

丝状真菌 *Amorphotheca resiniae* ZN1 的糠醛降解代谢分析

王晓凤, 张建, 辛秀娟, 鲍杰

华东理工大学生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

王晓凤, 张建, 辛秀娟, 等. 丝状真菌 *Amorphotheca resiniae* ZN1 的糠醛降解代谢分析. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1070-1079.

Wang XF, Zhang J, Xin XJ, et al. Furfural degradation by filamentous fungus *Amorphotheca resiniae* ZN1. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1070-1079.

摘要: 木质纤维素在预处理过程产生的降解产物对后续的酶水解和微生物发酵过程产生了强烈的抑制。因此, 这些抑制物的脱除即所谓的“脱毒”步骤是正常进行后续酶解和发酵的前提条件。我们对本实验室筛选的丝状真菌 *Amorphotheca resiniae* ZN1 的糠醛的代谢路径进行了研究。丝状真菌 *A. resiniae* ZN1 转化糠醛的降解代谢途径可以简述为: 糠醛首先快速地转化为毒性较低的糠醇; 在有氧条件下, 糠醇又再度生成不致对微生物产生危害的低浓度糠醛, 糠醛继续氧化为糠酸。推测糠酸可能继续进入 TCA 循环, 进而完成糠醛的完全降解。研究结果为将来加快丝状真菌 *A. resiniae* ZN1 生物脱毒速率、改善木质纤维素生物转化的限速步骤提供了重要的实验依据。

关键词: 降解途径, 生物脱毒, 糠醛, 木质纤维素

Furfural degradation by filamentous fungus *Amorphotheca resiniae* ZN1

Xiaofeng Wang, Jian Zhang, Xiujuan Xin, and Jie Bao

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Some degradation products from lignocellulose pretreatment strongly inhibit the activities of cellulolytic

Received: January 18, 2012; **Accepted:** June 13, 2012

Supported by: National Basic Research Program of China (No. 2011CB707406), National Natural Science Foundation of China (No. 20976051), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2011M500742), Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. WF0913005), Shanghai Leading Academic Discipline Project (No. B505).

Corresponding author: Jie Bao. Tel: +86-21-64251799; E-mail: jbao@ecust.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB707406), 国家自然科学基金 (No. 20976051), 中国博士后基金 (No. 2011M500742), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. WF0913005), 上海市重点学科建设项目 (No. B505) 资助。

enzymes and ethanol fermentation strains, thus the efficient removal of the inhibitor substances (“detoxification”) is the inevitable step for the biotransformation processes. In this study, the biological detoxification of furfural by a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, was studied and the metabolic pathways of furfural degradation was analyzed. The metabolic pathway of furfural degradation in *A. resinae* ZN1 was described as follows: first, furfural was quickly converted into the low toxic furfuryl alcohol; then the furfuryl alcohol was gradually converted into furfural again but under the low concentration under aerobic condition, which was not lethal to the growth of the fungi; furfural continued to be oxidized to furoic acid by *A. resinae* ZN1. It is likely that furoic acid was further degraded in the TCA cycle to complete the biological degradation of furfural. The present study provided the important experimental basis for speeding up the biodetoxification of furfural by *A. resinae* ZN1 and the rate-limiting step in the lignocellulose biotransformation to ethanol.

Keywords: metabolic pathway, biodetoxification, furfural, lignocellulose

在木质纤维素的生物转化过程中,预处理是破坏木质纤维素致密结构、提高纤维素酶解效率的必需步骤^[1]。高温、强酸或强碱的预处理在破坏木质纤维素结构的同时,不可避免地生成了多种对后续酶解和微生物发酵过程具有强烈抑制作用的降解产物,主要包括有机酸类化合物、呋喃类化合物和酚类化合物^[2-6],因此,要实现木质纤维素的有效生物转化,必须对预处理后的原料进行脱毒处理。

目前常用的脱毒方法有水洗法^[7]、过碱化处理 (Overliming)^[8]、活性炭或离子交换树脂吸附^[9]、真空蒸发^[2]以及生物降解等^[10-13]。这些方法中具有实际应用价值的仅有水洗法和过碱化方法,但都存在着大量耗水和大量废水产生、物料损失严重、处理后物料高含水等严重问题^[14]。与其他脱毒方法相比,生物脱毒法条件温和、抑制物转化彻底、耗能低且废水少,而且脱毒后的物料可以直接进入乙醇发酵,但脱毒效率低^[15-16]是制约生物脱毒法广泛应用的核心问题。因此,得到一株能够高效降解各种抑制物的微生物是生物脱毒法的关键^[17]。

糠醛由于含有呋喃环,不易受到代谢过程的

破坏,生物降解较为缓慢。Gerhard 等从含有亚硫酸盐的连续发酵罐中分离出了一株能够转化糠醛的菌株 *Desulfovibrio* sp. F-1^[18]。这株菌能够在无机盐和生长因子受限制的硫酸盐培养基中,以糠醛作为唯一的碳源和能源生长,得率为 1.6~1.8 mmol 乙酸/mmol 糠醛。Mohammad 等对有氧及厌氧情况下的驯化酿酒酵母 CBS 8066 降解糠醛进行了研究^[19],在有氧或者厌氧的分批发酵中,糠醛主要代谢为糠醇(产率约为 70%),而且在指数期生长长期代谢能力最强,稳定期较弱;糠醛使酵母的比生长速率和乙醇产率下降,而当糠醛完全代谢完后有所回升。Belay 等对一株产甲烷球菌属的突变株 *Methanococcus deltae* LH 厌氧转化糠醛进行了研究^[20],该菌株代谢糠醛的主要产物是糠醇,同时生成甲烷和二氧化碳气体,但它不能以糠醛为唯一碳源及能源生长。Nichols 等从被糠醛污染过的土壤中分离到了一种可以代谢呋喃衍生物、有机酸以及酚类化合物的真菌 *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616,可以把毒性强的糠醛转化为弱毒性的相应醇的形式,即糠醇,然后再氧化为相应的酸,从而使得酵母的后续发酵生产乙醇得以进行^[21]。

近两年,荷兰 Delft University of Technology 的一个研究组对糠醛的代谢路径进行了较为深入的研究。Wierckx 等从土壤中分离获得的 *Cupriavidus basilensis* HMF14 能够代谢转化 5-羟甲基糠醛和糠醛,但却不能利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖以及甘露糖^[22];进一步的代谢路径研究表明, *C. basilensis* HMF14 代谢糠醛的产物分别是糠醇和糠酸,并最终进入支持细胞生长的代谢路径;在这 3 种呋喃衍生物中,糠醛对微生物的毒性最大,因此在微生物转化糠醛时,首先将它快速地转化为糠醇,从而使糠醛含量保持在一个低水平浓度范围内,然后再分批少量地通过将其氧化为糠醛作为过渡阶段,最终将其氧化为糠酸,通过细胞摄入,将糠酸大量地运输到细胞中,支持菌体生长,因此在这个过程中,糠醛、糠醇和糠酸是相互转化的,且这个过程中只能看到少量的糠酸积累。Koopman 等建立了 *C. basilensis* HMF14 的突变体转座子文库,鉴定出了呋喃衍生物代谢途径涉及的基因,并在假单胞菌 *Pseudomonas putida* 体内重构了糠醛和 5-羟甲基糠醛的代谢途径^[23]。

Zhang 等从稀酸预处理后的玉米秸秆中筛选到了一株脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1,并对其作了分子生物学和微生物学鉴定,而且在玉米秸秆发酵乙醇过程中得到了有效利用^[15]。本实验主要是以糠醛作为唯一碳源对这一煤油真菌 *A. resinae* ZN1 的抑制物代谢路径进行了研究。所提出的煤油真菌 *A. resinae* ZN1 转化糠醛的降解代谢途径跟前人提出的细菌中的代谢途径基本一致,糠醛首先快速地转化为毒性较低的糠醇,糠醇又再度生成不致对微生物产生危害的

低浓度糠醛,糠醛继续氧化为糠酸。推测糠酸的进一步降解路径可能与其他微生物类似^[23],通过进入 TCA 循环完成糠醛的完全降解。研究结果对将来加快煤油真菌 *A. resinae* ZN1 生物脱毒速率、改善木质纤维素生物转化的限速步骤提供了重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和药品

糠醛购自上海德默化学技术有限公司(上海,中国),糠醇和糠酸购自国药集团化学试剂有限公司(上海,中国)。磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸铵、氯化钙购自上海凌峰化学试剂有限公司(上海,中国),酵母提取物购自 Oxoid Ltd (Basingstoke Hampshire, England)。所有试剂和药品均为分析纯。

1.2 脱毒菌株及培养

脱毒菌种为本实验室筛选和保存的 *Amorphotheca resinae* ZN1,该菌的分子生物学和微生物学鉴定见文献[8]。*A. resinae* ZN1 菌株在 PDA 试管斜面保存和传代。PDA 培养基的制备简述:取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加水 1 000 mL。煮沸 1 h,用 8 层纱布过滤,然后补足水至 1 L,并添加葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,121 °C 灭菌 20 min,贮存备用。该培养基为菌株的传代保存培养基。

1.3 *A. resinae* ZN1 的培养和发酵

种子培养基: KH_2PO_4 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, CaCl_2 0.5 g/L, 酵母提取物 1 g/L, 葡萄糖 40 g/L。

发酵培养基: KH_2PO_4 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L,

MgSO₄·7H₂O 1 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L, 酵母提取物 1 g/L, 葡萄糖 20 g/L。灭菌后分别添加过滤除菌的糠醛 (约 0.6 g/L)。

无机盐培养基: KH₂PO₄ 2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L。灭菌后加入过滤除菌的糠醛 (约 0.6 g/L)。

发酵菌种的培养: 用无菌水从培养好的 PDA 斜面试管洗下孢子悬液, 然后按照 10% (V/V) 的接种量接入含有种子培养基的三角瓶中, 置于 28 °C 的恒温培养箱里静止培养 3 d。

发酵操作是在 3 L 发酵罐 (保兴生物科技有限公司, 上海, 中国) 中进行的, 装液量为 1 L, 20% (V/V) 接种量, 温度 26 °C, 转速 100 r/min, 并通过调节通气量来控制不同的溶氧水平。在发酵过程中, 用 2 mol/L 的 HCl 和 NaOH 维持发酵体系的 pH 在 5.5, 并不时取样, 取样后立即用 0.22 μm 的滤膜过滤样品, 然后保存在 4 °C 的冰箱, 以备后续的分析。

1.4 分析方法

呋喃衍生物 (包括糠醛、糠醇、糠酸) 通过 RP-HPLC (Reversed-phase HPLC, LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A; Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 GC-MS (QP5000, Shimadzu, Agilent 19091S-433) 进行定性分析, 并用 RP-HPLC 进行定量分析。

RP-HPLC 的配置和工作条件为: YMC-Pack ODS-A 柱 (LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A; Shimadzu, Toyoto, Japan), 流动相流速 1 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 35 °C, 流动相为乙腈: 超纯水=50:50; 检测波长为: 糠醛、糠醇和糠酸为 220 nm。

葡萄糖和乙酸是通过 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A; Shimadzu, Toyoto, Japan) 测定的。HPLC 的配置和工作条件为: Bio-Rad HPX-87H 柱, 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 柱温为 65 °C 流速为 0.6 mL/min。所有从发酵罐中取的样品, 进样前均在 14 000 r/min 的条件下离心 7 min, 并通过 0.22 μm 的滤膜过滤。以上所有糠醛代谢过程均有两个重复实验。

2 结果与分析

2.1 *A. resinae* ZN1 的糠醛代谢分析

为了更清楚地了解 *A. resinae* ZN1 生物脱除糠醛的代谢路径, 也为了验证糠醛能否作为丝状真菌 *A. resinae* ZN1 的唯一碳源, 本研究采用了含糠醛的无糖无机盐离子培养基。种子扩培后用 500 mL 的无菌水洗菌膜 2 次, 将洗去残糖的菌膜接种到含糠醛的无糖无机盐离子培养基中进行发酵, 结果见图 1。该实验是采用的无糖无机

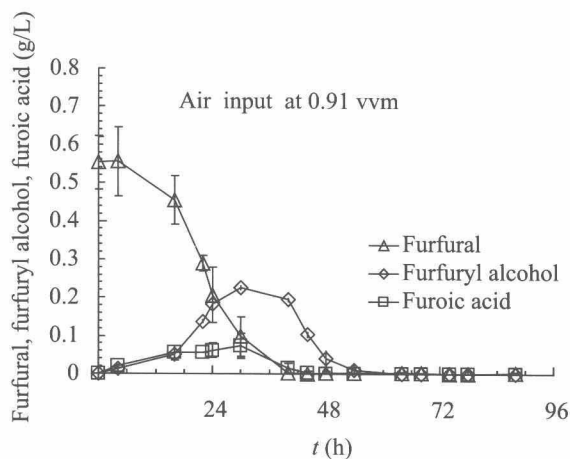


图 1 *A. resinae* ZN1 以糠醛为唯一碳源的代谢转化
Fig. 1 Metabolism of furfural as the sole carbon source by *A. resinae* ZN1. Conditions: 20% inoculation, 26 °C, pH 5.5, 100 r/min, ventilation of 0.91 vvm.

盐离子培养基对 *A. resinae* ZN1 进行培养, 从培养情况来看, *A. resinae* ZN1 依然可以很好地生长繁殖, 从接种发酵开始到糠醛转化期间, 发酵罐内从刚开始接种的少量菌片到发酵罐内壁周围贴满黑色的成片状菌丝、发酵罐搅拌桨上缠满菌丝片, 发酵液从初始的澄清透亮状态到发酵液变成黑色、浑浊状态, 菌体生物量大量增加。但是, 由于菌体生长的不规则性, 准确地定量测定生物量较为困难。从图 1 可以看出, 糠醛可以作为 *A. resinae* ZN1 的唯一碳源及能源进行生长和发酵, 首先, 糠醛快速地向糠醇转化, 随后进一步转化为糠酸。由于糠酸可以顺利进入后续的代谢步骤, 糠酸积累不显著, 并最终被完全代谢, 所以在代谢进行到 42 h 后, 已经看不到糠酸的积累; 而糠醛还原为糠醇的速度要远远快于糠醇进一步氧化的速度, 所以在糠醛快速转化的阶段 (16 h 至 42 h 之间), 糠醇的积累量要大于糠酸的积累量。对于微生物而言, 糠醛对其生长的抑制作用最大, 而糠醇的毒性最弱, *A. resinae* ZN1 将高浓度的糠醛先快速地还原为糠醇, 在一定程度上就大大减弱了糠醛对其生长的强抑制作用, 然后再将弱毒性的糠醇进一步氧化为糠酸, 并将之彻底代谢掉。在有氧状态下, *A. resinae* ZN1 不需要特殊的营养因子可以很好地降解糠醛。*A. resinae* ZN1 可以以少数几种无机盐作为营养代谢糠醛, 表现出了与以往研究中脱毒菌种所不具有的独特性质^[18,24]。

溶氧水平对真菌的液体培养非常重要。本研究对不同溶氧水平的 *A. resinae* ZN1 代谢糠醛的情况进行了考察, 结果见图 2。图 2 中糠醛的转

化曲线 error bar 跨度比较大, 分析原因可能是由于菌种接种时的生长状态存在一定差异。本文中的保藏菌种是在 PDA 试管斜面培养基上培养的, 斜面上菌种的生长状态很难测定其生长曲线, 每批种子接种时的生长状态可能不同, 因此 *A. resinae* ZN1 对糠醛的转化速率可能会存在一定差异。

分析图 2A 可知, 不通空气时, 糠醛转化和糠醇生成速率较慢, 而且生成糠醇后几乎不向糠酸转化, 也检测不到糠酸的积累。由于糠醇对微生物的毒性很小, 生物脱毒进行到这一步, 即可以进行下一步的酶解和乙醇发酵过程。由此可见, *A. resinae* ZN1 可以在厌氧状态下进行生物脱毒。图 2A 还表明, 在糠醛代谢完全之前葡萄糖几乎不消耗, 而在糠醛被完全代谢后, 葡萄糖的消耗速度大大加快, 表明当有抑制物存在时, *A. resinae* ZN1 优先转化其生长抑制物。

分析图 2B 可知, 在较低的溶氧状态下 (0.45 vvm), 糠醛转化和糠醇生成速率显著增加, 并出现有糠酸积累的阶段。与厌氧状态下糠醛代谢一致的是, 糠醛首先快速转为毒性较低的糠醇, 然后再氧化成为糠酸, 而氧的存在是糠醇进一步快速氧化为糠酸的必要条件。在糠醛被完全转化前, 葡萄糖的消耗速度不大; 当糠醛被完全转化为糠醇后, 葡萄糖的消耗速度大大增加。

分析图 2C 可知, 在较高的溶氧水平下 (1.88 vvm), 糠醛的转化非常迅速, 而由于高溶氧的存在, 糠醇向糠酸的转化也更为快速; 而且糠醇和糠酸积累的阶段持续时间很短。高溶氧条件下的葡萄糖利用情况与低溶氧状态时相近。

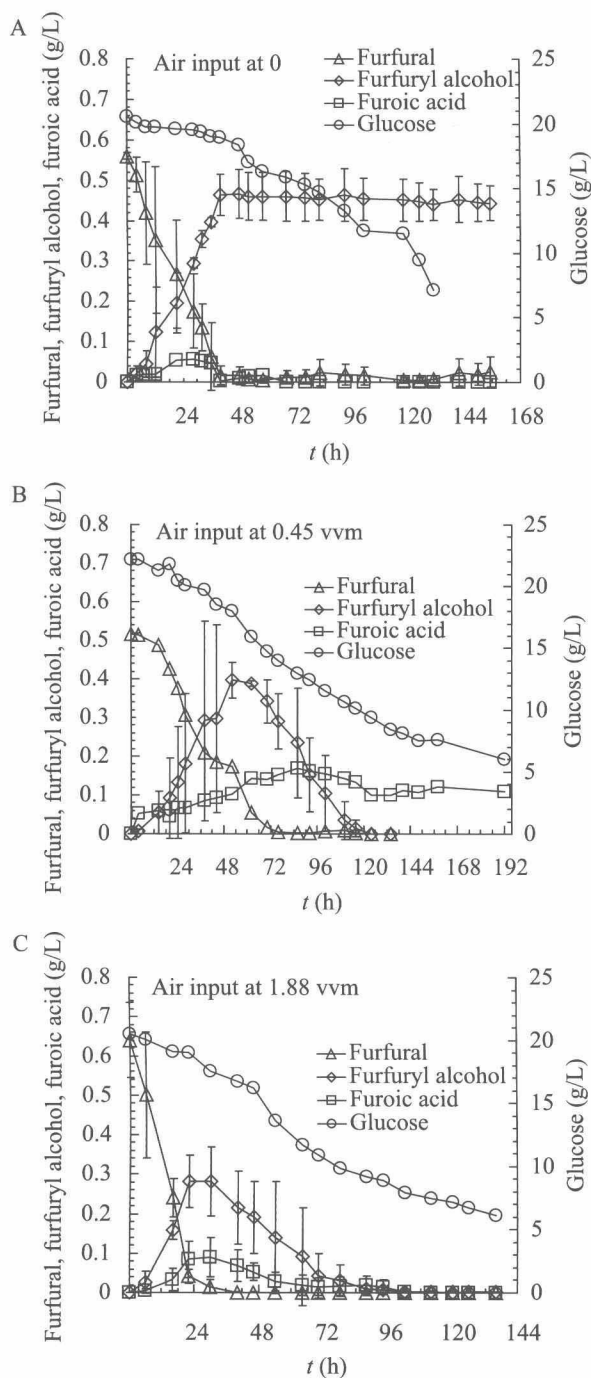


图2 不同溶氧水平下 *A. resinae* ZN1 对糠醛的代谢状况

Fig. 2 Influence of metabolic mechanism of furfural degradation by the kerosene fungus strain, *A. resinae* ZN1 at different oxygen dissolved levels. Conditions: 20% incaution, 26 °C, pH 5.5, 100 r/min.

上述实验结果表明,溶氧在糠醇向糠酸转化过程中起着至关重要的作用,较高的溶氧不仅可以促进糠醇向糠酸的转化,而且有利于糠酸在胞内被彻底代谢为终产物。溶氧虽然不是 *A. resinae* ZN1 进行糠醛降解的限制因素,但却是糠醇进一步向糠酸氧化的重要条件;溶氧可以显著影响糠醛降解的速率,尤其是糠醇向糠酸氧化以及糠酸后续代谢的速率。提高溶氧水平可以大大加快 *A. resinae* ZN1 进行糠醛脱除的速率。

为了进一步确定溶氧在糠醛转化过程中的作用,本研究设计了一个两阶段通气法来研究溶氧对糠醛转化的影响,所用培养基为发酵培养基,成分如下: KH_2PO_4 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, CaCl_2 0.5 g/L, 酵母提取物 1 g/L, 葡萄糖 20 g/L。灭菌后分别添加过滤除菌的糠醛 (约 0.6 g/L)。灭菌后添加过滤除菌的糠醛 (约 0.6 g/L)。两阶段通气法是指在发酵开始前,先通入足量的氮气,以置换发酵液中的溶解氧,在发酵开始后、糠醛完全转化的这段时间内,不通空气,即在糠醛完全转化的这段时间内是完全厌氧培养,之后则以 0.91 vvm 的通气量通入空气进行有氧培养 (图 3)。分析图 3 可知,厌氧培养时糠醛缓慢地向糠醇转化,在糠醛完全转化为糠醇并开始有氧培养时,糠醇开始向糠酸氧化。与图 2 不同的是,两阶段通气法中糠醛是在完全厌氧的环境中还原的,此时糠醇的生成速率很慢,糠酸的积累一直很少。原因可能是由于 *A. resinae* ZN1 在长时间的厌氧生长状态下,细胞活力大大下降,即使重新开始通气进行有氧培养,糠醇的氧化速度依然很慢,糠酸的利用速度也很慢。结合图 2 中的实验结果,有氧培养是提高细胞活力进而提高生物脱毒速率的有效途径。

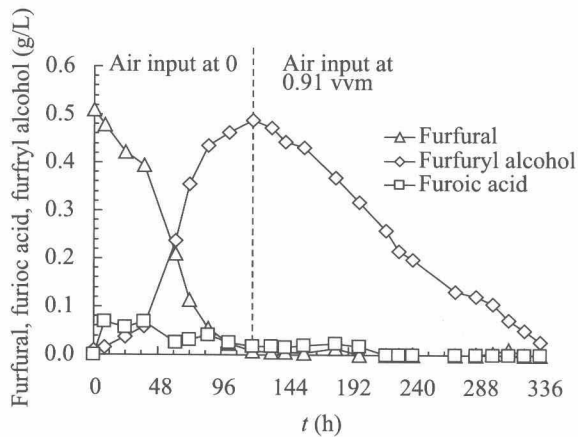


图3 两阶段通气法对 *A. resinae* ZN1 代谢糠醛的影响
Fig. 3 Influence of metabolic mechanism of furfural degradation by *A. resinae* ZN1 with the control method of the second stage. The experiment conditions: 20% incaution, 26 °C, pH 5.5, 100 r/min.

2.4 *A. resinae* ZN1 降解糠醛代谢路径的初步解析

综合上述实验结果, 本文对丝状真菌 *A. resinae* ZN1 转化糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解代谢途径进行了分析, 结果见图 4。糠醛首先在醛还原酶作用下快速地转化为毒性较低的糠醇; 然后糠醇在醇脱氢酶作用下, 再度生成不致对微生物产生危害的低浓度糠醛; 然后, 糠醛在醛脱氢酶作用下, 继续氧化为糠酸。推测糠酸的进一步降解路径可能与 Koopman 等^[23]提出的 *Cupriavidus basilensis* HMF14 代谢路径相似, 通过进入 TCA 循环完成糠醛的完全降解, 即糠酸在糠酰辅酶 A 合成酶的作用下, 结合一分子的 HSCoA 转化为 2-糠酰辅酶 A (2-Furoyl-CoA); 在钼依赖糠酰辅酶 A 脱氢酶的作用下, 结合一分子水后转化为 5-羟基-2-糠酰-辅酶 A; 通过酮-醇互变异构化, 以及自发的内酯水解或者在一般的内酯水解酶的作用下转化为 2-氧化戊二酸和辅酶

A, 2-氧化戊二酸最终进入 TCA 循环。

本研究推测, *A. resinae* ZN1 的糠醛生物降解路径与前人提出的细菌中的代谢途径基本一致^[23,25]。在本研究中, 无论是厌氧状态还是有氧发酵, 均发现糠醛也是被 *A. resinae* ZN1 的细胞摄取并且进行转化的, 我们分析, 发酵液中糠醛的减少应该是被 *A. resinae* ZN1 的细胞一点一点地摄入细胞内, 胞外的糠醛浓度才逐渐降低, 然后糠醛被快速地还原为糠醇后, 高浓度的糠醇又被分泌到胞外, 从而能在胞外检测到。我们认为, *A. resinae* ZN1 的细胞是定量分批地摄入糠醛, 并分泌糠醇的。因此, 糠醛是被 *A. resinae* ZN1 的细胞摄取并在胞内转化的, 其转化产物分别是糠醇、糠酸。考虑到糠醛的高生物毒性, *A. resinae* ZN1 首先是将其进行快速地还原为较弱生物毒性的糠醇, 然后再进行氧化反应, 将高毒性抑制物的浓度维持在不影响 *A. resinae* ZN1 细胞正常生长的水平, 这种脱毒方式被认为是经典的非特异性的呋喃醛脱毒机制^[22]。中间产物糠醇的大量积累充当无毒性的底物泵, 以供糠酸的氧化生成, 糠酸是 *A. resinae* ZN1 细胞进行生长的实际底物。在本文的各项实验中, 糠酸的浓度一直都不高, 说明糠酸被 *A. resinae* ZN1 的细胞作为碳源以供生长繁殖所需。

本文中丝状真菌 *A. resinae* ZN1 对糠醛的降解代谢分析的结论只是初步的研究, 准确的代谢路径确认还需要更多的实验数据和代谢组学研究支持。后续的工作包括 *A. resinae* ZN1 对木质纤维素预处理后的有机酸类 (乙酸、甲酸、乙酰丙酸等)、苯酚类衍生物 (香兰素、对羟基苯甲醛等) 的代谢路径分析, 以及在全基因组测序基础

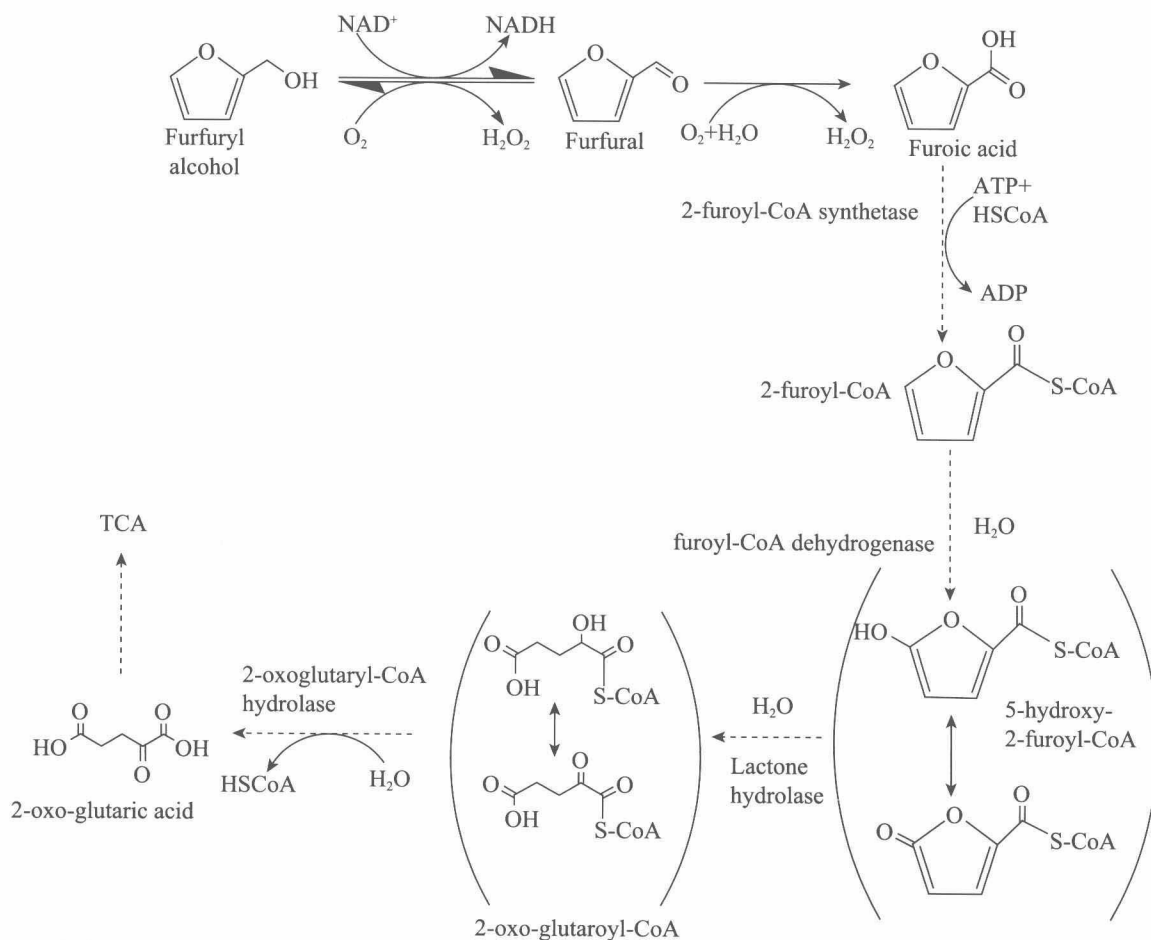


图4 *A. resiniae* ZN1 的糠醛生物降解路径^[23]

Fig. 4 Biodegradation pathway of furfural by *A. resiniae* ZN1^[23].

上的荧光定量 PCR 和生物芯片分析等, 最终的目标是将这一生物脱毒技术应用于真实木质纤维素加工过程, 提高木质纤维素生物炼制过程效率、降低纤维素乙醇的成本。

3 结论

本研究中的丝状真菌 *A. resiniae* ZN1 在厌氧或者有氧状态下均可以很好地降解木质纤维素预处理后产生的呋喃抑制物糠醛。丝状真菌 *A. resiniae* ZN1 转化糠醛的降解代谢途径跟前人提

出的细菌中的代谢途径基本一致: 糠醛首先快速地转化为毒性较低的糠醇, 糠醇则再度生成不致对微生物产生危害的低浓度糠醛, 糠醛继续氧化为糠酸。推测糠酸可能继续进入 TCA 循环, 进而完成糠醛的完全降解。结果为将来加快丝状真菌 *A. resiniae* ZN1 生物脱毒速率、改善限速步骤提供了重要的实验依据。

REFERENCES

- [1] Stricker AR, Mach RL, Graaff LH. Regulation of

- transcription of cellulases and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(2): 211–220.
- [2] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, 77(1/3): 91–103.
- [3] Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2007, 1(2): 119–134.
- [4] Almeida JR, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, 82(4): 340–349.
- [5] Klinken HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 66(1): 10–26.
- [6] Jing XY, Zhang XX, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(3): 697–707.
- [7] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I. Inhibition and detoxification. *Bioresour Technol*, 2000, 74(1): 17–24.
- [8] Martinez A, Rodriguez ME, Wells ML, et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol Progr*, 2001, 17(2): 287–293.
- [9] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(6): 691–697.
- [10] Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresour Technol*, 2008, 99(17): 8042–8048.
- [11] Nichols NN, Dien BS, Cotta MA. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. *Bioresour Technol*, 2010, 101(19): 7545–7550.
- [12] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(6): 691–697.
- [13] Nichols NN, Dien BS, Guisado GM, et al. Bioabatement to remove inhibitors from biomass-derived sugar hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 121: 379–390.
- [14] Dong HW, Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nat Chem Biol*, 2010, 5(6): 317–318.
- [15] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 2010, 3: 26.
- [16] Zhang J, Chu DQ, Yu ZC, et al. Process strategy for ethanol production from lignocellulose feedstock under extremely low water usage and high solids loading conditions. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 950–959.
- 张建, 楚得强, 于占春, 等. 低水用量约束条件下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 950–959.
- [17] Converti A, Perego P, Dominguez JM. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Candida guilliermondii*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, 82(2): 141–151.
- [18] Brune G, Schoberth SM, Sahn H. Growth of a strictly anaerobic bacterium on furfural (2-furaldehyde). *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(5): 1187–1192.
- [19] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic

- batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(2): 169–174.
- [20] Belay N, Boopathy R, Voskuilen G. Anaerobic transformation of furfural by *Methanococcus deltae* (Delta) LH. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(5): 2092–2094.
- [21] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 42(7): 624–630.
- [22] Wierckx N, Koopman F, Luaine B, et al. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnol*, 2010, 3(3): 336–343.
- [23] Koopman F, Wierckx N, Johannes HW, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(11): 4919–4924.
- [24] Boopathy R, Bokang H, Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *J Ind Microbiol*, 1993, 11(3): 147–150.
- [25] Nichols NN, Mertens JA. Identification and transcriptional profiling of *Pseudomonas putida* genes involved in furoic acid metabolism. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 284(1): 52–57.



《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论 (Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如 DNA、ATP 等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。