

学校代码：10251

学号：Y30191256

华东理工大学

硕士学位论文

题目 工程谷氨酸棒状杆菌提高纤维素
聚 3-羟基丁酸酯产量的研究

专业 生物工程

研究方向 生物炼制

姓名 李静

导师 鲍杰 教授

定稿时间： 年 月 日

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

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 硕士学位论文

工程谷氨酸棒状杆菌提高纤维素
聚 3-羟基丁酸酯产量的研究

李静

指导教师姓名:

鲍杰 教授

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专 业 名 称: 生物工程

论文定稿日期: _____ 论文答辩日期: _____

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席:

评阅人:

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

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

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

工程谷氨酸棒状杆菌提高纤维素聚 3-羟基丁酸酯产量的研究

摘要

聚 3-羟基丁酸酯 (Poly 3-hydroxybutyrate, PHB) 是一类可以由微生物全合成的高分子聚酯, 具有与石油基塑料相似的物理性质和热加工性能以及生物可降解性。PHB 可以生物质资源进行发酵生产, 但其昂贵的生产成本是产业化大规模生产 PHB 的最大障碍。PHB 生产大多以淀粉和糖类物质作为原料, 其成本占总生产成本的 30%-40%以上, 因此降低 PHB 的原料成本十分重要。木质纤维素具有来源广泛、价格低廉和可再生的优势, 并且不存在“与人争粮”的问题, 是未来工业化生产 PHB 的最具应用潜力的原料。

前期工作以高抗逆性 *Corynebacterium glutamicum* S9114 为出发菌株, 将 PHB 合成相关基因和木糖代谢、转运相关基因整合到基因组上, 获得了一株能够利用葡萄糖和木糖稳定合成 PHB 的 *C. glutamicum* JH02 菌株。本论文的研究目的是在 *C. glutamicum* JH02 基础上通过分子生物学改造和探究谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的最适 NH_4^+ 添加量进一步提高重组谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力, 并且将获得的重组菌株在麦秆水解液中检验其生产 PHB 的能力。具体研究内容包括: (1) 细胞形态工程改造增大细胞体积, 从而提供 PHB 在胞内积累的潜力; (2) 膜定位表达 PHA 合酶, 提高 PHA 合酶的稳定性以及缩短 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离; (3) 引入 *phaP* 基因, 缩小 PHB 颗粒的粒径起到保护菌体的作用; (4) 增加乙酰辅酶 A 流入 PHB 合成路径的代谢通量; (5) 探究氨氮水平 (NH_4^+) 对 *C. glutamicum* 合成 PHB 的影响; (6) 适应性进化提高 *C. glutamicum* 对木质纤维素中木糖的利用能力。

第一部分是通过对分子生物学改造来提高 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB 的能力。为了增大细胞体积, 为 PHB 的积累提供更多的空间, 通过过表达细胞形态相关的 *pknB* 和 *WhcD* 基因分别使细胞干重增加了 1.0 倍和 1.1 倍, 促进了谷氨酸棒状杆菌细胞生长, 最终 PHB 的产量分别提高了 177.0% 和 163.0%。为了提高 PHA 合酶的稳定性, 缩短 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离, 将 PHA 合酶定位在细胞膜上, 获得的两株重组菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 和 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 使胞内 PHB 含量显著提高 70.1%, 140.6%, 使细胞干重增加 1 倍左右, 最终两株重组菌的 PHB 产量分别提高 195.0% 和 310.6%。

第二部分是探究了氨氮对 *C. glutamicum* 合成 PHB 的影响。通过浓度梯度实验确定当 NH_4^+ 添加浓度为 45 g/L 时, *C. glutamicum* JH02 获得最高的 PHB 产量。RT-qPCR 实验表明当添加合适的 NH_4^+ 浓度时, EMP 途径、TCA 循环和 PHB 合成路径的相关基因转录水平都明显上调, 这证明氨氮的添加不仅能促进细胞生长, 更重要的是能有效促进 PHB 合成相关基因的表达, 从而促进胞内 PHB 的积累。

第三部分是检验重组菌株在麦秆水解液中合成 PHB 的能力, 以及通过适应性进化提高 *C. glutamicum* 对木质纤维素中木糖的利用速率。通过膜定位表达 PHA 合酶获得的

重组菌株 JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 在 30% 固含量的麦秆水解液中经过补料批发酵, 最终获得了 16.2 g/L 的 PHB 产量。 *C. glutamicum* 木糖利用能力的适应性进化实验表明, 对于非天然的 PHB 生产菌株, 适应性进化不利于胞内合成 PHB。

本论文获得的重组菌株 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 在合适的 NH_4^+ 浓度下利用木质纤维素合成 PHB 的能力显著提升, 胞内 PHB 含量最高可以达到 39.3 wt%, PHB 产量最高可以达到 16.2 g/L, 与对照菌株 *C. glutamicum* JH02 相比, 胞内 PHB 含量提高了 134.8%, PHB 产量提高了 57.3%。本论文获得的工程菌株实现了利用真实木质纤维素体系生产 PHB 的最高指标, 为接下来木质纤维素生产 PHB 的工业化应用提供了一株有潜力的候选菌株。

关键词: 谷氨酸棒状杆菌; 木质纤维素; PHB; PHA 合酶; NH_4^+

Study on the Improvement of Cellulose Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) of the Engineered *Corynebacterium glutamicum* Strain

ABSTRACT

Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) is a class of polymeric polyesters synthesized by microbial cell factories. Not only PHB has the physical properties and thermal processing properties similar to petroleum-based plastics, but also is biodegradable from renewable resources. PHB can be produced by fermentation from biomass resources, but its expensive production cost is the biggest obstacle to industrial large-scale production of PHB. Most of the PHB production uses starch and sugar substances as raw materials, the cost of which accounts for more than 30%-40% of the total production cost, so it is important to reduce the raw material cost of PHB. Lignocellulose is the most promising raw material for future industrial production of PHB because it is widely available, inexpensive and renewable, and there is no "competition for food".

The previous work used the highly resistant *Corynebacterium glutamicum* S9114 as a starting strain and integrated PHB synthesis-related genes and xylose metabolism and transport-related genes into the genome to obtain a *C. glutamicum* JH02 strain capable of stable PHB synthesis using glucose and xylose. The objectives of this paper were to further improve the ability of recombinant *C. glutamicum* to synthesize PHB by molecular biology modification and exploring the optimum NH_4^+ addition for PHB synthesis by *C. glutamicum* JH02, and to test the ability of the obtained recombinant strain to produce PHB in straw hydrolysate. The specific research includes: (1) Cellular morphological engineering modifications to increase cell volume and thus provide potential for intracellular accumulation of PHB; (2) membrane localized expression of PHA synthase to improve the stability of PHA synthase and shorten the spatial distance of PHA synthase involved in polymerization reaction; (3) introduction of *phaP* gene to reduce the particle size of PHB particles to protect the bacterium; (4) increase the metabolic flux of Acetyl-CoA into the PHB synthesis pathway; (5) investigation of the effect of ammonia nitrogen levels (NH_4^+) on PHB synthesis by *C. glutamicum*; (6) adaptive evolution to improve the ability of the strain to utilize xylose.

The first part was to improve the ability of *C. glutamicum* JH02 to synthesize PHB through molecular biology modification. To increase cell volume and provide more space for PHB accumulation, cell growth of *C. glutamicum* cells was promoted by overexpressing the cell morphology-related *pknB* and *WhcD* genes, which increased cell dry weight by 1.0-fold and 1.1-fold, respectively, and the final PHB production was increased by 177.0% and 163.0%, respectively. In order to improve the stability of PHA synthase and shorten the spatial distance of PHA synthase involved in the polymerization reaction, PHA synthase was localized on the cell membrane, and the two recombinant strains JH02-*Peftu-(Ncgl)phaC* and JH02-*Peftu-(porB)phaC* obtained could significantly increase the PHB content by 70.1% and 140.6%, and the cell dry weight increase about 1-fold. The final PHB titer of the two recombinant strains

were increased by 195.0% and 310.6%, respectively.

The second part explored the effect of ammonia nitrogen on the synthesis of PHB by *C. glutamicum*. It was determined by concentration gradient experiments that *C. glutamicum* JH02 could obtain the highest PHB production when NH_4^+ was added at a concentration of 45 g/L. RT-qPCR experiments showed that the transcript levels of genes related to the EMP pathway, TCA cycle and PHB synthesis pathway were significantly up-regulated when appropriate NH_4^+ concentrations were added, which demonstrated that the addition of ammonia nitrogen not only promoted cell growth, but more importantly, effectively promoted the expression of genes related to PHB synthesis, and therefore promoted the accumulation of intracellular PHB.

The third part was to examine the ability of the recombinant strain to synthesize PHB in straw hydrolysate and to improve the rate of utilization of xylose from lignocellulose by *C. glutamicum* through adaptive evolution. Recombinant strain JH02-*Peftu*-(*Ncgl*)*phaC* obtained by membrane-localized expression of PHA synthase was fermented in a 30% solids content straw hydrolysate by fed-batch fermentation to obtain a PHB production of 16.2 g/L. Adaptive evolution experiments of the xylose utilization capacity of *C. glutamicum* showed that for non-natural PHB-producing strains, adaptive evolution negatively affected the intracellular synthesis of PHB.

The recombinant strain *C. glutamicum* JH02-*Peftu*-(*Ncgl*)*phaC* obtained in this paper has a significantly higher ability to synthesize PHB from lignocellulose at suitable NH_4^+ concentrations, and the intracellular PHB content can reach up to 39.3 wt% and PHB titer can reach up to 16.2 g/L. Compared with the control strain *C. glutamicum* JH02, the intracellular PHB content was increased by 134.8% and the PHB titer was increased by 57.3%. The engineered strain obtained in this paper achieved the highest index of PHB production using real lignocellulosic system, providing a promising candidate strain for the next industrial application of PHB production from lignocellulose.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; lignocellulose; PHB; PHA synthase; NH_4^+ addition

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 生物基聚合物.....	1
1.1.1 聚羟基烷酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA)	1
1.1.2 聚 3-羟基丁酸酯 (Poly 3-hydroxybutyrate, PHB)	1
1.2 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的生物合成.....	2
1.3 利用低成本碳源生产 PHA.....	3
1.3.1 利用第一代糖基原料合成 PHA.....	3
1.3.2 第一代糖基原料合成 PHA 的优势及不足.....	4
1.4 木质纤维素生物炼制.....	4
1.4.1 木质纤维素合成 PHA 发展现状.....	5
1.4.2 利用木质纤维素生物质合成 PHA 的挑战.....	6
1.4.3 谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的优势.....	7
1.5 本研究的立题依据及意义.....	8
第 2 章 通过分子生物学改造提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力.....	10
2.1 引言.....	10
2.2 材料与方法.....	11
2.2.1 改造菌株、培养基和培养条件.....	11
2.2.2 实验所用酶及试剂.....	12
2.2.3 重组质粒的构建.....	19
2.2.4 重组菌株的构建.....	21
2.2.5 胞内 PHB 产物定量测定.....	22
2.2.6 PHB 得率计算.....	23
2.2.7 PHB 的摇瓶发酵.....	23
2.2.8 产物检测方法.....	23
2.2.9 细胞样品制作方法与电镜拍摄.....	23
2.2.10 激光共聚焦显微镜的拍摄.....	24
2.3 结果与讨论.....	25
2.3.1 细胞形态工程改造促进谷氨酸棒状杆菌合成 PHB.....	25
2.3.2 膜定位表达 PHA 合酶促进 PHB 生产.....	28
2.3.3 <i>Ncgl</i> 信号肽与 <i>porB</i> 细胞膜表面展示蛋白共表达提高 PHB 产量.....	31
2.3.4 探究 PHB 结合蛋白 <i>phaP</i> 对 <i>C. glutamicum</i> JH02 产 PHB 能力影响.....	33
2.3.5 弱化表达 <i>gltA-1</i> 基因提高 PHB 产量.....	34
2.4 本章小结.....	36
第 3 章 氨氮水平 (NH ₄ ⁺) 对谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的影响.....	37
3.1 引言.....	37
3.2 材料和方法.....	38
3.2.1 实验菌株、培养基和培养条件.....	38
3.2.2 PHB 发酵过程.....	38
3.2.3 RT-qPCR 实验.....	38

3.2.4 胞内 PHB 产物定量测定	42
3.2.5 PHB 得率计算	42
3.2.6 检测方法	42
3.2.7 PHB 聚合物的提取及 GPC 测定	42
3.3 结果与讨论	42
3.3.1 探究适合谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的 NH_4^+ 添加量	42
3.3.2 比较构建的改造菌株在 3 L 罐上利用合成培养基生产 PHB 能力	47
3.3.3 凝胶渗透色谱仪 (GPC) 测定 PHB 分子量	49
3.3.4 谷氨酸棒状杆菌胞内 PHB 形态观测	49
3.4 本章小结	50
第 4 章 膜定位表达 PHA 合酶的工程菌株利用麦秆水解液合成 PHB	51
4.1 引言	51
4.2 材料和方法	52
4.2.1 实验菌株、培养基和培养条件	52
4.2.2 PHB 发酵过程	52
4.2.3 胞内 PHB 产物定量测定	52
4.2.4 PHB 得率计算	52
4.2.5 检测方法	52
4.2.6 麦秆水解液的制备	52
4.3 结果与讨论	53
4.3.1 比较工程菌株利用 30% 固含量的麦秆水解液合成 PHB 的能力	53
4.3.2 <i>C. glutamicum</i> JH02 提高木糖利用能力的适应性进化	56
4.4 本章小结	57
第 5 章 结论与展望	58
5.1 结论与创新点	58
5.2 展望	59
参考文献	61
致谢	70
学术成果	71

第1章 文献综述

1.1 生物基聚合物

石油基塑料的广泛使用给人类生活带来极大的便利,但其致命缺点是产生不可降解的废品^[1]。由于这些产品的高分子质量以及复杂的结构,它们可以在水体、土壤和垃圾填埋场停留很多年,这种不可生物降解的性质给环境带来了很大的负担。如果不采取积极有效的预防措施,塑料垃圾对环境的影响以及为了处理塑料垃圾所带来的经济成本也会成倍增加,随着公众和环境机构对这些石油基塑料带来的有害影响的关注度越来越高,科学界开始努力寻找传统塑料的绿色替代品^[2]。其中,生物基聚合物具有传统塑料相类似的性能,同时还具有可生物降解的优良性能,因此具有替代传统聚合物的潜力,从而减少因人类活动给环境带来的损害^[3]。

1.1.1 聚羟基烷酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA)

聚羟基烷酸酯 (PHA)是目前备受关注的一类高聚物,由于其可生物降解、热塑性和生物相容性的特性而具有广泛的应用^[4]。PHA是天然的生物聚酯,通常作为许多微生物的碳源贮存物储存在细胞内。由于PHA的生物相容性和生物可降解性,这种天然的生物聚酯在生物医学领域具有广泛的应用,可以用于制造心血管产品(心脏瓣膜、支架)、药物输送系统(用于抗癌治疗的片剂、微载体)、伤口处理(缝合线、棉签)的材料^[5]。PHA是绿色塑料,与传统塑料相比,对环境具有积极的影响。此外,PHA在体内使用时不会对健康产生影响。这类生物塑料作为一种可再生和可持续的绿色资源,可以减少垃圾填埋的需求,不会造成持久性污染问题。

迄今为止,已有超过90个革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌属被鉴定为PHA产生菌^[6]。细菌将PHA作为碳源贮藏物储存在细胞质中,PHA以0.2-0.5 μm 大小的颗粒存在^[2]。根据PHA合成所需的条件,PHA生产菌株可以分为两类:第一类,细菌需要限制磷、氮、氧或镁等营养来积累PHA,并且它们在生长阶段不积累PHA,例如 *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator*, *Methylobacterium organophilum* 和 *Pseudomonas putida*; 第二类,细菌在生长阶段积累PHA,并且不需要任何营养限制,该类细菌包括 *Alcaligenes latus* 和含有PHA生物合成相关基因的重组 *Escherichia coli*^[1]。

根据有关文献报道,碳源的选择对PHA的产率具有重要的影响^[2]。例如葡萄糖、柠檬酸盐、甘油、玉米油和废弃煎炸油都可以分别被 *Pseudomonas* SP. DR2 菌株作为唯一碳源合成PHA,但该菌株利用不同碳源合成的胞内PHA含量却有所不同,其中,利用玉米油作为唯一碳源培养72 h胞内PHA含量可以达到37.3% (w/w),相同条件下利用废弃煎炸油作为唯一碳源胞内PHA含量只能达到23.5% (w/w)^[7]。

1.1.2 聚3-羟基丁酸酯 (Poly 3-hydroxybutyrate, PHB)

迄今为止,研究人员已经发现大约150种羟基烷酸是PHA的单体,这些单体与各种烷基侧链一起形成了具有不同性质和潜在应用的广泛的聚合物家族,PHB是最为常见

的一类 PHA^[8]。

PHB 是一种短链长度 (SCL) 的聚合物, 其单体中主要包含 3-5 个碳原子的 3-羟基丁酸^[9]。世界上首次从微生物中分离出 PHB 是在 1926 年, 由法国科学家 Lemoigne 从 *Bacillus megaterium* 中分离得到^[5]。这种聚合物的合成过程主要由三个基因参与: *PhaA*, *PhaB* 和 *PhaC*^[10]。PHB 的合成过程主要包括: 一开始, 葡萄糖经过 EMP 途径转化为乙酰 CoA; 之后, 2 个分子的乙酰辅酶 A 被 β -酮硫解酶 (*PhaA*) 转化为乙酰乙酰辅酶 A; 接下来, 乙酰乙酰辅酶 A 在 NADPH 依赖性乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (*PhaB*) 的催化作用下形成 PHB 的前体 (R)-3-羟基丁酰辅酶 A; 最后, (R)-3-羟基丁酰辅酶 A 在 PHA 合酶 (*PhaC*) 的聚合作用下形成 PHB^[11]。

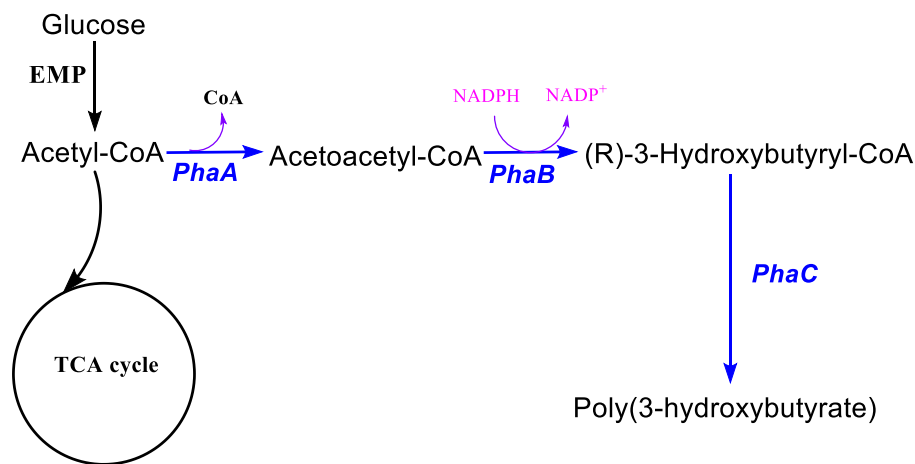


图 1.1 PHB 的生物合成路径^[12]

Fig. 1.1 Biosynthetic pathway of PHB

1.2 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的生物合成

PHB 是一类可以由微生物全合成的高分子聚酯, 因其可生物降解性而被认为具有替代传统的石油基塑料的潜力, 目前, PHB 的生物合成已成为研究的热点^[13]。用于 PHB 合成的菌株主要是芽孢杆菌^[14]、贪铜菌^[15]、嗜盐菌^[16]、假单胞菌^[17]、工程酿酒酵母^[18]和工程大肠杆菌^[19]。另外, 海洋微生物由于耐受高盐环境或低温海洋环境, 因而成为 PHB 生产的有力候选菌株^[10]。这是因为, 一方面, 来自海洋环境的耐盐细菌可以在低温和高盐介质中进行发酵, 这在一定程度降低了染菌的可能性; 另一方面, 由于后期无需抗生素处理或灭菌等操作, 简化了发酵工艺中的操作步骤。

目前, 关于 PHB 生产菌株的代谢工程改造主要涉及以下几个方面: (1) 提高 PHB 生物合成路径中关键酶的活性: NADPH 依赖型的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (*phaB*) 在 PHB 的合成路径中负责将 β -酮硫解酶 (*phaA*) 合成的乙酰乙酰辅酶 A 还原为 PHB 的前体 (R)-3-羟基丁酰辅酶 A。Matsumoto^[20]等人将 *R. eutropha* 的 *phaB* 基因通过定向进化的方式设计, 获得了两个带有 Gln47Leu(Q47L)和 Thr173Ser(T173S)的突变体, 这两个突变体 K_{cat} 值分别比野生型 *phaB* 基因酶活高 2.4 倍和 3.5 倍。将获得的 *phaB* 突变体基因转入重组谷氨酸棒状杆菌中可以观察到 PHB 的积累能力得到明显的提高。(2) 提高 *phaCAB* 基因的表达量: Jo 等人将源自 *R. eutropha* 的 PHA 生物合成基因操纵子 (*phaCAB_{Re}*)

引入谷氨酸棒状杆菌中，建立了 PHB 的合成路径。之后，Jo 等人一方面通过对 PHA 合酶基因 (*phaC_{Re}*) N 端密码子进行优化来提高其表达水平，另一方面通过双质粒表达 *phaCAB_{Re}* 基因簇的方式增加 *phaCAB* 基因的拷贝数，最终提高了谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力^[21]。需要注意的是，研究人员将 PHB 合成相关的基因簇 *phbCAB* 在谷氨酸棒状杆菌中通过质粒形式进行表达，这不仅具有遗传不稳定性，还会限制后续为提高 PHB 产量进行的进一步代谢工程改造。

1.3 利用低成本碳源生产 PHA

尽管微生物塑料比传统的石油基塑料相比，具有可生物降解等明显的优势，但是其主要缺点是发酵生产的成本高。PHA 的生产成本比聚乙烯等传统石油基塑料高 5-10 倍，这是阻碍其替代传统的石油基塑料实现广泛应用的主要因素^[2]。其中，在 PHB 的生产中，为微生物提供碳源的原料来源大约占据总成本的 40%^[22]。因此，研究人员的关注点越来越多地集中在使用低成本的碳源来降低 PHA 的生产成本上。

1.3.1 利用第一代糖基原料合成 PHA

乳清是奶酪和酪蛋白工业生产过程中的副产品，占加工牛奶体积的 90%。其中一半的乳清被转化为可供人类和动物使用的产品，其余的通常被丢弃到环境中。据报道，*Pseudomonas hydrogenovora* 可以将乳清中的主要碳源乳糖，水解为葡萄糖和半乳糖，将水解产物作为碳源，在氮源限制条件下发酵生产 PHB，可以最终获得 1.27 g/L 的 PHB 产量^[23]。

小麦是世界范围内大量种植的粮食作物，麸皮是小麦粒的外壳，含有蛋白质、碳水化合物和其他矿物质。利用来自 *Aspergillus oryzae* NM1 的粗酶制剂水解麦麸，得到主要由葡萄糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成的还原糖混合物，*Halomonas boliviensis* 可以利用混合糖中的葡萄糖和木糖作为碳源，生产 1.08 g/L PHB^[24]。此外，水稻和玉米也是世界范围内广泛种植的主要粮食作物。据报道，*Haloferax mediterranei* 可以利用米糠和玉米淀粉作为碳源，积累 55.6% (w/w)，77.8 g/L 的 PHA^[25]。

淀粉是市场上潜在的廉价原料，但许多微生物缺少水解它的 α -淀粉酶，因此需要外源添加这种酶来水解淀粉并用作碳源^[26]。根据相关文献报道，*R. eutropha* NCIM 5149 能够以马铃薯淀粉为唯一碳源，通过高细胞密度的补料分批发酵积累 55% (w/w)，94 g/L 的 PHA，细胞生物量达到 179 g/L^[27]。甘蔗糖蜜，是制糖工业将压榨出的甘蔗汁液经过一系列工序制糖后剩下的浓稠液体，属于食品加工过程中产生的废弃物。有相关文献报道，*Bacillus flexus* ME-77 可以利用低成本的甘蔗糖蜜作为唯一碳源有效生产 PHA，最终积累 4.5 g/L PHB^[28]。

除了上面提到的粮食类糖基原料外，如今，随着社会推动发展循环经济的目標，将废弃物转化为更有价值的产品越来越受到关注^[29]。因为这些废弃物的处理会产生额外的成本，将这些工业生产过程中产生的残留废弃物作为 PHA 生产的底物，在减轻环境污染的同时可以进一步降低 PHA 生产成本。据报道 *R. eutropha* H16 和 *Pseudomonas*

oleovorans 可以分别利用工业化生产鼠李糖脂的残油作为唯一的碳源积累 41.3% (w/w) 和 38.9% (w/w) 的 PHA^[30,31]。有关研究报道, 美国每年产生超过 110 亿升的废弃植物油, 主要来自马铃薯加工厂、休闲食品厂以及快餐店的工业油炸机, 尽管生产的大部分废弃植物油对野生动物不会产生直接的毒性影响, 但如果处置不当, 会导致水环境中生物需氧量 (BOD) 和化学需氧量 (COD) 增加, 废弃植物油中某些有毒物质深入土壤也会产生潜在的危害^[1]。如果能将这些废弃植物油作为廉价碳源用作 PHA 的生产不仅有助于将废物转化为更有价值的产品, 而且有利于降低 PHA 的生产成本。Pozo 等人研究发现, 菌株 *Azotobacter chroococcum* H23 可以利用橄榄油厂的废水作为唯一碳源生产 PHB 和(P[HB-coHV])的共聚物^[32]。

1.3.2 第一代糖基原料合成 PHA 的优势及不足

不同的 PHA 生产菌株以不同的糖基原料为碳源可以获得不同的 PHA 产量。尽管利用第一代糖基原料在一定程度上能够降低 PHA 的生产成本, 但是却存在许多不足之处。

一方面, 利用乳清、麦麸、甘蔗糖蜜和马铃薯淀粉等成本相对较低的碳源虽然在一定程度上能够降低 PHA 的生产成本, 但是却存在“与人争粮”等问题, 例如当玉米被用作底物葡萄糖的碳源时, 34,000 吨 PHA 需要消耗 126,000 吨的玉米^[33], 这在一定程度上可能会造成粮食危机。此外, 这些原料在种植、收获、运输和加工过程中需要消耗大量的人力、物力, 这将大幅度增加 PHA 的生产成本^[34]。因此为了避免粮食供应与 PHA 生产相竞争, 开发非食品碳源至关重要^[33]。

另一方面, 虽然将工业生产过程中的废食用油等废弃物用于 PHA 生产, 在废弃物处理方面具有实质性的好处, 但是, 由于这些废弃物中成分复杂, 导致最终合成的 PHA 产品结构不单一。另外, 废弃物中某些有毒物质的存在不仅阻碍获得的 PHA 产品在医疗方面的应用, 还会进一步提高下游 PHA 分离纯化的成本^[26]。

1.4 木质纤维素生物炼制

第二代木质纤维素生物质是一类丰富的碳资源, 主要含有 40%-80%的纤维素、10%-40%的半纤维素和 5%-25%木质素^[35]。纤维素属于多聚糖, 主要是由 D-葡萄糖的 β -1,4-糖苷键组成, 由于巨大的分子量和结晶结构, 使其既不溶于水, 也不被人消化; 半纤维素是几种简单戊糖的无定形多糖, 如木糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖和鼠李糖, 其中主要是木糖^[33]。由于纤维素和半纤维素都属于多糖, 因此不能被菌体利用, 需水解为单糖后才能用做碳源。木质纤维素的许多生理化学结构和组成因素阻碍了纤维素酶对木质纤维素生物质的水解能力, 为了消除酶水解过程中的结构和成分阻碍, 提高酶的水解率, 增加纤维素和半纤维素的发酵糖产量, 需要首先对木质纤维素进行预处理^[36]。常用的预处理方法包括稀酸预处理、蒸汽爆破、AFEX 预处理、有机溶剂预处理和碱法预处理^[33]。木质纤维素在预处理过程中会产生各种有毒的抑制剂, 如糠醛、5-羟甲基糠醛 (HMF)、乙酸和酚醛, 这些抑制物的存在会对发酵菌株的正常生长以及水解酶的活性产生严重影响, 因此需要在发酵之前去除^[37]。一般的脱毒

方法可以分为化学脱毒（碱法脱毒、还原剂脱毒、氨基酸脱毒）、物理脱毒（膜脱毒、吸附剂脱毒）和生物脱毒（酶法脱毒、抑制物高耐受菌株）三类^[38]。经过脱毒的木质纤维素生物质在纤维素酶的水解作用下进行水解释放出可发酵单糖。纤维素主要水解为葡萄糖，半纤维素主要水解为五碳糖，如木糖和阿拉伯糖。这些可发酵单糖可用于生产乙醇^[39]、谷氨酸^[40]、赖氨酸^[41]等高附加值产品。

1.4.1 利用木质纤维素生物质合成 PHA 的现状

第二代木质纤维素生物质原料，如甘蔗渣、玉米秸秆、小麦秸秆、稻草等农业废弃物是丰富的可再生生物能源^[42]。全球每年木质纤维素生物质原料的供应量可以达到 1,500 亿吨^[34]。为了避免 PHA 的生产与粮食供应相竞争，从木质纤维素中提取葡萄糖和其他单糖用于 PHA 的生产引起了极大关注。木质纤维素原料的利用是生产 PHA 最有前途、可持续和生态友好的方法，不仅完全避免了粮食作物的消耗，更重要的是，使用这些廉价且可再生的原料可以降低 PHA 的生产成本，并促进这些碳中性生物基聚酯的商业化^[34]。

近年来，通过利用富含葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和鼠李糖的木质纤维素水解液发酵生产 PHA 引起了广泛研究。例如，麦麸含有大量的纤维素和半纤维素，可通过水解释放出大量的可发酵单糖，为 PHA 的合成提供碳源。Annamalai 等人将经过碱法预处理的麦麸，利用木霉纤维素酶（37 FPU/g）和黑曲霉葡萄糖苷酶（50 CBU/g）进行酶解，释放出包含 48.3 g/L 葡萄糖和 14.56 g/L 木糖的可发酵糖，之后产 PHB 的突变菌株利用该水解液进行批发酵，最终获得细胞干重，PHB 胞内含量及得率分别为 24.5 g/L，62.5% (w/w) 和 0.319 g PHB/g Sugar^[43]。水葫芦是水域环境中广泛存在的一种水生杂草，其繁殖能力强，容易覆盖在水体表面，导致水体由于无法受到阳光的照射而发臭。即便如此，这种植物超强的繁殖能力以及富含木质纤维素的性质使其可以作为低成本的碳源，用于生产 PHA。Radhika 等人的研究发现，在氮和磷限制的条件下 *Cupriavidus necator* 可以利用经过酶水解的水葫芦水解物合成 4.3 g/L PHB^[44]。龙舌兰酒甘蔗渣是龙舌兰酒生产过程中产生的渣滓，它的产量很大，仅 2018 年就有 346,700 吨甘蔗渣产生^[45]。这种废弃物没有其他有价值的用途，但由于含有大量的纤维素和半纤维素，因此可以作为低成本的碳源用于发酵生产 PHA。Gonzalez-Garcia^[45]等人研究表明，*B. sacchari* 可以利用脱毒后的龙舌兰酒甘蔗渣水解液作为碳源进行 PHB 生产，经过批发酵后胞内积累的 PHB 含量可以达到 24% (w/w)。稻草是我国南方非常丰富的生物质资源之一，经过稀酸预处理后稻草含有丰富的戊糖^[46]。Sindhu 等人研究发现，*Bacillus firmus* NII0830 可以利用未脱毒的稻草水解液作为唯一的碳源发酵生产 PHB，胞内积累的 PHB 含量最高可以达到 89% (w/w)，产量达到 1.9 g/L^[46]。软木和硬木也可以作为廉价碳源用于生产 PHA。两者可提供的可发酵单糖的种类有所不同，软木半纤维素主要含有葡萄糖、半乳糖、甘露糖等六碳糖和木糖、阿拉伯糖等五碳糖；硬木半纤维素主要是由木糖和阿拉伯糖组成，只有少量的葡萄糖和葡萄糖醛酸^[47]。Radhika 等人将软木水解物和硬木水解物以不同比例混合后作为廉价碳源用于 PHB 的发酵生产，发现当利用硬木水解液时，可以获得最

大细胞干重和 PHB 胞内含量, 分别为 6.7 ± 0.1 g/L 和 $71\pm 5\%$ (w/w) [47]。

1.4.2 利用木质纤维素生物质合成 PHA 的挑战

(1) 抑制物的存在对菌株合成 PHA 产生不良影响

木质纤维素生物质的主要成分包括木质素、半纤维素和纤维素。纤维素是一种无支链的结晶结构的生物聚合物, 由几个到几十万个单位的葡萄糖组成, 通过 β -1,4 糖苷键连接, 由于纤维素微纤维的高稳定性和围绕在其周围的多糖, 使得酶水解纤维素释放可发酵糖的效率极低; 半纤维素是一种由多种己糖和戊糖组成的支链杂聚物, 它是木质纤维素中最容易水解的部分; 木质素是一种无定形、不溶于水的杂聚物, 由于其衍生物的毒性以及结构特性, 木质素的存在抑制了生物质的水解作用[48]。为了释放出更多的可发酵单糖供菌体利用, 在进行水解之前需要对木质纤维素进行预处理, 以便减轻木质素的影响, 破坏纤维素的结晶结构使其充分的与纤维素酶接触。

但是, 除了单糖和低聚糖之外, 木质纤维素生物质在预处理过程中还会释放出抑制物, 如有机酸(乙酸、甲酸、乙酰丙酸)、糠醛(5-羟甲基糠醛和糠醛), 以及芳香族或酚类化合物(4-羟基苯甲酸和 1,2-二羟基苯)[34]。一方面, 这些抑制物的存在会抑制许多微生物的生长繁殖, 包括许多天然的 PHB 生产菌株, 使它们无法在水解液中存活; 另一方面, 预处理的生物质中存在的酚类抑制物会对酶的活性产生影响, Kim [49] 等人通过研究发现, 由于酚类物质对酶的抑制和沉淀作用, 导致纤维素水解效率降低 50%。

为了解决由于抑制物存在而使 PHB 积累较少的问题, 在进行水解之前, 需要对预处理之后的木质纤维素进行脱毒处理。根据已有的研究发现, 一般的脱毒方法是通过将抑制物吸附在各种吸附剂上去除, 这些方法包括用碱(NaOH、Ca(OH)₂ 和 NH₄OH)、离子交换树脂、还原剂(如亚硫酸钠和连二亚硫酸钠)和活性炭进行处理[50]。但这样的脱毒方法在增加生产成本的同时还进一步增加下游分离纯化工艺, 且效率极低。因此, 确定高效、廉价且与下游过程兼容的脱毒过程至关重要。

此外, 寻找对抑制物具有较强耐受性的 PHA 生产菌株也成为提高 PHA 产量的另一种方法。天然的 PHA 生产菌株, 如伯克氏菌、嗜盐菌、真氧产碱杆菌以及经过改造的产 PHB 的大肠杆菌通常对抑制物的耐受性较弱, 因此至今没有利用真实木质纤维素生产 PHA 的相关研究报道[51,52]。

(2) 木质纤维素水解液中的碳源浓度限制发酵模式

PHB 作为一种在微生物胞内积累的聚合物, 高密度的细胞培养对于 PHB 产量的提高具有十分重要的作用[53]。一些研究已经报道了通过采取有效的发酵策略提高 PHA 的产量, 比如采用分批发酵、补料分批发酵的方式。

由于批发酵的灵活性和操作低成本, 分批发酵是一种有效且常用的生物基聚合物发酵方式。分批发酵定义为: 在一个封闭系统中, 在实验开始时加入底物和其他成分, 底物与其他成分在反应器中发生反应, 当底物耗尽即发酵结束, 此时可提取所需产品[54]。然而, 批发酵在操作过程中也存在不足: 一方面, 由于 PHA 作为一种胞内碳源贮藏物, 很多 PHA 生产菌株, 尤其是天然 PHA 生产菌株都具有降解利用 PHA 的能力, 因此,

随着发酵进行,碳源被不断消耗,到发酵后期碳源耗竭后,处于饥饿状态的细胞自然会利用 PHA 作为碳源,导致菌体胞内 PHA 含量下降;另一方面,当向分批培养物中添加高浓度的初始底物以解决碳耗竭时,菌体的生长和产量会受到抑制,因此在批发酵过程中,初始碳源添加量成为决定发酵体系中最终菌体浓度和 PHA 产量最主要的因素^[54,55]。

补料批发酵作为另一种常见的发酵模式,是实现高密度细胞培养、高产量的有效方式,因此它通常被用于微生物发酵生产 PHA^[54]。在补料批发酵中,细胞先在含有一定底物浓度的生物反应器中进行批发酵,当细胞接近指数生长期结束时,在不取出培养液的情况下向反应器中补加一定底物,直到反应器中达到所需体积。此发酵模式可以使菌体保持在特定的生长速度,可以弥补由于初始底物添加量的限制而导致的菌体浓度不高的问题^[56]。分批补料技术最初是由酵母生产商在 20 世纪初设计的,用于调整酿酒酵母分批培养的生长^[53]。这一发酵模式之后扩展到其他产品的生产,如一些酶、抗生素、氨基酸和其他有机酸以及聚合物(如 PHA)^[53]。

然而,受生物炼制过程技术的限制,木质纤维水解液中释放出来的可发酵糖的浓度有限,使得水解液中提供的碳源无法满足细胞高密度培养状态下对碳源的需求。Cesario^[57] 等人曾研究利用 *B. sacchari* DSM 17165 作为 PHB 生产菌株,以含有 32.4 g/L 葡萄糖, 12.9 g/L 木糖和 4.5 g/L 阿拉伯糖的麦秆水解液作为唯一碳源进行摇瓶发酵,最终只获得 7.0 g/L 细胞干重和 2.4 g/L PHB。之后研究人员将麦秆水解液浓缩 10 倍用于分批补料,经过 70 h 的发酵可以获得 100-140 g/L 的细胞干重^[57]。这种方法虽然能够为菌体合成 PHB 提供充足的碳源,却大大增加了操作成本,这与利用低成本的木质纤维素生物质生产 PHA 的初衷相违背。

1.4.3 谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的优势

近几年来,许多研究报道了提高 PHB 产量的基因工程方法,大多数关于在细菌胞内积累 PHB 的研究都是用革兰氏阴性菌作为生产菌株,包括大肠杆菌、真氧产碱杆菌和假单胞菌^[58]。然而,革兰氏阴性细菌积累 PHB 具有明显的不足,即革兰氏阴性菌合成大量的内毒素(又称免疫原性脂多糖),即使利用 NaOH 或氯仿尝试去除 PHB 中混有的内毒素,聚合物中仍然会有微量的内毒素存在,这可能会影响 PHB 在医疗、食品等领域的应用^[21]。

为了克服这一问题,关于利用革兰氏阳性菌进行 PHB 生产的研究成为人们关注的焦点。因为这些革兰氏阳性菌中不含内毒素,因此不会污染利用 PHB 生产的医疗用品或食品。谷氨酸棒状杆菌于 1956 年首次从土壤当中分离出来,该细菌是一种需氧的、生物素营养缺陷型的革兰氏阳性菌^[59]。与其他革兰氏阳性菌相比,谷氨酸棒状杆菌具有许多优势。比如,谷氨酸棒状杆菌是通过美国食品安全局认证的安全菌株,并且已经建立了大规模的发酵技术来有效地发酵生产氨基酸,如谷氨酸、赖氨酸,谷氨酸棒状杆菌生产的这些氨基酸产品已在食品、饲料和医药产品中使用了几十年^[21]。

更重要的是,木质纤维素生物质原料在预处理过程中产生大量抑制物:例如糠醛、5-羟甲基糠醛(HMF)、香草醛、丁香醛等,这些抑制物会导致许多天然的 PHB 生产菌

株以及改造的工程化大肠杆菌等菌株无法在木质纤维素体系中正常生长。谷氨酸棒状杆菌对于木质纤维素体系中的抑制物耐受性较强，可以将丁香醛，糠醛，5-羟甲基糠醛（HMF），香草醛等有毒的抑制物转化为对细胞没有毒害作用的酸类或醇类，因此谷氨酸棒状杆菌可以利用低成本的木质纤维素生物质作为唯一碳源发酵生产 PHB。

1.5 本研究的立题依据及意义

由石化原料制备的传统塑料由于其优越的热加工性能和稳定性而得到广泛应用。但与此同时，不可降解的传统塑料废弃物处理不当，会带来巨大的环境问题^[60]。聚 3-羟基丁酸酯（PHB）具有与石油基塑料相似的物理性质和热加工性能，并且具有很好的生物相容性和生物可降解性，因此有潜力替代传统的石油基塑料。

PHB 作为一种可以由微生物全合成的高分子聚酯，能够由多种微生物合成。目前微生物发酵生产 PHB 的技术，绝大部分以粮食淀粉作为可发酵单糖的原料来源，仅仅是原料成本就占据了 PHB 生产总成本的一半以上。利用粮食淀粉作为碳源生产 PHB 不仅大幅度提高了生产成本，而且存在“与人争粮”的问题，无法实现 PHB 对石油基聚合物的替代。非粮可发酵单糖的碳水化合物原料中，玉米秸秆、小麦秸秆、稻草、蔗渣、林业废弃物等木质纤维素生物质具有价格低廉、来源广泛的特征，以先进的生物炼制方法获得葡萄糖、木糖等可发酵单糖，进而将这些可发酵单糖作为碳源进行 PHB 的生产不仅具有原料来源丰富、成本低廉的优势，而且在减轻环境污染、促进碳中和、促进农业产业升级等各个方面具有巨大的潜力。

然而利用木质纤维素原料作为碳源进行 PHB 生物合成过程中存在一定的问题，由于木质纤维素水解液体系中抑制物的存在，导致许多天然的 PHB 生产菌株以及经过改造的大肠杆菌无法存活。在之前的研究中本实验室研究人员发现谷氨酸棒状杆菌对木质纤维素体系中的抑制物具有较强的耐受性，另外，由于该菌株属于生物素营养缺陷型菌株，在生长过程中需要外源添加生物素来促进细胞的生长，而木质纤维素中本身就含有大量的生物素，这就促使谷氨酸棒状杆菌可以在高固体含量的木质纤维素水解液体系中进行快速生长。因此，在上一阶段研究中，本实验室将 *C. glutamicum* S9114 作为出发菌株通过合成生物学的方法构建了能同时利用葡萄糖和木糖合成 PHB 的重组菌株 *C. glutamicum* JH02。

事实上，*C. glutamicum* 属于非天然的 PHB 生产菌株，单纯将 PHB 合成相关的三个基因整合在基因组上，所获得改造菌株 PHB 生产能力并不高。这是因为，第一，PHB 作为微生物在胞内积累的聚合物，其合成受到细胞体积的限制，大的细胞体积可以为 PHB 的积累提供更多的空间，而谷氨酸棒状杆菌作为一种革兰氏阳性菌，体积大约只有 $0.7\text{-}0.9\times 1.0\text{-}2.5\ \mu\text{m}$ ，微小的细胞体积在一定程度上限制了谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 产量的提高；第二，相关研究表明由 PHA 合酶催化进行的 PHB 聚合过程在整个 PHB 合成路径中起着关键性作用，是整个 PHB 合成过程的限速步骤，因此 PHA 合酶的表达量及其稳定性对谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力具有重要影响；第三，PHB 作为一种高分子

聚合物，在胞内以固体颗粒的形式存在，当颗粒体积过大时会给菌体的正常生长造成不良影响；第四，乙酰辅酶 A 是 PHB 合成的前体，在 *phaA* 基因编码的 β -酮硫解酶的作用下形成乙酰乙酰辅酶 A，之后通过一系列反应最终聚合为 PHB，故乙酰辅酶 A 供应量是 PHB 产量的重要影响因素；第五，相关研究表明，氮源是影响 PHB 合成的重要因素，大多数天然的 PHB 生产菌株需要在限氮条件下才能合成 PHB，但由于 *C. glutamicum* JH02 的 PHB 合成路径是人为构建，因此该菌株在 PHB 合成过程中对氮源的需求需要进一步的探究；第六，微生物利用真实的木质纤维素水解液合成 PHB 过程效率方面还存在诸多未解决的问题。

针对以上问题，本论文为了提高 PHB 的产量对获得的菌株进行了进一步的定向优化：第一，通过分子生物学改造提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力，包括，（1）细胞形态工程改造增大细胞体积，从而提供 PHB 在胞内积累的潜力；（2）膜定位表达 PHA 合酶，提高 PHA 合酶的稳定性以及缩短 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离；（3）引入 *phaP* 基因，缩小 PHB 颗粒的粒径起到保护菌体的作用；（4）通过代谢工程改造增加乙酰辅酶 A 流入 PHB 合成路径的代谢通量，为 PHB 的合成提供更多的前体；第二，探究氨氮水平 (NH_4^+) 对 *C. glutamicum* 合成 PHB 的影响。探究谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的最适 NH_4^+ 添加量，并通过 RT-qPCR 实验鉴定在合适的氨氮添加条件下与 PHB 合成相关基因转录水平发生的变化；第三，在麦秆水解液中检验通过分子生物学改造获得的重组菌株产 PHB 的能力，并通过适应性进化提高菌株对木质纤维素体系中木糖的利用能力。最终本论文成功构建了一株能够在木质纤维素体系中实现高产的改造菌株，实现了谷氨酸棒状杆菌利用真实木质纤维素生物质发酵生产 PHB 的最高指标。

本论文的研究内容包括：

- （1）通过质粒过表达或弱化表达谷氨酸棒状杆菌细胞形态相关的基因来干扰谷氨酸棒状杆菌的生长分裂，增大细胞体积，使胞内有更多空间用于 PHB 的积累。
- （2）通过将分泌表达信号肽或细胞膜表面展示蛋白与 *phaC* 基因融合表达，将 PHA 合酶定位在细胞膜上，提高 PHA 合酶的稳定性，缩短 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离，促进 PHB 的合成。
- （3）通过过表达在天然 PHB 生产菌株中普遍存在的 *phaP* 基因，缩小 PHB 颗粒的尺寸，起到保护菌体的作用，从而促进 PHB 的合成。
- （4）通过代谢工程改造，减少乙酰辅酶 A 流入 TCA 循环的代谢通量，为 PHB 的合成提供更多的乙酰辅酶 A 前体，促进 PHB 的合成。
- （5）探究 NH_4^+ 添加量对谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的影响，通过补加合适浓度的氨氮促使谷氨酸棒状杆菌在胞内积累更多的 PHB。
- （6）在 30% 的麦秆水解液中检验通过分子生物学改造获得的重组菌株产 PHB 的能力，并通过适应性进化提高谷氨酸棒状杆菌对木质纤维素体系中木糖的利用能力。

第 2 章 通过分子生物学改造提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力

2.1 引言

PHB 作为一种可以由微生物全合成的生物基聚合物,通常作为碳源贮藏物储存在细胞内。由于具有可生物降解性和生物相容性的优良特性,PHB 在生物医学领域具有广泛的应用前景;又因为具有与石油基塑料相似的物理特性和热加工性能,被认为具有替代传统石油基塑料的潜力;更重要的是,由于该聚合物能够利用可再生和丰富的生物质资源进行生物合成,以及在生产过程中能够实现碳中和,因此符合可持续发展的目标。

时至今日,已经有 90 多种微生物被鉴定为天然的 PHB 生产菌株,此外,研究人员还通过代谢工程改造使大肠杆菌具备合成 PHB 的能力。然而,不管是天然合成 PHB 的革兰氏阴性菌还是经过代谢工程改造的大肠杆菌,都是已知的能够产生潜在有害物质(如内毒素和脂多糖)的细菌。考虑到聚合物的实际应用,特别是食品级和生物医学方面需求时,不产生内毒素的革兰氏阳性菌通常被作为优先选择的生产菌株。

其中,谷氨酸棒状杆菌作为一种好氧、无孢子产生、革兰氏阳性的细菌,已经通过美国食品安全局认证是一株安全菌株。谷氨酸棒状杆菌已经作为工业生产菌株用于大规模发酵生产,由该菌株生产的氨基酸产品已经在食品、医药产品和饲料中使用了几十年。除此之外,在本实验室之前的研究中发现,谷氨酸棒状杆菌在价格低廉且来源丰富的木质纤维素生物质体系中生长状况良好。因此,将谷氨酸棒状杆菌作为 PHB 生产的出发菌株具有天然的优势。

尽管天然的谷氨酸棒状杆菌不具备合成 PHB 的能力,但已经有相关研究人员将来自 *R. eutropha* 的 PHB 合成相关的基因簇 *phbCAB* 导入谷氨酸棒状杆菌,成功构建了 PHB 的合成路径,并合成了一定量的 PHB,这表明谷氨酸棒状杆菌是具有积累 PHB 的潜力的。但是现有的关于在谷氨酸棒状杆菌中合成 PHB 的报道,大多采用质粒表达的形式,将 PHB 合成相关的基因簇 *phbCAB* 在该菌株中进行表达,这种表达方式不仅具有遗传不稳定性,还会限制后续为提高 PHB 产量进行的进一步基因工程改造。

为了弥补上述不足,本实验室在前一阶段的研究中,已经通过将 PHB 合成相关基因和木糖代谢、转运相关基因整合到基因组上,获得了一株能够利用葡萄糖和木糖稳定合成 PHB 的 *C. glutamicum* JH02。但由于谷氨酸棒状杆菌不是天然的 PHB 生产菌株,单纯将 PHB 合成相关的三个基因引入菌体内,获得的 PHB 产量较低。

因此,本章节的研究内容是以 *C. glutamicum* JH02 作为出发菌株,进一步通过分子生物学手段对该菌株进行改造来提高其合成 PHB 的能力,包括:(1)细胞形态工程改造增大细胞体积,从而提供 PHB 在胞内积累的潜力;(2)膜定位表达 PHA 合酶,提高 PHA 合酶的稳定性以及缩短 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离;(3)引入 *phaP* 基因,缩小 PHB 颗粒的粒径,起到保护菌体的作用;(4)增加乙酰辅酶 A 流入 PHB 合成路径的代谢通量,从而为 PHB 的合成提供更多的前体。

2.2 材料与方法

2.2.1 改造菌株、培养基和培养条件

本章节所用的原始菌株和经过改造的工程菌株在表 2.1 中列出。

Escherichia coli DH5 α 用于构建各个重组质粒；大肠杆菌 *E.coli*: pK18mob 用于提供敲除整合质粒；大肠杆菌 *E.coli*: P ϵ ftumob 用于提供表达质粒；*C. glutamicum* S9114 用于提供构建质粒所用的目的基因。本研究所用的表达质粒和敲除质粒分别为质粒 P ϵ ftu 和质粒 pK18。本研究的出发菌株是 *C. glutamicum* JH02，该菌株是在实验室之前的研究当中构建的可以同时利用葡萄糖和木糖稳定合成 PHB 的代谢工程改造菌株。*Paecilomyces variotii* FN89 是实验室在之前研究过程当中分离出来的一株脱毒菌株，主要用于去除木质纤维素经过预处理后产生的抑制物。本研究当中用到的培养基组成成分如下：

- (1) Luria-Bertani (LB) 培养基：10 g/L 氯化钠，5 g/L 酵母提取物和 10 g/L 蛋白胨。
- (2) LK 培养基：10 g/L 氯化钠，5 g/L 酵母提取物，10 g/L 蛋白胨和 50 mg/L 卡那霉素。
- (3) PHB 发酵培养基：3.0 g/L 尿素，1.0 g/L 磷酸二氢钾，60 g/L 一水合葡萄糖，5 g/L 酵母提取物，10 g/L 蛋白胨，0.6 g/L 硫酸镁。
- (4) CGXII-NL 培养基：120 g/L 葡萄糖，1.0 g/L 硫酸铵，0.01 g/L 七水合硫酸亚铁，2.5 g/L 尿素，1.0 g/L 磷酸二氢钾，0.001 g/L 七水合硫酸锌，0.0002 g/L 五水合硫酸铜，0.0001 g/L 生物素，0.01 g/L 一水合硫酸锰，0.0005 g/L thiamin(VB1)，1.0 g/L 磷酸氢二钾，0.03 g/L 原儿茶酸，0.01 g/L 氯化钙，0.00002 g/L 六水合氯化镍，0.25 g/L 硫酸镁。
- (5) CGXII-NR 培养基：120 g/L 葡萄糖，20 g/L 硫酸铵，0.01 g/L 七水合硫酸亚铁，5.0 g/L 尿素，1.0 g/L 磷酸二氢钾，0.001 g/L 七水合硫酸锌，0.0002 g/L 五水合硫酸铜，0.0001 g/L 生物素，0.01 g/L 一水合硫酸锰，0.0005 g/L thiamin(VB1)，1.0 g/L 磷酸氢二钾，0.03 g/L 原儿茶酸，0.01 g/L 氯化钙，0.00002 g/L 六水合氯化镍，0.25 g/L 硫酸镁。
- (6) SOC 培养基：20 g/L 蛋白胨，0.95 g/L 氯化镁，5.0 g/L 酵母粉，0.31 g/L 氯化钾，0.5 g/L 氯化钠，3.6 g/L 葡萄糖。
- (7) LBG 感受态培养基：20 g/L 葡萄糖，30 g/L 甘氨酸，6 g/L 蛋白胨，6.0 g/L 氯化钠，1.0 g/L 吐温 80，3 g/L 酵母提取物。
- (8) LBS 平板：10 g/L 蛋白胨，15 g/L 琼脂粉，10 g/L 氯化钠，100 g/L 蔗糖，5 g/L 酵母提取物。
- (9) 储存液：0.1 M 氯化钙，19% (w/w) 甘油。

LB 培养基主要用于培养大肠杆菌，LK 培养基主要用于培养含有卡那霉素抗性质粒的大肠杆菌。用于菌株活化的 LB 平板和 LK 平板则需要分别在 LB 培养基和 LK 培养基的基础上添加 20 g/L 的琼脂粉。PHB 发酵培养基主要用于谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的摇瓶发酵；CGXII-NL 培养基和 CGXII-NR 培养基主要用于谷氨酸棒状杆菌生产 PHB

的 3 L 罐发酵；SOC 培养基和 LBG 感受态培养基主要用于谷氨酸棒状杆菌电转实验；LBS 平板则主要用于敲除整合质粒电转入谷氨酸棒状杆菌之后的二次重组验证；储存液主要用于 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞的制备。

2.2.2 实验所用酶及试剂

扩增基因片段所用酶为 DNA 聚合酶，是从 Vazyme (Nanjing, China) 公司购买获得；将质粒或基因片段切开产生相应粘性末端的酶为限制性内切酶，是从 Thermo Scientific (Wilmington, DE, USA) 公司购买获得；将切开的含有相同粘性末端的质粒和基因片段连接在一起所用的酶为 DNA 连接酶，是从 Takara (Otsu, Japan) 公司购买获得。从汉恒生物科技公司 (Nanjing, China) 购买的无缝克隆试剂盒用于将含有同源片段的的目的基因片段何质粒载体连接起来。分子生物学实验中用于质粒提取、PCR 产物回收纯化和琼脂糖凝胶回收纯化的试剂盒均从上海捷瑞生物科技有限公司 (Shanghai, China) 购买获得。实验中用到的其他试剂等均从上海泰坦科技股份有限公司 ((Shanghai, China) 旗下的探索平台购买获得。木质纤维素生物炼制过程中用于水解木质纤维素体系中纤维素和半纤维素所用的酶为纤维素酶 CTec 2.0，是从诺维信生物技术有限公司 (Beijing, China) 购买获得。

表 2.1 本研究使用到的菌株
Table 2.1 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E.coli</i> DH5 α	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>E.coli</i> : pK18mob	Host providing knockout integration plasmids	Lab stock
<i>E.coli</i> : p eftu mob	Host providing expression plasmids	Lab stock
JH02-P eftu mob	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu mob	This work
JH02-P eftu -FtsZ	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -FtsZ	This work
JH02-P eftu -pknA	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -pknA	This work
JH02-P eftu -pknB	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -pknB	This work
JH02-P eftu -DivIVA	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -DivIVA	This work
JH02-P eftu -RodA	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -RodA	This work
JH02-PH36-WhcD	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid PH36-WhcD	This work
JH02-pknA_RBS0.1	<i>C. glutamicum</i> JH02 with RBS0.1 a.u. substitution of pknA	This work
JH02-pknB_RBS0.1	<i>C. glutamicum</i> JH02 with RBS0.1 a.u. substitution of pknB	This work
JH02-DivIVA_RBS0.1	<i>C. glutamicum</i> JH02 with RBS0.1 a.u. substitution of DivIVA	This work
JH02-FtsZ_RBS100	<i>C. glutamicum</i> JH02 with RBS100 a.u. substitution of FtsZ	This work
JH02-P eftu -(Ncgl)phaC	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -(Ncgl)phaC	This work
JH02-P eftu -(CGR)phaC	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -(CGR)phaC	This work
JH02-P eftu -(Ncgl)phaC(gfp)	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -(Ncgl)phaC and gfp fluorescent gene	This work
JH02-P eftu -(porB)phaC	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -(porB)phaC	This work
JH02-P eftu -(porC)phaC	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -(porC)phaC	This work
JH02-P eftu -(porB)phaC(gfp)	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmid P eftu -(porB)phaC and gfp fluorescent gene	This work

JH02-Peftu-(Ncgl)phaC(Km ^R), Peftu-(Ncgl)phaC(SP ^R)	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying the plasmids Peftu-(Ncgl)phaC and Peftu-(porB)phaC	This work
JH02-ΔphaC:: (Ncgl)phaC (JH03)	<i>C. glutamicum</i> JH02 carrying (Ncgl)phaC and phaC deleted (JH03)	This work
JH03-Peftu-(porB)phaC	<i>C. glutamicum</i> JH03 carrying the plasmid Peftu-(porB)phaC	This work
JH02-gltA-1_RBS0.1	<i>C. glutamicum</i> JH02 with RBS0.1 a.u. substitution of gltA-1	This work

表 2.2 本研究用到的质粒

Table 2.2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
Peftumob	Overexpression vector, <i>eftu</i> promoter	[40]
pK18mob	Mobilizable vector for selection of double crossover	[61]
Peftu-FtsZ	Peftu carrying <i>FtsZ</i>	This work
Peftu-pknA	Peftu carrying <i>pknA</i>	This work
Peftu-pknB	Peftu carrying <i>pknB</i>	This work
Peftu-DivIVA	Peftu carrying <i>DivIVA</i>	This work
Peftu-RodA	Peftu carrying <i>RodA</i>	This work
Peftu-WhcD	Peftu carrying <i>WhcD</i>	This work
Peftu-(Ncgl)phaC	Peftu carrying (Ncgl)phaC	This work
Peftu-(CGR)phaC	Peftu carrying (CGR)phaC	This work
Peftu-(Ncgl)phaC(gfp)	Peftu carrying (Ncgl)phaC(gfp)	This work
Peftu-(porB)phaC	Peftu carrying (porB)phaC	This work
Peftu-(porC)phaC	Peftu carrying (porC)phaC	This work
Peftu-(porB)phaC(gfp)	Peftu carrying (porB)phaC(gfp)	This work
pK18-FtsZ_RBS100	Plasmid for RBS 100 a.u. substitution of <i>FtsZ</i> in the genome	This work

pK18- <i>pknA</i> _RBS0.1	Plasmid for RBS 0.1 a.u. substitution of <i>pknA</i> in the genome	This work
pK18- <i>pknB</i> _RBS0.1	Plasmid for RBS 0.1 a.u. substitution of <i>pknB</i> in the genome	This work
pK18- <i>DivIVA</i> _RBS0.1	Plasmid for RBS 0.1 a.u. substitution of <i>DivIVA</i> in the genome	This work
pK18- Δ <i>phaC</i> ::(<i>Ncgl</i>) <i>phaC</i>	Plasmid for <i>phaC</i> gene knockout and carrying (<i>Ncgl</i>) <i>phaC</i> in the genome	This work
PK18- <i>gltA</i> -1RBS 0.1	Plasmid for RBS 0.1 a.u. substitution of <i>gltA</i> -1 in the genome	This work

表 2.3 本研究用到的引物

Table 2.3 Primers used in this study

Primers	Sequences(5'-3')
pk18-F	tgtgagtagctcactcattagg
pk18-R	tgaagctagcttatcgccatt
Peftu-F	ttgacagctt atcatcaaaa gctgggtacc tctatctggt
Peftu-R	tttgcgatca aataatgaca tggatcccat gctactccta
DivIVA-F (XbaI)	gctctagaatgccgttgactccagctga
DivIVA-R (Sall)	acgcgtcgacttaccagatggcttggtg
FtsZ-F (XbaI)	gctctagaatgacctaccgaacaact
FtsZ-R (Sall)	acgcgtcgacttactggaggaagctgggtacatcca
pknA-F (XbaI)	gctctagaatgagtcagaagaacatca
pknA-R (Sall)	acgcgtcgactcactgcgctcctcatccaat
pknB-F (Sall)	acgcgtcgacatgacctctgtagctgctgate
pknB-R (PstI)	aactgcagctattgcacgagtgccggcgag
RodA-F (XbaI)	gctctagaatgaacacgcttgaacgatta
RodA-R (Sall)	acgcgtcgactcagcagccacctccgatg
WhcD-F (XbaI)	gctctagaatggaagattcagctggggac
WhcD-R (Sall)	acgcgtcgacttaagaaatttcgctttcaggcggcg
CGR-F (Sall)	acgcgtcgacatgcaataaaccgccgaggc
CGR-R (IF phaC)	cggttgccattgctccctggcggtg
phaC-F (IF CGR)	caggagcaatggcaaccgcaaggg
phaC-R (PstI)	aactgcagttaagccttagccttgacgtaacgg
Ncgl-F (Sall)	acgcgtcgacatgaaatatgaatttaataatagattccgaacgaaatcggt
Ncgl-R (IF phaC)	ccggttgccataaagagctcctgatcatgtaggtgtc
phaC-F (IF Ncgl)	aggagctctttatggcaaccggcaaggg
GFP-F(OL Ncgl phaC)	aggcgttacgtcaaggctaaggctatgagtaaaggagaagaactttca
phaC-R(OL Ncgl GFP)	tgaaaagtctctccttactcatagccttagccttgacgtaacggcct
GFP-R(PstI)	ttatttgatagttcatccatgccaatgtaatcc

porC-F (XbaI)	atggaaaacgtttggaattcctcgg
porC-R(IF)	cagctgcgcccttgcgggtgccatgccaaccagaccgatgaggtcagc
phac-F(IF-proc)	gctgacctcatcggctctggtggcatggcaaccggcaagggcgagctg
porB-F (XbaI)	atgaagctttcacaccgcatcg
porB-R(IF)	gcagctgcgcccttgcgggtgccatggaagagaagttggaggacagctc
phac-F(IF-prob)	gagctgtcctccaacttcttccatggcaaccggcaagggcgagctgc
phaC-R(SalI)	ttaagccttagccttgacgtaacgg
GFP-F(OL porB phaC)	aggcgttacgtcaaggctaaggctatgagtaaaggagaagaactttca
phaC-R(OL PorB GFP)	tgaaaagtcttctccttactcatagccttagccttgacgtaacggcct
DivIVA-up-F (BamHI)	cgggatcccgccaccaaagtggttactac
DivIVA_RBS0.1-R (IF)	acggcattgctgccgttgaccctgatgcttggggccccaggcagggccg
DivIVA_RBS0.1-F (IF)	gccaccaagcatcaggggtcaacggcagcaatgccgttgactccagctgatgtg
DivIVA_down-R (SalI)	acgcgtcgacgtcagcttcgttgaccagagtg
FtsZ-up-F (EcoRI)	ggaattcaacgcgcacagatccggatcaa
FtsZ_RBS100-R (IF)	gtgaggtcatgctgtccttgttcaaagtagagttgatactaaaaaatttgc
FtsZ_RBS100-F (IF)	gtatcaactctactttgaacaaggacaagcatgacctcaccgaacaactacctcg
pknA-up-F (BamHI)	cgggatccaggaatcactgcctcctggatc
pknA_RBS0.1-R (IF)	ggtgtagatctgactagtttccctgaagcacagctcggccaattggg
pknA_RBS0.1-F (IF)	aaactagtcagatctacacatgagtcagaagacatcactggaaaag
pknA_down-R (SalI)	acgcgtcgaccaacgcaatgccaatcaactcg
pknB-up-F (EcoRI)	ggaattcgcggcttctgatatttattctcctcg
pknB_RBS0.1-R (IF)	ggggatataatgatctggacgtcggccatttacggcgtcgattaaatc
pknB_RBS0.1-F (IF)	gacgtccagatcatatataccccgtgaccttcgtgatcgtgatcgc
pknB_down-R (XbaI)	gctctagagttttgccatggcgggtgagt
RodA-up-F (BamHI)	cgggatcctgctctgatggctctatcagatccgg
RodA_RBS0.1-R (IF)	tgttcatggcggtaaggaagaccttaccgccgggttcgtttctatgccaccggt
RodA_RBS0.1-F (IF)	accggggtaaggtcttcttaccgcatgaacacgcttgaacgattaaagct
RodA_down-R (PstI)	aactgcagaccaacacagcaccaatcaacag
WhcD-up-F (BamHI)	cgggatccggcaccccaagcgacttc

WhcD_RBS0.1-R (IF)	gaatcttccatcgccgggaaaggctcgcgcatcaagctactttaagtctgttctcat
WhcD_RBS0.1-F (IF)	gtagctttgatgcgcgagcctttcccggcgatggaagattcagctggggacgtatct
WhcD_down-R (PstI)	aactgcagaccgcgagctcttagaggc
phaP1-F	atgacctcaccgccgaacaagttgcagca
phaP1-R	tcaggcagccgctcgtctctttgccgtggc
ifc-(Ncgl)phac-F	ggtaccggggatcctctagCCCCCTTATCACTCCAGACAATCAG
ifc-(Ncgl)phac-R	cttgcctgcctgcaggtcgacagcgaggacagcgagt
Ncgl-F(IF)	GTCGTAGCCACCACGAAGTCCAGGAGGACATACAaattcatgaaatat
Ncgl-up-R(IF)	catatttcatgaattTGTATGTCCTCCTGGACTTCGTGGTGGCTACGA
Ncgl-down2-F	aatcgggtgtagcgtctgt
Ncgl-up2-R	aaagagtcctgatcatgtaggtg
ifc-gltA RBS 0.1-F	ggtaccggggatcctctagGTCGAGCCAAGGAGCAAGC
ifc-gltA RBS 0.1-R	cttgcctgcctgcaggtcgaGTGCGGTCTCCTTGACGATT
gltA RBS-0.1 downstream-F(IF)	AATGGCGCATCAGGCTGTTTGCAGCCTGATGTTTGAAAGGGATATCGTGG
gltA RBS-0.1 upstream-R(IF)	CATCAGGCTGCAAACAGCCTGATGCGCCATTTGTTTCGGAAAAAACTC
gltA RBS0.1-down2-F	GGGGGAATTGGCTCTCACTTCG
gltARBS0.1-down2-R	GCCAGTGCTCACATAACCTGGGTC

2.2.3 重组质粒的构建

本研究所用到的质粒和引物如表 2.2 和表 2.3 所示，其具体构建过程如下：

对于表达质粒，其作用主要是将相应的目的基因在菌株中进行过表达。为了改变谷氨酸棒状杆菌的细胞形态，选取了与细胞生长和分裂相关的 6 个基因 *FtsZ*, *pknA*, *pknB*, *DivIVA*, *RodA* 和 *WhcD*，通过构建表达质粒分别对这 6 个基因进行过表达：首先，以 *C. glutamicum* S9114 为模板，利用引物 *FtsZ*-F (XbaI)/*FtsZ*-R (SalI), *pknA*-F (XbaI)/*pknA*-R (SalI), *DivIVA*-up-F (BamHI)/*DivIVA*-R (SalI), *pknB*-F (SalI)/*pknB*-R (PstI), *RodA*-F (XbaI)/*RodA*-R (SalI) 和 *WhcD*-F (XbaI)/*WhcD*-R (SalI) 通过 PCR 的方式扩增得到加有相应酶切位点的目的基因，接着用相应的限制性内切酶对 *Peftumob* 表达质粒和扩增出来的目的基因进行双酶切，将酶切完成后的片段用 T4 DNA 连接酶进行连接，分别构建了 *Peftu-FtsZ*, *Peftu-pknA*, *Peftu-DivIVA*, *Peftu-pknB* 和 *Peftu-RodA* 表达质粒，由于利用 *eftu* 作为启动子时，未成功获得相应的重组菌株，因此用 *H36* 启动子替换 *eftu* 启动子并成功构建了 *PH36-WhcD* 表达质粒。为了将 PHA 合酶定位到细胞膜上，选取了两个分泌表达信号肽 *CGR* 和 *Ncgl*，以及两个细胞膜表面展示蛋白 *porB* 和 *porC*，分别将这四个信号肽连接在 *phaC* 基因的氮端，构建了 4 个融合表达质粒：首先，以 *C. glutamicum* S9114 为模板，利用引物 *CGR*-F (SalI)/*CGR*-R (IF *phaC*), *Ncgl*-F (SalI)/*Ncgl*-R (IF *phaC*), *porB*-F (XbaI)/*porB*-R (IF) 和 *porC*-F (XbaI)/*porC*-R (IF) 通过 PCR 的方式扩增得到目的基因；然后以 *C. glutamicum* JH02 为模板，利用引物 *phaC*-F (IF *CGR*)/*phaC*-R (PstI), *phaC*-F (IF *Ncgl*)/*phaC*-R (SalI), *phaC*-F (IF-*proC*)/*phaC*-R (SalI) 和 *phaC*-F (IF-*proB*)/*phaC*-R (SalI) 通过 PCR 扩增得到与相应信号肽连接的 *phaC* 基因；再通过融合 PCR 将两个信号肽和两个细胞膜表面展示蛋白分别连接到 *phaC* 基因的氮端得到融合片段 *CGR_phaC*, *Ncgl_phaC*, *porC_phaC* 和 *porB_phaC*；接着用相应的限制性内切酶对 *Peftu* 表达质粒和融合片段进行双酶切，最后将酶切完成后的片段用 T4 DNA 连接酶进行连接，分别构建了四个融合表达质粒 *Peftu-(CGR)phaC*, *Peftu-(Ncgl)phaC*, *Peftu-(porC)phaC* 和 *Peftu-(porB)phaC*。为了过表达 *phaP* 基因，构建了 *Peftu-phaP* 表达质粒：首先通过擎科生物科技公司 (Shanghai, China) 合成 *phaP* 基因，接着用 XbaI 和 SmaI 分别对合成的 *phaP* 基因片段和表达质粒 *Peftumob* 进行双酶切处理，然后用 T4 DNA 连接酶将 *phaP* 基因片段连接到质粒 *Peftumob* 上，得到 *Peftu-phaP* 表达质粒。

对于敲除整合质粒，其作用主要是通过同源重组的原理，将基因组上特定位点的基因进行删减、替换或弱化表达。为了对选取的与细胞分裂周期相关的 6 个基因 *WhcD*, *pknA*, *pknB*, *DivIVA*, *RodA* 和 *FtsZ* 进行弱化表达，分别构建了相应的敲除整合质粒，用转录起始强度为 0.1 的 RBS 序列替换掉基因组上原始的 RBS 序列：以为了弱化表达 *WhcD* 基因所构建的 *pK18-WhcD_RBS0.1* 质粒为例：首先，将 *C. glutamicum* JH02 作为模板，设计末端带有 *WhcD_RBS0.1* 序列的引物 *WhcD_RBS0.1*-F (IF), *WhcD_RBS0.1*-R (IF)；接着利用设计的引物分别扩增得到上游片段 (*WhcD_RBS0.1*-upstream) 和下游片段 (*WhcD_RBS0.1*-downstream)；接着通过融合 PCR 的方法将上下游片段连接在一

起; 将获得的融合片段和 pK18 质粒用相应的限制性内切酶进行双酶切, 最后用 T4 DNA 连接酶连接起来, 构成 pK18-*WhcD*_RBS0.1 敲除整合质粒。为了将 *Ncgl* 信号肽整合到 *C. glutamicum* JH02 基因组上 *phaC* 基因的氮端, 构建了 pK18- Δ *phaC*::(*Ncgl*)*phaC* 敲除整合质粒, 其作用是用 *Ncgl*_ *phaC* 基因片段替换掉基因组上的 *phaC* 基因片段, 首先, 以 *C. glutamicum* JH02 基因组为模板, 利用引物 ifc-(*Ncgl*)*phac*-F/ *Ncgl*-up-R (IF) 通过 PCR 扩增得到 *Ncgl*-up 基因片段, 以上述构建的表达质粒 *Peftu*-(*Ncgl*)*phaC* 为模板, 利用引物 *Ncgl*-F (IF)/ ifc-(*Ncgl*)*phac*-R 通过 PCR 扩增得到 *Ncgl*_ *Ncgl*-down 基因片段; 然后, 通过融合 PCR 利用引物 ifc-(*Ncgl*)*phac*-F/ifc-(*Ncgl*)*phac*-R 将上一步扩增得到的两个基因片段融合起来得到 *Ncgl*-up_*Ncgl*_ *Ncgl*-down 基因片段; 利用 *Xba*II 和 *Sal*I 内切酶将 pK18mob 质粒切开, 最后通过无缝克隆将目的基因片段连接到质粒 *PK18mob* 上, 获得敲除整合质粒 pK18- Δ *phaC*::(*Ncgl*)*phaC*。为了减少乙酰辅酶 A 流入 TCA 循环的代谢通量, 构建了 pK18-*gltA*-1RBS0.1 敲除整合质粒, 对 *gltA*-1 基因进行弱化表达: 首先, 提取 *C. glutamicum* JH02 基因组作为模板, 利用引物 ifc-*gltA* RBS 0.1-F/ *gltA* RBS0.1 upstream-R(IF) 通过 PCR 扩增得到 *gltA*-upstream 基因片段, 利用引物 *gltA* RBS0.1 downstream-F(IF)/ ifc-(*Ncgl*)*phac*-R 通过 PCR 扩增得到 *gltA* RBS0.1_ *gltA* RBS0.1 downstream 基因片段; 接下来, 通过融合 PCR 利用引物 ifc-*gltA* RBS 0.1-F/ifc-(*Ncgl*)*phac*-R 将两个基因片段连接起来, 得到 *gltA* RBS0.1-up_ *gltA* RBS0.1_ *gltA* RBS0.1-down 基因片段; 然后利用内切酶 *Xba*II 和 *Sal*I 将 pK18mob 质粒切成线性, 最后通过无缝克隆将目的基因片段连接到 pK18mob 上, 获得敲除整合质粒 pK18-*gltA*-1_RBS0.1。

将上述构建成功的质粒经过热激法转化进 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 具体步骤如下:

(1) 制备 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞

- ① 从-80 °C的冰箱中取出一只保存有 *E. coli* DH5 α 菌株的保种管, 用 100 μ L 的移液枪从保种管中蘸取少量液体在 LB 平板上划线, 将划好线的平板放置在 37 °C 的恒温箱中过夜培养。
- ② 第二天早上, 在长出单菌落的平板上挑取一个单菌落接种在含有 5 mL LB 培养基的试管内, 将试管放置在 37 °C 的摇床中, 设置转速 200 rpm, 继续摇床培养 12-16 h。
- ③ 将试管中培养好的 5 mL 菌液全部接种在装有 100 mL LB 培养液的锥形瓶中, 培养 5-7 h。
- ④ 将锥形瓶中的菌液转移至 50 mL 离心管中, 放在冰上, 冰浴 30 min。
- ⑤ 冰浴完毕后用离心机在 4 °C 下离心 10 min, 离心转速为 4,000 rpm。弃去上清液, 并用移液枪吸干残留的培养基, 加入 10 mL 0.1M 的氯化钙, 用 5 mL 移液枪轻柔吹吸菌体, 使细胞重新悬浮起来。
- ⑥ 重复步骤 (5) 两次。
- ⑦ 最后弃去上清后加入 2 mL 储存液, 用 5 mL 移液枪轻柔吹吸菌体, 重悬细胞。将制备好的感受态分装在 EP 管中, 每个 EP 管中装 100 μ L。将分装好的感受态保存在

-80 °C的冰箱中备用。

(2) 质粒转化进大肠杆菌

- ① 将目的基因片段和酶切后的质粒在 DNA 连接酶的作用下 16 °C 反应 30 min，之后加入 100 μ L 的感受态细胞，用移液枪轻轻吹吸后混匀，注意动作要尽量轻柔，混合均匀后放在冰上冰浴 30 min；
- ② 冰浴完成后，在 42 °C 条件下热激 1 min 30 s，冰浴 2 min 之后迅速加入 900 μ L 的 LB 培养基，同样用移液枪轻轻混匀后在 37 °C 摇床培养 1 h；
- ③ 培养 1 h 后，利用离心机在 6,000 rpm 下离心两分钟，去除部分上清，留 100 μ L 涂在相应的抗性平板上；
- ④ 将抗性平板放置在 37 °C 恒温箱中过夜培养 12 h 左右，第二天早上待长出单菌落后进行菌落 PCR 验证；
- ⑤ 挑取菌落 PCR 结果为阳性的单菌落，培养后抽取质粒送去公司测序，测序结果没有问题则质粒构建成功。

2.2.4 重组菌株的构建

本研究所用的出发菌株为 *C. glutamicum* JH02。所用的质粒转化方式为电转化。将构建的质粒转入宿主菌 *C. glutamicum* JH02 的具体操作步骤如下所示：

(1) 预先制备谷氨酸棒状杆菌感受态细胞

- ① 从-80 °C的冰箱中取出一只保存有 *C. glutamicum* JH02 的保种管。利用 100 μ L 的移液枪蘸取少量菌液在 LB 平板上划线，将划线后的平板放置在 30 °C 恒温箱中培养。
- ② 待平板上长出合适大小的单菌落后，挑取单菌落接种到含有 5 mL LB 培养基的试管中，放在 30 °C 摇床中过夜培养 12-16 h，摇床转速设置为 200 rpm。
- ③ 第二天将培养好的菌液按照 10% 的接种比例，接种到含有 50 mL LBG 感受态培养基的 500 mL 摇瓶中，继续在温度 30 °C，转速 200 rpm 的摇床培养 5-6 小时。
- ④ 将培养好的菌液倒入 50 mL 的离心管中，放在冰上冰浴 20 min。
- ⑤ 待冰浴结束之后，将离心管放置在预冷至 4 °C 的高速离心机中，转速设置为 5,000 rpm，离心 10 min 收集菌体，倒掉上清液后加入 5 mL 预冷的 10% 的甘油，用 5 mL 移液枪轻柔的吹吸菌体，使细胞重新悬浮起来，之后再补加 10% 的甘油至 30 mL。然后再次在 5,000 rpm，4 °C 的条件下离心 10 min。用 10% 的甘油清洗菌体两次。
- ⑥ 最后清洗完毕弃去上层甘油后，再加入 1 mL 左右的 10% 甘油（具体甘油添加量视菌体量而定，可适量增加或减少），并用枪头轻柔吹吸，使细胞重悬并混合均匀。将制备好的感受态分装在 1.5 mL 的 EP 管中，每个 EP 管中装 100 μ L，放在冰块中冰浴备用。

(1) 电转实验

- ① 取 25 μ L 待转化的质粒与 100 μ L 感受态细胞轻柔混匀，放在冰上冰浴 30 min。
- ② 冰浴完后，将混合有质粒的感受态细胞转移到预冷干燥的电击杯中，并轻轻在桌子上磕几下确保加入的菌液中无气泡产生。用纸巾擦干电击杯外壁的水珠，确保电击

杯外壁干燥。设置电转仪电击程序为电压 2,000 V，电阻 200 Ω 。将电击杯放入电转仪中盖好盖子，按下电击按钮进行电击，待电转仪“嘀”声后即电击完成。

- ③ 将电击完成后的感受态细胞吸回到 1.5 mL 的离心管中，立即加入 800 μ L SOC 培养基，用移液枪轻轻吹吸，混合均匀后将感受态细胞在 46 $^{\circ}$ C 的水浴锅中热激 6 min，热激完成后再立即放回到冰上，冰浴 2 min。
- ④ 冰浴完成后，将离心管放置在 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 的摇床中，摇床培养 2 h，此步骤的作用是使电转入质粒的感受态细胞恢复生长。待摇床培养结束后，将装有感受态细胞的离心管在 5,000 rpm 的条件下离心 2 min，用 1,000 μ L 的移液枪吸走 900 μ L 剩下 100 μ L 用涂布棒均匀涂抹在 LK 平板上，最后将平板放在 30 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 2-3 天，待长出单菌落后用于菌落 PCR 验证。

(3) 菌落 PCR 验证

- ① 表达质粒菌落 PCR 验证：质粒 *Peftumob* 用于构建表达质粒，因此用于表达质粒筛选验证的引物为 *Peftu* 质粒上的通用引物 *Peftu-F/Peftu-R*，通过菌落 PCR 进行验证，能够在凝胶电泳中跑出正确条带大小的菌株则认为已经正确转化进目的质粒的重组谷氨酸棒状杆菌。
- ② 敲除整合质粒菌落 PCR 验证：
 - A. 一次重组验证：质粒 *pK18mob* 用于构建敲除整合质粒，第一次重组验证选取 *pK18mob* 质粒上的通用上游引物和目的基因在基因组上的下游引物作为一次重组验证引物，通过菌落 PCR 和凝胶电泳能够跑出正确条带大小的菌株即认为是完成一次重组的菌株。
 - B. 一次重组菌株筛选培养：将上一步中验证出来的完成一次重组的菌株接种在含有 5 mL LB 培养基的试管中，在 30 $^{\circ}$ C，2,000 rpm 的摇床中过夜培养，第二天将养好的菌液按不同的稀释梯度（一般稀释到 10^{-2} 即可）涂布在 LBS 平板上，最后将平板放在 30 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 2-3 天，待长出单菌落后进行后续的二次重组验证。
 - C. 二次重组验证：以目的基因的上游引物和基因组下游同源臂的下游引物作为二次重组验证的引物，挑取 LBS 平板上长出的单菌落进行菌落 PCR 验证，通过琼脂糖凝胶电泳能跑出正确条带大小的菌株，可初步认为该菌株完成了二次同源重组。接下来，将认为完成二次同源重组的菌株的基因组作为模板，利用目的基因的上下游引物扩增得到基因片段并送去公司测序，最终筛选出将目的基因成功整合到了基因组上的重组菌株。

2.2.5 胞内 PHB 产物定量测定

取 10 mL 发酵液于已知空管质量的 50 mL 离心管中，8,000 rpm 离心 10 min，倒掉上清后，加入 20 mL 去离子水，用 5 mL 移液枪吹吸菌体，使细胞悬浮，混合均匀后再次在 8,000 rpm 条件下离心 10 min，从而达到洗去残余发酵液的作用，重复此步骤两次。最后离心完毕后，将含有菌体沉淀的离心管放到 65 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干至恒重。称取 20 mg 左右（摇瓶发酵获得的干菌体可称取 100 mg 左右）干菌体于已称重的 5 mL 具塞试管

中，用移液枪准确吸取 1 mL 浓硫酸加到具塞试管中，用封口膜封口，防止浓硫酸在沸水加热过程中从具塞试管中溅出。将含有反应物的具塞试管在沸水中反应 40 min，反应完毕后将具塞试管中的反应液转移到 1.5 mL 的离心管中，用去离子水稀释 10 倍。用 0.22 μm 的水系滤头过滤除菌后通过装有 HPX-87P 型色谱分析柱 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC 来测定反应液中丁烯酸的浓度，然后间接计算出聚 3-羟基丁酸酯的浓度。

2.2.6 PHB 得率计算

通过发酵过程中消耗的葡萄糖和木糖以及生成的 PHB 可以计算出 PHB 的得率，具体计算公式如下：

$$PHB \text{ yield} = \frac{[PHB] \times V - [PHB]_0 \times V_0}{[G + X]_0 \times V_0 - [G + X] \times V} \times 100\% \quad (2-1)$$

公式中 $[PHB]$ 代表发酵终点发酵体系中 PHB 的浓度； $[PHB]_0$ 代表发酵开始时发酵体系中起始浓度； $[G+X]$ 代表发酵终点发酵体系中葡萄糖和木糖的浓度； $[G+X]_0$ 代表发酵开始时发酵体系中起始浓度； V 和 V_0 分别代表发酵终点发酵液体积和发酵开始时发酵液初始体积。

2.2.7 PHB 的摇瓶发酵

从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中取出保存有实验菌株的保种管，用接种环蘸取少量发酵液在 LB 平板上划线活化 (含有表达质粒的在 LK 平板上活化)。将划好线的平板放置在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养，待菌体在平板培养基上长出单菌落后，用接种环挑单个菌落接种在含有 10 mL PHB 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中，在恒温摇床过夜培养 16 h，培养条件为 $30\text{ }^\circ\text{C}$ ，200 rpm。接下来，按照 10% 接种量将种子液接种到含有 30 mL PHB 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ ，200 rpm 的恒温摇床培养 48 h，期间每隔 12 h 用 5M NaOH 调节 pH 至 7.0。

2.2.8 产物检测方法

本实验室人员用装有 HPX-87H 型色谱柱 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 的 HPLC 来分析测定胞内 PHB，培养基中葡萄糖、木糖的浓度以及麦秆水解液中糠醛、HMF、乙酸等抑制物的浓度。HPLC 测定时柱温维持在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ ，流速 0.6 mL/min，所用流动相为 5 mM 硫酸溶液。

2.2.9 细胞样品制作方法与电镜拍摄

取 1 mL 发酵液于 1.5 mL EP 管中，12,000 rpm 离心 5 分钟，离心完毕后弃去上清，收集到的菌体用于制备拍摄电镜所用的样品。往装有收集到的湿菌体的 EP 管中加入 1 mL 2.5% (v/v) 的戊二醛溶液，用移液枪轻轻吹打菌体，使细胞悬浮起来并与戊二醛溶液混合均匀后，放置在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中固定 4 h；固定完毕后，8,000 rpm 下离心 2 min 并弃去上清，用 0.1M 磷酸缓冲溶液清洗 3 次；接着用 4% (v/v) 的多聚甲醛溶液在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下继续固定 4 h，需要注意的是多聚甲醛溶液应当现配现用；固定完后，同样在 8,000 rpm 下离心 2 min 并弃去上清，最后用 0.1 M 磷酸缓冲溶液冲洗 3 遍。将处理好的细胞送至

上海师范大学 (Shanghai, China) 进行透射电镜 (FEI Tecnai Spirit G2 BioTWIN, FEI, Holland) 图片的拍摄。用于进行场发射扫描电镜拍摄的样品则需要进行进一步的处理, 首先要在 30%, 50%, 70%, 85% 和 90% 的 5 个不同浓度梯度乙醇溶液中进行脱水处理, 之后再冷冻干燥 24 h。将干燥后的样品送至华东理工大学 (Shanghai, China) 分析测试中心进行进一步的喷箔处理以及拍摄场发射扫描电镜 (GeminiSEM 500, ZEISS, Germany) 图片。

2.2.10 激光共聚焦显微镜的拍摄

将单个菌落接种于含有 30 mL PHB 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 并在 30 °C, 200 rpm 下培养 12 小时。吸取 1 mL 发酵液在 1.5 mL 的 EP 管中, 离心收集菌体, 再在装有收集到菌体的 EP 管中加入 1 mL 去离子水, 并用去离子水稀释 10 倍。取 20 uL 稀释后的发酵液, 均匀地铺在培养小皿的底部。处理好的样品被送到华东理工大学 (Shanghai, China), 用激光共聚焦显微镜 (A1R, Nikon, Japan) 拍摄荧光显微照片。

2.3 结果与讨论

2.3.1 细胞形态工程改造促进谷氨酸棒状杆菌合成 PHB

相关研究表明, PHB 的积累受到细胞尺寸的限制, 大的细胞体积可以为胞内 PHB 的积累提供更多的空间^[62]。本章节计划通过质粒过表达或弱化表达谷氨酸棒状杆菌细胞形态相关的基因来干扰谷氨酸棒状杆菌的生长分裂, 使细胞体积增大, 从而促进胞内 PHB 的合成。谷氨酸棒状杆菌细胞形态为短杆状, 属于放线菌属, 细胞在伸长过程中表现为“顶端生长”, 这是因为 *C. glutamicum* 中的 *DivIVA* 基因编码的 DivIVACG 蛋白可以将肽聚糖定位到细胞两极进行新细胞壁的合成, 当 *DivIVA* 基因缺失时, 会导致菌体由杆状变为球状^[63,64]。同样参与新细胞壁顶端合成的 *RodA* 基因对于维持谷氨酸棒状杆菌的杆状生长也至关重要, 该基因的缺失会导致菌体生长速度变慢和细胞长度变短^[65,66]。*FtsZ* 是最保守的细胞分裂蛋白之一, 其主要作用是在细胞分裂过程中招募其他蛋白形成功能性的 FtsZ 环, 引起细胞质膜内陷, 从而完成细胞分裂, 根据相关文献报道, 在谷氨酸棒状杆菌中对 *FtsZ* 基因进行过表达或弱化表达能够干扰细胞分裂过程, 从而改变细胞形态^[67,68]。*PknA* 和 *PknB* 都属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (STPK), 是细胞信号转导通路的关键参与者, 有相关文献报道, 对 *PknA* 和 *PknB* 基因进行弱化表达, 会产生细胞分裂缺陷型细胞, 导致细胞细长; 对 *PknA* 和 *PknB* 基因进行过表达会导致细胞顶端生长迟缓, 细胞形态由杆状变为球状^[69]。这表明 *PknA* 和 *PknB* 对于维持谷氨酸棒状杆菌细胞正常生长和形态是必不可少的。*WhcD* 基因作为 *WhiB* 基因的同系物, 是一种生长调控基因, 该基因能够参与许多细胞活动, 如细胞分裂、分化和应激反应^[70]。相关文献报道, 当谷氨酸棒状杆菌缺失 *WhcD* 基因时, 会导致与细胞生长分裂相关的 *FtsZ*、*DivIVA* 等基因转录水平下调^[70]。

我们将上述选取的与细胞形态相关的 6 个基因 *DivIVA*, *pknA*, *WhcD*, *RodA*, *FtsZ* 和 *pknB* 首先通过质粒表达的形式分别对其进行过表达, 成功构建的 6 个工程菌株分别为 JH02-Peftu-*DivIVA*, JH02-Peftu-*pknA*, JH02-PH36-*WhcD*, JH02-Peftu-*RodA*, JH02-Peftu-*FtsZ* 和 JH02-Peftu-*pknB*。需要强调的是, 当利用 *eftu* 启动子过表达 *WhcD* 基因时, 始终无法筛选出正确的重组菌株, 分析原因可能是由于 *eftu* 启动子使 *WhcD* 表达强度过高, 对细胞的正常生长产生了抑制作用, 因此最后用启动强度相对较弱的 *H36* 启动子替换掉了强启动子 *eftu*, 成功获得重组菌株 JH02-PH36-*WhcD*。将获得的 6 株工程菌株与对照菌株 JH02 通过摇瓶发酵比较产 PHB 能力的变化, 同时用 X100 倍的光学显微镜观察谷氨酸棒状杆菌细胞形态的变化。

摇瓶发酵结果如图 2.1 所示, 分别过表达 *pknB* 或 *WhcD* 基因的重组菌株细胞生长状况明显变好, 两株菌的细胞干重分别增加 88.0%和 115.0%, 同时胞内 PHB 含量也有小幅度的增加, 分别增加了 36.0%和 19.5%, 因此最终 PHB 产量分别增加了 177.0%和 163.0%; 分别过表达 *pknA* 和 *RodA* 基因的两株重组菌株胞内 PHB 含量增加的最多, 分别提高了 43.4%和 50.7%。但是通过光学显微镜照片, 未观察到细胞形态变化。该结果证明, 尽管过表达细胞形态相关的基因不能有效改变谷氨酸棒状杆菌的细胞形态,

但在一定程度上促进了细胞的生长和胞内 PHB 含量的增加，从而使 PHB 产量提高。

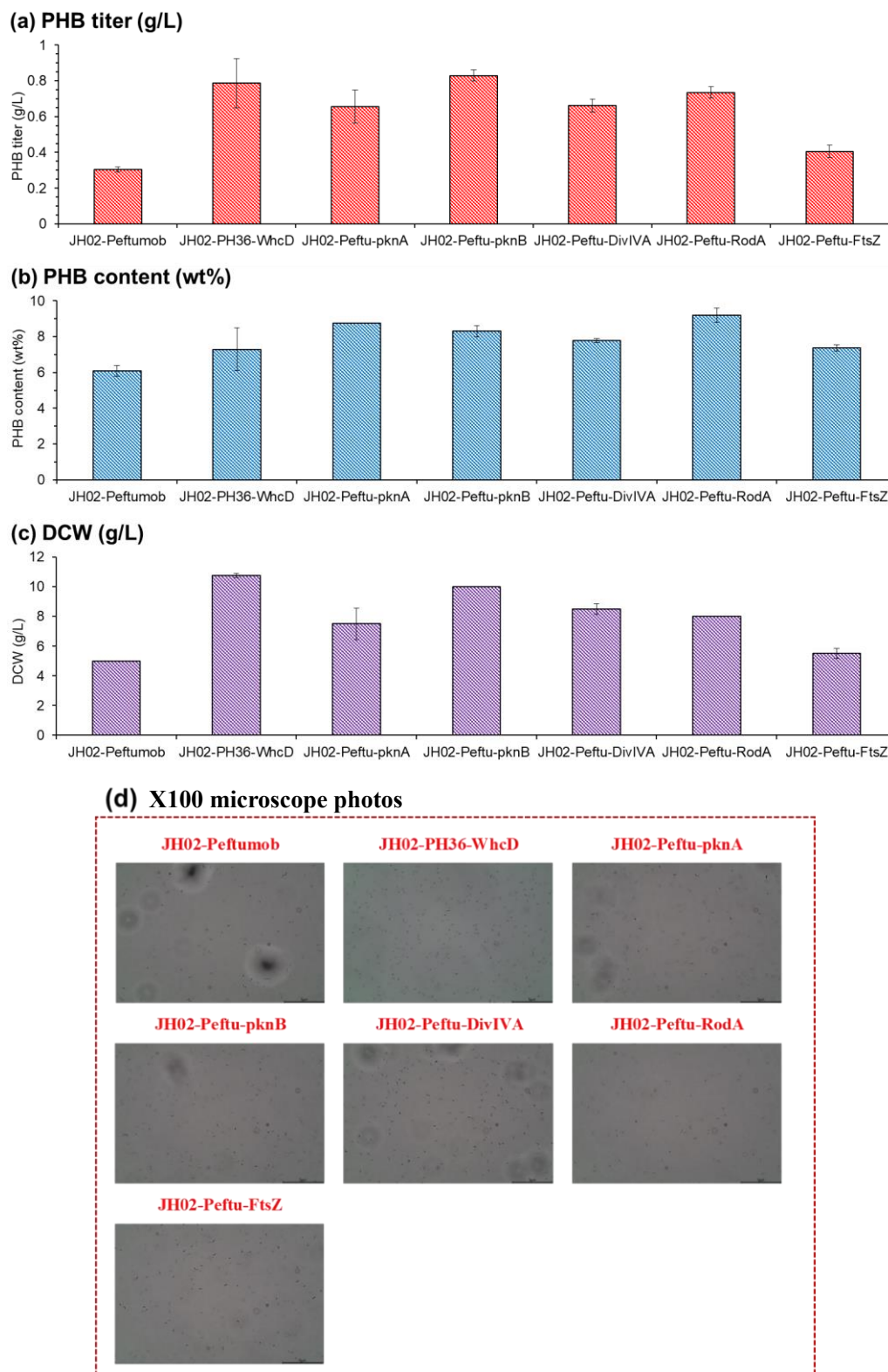


图 2.1 过表达细胞形态相关基因促进 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB

Fig. 2.1 Promoting PHB synthesis of the *C. glutamicum* JH02 by overexpression of cell morphology-related genes: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) × 100 microscope photos

发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行，所用培养基为 PHB 发酵培养基，具体成分如材料与方法所示，菌株培养在温度为 30 °C，转速为 200 rpm 的摇床中，过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

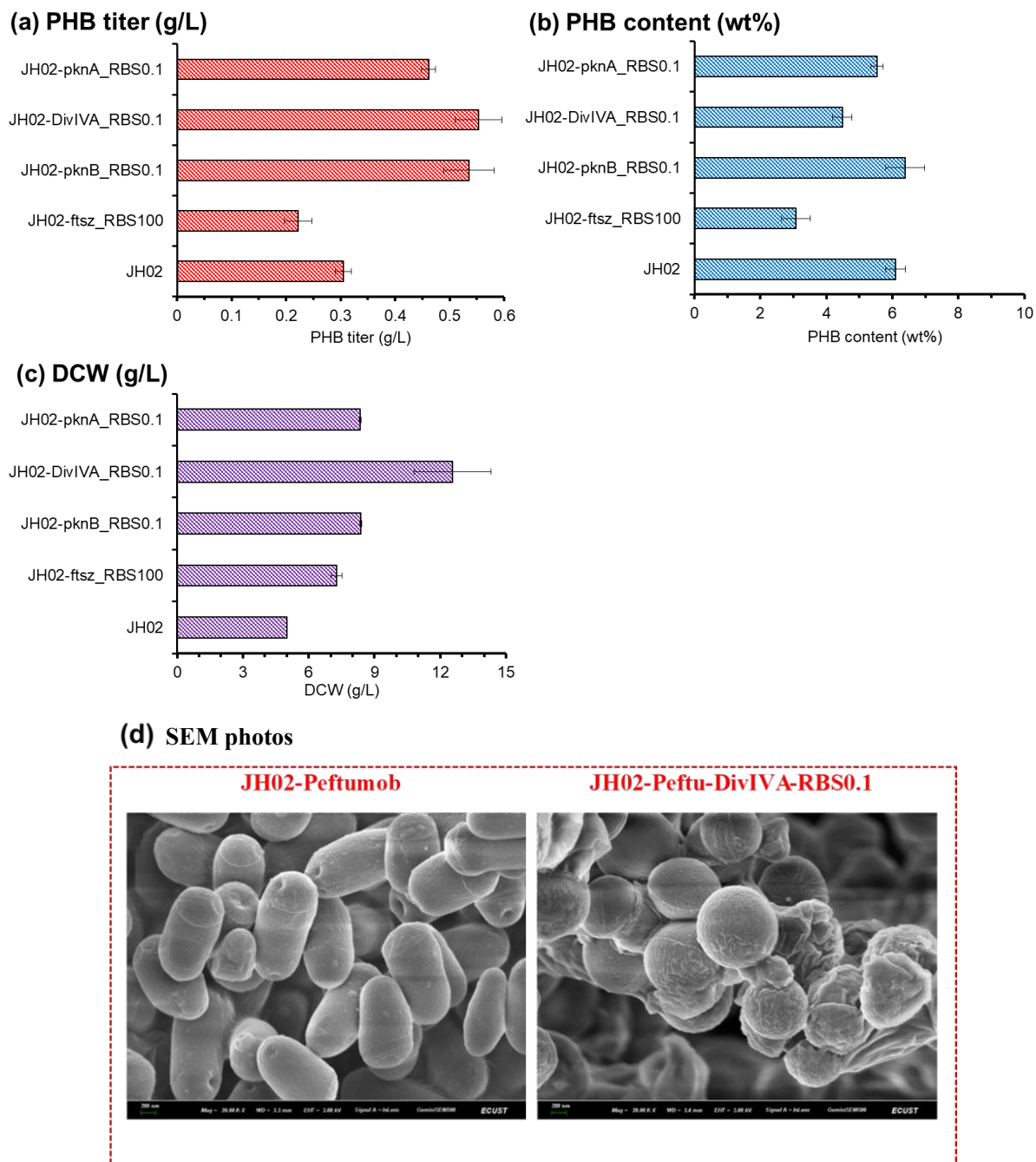


图 2.2 弱化细胞形态相关基因促进 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB

Fig. 2.2 Promoting PHB synthesis of the *C. glutamicum* JH02 by attenuation of cell morphology-related genes: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) SEM photos

发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行，所用培养基为 PHB 发酵培养基，具体成分如材料与方法所示，菌株培养在温度为 30 °C，转速为 200 rpm 的摇床中，过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

接下来, 本论文又通过替换 RBS 序列, 改变这 6 个基因的转录起始强度, 对这 6 个基因进行弱化表达。由于弱化表达 *RodA* 和 *WhcD* 基因时导致菌株无法生长, 因此最终未获得这两个基因的弱化表达菌株, 并且 *FtsZ* 基因弱化表达强度高时也导致菌株无法正常存活, 因此最终只获得了转录起始强度为 100 的弱化表达菌株。最终成功构建的 4 株弱化表达的菌株分别是 JH02-*pknA*_RBS0.1, JH02-*FtsZ*_RBS100, JH02-*DivIVA*_RBS0.1 和 JH02-*pknB*_RBS0.1, 利用获得的 4 株弱化表达菌株进行摇瓶发酵, 比较产 PHB 能力的变化。

发酵结果如图 2.2 所示, 与对照菌株 JH02 相比, 这 4 株菌的胞内 PHB 含量都没有明显提高。但由于弱化表达 *DivIVA* 基因的菌株细胞干重有明显提高, 增加了 151.0%, 因此最终 PHB 产量提高了 83.0%。通过拍摄光学显微镜发现, 弱化表达 *DivIVA* 基因的工程菌株 JH02-*DivIVA*_RBS0.1 的细胞形态发生了较明显的变化, 视野中的细胞长度明显变短。为了更清楚地观察到细胞发生的变化, 又对该菌株拍摄了场发射扫描电镜 (如图 2.2 (d) 所示), 从拍摄的照片可以明显观察到对照菌株 JH02 细胞形态为短杆状, 而改造菌株 JH02-*DivIVA*_RBS0.1 细胞形态变为球形。综上所述, 只有对 *DivIVA* 基因进行弱化表达时, 细胞形态发生了显著改变, 由原来的短杆状变为球状, 但是细胞体积增大之后并没有用来积累更多的 PHB, 因此对于非天然的 PHB 生产菌株, 仅仅通过体积增大来促进 PHB 的积累是行不通的。

2.3.2 膜定位表达 PHA 合酶促进 PHB 生产

在 PHB 的合成过程中主要涉及三个基因, 分别是: *phaA*, *phaB* 和 *phaC*。*phaC* 基因编码的 PHA 合酶负责将单体(R)-3-羟基丁酰辅酶 A 聚合为 3-羟基丁酸酯, 相关研究表明该聚合过程在整个 PHB 合成路径中起着关键性作用, 是整个 PHB 合成过程的限速步骤^[71]。PHA 合酶的表达量及其稳定性对 PHB 生产菌株合成 PHB 的能力具有重要影响。迄今为止, 有许多关于膜定位表达来提高相关酶活及稳定性的研究报道, 例如, 研究人员通过将几丁质酶定位在苏云金芽孢杆菌的细胞膜上, 从而提高了几丁质酶的活性和稳定性; 将木聚糖酶定位在大肠杆菌的细胞膜上从而提高了木聚糖酶的活性^[72,73]。另外, 相关报道称, 通过对新合成的 PHB 颗粒进行定位, 发现 PHB 积累的早期阶段, 大多数 PHB 颗粒附着在细胞质膜上或分布在非常靠近细胞质膜的地方, 因此推测 PHB 颗粒的形成并不是在细胞质中随机发生, 而是发生在细胞质内膜或细胞质膜上, 并且 PHB 颗粒在细胞内不是随机分布, 而是倾向于定位在细胞两极^[74]。因此, 将 PHA 合酶定位在细胞膜上进行表达, 能够有效缩短参与聚合反应的空间距离。在已发表的文献中也有通过缩短酶作用于相关反应的空间距离来促进产物合成的报道。例如, 为了减少胞外游离脂肪酸 (FFAs) 排出体外的空间距离, 减轻 FFA 对细胞的毒害作用, 研究人员通过将硫酸酯酶定位到膜上, 从而在细胞膜附近生成 FFA, 促进 FFA 快速排泄到细胞外^[75]。

基于以上研究结果, 本论文尝试通过膜定位表达 PHA 合酶的方式来提高 PHA 合酶的活性和稳定性以及缩短 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离, 从而提高 PHB 的生产能力。在谷氨酸棒杆菌中有两个主要的蛋白转运途径, 分别是 Sec 途径和 Tat 途径, 这两

条途径都具有介导靶蛋白分泌的特异性信号肽。其中，介导 Tat 途径的信号肽为 *CGR_RS04950* 信号肽（缩写为 *CGR*），介导 Sec 途径的信号肽为 *Ncgl1289* 信号肽（缩写为 *Ncgl*）^[76-78]。此外有研究证实谷氨酸棒状杆菌中的孔蛋白是在谷氨酸棒状杆菌细胞膜表面实现酶定位表达的非常有效的锚定蛋白^[79]。因此为了将 PHA 合酶成功定位到细胞膜上，首先选取了谷氨酸棒状杆菌中的 *Ncgl* 和 *CGR* 信号肽，以及两个细胞膜表面展示蛋白 *porC* 和 *porB*，然后分别将这四个蛋白的编码基因融合在 *phaC* 基因的氮端，将获得的融合片段插入到表达质粒，最后将构建成功的表达质粒在 *C. glutamicum* JH02 中进行表达。

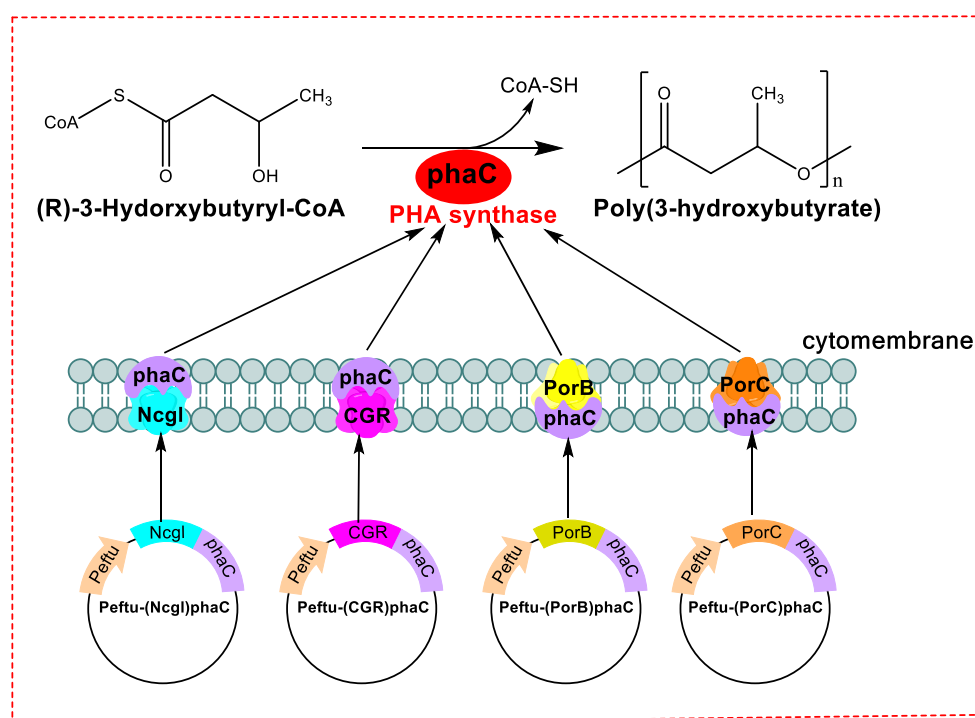


图 2.3 膜定位表达 PHA 合酶

Fig. 2.3 membrane-located expression of PHA synthase

将构建的四个重组菌株 JH02-*PefTu*-(*CGR*)*phaC*, JH02-*PefTu*-(*porB*)*phaC*, JH02-*PefTu*-(*Ncgl*)*phaC* 和 JH02-*PefTu*-(*porC*)*phaC* 作为实验菌株，并与出发菌株 JH02 和只过表达 *phaC* 基因的重组菌株 JH02-*PefTu*-*phaC* 进行比较，通过摇瓶发酵检验其 PHB 生产能力的变化。结果如图 2.4 所示，与只过表达 *phaC* 基因相比，分别融合表达 *Ncgl*, *porC* 和 *porB* 这三种蛋白的重组菌株生长状况明显变好，细胞干重增加接近 1 倍，有效促进了细胞的生长；分别融合表达这三种基因的重组菌株的胞内 PHB 含量显著提高，分别增加了 70.1%，72.3%和 140.6%；三株重组菌株的 PHB 产量得到了显著提高，分别提高 195.0%，160.5%和 310.6%。综上所述，通过将 PHA 合酶定位在细胞膜上显著促进了细胞的生长和胞内 PHB 的积累，其中融合表达 *Ncgl* 信号肽的 JH02-*PefTu*-(*Ncgl*)*phaC* 重组菌株和融合表达 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的 JH02-*PefTu*-(*porB*)*phaC* 重组菌株的菌体生长状况最好，PHB 产量提高最为显著。

对膜定位表达 PHA 合酶的重组菌株 PHB 生产能力显著提高的原因做出合理推测,一方面,将 PHA 合酶定位在细胞膜上增加了 PHA 合酶的稳定性和活性,使其在参与 PHB 聚合过程中不易失去活性;另一方面,根据相关研究报道,PHB 颗粒形成的初期发生在细胞膜内或细胞膜附近,将 PHA 合酶定位到细胞膜上能有效缩短单体参与聚合反应的空间距离,从而促进 PHB 的合成。

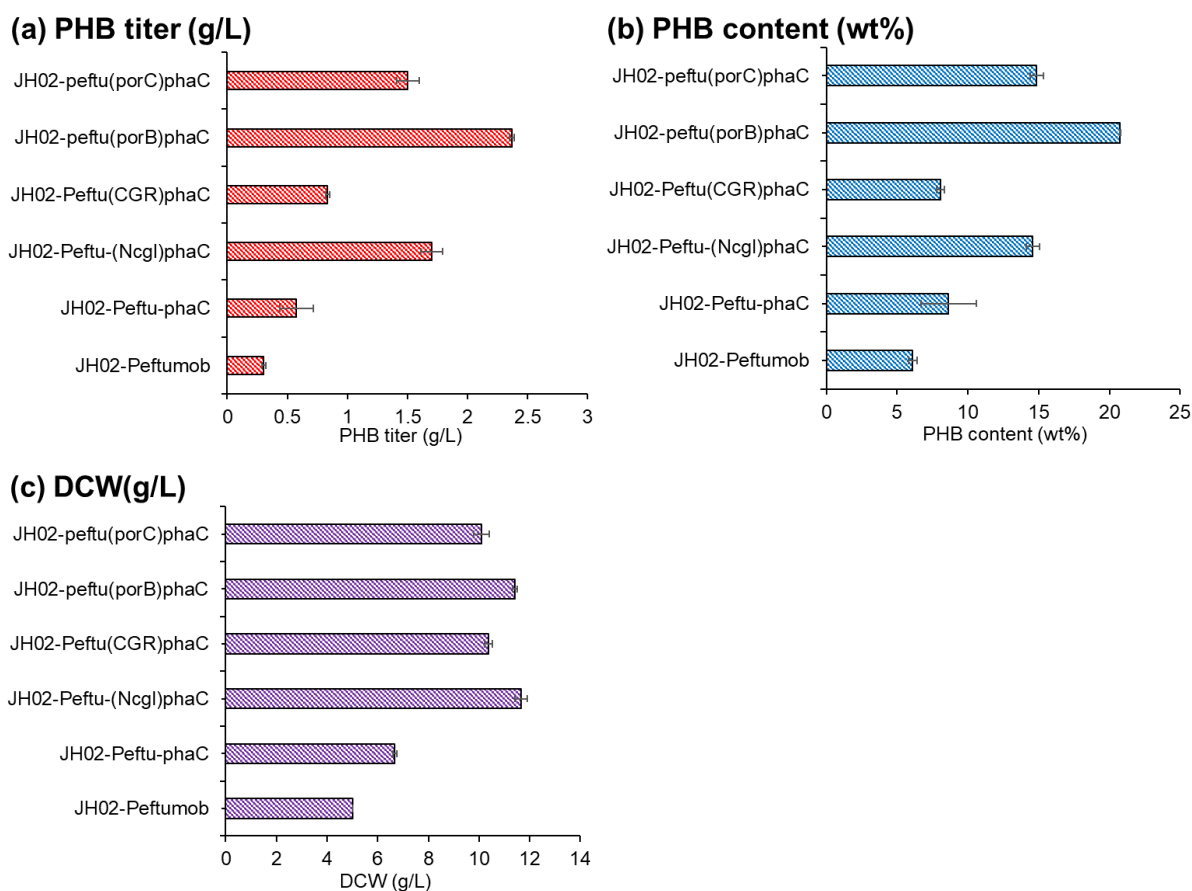


图 2.4 通过膜定位表达 PHA 合酶的方式促进 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB

Fig. 2.4 Promoting PHB synthesis of the *C. glutamicum* JH02 by membrane-located expression of PHA synthase: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L)

发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行,所用培养基为 PHB 发酵培养基,具体成分如材料与方法所示,菌株培养在温度为 30 °C,转速为 200 rpm 的摇床中,过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

由于上面提到在获得的 4 株重组菌中,融合表达 *Ncgl* 信号肽的 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 和融合表达 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 重组菌株 PHB 生产能力提高最为显著,因此接下来的研究主要围绕这两株重组菌株展开。

为了确定融合 *Ncgl* 信号肽的 *phaC* 基因和融合 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的 *phaC* 基因成功表达出相应蛋白,同时对成功表达的 PHA 合酶在细胞内的位置分布进行观测,本实验将编码 GFP 绿色荧光蛋白的基因 *gfp* 分别融合到了(*Ncgl*)*phaC* 基因片段和(*porB*)*phaC* 基因片段的碳端并将融合好的片段插入到表达质粒 *Peftumob* 中,最后将构

建好的表达质粒转入 *C. glutamicum* JH02，成功构建菌株 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC*(*gfp*) 和 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC*(*gfp*)重组菌株。

利用全自动倒置荧光显微镜在 405nm 和 488nm 发射光下观测重组菌株和 JH02 原始菌株胞内荧光情况，结果如图 2.5 所示。从拍摄的荧光照片可以清晰的看出，没有表达 GFP 绿色荧光蛋白的对照菌株 JH02-Peftumob 没有绿色荧光；对于只表达 GFP 绿色荧光蛋白而没有融合表达任何信号肽的对照菌株 JH02-Peftu-*gfp*，其绿色荧光均匀分布在细胞内；融合表达 *Ncgl* 信号肽的重组菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC*(*gfp*)的绿色荧光集中分布在细胞两极且发出的绿色荧光亮度更高；融合表达 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的重组菌株 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC*(*gfp*)的绿色荧光均匀分散在整个细胞中。基于以上现象，推测 *Ncgl* 信号肽将 PHA 合酶定位在了谷氨酸棒状杆菌细胞的两极，而 *porB* 细胞膜表面展示蛋白则将 PHA 合酶均匀的定位在了细胞膜上。

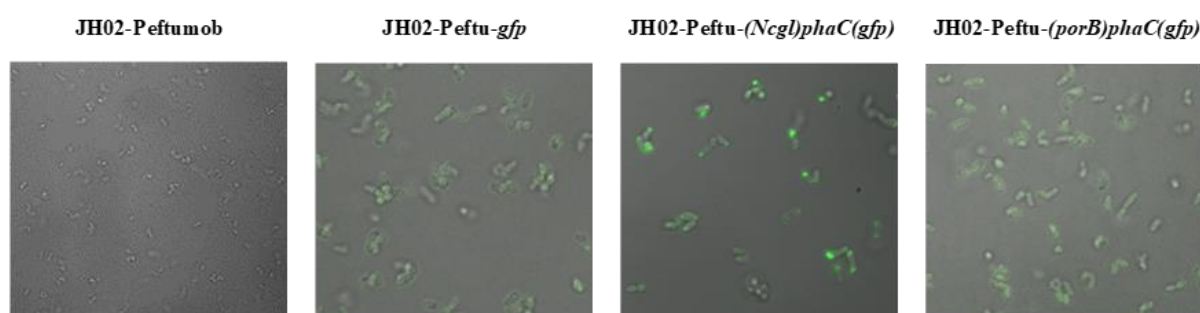


图 2.5 PHA 合酶位置分布绿色荧光验证

Fig. 2.5 Fluorescence microscopy of PHA synthase location distribution

2.3.3 *Ncgl* 信号肽与 *porB* 细胞膜表面展示蛋白共表达提高 PHB 产量

基于之前的研究，我们发现分别在 *C. glutamicum* JH02 通过质粒表达的形式，过表达融合 *Ncgl* 信号肽的 *phaC* 基因或融合 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的 *phaC* 基因，使谷氨酸棒状杆菌产 PHB 能力提高最为显著。于是本实验计划通过在 *C. glutamicum* JH02 中共表达这两个信号肽来探究是否能进一步提高谷氨酸棒状杆菌产 PHB 的能力。首先为了有利于菌株的筛选验证，构建了含有壮观霉素抗性的 Peftu-(*porB*)*phaC* 质粒，接下来，在本身含有卡那霉素抗性质粒的 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 中再次电转入带有壮观霉素抗性的质粒 Peftu-(*porB*)*phaC*，成功构建了含有双质粒双抗性的谷氨酸棒状杆菌 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC*, Peftu-(*porB*)*phaC*。

将构建的菌株与 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 和 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 进行发酵对比，结果如图 2.6 所示，结果显示双质粒的表达对谷氨酸棒状杆菌产 PHB 能力没有明显的提高，甚至低于只融合表达一种蛋白的菌株，推测是由于双质粒的存在对菌体的正常生理代谢产生了不良影响，这从菌体干重也可以看出。因此采用双质粒表达的模式实现分泌表达信号肽与细胞膜表面展示蛋白在 *C. glutamicum* JH02 中共表达并不可行。

接下来, 尝试先将 *Ncgl* 信号肽整合到基因组上 *phaC* 基因的氮端获得 JH02 - $\Delta phaC::(Ncgl)phaC$ 改造菌株, 并将其命名为 *C. glutamicum* JH03, 然后再通过质粒表达的形式过表达融合 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的 *phaC* 基因, 将获得的改造菌株命名为 JH03-Peftu-(*porB*)*phaC*。结果如图 2.7 所示, 实现 *Ncgl* 信号肽和 *porB* 细胞膜表面展示蛋白共表达的 JH03-Peftu-(*porB*)*phaC* 与对照菌株 JH02 相比, PHB 产量提高 2.5 倍, 胞内含量增加 1.9 倍; 与只过表达融合 *Ncgl* 信号肽的 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 相比, PHB 产量提高 1.1 倍, 胞内含量增加 0.9 倍; 与只过表达 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 相比, PHB 产量提高 1.5 倍, 胞内含量增加 1.4 倍。基于在摇瓶的发酵结果, 可以初步推断, *Ncgl* 信号肽和 *porB* 细胞膜表面展示蛋白共表达能够进一步提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力。分析造成这一结果的原因是由于 *Ncgl* 信号肽和 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的共表达在提高 PHA 合酶稳定性的同时, 在一定程度上通过增加 *phaC* 基因的拷贝数增加了 PHA 合酶的表达量, 从而进一步促进 PHB 的合成。

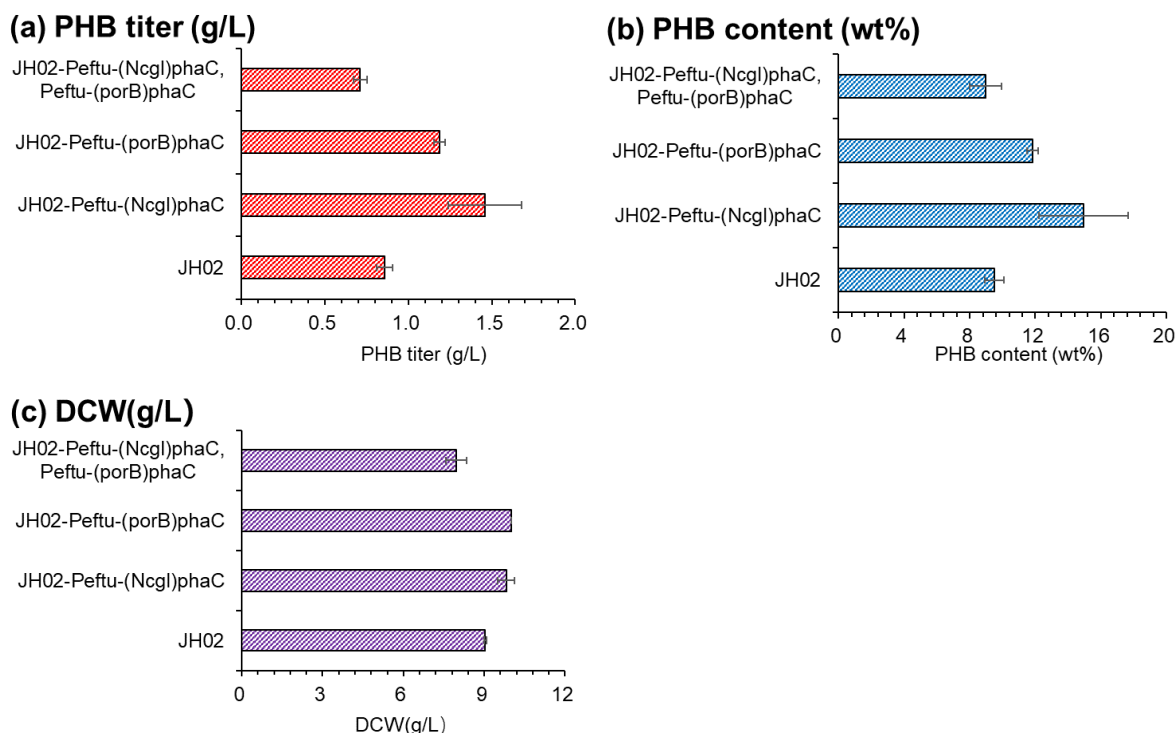


图 2.6 *Ncgl* 信号肽与 *porB* 细胞膜表面展示蛋白共表达提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力

Fig. 2.6 Co-expression of *Ncgl* signal peptide and *porB* cell membrane surface display protein improves PHB synthesis in *C. glutamicum*: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L) 发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行, 所用培养基为 PHB 发酵培养基, 具体成分如材料与与方法所示, 菌株培养在温度为 30 °C, 转速为 200 rpm 的摇床中, 过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

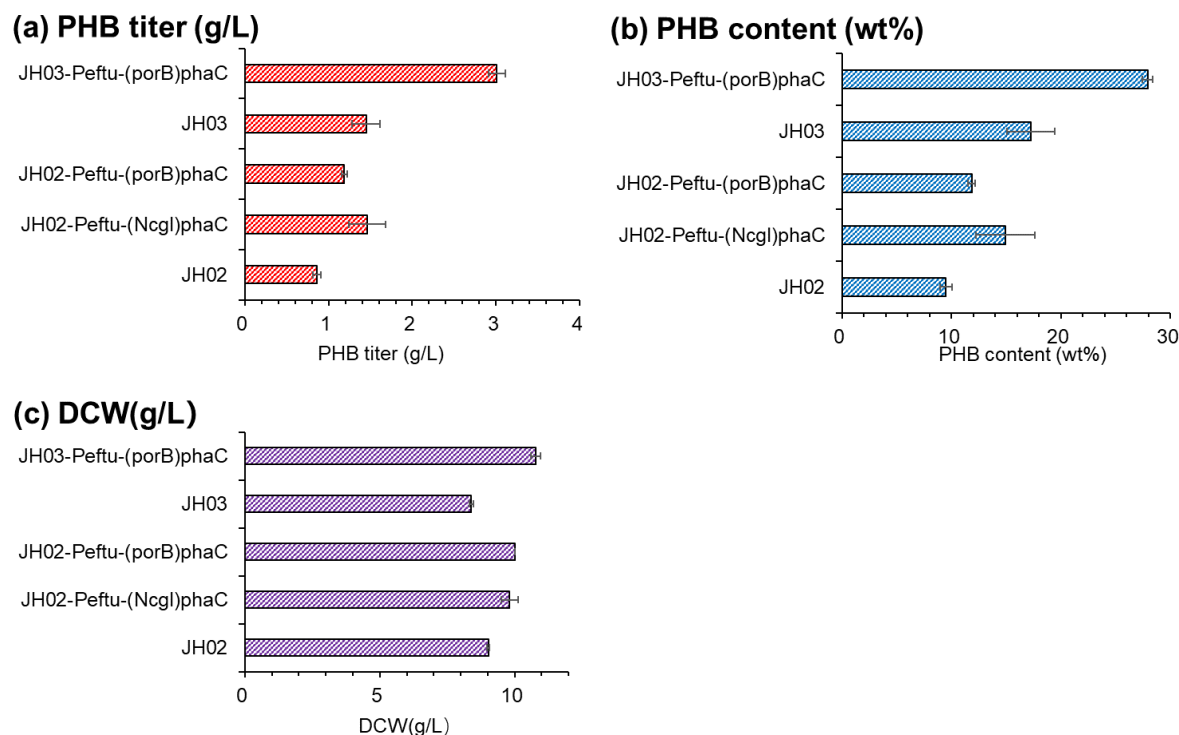


图 2.7 *Ncgl* 信号肽与 *porB* 细胞膜表面展示蛋白共表达提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力

Fig. 2.7 Co-expression of *Ncgl* signal peptide and *porB* cell membrane surface display protein improves PHB synthesis in *C. glutamicum*: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L) 发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行, 所用培养基为 PHB 发酵培养基, 具体成分如材料与方法所示, 菌株培养在温度为 30 °C, 转速为 200 rpm 的摇床中, 过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

2.3.4 探究 PHB 结合蛋白 *phaP* 对 *C. glutamicum* JH02 产 PHB 能力影响

在天然的 PHB 生产菌株中存在一种促进 PHB 颗粒成熟的 PHB 结合蛋白 *phaP*, 该蛋白由 *phaP* 基因编码, 相关文献报道, *phaP* 蛋白是一类大小在 14-28 kDa 之间的蛋白质, 可以包裹在 PHB 颗粒的疏水核心表面, 从而形成一个小小的 PHB 颗粒^[80]。相关研究表明, *phaP* 基因可以通过调节 PHB 颗粒的表面积与体积之比来降低 PHB 颗粒的尺寸从而起到对菌体的保护作用, 并且可以通过与 PHA 合酶相互作用, 引起构象的变化, 从而促进 PHB 的合成^[81,82]。目前已经有相关文献报道, 在改造的能够合成 PHB 的大肠杆菌中表达 *phaP* 基因能够促进细胞生长和胞内 PHB 的积累^[83]。

因此本论文选用了来自 *R. eutropha* H16 中的 *phaP* 基因, 用 *Peftumob* 质粒在 *C. glutamicum* JH02 中进行表达, 得到过表达 *phaP* 基因的改造菌株 JH02-*Peftu-phaP*。将其与含有空载质粒的 JH02 进行发酵对比。结果如图 2.8 所示, 重组菌株 JH02-*Peftu-phaP* 与原始菌株 JH02 相比, PHB 产量和胞内含量没有明显的提高, 因此在谷氨酸棒状杆菌中引入 *phaP* 基因并不会提高其产 PHB 的能力。分析原因可能是, 一方面, 天然 PHB 生产菌株或经过改造的大肠杆菌胞内 PHB 含量较多, 比如经过改造的工程大肠杆菌胞内 PHB 积累量可以达到 90 wt%左右, 而谷氨酸棒状杆菌中 PHB 含量相对较少, 最大积累量也只有 40 wt%左右, 胞内还有足够的空间用于 PHB 的积累, 所以 PHB 颗粒的存在不

足以对菌体的生长造成不利影响；另一方面，在天然的 PHB 生产菌株中，*phaP* 基因的表达还受到其他基因的调控，不同菌株之间胞质内蛋白所处的微环境也有所不同，所以在谷氨酸棒状杆菌中只表达 *phaP* 基因不能使其在 PHB 生产中发挥有效的促进作用。

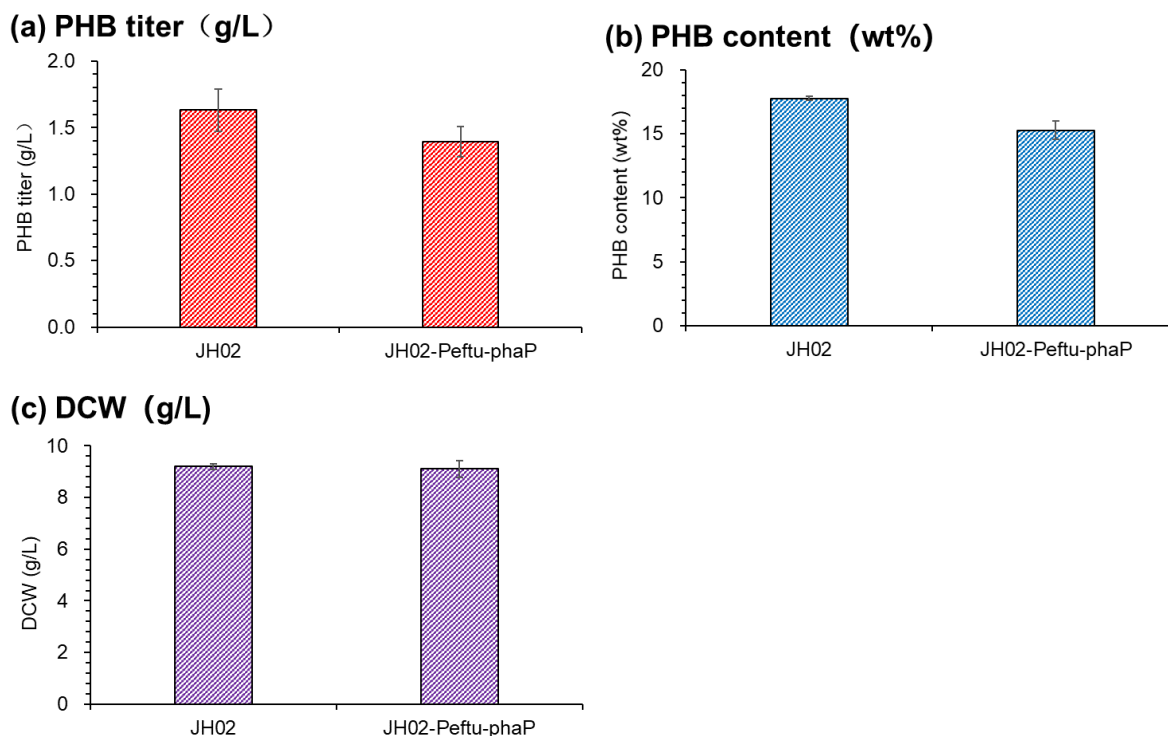


图 2.8 过表达 *phaP* 基因提高 *C. glutamicum* JH02 的 PHB 产量

Fig. 2.8 Increasing PHB titer of the *C. glutamicum* JH02 by overexpression of *phaP*: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L)

发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行，所用培养基为 PHB 发酵培养基，具体成分如材料与方法所示，菌株培养在温度为 30 °C，转速为 200 rpm 的摇床中，过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

2.3.5 弱化表达 *gltA-1* 基因提高 PHB 产量

乙酰辅酶 A 是 PHB 合成的重要前提物质，首先在 *phaA* 基因编码的 β -酮硫解酶的催化作用下生成乙酰乙酰辅酶 A，之后通过一系列反应最终聚合为 PHB。与 β -酮硫解酶竞争乙酰辅酶 A 的主要酶是柠檬酸合酶，它介导草酰乙酸和乙酰辅酶 A 的缩合反应形成柠檬酸并开始三羧酸循环。有文献报道可以通过降低柠檬酸合酶的活性或控制 *gltA* 基因的表达降低流入 TCA 循环的代谢通量，以增强所需代谢途径的代谢通量^[84,85]。

在谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* S9114 中，柠檬酸合酶具有三种形式同工酶，分别由 *gltA-1*，*gltA-2* 和 *gltA-3* 基因编码。众所周知，在绝大多数生物体中，TCA 循环是关键代谢途径，对于维持谷氨酸棒状杆菌细胞正常的生理代谢活动具有重要的作用^[86]。因此不适合对编码柠檬酸合酶的相关基因进行完全敲除。为了减少一部分碳和能量通量流入 TCA 循环，本研究选取了 *gltA-1* 基因，对其进行弱化表达。弱化表达 *gltA-1* 基因的代谢路径图如 2.9 所示。

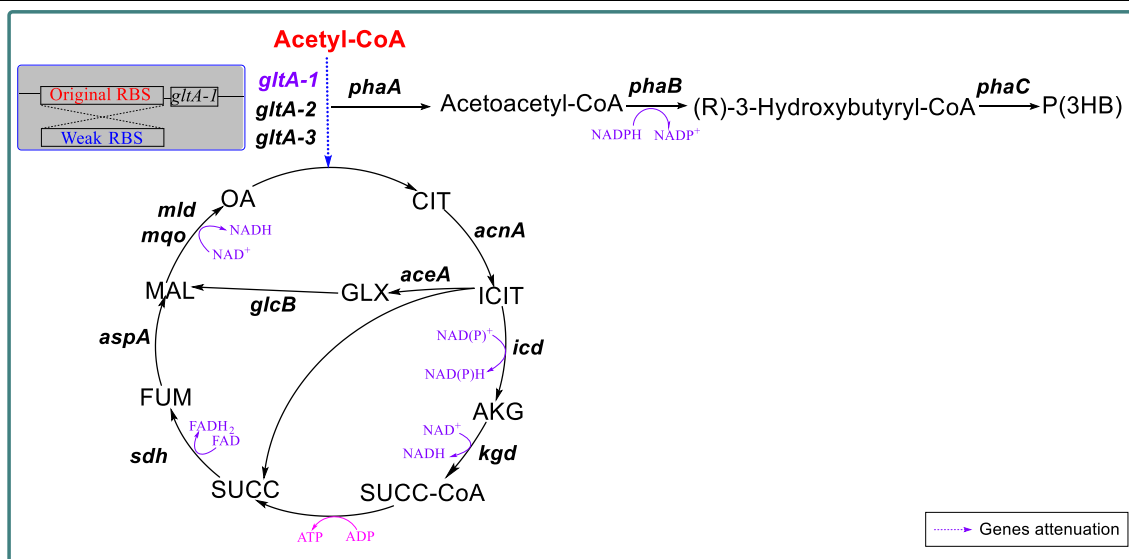


图 2.9 *C. glutamicum* JH02 中弱化表达 *gltA-1* 基因的代谢路径图

Fig. 2.9 Metabolic pathway of weakly expressed *gltA-1* gene in *C. glutamicum* JH02

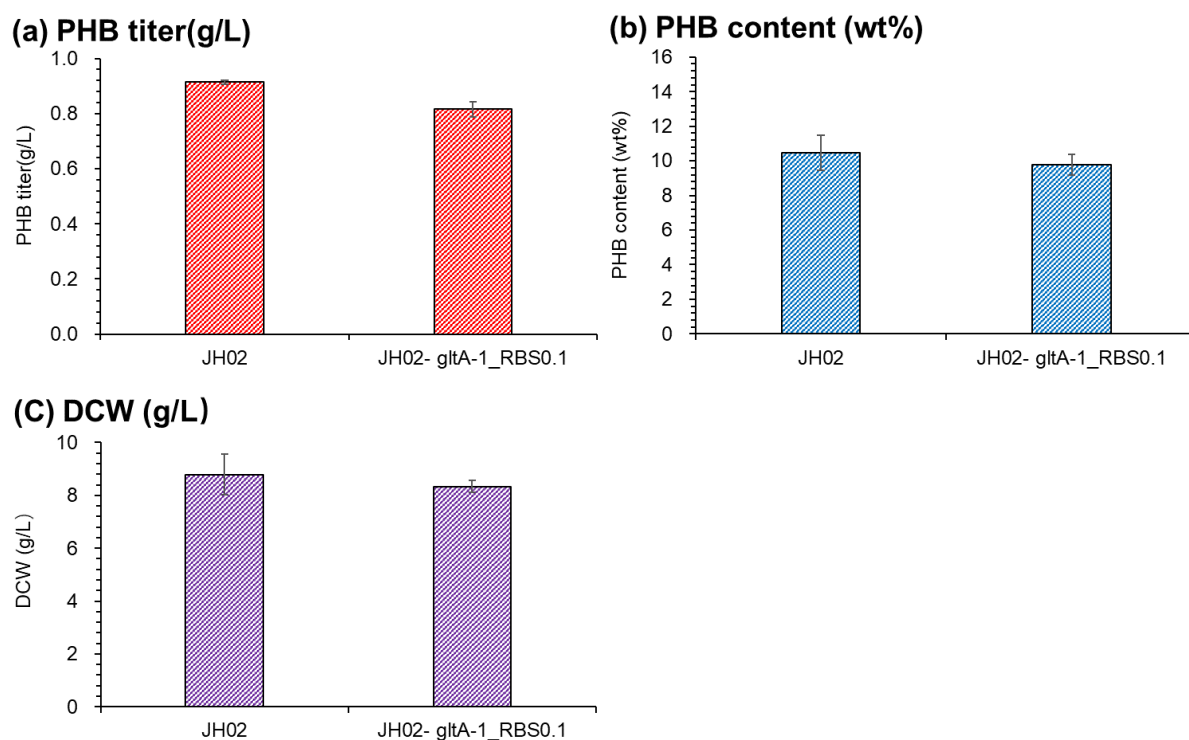


图 2.10 *C. glutamicum* JH02 中弱化表达 *gltA-1* 基因的摇瓶发酵结果

Fig. 2.10 Shake flask fermentation with weak expression of *gltA-1* gene in *C. glutamicum* JH02:

(a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L)

发酵过程在 250 mL 锥形瓶中进行，所用培养基为 PHB 发酵培养基，具体成分如材料与方法所示，菌株培养在温度为 30 °C，转速为 200 rpm 的摇床中，过程中每隔 12 h 用 5M NaOH 调节发酵液 pH 到 7.0 左右。

发酵结果如图 2.10 所示，从摇瓶发酵的结果来看，弱化表达 *gltA-1* 基因并不能有效提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力。分析原因，可能是由于：（1）谷氨酸棒状杆菌并

非天然的 PHB 生产菌株,因此碳和能量通量倾向于流向菌体自身含有的其他代谢途径,而非 PHB 的合成路径;(2) *gltA-1* 基因的弱化表达可能引起其他两个同工酶的表达量上调,单纯弱化其中一个基因不能有效减少流入 TCA 循环的代谢通量(3) 对于 PHB 代谢途径,乙酰辅酶 A 前体供应充足,但 PHB 合成路径相关酶量和酶活供应不足,从而限制了谷氨酸棒状杆菌 PHB 产量进一步提高。

2.4 本章小结

本章研究内容是在实验室之前构建的一株能够利用葡萄糖和木糖作为碳源稳定合成 PHB 的 *C. glutamicum* JH02 的基础上,通过分子生物学改造来进一步提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力,主要研究结果如下所示:

(1) 过表达细胞形态相关的基因对谷氨酸棒状杆菌细胞的生长和 PHB 积累具有一定的促进作用,但弱化表达这些基因则对 PHB 的生产没有明显的促进作用。尽管 PHB 作为一种在微生物胞内合成的聚酯,其合成受到细胞空间体积的限制,但在非天然的 PHB 生产菌株 *C. glutamicum* 中,单纯通过增大细胞体积的方式不能显著的促进胞内 PHB 的积累。

(2) 参与聚合反应的 PHA 合酶是整个 PHB 合成过程的限速步骤,该酶的活性和稳定性是影响 PHB 合成能力的关键因素。通过将 PHB 合成路径中的关键性酶(PHA 合酶)定位在细胞膜上进行表达能够显著提高 PHA 合酶的稳定性,缩短参与聚合反应的空间距离,从而促进了细胞的生长和胞内 PHB 的积累。

(3) *phaP* 基因编码的 PHB 结合蛋白,能够通过缩小 PHB 颗粒尺寸起到保护菌体的作用,也可以通过直接与 PHA 合酶相互作用来促进 PHB 的合成。但在谷氨酸棒状杆菌中,其胞内 PHB 含量有限,因此 PHB 颗粒大小不是限制 PHB 产量提高的最主要因素,并且,不同菌株之间胞质内蛋白所处的微环境也有所不同,所以只在谷氨酸棒状杆菌中表达 *phaP* 基因不能使其在 PHB 生产中发挥有效的促进作用。

(4) 利用代谢工程改造来弱化或敲除不需要的副产物途径能够让更多的碳和能量通量流向目标产物的合成路径从而促进目标产物的合成。但是本研究中单纯通过弱化表达与 β -酮硫解酶竞争乙酰辅酶 A 底物的 *gltA-1* 基因,不能有效促进 PHB 的合成。

第3章 氨氮水平(NH_4^+)对谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的影响

3.1 引言

聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 是一种以 3-羟基丁酰辅酶 A 为单体聚合而成的聚羟基烷酸酯 (PHA), 在某些微生物的次级代谢过程中产生, 该聚合物被证实是作为碳储能物质储存在微生物细胞内。

相关研究表明, 在天然的 PHB 生产菌株中, 需要在氮源限制的条件下才能合成 PHB, 但在经过改造的大肠杆菌中, PHB 的生产与生长相关联, 氮源添加量过低会影响大肠杆菌细胞正常的生长进而影响胞内积累 PHB。因此, 合适的氮源添加量在 PHB 生产过程中具有重要作用。

PHB 由于其良好的热加工性能、生物可降解性和生物相容性, 在许多领域都具有潜在的应用。调查显示, 2019 年聚羟基烷酸酯的产量达到 5,700 万美元, 预计到 2024 年其市场规模可以达到 9,800 万美元^[87]。PHB 的合成主要包括化学合成、酶催化以及生物合成法。化学或酶解合成通常需要严格控制工艺条件, 产率通常较低, 而 PHB 的胞内合成通常条件较温和, 产率更高, 而且更容易通过优化发酵条件以及培养基的成分来提高生产效率^[13]。

在上一章节中通过膜定位表达 PHA 合酶, 获得了两株与出发菌株相比, PHB 合成能力显著提高的谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 和 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(*porB*)*phaC*。但与天然的 PHB 生产菌株或经过改造的大肠杆菌 (胞内 PHB 积累量高达 80 wt%左右) 相比, 谷氨酸棒状杆菌中 PHB 含量相对较少, 胞内还有足够的空间用于 PHB 的积累。

由于通过分子生物学手段促进谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力有限, 所以本章节尝试探究氨氮水平 (NH_4^+) 对谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的影响, 包括: (1) 添加不同浓度梯度的 NH_4^+ 浓度来确定最适合 *C. glutamicum* 合成 PHB 的氨氮添加量; (2) 通过 RT-qPCR 实验探究添加合适的 NH_4^+ 浓度后 PHB 合成相关基因转录水平的变化; (3) 对谷氨酸棒状杆菌利用合成培养基合成 PHB 的分子量进行表征, 以及对胞内积累的 PHB 形态进行观测。

3.2 材料和方法

3.2.1 实验菌株、培养基和培养条件

本章节所用到的出发菌株和改造菌株均列于表 2.1。本章节所用培养基与第二章节相同，详细内容参考 2.2.1。

3.2.2 PHB 发酵过程

摇瓶发酵条件与第二章节相同，详细内容参考 2.2.7。

生物反应器发酵：为了放大发酵生产 PHB 的规模，以及更好的调控发酵过程中的 pH、温度和通气量等发酵参数，选择在实验室利用 3 L 罐（Biotech-3BG-4, Baoxing Co., China）进行罐上发酵。

[1] 批发酵：挑取平板上目的菌株的单菌落接种到含有 10 mL PHB 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶，在 30 °C，200 rpm 的恒温摇床培养 12 h，完成一级种子液扩培。之后按照 10%接种量接种到含有 80 mL PHB 发酵培养基的摇瓶中，在 30 °C，200 rpm 的恒温摇床继续培养 12 h，完成二级种子液扩培。一开始，先将 800 mL 合成培养基或麦秆水解液加入到灭过菌的 3 L 罐中，并加入 1 mL 消泡剂之后开启搅拌，将转速设置到 600 rpm，将温度控制系统设置为 30 °C，pH 设置为 7.0。待温度升到 30 °C 时，将培养好的 80 mL 种子液加到培养基中，将通气量调到 1.4 VVM，最后打开酸碱蠕动泵，通过发酵罐的自动控制系统调节发酵体系 pH 维持在 7.0。

[2] 补料批发酵：种子液培养方式及发酵一开始发酵罐的系统设置均与上述批发酵过程相同。发酵过程中每隔 24 h 取样测定发酵液中残糖浓度和 PHB 含量。当糖浓度降到 40 g/L 以下，补加 200 mL 500 g/L 的葡萄糖母液（若发酵体系是麦秆水解液，则补加 200 mL 水解液）。

3.2.3 RT-qPCR 实验

本章节 RT-qPCR 实验所用引物均列于表 3.1。

具体实验步骤如下所示：

[1] 细胞样品收集

从长有 JH02 菌株的平板上挑取单菌落接种在含有 10 mL PHB 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中进行一级种子液培养，在摇床中培养 12 h，培养条件为 30 °C，200 rpm。接下来，将培养好的一级种子液按照 10%的接种量接种到含有 80 mL PHB 发酵培养基的锥形瓶中进行二级种子液扩培，继续在摇床中培养 12 h 后完成种子液培养。将培养好的种子液接种到 800 mL 的合成培养基中，对照组所用培养基为 CGXII-NL，发酵过程中用 NaOH 调节 pH，实验组所用培养基为 CGXII-NR，发酵过程中用 25%的氨水调节 pH，整个发酵过程在 3 L 罐上进行，发酵条件设置为 600 rpm，发酵温度 30 °C，pH 维持在 7.0。在发酵过程中的 6 h，8 h，10 h 和 12 h 从发酵罐中取出 30 mL 发酵液，置于 50 mL 离心管中，在预冷的 4 °C 的离心机中，8,000 rpm 下离心 10 min。离心后弃去上清，并立即放到液氮中速冻菌体，将冷冻后收集的菌体储存在 -80 °C 冰箱中备用。

[2] RNA 的提取和逆转录

用液氮冷却研钵，将菌体从-80 °C冰箱中拿出，利用研磨棒将冻干的菌体从离心管敲到研钵中，加入液氮，反复研磨三次。将研碎的菌体放置到事先加入 1 mL Trizol 的 1.5 mL 离心管中，上下颠倒混合均匀，在室温下放置 5 min。在预冷至 4 °C的离心机中 12,000 g 离心 5 min，小心将上清液转移到新的 1.5 mL 的离心管中，加入氯仿（加入量为 RNAiso Plus 的 1/5），用震荡仪持续震荡 15 s 使其充分混合均匀。待溶液混合均匀后，室温静置 5 min，在预冷至 4 °C的离心机中 12,000 rpm 离心 15 min，用移液枪小心吸取上清至新的离心管中，切记不要吸到沉淀。加入与上清液等体积的异丙醇溶液到装有上层清液的离心管中，室温下放置 10 min，然后在事先预冷至 4 °C的离心机中 12,000 rpm 离心 10 min，把上层清液小心去除。向离心管中加入 1 mL 75%的乙醇溶液使菌体悬浮，并用手轻轻上下颠倒混匀，清洗沉淀，在预冷至 4 °C的离心机中 12,000 rpm 离心 5 min，小心地倒掉上清，保留沉淀。将离心管倒置在卫生纸上，室温干燥菌体，加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀，得到提取的 RNA。NanoDrop ND-1000 分光光度计测定提取到的 RNA 样品在 OD260nm 和 OD280nm 下的吸光值，以确定 RNA 样品的浓度和纯度。

将提取的 RNA 用 RNase-free 水稀释至 500 µg/mL 左右，然后用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 和 gDNA Remover 试剂盒（TOYOBO, Osaka, Japan）逆转录获得 cDNA，并将其作为模板用于后续的 RT-qPCR 实验。

[3] RT-qPCR 实验

实验所用引物均用 Prime Prime5 软件设计，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，相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。相对表达量上调倍数大于等于 2.0，认为是表达量显著上调的基因，下调倍数小于等于 0.5 的基因，认为是表达量发生显著下调的基因。RT-qPCR 的反应程序为：95 °C预变性 1min，之后 95 °C反应 15 s，55 °C反应 15 s，72 °C反应 30 s，在这 3 个反应条件下循环 40 次。

表 3.1 RT-qPCR 所用引物

Table 3.1 primers used for RT-qPCR

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	AAGGTCTTGTGGCCGAACTGG
<i>glpX-1</i>	CGS9114_RS07495	CCGCATTACAGGTTCGGTGGG	CGGATGGCCTTCGGTGTCACT
<i>glpX-2</i>	CGS9114_RS09660	CCTGAGGCCGCGAGGCAAGAT	TGGCGAGGACGGTCAAGCAC
<i>glpX-3</i>	CGS9114_RS12820	GTCGCAGGCGTTCCTGAAGCG	ACCAATAATCTGAGCCCTGGGTGAA
<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-1</i>	CGS9114_RS13495	TCCCAACTGACTTCTTACCCTATT	CGTGGGCGGTTGATCTTGTT
<i>gltA-2</i>	CGS9114_RS13295	CACGGAGGTGCCAATGAGTTTG	TCCCATGATGCGTTCCTTACGAT
<i>gltA-3</i>	CGS9114_RS02690	GGTTTGATCTCCCTGATCCACTCTT	ACATCCATCGGGTGGGCTTCT
<i>acnA</i>	CGS9114_RS06610	CACGAGTCCCTGGGCCTTGA	CGTCGCCGTTCTCCTTGGTT
<i>icd</i>	CGS9114_RS02730	CTTCGCACCAGTTGCAGAAGCA	CTCATCGTTTGGAGCGTAGTAGCC
<i>kgd</i>	CGS9114_RS03450	AAAGATGCGCCGCGTTTCCC	CGTCGATAAGCTGCTTCTCCTCC
<i>sdh-1</i>	CGS9114_RS04930	CACCTGTCTCACGGCATCTGGC	CAGCGATGGCGAACGGAATG
<i>sdh-2</i>	CGS9114_RS04935	CGAAGATGGCGAAGCAGAACG	GCGGAGACGAAGCACCAGTTTT
<i>sdh-3</i>	CGS9114_RS04940	CGAAGGCGACACCCTCAAGATC	TGTTCCATGACGCGGTCCAGT
<i>aspA</i>	CGS9114_RS09635	AGACCGCTACCCAGGTTTCCG	AAGCACGTTGCGAGCCATCA
<i>mgo</i>	CGS9114_RS11385	CGGGCAGCGTGTTCAAGTTA	CGAGCAATCCGGCGATAGTG
<i>mld</i>	CGS9114_RS08765	CGCCGCAGATGACATTCGTG	CATTGGTGTTCGCTGGGTTTCC
<i>aceA</i>	CGS9114_RS09005	GCTGCTGTCCTACAACCTGCTCCC	GCCCATTGCGCCGAGTTCCT

<i>glcB</i>	CGS9114_RS09010	ACCATTCCAACCGCACCAAA	GTGTTCAACCCAGCGCACAAC
<i>gdh-1</i>	CGS9114_RS07420	TCCATCTGGGATCTCAAGTGCG	ACGGAAGACCTCAACAGCCTCA
<i>gdh-2</i>	CGS9114_RS12025	GTAGTCGCCGCAGCATTTCGC	AGTTGCCCTTGCCGCTTCGTG
<i>zwf</i>	CGS9114_RS06460	TCGCCGTGTTACTGAGATTGCC	CTTGGAACCGAAGCGGATGA
<i>pgl</i>	CGS9114_RS06450	CCCTTCCTGCGGTTCACTCC	AGCATCATCAGCCAAGAACAATACC
<i>gndA</i>	CGS9114_RS07055	CCCAGTGTTCGCTTCCTCCTTG	CCATCCTTGTCGATGCGCTTGT
<i>rpe</i>	CGS9114_RS06360	GATCGACGGCGGCATCAGCT	GCAACTCCTGGATCGCCTTGTT
<i>tkt</i>	CGS9114_RS06470	CCACCAGCCTGTTGAAACCTTG	GGGCGGTCTCATTTCGCATCT
<i>tal</i>	CGS9114_RS06465	CGGCGACACCCTGTCCAAC	CCTGGAAGACATCTGCCAAGTCAA
<i>phaA</i>	H16_RS07140	CATCTAAGCGTGCTCTGTCCCG	CCAACCCATCTGCTGGTGAAC
<i>phaB</i>	H16_RS07145	CTCTGTGAACGGTCAGAAGGGTC	TGAGCAAGTGCCATTGTGAAGC
<i>phaC</i>	H16_RS07135	GTGCGTAACATGATGGAGG	TTGTACTGAAGAAGCTGGAAG

3.2.4 胞内 PHB 产物定量测定

PHB 产量测定方法与第二章节相同，详细内容参考 2.2.5。

3.2.5 PHB 得率计算

PHB 得率计算公式与第二章节相同，详细内容参考 2.2.6。

3.2.6 检测方法

检测方法与第二章相同，详细内容参考 2.2.8。

3.2.7 PHB 聚合物的提取及 GPC 测定

从长有实验菌株的平板上挑取单菌落接种在含有 10 mL PHB 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中进行一级种子液培养，在摇床中培养 12 h，培养条件为 30 °C，200 rpm。接下来，将培养好的一级种子液按照 10% 的接种量接种到含有 80 mL PHB 发酵培养基的锥形瓶中进行二级种子液扩培，继续在摇床中培养 12 h 后完成种子液培养。将培养好的种子液加入到 800 mL CGXII-NR 培养基中，在 3 L 发酵罐中进行培养，设置发酵条件为 30 °C，600 rpm，利用 2 M 硫酸和 25% 氨水作为 pH 调节剂使发酵过程中的 pH 维持在 7.0。96 h 后收集 10 mL 发酵液于 50 mL 离心管中，8,000 rpm 离心十分钟，倒掉上清后加入 5 mL 去离子水重悬细胞，再将去离子水补足至 30 mL，8,000 rpm，离心 10 min 清洗细胞，清洗细胞两次，将最后收集到的细胞置于真空冷冻干燥机中干燥 48 h。称取 0.03 g 左右干燥细胞，放置在酯化管内，加入 3 mL 氯仿，在 100 °C 的恒温加热器中反应 4 h。此时 PHB 已溶解到氯仿中，利用 0.22 μm 孔径的滤头过滤，得到的样品送科学指南公司通过凝胶渗透色谱以氯仿为流动相在 42 °C，流速 1 mL/min 条件下测定所提取 PHB 的分子量和分子量分布。

3.3 结果与讨论

3.3.1 探究适合谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的 NH_4^+ 添加量

PHB 是部分微生物在碳源过量的条件下合成的，用于储存能量的物质，有文献报道通过添加适量的氮源能够有效促进 PHB 的积累^[88]。因此为了探究氨氮水平 (NH_4^+) 对 PHB 生产的影响，以 *C. glutamicum* JH02 作为实验菌株进行了一系列发酵实验。由于摇瓶发酵实验对发酵过程中 pH、溶氧等条件调控能力有限，为了给菌株合成 PHB 提供最适的生长条件，使其充分发挥 PHB 合成的潜力，所以本章节所有的发酵实验在 3 L 罐中进行。在一开始的上罐实验中，*C. glutamicum* JH02 分别在限制氮源的培养基和富含氮源的培养基进行发酵实验；为了进一步补充氮源，将常用的 pH 调节剂 5 M NaOH 替换成了 25% 的氨水。结果如图 3.1 所示，随着 NH_4^+ 添加量的增加，PHB 产量，胞内 PHB 含量，菌体干重以及 PHB 得率都有大幅度增加。对该实验现象进行合理推测，经过改造的谷氨酸棒状杆菌只有当氮源充足时，菌体生长状况良好，细胞活力才能增强，这些具有 PHB 积累潜力的细胞才能在胞内积累更多的 PHB，获得更高的 PHB 产量。该结果初步证明，氨氮 (NH_4^+) 的添加对谷氨酸棒状杆菌积累 PHB 具有重要的影响。

为了进一步探究最适合 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB 的氨氮添加量，选取了 5 个不同浓度梯度的 NH_4^+ 浓度添加量，分别为 2 g/L，8 g/L，40 g/L，45 g/L 和 50 g/L。为

为了实现细胞的高密度培养，本实验采用的发酵方式为补料批发酵，整个发酵过程在 3 L 罐上进行。为了使菌体始终维持在一个相对均衡的 NH_4^+ 浓度条件下，防止氮源一次性加入过多给菌体的正常生长带来不良影响， NH_4^+ 并不是一性加入到初始培养基中，而是在发酵过程中从 48 h 开始每隔 24 h 补加一定浓度硫酸铵以及通过氨水调节 pH 的方式逐渐加入到发酵体系中。

发酵结果如图 3.2 所示，当 NH_4^+ 添加浓度为 45 g/L 时最适合 *C. glutamicum* JH02 进行 PHB 的生产，获得了最高的 PHB 产量和胞内含量。对实验结果进行分析，当培养基中氮源浓度过少时，无法满足菌体正常生长所需氮源，导致菌浓过低，菌体活性差，无法合成 PHB；当培养基中氮源浓度过高，菌体生长过于旺盛，碳源多用于满足菌体正常的能量消耗和其他副产物的合成，导致没有多余的碳源用于积累 PHB。综上所述，合适的氨氮 (NH_4^+) 添加量，在谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的过程中具有至关重要的作用。

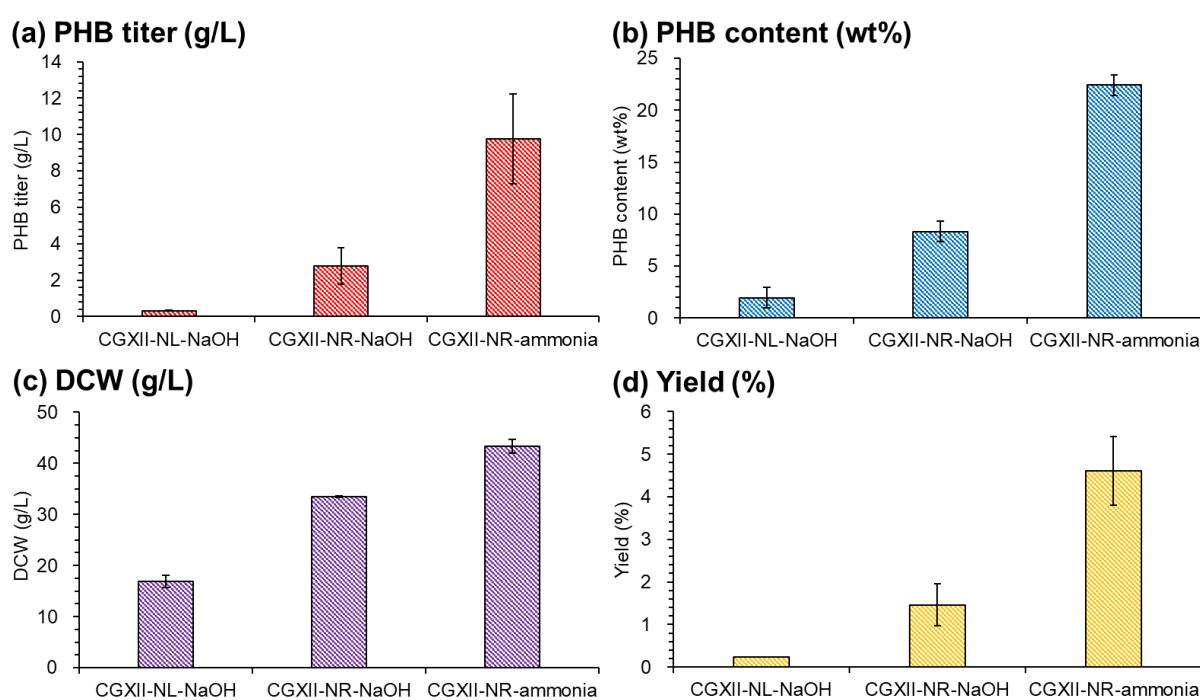


图 3.1 不同氨氮 (NH_4^+) 条件下 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB 能力对比

Fig. 3.1 Comparison of PHB synthesis capacity of *C. glutamicum* JH02 under different NH_4^+ addition: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) Yield (%)

CGXII-NL-NaOH: 表示在限制氮源的 CGXII-NL 培养基中进行发酵，过程中用 NaOH 调节 pH；
 CGXII-NR-NaOH: 表示在初始氮源充足的 CGXII-NR 培养基中进行发酵，过程中用 NaOH 调节 pH；
 CGXII-NR-ammonin: 表示在初始氮源充足的 CGXII-NR 培养基中进行发酵，过程中用 25% 氨水调节 pH。发酵在 3 L 罐上进行，发酵温度 30 °C，搅拌转速 600 rpm，通气量 1.4 VVM，过程中检测溶氧变化，发酵后期如果气泡太多，为了防止喷罐可适当降低通气量，通过酸碱泵自动添加 2 M H_2SO_4 和 NaOH（或 25% 氨水）调节 pH 维持在 7.0，在 3 L 罐上整个发酵过程持续 96 h，从发酵的 24 h 开始每间隔 24h 补加 200 mL 体积的 500 g/L 的葡萄糖母液。

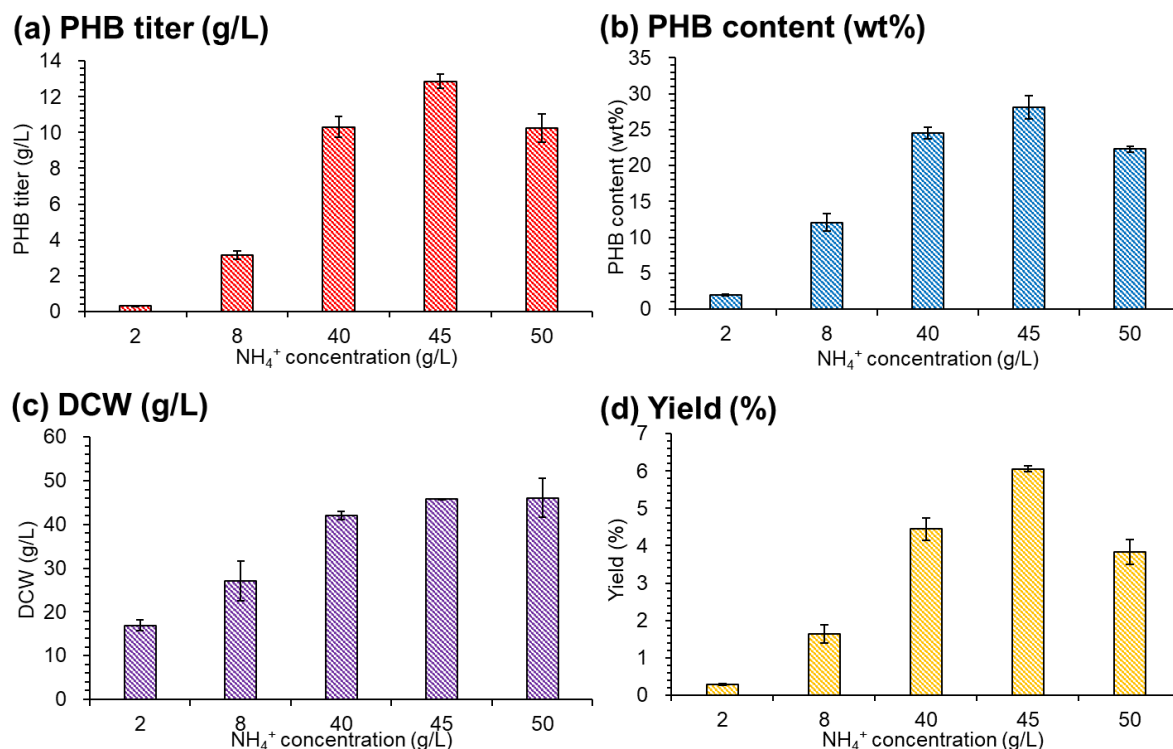


图 3.2 探究 *C. glutamicum* JH02 合成 PHB 的最适 NH₄⁺添加量

Fig. 3.2 Investigating suitable NH₄⁺ concentration for *C. glutamicum* JH02 PHB production: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) Yield (%)

NH₄⁺ 浓度添加量为 2 g/L 使用的是 CGXII-NL-NaOH 培养基；NH₄⁺ 浓度添加量为 8 g/L 使用的是 CGXII-NR-NaOH 培养基；其他三组实验使用的是富含氮源的 CGXII-NR 培养基，用 25% 的氨水调节 pH，同时从 48 h 开始，每隔 24 h 分别向发酵液体系中补加 2.5 g/L、5 g/L 和 10 g/L 硫酸铵。发酵在 3 L 罐上进行，发酵温度 30 °C，搅拌转速 600 rpm，通气量 1.4 VVM，过程中检测溶氧变化，发酵后期如果气泡太多，为了防止喷罐可适当降低通气量，通过酸碱泵自动添加 2 M H₂SO₄ 和 NaOH（或 25% 氨水）调节 pH 维持在 7.0，在 3 L 罐上整个发酵过程持续 96 h，从发酵的 24 h 开始每间隔 24h 补加 200 mL 体积的 500 g/L 的葡萄糖母液。

值得注意的是，在上面的 5 组不同浓度梯度的 NH₄⁺添加量的实验中，为了使前两组实验维持在较低的氨氮（NH₄⁺）添加量的水平上，使用的 pH 中和剂是氢氧化钠，其他三组实验使用的 pH 中和剂是 25% 的氨水。氢氧化钠在作为 pH 调节剂加入发酵液的同时，也会往发酵体系中引入大量的金属离子钠离子，而钠离子对于维持细胞外液的渗透压具有十分重要的作用。为了排除由于钠离子的添加量过高给菌体正常生长和 PHB 生产造成了影响，本论文还检测了不同 pH 中和剂对于发酵结果的影响。结果如图 3.3 所示，分析实验结果可以明显的看出，不管是用 NaOH 作为 pH 调节剂还是用 KOH 作为 pH 调节剂，最终发酵获得的 PHB 产量、含量、菌体干重以及 PHB 的得率都远低于氨水作为 pH 调节剂时。这就排除了金属钠离子对菌体生长和 PHB 生产的抑制，因此 PHB 合成能力提高的原因则主要归功于用氨水调节 pH 时向发酵体系中添加了氨氮（NH₄⁺），该实验结果进一步说明了充足的氨氮（NH₄⁺）对于谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的重要性。

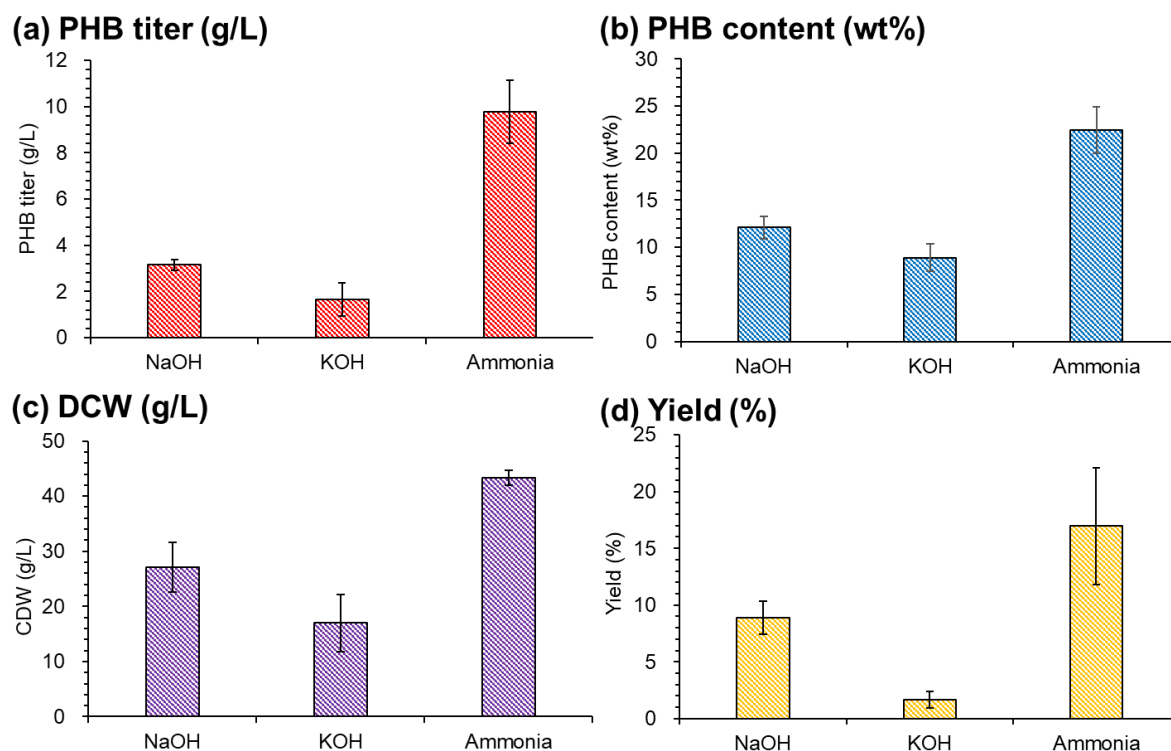


图 3.3 验证不同 pH 调节剂对 PHB 生产的影响

Fig. 3.3 Test the effect of different pH adjusters on PHB production: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) Yield (%)

本实验所用培养基为富含氮源的 CGXII-NR 培养基，具体成分如材料和方法所示。发酵在 3 L 罐上进行，发酵温度 30 °C，搅拌转速 600 rpm，通气量 1.4 VVM，过程中检测溶氧变化，发酵后期如果气泡太多，为了防止喷罐可适当降低通气量，三组实验在发酵过程中分别用 NaOH、KOH 和 25%氨水作为 pH 调节剂，调节 pH 维持在 7.0，在 3 L 罐上整个发酵过程持续 96 h，从发酵的 24 h 开始每间隔 24h 补加 200 mL 体积的 500 g/L 的葡萄糖母液。

为了进一步研究补加适量氨氮 (NH_4^+) 能够提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 能力的机制，我们以 NH_4^+ 添加浓度为 2 g/L 的限氮条件作为对照组，以最适 NH_4^+ 添加浓度 45 g/L 条件作为实验组，通过 RT-qPCR 实验鉴定补充合适的氨氮使 *C. glutamicum* JH02 菌体内相关基因的表达水平发生了哪些变化。结果如图 3.4 所示，与对照组相比，实验组基因转录水平的变化主要集中在三个方面：①TCA 循环和 EMP 途径中的大部分基因转录水平都明显上调，该结果说明补充适量氨氮有利于物质代谢和能量代谢相关基因的表达，使细胞的生长状况变好，这从实验组的菌体干重中也可以看出；②与 NADPH 再生相关基因的表达量显著上调，TCA 循环和 EMP 途径中催化 NADPH 再生的相关基因表现出普遍上调的现象，催化 6-磷酸葡萄糖合成 5-磷酸核酮糖途径中与 NADPH 再生相关的 *zwf* 基因也发生了显著上调。由于 PHB 合成过程中，*phaB* 基因编码的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶在将乙酰乙酰辅酶 A 还原为 (R)-3 羟基丁酰辅酶 A 时也需要辅酶 NADPH 提供还原力，因此可以推测补加氨氮增加了胞内 NADPH 的再生，这有助于为乙酰乙酰辅酶 A 还原酶提供更多的还原力，从而促进了 PHB 的合成；③PHB 合成路径中的三个主要基因 *phaA*、*phaB* 和 *phaC* 的表达量显著上调，尤其是参与 PHB 合成第一步反应的

phaA 基因的转录水平有大幅度的提高,这在一定程度上促使前体乙酰辅酶 A 更多的流入了 PHB 合成路径,为 PHB 的合成提供了充足的前体物质。该现象说明补充氨氮(NH₄⁺)通过促进 PHB 合成相关基因的表达,促进 PHB 的生产。

综上所述,RT-qPCR 实验证明补加氨氮(NH₄⁺)不仅提高谷氨酸棒状杆菌的物质代谢和能量代谢,更重要的是通过促进辅酶 NADPH 再生以及 PHB 合成相关基因的表达,提高了菌体胞内合成 PHB 的能力。

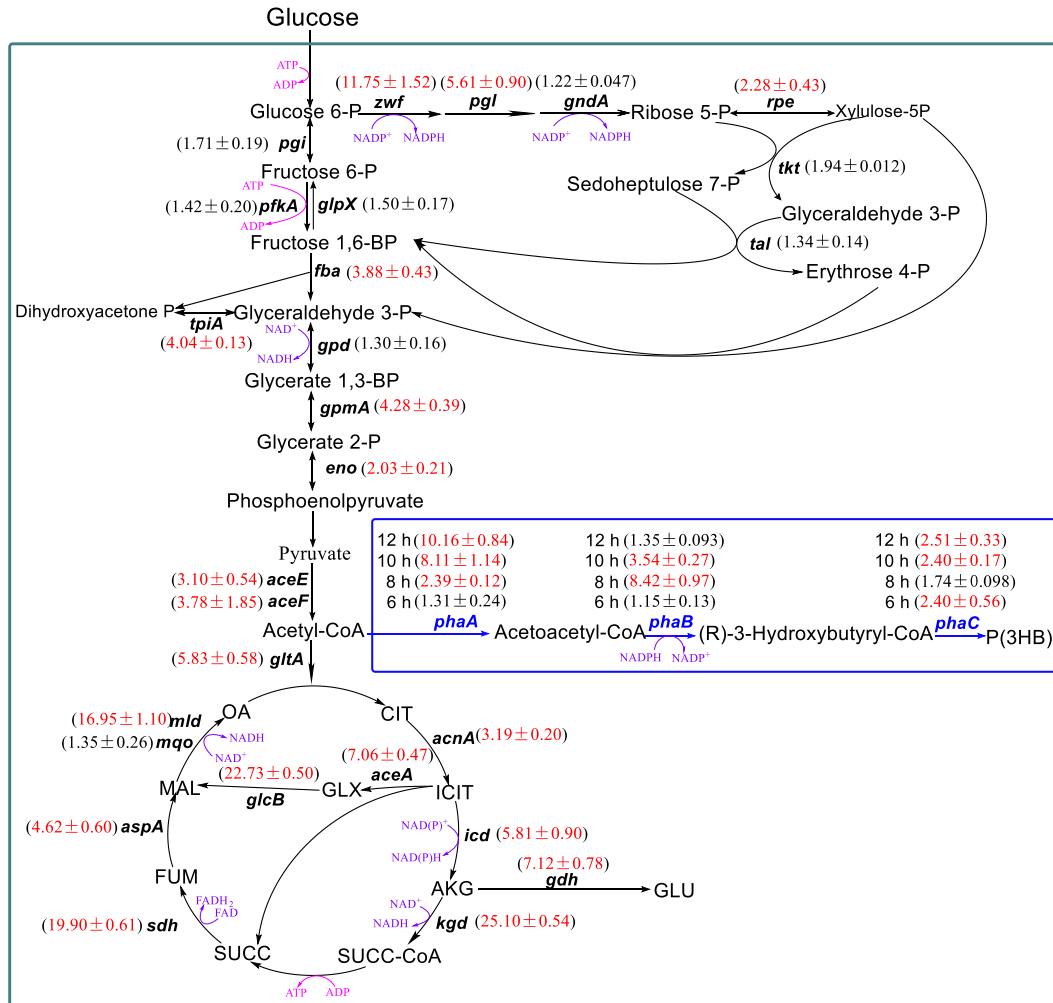


图 3.4 实时荧光定量 PCR 实验分析补加氨氮条件下 *C. glutamicum* JH02 的基因转录水平^[89]

Fig. 3.4 Gene transcript levels of *C. glutamicum* JH02 under supplemental ammonia nitrogen conditions by RT-qPCR

对照组使用限氮培养基 CGXII-NL, 实验组使用富含氮源培养基 CGXII-NR, 具体成分如材料和方法所示。在 3 L 罐上培养菌体并在 6 h, 8 h, 10 h 和 12 h 收集细胞, 发酵温度为 30 °C, 搅拌转速 600 rpm, 通气量 1.4 VVM, 过程中检测溶氧变化, 发酵后期如果气泡太多, 为了防止喷罐可适当降低通气量, pH 保持在 7.0。红色表示基因表达量发生显著上调, 黑色表示基因表达量无明显变化。Zwf, 编码 6-磷酸葡萄糖脱氢酶; *pgl*, 编码 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶; *rpe*, 编码 5-磷酸核酮糖异构酶; *gndA*, 编码磷酸葡萄糖酸脱氢酶; *pgi*, 编码 6-磷酸葡萄糖异构酶; *pfkA*, 编码-磷酸果糖激酶, *glpX*, 编码果糖 1,6-二磷酸酯酶; *fba*, 编码果糖 1,6-二磷酸醛缩酶; *tpiA*, 编码磷酸丙糖异构酶; *gpd*, 编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶; *gpmA*, 编码磷酸甘油酸变位酶; *eno*, 编码磷酸丙酮酸水合

酶; *aceE*, 编码丙酮酸脱氢酶; *aceF*, 编码二氢硫辛酰转乙酰基酶; *gltA*, 编码柠檬酸合酶; *acnA*, 编码乌头酸水合酶; *icd*, 编码异柠檬酸脱氢酶; *glcB*, 编码苹果酸合酶; *gdh*, 编码谷氨酸脱氢酶; *tkt*, 编码转酮醇酶; *tal*, 编码转醛醇酶; *aceA*, 编码异柠檬酸裂解酶; *kgd*, 编码 α -酮戊二酸脱羧酶; *sdh*, 编码琥珀酸脱氢酶; *aspA*, 编码天冬氨酸裂解酶; *mgo*, 编码苹果酸:醌氧化还原酶; *mld*, 编码苹果酸脱氢酶; *phaA*, 编码 β -酮硫解酶; *phaB*, 编码乙酰乙酰辅酶 A 还原酶; *phaC*, 编码 PHA 合酶; CIT, 柠檬酸; ICIT, 异柠檬酸; AKG, α -酮戊二酸; GIU, 谷氨酸; SUCC-CoA, 琥珀酰-CoA; SUCC, 琥珀酸; FUM, 延胡索酸; Mal, 苹果酸; OA, 草酰乙酸; P(3HB), 聚(3-羟基丁酸)。

3.3.2 比较构建的改造菌株在 3 L 罐上利用合成培养基生产 PHB 能力

为了检验改造菌株在最适氨氮添加条件下生产 PHB 的能力, 本实验将上一节 2.3.2 获得的两株 PHB 合成能力显著提高的重组菌株 JH02-*Peftu-(Ncgl)phaC* 和 JH02-*Peftu-(porB)phaC* 在补料批发酵的模式下利用合成培养基生产 PHB, 并与原始菌株 JH02-*Peftumob* 进行对比。发酵结果如图 3.5 所示, 从菌体干重可以看出, 三株菌株在细胞生长状况方面差异不大; 从葡萄糖的消耗速率来看, 重组菌株与对照菌株相比, 糖利用速率也没有明显的变化; 从合成 PHB 的能力来看, 两株重组菌株的 PHB 产量和含量都有明显的提高。对照菌株 JH02-*Peftumob* 的胞内 PHB 含量和 PHB 产量分别为 28.1 wt%, 12.9 g/L; 融合 *Ncgl* 信号肽的改造菌株 JH02-*Peftu-(Ncgl)phaC* 的胞内 PHB 含量和 PHB 产量分别为 32.0 wt%, 15.1 g/L, 与对照菌株相比分别提高了 14.2%和 17.1%; 融合 *porB* 信号肽的改造菌株 JH02-*Peftu-(porB)phaC* 的胞内 PHB 含量和 PHB 产量分别为 32.0 wt%, 15.5 g/L, 与对照菌株相比分别提高了 14.2%和 20.0%。

综上所述, 两株重组菌株的胞内 PHB 含量和产量与对照菌株相比都有明显的提高。但是, 相较于摇瓶发酵结果, 提升幅度较小, 分析原因可能是由于, 在探究谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的最适 NH_4^+ 添加量和发酵条件时, 是以 JH02 作为实验菌株的, 这就导致最终得到的实验条件可能并非是改造菌株最适宜的 NH_4^+ 添加量和发酵策略, 从而在一定程度上缩小了差距。与目前已发表文献当中报道的利用谷氨酸棒状杆菌生产 PHB 的结果进行对比, 如表 3.2 所示, 本研究获得了在合成培养基中生产 PHB 的最高指标。



图 3.5 改造菌株利用合成培养基生产 PHB 的能力

Fig. 3.5 The ability of the constructed strains to produce PHB using synthetic media (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) Glucose (g/L)

富含氮源培养基 CGXII-NR 如材料和方法所示。在 3 L 罐上进行补料批发酵，发酵温度为 30 °C，搅拌转速 600 rpm，通气量 1.4 VVM，过程中检测溶氧变化，发酵后期如果气泡太多，为了防止喷罐可适当降低通气量，通过酸碱泵自动添加 2 M H₂SO₄ 和 25% 氨水使 pH 保持在 7.0。在 3 L 罐上整个发酵过程持续 96 h，从发酵的 24 h 开始每间隔 24 h 补加 200 mL 体积的 500 g/L 的葡萄糖母液；从发酵的 48 h 开始每隔 24 h 补加一定体积 400 g/L 的 (NH₄)₂SO₄ 母液使发酵液体系中 (NH₄)₂SO₄ 终浓度达到 5 g/L。

表 3.2 目前已报道的谷氨酸棒状杆菌利用合成培养基发酵生产 PHB 的结果汇总^[89]

Table 3.2 Summary of the reported results of PHB production by *Corynebacterium glutamicum* using synthetic media

Feedstock	Titer (g/L)	Content (wt%)	Yield (mg/g glucose)	Sources
Glucose	2.8	22.5	47	[58]
Glucose	-	52.5	-	[21]
Glucose	0.2	2.2	3	[59]
Glucose	1.0	12.1	13	[59]
Starch	-	36.0	-	[90]
Glucose	1.7	19.0	28	[91]
Glucose	1.4	6.4	9	[92]
Glucose	15.5	32.0	64	This study

3.3.3 凝胶渗透色谱仪 (GPC) 测定 PHB 分子量

PHB 作为一种高分子聚合物, 其分子量具有两个基本特点: 一是分子量大; 二是分子量并非均一而是具有一定的分散性。高分子聚合物的分子量大小通常用平均分子量和分子量分布来进行表征, 其数值通常对高分子聚合物的加工性能和物理性能具有重要影响, 因此可作为加工过程中各种工艺条件的选择依据^[93]。

本研究通过 GPC 测定了 *C. glutamicum* JH02 以及重组菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC*, JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 利用合成培养基在胞内积累的 PHB 的分子量及分子量分布。如表 3.3 所示, JH02 菌株胞内积累的 PHB 重均分子量为 24 万, 数均分子量为 12 万, 分子量分布为 2.0; 重组菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 胞内积累的 PHB 重均分子量为 25 万, 数均分子量为 15 万, 分子量分布为 1.7; 改造菌株 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 的重均分子量为 43 万, 数均分子量为 25 万, 分子量分布为 1.7。分析以上结果, 我们可以得出结论, 由于这三株菌株的分子量属于同一数量级, 我们可以认为其分子量之间没有显著性差别。因此, 通过膜定位表达 PHA 合酶的方式对 PHB 的产量有了显著提高, 但对 PHB 分子量没有负面影响。

表 3.3 不同发酵菌株胞内积累 PHB 的分子量

Table 3.3 molecular weight of PHB accumulated intracellularly by different fermentation strains

Producing strain	Titer (g/L)	content (wt%)	Mn ($\times 10^5$ g/mol)	Mw ($\times 10^5$ g/mol)	PD
JH02	12.9	28.1	1.2	2.4	2.0
JH02:Peftu-(<i>Ncgl</i>) <i>phaC</i>	15.1	32.1	1.5	2.5	1.7
JH02:Peftu-(<i>porB</i>) <i>phaC</i>	15.5	32.0	2.5	4.3	1.7

3.3.4 谷氨酸棒状杆菌胞内 PHB 形态观测

由于在 *phaC* 基因的氮端融合表达 *Ncgl* 信号肽后, 获得的重组菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 与出发菌株 JH02 相比, 其 PHB 合成能力都有明显的提高, 因此为了观察 *C. glutamicum* JH02 和 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 两株菌胞内 PHB 颗粒的形态和分布, 我们分别对两株菌体拍摄了切片电镜。结果如图 3.6 所示, 从切片电镜中我们可以观测到 JH02 菌株胞内 PHB 颗粒数量较少; 膜定位表达 PHA 合酶的改造菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 胞内 PHB 颗粒的数量明显变多, 在之前的发酵实验中, 我们发现膜定位表达 PHA 合酶的 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 改造菌株与 JH02 相比, 其胞内 PHB 含量和产量都有明显提高, 透射电子显微镜图片和之前的发酵结果都证实了膜定位表达 PHA 合酶能够促使谷氨酸棒状杆菌在胞内积累更多的 PHB 颗粒。

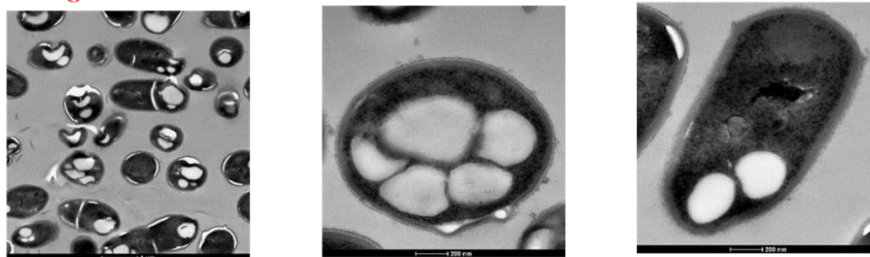
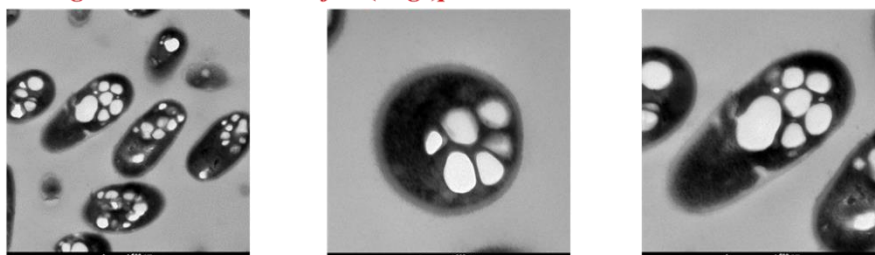
A: *C. glutamicum* JH02胞内PHB形态图片B: *C. glutamicum* JH02-Peftu-(Ncgl)phaC胞内PHB形态图片

图 3.6 TEM 分析胞内 PHB 形态

Fig. 3.6 TEM analysis of intracellular PHB morphology

A:菌株 *C. glutamicum* JH02 胞内 PHB 形态图片；B: 菌株 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 胞内 PHB 形态图片。

3.4 本章小结

本章节的研究内容包括，探究氨氮 (NH_4^+) 的添加对谷氨酸棒状杆菌 PHB 产量的影响，对谷氨酸棒状杆菌利用合成培养基合成 PHB 的分子量进行表征，以及对胞内积累的 PHB 形态进行观测。主要研究结果如下所述：

(1) 氮源是影响谷氨酸棒状杆菌 PHB 合成能力的重要影响因素。在谷氨酸棒状杆菌中，PHB 的合成与生长状况相关联，当细胞活力增强，PHB 产量也会相应增加。通过本论文研究发现，当 NH_4^+ 添加浓度为 45 g/L 时最适合 *C. glutamicum* JH02 进行 PHB 的生产。RT-qPCR 实验证实当添加合适的 NH_4^+ 浓度时不仅能促进细胞生长，更重要的是能有效促进 PHB 合成相关基因的表达，从而促进胞内 PHB 的积累。最终改造菌株 JH02-Peftu-(porB)phaC 通过补料批发酵生产了 15.5 g/L PHB，胞内含量最高达到 32 wt%，是目前谷氨酸给棒状杆菌利用合成培养基发酵生产 PHB 的最高指标。

(2) PHB 作为一种高分子聚合物，其分子量大小通常用平均分子量大小及分散性进行表征，通过测定对照菌株 *C. glutamicum* JH02 和改造菌株 JH02-Peftu-(Ncgl)phaC, JH02-Peftu-(porB)phaC 胞内 PHB 分子量，发现膜定位表达 PHA 合酶的方式显著提高了谷氨酸棒状杆菌胞内 PHB 的积累能力，但对 PHB 分子量没有产生负面的影响。

(3) 通过透射电子显微镜 (TEM) 拍摄的图片可以清楚的观测到，改造菌株 JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 与对照菌株 *C. glutamicum* JH02 相比，胞内积累了更多的 PHB 颗粒。再一次证实膜定位表达 PHA 合酶能够显著提高谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 的能力。

第4章 膜定位表达 PHA 合酶的工程菌株利用麦秆水解液合成 PHB

4.1 引言

聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 是一种重要的碳中性生物聚合物。由于其出色的热加工性能、生物降解性和利用可再生资源进行生物合成的特性,使其具有取代石油衍生塑料的潜力。作为一种可以由微生物全合成的高分子聚酯, PHB 的生物合成尽管具有许多优势,但由于生产成本低, PHB 在工业上的应用受到了限制。PHB 生产大多以淀粉和糖类物质作为原料,其成本占总生产成本的 30%-40%以上,因此许多研究人员专注于寻找低成本的原料来用于 PHB 的生产。

PHB 的发酵生产需要具有可持续和稳定供应的碳水化合物原料,木质纤维素生物质是满足这一要求的唯一可行的非粮碳水化合物。木质纤维素经过酶水解后可以释放出大量的葡萄糖、木糖以及少量的甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖。这些可发酵单糖可作为碳源被微生物用于 PHB 的合成。

本实验室以谷氨酸棒状杆菌作为出发菌株,通过代谢工程改造构建了一株能利用葡萄糖和木糖稳定合成 PHB 的 *C. glutamicum* JH02。为了进一步提高 PHB 的产量,本论文对该菌株进行了进一步的分子生物学改造。获得的两株改造菌株在合成培养基中的产 PHB 能力显著提高。本章节的研究内容则是在 30%麦秆水解液中检验改造菌株 JH02-*Peftu-(Ncgl)phaC* 和 JH02-*Peftu-(porB)phaC* 合成 PHB 的能力。同时,由于木糖是木质纤维素中第二大丰富的碳源,对木糖的利用速率是影响谷氨酸棒状杆菌合成 PHB 能力进一步提高的重要因素。为了克服在实际的发酵生产过程中存在葡萄糖代谢阻遏现象,本章节尝试通过适应性进化提高谷氨酸棒状杆菌利用木糖的能力。

4.2 材料和方法

4.2.1 实验菌株、培养基和培养条件

本章节所用到的出发菌株和改造菌株均列于表 2.1。本章节所用培养基与第二章节相同，详细内容参考 2.2.1。

4.2.2 PHB 发酵过程

摇瓶发酵条件与第二章节相同，详细内容参考 2.2.7。生物反应器发酵过程与第三章相同，详细内容参考 3.2.2

4.2.3 胞内 PHB 产物定量测定

PHB 产量测定方法与第二章节相同，详细内容参考 2.2.5。

4.2.4 PHB 得率计算

PHB 得率计算公式与第二章节相同，详细内容参考 2.2.6。

4.2.5 检测方法

检测方法与第二章相同，详细内容参考 2.2.8。

4.2.6 麦秆水解液的制备

实验室用于制备水解液的小麦秸秆于 2020 年购自中国河南省南阳市。将收集的小麦秸秆经过干酸预处理、生物脱毒和糖化后获得初步的发酵醪液，之后再利用高速离心机在 12,000 rpm 下离心 10 分钟。收集上层水解液，弃去底部固体沉淀，将收集的上层水解液经过过滤、灭菌操作后，即获得用于发酵的麦秆水解液。干酸预处理过程在 20 L 的反应釜中进行，小麦秸秆固体（干基）和 5%（w/w）的稀硫酸按照 2: 1 的固液比混合均匀，在 175 °C，50 rpm 的条件下反应 5 min，预处理后小麦秸秆固体含量为 52%（w/w）。用于生物脱毒的菌株为实验室在之前研究过程当中分离出的 *Paecilomyces variotii* FN89 菌株，脱毒过程中注意检测抑制物的剩余量，避免脱毒时间过长导致部分可发酵糖被脱毒菌株消耗。糖化过程在 5 L 罐上进行，将脱毒后的小麦秸秆干物料按照 30%（w/w）的固体含量加入到发酵罐中，纤维素酶用量为 6 mg 蛋白/g 干物料，糖化过程中温度为 50 °C，转速 150 rpm，糖化时间是 48 h。

将制备的麦秆水解液利用 HPLC 检测各组分含量，分别为：101.7 g/L 葡萄糖, 37.3 g/L 木糖, 0.002 g/L 糠醛, 0.8 g/L 乙酸和 0.019 g/L 5-羟甲基糠醛。

4.3 结果与讨论

4.3.1 比较工程菌株利用 30%固含量的麦秆水解液合成 PHB 的能力

为了检验改造菌株在真实的木质纤维素水解液体系中生产 PHB 的能力, 本论文将第 2 章节 2.3.2 获得的两株 PHB 合成能力显著提高的膜定位表达 PHA 合酶的重组菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 和 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 在补料批发酵的模式下利用 30%固体含量的小麦秸秆水解液合成 PHB, 并与 JH02 原始菌株进行对比。实验结果如图 4.1 所示, 与对照菌株相比, 融合 *Ncgl* 信号肽的改造菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 在木质纤维素体系中生长状况显著改善, 这从菌体干重的变化可以明显的看出, 改造菌株在发酵 72 h 后菌体干重可以达到 38.2 g/L, 与对照菌株相比, 增加了 40%; 改造菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 合成 PHB 的能力显著提升, 胞内 PHB 含量最高可以达到 39.3 wt%, PHB 产量最高可以达到 16.2 g/L, 与对照菌株相比, 胞内 PHB 含量提高了 134.8%, PHB 产量提高了 57.3%; 融合 *porB* 信号肽的改造菌株 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 在麦秆水解液体系中培养 72 h 后菌体干重为 29.7 g/L, 胞内 PHB 含量为 26.4 wt%, PHB 产量为 7.8 g/L, 与对照菌株相比, 菌体生长状况没有明显改善, PHB 的生产能力也没有明显的提高, 菌体干重仅增加 8.8%, 胞内 PHB 含量和 PHB 产量分别增加 6.5%和 13.0%。

综上所述, 融合 *Ncgl* 信号肽的改造菌株 JH02-Peftu-(*Ncgl*)*phaC* 在麦秆水解液中生长状况最好, PHB 生产能力最强。值得注意的是, 与在合成培养基中发酵结果不同, 改造菌株 JH02-Peftu-(*porB*)*phaC* 的 PHB 生产能力与对照菌株相比没有明显的差异, 分析造成这一现象的原因是由于麦秆水解液中抑制物的存在对 *porB* 细胞膜表面展示蛋白的活性造成了不良影响。

与目前已发表的文献中利用木质纤维素生物质生产 PHB 的研究进行对比, 结果如表 4.1 所示, 从已发表的研究结果中可以看出, 利用木质纤维素生物质作为碳源获得的 PHB 产量并不高, 这是因为, 一方面, 大部分研究都利用天然的 PHB 生产菌株作为实验菌株在木质纤维素水解液体系中进行 PHB 的生产, 但由于这些菌株对抑制物的耐受性极差, 因此生长状况并不好, 这从菌体干重中可以看出; 另一方面, 为了去除木质纤维素体系中的抑制物, 多采用低预处理强度, 高强度、高成本的脱毒方法(膜过滤、活性炭脱毒等), 这种操作不仅提高了生产成本, 给下游的分离纯化工工艺造成困难, 还会降低可发酵糖的利用率, 因为预处理强度不够会降低可发酵单糖的释放率, 而高强度的脱毒方法又会提高可发酵单糖的损耗率, 这就导致最终获得用于 PHB 合成的碳源十分有限, 从而限制 PHB 产量的提高。

本论文选用对抑制物具有较强耐受性的谷氨酸棒状杆菌作为实验菌株, 通过合成生物学的方法构建了 PHB 的合成路径, 并通过分子生物学改造提高其 PHB 的生产能力, 最终可以利用固体含量为 30%的麦秆水解液进行 PHB 的生产, PHB 产量最高达到 16.2 g/L, 是目前在真实木质纤维素水解液体系中发酵生产 PHB 的最高指标。

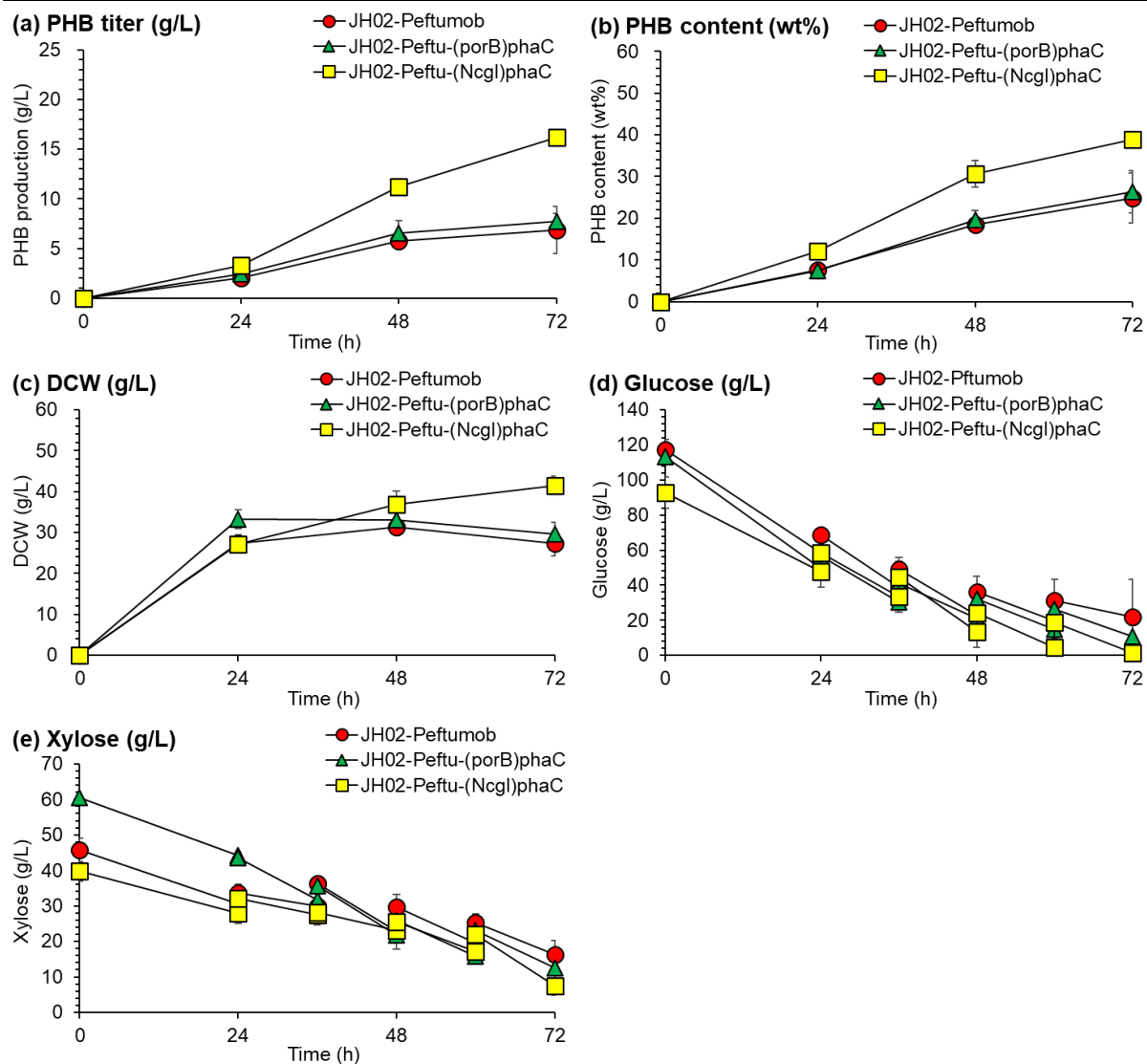


图 4.1 改造菌株利用麦秆水解液合成 PHB 的能力

Fig. 4.1 The ability of the constructed strain to produce PHB using wheat straw hydrolysate: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (wt%); (c) DCW (g/L); (d) Glucose (g/L); (e) Xylose (g/L)

30%固含量麦秆水解液的制备及组成如材料和方法所示。在 3 L 罐上进行补料批发酵，发酵温度为 30 °C，搅拌转速 600 rpm，通气量 1.4 VVM，过程中检测溶氧变化，发酵后期如果气泡太多，为了防止喷罐可适当降低通气量，通过酸碱泵自动添加 2 M H₂SO₄ 和 25%氨水使 pH 保持在 7.0。在 3 L 罐上整个发酵过程持续 72 h，从发酵的 24 h 开始每间隔 12 h 补加 200 mL 体积的麦秆水解液。在发酵一开始，向水解液中补加 1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 10 g/L (NH₄)₂SO₄。

表 4.1 目前已发表的以木质纤维素生物质为原料合成 PHB 的结果汇总^[89]

Table 4.1 Summary of published results on the synthesis of PHB from lignocellulosic biomass

Producing strain	Carbon source	Pretreatment and detoxification	DCW (g/L)	Content (wt%)	Titer (g/L)	Sources
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose and xylose)	Acid pretreatment; Overliming and activated carbon	4.4	53.0	2.3	[94]
<i>Burkholderia sacchari</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose and xylose)	Acid pretreatment; Overliming and activated carbon	4.4	62.0	2.7	[94]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose)	Acid pretreatment;	6.0	65.0	3.9	[95]
<i>Azotobacter beijerinickii</i>	Coir pitch (Glucose)	Autoclave	5.0	48.0	2.4	[96]
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wood hydrolysate (Xylose)	Acid pretreatment; Membrane filtration	17.0	51.4	8.7	[97]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Water hyacinth hydrolysates (Glucose)	Acid pretreatment; Overliming and activated carbon	12.0	58.3	7.0	[44]
<i>Bacillus megaterium</i>	Oil palm empty fruit bunch (Glucose and xylose)	Alkaline pretreatment	24.2	51.6	12.5	[98]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bagasse hydrolysate (Glucose)	Acid pretreatment; Overliming	10.6	39.6	4.2	[99]
<i>Paracoccus sp</i>	Corn stover (Glucose and xylose)	Alkaline pretreatment	14.8	72.0	9.7	[100]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Wheat bran hydrolysate (Glucose)	Alkaline pretreatment	24.5	62.5	14.8	[43]
<i>Ralstonia eutropha</i>	Sunflower hydrolysate (Glucose and xylose)	Hydrothermal treatment	11.0	72.5	7.9	[101]
<i>Bacillus megaterium</i>	Corn husk hydrolysate (Glucose and xylose)	Biologically pretreated	1.7	57.8	1.0	[102]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Wheat straw hydrolysate (Glucose and xylose)	Acid pretreatment; Bio-detoxification	38.2	39.3	16.2	This study

4.3.2 *C. glutamicum* JH02 提高木糖利用能力的适应性进化

木糖是木质纤维素水解液体系中第二大丰富的碳源，天然的谷氨酸棒状杆菌不具备利用木糖的能力。为了拓宽谷氨酸棒状杆菌的底物谱，本实验室在之前的研究中将来自大肠杆菌 *E. coli* BL21 的木糖利用基因 *xylAB* 和木糖转运蛋白 *araE* 整合到 *C. glutamicum* 的基因组上得到了可以同时利用葡萄糖和木糖合成 PHB 的 *C. glutamicum* JH02，这在一定程度上提高了 *C. glutamicum* 积累更多 PHB 的潜力。但是，在实际的发酵生产过程中发现存在葡萄糖代谢阻遏现象，即当培养基中存在葡萄糖时，*C. glutamicum* JH02 总是会优先利用葡萄糖，减缓对木糖的利用。

为了提高谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* JH02 利用木糖的能力，本论文将 *C. glutamicum* JH02 在含有 5 g/L 葡萄糖和 45 g/L 木糖的 PHB 发酵培养基中进行培养，每两天转接一次，使其逐渐增强对木糖的利用能力。结果如图 4.2 所示，在转接的初期（前 6 代），由于不适应木糖培养基体系，谷氨酸棒状杆菌胞内生成的 PHB 含量逐渐降低，菌体生长状况也逐渐变差。随着转接的进行，菌体逐渐适应木糖培养基体系，木糖消耗速度逐渐加快，菌体生长状况逐渐恢复，但胞内积累的 PHB 含量却不稳定，尤其是从第 6 代到第 7 代，PHB 产量迅速增加，从 15 代到 16 代，PHB 产量又迅速下降，直到完全不合成 PHB。

分析原因，由于谷氨酸棒状杆菌胞内的木糖利用途径是人为构建的，对木糖的利用能力有限，在木糖培养基中 *C. glutamicum* JH02 的细胞活力不高。回顾之前的 RT-qPCR 实验中得到的结论，在谷氨酸棒状杆菌中，PHB 的合成是与细胞生长状况相关联的。因此利用木糖培养基进行适应性进化的过程中，菌体一直处在不利于 PHB 合成的环境条件下，*C. glutamicum* JH02 在分裂过程中有一部分新分裂出的细胞丧失 PHB 合成能力，这从拍摄的 TEM 电镜图片可以得到验证。谷氨酸棒状杆菌属于非天然的 PHB 生产菌株，胞内聚酯的存在会对细胞本身正常生长产生负面压力，故随着传代进行，不能合成 PHB 的细胞成为优势菌株。因此，通过适应性进化的方法将 *C. glutamicum* JH02 在木糖培养基中进行驯化转接，不利于菌体合成 PHB。

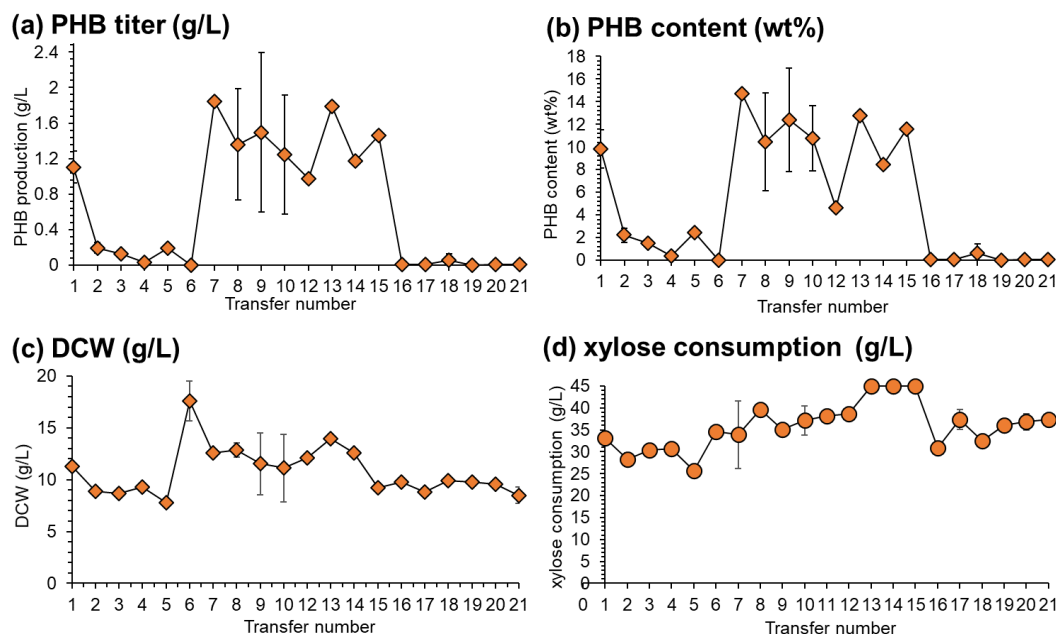


图 4.2 *C. glutamicum* JH02 在富含木糖的培养基中进行转接驯化

Fig. 4.2 Adaptive evolution of *C. glutamicum* JH02 in xylose medium: (a) PHB titer (g/L); (b) PHB content (%); (c) CDW (g/L); (d) Xylose consumption (g/L)

C. glutamicum JH02 的驯化过程在 250 mL 的锥形瓶中进行，培养基组成为：5 g/L Glucose, 45 g/L Xylose, 5 g/L Yeast, 10 g/L peptone, 1 g/L KH_2PO_4 , 3g/L Urea, 0.6 g/L MgSO_4 。发酵温度为 30 °C，摇床转速设置为 200 rpm，每隔 12 h 用 5 M NaOH 调节 pH 至 7.0，每 48 h 转接一次。

4.4 本章小结

本章节研究内容是将获得的改造菌株在真实的木质纤维素体系中检验其合成 PHB 的能力，并尝试通过适应性进化提高谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素体系中木糖的能力。主要研究结果如下所述：

(1) 本论文获得的改造菌株 JH02-*Peftu*-(*Ncgl*)*phaC* 在 30% 固体含量的麦秆水解液体系中生长状况良好，最高 PHB 产量达到 16.2 g/L，实现了在真实木质纤维素水解液体系中发酵生产 PHB 的最高指标。

(2) 谷氨酸棒状杆菌作为非天然的 PHB 生产菌株，PHB 的积累与细胞的生长状况相关联。通过对 *C. glutamicum* JH02 进行木糖利用能力的适应性进化实验后发现，当在含有较高含量的木糖培养基中驯化时，由于生长状况不好，细胞活性较差，因此随着传代的进行，在分裂过程中丧失 PHB 合成能力的细胞逐渐占据优势，最终使得驯化菌株不再合成 PHB。

第5章 结论与展望

5.1 结论与创新点

PHB 作为一种重要的碳中性生物聚合物, 具有与石油基塑料相似的物理性质和热加工性能, 更重要的是具有良好的生物可降解性和利用可再生资源进行生物合成的特性, 因此有潜力替代传统的石油基塑料。目前商业化生产 PHB 遇到的最大阻碍是生产成本过高, 其中原料成本占据了总成本的 30%-40%。为了降低 PHB 的生产成本, 本论文成功构建了一株能以价格低廉, 来源广泛和供应量充足的木质纤维素为原料生产 PHB 的改造菌株 JH02-Peftu-(Ncgl)phaC, 实现了利用真实木质纤维素生物质为原料生产 PHB 的最高指标, 为接下来木质纤维素生产 PHB 的工业化应用提供了一株有潜力的候选菌株。

本研究结论及创新点如下:

(1) 本论文首次通过调节 *C. glutamicum* 细胞的生长和分裂相关基因的表达来促进细胞的生长和 PHB 的生产。结果证明过表达细胞形态相关的基因对谷氨酸棒状杆菌细胞生长具有促进作用, 进而提高了 PHB 的产量, 但对 *C. glutamicum* 细胞形态没有明显的改变。通过弱化表达细胞形态相关基因虽然能使细胞由原先的短杆状变为球状, 但对 PHB 的生产没有明显的促进作用。综上所述, 尽管 PHB 作为一种在微生物胞内合成的聚酯, 其合成受到细胞空间体积的限制, 但在非天然的 PHB 生产菌株 *C. glutamicum* 中, 单纯通过细胞形态工程改造不能有效的促进 PHB 的合成。

(2) 本论文首次在 *C. glutamicum* 中对 PHB 合成路径中的关键性酶 (PHA 合酶) 进行膜定位表达。通过将 PHA 合酶定位在细胞膜上进行表达能够显著提高细胞的生长和胞内 PHB 的积累, 分析这种 PHA 合酶的表达方式在缩短了 PHA 合酶参与聚合反应的空间距离的同时, 能够有效提高 PHA 合酶的稳定性, 使其在 PHB 聚合过程中不易失去活性, 从而促进 PHB 的合成。这也进一步验证了限制 *C. glutamicum* 胞内 PHB 积累能力进一步提高的主要原因是 PHB 合成路径中关键酶的酶活和稳定性。此外, 将 Ncgl 信号肽和 porB 细胞膜表面展示蛋白在 *C. glutamicum* JH02 中共表达, 构建的改造菌株 *C. glutamicum* JH03-Peftu-(porB)phaC 的 PHB 合成能力得到进一步的提高。

(3) 本论文尝试过表达 phaP 基因来促进 PHB 的生产。在大多数天然的 PHB 生产菌株中都存在 phaP 基因, 该基因编码的 PhaP 蛋白可以包裹在 PHB 颗粒表面, 减小 PHB 粒径大小从而对菌体起到保护作用。实验结果证明, 单纯过表达该基因不能促进细胞的生长和 PHB 的合成, 推测是由于在 *C. glutamicum* 细胞内积累的 PHB 与天然 PHB 生产菌株相比, 胞内 PHB 含量相对较低, PHB 分子量相对偏小, 所以胞内 PHB 颗粒的尺寸不是限制胞内 PHB 积累能力提高的主要原因。

(4) 本论文尝试弱化表达与 β -酮硫解酶竞争乙酰辅酶 A 底物的 gltA-1 基因, 为 PHB 的合成提供更多的前体物质, 结果发现没有达到预期的效果。分析原因可能是由

于, PHB 合成过程中乙酰辅酶 A 前体供给充足, 限制 PHB 产量提高的关键因素不是乙酰辅酶 A 前体的供应量, 而是 PHB 合成路径中关键酶的酶活和稳定性。

(5) 本论文通过探究发现氨氮 (NH_4^+) 的添加对 *C. glutamicum* 合成 PHB 具有重要的影响。通过添加不同浓度梯度 NH_4^+ 作为氮源, 确定了 PHB 发酵过程中最适 NH_4^+ 添加量为 45 g/L。RT-qPCR 实验证实当添加合适的 NH_4^+ 浓度时不仅能促进细胞生长, 更重要的是能有效促进 PHB 合成相关基因的表达, 从而促进胞内 PHB 的积累。

(6) 本论文首次利用改造的 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 在 30% 固体含量的真实麦秆水解液体系中实现了 PHB 的高产。改造菌株 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 的 PHB 产量最高可达 16.2 g/L, 是目前已报道的利用木质纤维素生物质发酵生产 PHB 的最高产量。

5.2 展望

本论文通过分子生物学改造获得了一株能在高固含量麦秆水解液中进行 PHB 生产的 *C. glutamicum* JH02-Peftu-(Ncgl)phaC 菌株, 但是, 在利用麦秆水解液进行发酵生产的过程中仍存在问题限制了 PHB 产量的进一步提高, 接下来还需要进一步探究:

(1) 目前无法实现连续同步糖化共发酵

在木质纤维素生物炼制过程中, 糖化步骤的操作条件为 pH 4.8, 温度 50 °C; 在利用谷氨酸棒状杆菌发酵生产 PHB 的过程中, 最适发酵条件为 pH 7.0, 温度 30 °C。由于两个过程的操作条件不一致, 因此实验过程中需要先在 5 L 罐中将经过脱毒的麦秆物料进行糖化并经过灭菌过滤制备成麦秆水解液, 然后再将获得的水解液在 3 罐中用于 PHB 的发酵, 这就导致无法通过同步糖化共发酵来生产 PHB。

但是, 在利用麦秆水解液发酵生产 PHB 的过程中, 采用的是补料批发酵, 发酵后期菌体浓度达到较高值, 所以发酵过程中需要大量的碳源用于菌体的生长代谢和 PHB 的合成。我们已经认识到, 发酵后期葡萄糖等碳源供应不足是限制 PHB 产量进一步提高的重要因素。然而, 由于存在底物抑制作用, 一次糖化释放出来的可发酵单糖的浓度有限, 即使在过程中补加一定体积的麦秆水解液, 也无法满足高浓度细胞的生长代谢和 PHB 合成对碳源的需求。

如果能够实现同步糖化共发酵, 在发酵的同时可以通过糖化不断地释放出可发酵单糖, 这不仅解决了碳源供应不足的问题, 而且简化了操作工艺流程。因此, 下一步可以通过提高谷氨酸棒状杆菌的耐热性或选用中性纤维素酶的方法来缩小糖化步骤与发酵过程的操作条件的差距, 实现同步糖化共发酵, 从而进一步提高 PHB 的产量。

(2) 除葡萄糖和木糖外其他少量可发酵单糖未全部利用

木质纤维素生物质主要含有 40%-80% 的纤维素、10%-40% 的半纤维素和 5%-25% 木质素。纤维素经过酶水解后主要释放出葡萄糖, 半纤维素经过酶水解后除了释放出大量木糖外, 还会释放出部分甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖和鼠李糖。天然的谷氨酸棒状杆菌只能利用葡萄糖作为碳源, 本实验室通过将大肠杆菌的木糖利用途径引入谷氨

酸棒状杆菌中，使其具备木糖利用能力，但目前还不具备利用甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖和鼠李糖作为碳源的能力。因此后续可以将这几种碳源的利用途径也在谷氨酸棒状杆菌中构建起来，从而实现木质纤维素生物质的充分利用，为 PHB 的生产提供更多的碳源。

（3）重组谷氨酸棒状杆菌的木糖利用能力有待提高

尽管本实验室研究人员通过将木糖利用基因 *xylAB* 基因和木糖转运蛋白 *araE* 整合到谷氨酸棒状杆菌的基因组上，使其具备了转运木糖和利用木糖的能力，但从上述发酵结果可以明显看出，由于木质纤维素体系中高浓度葡萄糖的存在对木糖的利用产生了代谢阻遏作用，木糖利用速率有待提高。在本论文的 4.3.2 部分，我们曾尝试通过适应性进化的方式来提高谷氨酸棒状杆菌的木糖利用能力，但结果未达到预期效果。因此，接下来可以尝试利用分子生物学手段，通过过表达与木糖利用或木糖转运相关的基因来提高菌株利用木糖的能力。

参考文献

- [1] Akaraonye E, Keshavarz T, Roy I. Production of Polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2010, 85: 732-743.
- [2] Raza ZA, Abid S, Banat IM. Polyhydroxyalkanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 126: 45-56.
- [3] Alcântara JMG, Distanto F, Storti G, Moscatelli D, Morbidelli M, Sponchioni M. Current trends in the production of biodegradable bioplastics: the case of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Advances*. 2020, 42: 107582.
- [4] Ruiz C, Kenny ST, Narancic T, Babu R, Connor KO. Conversion of waste cooking oil into medium chain polyhydroxyalkanoates in a high cell density fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2019, 306: 9-15.
- [5] Możejko-Ciesielska J, Kiewisz R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous?. *Microbiological Research*. 2016, 192: 271-278.
- [6] Kim DY, Kim HW, Chung MG, Rhee YH. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology*. 2007, 45: 87-97.
- [7] Smilansky J, Hallberstadt N. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas sp.* strain DR2. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, 20: 183-201.
- [8] Vu DH, Wainaina S, Taherzadeh MJ, Akesson D, Ferreira JA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus megaterium* using food waste acidogenic fermentation-derived volatile fatty acids. *Bioengineered*. 2021, 12: 2480-2498.
- [9] Saratale RG, Cho SK, Saratale GD, Ghodake GS, Bharagava RN, Kim DS, Nair S, Shin H S. Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus sp.* and its characterization. *Bioresource Technology*. 2021, 324: 124673.
- [10] Park YL, Song HS, Choi TR, Lee SM, Park SL, Lee HS, Kim HJ, Bhatia SK, Gurav R, Park K, Yang YH. Revealing of sugar utilization systems in *Halomonas sp.* YLGW01 and application for poly(3-hydroxybutyrate) production with low-cost medium and easy recovery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 167: 151-159.
- [11] Lee HS, Lee H-J, Kim SH, Cho JY, Suh MJ, Ham S, Bhatia SK, Gurav R, Kim Y-G, Lee EY, Yang Y-H. Novel PHAs from the *Arctic pseudomonas sp.* B14-6 enhance the production of polyhydroxybutyrate and increase inhibitor tolerance. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 190: 722-729.

- [12] 黄振. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产聚 3-羟基丁酸和脂肪烃. 华东理工大学. 2020.
- [13] Wang J, Huang J, Guo H, Jiang S, Qiao J, Chen X, Qu Z, Cui W, Liu S. Effects of different sodium salts and nitrogen sources on the production of 3-hydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate by *Burkholderia cepacia*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021, 8: 64.
- [14] Amiri S, Mohammadi Zeydi M, Amiri N. *Bacillus cereus* saba.zh, a novel bacterial strain for the production of bioplastic (polyhydroxybutyrate). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021, 52: 2117-2128.
- [15] Shin G, Jeong DW, Kim H, Park SA, Kim S, Lee JY, Hwang SY, Park J, Oh DX. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate with cellulose nanocrystals using *Cupriavidus necator*. *Polymers (Basel)*. 2021, 13: 2604.
- [16] Ben Abdallah M, Karray F, Sayadi S. Production of polyhydroxyalkanoates by two halophilic archaeal isolates from chott el jerid using inexpensive carbon sources. *Biomolecules*. 2020, 10: 109.
- [17] Kanavaki I, Drakonaki A, Geladas ED, Spyros A, Xie H, Tsiotis G. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas* sp. PHDV1 strain grown on phenol as carbon sources. *Microorganisms*. 2021, 9: 1636.
- [18] Kocharin K, Chen Y, Siewers V, Nielsen J. Engineering of acetyl-coa metabolism for the improved production of polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*. 2012, 2:52.
- [19] Haiying W, Sijie L, Minghua J, Qiao C, Jiping S, Jenny B, Junsong S. Improvement of polyhydroxybutyrate production by deletion of *csra* in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020, 46: 8-13.
- [20] 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.
- [21] 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 Bioengineering*. 2007, 104: 457-463.
- [22] Kim BS. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27: 774-777.
- [23] Martin K, Rodolfo B, Emo C, Grillo FE, Predrag H, Christoph K, Paula H, Gerhart B.

- Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 4854-4863.
- [24] Van-Thuoc D, Quillaguamán J, Mamo G, Mattiasson B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 104: 420-428.
- [25] Ting-Yen H, Kow-Jen D, Shih-Yow H, Will CC. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2006, 33: 701-706.
- [26] Raza ZA, Abid S, Banat IM. Polyhydroxyalkanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 126: 45-56.
- [27] Haas R, Jin B, Zepf FT. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*. 2014, 72: 253-256.
- [28] El-Sheekh MM, El-Abd MA, El-Diwany AI, Ismail A-M S, Omar TH. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus flexus* Me-77 using some industrial wastes. *Rendiconti Lincei-Scictee Naturali*. 2015, 26: 109-119.
- [29] Estevez-Alonso A, Pei R, Van Loosdrecht MCM, Kleerebezem R, Werker A. Scaling-up microbial community-based polyhydroxyalkanoate production: status and challenges. *Bioresource Technology*. 2021, 327: 124790.
- [30] Haba E, Vidal-Mas J, Bassas M, Espuny MJ, Llorens J, Manresa A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. *Biochemical Engineering Journal*. 2007, 35: 99-106.
- [31] Fächtenbusch B, Wullbrandt D, Steinbüchel A. Production of polyhydroxyalkanoic acids by *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas oleovorans* from an oil remaining from biotechnological rhamnase production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 53: 167-172.
- [32] Poza C, Martinez-Toledo MV, Rodelas B, Gonzalez-Lopez J. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *Journal of Biotechnology*. 2002, 97: 125-131.
- [33] Jiang G, Hill D J, 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.
- [34] Govil T, Wang J, Samanta D, David A, Tripathi A, Rauniyar S, Salem DR, Sani RK. Lignocellulosic feedstock: a review of a sustainable platform for cleaner production of

- nature's plastics. *Journal of Cleaner Production*. 2020, 270: 122521.
- [35] Dietrich K, Dumont MJ, Del Rio LF, Orsat V. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology*. 2019, 49: 161-168.
- [36] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzaple M, Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresources Technology*. 2005, 96: 673-686.
- [37] Ahmed F, Yan Z, Bao J. Dry biodegradation of acid pretreated wheat straw for cellulosic ethanol fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*. 2019, 6: 24.
- [38] 杨莉, 谭丽萍, 刘同军. 木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展. *生物工程学报*. 2021, 37: 15-29.
- [39] Liu G, Zhang Q, Li H, Qureshi AS, Zhang J, Bao X, Bao J. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115: 60-69.
- [40] 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.
- [41] Jin C, Bao J. Lysine Production by dry biorefining of wheat straw and cofermentation of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2021, 69: 1900-1906.
- [42] Sayyed RZ, Shaikh SS, Wani SJ, Rehman MT, Al Ajmi MF, Haque S, El Enshasy HA. Production of biodegradable polymer from agro-wastes in *Alcaligenes* sp. and *Pseudomonas* sp. *Molecules*. 2021, 26: 2443.
- [43] Annamalai N, Sivakumar N. Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2016, 237: 13-17.
- [44] 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.
- [45] Gonzalez-Garcia Y, Grieve J, Meza-Contreras JC, Clifton-Garcia B, Silva-Guzman JA. Tequila agave bagasse hydrolysate for the production of polyhydroxybutyrate by *Burkholderia sacchari*. *Bioengineering (Basel)*. 2019, 6: 115.
- [46] Sindhu R, Silviya N, Binod P, Pandey A. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*. 2013, 78: 67-72.
- [47] Dietrich K, Dumont M-J, Orsat V, Del Rio LF. Consumption of sugars and inhibitors of

- softwood hemicellulose hydrolysates as carbon sources for polyhydroxybutyrate (PHB) production with *Paraburkholderia sacchari* IPT 101. *Cellulose*. 2019, 26: 7939-7952.
- [48] 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.
- [49] Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, Ladisch MR. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, 48: 408-415.
- [50] Mohan G, Johnson RL, Yu J. Conversion of pine sawdust into polyhydroxyalkanoate bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, 9: 8383-8392.
- [51] Kourilova X, Novackova I, Koller M, Obruca S. Evaluation of *mesophilic Burkholderia sacchari*, *thermophilic Schlegelella thermodepolymerans* and *halophilic Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresources Technology*. 2021, 325: 124704.
- [52] Salamanca-Cardona L, Scheel RA, Bergey NS, Stipanovic AJ, Matsumoto K, Taguchi S, Nomura CT. Consolidated bioprocessing of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from xylan as a sole feedstock by genetically-engineered *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 122: 406-414.
- [53] Ienczak JL, Schmidell W, Aragao GM. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 2013, 40: 275-286.
- [54] Vigneswari S, Noor MSM, Amelia TSM, Balakrishnan K, Adnan A, Bhubalan K, Amirul AA, Ramakrishna S. Recent advances in the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from lignocellulosic feedstocks. *Life (Basel)*. 2021, 11: 8-7.
- [55] Amache R, Sukan A, Safari M, Roy I, Keshavarz T. Advances in PHA production. *Chemical Engineering Transactions (CET Journal)*. 2013, 32: 931-936.
- [56] Ibrahim MH, Steinbuchel A. High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating *thermophile*, *Chelatococcus* sp. Strain MW10. *Applied Environmental Microbiology*. 2010, 76: 7890-7895.
- [57] Cesario MT, Raposo RS, De Almeida MC, Van Keulen F, Ferreira BS, Da Fonseca MM. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*. 2014, 31: 104-113.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] Yan X, Li D, Ma X, Li J. Bioconversion of renewable lignocellulosic biomass into multicomponent substrate via pressurized hot water pretreatment for bioplastic polyhydroxyalkanoate accumulation. *Bioresource Technology*. 2021, 339: 125667
- [61] 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 Environmental Microbiology*. 2018, 84: e02691-17.
- [62] 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.
- [63] Letek M, Fiuza M, Ordonez E, Villadangos AF, Flardh K, Mateos LM, Gil JA. DivIVA uses an N-terminal conserved region and two coiled-coil domains to localize and sustain the polar growth in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*. 2009, 297: 110-116.
- [64] 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.
- [65] Sieger B, Bramkamp M. Interaction sites of DivIVA and RodA from *Corynebacterium glutamicum*. *Frontiers in Microbiology*. 2014, 5: 738
- [66] 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.
- [67] Ramos A, Letek M, Campelo AB, Vaquera J, Mateos LM, Gil JA. Altered morphology produced by *ftsZ* expression in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Microbiology-SGM*. 2005, 151: 2563-2572.
- [68] Kraxner KJ, Polen T, Baumgart M, Bott M. The conserved actinobacterial transcriptional regulator *FtsR* controls expression of *ftsZ* and further target genes and influences growth and cell division in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol*. 2019, 19: 179.
- [69] 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283: 18099-18112.
- [70] Lee DS, Kim Y, Lee HS. The *whcD* gene of *Corynebacterium glutamicum* plays roles in cell division and envelope formation. *Microbiology-SGM*. 2017, 163: 131-143.
- [71] Ken'ichiro M, Kota T, Shunsuke A, Yuyang S, Toshihiko O, Seiichi T. Improved

- production of poly(lactic acid)-like polyester based on metabolite analysis to address the rate-limiting step. *AMB Express*. 2014, 4: 83.
- [72] Chen YP, Hwang IE, Lin CJ, Wang HJ, Tseng CP. Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, 112: 455-463.
- [73] Tang M, Sun X, Zhang S, Wan J, Li L, Ni H. Improved catalytic and antifungal activities of *Bacillus thuringiensis* cells with surface display of Chi9602DeltaSP. *Journal of Applied Microbiology*. 2017, 122: 106-118.
- [74] 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 Environmental Microbiology*. 2007, 73: 586-593
- [75] Afrin S, Khan MRI, Zhang W, Wang Y, Zhang W, He L, Ma G. Membrane-located expression of thioesterase from *Acinetobacter baylyi* enhances free fatty acid production with decreased toxicity in *Synechocystis* PCC6803. *Front Microbiology*. 2018, 9: 2842.
- [76] Liu X, Zhang W, Zhao Z, Dai X, Yang Y, Bai Z. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, 37: 541-551.
- [77] Yim SS, Choi JW, Lee R J, 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.
- [78] Zhang L, Jia H, Xu D. Construction of a novel twin-arginine translocation (Tat)-dependent type expression vector for secretory production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*. 2015, 82: 50-55.
- [79] Tateno T, Hatada K, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. Development of novel cell surface display in *Corynebacterium glutamicum* using porin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84: 733-739.
- [80] Markus P, Mohamed HM, Frank M, Alexander S. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology-SGM*. 2002, 148: 2413-2426.
- [81] Rahman A, Linton E, Hatch AD, Sims RC, Miller CD. Secretion of polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach. *Journal of Biological Engineering*. 2013, 7: 24.
- [82] 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.
- [83] De Almeida A, Nikel PI, Giordano AM, Pettinari MJ. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-

- producing *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology. 2007, 73: 7912-7916.
- [84] Wu X, Tovilla-Coutino DB, Eiteman MA. Engineered citrate synthase improves citramalic acid generation in *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering. 2020, 117: 2781-2790.
- [85] Zhou LB, Zeng AP. Exploring lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. ACS Synthetic Biology. 2015, 4: 729-734.
- [86] Baumgart M, Mustafi N, Krug A, Bott M. Deletion of the aconitase gene in *Corynebacterium glutamicum* causes strong selection pressure for secondary mutations inactivating citrate synthase. Journal of Bacteriology. 2011, 193: 6864-6873.
- [87] Sirohi R, Kumar Gaur V, Kumar Pandey A, Jun Sim S, Kumar S. Harnessing fruit waste for poly-3-hydroxybutyrate production: a review. Bioresource Technology. 2021, 326: 124734.
- [88] Sánchez Valencia AI, Rojas Zamora U, Meraz Rodríguez M, Álvarez Ramírez J, Salazar Peláez M L, Fajardo Ortiz C. Effect of C/N ratio on the PHA accumulation capability of microbial mixed culture fed with leachates from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). Journal of Water Process Engineering. 2021, 40: 101975.
- [89] Jin C, Li J, Huang Z, Han X, Bao J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from lignocellulose biomass. Biotechnology and Bioengineering. 2022, 119: 1598–1613.
- [90] Jo S J, Leong C R, 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.
- [91] 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.
- [92] 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
- [93] 叶镜清. 高聚物分子量对高分子材料性能的影响. 化学工业与工程技术. 2000, 5: 27.
- [94] 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 & Biotechnology. 2004, 31: 245-254.

- [95] Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresources Technology*. 2008, 99: 8042-8048
- [96] Prabu CS, Murugesan, A. G. Effective utilization and management of coir industrial waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) using the bacterium *Azotobacter beijerinickii*. *International Journal of Environmental Research*. 2010, 4: 519-524.
- [97] 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. *Bioresources Technology*. 2012, 125: 275-282
- [98] Zhang Y, Sun W, Wang H, Geng A. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresources Technology*. 2013, 147: 307-314.
- [99] Gowda V, Shivakumar S. Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014, 5: 55-61.
- [100] Sawant SS, Salunke BK, Kim BS. Degradation of corn stover by fungal cellulase cocktail for production of polyhydroxyalkanoates by moderate *Halophile paracoccus* sp. LL1. *Bioresources Technology*. 2015, 194: 247-255.
- [101] Kim HS, Oh YH, Jang YA, Kang H, David Y, Yu JH, Song BK, Choi JI, Chang YK, Joo JC, Park SJ. 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.
- [102] De Souza L, Y M, Shivakumar S. Bioconversion of lignocellulosic substrates for the production of polyhydroxyalkanoates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020, 28: 101754.

致谢

时光荏苒如白驹过隙，转眼间，忙碌而充实的三年研究生生活即将画上句号。回顾自己的研究生生活，不禁感慨万千，时光真的就像沙子一样，不经意间就从你的指缝溜走。三年的时间，说长也不长，说短也不短，但却是自己成长最快、收获最多的三年。

首先，我要感谢我的导师鲍杰老师，在科研上给予我很多的指导和帮助，在老师的教导下我从一个科研小白成长为具备一定科研能力的研究生。现在回想起来，当初来参加研究生复试，第一次与鲍老师交谈的场景还历历在目，鲍老师对待学生和藹可亲的态度让我记忆深刻，他的鼓励也打消了我当初参加复试时焦虑忐忑的心情。之后，鲍老师也成为我学术道路上的引路人，鲍老师对待工作的严谨认真让我心生佩服，同时也成为我努力的目标。

其次，我要感谢实验室的师兄师姐给予我生活和科研上的帮助。能加入到生物炼制实验室这个大家庭，我感到无比的幸运和开心。实验室融洽的氛围让我在紧张忙碌的实验间隙收获了许多幸福、快乐时光。在实验上，我要特别感谢金慈师兄给予我的帮助和指导，从刚进入实验室开始，金师兄就一直手把手的教我各种实验技能、写作技巧以及文献检索和阅读，面对我的许多疑问和不解，师兄总是很耐心的帮我解答。在金师兄的帮助下，我也学会了很多的“技能”，因此，师兄既是我生活上的朋友，又是我科研道路上的“良师”。同时还要感谢何妮玲师姐、孙鲁欢师姐、华珂君师姐、展宝睿师兄、张翼师兄以及贾佳师兄给予我的帮助。

生活上，我还要特别感谢刘祺师姐、王雅师姐、张斌师兄，我的同级徐迎迎以及李治斌、任大宇师弟。每次在忙碌的一周过后，跟你们周末一同出去吃吃喝喝，享受美食的时光，真的既开心又治愈。感谢有你们的陪伴，让我的研究生生涯充满了欢声笑语，能跟你们相遇真的很幸运。另外，我还要感谢我亲爱的室友胡靖敏、李诗慧和何晶同学，三年的同居生活对我来说是非常珍贵的回忆。

最后，我要感谢我最爱的父母，从小到大，你们一直无条件的包容我，在你们的保护下，我无忧无虑的生活，从来没有为生活苦恼过。如今，您的女儿已经长大，我会用我的实际行动报答您们的爱。

学术成果

已发表论文:

Ci Jin¹, **Jing Li**¹, Zhen Huang, Xushen Han, Jie Bao*. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from lignocellulose biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 119: 1598–1613. (¹表示共同一作)

申请专利:

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.

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.

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.

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共

页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____