.4  $\mu$ L、2 X SYBR Green Mix 10  $\mu$ L、上下游引物各 0.8  $\mu$ L (4 mM)、10 X cDNA 模板 2  $\mu$ L。反应程序设置如下: 预变性 95 °C 60 s, 变性 95 °C 15 s, 退火 55 °C 15 s, 延伸 72 °C 30 s, 经 40 次循环后进行熔解曲线分析, 每 5 s 升温 0.5 °C, 由 65 °C 升至 95 °C 结束。所有的实验均有三个重复。

表 4.2 相关基因的 qRT-PCR 用引物序列汇总

Table 4.2 Primers sequence of the selected genes used for qRT-PCR

| Gene ID         | Functional annotation                | Primers sequence 5'-3'   |                         |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                 |                                      | Forward                  | Reverse                 |
| CGS9114_RS11955 | 16S ribosomal RNA                    | TGCAACGCGAAGAACCTTAC     | CTTAACCCAACATCTCACGACAC |
| <b>ADH (23)</b> |                                      |                          |                         |
| CGS9114_RS00260 | alcohol dehydrogenase                | CTGGATATGGCTCGACGTG      | CGCGTGCAAAGAAATCG       |
| CGS9114_RS03315 | alcohol dehydrogenase                | GATGCTCAGGACGTAGATGG     | CTGTGGCATGGGTTTGC       |
| CGS9114_RS04130 | alcohol dehydrogenase                | CCTGGTGAAACTGCTTGGC      | AGCCCTTGACGGTGATGTG     |
| CGS9114_RS04750 | alcohol dehydrogenase                | ACCGTTCTGTCCCGTTCC       | TTCACCGGCGTGCTCTT       |
| CGS9114_RS05970 | alcohol dehydrogenase                | CTCGCGTAGATGTTCCCTGC     | CACATAAGTTGGGAAATCACG   |
| CGS9114_RS08205 | alcohol dehydrogenase                | GGTACGGAAGCCACTTTCG      | CCAGGCGAGGGATGAAAT      |
| CGS9114_RS10690 | alcohol dehydrogenase                | CAGTGCTTAATACCGCCAACA    | TGCCACAATCTCCGAAGCT     |
| CGS9114_RS08420 | benzyl alcohol dehydrogenase         | CGGCAGCATCAAGGTCATC      | CGCATGTGGTCAAGGGAAA     |
| CGS9114_RS07530 | histidinol dehydrogenase             | GCGGAACACCTGGAAATCC      | AACGAGCGGATCCAGAGGT     |
| CGS9114_RS14190 | histidinol dehydrogenase             | GTACTAACCATGTATTGCCAACCC | GTGCCCTTCGAATCGTTCA     |
| CGS9114_RS10650 | mannitol 2-dehydrogenase             | TACCCGCTTCCGGGATT        | ACGGTGTCTTTGACTGCGG     |
| CGS9114_RS04010 | inositol 2-dehydrogenase             | GCTTACAAGGCAGAGCTCG      | TTGGCAGGGTTGAGGGT       |
| CGS9114_RS10375 | inositol 2-dehydrogenase             | TTTACCACCCGTTTCGC        | TCGCATGACAGTGCAACCA     |
| CGS9114_RS03960 | short-chain dehydrogenase            | CGCGTGGTCGATGTTTG        | CGTGATGCACCTTTCCT       |
| CGS9114_RS04100 | short-chain dehydrogenase            | CTGCGTTGGCAAAGAAAG       | TGAAGGGTTGGCAAATCG      |
| CGS9114_RS08335 | short-chain dehydrogenase            | GAAGAAGCCAACAACGGCA      | GCCAGCGTCAATCACGAAT     |
| CGS9114_RS09725 | short-chain dehydrogenase            | GATCTGAGGCGAACAGCAAC     | AAGCCGATGGCATAGCG       |
| CGS9114_RS11770 | short-chain dehydrogenase            | CCGGCGCTAACGTATTG        | CAGTGGGTGGACAAAGATGA    |
| CGS9114_RS01785 | 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase | CTCGTCGAAGAGCCATTGC      | AATCGGAACGATTCCCCTG     |
| CGS9114_RS08860 | 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase | CCACTGTGCCTGCCATTAA      | AGATCAAAACGCCCTGTG      |

|                                  |   |                        |                       |
|----------------------------------|---|------------------------|-----------------------|
| CGS9114_RS03435                  | shikimate 5-dehydrogenase                 | ACCGAGCCGACGTAATCTT    | GAACTGCTCTGCTGCCTGA   |
| CGS9114_RS05180                  | shikimate 5-dehydrogenase                 | ACCGCCTTTGATGTCAGCT    | ACGGCTTGGTGGATTGC     |
| CGS9114_RS06205                  | shikimate 5-dehydrogenase                 | TCGCACGAGCCAAAGGT      | TTCCAAAGCCTCACGCATA   |
| <b>AKR/ARI (3)</b>               |   |                        |                       |
| CGS9114_RS02805                  | aldo/keto reductase                       | CCCTGTCTGAGGGCATGTT    | TGCACTGGTCACGGTATCC   |
| CGS9114_RS06730                  | aldo/keto reductase                       | CTGCAGCCAAAGGATTAGG    | GATTGGTGTGGCAAAGTCA   |
| CGS9114_RS03785                  | malonic semialdehyde reductase            | TGCAGACGCTATCTCCAAG    | GAGGGTCTCGACAACCTCG   |
| <b>ALDH (17)</b>                 |   |                        |                       |
| CGS9114_RS00305                  | aldehyde dehydrogenase                    | CGGACCGCATGGAAGAG      | CCAGCAAAGTAGCGGAAGT   |
| CGS9114_RS00855                  | aldehyde dehydrogenase                    | GATTCCGGCATGGTTCACA    | GCCGATCCATCGATCTGTG   |
| CGS9114_RS01955                  | aldehyde dehydrogenase                    | GCACTAAAAGTCGCCCGTC    | CCGTATTCCACCCCCATAC   |
| CGS9114_RS04340                  | aldehyde dehydrogenase                    | ATAACCATGCCCGACCTGAC   | CCGTTGTAGACCTTGGGGAC  |
| CGS9114_RS04600                  | aldehyde dehydrogenase                    | AGGCAAAGGCACGGGATA     | GCACCGTTGGTTCGTAGAAG  |
| CGS9114_RS08210                  | aldehyde dehydrogenase                    | ACCGCTATATCCCCGATCC    | GGTTTCTTGGTAGGACGCG   |
| CGS9114_RS08415                  | aldehyde dehydrogenase                    | TTCGGTCTGTCTTCTGCGG    | ACCAAACATCACATGCGCC   |
| CGS9114_RS10695                  | aldehyde dehydrogenase                    | TACCGGCACTATCGGCATC    | ATAATGTGCCAAGCCCTCG   |
| CGS9114_RS10725                  | aldehyde dehydrogenase                    | AGCCGACTCCAACAGTCAG    | CCTTTGTCCAAGCCTTCC    |
| CGS9114_RS12030                  | aldehyde dehydrogenase                    | AATTCCAGAGGCCTACTACGTT | GTGCGATTGCTTCTTCCAAAG |
| CGS9114_RS00655                  | succinate-semialdehyde dehydrogenase      | CTGTGCGGTGGCAAGTCAC    | TCCGTGAGCAGTGGGGTG    |
| CGS9114_RS01580                  | succinate-semialdehyde dehydrogenase      | CGCCTTATCATCGGTGGG     | ATCCGAGACTGTGCAGGGAC  |
| CGS9114_RS02715                  | succinate-semialdehyde dehydrogenase      | ATTGGTCCCATGGCTAGGG    | TGCGTGCCCTTTTTCTACG   |
| CGS9114_RS05600                  | aspartate-semialdehyde dehydrogenase      | TACAACGTGCTGCCATTCC    | TCTGGGAGGCCGAGAATCT   |
| CGS9114_RS10395                  | methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase | CTACGCTTATCGACGACATCC  | ATGCGACACGAACGACAGA   |
| CGS9114_RS06410                  | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  | ACTCCGAAGAGCCACTGGTT   | CCACTCGTTGTCTGACCAGG  |
| CGS9114_RS09335                  | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  | CTGGTGCTTTACGTGTGGTA   | CTATAGTACGGCTGGCTGCT  |
| <b>Other oxidoreductase (37)</b> |   |                        |                       |
| CGS9114_RS04585                  | heme peroxidase superfamily protein       | GGAGTGAAAGCAGACCGAATG  | CCTGATTGAAACCGCCAGA   |

|                 |                              |                         |                         |
|-----------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| CGS9114_RS09375 | multicopper oxidase          | CCAACGACAACCTCCGACTG    | GCCAAATTCCACGGCTAA      |
| CGS9114_RS14080 | thiol peroxidase             | ATCCGCATTCCGTTCCA       | AGCGTCGTAATCAGGTTTCAGT  |
| CGS9114_RS01595 | FAD-dependent oxidoreductase | AACACGGACCAAGTTCCTACA   | CGACTTCTGCTTCTGCGAA     |
| CGS9114_RS02640 | FAD-dependent oxidoreductase | TATCTGGGCGACTGGGTTT     | ATCATGCCAAACACCCCG      |
| CGS9114_RS12040 | FAD-dependent oxidoreductase | CCAACCGTGGTGAGATCAA     | TGTGGGGTAATGCCAATCA     |
| CGS9114_RS01515 | FAD-linked oxidoreductase    | TCGTAAAGCATGGCAACTCG    | GCCAGCCACATTTGACACC     |
| CGS9114_RS08560 | flavin oxidoreductase        | CAAAAAAGCACGCCTTACCC    | AGCTGACCAATGCGGAGAGT    |
| CGS9114_RS01005 | oxidoreductase               | ACAACCGCGAACCCTTAT      | CAGGGATACAGGCAGATGG     |
| CGS9114_RS01385 | oxidoreductase               | CAAACAGGGCAGCGGTCTT     | GCACACTCTTCCACGGCAA     |
| CGS9114_RS01830 | oxidoreductase               | GCTTCGACGCAGCAGATGT     | CAGATGCCGAGACCAAGGA     |
| CGS9114_RS03915 | oxidoreductase               | ATTCCTGACTCGATGCCACTG   | TCGACTGCATCCACACCCA     |
| CGS9114_RS03935 | oxidoreductase               | CGATTACATACGGCGGATCT    | GCGATCATCCTGTGGGTTT     |
| CGS9114_RS06280 | oxidoreductase               | GAAGAGTTAGCCTTAGCATCCC  | AATCGGCGAGTTGTTTCGTA    |
| CGS9114_RS08040 | oxidoreductase               | AGGGATTGATGTTATCGCGAAAA | GCTTTTTGTTCCTCACGCTTTCT |
| CGS9114_RS08080 | oxidoreductase               | CGATTCTGTCTGCGTTCC      | CAAGTTGTGCACGATGCGA     |
| CGS9114_RS11565 | oxidoreductase               | ACCTGGGATGGGTTGGA       | TCGCACACATCAAGAGTGG     |
| CGS9114_RS14460 | oxidoreductase               | CTTGACTCAGGCGTGGTCA     | TGACGTCCACGCTGTAGGT     |
| CGS9114_RS14735 | oxidoreductase               | TTTGACCGGAAAGTACACCT    | CAACTCATCGGCAACAGC      |
| CGS9114_RS15020 | oxidoreductase               | GAGAACTTCGCGGTCTTCG     | GGATCTCGATTCCGAAGGAC    |
| CGS9114_RS01975 | dehydrogenase                | GCAGAAACGTACGGTGTCGA    | CATCAACGATGAGCGTTTGC    |
| CGS9114_RS02100 | dehydrogenase                | TATGACCGCCTGACAATCC     | GCGATCAGCGATGGAGTAT     |
| CGS9114_RS04000 | dehydrogenase                | TGAATCCCGTCAAGGATGG     | TGTGCGGAAGTTGCTGATG     |
| CGS9114_RS04015 | dehydrogenase                | ACAACGGCGACCCAGAA       | CCTGCACCGTTGTAACGAG     |
| CGS9114_RS04770 | dehydrogenase                | TCATCAATGGTCGTAGTCTTCA  | TTCACTTTTTCTCATCCCA     |
| CGS9114_RS05810 | dehydrogenase                | CTCAGGATGTTGCGGGACT     | TGCTGGCTCTGGGTGCT       |
| CGS9114_RS05980 | dehydrogenase                | ATTCGTGGTAGCTGAGCCA     | GACGCCCTTCGCCTTAT       |
| CGS9114_RS07570 | dehydrogenase                | TCCAGAAGCTGCTGGCACT     | CCGCGAACGTCATAACCATA    |

---

|                 |                                 |                      |                      |
|-----------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| CGS9114_RS07680 | dehydrogenase                   | GCGATGGCATTCTGGGTAA  | CGCCAACCTCAACAGGGTGA |
| CGS9114_RS09125 | dehydrogenase                   | GTGTTTGTCAACGGCCTGG  | CTGCGCCATGCGTTCTT    |
| CGS9114_RS10340 | dehydrogenase                   | CCGATGAATACGAAGCAGTG | GTTGCGGAAATCAAAGAGC  |
| CGS9114_RS10360 | dehydrogenase                   | TTTCTGCCAGCAAGATTGA  | CATTGATGGGTCTGAAGTCC |
| CGS9114_RS11970 | dehydrogenase                   | GCATACATCCGCCACGAGT  | GCGTTTTTCGCAGTCGAGTT |
| CGS9114_RS11975 | dehydrogenase                   | TCCACGCACTTGTGTCCTT  | GGCGTGAGATGGTGACCTT  |
| CGS9114_RS01015 | FAD-binding dehydrogenase       | GCCAACGGCTACTACGACT  | CCAAGTATCCAGAACGCAAG |
| CGS9114_RS05340 | 2,5-dioxovalerate dehydrogenase | CCCTGGTGGTGCATTATGA  | CCAGCCGCCATAAAGAACA  |
| CGS9114_RS03195 | homoserine dehydrogenase        | GCCGCACGAAACAAGGT    | GTCTCACCGAAATCAGCGA  |

---

**Hypothetical protein (13)**

|                 |                      |                       |                      |
|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| CGS9114_RS06880 | hypothetical protein | CGTTTTCTCGATTGCTGG    | CGCAATAATCAATCGCACG  |
| CGS9114_RS08025 | hypothetical protein | CGGCGGAGATAAAGAACG    | TGCTTTGGAAGGCTCGC    |
| CGS9114_RS08410 | hypothetical protein | TCGCTGATGGACGAGTGC    | TCAGGTTGCTTTGACGACGT |
| CGS9114_RS10460 | hypothetical protein | AGATGTCCAAGATTCCGTGTC | AAGCTGTGCTTTCAGCTCC  |
| CGS9114_RS14900 | hypothetical protein | CGGTTGAGTTGGCAGCAGA   | AAGCGGGATGTCGAAGGAA  |
| CGS9114_RS11870 | hypothetical protein | TGGGTGCTACCGTTGCTAT   | TGGGTGTAGAGGACATCCG  |
| CGS9114_RS08150 | hypothetical protein | CACCTATGAGTCTTGCTCCG  | TAAACCCAGCCCATAACAGG |
| CGS9114_RS00320 | hypothetical protein | CACGCCTTCACTTCTTCGT   | GGTTGGGATGCTTCGGTA   |
| CGS9114_RS06005 | hypothetical protein | ATCACGCCCATCCAACAAC   | TCCCGAGATGAATCATTCCG |
| CGS9114_RS01115 | hypothetical protein | TCTCGCAACTCCCAAACCT   | ATGGCGATCTTTCCAACACC |
| CGS9114_RS06455 | hypothetical protein | ACCTCGGTGGATTTGGC     | GCCAGCAGTGGAGTACCAA  |
| CGS9114_RS08880 | hypothetical protein | GGCAAGATGAAGCCTTCTG   | GGGTGGCTATCAGGAAGTG  |
| CGS9114_RS09230 | hypothetical protein | CGCCCAGTTTTCACTGTC    | CGAATGGCAGATGAGGCAT  |

---

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 *C. glutamicum* S9114 对呋喃醛和酚醛类抑制物的耐受和降解

选取五种典型的木质纤维素来源的醛类抑制物：糠醛，HMF，HBA，香草醛和丁香醛。分别添加不同浓度梯度抑制物至发酵培养基中考察 *C. glutamicum* S9114 的抑制物耐受能力。抑制物添加浓度梯度的选择依据真实木质纤维素水解液中的含量设定<sup>[27]</sup>。

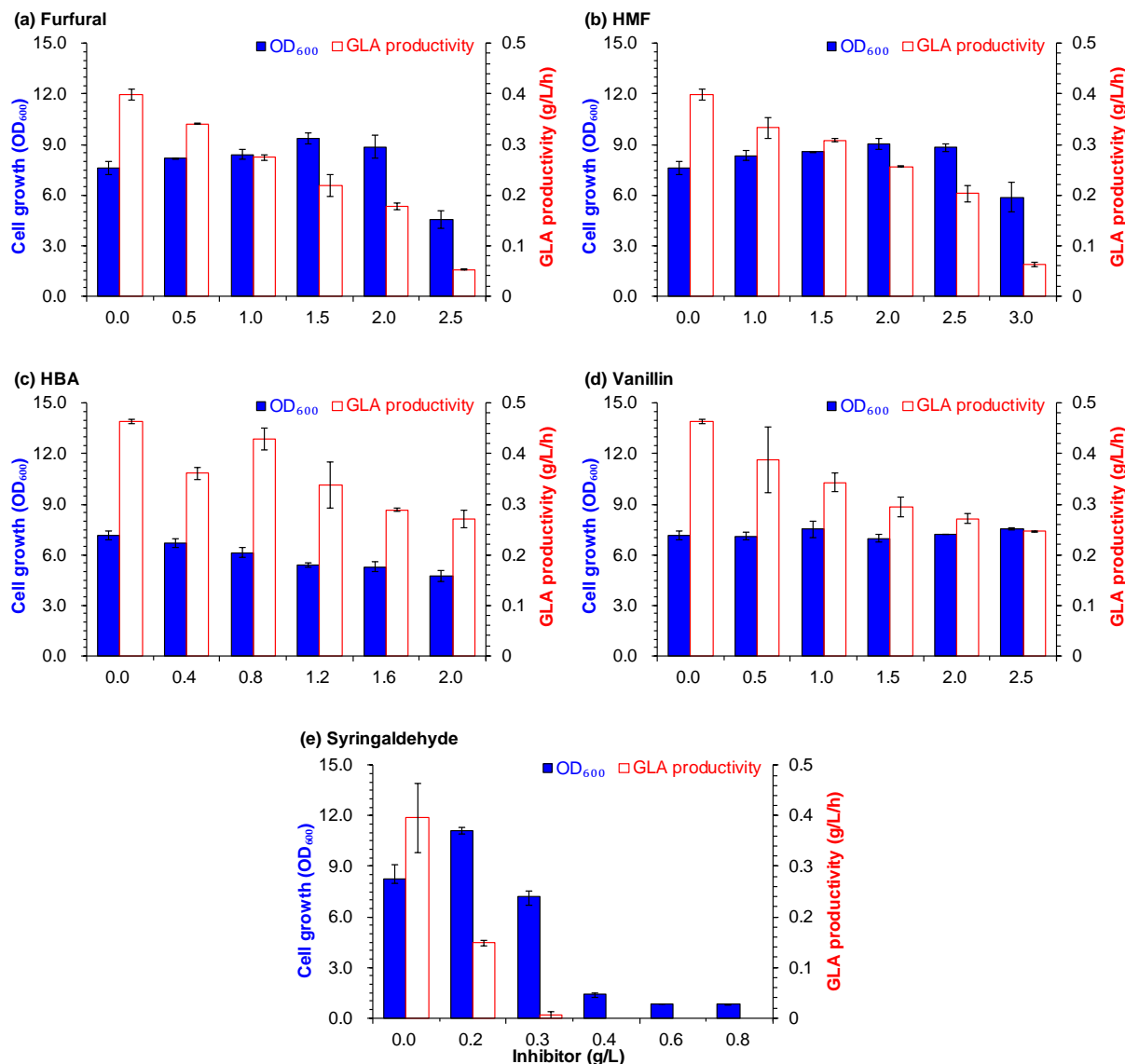


图 4.2 单一呋喃醛或酚醛对 *C. glutamicum* S9114 的生长和谷氨酸生成速率的影响

(a) 糠醛；(b) 5-羟甲基糠醛；(c) 4-羟基苯甲醛；(d) 香草醛；(e) 丁香醛。GLA 表示谷氨酸。发酵条件为：30 °C，200 rpm，pH 7.0，5% (v/v) 接种量，30 mL 合成培养基/250 mL 摇瓶，发酵 36 h。

Fig. 4.2 Effects of individual furan aldehyde or phenolic aldehyde on cell growth and glutamic acid productivity of *C. glutamicum* S9114

(a) Furfural; (b) HMF; (c) HBA; (d) vanillin; (e) syringaldehyde. GLA indicates glutamic acid. Conditions: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 5% (v/v) of inoculation ratio, 30 mL synthetic medium/250 mL flask, 36 h.

图 4.2a-b 结果显示，在两种呋喃醛抑制物胁迫下，*C. glutamicum* S9114 对糠醛和

HMF 表现出很强的耐受能力, 直到抑制物浓度达到 2.0 g/L 糠醛或者 2.5 g/L HMF 时, 菌体生长依然没有受到抑制作用。但是谷氨酸的产率则随着抑制物浓度的增加逐渐降低, 在 2.0 g/L 糠醛或者 2.5 g/L HMF 时, 谷氨酸产率分别降低 54.4%和 47.5%。图 4.2c-d 结果显示, 在香草醛和 HBA 胁迫下, *C. glutamicum* S9114 的生长在 2.0 g/L HBA 的作用下降低 34.0%, 在 2.5 g/L 香草醛的胁迫下生长基本不受影。而谷氨酸的生产速率则随着 HBA 和香草醛的抑制物浓度的增加逐渐降低, 2.0 g/L HBA 和 2.5 g/L 香草醛胁迫下分别降低了 40.7%和 45.4%。图 4.2e 结果显示, 丁香醛严重抑制了 *C. glutamicum* S9114 的细胞生长和谷氨酸的生成, 对该菌株来说, 丁香醛是五种醛类中毒性最强的抑制物, 0.4 g/L 丁香醛几乎可以完全抑制菌体的生长, 0.3 g/L 丁香醛可以完全抑制谷氨酸的生成。此外, 从图 4.2 得到, 与不添加抑制物的对照组中的菌体生长量相比, 一定抑制物添加量条件下的实验组中的微生物的生长量反而较高。推测其原因可能与发酵的取样时间点相关, 处理组和实验组经过相同的发酵时间 (36 h), 抑制物添加量越低的实验组中的微生物越早进入生长衰亡期 (OD 值略有下降), 因此经过 36 h 的生长与发酵, 一定抑制物添加量的实验组中检测到的微生物的 OD 值与对照组相比反而略有增加。抑制物对 *C. glutamicum* S9114 的生长和谷氨酸的生成的影响对比得到, 在每种抑制物实验范围内的最高浓度条件胁迫下 (2.5 g/L 糠醛, 3.0 g/L HMF, 2.0 g/L HBA, 2.5 g/L 香草醛或者 0.3 g/L 丁香醛), 虽然谷氨酸生产速率分别被抑制了 87.0%, 84.3%, 39.5%, 47.0%或 96.3%, 细胞生长量仅仅分别被抑制了 42.5%, 24.0%, 41.6%, 0%或者 37.5%, 因此木质纤维素来源的五种典型醛类抑制物对于 *C. glutamicum* S9114 的谷氨酸生产速率的抑制高于对菌体生长的影响。

*C. glutamicum* S9114 对五种醛类抑制物的降解实验也是通过向发酵培养基添加特定浓度的抑制物后进行, 选择的抑制物的浓度均高于 25% (w/w) 固含量的新鲜玉米秸秆水解液中的实际抑制物的含量<sup>[27]</sup>。图 4.3a-b 抑制物降解结果显示, 1.0 g/L 糠醛和 0.7 g/L HMF 分别在 6 h, 4 h 彻底降解完, 在降解过程中随着两种醛的快速降解, 糠醇和 5-羟甲基糠醇迅速生成, 当醛类抑制物降解完全时, 醇类产量达到最高, 随后醇继续降解, 糠酸和 5-羟甲基糠酸逐渐生成并随着时间的进行逐渐积累。在整个呋喃醛的转化过程中, 产生的呋喃醇与呋喃醛的摩尔量基本与减少的醛的摩尔量一致, 因此推测在 *C. glutamicum* S9114 中, 糠酸和 5-羟甲基糠酸可能是糠醛和 HMF 的最终降解产物, 并没有实现终极降解。与两种呋喃醛的降解过程相似, 图 4.3c-e 酚醛的降解现象结果显示, 0.3 g/L HBA, 0.2 g/L 香草醛和 0.2 g/L 丁香醛分别在 12 h, 6 h 和 12 h 后完全降解, 酚醛首先快速转化为酚醇, 醛类降解完时醇类产物的量达到最高, 再继续转化为酚酸类产物, 醇类降解完时, 酸类的产量达到最高峰。但是, 与两种呋喃醛的降解现象不同的是, 4-羟基苯甲酸和香草酸可以继续降解, 可能通过 CoA 依赖型的 $\beta$ -氧化脱乙酰路径在 *C. glutamicum* S9114 中继续代谢实现终极降解<sup>[242]</sup>。此外, 由于丁香醇的大量降解后仅有少量的丁香酸生成, 意味着丁香酸可能会通过相似的代谢路径被 *C. glutamicum* S9114 同化 (图 4.3e)。

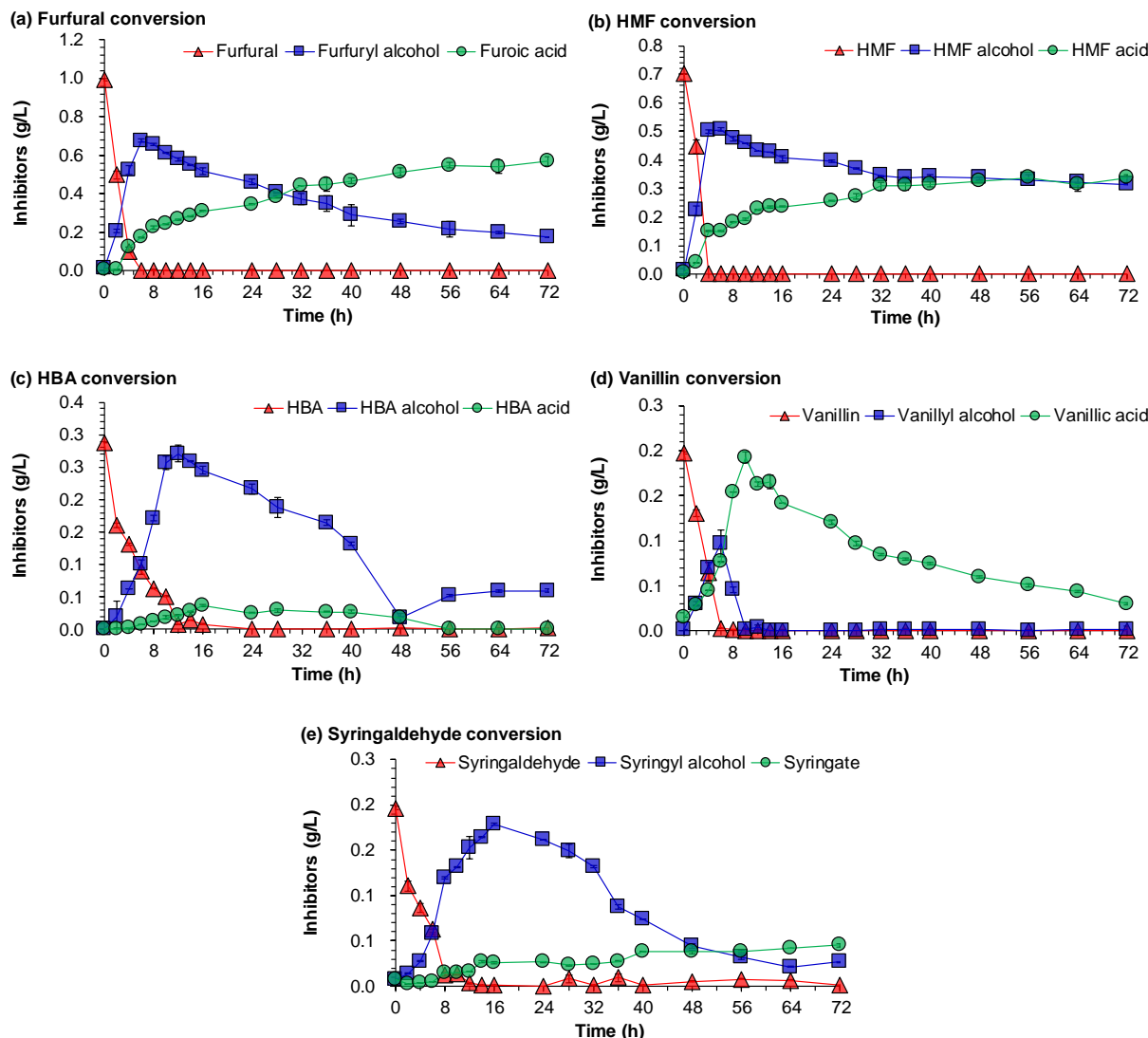


图 4.3 *C. glutamicum* S9114 对呋喃醛和酚醛的降解

(a) 糠醛 1.0 g/L; (b) 5-羟甲基糠醛 0.7 g/L; (c) 4-羟基苯甲醛 0.3 g/L; (d) 香草醛 0.2 g/L; (e) 丁香醛 0.2 g/L。发酵条件: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 10% (v/v) 接种量, 30 mL 合成培养基/250 mL 摇瓶。

Fig. 4.3 Degradation of furan and phenolic aldehyde inhibitors in *C. glutamicum* S9114 (a) Furfural 1.0 g/L, (b) HMF 0.7 g/L, (c) 4-hydroxybenzaldehyde 0.3 g/L, (d) vanillin 0.2 g/L, (e) syringaldehyde 0.2 g/L. Conditions: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 10% (v/v) of inoculation ratio, 30 mL synthetic medium/250 mL flask.

以上结果显示, *C. glutamicum* S9114 对木质纤维素来源的主要典型醛类抑制物呋喃醛和酚醛显示出较强的耐受能力, 可以通过将相关醛类物质快速转化为相应低毒的醇和酸类产物降低醛类抑制物带来的胁迫作用。其中, 三种酚醛可能都会被 *C. glutamicum* S9114 完全同化。*C. glutamicum* S9114 对呋喃醛和酚醛的降解现象与许多微生物的抑制物降解转化现象相似, 例如专司生物脱毒的菌株 *C. basilensis* HMF14 和 *A. resinae* ZN1, 以及一些可以降解抑制物的发酵微生物如 *T. cutaneum* 等<sup>[27, 74, 77]</sup>。

4.3.2 呋喃醛和酚醛胁迫下 *C. glutamicum* S9114 的 qRT-PCR 定量分析

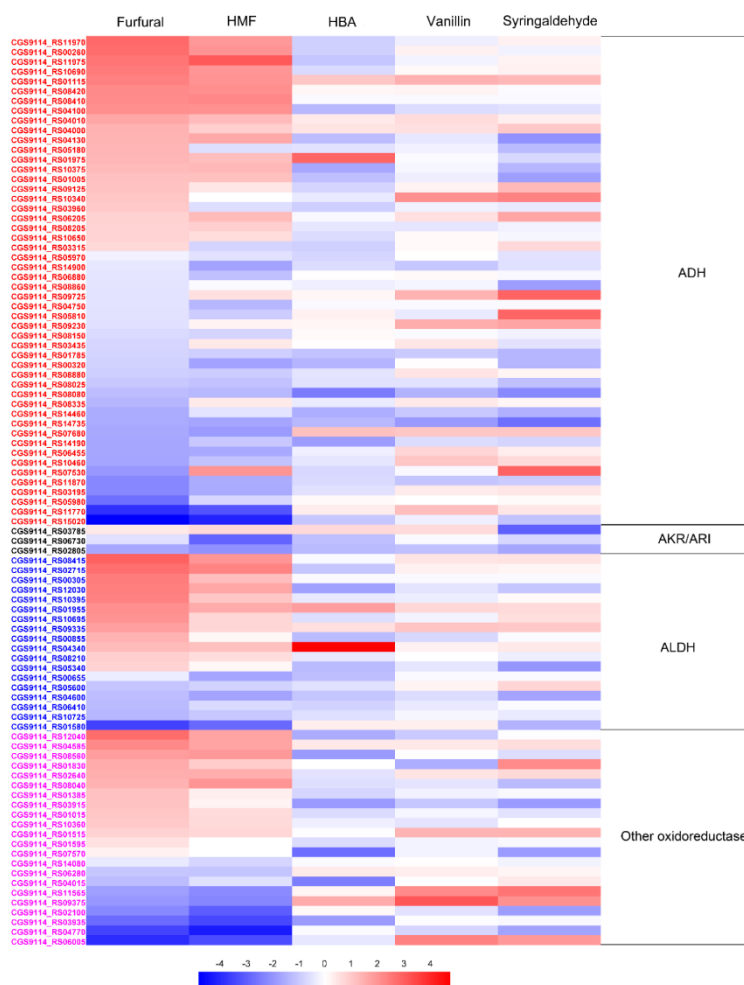


图 4.4 *C. glutamicum* S9114 在醛类胁迫下的基因转录水平响应情况

定量表达水平是与未添加醛类抑制物的对照相比得到的原始数据经过 log<sub>2</sub> 转化后的结果。红色表示差异上调表达，蓝色表示差异下调表达，图底部的色条显示了颜色对应的差异表达倍数。HMF 表示 5-羟基苯甲醛，HBA 表示 4-羟基苯甲醛。

Fig. 4.4 Comparison of transcription levels for selected relevant genes in *C. glutamicum* S9114 in response to aldehyde inhibitors

Quantitative expression level is log<sub>2</sub> transformed from raw fold changes against that without aldehyde addition sample. Red indicates up-regulated expression and blue for down-regulated expression as indicated by a color bar at the figure bottom. HMF, 5-hydroxymethylfurfural. HBA, 4-Hydroxybenzaldehyde.

氧化还原酶在醛类抑制物的降解过程中发挥着至关重要的作用，可以将醛类抑制物转化为毒性较弱的醇或酸类代谢产物。相关文献报道如醇脱氢酶，醛酮还原酶，醛还原酶等可以将呋喃醛或酚醛转化为相对应的呋喃醇或酚醇，醛脱氢酶或醛氧化酶可以将呋喃醛或酚醛转化为呋喃酸或酚酸<sup>[45, 74, 233, 234, 243, 244]</sup>。因而推测对抑制物具有强耐受和降解能力的 *C. glutamicum* S9114 中也存在一些氧化还原酶类在抑制物降解中发挥重要作用。为了挖掘来源于 *C. glutamicum* S9114 中的具备转化抑制物能力的氧化还原酶，依据 *C. glutamicum* S9114 的全基因组 (GenBank: AFYA00000000) <sup>[239]</sup> 注释选择了 80 个可能

参与抑制物转化的氧化还原酶，依据 Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) 分析出 13 个未知功能蛋白编码基因，然后通过 qRT-PCR 的方法考察选取的这些潜在基因在每种醛类抑制物的胁迫下的转录水平变化情况。93 个基因包括 50 个 NAD(P)H-或 NAD(P)-依赖型的醇脱氢酶 (ADH)，3 个醛酮还原酶/醛还原酶 (AKR/ARI)，18 个醛脱氢酶 (ALDH) 以及 22 个未明确注释的氧化还原酶 (表 4.2)。其中 ADH, AKR/ARI 是假定负责呋喃醛和酚醛与呋喃醇和酚醇之间可逆反应的酶，ALDH 是假定负责呋喃醛和酚醛氧化为相应的呋喃酸和酚酸的关键酶。93 个基因分别单一醛类抑制物胁迫下的转录水平变化的 qRT-PCR 结果如图 4.4 所示。

在呋喃醛胁迫下的 qRT-PCR 结果显示 (图 4.4)，在糠醛胁迫下，共有 18 个 ADH 编码基因，10 个 ALDH 编码基因和 10 个其它氧化还原酶编码基因显著差异表达上调 2 倍以上，有 26 个基因显著差异下调表达。在 HMF 胁迫下，共有 17 个 ADH 编码基因，7 个 ALDH 编码基因和 6 个其它氧化还原酶编码基因显著差异表达上调 2 倍以上，有 25 个基因显著差异下调表达。从表 4.3 可以得出，共有 14 个 ADH 编码基因，7 个 ALDH 编码基因和 6 个其它氧化还原酶编码基因在糠醛和 HMF 胁迫下都显著差异表达上调 2 倍以上。这表明由于糠醛和 HMF 在结构间具有相似性，糠醛和 HMF 可能会引起 *C. glutamicum* S9114 中相似的基因转化糠醛和 HMF 至相应的醇和酸。

在酚醛胁迫下的 qRT-PCR 结果显示 (图 4.4)，在 HBA 胁迫下，共有 3 个 ADH 编码基因，2 个 ALDH 编码基因和 1 个其它氧化还原酶编码基因显著差异表达上调 2 倍以上，有 22 个基因显著差异下调表达。在香草醛胁迫下，共有 7 个 ADH 编码基因，1 个 ALDH 编码基因和 4 个其它氧化还原酶编码基因显著差异表达上调 2 倍以上，有 4 个基因显著差异下调表达。在丁香醛胁迫下，共有 10 个 ADH 编码基因，1 个 ALDH 编码基因和 5 个其它氧化还原酶编码基因显著差异表达上调 2 倍以上，有 22 个基因显著差异下调表达。从表 4.4 可以得出，在酚醛胁迫下显著差异上调表达的基因中，共有 5 个 ADH 编码基因，1 个 ALDH 编码基因和 4 个其它氧化还原酶编码基因在至少两种酚醛胁迫下显著差异表达上调 2 倍以上。

从上述 qRT-PCR 研究结果得出，在呋喃醛和酚醛胁迫下引起的显著差异表达的基因是明显不同的，酚醛胁迫下显著差异表达的基因数目明显少于呋喃醛胁迫下基因的响应，这与 *C. glutamicum* S9114 转化酚醛的速率明显低于转化呋喃醛是一致的，推测在 *C. glutamicum* S9114 中负责酚醛转化的相关基因编码的酶的酶活不如负责呋喃醛转化的相关酶的活性高。若要提升转化酚醛的能力，需要提升酚醛转化基因在 *C. glutamicum* S9114 中的表达水平。有 2 个 ADH 编码基因 *CGS9114\_RS00260* 和 *CGS9114\_RS11970*，一个 ALDH 编码基因 *CGS9114\_RS00305* 仅在两种呋喃醛下显著差异上调表达，说明这两个基因可能是呋喃醛转化路径中的特异性的基因。一个多铜氧化酶编码基因 *CGS9114\_RS09375* 仅在三种酚醛下显著差异上调表达。通过 NCBI 中的 CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>) 蛋白同源性比对结果显示，多铜氧化酶与 *E. coli* 中的 CueO 相

似, CueO 的结构域与漆酶、L-抗坏血酸氧化酶相关<sup>[245]</sup>。相关报道证明漆酶在 *Daedalea quercina*, *Trametes villosa*, *Trametes hirsute* 和 *Perenniporia tephropora* 中以氧气作为电子受体时可以氧化香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲酸<sup>[246-249]</sup>。该结果表明, *C. glutamicum* S9114 中酚醛的转化可能需要氧气的参与。推测将多铜氧化酶在微生物中进行高水平表达时可以减少或者替代细胞中 NAD(P)-依赖型的氧化还原酶の利用, 降低细胞中用于抑制物降解转化过程的氧化还原力的消耗。

另一方面, 在呋喃醛胁迫下和酚醛胁迫下显著差异上调表达的基因也有部分是重叠的, 共有 11 个基因 *CGS9114\_RS01115*, *CGS9114\_RS01975*, *CGS9114\_RS10340*, *CGS9114\_RS04000*, *CGS9114\_RS07530*, *CGS9114\_RS06205*, *CGS9114\_RS09125*, *CGS9114\_RS01955*, *CGS9114\_RS04340*, *CGS9114\_RS09335* 和 *CGS9114\_RS01830* 在至少一种呋喃醛和至少一种酚醛胁迫下显著差异上调表达 2 倍以上。最为突出的是, 一个氧化还原酶编码基因 *CGS9114\_RS01115* 在五种醛类胁迫下都发生显著差异上调表达, 在糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛胁迫下分别显著差异上调了 5.54, 4.30, 2.25, 2.69 和 2.96 倍。通过 CDART 比对后发现 *CGS9114\_RS01115* 编码蛋白含有 Zn\_ADH7 的结构域, 该结构域属于中长链脱氢酶家族 (medium chain reductase/dehydrogenase (MDR) family)。锌依赖型的醇脱氢酶拥有还原醛产生醇和将醇氧化为醛的可逆反应的活性, 醇脱氢酶在抑制物的降解转化路径中的重要作用也在多种微生物诸如 *A. resinae*, *Z. mobilis* 和 *Cupriavidus necator* 中报道过<sup>[45, 74, 250]</sup>。

*C. glutamicum* S9114 对呋喃醛和酚醛的脱毒机制与第三章中 *G. oxydans* DSM2003 对呋喃醛和酚醛抑制物的脱毒机制相对比, 二者的共同点是, 两株菌均通过将呋喃醛和酚醛还原为相应的呋喃醇和酚醇及氧化产生相应的呋喃酸和酚酸解除醛类抑制物带来的毒性抑制, 这与自然界中已报道过的一些微生物如 *A. resinae* ZN1<sup>[74]</sup>, *Z. mobilis*<sup>[90, 234]</sup>, *S. cerevisiae*<sup>[85, 86, 233]</sup> 和 *E. coli*<sup>[73]</sup> 等对呋喃醛和酚醛的脱毒机制是相似的。由此说明, 虽然呋喃醛和酚醛的结构不同, 但是其发挥毒性机理的作用位点可能都是醛基基团, 呋喃醛和酚醛的主要脱毒机制也都是通过氧化还原反应将其转化为低毒的醇或(和)酸实现。木质纤维素体系中有多种抑制物存在, 这些抑制物之间存在着协同抑制的作用, 因此筛选出对多种抑制物的降解转化起作用的基因, 对于生物炼制发酵微生物的理性改造及在木质纤维素体系中的应用具有重要作用。在呋喃醛和酚醛处理下, *C. glutamicum* 和 *G. oxydans* 中均有大量的氧化还原酶编码基因在转录水平上产生了响应, 其中部分基因在多种醛类抑制物的处理下均发生了显著差异上调表达, 这部分基因值得更多的关注。两株微生物对呋喃醛和酚醛的生物脱毒机制的不同点在于 *G. oxydans* DSM2003 主要通过迅速将呋喃醛和酚醛(丁香醛除外)氧化为相应的呋喃酸和酚酸实现醛类抑制物毒性的解除。而 *C. glutamicum* 则是通过将呋喃醛和酚醛首先还原为相应的呋喃醇和酚醇来解除呋喃醛和酚醛的毒性抑制。这可能与 *G. oxydans* DSM2003 的细胞膜表面具有大量的氧化还原酶特别是细胞膜结合型的脱氢酶等自身特性相关, 节省了由呋喃醇和酚醇向呋喃酸和酚酸的转化这一步骤。

表 4.3 *C. glutamicum* S9114 在糠醛和 HMF 胁迫下显著差异上调表达的基因  
Table 4.3 Up-regulated genes involved in furfural and HMF conversion in *C. glutamicum* S9114

| Genes           | Genes ID                 | Functional annotation        | Fold change |           |
|-----------------|--------------------------|------------------------------|-------------|-----------|
|                 |                          |                              | Furfural    | HMF       |
| ADH             | CGS9114_RS00260          | alcohol dehydrogenase        | 7.12±1.05   | 4.31±0.64 |
|                 | CGS9114_RS10690          | alcohol dehydrogenase        | 5.92±0.63   | 4.20±1.43 |
|                 | CGS9114_RS04130          | alcohol dehydrogenase        | 2.81±0.52   | 3.32±1.92 |
|                 | CGS9114_RS08205          | alcohol dehydrogenase        | -           | 2.02±0.66 |
|                 | CGS9114_RS01115          | alcohol dehydrogenase        | 5.54±2.16   | 4.84±0.76 |
|                 | CGS9114_RS08420          | benzyl alcohol dehydrogenase | 4.84±0.97   | 4.56±2.10 |
|                 | CGS9114_RS04100          | short-chain dehydrogenase    | 4.55±0.77   | 4.43±1.80 |
|                 | CGS9114_RS03960          | short-chain dehydrogenase    | 2.16±0.49   | -         |
|                 | CGS9114_RS01975          | short-chain dehydrogenase    | 2.77±1.18   | 2.49±0.58 |
|                 | CGS9114_RS10375          | inositol 2-dehydrogenase     | 2.60±0.91   | 2.69±1.37 |
|                 | CGS9114_RS04010          | inositol 2-dehydrogenase     | 2.57±1.62   | 2.58±0.78 |
|                 | CGS9114_RS11970          | inositol 2-dehydrogenase     | 7.42±0.61   | 4.04±1.04 |
|                 | CGS9114_RS11975          | inositol 2-dehydrogenase     | 6.37±2.26   | 9.07±3.74 |
|                 | CGS9114_RS10340          | inositol 2-dehydrogenase     | 2.25±0.69   | -         |
|                 | CGS9114_RS04000          | inositol 2-dehydrogenase     | 2.92±0.12   | 2.01±0.73 |
|                 | CGS9114_RS01005          | inositol 2-dehydrogenase     | 2.42±0.21   | 2.42±1.36 |
|                 | CGS9114_RS07530          | histidinol dehydrogenase     | -           | 4.26±2.09 |
|                 | CGS9114_RS05180          | shikimate 5-dehydrogenase    | 2.80±1.42   | -         |
|                 | CGS9114_RS06205          | shikimate 5-dehydrogenase    | -           | 2.62±1.30 |
|                 | CGS9114_RS09125          | threonine dehydrogenase      | 2.35±0.75   | -         |
| CGS9114_RS08410 | 3-ketoacyl-ACP reductase | 4.84±0.76                    | 5.05±0.38   |           |
| ALDH            | CGS9114_RS08415          | aldehyde dehydrogenase       | 8.22±3.19   | 4.22±0.51 |
|                 | CGS9114_RS00305          | aldehyde dehydrogenase       | 5.80±2.62   | 2.51±0.79 |
|                 | CGS9114_RS12030          | aldehyde dehydrogenase       | 5.56±1.07   | 3.40±0.32 |
|                 | CGS9114_RS01955          | aldehyde dehydrogenase       | 4.60±1.44   | 3.19±0.35 |

|                |                 |   |           |           |
|----------------|-----------------|---|-----------|-----------|
|                | CGS9114_RS10695 | aldehyde dehydrogenase                    | 4.38±2.50 | -         |
|                | CGS9114_RS00855 | aldehyde dehydrogenase                    | 2.88±0.85 | -         |
|                | CGS9114_RS04340 | aldehyde dehydrogenase                    | 2.60±0.70 | 2.41±1.11 |
|                | CGS9114_RS02715 | succinate-semialdehyde dehydrogenase      | 6.91±1.72 | 5.32±1.78 |
|                | CGS9114_RS10395 | methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase | 5.45±1.19 | 2.25±1.10 |
|                | CGS9114_RS09335 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  | 3.72±0.63 | -         |
| Other          | CGS9114_RS04585 | heme peroxidase superfamily protein       | 5.01±1.46 | 3.52±1.09 |
| oxidoreductase | CGS9114_RS01015 | FAD-binding dehydrogenase                 | 2.26±0.11 | -         |
|                | CGS9114_RS10360 | dehydrogenase                             | 2.15±0.74 | -         |
|                | CGS9114_RS01830 | oxidoreductase                            | 3.19±1.20 | 2.07±0.72 |
|                | CGS9114_RS08040 | oxidoreductase                            | 2.89±0.64 | 4.28±0.30 |
|                | CGS9114_RS02640 | FAD-dependent oxidoreductase              | 3.07±1.22 | 3.08±1.16 |
|                | CGS9114_RS08560 | flavin oxidoreductase                     | 3.83±1.71 | 4.01±1.41 |
|                | CGS9114_RS12040 | FAD-dependent oxidoreductase              | 7.12±2.49 | 3.51±0.38 |
|                | CGS9114_RS01385 | oxidoreductase                            | 2.38±1.10 | -         |
|                | CGS9114_RS03915 | oxidoreductase                            | 2.36±0.98 | -         |

HMF, 5-hydroxymethylfurfural.

- Relative expression means not up-regulated or up-regulated to relative lower level (less than 2-fold).

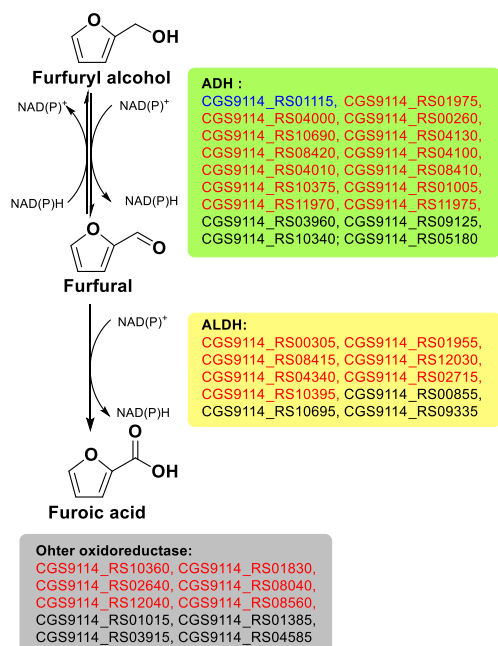
表 4.4 *C. glutamicum* S9114 在酚醛胁迫下显著差异上调表达的基因Table 4.4 Up-regulated genes involved in phenolic aldehydes conversion in *C. glutamicum* S9114

| Genes                | Genes ID        | Functional annotation                    | Fold change |           |                |
|----------------------|-----------------|--|-------------|-----------|----------------|
|                      |                 |  | HBA         | Vanillin  | Syringaldehyde |
| ADH                  | CGS9114_RS01115 | alcohol dehydrogenase                    | 2.25±1.14   | 2.25±1.14 | 2.69±1.11      |
|                      | CGS9114_RS09725 | short-chain dehydrogenase                | -           | 2.92±0.76 | 8.02±1.98      |
|                      | CGS9114_RS11770 | short-chain dehydrogenase                | -           | 2.46±0.25 | -              |
|                      | CGS9114_RS10460 | short-chain dehydrogenase                | -           | 2.23±0.78 | -              |
|                      | CGS9114_RS01975 | short-chain dehydrogenase                | 7.82±0.27   | -         | -              |
|                      | CGS9114_RS07680 | short-chain dehydrogenase                | 2.42±1.10   | 2.25±0.91 | 2.25±0.98      |
|                      | CGS9114_RS05810 | short-chain dehydrogenase                | -           | -         | 7.84±6.49      |
|                      | CGS9114_RS10340 | inositol 2-dehydrogenase                 | -           | 3.27±2.42 | 5.37±4.70      |
|                      | CGS9114_RS04000 | inositol 2-dehydrogenase                 | -           | -         | 2.17±0.73      |
|                      | CGS9114_RS07530 | histidinol dehydrogenase                 | -           | -         | 8.14±5.41      |
|                      | CGS9114_RS06205 | shikimate 5-dehydrogenase                | -           | -         | 3.44±1.87      |
|                      | CGS9114_RS09230 | 6-phosphogluconate dehydrogenase         | -           | 3.13±1.70 | 3.49±2.63      |
|                      | CGS9114_RS09125 | threonine dehydrogenase                  | -           | -         | 2.64±0.83      |
| ALDH                 | CGS9114_RS04340 | aldehyde dehydrogenase                   | 28.52±6.52  | -         | -              |
|                      | CGS9114_RS01955 | aldehyde dehydrogenase                   | 3.75±0.25   | -         | -              |
|                      | CGS9114_RS09335 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | -           | 2.32±1.60 | 2.20±0.62      |
| Other oxidoreductase | CGS9114_RS09375 | multicopper oxidase                      | 3.18±0.28   | 9.42±3.22 | 4.51±1.62      |
|                      | CGS9114_RS06005 | hypothetical protein                     | -           | 5.48±3.20 | 4.01±1.47      |
|                      | CGS9114_RS01515 | FAD-linked oxidoreductase                | -           | 2.80±0.61 | 2.87±0.82      |
|                      | CGS9114_RS11565 | oxidoreductase                           | -           | 4.78±1.26 | 6.38±3.27      |
|                      | CGS9114_RS01830 | oxidoreductase                           | -           | -         | 4.79±2.36      |

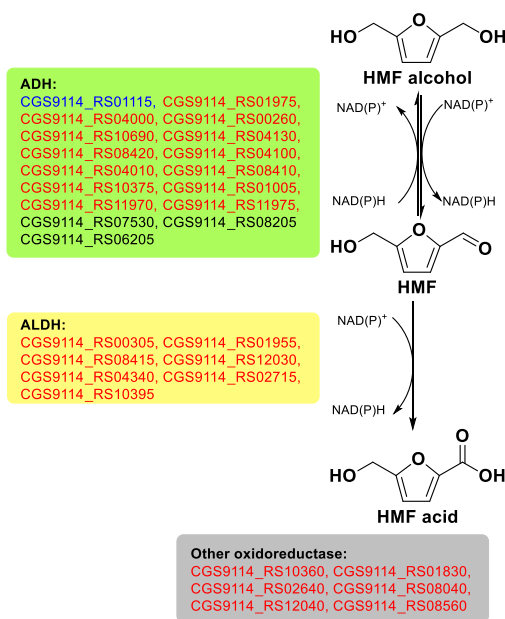
HBA, 4-Hydroxybenzaldehyde.

- Relative expression means not up-regulated or up-regulated to relative lower level (less than 2-fold).

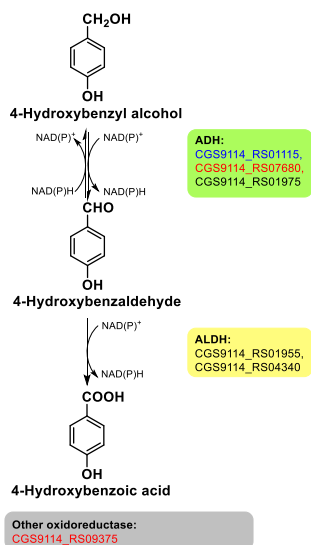
(a) Furfural conversion



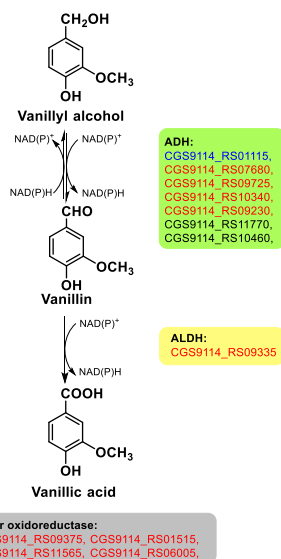
(b) HMF conversion



(c) HBA conversion



(d) Vanillin conversion



(e) Syringaldehyde conversion

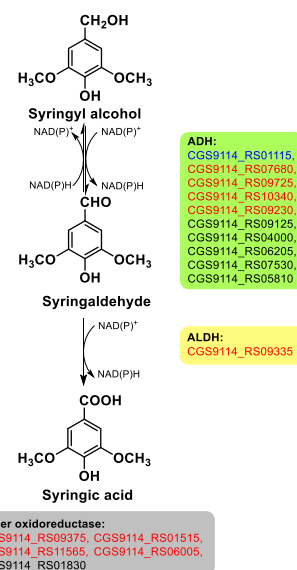


图 4.5 呋喃醛和酚醛在 *C. glutamicum* S9114 中的代谢路径

(a) 糠醛, (b) 5-羟甲基糠醛, (c) 4-羟甲苯甲醛, (d) 香草醛, (e) 丁香醛。基因后的背景颜色色块表示显著差异上调两倍以上基因: 绿色背景表示醇脱氢酶编码基因; 黄色表示醛脱氢酶基因; 灰色表示没有详细注释的氧化还原酶编码基因。红色的基因表示在两种呋喃醛或者至少两种酚醛下显著差异上调两倍以上基因; 蓝色的基因表示在五种醛类胁迫下均显著差异上调表达两倍以上基因; 黑色的基因则表示仅在相应的醛胁迫下显著差异上调表达的基因。

Fig. 4.5 Conversion pathways of furan and phenolic aldehydes in *C. glutamicum* S9114

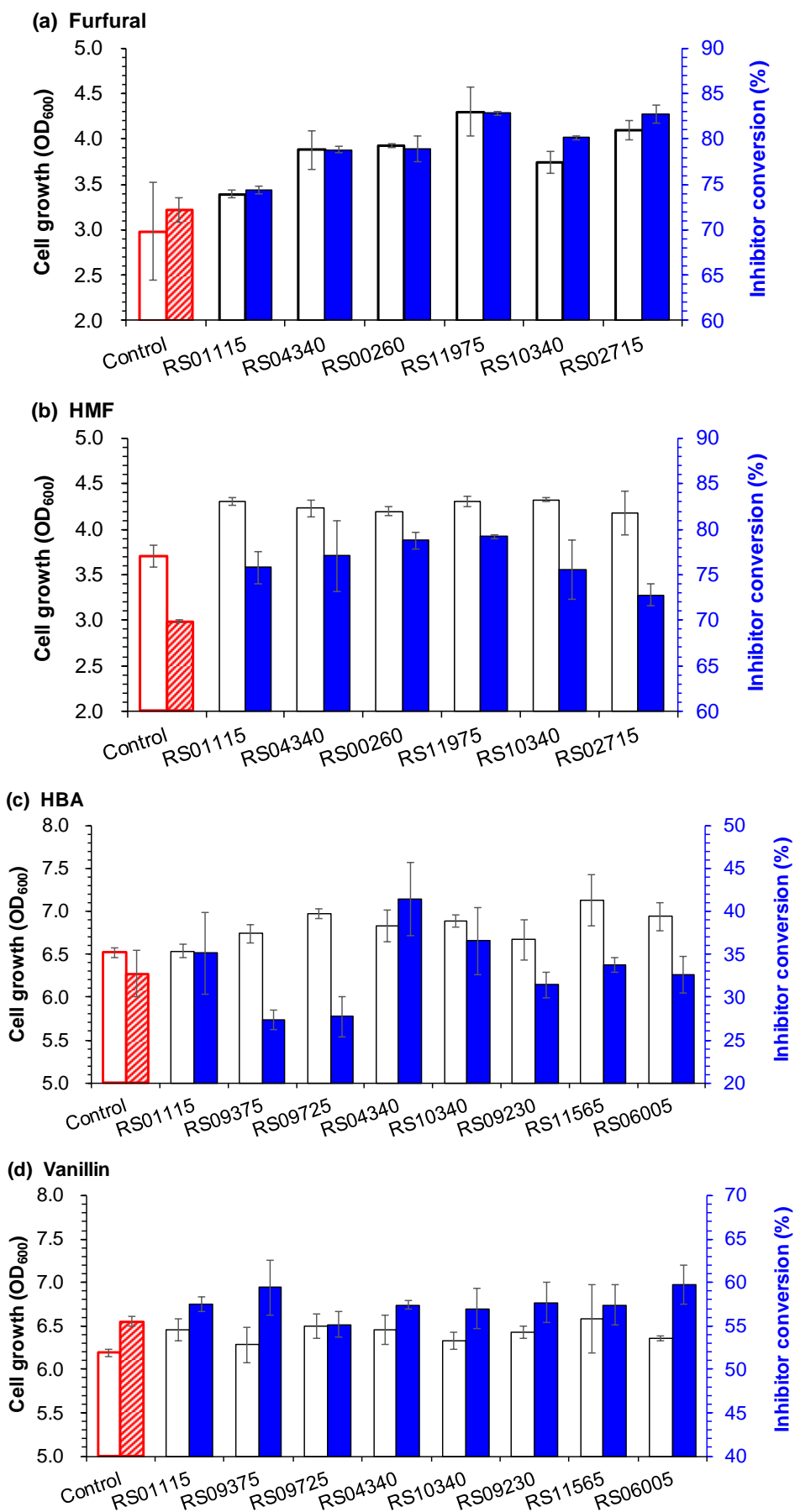
(a) Furfural, (b) HMF, (c) HBA, (d) vanillin, (e) syringaldehyde. Color background indicates the genes significantly up-regulated for more than two folds: green, ADH genes; yellow, ALDH genes; grey, oxidoreductase genes without detailed functional annotation. Genes in red color, the differentially expressed by two furan aldehydes or at least two phenolic aldehydes; blue, the differentially expressed by all the five aldehydes; black, the differentially expressed only by the corresponding aldehyde.

依据相关醛类抑制物的生物转化现象, 相关基因的转录水平变化和同源比对结果, *C. glutamicum* S9114 对五种典型呋喃醛和酚醛在分子水平上的转化路径如图 4.5 所示。*C. glutamicum* S9114 首先利用 NAD(P)H-依赖型的 ADH 将呋喃醛和酚醛迅速转化为相应的呋喃醇和酚醇, 然后经 NAD(P)-依赖的 ADH 以及 NAD(P)-依赖型的 ALDH 氧化相应的呋喃醇、酚醇、呋喃醛、酚醛产生相应的呋喃酸和酚酸, 这三步连续的反应被认为是 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛的脱毒路径。醛基基团被认为是五种典型醛类抑制物包括呋喃醛和酚醛的毒性基团, 而不是呋喃环, 芳香环或者酚羟基<sup>[39, 45, 124, 251]</sup>。五种典型醛类抑制物毒性的脱除的关键步骤均是醛类基团的还原与氧化, 而不是呋喃环或者芳香环的开环。对于 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛产生呋喃醇和酚醇的速率快于呋喃酸和酚酸的生成速率, 说明 ADH 以及 NAD(P)H 依赖型的氧化还原酶在 *C. glutamicum* S9114 中的呋喃醛和酚醛的脱毒机制中发挥着更为重要的作用。

如图 4.5 所示, 增加在转录水平上的基因筛选阈值, 仅在图 4.5 中展示了在呋喃醛胁迫下显著差异上调 5 倍以上的基因, 在酚醛胁迫下显著差异上调 3 倍以上的基因。对于两种呋喃醛的生物转化来说, 仅有一个编码 2-肌醇脱氢酶的基因 *CGS9114\_RS11975* 和一个编码琥珀酸半醛脱氢酶的基因 *CGS9114\_RS02715* 在糠醛和 HMF 两种呋喃醛胁迫下显著差异上调表达。对于三种酚醛的生物转化来说, 一个编码 2-肌醇脱氢酶的基因 *CGS9114\_RS10340* 和一个编码 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的基因 *CGS9114\_RS09230*, 2 个氧化还原酶编码基因 *CGS9114\_RS11565*, *CGS9114\_RS06005* 和一个多铜氧化酶编码基因 *CGS9114\_RS09375* 在至少两种酚醛胁迫下显著差异上调表达。上述筛选出的在多个在醛类胁迫下响应的氧化还原酶编码基因在 *C. glutamicum* S9114 的呋喃醛和酚醛的转化路径中发挥重要作用。

#### 4.3.3 过表达重组 *C. glutamicum* 菌株对呋喃醛和酚醛的转化

呋喃醛和酚醛中单个醛的降解转化可能是由细胞中的多个氧化还原酶基因相互作用的协同结果。从 4.3.2 部分中的 qRT-PCR 结果中筛选出 11 个在呋喃醛和酚醛胁迫下显著差异上调表达的基因构建至表达质粒 pEFTUmob 上, 电转化进入 *C. glutamicum* S9114 中进行重组菌株的转化呋喃醛和酚醛能力的验证。选择的基因包括在呋喃醛下显著差异上调 5 倍以上的基因或者在酚醛胁迫下显著差异上调 3 倍以上的基因, 以及在呋喃醛和酚醛多种醛的胁迫下都发生显著差异表达上调的基因。在验证重组菌株对呋喃醛的转化能力中, 考察了六个基因: *CGS9114\_RS01115*, *CGS9114\_RS04340*, *CGS9114\_RS00260*, *CGS9114\_RS11975*, *CGS9114\_RS10340* 和 *CGS9114\_RS02715*。在验证重组菌株对酚醛的转化中, 考察了八个基因: *CGS9114\_RS01115*, *CGS9114\_RS09375*, *CGS9114\_RS09725*, *CGS9114\_RS04340*, *CGS9114\_RS10340*, *CGS9114\_RS09230*, *CGS9114\_RS11565* 和 *CGS9114\_RS06005*。在呋喃醛和酚醛中多种醛类胁迫下 *CGS9114\_RS01115*、*CGS9114\_RS04340* 和 *CGS9114\_RS10340* 三个基因的转录水平都显著差异上调表达, 对分别含有这三个基因的重组菌验证了其五种醛的转化能力。



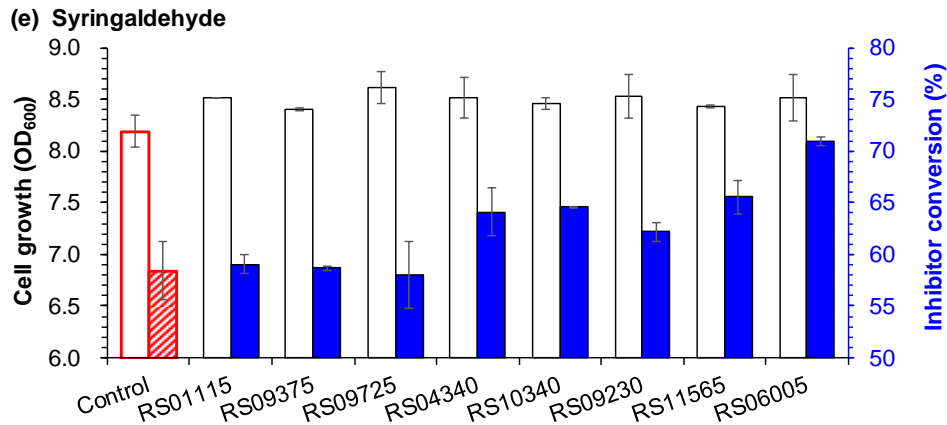


图 4.6 *C. glutamicum* S9114 重组菌株在单一抑制物下的生长和抑制物转化

(a) 糠醛, 1.7 g/L; (b) 5-羟甲基糠醛, 2.2 g/L; (c) 4-羟基苯甲醛, 0.8 g/L; (d) 香草醛, 1.0 g/L; (e) 丁香醛, 0.15 g/L。发酵条件: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 5% (v/v) 接种量, 30 mL 合成培养基/250 mL 摇瓶, 添加糠醛, 5-羟甲基糠醛, 4-羟基苯甲醛, 香草醛和丁香醛的培养基中分别发酵 8 h, 8 h, 16 h, 16 h 和 12 h。“Control”表示含有空载表达质粒 pEFTUmob 的对照 *C. glutamicum* S9114 菌株。

Fig. 4.6 Cell growth and inhibitors conversion ratio of recombinant *C. glutamicum* S9114 under individual inhibitor

(a) Furfural, 1.7 g/L; (b) HMF, 2.2 g/L; (c) HBA, 0.8 g/L; (d) vanillin; 1.0 g/L; (e) syringaldehyde, 0.15 g/L. Conditions: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 5% (v/v) of inoculation ratio, 30 mL synthetic medium/250 mL flask for 8 h, 8 h, 16 h, 16 h and 12 h by furfural, HMF, HBA, vanillin and syringaldehyde, respectively. “Control” indicates only transformed the plasmid pEFTUmob into *C. glutamicum* S9114.

重组 *C. glutamicum* S9114 菌的生长和抑制物转化的实验是通过向合成培养基中分别添加单一且合适浓度的抑制物实现, 合成培养基中的抑制物的添加量分别为 1.7 g/L 糠醛, 2.2 g/L HMF, 0.8 g/L HBA, 1.0 g/L 香草醛, 0.15 g/L 丁香醛。如图 4.6a-b 所示, 在含有呋喃醛的培养基中, 六种重组菌的生长和呋喃醛的转化率相比于对照菌株都有提升。其中, *CGS9114\_RS11975* 在 *C. glutamicum* S9114 中的过表达提升糠醛和 HMF 转化率的效果最为明显, 在发酵 8 h 时, 糠醛的转化率提升了 14.7%, HMF 的转化率提升了 13.3%。如图 4.6c-e 所示, 在含有酚醛的培养基中, 八种重组菌的生长相对于对照菌株提升都有一定的提升, 但是酚醛的转化率的提升不如呋喃醛转化率的提升明显。其中, 对于 HBA 的转化来讲, *CGS9114\_RS04340* 在 *C. glutamicum* S9114 中的过表达提升了 HBA 的转化率约为 26.4%; 对于香草醛和丁香醛来讲, *CGS9114\_RS06005* 在 *C. glutamicum* S9114 中的过表达提升效果最为显著, 分别提高了 7.7% (香草醛) 和 21.4% (丁香醛)。此外, 在五种醛胁迫下均发生显著差异上调表达的醇脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS01115* 的过表达, 对糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛的转化率分别提升 3.1%, 8.5%, 7.2%, 3.7% 和 1.1%。在糠醛、香草醛及丁香醛胁迫下发生显著差异上调表达的醇脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS10340* 的过表达, 对糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛的转化率分别提升了 11.0%, 10.3%, 11.5%, 2.6% 和 10.6%。在糠醛、HMF 和 HBA 胁迫下发生显著差异上调表达的醛脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS04340* 的过表达,

对糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛的转化率分别提升 9.1%，10.3%，26.4%，3.4% 和 9.7%。这三个基因对于呋喃醛和酚醛的转化都起到了促进作用。

从上述结果可以得出，相关基因在 *C. glutamicum* S9114 中的过表达在一定程度上提升了重组菌株的生长和醛的转化率。醛在微生物中的生物转化可能是由多基因编码的酶的复杂而协同工作的结果。单个基因的删除或过表达可能不会导致特定抑制物的生物转化性能发生重大变化。也许应该对完整的抑制物生物转化途径和相关的转运调控进行逐步和系统的修改，而不是对单个基因进行功能验证。完全阐明 *C. glutamicum* S9114 对各种抑制物的脱毒机制是非常重要的，也是一个长期的目标，需要对多种抑制剂的生物转化途径进行系统的研究。转录分析是实现这一长期目标的第一步，它揭示了抑制剂转化的潜在关键基因，这将为未来一般生物炼制菌株的代谢修饰提供一个丰富的基因库。

#### 4.4 本章小结

本章节主要通过 qRT-PCR 定量技术，在转录水平上对具有高抑制物耐受能力的 *C. glutamicum* S9114 转化五种典型呋喃醛和酚醛抑制物的关键基因进行了筛选及鉴定，推测了该菌株对五种典型醛类抑制物的转化路径。本研究筛选出的与多种抑制物转化相关的基因资源对促进高抑制物耐受型生物炼制发酵微生物的构建具有重要意义。本章节研究的主要结论如下：

(1) *C. glutamicum* S9114 对木质纤维素中来源的五种典型醛类抑制物（糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛）的耐受能力比较强，高于新鲜木质纤维素体系中实际抑制物含量数倍的抑制物浓度对该菌株的生长和产酸的抑制作用不显著。

(2) *C. glutamicum* S9114 可以将呋喃醛和酚醛还原为相应的呋喃醇和酚醇及氧化为相应的呋喃酸和酚酸，产生的呋喃醇和酚醇会继续降解产生相应的呋喃酸和酚酸。在 *C. glutamicum* S9114 中，呋喃酸是呋喃醛的最终转化产物，酚酸则会继续代谢进入微生物的中心碳代谢路径实现终极降解。

(3) qRT-PCR 定量结果显示，在呋喃醛和酚醛胁迫下 *C. glutamicum* S9114 中多个氧化还原酶基因显著差异上调表达，其中醇脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS01115* 在糠醛、HMF、HBA、香草醛和丁香醛胁迫下分别显著差异上调了 5.54, 4.30, 2.25, 2.69 和 2.96 倍，多铜氧化酶基因 *CGS9114\_RS09375* 在 HBA、香草醛和丁香醛胁迫下分别显著差异上调表达 3.18, 9.42, 4.51 倍，推测该类基因在参与多种抑制物的转化过程中发挥重要作用。基于相关抑制物的转化现象，基因组注释和相关基因在醛类胁迫下的转录水平变化推测了 *C. glutamicum* S9114 在分子水平上转化呋喃醛和酚醛的路径。

(4) 相关氧化还原酶基因在 *C. glutamicum* S9114 中进行过表达的结果显示，*CGS9114\_RS01115*，*CGS9114\_RS04340*，*CGS9114\_RS00260*，*CGS9114\_RS11975*，*CGS9114\_RS10340* 和 *CGS9114\_RS02715* 六个基因的过表达对 *C. glutamicum* S9114 转化糠醛和 HMF 有提升作用，是 *C. glutamicum* S9114 中参与呋喃醛类抑制物转化路径中的关键基因；*CGS9114\_RS01115*，*CGS9114\_RS04340*，*CGS9114\_RS10340*，

*CGS9114\_RS11565* 和 *CGS9114\_RS06005* 对 HBA 的转化有促进作用; *CGS9114\_RS01115*, *CGS9114\_RS09375*, *CGS9114\_RS04340*, *CGS9114\_RS10340*, *CGS9114\_RS09230*, *CGS9114\_RS11565* 和 *CGS9114\_RS06005* 的过表达促进了香草醛的转化; *CGS9114\_RS01115*, *CGS9114\_RS04340*, *CGS9114\_RS10340*, *CGS9114\_RS09230*, *CGS9114\_RS11565* 和 *CGS9114\_RS06005* 对丁香醛的转化有促进作用。醇脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS01115* 和 *CGS9114\_RS10340*, 醛脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS04340* 的过表达对呋喃醛和酚醛的转化都有促进作用。

## 第 5 章 细菌微生物中脂肪烃合成路径的构建与初步评价

### 5.1 引言

烃类化合物作为汽油、柴油及航空燃料的主要组成成分，在整个能源系统中占有至关重要的地位<sup>[157]</sup>。目前烃类化合物的生产主要依赖于对化石资源如煤油的高温（150-275 °C）蒸馏<sup>[165]</sup>，但是这种生产方式会不可避免的消耗大量不可再生的化石资源，其生产过程也会造成严重的环境污染。因此，寻求一种可持续的烃类化合物生产方法，降低对现有化石资源的过度依赖迫在眉睫<sup>[166]</sup>。利用木质纤维素原料进行烃类化合物的生产越来越受到关注，可持续再生的原料替换有限的化石燃料不仅是基础研究，也是应用科学和工业上不断追求的新型策略。

微生物生产烃类化合物具有多种优势<sup>[167]</sup>，最为显著的是微生物可以利用可再生木质纤维素资源进行烃类化合物的合成<sup>[181, 252]</sup>。目前发现的产烃能力最高的一种微生物是蓝藻，如 *B. braunii* 合成的烃类化合物的量可达细胞干重的 75%<sup>[161, 193]</sup>，但是蓝藻的培养周期较长且产烃速率较低。因此，为了提升烃类化合物的合成速率及产量，目前有较多的研究将蓝藻来源的产烃路径在诸如 *E. coli*<sup>[157, 169-172]</sup>、*S. cerevisiae*<sup>[158, 174-177]</sup> 或 *Y. lipolytica*<sup>[178-180]</sup> 等模式微生物中进行构建。蓝藻的脂肪烃合成路径与脂肪酸代谢路径相关，其关键步骤是通过长链脂酰-ACP 还原酶催化脂肪酸的前体物质脂酰-ACP 产生脂肪醛，脂肪醛再经脂肪醛脱羰基酶的催化生成少一个碳数的直链烷烃或者烯烃<sup>[157]</sup>。作为脂肪烃合成路径中的两个关键酶，目前关于脂肪醛脱羰基酶的研究较多<sup>[157, 164, 253, 254]</sup>，而另一个关键酶长链脂酰-ACP 还原酶的相关研究较少。因此，在脂肪烃的合成过程中依然存在一些关键问题值得探讨，如长链脂酰-ACP 还原酶在 *E. coli* 中诱导表达时容易形成没有活性的包涵体结构<sup>[255]</sup>，从而该酶很可能成为 *E. coli* 脂肪烃合成路径中的限速步骤。此外，除了在上述一些模式微生物中进行异源产烃路径的构建之外，将产烃路径构建至其它木质纤维素生物炼制发酵微生物中的研究相对较少。

谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* S9114 是一株对木质纤维素体系适应性较强的生物炼制发酵微生物，将该菌株作为烃类化合物合成路径构建的宿主菌具有独特优势，主要包括（1）该菌株对木质纤维素来源的抑制物具有较强的耐受及转化能力；（2）该微生物胞内存在脂肪酸的合成路径但不具备脂肪酸的 $\beta$ -氧化路径<sup>[256]</sup>，为烃类化合物的合成提供了充足的前体物质；（3）该菌体生长的最适发酵条件如温度、pH 等与蓝藻来源的产烃路径中两个关键酶达到最适酶活的温度、pH 条件接近；（4）该菌株在营养丰富的木质纤维素体系中培养时生物量比较大，脂肪烃的产生又与细胞内脂肪酸代谢相关，生物量大的菌株有助于脂肪烃的合成。本章节将来源于细长聚球藻 *S. elongatus* 的长链脂酰-ACP 还原酶编码基因 *aar* 及脂肪醛脱羰基酶编码基因 *ado* 在 *E. coli* BL21 中表达，考察两个基因的蛋白表达水平对产烃的影响。然后将该产烃路径构建至具有高抑制物耐受性的生物炼制发酵微生物 *C. glutamicum* S9114 中进行了脂肪烃合成的尝试。

## 5.2 材料与方法

### 5.2.1 实验菌株和试剂

本章节研究中涉及到的菌株及质粒见表 5.1。*E. coli* BL21 (DE3) 用于目的蛋白的诱导表达与纯化。*C. glutamicum* S9114 购自上海工微所科技有限公司 (原上海市工业微生物研究所) 菌种保藏中心 (Shanghai Industrial Microbiology Institute Tech., China)。质粒 pET-28a(+) 用于目的基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的诱导表达。质粒 pKD46 及消除抗性基因质粒 pCP20 用于 *E. coli* 的 RED 重组。质粒 pTRCmob 由孙际宾老师 (中国科学院天津工业生物技术研究所) 慷慨馈赠, 用于目的基因在 *C. glutamicum* 中的过表达。

本章节使用的实验室试剂见附录 I。

### 5.2.2 培养基及培养条件

*E. coli* BL21 生长和发酵的培养基包括: (1) Luria-Bertani (LB) 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, NaCl 10; (2) M9 (Minimal) 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 30, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 12.8, NaCl 0.5, NH<sub>4</sub>Cl 2.0, 酵母浸粉 2.0, Triton-X100 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, CaCl<sub>2</sub> 0.011, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.027, ZnCl<sub>2</sub> 0.002, CaCl<sub>2</sub> 0.001, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.002, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0019, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.0005。

取 *E. coli* 在 -80 °C 保存的甘油管, 在 LB 固体平板上划线, 37 °C 倒置培养过夜, 然后取 *E. coli* 单菌落接入含有 5 mL LB 的 15 mL 试管中, 37 °C, 200 rpm 过夜培养, 以 1% (v/v) 接种量接入 M9 合成培养基中, 37 °C, 200 rpm 培养至 OD 约为 1.0-1.2 时, 加入 1 mM IPTG 于 30 °C, 200 rpm 诱导 48 h。

*C. glutamicum* S9114 生长和发酵的培养基包括: (1) 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 25, 玉米浆 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 0.6, 尿素 2.5, FeSO<sub>4</sub> 0.002, MnSO<sub>4</sub> 0.002; (2) CGXII-NL 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 40, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0, 尿素 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 0.25, 3-吗啡丙磺酸 42, CaCl<sub>2</sub> 0.001, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0001, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.00002, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.000002, 生物素 0.00002, 硫胺素 0.00005, 原儿茶酸 0.03。

取 *C. glutamicum* 在 -80 °C 保存的甘油管, 在 LB 固体平板上划线, 30 °C 倒置培养 36 h, 取单菌落接入含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C, 200 rpm 培养 16 h, 然后以 5% (v/v) 接种量接入 30 mL CGXII-NL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中于 30 °C, 200 rpm 培养, 发酵中间过程 pH 利用 5 M NaOH 调节至 7.0 左右。3 L 发酵罐发酵条件: 30 °C, 600 rpm, 1.4 vvm, 1 L/3 L, 发酵中间 pH 利用 5 M NaOH 调节至 7.25 左右。

表 5.1 本章节研究中使用到的菌株及质粒  
Table 5.1 Strains and plasmids used in the study of this chapter

| Strain                                     | Relevant genotype  |  | Source     |            |            |
|--|--|--|------------|------------|------------|
| <i>S. elongatus</i>                        | <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942, cyanobacterial strain  |  | PCC        |            |            |
| <i>E. coli</i> BL21                        | <i>F ompT hsdS<sub>B</sub> (rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)  |  | Invitrogen |            |            |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                | <i>F endA1 glnV44 thi<sup>-1</sup> recA1 relA1 gyrA96 deoRnupG <math>\Phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math> (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>), <math>\lambda</math></i> |  | Invitrogen |            |            |
| <i>C. glutamicum</i> S9114                 | Wild-type strain   |  | SIIM       |            |            |
| <i>E. coli</i> BL21- <i>AfadE</i>          | In-frame deletion of <i>fadE</i> in <i>E. coli</i> BL21  |  | This study |            |            |
| <i>E. coli</i> BL21- <i>AfadE::aar-ado</i> | <i>E. coli</i> BL21: $\Delta$ <i>fadE::P<sub>T7</sub>:aar, P<sub>T7</sub>:ado</i>  |  | This study |            |            |
| Plasmids                                   | Origin of replication  | Overexpressed genes  | RBS/Linker | Resistance | Source     |
| pET-28a(+)                                 | pBR322   | <i>Km<sup>r</sup>, ori pMB1, T7 promoter/terminator</i>  | Wild type  | Kan        | Novagen    |
| pKD46                                      | repA101  | Carries Flp Recombination Target (FRT) site  | Wild type  | Amp        | CGSC       |
| pCP20                                      | repA101  | Carries gene for flippase enzymes  | Wild type  | Amp/Cm     | CGSC       |
| pTRCmob                                    | repA101  | <i>E. coli-C. glutamicum</i> shuttle cloning vector, <i>Km<sup>r</sup>, Ptrc</i> , RP4-mob region instead of <i>lacI<sup>q</sup></i> | Wild type  | Kan        | [240]      |
| pH36mob                                    | repA101  | Replacing the promoter <i>P<sub>trc</sub></i> of pTRCmob with a strong promoter <i>P<sub>H36</sub></i>                               | Wild type  | Kan        | This study |
| pH36mobspr                                 | repA101  | Replacing the resistance gene <i>Kan</i> of pH36mob with <i>Spr</i>  | Wild type  | Spr        | This study |
| pEFTUmob                                   | repA101  | Replacing the promoter <i>P<sub>trc</sub></i> of pTRCmob with a strong promoter <i>P<sub>efu</sub></i>                               | Wild type  | Kan        | This study |
| pET-28a-aar                                | pBR322   | <i>P<sub>T7</sub>: aar (Synpcc7942_1594</i> from <i>S. elongatus</i> PCC7942 was synthesized after codon optimization)               | Wild type  | Kan        | This study |
| pET-28a-alr5284                            | pBR322   | <i>P<sub>T7</sub>: aar (alr5284</i> from <i>Nostoc sp.</i> PCC 7120)   | Wild type  | Kan        | This study |

|                     |         |   |                               |     |            |
|---------------------|---------|---|-------------------------------|-----|------------|
| pET-28a-ado         | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>ado</i> ( <i>Synpcc7942_1593</i> from <i>S. elongatus</i> PCC7942 was synthesized after codon optimization) | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-aar-ado     | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>aar</i> , $P_{T7}$ : <i>ado</i>   | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-aar-rbs-ado | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>aar-rbs-ado</i>   | RBS:<br>ATTAAAGAGGAGAAATACTAG | Kan | This study |
| pET-28a-ado-rbs-aar | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>ado-rbs-aar</i>   | RBS:<br>ATTAAAGAGGAGAAATACTAG | Kan | This study |
| pTRCmob-aar-rbs-ado | repA101 | $P_{trc}$ : <i>aar-rbs-ado</i>  | RBS:<br>ATTAAAGAGGAGAAATACTAG | Kan | This study |
| pTRCmob-ado-rbs-aar | repA101 | $P_{trc}$ : <i>ado-rbs-aar</i>  | RBS:<br>ATTAAAGAGGAGAAATACTAG | Kan | This study |
| pET-28a-aarado      | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>aarado</i>  | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-adoaar      | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>adoaar</i>  | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-gfpaar      | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>gfpaar</i>  | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-gfpado      | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>gfpado</i>  | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-gfpaarado   | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>gfpaarado</i>   | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-gfpadoaar   | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>gfpadoaar</i>   | Wild type                     | Kan | This study |
| pET-28a-MBPaar      | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>mbp-linker-aar</i>  | Linker:SGSGSGSGGGGSGGGG       | Kan | This study |
| pET-28a-SPYaar      | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>spy-linker-aar</i>  | Linker:SGSGSGSGGGGSGGGG       | Kan | This study |
| pET-28a-MBPaar-ado  | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>mbp-linker-aar</i> , $P_{T7}$ : <i>ado</i>  | Linker:SGSGSGSGGGGSGGGG       | Kan | This study |
| pET-28a-SPYaar-ado  | pBR322  | $P_{T7}$ : <i>spy-linker-aar</i> , $P_{T7}$ : <i>ado</i>  | Linker:SGSGSGSGGGGSGGGG       | Kan | This study |
| pH36mob-aar         | repA101 | $P_{H36}$ : <i>aar</i>  | Wild type                     | Kan | This study |
| pH36mobspr-ado      | repA101 | $P_{H36}$ : <i>ado</i>  | Wild type                     | Spr | This study |

---

|                            |         |   |                              |     |            |
|----------------------------|---------|---|------------------------------|-----|------------|
| pH36mob-ado-rbs1-<br>aar   | repA101 | $P_{H36}$ : <i>ado-rbs1-aar</i>                   | rbs1: cccaattGAAAGGAcatcaacg | Kan | This study |
| pH36mob-ado-rbs2-<br>aar   | repA101 | $P_{H36}$ : <i>ado-rbs2-aar</i>                   | rbs2: tccaggaaatctga         | Kan | This study |
| pH36mob-aar-<br>pTacM-ado  | repA101 | $P_{H36}$ : <i>ado</i> , $P_{tacM}$ : <i>aar</i>  | tacM: cccaattgaaaggacatcaacg | Kan | This study |
| pEFTUmob-ado-rbs1-<br>aar  | repA101 | $P_{eftu}$ : <i>ado-rbs1-aar</i>                  | rbs1: cccaattGAAAGGAcatcaacg | Kan | This study |
| pEFTUmob-ado-rbs2-<br>aar  | repA101 | $P_{eftu}$ : <i>ado-rbs2-aar</i>                  | rbs2: tccaggaaatctga         | Kan | This study |
| pEFTUmob-ado-<br>pTacM-aar | repA101 | $P_{eftu}$ : <i>ado</i> , $P_{tacM}$ : <i>aar</i> | tacM: cccaattgaaaggacatcaacg | Kan | This study |

---

PCC: Pasteur Culture Collection

CGSC: Coli Genetic Stock Center

表 5.2 本章节研究中使用到的引物序列  
Table 5.2 Primers used in the study of this chapter

| Strains/Plasmids    | Primer's name         | Primer sequence (5'-3')                              |
|---------------------|-----------------------|--|
| pET-28a-aar         | BamHI-aar-EcoRI-F     | CGCGGATCCATGTTTGGCCTGATTGGC                          |
|                     | BamHI-aar-EcoRI-R     | CCGGAATTCCTTATTAAATCGCCAGCGC                         |
| pET-28a-alar5284    | BamHI-alar5284-F      | CGCGGATCCATGTTTGGTCTAATTGGACATCTG                    |
|                     | EcoRI-alar5284-R      | CCGGAATTCCTAAACCAGCAGTGGTCTAAACC                     |
| pET-28a-ado         | BamHI-ado-EcoRI-F     | CGCGGATCCATGCCGCAGCTGGAAGC                           |
|                     | BamHI-ado-EcoRI-R     | CCGGAATTCCTATTACACCGCCGCCAGG                         |
| pET-28a-aar-rbs-ado | EcoRI-r-ado-HindIII-F | CCGGAATTCATTAAGAGGAGAAATACTAGATGCCGCAGCTGGAAGCGA     |
|                     | EcoRI-r-ado-HindIII-R | CCCAAGCTTTTATTACACCGCCGCCAGGCCA                      |
| pET-28a-ado-rbs-aar | EcoRI-o-aar-HindIII-F | CCGGAATTCATTAAGAGGAGAAATACTAGATGTTTGGCCTGATTGGCC     |
|                     | EcoRI-o-aar-HindIII-R | CCCAAGCTTTTATTAAATCGCCAGCGCCAGC                      |
| pTRCmob-aar-rbs-ado | BamHI-aar-XbaI-F      | CGCGGATCCATGTTTGGCCTGATTGGC                          |
|                     | BamHI-aar-XbaI-R      | GCTCTAGATTAGTGATGATGATGATGATGAATC                    |
|                     | XbaI-ado-PstI-F       | GCTCTAGAATTAAGAGGAGAAATACTAGATGCCGCAGCTGGAAGCGA      |
|                     | XbaI-ado-PstI-R       | AAAACACTGCAGTTATTACACCGCCGCCAGGCCA                   |
| pTRCmob-ado-rbs-aar | EcoRI-ado-BamHI-F     | CCGGAATTCATGCCGCAGCTGGAAGCGA                         |
|                     | EcoRI-ado-BamHI-R     | CGCGGATCCCTAGTATTTCTCCTCTTTAATTTATTACACCGCCGCCAGGCCA |
| pET-28a-aarado      | aar-o-R               | ctcgcttcagctgcgccataatcgccagcgccagcgg                |
|                     | r-ado-F               | agccgctggcgtggcgattatgccgcagctggaagc                 |
| pET-28a-adoaar      | ado-r-R               | tggccaatcagccaaacatcaccgcccaggccatacgc               |
|                     | o-aar-F               | cgatggcctggcggcggtgatgtttggcctgattggccatct           |
| pET-28a-gfpaar      | BamHI-gfp-F           | CGCGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTACTGGAGT           |
|                     | gfp-r-R               | ccaatcagccaaacafTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGT          |
|                     | g-aar-F               | GCATGGATGAACTATACAAAatgtttggcctgattggccatct          |
|                     | EcoRI-aar-R           | CCGGAATTCttaaatcgccagcgccagcgg                       |

|   |                     |   |
|---|---------------------|---|
| pET-28a-gfpado  | gfp-o-R             | cttcagctgcgccatTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGT  |
|   | g-ado-F             | ATGGATGAACTATACAAAatgccgcagctggaagcgag  |
|   | EcoRI-aao-R         | CCGGAATTCttacaccgccagccatac   |
| pET-28a-gfpaarado   | g-aar-o-R           | gctcgcttcagctgcgccataatgccagcggcggct  |
|   | gr-ado-F            | agccgctggcgtggcgattatgccgcagctggaagcgag   |
| pET-28a-gfpadoaar   | g-ado-r-R           | tggccaatcaggccaacatcaccgccagccatac  |
|   | go-aar-F            | cgatggcctggcggcggtgatgttggcctgattggccatct   |
| pET-28a-MBP/SPYaar  | SPY-F               | AGCAAATGGGTTCGCGGATCCGCAGACACCACTACCGCAGC<br>tggccaatcaggccaacatTCCACCTCCGCCTGATCCGCCGCCTCCGCTCCCACTTCCGCTCCC<br>GGATTGAGCAGTTGCAGGCATTTT         |
|   | SPY-R               | AGCAAATGGGTTCGCGGATCCaaatcgaagaaggtaaactgtaac   |
|   | MBP-F               | tggccaatcaggccaacatTCCACCTCCGCCTGATCCGCCGCCTCCGCTCCCACTTCCGCTCCC<br>GGActtggtgatacagagtctgcgc   |
|   | MBP-R               | TCCGGGAGCGGAAGTGGGAGCGGAGGCGGCGGATCAGGCGGAGGTGGAatgttggcctg<br>attggcca   |
|   | Linker-28a-aar-F    | GGATCCGCGACCCATTTG  |
|   | 28a-aar-R           |   |
| pET-28a-MBP/SPY-aar-ado   | MBP-F-2             | ttaaagaggagaaactgcagatgaaataaaaacaggtgcag   |
|   | SPY-F-2             | ttaaagaggagaaactgcagGCAGACACCACTACCGCAGC  |
| <i>E. coli</i> BL21 $\Delta$ <i>fadE</i>  | UP-Km-F             | TATCATCACAAAGTGGTCAGACCTCCTACAAGTAAGGGGCTTTTCGTTATGTGTGTAG<br>GCTGGAGCTGCTT<br>AAACGGAGCCTTTCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAACTTCCGttaaggttaacg<br>g |
|   | Km-Down-R           |   |
|   | Km-R                | attaatttcgcggtatcagatcttaaggttaacggttggtgacaacaagccagggatgtaacgc  |
| <i>E. coli</i> BL21 $\Delta$ <i>fadE</i> :: <i>P</i> <sub>T7</sub> - <i>aar</i> - <i>P</i> <sub>T7</sub> - <i>ado</i> | T7-AAR-F            | gtgctgtacatccctggcttgtgtccacaaccgtaaaccttaagatctcgcgaaattaat<br>AAACGGAGCCTTTCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAACTTCCGttattagtggtggt<br>g              |
|   | ADO-Down-R          |   |
|   | ADO-R               |   |
| pTRCmob-aar   | pTRCmob-BamHI-aar-F | CGCGGATCCATGTTTGGCCTGATTGGC   |
|   | pTRCmob-XbaI-aar-R  | GCTCTAGATTAGTGATGATGATGATGATGAATC   |

|                                |  |   |
|--------------------------------|--|---|
| pH36mob-aar                    | PH36-SacI-AAR-F  | <u>CGAGCTC</u> atgtttggcctgattggcc  |
| pH36mobspr-ado                 | PH36-XbaI-ADO-R  | G <u>CTCTAG</u> Attacaccgccccaggccatac                                    |
| pH36/EFTUmob-aar-rbs1-ado      | pH36-SacI-ADO-F  | <u>CGAGCTC</u> atgccgcagctggaagc  |
|                                | ADOaarcluster-R  | aacattcagattcctggattacaccgccccaggccatac                                   |
|                                | adoAARcluster-F  | gcggtgtaatccaggaaatctgaatgtttggcctgattggcc                                |
|                                | (PH36)-XbaI-AAR-R  | G <u>CTCTAG</u> Attaaatgccagcggccagc                                      |
|                                | eftu-XbaI-ADO-F  | G <u>CTCTAG</u> Aatgccgcagctggaagc  |
| pH36/EFTUmob-aar-rbs2-ado      | (eftu)-PstI-AAR-R  | <u>AACTGCAG</u> ttaaatgccagcggccagc                                       |
|                                | ADO-rbs-aar-R  | gccaaacatTCCTTTCttacaccgccccaggccatac                                     |
| pH36mob/pEFTUmob-aar-PtacM-ado | ado-rbs-AAR-F  | gcggtgtaaGAAAGGAatgtttggcctgattggcc                                       |
|                                | ADOtac-R   | TGATTAATTGTCAACAGCTCttacaccgccccaggccatac                                 |
|                                | tacAAR-F   | TCACACAGGAAACAGTATTCatgtttggcctgattggcc                                   |
|                                | ado-rbsN-AAR-F   | tgtaaccaattGAAAGGAcatcaacgatgtttggcctgattggcc                             |
|                                | ADO-rbsN-aar-R   | tcgttgatgTCCTTTCaattgggttacaccgccccaggccatac                              |
|                                | ADOtac-R   | cgctcacaattccacacatggtaccacacgatgattaattgtcaacagctcattacaccgccccaggccatac |
| tacAAR-F                       | gtaccatgtgtggaattgtgagcggataacaattccaattgaaaggacatcaacgatgtttggcctgattggcc |   |

下划线表示限制性酶切位点。

The underlined letters indicate the restriction sites.

### 5.2.3 目的基因扩增及重组质粒构建

本章节重组质粒构建过程中涉及到的引物序列见表 5.2，构建的重组质粒图谱见图 5.1。将来源于细长聚球藻 *S. elongatus* PCC7942 的长链脂酰-ACP 还原酶编码基因 *aar* 以及脂肪醛脱羧基酶编码基因 *ado* 依据 Cao 等<sup>[169]</sup>进行密码子优化后，构建至相关表达质粒中。经密码子优化后的 *aar* 和 *ado* 的基因序列见附录 II。

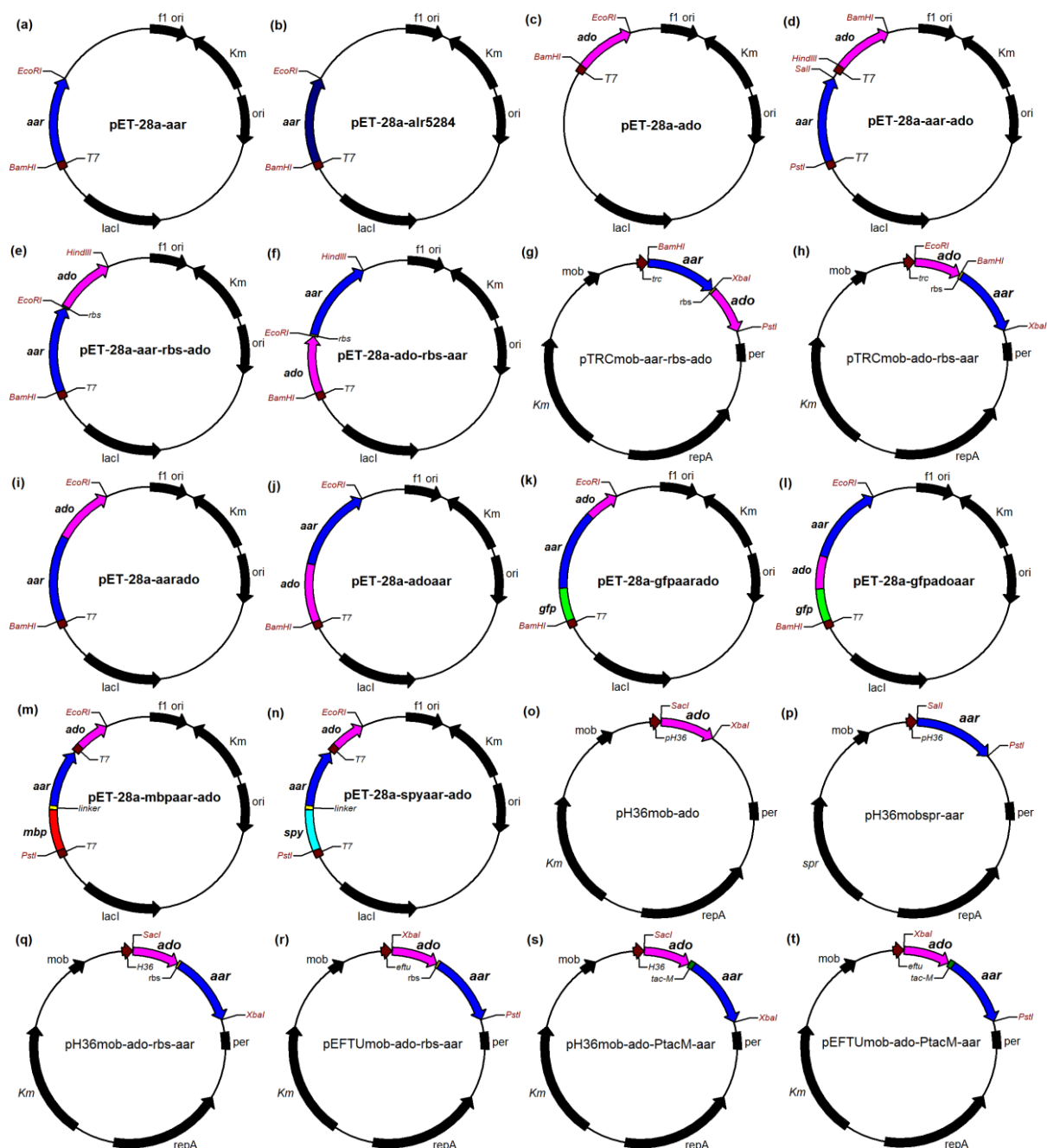


图 5.1 本章节构建的重组质粒

Fig. 5.1 Recombinant plasmids constructed in the study of this chapter

- (a) pET-28a-aar; (b) pET-28a-alsr5284; (c) pET-28a-ado; (d) pET-28a-aar-ado; (e) pET-28a-aar-rbs-ado; (f) pET-28a-ado-rbs-aar; (g) pTRCmob-aar-rbs-ado; (h) pTRCmob-ado-rbs-aar; (i) pET-28a-aarado; (j) pET-28a-adoaar; (k) pET-28a-gfpaarado; (l) pET-28a-gfpadoaar; (m) pET-28a-mbpaar-ado; (n) pET-28a-spyaar-ado; (o) pH36mob-ado; (p) pH36mobspr-aar; (q) pH36mob-ado-rbs-aar; (r) pEFTUmob-rbs-aar; (s) pH36mob-ado-PtacM-aar; (t) pEFTUmob-ado-PtacM-aar.

### 5.2.4 感受态制备及阳性克隆子的筛选

用枪头从 LB 固体培养基上挑取新鲜培养好的 *E. coli* 单菌落接种于装有 5 mL LB 液体培养基的 15 mL 试管中, 37 °C, 200 rpm 过夜培养。取 200  $\mu$ L 培养好的菌液再次转接至装有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 37 °C, 200 rpm 培养 2 h。然后将培养好的菌液分装至 1.5 mL 离心管中, 4 °C 冰浴 10 min 后 5,000 rpm 离心 10 min, 弃上清。向离心管中加入 1 mL 预冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub>, 轻轻吹打均匀重悬细胞, 4 °C, 5,000 rpm 离心 10 min, 弃上清。最后向离心管加入 100  $\mu$ L 预冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液重悬细胞。*E. coli* 感受态细胞最好现配现用, 也可用液氮冷冻后于 -80 °C 保存备用。

取 10  $\mu$ L 表达质粒加入 100  $\mu$ L 感受态细胞中后轻柔混匀, 冰浴静置 30 min。冰浴后的离心管于 42 °C 热激 90 s 后立刻至于冰上静置 2 min, 然后向离心管中加入 900  $\mu$ L LB 液体培养基, 于 37 °C, 200 rpm 培养 1 h。最后取 200  $\mu$ L 培养液涂布于含有卡那霉素 (Kan, 50  $\mu$ g/mL)、氨苄霉素 (Amp, 100  $\mu$ g/mL) 或者壮观霉素 (Spr, 100  $\mu$ g/mL) 的固体 LB 平板上, 37 °C 培养 12 h 后长出的单菌落即可进行 PCR 验证。

*C. glutamicum* 电转感受态制备、转化及阳性克隆子的筛选方法详情见 4.2.3。

### 5.2.5 RED 重组

依据 5.2.4 中热激转化法将质粒 pKD46 转化进入 *E. coli* 感受态中, 然后将筛选得到的阳性单菌落接种至含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基 (LA) 中, 30 °C, 200 rpm 过夜培养。取 1 mL 培养液转接至 50 mL LA 中, 30 °C, 200 rpm 培养至 OD 约为 0.25-0.4 (约培养 2 h) 时, 向其中加入终浓度为 10 mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 1 h (使 pKD46 上的 *exo*, *bex*, *gam* 充分表达)。然后将诱导好的培养液转移至预冷的 50 mL 离心管中, 冰浴静置 30 min 后 4 °C, 6,000 rpm 离心 5 min, 弃上清。向 50 mL 离心管中加入 25 mL 10% (v/v) 甘油重悬细胞, 4 °C, 6,000 rpm 离心 5 min, 反复 2 次。最后加入 2 mL 10% (v/v) 甘油重悬细胞, 每 1.5 mL 离心管分装约 90  $\mu$ L, 于 -80 °C 中保存备用。

取 500 ng 经 DpnI 酶消化处理后的电转样品与 *E. coli*-pKD46 感受态细胞轻柔混匀, 冰浴静置 30 min。期间将预先洗干净并在无水乙醇中浸泡 30 min 以上的直径 1 mm 的电转杯 (Bio-rad, 美国, Hercules) 置于超净台中, 紫外灭菌并风干 30 min。待电转杯中的乙醇挥发完全后, 将电转杯盖子盖好后用一次性塑料手套密封好, 冰浴 30 min。然后将冰浴后的混合有电转样品的感受态细胞转移至电转杯中立刻进行电转, 电转参数为 2,000 V, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 4-5 ms 电击。将电转后的混合溶液转移至含有 900  $\mu$ L SOC 培养基的 1.5 mL 离心管中, 于 37 °C, 150 rpm 培养 1 h。培养好的培养液于 8000 rpm 离心 5 min 后弃 700  $\mu$ L 上清, 剩余液体用枪头吹打均匀后全部涂布于含 25  $\mu$ g/mL Kan 的固体 LB 平板中, 37 °C 培养。长出的单菌落转移至含 100  $\mu$ g/mL Kan 的固体 LB 平板上进行复筛, 37 °C 培养后再次长出的菌落进行 PCR 鉴定。鉴定出的阳性单菌落分别转移至含有 50  $\mu$ g/mL Kan 的固体 LB 平板 (LK) 及 100  $\mu$ g/mL Amp 的固体 LB 平板 (LA) 上; 在 LK 平板上生长, 在 LA 平板未生长的单菌落, 转接至 LK 液体培养基中培养, 进行 pKD46 质粒提取鉴定, pKD46 质粒丢失的阳性菌落进行后续抗性基因的消除。

将用于抗性基因消除的辅助质粒 pCP20 通过上述电转化方式转化进入经 RED 重组的 *E. coli* 感受态中。向电转后的混合培养液中添加 900  $\mu$ L SOC 培养基, 30  $^{\circ}$ C, 200 rpm 培养 1 h 后涂布于 LA 固体平板, 30  $^{\circ}$ C 培养; 挑选长出的单菌落在 LB 固体平板上划线后于 42  $^{\circ}$ C 培养; 挑选长出的单菌落分别划线至 LB, LA, LK 固体平板上, 30  $^{\circ}$ C 培养; 在 LB 平板上生长, 在 LA, LK 固体平板上没有生长的单菌落进行菌落 PCR 验证及提取基因组进行基因组 PCR 验证。

### 5.2.6 SDS-PAGE

收集经 IPTG 诱导好的重组 *E. coli* BL21 菌体, 用 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 洗涤菌体两次后, 用该缓冲液再次重悬菌体进行超声破碎, 超声条件为 400 W, 工作 4 s, 间隔 6 s, 超声 100 次。超声破碎后的溶液于 4  $^{\circ}$ C, 13,000 rpm 离心 20 min, 上清液即为细胞内可溶性组分; 离心后的沉淀为细胞不溶性组分, 使用 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 洗涤细胞碎片两次, 用该缓冲液重悬后用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 实验。

取上清液和细胞不溶性组分的重悬液各 40  $\mu$ L 加入 5  $\times$  Loading Buffer (北京全式金生物技术有限公司) 在 1.5 mL 离心管中混匀, 沸水中煮 5 min 后于 13,000 rpm 离心 30 min, 上清液用于 SDS-PAGE 实验。先在电压为 90 V 的条件下工作约 20 min (蛋白样品到达浓缩胶和分离胶的交界处), 然后在电压为 120 V 条件下工作约 60 min 后进行后续染色、脱色处理。

### 5.2.7 脂肪烃的提取与 GC-MS 检测

向装有 50 mL 发酵液的 250 mL 摇瓶中按照 2:1 的比例加入 25 mL 氯仿-甲醇(2:1, v/v) 溶液, 混合均匀后用橡胶塞封口, 30  $^{\circ}$ C, 200 rpm 过夜浸提。然后将混合液转移至 50 mL 离心管中, 10,000 rpm 离心 20 min, 用针头取出最下层氯仿层用于后续 GC-MS 检测。其中添加 100 mg/L 十二烷烃 (C12) 作为内标。

脂肪酸, 脂肪醛和脂肪烃等代谢产物通过气相色谱质谱分析法 (GC-MS) 测定。经过上述有机溶剂浸提萃取离心后的氯仿层用 Agilent 6890 GC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 检测, GC-MS 配置 HP-5-MS 柱子 (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m)。温度参数设置如下: 进样温度 280  $^{\circ}$ C, 通氮气速率为 1 mL/min; 初温 50  $^{\circ}$ C, 维持 2 min; 以 15  $^{\circ}$ C/min 的升温速率升温至 80  $^{\circ}$ C, 维持 3 min 后继续以 15  $^{\circ}$ C/min 的升温速率, 升温至最终温度 280  $^{\circ}$ C, 维持 8 min。进样量为 2  $\mu$ L, 在无分流条件下检测样品。

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 *E. coli* 中脂肪烃合成路径的构建

将来源于 *S. elongatus* PCC7942 的长链脂酰-ACP 还原酶编码基因 *Synpcc7942\_1594* (*aar*, EC 1.2.1.80, long-chain acyl-(acyl-carrier-protein) reductase) 及脂肪醛脱羰基酶编码基因 *Synpcc7942\_1593* (*ado*, EC 4.1.99.5, aldehyde decarbonylation/aldehyde oxygenase (deformylating)) 进行密码子优化后构建至表达质粒 pET-28a(+) 上, 将重组质粒分别转入

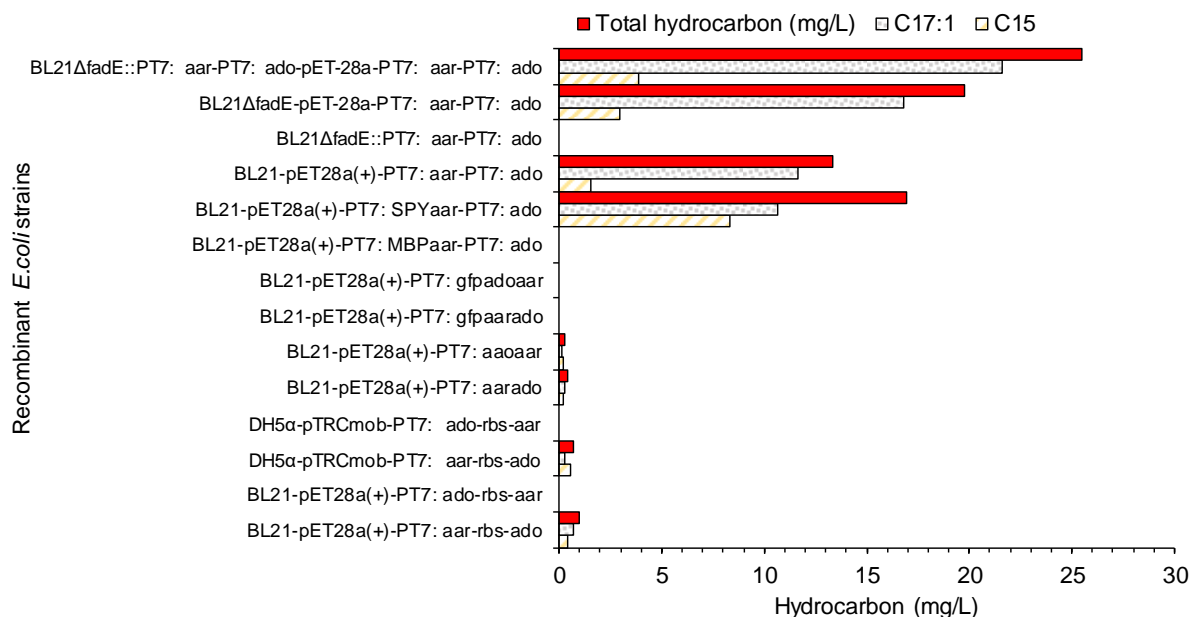


图 5.2 *E. coli* 重组菌株的脂肪烃合成

发酵条件: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 1% (v/v) 接种量, 1 mM IPTG 诱导 48 h, 30 mL M9 培养基 /250 mL 摇瓶。

Fig. 5.2 Fatty hydrocarbon production by *E. coli* recombinant strains

Conditions: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 1% (v/v) inoculation ratio, 1 mM IPTG induction 48 h, 30 mL M9 medium/250 mL flask.

*E. coli* BL21 中考察相关蛋白的表达及重组菌的产烃情况。图 5.2 结果显示重组菌 *E. coli* BL21-pET-28a-PT7: aar-PT7: ado 生成以十五烷(C<sub>15:0</sub>, 1.6 mg/L)和十七烯(C<sub>17:1</sub>, 11.6 mg/L)为主的直链脂肪烃。

两个基因分别在 *E. coli* BL21 中进行诱导表达时的 SDS-PAGE 结果如图 5.3a 所示, *aar* 在 *E. coli* BL21 中诱导表达产生的蛋白容易形成包涵体结构, 在超声破碎后的上清液中的可溶性组分中, 几乎观察不到 AAR (38.4 kDa) 的蛋白条带, 而 *ado* 在 *E. coli* BL21 中诱导表达的蛋白可溶度较高, 在可溶性组分的 SDS-PAGE 结果中能够清晰的观察到 ADO (26.2 kDa) 蛋白条带。由此推测不具生物学活性的 AAR 蛋白包涵体结构的形成是 *E. coli* 产烃路径中的限速步骤, 进而影响重组 *E. coli* 合成脂肪烃的产量。于是选择其它蓝藻如 *Nostoc sp.* PCC 7120 来源的 AAR 编码基因 *alr5284* (与 *Synpcc7942\_1594* 编码的氨基酸序列相似性为 77%, 37.4 kDa) 在 *E. coli* BL21 中进行诱导表达。图 5.3b 结果显示该蛋白同样形成了包涵体结构, 说明蓝藻来源的 *aar* 编码的多肽链结构具有共性。因此接下来考察通过提升 *Synpcc7942\_1594* 在 *E. coli* 中表达蛋白的溶解度对脂肪烃产量的影响。

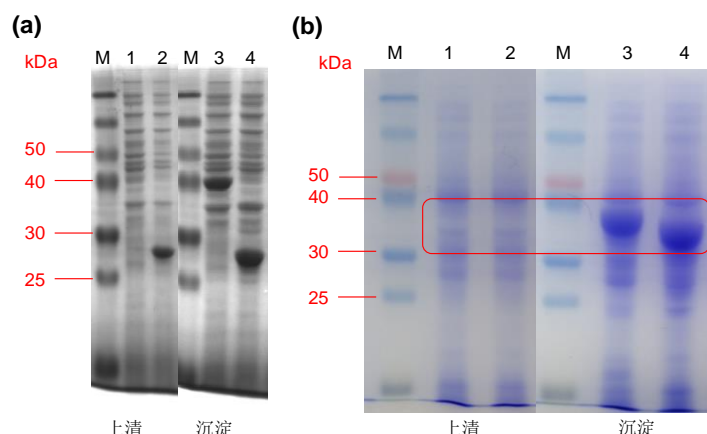


图 5.3 AAR 和 ADO 在可溶性组分及不可溶性组分中的 SDS-PAGE

(a) Synpcc7942\_1594 (AAR, 38.4 kDa) 和 Synpcc7942\_1593 (ADO, 26.2 kDa) 蛋白的 SDS-PAGE。M 通道：标准蛋白样品 (kDa)；通道 1, Synpcc7942\_1594 (AAR) 的可溶性表达组分；通道 2, Synpcc7942\_1593 (ADO) 的可溶性表达组分；通道 3, Synpcc7942\_1594 (AAR) 的不可溶性表达组分；通道 4, Synpcc7942\_1593 (ADO) 的不可溶性表达组分。

(b) Synpcc7942\_1594 (AAR, 38.4 kDa) 及 alr5284 (AAR, 37.4 kDa) 蛋白的 SDS-PAGE。M 通道：标准蛋白样品 (kDa)；通道 1, Synpcc7942\_1594 (AAR) 的可溶性表达组分；通道 2, alr5284 (AAR) 的可溶性表达组分；通道 3, Synpcc7942\_1594 (AAR) 的不可溶性表达组分；通道 4, alr5284 (AAR) 的不可溶性表达组分。上清代表超声破碎离心后的上清液中的可溶性组分，沉淀指超声破碎离心后的细胞碎片沉淀等不可溶性组分。

Fig. 5.3 SDS-PAGE of AAR and ADO in crude soluble and insoluble fraction

(a) SDS-PAGE of Synpcc7942\_1594 (AAR, 38.4 kDa) and Synpcc7942\_1593 (ADO, 26.2 kDa). Lane M, molecular mass markers (in kDa); lane 1, Synpcc7942\_1594 (AAR) in crude soluble fraction; lane 2, Synpcc7942\_1593 (ADO) in crude soluble fraction; lane 3, Synpcc7942\_1594 (AAR) in crude insoluble fraction; lane 4, Synpcc7942\_1593 (ADO) in crude insoluble fraction.

(b) SDS-PAGE of Synpcc7942\_1594 (AAR, 38.4 kDa) and alr5284 (AAR, 37.4 kDa). Lane M, molecular mass markers (in kDa); lane 1, Synpcc7942\_1594 (AAR) in crude soluble fraction; lane 2, alr5284 (AAR) in crude soluble fraction; lane 3, Synpcc7942\_1594 (AAR) in crude insoluble fraction; lane 4, alr5284 (AAR) in crude insoluble fraction.

### 5.3.2 *E. coli* 重组菌脂肪烃合成产量的提升

在 *E. coli* 中进行外源蛋白的诱导表达时，多肽的生成速率过快会导致其没有充足的时间进行正确的折叠，从而容易形成非结晶、无定形、非折叠状态且不具生物学活性的蛋白质聚合物即包涵体结构<sup>[257]</sup>。除了多肽的生成速率过快，包涵体的形成还会受到如培养基组分、温度、pH、离子强度等因素的影响。本小节主要从两个方面考察了增加 AAR 在 *E. coli* 中的可溶性蛋白表达水平对脂肪烃合成的影响，包括：(1) 降低 AAR 的合成速率（弱化启动子、将 *aar* 置于距离启动子较远的位置表达、降低诱导温度、改变 IPTG 浓度及诱导时间等）；(2) 添加可溶性标签或与溶解度较高的蛋白进行共表达。

#### 5.3.2.1 降低 AAR 的合成速率

首先考察弱化启动子（组成型  $P_{trc}$  启动子及诱导型  $P_{T7}$  启动子比较）及改变两个基因的表达顺序对蛋白表达水平的影响及脂肪烃的生成情况。如图 5.4 的 SDS-PAGE 结果所

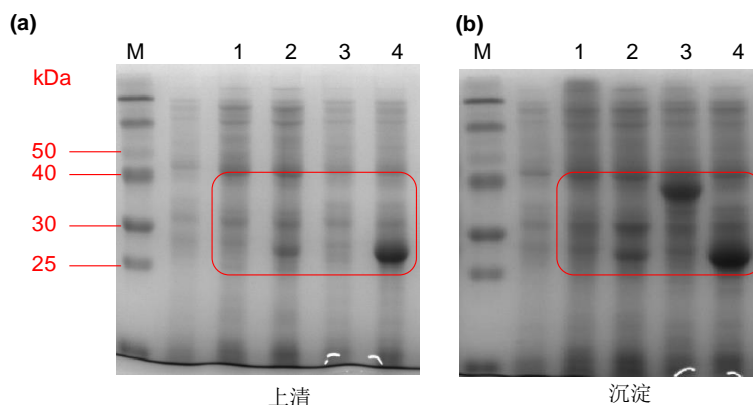


图 5.4 不同启动子或基因表达顺序条件下 AAR 和 ADO 粗蛋白的 SDS-PAGE

(a) 可溶性组分中 AAR 和 ADO 的 SDS-PAGE; (b) 不可溶性组分中 AAR 和 ADO 的 SDS-PAGE。M 通道: 标准蛋白样品 (kDa); 通道 1, *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-P<sub>trc</sub>-ado-rbs-aar 的粗蛋白样品; 通道 2, *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-P<sub>trc</sub>-aar-rbs-ado 的粗蛋白样品; 通道 3, *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-aar-rbs-ado 的粗蛋白样品; 通道 4, *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-ado-rbs-aar 的粗蛋白样品。

Fig. 5.4 SDS-PAGE of AAR and ADO under different promoter or gene expression order

(a) The SDS-PAGE results of AAR and ADO prote in crude soluble fraction; (b) The SDS-PAGE results of AAR and ADO prote in crude insoluble fraction. Lane M, molecular mass markers (in kDa); lane 1, *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-P<sub>trc</sub>-ado-rbs-aar; lane 2, *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-P<sub>trc</sub>-aar-rbs-ado; lane 3, *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-aar-rbs-ado; lane 4, *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-ado-rbs-aar.

示, 以 P<sub>trc</sub> 作为启动子时, 重组菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-P<sub>trc</sub>-ado-rbs-aar 以及 *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-P<sub>trc</sub>-aar-rbs-ado 两种构建方式都有少量可溶性 ADO 蛋白的表达, 但是在上清及沉淀中均未检测到 AAR 的蛋白条带; 以 P<sub>T7</sub> 启动子诱导表达时, *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-ado-rbs-aar 和 *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-aar-rbs-ado 两种构建方式中距离启动子较远的基因在上清和沉淀中均没有检测到正确的蛋白条带。上述结果说明, 以单个启动子启动两个基因串联表达的方式, 距离启动子较远的基因编码蛋白的表达量确实会受到影响, 但是通过弱化启动子及改变基因的表达顺序的方式对 AAR 溶解度的提升并未得到积极的结果。

重组 *E. coli* 的产烃结果 (图 5.2) 显示, 重组菌 *E. coli* BL21-pET-28a-aar-rbs-ado 和 *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-aar-rbs-ado 都检测到以十五烷 (C<sub>15:0</sub>) 和十七碳烯 (C<sub>17:1</sub>) 为主的脂肪烃, 在两个重组菌中的脂肪烃总产量分别为 1.0 mg/L 和 0.7 mg/L。此外, *E. coli* BL21-pET-28a-aar-rbs-ado 的产物以 C<sub>17:1</sub> 为主, *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-aar-rbs-ado 的产物以 C<sub>15:0</sub> 为主, 这可能宿主菌的种类差异相关。而将 aar 置于距离启动子较远的位置表达时, 重组菌 *E. coli* BL21-pET-28a-ado-rbs-aar 和 *E. coli* DH5 $\alpha$ -pTRCmob-ado-rbs-aar 均没有检测到脂肪烃的生成。总来的说, 当使用一个启动子串联表达两个基因时, aar-rbs-ado 的表达框构建顺序比 ado-rbs-aar 的表达框构建顺序的重组菌的产烃能力强, 通过改变启动子及基因表达顺序的方式对脂肪烃产量的提升作用不大。

此外, 本小节还考察了改变诱导温度、IPTG 浓度以及诱导时间等因素降低 AAR 的合成速率对蛋白表达水平的影响。结果显示, 降低温度对于增加蛋白溶解度效果更为明

显，改变 IPTG 浓度和改变诱导时间对增加 AAR 的溶解度并不显著（数据未展示）。虽然低温可以增加 AAR 的溶解度，但是降低诱导温度的方法会延长发酵时间，因此并不适合脂肪烃的发酵。

### 5.3.2.2 与溶解度较高的蛋白进行融合表达

除了上述降低 AAR 的合成速率的方式，还可将 *aar* 与一些自身溶解度较高的蛋白编码基因进行融合表达的方式来增加 AAR 蛋白的可溶性表达水平。本小节选择了两类自身溶解度较高的蛋白，一是脂肪醛脱羧基酶蛋白 ADO（26.2 kDa）或荧光蛋白 GFP（25.1 kDa），二是一些典型的可溶蛋白标签包括来源于 *E. coli* 的麦芽糖结合蛋白 MBP（40.7 kDa）以及 Spy（15.2 kDa）。

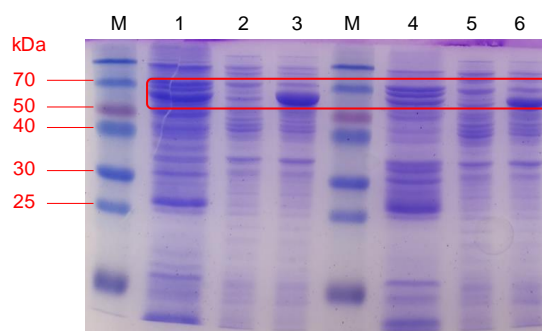


图 5.5 AARADO 或 ADOAAR 蛋白的 SDS-PAGE 结果

M 通道：标准蛋白样品（kDa）；通道 1，纯化后的 AARADO<sub>his</sub>（64.6 kDa）蛋白；通道 2，AARADO 粗蛋白的可溶性表达组分；通道 3，AARADO 粗蛋白的不可溶性表达组分；通道 4，纯化后的 ADOAAR<sub>his</sub>（64.6 kDa）蛋白；通道 5，ADOAAR 粗蛋白的可溶性表达组分；通道 6，ADOAAR 粗蛋白的不可溶性表达组分。

Fig. 5.5 SDS-PAGE of AARADO or ADOAAR

Lane M, molecular mass markers (in kDa); lane 1, purified AARADO<sub>his</sub> (64.6 kDa); lane 2, AARADO in crude soluble fraction; lane 3, AARADO in crude insoluble fraction; lane 4, purified ADOAAR<sub>his</sub> (64.6 kDa); lane 5, ADOAAR in crude soluble fraction; lane 6, ADOAAR in crude insoluble fraction.

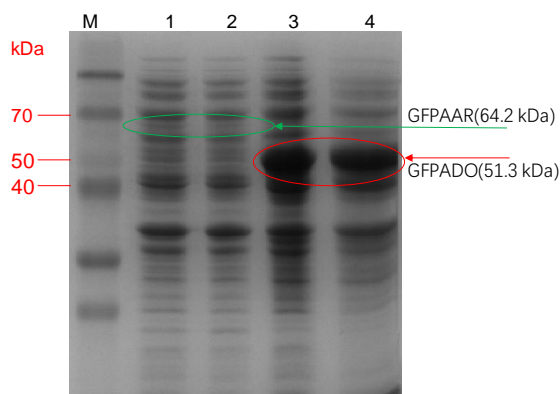


图 5.6 GFPAAR 或 GFPADO 蛋白在可溶性组分中的 SDS-PAGE 结果

M 通道：标准蛋白样品（kDa）；通道 1 和 2，GFPAAR（64.2 kDa）粗蛋白；通道 3 和 4，GFPADO（51.3 kDa）粗蛋白。

Fig. 5.6 SDS-PAGE of GFPAAR or GFPADO in crude soluble fraction

Lane M, molecular mass markers (in kDa); lane 1 and 2, GFPAAR (64.2 kDa); lane 3 and 4 GFPADO (51.3 kDa).

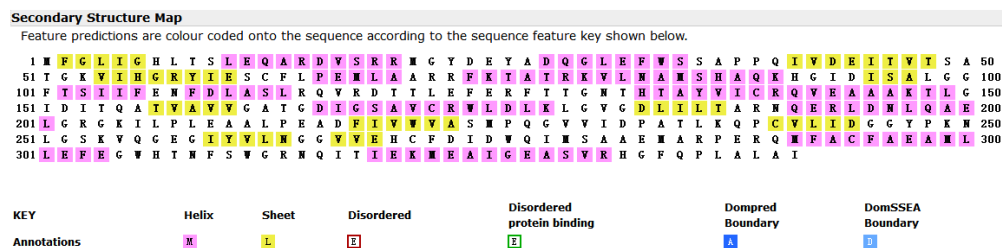
首先, 将 ADO 与 AAR 进行融合表达的 SDS-PAGE 结果如图 5.5 所示, 在上清液中有较浅的 AARADO 及 ADOAAR 可溶性融合蛋白条带出现。蛋白纯化结果也显示, 能够纯化出大小相近的 AARADO 及 ADOAAR 可溶性蛋白条带。该结果表明这种融合方式可以适当增加 AAR 的溶解度。脂肪烃的合成结果如图 5.2 所示, 重组菌 *E. coli* BL21-pET-28a-aarado 及 *E. coli* BL21-pET-28a-adoaar 能够检测到十五烷和十七烯, 脂肪烃总产量分别为 0.4 mg/L 和 0.3 mg/L。

其次, 将荧光蛋白编码基因 *gfp* 与 *aar* 或者 *ado* 进行融合表达, 如图 5.6 的 SDS-PAGE 结果所示, GFP AAR 有较少的可溶性蛋白表达, GFP ADO 蛋白的可溶性表达较高, 与可溶性蛋白 GFP 融合, 一定程度上提升了 AAR 的溶解度。使用共聚焦荧光显微镜检测荧光亮度结果显示, 在背景亮度相同的情况下, *E. coli* BL21-pET-28a-gfpado 菌株的荧光强度比 *E. coli* BL21-pET-28a-gfpaar 要高, 说明与 *gfp* 融合的 *aar* 在 *E. coli* BL21 中可以正常表达, 但是与比 *ado* 的表达更弱一些。如图 5.2 脂肪烃合成结果所示, 重组菌株 *E. coli* BL21-pET-28a-gfpadoaar 和 *E. coli* BL21-pET-28a-gfpaarado 的产烃情况不如 *E. coli* BL21-pET-28a-aarado, *E. coli* BL21-pET-28a-adoaar, 而后两者的产烃情况也不如重组菌株 *E. coli* BL21-pET-28a-aar-rbs-ado 的发酵产烃结果。

第三, 选择两种典型的可溶性蛋白标签 MBP (40 kDa) 或者 SPY (14.5 kDa) 分别与 AAR 进行共表达。依据 Biasini 等<sup>[258]</sup>的方法, 对 *aar* 和 *ado* 两个基因编码蛋白的二级结构进行分析, 图 5.7 结果显示 AAR 蛋白的 N 端的灵活度较低且具有多个折叠结构, 因此在可溶蛋白标签和 AAR 之间加一个较长且柔和的多肽。本研究选择了两种连接子 (linker), SGSGSGSGGGSGGGG 和 GGGSGGGSGGGG。经实验验证第一种连接子 SGSGSGSGGGSGGGG 的效果较好。重组菌 *E. coli* BL21-pET-28a-mbp-linker1-aar 和 *E. coli* BL21-pET-28a-spy-linker1-aar 的 SDS-PAGE 结果如图 5.8 所示, 可溶蛋白标签 MBP 和 SPY 对 AAR 的溶解度的提升较为明显, 能够明显的检测到 MBPAAR (78.4 kDa) 及 SPYAAR (52.9 kDa) 的蛋白条带。图 5.2 产烃结果显示, SPY 融合蛋白标签的利用不仅提升了 AAR 溶解度, 也增加了脂肪烃的产量, 重组菌 *E. coli* BL21-pET-28a-P<sub>T7</sub>-spy-linker1-aar-P<sub>T7</sub>-ado 产生的脂肪烃的总含量达到 17.0 mg/L, 与未添加融合蛋白标签的重组菌相比提升了 21.4%, 该结果表明, 增加 AAR 的溶解度能够提升重组菌株的脂肪烃产量。

最后, 通过 RED 重组的方式将该脂肪烃合成路径中的两个关键基因整合至 *E. coli* BL21 的基因组上, 选择的整合位点为脂肪酸氧化产生脂酰-CoA 的关键酶的编码基因 *fadE*。重组菌株的脂肪烃生产结果显示 (图 5.2), 重组菌 *E. coli* BL21 $\Delta$ *fadE*::P<sub>T7</sub>:aar-P<sub>T7</sub>:ado 的发酵液中并未检测到脂肪烃的生成, *E. coli* BL21 $\Delta$ *fadE*-pET-28a-P<sub>T7</sub>:aar-P<sub>T7</sub>:ado 产生了 3.0 mg/L 十五烷 (C<sub>15:0</sub>) 和 16.8 mg/L 十七碳烯 (C<sub>17:1</sub>), *E. coli* BL21 $\Delta$ *fadE*::P<sub>T7</sub>:aar-P<sub>T7</sub>:ado-pET-28a-P<sub>T7</sub>:aar-P<sub>T7</sub>:ado 产生了 3.9 mg/L 十五烷 (C<sub>15:0</sub>) 和 21.6 mg/L 十七碳烯 (C<sub>17:1</sub>), 说明含有表达质粒 pET-28a-P<sub>T7</sub>:aar-P<sub>T7</sub>:ado 的重组 *E. coli* BL21 中 *fadE* 的敲除有助于提升脂肪烃的产量。

(a) AAR



(b) ADO

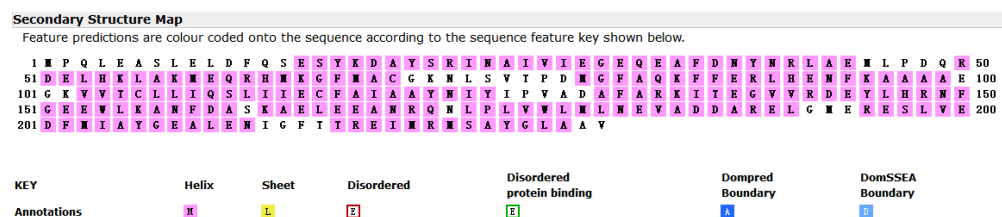


图 5.7 (a) *aar* 与 (b) *ado* 编码氨基酸序列的二级结构预测

Fig. 5.7 Secondary structure prediction of amino acid sequences encoded by (a) *aar* and (b) *ado*

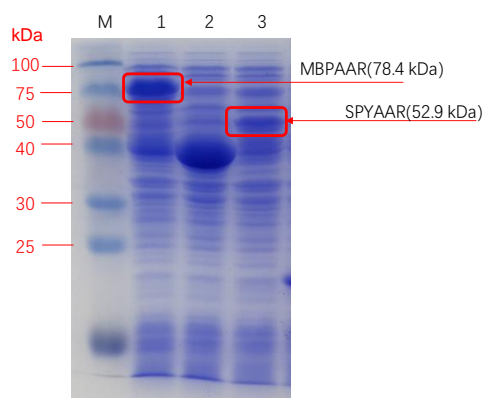


图 5.8 MBPAAR 或 SPYAAR 在可溶性组分中的 SDS-PAGE 结果

M 通道：标准蛋白样品 (kDa)；通道 1，MBP-Linker1-AAR (78.4 kDa) 粗蛋白；通道 2，MBP-Linker2-AAR (78.4 kDa) 粗蛋白；通道 3，SPY-Linker1-AAR (52.9 kDa) 粗蛋白

Fig. 5.8 SDS-PAGE of MBPAAR or SPYAAR in crude soluble fraction

Lane M, molecular mass markers (in kDa); lane 1, MBP-Linker1-AAR (78.4 kDa); lane 2, MBP-Linker2-AAR (78.4 kDa); lane 3, SPY-Linker1-AAR (52.9 kDa)

依据上述多种重组菌的脂肪烃合成实验结果得到，两个基因分别在单独的启动子启动下的构建方式更有利于脂肪烃的生产。通过与融合蛋白标签 SPY 共表达的方式促进了 AAR 的可溶性蛋白表达水平，并且将脂肪烃产量的提升了 21.4%；脂肪酸氧化路径的阻断，可能通过促进脂肪酸前体物质脂酰-ACP 的积累，对脂肪酸的产量提升了 32.6%。但是将重组 *E. coli* 在新鲜或经生物脱毒后的玉米秸秆水解液中进行发酵验证时发现该菌株对木质纤维素体系的适应能力比较差（数据未展示），*E. coli* 并不是一株优秀的适宜木质纤维素生物炼制工艺的发酵菌株。利用木质纤维素原料进行脂肪烃生产的重要前提是选择对木质纤维素体系具有较强的适应性菌株。因此接下来尝试利用 *C. glutamicum* S9114 作为底盘微生物进行代谢产烃路径的构建。

### 5.3.3 *C. glutamicum* S9114 中脂肪烃合成路径的构建

在 *C. glutamicum* 中产脂肪烃合成路径的构建，以表达质粒 pTRCmob 为原始质粒，另外选择三种强启动子  $P_{H36}$ ,  $P_{efu}$ ,  $P_{tac-M}$ , 两种 RBS 序列构建了六个重组表达质粒，将来源于蓝藻的长链脂酰-ACP 还原酶编码基因 *aar* 以及脂肪醛羧化酶编码基因 *ado* 构建至同一个质粒 pTRCmob 上。

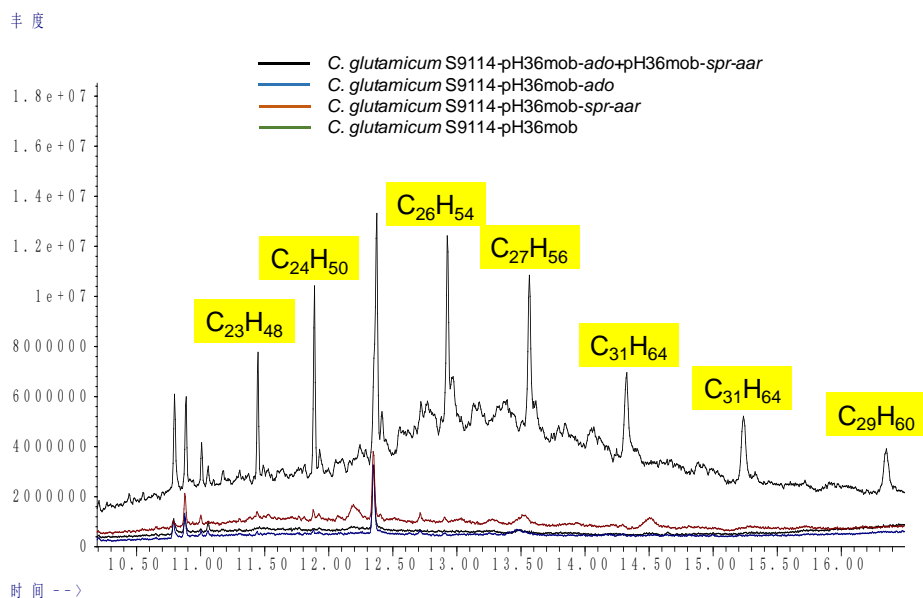


图 5.9 *C. glutamicum* S9114 重组菌株的 GC-MS 结果

发酵条件: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 30 mL CGXII-NL 培养基/250 mL 摇瓶。

Fig. 5.9 GC-MS results of *C. glutamicum* S9114 recombinants

Conditions: 30 °C, 200 rpm, pH 7.0, 30 mL CGXII-NL medium/250 mL flask.

发酵结果显示，重组 *C. glutamicum* 菌株在 3 L 发酵罐中利用 CGXII-NL 限氮培养基进行培养时，含有单个重组质粒的重组菌未检测到脂肪烃的产生，推测两个基因没有在 *C. glutamicum* 中得到高效的表达或者脂肪烃合成产量较低。因此，将两个基因分别构建至含有不同抗性基因的表达质粒 pH36mob 和 pH36mobspr 上，在 *C. glutamicum* 中进行两个质粒的兼容性表达，以期两个基因的表达互不影响，从而提升脂肪烃的表达量。如图 5.9 中 GC-MS 检测结果显示，含有 pH36mob-*ado* 和 pH36mobspr-*aar* 两个质粒的重组菌 *C. glutamicum* S9114-pH36mob+pH36mobspr-*aar* 能够合成一些如 C23, C24, C27, C29, C31 等链长的超长链 ( $\geq 23$ ) 烷烃。这个结果与常规微生物中的脂肪烃合成种类的碳链长度不一致，如上述重组 *E. coli* 合成以十五烷和十七烯为主的烃类化合物，该菌株合成的脂肪酸种类以棕榈酸（十六烷酸）及油酸（十八烯酸）为主，产生的烃类化合物却以超长链烷烃为主。因此接下来对该重组菌株中超长链烷烃的合成路径进行了推测。

### 5.3.4 *C. glutamicum* S9114 重组菌中长链脂肪烃合成路径推测

依据 *C. glutamicum* S9114 的全基因组注释，本小节推测了该菌株中可能存在的两条超长链烷烃 (C<sub>23</sub>-C<sub>31</sub>) 合成路径 (图 5.10)。



首先, 由于多数天然微生物中烃类化合物的合成与胞内脂肪酸代谢路径相关, 因此推测重组 *C. glutamicum* S9114 中超长链烷烃的合成与菌株胞内脂肪酸代谢路径相关。*C. glutamicum* 中存在两类脂肪酸合成酶 FAS-I 及 FAS-II, 其中 I 型脂肪酸合成酶是该菌株脂肪酸代谢的主要酶, FAS-II 型的脂肪酸合酶在其中不发挥作用<sup>[259]</sup>。*C. glutamicum* 依赖 FAS-I 脂肪酸合成酶产生的直链脂肪酸种类主要是棕榈酸 (C<sub>16:0</sub>) 和油酸 (C<sub>18:1</sub>), 因此推测 *aar* 和 *ado* 的表达激活了 *C. glutamicum* 中的 FAS-II 脂肪酸合成酶, 其可以利用 FAS-I 合成的脂肪酸作为底物继续进行延长代谢, 使得脂肪酸合成过程中的碳链不断延长产生超长链脂酰-ACP, 后者在 AAR 的作用下产生超长链脂肪醛, 然后在 ADO 的催化作用下脱甲酸产生超长链烷烃。

其次, 超长链烷烃的合成路径可能与 *C. glutamicum* 中分枝菌酸的合成相关。诸如谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum*, 结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*, 麻风分枝杆菌 *Mycobacterium Leprae* 及白喉棒状杆菌 *Corynebacterium diphtheriae* 等棒状杆菌科的微生物除了可以合成直链脂肪酸外, 还能合成超长碳链长度的分枝菌酸 (支链脂肪酸)<sup>[260, 261]</sup>。分枝菌酸在微生物中可以形成不透水的疏水性外层, 与微生物的抗药性<sup>[261]</sup>及胞内代谢产物的分泌<sup>[263]</sup>相关。不同的微生物合成的分枝菌酸碳链长度也存在差异, 其中 *C. glutamicum* 产生分枝菌酸的碳链长度主要在 C<sub>22</sub>-C<sub>38</sub> 之间<sup>[260, 261]</sup>, 因此推测重组 *C. glutamicum* 中的超长链烷烃的合成路径更可能与分枝菌酸的合成路径相关。分枝菌酸的合成机制也与微生物的脂肪酸代谢路径相关, 利用 FAS-I 脂肪酸合成酶生成的脂肪酸类代谢产物通过缩合、羧化、激活和还原等系列反应完成<sup>[259, 264, 265]</sup>。依赖于分枝菌酸合成路径推测的超长链烷烃合成路径如图 5.10 所示, 经 FAS-I 合成的游离脂肪酸分别被 *CGS9114\_RS12330* 激活为脂酰-AMP, 脂酰-CoA 在乙酰-CoA 羧化酶编码基因 *CGS9114\_RS12340* 的作用下产生羧酸脂酰 CoA, 通过分枝菌酸合成路径中的关键酶缩合酶编码基因 *CGS9114\_RS12335*<sup>[267]</sup>的作用下催化产生超长链酮酰基-ACP 产物, 然后再经系列脱水、还原反应产生超长链脂酰-ACP, 最后经过 AAR 及 ADO 的催化生成超长链烷烃。

综上所述, *C. glutamicum* S9114 中超长链烷烃的合成路径可能与胞内脂肪酸代谢和分枝菌酸合成路径中是相关的, 本小节为后续 *C. glutamicum* S9114 作为宿主微生物利用木质纤维素原料产超长链烃提供了重要的参考依据及改造思路。

## 5.4 本章小结

本章节将蓝藻来源的脂肪烃的合成路径分别在 *E. coli* 和 *C. glutamicum* S9114 中进行了构建和初步评价, 对微生物产烃路径中的一些关键问题进行了探索。本章节研究的主要结论如下:

(1) 蓝藻来源的长链脂酰-ACP 还原酶 AAR 在 *E. coli* BL21 中诱导表达时容易形成包涵体结构, 降低诱导温度及与可溶性蛋白标签共表达的方法可以提高 AAR 的可溶性表达水平。其中 AAR 与可溶性蛋白标签 SPY 的融合表达, 能够将重组菌株的脂肪烃

的产量提升 21.4%。

(2) 重组 *E. coli* 菌株合成的脂肪烃主要为十五烷烃 (C<sub>15:0</sub>) 及十七烯烃 (C<sub>17:1</sub>)，敲除脂肪酸氧化路径中关键酶的编码基因 *fadE* 对脂肪烃的合成有促进作用，将脂肪烃的产量提升了 32.6%。

(3) 将蓝藻中脂肪烃合成路径中的两个关键基因在 *C. glutamicum* S9114 中进行产烃路径构建，重组菌株发酵生成超长链 (C<sub>23</sub>-C<sub>31</sub>) 长的脂肪烷烃。依据 *C. glutamicum* S9114 的全基因组注释，推测了 *C. glutamicum* 中两条可能的超长链烃的合成路径，与微生物中脂肪酸代谢及分枝菌酸合成路径相关，代谢路径的推测将为后续解析 *C. glutamicum* S9114 的长链烃的合成机制提供了重要参考价值。

## 第 6 章 结论与展望

### 6.1 结论

呋喃醛和酚醛是木质纤维素生物炼制过程中产生的两大类主要抑制物，不仅会抑制纤维素酶的水解效率，还会对生物炼制发酵菌株的生长和代谢产物积累产生严重的抑制作用。针对呋喃醛和酚醛类抑制物对发酵微生物带来的毒性抑制，可采用典型生物炼制过程中的生物脱毒工艺即利用专司生物脱毒的微生物在发酵前对抑制物进行脱除处理，或是使用具有高抑制物耐受性的生物炼制发酵微生物同步脱毒与发酵过程。本研究将干式生物炼制中的生物脱毒工艺成功应用至木质纤维素柠檬酸生产中，完成了木质纤维素柠檬酸的高指标发酵；通过 DNA 芯片和 qRT-PCR 定量技术阐明了两株高抑制物耐受性生物炼制发酵微生物 *G. oxydans* DSM 2003 和 *C. glutamicum* S9114 转化呋喃醛和酚醛的分子生物学机制，筛选并鉴定得到了与呋喃醛和酚醛抑制物转化相关的重要基因；利用模式菌株 *E. coli* 及生物炼制发酵菌株 *C. glutamicum* S9114 进行新型生物燃料脂肪烃的合成路径构建及初步评价。上述研究内容的主要结论如下：

(1) 木质纤维素干法生物脱毒工艺成功拓展应用至木质纤维素柠檬酸的生产中。工业上用于柠檬酸发酵的菌株 *A. niger* SIIM M288 对木质纤维素体系耐受能力较差，呋喃醛和酚醛类抑制物对该菌株的生长和柠檬酸的发酵有较强的抑制作用。在发酵前阶段利用专司生物脱毒的 *A. resiniae* ZN1 将玉米秸秆原料中的呋喃醛和酚醛抑制物进行脱除后，*A. niger* SIIM M288 可利用 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液进行高指标柠檬酸发酵。生物脱毒玉米秸秆水解液富含充足的营养组分，除氮源外不需向其额外补充任何营养物质即可满足柠檬酸的发酵需求。在仅补充 1 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的 25% (w/w) 固含量脱毒玉米秸秆水解液中，33 °C，初始 pH 6.0 条件下发酵 192 h，最终得到的柠檬酸的浓度达 100.0 g/L，基于葡萄糖的得率为 94.1%。

(2) *G. oxydans* DSM 2003 中细胞膜结合型的葡萄糖氧化呼吸链对呋喃醛和酚醛的耐受性较强。该菌株能够转化呋喃醛和酚醛产生相应的醇和酸，酸类产品是醛类抑制物降解转化的主要产物。基于 DNA 芯片技术，筛选到多个氧化还原酶参与 *G. oxydans* DSM 2003 还原醛类抑制物产生醇类产物的过程以及氧化醛类抑制物产生酸类产物的过程，特别是细胞膜结合型的氧化还原酶在醛类抑制物的转化中可能发挥了更为重要的作用。此外，醛类抑制物的转化过程还涉及大量转运蛋白编码基因的响应，这些转运体可能与进入 *G. oxydans* DSM 2003 胞内的醛类抑制物的转化过程相关。

(3) *C. glutamicum* S9114 能够转化呋喃醛和酚醛产生相应的醇和酸，呋喃醇和酚醇会继续转化为呋喃酸和酚酸，呋喃酸是该菌株转化醛类抑制物的主要产物，而酚酸在该菌株中可以继续降解进入中心碳代谢。基于呋喃醛和酚醛处理下的 qRT-PCR 定量结果显示，多个醇脱氢酶、醛脱氢酶及氧化还原酶参与了 *C. glutamicum* S9114 还原产呋喃醇和酚醇的过程及氧化产生呋喃酸和酚酸的过程。单基因过表达实验结果表明，多个在

转录水平上调表达的基因对呋喃醛和酚醛转化有促进作用。特别是一个在两种呋喃醛和三种酚醛胁迫下均显著差异上调表达的醇脱氢酶编码基因 *CGS9114\_RS01115* 的过表达, 对五种典型醛类抑制物的转化都有促进作用。

(4) 重组 *E. coli* 可以生成以十五烷 (C<sub>15:0</sub>) 和十七烯 (C<sub>17:1</sub>) 为主的直链脂肪烃。AAR 与可溶性蛋白标签 SPY 的融合表达, 提升了 AAR 蛋白的可溶性表达水平, 脂肪烃产量提升了 21.4%, 通过敲除脂酰-CoA 合成酶编码基因 *fadE* 阻断了胞内脂肪酸代谢的氧化路径, 脂肪烃的产量提升了 32.6%。重组 *C. glutamicum* S9114 可以代谢产生一些碳链长度超过 23 的超长链长的烷烃, 推测其在 *C. glutamicum* S9114 中的合成路径除与脂肪酸的代谢路径相关外还与胞内的分枝菌酸合成路径相关。

## 6.2 创新点

(1) 本研究首次将典型干法木质纤维素生物脱毒工艺成功应用至木质纤维素柠檬酸的生产中, 该生物炼制过程中没有废水的产生, 除少量氮源外不需要向木质纤维素原料中添加额外的营养组分和诱导剂, 最终得到的木质纤维素柠檬酸的浓度达到了工业上柠檬酸分离纯化的浓度标准, 为以木质纤维素为原料生产柠檬酸的产业化提供了重要的可行性参考依据。

(2) 利用 DNA 芯片技术首次对木质纤维素生物炼制发酵微生物 *G. oxydans* DSM 2003 中呋喃醛和酚醛的脱毒机制进行了解析, 推测出该菌株转化呋喃醛和酚醛的分子生物学路径。筛选出呋喃醛和酚醛抑制物转化过程中的关键酶, 负责醛类抑制物转化的细胞膜结合型脱氢酶的挖掘, 为高抗逆生物炼制发酵微生物的构建提供一种新的代谢工程改造思路, 也为后续生物炼制领域中通过代谢工程手段构建高抑制物耐受发酵菌株提供了丰富的基因储备资源。

(3) 利用 qRT-PCR 技术, 本研究首次从转录水平上综合性分析了 *C. glutamicum* S9114 中呋喃醛和酚醛抑制物的转化机理。筛选并鉴定出多个在 *C. glutamicum* S9114 中能够促进多种典型醛类抑制物的作用基因。参与多种醛类抑制物的转化的相关基因的挖掘, 可进一步应用至生物炼制领域其它抗逆发酵微生物的构建研究中, 以促进生物炼制发酵微生物在对木质纤维素的利用效率。

(4) 本研究从提高 AAR 蛋白的可溶性表达水平方面考虑促进了脂肪烃的合成。首次将蓝藻来源的烷烃合成路径构建至 *C. glutamicum* S9114 中, 发现重组菌株可以产生碳链长度超过 23 的超长链烷烃。推测出的两条 *C. glutamicum* 产超长链烃的合成路径, 为后续长链烃的代谢机制解析提供了重要的参考价值。

## 6.3 展望

本研究针对木质纤维素生物炼制中具有毒性作用的呋喃醛和酚醛类抑制物, 从微生物脱毒方面采取了相应的应对和分析策略。但是在研究过程中仍存在问题有待进一步的深入研究:

(1) 借助专司生物脱毒的菌株在发酵前将抑制物彻底脱除的方式, 会增加整个木

质纤维素生物炼制工艺的时间及能耗成本。后续可以考虑通过代谢工程改造或长期驯化的手段提高工业柠檬酸生产菌株 *A. niger* SIIM M288 对呋喃醛和酚醛抑制物的耐受能力，从而缩短常规生物脱毒时间。另一方面，也可以选择一些高抑制物耐受型发酵微生物进行柠檬酸代谢积累的代谢工程改造。

(2) 与其它多数微生物主要通过还原醛类抑制物的脱毒机制不同, *G. oxydans* DSM 2003 主要通过将呋喃醛和酚醛氧化为呋喃酸和酚酸完成脱毒过程, 通过 DNA 芯片数据筛选到的细胞膜结合型的醛脱氢酶在其中可能发挥了重要的功能, 后续会进一步在酶学水平上对细胞膜结合型的醛脱氢酶进行功能验证。此外, 对于 *G. oxydans* DSM 2003 在五种醛类抑制物胁迫下的 DNA 芯片数据, 本研究只分析了与抑制物转化相关的显著差异上调表达的基因, 一些显著差异下调表达的基因可能在醛类抑制物的转化中也发挥了重要功能, 需要进一步的分析。

(3) 本研究从定量数据中筛选到的与抑制物转化相关的关键基因在 *C. glutamicum* S9114 中的过表达结果显示, 单个基因的过表达对呋喃醛和酚醛转化性能的提升幅度有限。呋喃醛和酚醛类抑制物在微生物中的生物转化或降解可能是由多个氧化还原酶的协同作用的结果。后续考虑对相关基因进行组合或者系统的修改以更加完整的阐述 *C. glutamicum* S9114 中醛类抑制物的转化途径。

(4) 可进一步通过代谢工程手段从分子水平解析 *C. glutamicum* S9114 中推测出的超长链烃的合成机制, 以及通过对脂肪酸及分枝菌酸代谢路径的改造进一步提升脂肪烃的产量。本研究在 *C. glutamicum* S9114 中超长链脂肪烃合成路径的构建仅通过构建重组质粒进行过表达实现, 后续可将相关基因整合至该菌株的基因组中进行脂肪烃的合成。另外, 本研究仅考察了蓝藻来源脂肪烃合成路径在生物炼制发酵微生物中的构建, 还存在其他产烃路径可以构建至生物炼制发酵菌株中进行产烃效率的考察。

## 参考文献

- [1] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 69(6): 627-642.
- [2] Chen W, Wu FW, Zhang JH. Potential production of non-food biofuels in China. *Renewable Energy*. 2016, 85: 939-944.
- [3] Ji LQ. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 44: 561-575.
- [4] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, 9(6): 598-612.
- [5] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, et al. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. 2006, 311(5760): 484-489.
- [6] Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51(7): 1412-1421.
- [7] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016, 39(1): 133-140.
- [8] Octave S, Thomas D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*. 2009, 91(6): 659-664.
- [9] da Costa Sousa L, Chundawat SP, Balan V, et al. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20(3): 339-347.
- [10] Silveira MHL, Morais ARC, da Costa Lopes AM, et al. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*. 2015, 8(20): 3366-3390.
- [11] Mupondwa E, Li X, Tabil L, et al. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 72: 178-190.
- [12] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1959-1966.
- [13] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.
- [14] He YQ, Zhang LP, Zhang J, et al. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 1.
- [15] Zhang J, Chu DQ, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4): 718-728.
- [16] Lloyd TA, Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1967-1977.
- [17] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 17-24.
- [18] Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*. 2007, 25(7): 759-761.
- [19] Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20(3): 372-380.

- [20] Girio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4775-4800.
- [21] Palonen H, Viikari L. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 86(5): 550-557.
- [22] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4744-4753.
- [23] Jing XY, Zhang XX, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3): 696-707.
- [24] Hawkins GM, Doran-Peterson J. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4(1): 49.
- [25] Bai ZZ, Gao Z, He BF, et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on the growth and D-lactic acid production of *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015, 38(10): 1993-2001.
- [26] Zhang HS, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 211-219.
- [27] Wang J, Gao QQ, Zhang HZ, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 892-901.
- [28] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(6): 1207-1218.
- [29] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 53(6): 701-708.
- [30] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 65(1): 24-33.
- [31] Yi X, Zhang P, Sun JE, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Bacteriology*. 2016, 217: 112-121.
- [32] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1981, 11(4): 226-228.
- [33] Modig T, Lidén G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 2002, 363(3): 769-776.
- [34] Palmqvist E, Almeida JS, Hahn-Hagerdal B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 62(4): 447-454.
- [35] Huang C, Wu H, Liu QP, et al. Effects of aldehydes on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(9): 4606-4613.
- [36] Xu HT, Wang C, Zhou ZH, et al. Effects of lignocellulose-derived inhibitors on growth and succinic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2015, 20(4): 744-752.
- [37] Allen SA, Clark W, McCaffery JM, et al. Furfural induces reactive oxygen species

- accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3(1): 2.
- [38] Khan QA, Hadi SM. Inactivation and repair of bacteriophage lambda by furfural. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1994, 32(2): 379-385.
- [39] Liu ZL. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90(3): 809-825.
- [40] Pienkos PT, Zhang M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 2009, 16(4): 743-762.
- [41] Mikulášová M, Vodný Š, Pekarovičová A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass*. 1990, 23(2): 149-154.
- [42] Larsson S, Quintana-Sainz A, Reimann A, et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, 84-86(1-9): 617-632.
- [43] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 25-33.
- [44] Heipieper HJ. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol*. 1994, 12: 409-415.
- [45] Yi X, Gu HQ, Gao QQ, et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 153.
- [46] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 66(1): 10-26.
- [47] Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992, 73(5): 363-370.
- [48] Pampulha M, Loureirodias M. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1989, 31(5-6): 547-550.
- [49] Roe AJ, McLaggan D, Davidson I, et al. Perturbation of anion balance during Inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180(4): 767-772.
- [50] Giannattasio S, Guaragnella N, Zdravlevic M, et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Frontiers in Microbiology*. 2013, 4: 33.
- [51] Kim D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review. *Molecules*. 2018, 23(2): 309.
- [52] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 77(1-3): 91-103.
- [53] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 16.
- [54] Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, et al. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27(3-5): 240-247.
- [55] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, 91-93(1-9): 35-49.
- [56] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 2004,

- 93(1): 1-10.
- [57] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011, 31(1): 20-31.
- [58] Moreno AD, Ibarra D, Alvira P, et al. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015, 35(3): 342-354.
- [59] Ran H, Zhang J, Gao QQ, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 51.
- [60] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [61] Fonseca BG, Moutta RDO, Ferraz FDO, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38(1): 199-207.
- [62] Jurado M, Prieto A, Martinez-Alcala A, et al. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource Technology*. 2009, 100(24): 6378-6384.
- [63] Wierckx N, Koopman F, Ruijsenaars HJ, et al. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 92(6): 1095-1105.
- [64] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, Szengyel Z, et al. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 20: 286-293.
- [65] Wang P, Brenchley JE, Humphrey AE. Screening microorganisms for utilization of furfural and possible intermediates in its degradative pathway. *Biotechnology Letters*. 1994, 16(9): 977-982.
- [66] Almeida JR, Modig T, Roder A, et al. *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1(1): 12.
- [67] Koenig K, Andreesen JR. Molybdenum Involvement in Aerobic Degradation of 2-Furoic Acid by *Pseudomonas putida* Fu1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55(7): 1829-1834.
- [68] Huang X, Wang YM, Liu W, et al. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(20): 9705-9709.
- [69] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, 87(2): 169-174.
- [70] Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, et al. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106(2): 128-133.
- [71] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(1): 125-131.
- [72] Park H-S, Um Y, Sim SJ, et al. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochemistry*. 2015, 50(3): 347-356.
- [73] Miller EN, Jarboe LR, Turner PC, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and*

- Environmental Microbiology. 2009, 75(19): 6132-6141.
- [74] Wang X, Gao QQ, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 136.
- [75] Trudgill PW. The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochemical Journal*. 1969, 113(4): 577.
- [76] Koenig K, Andreesen JR. Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172(10): 5999-6009.
- [77] Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(11): 4919-4924.
- [78] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 42(7): 624-630.
- [79] Brune G, Schoberth SM, Sahn H. Growth of a strictly anaerobic bacterium on furfural (2-furaldehyde). *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, 46(5): 1187-1192.
- [80] Boopathy R, Daniels L. Isolation and characterization of a furfural degrading sulfate-reducing bacterium from an anaerobic digester. *Current Microbiology*. 1991, 23(6): 327-332.
- [81] Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(20): 8675-8683.
- [82] Tsuge Y, Kudou M, Kawaguchi H, et al. FudC, a protein primarily responsible for furfural detoxification in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(6): 2685-2692.
- [83] Buchert J, Niemelä K. Oxidative detoxification of wood-derived inhibitors by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Biotechnology*. 1991, 18(1-2): 1-12.
- [84] Zhou XL, Zhou X, Xu Y, et al. *Gluconobacter oxydans* (ATCC 621H) catalyzed oxidation of furfural for detoxification of furfural and bioproduction of furoic acid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2017, 92(6): 1285-1289.
- [85] Lin FM, Qiao B, Yuan YJ. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(11): 3765-3776.
- [86] Bajwa PK, Ho CY, Chan CK, et al. Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* T2 cells upon exposure to hardwood spent sulphite liquor: comparison to acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013, 103(6): 1281-1295.
- [87] Ma M, Liu ZL. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover *YAPI*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4*, and *HSF1* as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2010, 11(1): 660.
- [88] Boopathy R, Bokang H, Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*. 1993, 11(3): 147-150.
- [89] Gutierrez T, Buszko ML, Ingram LO, et al. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98-100(1-9): 327-340.
- [90] He MX, Wu B, Shui ZX, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1): 189-199.

- [91] Gu HQ, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresource Technology*. 2014, 157: 6-13.
- [92] Thomsen MH, Thygesen A, Thomsen AB. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 83(3): 447-455.
- [93] Chaudhry MT, Huang Y, Shen XH, et al. Genome-wide investigation of aromatic acid transporters in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*. 2007, 153(3): 857-865.
- [94] Shen Y, Li HX, Wang XN, et al. High vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014, 41(11): 1637-1645.
- [95] Shen XH, Jiang CY, Huang Y, et al. Functional identification of novel genes involved in the glutathione-independent gentisate pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(7): 3442-3452.
- [96] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1): 77-89.
- [97] Shen XH. Functional identification of the gene locus (*ncg12319*) and characterization of catechol 1,2-dioxygenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett*. 2004, 26(7): 575-580.
- [98] Li T, Chen X, Chaudhry MT, et al. Genetic characterization of 4-cresol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2014, 192: 355-365.
- [99] Shen XH, Huang Y, Liu SJ. Genomic analysis and identification of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbes and Enviroments*. 2005, 20(3): 160-167.
- [100] Huang Y, Zhao KX, Shen XH, et al. Genetic characterization of the resorcinol catabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(11): 7238-7245.
- [101] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 62(2-3): 99-109.
- [102] Qi SW, Chaudhry MT, Zhang Y, et al. Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis via fructose-1,6-bisphosphatase. *Proteomics*. 2007, 7(20): 3775-3787.
- [103] Merkens H, Beckers G, Wirtz A, et al. Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Current Microbiology*. 2005, 51(1): 59-65.
- [104] Hu MS, Wang J, Gao QQ, et al. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Bacteriology*. 2018, 281: 81-86.
- [105] Shields-Menard SA, AmirSadeghi M, Green M, et al. The effects of model aromatic lignin compounds on growth and lipid accumulation of *Rhodococcus rhodochrous*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2017, 121: 79-90.
- [106] Kosa M, Ragauskas AJ. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 93(2): 891-900.
- [107] Mitsui R, Hirota M, Tsuno T, et al. Purification and characterization of vanillin dehydrogenases from alkaliphile *Micrococcus* sp. TA1 and neutrophile *Burkholderia cepacia* TM1. *FEMS Microbiology Letters*. 2010, 303(1): 41-47.
- [108] 姚瑞苗. 氧化葡萄糖酸杆菌的抑制物耐受性及全糖转化探究[D]. 华东理工大学. 2017.
- [109] 张宏森. 木质纤维素干法生物炼制生产葡萄糖酸和木糖酸的微生物发酵过程研究

- [D]. 华东理工大学. 2017.
- [110] 冉红. *Amorphotheca resinae* ZN1 对木质纤维素来源的芳香醛代谢路径的实验研究[D]. 华东理工大学. 2014.
- [111] 易霞. 酚醛抑制物生物脱毒的分子生物学解析及其关键基因元器件库的构建[D]. 华东理工大学. 2016.
- [112] Sundström L, Larsson S, Jönsson LJ. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in the resistance to phenolic fermentation inhibitors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 161(1-8): 106-115.
- [113] Chen C, Pan JF, Yang XB, et al. Global transcriptomic analysis of the response of *Corynebacterium glutamicum* to vanillin. *PLoS One*. 2016, 11(10): 1-10.
- [114] Ding W, Si MR, Zhang WP, et al. Functional characterization of a vanillin dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific Reports*. 2015, 5: 8044.
- [115] Morabbi HK, Lange J, Watzlawick H, et al. Transcriptional regulation of the vanillate utilization genes (*vanABK* Operon) of *Corynebacterium glutamicum* by VanR, a PadR-like repressor. *Journal of Bacteriology*. 2015, 197(5): 959-972.
- [116] Overhage J, Priefert H, Steinbuchel A. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(11): 4837-4847.
- [117] Overhage J, Kresse AU, Priefert H, et al. Molecular characterization of the genes *pcaG* and *pcaH*, encoding protocatechuate 3,4-dioxygenase, which are essential for vanillin catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(3): 951-960.
- [118] Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, et al. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, 52(6): 820-828.
- [119] Plaggenborg R, Overhage J, Steinbuchel A, et al. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 61(5-6): 528-535.
- [120] Shaw JP, Harayama S. Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *European Journal of Biochemistry*. 1990, 191(3): 705-714.
- [121] Fleige C, Hansen G, Kroll J, et al. Investigation of the *Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116 vanillin dehydrogenase and its impact on the biotechnical production of vanillin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(1): 81-90.
- [122] Plaggenborg R, Overhage J, Loos A, et al. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 72(4): 745-755.
- [123] Masai E, Harada Y, Peng X. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(9): 4416-4424.
- [124] Liu ZL, Ma MG, Song MZ. Evolutionarily engineered ethanogenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009, 282(3): 233-244.
- [125] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant N-O, et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 49(6): 691-697.
- [126] Kapoor RK, Rajan K, Carrier DJ. Applications of *Trametes versicolor* crude culture filtrates in detoxification of biomass pretreatment hydrolyzates. *Bioresource Technology*. 2015, 189: 99-106.

- [127] Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*. 2007, 98(10): 1947-1950.
- [128] Martin C, Galbe M, Wahlbom CF, et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, 31(3): 274-282.
- [129] Hayashi M, Mizoguchi H, Shiraishi N, et al. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2002, 66(6): 1337-1344.
- [130] Yang SH, Pan CL, Hurst GB, et al. Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. *Frontiers in Microbiology*. 2014, 5(3): 246.
- [131] Nichols NN, Lunde TA, Graden KC, et al. Chemotaxis to furan compounds by furan-degrading *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(17): 6365-6368.
- [132] Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 66(4): 203-210.
- [133] National Research Council (US) Committee on Biobased Industrial Products. Biobased industrial products: priorities for research and commercialization [J]. Staff General Research Papers Archive. 2000.
- [134] Berovic M, Legisa M. Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*. 2007, 13: 303-343.
- [135] Anastassiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, et al. Citric acid production patent review. *Recent Patents on Biotechnology*. 2008, 2(2): 107-123.
- [136] Angumeenal AR, Venkappayya D. An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, 50(2): 367-370.
- [137] Crolla A, Kennedy KJ. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using *n*-paraffin. *Journal of Biotechnology*. 2001, 89: 27-40.
- [138] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*. 2007, 25(3): 244-263.
- [139] Kuforiji O, Kuboye AO, Odunfa SA. Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. *International Journal of Plant Biology*. 2010, 1(4): 19-21.
- [140] Show PL, Oladele KO, Siew QY, et al. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*. 2015, 8(3): 271-283.
- [141] Karaffa L, Kubicek CP. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 61(3): 189-196.
- [142] Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, et al. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2): 141-149.
- [143] Khosravi-Darani K, Zoghi A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: Experimental design for citric acid production. *Bioresource Technology*. 2008, 99(15): 6986-6993.
- [144] Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, et al. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 59(4-5): 426-435.
- [145] Hang YD, Splittstoesser DF, Woodams EE, et al. Citric acid fermentation of brewery waste. *Journal of Food Science*. 1977, 42(2): 383-384.
- [146] Roukas T, Kotzekidou P. Production of citric acid from brewery wastes by surface fermentation using *Aspergillus niger*. *Journal of Food Science*. 1986, 51(1): 225-228.

- [147] Moyer AJ. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. I. Nature of the alcohol effect. *Applied Microbiology*. 1953, 1(1): 1-6.
- [148] Hang YD, Splittstoesser DF, Woodams EE. Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*. 1975, 30(5): 879-880.
- [149] Kundu S, Panda T, Majumdar SK, et al. Pretreatment of Indian cane molasses for increased production of citric acid. *Biotechnology and Bioengineering*. 1984, 26: 1114-1121.
- [150] Dhillon GS, Brar SK, Verma M, et al. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 2011, 54(2): 83-92.
- [151] Shankaranand VS, Lonsane BK. Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1994, 10(2): 165-168.
- [152] Hang YD, Woodams EE. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 1998, 65(3): 251-253.
- [153] Hang YD, Woodams EE. Grape pomace: A novel substrate for microbial production of citric acid. *Biotechnology Letters*. 1985, 7(4): 253-254.
- [154] Aravantinos-Zafirios G, Tzia C, Oreopoulou V, et al. Fermentation of orange processing waste for citric acid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994, 65(1): 117-120.
- [155] Tran CT, Sly LI, Mitchell DA. Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1998, 14(3): 399-404.
- [156] Zhang JA, Zhang XY, Han RL, et al. Fermentation of citric acid with cellulase hydrolyte by *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiology*. 2001, 21(3): 5-8.
- [157] Schirmer A, Rude MA, Li X, et al. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*. 2010, 329(5991): 559-562.
- [158] Kang MK, Zhou YJ, Buijs NA, et al. Functional screening of aldehyde decarboxylases for long-chain alkane production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 2017, 16(1): 74.
- [159] Dennis M, Kolattukudy PE. A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992, 89(12): 5306-5310.
- [160] Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ, et al. Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*. 1995, 7(12): 2115-2127.
- [161] Kalacheva GS, Zhila NO, Volova TG. Lipid and hydrocarbon compositions of a collection strain and a wild sample of the green microalga *Botryococcus*. *Aquatic Ecology*. 2002, 36(2): 317-331.
- [162] Ladygina N, Dedyukhina EG, Vainshtein MB. A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry*. 2006, 41(5): 1001-1014.
- [163] Bagaeva TV, Zinurova EE. Comparative characterization of extracellular and intracellular hydrocarbons of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry (Moscow)*. 2004, 69(4): 427-428.
- [164] Warui DM, Li N, Norgaard H, et al. Detection of formate, rather than carbon monoxide, as the stoichiometric coproduct in conversion of fatty aldehydes to alkanes by a cyanobacterial aldehyde decarboxylase. *Journal of the American Chemical Society*. 2011, 133(10): 3316-3319.
- [165] Kallio P, Pásztor A, Akhtar MK, et al. Renewable jet fuel. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 26: 50-55.

- [166] Lennen RM, Braden DJ, West RA, et al. A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 106(2): 193-202.
- [167] Machado IMP, Atsumi S. Cyanobacterial biofuel production. *Journal of Biotechnology*. 2012, 162(1): 50-56.
- [168] Parmar A, Singh NK, Pandey A, et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*. 2011, 102(22): 10163-10172.
- [169] Cao YX, Xiao WH, Zhang JL, et al. Heterologous biosynthesis and manipulation of alkanes in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 2016, 38: 19-28.
- [170] Rahmana Z, Sung BH, Yi JY, et al. Enhanced production of n-alkanes in *Escherichia coli* by spatial organization of biosynthetic pathway enzymes. *Journal of Biotechnology*. 2014, 192: 187-191.
- [171] Akhtar MK, Turner NJ, Jones PR. Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(1): 87-92.
- [172] Choi YJ, Lee SY. Microbial production of short-chain alkanes. *Nature*. 2013, 502(7472): 571-574.
- [173] Howard TP, Middelhaufe S, Moore K, et al. Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(19): 7636-7641.
- [174] Buijs NA, Zhou YJ, Siewers V, et al. Long-chain alkane production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(6): 1275-1279.
- [175] Rungtaphan W, Keasling JD. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metabolic Engineering*. 2014, 21(1): 103-113.
- [176] Foo JL, Susanto AV, Keasling JD, et al. Whole-cell biocatalytic and de novo production of alkanes from free fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 114(1): 232-237.
- [177] Chen BB, Lee DY, Chang MW. Combinatorial metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terminal alkene production. *Metabolic Engineering*. 2015, 31: 53-61.
- [178] Xu P, Qiao KJ, Ahn WS, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113(39): 10848-10853.
- [179] Blazeck J, Liu L, Knight R, et al. Heterologous production of pentane in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*. 2013, 165(3-4): 184-194.
- [180] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, et al. Fatty aldehyde dehydrogenase multigene family involved in the assimilation of n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289(48): 33275-33286.
- [181] Ahamed A, Ahring BK. Production of hydrocarbon compounds by endophytic fungi *Gliocladium* species grown on cellulose. *Bioresource Technology*. 2011, 102(20): 9718-9722.
- [182] Jiménez-Díaz L, Caballero A, Pérez-Hernández N, et al. Microbial alkane production for jet fuel industry: motivation, state of the art and perspectives. *Microbial Biotechnology*. 2017, 10(1): 103-124.
- [183] Winters K, Parker PL, Van Baalen C. Hydrocarbons of blue-green algae: geochemical significance. *Science*. 1969, 163(3866): 467-468.
- [184] Han J, Chan HWS, Calvin M. Biosynthesis of alkanes in *Nostoc muscorum*. *Journal of the American Chemical Society*. 1969, 91(18): 5156-5159.
- [185] Dembitskii VM, Dor I, Shkrob I, et al. Branched alkanes and other apolar compounds

- produced by the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* from the Negev desert. *Bioorganicheskaya Khimiya*. 2001, 27(2): 130-140.
- [186] Walker JD, Cooney JJ. Aliphatic hydrocarbons of *Cladosporium resinae* cultured on glucose, glutamic acid, and hydrocarbons. *Applied Microbiology*. 1973, 26(5): 705-708.
- [187] Manitchotpisit P, Price NPJ, Leathers TD, et al. Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*. 2011, 33(6): 1151-1157.
- [188] Merdinger E, Frye RH. Distribution of C<sup>14</sup> from glucose-1-C<sup>14</sup> in the lipid fractions of *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*. 1966, 91(5): 1831.
- [189] Stone RW, Zobell CE. Bacterial aspects of the origin of petroleum. *Industrial and Engineering Chemistry*. 2002, 44(11): 2564-2567.
- [190] Park MO. New pathway for long-chain *n*-alkane synthesis via 1-alcohol in *Vibrio furnissii* M1. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187(4): 1426-1429.
- [191] Park MO, Tanabe M, Hirata K, et al. Isolation and characterization of a bacterium that produces hydrocarbons extracellularly which are equivalent to light oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 56(3-4): 448-452.
- [192] Tornabene TG, Oró J. <sup>14</sup>C incorporation into the fatty acids and aliphatic hydrocarbons of *Sarcina lutea*. *Journal of Bacteriology Advances*. 1967, 94(2): 349.
- [193] Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, et al. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2002, 22(3): 245-279.
- [194] Bird CW, Lynch JM. Formation of hydrocarbons by micro-organisms. *Chemical Society Reviews*. 1974, 3(3): 224-225.
- [195] Albro PW, Dittmer JC. Bacterial hydrocarbons: occurrence, structure and metabolism. *Lipids*. 1970, 5(3): 320-325.
- [196] Nikolaev YA, Panikov NS, Lukin SM, et al. Saturated C<sub>21</sub>-C<sub>33</sub> hydrocarbons are involved in the self-regulation of *Pseudomonas fluorescens* adhesion to a glass surface. *Microbiology*. 2001, 70(2): 138-144.
- [197] Arndt KA, Benson AA. Chemistry and biochemistry of natural waxes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1977, 68(6): 391-391.
- [198] Coursolle D, Lian JZ, Shanklin J, et al. Production of long chain alcohols and alkanes upon coexpression of an acyl-ACP reductase and aldehyde-deformylating oxygenase with a bacterial type-I fatty acid synthase in *E. coli*. *Molecular BioSystems*. 2015, 11(9): 2464-2672.
- [199] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*. 2010, 463(7280): 559-562.
- [200] Mendez-Perez D, Begemann MB, Pflieger BF. Modular synthase-encoding gene involved in alpha-olefin biosynthesis in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(12): 4264-4267.
- [201] Song XJ, Yu HY, Zhu K. Improving alkane synthesis in *Escherichia coli* via metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(2): 757-767.
- [202] He YQ, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360-364.
- [203] He YQ, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [204] Qureshi AS, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioresource Technology*. 2015, 189: 399-404.
- [205] Qiu ZY, Gao QQ, 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.
- [206] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. Bioresource Technology. 2018, 249: 9-15.
- [207] Zhao K, Qiao QA, Chu DQ, 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.
- [208] Liu G, Sun JE, 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.
- [209] Zhang HS, Liu G, Zhang J, et al. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. Bioresource Technology. 2016, 219: 123-131.
- [210] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. Laboratory Analytical Procedure. Technical Report NREL/TP510-42628. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 1996.
- [211] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 1987, 59: 257-268.
- [212] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976, 72(1-2): 248-254.
- [213] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in Liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42623. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. 2008.
- [214] Bizzi CA, Barin JS, Garcia EE, et al. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy. 2011, 66(5): 394-398.
- [215] Nydahl F. On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. Water Research. 1978, 12(12): 1123-1130.
- [216] 孟佼. 玉米秸秆原料的黑曲霉发酵生产柠檬酸[D]. 华东理工大学. 2014.
- [217] Angumeenal AR, Kamalakannan P, Prabhu HJ, et al. Effect of transition metal cations and anions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. Indian Journal of Chemical Technology. 2002, 9(6): 508-512.
- [218] Gutiérrez-Rojas M, Córdova J, Auria R, et al. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. Biotechnology Letters. 1995, 17: 219-224.
- [219] Roukas T, Harvey L. The effect of pH on production of citric and gluconic acid from beet molasses using continuous culture. Biotechnology Letters. 1988, 10(4): 289-294.
- [220] Haq I, Ali S, Qadeer MA, et al. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. Bioresource Technology. 2003, 86(3): 227-233.
- [221] Nikolov ZL, Meagher MM, Reilly PJ. Kinetics, equilibria, and modeling of the formation of oligosaccharides from D-glucose with *Aspergillus niger* glucoamylases I and II. Biotechnology and Bioengineering. 1989, 34: 694-704.
- [222] Pazur JH, Cepure A, Okada S, et al. Comparison of the action of glucoamylase and glucosyltransferase on D-glucose, maltose, and malto-oligosaccharides. Carbohydrate Research. 1977, 58(1): 193-202.
- [223] Xu DB, Madrid CP, Röhr M, et al. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology. 1989, 30(6): 553-558.
- [224] Hossain M, Brooks JD, Maddox IS. The effect of the sugar source on citric acid

- production by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology. 1984, 19(6): 393-397.
- [225] Hristozova T, Angelov A, Tzvetkova B, et al. Effect of furfural on carbon metabolism key enzymes of lactose-assimilating yeasts. Enzyme and Microbial Technology. 2006, 39(5): 1108-1112.
- [226] Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, et al. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. Applied Microbiology and Biotechnology. 2003, 62(1): 92-98.
- [227] Yao RM, Hou WL, Bao J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. Bioresource Technology. 2017, 244: 1188-1192.
- [228] Worley LA, Long MD, Onken MD, et al. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. Melanoma Research. 2008, 18(3): 184-190.
- [229] Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. Nature Biotechnology. 2005, 23(2): 195-200.
- [230] Richhardt, Janine, Bringer, et al. Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013, 97(10): 4315-4323.
- [231] Krajewski V, Simic P, Mouncey NJ, et al. Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. Applied and Environmental Microbiology. 2010, 76(13): 4369-4376.
- [232] Ernst R, Kueppers P, Stindt J, et al. Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps - first come, first served? FEBS Journal. 2010, 277(3): 540-549.
- [233] Ishii J, Yoshimura K, Hasunuma T, et al. Reduction of furan derivatives by overexpressing NADH-dependent Adh1 improves ethanol fermentation using xylose as sole carbon source with *Saccharomyces cerevisiae* harboring XR-XDH pathway. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013, 97(6): 2597-2607.
- [234] Wang X, Gao QQ, Bao J. Enhancement of furan aldehydes conversion in *Zymomonas mobilis* by elevating dehydrogenase activity and cofactor regeneration. Biotechnology for Biofuels. 2017, 10: 24.
- [235] Wilson CM, Yang S, Rodriguez M, Jr., et al. Clostridium thermocellum transcriptomic profiles after exposure to furfural or heat stress. Biotechnology for Biofuels. 2013, 6(1): 131.
- [236] Clarkson SM, Hamilton-Brehm SD, Giannone RJ, et al. A comparative multidimensional LC-MS proteomic analysis reveals mechanisms for furan aldehyde detoxification in *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E. Biotechnology for Biofuels. 2014, 7(1): 165.
- [237] Simon O, Klaiber I, Huber A, et al. Comprehensive proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the flavor compound vanillin. Journal of Proteomics. 2014, 109: 212-227.
- [238] 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.
- [239] Lv YY, Wu ZH, Han SY, et al. Genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* S9114, a strain for industrial production of glutamate. Journal of Bacteriology. 2011, 193(21): 6096-6097.
- [240] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, et al. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology.

- 2007, 132(3): 273-279.
- [241] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001, 25(4): 402-408.
- [242] Kallscheuer N, Vogt M, Kappelmann J, et al. Identification of the *phd* gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(4): 1871-1881.
- [243] Liu ZL, Moon J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene*. 2009, 446(1): 1-10.
- [244] Petersson A, Almeida JR, Modig T, et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*. 2006, 23(6): 455-464.
- [245] Roberts SA, Weichsel A, Grass G, et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, 99(5): 2766-2771.
- [246] Baldrian P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 63(5): 560-563.
- [247] Bukh C, Lund M, Bjerrum MJ. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006, 100(9): 1547-1557.
- [248] Rebrikov DV, Stepanova EV, Koroleva OV, et al. Laccase of the lignolytic fungus *Trametes hirsuta*: Purification and characterization of the enzyme and cloning and primary structure of the gene. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006, 42(6): 564-572.
- [249] Ben Younes S, Mechichi T, Sayadi S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(4): 1033-1042.
- [250] Li Q, Metthew Lam LK, Xun LY. *Cupriavidus necator* JMP134 rapidly reduces furfural with a Zn-dependent alcohol dehydrogenase. *Biodegradation*. 2011, 22(6): 1215-1225.
- [251] Zhao L, Zhang H, Wang L, et al.  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresource Technology*. 2015, 197: 23-29.
- [252] Gianoulis TA, Griffin MA, Spakowicz DJ, et al. Genomic analysis of the hydrocarbon-producing, cellulolytic, endophytic fungus *Ascocoryne sarcoides*. *PLoS Genetics*. 2012, 8(3): e1002558.
- [253] Bao LY, Li JJ, Jia CJ, et al. Structure-oriented substrate specificity engineering of aldehyde-deformylating oxygenase towards aldehydes carbon chain length. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9(1): 185.
- [254] Schneider-Belhaddad F, Kolattukudy P. Solubilization, partial purification, and characterization of a fatty aldehyde decarbonylase from a higher plant, *Pisum sativum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000, 377(2): 341-349.
- [255] Kudo H, Nawa R, Hayashi Y, et al. Comparison of aldehyde-producing activities of cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductases. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 234.
- [256] Plassmeier J, Li YY, Rueckert C, et al. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce triacylglycerols. *Metabolic Engineering*. 2016, 33: 86-97.
- [257] Lavallie ER, Diblasio EA, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents Inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*. 1993, 11(2): 187-193.
- [258] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary

- and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 2014, 42(W1): W252-W258.
- [259] Radmacher E, Alderwick LJ, Besra GS, et al. Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*. 2005, 151(7): 2421-2427.
- [260] Yang Y, Shi F, Tao GJ, et al. Purification and structure analysis of mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of Microbiology*. 2012, 50(2): 235-240.
- [261] Laneelle MA, Tropis M, Daffe M. Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(23): 9923-9930.
- [262] Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 1995, 64(1): 29-63.
- [263] Hashimoto K, Kawasaki HK, Nakamura J, et al. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2006, 70(1): 22-30.
- [264] Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, et al. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, 101(1): 314-319.
- [265] Roland G, Gibson KJC, Brown AK, et al. Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacterianae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(43): 44847-44857.
- [267] Gande R, Dover LG, Krumbach K, et al. The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189(14): 5257-5264.

## 附录 I 主要试剂

| 试剂      | 规格  | 生产厂家                      |
|---------|-----|---------------------------|
| 一水葡萄糖   | 工业级 | 秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司             |
| 葡萄糖     | 分析纯 | 上海泰坦科技股份有限公司              |
| 柠檬酸     | 色谱纯 | Sigma Aldrich (上海) 贸易有限公司 |
| 柠檬酸     | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 糠醛      | 分析纯 | 百灵威科技有限公司                 |
| 5-羟甲基糠醛 | 分析纯 | 上海德默医药科技有限公司              |
| 4-羟基苯甲醛 | 分析纯 | 生工生物工程(上海)股份有限公司          |
| 香草醛     | 分析纯 | 生工生物工程(上海)股份有限公司          |
| 丁香醛     | 分析纯 | 生工生物工程(上海)股份有限公司          |
| 甲酸      | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司              |
| 乙酸      | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司              |
| 乙酰丙酸    | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司              |
| 磷酸二氢钾   | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 氯化铵     | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 七水合硫酸镁  | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 七水合硫酸锌  | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 无水硫酸铜   | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 七水合硫酸亚铁 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 氯化锰     | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 氢氧化钠    | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 硫酸      | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 氢氧化钙    | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 甲醇      | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 乙醇      | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司              |
| 糠醇      | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司              |
| 糠酸      | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司              |
| 5-羟甲基糠醇 | 分析纯 | 上海毕得医药科技有限公司              |
| 5-羟甲基糠酸 | 分析纯 | 上海毕得医药科技有限公司              |
| 4-羟基苯甲醇 | 分析纯 | 上海泰坦科技股份有限公司              |
| 香草醇     | 分析纯 | 上海泰坦科技股份有限公司              |
| 丁香醇     | 分析纯 | 上海泰坦科技股份有限公司              |
| 4-羟基苯甲酸 | 分析纯 | 上海泰坦科技股份有限公司              |

---

|             |      |                  |
|-------------|------|------------------|
| 香草酸         | 分析纯  | 上海泰坦科技股份有限公司     |
| 丁香酸         | 分析纯  | 上海泰坦科技股份有限公司     |
| 山梨醇         | 分析纯  | 上海凌峰化学试剂有限公司     |
| 玉米浆         | 工业级  | 山东龙力生物科技股份有限公司   |
| 尿素          | 分析纯  | 上海凌峰化学试剂有限公司     |
| 硫酸锰         | 分析纯  | 上海凌峰化学试剂有限公司     |
| 蛋白胨         | 生化试剂 | 上海阿拉丁生化科技股份有限公司  |
| 酵母浸提物       | 生化试剂 | 安琪酵母股份有限公司       |
| 琼脂          | 生化试剂 | 上海阿拉丁生化科技股份有限公司  |
| 甘油          | 分析纯  | 国药集团化学试剂有限公司     |
| 异丙基硫代半乳糖苷   | 生化试剂 | 阿达玛斯试剂有限公司       |
| 3-吗啉丙磺酸     | 生化试剂 | 阿达玛斯试剂有限公司       |
| 生物素         | 生化试剂 | 上海阿拉丁生化科技股份有限公司  |
| 硫胺素         | 生化试剂 | 国药集团化学试剂有限公司     |
| 钼酸钠         | 生化试剂 | 中国医药（集团）上海化学试剂公司 |
| Triton-X100 | 分析纯  | 上海泰坦科技股份有限公司     |

---

## 附录 II 密码子优化后基因序列

### 1、*aar* 经密码子优化后的基因序列

atgtttggcctgattggccatctgaccagcctggaacaggcgcgtgatgtgagccgtcgtatgggctatgatgaatatgcggatcaggg  
cctggaatfttgagcagcgcgccgccagatttggtatgaaattaccgtgaccagcgcgaccggcaaaagtgattcatggccgttat  
attgaaagctgctttctgccgaaatgctggcggcgcgtcgttttaaaaccgcgaccgtaaagtgtgaacgcgatgagccatgcg  
agaaacatggcattgatattagcgcgctggcggttaccagcattatfttgaaaactttgatctggcgagcctgcgtcaggtgcgtga  
taccacctggaattgaaactttaccaccggcaacaccataaccgcgtatgtgatttggcgtcaggtggaagcggcggcggcaaaacc  
tgggcattgatattaccaggcgaccgtggcgggtggcgcgaccggcgatattggcagcgcggtgtgccgttggctggatctga  
aactgggcgtggcgatctgattctgaccgcgtaaccaggaacgtctggataacctgcaagcggaaactggccgtggcaaaattc  
tggcgtggaagcggcgtgccggaagcggattttattgtgtgggtggcgagcatgccgcagggcgtggtgattgatccggcgacc  
tgaaacagccgtgcgtgctgattgatggcggctatccgaaaaactgggcagcaaaagtgcagggcgaaggcatttatgtgctgaa  
cggcggtggtggaacattgcttgatattgattggcagattatgagcgcggcggaaatggcgcgtccggaacgtcagatgttgcgtgc  
tttgcggaagcgtgctgctggaattgaaggctggcataccaactttagctggggccgtaaccagattaccattgaaaaatggaagc  
gattggcgaagcagcgtgcgtcatggctttcagccgctggcgtggcgattcatcatcatcatcactaataa

### 2、*ado* 经密码子优化后的基因序列

atgccgcagctggaagcagcctggaactggattttcagagcgaagctataaagatgcgtatagccgtattaacgcgattgtgattga  
aggcgaacaggaagcgtttgataactataaccgtctggcggaaatgctgccggatcagcgtgatgaactgcataaactggcggaaatg  
gaacagcgtcacatgaaaggctttatggcgtgcggcaaaaacctgagcgtgaccccgatattggcgtttgcgcagaaatftttgaa  
tctgatgaaaactttaagcggcggcggcggaaaggcaaaagtggtagcctgctgattcagagcctgattattgaatgctttgcgat  
tgcggcgtataacatttatattccggtggcggatgcgtttgcgcgtaaaattaccgaaggcgtggtgcgtgatgaatatctgcatcgtaac  
tttggcgaagaatggctgaaagcgaactttgatgcgagcaaaagcggaaactggaagaagcgaaccgtcagaacctgccgctggtgtg  
gctgatgctgaaacgaagtggcgatgatgcgctgaaactggcgtggaacgtgaaagcctggtggaagattttatgattgcgtatggc  
gaagcgtggaaaacattggctttaccaccgctgaaattatgcgtatgagcgcgtatggcctggcggcgggtgcaccaccaccacc  
actaataa

## 学术成果

### 已发表的论文:

1. **Pingping Zhou**, Jiao Meng, Jie Bao\*. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. **Bioresource Technology**. 2017, 224: 563-572. (SCI IF=5.807, 对应本论文第二章)
2. **Pingping Zhou**<sup>1</sup>, Ruimiao Yao<sup>1</sup>, Hongsen Zhang, Jie Bao\*. Unique glucose oxidation catalysis of *Gluconobacter oxydans* constitutes an efficient cellulosic gluconic acid fermentation free of inhibitory compounds disturbance. **Biotechnology and Bioengineering**. 2019, in press. (SCI IF=3.952, 对应本论文第三章)
3. **Pingping Zhou**<sup>1</sup>, Imrana Khushk<sup>1</sup>, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. Tolerance and transcriptional analysis of *Corynebacterium glutamicum* on biotransformation of toxic furaldehyde and benzaldehyde inhibitory compounds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2019, 1-13. (SCI IF=3.103, 对应本论文第四章)

### 学术会议论文:

1. **Pingping Zhou**, Jiao Meng, Jian Zhang, Jie Bao\*. High titer citric acid fermentation of industrial *Aspergillus niger* strain using corn stover as feedstock. **International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering**. 2015, Shanghai, China. (Poster)
2. **Pingping Zhou**, Jiao Meng, Jie Bao\*. High titer citric acid fermentation by industrial *Aspergillus niger* strain using dry dilute acid pretreated and biodetoxified corn stover feedstock. **The 22<sup>nd</sup> Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC)**. 2016, Miyazaki, Japan. (Poster)

## 致谢

时光荏苒，六年的硕博研究生生活即将画上句号。回想这段时光，是我人生旅程中收获最多的一个阶段。科研生活如同发酵折线图一样一波三折，在这充满酸甜苦辣的生活中，感谢与我同行的老师、朋友及同学们的陪伴与帮助。

特别感谢我的导师鲍杰教授。在我的科研工作中，从研究方向的把握、科研困难的解决到论文的撰写与修改都离不开鲍老师的无私付出与悉心教导。鲍老师治学严谨的科研态度、一丝不苟的科研精神、充沛的科研热情、广博的专业知识及创新性的思维方式将会一直是我学习的标杆。生活中，鲍老师善良、正直、豁达的品格也深深影响着我，让我逐渐成长与进步。以后的工作和生活中，我也会时刻牢记鲍老师的教诲，不辜负老师的期望。在此论文撰写完成之际，再次对鲍老师致以诚挚的谢意。

感谢高秋强老师和张建老师在科研和生活中对我的帮助与关怀。两位老师在实验中给予了我许多宝贵的建议与启发，在工作中认真负责的态度也是我学习的目标与榜样。在此也衷心的祝愿两位老师以后的人生道路一帆风顺。

感谢我的男朋友张宏森对我的爱与包容，你幽默、乐观的人生态度一直温暖和鼓励着我。在以后的生活中，希望我们能够陪伴彼此成为更优秀的人。

感谢这几年曾给予我帮助、鼓励及陪伴时间最长的木质纤维素生物炼制课题组的同学们。感谢孟佼师姐、易霞师姐和王霞师姐对我实验入门的引导及帮助，特别是易霞师姐和王霞师姐认真的科研态度给予了我学习和努力的方向，生活中你们对我的关怀也让我倍感温暖；感谢新干线四人组邱忠洋、邵帅和赵瞭在科研和生活中对我的关心、鼓励和帮助；感谢刘刚师兄在我入学初期对我的无私帮助；感谢爬山踏青小团队韩昞身、姚瑞苗、魏成香和周奇圣给予我的美好经历；感谢何燕青师兄、顾翰琦师兄、高小创师兄、雷成师兄、刘克师兄、安瑞鑫师姐、孙娇娥师姐和张鹏师兄对我的照顾；感谢 1301 分子组金慈、颜钊、方纯和黄振师弟师妹们的陪伴与帮助；还要感谢侯伟亮、温经柏、张强、谌泽宇、阚家伦、胡明珊、董维涛、李莉、柳云龙、韩涛、李园园、卢敏萍、郑理想、依热娜、法娅儿和马斯分等师弟师妹和同学们的陪伴和帮助。

感谢我的室友杨霞、王乐和刘婷，感谢生活中有你们的陪伴，谢谢你们对我作息不规律的包容。

最后，我要感谢我父母和我的哥哥嫂子，此心安处是你们，你们对我的理解和支持将成为我前行的坚强后盾。同时也谢谢我的侄子和侄女们成长中给我带来的快乐！

# 卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 壹佰贰拾肆 页

立卷人\_\_\_\_\_

检查人\_\_\_\_\_

立卷时间\_\_\_\_\_