

学校代码: 10251

学 号: Y30180967

# 華東理工大學

## 硕士学位论文

论文题目: 谷氨酸棒杆菌中双产烃路径构建

生产纤维素烃类化合物

学科专业: 生物化工

研究方向: 生物炼制

论文作者: 华珂君

指导教师: 鲍杰 教授

定稿日期: 2021 年 05 月 26 日

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学

## 学位论文

谷氨酸棒杆菌中双产烃路径构建生产  
纤维素烃类化合物

华珂君

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:   生物化工  

论文定稿日期:   2021.05.26        论文答辩日期: \_\_\_\_\_

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:

评 阅 人:

# 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：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 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：

年 月 日

## 谷氨酸棒杆菌中双产烃路径构建生产纤维素烃类化合物

### 摘要

烃类化合物是航空燃油的主要成分，目前全部来自于石油、煤炭等不可再生的化石燃料。以可再生的资源为原料实现航空燃油的生物制造，是后石油时代和碳中和经济的重要方向。产烃微生物的烃得率较低，需要消耗大量的碳水化合物原料。因此，以来源广泛的木质纤维素原料进行烃类化合物的发酵生产具有重要意义。木质纤维素必须经过预处理后才能有效酶解糖化产生可发酵单糖，产烃微生物必须对预处理产生的抑制物具备强大的耐受性。谷氨酸棒杆菌具有独特的抑制物耐受性和完整的遗传操作系统，是木质纤维素原料进行烃类发酵生产的重要宿主菌。

本文以常规工业菌株谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114 为出发菌株，首先在 *C. glutamicum* 中引入了来自蓝藻的 AAR (酰基-ACP 还原酶)-ADO (醛去甲酰化加氧酶) 产烃路径，成功构建了一株具备产烃能力的谷氨酸棒杆菌；对构建的产烃路径进行了多层次的代谢改造和路径优化后，发现增加辅因子 NADPH 的供给可以使烃类化合物的产量比原始菌株提高约 8.3%。

其次，为了提高谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 的烃产量，本文在 *C. glutamicum* 中构建了第二条脂肪酸直接脱羧路径。*C. glutamicum* 的突出代谢特征是缺少磷脂酸磷酸酶 (PAP) 和二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT)，从而无法合成三酰甘油等微生物油脂，大量脂肪酸在胞外形成高浓度积累。为了有效利用脂肪酸，本文在 *C. glutamicum* 中异源表达了来自 *Macrococcus caseolyticus* 的脂肪酸脱羧酶 OleT<sub>MC</sub>，构建了一条直接将游离脂肪酸脱羧生成烃类化合物的途径。为了避免烃类化合物的跨膜运输对细胞膜磷脂和蛋白的伤害，本文将胞内表达的脂肪酸脱羧酶 OleT<sub>MC</sub> 通过 Sec 路径引导分泌到了胞外，成功地将烃类化合物的产量提高到胞内表达 OleT<sub>MC</sub> 时的 3 倍左右。

再次，本文将构建的 AAR-ADO 路径和 OleT 分泌表达路径等两条产烃路径整合到了同一株 *C. glutamicum* 菌株中，形成了一株具备双产烃路径的 *C. glutamicum* 工程菌，将烃产量提高到了 AAR-ADO 路径工程菌的 3.3 倍，以及 OleT 分泌表达路径工程菌的 6.7 倍。

最后，通过对该双产烃路径工程菌株的发酵条件进行优化，烃产量提高了 81.3%，达到了 29.1 mg/L。在玉米秸秆水解液中进行初步产烃，产量达到 10.8 mg/L，成功实现了木质纤维素生物质发酵生产烃类化合物，为纤维素烃类化合物的工业生产奠定了重要的应用基础。

**关键词：**木质纤维素水解液；谷氨酸棒杆菌；生物产烃；脂肪酸脱羧酶；代谢工程

## Cellulosic Hydrocarbons Production by Engineering Dual Synthesis Pathways in *Corynebacterium glutamicum*

### Abstract

Hydrocarbons are the main components of aviation fuel, which all come from non-renewable fossil fuels such as oil and coal. Biomanufacturing of aviation fuel from renewable resources is an important direction for the post-oil era and carbon neutral economy. Hydrocarbon-producing microorganisms have low hydrocarbons yield and require the consumption of large amounts of carbohydrate feedstock. Therefore, it is of great significance to use the most available lignocellulose feedstock for the production of hydrocarbons. Lignocellulose must be pretreated before effective enzymatic saccharification to produce fermentable monosaccharides, and hydrocarbon-producing microorganisms must have a strong tolerance to the inhibitors produced by pretreatment. *Corynebacterium glutamicum* is an important host strain for the production of hydrocarbons from lignocellulose feedstock due to its unique inhibitor tolerance and complete genetic operating system.

In this study, the conventional industrial strain *Corynebacterium glutamicum* S9114 was used as the starting strain. Firstly, the AAR (acyl-acyl carrier protein ACP reductase)-ADO (aldehyde deformylating oxygenase) hydrocarbons synthesis pathway from cyanobacteria was introduced into *C. glutamicum* and a hydrocarbon-producing strain was successfully constructed. After multi-level metabolic modification and optimization of the constructed hydrocarbons synthesis pathway, it was found that increasing the supply of cofactor NADPH could increase the hydrocarbons production by about 8.3% compared with the original strain.

Next, in order to improve the hydrocarbons production of *C. glutamicum*, the pathway of fatty acid decarboxylation was constructed in *C. glutamicum*. The prominent metabolic characteristic of *C. glutamicum* is the lack of phosphatidate phosphatase (PAP) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT), which makes it impossible to synthesize microbial lipids such as triacylglycerol, and a large number of fatty acids accumulates in the extracellular space. In order to efficiently utilize fatty acids, the fatty acid decarboxylase OleT<sub>MC</sub> from *Macrococcus caseolyticus* was heterologously expressed in *C. glutamicum* to construct a pathway of directly decarboxylating free fatty acids to generate hydrocarbons. To avoid the damage of the transmembrane transport of hydrocarbons to the phospholipids and proteins of the cell membrane, the fatty acid decarboxylase OleT<sub>MC</sub> was secreted to the extracellular through the Sec pathway, and the yield of hydrocarbons was successfully increased to about 3 times of that when OleT<sub>MC</sub> was expressed intracellularly.

Then the dual synthesis pathways, including the AAR-ADO pathway and the OleT secreting expression pathway, were integrated into one *C. glutamicum* strain to form an

engineered *C. glutamicum* strain with dual synthesis pathways of hydrocarbons. The hydrocarbons production was increased to 3.3 folds of the engineered strain with AAR-ADO pathway and 6.7 folds of the engineered strain with the secreting expression OleT.

Finally, by optimizing the fermentation conditions of the strain with dual synthesis pathways, the production of hydrocarbons was increased by 81.3% to 29.1 mg/L. The preliminary cellulosic hydrocarbons generation was carried out in the corn stover hydrolysate, and the yield reached 10.8 mg/L, which successfully realized the production of hydrocarbons from lignocellulose biomass and laid an important application foundation for the industrial production of cellulosic hydrocarbons.

**Keywords:** Lignocellulose hydrolysate; *Corynebacterium glutamicum*; Biological hydrocarbons production; Fatty acid decarboxylase; Metabolic engineering

## 目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制.....	1
1.2 谷氨酸棒杆菌和生物炼制.....	3
1.3 生物燃料简介.....	4
1.4 烃类化合物.....	7
1.4.1 烃类化合物的生物合成.....	7
1.4.2 合成烃类化合物的微生物平台.....	9
1.4.3 生成烃类化合物培养条件的优化.....	10
1.5 本课题研究意义与研究内容.....	11
第 2 章 蓝藻产烃路径在谷氨酸棒杆菌中的构建及优化.....	12
2.1 引言.....	12
2.2 材料与方法.....	13
2.2.1 实验菌株.....	13
2.2.2 培养基和培养条件.....	13
2.2.3 重组质粒的构建及转化.....	16
2.2.4 重组菌株的构建.....	16
2.2.5 产烃发酵.....	16
2.2.6 烃类的提取与测定.....	17
2.3 结果与讨论.....	17
2.3.1 强化烃类的合成路径提高烃的产量.....	18
2.3.2 增加辅因子供给并减少有毒副产物的积累提高烃的产量.....	18
2.4 本章小结.....	19
第 3 章 谷氨酸棒杆菌分泌表达脂肪酸脱羧酶生成烃类化合物.....	21
3.1 引言.....	21
3.2 材料与方法.....	21
3.2.1 实验菌株.....	21
3.2.2 培养基和培养条件.....	22
3.2.3 重组质粒的构建及转化.....	22
3.2.4 重组菌株的构建.....	27
3.2.5 产烃发酵.....	27

3.2.6 烃类的提取与测定.....	27
3.3 结果与讨论.....	27
3.3.1 脂肪酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的异源表达.....	27
3.3.2 脂肪酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的分泌表达.....	28
3.3.3 脂肪酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的表面展示.....	30
3.4 本章小结.....	31
第 4 章 双产烃路径在谷氨酸棒杆菌中的构建.....	32
4.1 引言.....	32
4.2 材料与方法.....	32
4.2.1 实验菌株及质粒.....	32
4.2.2 培养基和培养条件.....	32
4.2.3 重组质粒的构建及转化.....	34
4.2.4 重组菌株的构建.....	34
4.2.5 木质纤维素原料预处理及生物脱毒.....	34
4.2.6 玉米秸秆水解液的制备.....	34
4.2.7 产烃发酵.....	34
4.2.8 烃类的提取与测定.....	35
4.2.9 分析方法.....	35
4.3 结果与讨论.....	35
4.3.1 双产烃路径在谷氨酸棒杆菌中的构建.....	35
4.3.2 利用葡萄糖为碳源优化烃类化合物的生产.....	37
4.3.3 以木质纤维素原料进行烃类化合物的生产.....	39
4.4 本章小结.....	40
第 5 章 结论与展望.....	41
5.1 结论与创新点.....	41
5.2 展望.....	42
参考文献.....	43
硕士期间研究成果.....	52
致谢.....	53

## 第 1 章 文献综述

### 1.1 木质纤维素生物炼制

现代工业社会是建立在对化石燃料的勘探、开采、加工和利用上的，因此随着全球经济的不断发展，人们对化石燃料的需求也与日俱增。化石燃料是一种不可再生资源，且在开采和使用的时候会产生大量的污染，所以考虑逐渐过渡到以生物原料为基础的社会很有必要。现在已经出现了包括生物质在内的一系列新能源，其中化学品的生产将日益尤其依赖于植物生物质<sup>[1]</sup>。我国是一个农业大国，来自农业和林业的木质纤维素生物质是来源广泛、含量丰富的生物资源，非常适合作为原料进行生物炼制<sup>[2]</sup>。从目前的形势来看，利用木质纤维素替代化石燃料并进行化学品的生产，具有非常广阔的应用前景。

木质纤维素的主要成分为纤维素 (40 ~ 50%)、半纤维素 (25 ~ 35%) 和木质素 (15 ~ 20%)<sup>[3,4]</sup>。在纤维素的骨架上的羟基会形成致密的晶体构造，因此纤维素在水和大多数有机溶剂中溶解度较低<sup>[5]</sup>。半纤维素也是一种多糖聚合物，对操作条件比较敏感，所以必须控制好处理的时间和温度等条件，避免形成糠醛等抑制物，抑制后续的发酵过程<sup>[6]</sup>。木聚糖则是地球上含量最丰富的半纤维素<sup>[7]</sup>。木质素是一种复杂的聚合物<sup>[8]</sup>，部分与半纤维素共价结合，可以使植物细胞壁变得更为坚韧<sup>[9]</sup>。

将木质纤维素转化为微生物可利用的糖的最佳策略之一是酶解糖化，这一过程不会消耗大量能源并且污染较小。但是木质纤维素结构复杂不易被分解，这一特性使得酶水解变得十分困难。因此，预处理在生物炼制的过程中的重要性便不言而喻了，其根本目标是破坏木质纤维素致密的构造，从而提升之后酶水解的效率<sup>[10]</sup>。一个高效且低成本的预处理方法应该考虑以下几个要点：(1) 不同的预处理方法都有各自最适宜的原料，碱式预处理方法能有效降低农业废渣中木质素的含量，但是对于较难降解的底物（例如软木）则处理效果不佳，酸式预处理效果更好但成本较高；(2) 在酶活低于 10 FPU/g 纤维素的情况下，经过预处理的纤维素五天内酶水解得率应高于 90%；(3) 不会出现明显的糖降解，造成单糖和寡糖的流失；(4) 尽可能减少抑制物的生成<sup>[11]</sup>。目前预处理的方式主要有四大类。其中，物理法是通过破碎、冷冻、辐射等手段增加原料的表面积，减小其颗粒直径从而降低原料的聚合度<sup>[12]</sup>。化学法通过化学试剂将各组分进行溶解分离<sup>[13-16]</sup>等。物理-化学法是将物理法和化学法结合起来破坏木质纤维素的结构，主要包括蒸汽爆破、氨纤维爆破预处理 (AFEX)、CO<sub>2</sub> 爆破预处理等。生物法是一种环境友好型预处理方法，该方法利用白腐真菌、软腐真菌等微生物生产木质素降解酶对木质素进行降解<sup>[17]</sup>。这种方法虽然能耗低，作用条件温和，但由于其耗时久和所需空间较大等缺点，并不适用于大规模的使用。在以上方法中，稀酸预处理应用最多，该方法强度大效率高，并且原料成本较低<sup>[18]</sup>。但同时也存在很多弊端：(1) 会有大量废水的生成，从而提高了生产成本；(2) 酸液具有腐蚀性，容易给设备造成损坏；(3) 在预处理过程中会产生影

响细胞生长的抑制物，对于后续的发醇会造成较为严重的影响<sup>[19]</sup>。针对传统稀酸预处理方法中存在的这些问题，本课题组对其进行了改进，研发出一种新型的干酸预处理方式。干酸预处理可以将硫酸和水的用量最大程度地减少，成功实现预处理的零废水产生，也很好解决了酸液易对设备造成腐蚀这一问题，极大地降低了预处理成本，是一种实际应用潜力巨大的技术手段<sup>[20]</sup>。

预处理是在高温高压的条件下进行的，所以会产生大量的抑制物，这些抑制物不仅会影响之后纤维素酶的酶水解效率，还会明显抑制菌株的生长和发酵性能<sup>[6]</sup>。抑制物一般有几类，分别为酚类、弱酸类和呋喃醛及其衍生物类<sup>[21]</sup>。酚类化合物会作用于细胞膜破坏其完整性，使细胞膜的功能受损<sup>[22]</sup>。弱酸类也有很多种类，未分解的弱酸会从培养基中扩散至胞内分解，导致胞内 pH 降低，细胞通过 ATP 水解将质子泵出胞外，因此用于生物质形成的 ATP 便大大减少影响到了菌株的生长<sup>[23]</sup>。呋喃醛类包括糠醛和 5-羟甲基糠醛等，此类抑制物会降低胞内参与能量代谢过程酶的活性，从而抑制菌株生长或增加生长的延滞期<sup>[24]</sup>。预处理完成后需要将原料中存在的这些有毒物质去除，这便是脱毒。目前常用的脱毒方法有物理法、化学法和生物法等三种<sup>[6]</sup>。物理法包括水洗、蒸发；化学法包括中和、萃取等；这些方法会不可避免地使用大量化学品和能源并生成大量废水，因此，生物法简单、温和、能耗低等优势便体现了出来。本实验室通过筛选得到了一株可以在低 pH 条件下降解抑制物的脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89，该菌株在脱毒过程中无需添加额外的营养物质，不会产生任何废水和固体废弃物，具有很高的实际应用价值。

糖化是生物炼制的一个主要限速步骤<sup>[25]</sup>。物料在经过复杂的预处理反应后剩下的多糖中，纤维素占据绝大部分，糖化的作用就是将这些纤维素分解为可被菌株生长发酵时利用的单糖。酶水解是目前应用较多的一种糖化方法，利用由内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及 $\beta$ -葡糖苷酶等组成的纤维素酶将长链纤维素分解为单糖。另外，纤维素酶中还含有半纤维素酶和木质素酶，它们的催化可以使更多的纤维素与纤维素酶结合，从而提高酶水解的效率<sup>[26]</sup>。这种方法具备条件温和、效率高等优点，但同时也存在纤维素酶价格昂贵且酶的用量比较大等缺点，所以酶水解的成本很高。针对这一问题，本课题组研发的一种生物反应器可以将物料和纤维素酶充分混合，减少酶的用量，生产成本也会因此明显降低<sup>[27]</sup>。

糖化和发酵可以分开进行，即分步糖化发酵，这样可以在各自的最适条件下进行。但是在这种情况下，底物浓度相对较高，容易产生纤维素酶的底物抑制，影响酶活使得酶水解不充分效率变低，从而需要消耗更多的酶以及造成纤维素的浪费<sup>[28]</sup>。这两个步骤也可以同时进行，即同步糖化共发酵。在这种情况下，纤维素水解后生成的单糖可以马上被利用，在减轻底物抑制的同时也能减少酶的用量，提高糖化效率，缩短整个过程的所需时间<sup>[29]</sup>。尽管同步糖化发酵有相当大的优势，但是当酶水解的条件和菌株的最适发酵条件存在比较大的差异时，这种方式并不适用，所以还是需要具体问题具体分析。不管采用哪种糖化发酵形式，固态和液态的分离都是不能缺少的一个环节。将高固含量的

发酵液进行固液分离存在一定的难度，并且其中各种复杂的成分也会进一步增加固液分离的成本。针对这个问题，本实验室开发了在短时间内升高温度进行加热的方法，可以实现快速固液分离，降低难度提高效率，为产品的纯化提供更多保障，有非常广阔的应用前景。

## 1.2 谷氨酸棒杆菌和生物炼制

谷氨酸棒杆菌是一株革兰氏阳性菌，由于其不会产生内毒素而被公认为是一种安全菌株，现在已经大面积应用于各种氨基酸的生产<sup>[30]</sup>。除此之外，谷氨酸棒杆菌的细胞代谢灵活<sup>[31]</sup>，对碳源和目标产物的耐受度高<sup>[32]</sup>，并且具有较好的遗传稳定性<sup>[33]</sup>，因此利用该菌株生产化学品是非常有潜力的。现在大量的研究都集中于谷氨酸棒杆菌，为其基因组学<sup>[34]</sup>、转录组学<sup>[35]</sup>、中心碳代谢、系统生物学和生理学等方面提供了深入的见解。

在预处理的过程中会不可避免地产生各类不同的分子量较小的抑制物。虽然后续会进行进一步的脱毒处理，抑制物的浓度也会因此有大幅度的下降，但是将抑制物全部脱除会造成部分糖类的损失，不利于之后的发酵，所以在脱毒处理结束后依然会有少量抑制物残余。谷氨酸棒杆菌耐受性较强，相比于其他菌株，它在木质纤维素体系中可以较好地生长<sup>[36]</sup>。有研究表明，通过驯化或对其进行基因改造等手段能够进一步提高耐受性从而更好地适应存在有毒抑制物的木质纤维素体系<sup>[37]</sup>，因此谷氨酸棒杆菌是一种非常适合生物炼制的菌株。虽然谷氨酸棒杆菌无法利用水解后的全部糖类，但是它不会优先利用大量的葡萄糖，因此通过引入其它糖类的利用途径可以使谷氨酸棒杆菌具备利用混合糖进行发酵的能力<sup>[38]</sup>。

谷氨酸棒杆菌是工业生物技术的主要研究对象之一，在过去主要被用来生产 L-谷氨酸和 L-赖氨酸，年平均产量高达 600 万吨。如今随着合成生物学的不断发展，利用谷氨酸棒杆菌生产的产品已经从传统的食品和饲料行业发展到各行各业，包括氨基酸衍生物、生物燃料等<sup>[39]</sup>。此外，谷氨酸棒杆菌作为一株兼性厌氧菌，在缺氧条件下菌株的生长会变得缓慢，但细胞的代谢仍旧十分活跃，可以更多地将碳源转化为有机酸<sup>[35]</sup>。在缺氧并且有抑制物存在时，细胞内的各种酶还是会有高度活性<sup>[40]</sup>。综上所述，谷氨酸棒杆菌在木质纤维素生物炼制体系中有着巨大的优势，通过对其进行更深入的研究一定能挖掘出更多的工业应用价值。

在谷氨酸棒杆菌中不存在合成甘油三酯等微生物油脂的途径，同时也不具备脂肪酸的 $\beta$ -氧化路径，因此在其生长过程中产生的脂肪酸有极大部分难以被分解，分泌到胞外之后会造成发酵液中有大量脂肪酸的累积。这是谷氨酸棒杆菌中比较独特的一种现象。而烃类化合物的生成正是基于脂肪酸合成的，其合成前体可以是脂肪酸，也可以是脂肪酸的前体脂酰-ACP，只是需要不同的酶催化烃类化合物以不同的路径生成。例如以脂肪酸脱羧酶进行产烃只需一步脱羧反应即可完成，而蓝藻中的产烃路径则需分两步进行。总的来说，利用谷氨酸棒杆菌生产纤维素烃类化合物具有众多得天独厚的优势，对于烃类化合物未来的大规模产业化生产来说是一个良好的基础。

### 1.3 生物燃料简介

在 20 世纪, 人类社会的研究重点是建造以石油、煤和天然气为基础的炼油厂来开发化石原料。这些原料在工业上被用来生产多种产品, 如各种燃料、精细化工、焦炭、沥青等, 以满足全世界人类日益增长的需求<sup>[41]</sup>。不可再生的化石燃料一旦被使用, 在长时间内无法再次生成, 而人们的需求量却越来越大, 这样便出现了相当大的矛盾, 直到能源危机的出现才让人们注意到问题的存在。此外, 化石燃料的过度使用也会对环境造成无法挽回的伤害。燃烧化石燃料是使空气中温室气体含量增加的一个重要因素, 温室气体的排放令气候变暖, 让人们赖以生存的地球负担越来越重, 如果继续这样下去, 情况会变得越来越糟糕。因此, 生物燃料的开发和应用迫在眉睫。生物燃料是满足运输、发电和供暖部门对能源需求的一种非常有希望的替代产品。生物燃料可以直接用作化石燃料的替代品, 也可以与化石燃料混合后使用<sup>[42]</sup>。不仅如此, 燃烧生物燃料时所产生的温室气体远远低于传统化石燃料燃烧所产生的排放量。因此, 利用可再生物质生产的生物燃料有助于减少化石燃料的燃烧, 缓解全球气候变暖, 对环境非常友好, 同样也有助于减弱现代社会对石油等燃料的依赖, 为走上可持续发展的道路贡献一份强大的力量。

根据原料的不同, 生物燃料被分为了四大类<sup>[43]</sup>。第一代生物燃料的原料包括油籽、甘蔗和其他含油的食物和动物饲料作物等产品。工业上大规模生产和使用的第一代生物燃料主要有生物乙醇以及生物柴油。其中, 第一代生物乙醇绝大多数以含糖植物或谷物作物为原料进行工业生产, 其中 80%的原料来自玉米和甘蔗这两种粮食作物。之前有学者研究了采用不同生长阶段的甘蔗作为原料生产生物乙醇的情况, 结果表明在甘蔗种植 300-325 天之后, 利用其作为原料生产乙醇的产量会有所提高<sup>[44]</sup>。它不仅可以直接作为汽油燃料的替代品, 也可以作为更容易与汽油混合的乙叔丁基醚(ETBE)的原料。第一代生物柴油是指脂肪酸甲酯或其它酯类油, 是由动植物油脂等可再生资源与醇类进行酯交换得到的。这一反应的催化剂可以是液态酸, 也可以是液态碱。但是脂肪酸含量较高的油脂要进行基本的酯交换反应是非常困难的, 所以对于这一类油脂, 使用固相催化剂进行反应的效果更好。固体催化剂可以将催化甘油三酯和游离脂肪酸酯化生成甲酯同时进行, 这样也可以解决分离难、易对环境造成影响等问题<sup>[45]</sup>。有研究用 20%的甲醇和 0.5%的氢氧化钠从棉籽油中获得了 77%的生物柴油产量<sup>[46]</sup>。

渐渐人们对第一代生物燃料产生了质疑, 调查显示有人认为这些燃料产量的增加是导致食品价格上涨的原因之一, 并且影响到了众多发展中国家的粮食安全, 因此第二代生物燃料便应运而生。生产第二代生物燃料的原料则是木质纤维素, 木质纤维素原料是地球上含量最多但是并未被人们充分利用的生物资源之一, 因此具有巨大的工业生产潜力。最具典型特征的第二代生物燃料便是生物乙醇。生物乙醇具有高汽化热的特点, 是非常合适的汽油替代品<sup>[47]</sup>。有研究人员尝试了用三种不同的木糖/纤维素分离策略对玉米芯处理, 然后进行发酵生产生物乙醇。结果表明玉米芯中有 40-70%的半纤维素以及 72-90%的纤维素可以通过不同的分馏方法转化为乙醇<sup>[48]</sup>。利用农业生产的废弃物生产第

二代生物乙醇也可以与生产沼气相结合。有学者研究了在生物炼制时利用小麦秸秆生产生物乙醇和生物氢，接着利用产生的废水生产甲烷，不仅提高了生物质利用率，也减少了生产成本，是一种更经济的生产方式<sup>[49]</sup>。此外，费托柴油也属于第二代生物燃料。费托合成 (Fischer-Tropsch Synthesis) 是指以合成气为底物，在合适条件下催化生成液态碳氢化合物的过程<sup>[50]</sup>。以利用生物质制备的合成气为原料制备的费托柴油可以应用于交通、化工等行业，而且不含硫元素，不仅环境友好，也有望在一定程度上缓解能源危机。

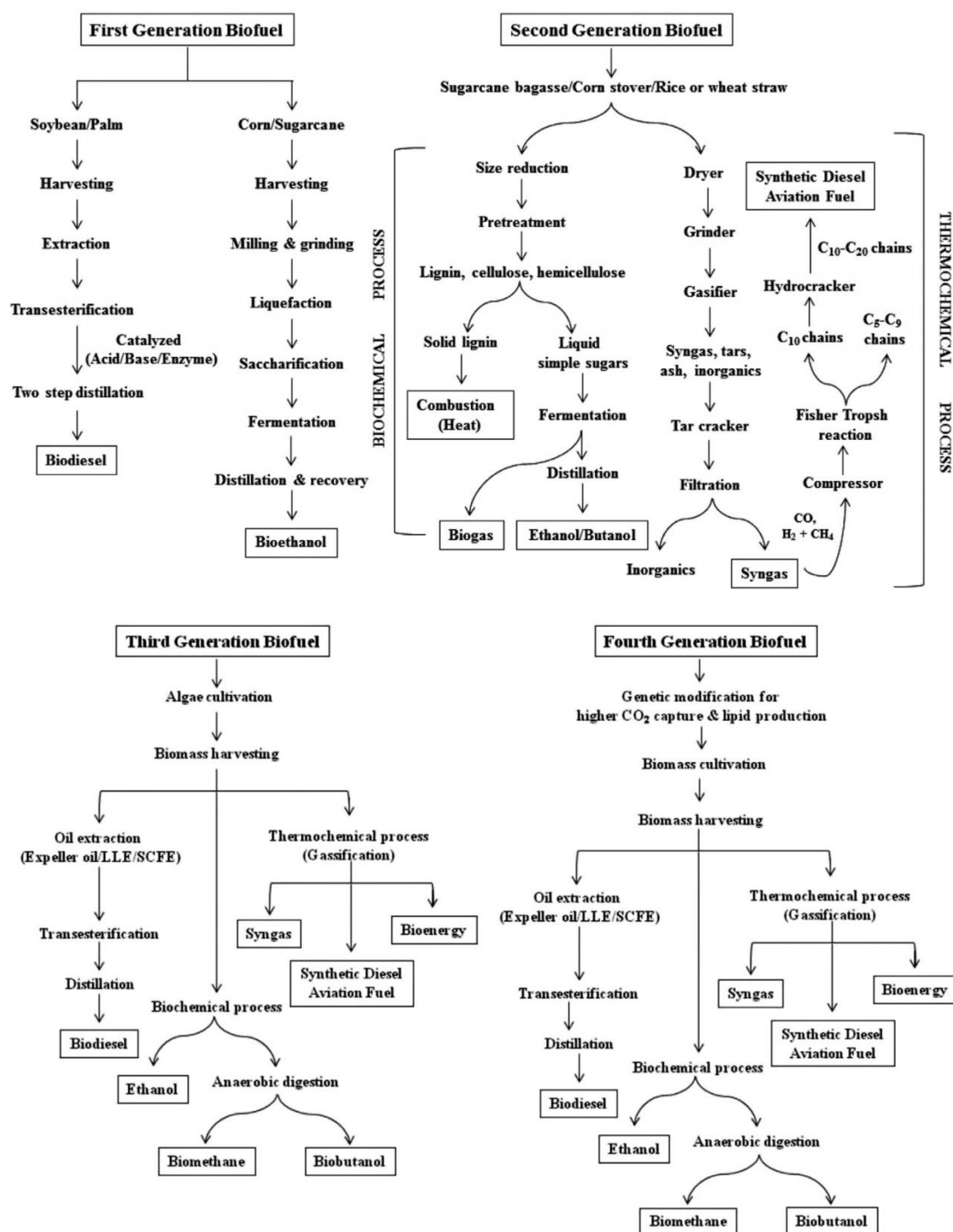


图 1.1 用于生产第一、第二、第三和第四代生物燃料的技术<sup>[43]</sup>

Fig. 1.1 Technologies involved for production of the first, second, third and fourth generation of biofuel<sup>[43]</sup>

第二代生物燃料虽然相比于第一代有众多突出的特点，但是需要大面积土壤湿润的土地是比较麻烦的一点，因此最近几年将藻类作为生物燃料生产的宿主引起了研究者的兴趣。藻类是一种的光自养生物。它们可以将大气中的二氧化碳转化为有机物，也可以从太阳光中吸收能量用于生长以及各种化合物的生产<sup>[51]</sup>。由于它们总是进行光合作用，所以属于类植物的有机体。而且它们通常是生长在水中的。光合作用效率要好于其他植物。据报道，藻类的光合作用效率范围从 3%到 8%不等，处于一个相对较高的范围，而许多陆生作物的光合作用效率仅为 0.5%。另一方面，绝大部分藻类含有高达 70%的基于细胞干重的脂质<sup>[52]</sup>，并可以利用不同的废水流在液体介质中生长，从而减少淡水的使用量。藻类可作为潜在的多种生物燃料的生产原料，包括在生物质的厌氧降解过程中产生的沼气和藻类细胞中积累的油脂生产的生物柴油，这是藻类生产的最常见的生物燃料类型<sup>[53]</sup>。藻类的生物量由有机物组成，厌氧降解的过程是将这些有机物转化为最终产物，即甲烷、二氧化碳新生物质和无机残留物。通常该过程可以简化为三组生化反应：水解、乙酰化和甲烷生成。对于生物柴油，在收集藻类生物质后将其进行干燥处理，之后使用相应的溶剂提取脂质。有文献表明，如果在提取前将藻类进行机械研磨处理或热处理使脂质暴露于溶剂，与溶剂接触更充分，则提取效果会更佳。己烷由于其沸点低和油脂在其中的溶解度高的特性，成为了大规模从藻类中提取脂质时的最常用溶剂。生物柴油可以通过以下任意方法从油脂中获得：(1)碱催化油与醇的酯交换反应；(2)酸催化油与甲醇的酯交换反应；(3)油脂先转化为脂肪酸，然后脂肪酸在酸催化下转化为烷基酯。与使用其它生物质生产柴油相比，利用藻类作为原料生产柴油优势更为明显。例如藻类的含油量更高，不与粮食食品等产品的生产竞争农业用地以及在藻类生长过程中会对废气二氧化碳进行生物固定等。但同时也有生物量浓度低、生产成本高以及提取难度大等不足。

最近几年的研究集中在寻找高油脂含量藻类和各自对应的最佳生长条件，一些藻类例如 *Botryococcus braunii*, *Chaetocero scalcitrans*，还有几种小球藻等，都被认为是未来的生物燃料来源<sup>[54,55]</sup>。其中，小球藻的油脂含量和生物量最高，但甘油三酯含量较低。而另外一些藻类物种，可以生产高达基于细胞干重 77%的甘油三酯，但是它们的生物量都比较低，所以最终的产量水平不算很高。生长快速的藻类含油量低，油脂含量高的藻类生长缓慢，这是一个很普遍的现象。因此，开发具有快速生长的高生物量和高脂质含量的物种在藻类生物燃料的商业化进程中是非常重要的。另外也有研究表明，不同的培养方式会影响同一种微藻菌株的生物量和油脂产量<sup>[55]</sup>。对此，研究者们也正在为这些微藻寻找最适合的培养策略，进一步提高其油脂含量，努力开发更具成本效益和环境友好的可持续生产的生物燃料。在如今生物技术飞速发展的情况下，基因改造技术应该是增加藻类油脂产量最理想的手段。这种利用生物技术改造藻类细胞内的相关代谢途径让其高产油脂而得到的生物燃料便是第四代生物燃料。提高光合作用效率、增加光透射以及减少光抑制也是藻类基因工程中的一些常用手段<sup>[56]</sup>。扩大藻类光合作用的吸收光谱范围，可以使微藻的光合作用效果得到显著的提升<sup>[57]</sup>。要增加致密藻类培养物的光透射

可以通过缩短叶绿体的叶绿素天线来实现<sup>[58]</sup>。此外，藻类中油脂含量的增加也是提高藻类生物量得率的关键因素<sup>[59]</sup>。已经有文献研究了藻类细胞内的脂质合成和分解代谢途径，以鉴定和修饰这些途径的关键酶<sup>[60]</sup>。在一株不产淀粉的衣藻工程菌中，AGPase 的失活使三酰甘油(TAG)的产量增加了十倍，这表明将碳代谢流从淀粉转移到 TAG 合成可能是比直接改造脂质合成路径来生产 TAG 更有效的策略<sup>[61]</sup>。此外，利用微藻直接从 CO<sub>2</sub> 生产化学品和燃料也是一个解决能源紧缺和环境问题的好方法。有研究表明，在蓝藻 *Synechococcus elongatus* 中引入改造后的 CoA 依赖型 1-丁醇生产途径后，该菌株可以直接利用 CO<sub>2</sub> 产生丁醇<sup>[62]</sup>。

毋庸置疑，在未来，发展生物燃料的大规模生产及运用一定是将来的发展趋势。每一代生物燃料都有自己的优势，同时也都面临着挑战。为了持续进行燃料的供给，不间断的原料供应必须要实现的。第一代生物燃料来源的物质的产量取决于地理位置、人们经济状况和粮食燃料的需求量，这使得它不适合替代化石燃料，因为容易引起食品和燃料原料的竞争。相比之下，第三、第四代生物燃料更适合作为替代品。要制造经济和环境友好型的可持续生产的生物燃料，另一个关键因素便是生物燃料生产技术的进步。为了实现生物燃料的商业化生产，需要建立具有成本效益和高产率的转化系统。利用代谢工程也可以提高转化率。代谢工程可以被用来改善现有的生物产品代谢途径，从数量和质量上改善生物燃料。该方式在原料的改进或改造微生物以获得更大的转化率方面也发挥着重要作用，不过要实现高收率和低成本的生产工艺还需要进行更多的研究。

## 1.4 烃类化合物

近些年随着生物技术的发展，各种类型的生物燃料已经投入日常使用，但是由于其化学性质，许多生物燃料都存在着一些致命的缺点。例如，生物乙醇的能量密度比化石燃料低得多，而且它高度的吸水性和挥发性让它如何保存成了一个令人头疼的问题<sup>[63]</sup>。相比之下，烷烃和烯烃等烃类化合物作为来源于微生物脂肪酸代谢途径的生物燃料，不存在这样的缺点。烃类化合物的链长、饱和度以及直链或支链的结构等特征是决定它使用途径的关键因素。根据其链长，烃类化合物构成了大多数石油基燃料，例如汽油、航空燃料等。不饱和和支链烃类化合物的存在确保了燃料在高海拔地区的低凝固点<sup>[64]</sup>。另一方面，烃类化合物还被用于生产洗涤剂和润滑剂等化学品，产品范围非常广泛。目前使用的烃类化合物大多数来自化石燃料，而化石燃料是不可再生能源，在短时间内不可能形成，因此全世界每天巨大的消耗量让其储存量越来越少，使得目前的情况并不乐观。除此之外，现在用于生产烃类化合物的方法主要是化石燃料的高温蒸馏，不仅反应条件严苛，还会产生大量温室气体，严重时可能会造成酸雨的形成，对环境极其不友好，会造成极大的不可逆转的损害。所以从各方面来看，利用可再生的原料和可持续的方式生产燃料是一个急需发展并推广的产业。

### 1.4.1 烃类化合物的生物合成

自从研究人员确定了蓝藻中合成烃类化合物的路径，有许多研究都试图在其它菌株

中构建这条烃类化合物的生物合成途径,以提高烃的产量并改变其性质。烃类化合物的合成路径包括两个主要步骤,需要两种关键酶。其中一种酶的作用底物是宿主菌的脂肪酸代谢提供的前体,而另一种酶则负责将上一步催化的产物转化为烃类化合物<sup>[65]</sup>。烃类生物合成的第一步通常是将碳源导向三种前体,大多数情况下是通过酰基-ACP 还原酶(AAR)催化合成的脂肪醛,另外还有脂肪酸和酰基-ACP。这一步骤非常容易受到细胞内存在的原有途径的影响。例如,当以醛类作为底物时,会生成副产物脂肪醇。在某些情况下,副产物脂肪醇的产量甚至会比目标产物烃类化合物更多<sup>[66]</sup>,这主要是因为在大肠杆菌和酿酒酵母等菌株中存在多种脂肪醛还原酶同系物,对底物的竞争更强<sup>[67]</sup>。另外,实验证明在 *Aspergillus carbonarius* 中引入生产烃类化合物的路径后,伴随着烃类化合物的生成,胞内的脂肪酸和三酰甘油的含量也会增加,这是因为胞内还存在一条脂肪醛的脱氢路径,脂肪醛脱氢酶会将脂肪醛转化为脂肪酸<sup>[68]</sup>。因此现在有很多研究都着手于敲除这些竞争途径,通过增加前体物质脂肪醛的积累从而增加目标产物烃类化合物的产量。然而有研究表明,完全敲除醛还原酶可能不是生产烃类的最佳方案。当烃和醇浓度的比值在 1.5-3.3 时,烃的产量才是最高的,副产物脂肪醇的大量减少将在一定程度上降低烃的产量<sup>[69]</sup>。为了提供充足的前体物质,有很多研究人员尝试着引入了不同类型的硫酯酶。这些硫酯酶的表达成功地将胞内脂肪酸浓度提高了三倍以上,并最终生成了烷烃<sup>[70,71]</sup>。此外,不同来源的硫酯酶对于不同链长的底物有不同的偏好性,所以硫酯酶也是控制最终烃类产物链长的一个关键点。烃类化合物的合成是基于脂肪酸生成路径的,因此脂肪酸代谢与烃类化合物的生物合成密切相关。脂肪酸相关途径的改变往往会影响烃类合成前体的供应。有研究人员将脂肪酸代谢路径通过代谢工程进行改造,成功地使大肠杆菌中烃的产量达到 580.8 mg/L<sup>[72]</sup>。另外有人将大肠杆菌中的醛还原酶敲除并过表达了一个脂肪酸合成酶,得到的改造菌烃的产量达到 255.6 mg/L<sup>[73]</sup>。大多数研究者都致力于优化脂肪酸代谢路径从而促进烃类的合成。一些研究甚至设计了一种理论效率更高的反向 $\beta$ -氧化途径来增加短链烃的产生<sup>[74]</sup>。这些改造手段大部分被证明是有效的。

烃类化合物生物合成的第二步是限速步骤,因为从前体到目标产物的转化率很低<sup>[65]</sup>。有研究选择了几种能够将脂肪醛转化为烃类化合物的酶在一株高产脂肪酸的酿酒酵母中进行异源表达,这些酶分别是来自不同蓝藻的醛去甲酰化加氧酶(ADO)以及来自昆虫和植物中的同类型酶<sup>[75]</sup>。虽然来自昆虫和植物的酶对于底物脂肪醛是有活性的<sup>[76,77]</sup>,但此研究的结果表明只有 ADO 才能催化生成最终的烃类。各类实验表明 ADO 在不同的宿主中都能发挥作用,所以现在更倾向于利用 ADO 催化生产烃类的最后一步。另外也有大量的研究表明来源于不同种类蓝藻的 ADO,其催化能力往往具有显著差异<sup>[65,75]</sup>。对 ADO 进行改造可以提高其性能。例如,ADO-过氧化氢酶融合蛋白可以减轻过氧化氢的抑制<sup>[78]</sup>;不同 ADO 的点突变可能会改变其对底物链长的偏好<sup>[70,79]</sup>;设计改善 AAR 和 ADO 的空间结构也可使烃类化合物的产量提高 8.8 倍<sup>[80]</sup>。以脂肪酸为底物催化生产烃类的酶(OleT/UndA/UndB)不是近年来研究的热点,但是当利用脂肪酸为底物时,催化过程相对较短,只需脱去一个羧基,因此这可能是高效合成烯烃的一个方向。UndA

和 UndB 两者的区别在于 UndA 是普遍存在的，而 UndB 是仅存在于膜结合的脂肪酸脱羧酶。在 *E. coil* 中异源表达 UndB 的同系物 Pmen\_4370 可以产生 55 mg/L 的 1-十一烯，是表达 OleT 或 UdhA 产量的 3 倍<sup>[81,82]</sup>，并且有超过 95 % 的月桂酸被转化为目标产物，表明其相比 ADO 在生成烯烃方面有很大的优势。

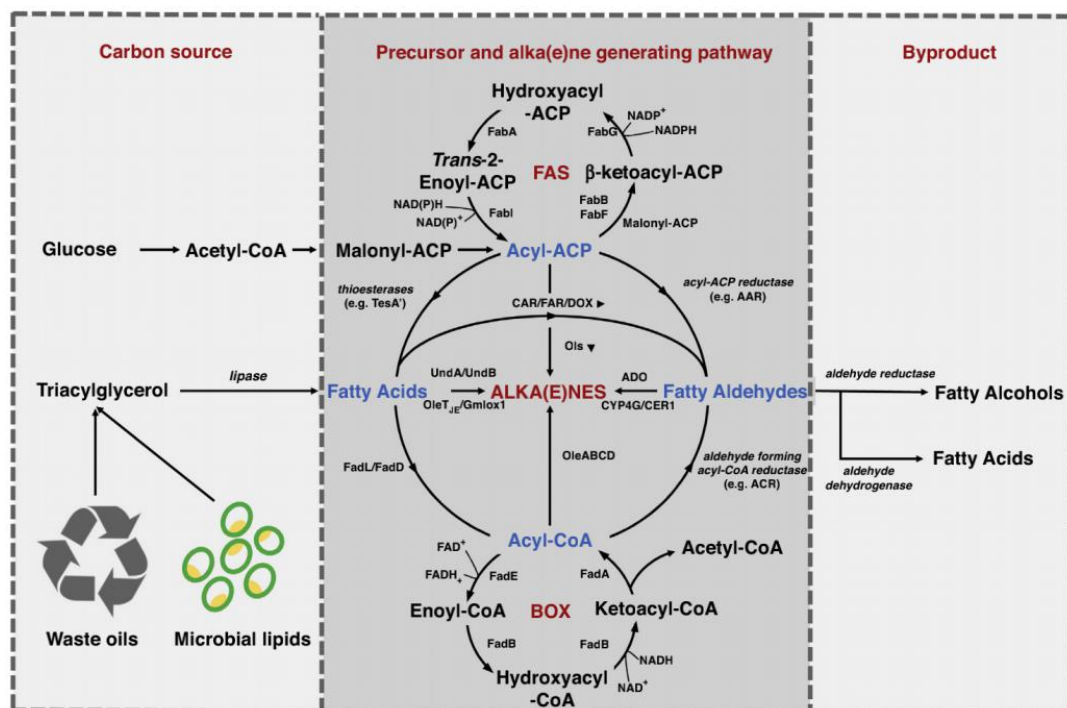


图 1.2 烃类化合物生产的改造策略<sup>[83]</sup>

Fig.1.2 Metabolic strategies of alkane/alkene production<sup>[83]</sup>

### 1.4.2 合成烃类化合物的微生物平台

许多生物都有合成烃类的能力。有研究表明，烃类化合物也许可以为宿主菌提供应对恶劣天气的能力或交流方式(如信息素)<sup>[77,84]</sup>。一般来说，天然的产烃菌株产率较低<sup>[85]</sup>，所以利用这些菌株进行工业规模的生产是不现实的。不过鉴于自然界中存在着大量微生物，不能排除存在某些菌株可直接作为微生物产烃平台的可能性<sup>[86,87]</sup>。

由于脂肪酸代谢对于烃类化合物的生产至关重要，所以从理论上讲任何具有高效脂肪酸代谢的微生物都有潜力成为生成烃类的生产平台。目前实验最多的是利用 *E. coil* 作为产烃菌株，经过改造之后产量可以达到 580.8 mg/L。

以酵母作为宿主菌生产烃类的产量通常会比大肠杆菌低。研究表明，一些酵母中含有至少 12 种会导致烃类降解的基因<sup>[89]</sup>。此外，真核细胞的结构较为复杂，各种细胞器的区室化往往会阻碍代谢进程<sup>[90]</sup>。生成烃类化合物的关键酶所需的辅因子通常来自线粒体和过氧化物酶体<sup>[91]</sup>，而人为构建的产烃途径通常是在细胞质中进行的，所以有研究人员将产烃途径转移至酿酒酵母的过氧化物酶体中，烃类化合物和脂肪醇的产量提高了 7 倍<sup>[92]</sup>。再加上某些基因的敲除会使过氧化物酶体变多，于是产量又能提高 3 倍。

关于蓝藻产烃的报道可以追溯到 1960 年。蓝藻通过光合作用获取能量，并且能够将 CO<sub>2</sub> 当成唯一碳源。只要有阳光和通气，蓝藻就可以快速生长，在短时间内积累大量

的生物质<sup>[93]</sup>。通过多拷贝表达 AAR 和 ADO, 蓝藻可以生产占细胞干重 12.9%的烷烃<sup>[94]</sup>。经代谢工程改造的化能自养菌 *Cupriavidus necator* 也可以将 CO<sub>2</sub> 转化为烃类<sup>[95]</sup>。由于大气中 CO<sub>2</sub> 含量丰富, 所以使用蓝藻或 *C. necator* 等可以利用 CO<sub>2</sub> 作为碳源的菌株进行烃类化合物的生物合成也有较大的应用前景。

目前生物合成烃类的产量还维持在较低的生产水平, 其中一个很大的原因便是烃类化合物对细胞有较大的毒性。烃类化合物是一种胞外产物, 在进行跨膜运输时会溶解细胞膜上的磷脂, 并沉淀细胞内和膜上的蛋白质, 对细胞膜有一定程度的损害, 会抑制细胞的生长甚至造成细胞的死亡。针对这个问题, 研究者们尝试了增强细胞对产物的耐受性, 确实起到了一些作用。也有文献研究了细胞中烃类化合物的相关转运体, 通过降低胞内的烃类化合物水平来提高其耐受性。因此, 要实现烃类化合物的工业化生产, 烃类化合物对细胞的毒性是一个必须考虑在内的重要因素。

#### 1.4.3 生成烃类化合物培养条件的优化

培养条件 (碳源、温度、pH 等) 也是影响烃类化合物生成系统整体性能的关键因素。在某些情况下, 基因改造的效果只有在最合适的培养条件下才会显现出来。然而培养条件的调整往往最容易被忽视。

以碳源为例, 用菊粉代替葡萄糖作为碳源时, *Aureobasidium melanogenum* 的烷烃产量可以提高将近 30%<sup>[86]</sup>。如果碳源从葡萄糖变为燕麦, 经代谢工程改造的 *Aspergillus carbonarius* 表现出了 13 倍的烷烃产量差异<sup>[68]</sup>。这些例子都表明, 碳源的选择对烃类化合物的生产十分重要。然而在很多研究中, 无论选择哪一条产烃途径, 都以葡萄糖作为唯一碳源。为了将葡萄糖转化为烃类, 通常都会依赖于脂肪酸生物合成途径。这条代谢路径会受到多种反馈抑制所带来的潜在障碍, 从而阻碍宿主菌积累脂肪酸<sup>[96]</sup>, 最终可能会抑制烃类的合成。由于烃类化合物并不是传统意义上的高附加值产品, 所以从节约成本和提高产量的角度来看, 筛选葡萄糖以外的非食品原料非常重要。微生物油脂或废油或许可以作为合成烃类化合物的廉价底物。利用油脂或脂肪酸为底物生产烃类化合物不仅可以缩短代谢过程, 避开脂肪酸合成路径的反馈抑制, 还可以增加产物的多样性。例如, 通过向培养基中添加支链脂肪酸, 大肠杆菌可以生产相应的支链烷烃<sup>[71]</sup>。

除了碳源的选择, 其它培养条件也十分重要。将培养基的 pH 维持在相对较高的水平, 可以使烃类的前体物质脂肪醛的浓度增加 212.7 倍, 从而使烃类的产量增加了 110 倍 (<3-337 μg/L)<sup>[97]</sup>。当在限氮或高盐浓度下时, 改造后的蓝藻中烃类的产量可以提高 11 倍<sup>[94,98]</sup>。虽然利用大肠杆菌生产烃类化合物时, 培养温度大多为 37°C, 但是有研究表明培养温度调整为 24°C 时烃类的产量可以增加 6 倍<sup>[73]</sup>。虽然这种现象背后的机理还未清晰, 但是有三个可能的原因: (1) 较低的温度会使大肠杆菌生长得更好; (2) 低温可能会改变天然脂肪酸的组成, 更符合生成烃类关键酶的催化特性; (3) 来自蓝藻的酶可能在较低温度下催化效果更好, 因为野生型蓝藻的最适生长温度为 30°C, 而不是 37°C。

当今市场上, 最常见的可再生生物燃料是生物乙醇和生物柴油。目前微生物生产烃类的产率较低, 要实现工业化还有很长的路要走。继续寻找高效的烃类生物合成途径以



## 第 2 章 蓝藻产烃路径在谷氨酸棒杆菌中的构建及优化

### 2.1 引言

烃类是一种非常重要的碳氢化合物，它不仅是航空燃料的主要组成成分，而且可以作为生产塑料、活性剂等产品的原料。与其它生物燃料相比，烃类化合物具有很多优势，例如高能量密度、疏水性等。然而，为了获得性质合适的烷烃和烯烃，不可避免地要将石油在特定的条件下进行裂化裂解。这一复杂的过程不仅要消耗大量化石能源，还会对环境造成极大的影响，加剧温室效应。面对这样的情况，烃类化合物的生物合成已经成为了现在的热门研究。微生物可以直接利用木质纤维素等可再生原料产烃，不仅减轻了人类社会不可再生资源的依赖，也减少了对环境的损害并大大降低了生产成本，是一种非常具有前景的可持续生产方式。

目前研究最多的是来自于蓝藻的由脂酰-ACP 还原酶(AAR)与醛去甲酰化加氧酶(ADO)组成的产烃途径。这条产烃路径的前体是脂酰-ACP，它是脂肪酸合成路径中的重要中间产物，因此烃类化合物的合成与脂肪酸的生成息息相关。这些天然的产烃菌株一般产量都相对较低，很难达到大规模工业生产的需求。因此为了增加烃类的产量，很多研究者在大肠杆菌和酿酒酵母中构建了产烃途径，并进行相关的代谢工程改造进一步提高其产烃能力。大多数研究的改造重点都是围绕菌株中的脂肪酸合成路径进行的，包括对关键酶进行过表达或敲除；也有一部分研究选取了醛还原酶进行敲除，因为它会和 ADO 竞争同一底物脂肪醛生成脂肪醇；另外也有文献研究了脂肪醛和脂肪醇之间的浓度比例对生成烃类的影响，并指出完全阻断副产物脂肪醇的生成对于产烃没有任何帮助。但是这些研究选择的宿主菌无法在木质纤维素体系中正常生长，更加无法合成烃类化合物。谷氨酸棒杆菌则是一个很好的选择。谷氨酸棒杆菌对木质纤维素体系中存在的抑制物有很强的耐受性，在木质纤维素体系中的生长发酵不会受到很大的抑制，因此非常适合以木质纤维素作为原料进行各种产品的生产。除此之外，谷氨酸棒杆菌中不存在合成微生物油脂的路径，不含有 $\beta$ -氧化路径，所以它可以积累大量的脂肪酸，为烃类化合物的合成提供了重要的前体物质。

在本章节中，我们的出发菌株是实验室之前就构建好的具备烃类化合物合成路径的菌株 *C. glutamicum* HW4。将细长聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 中编码产烃路径两个关键酶的基因 *aar* 和 *ado* 整合到 *C. glutamicum* S9114 基因组上的 *fasR* 位点，便得到了菌株 HW4。但是之前的研究表明，菌株 HW4 中烃的产量比较低，说明其产烃能力不够，代谢较弱。所以我们从强化代谢路径以及优化代谢路径两个方面入手，对其进行代谢工程改造来提高菌株 HW4 中烃类化合物的产量。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 实验菌株

本章节研究所使用的出发菌株和改造菌株均列于表 2.1 中。本章节的出发菌株是 *C. glutamicum* HW4, 是将蓝藻中的 *aar*、*ado* 基因整合到 *C. glutamicum* S9114 基因组上的 *fasR* 位点得到的。构建质粒所用的宿主菌为 *E. coli* BL21。以上菌株均保存于本实验室。

### 2.2.2 培养基和培养条件

#### 培养基

(1) LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 氯化钠。固体培养基则需要额外添加 17 g/L 琼脂粉。

(2) CM2B 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母粉, 10 g/L 氯化钠。固体培养基同样需要额外添加 17 g/L 琼脂粉。

(3) CGXII-NL 培养基: 60 g/L 葡萄糖, 1.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 g/L 尿素, 1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 42 g/L 3-吗啉代丙磺酸, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.01 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0002 g/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.00002 g/L NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0002 g/L biotin, 0.0005 g/L thiamin, 0.03 g/L 原儿茶酸。

(4) LBG 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 氯化钠, 3 g/L 甘氨酸, 0.1 g/L 吐温 80。

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

#### 培养条件

*E. coli* BL21 与 60% (v/v) 的甘油中按 1:1 的体积比混合后保存于 -80°C 冰箱。活化时取甘油管解冻后, 蘸取适当菌液在 LB 平板划线。在 37°C 恒温培养箱中培养 12-24 h。之后挑取适宜的单菌落接至液体 LB 中进行培养。培养条件为 37°C, 200 rpm。

*C. glutamicum* HW4 与 60% (v/v) 的甘油中按 1:1 的体积比混合后保存于 -80°C 冰箱。活化时取甘油管解冻后, 蘸取适当菌液在 CM2B 平板上划线。在 30°C 恒温培养箱中培养 36-48 h。之后挑取大小合适的单菌落接至液体 CM2B 中进行培养。培养条件为 37°C, 200 rpm。

以上菌株若有质粒, 则需要在培养基中额外加入 50 µg/mL 的硫酸卡那霉素来维持质粒防止其丢失。

表 2.1 本章所使用的菌株、质粒和引物

Table 2.1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> BL21	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> HW4	<i>C. glutamicum</i> S9114 with <i>f<sub>as</sub>R</i> gene deleted and carrying <i>aar</i> and <i>ado</i>	Lab stock
HW4-pH36- <i>aar</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>aar</i>	This study
HW4-pH36- <i>ado</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>ado</i>	This study
HW4-pH36- <i>pntAB</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>pntAB</i>	This study
HW4-pH36- <i>udhA</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>udhA</i>	This study
HW4-pH36- <i>sgdh</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>sgdh</i>	This study
HW4-pH36- <i>aasS</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>aasS</i>	This study
HW4-pH36- <i>fdh1</i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>fdh1</i>	This study
Plasmids	Characteristics	Sources
pH36mob	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pH36- <i>aar</i>	pH36mob carrying <i>aar</i>	This study
pH36- <i>ado</i>	pH36mob carrying <i>ado</i>	This study
pH36- <i>pntAB</i>	pH36mob carrying <i>pntAB</i>	This study
pH36- <i>udhA</i>	pH36mob carrying <i>udhA</i>	This study
pH36- <i>sgdh</i>	pH36mob carrying <i>sgdh</i>	This study
pH36- <i>aasS</i>	pH36mob carrying <i>aasS</i>	This study
pH36- <i>fdh1</i>	pH36mob carrying <i>fdh1</i>	This study

Primers	Sequence(5'-3')	Restriction enzyme
aar-F	CCGGAATTCATGTTTGGCCTGATTGGCC	EcoRI
aar-R	GCTCTAGATTAATCGCCAGCGCCAGC	XbaI
ado-F	CGAGCTCATGCCGCAGCTGGAAGC	SacI
ado-R	GCTCTAGATTACACCGCCGCCAGGCCATAC	XbaI
pntAB-F	CGAGCTCATGCGAATTGGCATAACCAAG	EcoRI
pntAB-R	GCTCTAGATTACAGAGCTTTCAGGATTGCA	XbaI
udhA-F	CGAGCTCATGCCACATTCCTACGATTAC	EcoRI
udhA-R	GCTCTAGATTA AACAGGCGGTTTAAACC	XbaI
sgdh-F	CCGGAATTCATGCCTGCCCTTACAAAGA	EcoRI
sgdh-R	GCTCTAGATTACGAGGACCAGTTGTTTTCG	XbaI
aasS-F	ACGCGTCGACATGAACCAGTATGTGAACGA	SalI
aasS-R	AACTGCAGTTATTACAGATGCAGTTTACGC	PstI
fdh1-F	CCGGAATTCATGTCGAAGGGAAAGTTTTGCT	EcoRI
fdh1-R	GCTCTAGATTATTTCTTCTGTCCATAAGCTCTGGTG	XbaI

### 2.2.3 重组质粒的构建及转化

本章节研究所使用的质粒和引物均列于表 2.1 中。以上质粒均为表达质粒，都以 pH36mob 质粒为载体。pH36mob 质粒则来自于 PTRCmob 质粒，将质粒上原有的 Trc 启动子替换为人工合成的强启动子 H36 启动子即可得到。利用引物 aar-F/R 和 ado-F/R 将片段进行扩增，并分别插入到 pH36mob 质粒的 EcoRI/XbaI 和 SacI/XbaI 位点得到质粒 pH36-aar 和 pH36-ado。利用引物 pntAB-F/R、udhA-F/R、sgdh-F/R、fdh1-F/R 分别将来自 *E. coli* 的 *pntAB*、*udhA* 基因、来自 *G. oxydans* DSM 2003 的 *sgdh* 基因和来自 *S. cerevisiae* S288c 的 *fdh1* 基因从基因组扩增下来，并分别插入到 pH36mob 质粒的 EcoRI/XbaI 位点得到质粒 pH36-pntAB、pH36-udhA、pH36-sgdh 和 pH36-fdh1。来自 *Vibrio harveyi* B392 的 *aasS* 基因是上海捷瑞生物工程有限公司人工合成的。利用引物 aasS-F/R 扩增得到相应片段，并分别插入到 pH36mob 的 SalI/PstI 位点构建质粒 pH36-aasS。

大肠杆菌感受态细胞的制备：挑取合适大小的 *E. coli* BL21 单菌落至 5 mL LB 培养基中过夜培养，条件为 37°C，200 rpm。然后吸取 200  $\mu$ L 菌液于 5 mL 新鲜 LB 培养基中，37°C 培养至 OD 为 0.4~0.6。从摇床拿出后立即转移至冰上冰浴 10 min。接着吸取 1 mL 培养液至灭过菌的 EP 管，4°C 下 5000 rpm 离心 10 min。接着倒掉上清，使用冰凉的 0.1M 氯化钙溶液重悬，相同条件下再次离心。最后弃去上清，加入 100  $\mu$ L 0.1M 氯化钙溶液重悬，4°C 下可保存 2~3 天。

重组完成的表达质粒通过热激法转至 *E. coli* BL21。LK（含有卡纳的 LB）平板上长出阳性克隆后，选取单克隆子进行菌落 PCR 验证。提取跑胶条带位置正确的单菌落中的质粒，测序无误即质粒构建成功。

### 2.2.4 重组菌株的构建

本章节研究所使用的宿主菌为 *C. glutamicum* HW4，转化方式为电转化法。从划线平板上挑取单菌落至 5 mL CM2B 中培养一夜，条件为 30°C，200 rpm。然后转接 3 mL 菌液到 30 mL LBG 培养基中，30°C，200 rpm 培养 5~6 h。之后把菌液转移至 50 mL 离心管中，冰浴 15 min，在 4°C 下 5000 rpm 离心 10 min。倒掉上清后加入适量 10% (v/v) 甘油重悬，再次离心，重复两次。加入少量冰冷的甘油重悬沉淀即为感受态细胞，每 EP 管分装 100  $\mu$ L 备用。

将 20  $\mu$ L 质粒与 100  $\mu$ L 感受态细胞轻柔地混匀，冰浴 30 min 后转至预冷电击杯中进行电转。电转条件为 2000 V，200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F。完成后立即加入 800  $\mu$ L SOC 培养基混匀，46°C 下热激 6 min，取出后冰浴 2 min。最后 30°C，200 rpm 培养 2 h，吸取 100  $\mu$ L 菌液涂布。培养至长出单菌落后，利用菌落 PCR 对电转结果进行验证。

### 2.2.5 产烃发酵

取菌株在平板上划线，于 30°C 恒温培养箱中培养 36-48 h。然后挑单菌落至 20 mL CM2B 培养基中，30°C，200 rpm 培养 16 h 后得到种子液。发酵在含有 30 mL 发酵培养基 CGXII-NL 的 250 mL 摇瓶中进行，接种量为 5%。发酵条件为 30°C，200 rpm，用 5M

NaOH 调节 pH 至 7.0 左右，发酵时间为 72 h。发酵过程中每 12 h 进行 OD<sub>600</sub> 和葡萄糖的测定。

### 2.2.6 烃类的提取与测定

发酵完成后将两瓶发酵液合并至一个摇瓶中，即一共 60 mL 发酵液。向 60 mL 发酵液中加入 30 mL 甲醇-氯仿（体积比 2:1）萃取液。接着使用橡胶塞密封，200 rpm 萃取 24 h。萃取完成后将液体倒入离心杯中，10000 rpm 离心 10 min。离心完成之后用针头吸取下层的有机相于旋蒸瓶中，35°C 旋蒸至全部挥发，然后加入 1 mL 氯仿即可获得烃类化合物的样品。

样品使用气相色谱-质谱联用仪进行检测，仪器型号为 Agilent 6890 GC- MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)，配置 HP-5-MS 色谱柱。检测程序设置如下：进样温度为 280°C，通氮气速率 1 mL/min；初温为 50°C，维持时间 2 min；之后升温至 80°C，升温速率为 15°C/min，维持时间 3 min；最后以同样的速率升温至 280°C，保持时间 8 min。在无分流条件下进样，进样量为 0.4 μL。定性分析采用 NIST MS Search 2.0 谱库，样品与标准品的匹配度达到 95% 以上。定量分析采用内标法，以 100 mg/L 十二烷(C12)作为内标，根据内标物与样品峰面积比值计算样品浓度。

## 2.3 结果与讨论

在本章研究中，我们以本实验室之前就构建好的 *C. glutamicum* HW4 为出发菌株，这是一株具有产烃能力的谷氨酸棒杆菌。通过将 *S. elongatus* PCC7942 中产烃途径的两个关键基因 *aar* 和 *ado* 整合到原始 *C. glutamicum* S9114 基因组的 *fasR* 位点，便得到了菌株 HW4。FasR 是 *C. glutamicum* 中的一种 TetR 型转录调控因子，对游离脂肪酸的合成具有负调控作用<sup>[99]</sup>。换言之，*fasR* 的敲除会导致游离脂肪酸的大量生成，理论上来说会对菌株的产烃起到帮助作用。

之前对菌株 HW4 发酵产物的 GC-MS 检测结果表明，菌株 HW4 确实具备产烃能力，且生成的烃类化合物链长为 C21、C23、C28、C29、C30，都是一些超长链烃。但是该菌株中烃类化合物产量较低，因此本章的研究重点就在于通过代谢工程改造提高菌株 HW4 中烃的产量。

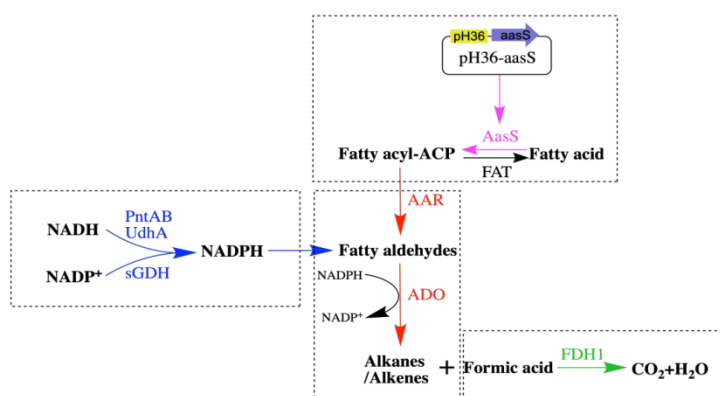


图 2.1 烃类增产的改造策略

Figure 2.1 Metabolic engineering strategies for increasing alkane production

### 2.3.1 强化烃类的合成路径提高烃的产量

首先我们考虑到将 *aar* 和 *ado* 整合到基因组上之后, 基因的拷贝数会比使用表达质粒进行表达时低, 表达量也会因此下降, 所以我们尝试的第一个方法就是在菌株 HW4 中分别再次利用表达质粒过表达基因 *aar* 和 *ado*, 增加它们的拷贝数从而增强产烃路径。除此之外, 在很多研究中都会通过增加前体物质的供给来增加目标产物的产量。因此我们也从这方面入手, 希望通过增加烃类的合成前体脂酰-ACP 的供给来提高烃的产量。有文献表明, 来自 *Vibrio harveyi* B392 的脂酰-ACP 合成酶 AasS 可以以游离脂肪酸为底物, 将其转化为脂酰-ACP<sup>[10]</sup>。而菌株 HW4 中没有 FasR, 会有大量的脂肪酸生成, 恰好为 AasS 的催化提供了足够的底物。因此, 构建好的质粒 pH36-*aar*、pH36-*ado* 和 pH36-*aasS* 以及空质粒 pH36mob 都通过电转的方式转入菌株 HW4 中。菌落 PCR 验证通过的工程菌株用于发酵验证, 其中对照菌为带有 pH36mob 空载质粒的菌株。

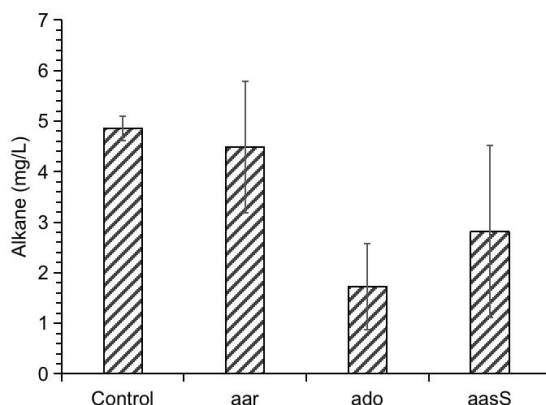


图 2.2 过表达 *aar*, *ado* 和 *aasS* 后烃类的产量

Figure 2.2 Alkane production under overexpression of *aar*, *ado* and *aasS*

注: *aar*, *ado*, *aasS* 分别代表异源表达对应基因的菌株 HW4。发酵在 250mL 摇瓶中进行, 发酵体系为 30 mL, 30°C, 200 rpm, pH 7.0。

各菌株中烃类的产量如图 2.2 所示。过表达 *aar* 和 *ado* 的菌株 HW4-pH36-*aar* 和菌株 HW4-pH36-*ado* 均未表现出烃产量的上升。其中, 菌株 HW4-pH36-*aar* 烃的产量(4.5 mg/L)与对照菌株(4.8 mg/L)相差不大, 有一些略微的下降; 而菌株 HW4-pH36-*ado* 中烃的产量只有 1.7 mg/L, 比对照菌株下降了 64.6%。这一结果表明, 过表达烃类合成路径的关键基因对于菌株 HW4 的产烃没有帮助。据文献报道, ADO 催化的步骤是产烃路径的限速步骤, 而我们的数据表明将其进行过表达并不能增加产烃效率, 因此可能需要对 ADO 进行改造才可以进一步提高其催化效率。此外, 异源表达 *aasS* 的菌株 HW4-pH36-*aasS* 中烃的产量为 2.8 mg/L, 仅为对照菌株产量的 58%, 表明增加前体脂酰-ACP 的供给对于产烃也没有帮助作用, 说明在菌株 HW4 中烃的合成路径并不存在前体供给不足的情况。

### 2.3.2 增加辅因子供给并减少有毒副产物的积累提高烃的产量

由于对烃类合成路径的强化没有起到作用, 所以我们接下来对烃类的合成路径进行了优化。优化同样是从两个方面入手。首先我们注意到在烃类合成的过程中需要消耗大

量的 NADPH，为了防止 NADPH 供应不足导致产烃有限，所以我们尝试了在菌株 HW4 中异源表达 NADPH 还原酶基因 *pntAB*、*udhA* 以及 *sgdh* 来提供额外的 NADPH。*PntAB* 和 *UdhA* 都来自于大肠杆菌，两者均可催化 NADH 生成 NADPH<sup>[102]</sup>。*sGDH* 则是来自 *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖脱氢酶，在其进行催化时会有 NADPH 的生成。除此之外，我们发现在 ADO 催化脂肪醛生成烃类的过程中，会有副产物甲酸的生成。甲酸对细胞的伤害比较大，会对细胞的生长和代谢等方面造成不利影响。有研究表明，在大肠杆菌中表达来自 *Xanthobacter* sp. 91 的甲酸脱氢酶 *XaFDH* 后，烃的产量有了一定的增加<sup>[103]</sup>。因此，我们选择了来自 *S. cerevisiae* S288c 的甲酸脱氢酶 *FDH1* 进行异源表达来降解细胞内的甲酸。

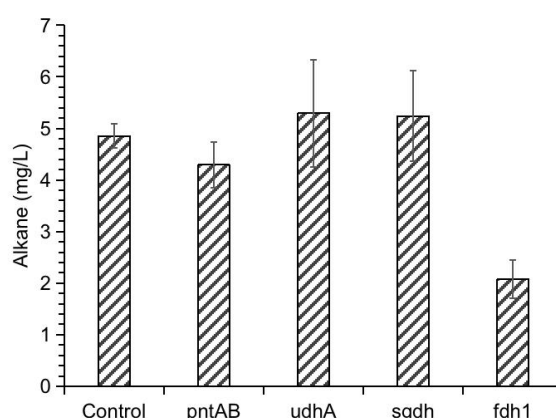


图 2.3 过表达 *pntAB*、*udhA*、*sgdh*、*fdh1* 后烃类的产量

Figure 2.3 Alkane production under overexpression of *pntAB*, *udhA*, *sgdh*, *fdh1*

注：*pntAB*、*udhA*、*sgdh*、*fdh1* 分别代表异源表达对应基因的菌株 HW4。发酵在 250 mL 摇瓶中进行，发酵体系为 30 mL，30°C，200 rpm，pH 7.0。

具体的烃类化合物的产量如图 2.3 所示。在增加 NADPH 供给的策略中，我们发现异源表达 *udhA* 和 *sgdh* 的菌株 HW4-pH36-*udhA* 和 HW4-pH36-*sgdh*，烃的产量略微有些提高，分别达到了 5.3 mg/L 和 5.2 mg/L，比对照增加了 8.3% 左右，说明 NADPH 的增加对产烃有一定的帮助，但效果不是特别明显。虽然做了平行实验，但是也不能排除存在实验误差的情况。在降解有毒副产物甲酸方面，我们发现 *fdh1* 的异源表达对于产烃也没有帮助，反而使烃的产量有了一定幅度的下降。推测原因可能是因为细胞中烃的产量本来就比较少，因此也不存在大量甲酸的积累，所以降解甲酸不会对烃产量的提高有很大作用。

## 2.4 本章小结

本章以 *C. glutamicum* HW4 为研究对象，针对细胞内的 AAR-ADO 产烃合成路径，从两方面对其进行代谢工程改造提高其产量。本章的主要结论如下：

(1) 通过过表达烃类化合物生成路径的两个关键基因 *aar* 和 *ado*，以及通过异源表达脂酰-ACP 合成酶 *AasS* 来增加前体物质的供给这两个方法来强化菌株 HW4 中的产烃路径，对于菌株 HW4 的烃类化合物产量的提高没有明显的帮助作用。表明要增加关键

酶的催化效率并没有那么简单，可能需要对关键酶进行改造才能实现；除此之外，烃类化合物在菌株 HW4 中的合成也不存在前体不足的问题，因此增加前体物质的供给不能提高烃类的产量。

(2) 通过增加辅因子 NADPH 的供给，菌株 HW4 中烃类化合物的产量有一定的增加，但是幅度不大，效果并不明显。另外，将副产物甲酸进行降解也没有对产烃有太大的帮助，可能是因为细胞中生产的甲酸本来就并不多，没有对细胞造成太大的伤害。

## 第 3 章 谷氨酸棒杆菌分泌表达脂肪酸脱羧酶生成烃类化合物

### 3.1 引言

在目前有关烃类化合物的研究中,除了上一章节提到的蓝藻中的 AAR-ADO 产烃路径,另外研究较多的则是利用脂肪酸脱羧酶进行烃类化合物的生产。脂肪酸脱羧酶 OleT 是一种细胞色素 P450 酶,隶属于 CYP152 家族,其催化需要利用  $H_2O_2$  作为电子和  $O_2$  的供体或依赖于 RhFRed、Fdr/Fdx 或 CamAB 等辅因子系统<sup>[104]</sup>。在目前已知的脂肪酸脱羧酶中, OleT<sub>JE</sub> 是最具特征的烯烃的生物合成酶。OleT<sub>JE</sub> 来源于 *Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456, 相对偏好 C12 ~ C20 链长的饱和脂肪酸。此外,对于低成本、大规模生产烯烃,使用不依赖于  $H_2O_2$  的脂肪酸脱羧酶(例如 OleT<sub>JE</sub>)是有利的,因为可以避免  $H_2O_2$  的使用,避免其对细胞产生毒性。除了 OleT<sub>JE</sub>, 来自 *Macrococcus caseolyticus* 的脂肪酸脱羧酶 OleT<sub>MC</sub> 也受到了关注。有研究表明 OleT<sub>MC</sub> 在体外不存在  $H_2O_2$  的情况下,对 C10 ~ C18 链长的饱和脂肪酸能表现出一定的催化活性,其中对 C16 ~ C18 脂肪酸活性更高。在大肠杆菌中异源表达 OleT<sub>MC</sub> 后可以成功生产烯烃,引入还原系统之后烯烃的产量可以进一步增加 2.8 倍<sup>[105]</sup>。

鉴于在 *C. glutamicum* 中不存在合成微生物油脂的途径,也不存在脂肪酸的 $\beta$ -氧化路径,导致有大量游离脂肪酸的积累。对于脂肪酸脱羧酶 OleT 来说, *C. glutamicum* 中含有足够的催化底物,因此是一个很好的宿主菌的选择。

现在烃类化合物的生产还停留在较低的水平,难以满足工业大规模生产的需求,而主要原因之一便是烃类化合物等生物燃料会对细胞产生毒性<sup>[106]</sup>。烃类化合物会破坏细胞膜的结构,而细胞膜的损坏将导致其某些重要功能的受损,如离子、脂质、蛋白质的流失和细胞膜 pH 梯度及电势差的消散。到目前为止,适应性进化、全局转录调控以及细菌的外排泵系统已被应用于提高菌株对生物燃料的耐受性<sup>[107]</sup>。其中,外排泵可以将胞内的烃类泵出到胞外,从而减轻其对细胞的毒性并提高生产力<sup>[108]</sup>。

为此,本章研究以 *C. glutamicum* S9114 为出发菌株,选择了不同的脂肪酸脱羧酶进行异源表达,初步实现通过脂肪酸的脱羧反应生成烯烃。然后在编码脂肪酸脱羧酶的基因前端加上一段信号肽使其进行分泌表达,将烃类的生成转移至胞外,减小了烃类化合物对细胞的毒害,显著提高了谷氨酸棒杆菌中烃类化合物的产量。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 实验菌株

本章节研究所使用的出发菌株和改造菌株均列于表 3.1 中。本章节的出发菌株是 *C. glutamicum* S9114, 从上海微生物研究所购买,注册编号 B460。构建质粒所用的宿主菌为 *E. coli* BL21, 保存于本实验室。

### 3.2.2 培养基和培养条件

本章使用的培养基和培养条件与上一章节相同，详情请参考 2.2.2。

### 3.2.3 重组质粒的构建及转化

本章节研究所使用的质粒和引物均列于表 3.1 中。以上质粒均为表达质粒，以 pH36mob、pEftumob 质粒为载体。来自 *Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456 和 *Macrocooccus caseolyticus* 的 *oleT<sub>JE</sub>* 和 *oleT<sub>MC</sub>* 基因由上海捷瑞生物工程有限公司人工合成。利用引物 *oleT<sub>JE</sub>*-F/R 和 *oleT<sub>MC</sub>*-F/R 分别扩增得到相应片段，并分别插入到 pH36mob 的 Sall/PstI 位点得到质粒 pH36-*oleT<sub>JE</sub>* 和 pH36-*oleT<sub>MC</sub>*。

对于分泌表达质粒，首先利用引物 NsoleT<sub>JE</sub>-F1/R1 将 *Ncgl1289* 基因的信号肽从 *C. glutamicum* ATCC13032 扩增下来，然后利用 NsoleT<sub>JE</sub>-F2/R2 将 *oleT<sub>JE</sub>* 基因从质粒 pH36-*oleT<sub>JE</sub>* 上扩增下来，将这两个片段融合后插入到质粒 pH36mob 的 XbaI/SalI 位点，得到质粒 pH36-NsoleT<sub>JE</sub>。利用引物 RsoleT<sub>JE</sub>-F1/R1 将 *cgR\_0949* 基因的信号肽从 *C. glutamicum* S9114 扩增下来，然后利用 RsoleT<sub>JE</sub>-F2/R2 将 *oleT<sub>JE</sub>* 基因从 pH36-*oleT<sub>JE</sub>* 扩增下来，将这两个片段融合后插入到质粒 pH36mob 的 XbaI/SalI 位点，得到质粒 pH36-RsoleT<sub>JE</sub>。利用同样的方法构建另外两个质粒 pH36-NsoleT<sub>MC</sub> 和 pH36-RsoleT<sub>MC</sub>。

对于表面展示质粒，首先利用引物 NCgl1221-F1/R1、NCgl1337-F1/R1、PorB-F1/R1、PorC-F1/R1 将载体蛋白 NCgl1221、NCgl1337、PorB、PorC 基因从 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增下来，然后 NCgl1221 与 *oleT<sub>MC</sub>* 片段融合后插入到质粒 pH36mob 的 SacI/SmaI 位点，其他三个片段与 *oleT<sub>MC</sub>* 融合后插入到质粒 pH36mob 的 Sall/PstI 位点，得到质粒 pH36-NCgl1221-*oleT<sub>MC</sub>*、pH36-NCgl1337-*oleT<sub>MC</sub>*、pH36-PorB-*oleT<sub>MC</sub>*、pH36-PorC-*oleT<sub>MC</sub>*。对于 Eftu 启动子的表面展示质粒，首先利用引物 NCgl1221MC-F/R、NCgl1337MC-F/R、PorBMC-F/R、PorCMC-F/R 将载体蛋白与 *oleT<sub>MC</sub>* 基因融合片段从 pH36-NCgl1221-*oleT<sub>MC</sub>*、pH36-NCgl1337-*oleT<sub>MC</sub>*、pH36-PorB-*oleT<sub>MC</sub>*、pH36-PorC-*oleT<sub>MC</sub>* 扩增下来，然后将片段 NCgl1221-*oleT<sub>MC</sub>* 通过无缝克隆连接到经 XbaI/PstI 酶切过的质粒 pEftumob 上，就可以得到质粒 pEftu-NCgl1221-*oleT<sub>MC</sub>*。剩下的三个片段分别插入到质粒 pEftumob 的 Sall/PstI 位点，得到质粒 pEftu-NCgl1337-*oleT<sub>MC</sub>*、pEftu-PorB-*oleT<sub>MC</sub>*、pEftu-PorC-*oleT<sub>MC</sub>*。

大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒的转化详见 2.2.3。

表 3.1 本章所使用的菌株、质粒和引物

Table 3.1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> BL21	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> S9114	Wild-type strain	SIIM
S9114-pH36- <i>oleT<sub>JE</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36- <i>oleT<sub>JE</sub></i>	This study
S9114-pH36- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pH36- <i>NsoleT<sub>JE</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36- <i>NsoleT<sub>JE</sub></i>	This study
S9114-pH36- <i>RsoleT<sub>JE</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36- <i>RsoleT<sub>JE</sub></i>	This study
S9114-pH36- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pH36- <i>RsoleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36- <i>RsoleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pH36-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pH36-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pH36-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pH36-PorC- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pH36-PorC- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pEftu-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pEftu-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pEftu-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pEftu-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pEftu-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pEftu-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
S9114-pEftu-PorC- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pEftu- <i>PorC-oleT<sub>MC</sub></i>	This study
Plasmids	Characteristics	Sources
pH36mob	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pEftumob	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pH36- <i>oleT<sub>JE</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>JE</sub></i>	This study
pH36- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study

pH36- <i>NsoleT<sub>JE</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>JE</sub></i> with signal peptide of Ncgl1289	This study
pH36- <i>RsoleT<sub>JE</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>JE</sub></i> with signal peptide of RS04950	This study
pH36- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i> with signal peptide of Ncgl1289	This study
pH36- <i>RsoleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i> with signal peptide of RS04950	This study
pH36-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i> with signal peptide of Ncgl1221	This study
pH36-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i> with signal peptide of Ncgl1337	This study
pH36-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i> with signal peptide of PorB	This study
pH36-PorC- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36mob carrying <i>oleT<sub>MC</sub></i> with signal peptide of PorC	This study
pEftu-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36-NCgl1221- <i>oleT<sub>MC</sub></i> with H36 promoter replaced by Eftu promoter	This study
pEftu-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36-NCgl1337- <i>oleT<sub>MC</sub></i> with H36 promoter replaced by Eftu promoter	This study
pEftu-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36-PorB- <i>oleT<sub>MC</sub></i> with H36 promoter replaced by Eftu promoter	This study
pEftu-PorC- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	pH36-PorC- <i>oleT<sub>MC</sub></i> with H36 promoter replaced by Eftu promoter	This study
<b>Primers</b>	<b>Sequence(5'-3')</b>	<b>Restriction enzyme</b>
oleT <sub>JE</sub> -F	ACGCGTCGACAAGGAAGGCGCTGAAATG	SaI
oleT <sub>JE</sub> -R	AACTGCAGCATCATGCGTTGTACCATAAAC	PstI
oleT <sub>MC</sub> -F	ACGCGTCGACATGAGTAAAAGAGTTCCTAAAGATAG	SaI
oleT <sub>MC</sub> -R	AACTGCAGTTATTTTGTACGGTCGATATTC	PstI
NsoleT <sub>JE</sub> -F1	CCTCTAGAATGAAATATGAATTTAATAATAGATTCCGAAC	XbaI
NsoleT <sub>JE</sub> -R1	CTTAAGTGTTGCCATAAAGAGCTCCTGATCATGTAGGTGTC	
NsoleT <sub>JE</sub> -F2	GATCAGGAGCTCTTTATGGCAACACTTAAGAGGGGATAAG	
NsoleT <sub>JE</sub> -R2	GCAGGTCGACTTAGTGATGGTGTATGGTGTGTCTGTCTACAACCTCGC GAACA	SaI
RsoleT <sub>JE</sub> -F1	CCTCTAGAATGCAAATAAACCGCCGAGG	XbaI
RsoleT <sub>JE</sub> -R1	TCCCTCTAAGTGTTGCCATTGCTCCCTGGGCGTTG	



---

PorC-F1	ACGCGTCGACATGGAAAACGTTTTGGAATTC	SalI
PorC-R1	CTCTTTTACTCATGCCAACCAGACCGATGAGG	
PorC-F2	CGGTCTGGTTGGCATGAGTAAAAGAGTTCCTAAAGATAGAGGTATTGATAAT	
PorC-R2	AACTGCAGTTATTTTGTACGGTCGATATTCAC	PstI
NCgl1221MC-F	ATCCTCTAGAGTCGAATGATTTTAGGCGTACCCATTCAATATTTGC	
NCgl1221MC-R	CCAAGCTTGCATGCCTTATTTTGTACGGTCGATATTCACCCTTATATTTTCAAT	
NCgl1337MC-F	ACGCGTCGACATGGCTCAGCGAAAACCTGGCCTCTGTGA	SalI
NCgl1337MC-R	AACTGCAGTTATTTTGTACGGTCGATATTCAC	PstI
PorBMC-F	ACGCGTCGACATGAAGCTTTCACACCGCA	SalI
PorBMC-R	AACTGCAGTTATTTTGTACGGTCGATATTCAC	PstI
PorCMC-F	ACGCGTCGACATGGAAAACGTTTTGGAATTC	SalI
PorCMC-R	AACTGCAGTTATTTTGTACGGTCGATATTCAC	PstI

---

### 3.2.4 重组菌株的构建

本章节研究所使用的宿主菌为 *C. glutamicum* S9114, 转化方式详见 2.2.4。

### 3.2.5 产烃发酵

发酵方式及条件与上一章节相同, 详见 2.2.5。

### 3.2.6 烃类的提取与测定

提烃方法及计算方式与上一章节相同, 详见 2.2.6。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 脂肪酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的异源表达

*C. glutamicum* 中不存在合成微生物油脂的途径, 也不存在脂肪酸的 $\beta$ -氧化路径, 因而有大量脂肪酸的积累。为了有效利用这些脂肪酸, 我们在 *C. glutamicum* S9114 中异源表达编码脂肪酸脱羧酶的基因 *oleT*, 构建了一条直接将脂肪酸进行脱羧反应从而生成烃类化合物的 OleT 路径。我们选择了两个不同来源的脂肪酸脱羧酶进行异源表达, 分别是来自 *Jeotgaliococcus* sp. ATCC 8456 的 OleT<sub>JE</sub> 和来自 *Macrococcus caseolyticus* 的 OleT<sub>MC</sub>。目前有关 OleT<sub>JE</sub> 的研究较多, 有很多研究表明 OleT<sub>JE</sub> 在大肠杆菌中的异源表达可以使其具备产烃能力; OleT<sub>MC</sub> 则是最近发现的另一种与 OleT<sub>JE</sub> 的催化机制略有不同的脂肪酸脱羧酶。我们构建了这两个基因的表达质粒, 然后分别转入 *C. glutamicum* S9114 中, 菌落 PCR 验证成功之后得到相应的过表达脂肪酸脱羧酶的改造菌株。发酵 72 h 后对各菌株的产烃情况进行检测。

实验结果如图 3.1(b)所示, 在携带空质粒的对照菌株 S9114-pH36 中没有检测到烃类物质, 进一步证明了原始的菌株 *C. glutamicum* S9114 没有产烃能力。此外, 在异源表达两种脂肪酸脱羧酶的改造菌株中都发现有烯烃的生成, 并且生成的种类相同, 分别是 C12、C14 的双烯烃和 C15、C17 的单烯烃。另外, 从 GC-MS 谱图上可以明显地看到菌株 S9114-pH36-*oleT*<sub>MC</sub> 的发酵液样品中烃类的色谱峰面积更大, 这也意味着来自 *Macrococcus caseolyticus* 的脂肪酸脱羧酶 OleT<sub>MC</sub> 在 *C. glutamicum* S9114 中的催化效果更好, 烃的产量更高。

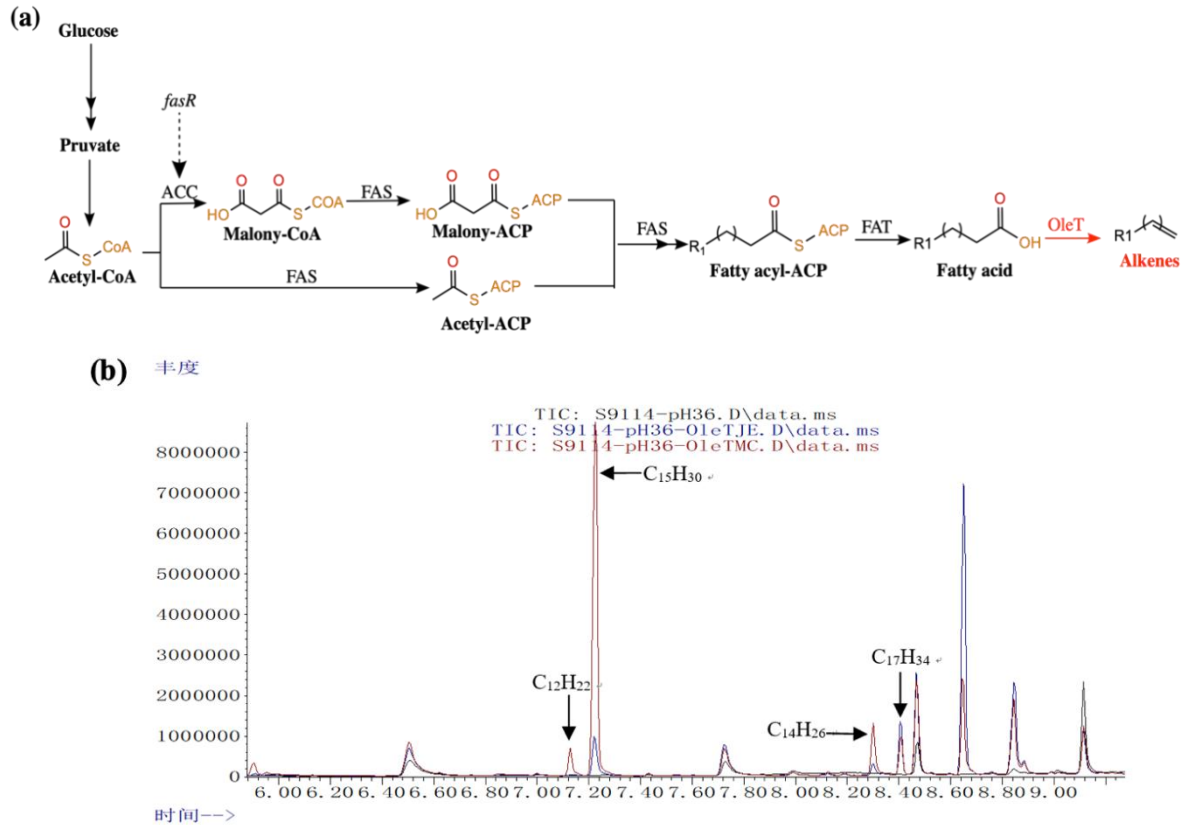


图 3.1 (a) *C. glutamicum* S9114-pH36-*oleT<sub>JE/MC</sub>* 中烃类合成路径; (b) *C. glutamicum* S9114-pH36, S9114-pH-*oleT<sub>JE</sub>* and S9114-pH-*oleT<sub>MC</sub>* 中的产烃情况

Figure 3.1 (a) The alkane biosynthesis pathway in *C. glutamicum* S9114-pH36-*oleT<sub>JE/MC</sub>*.

(b) GC-MS result of alkane production in *C. glutamicum* S9114-pH36, S9114-pH-*oleT<sub>JE</sub>* and S9114-pH-*oleT<sub>MC</sub>*.

注: 发酵在 250mL 摇瓶中进行, 发酵体系为 30 mL, 30°C, 200 rpm, pH 7.0.

### 3.3.2 脂肪酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的分泌表达

烃类化合物在胞内合成会被运输到胞外, 而这一过程会对细胞膜造成一定的伤害。为了尽可能减小烃类化合物对细胞膜的损害, 我们尝试了 OleT 的分泌表达, 将烃类的生成转移到胞外进行, 同时也可以避免烃类化合物的跨膜运输。再加上谷氨酸棒杆菌生产的脂肪酸大部分都分泌到了胞外, 所以 OleT 即使分泌到胞外进行表达也不会出现底物不足的问题。在本研究中, 我们选择了 *C. glutamicum* 中的两条分泌路径, 分别是 Sec 路径和 Tat 路径。Sec 路径分泌未折叠的蛋白, 而 Tat 路径分泌已经折叠的蛋白<sup>[109]</sup>。我们将 *C. glutamicum* ATCC 13032 中引导 Sec 途径的信号肽 *Ncgl1289*<sup>[110]</sup>和 *C. glutamicum* S9114 中引导 Tat 途径的信号肽 *cgR\_0494*<sup>[111]</sup>, 分别将它们与基因 *oleT<sub>JE</sub>* 和 *oleT<sub>MC</sub>* 融合, 并构建到表达质粒 pH36 上, 将质粒分别导入 *C. glutamicum* S9114, 得到重组菌株 S9114-pH36-*NsoleT<sub>JE</sub>*, S9114-pH36-*RsoleT<sub>JE</sub>*, S9114-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* 和 S9114-pH36-*RsoleT<sub>MC</sub>*。

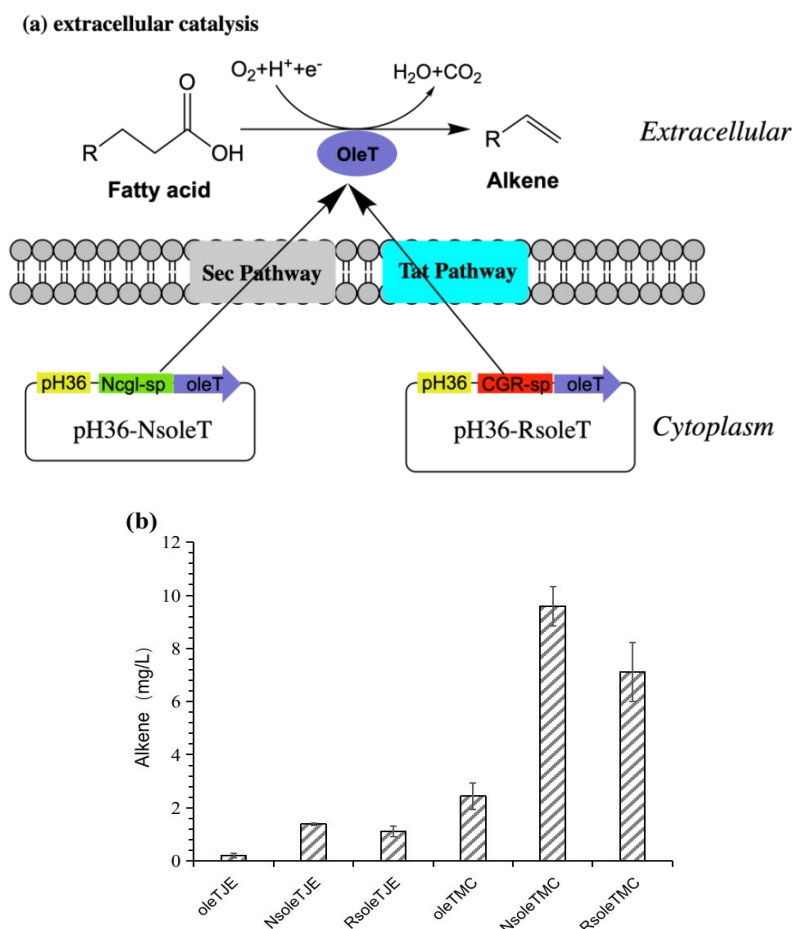


图 3.2 (a)脂肪酸脱羧酶在 *C. glutamicum* S9114 中的分泌表达; (b)烯烃的生产

Figure 3.2 (a) Secretive expression of fatty acid decarboxylase in *C. glutamicum* S9114.

(b) Alkene production.

注: oleT<sub>JE</sub>、oleT<sub>MC</sub> 代表异源表达对应基因的 *C. glutamicum* S9114; NsoleT<sub>JE</sub>、NsoleT<sub>MC</sub> 代表融合 Sec 路径信号肽分泌表达对应基因的 *C. glutamicum* S9114; RsoleT<sub>JE</sub>、RsoleT<sub>MC</sub> 代表融合 Tat 路径信号肽分泌表达对应基因的 *C. glutamicum* S9114。发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 发酵体系为 30 mL, 30°C, 200 rpm, pH7.0。

我们以胞内表达 *oleT* 的菌株为对照, 以分泌表达 *oleT* 的重组菌株为实验组在摇瓶中进行产烃发酵验证。在整个发酵过程的 72 h 内, 实验组和对照组菌株的生长和糖耗情况相差不大, 没有明显的区别。但是在发酵结束后烃类的产量上, 这些菌株的表现有很大的不同。首先, 从两组胞内表达脂肪酸脱羧酶的对照菌株中的产烃情况来看, 表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株 S9114-pH36-*oleT<sub>MC</sub>* 中烃的产量更高, 达到了 2.4 mg/L, 而表达 OleT<sub>JE</sub> 的菌株 S9114-pH36-*oleT<sub>JE</sub>* 中烃的产量只有 0.2 mg/L, 仅为另一株菌株的 1/12。说明 OleT<sub>MC</sub> 在 *C. glutamicum* S9114 中有更好的表达效果, 与之前 GC-MS 谱图的结果也是一致的。此外, 在通过不同分泌途径分泌表达 OleT<sub>JE</sub> 的菌株 S9114-pH36-*NsoleT<sub>JE</sub>* 和菌株 S9114-pH36-*RsoleT<sub>JE</sub>* 中, 烃的产量分别达到了 1.4 mg/L 和 1.1 mg/L, 产量都比胞内表达 OleT<sub>JE</sub> 的对照组菌株(0.2 mg/L)要高, 并且 Sec 路径的分泌效果更好一些。同样, 在通过不同分泌途径分泌表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株 S9114-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* 和 S9114-pH36-*RsoleT<sub>MC</sub>* 中,

烃类化合物的产量分别为 9.6 mg/L 和 7.1 mg/L。相比胞内表达 OleT<sub>MC</sub> 的对照菌株，烃类化合物的产量提高了 3 倍和 2 倍。从以上实验结果来看，无论是胞内表达还是分泌表达，都是 OleT<sub>MC</sub> 催化产烃更多。另外，从我们所选择的两条分泌路径来看，都是通过 Sec 路径分泌表达脂肪酸脱羧酶的两菌株中烃的产量更高，因此 Sec 路径比 Tat 路径更适合用于脂肪酸脱羧酶的分泌表达。

### 3.3.3 脂肪酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中的表面展示

在上一节研究中我们尝试了脂肪酸脱羧酶的分泌表达，发现分泌表达可以在一定程度上提高烃类化合物在谷氨酸棒杆菌中的产量。但是后面我们考虑到，如果将脂肪酸脱羧酶分泌到胞外进行表达的话，它的活性可能会受到影响，从而影响其催化效率。因此针对这个问题，我们又尝试了细菌的表面展示技术。表面展示的原理就是使载体蛋白的基因与目标基因融合到一起，连接到表达质粒上后导入宿主细胞进行表达，此时目标蛋白便会跟着载体蛋白定位于宿主细胞的表面进行表达，从而实现目标蛋白的表面展示<sup>[112]</sup>。这样的表达方式同样可以避免烃类化合物在细胞内积累以及跨膜运输，减少烃类对宿主的细胞膜造成的损伤。通过查阅文献，我们选择了谷氨酸棒杆菌中的四个载体蛋白来进行脂肪酸脱羧酶的表面展示，分别为 NCgl1221<sup>[113]</sup>，NCgl1337<sup>[114]</sup>，PorB<sup>[115]</sup>和 porC<sup>[116]</sup>。之前的实验数据表明，在我们所选择的两种脂肪酸脱羧酶中，OleT<sub>MC</sub> 的催化效率比 OleT<sub>JE</sub> 的催化效率高，所以我们分别将编码这四个载体蛋白的基因与编码 OleT<sub>MC</sub> 的基因进行融合，融合后的片段连接到质粒 pH36mob 上，之后再导入 *C. glutamicum* S9114 中，菌落 PCR 验证无误后便得到了四株不同的将 OleT<sub>MC</sub> 进行表面展示的重组菌株。

我们以胞内表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株 S9114-pH36-oleT<sub>MC</sub> 作为对照，将上述构建的四个表面展示菌株在摇瓶中进行产烃发酵验证。从生长情况来看，OleT<sub>MC</sub> 的表面展示对于菌株的生长和糖耗没有产生很大的影响。如图 3.3(a)所示，从各菌株的产烃情况来看，将 OleT<sub>MC</sub> 进行表面展示后，菌株中烃的产量都有不同程度的下降。对照菌株中烃的产量为 2.4 mg/L，而实验组中产烃相对较多的菌株 S9114-pH36-NCgl1337-oleT<sub>MC</sub> 产量达到了 0.5 mg/L，仅为对照组的 1/5。产烃最少的菌株 S9114-pH36-PorB-oleT<sub>MC</sub> 产量只有 0.1 mg/L，相比对照组菌株有一个大幅度的下降。

之后我们考虑到启动子的选择可能会对基因的表达效果产生一定的影响，所以我们尝试了将 H36 启动子替换为 Eftu 启动子进行表面展示。产烃结果如图 3.3(b)所示，Eftu 启动子的表达效果与 H36 启动子结果类似，实验组的产烃依然比对照组低，实验组中产烃最多的菌株 S9114-pH36-NCgl1337-oleT<sub>MC</sub> 产量仅为对照组菌株的 1/6。这些实验结果表明，OleT<sub>MC</sub> 的表面展示结果与预期结果完全相反，应该与启动子的选择无关，但是其中具体的原因还不得而知。我们推测可能是因为脂肪酸脱羧酶与载体蛋白融合后影响了它的表达效果，从而导致了烃产量的下降。

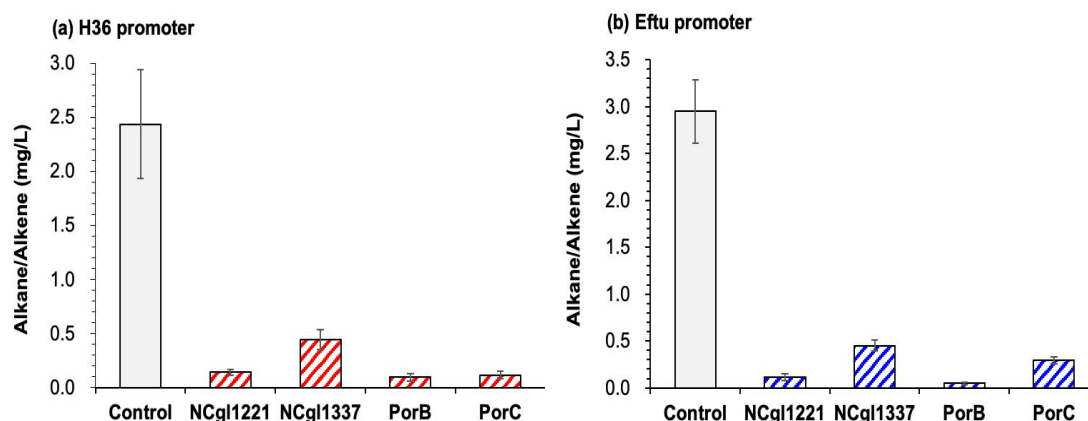


图 3.3 OleT<sub>MC</sub> 表面展示后烃的产量 (a)H36 启动子; (b)Eftu 启动子

Figure 3.3 Alkene production of displaying fatty acid decarboxylase OleT<sub>MC</sub> on the cell surface.

(a) Alkane/alkene production under the control of H36 promoter. (b) Alkane/alkene production under the control of Eftu promoter. Fermentation was carried out in shake flask.

注: NCgl1221、NCgl1337、PorB、PorC 分别代表融合对应载体蛋白表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株。发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 发酵体系为 30 mL, 30°C, 200 rpm, pH 7.0。

### 3.4 本章小结

本章实验以 *C. glutamicum* S9114 为研究对象, 通过异源表达脂肪酸脱羧酶使 *C. glutamicum* S9114 具备了产烃能力, 并通过进一步的脂肪酸脱羧酶的分泌表达实现了烃类化合物产量的明显提高。本章的主要结论如下:

(1) 异源表达我们所选择的来自 *Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456 的 OleT<sub>JE</sub> 和来自 *Macroccoccus caseolyticus* 的 OleT<sub>MC</sub> 后, *C. glutamicum* S9114 能够通过脂肪酸的脱羧成功生产烯烃。并且在两种不同来源的脂肪酸脱羧酶的催化下, 菌株生成的烯烃的种类是一致的。其中, OleT<sub>MC</sub> 的表达效果更好, 在菌株中产烃更多。

(2) 将脂肪酸脱羧酶通过 Sec 路径或 Tat 路径分泌至细胞外进行催化反应, 直接在胞外利用谷氨酸棒杆菌生成的大量游离脂肪酸进行脱羧产烃, 同时也避免了烃类化合物的跨膜运输, 各菌株烃类化合物的产量都有较为明显的提高。其中, 通过 Sec 路径分泌表达脂肪酸脱羧酶的效果更好, 最终烃类化合物的产量可以达到 9.6 mg/L, 比胞内表达脂肪酸脱羧酶的对照菌株产量提高了 3 倍左右。而将脂肪酸脱羧酶 OleT<sub>MC</sub> 进行表面展示后, 对于菌株中烃类化合物产量的提高没有帮助, 反而造成了产量有一个比较大幅度的下降。并且我们尝试了替换启动子之后也是同样的实验结果。对于这个现象, 暂时还不清楚其中具体的原因。我们推测可能是因为脂肪酸脱羧酶与载体蛋白融合后, 基因的表达效果受到了影响, 从而导致了烃产量的下降。

## 第 4 章 双产烃路径在谷氨酸棒杆菌中的构建

### 4.1 引言

在前面两个章节的实验中，我们分别在谷氨酸棒杆菌中尝试了两条不同的烃类化合物的合成路径。两条路径分别是由 AAR、ADO 组成的将脂酰-ACP 作为合成前体经过两步反应生成烃类的 AAR-ADO 路径，以及直接将脂肪酸进行脱羧生成烃类的 OleT 路径。虽然我们针对这两条路径都进行了一些优化，烃类化合物的产量也有了一些提高，但是其生产水平依然在比较低的一个范围内，与实现烃类化合物的产业化大规模生产之间还存在着非常大的差距。此外，*C. glutamicum* 对木质纤维素体系有较强的耐受性，在其中可以生长得非常好。因此，对 *C. glutamicum* 进行代谢工程改造后，实现了利用来源广泛并且可再生的木质纤维素原料生产纤维素烃类化合物，可以降低生产成本，具有非常大的实际应用优势。

在本章研究中，为了进一步提高 *C. glutamicum* 中烃类化合物的产量，我们尝试了在具备 AAR-ADO 产烃路径的菌株 HW4 中构建 OleT 产烃路径，通过将两条路径结合到一起从而提高菌株的产烃能力。接下来尝试了将脂肪酸脱羧酶分泌到胞外进行表达，烃类化合物的产量也有了进一步的提高。之后我们针对发酵条件进行了优化，发现溶氧对于 OleT 路径非常重要，增加溶氧可以使烃类化合物的产量有比较大的提高。最后我们利用玉米秸秆水解液进行烃类化合物的生产，为利用廉价的木质纤维素原料工业化生产烃类化合物奠定了基础。

### 4.2 材料与方法

#### 4.2.1 实验菌株及质粒

本章节研究所使用的出发菌株和改造菌株均列于表 4.1 中。本章节的出发菌株是 *C. glutamicum* HW4，构建质粒所用的宿主菌为 *E. coli* BL21，生物脱毒菌株为 *Paecilomyces variotii* FN89，由本实验室自主筛选得到。以上菌株均保存于本实验室。

#### 4.2.2 培养基和培养条件

*Paecilomyces variotii* FN89 保存培养于 PDA 斜面培养基。PDA 培养基中各成分及含量为 200 g/L 土豆汁，20 g/L 葡萄糖和 15 g/L 琼脂。

本章节使用的其余培养基和培养条件与前两个章节相同，详情请参考 2.2.2。

表 4.1 本章所使用的菌株、质粒和引物

Table 4.1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> BL21	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> HW4	<i>C. glutamicum</i> S9114 with <i>fasR</i> gene deleted and carrying <i>aar</i> and <i>ado</i>	Lab stock
HW4-pH36- <i>oleT<sub>JE</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>oleT<sub>JE</sub></i>	This study
HW4-pH36- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>oleT<sub>MC</sub></i>	This study
HW4-pH36- <i>NsoleT<sub>JE</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>NsoleT<sub>JE</sub></i>	This study
HW4-pH36- <i>RsoleT<sub>JE</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>RsoleT<sub>JE</sub></i>	This study
HW4-pH36- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	This study
HW4-pH36- <i>RsoleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> HW4 carrying pH36- <i>RsoleT<sub>MC</sub></i>	This study
HW4-pEftu- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 carrying pEftu- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	This study
Plasmids	Characteristics	Sources
pH36mob	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pEftumob	Overexpression vector, kanamycin resistance	Lab stock
pEftu- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i>	pH36- <i>NsoleT<sub>MC</sub></i> with H36 promoter replaced by Eftu promoter	This study
Primers	Sequence(5'-3')	Restriction enzyme
NsoleT <sub>MC</sub> (Eftu)-F	ACGCGTCGACATGAAATATGAATTTAATAATAGATTCCGAAC	SaII
NsoleT <sub>MC</sub> (Eftu)-R	AACTGCAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTTGTACGGTCGATATTCACCCTTA TATTTTC	PstI

#### 4.2.3 重组质粒的构建及转化

本章节研究新构建的质粒及其引物列于表 4.1, 其余均列于表 3.1 中。以上质粒均为表达质粒, 以 pH36mob、pEftumob 质粒为载体。利用引物 Nsole<sub>TMc</sub>(Eftu)-F/R 将 *Ncg11289* 基因信号肽与 *ole<sub>TMc</sub>* 融合后的片段从质粒 pH36-*Nsole<sub>TMc</sub>* 上扩增下来, 然后插入到质粒 pEftumob 的 Sall/PstI 位点, 从而得到质粒 pEftu-*Nsole<sub>TMc</sub>*。

大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒的转化详见 2.2.3。

#### 4.2.4 重组菌株的构建

本章节研究所使用的宿主菌为 *C. glutamicum* HW4, 转化方式详见 2.2.4。

#### 4.2.5 木质纤维素原料预处理及生物脱毒

预处理方法采用干酸预处理。首先将玉米秸秆洗净晾干, 然后进行粉碎。粉碎后的玉米秸秆与 3.5% (w/w) 的稀硫酸以 2:1 (w/w) 的比例混合, 一起加到预处理反应器中进行预处理, 反应条件为 175°C, 50 rpm, 5 min。经过预处理的原料中固含量约为 50% (w/w), 整个预处理过程中没有废水的产生。预处理过后的玉米秸秆原料每 g 干物料含有 41.5 mg 葡萄糖、115.6 mg 木糖、20.4 mg 乙酸、1.8 mg 糠醛、4.8 mg 5-羟甲基糠醛。

物料经过预处理后, 使用固态生物脱毒方式。首先利用 20% (w/w) 的氢氧化钙溶液将物料的 pH 调至 5.5 左右, 接着进行磨浆。然后在物料中以 10% (w/w) 的接种量接入 *Paecilomyces variotii* FN89 的种子, 混合均匀, 在密封盒中进行脱毒。在室温下脱毒三到四天即可脱除抑制物。

#### 4.2.6 玉米秸秆水解液的制备

本研究中用到了 15% (w/w) 的玉米秸秆水解液, 水解液的制备在 5L 发酵罐中进行。将脱毒后的玉米秸秆原料基于干物料 15% (w/w) 的装载量加入发酵罐中, 纤维素酶添加浓度为 10 mg 蛋白/g 干物料。糖化条件为 50°C, 150 rpm, pH 为 4.8, 时间为 48 h。结束后将发酵醪 10,000 rpm 离心 10 min, 上清灭菌后在无菌条件下进行过滤, 滤液即为水解液。通过检测, 水解液中含有 58.9 g/L 葡萄糖, 25.6 g/L 木糖, 0.78 g/L 乙酸, 0.08 g/L 糠醛和 0.02 g/L 5-羟甲基糠醛。

#### 4.2.7 产烃发酵

发酵种子液的培养以及摇瓶发酵的条件与前两章节相同, 详见 2.2.5。

条件优化的发酵在 1 L 发酵罐中进行, 发酵体系为 600 mL, 温度为 30°C, 转速 600 rpm, 接种量为 10%, 通气量为 1.4 vvm。发酵过程中通过自动补加 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 5M NaOH 使 pH 维持在 7.0。

在使用水解液进行上罐发酵之前, 我们对菌株 HW4-pH36-*Nsole<sub>TMc</sub>* 进行了短期的适应性进化。驯化在装有 30 mL 15%玉米秸秆水解液的 250 mL 摇瓶中进行, 并额外添加了营养盐保证菌株可以正常生长。营养盐各组分在培养基中的浓度为 5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 以及 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>。以 5% (v/v) 的接种量每 72 h 转接一次, 期间使用 5M NaOH 调节 pH 维持在 7.0 左右。

利用水解液生产纤维素烃类化合物的发酵在 3 L 罐中进行，培养基为 800 mL 添加了营养盐的 15% 玉米秸秆水解液，发酵温度设置为 30°C，转速 600 rpm，接种量为 10%，通气 1.4 vvm。发酵过程中通过自动补加 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 5M NaOH 使 pH 维持在 7.0。发酵期间取样测定 OD<sub>600</sub> 及葡萄糖消耗情况。

#### 4.2.8 烃类的提取与测定

提烃方法及计算方式与前两个章节相同，详见 2.2.6。

#### 4.2.9 分析方法

葡萄糖通过生物传感分析仪 SBA-90 测定。乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛通过高效液相色谱检测，配备的色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱，示差折光检测器 RID-10A。检测时柱温为 65°C，流动相为 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，流速为 0.6 mL/min。菌株的生长情况通过分光光度计在 600 nm 下测定光密度 (OD<sub>600</sub>)，然后制作生长曲线。

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 双产烃路径在谷氨酸棒杆菌中的构建

之前的研究表明，利用谷氨酸棒杆菌生产烃类化合物是可行的，但是目前的产量还维持在较低的水平。因此为了进一步提高谷氨酸棒杆菌的产烃能力，我们尝试了在具备 AAR-ADO 产烃路径的菌株 HW4 中构建了另外一条 OleT 产烃路径，将这两条路径结合到同一株菌株中。我们将之前构建好的两个脂肪酸脱羧酶表达质粒电转到菌株 HW4 中，构建了菌株 HW4-pH36-*oleT<sub>JE</sub>* 和 HW4-pH36-*oleT<sub>MC</sub>*。之后以带有空载质粒的菌株 HW4-pH36 为对照进行发酵，72 h 后对发酵液中的烃类化合物进行检测。

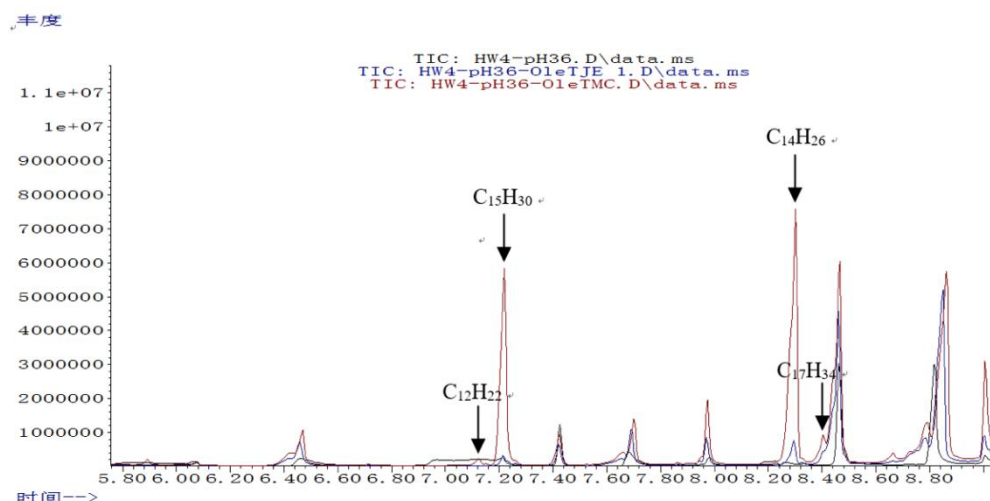


图 4.1 菌株 HW4-pH36, HW4-pH36-*oleT<sub>JE</sub>* and HW4-pH36-*oleT<sub>MC</sub>* 中的产烃情况

Figure 4.1 GC-MS result of alkane production in *C. glutamicum* HW4-pH36, HW4-pH36-*oleT<sub>JE</sub>* and HW4-pH36-*oleT<sub>MC</sub>*.

发酵液的检测结果如图 4.1 所示，在菌株 HW4 中异源表达两种脂肪酸脱羧酶后都有烯烃的生成，分别是 C<sub>12</sub>、C<sub>14</sub> 的双烯烃和 C<sub>15</sub>、C<sub>17</sub> 的单烯烃，并且同样是 OleT<sub>MC</sub> 催化生成的烯烃更多，与在菌株 S9114 中的结果是一致的。另外，在对照菌株中，没有上述四种烯烃的生成，进一步表明菌株 HW4 中脂肪酸脱羧酶的导入可以使其产烃能力

有进一步的增强。

在第二章的研究中，我们针对菌株 HW4 中烃类化合物合成路径进行的代谢工程改造没有取得明显的效果。在第三章的研究中，我们将脂肪酸脱羧酶分泌到胞外进行表达后，烃类化合物的产量有了一定的提高。接下来便于菌株 HW4 中尝试了 OleT 的分泌表达。由于菌株 HW4 中缺乏脂肪酸的转录调控因子 FasR，脂肪酸的生成不会受到反馈抑制，所以菌株 HW4 相比 *C. glutamicum* S9114 在发酵过程中会更多的游离脂肪酸，这也刚好为脂肪酸脱羧酶提供了足量的底物，所以在底物供给方面会比 *C. glutamicum* S9114 更具优势。

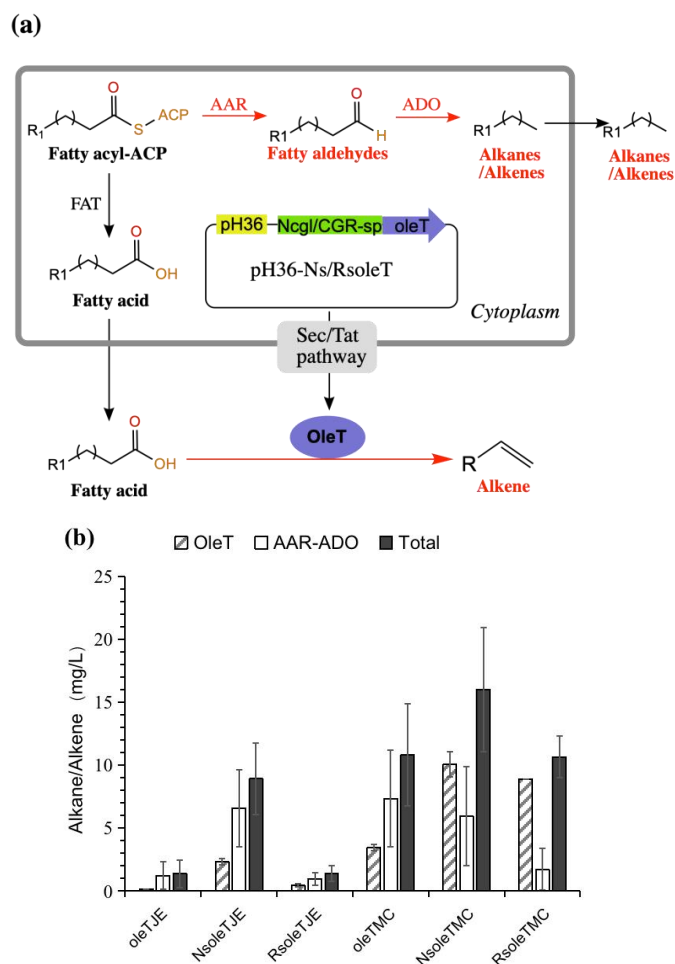


图 4.2 (a) *C. glutamicum* HW4-pH36-Ns/RsoleT<sub>JE/MC</sub> 中的烃类合成路径示意图; (b) 各菌株中烃类化合物的产量

Figure 4.2 (a) The alkane biosynthesis pathway in *C. glutamicum* HW4-pH36-Ns/RsoleT<sub>JE/MC</sub>.  
(b) Alkane/alkene production.

注：发酵在 250mL 摇瓶中进行，发酵体系为 30 mL，30°C，200 rpm，pH 7.0。

我们将之前构建好的 4 个分泌表达脂肪酸脱羧酶的质粒转入菌株 HW4 中，菌落 PCR 验证无误后进行发酵。我们以胞内表达两种脂肪酸脱羧酶的菌株为对照，在摇瓶中对重组菌株进行了产烃发酵验证。在这里，菌株中存在两条产烃路径，为了便于区分，我们将这两条路径的产量分开进行统计计算。C12、C14 的双烯烃和 C15、C17 的单烯烃为 OleT 产烃路径的产量，其余的烃类为 AAR-ADO 产烃路径的产量，菌株中烃类化合物

的总产量则为这两条产烃路径的总和。

实验结果如图 4.2(b)所示, 从 OleT 产烃路径来看, 不管有没有分泌表达, 依然是表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株产烃更多。其中, 对照菌株 HW4-pH36-oleT<sub>MC</sub> 的 OleT 路径产量为 3.5 mg/L, 通过 Tat 途径分泌表达的菌株 HW4-pH36-RsoleT<sub>MC</sub> 产量为 8.9 mg/L, 通过 Sec 途径分泌表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株 HW4-pH36-NsoleT<sub>MC</sub> 烃的产量达到了 10.1 mg/L, 比对照提高了 1.9 倍。而从 AAR-ADO 路径来看, 这条路径的产烃情况依然不稳定, 各菌株平行实验组之间烃的产量都出现了差距较大的情况。从烃的总产量来看, 菌株 HW4-pH36-NsoleT<sub>MC</sub> 产量最高, 达到了 16.0 mg/L。所以在后续实验中, 我们都以菌株 HW4-pH36-NsoleT<sub>MC</sub> 进行。

### 4.3.2 利用葡萄糖为碳源优化烃类化合物的生产

在确定了合适的脂肪酸脱羧酶及其最佳分泌途径之后, 我们尝试了另外两个策略来进一步提高烃类化合物的产量。一方面是替换启动子, 提高脂肪酸脱羧酶的分泌表达效果; 另一方面是针对产烃发酵时的各个条件进行优化, 从而提高烃类化合物的产量。

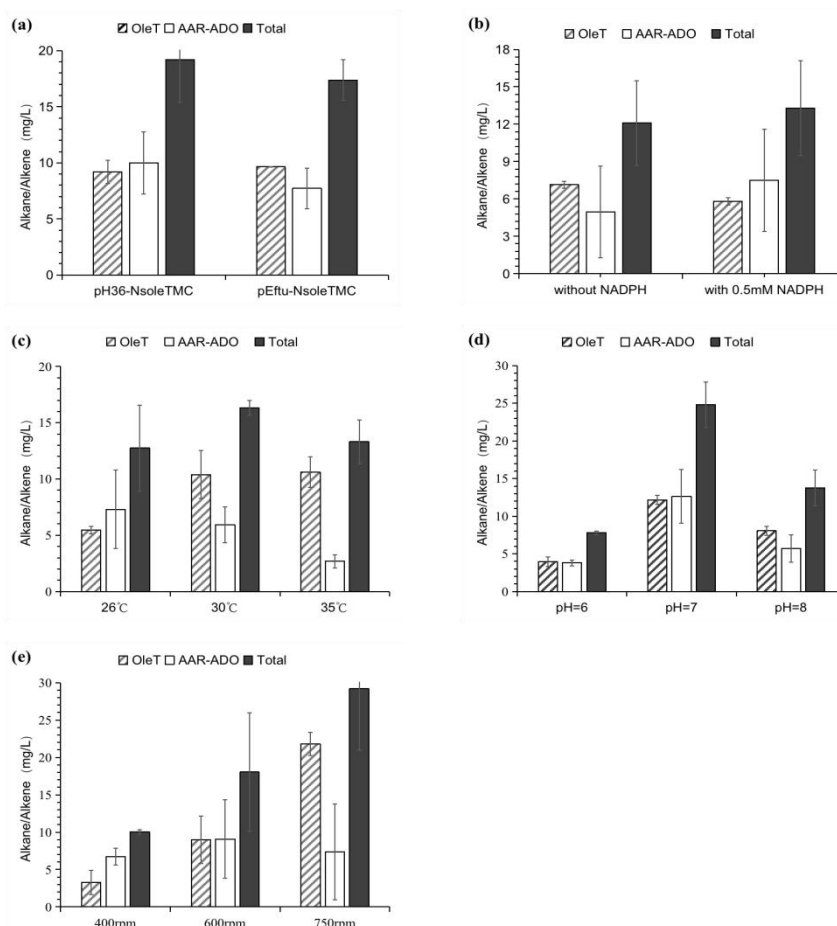


图 4.3 通过优化启动子和发酵条件来提高烃的产量 (a) 启动子; (b) NADPH; (c) 温度; (d) pH; (e)溶氧

Figure 4.3 Improving alkane/alkene production by promoter optimization and optimizing culture conditions. (a) Promoter; (b) NADPH; (c) Temperature; (d) pH; (e) DO.

注: 启动子的优化及额外添加 NADPH 的发酵是在 250 mL 摇瓶中进行的, 发酵体系为 30 mL, 30°C, 200 rpm, pH 7.0。温度、pH 和转速的优化是在 1L 发酵罐中进行的, 发酵体系为 600 mL。

对于启动子的优化, 我们现在使用的是 H36 启动子, 后面选择了组成型强启动子 Eftu 进行替换。构建好对应的质粒后电转菌株 HW4 中进行产烃验证。实验结果如图 4.3(a) 所示, 采用 H36 启动子的对照菌株 HW4-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* 中 OleT 路径产烃为 9.2 mg/L, 而 Eftu 启动子控制下 OleT 路径产烃为 9.7 mg/L, 略高于对照菌株。这一结果表明, 将启动子替换为 Eftu 对于产烃没有明显的影响, 或许后续可以考虑换成弱启动子验证一下表达效果。

之后我们针对发酵条件进行了一系列优化来提高烃类化合物的产量。首先我们考虑到脂肪酸脱羧酶 OleT 属于 P450 酶系, P450 酶的催化需要电子传递系统从 NADPH 中获得电子传递给 P450 蛋白。而我们将脂肪酸脱羧酶分泌到胞外表达的话, 可能会存在还原力不足的问题, 因此我们尝试着直接在培养基中添加 0.5 mM NADPH。实验结果如图 4.3(b) 所示, 在额外添加 NADPH 之后, 菌株中 OleT 路径的产烃反而略微有些下降, 产量从 7.1 mg/L 下降到了 5.8 mg/L, 这一结果表明 NADPH 在正常的情况下也是足量的。对此, 我们推测原因可能是目前烃类化合物的产量还停留在较低的水平, 在脂肪酸脱羧酶的催化过程中并不需要消耗大量的还原力。

接着我们对发酵时的温度进行了优化。通过查阅资料我们发现 OleT<sub>MC</sub> 来源的菌株 *M. caseolyticus* 的最适生长温度为 26°C, 因此选择了 26, 30, 35°C 三个不同的温度进行发酵验证。在发酵过程中, 我们发现菌株在 30 °C 下生长得最好。烃类的产量如图 4.3(c) 所示, 从 OleT 产烃路径来看, 菌株在 30 和 35 °C 下的产量相差不大, 都达到了 10mg/L 左右, 而 26°C 下烃类的产量仅为 5.5 mg/L, 。可能是因为谷氨酸棒杆菌在 26°C 下的生长情况不是很好, 所以产烃能力也有一定幅度的降低。从各发酵温度下烃类的总产量来看, 菌株在 30°C 时产烃最多, 产量有 16.3 mg/L。

然后我们在不同的 pH 下进行了产烃发酵的尝试。谷氨酸棒杆菌发酵时 pH 一般维持在 7 左右, 因此我们选择了 6, 7, 8 三个不同 pH 进行发酵。从生长情况来看, 当 pH 为 6 或 8 时, 菌株生长得很差, 因此菌株中的两条产烃路径的产量都比较低。如图 4.3(d) 所示, pH 为 6 时菌株中烃类的总产量仅为 7.8 mg/L; pH 为 8 时菌株中烃类的总产量为 13.8 mg/L; 在 pH 为 7 时, 菌株中烃类的产量达到最高, 有 24.8 mg/L。这一结果表明发酵时的 pH 对于 *C. glutamicum* 的生长是非常重要的, 同时也与目标产物的产量息息相关。

最后我们考虑到, 在脂肪酸脱羧酶的催化过程中需要有氧气的参与, 所以溶氧对于烃类化合物的生产应该是一个比较重要的影响因素。因此, 我们通过设置发酵罐搅拌桨 400, 600, 750 rpm 等不同的转速来改变产烃发酵时的溶氧。实验数据表明, 随着转速的增加, 发酵时的溶氧越高, 菌株的生长情况越好, 耗糖速率也越快。实验数据如图 4.3(e), 从 OleT 路径的产烃情况来看, 当搅拌桨转速为 400 rpm 时, OleT 路径的产量只有 3.3 mg/L。相比之下, 转速为 600 rpm 时, OleT 催化生成的烯烃产量为 9.0 mg/L; 在 750 rpm 转速时, OleT 路径产烃高达 21.8 mg/L, 比 400 rpm 时提高了 5.6 倍。从 AAR-ADO 产烃路径来看, 溶氧的变化对于烃类化合物的产量没有太大的影响。因此产烃最多的是

转速为 750 rpm 下的发酵，菌株中烃类产量为 29.2 mg/L。这一结果同时也证明了菌株的生长对于烃类化合物的最终产量来说是比较重要的。

### 4.3.3 以木质纤维素原料进行烃类化合物的生产

为了充分发挥谷氨酸棒杆菌的优势并且进一步降低生产成本，我们利用目前产烃最多的改造菌株 HW4-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* 在木质纤维素体系中进行了产烃发酵。考虑到我们的重组菌株是在原始谷氨酸棒杆菌的基础上做了很多代谢工程改造的，对木质纤维素体系的耐受性可能会变弱，因此为了增强其适应性，我们将改造菌株在玉米秸秆水解液中进行了一个短期的适应性进化。驯化在 15% (w/w) 的玉米秸秆水解液中进行，并额外添加营养盐来帮助菌株生长。待菌株的各方面都得到稳定，我们便将其在的玉米秸秆水解液中进行纤维素烃类化合物的发酵，并向水解液中额外添加 5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 以及 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>。

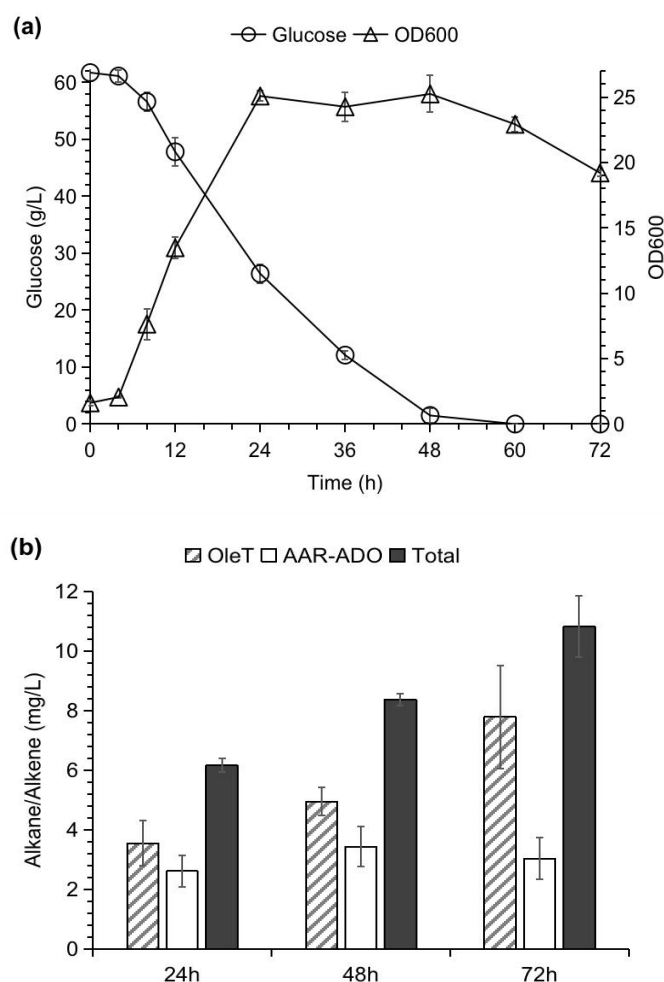


图 4.4 (a) 菌株 HW4-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* 在 15% 玉米秸秆水解液中的生长和糖耗情况；(b) 各时间段的产烃情况

Figure 4.4 (a) The cell growth and glucose consumption of the strain HW4-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* in 15% corn stover hydrolysate; (b) Alkane/alkene production

注：发酵在 3 L 罐中进行，发酵体系为 800 mL。发酵时向水解液中额外添加了营养盐，具体成分及发酵条件见 4.2.7。

如图 4.4 所示, 菌株在水解液中进行了短期的驯化之后, 对木质纤维素体系的适应性得到一定程度的提高。在发酵进行到 48 h 时,  $OD_{600}$  达到了 25 以上, 之后略微有些下降, 可能是发酵液中的葡萄糖耗尽导致的结果。从产烃情况来看, 在整个发酵过程中, 纤维素烃类化合物的产量表现出慢慢增长的趋势。在发酵结束时的 72 h 时, 纤维素烃类化合物的总产量达到了 10.8 mg/L。其中, OleT 路径的产量为 7.8 mg/L, AAR-ADO 路径的产量为 3.0 mg/L。

虽然相较于在合成培养基中的最终产量, 这个结果相对较低, 但是也有力地证明了利用木质纤维素原料进行可持续生产纤维素烃类化合物是可行的。基于上面的实验结果, 后续可以考虑在水解液中从增加溶氧等方面对菌株的产烃进行优化, 进一步提高烃类化合物的产量。

以当前报道的技术来看, 利用大肠杆菌产烃的产量从 1.3 至 1310 mg/L 不等, 而在酿酒酵母中的产量会相对更低一些。本文以葡萄糖为碳源时最高产量达到 29.2 mg/L, 这一结果比大部分大肠杆菌的产量低一些, 但是比酿酒酵母的产量高。此外, 本文以木质纤维素生物质为碳源进行初步产烃, 烃类化合物的产量达到 10.8 mg/L, 目前还具有很大的提升空间。

#### 4.4 本章小结

本章将 AAR-ADO 路径和 OleT 路径结合到一起, 在 *C. glutamicum* 中构建了双产烃路径, 并通过对培养条件进行优化提高了以葡萄糖为碳源时烃类化合物的产量, 最后在玉米秸秆水解液中实现了纤维素烃类化合物的生产。本章的主要结论如下:

(1) 在具备 AAR-ADO 产烃路径的 *C. glutamicum* 中进行 OleT<sub>MC</sub> 的分泌表达, 我们成功构建了一株具备双产烃路径的 *C. glutamicum*;

(2) 在以葡萄糖为碳源的合成培养基中针对培养条件进行优化, 我们发现通过增加发酵罐搅拌桨的转速来增加溶氧能够提高烃类化合物的产量, 最高可达 29.1 mg/L;

(3) 在 15% (w/w) 的玉米秸秆水解液中, 菌株 HW4-pH36-*NsoleT<sub>MC</sub>* 中烃类化合物的产量达到了 10.8 mg/L, 成功实现了纤维素烃类化合物的生产。

## 第 5 章 结论与展望

### 5.1 结论与创新点

随着不可再生化石资源的日益紧缺，人们加快了对各类替代燃料的研究与开发。生物燃料作为一种非常有希望的替代产品引起了极大的关注，而利用来源广泛的木质纤维素原料进行生物燃料的生产则是更具有不可多得的实际应用意义。本研究选择的 *C. glutamicum* 对木质纤维素体系中的各类抑制物耐受性较高，在菌株中构建生产烃类化合物的路径之后对其进行了优化，显著提高了菌株的产烃能力。最后在水解液中进行产烃发酵，成功实现利用可再生木质纤维素生产烃类化合物。此外，根据我们对已发表文献的多次检索及查阅，在本文成文前未有利用谷氨酸棒杆菌生产烃类化合物的论文发表。

本论文的主要结论如下：

(1) 在具有 AAR-ADO 产烃的路径的谷氨酸棒杆菌 HW4 中，烃类化合物的产量并不理想。通过过表达烃类合成路径的两个关键基因，以及通过异源表达脂酰-ACP 合成酶 AasS 来增加前体物质的供给这两个方法来强化菌株 HW4 中的产烃路径，对于菌株 HW4 的烃类化合物产量的提高没有明显的帮助作用。通过增加辅因子 NADPH 的供给，菌株 HW4 中烃类化合物的产量有一定的增加，但是幅度不大，效果并不明显。另外，将副产物甲酸进行降解也没有对产烃有太大的帮助，可能是因为细胞中生产的甲酸本来就并不多，没有对细胞造成太大的伤害。

(2) 在 *C. glutamicum* S9114 中异源表达来自不同菌株的脂肪酸脱羧酶 OleT 能够实现烯烃的生产。OleT 通过 Sec 路径或 Tat 路径分泌到胞外进行表达，直接在胞外利用谷氨酸棒杆菌生成的大量游离脂肪酸进行脱羧产烃，同时也避免了烃类化合物的跨膜运输，各菌株烃类化合物的产量都有较为明显的提高。其中，通过 Sec 路径分泌表达脂肪酸脱羧酶的效果更好，最终烃类化合物的产量可以达到 9.6 mg/L，比胞内表达脂肪酸脱羧酶的对照菌株产量提高了 3 倍左右。而将脂肪酸脱羧酶 OleT<sub>MC</sub> 进行表面展示后，对于菌株中烃类化合物产量的提高没有帮助，反而造成了产量有一个比较大幅度的下降。并且尝试了替换启动子之后也是同样的实验结果。对于这个现象，暂时还不清楚其中具体的原因。推测可能是因为脂肪酸脱羧酶与载体蛋白融合后，基因的表达效果受到了影响，从而导致了烃产量的下降。

(3) 为了进一步提高谷氨酸棒杆菌中烃类化合物的产量，我们在具备 AAR-ADO 路径的菌株 HW4 中引入了另外一条 OleT 产烃路径，将这两条路径结合到同一株菌株中。之后同样将脂肪酸脱羧酶进行分泌表达，发现同样是通过 Sec 路径分泌表达 OleT<sub>MC</sub> 的菌株产烃更多，总产量达到了 16.0 mg/L。接着我们在以葡萄糖为碳源的合成培养基中对温度、pH、转速等几个方面对发酵条件进行了优化。我们发现增加转速可以明显增加脂肪酸脱羧酶催化生成的烯烃。因为脂肪酸脱羧酶的催化过程需要有氧气的参与，转速

的增加使得溶氧增加，提高了脂肪酸脱羧酶的催化效率。在合成培养基中，烃的产量最高可达到 29.2 mg/L。最后，本研究还利用了木质纤维素原料实现了纤维素烃类化合物的可持续生产。虽然这个结果与大肠杆菌中烃的产量相比较少，但是为利用可再生的木质纤维素进行烃的生产奠定了基础，具有实际应用的意义。

根据 GC-MS 谱图的峰面积计算烃类化合物的产量，是导致产量测定不准确的重要因素。由于样品中大量脂肪酸的存在，GC-MS 谱图的基线漂移过高且不规则，使得烃类化合物的产量比实际的偏低。我们也尝试过将样品进行甲酯化处理，但是这一过程会导致烃类化合物的损失。所以在高浓度脂肪酸存在的情况下，需要研发一种更为准确的检测方法。

## 5.2 展望

本研究在谷氨酸棒杆菌中构建了生产烃类化合物的途径，并对菌株进行了代谢工程改造提高烃类化合物的产量。但是还存在一些问题需要进行深入研究：

(1) *aar* 和 *ado* 虽然被整合到了基因组上，但是菌株 HW4 中烃类化合物的产量并不稳定，并且对其进行的改造也没有太大的效果。可能与这两个基因整合的位点有关，所以后续可以尝试更换整合位点。

(2) 在其他菌株中，OleT 催化生成的都是奇数链长的单烯烃；而在谷氨酸棒杆菌中还出现了偶数链长的双烯烃，这可能与谷氨酸棒杆菌生成的脂肪酸种类有关。所以之后可以对其生成的脂肪酸种类进行研究，探究其脂肪酸生成机制与其他菌株的不同。

(3) 在玉米秸秆水解液中，烃类化合物的产量还处在较低的水平。后续可以考虑优化其在水解液中的各种发酵参数等，提高纤维素烃类化合物的产量。

## 参考文献

- [1] FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham MF, Whitney RA. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology* 2010; 101(23):8915-8922.
- [2] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 2016; 199:103-112.
- [3] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 2008; 454(7206):841-845.
- [4] Sun Y, Cheng JY. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 2002; 83(1):1-11.
- [5] Sun SN, Sun SL, Cao XF, Sun RC. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology* 2016; 199:49-58.
- [6] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 2000; 74(1):17-24.
- [7] Sun XF, Sun RC, Fowler P, Baird MS. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53:860-870.
- [8] Ralph J, Lundquist K, Brunow GS et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. 2004; 3(1-2):29-60.
- [9] Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008; 11(3):278-285.
- [10] Brodeur G, Yau E, Badal K et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research* 2011; 2011:787532-787532.
- [11] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol* 2010; 101(13):4851-4861.
- [12] Harun MY, Radiah ABD, Abidin ZZ, Yunus R. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technology* 2011; 102(8):5193-5199.
- [13] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 2008; 9(9):1621-1651.
- [14] Li X, Kim TH, Nghiem NP. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource Technology* 2010; 101(15):5910-5916.

- [15] Karimi, Keikhosro, Taherzadeh, Mohammad J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource Technology*, 2016,200:1008-1018.
- [16] Li CL, Knierim B, Manisseri C et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 2010; 101(13):4900-4906.
- [17] Singh P, Suman A, Tiwari P et al. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2008; 24(5):667-673.
- [18] Wyman CE, Dale BE, Elander RT et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 2005; 96(18):1959-1966.
- [19] Modenbach AA, Nokes SE. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment-a review. *Biotechnol. Bioeng.* 2012; 109(6):1430-1442.
- [20] Zhang J, Wang XS, Chu DQ et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology* 2011; 102(6):4480-4488.
- [21] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular Adaptation Mechanisms Employed by Ethanogenic Bacteria in Response to Lignocellulose-derived Inhibitory Compounds. *Int. J. Biol. Sci.* 2013; 9(6):598-612.
- [22] Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J et al. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology* 1994; 12(10):409-415.
- [23] Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast (Chichester, England)* 1992; 8(7):501-517.
- [24] Palmqvist E, Almeida JS, Hahn-Hagerdal B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 1999; 62(4):447-454.
- [25] Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25(7):759-761.
- [26] Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; 20(3):372-380.
- [27] Zhang J, Chu DQ, Huang J et al. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation at High Corn Stover Solids Loading in a Helical Stirring Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2010; 105(4):718-728.

- [28] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 2010; 101(13):4744-4753.
- [29] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, Kondo A. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology* 2016; 42:30-39.
- [30] Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* 2003; 104(1-3):155-172.
- [31] Buschke N, Schafer R, Becker J, Wittmann C. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications - Optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresource Technology* 2013; 135:544-554.
- [32] Yamamoto S, Suda M, Niimi S et al. Strain Optimization for Efficient Isobutanol Production Using *Corynebacterium glutamicum* Under Oxygen Deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 110(11):2938-2948.
- [33] Nakamura Y, Nishio Y, Ikeo K, Gojobori T. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene* 2003; 317(1-2):149-155.
- [34] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 2003; 104(1-3):5-25.
- [35] Inui M, Suda M, Okino S et al. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology-Sgm* 2007; 153:2491-2504.
- [36] Sakai S, Tsuchida Y, Okino S et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73(7):2349-2353.
- [37] Park H-S, Um Y, Sim SJ et al. Transcriptomic analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochemistry* 2015; 50(3):347-356.
- [38] Wendisch VF, Brito LF, Lopez MG et al. The flexible feedstock concept in Industrial Biotechnology: Metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources. *J. Biotechnol.* 2016; 234:139-157.
- [39] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab Eng* 2018; 50:122-141.

- [40] Tsuge Y, Hori Y, Kudou M et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 98(20):8675-8683.
- [41] Bender MH. Potential conservation of biomass in the production of synthetic organics. *Resources Conservation and Recycling* 2000; 30(1):49-58.
- [42] Lapuerta M, Barba J, Sediako AD et al. Morphological analysis of soot agglomerates from biodiesel surrogates in a coflow burner. *J. Aerosol. Sci.* 2017; 111:65-74.
- [43] Dutta K, Daverey A, Lin J-G. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy* 2014; 69:114-122.
- [44] Rolz C, de Leon R. Ethanol fermentation from sugarcane at different maturities. *Ind. Crop. Prod.* 2011; 33(2):333-337.
- [45] Kulkarni MG, Gopinath R, Meher LC, Dalai AK. Solid acid catalyzed biodiesel production by simultaneous esterification and transesterification. *Green Chem.* 2006; 8(12):1056-1062.
- [46] Nabi MN, Rahman MM, Akhter MS. Biodiesel from cotton seed oil and its effect on engine performance and exhaust emissions. *Appl. Therm. Eng.* 2009; 29(11-12):2265-2270.
- [47] Balat M, Balat H, Oz C. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 2008; 34(5):551-573.
- [48] Chen YF, Dong BY, Qin WJ, Xiao DG. Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol. *Bioresource Technology* 2010; 101(18):6994-6999.
- [49] Kaparaju P, Serrano M, Thomsen AB et al. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 2009; 100(9):2562-2568.
- [50] Khodakov AY, Chu W, Fongarland P. Advances in the development of novel cobalt Fischer-Tropsch catalysts for synthesis of long-chain hydrocarbons and clean fuels. *Chem. Rev.* 2007; 107(5):1692-1744.
- [51] Han W, Clarke W, Pratt S. Composting of waste algae: A review. *Waste Manage.* 2014; 34(7):1148-1155.
- [52] Suali E, Sarbatly R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2012; 16(6):4316-4342.
- [53] Alaswad A, Dassisti M, Prescott T, Olabi AG. Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015; 51:1446-1460.
- [54] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007; 25(3):294-306.

- [55] Singh J, Cu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2010; 14(9):2596-2610.
- [56] Tandon P, Jin Q. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2017; 80:1089-1099.
- [57] Wolf BM, Niedzwiedzki DM, Magdaong NCM et al. Characterization of a newly isolated freshwater Eustigmatophyte alga capable of utilizing far-red light as its sole light source. *Photosynthesis Research* 2018; 135(1-3):177-189.
- [58] Buitron G, Carrillo-Reyes J, Morales M et al. Biohydrogen production from microalgae. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. Edited by: GonzalezFernandez C, Munoz R. 2017. pp. 209-234.
- [59] Chen CY, Yeh KL, Aisyah R et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 2011; 102(1):71-81.
- [60] Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, et al. Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production [J]. *Eukaryot Cell*, 2010, 9(4): 486-501.
- [61] Li YT, Han DX, Hu GR et al. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab. Eng.* 2010; 12(4):387-391.
- [62] Lan EI, Liao JC. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metab. Eng.* 2011; 13(4):353-363.
- [63] P.P. Peralta-Yahya, F.Z. Zhang, S.B. del Cardayre, J.D. Keasling, Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 2012, 488(7411): 320-8.
- [64] Kallio P, Pasztor A, Akhtar MK, Jones PR. Renewable jet fuel. *Current Opinion in Biotechnology* 2014; 26:50-55.
- [65] Schirmer A, Rude MA, Li XZ et al. Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science* 2010; 329(5991):559-562.
- [66] Zhou YJJ, Buijs NA, Zhu ZW et al. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories. *Nat. Commun.* 2016; 7:9.
- [67] Buijs NA, Zhou YJJ, Siewers V, Nielsen J. Long-chain Alkane Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 2015; 112(6):1275-1279.
- [68] Sinha M, Weyda I, Sorensen A et al. Alkane biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010 through heterologous expression of *Synechococcus elongatus* acyl-ACP/CoA reductase and aldehyde deformylating oxygenase genes. *Amb Express* 2017; 7.
- [69] Cao YX, Xiao WH, Zhang JL et al. Heterologous biosynthesis and manipulation of alkanes in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 2016; 38:19-28.

- [70] Bao L, Li J-J, Jia C et al. Structure-oriented substrate specificity engineering of aldehyde-deformylating oxygenase towards aldehydes carbon chain length. *Biotechnol. Biofuels* 2016; 9.
- [71] Howard TP, Middelhaufe S, Moore K et al. Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110:7636-7641.
- [72] Choi YJ, Lee SY. Microbial production of short-chain alkanes. *Nature* 2013; 502(7472):571-+.
- [73] Song XJ, Yu HY, Zhu K. Improving alkane synthesis in *Escherichia coli* via metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 100(2):757-767.
- [74] Sheppard MJ, Kunjapur AM, Prather KLJ. Modular and selective biosynthesis of gasoline-range alkanes. *Metab. Eng.* 2016; 33:28-40.
- [75] Kang M-K, Zhou YJ, Buijs NA, Nielsen J. Functional screening of aldehyde decarbonylases for long-chain alkane production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 2017; 16.
- [76] Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C et al. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109(37):14858-14863.
- [77] Bernard A, Domergue F, Pascal S et al. Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That *Arabidopsis ECERIFERUM1* and *ECERIFERUM3* Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex. *Plant Cell* 2012; 24(7):3106-3118.
- [78] Andre C, Kim SW, Yu XH, Shanklin J. Fusing catalase to an alkane-producing enzyme maintains enzymatic activity by converting the inhibitory byproduct H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the cosubstrate O<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110(8):3191-3196.
- [79] Zhang L, Liang Y, Wu W et al. Microbial synthesis of propane by engineering valine pathway and aldehyde-deformylating oxygenase. *Biotechnol. Biofuels* 2016; 9.
- [80] Rahman Z, Sung BH, Yi JY et al. Enhanced production of n-alkanes in *Escherichia coli* by spatial organization of biosynthetic pathway enzymes. *J. Biotechnol.* 2014; 192:187-191.
- [81] Rui Z, Li X, Zhu XJ et al. Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111(51):18237-18242.
- [82] Rui Z, Harris NC, Zhu XJ et al. Discovery of a Family of Desaturase-Like Enzymes for 1-Alkene Biosynthesis. *Acs Catalysis* 2015; 5(12):7091-7094.
- [83] Wang J, Zhu K. Microbial production of alka(e)ne biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 2018; 50:11-18.

- [84] Nikolaev IA, Panikov NS, Lukin SM, Osipov GA. Saturated C21-C33 hydrocarbons are involved in the self-regulation of *Pseudomonas fluorescens* adhesion to a glass surface. *Mikrobiologiya* 2001; 70(2):174-181.
- [85] Ladygina N, Dedyukhina EG, Vainshtein MB. A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry* 2006; 41(5):1001-1014.
- [86] Xin F-H, Zhang Y, Xue S-J et al. Heavy oils (mainly alkanes) over-production from inulin by *Aureobasidium melanogenum* 9-1 and its transformant 88 carrying an inulinase gene. *Renewable Energy* 2017; 105:561-568.
- [87] Liu YY, Chi Z, Wang ZP et al. Heavy oils, principally long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 41(9):1329-1337.
- [88] Patrikainen P, Carbonell V, Thiel K et al. Comparison of orthologous cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenases in the production of volatile C3-C7 alkanes in engineered *E. coli*. *Metabolic engineering communications* 2017; 5:9-18.
- [89] Iwama R, Kobayashi S, Ishimaru C et al. Functional roles and substrate specificities of twelve cytochromes P450 belonging to CYP52 family in n-alkane assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet. Biol.* 2016; 91:43-54.
- [90] Mlickova K, Roux E, Athenstaedt K et al. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(7):3918-3924.
- [91] Sheng JY, Feng XY. Metabolic engineering of yeast to produce fatty acid-derived biofuels: bottlenecks and solutions. *Front. Microbiol.* 2015; 6:11.
- [92] Zhou YJ, Buijs NA, Zhu ZW et al. Harnessing Yeast Peroxisomes for Biosynthesis of Fatty-Acid-Derived Biofuels and Chemicals with Relieved Side-Pathway Competition. *J. Am. Chem. Soc.* 2016; 138(47):15368-15377.
- [93] Su Y, Song K, Zhang P et al. Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2017; 74:402-411.
- [94] Yoshino T, Liang Y, Arai D et al. Alkane production by the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp NKBG15041c possessing the alpha-olefin biosynthesis pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(3):1521-1529.
- [95] Crepin L, Lombard E, Guillouet SE. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metab. Eng.* 2016; 37:92-101.
- [96] Janssen HJ, Steinbuchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol. Biofuels* 2014; 7:26.

- [97] Foo JL, Susanto AV, Keasling JD et al. Whole-Cell Biocatalytic and De Novo Production of Alkanes From Free Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 2017; 114(1):232-237.
- [98] Kageyama H, Waditee-Sirisattha R, Sirisattha S et al. Improved Alkane Production in Nitrogen-Fixing and Halotolerant Cyanobacteria via Abiotic Stresses and Genetic Manipulation of Alkane Synthetic Genes. *Current Microbiology* 2015; 71(1):115-120.
- [99] Plassmeier J, Li YY, Rueckert C, Sinskey AJ. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce triacylglycerols. *Metab. Eng.* 2016; 33:86-97.
- [100] Wang X, Khushk I, Xiao YQ et al. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102(1):377-388.
- [101] Jiang Y, Chan CH, Cronan JE. The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio harveyi* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry* 2006; 45(33):10008-10019.
- [102] Li W, Wu H, Li M, San KY. Effect of NADPH availability on free fatty acid production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2018; 115(2):444-452.
- [103] Jaroensuk J, Intasian P, Kiattisewee C et al. Addition of formate dehydrogenase increases the production of renewable alkane from an engineered metabolic pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2019; 294(30):11536-11548.
- [104] Dennig A, Kuhn M, Tassoti S et al. Oxidative Decarboxylation of Short-Chain Fatty Acids to 1-Alkenes. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2015; 54:8819-8822.
- [105] Lee JW, Niraula NP, Trinh CT. Harnessing a P450 fatty acid decarboxylase from *Macroccoccus caseolyticus* for microbial biosynthesis of odd chain terminal alkenes. *Metab Eng Commun* 2018; 7:e00076.
- [106] Ruffing AM, Trahan CA. Biofuel toxicity and mechanisms of biofuel tolerance in three model cyanobacteria. *Algal Research* 2014; 5:121-132.
- [107] Chen BB, Ling H, Chang MW. Transporter engineering for improved tolerance against alkane biofuels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 2013; 6:10.
- [108] Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmids H et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol. Syst. Biol.* 2011; 7:7.
- [109] Liu X, Zhang W, Zhao Z et al. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Crit Rev Biotechnol* 2017; 37(4):541-551.
- [110] Yim SS, Choi JW, Lee RJ et al. Development of a new platform for secretory production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng* 2016; 113(1):163-172.

- [111] Zhang L, Jia H, Xu D. Construction of a novel twin-arginine translocation (Tat)-dependent type expression vector for secretory production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* 2015; 82:50-55.
- [112] Lee MJ, Kim P. Recombinant Protein Expression System in *Corynebacterium glutamicum* and Its Application. *Front Microbiol* 2018; 9:2523.
- [113] Yao W, Chu C, Deng X et al. Display of alpha-amylase on the surface of *Corynebacterium glutamicum* cells by using NCgl1221 as the anchoring protein, and production of glutamate from starch. *Arch Microbiol* 2009; 191(10):751-759.
- [114] Choi JW, Yim SS, Jeong KJ. Development of a Potential Protein Display Platform in *Corynebacterium glutamicum* Using Mycolic Acid Layer Protein, NCgl1337, as an Anchoring Motif. *Biotechnol J* 2018; 13(2).
- [115] Zhu Q, Zhang X, Luo Y et al. L-Serine overproduction with minimization of by-product synthesis by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(4):1665-1673.
- [116] Adachi N, Takahashi C, Ono-Murota N et al. Direct L-lysine production from cellobiose by *Corynebacterium glutamicum* displaying beta-glucosidase on its cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(16):7165-7172.

## 硕士期间研究成果

待发表论文:

Kejun Hua<sup>1</sup>, Yingying Xu<sup>1</sup>, Zhen Huang<sup>1</sup>, Pingping Zhou, Jingbai Wen, Ci Jin, Jie Bao\*. Cellulosic hydrocarbons production by engineering dual synthesis pathways in *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology and Bioengineering.

## 致谢

光阴似箭，三年充实的硕士生活即将画上句点。研一刚开学的场景还在眼前，而现在在我即将离开。回想三年来的点点滴滴，心中百感交集。我经历过很多次的失败，但也感受过很多次成功的喜悦，这一定是我目前人生中最有价值、收获最多的一段时光。在这里，我要向实验室的各位老师、同学以及一直支持我的家人们表示最衷心的感谢。

首先, 特别感谢我的导师鲍杰教授。鲍老师在整个科研过程中投入了诸多精力, 不管是论文研究方向的确立、各种研究问题的解决, 还是研究论文的撰写与修改, 每个过程都离不开鲍老师的悉心指导。鲍老师认真的工作态度、严谨的科研精神以及渊博的学识修养, 永远是我学习的榜样。此时此刻, 再次对鲍老师表示最诚挚的感谢。

其次, 感谢温经柏师兄和黄振师兄在实验上对我的帮助和指导, 在我实验遇到困难时提出了许多宝贵的建议, 不仅带我快速入门相关研究, 也让我顺利完成了相关的实验; 感谢何妮玲同学七年来在生活中对我的关心和鼓励, 实验做累了出去去吃好吃的真的很开心; 感谢徐迎迎师妹对于我实验的支持和帮助。也要感谢实验室金慈师兄、颜钊师兄、张斌师兄、韩涛师兄、郑理想师兄、刘祺师姐、卢敏萍师姐、方纯师姐、李园园师姐和孙鲁欢、张翼、展宝睿、贾佳等同学们的陪伴和帮助。

最后, 感谢我的父母一直以来对我的关心, 不管我做什么决定都会无条件地支持我, 在我实验没有进展心情最低落的时候会一直鼓励我为我加油。千言万语难以表达我心中的感激, 在今后的日子里我一定会以实际行动来报答你们对我的恩情。