

学校代码：10251

学 号：Y45170501

# 华东理工大学

## 工程硕士学位论文

论文题目： 乳酸片球菌的全糖代谢能力探究及

抗逆性强化改造

工程领域： 生物工程

研究方向： 生物炼制

论文作者： 方纯

学校导师： 鲍杰 教授

企业导师： 王华明 首席科学家

定稿日期： 2020 年 04 月 26 日

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学

## 学位论文

乳酸片球菌的全糖代谢能力探究及

抗逆性强化改造

方纯

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

王华明 首席科学家 青岛蔚蓝生物集团有限公司

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2020.04.26 论文答辩日期: 2020.06.08

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: 庄英萍 教授

评 阅 人: 杨世辉 教授

洪 枫 教授

宁艳春 高级工程师

# 华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

研究生学位论文全文电子版由档案馆按\_\_\_\_\_①\_\_\_\_\_（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

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

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

学位论文作者签名：方纯

2020年6月12日

指导教师签名：鲍杰

2020年6月12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：方纯

2020年6月12日

## 乳酸片球菌的全糖代谢能力探究及抗逆性强化改造

### 摘要

木质纤维素组成成分中纤维素来源的己糖主要是葡萄糖，半纤维素来源的己糖为半乳糖和甘露糖，戊糖主要为木糖和阿拉伯糖。其中木糖和阿拉伯糖约占木质纤维素总单糖的 30-40%，半乳糖和甘露糖占总单糖的 1%左右。首先，全糖的高效利用是木质纤维素生物炼制的重点问题之一，发酵菌株中普遍存在葡萄糖抑制作用，即当葡萄糖存在时只能优先利用葡萄糖，待耗完后再利用其它单糖，从而导致发酵菌株在进行全糖发酵时非葡萄糖单糖的利用率偏低，在近期关于木质纤维素乳酸发酵的研究工作中并未探究出缓解葡萄糖抑制作用的有效解决方案。其次，生物炼制的预处理过程中会产生呋喃类、酚类和弱酸类等多种抑制物，通过生物脱毒技术可以快速的将呋喃类和弱酸类抑制物脱除，但难以有效脱除酚类抑制物，延长脱毒时间可以将酚类抑制物脱除完全，但会损失葡萄糖和木糖等单糖进而降低后期的发酵指标。另外，预处理过程中富集的金属离子也是一类主要的抑制物，其中钠离子是整个生物炼制技术进行 pH 调控所富集的典型金属离子，在一定浓度范围内会严重抑制菌株的发酵性能。

本文针对上述三个关键问题进行了探究。利用实验室前期构建的具有木糖代谢路径的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY15，在五种单糖及混合糖体系下探究了两株菌株的全糖利用能力，并且从糖代谢和糖转运相关基因的转录水平对发酵现象进行了初步分析。其次，通过基因工程，实现了 *P. acidilactici* 酚类抑制物和钠离子的抗逆性强化。基于以上实验探究，最终为高指标木质纤维素乳酸及乳酸钠发酵提供了有效菌株。

第一部分，利用构建了木糖代谢路径的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY15，分别进行了五种单糖（葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖）和混合糖的发酵评价，为了进一步提高构建菌株对糖的利用以及糖代谢速率，我们进行了混合糖的驯化。从发酵现象中可得，两株构建菌株可以实现全糖利用且不存在葡萄糖抑制作用，即可同步代谢多种单糖，并且木糖代谢路径的构建提高了菌株对于甘露糖的代谢速率。针对这两个主要的发酵现象，本研究从糖代谢和糖转运蛋白两方面进行了相关基因的转录水平分析，发现编码甘露糖 PTS 转运系统中的  $EII^{Man}$  蛋白的 *manXYZ* 基因簇对糖的高效利用起到关键作用，对相关基因进行进一步探究，可运用在其他菌株中，为其他菌株对糖的高效利用提供基因来源。

第二部分，通过基因工程，实现了 *P. acidilactici* ZY15 对酚类抑制物的抗逆性强化。本研究首先对 *P. acidilactici* ZY15 的酚类抑制物（4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛和苯醌（BQ））耐受性进行了探究，可以得到香草醛对 *P. acidilactici* ZY15 的抑制作用最强，而实验室在前期工作中已经探究出 *P. acidilactici* ZY15 不具备降解 BQ 的能力，且菌株

对醌类化合物较为敏感。之后将筛选出来的酚醛耐受有效基因 *CGS9114\_RS09725* 和 BQ 降解有效基因 *ZMO1116* 分别整合到了 *P. acidilactici* ZY15 基因组中, 在相应的酚类抑制物胁迫的环境下, *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2::CGS9114\_RS09725* 提高了对香草醛的转化能力且发酵性能得到显著加强, *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2::ZMO1116* 具备了 BQ 降解途径, 可以实现对 BQ 的转化并且最终的发酵性能也得到了提升。最后以玉米秸秆为原料进行 SSCF, 与原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 相比较, 两株整合菌株的发酵性能都优于原始菌株。

第三部分, 通过基因工程, 提高了 *P. acidilactici* ZY271 对于钠离子的耐受能力。本研究首先对 *P. acidilactici* ZY271 的钠离子耐受能力进行了探究, 发现一定浓度 (约 25 g/L) 的钠离子可完全抑制 *P. acidilactici* ZY271 的生长活性。将编码  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的基因 *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter\_RS02775* 在 *P. acidilactici* ZY271 中进行过表达, 在  $\text{Na}^+$  浓度较高的胁迫环境下, 相对于原始菌株, 重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02775*) 的糖代谢能力和乳酸钠的产量均有所提高。最后以麦秆为原料进行了 SSCF, 使用 NaOH 溶液 (13.5 M) 作为 pH 中和剂, 与原始菌株 *P. acidilactici* ZY271 相比较, 工程菌株的乳酸钠发酵指标有了明显提高。

综上所述, 本研究以已构建木糖代谢路径的两株 *P. acidilactici* 为实验对象, 探究了两株构建菌株的全糖利用能力, 并针对全糖利用的发酵现象进行了初步的分子机制的分析; 经基因工程改造有效提高了 *P. acidilactici* 对于酚类抑制物的抗逆性以及钠离子的耐受能力。本研究为可发酵单糖的高效利用提供了具有参考价值的基因, 以及为高指标的木质纤维素乳酸及乳酸钠发酵提供了有效菌株。

**关键词:** 木质纤维素; 乳酸; 全糖代谢; 酚类抑制物; 钠离子

## Study on the all fermentable sugars metabolism capability and inhibitor tolerance of *Pediococcus acidilactici*

### Abstract

Hexose derived from cellulose in the composition of lignocellulose is mainly glucose. Hexose derived from hemicellulose is galactose and mannose, and pentose is mainly xylose and arabinose. Among them, xylose and arabinose account for about 30-40% of total carbohydrates, and galactose and mannose account for about 1% of total carbohydrates in lignocellulose. One of the key issues in current biorefinery fermentation technology is the efficient utilization of sugars. The problem of many fermentation strains is glucose inhibition. When glucose is present, only glucose can be used preferentially, and other sugars are used after it is consumed. As a result, the utilization of non-glucose by fermentation strains is low. In recent research work on lactic acid fermentation of lignocellulose, no effective solution has been explored to alleviate the inhibitory effect of glucose. On the other hand, more inhibitors such as furans, phenols, and weak acids are generated during the pretreatment process of biorefinery. Furan and weak acid inhibitors can be quickly removed through detoxification of biological, but it is difficult to effectively remove phenolic inhibitors. If the detoxification time is prolonged, glucose and xylose will be lost, which will affect the fermentation index in the later stage. In addition, the metal ions enriched during the pretreatment process are also a kind of major inhibitors, among which sodium ions are typical metal ions enriched by pH adjustment of the biorefining technology. It will seriously inhibit the fermentation performance of the strain in a certain concentration range.

This article explores the three key issues mentioned above. We selected *P. acidilactici* ZY271 and *P. acidilactici* ZY15, which have constructed the xylose metabolism pathway in the early stage of the laboratory. Investigating the utilization ability of all fermentable sugars of two constructing strains in different systems. And the analysis of the fermentation phenomenon was conducted from the transcription levels of sugar metabolism and sugar transport. Secondly, enhancing inhibitor tolerance of phenolic inhibitors and sodium ions for *P. acidilactici* was achieved from genetic engineering.

In the first part, we evaluated the fermentation of *P. acidilactici* ZY271 and *P. acidilactici* ZY15 in different systems. In order to improve the utilization of sugar and the rate of metabolizing for the constructed strain, we carried out the domestication strategy of mixed sugar. It could be obtained from the fermentation phenomenon that the two constructed strains can realize the utilization of all fermentable sugars without glucose inhibition. And the construction

of the xylose metabolic pathway increased the strain's metabolic rate of mannose. Aiming at these fermentation phenomena, the transcription level analysis of related genes was conducted from two aspects of sugar metabolism and sugar transporter. It was found that the gene cluster of *manXYZ* in EII<sup>Man</sup> played a key role in the efficient utilization of sugars. Further exploration of related genes would provide gene sources for efficient utilization of sugars in other strains.

In the second part, enhancing the inhibitor tolerance for *P. acidilactici* ZY15 of phenolic inhibitors from genetic engineering. The tolerance of *P. acidilactici* ZY15 on 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde and BQ were assayed, respectively. Vanillin showed the most inhibition on *P. acidilactici* ZY15. And in the previous work, the laboratory has discovered that BQ has a strong inhibitory effect on *P. acidilactici* ZY15, and the strain is more sensitive to quinone compounds. The selected effective gene *CGS9114\_RS09725* of phenolic tolerance and effective gene *ZMO1116* of benzoquinone degradation were integrated into the *P. acidilactici* ZY15 genome. The resulting strain *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::CGS9114\_RS09725* performed better fermentation than *P. acidilactici* ZY15 under the stress of vanillin. It indicated that *CGS9114\_RS09725* integration strengthened the vanillin tolerance of *P. acidilactici* ZY15. *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116* had a pathway of BQ degradation, and the final fermentation performance was also improved. High solids loading SSCF using corn stover was conducted. Compared with the original strain of *P. acidilactici* ZY15, the fermentation performance of the two integrated strains was better than the original strain.

In the third part, enhancing the inhibitor tolerance for *P. acidilactici* ZY271 of sodium ions from genetic engineering. The tolerance of *P. acidilactici* ZY271 on sodium ions was assayed and we found that a certain concentration (about 25 g/L) of sodium ions could completely inhibit the growth activity of *P. acidilactici* ZY271. The gene of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *RS02775* was overexpressed in *P. acidilactici* ZY271. The recombinant strain of *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02775*) performed better fermentation than *P. acidilactici* ZY271 under the stress of sodium ions. High solids loading SSCF using wheat straw was conducted and the pH neutralizer was NaOH solution of 13.5 M. Compared with the original strain of *P. acidilactici* ZY271, the fermentation index of sodium lactate was improved.

Conclusively, this study investigated the utilization capacity of all fermentable sugars for *P. acidilactici* which have established a xylose metabolism pathway, and conducted a preliminary molecular mechanism analysis on the fermentation phenomenon of all sugars utilization. Enhancing inhibitor tolerance of phenolic inhibitors and sodium ions for *P. acidilactici* by genetic engineering. This study provided genes with reference value for the efficient utilization of fermentable sugars, as well as effective strains for the fermentation of high-quality lactic acid and sodium lactate from lignocellulose.

---

**Keywords:** Lignocellulose; Lactic acid; All sugars fermentation; Phenolic inhibitors; Sodium ions

## 目录

第 1 章 绪论	1
1.1 木质纤维素生物炼制	1
1.1.1 预处理	1
1.1.2 脱毒	2
1.1.3 糖化和发酵	3
1.1.4 干法生物炼制技术	3
1.2 木质纤维素来源抑制物概述	4
1.2.1 抑制物的种类	4
1.2.2 抑制物的不同抑制机理	4
1.2.3 抑制物脱除方式	5
1.3 乳酸概述	5
1.3.1 乳酸的结构与基本特性	5
1.3.2 乳酸生产菌株	5
1.3.3 聚乳酸	6
1.3.4 乳酸钠	6
1.4 利用木质纤维素生产乳酸现存问题	7
1.4.1 生物炼制中的基本问题	7
1.4.2 抑制物脱除的同时可发酵单糖的大量损失	7
1.4.3 抑制物对发酵过程的影响	7
1.4.4 金属离子对发酵过程的影响	8
1.5 本论文立题依据和主要研究内容	9
第 2 章 <i>Pediococcus acidilactici</i> 工程菌株利用麦秆中的己糖和戊糖共发酵 制备高浓度 D-乳酸和 L-乳酸	11
2.1 引言	11
2.2 材料与方法	12
2.2.1 菌株、培养基及培养方法	12
2.2.2 原料、酶与试剂	12
2.2.3 单糖与乳酸的分析方法	13
2.2.4 适应性驯化	13
2.2.5 干法生物炼制技术以进行乳酸生产	13
2.2.6 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析	13
2.3 结果与讨论	14

2.3.1	木糖路径构建前后 <i>P. acidilactici</i> 己糖和戊糖的发酵性能评价 .....	14
2.3.2	构建菌株的混合糖适应性驯化及驯化前后发酵评价 .....	16
2.3.3	<i>P. acidilactici</i> ZY271 和 <i>P. acidilactici</i> ZY15 全糖代谢机制分析 .....	19
2.4	本章小结 .....	23
第 3 章 <i>Pediococcus acidilactici</i> 酚类抑制物抗逆性强化改造 .....		24
3.1	引言 .....	24
3.2	材料与方法 .....	25
3.2.1	菌株、培养基及培养方法 .....	25
3.2.2	原料、酶与试剂 .....	25
3.2.3	质粒构建 .....	26
3.2.4	基因整合、敲除 .....	26
3.2.5	苯醌适应性驯化 .....	29
3.2.6	SSCF 以进行 D-乳酸生产 .....	29
3.2.7	HPLC 检测方法 .....	29
3.3	结果与讨论 .....	30
3.3.1	D-乳酸生产菌株 <i>P. acidilactici</i> ZY15 对酚类抑制物的耐受性评估 .....	30
3.3.2	<i>P. acidilactici</i> ZY15 对酚类抑制物的耐受性改造 .....	32
3.3.3	整合菌株的抑制物转化能力和发酵性能评估 .....	35
3.3.4	整合菌株的纤维素 D-乳酸发酵 .....	37
3.4	本章小结 .....	40
第 4 章 <i>Pediococcus acidilactici</i> 钠离子耐受性工程菌株的构建 .....		41
4.1	引言 .....	41
4.2	材料与方法 .....	41
4.2.1	菌株、培养基及培养方法 .....	41
4.2.2	原料、酶与试剂 .....	42
4.2.3	质粒构建 .....	42
4.2.4	SSCF 以进行乳酸钠生产 .....	42
4.2.5	HPLC 检测方法 .....	42
4.2.6	荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析 .....	42
4.3	结果与讨论 .....	44
4.3.1	L-乳酸生产菌株 <i>P. acidilactici</i> ZY271 对钠离子的耐受性评估 .....	44
4.3.2	Na <sup>+</sup> 耐受性工程菌株的构建及重组菌株的发酵性能评估 .....	44
4.3.3	重组菌株糖代谢路径相关基因转录水平分析 .....	46
4.4	本章小结 .....	47

---

第 5 章 结论与展望 .....	48
5.1 结论 .....	48
5.2 创新点 .....	49
5.3 展望 .....	49
参考文献 .....	51
附录 I qRT-PCR 基因分析及引物 .....	63
附录 II 质粒构建所用的菌株、质粒及引物 .....	65
硕士期间取得成果 .....	69
致谢 .....	70

## 第1章 绪论

### 1.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素在自然界中广泛存在,是一种可替代匮乏化石资源的可再生生物质资源<sup>[1]</sup>。木质纤维素的组成成分主要源自三种聚合物,分别为纤维素(占干重 30-50%)、半纤维素(20-40%)和木质素(15-25%),同时也含有少量的灰分、蛋白质和无机化合物等(图 1.1)<sup>[2-4]</sup>。其中纤维素为 D-吡喃葡萄糖经  $\beta$ -1,4-糖苷键连接形成的致密大分子同聚多糖,是构成细胞壁的主要成分<sup>[5]</sup>,其化学结构较为简单,分子内存在大量氢键,形成了很难被酶转化的致密的结晶结构。半纤维素结构较为复杂,化学成分包括戊糖(D-木糖、L-阿拉伯糖)、己糖(D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖)、以及糖醛酸等<sup>[6]</sup>。木质素主要是由三种酚类物质组成的一种芳香族类化合物<sup>[7]</sup>:愈创木基(G),对羟基苯基(H)和紫丁香基(S),包裹在纤维素和半纤维素表面,阻碍了聚糖的解聚。

木质纤维素生物炼制主要是指将价格低廉的木质纤维素转化为化学品、能源及动物饲料等的工艺手段<sup>[8]</sup>。在中国木质纤维素生物质的主要来源为农作物秸秆,其产量较大,除去农作物和家禽的肥料以及造纸等用途之外,大部分的农作物秸秆被遗弃或者焚烧,不仅构成了资源浪费,同时也造成了环境污染<sup>[9,10]</sup>。目前,由于木质纤维素的致密结构,将廉价的木质纤维素原料转化为浓度较高的可发酵单糖存在技术障碍,而解决这些问题需要通过不断改进主要的工段来降低过程成本,其中主要的工段为预处理、脱毒、糖化和发酵<sup>[8,11,12]</sup>。

#### 1.1.1 预处理

由于木质纤维素致密的结晶结构,使其很难被微生物转化为可发酵的单糖从而进行后续的生物基化学品的生产<sup>[13,14]</sup>。如图 1.1 所示,纤维素的表层覆盖着半纤维素,隔断了纤维素酶对纤维素的作用,此外,在纤维素和半纤维素的表层存在的木质素,进一步阻止了纤维素和半纤维素的降解<sup>[15]</sup>。针对木质纤维素的致密结构,若想达到较好的糖化效果,预处理环节尤为重要。高效预处理技术一般具备以下特点<sup>[16]</sup>:(1)降低生物质颗粒大小;(2)较低的抑制物含量;(3)保留大部分可发酵单糖;(4)能耗及成本低。

目前开发的预处理的方式多样化,主要为<sup>[17,18]</sup>:物理法(机械碾磨、微波处理、蒸汽爆破等);化学法(酸处理、碱处理等);物理化学法(AFEX、微波-化学处理等);生物法。物理法通过降低木质纤维素的颗粒尺寸,以增大表面的孔隙尺度,进而增加底物与酶的结合来提高酶解效率<sup>[17]</sup>。化学法则主要是通过某种化学对木质纤维素结构进行解聚以瓦解其生物顽抗性<sup>[18]</sup>。生物法的反应条件相对温和,其降解方式主要是利用降解微生物自身来破坏木质纤维素的结构<sup>[18]</sup>。众多预处理方法中,应用频率较高且有效的处理方式稀酸预处理,酸性环境下半纤维素被降解为可发酵单糖,在预处理后的物料

中可稳定存在, 但该方法依旧存在产生多种类抑制物, 对反应器具有一定腐蚀性等问题 [17-19]。

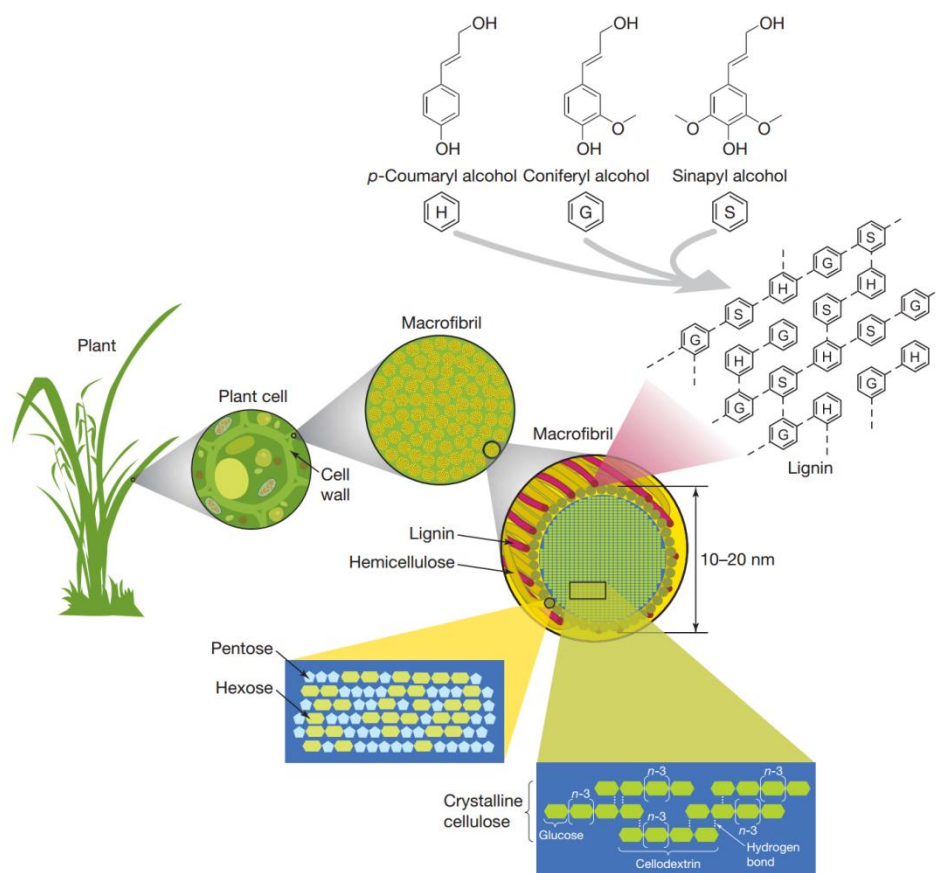


图 1.1 木质纤维素结构<sup>[15]</sup>

Fig. 1.1 Structure of lignocellulosic biomass<sup>[15]</sup>

### 1.1.2 脱毒

预处理大多是在高温高压下进行, 部分木质纤维素会被过度降解, 产生的抑制物会抑制微生物的生长代谢、相关的酶水解以及最后的生物基产品的生产<sup>[20]</sup>。抑制物的来源如图 1.2 所示, 常见的抑制物可分为三大类<sup>[20]</sup>: 主要有呋喃类 (5-羟甲基糠醛、糠醛等); 酚类 (香草醛、丁香醛等); 弱酸类 (甲酸、乙酸等)。

抑制物的存在会抑制微生物的生长以及相关发酵性能<sup>[21]</sup>, 因此对抑制物的移除是重要步骤, 目前主要是通过脱毒的方法进行解决。常用的脱毒方式有: 水洗<sup>[22,23]</sup>、碱中和<sup>[24,25]</sup>和活性炭吸附<sup>[26]</sup>。但这些脱毒方式存在部分设备成本较高、废水产生量大和糖损失较多等问题<sup>[27]</sup>。相比较而言, 生物脱毒可以避免这些问题, 生物脱毒是利用微生物自身在代谢过程中产生的酶将抑制物进行转化, 从而达到除去抑制物的目的<sup>[28]</sup>, 生物脱毒具有较多优点, 如成本低和反应温和等, 该方法逐渐成为热门研究问题。

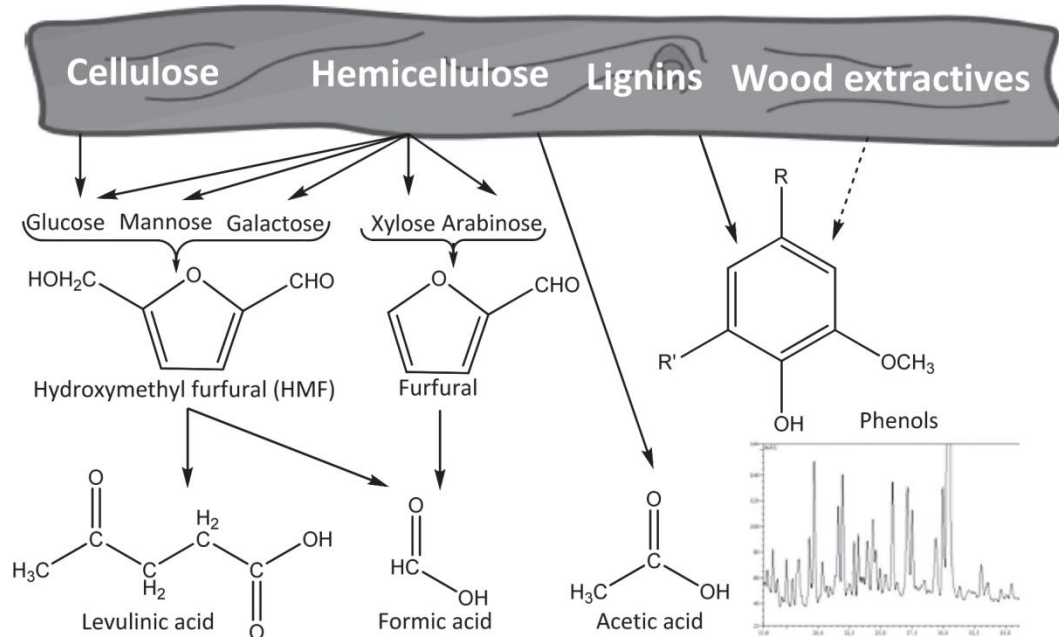


图 1.2 木质纤维素预处理过程中的抑制物来源<sup>[20]</sup>

Fig. 1.2 Main derived hydrolysis products in the pretreatment process of lignocellulose<sup>[20]</sup>

### 1.1.3 糖化和发酵

为了使微生物进一步利用木质纤维素以生产生物基化学品，需要对预处理和脱毒后的物料进行酶水解，使纤维素和半纤维素通过此方法降解为可发酵单糖。通常被用来进行酶水解的酶为纤维素酶和半纤维素酶<sup>[29]</sup>。

可发酵单糖经过生物发酵后可以转化为相应的生物基化学品，利用木质纤维素进行发酵的方法一般有两种<sup>[30-33]</sup>：分步糖化与发酵（SHF），同步糖化与发酵（SSF）。SHF 最开始是将之前经过预处理和脱毒处理后的物料进行酶水解，过滤后得到含糖水解液，之后使微生物在其中进行发酵，SHF 的优势在于将糖化和发酵分开，使得两者可分别在较优的条件下进行<sup>[34]</sup>，但依然存在问题，在糖化过程中过高的糖浓度会对酶产生抑制，大大降低酶解效率，并且高浓度的糖会产生底物抑制作用，抑制菌株的生长及代谢活性<sup>[33,35]</sup>。SSF 是在反应器中同时加入物料、酶和微生物，单糖得到释放后被微生物快速利用，即同步进行糖化与发酵。SSF 的优点在于糖化产生的单糖可以同步直接被微生物利用，解决了高浓度糖所造成的抑制作用，并且两步操作在同一个反应器中进行，一定程度的降低了设备成本<sup>[36]</sup>。

### 1.1.4 干法生物炼制技术

传统的稀酸预处理可以使木质纤维素的结晶结构得到有效破坏，但会产生大量呈酸性的废水对反应器进行腐蚀，并且在预处理的过程中会产生多种抑制物，使用碱中和等方法来中和酸液并除去抑制物时，会造成糖损失，同时也会有部分抑制物无法彻底脱除<sup>[18,37-39]</sup>。

本实验室在 2011 年自主开发了一套干酸预处理工艺<sup>[39]</sup>。干酸预处理主要是在物料固含量为 70%左右的前提条件下用蒸汽加热<sup>[39]</sup>；使用螺带浆让固含量为 70%的物料和

酸催化剂在短时间内均匀混合<sup>[40]</sup>；减少了酸对反应设备的腐蚀，降低了成本<sup>[41,42]</sup>。干酸预处理后，物料的 pH 很低并且存在多种抑制物，可以长期堆放存储<sup>[43,44]</sup>。

干酸预处理后，物料中含有多种组分。在进行后续脱毒操作时，若采用水洗会将抑制物和糖一起洗脱，并且会有大量废水产生；其他的脱毒方法（活性炭吸附、离子交换等）在固态物料中无法进行操作。本实验室成功筛选到 *Amorphotheca resinae* ZN1，一株可有效进行固态脱毒的脱毒真菌<sup>[45]</sup>。该脱毒菌株会优先利用物料中的大部分抑制物（如呋喃醛和乙酸等），待其耗完后再消耗糖，整个过程只需通入空气，控制好脱毒时间便可在保留糖的同时除去抑制物<sup>[46-48]</sup>。

## 1.2 木质纤维素来源抑制物概述

### 1.2.1 抑制物的种类

由于预处理条件剧烈会对木质纤维素结构进行降解或解聚，因此会产生众多有毒的副产物<sup>[21]</sup>。衍生自木质纤维素的抑制物可以分为三大类：呋喃类、酚类和弱酸类，其中呋喃类化合物主要有 5-HMF 和糠醛，酚类化合物主要有酚醛、酚酸和酚醇，弱酸类化合物主要有甲酸、乙酸和乙酰丙酸<sup>[20,21]</sup>。其中 HMF 和糠醛主要来源于戊糖和己糖在剧烈条件下的脱水降解<sup>[49,50]</sup>。酚类化合物主要是由木质素降解所产生的带有官能团的化合物，官能团的种类主要有愈创木酚基（G）、p-羟基苯基（H）或丁香基（S）<sup>[51-53]</sup>。乙酸的主要来源则为半纤维素与木质素结构中的乙酰木聚糖乙酰基团通过去酰化所释放，而 HMF 与糠醛的进一步降解可形成甲酸与乙酰丙酸<sup>[54,55]</sup>。

除了主要的抑制物外，预处理过程中还会产生或富集醌类化合物、无机盐和金属离子等抑制物<sup>[56]</sup>。醌类化合物主要源自酚类化合物的进一步氧化降解<sup>[56]</sup>，已发现的醌类化合物主要有 p-苯醌和氢醌等<sup>[57-60]</sup>。而金属离子和无机盐主要是由于木质纤维素自身的矿物质成分、预处理过程中添加的化学试剂以及发酵过程中添加的酸性或碱性的中和剂等富集产生的<sup>[61-63]</sup>。

### 1.2.2 抑制物的不同抑制机理

抑制物对发酵菌株的抑制作用主要体现在抑制菌株的代谢活性和菌体生长，进而抑制了发酵产品的生产，但不同类别的抑制物对菌株的抑制机理会有所区别<sup>[64-66]</sup>。呋喃类化合物（糠醛和 HMF）可破坏细胞膜的完整性，对胞内 ATP 生产速率和生物质生成速率进行抑制，进而抑制了发酵菌株的生长<sup>[67]</sup>。当呋喃类化合物进入胞内后可作为诱变剂致使胞内蛋白质相互交联，并且对菌株糖酵解过程相关的酶产生抑制作用<sup>[68,69]</sup>。此外呋喃类化合物自身的活性醛基可诱导胞内 ROS（活性氧自由基）水平的增加，从而诱发一系列危害<sup>[70]</sup>。酚类化合物也可影响细胞膜，改变其组分与渗透性，最终导致细胞膜的破坏以及损坏细胞膜选择性功能屏障<sup>[71]</sup>。当酚类化合物进入胞内后可致使胞内蛋白、离子和 ATP 等流向胞外，使胞内生物质水平降低，从而抑制细胞的代谢<sup>[71]</sup>。此外酚类化合物可诱导胞内 ROS 产生，进而诱发 DNA 突变和细胞死亡等<sup>[72]</sup>。而弱酸类化合物对菌株的抑制作用与自身的解偶联机制有关，即弱酸具有脂溶性，通过被动运输进入细胞内，在

胞内解偶联以氢离子 ( $H^+$ ) 和酸根离子的形式存在,  $H^+$  富集会使胞内处于低 pH 环境, 影响蛋白与酶的活性, 并且将  $H^+$  外排的过程中会消耗大量的 ATP, 进而阻碍了菌体生长<sup>[73-75]</sup>。

### 1.2.3 抑制物脱除方式

抑制物的存在不仅会抑制菌株的代谢活性, 还会对后期酶解过程造成影响, 进而抑制了高效的木质纤维素发酵<sup>[76]</sup>。若改变强烈的预处理条件, 采用温和的预处理方式, 可以降低对生物质结构的过度降解, 在一定程度上减少抑制物的生成, 但是温和的预处理条件会降低可发酵单糖的转化效果, 使发酵菌株无法进行高浓度的木质纤维素发酵<sup>[77,78]</sup>。因此抑制物的有效脱除至关重要, 在 1.1.2 中已经介绍了一般采用的抑制物脱除方式以及较为高效的生物脱毒方式, 在此处不重复进行介绍。

## 1.3 乳酸概述

乳酸在工业, 化妆品和食品行业等被广泛应用, 其中 70% 乳酸用于被大家熟知的酸奶和乳制品行业, 另外乳酸也是新型聚合材料的单体<sup>[79,80]</sup>。目前市场对乳酸的需求逐步增加, 到 2016 年乳酸的需求量在全球范围高达 1220.0 kt<sup>[81]</sup>。当前, 乳酸主要通过化学合成和微生物发酵这两种方式来进行生产, 较化学合成来说, 利用微生物发酵来获得乳酸的成本更低, 纯度更高<sup>[82]</sup>。然而在进行微生物发酵时, 大部分选择的底物是葡萄糖或者淀粉, 虽然可以得到浓度较高的乳酸单体, 但成本过高, 为了能在低生产成本的前提下进行大规模的乳酸生产, 可再生的生物质-木质纤维素可作为替代品<sup>[83]</sup>。

### 1.3.1 乳酸的结构与基本特性

$CH_3CHOHCOOH$  为乳酸的分子式, 存在两种构型: D-和 L-型 (图 1.3)。在生物体内, D/L-乳酸分别由 D/L-LDH 催化丙酮酸所得<sup>[84]</sup>。在食品等领域, D-乳酸不能被人体代谢, 但 L-乳酸可被代谢, 因此对 L-乳酸的需求范围更加广泛。在工业生产中, 对乳酸单体的光学纯度要求很高, 一般要求达到 99% 以上, 而自然界中野生型菌株最终生产得到的乳酸大部分为 D, L-混合型, 因此可对野生型菌株进行相应的基因改造, 得到所需的乳酸单体。

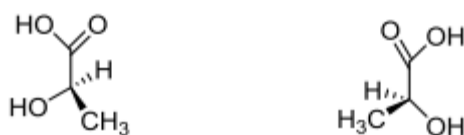


图 1.3 不同构型乳酸

Fig. 1.3 Different configurations of lactic acid

### 1.3.2 乳酸生产菌株

在关于乳酸的介绍中已经提到, 野生型菌株生产得到的乳酸大部分为混合型, 后续工作中都要进行相应的基因改造。目前关于乳酸生产菌株方面的研究主要集中在细菌、酵母和藻类等几种微生物上, 如乳酸菌、大肠杆菌<sup>[85]</sup>、米根霉<sup>[90,91]</sup>和酿酒酵母<sup>[92,93]</sup>等。经过相应的基因改造, 以上菌株都可以进行乳酸生产, 但部分菌株并不能得到很理想的

结果, 如在很早之前就对 *Escherichia coli* 进行了基因改造来生产 D-乳酸<sup>[85]</sup>, 但有较多副产物生成且 *E. coli* 一般在 pH 为 7 的环境下培养<sup>[84]</sup>, 耐酸能力差; 米根霉 *Rhizopus oryzae* 主要用来进行 L-乳酸的生产, 但其 L-乳酸得率低并且需氧量高<sup>[86,87]</sup>。现在进行乳酸生产基本利用乳酸菌, 较其他乳酸生产菌株而言竞争优势较为突出<sup>[79,88,89]</sup>: 乳酸为直接产物且得率较高; 生长环境 (pH、温度) 可变化范围大; 副产物少。

本实验室在前期工作中成功筛选得到一株乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2<sup>[88]</sup>, 之后 Yi 等<sup>[94]</sup>通过基因改造分别敲除了 *ldhL* 和 *ldhD*, 得到了生产 L-乳酸的 *P. acidilactici* TY112 和生产 D-乳酸的 *P. acidilactici* ZP26。为降低生产成本, 选择木质纤维素用于乳酸生产, 木质纤维素的致密结构在经过预处理破坏后得到多种可发酵单糖, 其中木糖约占总糖的 30% (w/w), 前期改造的乳酸菌并不能有效的利用这一部分木糖, 即此时乳酸菌中并不具备木糖代谢路径, 为了得到高浓度乳酸, 实现木糖的有效利用成为重要环节<sup>[95]</sup>。之后 Qiu 等<sup>[95,96]</sup>在 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 中构建了木糖代谢路径, 使得乳酸菌可以利用多种可发酵单糖, 并且通过敲除 *pkt* 基因, 用 PP 路径 (戊糖磷酸途径) 替代 PK (磷酸转酮酶途径)<sup>[97]</sup>, 在减少副产物乙酸生成的同时提高乳酸得率。

### 1.3.3 聚乳酸

乳酸的应用较为广泛, 在工业上尤为突出, 如聚乳酸 (PLA)。现在都在倡导“环境友好型”, 但每年仍有大量的石油基材料作为工业废弃物被丢弃在大自然中<sup>[98]</sup>, 严重的白色污染也是起源于这些在自然界中难以降解的石油基材料<sup>[99]</sup>。聚乳酸 (PLA) 被称为“绿色塑料”, 是一种可降解的新型材料, 并且相对于一般的石油基材料而言, PLA 与其性能相当, 可作为一种优质替代品<sup>[100-103]</sup>。PLA 在较多领域也有相应的用途, 如可作为包装材料和餐具等, 在医疗领域由于其强度较高和不具有免疫排斥等优点, 被用来制备假肢和手术用途的缝合线等医用材料<sup>[104-106]</sup>。

### 1.3.4 乳酸钠

乳酸钠是乳酸右旋 (L-) 化合物的钠盐, 液体状, 无色透明, 具有吸湿性, 溶于水和乙醇, 不溶于醚<sup>[107]</sup>。在之前的生产中, 乳酸钠主要通过化学法来合成, 但是所得产品的质量较低且生产成本较高, 所以目前基本通过发酵法来获得乳酸钠。即使用一定浓度的 NaOH 溶液作为中和剂, 中和发酵所产生的乳酸, 直接获得乳酸钠。其主要的工艺路线如下<sup>[107]</sup>:

发酵 → 膜过滤 → 离子膜提纯 → 纯净乳酸钠 (液体) → 浓缩 → 成品

使用发酵法直接生产乳酸钠仍存在一些问题, 如中和剂 NaOH 溶液的使用会额外增加金属离子, 当金属离子浓度达到一定范围时, 会对发酵菌株产生抑制作用, 进而抑制了高指标乳酸钠的生产。因此在通过发酵法进行乳酸钠生产的过程中, 还需进行条件优化以提高发酵指标。

乳酸钠应用范围较为广泛, 在食品行业, 由于乳酸钠可直接降低食品中的水分活度值, 可有效的抑制食品中的致病菌和腐败菌, 延长食品的货架期, 增加食品的安全性,

另外乳酸钠也可作为风味改进剂来增加食品的风味<sup>[107,108]</sup>。在医药方面,乳酸钠可作为补充液调节人体电解质平衡,还可用作格林液配制以治疗代谢酸中毒,由于其抗微生物功效,乳酸钠常被添加在抗粉刺的产品中<sup>[109,110]</sup>。在化妆品行业,乳酸钠被称为一种天然的保湿因子,有效的保持皮肤的滋润度,将其添加至化妆品中可有效减少皮肤水分的挥发,并且乳酸钠可与大部分有效成分结合从而共同发挥作用,治疗皮肤紊乱所引起的一系列问题<sup>[111]</sup>。

#### 1.4 利用木质纤维素生产乳酸现存问题

木质纤维素拥有致密的结晶结构,在使用其进行生物基化学品生产时需要经过预处理、生物脱毒、糖化与发酵以及后期分离纯化等操作。目前,使用价格低廉的木质纤维素替代淀粉等进行生物基化学品生产时,过程复杂,并且依然存在较多问题,如能耗较高、废水量大以及发酵指标较低等<sup>[112,113]</sup>。为了使木质纤维素成为有效的替代品,需要在降低整个生物炼制过程的生产成本的基础上提高发酵指标<sup>[114]</sup>。本节针对生物炼制技术存在的问题,以及在此问题的基础上如何改进以提高木质纤维素乳酸发酵指标展开论述。

##### 1.4.1 生物炼制中的基本问题

在第一节中已经提到,传统的木质纤维素生物炼制过程较为复杂,并且在整个过程中能耗高<sup>[112]</sup>、废水量大<sup>[113]</sup>等问题使其并不能很好的替代淀粉基进行相关化学品的生产。为了解决相应问题,本实验室独创了干法生物炼制来一定程度的降低能耗与减少废水的排放<sup>[39]</sup>。该技术已经较为成功的运用在本实验的实验操作中,如利用木质纤维素进行乙醇生产,通过最终的实验探究可得,乙醇发酵浓度较高,且废水的排放量明显减少,经过 Aspen Plus 分析其生产成本与玉米乙醇接近<sup>[39,115]</sup>。干法生物炼制技术为低能耗、低废水量和较高指标的纤维素乳酸发酵提供基础平台。

##### 1.4.2 抑制物脱除的同时可发酵单糖的大量损失

预处理在破坏木质纤维素致密的结构后,可以释放多种可发酵单糖,同时也会产生多种抑制物。抑制物对纤维素酶的活性会产生抑制,并且还会抑制微生物的生长及糖代谢,进而降低发酵指标<sup>[21]</sup>。将物料中的抑制物进行脱除是重要环节,传统的脱除方式主要是水洗或碱中和,虽然会达到抑制物脱除的效果,但大部分可溶性单糖会随产生的废水一起排出<sup>[27]</sup>。本实验室成功筛选到了脱毒菌株 *A. resinae* ZN1<sup>[45]</sup>,该菌株在预处理后的物料中可以优先利用大部分抑制物(如呋喃醛和乙酸等),再利用可发酵单糖,如果严格控制好脱毒时间,可有效的避免糖的损失<sup>[46-48]</sup>。该方法可以在保证可发酵单糖不受损失的前提条件下将抑制物脱除,为高指标的纤维素乳酸发酵提供保障。

##### 1.4.3 抑制物对发酵过程的影响

木质纤维素在经过预处理后,其致密结构会得到破坏,生成多种抑制物如酚类、呋喃类以及弱酸类等<sup>[116,117]</sup>。抑制物的存在会对菌株的生长及代谢产生抑制,本实验室筛选出的脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 能快速脱除呋喃类及弱酸类抑制物且没有木糖的损失<sup>[45]</sup>。

脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 对抑制物的快速脱除只针对于部分抑制物, 在脱除酚类抑制物如酚醛类化合物和醌类化合物时十分缓慢, 若延长脱毒时间, 会消耗木糖和葡萄糖。对于一些对酚类化合物敏感即抑制物耐受性较差的菌株而言, 单一使用脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 进行抑制物脱除, 并不能有效的解决主要问题且无法得到较高的发酵指标, 提高菌株自身的抑制物耐受性才是解决问题的根本。

为了提高菌株的抑制物耐受性, 相关的研究工作者已经进行了大量的实验探究, 如为了提高 *S. cerevisiae* 对于糠醛或 HMF 的耐受性, 将 *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 放置在含有对应高浓度抑制物的培养基中进行驯化, 驯化多代后, 驯化菌株生长变好, 经过检测驯化菌株可将 HMF 或者糠醛还原成对应的醇<sup>[118]</sup>。通过基因工程也可以实现提高菌株抑制物耐受性这一目标, 如为了提高 *S. cerevisiae* 对糠醛和 HMF 的耐受性, 将相关耐受基因 (*ADH1*、*ALD6* 和 *ADH6*) 在 *S. cerevisiae* 中表达, 经检测 *S. cerevisiae* 可以实现对糠醛和 HMF 的转化且其乙醇发酵性能得到提高<sup>[119-121]</sup>。综上所述可以看出, 菌株对于抑制物的耐受主要体现在将高毒性的抑制物转化为低毒性或者无毒性的物质, 进而来提高自身的发酵性能。本实验室也进行了相应探究, 在之前的工作中, 通过基因工程, 将部分抑制物耐受相关的基因在 *Z. mobilis* ZM4 中过表达, 如过表达酚醛耐受相关基因 (*ZMO1116*、*ZMO1696*、*ZMO1885*)<sup>[122]</sup>和苯醌耐受相关基因 (*ZMO1116*、*ZMO1399*、*ZMO1696*、*ZMO1576* 和 *ZMO1984*)<sup>[56]</sup>等, 来进一步探究菌株的抗逆能力是否得到强化。

针对乳酸发酵过程中抑制物的影响这一科学问题, 已有相关科研人员进行了探究。Zhang<sup>[123]</sup>等利用 *B. coagulans* LA204 进行乳酸发酵, 分别使用水洗脱毒后的玉米芯和没有经过水洗脱毒的玉米芯进行发酵, 从实验结果可以看出经水洗脱毒后的物料最终乳酸产量提高 49%。实验室在前期探究中, 使用预处理后的玉米秸秆进行乳酸发酵, 为除去酚类抑制物, 适当延长脱毒时间, 可使乳酸产量得到一定提高, 但该方法造成了部分单糖的损失<sup>[94]</sup>。如果从根本问题出发, 提高乳酸发酵菌株自身对抑制物的耐受能力, 可以进一步的提高菌株的发酵性能得到高指标的木质纤维素乳酸。

#### 1.4.4 金属离子对发酵过程的影响

木质纤维素在进行生物炼制的过程中会额外添加酸、碱或其他化学试剂, 导致水解液中会富集大量的金属离子, 如钠离子 ( $\text{Na}^+$ )、钾离子 ( $\text{K}^+$ ) 和铵离子 ( $\text{NH}_4^+$ ) 等, 同时在发酵过程中进行 pH 调节时也会造成金属离子的富集<sup>[124,125]</sup>。一定浓度的金属离子会抑制发酵菌株的活性进而降低其发酵性能<sup>[125-128]</sup>。本实验室针对金属离子耐受方面的问题进行了相关探究。Gao<sup>[129]</sup>等探究出 *Z. mobilis* ZM4 对于  $\text{Na}^+$  较为敏感, 通过基因改造, 将编码  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter 的基因 *ZMO0119* 在 *Z. mobilis* ZM4 中进行过表达, 从实验结果可以发现, 当处于高浓度  $\text{Na}^+$  胁迫环境下时, 工程菌株加强了  $\text{Na}^+$  外排能力, 减少了高浓度  $\text{Na}^+$  对菌株的抑制作用进而使菌株的发酵性能得到明显提高。

本实验室在利用小麦秸秆进行乳酸钠发酵时, 在糖浓度较高的情况下, 用 NaOH 溶液作为 pH 中和剂, 发酵 96 h 后乳酸钠产量偏低, 其主要的原因是在进行 pH 调节时会导致  $\text{Na}^+$  的富集, 当  $\text{Na}^+$  累积到一定浓度时, 会抑制菌株的生长及糖代谢。若通过基因

工程手段来提高 *P. acidilactici* 对于  $\text{Na}^+$  的耐受能力，可以在一定程度上提高乳酸钠的产量。

### 1.5 本论文立题依据和主要研究内容

干酸预处理是干法生物炼制技术的首要环节，在破坏木质纤维素的致密结构后，它可以释放多种可发酵单糖，同时也会生成多种抑制物。这些抑制物主要为呋喃类化合物、酚类化合物、弱酸类化合物及金属离子（其中较为典型的便是  $\text{Na}^+$ ）。通过生物脱毒的方式可以将呋喃类与弱酸类抑制物快速脱除，但很难快速脱除酚类抑制物，富集的  $\text{Na}^+$  也无法通过此方式除去。抑制物的存在对高指标木质纤维素乳酸发酵具有一系列影响。

实验室在前期研究中，分离出一株耐高温的乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2，该菌株可利用木质纤维素生产 D, L-混合型乳酸<sup>[130]</sup>。之后对野生型菌株 *P. acidilactici* DQ2 进行了基因改造，分别敲除基因组中的 *ldhD* 和 *ldh* 基因，得到了两株可分别进行手性乳酸生产的 *P. acidilactici* TY112（L-乳酸）和 *P. acidilactici* ZP26（D-乳酸）<sup>[94]</sup>。但两株改造菌株缺乏木糖代谢路径，并不能有效利用木糖，为了进一步提高乳酸产量，在两株改造菌株中分别构建了木糖代谢路径，最终得到 *P. acidilactici* ZY271（L-乳酸）和 *P. acidilactici* ZY15（D-乳酸）两株乳酸生产菌株<sup>[95,96]</sup>。生物脱毒后大部分单糖得以保留，如纤维素衍生的葡萄糖，半纤维素衍生的半乳糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖，虽然在两株乳酸生产菌株中构建了木糖代谢路径，但目前并不能确认两株构建菌株是否能实现可发酵单糖的高效利用。因此本论文利用两株已构建木糖代谢路径的乳酸发酵菌株，对其全糖代谢能力进行了验证，通过基因工程使其抑制物（主要为酚类抑制物和  $\text{Na}^+$ ）耐受能力得到提高，并以干法生物炼制为基础平台，进行了同步糖化共发酵，最终得到高浓度的纤维素乳酸。具体开展的工作如下：

(1) 利用构建了木糖代谢路径的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY15，在单糖和混合糖体系下对两株构建菌株的全糖代谢能力进行了探究。之后，通过混合糖驯化以提高菌株的糖代谢速率。最后借助 qRT-PCR 技术，从糖代谢和糖转运相关基因的转录水平这两方面对构建菌株全糖利用的发酵现象进行了初步分析。

(2) *P. acidilactici* 对酚类抑制物（如酚醛和苯醌）较为敏感，生物脱毒可以将大部分抑制物快速除去，但对于酚类抑制物脱除较慢，若延长脱毒时间，会造成部分单糖的损失。本论文通过基因工程，将 *CGS9114\_RS09725*（酚醛耐受相关基因）和 *ZMO1116*（苯醌降解相关基因）分别整合到 *P. acidilactici* ZY15 基因组中，成功地提高了 *P. acidilactici* ZY15 对相应抑制物的耐受能力，为酚类抑制物胁迫下的高指标木质纤维素乳酸发酵提供有效菌株。

(3) 通过基因工程，将编码  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的基因 *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter\_RS02775* 在 *P. acidilactici* ZY271 中进行过表达，以提高菌株对  $\text{Na}^+$  的耐受能力，实现  $\text{Na}^+$  胁迫下

---

的高指标木质纤维素乳酸钠发酵。最后借助 qRT-PCR 技术，从糖代谢相关基因的转录水平对相应的发酵现象进行了合理分析。

## 第2章 *Pediococcus acidilactici* 工程菌株利用麦秆中的己糖和戊糖共发酵

### 制备高浓度 D-乳酸和 L-乳酸

#### 2.1 引言

乳酸被广泛应用于多个领域，如化妆品、食品和医疗等，是一种重要的工业化学品<sup>[79,80]</sup>。近年来，工业应用中倡导“环境友好”，生物可降解型塑料聚乳酸（PLA）得以广泛使用，使得乳酸的需求量不断扩大<sup>[83,131]</sup>。目前，较为直接的乳酸生产方式主要是利用淀粉或葡萄糖发酵得到，但成本较高，因此需要寻找一种价格更加低廉的原料将其替代，降低乳酸生产成本<sup>[132,133]</sup>。木质纤维素是一种可再生资源，在中国其主要来源于农作物秸秆，来源广泛且价格低廉，有望成为淀粉和葡萄糖的优质替代品以进行乳酸生产。

木质纤维素由三部分构成，组成成分分别为纤维素、半纤维素和木质素，来自纤维素的己糖主要是葡萄糖，来自半纤维素的己糖为半乳糖和甘露糖，戊糖主要为木糖和阿拉伯糖，其中木糖和阿拉伯糖分别约占总单糖的 34.1%和 5.1%，半乳糖和甘露糖分别约占总单糖的 0.5%<sup>[134]</sup>。在生物炼制过程中半纤维素来源的非葡萄糖单糖大量丢失<sup>[27]</sup>，并且自然界中大部分的野生型乳酸菌只能代谢葡萄糖，对部分保存下来的非葡萄糖单糖无法进行有效的利用。可发酵单糖的不充分利用使得木质纤维素乳酸发酵浓度较低，无法代谢的单糖会阻碍后期乳酸的分离纯化，增加分离纯化的操作成本<sup>[135]</sup>。为了得到高指标的木质纤维素乳酸，本实验室对筛选出来的 *P. acidilactici* DQ2 进行了基因改造，最终得到了具有木糖代谢路径的 *P. acidilactici* ZY271（L-乳酸）和 *P. acidilactici* ZY15（D-乳酸）<sup>[95,96,130]</sup>。

基于本实验室独创的干法生物炼制技术平台，生物脱毒后大部分的可发酵单糖被有效保留<sup>[39]</sup>。以构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 为研究对象，在单糖和混合糖体系下对两株构建菌株进行了发酵评价。两株构建菌株可以实现全糖的共发酵，并且不存在葡萄糖抑制作用，初步实现了全糖利用的目标。为了提高菌株对糖的利用率，达到零还原糖残余的目的，我们对构建菌株进行了混合糖驯化。之后，将驯化菌株在麦秆（固含量为 30%（w/w））中进行同步糖化共发酵（SSCF）。最后，针对发酵现象，借助 qRT-PCR 技术，分析了 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 在以五种单糖为碳源的情况下糖代谢相关基因的转录水平，以及在混合糖为碳源的情况下编码糖转运蛋白相关基因的转录水平。本研究探究了两株构建菌株的全糖代谢能力，通过对糖代谢和糖转运相关基因的转录水平的初步分析，发现编码甘露糖 PTS 转运系统中的 EII<sup>Man</sup> 蛋白的 *manXYZ* 基因簇对糖的高效利用起到关键作用，为后续探究其他发酵菌株中糖的高效利用提供了重要的基因参考依据。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 菌株、培养基及培养方法

本章所使用的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY112 在中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC) 中保存, 注册编号为 8664, D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZP26 也保存在 CGMCC, 注册编号为 8665<sup>[94]</sup>。本实验室前期改造得到的 *P. acidilactici* ZY271 保存在 CGMCC, 注册编号 13611, *P. acidilactici* ZY15 保存在 CGMCC, 注册编号 13612。本实验室成功筛选出的脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 保存在 CGMCC, 注册编号 7452<sup>[45]</sup>。

本章实验所使用的培养基如下:

(1) MRS 培养基 (简化, 用于种子培养): 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母粉, 5 g/L 无水乙酸钠, 2 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.58 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.25 g/L  $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

(2) MRS 培养基 (简化, 用于发酵): 单糖或混合糖浓度根据实验需要来调整, 10 g/L 酵母粉, 2 g/L  $K_2HPO_4$ , 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.58 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 g/L 蛋白胨, 0.25 g/L  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 5 g/L 无水乙酸钠。

(3) PDA 培养基: 使用剥皮切碎后的 200 g 土豆, 在 1 L 去离子水中煮沸, 维持 30 min, 用纱布过滤, 取上清, 定容至 1 L, 加入 20 g 葡萄糖, 15 g 琼脂。

实验室所用的 *P. acidilactici* 均使用 MRS 培养基进行培养, 培养条件为 150 rpm, 42°C。 *A. resinae* ZN1 在 PDA 培养基中进行培养, 在 4°C 条件下保存。在实验过程中使用的培养基, 枪头和三角瓶等均需要使用高压灭菌锅进行灭菌, 灭菌条件为 115°C 高温下灭菌 20 min。

### 2.2.2 原料、酶与试剂

本章实验所使用的小麦秸秆收获于河南南阳, 收割于 2018 年春季。水洗后的小麦秸秆在室温下晾干, 用粉碎机进行粉碎, 装袋储存。

纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购自 Novozymes 公司 (中国北京)。滤纸酶活的检测方法参考 NREL 方法<sup>[136]</sup>, 滤纸酶活为 203.2 FPU/mL。纤维二糖酶活的检测方法依据 Ghose (1987)的方法<sup>[137]</sup>, 纤维二糖酶活为 4,900 CBU/mL。依据 Bradford 法对 Cellic CTec 2.0 的蛋白浓度进行检测, 蛋白浓度为 87.3 mg/mL。

蛋白胨和酵母粉购自 Oxoid (UK)。葡萄糖、甘露糖、半乳糖和木糖购自 Tansoole (上海), 阿拉伯糖购自 Aladdin (上海)。RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus 购自 Takara 公司 (Japan); 反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit 购自 Toyobo 公司 (Japan); qRT-PCR 分析试剂盒 SYBR Green Realtime PCR Master Mix kit 购自 Toyobo 公司 (Japan)。乳酸光学纯度检测试剂盒为 Megazyme D-/L-Lactic Acid Kit (Megazyme International Ireland, Bray, Wicklow, Ireland)。

### 2.2.3 单糖与乳酸的分析方法

利用 HPLC 检测几种单糖和乳酸。针对葡萄糖、木糖和乳酸，使用的检测器为 RID-10A 示差检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan)，色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H (Bio-rad, Hercules, CA, USA)，5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为流动相，柱温为 65°C，流动相流速为 0.6 mL/min。针对于阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖，使用的检测器为 RID-10A 示差检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan)，色谱柱为 HPX-87P column (Bio-rad, Hercules, CA, USA)，超纯水 (经过灭菌) 作为流动相，柱温为 80°C，流动相流速为 0.6 mL/min

### 2.2.4 适应性驯化

为提高构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 对糖的利用率，在混合糖培养基中对两株构建菌株进行了适应性驯化。驯化分为三个阶段，每个阶段添加不同浓度的混合糖 (参照实际物料中的糖浓度)，培养体系为 20 mL, CaCO<sub>3</sub> 用以 pH 的调节 (0.6 g CaCO<sub>3</sub>/g 糖)，接种量为 10% (v/v)，每隔 24 h 转接一次，于 42°C 和 150 rpm 条件下进行培养。

### 2.2.5 干法生物炼制技术以进行乳酸生产

依据 Zhang et al. (2011)<sup>[39]</sup>和 He et al. (2014)<sup>[138]</sup>对麦秆进行了干酸预处理，将预处理后的麦秆调节到 pH5.5，使用的 pH 中和剂为 20% (w/w) Ca(OH)<sub>2</sub>，之后将脱毒种子 *A. resinae* ZN1 加入到物料中，种子接种量为 10% (w/w)，混匀后加入到脱毒反应器中，通气量为 0.8 vvm，维持 28°C 大约脱毒 3 天，每隔 12 h 搅拌 1 min。依据 NREL 的两步酸解法，对脱毒后的麦秆进行了组分测定<sup>[139]</sup>。测得麦秆中含有 36.2%纤维素，1.7%半纤维素。

同步糖化共发酵 (SSCF) 之前需要对种子进行培养，将冻存管中的 *P. acidilactici* 菌液接种到简化 MRS 培养基中，体系为 20 mL，42°C，150 rpm 条件下培养 12 h，之后将培养液转接到新鲜培养基中 (体系为 200 mL)，在同样的培养条件下培养 5 h，种子液制备的过程中两次培养都需要加入 1% (v/v) 的糖化酶，其主要目的是为了防止菌体絮凝<sup>[140]</sup>。同步糖化共发酵 (SSCF) 是在 5 L 生物反应器中进行，其搅拌桨为螺带式搅拌桨<sup>[141]</sup>。在最开始的预糖化阶段，需将一定量的水和 10 mg 蛋白/g 纤维素的纤维素酶 Cellic CTec 2 加入到反应器中，分批加入麦秆，在 50°C，150 rpm 条件下预糖化 6 h；之后加入营养盐 (不包含葡萄糖的 MRS 培养基) 和种子液，于 42°C，150 rpm，pH 为 5.5 的条件下进行 SSCF。在发酵过程中控制 pH 维持在 5.5，使用 25% (w/w) Ca(OH)<sub>2</sub> 溶液调节 pH。

### 2.2.6 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析

为了对构建菌株全糖利用的发酵现象作进一步合理的分析解释，我们在含有不同可发酵单糖的培养体系下探究了糖代谢相关基因的转录水平以及混合糖培养体系下糖转运蛋白相关基因的转录水平。针对相关基因，本实验利用 Primer 5.0 进行引物设计，相关基因及其引物见附录 I。

在进行 qRT-PCR 分析之前,需要对实验所用菌株的菌体进行收集,并提取收集菌体的 RNA。菌株培养在简化 MRS 培养基中,培养体系为 50 mL,单糖培养体系下,糖浓度分别为 40 g/L 葡萄糖、40 g/L 木糖、10 g/L 阿拉伯糖、10 g/L 甘露糖和 10 g/L 半乳糖;混合糖培养体系下,糖浓度为 70 g/L 的葡萄糖、50 g/L 的木糖、8 g/L 的阿拉伯糖、2 g/L 的甘露糖和半乳糖。培养条件为 42°C, 150 rpm。单糖培养体系的菌株收集时间分别为:以葡萄糖和木糖为碳源的收集时间是 12 h,以阿拉伯糖和半乳糖为碳源的收集时间是 8 h,以甘露糖为碳源的收集时间为 24 h。混合糖培养体系的菌株收集时间为 6 h。在确定好的培养时间点取培养液于 4°C, 13500 g, 离心 10 min 以进行菌体的收集,液氮冷冻,存于-80°C 冰箱备用。收集的菌体需设置 3 个生物学重复。

使用液氮冷却研钵,之后立即进行菌体的研磨,参照 RNAiso Plus 试剂盒 (Takara, Otsu, Japan) 方法进行 RNA 提取。在分光光度计 DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 上检测提取 RNA 的可用性,检测内容主要为 RNA 质量与浓度。将检测合格的 RNA 处理到适宜浓度范围,进行反转录以合成作为模板使用的 cDNA,反转录试剂盒为 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit。以 SYBR Green Realtime PCR Master Mix kit (Toyobo, Osaka, Japan) 作为 qRT-PCR 实验的染料,反应仪器为 BioRad CFX 96 PCR 仪 (BioRad, Hercules, CA, USA)。qRT-PCR 实验设定程序为:95°C 预变性 60 s, 95°C 变性 15 s, 55°C 退火 15 s, 72°C 延伸 30 s, 40 个循环后进行溶解曲线分析,升温速度为 0.5°C/5 s,从 55°C 升至 95°C 终止。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 木糖路径构建前后 *P. acidilactici* 己糖和戊糖的发酵性能评价

经生物脱毒后,大部分的可发酵单糖得以保留,占总单糖比例较高的木质纤维素来源的单糖主要有五种,分别包括己糖(葡萄糖、半乳糖和甘露糖)和戊糖(阿拉伯糖和木糖)。对单糖的高效利用将增加木质纤维素乳酸的发酵指标,并且在发酵液中没有残糖的存在也会减少后期乳酸分离纯化的成本。目前关于 *P. acidilactici* 对单糖利用方面的研究较多,而关于全糖共发酵方面的研究几乎没有。本实验室在前期研究中筛选到了一株野生型乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2<sup>[130]</sup>, Yi 等<sup>[94]</sup>对其进行基因改造得到了生产 L-乳酸的 *P. acidilactici* TY112 和生产 D-乳酸的 *P. acidilactici* ZP26,但两株菌株无法有效的代谢木糖,在此基础上, Qiu 等<sup>[95,96]</sup>构建了木糖代谢路径最终得到 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 两株乳酸生产菌株。在实验的最开始,以 *P. acidilactici* TY112 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZP26 (D-乳酸) 为对照组,探究了木糖代谢路径构建前后,几株菌株对五种主要单糖的发酵能力,初始糖浓度分别为 40 g/L 的葡萄糖、40 g/L 的木糖、10 g/L 的阿拉伯糖、10 g/L 的甘露糖和半乳糖(表 2.1 和表 2.2)。由发酵结果可以看出,木糖代谢路径的构建实现了菌株有效利用木糖的目的,且提高了菌株对于甘露糖的代谢速率,由于 PK 路径的阻断,使其直接通过 PP 路径,有效的减少了副产物乙酸的生成。

表 2.1 L-乳酸生产菌株的五种单糖发酵比较

Table 2.1 Comparison of five sugars fermentations for L-lactic acid producing strains

Sugars	<i>P. acidilactici</i> strains	Initial sugar concentration (g/L)	Sugar exhausting time (h)	Acetic acid yield (%)
Glucose	TY112	39.0±1.6	36	3.0±0.2
	ZY271	45.4±0.7	36	1.1±0.1
Xylose	TY112	36.4±3.1	—	—
	ZY271	35.5±0.4	60	5.2±0.2
Arabinose	TY112	12.2±0.6	24	42.3±4.0
	ZY271	10.7±0.3	24	7.1±0.1
Mannose	TY112	11.5±0.0	48	29.3±2.0
	ZY271	10.3±0.3	12	6.2±2.0
Galactose	TY112	12.5±0.5	24	6.2±2.0
	ZY271	10.6±0.2	36	2.2±0.1

发酵条件：简化 MRS 培养基中分别含有五种不同碳源；在摇瓶中加入 0.6 g CaCO<sub>3</sub>/g 糖用于 pH 的调节。

表 2.2 D-乳酸生产菌株的五种单糖发酵比较

Table 2.2 Comparison of five sugars fermentations for D-lactic acid producing strains

Sugars	<i>P. acidilactici</i> strains	Initial sugar concentration (g/L)	Sugar exhausting time (h)	Acetic acid yield (%)
Glucose	ZP26	40.1±0.2	36	1.2±0.1
	ZY15	44.4±1.0	36	0.3±0.0
Xylose	ZP26	36.1±0.4	—	—
	ZY15	33.3±0.3	72	2.2±0.2
Arabinose	ZP26	12.5±0.1	12	34.2±3.1
	ZY15	10.8±0.3	24	3.1±0.3
Mannose	ZP26	11.3±1.2	72	22.4±4.0
	ZY15	11.0±0.1	36	11.0±2.1
Galactose	ZP26	10.7±0.0	12	3.1±0.1
	ZY15	10.8±0.2	36	6.1±1.2

发酵条件：简化 MRS 培养基中分别含有五种不同碳源；在摇瓶中加入 0.6 g CaCO<sub>3</sub>/g 糖用于 pH 的调节。

木糖代谢路径构建之后，得到了可以利用五种单糖的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY15。但最终的发酵体系是混合碳源，此时并不能很好的确认构建菌株在混合糖的体系下是否能实现全糖的利用。因此我们参照了实际物料中几种主要单糖的糖浓度，在 3 L 的生物反应器中进行了合成培养基的混合糖发酵（图 2.1）。本实验以 *P. acidilactici* ZY271（L-乳酸）和 *P. acidilactici* ZY15（D-乳酸）为实验组，*P. acidilactici* TY112（L-乳酸）和 *P. acidilactici* ZP26（D-乳酸）为对照组，发酵 72 h 后，L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY112 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖与甘露糖和半乳糖的剩余糖浓度为 0.2、40.19、0.1 和 0 g/L，L-乳酸产量为 59.77 g/L（图 2.1 a）；*P.*

*acidilactici* ZY271 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖与甘露糖和半乳糖的剩余糖浓度为 0.39、0.44、0.71 和 0.84 g/L, L-乳酸产量为 85.48 g/L (图 2.1 b)。D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZP26 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖与甘露糖和半乳糖的剩余糖浓度为 0.16、36.62、0.29 和 0 g/L, D-乳酸产量为 55.28 g/L (图 2.1 c); *P. acidilactici* ZY15 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖与甘露糖和半乳糖的剩余糖浓度为 0.29、1.26、0.34 和 0.16 g/L, D-乳酸产量为 81.11 g/L (图 2.1 d)。从发酵结果可以发现, 在混合糖体系下, 构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 可以同步利用五种糖, 初步达到了全糖利用的目标。

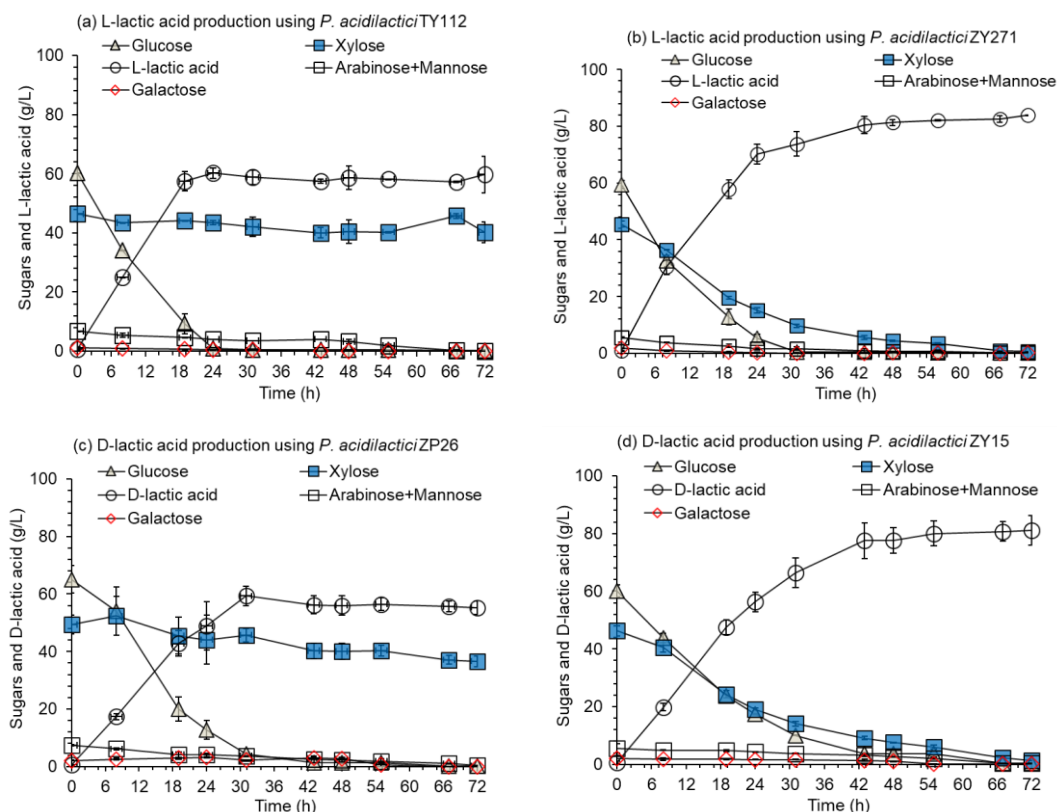


图 2.1 L-乳酸生产菌株和 D-乳酸生产菌株混合糖发酵

(a) 对照组 *P. acidilactici* TY112; (b) 实验组 *P. acidilactici* ZY271;  
(c) 对照组 *P. acidilactici* ZP26; (d) 实验组 *P. acidilactici* ZY15

Fig. 2.1 The fermentation of mixed sugar for L-lactic acid producing strains and D-lactic acid producing strains

(a) The control group of *P. acidilactici* TY112; (b) The experimental group of *P. acidilactici* ZY271;  
(c) The control group of *P. acidilactici* ZP26; (d) The experimental group of *P. acidilactici* ZY15

### 2.3.2 构建菌株的混合糖驯化及驯化前后发酵评价

以 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 为实验组, *P. acidilactici* TY112 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZP26 (D-乳酸) 为对照组, 在混合糖培养基中进行发酵, 可以发现木糖代谢路径构建后, 构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 可以同步利用多种可发酵单糖, 初步实现了全糖利用的目的, 但是为了提高菌株对糖的利用率, 进一步实现零还原糖残余的目的, 我们参照物料中可发酵单糖

的浓度，将构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 在混合糖的体系下进行驯化（图 2.2）。驯化分为三个阶段：第一阶段混合糖浓度为 70 g/L 的葡萄糖、50 g/L 的木糖、8 g/L 的阿拉伯糖、2 g/L 的甘露糖和半乳糖，驯化一段时间后，*P. acidilactici* ZY271 对糖的代谢速率有所提高，之后慢慢趋于稳定，但 *P. acidilactici* ZY15 的木糖代谢退化；第二阶段针对 *P. acidilactici* ZY15 木糖代谢减弱的问题，我们调整了混合糖浓度，加入 10 g/L 的葡萄糖、110 g/L 的木糖、8 g/L 的阿拉伯糖、2 g/L 的甘露糖和半乳糖，驯化一段时间后，*P. acidilactici* ZY15 木糖代谢能力提高（恢复到之前水平）；第三阶段再调整回最开始的糖浓度进行驯化，一段时间两株菌株糖代谢速率趋于稳定后停止。

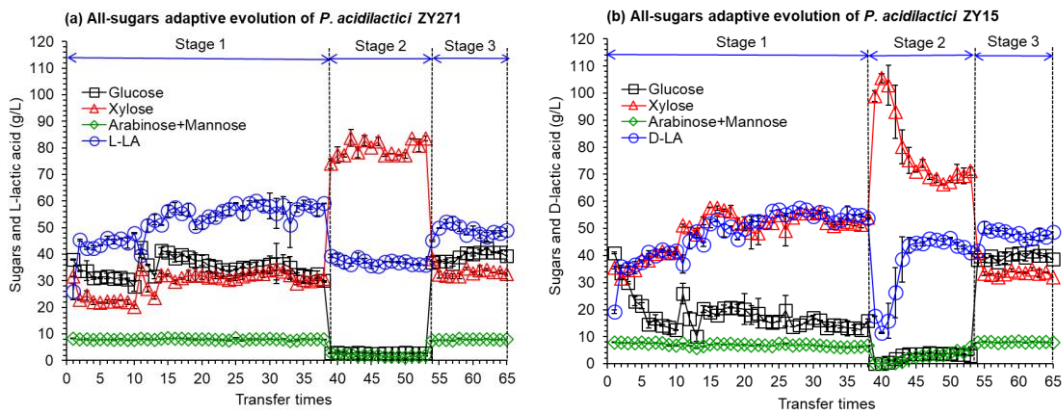


图 2.2 *P. acidilactici* ZY271 (a) 和 *P. acidilactici* ZY15 (b) 混合糖适应性驯化

Fig. 2.2 All-sugars adaptive evolution of *P. acidilactici* ZY271 (a) and *P. acidilactici* ZY15 (b)

驯化条件：使用体系为 20 mL 的简化 MRS，糖浓度参考物料中的糖浓度；每隔 24 h 转接到新鲜 MRS 培养基种，接种量为 10% (v/v)。

将驯化前后的菌株在混合糖的体系下进行发酵评价（图 2.3）。发酵 72 h 后，驯化前后的菌株都可以将几种单糖消耗完，但驯化后的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 在葡萄糖、阿拉伯糖与甘露糖的代谢和产酸速率上有一定提高，对木糖的代谢速率没有明显的变化（图 2.3 a,b）。对于驯化后的 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY15，在葡萄糖、阿拉伯糖与甘露糖的代谢和产酸速率上也有一定提高(图 2.3 c,d)。

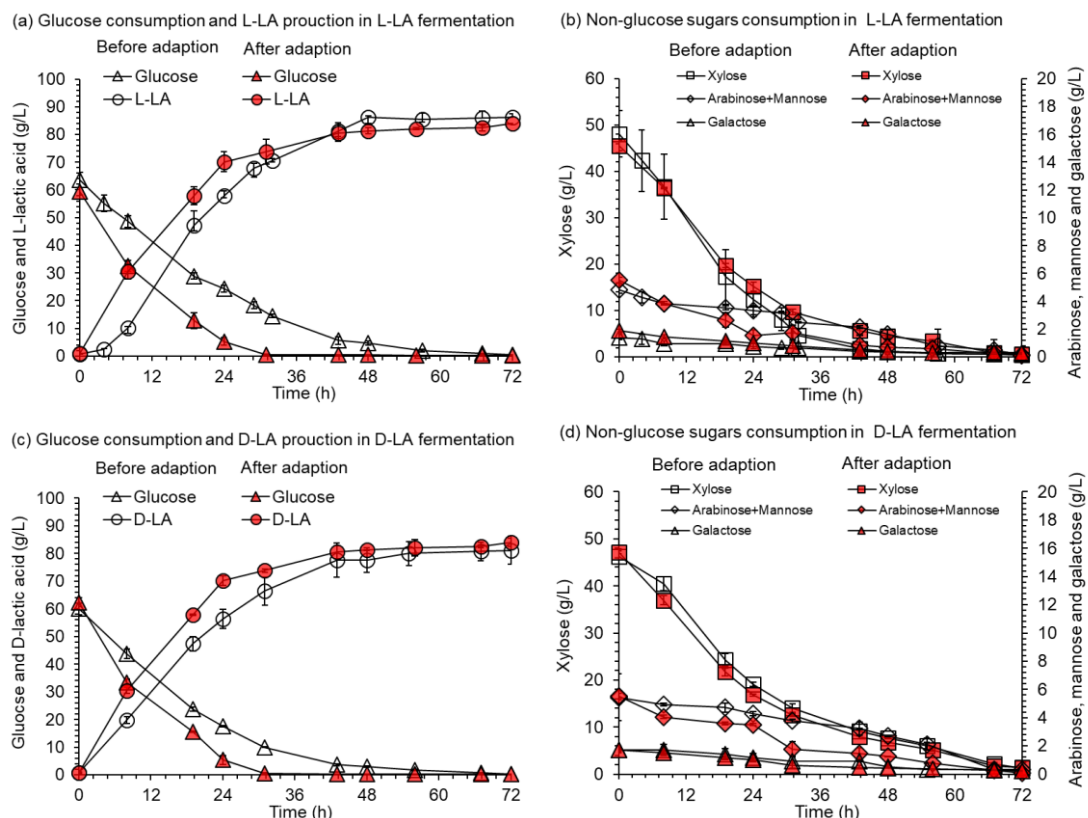


图 2.3 驯化前后混合糖发酵

(a) (b) L-乳酸生产菌株; (c) (d) D-乳酸生产菌株

Fig. 2.3 All-sugars fermentation before and after adaptive evolution

(a) (b) L-lactic acid producing strains; (c) (d) D-lactic acid producing strains

发酵条件: 3 L 生物反应器, 糖浓度为 70 g/L 的葡萄糖、50 g/L 的木糖、8 g/L 的阿拉伯糖、2 g/L 的甘露糖和半乳糖; 使用 25% (w/w) 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH, 使其维持在 5.5。

实验最终目的是利用木质纤维进行高指标的乳酸生产, 因此我们使用固含量为 30% (w/w) 的小麦秸秆进行同步糖化共发酵 (SSCF) (图 2.4)。发酵 96 h 后, 我们检测了物料中几种主要的可发酵单糖以及乳酸的产量。驯化后的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 基本可以消耗掉所有单糖, 最终的 L-乳酸浓度为 136.6 g/L, 与驯化前的菌株相比, 驯化后 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 在葡萄糖、阿拉伯糖与甘露糖的代谢速率上有一定提高 (图 2.4 a,b)。对于 D-乳酸生产菌株在驯化前后都可以消耗掉所有的单糖, 但在糖的代谢速率上, 驯化前后基本没什么变化, 最终的 D-乳酸产量为 131.8 g/L (图 2.4 c,d)。在进行混合糖适应性驯化时, *P. acidilactici* ZY15 出现木糖代谢能力退化的现象, 发酵性能并没有 *P. acidilactici* ZY271 稳定, 而实际的物料体系成分较为复杂, 这也可能是驯化前后 D-乳酸生产菌株糖代谢速率并没有出现明显变化的原因。糖代谢速率的提高可以在一定程度上减少时间成本, 即一定时间内可以得到较高产量的乳酸, 为工业化发展木质纤维素乳酸提供条件。

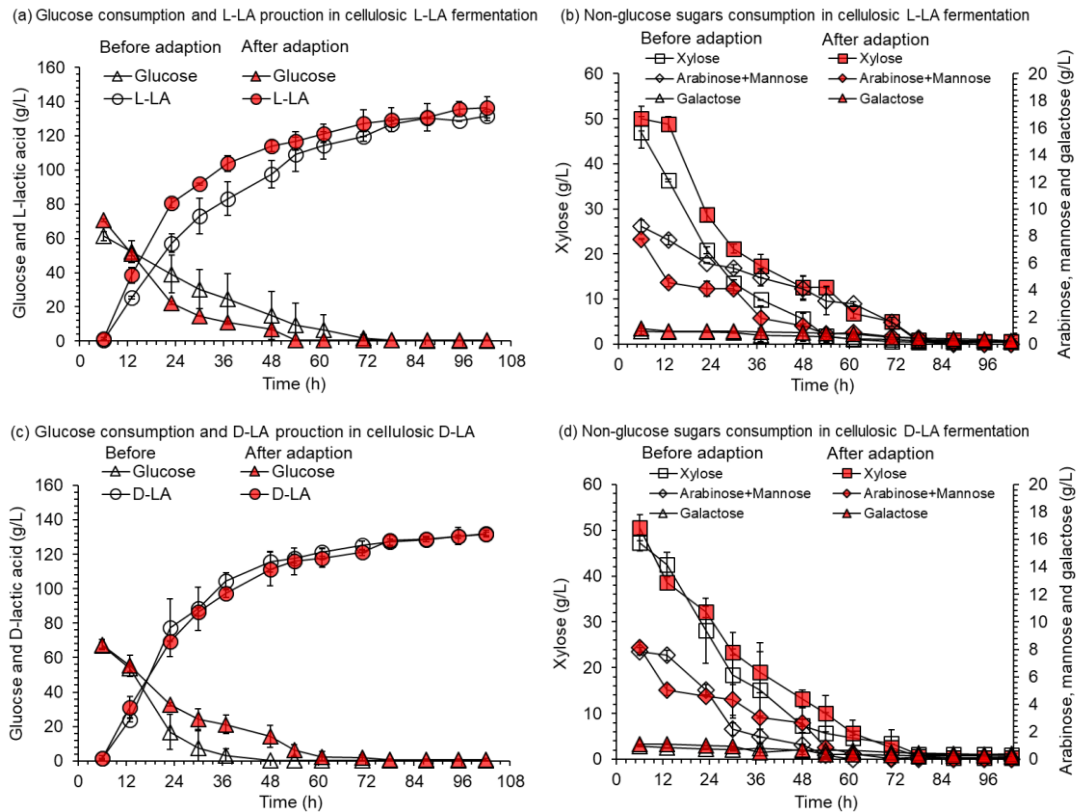


图 2.4 驯化前后同步糖化共发酵 (SSCF)

(a) (b) L-乳酸生产菌株; (c) (d) D-乳酸生产菌株

Fig. 2.4 Simultaneous saccharification and co-fermentation before and after adaptive evolution

(a) (b) L-lactic acid producing strains; (c) (d) D-lactic acid producing strains

SSCF 条件: 固含量为 30% (w/w) 的小麦秸秆 (干酸预处理, 生物脱毒 2-3 天); 5 L 生物反应器; 使用 25% (w/w) 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH, 使其维持在 5.5。

### 2.3.3 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 全糖代谢机制分析

木糖代谢路径的构建, 使构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 能实现全糖利用, 并且无论是在合成培养基混合糖发酵体系下, 还是利用麦秆进行 SSCF, 由最终的发酵结果可以总结出两个主要问题: 1. 木糖代谢路径构建后, 并没有出现葡萄糖抑制作用, 即在多种单糖 (包括葡萄糖) 同时存在的情况下, 两株构建菌株可以同时代谢几种单糖; 2. 木糖代谢路径的构建, 加快了菌株对于甘露糖的代谢速率。针对这两个主要的问题, 我们在最开始对糖代谢相关基因的转录水平进行了探究。图 2.5 是 *P. acidilactici* 利用五种单糖的代谢路径图。对于 L-乳酸生产菌株, 以原始菌株 *P. acidilactici* TY112 为对照组, *P. acidilactici* ZY271 为实验组, 分别以五种单糖为碳源, 考察五种碳源发酵下糖代谢与乙酸生成相关基因的转录水平。从 qRT-PCR 实验结果可以发现, 以葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖为碳源时, 糖代谢与乙酸生成相关基因的转录水平并没有明显的表达上调或者下调, 但以甘露糖为碳源时, 甘露糖代谢路径上 *manX* 基因表达上调 57 倍 (图 2.6 a)。因此我们单独列出了以甘露糖为碳源时相关基因的转录水平 (图 2.6)。

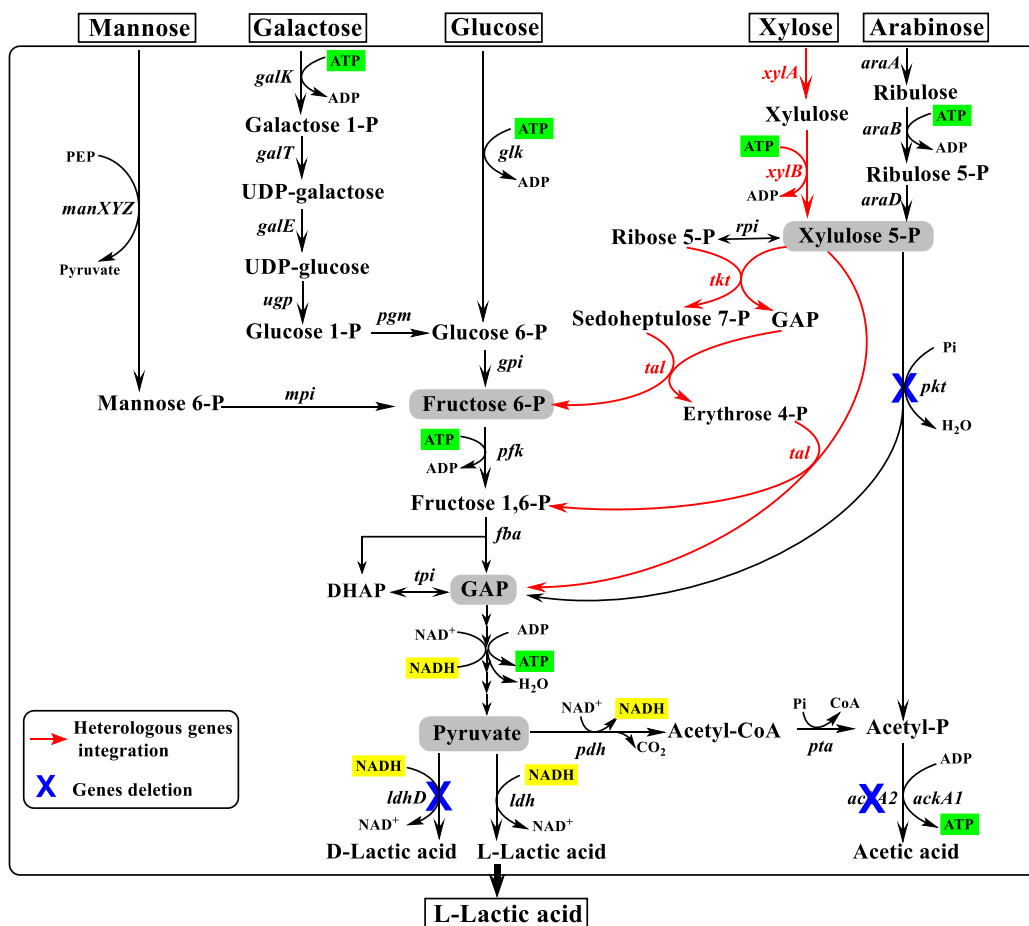


图 2.5 *P. acidilactici* 五种单糖代谢路径图

Fig. 2.5 The metabolic pathways of five monosaccharides in *p. acidilactici*

同样，对于 D-乳酸生产菌株，以原始菌株 *P. acidilactici* ZP26 为对照组，*P. acidilactici* ZY15 为实验组，qRT-PCR 实验结果与 L-乳酸生产菌株的实验结果相似，以甘露糖为碳源时，甘露糖代谢路径上 *manX* 基因表达上调 41 倍（图 2.6 b）。木糖代谢路径构建后，构建菌株对于甘露糖的代谢速率加快，因此相对于出发菌株 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 来说，构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 在甘露糖代谢路径上（主要是甘露糖到 6-磷酸果糖）某些酶活性较高，导致基因转录水平上调明显，但并不能很好的解释上面所总结的两个问题，本实验在后续的工作中对编码糖转运蛋白相关基因进行了探究。

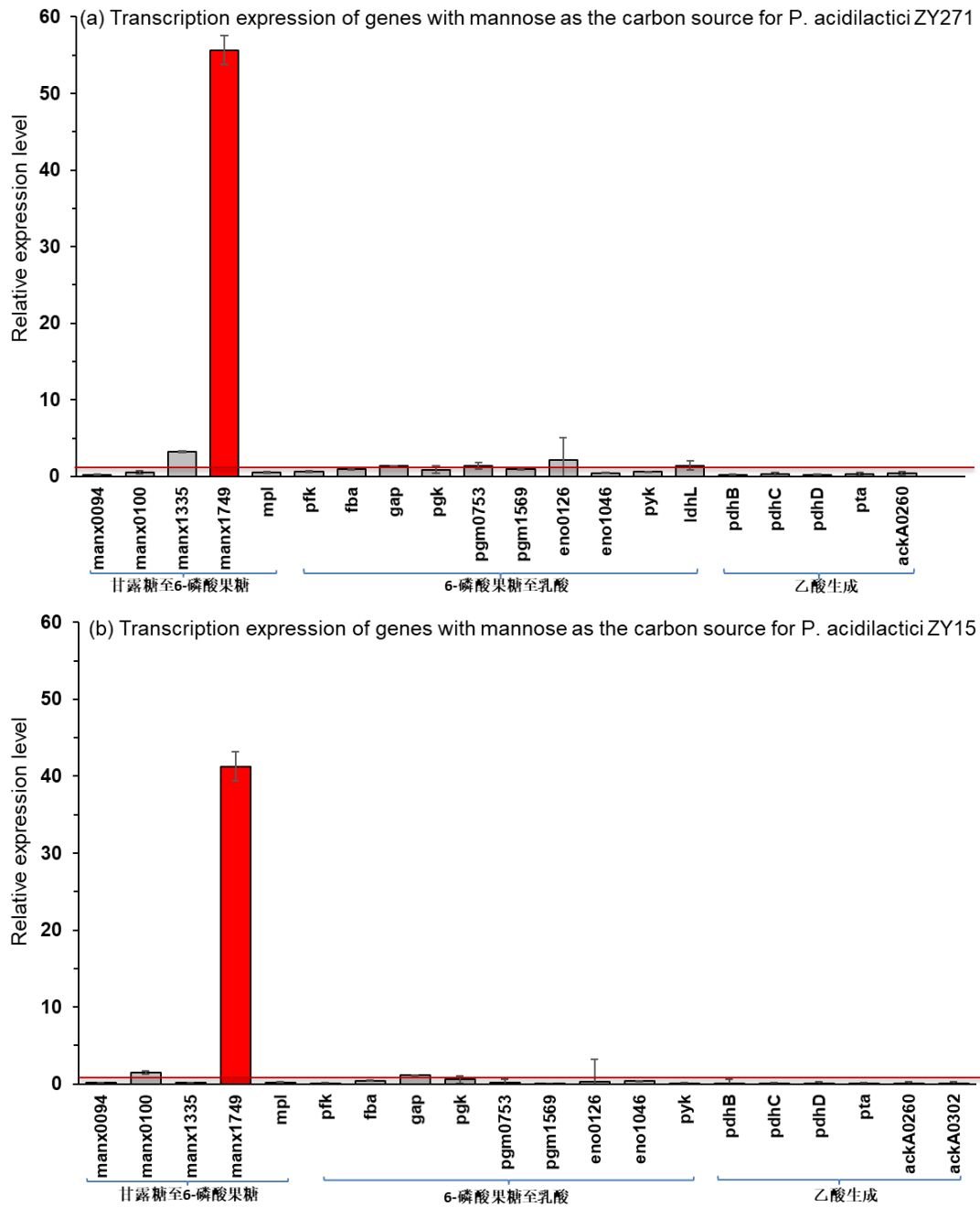


图 2.6 以甘露糖为碳源时 *P. acidilactici* 糖代谢及乙酸合成相关基因 qRT-PCR 实验结果  
(a) L-乳酸生产菌株；(b) D-乳酸生产菌株

Fig. 2.6 Results of qRT-PCR on *p. acidilactici* Sugar metabolism genes and acetic acid synthesis genes with mannose as carbon source

(a) L-lactic acid producing strains; (b) D-lactic acid producing strains

我们主要选取了三类糖转运蛋白，分别为 PTS 型（phosphotransferase system）、ABC 型（ATP-binding cassette transporters）和 MFS 型（Major facilitator superfamily）糖转运蛋白。在乳酸菌中不存在  $PTS^{Glc}$  转运系统，葡萄糖的转运主要是通过甘露糖-PTS（ $PTS^{Man}$ ）、纤维二糖-PTS（ $PTS^{Cel}$ ）转运系统和非 PTS 依赖型的渗透酶 GlcU，其中， $PTS^{Man}$  也可以转运甘露糖<sup>[30,33]</sup>。从相关研究可得，细菌中的己糖的转运主要通过 PTS 转

运蛋白，而戊糖的转运则通过 ABC 和 MFS 型转运蛋白。在之前的发酵实验中，构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 较为稳定，并没有出现糖代谢退化的现象，因此只挑选了 L-乳酸生产菌株进行糖转运蛋白相关基因转录水平的分析。原始菌株 *P. acidilactici* TY112 为对照组，*P. acidilactici* ZY271 为实验组，以混合糖为碳源，我们挑选了三个糖转运系统中的编码糖转运蛋白的相关基因进行了大量的 qRT-PCR 实验。其中 ABC 和 MFS 系统中的相关基因并没有出现表达上调很明显的现象，而 PTS 系统中有个别基因表达上调较为明显，我们列出了主要的实验结果（图 2.7）。PTS<sup>Man</sup> 转运系统主要负责转运葡萄糖和甘露糖，由 EI、HPr、EIIA、EIIB、EIIIC 和 EIID 组成，EI、HPr、EIIA 和 EIIB 主要负责磷酸基团的转运，而 EIIIC 和 EIID 负责糖的特异性转运（*manX* 编码 EIIAB，*manY* 编码 EIIIC，*manZ* 编码 EIID，因此，*manX* 与糖的磷酸化相关）<sup>[143,145]</sup>。EII<sup>Man</sup> 属于 PTS 系统中的甘露糖磷酸转移酶系统，其中 *manX* 与糖的磷酸化相关，与上面的糖代谢相关基因的 qRT-PCR 实验结果相印证，*manY* 与 *manZ* 负责糖的转运，*manY* 在混合糖体系中表达上调 25 倍，*manZ* 在混合糖体系中表达上调 10 倍。Stephane et al.<sup>[144]</sup> 经过相关实验已经验证，木糖代谢与甘露糖磷酸转移酶系统之间存在协同作用。在本实验中构建了木糖代谢路径后，促进了菌株对木糖的利用，由于木糖代谢与甘露糖磷酸转移酶系统之间的

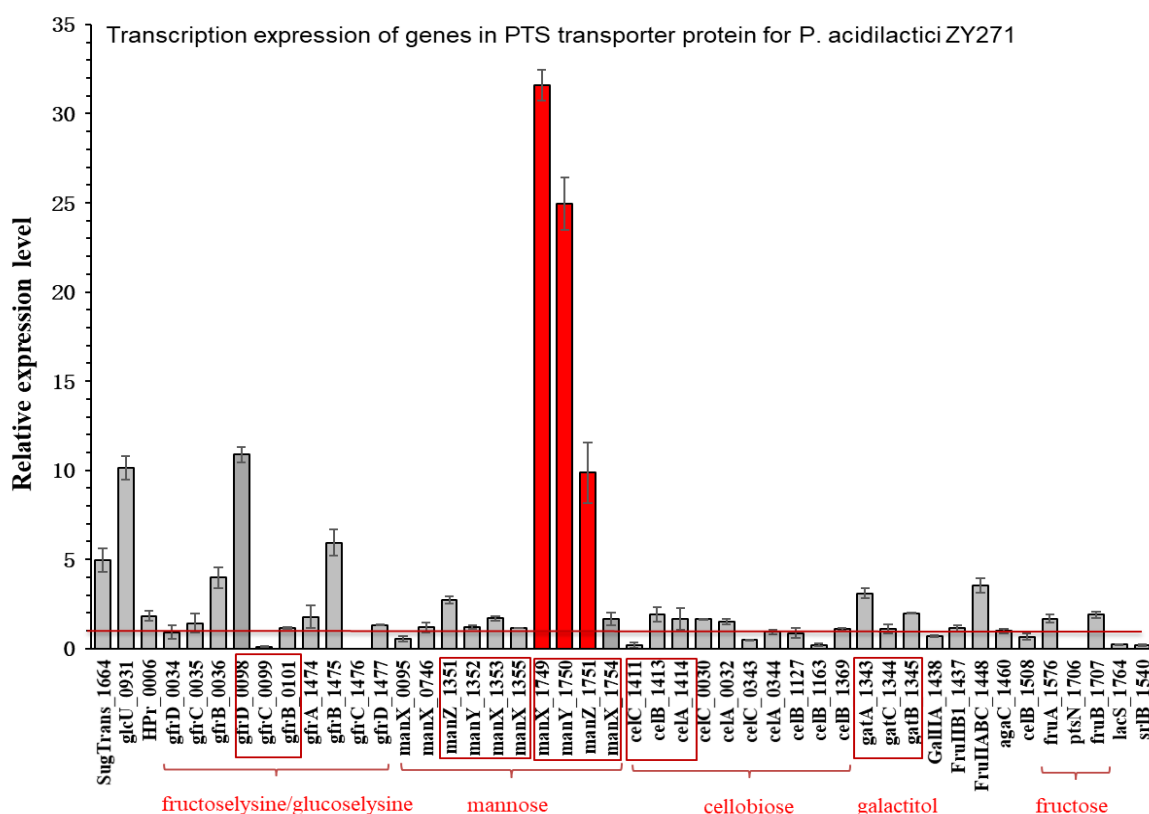


图 2.7 PTS 转运蛋白相关基因 qRT-PCR 实验结果

Fig. 2.7 Results of qRT-PCR of genes in PTS transporter protein

协同作用,同时使  $EII^{Man}$  相关的酶也较为活跃,因此 *manXYZ* 基因簇都呈现表达上调现象。在本实验中 *P. acidilactici* ZY271 可进行全糖的同步利用,即不存在葡萄糖抑制作用,也就是在 PTS 系统中转化葡糖糖相关的酶得到弱化,但在进行发酵时构建菌株对于葡萄糖的代谢依旧正常,此时肯定有其他酶对葡萄糖的转运起到补充作用,相关研究已经表明 PTS 系统中的甘露糖磷酸转移酶系统  $EII^{Man}$  也可转运葡萄糖<sup>[143]</sup>,木糖代谢路径的构建促使  $EII^{Man}$  中相关的酶较为活跃,在转运甘露糖的同时也可转运葡萄糖。以上是从 qRT-PCR 实验结果对总结的两个发酵现象进行的一个初步分析,关于  $EII^{Man}$  中的 *manXYZ* 基因簇是否在构建菌株中发挥相应的作用,目前还在做进一步的探究。

## 2.4 本章小结

本实验在前期工作中将木糖代谢路径构建至 *P. acidilactici* TY112 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZP26 (D-乳酸) 中,得到了可以利用木糖的构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸)。本章节针对构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15, 对其进行了五种单糖和混合糖的发酵评价,为了进一步提高菌株对糖的利用及糖代谢速率,我们进行了混合糖的驯化策略,最后就发酵结果从糖代谢和糖转运蛋白两方面进行了相关基因的 qRT-PCR 实验,为后续进行糖的高效利用相关研究提供基因来源。本章的主要结论如下:

(1) 木糖代谢路径的构建并不会影响菌株对于其他糖的利用,且构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 可以共发酵多种糖,实现了高指标的木质纤维素乳酸的生产。

(2) 木糖代谢路径的构建提高了菌株对于甘露糖的代谢速率,且构建菌株在混合糖培养基或者实际物料体系中进行发酵时,都不存在葡萄糖抑制作用。通过对糖代谢和糖转运蛋白相关基因进行转录水平的分析,发现  $EII^{Man}$  中的 *manXYZ* 基因簇对糖的高效利用起到关键作用,对相关基因进行进一步探究,可运用在其他菌株中,为其他菌株对糖的高效利用提供基因来源。

(3) 为提高菌株对糖的利用,将构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 在混合糖中进行适应性驯化,最终 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 菌株在葡萄糖、阿拉伯糖与甘露糖的代谢速率上有一定提高,为木质纤维素乳酸工业化发展提供条件。

### 第3章 *Pediococcus acidilactici* 酚类抑制物抗逆性强化改造

#### 3.1 引言

手性 D-乳酸是生物可降解型塑料聚乳酸 (PLA) 的重要单体之一<sup>[29,99]</sup>。利用廉价的木质纤维素替代淀粉进行 D-乳酸的生产是一个利用可再生生物质资源的重要方法<sup>[95]</sup>。实验室的 *Pediococcus acidilactici* 改造菌株可高效利用木质纤维素来源的可发酵单糖, 得到一个较高的纤维素乳酸发酵指标<sup>[95]</sup>。而天然的木质纤维素原料的酶水解程度很低, 可发酵单糖的释放得到阻碍, 因此原料的预处理过程尤为重要<sup>[13,14]</sup>。

预处理可有效破坏木质纤维素的致密结构, 增大纤维素和半纤维素与酶结合的机率, 从而提高可发酵单糖的得率<sup>[15]</sup>。预处理在破坏木质纤维素结晶结构的同时会产生多种抑制菌体生长和代谢活性的呋喃醛、有机酸和酚类等抑制物<sup>[146]</sup>。其中木质素来源的酚类抑制物是一种常见的抑制物, 主要有酚醛类化合物以及酚类化合物氧化产生的醌类化合物<sup>[57,147-149]</sup>。酚类抑制物对多种微生物的菌体活性会产生抑制, 进而降低菌株的生长和发酵性能<sup>[56,151]</sup>。生物脱毒是一种利用特异的生物脱毒菌株进行的有效而清洁的抑制物脱毒方法, 可以将呋喃类、弱酸类等抑制物快速脱除, 但是对于酚类化合物脱除效率很低, 若延长脱毒时间, 会消耗木糖和葡萄糖<sup>[45-48]</sup>。Yi 等<sup>[94]</sup>发现 *P. acidilactici* ZP26 对酚醛类抑制物的抗逆性较差, Yan 等<sup>[56]</sup>探究出乳酸菌一般不具备直接降解 BQ 的能力, 即在 BQ 降解路径上的关键基因是缺失的, 在 BQ 浓度较高的环境下, 乳酸菌无法进行正常的发酵生产。在实验室的前期工作中, 构建了多种菌株关于酚醛抑制物降解的关键基因元器件库, 基于转录组的分析发现了细菌来源的 *Z. mobilis* ZM4 和 *P. putida* KT2440 中参与酚醛抑制物转化的关键基因<sup>[152]</sup>。Zhou 等<sup>[153]</sup>通过转录水平的分析发现了在酚醛胁迫环境下 *Corynebacterium glutamicum* S9114 中显著上调表达的基因。并且在最近的研究中发现, 酿酒酵母、*Z. mobilis*、*G. oxydans* 等菌株自身具有降解 BQ 能力, 可以将高毒性的 BQ 转化为基本无毒性的 HQ, 与其他具有 BQ 降解能力的菌株相比, 细菌来源的 *Z. mobilis* ZM4 降解 BQ 的能力最强, 且通过转录水平分析探究出 *Z. mobilis* ZM4 中 BQ 降解的关键基因<sup>[56,58,59,148]</sup>。若将上述探究出的酚醛转化相关基因和 BQ 降解相关基因分别在 *P. acidilactici* 中进行表达, 可使 *P. acidilactici* 对相应抑制物的耐受能力得到提高, 在较高酚类抑制物胁迫的环境下仍具有正常的发酵性能。

本研究首先对 *P. acidilactici* ZY15 的酚类抑制物 (4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛和 BQ) 耐受性进行了探究, 可以得到香草醛对 *P. acidilactici* ZY15 的抑制作用最强, 而实验室在前期工作中已经探究出 *P. acidilactici* ZY15 不具备 BQ 降解途径。之后将筛选出来的酚醛耐受有效基因 *CGS9114\_RS09725* 和 BQ 降解有效基因 *ZMO1116* 整合到了 *P. acidilactici* ZY15 基因组中。在对应的酚类抑制物胁迫的环境下, 对整合菌株的抑制物降解能力以及 D-乳酸的发酵性能进行了评估, 其 D-乳酸发酵指标 (浓度和得率) 都优于原始菌株 *P. acidilactici* ZY15。本研究通过基因工程最终得到了一株对香草醛耐受较强

的 *P. acidilactici* 和一株具备 BQ 降解能力的 *P. acidilactici*, 为一定浓度酚类抑制物胁迫下的木质纤维素生物炼制发酵提供了有效菌株。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 菌株、培养基及培养方法

*E. coli* XLI-blue 用于质粒的构建, 保存于本课题组。*P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 保存于 CGMCC, 注册编号 13612。*PP\_3151*、*PP\_5120* 和 *PP\_5258* 来源于 *Pseudomonas putida* KT2440<sup>[152]</sup>; *ZMO1885*、*ZMO1116*、*ZMO1399*、*ZMO1696*、*ZMO1576* 和 *ZMO1984* 来源于 *Z. mobilis* ZM4<sup>[56,152]</sup>; *CGS9114\_RS10340* 和 *CGS9114\_RS09725* 来源于 *C. glutamicum* S9114<sup>[153]</sup>。

培养 *E. coli* 的培养基为 LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl。若配置固体 LB 培养基, 需添加 15 g/L 琼脂粉。*E. coli* 培养条件为 200 rpm, 37°C。若 *E. coli* XLI-blue 中携带有质粒 (表达质粒 pMG36E 或者敲除质粒 pSET4E), 则需添加红霉素, 其终浓度为 200 µg/mL。

*A. resiniae* ZN1 和 *P. acidilactici* 的培养方法及培养基见 2.2.1。

### 3.2.2 原料、酶与试剂

本章实验所使用的玉米秸秆收获于河南南阳, 收割于 2018 年春季。水洗后将玉米秸秆晾干, 其纤维素含量为 34.4% (w/w), 半纤维素含量为 23.6% (w/w)。

本章使用的酶及部分试剂见 2.2.2。

香草醛、香草醇和香草酸购自 Macklin (上海); 丁香醛、丁香醇和丁香酸购于 Aladdin (上海); 4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲醇和 4-羟基苯甲酸购于 Tansoole (上海)。p-苯醌购于 Amresco (上海), 氢醌购于 Tansoole (上海)。Prime STAR 聚合酶购自 Takara 生物公司; Restriction enzyme 购自 Fermentas 公司; 质粒抽提试剂盒、基因组提取和产物纯化试剂盒购自 Generay (上海); 核酸染料购自 Tanon Science (上海)。红霉素购自 Biosharp (北京)。

电泳试剂配制:

(1) TBE 贮存液 (5×): 27.5 g 硼酸, 20 mL EDTA 溶液, 54 g Tris, 定容至 1 L (去离子水), 超声溶解, 避光保存。

(2) TBE 贮存液 (1×): 将 5×TBE 贮存液进行稀释。

(3) 琼脂糖凝胶 (1.2%): 取 (2) 中试剂 100 mL, 称量 1.2 g 琼脂糖 (粉末), 添加 10 µL 核酸染料, 微波加热。

电转化:

(1) 缓冲液 I: 205.4 g 蔗糖, 1.86 g K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 定容至 1 L, 浓盐酸进行 pH 调节, 至 pH 为 7.5。

(2) 缓冲液 II: 171.15 g 蔗糖, 100 mL 甘油, 定容至 1 L。

(3) 复苏液: 171.15 g 蔗糖, 20 g 葡萄糖, 10 g 蛋白胨, 2 g 柠檬酸氢二铵, 2 g  $K_2HPO_4$ , 4 g 酵母提取物, 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3 g 无水乙酸钠, 0.05 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 8 g 牛肉膏, 1 mL Tween 80, 定容至 1 L。

(4) Tris-Cl: 121 mg Tris, 少量超纯水溶解, 浓盐酸进行 pH 调节, 至 pH 为 8.0, 定容至 100 mL。

(5) 溶菌酶母液 (1 mg/mL): 5 mg 溶菌酶, 5 mL Tris-Cl, 通过滤膜除菌 (规格为 0.22  $\mu m$ )。

(6) D/L-苏氨酸 (40 mM): 587 mg D/L-苏氨酸, 5 mL 超纯水进行溶解, 通过滤膜除菌。

(7) 红霉素 (50 mg/mL): 红霉素粉 250 mg, 5 mL 无水乙醇进行溶解, 通过滤膜除菌,  $-20^\circ C$  避光保存。

### 3.2.3 质粒构建

本章所引用的质粒、引物见附录II。提取所需基因组, 包括 *P. acidilactici* ZY15、*Z. mobilis* ZM4、*C. glutamicum* S9114 和 *P. putida* KT2440 的基因组。分别以所提取的基因组为模板扩增得到我们所需的基因, 其中 *ZMO1885*、*ZMO1116*、*ZMO1399*、*ZMO1696*、*ZMO1576* 和 *ZMO1984* 来源于 *Z. mobilis* ZM4, *CGS9114\_RS10340* 和 *CGS9114\_RS09725* 来源于 *C. glutamicum* S9114, *PP\_3151*、*PP\_5120* 和 *PP\_5258* 来源于 *Pseudomonas putida* KT2440。通过 *P. acidilactici* ZY15 基因组扩增得到启动子 *PldhD*。

所使用的表达质粒 pZY36e 储存在我们实验室中。选取两个酶切位点 *XbaI* 和 *Sall*, 将基因 *ZMO1885*、*ZMO1116*、*ZMO1399*、*ZMO1696*、*ZMO1576*、*ZMO1984*、*CGS9114\_RS10340*、*CGS9114\_RS09725* 和 *PP\_5120* 连接至 pZY36e 上, 选取酶切位点 *XbaI* 和 *PstI*, 将基因 *PP\_3151* 和 *PP\_5258* 连接至 pZY36e 上。最终得到 11 个重组质粒 pZY36e-*ZMO1885*、pZY36e-*ZMO1116*、pZY36e-*ZMO1116*、pZY36e-*ZMO1399*、pZY36e-*ZMO1696*、pZY36e-*ZMO1576*、pZY36e-*ZMO1984*、pZY36e-*CGS9114\_RS10340*、pZY36e-*CGS9114\_RS09725*、pZY36e-*PP\_5120*、pZY36e-*PP\_3151* 和 pZY36e-*PP\_5258*。

### 3.2.4 基因整合、敲除

制备感受态细胞 (*P. acidilactici*):

(1) 挑取 *P. acidilactici* 菌液, 平板划线 (MRS 平板),  $42^\circ C$  培养 24 h, 观察单菌落, 挑取菌落进行培养, 培养体系为 20 mL MRS 培养基,  $42^\circ C$  培养 12 h。

(2) 在新鲜 MRS 培养基中接种 400  $\mu L$  种子液, 加入 D/L-苏氨酸 600  $\mu L$  (40 mM), 150 rpm,  $42^\circ C$  培养 6 h, 检测其  $OD_{600}$  约为 1.0 左右。

(3) 取菌液 1.5 mL,  $4^\circ C$ , 10000 rpm 离心弃上清 (5 min), 添加 BufferI (1 mL), 吹打悬浮菌体,  $4^\circ C$ , 10000 rpm 离心弃上清 (5 min), 再次加入 BufferI (1 mL), 离心弃上清。

(4) 添加 BufferI (100  $\mu L$ ), 悬浮菌体, 加入溶菌酶 (1 mg/mL) 10  $\mu L$ , 水浴锅 ( $37^\circ C$ ) 处理大约 30 min。

(5) 4°C, 10000 rpm 离心弃上清 (5 min), 添加 BufferI (1 mL), 悬浮菌体, 去上清 (重复一次), 添加 BufferII (500  $\mu$ L), 悬浮细胞, 分装感受态, 大约每管 80  $\mu$ L。

电转化技术 (敲除、整合质粒, 表达质粒操作方法一样, 只是最后在 42°C 培养)。

(1) 质粒 10  $\mu$ L, 感受态细胞 80  $\mu$ L, 混合, 冰上放置, 15 min。

(2) 转移上面两者的混合液, 置于电击杯中 (1 mm, 电击杯提前预冷), 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 2000 V 设置条件下进行电击, 转移电击液, 加入 900  $\mu$ L 复苏液, 冰上放置, 15 min。

(3) 150 rpm, 28°C 培养 6 h, 6000 rpm 离心 5 min, 去掉 800  $\mu$ L 上清, 混匀剩余菌液, 在 MRS (添加红霉素) 平板上涂布菌液, 28°C, 培养 3 天左右。将单菌落进行 PCR 验证, 确认后保种 (60% (v/v))。

基因敲除、整合 (图 3.1):

(1) 单交换筛选:

挑选已验证单菌落, 接种到 MRS 培养基 (含有红霉素) 中, 150 rpm, 28°C, 培养 24 h。在新鲜 MRS (含有红霉素) 培养基中接种培养液 (接种量为 1% (v/v)), 150 rpm, 42°C 培养 12 h, 稀释菌液, 在 MRS (含有红霉素) 平板上涂布, 42°C 培养 24 h。

(2) 双交换筛选:

待 (1) 长出单菌落后, 接种至 MRS 培养基, 28°C, 培养 24 h, 稀释菌液, 平板涂布 (MRS 平板), 待平板长出菌落后, 将菌落对应点在 MRS 平板和含有红霉素的 MRS 平板上, 42°C, 培养 24 h。若同一单菌落, 在 MRS 平板上生长, 而在含有红霉素的平板上不生长, 挑取该菌落进行后续验证。

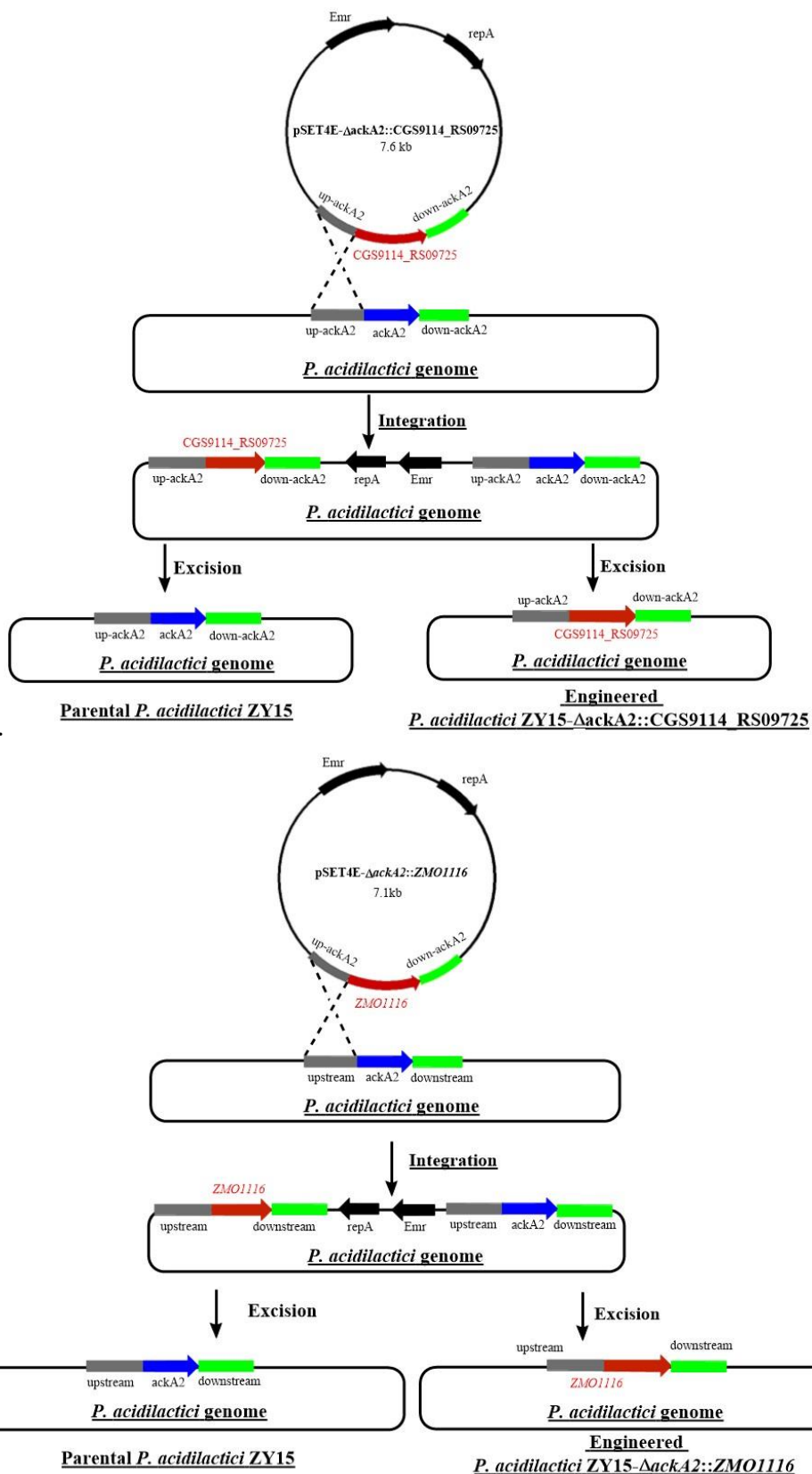


图 3.1 *CGS9114\_RS09725* 和 *ZMO1116* 整合至 *P. acidilactici* ZY15 基因组的同源重组过程  
 Fig. 3.1 The homologous recombination process *CGS9114\_RS09725* and *ZMO1116* integration into genome of *P. acidilactici* ZY15

所使用的敲除质粒 pSET4E- $\Delta ackA2$  储存在我们实验室中。选取酶切位点 XbaI 和 PstI, 将 ZMO1116、ZMO1399 和 CGS9114\_RS09725 分别连接至 pSET4E- $\Delta ackA2$  中。最终得到整合质粒 pSET4E- $\Delta ackA2::ZMO1116$ 、pSET4E- $\Delta ackA2::ZMO1399$  和 pSET4E- $\Delta ackA2::CGS9114\_RS09725$ 。依据 Qiu 等<sup>[95,96]</sup>实验方法, 将重组质粒和整合质粒电转化到 *P. acidilactici* ZY15 中。将 ZMO1116、ZMO1399 和 CGS9114\_RS09725 整合到 *P. acidilactici* ZY15 基因组的实验方法参考 Qiu 等<sup>[95,96]</sup>和 Yi 等<sup>[94]</sup>。

### 3.2.5 苯醌适应性驯化

为使整合菌株适应新整合基因, 从而发挥其 BQ 降解能力, 我们将整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$  和 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1399$  在不同浓度的 BQ 胁迫环境下进行了短期的适应性驯化。在驯化的三个阶段依次加入终浓度为 45、50 和 55 mg/L 的 BQ。适应性驯化是在体系 20 mL 的简化 MRS 培养基中进行, 0.6 g CaCO<sub>3</sub>/g 糖用以 pH 的调节, 接种量为 10% (v/v), 每隔 48 h 转接一次, 于 42°C 和 150 rpm 条件下进行培养。

### 3.2.6 SSCF 以进行 D-乳酸生产

本章所使用的物料为玉米秸秆, 经生物脱毒后检测物料中抑制物的含量, 大部分的抑制物可被快速脱除, 剩余的 4-羟基苯甲醛含量为 0.1 mg/g DM, 香草醛为 0.6 mg/g DM, 丁香醛为 1.5 mg/g DM, 苯醌为 0.09 mg/g DM。

玉米秸秆 SSCF 详细操作方法参照 2.2.5。

### 3.2.7 HPLC 检测方法

单糖和乳酸的检测方法参照 2.2.3。

对于 4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、BQ 和 HQ, 我们使用的检测器为 SPD-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan), 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A(Tokyo, Japan)。对于 BQ 和 HQ, 柱温 30°C, 检测波长 245 nm, 流速为 0.25 mL/min, 洗脱液 A 是 0.1% (v/v) 甲酸溶液, 洗脱液 B 为混合液 (乙腈与异丙醇的配比为 3:1 (v/v), 甲酸以 0.1% (v/v) 溶解于以上两者的混合液中)。梯度洗脱方法: 0-9 min, 洗脱液 B 从 30%含量增到 40%; 9-17 min, 洗脱液 B 从 40%含量增到 50%; 17-17.01 min, 洗脱液 B 从 50%含量降到 30%; 17.01-50 min, 洗脱液 B 稳定在 30%的含量。对于 4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛, 柱温 35°C, 检测波长 270 nm, 流速为 1.0 mL/min, 洗脱液 A 是 0.1% (v/v) 甲酸溶液, 洗脱液 B 是 100%乙腈。梯度洗脱方法: 0-4 min, 乙腈从 10%含量增到 35%; 4-15 min, 乙腈稳定在 35%的含量; 15-20 min, 乙腈从 35%含量降到 10%; 20-30 min, 乙腈稳定在 10%的含量。

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 D-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY15 对酚类抑制物的耐受性评估

在进行生物脱毒时，部分抑制物可以被快速脱除，但是仍有抑制物残存（如酚类抑制物），若延长脱毒时间，会造成木糖等单糖的损失。利用木质纤维素进行乳酸生产时，若大部分单糖得以保留，能一定限度的提高纤维素乳酸的产量，因此提高菌株自身对抑制物的耐受能力可从根本上解决生物脱毒面临的问题。

首先，我们探究了 *P. acidilactici* ZY15 对于酚醛类抑制物的耐受能力（图 3.2）。参照实际物料发酵体系中酚类抑制物浓度（0.04 g/L 4-羟基苯甲醛，0.23 g/L 香草醛，0.56 g/L 丁香醛），我们设置了不同浓度梯度的酚醛类抑制物来探究 *P. acidilactici* ZY15 对于酚醛类抑制物的耐受能力。从图 3.2 a 可以发现，当香草醛浓度为 0.20 g/L 时，对 *P. acidilactici* ZY15 产生了明显的抑制作用，其细胞生长和 D-乳酸的生产降低到初始值（无抑制物添加）的 50%。而丁香醛浓度达到 0.80 g/L 时才开始对 *P. acidilactici* ZY15 产生抑制作用。4-羟基苯甲醛对 *P. acidilactici* ZY15 的细胞生长和 D-乳酸生产基本不会造成影响。微生物的耐受性主要被理解为将高毒性的物质转化成毒性较低物质的能力，因此我们进一步探究了酚醛类抑制物相应的还原产物对 *P. acidilactici* ZY15 的影响。从图 3.2 b 可以看出酚醇类抑制物对 *P. acidilactici* ZY15 基本不会产生抑制作用。针对于酚酸类抑制物（图 3.2 c），香草酸对 *P. acidilactici* ZY15 的影响较小；当丁香酸浓度为 2.40 g/L 时，*P. acidilactici* ZY15 的细胞生长和 D-乳酸生产才出现明显的降低；而 4-羟基苯甲酸对 *P. acidilactici* ZY15 的细胞生长影响较为明显，其 D-乳酸生产可正常进行。从以上实验结果可以发现，在酚醛类抑制物中，香草醛对 *P. acidilactici* ZY15 的抑制作用最强。

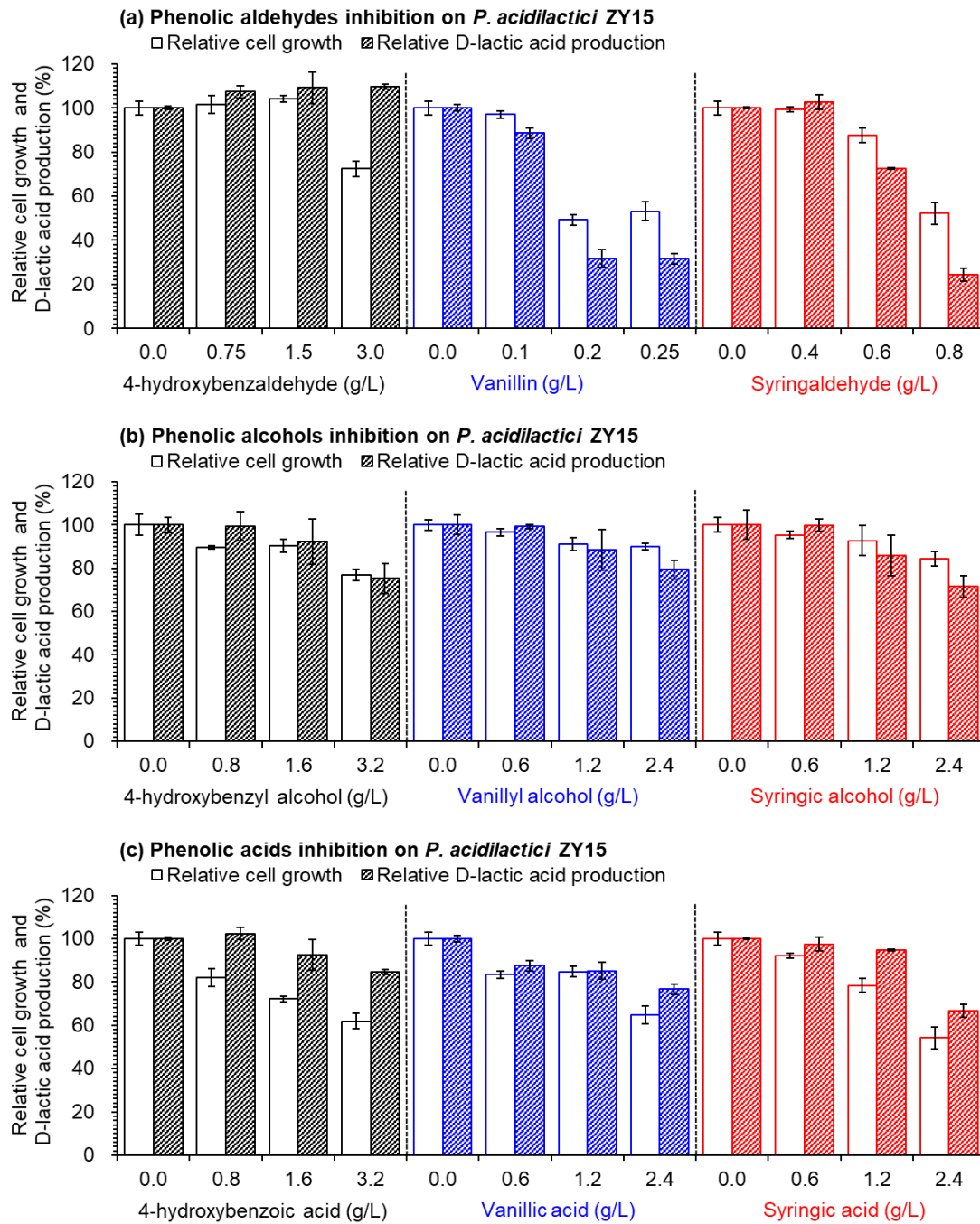


图 3.2 酚醛类抑制物对 *P. acidilactici* ZY15 细胞生长 ( $OD_{600}$ ) 和 D-乳酸生产的抑制作用  
 (a) 酚醛类抑制物; (b) 酚醇类抑制物; (c) 酚酸类抑制物

Fig. 3.2 Inhibition of phenolic compounds on the cell growth ( $OD_{600}$ ) and D-lactic acid production of *P. acidilactici* ZY15

(a) Phenolic aldehydes inhibition; (b) Phenolic alcohols inhibition; (c) Phenolic acids inhibition  
 发酵条件: 简化 MRS 培养基, 葡萄糖浓度为 20 g/L, 额外添加不同浓度梯度的酚醛; 检测细胞生长摇瓶中, 用 5 M 的 NaOH 进行 pH 调节; 检测 D-乳酸摇瓶中, 用 0.6 g  $CaCO_3$ /g 糖调节 pH;

之后我们探究了 *P. acidilactici* ZY15 对酚醛类抑制物的转化能力 (图 3.3)。我们在 MRS 培养基中分别添加了相应抑制物, 分别为 0.1 g/L 的 4-羟基苯甲醛、0.1 g/L 的香草醛和 0.1 g/L 的丁香醛, 在对照组中不添加 *P. acidilactici* ZY15, 从而除去挥发掉的抑制物的量。从实验结果可以看出, *P. acidilactici* ZY15 可以实现对 4-羟基苯甲醛的转化, 将其降解为对应的醇和酸; *P. acidilactici* ZY15 也可以降解香草醛, 将其转化为香草醇, 但不可以实现对香草醇的降解; 并且 *P. acidilactici* ZY15 不具有降解丁香醛的能力。

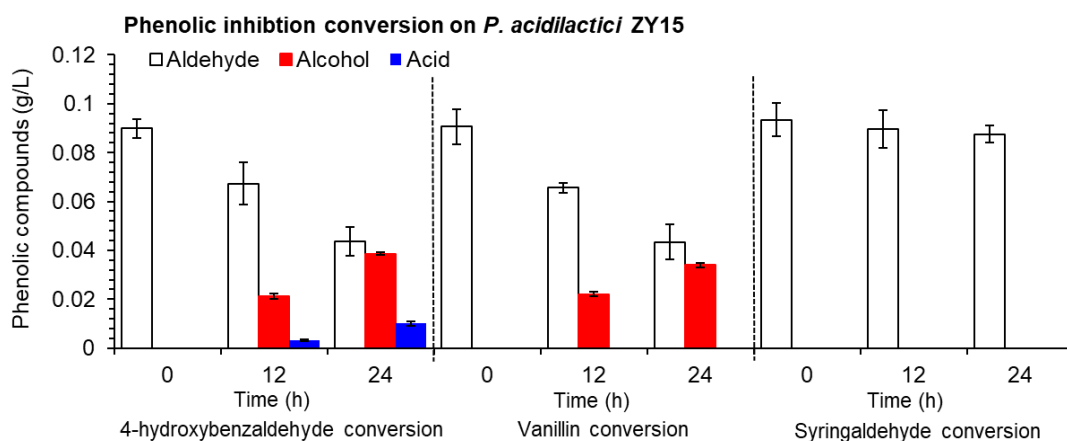


图 3.3 *P. acidilactici* ZY15 对酚醛类抑制物的转化

Fig. 3.3 The conversion of phenolic inhibition on *P. acidilactici* ZY15

针对于醌类抑制物, Yan 等<sup>[56]</sup>已经在前期研究中探究出 *P. acidilactici* ZY15 不具备 BQ 降解能力, 且在一定浓度 BQ 胁迫环境下, 会明显抑制菌株的生长, 进而抑制 D-乳酸的生产。在本章实验中不再重复探究 *P. acidilactici* ZY15 对 BQ 的耐受能力。

### 3.3.2 *P. acidilactici* ZY15 对酚类抑制物的耐受性改造

从 *P. acidilactici* ZY15 对酚类抑制物的耐受性评估结果可以发现, 酚类抑制物中香草醛、丁香醛和 BQ 都会对 *P. acidilactici* ZY15 产生一定程度的抑制作用, 若通过延长生物脱毒时间的方法来达到除去酚类抑制物的效果, 会造成部分单糖的损失。为保留部分单糖以提高纤维素乳酸的产量, 本实验对 *P. acidilactici* ZY15 进行了基因工程改造, 来提高菌株对于抑制物的耐受性。针对酚醛类抑制物, 我们选取了 6 个异源基因, 其中 ZMO1885 来源于 *Z. mobilis* ZM4<sup>[152]</sup>, PP\_3151、PP\_5120 和 PP\_5258 来源于 *Pseudomonas putida* KT2440<sup>[152]</sup>, CGS9114\_RS10340 和 CGS9114\_RS09725 来源于 *C. glutamicum* S9114<sup>[152]</sup>, 将异源基因在 *P. acidilactici* ZY15 中进行表达。首先分别将 6 个异源基因构建到表达质粒 pZY36e 中, 通过电转化技术将 6 个重组质粒电转化到 *P. acidilactici* ZY15 中, 得到 6 株重组菌株 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-ZMO1885)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-PP\_3151)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-PP\_5120)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-PP\_5258)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-CGS9114\_RS10340)和 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-CGS9114\_RS09725)。之后我们在 MRS 培养基中加入混合的酚醛类抑制物, 其中含有终浓度为 3.0 g/L 的 4-羟基苯甲醛、0.6 g/L 的丁香醛和 0.2 g/L 的香草醛 (浓度参照 3.3.1 中开始产生抑制作用的浓度), 以含有空载质粒的 *P. acidilactici* ZY15 为对照

组，对 6 株重组菌株进行了发酵评价（图 3.4）。我们检测糖耗及 D-乳酸生产，从实验结果可以看出，在混合酚醛胁迫环境下，重组菌株 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-CGS9114\_RS09725)在葡萄糖消耗和 D-乳酸生产上明显优于其他几株重组菌以及对照菌株。

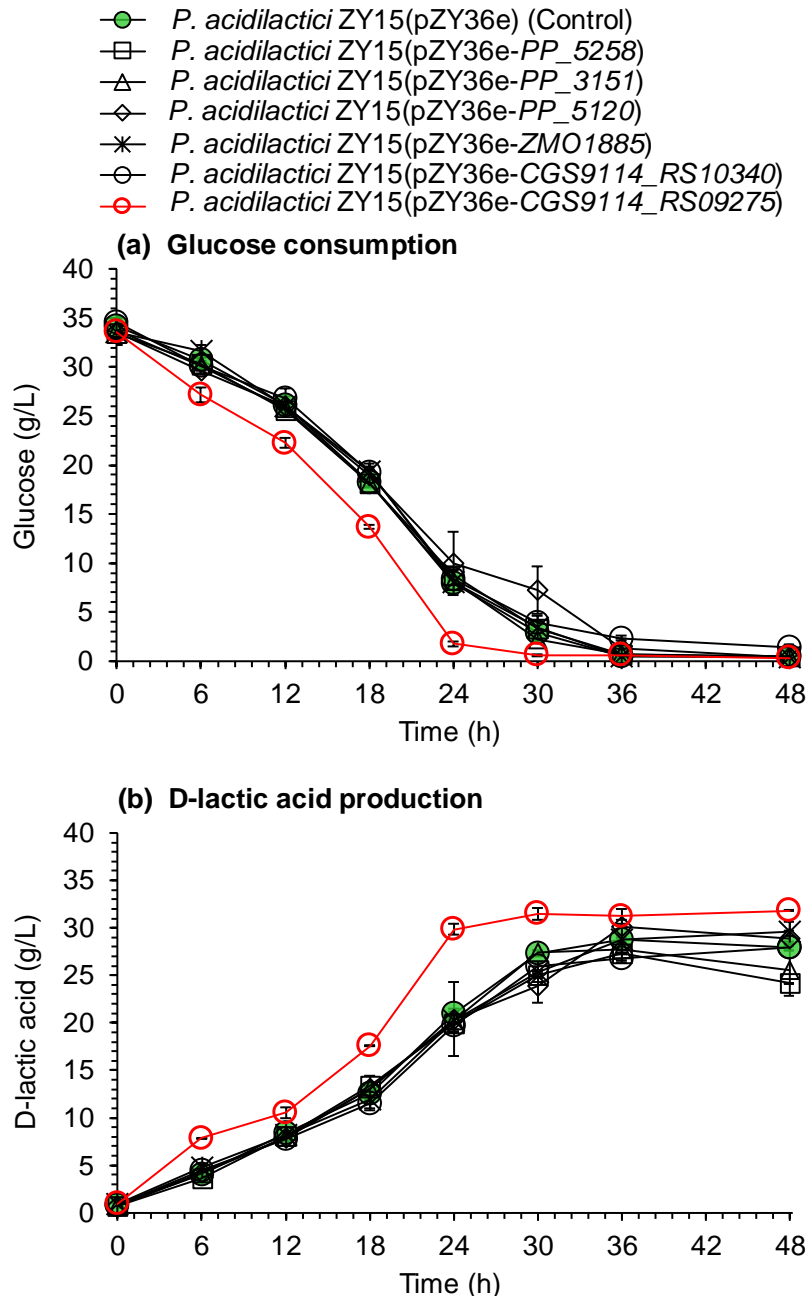


图 3.4 重组菌株在混合酚醛胁迫下的发酵评价

(a) 葡萄糖消耗; (b) D-乳酸生产

Fig. 3.4 Fermentation evaluation of recombinant strains under mixed phenolic aldehydes stress

(a) Glucose consumption; (b) D-lactic acid production

发酵条件：简化 MRS 培养基；葡萄糖初始浓度 35 g/L；红霉素终浓度 5 mg/L；用 0.6 g CaCO<sub>3</sub>/g 糖调节 pH。

在之前的研究中,通过对 *Z. mobilis* ZM4 的转录水平分析发现多个脱氢酶、氧化还原酶等降解 BQ 的关键基因,将基因表达水平较高的 BQ 降解基因在 *Z. mobilis* ZM4 中进行过表达,在 BQ 胁迫的情况下,重组菌的发酵性能有所提高<sup>[56]</sup>。我们选择了 5 个 BQ 降解能力较好的异源基因 *ZMO1116*、*ZMO1399*、*ZMO1696*、*ZMO1576* 和 *ZMO1984* 分别在 *P. acidilactici* ZY15 中进行表达。用同样的方法最终得到 5 株重组菌株 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1116*)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1399*)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1696*)、*P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1576*) 和 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1984*)。之后我们使用含有 50 mg/L BQ (浓度参照 Yan 等<sup>[56]</sup>在合成培养基中探究 *P. acidilactici* ZY15 对醌类化合物的耐受性时开始起抑制作用的 BQ 浓度)的 MRS 培养基,将携带空载质粒的 *P. acidilactici* ZY15 与构建得到的重组菌株进行了发酵评价(表 3.1)。经过 12 h 的发酵,通过图表可以得到,在 BQ 浓度为 50 mg/L 的胁迫环境下,重组菌 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1116*)的葡萄糖消耗及 D-乳酸生产分别为 18.9 g/L 和 18.8 g/L,重组菌 *P. acidilactici* ZY15(pZY36e-*ZMO1399*)葡萄糖消耗及 D-乳酸生产分别为 18.6 g/L 和 18.6 g/L。表达 *ZMO1116* 和 *ZMO1399* 的两株重组菌株在糖耗和 D-乳酸生产上优于其他几株重组菌和携带空载质粒的原始菌株。

表 3.1 重组菌株在 BQ 胁迫下的发酵评价

Table 3.1 Fermentation evaluation of recombinant strains under BQ stress

Strains	Glucose consumed (g/L)	D-lactic acid produced (g/L)
<i>P. acidilactici</i> ZY15(pZY36e)	15.1 ± 0.0	15.0 ± 0.3
<i>P. acidilactici</i> ZY15(pZY36e- <i>ZMO1116</i> )	18.9 ± 0.0	18.8 ± 0.0
<i>P. acidilactici</i> ZY15(pZY36e- <i>ZMO1399</i> )	18.6 ± 0.0	18.6 ± 0.0
<i>P. acidilactici</i> ZY15(pZY36e- <i>ZMO1696</i> )	16.4 ± 0.3	14.8 ± 0.2
<i>P. acidilactici</i> ZY15(pZY36e- <i>ZMO1576</i> )	13.7 ± 0.7	12.7 ± 0.2
<i>P. acidilactici</i> ZY15(pZY36e- <i>ZMO1984</i> )	12.7 ± 0.0	12.4 ± 0.5

发酵条件: 摇瓶中加入体系为 50 mL 的 MRS 培养基, BQ 添加终浓度为 50 mg/L; 葡萄糖初始浓度 20 g/L; 红霉素终浓度 5 mg/L; 42°C, 150 rpm 发酵 12 h。

通过重组菌株在酚类抑制物胁迫环境下的发酵评价,最终得到了酚醛耐受的有效基因 *CGS9114\_RS09725* 以及 BQ 耐受的有效基因 *ZMO1116* 和 *ZMO1399*。为了得到相关抑制物耐受能力提高的性状稳定的工程菌株,我们将上面筛选得到的有效基因 *CGS9114\_RS09725*、*ZMO1116* 和 *ZMO1399* 分别整合到 *P. acidilactici* ZY15 的基因组上,选取的整合位点为 *ackA2* 基因位点处。最终得到了酚醛耐受相关的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2*::*CGS9114\_RS09725*, BQ 耐受相关的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2*::*ZMO1116* 和 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2*::*ZMO1399*。在前面的探究实验中已经知道, *P. acidilactici* ZY15 可以实现对香草醛的转化(香草醛对 *P. acidilactici* ZY15 的抑制作用较强,但菌株具备香草醛转化途径,可以实现对高毒性抑制物的转化),但不能降解

BQ, 即在 *P. acidilactici* ZY15 中不具备 BQ 降解途径。现在在 *P. acidilactici* ZY15 的基因组上整合一个新的 BQ 降解基因, 想使 *P. acidilactici* ZY15 具备 BQ 降解途径, 为了使菌株更好的适应新的基因从而发挥相应的作用, 将整合菌株在不同的 BQ 浓度下进行了短期的适应性驯化。在短期驯化过程中, 依次提高 BQ 浓度, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$  的生长较稳定且在葡萄糖含量为 20 g/L 的 MRS 培养基中的 D-乳酸产量为 15 g/L, 优于整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1399$ , 因此在驯化结束后我们挑选了驯化结果较好的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$  进行后期实验。

### 3.3.3 整合菌株的抑制物转化能力和发酵性能评估

在 *P. acidilactici* ZY15 基因组上整合筛选到的有效基因 *CGS9114\_RS09725* 和 *ZMO1116* 后, 得到了酚醛耐受相关的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114_RS09725$ , BQ 耐受相关的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$ 。为了探究整合菌株是否具备抑制物转化能力以及在酚类抑制物胁迫环境下整合菌株的发酵性能是否得到改善, 我们对整合菌株进行了抑制物转化能力和发酵性能的评估。

针对于酚醛类抑制物, 在最开始的 3.3.1 实验探究中我们可以得到, 香草醛对 *P. acidilactici* ZY15 的抑制作用最为强烈, 因此我们在此处的探究中主要针对于香草醛这一类抑制物。参照纤维素乳酸发酵体系中香草醛浓度 (0.23 g/L 香草醛) 以及最开始探究的香草醛浓度梯度下的发酵结果, 最终选择在较高香草醛浓度下 (0.25 g/L 香草醛) 对整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114_RS09725$  进行评估 (图 3.5)。在实验初期, 向 MRS 培养基中外源添加终浓度为 0.25 g/L 的香草醛, 对整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114_RS09725$  的香草醛转化能力进行了检测分析 (图 3.5 a)。通过实验结果可以发现, 相对于原始菌株 *P. acidilactici* ZY15, 整合菌株对香草醛的转化能力明显提高, 即在相同的抑制物胁迫环境下, 可以将更多的香草醛转化为毒性较低的香草醇。之后在 MRS 培养基中添加 0.25 g/L 香草醛, 对整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114_RS09725$  进行了发酵评价。从细胞生长和葡萄糖消耗的实验结果来看 (图 3.5 b,c), 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114_RS09725$  明显优于原始菌株。发酵 24 h 后, 原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 最终的 D-乳酸产量为 11 g/L, 整合菌株最终的 D-乳酸产量为 17 g/L, 相比于原始菌株, D-乳酸发酵浓度提高 54% (图 3.5 d)。由以上实验结果可以得出, *CGS9114\_RS09725* 基因的整合提高了 *P. acidilactici* ZY15 对于香草醛的耐受能力, 通过目前的工作我们得到了香草醛耐受能力提高的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114_RS09725$ 。

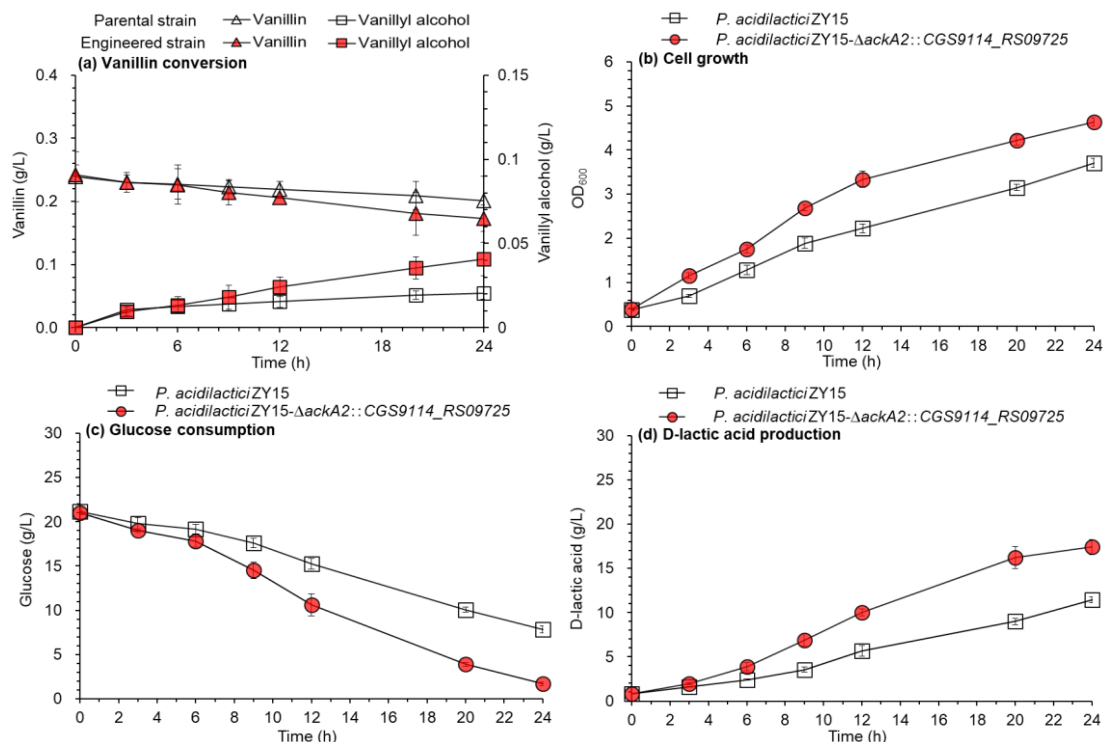


图 3.5 香草醛胁迫下整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::CGS9114\_RS09725 的转化能力和发酵性能评价

(a) 香草醛转化; (b) 细胞生长; (c) 葡萄糖消耗; (d) D-乳酸生产

Fig. 3.5 Evaluation of vanillin conversion and fermentability for *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::CGS9114\_RS09725 under stress of vanillin

(a) Vanillin conversion; (b) Cell growth; (c) Glucose consumption; (d) D-lactic acid production

Yan 等<sup>[56]</sup>在之前的研究工作中已经发现高浓度的 BQ 对 *P. acidilactici* ZY15 的生长和发酵性能会产生强烈的抑制作用, 而将高毒性的 BQ 降解转化为基本无毒性 HQ 是对醌类抑制物耐受的主要作用机制。之后在高浓度 BQ 胁迫下, 我们对整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::ZMO1116 的 BQ 转化能力以及发酵性能进行了检测分析 (图 3.6)。从图 3.6 a 中可以发现, 在 MRS 培养基中外源添加 0.2 g/L 的 BQ, 通过 HPLC 检测分析, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::ZMO1116 可逐步对 BQ 进行降解, 并且中间代谢产物 HQ 逐渐增加, 原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 无法降解 BQ。之后使用 MRS 培养基, 额外添加 0.2 g/L BQ (浓度参照 Yan 等<sup>[56]</sup>在玉米秆水解液中探究高浓度 BQ 对菌株发酵性能的影响时起抑制作用的 BQ 浓度), 在 1 L 发酵罐中对整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::ZMO1116 进行了发酵评价, 对比于原始菌株 *P. acidilactici* ZY15, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::ZMO1116 在前期葡萄糖和木糖的代谢速率上较慢, 可能是将异源基因 ZMO1116 整合到 *P. acidilactici* ZY15 的基因组上后给菌株的代谢活性造成负担, 导致糖耗速率减慢, 但是在高浓度苯醌胁迫的环境下, 整合菌株可以将高毒性的 BQ 转化为基本无毒性的 HQ, 而原始菌株不具有 BQ 降解能力, 所以在发酵后期原始菌株基本不耗糖, 整合菌株可进行正常的发酵 (图 3.6 b,c), 经过 72 h 的发酵后, 原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 的 D-乳酸生产量为 62 g/L, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$

*ackA2::ZMO1116* 的 D-乳酸生产量为 82 g/L, 相比于原始菌株, D-乳酸发酵浓度提高 32% (图 3.6 d)。从以上的发酵结果可以看出, 在高浓度的 BQ 胁迫下, *ZMO1116* 的整合提高了原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 的发酵性能, 通过目前工作我们得到了苯醌耐受能力加强的工程菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116*。

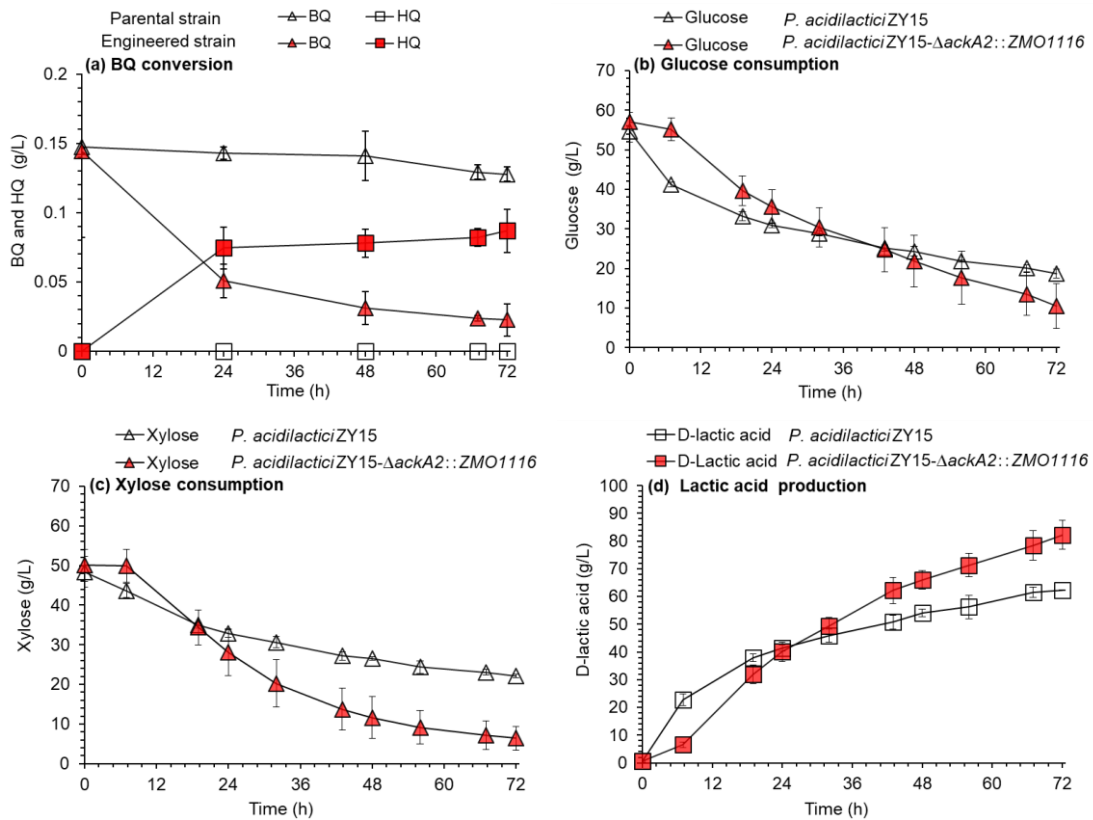


图 3.6 BQ 胁迫下整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116* 的转化能力和发酵性能评价  
(a) BQ 转化; (b) 葡萄糖消耗; (c) 木糖消耗; (d) D-乳酸生产

Fig. 3.6 Evaluation of BQ conversion and fermentability for *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116* under stress of BQ

(a) BQ conversion; (b) Glucose consumption; (c) Xylose consumption; (d) D-lactic acid production

### 3.3.4 整合菌株的纤维素 D-乳酸发酵

*CGS9114\_RS09725* 基因的整合提高了 *P. acidilactici* ZY15 对香草醛的转化能力, 并且在 *P. acidilactici* ZY15 的基因组中整合 *ZMO1116* 基因后, 使菌株具备了 BQ 降解途径。为了探究在真实木质纤维素体系中整合菌株的酚类抑制物耐受能力是否也得到提高, 我们进行了 SSCF。

使用经干酸预处理, 生物脱毒后的玉米秸秆, 探究了整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::CGS9114\_RS09725* 的发酵性能 (图 3.7)。生物脱毒后, 物料中的大部分抑制物被快速脱除, 残存 0.04 g/L 4-羟基苯甲醛, 0.23 g/L 香草醛和 0.56 g/L 丁香醛。从发酵结果可以看出, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::CGS9114\_RS09725* 基本可以耗完大部分单糖, 最终 D-乳酸的产量为 114.8 g/L, 而原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 对葡萄糖的代谢速率较慢, 最终 D-乳酸产量为 101.0 g/L。相比于原始菌株, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::CGS9114\_RS09725* 的 D-乳酸产量提高 14%。通过基因改造, 将酚醛耐受

相关基因 *CGS9114\_RS09725* 整合到 *P. acidilactici* ZY15 基因组中, 提高了菌株对香草醛的转化能力, 因此在含有香草醛的玉米秸秆中, 整合菌株的乳酸发酵性能也得到了一定提高。

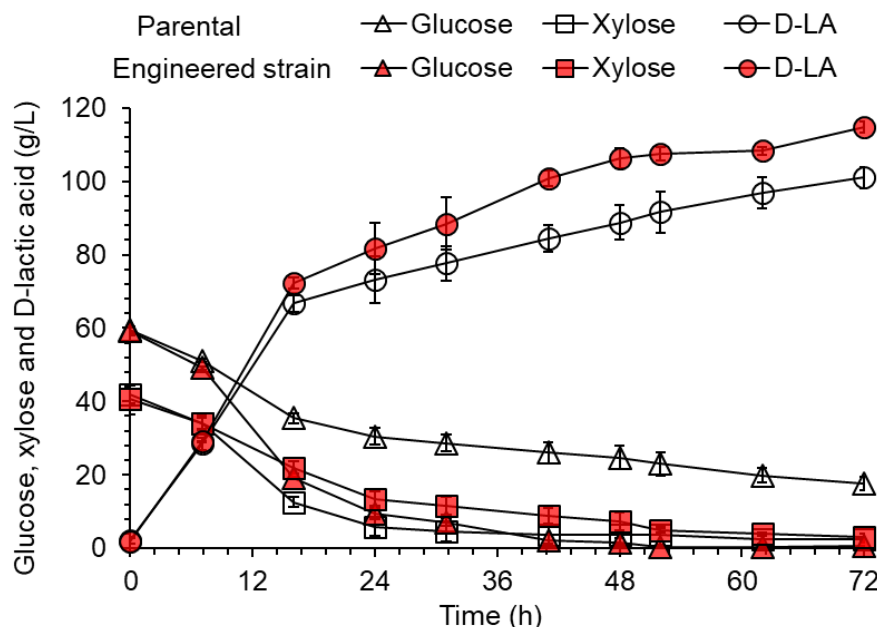


图 3.7 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::CGS9114\_RS09725* 利用玉米秸秆进行 SSCF 以生产 D-乳酸

Fig. 3.7 SSCF of D-lactic acid production by engineered strain *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::CGS9114\_RS09725* using corn stover feedstock

发酵条件: 玉米秸秆固含量为 30% (w/w); 0.04 g/L 4-羟基苯甲醛, 0.23 g/L 香草醛和 0.56 g/L 丁香醛; 5 L 生物反应器; 按照 10 mg 蛋白/g 纤维素加入 Cellic CTec2; pH 调节剂为 25% (w/w)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 使其维持在 pH 5.5。

采用上面实验的方法将玉米秸秆进行处理, 在进行生物脱毒环节时, 适当的延长了脱毒时间 (除去部分酚醛类抑制物), 最终测得物料中 BQ 的浓度为 0.03 g/L。为了探究在真实木质纤维素体系下整合菌株的苯醌耐受能力是否也得到提高, 使用上述处理后的玉米秸秆为原料, 对整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116* 的发酵性能进行了探究 (图 3.8)。由发酵结果可以看出 (图 3.8 a), 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116* 最终的乳酸发酵浓度为 121 g/L, 原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 的最终乳酸浓度为 112 g/L。进行生物脱毒后测得原料里 BQ 的浓度为 0.03 g/L, 在 BQ 浓度较低的环境下, 对原始菌株和整合菌株的胁迫强度并不是很强烈, 造成两者的乳酸产量差异并不是很大。之后在原料中额外添加 0.3 g/L BQ, 经过 72 h 发酵后, 从实验结果中可以得到 (图 3.8 b), 原始菌株 *P. acidilactici* ZY15 最终的 D-乳酸产量为 102 g/L, 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ *ackA2::ZMO1116* 最终的 D-乳酸产量为 123 g/L, 相比于原始菌株, D-乳酸产量提高 21%。在 *P. acidilactici* ZY15 基因组中整合苯醌降解有效基因 *ZMO1116*, 使菌株具备 BQ 降解途径, 可以将毒性较高的 BQ 转化为基本无毒性的 HQ, 因此在添加高浓度苯醌胁迫的木质纤维素体系中, 整合菌株的乳酸发酵性能得到提高。

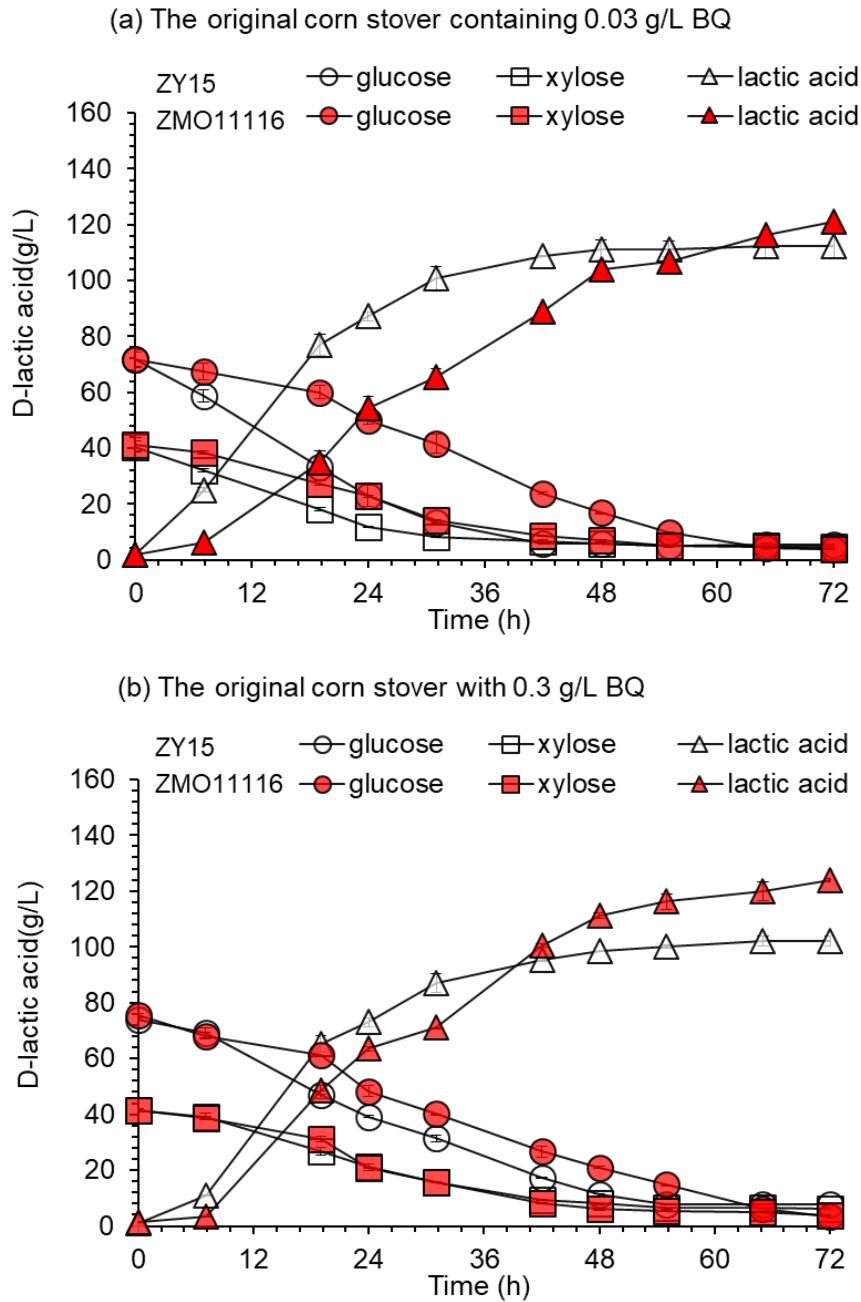


图 3.8 整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::*ZMO1116* 利用玉米秸秆进行 SSCF 以生产 D-乳酸  
 Fig. 3.8 SSCF of D-lactic acid production by engineered strain *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$ ackA2::*ZMO1116* using corn stover feedstock

发酵条件：玉米秸秆固含量为 30% (w/w)；5 L 生物反应器；按照 10 mg 蛋白/g 纤维素加入 Cellic CTec2；pH 调节剂为 25% (w/w)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，使其维持在 pH 5.5。

### 3.4 本章小结

在本章实验中，通过基因工程，得到香草醛耐受能力提高的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114\_RS09725$  和具有苯醌降解能力的整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$ 。在酚类抑制物胁迫环境下进行 SSCF，相比于原始菌株，两株整合菌株的 D-乳酸产量都得到一定程度的提高。本章的主要结论如下：

(1) 针对酚醛类抑制物，香草醛对 *P. acidilactici* ZY15 的抑制作用最为强烈，其次是丁香醛，4-羟基苯甲醛对 *P. acidilactici* ZY15 基本没有影响。并且 *P. acidilactici* ZY15 可以实现对 4-羟基苯甲醛和香草醛的转化，但是并不能转化丁香醛。针对醌类抑制物，*P. acidilactici* ZY15 自身不具备 BQ 降解能力，一定浓度的 BQ 对 *P. acidilactici* ZY15 的生长和发酵性能会产生抑制作用。

(2) 在 *P. acidilactici* ZY15 基因组中整合 *CGS9114\_RS09725* 基因，得到整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114\_RS09725$ ，在浓度为 0.25 g/L 香草醛（此浓度对 *P. acidilactici* ZY15 会产生强烈抑制）胁迫环境下，相比于原始菌株，*P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114\_RS09725$  对香草醛的转化能力提高。同样将异源 BQ 降解基因 *ZMO1116* 整合在 *P. acidilactici* ZY15 的基因组中，整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$  具备了 BQ 降解途径，可以将高毒性的 BQ 转化为基本无毒性的 HQ。

(3) 玉米秸秆经过生物炼制技术处理后进行 SSCF。整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::CGS9114\_RS09725$  在葡萄糖消耗和 D-乳酸生产上明显优于原始菌株，本研究通过基因工程提高了 *P. acidilactici* ZY15 对香草醛的耐受能力，为酚醛胁迫下的木质纤维素乳酸发酵提供了一株有效菌株。

(4) 在高浓度（0.3 g/L）BQ 胁迫的环境下进行 SSCF，相对于原始菌株，整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta ackA2::ZMO1116$  的 D-乳酸产量提高 21%。通过基因工程在 *P. acidilactici* ZY15 的基因组上整合 BQ 降解基因使其具备 BQ 降解能力，为高浓度 BQ 胁迫下的木质纤维素乳酸发酵提供了一株有效菌株。

## 第4章 *Pediococcus acidilactici* 钠离子耐受性工程菌株的构建

### 4.1 引言

乳酸钠被广泛应用于多个领域：在食品行业常被人们用来作为保鲜剂、保湿剂和调味剂等，由于其较强的抑菌作用，可以延长物品存放的时间<sup>[107,108]</sup>；在医药方面由于乳酸钠可与其他有效成分结合共同作用，常被用作补充液来调节人体内的电解质平衡、治疗代谢性酸中毒和治疗皮肤功能紊乱等<sup>[109]</sup>；在化妆品行业乳酸钠也作为护肤品中的关键成分，可以有效的保持皮肤的滋润度，防止皱纹产生等<sup>[111]</sup>。

目前生产乳酸钠的方法主要是通过微生物发酵法，即使用一定浓度的 NaOH 溶液中和发酵产生的乳酸直接得到乳酸钠，在提高乳酸钠得率的同时精简工艺路线，降低生产成本<sup>[111]</sup>。在利用微生物发酵法进行乳酸钠生产的早期阶段，需要对原料进行预处理，预处理过程中添加的酸、碱或其他化学试剂会导致木质纤维素水解液中富集大量的金属离子，其中钠离子(Na<sup>+</sup>)是整个生物炼制技术进行 pH 调控所富集的典型金属离子<sup>[124,125]</sup>。当 Na<sup>+</sup>达到一定浓度时会对菌株代谢相关的酶产生影响从而抑制发酵菌株的活力，进而抑制高效的纤维素乳酸钠发酵<sup>[126-128]</sup>。本实验室在前期利用 *P. acidilactici* 进行发酵生产乳酸钠时，一定浓度的乳酸钠会对菌株的活性产生抑制，降低最终乳酸钠的生产指标。目前对于乳酸钠的研究主要集中在实际应用上，关于利用微生物发酵法提高乳酸钠产量的研究比较少。从相关研究中可得，微生物在 Na<sup>+</sup>浓度较高的环境下主要通过 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白来维持胞内外环境的稳态，即将菌体内较高浓度的 Na<sup>+</sup>外排，来减少对菌体的危害<sup>[152]</sup>。Yang 等<sup>[153]</sup>探究出 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白编码基因 *NHAA* (*ZMO0119*) 可提高菌株 *Z. mobilis* 的钠离子耐受性。Gao 等<sup>[154]</sup>进一步研究了关键基因 *ZMO0119* 提高 Na<sup>+</sup>耐受性的作用机制，并在含有高 Na<sup>+</sup>浓度的木质纤维素体系中进行了发酵评价。因此，想将编码 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白的基因在本实验室 *P. acidilactici* 中进行过表达，来进一步提高菌株在较高 Na<sup>+</sup>浓度胁迫下乳酸钠的产量。

本研究以 *P. acidilactici* ZY271 为目的菌株，选择 *P. acidilactici* 自身编码 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白的基因 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter\_RS02775，在 *P. acidilactici* ZY271 中进行过表达。在实验最开始探究了不同浓度 Na<sup>+</sup>对 *P. acidilactici* ZY271 的抑制作用，之后使用 13.5 M NaOH 溶液作为中和剂，在固含量为 25% (w/w) 的麦秆中对重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)进行了发酵评价。本研究最终得到一株 Na<sup>+</sup>耐受能力提高的重组菌，为 Na<sup>+</sup>胁迫下的木质纤维素乳酸钠高指标发酵提供了有效菌株。

### 4.2 材料与方法

#### 4.2.1 菌株、培养基及培养方法

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter\_RS02775 来源于 *P. acidilactici* DSM20284，菌株保存于本课题组。

*E. coli* XLI-blue、*A. resinae* ZN1 和 *P. acidilactici* 的培养方法及培养基见 2.2.1 和 3.3.1。

#### 4.2.2 原料、酶与试剂

本章实验所使用的麦秆与 2.2.2 中使用的麦秆为同一批次，处理方式一致。

本章使用的酶及部分试剂见 2.2.2。

#### 4.2.3 质粒构建

本章所引用的质粒、引物见表 4.1。使用试剂盒提取 *P. acidilactici* DSM20284 的基因组，以其为模板扩增得到我们所需基因  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775。所使用的表达质粒 pZY36e 储存在我们实验室中，选取两个酶切位点 XbaI 和 SalI，将  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775 连接至 pZY36e 上，最终得到重组质粒 pZY36e-RS02775。

将重组质粒电转化到 *P. acidilactici* ZY271 中。电转化技术参考于 3.2.4。

#### 4.2.4 SSCF 以进行乳酸钠生产

小麦秸秆 SSCF 详细操作方法参照 2.2.5。

#### 4.2.5 HPLC 检测方法

检测方法详见 2.2.3。

#### 4.2.6 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析

分析方法详见 2.2.6。

表 4.1 菌株、质粒和引物

Table 4.1 Strains, plasmids and primers

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> XLI-blue	Host for plasmid construction	Stratagene
<i>A. resinae</i> ZN1	Biodetoxification fungus isolated in our lab	[45]
<i>P. acidilactici</i> ZY271	L-lactic acid production strain	Stored in our lab
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pMG36e)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 contains empty plasmid pZY36e	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter_RS02775)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 contains Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter_RS02775 expression plasmid pZY36e- Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter_RS02775	This work
Plasmids	Characteristics	Sources
pZY36e	<i>PldhD</i> replacing <i>P32</i> promoter of pMG36e	[94]
pZY36e_RS02775	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter_RS02775 was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
Primers	Sequences (5' - 3')	
<i>PldhD</i> -F	CCGGAATTCTGCTCTGGTGTGCAGACCAGAC	
<i>PldhD</i> -R	CTAGTCTAGATGTAATATTACCCCTTCTTTTTTA	
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter_RS02775-F	CTAGTCTAGAATGAATATTTTGATTTC AACCTTT	
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter_RS02775-R	ACGCGTCGACTTAAACCATTTGATTTTGTGGA	

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 对钠离子的耐受性评估

使用微生物发酵法生产乳酸钠，在前期物料预处理的过程以及后期的发酵过程中会富集大量的  $\text{Na}^+$ 。一定浓度的  $\text{Na}^+$  会抑制菌株的活性进而抑制高效的纤维素乳酸钠发酵<sup>[30,33]</sup>。因此在实验的最开始我们对 *P. acidilactici* ZY271 的钠离子耐受性进行了评估（图 4.1）。我们在简化 MRS 培养基中外源添加不同浓度的  $\text{Na}^+$ ，分别为 0、5、15 和 25 g/L（折算成外源添加的乳酸钠，浓度分别为 0、24、73 和 122 g/L）。发酵 48 h 后，从图 4.1 可以看出随着发酵体系中初始  $\text{Na}^+$  浓度的逐渐提高，*P. acidilactici* ZY271(pZY36e) 的糖耗及乳酸钠发酵均受到抑制，当  $\text{Na}^+$  增加到一定浓度时，可完全抑制乳酸钠的生产。由此可说明 *P. acidilactici* ZY271 对钠离子较为敏感，一定浓度范围的  $\text{Na}^+$  可明显抑制菌株的发酵性能。

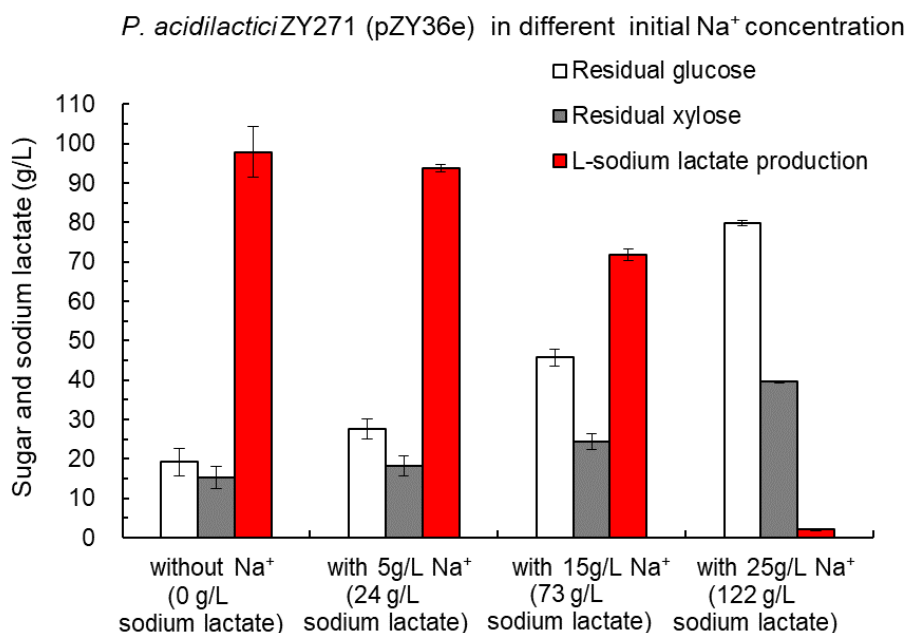


图 4.1 *P. acidilactici* ZY271 对钠离子的耐受性评估

Fig. 4.1 Evaluation of the tolerance of *p. acidilactici* ZY271 to sodium ions

发酵条件：含有 100 g/L glucose 和 50 g/L xylose 的简化 MRS 培养基；1 L 生物反应器；添加了 0、5、15 g/L、25 g/L 的  $\text{Na}^+$ ；使用 13.5 mol/L 的 NaOH 溶液实时调节 pH 至 5.5。

#### 4.3.2 $\text{Na}^+$ 耐受性工程菌株的构建及重组菌株的发酵性能评估

为了提高 *P. acidilactici* ZY271 的  $\text{Na}^+$  耐受能力，使菌株在  $\text{Na}^+$  浓度较高的环境下仍能得到指标较高的乳酸钠，我们对原始菌株 *P. acidilactici* ZY271 进行了相应的基因改造。在最开始的预实验中，我们选择了 *P. acidilactici* 自身编码  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的所有基因（ $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02845、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS06435 和  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS08600），以及 *P. acidilactici* 自身的启动子 PldhD（pZY36e），将这些基因在 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e) 中进行过表达，得到 4 株重组菌株。在 MRS 培养基中（糖浓度较高），使用 13.5 M NaOH 溶液调节 pH，对重组菌株

进行了发酵评价。通过监测生长和糖耗发现，过表达  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775，可明显提高菌株的  $\text{Na}^+$  耐受能力。最终我们挑选了优势菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)进行了后续实验。基因改造的最终目的是想提高  $\text{Na}^+$  胁迫下的木质纤维素乳酸钠的产量，因此我们在 3 L 生物反应器中对重组菌 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)进行了发酵评价（图 4.2）。实验的反应体系为 600 mL MRS 培养基，用 13.5 M 的 NaOH 进行 PH 的调节，发酵 72 h 后，携带空载质粒的原始菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e)的乳酸钠产量为 97.9 g/L，重组菌 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的乳酸钠产量为 121.1 g/L，相对于原始菌株，*P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的乳酸钠产量提高 24%。可以看出过表达  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775 基因可明显提高菌株的  $\text{Na}^+$  耐受能力，进而提高乳酸钠的产量。

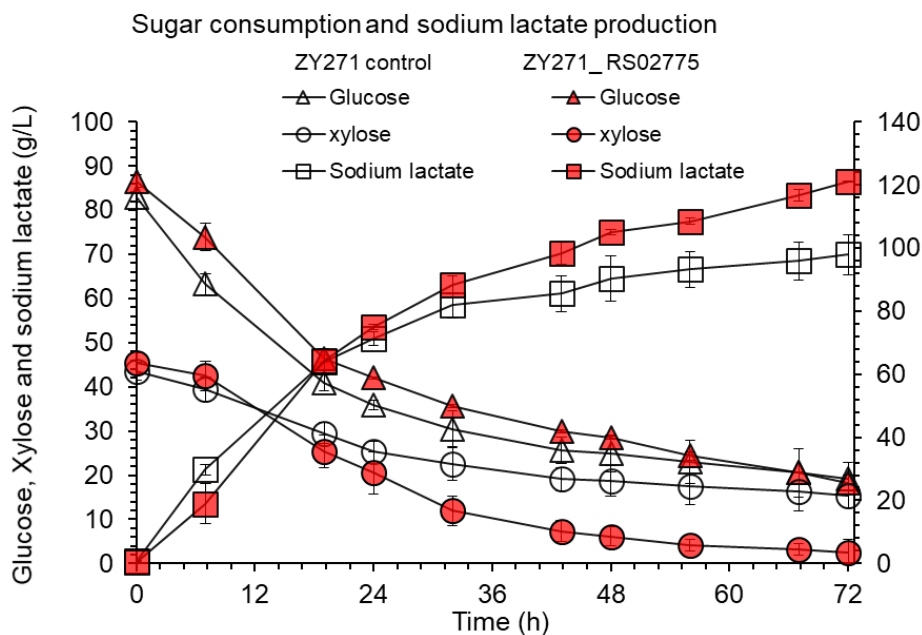


图 4.2 钠离子胁迫下重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的发酵性能评价

Fig. 4.2 Evaluation of fermentability for *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) under stress of  $\text{Na}^+$  发酵条件：含有 100 g/L glucose 和 50 g/L xylose 的简化 MRS 培养基；3 L 生物反应器；使用 13.5 M 的 NaOH 溶液实时调节 pH 至 5.5；在 42°C、150 rpm 下发酵 72 h。

为了探究在真实木质纤维素体系下重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的  $\text{Na}^+$  耐受能力是否也有所提高，在 5 L 生物反应器中，使用固含量为 25% (w/w) 的小麦秸秆进行 SSCF 以生产乳酸钠（图 4.3）。发酵 96 h 后，原始菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e)的乳酸钠产量为 103.4 g/L，重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的乳酸钠产量为 141.6 g/L。从发酵结果可得，重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)对葡萄糖和木糖的代谢能力明显优于原始菌株，且最终的 L-乳酸钠产量提高 36.9%。在 *P. acidilactici* ZY271 中过表达  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775 基因可明显提高菌株对  $\text{Na}^+$  的耐受能力，在  $\text{Na}^+$  胁迫的木质纤维素体系下，可得到较高指标的乳酸钠。

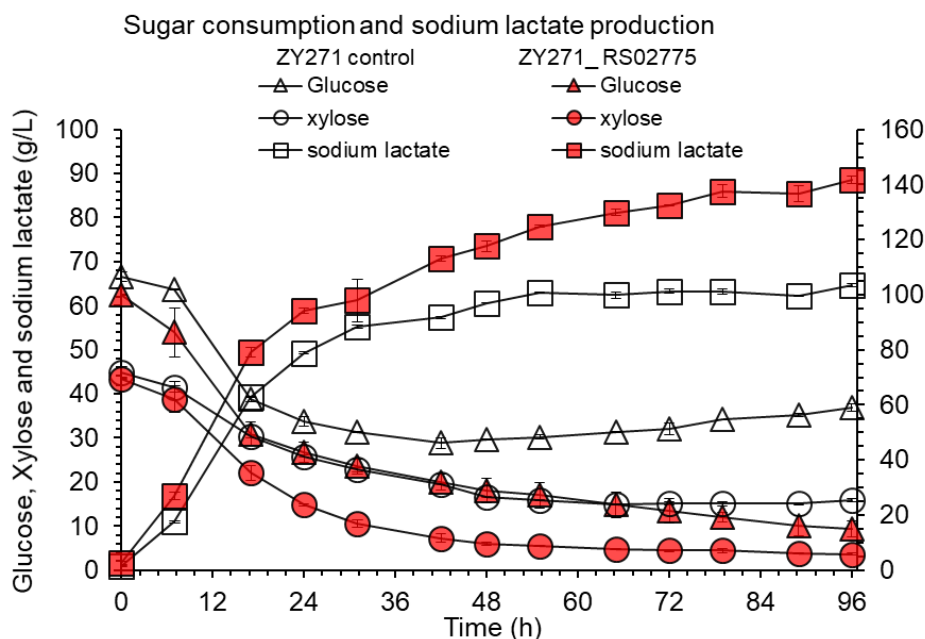


图 4.3 重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)利用麦秆进行 SSCF 以生产乳酸钠

Fig. 4.3 SSCF of sodium lactate production by *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) using straw 发酵条件: 固含量 25% (w/w) 小麦秸秆; 5 L 生物反应器; 使用 13.5 M 的 NaOH 溶液实时调节 pH 至 5.5; 在 42°C、150 rpm 下发酵 96 h。

#### 4.3.3 重组菌株糖代谢路径相关基因转录水平分析

通过在  $\text{Na}^+$  胁迫下的相关发酵性能评价可以总结出, 在 *P. acidilactici* ZY271 中过表达  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter\_RS02775 基因, 当处于  $\text{Na}^+$  浓度较高的胁迫环境下, 重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 对于葡萄糖和木糖的代谢能力明显优于原始菌株。针对这一实验现象, 我们以原始菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e) 为对照组, *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 为实验组, 在混合糖的合成培养基发酵条件下, 对葡萄糖, 木糖和甘露糖代谢路径上的关键基因进行了实时荧光定量 PCR 实验 (qRT-PCR) (图 4.4)。从实验结果可以看出, 木糖代谢途径中的木酮糖激酶 (XylB)、甘露糖、葡萄糖代谢途径中的 *manX* 以及 6-磷酸果糖至乳酸途径中的烯醇酶 (Eno) 基因表达上调明显。在第二章的实验探究中可以得到, 木糖代谢与甘露糖磷酸转移酶系统之间存在协同作用<sup>[112]</sup>。重组菌 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 对木糖的代谢加快, 此时木糖代谢基因 *xylB* 较为活跃, 转录水平上调明显, 由于协同作用, 甘露糖磷酸转移酶系统也呈现出活跃状态, 因此 *manX* 上调明显。相关文献表明, 渗透压对甘露糖-PTS 系统会产生影响<sup>[133]</sup>。在高浓度的  $\text{Na}^+$  胁迫环境下, PTS 系统中糖代谢相关的酶的活性会下降, 菌株为了维持正常的生长代谢, 需要更多的酶相互作用, 因此相关的基因表达上调明显。另外一方面, 在原始菌株 *P. acidilactici* ZY271 中过表达  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白相关基因, 增强了菌株将胞内  $\text{Na}^+$  外排的能力, 降低了  $\text{Na}^+$  对菌株中代谢相关的酶的影响, 因此相关基因的转录水平上调。

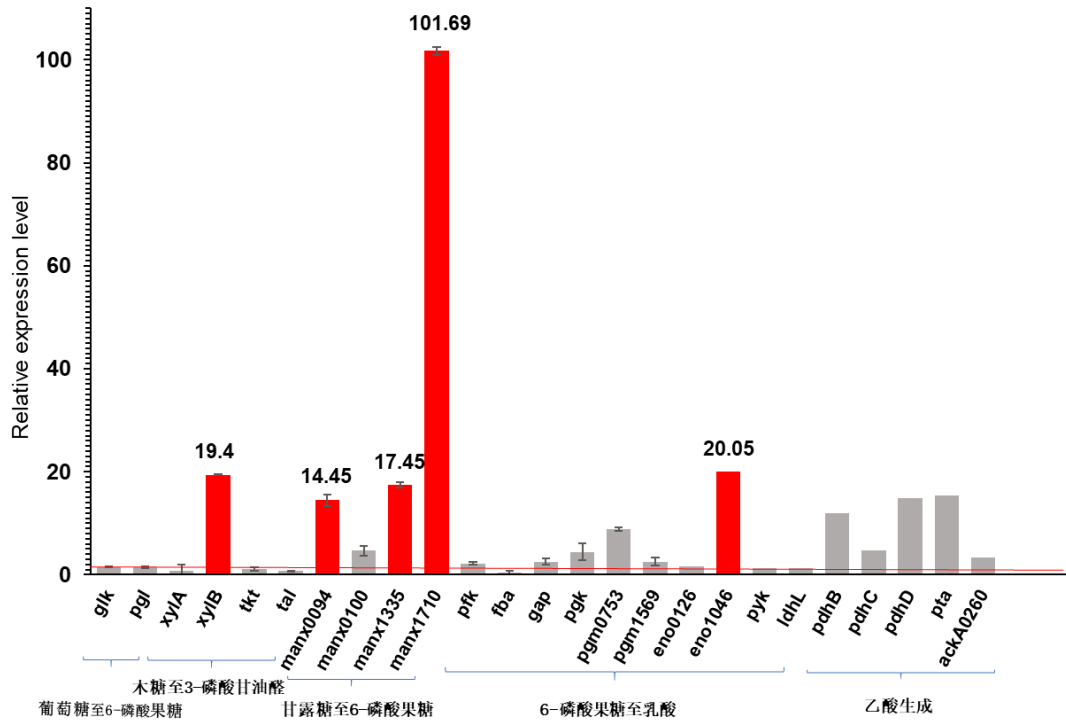


图 4.4 钠离子胁迫下 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)糖代谢及乙酸合成相关基因 qRT-PCR 实验结果

Fig. 4.4 Results of qRT-PCR on *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) Sugar metabolism genes and acetic acid synthesis genes under stress of Na<sup>+</sup>

#### 4.4 本章小结

在本章实验中，通过基因工程，得到钠离子耐受能力提高的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)。使用固含量为 25% (w/w) 的小麦秸秆进行 SSCF，发酵过程中添加高浓度 NaOH 溶液实时调节 pH，相比于原始菌株，*P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的乳酸钠产量得到提高。本章的主要结论如下：

(1) 在糖浓度较高的条件下，利用 *P. acidilactici* 进行乳酸钠的生产，当乳酸钠的产量达到一定浓度时，会对 *P. acidilactici* 的发酵产生影响。主要是因为发酵液中 Na<sup>+</sup>逐渐积累，当 Na<sup>+</sup>达到一定浓度时会对菌株代谢相关的酶产生影响从而抑制发酵细胞的活力，进而抑制高效的纤维素乳酸钠发酵。

(2) 将编码 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白的基因 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter\_RS02775 在 *P. acidilactici* ZY271 中进行过表达，在 Na<sup>+</sup>浓度较高的胁迫环境下，相对于原始菌株，重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)的糖代谢能力和乳酸钠的产量均有所提高。通过基因工程使 *P. acidilactici* ZY271 的 Na<sup>+</sup>耐受能力得到提高，为高浓度 Na<sup>+</sup>胁迫下的木质纤维素乳酸钠发酵提供一株有效菌株。

## 第5章 结论与展望

### 5.1 结论

木质纤维素来源的可发酵单糖的高效利用,以及降低抑制物对发酵菌株的抑制作用,是木质纤维素生物炼制技术所关注的核心问题。基于这两个关键问题,本论文展开的研究工作如下。

在实验室的前期工作中,得到两株乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY112 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZP26 (D-乳酸),但两菌株无法实现木糖的有效利用,之后在两菌株中构建了木糖代谢路径,最终得到具有木糖代谢路径的 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸)。本论文选取了木质纤维来源的5种主要单糖,对构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 进行了单糖和混合糖的发酵评价,探究出两菌株可以实现全糖利用的目的,之后针对实验中的发酵现象,对两菌株糖代谢相关基因和编码糖转运蛋白相关基因进行了转录水平的分析,初步了解了全糖代谢的分子机制。将预处理后的原料进行生物脱毒,可以将呋喃类、弱酸类等抑制物快速脱除,但是对于酚类化合物脱除效率很低,若延长脱毒时间,会消耗部分单糖。针对酚类抑制物,通过基因工程,加强了乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY15 对于酚类抑制物的耐受能力,进一步提高了在酚类抑制物胁迫下的纤维素乳酸发酵性能。预处理后的物料中还存在金属离子这一类抑制物,并且无法通过生物脱毒的方式除去,其中包含大量的钠离子,对高指标的纤维素乳酸钠发酵产生抑制。通过基因工程,加强了菌株 *P. acidilactici* ZY271 对于钠离子的耐受能力,进一步提高了在钠离子胁迫下的纤维素乳酸钠的发酵性能。主要结论如下:

(1) 木糖代谢路径的构建并不会影响菌株对于其他单糖的利用,且构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 可以共发酵多种单糖,实现了高指标的木质纤维素乳酸的生产。

(2) 构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸) 在进行全糖利用的发酵过程中,并不存在葡萄糖抑制作用,几种糖可实现同步利用。并且木糖代谢路径的构建加快了构建菌株对甘露糖的代谢速率。通过对糖代谢相关基因和编码糖转运蛋白相关基因转录水平的分析,发现编码甘露糖 PTS 转运系统中的 EII<sup>Man</sup> 蛋白的 *manXYZ* 基因簇对糖的高效利用起到关键作用。由于木糖代谢与甘露糖磷酸转移酶系统之间存在协同作用,构建木糖代谢路径后菌株可以有效利用木糖,由于协同作用,提高了构建菌株对于甘露糖的代谢速率,同时也可转运葡萄糖。对相关基因作进一步探究,可运用在其他菌株中,为其他菌株探究糖的高效利用提供基因来源。

(3) 针对酚醛类抑制物,将筛选到的酚醛耐受有效基因 *CGS9114\_RS09725*,通过基因工程,整合到 *P. acidilactici* ZY15 的基因组中。最终菌株对香草醛的转化能力得到提高,在酚醛类抑制物胁迫的环境下,整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$

*ackA2::CGS9114\_RS09725* 的纤维素乳酸发酵指标也得到显著提高。

(4) *P. acidilactici* ZY15 对醌类抑制物较为敏感,且自身不具备降解苯醌的能力。将筛选到的苯醌降解有效基因 *ZMO1116*,通过基因工程,整合到 *P. acidilactici* ZY15 的基因组中。最终整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2::ZMO1116* 具备苯醌降解途径,可以将高毒性的苯醌降解为基本无毒性的氢醌。在高浓度苯醌胁迫的环境下,相对于原始菌株,整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2::ZMO1116* 的纤维素乳酸发酵指标得到提高。

(5) 一定浓度的  $\text{Na}^+$  会抑制 *P. acidilactici* ZY271 的菌体生长,进而抑制高指标的乳酸钠生产。通过基因工程,将 *P. acidilactici* 自身编码  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的基因 *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter\_RS02775* 在 *P. acidilactici* ZY271 中进行过表达,以加强菌株对  $\text{Na}^+$  的耐受能力。在  $\text{Na}^+$  浓度较高的胁迫环境下,相对于原始菌株 *P. acidilactici* ZY271,重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 的糖代谢能力得到提高,也进一步提高了纤维素乳酸钠的发酵指标。

## 5.2 创新点

(1) 针对构建菌株 *P. acidilactici* ZY271 (L-乳酸) 和 *P. acidilactici* ZY15 (D-乳酸),首次探究出两菌株可以实现全糖利用,并且不存在葡萄糖抑制作用,同步利用多种单糖以进行高指标生物质乳酸发酵。结合 qRT-PCR 技术,初步分析了菌株全糖代谢的分子机制,为后续在其他菌株中优化对糖的利用提供基因来源。

(2) 基于基因工程和代谢分析,成功筛选出酚类抑制物耐受的有效基因。为后期酚类抑制物胁迫下的纤维素乳酸发酵提供了有效菌株。

(3) 本研究通过基因工程,加强了 *P. acidilactici* ZY271 的  $\text{Na}^+$  耐受能力,为高浓度  $\text{Na}^+$  胁迫下的木质纤维素乳酸钠发酵提供一株有效菌株。

## 5.3 展望

本论文针对 *P. acidilactici* 全糖利用、酚类抑制物耐受和钠离子耐受这几个问题进行了研究。成功探究出构建菌株可共发酵多种单糖且不存在葡萄糖抑制作用。在应对酚类抑制物和钠离子抑制作用的问题上也取得了进展,为后续工作提供了一定的参考依据,但仍存在不足的地方,有待深入研究改进。

(1) 在 *Pediococcus acidilactici* 的基因组上整合 BQ 降解基因 *ZMO1116* 后,使菌株具备了降解 BQ 的能力,但整合菌株 *P. acidilactici* ZY15- $\Delta$  *ackA2::ZMO1116* 在合成培养基以及实际物料中进行发酵时,存在前期糖代谢能力降低的问题。在实验室前期研究工作中发现, B 族维生素可有效的促进乳酸发酵。为了进一步在高浓度 BQ 胁迫的条件下得到浓度更高的乳酸,我们可以在发酵的过程中添加 B 族维生素,看是否能促进更高浓度的乳酸生产。

(2) 相关研究表明, pH 对  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的活性具有一定的影响,因此我们可以将重组菌 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 在几个不同 pH (如 pH5、pH5.5 和

pH6) 条件下对比乳酸钠的生产情况, 看是否能探究出一个适当的 pH, 在此环境下得到更高浓度的乳酸钠。

(3) 目前, 细菌来源的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的转运机制研究主要集中在 *Escherichia coli* 中, 其转运蛋白的类型主要分为 NhaA、NhaB 和 ChaA 这三类。对于 *Pediococcus acidilactici* 自身  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白相关机制研究的很少, 我们可以针对重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)  $\text{Na}^+$  耐受能力提高这一现象, 对重组菌 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 自身  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的转运机制进行详细探究。

## 参考文献

- [1] Zhang T, Zhu M J. Enhanced bioethanol production by fed-batch simultaneous saccharification and co-fermentation at high solid loading of Fenton reaction and sodium hydroxide sequentially pretreated sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 2017, 229: 204-210.
- [2] Cherubini F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51 (7): 1412-1421.
- [3] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38: 522-550.
- [4] Brandt A, Gräsvik J, Halletta, JP, et al. Destruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*. 2013, 15 (3): 550-583.
- [5] Van Wyk JPH. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in Biotechnology*. 2001, 19 (5): 172-177.
- [6] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015, 6 (25): 4497-4559.
- [7] Zabed H, Sahu J, Suelly A, Boyce A, et al. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2017, 71: 475-501.
- [8] Wyman CE, Dale BE. Producing biofuels via the sugar platform. *Chemical Engineering Progress*. 2015, 111: 45-51.
- [9] Niu W, Han L, Liu X, et al. Twenty-two compositional characterizations and theoretical energy potentials of extensively diversified China's crop residues. *Energy*. 2016, 100: 238-250.
- [10] Qiu H, Sun L, Xu X, et al. Potentials of crop residues for commercial energy production in China: A geographic and economic analysis. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 64: 110-123.
- [11] Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, et al. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energy and Fuels*. 2006, 20: 1727-1737.
- [12] Wen J, Xiao Y, Liu T, et al. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 132.
- [13] Hong J, Ye X, Zhang YH. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir*. 2007, 23: 12535-12540.
- [14] Pan X, Xie D, Gilkes N, et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated

- softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 124: 1069-1080.
- [15] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454: 841-845.
- [16] De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*. 2018, 247: 1144-1154.
- [17] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861.
- [18] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1959-1966.
- [19] Cao S, Pu Y, Studer M, et al. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2012, 2: 10925-10936.
- [20] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 16.
- [21] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 17-24.
- [22] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 77: 91-103.
- [23] Wu D, Li Q, Wang D, et al. Enzymatic hydrolysis and succinic acid fermentation from steam-exploded corn stalk at high solid concentration by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 170: 1942-1949.
- [24] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, et al. Effects of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 69: 526-536.
- [25] Mohagheghi A, Ruth M, Schell DJ. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*. 2006, 41: 1806-1811.
- [26] Liu Y, Liu G, Zhang J, et al. Itaconic acid fermentation using activated charcoal-treated corn stover hydrolysate and process evaluation based on Aspen plus model. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: 10.1007/s13399-019-00423-3.
- [27] Dong HW, Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6: 316-318.
- [28] 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.
- [29] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011, 156(4): 286-301.
- [30] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19(4): 1109-1117.
- [31] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, et al. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2015, 69: 424-432.
- [32] Ask M, Olofsson K, Felice TD, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47 (10): 1452-1459.
- [33] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25 (4): 184-192.
- [34] Paulova L, Patakova P, Branska B, et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. 2015, 33 (6): 1091-1107.
- [35] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, et al. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 42: 30-39.
- [36] Hu Y, Wu H, Yin X, et al. Rapid and interference-free analysis of nine B-group vitamins in energy drinks using trilinear component modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data. *Talanta*. 2018, 180: 108-119
- [37] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861.
- [38] Modenbach AA, Nokes SE. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment - a review. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109: 1430-1442.
- [39] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488.
- [40] He Y, Zhang L, 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.
- [41] He Y, 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.

- [42] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of reactor corrosion by eliminating liquid phase existence in dry dilute acid pretreatment of corn stover. *Energy and Fuels*. 2017, 31: 6140-6144.
- [43] Shao S, Zhang J, Hou W, et al. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*. 2017, 238: 744-748.
- [44] Zhang J, Shao S, Bao J. Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock and ethanol fermentability evaluation. *Bioresource Technology*. 2016, 201: 355-359.
- [45] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus *Amorphotheca resiniae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [46] 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.
- [47] Wang X, Gao Q, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resiniae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 1-13.
- [48] Gao X, Gao Q, Bao J. Tolerance response and metabolism of acetic acid by biodetoxification fungus *Amorphotheca resiniae* ZN1. *Journal of Biotechnology*. 2018, 275: 31-39.
- [49] Dunlop AP. Furfural formation and behavior. *Industrial Engineering Chemistry*. 1948, 40 (2): 204-209.
- [50] Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Toxicological Sciences*. 1984, 4 (5): 843-853.
- [51] Bardet M, Robert DR, Lundqvist K. On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood. *Svensk Papperstidning*. 1985, 6: 61-67.
- [52] Lapierre C, Rolando C, Monties B. Characterization of poplar lignins acidolysis products: capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung*. 1983, 37 (4): 189-198.
- [53] Sears KD, Beelik A, Casebier RL, et al. Southern pine prehydrolyzates: characterization of polysaccharides and lignin fragments. *Journal of Polymer Science*. 1971, 36: 425-443.
- [54] Wende G, Fry SC. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. *Phytochemistry*. 1997; 6: 1011-1018.
- [55] Horvat J, Klaić B, Metelko B, et al. Mechanism of levulinic acid formation. *Tetrahedron Letters*. 1985, 26 (17): 2111-2114.
- [56] Yan Z, Gao X, Gao Q, Bao J. Mechanism of tolerance to the lignin-derived inhibitor p-benzoquinone and metabolic modification of biorefinery fermentation strains. *Appl*

- Environ Microbiol. 2019, 85: e01443-19.
- [57] Buchert J, Niemela K, Puls J, Poutanen K. Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. *Process Biochem.* 1990, 25: 176-180.
- [58] Stagge S, Cavka A, Jonsson LJ. Identification of benzoquinones in pretreated lignocellulosic feedstocks and inhibitory effects on yeast. *AMB Express.* 2015, 5: 62.
- [59] Larsson S, Quintana-Sáinz A, Reimann A, Nilvebrant N-O, Jönsson LJ. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry And Biotechnology.* 2000, 84: 617-632.
- [60] Mitchell VD, Taylor CM, Bauer S. Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. *Bioenergy Research.* 2014, 7 (2): 654-669.
- [61] Lynd LR, Baskaran S, Casten S. Salt accumulation resulting from base added for pH control, and not ethanol, limits growth of thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture. *Biotechnology Progress.* 2001, 17 (1): 118-125.
- [62] 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: 240-247.
- [63] 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.
- [64] Jayakody LN, Hayashi N, Kitagaki, H. Identification of glycolaldehyde as the key inhibitor of bioethanol fermentation by yeast and genome-wide analysis of its toxicity. *Biotechnology Letters.* 2011, 33 (2): 285-292.
- [65] Haroun BM, Nakhla G, Hafez M, et al. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. *Renewable Energy.* 2016, 93: 302-311.
- [66] Kumar G, Cheon HC, Kim SH, et al. Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H<sub>2</sub> production from glucose and galactose. *International Journal of Hydrogen Energy.* 2014, 39 (30): 16885-16890.
- [67] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehyde on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering.* 1999; 65: 24-33.
- [68] Uddin S, Hadi SM. Reactions of furfural and methylfurfural with DNA. *Biochemistry and Molecular Biology International.* 1995, 35 (1): 185-195.

- [69] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1981, 11 (11): 226-228.
- [70] 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.
- [71] Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, et al. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*. 1994, 12 (10): 409-415.
- [72] Mikulášová M, Vodný Š, Pekarovičová A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass*. 1990, 23 (2): 149-154.
- [73] Trček J, Mira N P, Jarboe L R. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015, 99 (15): 6215-6229.
- [74] Axe DD, Bailey JE. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995, 47 (1): 8-19.
- [75] Russell AD. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991, 71 (3): 191-201.
- [76] 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.
- [77] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour Technol*. 2016, 199: 103-112.
- [78] Chiaramonti D, Prussi M, Ferrero S, et al. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 2012, 46: 25-35.
- [79] Martinez FAC, Balciunas EM, Salgado JM, et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2013, 30 (1): 70-83.
- [80] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013, 31 (6): 877-902.
- [81] Oliveira RAD, Komesu A, Rossell CEV, et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design-From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, 133: 219-239.
- [82] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119 (1): 10-18.
- [83] Abdel-Rahman MA, Sonomoto K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of*

- Biotechnology. 2016, 236: 176-192.
- [84] Okano K, Tanaka T, Ogino C, et al. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85: 413-423.
- [85] Chang DE, Jung HC, Rhee JS, et al. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65 (4): 1384-1389.
- [86] Litchfield JH. Lactic acid, microbially produced. In: Schaechter Mosel O, editor. *Encyclopedia of microbiology*. Oxford: Academic Press. 2009, 362-372.
- [87] Liu T, Miura S, Yaguchi M, et al. Scale-up of L-Lactic acid production by mutant strain *Rhizopus sp.* Mk-96-1196 from 0.003 m<sup>3</sup> to 5 m<sup>3</sup> in airlift bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, 101: 9-12.
- [88] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-489.
- [89] Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004, 7 (2): 167-179.
- [90] Fu YQ, Yin LF, Zhu HY, et al. High-efficiency l-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using a novel modified one-step fermentation strategy. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 410-417.
- [91] Wu X, Jiang S, Liu M, et al. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semi-continuous fermentation in bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38: 565-571.
- [92] Hohmann S. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 1991, 173 (24): 7963-7969.
- [93] Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, et al. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1998, 86: 284-289.
- [94] Yi X, Zhang P, Sun J, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer l- and d-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121.
- [95] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369-1376.
- [96] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 9-15.

- [97] Okano K, Yoshida S, Tanaka T, et al. Homo D-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of phosphoketolase pathway to pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75 (15): 5175-5178.
- [98] Shah AA, Hasan F, Hameed A, et al. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advance*. 2008, 26: 246-265.
- [99] Nampoothiri NK, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, 101 (22): 8493-8501.
- [100] Athanasiou K A., Niederauer G G., Agrawal C M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers[J]. *Biomaterials*. 1996, 17: 93-102.
- [101] Bourissou D, Martin-Vaca B, Dumitrescu A, et al. Controlled cationic polymerization of lactide. *Macromolecules*. 2005, 38 (24): 9993-9998.
- [102] Achmad F, Yamane K, Quan S, et al. Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. *Chemical Engineering Journal*. 2009, 151 (1): 342-350.
- [103] Xiong HM, Zheng JX, Van Horn R M, et al. A new approach in the study of tethered diblock copolymer surface morphology and its tethering density dependence[J]. *Polymer*. 2007, 48 (13): 3732-3738.
- [104] Ramot Y, Zada MH, Domb AJ, et al. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107: 153-162.
- [105] Hammouche S, Hammouche D, McNicholas M. Biodegradable bone regeneration synthetic scaffolds: in tissue engineering. *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2012, 7: 134-142.
- [106] Lanao RPF, Jonker AM, Wolke JGC, et al. Physicochemical properties and applications of poly (lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue engineering Part B-Reviews*. 2013, 19: 380-390.
- [107] 王卫. 乳酸钠及其在肉品生产中的应用. *Food Science*. 1993, 11.
- [108] Suo YJ, Gao SG, Gian Marco Baranzoni. Comparative transcriptome RNA-Seq analysis of *Listeria monocytogenes* with sodium lactate adaptation. *Food Control*. 2018, 91: 193-201.
- [109] Vlasta Dostalova, Jitka Schreiberova, Jaroslav Kraus. Effects of Hypertonic Saline and Sodium Lactate on Cortical Cerebral Microcirculation and Brain Tissue Oxygenation. *Laboratory Investigation*. 2018, 30: 163-170.
- [110] Evita C Wieggers, Bart WJ Philips, Arend Heerschap. Effect of lactate administration on brain lactate levels during hypoglycemia in patients with type 1 diabetes. *Journal of*

- Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2019, 39 (10): 1974-1982.
- [111] 郭廷, 于培星, 张国宣. 乳酸钠的生产与应用探讨. *China Food Additives*. 2007, 322-323.
- [112] McAloon A, Taylor F, Yee W, et al. Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks. National Renewable Energy Laboratory. 2000, 580-28893.
- [113] Ahmetovic E, Martin M, Grossmann IE. Optimization of energy and water consumption in corn-based ethanol plants. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2010, 49 (17): 7972-7982.
- [114] Martin M, Grossmann IE. Energy optimization of bioethanol production via hydrolysis of switchgrass. *AIChE Journal*. 2011, 58 (5): 1538-1549.
- [115] 刘刚, 鲍杰. 逼近玉米乙醇指标的先进纤维素乙醇技术. *生物产业技术*. 2018, 1: 94-101.
- [116] Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2007, 1: 119-134.
- [117] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy*. 2012, 46: 70-78.
- [118] Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 121: 451-460.
- [119] Laadan B, Almeida JRM, Rådström P, et al. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2008, 25 (3): 191-198.
- [120] Park SE, Koo HM, Park YK, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2011, 102 (10): 6033-6038.
- [121] Petersson A, Almeida JRM, Modig T, et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*. 2006, 23 (6): 455-464.
- [122] Yi X, Gu H, Gao Q, 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.
- [123] Zhang Z, Xie Y, He X, et al. Comparison of high-titer lactic acid fermentation from NaOH- and NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-pretreated corncob by *Bacillus coagulans* using simultaneous saccharification and fermentation. *Scientific Reports*. 2016, 6: 37245.

- [124] Lynd LR, Baskaran S, Casten S. Salt accumulation resulting from base added for pH control, and not ethanol, limits growth of thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture. *Biotechnology Progress*. 2001, 17 (1): 118-125.
- [125] 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: 240-247.
- [126] Darren Greetham, Abdelrahman Saleh Zaky, Chenyu Du. Exploring the tolerance of marine yeast to inhibitory compounds for improving bioethanol production. *Sustainable Energy Fuels*. 2019, 3, 1545.
- [127] Maiorella BL, Blanch HW, Wilke CR. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1984, 26 (10): 1155-1166.
- [128] Park SC, Baratti J. Effects of potassium chloride on ethanol production by an osmotolerant mutant of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993, 38: 542-549.
- [129] Gao XC, Gao QQ, Jie Bao. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene *ZMO0119*. *Journal of Biotechnology*. 2018, 282: 32-37.
- [130] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-489.
- [131] Nampoothiri NK, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, 101 (22): 8493-8501.
- [132] National STEM Centre. Lactic acid, National Non-Food Crops Centre. [http://www.nationalstemcentre.org.uk/dl/ce274003bba8e131e0b7f4d040691f2b6156fa57/14765-lactic\\_acid.pdf](http://www.nationalstemcentre.org.uk/dl/ce274003bba8e131e0b7f4d040691f2b6156fa57/14765-lactic_acid.pdf). 2011.
- [133] Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014, 7 (2): 222-229.
- [134] Humbird D, Davis R, Tao L, et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *National Renewable Energy Laboratory*. 2011, 5100-47764.
- [135] Lv XY, Guo YX, Zhuang YP, et al. Optimization and validation of an extraction method and HPAEC-PAD for determination of residual sugar composition in L -lactic acid industrial fermentation broth with a high salt content. *Anal. Methods*. 2015, 7, 9076.

- [136] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. Laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP510-42628. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 1996.
- [137] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [138] He Y, Zhang L, 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.
- [139] Sluiter A., Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure. Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 2008.
- [140] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 803-810.
- [141] 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.
- [142] Stephane Chaillou, Pieter W. Postma, Peter H. Pouwels. Contribution of the phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system to carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*. *Microbiology*. 2001, 147: 671-679.
- [143] Yane Luo, Tao Zhang, Hui Wu. The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*. 2014, 32: 905-919.
- [144] Stephane chaillou, Peter H. Pouwels, Pieter W. Postma. Transport of D -Xylose in *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum*: Evidence for a Mechanism of Facilitated Diffusion via the Phosphoenolpyruvate: Mannose Phosphotransferase System. *Journal of Bacteriology*. 1999, 181: 4768-4773.
- [145] Rute Castro, Ana R. Neves, Luis L. Fonseca. Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Molecular Microbiology*. 2009, 71 (3): 795-806.
- [146] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 16.
- [147] Saa JM, Morey J, Rubido C. An oxidative degradation approach to p-quinones. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 1986, 51: 4471-4473.
- [148] Gu HQ, Jian Zhang, Jie Bao. High Tolerance and Physiological Mechanism of *Zymomonas Mobilis* to Phenolic Inhibitors in Ethanol Fermentation of Corn cob Residue. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112: 9.

- [149] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour Technol.* 2016, 199: 103-112.
- [150] Fuchs G, Boll M, Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology.* 2011, 9 (11): 803-816.
- [151] Ping Zhou, Imrana Khushk, Gao Q, Bao J. Tolerance and transcriptional analysis of *Corynebacterium glutamicum* on biotransformation of toxic furaldehyde and benzaldehyde inhibition compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2019, 1-13.
- [152] Mager T, Rimon A, Padan E, et al. Transport mechanism and pH regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *NhaA* from *Escherichia coli*: an electrophysiological study[J]. *Journal of Biological Chemistry.* 2011, 286 (26): 23570-23581.
- [153] Yang S, Land ML, Klingeman DM, et al. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010, 107 (23): 10395-10400.
- [154] Gao XX, Gao QQ, Jie Bao. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene *ZMO0119*. *Journal of Biotechnology.* 2018, 282: 32-37.

附录 I qRT-PCR 基因分析及引物

Gene	Primer sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
Two selected genes of primers for glucose metabolism		
<i>16S rRNA</i>	GTCCATGCCGTAAACGATGATT	CTTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
<i>glk</i>	CATGCTCGGTTTGGCACT	TGAAGAACGCACGGTAGA
<i>pgi</i>	CGCAAGCAAGGAATACAC	TTACCTTCGGATTCACCC
Four selected genes of primers for xylose metabolism		
<i>xylA</i>	CACATCAATACGATACGGACGC	CACATCAATACGATACGGACGC
<i>xylB</i>	GGTTACCTTGGCAGCTGGATAT	GGAGTCCGTTTCTCCAACGATGT
<i>ikt</i>	TTGGGAGCACGTTCTTTGTCTT	TTCAATCGGCTCATGAGTTGGT
<i>tal</i>	CAATCACCACGGTAGAACAGGT	CTTTCAATCAAATGATGCGGAT
Three selected genes of primers for arabinose metabolism		
<i>araA</i>	GATACACCGCATTCAAA	CTTCATTAAGCGATCCAAA
<i>araB</i>	TGCAAACCCAGCTTTATT	TTGAGGGCGTCTGATAGA
<i>araD</i>	TTCTGTGCTGATTGGTTAG	GTTTACGGTAGTAGTGCTTAT
Five selected genes of primers for mannose metabolism		
<i>manX-1</i>	TCAACAGCGGAATAACGG	TCAACAGCGGAATAACGG
<i>manX-2</i>	ACCGACGGAAAGATTGGG	TTCGCTAGGAACTTGTTGGATA
<i>manX-3</i>	TACGCTGATAATGACGAG	AACAACGGTCCTAGAAAAG
<i>manX-4</i>	GGCTAAGGACGACAAACA	TGGTCAAACGCCAATACG
<i>mpi</i>	AACTTGCCGACTGGATTA	TGCTTTGTTGGGTTTCTA
Ten selected genes of primers for galactose metabolism		
<i>galK-1</i>	TTGCAGAAAAGTTCCATC	GTAAGTTCCCAGGCTAAT
<i>galK-2</i>	GGTTGTCATCATCTGCCTCG	GTTTCGCCGTCCCATTTC
<i>galK-3</i>	TAACTAAGGATGCGTTCGA	TAGGTTCGCCTTGTTTGAG
<i>galK-4</i>	TTCGCAGTTGGAATGGGTAA	CGGCGTTCGTTGTATTTAGAGT
<i>galT</i>	GGCTTCCAATACTCACCG	TCAGCATTACTGCCACA
<i>galE-1</i>	CGACTACAATACGCCTGAC	GAAGAACCGAGGTTGAATA
<i>galE-2</i>	TACCCAAGTGTGACGGAAGT	CTTCACGAGCGGCATCCA
<i>ugp</i>	CCGCAGTTGATGAAGCAC	GCGTCGGTTAATTGGATT
<i>pgm</i>	CACAACGTATGGCTACCA	TCTGCGTACTTAGTTGACTT
<i>pgi</i>	CGCAAGCAAGGAATACAC	TTACCTTCGGATTCACCC
Ten selected genes of primers for metabolism of 6-p-fructose to lactic acid		
<i>pfk</i>	CAGAACACGGATACAATACA	TACTTGAACCGCAAACAC
<i>fba</i>	CTGCTGGATACAGCTCAG	TCTTCTTACCACCGATT
<i>gap</i>	GTTGGAACGAAGACGAGGTA	CCATTGGCAAGTGAAGC
<i>pgk</i>	ACAGCAATGAAGGCAGAA	TTGTCAAGTAAGTGGTCGA
<i>pgm-1</i>	GGTACTGCCTTACTGGGTT	CCTGGTCCGAAATCTGTTC
<i>pgm-2</i>	CAGCAGTTCCGCCACATA	TTCATTCCCTCCATCACG
<i>eno-1</i>	TCAAGATGGGTGCTGCTA	CCTGAACGGTGAGATACG
<i>eno-2</i>	AAGGGATGGCAAATTCAA	CACGGTAAAGTCCGCAAC

<i>pyk</i>	TTCGTAAGCCTCAAGACG	CAACACCCATGTCACCAC
<i>ldhL</i>	AAAGCCAGGTGAAACACG	TTCCTTAGGGAAGCCAGA
Four selected genes of primers for metabolism of acetic acid		
<i>pkt</i>	GTGCTCACCAAATTCCAATTCC	CTTTGGCACGAAGTCAAGAATG
<i>pta</i>	GATCAGTGGAGCCTTCCTCATG	AAGCAACCTTAGGGTCAATTCC
<i>ackA1</i>	CAATTACGGCGATTAAGGATGG	CCAAAGAAACGTCGATGTCTC
<i>ackA2</i>	CTTCGACCAGGGTCAGGTTATC	TTTCTCAGCTAGGAAAGCCACG
Thirty-three selected genes of primers for sugar transporter		
<i>glcU_0931</i>	AAGAGCGATTCCACGAC	TGCCTTCGCATCAACA
<i>gfrD_0034</i>	GGGTTGAAATACGGGTATC	TAAGTGTTTAAAGGCTGGG
<i>gfrC_0035</i>	CATAATGATCTCACGTCCAA	AGTGCTGCTCCCACCT
<i>gfrB_0036</i>	ACGGACGGCTGCTTT	CGTTATTCCGCTGTTGA
<i>gfrD_0098</i>	CCGCTAGGCATTTCG	CGATCCCGGTAGCAAT
<i>gfrC_0099</i>	CAATAGCAAGGGACTCGA	TAACGCAAACCGTAAGC
<i>gfrB_0101</i>	AACCGACGGAAAGATTG	CTCCCTCATCGTTAGTCAA
<i>gfrA_1474</i>	GTAGCAGGTCTTAATTTACCAC	ATCTTTCCAATAAGTCATTACAGA
<i>gfrB_1475</i>	TAATGATGAAGTCGCTGGAGA	CTGTATTTTGTTCGCTAGA
<i>gfrC_1476</i>	TTTGTCCCAAGGGGTAA	CCGCCACTTTGAATAGC
<i>gfrD_1477</i>	GCCCTTATCGGCAATC	ACGGTCCTAGAAAGAAACCT
<i>manX_0095</i>	GCATGGAAAATCAGCCA	TTTGAAATCTACGGCCG
<i>manX_0746</i>	AAAATTTATCACGATCCCC	GACCTCTTCCTTACCGACT
<i>manZ_1351</i>	TCGTCATCATGTGGTTCC	CATCTTTCCTAAGTGCGC
<i>manY_1352</i>	GCAATACAACCGTTTCGG	AGAGTTCGTCGCCATGA
<i>manX_1353</i>	GTCCGGCAGGAGTAGATT	GGGCGTTTAACCACGA
<i>manX_1355</i>	CGGAACTCCATCAAACG	CCATTCCCATCATTACTTG
<i>manX_1749</i>	GGCCCTGACGATCTCA	GTGCAGCAATTTCTTG TG
<i>manY_1750</i>	GGTCAAGGTAAAGCAGGTG	GAGCAATGATGGTAAGCAA
<i>manZ_1751</i>	CAATGGGTGGCAGTATCTTA	TGTAGCCGAATTCTTGAGTA
<i>manX_1754</i>	CTCGCACGGGTAGACAG	CCACCAAAATCCGGTTA
<i>celC_1411</i>	AAATAATTAGTCACTCGGGC	ATAGTCTGGATGTTCCGCTC
<i>celB_1413</i>	TGTTTGGGTTGGTGGAG	AATGTTGAAAATGGCCG
<i>celA_1414</i>	GTGGTGGGATGAGTTCG	GGTGCAGGAGGACAA
<i>celA_0032</i>	GCTTCATCGGGTTTTATG	CTTTTTTGGAGTGCTTCG
<i>celA_0344</i>	CGTTGACGCGGAAAT	ATGCCGTAGTCTTGCATAT
<i>celB_1127</i>	CCAAACCATCCCATACAT	TCATAACCACCGGAAAAC
<i>gatA_1343</i>	ATTTATCTTTATGCTTGCTTTG	TCTTTGATTACTTGTTGGTTTT
<i>gatC_1344</i>	AGCTCCGCTCGTAACTG	TGGTCCAAACTCCTCCA
<i>gatB_1345</i>	ATGAAAACACTAATGGTCGT	CTTATCCTGATTACTCCG
<i>agaC_1460</i>	TCAACCGCCTAACACAGT	AGCATCGCAAATAGCAAC
<i>celB_1508</i>	TGGTGGTGGTGGTGGAA	CCCGAAGATGATCGGTT
<i>fruA_1576</i>	CCGTAATGGTAGGTGGG	GCTTCGCGTTCTTGTTTC

## 附录II 质粒构建所用的菌株、质粒及引物

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> XLI-blue	Host for plasmid construction	Stratagene
<i>A. resinae</i> ZN1	Biodetoxification fungus isolated in our lab	[45]
<i>Z. mobilis</i> ZM4	Genes ZMO1885,ZMO1116,ZMO1399,ZMO1696,ZMO1576 and ZMO1984 ,contained strain	Stored in our lab
<i>C. glutamicum</i> S9114	Gene CGS9114_RS09725 contained strain	Stored in our lab
<i>P. putida</i> KT2440	Genes PP_3151, PP_5120, PP_5258 contained strain	Stored in our lab
<i>P. acidilactici</i> ZY15	D-lactic acid production strain	Stored in our lab
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pMG36e)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains empty plasmid pZY36e	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-ZMO1116)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains ZMO1116 expression plasmid pZY36e-ZMO1116	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-ZMO1399)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains ZMO1399 expression plasmid pZY36e-ZMO1399	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-ZMO1576)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains ZMO1576 expression plasmid pZY36e-ZMO1576	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-ZMO1984)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains ZMO1984 expression plasmid pZY36e-ZMO1984	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-ZMO1885)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains ZMO1885 expression plasmid pZY36e-ZMO1885	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-ZMO1696)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains ZMO1696 expression plasmid pZY36e-ZMO1696	This work

<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-CGS9114_RS09725)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains CGS9114_RS09725 expression plasmid pMG36e-CGS9114_RS09725	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-PP_3151)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains PP_3151 expression plasmid pZY36e-PP_3151	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-PP_5120)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains PP_5120 expression plasmid pZY36e-PP_5120	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15 (pZY36e-PP_5258)	<i>P. acidilactici</i> ZY15 contains PP_5258 expression plasmid pZY36e-PP_5258	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15- $\Delta$ ackA2	Gene <i>ackA2</i> deficient of <i>P. acidilactici</i> ZY15	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15- $\Delta$ ackA2:: <i>ZMO1116</i>	Integration of the expression cassette <i>PldhD_ZMO1116</i> into <i>ackA2</i> locus of <i>P. acidilactici</i> ZY15- $\Delta$ ackA2; BQ tolerant strain	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY15- $\Delta$ ackA2:: <i>CGS9114_RS09725</i>	Integration of the expression cassette <i>PldhD_CGS9114_RS09725</i> into <i>ackA2</i> locus of <i>P. acidilactici</i> ZY15- $\Delta$ ackA2; Vanillin tolerant strain	This work
Plasmids	Characteristics	Sources
pZY36e	<i>PldhD</i> replacing <i>P32</i> promoter of pMG36e; newly constructed expression plasmid in <i>P. acidilactici</i>	This work
pZY36e- <i>ZMO1116</i>	<i>ZMO1116</i> was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e- <i>ZMO1885</i>	<i>ZMO1885</i> was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e- <i>ZMO1399</i>	<i>ZMO1399</i> was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e- <i>ZMO1576</i>	<i>ZMO1576</i> was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e- <i>ZMO1984</i>	<i>ZMO1984</i> was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work

pZY36e-ZMO1696	ZMO1696 was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e-CGS9114_RS09725	CGS9114_RS09725 was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e-PP_3151	PP_3151 was inserted into pZY36e at Xba I and Pst I	This work
pZY36e-PP_5120	PP_5120 was inserted into pZY36e at Xba I and Sal I	This work
pZY36e-PP_5258	PP_5258 was inserted into pZY36e at Xba I and Pst I	This work
pSET4E	<i>Em<sup>r</sup></i> replacing <i>Spc<sup>r</sup></i> marker of pSET4S, temperature sensitive vector	[94]
pSET4E- $\Delta$ ackA2::ZMO1116	Plasmid for integration of expression cassette <i>PldhD_ZMO1116</i> into <i>ackA2</i> locus of <i>P. acidilactici</i>	This work
	ZY15- $\Delta$ ackA2	
pSET4E- $\Delta$ ackA2::CGS9114_RS09725	Plasmid for integration of expression cassette <i>PldhD_CGS9114_RS09725</i> into <i>ackA2</i> locus of <i>P. acidilactici</i>	This work
	ZY15- $\Delta$ ackA2	
Primers	Sequences (5' - 3')	
<i>PldhD-F</i>	CCGGAATTCTGCTCTGGTGTGCAGACCAGAC	
<i>PldhD-R</i>	CTAGTCTAGATGTAATATTACCCCTTTCTTTTTTA	
<i>ZMO1116-F</i>	CTAGTCTAGAAATGGCGCAAAATAAAAATGCTGTC	
<i>ZMO1116-R</i>	ACGCGTCGACTCAGGCAAAAACAGCTTTCTTTTTAG	
<i>ZMO1696-F</i>	CTAGTCTAGAAATGCGCGCCATAGGTTATCAAAG	
<i>ZMO1696-R</i>	ACGCGTCGACTTAGAAGCCTTCTAAGACGATTTTACCT	
<i>CGS9114_RS09725-F</i>	CTAGTCTAGAAATGCCACCAAAGTCGCCCTCGT	
<i>CGS9114_RS09725-R</i>	ACGCGTCGACTCAGTCGCGGGGACGCCAGT	
<i>PP_3151-F</i>	CTAGTCTAGAAATGAGCGCGATCAGCAGCCTG	
<i>PP_3151-R</i>	TGCACTGCAGTCAGTTACGGTCCAGCCACACGG	
<i>PP_5120-F</i>	CTAGTCTAGAAATGAACTCGCCCAGTGCCTTG	
<i>PP_5120-R</i>	ACGCGTCGACTCAGCGGATGAACAGTTTGTAGACC	

---

<i>PP_5258-F</i>	ACGCGTCGACATGGTTGCTGGATTGCTCGAG
<i>PP_5258-R</i>	TGCACTGCAGTCAGTCGAACACGATACCCTGC
<i>PldhD-F*</i>	CCGCTCGAGTGCTCTGGTGTGCAGACCAGAC
<i>ZMO1116-R*</i>	CGCGGATCCTCAGGCAAAAACAGCTTTCTTTTATAG
<i>ZMO1696-R*</i>	CGCGGATCCTTAGAAGCCTTCTAAGACGATTTTACCT
<i>CGS9114_RS09725-R*</i>	CGCGGATCCTTCAGTCGCGGGGGACGCCAGT

---

## 硕士期间取得成果

## 已发表论文:

Zhongyang Qiu<sup>1</sup>, **Chun Fang**<sup>1</sup>, Qiuqiang Gao, Jie Bao\*. A short-chain dehydrogenase plays a key role in cellulosic D-lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*. **Bioresource Technology**. 2020, 297: 122473. (IF=6.669 对应本文第三章)

## 准备发表论文:

1. **Chun Fang**<sup>1</sup>, Niling He<sup>1</sup>, Zhongyang Qiu, Jie Bao\*. Overexpression of *ZMO1116* enhances the p-benzoquinone biodegradation and chiral lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*. (对应本论文第三章)
2. **Chun Fang**<sup>1</sup>, Niling He<sup>1</sup>, Zhongyang Qiu, Jie Bao\*. Overexpression of gene encoding Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter to improve sodium ion tolerance of *Pediococcus acidilactici* for high titer sodium lactate fermentation. (对应本论文第四章)

## 致谢

2017年春季考研复试通过后，鲍杰老师带着我们6个新生参观实验室，看着师兄师姐穿着实验服在实验室认真忙碌的身影，我心里暗喜——我即将成为其中一员啦。九月份正式进入生物能源与生物炼制实验室，开启了我的三年研究生生活。与大学生活截然不同，研究生阶段忙碌且单一，实验室的师兄师姐都很优秀并且刻苦，在这种氛围的渲染下，自己也一直有一种紧迫感。还记得第一次参加实验室大组会，轮到自己讲的时候，紧张到说话毫无逻辑。在台下看到师兄师姐淡定从容的汇报，感觉到自己需要努力的路还很长。我不是最聪明的那一个，所以只能放弃很多休息的时间，会将周末都安排满实验，因为仪器使用时间比较宽裕，不用排队等候。经常因为课题进展不顺利感觉动力不足，会给自己点一杯喜欢的奶茶与甜品，缓解情绪后继续进行实验。这一阶段的学习让我学会沉淀自己，学会坚持，学会调整，这是对我异常重要的一个阶段，让我能够更好的认识自己。

感谢鲍老师。鲍老师经常会对我们说“好男儿志在四方，要多出去看看，多学习，女生同样也是，不能被传统定义”，老师鼓励我们不断接受新知识，不断提升自己。老师是我崇拜尊敬的学者，他对科研的热爱以及严谨的态度感染着实验室的每一个人。鲍老师对学生是包容的，很多没有科研进展的时间里，老师依旧耐心的听我们汇报然后给出建议，并给大家鼓励；鲍老师也是严格的，同样要求我们严谨的对待科研，会花大量时间与学生一起修改论文，告诉我们存在的问题。研究生期间犯过不少错误，但鲍老师从不计较，特别感谢鲍老师这段时间的照顾与指导，希望鲍老师能花一部分时间在自己身上，好好照顾自己身体，不再那么辛苦。

感谢邱忠洋师兄。刚进实验室便由邱师兄指导我实验，师兄很优秀，所以对我也很严格，我经常跟在他身边看他实验操作，我的问题很多，他总会耐心的解答。很感谢邱师兄在我状态不好时，对我的开导；在实验进展不顺利时，没有责怪，还依旧对我进行指导；实验到很晚时，让我提前回去，自己留下完成剩余工作。即使邱师兄毕业了，依旧对我很关照，经常给我解答问题。祝愿邱师兄以后生活美满，科研顺利。

感谢1301室的金慈师兄，颜钊师兄，黄振，何妮玲师妹，贾佳师弟的陪伴与照顾，希望大家学业顺利。感谢卢敏萍，李园园，郑理想，韩涛和王江的关照与包容，祝愿大家顺利毕业。感谢我的室友陈靓，王娟，王林，谢谢你们给予我的温暖与欢笑。

感谢我的家人，谢谢你们的开明，让我可以自由选择，做自己想做的事情；谢谢你们的理解与支持，让我可以更加自信的面对很多问题；谢谢你们的包容，让我可以是你们眼中那个不管怎样，依旧很好的孩子。我很爱你们。

弥足珍贵，永不后悔的三年。

方纯

2020年4月17日

# 卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 柒拾 页

立卷人\_\_\_\_\_

检查人\_\_\_\_\_

立卷时间\_\_\_\_\_