

学校代码：10251

学 号：Y30171181

华东理工大学

硕士学位论文

论文题目：代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产

聚 3-羟基酸丁酸和脂肪烃

学科专业：生物工程

研究方向：生物炼制

论文作者：黄振

指导教师：鲍杰 教授

定稿日期：2020 年 05 月 15 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产聚 3-羟基丁酸和脂肪烃

黄振

指导教师姓名:

鲍杰教授

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2020.05.15 论文答辩日期: 2020.6.15

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: 董宏伟 高级工程师

评 阅 人: 洪枫 教授

杨世辉 教授

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

研究生学位论文全文电子版由档案馆按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：黄振

指导教师签名：鲍杰

2020 年 6 月 16 日

2020 年 6 月 16 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：黄振

2020 年 6月 16 日

代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产聚 3-羟基丁酸和脂肪烃

摘要

在日益增长的能源和工业产品需求下,以生物基产品替代传统的化学品的生物经济备受关注。随着基因组学、合成生物学的发展,利用重组微生物生产生物塑料、生物燃料等生物基产品有很好的应用前景。

聚羟基脂肪酸酯(PHA)是一类能够由生物合成的可降解生物塑料。通过改变单体的类型和比例可以改变聚酯类塑料的物理性质,因而利用代谢改造生产不同单体混合的聚酯生物塑料是目前的热点。烃类化合物作为化石燃料的重要组成部分一般从原油中提取,但利用微生物合成脂肪烃的研究也为生物燃料替代化石燃料提供了新的思路。利用木质纤维素原料生产 PHB、脂肪烃等生物基产品,有利于降低产品生产成本、节约粮食资源。但利用纤维素原料生产 PHB、烃类的报道较少,发酵菌株较难适应当下的木质纤维素体系。本实验室开发的干发生物炼制能有效利用木质纤维素中的可发酵糖,而 *Corynebacterium glutamicum* S9114 对该体系中的酚醛类抑制物有很好的适应能力,在谷氨酸发酵中已有很好的应用。本论文以其作为改造出发菌株,利用代谢工程改造引入外源的 PHB、脂肪烃合成途径,成功实现了产物的合成,进一步推动纤维素原料生产生物塑料、生物燃料。

本文第一部分以 *C. glutamicum* S9114- Δ *ldhA1::xylAB* 为出发菌株,引入来自罗氏真养菌 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHB 合成途径,得到了能合成 PHB 的 JH01 菌株。本研究还尝试了增加底物乙酰辅酶 A 的供给、强化合成代谢等策略进行代谢改造,发现过表达合成途径基因能使 PHB 含量提高到原来两倍。此外研究中还发现表达 PHB 合成的辅助基因 *phaP* 有最好的提升效果,最终得到 19.51% 的 PHB 含量以及 2.36 g/L 的 PHB 产量。

本文的第二部分是针对 *C. glutamicum* S9114 的产烃代谢改造。通过导入来自蓝藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 的脂肪烃合成途径得到产烃菌株 HW4,检测发酵液产物发现有 C21-C30 的超长链烃以及大量脂肪酸,发酵测得总烃产量为 18.77 mg/L。推测超长链烃合成机制和脂肪酸代谢和分枝菌酸代谢有关,并利用 qRT-PCR 分析相关基因表达情况。对于影响产物检测的大量脂肪酸,本研究导入脂肪酸脱羧酶 *OleT_{JE}*、*OleT_{MC}* 基因,消耗积累的脂肪酸并得到 C12-C17 的长链烯烃。

通过本论文的研究,在 *C. glutamicum* S9114 基础上得到了能够合成 PHB 的 JH01 菌株以及能生产脂肪烃的 HW4 菌株,通过代谢改造增加了产物产量。对 PHB 增产的改造研究和超长链烃机制研究为接下来的进一步增产改造提供了新的思路。

关键词:木质纤维素; *C. glutamicum* S9114; 烃类化合物; PHB; 超长链烃;

Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Poly-3-hydroxybutyrate and Hydrocarbons Fermentation

Abstract

With the increasing demand for energy and industrial products, the bio-economy of replacing traditional chemicals with bio-based products has attracted much attention. The development of genomics and synthetic biology makes the use of recombinant microorganisms to produce bioplastics, biofuels and other bio-based products have good prospects.

PHA is fully bio-synthesized bioplastic with good biocompatibility and degradability. The physical properties of polyester plastics can be changed by changing the type and ratio of monomers. Therefore, the research on the production of polyester bioplastics mixed with different monomers by metabolic transformation is currently a hot topic. As an important part of fossil fuels, hydrocarbon compounds are generally extracted from crude oil, but the research on the use of microorganisms to synthesize fatty hydrocarbons also provides new ideas for replacing fossil fuels. Using lignocellulosic raw materials to produce PHB and aliphatic hydrocarbons is conducive to reducing production costs and saving food resources. However, there are few reports on the production of PHB and hydrocarbons from cellulosic raw materials, because many strains are not suitable for lignocellulose systems. Dry biorefinery process by our laboratory can effectively utilize the fermentable sugar in lignocellulose, and *Corynebacterium glutamicum* S9114 has a good adaptability to the inhibitors in this system, and has been used in glutamic acid fermentation. In this study, it was used as a starting strain for transformation, using metabolic engineering to introduce PHB and aliphatic hydrocarbon synthesis pathways, and successfully achieved the synthesis of products, which is conducive to further promoting the industrial production of bioplastics and biofuels.

In the first part of this study, *C. glutamicum* S9114- Δ *ldhA1::xylAB* was used as the starting strain, and PHB was successfully synthesized using the PHB synthesis pathway from *Ralstonia eutropha* H16. The present study also attempted metabolic modification by increasing the supply of substrate acetyl-coa and strengthening anabolism, and found that overexpression of synthetic pathway genes can increase the PHB content to twice. In addition, it was found in the study that the expression of gene *phaP*, a helper gene for PHB synthesis, had the best effect, and finally obtained a PHB content of 19.51 % and a PHB yield of 2.36 g/L.

The second part of this study is the transformation of *C. glutamicum* S9114's hydrocarbon production metabolism. Hydrocarbon-producing strain HW4 was obtained by

introducing the aliphatic hydrocarbon synthesis route from *Synechococcus elongatus* PCC7942. The fermentation broth products were C21-C30 long-chain hydrocarbons and many of fatty acids. The total hydrocarbon production measured by fermentation was 18.77 mg/L. This study speculate that the long-chain hydrocarbon synthesis mechanism is related to fatty acid metabolism and mycobacterial acid metabolism, and use qRT-PCR to analyze the expression of related genes. Many fatty acids affect product extraction and detection, so study introduced fatty acid decarboxylase *OleT_{JE}*, *OleT_{MC}* genes, consumed accumulated fatty acids and obtained C12-C17 long-chain olefins.

This study obtained the JH01 strain capable of synthesizing PHB and the HW4 strain capable of producing aliphatic hydrocarbons, and increased product yield through metabolic engineering. The study on the mechanism of improving PHB production and very-long-chain hydrocarbons provides new ideas for further production stimulation.

Keywords: lignocellulose; *C.glutamicum* S9114; Hydrocarbon; PHB; Long-chain hydrocarbon ;

目录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 聚羟基脂肪酸酯 (PHA)	1
1.2 烃类化合物.....	3
1.3 木质纤维素与生物炼制.....	7
1.4 谷氨酸棒状杆菌与生物炼制.....	9
1.5 本课题的研究内容与意义.....	10
第 2 章 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产聚 3-羟基丁酸.....	11
2.1 引言.....	11
2.2 材料与方法.....	11
2.2.1 改造菌株.....	11
2.2.2 培养基及培养条件.....	11
2.2.3 重组质粒构建.....	15
2.2.4 重组菌株构建.....	15
2.2.5 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 发酵.....	16
2.2.6 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的提取与检测.....	18
2.2.7 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 含量测定.....	18
2.3 结果与讨论.....	15
2.3.1 <i>C. glutamicum</i> S9114 中 PHB 路径构建.....	15
2.3.2 发酵培养基中的玉米浆替代.....	16
2.3.3 增强底物乙酰辅酶 A 的供给促进 PHB 合成.....	18
2.3.4 对 PHB 合成途径强化以提高 PHB 产量.....	19
2.3.5 优化 PHB 合成代谢以增加 PHB 积累.....	21
2.4 本章小结.....	22
第 3 章 代谢改造谷氨酸棒状杆菌生产脂肪烃.....	25
3.1 引言.....	23
3.2 材料与方法.....	23
3.2.1 使用菌株.....	23
3.2.2 培养基及培养条件.....	23
3.2.3 重组质粒构建.....	24
3.2.4 重组菌株构建.....	24
3.2.5 产烃发酵.....	24
3.2.6 脂肪烃提取与气质联用 (GC-MS) 检测.....	24

3.2.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR)	25
3.3 结果与讨论.....	25
3.3.1 <i>C. glutamicum</i> S9114 中构建脂肪烃合成途径.....	25
3.3.2 超长链烃生产机制探究.....	27
3.3.3 发酵液中大量脂肪酸的利用尝试.....	30
3.4 小结.....	32
第 4 章 结论与展望.....	32
4.1 结论和创新点.....	33
4.2 展望.....	33
参考文献.....	34
附录 I 仪器设备.....	43
附录 II 相关基因序列.....	44
附录 III 使用的菌株、质粒和引物.....	45
硕士期间研究成果.....	55
致谢.....	56

第 1 章 绪论

1.1 聚羟基脂肪酸酯 (PHA)

PHA 是一种微生物在营养匮乏情况下积累的作为能源和碳源的存储物质^[1-3], 在化学结构上是由羟基脂肪酸酯单体聚合而成的线性聚酯。根据单体碳链长度不同, PHA 可分为短链 PHA 和中长链 PHA。短链 PHA 的单体碳原子数目在 3-6 而中长链的单体碳原子数目为 6-16, 其中 PHB 是一种由短链单体聚合的 PHA 材料。PHA 材料的性能由构成单体的含量与结构决定^[4], 因此材料性质差别很大。PHB 作为一种结构简单的 PHA, 由于其结晶度达到 60 %-80 %, 使得材料脆性很强^[5]。除此之外, PHB 材料的热加工难度较大, 在高于熔点 (180℃) 十度以上时加工容易断裂。为了改善这些问题, 人们也尝试了 PHB 和 PHV 两种短链 PHA 单体的共聚 PHBV, 或者将 PHB 与中长链 PHA 共聚, 改善材料强度与韧性^[6]。

PHA 类材料性质优良, 有着化学合成塑料的性质。还有很好的可降解性和生物相容性。这使得 PHA 材料在石油资源即将耗尽、白色污染日益严重的现在有很大的发展前景^[7,8]。以 PHB 为代表的 PHA 类材料如今主要应用于医疗、农业等领域。在医疗方面, PHB 可被用于医疗中的植入材料, 作为骨科的细胞支撑材料^[9]。在医药方面, PHA 类材料可制作药物缓释载体, 通过细胞内的酮代谢分解, 缓慢释放药物。因为具有气体阻隔性质, PHB 也可用作包装材料, 能使 O₂ 和 CO₂ 缓慢透过。

目前 PHB 的主要合成方法是生物化学法, 通过微生物在非平衡条件下发酵合成获得, 也是工业上生产 PHB 的主要方法。除此之外, 利用化学方法也能合成 PHB, 如以 β -丁内酯或者 3-羟基丁酸为单体^[10], 通过催化剂催化得到 PHB 产品。但这种方法参与生产的成本很高, 反应步骤也很繁琐, 不利于工业生产。发酵结束之后, 产物的提取是较为关键的步骤^[11], 提取方法通常有溶剂萃取法、水相分离法、酶法以及机械破碎法。

能够天然合成 PHB 的微生物由于培养基质等差异合成途径也不尽相同, 但在大体主要是三步法和五步法两种^[12]。三步法是目前发现的分布最广的一条合成途径, 大部分微生物如罗氏真养菌 *Rhodospirillum rubrum* 等常采用这种途径合成 PHB, 具体步骤为糖类通过 EMP 途径生成乙酰辅酶 A, 之后再通过 *phaA* 基因编码的 β -酮硫解酶 (β -ketothiolase) 的作用下得到乙酰乙酰辅酶 A, 再经过 *phaB* 基因编码的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (acetoacetyl-CoA reductase) 催化得到单体 3-羟基丁酰辅酶 A, 最后 n 分子的辅酶 A 单体在 *phaC* 即聚羟基烷酸酯合酶 (polyhydroxyalkanoate synthase) 的作用下脱去 n 分子的辅酶 A 聚合成聚 3-羟基丁酸^[13,14]。

除此之外, 真养产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus*^[15] 中的五步合成 PHB 反应也较典型。主要区别在于第二步反应得到的乙酰乙酰辅酶 A 因构型不同额外经过了两步反应得到单体, 最终在 PHB 合酶的作用下缩合得到 PHB。

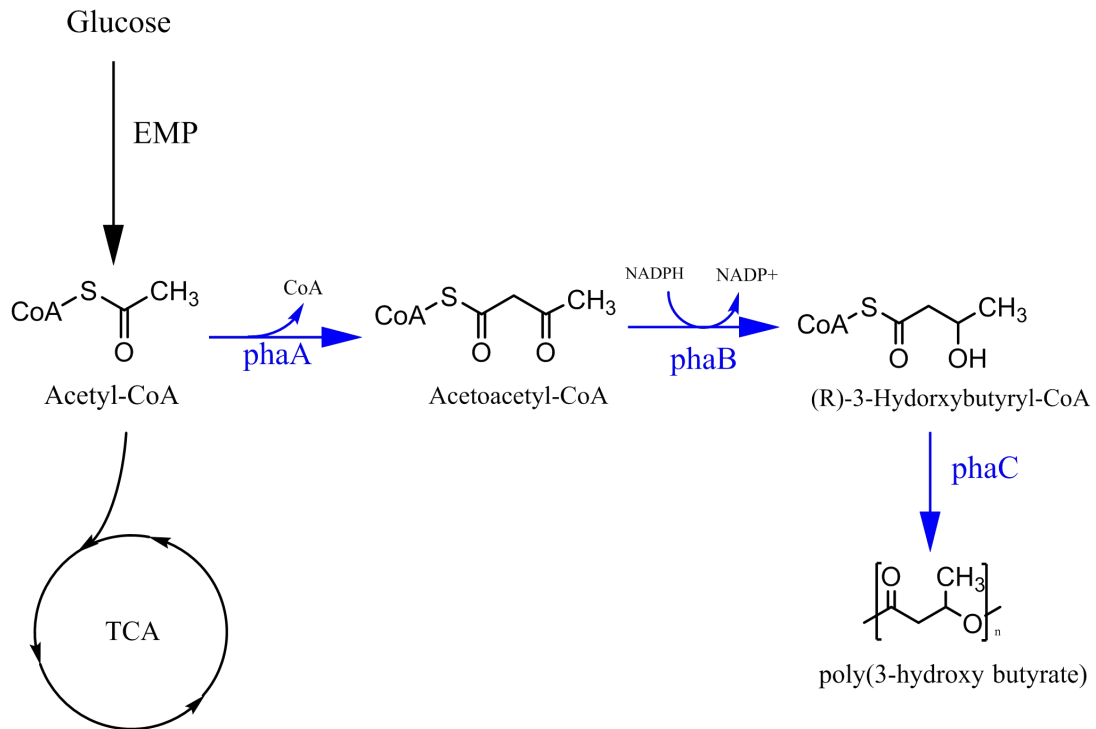


图 1.1 PHB 合成途径

Fig. 1.1 Pathway of PHB synthesis

产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus*、罗氏真养菌 *Rhodospirillum rubrum*、重组大肠杆菌 *Escherichia coli* 等是目前具有商业应用价值的菌株，这主要出于培养原料、产物提取等生产成本的考量。在生产菌株的生产性能上，广泛产碱菌 *Alcaligenes latus* 在蔗糖底物中培养的产物产率最高达到了 4.94 g(L.h)^[20]，在生产菌株中达到相当高的标准。在利用重组菌生产 PHB 的应用中，转基因大肠杆菌是重要的工程菌种，也是当今研究的热点^[16-19]。魏国清等利用重组大肠杆菌工程菌 PHB 发酵得到 8.24 g/L 产物，含量达到总干重的 84.6 %^[21]。清华大学陈国强实验室在海水中培养的一系列嗜盐菌中经过代谢工程改造后得到 PHB 最高占干重 92 % 的高产菌株^[22-27]。

对 PHB 产物的提取是工业生产的重要部分。目前主要的 PHB 提取工艺分别为：萃取法、水相法、酶法以及机械破碎法^[28]。水相分离法中的次氯酸盐法是研究最早、报道最多的 PHB 提取方法，主要原理是利用次氯酸钠消化非 PHB 的物质，但也有易分解产物和降低产物分子量的缺点^[29]。在工业的产物提纯上，提纯过程中的溶剂和设备费用增加了产品的成本。工业上提纯最有效的方法是使用氢氧化钠等廉价的化学试剂，但这类方法对于菌体要求较高，需要 PHB 含量较高且易于破碎。PHB 的检测及分析技术不断的改进和创新^[30,31]，其中 PHB 的定性检测方法主要包括染色法、红外光谱法^[32]、核磁共振法等。在对产物的定量上常采用液相色谱、质谱仪以及质量分析等方法^[33-37]。在发酵生产中，生产菌株受不同培养环境的碳氮比^[38,39]、磷、pH、溶氧^[40]等因素的影响，提高菌株生产 PHB 的能力、改变细胞状态使其更利于后续的提纯以及增强菌株对于多种原料的利用能力是现在生产菌种需要解决的问题。

工业发酵生产 PHB 所使用的原料成本对于产品的生产成本有着很大的影响, 因此, 寻找更为廉价的碳源是工业生产重要的考量因素。PHB 生产使用的主要碳源有除了糖类碳源外还包括一些醇和有机酸类。陈国强^[41]等人在利用重组大肠杆菌以废糖蜜等作为碳源生产 PHB 上有较好结果, 得到的细胞干重达到 200 g/L, 其中得到 80 % 含量的 PHB 产物。而刘双江在需钠弧菌 *Vibrionatriegens* 合成 PHB 上^[42], 得到了占细胞干重的 28.4 % 的产物。在使用非糖类碳源方面, 甲醇作为一种脂肪醇是一种最便宜的基质, 低廉原料成本有利于降低产品成本, D. bourque^[43]利用甲醇培养甲基杆菌 *Methylobacterium* 得 25-30 % 干重的 PHB。ueda^[44]在限氮条件下利用甲醇和正戊醇培养脱氮副球菌 *Paracoccus denitrificans* 和甲基杆菌 *Methylobacterium* 合成共聚物 PHBV, 其中脱氮副球菌生产共聚物中的 HV 单体最高含量达到 91.5 %。此外, 利用脂肪酸作碳源也有很多报道。高海军^[45]等人以丙酸、丁酸、戊酸作碳源培养真养产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus* ATCC176967 原始菌株 25 h 发现, 得到的细胞干重达 13.65 g/L, PHB 含量达到 67 %。L.Anaylor^[46]利用天然的玉米油生产 PHA, 发酵得到的菌体干重达到 200 g/L 其中 PHA 含量达 67 %。

1.2 烃类化合物

化石燃料作为一种不可再生资源如今正在快速消耗, 因此人类社会日益增加的能源需求与这一现状产生了较大矛盾。在这样的时代背景下, 利用可再生资源来生产生物燃料以及油类化学品的需求较大, 这推动了生物燃料的发展生产。工厂在以化石燃料为原料生产油类燃料以及工业化学品时会产生大量的环境污染物, 产生严重的环境问题。与此相比生物燃料有良好的可持续性且更有利环境保护。

烃类化合物是化石燃料的重要组成部分, 与其他燃料相比, 其具有高能量密度、高燃烧效率以及低吸湿性等优点。依照化合物碳原子数不同, 烃类分为短链烃 (C2- C5)、中链烃 (C6- C12)、长链烃 (C13- C22) 以及超长链烃 (C23- C32)。而不同碳链长度的烃类也有不同的功能。典型的油类燃料如汽油的主要组成部分是碳链长度 4-10 的部分中链及长链烃, 而柴油以及航空燃油的主要成分是碳链长度为 8-18 的中链烃和长链烃^[47]。此外, 碳链长度较大的部分长链烃以及超长链烃主要用于油类化学品的生产, 如制造乳化剂、润滑油等产品。在石油化工中, 烃类化合物主要以原油为原料进行蒸馏提取获得。对于重质原油则需要进行催化裂化以及加氢裂化处理进一步提取出其中的烃类。要加工成汽油、柴油以及航空燃油等燃料还需进行硫、氮等元素的脱除处理^[48]。利用化学或生物方法直接合成的烃类化合物不仅具有较高的选择性, 在生产过程中也大大减少了温室气体的排放, 在最近几十年备受关注。

生物燃料发展至今已有很多生产工艺大致为: (1) 利用煤炭、天然气等为原料, 通过气体费托合成法^[49]在高温高压的反应条件下进行煤炭液化, 生产烃类等液体燃料。费托合成法生产的烃类纯度较高, 并且不含硫氮等杂质, 可以生产航空燃料^[50]。这种方法有效利用了煤炭、天然气资源, 但是其也有生产中需要维持高温高压、产品的选择性

较低以及生产成本高的缺点^[51]。(2)以油料作物如大豆、棕榈油等为主要原料,首先进行油脂提取,然后通过加氢裂解脱氧或直接脱羧生产烃类燃料。加氢脱氧法^[52]作为目前最成熟的生产工艺,利用从油料作物中提取的脂肪酸或甘油三酯,与氢气进行加氢反应,脱去其中的氧。后续还可进行进一步的加氢反应,使烃类化合物裂解以及支链化^[53],用以生产短链烃以及支链烃。而脱羧法也是以油料作物中提取的脂肪酸以及甘油三酯为原料,采用金属离子催化剂在水热环境下进行脱羧反应,其中脂肪酸脱去羧基、甘油三酯脱去羰基生成直链烃以及一氧化氮二氧化碳。脱羧法具有成本低、工艺简单以及产物选择性高的特点,是目前备受关注的生物燃料生产方法^[54]。但是采用粮食作物作为生产原料与以生物质为原料生产生物燃料的工艺相比收到原料和成本的限制。(3)以海藻、含油酵母等含油生物质为原料,通过裂解法,制成烃类燃料,分为高温裂解和催化裂解^[55]。高温裂解法需 1000℃左右的高温环境,裂解产物存在选择性低的问题,生产成本也较高。与此相比,催化裂解法利用金属离子催化剂催化^[56]生物质,转化成生物燃料,替代了高温裂解的高温环境。催化法有着选择性高、温度低以及速度快的优点。裂解法直接利用含油微生物等生物质为原料,有更好的可持续性且避免了环境污染。但是这类方法需要含油量较高的生物质作为原料,并且裂解完成后产物较复杂,需要进一步分离提纯。(4)利用秸秆、蔗渣等含糖生物质为原料,经过生物质水解以及微生物发酵,生物合成得到生物燃料。以水解后的含糖生物质为原料,通过能源微生物进行醇与烃类的发酵生产^[57],从而得到烃类化合物。通过生物发酵得到脂肪醇还需要进行后续的脂肪醇脱水、聚合以及加氢的处理。直接通过微生物合成烃类化合物是目前研究的热点,在胞内以脂肪酸或合成脂肪酸的中间代谢物为底物,通过生物产烃途径直接合成,实现了从糖类到烃类的直接转化^[58]。

利用发酵生产烃类的生产方式在目前受到较大关注。藻类、真菌、细菌等微生物均能天然合成烃类^[59]。诸如布朗葡萄藻 *Botryococcus braunii*、细长聚球藻 *Synechococcus elongates*、灰色念珠藻 *Nostoc muscorum* 等藻类以及一些霉菌、酵母也被发现可以合成烃类,如霉菌的粉红粘帚霉 *Clonostachys rosea*^[58]、树脂枝孢霉 *Amorphotheca resiniae*^[60]等,酵母中有巴斯德汉逊酵母 *Debaryomyces hansenii*^[61]等。在细菌中,发现如藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*^[62]、弗尼斯弧菌 *Vibrio furnissii*^[63]、硫酸盐还原细菌 *Sulfate-reducing bacteria*^[58]等细菌也存在烃的合成途径。通过生物发酵,我们可以有效利用产烃微生物进行烃的生产。在天然的产烃微生物中,烃类作为一种代谢产物,在胞内主要参与细胞壁的合成,而在胞外主要参与荚膜^[58]的形成。微生物合成法和其他合成方法相比具有一些优势:(1)微生物可以利用自然界广泛存在的生物质资源进行发酵生产,具有很好的可持续性;(2)微生物发酵可以实现糖类到烃类的直接生产,省去了工业生产中的复杂步骤,能有效减少环境污染;(3)烃类的生产菌株不仅可以利用天然的产烃微生物,也可以利用分子生物学手段在一些不产烃的模式菌株中引入烃的合成路径,更好地适应工业生产。还可以针对产烃路径进行改造,实现生产特定种类的烃类产物,更好地满足工业需求^[64]。

微生物合成烃类的主要产物主要分为直链烃、支链烃以及非甲烷类烃^[58]。支链烃产物在藤黄微球菌 *M. luteus* 中比较常见，主要通过头头缩合的方式合成，一般利用脂肪酸代谢的中间代谢物为前体，得到两倍长度的支链烃。非甲烷类产物主要是异丙酮、异丁烯以及乙烯等。最为常见的烃类产物是直链烃类化合物，其主要合成途径为延伸脱羧（Elongation-decarboxylation）^[65]和头头缩合（Head-to-head condensation）^[66]两类。因此烃的合成与脂肪酸^[67]息息相关。与脂肪酸合成代谢相关的烃合成途径有三类，分别为脂肪醛脱羧基、脂肪酸脱羧^[68]以及头头缩合。

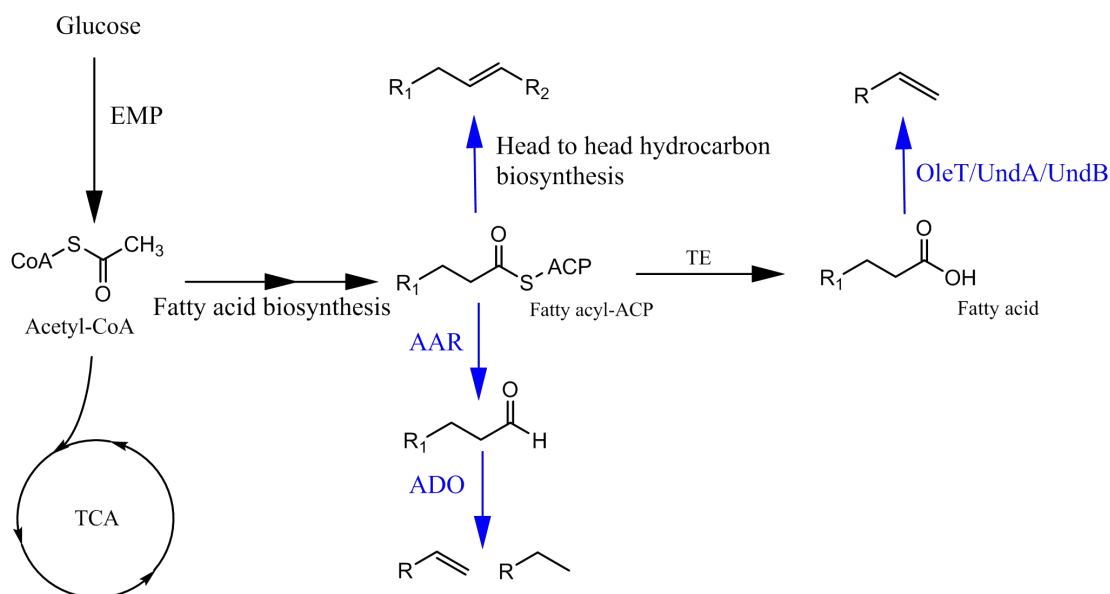


图 1.2 脂肪烃合成途径

Fig. 1.2 Pathway of alkane/alkene biosynthesis

(1) 脂肪醛脱羧基

利用脂肪醛脱羧基合成烃类存在于大多数产烃生物中，是最为典型的产烃合成途径。烃的合成一般以脂肪醛为底物，经过醛脱羧酶 ADs（Aldehyde oxygenase）的催化脱去一个羧基，生成烃以及 CO₂ 或 CO，醛脱羧酶的来源较为广泛，在植物、昆虫、蓝藻细菌及其他微生物^[69]中都有发现。其中，植物中的醛脱羧酶如来自拟南芥的 CRE 主要催化碳链较长的脂肪醛，生成 C₂₇、C₃₁ 等超长链烃，用以植物枝叶保持水分^[70]。昆虫中的 CYP4 G1 也是比较典型的醛脱羧酶，这是一种 P450 酶^[71]，也能催化碳链较长的脂肪醛。将果蝇 CYP4 G1 和动物 p450 还原酶的 CRP 的基因一同导入酿酒酵母细胞中^[69]，在产物中检测到 C₂₃、C₂₅、C₂₇ 的超长链烃。微生物中来自蓝藻的醛脱氧氧合酶 ADO 也能够催化脂肪醛合成烷烃，烃类产物主要是中链以及长链的烃。脂肪醛脱羧基合成烃需要大量脂肪醛的供给，因此能天然合成烃的生物一般还有从脂肪酸代谢中合成脂肪醛的分支路径。目前研究发现脂肪醛的供给可来自脂酰-ACP、脂酰-CoA 以及脂肪酸。Cao^[72]等利用来自蓝藻的脂酰-ACP 还原酶 AAR（Long-chain acyl-reductase）还原成脂肪醛；choi^[71]等以脂肪酰基 CoA 为底物，利用来自乙酰丁酸梭菌的脂肪酰基 CoA

还原酶 ACR (Fatty acyl-CoA reductase) 催化得到脂肪醛; 来自发光杆菌的 FAR 蛋白复合体^[73] (由 luxCDE 组合而成)、海鱼分支杆菌中的羧酸还原酶 CAR (Arboxylate reductase)^[74]以及水稻的 DOX^[75]这类脂肪酸单加氧酶都被发现能够催化脂肪酸生成脂肪醛。Choi 和 Lee^[71]等人利用来自蓝藻 AAR 与 ADO, 在大肠杆菌中构建产烃路径, 得到 580.8 mg/L 中长链烃。Lucie^[76]等在改造菌株 *Cupriavidus necator* Re2061-pMAB2 中表达 AAR 和 ADO, 得到总计 1.85 g/L 的烯烃烷烃产物。

(2) 脂肪酸脱羧

脂肪酸脱羧反应得到的产物主要是末端烯烃, 可用于洗涤剂、润滑油以及聚乙烯的生产。其中编码脂肪酸脱羧的酶的相关基因主要是 *OleT_{JE}*^[77]、*undA*^[78]以及 *undB*^[78]。*OleT_{JE}* 来自 *Jeotglicoccus species*, 是一种 CYP152 家族的 p450 酶, 能够利用过氧化氢提供的电子以及氧催化脂肪酸脱去羧基得到奇数碳链末端烯烃。最初的研究表明单加氧酶 *OleT_{JE}* 的催化活性必须依赖过氧化氢, 但后来在生物体内发现的催化辅因子系统如 RhF-Red、Fdr/ Fdx, CamAB 也能替代过氧化氢的作用。辅因子系统多为以铁离子为活性中心的铁氧化还原蛋白组合, 利用铁离子的价态变化传递电子。*OleT_{JE}* 的体外催化反应表明其活性完全依赖过氧化氢以及铁氧化还原系统。最近发现的来自溶酪巨球菌 *Macrococcus caseolyticus* 的 *OleT_{MC}*^[79]单加氧酶与 *OleT_{JE}* 有较高同源性, 体外反应表明其在无过氧化氢或辅因子系统的环境中依旧有催化活性, 而辅因子系统的添加可以提高其酶活。Liu^[80]等在大肠杆菌中表达 *OleT_{JE}* 基因, 得到 97.6 mg/L 的末端烯烃; Jong^[79]等利用大肠杆菌表达 *OleT_{MC}* 获得了 49.64 mg/L 的末端烯烃。*OleT_{JE}* 以及 *OleT_{MC}* 的催化产物分析表明其对 C12 至 C18 的脂肪酸催化活性较高。*UndA* 和 *UndB* 是来自假单胞菌的单加氧酶, *UndA* 的底物主要是 C10-14 的脂肪酸, 而 *UndB* 有更广的底物谱, 为 C6-16 的脂肪酸。Rui^[77,78]等在大肠杆菌中分别表达 *undA* 和 *undB* 基因, 分别获得 6 mg/L 以及 55 mg/L 的单末端烯烃。

(3) 头头缩合

Ole-ABCD 是来自黄体微球菌的催化头头缩合的一系列酶。通过头头缩合的形式产生的烃类碳链长度一般是脂肪酸的两倍, 是一种长链的内部烯烃。*OleA*^[83]是一种硫解酶, 主要催化酰基-CoA 生成不饱和单酮, 酮基经过还原酶 *OleD* 消耗 NADPH 还原为氢氧根, 最后在依赖 AMP 的合酶 *OleC* 的催化下两分子头头缩合成一分子的内部烯烃。Beller^[81]等在大肠杆菌中表达 *Ole-ABCD* 基因, 获得了 40 μg/L 的内部烯烃。

许多天然产烃的微生物都存在烃的产量过低的问题, 其中大部分烃类产物小于细胞干重的 10%。也有个别菌株如布朗葡萄藻和弗尼斯弧菌的产量可达干重的 60%以上。利用天然产烃微生物进行发酵生产有较大的局限性, 因此, 将这些天然产烃路径导入到一些模式生物如大肠杆菌、酿酒酵母等细胞中, 并进行代谢工程改造是目前研究的热点。Kang^[82]等总结近年来烃合成途径研究的相关进展, 利用代谢工程改造的方式来提高烃的产量可以从以下几个方面考虑: 1. 可以促进烃合成前体的供给, 以脂酰-ACP 为前体时可以删除 *fadD* 基因, 减少脂酰-CoA 的供给; 当以脂酰-CoA 为前体时, 相关脱氢酶 *fadE*

可以促进前体积累；2. 阻断副产物路径，敲除 β 氧化途径以减少脂肪酸的消耗，在大肠杆菌中敲除醛脱氢酶 HFD1 可以减少脂肪醛流向脂肪醇；3. 增强合成路径，在 AAR 与 ADO 的产烃路径中，过表达 *ado* 或加入 *cer* 基因以增强合成途径，促进脂肪醛向脂肪烃的转化；4. 增强氧化还原系统与还原力供给，酶的催化活性是烃合成的主要限速步骤，额外供给 NADPH 以及导入相关合酶配套的辅因子系统可以有效增加酶活。

1.3 木质纤维素与生物炼制

工业的发展使得现代社会对无法再生的化石资源的需求剧增，而我国是一个高度依赖能源进口的国家。根据统计数据，我国在 2018 年石油总消耗约为 6.14 亿吨。而当年我国共进口 4.6 亿吨石油，约 75 % 依赖进口。但石油产品的生产使得环境污染加重，碳排放陡增。因此，为了减轻我国对进口能源的依赖，减少环境污染，寻求一种可以替代石油进行燃料以及化工产品生产的原料迫在眉睫。木质纤维素作为一类分布广泛、未被有效利用的含糖生物质资源，以此为原料生产生物燃料是较好的替代方案。木质纤维素主要来自农林产业副产物，是价格低廉、含量丰富的生物质。我国是一个农业生产大国，玉米、水稻以及小麦是我国种植最多的粮食作物。根据中华人民共和国统计局统计，在 2018 年，我国玉米种植面积达 42130.05 千公顷，水稻种植面积达 30189.45 千公顷，小麦的面积为 24299.19 千公顷，占我国耕地面积的 70% 以上。我国在 2018 年三大作物产量为 25717.39 万吨玉米、21213.9 万吨水稻以及 13144.05 万吨小麦，总计约 6 亿吨。粮食作物的生产带来大量的秸秆等木质纤维素生物质，根据玉米水稻小麦的草谷比粗略估算^[83]，我国每年至少有 8.8 亿吨以上的秸秆产生。粮食收获产生的秸秆多用来做动物饲料以及食用菌生产等。有相当一部分直接就地燃烧引起环境污染，未能有效利用。目前对生物燃料的研究中，纤维素原料是一种可靠且可持续供给的原料，其经过预处理后可进行生物柴油等生物燃料的生产，这在我国是一项具有很好应用前景的产业。

木质纤维素原料的主要组分是纤维素，而木质素和半纤维素含量随原料不同而不同，此外还含有少量蛋白质以及灰分，这些组分以特定方式结合构成了木质纤维素紧凑致密的结构，使其具有较强的生物顽抗性^[84]。纤维素是一种结构致密的聚合物，D-葡萄糖通过 β -1, 4 糖苷键连接构成，其晶体结构非常紧密，因此纤维素酶很难将其水解。半纤维素的组分较复杂由多种五碳六碳糖构成，如木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖以及半乳糖等以 β -1, 4 糖苷键连接形成，但结构强度上不如纤维素紧密。木质素是不溶于水的非糖聚合物，由 p-香豆醇、松柏醇和介子醇聚合而成且其聚合度较低，一般与纤维素一同组成植物细胞壁以增加植物细胞的强度、抵御纤维素酶的酶解^[85]。预处理能够将原料的糖类释放以用于后续发酵生产。

生物炼制步骤包括预处理、脱毒、微生物发酵以及产物提取纯化^[86]等。预处理环节作为最初也是最为重要的一步，主要用于破坏原料结构，使得后续纤维素酶更好和底物结合从而提升酶水解效率。目前的预处理方法多使用物理、化学试剂处理以及微生物降解等。物理法主要是利用物理方法如机械粉碎、辐射处理等破坏原料的晶体结构，常用

方法有机械粉碎、辐射处理、热水处理^[87]等。生物法则是利用能够合成相关纤维素酶的微生物如软腐真菌等对纤维素原料进行酶解处理,降低原料的聚合度。物理化学法则是采用物理手段和化学手段相结合的方式破坏纤维素结构,常用的方法有蒸汽爆破、氨纤维膨爆以及微波处理^[88,89]等。化学法则是利用化学试剂如酸碱和过氧化物等氧化剂、有机溶剂等将木质纤维素中的一些组分溶解分离。稀碱预处理法利用通过溶解木质素使木质纤维素结构强度降低,更为蓬松,有利于后续糖化过程中纤维素酶更好的结合酶解,并且预处理之后的物料抑制作用较弱,有利于发酵菌株生长。但该处理法对于原料破坏程度不彻底,影响了后续糖化效率。与此相比,稀酸预处理法则更有优势,利用稀硫酸对原料进行处理,使得原料中的半纤维素水解成单糖。酸预处理法能更好地水解半纤维素,是具有很好的应用于工业生产前景的方法。但是一般的稀酸处理也有如会产生大量废水、会损的糖类,产生的抑制物较多以及对反应器腐蚀较大等问题^[90]。本实验室开发的干式稀酸预处理^[91]是针对酸处理法的主要缺陷进行改良的处理技术。干式稀酸预处理法是在反应器中将少量稀硫酸与物料混合并通入过热蒸汽并充分搅拌的预处理方法。这种处理方法大大降低了水、蒸汽以及酸液的用量,实现了零废水排放,具有很好的应用价值^[91]。

在预处理的过程中,高温高压使得一些组分过度分解产生了较多抑制物。因此,预处理后的物料还需对其中的抑制物进行脱除处理,这一过程称为脱毒。预处理的抑制物主要分为呋喃醛、酚类和有机酸类三种。典型的呋喃醛类抑制物是糠醛和 5-羟甲基糠醛^[92],由预处理得到的戊糖与己糖在预处理的高温酸性条件下脱水产生。这类抑制物能通过抑制微生物酶活,使其生长缓慢,增加发酵菌株的延滞期,不利于发酵生产。抑制物主要包括香草醛、丁香醛等,由木质素的过度分解产生。这些抑制物能够协同抑制发酵菌株,具体体现在降低代谢酶活、降低胞内 PH 以及对破坏细胞膜等。脱除抑制物方法可分为物理脱毒法(吸附、水洗)、化学脱毒法(碱化处理)以及生物法(微生物和相关酶处理)。物理和化学脱毒法会产生大量废水及损失物料的糖类,因此生物脱毒法有着独特的优势,是当今研究的热点。本实验室在对生物脱毒法的研究中分离得到一株树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1^[93],这是一株能够降解烃类的煤油真菌,其能够优先利用无氧中的抑制物,保留绝大部分糖类。该脱毒菌株能够在固态物料中快速生长,与传统的液态脱毒有较大优势且避免了废水的产生。本实验室针对树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 开发了静态脱毒和快速脱毒两种固态脱毒法。快速脱毒法是在特定反应器中通气,利用螺带桨搅拌实现快速脱毒,节省了脱毒时间。

经预处理和脱毒后的物料还需糖化即将纤维素水解以释放其中的可发酵糖的过程。糖化过程使用的纤维素酶主要包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡糖苷酶三种。纤维素酶中内切葡聚糖酶主要作用于纤维素长链内部,将长链纤维素水解成具有还原末端的短链纤维素;外切葡聚糖酶则自末端得到纤维二糖;水解得到的纤维二糖经 β -葡糖苷酶酶解成葡萄糖单体。糖化与发酵过程一般分为分步糖化与发酵和同步糖化共发酵两类。分步糖化与发酵将糖化和发酵分开,在不同反应器中进行,因此,能够保证糖化与

发酵能够在各自适宜的 PH 环境下进行。但这种方式在高固含量物料情况下，容易因高浓度的反应底物或产物使得纤维素酶活下降，影响糖化效率，造成糖化时间过长或纤维素糖化不彻底，无法充分利用纤维素原料中的可发酵糖，造成浪费。同步糖化共发酵中糖化与发酵同时进行，经过短时间预糖化后直接进行发酵，反应在同一反应器中。这种发酵方法通过预糖化部分释放物料中的糖，在发酵过程中继续通过纤维素酶缓慢水解，缓解了高糖浓度对酶活的抑制作用，缩短了糖化与发酵的整体时间。同步糖化共发酵在糖化液中直接进行发酵，在高固含量情况下搅拌是影响酶水解效率的关键因素，因此本实验室采用自主设计的螺带桨促进高固含量物料与纤维素酶的结合，提高酶解效率。在生物炼制过程中，使用木质纤维素原料发酵结束后一些发酵产物还需进行对发酵醪固液分离，再进行产物提取。高固含量物料进行同步糖化共发酵后发酵醪较为粘稠，固液分离较困难。本实验室针对这一现象开发的短时间内高温处理可有效进行固液分离，降低了产物分离的难度，使生物炼制更符合工业生产需求，具有很好的前景。

1.4 谷氨酸棒状杆菌与木质纤维素生物炼制

谷氨酸棒状杆菌是一株能够快速生长的好氧菌株，经改造后可用于生产氨基酸类及乳酸等产品。同时，该菌株属于 GRAS^[94]菌株，具有较高的安全性，因此也被应用于食品工业以及生物材料的原料生产。组学和合成生物学的研究让微生物的代谢工程改造更加容易。谷氨酸棒状杆菌作为较常用的工业生产菌株经过代谢工程改造可以生产许多生物基产品，如生物柴油、生物材料和生物基化学品^[95]等。生长快、醛类抑制物耐受性强、易于代谢工程改造等优点使得谷氨酸棒状杆菌在生物炼制上具有很大的应用潜力。

木质纤维素原料在经过干式稀酸预处理时会过度分解产生大量醛类酚类抑制物。在之后的快速脱毒步骤，完全脱除抑制物会损失物料中部分糖类，并且也会大幅延长脱毒时间，不利于工业化生产。因此，一般在脱毒步骤，物料中抑制物一般有少量残余。对抑制物有良好耐受性的菌株更适合在木质纤维素体系中生长发酵。谷氨酸棒状杆菌对于醛类酚类抑制物有较高的耐受性，能够在一般木质纤维素原料中数倍的抑制物浓度下正常生长，与其他发酵菌株相比较适合生物炼制^[96,97]。谷氨酸棒状杆菌中相关醇脱氢酶 ADH 和醛脱氢酶 ALDH 能够催化抑制物中的呋喃醛和酚醛类变成呋喃醇、酚醇，最终转化成呋喃酸和酚酸这类低毒物质，并进入中心碳代谢完全分解。在各种糖类的利用上谷氨酸棒状杆菌也具有很大的潜力，原始菌株虽然不能利用原料中的木糖、阿拉伯糖等，但其具有较弱的葡萄糖效应，这为以后导入其他糖类的代谢途径提供了较好平台。目前对于谷氨酸棒状杆菌的木糖代谢改造使得该菌株能够有效利用纤维素原料中的木糖生产谷氨酸、赖氨酸的产品。

谷氨酸棒状杆菌作为的发酵菌株除了氨基酸产品，经改造合成其他生物基产品的应用也很多。目前的报道中谷氨酸棒状杆菌重组菌可以生产氨基酸衍生物^[98]（谷氨酸、羧基丁酸、精氨酸等）、生物燃料（油脂、乙醇等）、生物材料（酯类酸类等共聚合物）等。谷氨酸棒状杆菌能够在脱毒物料中糠醛、HMF、芳草醛、丁香醛等主要醛类抑制物

协同抑制作用下正常生长，且耐受性能达到一般浓度的几倍，在生物炼制中有良好的适应性，在生物基产品的生产上有很大优势。

1.5 本课题的研究内容与意义

我国是一个农业大国，每年会产生大量的农业废弃物，如何有效利用这些生物质资源、减少处理废弃物的成本是值得思考的问题。而利用生物质资源生产生物基产品，替代石油原料生产化学产品是目前的研究热点，用木质纤维素原料生产生物燃料、生物材料等生物基产品能够很好利用农业废弃物变废为宝，也为工业发酵生产提供了新的原料。本实验室开发的干法生物炼制技术能够很好利用木质纤维素原料，转化为可发酵糖用于发酵生产，目前在生产乙醇、乳酸、谷氨酸、氨基丁酸等生物基产品有一定进展。目前在利用木质纤维素生产 PHB 以及烃类产品应用较少。原料成本对于产品的生产成本有着很大的影响，寻找更为廉价的碳源是工业生产重要的考量因素。因此利用木质纤维素这一来源丰富、成本低廉的含糖生物质在工业发酵生产上有巨大潜力，这将有利于降低 PHB、烃类等生物产品的生产成本，有很好的应用前景。

本研究选用 *C. glutamicum* S9114 为出发菌株进行代谢工程改造，该菌株在本实验室干法生物炼制的木质纤维素水解体系中有很好的适应性，对酚类、醛类抑制物有较高的耐受性。该菌株在改造生产谷氨酸、赖氨酸、 γ -羟基丁酸等产物上均有较好结果，有很好的应用前景。本研究在 *C. glutamicum* S9114 中导入外源基因，以该菌株为底盘细胞构建相应的 PHB 合成途径和脂肪烃合成途径，实现 PHB 和脂肪烃的合成生产。

本论文的主要内容包括以下两个部分：

(1) 在 *C. glutamicum* S9114 中导入了来自 *Ralstonia eutropha* H16 的 *phaA*、*phaB*、*phaC* 三个关键基因，实现了。在提高 PHB 含量上，尝试从前体供给以及代谢本身的优化方面进行改造，也尝试了引入经过定向进化的关键基因以及相关辅助基因，最终使得 JH01 菌株的 PHB 含量较最初有较大提升。

(2) 在 *C. glutamicum* S9114 中构建脂肪烃合成途径，产物中检测发现超长链烃。本研究针对超长链烃的产生机制进行探究，推测可能与脂肪酸代谢和分枝菌酸合成代谢有关，并利用 qRT-PCR 进行解析。此外还对改造后发酵液中的大量脂肪酸进一步利用，导入脂肪酸脱羧酶进一步提升烃类产量。

第 2 章 代谢改造谷氨酸棒状杆菌生产聚 3-羟基丁酸

2.1 引言

以化石资源为原料生产的化工塑料制品在当今生产生活中应用广泛，但由于难降解的特点对目前环境压力很大。传统的化工塑料由于难分解且吸附性强，因而容易吸附有害物质污染环境，而进入食物链则危害动物和人类的健康。生物降解塑料作为新一代的塑料产品有着无毒无害且可被环境分解的优点。在各国限制使用化工塑料的政策环境下，生物塑料以其环境友好的优势被大力发展。生物塑料中的聚羟基脂肪酸酯（PHA）和聚乳酸（PLA）是目前主要的可降解塑料，其中 PHA 完全通过生物合成方式生产。PHB 作为典型的 PHA 类生物塑料在医疗材料、医药载体、食品包装和农业生产等领域有很好利用。但通过微生物发酵合成生物塑料的成本较高，其中生产原料占总成本的一半以上。利用木质纤维素原料生产 PHB 能够有效降低原料价格，是降低生物塑料价格、压缩生产成本的有效策略。我国作为农业大国每年有大量小麦、水稻和玉米收获，因此能够有效保障生产原料的供给实现可持续生产，还有效利用了我国的农业秸秆等生物质资源。

改造 *C. glutamicum* S9114 利用木质纤维素生产 PHB 较其他菌株有很大优势。谷氨酸棒状杆菌是一株能够很好适应干法生物炼制的菌株，有着生长良好、对抑制物有很好耐受性的优点。*C. glutamicum* S9114 存在大量的醛脱氢酶、醇脱氢酶，因此对干式稀酸预处理并脱毒后纤维素原料的酚醛类抑制物有很好的降解作用，对缩短生物炼制时间和产物生产周期有促进作用。在碳源利用方面，由于木质素原料中除了葡萄糖还含有木糖、阿拉伯糖、半乳糖等其他糖类，而谷氨酸棒状杆菌葡萄糖效应较弱，因此可以导入其他糖的利用代谢，实现多糖的同步利用。目前利用纤维素原料生 PHB 的研究较少，利用重组 *C. glutamicum* S9114 更有利于适应工业生产环境。相关报道有改造 *C. glutamicum* 生产乳酸和 PHA 的共聚物，这也为谷氨酸棒状杆菌生产性能更加优良的共聚物生物塑料提供了很好的基础。

本章中在 *C. glutamicum* S9114- Δ *ldhA1::xylAB* 中引入外源 PHB 合成途径基因，验证 PHB 生产。并对得到的重组菌株进行代谢上的改造以提高 PHB 含量，包括增加前体供给、PHB 合成基因表达强化以及代谢优化三种策略，以进一步提高 PHB 产量。

2.2 材料与方法

2.2.1 改造菌株

本章所用的原始菌株和经代谢工程改造的重组菌株在附录 III 表 1 中列出。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 作为宿主菌株用于重组质粒构 *C. glutamicum* S9114- Δ *ldhA1::xylAB* 是在 *C. glutamicum* S9114 基础上导入了木糖代谢途径，是本章整合基因的出发菌株。表达质粒

pH36 用于 *C. glutamicum* S9114 中过表达目的基因, 重组表达质粒在 *E. coli* DH5 α 中构建。质粒 pk18 用于 *C. glutamicum* S9114 中目的基因的敲除。质粒 pH36、pk18 含有卡那霉素抗性基因, 携带该质粒的重组菌株需要添加 50 mg/ml 卡那霉素母液保持质粒。

2.2.2 培养基及培养条件

本章使用的培养基配方有: (1) LB 培养基包括 (g/L): 酵母粉 (YE) 5、蛋白胨 10、氯化钠 (NaCl) 10; (2) 种子培养基包括 (g/L): 葡萄糖 30、磷酸二氢钾 1、硫酸镁 0.6、尿素 3、酵母粉 5、蛋白胨 10; (3) 发酵培养基: 葡萄糖 60、磷酸二氢钾 1、硫酸镁 0.6、尿素 3、酵母粉 5、蛋白胨 10。固体添加 2% 琼脂粉。

E. coli DH5 α 的培养: 菌种解冻后划线, 在 37 °C 培养箱中倒置培养 12 h, 之后挑取平板菌落接种至试管的 LB 中培养 12 h, 200 rpm, 37 °C, 以 10% (v/v) 接种量接种并培养 12 h 用以提取质粒。含抗生素的 LB 中需添加 0.1% (v/v) 50 mg/ml 卡那霉素母液。

C. glutamicum S9114 的培养: 取甘油管解冻后在 LB 平板上划线。30 °C 倒置培养 36 h, 接至 5 ml LB 接种单菌落, 200 rpm, 30 °C 培养 12 h。取 1 ml 菌液接至含 10 ml 种子培养基中, 200 rpm, 30 °C 培养 12 h, 以 10% (v/v) 接至 30 ml 种子培养基进行发酵种子液培养。培养抗性菌株时需加入 0.1% (v/v) 抗生素母液。

2.2.3 重组质粒构建

本章改造使用的质粒在附录 III 表 2 中列出, 重组质粒构建使用的引物以及构建重组菌株使用的验证引物见附录 III 表 2。改造重组质粒方法为标准方法。构建 PHB 的合成途径需要构建三个质粒, 分别为 pk18- Δ *ldhA*-*phaC*、pk18- Δ *pdh*-*phaA*、pk18- Δ *MscCG*-*phaB*, 构建质粒使用的 PHB 合成途径基因 *phaC*、*phaA*、*phaB* 基因片段由人工合成获得并添加 *peftu* 启动子。对于 *phaC* 的整合质粒, 利用 *ldhA*-up-F/R 与 *ldhA*-down-F/R 两对引物将基因组上位点上游下游的约 1000 bp 的同源臂扩增出来。对于扩增下来同源臂片段酶切处理, 上游片段利用 Xba I 和 Sal I 酶切, 而下游则使用 *pst* I 与 HindIII 酶切处理。此外, 敲除质粒 pk18 *mobsacB* 使用 Xba I 和 Sal I 线性化后先连接上下游片段得到敲除质粒 pk18- Δ *ldhA*。由于 *phaC* 片段上有较多酶切位点不适合利用酶切连接的方式, 因此先使用 Sal I 与 *pst* I 将质粒 pk18- Δ *ldhA* 线性化, 再通过无缝克隆的方式连接片 *phaC* 片段。对于 pk18- Δ *pdh*-*phaA* 的构建, 利用引物 *pdh*-up-F/R、*pdh*-down-down-F/R 将 *pdh* 的上下游同源臂片段从谷氨酸棒状杆菌基因组上扩增, 上游同源臂利用 EcoR I、BamH I 酶切, 下游同源臂通过 Sal I 与 *pst* I 酶切处理, *phaA* 使用 BamH I、Sal I 酶切, 利用 T4 连接酶依次连接至 pk18 *mobsacB* 质粒上得到 pk18- Δ *pdh*-*phaA*。此外, pk18- Δ *MscCG*-*phaB* 构建方法与 pk18- Δ *pdh*-*phaA* 相同。对于 *odhA* 基因, 利用软件计算该基因 RBS 位点的翻译起始速率, 通过软件设计 *odhA* 翻译速率为 0.1au 的 RBS 序列, 合成引物 *odhA*RBS0.1-up-F/R 和 *odhA*RBS0.1-down-F/R 直接从基因组上扩增合成上下游同源臂, 最后将 pk18 *mobsacB* 利用 EcoR I、BamH I 线性化后通过无缝克隆构建重组质粒。

对于表达质粒的构建, 使用的 pH36 质粒是利用 PTRCmob 质粒为原始质粒, 将其

中的 Trc 启动子替换为 H36 启动子得到。利用 PhaA-F/R、PhaB-F/R、PhaC-F/R 从合成片段扩增含 Sma I、Xba I 酶切位点的片段并酶切，将其整合至 pH36 的 Sma I、Xba I 位点，得到重组表达质粒 pH36-*phaA*、pH36-*phaB*、pH36-*phaC*，用于分别过表达这三个基因以增强合成途径。*aceE* 基因和 *fasR* 基因均通过引物 *aceE*-F/R、*fasR*-F/R 从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增，通过酶切连接的方式连接到 pH36 的 EcoR I / Sal I 位点，构建重组质粒 pH36-*aceE*、pH36-*fasR*。有关 NADPH 供给的相关基因包括 *sGDH*、*pntAB*、*udhA*，其中 *sGDH* 基因来自 *Gluconobacter oxydans*，利用 *sGDH*-F/R 引物自基因组扩增经 EcoR I / Xba I 酶切，连接至 pH36 相应位点，构建质粒 pH36-*sGDH*。*PntAB*、*udhA* 基因均来自 *E. coli* 基因组，构建方法与上述方法类似。*phaP* 基因则由人工合成。所有质粒构建完成经过质粒 PCR 及测序验证后使用。

2.2.4 重组菌株构建

本章使用的菌株主要是 *C. glutamicum* S9114，主要的质粒导入方式是电转化。平板挑取单菌落后接至 5 ml LB 中，200 rpm，30℃ 过夜，以 10% (v/v) 接至 30 ml LBG 感受态培养基中，其中 LBG 培养基是在 LB 的基础上额外添加了 3% 甘氨酸和 0.11% 吐温 80，LBG 中培养 5-6 h 后取出转至 50 ml 离心管中，置于冰上 15 min。完成后离心管需 5000 rpm，4℃ 离心 10 min 后去除液体，之后加原先等体积 10% 甘油吹打重悬离心两次，最后加入预冷甘油进行重悬处理得到感受态。

感受态细胞取 60 μl 加至 1 ml EP 管，之后加 20 μl 质粒吹打，将 EP 管放置冰中 30 min 备用。本实验室电转化仪器是美国伯乐电穿孔仪 Genepulser Xcel I，电转条件是：2.0 kv、200 Ω、25 μF。电击杯冷却后将感受态细胞混合液加入在电穿孔仪中电转，之后转移至灭菌的 EP 管中并加入 800 μl SOC 培养基，将 EP 管在 46℃ 条件下处理 6 min，放冰上 2 min，最后在 200 rpm、30℃ 培养 2 h。其中 SOC 培养基是在 LB 基础上加入 20 mM 葡萄糖、10 mM MgCl₂、2.5 mM KCl、0.05% NaCl、2% 蛋白胨以及 0.5% 酵母粉。培养完成后取适量菌液在抗性板上涂布培养 48h 以上。

对于导入重组表达质粒的菌株，通过挑取抗性板上的菌落利用 pH36-F/R 引物菌落 PCR 验证重组质粒是否导入至宿主菌中。而对基因的敲除则使用 pk18 重组质粒，利用该质粒上的 *sacB* 的同源双交换方法进行特定位点基因的敲除与替换。基因的敲除与替换需要两次重组验证。首先挑取验证成功单菌落，以一次重组验证引物和质粒自带 pk18-F/R 组合进行一次重组，验证成功的菌株即进行了一次重组交换。二次重组主要利用整合菌株无法利用蔗糖生长的特点进行筛选。一次重组成功的菌株在 LB 中过夜培养使其发生二次重组，菌液按梯度稀释涂布在蔗糖抗性板上。在二次重组验证中，蔗糖板上生长的单菌落易出现假阳性，因此需挑取单菌落在抗生素抗性板与蔗糖板上进行点板对照。无抗性的菌落进行菌落 PCR，验证后通过测序验证后完成重组菌株构建。

2.2.5 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 发酵

首先对 *C. glutamicum* S9114 或重组菌株在平板上划线，并 30℃ 倒置培养 48 h 备用。挑取生长好的菌落接入 10 ml 种子培养基中预培养，200 rpm，30℃ 培养 12 h，接下来

按 10% (v/v) 接入 30 ml 种子培养基中进行种子扩培, 培养 12 h 后得到发酵种子液。其中种子培养基成分见 2.2.2。培养前需用 5 M NaOH 与 PH 试纸控制培养基 PH 在 7.0 左右。

此外还需在培养基中加入硫酸镁与尿素母液, 温度为 30℃, 转速为 200 rpm, 接种量为 10% (v/v)。发酵中使用 5 M NaOH 调节 PH 维持 7.0 左右, 每 6h 调节一次。含抗性质粒菌株需添加卡那霉素以保持质粒。在发酵过程中定时取样, 观察其糖耗与生长情况, 每组实验均需进行重复实验。

2.2.6 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的提取与检测

发酵完成得到菌体在烘箱烘干 12 h。将干燥的菌体测定质量后捣碎研磨并取 100 mg 左右样品转移至 5 ml 带塞试管中, 加 1 ml 浓硫酸, 密封塞口并置 100℃ 反应 30 min 使菌体酸解。酸解后得到的混合物混匀后稀释 100 倍, 稀释后的液体经滤膜过滤后得到样品。PHB 浓度测定采用外标法, 将不同质量的 PHB 颗粒按上述方法酸解, 通过液相测定得到标准曲线。

在上述酸解过程中 PHB 颗粒与硫酸反应生成丁烯酸, 利用液相测定丁烯酸浓度可得到菌体中 PHB 的含量与浓度。液相采用岛津高效液相色谱 (Aminex HPX-87H), 检测器为 RID-10A 视差折光检测器, 流动相为 5 mM H₂SO₄, 流速为 0.6 ml/min, 柱温为 65℃, 进样量 20 μl。

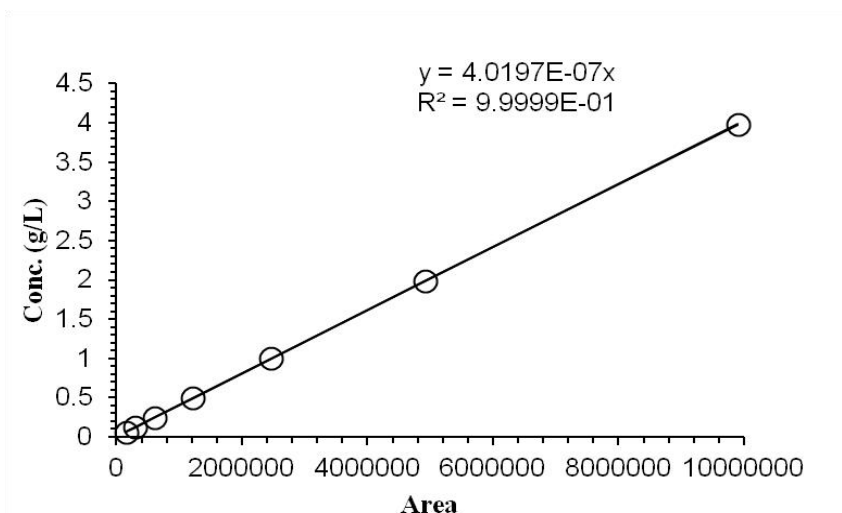
2.2.7 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 含量测定

对于酸解后得到的丁烯酸, 我们通过液相色谱测定浓度来确定 PHB 浓度。细胞 PHB 含量计算公式如下:

$$\text{PHB content} = \frac{K \times S \times V \times A}{1000 \times m} \times 100\%$$

其中 K 为丁烯酸的也想标准曲线斜率, S 为 PHB 酸解后的液相读数, V 为酸解体积, A 为酸解后的稀释倍数, m 为酸解所用的菌体干重。

丁烯酸液相标准曲线:



2.3 结果与讨论

2.3.1 *C. glutamicum* S9114 中 PHB 路径构建

天然的 *C. glutamicum* 中没有合成 PHB 的相关代谢，因此引入外源基因进行合成途径构建。而 *Ralstonia eutropha* 的 PHB 合成途径在其他菌株中异源表达有较好应用。因此本研究在 *C. glutamicum* S9114 中导入来自罗氏真养菌 *R. eutropha* H16 的三个关键基因 *phaA* (H16_RS07135)、*phaB*(H16_RS07140)、*phaC*(CH16_RS07145)，构建该菌株 PHB 合成代谢途径。这三个基因经过早期实验验证，以 *peftu* 作为启动子有最好的表达效果。因此在后续实验中这三个关键基因片段分开表达时，均通过酶切连接方式自带该启动子。将三个基因通过酶切连接得到合并片段 *phaCAB*，且合并片段共用一个 *peftu* 启动子，构建表达质粒 pH36-*phaCAB*。首先在 *C. glutamicum* S9114 中导入表达质粒 pH36-*phaCAB*，得到重组菌株 *C. glutamicum* S9114-pH36-*phaCAB*。经过菌落 PCR 验证质粒基因完整性，并通过发酵实验验证该基因能否正常表达。发酵结果表明表达 *phaCAB* 基因能够正常合成 PHB，因此之后进行三个基因的基因组整合工作。

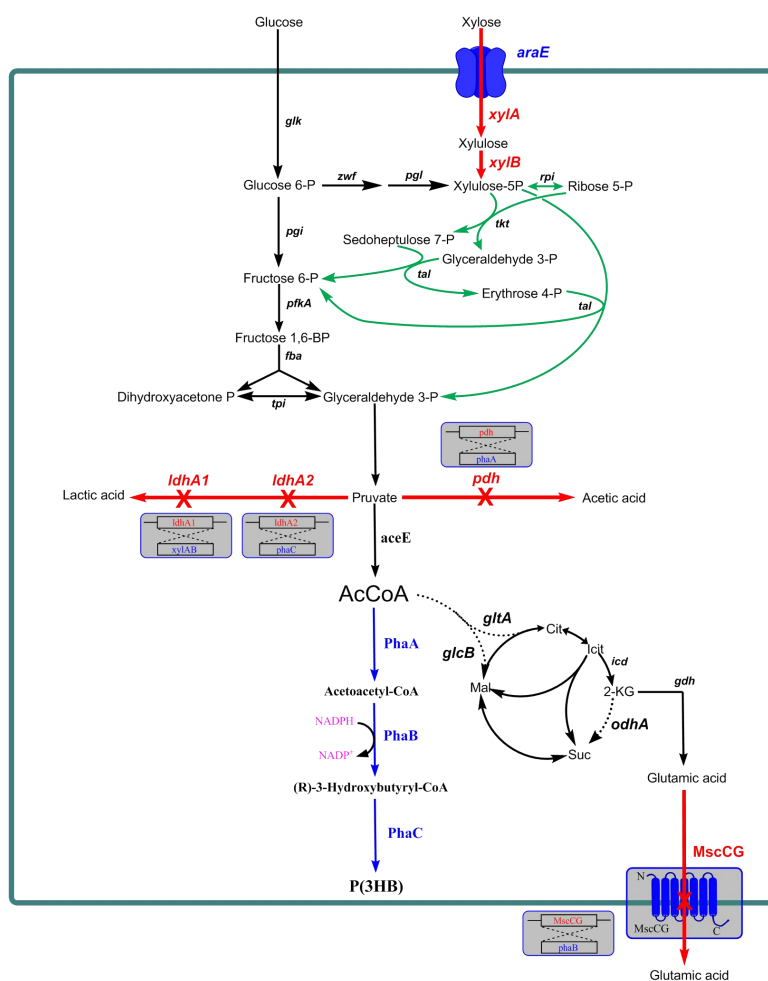


图 2.1 *C. glutamicum* S9114 中合成 PHB 的改造策略图

Fig. 2.1 Diagram of the engineering strategy for PHB production in *C. glutamicum* S9114

我们在原始菌株的基础上选取了整合了木糖代谢的改造菌株 *C. glutamicum* S9114- Δ *ldhA1::xyLAB*, 以此为基因整合的出发菌株。在整合过程中发现大片段基因整合困难, 因此将三个基因分别整合至基因组三个位点。如图 2.1 所示, 利用重组整合质粒 pk18- Δ *ldhA1-phaC*、pk18- Δ *pdh-phaA*、pk18- Δ *MscCG-phaB*, 通过同源双交换的方式敲除了菌株基因组上的 *ldhA1* (编码乳酸脱氢酶)、*pdh* (编码乙酸激酶)、*MscCG* (编码谷氨酸转运通道蛋白) 三个基因, 在相应位置分别插入了 *phaA*、*phaB*、*phaC* 三个基因, 得到能够利用葡萄糖和木糖合成 PHB 的重组菌株 JH01。

表 2.1 *C. glutamicum* S9114 重组菌株发酵生产 PHB

Table 2.1 PHB fermentation of *C. glutamicum* S9114 recombinant strain

Strain	Carbon source	PHB content(%)	PHB titer (g/L)	Dry weight(g/L)
<i>C. glutamicum</i> S9114	glucose	0	0	8.29±0.10
<i>C. glutamicum</i> S9114-pH36- <i>phaCAB</i>	glucose	3.81±1.43	0.23±0.06	6.12±0.34
<i>C. glutamicum</i> JH01	glucose	3.92±0.14	0.33±0.02	8.36±0.16
<i>C. glutamicum</i> JH01	xylose	2.91±0.55	0.51±0.07	17.60±0.44

发酵条件: 30 °C, 200 rpm, PH 7.0, 10 % (v/v), 30 ml 玉米浆发酵培养基/250 ml 摇瓶, 其中木糖与葡萄糖初糖浓度均为 60 g/L

表 2.1 中发酵结果发现, 对照组 *C. glutamicum* S9114 在发酵过程中没有 PHB 积累, 而 *C. glutamicum*S9114-pH36-*phaCAB*、JH01 均有 PHB 产生。JH01 存在木糖利用途径, 因此也在木糖发酵培养基中进行 PHB 发酵测试。在发酵培养基中培养 48 h 后, 得到 PHB 产量分别为为 0.23 g/L、0.33 g/L、0.51 g/L, PHB 含量 (m/m) 为 3.81 %、3.92 %、2.91 %, 在以葡萄糖为碳源时, JH01 菌株和 *C. glutamicum* S9114-pH36-*phaCAB* 在 PHB 含量上相差不大, 均接近 4 %, PHB 相关基因在整合至基因组上后未对菌株产生负面影响。

在生长情况上 *C. glutamicum* S9114-pH36-*phaCAB* 获得的菌体干重和 *C. glutamicum* S9114、JH01 相比较低, 生长受到一定影响, 因而 PHB 产量略高。表 2.1 的干重数据显示, 木糖对 JH01 的生长具有促进作用, 菌体干重达到 17.6 g/L, 是利用葡萄糖发酵得到干重的两倍以上。

基因的不同表达方式也未有明显区别。发酵结果表明, 在质粒上表达合并基因片段 *phaCAB* 和分别在基因组上表达三个基因得到的细胞 PHB 含量相差不大。由于表达质粒 pH36 在 *C. glutamicum*S9114 中具有较高拷贝数, 因此 *C. glutamicum* S9114-pH36-*phaCAB* 中三个基因应当有比 JH01 更高的表达量。分析原因是质粒上的三个基因通过 RBS 序列连接为一个大片段并共用 *peftu* 一个强启动子, 这种表达方式会降低表达效率, 在拷贝数上有一定影响。

2.3.2 发酵培养基中的玉米浆替代

由于 *C. glutamicum* S9114 在高生物素条件下谷氨酸积累受到限制, 因此在生产非谷氨酸产物时需要维持高生物素浓度以抑制谷氨酸代谢。最初的发酵培养基添加了大量玉

米浆保证高生物素环境和氮源供给。但高浓度的玉米浆在 PHB 产物提取步骤会随着离心产生大量杂质沉淀，在烘干过程增加了菌体干重，这对 PHB 提取的准确性有较大影响。因此寻找可以替代玉米浆且不含有过多杂质的营养物质对 PHB 的提取有重要作用。玉米浆在发酵中主要提供氮源、高生物素以及矿物质、维生素等微量营养物质，我们参考水解液中营养盐的成分，使用酵母粉和蛋白胨替代。这两种营养物质能够抑制谷氨酸代谢和并保证菌体的正常生长。考虑到 *C. glutamicum* S9114 的生长条件以及 PHB 生产环境，在酵母粉和蛋白胨浓度上，我们分别选取了 5 g/L、10 g/L、15 g/L 三个梯度。

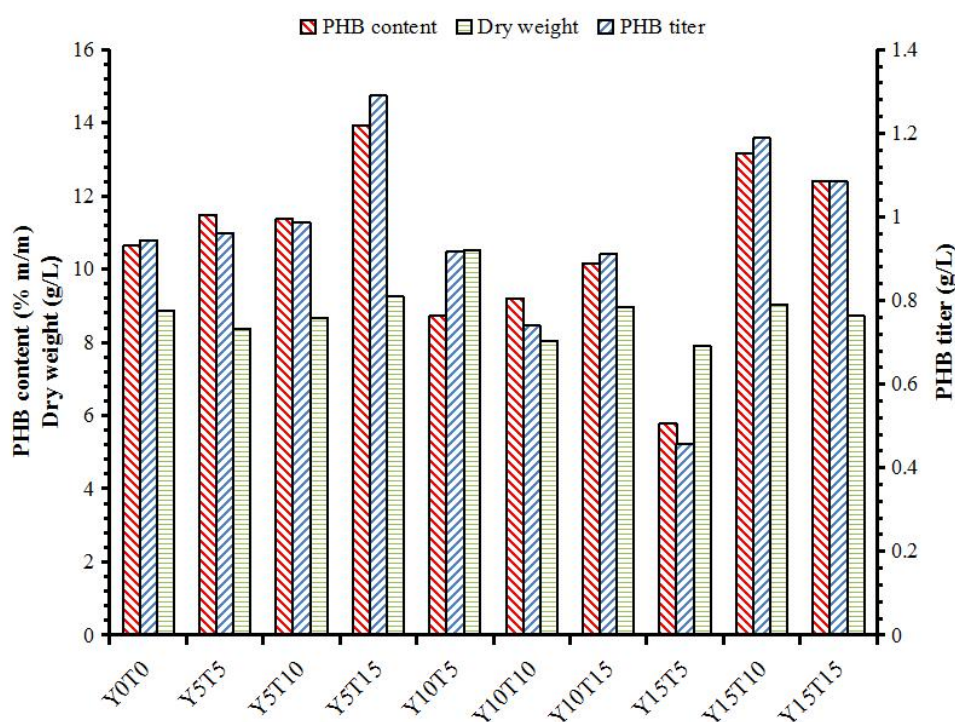


图 2.2 JH01 在不同酵母粉和蛋白胨浓度下的 PHB 发酵结果

Fig. 2.2 PHB fermentation of JH01 at different concentrations of YE and peptone

其中 Y 为酵母粉，T 为蛋白胨，以 Y0T0 为添加玉米浆的发酵培养基，实验组不添加玉米浆

利用酵母粉和蛋白胨代替玉米浆后，菌体干重的测定更加准确且在酸解步骤更容易被酸解，这对菌体的收集、产物提取测定有一定改善。以只添加玉米浆的原始发酵培养基为对照，分别设置三个梯度的酵母粉与蛋白胨浓度，共九组实验组。图 2.2 的发酵结果显示，从细胞 PHB 含量看，5 g/L 的酵母粉就能够满足 PHB 发酵需求，并且增加浓度对菌体生长以及 PHB 积累并没有促进作用。在 5 g/L 的酵母粉添加条件下，不同的蛋白胨浓度对细胞 PHB 含量有一定影响。就替代对照组的玉米浆而言，5-15 g/L 的蛋白胨配置均能达到替代作用。考虑到碳氮比和菌体生长需求，选取 5 g/L 酵母粉、10 g/L 蛋白胨的配方以替代原发酵培养基中的玉米浆。JH01 菌株在本次发酵实验中发酵后的 PHB 含量均较高在 8 % 以上，这是因为菌体生长情况较好，PHB 合成代谢活跃。

2.3.3 增强底物乙酰辅酶 A 的供给促进 PHB 合成

本章的 PHB 合成途径来自 *R. eutropha* H16, 以乙酰辅酶 A 作为底物。而乙酰辅酶 A 又参与多种细胞基础代谢, 引入新的代谢会造成底物的不足从而限制 PHB 合成反应。因此本研究希望先通过增强合成底物乙酰辅酶 A 的供给, 增大合成途径的碳代谢流, 缓解底物不足的情况。

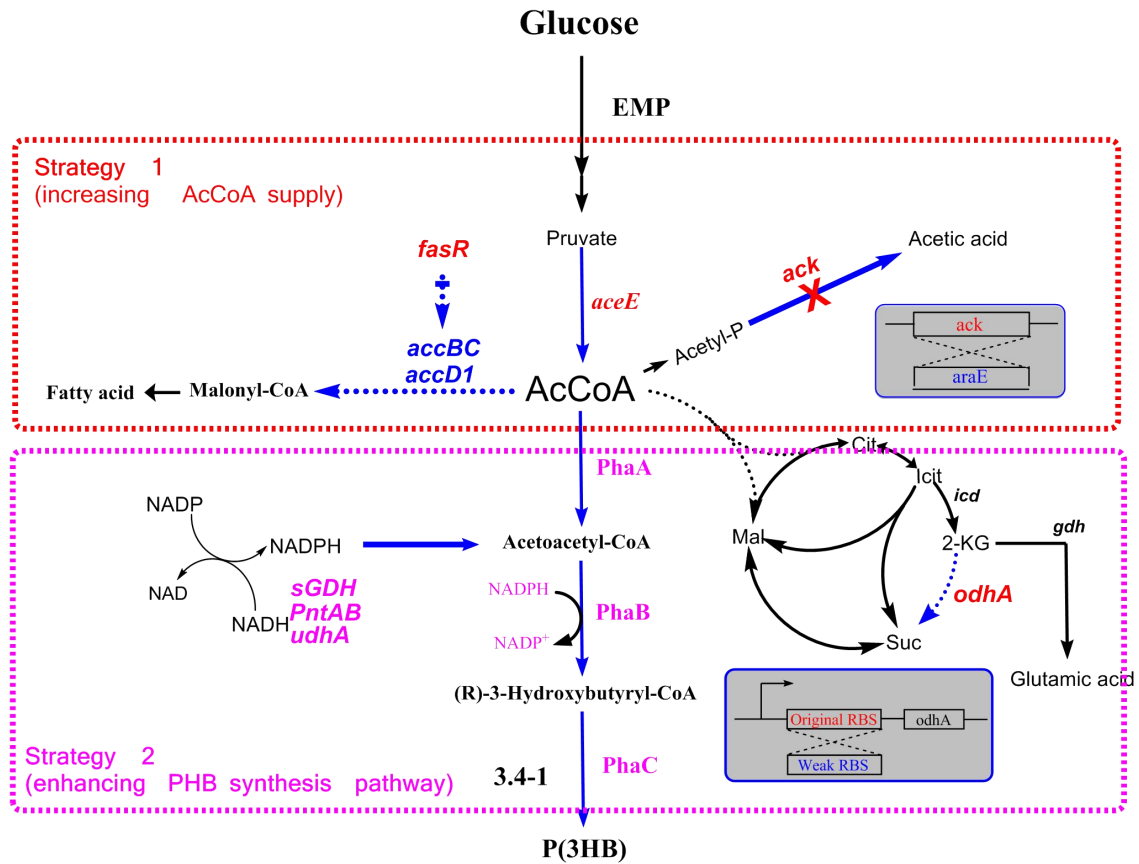


图 2.3 PHB 增产的改造策略

Fig.2.3 Metabolic engineering strategies for increasing PHB production

本节围绕增加乙酰辅酶 A 的合成尝试了两种策略, 包括 (1) 增强丙酮酸到乙酰辅酶 A 的反应: 主要通过过表达编码丙酮酸脱氢酶的基因 *aceE*, 强化反应从而增加底物供给。(2) 减少乙酰辅酶 A 流入其他分支代谢: 通过削弱乙酸代谢、脂肪酸代谢以及 TCA 循环减少底物消耗。

第二个策略中, 在乙酸代谢上, 编码乙酸激酶的 *ack* 基因被敲除, 原来的位点被插入编码木糖转运蛋白的 *araE* 基因, 目的是阻断了乙酸途径并增强了木糖转运利用, 改造得到的菌株被命名为 JH02。在脂肪酸代谢上, *fasR* 基因被导入质粒在 JH01 中过表达, *fasR* 基因编码的负反馈调节因子能够抑制乙酰辅酶 A 还原酶 *accBC*、*accD1* 活性, 从而削弱脂肪酸合成。在 TCA 循环上, α -酮戊二酸脱氢酶 (ODHC) 是 *C. glutamicum* S9114 中 TCA 循环中的关键基因, 敲除编码该酶 *elo* 亚基的基因 *odhA* 对 TCA 循环削弱较明

显,但会严重影响菌体的生长。因此本研究采取弱化 *odhA* 基因的表达式以削弱 TCA 循环,表达强度弱化为原先的 0.1 倍。

表 2.2 改造后的重组菌株的 PHB 发酵情况

Table 2.2 Results of PHB production by increasing the supply of Acetyl CoA

Strain	PHB content(%)	PHB titer (g/L)	Dry weight(g/L)
JH01	4.75±0.17	0.24±0.02	4.96±0.33
JH01-pH36- <i>aceE</i>	6.02±2.63	0.39±0.16	6.57±0.14
JH02(JH01- Δ <i>ack::araE</i>)	4.90±0.41	0.29±0.03	5.89±0.02
JH01-pH36- <i>fasR</i>	5.83±1.28	0.34±0.08	5.85±0.02
JH01- <i>odhARBS0.1</i>	3.89±1.42	0.22±0.08	5.70±0.03

发酵条件: 30 ℃, 200 rpm, PH 7.0, 10 % (v/v), 30 ml 发酵培养基/250 ml 摇瓶

表 2.2 中结果表明,第一个策略的改造得到的 JH01-pH36-*aceE* 中 PHB 含量为 6.02 % (m/m), 而 JH01 对照菌株 PHB 含量为 4.75 % (m/m), 改造后含量略有提高, PHB 产量达到 0.39 g/L。第二个策略中通过弱化乙酸途径得到 JH02 (JH01- Δ *ack::araE*), 削弱脂肪酸代谢得到 JH01-pH36-*fasR* 以及弱化 TCA 循环得到 JH01-*odhARBS0.1* 这三株菌。在发酵 48h 后菌体 PHB 含量分别为 4.90 %、5.83 %、3.89 %, 与原始的 JH01 相比未有明显提升。

两种改造策略在结果上对 PHB 积累未有明显促进作用,改造选取的的基因均来自 *C. glutamicum* S9114, 且选取的表达质粒 pH36 是该菌株常用质粒, 因此基因一般均有效表达。这表明在 JH01 中乙酰辅酶 A 供给不是 PHB 合成的主要限速步骤, 推测可能是合成代谢的基因表达量或相关酶活制约了 PHB 合成。因此考虑接下来对 PHB 合成途径做进一步强化, 探究合成代谢的基因本身是否为产物合成的主要限制原因。

2.3.4 对 PHB 合成途径强化以提高 PHB 产量

在上一节中我们发现底物不是主要限制步骤, 因此在本节我们希望强化合成途径来实现 PHB 增产。JH01 的 PHB 合成基因在人工合成时已针对谷氨酸棒状杆菌进行了密码子优化, 增强了该基因在 *C. glutamicum* S9114 的翻译效率。在强化合成途径方面, 我们也采取两个改造策略: (1) 增强合成途径关键基因表达: 在 JH01 中分别利用质粒过表达基因 *phaA*、*phaB*、*phaC*, 分别增强三步反应中的酶催化; (2) 增加 NADPH 的供给: PHB 合成过程需要消耗大量额外的 NADPH, 过表达 NADPH 还原酶基因 *pntAB*、*udhA*、*sGDH* 以实现还原力的补充。

第一个策略中我们通过构建 pH36-*phaA*、pH36-*phaB*、pH36-*phaC* 三个表达质粒分别增加表达量, 其中目的基因自带 *peftu* 强启动子, 导入 JH01 中构建了 JH01-pH36-*phaA*、JH01-pH36-*phaB*、JH01-pH36-*phaC*。第二个策略中我们选取 *pntAB*、*udhA*、*sGDH* 三个基因在 JH01 中过表达以补充 NADPH。*pntAB*、*udhA* 基因来自大肠杆菌, 是一种典型的 NADPH 还原酶, 消耗 ATP 和 NADH 合成 NADPH。而 *sGDH* 则是来自 *Gluconobacter*

oxydans 的催化葡萄糖进行脱氢反应的基因, 反应中合成 NADPH。构建这三个基因的表
达质粒并导入至 JH01 中构建重组菌株 JH01-pH36-*pntAB*、JH01-pH36-*udhA*、JH01-
pH36-*sGDH*。

表 2.3 强化 PHB 合成途径的 PHB 发酵结果

Table 2.3 The result of PHB production by enhancing PHB synthesis pathway

Strain	PHB content(%)	PHB titer (g/L)	Dry weight(g/L)
JH01	4.75±0.17	0.24±0.02	4.96±0.33
JH01-pH36- <i>phaA</i>	8.23±2.09	0.56±0.18	6.72±0.25
JH01-pH36- <i>phaB</i>	9.24±0.29	0.60±0.00	6.55±0.10
JH01-pH36- <i>phaC</i>	9.37±0.42	0.59±0.06	6.36±0.16
JH01-pH36- <i>pntAB</i>	7.39±1.04	0.45±0.08	6.01±0.09
JH01-pH36- <i>udhA</i>	5.21±0.62	0.31±0.04	6.04±0.03
JH01-pH36- <i>sGDH</i>	5.69±0.75	0.34±0.05	6.04±0.02

发酵条件: 30 °C, 200 rpm, PH 7.0, 10% (v/v), 30 ml 发酵培养基/250 ml 摇瓶

从发酵结果上看, 两个策略对 PHB 积累都有一定促进作用, 其中第一个策略的三个重组菌株 PHB 含量以及产量约为对照菌株 JH01 的两倍, 改造菌株最高产量达到 0.6 g/L。第二个策略得到的菌株 JH01-pH36-*pntAB* 的 PHB 含量也增加了 50% 左右。过表达关键基因、额外供给 NADPH 对 JH01 的 PHB 合成均有一定促进作用。过表达基因的提
升效果最好, 说明目前 PHB 合成途径基因表达量不足, 本身的限制是影响生产 PHB 的一个较大因素。而在 PHB 生物合成反应中会消耗胞内 NADPH。发酵结果显示, *pntAB* 的表达对 NADPH 有最好的效果。NADPH 的消耗对目前 PHB 积累也有一定影响。*pntAB* 直接利用 NADH 合成 NADPH, 而 NADH 主要参与菌体的生长代谢, 过度消耗可能会影响生长。但从细胞干重来看, 重组菌株 JH01-*pntAB* 的生长并未受到影响, 推测原因是目前 PHB 合成较缓慢未消耗过多 NADPH。在强化 PHB 合成途径的上述实验中, 发现代谢途径本身是合成 PHB 的主要限速步骤, 因此接下来对合成途径本身的限制因素作进一步探究。

2.3.5 优化 PHB 合成代谢以增加 PHB 积累

对 JH01 菌株的代谢改造结果显示, 针对合成途径本身的强化对 PHB 增产更为有效, 其中过表达合成途径的关键基因使 PHB 含量增加了一倍。增加表达量有一定提升效果, 尝试活性更高的酶进行 PHB 增产也是一个策略。因此我们针对合成途径进行进一步改造: 分别表达有更高酶活的基因和 PHB 合成途径辅助基因 *phaP*。

上一节我们分别过表达了原来的 *phaA*、*phaB*、*phaC* 三个基因, 发现合成途径基因的拷贝数不足, 拷贝数的提高对 PHB 积累有提升作用。除此之外, 进一步提高酶活也是值得考虑的促进 PHB 生产的方法。*phaB* (QLTS)、*phaC* (STQK) 是两个经过定向进化的基因, 其中 *phaB* (QLTS) 来自 *R. eutropha*, 由 *phaB* 编码的酶蛋白在第 47 位谷氨酰胺突变成亮氨酸, 第 173 位的苏氨酸替换为丝氨酸得到。*phaB* (QLTS) 的体外酶

活较原始酶有进一步提升，在 *C. glutamicum* 中表达得到的 PHB 含量提高了一倍以上。*phaC*(STQK)则是以来自 *Pseudomonas. sp* 的 *phaC* 为基础，通过定向进化后对蛋白氨基酸序列分析发现了 325 位丝氨酸突变为苏氨酸，481 位谷氨酰胺替换为赖氨酸两个有益替换。

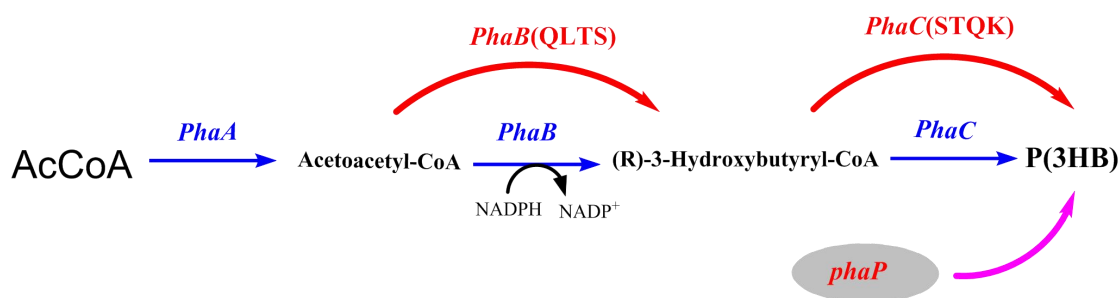


图 2.4 PHB 增产的改造

Fig.2.4 Metabolic engineering for increasing PHB production

在对一些能够天然合成 PHB 菌株的 PHB 途径研究发现，除了关键基因 *phaABC* 还发现了 *phaP* 这一辅助基因，其编码的蛋白参与 PHB 颗粒形成过程或者具有调节形成颗粒的功能。本小节选取的 *phaP* 基因来自 *Azotobacter species* FA8，研究发现其编码的辅助蛋白在体外能够有效增强 *phaA*、*phaB*、*phaC* 的酶活，在胞内能够形成疏水聚合物包裹 PHB 颗粒并分隔细胞质，从而保护细胞。在产 PHB 的重组大肠杆菌中表达该基因发现能够促使产生更多 PHB 颗粒，同时对细胞生长有促进作用。

表 2.4 JH02 表达 *phaB*(QLTS)、*phaC*(STQK)、*phaP* 的 PHB 发酵结果

Table 2.4 Effects of PHB production by expressing *phaB*(QLTS)、*phaC*(STQK)、*phaP* in JH02

Strain	PHB content(%)	PHB titer (g/L)	Dry weight(g/L)
JH02	7.48±0.03	0.58±0.00	6.20±0.00
JH02- pH36- <i>phaB</i> (QLTS)	7.52±0.03	0.61±0.00	6.94±0.04
JH02- pH36- <i>phaC</i> (STQK)	8.63±0.54	0.72±0.02	7.70±0.07
JH02- pH36- <i>phaP</i>	19.51±0.57	2.36±0.12	11.42±0.01

发酵条件：30 °C，200 rpm，PH 7.0，10 % (v/v)，30 ml 发酵培养基/250 ml 摇瓶

从发酵结果上看，在 JH02 的基础上表达 *phaB* (QLTS)、*phaC*(STQK)两个基因得到的 JH02-pH36-*phaB*(QLTS)和 JH02-pH36-*phaC*(STQK)，PHB 含量分别为 7.52 % 和 8.63 %，与原始菌株 JH02 相比未有提高。而在 JH02 中表达的来自 *Azotobacter sp.* FA8 的 *phaP* 基因对 PHB 积累的有较好的提升，JH02-pH36-*phaP* 的 PHB 含量达到 19.51 % 是 JH02 的 2.6 倍，产量达到 2.36 g/L 提高了 307 %。此外我们还发现 JH02-pH36-*phaP* 发酵得到的菌体干重达到了 11.42 g/L，与原始菌株相比有较大提高。

在提升酶活方面，我们选取的 *phaB* (QLTS)、*phaC*(STQK)基因在 *E. coli* 中表达对 PHB 增产效果明显，并且 *phaC* (STQK) 也有报道在 *C. glutamicum* ATCC13032 中对 PHB 生产也有很好效果。在实验中两个基因的表达未有提升效果，排除不能正常表达的因素，分析原因可能是这些基因虽然在其他 *C. glutamicum* 中表达效果较好，但在 S9114 中的相关酶酶活不高，未能有效发挥作用。表 2.4 数据显示，JH02- pH36-*phaP* 不仅有更高的 PHB 含量，菌体干重也有较大增长。文献报道该 *phaP* 基因表达的辅助蛋白在体外酶活实验中具有促进催化的作用，但对体内酶活测定发现酶活并未提高。因此，我们认为 PHB 含量提高的主要原因主要在于该辅助蛋白对细胞的保护作用，通过包裹 PHB 颗粒从而减少其对细胞质内其他物质的干扰。

2.4 本章小结

本章实现了利用谷氨酸棒状杆菌生产 PHB，并进行了一些代谢工程改造以增加细胞 PHB 含量。探究了从底物供给到合成代谢优化等改造，发现了一些限制 PHB 合成的限制因素。本章主要研究结论如下：

(1)将来自 *R. eutropha* H16 的 PHB 合成基因整合至 *C. glutamicum* S9114 基因组上，构建了能够利用葡萄糖和木糖合成 PHB 的重组菌株 JH01。以葡萄糖为碳源发酵后细胞 PHB 含量为 3.92 %，PHB 产量为 0.33 g/L。而以木糖为碳源时，JH01 的 PHB 含量为 2.91 %，菌体干重达到 17.60 g/L，生长上比以葡萄糖为碳源更具优势。

(2) 利用酵母粉和蛋白胨对原始发酵培养基中的玉米浆替换，解决了玉米浆杂质对菌体收集和 PHB 提取检测干扰的问题，通过梯度试验得到 5 g/L 酵母粉保证生物素和微量营养元素的供给，10 g/L 蛋白胨保证氮源的替换浓度。

(3) 增加乙酰辅酶 A 供给的相关改造对 JH01 的 PHB 合成未有明显促进作用，表明底物供给目前不是 PHB 合成的限制因素。在之后的强化 PHB 合成途径的改造中发现合成基因的表达量不足或酶活不高是 PHB 合成的较大限制因素。结果显示过表达关键基因能够使细胞 PHB 含量提高至原来的两倍。额外供给 NADPH 的改造中发现 *pntAB* 的表达对 PHB 积累也有一定促进作用。

(4) 在 JH02 中过表达经过定向进化的 *phaB* (QLTS)、*phaC*(STQK)基因对 PHB 积累未有更好地促进作用，分析原因是在 *C. glutamicum* S9114 中表达的酶活较低。此外，我们还发现辅助蛋白基因 *phaP* 基因的表达对 PHB 积累和菌体生长有很大提升，细胞的 PHB 含量能够提高到 19.51 %，产量达到 2.36 g/L，菌体生长状况也得到改善。这揭示了 *phaP* 编码的辅助蛋白对菌体的保护作用，为后续改造提供了新的思考方向。

第 3 章 代谢改造谷氨酸棒状杆菌生产脂肪烃

3.1 引言

烃类是油类燃料的重要组成部分。烃类化合物的生产主要来自石油分馏，提取不同碳链长度的烃有不同的功能，中长链烃类因较高的能量密度可有效替代柴油等燃料。除了用于燃料生产还可作为聚合物、活性剂以及涂料等产品的生产原料。传统的石化产业在生产化石燃料时能耗较高且污染严重。此外，生产成本还受到国际石油价格的制约。因此生物燃料作为环保且可持续的新型能源备受瞩目。将油脂、含油生物通过裂化等方法生产生物柴油是工业较为常用的生产方式，而使用微生物直接发酵生产烃类等生物燃料在产量方面还有所限制。但利用微生物生产生物燃料能够很好保证产物纯度，且不用考虑脱硫等处理，直接实现从碳源到燃料的转化。而利用木质纤维素原料生产脂肪烃能够有效利用废弃生物质，通过生物炼制过程实现纤维素原料向烃类的直接转化，是缓解我国的能源需求的一个有效策略。

自从蓝藻中的醛脱羧基产烃途径被发现以来，改造微生物产烃代谢，实现烃类的发酵生产一直是研究的热点。其中由脂肪酰基-ACP 还原酶 AAR 与脂肪醛脱羧基酶 ADO 组成的产烃途径是目前最具生产潜力的，在重组大肠杆菌中 C15、C17 脂肪烃产量最高达到 300 mg/L。而脂肪酸代谢和醛类耐受性是提高产烃的重要影响因素。我们选取的 *C. glutamicum* S9114 不仅能够适应木质纤维素体系，在醛类物质的耐受上也很有优势。并且谷氨酸棒状杆菌的脂肪酸代谢也较为活跃，除了参与胞内代谢的中长链脂肪酸，还有大量长链脂肪酸用于细胞壁上分枝菌酸的合成，可为产烃提供丰富底物。与蓝藻等产烃微生物相近的胞内 pH 和温度可以很好保证相关酶的酶活和催化效率。

本章尝试在 *C. glutamicum* S9114 中引入蓝藻细胞的脂肪烃合成途径实现烃的生产。在对产物检测过程中对超长链烃的合成机制进行推测和 qRT-PCR 分析。尝试利用发酵液中的大量脂肪酸，减少对烃类提取测定的影响，增加烃的产量。

3.2 材料与方法

3.2.1 使用菌株

本章使用的各种发酵菌株见附录 III 表 3。重组质粒的构建使用 *E. coli* DH5 α 为宿主菌株。改造的出发菌株为 *C. glutamicum* S9114，购自上海工业微生物研究所，保藏编号为 SIIM B460。改造所使用的表达质粒为 pH36，敲除质粒为 pk18 mobsacB，均带有卡那霉素的抗性基因。

3.2.2 培养基及培养条件

本章培养使用 LB 培养基、谷棒种子培养基和 CGX II -NL 氮源限制培养基。其中 LB 培养基、种子培养基成分见 2.2.2。CGX II -NL 发酵培养基包括 (g/L): 葡萄糖 60，

硫酸铵 1.0, 尿素 2.5, KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 1.0, 硫酸镁 0.25, 3-吗啡丙磺酸 42, 氯化钙 0.001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.00002, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.000002, 生物素 0.00002, 硫胺素 0.00005, 原儿茶酸 0.03。

E. coli DH5 α 的培养方法见 2.2.2。 *C. glutamicum* S9114 培养方法为：取冷冻甘油管后室温解冻并划线，30 °C 倒置 36 h，接种至 LB 中 200 rpm，30 °C 培养 12 h，之后养种子接种量为 10 % (v/v)，在发酵接种时接种量为 5 % (v/v)。

3.2.3 重组质粒构建

改造质粒见附录 III 表 3，所用验证和构建引物见附录 III 表 4。对于 *fasR* 基因，利用引物 *fasR*-up-F/R、*fasR*-down-F/R 从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增上下游同源臂，分别插入到 pk18mobsacB 的 Xba I /Sal I 和 Sal I /HindIII 位点，*aar*、*ado* 基因片段通过合成得到，利用无缝克隆的方式整合至重组质粒，构建得到 pk18- Δ *fasR*-*aarado*。*OleT_{JE}*、*OleT_{MC}* 分别来自 *Jeotglicoccus* sp 和 *Macrococcus caseolyticus*，通过上海市捷瑞生物工程有限公司合成得到，通过酶切连接的方式分别连接到表达质粒 pH36 的 Sal I /pst I 与 Xba I /Sal I 位点，得到 pH36-*OleT_{JE}*、pH36-*OleT_{MC}*。

3.2.4 重组菌株构建

C. glutamicum S9114 的电转化方法已在 2.2.4 中详细描述。

E. coli DH5 α 的感受态制备：首先挑取单菌在至 LB，200 rpm 条件下在 37 °C 过夜，200 μ l 接至 5 ml LB 中 2 h 后转移离心管中，冰上处理 4 min 后 5000 rpm 条件离心 10 min，去除液体后加 1 ml 预冷的 0.1 M CaCl_2 重悬，最终得到感受态细胞。感受态制备完成后可以经液氮冷冻后置于 -80 °C 冰箱保存。

感受态菌液取 100 μ l 加入 EP 管，加 10 μ l 质粒并吹打，冰上处理 30 min。冰浴完成后 42 °C 持续 90 s，之后放置在冰上冷却 2 min，之后加 800 μ l LB，37 °C，200 rpm 培养 1 h。培养完成后取适量菌液涂布于抗性平板上，在 37 °C 隔夜培养。菌落经过 PCR 验证并测序通过后得到重组菌株。

3.2.5 产烃发酵

种子的培养基与上一章节相同，种子培养基以 5 % (v/v) 的接种量接至 30 ml CGX II -NL 培养基中，培养基中其中 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 配制成金属离子母液、生物素、氯化钙、硫酸镁均以母液形式单独添加。在发酵过程中用 5 M NaOH 调节 PH 至 7.0 左右，发酵周期为 96 h。

3.2.6 脂肪烃提取与气质联用 (GC-MS) 检测

发酵完成后在发酵液中按 2:1 的比例加入甲醇氯仿浸提液（甲醇氯仿为 2:1），密封瓶口后 200 rpm，30 °C 摇床浸提 12 h。将浸提液转移至杯中，10000 rpm 离心 10 min。离心得到的上清分为三层，取最下层有机相加入旋蒸瓶旋蒸，最后加入 1 ml 氯仿溶解得到样品。在测定前需离心去除沉淀等杂质。

浸提得到的有机层中含有烃类等产物，利用 GC-MS 测定，本实验采用 Agilent 6890 GC-MS 气象色谱质谱分析仪检测，配置 HP-5-MS 色谱柱。GC-MS 测定参数为：进样温

度为 280 °C 且无分流条件，初始温度为 50 °C 并维持 2 min；升温阶段以 15 °C/min 速率升至 80 °C 维持 3 min；接下来以相同升温速率升至 280 °C 维持 8 min；进样量 2 μ l。

3.2.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

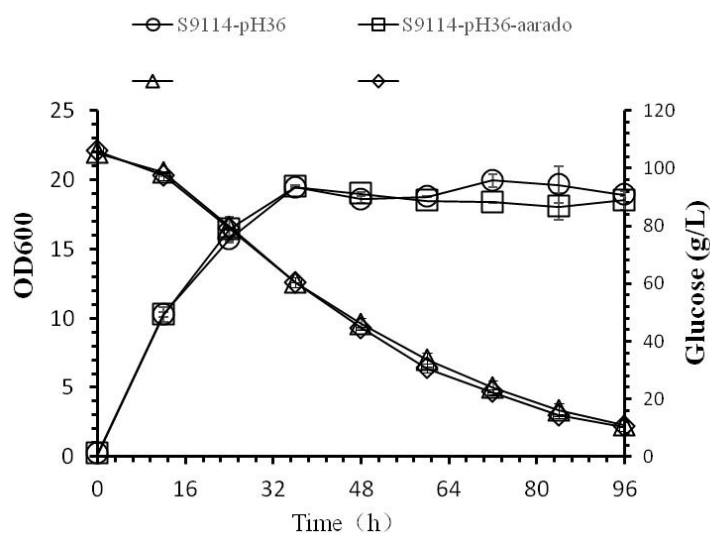
以 *C. glutamicum* S9114-pH36-*aarado* 为实验组，原始 *C. glutamicum* S9114 为对照组在 250 ml 摇瓶中发酵并设置三个重复。在开始发酵后的 24 h、48 h 收集菌体，经过 4 °C 条件下 8000 rpm 离心后液氮冷冻保存于 -80 °C。

将菌体从冰箱中取出，加入液氮后充分研磨并加入至 Trizol (TAKARA, japan) 试剂在进行 RNA 提取。确认 RNA 完整性和浓度后需进行适当稀释。之后对 RNA 逆转录得到 cDNA，稀释合适倍数后置于 -20 °C 冰箱。将适宜浓度的 cDNA 样品加入至 SYBR Green Realtime PCR Master Mix，在 Bio-Rad CFX 96 中进行 qRT-PCR 反应。反应中以 16S rDNA 基因 CGS9114_RS11955 为内参基因计算各基因转录水平，其中差异表达倍数 Foldchange ≥ 2.0 时为显著差异上调，Foldchange ≤ 0.5 时为显著差异下调。

3.3 结果与讨论

3.3.1 *C. glutamicum* S9114 中构建脂肪烃合成途径

在 *C. glutamicum* S9114 中引入的脂肪烃合成途径来自蓝藻细菌 *S. elongatus* PCC7942，包括编码脂肪酰基-ACP 还原酶 *aar* (synpcc7942_1594) 和编码脂肪醛脱羧基酶 *ado* (synpcc7942_1593) 两个关键基因。我们发现 *aar* 基因在 *E. coli* 中表达可溶性较低，因此采取加入可溶性蛋白标签 SPY，通过融合表达的方式增强可溶性避免出现包涵体。*aar*、*ado* 基因片段都通过人工合成获得，中间加入 RBS 序列连接成一个片段，利用酶切连接的方法连接至表达质粒 pH36 上得到重组表达质粒 pH36-*aarado*，导入至 *C. glutamicum* S9114 中得到 *C. glutamicum* S9114-pH36-*aarado*。由于脂肪烃合成依赖于脂肪酸代谢，因此在发酵验证能够进行脂肪烃生产后，我们选定 *C. glutamicum* S9114 基因组上的 *fasR* 基因作为敲除和 *aarado* 基因整合位点。扩增上下同源臂片段构建重组敲除质粒 pk18- Δ *fasR*-*aarado*，导入至 *C. glutamicum* S9114 中得到重组菌株 HW4。



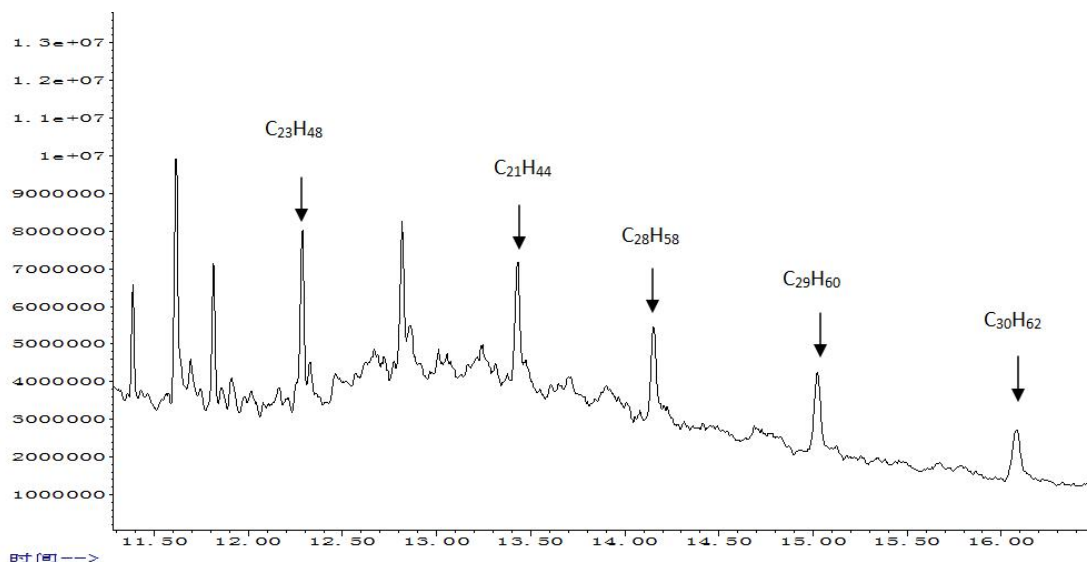
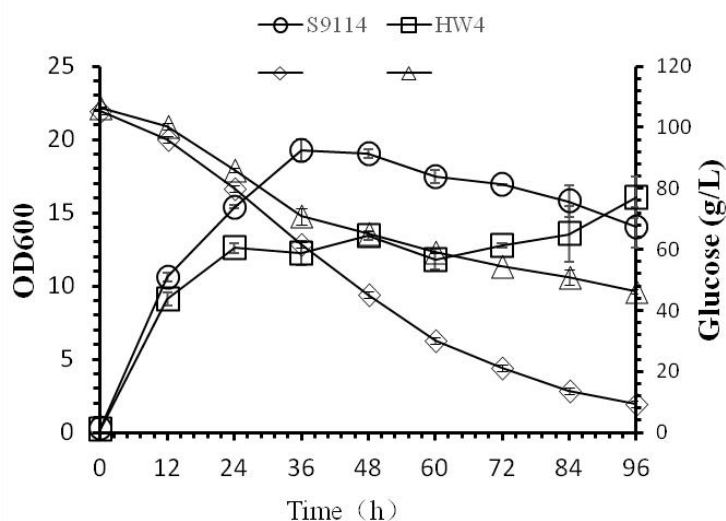


图 3.1 (a) *C. glutamicum* S9114 中质粒表达 *aarado* 基因的产烃发酵生长和糖耗；(b) HW4 和 *C. glutamicum* S9114 发酵情况比较；(c) HW4 的 CGMS 测定结果

Fig. 3.1 (a) The growth and sugar consumption of hydrocarbon fermentation by strain *C. glutamicum* S9114-pH36-*aarado* and *C. glutamicum* S9114;(b) Result of hydrocarbon fermentation by HW4;(c)Hydrocarbon product of HW4

发酵条件：30 °C，200 rpm，PH 7.0，接种量 5 % (v/v)，30 ml 发酵培养基/250 ml 摇瓶；

在 CGX II 限氮培养基中以 *C. glutamicum* S9114-pH36 为对照组，*C. glutamicum* S9114-pH36-*aarado* 为实验组进行摇瓶发酵，在表达质粒上验证是否能够正常合成脂肪烃。图 3.1 (b) 结果显示，HW4 在发酵过程中 OD 值偏低，发酵结束后有大量残糖剩余。这是由于 HW4 的发酵液中含有大量脂肪酸，菌体出现絮凝情况，这严重影响了菌

株生长和糖的利用。如表 3.1 所示, GC-MS 结果显示在 S9114-pH36-*aarado* 发酵液中检测到 C21、C23、C28、C29、C30 的超长链脂肪烃的产生, 但典型的 C15、C17 脂肪烃未有检测到。*aarado* 基因能够在 *C. glutamicum* S9114 中正常表达。在将该基因整合至基因组上后得到的 HW4 菌株在摇瓶发酵后也检测到相同种类的脂肪烃, 同时在发酵液中还检测到大量 C16、C18 的脂肪酸, 在生长和糖耗上与对照相比 HW4 均有所降低。在 3L 发酵罐中进行 HW4 的产烃发酵, 我们以 C12 烷烃作为内标物, 测定总烃产量为 18.77 mg/L。

表 3.1 重组菌株发酵液中的烃类

Table 3.1 Types of hydrocarbons in recombinant strain fermentation broth

Product	S9114	S9114-pH36	S9114-pH36- <i>aarado</i>	HW4
C ₂₁ H ₄₄	-	-	+	+
C ₂₃ H ₄₈	-	-	+	+
C ₂₈ H ₅₈	-	-	+	+
C ₂₉ H ₆₀	-	-	+	+
C ₃₀ H ₆₂	-	-	+	+

蓝藻的产烃途径主要产物是 C15、C17 的烷烃。但从发酵结果看, 在 *C. glutamicum* S9114-pH36-*aarado* 和 HW4 的发酵液中只检测到 C21-C30 的长链超长链烃, 未发现 C15、C17 烷烃产物。而我们选取的 *aar*、*ado* 基因能够在 *E. coli* 中表达, 合成的主要产物是 C15、C17 的烷烃, 对该长度的脂酰-ACP 具有催化能力。这说明导入的 *aar* 和 *ado* 基因能够正常表达和催化, 但反应的主要底物不是来自通常的脂肪酸代谢。我们在构建 HW4 时敲除了 *fasR* 基因, 因而脂肪酸代谢得到增强, 在发酵液中也检测到大量 C16 和 C18 脂肪酸, 但这未对烃类的种类产生影响。

因此分析 *C. glutamicum* S9114 中存在超长链的脂酰-ACP, 并且在产烃途径中更为优先被 AAR、ADO 利用。在产烃发酵中, AAR、ADO 不能够利用长链脂酰-ACP 使得烃类产量较低, 无法有效利用增强的脂肪酸代谢。因此需要进一步探究超长链烃的合成机制, 这有利于针对产烃途径做进一步改造优化。

3.3.2 超长链烃生产机制探究

发酵液组分经 GC-MS 检测只发现有 C21、C23、C28、C29、C30 的超长链烃产生。为了解析超长链烃的合成机制, 我们利用 *C. glutamicum* S9114 的基因组注释, 分析超长链烃的底物可能来自脂肪酸代谢和分枝菌酸途径。

在 HW4 发酵液中的检测到 C8、C10、C12、C14、C16、C18 脂肪酸产生, 其中 C16、C18 脂肪酸含量最多。这些脂肪酸的延长利用 FAS I 型脂肪酸合成酶催化进行, 最长产物是 C18 的脂酰-ACP, 经硫脂酶 *tes* 催化合成脂肪酸。我们发现在 *C. glutamicum* S9114 中还存在另一种由 FAS II 型脂肪酸合酶参与的碳链延长途径, 可产生超长链脂酰-ACP, 因此可经过 AAR、ADO 的催化生成超长链烃。但 FAS II 途径一般不发挥作用, 这可能由于 *aar*、*ado* 基因的表达使得该途径被激活, 进而产生超长链脂酰-ACP, 经还

原和脱甲酸反应得到超长链脂肪烃。

除此之外，超长链的脂酰-ACP 还可能来自 *C. glutamicum* S9114 的分枝菌酸合成途径。*C. glutamicum* 作为一种放线菌，能够天然合成分枝菌酸，碳链长度一般在 22-38。分枝菌酸能够在细胞壁肽聚糖层外形成疏水层作为细胞的屏障，分枝菌酸的存在能够提升菌体抗性，对细胞的生长以及形态维持有重要作用。分枝菌酸合成的底物来自基础脂肪酸代谢，以脂肪酸为底物经 *fadD*、*accD23* 以及聚酮合酶 *cgpk13* 的催化下形成长链酮酰基-ACP，之后在酮还原酶 *cmrA* 的催化下一个酮基还原为羟基，该中间代谢产物经过脱水、还原后经 AAR、ADO 催化可得到超长链脂肪烃。

为了探究这两个途径是否参与了超长链烃的合成，我们利用 qRT-PCR 定量分析探究这两个途径关键基因表达情况。两个代谢途径的关键基因分为七个部分，脂肪酸途径基因包括 ACC、FAS-I、FAS-II、FAT 四个部分，其中 ACC 部分为编码乙酰-CoA 羧化酶的基因 CGS9114_RS13275、CGS9114_RS13235、CGS9114_RS13505；FAS-I 为通常脂肪酸延长途径基因 CGS9114_RS13530、CGS9114_RS11835、CGS9114_RS13185；FAS-II 包括超长链脂肪酸延伸相关基因 CGS9114_RS05810、CGS9114_RS05820、CGS9114_RS01975；FAT 部分是催化合成脂肪酸的相关硫酯酶基因 CGS9114_RS01940、CGS9114_RS04060、CGS9114_RS05365、CGS9114_RS06045；分枝菌酸途径相关基因包括 FADs、MA、的酶类基因 CGS9114_RS05800、CGS9114_RS05075、CGS9114_RS09215、CGS9114_RS03120、CGS9114_RS12330；MA 为分枝菌酸合成途径的关键基因 CGS9114_RS13240、CGS9114_RS12340、CGS9114_RS12335、CGS9114_RS08800、CGS9114_RS08150；related 部分是分枝菌酸相关的调控细胞分裂与形态的基因 CGS9114_RS05480、CGS9114_RS12355、CGS9114_RS12325。

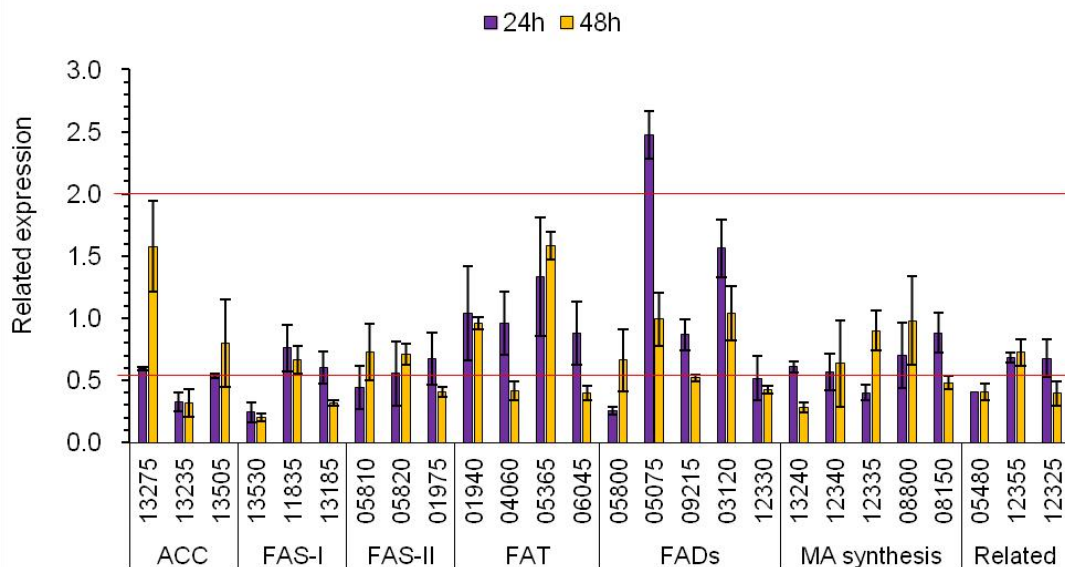


图 3.2 *C. glutamicum* S9114 产烃后脂肪酸途径和分枝菌酸途径基因表达水平差异

Fig. 3.2 Comparison of transcription levels for selected genes of fatty acid biosynthesis pathway and mycotic acid pathway in *C. glutamicum* S9114

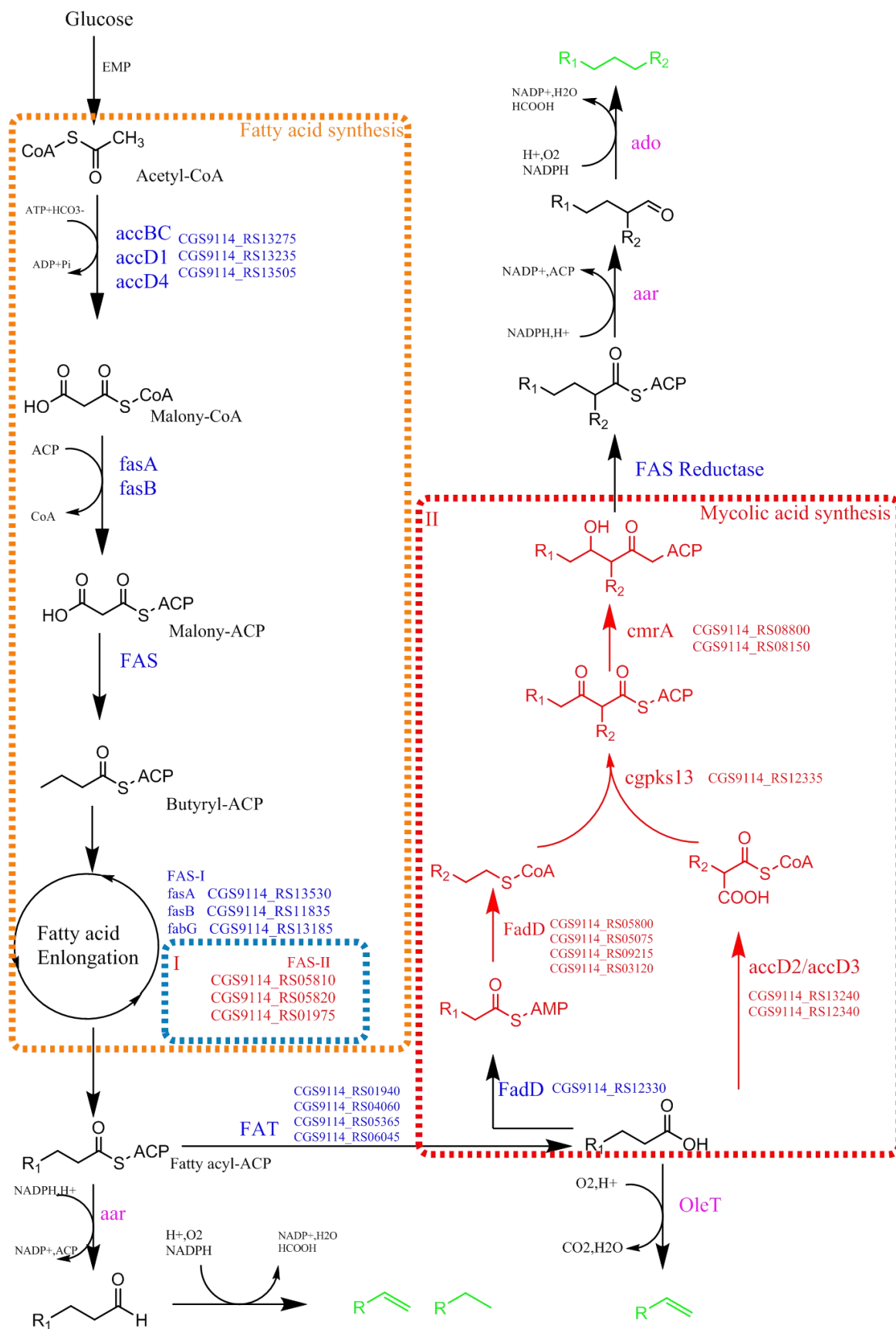


图 3.3 *C. glutamicum* S9114 中的脂肪酸代谢和分枝菌酸代谢

Fig. 3.3 Fatty acid synthesis pathway and mycobacterial acid synthesis pathway in *C. glutamicum* S9114 .

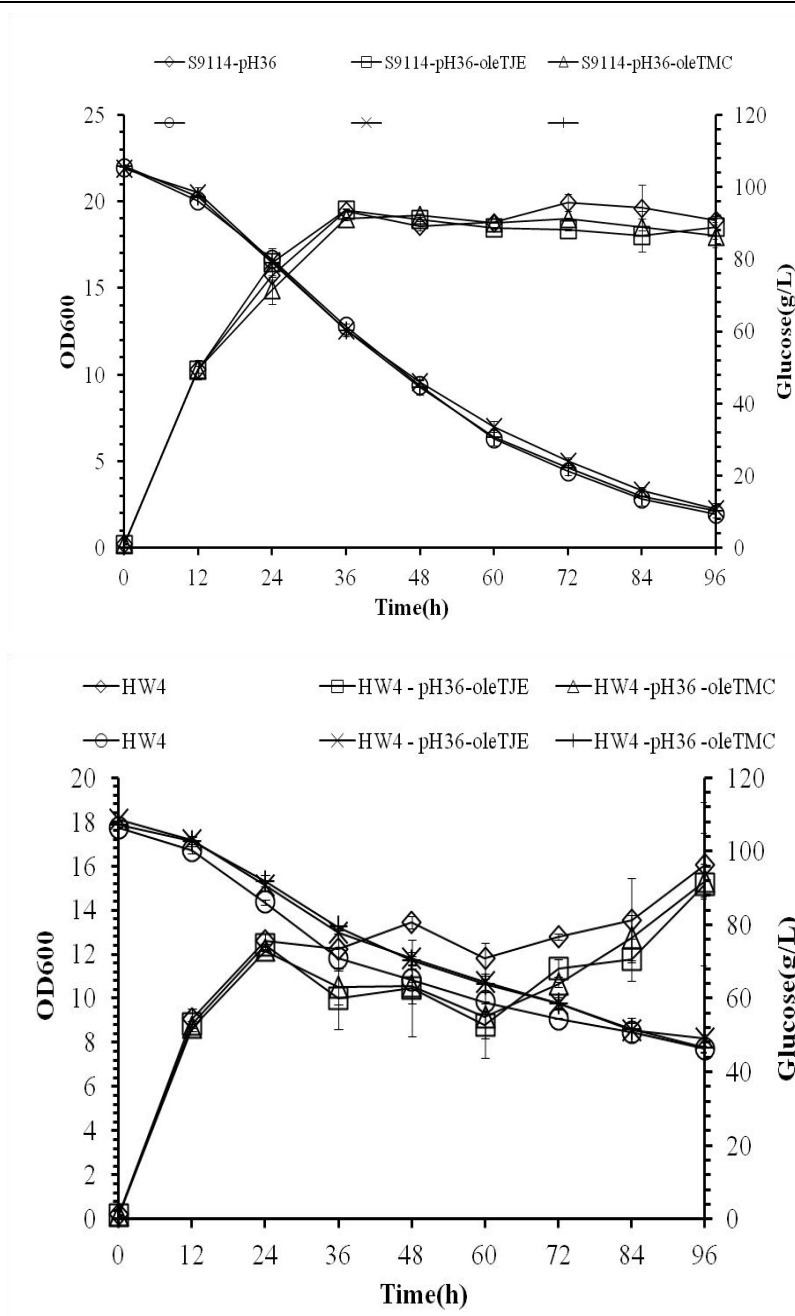
由于 HW4 敲除了 *fasR* 基因,使得脂肪酸代谢有很大增强,因此我们以 *C.glutamicum* S9114-pH36-*aarado* 为实验组,以导入空载质粒 pH36 的 *C.glutamicum* S9114-pH36 为对照,比较关键基因的表达情况。结果显示,相关基因在发酵过程中差异表达不明显,只有在 24 h 时 CGS9114_RS05075 即编码 *fadD5* 的基因显著差异表达上调 2 倍以上。*FadD5* 是一种脂酰-CoA 合酶,主要作用是激活脂肪酸催化生成脂酰-CoA,为分枝菌酸合成提供底物。但是其他相关的 *fadD* 类基因未有明显差异表达,因此未能证明分枝菌酸途径与超长链烃合成途径的关系。在脂肪酸代谢方面,我们选取的关键基因都未有明显的差异表达,产烃途径的导入未对 *C.glutamicum* S9114 的相关代谢产生影响。分析原因可能是目前的脂肪烃产物种类较多且总量过少,因而未对我们推测的 FAS-II 途径或分枝菌酸途径产生较大影响。后续的 qRT-PCR 实验可能需要在烃的产量更高对相关代谢影响较大的情况下进行。超长链烃合成机制研究除了利用 qRT-PCR,对我们推测的途径还可通过敲除部分关键基因,削弱或阻断相关途径来观察超长链烃的合成是否受到影响,这也可以在以后的探究中继续尝试。

3.3.3 HW4 产生的大量脂肪酸利用尝试

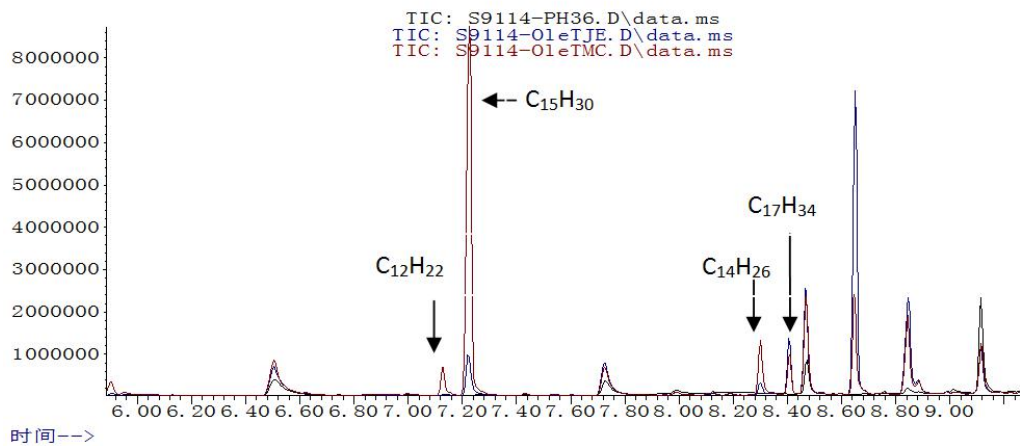
我们在 HW4 发酵液发现 *fasR* 的敲除导致大量 C16、C18 脂肪酸的积累。在脂肪烃的提取过程中脂肪酸也被提取至氯仿中,在 GC-MS 检测中大量的脂肪酸会导致样品不能及时汽化造成拖尾现象,影响了样品的定性定量测定。HW4 的产烃途径目前未能有效利用脂肪酸基础代谢,*fasR* 的敲除造成大量脂酰 ACP 的浪费,而 HW4 不存在脂肪酸的 β 氧化途径,除了供给分枝菌酸途径,还有大量脂肪酸未能利用。为了消除过多脂肪酸对烃类检测的干扰以及有效利用 C16、C18 的脂肪酸,我们考虑在 HW4 中导入脂肪酸脱羧酶基因 *OleT_{JE}* 与 *OleT_{MC}*,在消耗 C16、C18 脂肪酸的同时增加脂肪烃的产量。

构建重组表达质粒 pH36-*OleT_{JE}* 和 pH36-*OleT_{MC}*,分别导入至 HW4 中得到菌株 HW4-pH36-*OleT_{JE}* 和 HW4-pH36-*OleT_{MC}*,此外,将这两个表达质粒导入至 *C. glutamicum* S9114 中得到 *C. glutamicum* S9114-pH36-*OleT_{JE}* 和 *C. glutamicum* S9114 -pH36-*OleT_{MC}*。由于 HW4 中拥有脂肪酸脱羧酶所需的铁氧化还原系统 FDR/FDX,因此可以直接导入不需要额外添加提供电子的还原系统。

GC-MS 结果如图 3.4(c)、(d)显示,这四株菌的发酵液中都检测到了 C15、C17 的单末端烯烃以及 C14 的双末端烯烃,表达 *OleT_{MC}* 菌株的发酵液中还额外检测到 C12 的双末端烯烃,*OleT* 催化的主要产物在种类上是长链脂肪烃。与表达 *OleT_{JE}* 的菌株相比,表达 *OleT_{MC}* 基因的菌株生产的长链烃更多,这是因为 *OleT_{MC}* 对还原系统的依赖程度较低,因此更能适应 *C. glutamicum* S9114 的胞内环境。HW4-*OleT_{JE}* 和 HW4-*OleT_{MC}* 的脂肪烃产物种类较为丰富,碳链长度从 12 到 30,包含了大部分的长链烃和超长链烃,实现了长链和超长链烃的同时生产。但发酵液中的脂肪酸含量依旧过高,脂肪酸脱羧代谢虽然能够利用长链脂肪酸,但依旧存在反应速率过慢,不能消耗大量脂肪酸的问题,因此这也是脂肪酸进一步利用的改造方向。



丰度



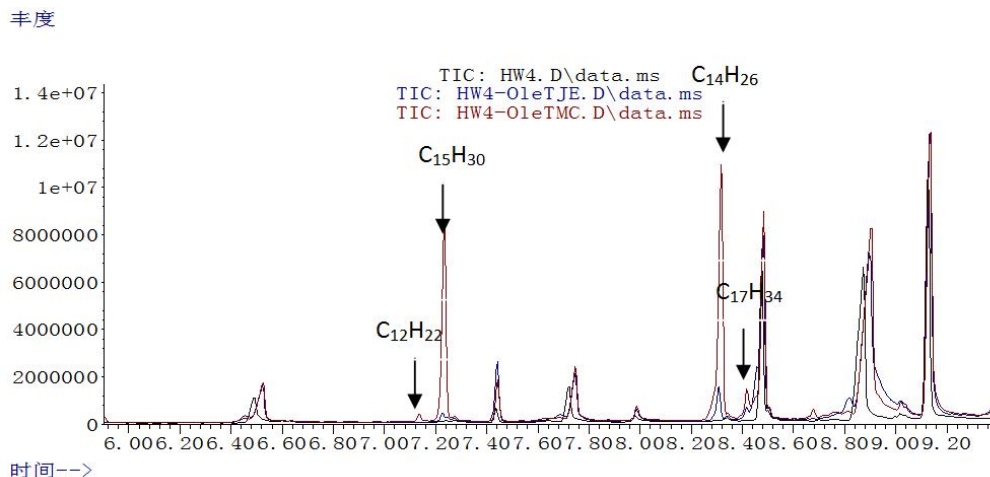


图 3.4 (a) 在 *C.glutamicum*S9114 中表达 *OleT_{JE}*、*OleT_{MC}* 的发酵结果；(b) 在 HW4 中表达 *OleT_{JE}*、*OleT_{MC}* 的发酵结果；(c) 在 *C. glutamicum* S9114 中表达 *OleT_{JE}*、*OleT_{MC}* 发酵液烃类产物；(d) 在 HW4 中表达 *OleT_{JE}*、*OleT_{MC}* 发酵液烃类产物

Fig. 3.4 (a)fermentation results of gene *OleT_{JE}* and *OleT_{MC}* expressed in *C. glutamicum* S9114;(b) fermentation results of gene *OleT_{JE}* and *OleT_{MC}* expressed in HW4;(c) the hydrocarbon products of fermentation broth by *C. glutamicum* S9114 expressed *OleT_{JE}* and *OleT_{MC}*;(d) the hydrocarbon products of fermentation broth by HW4 expressed *OleT_{JE}* and *OleT_{MC}*

表 3.2 表达 *OleT* 后的发酵液产物

Table 3.2 The product of fermentation broth after expression gene of fatty acid decarboxylase

product	S9114-pH36	HW4	S9114-pH36- <i>OleT_{JE}</i>	S9114-pH36- <i>OleT_{MC}</i>	HW4-pH36- <i>OleT_{JE}</i>	HW4-pH36- <i>OleT_{MC}</i>
C ₁₂ H ₁₂	-	-	-	+	-	+
C ₁₄ H ₂₆	-	-	+	+	+	+
C ₁₅ H ₃₀	-	-	+	+	+	+
C ₁₇ H ₃₄	-	-	+	+	+	+
C ₂₁ H ₄₄	-	+	-	-	+	+
C ₂₃ H ₄₈	-	+	-	-	+	+
C ₂₈ H ₅₈	-	+	-	-	+	+
C ₂₉ H ₆₀	-	+	-	-	+	+
C ₃₀ H ₆₂	-	+	-	-	+	+

3.4 本章小结

在 *C. glutamicum* S9114 中构建了脂肪烃合成途径，实现了在 CGX II 限氮培养基中合成脂肪烃，在将合成途径整合至基因组上后得到了一株稳定产超长链烃的菌株 HW4，并对超长链烃机制进行解析以及解决发酵液脂肪酸过多的问题。本章主要结论如下：

- (1) 在 *C. glutamicum* S9114 基因组的 *fasR* 位点整合了来自 *S. elongatus* 的产烃基

因，构建了稳定产烃的菌株 HW4，其主要烃类产物都是超长链烃，同时发现发酵液有大量脂肪酸积累。

(2) 依据 *C. glutamicum* S9114 基因组注释选取了可能参与超长链烃的合成的脂肪酸代谢 FAS-II 和分枝菌酸途径，但 qRT-PCR 结果显示相关基因未有明显差异表达，分析原因在于烃产量过低对相关代谢未有明显影响。

(3) 在 HW4 中导入脂肪酸脱羧酶 OleT_{JE} 和 OleT_{MC} 以减少 HW4 中长链脂肪酸积累，我们得到了能够合成 C12-C30 脂肪烃的菌株，但 *fasR* 敲除效果依旧明显，发酵液中还存在大量脂肪酸。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论和创新点

微生物发酵生产生物基产品是目前具有工业应用前景的生产方式，但发酵的原料成本对生产成本的降低一直是重要的限制因素。而木质纤维素作为分布广泛且低廉的含糖生物质能够很好地解决原料的成本问题。本实验室的干法生物炼制为工业利用纤维素发酵提供了很好的技术方案。本研究选取的出发菌株 *C. glutamicum* S9114 能很好使用干式稀酸预处理后的纤维素物料，对预处理脱毒后物料中残余的分醛类抑制物有耐受性，具有生长快、耐受性强的优点。在该菌中通过代谢工程改造引入 PHB 合成途径、脂肪烃合成途径能够扩大木质纤维素原料的应用范围。

在 *C. glutamicum* S9114 中分别引入来自罗氏真养菌的 PHB 合成代谢和蓝藻的脂肪烃合成途径，使其能够合成 PHB 以及生产脂肪烃，对降低生产成本具有重要意义，并在构建相关代谢途径后通过代谢改造使产量进一步提升。

本论文主要结论如下：

(1) *C. glutamicum* S9114 在整合了 *R. eutropha* H16 的 PHB 合成基因后得到了能够利用葡萄糖和木糖合成 PHB 的重组菌株 JH01。发酵结果显示，JH01 利用葡萄糖发酵后得到的细胞 PHB 含量为 3.92 % (m/m)；而利用木糖发酵得到 PHB 含量为 2.91 % (m/m)，但获得了 17.60 g/L 干菌体，是在葡萄糖中培养的两倍。因培养基中玉米浆的存在对 PHB 测定结果有一定干扰，利用酵母粉和蛋白胨替换玉米浆。梯度试验表明 5 g/L 酵母粉、10 g/L 蛋白胨能够达到替代效果。

(2) JH01 存在 PHB 含量过低的问题，因此提出增加底物乙酰辅酶 A 供给和强化合成途径两种代谢改造策略增加 PHB 产量。在增加乙酰辅酶 A 供给的改造上，采用分别削弱乳酸、乙酸、脂肪酸代谢和 TCA 循环以及表达丙酮酸脱氢酶基因等方法，在结果上未对 JH01 的 PHB 合成有明显促进作用，表明底物供给不是主要限速步骤。在强化合成途径上，使用分别过表达 *phaA*、*phaB*、*phaC* 三个基因和增加 NADPH 供给的方法，结果显示表达关键基因有最明显的提升效果，说明基因的表达量或编码酶的酶活是现在

PHB 积累的限制因素。在此结果基础上, 我们又在 JH02 中分别表达经定向进化的基因 *phaB* (QLTS)、*phaC* (STQK) 以及辅助基因 *phaP*。其中 JH02 表达定向进化的基因后 PHB 含量未有明显提升, 但 *phaP* 基因的表达对 PHB 含量提升较大达到 19.51%, 产量达到 2.36 g/L。此外表达 *phaP* 对细胞生长也有促进作用, 原因是该基因编码的蛋白对菌体的保护作用。

(3) 在 *C. glutamicum* S9114 中导入 *S. elongatus* 的脂肪烃合成基因得到了重组菌株 HW4, 并且在构建过程中敲除了 *fasR* 基因以增强脂肪酸代谢。检测产物发现了超长链烃以及大量的脂肪酸的产生。针对产生超长链烃的异常现象, 我们选取了脂肪酸代谢和分枝菌酸途径这两个可能相关途径, 利用 qRT-PCR 分析两个途径的关键基因以解析超长链烃合成机制。结果显示, 相关基因的相对表达量未有明显变化, 分析原因在于烃的产量过低, 未对相关代谢产生影响。此外, 为减少发酵液中大量的脂肪酸对烃类提取和分析的影响, 在 HW4 中表达脂肪酸脱羧酶基因 *OleT_{JE}* 和 *OleT_{MC}*, 消耗脂肪酸的同时增加长链烃的产量, 得到的重组菌株能够同时生产 C12-C30 的长链烃和超长链烃。

4.2 展望

本研究在 *C. glutamicum* S9114 中导入了合成 PHB 和脂肪烃的关键基因, 构建了合成途径, 并对提高产物的产量进行了初步的优化。但上述工作中仍需要深入研究:

(1) 由于原始 JH01 的 PHB 含量较低, 很多代谢改造如增加前体和 NADPH 供给均未有改善作用, 可以在表达 *phaP* 基因的基础上继续尝试。除了增强合成代谢, 减小 PHB 合成对菌体的负担也是优化 PHB 产量的思路。

(2) PHB 增产方面除了代谢改造, 还可以考虑定向进化如利用离心筛选的方法获得 PHB 含量更高的菌株, 利用 PHB 密度大于细胞密度的特性筛选 PHB 含量更高的细胞。

(3) 利用 qRT-PCR 解析高碳烃的合成机制解析未有明显差异, 可以通过敲除两个途径的几个关键基因进行验证, 在接下来的探究中可以选取其他的 *aar*、*ado* 基因观察超长链烃是否为共同产物。

参考文献

- [1] Aswini P , Kavitha P , Revathy A R , et al. Poly β hydroxy butyrate (PHB) biosynthesis in *Bacillus*[J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2014, 28(1):8-11.
- [2] Moorkoth D, Nampoothiri K M. Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate[J]. Bioresource technology. 2016,201:253-260.
- [3] Wang D , Zeng G , Chen Y , et al. Effect of polyhydroxyalkanoates on dark fermentative hydrogen production from waste activated sludge[J]. Water Research, 2015, 73(apr.15):311-322.
- [4] Mcchalicher C W J,Srienc F. Investigating the structure–property relationship of bacterial PHA block copolymers[J]. journal of biotechnology, 2007, 132(3):296-302.
- [5] Kumar P,Patel S K S, Lee J K ,et al. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8):1543-1561.
- [6] 汤洪敏. 聚羟基脂肪酸脂(PHAs)的应用前景[J]. 贵州大学学报:自然科学版, 2004, 019(003):268-273.
- [7] Chen G Q . A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry[J]. CHEMICAL SOCIETY REVIEWS, 2009, 38(8):2434-2446.
- [8] Baki Hazer, Alexander Steinbüchel. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2007, 74(1):1-12.
- [9] Zhao Y , Zou B , Shi Z , et al. The effect of 3-hydroxybutyrate on the in vitro differentiation of murine osteoblast MC3T3-E1 and in vivo bone formation in ovariectomized rats[J]. Biomaterials, 2007, 28(20):3063-3073.
- [10]Dieter Seebach, H. Michael Bürger, Hans-Martin Müller, 等 . Synthesis of Linear Oligomers of (R)-3-Hydroxybutyrate and Solid-State Structural Investigations by electron microscopy and X-ray scattering[J]. 1994, 77(4):1099-1123.
- [11]Ohta T, Miyake T, Takaya H. An efficient synthesis of optically active 4-methyloxetan-2-one:Asymmetric hydrogenation of diketene catalysed by binap-ruthenium(II) complexes [binap = 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl][J]. Journal of the Chemical Society Chemical Communications, 1992, 23(23):1725-1726.
- [12]Madden L A, Anderson A J, Asrar J, et al. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures[J]. Polymer, 2000, 41(10):3499-3505.

- [13]PEOPLES,O. P. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase[J]. journal of biological chemistry, 1989, 264(26):15293-7.
- [14]Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phb C). J Biol Chem, 1989, 264(26):15298-15303.
- [15]A Steinbüchel, H G Schlegel. Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(3):535-542.
- [16]Doi Y,Kawaguchi Y,Koyama N,et al.Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*[J]. Fems Microbiology Letters, 1992, 103(2-4):103-108.
- [17]Zhou X Y , Yuan X X , Shi Z Y , et al. Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1):54.
- [18]Chen Q, Wang Q, Wei G, et al.Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate -co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources.[J].Applied and environmental microbiology , 2011,77 (14) : 4886-93.
- [19]Nduko JM, Matsumoto K, Ooi T, et al. Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme. Metab Eng, 2013, 15:159-166.
- [20]Jiang Y, Marang L, Kleerebezem R, et al. Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor[J]. Isme Journal, 2011, 5(5):896-967.
- [21]Fulai Wang,Sang Yup Lee. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation[J].Applied and Environmental Microbiology,1997,63(9):3703-3706.
- [22]魏国清, 陈泉, 康振, 等. 利用大肠杆菌工程菌廉价高效生产聚羟基丁酸酯[J]. 生物工程学报,2010, 26(9):1257-1262.
- [23]陈国强, 王颖. 中国“生物基材料”研究和产业化进展[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6):955-967.
- [24]Yue H, Ling C, Yang T, et al. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1):1-12.
- [25]Fu X Z, Tan D, Aibaidula G, et al. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals[J]. Metabolic engineering, 2014, 23(2):78-91.

- [26] Tan D, Wu Q, Chen J C, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates[J]. *Metabolic engineering*, 2014, 26:34-47.
- [27] Yin J, Chen J C, Wu Q, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology[J]. *Biotechnology advances*, 2014, 33(7):1433-1442.
- [28] 薛林贵, 赵旭, 张宝芹, 等. 提取细菌胞内 PHB 方法的研究[J]. *应用化工*, 2011, 40(7):1134-1137.
- [29] Aramvash A, Gholami B N, Moazzenizavareh F, et al. An environment-friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer by non-halogenated solvents[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(11):1936-1943.
- [30] 魏大巧, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯的鉴定及检测方法研究进展[J]. *云南化工*, 2007, 34(4):83-86.
- [31] 刘俊梅, 王璐, 李琢伟, 等. 聚- β -羟基丁酸酯的特性及检测方法研究进展[J]. *广州化工*, 2014, 42(15):5-8.
- [32] Wei L, McDonald A G. Accelerated weathering studies on the bioplastic, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)[J]. *Polymer Degradation & Stability*, 2016, 126(Apr):93-100.
- [33] López J A, Naranjo J M, Higuera J C, et al. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(2):250-258.
- [34] Koller M, Bona R, Chiellini E, et al. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*[J]. *Bioresource technology*, 2008, 99(11):4854-4863.
- [35] Sathiyarayanan G, Kiran G S, Selvin J, et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2013, 60:253-261.
- [36] Wang B, Sharmashivappa R R, Olson J W, et al. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice[J]. *Industrial Crops & Products*, 2013, 43(5):802-811.
- [37] Rodgers M, Wu G X. Production of polyhydroxybutyrate by activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal[J]. *Bioresource technology*, 2010, 101(3):1049-1053.
- [38] Wang N, Cheng J, Staley S M, et al. Effects of environmental conditions on cell growth and poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Alcaligenes eutrophus*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16(1):9-13.
- [39] Wang Y J, Hua F L, Tsang Y F, et al. Synthesis of PHAs from waste under various C:N ratios[J]. *Bioresource technology*, 2007, 98(8):1690-1693.
- [40] Wu G F, Wu Q Y, Shen Z Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium

- Synechocystis sp. PCC6803[J]. *Bioresource technology*, 2001, 76(2):85-90.
- [41]陈国强,吴琼.生物可降解塑料-聚羟基脂肪酸酯(PHA)的生产技术研究[J].*精细与专用化学品*,2001(18):24-27.
- [42]刘双江.需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)合成聚羟基丁酸的研究[J].*生物工程学报*,2002(05):614-618.
- [43]D. Bourque, B. Ouellette, G. André, et al. Production of poly- β -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 37(1):7-12.
- [44]Ueda S , Matsumoto S , Takagi A , et al. Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) from Methanol and n-Amyl Alcohol by the Methylophilic Bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Methylobacterium extorquens*. [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1992, 58(11):3574-9.
- [45]高海军,陈坚,堵国成,华兆哲,伦世仪.聚 β -羟基丁酸(PHB)降解的研究和展望[J].*无锡轻工大学学报*,1996(02):174-178.
- [46]Naylor, Linda, Anne W, et al. PROCESS FOR THE MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF PHA-POLYMERS: US.
- [47]Min-Kyoung Kang, Yongjin J. Zhou, Nicolaas A. Buijs. Functional screening of aldehyde decarboxylases for long-chain alkane production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1):74.
- [48]Min K , Valco D , Oldani A , et al. An Ignition Delay Study of Category A and C Aviation Fuel[C]. *Asme International Mechanical Engineering Congress & Exposition*. 2015.
- [49]Kandaramath Hari T , Yaakob Z , Binitha N N . Aviation biofuel from renewable resources: Routes, opportunities and challenges[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 42:1234-1244.
- [50]Li J , Yang G , Yoneyama Y , et al. Jet fuel synthesis via Fischer-Tropsch synthesis with varied 1-olefins as additives using Co/ZrO₂-SiO₂ bimodal catalyst[J]. *Fuel*, 2016, 171(may1):159-166.
- [51]Bann S J , Malina R , Staples M D , et al. The costs of production of alternative jet fuel: A harmonized stochastic assessment[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 227:179.
- [52]Liu G,Yan B, Chen G. Technical review on jet fuel production[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2013, 25(1):59-70
- [53]Zhang X , Lei H , Zhu L , et al. From plastics to jet fuel range alkanes via combined catalytic conversions[J]. *Fuel*, 2017, 188:28-38.
- [54]Yang X , Guo F , Xue S , et al. Carbon distribution of algae-based alternative aviation fuel obtained by different pathways[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2016, 54(FEB.):1129-1147.

- [55] Donghai X , Savage P E . Effect of temperature, water loading, and Ru/C catalyst on water-insoluble and water-soluble biocrude fractions from hydrothermal liquefaction of algae[J]. *Bioresource Technology*. 2017,239:1-6.
- [56] Tzanetis K F , Posada J A , Ramirez A . Analysis of biomass hydrothermal liquefaction and biocrude-oil upgrading for renewable jet fuel production: The impact of reaction conditions on production costs and GHG emissions performance[J]. *Renewable Energy*, 2017, 113(dec.):1388-1398.
- [57] Lennen R M , Braden D J , West R M , et al. A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes[J]. *biotechnology & bioengineering*, 2010, 106(2):193-202.
- [58] ladygina N. Dedyukhina EG, Vainshtein MB. A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry*. 2006, 41(5):1001-1014.
- [59] Machado I M P, Atsumi S. Cyanobacterial biofuel production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 162(1):0-0.
- [60] Walker J D , Cooney J J . Aliphatic Hydrocarbons of *Cladosporium resinae* Cultured on Glucose, Glutamic Acid, and Hydrocarbons[J]. *Applied Microbiology*, 1973, 26(5):705-708.
- [61] Merdinger E, Frye RH. Distribution of C¹⁴ from glucose-7-C¹⁴ in the lipid fractions of *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*. 1966, 91(5):1831.
- [62] Tornabene T G , J Oró. ¹⁴C Incorporation into the Fatty Acids and Aliphatic Hydrocarbons of *Sarcina lutea*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1967, 94(2):349-358.
- [63] Park, M.-O. New Pathway for Long-Chain n-Alkane Synthesis via 1-Alcohol in *Vibrio furnissii* M1[J]. *Journal of Bacteriology*, 187(4):1426-1429.
- [64] Nielsen J , Keasling J .Engineering Cellular Metabolism[J]. *Cell*, 2016,164(6):1185-1197.
- [65] Yu. A. Nikolaev, N. S. Panikov, S. M. Lukin. Saturated C₂₁–C₃₃Hydrocarbons Are Involved in the Self-Regulation of *Pseudomonas fluorescens* Adhesion to a Glass Surface[J]. *Microbiology*, 2001, 70(2):138-144.
- [66] Albro P W , Dittmer J C .Bacterial hydrocarbons: Occurrence, structure and metabolism[J]. *Lipids*, 1970, 5(3):320-325.
- [67] Kunjapur, Aditya M, Prather, Kristala L. J, Müller, V. Microbial Engineering for Aldehyde Synthesis[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 81(6):1892-1901.
- [68] Rude, M. A, Baron, T. S, Brubaker, S,等. Terminal Olefin (1-Alkene) Biosynthesis by a Novel P450 Fatty Acid Decarboxylase from *Jeotgalicoccus* Species[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 77(5):1718-1727.
- [69] Qiu Y , Tittiger C , Wicker-Thomas C , et al. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis[J]. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences, 2012, 109(37):14858-14863.
- [70] Bourdenx B , Bernard A , Domergue F , et al. Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 Promotes Wax Very-Long-Chain Alkane Biosynthesis and Influences Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses[J]. PLANT PHYSIOLOGY, 2011, 156(1):29-45.
- [71] Choi Y J , Lee S Y . Microbial production of short-chain alkanes[J]. Nature, 2013, 502 (7472):397,571-574.
- [72] Cao Y X , Xiao W H , Zhang J L , et al. Heterologous biosynthesis and manipulation of alkanes in Escherichia coli[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38(Complete):19-28.
- [73] Bernard, A, Domergue, F, Pascal. Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex[J]. Plant Cell, 24 (7):3106-3118.
- [74] Akhtar M K , Turner N J , Jones P R . Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(1):87-92.
- [75] Foo J L , Susanto A V , Keasling J D , et al. Whole-cell biocatalytic and de novo production of alkanes from free fatty acids in Saccharomyces cerevisiae[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2015, 114(1):232-237.
- [76] Schirmer A , Rude M A , Li X , et al. Microbial Biosynthesis of Alkanes[J]. Science, 2010, 329(5991):P.559-562.
- [77] Rui Z, Harris NC, Zhu X, Huang W, Zhang W. Discovery of a Family of Desaturase-Like Enzymes for 1-Alkene Biosynthesis[J]. Acs Catalysis, 2015, 5(12):7091-7094.
- [78] Rui Z , Li X , Zhu X , et al. Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(51):18237-18242.
- [79] Jong-Won L , Niraula N P , Trinh C T . Harnessing a P450 fatty acid decarboxylase from, *Macroccoccus caseolyticus*, for microbial biosynthesis of odd chain terminal alkenes[J]. Metabolic Engineering Communications, 2018, 7:e00076-.
- [80] Liu Y, Wang C, Yan J, Zhang W, et al. Hydrogen peroxide-independent production of α -alkenes by OleTJE P450 fatty acid decarboxylase. Biotechnol Biofuels.2014,7(1):28.
- [81] Beller H R , Goh E B , Keasling J D . Genes Involved in Long-Chain Alkene Biosynthesis in *Micrococcus luteus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(4):1212-1223.
- [82] Kang, M.-K., & Nielsen, J. Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of microorganisms. Journal of Industrial Microbiology &

- Biotechnology, 2016,44(4-5):613-622.
- [83] Ji, Li-Qun. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2015, 44:561-575.
- [84] Brett C , Waldron K . *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls || The role of the cell wall in the life of the plant*[M]. Springer Netherlands, 1990.
- [85] Karimi, Keikhosro, Taherzadeh, Mohammad J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity[J]. *Bioresource Technology*, 2016,200:1008-1018.
- [86] Parawira W , Tekere M . Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(1):20-31.
- [87] J.Y. Zhu, G.S. Wang, X.J. Pan. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification[J]. *Chemical Engineering Science*, 64(3):474-485.
- [88] Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara, Ballesteros M , et al. Ethanol Production From Pretreated Olive Tree Wood and Sunflower Stalks by an SSF Process[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2006, 129-132(1):631-643.
- [89] Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated douglas-fir by novel and commercial fungal cellulases[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121(1-3):219-230.
- [90] Modenbach A A , Nokes S E . The use of high-solids loadings in biomass pretreatment-a review[J]. *biotechnology & bioengineering*, 2012, 109(6):1430-1442.
- [91] Zhang J , Wang X , Chu D , et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6):4480-4488.
- [92] Taherzadeh M J , Gustafsson L , Niklasson C , et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2000, 53(6):701-708.
- [93] Jian Zhang, Zhinan Zhu, Xiaofeng Wang, 等. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(1):26.
- [94] Ikeda M , Nakagawa S . The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2003, 62(2-3):99-109.
- [95] Becker J , Wittmann C . Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory[J]. *Current Opinion in*

- Biotechnology, 2012, 23(4):631-640.
- [96] Lessmeier L, Hoefener M, Wendisch V F. Formaldehyde degradation in *Corynebacterium glutamicum* involves acetaldehyde dehydrogenase and mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt_12):2651-2662.
- [97] Park H S, Um Y, Sim S J, et al. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(3):347-356.
- [98] Wendisch V F. Microbial Production of Amino Acid-Related Compounds[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2016, 159:255-269.

附录 I 仪器设备

名称	型号	生产厂家
生物传感分析仪	SBA-90	山东省科学院生物研究所
PCR 仪	T110	美国 BioRad 公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化
超纯水机	Milli-Q Synthesis	德国 Merck Millipore 公司
旋转蒸发仪	EYELA	上海大颜仪器设备有限公司
低温冷却循环泵	DLSB-10/20°	上海大颜仪器设备有限公司
台式离心机	5415R	德国 Eppendorf 公司
超高速离心机	J-26	美国 Beckman Coulter 有限公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
气浴摇床	ZDLH-8050-3S	上海佐研仪器科技有限公司
核酸电泳仪	Tanon EPS100	上海天能科技
凝胶成像仪	Tanon 1600	上海天能科技
隔水式恒温培养箱	DK-8D	上海一恒科学仪器
高压蒸汽灭菌锅	TOMY-SX-700	天美科技有限公司
pH 计	PHS-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
高效液相色谱	LC-20AT 紫外检测器	日本岛津公司
紫外分光光度计	Biomate-3S	Thermo Scientific
蒸汽发生器	KQ-C	上海奉贤协新机电厂
生物反应器	BIOTECH-3L-4BG	上海保兴生物设备工程有限公司
恒温水浴摇床	HZ-9212S	江苏华利达
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
GC-MS	Agilent 6890	安捷伦科技有限公司

附录 II 相关基因序列

1. PHB 合成辅助基因 phaP 序列

atgatcctcaccgggaacaagttgcagcagcgcaaaaggccaacctgaaacgctgtcggcctgaccaccaaggcgttgaaggcgtcgaaaagctc
gtcgagctgaacctgcaggtcgtcaagacttcgttcgcagaaggcgttgacaacccaagaaggcgtgtcggccaaggacgcacaggaactgtggc
catccaggccgcagccgtgcagccggttccgaaaagacctggcctacaccgccacctgtatgaaatcgttcggaaaccagagcgagttcaccaa
ggtagccgaggctcaactggcgaaggctcgaagaacgtgcaagcgtgtgcgagaacctgccaaagacccccggcgggtcgaatcgaccgtg
gccatcgtgaagtcggcgatctccgctgccaacaacgcctacgagtcggtgcagaaggcgaccaagcaagcggtcgaaatcgtgaaaccaacttcaa
gctgcggctacggctgccaccaaggctgcccagcaagccagcgcaccggccgtacggccacggcaagaagacgacggctgcctga

2. 编码脂肪酸脱羧酶的基因 OleT_{JE} 和 OleT_{MC} 序列OleT_{JE}

atggcaacacttaagaggataaggccttagataatactttaaagattaaagcaaggttatctttacacaacaatcagagaaatcgttaaacacatcagtt
ttcaaaactaaagcactcgggtgtaaaccattcgtagttgtgactggtaaggaaggcgtgaaatgttctacaacaatgatgttcaacgtgaaggcatgtt
accaaaacgtatcgttaatacgttttggtaaagggtcaatccatagctgtagttaaataaacgtagacagaaagcattgttcagcttgatgactg
aaggttaactgaattatgtacgagaattaacgcgtacattatggcatgcgaacacacaacgtatgaaagtatggatgaggtaaatattaccgtgaatctatc
gtactactacaaaagtaggaacacgttgggcaggcgttcaagcaccacctgaagatcgaagaatcgaacagacatggacatcatgatcattcatt
agagcacttggtgtgcctttaaagggtacaaggcatcaaaagaagcagcgtcgtcgttgaagattggttagaagaacaaattattgagactcgtaaaggg
aatattcatccaccagaaggtagcagcatttacgaattgacattgggaagactacttagtaaccaatggactcaagaactgtgcgattgacttaatgaa
cacattccgccattaatcgcaatcaacagattcgttaccgtttacacgcgatgaacgaaaaccaatcacacgtgaaaaaattaatcagaacctgact
atgcatataaattcgtcaagaagttcgtcgttactatccattcgttccattcctccagtaaagcgaagtagacatcgacttccaaggcgttacaattcctgc
agggtgtaggtcttcattagatgtttatggtacaacgcgatgaatcactttgggacgatccaaatgaattccgccagaagattcgaacttgggacggat
caccattgacctattccacaagggtggtggagattactggacaaatcaccgttgcaggtgaatggatcacagfaatcatcatggaagaacaatgaata
ctttgcagaaaaataactatgatgtccagaacaagattagaagtggaacttaaacagatcccaggatagcgttaagagtggttfgtaatacaaaatgttcg
cgaagttgtagacagaacataa

OleT_{MC}

atgagtaaaagagttcctaaagatagaggattgataattcattgaagattatgaaggaaaggttatgaatacgttccagcgcgatgaagaaatttaatacgaat
atftttgaaacacgcgttttaggaggtaaaactgctgtgttatcagtggtaaagacgctgctgaatttttatgataatgataagacagaacgtaaaaggtacctt
acctaaacgttggtgaaagacgctgttcggtaaagggtcaatacacaacgacaggtaaaaagcatatagatgtaaagcattatattatgtcgttaatgactg
atgaaaacttagcatatttaagaaagcttacacgatctactggttcagaacatcagcatatgcagtacaacagaagtaaacgtctatgaagaagcaact
gaactgcttactaaagttggactacgctggcgtggtattgtggatcacctgaaaatatccaaaagatggcggatgacatgaacaagatgattgattcattcag
tgcgattggttcattatattggcggctatcgtgaagccaaaaggcagcgtgcagctgagcaatttctagaggatcaaattacagcagtgctgtaaaggaaa
gattcatccggaaaaaggaactgccttatgaatttagtcattgggaagatgaacgggaaacctatggacgcaagactttgtcgggtgatctcatgaatg
tcattcgtccactgtcgcaatcaataagttgtgagctcgggtgactagcgttgcacaggttctcggagaacggttcgtgttcattaaacgaaggggatta
tgcatataaattcgtcaggaagtaagcagatattatccgtttgtccgttctcggcagtaaagcgaagaaaaatattacatttgacggttataagattcaaaaa
gatacaatgatgctcctggatattctatggtacattacatcgagacgatttattcagtgaaacctgaaagatttaaccttattcgtttgataactgggatggaagcc
catttgatctgatccctcaaggtggaggcgattattatacaaatcattcgttgcaggtgaatggatgacaatcatcattatggaagaaacaatgaaattctttgc
gaacgaaatctctatgatgtaccacctcaggactttacagtggtatcagcaaaagttccctggttaaagtagcttctggaatggatattgaaaatataagggtga
atatcgaccgtacaaaataa

附录 III

表 1 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 所用的菌株

Table.1 Recombinant strains for PHB production

strains	characteristics	sources
E.coli DH5 α	Host for plasmid construction	Lab stock
C.glutamicumS9114	Wild-type strain	Lab stock
C.glutamicumS9114- Δ ldhA1::xylAB	S9114carrying xylAB and ldhA1 deleted	This study
C.glutamicumS9114-pH36-phaCAB	S9114carrying pH36-phaCAB	This study
JH01	C.glutamicumS9114- Δ ldhA1::xylAB carrying phaA phaB phaC and ldhA2 pdh MscCG deleted	This study
JH01-pH36-aceE	C.glutamicum JH01 carrying pH36-aceE	This study
JH02(JH01- Δ ack::araE)	C.glutamicum JH01carrying araE and ack deleted	This study
JH01-pH36-fasR	C.glutamicum JH01 carrying pH36-fasR	This study
JH01-odhARBS0.1	C.glutamicum JH01 with RBS0.1 substitution of odhA	This study
JH01-pH36-phaA	C.glutamicum JH01 carrying pH36-phaA expressing vector	This study
JH01-pH36-phaB	C.glutamicum JH01 carrying pH36-phaB expressing vector	This study
JH01-pH36-phaC	C.glutamicum JH01 carrying pH36-phaC expressing vector	This study
JH01-pH36-pntAB	C.glutamicum JH01 carrying pH36-pntAB expressing vector	This study
JH01-pH36-udhA	C.glutamicum JH01 carrying pH36-udhA expressing vector	This study
JH01-pH36-sGDH	C.glutamicum JH01 carrying pH36-sGDH expressing vector	This study

JH02- pH36-phaB(QLTS)	C. glutamicum JH01 carrying pH36- phaB(QLTS) expressing vector	This study
JH02- pH36-phaC(STQK)	C. glutamicum JH01 carrying pH36- phaC(STQK) expressing vector	This study
JH02- pH36-phaP	C. glutamicum JH01 carrying pH36- phaP expressing vector	This study

表 2 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 所用的质粒和引物

Table 2. Plasmid and primers for PHB Metabolic Engineering

plasmids	characteristics	sources
pTRCmob	Overexpressing vector	
pH36mob	Overexpressing vector derived from pTRCmob	This study
Pk18mobsacB	Mobilizable vector	This study
pH36-phaCAB	phaCAB gene overexpressing vector	This study
Pk18- Δ pdh-phaA	Plasmid for pdh knockout and carrying phaA	This study
Pk18- Δ MscCG-phaB	Plasmid for MscCG knockout and carrying phaB	This study
Pk18- Δ ldhA2-phaC	Plasmid for ldhA2 knockout and carrying phaC	This study
pH36-aceE	aceE gene overexpressing vector	This study
Pk18- Δ ack-araE	Plasmid for ack knockout and carrying araE	This study
pH36-fasR	fasR gene overexpressing vector	This study
Pk18-odhARBS0.1	Plasmid for RBS 0.1au substitution of odhA	This study
pH36-phaA	phaA gene overexpressing vector	This study
pH36-phaB	phaB gene overexpressing vector	This study
pH36-phaC	phaC gene overexpressing vector	This study
pH36-pntAB	pntAB gene overexpressing vector	This study
pH36-udhA	udhA gene overexpressing vector	This study
pH36-sGDH	sGDH gene overexpressing vector	This study
pH36-phaB(QLTS)	phaB(QLTS) gene overexpressing vector	This study
pH36-phaC(STQK)	phaC(STQK) gene overexpressing vector	This study
pH36-phaP	phaP gene overexpressing vector	This study

Primers	Sequence(5'-3')	Restriction enzyme
pH36-F	AATTGATCTGGTTTGACAGCTTAT	
pH36-R	GATGCCTGGCAGTTCCT	
Pk18-F	TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC	
Pk18-R	CCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	
pd-up-F	CCGGAATTCAATTGCCACAGAACCCCAAATA	EcoR I
pd-up-R	ACGCGTCGACCTGAACTCCTCAACGTTATGGCTAT	Sal I
pd-down-F	CGGGATCCAATTGCCACAGAACCCCAAATA	BamH I
pd-down R	AACTGCAGCGATTACTGGAAGTGGCACTTTATC	Pst I
phaA-F	CGGGATCCcgaaaagcaattgcttttcca	B BamH I
phaA-R	AACTGCAGttacttaactgccaactgcaag	Pst I
MscCG-up-F	CCGGAATTCgatggcaacctgggaac	EcoR I
MscCG-up-R	CGCGGATCCgagccaagattagcgctga	BamH I
MscCG-down-F	ACGCGTCGACgacgctgattacagacgtg	Sal I
MscCG-down-R	AACTGCAGgcatattgtggcagatgca	Pst I
phaB-F	CGAAAAGCAATTTGCTTTTC	BamH I
phaB-R	TTAGCCCATGTGCAGGC	Sal I
ldhA-up-F	CTAGAGACTGCTATCGGTGTGGC	
ldhA-up-R	GTAGCCCTTTCAGTTGTTGGTATAAC	
LdhA-down-F	GGAGAAAAAATGTTGTCACTCACCG	
LdhA-down-R	AGCACTCCTTCAACGCCTCCACC	
phaC-F	ccaacaactgaaagggtaccaaaagctgggtacctctatctggt	
phaC-R	agtgacaacatTTTTctccttaagccttagccttgacgtaacgg	
ack-up-F	ctatgacatgattacgaattatggctgccaccagc	
ack-up-R	ccgggtaccgagctcgaatttagctgcctcctctgcc	
ack-down-R	ACGCGTCGACggcccctagacctcttg	Sal I
ack-down-R	AAA ACTGCAGttgtctgggcaaccaacc	pst I

araE-F	gagctcggtaccgggatccaaaagctgggtacctctatctggt	
araE-R	gccgtcgactctagaggatctcagacgccgatatttctcaacttct	
fasR-F	ACGCGTCGACCTACTGGCTAGTCAAAACGCACGTC	Sal I
fasR-R	AAAACCTGCAGATGATCAGCATTGGAACCGACCTCG	Pst I
odhA-F	ACAGCTATGACATGATTACGTCAGACGATCCGATCCTAGAAAAC	
odhA-R	GCAGGTCGACTCTAGAGCTTGGTCAGACGTGGGACAGAG	
odhARBS0.1-F	CCTAGTTATTGAACTCGTGGGTGAGCTTCTTGAGGGTTTATTGAGCTTTG	
odhARBS0.1-R	CTCACCCACGAGTTCAATAACTAGGGTGAGCAGCGCTAGTACTTTCG	
PntAB-F	CGAGCTCatgccaattggcataccaag	EcoR I
PntAB-R	GCTCTAGAttacagagcttccaggattgca	Xba I
udhA-F	CGAGCTCatgccacattctacgattac	EcoR I
udhA-R	GCTCTAGAttaaaacagcggtttaaacc	Xba I
sGDH-F	CCGGAATTCATGCCTGCCCTTACAAAGA	
sGDH-R	GCTCTAGATTACGAGGACCAGTTGTTTTCG	
phaP-F	GCTCTAGAATGATCCTCACCCCGGAACAAGTTG	Xba I
phaP-R	CCCAAGCTTTCAGGCAGCCGTCGTCTTCTTTG	HindIII

表 3 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌合成脂肪烃构建的菌株和质粒

Table 3 Strains and plasmid for alkane production

strains	characteristics	sources
E.coli DH5 α	Host for plasmid construction	Lab stock
C.glutamicum S9114	Wild-type strain	Lab stock
C.glutamicum S9114-pH36-aarado	C.glutamicum S9114 carrying pH36-aceE expressing vector	This study
HW4	C.glutamicum S9114 carrying aarado and fasR deleted	This study
C.glutamicumS9114-pH36-oleT _{JE}	C.glutamicum S9114 carrying pH36-aceE expressing vector	This study
C.glutamicumS9114-pH36-oleT _{MC}	C.glutamicum S9114 carrying pH36-aceE expressing vector	This study
HW4-pH36-oleT _{JE}	HW4 carrying pH36- oleT _{JE} expressing vector	This study
HW4-pH36-oleT _{MC}	HW4 carrying pH36- oleT _{MC} expressing vector	This study
plasmids	characteristics	sources
pH36mob	Overexpressing vector derived from pTRCmob	This study
Pk18mobsacB	Mobilizable vector	This study
pH36-aarado	aarado gene overexpressing vector	This study
Pk18- Δ fasR-aarado	Plasmid for fasR konckout and carrying aarado	This study
pH36- OleT _{JE}	oleT _{JE} gene overexpressing vector	This study
pH36- OleT _{MC}	oleT _{MC} gene overexpressing vector	This study
plasmids	characteristics	sources
pH36mob	Overexpressing vector derived from pTRCmob	This study
Pk18mobsacB	Mobilizable vector	This study
pH36-aarado	aarado gene overexpressing vector	This study
Pk18- Δ fasR-aarado	Plasmid for fasR konckout and carrying aarado	This study
pH36- OleT _{JE}	oleT _{JE} gene overexpressing vector	This study
pH36-OleT _{MC}	oleT _{MC} gene overexpressing vector	This study

q-13235-F	ACATCCCAATCGTCATGCTT
q-13235-R	CCGTATGCGTAGAGCAGCTT
q-13505-F	CCTGATCTACGCAGCCGA
q-13505-R	CTGCACGCCTTGTCGTTT
q-13530-F	CCACCGTCACTGGTGAAGAA
q-13530-R	CGTCGTAGAGTTCGGTGTTC
q-11835-F	GCAGCATTCCAGATGATTGG
q-11835-R	CCAGACCAAGTGGGAGTGC
q-13185-F	CGCCCGAGGAAGTCTTT
q-13185-R	GGATGCGAAGAAGAGGGA
q-05810-F	AGCACCCAGAGCCAGCAGT
q-05810-R	TTGACTGGGATTTGTGGCTGA
q-05820-F	CTTCGGGAGACCGCTAGTTG
q-05820-R	TTGATTTTCGTGGGTGCCTTC
q-01975-F	GCCTGGGTTTACGCTGACTG
q-01975-R	ATGTATTCGGCTTCTGGGGAT
q-01940-F	GCCTCAACGGCTATGTCACC
q-01940-R	CGATTGCGTTTCGTAATTCTGG
q-04060-F	CCACTGAACGAATCGGCAAC
q-04060-R	GCCCTCCACTAGATACGCTGAA
q-05365-F	CGCAGAGATCAATCGTCGC
q-05365-R	CAGGCAGACGGGAGACAAA
q-06045-F	GTGGTTCCTGCGTCCCTTC
q-06045-R	GTGCGGGTCATTCCCTCTT
q-05800-F	CTCCCTCCGAGAAAGCCAC
q-05800-R	TGGTGAAGTCTCGCAGGATGT
q-05075-F	AAGATTCCGCAGTCGTTGG
q-05075-R	CGCCTAATCTTGCCCATCT

q-09215-F	CTGCGTGC GGAAATCCA
q-09215-R	TCTGCGTAACGGCGAACA
q-03120-F	GCTACGGAAGAGGTTGTCG
q-03120-R	CAGCATCCAGTTGGGTAGG
q-08800-F	GGGAGACACGGAGCGAGGT
q-08800-R	GGGGTAAATTCCCATGATTCAGT
q-12335-F	CACCAGATACCGCTGAGGAAA
q-12335-R	TCATGGACAGCATTCCGTCTT
q-12330-F	TCCGTCGCAGCATTTCGC
q-12330-R	GCGGAGCGGATTGCTTCTT
q-08150-F	GTTGTCCCTGATTCTTGTGG
q-08150-R	AGCACAGCGGTTGGAGC
q-05480-F	TTGACGCCTTCTTCATTCG
q-05480-R	CTCCTCCCATTCTTCTCCA
q-12355-F	GATGAGGAAGTCACCGTGCA
q-12355-R	GTTCCACGAAGGACACCAGAT
q-13240-F	GTTCTGTTGGCATCGTGGCT
q-13240-R	AGGAAGCCTGGAACGTCCAC
q-12340-F	CCCACCTGAGCAGCGTGAA
q-12340-R	ACGAGTTTCTGCGGGTTCGAT
q-12325-F	ACCGGGTGCAGGATATTTGT
q-12325-R	CACACCGTTGGCGGAGAC

表 5 谷氨酸棒状杆菌中脂肪酸代谢和分枝菌酸代谢相关基因表达水平分析

Table5 Expressing level of genes involving Fatty acid and mycolic acid synthesis in *C. glutamicum* S9114

	Proteins	Genes	Locus_tag	Relative gene expressing level	
				24h	48h
Fatty acid synthesis					
ACC	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase subunit alpha	accBC	CGS9114_RS13275	0.59±0.01	1.58±0.37
	methylmalonyl-CoA carboxyltransferase	accD1	CGS9114_RS13235	0.33±0.08	0.32±0.11
	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	accD4	CGS9114_RS13505	0.54±0.02	0.80±0.35
FAS-I	ACP S-malonyltransferase	fasA	CGS9114_RS13530	0.24±0.08	0.20±0.03
	3-oxoacyl-ACP synthase	fasB	CGS9114_RS11835	0.76±0.19	0.66±0.11
	3-ketoacyl-ACP reductase	fabG	CGS9114_RS13185	0.61±0.13	0.32±0.02
FAS-II	dehydrogenase		CGS9114_RS05810	0.44±0.17	0.73±0.22
	glutaryl-CoA dehydrogenase		CGS9114_RS05820	0.56±0.26	0.71±0.08
	dehydrogenase		CGS9114_RS01975	0.68±0.21	0.41±0.04
FAT	thioesterase		CGS9114_RS01940	1.04±0.38	0.96±0.05
	thioesterase		CGS9114_RS04060	0.96±0.25	0.42±0.08
	thioesterase		CGS9114_RS05365	1.33±0.48	1.58±0.11
	acyl-CoA thioesterase		CGS9114_RS06045	0.88±0.26	0.40±0.06
Mycolic acid synthesis					
FADs	acyl-CoA synthetase	fadD1	CGS9114_RS05800	0.26±0.03	0.66±0.25
	long-chain fatty acid--CoA ligase	fadD5	CGS9114_RS05075	2.48±0.19	0.99±0.21
	acyl-CoA synthetase	fadD4	CGS9114_RS09215	0.87±0.12	0.52±0.03
	long-chain fatty acid--CoA ligase	fadD15	CGS9114_RS03120	1.56±0.23	1.04±0.22
	acyl-CoA synthase	fadD32	CGS9114_RS12330	0.52±0.18	0.43±0.03
ACCDs	methylmalonyl-CoA	CgAccD2	CGS9114_RS13240	0.61±0.04	0.28±0.04

	carboxyltransferase				
	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	CgAccD3	CGS9114_RS12340	0.57±0.15	0.63±0.35
Condesnsation	polyketide synthase	CgPks13	CGS9114_RS12335	0.40±0.07	0.90±0.16
	polyketide cyclase		CGS9114_RS08800	0.70±0.26	0.98±0.36
Reductase	hypothetical protein/SDR family	CgCmrA	CGS9114_RS08150	0.87±0.16	0.48±0.05
	oxidoreductase				
Related genes	multidrug RND transporter		CGS9114_RS05480	0.41±0.00	0.41±0.07
	RND transporter		CGS9114_RS12355	0.68±0.04	0.72±0.11
	phospholipase/thioesterase		CGS9114_RS12325	0.68±0.15	0.40±0.10

硕士期间研究成果

已发表论文

1. (第二作者) Jin, Ci¹. **Huang, Zhen**². Bao, Jie. High titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.2020,8, 6315-6322.

致谢

三年的硕士研究生生活转瞬即逝，论文撰写完成之际，在这里向帮助过我的老师同学和家人朋友送上真挚的感谢。

首先对我的导师鲍杰教授表达我最诚挚的感谢。在科研工作中，鲍老师严谨、创新的科研精神，渊博的专业知识以及强烈的科研热情都是我很好的学习榜样。从研究方向的确定到后续各类问题的解决都离不开鲍老师耐心与仔细的指导。在课题的实验设计以及结果分析中，鲍老师付出很多并注重独立思考能力的培养。鲍老师的工作态度和治学态度将是我以后工作学习标杆。在此我再次对鲍老师致以真诚的感谢与尊敬。

其次，我要感谢张建老师和温经柏、金慈、柳云龙师兄和周平平师姐对我科研工作的指导，给我的实验操作和课题思路提供了很好的参考与建议。他们扎实的专业技术、灵活创新的科研思维以及乐于助人的生活态度是我学习的榜样。

此外，要感谢生物炼制课题组关心帮助我的同学们，包括颜钊师兄、侯伟亮师兄、邱忠洋师兄、韩昀身师兄、董维涛师兄、赵瞭师姐、李莉师姐；还有包括郑理想、卢敏萍、李园园、方纯、韩涛的同一届小伙伴们以及实验室其他同学。

最后，我还要感谢我的家人朋友，你们的帮助和支持是我前进的动力，同时也祝你们身体健康、平安快乐！

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 伍拾陆 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____