

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学

## 博士学位论文

生物炼制合成生物基聚合物及前体  
的谷氨酸棒状杆菌合成生物学研究

金慈

指导教师姓名: 鲍杰 华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2021.07.15 论文答辩日期: 2021.12.11

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: 周志华 研究员

评阅人: 杨晟 研究员

孙际宾 研究员

刘立明 教授

## 学位论文使用授权声明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华东理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。保密论文在解密后遵守此规定。

论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日至\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日）

学位论文作者签名：

指导老师签名：

日期： 年 月 日

日期： 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

## 生物炼制合成生物基聚合物及前体的谷氨酸棒状杆菌合成生物学研究

## 摘要

新型的生物基聚合物有望替代传统的石油基聚合物解决环境污染和温室气体过量排放的问题，但是使用淀粉和糖等可食用原料生产生物基聚合物不仅提高了生产成本，还会造成粮食短缺等问题。来源广泛、供应量巨大且不可食用的木质纤维素可再生资源是生物基聚合物生产原料的最佳选择。本论文旨在利用木质纤维素作为原料，生产生物基聚合物及前体，具体包括聚 3-羟基丁酸酯（Poly 3-hydroxybutyrate, PHB）以及生物基聚合物的合成前体谷氨酸和赖氨酸。但是利用木质纤维素生产生物基聚合物及前体也存在一些技术难题，包括：（1）木质纤维素预处理过程中会产生大量的抑制物，这些抑制物会阻碍菌体的生长与发酵；（2）木质纤维素中的半纤维素组分在预处理阶段发生降解，产生大量木糖和其他可发酵单糖，但是这些多糖组分难以保存和利用；（3）木质纤维素中存在的一些非抑制物组分会对特定产物的生产造成干扰，如生物素会降低细胞膜的通透性，从而抑制产物的分泌生产；（4）复杂的木质纤维素环境需要对发酵菌株进行全局调控，例如多糖环境引起的葡萄糖代谢阻遏效应，抑制物环境影响细胞生长。针对这些技术问题，本论文以对抑制物具有较强耐受性的谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）作为出发菌株，通过干法生物炼制技术结合合成生物学的方法，对上述问题逐个加以解决，最终使 *C. glutamicum* 可以利用木质纤维素水解液生产高指标的 PHB，谷氨酸和赖氨酸。

本论文第一部分以谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* S9114 作为出发菌株，针对出发菌株不能利用木质纤维素中的木糖以及木质纤维素中存在大量生物素抑制谷氨酸分泌生产的两个关键问题，对出发菌株进行了以下改造：（1）通过优化木糖利用基因表达，并将表达框整合至基因组上获得了一株可以稳定利用木糖的重组菌株 *C. glutamicum* GJ01；（2）对重组菌株的谷氨酸分泌蛋白编码基因 *MscCG* 的羧基端 330 个碱基进行了敲除，使改造菌株可以在高生物素环境中分泌生产谷氨酸；（3）对  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的亚基 *OdhA* 的表达进行弱化，使代谢流更多地导向谷氨酸的合成，使谷氨酸的得率从 16.7% 提高至 59.1%；（4）在基因组上整合戊糖转运蛋白的编码基因 *araE*，进一步提高菌株的木糖利用速率。最终得到的改造菌株 *C. glutamicum* GJ04 可以利用木质纤维素水解液中的葡萄糖和木糖生产 61.7 g/L 的谷氨酸，产率达到 1.29 g/L/h，是目前木质纤维素批发酵生产谷氨酸的最高指标。

本论文第二部分以赖氨酸生产菌株 *C. glutamicum* B253 作为出发菌株，首先将木糖利用表达框整合至基因组上获得了一株可以稳定利用木糖生产赖氨酸的菌株 *C. glutamicum* LJ01。其次从增加前体供应，减少副产物形成，增强辅酶再生和增加赖氨酸合成路径关键酶的表达量等方面尝试提高赖氨酸的合成，结果发现引入木糖利用途径会使胞内 NADPH 的含量降低 46.6%，而过表达转氢酶编码基因 *pntAB* 可以使胞内 NADPH

的含量增加 61.3%，从而使赖氨酸的产量提高 63.6%。最后得到的改造菌株 *C. glutamicum* LJ01-Peftu-PntAB 可以利用木质纤维素水解液中的葡萄糖和木糖生产 31.3 g/L 的赖氨酸，与出发菌株相比，赖氨酸产量提高了 25.7%。

本论文第三部分以第一部分得到的木糖利用菌株 *C. glutamicum* GJ01 作为出发菌株，首先将 PHB 合成路径的相关外源基因 *phaA*, *phaB* 和 *phaC* 分步整合至出发菌株基因组上，并敲除了副产物乳酸、乙酸和谷氨酸的合成和分泌路径，从而获得了一株可以稳定生产 PHB 的菌株 *C. glutamicum* JH01；接着从代谢工程角度尝试从多个方面提高 PHB 的产量，发现 PHB 主要合成路径关键酶的活性当量不足是 *C. glutamicum* 生产 PHB 的限速步骤，过表达 *phaA*, *phaB* 或 *phaC* 基因可以使 PHB 产量提高接近 70%-90%；而通过将 PHA 合酶固定在细胞膜上，增加 PHA 合酶的稳定性可以使 PHB 产量进一步提高 2-3 倍；通过形态工程改造，发现过表达 *pknA*, *pknB*, *DivIVA*, *RodA* 和 *WhcD* 这些与细胞形态相关的基因可以促进细胞的生长，从而使 PHB 产量提高 100%-180%。对发酵条件进行优化，发现氮源的过量补加对于谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 尤为重要。最终得到的改造菌株 JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 可以利用木质纤维素水解液中的葡萄糖和木糖生产 16.2 g/L 的 PHB，PHB 含量为细胞干重的 39.0 % (w/w)，实现了木质纤维素 PHB 的高指标生产。

本论文的第四部分以糖酸生产菌株 *Gluconobacter oxydans* DSM2003 作为出发菌株，针对其在木质纤维素水解液中利用非葡萄糖碳源速率较慢的问题，将 *G. oxydans* 在不同抑制物含量的木质纤维素水解液中进行 420 天的交替适应性进化，使其全糖利用速率大幅提高，使发酵总时间从 72 小时缩短至 36 小时。在转录水平上对进化菌株的相关基因进行分析，发现进化菌株葡萄糖脱氢酶的转录水平显著上调，说明葡萄糖脱氢酶的超量表达是进化菌株全糖利用速率加快的重要因素。此研究为提高发酵菌株对于木质纤维素中全糖的利用速率提供了一种可行的方案。

综上所述，本研究针对木质纤维素体系生产生物基聚合物及前体存在的技术障碍，通过合成生物学的方法，构建木糖利用途径，引入外源产物合成路径，打通产物分泌通道，重构胞内能量平衡和氧化还原平衡，同时结合干法生物炼制技术，解决了木质纤维素生产生物基聚合物及前体存在的关键问题，实现了纤维素 PHB、谷氨酸和赖氨酸的高指标生产，为生物基聚合物的工业化生产奠定了基础。

**关键词：**木质纤维素；聚 3-羟基丁酸酯；谷氨酸；赖氨酸；合成生物学。

## Synthetic Biology Research of *Corynebacterium glutamicum* on Biorefinery Synthesis of Biopolymer and Precursors

### Abstract

The biopolymers have the potential to work as an alternative of petroleum-based plastics, therefore contributes to solving the environmental pollution and greenhouse effect, but the utilization of food crop starch used for biopolymers production increases the production cost and leads to food shortage. The lignocellulose biomass is an ideal feedstock for commercialization of biopolymers owing to its abundance and availability. This thesis aims to produce biopolymer (Poly 3-hydroxybutyrate, PHB) and precursors (glutamic acid and lysine) from lignocellulose. However, some technical bottlenecks remain to be solved such as: (i) the inhibitors generated in the lignocellulose pretreatment process suppressing the growth and fermentation of microorganisms; (ii) the xylose and other fermentable sugars produced in the pretreatment difficult to preserve and utilize; (iii) the non-inhibitory compounds in lignocellulose adverse to production processes; (iv) the strains to be optimized globally to accommodate for the complex lignocellulose environment. To address these obstacles, the *Corynebacterium glutamicum* which shows strong tolerance to the inhibitors used as the starting strain and further engineered with a synthetic biology approach to make use of the dry biorefinery hydrolysate of lignocellulose biomass as carbon source. In the end, the high concentration of PHB, glutamic acid, and lysine were produced from lignocellulose by recombinant *C. glutamicum*.

In the first part, the glutamic acid-producing strain *C. glutamicum* S9114 was used as the starting strain, and the stepwise metabolic engineering was conducted: (i) the stable xylose-utilizing strain *C. glutamicum* GJ01 was obtained by promoter engineering and genome integration; (ii) the glutamic acid transport protein MscCG was modified to activate the glutamic acid secretion channel upon high concentration of lignocellulose-originated biotin; (iii) the  $\alpha$ -oxoglutarate dehydrogenase activity was decreased to redirect the  $\alpha$ -oxoglutarate flux to glutamic acid synthesis; (iv) the pentose transporter was overexpressed to enhance xylose uptake rate. The final strain *C. glutamicum* GJ04 produced 61.7 g/L of glutamic acid at 1.29 g/L/h from the wheat straw hydrolysate with no need of induction.

In the second part, the lysine-producing strain *C. glutamicum* B253 was used as starting strain, and the xylose-utilizing strain *C. glutamicum* LJ01 was obtained by promoter engineering and genome integration. Moreover, systematic metabolic engineering was conducted to increase lysine production, including amplifying lysine biosynthetic flux, increasing precursor supply, increasing NADPH regeneration, and enhancing xylose utilization rate. The concentration of NADPH decreased by 46.6% when the *C. glutamicum* LJ01 was cultured in the xylose medium compared to the glucose medium, and the NADPH content increased by 61.3% when the *PntAB* gene was overexpressed. The final strain *C. glutamicum* LJ01-*Peftu-PntAB* produced 31.3 g/L of lysine, which was approximately 25% greater than that

of the control strain.

In the third part, the xylose-utilizing strain *C. glutamicum* GJ01 obtained in the first part was used as the starting strain and the PHB synthesis pathway was constructed and optimized: (i) the stable PHB-producing strain was obtained by successively integrating the PHB synthetic genes (*phaA*, *phaB*, and *phaC*) into the genome of *C. glutamicum* GJ01; (ii) the cell growth and division of *C. glutamicum* were adjusted to change cell morphology and increase cell volume; (iii) the stability of PHA synthase was increased by fixing the PHA synthase in the cell membrane; (iv) The C/N ratio of PHB fermentation was optimized to further increase PHB production. The final obtained strain produced 15.1 g/L of PHB with 32.0% g PHB/g DCW from the synthetic medium, which is the highest PHB production by *C. glutamicum*. Moreover, the 16.2 g/L of PHB with 39.0% g PHB/g DCW was obtained from the wheat straw hydrolysate, which is the highest PHB production from the practical lignocellulose.

In the fourth part, the *Gluconobacter oxydans* DSM2003 with lignocellulose full spectrum of sugars utilization capacity was used as the starting strain, which was alternately transferred in inhibitors containing hydrolysate and inhibitors free hydrolysate for 420 days to intensify sugars simultaneous utilization. The conversion rate of all non-glucose sugars was significantly improved by several folds and the total fermentation time was reduced to 36 h from 72 h. The significant up-regulation of *mGDH* gene in the adapted *G. oxydans* strain (more than 40-fold greater than the parental) was considered as the decisive factor for the improvement of strain performance. This evolution adaptation strategy also could be used to accelerate robust sugar utilization for other fermented strains in lignocellulose biorefinery.

In conclusion, the dry biorefinery process combined with synthetic biology were applied to overcome the technical bottlenecks of biopolymer and monomers production from lignocellulose. High concentration of PHB, glutamic acid, and lysine was achieved from lignocellulose which represents a big step toward industrial biopolymer production.

**Key words:** lignocellulose; poly 3-hydroxybutyrate; glutamic acid; lysine; synthetic biology

## 目录

第 1 章 前言 .....	1
1.1 生物基聚合物 .....	1
1.1.1 生物基聚合物概述 .....	1
1.1.2 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) .....	2
1.1.3 谷氨酸作为前体合成生物基聚合物 .....	2
1.1.4 赖氨酸作为前体合成生物基聚合物 .....	3
1.1.5 生物基聚合物的发展瓶颈 .....	4
1.2 木质纤维素生物炼制 .....	5
1.2.1 木质纤维素资源 .....	5
1.2.2 预处理 .....	6
1.2.3 抑制物与脱毒 .....	7
1.2.4 酶解与发酵 .....	9
1.2.5 产物分离与提纯 .....	9
1.3 生物基聚合物及前体的生物合成 .....	10
1.3.1 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的生物合成 .....	10
1.3.2 谷氨酸的生物合成 .....	11
1.3.3 赖氨酸的生物合成 .....	13
1.4 木质纤维素生产生物基聚合物及前体的挑战 .....	15
1.4.1 抑制物阻碍发酵菌株的生长与生产 .....	15
1.4.2 木质纤维素中多糖成分的保存与利用 .....	15
1.4.3 木质纤维素中的非抑制物组分对发酵的影响 .....	16
1.4.4 复杂的木质纤维素环境需要对发酵菌株进行全局调控 .....	16
1.5 本文的立题依据和主要研究内容 .....	16
第 2 章 改造谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素生产聚合前体谷氨酸 .....	19
2.1 引言 .....	19
2.2 材料与方法 .....	20
2.2.1 菌株, 培养基和培养环境 .....	20
2.2.2 酶和试剂 .....	21
2.2.3 质粒构建 .....	26
2.2.4 重组菌株构建 .....	27
2.2.5 木质纤维素原料 .....	28
2.2.6 生物炼制过程 .....	28

2.2.7 谷氨酸发酵.....	28
2.2.8 适应性进化.....	29
2.2.9 分析方法.....	29
2.2.10 谷氨酸得率计算.....	29
2.3 结果与讨论.....	30
2.3.1 谷氨酸棒状杆菌 S9114 木糖代谢能力考查.....	30
2.3.2 谷氨酸棒状杆菌 S9114 的木糖代谢路径构建.....	31
2.3.3 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌促进谷氨酸分泌生产.....	34
2.3.4 提高重组谷氨酸棒状杆菌的木糖利用速率.....	37
2.3.5 重组谷氨酸棒状杆菌利用富含生物素的混糖合成培养基生产谷氨酸.....	40
2.3.6 重组谷氨酸棒状杆菌利用麦秆水解液生产谷氨酸.....	41
2.4 本章小结.....	43
第 3 章 改造谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素生产聚合前体赖氨酸.....	44
3.1 引言.....	44
3.2 材料与方法.....	45
3.2.1 菌株, 培养基和培养环境.....	45
3.2.2 酶和试剂.....	45
3.2.3 质粒构建.....	50
3.2.4 重组菌株构建.....	51
3.2.5 木质纤维素原料.....	51
3.2.6 生物炼制过程.....	51
3.2.7 赖氨酸发酵.....	51
3.2.8 适应性进化.....	51
3.2.9 分析方法.....	51
3.2.10 赖氨酸得率计算.....	51
3.3 结果与讨论.....	52
3.3.1 谷氨酸棒状杆菌 B253 的木糖代谢路径构建.....	52
3.3.2 代谢工程改造提高木糖到赖氨酸的转化率.....	54
3.3.3 利用小麦秸秆水解液生产赖氨酸.....	59
3.4 本章小结.....	61
第 4 章 改造谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素生产聚 3-羟基丁酸酯.....	62
4.1 引言.....	62
4.2 材料与方法.....	63
4.2.1 菌株, 培养基和培养环境.....	63
4.2.2 酶和试剂.....	64
4.2.3 质粒构建.....	75

4.2.4	重组菌株构建	77
4.2.5	生物炼制过程	77
4.2.6	PHB 发酵	78
4.2.7	分析方法	78
4.2.8	PHB 定量测定方法	78
4.2.9	电镜检测与细胞样品制备方法	78
4.2.10	胞内 PHB 提取与 GC-MS 鉴定	79
4.2.11	PHB 含量和得率计算	79
4.2.12	菌体收集, RNA 提取与 qRT-PCR	79
4.3	结果与讨论	80
4.3.1	通过分步整合构建稳定生产 PHB 的谷氨酸棒状杆菌 JH01	80
4.3.2	通过透射电镜和 GC-MS 确认胞内 PHB 的生产	82
4.3.3	代谢工程改造提高重组菌株 JH01 的 PHB 产量	83
4.3.4	增加 PHA 合酶的活力	87
4.3.5	改造谷氨酸棒状杆菌细胞形态促进 PHB 生产	90
4.3.6	探究氮源对于 PHB 生产的影响	92
4.3.7	合成培养基发酵生产 PHB	96
4.3.8	麦秆水解液发酵生产 PHB	97
4.4	本章小结	100
第 5 章	应用适应性进化方法提高氧化葡萄糖酸杆菌对木质纤维素中全糖的利用速率	101
5.1	引言	101
5.2	材料与方法	102
5.2.1	木质纤维素原料	102
5.2.2	酶和化学试剂	102
5.2.3	菌株和培养基	102
5.2.4	生物炼制过程	102
5.2.5	适应性进化	102
5.2.6	好氧发酵	102
5.2.7	分析方法	103
5.2.8	菌体收集, RNA 提取与 qRT-PCR	103
5.2.9	基因组 DNA 提取, 基因扩增与基因测序	104
5.3	结果与讨论	104
5.3.1	氧化葡萄糖酸杆菌 DSM 2003 单糖与混糖代谢能力考查	104
5.3.2	氧化葡萄糖酸杆菌 DSM 2003 长期适应性进化	106
5.3.3	氧化葡萄糖酸杆菌 RM 7 的发酵性能评估	108

---

5.3.4 氧化葡萄糖酸杆菌 RM 7 的基因和转录水平检测.....	110
5.4 本章小结.....	112
第 6 章 结论与展望.....	113
6.1 结论.....	113
6.2 创新点.....	114
6.3 展望.....	114
参考文献.....	116
附录 I.....	137
学术成果.....	140
致谢.....	142

## 第 1 章 前言

### 1.1 生物基聚合物

#### 1.1.1 生物基聚合物概述

石油基聚合物具有用途广泛和价格低廉等特点，是包装、纺织、农业和建筑领域的重要材料。但是石油基聚合物的滥用也造成了严重的环境问题，包括：（1）石油炼制生产过程以及聚合物焚烧处理过程向环境中排放了大量的温室气体，导致全球变暖和海平面上升；（2）常用的一次性石油基聚合物（聚乙烯，聚氯乙烯，聚丙烯，对苯二甲酸乙二醇酯和聚苯乙烯）难以在自然环境中被生物降解，造成“白色污染”<sup>[1,2]</sup>。另一方面，石油资源的日渐枯竭也迫使人们去寻找石油基聚合物的替代品。

为了应对这一危机，人们开始利用自然环境中的可再生资源，通过生物法，物理法或化学法来合成一些生物基聚合物，这些新型聚合物与传统聚合物相比，具有碳排放少和污染小等特点，部分生物基聚合物还具备可完全生物降解的性质<sup>[3]</sup>。尽管目前生物基聚合物在价格方面与传统聚合物相比不占优势，但是各国为了环境保护和可持续发展战略都在大力推进生物基聚合物的使用。美国农业部主导的“生物优先计划”，将植物和其他可再生农业材料制成的生物产品列为优先采购对象，很多新的联邦生产计划项目中，例如粘合剂、胶带、绝缘泡沫、复合板和薄膜都需优先使用生物基聚合物。联合国制定的可持续发展目标和欧洲循环经济政策都提出了要重点发展生物基聚合物。中国在第十四个五年规划中，将改善环境质量，加快发展方式绿色转型作为主要目标之一，并且在 2020 年发布了《关于进一步加强塑料污染治理的意见》，对不可降解的石油基聚合物的使用进行了严格限制。中国在第 75 届联合国大会上提出，要力争在 2030 年前达到碳达峰，在 2060 年前实现碳中和，并且在 2021 年国务院报告中强调要扎实做好碳达峰和碳中和的各项工作。因此普及生物基聚合物的使用，降低石化资源的消耗，减少温室气体的排放对中国来说势在必行。

生物基聚合物根据生产方式的不同可以分为三类：一是不需加工或仅需少量加工就可以使用的天然聚合物，主要包括淀粉、纤维素、木质素和甲壳素等，这些天然聚合物的最大缺陷是物理化学强度不足，需要经过物理或化学法进行改性后才能作为材料使用；二是由微生物通过发酵直接合成的高分子聚合物，主要包括聚酯（聚羟基脂肪酸酯、聚乳酸和聚苹果酸）和聚酰胺（聚氨基酸和蛋白质），其中由微生物直接合成的聚酰胺分子量较低，一般是水溶性的低聚物，而由微生物直接合成聚乳酸和聚苹果酸的研究也还不成熟，唯有聚羟基脂肪酸酯是由微生物全合成，且具备产业化生产基础的高分子聚合物；三是由微生物发酵生产得到的前体通过化学法或生物法合成的聚合物，包括脂肪族聚酯（聚羟基酸和聚二羧酸亚烷基二酯），脂肪族-芳香族聚酯（聚对苯二甲酸乙二醇酯和对苯二甲酸丁二醇酯）和聚酰胺，而谷氨酸和赖氨酸都可以通过脱羧基或脱氨基反应生成相应的二元胺、二元酸或内酰胺，是合成生物基聚酯和聚酰胺的重要材料前体，且谷氨

酸和赖氨酸的年产量巨大，具备工业化应用潜力。因此本研究主要聚焦于聚 3-羟基丁酸酯（Poly 3-hydroxybutyrate, PHB）的合成，以及谷氨酸和赖氨酸的生产。

### 1.1.2 聚 3-羟基丁酸酯（PHB）

聚 3-羟基丁酸酯简称 PHB，是聚羟基脂肪酸酯（Polyhydroxyalkanoates, PHA）家族中最早被人们发现并分离得到的一类 PHA。PHB 是由 R-3-羟基丁酰辅酶 A（R-3-Hydroxybutyryl-CoA）共聚得到的线性高分子聚酯，结构如图 1.1 所示，它在材料学方面的性质与聚丙烯相似，具有较高的熔点和拉伸强度。

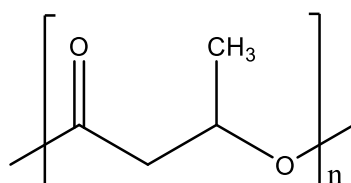


图 1.1 PHB 的结构式

Fig. 1.1 Structural formula of PHB

PHB 通常是微生物在氮源限制的条件下合成的一种生物聚酯<sup>[4]</sup>。PHB 材料具有热加工性，无毒性，生物可降解性和生物相容性等特点<sup>[5-8]</sup>，因此 PHB 已经被制成薄膜，泡沫和粉剂等形式的产品<sup>[5,6,9]</sup>，还被用作医用植入材料<sup>[10,11]</sup>，药物载体，控释材料<sup>[12]</sup>，组织修复支架<sup>[13]</sup>和生物燃料<sup>[14-16]</sup>。

### 1.1.3 谷氨酸作为前体合成生物基聚合物

L-谷氨酸，又称 L- $\alpha$ -氨基戊二酸，分子结构如图 1.2 所示，本文所提及的谷氨酸如不做特殊说明均指 L-谷氨酸。谷氨酸分子内含有 2 个羧基和 1 个氨基，这种结构特性使其可以进行分子间聚合生成聚  $\alpha$ -谷氨酸和聚  $\gamma$ -谷氨酸，两种聚谷氨酸都具有水溶性，可食用性，生物相容性和生物可降解性，在食品医疗领域有巨大的应用潜力<sup>[17-23]</sup>。谷氨酸还可以在谷氨酸脱羧酶的作用下生成  $\gamma$ -氨基丁酸，进一步通过环化反应生成丁内酰胺，丁内酰胺在催化剂的作用下通过阴离子开环聚合法（Ring Opening Polymerization, ROP）生成生物基聚酰胺 4（Polyamide 4, PA4）（如图 1.2 所示）。PA4 具有生物可降解性，以及良好的氧气阻隔性，热稳定性和吸湿性，可以作为环保型工程材料进行使用。谷氨酸还可以经过重氮化反应和加氢作用脱去氨基生成戊二酸（Glutaric acid）<sup>[24]</sup>，戊二酸是聚合物生产的重要平台化合物，它既可以与二元醇反应生成聚戊二酸亚烷基二酯，如与丙二醇聚合生成聚戊二酸丙二醇酯（Poly propylene glutarate）<sup>[25]</sup>，也可以与二元胺反应生成聚酰胺，如与己二胺反应生成聚酰胺 65（Polyamide 65, PA65）<sup>[26]</sup>（如图 1.2 所示）。另一方面，目前谷氨酸的年产量已经超过 300 万吨<sup>[27]</sup>，将产能过剩的谷氨酸用于聚合物生产，既拓展了谷氨酸产业链，也稳定了谷氨酸市场价格。

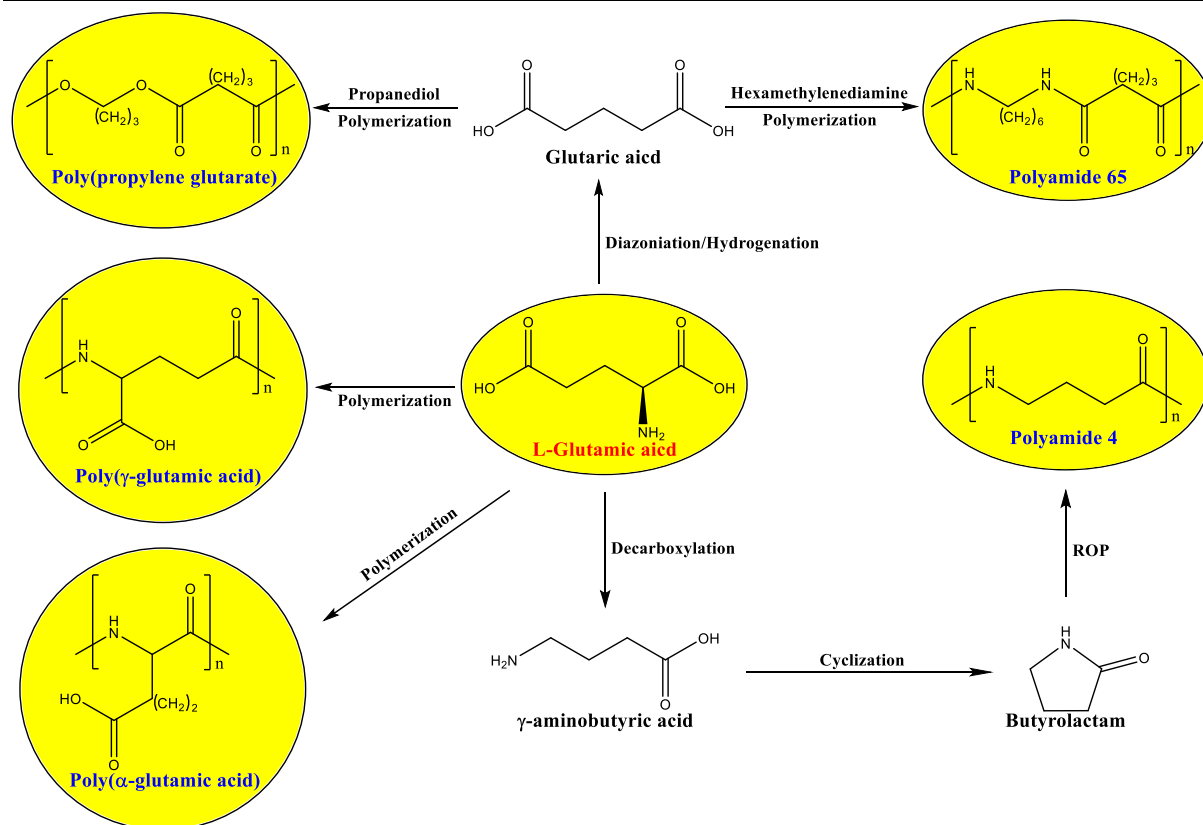


图 1.2 L-谷氨酸合成生物基聚合物

Fig. 1.2 Synthesis of biobased polymers from L-glutamic acid

#### 1.1.4 赖氨酸作为前体合成生物基聚合物

L-赖氨酸，又称 L-2,6-二氨基己酸，结构式如图 1.3 所示，本文所提及的赖氨酸如不做特殊说明均指 L-赖氨酸。赖氨酸分子内含有 2 个氨基和 1 个羧基，因此可以通过分子间聚合形成聚  $\alpha$ -赖氨酸和聚  $\epsilon$ -赖氨酸，两种聚赖氨酸都具有水溶性、热稳定性和抑菌性，是天然的食物防腐剂。赖氨酸还可以在赖氨酸脱羧酶的作用下生成戊二胺（Pentamethylene diamine）<sup>[28]</sup>，戊二胺可以与二元酸聚合生成聚酰胺，如戊二胺和己二酸在催化剂作用下缩合形成生物基聚酰胺 56（Polyamide 56, PA56）（如图 1.3 所示）。PA56 与 PA6 和 PA66 相比，具备更好的热阻隔性，透气性，吸水性和高弹性，被认为是最有前途的化纤材料之一<sup>[29]</sup>。赖氨酸还可以经过生物催化合成 6-氨基己酸，6-氨基己酸进一步通过环化反应生成  $\epsilon$ -己内酰胺，后者通过开环聚合反应生成聚酰胺 6（Polyamide 6, PA6）（如图 1.3 所示）。赖氨酸也可以经过氧化和脱羧反应生成 5-氨基戊酸，5-氨基戊酸进一步通过环化反应生成  $\delta$ -戊内酰胺，后者通过开环聚合反应生成聚酰胺 5（Polyamide 5, PA5）<sup>[30]</sup>（如图 1.3 所示）。此外， $\epsilon$ -己内酰胺和  $\delta$ -戊内酰胺还可以在叔丁醇钾的催化下开环聚合生成聚酰胺 65（Polyamide 65, PA65）<sup>[31]</sup>。另一方面，赖氨酸的年产量高达 200 万吨，过剩的赖氨酸产能为其作为生物基聚合物的原料前体奠定了基础<sup>[32]</sup>。

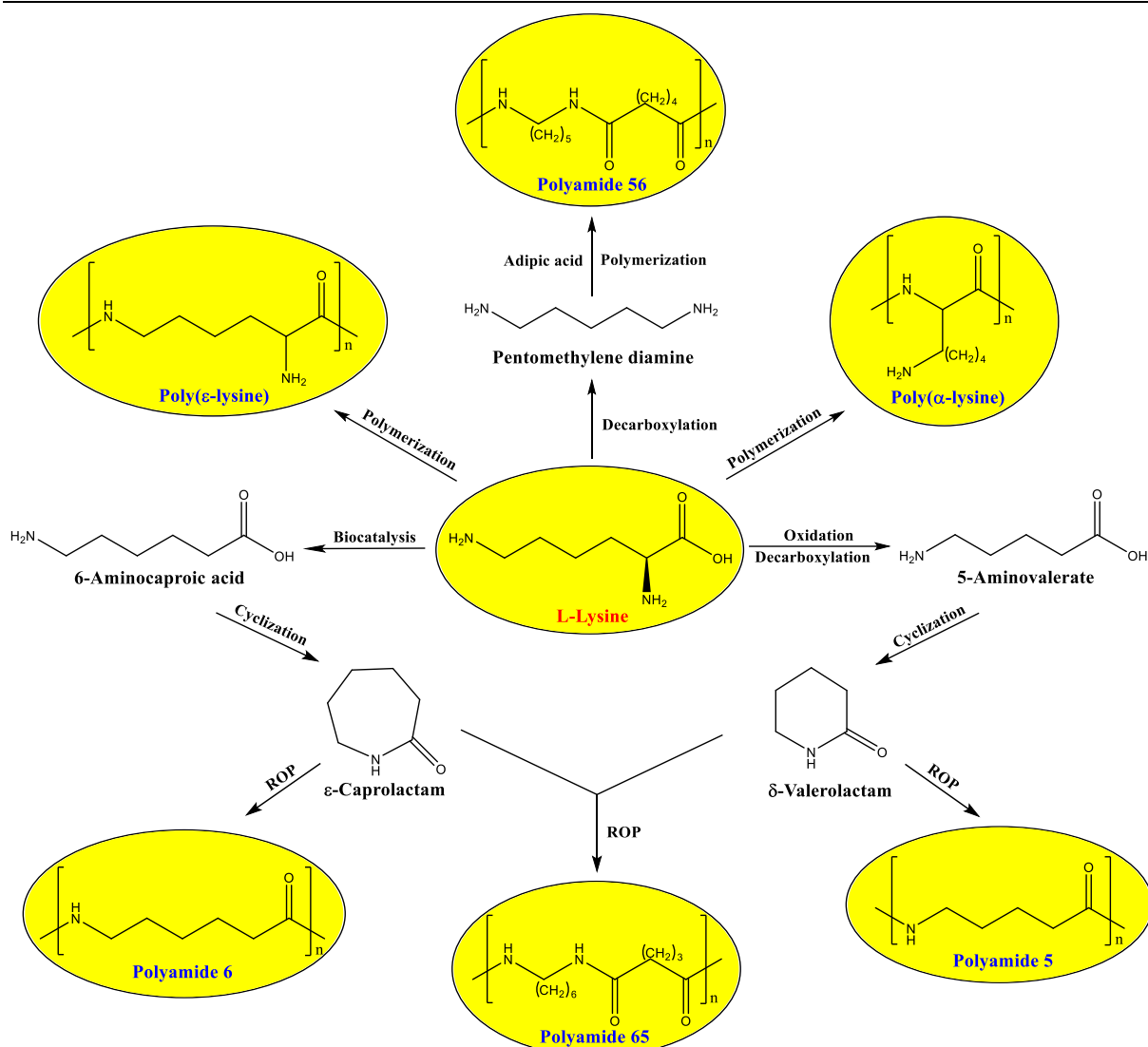


图 1.3 L-赖氨酸合成生物基聚合物

Fig. 1.3 Synthesis of biobased polymers from L-lysine

### 1.1.5 生物基聚合物的发展瓶颈

虽然生物基聚合物具有更广阔的发展前景,可以满足更全面的市场需求,但是目前,生物基聚合物的年产量只占到总聚合物年产量的 1%<sup>[33]</sup>。限制生物基聚合物发展的最主要因素还是高昂的生产成本,石油基聚合物如聚丙烯和聚乙烯的价格大约为 0.6-0.9 美元一磅,而一般生物基聚合物的价格大约为 2.25-2.75 美元一磅<sup>[34]</sup>,其中底物成本大约占了生产总成本的 30-40%<sup>[35]</sup>。目前,生物基聚合物及前体的生产多还是利用第一代糖基原料,例如粮食作物,乳清,糖蜜,甘蔗和玉米糖等<sup>[36]</sup>。这些原料可以水解为相应的单糖,用于生物基聚合物及前体的生产<sup>[37]</sup>。但是,这些原料的生长,收集,运输和加工需要占用大量的土地,消耗大量的水和能量。而且,将这些可食用的原料用于聚合物工业会减少食物供应,提高食品价格。因此使用可食用原料大规模生产生物基聚合物不仅会抬高生产成本,还会造成粮食短缺等问题<sup>[36]</sup>。

为了降低生物基聚合物及前体生产的原料成本,同时避免与食物和农业资源相竞争,本研究计划利用木质纤维素生物质生产生物基聚合物及前体。木质纤维素生物质(包括

玉米秸秆, 能源作物, 稻秆, 木屑等) 是广泛存在的可再生生物资源, 并且供应量巨大又稳定, 每年全球大约可以生产 1500 亿吨木质纤维素生物质<sup>[38]</sup>。木质纤维素的主要成分是植物细胞壁, 是植物通过光合作用利用环境中的二氧化碳和水合成的, 因此木质纤维素是一种非竞争性的可再生有机碳源, 并且生产速度快, 成本低。同时木质纤维素也属于不可食用的植物组分, 利用木质纤维素不会对食物供应造成影响。因此, 与很多生物质资源相比, 木质纤维素具有绝对的优势, 可以为生物基聚合物及前体的工业化生产提供稳定持久、清洁无污染的生产原料, 促进农业经济发展, 帮助人类社会向生物型经济转型。

## 1.2 木质纤维素生物炼制

### 1.2.1 木质纤维素资源

木质纤维素生物质主要来源于农业废弃物, 林业废弃物, 能源作物和城市固体废弃物, 是来源最广泛, 供应量最大的可再生生物资源。木质纤维素也被认为是有望取代化石资源生产燃料和平台化学品的重要生物资源。

常规的木质纤维素生物质的组成包括 40-50%的纤维素, 25-30%的半纤维素, 15-20%的木质素和少量的其他物质<sup>[39]</sup>。木质纤维素中的纤维素和半纤维素、木质素相互交联在一起构成一个结构复杂的生物聚合物。纤维素是一种以 D-吡喃型葡萄糖基为单体, 通过  $\beta$ -(1,4)-糖苷键连接而成的线性间同立构聚合物。纤维素保持了一定的结晶度, 它形成的刚性骨架起到了支撑细胞壁的作用<sup>[40]</sup>。半纤维素是一种由多种单体, 包括 D-吡喃型木糖, L-吡喃型阿拉伯糖, D-吡喃型甘露糖, D-吡喃型葡萄糖和 D-吡喃型半乳糖, 共同组成的杂聚物, 没有晶体结构, 因此比纤维素更易水解<sup>[41]</sup>。木质素主要由三种酚类物质聚合而成, 分别是香豆醇, 松柏醇和芥子醇。在不同类型的木质纤维素中, 组成木质素的这三种酚类物质的比例也有所不同。一个典型的木质纤维素生物质结构组成如图 1.4 所示。

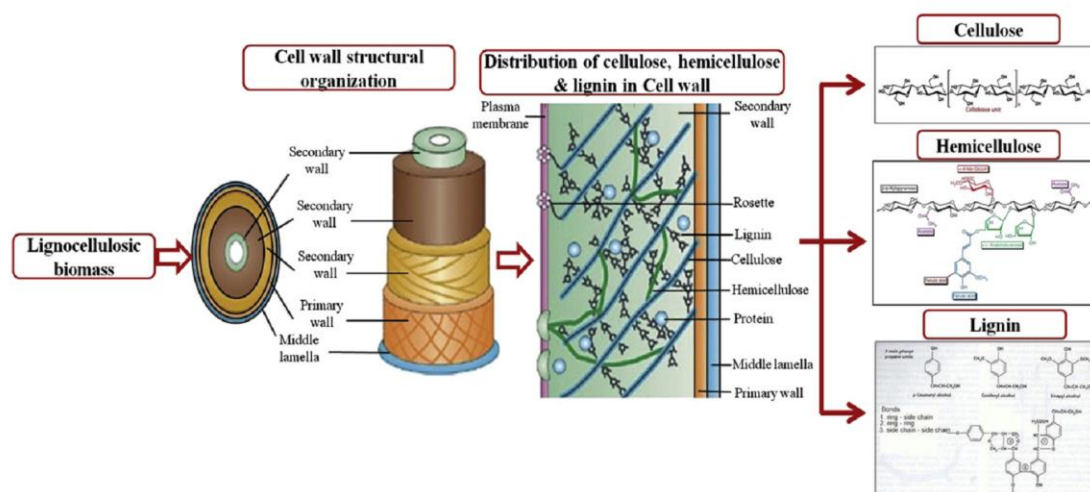


图 1.4 木质纤维素结构示意图<sup>[42]</sup>

Fig. 1.4 Diagrammatic illustration of the lignocellulosic framework<sup>[42]</sup>

一个典型的木质纤维素生物质结构组成如图 1.4 所示。从图中可以看出，植物细胞壁通常分为初生壁和次生壁，而大部分的纤维素都分布在次生壁中，同时纤维素被半纤维素和木质素紧紧地包裹，导致纤维素酶这样的大分子蛋白难以透过这个复杂的结构接触到纤维素成分<sup>[43,44]</sup>。因此需要通过预处理方法破坏木质纤维素的复杂结构，降低纤维素的结晶度，部分水解半纤维素，增加孔隙率使得纤维素酶可以更高效地水解木质纤维素<sup>[45,46]</sup>。

### 1.2.2 预处理

在木质纤维素生物炼制过程中，使用预处理方法来破坏植物细胞壁中紧密相连的结构是必不可少的一环<sup>[47]</sup>。预处理技术可以消除天然的木质纤维素生物质在降解方面的物理和化学障碍，使得纤维素组分可以被酶解，是木质纤维素生化加工的关键步骤。半纤维素和木质素覆盖在纤维素的表面使其难以被酶解，预处理可以促进半纤维素和木质素降解，增加纤维素的可接触面积，促进纤维素酶解过程。预处理方法的选择应综合考虑原料，酶和发酵微生物的整体相容性。

在过去的数十年中，研究人员已经开发了很多低成本的预处理方法，包括生物法，物理法，化学法和多种策略相结合的方法<sup>[48-50]</sup>，但是没有一种预处理方法是完美的，每种方法都有其固有的优点和缺点。一个经济有效的预处理方法应包括以下几个特征：避免原料损失；保存半纤维素组分；限制由于产物的降解而导致的抑制物的形成；最小化能源输入；减少废水产生<sup>[51]</sup>。物理预处理通常采用研磨，照射（伽马射线，电子束和微波辐射等）和挤压的方法，优点是可以降低纤维素的结晶度，缺点是功耗过大，难以大规模应用。水热预处理是在高温高压下用液态或气态的水对木质纤维素进行处理的方法<sup>[52-55]</sup>，优点是不需要添加任何催化剂，抑制物产生较少<sup>[56]</sup>，缺点是处理时间过长，木质素移除较少且会产生大量废水<sup>[57,58]</sup>。碱预处理通常是用氢氧化钠或氢氧化钾等碱性溶液浸泡生物质的处理方法<sup>[59-61]</sup>，优点是木质素移除效果好，抑制物产生较少，缺点是处理时间较长，试剂成本较高，可发酵糖损失多。目前也有通过更换碱性溶液（氢氧化钙，氨水）和结合蒸汽爆破技术来优化碱预处理的研究，如氨循环浸泡（Ammonia recycle percolation, ARP）和氨纤维膨爆（Ammonia fiber explosion, AFEX）<sup>[52-67]</sup>。酸预处理一般是用稀硫酸（0.2%-2.5% w/w）在高温（130 °C-210 °C）条件下对生物质进行处理的方法，也是目前使用最广泛的预处理技术，已经被商业化地用于各种生物质的加工过程，包括柳枝稷<sup>[68,69]</sup>，玉米秸秆<sup>[70,71]</sup>，云杉<sup>[72]</sup>和白杨<sup>[73,74]</sup>。酸预处理可以有效的将绝大部分的半纤维素降解为相应的寡糖和单糖，促进后续的纤维素酶解过程，但是酸预处理也存在一定的缺陷，包括对设备的腐蚀性高，废水产生较多，半纤维素降解产生的单糖和寡糖溶于含有大量抑制物的水相而难以被利用，不同生物质预处理的酸用量难以确定和抑制物大量生成的问题。

针对酸预处理所存在的问题，实验室开发了干酸预处理技术<sup>[75]</sup>，在总体酸用量不变（~2.5% w/w）的前提下，将水用量降至常规水用量的 1/10-1/20，成功地实现了预处理过程的零废水产生，因此半纤维素降解产生的单糖和寡糖与纤维素一起完整地保存在固

相中,有利于提高整体的木质纤维素利用率。并且研究发现干酸预处理对设备的腐蚀程度降低,缓解了酸预处理设备维护费用高昂的问题<sup>[76]</sup>。实验室还研发了酸用量计算方法,可以在摇瓶规模的实验上确定不同生物质预处理需要的酸用量,大大降低了实际处理时的试错成本<sup>[77]</sup>。

### 1.2.3 抑制物与脱毒

虽然干酸预处理技术可以分开木质纤维素中的组分,暴露纤维素利于后续的酶解糖化过程,同时将产生的单体和寡糖完整地保存在固相中用于后续发酵,但是干酸预处理过程也会涉及到一些副反应,导致一些抑制物的生成(图 1.5),这些抑制物会和可利用成分一起保留在固相中,对生物炼制下游工艺(糖化,发酵)产生抑制作用。水循环预处理技术的使用和高固含量预处理技术的发展使得物料中抑制物的浓度进一步增加<sup>[78]</sup>,因此必须针对产生的抑制物进行脱除。

在典型的酸预处理过程中,半纤维素降解产生的部分戊糖和糠醛酸会进一步脱水形成 2-呋喃醛(简称为糠醛),产生的部分己糖脱水形成 5-羟甲基-2-呋喃醛(5-Hydroxymethylfurfural, HMF)。在长时间,高浓度酸和高温的条件下,HMF 会被进一步降解为乙酰丙酸和甲酸<sup>[79]</sup>,糠醛也会被进一步降解为甲酸<sup>[80]</sup>。乙酸并不是糖的降解产物,而是半纤维素中乙酰基团的水解产物。组成木质素的三种酚类化合物在酸预处理过程中,醚键和其他酸敏感键发生断裂,生成大量的酚醛化合物,如对羟基苯甲酸,对羟基苯甲醛,香草醛,二氢松柏醇,松柏醛,丁香醛,丁香酸,香豆酸和阿魏酸,这些化合物的数量和种类因生物质种类和预处理条件的不同而异<sup>[70,81-85]</sup>。一些含有酚类化合物的植物,经过预处理和水解后,焦棓酸和没食子酸等酚类物质仍然留存在水解液中<sup>[70,85,86]</sup>。除了酚类化合物,非酚类的芳香族化合物例如苯甲酸<sup>[83-85]</sup>,苯甲醇<sup>[85]</sup>,肉桂酸<sup>[86,87]</sup>,肉桂醛<sup>[87]</sup>,对甲基苯甲酸<sup>[85]</sup>和邻甲基苯甲酸<sup>[70]</sup>也存在于木质纤维素中,它们与上述的酚类化合物一起构成了木质纤维素水解液中的芳基成分。最近的研究还发现酚类化合物在预处理过程中还会形成邻苯醌和对苯醌<sup>[88]</sup>。除了呋喃醛和芳香醛,在预处理时还会产生一些脂肪醛。而除了生物质中的成分转化产生的抑制物,在酸预处理过程中,由于酸对设备的腐蚀会导致重金属离子的释放,例如铜,镍,铬和铁,这些金属离子也会对发酵菌株产生抑制作用<sup>[89]</sup>。

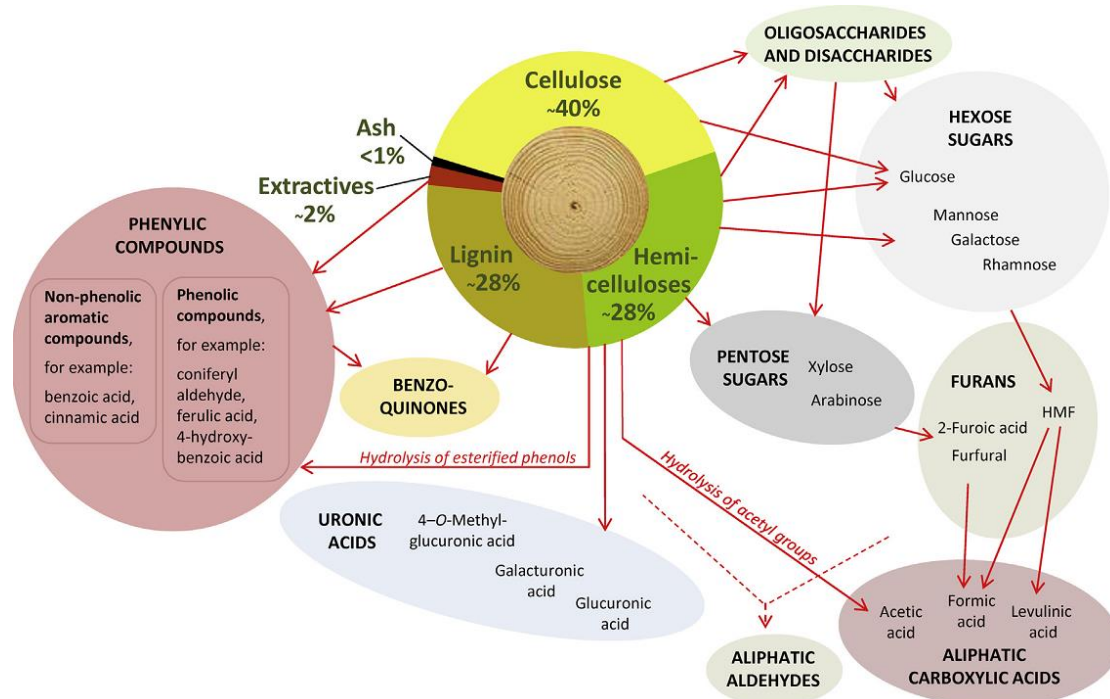


图 1.5 木质纤维素在酸预处理过程中产生的抑制物<sup>[90]</sup>

Fig. 1.5 Inhibitors generated from acid pretreatment process of lignocellulose <sup>[90]</sup>

纤维素和半纤维素中的糖降解产生的抑制物主要是多种脂肪族有机酸，包括甲酸，乙酰丙酸，糠醛和 HMF，它们对菌体的毒性较低，但是在水解液中的浓度较高。木质素来源的芳香族抑制物虽然在水解液中的浓度比脂肪族抑制物浓度低，但是它们对于发酵菌株的毒性要远高于脂肪族抑制物<sup>[82,91]</sup>。其他的含量较低的抑制物如醌类和脂肪醛等，对细胞也具有较强的毒性，近来受到了广泛的关注。这些抑制物不仅会抑制发酵过程中细胞的生长和生产性能，还会影响糖化过程中的纤维素酶活性<sup>[92]</sup>。

目前已知的克服抑制物问题的方法主要包括以下几种：一是筛选合适的原料，选择半纤维素，木质素含量较少的生物质作为预处理原料可以有效减少抑制物的生成，但是这极大限制了可供使用原料的范围<sup>[93-95]</sup>；二是使用化学试剂脱毒，例如添加过量的碱中和物料中的抑制物，但是这种方法一方面极大地提高了处理成本，另一方面大量化学溶剂的加入也会将物料中可溶性糖带走，造成可发酵糖的大量损失<sup>[96-98]</sup>；三是使用耐受抑制物的发酵菌株，通过适应性进化和代谢工程改造策略可以适当提高发酵菌株对于抑制物的耐受性，但是木质纤维素水解液中存在多种类型的抑制物，而这些方法通常只能提高菌株对于某一类抑制物的耐受性，导致菌体的生长和发酵仍然受到抑制<sup>[99-101]</sup>，而且增强发酵菌株的抑制物耐受性往往导致菌株自身的生产性能受到影响<sup>[102,103]</sup>。

为了在不损失可发酵糖的情况下对固体物料中的抑制物进行脱除，实验室开发了一种固态生物脱毒的方式，利用可以降解抑制物的菌株，在不添加任何水的情况下对物料中的抑制物进行脱除，它的优点包括：适用于任何原料的脱毒；可以对多种抑制物进行降解；在酶水解步骤之前脱除抑制物利于酶水解过程；可以对固体物料进行脱毒，无水添加，减少了废水的产生；优先利用抑制物，减少了可发酵糖的损失<sup>[207]</sup>。

#### 1.2.4 酶解与发酵

经过预处理的木质纤维素，绝大部分的纤维素还未降解，虽然提高预处理强度可以使部分纤维素降解为葡萄糖，但是也会使单糖更多地转化为抑制物。因此，一般用纤维素酶将纤维素转化为微生物可利用的单糖，从而避免抑制物的增加。基于纤维素的结构性质，至少有三种主要的纤维素酶参与到了纤维素水解过程中，包括内切葡聚糖酶，外切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶。内切葡聚糖酶主要作用于纤维素葡聚糖链的无定型区，在内部随机切割产生新的葡聚糖链末端，外切葡聚糖酶主要作用于这些产生的葡聚糖链末端，将葡聚糖链分解为葡萄糖或纤维二糖，最后再通过  $\beta$ -葡萄糖苷酶将纤维二糖分解为葡萄糖<sup>[104-106]</sup>。同时预处理后的木质纤维素中还有一些未降解的半纤维素，降解半纤维素的酶主要是内切木聚糖酶和内切甘露糖酶<sup>[107]</sup>。木聚糖是半纤维素中的一个复杂组分，它的完全水解需要一个多种酶的组合体系，包括  $\beta$ -木聚糖酶， $\beta$ -木糖苷酶， $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶和  $\alpha$ -葡糖醛酸酶等<sup>[107]</sup>。半纤维素中还含有甘露聚糖，它的完全水解也需要多种酶的配合，包括  $\beta$ -甘露聚糖酶， $\beta$ -甘露糖苷酶， $\beta$ -葡糖苷酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[108-110]</sup>。虽然纤维素酶可以在不产生抑制物的情况下，将木质纤维素转化为可发酵糖，但是也存在成本高昂，产物抑制以及与固体物料混合不均匀等缺陷。而实验室开发的螺带搅拌浆生物反应器可以将固体物料与纤维素酶进行充分地混合，不但降低了纤维素酶的使用量，还实现了高固含量糖化过程，为后续发酵过程提供了高浓度碳源<sup>[273]</sup>。

木质纤维素发酵方式主要包括分步糖化发酵和同步糖化发酵。分步糖化发酵指先将木质纤维素转化为可发酵糖，然后微生物再利用这些糖进行发酵生产。这种模式的优点是糖化和发酵过程都是在最适合的条件（温度、pH 和溶氧）下进行，有利于微生物生长和发酵；缺点是糖化过程会产生大量的单糖，而这些单糖会对纤维素酶产生强烈的产物抑制，导致纤维素酶解不完全，造成原料损失。同步糖化发酵指木质纤维素酶解和微生物发酵同时进行。这种模式的优点是纤维素酶解产生的单糖被微生物不断消耗，减少了对纤维素酶的抑制，增加了底物利用效率；缺点是糖化和发酵过程必须统一在同一个条件下进行，这种折中的环境条件对纤维素酶的活性以及微生物的生长发酵都会产生一定的负面影响。两种发酵方式各有优劣，因此具体使用何种发酵方式需根据实际情况而定。

#### 1.2.5 产物分离与提纯

产物分离与提纯是木质纤维素生物炼制的最终环节，不同类型的产物和不同的发酵方式对分离纯化操作的要求也有所不同。同步糖化发酵方式虽然提高了底物利用率，但是会向发酵环境中引入大量的木质纤维素残渣，对于可溶性的胞外产物（例如谷氨酸、赖氨酸和葡萄糖酸等），这些残渣和菌体可以通过离心和固液分离过程去除，不影响后续的产物提纯；但是对于不溶性的胞内产物（例如聚 3-羟基丁酸酯），含有目标产物的菌体和残渣一起留存在固相中难以分离，对后续产物分离过程造成了严重影响，因此对于不溶性的胞内产物一般采用分步糖化发酵的方式。

另一方面，发酵后的木质纤维素体系中除了目标产物，还含有未利用的残糖、金属离子、抑制物和色素等物质，严重影响了产物分离纯化过程。为了克服这些障碍，本研

究采用的固态生物脱毒技术可以对木质纤维素体系中的抑制物进行完全降解，并且通过代谢工程改造和适应性进化策略大幅提高了发酵菌株对于木质纤维素中全糖的利用效率，最大限度减少了抑制物和残糖对于分离纯化过程的影响。

### 1.3 生物基聚合物及前体的生物合成

#### 1.3.1 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的生物合成

在微生物中，PHB 的合成路径如图 1.6 所示。通过糖代谢产生的乙酰辅酶 A 是 PHB 合成最重要的前体物质，首先由 *phaA* 基因编码的  $\beta$ -酮硫解酶 ( $\beta$ -Ketothiolase) 也被称为乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 (Acetyl-CoA acetyltransferase) 催化两分子的乙酰辅酶 A 缩合形成一分子的乙酰乙酰辅酶 A；接着，*phaB* 基因编码的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (Acetoacetyl-CoA reductase) 将乙酰乙酰辅酶 A 还原为(R)-3-羟基丁酰辅酶 A；最后，*phaC* 基因编码的聚羟基脂肪酸酯合酶 (PHA synthases) 将(R)-3-羟基丁酰辅酶 A 缩合成 PHB。

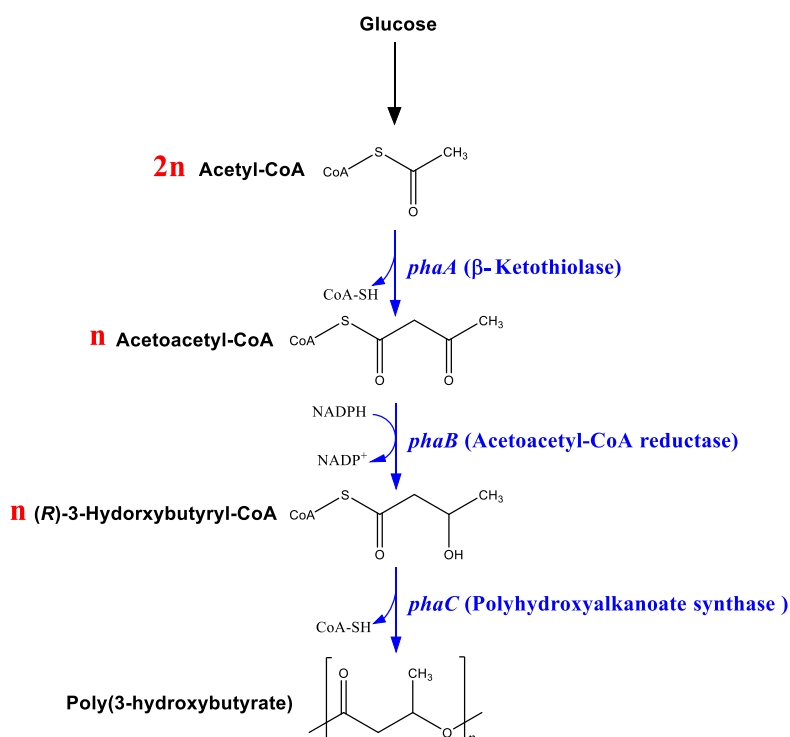


图 1.6 PHB 的生物合成路径

Fig. 1.6 Biosynthetic pathway of PHB

与 PHA 生产相关的合成生物学研究主要包括以下几个方面：

(1) 通过酶的定向进化或嵌合酶的方法提高聚羟基脂肪酸酯合酶的活性。例如对恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* KT2440 的 PHA 合酶进行随机突变和定向筛选，得到一个发生两个氨基酸突变(E358G 和 N398S)的新酶，在大肠杆菌中过表达这种突变酶，发现 PHA 的产量大幅提高<sup>[111]</sup>。嵌合酶 AcRe12 是由 *Aeromonas caviae* 的 PHA 合酶的氨

基端与 *Ralstonia eutropha* 的 PHA 合酶的羧基端组合而成的, 表达这种嵌合酶的大肠杆菌, PHA 产量显著提高<sup>[112]</sup>。

(2) 通过增加 PHA 合成基因的拷贝数或利用诱导表达系统来增加 PHA 合成路径关键蛋白的表达, 增加 PHA 合成路径的代谢通量。有研究表明, 当染色体上 *phaCAB* 表达盒拷贝数从 11 个增加至 50 个时, 重组大肠杆菌的 PHA 积累从 0.1 g/L 增加至 1.3 g/L, 说明增加 *phaCAB* 表达盒的拷贝数可以显著促进 PHA 的生产<sup>[113]</sup>。在嗜盐菌 *Halomonas bluephagenesis* 的基因组上用类似大肠杆菌 T7 的诱导表达系统表达 *phaCAB*, 改造菌株可以生产 69.0 g/L 的 PHA, 而非诱导表达的对照菌株只能生产 50.0 g/L 的 PHA<sup>[114]</sup>。

(3) 过表达某些调节 PHA 合成的蛋白增加 PHA 的产量。PhaP 是一个 PHA 颗粒结合蛋白, 研究证明表达 PhaP 可以缩小 PHA 颗粒的尺寸, 促进聚合物的合成<sup>[115]</sup>。过表达 PhaP 蛋白的重组大肠杆菌与出发菌株相比, PHA 产量提高了 2.6 倍, 生物量提高了 1.9 倍<sup>[116]</sup>。

(4) 通过生物信息学重构细菌中的 PHA 生产路径, 同时与代谢流模型相结合, 优化路径设计, 促进产物合成。Poblete-Castro 等人为了将代谢流导向 PHA 及其前体的合成, 基于恶臭假单胞菌的基因组信息建立了代谢流模型。代谢流模型分析表明, 敲除葡萄糖脱氢酶的编码基因 *gcd* 可以使 PHA 的产量增加一倍。实验结果表明, 改造菌株 *P. putida*  $\Delta gcd$  的 PHA 得率增加 80%, PHA 浓度增加 100%, 胞内 PHA 含量增加 50%, 并且细胞的生长几乎不受影响<sup>[117]</sup>。他们进一步的研究发现, 在敲除 *gcd* 基因的同时过表达丙酮酸脱氢酶亚基的编码基因 *acoA* 可以使 PHA 的产量提高 120%, 而实际的实验结果表明 PHA 的产量提高了 121%<sup>[118]</sup>。

(5) 通过调控细胞生长模式, 可以扩大细胞体积, 促进产物积累。在大肠杆菌中过表达 *sulA* 基因可以抑制细胞的分裂<sup>[119]</sup>。在大肠杆菌中过表达 *phaCAB* 基因, 同时诱导表达 *sulA* 基因, 仅仅 2 小时后, 细胞开始变长, 经过 48 小时的培养后, 改造菌株可以生产 2.2 g/L 的 PHA, 而对照菌株只能生产 0.5 g/L 的 PHA<sup>[120]</sup>。为了改变细胞生长模式, 敲除细胞分裂环定位基因 *minC* 和 *minD*, 使细胞在多个位置都能形成细胞分裂环, 此时发现改造菌株可以同时分裂生成多个子细胞。为了进一步提高细胞生长和 PHA 生产, 一些与细胞分裂过程相关的基因 (*ftsQ*, *ftsL*, *ftsW*, *ftsN* 和 *ftsZ*)<sup>[121]</sup>和细胞形态相关的基因 *MreB* 一起在重组大肠杆菌 *E. coli* JM109 $\Delta minCD$  中进行了过表达, 得到的改造菌株的 PHA 产量与对照相比增加了一倍<sup>[122]</sup>。

### 1.3.2 谷氨酸的生物合成

谷氨酸的生物合成路径如图 1.7 所示, 糖经过代谢生成乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环后合成  $\alpha$ -酮戊二酸, 它也是谷氨酸合成最重要的前体物质; 接着  $\alpha$ -酮戊二酸在 *gdh* 基因编码的谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH) 的催化下生成谷氨酸, 同时将 NADPH 转化为 NADP<sup>+</sup>; 最后, 胞内生成的谷氨酸通过谷氨酸分泌通道分泌到胞外。

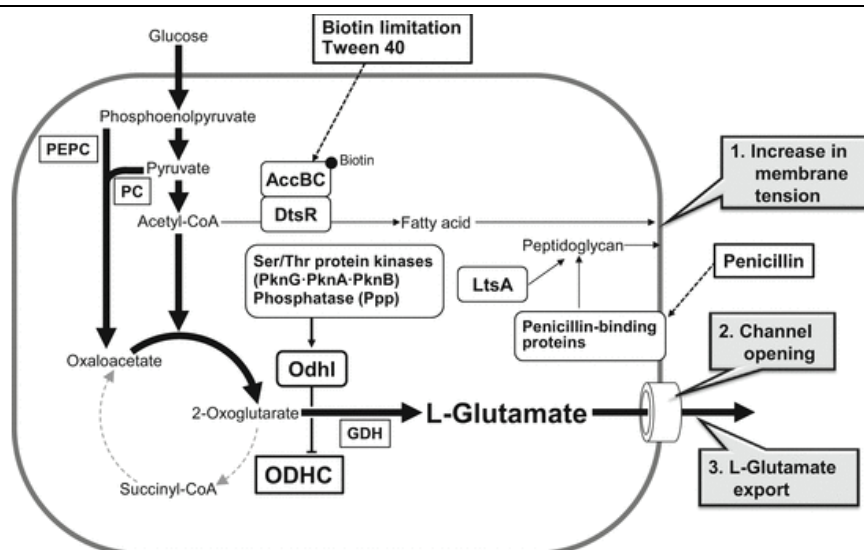


图 1.7 谷氨酸合成路径<sup>[123]</sup>

Fig. 1.7 Biosynthetic pathway of glutamic acid<sup>[123]</sup>

关于谷氨酸的合成生物学研究主要包括以下几个方面：

(1) 降低  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系 (Oxoglutarate dehydrogenase complex, ODHC) 的活性，促进谷氨酸的合成。 $\alpha$ -酮戊二酸是谷氨酸合成的直接前体物质，而 ODHC 负责催化  $\alpha$ -酮戊二酸到琥珀酰辅酶 A 的合成，正好位于  $\alpha$ -酮戊二酸代谢的分支路径上。Shimizu 等人研究了与谷氨酸合成相关酶的活性对谷氨酸合成的影响，结果发现异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase, ICDH) 和 GDH 活性的改变对谷氨酸的合成影响很小，而改变 ODHC 的活性对谷氨酸的生产有显著的影响<sup>[124-126]</sup>。Kawahara 等人检测了 ODHC 的活性后，发现诱导谷氨酸生产的方法，如生物素限制，添加吐温 40 和添加盘尼西林等措施也会抑制 ODHC 的活性<sup>[127]</sup>。这些结果表明降低 ODHC 的活性是提高谷氨酸产量的重要策略。

(2) OdhI 蛋白的磷酸化影响谷氨酸的合成。谷氨酸棒状杆菌需要在一定的诱导条件 (生物素限制，添加吐温 40，添加盘尼西林或添加异丁醇) 下才能分泌生产谷氨酸。Schultz 等人发现 *odhI* 突变株在各种诱导条件下都无法生成谷氨酸<sup>[128]</sup>，而 Kim 等人发现菌体在诱导条件下合成谷氨酸时，胞内 OdhI 蛋白的含量显著增加<sup>[129]</sup>，这说明 OdhI 蛋白与谷氨酸的合成相关。进一步的研究发现，*pknG* 基因突变会导致 OdhI 无法磷酸化，未磷酸化的 OdhI 蛋白会与 ODHC 的亚基蛋白 OdhA 相作用，从而抑制 ODHC 的活性，促进谷氨酸的合成<sup>[130,131]</sup>。Boulaya 等人也在生物素限制诱导谷氨酸生产的条件下，观察到了 OdhI 的去磷酸化<sup>[132]</sup>，OdhI 蛋白的晶体结构表明，磷酸化的 OdhI 无法与 OdhA 蛋白相作用<sup>[133]</sup>。这些结果表明，可以通过调节 OdhI 蛋白的磷酸化，调节 ODHC 的活性，促进谷氨酸合成。

(3) 通过回补反应增加谷氨酸合成前体的供应。回补反应可以增加 TCA 循环中草酰乙酸的供应，进而转化成  $\alpha$ -酮戊二酸，为谷氨酸的合成提供更多的前体。谷氨酸棒状杆菌中有两个回补反应，分别由磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate

carboxylase, PEPC) 和丙酮酸羧化酶 (Pyruvate carboxylase, PYC) 进行催化<sup>[134,135]</sup>。研究发现, 当诱导谷氨酸生产时, 细胞内的两条回补路径的代谢流都有一定程度的增加<sup>[136,137]</sup>, 表明谷氨酸合成需要回补路径提供额外的前体物质。

(4) 细胞膜, 细胞壁合成对谷氨酸生产的影响。Hashimoto 等人发现, 利用生物素限制和添加吐温 40 等方法诱导谷氨酸生产时, 细胞内分枝菌酸的合成也受到了影响, 而分枝菌酸是细胞壁的重要组成部分之一, 起到阻隔胞内物质外流和维持胞内渗透压的作用, 因此分枝菌酸含量的降低可能会导致谷氨酸的分泌<sup>[138-140]</sup>。*dtsR* 基因编码脂肪酸合成蛋白, 对吐温 40 表现出敏感性<sup>[141]</sup>, 进一步研究发现 *dtsR* 突变株可以不经诱导生产谷氨酸, 而过表达 *dtsR* 基因可以抑制谷氨酸的生产<sup>[142,143]</sup>, 这些结果表明吐温 40 诱导会抑制 DtsR 蛋白活性, 影响细胞膜脂肪酸的组成, 导致谷氨酸的分泌。LtsA 蛋白负责细胞壁肽聚糖结构中 mDAP 残基的酰胺化<sup>[144]</sup>, *ltsA* 基因突变菌株的肽聚糖酰胺化受到影响, 导致细胞壁的完整性降低, 使得细胞可以不经诱导分泌谷氨酸<sup>[145,146]</sup>。

(5) 机械敏感型通道蛋白 Ncgl1221 对谷氨酸生产的影响。通过前面的介绍可知仅仅降低 ODHC 的活性只能促进  $\alpha$ -酮戊二酸流向谷氨酸的合成, 却无法使谷氨酸分泌到胞外。但是一个 *odhA* 基因突变 (*odhA* 基因编码 ODHC 的一个亚基) 的菌株却可以不经诱导分泌生产谷氨酸<sup>[147]</sup>。进一步的研究发现, 这个突变菌株的 *NCgl1221* 基因也发生了突变, 而它编码一个机械敏感型通道蛋白<sup>[148]</sup>。接着多个研究表明, 诱导处理引起了细胞膜张力的变化, 激活了 Ncgl1221 的机械敏感型通道, 导致谷氨酸的分泌<sup>[148-152]</sup>。对 Ncgl1221 蛋白的结构功能进行分析发现, Ncgl1221 蛋白的氨基端结构域具备分泌谷氨酸的功能, 而羧基端结构域对谷氨酸分泌起到负调控的作用, 对 Ncgl1221 的羧基端进行部分敲除可以使改造菌株在不经诱导的条件下分泌生产谷氨酸<sup>[153,154]</sup>。

### 1.3.3 赖氨酸的生物合成

赖氨酸的生物合成路径如图 1.8 所示 (本论文所有图表中出现的缩略词均在附录 I 中列出, 图表注释中不再进行说明), 首先葡萄糖经过糖酵解途径生成磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸, 同时部分葡萄糖通过磷酸戊糖途径进行代谢, 为赖氨酸合成提供辅酶 NADPH; 接着, 生成的磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸通过回补路径, 分别在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶的催化下生成草酰乙酸, 其是赖氨酸合成最重要的前体物质; 草酰乙酸通过二氨基庚二酸途径 (Diminoheptanoic acid pathway, DAP), 经过 7 步催化反应生成赖氨酸 (其中四步反应需要 NADPH 作为辅酶); 最后生成的赖氨酸通过赖氨酸转运蛋白分泌到胞外。

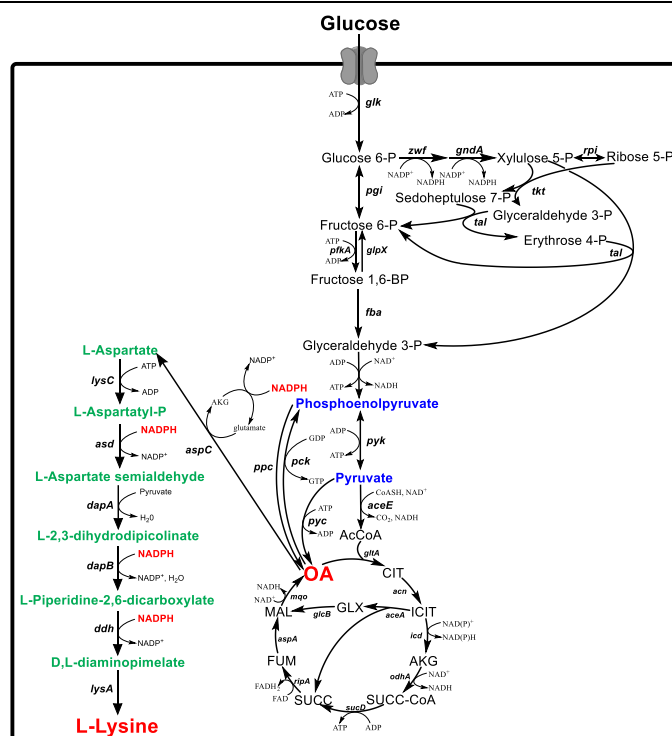


图 1.8 L-赖氨酸的生物合成路径

Fig. 1.8 Biosynthetic pathway of lysine

关于赖氨酸合成生物学的研究主要包括：

(1) 增加前体供应。草酰乙酸是赖氨酸合成最重要的前体物质，增加草酰乙酸的供应可以显著提高赖氨酸的产量。研究人员通过多种方式使糖酵解的中间产物更多的转化为草酰乙酸，从而提高了赖氨酸的产量，这些方法包括过表达丙酮酸羧化酶<sup>[155,156]</sup>；过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶<sup>[152]</sup>；敲除磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶<sup>[158,159]</sup>；弱化丙酮酸脱氢酶的活性<sup>[160]</sup>。另一方面，弱化 TCA 循环相关酶的表达也可以促进赖氨酸的生产，已经证实的包括异柠檬酸脱氢酶<sup>[161]</sup>；柠檬酸合酶<sup>[162,163]</sup>；苹果酸:醌氧化还原酶<sup>[164]</sup>。

(2) 增强 NADPH 再生。1 mol 草酰乙酸生成 1 mol 赖氨酸需要消耗 4 mol NADPH，因此 NADPH 的供应对于赖氨酸合成是至关重要的。常规的增加 NADPH 再生的策略是将葡萄糖代谢从糖酵解途径更多的导向磷酸戊糖途径，这样 1 mol 葡萄糖代谢可以多提供 2 mol NADPH。具体的方法包括敲除葡萄糖-6-磷酸异构酶<sup>[165]</sup>；过表达果糖-1,6-二磷酸脂酶<sup>[166]</sup>；过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶<sup>[167]</sup>和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶<sup>[168]</sup>。但是葡萄糖通过磷酸戊糖途径代谢会释放二氧化碳，导致产物得率降低，为了解决这个矛盾，研究者将糖酵解途径中的 NAD 依赖型的甘油醛-3-磷酸脱氢酶替换为 NADP 依赖型的甘油醛-3-磷酸脱氢酶，使得葡萄糖即使通过糖酵解途径代谢也可以促进 NADPH 再生<sup>[169,170]</sup>。

(3) 赖氨酸分泌蛋白。分泌步骤对于氨基酸的生产是至关重要的<sup>[171]</sup>，谷氨酸棒状杆菌中鉴定出的第一个氨基酸分泌蛋白是 LysE，它负责赖氨酸和精氨酸的分泌<sup>[172]</sup>。在谷氨酸棒状杆菌中过表达 *lysE* 基因，可以使赖氨酸分泌速率提高 5 倍<sup>[172]</sup>。在嗜甲基菌中过表达 *lysE* 基因，可以增加赖氨酸的产量<sup>[173]</sup>。大肠杆菌中的 YbjE 蛋白被鉴定为可能

的赖氨酸分泌蛋白, 过表达 *ybjE* 基因的改造菌株的赖氨酸产量显著提高<sup>[174,175]</sup>。

(4) 葡萄糖摄取。在谷氨酸棒状杆菌中, 葡萄糖的转运和磷酸化主要通过磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统 (Phosphotransferase system, PTS) 实现<sup>[176-180]</sup>, 但是这个磷酸化系统需要磷酸烯醇式丙酮酸提供磷酸根, 这样就减少了生成草酰乙酸的前体。近来, 人们又发现 *iolT1* 和 *iolT2* 编码的肌醇转运蛋白也可以转运葡萄糖<sup>[181]</sup>, 用 *iolT1* 葡萄糖摄取系统结合非磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的葡萄糖激酶, 取代菌株自身的 PTS 系统, 可以使赖氨酸的产量提高 20%<sup>[177]</sup>。

(5) 能量效率。类似于氧化还原平衡, 能量平衡对于赖氨酸的高效生产也是非常重要的。因此, 提高 ATP 的合成效率是提高赖氨酸生产的另一种策略。细胞呼吸链中, 不同的末端氧化酶催化合成 ATP 的效率也不同, 细胞色素 *aa<sub>3</sub>* 氧化还原酶比细胞色素 *bd* 氧化还原酶的能量生成效率高 3 倍<sup>[182]</sup>。因此, 敲除低效的细胞色素 *bd* 分支路径可以增加赖氨酸的生产, 并且不影响糖利用速率和细胞生长<sup>[183]</sup>。

## 1.4 木质纤维素生产生物基聚合物及前体的挑战

### 1.4.1 抑制物阻碍发酵菌株的生长与生产

在木质纤维素预处理过程中, 除了产生单糖和二糖外, 还有三类主要化合物生成, 包括有机酸 (乙酸, 甲酸, 乙酰丙酸), 醛类化合物 (5-羟甲基糠醛, 糠醛) 和芳香类化合物 (4-羟基苯甲酸, 邻苯二酚)<sup>[184]</sup>。这些化合物会对发酵菌株产生不同程度的抑制效果, 因此统称为抑制物。为了摆脱抑制物的影响, 研究人员开发了各种各样的脱毒方法, 但是没有一种方法可以完全脱除这些抑制物, 这就要求发酵菌株必须具备一定的抑制物耐受能力。但是, 传统的生物基聚合物生产菌株 (伯克氏菌, 罗氏菌, 假单胞菌, 嗜盐菌和重组大肠杆菌) 对抑制物的耐受性较差, 只能在稀释过或蒸发过的木质纤维素水解液中进行生长发酵, 这大大增加了操作的复杂性, 时间和成本, 抵消了利用木质纤维素生产可降解聚合物的经济性<sup>[185]</sup>。而通过基因工程的方法提高发酵菌株的抑制物耐受性的结果非常有限<sup>[186-188]</sup>。基于以上考虑, 本研究选择谷氨酸棒状杆菌作为出发菌株, 因为它具备很强的抑制物耐受性, 可以对木质纤维素中的各种抑制物进行有效的降解<sup>[189]</sup>。谷氨酸棒状杆菌还具备广泛的底物生产潜力, 可以经过代谢工程改造生产各种高附加值产品, 因此可以在谷氨酸棒状杆菌中构建异源聚合物合成路径。

### 1.4.2 木质纤维素中多糖成分的保存与利用

木质纤维素的糖类降解产物包括葡萄糖, 木糖, 阿拉伯糖, 半乳糖和甘露糖, 其中葡萄糖和木糖一般分别占据木质纤维素总糖的 60% 和 30% 以上, 因此葡萄糖和木糖成分的保存和利用对于木质纤维素生物炼制非常重要。葡萄糖主要存在于纤维素中, 后者的结构较为稳定, 在预处理过程中降解较少, 因此葡萄糖组分可以得到较好的保留。木糖主要存在于半纤维素中, 而绝大部分的半纤维素都在预处理过程中降解为可溶性的单糖和寡糖, 加上预处理和脱毒过程中水的大量加入, 导致木糖成分难以保存。对此, 本研究采用了干酸预处理结合固态生物脱毒的技术, 使得整个生物炼制过程中没有废水的产

生，将预处理降解产生的木糖完整的保存在固体物料中，和纤维素一起用于后续的糖化和发酵过程。另一方面，一些发酵菌株并不具备木糖利用能力，因此需要引入外源的木糖利用基因，构建木糖代谢途径。

#### 1.4.3 木质纤维素中的非抑制物组分对发酵的影响

木质纤维素的降解产物除了抑制物以外，还存在一些非抑制物组分也会对发酵过程造成阻碍。生物素（维生素 B7）广泛地存在于各种生物质（玉米秸秆、小麦秸秆、稻秆和甘蔗渣等）当中，并且在整个生物炼制加工链（预处理、脱毒、糖化和发酵）中没有损失<sup>[190]</sup>。这就导致木质纤维素水解液当中存在大量的生物素，而环境中大量生物素的存在会抑制谷氨酸的分泌和生产。虽然添加青霉素和异丁醇等试剂可以诱导谷氨酸的分泌，但是增加了操作的复杂性和生产成本。因此，通过合成生物学的方法打开谷氨酸分泌通道，使其可以在含有大量生物素的环境中高效生产谷氨酸是十分必要的。另一方面，木质纤维素的降解产物中含有大量的碳源，而氮源等其他营养成分较少，因此在使用木质纤维素水解液发酵时，需要根据生产的需要添加相应的营养元素。例如生产生物聚合物等胞内产物时，需要添加适量的氮源促进菌体的生长；赖氨酸生产菌株一般是高丝氨酸营养缺陷型菌株，因此需要在水解液中添加适量的甲硫氨酸和苏氨酸以满足菌株的生长需求。

#### 1.4.4 复杂的木质纤维素环境需要对发酵菌株进行全局调控

木质纤维素水解液中含有大量的葡萄糖和木糖，为了最大化的利用木质纤维素，一般要求发酵菌株必须具备葡萄糖和木糖利用能力，但是大部分菌株都存在葡萄糖代谢阻遏（Carbon catabolite repression, CCR）的现象，这严重影响了发酵的得率和时空产率。为了使菌株快速利用木质纤维素中的葡萄糖和木糖，通常需要对发酵菌株进行适应性进化或者对木糖转运和代谢途径进行强化。如果菌株自身不具备木糖利用能力，还需引入外源的木糖代谢路径，而新的糖代谢路径的引入必然会影响到原代谢流的走向，打破菌体原本的氧化还原平衡和能量平衡，对产物的合成造成影响。例如在赖氨酸生产菌株中引入木糖利用途径，而木糖主要通过磷酸戊糖途径进行代谢，导致葡萄糖通过磷酸戊糖途径的代谢通量减少，影响了辅酶 NADPH 的再生，使赖氨酸的产量降低。在菌体中引入新的产物合成路径也会造成类似的影响。木质纤维素水解液中抑制物的存在还对菌体的生长能力提出了一定的要求，因此对菌株的代谢工程改造还需照顾到菌体的生长情况，不能对菌体生长造成过重的负担。综合以上几点，针对木质纤维素复杂环境，需要利用合成生物学的方法对菌株进行全局调控。

### 1.5 本文的立题依据和主要研究内容

随着社会经济的发展，聚合物材料也在人类社会中得到越来越重要的作用，但是不可降解的石油基聚合物也给生态环境造成了巨大的危害。为了遵循国家在第十四个五年规划中，关于“改善环境质量，加快发展方式绿色转型”的纲领，同时实现碳达峰和碳

中和的目标, 必须发展生物基聚合物替代传统的石油基聚合物。本研究主要聚焦于聚 3-羟基丁酸酯 (Poly 3-hydroxybutyrate, PHB) 的生物合成, 以及生物基聚合物的合成前体 (谷氨酸和赖氨酸) 的生产。目前生物基聚合物的年产量只占到全球聚合物总市场的 1%, 发展受阻最主要的原因是生产原料方面的限制。生物基聚合物及前体的生产主要使用淀粉和糖作为原料, 这一方面极大的提高了生产成本, 另一方面减少了食物供应, 造成粮食短缺。

木质纤维素具有来源广泛, 供应量大等优势, 为了降低生物基聚合物生产的原料成本, 同时避免与食物和农业资源相竞争, 本研究计划利用木质纤维素生物质生产生物基聚合物及前体。木质纤维素需要经过预处理和酶解后才能被转化为生物可利用糖, 但是预处理过程会产生大量的抑制物, 导致常用的生物基聚合物生产菌株无法在高固含量的木质纤维素水解液中生长。为此本研究采用了 *C. glutamicum* 作为出发菌株, 因为它具有较强的抑制物耐受性, 可以将木质纤维素体系中的糠醛, 5-羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural, HMF), 4-羟基苯甲醛 (4-Hydroxybenzaldehyde, HBA), 香草醛和丁香醛等抑制物转化为对菌体无毒的醇类和酸类物质 (如图 1.9 所示), 因此谷氨酸棒状杆菌可以在高固含量的木质纤维素体系中进行正常的生长和发酵<sup>[189,191]</sup>。另一方面, 木质纤维素中含有大量的生物素, 而生物素会促进 *C. glutamicum* 细胞膜的合成, 降低细胞膜的通透性, 这也增强了菌株对于木质纤维素复杂环境的抵抗力<sup>[190]</sup>。*C. glutamicum* 还是一株通过美国食品药品监督管理局 (Food and drug administration, FDA) 认证的公认安全菌株 (Generally recognized as safe, GRAS), 生产的产品具有更好的安全性, 不含有内毒素, 节省了下游加工成本。

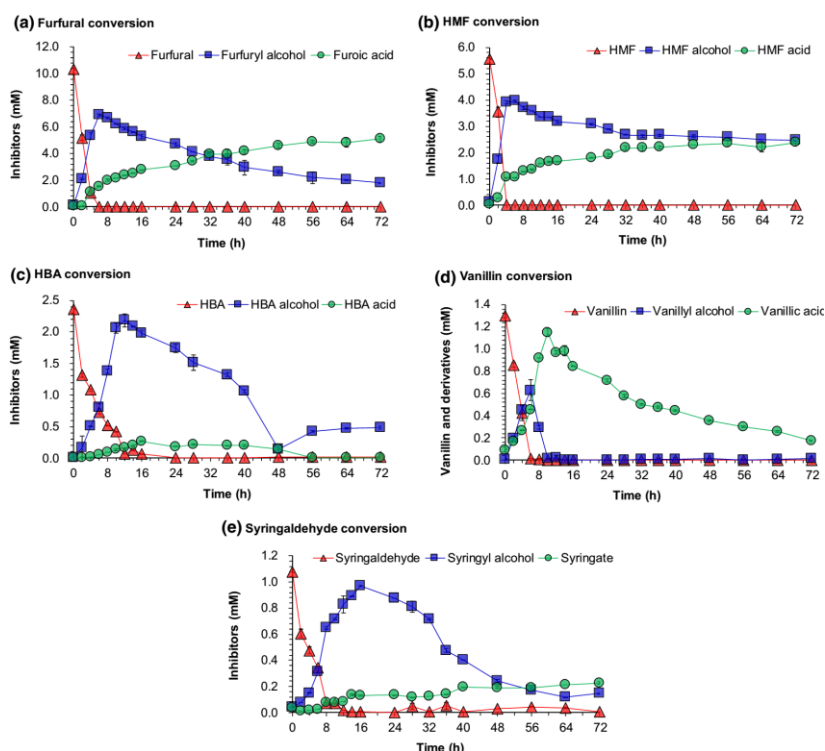


图 1.9 谷氨酸棒状杆菌转化抑制物<sup>[189]</sup>

Fig. 1.9 Inhibitors biotransformation by *C. glutamicum*<sup>[189]</sup>

但是, *C. glutamicum* 利用木质纤维素生产生物基聚合物及前体也有一些需要解决的问题: (1) 木质纤维素的降解产物中不仅含有葡萄糖, 还含有大量的木糖, 而天然的 *C. glutamicum* 不能利用木糖, 导致原料的浪费; (2) 木质纤维素水解液中的碳源较多, 而其他营养成分较少, 需要针对不同的产物合成需求优化营养盐添加策略和发酵策略; (3) 木质纤维素中含有大量的生物素, 生物素会降低细胞膜的通透性, 从而抑制谷氨酸的分泌生产; (4) *C. glutamicum* 自身并不具备 PHB 合成路径, 需要引入外源的产物合成路径; (5) 新的碳源代谢路径或者产物合成路径的引入都会打破发酵菌株原本的氧化还原平衡和能量平衡, 需要对发酵菌株进行全局调控。因此, 本论文首先通过干式稀酸预处理, 固态生物脱毒和酶水解步骤将木质纤维素转化为生物可发酵单糖; 再以 *C. glutamicum* 作为出发菌株, 利用合成生物学的方法, 针对木质纤维素体系和目标产物, 对 *C. glutamicum* 进行全局性的代谢工程改造; 最后得到的改造菌株可以利用木质纤维素水解液生产生物基聚合物及前体。

具体研究内容包括以下几个方面:

(1) 以谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* S9114 作为出发菌株, 针对木质纤维素体系, 在菌体内引入木糖利用路径, 并优化木糖利用速率; 改造 *C. glutamicum* 的谷氨酸分泌系统, 使其可以在木质纤维素环境中不经诱导进行谷氨酸的分泌生产; 调控代谢流, 使碳源更多地导向目标产品谷氨酸的合成; 最后利用木质纤维素水解液生产高指标的谷氨酸。

(2) 以赖氨酸生产菌株 *C. glutamicum* B253 作为出发菌株, 引入木糖利用途径, 并从增加前体供应, 减少副产物形成, 增强辅酶再生和增加赖氨酸合成路径关键酶的表达量等方面尝试提高目标产品赖氨酸的合成, 找到并解除木质纤维素生产赖氨酸的限制因素。最终利用木质纤维素水解液生产高指标的赖氨酸。

(3) 以研究(1)得到的木糖利用菌株作为出发菌株, 引入外源 PHB 的合成路径, 并针对目标产物的合成进行定向优化, 找到并解除谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的限速步骤, 大幅提升重组菌株的 PHB 生产能力。同时对谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的发酵条件进行优化, 构建完整的木质纤维素 PHB 生产系统。

(4) 以 *Gluconobacter oxydans* DSM2003 作为研究对象, 针对其在木质纤维素水解液中利用非葡萄糖碳源速率较慢的问题, 通过适应性进化的方法提高其全糖利用速率, 并在基因层面和转录层面上对进化菌株的相关基因进行分析, 找出进化菌株全糖利用速率加快的原因。

## 第 2 章 改造谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素生产聚合前体谷氨酸

### 2.1 引言

L-谷氨酸，又称 L- $\alpha$ -氨基戊二酸，通常作为鲜味增强剂应用在食品领域，但是目前其也被开发用作生物基聚合物前体。谷氨酸分子内含有 2 个羧基和 1 个氨基，这种结构特性使其可以进行分子间聚合生成聚  $\alpha$ -谷氨酸和聚  $\gamma$ -谷氨酸，两种聚谷氨酸都具有水溶性，可食用性，生物相容性和生物可降解性，在食品医疗领域有巨大的应用潜力<sup>[17-23]</sup>。谷氨酸还可以在谷氨酸脱羧酶的作用下生成  $\gamma$ -氨基丁酸，进一步通过环化反应生成丁内酰胺，丁内酰胺在催化剂的作用下通过阴离子开环聚合法生成生物基聚酰胺 4 (Polyamide 4, PA4)。PA4 具有生物可降解性，以及良好的氧气阻隔性，热稳定性和吸湿性，可以作为环保型工程材料进行使用。谷氨酸还可以经过重氮化反应和加氢作用脱去氨基生成戊二酸<sup>[24]</sup>，戊二酸是聚合物生产的重要平台化合物，它既可以与二元醇反应生成聚戊二酸亚烷基二酯，如与丙二醇聚合生成聚戊二酸丙二醇酯<sup>[25]</sup>，也可以与二元胺反应生成聚酰胺，如与己二胺反应生成聚酰胺 65<sup>[26]</sup>。

目前谷氨酸的年产量已经超过 300 万吨<sup>[27]</sup>，将产能过剩的谷氨酸用于聚合物生产，既拓展了谷氨酸产业链，也稳定了谷氨酸市场价格。但是目前谷氨酸主要以淀粉和糖类可食用原料进行生产，这不仅提高了其生产成本，也减少了粮食供应，因此用非粮食类碳源替代玉米等粮食类作物作为原料生产谷氨酸是十分必要的<sup>[192-193]</sup>。在众多非粮食类原料中，木质纤维素无疑是最好的选择，因为它具有来源稳定和供应量大等优势<sup>[194]</sup>。木质纤维素由纤维素、半纤维素和木质素组成，而木糖是半纤维素中的关键组分，并且大约占据了木质纤维素总糖的 30%。*C. glutamicum* 是用于谷氨酸工业化生产的菌株<sup>[195]</sup>，但是目前报道的天然 *C. glutamicum* 只能利用葡萄糖，而不能利用木糖。

在谷氨酸棒状杆菌中引入木糖利用途径可以使重组菌株利用木糖进行生长。细菌中最常见的木糖利用途径为木糖异构酶途径，在木糖异构酶途径中，*xylA* 基因编码的木糖异构酶可以将木糖转化为木酮糖，木酮糖再通过 *xylB* 基因编码的木酮糖激酶催化形成木酮糖-5-磷酸，其可以作为磷酸戊糖途径的中间体被进一步代谢。在 *glutamicum* R 中异源表达来自大肠杆菌的木糖异构酶可以使重组菌株利用木糖为唯一碳源进行生长<sup>[196]</sup>，接着通过表达 *C. glutamicum* 来源的阿拉伯糖转运蛋白促进了多种糖的同步利用<sup>[197]</sup>。在谷氨酸棒状杆菌中表达来自 *X. campestris* 的 *xylA* 基因和来自 *C. glutamicum* 的 *xylB* 基因可以进一步增加木糖的利用速率。通过在 *C. glutamicum* 中引入木糖利用途径，可以使其利用木糖生产乳酸<sup>[198]</sup>，琥珀酸<sup>[199,200]</sup>，3-羟基丙酸<sup>[201]</sup>， $\gamma$ -氨基丁酸<sup>[202]</sup>和 1,5-二氨基戊烷<sup>[203]</sup>。

Gopinath 等人通过质粒表达 *xylA* 基因在模式菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 中构建了木糖异构酶途径<sup>[204]</sup>。该重组菌株培养在含有木糖的半纤维素水解液中，在乙胺丁醇的诱导下经过 96 小时仅利用了 8.7 g/L 木糖，对谷氨酸的生产贡献极其微弱。利用木质纤维素原料生产谷氨酸还存在以下几个没有解决的关键问题：（1）木质纤维素中含

有大量的生物素，降低了细胞膜的通透性，完全阻断了胞内谷氨酸的分泌<sup>[185]</sup>；(2) 木糖代谢速率慢，并且通过质粒表达 *xylAB* 基因容易丢失质粒造成遗传的不稳定；(3) 谷氨酸得率低，同时在谷氨酸生产的过程中还伴有乳酸，乙酸等副产物的大量生成。目前，从木质纤维素原料发酵生产谷氨酸，仅有使用预处理后浸提液中的木糖为原料进行发酵的尝试，没有同时利用木质纤维素中的纤维素和半纤维素组分进行谷氨酸生产的研究。

本研究尝试通过筛选不同的启动子表达不同来源的 *xylAB* 基因在 *C. glutamicum* S9114 中构建木糖利用途径，并对 *C. glutamicum* 进行代谢工程改造使其可以在高生物素浓度的麦秆水解液中高效分泌生产谷氨酸。最终获得了一株不需诱导就可以共利用麦秆水解液中的葡萄糖和木糖高效生产谷氨酸的重组菌株。这个改造菌株为木质纤维素生产谷氨酸的实际工业化应用奠定了基础。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 菌株，培养基和培养环境

本小节所使用的原始菌株和改造得到的重组菌株如表 2.1 所示。

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  用于表达质粒和敲除质粒的构建，大肠杆菌 *E.coli* BL21 用于提供大肠杆菌来源的木糖利用基因 (*xylAB*\_BL21)。培养大肠杆菌使用的培养基是 Luria-Bertani (LB) 培养基，具体成分如下：10.0 g/L 氯化钠，10.0 g/L 蛋白胨和 5.0 g/L 酵母提取物。培养温度为 37 °C，如在摇床中培养，则需将转速设置为 200 rpm，如果需要培养带有卡那霉素抗性质粒的大肠杆菌，则需要在培养基中额外添加终浓度为 50.0  $\mu\text{g/mL}$  的卡那霉素。

谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* S9114 是一株工业上用于生产谷氨酸的菌株，目前保存在上海工业微生物研究所中 (SIIM, Shanghai, China, <http://www.gsysiim.com/>)。本实验中 *C. glutamicum* S9114 主要作为出发菌株进行使用。谷氨酸棒状杆菌发酵所用的培养基有两种，分别是限制生物素培养基和富含生物素培养基，生物素浓度的高低主要由添加玉米浆的量来决定，种子培养基和两种发酵培养基的具体成分如下：

(1) 预培养培养基：25.0 g/L 葡萄糖，1.5 g/L 磷酸二氢钾，2.5 g/L 尿素和 0.6 g/L 硫酸镁，25.0 g/L 玉米浆。

(2) 种子培养基：25.0 g/L 葡萄糖，1.5 g/L 磷酸二氢钾，2.5 g/L 尿素和 0.6 g/L 硫酸镁，5.0 g/L 玉米浆。

(3) 限制生物素培养基：1.0 g/L 磷酸二氢钾，3.0 g/L 尿素，0.6 g/L 硫酸镁，0.5 g/L 玉米浆，视情况添加 60.0 g/L 葡萄糖或木糖作为碳源。

(4) 富含生物素培养基：1.0 g/L 磷酸二氢钾，3.0 g/L 尿素，0.6 g/L 硫酸镁，25.0 g/L 玉米浆，视情况添加 60.0 g/L 葡萄糖或木糖作为碳源。

谷氨酸棒状杆菌电转化时所用的培养基主要有两种，分别是 LBG 感受态培养基和 SOC 培养基，筛选需要用到 LBS 平板，具体成分如下：

(1) LB 培养基: 10.0 g/L 氯化钠, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物。

(2) LBG 感受态培养基: 10.0 g/L 氯化钠, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物, 30.0 g/L 甘氨酸, 20.0 g/L 葡萄糖, 1.0 g/L 吐温 80。

(3) SOC 培养基: 20.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物, 0.5 g/L 氯化钠, 186.4 mg/L 氯化钾, 2.0 g/L 六水合氯化镁, 4.0 g/L 葡萄糖。

(4) LB 平板: 10.0 g/L 氯化钠, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物, 15.0 g/L 琼脂粉。

(5) LK 平板: 10.0 g/L 氯化钠, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物, 50.0  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素, 15.0 g/L 琼脂粉。

(6) LBS 平板: 10.0 g/L 氯化钠, 10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L 酵母提取物, 100.0 g/L 蔗糖, 15.0 g/L 琼脂粉。

谷氨酸棒状杆菌的培养温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 如在摇床中培养, 则需将转速设置为 200 rpm, 如果需要培养带有卡那霉素抗性质粒的谷氨酸棒状杆菌, 则需要在培养基中额外添加终浓度为 50.0  $\mu\text{g/mL}$  的卡那霉素。

乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DSM 20284 购自德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ, Braunschweig, Germany)。*P. acidilactici* DSM 20284 的主要作用是提供乳酸片球菌来源的木糖利用基因 (*xyLAB\_2911*)。培养乳酸片球菌所用的培养基为简化的 Man-Rogosa-Sharp (MRS) 培养基, 具体成分如下: 20.0 g/L 葡萄糖, 10.0 g/L 蛋白胨, 10.0 g/L 酵母提取物, 5.0 g/L 乙酸钠, 2.0 g/L 柠檬酸铵, 0.58 g/L 七水硫酸镁, 2.0 g/L 磷酸氢二钾, 0.25 g/L 一水硫酸锰。培养温度为 42  $^{\circ}\text{C}$ , 如在摇床中培养, 则需将转速设置为 200 rpm。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 是实验室之前分离得到的生物脱毒菌株, 目前保存在中国普通微生物保藏中心 (CGMCC), 菌株保藏编号为 7452。*A. resinae* ZN1 的主要作用是脱去木质纤维素经过预处理后产生的抑制物。培养 *A. resinae* ZN1 所用的培养基是马铃薯葡萄糖琼脂斜面 (PDA) 培养基, 具体成分如下: 200.0 g/L 马铃薯提取液, 20.0 g/L 葡萄糖和 15.0 g/L 琼脂粉。

### 2.2.2 酶和试剂

纤维素酶 CTec 2.0 用于水解木质纤维素中的纤维素和半纤维素, 购自中国北京的诺维信(中国)公司。根据 NRELLAP-006 指南中的方法测得纤维素酶活为 203.2 FPU/mL, 纤维二糖酶活为 4900.0 CBU/mL<sup>[205]</sup>, 根据 Bradford 方法测得蛋白浓度为 87.3 mg/mL<sup>[206]</sup>。限制性内切酶用于切割质粒或基因片段产生粘性末端, 购自 Thermo Scientific (Wilmington, DE, USA)。DNA 聚合酶用于扩增基因片段, DNA 连接酶用于连接酶切过的基因片段和质粒载体, 这两种酶都是购自 Takara (Otsu, Japan)。无缝克隆试剂盒用于连接含有同源片段的基因片段和质粒载体, 购自汉恒生物科技有限公司 (Nanjing, China)。质粒抽提试剂盒, PCR 产物纯化回收试剂盒和凝胶回收试剂盒都是购自上海捷瑞生物科技有限公司 (Shanghai, China)。其他试剂从本地供应商处购买。

表 2.1 本章节使用到的菌株

Table 2.1 Strains used in this chapter

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> BL21	Genes <i>xylAB</i> _BL21 and <i>araE</i> source	Lab stock
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	Genes <i>xylAB</i> _2911 source	DSMZ*
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 (CGMCC 7542)	Biodetoxification fungus	[207]
<i>C. glutamicum</i> S9114	Parental for glutamic acid fermentation	SIIM $\ddagger$
<i>C. glutamicum</i> -pPH36- <i>xylAB</i> _BL21	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPH36- <i>xylAB</i> _BL21	This work
<i>C. glutamicum</i> -pPH36- <i>xylAB</i> _2911	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPH36- <i>xylAB</i> _2911	This work
<i>C. glutamicum</i> -pPsod- <i>xylAB</i> _BL21	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPsod- <i>xylAB</i> _BL21	This work
<i>C. glutamicum</i> -pPsod- <i>xylAB</i> _2911	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPsod- <i>xylAB</i> _2911	This work
<i>C. glutamicum</i> -pPeftu- <i>xylAB</i> _BL21	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPeftu- <i>xylAB</i> _BL21	This work
<i>C. glutamicum</i> -pPeftu- <i>xylAB</i> _2911	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPeftu- <i>xylAB</i> _2911	This work
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> (GJ01)	<i>LdhA</i> knockout and integration of the expression cassette <i>Peftu_xylAB</i> _BL21 in <i>C. glutamicum</i> S9114	This work
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110 (GJ02)	C-terminal truncation of MscCG in <i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110-RBS (GJ03)	RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>odhA</i> in <i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110	This work
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110-RBS- $\Delta$ <i>ack</i> :: <i>araE</i> (GJ04)	<i>Ack</i> knockout and the integration of the expression cassette PH36_ <i>araE</i> in <i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110-RBS	This work
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ C110-RBS0.1	C-terminal truncation of MscCG and RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>odhA</i> in <i>C. glutamicum</i> S9114	[208]

DSMZ\* 德国微生物菌种保藏中心

SIIM $\ddagger$  上海工业微生物研究所

表 2.2 本章节使用到的质粒

Table 2.2 Plasmids used in this chapter

Plasmids	Characteristics	Sources
pTRCmob	Expression vector for <i>C. glutamicum</i> , TRC promoter, kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[209]
pK18mobsacB	Mobilizable vector for selection of double crossover in <i>C. glutamicum</i> , kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[209]
pPH36- <i>xylAB</i> _BL21	Vector for expression of <i>xylAB</i> _BL21 by PH36 promoter	This work
pPH36- <i>xylAB</i> _2911	Vector for expression of <i>xylAB</i> _2911 by PH36 promoter	This work
pPsod- <i>xylAB</i> _BL21	Vector for expression of <i>xylAB</i> _BL21 by Psod promoter	This work
pPsod- <i>xylAB</i> _2911	Vector for expression of <i>xylAB</i> _2911 by Psod promoter	This work
pPeftu- <i>xylAB</i> _BL21	Vector for expression of <i>xylAB</i> _BL21 by Peftu promoter	This work
pPeftu- <i>xylAB</i> _2911	Vector for expression of <i>xylAB</i> _2911 by Peftu promoter	This work
pK18- $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i>	Vector for replacement of <i>ldhA</i> by integrating the expression cassette <i>Peftu_xylAB</i> _BL21 into the genome of <i>C. glutamicum</i> S9114	This work
pK18- $\Delta$ C110	Vector for truncation of C-terminal of MscCG in the genome of <i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i>	[208]
pK18- <i>odhA</i> RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>odhA</i> in the genome of <i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110	[208]
pK18- $\Delta$ <i>ack</i> :: <i>araE</i>	Vector for replacement of <i>ack</i> by integrating the expression cassette PH36_ <i>araE</i> into the genome of <i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ C110-RBS	This work

表 2.3 本章节使用到的引物

Table 2.3 Primers used in this chapter

Primers	sequences (5'-3')
pTRCmob-F	accatggaattcgagctcgggtac
pTRCmob-R	atgataagctgtcaaacagatcaattcg
PH36-F	ttgacagcttatcatcaaaagctgggtacctctatctggt
PH36 ( <i>xylAB</i> _2911)-R	ttagcgaatcaataatgacatggatcccatgctactccta
<i>xylAB</i> _2911 (PH36)-F	taggagtagcatgggatccatgtcattatgacgcaaa
<i>xylAB</i> _2911-R	ctcgaattccatgggttacacatttcacgccggaattcat
PH36 ( <i>xylAB</i> _BL21)-R	ctgggtcaaaataggcttgcattggatcccatgctactccta
<i>xylAB</i> _BL21 (PH36)-F	taggagtagcatgggatccatgcaagcctatgaccag
<i>xylAB</i> _BL21-R	ctcgaattccatgggttacgccattaatggcagaagtgc
<i>Psod</i> -F	ttgacagcttatcatagcggtaaccatcacggg
<i>Psod</i> ( <i>xylAB</i> _2911)-R	tgcgatcaataatgacatgggtaaaaatcctttcgt
<i>xylAB</i> _2911 ( <i>Psod</i> )-F	acgaaaggatttttaccatgtcattatgacgca
<i>Psod</i> ( <i>xylAB</i> _BL21)-R	ggtcaaaataggcttgcattgggtaaaaatccttt
<i>xylAB</i> _BL21 ( <i>Psod</i> )-F	aaaggatttttaccatgcaagcctatgacc
<i>Peftu</i> -F	ttgacagcttatcatcgaagcaattgctttcgcag
<i>Peftu</i> ( <i>xylAB</i> _2911)-R	tgcgatcaataatgacattgtatgtcctcctggact
<i>xylAB</i> _2911 ( <i>Peftu</i> )-F	agtccaggaggacatacaatgtcattatgacgca
<i>Peftu</i> ( <i>xylAB</i> _BL21)-R	ggtcaaaataggcttgcattgtatgtcctcctggactc
<i>xylAB</i> _BL21 ( <i>Peftu</i> )-F	gaagtccaggaggacatacaatgcaagcctatgacc
PH36 ( <i>araE</i> )-R	ccgtattgatagtaaccatggatccatgctactcct
<i>araE</i> -F	aggagtagcatgggatccatggttactatcaatacgg
<i>araE</i> -R	ggtaccgagctcgaattccatggttcagacgccgataattct
<i>ldhA</i> -up-F (EcoR I)	ccggaattcggaacaccatgcgattaaggt
<i>ldhA</i> -up-R	cgaaaagcaattgcttttcgttcgatcccacttct
<i>Peftu-xylAB</i> _BL21-F	aggaagtgggatcgaaacgaaaagcaattgcttttcg
<i>Peftu-xylAB</i> _BL21-R	gtcgccaactaggcgccaagatttacgccattaatggc

---

<i>ldhA</i> -down-F	gccattaatggcgtaaatctttggcgcctagttggcgac
<i>ldhA</i> -down-R (Hind III)	cccaagcttgctctgggacgttgatgacgctg
<i>ack</i> -up-F (Xba I)	ctagtctagaatggctgccaccagctgcttgatca
<i>ack</i> -up-R	atagaggtaccagctttttagctgctgctcct
<i>PH36-araE</i> -F	aggaggacgcagctacaaaagctgggtacctctat
<i>PH36-araE</i> -R	ccaagaggtctagggcctcagacgccgatatttctcaac
<i>ack</i> -down-F	gttgagaaatatcggcgtctgagggccctagacctcttgg
<i>ack</i> -down-R (Sph I)	acatgcatgcttgctctggcaaccaacccc

---

### 2.2.3 质粒构建

本章所构建的质粒列在表 2.2 中，所用到的引物列在表 2.3 中。

表达质粒的作用是通过质粒在菌株内进行特定基因的表达，本章所用的表达质粒的构建方法如下。首先介绍本章所用到的三个启动子的来源：*PH36* 启动子是通过上海捷瑞生物科技公司（Shanghai, China）合成的；*Psod* 启动子和 *Peftu* 启动子是谷氨酸棒状杆菌内源性启动子，以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，根据 *sod*（CGS9114\_RS12000）基因前 288 个碱基长度的序列和 *eftu*（CGS9114\_RS01665）基因前 335 个碱基长度的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增获得。其次本章所用到的两个 *xylAB* 基因簇：*xylAB\_2911* 是以 *P. acidilactici* DSM 20284 的基因组为模板，根据 *xylAB* 基因的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增获得；*xylAB\_BL21* 是以 *E.coli* BL21 的基因组为模板，根据 *xylAB* 基因的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增获得。然后通过重叠延伸 PCR（Overlap PCR）的方法，将三个启动子（*PH36*，*Psod* 和 *Peftu*）分别与两个 *xylAB*（*xylAB\_2911*，*xylAB\_BL21*）基因簇相融合，构建了 6 个表达盒（*PH36-xylAB\_2911*，*PH36-xylAB\_BL21*，*Psod-xylAB\_2911*，*Psod-xylAB\_BL21*，*Peftu-xylAB\_2911*，*Peftu-xylAB\_BL21*）。接着，通过无缝克隆的方式，将这 6 个表达盒构建到 pTRCmob 质粒上，同时替换掉原质粒上的 TRC 启动子，这样就构建了 6 个表达质粒（p*PH36-xylAB\_2911*，p*PH36-xylAB\_BL21*，p*Psod-xylAB\_2911*，p*Psod-xylAB\_BL21*，p*Peftu-xylAB\_2911*，p*Peftu-xylAB\_BL21*）。

敲除整合质粒的作用是对菌株自身基因组上的基因进行修饰、敲除或插入新的外源基因，本章所用的敲除整合质粒的构建方法如下。对于 pK18- $\Delta$ *ldhA*::*xylAB* 质粒，其作用是在 *C. glutamicum* S9114 的基因组上插入 *Peftu-xylAB\_BL21* 表达盒，同时替换掉基因组上编码乳酸脱氢酶的基因 *ldhA*。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，根据 *ldhA* 基因上游 1000 个碱基长度的序列和下游 1000 个碱基长度的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段（*ldhA-up*）和下游片段（*ldhA-down*）；再以 p*Peftu-xylAB\_BL21* 表达质粒为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *Peftu-xylAB\_BL21* 片段；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，按照 *ldhA-up*，*Peftu-xylAB\_BL21* 和 *ldhA-down* 的顺序将这三个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta$ *ldhA*::*xylAB*；用 EcoRI 和 HindIII 内切酶对融合片段  $\Delta$ *ldhA*::*xylAB* 和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18- $\Delta$ *ldhA*::*xylAB* 整合质粒。对于 pK18- $\Delta$ *ack*::*araE* 质粒，其作用是在 *C. glutamicum* S9114 的基因组上插入 *PH36-araE* 表达盒，同时替换掉基因组上编码乙酸脱氢酶的基因 *ack*。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，根据 *ack* 基因上游 1000 个碱基长度的序列和下游 1000 个碱基长度的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段（*ack-up*）和下游片段（*ack-down*）；再以 p*PH36-araE* 表达质粒为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *PH36-araE* 片段；再通过重叠延伸 PCR 的方式，按照 *ack-up*，*PH36-araE* 和 *ack-down* 的顺序将这三个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta$ *ack*::*araE*；用 XbaI 和 SphI 内切酶对融合片段  $\Delta$ *ack*::*araE* 和 pK18mobsacB 质粒

进行处理，再通过连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18- $\Delta$ ack::araE 整合质粒。以上所有构建的质粒都是在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  内构建，并经过测序确认正确后才能进行下一步的使用。

#### 2.2.4 重组菌株构建

本章所构建的重组菌株列在表 2.1 中。

谷氨酸棒状杆菌的重组菌株构建主要分为三步，分别是感受态制作，电转化和筛选验证。下面将针对这三个部分做详细介绍。

##### (1) 谷氨酸棒状杆菌感受态制作

①从-80℃冰箱中取出保有谷氨酸棒状杆菌的保种管，用接种环蘸取少许菌液在 LB 平板上划线，划线后的平板置于 30℃培养箱培养 2 天。

②从长好菌的平板上挑取谷氨酸棒状杆菌单菌落，接种于装有 5 mL LB 培养基的试管中，将试管置于 30℃摇床中过夜培养。

③将试管中培养好的菌体按照 1%的添加量加入含有 30 mL LBG 感受态培养基的 250 mL 摇瓶中，置于 30℃摇床中培养 6 小时。

④将培养好的菌体装入 50 mL 离心管中，并置于冰水中预冷 20 分钟。

⑤待预冷结束后，将含有菌体的离心管在 4℃，5000 rpm 的条件下离心 10 分钟，弃置上清液，在离心管中加入 30 mL 预冷的 10%甘油，吹打菌体使其均匀地悬浮于甘油中。

⑥重复第五步两次。最后一次弃置上清液后加入 1 mL 预冷的 10%甘油，并充分混匀菌体，将混匀好的菌体按照每管 100  $\mu$ L 的体积分装在 1.5 mL 离心管中，置于冰水中备用。

##### (2) 电转化

①取 20  $\mu$ L 需要转化的质粒加入上一步制备好的 100  $\mu$ L 谷氨酸棒状杆菌感受态细胞中，轻柔混匀，并置于冰水中 30 分钟。

②将混有质粒的感受态细胞加入干燥预冷后的电极杯中，擦干电击杯壁上水滴，置于电转化仪中，在电压为 2000 V，电阻为 200  $\Omega$  的条件下电击。

③从电击杯中取出电击完的感受态细胞，置于 1.5 mL 离心管中，并加入 800  $\mu$ L SOC 培养基，颠倒混匀。再将含有感受态的离心管置于 46℃水浴锅中热激 6 分钟，热激完成后，迅速将离心管置于冰水中 2 分钟。

④将含有感受态细胞的离心管放于 30℃摇床中孵育 2 小时，孵育完成后，将离心管在 5000 rpm 的条件下离心 2 分钟，去除大部分上清液，将剩下的菌体均匀涂布在 LK 平板上，将平板置于 30℃培养箱中培养 2 天。

##### (3) 筛选验证

①表达菌株筛选验证：用表达质粒上的通用引物作为验证引物，通过菌落 PCR 的方法验证出有正确条带的菌株即认为其是含有目标表达质粒的重组谷氨酸棒状杆菌。

②整合敲除菌株筛选验证

A. 一次重组验证：用质粒上的通用引物和目的基因在基因组上的引物作为一对验证引物，通过菌落 PCR 的方法验证出有正确条带的菌株即认为其是完成了一次同源重组的菌株。

B. 培养筛选：将验证成功的一次重组菌株接于含有 5 mL LB 培养基的试管中，过夜培养。再将培养好的菌体稀释到合适浓度后涂布在 LBS 平板上，将平板置于 30 °C 培养箱中培养 2 天。

C. 二次重组验证：以目的基因在基因组上的引物作为一对验证引物，将 LBS 平板上生长起来的菌株作为模板，通过菌落 PCR 的方法验证出有正确条带的菌株即认为其是完成了二次同源重组的菌株。

### 2.2.5 木质纤维素原料

小麦秸秆是 2018 年秋季，从中国河南省南阳县收集的。收集好的秸秆经过粉碎后，再通过直径为 10 毫米的筛网进行筛分，筛分后的秸秆再经过水洗除去泥土，石块和金属等杂质，在 105 °C 烘箱中烘干至恒重后保存在封闭的塑料袋中备用。根据 NREL 的两步酸解法测得小麦秸秆含有 34.6% 的纤维素和 25.1% 的半纤维素<sup>[210,211]</sup>。

### 2.2.6 生物炼制过程

小麦秸秆采用实验室之前研发的干酸法进行预处理<sup>[75]</sup>，具体过程如下：小麦秸秆固体（干基）和 5%（w/w）的稀硫酸溶液按照 2:1（w/w）的固液比，同时加入到 20 L 的反应釜中，反应釜内带有螺旋搅拌桨。最终的硫酸添加量为每 100 g 小麦秸秆（干基）添加 2.5 g 硫酸。小麦秸秆与硫酸在 175 °C，50 rpm 的条件下反应 5 分钟。预处理后的小麦秸秆的固含量大约为 50%（w/w）。值得一提的是在整个预处理过程中没有废水的产生。

预处理后的小麦秸秆用 20%（w/w）的 Ca(OH)<sub>2</sub> 溶液调节 pH 至 5.5，然后按照实验室之前研发的方法，利用脱毒菌株 *A. resiniae* ZN1 移除预处理过程中产生的各种抑制物<sup>[212]</sup>。具体过程如下：将准备好的 *A. resiniae* ZN1 种子按照 10%（w/w）的接种量，接种到预处理后的小麦秸秆中，将种子和物料充分混合后加入 15 L 的生物反应器中，在 28 °C，通气量为 1.0 vvm 的条件下脱毒 48 小时。脱完毒的物料再通过磨浆机磨碎以移除较长的纤维组分。

脱毒后的小麦秸秆需要在 5 L 的生物反应器中进行水解反应，其中纤维素酶的添加量为 4 毫克蛋白每克干物料，反应条件为 50 °C，pH 4.8，150 rpm，在此条件下反应 48 小时得到初步的糖化醪。将糖化醪进行离心分离以移除其中的固体组分，再通过灭菌和滤纸过滤就可以得到小麦秸秆水解液。得到的麦秆水解液的具体组分如下：116.1 g/L 葡萄糖，39.6 g/L 木糖，1.3 g/L 乙酸，0.04 g/L 糠醛和 0.01 g/L 5-羟甲基糠醛。

### 2.2.7 谷氨酸发酵

摇瓶发酵：从 -80 °C 冰箱中取出含有目标菌株的冻存管，在 LB 平板上进行划线，然后置于 30 °C 培养箱中培养 36 小时。从培养好的平板上挑取单菌落接种于含有 10 mL 预

培养培养基的 100 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 的摇床中培养 10 小时, 然后将 1.5 mL 的预培养菌液转入含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 的摇床中培养 8 小时。接着将 3 mL 种子液转入含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 的摇床中进行发酵。在发酵期间, 每 6 小时添加一定量的 20% 尿素来调节 pH 至 7.0。

生物反应器发酵: 在 3 L 发酵罐 (Biotech-3BG-4, Baoxing Co., China) 上进行批发酵, 种子液的培养方式与在摇瓶中的培养方式一致。在开始发酵前, 将额外添加了 10 g/L 硫酸铵, 1 g/L 磷酸二氢钾和 0.6 g/L 七水合硫酸镁的 800 mL 麦秆水解液加入到 3 L 的发酵罐中, 同时添加适量的消泡剂, 并开启搅拌, 控制转速为 600 rpm。通过加入 25% 的氨水将水解液的 pH 调至 7.0, 并将发酵罐的温度控制在 32 °C。然后将 80 mL 培养好的种子液加入至发酵罐中, 并通过发酵罐的自动控制系统将 pH 控制在 7.0, 在菌体生长期将溶氧控制在 10%, 在谷氨酸生产期, 将溶氧控制在 40%。

### 2.2.8 适应性进化

从 -80 °C 冰箱中取出含有目标菌株的冻存管, 在 LB 平板上进行划线, 然后置于 30 °C 培养箱中培养 36 小时。从培养好的平板上挑取单菌落接种于含有 10 mL 预培养培养基的 100 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 的摇床中培养 10 小时, 然后将 1.5 mL 的预培养菌液转入含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 的摇床中培养 8 小时。接着将 3 mL 种子液转入含有 30 mL 木糖培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 200 rpm 的摇床中进行培养。在培养期间, 每 6 小时添加一定量的 20% 尿素来调节 pH 至 7.0。在完成 48 小时的培养后, 从培养好的发酵液中取 3 mL 菌液接入到 30 mL 新鲜的木糖培养基中, 重复上轮的培养, 如此反复进行。

### 2.2.9 分析方法

本实验用装配有 HPX-87H 型色谱分析柱 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 来分析测定培养基中 D-葡萄糖、D-木糖、乙酸、糠醛和 HMF 的含量, 测定时柱温保持在 65 °C, 使用的流动相为 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min。用 SBA-90 生化分析仪 (Shandong Academy of Sciences, Shandong, China) 测定培养基中的谷氨酸浓度。用紫外分光光度计 (BIOMATE 3S; Thermo, Waltham, MA, USA) 测定细胞的生长量。

### 2.2.10 谷氨酸得率计算

基于消耗的葡萄糖和木糖和生成的谷氨酸的量可以计算谷氨酸的得率, 公式如下:

$$\text{谷氨酸得率} = \frac{[GLA] \times V - [GLA]_0 \times V_0}{[X+G]_0 \times V_0 - [X+G] \times V} \times 100\%$$

公式中 [GLA] 和 [GLA]<sub>0</sub> 分别代表发酵液中谷氨酸的终浓度和初始浓度, [X+G] 和 [X+G]<sub>0</sub> 分别代表发酵液中木糖和葡萄糖的终浓度和初始浓度, V 和 V<sub>0</sub> 分别代表发酵液的终体积和初始体积。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 谷氨酸棒状杆菌 S9114 木糖代谢能力考查

木质纤维素中不仅含有大量的以葡萄糖为单体聚合而成的纤维素,还有占总糖约 40% 的半纤维素,而木糖是组成半纤维素的最重要单糖。为了完全充分的利用木质纤维素,必须对木糖加以利用。*C. glutamicum* S9114 可以在木质纤维素体系中经过青霉素诱导生产谷氨酸,但是还未对其木糖利用能力进行测试,本研究设计了两组实验考察 *C. glutamicum* S9114 的木糖利用能力。第一组实验是在只含有木糖作为唯一碳源的生物素限制培养基中进行,在这种营养比较匮乏的环境中,排除其他营养物质的干扰,只研究木糖对于菌体生长发酵的影响。在此培养条件下,*C. glutamicum* S9114 的木糖利用、谷氨酸生产和菌体生长结果如图 2.1 (a, b) 所示。从结果可以看出,在以木糖为唯一碳源的生物素限制培养基中,木糖几乎没有被消耗,产物中也检测不到谷氨酸的生成,菌体没有生长,这说明在这种营养限制的条件下,*C. glutamicum* S9114 不能利用木糖进行生长和产物生产。

为了排除菌体生长受到影响从而限制其木糖利用的可能性,本研究又设计了第二组实验,在含有木糖和葡萄糖的富含生物素培养基中进行,在这种营养丰富的环境中,检测菌体能否利用木糖,结果如图 2.1 (c, d, e) 所示。从结果可以看出,*C. glutamicum* S9114 可以完全利用培养基中的葡萄糖,但是木糖完全没有消耗,同时培养基中的生物素含量较高,因此菌体虽然可以正常生长,但是无法分泌生产谷氨酸,在这个过程中还可以观察到副产物乳酸的大量生成。这说明菌体在生长不受限的条件下也无法对木糖进行利用。通过这两组实验确定了 *C. glutamicum* S9114 无法利用木糖,并且在发酵过程中会伴有副产物乳酸的大量生成。

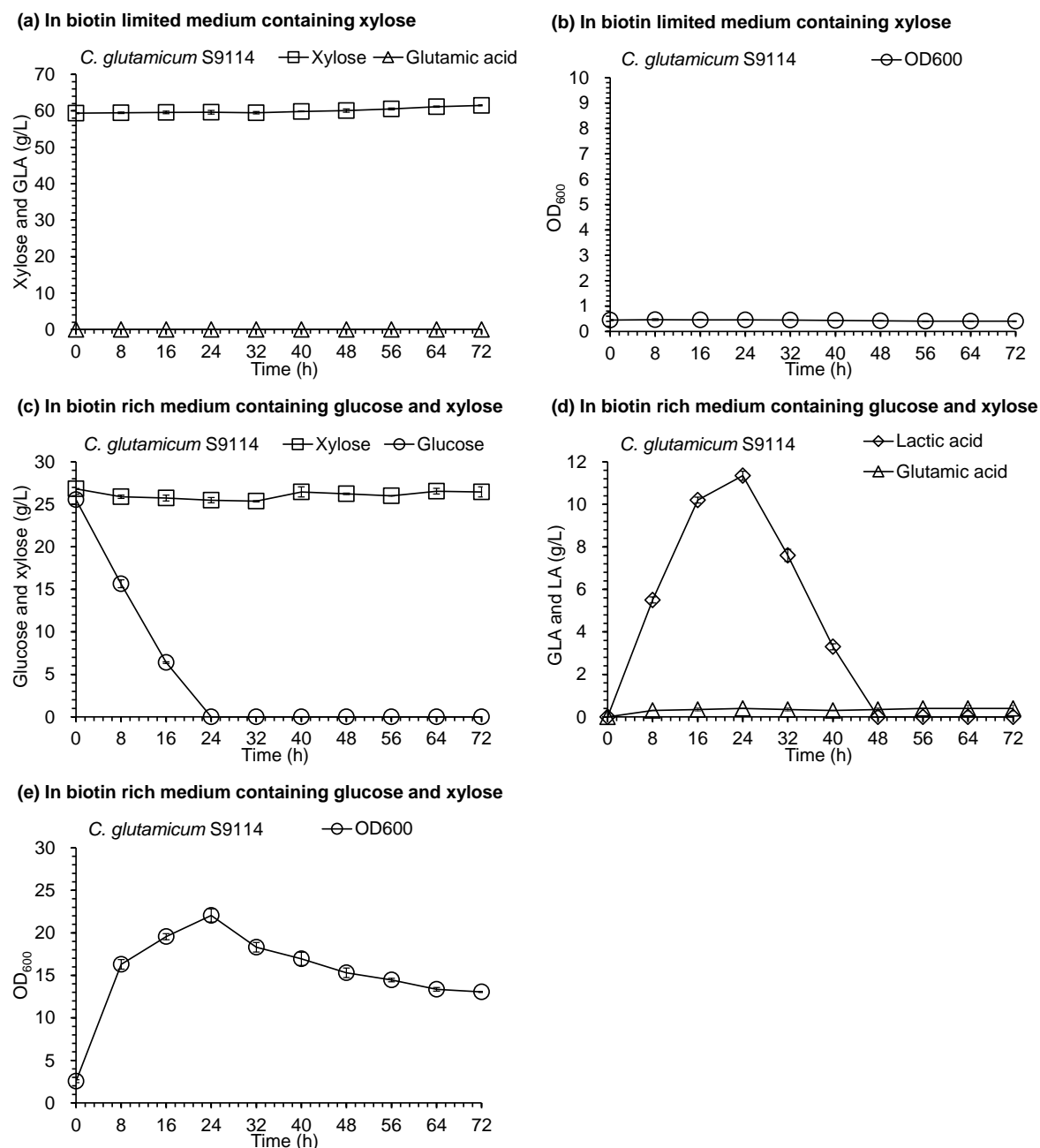


图 2.1 出发菌株 *C. glutamicum* S9114 的木糖代谢能力评估

Fig. 2.1 Evaluation xylose utilization of *C. glutamicum* S9114 in different biotin environment: (a,b) in biotin limited medium containing xylose as the sole carbon source; (c,d,e) in biotin rich medium containing glucose and xylose

注：限制生物素培养基和富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm。

### 2.3.2 谷氨酸棒状杆菌 S9114 的木糖代谢路径构建

本研究计划在 *C. glutamicum* S9114 中构建木糖异构酶途径。通过表达木糖异构酶 (*xyIA*) 将木糖转化为木酮糖，再经过木酮糖激酶 (*xyIB*) 催化形成 5-磷酸木酮糖，5-磷酸木酮糖经过磷酸戊糖途径生成 3-磷酸甘油醛，后者再通过糖酵解途径被细胞加以利用。木糖异构酶途径中，*xyLAB* 基因的来源和表达效率是影响木糖利用的关键因素，因此本

研究对 *xylAB* 基因的来源和表达基因所用的启动子进行了筛选。选择的两个 *xylAB* 基因，一个是大肠杆菌 BL21 中的木糖利用基因，命名为 *xylAB*\_BL21；另一个是来自于乳酸片球菌 DSM 20284 中的基因，命名为 *xylAB*\_2911。选择的三个启动子都是组成型启动子，一个是从人工合成启动子库中筛选出的在谷氨酸棒状杆菌中表达能力较强的 PH36 启动子；还有两个来自谷氨酸棒状杆菌自身的内源性启动子 *Psod* 和 *Peftu*。在 *C. glutamicum* S9114 中，分别用这三种启动子表达两种不同来源的 *xylAB* 基因，在只含有木糖作为唯一碳源的培养基中进行发酵，结果如表 2.4 所示。从不同基因的对比结果可以看出相较于乳酸片球菌来源的 *xylAB*\_2911，大肠杆菌来源的 *xylAB*\_BL21 更加适合谷氨酸棒状杆菌的木糖利用，这可能是因为乳酸片球菌 DSM 20284 的生长最适 pH 在 5.5 左右，偏酸性，因此 *xylAB*\_2911 编码的蛋白可能在谷氨酸棒状杆菌所处的中性 pH 环境中的酶活较低，而大肠杆菌中酶的活性在此 pH 下不受影响。从不同启动子的对比结果可以看出，*Peftu* 启动子的表达效果优于 *Psod* 和 PH36 启动子的表达效果。综上所述，在 *C. glutamicum* S9114 中，用 *Peftu* 启动子表达来自大肠杆菌的木糖利用基因 *xylAB*\_BL21 可以实现最高的木糖利用效率。

表 2.4 木糖利用基因与表达启动子筛选

Table 2.4 Screening promoters and xylose assimilation gene in *C. glutamicum* S9114

Promoters	Gene clusters	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Xylose consumed (g/L)
PH36	<i>xylAB</i> _BL21	7.6 ± 0.3	2.6 ± 0.1
	<i>xylAB</i> _2911	6.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0
<i>Psod</i>	<i>xylAB</i> _BL21	17.2 ± 0.9	15.5 ± 0.5
	<i>xylAB</i> _2911	8.4 ± 0.3	3.1 ± 0.1
<i>Peftu</i>	<i>xylAB</i> _BL21	31.3 ± 0.6	32.6 ± 0.7
	<i>xylAB</i> _2911	11.6 ± 0.4	6.1 ± 0.2

注：发酵使用的是富含生物素培养基，培养基中添加 40 g/L 木糖作为唯一碳源，并添加 25 μg/mL 的卡纳霉素。发酵在 250 mL 的摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，发酵时间为 48 小时。

为了使菌体获得稳定的木糖利用能力，本研究将 *Peftu\_xylAB*\_BL21 表达盒整合到了 *C. glutamicum* S9114 的基因组上，同时替换掉了原基因组上的乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA*，获得的重组菌株为 *C. glutamicum*- $\Delta$ *ldhA*::*xylAB*，命名为 *C. glutamicum* GJ01。将改造菌株与出发菌株 *C. glutamicum* S9114 培养在富含生物素的混合糖培养基中进行发酵，结果如图 2.2 所示。从结果可以看出，在糖利用方面，出发菌株不能利用木糖，因此葡萄糖消耗较快，而改造菌株 *C. glutamicum* GJ01 可以利用葡萄糖和木糖，但是存在一定的碳代谢阻遏现象，当葡萄糖利用完后，木糖才能得到较快的利用。在产物生成方面，由于是在富含生物素的培养基中进行发酵，因此出发菌株和改造菌株的谷氨酸分泌都收到了抑制，但是出发菌株会产生大量的乳酸，而改造菌株 *C. glutamicum* GJ01 敲除了乳酸脱氢酶的编码基因 *ldhA*，因此在发酵过程中几乎没有乳酸的产生。在细胞

生长方面可以看出，出发菌株利用完葡萄糖后，菌体量开始下降，而改造菌株在利用完葡萄糖后可以继续利用木糖，使得菌体量进一步提高。

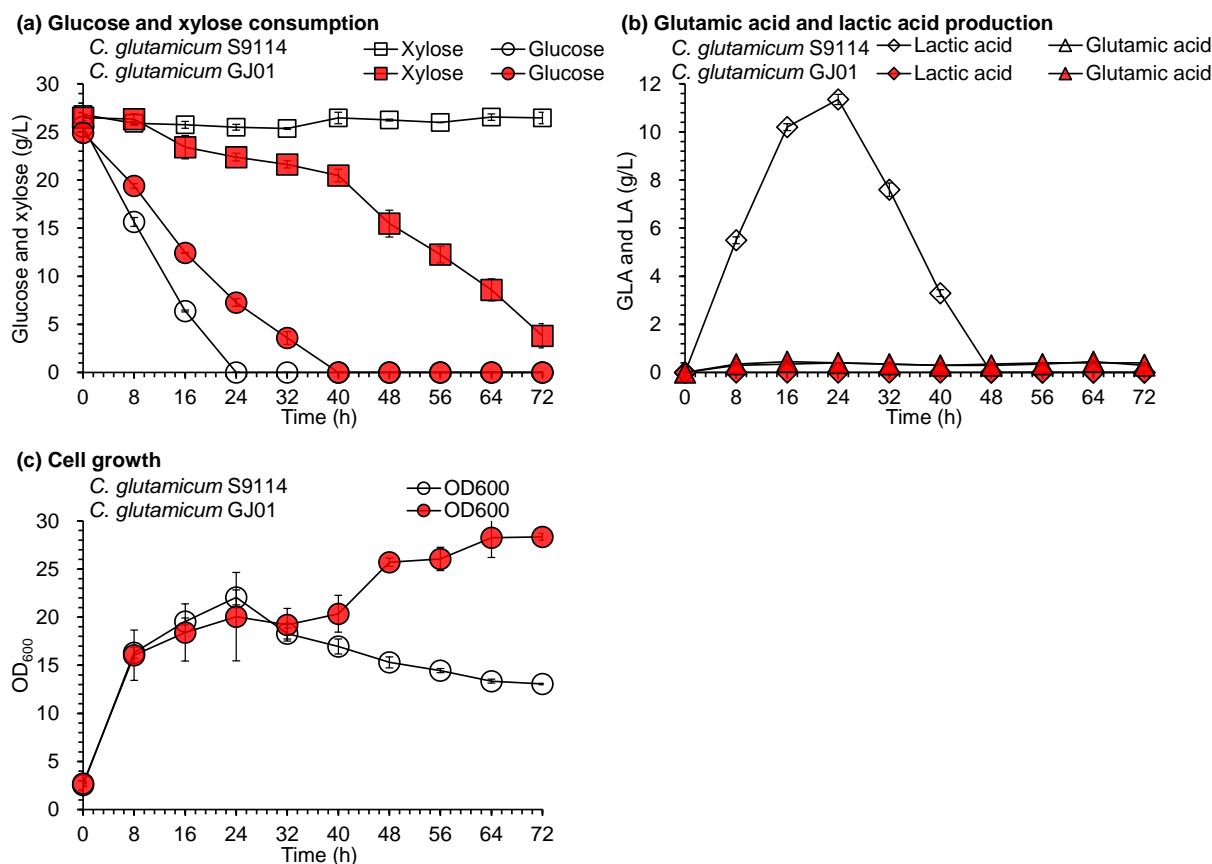


图 2.2 改造菌株 *C. glutamicum* GJ01 在富含生物素环境中的谷氨酸发酵

Fig. 2.2 Glutamic acid fermentation of *C. glutamicum* GJ01 in biotin rich environment: (a) glucose and xylose consumption; (b) glutamic acid and lactic acid production; (c) cell growth

注：*C. glutamicum* GJ01 即是在 *C. glutamicum* S9114 的基因组上整合 *P<sub>eftu-xyLAB</sub>\_BL21* 表达盒，同时替换掉基因组上的 *ldhA* 基因获得的重组菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ *ldhA::xyLAB*。富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm。

为了进一步考察改造菌株的木糖利用能力和谷氨酸生产情况，本研究将出发菌株 *C. glutamicum* S9114 与改造菌株 *C. glutamicum* GJ01 在只含有木糖的富含生物素培养基和限制生物素培养基中进行发酵，结果如图 2.3 所示。在富含生物素培养基中，出发菌株不能利用木糖因此无法积累谷氨酸，而改造菌株在 72 小时内可以利用 47.0 g/L 的木糖，但是高生物素环境限制了谷氨酸的分泌，因此改造菌株也几乎没有谷氨酸生成。在限制生物素培养基中，出发菌株同样不能消耗木糖生产谷氨酸，但是改造菌株可以消耗 38.4 g/L 的木糖，生产 23.5 g/L 的谷氨酸。说明改造菌株 *C. glutamicum* GJ01 具备以木糖为唯一碳源生产谷氨酸的能力。

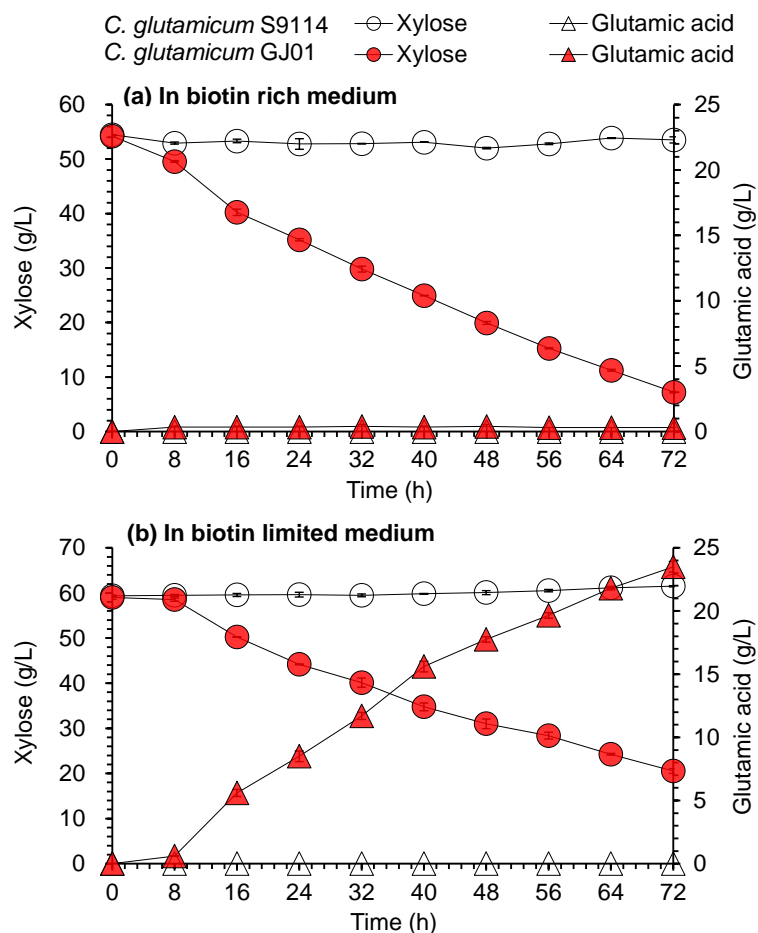


图 2.3 改造菌株 *C. glutamicum* GJ01 在单一木糖培养基中的谷氨酸发酵

Fig. 2.3 Glutamic acid fermentation of *C. glutamicum* GJ01 in culture medium containing xylose as the sole carbon source: (a) in biotin rich medium; (b) in biotin limited medium

注：*C. glutamicum* GJ01 即是在 *C. glutamicum* S9114 的基因组上整合 *P<sub>eftu-xy</sub>LAB<sub>BL21</sub>* 表达盒，同时替换掉基因组上的 *ldhA* 基因获得的重组菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ *ldhA::xylAB*。限制生物素培养基和富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm。

### 2.3.3 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌促进谷氨酸分泌生产

上一节已经构建了一个可以利用木糖的菌株 *C. glutamicum* GJ01，但是木质纤维素中含有大量的生物素，而这些生物素会降低细胞膜的通透性，从而抑制谷氨酸的分泌。因此本研究还需解决谷氨酸棒状杆菌在高生物素环境中无法分泌生产谷氨酸的问题。本小节在 *C. glutamicum* GJ01 的基因组上，敲除了谷氨酸分泌通道蛋白编码基因 *MscCG* 羧基端的 330 个碱基，得到改造菌株 *C. glutamicum*- $\Delta$ *ldhA::xylAB*- $\Delta$ C110，命名为 *C. glutamicum* GJ02。将 *C. glutamicum* GJ02 培养在含有葡萄糖或者木糖的富含生物素培养基中，检测谷氨酸生产情况，如图 2.4 所示。从结果可以看出，在葡萄糖培养基中，改造菌株可以积累 2.9 g/L 的谷氨酸，而在木糖培养基中，积累了 7.5 g/L 的谷氨酸。这些结果表明对谷氨酸分泌通道蛋白 *MscCG* 羧基端的 110 个氨基酸进行敲除，可以使得谷氨酸棒状杆菌在富含生物素的环境中分泌生产谷氨酸，但是谷氨酸的产量较低，说明还

需通过进一步的代谢工程改造使代谢流更多地导向谷氨酸的合成。

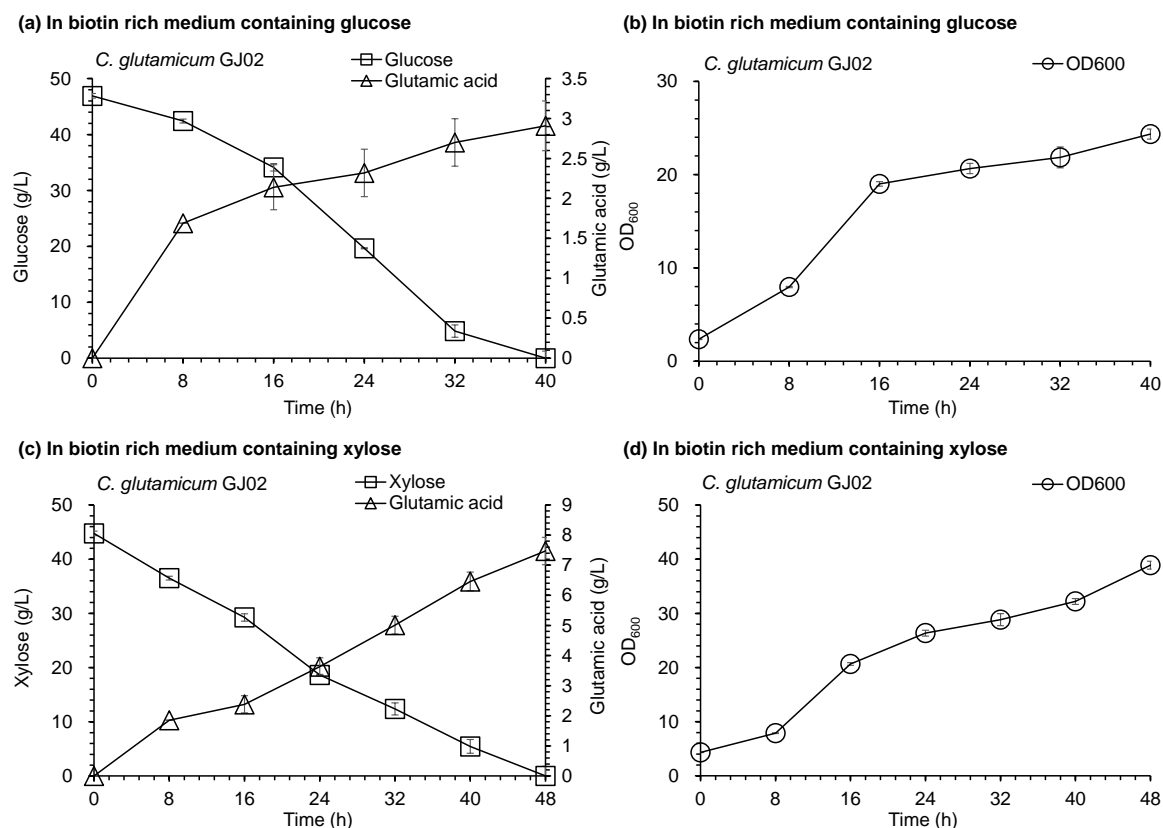


图 2.4 改造菌株 *C. glutamicum* GJ02 在富含生物素环境中的谷氨酸发酵

Fig. 2.4 Glutamic acid fermentation of *C. glutamicum* GJ01 in rich biotin environment: (a, b) in biotin rich medium containing glucose; (c, d) in biotin limited medium containing xylose

注：*C. glutamicum* GJ02 即是在 *C. glutamicum* GJ01 的基因组上截取谷氨酸分泌蛋白的编码基因 *MscCG* 碳端的 330 个碱基，获得的重组菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ *ldhA::xylAB*- $\Delta$ C110。富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm。

谷氨酸合成的直接前体是  $\alpha$ -酮戊二酸，但是在谷氨酸棒状杆菌中， $\alpha$ -酮戊二酸有两条主要的代谢途径，一是在谷氨酸脱氢酶的作用下生成谷氨酸，二是在  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系的作用下生成琥珀酰辅酶 A，参与 TCA 循环。因此，为了使  $\alpha$ -酮戊二酸更多地导向谷氨酸的合成，本研究计划削弱  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系的表达。具体的方法是在 *C. glutamicum* GJ02 的基因组上将  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系 E1 亚基的编码基因 *odhA* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS0.1 序列，获得的重组菌株为 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ *ldhA::xylAB*- $\Delta$ C110-RBS0.1，命名为 *C. glutamicum* GJ03。将改造菌株 *C. glutamicum* GJ03 置于富含生物素的单一木糖培养基中进行培养，以 *C. glutamicum* GJ02 作为对照，结果如图 2.5 所示。从发酵结果可以看出，弱化了  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系的表达后，菌体的木糖消耗速率明显降低，从原先的 0.9 g/L/h 降低至 0.5 g/L/h，但是谷氨酸的得率有了大幅提高，从原先的 16.7%提高至 59.1%。这些结果表明，弱化  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系的表达确实有助于谷氨酸产量的提升，但也会对糖利用速

率造成影响。

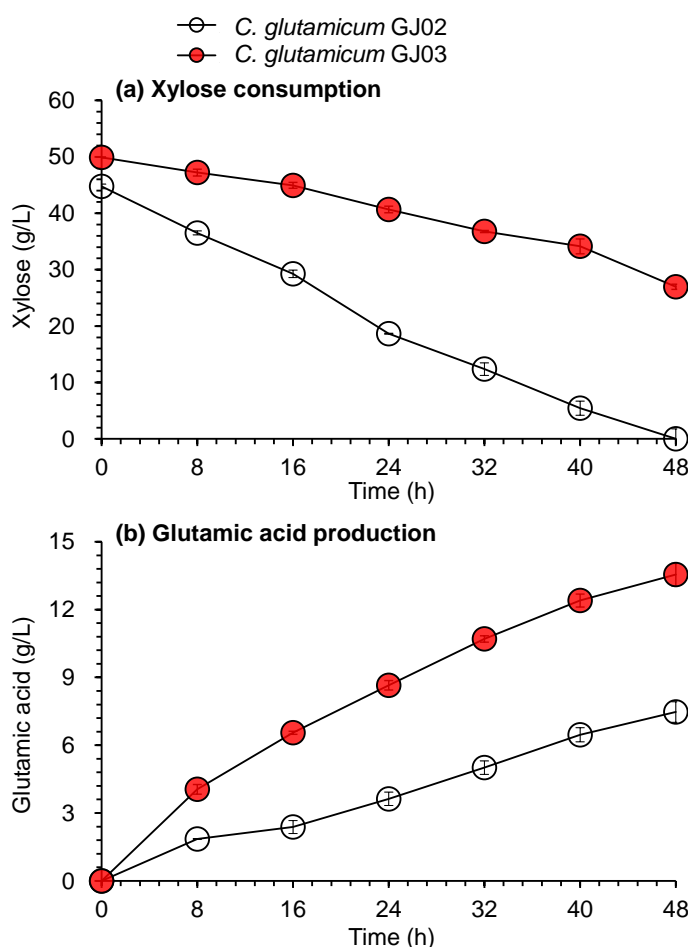


图 2.5 *C. glutamicum* GJ02 和 *C. glutamicum* GJ03 在富含生物素环境中的谷氨酸发酵对比

Fig. 2.5 Glutamic acid fermentation comparison of the *C. glutamicum* GJ02 and the *C. glutamicum* GJ03 in rich biotin environment: (a) xylose consumption; (b) glutamic acid production

注：*C. glutamicum* GJ03 即是在 *C. glutamicum* GJ02 的基因组上替换了  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 E1 亚基的编码基因 *odhA* 的原始 RBS 序列为 0.1 转录起始强度的 RBS0.1 序列，获得的重组菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ *ldhA*::*xyLAB*- $\Delta$ C110-RBS0.1。富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm。

为了进一步考察改造菌株 *C. glutamicum* GJ03 在糖耗和谷氨酸生产方面的性能，本研究将 *C. glutamicum* GJ03 置于富含生物素的混糖培养基中进行培养，同时以不能利用木糖的菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ C110-RBS0.1 作为对照菌株，结果如图 2.6 所示。从发酵结果可以看出，改造菌株 *C. glutamicum* GJ03 与对照菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ C110-RBS0.1 的葡萄糖消耗速率没有很大差别，但是对照菌株不能利用木糖，只生产了 7.6 g/L 的谷氨酸，而改造菌株可以额外利用 19.4 g/L 的木糖，生产 18.3 g/L 的谷氨酸。这个实验说明，改造菌株 *C. glutamicum* GJ03 在高生物素环境中的葡萄糖利用速率和糖酸转化率都已与生物素限制环境中的发酵水平相当，唯一存在的问题是木糖的利用速率较为缓慢。

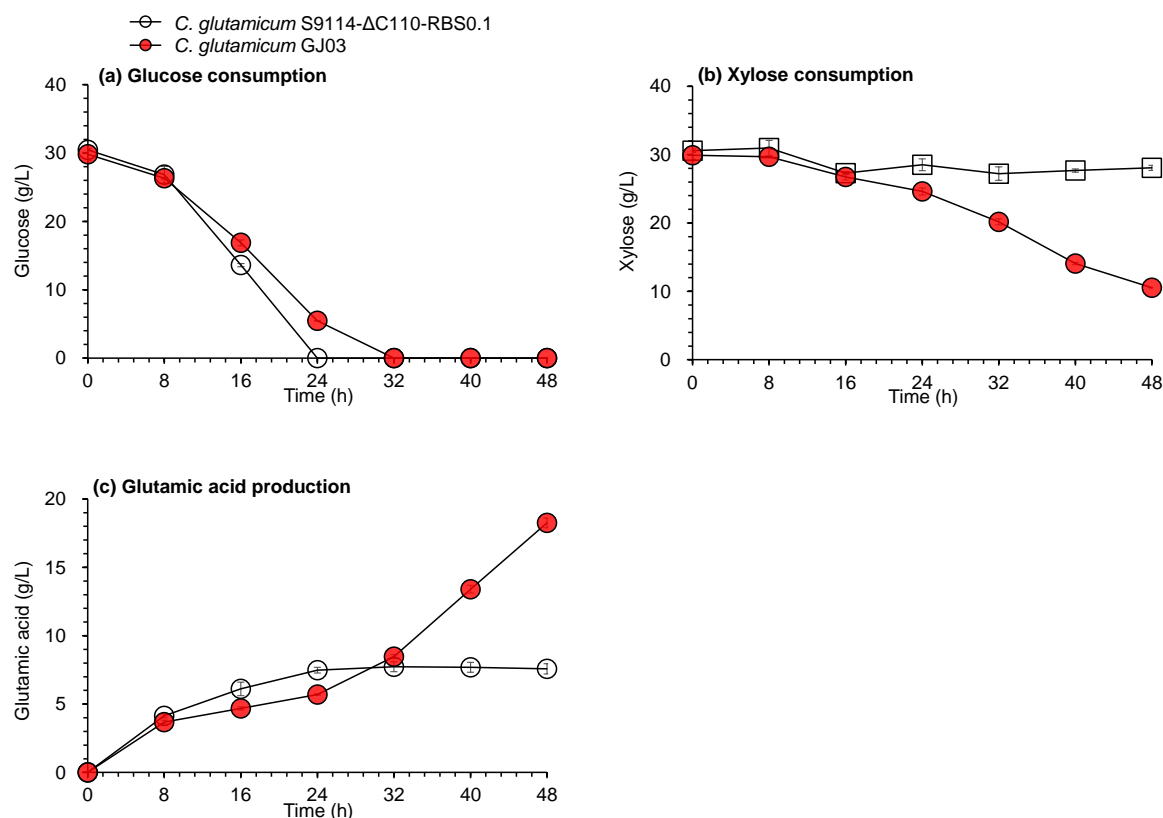


图 2.6 *C. glutamicum* GJ03 和 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ C110-RBS0.1 在富含生物素环境中的谷氨酸发酵对比

Fig. 2.6 Glutamic acid fermentation comparison of the *C. glutamicum* GJ03 and *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ C110-RBS0.1 in rich biotin environment: (a) glucose consumption; (b) xylose consumption; (c) glutamic acid production

注: *C. glutamicum* GJ03 即是在 *C. glutamicum* GJ02 的基因组上替换了  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的编码基因 *odhA* 的原始 RBS 序列为转录起始强度 0.1 的 RBS0.1 序列, 获得的重组菌株 *C. glutamicum* S9114- $\Delta$ *ldhA*::*xyLAB*- $\Delta$ C110-RBS0.1。富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示, 发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 培养条件为 30 °C, 200 rpm。

### 2.3.4 提高重组谷氨酸棒状杆菌的木糖利用速率

适应性进化的方法经常被用于提高菌株对于木质纤维素体系中存在的相关抑制物的耐受性, 也常被用于提高菌体对于非葡萄糖碳源的利用能力。因此本研究首先计划采用适应性进化的方法提高 *C. glutamicum* GJ03 的木糖利用能力。具体的步骤是将 *C. glutamicum* GJ03 培养在只含有木糖的培养基中, 培养 48 小时后再转接到新鲜的培养基中, 这样逐步提高菌体对于木糖的适应性, 记录每一代的木糖剩余, 谷氨酸生成和菌体生长, 结果如图 2.7 所示。从结果可以看出, 随着转接次数的增加, 剩余木糖越来越少, 说明木糖的消耗明显增加, 但是谷氨酸的积累却随之显著减少, 细胞生长显著提高, 说明多消耗的木糖并没有转化为谷氨酸, 而是被用于合成菌体。这个结果表明适应性进化的方法并不适合于提高 *C. glutamicum* GJ03 的木糖利用速率, 因为在适应性进化的过程中, 只有迫使菌体利用木糖的压力, 并没有促进谷氨酸积累的压力, 因此在传代培养的

过程中，菌体对于木糖的利用能力逐渐提高，菌体的生长越来越好，但是菌体合成谷氨酸的能力也在逐步丢失，因此不得不采取其他的方法来提高 *C. glutamicum* GJ03 的木糖利用能力。

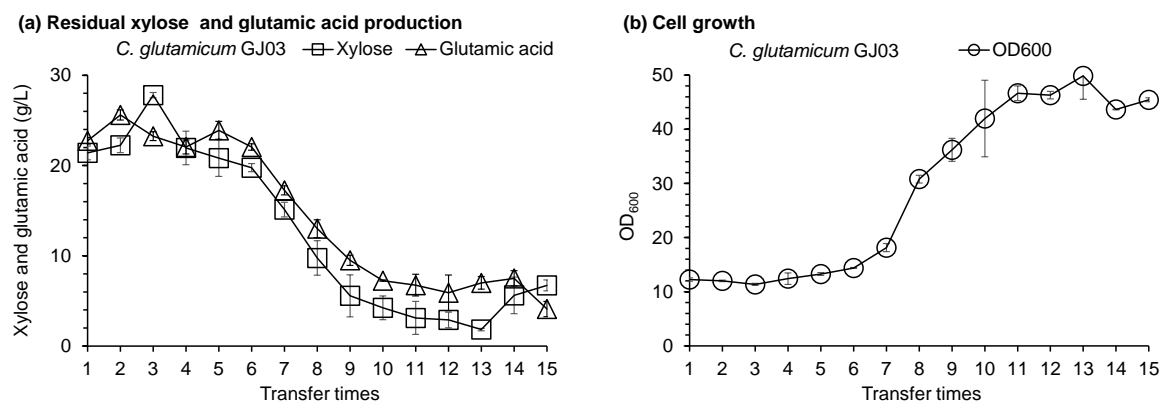


图 2.7 改造菌株 *C. glutamicum* GJ03 在木糖培养基中进行适应性进化

Fig. 2.7 Adaptive evolution of the *C. glutamicum* GJ03 in the medium containing 40 g/L of xylose as the sole carbon source: (a) residual xylose and glutamic acid production; (b) cell growth

注：富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用 25% 的氨水调节培养基的 pH 至 7。适应性进化每一代的培养时间为 48 小时，接种量为 10%。

木糖的转运速率也会对木糖的利用速率造成影响，因此本研究在 *C. glutamicum* GJ03 中分别表达了两种来自大肠杆菌 BL21 的戊糖转运蛋白，分别是 *xylE* (B21\_RS20535) 编码的木糖转运蛋白和 *araE* (B21\_RS14040) 编码的阿拉伯糖转运蛋白，结果发现，表达 *araE* 基因可以显著的提高 *C. glutamicum* GJ03 的木糖利用速率，而表达 *xylE* 基因则对木糖利用没有影响。进一步将 *araE* 基因整合到了 *C. glutamicum* GJ03 的基因组上，同时替换掉了原基因组上的乙酸激酶的编码基因 *ack*，得到的菌株为 *C. glutamicum-ΔldhA::xylAB-ΔC110-RBS-Δack::araE*，命名为 *C. glutamicum* GJ04。最后，将出发菌株 *C. glutamicum* S9114 以及后面所构建的一系列改造菌株在富含生物素的混糖环境中进行了一次发酵对比，分别对木糖利用，葡萄糖利用和谷氨酸生产三个方面进行了考察，结果如图 2.8 所示。从结果可以看出，经过一系列的代谢工程改造，在葡萄糖的利用不发生减弱的情况下，菌体从一开始无法利用木糖，提升到可以在 48 小时内将 38.8 g/L 的木糖完全利用，同时菌体从一开始在富含生物素的环境中无法分泌生产谷氨酸，提升到可以在高生物素的条件下不经诱导以较高的转化率生产谷氨酸，总的代谢工程改造策略图谱如图 2.9 所示。

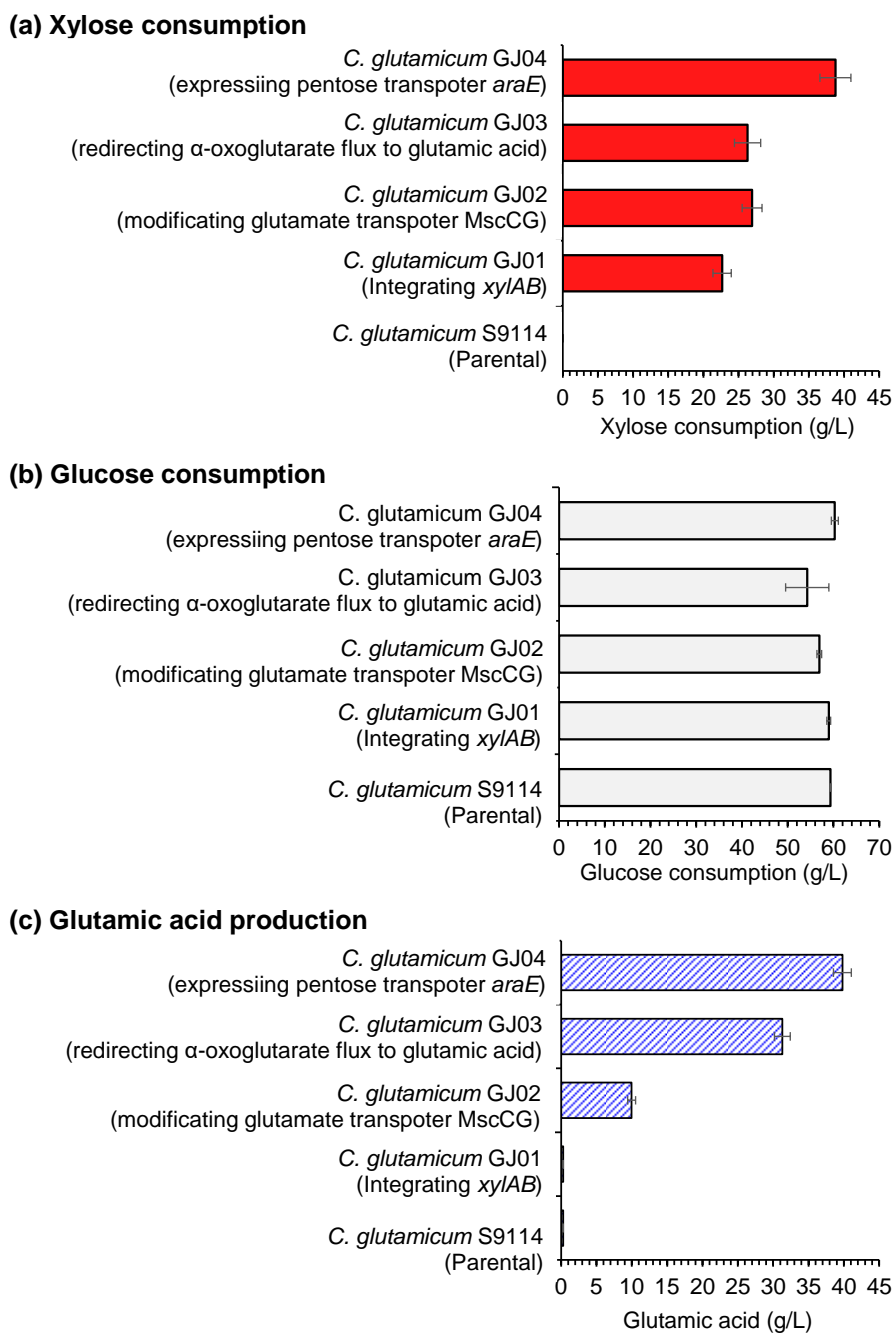


图 2.8 重组谷氨酸棒状杆菌在富含生物素环境中的谷氨酸发酵对比

Fig. 2.8 Glutamic acid fermentation comparison of the recombinant *C. glutamicum* in biotin rich environment: (a) xylose consumption, (b) glucose consumption, and (c) glutamic acid production

注：富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，培养基中含有 60 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖，发酵在 3 L 发酵罐中进行，培养条件为 32 °C，1.4 vvm，600 rpm，通过蠕动泵自动补加 25%的氨水维持发酵液的 pH 在 7.2。

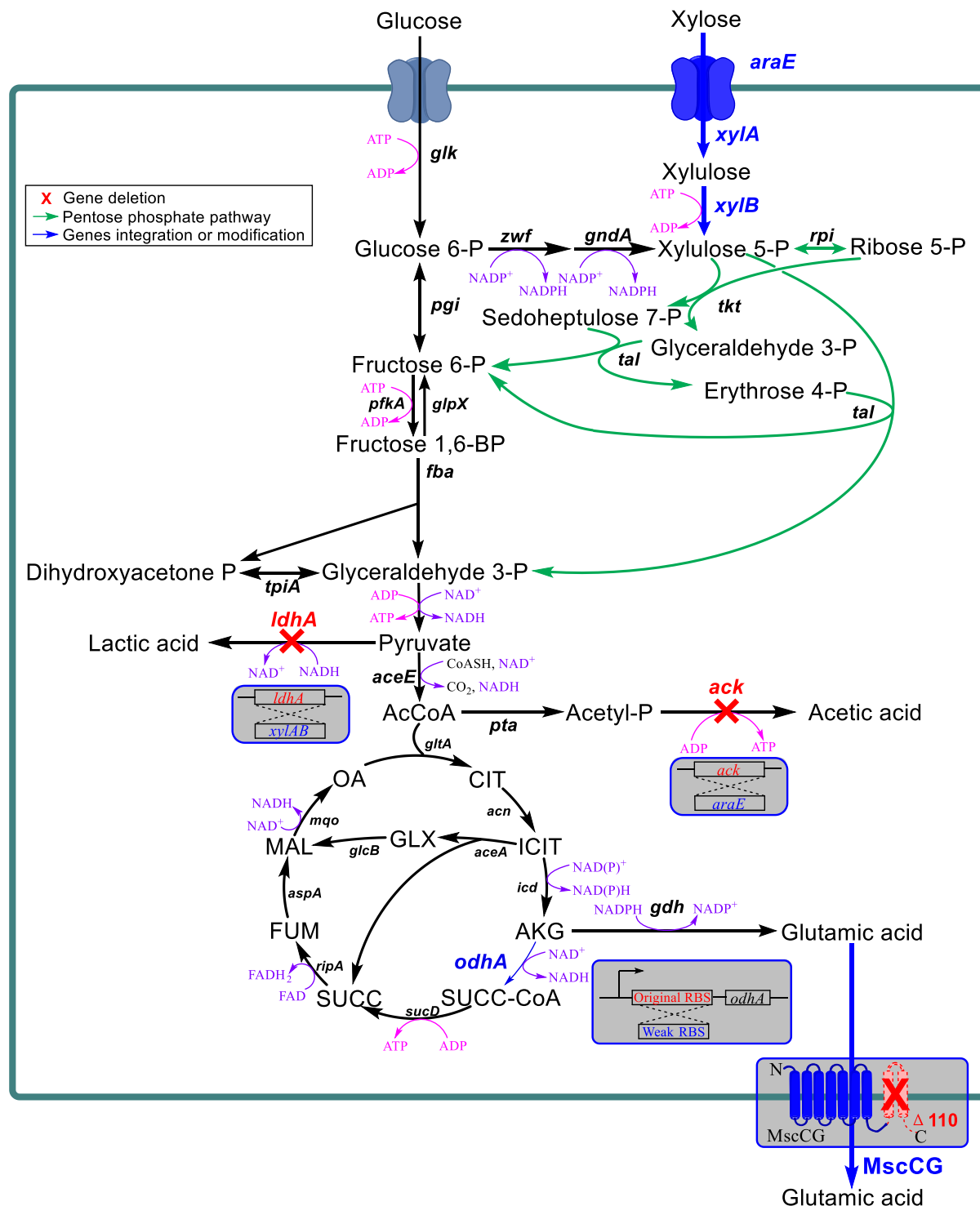


图 2.9 提高谷氨酸棒状杆菌在富含生物素环境中利用木糖和葡萄糖生产谷氨酸的改造策略  
 Fig. 2.9 Metabolic engineering strategies for *C. glutamicum* on xylose and glucose assimilation to glutamic acid

### 2.3.5 重组谷氨酸棒状杆菌利用富含生物素的混糖合成培养基生产谷氨酸

为了进一步考察改造菌株 *C. glutamicum* GJ04 利用木糖生产谷氨酸的能力，本研究将其与不能利用木糖的对照菌株 *C. glutamicum*- $\Delta$ C110-RBS0.1 置于富含生物素的混糖培养基中，模拟低糖浓度水解液进行上罐发酵测试，结果如图 2.10 所示。从结果可以

看出对照菌株虽然可以在富含生物素的环境中利用葡萄糖生产谷氨酸，但是并不能利用木糖，因此只有 25.8 g/L 的谷氨酸生成，而改造菌株 *C. glutamicum* GJ04 可以额外利用培养基中的木糖，最终生产 39.8 g/L 的谷氨酸。

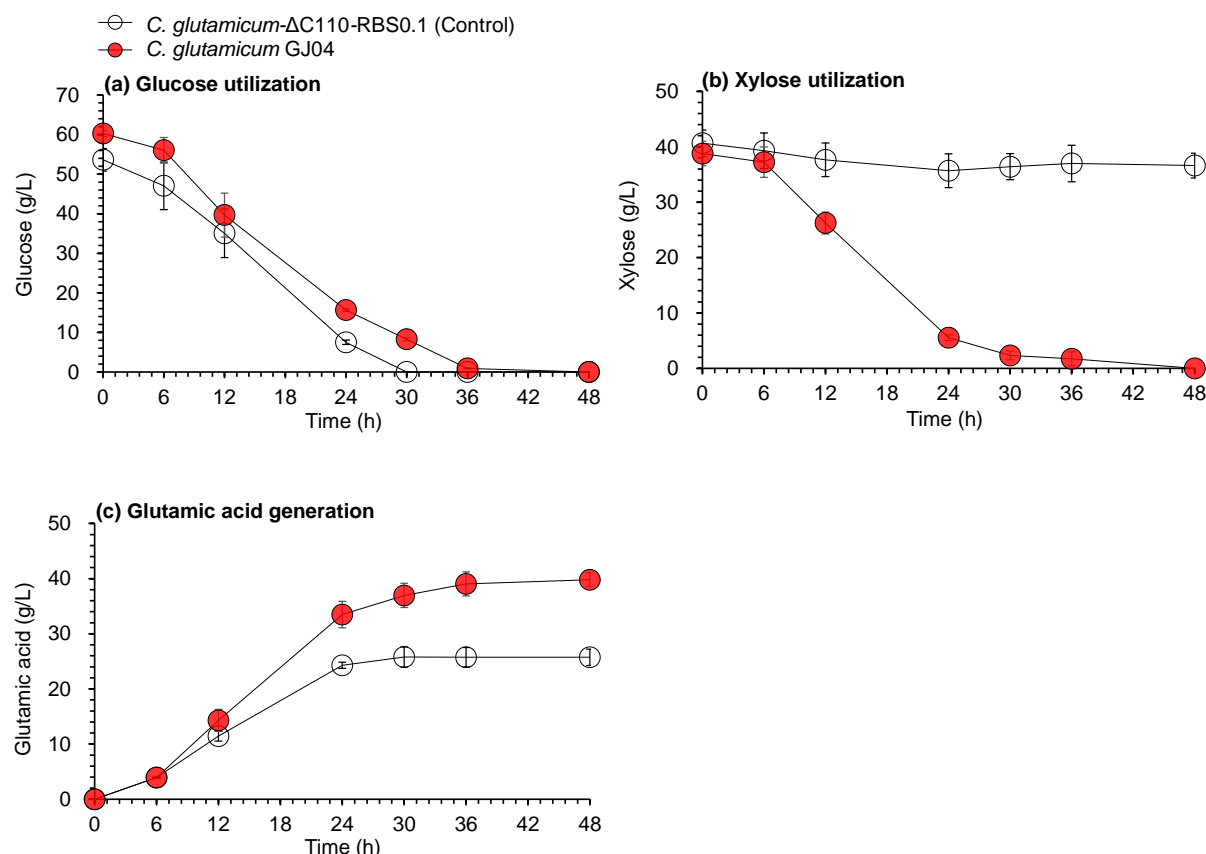


图 2.10 *C. glutamicum* GJ04 和 *C. glutamicum*- $\Delta$ C110-RBS0.1 在富含生物素环境中的谷氨酸发酵对比

Fig. 2.10 Glutamic acid fermentation comparison of *C. glutamicum* GJ04 and *C. glutamicum*- $\Delta$ C110-RBS0.1 in biotin rich environment: (a) glucose utilization; (b) xylose utilization; (c) glutamic acid generation

注：富含生物素培养基的配方如材料和方法内容所示，培养基中含有 60 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖，发酵在 3 L 发酵罐中进行，培养条件为 32 °C，1.4 vvm，600 rpm，通过蠕动泵自动补加 25% 的氨水维持发酵液的 pH 在 7.2。

### 3.3.6 重组谷氨酸棒状杆菌利用麦秆水解液生产谷氨酸

本研究的目的是利用木质纤维素中的葡萄糖和木糖作为碳源生产谷氨酸，虽然经过了一系列的代谢工程改造，获得了一株可以共利用葡萄糖和木糖在高生物素的环境中生产谷氨酸的工程菌株，但是还未在真实的木质纤维素体系中进行发酵测试。因此本小节的目标就是测试改造菌株 *C. glutamicum* GJ04 在真实木质纤维素水解液中的发酵性能。

首先将小麦秸秆经过粉碎后，与稀硫酸在 175 °C 的条件下进行混合，反应 5 分钟，这个时候木质纤维素中的半纤维素大部分都被降解，因此有大量木糖的产生。同

时在预处理过程中会产生各种酚类和醛类等抑制物，因此需要对预处理后的麦秆进行脱毒处理。传统的脱除抑制物的方式主要是水洗脱毒，但是此时木糖和抑制物混合在一起，所以这种方式会在脱除抑制物的同时造成大量木糖的损失。为了解决这一两难的处境，实验室挖掘了一株生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1，它可以对抑制物进行代谢，并且会在利用木糖之前优先利用抑制物，因此只需控制好脱毒时间，就可以在完整保留木糖的前提下，对抑制物进行较为彻底的脱除。脱毒后的小麦秸秆经过纤维素酶催化就可以获得麦秆水解液，经过测定，得到的麦秆水解液含有 116.1 g/L 葡萄糖，39.6 g/L 木糖，1.3 g/L 乙酸，0.04 g/L 糠醛和 0.01 g/L 5-羟甲基糠醛。

将改造菌株 *C. glutamicum* GJ04 与对照菌株 *C. glutamicum*- $\Delta$ C110-RBS0.1 置于麦秆水解液中进行发酵对比，结果如图 2.11 所示。从结果可以看出，对照菌株无法利用木糖，只能利用葡萄糖，最终生产 49.2 g/L 谷氨酸。而改造菌株 *C. glutamicum* GJ04 不仅可以利用葡萄糖，还可以额外利用水解液中的木糖，最终生产 61.7 g/L 谷氨酸，谷氨酸得率为 39%，与对照相比，纤维素谷氨酸的产量提高了 25.4%。

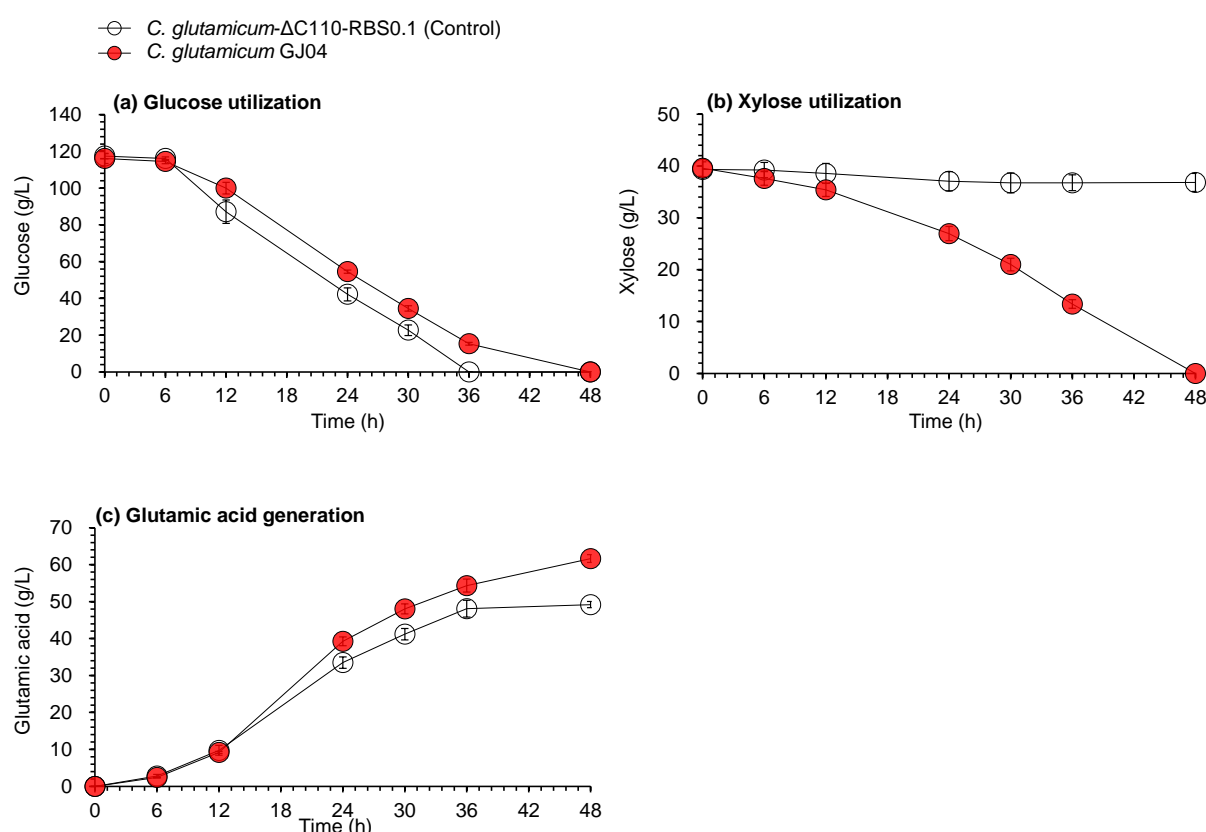


图 2.11 重组谷氨酸棒状杆菌利用麦秆水解液生产谷氨酸

Fig. 2.11 Glutamic acid fermentation of *C. glutamicum* GJ04 from wheat straw hydrolysate: (a) glucose utilization; (b) xylose utilization; (c) glutamic acid generation

注：麦秆水解液的成分如材料和方法内容所示，水解液中含有 116.1 g/L 葡萄糖和 39.6 g/L 木糖，发酵在 3 L 发酵罐中进行，培养条件为 32 °C，1.4 vvm，600 rpm，通过蠕动泵自动补加 25% 的氨水维持发酵液的 pH 在 7.2。

## 2.4 本章小结

木质纤维素生产聚合前体谷氨酸主要受到两方面的掣肘，一方面是谷氨酸工业生产菌株无法利用木糖，另一方面是木质纤维素中的高生物素抑制了谷氨酸的分泌。本章节从这两个核心问题出发，利用代谢工程改造的方法，在谷氨酸工业生产菌株 *C. glutamicum* S9114 中，构建了木糖利用途径，打通了谷氨酸分泌通道，得到了一株可以高效利用木质纤维素中的葡萄糖和木糖，不需诱导就可以分泌生产谷氨酸的工程菌株 *C. glutamicum* GJ04，并实现了木质纤维素谷氨酸的高指标生产。本章主要的研究结论如下：

(1) 谷氨酸工业生产菌株 *C. glutamicum* S9114 不能利用木糖进行生长和谷氨酸生产，并且发现 *C. glutamicum* S9114 在利用葡萄糖生产谷氨酸时会伴随有大量副产物乳酸的产生。

(2) 在 *C. glutamicum* S9114 中，用 *P<sub>eftu</sub>* 启动子表达来自大肠杆菌 BL21 的 *xyLAB* 基因可以使重组菌株有最好的木糖利用能力，并且在将其整合到谷氨酸棒状杆菌的基因组上后，木糖利用能力也没有显著降低。

(3) 对谷氨酸分泌通道蛋白 MscCG 碳端的 110 个氨基酸进行敲除后，使谷氨酸棒状杆菌在高生物素环境中也可以分泌生产谷氨酸，但是由于菌体生长过于旺盛，因此对 TCA 循环中的  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶进行了弱化，可以使得代谢流更多地导向谷氨酸的合成，提高谷氨酸的得率。

(4) 由于环境中缺乏迫使谷氨酸棒状杆菌积累谷氨酸的条件，因此适应性进化的方法并不适合于提高谷氨酸生产菌株的木糖利用能力，虽然在传代培养的过程中，菌体对于木糖的利用能力逐渐提高，菌体的生长越来越好，但是菌体合成谷氨酸的能力也会逐步丢失。而表达来自大肠杆菌的戊糖转运蛋白 AraE 可以有效提高重组菌株的木糖利用速率。

(5) 经过一系列的代谢工程改造，最终获得的工程菌株 *C. glutamicum* GJ04 可以利用麦秆水解液中的葡萄糖和木糖生产 61.7 g/L 的谷氨酸，与对照菌株相比，谷氨酸产量提高了 25%。

### 第 3 章 改造谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素生产聚合前体赖氨酸

#### 3.1 引言

L-赖氨酸，又称 L-2,6-二氨基己酸，通常作为饲料添加剂应用在畜牧业，但是目前其也被开发用作生物基聚合物前体。赖氨酸分子内含有 2 个氨基和 1 个羧基，因此可以通过分子间聚合形成聚  $\alpha$ -赖氨酸和聚  $\epsilon$ -赖氨酸，两种聚赖氨酸都具有水溶性、热稳定性和抑菌性，是天然的食物防腐剂。赖氨酸还可以在赖氨酸脱羧酶的作用下生成戊二胺<sup>[28]</sup>，戊二胺可以与二元酸聚合生成聚酰胺，如戊二胺和己二酸在催化剂作用下缩合形成生物基聚酰胺 56 (Polyamide 56, PA56)。PA56 与 PA6 和 PA66 相比，具备更好的热阻隔性，透气性，吸水性和高弹性，被认为是最有前途的化纤材料之一<sup>[29]</sup>。赖氨酸还可以经过生物催化合成 6-氨基己酸，6-氨基己酸进一步通过环化反应生成  $\epsilon$ -己内酰胺，后者通过开环聚合反应生成聚酰胺 6。赖氨酸也可以经过氧化和脱羧反应生成 5-氨基戊酸，5-氨基戊酸进一步通过环化反应生成  $\delta$ -戊内酰胺，后者通过开环聚合反应生成聚酰胺 5<sup>[30]</sup>。此外， $\epsilon$ -己内酰胺和  $\delta$ -戊内酰胺还可以在叔丁醇钾的催化下开环聚合生成聚酰胺 65<sup>[31]</sup>。

目前赖氨酸的年产量也达到了 200 万吨，过剩的赖氨酸产能为其作为生物基聚合物的原料前体奠定了基础<sup>[32]</sup>。利用粮食性淀粉原料，通过微生物发酵生产赖氨酸是目前最常用的赖氨酸生产方式，但是昂贵的淀粉原料极大地增加了赖氨酸的生产成本，阻碍了赖氨酸的商业化应用。为了降低原料成本，一些粗甘油和青贮饲料汁等廉价原料已经被尝试用于生产赖氨酸，但是产物浓度过低难以实际应用<sup>[213,214]</sup>。在众多的廉价原料中，木质纤维素由于其供应量大，来源广泛的优势，是目前最可靠的可再生碳源。实验室之前的研究已经初步实现了木质纤维素原料到赖氨酸的合成，但是仅仅只利用了木质纤维素中的葡萄糖，而舍弃了木糖，造成了原料的极大浪费<sup>[215]</sup>。

木糖占据了木质纤维素总糖的 30%，但是利用木质纤维素中的木糖生产赖氨酸存在两大阻碍。一是木糖在木质纤维素生物炼制过程中难以保存：木糖主要在预处理阶段由半纤维素降解产生，而常规的预处理工艺需要添加大量的水作为溶剂，导致产生的木糖溶解于废水中，与仍处于固体物料中的纤维素组分相分离，存留于废水中的木糖也因浓度太低而难以被利用，造成木糖的大量损失<sup>[216,217]</sup>；预处理过程中还会产生大量的抑制物，为了降低抑制物对于发酵菌株的影响，需要对预处理物料进行脱毒处理，但是常用的脱毒方法，如水洗和过量碱处理又会进一步降低物料中的木糖含量<sup>[218,219]</sup>。二是缺少一株可以共利用葡萄糖和木糖高效生产赖氨酸的菌株，尽管通过对谷氨酸棒状杆菌的代谢工程改造已经实现了木糖到多种产品的生产路线，但是木糖到赖氨酸的生产还停留在一个较为基础的水平；另一方面，尽管通过代谢工程改造的方法提高赖氨酸产量的策略已经非常明确，包括增加重要前体草酰乙酸的供应、增加辅酶 NADPH 的供应、增加赖氨酸主要合成路径关键酶的表达、减少副产物的生产等措施，但是还未有研究探究这些改造策略对于木糖合成赖氨酸的影响。

针对木糖难以保存的问题,应用实验室开发的干式稀酸预处理技术可以有效地减少预处理阶段过量水的引入,使水用量降低至常规预处理水用量的十分之一到二十分之一,预处理后的物料以固体颗粒的形式存在,预处理阶段由半纤维素降解产生的木糖也完整地保存在固相中。但是此时预处理产生的抑制物也留在固体中,此时采用实验室开发的固态生物脱毒技术,就可以在不添加水的情况下针对性地降解物料中的抑制物组分,同时保留葡萄糖和木糖用于后续的发醇过程。针对缺少利用木糖和葡萄糖高效生产赖氨酸菌株的问题,本研究从一株工业上生产赖氨酸的谷氨酸棒状杆菌出发,通过代谢工程改造,构建木糖利用途径,提高木糖到赖氨酸的转化率,最终成功得到了一株可以利用木质纤维素水解液中的葡萄糖和木糖高效生产赖氨酸的发醇菌株。本研究为木质纤维素生产赖氨酸的工业化应用奠定了基础。

## 3.2 材料与方 法

### 3.2.1 菌株,培养基和培养环境

本小节所使用的原始菌株和改造得到的重组菌株如表 3.1 所示。

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  用于表达质粒和敲除质粒的构建,大肠杆菌 *E.coli* BL21 用于提供大肠杆菌来源的木糖利用基因 (*xyLAB*\_BL21)。大肠杆菌的培养基和培养条件见 2.2.1。

谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* B253 是一株工业上用于生产赖氨酸的菌株,目前保存在上海工业微生物所中 (SIIM, Shanghai, China, <http://www.gsysiim.com/>)。本实验中 *C. glutamicum* B253 主要作为出发菌株进行使用。培养谷氨酸棒状杆菌所用的培养基具体成分如下,培养条件见 2.2.1。

(1) 种子培养基: 25g/L 葡萄糖, 1.5 g/L 磷酸二氢钾, 2.5 g/L 尿素和 0.6 g/L 硫酸镁, 25 g/L 玉米浆。

(2) 发醇培养基: 1 g/L 磷酸二氢钾, 3 g/L 尿素, 0.6 g/L 硫酸镁, 20 g/L 玉米浆, 视情况添加 60 g/L 葡萄糖或木糖作为碳源。

谷氨酸棒状杆菌电转化时所用的培养基见 2.2.1。

乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DSM 20284 是从德国微生物保藏中心 (DSMZ, Braunschweig, Germany) 购买的。*P. acidilactici* DSM 20284 的主要作用是提供乳酸片球菌来源的木糖利用基因 (*xyLAB*\_2911)。乳酸片球菌的培养基和培养条件见 2.2.1。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 是实验室之前分离得到的生物脱毒菌株,目前保存在中国普通微生物保藏中心 (CGMCC), 菌株保藏编号为 7452。*A. resinae* ZN1 的培养基和培养条件见 2.2.1。

### 3.2.2 酶和试剂

纤维素酶和化学试剂的来源与用途见 2.2.2。

表 3.1 本章节使用到的菌株

Table 3.1 Strains used in this chapter

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> BL21	Genes <i>xylAB</i> _BL21 and <i>araE</i> source	Lab stock
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	Genes <i>xylAB</i> _2911 source	DSMZ*
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 (CGMCC 7542)	Biodetoxification fungus	[207]
<i>C. glutamicum</i> B253	Parental for lysine fermentation	SIIM‡
<i>C. glutamicum</i> B253-pPeftumob	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPeftumob	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pPH36- <i>xylAB</i> _BL21	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPH36- <i>xylAB</i> _BL21	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pPH36- <i>xylAB</i> _2911	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPH36- <i>xylAB</i> _2911	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pPsod- <i>xylAB</i> _BL21	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPsod- <i>xylAB</i> _BL21	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pPsod- <i>xylAB</i> _2911	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPsod- <i>xylAB</i> _2911	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pPefu- <i>xylAB</i> _BL21	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPefu- <i>xylAB</i> _BL21	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pPefu- <i>xylAB</i> _2911	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPefu- <i>xylAB</i> _2911	This work
<i>C. glutamicum</i> B253- $\Delta$ <i>ldhA</i> :: <i>xylAB</i> (LJ01)	<i>ldhA</i> knockout and integration of the expression cassette Pefu_ <i>xylAB</i> _BL21 in <i>C. glutamicum</i> B253	This work
LJ01-pPeftumob	LJ01 harboring the empty plasmid Peftumob	This work
LJ01-pPefu- <i>lysC</i> - <i>asd</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>lysC</i> - <i>asd</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>dapA</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>dapA</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>dapB</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>dapB</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>ddh</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>ddh</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>lysA</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>lysA</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>pyc</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>pyc</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>PntAB</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>PntAB</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>araE</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>araE</i>	This work
LJ01-pPefu- <i>tkt-tal</i>	LJ01 harboring the plasmid Peftu- <i>tkt-tal</i>	This work
LJ01- $\Delta$ <i>pck</i>	<i>Pck</i> knockout in LJ01	This work
LJ01-evolution	Adaptive evolution of LJ01 in xylose medium	This work

表 3.2 本章节使用到的质粒

Table 3.2 Plasmids used in this chapter

Plasmids	Characteristics	Sources
pTRCmob	Expression vector for <i>C. glutamicum</i> , TRC promoter, kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[209]
pK18mobsacB	Mobilizable vector for selection of double crossover in <i>C. glutamicum</i> , kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[209]
pK18- $\Delta$ ldhA::xylAB	Vector for replacement of <i>ldhA</i> by integrating the expression cassette <i>Peftu_xylAB_BL21</i> into the genome of <i>C. glutamicum</i> B253	This work
pK18- $\Delta$ pck	Vector for truncation of <i>pck</i> in the genome of LJ01	This work
pPeftumob	Expression vector for <i>C. glutamicum</i> , <i>Peftu</i> promoter, kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	This work
pPeftu-lysC-asd	Vector for expression of <i>lysC</i> and <i>asd</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-dapA	Vector for expression of <i>dapA</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-dapB	Vector for expression of <i>dapB</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-ddh	Vector for expression of <i>ddh</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-lysA	Vector for expression of <i>lysA</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-pyc	Vector for expression of <i>pyc</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-PntAB	Vector for expression of <i>PntAB</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-araE	Vector for expression of <i>araE</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work
pPeftu-tkt-tal	Vector for expression of <i>tkt</i> and <i>tal</i> by <i>Peftu</i> promoter	This work

表 3.3 本章节使用到的引物  
Table 3.3 Primers used in this chapter

Primers	sequences (5'-3')
pTRCmob-F	accatggaattcgagctcggtag
pTRCmob-R	atgataagctgtcaaacagatcaattcg
<i>Peftu</i> -F	ctggtttgacagcttatcatcgaaaagcaattgcttttcgacg
<i>Peftu</i> -R	ccgagctcgaattccatggttgatgtcctcctggacttcgt
<i>dapA</i> -F	tccccgggatggcttccgcaactttcac
<i>dapA</i> -R	ctagtctagattaagcgggtgtacaggaatt
<i>dapB</i> -F	tccccgggatgggaatcaagttggcgt
<i>dapB</i> -R	ctagtctagattacaggcctagtaacgct
<i>ddh</i> -F	tccccgggatgaccaacatccgcgtagc
<i>ddh</i> -R	ctagtctagattagacgtcgcgtgcgatca
<i>lysA</i> -F	tccccgggatggctacagttgaaaattt
<i>lysA</i> -R	ctagtctagattatgcctctagttagagga
<i>araE</i> -F	tccccgggatggttactatcaatacggga
<i>araE</i> -R	ctagtctagatcagacgccgatatttctca
<i>PntAB</i> -F	tccccgggatgcgaattggcataccaag
<i>PntAB</i> -R	ctagtctagattacagagctttcaggattg
<i>lysC</i> -asd-F	ggtaccggggatcctctaggtggccttggtcgtacaga
<i>lysC</i> -asd-R	cttgcctgcctgcaggtcgattaaaccagcagctcagcgtc
<i>tkl</i> -tal-F	ggtaccggggatcctctagatgaccacctgacgctgt
<i>tkl</i> -tal-R	cttgcctgcctgcaggtcgactctcagcgcgacttccatg
<i>pyc</i> -F	ggtaccggggatcctctaggtgtcactaacacatcttcaacgc
<i>pyc</i> -R	cttgcctgcctgcaggtcgattaggaacgacgacgatcaagtcg

---

<i>pck</i> -up-F	tccccgggtagcttttggtcgaagaggagtg
<i>pck</i> -up-R	gttcttaagcgtgaacttacttctccagatttgtgcattcgacag
<i>pck</i> -down-F	caaaatctggagaagtaagttcacgcttaagaactgctaaataacaag
<i>pck</i> -down-R	ctagtctagaccatcgacgatgccatcacca
<i>ldhA</i> -up-F	tccccggggaacacatgcgattaaggtgc
<i>ldhA</i> -up-R	caaattgcttttcgattcgcacttctgattccctaac
<i>Peftu-xyLAB</i> -F	aagtgggatcgaacgaaaagcaattgcttttcgacg
<i>Peftu-xyLAB</i> -R	aggcgccaaagatttacgccattaatggcagaagttgc
<i>ldhA</i> -down-F	ttaatggcgtaaatctttggcgctagtggc
<i>ldhA</i> -down-R	ctagtctagagtctgggacgttgatgacgct

---

### 3.2.3 质粒构建

本章所构建的质粒列在表 3.2 中，所用到的引物列在表 3.3 中。

表达质粒的作用是通过质粒在菌株内进行特定基因的表达，本章所用的表达质粒的构建方法如下。*Peftu* 启动子是谷氨酸棒状杆菌内源性启动子，以 *C. glutamicum* B253 的基因组为模板，根据 *eftu* (CGS9114\_RS01665) 基因前 335 个碱基长度的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增得到的 *Peftu* 启动子基因片段，再通过无缝克隆的方式取代原 pTRCmob 上的 TRC 启动子，得到 p*Peftumob* 表达质粒。本章所用到的基因 *PntAB* (B21\_RS08255, B21\_RS08250) 和 *araE* (B21\_RS20170) 是以大肠杆菌 BL21 的基因组为模板，通过 PCR 扩增得到的；基因 *dapA*, *dapB*, *ddh*, *lysA* 是以 *C. glutamicum* B253 的基因组为模板通过 PCR 扩增得到的；用 *Sma*I 和 *Xba*I 内切酶对 *PntAB*, *araE*, *dapA*, *dapB*, *ddh*, *lysA* 基因和 p*Peftumob* 表达质粒分别进行酶切处理，再通过 T4 连接酶将基因片段与表达载体相连接，得到 p*Peftu-PntAB*, p*Peftu-araE*, p*Peftu-dapA*, p*Peftu-dapB*, p*Peftu-ddh* 和 p*Peftu-lysA* 表达质粒。本章所用到的基因 *lysC-asd*, *tkl-tal* 和 *pyc* 是以 *C. glutamicum* B253 的基因组为模板通过 PCR 扩增得到的，用 *Sma*I 和 *Xba*I 内切酶对 p*Peftumob* 表达质粒进行线性化处理，再通过无缝克隆的方式将基因片段与表达载体相连接，得到 p*Peftu-lysC-asd*, p*Peftu-tkl-tal* 和 p*Peftu-pyc* 表达质粒。

敲除整合质粒的作用是对菌株自身基因组上的基因进行修饰、敲除或插入新的外源基因，本章所用的敲除整合质粒的构建方法如下。对于 pK18- $\Delta$ *ldhA*::*xylAB* 质粒，其作用是在 *C. glutamicum* B253 的基因组上插入 *Peftu-xylAB*\_BL21 表达盒，同时替换掉基因组上编码乳酸脱氢酶的基因 *ldhA*。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* B253 的基因组为模板，根据 *ldhA* 基因上游 1000 个碱基长度的序列和下游 1000 个碱基长度的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*ldhA*-up) 和下游片段 (*ldhA*-down)；再以 p*Peftu-xylAB*\_BL21 表达质粒为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *Peftu-xylAB*\_BL21 片段；再通过重叠延伸 PCR 的方式，按照 *ldhA*-up, *Peftu-xylAB*\_BL21 和 *ldhA*-down 的顺序将这三个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta$ *ldhA*::*xylAB*；用 *Eco*RI 和 *Hind*III 内切酶对融合片段  $\Delta$ *ldhA*::*xylAB* 和 pK18*mobsacB* 质粒进行酶切处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18- $\Delta$ *ldhA*::*xylAB* 整合质粒。对于 pK18- $\Delta$ *pck* 质粒，其作用是在 *C. glutamicum* B253 的基因组上敲除 *pck* 基因。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* B253 的基因组为模板，根据 *pck* 基因上游 1000 个碱基长度的序列和下游 1000 个碱基长度的序列设计引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*pck*-up) 和下游片段 (*pck*-down)；再通过重叠延伸 PCR 的方式，按照 *pck*-up 和 *pck*-down 的顺序将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta$ *pck*；用 *Sma*II 和 *Hind*III 内切酶对融合片段  $\Delta$ *pck* 和 pK18*mobsacB* 质粒进行酶切处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18- $\Delta$ *pck* 整合质粒。以上所有构建的质粒都是在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  内构建，并经过测序确认正确后才能进行下一步的使用。

### 3.2.4 重组菌株构建

本章所构建的重组菌株列在表 3.1 中。

谷氨酸棒状杆菌重组菌株的构建流程见 2.2.4。

### 3.2.5 木质纤维素原料

小麦秸秆的来源和组分测定见 2.2.5。

### 3.2.6 生物炼制过程

小麦秸秆的预处理，生物脱毒和酶水解方法见 2.2.6。得到的麦秆水解液的具体组分如下：100.2 g/L 葡萄糖，33.3 g/L 木糖。水解液中需要添加额外的营养盐才能用作赖氨酸发酵，营养盐的成分如下：20.0 g/L 玉米浆，20.0 g/L 硫酸铵，0.5 g/L 苏氨酸，0.5 g/L 甲硫氨酸，1.0 g/L 磷酸二氢钾和 0.6 g/L 硫酸镁。

### 3.2.7 赖氨酸发酵

摇瓶发酵：从-80 °C冰箱中取出含有目标菌株的冻存管，在 LB 平板上进行划线，然后置于 30 °C 培养箱中培养 48 小时。从培养好的平板上挑取单菌落接种于含有 10 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中培养 12 小时，然后将 3 mL 的种子液转入含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中培养 8 小时。接着将 3 mL 种子液转入含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中进行发酵。在发酵期间，每 6 小时添加一定量 5M 的 NaOH 来调节 pH 至 7.0。

生物反应器发酵：为了放大生产规模，选择在 3 L 发酵罐（Biotech-3BG-4, Baoxing Co., China）上进行批发酵。种子液的培养方式与在摇瓶中的培养方式一致。在开始发酵前，将额外添加了 20.0 g/L 硫酸铵，20.0 g/L 玉米浆，0.5 g/L 苏氨酸，0.5 g/L 甲硫氨酸，1.0 g/L 磷酸二氢钾和 0.6 g/L 七水合硫酸镁的 800 mL 麦秆水解液加入到 3 L 发酵罐中，同时添加适量的消泡剂，并开启搅拌，控制转速为 600 rpm。通过加入 25% 的氨水将水解液的 pH 调至 7.0，并将发酵罐的温度控制在 30 °C。然后将 80 mL 培养好的种子液加入至发酵罐中，并通过发酵罐的自动控制系统利用 25% 的氨水和 2M 的硫酸将 pH 控制在 7.0。

### 3.2.8 适应性进化

适应性进化所用培养基和方法见 2.2.8。

### 3.2.9 分析方法

培养基中糖浓度、抑制物浓度和细胞生长量的测定方法见 2.2.9。用 SBA-40 生化分析仪（Shandong Academy of Sciences, Shandong, China）测定培养基中的赖氨酸。

### 3.2.10 赖氨酸得率计算

基于消耗的葡萄糖和木糖以及生成的赖氨酸的量可以计算赖氨酸的得率，公式如下：

$$\text{赖氨酸得率} = \frac{[Lys] \times V - [Lys]_0 \times V_0}{[X+G]_0 \times V_0 - [X+G] \times V} \times 100\%$$

公式中 $[Lys]$ 和 $[Lys]_0$ 分别代表发酵液中赖氨酸的终浓度和初始浓度， $[X+G]$ 和 $[X+G]_0$ 分别代表发酵液中木糖和葡萄糖的终浓度和初始浓度， $V$ 和 $V_0$ 分别代表发酵液的终体积和初始体积。

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 谷氨酸棒状杆菌 B253 的木糖代谢路径构建

*C. glutamicum* B253 是实验室之前筛选到的适合木质纤维素体系的赖氨酸生产菌株，之前已经利用此菌株在水解液中做了初步的发酵实验，但是并没有对水解液中木糖的变化进行测定，因此需要先确定 *C. glutamicum* B253 是否可以代谢木糖。将 *C. glutamicum* B253 分别培养在只含有木糖的发酵培养基和含有葡萄糖和木糖的混糖发酵培养基中进行发酵测试，结果如图 3.1 所示。从结果可以看出，在纯木糖培养基中，*C. glutamicum* B253 无法利用木糖，没有赖氨酸生产，菌体只能利用培养基中的玉米浆成分进行一定的生长；而在混糖培养基中，*C. glutamicum* B253 也无法代谢木糖，只能利用葡萄糖进行菌体生长和赖氨酸生产。因此必须在 *C. glutamicum* B253 中构建木糖利用途径，才能实现木质纤维素成分的充分利用。

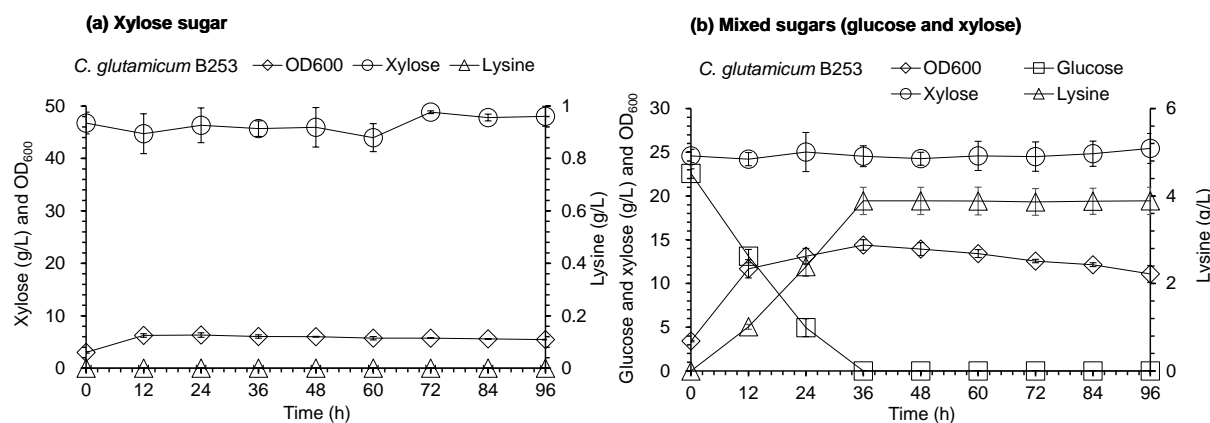


图 3.1 出发菌株 *C. glutamicum* B253 的木糖代谢能力评估

Fig. 3.1 Evaluation xylose utilization of *C. glutamicum* B253: (a) medium containing xylose as the sole carbon source; (b) medium containing glucose and xylose

注：发酵培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm。

为了使谷氨酸棒状杆菌可以更高效地利用木糖，需要对引入的外源木糖基因和表达方式进行了筛选。本研究选用了 3 个启动子和 2 个木糖利用基因簇：3 个启动子中有 1 个是人工合成的启动子 PH36，还有 2 个是谷氨酸棒状杆菌内源性的启动子 Psod 和 Pefu；2 个木糖利用基因簇分别是来自大肠杆菌 BL21 中的 *xyLAB*\_BL21 和来自乳酸片球菌 DSM 20284 中的木糖利用基因 *xyLAB*\_2911。利用这三个启动子分别表达这两个木糖利

用基因簇，获得六个表达质粒，再转入 *C. glutamicum* B253，就获得了六个重组菌株，将这六个菌株培养在以木糖为唯一碳源的培养基中进行发酵测试，结果如表 3.4 所示。从发酵结果可以看出，用 *Peftu* 启动子表达来自大肠杆菌 BL21 中的木糖利用基因 *xylAB*\_BL21 可以使 *C. glutamicum* B253 获得最好的木糖利用能力。

表 3.4 木糖利用基因与表达启动子筛选

Table 3.4 Screening promoters and xylose assimilation genes in *C. glutamicum* B253

Promoters	Gene clusters	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Xylose consumed (g/L)
PH36	<i>xylAB</i> _BL21	5.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2
	<i>xylAB</i> _2911	5.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
Psod	<i>xylAB</i> _BL21	13.2 ± 0.3	10.2 ± 0.3
	<i>xylAB</i> _2911	6.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1
Peftu	<i>xylAB</i> _BL21	16.9 ± 0.4	20.3 ± 0.5
	<i>xylAB</i> _2911	10.5 ± 0.2	7.1 ± 0.2

注：发酵培养基中添加 40 g/L 木糖作为唯一碳源，并添加 25 μg/mL 的卡纳霉素。发酵在 250 mL 的摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，发酵时间为 96 小时。

为了使 *C. glutamicum* B253 获得稳定的木糖利用能力，本研究将木糖利用表达框整合到了谷氨酸棒状杆菌的基因组上，同时替换掉了基因组上的乳酸脱氢酶的编码基因 *ldhA*，从而减少了副产物乳酸的产生，获得了重组菌株 *C. glutamicum* B253-Δ*ldhA*::*xylAB*，命名为 *C. glutamicum* LJ01。将 *C. glutamicum* LJ01 分别培养在只含有木糖作为唯一碳源的培养基和混糖培养基中进行发酵，结果如图 3.2 所示。从发酵结果可以看出，与出发菌株相比，改造菌株 *C. glutamicum* LJ01 可以以木糖为唯一碳源进行生长和赖氨酸生产；在混糖培养基中，*C. glutamicum* LJ01 可以额外地利用培养基中的木糖生产更多的赖氨酸。

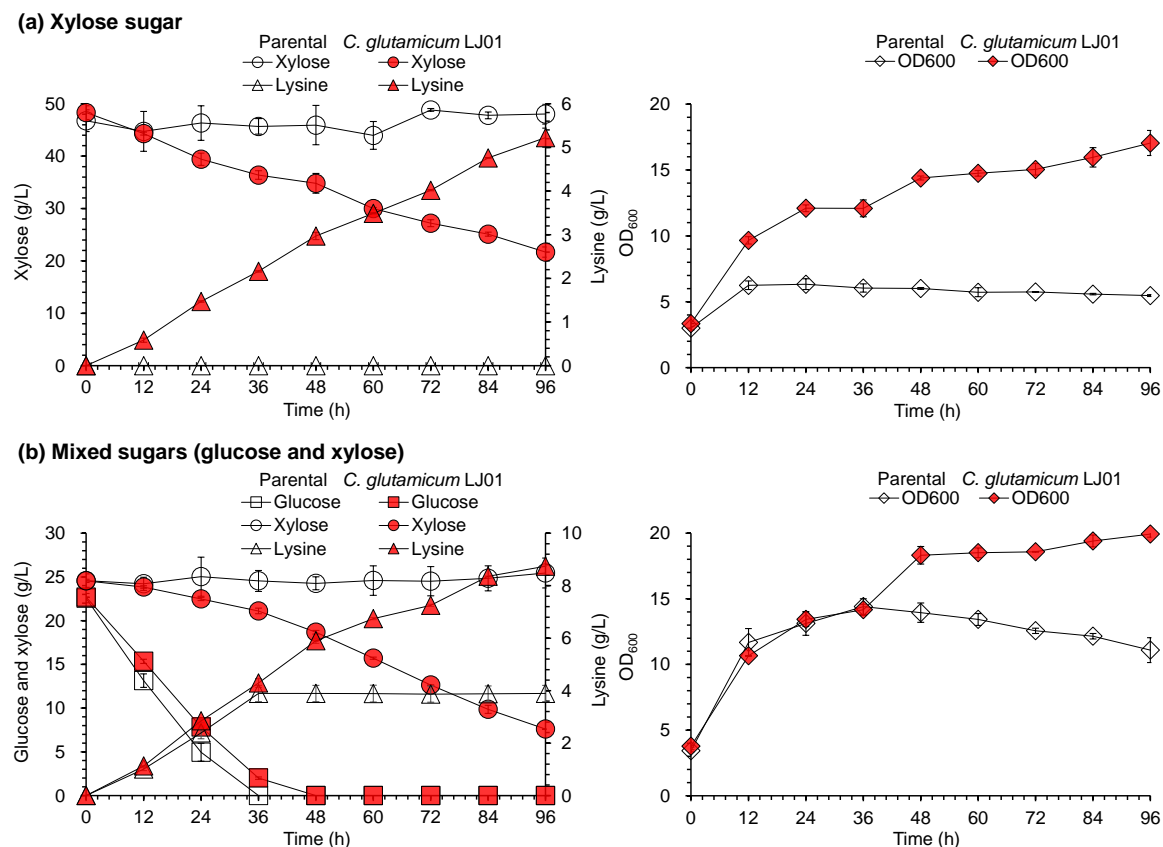


图 3.2 出发菌株 *C. glutamicum* B253 和改造菌株 *C. glutamicum* LJ01 的赖氨酸发酵对比

Fig. 3.2 Lysine fermentation comparison of *C. glutamicum* B253 and *C. glutamicum* GJ01: (a) medium containing xylose as the sole carbon source; (b) medium containing glucose and xylose

### 3.3.2 代谢工程改造提高木糖到赖氨酸的转化率

对于新引入的木糖利用途径，需要通过代谢工程改造的方法调节胞内代谢流，使底物消耗，产物生产，能量供给和辅酶供给达到平衡，才能使木糖更多地流向赖氨酸的合成。为此，本研究通过合成生物学的方法尝试从多个方面提高木糖到赖氨酸的合成。主要包括（1）强化赖氨酸合成途径；（2）增加木糖利用速率；（3）增加前体草酰乙酸供应；（4）提高辅酶 NADPH 再生。

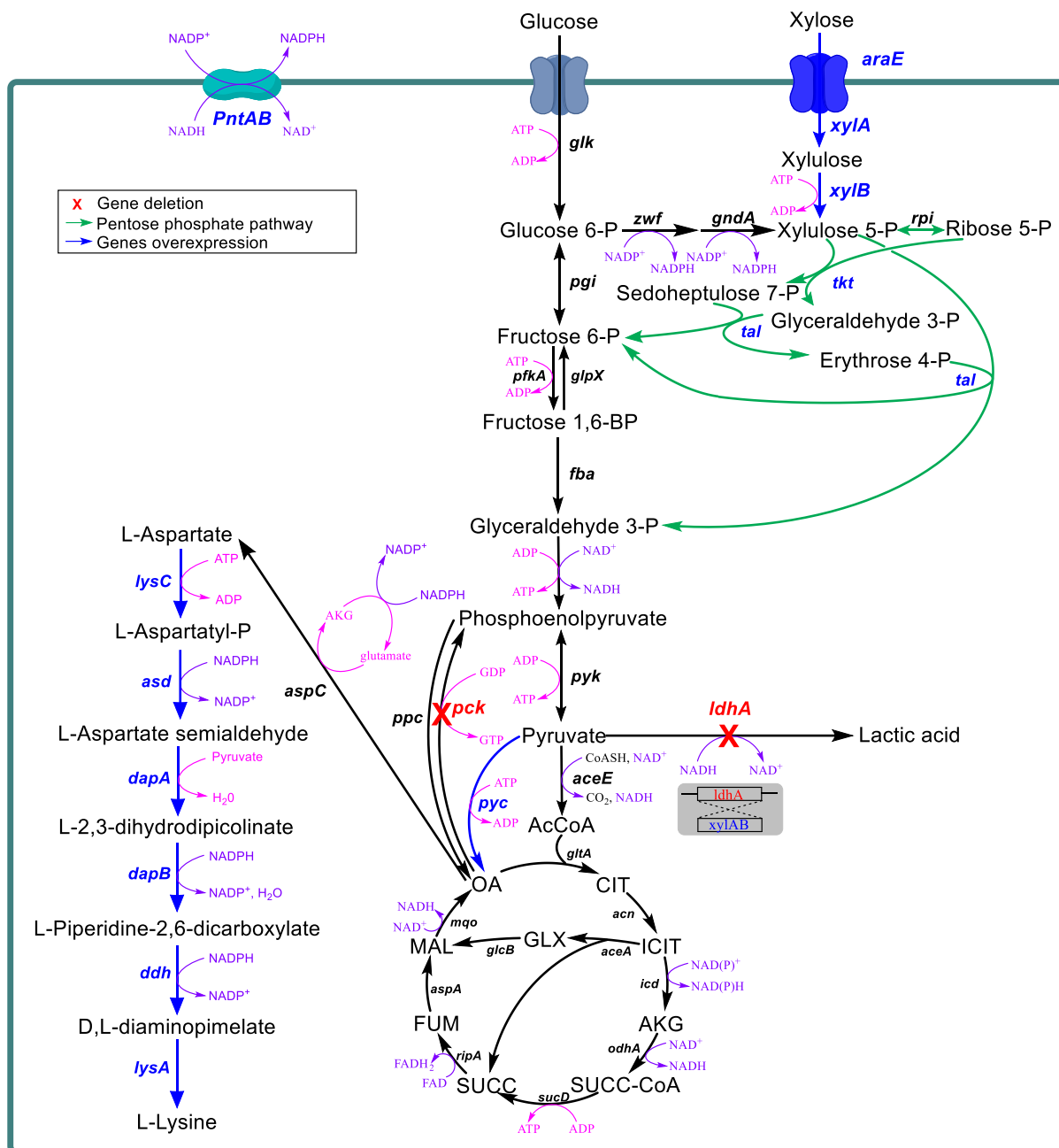


图 3.3 提高谷氨酸棒状杆菌利用木糖生产赖氨酸的改造策略

Fig. 3.3 Metabolic engineering strategies for *C. glutamicum* on xylose assimilation to lysine

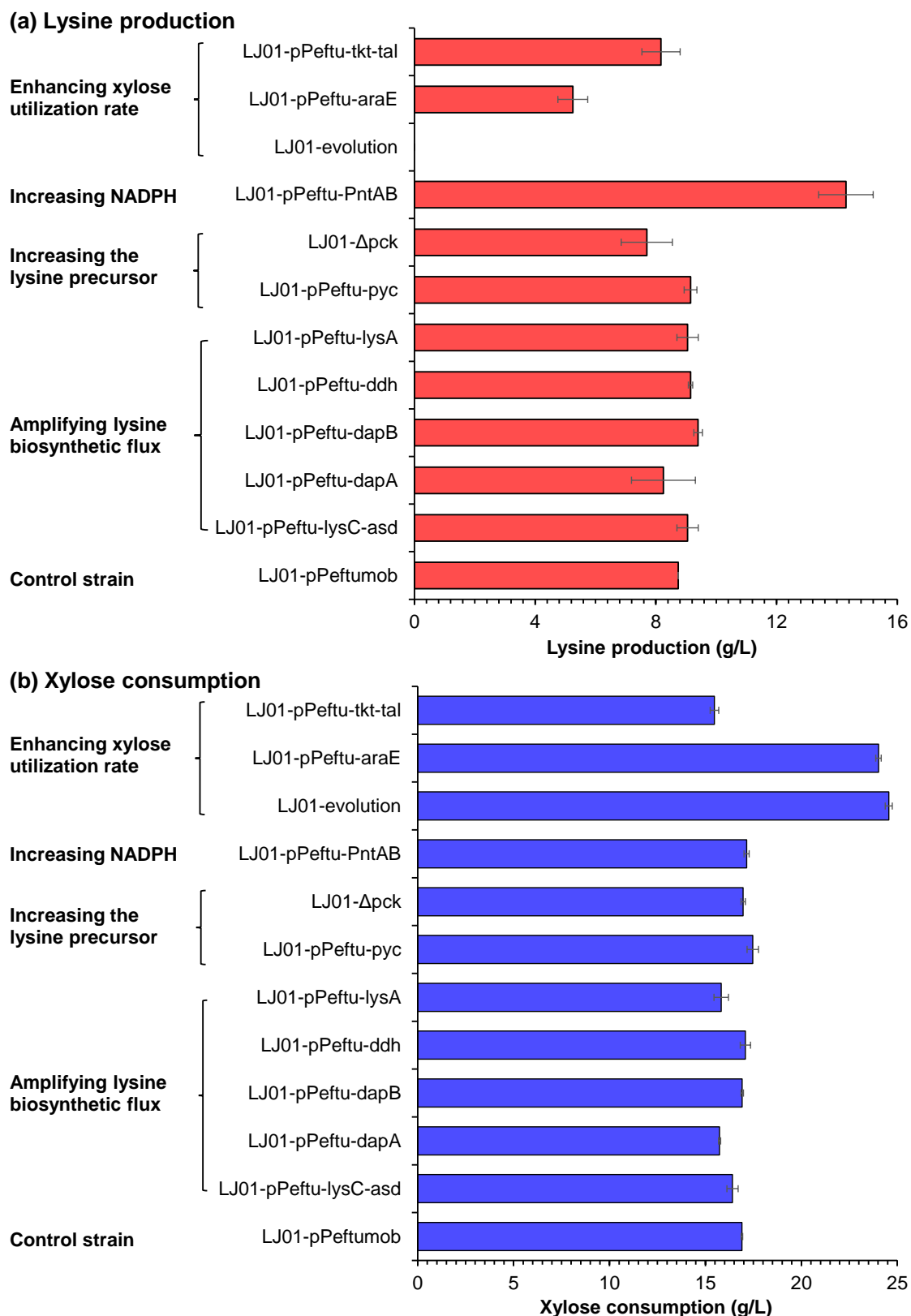


图 3.4 代谢工程改造促进 *C. glutamicum* LJ01 生产赖氨酸

Fig. 3.4 Increasing lysine production by metabolic engineering of *C. glutamicum* LJ01. (a) lysine production; (b) xylose consumption.

注：发酵培养基含有 25 g/L 木糖和 25 g/L 葡萄糖，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 6 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7，发酵时间为 96 小时。

(1) 强化赖氨酸合成路径。*C. glutamicum* B253 主要通过二氨基庚二酸途径 (Diminoheptanoic acid pathway, DAP) 进行赖氨酸的合成, 涉及到的关键酶包括天冬氨酸激酶 (*lysC*) (催化 L-天冬氨酸生成 L-天冬氨酸磷酸); 天冬氨酸半醛脱氢酶 (*asd*) (催化 L-天冬氨酸磷酸生成 L-天冬氨酸半醛); 二氢吡啶二羧酸合成酶 (*dapA*) (催化 L-天冬氨酸半醛和丙酮酸生成 L-2,3-二氢吡啶二羧酸); 二氢吡啶二羧酸还原酶 (*dapB*) (催化 L-2,3-二氢吡啶二羧酸还原为 L-哌啶-2,6-二羧酸); 二氨基庚二酸脱氢酶 (*ddh*) (催化 L-哌啶-2,6-二羧酸还原为 D, L-二氨基庚二酸); 二氨基庚二酸脱羧酶 (*lysA*) (催化 D,L-二氨基庚二酸为 L-赖氨酸) [220]。本章通过过表达 *lysC*, *asd*, *dapA*, *dapB*, *ddh* 和 *lysA* 基因来强化赖氨酸的合成途径, 促进木糖到赖氨酸的生产, 如图 3.3 所示。通过质粒在 *C. glutamicum* LJ01 中分别过表达这些基因, 得到的重组菌 LJ01-Peftu-*lysC*-*asd*, LJ01-Peftu-*dapA*, LJ01-Peftu-*dapB*, LJ01-Peftu-*ddh*, LJ01-Peftu-*lysA* 与对照菌株进行发酵对比, 如图 3.4 所示。结果发现 LJ01-Peftu-*lysC*-*asd*, LJ01-Peftu-*ddh* 和 LJ01-Peftu-*lysA* 的赖氨酸产量大约提高了 4.7%, LJ01-Peftu-*dapB* 的赖氨酸生产提高了 7.6%, 而 LJ01-Peftu-*dapA* 的赖氨酸生产反而下降了 5.7%。以上结果说明草酰乙酸到赖氨酸的合成路径并没有受阻, 赖氨酸主要合成路径关键酶的表达水平并不是木糖生产赖氨酸的限制性因素。

(2) 增加木糖利用速率。木糖利用速率较慢可能限制了赖氨酸的合成, 本研究采取了三种方式来提高木糖的利用速率: (I) 在只含木糖的培养基中进行连续转接培养, 增强改造菌株对木糖的适应性, 获得重组菌株 LJ01-evolution (适应性进化过程如图 3.5 所示); (II) 过表达戊糖转运蛋白 (*AraE*), 增强木糖的转运速率, 获得重组菌株 LJ01-Peftu-*araE*; (III) 过表达磷酸戊糖途径的转酮醇酶和转醛醇酶 (TKT 和 TAL), 增强磷酸戊糖途径, 获得菌株 LJ01-Peftu-*tkt-tal*。这三个改造菌株的发酵结果如图 3.4 所示。LJ01-evolution 的木糖利用速率虽然显著地提升了 45.3%, 但是赖氨酸完全没有积累, 可能是因为在适应性进化的过程中, 菌体虽然适应了木糖的利用, 但是碳源也从赖氨酸的合成转移向了 TCA 循环当中, 用于菌体的生长; LJ01-Peftu-*araE* 的木糖利用速率也显著提升了 42.0%, 但是葡萄糖的利用速率却出现下降, 经过 96 小时的发酵, 仍有 8.6 g/L 的葡萄糖残留, 因此也导致赖氨酸生产反而降低; LJ01-Peftu-*tkt-tal* 的木糖利用速率, 葡萄糖利用速率和赖氨酸积累都没有显著变化。这些结果说明碳源的供应速率足以满足赖氨酸合成需求, 木糖的利用速率不是赖氨酸生产的限制因素。

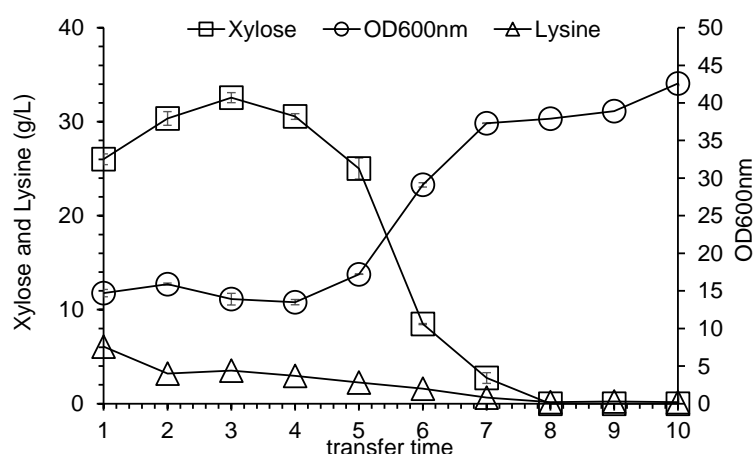


图 3.5 *C. glutamicum* LJ01 在单一木糖培养基中进行适应性进化

Fig. 3.5 Adaptive evolution of the *C. glutamicum* LJ01 in medium containing 40 g/L of xylose as the sole carbon source: (a) residual xylose and glutamic acid production; (b) cell growth

(3) 增加前体草酰乙酸供应。草酰乙酸是赖氨酸合成最重要的前体物质，增加草酰乙酸的供应可以促进赖氨酸的合成<sup>[156,159]</sup>。本研究计划通过两种策略促进草酰乙酸的供应：一是过表达丙酮酸羧化酶 (*pyc*) (催化丙酮酸合成草酰乙酸) 增加草酰乙酸的合成；二是敲除丙酮酸羧化激酶 (*pck*) (催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸) 减少草酰乙酸的损失 (如图 3.3 所示)。通过过表达 *pyc* 基因得到的 LJ01-*Peftu-pyc* 与对照相比，赖氨酸的合成增加了 4.7%，但是通过敲除 *pck* 基因得到的 LJ01- $\Delta pck$  与对照组相比，赖氨酸的生产反而降低了 11.9% (如图 3.4 所示)。实验结果说明增加前体草酰乙酸的供应对赖氨酸的合成影响较小，说明有其他因素限制了赖氨酸的生产。

(4) 提高辅酶 NADPH 供给。生成 1 mol 赖氨酸需要消耗 4 mol 的辅酶 NADPH，因此 NADPH 的供给在赖氨酸的合成中起到了非常重要的作用<sup>[221]</sup>。*PntAB* 基因编码膜结合的转氢酶，功能是催化  $\text{NADP}^+$  生成 NADPH<sup>[222]</sup>。在 *C. glutamicum* LJ01 中过表达 *PntAB* 基因获得的重组菌株 LJ01-*Peftu-PntAB* 与对照菌株相比，赖氨酸的产量提高了 63.6% (如图 3.4 所示)，说明辅酶 NADPH 的供应不足是限制木糖合成赖氨酸的重要因素。进一步对改造菌株在不同培养基中的 NADPH 含量进行测定 (如图 3.6 所示)，结果发现 *C. glutamicum* LJ01 在葡萄糖培养基中的 NADPH 含量为 23.3 nmol/mg prot，而在木糖培养基中的 NADPH 含量仅为 12.4 nmol/mg prot，NADPH 含量下降了接近 46.6%；在过表达了 *PntAB* 基因之后，重组菌株在木糖培养基中的 NADPH 含量又恢复至正常水平的 86.0%。这个实验结果也进一步证实了额外的 NADPH 供给对于木糖合成赖氨酸是至关重要的。造成这种现象的原因可能是：当菌体利用葡萄糖时，一部分 6-磷酸葡萄糖会通过磷酸戊糖途径代谢，在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (*zwf*)，6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (*pgl*) 和磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (*gndA*) 的作用下生成 5-磷酸核酮糖，为 DNA 复制和 RNA 合成提供前体，同时生成大量的辅酶 NADPH，而大量的辅酶 NADPH 为赖氨酸的生产创造了条件。但是当菌体利用木糖时，木糖通过木糖异构酶 (*xylA*)，木酮糖激酶 (*xylB*) 和磷酸核酮糖

差向异构酶 (*rpe*) 的催化生成 5-磷酸核酮糖, 虽然木糖也是通过磷酸戊糖途径进行代谢, 但是过程中并没有辅酶 NADPH 的产生。因此菌体在利用木糖时产生的 NADPH 相对利用葡萄糖时较少; 而在混糖培养基中, 木糖代谢产生的 5-磷酸核酮糖还会抑制葡萄糖通过磷酸戊糖途径代谢, 导致胞内的 NADPH 供给与利用葡萄糖时相比有所降低。

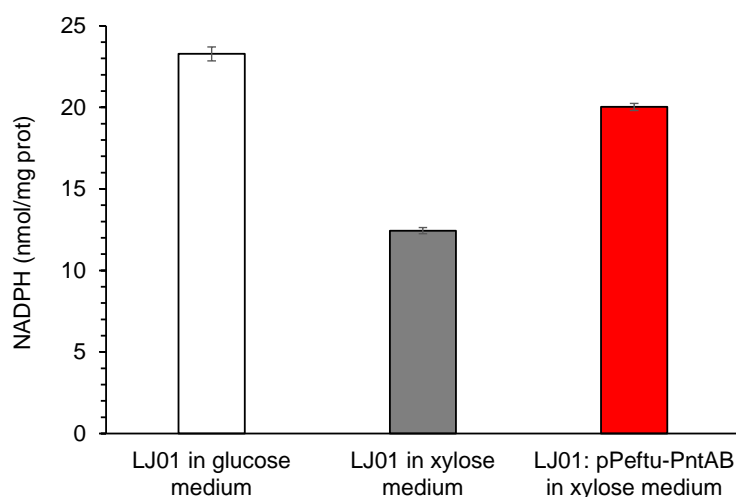


图 3.6 检测 *C. glutamicum* 在不同培养基中胞内的 NADPH 含量

Fig. 3.6 Detection of the intracellular NADPH content of *C. glutamicum* in different medium

注: 发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 培养条件为 30 °C, 200 rpm, 每 6 小时用 5M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7。

### 3.3.3 利用小麦秸秆水解液生产赖氨酸

为了评估改造菌株在实际木质纤维素水解液体系中的发酵性能, 将小麦秸秆经过干式稀酸预处理, 生物脱毒和酶水解后, 获得了小麦秸秆水解液。实验室开发的干式稀酸预处理结合生物脱毒技术可以在保留木糖的情况下将抑制物成分尽可能的脱除, 为后续の木糖发酵提供了基础。最终得到的小麦秸秆水解液含有 100.2 g/L 葡萄糖和 33.3 g/L 木糖。

利用代谢工程改造得到的重组菌株 *C. glutamicum* LJ01-Peftu-PntAB 与对照菌株 *C. glutamicum* B253-Peftumob 在小麦秸秆水解液中进行发酵对比, 结果如图 3.7 所示。从结果可以看出, 对照菌株无法利用水解液中的木糖, 只能代谢葡萄糖生产 24.9 g/L 赖氨酸; 而改造菌株 *C. glutamicum* LJ01-Peftu-PntAB 可以同时利用水解液中的葡萄糖和木糖, 生产得到 31.3 g/L 赖氨酸, 赖氨酸得率为 23%; 与对照菌株相比, 赖氨酸产量提高了 25.7%。

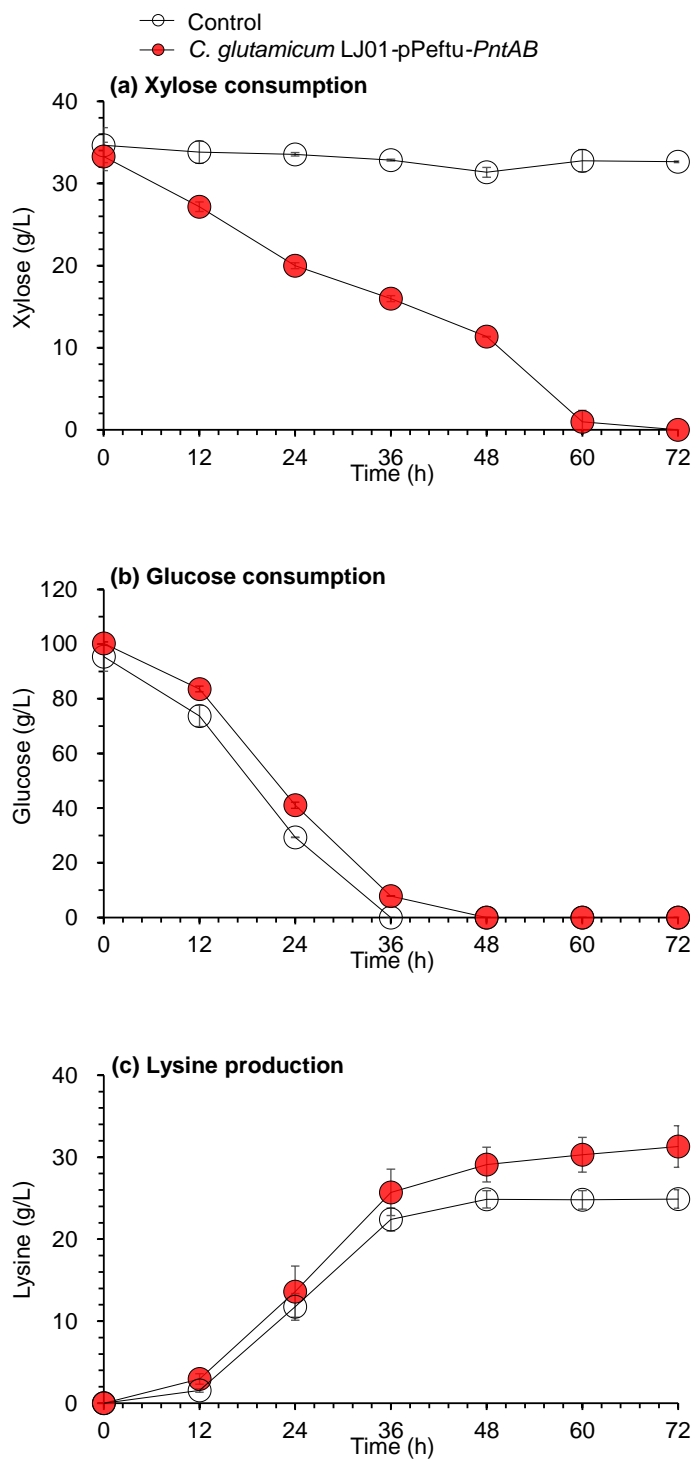


图 3.7 改造菌株 *C. glutamicum* LJ01-Peftu-PntAB 利用麦秆水解液发酵生产赖氨酸

Fig. 3.7 Lysine fermentation of *C. glutamicum* LJ01-Peftu-PntAB from wheat straw hydrolysate: (a) xylose consumption; (b) glucose consumption; (c) lysine production

注：麦秆水解液的成分如材料和方法内容所示，水解液中含有 100.2 g/L 葡萄糖和 33.3 g/L 木糖，发酵在 3 L 发酵罐中进行，培养条件为 30 °C，1.4 vvm，600 rpm，通过蠕动泵自动补加 25%的氨水和 2 M 的硫酸维持发酵液的 pH 在 7.0。

### 3.4 本章小结

本章节从一个赖氨酸工业生产菌株 *C. glutamicum* B253 出发, 先通过整合木糖利用基因使其获得了稳定的木糖利用能力, 接着通过代谢工程改造的方法, 尝试从多方面提高木糖到赖氨酸的转化率, 结果发现辅酶 NADPH 的供给对于木糖合成赖氨酸是最为重要的。最后改造得到的重组菌株 *C. glutamicum* LJ01-*Peftu-PntAB* 可以利用小麦秸秆水解液生产 31.3 g/L 赖氨酸。本章主要的研究结论如下:

(1) 赖氨酸工业生产菌株 *C. glutamicum* B253 不能利用木糖进行生长和赖氨酸生产, 用 *Peftu* 启动子表达来自大肠杆菌 BL21 的 *xylAB* 基因可以使重组菌株有最好的木糖利用能力, 并且在将其整合到谷氨酸棒状杆菌的基因组上后, 木糖利用能力也没有显著降低。

(2) 在引入了木糖利用途径之后, 木糖代谢途径相比葡萄糖代谢途径减少了辅酶 NADPH 的生成, 因此导致菌体在利用木糖时的 NADPH 供应不能满足赖氨酸合成的需求, 使得木糖生成赖氨酸的得率较低。再过表达了促进 NADPH 再生的 *PntAB* 基因之后, 胞内的 NADPH 水平和赖氨酸产量都有显著提升。

(3) 适应性进化方法依然不适合于提高谷氨酸棒状杆菌的木糖利用能力, 由于环境中缺少胁迫赖氨酸生产的压力, 导致菌体在适应性进化的过程中逐步丢失了赖氨酸过量生产的性能。而过表达戊糖转运蛋白虽然可以提高木糖的利用速率, 但是会影响 *C. glutamicum* B253 对于葡萄糖的代谢。

(4) 经过一系列的代谢工程改造, 最终获得的重组菌株 *C. glutamicum* LJ01-*Peftu-PntAB* 可以利用麦秆水解液中的葡萄糖和木糖生产 31.3g/L 的赖氨酸, 与对照菌株相比赖氨酸产量提高了 25.7%。

## 第 4 章 改造谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素生产聚 3-羟基丁酸酯

### 4.1 引言

塑料产品用途广泛，价格低廉，普遍存在于人们的日常生活中。在过去 50 年中，人们对于塑料制品的需求呈现一个不断上升的趋势，在 2017 年，全球的塑料产量已经达到 3.48 亿吨<sup>[223]</sup>。但是绝大部分塑料制品是通过石油基化学品加工而成，而石油炼制过程中会排放大量的温室气体，且大部分石油基聚合物很难在自然环境中被降解，因此造成了严重的环境问题。

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)是一类由微生物全合成的高分子聚酯，这种聚合材料具有与石油基聚丙烯材料相当的物理强度和热化学性能，并且具有很好的生物相容性和生物可降解性，因此其有潜力替代传统的石油基塑料，解决环境污染、温室效应和气候变化等问题。PHA 根据组成前体类别和聚合度的不同会有不同的材料性质，其中由单一的 3-羟基丁酰辅酶 A 构成的聚合物为聚 3-羟基丁酸酯，简称 PHB。目前商业化生产 PHB 遇到的最大阻碍是使用淀粉和糖类作为原料。这一方面极大地抬高了生产成本，使原料成本占到生产总成本的 30-40%<sup>[35]</sup>；另一方面有限的粮食资源根本无法满足大量聚合物生产的需求，而且将这些可食用的原料用于聚合物工业会减少食物供应，提高食品价格，造成粮食短缺。因此寻求价格低廉和来源广泛的生产原料是 PHB 实际工业化生产的必经之路。近年来，很多研究为寻求更加廉价的 PHB 生产原料做了尝试，包括甘蔗糖蜜<sup>[224]</sup>，木薯和淀粉水解液<sup>[225]</sup>，棕榈油<sup>[226]</sup>，乳清<sup>[227,228]</sup>，米糠<sup>[229]</sup>，粗甘油<sup>[230,231]</sup>和办公废纸<sup>[232]</sup>等等。但是，这些原料都存在来源有限和供应量不足的问题。与这些原料相比，木质纤维素具有价格低廉，来源广泛和供应量大等优势，是未来工业化生产 PHB 的最佳原料。

木质纤维素原料生产 PHB 也存在一定的障碍。一是木质纤维素在预处理过程中会产生大量的抑制物，例如糠醛，5-羟甲基糠醛，4-羟基苯甲醛，香草醛和丁香醛，这些抑制物会导致部分菌株无法在木质纤维素体系中生长，因此发酵菌株必须具备较强的抑制物耐受性，但是常见的 PHB 生产菌株，如伯克氏菌，恶臭假单胞菌，盐单胞菌，真氧产碱杆菌和经过代谢工程改造的大肠杆菌对抑制物耐受性均较弱，因此至今没有应用真实的高固含量木质纤维素高产 PHB 的研究报道。二是木质纤维素中除了葡萄糖外，还含有大量的木糖，其大约占了木质纤维素总糖的 30%，因此木糖利用能力是应用木质纤维素生产 PHB 的必要条件。*C. glutamicum* 具有较强的抑制物耐受性，可以将木质纤维素体系中的糠醛，5-羟甲基糠醛，4-羟基苯甲醛，香草醛和丁香醛等抑制物转化为对菌体无毒的醇类和酸类物质，因此 *C. glutamicum* 可以在高固含量的木质纤维素体系中进行良好的生长和发酵<sup>[189]</sup>。另一方面，木质纤维素中含有大量的生物素，而生物素会促进 *C. glutamicum* 细胞膜的合成，降低细胞膜的通透性，这也增强了菌株对于木质纤维素复杂环境的抵抗力。*C. glutamicum* 还是一株通过美国食品安全局认证的安全性菌株 (Generally recognized as safe, GRAS)，生产的产品具有更好的安全性，不含有内毒素，

节省了下游加工成本。*C. glutamicum* 不是一个天然生产 PHB 的菌株,近年来有一些研究在 *C. glutamicum* 中通过质粒表达 PHB 合成相关基因使其具备利用葡萄糖或淀粉合成 PHB 的能力<sup>[233-238]</sup>。但是这些研究得到的 *C. glutamicum* 难以在木质纤维素体系中进行实验,因为他们存在以下缺陷:(1)木糖占了木质纤维素总糖的 30%,而这些研究得到的 *C. glutamicum* 只能利用葡萄糖,导致原料的大量浪费;(2)这些研究得到的 *C. glutamicum* 的 PHB 产量都较低;(3)通过质粒表达 PHB 合成基因的方法既导致遗传的不稳定性,也限制了后续对于提高 PHB 产量的改造策略。因此至今没有 *C. glutamicum* 利用真实木质纤维素生产 PHB 的研究报道。

在本研究中,以第二章构建的可以利用木糖的 *C. glutamicum* GJ01 作为出发菌株,将 PHB 合成所需的三个关键基因分步整合至其基因组上,使其获得稳定的 PHB 生产能力。并系统性的从各个方面优化了 *C. glutamicum* 生产 PHB 的性能,包括:强化主要合成路径;敲除副产物生成路径;增加前体供应;增加辅酶供应;改造细胞形态;多种方式表达 PHA 合酶等等。此外,还对 PHB 的发酵条件进行了优化,探索了影响谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的关键营养元素。最后得到的重组谷氨酸棒状杆菌可以利用合成培养基生产 15.1 g/L 的 PHB,PHB 含量为细胞干重的 32.1% (w/w),是目前谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的最高指标;同时改造菌株可以利用小麦秸秆水解液 16.2 g/L 的 PHB,PHB 含量为细胞干重的 39.0% (w/w),是目前应用真实木质纤维素生产 PHB 的最高指标。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 菌株,培养基和培养环境

本小节所使用的原始菌株和改造得到的重组菌株如表 4.1 所示。

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  用于表达质粒和敲除质粒的构建,大肠杆菌 *E.coli* BL21 用于提供大肠杆菌来源的 NADPH 再生基因和戊糖转运基因(*PntAB*,*udhA* 和 *araE*)。培养大肠杆菌使用的培养基和培养条件见 2.2.1。

*C. glutamicum* LJ01 和 *C. glutamicum* GJ01 是前两章构建的可以利用葡萄糖和木糖的菌株,并且对木质纤维素体系中的抑制物有较强的耐受性,因此被选择作为生产 PHB 的候选菌株。摇瓶培养谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 所用的培养基为发酵培养基,上罐发酵生产 PHB 所用的培养基分为限氮培养基和富含氮源培养基,种子培养基的成分一致,培养基的具体成分如下:

(1) 种子培养基: 25.0 g/L 葡萄糖, 1.0 g/L 磷酸二氢钾, 3.0 g/L 尿素, 0.6 g/L 硫酸镁, 5.0 g/L 酵母提取物和 10.0 g/L 蛋白胨。

(2) 发酵培养基: 1.0 g/L 磷酸二氢钾, 3.0 g/L 尿素, 0.6 g/L 硫酸镁, 5.0 g/L 酵母提取物和 10.0 g/L 蛋白胨, 视情况添加不同浓度的葡萄糖或木糖作为碳源。

(3) 限氮培养基: 1.0 g/L 硫酸铵, 2.5 g/L 尿素, 1.0 g/L 磷酸二氢钾, 1.0 g/L 磷酸氢二钾, 0.25 g/L 硫酸镁, 42.0 g/L 吗啡丙磺酸, 0.01 g/L 氯化钙, 0.01 g/L 七水合硫酸亚铁, 0.01 g/L 一水合硫酸锰, 1.0 mg/L 七水合硫酸锌, 0.2 mg/L 硫酸铜, 0.02 mg/L 六

水合氯化镍和 0.1 mg/L 生物素。

(4) 富含氮源培养基: 20.0 g/L 硫酸铵, 5.0 g/L 尿素, 1.0 g/L 磷酸二氢钾, 1.0 g/L 磷酸氢二钾, 0.25 g/L 硫酸镁, 42.0 g/L 吗啡丙磺酸, 0.01 g/L 氯化钙, 0.01 g/L 七水合硫酸亚铁, 0.01 g/L 一水合硫酸锰, 1.0 mg/L 七水合硫酸锌, 0.2 mg/L 硫酸铜, 0.02 mg/L 六水合氯化镍和 0.1 mg/L 生物素。

*C. glutamicum* 电转化时所用的培养基和培养条件见 2.2.1。

氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 用于提供氧化杆菌来源的 NADPH 再生基因 (*SGDH*), 是从德国不伦瑞克的德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 购买的。两种合成培养基的成分如下: 种子培养基含有 80.0 g/L 山梨醇, 10.0 g/L 酵母提取物, 1.5 g/L 磷酸二氢钾, 1.5 g/L 硫酸铵和 0.5 g/L 硫酸镁。发酵培养基含有 40.0 g/L 葡萄糖, 10.0 g/L 酵母提取物, 1.5 g/L 磷酸二氢钾, 1.5 g/L 硫酸铵和 0.5 g/L 硫酸镁。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 的来源, 培养基和培养条件见 2.2.1。

#### 4.2.2 酶和试剂

纤维素酶和化学试剂的来源与用途见 2.2.2。PHB 标品用于制作液相标线, 购自 Sigma-Aldrich (Shanghai, China)。

表 4.1 本章节使用到的菌株

Table 4.1 Strains used in this chapter

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> BL21	Genes <i>PntAB</i> , <i>udhA</i> and <i>araE</i> source	Lab stock
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM2003	Gene <i>SGDH</i> source	DSMZ*
<i>Amorphotheca resiniae</i> ZN1 (CGMCC 7542)	Biodetoxification fungus	[207]
<i>C. glutamicum</i> B253	Lysine production strain	SIIM <sup>‡</sup>
<i>C. glutamicum</i> S9114	Glutamic acid production strain	SIIM <sup>‡</sup>
<i>C. glutamicum</i> B253-pPH36- <i>phaCAB</i>	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pPH36- <i>phaCAB</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> B253-pP $\epsilon$ ftu- <i>phaCAB</i>	<i>C. glutamicum</i> B253 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>phaCAB</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> S9114-pPH36- <i>phaCAB</i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pPH36- <i>phaCAB</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> S9114-pP $\epsilon$ ftu- <i>phaCAB</i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>phaCAB</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA1</i> :: <i>xylAB</i> (GJ01)	<i>C. glutamicum</i> S9114 with xylose utilization ability	[239]
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>ldhA1</i> :: <i>xylAB</i> - $\Delta$ <i>pdh</i> :: <i>phaA</i> - $\Delta$ <i>MscCG</i> :: <i>phaB</i> - $\Delta$ <i>ldhA2</i> :: <i>phaC</i> (JH01)	<i>Pdh</i> , <i>MscCG</i> and <i>ldhA2</i> knockout and integration of the expression cassette <i>Peftu_phaA</i> , <i>Peftu_phaB</i> and <i>Peftu_phaC</i> in <i>C. glutamicum</i> GJ01	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftumob	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftumob as control	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>phaA</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>phaA</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>phaB</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>phaB</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>phaC</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>PntAB</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>PntAB</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>udhA</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>udhA</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>SGDH</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>SGDH</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>fasR</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>fasR</i>	This work
JH01-pP $\epsilon$ ftu- <i>aceE</i>	<i>C. glutamicum</i> JH01 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>aceE</i>	This work
JH01- <i>odhA</i> _RBS0.1	RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>odhA</i> in <i>C. glutamicum</i> JH01	This work
JH01- $\Delta$ <i>ack</i> :: <i>araE</i> (JH02)	<i>Ack</i> knockout and the integration of the expression cassette <i>PH36_araE</i> in JH01	This work
JH02-pP $\epsilon$ ftumob	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftumob as control	This work
JH02-pP $\epsilon$ ftu- <i>phaB</i> (QLTS)	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP $\epsilon$ ftu- <i>phaB</i> (QLTS)	This work

JH02-pP <i>eftu-phaC</i> (STQK)	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-phaC</i> (STQK)	This work
JH02-pP <i>eftu-phaP</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-phaP</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-FtsZ</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-FtsZ</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-pknA</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-pknA</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-pknB</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-pknB</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-DivIVA</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-DivIVA</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-RodA</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-RodA</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-WhcD</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-WhcD</i>	This work
JH02- <i>pknA</i> _RBS0.1	RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>pknA</i> in <i>C. glutamicum</i> JH02	This work
JH02- <i>pknB</i> _RBS0.1	RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>pknB</i> in <i>C. glutamicum</i> JH02	This work
JH02- <i>DivIVA</i> _RBS0.1	RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>DivIVA</i> in <i>C. glutamicum</i> JH02	This work
JH02- <i>FtsZ</i> _RBS100	RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>FtsZ</i> in <i>C. glutamicum</i> JH02	This work
JH02-pP <i>eftu-(Ncgl)phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(Ncgl)phaC</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(CGR)phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(CGR)phaC</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(Ncgl)phaC(gfp)</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(Ncgl)phaC(gfp)</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(CGR)phaC(gfp)</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(CGR)phaC(gfp)</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(porB)phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(porB)phaC</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(porC)phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(porC)phaC</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(porB)phaC(gfp)</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(porB)phaC(gfp)</i>	This work
JH02-pP <i>eftu-(porC)phaC(gfp)</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pP <i>eftu-(porC)phaC(gfp)</i>	This work

DSMZ\* 德国菌种保藏与细胞培养中心

SIIM‡ 上海工业微生物研究所

表 4.2 本章节使用到的质粒

Table 4.2 Plasmids used in this chapter

Plasmids	Characteristics	Sources
pPH36mob	Expression vector for <i>C. glutamicum</i> , PH36 promoter, kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[239]
pPeftumob	Expression vector for <i>C. glutamicum</i> , Peftu promoter, kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[239]
pK18mobsacB	Mobilizable vector for selection of double crossover in <i>C. glutamicum</i> , kanamycin resistance Km <sup>R</sup>	[209]
pPH36-phaCAB	Vector for expression of <i>phaCAB</i> by PH36 promoter	This work
pPeftu-phaCAB	Vector for expression of <i>phaCAB</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-phaA	Vector for expression of <i>phaA</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-phaB	Vector for expression of <i>phaB</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-phaC	Vector for expression of <i>phaC</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-PntAB	Vector for expression of <i>PntAB</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-udhA	Vector for expression of <i>udhA</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-SGDH	Vector for expression of <i>SGDH</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-fasR	Vector for expression of <i>fasR</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-aceE	Vector for expression of <i>aceE</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-phaB(QLTS)	Vector for expression of <i>phaB(QLTS)</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-phaC(STQK)	Vector for expression of <i>phaC(STQK)</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-phaP	Vector for expression of <i>phaP</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-FtsZ	Vector for expression of <i>FtsZ</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-pknA	Vector for expression of <i>pknA</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-pknB	Vector for expression of <i>pknB</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-DivIVA	Vector for expression of <i>DivIVA</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-RodA	Vector for expression of <i>RodA</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-WhcD	Vector for expression of <i>WhcD</i> by Peftu promoter	This work
pPeftu-(Ncgl)phaC	Vector for expression of (Ncgl)phaC by Peftu promoter	This work
pPeftu-(CGR)phaC	Vector for expression of (CGR)phaC by Peftu promoter	This work
pPeftu-(Ncgl)phaC(gfp)	Vector for expression of (Ncgl)phaC(gfp) by Peftu promoter	This work
pPeftu-(CGR)phaC(gfp)	Vector for expression of (CGR)phaC(gfp) by Peftu promoter	This work

---

pPeftu-( <i>porB</i> ) <i>phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pPeftu-( <i>porB</i> ) <i>phaC</i>	This work
pPeftu-( <i>porC</i> ) <i>phaC</i>	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pPeftu-( <i>porC</i> ) <i>phaC</i>	This work
pPeftu-( <i>porB</i> ) <i>phaC</i> ( <i>gfp</i> )	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pPeftu-( <i>porB</i> ) <i>phaC</i> ( <i>gfp</i> )	This work
pPeftu-( <i>porC</i> ) <i>phaC</i> ( <i>gfp</i> )	<i>C. glutamicum</i> JH02 harboring the plasmid pPeftu-( <i>porC</i> ) <i>phaC</i> ( <i>gfp</i> )	This work
pK18- $\Delta$ <i>pdh</i> :: <i>phaA</i>	Vector for replacement of <i>pdh</i> by integrating the expression cassette <i>Peftu_phaA</i> into the genome	This work
pK18- $\Delta$ <i>MscCG</i> :: <i>phaB</i>	Vector for replacement of <i>MscCG</i> by integrating the expression cassette <i>Peftu_phaB</i> into the genome	This work
pK18- $\Delta$ <i>ldhA2</i> :: <i>phaC</i>	Vector for replacement of <i>ldhA2</i> by integrating the expression cassette <i>Peftu_phaC</i> into the genome	This work
pK18- <i>odhA</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>odhA</i> in the genome	[208]
pK18- $\Delta$ <i>ack</i> :: <i>araE</i>	Vector for replacement of <i>ack</i> by integrating the expression cassette <i>PH36_araE</i> into the genome	[239]
pK18- <i>FtsZ</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>FtsZ</i> in the genome	This work
pK18- <i>FtsZ</i> _RBS1.0	Vector for RBS with 1.0 a.u. substitution of <i>FtsZ</i> in the genome	This work
pK18- <i>FtsZ</i> _RBS10	Vector for RBS with 10 a.u. substitution of <i>FtsZ</i> in the genome	This work
pK18- <i>FtsZ</i> _RBS100	Vector for RBS with 100 a.u. substitution of <i>FtsZ</i> in the genome	This work
pK18- <i>pknA</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>pknA</i> in the genome	This work
pK18- <i>pknB</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>pknB</i> in the genome	This work
pK18- <i>DivIVA</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>DivIVA</i> in the genome	This work
pK18- <i>RodA</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>RodA</i> in the genome	This work
pK18- <i>WhcD</i> _RBS0.1	Vector for RBS with 0.1 a.u. substitution of <i>WhcD</i> in the genome	This work

---

表 4.3 本章节使用到的引物

Table 4.3 Primers used in this chapter

Primers	sequences (5'-3')
phaCAB-F (EcoRI)	ggaattcatggcaaccggcaagggcgca
phaCAB-R (SacI)	tccccgcggttagcccatgtgcaggccgccg
aceE-F (XbaI)	gctctagaatggccgatcaagcaaaactg
aceE-R (SalI)	acgcgtcgacgatccaacgctcctgaggaataa
fasR-F (XbaI)	gctctagaatggaagcggcgggactgagatt
fasR-R (SalI)	acgcgtcgacctagccagtagccacggagaa
phaA-F (XbaI)	gctctagaatgaccgatgtgtcatcgtttctg
phaA-R (SalI)	acgcgtcgacttactacgttccactgcaagtgc
phaB-F (XbaI)	gctctagactcgaattccatggtttacgccattaatggcagaagtgc
phaB -R (SalI)	acgcgtcgacttgacagcttatcatagcggtaaccatcacggg
phaC-F (XbaI)	gctctagatgcgatcaataatgacatgggtaaaaaatccttctg
phaC-R (SalI)	acgcgtcgacacgaaaggatTTTTaccatgtcattattgatcgca
PntAB-F (SmaI)	tccccgggatgcgaattggcataccaag
PntAB-R (XbaI)	gctctagattacagagctttcaggattgc
udhA-F (SmaI)	tccccgggatgccacattcctacgattacgatgc
udhA-R (XbaI)	gctctagattaaaacaggcggtttaaac
SGDH-F (SmaI)	tccccgggatgcctgccccttacaagaccg
SGDH-R (XbaI)	gctctagattacgaggaccagttgtttcga
phaP-F (SmaI)	tccccgggatgatcctcaccgggaacaagt
phaP-R (XbaI)	gctctagatcaggcagcgcgtcttctttg
DivIVA-F (XbaI)	gctctagaatgccgttgactccagctga
DivIVA-R (SalI)	acgcgtcgacttactaccagatggcttgttg
FtsZ-F (XbaI)	gctctagaatgacctcaccgaacaact
FtsZ-R (SalI)	acgcgtcgacttactggaggaagctgggtacatcca
pknA-F (XbaI)	gctctagaatgagtcaagaagacatca
pknA-R (SalI)	acgcgtcgactcactgcgtcctcctacatccaat

---

pknB-F (SalI)	acgcgtcgacatgaccttcgtgatcgctgatc
pknB-R (PstI)	aactgcagctattgcacgagtgcggcgag
RodA-F (XbaI)	gctctagaatgaacacgcttgaacgatta
RodA-R (SalI)	acgcgtcgactcacgcagccacctccgatg
WhcD-F (XbaI)	gctctagaatggaagattcagctggggac
WhcD-R (SalI)	acgcgtcgacttaagaaattcgcgttcaggcggcg
CGR-F (SalI)	acgcgtcgacatgcaaataaaccgccgaggc
CGR-R (IF phaC)	cggttgccattgctccctgggcgttg
phaC-F (IF CGR)	caggagcaatggcaaccggcaaggg
phaC-R (PstI)	aactgcagttaagccttagccttgacgtaacgg
Ncgl-F (SalI)	acgcgtcgacatgaaatgaatttaataatagattccgaacgaaatcgg
Ncgl-R (IF phaC)	ccggttgccataaagagctcctgatcatgtaggtgc
phaC-F (IF Ncgl)	aggagctctttatggcaaccggcaaggg
GFP-R(PstI)	aactgcagttattgtatagttcatccatgccatgtgtaatcc
ldhA2-up-F (XbaI)	gctctagagactgctatcgggtgtggtttacg
ldhA2-up-R (IF Pefu_phaC)	accagatagaggtagccagcttttgtagcccttcagttgttg
Pefu_phaC-F (IF ldhA2-up)	ccaacaactgaaagggtaccaaagctgggtacctctatctggt
Pefu_phaC-R (IF ldhA2-down)	agtgacaacatTTTTCTCCTTAAGCCTTAGCCTTGACGTAACGG
ldhA2-down-F (IF Pefu_phaC)	ccgttacgtcaaggctaaggctaaggagaaaaatggtgtcact
ldhA2-down-R (HindIII)	ccaagcttagcaactcctcaacgcctccacctcaccgc
pdh-up-F (EcoRI)	ggaattcaattgccacagaaccccaatacc
pdh-up-R (BamHI)	cgggatccctgaactcctcaacgttatggctatt
Pefu_phaA-F (BamHI)	cgggatcccgaaaagcaatttgcctttcgcagcc
Pefu_phaA-R (SalI)	acgcgtcgacttacttacgttcactgcaagtgcc
pdh-down-F (SalI)	acgcgtcgactgattgatacactgctgttctc
pdh-down-R (PstI)	aactgcagcgattactggaagtggcactttat
MscCG-up-F (EcoRI)	ggaattcgatggcaacctgggaacgga
MscCG-up-R (BamHI)	cgggatccgagccaagattagcgcgtgaaaagtagc
Pefu_phaB-F (BamHI)	cgggatcccgaaaagcaatttgcctttcgcagc

---

Peftu_phaB-R (Sall)	acgcgtcgacttagcccatgtgcaggccgccgta
MscCG -down-F (Sall)	acgcgtcgacgacgctgattacagacgtgtccatt
MscCG -down-R (PstI)	aactgcagtgcatctgccacaatatcgccgacgttc
DivIVA-up-F (BamHI)	cgggatcccgccaccaaagtgttctactac
DivIVA_RBS0.1-R (IF)	acggcattgtgccgttgaccctgatgcttggtggccccaggcagggccg
DivIVA_RBS0.1-F (IF)	gccaccaagcatcagggtcaacggcagcaatgccgttgactccagctgatgtg
DivIVA_down-R (Sall)	acgcgtcgacgtcagcttcgttgaccagagtg
FtsZ-up-F (EcoRI)	ggaattcaacgcgcacagatccgatcaa
FtsZ_RBS0.1-R (IF)	tgaggtcattgcgctgagttgcaatgacctcgagttgatactaaaaaatttgc
FtsZ_RBS0.1-F (IF)	gtatcaactcgaggtcattgcaactcagcgcaatgacctcaccgaacaactacctcg
FtsZ_down-R (XbaI)	gctctagaacagcaggacgccagttgc
FtsZ_RBS1.0-R (IF)	aggtcatcctggaggtgacctgccgagacgagagttgatactaaaaaatttgc
FtsZ_RBS1.0-F (IF)	gtatcaactctcgtctcggcaggtcacctccaggatgacctcaccgaacaactacctcg
FtsZ_RBS10-R (IF)	gtgaggtcatggacctagaccaatctatggcgagttgatactaaaaaatttgc
FtsZ_RBS10-F (IF)	gtatcaactcgccatagattggtctaggtccatgacctcaccgaacaactacctcg
FtsZ_RBS100-R (IF)	gtgaggtcatgcttgcctgttcaaagtagagttgatactaaaaaatttgc
FtsZ_RBS100-F (IF)	gtatcaactctacttgaacaaggacaagcatgacctcaccgaacaactacctcg
pknA-up-F (BamHI)	cgggatccaggaatcactgcctcctggatc
pknA_RBS0.1-R (IF)	ggtgtagatctgactagtttctgaagcacagctcggccaattggg
pknA_RBS0.1-F (IF)	aaactagtcagatctacccatgagtcagaagacatcactggaaaag
pknA_down-R (Sall)	acgcgtcgaccaacgcaatgccaatcaactcg
pknB-up-F (EcoRI)	ggaattcgcggcttctgatatttattctctcgg
pknB_RBS0.1-R (IF)	ggggatatatgatctggacgtcggcatttacggcgtcgattaaatc
pknB_RBS0.1-F (IF)	gacgtccagatcatatateccccgtgaccttcgtgatcgtgatcgc
pknB_down-R (XbaI)	gctctagagtttggccatggcggtgagt
RodA-up-F (BamHI)	cgggatcctgctctgatgggtctatcagatccgg
RodA_RBS0.1-R (IF)	tgttcatggcgtaagggaagaccttaccgggttcgttctatgccaccggt
RodA_RBS0.1-F (IF)	accggggtaagggtcttcttaccgcatgaacacgcttgaacgattaaagct
RodA_down-R (PstI)	aactgcagaccaacacagcaccatcaacag

---

WhcD-up-F (BamHI)	cgggatccggcaccccaagcgacttc
WhcD_RBS0.1-R (IF)	gaatcttccatcgccgggaaaggctcgcgcatcaaagctactttaagtctgttctcat
WhcD_RBS0.1-F (IF)	gtagctttgatcgcgagcctttccggcgatggaagattcagctggggacgtatct
WhcD_down-R (PstI)	aactgcagaccgcgagctttagaggc

---

表 4.4 RT-qPCR 实验所用引物

Table 4.4 Primers used for RT-qPCR assay

Genes	Gene locus	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')
<i>16S rRNA</i>	CGS9114_RS11955	GCCCCTTATGTCCAGGGCTT	GGTCGAGTTGCAGACCCCAA
<i>pgi</i>	CGS9114_RS13610	GGGGTGAGCCTGGCACAAAT	TGGACGAGCGAAACCAATGAA
<i>pfkA</i>	CGS9114_RS02860	ATCTGCAAGGCGATGGAACG	AAGGTCTTGTGGCCGAAGTGG
<i>glpX</i>	CGS9114_RS07495	CCGCATTACAGGTTCCGGTGGG	CGGATGGCCTTCGGTGTCACT
<i>fba</i>	CGS9114_RS00405	TTCGTCTTCCACGGTGGCTCA	GGCGGGTGAATGCGTACTGG
<i>tpiA</i>	CGS9114_RS06420	AGCGCCGCGAGTACCACAAC	GTGGCTCACCAACGCAGACG
<i>gpd</i>	CGS9114_RS09335	TAGAAACCGTTCACTCCTTCACCAA	CCAGCTCTGGAAGCGCCTTG
<i>gpmA</i>	CGS9114_RS05085	CGCAAAGAAGGGCGAAACCG	CATCGGAGATGCCGTCAAGGTG
<i>eno</i>	CGS9114_RS09495	GCTGCCAACTCCATCCTGGTTAA	CAGCAATAGTGGTGTCTCGGTCT
<i>aceE</i>	CGS9114_RS10055	CGGTGTTGGTATGCAGTGGGC	ACGAACTCCGTAGTCAGCCTCAA
<i>aceF</i>	CGS9114_RS08045	CACGCAACAACAAGCTGAAGCC	GCCTGTGGTGGAAACCAGGATT
<i>gltA</i>	CGS9114_RS13495	TCCCAACTGACTTCTTCACCGTATT	CGTGGGCGGTTGATCTTGTT
<i>acnA</i>	CGS9114_RS06610	CACGAGTCCCTGGGCCTTGA	CGTCGCCGTTCTCCTTGTT
<i>icd</i>	CGS9114_RS02730	CTTCGCACCAGTTGCAGAAGCA	CTCATCGTTTGGAGCGTAGTAGCC
<i>kgd</i>	CGS9114_RS03450	AAAGATGCGCCGCGTTTCCC	CGTCGATAAGCTGCTTCTCCTCC
<i>sdh</i>	CGS9114_RS04930	CACCTGTCTCACGGCATCTGGC	CAGCGATGGCGAACGGAATG
<i>aspA</i>	CGS9114_RS09635	AGACCGCTACCCAGGTTTCCG	AAGCACGTTGCGAGCCATCA
<i>mgo</i>	CGS9114_RS11385	CGGGCAGCGTGTTCAAGTTA	CGAGCAATCCGGCGATAGTG
<i>mld</i>	CGS9114_RS08765	CGCCGCAGATGACATTTCGTG	CATTGGTGTTCGCTGGGTTTCC
<i>aceA</i>	CGS9114_RS09005	GCTGCTGTCTACAACCTGCTCCC	GCCCATTCGCGCCGAGTTCCT
<i>glcB</i>	CGS9114_RS09010	ACCATTCCAACCGCACCAA	GTGTTCAACCCAGCGCACAAAC
<i>gdh</i>	CGS9114_RS07420	TCCATCTGGGATCTCAAGTGCG	ACGGAAGACCTCAACAGCCTCA
<i>zwf</i>	CGS9114_RS06460	TCGCCGTGTTACTGAGATTGCC	CTTGAACCGAAGCGGATGA
<i>pgl</i>	CGS9114_RS06450	CCCTTCCTGCGGTTCACTCC	AGCATCATCAGCCAAGAACAATACC
<i>gndA</i>	CGS9114_RS07055	CCCAGTGTTGCTTCCTCCTTG	CCATCCTTGTGATGCGCTTGT
<i>rpe</i>	CGS9114_RS06360	GATCGACGGCGGCATCAGCT	GCAACTCCTGGATCGCCTTGTT

---

<i>tkl</i>	CGS9114_RS06470	CCACCAGCCTGTTGAAACCTTG	GGGCGGTCTCATTTCGCATCT
<i>tal</i>	CGS9114_RS06465	CGGCGACACCCTGTCCAACCT	CCTGGAAGACATCTGCCAAGTCAA
<i>phaA</i>	H16_RS07140	CATCTAAGCGTGCTCTGTCCCG	CCAACCCATCTGCTGGTGAACCT
<i>phaB</i>	H16_RS07145	CTCTGTGAACGGTCAGAAGGGTC	TGAGCAAGTGCCATTGTGAAGC
<i>phaC</i>	H16_RS07135	GTGCGTAACATGATGGAGG	TTGTACTGAAGAAGCTGGAAG

---

### 4.2.3 质粒构建

本章所构建的质粒列在表 4.2 中，所用到的引物列在表 4.3 中。

表达质粒的作用是通过质粒在菌株内进行特定基因的过表达，本章所用的两个主要的表达载体分别是以 PH36 为启动子的 pPH36mob 表达质粒和以 P<sub>eftu</sub> 为启动子的 pP<sub>eftumob</sub> 表达质粒。本章所用到的 PHB 合成基因簇 *phaCAB* (H16\_RS07135) 是通过上海捷瑞生物科技公司 (Shanghai, China) 合成的，以合成片段为模板，通过 PCR 的方式扩增得到两端带有酶切位点的 *phaCAB* 片段，用 EcoRI 和 SacI 内切酶对基因片段和两种表达质粒分别进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，得到 pPH36-*phaCAB* 和 pP<sub>eftu-phaCAB</sub> 表达质粒。再以 pP<sub>eftu-phaCAB</sub> 表达质粒作为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *phaA*, *phaB* 和 *phaC* 片段，用 XbaI 和 SalI 内切酶对这三个基因片段和 pP<sub>eftumob</sub> 表达质粒分别进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，得到 pP<sub>eftu-phaA</sub>, pP<sub>eftu-phaB</sub> 和 pP<sub>eftu-phaC</sub> 表达质粒。本章所用到的促进 NADPH 再生的基因 *PntAB* (B21\_RS08255, B21\_RS08250) 和 *udhA* (B21\_RS20170) 是以大肠杆菌 BL21 的基因组为模板，通过 PCR 扩增得到的，另外一个促进 NADPH 再生的基因 *SGDH* (GOX2015) 是以氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 的基因组作为模板，通过 PCR 扩增得到的，用 SmaI 和 XbaI 内切酶对 *PntAB*, *udhA*, *SGDH* 基因和 pP<sub>eftumob</sub> 表达质粒分别进行处理，再通过 T4 连接酶将基因片段与表达载体相连接，得到 pP<sub>eftu-PntAB</sub>, pP<sub>eftu-udhA</sub> 和 pP<sub>eftu-SGDH</sub> 表达质粒。*phaB* 和 *phaC* 的催化活性更高的突变体 *phaB*(QLTS)和 *phaC*(STQK)，以及 PHB 颗粒结合蛋白的编码基因 *phaP*，都是通过上海捷瑞生物科技公司 (Shanghai, China) 合成的，用 XbaI 和 SalI 内切酶处理 *phaB*(QLTS) 和 *phaC*(STQK)片段，连接入经过同种内切酶处理的 pP<sub>eftumob</sub> 表达载体，得到 pP<sub>eftu-phaB</sub>(QLTS)和 pP<sub>eftu-phaC</sub>(STQK)表达质粒；用 SmaI 和 XbaI 内切酶处理 *phaP* 片段，连接经过同种内切酶处理的 pP<sub>eftumob</sub> 表达载体，得到 pP<sub>eftu-phaP</sub> 表达质粒。与乙酰辅酶 A 合成或代谢相关的基因 *fasR*(CGS9114\_RS11820)和 *aceE*(CGS9114\_RS10055)，以及与细胞生长分裂相关的基因 *ftsZ*(CGS9114\_RS07790), *pknA*(CGS9114\_RS04550), *pknB* (CGS9114\_RS04545), *DivIVA* (CGS9114\_RS07765), *RodA* (CGS9114\_RS04560) 和 *WhcD* (CGS9114\_RS13100) 都是以 *C. glutamicum* S9114 的基因组作为模板，通过 PCR 的方式扩增得到的，用 XbaI 和 SalI 内切酶对上述基因片段和 pP<sub>eftumob</sub> 表达载体进行处理，再通过 T4 连接酶将基因片段与表达载体相连接，得到 pP<sub>eftu-fasR</sub>, pP<sub>eftu-aceE</sub>, pP<sub>eftu-FtsZ</sub>, pP<sub>eftu-pknA</sub>, pP<sub>eftu-pknB</sub>, pP<sub>eftu-DivIVA</sub>, pP<sub>eftu-RodA</sub> 和 pP<sub>eftu-WhcD</sub> 表达质粒。分泌信号肽 CGR 和 Ncgl, 和细胞膜孔蛋白 PorB 和 PorC 是以 *C. glutamicum* S9114 的基因组作为模板，通过 PCR 的方式扩增得到的，再通过融合 PCR 将四个信号肽分别与 *phaC* 基因相连接，得到 *CGR\_phaC*, *Ncgl\_phaC*, *porB\_phaC* 和 *porC\_phaC* 融合片段，接着通过酶切连接的方式将融合片段插入到 pP<sub>eftumob</sub> 表达载体中，得到 pP<sub>eftu-(Ncgl)phaC</sub>, pP<sub>eftu-(CGR)phaC</sub>, pP<sub>eftu-(porB)phaC</sub> 和 pP<sub>eftu-(porC)phaC</sub>。

敲除整合质粒的作用是对基因组上的特定片段进行敲除，删减和替换，本章节所用

的敲除整合载体是 pK18mobsacB 质粒，所用的敲除整合质粒的构建方法如下。对于 pK18- $\Delta pdh::phaA$  质粒，其作用是在基因组上插入 *Peftu-phaA* 表达盒，同时替换掉基因组上编码丙酮酸脱氢酶的基因 *pdh*。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *pdh* 的上游片段 (*pdh-up*) 和下游片段 (*pdh-down*)；再以 p*Peftu-phaA* 表达质粒为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *Peftu-phaA* 片段；接着通过酶切连接的方式，按照 *pdh-up*、*Peftu-phaA* 和 *pdh-down* 的顺序将这三个片段依次插入至 pK18mobsacB 质粒上，构建成 pK18- $\Delta pdh::phaA$  整合质粒。对于 pK18- $\Delta MscCG::phaB$  质粒，其作用是在基因组上插入 *Peftu-phaB* 表达盒，同时替换掉基因组上编码谷氨酸分泌蛋白的基因 *MscCG*。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *MscCG* 的上游片段 (*MscCG-up*) 和下游片段 (*MscCG-down*)；再以 p*Peftu-phaB* 表达质粒为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *Peftu-phaB* 片段；接着通过酶切连接的方式，按照 *MscCG-up*、*Peftu-phaB* 和 *MscCG-down* 的顺序将这三个片段依次插入至 pK18mobsacB 质粒上，构建成 pK18- $\Delta MscCG::phaB$  整合质粒。对于 pK18- $\Delta ldhA2::phaC$  质粒，其作用是在基因组上插入 *Peftu-phaC* 表达盒，同时替换掉基因组上编码乳酸脱氢酶的基因 *ldhA2*。它的具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *ldhA2* 的上游片段 (*ldhA2-up*) 和下游片段 (*ldhA2-down*)；再以 p*Peftu-phaC* 表达质粒为模板，通过 PCR 的方式扩增得到 *Peftu-phaC* 片段；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，按照 *ldhA2-up*、*Peftu-phaC* 和 *ldhA2-down* 的顺序将这三个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta ldhA2::phaC$ ；用 XbaI 和 HindIII 内切酶对融合片段  $\Delta ldhA2::phaC$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18- $\Delta ldhA2::phaC$  整合质粒。对于 pK18-*FtsZ\_RBS0.1*、pK18-*FtsZ\_RBS1.0*、pK18-*FtsZ\_RBS10* 和 pK18-*FtsZ\_RBS100* 质粒，其作用是在基因组上将 *FtsZ* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1、1.0、10 和 100 的 RBS 序列。以 pK18-*FtsZ\_RBS0.1* 为例，具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，设计末端带有 *FtsZ\_RBS0.1* 序列的引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*FtsZ\_RBS0.1-up*) 和下游片段 (*FtsZ\_RBS0.1-down*)；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta FtsZ\_RBS::FtsZ\_RBS0.1$ ；用 EcoRI 和 XbaI 内切酶对融合片段  $\Delta FtsZ\_RBS::FtsZ\_RBS0.1$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18-*FtsZ\_RBS0.1* 整合质粒。对于 pK18-*pknA\_RBS0.1* 质粒，其作用是在基因组上将 *pknA* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列。具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，设计末端带有 *pknA\_RBS0.1* 序列的引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*pknA\_RBS0.1-up*) 和下游片段 (*pknA\_RBS0.1-down*)；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta pknA\_RBS::pknA\_RBS0.1$ ；用 BamHI 和 SalI 内切酶对融合片段  $\Delta pknA\_RBS::pknA\_RBS0.1$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18-*pknA\_RBS0.1* 整合质粒。对于 pK18-*pknB\_RBS0.1* 质粒，其作

用是在基因组上将 *pknB* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列。具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，设计末端带有 *pknB*\_RBS0.1 序列的引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*pknB*\_RBS0.1-up) 和下游片段 (*pknB*\_RBS0.1-down)；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta pknB\_RBS::pknB\_RBS0.1$ ；用 EcoRI 和 XbaI 内切酶对融合片段  $\Delta pknB\_RBS::pknB\_RBS0.1$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18-*pknB*\_RBS0.1 整合质粒。对于 pK18-*DivIVA*\_RBS0.1 质粒，其作用是在基因组上将 *DivIVA* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列。具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，设计末端带有 *DivIVA*\_RBS0.1 序列的引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*DivIVA*\_RBS0.1-up) 和下游片段 (*DivIVA*\_RBS0.1-down)；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta DivIVA\_RBS::DivIVA\_RBS0.1$ ；用 BamHI 和 SalI 内切酶对融合片段  $\Delta DivIVA\_RBS::DivIVA\_RBS0.1$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18-*DivIVA*\_RBS0.1 整合质粒。对于 pK18-*RodA*\_RBS0.1 质粒，其作用是在基因组上将 *RodA* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列。具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，设计末端带有 *RodA*\_RBS0.1 序列的引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*RodA*\_RBS0.1-up) 和下游片段 (*RodA*\_RBS0.1-down)；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta RodA\_RBS::RodA\_RBS0.1$ ；用 BamHI 和 PstI 内切酶对融合片段  $\Delta RodA\_RBS::RodA\_RBS0.1$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18-*RodA*\_RBS0.1 整合质粒。对于 pK18-*WhcD*\_RBS0.1 质粒，其作用是在基因组上将 *WhcD* 的原始 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列。具体构建方式如下：以 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板，设计末端带有 *WhcD*\_RBS0.1 序列的引物，通过 PCR 的方式扩增得到上游片段 (*WhcD*\_RBS0.1-up) 和下游片段 (*WhcD*\_RBS0.1-down)；接着通过重叠延伸 PCR 的方式，将这两个片段融合在一起，得到融合片段  $\Delta WhcD\_RBS::WhcD\_RBS0.1$ ；用 BamHI 和 PstI 内切酶对融合片段  $\Delta WhcD\_RBS::WhcD\_RBS0.1$  和 pK18mobsacB 质粒进行处理，再通过 T4 连接酶将两者连接在一起，构建成 pK18-*WhcD*\_RBS0.1 整合质粒。

#### 4.2.4 重组菌株构建

本章所构建的重组菌株列在表 4.1 中。

谷氨酸棒状杆菌感受态制作，电转化及阳性克隆筛选步骤见 2.2.4。

#### 4.2.5 生物炼制过程

小麦秸秆是 2021 年春季从河南南阳收购的，经过两步酸解法测定含有 30.5%纤维素，24.9%半纤维素，21.6%木质素和 9.7%灰分。脱毒和酶水解方法见 2.2.5 和 2.2.6。水解液中各组分含量为 101.7 g/L 葡萄糖，37.3 g/L 木糖，0.9 g/L 乙酸，0.003 g/L 糠醛和

0.019 g/L 5-羟甲基糠醛。水解液中需添加营养盐：1.0 g/L 磷酸二氢钾，1.0 g/L 磷酸氢二钾，0.6 g/L 硫酸镁和 20.0 g/L 硫酸铵。

#### 4.2.6 PHB 发酵

摇瓶发酵：从-80 °C冰箱中取出含有目标菌株的冻存管，在 LB 平板上进行划线，然后置于 30 °C 培养箱中培养 48 小时。从培养好的平板上挑取单菌落接种于含有 10 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中培养 16 小时，接着将 3 mL 种子液转入含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中进行发酵。在发酵期间，每 12 小时添加一定量的 5 M NaOH 调节 pH 至 7.0。

生物反应器发酵：为了放大生产规模，选择在 3 L 发酵罐（Biotech-3BG-4, Baoxing Co., China）上进行批发酵。从培养好的平板上挑取单菌落接种于含有 10 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中培养 12 小时，然后按 10% 的接种量接种到 80 mL 种子培养基中进行扩培，继续培养 12 小时完成种子培养。在开始发酵前，将 800 mL 合成培养基或麦秆水解液加入到 3 L 的发酵罐中，同时添加适量的消泡剂，并开启搅拌，控制转速为 600 rpm。通过加入 5 M 的 NaOH 将培养基的 pH 调至 7.0，并将发酵罐的温度控制在 30 °C。然后将 80 mL 培养好的种子液加入至发酵罐中，并通过发酵罐的自动控制系统将 pH 控制在 7.0。

补料批发酵：种子的培养方式和批发酵的种子培养方式一致，转速控制在 600 rpm，温度控制在 30 °C，发酵开始时用 5 M 的 NaOH 将培养基的 pH 调至 7.0，然后换用 25% 的氨水将发酵液的 pH 维持在 7.0。发酵过程中监测糖浓度的变化，当糖浓度降到 30 g/L 时，向发酵罐中补入 200 mL 浓度为 500 g/L 的葡萄糖母液或补入 200 mL 麦秆水解液。

#### 4.2.7 分析方法

培养基中糖浓度，抑制物浓度和细胞生长量的测定见 2.2.9。

#### 4.2.8 PHB 定量测定方法

取 10 mL 发酵液于已称量质量的 50 mL 离心管中，8000 rpm 离心 10 分钟，去除上清，并用无菌水清洗两次后将含有菌体沉淀的离心管至于 60 °C 烘箱中烘干至恒重（约 24 到 48 小时）。称取 0.1 g 左右的干菌体于已称量质量的 5 mL 具塞试管中，准确加入 1 mL 浓硫酸，塞上试管塞并用封口膜封口。将含有反应物的具塞试管至于沸水浴中反应 40 分钟，倒出试管内的反应液，稀释 10 倍并过滤后，通过装配有 HPX-87H 型色谱分析柱（Bio-rad, Hercules, CA, USA）的 HPLC（LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan）测定反应液中巴豆酸的峰面积，从而通过外标法间接计算出 PHB 的含量。

#### 4.2.9 电镜检测与细胞样品制备方法

取约 1 立方毫米的湿菌体于 1.5 mL 离心管中，添加 1 mL 2.5% (v/v) 戊二醛溶液重悬菌体，固定 6 小时以上。固定完后再通过 2000 rpm 离心去除上清，并用 0.1 M 磷酸缓冲盐溶液漂洗三次，接着用 4% (v/v) 多聚甲醛固定液再次固定 2 小时。固定后用 0.1

M 磷酸缓冲盐溶液漂洗三次。将洗净的细胞用从低到高浓度的乙醇进行脱水处理。脱水后的细胞再进行冷冻干燥 24 小时。用于切片透射电子显微镜拍照的细胞样品只需进行固定即可，固定好的细胞样品送上海师范大学 (Shanghai, China) 进行细胞切片制备和透射电镜 (FEI Tecnai Spirit G2 BioTWIN, FEI, Holland) 拍摄。用于场发射电子显微镜拍照的细胞样品需进一步脱水和冷冻干燥处理，处理好的细胞样品送华东理工大学 (Shanghai, China) 进行喷箔处理和场发射电镜 (GeminiSEM 500, ZEISS, Germany) 拍摄。

#### 4.2.10 胞内 PHB 提取与 GC-MS 鉴定

取 10 mL 发酵液于 50 mL 离心管中，8000 rpm 离心 10 分钟，去除上清后再用去离子水清洗细胞两次，之后将菌体进行冷冻干燥 24 小时。取 20 mg 左右的干菌体或 PHB 标品置于反应瓶中，加入 2 mL 甲醇 (含 3% 硫酸) 和 2 mL 氯仿，100 °C 反应 6 小时后终止反应。待温度降至室温后，向反应瓶中加入 1 mL 去离子水，充分震荡 5 分钟后静置分相，从下层有机相中吸取 0.5 mL 的样品并过滤即得到气象样品。通过气质联用色谱 Agilent 6890 GC-MS (Santa Clara, CA, USA) 对样品进行检测。气质色谱程序设置如下：开始时先将柱温升至 80 °C，停留 90 秒；然后按照 0.5 °C/s 的速率升至 140 °C；再按照 0.7 °C/s 的速率升至 240 °C，停留 120 秒，随后降温至 80 °C。空气流量为 70 mL/s。

#### 4.2.11 PHB 含量和得率计算

基于干细胞浓度和生成的 PHB 浓度可以计算 PHB 的含量，公式如下：

$$\text{PHB 含量} = \frac{\text{PHB}}{\text{DCW}} \times 100\%$$

公式中 *PHB* 代表发酵液中 PHB 的浓度，*DCW* 代表发酵液中干细胞的浓度。

基于消耗葡萄糖和木糖的质量和生成 PHB 的质量可以计算 PHB 的得率，公式如下：

$$\text{PHB 得率} = \frac{[\text{PHB}] \times V - [\text{PHB}]_0 \times V_0}{[\text{X+G}]_0 \times V_0 - [\text{X+G}] \times V} \times 100\%$$

公式中  $[\text{PHB}]$  和  $[\text{PHB}]_0$  分别代表发酵液中 PHB 的终浓度和初始浓度， $[\text{X+G}]$  和  $[\text{X+G}]_0$  分别代表发酵液中木糖和葡萄糖的终浓度和初始浓度， $V$  和  $V_0$  分别代表发酵液的终体积和初始体积。

#### 4.2.12 菌体收集，RNA 提取与 qRT-PCR

从培养好的平板上挑取单菌落接种于含有 10 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的摇床中培养 12 小时，然后按 10% 的接种量接种到 80 mL 种子培养基中进行扩培，继续培养 12 小时完成种子培养。将 80 mL 种子液加入到 800 mL 合成培养基 (对照组使用限氮培养基，实验组使用富含氮源培养基) 中，在 3 L 发酵罐中进行培养。控制转速为 600 rpm。通过 pH 调节剂 (对照组使用 5 M 氢氧化钠，实验组使用 25% 氨水) 将培养基的 pH 控制在 7.0，并将发酵罐的温度控制在 30 °C。分别在 6 小时、8 小时、10 小时和 12 小时从罐上取出 20 mL 菌液置于 50 mL 离心管中，4 °C 离心去上

清, 并用 PBS 缓冲溶液清洗三次, 随后立即放入液氮中冷冻菌体。收集好的菌体置于-80 °C 冰箱中备用。

取出适量冷冻好的菌体在研钵中碾碎, 并通过 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 提取菌体中的总 RNA。然后用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) 测定提取到的 RNA 样品在 OD260nm 和 OD280nm 下的吸光值, 以此来确定 RNA 样品的纯度和浓度。提取到的 RNA 通过 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 和 gDNA Remover 试剂盒 (TOYOBO, Osaka, Japan) 逆转录为 cDNA, 用于下一步的 qRT-PCR 实验。

qRT-PCR 实验所用到的引物是利用 Primer Premier 5 软件, 基于 *C. glutamicum* 的全基因组进行设计, 具体序列如表 3.4 所示。以 *C. glutamicum* 的 16s rRNA 作为内参基因, 对 RNA 总量的差异进行归一化处理。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算方法得出基因的相对表达量。相对表达上调倍数大于等于 2.0, 下调倍数小于等于 0.5 的结果, 认为是有显著差异表达的基因。qRT-PCR 的总反应体系为 20  $\mu$ L, 其中包含 2  $\mu$ L 的 cDNA, 10  $\mu$ L 的 SYBR Green Mix (TOYOBO, Osaka, Japan), 6.4  $\mu$ L 的去离子水和上下游引物各 0.8  $\mu$ L。qRT-PCR 的反应程序设置如下: 在 95 °C 预变性反应 1 分钟, 循环反应步骤为 95 °C 反应 15 秒, 55 °C 反应 15 秒, 72 °C 反应 30 秒, 循环 40 次。

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 通过分步整合构建稳定生产 PHB 的谷氨酸棒状杆菌 JH01

为了构建一株可以在木质纤维素体系中正常生长且高产 PHB 的菌株, 本研究选择了第二章和第三章构建的用于生产谷氨酸和赖氨酸的菌株 *C. glutamicum* GJ01 和 *C. glutamicum* LJ01 作为候选的出发菌株, 因为谷氨酸棒状杆菌具有较强的抑制物耐受性, 且它的遗传背景相对清楚, 利于之后的代谢工程改造。另一方面, 前两章构建的菌株都已具备木糖利用能力, 更加适合木质纤维素体系。同时选择来自 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHB 合成基因簇 *phaCAB* (H16\_RS07135, H16\_RS07140, H16\_RS07145) 用于构建乙酰辅酶 A 至 PHB 的合成路径。为了进一步优化 *phaCAB* 的表达, 本研究采用了两个启动子来表达 *phaCAB* 基因簇, 一个是人工合成的 PH36 启动子, 另一个是谷氨酸棒状杆菌内源性的 *Peftu* 启动子。在 *C. glutamicum* GJ01 和 *C. glutamicum* LJ01 中, 分别用 PH36 启动子和 *Peftu* 启动子表达 *phaCAB* 基因簇, 将 4 个重组菌株培养在发酵培养基中进行 PHB 发酵对比, 结果如表 4.5 所示。从结果可以看出, 在 *C. glutamicum* LJ01 中, 无论采用哪种表达方式, 都检测不到 PHB 的积累, 说明 *C. glutamicum* LJ01 中乙酰辅酶 A 的生产途径表达较弱, 不适合作为 PHB 的生产菌株; 在 *C. glutamicum* GJ01 中, 用 PH36 启动子表达 *phaCAB* 基因簇也检测不到 PHB 的积累, 只有用 *Peftu* 启动子表达 *phaCAB* 基因簇才能检测到 PHB 的产生, 说明在 *C. glutamicum* GJ01 中, *Peftu* 启动子表达 *phaCAB* 基因簇可以构建 PHB 合成路径。

表 4.5 PHB 生产菌株与表达启动子筛选

Table 4.5 Screening promoters and producing-strains for more PHB production

Strains	Expression methods	PHB production (g/L)	PHB content (wt%)
<i>C. glutamicum</i> LJ01	<i>PH36-phaCAB</i>	0	0
<i>C. glutamicum</i> LJ01	<i>Peftu-phaCAB</i>	0	0
<i>C. glutamicum</i> GJ01	<i>PH36-phaCAB</i>	0	0
<i>C. glutamicum</i> GJ01	<i>Peftu-phaCAB</i>	0.14 ± 0.01	2.68 ± 0.16

注：发酵使用的是发酵培养基，培养基中添加 60 g/L 葡萄糖作为碳源。发酵在 250 mL 摇瓶中进行，发酵条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用氢氧化钠调节 pH 至 7.0。

为了使菌株获得更加稳定的 PHB 生产能力，同时也为了之后进一步的代谢工程改造，需要将 *phaCAB* 基因整合到 *C. glutamicum* GJ01 的基因组上。本研究一开始尝试直接将 *phaCAB* 基因簇整合至基因组上，但是经历了数次实验后，始终得不到发生正确同源重组的菌株，猜测可能是整合质粒过大影响了同源重组的效率，因此本研究换用多步同源重组的方法，依次将 *phaC*、*phaA* 和 *phaB* 基因整合至谷氨酸棒状杆菌的基因组上，并替换掉了基因组上原始的乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA2*，丙酮酸脱氢酶编码基因 *pdh* 和谷氨酸分泌通道蛋白 *MscCG*，最终成功获得了遗传稳定且具备 PHB 生产能力的谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum*- $\Delta$ *ldhA1*::*xylAB*- $\Delta$ *ldhA2*::*phaC*- $\Delta$ *pdh*::*phaA*- $\Delta$ *MscCG*::*phaB*，命名为 *C. glutamicum* JH01。这也是世界上首次报道在谷氨酸棒状杆菌的基因组上完成 *phaCAB* 基因的整合。将改造菌株培养在葡萄糖和木糖发酵培养基中，检测其 PHB 生产能力，结果如表 4.6 所示。从发酵结果可以看出，*C. glutamicum* JH01 无论是在葡萄糖培养基还是在木糖培养基中，都可以生产 PHB，区别是在葡萄糖培养基中，虽然 PHB 含量占菌体干重的比例较高，但是菌体的生物量一般，导致 PHB 产量略低；而在木糖培养基中，虽然 PHB 含量占干重的比例较低，但是菌体生物量很高，使得以木糖作为碳源时，PHB 的产量反而更高。菌体在利用葡萄糖时，一部分葡萄糖通过磷酸戊糖途径代谢产生辅酶 NADPH，导致菌体利用葡萄糖时产生的 NADPH 更多，这些辅酶不仅为 PHB 的合成提供了还原力，也为其他氨基酸等物质的合成提供了辅酶，导致碳源更多地流向产物的合成。而利用木糖时，胞内 NADPH 供应较少，导致碳源较多地流向细胞的生长。

表 4.6 *C. glutamicum* JH01 利用葡萄糖或木糖生产 PHB

Table 4.6 PHB production of *C. glutamicum* JH01 from glucose or xylose

Carbon source	Dry cell weight (g/L)	PHB titer (g/L)	PHB content (wt%)
Glucose	8.36 ± 0.33	0.33 ± 0.02	3.92 ± 0.14
Xylose	17.60 ± 0.87	0.51 ± 0.07	2.91 ± 0.57

注：发酵培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

#### 4.3.2 通过透射电镜和 GC-MS 确认胞内 PHB 的生产

之前测定胞内 PHB 的含量是通过文献中报道的方法，将烘干后的菌体与浓硫酸相混合，在沸水浴中进行反应，PHB 会在浓硫酸高温的条件下反应生成巴豆酸，通过 HPLC 测定巴豆酸的含量来计算 PHB 的含量。但是这只是 PHB 的间接测定，本研究进一步对发酵了 48 小时的改造菌株 JH01 进行了切片透射电镜检测，结果如图 4.1 所示。从结果可以看出，整体上，大部分细胞内都含有 PHB 颗粒，极少数的细胞没有 PHB 颗粒产生（图 4.1 E）；局部上，含有 PHB 颗粒的细胞它们的 PHB 含量上也存在较大的差异，有的细胞内只含有大约 10% 的 PHB（图 4.1 B, F），有的细胞内大约含有 50% 的 PHB（图 4.1 D, G, H），而有的胞内空间则被 PHB 完全占据（图 4.1 A, C, I）。大部分细胞中，PHB 颗粒都集中在细胞的一侧，对于一些处于分裂中的细胞，它们的 PHB 颗粒的分布也有所不同，大部分情况是 PHB 颗粒集中在细胞隔膜的一侧中，而另一侧没有 PHB 颗粒的分布，也会有极少数分裂中的细胞在细胞隔膜的两侧都有 PHB 颗粒的分布，这说明细胞合成的 PHB 在胞内的流动性较差。

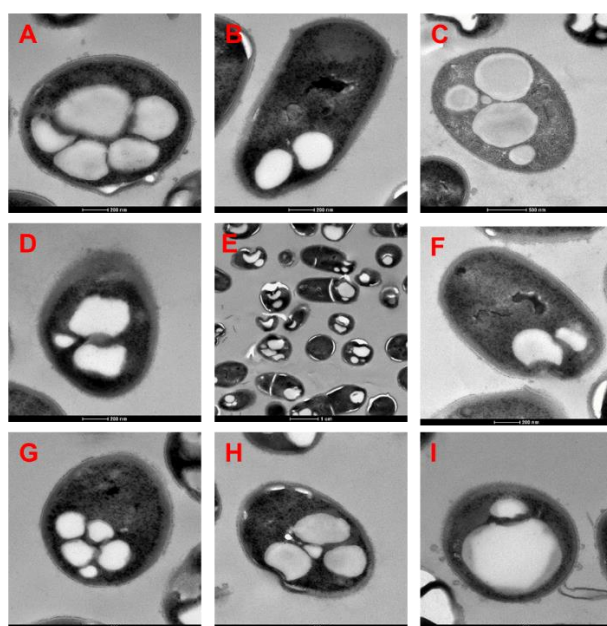


图 4.1 改造菌株 *C. glutamicum* JH01 透射电镜图

Fig. 4.1 The TEM of the *C. glutamicum* JH01

注：图 E 为放大 5000 倍的细胞切片图，图 A, B, C, D, F, G, H, I 为放大 10000 倍的细胞切片图

除了通过切片电镜对生产的 PHB 进行直接的观测，本研究也通过气质联用色谱对提取的 PHB 做了进一步的定性分析，将 PHB 标品和发酵得到的 PHB 产物经过酯化反应后制成 3-羟基丁酸甲酯，进行 GC-MS 检测分析，如图 4.2 所示。发现 PHB 标品的酯化反应物的出峰时间和发酵产物的酯化反应物的出峰时间完全一致，进一步说明发酵产品是 PHB，不含有其他的杂质单体。

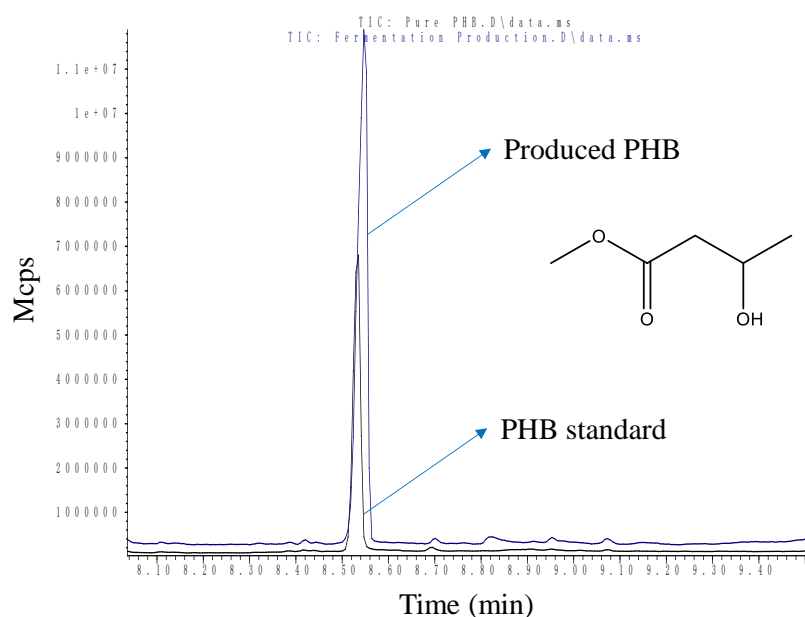


图 4.2 GC-MS 分析发酵产物和 PHB 标品的酯化反应物

Fig. 4.2 The GC-MS analysis of fermentation production and pure PHB

注：黑色的峰为 PHB 标品的酯化物峰，蓝色的峰为发酵产物的酯化物峰。

#### 4.3.3 代谢工程改造提高重组菌株 JH01 的 PHB 产量

为了进一步提高重组菌株 JH01 的 PHB 产量，本研究采取了一系列的代谢工程改造方法，如图 4.3 所示，主要分为以下几个方面：

(I) 强化 PHB 主要合成路径。PHB 合成路径较为简单，从乙酰辅酶 A 合成 PHB 只涉及到 3 步反应，首先是 *phaA* 基因编码的  $\beta$ -酮硫解酶催化两分子的乙酰辅酶 A 缩合形成一分子的乙酰乙酰辅酶 A；其次是 *phaB* 基因编码的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶将乙酰乙酰辅酶 A 还原为 3-羟基丁酰辅酶 A；最后由 *phaC* 基因编码的 PHA 合酶催化多个 3-羟基丁酰辅酶 A 缩合形成 PHB。在乙酰辅酶 A 供应充足的条件下，增强 *phaA*，*phaB* 和 *phaC* 基因的表达可能会促进 PHB 的生产，因此本研究在 *C. glutamicum* JH01 中通过质粒分别过表达三个基因，获得了 JH01-pPefu-*phaA*，JH01-pPefu-*phaB* 和 JH01-pPefu-*phaC* 三个重组菌株。

(II) 增强辅酶 NADPH 再生。PHB 合成的第二步反应，*phaB* 基因编码的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶是一个 NADPH 依赖型的还原酶，因此重组菌体在合成 PHB 的过程中会消耗大量的 NADPH，这必然会影响到胞内的辅酶平衡，导致 NADPH 供应不足。本研究选择了三个基因，分别是来自氧化葡萄糖酸杆菌 DSM2003 的 *SGDH* 基因，和来自大肠杆菌 BL21 的 *PntAB* 和 *udhA* 基因，他们都可以催化 NADPH 的再生反应，增加胞内辅酶 NADPH 的供给。因此本研究在 *C. glutamicum* JH01 中通过质粒分别过表达三个基因，获得了 JH01-pPefu-*SGDH*，JH01-pPefu-*PntAB* 和 JH01-pPefu-*udhA* 三个重组菌株。

(III) 增加关键前体乙酰辅酶 A 供应。乙酰辅酶 A 是合成 PHB 最重要的前体物

质, 提高胞内乙酰辅酶 A 的积累可能会促进 PHB 的生产。同时乙酰辅酶 A 也处于谷氨酸棒状杆菌整个代谢网络的中心, 因此它具有很多分支路径, 计划从以下几个方面提高胞内乙酰辅酶 A 的供应: (1) 增加丙酮酸到乙酰辅酶 A 的合成, 方法是过表达 *aceE* 基因 (CGS9114\_RS10055), 获得重组菌株 JH01-p*Peftu-aceE*, *aceE* 基因编码丙酮酸脱氢酶 E1 亚基, 负责催化丙酮酸生成乙酰辅酶 A; (2) 减少乙酰辅酶 A 到乙酸的合成, 方法是敲除 *ack* 基因 (CGS9114\_RS00465), 获得重组菌株 JH01- $\Delta$ *ack::araE*, *ack* 基因编码乙酸激酶, 催化乙酰磷酸生成乙酸, 通过敲除 *ack* 基因可以阻断乙酰辅酶 A 到乙酸的合成路径, 增加前体乙酰辅酶 A 的积累, 同时还插入了一个戊糖转运蛋白的编码基因 *araE* (B21\_RS14040), 加快菌体对于木糖的利用速率; (3) 减少乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环的代谢流, 方法是弱化  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 E1 亚基的编码基因 *odhA* (CGS9114\_RS03450) 的表达, 获得重组菌株 JH01-*odhA*\_RBS0.1, 弱化 *odhA* 的表达会减缓整个 TCA 循环的流通速率, 从而减少乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环的代谢流; (4) 减少乙酰辅酶 A 到脂肪酸的合成, 方法是过表达 *fasR* 基因 (CGS9114\_RS11820), 获得重组菌株 JH01-p*Peftu-fasR*, *fasR* 基因编码一个负反馈调节因子, 能够抑制乙酰辅酶 A 羧化酶 (*accBC*、*accD1*) 的活性, 而乙酰辅酶 A 羧化酶是催化乙酰辅酶 A 合成丙二酰辅酶 A 的关键酶, 其活性的降低会大大减少乙酰辅酶 A 到脂肪酸的合成。

将上述从三个方面构建得到的重组菌株在摇瓶中进行发酵测试, 同时用含有空载质粒的 *C. glutamicum* JH01 作为对照菌株, 结果如图 4.4 所示。从结果可以看出: (1) 增强 PHB 合成路径关键酶的表达对 PHB 的生产有明显的促进作用, 过表达 *phaA*, *phaB* 和 *phaC* 基因对于提高 PHB 的含量有较为明显的效果, 分别使 PHB 的含量提高了 73%, 95% 和 97%, 而且对于菌体的生长没有抑制作用, 因此使得 PHB 的产量也有了相应的提高; (2) 提高前体乙酰辅酶 A 的供应对于 PHB 生产的影响较小, 无论是促进乙酰辅酶 A 的合成 (过表达 *aceE* 基因) 还是减少乙酰辅酶 A 的分流 (过表达 *fasR* 基因, 弱化 *odhA* 基因和敲除 *ack* 基因), 对于菌体的生长, PHB 的含量和产量都没有显著的影响; (3) 增加 NADPH 的供给对于 PHB 的生产有一定的促进效果, 在表达的三个促进辅酶再生的基因中, 过表达 *SGDH* 和 *udhA* 基因与对照相比并无显著差异, 只有过表达 *PntAB* 基因时, 使得 PHB 的含量提高了 56%。

综上所述, 这些代谢工程改造及对应的发酵结果表明, 谷氨酸棒状杆菌胞内的乙酰辅酶 A 供应是足够的, 而限制其 PHB 生产的主要因素是 PHB 合成路径关键酶的活力不足。最后, 虽然改造菌株 JH01- $\Delta$ *ack::araE* 的 PHB 含量提高不显著, 但是其木糖利用速率更快, 副产物乙酸产生较少, 且不带有表达质粒, 有利于后续的代谢工程改造, 因此将其命名为 *C. glutamicum* JH02, 用于后面的研究。

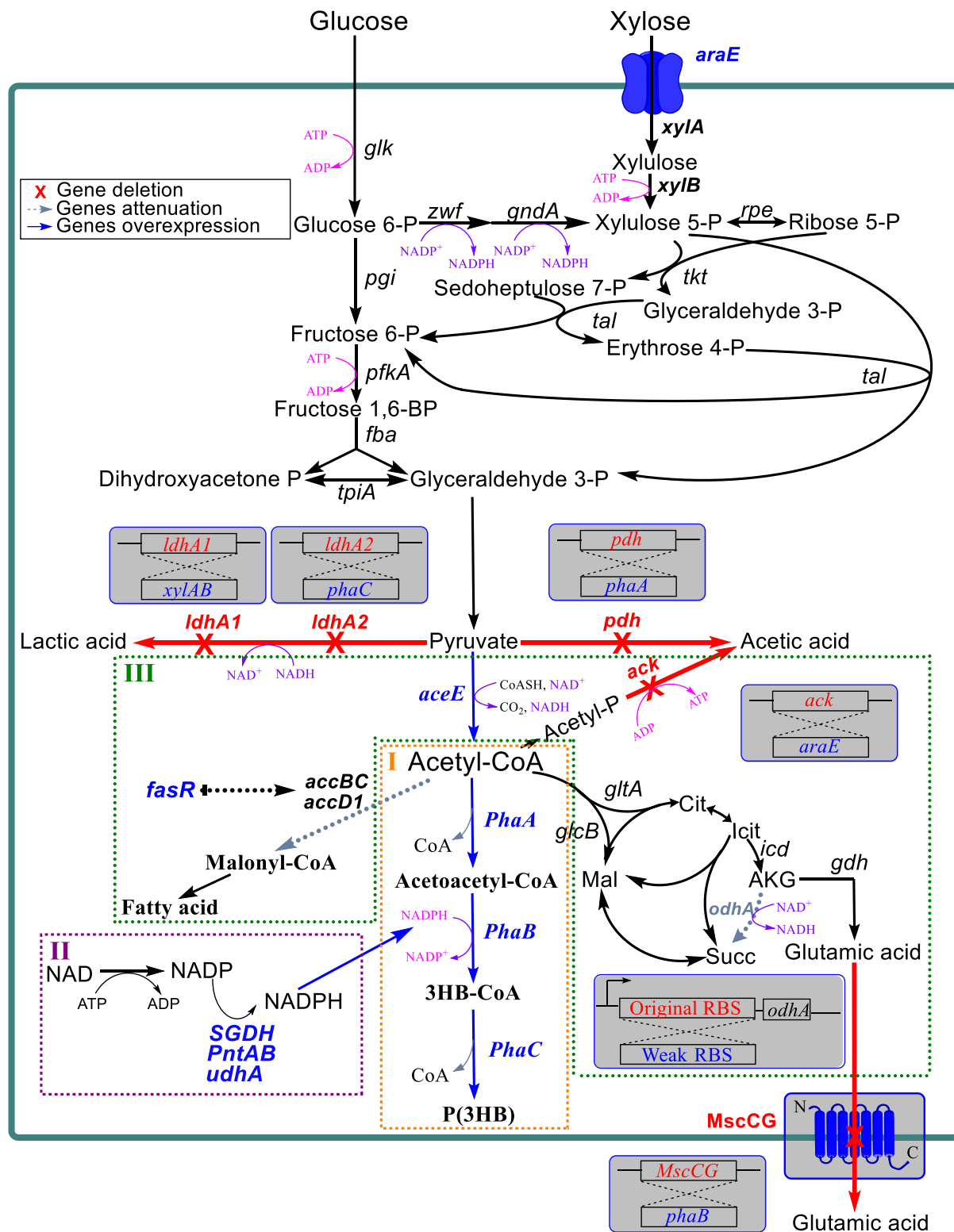


图 4.3 提高谷氨酸棒状杆菌胞内 PHB 产量的代谢工程改造策略

Fig. 4.3 Metabolic engineering strategies for increasing intracellular PHB production of *C. glutamicum*

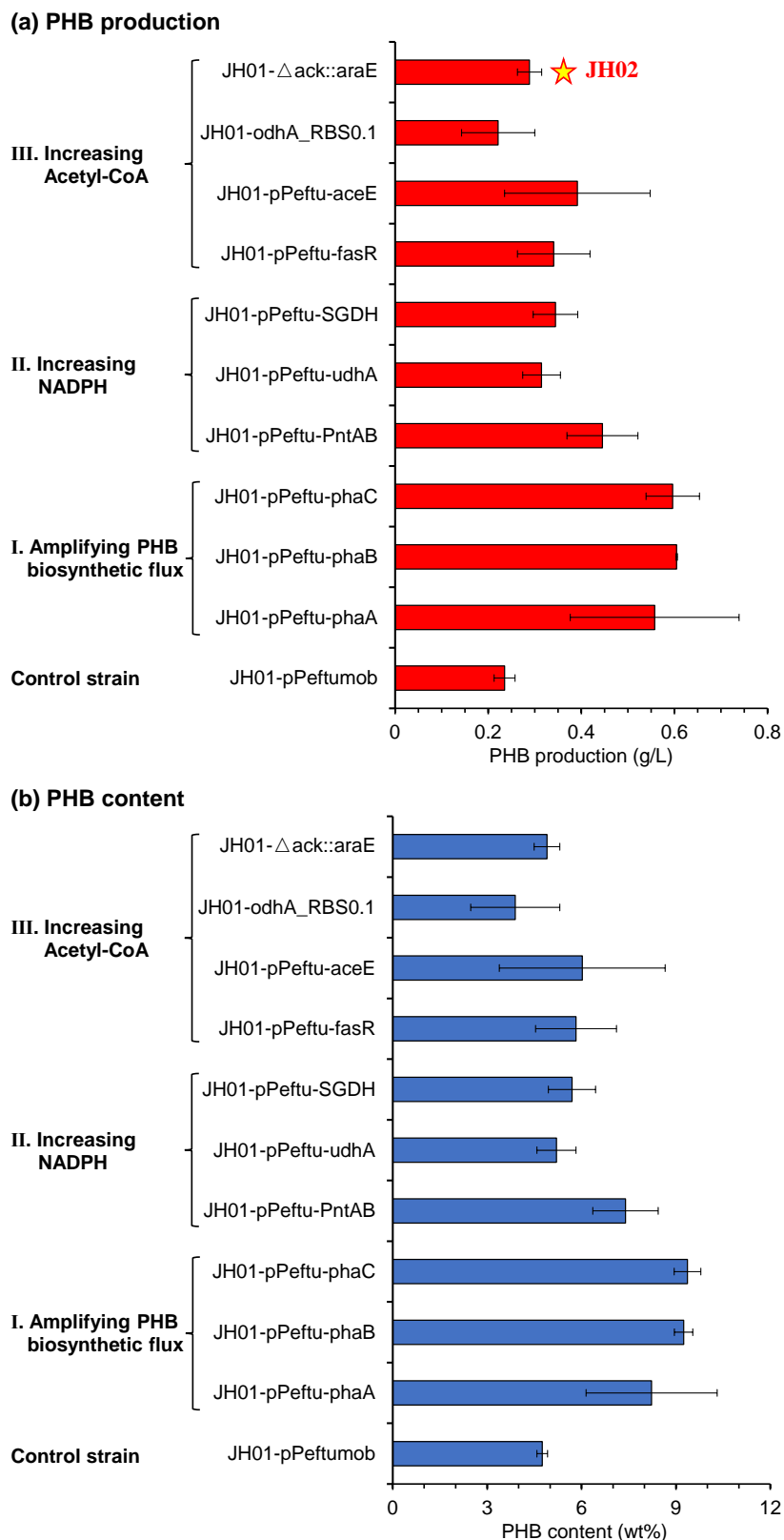


图 4.4 代谢工程改造提高 *C. glutamicum* JH01 的 PHB 产量

Fig. 4.4 Increasing PHB production of *C. glutamicum* JH01 by metabolic engineering: (a) PHB production; (b) PHB content

注：发酵培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

#### 4.3.4 增加 PHA 合酶的活力

通过以上实验确定了 PHB 合成路径关键酶的活力不足是谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的主要限制因素，为了解决这一问题，除了增加 PHB 合成基因的表达量，本研究还设计了两种解决方案：（1）表达催化活性更高的酶；（2）膜结合表达 PHA 合酶。

（1）表达催化活性更高的酶。本研究选用了文献中报道的具有更高催化活性的两个突变基因 *phaB*(QLTS)和 *phaC*(STQK)<sup>[240,241]</sup>。将它们分别表达在 *C. glutamicum* JH01 中，获得重组菌株 JH01-pPefu-*phaB*(QLTS)和 JH01-pPefu-*phaC*(STQK)，与前文的 JH01-pPefu-*phaB* 和 JH01-pPefu-*phaC* 进行发酵对比，结果如图 4.5 所示。从结果可以看出，虽然过表达 *phaB*(QLTS)和 *phaC*(STQK)同样也可以促进胞内 PHB 的积累，但是与过表达未突变的 *phaB* 和 *phaC* 的发酵结果没有显著差别，甚至 PHB 含量还要略低于表达未突变基因的水平。

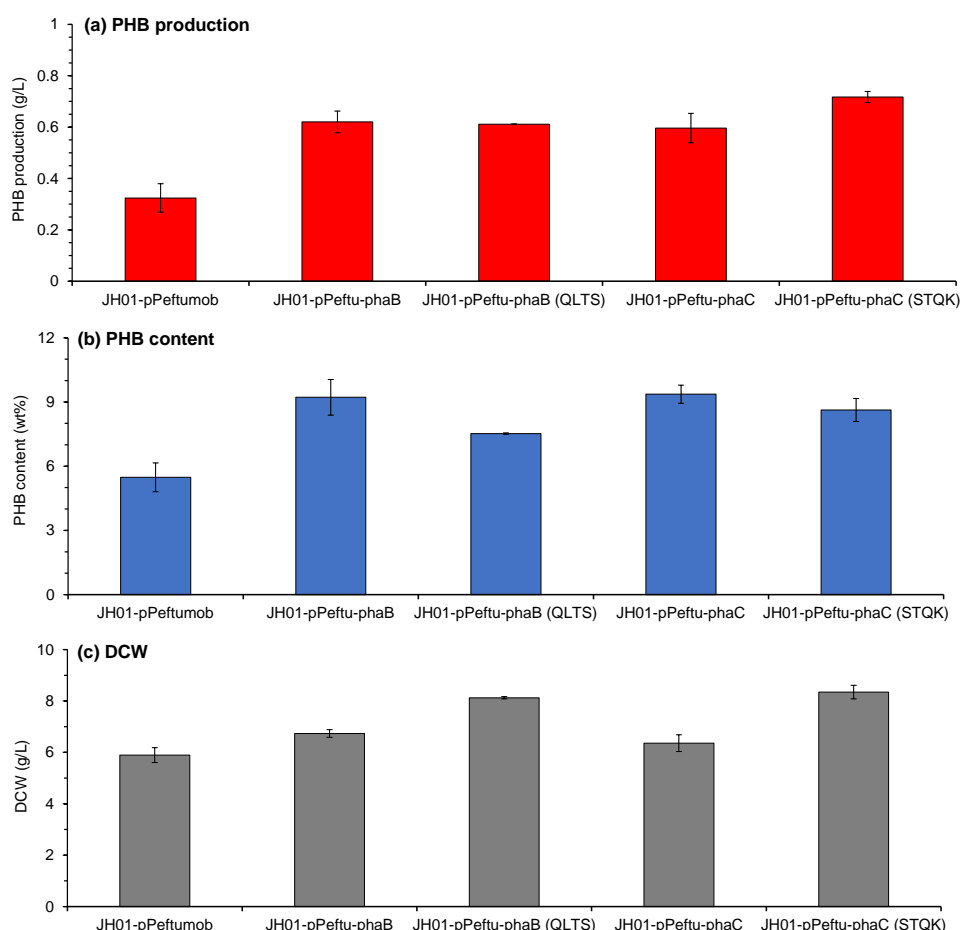


图 4.5 过表达 *phaB*(QLTS)和 *phaC*(STQK)基因促进 *C. glutamicum* JH01 的 PHB 生产

Fig. 4.5 Increasing PHB production of *C. glutamicum* JH01 by overexpression of *phaB*(QLTS) and *phaC*(STQK): (a) PHB production; (b) PHB content; (c) DCW

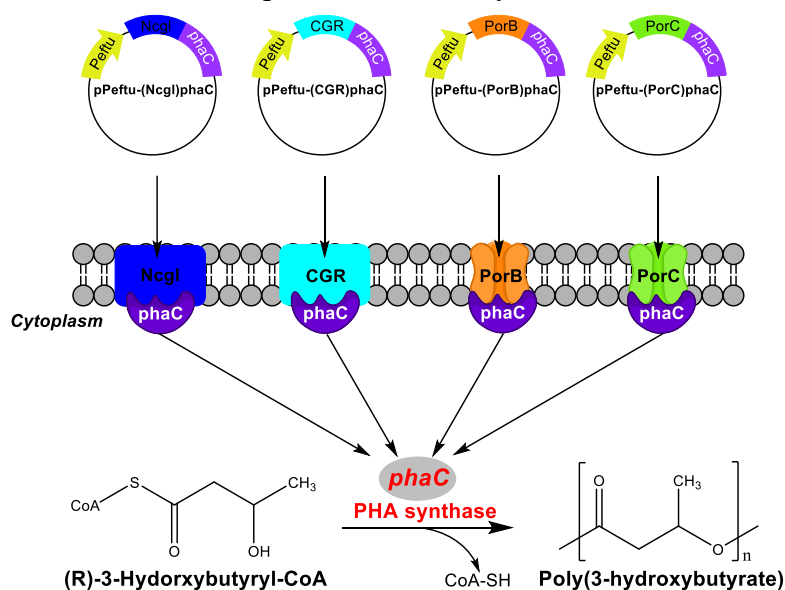
注：发酵培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

（2）膜结合表达 PHA 合酶。一方面，很多文献报道通过膜结合表达酶的方法可

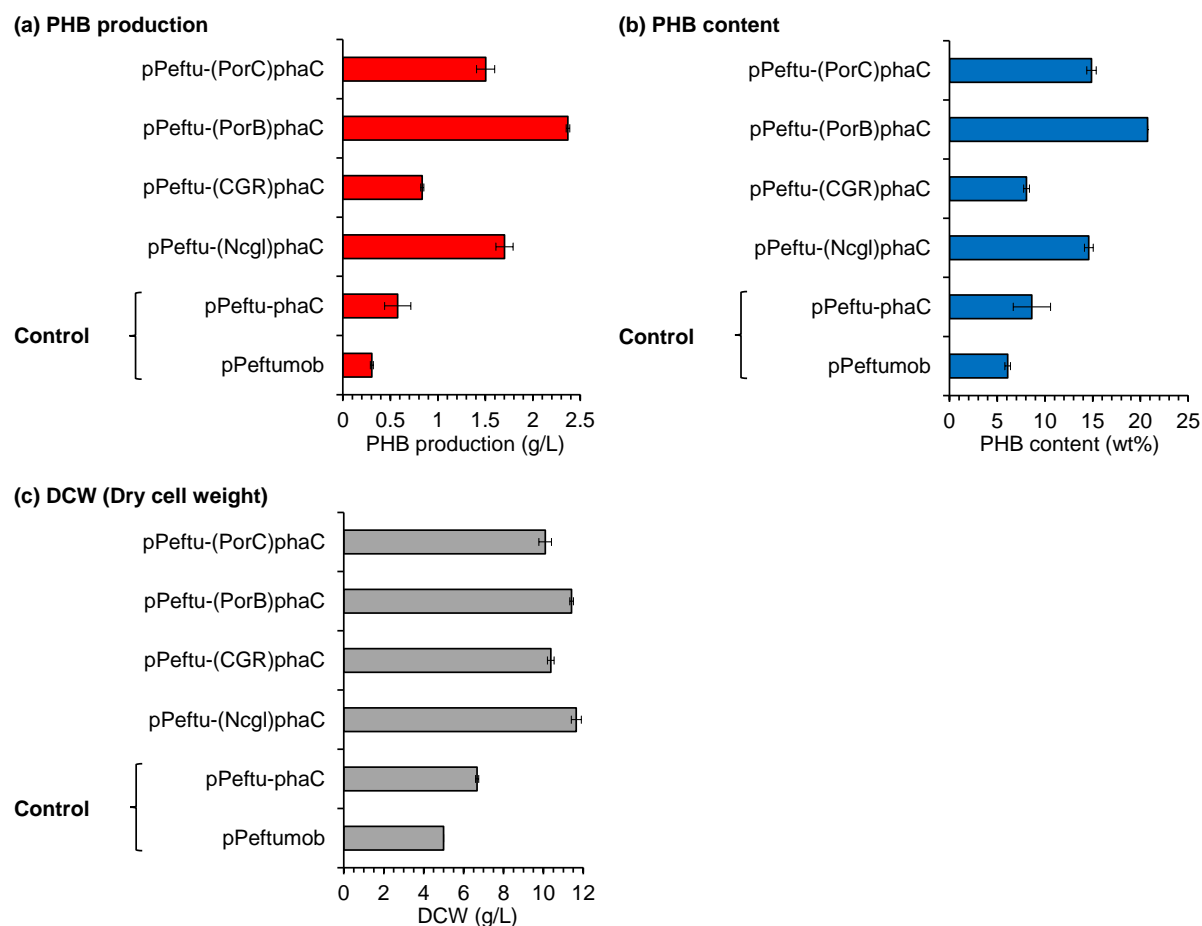
以提高酶的稳定性<sup>[274,275]</sup>；另一方面，一些研究表明，由于 PHB 的疏水性质，胞内 PHB 颗粒的初步形成是在细胞膜的磷脂双分子层内的疏水空间完成的，进而形成被单层膜包裹的 PHB 颗粒<sup>[276,277]</sup>。因此，我们计划将 PHA 合酶固定在细胞膜上，增加其稳定性的同时缩小生产上的空间距离。本研究首先选取了四个细胞膜锚定蛋白，分别是介导 Sec 蛋白分泌途径的 Ncgl1289 信号肽（缩写为 Ncgl）<sup>[247]</sup>；介导 Tat 蛋白分泌途径的 CGR\_RS04950 信号肽（缩写为 CGR）<sup>[248]</sup>；细胞膜孔蛋白 CGS9114\_RS00645（缩写为 PorC）和 CGS9114\_RS09485（缩写为 PorB）<sup>[249]</sup>。接着将这四个锚定蛋白的编码基因连接在 *phaC* 基因的氨基端，并在 *C. glutamicum* JH02 中进行融合表达，获得四个重组菌株 JH02-pPeftu-(Ncgl)*phaC*，JH02-pPeftu-(CGR)*phaC*，JH02-pPeftu-(porB)*phaC* 和 JH02-pPeftu-(porC)*phaC*，将它们与含有空载质粒的 JH02-pPeftumob 和过表达 *phaC* 基因的 JH02-pPeftu-*phaC* 重组菌株进行发酵对比，结果如图 4.6（II）所示。从结果可以看出，与只过表达 *phaC* 基因相比，PHA 合酶融合表达 Ncgl，porB 和 porC 蛋白可以使 PHB 含量显著提高 70.1%，140.6%和 72.3%；并且融合表达这三种蛋白都可以促进细胞生长，使细胞干重增加接近 1 倍，最终使 PHB 产量显著提高 195.0%，310.6% 和 160.5%。以上结果说明，通过将 PHA 合酶固定在细胞膜上可以显著提高 PHB 产量。

为了证实 PHA 合酶确实锚定在了细胞膜上，本研究将 GFP 绿色荧光蛋白的编码基因 *gfp* 连接到了 *phaC* 基因的羧基端，构建了锚定蛋白、PHA 合酶和 GFP 绿色荧光蛋白的融合表达系统，得到改造菌株 JH02-pPeftu-(Ncgl)*phaC(gfp)* 和 JH02-pPeftu-(porB)*phaC(gfp)*。通过共聚焦显微镜对改造菌株和对照菌株在相同的荧光强度下进行观测，结果如图 4.6（III）所示。从结果可以看出，对照菌株没有绿色荧光，JH02-pPeftu-(Ncgl)*phaC(gfp)* 的绿色荧光集中于细胞的两端且荧光亮度较高，而 JH02-pPeftu-(porB)*phaC(gfp)* 的绿色荧光平均分散在整个细胞中，推测 Ncgl 锚定蛋白将 PHA 合酶定位在细胞的两端，而 porB 锚定蛋白则将 PHA 合酶均匀的定位在细胞膜上。

(I) Diagram of membrane-located expression of PHA synthase



(II) Fermentation of *C. glutamicum* JH02 by membrane-located expression of PHA synthase



(III) Fluorescence microscopy of the JH02-Peftumob, JH02-Peftu-(Ncgl)phaC(gfp) and JH02-Peftu-(porB)phaC(gfp)

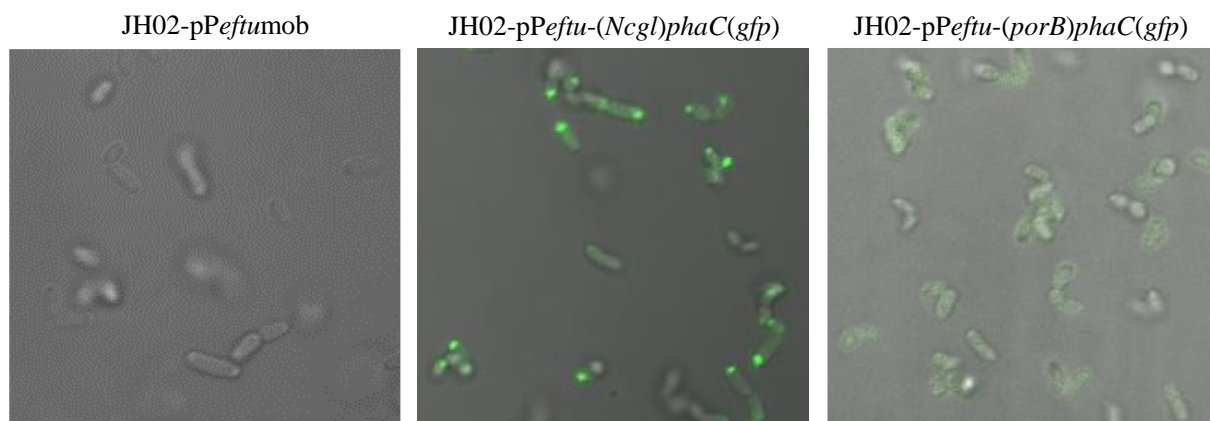


图 4.6 膜结合表达 PHA 合酶提高 PHB 产量

Fig. 4.6 Increasing PHB production of *C. glutamicum* JH02 by membrane-located expression of PHA synthase: (I) Diagram; (II) Fermentation comparison; (III) Fluorescence microscopy.

注：发酵培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

#### 4.3.5 改造谷氨酸棒状杆菌细胞形态促进 PHB 生产

足够大的细胞体积是胞内产物大量积累的前提，目前已经有一些通过改变细胞的形态和大小促进 PHB 生产的研究报道<sup>[120,122]</sup>。因此，本小节计划通过基因工程方法干扰谷氨酸棒状杆菌的生长分裂，改变细胞形态，增大细胞体积，促进 PHB 的生产。谷氨酸棒状杆菌属于放线菌属，因此表现为“顶端生长”的生长模式，即新的细胞壁是在细胞的两端进行合成，而控制谷氨酸棒状杆菌顶端生长的基因主要是 *DivIVA* 和 *RodA* 基因，它们编码的蛋白可以控制新合成的肽聚糖在细胞壁上的定位。相关文献报道过表达 *DivIVA* 和 *RodA* 基因会使细胞在两端合成大量的细胞壁，从而使形成类似于“酵母出芽”的形态，而对这两个基因进行敲除或弱化表达则会使细胞失去顶端生长的模式，形成球状形态<sup>[242,243]</sup>。当谷氨酸棒状杆菌生长到一定程度时，细胞开始进入分裂时期，这时 *FtsZ* 基因编码的细胞分裂环蛋白开始招募一些其他的蛋白来共同构成细胞质膜的内陷，从而使细胞完成分裂。相关文献报道过表达或者弱化 *FtsZ* 基因都会影响细胞的正常分裂，使细胞呈现出多节状<sup>[244]</sup>。而在细胞分裂的过程当中，一些信号转导蛋白，如 *pknA* 和 *pknB* 它们编码一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，能够磷酸化激活 *FtsZ* 蛋白，从而调控细胞分裂<sup>[245]</sup>；一些转录调控因子，如 *WhcD*，能够调控与细胞分裂相关基因的转录水平，从而影响细胞分裂<sup>[246]</sup>。

本小节在 PHB 生产菌株 JH02 中，通过表达质粒分别对以上六个基因：*FtsZ*，*pknA*，*pknB*，*DivIVA*，*RodA* 和 *WhcD* 进行过表达，获得了相应的六个重组菌株，分别为 JH02-p*Peftu-FtsZ*，JH02-p*Peftu-pknA*，JH02-p*Peftu-pknB*，JH02-p*Peftu-DivIVA*，JH02-p*Peftu-RodA* 和 JH02-p*PH36-WhcD*。值得一提的是，本研究多次尝试用 *Peftu* 启动子来表达 *WhcD* 基因，但是都未能获得正确的阳性克隆，推测可能是高水平的 *WhcD* 蛋白对细胞有毒性，抑制了细胞的生长，因此后面换用了表达强度相对较弱的 *PH36* 启动子，最后成功获得了重组菌株 JH02-p*PH36-WhcD*。将以上获得的过表达菌株与对照菌株 JH02-p*Peftumob* 进行 PHB 发酵对比，同时用光学显微镜对细胞形态进行观测，结果如图 4.7 所示。从结果可以看出，过表达 *pknB* 和 *WhcD* 基因对细胞的生长起到了很大的促进作用，使细胞干重增加了 1.0 和 1.1 倍，同时细胞的 PHB 含量没有降低，因此最终的 PHB 产量也增加了 1.8 和 1.6 倍；而过表达 *pknA* 和 *RodA* 基因对胞内 PHB 的含量影响最大，使 PHB 的含量增加了 43.4% 和 50.7%。但是从光学显微镜中并没有观察到细胞形态发生明显的变化。这说明这些基因的过表达虽然对谷氨酸棒状杆菌的形态影响有限，但是可以促进菌体的生长或提高胞内 PHB 的积累，从而使 PHB 产量增加。

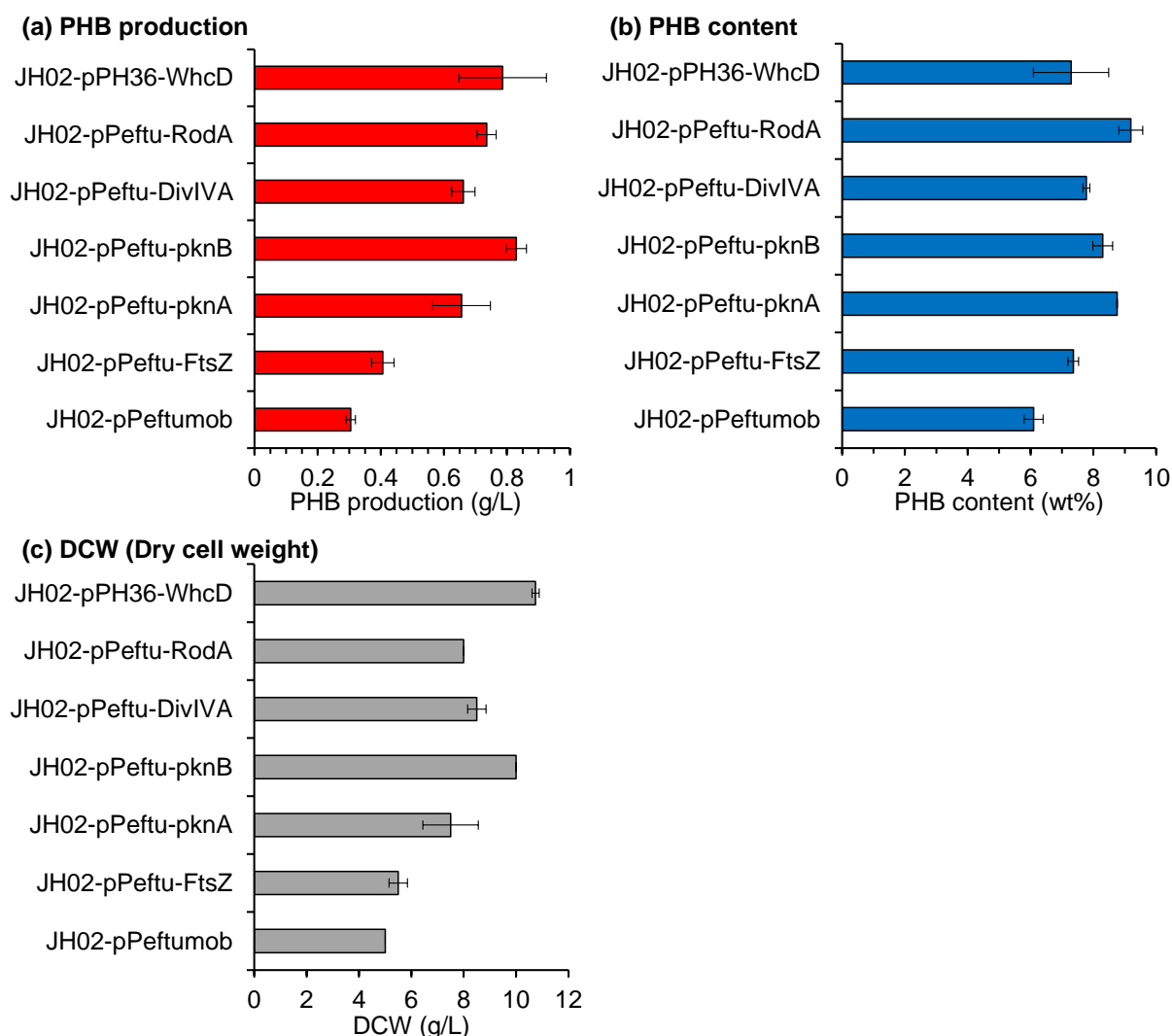


图 4.7 过表达细胞生长与分裂相关基因提高 *C. glutamicum* JH02 的 PHB 产量

Fig 4.7 Increasing PHB production of the *C. glutamicum* JH02 by overexpression of genes involved in cell growth and division: (a) PHB production; (b) PHB content; (c) DCW

注：发酵培养基的配方如材料和方法内容所示，发酵在 250 mL 摇瓶中进行，培养条件为 30 °C，200 rpm，每 12 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

本研究又进一步尝试了对以上六个基因进行弱化表达，具体的方法是在 JH02 的基因组上，将 *FtsZ*, *pknA*, *pknB*, *DivIVA*, *RodA* 和 *WhcD* 原始的 RBS 序列替换为转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列，经过多轮实验后，最终获得了三个弱化菌株，分别是 JH02-*pknA*\_RBS0.1, JH02-*pknB*\_RBS0.1 和 JH02-*DivIVA*\_RBS0.1。但是其他三个基因的弱化经过多次实验仍然得不到阳性克隆，因此推测对 *FtsZ*, *RodA* 和 *WhcD* 基因的弱化强度太高导致菌株不能正常生长，于是选择了其中对细胞分裂影响最关键的 *FtsZ* 基因，对它进行不同强度的弱化来测试对细胞形态的影响。鉴于 *FtsZ* 基因的原 RBS 序列的转录起始强度为 489.6，本研究分别选择了转录起始强度为 1.0、10 和 100 的 RBS 序列去替换 *FtsZ* 基因的原 RBS 序列，结果发现只有强度为 100 的 RBS 序列替换成功，而强度为 1.0 和 10 的 RBS 序列仍然会导致菌体无法生长。最后将获得的四个弱化

菌株 JH02-*pknA*\_RBS0.1, JH02-*pknB*\_RBS0.1, JH02-*DivIVA*\_RBS0.1 和 JH02-*FtsZ*\_RBS100 与对照菌株 JH02 进行发酵对比, 同时用 100 倍光学显微镜进行观测, 结果如图 4.8 所示。从结果可以看出, 弱化这四个基因的表达不但对胞内 PHB 的含量没有促进作用, 反而在弱化 *DivIVA* 和 *FtsZ* 基因时会显著降低胞内的 PHB 含量。在细胞的形态方面, JH02-*FtsZ*\_RBS100 与对照相比并无显著差异, 而弱化 *DivIVA* 基因菌株的细胞形态由原先的短杆状变为了球状。为了更加清楚地观测细胞形态的改变, 在场发射扫描电子显微镜下对细胞进行了进一步的观察, 从电镜照片可以看出, 对照菌株 JH02 为短杆状, 而改造菌株 JH02-*DivIVA*\_RBS0.1 为球型, 且存在部分细胞破裂的现象。以上结果说明对 *pknA*, *pknB* 和 *FtsZ* 基因表达的弱化不会对细胞形态造成显著影响, 而对 *DivIVA* 基因表达的弱化会使得细胞由短杆状变为球状, 但是这种细胞形态的改变并没有增加胞内 PHB 的含量。

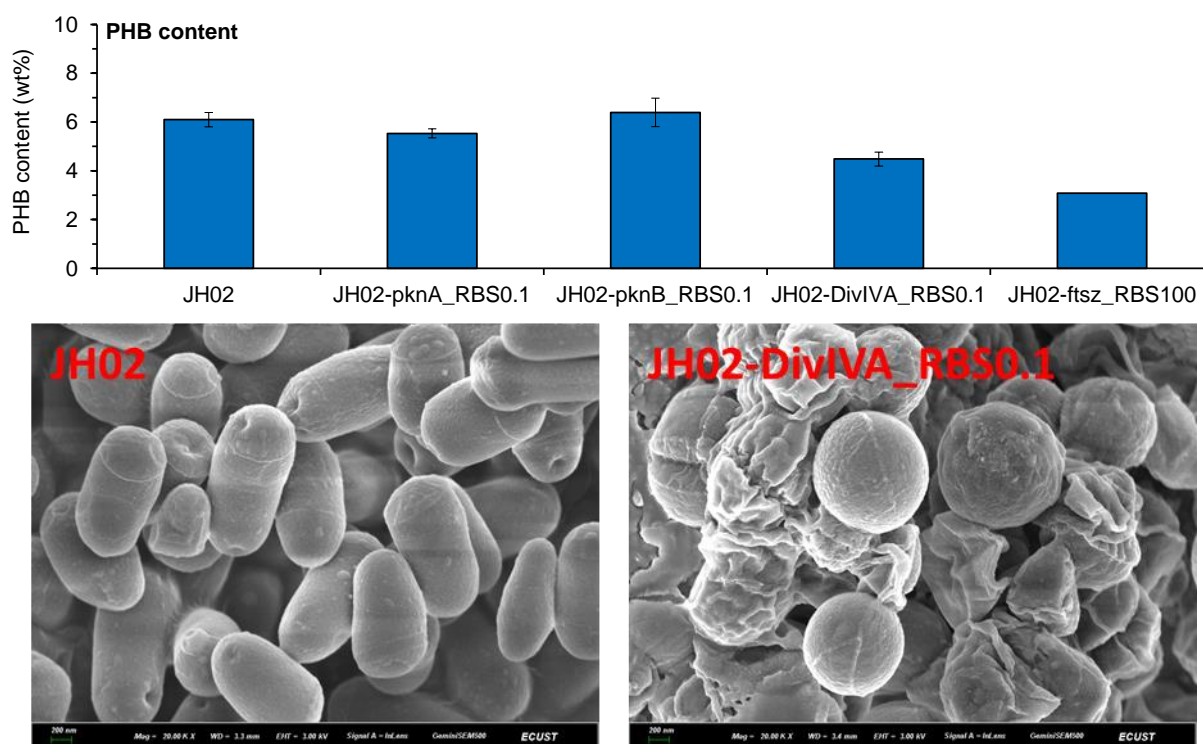


图 4.8 弱化与细胞生长和分裂相关基因提高 *C. glutamicum* JH02 的 PHB 产量

Fig. 4.8 Increasing PHB production of the *C. glutamicum* JH02 by attenuation of genes involved in cell growth and division: (a) PHB production; (b) PHB content

注: 发酵培养基的配方如材料和方法内容所示, 发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 培养条件为 30 °C, 200 rpm, 每 12 小时用 5 M 的 NaOH 调节培养基的 pH 至 7.0。

#### 4.3.6 探究氮源对于 PHB 生产的影响

PHB 是部分微生物在氮源限制的条件下, 利用多余的碳源合成的用于储存能量的物质, 类似于哺乳动物合成的糖原, 因此对于 PHB 生产菌株而言, 限制氮源是调控 PHB 生产的重要措施。本小节主要研究培养基中氮源添加量对于重组谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* JH02 生产 PHB 的影响, 选取的氮源添加量分别为 2 g/L, 8 g/L, 40 g/L, 45

g/L 和 50 g/L。需要强调的是，本实验是在发酵罐上进行的补料批发酵，氮源并不是全部添加在初始培养基中，而是通过用氨水调节 pH 和发酵过程中补加硫酸铵的方式将氮源逐步添加至培养基中，发酵结果如图 4.9 所示。从结果可以看出，最低的氨氮添加量为 2 g/L，但是在此条件下菌体生长和 PHB 生产都很低，说明培养基中的氨氮太少会抑制菌体生长和 PHB 合成；随着氨氮的增加，菌体生长和 PHB 生产都显著提高，并在氨氮添加量为 45 g/L 时达到最大值；当氨氮添加量进一步提高至 50 g/L 时，虽然菌体的生长不变，但是碳源却开始流向其他副产物的合成，导致 PHB 的产量降低。通过本实验说明补加过量氮源不仅可以促进细胞生长，还有利于谷氨酸棒状杆菌合成 PHB，并且确定了当氨氮添加量为 45 g/L 时最适合 *C. glutamicum* JH02 生产 PHB。

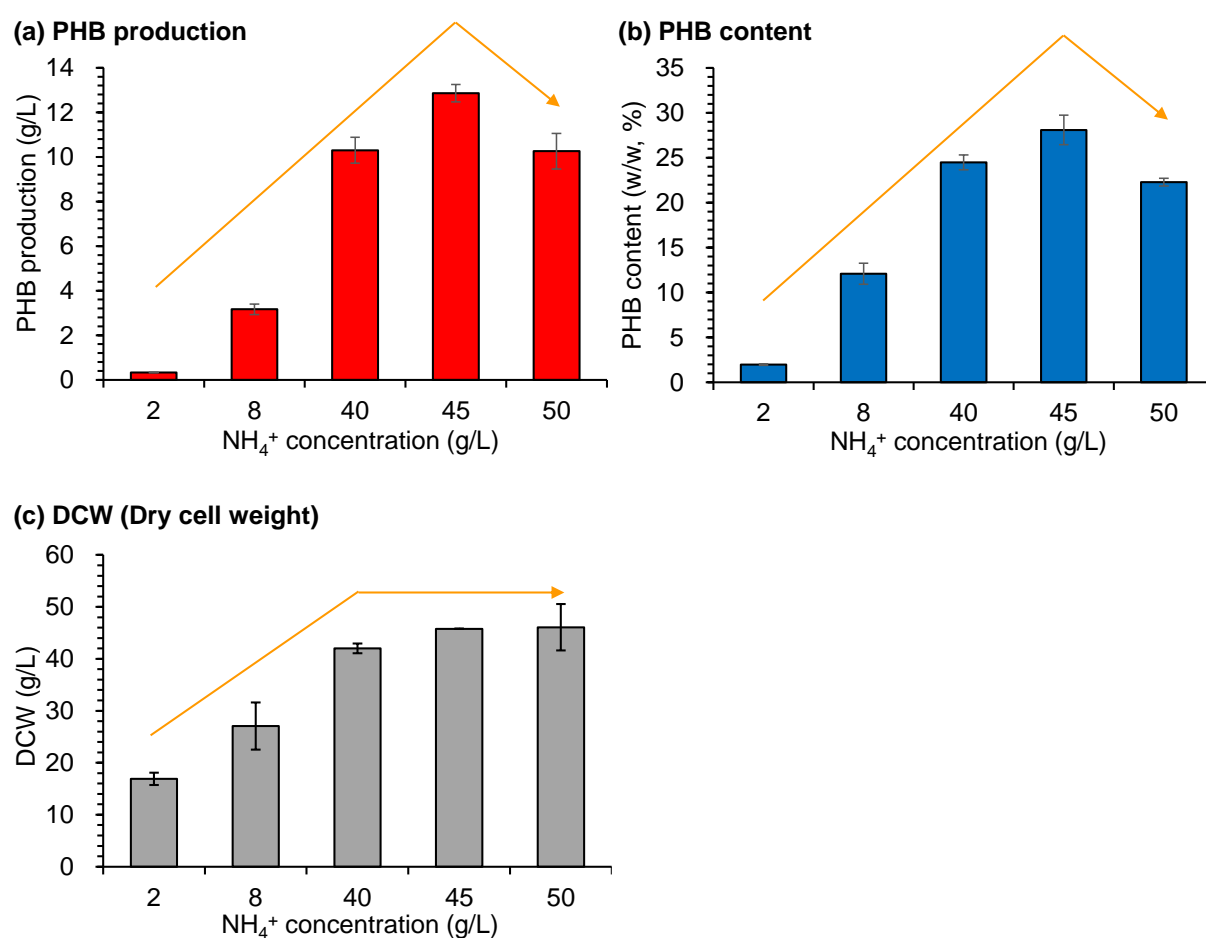


图 4.9 探究氨氮添加量对 *C. glutamicum* JH02 细胞生长和 PHB 生产的影响

Fig. 4.9 Exploring the influence of C/N ratio on *C. glutamicum* JH02 for cell growth and PHB production: (a) PHB production; (b) PHB content; (c) DCW; (d) Yield

注：氨氮添加量为 2 g/L 和 8 g/L 的实验组使用的是限氮培养基，用 NaOH 调节 pH，其他实验组使用的是富含氮源培养基，用氨水调节 pH，培养基的配方如材料和方法内容所示。在 3 L 发酵罐中进行补料批发酵，发酵条件为 30 °C，600 rpm，1.4 VVM（气泡太多后降低通气量至 0.5 VVM），pH 保持在 7.0，发酵进行 96 小时，每 24 小时补加一定量的硫酸铵和 200 mL 浓度为 500 g/L 的葡萄糖。

但是上述实验为了实现控制氨氮添加量为 2 g/L 和 8 g/L 的条件, 使用的 pH 中和剂是氢氧化钠, 与其他四组实验使用氨水作为 pH 中和剂不一样。因此, 为了排除是否是钠离子对 PHB 生产造成了影响, 本研究还检测了不同 pH 中和剂对于发酵结果的影响, 结果如图 4.10 所示。从结果可以看出, 用氢氧化钠和氢氧化钾作为 pH 中和剂得到的 PHB 产量和含量相近, 因此排除了钠离子抑制菌体生长和 PHB 生产的可能性; 而用氨水调节 pH 得到的 PHB 产量和含量都明显更高, 进一步说明了补充氮源对于 PHB 生产的重要性。

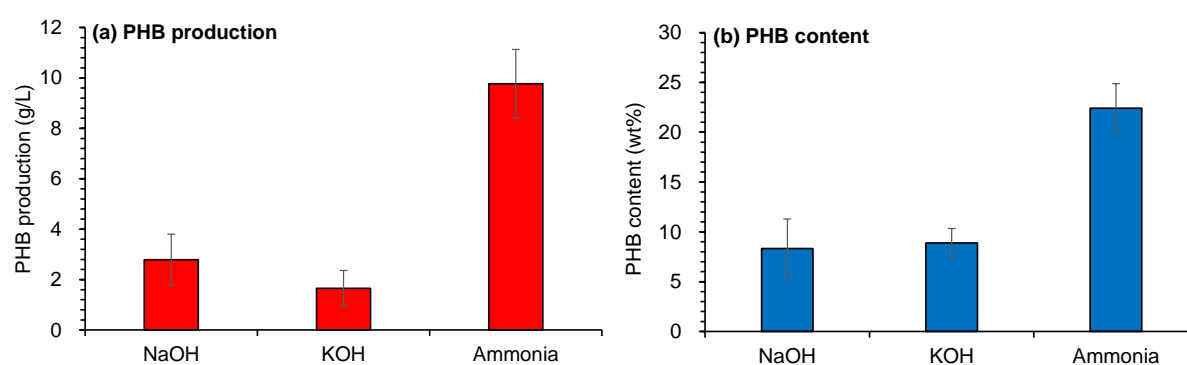


图 4.10 检测不同 pH 中和剂对 PHB 生产的影响

Fig. 4.10 Detecting the influence of different pH neutralizer on PHB production: (a) PHB production; (b) PHB content

注: 富含氮源培养基的配方如材料和方法内容所示。在 3 L 发酵罐中进行补料批发酵, 发酵条件为 30 °C, 600 rpm, 1.4 VVM (气泡太多后降低通气量至 0.5 VVM), pH 保持在 7.0, 发酵进行 96 小时, 每 24 小时补加 200 mL 浓度为 500 g/L 的葡萄糖。

为了进一步研究过量补加氮源对菌体生长和 PHB 生产的影响, 我们以氨氮添加量 2 g/L 的条件作为对照组, 以氨氮添加量 45 g/L 的条件作为实验组, 通过 qRT-PCR 实验检测过量补充氮源对于 *C. glutamicum* JH02 菌体内相关基因转录水平的影响, 结果如图 4.11 所示。从结果可以看出, 基因转录水平的变化主要集中在三个方面: (1) 糖酵解途径和 TCA 循环中的大部分基因转录水平都显著上调, 这与细胞干重显著增加的结果相吻合, 说明补充氮源有利于物质代谢和能量代谢相关基因的表达, 促进了细胞生长, 提高了细胞活力; (2) 与 NADPH 再生相关基因的转录水平显著上调, 除了糖酵解途径和 TCA 循环中催化 NADPH 再生的基因都显著上调外, 催化 6-磷酸葡萄糖合成 5-磷酸核酮糖的相关基因 (*zwf* 和 *pgl*) 也发生了显著上调, 而这条路径是 NADPH 再生的主要路径。另一方面, PHB 的合成也需要辅酶 NADPH 提供还原力, 因此可以推测补加氮源促进了胞内 NADPH 的再生, 促进了 PHB 的合成; (3) PHB 主要合成路径相关基因 (*phaA*, *phaB* 和 *phaC*) 的转录水平显著上调, 这也与 PHB 产量, 含量和得率提高的结果相吻合, 说明补充氮源有利于 PHB 合成基因的表达, 促进了 PHB 生产。另一方面, 通过对 *phaCAB* 基因不同时间点转录水平的分析, 发现 *phaA* 基因的转录水平始终在增加, 推测菌体内有大量乙酰辅酶 A 的积累, 需要通过 *phaA* 基因编码的  $\beta$ -酮硫解酶转化为乙酰乙

酰辅酶 A。而 *phaB* 基因的转录水平先增加后降低，推测随着发酵的进行，*phaB* 基因编码的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶的反应底物供应充足，但是辅酶 NADPH 供应不足，因此不需要更多的还原酶催化反应，NADPH 再生相关基因的转录水平上调也侧面说明了辅酶 NADPH 供应不足的事实。综上所述，qRT-PCR 实验说明过量补加氮源促进了菌体物质代谢、能量代谢、辅酶 NADPH 再生和 PHB 合成相关基因的表达，从而促进了菌体生长和 PHB 生产。

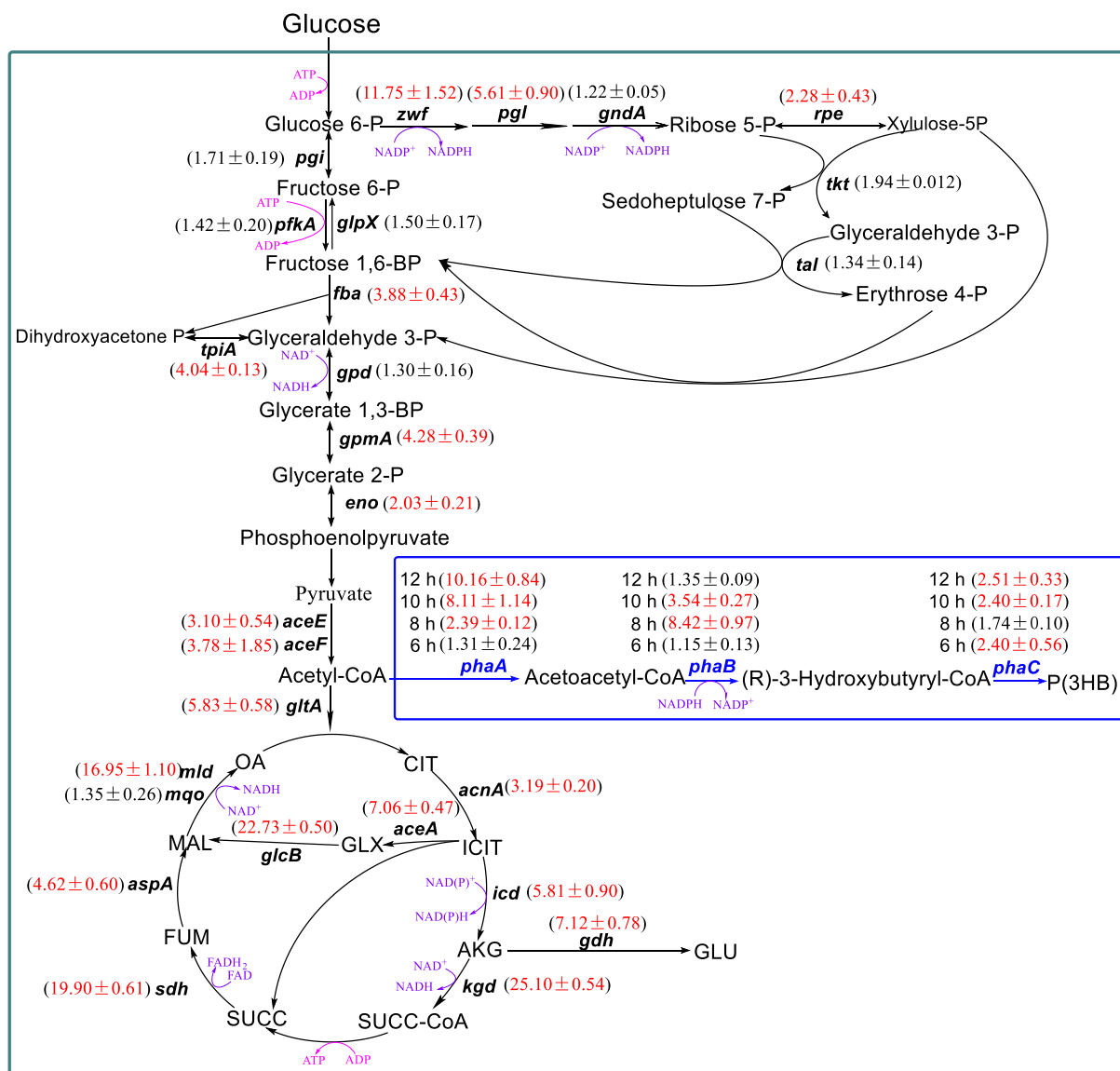


图 4.11 补充氮源条件下 *C. glutamicum* JH02 的基因转录水平分析

Fig. 4.11 Genes transcription level analysis of *C. glutamicum* JH02 in supplementary nitrogen condition  
 注：对照组使用限氮培养基，实验组使用富含氮源培养基，配方如材料和方法内容所示。在 3 L 发酵罐中培养菌体，发酵条件为 30 °C，600 rpm，1.4 VVM，pH 保持在 7.0，发酵进行 12 小时。红色表示显著上调表达的基因，黑色表示差异表达不显著的基因。

### 4.3.7 合成培养基发酵生产 PHB

为了检验改造菌株在发酵罐中生产 PHB 的性能，本小节将含有空载质粒的 JH02-pPeftumob 和两株 PHB 产量最高的改造菌株 JH02-pPeftu-(Ncgl)phaC 和 JH02-pPeftu-(porB)phaC 在合成培养基中进行补料批发酵对比，结果如图 4.12 所示。从发酵结果可以看出，三株菌种的细胞生长和糖利用速率方面差别较小，对照菌株的 PHB 含量为 28.1 wt%，PHB 产量为 12.9 g/L；改造菌株 JH02-pPeftu-(Ncgl)phaC 的 PHB 含量为 32.1 wt%，PHB 产量为 15.1 g/L，与对照相比分别提升 14.2%和 17.1%；改造菌株 JH02-pPeftu-(porB)phaC 的 PHB 含量为 32.0%，PHB 产量为 15.5 g/L，与对照相比分别提升 13.9%和 20.2%，PHB 得率为 6.4%。以上结果说明改造菌株的 PHB 产量和含量与对照相比有显著提升，但是提升幅度与摇瓶中的实验结果存在一定差距，推测可能是使用的氨氮添加量等培养条件是以 JH02 菌株为模板测试得出的最适培养条件，并不是最适合改造菌株发酵生产的条件，并且培养条件的改变对发酵结果也有显著影响，因此缩小了对照菌株与改造菌株之间的差异。但是与目前已报道的利用谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的结果相比，本研究实现了谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的最高指标，且 PHB 产量提升巨大，几乎超过同类研究结果一个数量级（表 4.7）。

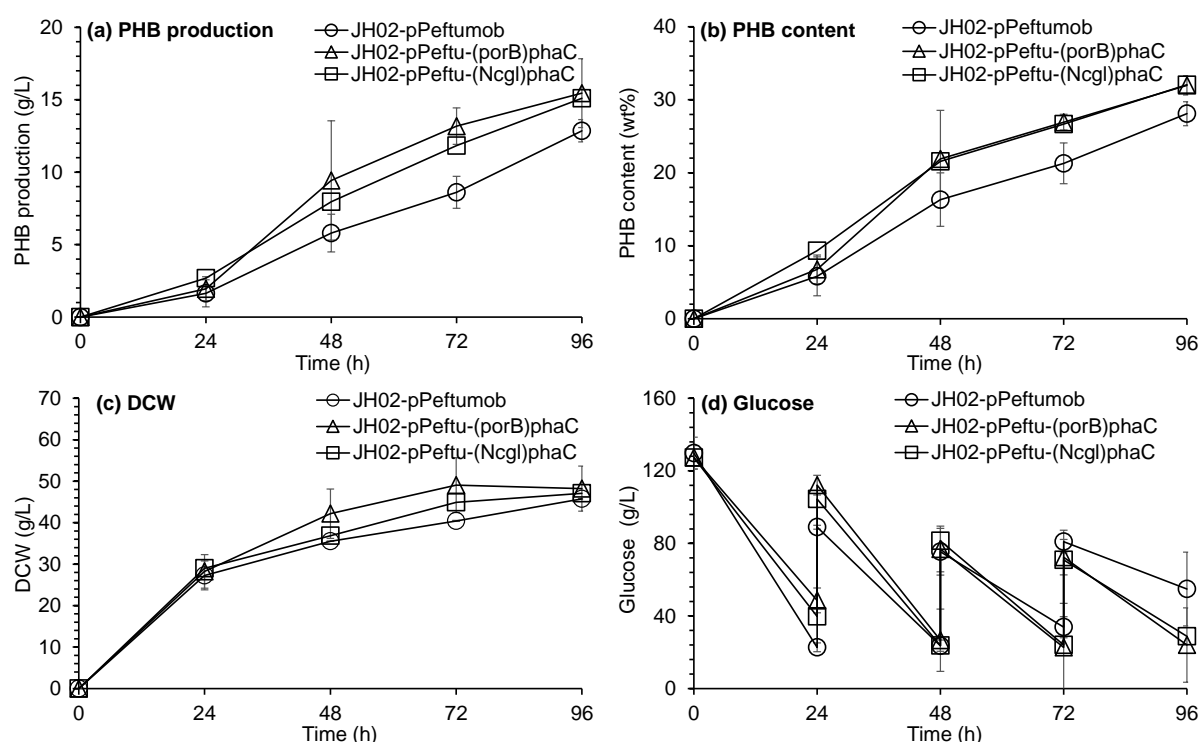


图 4.12 改造菌株利用合成培养基补料批发酵生产 PHB

Fig. 4.12 PHB production of engineering strains in synthetic medium by fed-batch fermentation: (a) PHB production; (b) PHB content; (c) DCW; (d) glucose

注：富含氮源培养基的配方如材料和方法内容所示。在 3 L 发酵罐中进行补料批发酵，发酵条件为 30 °C，600 rpm，1.4 VVM（气泡太多后降低通气量至 0.5 VVM），用氨水调节 pH 为 7.0，发酵进行 96 小时，每 24 小时补加一定量 400 g/L 的硫酸铵使培养基中硫酸铵的终浓度达到 5 g/L，每 24 小时补加 200 mL 浓度为 500 g/L 的葡萄糖。

表 4.7 目前已报道的利用谷氨酸棒状杆菌发酵生产 PHB 的结果汇总  
Table 4.7 Summary of the reported results of PHB production by *C. glutamicum*

Titer (g/L)	Content (wt%)	Yield (g/g glucose)×100%	Feedstock	Sources
2.8	22.5	4.7	Glucose	[233]
-	52.5	-	Glucose	[234]
-	36.0	-	Glucose	[235]
1.7	19.0	2.8	Glucose	[236]
0.4	6.4	0.9	Starch	[237]
0.2	2.2	0.3	Glucose	[238]
1.0	12.1	1.3	Glucose	[238]
15.5	32.0	6.4	Glucose	This study

#### 4.3.8 麦秆水解液发酵生产 PHB

为了测试改造菌株在真实水解液中的 PHB 生产性能, 本小节将含有空载质粒的 JH02-pPeftumob 和两株改造菌株 JH02-pPeftu-(Ncgl)phaC 和 JH02-pPeftu-(porB)phaC 在麦秆水解液中进行补料批发酵对比, 结果如图 4.13 所示。从发酵结果可以看出, 对照菌株 JH02-pPeftumob 可以生产 6.9 g/L 的 PHB, PHB 含量为细胞干重的 24.8 wt%; 改造菌株 JH02-pPeftu-(Ncgl)phaC 可以生产 16.2 g/L 的 PHB, PHB 含量为细胞干重的 39.0 wt%, 与对照相比分别提升 134.8%和 57.3%, PHB 得率为 13.2%; 改造菌株 JH02-pPeftu-(porB)phaC 可以生产 7.8 g/L 的 PHB, PHB 含量为细胞干重的 26.4 wt%, 与对照相比分别提升 11.5%和 6.5%。以上结果说明 JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 最适合在麦秆水解液环境中生产 PHB。造成这种结果的原因可能是 Ncgl 分泌信号肽将大部分 PHA 合酶定位在胞内, 因此 PHA 合酶较为稳定, 受抑制物的影响较小。而 PorB 细胞表面展示蛋白可能将大部分 PHA 合酶暴露在了细胞膜外, 因此在水解液环境中存在的各种抑制物可能会极大地抑制暴露在膜外的 PHA 合酶的活性, 导致 PHB 产量降低。

与目前已报道的利用真实木质纤维素生产 PHB 的研究相比 (Cesario 等人将木质纤维素水解液进行高度蒸发浓缩, 耗能巨大, 不具参考与对比性, 因此没有列出)<sup>[250]</sup>, 如表 4.8 所示。从对比结果可以看出, 已报道的研究都是采用天然可以积累 PHB 的菌株进行发酵, 所以这些菌株的 PHB 含量较高, 但是这些研究使用的木质纤维素水解液的糖浓度普遍偏低, 细胞量较少。这是因为这些菌株对木质纤维素体系中的抑制物耐受性较差, 因此这些研究往往采用强度较弱的预处理方法 (水热预处理和生物预处理), 或者用高成本的脱毒方法 (膜过滤、过碱中和与活性炭脱毒) 来避免抑制物的影响。但是这些措施一方面增加了利用木质纤维素原料的成本, 与出发目的背道而驰; 另一方面这些措施降低了木质纤维素可发酵糖的利用率, 削弱了木质纤维素的经济竞争力。而本研究从一个耐受抑制物的谷氨酸棒状杆菌出发, 通过合成生物学的方法, 在此菌株中构建并优化 PHB 生产路径, 得到的改造菌株可以利用高固含量的木质纤维素水解液进行发酵生产高浓度的 PHB, 实现了真实木质纤维素水解液生产 PHB 的最高指标。

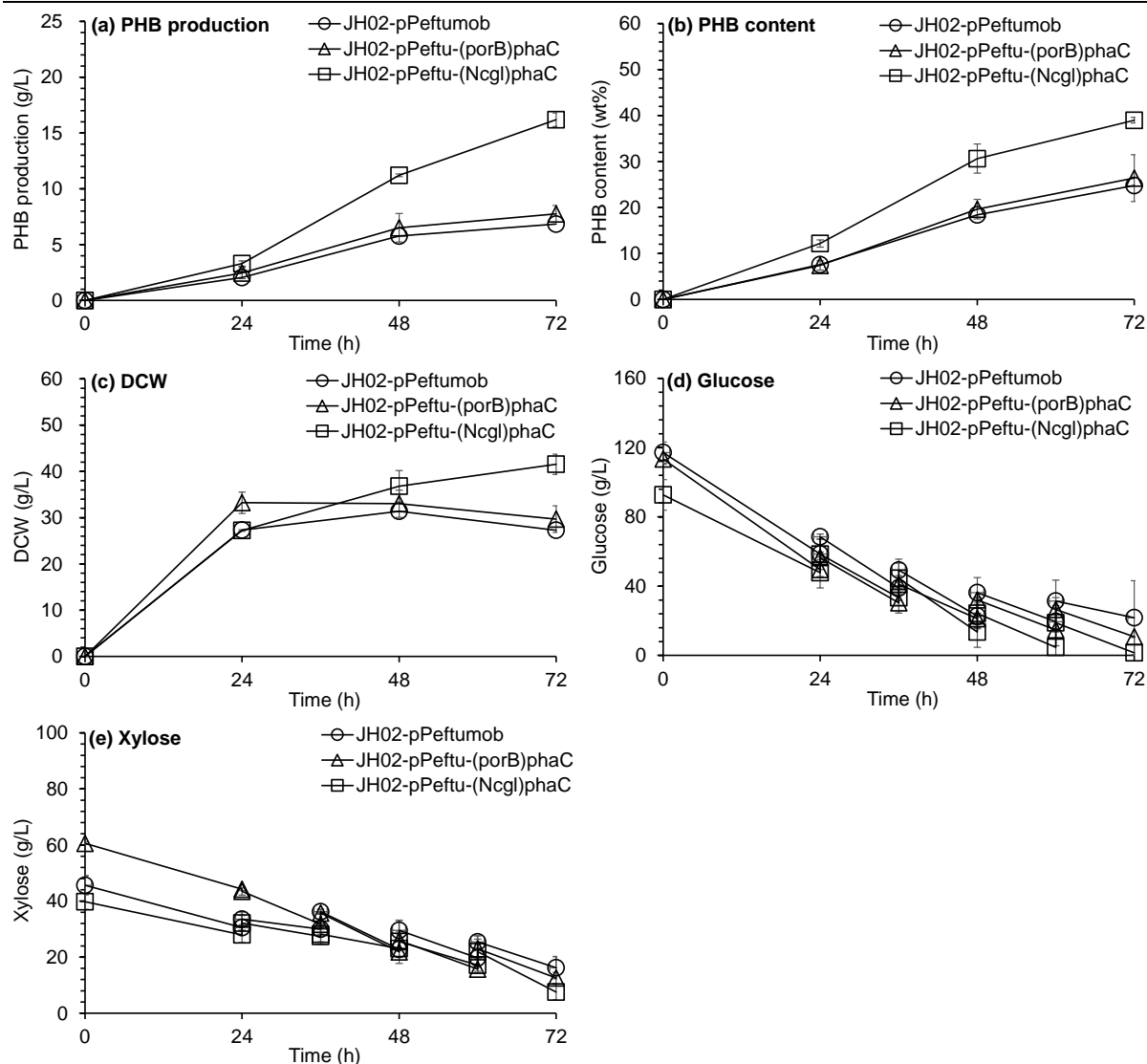


图 4.13 改造菌株利用麦秆水解液补料批发酵生产 PHB

Fig. 4.13 PHB production of engineering strains in wheat straw hydrolysate by fed-batch fermentation:  
 (a) PHB production; (b) PHB content; (c) DCW; (d) glucose; (e) xylose

注：麦秆水解液的组成如材料和方法内容所示。在 3 L 发酵罐中进行补料批发酵，发酵条件为 30 °C，600 rpm，1.4 VVM，用氨水调节 pH 为 7.0，发酵进行 72 小时，从 24 小时开始每 12 小时补加 200 mL 麦秆水解液。

表 4.8 目前已报道的利用木质纤维素生产 PHB 的结果汇总

Table 4.8 Summary of the reported results of PHB production from lignocellulose biomass

Producing strain	Carbon source	Pretreatment and detoxification	DCW (g/L)	Content (wt %)	Titer (g/L)	Sources
<i>Azotobacter beijerinickii</i>	Coir pitch (Glucose)	Autoclave	5.0	48.0	2.4	[251]
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wood hydrolysate (Xylose)	Acid pretreatment; Membrane filtration	17.0	51.4	8.7	[252]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose)	Acid pretreatment;	6.0	65.0	3.9	[188]
<i>Bacillus megaterium</i>	Oil palm empty fruit bunch (Glucose and xylose)	Alkaline pretreatment	24.2	51.6	12.5	[253]
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose and xylose)	Acid pretreatment;	4.4	53.0	2.3	[254]
<i>Burkholderia sacchari</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose and xylose)	Overliming and activated carbon Acid pretreatment;	4.4	62.0	2.7	[254]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Water hyacinth hydrolysates (Glucose)	Overliming and activated carbon Acid pretreatment;	12.0	58.3	7.0	[255]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose)	Overliming Acid pretreatment;	10.6	39.6	4.2	[256]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Wheat bran hydrolysate (Glucose)	Overliming Alkaline pretreatment	24.5	62.5	14.8	[257]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Sunflower stalk hydrolysate (Glucose and xylose)	Hydrothermal treatment	11.0	72.5	7.9	[258]
<i>Bacillus megaterium</i>	Corn husk hydrolysate (Glucose and xylose)	Biologically pretreated	1.7	57.8	1.0	[259]
<i>Paracoccus sp</i>	Corn stover (Glucose and xylose)	Alkaline pretreatment	14.8	72.0	9.7	[260]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Wheat straw hydrolysate (Glucose and xylose)	Acid pretreatment; Bio-detoxification	41.6	39.0	16.2	This study

#### 4.4 本章小结

本章节从第二章节得到的可以利用葡萄糖和木糖，并且具备高抑制物耐受性的 *C. glutamicum* GJ01 出发，通过合成生物学的方法，在此菌株中引入了 PHB 合成路径，并针对 PHB 生产做了定向优化和改造，最终得到的改造菌株不仅实现了谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的最高指标，还实现了真实木质纤维素体系生产 PHB 的最高指标。本章主要的研究结论如下：

(1) 谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* GJ01 比赖氨酸生产菌株 *C. glutamicum* LJ01 更适合作为生产 PHB 的出发菌株，用 *P<sub>eftu</sub>* 启动子表达来自罗氏菌的 *phaCAB* 基因可以使重组菌株有最佳的 PHB 生产能力，并且在将 *phaCAB* 基因分步整合至基因组上后，可以获得一株稳定生产 PHB 的菌株 *C. glutamicum* JH01。

(2) 通过合成生物学的方法对 *C. glutamicum* JH01 的 PHB 生产性能进行定向优化，发现 PHB 合成前体乙酰辅酶 A 的供给充足，而主要限速原因在于 PHB 合成路径关键酶的活力较低。

(3) 在谷氨酸棒状杆菌中通过膜结合表达 PHA 合酶的方法可以提高 PHA 合酶的稳定性，极大的提高 PHB 的生产。

(4) 对谷氨酸棒状杆菌细胞分裂和形态相关基因进行过表达或弱化表达，虽然对细胞形态的影响较小，但是过表达这些基因都对细胞生长和 PHB 生产有一定的促进作用，而弱化表达这些基因对 PHB 的生产影响较小。

(5) 合适的氨氮添加量对于 *C. glutamicum* JH02 的 PHB 生产极为重要，氨氮添加量过高会使菌体生长过于旺盛，降低 PHB 的产量；而氨氮添加量过低会抑制菌体的生长和 PHB 积累，当氨氮添加量为 45 g/L 时最适合 *C. glutamicum* JH02 生产 PHB。对基因的转录水平进行分析，发现过量补加氮源可以促进菌体物质代谢、能量代谢、辅酶再生和 PHB 合成相关基因的表达，从而促进菌体生长和 PHB 生产。

(6) 最终得到的重组谷氨酸棒状杆菌可以利用合成培养基生产 15.5 g/L 的 PHB，PHB 含量为细胞干重的 32.0 wt%，是目前利用谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的最高指标；重组谷氨酸棒状杆菌可以利用小麦秸秆水解液生产 16.2 g/L 的 PHB，PHB 含量为细胞干重的 39.0 wt%，是目前真实木质纤维素体系生产 PHB 的最高指标。

## 第 5 章 应用适应性进化方法提高氧化葡萄糖酸杆菌对木质纤维素中全糖的利用速率

### 5.1 引言

第二章和第三章分别构建了可以利用木糖生产谷氨酸和赖氨酸的工程菌株，但是当用适应性进化方法提高木糖利用速率时，都出现了木糖利用速率增加，但是产物合成减少的现象。因此本研究推测进化要与生长相关联，才能达成进化的目标，谷氨酸和赖氨酸都不是和生长偶联型的细胞代谢产物，因此适应性进化反而减弱了谷氨酸和赖氨酸的生产。为了证实我们的推测，这里我们选择以氧化葡萄糖酸杆菌为研究对象，它可以催化糖生成相应的糖酸，同时为细胞生长提供能量，因此糖酸是一种生长偶联型产品。对氧化葡萄糖酸杆菌进行适应性进化以验证我们的推测是否正确。

*Gluconobacter oxydans* 是属于醋酸杆菌科的一种革兰氏阴性菌，是一种专性需氧且为杆状的嗜酸菌。氧化葡萄糖酸杆菌细胞膜上的葡萄糖脱氢酶不仅可以将葡萄糖转化为葡萄糖酸，还可以将木糖转化为木糖酸，将半乳糖转化为半乳糖酸，将甘露糖和阿拉伯糖转化为甘露糖酸和阿拉伯糖酸<sup>[261,262]</sup>。这些糖酸类化合物在食品，药品和建筑等行业都发挥着重要的作用<sup>[263-265]</sup>。*G. oxydans* 可充分利用木质纤维素中的各种碳源，并将之转化为相应的糖酸，但是 *G. oxydans* 在利用非葡萄糖碳源（木糖，半乳糖，甘露糖，阿拉伯糖）时的转化速率较低<sup>[266]</sup>，这就显著延长了纤维素中的所有糖分转化为相应糖酸的发酵时间，严重降低了生产效率<sup>[267]</sup>。

一般有两种方法来提高氧化葡萄糖酸杆菌对糖的转化效率。一种是利用全细胞催化的方法，但是这种方法需要大量的细胞，这样就不可避免地增加了细胞培养和收集的成本<sup>[268,269]</sup>。第二种方法是增加微生物对特定环境压力的适应性，进而提高其糖转化效率。在复杂的木质纤维素体系中，适应性进化方法被大量的使用，提高微生物对于木质纤维素体系的适应性，同时其底物代谢速率和产物生成速率也有所提高<sup>[270]</sup>。Qiu 等人将一株经过改造后可以利用木糖的乳酸片球菌在含有木糖的培养基中进行了 27 天的适应性进化培养，成功地使菌体的木糖利用速率提高了 10 倍<sup>[271]</sup>。Wang 等人将一株经过改造的酿酒酵母进行短期的适应性进化培养，使菌体的阿拉伯糖利用速率提高了 4.2 倍<sup>[272]</sup>。这些研究表明适应性进化是一种提高微生物糖转化效率的有效方法。

*G. oxydans* 可以将木质纤维素中的各种糖转化为相应的糖酸，但是其对非葡萄糖碳源的转化效率较低。本章采用交替适应性进化的方法，将氧化葡萄糖酸杆菌在水解液中进行不断的传代培养，同时为了逐步提高菌株对于水解液体系的适应性，在传代培养的过程中采用了一代用无抑制物的水解液进行培养，下一代用含有抑制物的水解液进行培养的策略。*G. oxydans* 在这样的培养模式中进行了长达 420 天的适应性进化，最终得到的进化菌株 *G. oxydans* RM7 对于全糖的转化速率显著提高。进一步比较进化菌株和原始菌株中葡萄糖脱氢酶 (*mGDH*) 的基因序列和转录水平，发现 *mGDH* 的转录水平显著上调，这可能是进化菌株糖耗速率增加的主要原因。本研究为提高发酵菌株在木质纤维

素体系中的全糖利用速率提供了一个有效的策略。

## 5.2 材料与方法

### 5.2.1 木质纤维素原料

玉米秸秆是 2015 年秋季，从内蒙古自治区的巴彦淖尔盟收购的。收集好的秸秆经过粉碎后，再通过直径为 10 毫米的筛网进行筛分，筛分后的秸秆再经过水洗除去泥土，石块和金属等杂质，在 105℃ 烘干至恒重后保存在封闭的塑料袋中备用。根据 NREL 的两步酸解法测得玉米秸秆含有 35.4% 的纤维素和 24.6% 的半纤维素。

### 5.2.2 酶和化学试剂

纤维素酶和化学试剂的来源与用途见 2.2.2。

### 5.2.3 菌株和培养基

氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 是从德国不伦瑞克的德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 购买的。两种合成培养基的成分如下：

种子培养基含有 80.0 g/L 山梨醇，10.0 g/L 酵母提取物，1.5 g/L 磷酸二氢钾，1.5 g/L 硫酸铵和 0.5 g/L 七水合硫酸镁。

发酵培养基含有 40.0 g/L 葡萄糖（或木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖），10.0 g/L 酵母提取物，1.5 g/L 磷酸二氢钾，1.5 g/L 硫酸铵和 0.5 g/L 七水合硫酸镁。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 的来源和培养基见 2.2.1。

### 5.2.4 生物炼制过程

玉米秸秆的预处理，生物脱毒和酶水解过程与小麦秸秆的处理相同，见 2.2.6。

### 5.2.5 适应性进化

氧化葡萄糖酸杆菌的适应性进化主要通过含有抑制物的水解液和不含抑制物的水解液中进行不断地转接培养来完成。具体过程如下：在 100 mL 的摇瓶中加入 20 mL 不含抑制物的水解液，将氧化葡萄糖酸杆菌接种到不含抑制物的水解液中，在 30 °C，220 rpm 的条件下培养 24 小时。然后将培养好的菌体以 10% (v/v) 的接种量加入到新鲜的含有抑制物的水解液中，在相同的条件下再培养 24 小时。培养好的菌体按照同样的接种量再加入到不含抑制物的水解液中，如此重复循环这个过程，一共连续培养了 420 天。每次转接时，在水解液中加入 0.16 g CaCO<sub>3</sub> 将 pH 保持在 5-6 之间。前 34 次转接使用的含有抑制物的水解液的具体组分如下：54.5 g/L 葡萄糖，23.5 g/L 木糖，3.2 g/L 乙酸，0.3 g/L 糠醛和 0.2 g/L 5-羟甲基糠醛 (HMF)。34 次转接之后使用的含有抑制物的水解液的具体组分如下：62.9 g/L 葡萄糖，29.7 g/L 木糖，6.2 g/L 乙酸，0.2 g/L 糠醛和 0.2 g/L HMF。不含抑制物的水解液的具体组分如下：67.2 g/L 葡萄糖，21.8 g/L 木糖和 0.6 g/L 乙酸。

### 5.2.6 好氧发酵

从 -80 °C 冰箱中取出一支含有 2 mL 氧化葡萄糖酸杆菌的冻存管，待自然解冻后，将

冻存管中的菌液全部加入含有 20 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 220 rpm 的条件下培养 15 小时。在摇瓶中进行发酵时, 将种子液按照 10% 的接种量加入含有 45 mL 水解液的 250 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 220 rpm 的条件下发酵 72 小时。在发酵过程中, 每 6 小时用 5 M NaOH 调节 pH 范围至 5-6 之间。

在生物反应器中进行发酵时, 首先需要把经过预处理和脱毒后的玉米秸秆按照 30% 的固含量加入到生物反应器中, 按照 2.2.6 中所述的酶水解方法添加纤维素酶进行水解反应 48 小时, 然后将得到的 2.5 L 玉米秸秆糖化醪用灭过菌的烧杯转移至 5 L 生物反应器中, 接着将预培养好的种子液按照 5% (v/v) 的接种量添加到生物反应器中。在温度为 35 °C, 通气量为 1.0 vvm, 转速为 500 rpm 的条件下发酵 72 小时, 发酵过程中用 5 M NaOH 维持 pH 在 4.8。

### 5.2.7 分析方法

本实验用装配有 HPX-87P 型色谱分析柱 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 来分析测定培养基中的各种糖类, 包括 D-葡萄糖, D-木糖, D-半乳糖, L-阿拉伯糖和 D-甘露糖, 测定时柱温保持在 80 °C, 使用的流动相为灭菌水, 流速为 0.6 mL/min, 因为 L-阿拉伯糖和 D-甘露糖的出峰时间相同, 所以本章将两者的浓度合并在一起进行计算。

发酵产物中的 D-葡萄糖酸和 D-木糖酸用装配有 HPX-87H 型色谱分析柱 (Biorad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC (LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行分析测定, 柱温控制在 55 °C, 流动相为 5 mM 硫酸, 流速为 0.4 mL/min, 检测波长为 210 nm。发酵产物中的其他糖酸 (D-半乳糖酸, D-甘露糖酸和 L-阿拉伯糖酸) 用装配有四级 LC-MS 6120 型检测器 (Santa Clara, California, USA) 的安捷伦 1200 型 HPLC 进行分析测定。色谱柱采用的是 Zorbax Eclipse XDB-C18 型色谱分析柱。流动相由两个泵来控制, A 泵控制 10 mM 甲酸的加入, B 泵控制乙腈的加入, 两种流动相在开始时以 80% 10 mM 甲酸和 20% 乙腈的比例相混合, 流速控制在 0.6 mL/min。流动相的具体控制过程如下: 乙腈添加比例从开始的 20%, 在 4 分钟内匀速增加到 90%, 保持 4 分钟, 接着在 2 分钟内递减到 20%, 并保持 3 分钟。

### 5.2.8 菌体收集, RNA 提取与 qRT-PCR

从 -80 °C 冰箱中取出含有实验菌株的冻存管, 待解冻后全部加入含有 20 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中, 在 30 °C, 220 rpm 的条件下培养 24 小时。接着将种子液按照 10% 的接种量加入含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 并用 5 M NaOH 调节初始 pH 为 5-6 之间, 在 30 °C, 220 rpm 的条件下继续培养 16 小时。将培养后的菌液分装至 50 mL 离心管中, 在预冷至 4 °C 的离心机中, 8000 rpm 离心 5 分钟。离心后去除上层的液体培养基, 并立即放入液氮中冷冻菌体。收集好的菌体置于 -80 °C 冰箱中备用。

RNA 提取和 qRT-PCR 实验步骤见 3.2.12。qRT-PCR 实验所用到的引物是利用 Primer Premier 5 软件, 基于 *G. oxydans* 的全基因组进行设计, 具体序列如表 5.1 所示。以 *G.*

*oxydans* 的 16s rRNA 作为内参基因，对 RNA 总量的差异进行归一化处理。

表 5.1 RT-qPCR 实验所用引物

Table 5.1 Primers used for RT-qPCR

Genes	Genes locus	Forward and reverse primer sequences (5'-3')
16S rRNA	GOX_RS02270	CACTTTCAGGTGGGCACTC GTCACCGCCATTGTAGCAC
mGDH	GOX_RS02475	GGAATGTTCGAGTGGGGT TACCCTTGCGTCCTTTT

### 5.2.9 基因组 DNA 提取，基因扩增与基因测序

从-80 °C冰箱中取出含有实验菌株的冻存管，待解冻后取 100 μL 加入含有 5 mL 种子培养基的 15 mL 试管中，在 30 °C，220 rpm 的条件下培养 24 小时。离心收集菌体，接着使用 TIANamp Bacterial DNA Kit (Tiangen Biotech, Beijing, China) 提取菌体的基因组 DNA。提取到的基因组 DNA 放在-20 °C冰箱中冷冻备用。

为了检测目的基因及其启动子是否发生了基因突变，本研究设计了一对引物用于扩增提取目标基因的启动子及编码序列，如表 2.2 所示。基因扩增的总反应体系为 50 μL，其中包含 1 μL 的基因组 DNA，22 μL 的去离子水，25 μL 的 Prime STAR MAX (TAKARA, Japan) 和上下游引物各 1 μL。基因扩增的 PCR 反应程序设置如下：在 95 °C 预变性反应 5 分钟，循环反应步骤为 95 °C 反应 30 秒，55 °C 反应 30 秒，72 °C 反应 3 分钟，循环 30 次，最后在 72 °C 继续反应 10 分钟。扩增得到的目的片段由美吉公司 (Shanghai, China) 进行基因测序。使用 BPRM 软件 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) 对基因启动子的-35 区和-10 区进行预测。

表 5.2 基因扩增所用引物

Table 5.2 Primers used for gene amplification

Genes	Genes locus	Forward and reverse primer sequences (5'-3')
mGDH	GOX_RS02475	ACTGCTTGATTGTCTTCGC TCATTCTGATCGGGCAG

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 氧化葡萄糖酸杆菌 DSM 2003 单糖与混糖代谢能力考查

木质纤维素中不仅含有大量的纤维素，还有占总糖约 40% 的半纤维素，而组成半纤维素的单体包括木糖，阿拉伯糖，半乳糖，甘露糖等单糖。为测试出发菌株 *G. oxydans* DSM 2003 对于这些非葡萄糖碳源的利用能力，将菌株分别培养在只含有木糖（或阿拉伯糖，半乳糖，甘露糖）作为碳源的发酵培养基中培养 72 小时，糖耗和细胞生长结果如图 5.1 所示。从糖耗曲线可以看出，*G. oxydans* DSM 2003 利用木糖的速率最快；利用阿拉伯糖和半乳糖的速率相似，略慢于木糖的利用速率；甘露糖的消耗速率最慢，经过

72 小时都未能将 40 g/L 甘露糖完全耗尽。从菌体生长曲线可以看出, *G. oxydans* DSM 2003 利用己糖(半乳糖、甘露糖)时的生长速率和最大生物量都要稍低于利用戊糖(木糖、阿拉伯糖)时的情况。虽然 *G. oxydans* DSM 2003 对于这些单糖的利用速率有所差异, 但是本实验说明 *G. oxydans* DSM 2003 可以利用木质纤维素中的各种单糖组分进行生长, 这为其在木质纤维素领域中的应用奠定了基础。

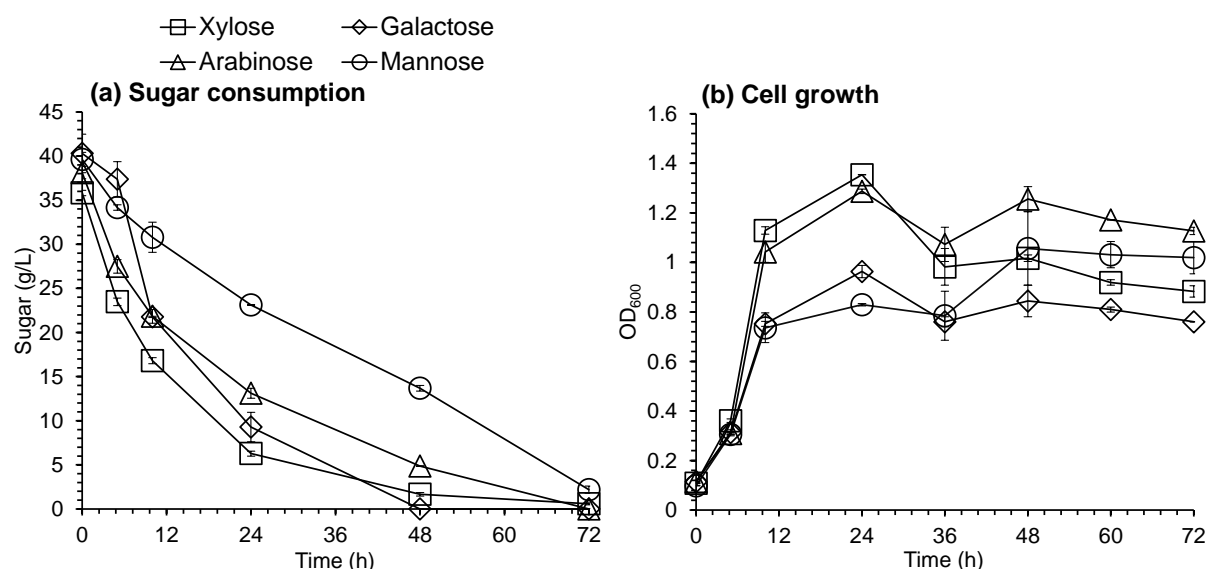


图 5.1 *G. oxydans* DSM 2003 在各种单糖(木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖)培养基中的糖耗和生长情况

Fig. 5.1 Sugar consumption and cell growth of *G. oxydans* DSM 2003 in monosaccharide medium:  
(a) sugar consumption; (b) cell growth

发酵条件: 发酵在装液量为 20% 的 250 mL 摇瓶中进行, 在 30 °C, 220 rpm 的条件下发酵 72 小时, 在发酵过程中, 每 6 小时用 5 M NaOH 调节 pH 范围至 5-6 之间。

木质纤维素环境非常复杂, 具体体现在以下两个方面: 一是木质纤维素预处理过程中, 会产生大量的抑制物, 虽然经过脱毒步骤处理, 但仍会有少量抑制物残留, 而且长时间的脱毒处理也会损耗原料中的可利用糖, 而残留的抑制物对菌体的糖利用速率是一个极大的考验; 二是经过酶水解获得的木质纤维素水解液是一个混糖的环境, 其中含有大量的葡萄糖和其他各种单糖, 但是很多微生物都存在葡萄糖代谢阻遏的现象, 即在葡萄糖存在的条件下, 微生物会优先利用葡萄糖而停止或减慢对其他糖的利用, 因此复杂的混糖环境对菌体利用各种单糖的效率是另一个考验。为了进一步考察 *G. oxydans* DSM 2003 在木质纤维素环境中的发酵性能, 本研究将 *G. oxydans* DSM 2003 在木质纤维素水解液中培养 48 小时, 并测定初始糖浓度和残留糖浓度, 各种单糖的残留糖浓度和所占比例如图 5.2 所示。从结果可以看出, 经过 48 小时的发酵, 还有 12.2 g/L 的木糖剩余, 约占总木糖的 38.2%; 有 4.9 g/L 的阿拉伯糖和甘露糖剩余, 约占总阿拉伯糖和甘露糖的 57.5%; 而半乳糖几乎没有被利用, 剩余半乳糖约占总半乳糖的 89.9%。水解液中的发酵结果表明, 在木质纤维素体系下, *G. oxydans* DSM 2003 对各种非葡萄糖碳源的利用速

率较慢，这就显著延长了木质纤维素中的所有糖分转化为相应糖酸的发酵时间，严重降低了生产效率。因此，必须提高 *G. oxydans* DSM 2003 对于木质纤维素体系中多种单糖的转化效率。

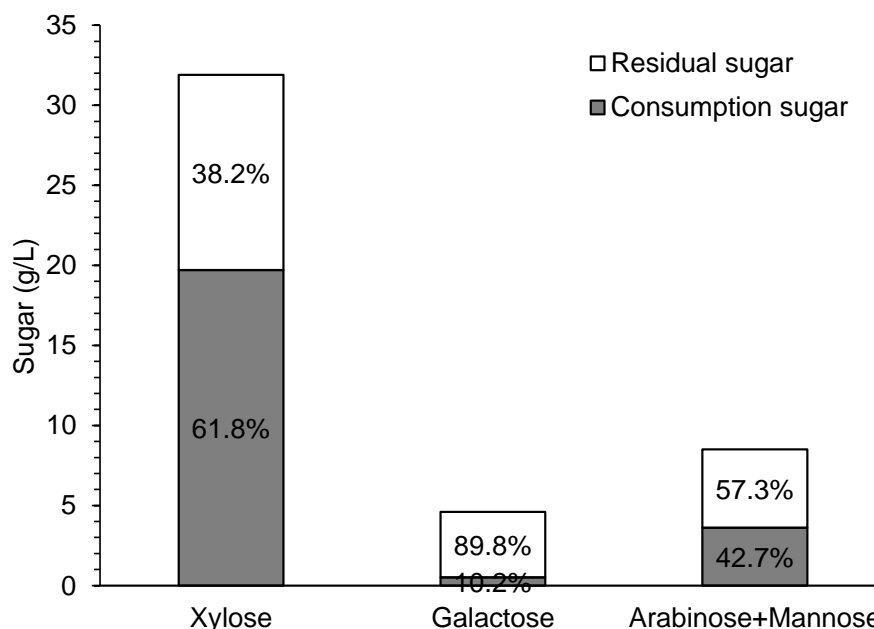
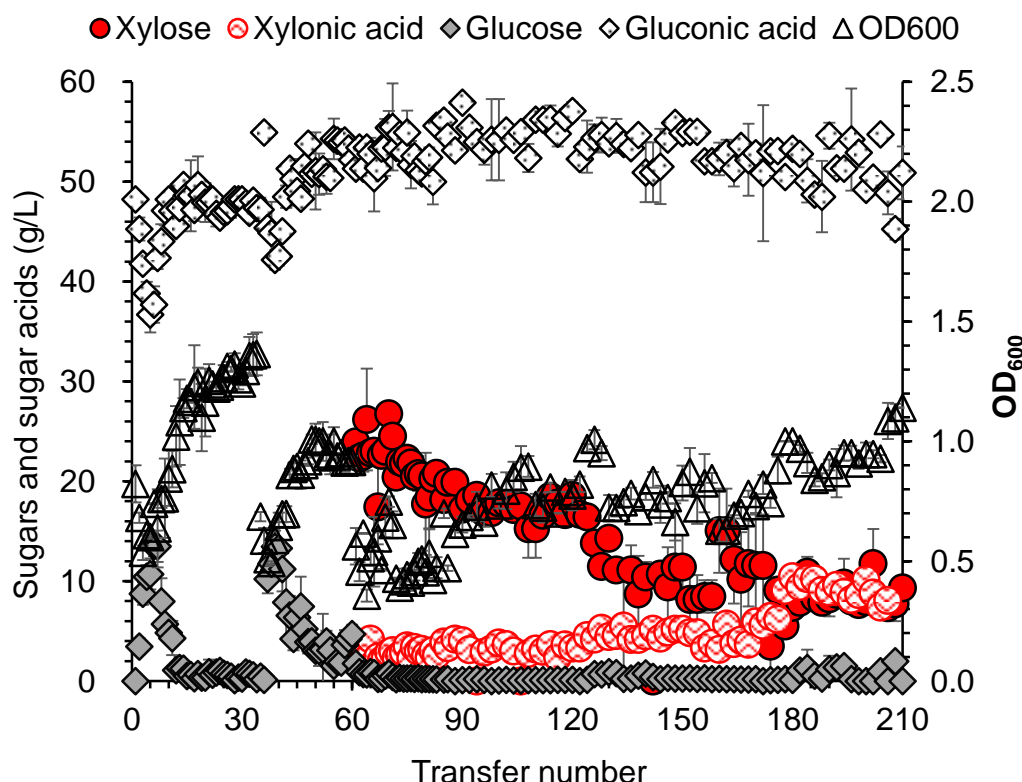


图 5.2 *G. oxydans* DSM 2003 在水解液中发酵 48 小时后各种残留单糖（木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖）的浓度和占比

Fig. 5.2 Concentration and proportion of residual sugar by *G. oxydans* DSM 2003 in hydrolysate after 48 h' fermentation.

### 5.3.2 氧化葡萄糖酸杆菌 DSM 2003 长期适应性进化

为了增加 *G. oxydans* DSM 2003 对于木质纤维素中非葡萄糖碳源的利用速率和对于木质纤维素体系的耐受性，本研究计划将该菌株在木质纤维素体系中进行适应性进化培养。即是将氧化葡萄糖酸杆菌培养在含有多种碳源和抑制物的木质纤维素水解液中，进行反复的培养和转接，使菌体逐步适应在含有多种碳源和抑制物的环境中生长，同时逐步提高其对于非葡萄糖碳源的利用。但是高抑制物含量的水解液会抑制菌体的生长，如果一直在含有抑制物的水解液中进行不断的转接培养，将导致菌体完全失去活性。因此本研究采取了隔代培养的策略，即是将菌体先在含有抑制物的水解液中培养 24 小时，这时菌体的生长由于抑制物的存在而降低，接着将菌体转接到不含抑制物的水解液中培养 24 小时，使菌体的活性得以恢复，这样的两次培养过程算作一次转接培养。将这样的转接培养过程进行 210 次（共计 420 天），记录进化过程中残留的葡萄糖和木糖以及生成的糖酸和生物量的变化，如图 5.3 所示。

图 5.3 *G. oxydans* DSM 2003 在水解液中进行适应性进化Fig. 5.3 Adaptive evolution of *G. oxydans* DSM 2003 in hydrolysate.

从适应性进化过程中残糖浓度的变化可以看出,在转接培养的初期(前四次转接),受到水解液中抑制物的影响,氧化葡萄糖酸杆菌的葡萄糖利用速率,生成的葡萄糖酸浓度和菌体生长水平都显著降低。随着转接培养的进行,菌体的糖转化速率和生长水平又逐渐恢复。当转接进行到 36 次时,用新的玉米秸秆水解液取代之前使用的水解液进行培养(乙酸从 3.2 g/L 增加到 6.1 g/L,糖含量从 54.5 g/L 增加到 62.9 g/L)。在之后的 174 次转接培养过程中,刚开始由于水解液中抑制物浓度的提高,导致菌体的葡萄糖转化速率和菌体生长都降至一个较低的水平,但是随着转接的进行,葡萄糖利用速率逐渐提高,菌体生长逐渐恢复。当残余葡萄糖浓度降至 0 后,又进一步检测了残余木糖浓度,结果发现,随着转接的进行,木糖的转化速率也在逐步提高。最终经过 210 次的转接培养(共计 420 天),菌株的生长,糖转化速率和糖酸生成水平都趋于稳定,将得到的进化菌株命名为 *G. oxydans* RM 7。

将进化菌株和出发菌株分别培养在只含有木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖的单糖培养基中,检测它们对于这四种单糖利用能力的差异,结果如图 2.4 所示。从结果可以看出,与出发菌株相比,进化菌株 *G. oxydans* RM 7 对于木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖的利用速率都明显提高,说明适应性进化过程明显提高了氧化葡萄糖酸杆菌对于非葡萄糖碳源的利用速率。

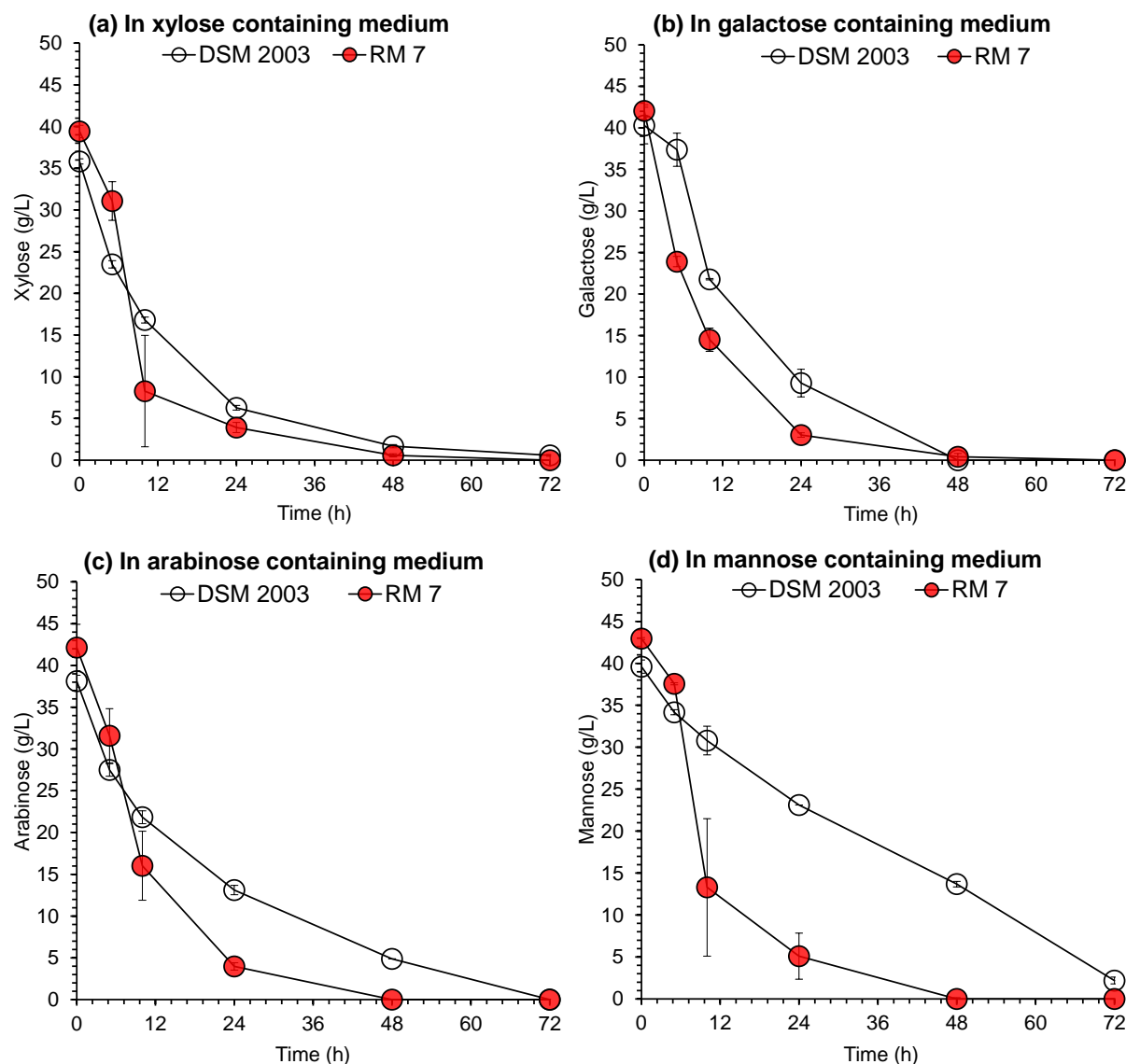


图 5.4 进化菌株 *G. oxydans* RM 7 在各种单糖（木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖）培养基中的糖耗和生长情况

Fig. 5.4 Sugar consumption and cell growth of *G. oxydans* RM7 in monosaccharide medium: (a) sugar consumption; (b) cell growth

发酵条件：发酵在装液量为 20% 的 250 mL 摇瓶中进行，在 30 °C，220 rpm 的条件下发酵 72 小时，在发酵过程中，每 6 小时用 5 M NaOH 调节 pH 范围至 5-6 之间。

### 5.3.3 氧化葡萄糖酸杆菌 RM 7 的发酵性能评估

为了测试进化菌株在真实木质纤维素体系中的发酵性能，本研究先在摇瓶中测试了出发菌株 *G. oxydans* DSM 203 与进化菌株 *G. oxydans* RM 7 的发酵性能，使用的是 15% (w/w) 固含量的玉米秸秆水解液，水解液中含有 61.5 g/L 葡萄糖，26.2 g/L 木糖，6.1 g/L 乙酸，0.15 g/L 糠醛和 0.24 g/L 5-羟甲基糠醛。测定发酵过程中葡萄糖、木糖和相应糖酸的浓度，以及菌体的生长情况，如图 5.5 所示。从图中可以看出，与对照菌株相比，进化菌株的葡萄糖转化速率有略微的提升；木糖转化为木糖酸的速率显著提高，总的发酵时间从 72 小时缩短至 36 小时；并且由于糖利用速率的增加，使得细胞生长速率也有

了显著提高。

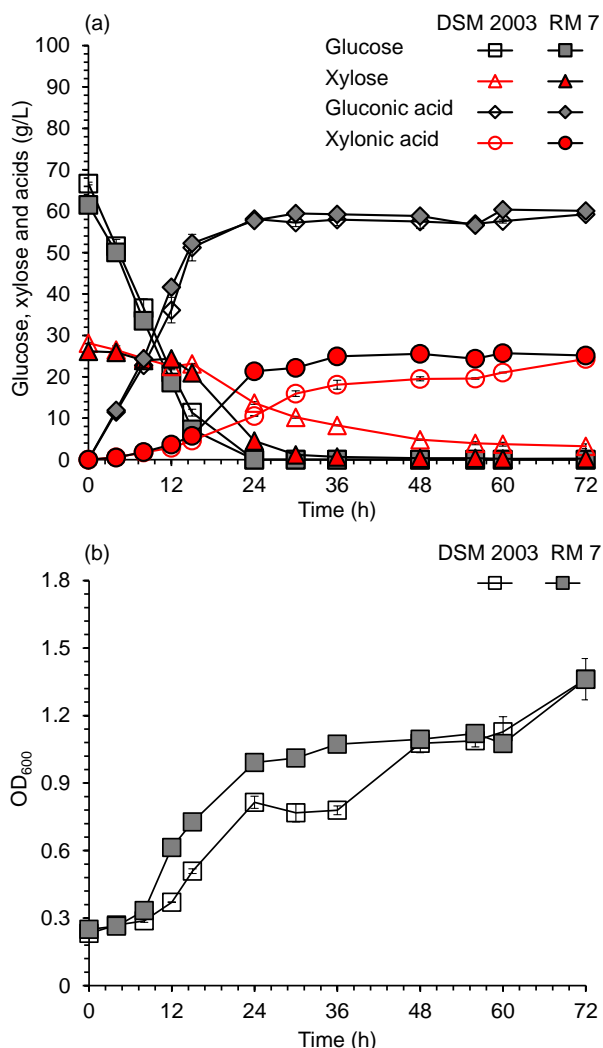


图 5.5 进化菌株 *G. oxydans* RM 7 在低糖玉米秸秆水解液中进行发酵

Fig. 5.5 Fermentation of *G. oxydans* RM 7 in the low sugars containing corn stover hydrolysate: (a) sugar consumption and conversion; (b) cell growth

发酵条件：发酵在装液量为 20% 的 250 mL 摇瓶中进行，在 30 °C，220 rpm 的条件下发酵 72 小时，在发酵过程中，每 6 小时用 5 M NaOH 调节 pH 范围至 5-6 之间。

进一步在发酵罐上进行放大研究，用高糖浓度的水解液对进化菌株 *G. oxydans* RM 7 的发酵能力进行测试。使用的是 30% (w/w) 固含量的玉米秸秆水解液，水解液中含有 111.8 g/L 葡萄糖，29.1 g/L 木糖，8.7 g/L 阿拉伯糖和甘露糖，以及 4.3 g/L 半乳糖。以出发菌株 *G. oxydans* DSM 2003 作为对照，结果如图 5.6 所示。从发酵结果可以看出，进化菌株的葡萄糖利用速率与对照相比略有上升，而木糖的转化速率提高了 4.1 倍；并且进化菌株可以在 72 小时内，将阿拉伯糖，甘露糖和半乳糖全部转化为相应的糖酸，而对照菌株还有 70% 以上的阿拉伯糖，甘露糖和半乳糖剩余。这些结果表明适应性进化可以有效地提高氧化葡萄糖酸杆菌对于木质纤维素中全糖的利用效率。

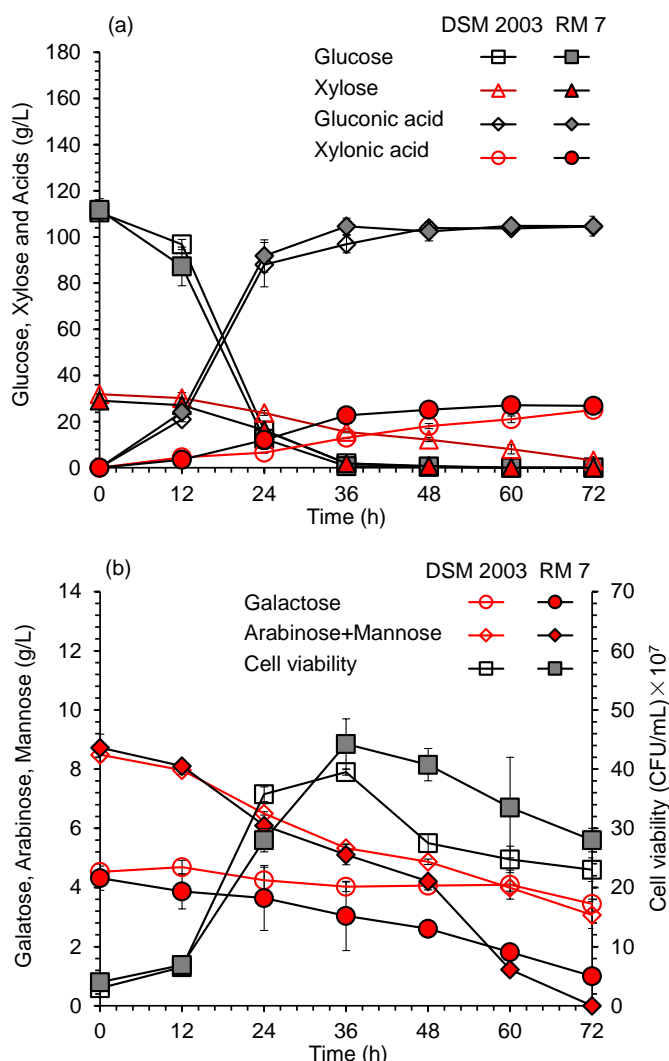


图 5.6 进化菌株 *G. oxydans* RM 7 在高糖玉米秸秆水解液中进行发酵

Fig. 5.6 Fermentation of *G. oxydans* RM 7 in the high sugars containing corn stover hydrolysate: (a) glucose and xylose conversion; (b) other non-glucose sugars consumption and cell viability

发酵条件：发酵在 5 L 发酵罐中进行，接种量为 5% (v/v)，在 35 °C，500 rpm 和 1.0 vvm 的条件下进行发酵，在发酵过程中，用 5 M NaOH 维持 pH 在 4.8。

### 5.3.4 氧化葡萄糖酸杆菌 RM 7 的基因和转录水平检测

为了进一步探究进化菌株 *G. oxydans* RM 7 糖转化速率提高的原因，本小节在基因和转录水平上对进化菌株进行了研究。在目标基因的筛选上，选择了膜结合的葡萄糖脱氢酶 (mGDH)，因为 mGDH 负责了氧化葡萄糖酸杆菌接近 90% 的葡萄糖转化，并且它也可以催化木糖，阿拉伯糖，半乳糖和甘露糖转化为相应的糖酸，因此它对于氧化葡萄糖酸杆菌的糖转化速率起到了决定性作用。将出发菌株和进化菌株培养在葡萄糖培养基和木糖培养基中，测定了两种菌株利用葡萄糖和木糖时 *mGDH* 的转录水平，结果如表 5.3 所示。从结果可以看出，在利用葡萄糖时，进化菌株 *mGDH* 的转录水平是原始菌株的 39.9 倍；在利用木糖时，进化菌株 *mGDH* 的转录水平是原始菌株的 69.9 倍。在两种糖培养基中，*mGDH* 的转录水平都显著上调，这说明适应性进化提高了葡萄糖脱氢酶的

表达, 从而使得进化菌株的糖转化速率显著提高; 另一方面, *mGDH* 在木糖培养基中转录水平的上调幅度高于其在葡萄糖培养基中的上调幅度, 说明进化菌株在利用木糖时, 葡萄糖脱氢酶的表达更高, 因此木糖转化速率提升更为明显。

表 5.3 在葡萄糖培养基和木糖培养基中比较进化菌株的 *mGDH* 转录水平

Table 5.3 The *mGDH* transcriptional level comparison of the evolved strain and the parental strain in glucose medium and xylose medium

Genes	Genes ID	Functional annotation	Fold change	
			Glucose	Xylose
<i>mGDH</i>	W826_RS0112255	Glucose dehydrogenase	39.9±2.8	69.9±7.6

培养条件: 发酵在 250 mL 摇瓶中进行, 培养基为只添加 40 g/L 葡萄糖或 40 g/L 木糖的种子培养基, 在 30 °C, 220 rpm 的条件下发酵 24 小时。

进一步检测了进化菌株 *mGDH* 的基因序列, 结果如表 5.4 所示, 结果发现 *mGDH* 的编码序列并无突变, 但是发现在 *mGDH* 基因前 40bp 的位置, 有一个碱基从鸟嘌呤(G) 突变为了腺嘌呤 (A), 并且通过预测软件发现此突变位点刚好位于 *mGDH* 启动子的-10 区, 因此推测进化菌株 *mGDH* 转录水平的提高很有可能是由于此碱基的突变所导致的。为了证实此突变是否影响了 *mGDH* 启动子的转录效率, 本研究在氧化葡萄糖酸杆菌中分别用突变后的启动子和原始的启动子表达荧光蛋白基因 *GFP*, 结果发现得到的两个改造菌株表达荧光蛋白的亮度没有显著差异, 因此未能证明此突变决定性的影响了 *mGDH* 启动子的转录效率, 可能还与其他因素有关。

表 5.4 比对进化菌株和出发菌株的 *mGDH* 基因及启动子序列

Table 5.4 *mGHD* sequence alignment of the evolved strain and the parental strain

	Promoter	CDS (2427bp)
<i>G. oxydans</i> DSM2003	TCTGACATC <b>TTGACC</b> CTTGACGCCATCC <b>ATGTG</b> CTTTGTCCGGAAGTCACCGTGATGCATCAGAACAAACAGATCCAGGAACATC	ATGAGCAC...
<i>G. oxydans</i> RM7	TCTGACATC <b>TTGACC</b> CTTGACGCCATCC <b>ATGTG</b> <b>A</b> CTTTGTCCGGAAGTCACCGTGATGCATCAGAACAAACAGATCCAGGAACATC	ATGAGCAC...

斜体字表示的 -10 区 (红色) 和 -35 区 (黄色) 碱基序列是通过 BPROM 软件 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) 预测的, 蓝色字体表示 *mGDH* 的编码区序列, 用黑色方框注明的加粗字体为突变碱基。

*mGDH* 是氧化葡萄糖酸杆菌催化糖转化为糖酸的关键酶, 同时在能量供应上也扮演着重要的角色, 具体过程如图 5.7 所示。*mGDH* 以 PQQ 为辅因子催化各种糖 (葡萄糖, 木糖, 半乳糖, 阿拉伯糖, 甘露糖) 转化为相应的糖酸 (葡萄糖酸, 木糖酸, 半乳糖酸, 阿拉伯糖酸, 甘露糖酸), 并将呼吸链上的泛醌 (UQ) 还原为醌醇 (UQH<sub>2</sub>), 醌醇将电子传递给细胞色素末端氧化酶 bd (CydAB) 和细胞色素末端氧化酶 bo3 (CydBACD), 最终形成质子梯度, 在 ATP 合酶的催化下产生 ATP。一方面, 这说明了可能是适应性进化过程中菌体为了加快 ATP 的生成, 从而促进了 *mGDH* 的合成, 另一方面, 在适应性进化过程中, 与呼吸链相关的这些酶或者辅酶 (辅酶 PQQ, 辅酶 Q, 细胞色素 bd, 细胞

色素 bo3) 的表达水平可能也发生了一些变化从而促进了菌体的生长和糖利用速率。

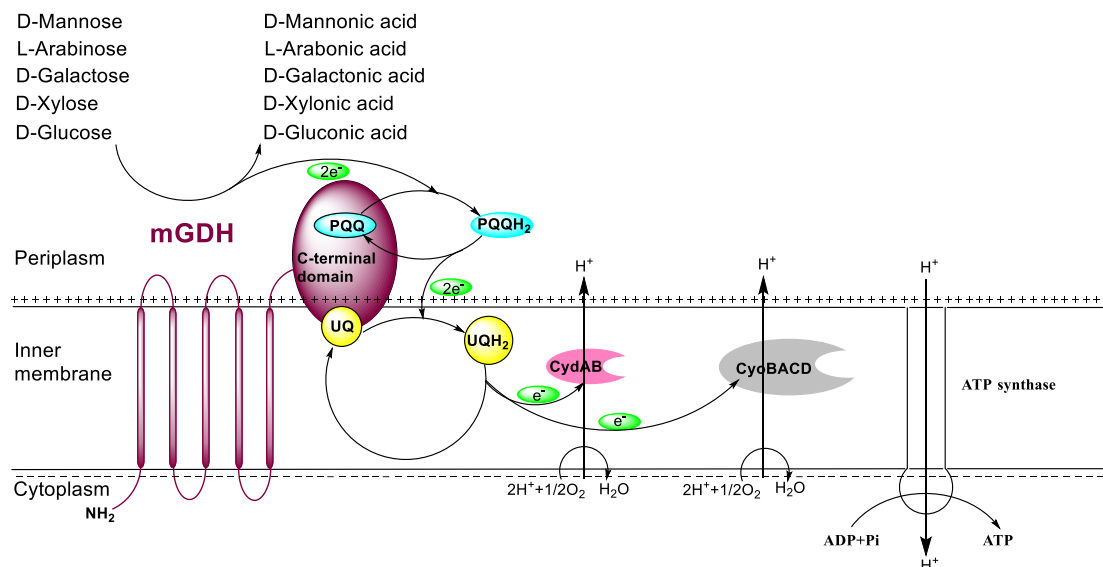


图 5.7 氧化葡萄糖酸杆菌的糖转化偶联细胞呼吸链示意图

Fig. 5.7 Schematic diagram of sugar transformation coupled cellular respiratory chain in *G. oxydans*

#### 5.4 本章小结

木质纤维素的水解产物除了含有葡萄糖外，还含有大量的非葡萄糖碳源（如木糖，阿拉伯糖，半乳糖和甘露糖），对这些非葡萄糖碳源的高效利用是有效利用木质纤维素的前提。氧化葡萄糖酸杆菌本身可以将上述各种糖转化为相应的糖酸，但是在木质纤维素的复杂环境中，其对非葡萄糖碳源的转化速率较低，严重影响了生产效率。为了克服这一困难，本研究将氧化葡萄糖酸杆菌交替培养在含有抑制物 and 不含抑制物的玉米秸秆水解液中进行适应性进化，经过 420 天的长期培养，获得的菌株命名为 *G. oxydans* RM 7。通过发酵实验发现，在玉米秸秆水解液中，进化菌株的全糖利用速率大幅提高，生产总时间由 72 小时缩短至 36 小时。进一步对进化菌株的关键糖转化基因的转录水平进行分析，结果发现葡萄糖脱氢酶 mGDH(同时也负责其他糖的转化)的转录水平大幅上调，这是进化菌株糖转化速率加快的重要原因。本章主要的研究结论如下：

(1) 交替在含有抑制物 and 不含抑制物的水解液中进行转接培养的方法，在保证 *G. oxydans* DMS 2003 存活的同时，使其逐步适应水解液环境。经过 420 天的适应性进化，得到的进化菌株在木质纤维素水解液中的全糖利用速率大幅提高，发酵总时间从 72 小时缩短至 36 小时

(2) 通过 qRT-PCR 实验发现，进化菌株的葡萄糖脱氢酶 mGDH（同时也负责其他糖的转化）的转录水平大幅上调，说明适应性进化过程增加了胞内 mGDH 的表达，从而提高了菌体的糖转化速率。

(3) 通过对谷氨酸、赖氨酸和糖酸生产菌株的适应性进化研究，证实了只有当进化目标与生长相关联时才能取得理想的效果，为适应性进化策略的使用提供了指导依据。

## 第 6 章 结论与展望

### 6.1 结论

生物基聚合物是建设绿色生态环境的重要材料，但是昂贵且有限的淀粉和葡萄糖等生产原料严重限制了生物基聚合物的发展。为了解决这一难题，本论文旨在利用廉价且来源广泛的木质纤维素作为原料，生产生物基聚合物及前体，具体包括聚 3-羟基丁酸酯 (Poly 3-hydroxybutyrate, PHB) 以及生物基聚合物的合成前体谷氨酸和赖氨酸。

但是利用木质纤维素生产生物基聚合物及前体也存在一定的困难，包括预处理过程中产生的抑制物会阻碍菌体的生长与发酵；木质纤维素中多糖成分难以保存与利用；木质纤维素中的非抑制物组分影响产物生产；复杂的木质纤维素环境需要对发酵菌株进行全局调控。针对这些存在的问题，本论文以对抑制物具有较强耐受性的 *C. glutamicum* 作为出发菌株，通过合成生物学的方法，在出发菌株中构建木糖利用途径，引入产物合成路径，打通产物分泌通道，重构胞内能量平衡和氧化还原平衡，使 *C. glutamicum* 可以利用木质纤维素水解液生产高指标的 PHB、谷氨酸和赖氨酸。

本论文的主要结论如下：

(1) 解决了以木质纤维素为原料生产谷氨酸的障碍。在谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* S9114 中整合木糖利用途径，促进木质纤维素中的可发酵糖向谷氨酸的转化；对谷氨酸分泌通道蛋白 MscCG 的羧基端进行敲除，使发酵菌株可以在富含生物素的木质纤维素体系中分泌生产谷氨酸；对  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的表达进行弱化，使代谢流更多地导向谷氨酸的生产；整合戊糖转运蛋白，提高菌株的木糖利用速率。最终得到的改造菌株可以利用木质纤维素水解液中的葡萄糖和木糖生产高浓度的谷氨酸。

(2) 提高了以木质纤维素为原料生产赖氨酸的水平。在赖氨酸生产菌株 *C. glutamicum* B253 中整合木糖利用途径，促进木质纤维素中的可发酵糖向赖氨酸的转化；通过合成生物学的方法，从增加前体供应，减少副产物形成，增强辅酶再生和扩大赖氨酸合成路径通量等方面尝试提高赖氨酸的合成，最后发现引入木糖利用途径后会减少胞内 NADPH 的再生，导致赖氨酸的得率降低；过表达促进 NADPH 再生的 *PntAB* 基因可以显著提高胞内的 NADPH 水平和赖氨酸产量。最终得到的改造菌株可以利用木质纤维素水解液生产高指标的赖氨酸。

(3) 构建了以木质纤维素为原料生产 PHB 的合成路径，并通过合成生物学的方法提高了 *C. glutamicum* 的 PHB 产量。以第一个研究得到的木糖利用菌株 *C. glutamicum* GJ01 作为出发菌株，将 PHB 主要合成路径的关键基因 *phaA*, *phaB* 和 *phaC* 分步整合至基因组上，从而获得了一株可以稳定生产 PHB 的菌株 *C. glutamicum* JH01。通过合成生物学的方法尝试从多个方面提高菌株的 PHB 生产能力，结果发现 PHB 主要合成路径关键酶的活力不足是 *C. glutamicum* 生产 PHB 的限制因素；膜结合表达 PHA 合酶可以极大的提高 PHB 的产量。进一步对罐上发酵条件进行优化，发现适量氮源的补给对于 PHB 的生产极为重要。最终得到的改造菌株可以利用木质纤维素水解液生产高浓度的 PHB。

(4) 检验了应用适应性进化策略提高发酵菌株对于木质纤维素中全糖利用速率的可行性, 并探究了全糖利用速率提高的原因。*G. oxydans* DSM2003 对木质纤维素水解液中的非葡萄糖碳源的利用速率较慢, 将其在木质纤维素水解液中进行 420 天的适应性进化培养, 结果发现进化菌株的全糖利用速率大幅提高。在转录水平上对进化菌株的糖利用相关基因进行分析, 发现进化菌株的葡萄糖脱氢酶的转录水平显著上调, 说明葡萄糖脱氢酶的超量表达是进化菌株全糖利用速率加快的重要因素。此研究为提高发酵菌株对于木质纤维素中全糖的利用速率提供了一种可行的方案。

## 6.2 创新点

(1) 通过对谷氨酸棒状杆菌的代谢工程改造, 首次实现了在高生物素含量的木质纤维素环境中, 无需诱导同时利用多种碳源合成高浓度谷氨酸; 并首次完成利用木质纤维素的多种碳源合成赖氨酸。

(2) 首次在 *C. glutamicum* 的基因组上完成了 PHB 主要合成基因的整合, 构建了一株可以稳定生产 PHB 的工程菌株, 并进一步通过代谢工程改造和发酵条件优化, 极大地提高了 PHB 产量, 为今后对于 *C. glutamicum* 合成 PHB 的研究奠定了基础。

(3) 通过对谷氨酸、赖氨酸和糖酸生产菌株的适应性进化研究, 证实了只有当进化目标与生长相关联时才能取得理想的效果, 为适应性进化策略的使用提供了指导依据。

## 6.3 展望

本论文通过合成生物学的方法, 针对木质纤维素复杂环境以及不同的目标产品, 对 *C. glutamicum* 进行定向改造和发酵条件优化, 同时结合干法生物炼制技术, 实现了木质纤维素到 PHB、谷氨酸和赖氨酸的高指标生产。但是本研究也存在一些有待深入研究的问题:

(1) 木质纤维素的水解产物中不仅含有大量的葡萄糖和木糖, 还存在部分的阿拉伯糖, 甘露糖和半乳糖。本论文构建的工程菌株只能利用葡萄糖和木糖, 未利用的其他单糖不仅降低了木质纤维素利用率也增加了下游分离纯化的成本。因此有必要在已构建工程菌株的基础上再引入阿拉伯糖, 甘露糖和半乳糖的利用途径, 构建一个可以同步利用木质纤维素中全糖的工程菌株。

(2) 常见的 PHB 生产菌株对木质纤维素体系中的抑制物耐受性较差, 因此本论文采用一个对抑制物具有较强耐受性的 *C. glutamicum* 作为出发菌株进行研究。但是本论文未对 *C. glutamicum* 的抑制物耐受机制进行深入研究, 未来可以在基因层面, 转录层面和蛋白层面上对其抑制物耐受机制进行全面解析, 获得的研究结果可以用于提高其他优秀生产菌株的抑制物耐受性。

(3) 本研究采用的木质纤维素发酵方法为分步糖化发酵, 是将木质纤维素通过预处理、生物脱毒和糖化的方法先转化为木质纤维素水解液, 再利用水解液进行发酵的策略。但是这种方法在糖化过程中, 产生的高浓度糖会对纤维素酶产生严重的产物抑制,

导致纤维素酶解不完全。如果采用同步糖化发酵的方法将糖化与发酵过程结合在一起则可以解决产物抑制的问题。但是常用纤维素酶催化的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 4.8, 而 *C. glutamicum* 发酵的最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 7.0, 巨大的差异导致 *C. glutamicum* 难以进行同步糖化发酵过程。因此未来有必要改变 *C. glutamicum* 的发酵温度和 pH, 或者采用适合中性 pH 环境的纤维素酶, 使其可以进行同步糖化发酵过程。

## 参考文献

- [1] Gallo F, Fossi C, Weber R, Santillo D, Sousa J, Ingram I. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. *Environmental Science Europe*. 2018, 30: 13.
- [2] Varsha YM, Savitha R. Overview on polyhydroxyalkanoates: a promising biopol. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2011, 3: 99-105.
- [3] Babu RP, O'Connor K, Seeram R. Current progress on biobased polymers and their future trends. *Progress in Biomaterials*. 2013, 2: 8.
- [4] Lee S, Choi J, Wong H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, 25: 31-36.
- [5] Amass W, Amass A, Tighe B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*. 1998, 47: 89-144.
- [6] Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. 2014, 8: 791-808.
- [7] Chen GQ, Wu Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 67: 592-599.
- [8] Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, 16: 81-96.
- [9] Liang Q, Qi Q. From a co-production design to an integrated single-cell biorefinery. *Biotechnology Advances*. 2014, 32: 1328-1335.
- [10] Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2007, 82: 233-247.
- [11] Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009, 38: 2434-2446.
- [12] Chen W, Tong YW. PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon-dendrite polarization. *Acta Biomaterialia*. 2012, 8: 540-548.
- [13] Lim J, You M, Li J, Li Z. Emerging bone tissue engineering via polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science & Engineering*. 2017, 79: 917-929.
- [14] Chen GQ, Patel MK. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. *Chemical Reviews*. 2012, 112: 2082-2099.
- [15] Wang S, Wang Z, Liu M, Xu Y, Zhang X, Chen GQ. Properties of a new gasoline oxygenate blend component: 3-hydroxybutyrate methyl ester produced from bacterial poly-3-hydroxybutyrate. *Biomass Bioenergy*. 2010, 34: 1216-1222.

- [16] Wang X, Jiang XR, Wu F, Ma Y, Che X, Chen X, Liu P, Zhang W, Ma X, Chen GQ. Microbial poly-3-hydroxybutyrate (PHB) as a feed additive for fishes and piglets. *Biotechnology Journal*. 2019, 14: e1900132.
- [17] Shih IL, Van YT, Shen MH. Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine). *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2004, 4: 179-188.
- [18] Alsaheb RAA, Othman NZ, Malek RA, Leng OM, Aziz R, Enshasy HAE. Polyglutamic acid applications in pharmaceutical and biomedical industries. *Der Pharmacia Lettre*. 2016, 8: 217-225.
- [19] Bajaj I, Singhal R. Poly(glutamic acid)-an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 5551-5561.
- [20] Candela T, Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*. 2006, 60: 1091-1098.
- [21] Luo Z, Guo Y, Liu J, Qiu H, Zhao M, Zou W, Li S. Microbial synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 134.
- [22] Ho GH, Ho TI, Hsieh KH, Su YC, Lin PY, Yang J.  $\gamma$ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus Subtilis* (Natto): structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2006, 53: 1363-1384.
- [23] Akagi T, Matsusaki M, Akashi M. Pharmaceutical and medical applications of poly-gamma-glutamic acid. *Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature*. 2010, 15: 119-153.
- [24] Zhang W, Rao MY, Cheng ZJ, Zhu XY, Gao K, Yang J, Liao XL. Efficient synthesis of glutaric acid from L-glutamic acid via diazotiation/hydrogenation sequence. *Chemical Papers*. 2015, 69: 716-721.
- [25] 张晶, 黄关葆. 聚戊二酸丙二醇酯的合成. *塑料*. 2013, 42: 65-68.
- [26] 卢晶晶, 左岳, 王训道. 尼龙 65 盐及尼龙 65 的制备研究进展. *化工新型材料*. 2020, 48: 247-250.
- [27] Woo HM, Park J. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2014, 180: 43-51.
- [28] Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*. 1985, 49: 81-99.
- [29] Thielen M. Bio-Polyamides for automotive applications. *Bioplastics Magazine*. 2010, 1: 10-11.
- [30] Adkins J, Jordan J, Nielsen DR. Engineering *Escherichia coli* for renewable production of the 5-carbon polyamide building-blocks 5-aminovalerate and glutarate. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110: 1726-1734.
- [31] Park SJ, Oh YH, Noh W. High-level conversion of L-lysine into 5-aminovalerate that can be used for nylon 6,5 synthesis. *Biotechnology Journal*. 2014, 9: 1322-1328.

- [32] Lee JH, Wendisch VF. Production of amino acids-Genetic and metabolic engineering approaches. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1575-1587.
- [33] Lettner M, Schöggel JP, Stern T. Factors influencing the market diffusion of biobased plastics: results of four comparative scenario analyses. *Journal of Cleaner Production*. 2017, 157: 289-298.
- [34] Kourmentza C, Plácido J, Venetsaneas N, Burniol-Figols A, Varrone C, Gavala HN, Reis MAM. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*. 2017, 4: 55.
- [35] Andler R, Vivod R, Steinbuchel A. Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019, 127: 360-365.
- [36] Jiang G, Hill DJ, Kowalczyk M, Johnston B, Adamus G, Irorere V, Radecka I. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17: 1157.
- [37] Choi J, Lee SY. Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*. 1997, 17: 335-342.
- [38] David A, Govil T, Tripathi AK, McGeary J, Farrar K, Sani RK. Thermophilic anaerobic digestion: enhanced and sustainable methane production from Co-digestion of food and lignocellulosic wastes. *Energies*. 2018, 11: 2058.
- [39] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*. 2004, 106: 147-150.
- [40] Ramsay JA, Hassan MCA, Ramsay BA. Hemicellulose as a potential substrate for production of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates). *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, 41: 262-266.
- [41] Yu J. Chapter 23-microbial production of bioplastics from renewable resources. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. 2007, 585-610.
- [42] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy & Combustion Science*. 2012, 38: 522-550.
- [43] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 1-11.
- [44] Wen PY, Xu Y, Zhang JH. Alkaline incubation improves the saccharification of poplar after sodium chlorite pretreatment with ultra-low cellulase loading. *Renewable Energy*. 2021, 170: 517-524.
- [45] Balan V, Bals B, Chundawat SPS, Marshall D, Dale BE. Lignocellulosic biomass pretreatment using AFEX. *Biofuels: Methods and Protocols*. 2009, 61-77.
- [46] Hallac BB, Ragauskas AJ. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2011, 5: 215-225.
- [47] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2: 26-40.
- [48] Fatmawati NV, Ketbot P, Phitsuwan P, Waeonukul R, Tachaapaikoon C, Kosugi A,

- Ratanakhanokchai K, Pason P. Efficient biological pretreatment and bioconversion of corn cob by the sequential application of a *Bacillus firmus* K-1 cellulase-free xylanolytic enzyme and commercial cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021, 105: 4589-4598.
- [49] Wyman CE. Handbook on bioethanol-production and utilization. Taylor & Francis. 1996.
- [50] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1959-1966.
- [51] Banerjee S, Mudaliar S, Sen R, Giri B, Satupte D, Chakrabarti T. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2010, 4: 77-93.
- [52] Yu G, Yano S, Inoue H, Inoue S, Endo T, Sawayama S. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160: 539-551.
- [53] Kobayashi N, Okada N, Hirakawa A, Sato T, Kobayashi J, Hatano S. Characteristics of solid residues obtained from hot-compressed-water treatment of woody biomass. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2009, 48: 373-379.
- [54] Ingram T, Rogalinski T, Bockemühl V, Antranikian G, Brunner G. Semicontinuous liquid hot water pretreatment of rye straw. *Journal of Supercritical Fluids*. 2009, 48: 238-246.
- [55] Yu Q, Zhuang X, Yuan Z, Wang Q, Qi W, Wang W. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4895-4899.
- [56] Kim Y, Mosier NS, Ladisch MR. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnology Progress*. 2009, 25: 340-348.
- [57] Pérez JA, Ballesteros I, Ballesteros M, Sáez F, Negro MJ, Manzanares P. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*. 2008, 87: 3640-3647.
- [58] Pérez JA, Gonzalez A, Oliva JM, Ballesteros I, Manzanares P. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2007, 82: 929-938.
- [59] Cheng YS, Zheng Y, Yu CW, Dooley TM, Jenkins BM, VanderGheynst JS. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162:1768-1784.
- [60] Ibrahim MM, El-Zawawy WK, Abdel-Fattah YR, Soliman NA, Agblevor FA. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. *Carbohydrate Polymers*. 2011, 83: 720-726.
- [61] McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 6718-6727.
- [62] Zheng Y, Pan Z, Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2009, 2: 51-68.

- [63] Gollapalli LE, Dale BE, Rivers DM. Predicting digestibility of ammonia fibre explosion (AFEX) treated rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 100: 23-35.
- [64] Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2009, 48: 37-39.
- [65] Teymouri F, Perez LL, Alizadeh H, Dale BE. Ammonia fiber explosion treatment of corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, 116: 951-963.
- [66] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9: 1621-1651.
- [67] Holtzapple MT, Lundeen JE, Sturgis R. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1992, 34: 5-21.
- [68] Digman MF, Shinnors KJ, Casler MD, Dien BS, Hatfield RD, Jung HJG. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5305-5314.
- [69] Li C, Knierim B, Manisseri C, Arora R, Scheller HV, Auer M. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4900-4906.
- [70] Du B, Sharma LN, Becker C, Chen SF, Mowery RA, Walsum GP. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 107: 430-440.
- [71] Xu J, Thomsen MH, Thomsen AB. Pretreatment on corn stover with low concentration of formic acid. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009, 19: 845-850.
- [72] Shuai L, Yang Q, Zhu JY, Lu FC, Weimer PJ, Ralph J. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 3106-3114.
- [73] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress*. 2009, 25: 333-339.
- [74] Kumar R, Wyman CE. Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. *Biotechnology Progress*. 2009, 25: 807-819.
- [75] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488.
- [76] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of reactor corrosion by eliminating liquid-phase existence in dry dilute acid pretreatment of corn stover. *Energy & Fuels*. 2017, 31: 6140-6144.
- [77] Han X, Bao J. General method to correct the fluctuation of acid based pretreatment

- efficiency of lignocellulose for highly efficient bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6: 4212-4219.
- [78] Zheng L, Han X, Han T, Liu G, Bao J. Formulating a fully converged biorefining chain with zero wastewater generation by recycling stillage liquid to dry acid pretreatment operation. *Bioresource Technology*. 2020, 318: 124077.
- [79] Steinbach D, Kruse A, Sauer J. Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production- A review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2017, 7: 247-274.
- [80] Danon F, van der Aa L, de Jong W. Furfural degradation in a dilute acidic and saline solution in the presence of glucose. *Carbohydrate Research*. 2013, 375: 145-152.
- [81] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 49: 691-697.
- [82] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 77: 91-103.
- [83] Martín C, Galbe M, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98: 699-716.
- [84] Martín C, Klinke H, Marcet M, García L, Hernández E, Thomsen AB. Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. *Holzforschung*. 2007, 61: 483-487.
- [85] Mitchell VD, Taylor CM, Bauer S. Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. *BioEnergy Research*. 2014, 7: 654-669.
- [86] Kim Y, Kreke T, Hendrickson R, Parenti J, Ladisch MR. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 30-38.
- [87] Persson P, Andersson J, Gorton L, Larsson S, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50: 5318-5325.
- [88] Stagge S, Cavka A, Jönsson LJ. Identification of benzoquinones in pretreated lignocellulosic feedstocks and inhibitory effects on yeast. *AMB Express*. 2015, 5: 62.
- [89] Watson NE, Prior BA, Lategan PM, Lussi M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1984, 6: 451-456.
- [90] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103-112.
- [91] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in

- Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 1981, 11: 226-228.
- [92] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M. Deactivation of cellulases by phenols. Enzyme and Microbial Technology. 2011, 48: 54-60.
- [93] Studer MH, DeMartini JD, Davis MF, Sykes RW, Davison B, Keller M, Tuskan GE, Wyman CE. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011, 108: 6300-6305.
- [94] Chiaramonti D, Prussi M, Ferrero S, Oriani L, Ottonello P, Torre P, Cherchi F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. Biomass Bioenergy. 2012, 46: 25-35.
- [95] Larsen J, Haven M, Thirup L. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. Biomass Bioenergy. 2012, 46: 36-45.
- [96] Alriksson B, Sjöde A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2006, 129: 599-611.
- [97] Alriksson B, Cavka A, Jönsson LJ. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. Bioresource Technology. 2011, 102: 1254-1263.
- [98] Cannella D, Sveding PV, Jrgensen H. PEI detoxification of pretreated spruce for high solids ethanol fermentation. Applied Energy. 2014, 132: 394-403.
- [99] Koppram R, Albers E, Olsson L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. Biotechnology for Biofuels. 2012, 5: 32.
- [100] Almario MP, Reyes LH, Kao KC. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. Biotechnology and Bioengineering. 2013, 110: 2616-2623.
- [101] Smith J, van Rensburg E, Görgens JF. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. BMC Biotechnology. 2014, 14: 41.
- [102] Favaro L, Basaglia M, Trento A, Van Rensburg E, García-Aparicio M, Van Zyl WH, Casella S. Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. Biotechnology for Biofuels. 2013, 6: 168.
- [103] Wimalasena TT, Greetham D, Marvin ME, Liti G, Chandelia Y, Hart A, Louis EJ, Phister TG, Tucker GA, Smart KA. Phenotypic characterisation of *Saccharomyces spp.* yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. Microbial Cell Factories. 2014, 13: 47.
- [104] Schulein M. Cellulases from *Trichoderma reesei*. Methods in Enzymology. 1988, 60: 234-242.

- [105] Henrissat B, Teeri TT, Warren RAJ. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* 1998, 425: 352-354.
- [106] Lynd LR, Weimer PJ, Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2002, 66: 506-577.
- [107] Zhang Y, Yang JS, Luo LJ, Wang ET, Wang RN, Liu L, Liu JW, Yuan HL. Low-cost cellulase-hemicellulase mixture secreted by *Trichoderma harzianum* em0925 with complete saccharification efficacy of lignocellulose. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020, 21: 371.
- [108] Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2007, 27: 197-216.
- [109] Wyman CE. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. *Biotechnology Progress.* 2003, 19: 254-262.
- [110] Paulechka YU, Kabo GJ, Blokhin AV, Vydrov OA, Magee JW, Frenkel M. Thermodynamic properties of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in the ideal gas state. *Journal of Chemical and Engineering Data.* 2003, 48: 457-462.
- [111] Hiroe A, Watanabe S, Kobayashi M, Nomura CT, Tsuge T. Increased synthesis of poly(3-hydroxydodecanoate) by random mutagenesis of polyhydroxyalkanoate synthase. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2018, 102: 7927-7934.
- [112] Matsumoto Ki, Takase K, Yamamoto Y, Doi Y, Taguchi S. Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae* enhances production of PHAs in recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules.* 2009, 10: 682-685.
- [113] Zheng Y, Chen JC, Ma YM, Chen GQ. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering.* 2020, 58: 82-93.
- [114] Zhao H, Zhang HM, Chen X, Li T, Wu Q, Ouyang Q, Chen GQ. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metabolic Engineering.* 2017, 39: 128-140.
- [115] York GM, Stubbe J, Sinskey AJ. New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology.* 2001, 183: 2394-2397.
- [116] de Almeida A, Nikel PI, Giordano AM, Pettinari JM. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly (3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007, 73: 7912-7916.
- [117] Poblete-Castro I, Binger D, Rodrigues A, Becker J, dos Santos V, Wittmann C. In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering.* 2013, 15: 113-123.
- [118] Acuña J, Bielecka A, Häussler S, Schobert M, Jahn M, Wittmann C, Jahn D, Poblete-Castro I. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial Cell Factories.* 2014, 13: 88.
- [119] Errington J, Daniel RA, Scheffrs DJ. Cytokinesis in bacteria. *Microbiology and*

- Molecular Biology Reviews. 2003, 67: 52-65.
- [120] Wang Y, Wu H, Jiang X, Chen GQ. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metabolic Engineering*. 2014, 25: 183-193.
- [121] Chen JC, Beckwith J. FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for colocalization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Molecular Microbiology*. 2001, 42: 395-413.
- [122] Wu H, Fan Z, Jiang X, Chen J, Chen GQ. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing *E. coli*. *Microbial Cell Factories*. 2016, 15: 128.
- [123] Hirasawa T, Wachi M. Glutamate fermentation-2: Mechanism of L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotichnology*. 2016, 159: 57-72.
- [124] Eikmanns BJ, Rittmann D, Sahm H. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Journal of Bacteriology*. 1995, 177: 774-782.
- [125] Shimizu H, Hirasawa T. Production of glutamate and glutamate-related amino acids: molecular mechanism analysis and metabolic engineering. *Microbiology Monographs*. 2007, 5: 1-38.
- [126] Shimizu H, Tanaka H, Nakato A, Nagahisa K, Kimura E, Shioya S. Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2003, 25: 291-298.
- [127] Kawahara Y, Takahashi-Fuke K, Shimizu E, Nakamatsu T, Nakamori S. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1997, 61: 1109-1112.
- [128] Schultz C, Niebisch A, Gebel L, Bott M. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 76: 691-700.
- [129] Hirasawa T, Kim J, Shirai T, Furusawa C, Shimizu H. Molecular mechanisms and metabolic engineering of glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Subcellular Biochemistry*. 2012, 64: 261-281.
- [130] Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281: 12300-12307.
- [131] Kim J, Hirasawa T, Saito M, Furusawa C, Shimizu H. Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 91: 143-151.
- [132] Boulahya KA, Guedon E, Delaunay S, Schultz C, Boudrant J, Bott M, Goergen JL. OdhI

- dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 87: 1867-1874.
- [133] Barthe P, Roumestand C, Canova MJ, Kremer L, Hurard C, Molle V, Cohen-Gonsaud M. Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism. *Structure*. 2009, 17: 568-578.
- [134] O'Regan M, Thierbach G, Bachmann B, Villeval D, Lepage P, Viret JF, Lemoine Y. Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Gene*. 1989, 77: 237-251.
- [135] Peters-Wendisch PG, Kreutzer C, Kalinowski J, Patek M, Sahm H, Eikmanns BJ. Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiology*. 1998, 144: 915-927.
- [136] Sato H, Orishimo K, Shirai T, Hirasawa T, Nagahisa K, Shimizu H, Wachi M. Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106: 51-58.
- [137] Shirai T, Fujimura K, Furusawa C, Nagahisa K, Shioya S, Shimizu H. Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. *Microbial Cell Factories*. 2007, 6: 19.
- [138] Hoischen C, Krämer R. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172: 3409-3416.
- [139] Nampoothiri KM, Hoischen C, Bathe B, Mockel B, Pfefferle W, Krumbach K, Sahm H, Eggeling L. Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 58: 89-96.
- [140] Hashimoto K, Kawasaki H, Akazawa K, Nakamura J, Asakura Y, Kudo T, Sakuradani E, Shimizu S, Nakamatsu T. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2006, 70: 22-30.
- [141] Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T. Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1996, 60: 1565-1570.
- [142] Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T, Tokuda H. A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997, 234: 157-161.
- [143] Kimura E, Yagoshi C, Kawahara Y, Ohsumi T, Nakamatsu T, Tokuda H. Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1999, 63: 1274-1278.

- [144] Levefaudes M, Patin D, de Sousa-d'Auria C, Chami M, Blanot D, Herve M, Arthur M, Houssin C, Mengin-Lecreulx D. Diaminopimelic acid amidation in *Corynebacteriales*: new insights into the role of LtsA in peptidoglycan modification. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290: 13079-13094.
- [145] Hirasawa T, Wachi M, Nagai K. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* ltsA gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *Journal of Bacteriology*. 2000, 182: 2696-2701.
- [146] Hirasawa T, Wachi M, Nagai K. L-Glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* ltsA mutant strains. *BMC Biotechnology*. 2001, 1: 9.
- [147] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, Kawahara Y, Matsui K, Osumi T, Nakamatsu T. Altered metabolic flux due to deletion of odhA causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73: 1308-1319.
- [148] Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73: 4491-4498.
- [149] Wachi M. Amino acid exporters in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology Monographs*. 2013, 23: 335-349.
- [150] Börngen K, Battle AR, Moker N, Morbach S, Marin K, Martinac B, Krämer R. The properties and contribution of the *Corynebacterium glutamicum* MscS variant to fine-tuning of osmotic adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1798: 2141-2149.
- [151] Hashimoto K, Nakamura K, Kuroda T, Yabe I, Nakamatsu T, Kawasaki H. The protein encoded by NCgl1221 in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2010, 74: 2546-2549.
- [152] Hashimoto K, Murata J, Konishi T, Yabe I, Nakamatsu T, Kawasaki H. Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2012, 76: 1422-1424.
- [153] Becker M, Börngen K, Nomura T, Battle AR, Marin K, Martinac B, Krämer R. Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1828: 1230-1240.
- [154] Yamashita C, Hashimoto K, Kumagai K, Maeda T, Takada A, Yabe I, Kawasaki H, Wachi M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2013, 77: 1008-1013.
- [155] Ikeda M. Lysine fermentation: History and genome breeding. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2016, 159: 73-102.
- [156] Peters-Wendisch PG, Schiel B, Wendisch VF, Katsoulidis E, Möckel B, Sahm H, Eikmanns BJ. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001, 3: 295-300.

- [157] Chen Z, Bommarreddy RR, Frank D, Rappert S, Zeng AP. Dereglulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80: 1388-1393.
- [158] Petersen S, Mack C, de Graaf AA, Riedel C, Eikmanns BJ, Sahm H. Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic mechanisms in vivo. *Metabolic Engineering*. 2001, 3: 344-361.
- [159] Riedel C, Rittmann D, Dangel P, Möckel B, Sahm H, Eikmanns BJ. Characterization, expression, and inactivation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001, 3: 573-583.
- [160] Blombach B, Schreiner ME, Moch M, Oldiges M, Eikmanns BJ. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 76: 615-623.
- [161] Becker J, Klopprogge C, Schröder H, Wittmann C. Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75: 7866-7869.
- [162] Radmacher E, Eggeling L. The three tricarboxylate synthase activities of *Corynebacterium glutamicum* and increase of L-lysine synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 76: 587-595.
- [163] van Ooyen J, Noack S, Bott M, Reth A, Eggeling L. Improved L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum* and systemic insight into citrate synthase flux and activity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109: 2070-2081.
- [164] Mitsunashi S, Hayashi M, Ohnishi J, Ikeda M. Disruption of malate:quinone oxidoreductase increases L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2006, 70: 2803-2806.
- [165] Marx A, Hans S, Mockel B, Bathe B, de Graaf AA. Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104: 185-197.
- [166] Becker J, Klopprogge C, Zelder O, Heinzle E, Wittmann C. Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71: 8587-8596.
- [167] Becker J, Klopprogge C, Herold A, Zelder O, Bolten CJ, Wittmann C. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*-over expression and modification of G6P dehydrogenase. *Journal of Biotechnology*. 2007, 132: 99-109.
- [168] Ohnishi J, Katahira R, Mitsunashi S, Kakita S, Ikeda M A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 242: 265-274.
- [169] Takeno S, Hori K, Ohtani S, Mimura A, Mitsunashi S, Ikeda M. L-Lysine production

- independent of the oxidative pentose phosphate pathway by *Corynebacterium glutamicum* with the *Streptococcus mutans gapN* gene. *Metabolic Engineering*. 2016, 37: 1-10.
- [170] Takeno S, Murata R, Kobayashi R, Mitsuhashi S, Ikeda M. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76: 7154-7160.
- [171] Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 58: 265-274.
- [172] Vrljić M, Sahm H, Eggeling L. A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*. 1996, 22: 815-826.
- [173] Gunji Y, Yasueda H. Enhancement of L-lysine production in methylotroph *Methylophilus methylotrophus* by introducing a mutant LysE exporter. *Journal of Biotechnology*. 2006, 127: 1-13.
- [174] Nagai Y, Ito H, Yasueda H. Amino acid production: L-lysine. *Encyclopedia of industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. 2010, 7: 1-10.
- [175] Pathania A, Sardesai AA. Distinct paths for basic amino acid export in *Escherichia coli*: YbjE (LysO) mediates export of L-lysine. *Journal of Bacteriology*. 2015, 197: 2036-2047.
- [176] Ikeda M. Sugar transport systems in *Corynebacterium glutamicum*: features and applications to strain development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 96: 1191-1200.
- [177] Ikeda M, Mizuno Y, Awane S, Hayashi M, Mitsuhashi S, Takeno S. Identification and application of a different glucose uptake system that functions as an alternative to the phosphotransferase system in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90: 1443-1451.
- [178] Sato N, Kishida M, Nakano M, Hirata Y, Tanaka T. Metabolic engineering of shikimic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* from glucose and cellobiose retaining its phosphotransferase system function and pyruvate kinase activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, 8: 569406.
- [179] Lindner SN, Seibold GM, Henrich A, Krämer R, Wendisch VF. Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77: 3571-3581.
- [180] Lindner SN, Seibold GM, Krämer R, Wendisch VF. Impact of a new glucose utilization pathway in amino acid-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Bioengineered Bugs*. 2011, 2: 291-295.
- [181] Krings E, Krumbach K, Bathe B, Kelle R, Wendisch VF, Sahm H, Eggeling L. Characterization of myo-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. *Journal of Bacteriology*. 2006, 188: 8054-8061.

- [182] Bott M, Niebisch A. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bacteriology. 2003, 104: 129-153.
- [183] Kabus A, Niebisch A, Bott M. Role of cytochrome bd oxidase from *Corynebacterium glutamicum* in growth and lysine production. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73: 861-868.
- [184] Kucharska K, Rybarczyk P, Holowacz I, Lukajtis R, Glinka M, Kaminski M. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. Molecules. 2018, 23: 2937.
- [185] Nieves LM, Panyon LA, Wang X. Engineering sugar utilization and microbial tolerance toward lignocellulose conversion. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2015, 3: 17.
- [186] Nduko JM, Suzuki W, Matsumoto K, Kobayashi H, Ooi T, Fukuoka A, Taguchi S. Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance to 5-hydroxymethylfurfural. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2012, 113: 70-72.
- [187] Matsumoto K, Kobayashi H, Ikeda K, Komanoya T, Fukuoka A, Taguchi S. Chemo-microbial conversion of cellulose into polyhydroxybutyrate through ruthenium-catalyzed hydrolysis of cellulose into glucose. Bioresource Technology. 2011, 102: 3564-3567.
- [188] Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. Bioresource Technology. 2008, 99: 8042-8048.
- [189] Zhou P, Khushk I, Gao Q, Bao J. Tolerance and transcriptional analysis of *Corynebacterium glutamicum* on biotransformation of toxic furaldehyde and benzaldehyde inhibitory compounds. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2019, 46: 951-963.
- [190] Wen J, Xiao Y, Gao Q, Bao J. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology for Biofuels. 2018, 11: 132.
- [191] Wang X, Khushk I, Xiao YQ, Gao QQ, Bao J. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018, 102: 377-388.
- [192] Werpy T, Petersen G. Top Value Added Chemicals from Biomass. NREL/PNNL-14808, NREL: Golden, CO. 2004.
- [193] Woo HM, Park J. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology. 2014, 180: 43-51.
- [194] Taha M, Foda M, Shahsavari E, Aburto-Medina A, Adetutu E, Ball A. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. Current Opinion in Biotechnology. 2016, 38: 190-197.
- [195] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. Current Opinion in Biotechnology. 2012, 23: 631-640.

- [196] Kawaguchi H, Vertes AA, Okino S, Inui M, Yukawa H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72: 3418-3428.
- [197] Sasaki M, Jojima T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 85: 105-115.
- [198] Tsuge Y, Kato N, Yamamoto S, Suda M, Inui M. Enhanced production of d-lactate from mixed sugars in *Corynebacterium glutamicum* by overexpression of glycolytic genes encoding phosphofructokinase and triosephosphate isomerase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019, 127: 288-293.
- [199] Mao Y, Li G, Chang Z, Tao R, Cui Z, Wang Z, Tang Y, Chen T, Zhao X. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinate from lignocellulosic hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 95.
- [200] Wang C, Zhang H, Cai H, Zhou Z, Chen Y, Chen Y, Ouyang P. Succinic acid production from corn cob hydrolysates by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 172: 340-350.
- [201] Chen Z, Huang J, Wu Y, Wu W, Zhang Y, Liu D. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of 3-hydroxypropionic acid from glucose and xylose. *Metabolic Engineering*. 2017, 39: 151-158.
- [202] Baritugo K, Kim HT, David Y, Khang TU, Hyun, SM, Kang KY, Yu JH, Choi JH, Song JJ, Joo JH, Park SJ. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from empty fruit bunch biosugar solution. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17: 129.
- [203] Buschke N, Becker J, Schafer R, Kiefer P, Biedendieck R, Wittmann C. Systems metabolic engineering of xylose-utilizing *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane. *Biotechnology Journal*. 2013, 8: 557-570.
- [204] Gopinath V, Meiswinkel TM, Wendisch VF, Nampoothiri KM. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 92: 985-996.
- [205] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [206] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.
- [207] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [208] Wen J, Bao J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin-rich corn stover hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 86.

- [209] Wang Y, Cao G, Xu D, Fan L, Wu X, Ni X, Zhao S, Zheng P, Sun J, Ma Y. A novel *Corynebacterium glutamicum* L-glutamate exporter. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018, 84: e02691-17.
- [210] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL/TP-510-42618, NREL: Golden, CO. 2012.
- [211] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. NREL/TP-510-42623, NREL: Golden, CO. 2008.
- [212] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodegradation on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [213] Meiswinkel TM, Rittmann D, Lindner SN, Wendisch VF. Crude glycerol-based production of amino acids and putrescine by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*. 2013, 145: 254-258.
- [214] Neuner A, Wagner I, Sieker T, Ulber R, Schneider K, Peifer S, Heinzle E. Production of L-lysine on different silage juices using genetically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2013, 163: 217-224.
- [215] Chen Z, Liu G, Zhang J, Bao J. A preliminary study on L-lysine fermentation from lignocellulose feedstock and techno-economic evaluation. *Bioresource Technology*. 2019, 271: 196-201.
- [216] Humbird D, Mohagheghi A, Dowe N, Schell D. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. *Biotechnology Progress*. 2010, 26: 1245-1251.
- [217] Uppugundla N, da Costa Sousa L, Chundawat SPS, Yu X, Simmons B, Singh S, Gao X, Kumar R, Wyman CE, Dale BE, Balan V. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX<sup>TM</sup> pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 72.
- [218] Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Dudgeon D. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. NREL/TP-5100-47764, NREL: Golden, CO. 2011.
- [219] Liu ZH, Chen HZ. Simultaneous saccharification and cofermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. *Bioresource Technology*. 2016, 201: 15-26.
- [220] Wu W, Zhang Y, Liu D, Chen Z. Efficient mining of natural NADH-utilizing dehydrogenases enables systematic cofactor engineering of lysine synthesis pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*. 2019, 52: 77-86.
- [221] Wittmann C, Kiefer P, Zelder O. Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70: 7277-7287.
- [222] Kabus A, Georgi T, Wendisch VF, Bott M. Expression of the *Escherichia coli* *pntAB* genes

- encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 75: 47-53.
- [223] Choi SY, Rhie MN, Kim HT, Joo JC, Cho IJ, Son J, Jo SY, Sohn YJ, Baritugo KA, Pyo J, Lee Y, Lee SY, Park SJ. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*. 2020, 58: 47-81.
- [224] Santimano MC, Prabhu NN, Garg S. PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus sp.* Strain COL1/A6. *Research Journal of Microbiology*. 2009, 4: 89-96.
- [225] Sheu DS, Chen WM, Yang JY, Chang RC. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009, 44: 289-294.
- [226] Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha CK, Sinskey AJ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia Eutropha* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77: 2847-2854.
- [227] Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlic A, Braunegg G. Potential of various archae and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromolecular Bioscience*. 2007, 7: 218-226.
- [228] Park SJ, Park JP, Lee SY. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter. *Biotechnology Letters*. 2002, 24: 185-189.
- [229] Oh YH, Lee SH, Jang YA, Choi JW, Hong KS, Yu JH, Shin J, Song BK, Mastan SG, David Y, Baylon MG, Lee SY, Park SJ. Development of rice bran treatment process and its use for the synthesis of polyhydroxyalkanoates from rice bran hydrolysate solution. *Bioresource Technology*. 2015, 181: 283-290.
- [230] Andreeßen B, Lange AB, Robenek H, Steinbuchel A. Conversion of glycerol to poly(3-Hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76: 622-626.
- [231] Wang Q, Yang P, Liu C, Xue Y, Xian M, Zhao G. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 2013, 131: 548-551.
- [232] Annamalai N, Al-Battashi H, Al-Bahry S, Sivakumar N. Biorefinery production of poly-3-hydroxybutyrate using waste office paper hydrolysate as feedstock for microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2018, 165: 25-30.
- [233] Jo SJ, Maeda M, Ooi T, Taguchi S. Production system for biodegradable polyester polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, 102: 233-236.
- [234] Jo SJ, Matsumoto K, Leong CR, Ooi T, Taguchi S. Improvement of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] production in *Corynebacterium glutamicum* by codon optimization, point mutation and gene dosage of P(3HB) biosynthetic genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2007, 104: 457-463.

- [235] Jo SJ, Liong CR, Matsumoto K, Taguchi S. Dual production of poly(3-hydroxybutyrate) and glutamate using variable biotin concentrations in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, 107: 409-411.
- [236] Matsumoto K, Yamada M, Leong CR, Jo SJ, Kuzuyama T, Taguchi S. A new pathway for poly(3-hydroxybutyrate) production in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* by functional expression of a new acetoacetyl-coenzyme a synthase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2011, 75: 364-366.
- [237] Song Y, Matsumoto K, Tanaka T, Kondo A, Taguchi S. Single-step production of polyhydroxybutyrate from starch by using  $\alpha$ -amylase cell-surface displaying system of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013, 115: 12-14.
- [238] Liu Q, Ouyang Sp, Kim J, Chen GQ. The impact of PHB accumulation on l-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2007, 132: 273-279.
- [239] Jin C, Huang Z, Bao J. High-titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8: 6315-6322.
- [240] Matsumoto K, Tanaka Y, Watanabe T, Motohashi R, Ikeda K, Tobitani K, Yao M, Tanaka I, Taguchi S. Directed evolution and structural analysis of NADPH-dependent Acetoacetyl Coenzyme A (Acetoacetyl-CoA) reductase from *Ralstonia eutropha* reveals two mutations responsible for enhanced kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79: 6134-6139.
- [241] Takase K, Taguchi S, Doi Y. Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and *in vitro* recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. *The Journal of Biochemistry*. 2003, 133: 139-145.
- [242] Letek M, Ordonez E, Vaquera J, Margolin W, Flardh K, Mateos LM, Gil JA. Diviva is required for polar growth in the mreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 2008, 190: 3283-3292.
- [243] Sieger B, Schubert K, Donovan C, Bramkamp M. The lipid II flippase RodA determines morphology and growth in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*. 2013, 90: 966-982.
- [244] Ramos A, Letek M, Campelo AB, Vaquera J, Mateos LM, Gil JA. Altered morphology produced by *ftsZ* expression in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Microbiology*. 2005, 151: 2563-2572.
- [245] Fiuza M, Canova MJ, Zanella-Cleon I, Becchi M, Cozzone AJ, Mateos LM, Kremer L, Gil JA, Molle V. From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. 2008, 283: 18099-18112.
- [246] Lee DS, Kim Y, Lee HS. The *whcD* gene of *Corynebacterium glutamicum* plays roles in cell division and envelope formation. *Microbiology*. 2017, 163: 131-143.

- [247] Yim SS, Choi JW, Lee RJ, Lee YJ, Lee SH, Kim SY, Jeong KJ. Development of a new platform for secretory production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 113: 163-172.
- [248] Zhang L, Jia H, Xu D. Construction of a novel twin-arginine translocation (Tat)-dependant type expression vector for secretory production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*. 2015, 82: 50-55.
- [249] Tateno T, Hatada K, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. Development of novel cell surface display in *Corynebacterium glutamicum* using porin. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 2009, 84: 733-739.
- [250] Cesario MT, Raposo RS, de Almeida MCMD, van Keulen F, Ferreira BS, da Fonseca MMR. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*. 2014, 31: 104-113.
- [251] Sathesh Prabu C, Murugesan AG. Effective utilization and management of coir industrial waste for the production of poly-hydroxybutyrate (PHB) using the bacterium *azotobacter beijerinickii*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2010, 4: 519-524.
- [252] Pan W, Nomura CT, Nakas JP. Estimation of inhibitory effects of hemicellulosic wood hydrolysate inhibitors on PHA production by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2012, 125: 275-282.
- [253] Zhang Y, Sun W, Wang H, Geng A. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology*. 2013, 147: 307-314.
- [254] Silva LF, Taciro MK, Michelin Ramos ME, Carter JM, Pradella JG, Gomez JG. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2004, 31: 245-254.
- [255] Radhika D, Murugesan AG. Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxybutyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as sole carbon source. *Bioresource Technology*. 2012, 121: 83-92.
- [256] Gowda V, Shivakumar S. Agrowaste-based polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014, 57: 55-61.
- [257] Annamalai N, Sivakumar N. Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2016, 237: 13-17.
- [258] Kim HS, Oh YH, Jang YA, Kang KH, David Y, Yu JH. Recombinant *Ralstonia eutropha* engineered to utilize xylose and its use for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from sunflower stalk hydrolysate solution. *Microbial Cell Factories*. 2016, 15: 95.
- [259] de Souza L, Y M, Shivakumar S. Bioconversion of lignocellulosic substrates for the production of polyhydroxyalkanoates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020, 28: 101754.

- [260] Sawant SS, Salunke BK, Kim BE. Degradation of corn stover by fungal cellulase cocktail for production of polyhydroxyalkanoates by moderate halophile *Paracoccus sp.* LL1. *Bioresource Technology*. 2015, 194: 247-255.
- [261] Zhang HS, Liu G, Zhang J, Bao J. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 123-131.
- [262] Zhou X, Wang X, Cao R, Tao YH, Xu Y, Yu SY. Characteristics and kinetics of the aldonic acids production using whole-cell catalysis of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresources*. 2015, 10: 4277-4286.
- [263] Zhang HS, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 211-219.
- [264] Ma S, Li W, Zhang S, Ge D, Yu J, Shen X. Influence of sodium gluconate on the performance and hydration of Portland cement. *Construction and Building Materials*. 2015, 91: 138-144.
- [265] Hou WL, Bao J. Evaluation of cement retarding performance of cellulosic sugar acids. *Construction and Building Materials*. 2019, 202: 522-527.
- [266] Yao RM, Hou WL, Bao J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 244: 1188-1192.
- [267] Hou WL, Zhang MF, Bao J. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresource Technology*. 2018, 264: 395-399.
- [268] Zhou X, Han J, Xu Y. Electrodialytic bioproduction of xylonic acid by using immobilized whole-cell *Gluconobacter oxydans* as biocatalyst. *Bioresource Technology*. 2019, 282: 378-383.
- [269] Zhou PP, Yao RM, Zhang HS, Bao J. Unique glucose oxidation catalysis of *Gluconobacter oxydans* constitutes an efficient cellulosic gluconic acid fermentation free of inhibitory compounds disturbance. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019, 116: 2191-2199.
- [270] Wisselink HW, Toirkens MJ, Wu QX, Pronk JT, Maris AJA. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75: 907-914.
- [271] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369-1376.
- [272] Wang CQ, Shen Y, Zhang YY, Suo F, Hou J, Bao XM. Improvement of L-Arabinose fermentation by modifying the metabolic pathway and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMed Research International*. 2013, 24: 461204.
- [273] Zhang J, Chu DQ, Huang J, Yu ZC, Dai G, Bao J. Simultaneous saccharification and

- ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105: 718-728.
- [274] Ugwuodo CJ, Nwagu TN. Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: A review of literature. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 166: 238-250.
- [275] Afrin S, Khan MRI, Zhang WY, Wang YS, Zhang WW, He L, Ma G. Membrane-located expression of thioesterase from *Acinetobacter baylyi* enhances free fatty acid production with decreased toxicity in *Synechocystis* sp PCC6803. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9: 2842.
- [276] Stubbe JA, Tian J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Product Reports*. 2003, 20: 445-457.
- [277] Jendrossek D, Selchow O, Hoppert M. Poly(3-Hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73: 586-593.

附录 I

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
<i>araE</i>	Pentose transporter	戊糖转运蛋白
<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase	丙酮酸脱氢酶
<i>ack</i>	Acetate kinase	乙酸激酶
<i>aspA</i>	Aspartate ammonia-lyase	天冬氨酸裂解酶
<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	异柠檬酸裂解酶
<i>aspC</i>	Aspartate aminotransferase	天冬氨酸转氨酶
<i>asd</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	天冬氨酸半醛脱氢酶
<i>accBC</i>	Acetyl-CoA carboxylase BC component	乙酰辅酶 A 羧化酶 BC 亚基
<i>accD1</i>	Acetyl-CoA carboxylase D1 component	乙酰辅酶 A 羧化酶 D1 亚基
<i>aceF</i>	Dihydrolipoamide acetyltransferase	二氢硫辛酰转乙酰基酶
<i>aspA</i>	Fumarate hydratase	延胡索酸水合酶
<i>acn</i>	Aconitate hydratase	乌头酸水合酶
AKG	$\alpha$ -oxoglutarate	$\alpha$ -酮戊二酸
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
CCR	Carbon catabolite repression	碳代谢阻遏
CGMCC	China General Microbiological Culture Collection Center	中国普通微生物保藏中心
CIT	Citrate	柠檬酸
CDW	Cell dry weight	细胞干重
<i>dapA</i>	Dihydrodipicolinate synthase	二氢吡啶二羧酸合酶
<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinate reductase	二氢吡啶二羧酸还原酶
<i>ddh</i>	Diaminopimelate dehydrogenase	二氨基庚二酸脱氢酶
<i>eno</i>	Phosphopyruvate hydratase	磷酸丙酮酸水合酶
<i>fba</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	果糖 1,6-二磷酸醛缩酶
FtsZ	Cell division Z ring protein	细胞分裂环蛋白
FUM	Fumarate	延胡索酸
<i>glk</i>	Glucokinase	葡萄糖激酶
<i>glpX</i>	Fructose 1,6-bisphosphatase	果糖 1,6-二磷酸酯酶
<i>gltA</i>	Citrate synthase	柠檬酸合酶
<i>glcB</i>	Malate synthase	苹果酸合酶
<i>gdh</i>	Glutamate dehydrogenase	谷氨酸脱氢酶

英文缩写	英文全称	中文全称
<i>gpd</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油醛脱氢酶
<i>gndA</i>	Phosphogluconate dehydrogenase	磷酸葡萄糖酸脱氢酶
<i>gpmA</i>	Phosphoglycerate mutase	磷酸甘油酸变位酶
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
HMFB	5-hydroxymethylfurfural	5-羟甲基糠醛
<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase	异柠檬酸脱氢酶
ICIT	Isocitrate	异柠檬酸
<i>kgd</i>	$\alpha$ -ketoglutarate decarboxylase	$\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶
<i>ldhA</i>	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
<i>lysC</i>	Aspartokinase	天冬氨酸激酶
<i>lysA</i>	Diaminopimelate decarboxylase	二氨基庚二酸脱羧酶
<i>mgo</i>	Malate:quinone oxidoreductase	苹果酸:醌氧化还原酶
MscCG	Glutamate exporter	谷氨酸转运蛋白
mGDH	Membrane bound glucose dehydrogenase	膜结合的葡萄糖脱氢酶
MAL	Malate	苹果酸
Ncgl/CGR	Secreted expressed signal peptides	分泌信号肽
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (氧化型辅酶 II)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (还原型辅酶 II)
<i>odhA</i>	$\alpha$ -oxoglutarate dehydrogenase E1 component	$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 E1 亚基
ODHC	$\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase system	$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系
OA	Oxaloacetate	草酰乙酸
<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase	6-磷酸葡萄糖酸内酯酶
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	6-磷酸葡萄糖异构酶
<i>pfkA</i>	6-phosphofructokinase	6-磷酸果糖激酶
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase	磷酸乙酰转移酶
<i>Pyc</i>	Pyruvate carboxylase	丙酮酸羧化酶
<i>pyk</i>	Pyruvate kinase	丙酮酸激酶
<i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶
<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶
<i>phaA</i>	$\beta$ -ketothiolase	$\beta$ -酮硫解酶
<i>phaB</i>	Acetylacetyl-CoA reductase	乙酰乙酰辅酶 A 还原酶
<i>phaC</i>	PHA synthase	PHA 合酶
<i>pknA/pknB</i>	Serine/threonine protein kinase	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

英文缩写	英文全称	中文全称
<i>porB/porC</i>	Cell membrane anchor peptide	细胞膜锚定肽
PHA	Polyhydroxyalkanoate	聚羟基脂肪酸酯
PHB	Polyhydroxybutyrate	聚羟基丁酸酯
PLA	Polylactic acid	聚乳酸
PTS	Phosphotransferase system	磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDA	Potato dextrose agar (medium)	马铃薯葡萄糖琼脂培养基
<i>ripA/sdh</i>	Succinate dehydrogenase	琥珀酸脱氢酶
<i>rpe</i>	Ribulose-5-phosphate-epimerase	5-磷酸核酮糖异构酶
<i>sucD</i>	Succinyl-CoA synthetase subunit alpha	琥珀酰辅酶 A- $\alpha$ 亚基
SUCC-CoA	Succinyl-CoA	琥珀酰辅酶 A
SUCC	Succinate	琥珀酸
<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	磷酸丙糖异构酶
<i>tkt</i>	Transketolase	转酮醇酶
<i>tal</i>	Transaldolase	转醛醇酶
<i>xylA</i>	Xylose isomerase	木糖异构酶
<i>xylB</i>	Xylulose kinase	木酮糖激酶
<i>zwf</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	6-磷酸葡萄糖脱氢酶
$\alpha$ -PGA	$\alpha$ -polyglutamic acid	$\alpha$ -聚谷氨酸
$\gamma$ -PGA	$\gamma$ -polyglutamic acid	$\gamma$ -聚谷氨酸
$\epsilon$ -PL	$\epsilon$ -polylysine	$\epsilon$ -聚赖氨酸

注：英文全称和中文全称都特指基因编码的酶的名称。

## 学术成果

## 已发表论文:

1. **Ci Jin**, Zhen Huang, Jie Bao\*. High-titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. 2020, 8: 6315-6322. (SCI IF=8.198, 对应本论文第二章)
2. **Ci Jin**, Jie Bao\*. Lysine production by dry biorefining of wheat straw and cofermentation of *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2021, 69: 1900-1906. (SCI IF=5.279, 对应本论文第三章)
3. **Ci Jin**<sup>1</sup>, Weiliang Hou<sup>1</sup>, Ruimiao Yao<sup>1</sup>, Pingping Zhou, Hongsen Zhang, Jie Bao\*. Adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* accelerates the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. **Bioresource Technology**. 2019, 289: 121623. (SCI IF=9.642, 对应本论文第五章)

## 准备发表论文:

1. **Ci Jin**<sup>1</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Zhen Huang, Xushen Han, Jie Bao\*. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from lignocellulose biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. Under review. (对应本论文第四章)
2. Qi Liu<sup>1</sup>, Minping Lu<sup>1</sup>, **Ci Jin**<sup>1</sup>, Weiliang Hou, Liao Zhao, Jie Bao. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of *Trichosporon cutaneum* for lipid accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*. (Under review).
3. Ying-Ying Xu<sup>1</sup>, Ke-Jun Hua<sup>1</sup>, Zhen Huang, Ping-Ping Zhou, Jing-Bai Wen, **Ci Jin**, Jie Bao. Cellulosic hydrocarbons production by engineering dual synthesis pathways in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. *Biotechnology for Biofuels*. (Under review).

## 申请专利:

1. 鲍杰, **金慈**。一种在谷氨酸棒状杆菌中利用木糖生产谷氨酸的合成路径的构建方法。专利申请号: 202011331840.8。
2. **金慈**, 鲍杰, 张明明, 刘修才。一种谷氨酸棒状杆菌及其应用。专利申请号: 202111165962.9。
3. **金慈**, 李静, 鲍杰, 刘修才。一种谷氨酸棒状杆菌发酵生产 PHB 的方法。专利申请号: 202111215841.0。
4. **金慈**, 李静, 黄振, 鲍杰, 张明明, 刘修才。一种融合基因、基因工程菌及生产 PHB 的方法。专利申请号: 202111223614.2。
5. **金慈**, 李静, 鲍杰, 张明明, 刘修才。一种基因工程菌及利用其生产聚 3-羟基丁

酸酯的方法。专利申请号：202111223624.6。

6. 鲍杰, 侯伟亮, 姚瑞苗, 张宏森, **金慈**, 张建。一株高效利用非葡萄糖碳源的氧化葡萄糖酸杆菌适应性进化方法及其应用。专利申请号：201811308621.0。

#### 学术会议论文:

1. **Ci Jin**, Zhen Huang, Jie Bao\*. High-titer glutamic acid production from lignocellulose using a recombinant *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose. BBChina project. Rostock, Germany, June 2019. (Oral presentation)
2. **Ci Jin**<sup>1</sup>, Weiliang Hou<sup>1</sup>, Ruimiao Yao<sup>1</sup>, Pingping Zhou, Hongsen Zhang, Jie Bao\*. Adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* improves the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. The 14<sup>th</sup> Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019). Taiwan, China, July 2019. (Poster)
3. **Ci Jin**, Zhen Huang, Jie Bao\*. High-titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose. 华东理工大学第二十四届论文年会. (Oral presentation)

## 致谢

五年的时光一晃而过，与五年前的自己对比，在科研方面：我从一个“科研小白”变成了一个具备一定科研思维的人，懂得辩证地、多角度地看待问题、分析问题，并设计对应的方案去解决问题，这是我在理性方面的成长。在生活方面：我也从一个幼稚的男孩，变成了一个稍微成熟些的人，认识到自己对于亲人和爱人的责任，摒弃掉不成熟的举动和言论，这是我在感性方面的成长。以上的改变离不开老师，家人和朋友们的帮助和支持，我是个内向的人，在生活中不擅长表现自己的感情，所以请允许我在论文的最后对各位表示最衷心的感谢。

首先要感谢鲍杰老师，一方面鲍老师作为我的科研引路人，培养了我的科研思维，教导我分析问题和设计实验，也锻炼了我的科研写作能力；另一方面鲍老师对于每一位学生认真负责、不偏不倚的态度，以及对待科研和工作不辞辛劳、全力以赴的态度都为我树立了一个榜样，希望我今后也能成为像您一样的老师，不辜负您的培养。我还要感谢实验的张建老师，高秋强老师和易霞老师，感谢你们对我的耐心指导和帮助。此外，我还要感谢范立强老师，感谢您让我加入大创课题组，让我对科研有了初步的了解和认知。

其次，我要感谢我的父亲和母亲，从大学到博士毕业，9年的时间让我从孩子变得成熟，却让你们花白了头发。这9年间陪伴你们的时间太少，以前年少无知，觉得离开了父母变得自由无拘束，却从没想过你们的感受，现在才发现自己能心无旁骛的科研，安心自在的生活都是你们包容下了生活的全部，不想让我分心，怕影响我学习。但是妈妈，以后别再瞒着我做手术了，你的儿子早已长大，可以负担起生活的压力和照顾你们的责任了。我还要感谢我的爱人王慧和我的姐姐，你们是特殊的存在，父母和亲戚很少提我的错误和问题，朋友又不好说我的缺点，是你们让我能认识到自己的缺点和问题，让我不断成长和成熟。

最后，我还要感谢实验室的同学们。感谢张宏森师兄，刘刚师兄，邱忠洋师兄，周平平师姐，温经柏师兄，侯伟亮师兄，韩昀身师兄，邵帅师兄和谌泽宇师兄，感谢你们对我在实验和生活上的指导和帮助，你们对我的帮助和恩情我都记在心里，这里就不一一详述了，你们在科研上的认真态度不仅为我树立了榜样，也为实验室创造了浓厚的科研氛围，再次感谢你们。我还要感谢颜钊，作为同一届的学生，我们在实验室一起度过了五年时光，有互帮互助，也有争吵生气，但我相信这些都将成为有趣的回忆。我还要感谢黄振师弟和李静师妹，感谢你们在实验上的支持和帮助，我对你们的要求比较严格，希望你们不要介意，也希望未来我们也是很好的朋友。感谢何妮玲师妹和韩涛师弟，感谢你们的尊重和信任，我们的方向差距比较大，对你们的指导有限，希望生物炼制实验室在你们地带领下可以越来越好。

金慈

2021年5月21日