

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

博士学位论文

酚类抑制物、高温和低 pH 值胁迫下
的生物炼制菌株适应性进化研究

颜钊

指导教师姓名:

鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: _____ 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: 姓名、职称

评阅人: 姓名、职称

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：

日期： 年 月 日

指导老师签名：

日期： 年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

酚类抑制物、高温和低 pH 值胁迫下的生物炼制菌株适应性进化研究

摘要

生物炼制菌株在木质纤维素生物炼制过程中不可避免地会遭遇到各种胁迫，这些胁迫会抑制生物炼制菌株的生长以及发酵，进而导致发酵过程难以进行以及生物炼制过程无法持续。因此，解除或者缓解这些胁迫对于生物炼制菌株的抑制作用，一直以来是木质纤维素生物炼制领域研究的关键问题。

本研究主要为了解决生物炼制菌株遭遇到的三种胁迫，包括酚类抑制物、高温以及低 pH 值。酚类抑制物来源于木质素的降解，包括酚醛抑制物以及醌类抑制物等。高温胁迫来源于两个方面，一方面是进行高温条件下的同步糖化共发酵（Simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF）；另一方面是大型发酵罐传热不均导致的局部过热也会抑制菌株的发酵性能。低 pH 值胁迫来源于低 pH 值条件下的乳酸发酵，在低 pH 值条件下进行乳酸发酵能够有效简化乳酸的纯化工艺。提高生物炼制菌株胁迫抗逆性常用的策略包括适应性进化以及理性改造。分子生物学以及合成生物学等理性改造策略在提高生物炼制菌株抗逆性方面不具备普适性，其应用经常由于菌株抗逆性的复杂而受到阻碍。适应性进化策略是一种简单、有效的方式，已经被广泛应用于提高生物炼制菌株的抗逆性，并且可以借助转录组（RNA sequencing, RNA-seq）以及基因组重测序分析等技术来挖掘适应性进化的潜在机理。

第一部分对运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的适应性进化提高酚醛抑制物耐受进行了研究。*Z. mobilis* 8b 在高固体含量玉米秸秆水解液中进行了长达 198 天的适应性进化培养，最终获得了一株稳定的进化菌株 *Z. mobilis* Z198。进化菌株的酚醛抑制物转化能力有显著性的提升，尤其是对于毒性最大的香草醛，相比于出发菌株，进化菌株的香草醛转化率提高了 6.3 倍。在进行高固体含量玉米秸秆的 SSCF 时，进化菌株的乙醇发酵浓度提升了 21.6%。进一步的实时荧光定量 PCR（Quantitative real-time PCR, qRT-PCR）分析发现，进化菌株中 SDR 家族氧化还原酶编码基因 *ZMO3_RS07160* 显著上调表达了 11.7 倍，在出发菌株中过表达这一基因，重组菌株在水解液以及 SSCF 发酵中的乙醇浓度分别提高了 23.6% 以及 21.8%，能够达到适应性进化提高乙醇发酵性能相似的结果。本研究不仅获得了一株酚醛抑制物抗逆性能优异的乙醇发酵菌株，而且为理性改造提高酚醛抑制物抗逆性提供了重要的候选基因。

第二部分研究了木质纤维素原料预处理后产生的 *p*-苯醌对于生物炼制菌株的抑制作用以及生物炼制菌株高 *p*-苯醌耐受的抗逆机理。6 种木质纤维素原料经过预处理后产生的 *p*-苯醌含量在进行高固体含量的 SSCF 时可以达到 20~205 mg/L。通过比较不同生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的耐受能力以及转化能力，发现菌株的高 *p*-苯醌抗逆性是通过将毒性较强的 *p*-苯醌转化为低毒性的氢醌来实现的。进一步的 qRT-PCR 分析筛选到了 *Z.*

mobilis 中 *p*-苯醌抗逆的关键基因，并通过在含有不同浓度 *p*-苯醌的合成培养基、水解液以及 SSCF 的发酵来验证了过表达这些基因(*ZMO1696*、*ZMO1949* 以及 *ZMO1399* 等) 重组菌株的发酵性能。本研究发现了 *p*-苯醌对于生物炼制菌株的强抑制作用以及菌株的抗逆机理，挖掘到的抗逆基因能够为其它生物炼制菌株的 *p*-苯醌抗逆性改造提供重要的候选基因。

第三部分借助于 RNA-seq 以及基因组重测序技术解析了进化菌株 *Saccharomyces cerevisiae* Z198 耐高温性能以及发酵性能提升背后的分子机理。进化菌株在 50 °C 高温胁迫下虽然停止了生长以及发酵，但其细胞活力相比于出发菌株有显著性的提升。进化菌株 *Saccharomyces cerevisiae* Z198 提高的耐高温性能促进了随后的乙醇发酵，并且减少了乳酸菌污染的风险。RNA-seq 分析发现，核糖体通路是高温胁迫下富集度最高的通路，通路上大部分基因在两株菌株中都是下调的。进一步系统比较两株菌株中碳代谢通路上基因的转录情况，结果发现进化菌株碳代谢通路中的很多关键酶（限速酶以及葡萄糖磷酸化酶）编码基因相比于出发菌株在 30 °C 条件下发生了显著性的上调表达，进化菌株碳代谢通路上关键基因的上调表达不仅能够促进发酵性能的提升，而且有助于进化菌株抵抗高温胁迫。本章节不仅为纤维素乙醇发酵提供了一株耐高温性能优异的发醇菌株，而且可以为其它菌株的高温抗逆性改造提供重要的参考信息。

第四部分对适应性进化以及理性改造提高 L-乳酸生产菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性进行了研究。过表达乳酸脱氢酶、重组酶、分子伴侣、谷胱甘肽以及 ATPase 来强化酸耐受能力并没有起到显著的效果，而适应性进化得到的进化菌株在进行低指标的乳酸发酵时展现出显著提升的低 pH 值抗逆性以及乳酸发酵性能。进化菌株在进行 pH 值 4.0 条件下的发酵能够显著减少中和剂的用量 39.8%~56.3%。本研究初步探索了运用适应性进化以及理性改造策略来提高 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性，适应性进化策略提升了菌株的低 pH 抗逆性，但距离实际应用还需要后续进一步的研究。

本论文针对生物炼制菌株在木质纤维素生物炼制过程中遭遇的三种胁迫，采取了适应性进化以及理性改造等策略来提高生物炼制菌株的胁迫抗逆性。本研究通过适应性进化策略提高了生物炼制菌株对上述三种胁迫的抗逆性，并且借助于 RNA-seq 以及 qRT-PCR 等分析，挖掘到了很多与抑制物以及高温等胁迫抗逆性相关的关键基因，能够为理性改造提高生物炼制菌株的抗逆性提供重要的基因元件和理论指导。

关键词：生物炼制菌株；适应性进化；酚类抑制物；高温；低 pH 值；抗逆机理

Adaptive evolution of biorefinery strains to improve the tolerance of phenolic inhibitors, high temperature, and low pH

Abstract

During the process of lignocellulosic biorefinery, biorefinery strains inevitably encounter various stresses, including phenolic inhibitors, high temperature, high salinity, and low pH. These stresses inhibit the cell growth and fermentation of biorefinery strains, disturbing the fermentation process. Hence, removing or relieving the inhibition derived from these stresses on biorefinery strains, is crucially important for lignocellulosic biorefinery.

In this thesis, three frequently encountered stresses (phenolic inhibitors, high temperature, and low pH) for biorefinery strains were studied. Phenolic inhibitors from the degradation of lignin, include phenolic compounds and quinones. Phenolic inhibitors are the stubbornest inhibitors because of its low water solubility and wide varieties. Prolonging biodegradation time has the capacity to remove all the inhibitors, but result in the great loss of fermentable sugars. High temperature stress is from two aspects: firstly, as for simultaneous saccharification and fermentation, a big compromise has to be made between the modest fermentation temperature of microorganisms and the optimal activity of cellulase enzyme, leading to the decrease of enzyme activity of cellulase and large cooling cost; secondly, the frequently encountered heat transfer difficulties in industrial fermenters (up to several thousands of cubic meters) inevitably lead to local overheating regions and result in the viability loss of biorefinery strains. Low-pH stress is derived from the lactic acid fermentation under low-pH condition. Conducting lactic acid fermentation under low-pH condition decreases the generation of high salinity wastewater and solid waste like CaSO₄, but the cell viability and lactic acid production of biorefinery strains were inhibited. Obtaining biorefinery strains with improved stress tolerance through adaptive evolution and metabolic engineering methods, is crucially important for highly efficient lignocellulosic biorefinery process.

The first part was study on increasing cellulosic ethanol fermentability by enhancing phenolic tolerance of *Z. mobilis* in adaptive evolution. A 198 days' laboratory adaptive evolution of *Z. mobilis* 8b was conducted in corn stover hydrolysate for increasing its phenolic aldehydes tolerance and ethanol fermentability. The obtained *Z. mobilis* Z198 demonstrated a significantly improved conversion of the most toxic phenolic aldehyde (vanillin) by 6.3-fold and cellulosic ethanol production by 21.6%. The transcriptional analysis revealed that the gene *ZMO3_RS07160* encoding SDR family oxidoreductase in the evolved strain was significantly up-regulated by 11.7-folds. The overexpression of *ZMO3_RS07160* in the parental *Z. mobilis* 8b increased the ethanol fermentability to that of the adaptively evolved strain *Z. mobilis* Z198. This study obtained a robust strain with improved phenolic tolerance, and provided a candidate gene for synthetic biology of biorefinery strains with strong phenolic aldehydes tolerance.

The second part was study on the inhibition and tolerance mechanism of biorefinery strains to *p*-benzoquinone derived from lignin degradation in various pretreated lignocellulose

feedstock. The *p*-benzoquinone content was measured in six different pretreated lignocellulose feedstocks, approximately equivalent to 12~205 mg/L when conducting SSCF under high solids loading condition. Comparing the *p*-benzoquinone tolerance and conversion capacity in various biorefinery strains, it was found that high *p*-benzoquinone tolerance of the biorefinery strains was from their capacity for *p*-benzoquinone conversion to non-toxic hydroquinone. Based on the clear genome and gene annotation of *Z. mobilis*, genes responsible for *p*-benzoquinone tolerance were mined in *Z. mobilis* through qRT-PCR analysis. Overexpression of the five key genes in *Z. mobilis* (*ZMO1696*, *ZMO1949*, *ZMO1576*, *ZMO1984* and *ZMO1399*) accelerated its cell growth and cellulosic ethanol production in *p*-benzoquinone-containing medium and lignocellulose hydrolysates. This study advances our understanding of *p*-benzoquinone inhibition behavior and the mechanism of microbial tolerance to this inhibitor and identifies the key genes responsible for BQ detoxification.

The third part uncovered the underlying mechanism of the enhanced thermotolerance and accelerated ethanol fermentability in the evolved *S. cerevisiae* Z198 through RNA-seq and genome resequencing. A robust thermotolerant *S. cerevisiae* Z100 was obtained after a 91 days' adaptive evolution at a relatively modest temperature (35 °C). The adaptively evolved *S. cerevisiae* Z100 acquired the strong thermotolerance up to 50 °C. The cell viability of *S. cerevisiae* Z100 under the enzymatic hydrolysis temperature (50 °C) for wheat straw was significantly improved. The cell viability and ethanol fermentability of *S. cerevisiae* Z100 using wheat straw feedstock were significantly improved. We uncovered that adaptive evolution led to the unique transcriptional profiling in *S. cerevisiae* Z100 using RNA-seq technique. In agreement with the improved ethanol fermentability and strengthened thermotolerance, the gene transcriptional response of carbon metabolism was enhanced at 30 °C in the evolved *S. cerevisiae* Z100. The deeply repressed gene expression of ribosome indicated ribosome would be another key thermotolerant mechanism for the evolved strain. Genome resequencing further confirmed that the outstanding thermotolerance performance of the evolved strain brought about less SNPs in the evolved *S. cerevisiae* Z100. This study would provide a robust thermotolerant *S. cerevisiae* suitable for cellulosic ethanol production and the tools of synthetic biology to improve thermotolerance of biorefinery strains.

The fourth part was study on improving low-pH tolerance of L-lactic acid producing strain *P. acidilactici* ZY271 by adaptive evolution and rational design. Overexpression of the genes encoding lactate dehydrogenase, recombinase, chaperone, glutathione and ATPase did not show the observable improvements of acid tolerance. On the other hand, the low-pH adaptive evolution showed the clear improvement of acid tolerance. The L-lactic acid generation and cell viability of the adaptively evolved *P. acidilactici* were doubled at the low pH up to 4.0 when using wheat straw as carbohydrates feedstock. However, the further decrease of pH value close to the pKa (3.86) of lactic acid led to the dramatically reduced L-lactic acid generation. This preliminary result may be used as an effective approach on improving acid tolerance for general lactic acid bacteria strains.

This thesis focused on three frequently encountered stress for biorefinery strains in lignocellulosic biorefinery, including phenolic inhibitors, high temperature, and low pH, and

adaptive evolution and rational design were carried out to improve stress tolerance of biorefinery strains. This study explored the application of adaptive evolution and rational design to improve stolerance of various stresses, mined many genes responsible for stress tolerance through RNA-seq and qRT-PCR, provided tools and guidance for rational design of biorefinery strains to improve stress tolerance.

Keywords: Biorefinery strains; Adaptive evolution; Phenolic inhibitors; High temperature; Low pH; Tolerance mechanism

目录

第 1 章 前言	1
1.1 木质纤维素生物炼制	1
1.2 生物炼制菌株	4
1.3 酚类抑制物胁迫	6
1.3.1 酚类抑制物的产生	6
1.3.2 酚类抑制物的抑制机理	7
1.3.3 生物炼制菌株对酚类抑制物的转化机理	8
1.4 高温胁迫	9
1.4.1 高温胁迫的产生	9
1.4.2 高温胁迫对于生物炼制菌株的损伤	9
1.4.3 生物炼制菌株对高温胁迫的抗逆机理	9
1.5 低 pH 值胁迫	10
1.5.1 低 pH 值胁迫的产生	11
1.5.2 低 pH 值胁迫对于生物炼制菌株的影响	11
1.5.3 生物炼制菌株对低 pH 值胁迫的抗逆机理	11
1.6 高抗逆性生物炼制菌株的构建	13
1.6.1 理性改造策略提高生物炼制菌株的抗逆性	13
1.6.2 适应性进化策略提高生物炼制菌株的抗逆性	15
1.7 本论文立题依据及主要研究内容	16
第 2 章 适应性进化提高运动发酵单胞菌的酚醛抑制物耐受能力	18
2.1 引言	18
2.2 材料与方法	19
2.2.1 菌株、培养基与培养条件	19
2.2.2 木质纤维素原料和生物炼制过程	19
2.2.3 酶和试剂	20
2.2.4 水解液制备	20
2.2.5 适应性进化	21
2.2.6 酚醛抑制物转化能力评估	21
2.2.7 水解液发酵评估	21
2.2.8 同步糖化共发酵生产乙醇	21
2.2.9 发酵产物以及细胞生长的检测	22
2.2.10 qRT-PCR 实验	22
2.2.11 重组菌株构建以及发酵评估	23
2.3 结果与讨论	25
2.3.1 出发菌株的同步糖化共发酵能力评估	25

2.3.2	长周期的适应性进化培养提高酚醛抑制物抗逆性.....	26
2.3.3	进化菌株的酚醛抑制物转化评估.....	29
2.3.4	进化菌株的同步糖化共发酵评估.....	30
2.3.5	进化菌株中酚醛抑制物耐受相关基因的转录分析.....	31
2.3.6	过表达 SDR 家族氧化还原酶 <i>ZMO3_RS07160</i> 提高菌株的发酵性能.....	32
2.4	本章小结.....	33
第 3 章	生物炼制菌株对于 <i>p</i> -苯醌的耐受机理以及抗逆性改造.....	35
3.1	引言.....	35
3.2	材料与方法.....	36
3.2.1	菌株、培养基与培养条件.....	36
3.2.2	木质纤维素原料以及脱毒.....	36
3.2.3	酶与试剂.....	37
3.2.4	<i>p</i> -苯醌与氢醌对于多种生物炼制菌株的抑制情况分析.....	37
3.2.5	生物炼制菌株对于 <i>p</i> -苯醌的转化情况分析.....	37
3.2.6	qRT-PCR 实验.....	37
3.2.7	水解液制备.....	37
3.2.8	重组菌株的构建以及 <i>p</i> -苯醌耐受评估.....	37
3.2.9	HPLC 检测方法以及 GC-MS.....	38
3.3	结果与讨论.....	43
3.3.1	预处理后木质纤维素原料中 <i>p</i> -苯醌的鉴定、定量以及脱毒.....	43
3.3.2	不同生物炼制菌株对于 <i>p</i> -苯醌以及氢醌的耐受能力.....	44
3.3.3	不同生物炼制菌株对于 <i>p</i> -苯醌转化能力的评估.....	46
3.3.4	运动发酵单胞菌中 <i>p</i> -苯醌耐受基因的挖掘.....	48
3.3.5	运动发酵单胞菌 8b 的 <i>p</i> -苯醌抗逆性强化以及纤维素乙醇发酵性能评估.....	49
3.4	本章小结.....	52
第 4 章	酿酒酵母适应性进化突变株耐高温性能提升的分子机理解析	54
4.1	引言.....	54
4.2	材料与方法.....	54
4.2.1	菌株、培养基与培养条件.....	54
4.2.2	酶与试剂.....	55
4.2.3	木质纤维素原料及后续的生物炼制过程.....	55
4.2.4	适应性进化、耐高温性能评估以及随后的乙醇发酵.....	55
4.2.5	发酵产物测定、细胞活力检测以及葡萄糖消耗延滞期.....	55
4.2.6	转录组分析.....	55
4.2.7	基因组重测序以及 SNPs 分析.....	56
4.3	结果与讨论.....	56
4.3.1	酿酒酵母 XH7 的长期适应性进化以及耐高温性能评估.....	56

4.3.2 进化菌株和出发菌株的转录全景图.....	60
4.3.3 高温胁迫和适应性进化影响了核糖体通路中基因的转录响应.....	63
4.3.4 碳代谢通路基因表达的增强有助于进化菌株耐高温性能以及发酵性能的提升..	64
4.3.5 出发菌株和进化菌株的基因组重测序对比.....	66
4.4 本章小结.....	68
第 5 章 适应性进化以及理性改造策略提高乳酸片球菌 ZY271 的低 pH 值抗逆性.....	70
5.1 引言.....	70
5.2 材料与方法.....	71
5.2.1 菌株、培养基与培养条件.....	71
5.2.2 木质纤维素原料及后续的生物炼制过程.....	71
5.2.3 酶与试剂.....	71
5.2.4 质粒构建.....	71
5.2.5 感受态制备、电转化以及阳性克隆的筛选.....	72
5.2.6 重组菌株在低 pH 值条件下的发酵性能评估.....	72
5.2.7 低 pH 条件下的适应性进化.....	72
5.2.8 进化菌株的低 pH 值抗逆性发酵评估.....	73
5.2.9 发酵产物、pH 值、细胞活力以及碱用量的计算.....	73
5.3 结果与讨论.....	76
5.3.1 理性改造提高乳酸片球菌在低 pH 值条件下的发酵性能.....	76
5.3.2 低 pH 值条件下的适应性进化.....	77
5.3.3 进化菌株的低 pH 值发酵性能评估.....	79
5.3.4 进化菌株在低 pH 值条件下的乳酸发酵减少中和剂的使用.....	80
5.4 本章小结.....	81
第 6 章 结论与展望.....	83
6.1 结论.....	83
6.2 创新点.....	84
6.3 展望.....	84
参考文献.....	86
学术成果.....	104
致谢.....	105

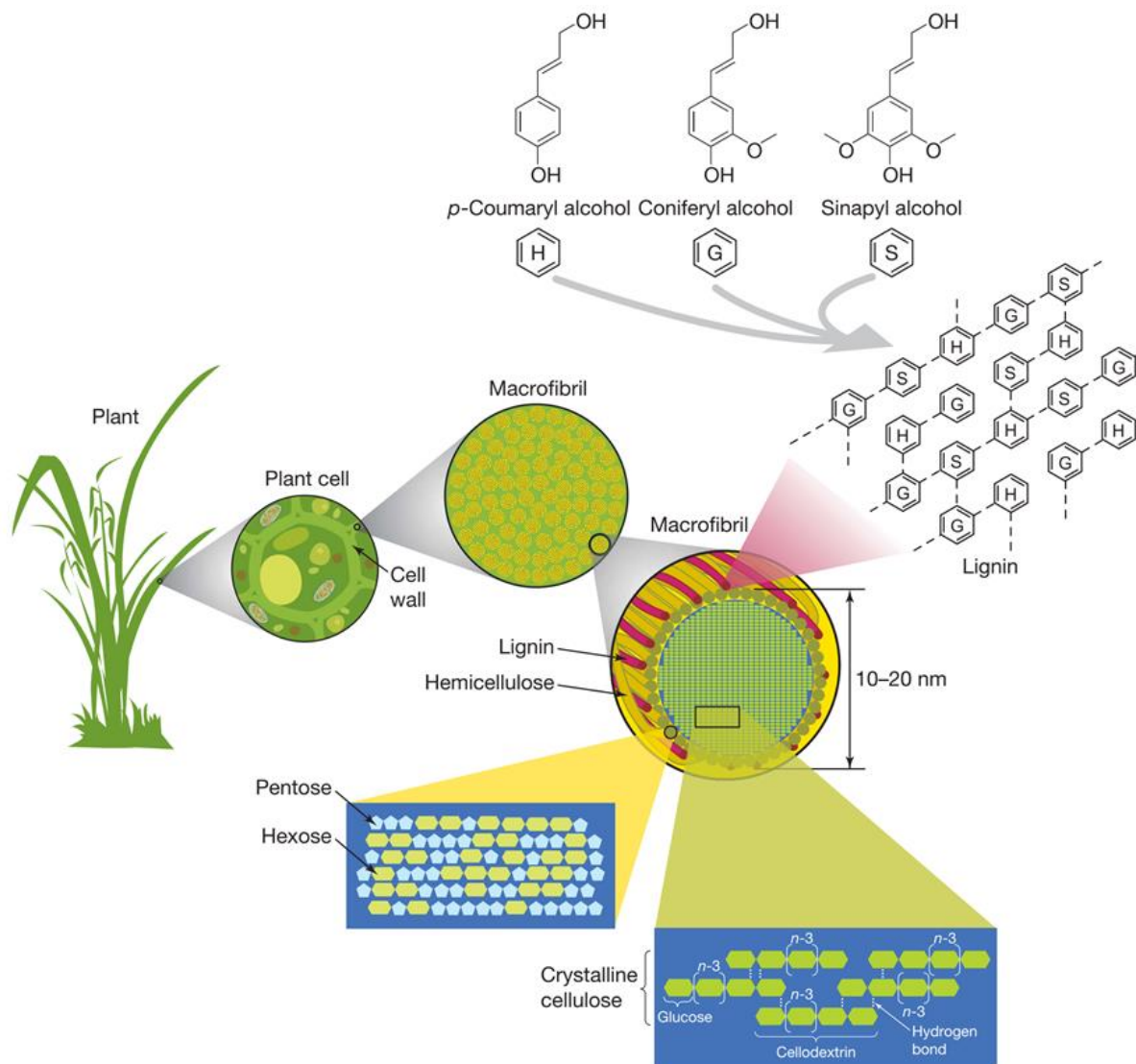
第 1 章 前言

化石能源如石油、天然气以及煤炭等，能够为人类提供能源以及多种化学品，满足人类的生活需求。随着世界人口增多和全球经济的不断增长，人类对于能源以及化学品的需求也越来越多。然而化石能源是不可再生的，其自然储量是有限的，寻找一种清洁、可再生的能源是人类亟待解决的问题。生物质，是植物通过光合作用固定自然界中的二氧化碳后形成的，在自然界中广泛存在^[1]。木质纤维素是最为丰富的生物质资源，包括农业废弃物（玉米秸秆、稻秆、甘蔗渣等）、林业废弃物、专用的能源作物以及工业废物的有机部分。这些木质纤维素材料在自然界中十分丰富，在很多情况下没有经济价值，而且这种类型的生物质不能被用作食品，不存在与食品行业的竞争。因此，利用木质纤维素生产生物燃料、生物基化学品以及生物基材料，具有良好的市场前景。

1.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素、木质素以及少量灰分组成，其中纤维素占比 35%~50% (w/w)，半纤维素占比 20%~35% (w/w)，而木质素占比 10%~30% (w/w)^[2]（图 1.1）。纤维素是一种线性的聚合物，由 β -D-葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成。在木质纤维素中，纤维素通过羟基之间的交联借助氢键和范德华力被组织成微纤维^[3]。纤维素微纤维有结晶和无定型两种区域，而且木质纤维素中大约有 2/3 的纤维素都是结晶形态^[4]。无定型形态的纤维素容易被酶水解，而结晶形态的纤维素则很难被酶水解。半纤维素是一种杂多糖，由戊糖（木糖以及阿拉伯糖）以及少量己糖（葡萄糖、半乳糖以及甘露糖）组成，一般为 50~200 个糖单元^[3,5]。尽管不同的生物质组成有差异，半纤维素在其中都是通过乙酰基以及少量的葡萄糖醛酸而高度分支化的，稳固了木质纤维素的结构^[5-7]。木质纤维素中的第三大组成成分是木质素，是一种混杂的、无定形的并且高度分支化的芳香族聚合物，主要由松柏醇、芥子醇以及香豆醇三种单元构成^[2,5]。木质素相当于半纤维素和纤维素之间的粘合剂，可以将三者牢牢捆绑在一起，这一成分赋予了植物足够的结构强度和顽抗特性。木质纤维素这种致密的结构使得木质纤维素具有强烈的生物顽抗性，这种顽抗性导致木质纤维素中的糖很难直接释放以供应微生物发酵，需要经过剧烈的预处理过程来破坏木质纤维素的顽抗性^[3,4]。

预处理过程是木质纤维素生物炼制的核心环节，木质纤维素必须经过强烈的预处理过程来打破其顽固结构^[8]。破坏木质纤维素的生物顽抗性主要通过破坏木质纤维素中的结晶区域以及增加酶解的可接触表面积。强烈的预处理过程能够有效破坏纤维素的结晶形态，结构破坏暴露出的纤维素使得水解的酶更易接近，进而能够将木质纤维素中的多糖转化为可以被微生物发酵的单糖。一种高效并且经济的预处理方式必须满足以下这些要求^[4,8]：（1）形成可被酶解的活性纤维素颗粒；（2）避免糖的损失；（3）减少影响酶解及发酵的抑制物产生；（4）最小化能源消耗；（5）减少残留物产生；（6）使用廉价化学品进行预处理；（7）设备投入成本低。

图 1.1 木质纤维素结构^[2]Fig. 1.1 The structure of lignocellulose^[2]

常用的热化学预处理方式包括酸预处理以及碱预处理^[9]。酸预处理一般采用商业化的有机酸或者无机酸进行预处理，有机酸包括乙酸^[10, 11]、柠檬酸^[12]、草酸^[12, 13]、富马酸^[14]等，无机酸包括硫酸^[15]、磷酸^[16]等。酸预处理的机制是通过亲电水解反应破坏木质素中的酯交叉连接和 β -乙醚基，半纤维素中的乙酰基以及糖苷键也会被破坏，并且还会导致单糖的降解。酸预处理的主要特点是会大量破坏半纤维素中的糖苷键，使得半纤维素降解为木糖、阿拉伯糖以及甘露糖等；酸预处理对半纤维素以及木质素的作用会增加酶解的可接触表面积，使得细胞壁疏松多孔，进而提高酶解效率^[9, 17]。酸预处理的缺点如下：（1）酸液会造成设备的腐蚀，降低设备的使用寿命；（2）酸预处理会产生大量的抑制物，这些抑制物会影响随后的酶解及发酵过程；（3）有大量酸性废水产生。碱预处理的机制是亲核取代反应破坏木质素和细胞壁聚合物之间的酯键和 β -乙醚基，并且还会溶解木质素于水相中^[9]。碱预处理的最主要特点是移除木质素组分，并且产生的抑制物很少。碱预处理的缺点如下^[17]：（1）对木质纤维素的破坏程度不如酸预处理；（2）碱预处

理后的固液分离步骤会造成部分半纤维素的损失。本实验室自主开发的干酸预处理是通过强烈的酸预处理过程来破坏木质纤维素的生物顽抗性。干酸预处理采用高的固液比进行预处理，螺带搅拌桨进行物料与酸液的混合，可以在低的蒸汽压力下进行高强度的预处理过程，降低设备成本，并且可以显著降低稀酸对于设备的腐蚀^[18,19]。预处理得到的物料呈现固态形式，可以进行高密度（堆积密度可以高达 200 kg/m^3 ）的运输，物料处于低 pH 值和高抑制物含量的状态，能够进行长期储存^[20,21]。

脱毒是生物炼制过程中的一个重要环节，尤其是对于抑制物产生较多的酸预处理。高温高压下强烈的预处理过程，会导致大量的抑制物产生。这些抑制物会抑制糖化过程中纤维素酶的活性，更重要的是还会影响后期的微生物发酵，导致发酵过程难以进行^[22-25]。目前常用的脱毒方式包括过碱化处理^[7,13]、水洗^[26,27]、活性炭处理^[28]以及微生物脱毒^[29,30]等。过碱化处理是通过添加过量的 Ca(OH)_2 来脱除抑制物，可能的机理是通过沉淀作用以及转化有毒的抑制物为无毒或者低毒的物质来实现脱毒；过碱化处理具有操作简单、效果显著等优点，但是需要进行固液分离的操作，同时还会造成部分糖的损失^[7,13]。水洗可以有效去除预处理后物料中的抑制物，但会产生大量难以处理的酸性废水，并造成木糖的大量损失^[26,27]。活性炭处理能够吸附大部分的抑制物，但是需要经过固液分离操作，并存在可发酵性糖的损失^[28]。微生物脱毒是利用部分微生物（包括细菌^[29]、酵母^[30]等）能够降解抑制物的特性实现抑制物的脱毒，但是存在抑制物脱除不完全、脱毒周期长等缺点。本实验自主开发的生物脱毒是为了解决干酸预处理后产生的大量抑制物，利用专司脱毒的树脂枝孢霉 *Amorphotheca resiniae* ZN1 在固态情况下来进行抑制物的脱除。生物脱毒具有以下优点^[31,32]：（1）脱毒过程不会产生任何废水，也不需要进行固液分离操作；（2）脱毒终点可控，可以极大的保留预处理后释放的木糖；（3）在通气条件下，脱毒时间可以从 72 h 缩短到 36 h，显著缩短脱毒周期。

稀酸预处理后物料中的半纤维素基本完全降解为单糖，但是大部分的纤维素仍然是以聚合物的形式存在，需要通过纤维素酶来进行进一步的水解。纤维素酶主要包括三类：纤维素内切酶、外切葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶^[33-35]。纤维素内切酶可以随机切开纤维素链内部的连接，外切葡聚糖酶只能攻击链的尾端，形成纤维二糖，而 β -葡萄糖苷酶则可以作用于低聚寡糖以及纤维二糖生成葡萄糖。碱预处理不同于稀酸预处理，大量的纤维素以及半纤维素经过预处理后都没能完全释放，需要纤维素酶和半纤维素酶的共同作用才能将物料中的糖释放完全。半纤维素酶的种类繁多，内-1,4- β -木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 α -葡萄糖醛酸酶、 α -阿拉伯呋喃糖酶、乙酰木聚糖酯酶等可以作用于木聚糖的水解， β -甘露聚糖酶以及 β -甘露糖苷酶则可以作用于甘露聚糖的水解^[35]。

木质纤维素生物炼制过程中的糖化与发酵一般分为两种模式，一种是分步糖化共发酵^[36-39]（Separate hydrolysis and fermentation, SHF），而另一种是同步糖化共发酵^[40-43]（Simultaneous saccharification and fermentation, SSF）。SHF 是糖化与发酵分开进行的过程，将预处理后的木质纤维素先进行酶水解，固液分离得到水解液，然后利用水解液进行发酵^[38]。SHF 主要应用于糖化与发酵过程难以同步进行的发酵过程，例如谷氨酸棒状

杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 的氨基酸发酵, 由于 *C. glutamicum* 的生长以及发酵 pH 值为 7.0, 而这与纤维素酶的催化 pH 值 (4.75-5.25) 难以匹配^[36, 39]。SHF 的缺点如下^[38]: (1) 在糖化过程中, 过高的糖浓度会抑制纤维素酶的催化能力, 降低酶解效率; (2) 需要进行固液分离操作, 成本很高; (3) 在发酵阶段过高糖浓度带来的渗透压会对菌株的生长产生影响。SSF 是糖化与发酵同步进行的过程, 不存在固液分离过程, 可以在一台设备中完成糖化与发酵过程, 降低了设备投入成本, 操作简单, 但是往往由于糖化条件 (包括温度、pH 值等) 与发酵菌株的发酵条件不匹配, 会降低 SSF 过程的酶解效率, 增加冷却成本^[40, 41]。目前, 也有很多研究采用先预糖化再同步糖化共发酵, 这种方式显著增强酶解效率, 提高发酵性能, 但是对于大型的发酵设备, 糖化后的冷却仍然是一个不小的挑战^[44, 45]。本实验室自主设计的螺带搅拌桨反应器, 能够实现高固体含量条件下的同步糖化共发酵, 螺带搅拌桨反应器大大降低了设备能耗, 而高固体含量下的发酵有助于获得高指标的发酵产物^[40]。

干法生物炼制技术是本实验室自主开发的, 实现了将木质纤维素转化为发酵产物的全过程, 包括干酸预处理、生物脱毒以及后续的同时糖化共发酵等过程^[46] (图 1.2)。干酸预处理与生物脱毒解决了木质纤维素的生物顽抗性以及预处理后的抑制物等问题, 为后续的糖化与发酵过程保留了大量的可发酵性糖, 而螺带搅拌桨反应器实现了在高固体含量下的同步糖化共发酵, 这些过程的有效结合有助于干法生物炼制技术的工业化应用。目前, 通过干法生物炼制技术, 很多发酵产物包括乙醇^[46]、葡萄糖酸^[47]、微生物油脂^[41]、L-乳酸^[48]、D-乳酸^[49]等的浓度均达到行业领先水平。

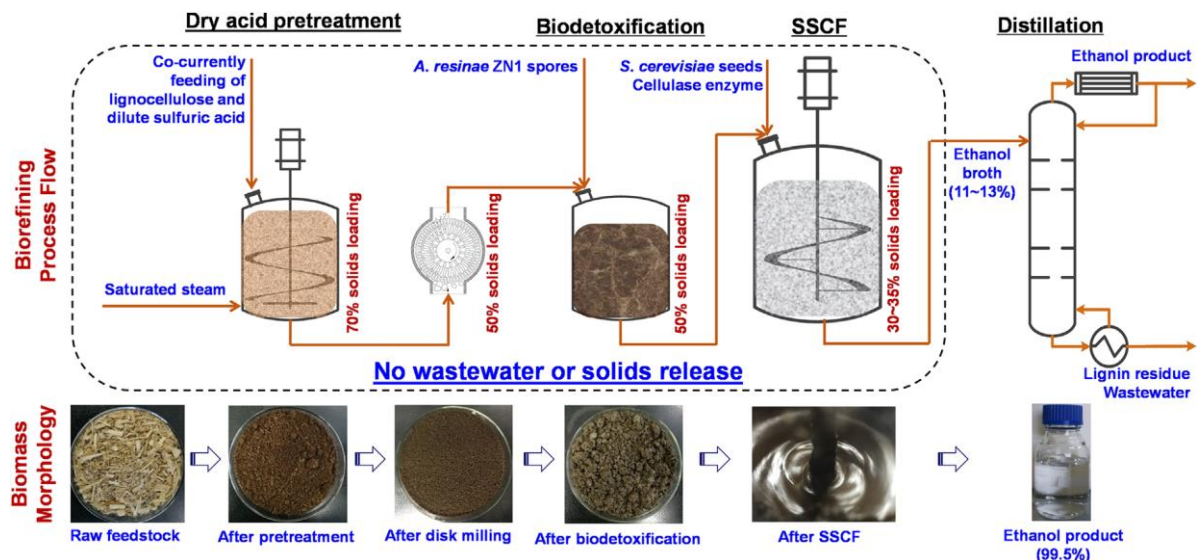


图 1.2 干法生物炼制技术生产纤维素乙醇图解^[46]

Fig. 1.2 Diagram of DryPB biorefining process for cellulosic ethanol production^[46]

1.2 生物炼制菌株

常用的生物炼制菌株包括酿酒酵母 *S. cerevisiae*、乳酸片球菌 *P. acidilactici*、运动发

酵母单胞菌 *Z. mobilis*、谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* 以及氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 等。这些菌株对于木质纤维素体系比较适应，能够耐受多种生物炼制体系中的胁迫，而有些发酵菌株由于对木质纤维素体系不适应，很难用于木质纤维素体系的发酵，例如土曲霉 *Aspergillus terreus* M69 在 1 g/L 低浓度乙酸条件下就很难进行衣康酸的发酵^[50]。另外，随着生物炼制技术的不断发展，对于生物炼制菌株的要求也不断增多，需要菌株具备多方面的抗逆性能，包括抑制物抗逆性、耐高温性能、低 pH 值抗逆性以及高盐抗逆性等^[51, 52]。

酿酒酵母 *S. cerevisiae* 是一种常用的纤维素乙醇发酵菌株，对于木质纤维素来源的抑制物具有良好的耐受能力，能够利用不同的原料进行高指标的乙醇发酵^[46, 53, 54]。据报道，*S. cerevisiae* XH7 能够以预处理并脱毒的麦秆为原料进行 SSCF 生产高达 101.4 g/L 的乙醇^[46]。*S. cerevisiae* DQ1 不仅具有良好的抑制物耐受能力，而且还具有优异的耐高温性能。据报道，*S. cerevisiae* DQ1 能够利用玉米芯残渣生产 62.7 g/L 的乙醇^[53]，并且在 40 °C 高温下能够利用脱毒后的玉米秸秆生产 48 g/L 乙醇^[54]。另外，由于 *S. cerevisiae* 对低 pH 的抗逆性，也被改造用于生产乳酸等。Watcharawipas 等 2021 年通过在 *S. cerevisiae* 中表达来源于假肠膜明串珠菌 *Leuconostoc pseudomesenteroides* 中的 D-乳酸脱氢酶，敲除甘油生产途径中的 GPD1 和 GPD2，并弱化乙醇生产路径中的醇脱氢酶 ADH1，实现了 40.0 g/L 的 D-乳酸生产^[55]。

乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 是本实验室从高温乙醇发酵过程中筛选出来的一株乳酸发酵菌株，能够产生混合的 L-乳酸和 D-乳酸，具有如下优点^[42, 56]：（1）耐高温性能优异，能够在 42 °C 条件下进行 SSCF 生产纤维素乳酸；（2）自身能够产生抗菌肽，可以进行开放式的乳酸发酵；（3）对于木质纤维素来源的抑制物具有良好的耐受能力。目前，已经通过很多的理性改造来进一步提升 *P. acidilactici* 的发酵性能，Yi 等 2016 年通过分别敲除 *P. acidilactici* DQ2 中的 L-乳酸脱氢酶以及 D-乳酸脱氢酶获得了产单一手性的 D-乳酸生产菌株以及 L-乳酸生产菌株^[57]。Qiu 等在此基础上进一步实现了两株单一乳酸生产菌株的木糖利用能力以及酚类抑制物抗逆改造^[48, 49, 58]。

运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 是一株天然乙醇生产菌株，具有优异的纤维素乙醇发酵性能^[59]。相比于酵母的糖酵解途径（Embden-Meyerhof-Parnas, EMP），*Z. mobilis* 具有独特的 ED（Entner-Doudoroff）途径来代谢葡萄糖生产乙醇；ED 途径产生的 ATP 比 EMP 途径少了一半，但途径较短具有更高的乙醇得率。目前，很多研究通过强化 *Z. mobilis* 的性能来进一步增强其应用价值。Zhang 等 1995 年在 *Z. mobilis* 中导入了木糖利用途径，使得 *Z. mobilis* 能够利用木质纤维素中的戊糖（阿拉伯糖以及木糖等）^[60]。Zhang 等 2013 年在 *Z. mobilis* 中表达了赖氨酸及甲硫氨酸合成的关键基因 *yfdZ* 和 *metB*，实现了 *Z. mobilis* 在不添加酵母提取物的平板中生长，降低了 *Z. mobilis* 的氮源需求^[61]。另外，由于 *Z. mobilis* 具有丰富的抑制物转化酶系，很多研究致力于挖掘 *Z. mobilis* 中抑制物转化的关键基因并应用于自身的抗逆性强化或者其它菌株的抗逆改造。Yi 等通过 DNA 芯片技术挖掘到了 *Z. mobilis* ZM4 中响应 3 种典型酚醛抑制物的关键基因 *ZMO1116*、

ZMO1696 以及 ZMO1885^[62]。Wang 等在 *Z. mobilis* ZM4 中进行呋喃抑制物的强化改造, 验证了一个 NADPH 依赖型的醇脱氢酶 ZMO1771 对于转化糠醛以及 5-羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural, HMF) 的重要作用^[63]。

谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* 是一株 GRAS (Generally recognized as safe) 菌株, 常用于工业化生产各种氨基酸等, 对于木质纤维素体系也具有良好的适应能力。目前, *C. glutamicum* 的氨基酸生产种类以及碳源谱在不断扩大, Melanie 等在 *C. glutamicum* 中异源表达 *dpkA* 实现了肌氨酸的生产, 改造菌株利用木糖能够生产 8.7 g/L 肌氨酸^[64]。Li 等通过调整 *C. glutamicum* 的代谢流, 实现了 *C. glutamicum* 的 L-高亮氨酸生产^[65]。另外, *C. glutamicum* 对于木质纤维素来源的抑制物具有很强的降解能力, Zhou 等发现 *C. glutamicum* 能够转化 HMF 以及糠醛为相对应的酸, 并且能够彻底降解三种典型的酚醛抑制物 (*p*-羟基苯甲醛、丁香醛以及香草醛)^[66]。

氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* 由于具有独特的膜结合型葡萄糖脱氢酶以及抑制物转化能力, 能够免受木质纤维素来源抑制物的影响进行糖酸的发酵^[67]。Zhou 等 2017 年利用 *G. oxydans* NL71 来进行木质纤维素水解液的全细胞催化生产了 63.0 g/L 葡萄糖酸以及 33.8 g/L 木糖酸^[68]。据报道, *G. oxydans* 还能够利用木质纤维素来源的非葡萄糖碳源 (木糖、甘露糖、半乳糖以及阿拉伯糖) 生产混合型的糖酸^[69]。

1.3 酚类抑制物胁迫

生物炼制菌株会遭遇到来源于抑制物的胁迫, 抑制物胁迫会影响纤维素酶的酶解效率, 更重要的是还能抑制发酵菌株的细胞生长和发酵性能^[22]。了解抑制物胁迫的来源以及对于发酵菌株的抑制机理, 有助于通过工程策略来针对性地提高生物炼制菌株的抗逆性。下面这一小节主要论述酚类抑制物的产生、对于生物炼制菌株的抑制机理以及生物炼制菌株的抗逆机理。

1.3.1 酚类抑制物的产生

木质纤维素中的不同组分在强烈的预处理过程中会产生不同类型的抑制物^[25], 如图 1.3 所示。呋喃类抑制物包括糠醛以及 HMF, 糠醛产生于纤维素以及半纤维素来源的己糖降解, 而 HMF 则来源于戊糖的降解^[33, 70, 71]。有机酸类抑制物包括乙酸、阿魏酸以及甲酸等, 乙酸来源于乙酰基的断裂^[72, 73], 而阿魏酸以及甲酸则分别来源于 HMF 以及糠醛的进一步降解^[9, 14, 17, 74]。酚类抑制物来源于木质素的过度降解, 根据其官能团、甲基化等的不同^[62], 可以分为三类: (1) 愈创木酚类, 包括香草醛、香草醇、香草酸、松柏醛以及愈创木酚等; (2) 羟基类, 包括 *p*-羟基苯甲醛、*p*-羟基苯甲醇、*p*-羟基苯甲酸等; (3) 丁香基类, 包括丁香醛、丁香醇以及丁香酸等。醌类抑制物则来源于酚类组分的进一步氧化, 也属于酚类抑制物中的一个分支, 其中 *p*-苯醌来源于 *p*-羟苯基物质 (包括 *p*-羟基苯甲酸、*p*-羟基苯甲醛以及 *p*-羟基苯甲醇等) 的进一步氧化^[75]。与呋喃类抑制物以及有机弱酸类抑制物相比, 酚类抑制物具有以下几个特点^[57, 76, 77]: (1) 酚类抑制物水溶性较差、含量较低并且种类繁多, 难以通过水洗等方法除去; (2) 酚类抑制物生物降解

缓慢，延长生物脱毒时间会造成木糖的大量损失。

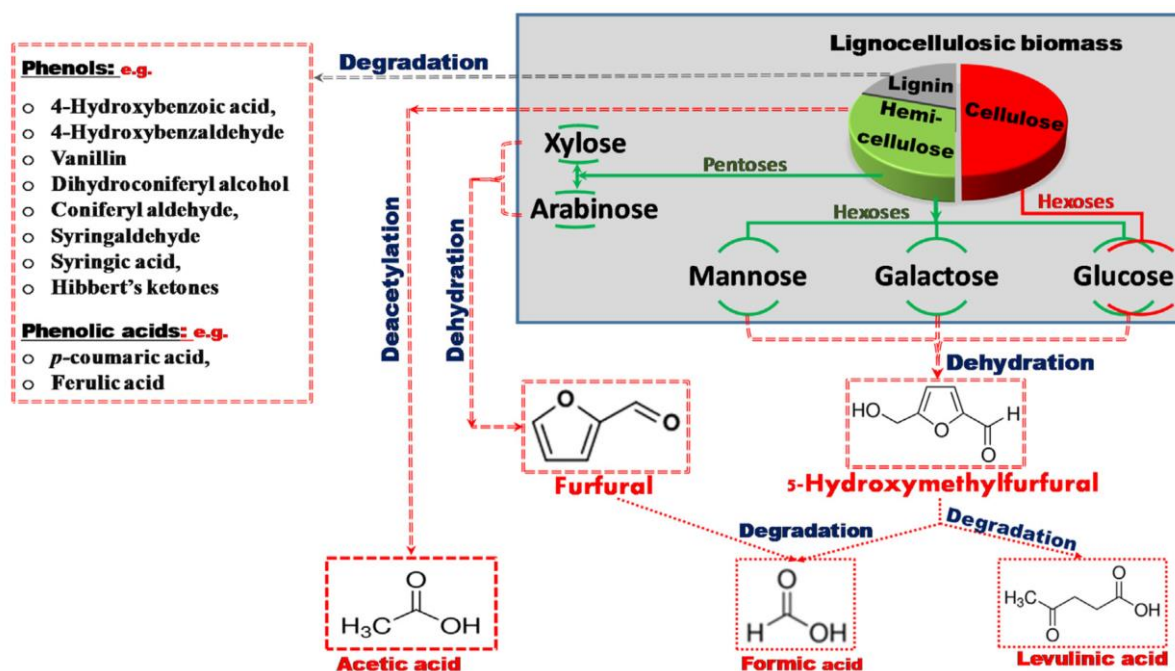


图 1.3 木质纤维素物质来源抑制物的产生^[25]

Fig. 1.3 Generation of inhibitors derived from lignocellulosic biomass^[25]

1.3.2 酚类抑制物的抑制机理

酚类抑制物能够强烈抑制生物炼制菌株的细胞生长以及发酵性能^[77, 78]。据报道，0.6 g/L 的 *p*-香豆酸能显著抑制 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞生长以及乙醇发酵^[77]；0.3 g/L 的香草醛以及 1 g/L 丁香醛都能极大地抑制黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 的菌体生长^[78]；0.9 g/L 的香草醛能显著影响 *Z. mobilis* ZM4 的细胞生长和乙醇发酵^[62]。而醌类抑制物在很低的浓度下就能对发酵菌株产生强烈的抑制作用^[79, 80]。据报道，2 mg/L 低浓度 *p*-苯醌可以显著抑制酵母的葡萄糖消耗速率，20 mg/L 的 2,6-二甲基苯醌也能轻微抑制酵母的乙醇发酵^[79]；100 mg/L 的 *p*-苯醌会强烈抑制 *P. acidilactici* ZY15 的 D-乳酸发酵性能^[80]。酚类抑制物和醌类抑制物对于菌株的抑制机理很类似，都能够抑制糖酵解过程中的关键酶（丙酮酸脱羧酶等）的酶活，进而抑制细胞的生长，造成细胞凋亡^[81]。酚类抑制物还能导致胞内的活性氧自由基（Reactive oxygen species, ROS）积累，ROS 的积累不仅会造成酵母细胞的程序性死亡，而且还会影响细胞膜的完整性（图 1.4）^[82-85]。另外，醌类抑制物还会影响胞内 DNA 拓扑异构酶的活性，进而影响细胞中 DNA 的复制^[86, 87]。

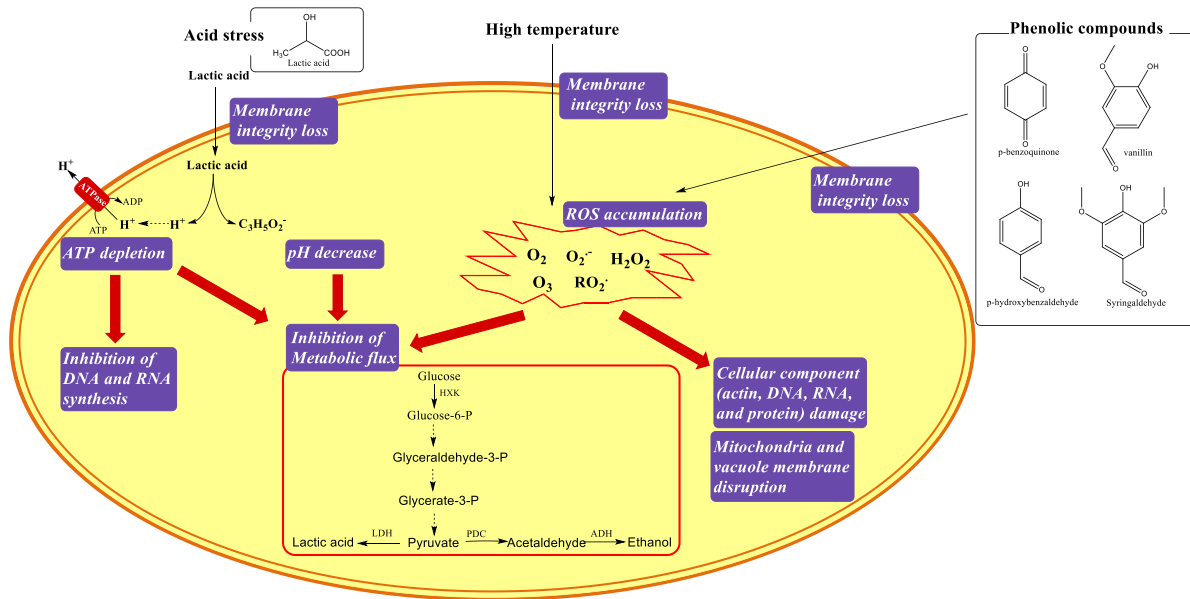


图 1.4 酸胁迫、高温以及酚类组分对于菌株的抑制机理

Fig. 1.4 Inhibition mechanism of acid stress, high temperature, and phenolic compounds

1.3.3 生物炼制菌株对酚类抑制物的转化机理

生物炼制菌株对于酚类抑制物耐受的最主要机理是通过将酚类抑制物转化为低毒性的醇或酸^[34, 88]，只有部分微生物具有能将酚类抑制物转化为糖酵解途径中的中间产物进而实现完全降解^[89-91]。

酚类抑制物完全降解的途径在 *C. glutamicum* 中研究最多。Shen 等 2005 年在 *C. glutamicum* RES167 中发现了龙胆酸盐/3-羟基苯甲酸盐代谢途径来完全降解酚类组分，邻羟基苯甲酸以及间羟基苯甲酸在多种酶（水杨酰腺苷一磷酸连接酶、水杨酰-CoA 合成酶、水杨酰-CoA 5-羟化酶以及龙胆酸盐 1,2-双加氧酶等）的催化下，生成水杨酰-AMP、2,5-二羟基苯甲酸等中间产物，由龙胆酸盐 1,2-双加氧酶催化开环，最后在顺丁烯二酸异构酶以及反丁烯二酸水解酶催化下生成丙酮酸和反丁烯二酸^[89]。另外，苯酚、苯甲醇以及苯甲酸还可以通过儿茶酚以及 *p*-羟基苯二酚途径来进行完全降解^[90]。Ni 等 2013 年也在鞣丸酮丛毛单胞菌 *Comamonas testosteroni* CNB-1 中发现了原儿茶酸 4,5-裂解途径^[91]。Qi 等 2007 年也在 *C. glutamicum* 中通过比较蛋白组学发现酚类组分代谢途径与糖异生途径是借助果糖-1,6-二磷酸酯酶来进行连接的^[92]。Hu 等 2018 年发现皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271 能够转化 *p*-羟基苯甲醛为乙酰-CoA 用于油脂合成^[93]。Takenaka 等 2011 年在伯克霍尔德菌 *Burkholderia* AK-5 中发现了氢醌完全降解的途径，氢醌可以通过 1,2,4-三羟基苯酚中间体最终被完全降解成水和二氧化碳^[94]。

然而，大多数的微生物都不具备完全降解酚类抑制物的能力，只能通过自身的过氧化氢酶、短链脱氢酶以及醛酮还原酶等将毒性较强的酚醛抑制物等转化为相对应低毒性甚至无毒的醇或者酸^[62, 67, 80, 89, 95]。Zhou 等 2019 年通过 DNA 芯片技术挖掘到了氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 中与酚醛抑制物转化相关的膜结合型氧化还原酶^[67]。

Wang 等 2016 年发现皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271 能够通过胞内的醇脱氢酶在 72 h 内将 1.5 g/L 丁香醛完全转化为丁香酸^[95]。Yi 等借助 DNA 芯片技术挖掘到了运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 中响应三种典型酚醛抑制物胁迫的氧化还原酶基因^[62]。

1.4 高温胁迫

随着生物炼制技术的不断发展,对于生物炼制菌株具备高温抗逆性的需求也在不断增大。了解高温胁迫的产生、抑制机理以及生物炼制菌株的耐高温机制对于提高菌株的高温抗逆性至关重要。

1.4.1 高温胁迫的产生

同步糖化共发酵过程中,糖化过程需要在生物炼制菌株生长的温度下进行以维持菌株的细胞活力,这会降低纤维素酶的酶解效率,增加冷却成本,提高发酵菌株的高温抗逆性来实现高温条件下的 SSF 具有重要意义^[96,97]。另外,大型发酵罐传热不均导致的局部过热也会抑制生物炼制菌株的生长和发酵性能。

1.4.2 高温胁迫对于生物炼制菌株的损伤

高温胁迫会对生物炼制菌株造成多方面的影响,主要分为以下几方面的影响^[98]:(1) 高温胁迫会造成细胞中蛋白质的结构变化及缠绕、非特异蛋白的聚集,进而影响细胞中代谢过程的正常进行;(2) 高温胁迫对于细胞的内部结构有致命性的影响,尤其是对于真核生物,高温会导致细胞骨架的缺陷^[99-101];(3) 细胞核中的生物学过程也会受到高温胁迫的影响,RNA 剪切体^[102]以及核糖体蛋白的合成^[103]在高温下都被严重抑制(图 1.4);(4) 高温胁迫也会造成 ROS 的积累,ROS 的过量累积会大量破坏胞内组分,导致脂质过氧化、蛋白质氧化以及基因损伤等^[104]。上述这些影响都会使得细胞循环的停止以及细胞生长、繁殖的停滞,进而导致细胞凋亡。

1.4.3 生物炼制菌株对高温胁迫的抗逆机理

高温对于生物炼制菌株的损伤很大,而生物炼制菌株也会通过一系列的响应来应对高温胁迫,其中关于酵母耐高温机理的研究最为广泛。酵母的高温抗逆机理主要包括热休克蛋白、海藻糖以及糖原合成、ATP 酶以及抗氧化保护等。

热休克蛋白(Heat shock proteins, Hsps)能够防止高温损伤后的蛋白质发生聚集、复性受损的蛋白质、清除不可逆聚集的蛋白质以及提高可溶性蛋白的热稳定性^[105]。Hsps 几乎是所有微生物抵抗高温胁迫所必需的,并且 Hsps 缺陷菌株的耐高温性能可以通过相对应基因的转染或者表达而重新获得^[106]。而且,有研究发现,通过在温和的热胁迫下诱导的 Hsps 能够为致死温度下的高温胁迫提供保护^[107]。在酵母中,Hsps 一般按照分子量以及功能进行命名,其中主要的 Hsps 包括小分子 Hsps、Hsp12、Hsp70s 以及 Hsp90s 等^[105]。Hsp70 分子伴侣系统是其中最大并且高度保守的 Hsps 家族,大部分的 Hsp70s 在细胞中是组成型表达,在受到高温胁迫的细胞中表达量还会提高^[108]。在非胁迫状态下,Hsp70s 会协助蛋白质的从头合成,而在高温胁迫下,它们会参与聚集蛋白的再增溶以及

维持展开状态的蛋白处于溶解状态。Hsp90s 主要参与一些顾客蛋白（重要的激酶以及转录调控因子）的成熟和稳定^[109, 110]。小分子 Hsps 如 Hsp26 可以与蛋白低聚物中受损部位发生相互作用以防止顾客蛋白发生不可逆聚集^[111]。Hsp12 作为一种特殊的分子伴侣可以与细胞膜发生相互作用，其功能不同上述所有的 Hsps^[112]。在正常生理状态下，Hsp12 以一种无定形的状态溶解于细胞质中，而在高温胁迫下，Hsp12 会以一种螺旋状态与酵母细胞膜结合发挥作用，可以稳定细胞膜的流动性。

当遭受高温胁迫时，酵母可以通过增加海藻糖以及糖原的合成来保护自身免受高温损伤。海藻糖是酵母中常见的储存多糖，能够在不同胁迫（低 pH 值^[113, 114]、高温^[115]以及高盐浓度^[116]等）下稳定细胞膜、蛋白质以及核酸的正常运作。Hottiger 等 1994 年发现海藻糖在高温胁迫下可以作为蛋白质保护剂以及非特定蛋白聚集的抑制剂而发挥作用^[115]。海藻糖的合成是由海藻糖合酶复合物催化的，包括两个酶亚基海藻糖-6-磷酸合酶（Trehalose-6-phosphate synthase 1, Tps1）、海藻糖-6-磷酸酶（Tps2）以及两个调控亚基海藻糖磷酸合酶调节亚基（ α,α -trehalose-phosphate synthase, Tsl1）Tsl1 和海藻糖磷酸合酶调节亚基（Trehalose-6-phosphate synthase 3, Tps3）^[105, 117]。在高温胁迫下，TSL1 编码的 Tsl1 会被诱导强烈表达，大量激活 TPS 复合物来实现海藻糖的合成^[118]。当酵母从高温胁迫中恢复到正常生理状态时，Tps3 会被磷酸化进而抑制 Tps2 的活性，导致海藻糖-6-磷酸的大量累积，而海藻糖-6-磷酸的增加会抑制 Tps1 的活性，进而终止海藻糖的合成^[119]。糖原对于酵母的耐高温性能也有重要作用，糖原作为酵母中的另一储存多糖，可以在高温胁迫时通过迅速转化为海藻糖从而提高菌株的高温抗逆性^[120, 121]。

ATP 酶对于酵母的耐高温具有重要意义。当处于高温胁迫时，酵母胞质中的 pH 值会由于细胞膜透化作用而实质性地下降，胞内 pH 值（intracellular pH, pH_i）下降会干扰胞质中氧化还原反应的调节，影响胞内 pH_i 的内稳态^[122]。H⁺-ATPase 能够消耗 ATP 逆浓度梯度泵出 H⁺，维持酵母中的 pH 值内稳态^[123]。

来源于高温的氧化损伤是高温胁迫下的主要损伤之一，而酵母中有多种机制来应对氧化损伤。酶催化的抗氧化保护包括大量的抗氧化保护酶，例如超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）、过氧化物酶以及过氧化氢酶等。超氧化物歧化酶是其中最为重要的抗氧化保护剂，能够将胞内的 O₂ 转化为 H₂O₂，而 H₂O₂ 可以通过后续的过氧化氢酶分解为 H₂O 和 O₂^[124]。SOD 中的锰超氧化物歧化酶（MnSOD）Sod2 可以有效清除线粒体中的 ROS，起到保护线粒体中的离子转运通道以及维持胞内氧化还原环境稳态的重要作用。另外，过氧化物酶具有多种保护功能，不仅可以直接作为抗氧化剂参与抗氧化保护，而且还可以作为分子伴侣调控信号转导^[125]。

1.5 低 pH 值胁迫

生物炼制菌株在进行发酵的过程中难免会遭受到低 pH 值胁迫，尤其是对于生产酸性物质如乙酸以及乳酸等的菌株。本小节主要论述低 pH 值胁迫的产生、低 pH 值胁迫对于发酵菌株的影响以及生物炼制菌株如何抵抗低 pH 值胁迫。

1.5.1 低 pH 值胁迫的产生

微生物乳酸发酵过程中, 乳酸在发酵液 pH 值低于 pKa (3.86) 时, 会扩散进入到细胞中; 而胞内的 pH 值高于乳酸的 pKa, 乳酸会电离出乳酸根和 H^+ , 胞内这些离子的积累会抑制细胞生长^[126]。为了防止这一危害的产生, 传统乳酸发酵需要添加中和剂 (例如碳酸钙、氢氧化钙、氢氧化钠等) 中和乳酸生成乳酸钠或者乳酸钙; 为了回收得到乳酸, 需要添加大量的硫酸来置换得到乳酸, 生成大量难以处理的石膏 $CaSO_4$ 等^[127, 128]。乳酸的中和以及酸化不仅会使得下游过程复杂化, 增加工艺成本, 而且还会产生难处理的石膏副产物。目前已经有好多研究采用在低 pH 值条件下进行乳酸发酵以减少中和剂的使用, 但是在低 pH 值下发酵, 生物炼制菌株会受到低 pH 值的胁迫^[127-131]。

1.5.2 低 pH 值胁迫对于生物炼制菌株的影响

乳酸片球菌 *P. acidilactici* 是天然能产乳酸的微生物, 在 pH 值 5.0 条件下, *P. acidilactici* 的乳酸发酵受到了强烈的抑制^[42, 56]。低 pH 值胁迫对于乳酸菌的影响是多方面的, 不仅会对胞内内环境造成影响, 而且还会影响细胞膜的组成 (图 1.4)^[56]。在低 pH 值环境下, 干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 细胞膜中的脂质结构和功能会发生改变, 单不饱和脂肪酸含量会增加, 进而影响到细胞膜的完整性和流动性^[132, 133]。微生物胞内的蛋白质在酸性条件下结构和功能都会被改变, 导致细胞中的代谢无法正常进行^[134, 135]。低 pH 值条件还会造成细胞中大量的 ROS 积累, ROS 会破坏细胞中的生物大分子 (DNA 以及蛋白质等), 进而导致细胞凋亡^[135, 136]。另外, 乳酸菌在低 pH 值胁迫下, pH_i 下降会导致 DNA 的脱嘌呤和脱嘧啶, 而 DNA 的损伤会抑制乳酸菌生长和繁殖^[137]。

1.5.3 生物炼制菌株对低 pH 值胁迫的抗逆机理

低 pH 值胁迫会对菌株的生长以及发酵造成巨大的影响, 而微生物自身也有多种机制用于抵抗低 pH 值胁迫 (图 1.5)^[138]。微生物抵抗低 pH 值胁迫主要有以下几种机制:

- (1) 调节细胞膜组分^[139, 140];
- (2) ATP 酶^[141-144];
- (3) 自身代谢产生 NH_3 中和胞内的 H^+ ^[145-151];
- (4) 谷氨酸脱羧酶^[152-154];
- (5) 蛋白质以及 DNA 等的损伤修复机制^[155, 156];
- (6) 谷胱甘肽^[157, 158]。

在低 pH 值条件下, 乳酸菌可以通过调整细胞膜的组分来抵抗低 pH 值胁迫。在低 pH 值环境下, 乳酸菌可以通过增加不饱和脂肪酸 $C_{18:1}$ 和 $C_{20:1}$ 以及长链脂肪酸的含量来增强低 pH 值抗逆性能^[139]。双歧杆菌 *Bifidobacterium* 和短双歧杆菌 *Bifidobacterium breve* 在添加吐温-80 的培养基培养会增加 $C_{18:1}$ 以及长链脂肪酸的含量, 低 pH 值抗逆性能也大幅增强了^[140]。

ATP 酶对于乳酸菌抵抗低 pH 值胁迫至关重要。F₀F₁-ATP 酶普遍存在于细菌中, 由膜结合型的 F₀ 大亚基和胞质游离型的 F₁ 大亚基组成; F₁ 大亚基主要作用于 ATP 的合成和分解, 而 F₀ 大亚基则负责转运胞内的 H^+ 到胞外以维持 pH_i 稳态^[141, 142]。Matsumoto 等通过比较多种 *Bifidobacterium* 在低 pH 值条件下的耐受能力以及相对应 H^+ -ATPase 催化的最适 pH 值, 发现低 pH 值耐受能力越强的菌株, 其 H^+ -ATPase 的最适 pH 值越低

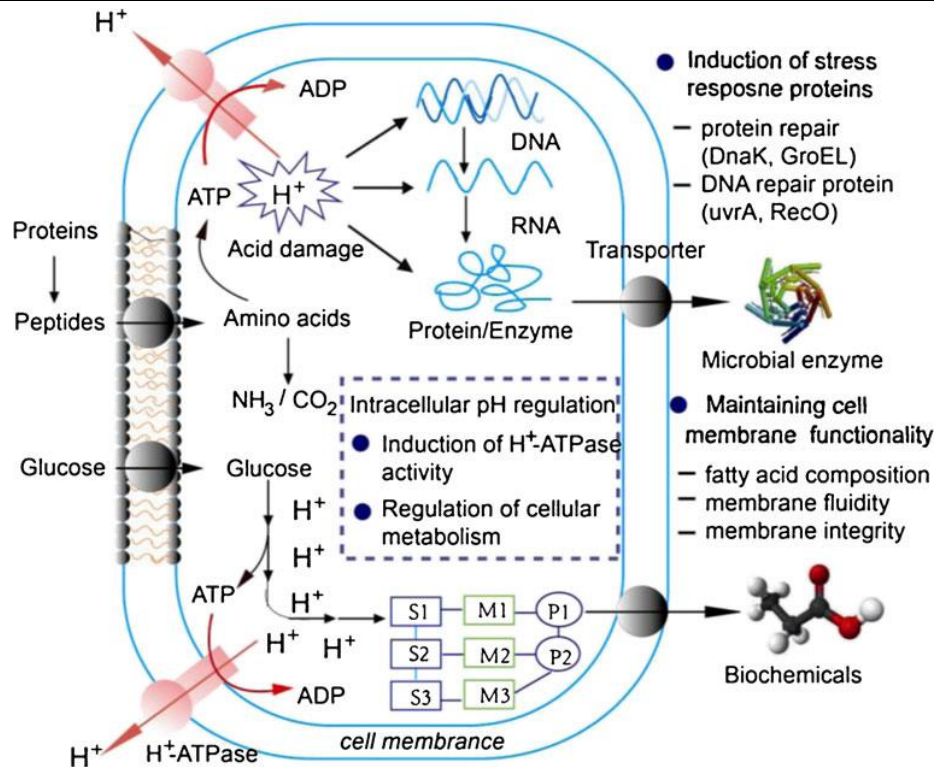
[143]。Miwa 等研究了链球菌 *Streptococcus bovis* 的 H⁺-ATPase 突变菌株 Mutation 2 的低 pH 值抗逆性能, 结果发现突变后的 H⁺-ATPase 的酶活相比于未突变的显著降低了, 进而导致突变株不能够在 pH 值 5.5 条件下正常生长^[144]。另外, K⁺-ATPase 对于维持 pHi 稳态也有重要作用, 变形链球菌 *Oral Streptococcus* 在添加 25 mmol/L 的 K⁺后, pHi 可以从 5.5 上升到了 6.14^[135]。

NH₃ 可以用于中和胞内的 H⁺ 以提高 pHi, 而微生物中存在多种代谢系统产生 NH₃ 用于维持 pHi 稳态。精氨酸脱亚胺酶 (Arginine deiminase, ADI) 系统是微生物中很常见的 NH₃ 来源之一, 包括三个重要的酶: 精氨酸脱亚胺酶、鸟氨酸氨基甲酰转移酶以及鸟氨酸氨基甲酸激酶^[146]。乳酸菌通过 ADI 系统可以催化 1 mol 精氨酸生成 2 mol 的 NH₃ 和 1 mol 的 ATP, NH₃ 可以用于中和胞内的 H⁺, 而 ATP 则可以用于供应低 pH 值耐受所需要的能量消耗。胍基丁胺脱亚胺酶 (Guanidylbutamine deiminase, AgDI) 系统与 ADI 系统类似, 主要由胍基胺脱亚胺酶、腐胺氨甲酰基转移酶以及氨基甲酸激酶组成, 可以通过多步反应催化胍基丁胺生成 NH₃、CO₂ 和 ATP^[147, 148]。Del 等 2015 年通过在培养基中添加胍基丁胺, 显著增强了乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 的细胞生长, 并使 *L. lactis* 的 pHi 上升; 而缺乏 AgDI 的突变株则不能够代谢胍基丁胺, 低 pH 值耐受能力显著下降^[149]。另外, 微生物中存在的脲酶系统可以通过代谢尿素生成 NH₃ 和 CO₂。Chen 等在乳酸菌的培养基中添加微量的尿素, 显著改善了菌株在低 pH 值下的存活率^[150, 151]。

谷氨酸脱羧酶对于微生物的低 pH 值抗逆性具有重要作用^[152]。谷氨酸脱羧酶 (Glutamic acid decarboxylase, GAD) 的功能是催化 L-谷氨酸脱羧生成 γ -氨基丁酸, 而在催化的过程中会不可逆的消耗胞内的 H⁺ 进而提高 pHi, 生成的 γ -氨基丁酸可以通过转运蛋白输送到胞外, 由于 γ -氨基丁酸显碱性, 会提高胞外的 pH 值^[153]。另外, L-谷氨酸脱羧生成的 pH 值梯度也可以驱动 ATP 酶合成大量的 ATP 用于抵抗低 pH 值胁迫^[154]。

低 pH 值胁迫会造成细胞中 ROS 的大量积累, 而积累的 ROS 会攻击胞内的生物大分子包括蛋白质以及核酸等造成损伤, 而微生物可以通过一系列的热休克蛋白、分子伴侣等来修复蛋白质以及核酸的损伤^[138]。Zhu 等 2018 年通过在乳酸乳球菌 *L. lactis* NZ9000 和 *E. coli* BL21 中表达重组酶编码基因 *recA* (用于修复受损的 DNA) 提高了菌株的低 pH 值耐受^[155]。Lim 等 2000 年通过转录组分析发现分子伴侣 DnaK、GroES 等在不同 pH 值条件下的表达量有所差异, 在低 pH 值环境下, 这些蛋白会被大量诱导表达用于抵抗低 pH 值胁迫^[156]。

低 pH 值胁迫还会造成氧化损伤, 包括 ROS 以及 H₂O₂ 等的积累, 微生物可以借助谷胱甘肽等活性物质来进行清除^[157, 158]。Li 等在 *L. lactis* 中添加谷胱甘肽能够有效清除 H₂O₂ 等, 从而抵抗氧化损伤^[157]。Zhang 等发现外源添加谷胱甘肽或者表达谷胱甘肽合成路径都能够提高 *L. lactis* 对抗 pH 值 4.0 的酸性条件以及短暂 pH 值 2.5 下的极端酸性条件的能力, 提高了胞内的 pHi^[158]。

图 1.5 乳酸菌对于低 pH 值胁迫的响应^[138]Fig. 1.5 Responses of lactic acid bacterial to low-pH stress^[138]

1.6 高抗逆性生物炼制菌株的构建

在木质纤维素生物炼制过程中存在多种对生物炼制菌株具有抑制作用的胁迫，这些胁迫会影响糖化过程的酶解效率，更重要的是还会抑制生物炼制菌株的生长和发酵，进而导致发酵的终止。因此，筛选高抗逆性的菌株对于生物炼制菌株的工业化应用具有重要意义。目前常用的菌株构建策略包括理性改造和适应性进化。本小节主要讲述这两种策略的实际应用。

1.6.1 理性改造策略提高生物炼制菌株的抗逆性

理性改造策略通过在生物炼制菌株中导入抗逆基因，从而赋予菌株自身所没有的抗逆能力。理性改造已经成功应用于提高生物炼制菌株的抑制物以及高温等胁迫的抗逆能力，能够有效提高菌株的胁迫抗逆性能以及发酵性能。但是菌株的强健性包含很多基因或代谢节点的变化，是一种复杂的表型，这往往使得理性改造效果不显著^[159]；另外，抗逆基因的获取需要对抗逆机理有比较全面的了解，而这也会限制理性改造在抗逆性强化方面的应用^[160]。

目前，由于对微生物抑制物转化的研究比较深入，很多的抑制物转化抗逆基因已经被成功挖掘出来并应用到生物炼制菌株的抑制物抗逆性改造中。呋喃类抑制物转化相关基因的研究比较广泛，Kim 等 2017 年通过在嗜热纤维梭菌 *Clostridium thermocellum* 1313 中表达来源于高温厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E 的 NADPH 依赖型

醇脱氢酶提高了菌株的生长以及对于 HMF 的转化能力^[161]。Qiu 等 2015 年在 *S. cerevisiae* 中表达了双功能谷胱甘肽合成酶提高了其分别在 3 mM 的 H₂O₂、40 °C 高温、10 mM 的糠醛、10 mM 的 HMF 以及 0.5 mM 的 Cd⁺ 条件下的抗逆性能^[162]。Wang 等 2017 年在 *Z. mobilis* 中过表达自身的醇脱氢酶以及增强 NADPH 的再生进一步强化了 *Z. mobilis* 的呋喃醛抑制物转化能力, 改造菌株对于 2 g/L 的糠醛以及 4 g/L 的 HMF 的转化能力分别提高了 20% 和 38%^[63]。Yi 等 2019 年外源表达来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 中的醛脱氢酶 PP_2680 提高了 *Z. mobilis* ZM4 的 HMF、糠醛以及 *p*-羟基苯甲醛的转化能力, 并且显著提高了 *Z. mobilis* ZM4 的纤维素乙醇发酵性能^[57]。Yi 等 2015 年通过 DNA 芯片技术挖掘到了 *Z. mobilis* ZM4 中响应三类典型酚醛抑制物的重要基因, 过表达这些基因能够进一步提高酚醛抑制物耐受能力^[62]。Qiu 等 2020 年通过在 *Pediococcus acidilactici* ZY15 中外源表达来源于 *Z. mobilis* ZM4 的氧化还原酶基因 ZMO1116 实现了高毒性 *p*-苯醌的耐受, 并且促进了手性 D-乳酸的发酵^[80]。Qiu 等 2020 年还在 *Pediococcus acidilactici* ZY15 中外源表达来源于 *C. glutamicum* 的短链脱氢酶 CGS9114_RS09725 强化了香草醛的耐受和转化能力^[58]。Sundstrom 等 2010 年在 *S. cerevisiae* 中通过 DNA 芯片技术挖掘到了三个响应酚类抑制物胁迫的基因 (*yap1*、*atr1* 以及 *flr1*), 分别敲除这三个基因都会导致松柏醛转化为松柏醇的速率降低, 而过表达这三个调控基因都能够显著提高 *S. cerevisiae* 的酚类抑制物耐受能力^[163]。

在酿酒酵母中导入耐热基因已经被广泛应用于提高酵母的耐高温性能, 这主要是基于目前对于耐高温机理的解析比较清晰, 但由于高温对于菌株的影响较大以及理性改造本身的局限性, 理性改造往往难以显著提高发酵菌株的高温抗逆性。Dong 等 2018 年通过在枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB600 中外源表达嗜热地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* B186 中的热休克蛋白 GroES 稍微提高了 WB600 在 50 °C 下的高温耐受能力^[164]。Xu 等 2018 年在 *S. cerevisiae* 中导入了人工蛋白控制系统提高了其在 37 °C 温度下的生长状况^[165]。Khatun 等 2017 年在 *Saccharomyces cerevisiae* MNII 中表达人工锌指蛋白提高了菌株在 42 °C 高温下的乙醇发酵^[166]。Xu 等 2018 年通过在 *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 中导入抗氧化保护基因包括 SOD、CAT 等提高了其高温抗逆性, 改造菌株在 40 °C 温度下的乙醇发酵浓度可以达到 61 g/L, 相比于对照提高了 66%^[167]。Jia 等 2016 年在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中构建了智能微生物热调节引擎 (耐高温系统以及群体响应系统), 显著改善了 *Escherichia coli* 在 40 °C 下的细胞生长, 改造菌株在 40 °C 下赖氨酸的生产提高了 5 倍^[168]。Sun 等 2017 年将 HSP 基因和 SOD 基因在 *S. cerevisiae* INVSc1 中进行合理的共表达, 显著提高了酵母在 42 °C 下的乙醇发酵^[169]。An 等 2011 年在 *S. cerevisiae* 中过表达海藻糖-6-磷酸合酶 (TPS1), 促进了酵母中海藻糖的合成, 提高了菌株的高温抗逆性^[170]。

提高菌株的低 pH 值抗逆性对于乳酸的大规模工业化生产具有重要意义, 很多的研究是通过在乳酸菌中表达耐酸基因来实现低 pH 值的耐受, 但是目前的研究结果大多数集中在提高了菌株在低 pH 值环境下的细胞活力, 并没有得到显著提高乳酸产量的相关

结果。Carvalho 等 2011 年在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 中外源表达了海藻糖合成路径, *L. lactis* 在 pH 值 3.0 条件下的存活能力提升了几倍^[113]。Zhang 等 2007 年在乳酸乳球菌 *L. lactis* 中表达了谷胱甘肽合成路径, 显著提高了 *L. lactis* 胞内谷胱甘肽的含量以及在 pH 值 4.0 条件下的细胞存活能力^[158]。Trip 等 2012 年在 *L. lactis* 中构建了来源于嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* 中的组氨酸脱羧途径, 改造后的 *L. lactis* 在添加了组氨酸的培养基 pH 值 3.0 条件下能够维持细胞生长 2 h^[171]。Wu 等 2013 年在 *L. lactis* 中异源表达了来源于干酪乳杆菌 *L. casei* 中的重组酶 RecO, 提高了菌株在 pH 值 4.0 条件下的细胞生长^[172]。

1.6.2 适应性进化策略提高生物炼制菌株的抗逆性

适应性进化策略是一种用于提高生物炼制菌株胁迫抗逆性的简单而且高效的方法^[173-175], 已经被成功应用于提高菌株对于多种胁迫包括高盐浓度^[176]、抑制物^[177]、低 pH 值^[128]、低温^[178]以及高温^[97]等的抗逆性。不同于理性改造, 适应性进化不需要对于胁迫抗逆机理有非常全面的了解, 能够通过调节筛选压力获得具有不同抗逆性的生物炼制菌株。而且随着基因组重测序技术以及转录组技术的广泛应用, 适应性进化得到的进化菌株发酵性能以及抗逆性能提高背后的分子机理已经能够被进一步解析, 并且挖掘到很多与抗逆性能提高相关的关键基因, 可以为后续的理性改造提供重要的候选基因^[173, 179]。

适应性进化在提高生物炼制菌株抑制物抗逆性方面具有十分显著的效果, 而且通过进一步的转录组以及 qRT-PCR 等分析能够挖掘到很多与抑制物抗逆性提高相关的关键基因^[180-182]。Zhou 等 2021 年在添加递增浓度 (0.25 g/L、0.5 g/L、0.75 g/L) 三种单一酚醛抑制物的条件下进行解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 的长期连续培养, 结果发现三株进化菌株都实现了对于酚醛抑制物的高抗逆性, 并且发现 *Yarrowia lipolytica* 对于香草醛浓度增大的适应较慢, 而对于丁香醛和 *p*-羟基苯甲醛浓度增大的适应较快; 进一步的转录组分析, 挖掘到了很多能够响应三种酚醛抑制物的重要基因如 *YALI0_B07117g* 和 *YALI0_B01298g*, 并且在 *E. coli* BL21 中进行了基因的功能验证^[183]。混浊红球菌 *Rhodococcus opacus* 对于木质素以及木质素来源的酚类抑制物十分敏感, 通过在不同浓度的木质素 (3.0~3.8 g/L) 中进行适应性进化培养, 获得的进化菌株对于木质素以及木质素来源的酚类抑制物的耐受能力提高了 2~3 倍, 并且在不同原料 (玉米秸秆、麦秆以及硬木等) 制备水解液中进行了生长测试, 结果发现进化菌株相比于对照菌株在水解液中的生长显著改善了^[184]。*C. glutamicum* S9114 通过在木质纤维素水解液中进行了长期的适应性进化培养, 其在水解液中的生长显著改善了, 进行水解液的发酵时, 谷氨酸的生产相比于对照提高了 68.4%, 随后通过转录组分析, 发现磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的糖磷酸转移酶系统以及戊糖磷酸途径在进化菌株中都得到了增强^[185]。

高温抗逆性对于生物炼制菌株来说是一种复杂的表型, 涉及到多种代谢通路的相互作用, 通过适应性进化策略能够很好地将有利的突变富集起来, 能够有效获得高温抗逆性能提升的发酵菌株^[186-190]。工业化菌株 *S. cerevisiae* ER 经过长周期的适应性进化得到了一株稳定的 *S. cerevisiae* ISO12; ISO12 与出发菌株相比, 能够在未脱毒的云杉水解液

中 39 °C 条件下生长并发酵生产乙醇，乙醇得率为 0.38 g 乙醇/g 己糖；ISO12 展现了比 ER 在 39 °C 条件下中更好的水解液发酵性能，并且能够在 52 °C 热休克后维持更高的细胞活力^[97]。Garcia-Rios 等 2021 年将 *S. cerevisiae* L5 在 40 °C 条件下进行适应性进化培养，一共持续了 150 天，获得了耐高温性能显著提升的进化菌株；通过脂质分析发现，进化菌株的细胞膜组分发生了明显的变化，而这些变化可能与细胞膜在高温胁迫下维持稳定相关^[188]。

低 pH 值胁迫对于生物炼制菌株的影响巨大，关于适应性进化提高发酵菌株低 pH 值耐受相关的报道比较多^[128, 191-194]。戊糖乳杆菌 *Lactobacillus pentosus* 在添加不同浓度木糖的培养基中进行在低 pH 值条件下的适应性培养，获得了多株进化菌株，其中一株进化菌株相比于出发菌株在不控 pH 值的条件下木糖利用速率和乳酸产量分别提高了 1.5 倍和 2 倍^[128]。干酪乳杆菌 *L. casei* 经过在不同 pH 值的培养基中适应性培养 70 天后，获得了一株低 pH 值抗逆性能显著提高的进化菌株 lb-2；lb-2 在 pH 值 4.3 条件下培养 43 h 后，其生长、乳酸产量相比于对照分别提高了 60% 和 13.6%；生理学分析发现，lb-2 的 pH_i 以及胞内的 NH₄⁺ 显著升高了，并且细胞膜的通透性下降了，这些特性都有助于 lb-2 的低 pH 值抗逆性提高^[195]。

1.7 本论文立题依据及主要研究内容

生物炼制菌株在生物炼制过程中会遭受到多种胁迫，包括酚类抑制物、高温胁迫以及低 pH 值胁迫。酚类抑制物来源于预处理过程木质素的降解，由于其种类繁多以及生物难降解的特性，很难通过生物炼制工艺中的生物脱毒环节完全脱除，残留的抑制物仍会对生物炼制菌株的生长以及发酵造成影响。高温胁迫来源于两个方面，一方面是 SSCF 中，为了维持纤维素酶的催化活力，在高温下进行酶解过程会严重抑制菌株的发酵性能；另一方面是大型发酵罐传热不均导致的局部过热也会抑制生物炼制菌株的发酵性能。低 pH 值条件下进行乳酸发酵可以有效减少固体废弃物的产生，降低乳酸纯化的工艺成本，但低 pH 值胁迫会严重影响生物炼制菌株的生长以及乳酸生产。提高生物炼制菌株的胁迫抗逆性，不仅能够有效提高生物炼制工艺的效率和经济性，而且可以减少废水以及固体废弃物的产生。本论文主要采取理性改造以及适应性进化策略来提高生物炼制菌株的胁迫抗逆性，并且通过 qRT-PCR、转录组分析等手段来进一步挖掘菌株抗逆性能提升背后的分子机理，能够为其它发酵菌株的抗逆性强化提供重要的参考信息。本论文的研究内容主要分为以下四个方面：

(1) 通过长周期的适应性进化培养，提高了 *Z. mobilis* 的酚醛抑制物耐受能力和纤维素乙醇发酵性能。选用能够代谢木糖的 *Z. mobilis* 8b 在高固体含量玉米秸秆水解液中进行了长期的适应性进化培养，对进化菌株的酚醛抑制物转化以及纤维素乙醇发酵进行评估，并通过进一步的 qRT-PCR 实验，挖掘进化菌株酚醛抑制物转化能力提升的分子机理，并且通过水解液以及 SSCF 发酵来验证挖掘到的基因的功能。

(2) 鉴定了木质纤维素生物炼制后 *p*-苯醌的普遍存在以及对于生物炼制菌株的抑

制作用，挖掘 *Z. mobilis* 高 *p*-苯醌抗逆的机理和关键基因。测定了 6 种原料中 *p*-苯醌的含量，考察了 5 种生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的耐受能力以及对于 *p*-苯醌的转化能力，探究菌株高 *p*-苯醌耐受的机理。随后通过 qRT-PCR 实验，进一步研究了 *Z. mobilis* 中与 *p*-苯醌转化相关的关键基因，并且通过理性改造策略进一步强化 *Z. mobilis* 的 *p*-苯醌耐受能力以及纤维素乙醇发酵性能。

(3) 基于 RNA-seq 和基因组重测序分析，探究进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 耐高温性能以及乙醇发酵性能提升背后的分子机理。首先将出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 进行长期的适应性进化培养，然后对获得的进化菌株进行高温胁迫下同步糖化共发酵测试。随后，利用 RNA-seq 技术分析比较了进化菌株与出发菌株在 30 °C 以及 50 °C 条件下的转录情况，挖掘进化菌株耐高温性能以及发酵性能的提升背后的分子机理，借助基因组重测序技术探究进化菌株与出发菌株在基因层面的差异。

(4) 通过理性改造以及适应性进化策略提高 *P. acidilactici* 的低 pH 值抗逆性和纤维素乳酸发酵性能。首先对出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 进行了一系列的代谢改造，包括强化乳酸生产性能以及低 pH 值抗逆性；并且同时进行 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 值条件下的适应性进化。通过不控 pH 值的摇瓶发酵以及不同 pH 值条件下的 1 L 罐发酵来分别评估改造菌株以及进化菌株的乳酸发酵性能以及低 pH 值抗逆性，计算分析低 pH 值条件下发酵碱用量的变化。

第 2 章 适应性进化提高运动发酵单胞菌的酚醛抑制物耐受能力

2.1 引言

预处理过程是为了打破木质纤维素的生物顽抗性从而释放来源于木质纤维素生物质中的可发酵性糖^[8, 196, 197]。这一强烈的过程会产生大量来源于木质纤维素的抑制物, 包括呋喃类抑制物、有机弱酸类抑制物以及酚类抑制物^[32]。这些抑制物不仅会影响糖化过程的酶解效率, 而且还能抑制生物炼制菌株的生长^[22-25]。其中, 酚类抑制物由于其水溶性差以及生物难降解的特性而受到广泛的关注。传统的脱毒方式如水洗、过碱中和等存在大量废水产生、可发酵糖的损失或者脱毒不彻底等问题^[26-28]。生物脱毒可以在保留大部分可发酵单糖的前提下快速完全地去除呋喃类抑制物、弱酸类抑制物, 而由于酚类抑制物生物难降解的特性, 生物脱毒对于酚类抑制物的脱毒效率低下, 延长脱毒时间虽然可以将酚类抑制物完全脱出, 但会造成可发酵性糖的大量消耗^[198]。因此, 预处理后的物料经过生物脱毒后残留的酚类抑制物仍会对发酵菌株的生长以及产物合成造成影响。

酚类抑制物中的酚醇以及酚酸对于发酵菌株的抑制作用不太明显, 主要是其中的酚醛抑制物对于发酵菌株的胁迫比较大^[76, 77, 199]。酚醛抑制物可以破坏细胞膜的完整性, 造成胞内的活性氧自由基 (Reactive oxygen species, ROS) 积累, 并且还会引起 DNA 损伤, 从而造成细胞死亡^[200]。这三种抑制物对于不同发酵菌株的毒害作用也有很大差异, *Y. lipolytica* 对于香草醛比较敏感^[201], *Z. mobilis* 对于香草醛以及 *p*-羟基苯甲醛比较敏感^[62, 202], *S. cerevisiae* 对于 *p*-羟基苯甲醛比较敏感^[96, 203], 而乳酸片球菌 *P. acidilactici* 则对于香草醛比较敏感^[58]。

高抑制物耐受的生物炼制菌株对于利用木质纤维素生产多种化学品具有重要意义^[203-205]。然而, 菌株的强健性是一个复杂的表型, 提高菌株的强健性包含很多基因或代谢节点的变化, 是一个复杂的相互协同系统的结果。通常情况下, 非特定靶点的单个或有限多个基因的改造对菌株的强健性难以产生直接的影响^[159, 160]。同理性设计与基因工程改造相比, 适应性进化是一种简单、高效的方式, 通过对菌株在选定的筛选压力下进行长期进化培养即可获得具有很高抑制物耐受能力的菌株^[206-209]。而且, 由于检测技术的不断发展, 高通量测序以及转录组分析已经被广泛用于分析进化菌株在基因表达水平以及序列上的变化, 能够挖掘到进化菌株性能提升的内在机理, 可以为后续的理性改造提供理论指导。Dunn 等通过长周期的适应性进化提高了 *Z. mobilis* 的戊糖利用能力, 并运用高通量测序手段成功挖掘到了戊糖代谢增强的一个重要的突变转运蛋白 Gif 以及与质粒稳定性相关的 AddB 蛋白^[210]。

Z. mobilis 是一种革兰氏阴性菌, 拥有独特的 ED 途径, 是用于纤维素乙醇生产的优异菌株, 具有以下特点: (1) 木糖改造菌株 *Z. mobilis* 8b 能够利用木质纤维素中主要的葡萄糖、木糖以及阿拉伯糖来生产乙醇^[59, 60, 211]; (2) *Z. mobilis* 对于酚酸以及酚醇具有很高的耐受能力, 但是对于酚醛抑制物敏感^[77]; (3) *Z. mobilis* 拥有丰富的脱氢酶和氧化还原酶, 能够将高毒性的酚醛转化为相对应低毒性的酚醇, 并且其独特的脂多糖膜结构

有助于 *Z. mobilis* 抵抗酚类组分的进攻^[77, 212, 213]。为了进一步提高运动发酵单胞菌的酚醛抑制物耐受能力, 本研究尝试通过长周期的适应性进化, 提高菌株的酚醛耐受能力以及乙醇发酵性能, 并通过 qRT-PCR 技术挖掘与酚醛抑制物耐受相关的基因。本研究工作不仅为纤维素乙醇生产提供了一株强健的菌株, 而且还可以为后续酚醛抑制物耐受菌株的改造提供候选基因。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株、培养基与培养条件

运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 8b 购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC, USA, Manassas)。 *Z. mobilis* 8b 培养于 RM (Rich medium) 培养基 (酵母提取物 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L) 中, 30 °C 静置培养。质粒 pHW20a 用于目的基因在 *Z. mobilis* 8b 中的过表达, 添加 20 µg/mL 四环素以及 30 µg/mL 萘啶酸用于重组菌株的培养。

大肠杆菌 *Escherichia coli* S17-1 λ π 用于质粒构建以及转染, 培养于 LB (Luria-Bertani Medium) 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L) 中, 30 °C, 220 rpm; 添加 20 µg/mL 四环素用于重组菌株的培养^[52, 214]。

生物脱毒菌株树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 是从发霉的预处理物料中分离得到, 保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (Chinese general microorganism collection center, CGMCC, Beijing, China), 注册编号为 7452。 *A. resiniae* ZN1 培养在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基中, PDA 培养基制备方法如下: 取 200 g 土豆, 洗净剥皮后切碎, 加入到 1 L 去离子水中煮沸 30 min 后纱布过滤, 加入 15~20 g 葡萄糖、15~20 g 琼脂, 高温灭菌 (115 °C, 20 min) 后分装到试管中冷却备用^[32, 215]。 *A. resiniae* ZN1 接种到 PDA 培养基中, 28 °C 培养, 4 °C 保藏备用。

固体培养基 (固体平板) 配置需要在液体培养基中额外添加 20 g/L 琼脂。

2.2.2 木质纤维素原料和生物炼制过程

玉米秸秆生长在河南南阳, 收获于 2018 年春季, 玉米秸秆经过水洗除尘后晾晒烘干, 通过 105 °C 烘箱烘干至恒重测得固体含量为 90% (w/w), 然后经过锤石粉碎机 (SF-300) 粉碎, 最终得到的细碎的玉米秸秆放置在密封袋中保存^[21]。经过水洗、烘干、粉碎这些前处理后得到的玉米秸秆, 通过两步酸解的方法, 经过测定含有 32.9% (w/w) 纤维素、23.3% (w/w) 半纤维素、21.4% (w/w) 木质素和 11.3% (w/w) 灰分^[216]。

生物炼制过程包括预处理、调 pH 值并磨浆以及生物脱毒等过程^[46]。经过前处理后的玉米秸秆要通过预处理的方式破坏木质纤维素生物物质的生物抵抗性, 从而释放可发酵性的糖。预处理的条件为: 1200 g 干物料与一定浓度的稀硫酸依次加入到 20 L 的预处理反应器中, 固液比为 2:1, 酸用量经过调整确定为 2.5% (即 2.5 g 硫酸/100 g 干物料), 预处理反应器中螺带浆转速设定为 50 rpm, 搅拌 3 min 使得物料和酸液充分混匀, 通入高温蒸汽, 反应温度控制在 175 °C, 处理 5 min^[217]。预处理后的物料中含有 5.78 ± 0.01

mg 糠醛/g 干物料 (Dry matter, DM)、 3.52 ± 0.01 mg 5-羟甲基糠醛/g DM、 23.00 ± 1.01 mg 乙酸/g DM、 0.43 ± 1.00 mg *p*-羟基苯甲醛/g DM、 3.30 ± 0.01 mg 丁香醛/g DM 以及 3.29 ± 0.01 mg 香草醛/g DM。预处理后的物料需要加入 20% (w/w) Ca(OH)₂ 调节 pH 至 5.0~5.5, 磨浆后用于后续的脱毒过程。

生物脱毒是利用专司脱毒的霉菌树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 来进行抑制物的脱除, *A. resiniae* ZN1 能够将呋喃类抑制物以及有机酸类抑制物完全脱除, 但是会有部分酚类抑制物残留^[32]。生物脱毒过程是将培养好的 *A. resiniae* ZN1 种子 (PDA 培养的种子或者预处理后物料培养的种子) 以 1:10 (w/w) 的接种量接种到 15 L 脱毒罐中, 脱毒罐中物料的装载量为 4~5 kg, 预处理的物料以及种子加入后 50 rpm 搅拌 5 min, 通气速率控制为 1 vvm, 加热夹套控制温度在 28~30 °C, 脱毒时间根据糠醛抑制物的完全脱除来确定。物料中抑制物的测定是通过称取 5 g 物料以及 45 g 去离子水置于 250 mL 三角瓶中, 30 °C, 200 rpm 浸提 2~2.5 h 后取样离心测定上清液中的抑制物含量。经过生物脱毒后, 呋喃类抑制物以及有机弱酸类抑制物被完全脱除, 只有部分酚类抑制物残留, 酚类抑制物包含有 0.12 ± 0.01 mg *p*-羟基苯甲醛/g DM、 0.62 ± 0.12 mg 香草醛/g DM 以及 1.53 ± 0.13 mg 丁香醛/g DM。

2.2.3 酶和试剂

Prime STAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶以及 T4 DNA ligase 购自 Takara 生物医药技术有限公司 (Takara Biomedical Technology Co., Ltd); 各类试剂盒包括基因组提取、DNA 凝胶回收、PCR 产物回收、质粒抽提等都是购买于上海捷瑞生物工程有限公司 (Shanghai Generey Biotech Co., Ltd)。

商业化的纤维素酶购自诺维信中国 (Novozymes, China), 滤纸酶活为 205.6 FPU, 根据 Adney & Baker 的方法^[218]测得; 纤维二糖酶活为 5,144 CBU/mL, 根据 Ghose 的方法^[219]测得; 蛋白质含量为 79.9 mg 蛋白/mL, 以牛血清白蛋白 BSA 绘制标准曲线, 根据 Bradford 的方法^[220]测得纤维素酶的蛋白含量。

RNA 提取是使用 RNAiso Plus (Takara, Japan), RNA 的反转录是按照反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit (Toyobo, Japan) 的方法, qRT-PCR 是采用的荧光定量试剂盒 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Japan)。

2.2.4 水解液制备

预处理并生物脱毒后的玉米秸秆首先经过预糖化过程, 以 25% (w/w) 的高固体含量将预处理并脱毒的玉米秸秆以及灭菌水加入到 5 L 发酵罐中, 150 rpm 螺带桨搅拌, 纤维素酶用量为 10 mg 蛋白/g 纤维素, 温度控制为 50 °C, 糖化 48 h^[221]。糖化后的醪液在 Beckman J-26 高速离心机中经过 10,000 rpm 离心 10 min, 去除固体残渣获得上清液; 上清液再经过高温灭菌 (115 °C, 20 min) 以及最终的滤纸过滤步骤得到用于发酵以及适应性进化培养的高固体含量玉米秸秆水解液。水解液用于适应性进化以及发酵时, 需要按照 RM 培养基中的营养盐添加量添加 10 g/L 的酵母提取物以及 2 g/L 的磷酸二氢

钾。

2.2.5 适应性进化

Z. mobilis 8b 的适应性进化是在高固体含量玉米秸秆水解液中进行连续转接的。水解液中含有 98 g/L 葡萄糖、36 g/L 木糖、0.03 g/L *p*-羟基苯甲醛、0.16 g/L 香草醛以及 0.38 g/L 丁香醛。将 *Z. mobilis* 8b 在含有 20 mL 水解液的 100 mL 三角瓶中 30 °C 静置培养, 每 24 h 转接一次到新鲜的培养基中; 每次转接时用 4 M KOH 调节初始 pH 值为 5.5, 期间检测糖的消耗、乙醇的产生以及细胞的生长。适应性进化培养的前 17 代接种量为 10% (v/v), 随后降低接种量至 5% (v/v)。进化菌株的木糖利用能力存在问题, 随后进行了短期的木糖适应性进化培养。短期的木糖适应性进化培养是在以 30 g/L 木糖为唯一碳源的 RM 培养基中进行的, 接种量为 20% (v/v), 每 3 天转接一次。

2.2.6 酚醛抑制物转化能力评估

进化菌株以及对照菌株的酚醛抑制物转化是在分别单独添加 0.3 g/L *p*-羟基苯甲醛、0.6 g/L 香草醛以及 1 g/L 丁香醛的含有 40 g/L 葡萄糖的 RM 培养基中进行的。首先将菌株在 RM 平板上划线, 挑取单菌落接种到含有 5 mL RM 培养基的 10 mL 试管中, 30 °C 培养箱中静置培养 12 h 后, 以 10% (v/v) 接种量接种到含有 20 mL 的 RM 培养基的 100 mL 三角瓶中静置培养 12 h 得到二级种子液, 最后以 10% (v/v) 接种量接种到单独添加抑制物的含有 30 mL 的 RM 培养基的 100 mL 三角瓶进行抑制物转化, 期间测定糖的消耗、细胞生长以及抑制物转化的情况。

2.2.7 水解液发酵评估

进化菌株的水解液发酵是在水解液中进行的。按照 2.2.6 部分的种子培养方法, 将种子液以 10% (v/v) 接种量接种到含有 30 mL 水解液的 100 mL 三角瓶中进行发酵, 期间测定糖的消耗、细胞生长以及乙醇生产的情况。

2.2.8 同步糖化共发酵生产乙醇

同步糖化共发酵 (Simultaneous saccharification and ethanol co-fermentation, SSCF) 是在装置有螺带搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行的^[40]。预处理并脱毒的物料灭菌后与灭菌水以 25%~30% (w/w) 的固体含量加入到发酵罐中, 纤维素酶用量为 10 mg 酶蛋白/g 纤维素, 50 °C, 150 rpm 预糖化 12 h 后, 接入培养好的种子液; 种子液的培养方法同 2.2.6 部分的种子培养方法, 将二级种子液以 10% (v/v) 接种量接种到含有 200 mL RM 培养基的 500 mL 三角瓶中, 培养 12 h 后以 20% (v/v) 接种量接入发酵罐中, 用 4 M KOH 控制 pH 值为 5.8, 温度为 30 °C, 转速设定为 150 rpm, 发酵过程中测定糖的消耗以及乙醇的产生。

木糖利用率是基于发酵过程中木糖的消耗来计算得到, C_0 表示初始的木糖浓度 (g/L), C_1 表示发酵结束时的木糖浓度 (g/L)。计算方式如下:

$$\text{Xylose conversion ratio (\%)} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

乙醇得率是基于 Zhang and Bao (2012)^[222]的方法计算的:

$$\text{Ethanol yield (\%)} = \frac{[\text{Ethanol}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Ethanol}]} \times \frac{1}{0.511 \times ([\text{Cellulose}] \times 1.111 + [\text{Xylose}] \times [\text{Solids}] \times M)} \times 100\%$$

其中[Ethanol]表示发酵终点的乙醇浓度(g/L); [Cellulose]表示预处理后物料的纤维素含量(g/g); [Xylose]表示预处理后物料的木糖含量(g/g); [Solids]表示基于干基的糖化以及发酵体系的固体含量(g/g); W 表示糖化以及发酵阶段加入的水的总质量(g); M 表示 SSCF 开始时的总质量(g); 976.9 是质量浓度(g/g)和体积浓度(g/L)之间的乙醇校正因子(g/L); 0.804 是计算 SSCF 过程中水损失的无量纲因数; 0.511 是基于葡萄糖到乙醇的生物化学计量平衡得到的无量纲转化系数; 1.111 是纤维素到等量葡萄糖的无量纲转化系数。

2.2.9 发酵产物以及细胞生长的检测

从三角瓶或者发酵罐中取样, 12,000 rpm 离心 5 min, 取上清, 上清液稀释过滤(0.22 μm 滤膜)后用于高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)检测。

葡萄糖、木糖以及乙醇的浓度是在装备有 HPX-87H 柱(LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)的 HPLC 中测定的, 流动相为 5 mM H_2SO_4 , 柱温为 65 $^\circ\text{C}$, 流速为 0.6 mL/min。

酚醛抑制物及其转化后对应的酚醇或者酚酸则采用装备有 YMC-Pack ODS-A (Tokyo, Japan) 柱子的反向 HPLC (SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 来进行测定的, 柱温为 30 $^\circ\text{C}$ 。A 泵是 0.1% (v/v) 的甲酸水溶液, B 泵是 100%乙腈, 流速设置为 1.0 ml/min, 检测波长为 270 nm, 梯度洗脱方法如下: 0-4 min, 乙腈和甲酸溶液的浓度配比从 10% (v/v) 增加至 35% (v/v); 5-20 min, 浓度配比从 35% (v/v) 降至 10% (v/v); 20-30 min, 浓度配比为 10% (v/v)。

水解液发酵中离心得到的细胞, 要经过超纯水的洗涤再重悬以去除水解液中的色素影响, 稀释到合适的倍数后, 在 Thermo Biomate 3S 分光光度计中测定 600 nm 处吸光值即 OD_{600} 来检测细胞生长情况。

2.2.10 qRT-PCR 实验

收集出发菌株 *Z. mobilis* 8b 以及进化菌株 *Z. mobilis* Z198 培养至对数中期的细胞用于 qRT-PCR 实验的菌体。简而言之, 种子的培养方法同 2.2.6 部分的方法, 将培养好的种子以 10% (v/v) 的接种量接种到含有 50 mL 水解液的 250 mL 三角瓶中, 用 4 mol/L 的 KOH 调节初始 pH 值为 5.5, 静置培养 24 h 后, 12,000 rpm 离心 10 min, 4 $^\circ\text{C}$ 下收集菌体, 收集好的菌体置于 -80 $^\circ\text{C}$ 冻存储备用。

RNA 提取方法:

(1) 用锡箔纸包好研钵、研磨棒以及铁勺子, 置于 200 $^\circ\text{C}$ 高温下处理 6~8 h, 待温度冷却后拿出备用;

(2) 用液氮冷却研钵以及研磨棒, 将冷冻的菌体置于研钵中充分研磨, 中间加液氮冷却;

(3) 用勺子将研磨好的菌体放置于含 1 mL RNAliso plus 的离心管中, 放置 5 min;

(4) 12,000 rpm, 4 °C 离心 5 min, 吸取上层清液于新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 15-30 °C 静置 10 min;

(5) 12,000 rpm, 4 °C 离心 10 min, 底部会出现 RNA 沉淀, 将上清液完全移除后, 加入 1 mL 的 75% (v/v) 乙醇, 用焦碳酸二乙酯处理 (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) 后的水配置, 均匀打散 RNA;

(6) 12,000 rpm, 4 °C 离心 5 min, 去除乙醇, 离心管倒置直至乙醇完全挥发, 最后加入 DEPC 水溶解即可。

RNA 的定量以及纯度检测是通过 Nano-300 (Allsheng, Hangzhou, China) 微量分光光度计来进行的, 质量达标的 RNA 采用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 进行 cDNA 的合成, 稀释一定倍数后用于 qRT-PCR 实验。

qRT-PCR 实验是按照之前的方法进行的^[62], 用于 qRT-PCR 的基因引物设计参考 *Z. mobilis* 8b 参考基因组 (Gene Bank accession number NZ_CP023682), 实验用的引物见表 2.1。以合成的 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) 试剂盒, 通过 QuantStudio 1 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, USA) 荧光定量 PCR 仪来进行 qRT-PCR 实验。qRT-PCR 的条件设定为: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 2 min, 再 55 °C 退火 30 sec, 最后 72 °C 延伸 30 sec, 循环 40 次。内参基因为编码 16S rRNA 的 *ZMO3_RS07205* 基因。

2.2.11 重组菌株构建以及发酵评估

Z. mobilis 8b 的基因组提取是按照天根 (Tiangen, Shanghai, China) 的细菌基因组提取试剂盒的方法进行的, 提取的基因组用于目的基因的扩增。用于质粒构建以及 qRT-PCR 质粒的构建以及 qRT-PCR 的引物均是由上海捷瑞生物工程有限公司 (Shanghai Generay Biotech Co., Ltd) 合成的。转化是通过穿梭质粒 pHW20a 来实现的, 目的基因 *ZMO3_RS07160* 通过酶切连接于 Hind III 和 Kpn I 位点, 然后通过结合转化的方式导入到 *Z. mobilis* 中, 重组菌株通过添加 20 µg/mL 四环素的 RM 平板筛选得到^[214, 223]。发酵用的菌株以及构建的质粒见表 2.2。

重组菌株的发酵评估是在水解液以及 SSCF 中进行的。种子液培养方法如下: 将重组菌株的单菌落接种至含有 5 mL RM 培养基的 10 mL 试管中, 30 °C 静置培养 12 h 后全部转移到含有 50 mL RM 培养基的 250 mL 三角瓶中扩大培养, 然后以相同的初始 OD (0.2 左右) 接种到水解液或者发酵罐中, 添加 20 µg/mL 四环素来避免质粒丢失。

表 2.1 qRT-PCR 选用的基因以及对应的引物
Table 2.1 Genes and primers used in qRT-PCR assay

Gene	Annotation	Primer sequence (5'-3')	
		Forward	Reverse
Primers for the ethanol production related genes			
<i>ZMO3_RS07750</i>	zinc-binding alcohol dehydrogenase	CCTCGTCACCGACCTTAAATAGC	AAGACAGGCGAAGAATGGAAAA
<i>ZMO3_RS08090</i>	iron-containing alcohol dehydrogenase	CACAGGATTGGGCAACCCATATG	TGATTTTGCAACAGCGAAGGGAG
<i>ZMO3_RS06175</i>	pyruvate decarboxylase	GATAACCGCATCGGCTTCTTTC	CCGCATTACATCGGCACCTC
Primers for the oxidoreductase genes			
<i>ZMO3_RS0038</i>	SDR family oxidoreductase	AGCACCATATTGGCGACCTCTT	CGGCGTTACCGTCAATTCTGT
<i>ZMO3_RS05040</i>	NAD(P)-dependent oxidoreductase	GGGGTCTTTGCTGCTGGTG	TTTGTCGGTGCGTCCCTGTTT
<i>ZMO3_RS07160</i>	SDR family oxidoreductase	TGAAGGATTACGAGCCGAAGTG	GCTGATCGCAAAGGCCACA
<i>ZMO3_RS07170</i>	SDR family oxidoreductase	ACGCTTCGGCTGGTTACTGA	TGATGCGATCCCATTTCTTG
Primers for the reductase genes			
<i>ZMO3_RS05930</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase	CCCTTCGGCAACGGGTTT	CAGTATGATAAGCTGCTGGCTCAATA
<i>ZMO3_RS08665</i>	alkene reductase	CGTCCGCTCTTTCCAATG	CGTACAGATCCATGCCGCTAAT
<i>ZMO3_RS09175</i>	aldo/keto reductase	GATACTGCCGATGTTTATGGTGG	CGCCGGATATGATAGGCTGAC
Primers for the other gene			
<i>ZMO3_RS07205</i>	16S ribosomal RNA	CCGTGCGGAAGAAGGGAATA	GGGCTGCAAATCTTTGACCAG

表 2.2 本章节所使用到的菌株和质粒

Table 2.2 Strains and plasmids used in this chapter

Strains	Characteristic	Sources
<i>Escherichia coli</i> S17-1 $\lambda\pi$	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Z. mobilis</i> 8b	Parental for ethanol fermentation	[60]
<i>Z. mobilis</i> Z198	The evolved strain after long-term adaptive evolution	This work
<i>Z. mobilis</i> -pHW20a	<i>Z. mobilis</i> 8b harboring the plasmid pHW20a	This work
<i>Z. mobilis</i> -pHW20a-ZMO3_RS07160	<i>Z. mobilis</i> 8b harboring the plasmid pHW20a-ZMO3_RS07160	This work
Plasmids	Characteristic	Sources
pHW20a	Expression and shuttle vector for <i>Z. mobilis</i> by lacZ α promotor	[214]
pHW20a-ZMO3_RS07160	Vector for expression of ZMO3_RS07160 by lacZ α promotor	This work

2.3 结果与讨论

2.3.1 出发菌株的同步糖化共发酵能力评估

Z. mobilis 8b 是一株能够利用葡萄糖、木糖以及阿拉伯糖等多种糖的优异菌株，适用于生产纤维素乙醇。而木质纤维素生物质在预处理工段会产生大量的抑制物，生物脱毒能够完全脱除呋喃类抑制物以及有机酸类抑制物，但难以完全脱除酚类抑制物，残留的酚类抑制物仍会影响到发酵菌株的生长以及乙醇生产。本节首先对 *Z. mobilis* 8b 的 SSCF 性能进行了考察，SSCF 是在 25% (w/w) 固体含量的脱毒玉米秸秆中进行的（图 2.1）。发酵结果显示，在 25% (w/w) 固体含量下，出发菌株 *Z. mobilis* 8b 的乙醇发酵效果较差，需要经过长达 72 h 才能将葡萄糖消耗完全，发酵 96 h 的乙醇浓度和乙醇得率分别为 51.0 g/L 和 65.9%，木糖利用率仅为 43.0%。SSCF 的结果表明脱毒物料中残留的酚类抑制物（尤其是酚醛抑制物）对于 *Z. mobilis* 8b 的乙醇发酵仍具有很大的抑制作用。因此，需要通过适应性进化策略来提高 *Z. mobilis* 8b 的酚类抑制物耐受能力。

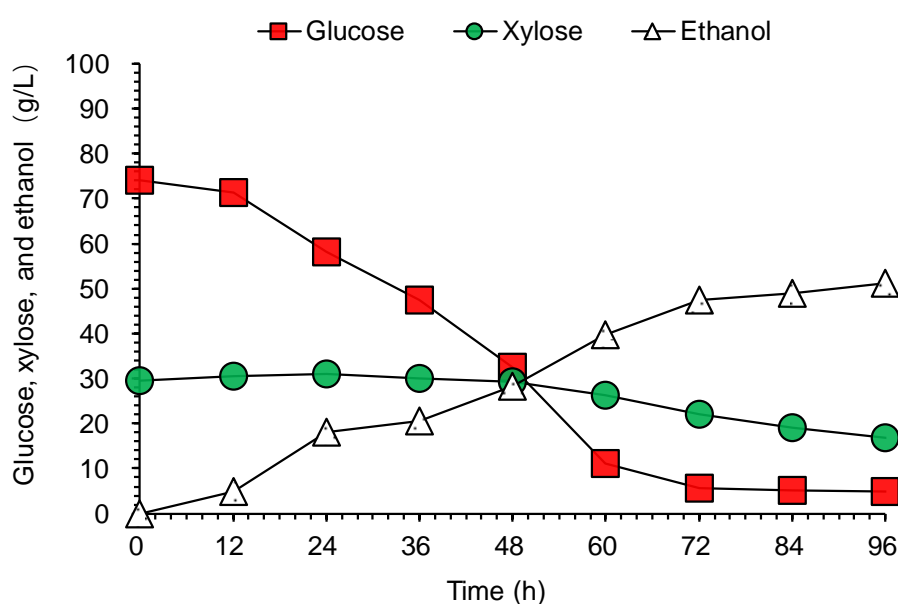


图 2.1 出发菌株 *Z. mobilis* 8b 利用脱毒后的玉米秸秆在 25% (w/w) 固体含量下进行同步糖化共发酵

Fig. 2.1 Simultaneous saccharification and co-fermentation of biodetoxified corn stover under 25% (w/w) solids loading by the parental strain *Z. mobilis* 8b

2.3.2 长周期的适应性进化培养提高酚醛抑制物抗逆性

为了能够给出发菌株 *Z. mobilis* 8b 足够的酚醛抑制物筛选压力，采用含有较多酚醛抑制物的高固体含量玉米秸秆水解液来进行长周期的适应性进化培养（图 2.2）。在最初的 17 次转接时，采用了 10% (v/v) 的接种量，结果发现菌株的生长、糖耗、乙醇生产都比较稳定，推测可能是筛选压力还不够；基于此，调整接种量为 5% (v/v)，并进行后续连续转接培养。随着转接的不断进行，菌株的生长、糖耗以及乙醇生产开始出现波动，并且生长的 OD_{600} 越来越高，糖耗和乙醇生产都不断增加，直到转接至第 80 次时，开始稳定。经过长达 198 次的转接（大约 9.6×10^3 个细胞代数），获得了一株抑制物耐受显著提升的进化菌株。经过水解液发酵实验，结果发现进化菌株相比与对照菌株在高固体含量的水解液中的生长、糖耗以及乙醇生产都有显著性的提升，但是进化菌株的木糖利用能力有所下降，发酵终点 36 h 基本没有进行木糖利用（图 2.3）。出发菌株的木糖利用率低于 2.3.1 中的 43%，主要原因是出发菌株的抑制物耐受能力较差，由于葡萄糖抑制效应，在 36 h 时在未消耗完葡萄糖的情况下无法消耗木糖；而进化菌株由于抑制物耐受能力显著提高在 24 h 时已经完全消耗完葡萄糖，但是由于长期适应性进化导致了木糖利用能力的下降。为了恢复进化菌株的木糖利用能力，进行了短期的木糖适应性进化培养从而提高菌株的木糖利用能力，最终得到了一株稳定的乙醇发酵菌株，命名为 *Z. mobilis* Z198。*Z. mobilis* Z198 利用高固体含量玉米秸秆水解液发酵，在 72 h 可以消耗 20 g/L 木糖，木糖利用率可以达到 50%。

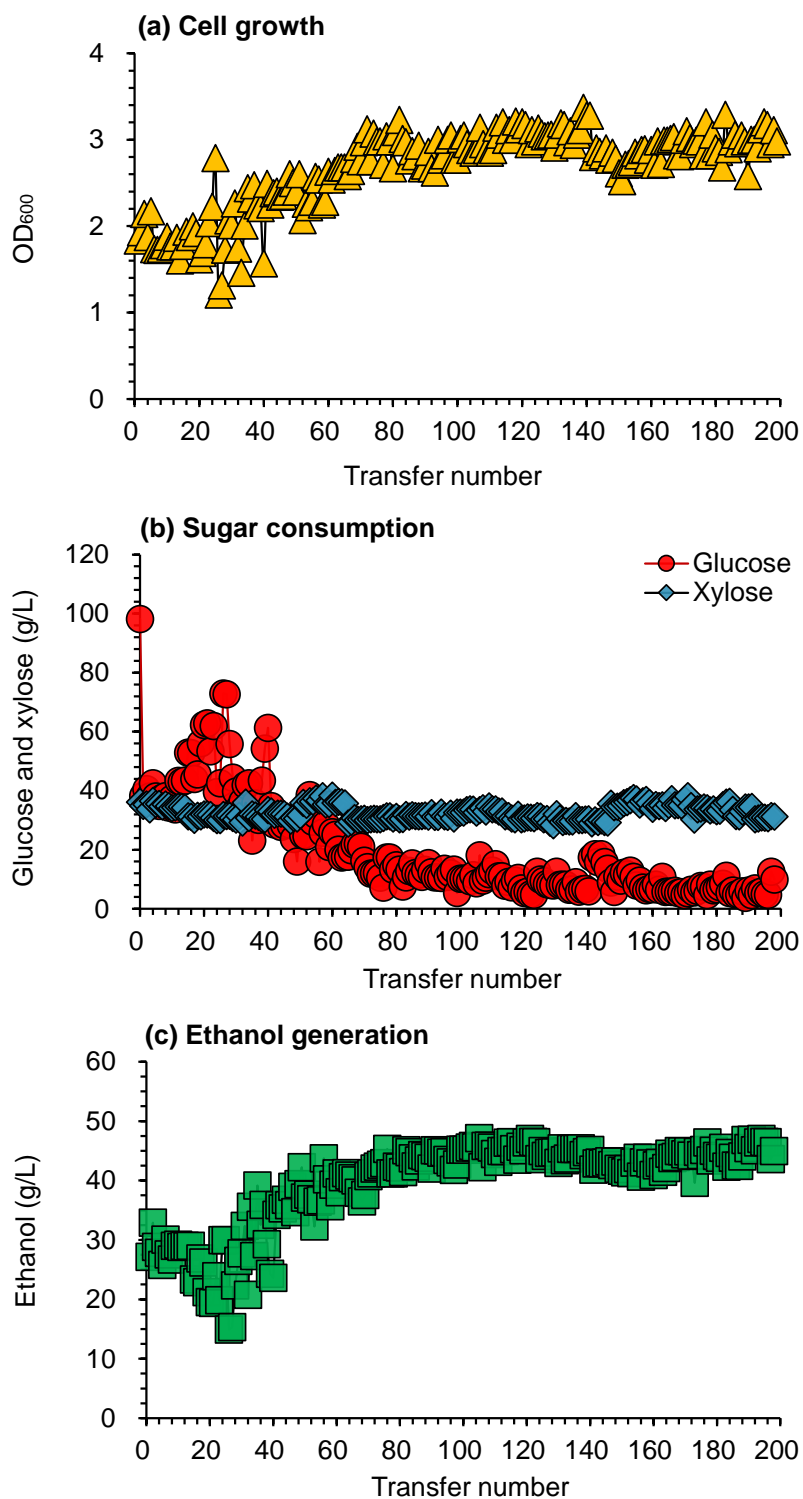


图 2.2 *Z. mobilis* 8b 在玉米秸秆水解液中的长周期适应性进化

(a) 细胞生长; (b) 糖的消耗; (c) 乙醇生产

Fig. 2.2 Long-term adaptive evolution of *Z. mobilis* 8b in corn stover hydrolysate

(a) Cell growth; (b) Sugar consumption; (c) Ethanol generation.

培养条件: 最初的 17 次转接接种量为 10% (v/v), 随后调整为 5% (v/v) 的接种量。每 24 h 转接一次, 30 °C 静置培养。

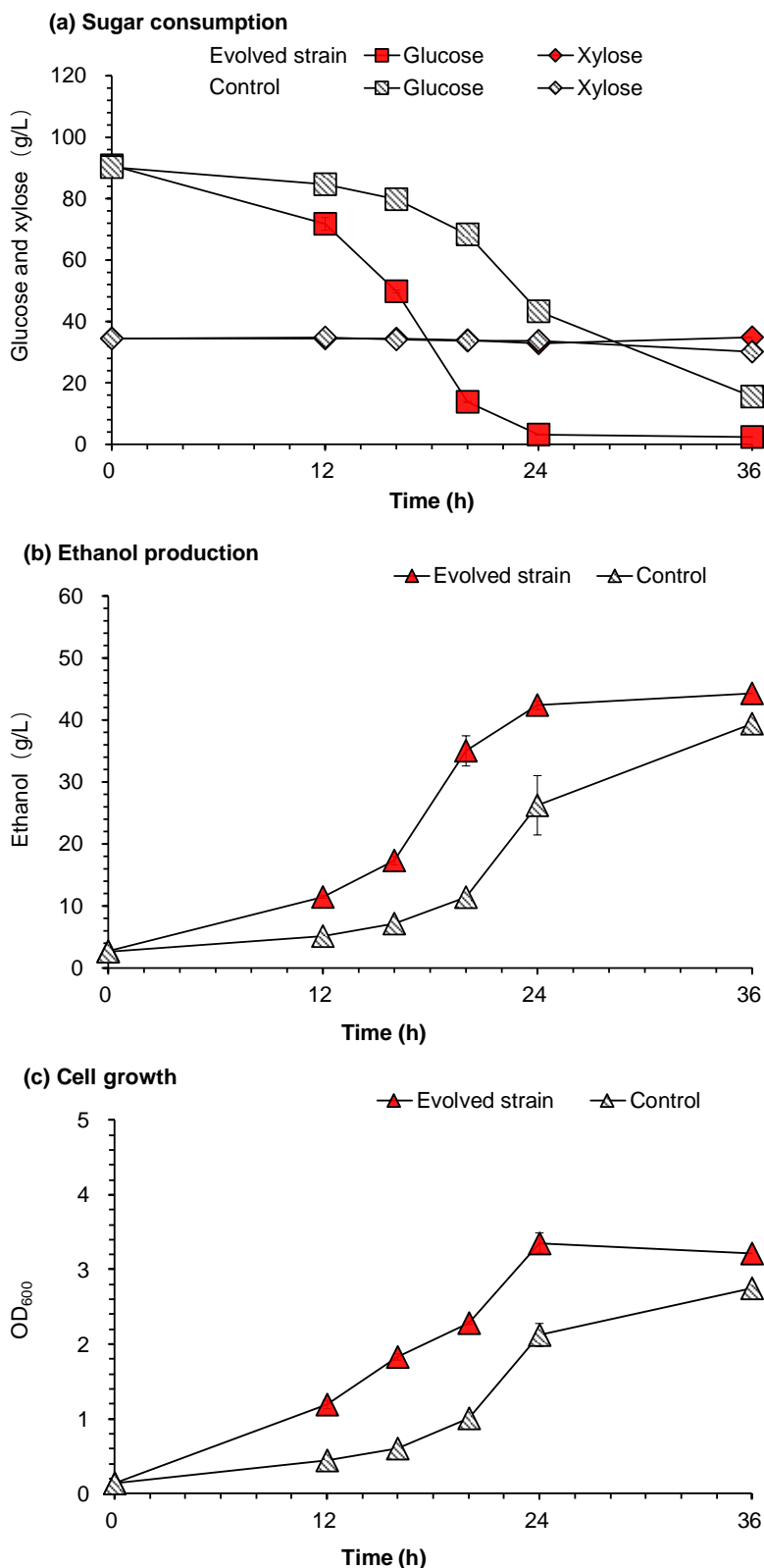


图 2.3 进化菌株（未进行木糖适应性进化培养）在高固体含量玉米秸秆水解液中的乙醇发酵性能评估

(a) 葡萄糖以及木糖消耗；(b) 乙醇生产；(c) 细胞生长

Fig. 2.3 Ethanol fermentation performance of the evolved strain in corn stover hydrolysate.

(a) Glucose and xylose consumption; (b) Ethanol production; (c) Cell growth.

发酵条件：以出发菌株 *Z. mobilis* 8b 作为对照。

2.3.3 进化菌株的酚醛抑制物转化评估

Z. mobilis 具有将酚醛转化为相对应的低毒性的酚醇衍生物，从而实现酚醛抑制物的耐受^[224]。首先测试了进化菌株 *Z. mobilis* Z198 对于三种典型的酚醛抑制物的转化能力，选择的三种酚醛抑制物 *p*-羟基苯甲醛、香草醛以及丁香醛的浓度分别为 0.3 g/L、0.6 g/L 以及 1 g/L。抑制物浓度的选择主要是基于两方面因素的考虑，一方面是脱毒后的玉米秸秆中三种抑制物含量^[32]排序依次是：丁香醛 > 香草醛 > *p*-羟基苯甲醛，另一方面是因为酚醛抑制物种类繁多并且水溶性不好，这会导致检测到的含量远低于其在木质纤维素中的真实含量^[77]。发酵结果显示（图 2.4），进化菌株 *Z. mobilis* Z198 对于三种酚醛抑制物的转化都有明显的提升，尤其是对于香草醛，12 h 香草醛、*p*-羟基苯甲醛以及丁香醛的转化率分别为 50.4%、29.2%以及 25.4%，相比较于对照菌株 *Z. mobilis* 8b 分别提升了 6.3 倍、13.2%以及 9.5%。*p*-羟基苯甲醛是一种很强的抑制物，但是由于其在木质纤维素体系中的含量较低，降低了 *p*-羟基苯甲醛对于菌株的抑制作用。丁香醛的毒性很微弱，即使很高的浓度（高达 1 g/L），其对于 *Z. mobilis* 的抑制作用也不显著。香草醛是一种很强的抑制物，这主要是由于其在木质纤维素体系中含量较高，并且毒性较大。进化菌株 *Z. mobilis* Z198 对于香草醛的转化提升最为显著，这表明适应性进化优先提高了对于菌株影响最大的抑制物的抗逆能力。

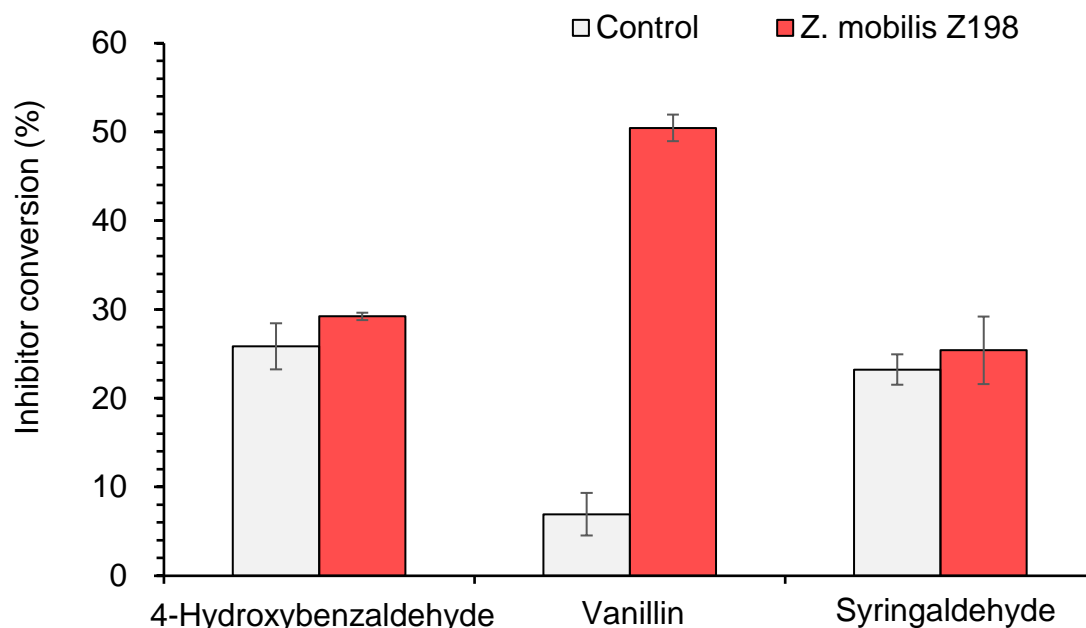


图 2.4 进化菌株 *Z. mobilis* Z198 酚醛抑制物的转化能力评估

(a) 抑制物转化; (b) 细胞生长

Fig. 2.4 Conversion of phenolic aldehyde inhibitors by the evolved *Z. mobilis* Z198

(a) Inhibitor conversion; (b) Cell growth

发酵条件：以出发菌株 *Z. mobilis* 8b 作为对照，在添加了 40 g/L 葡萄糖的 RM 培养基中分别单独添加 0.3 g/L 的 *p*-羟基苯甲醛、0.6 g/L 的香草醛以及 1 g/L 的丁香醛的单一抑制物，抑制物转化测定于 12 h 发酵终点。

2.3.4 进化菌株的同步糖化共发酵评估

进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的高固体含量同步糖化共发酵是利用脱毒后的玉米秸秆以及麦秆来进行的。高固体含量就意味着更多的酚醛抑制物以及更高的抑制物胁迫，并且酚醛抑制物的含量也会随着酶解的不断进行而逐步释放到发酵液中，从而增大对于菌株生长以及发酵的抑制。

以脱毒后的玉米秸秆为原料，在 30% (w/w) 固体含量下，其总的纤维素含量为 10.5% (w/w)，总的木聚糖含量为 4.5% (w/w)。进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的同步糖化共发酵相比于对照菌株 *Z. mobilis* 8b，展现了巨大的发酵优势 (图 2.5)。进化菌株 *Z. mobilis* Z198 在进行发酵时葡萄糖消耗的延滞期显著缩短至 12 h，而对照菌株 *Z. mobilis* 8b 的发酵延滞期则长达 24 h；进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的乙醇生产速率为 0.914 g/L/h，比对照菌株 *Z. mobilis* 8b 的高了 21.3%；进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的木糖利用率为 75.2%，相比于对照菌株 *Z. mobilis* 8b 提高了 1.8 倍；而进化菌株 *Z. mobilis* Z198 在 72 h 的乙醇浓度高达 65.8 g/L，相比于对照菌株 *Z. mobilis* 8b 提高了 21.6%。以脱毒后的玉米秸秆为发酵原料时，在 25% (w/w) 固体含量下，进化菌株 *Z. mobilis* Z198 与对照菌株 *Z. mobilis* 8b 相比，几乎没有差异，这主要是由于这一批次的玉米秸秆经过预处理并脱毒后，残留的抑制物比较少，无法对菌株的生长以及乙醇生产产生显著的抑制作用。

与利用脱毒后的玉米秸秆进行乙醇发酵相比，脱毒后的麦秆由于脱毒程度的差异，残留的酚醛抑制物对菌株的抑制作用很显著，在 25% (w/w) 固体含量下的 SSCF，进化菌株 *Z. mobilis* Z198 以及对照菌株 *Z. mobilis* 8b 的乙醇生产速率以及木糖利用率都显著下降了，但是进化菌株 *Z. mobilis* Z198 仍然显示出了比对照菌株 *Z. mobilis* 8b 更强的抑制物耐受能力以及更优异的纤维素乙醇发酵性能，木糖利用率、乙醇生产速率以及乙醇浓度相比于对照菌株分别提高了 1.9 倍、28.3% 以及 28.3% (表 2.3)。

表 2.3 进化菌株 *Z. mobilis* Z198 与对照菌株 *Z. mobilis* 8b 利用两种不同原料在不同固体含量下的同步糖化共发酵产乙醇对比

Table 2.3 Simultaneous saccharification and ethanol co-fermentation comparison of the evolved strain *Z. mobilis* Z198 and the parental strain *Z. mobilis* 8b using two different feedstocks under various solids loading

Solids loading (% w/w)	<i>Z. mobilis</i> strains	Lignocellulose	Xylose utilization ratio (%)	Productivity (g/L/h)	Ethanol titer (g/L)	Ethanol yield (%)
25	Z198	Corn stover	81.6	0.843	60.7	78.4
	8b	Corn stover	82.0	0.833	60.0	77.0
25	Z198	Wheat straw	66.0	0.725	52.2	74.3
	8b	Wheat straw	22.4	0.565	40.7	57.3
30	Z198	Corn stover	75.2	0.914	65.8	71.2
	8b	Corn stover	29.2	0.751	54.1	57.9

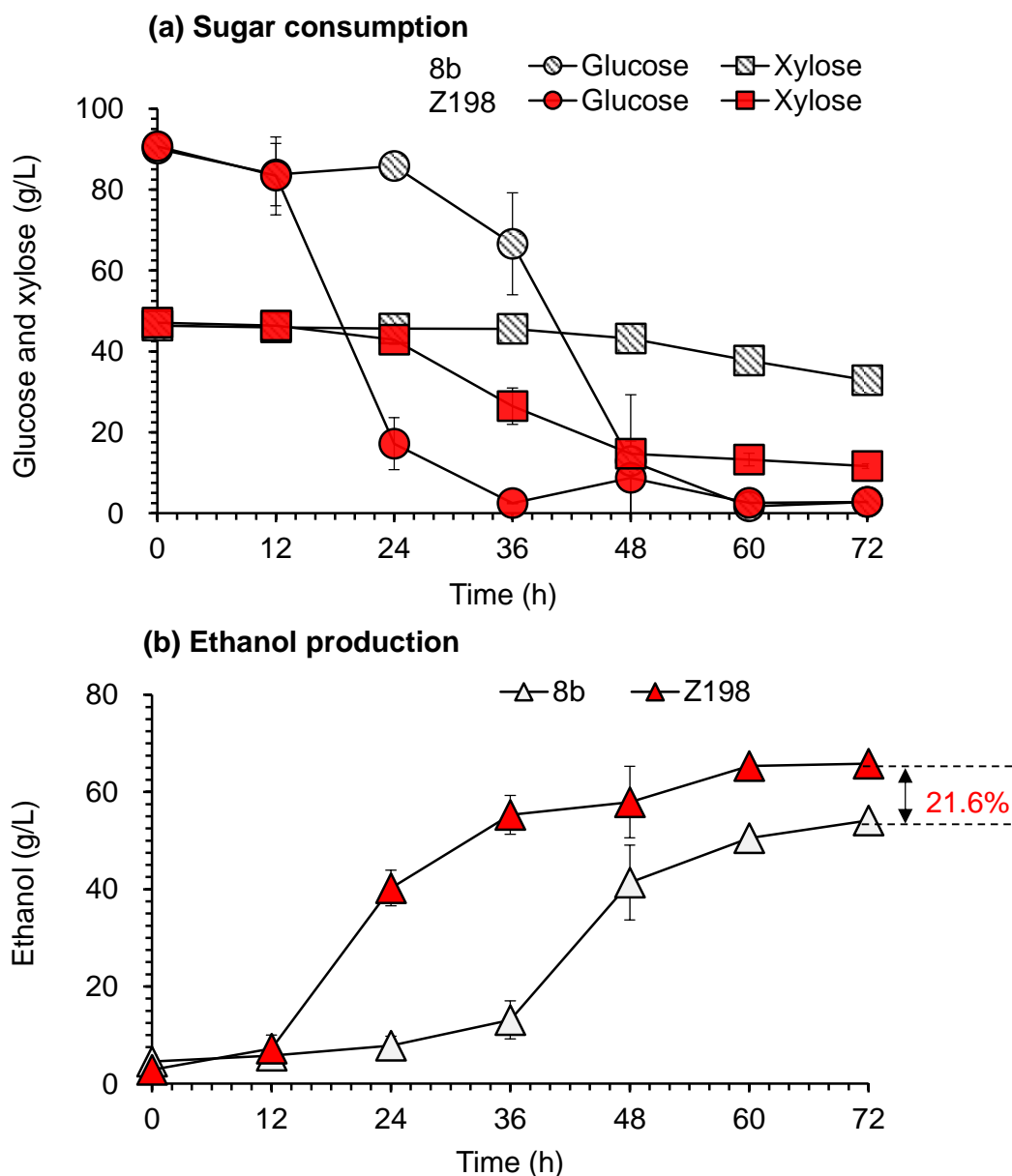


图 2.5 进化菌株 *Z. mobilis* Z198 使用脱毒玉米秸秆的高固体含量同步糖化共发酵

(a) 糖的消耗; (b) 乙醇生产

Fig. 2.5 Simultaneous saccharification and ethanol co-fermentation of detoxified corn stover under high solids loading by the evolved *Z. mobilis* Z198

(a) Sugar consumption; (b) Ethanol production

发酵条件: 同步糖化共发酵是在 30% (w/w) 固体含量下进行的, 以脱毒后的玉米秸秆为原料; 50 °C 预糖化 12 h 后, 降温至 30 °C 后接入发酵菌株, 用 4 M KOH 控制发酵 pH 值为 5.8。

2.3.5 进化菌株中酚醛抑制物耐受相关基因的转录分析

通过长周期的适应性进化培养, 进化菌株 *Z. mobilis* Z198 展现了显著提升的酚醛抑制物转化能力 (尤其是对于香草醛) 以及优异的乙醇发酵性能。尝试通过 qRT-PCR 实验来探究进化菌株 *Z. mobilis* Z198 和出发菌株 *Z. mobilis* 8b 在转录水平上的差异。主要考察的是酚醛抑制物转化以及乙醇生产相关的基因, 据报道三个乙醇生产相关的基因也具

有转化醛类抑制物的能力^[63]，这些基因的选择主要是基于 NCBI 上的基因注释以及 Yi 等^[62]的研究，包括三个还原酶基因 *ZMO3_RS09175*（编码醛/酮还原酶）、*ZMO3_RS08665*（编码烯烃还原酶）以及 *ZMO3_RS05930*（编码二氢吡咯-5-羧酸还原酶），四个氧化还原酶基因 *ZMO3_RS003*（编码 SDR 家族氧化还原酶）、*ZMO3_RS05040*（编码 NAD(P)依赖型的氧化还原酶）、*ZMO3_RS07160*（编码 SDR 家族氧化还原酶）以及 *ZMO3_RS07170*（编码 SDR 家族氧化还原酶），三个乙醇生产相关的基因 *ZMO3_RS07750*（编码锌离子结合型的醇脱氢酶）、*ZMO3_RS08090*（编码含铁的醇脱氢酶）以及 *ZMO3_RS06175*（丙酮酸脱羧酶）。

qRT-PCR 的结果显示，乙醇生产相关的基因中只有 *ZMO3_RS07750* 发生了显著性的上调表达，*ZMO3_RS07750* 上调表达了 2.5 倍；还原酶相关的基因中 *ZMO3_RS07170* 显著上调了 3.8 倍；氧化还原酶相关的基因中 *ZMO3_RS07170*、*ZMO3_RS07160*、*ZMO3_RS0038* 分别上调了 4.4 倍、11.7 倍以及 2.8 倍（图 2.6）。*ZMO3_RS07160* 在这些挑选的基因中上调表达最显著，推测这个基因可能在进化菌株 *Z. mobilis* Z198 基因水平上也发生了变化，因而对其进行了后续的基因序列比对。进化菌株和出发菌株的 *ZMO3_RS07160* 基因包括启动子部分的序列比对结果发现并没有发生基因突变，这表明 *ZMO3_RS07160* 仅仅是在转录水平上发生了变化。

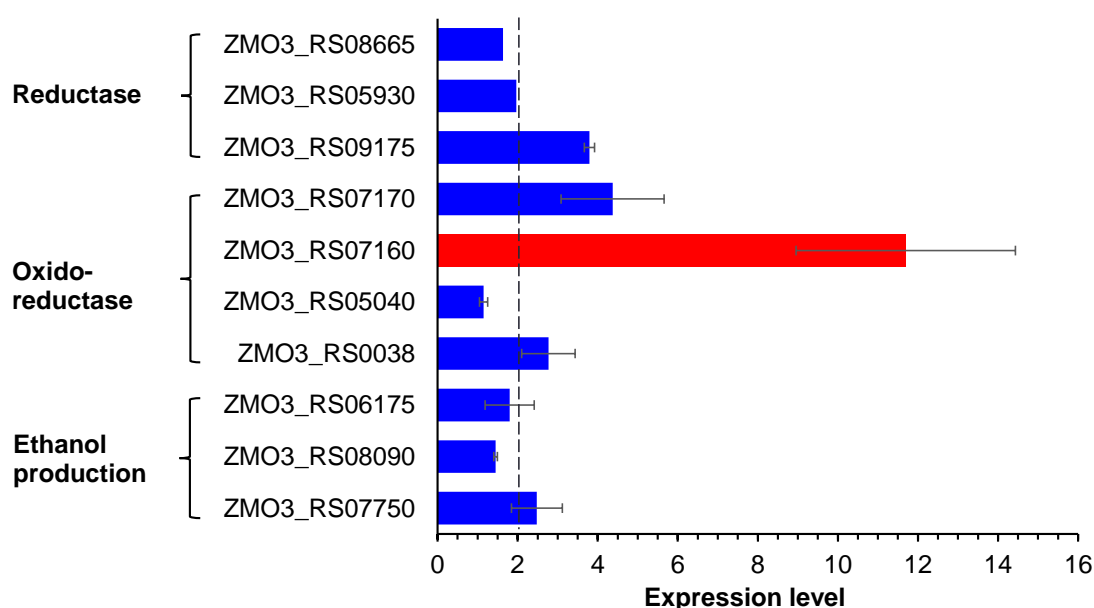


图 2.6 进化菌株 *Z. mobilis* Z198 中与抑制物耐受以及乙醇生产相关基因的转录情况

Fig. 2.6 Transcriptional changes of genes related with inhibitors tolerance and ethanol production in the adaptive *Z. mobilis* Z198

2.3.6 过表达 SDR 家族氧化还原酶 *ZMO3_RS07160* 提高菌株的发酵性能

为了进一步探究 *ZMO3_RS07160* 编码的 SDR 家族氧化还原酶的功能，在出发菌株中过表达了这一基因，并且将重组菌株在水解液以及同步糖化共发酵中进行了发酵验证。实验采用的是脱毒后的玉米秸秆来进行实验，这一批次的玉米秸秆总纤维素含量为 8.5%

(w/w)，总木聚糖含量为 2.8% (w/w)，比之前的原料相比，总纤维素含量以及总木聚糖含量偏低。

ZMO3_RS07160 在 *Z. mobilis* 8b 中的过表达显著提高了其在玉米秸秆水解液发酵以及 SSCF 中的乙醇发酵性能 (图 2.7)。在水解液中，重组菌株 *Z. mobilis*-pHW20a-*ZMO3_RS07160* 相比于对照菌株 *Z. mobilis*-pHW20a，在 72 h 的乙醇产量提升了 23.6%；而在 30% (w/w) 固体含量的同步糖化共发酵中，相比于携带空载质粒的对照菌株，重组菌株的乙醇产量显著提升了 21.8%。这些结果表明 *ZMO3_RS07160* 编码的 SDR 家族氧化还原酶对于 *Z. mobilis* 的酚醛抑制物耐受具有重要的意义。进一步的分析发现，*ZMO3_RS07160* 基因的过表达对于出发菌株发酵性能的提升 (21.8%~23.6%) 与长周期的适应性进化对于菌株发酵性能的促进 (21.6%) 是近似的，这表明 *ZMO3_RS07160* 的上调表达对于进化菌株发酵性能的提升以及抑制物转化能力的促进起到了关键性的作用，这一关键基因可以用于理性改造提高其它生物炼制菌株的酚醛抑制物 (尤其是香草醛) 抗逆性和发酵性能。

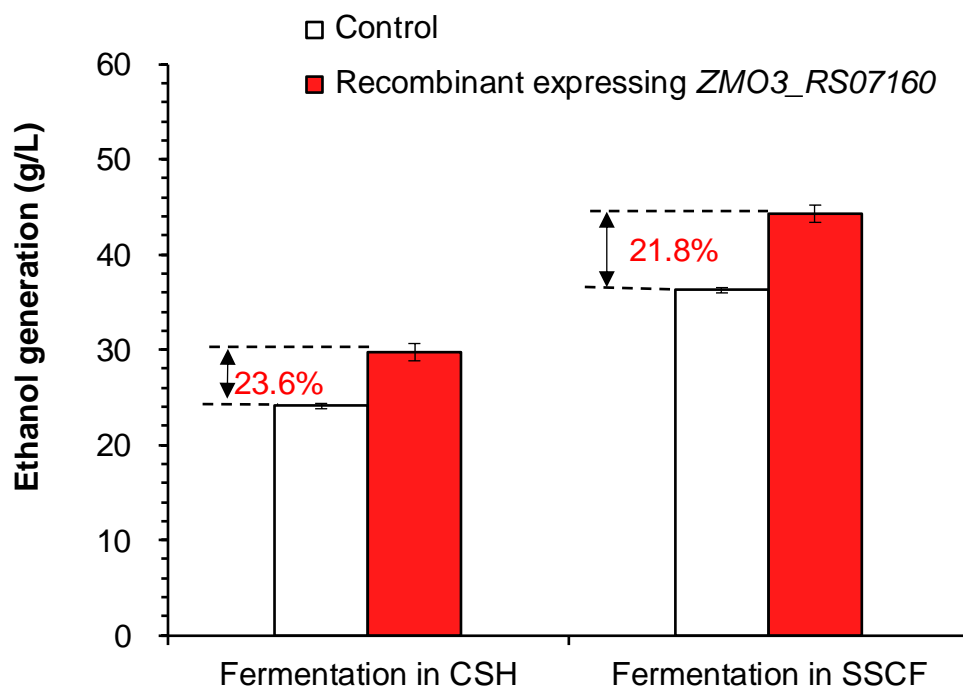


图 2.7 过表达 *ZMO3_RS07160* 的重组菌株在水解液以及同步糖化共发酵中的乙醇发酵性能评估

Fig. 2.7 Ethanol fermentation evaluation of the *Z. mobilis* recombinant expressing the gene *ZMO_RS07160* in corn stover hydrolysate (CSH) and in SSCF

发酵条件：水解液为高固体含量的玉米秸秆水解液，SSCF 是在 30% (w/w) 固体含量下进行的，纤维素含量为 8.5% (w/w) 半纤维素含量为 2.8% (w/w)。

2.4 本章小结

木质纤维素来源的酚醛抑制物难以通过脱毒的手段进行完全脱除，残留的酚醛抑制物仍会对 *Z. mobilis* 的纤维素乙醇发酵造成影响。通过长周期的适应性进化培养，*Z.*

mobilis 的细胞生长、乙醇生产以及糖耗速率都有显著的提高。随后的评估发现进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的酚醛抑制物转化能力以及纤维素乙醇发酵性能都有显著性的提升。通过进一步的 qRT-PCR 分析挖掘到了进化菌株抑制物耐受和发酵性能提升的关键基因。本章主要研究结论如下：

(1) 出发菌株 *Z. mobilis* 8b 在进行高固体含量的 SSCF 时受到强烈的抑制，乙醇发酵性能很差，糖化后释放的 70 g/L 葡萄糖需要经过长达 72 h 才能消耗完。

(2) 通过在玉米秸秆水解液中进行长周期的适应性进化，*Z. mobilis* 的生长、糖耗以及乙醇生产都有显著性的提升。

(3) 酚醛抑制物转化实验显示，进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的酚醛抑制物转化能力得到了显著性的提升，相比于出发菌株 *Z. mobilis* 8b，*Z. mobilis* Z198 对于毒性最大的香草醛在 12 h 时的转化率提升了 6.3 倍，而对于 *p*-羟基苯甲醛以及丁香醛的转化率则分别提高了 13.2% 以及 9.5%。

(4) 进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的高固体含量 SSCF 过程中的葡萄糖消耗延滞期显著缩短了，乙醇生产速率、乙醇浓度以及木糖利用率相对于出发菌株 *Z. mobilis* 8b 分别提高了 21.3%、21.6% 以及 1.8 倍。

(5) 通过 qRT-PCR 实验，挖掘到了在适应性进化培养过程中起到关键作用的基因 *ZMO3_RS07160*，这一基因在进化菌株中显著上调表达了 11.7 倍；将这一基因在出发菌株 *Z. mobilis* 8b 中进行过表达也能提升出发菌株的乙醇发酵性能，并且能够达到和适应性进化提升菌株发酵性能相似的效果。

(6) 本章节不仅为纤维素乙醇发酵提供了一株具有优异发酵性能的发菌株 *Z. mobilis* Z198，而且还挖掘到了一个重要的酚醛抑制物抗逆基因 *ZMO3_RS07160*，这一基因可以作为候选基因用于提升其它发菌株的酚醛抑制物抗逆性能。

第 3 章 生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的耐受机理以及抗逆性改造

3.1 引言

木质纤维素在经过剧烈的预处理过程后,会产生大量的抑制物^[8]。这些抑制物会抑制纤维素酶的酶活,更重要的是,还会对生物炼制菌株的生长以及产物合成造成影响^[22-225, 226]。目前研究比较多的抑制物,包括呋喃类抑制物、有机弱酸类抑制物以及酚类抑制物,而且新的抑制物也在不断地被发现。软木、农业废弃物以及硬木经过酸预处理后会产生来源于木质素的醌类及其衍生物(*p*-苯醌以及 2,6-双甲氧基苯醌),桦木经过蒸汽预处理会产生甲氧基氢醌类物质,挪威云杉经过酸处理也会产生氢醌类物质^[79]。这些醌类物质是由于酚类物质的进一步氧化产生的,例如 *p*-苯醌来源于 *p*-羟苯基物质(*p*-羟基苯甲酸、*p*-羟基苯甲醛以及 *p*-羟基苯甲醇等)^[75],甲氧基苯醌产生于愈创木基物质(香草酸、香草醛以及香草醇等),2,6-双甲氧基苯醌则来源于丁香基物质(丁香酸、丁香醛以及香草醇等)的进一步氧化^[227]。

减轻抑制物对于发酵微生物的抑制作用一直以来都是生物炼制领域不可忽略的重要问题。常规的脱毒方式包括过碱中和、水洗、碱处理、离子交换等都能够有效地除去抑制物,但同时也会造成可发酵性糖(大量的木糖以及少量寡糖)损失以及大量的废水产生,影响整个过程的经济性以及可持续性。生物脱毒是利用专司脱毒的微生物来进行抑制物的降解,能够有效地转化毒性较强的抑制物为低毒性甚至无毒的代谢产物。已经报道的比较高效的脱毒菌株包括树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1^[32]等能够在通气条件下快速降解酸预处理后产生的呋喃类抑制物以及有机弱酸类抑制物,但对于木质素来源的抑制物包括酚类抑制物以及醌类抑制物的降解能力有限;延长生物脱毒的时间虽然能够降解这些木质素来源的抑制物,但也会造成可发酵性糖的大量损失,降低脱毒过程的经济性。因此,改造或者强化生物炼制菌株的抑制物抗逆性,使得其能够转化生物脱毒难以脱除的抑制物,不仅可以缩短脱毒周期,而且可以保留大量可发酵性糖。

据报道,醌类抑制物能强烈抑制酵母菌株的生长以及乙醇生产,即使是 0.02 g/L 的 *p*-苯醌或者 0.2 g/L 的 2,6-双甲氧基苯醌都会完全抑制酵母菌株的生长^[79, 228]。*p*-苯醌的毒性主要体现在可以增加细胞中 ROS 的积累,而 ROS 不仅能氧化 DNA 造成 DNA 双链断裂,而且还能破坏胞内的蛋白质,导致细胞凋亡^[87, 229, 230]。然而,相比较于呋喃类抑制物以及有机酸类抑制物,很少有关于醌类抑制物的研究;不同种类物料经过预处理后会产生多少含量的醌类抑制物,常规的抑制物脱除方式能否有效地去除醌类抑制物,以及醌类抑制物如何进行微生物转化,这些问题目前还没有研究清楚。

在本研究中,首先定性鉴定了 6 种物料(玉米秸秆、玉米芯残渣、小麦秸秆、稻秆、烟草秆、葵花秆等)经过干式稀酸预处理后产生的 *p*-苯醌,定量测定了每种物料预处理后的 *p*-苯醌含量,并尝试了多种脱毒方式(碱处理、水洗、生物脱毒等方式)来脱除玉米秸秆预处理后的 *p*-苯醌。紧接着,还测试了 *p*-苯醌以及氢醌对于 5 种生物炼制菌株包

括 *S. cerevisiae* XH7、耐高温的 *S. cerevisiae* DQ1、*Z. mobilis* ZM4、乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY112 以及氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* DSM2003 的生长以及产物合成的影响, 以及这 5 种生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的转化能力。随后借助 qRT-PCR 实验来挖掘 *Z. mobilis* ZM4 中与 *p*-苯醌抗逆相关的基因, 并通过过表达这些基因在含有 *p*-苯醌的合成培养基、水解液以及 SSCF 发酵进一步验证这些基因的功能。本研究发现了 *p*-苯醌的抗逆机理, 为生物炼制菌株的 *p*-苯醌抗逆改造提供重要的理论指导和候选基因。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株、培养基与培养条件

本章节中使用到的菌株、构建的质粒以及使用的引物见表 3.1。*Z. mobilis* ZM4、*A. resinae* ZN1 以及 *E. coli* S17-1 $\lambda\pi$ (用于质粒构建以及转染) 的培养基配方以及培养方法见 2.2.1。

P. acidilactici TY112 是一株 *ldhD* 缺失的 L-乳酸生产菌株, 保存于 CGMCC, 注册编号为 8664^[48]。*P. acidilactici* TY112 培养于 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe medium) 培养基 (22 g/L 一水合葡萄糖、2 g/L 磷酸氢二钾、10 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、0.58 g/L 七水合硫酸镁、0.25 g/L 一水合硫酸锰), 固体培养基需要额外添加 15~20 g/L 的琼脂粉, 培养条件为 42 °C, 150 rpm。

S. cerevisiae XH7 是一株具有木糖利用能力的乙醇生产菌株, 来自于山东大学鲍晓明老师^[231]; *S. cerevisiae* DQ1 是实验室诱变筛选的一株耐高温酿酒酵母, 具有优异的抑制物耐受能力^[54]。*S. cerevisiae* XH7 和 *S. cerevisiae* DQ1 都培养于 YPD (Yeast extract peptone dextrose medium) 培养基 (22 g/L 一水合葡萄糖、10 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨、2 g/L 磷酸氢二钾), 培养条件为 30 °C, 200 rpm。

G. oxydans DSM2003 是一株葡萄糖酸生产菌株, 购买于德国微生物菌种保藏中心 (German collection of microorganisms and cell cultures, DSMZ, German)^[232]。*G. oxydans* DSM2003 培养于含有 1.5 g/L 磷酸氢二钾、0.5 g/L 七水合硫酸镁、1.5 g/L 硫酸铵、10 g/L 酵母提取物以及 80 g/L 山梨醇的培养基中, 培养条件为 30 °C, 220 rpm。

3.2.2 木质纤维素原料以及脱毒

玉米秸秆、玉米芯残渣、小麦秸秆、稻秆、烟草秆、葵花秆的前处理以及预处理过程见 2.2.2。

选取典型的木质纤维素原料玉米秸秆为对象, 分析三种脱毒方式 (物理的水洗过程、化学的过碱化处理以及生物脱毒) 对于 *p*-苯醌的脱除效率。水洗过程, 是采用 10 倍、20 倍以及 40 倍玉米秸秆干重的自来水洗涤预处理后的玉米秸秆; 水洗后经过真空抽滤来除去产生的废水, 然后放置于 115 °C 烘箱中烘干至恒重, 最后测定其中的 *p*-苯醌含量。过碱化处理, 是利用氨水将预处理后的玉米秸秆调节 pH 至 9.0 左右, 30 °C 条件下放置

1 h 后用硫酸调节 pH 至 5.5, 测定其中的 *p*-苯醌含量。生物脱毒的方法参考 2.2.2, 脱毒 3 天、5 天以及 7 天后分别测定剩余的 *p*-苯醌含量。

3.2.3 酶与试剂

p-苯醌和氢醌购买于本地的供应商, 本章中使用到的其它酶及试剂见 2.2.3。

3.2.4 *p*-苯醌与氢醌对于多种生物炼制菌株的抑制情况分析

p-苯醌与氢醌对于多种生物炼制菌株 (*S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1、*P. acidilactici* TY112、*Z. mobilis* ZM4 以及 *G. oxydans* DSM2003) 的抑制实验是在分别添加了 *p*-苯醌与氢醌的各自的培养基中进行的, *p*-苯醌的添加量为 0~200 mg/L, 氢醌的添加量为 0~1000 mg/L。将 5 株菌株从 -80 °C 冰箱中取出后, 接种至 20 mL 各自的培养基中进行活化, 活化后以 10% (v/v) 的接种量接种至新鲜的培养基中培养至对数生长中期作为发酵种子液, 最后将发酵种子液以 10% (v/v) 接种量接种至添加了不同浓度 *p*-苯醌或者氢醌的培养基中进行培养, 12 h 后分别测定不同菌株的生长以及产物合成。

3.2.5 生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的转化情况分析

将 5 株菌株 (*S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1、*P. acidilactici* TY112、*Z. mobilis* ZM4 以及 *G. oxydans* DSM2003) 在各自不含 *p*-苯醌的培养基中培养至对数生长中期, 用 PBS 缓冲液 (pH 值 7.0) 洗涤收集到的菌体细胞; 然后用等体积的 PBS 缓冲液重悬细胞, 以 10% (v/v) 的接种量接种至含有 20 g/L 葡萄糖并添加了一定量 *p*-苯醌的 PBS 缓冲液中进行 *p*-苯醌的转化。*Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 的 *p*-苯醌耐受较好, *p*-苯醌添加量为 200 mg/L, 而 *S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1 和 *P. acidilactici* TY112 的 *p*-苯醌耐受较差, *p*-苯醌添加量为 100 mg/L。每隔两个小时取样测定 *p*-苯醌和氢醌的含量, 每株菌株各两个平行实验。

3.2.6 qRT-PCR 实验

本章中所用到的引物序列见表 3.2。 *Z. mobilis* 8b 在含有 200 mg/L 的 *p*-苯醌的 RM 培养基中培养 1 h, 以在不含 *p*-苯醌的 RM 培养基中培养 1 h 作为对照。12,000 rpm 离心 10 min, 4 °C 下收集菌体, 收集好的菌体置于 -80 °C 冻存备用。RNA 提取、RNA 质量检测、RNA 反转录以及 qRT-PCR 方法见 2.2.10。其中转录水平变化大于 2 的视为显著上调。

3.2.7 水解液制备

水解液制备参考 2.2.4。脱毒后的玉米秸秆以 15% (w/w) 固体含量酶解糖化后得到的水解液作为低糖水解液, 以 30% (w/w) 固体含量酶解糖化后得到的水解液作为高糖水解液, 高糖水解液意味着更高浓度的 *p*-苯醌抑制物。

3.2.8 重组菌株的构建以及 *p*-苯醌耐受评估

Z. mobilis 的基因组提取以及重组菌株的构建方法参考 2.2.11。将 ZMO1772、ZMO0833、ZMO1303、ZMO1984、ZMO1949、ZMO1696、ZMO1576、ZMO1399、ZMO0074、

ZMO1821、ZMO1116 以及 ZMO1335 分别在具有木糖利用能力的 *Z. mobilis* 8b 中进行过表达。

重组菌株的 *p*-苯醌耐受评估是在三种添加了不同含量 *p*-苯醌的培养基中进行的, 包括添加了 200 mg/L *p*-苯醌的 RM 培养基、额外添加 *p*-苯醌使得其含量达到 200 mg/L 的低糖水解液以及含有 110 mg/L *p*-苯醌的高糖水解液。重组菌株的培养方法参考 2.2.11, 在 RM 培养基中发酵 16 h 后测定细胞生长以及乙醇生产, 在低糖水解液中发酵 24 h 后测定细胞生长以及乙醇生产, 而高糖水解液发酵则在 72 h 后测定细胞生长以及乙醇生产。

重组菌株的同步糖化共发酵参考 2.2.8, 发酵过程中添加 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素来维持质粒的稳定性。

3.2.9 HPLC 检测方法以及 GC-MS

葡萄糖、乙酸、HMF、糠醛以及乳酸的定量检测参见 2.2.9。

葡萄糖酸的定量检测是使用配备了 SPD-20A 紫外检测器的 HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan) 来进行的, 柱温控制为 55 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为 5 mM 硫酸, 流速控制为 0.4 mL/min, 检测波长为 210 nm。

p-苯醌和氢醌的含量检测是通过配备了 SPD-20A 检测器的反式 HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan) 来进行。泵 A 为 0.1% (v/v) 的甲酸水溶液, 泵 B 为含有 0.1% (v/v) 甲酸的比例为 3:1 (v/v) 乙腈、2-丙醇混合液。最开始为 30% (v/v) 的泵 B, 9 分钟内从 30% (v/v) 提升到 40% (v/v), 随后 8 分钟内从 40% (v/v) 提升到 50% (v/v), 然后 0.01 分钟从 50% (v/v) 降至 30% (v/v), 最后在 30% (v/v) 维持 33 分钟。流速控制为 0.25 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 245 nm。

p-苯醌和氢醌的定性检测是通过配备了 HP-5 MS 毛细管柱的 Agilent 6890-5973N GC-MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 来进行的。进样口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$, 不分流模式进样 1 μL 。程序设定为 80 $^{\circ}\text{C}$ 维持 4 分钟, 然后以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 。预处理后物料中浸提得到的 *p*-苯醌 (质荷比, m/z 108) 的保留时间为 5.64 min, 而在合成培养基中测得的 *p*-苯醌 (m/z 108) 和氢醌 (m/z 110) 的保留时间分别为 5.13 和 9.17。

表 3.1 本章节所使用到的菌株、质粒以及引物

Table 3.1 Strains, plasmids, and primers used in this chapter

Strains	Genotype	Sources
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4	Wild-type strain	ATCC
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM2003	Wild-type strain	DSMZ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> XH7	Xylose-utilizing strain for ethanol fermentation	[231]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DQ1	Thermotolerant strain for ethanol fermentation	[214]
<i>Pediococcus acidilactici</i> TY112	Co-utilization of glucose and xylose for L-lactic acid production	[57]
<i>Zymomonas mobilis</i> 8b	Xylose-utilizing strain for ethanol fermentation	[60]
<i>Escherichia coli</i> S17-1 $\lambda\pi$	<i>Pro</i> , <i>res</i> ⁻ , <i>mod</i> ⁺ ; chromosomal integrated RP4, 2- <i>Tc</i> ::Mu- <i>Km</i> :: <i>Tn7</i> ; <i>Tp</i> , <i>sm</i>	Lab stock
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Wild-type strain for biodegradation	[215]
Plasmids	Characteristic	Sources
pHW20a	<i>Tc</i> ^r , <i>mob</i> (RP4), <i>mob</i> (RSF1010), <i>lacZα</i> , MCS, and <i>oriV</i>	[214]
pHW20a-ZMO1772	NAD(P)H quinone oxidoreductase gene ZMO1772 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO0833	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase gene ZMO0833 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO1303	Pyrroline-5-carboxylate reductase gene ZMO1303 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO1984	Aldo/keto reductase gene ZMO1949 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO1949	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) gene ZMO1949 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO1696	Zinc-binding alcohol dehydrogenase gene ZMO1696 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO1576	Short-chain dehydrogenase/reductase gene ZMO1576 from ZM4	This study
pHW20a-ZMO1399	Fatty acid hydroxylase gene ZMO1399 from ZM4	This study

Primers for gene amplification	Sequence (5' - 3')
ZMO1772-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGGCAGGCAACATGATGAAAG
ZMO1772-R	CGGGGTACCTCAAAAAAGCGCCTCTGGC
ZMO0833-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGACGACTGCTACATCTTCC
ZMO0833-R	CGGGGTACCTCATGCCTTATCCCCATC
ZMO1303-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGAGTGATACCGCATCAGATTC
ZMO1303-R	CGGGGTACCTTATTGCGGATAGTCTCTTTG
ZMO1984-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGGATTATAACGTATTTGGGTCG
ZMO1984-R	GCTCTAGACTACCATGCATAGGCTTCAGG
ZMO1949-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGAAAGTATTGATCGTTCACGC
ZMO1949-R	CGGGGTACCTCATGGTTGTTGTTTCCTCAAAC
ZMO1696-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGCGGCCATAGGTTATC
ZMO1696-R	CGGGGTACCTTAGAAGCCTTCTAAGACGATTTTA
ZMO1576-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGAACCAGAATATCCGCAA
ZMO1576-R	CGGGGTACCTTATAATGCCTGTTTTGTCGG
ZMO1399-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGAACACAACACTGATGCCAAGAC
ZMO1399-R	CGGGGTACCTCAGCGGATATCCTGTATTTTATC

注释：下划线表示酶切位点。

表3.2 qRT-PCR实验用到的基因以及对应的引物
Table 3.2 Genes and primers used in qRT-PCR assay

Gene	Annotation	Primer sequence (5' - 3')	
		Forward	Reverse
Primers for the oxidoreductase gene			
ZMO1116	Oxidoreductase	TGTGGTTTGGGCCATCCG	TGTCGGTGCGTCCTGTTTGT
ZMO1772	NAD(P)H quinone oxidoreductase	GGTCGCCTTGTCATTGTCG	GGCTGTTCTGGCACGCAT
ZMO1885	NADH flavin oxidoreductase	TGGAGTGATGCCCAAGTAGAAG	CACTGACATTAGACGGCACCATA
Primers for the reductase gene			
ZMO1993	NADPH quinone reductase	GCGGTGTCGGTAGCTTGTT	GCCTTCGCCGTGATTCTG
ZMO0833	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	ATCGCCTGCGTTGTGGTG	GCATTCATGCGGATCATACCA
ZMO1222	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	TTAGCCGTGCCGTCATCAGA	CGATCATGCCTGCCTTTGC
ZMO1303	Pyrroline-5-carboxylate reductase	ACAACCCTGATTTCTATTCTTGCC	AACAACGCCCTTCCCTAACG
ZMO1984	Aldo/keto reductase	TCGCCATTTGTCAGCCTATC	CAGCAAAGTTACTGCTACCCAC
ZMO1254	Redoxin domain-containing protein	CGCTATGGTAATCCCTATCAGGC	GCTCATAAGCTGTGGCAAATCC
Primers for the dehydrogenase gene			
ZMO1335	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	CCCGATTTGGGCGTTTG	AGACCGCTCCGACCTTTCC
ZMO1949	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	TGGAGGCAAGCGGTTCTAC	GCAACAGCGGTTTGAGCAT

<i>ZMO0157</i>	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	TATGGCTGTCGGGTTATTCC	TTCGGCGATGGCTTGG
<i>ZMO0788</i>	D-sorbitol dehydrogenase	CAGTTGTCACGGTCGCAATG	GCCGCAATCTGACTATCGTTTA
<i>ZMO1576</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase	TCTATCGTCGCTAAGGGTGGTC	GCTGCAATCCCATAAAGAACG
<i>ZMO1696</i>	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	TCCGAAGACAGGCGAAGAATG	CCTCGTCACCGACCTTAAATAGC
Primers for other genes			
<i>ZMO1399</i>	Fatty acid hydroxylase	GAAACGGATTCACTATGACCAC	CCGACAGCATAACCGATACA
<i>ZMO0020</i>	Hypothetical protein	CCGATCTAGTAAGCCAATTCACC	TTTCAAATCTGTTGGTTGGGTGT
<i>ZMO0021</i>	Hypothetical protein	CCACTTCATATCGCTTCTGTCG	GCGTAATCGGTGATCCCAA
<i>ZMO0074</i>	Hypothetical protein	CGATAAAGACCGCCCGACC	TCGCCAAGCAGGCATTTCG
<i>ZMO1821</i>	Hypothetical protein	AGAAAGCCGCCGCCATC	CACCATCATAACCAACTGTCAACG
<i>ZMOr003</i>	16S rRNA	TTAAGTTGGGCACTTTAGAGGAAC	TGTCACCGCCATTGTAGCAC

注释：16S rRNA 基因 *ZMOr003* 作为标准化 qRT-PCR 实验的内参基因。

3.3 结果与讨论

3.3.1 预处理后木质纤维素原料中 *p*-苯醌的鉴定、定量以及脱毒

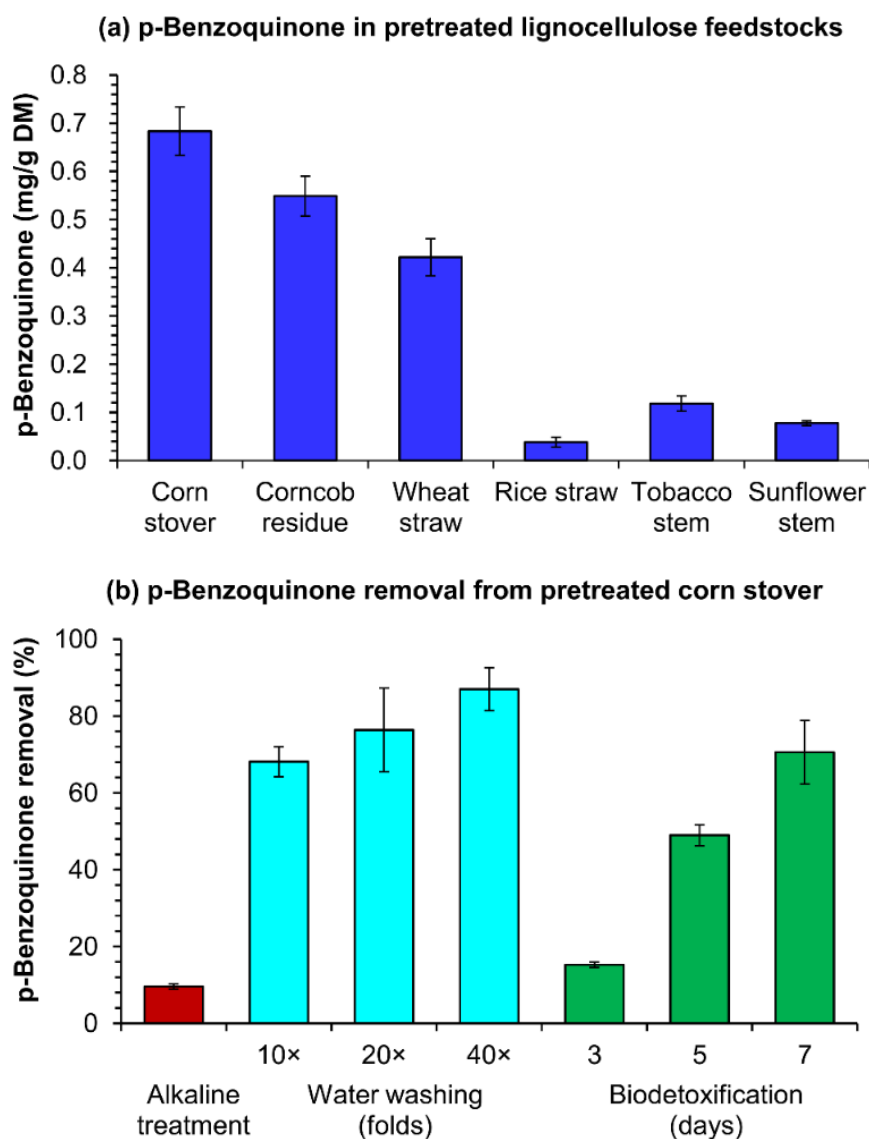


图 3.1 预处理后木质纤维素原料中 *p*-苯醌的定量以及脱毒

(a) 6 种木质纤维素原料经过预处理后产生的 *p*-苯醌含量；(b) 多种脱毒方式脱除预处理后玉米秸秆中的 *p*-苯醌

Fig. 3.1 Quantification and detoxification of *p*-benzoquinone in the pretreated lignocellulose feedstocks (a) *p*-benzoquinone content in the six different lignocellulose feedstocks after dry acid pretreatment; (b) *p*-benzoquinone detoxification from the pretreated corn stover by various detoxification methods.

木质素来源的抑制物由于其对于生物炼制菌株的强烈抑制作用而受到广泛的关注。本节首先对 6 种常见的木质纤维素原料（玉米秸秆、玉米芯残渣、小麦秸秆、稻秆、烟草秆、葵花秆）经过干酸预处理后产生的 *p*-苯醌进行了定性鉴定以及定量检测，并且考察了多种脱毒方式对于预处理后玉米秸秆中 *p*-苯醌抑制物的脱除效率。预处理后原料中 *p*-苯醌的定性鉴定是通过 GC-MS 来进行的，*p*-苯醌的保留时间为 5.64 min, *m/z* 为 108。*p*-苯醌的定量测定则是通过反式 HPLC 来实现的，经过测定，预处理后的玉米秸秆、玉

米芯残渣、小麦秸秆、稻秆、烟草秆、葵花秆中分别含有 0.050、0.041、0.038、0.010、0.016、0.0051 mg/g DM 的 *p*-苯醌；很明显，干酸预处理后玉米秸秆中的 *p*-苯醌含量最高，在进行 30% (w/w) 高固体含量的发酵时发酵醪液中的 *p*-苯醌浓度最高可以达到 205 mg/L (图 3.1)。

抑制物的脱除不仅有利于糖化过程的进行，而且还可以解除对于发酵微生物的抑制作用。*p*-苯醌的脱毒采用了三种脱毒策略，包括水洗过程、过碱化处理以及生物脱毒。干酸预处理后玉米秸秆中的 *p*-苯醌含量在 6 种物料中是最高的，因此选用玉米秸秆作为脱毒实验的原料。如图 3.2 所示，过碱化处理对于 *p*-苯醌的脱除效率最低，仅有 10.2%；10 倍水洗可以脱除 68.3% 的 *p*-苯醌，增加到 20 倍或者 40 倍水洗可以进一步地提高 *p*-苯醌的脱除效率，但这一过程不仅会产生大量的废水，而且还会造成木糖的损失；呋喃类抑制物、有机弱酸类抑制物可以通过生物脱毒在 36 h 内快速完全脱毒，而 *p*-苯醌经过长达 3 天的生物脱毒仅能脱除 15.1%，5 天和 7 天可以分别脱除 49.4% 和 71.2% 的 *p*-苯醌，生物脱毒对于 *p*-苯醌的脱毒速率很慢，延长脱毒周期不仅会影响过程的经济性，而且还会导致大量可发酵性糖的消耗。

3.3.2 不同生物炼制菌株对于 *p*-苯醌以及氢醌的耐受能力

p-苯醌对于 5 种典型生物炼制菌株的抑制作用是在合成培养基中进行，这 5 种发酵菌株包含有 2 株酵母菌株 (*S. cerevisiae* XH7 和 *S. cerevisiae* DQ1)、1 株 L-乳酸生产菌株 (*P. acidilactici* TY112)、1 株革兰氏阴性菌株 (*Z. mobilis* ZM4) 以及 1 株葡萄糖酸生产菌株 (*G. oxydans* DSM2003) (图 3.2)。培养基中 *p*-苯醌的添加量 20~200 mg/L，这是基于预处理后物料制备水解液中的 *p*-苯醌含量来确定的。如图 3.2a 和图 3.3b 所示，仅 20 mg/L 的 *p*-苯醌就对 *S. cerevisiae* XH7 的生长和产物合成产生了强烈的抑制作用，60 mg/L 的 *p*-苯醌对 *S. cerevisiae* DQ1 的生长和产物合成产生了强烈的抑制作用。如图 3.2c 所示，*Z. mobilis* ZM4 仅在 *p*-苯醌浓度高达 100~200 mg/L 时受到明显的抑制，*Z. mobilis* ZM4 在 100 mg/L 的 *p*-苯醌浓度下生长和乙醇生产分别被抑制了 63.4% 和 67.2%，而在 200 mg/L 的 *p*-苯醌浓度下生长和乙醇生产分别被抑制了 87.1% 和 91.3%。如图 3.2d 所示，*P. acidilactici* TY112 对于 *p*-苯醌具有相当强的耐受能力 (高达 80 mg/L)，但当 *p*-苯醌浓度高达 100 mg/L 时几乎完全抑制了 *P. acidilactici* TY112 的生长以及乳酸生产。如图 3.2e 所示，*G. oxydans* DSM2003 对于 *p*-苯醌具有非常强的耐受能力，只有在 *p*-苯醌浓度高达 200 mg/L 时受到明显的抑制。

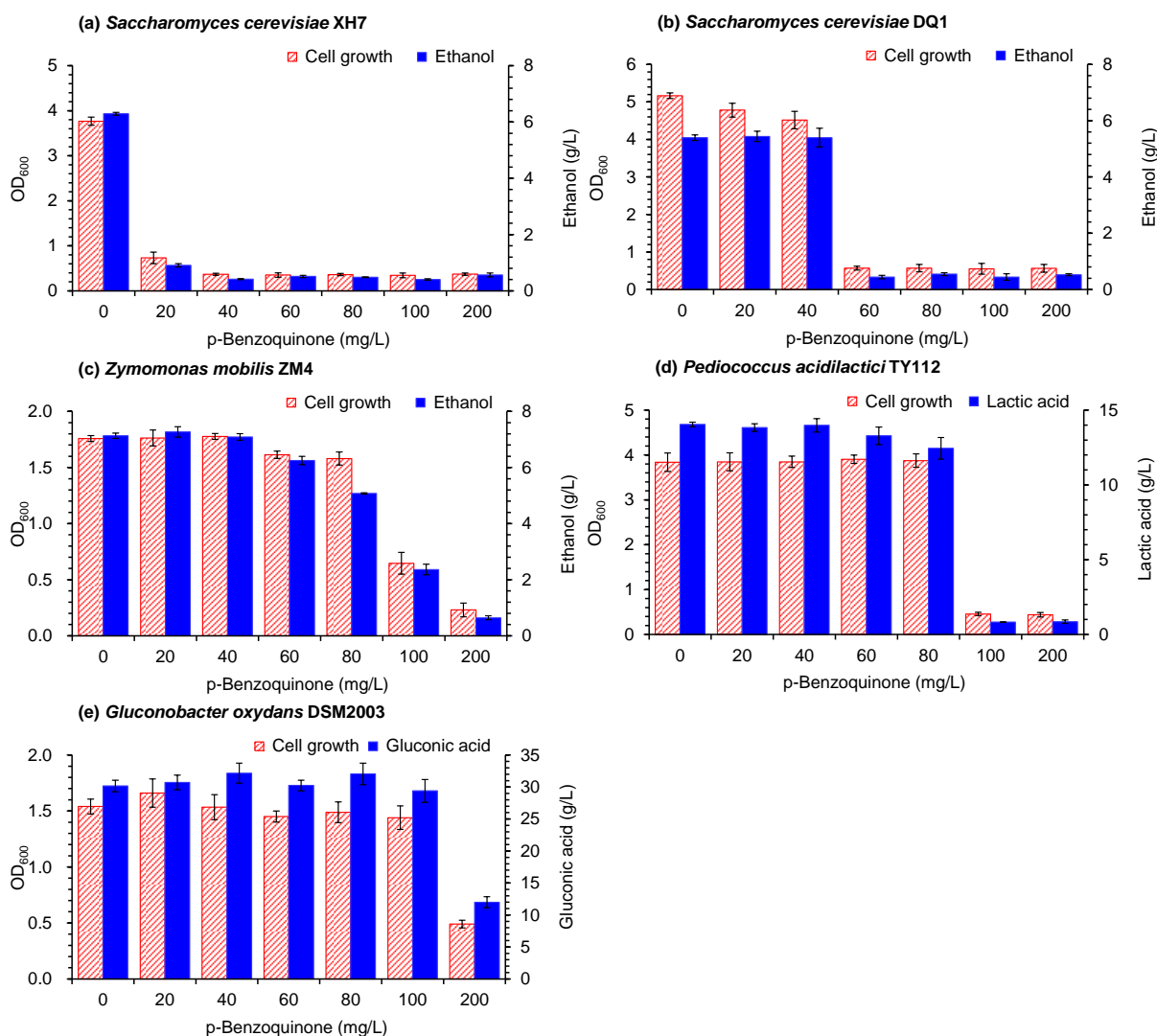


图 3.2 *p*-苯醌对于 5 种生物炼制菌株的生长以及产物合成的影响

(a) 具有木糖利用能力的改造菌株 *S. cerevisiae* XH7; (b) 耐高温的 *S. cerevisiae* DQ1; (c) 野生型的 *Z. mobilis* ZM4; (d) 改造菌株 *P. acidilactici* TY112

Fig. 3.2 Inhibition of *p*-benzoquinone on cell growth and product fermentation of five biorefinery strains (a) Engineered *S. cerevisiae* XH7 with xylose utilization; (b) Thermotolerant *S. cerevisiae* DQ1; (c) Wild *Z. mobilis* ZM4; (d) Engineered *P. acidilactici* TY112.

发酵条件：5 种发酵菌株在添加了 0~200 mg/L *p*-苯醌的培养基中培养 12 h 后测定细胞生长以及产物合成。

另外，这 5 种发酵菌株对于氢醌的耐受性也在合成培养基中进行了测试，培养基中氢醌的浓度设定为 0~1000 mg/L。有趣的是，5 种发酵菌株都对氢醌展现了很强的耐受能力，即使氢醌浓度高达 600 mg/L，也不会影响菌株的生长以及产物的合成（图 3.3）。

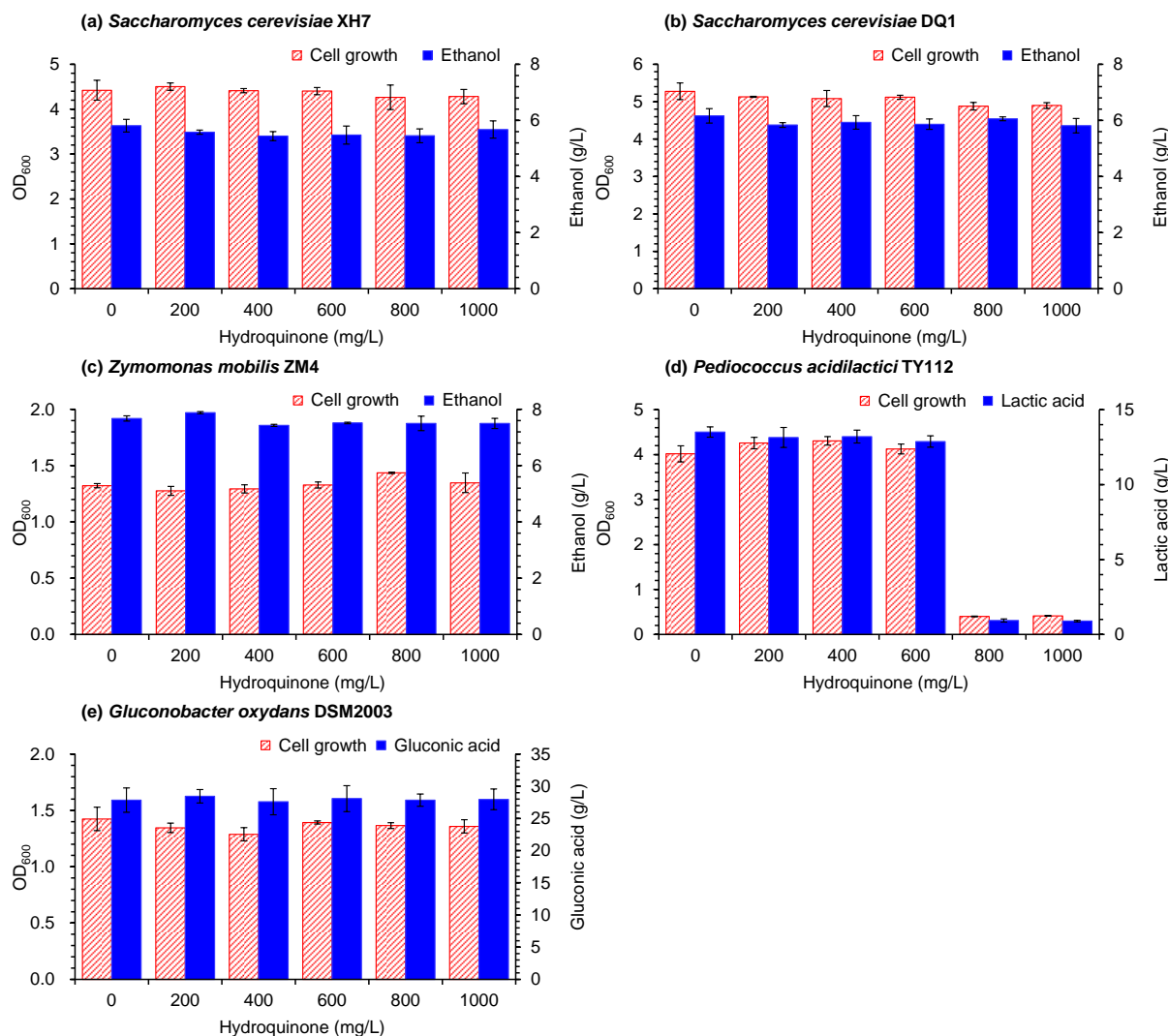


图 3.3 氢醌对于 5 种生物炼制菌株的生长以及产物合成的影响

(a) 具有木糖利用能力的改造菌株 *S. cerevisiae* XH7; (b) 耐高温的 *S. cerevisiae* DQ1; (c) 野生型的 *Z. mobilis* ZM4; (d) 改造菌株 *P. acidilactici* TY112; (e) *G. oxydans* DSM2003

Fig. 3.3 Inhibition of hydroquinone on cell growth and fermentation of five biorefinery strains
(a) Engineered *S. cerevisiae* XH7 with xylose utilization; (b) Thermotolerant *S. cerevisiae* DQ1; (c) Wild *Z. mobilis* ZM4; (d) Engineered *P. acidilactici* TY112; (e) *G. oxydans* DSM2003.

发酵条件：5 株菌株在添加了 0~1000 mg/L 氢醌的培养基中培养 12 h 后测定细胞生长以及产物合成。

3.3.3 不同生物炼制菌株对于 *p*-苯醌转化能力的评估

微生物具有将高毒性的抑制物转化为低毒性的物质从而实现自解毒，例如 *Z. mobilis* 可以将抑制作用很强的 HMF 以及糠醛通过自身的氧化还原酶、脱氢酶以及醛酮还原酶转化为低毒性的醇或酸^[58, 233]。分别对这 5 种发酵菌株进行了 *p*-苯醌的转化实验，*Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 由于对于 *p*-苯醌具有较强的耐受能力，*p*-苯醌的添加量为 200 mg/L，而对于剩余的三株菌株，*p*-苯醌的添加量为 100 mg/L。如图 3.4a 所示，*Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 都能够在短时间内将所有的 *p*-苯醌转化为氢醌，但是不能进一步代谢氢醌（图 3.4a）。*S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1 以及 *P.*

acidilactici TY112 都没有检测到氢醌的产生以及 *p*-苯醌的减少 (图 3.4b)。通过 GC-MS 图谱, 如图 3.5 所示, *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 的样品 0 h 只有 *p*-苯醌 (保留时间 5.13 min) 存在, 而在反应 6 h 后生成了大量的氢醌 (保留时间 9.17 min), 这进一步说明了 *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 具有转化 *p*-苯醌为氢醌的能力。*Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 不能进一步代谢氢醌, 只有一些特殊的菌株, 例如伯克霍尔德菌 AK-5, 能够通过 2-羟基-1,4-苯醌和 1,2,4-三羟基苯途径来完全代谢氢醌生成水和二氧化碳^[94]。

Z. mobilis ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 对于 *p*-苯醌高抗逆性的机制是通过胞内的氧化还原酶、脱氢酶以及醛酮还原酶等将高毒性的 *p*-苯醌转化为低毒性的氢醌, 从而实现了对于 *p*-苯醌的高抗逆性。酚类抑制物, 包括酚醛以及 *p*-苯醌等, 对于生物炼制菌株具有强烈的毒性, 并且具有低水溶性、衍生物种类繁多以及生物难降解的特点。常规的水洗方法对于这种水溶性差的抑制物很难达到完全去除的效果, 不仅会产生大量的废水, 而且还会导致可发酵性糖的损失。生物脱毒方法干净、清洁, 但对于这种生物难降解的抑制物会大大延长脱毒的周期, 并且还会大量消耗预处理后释放的木糖。这种通过发酵微生物来转化抑制物的策略为彻底解除醌类抑制物的抑制效应提供了一种实用的方式。

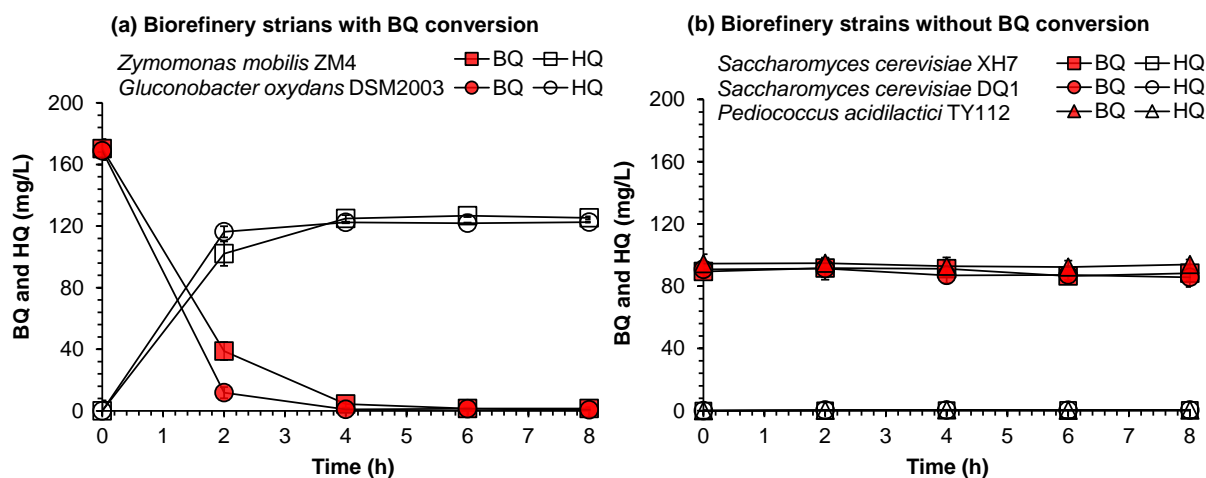


图 3.4 5 种生物炼制菌株转化 *p*-苯醌为氢醌的能力评估

(a) 具有 *p*-苯醌转化能力的 *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003; (b) 不具有 *p*-苯醌转化能力的 *S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1 和 *P. acidilactici* TY112

Fig. 3.4 Conversion of *p*-benzoquinone (BQ) to hydroquinone (HQ) by five different biorefinery strains (a) *Z. mobilis* ZM4 and *G. oxydans* DSM2003 with *p*-benzoquinone conversion capacity; (b) *S. cerevisiae* XH7, *S. cerevisiae* DQ1, and *P. acidilactici* TY112 without *p*-benzoquinone conversion capacity.

条件: *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 是在添加了 200 mg/L 的 *p*-苯醌的 PBS 缓冲液中进行的, 而 *S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1 和 *P. acidilactici* TY112 是在添加了 100 mg/L 的 *p*-苯醌的 PBS 缓冲液中进行的。

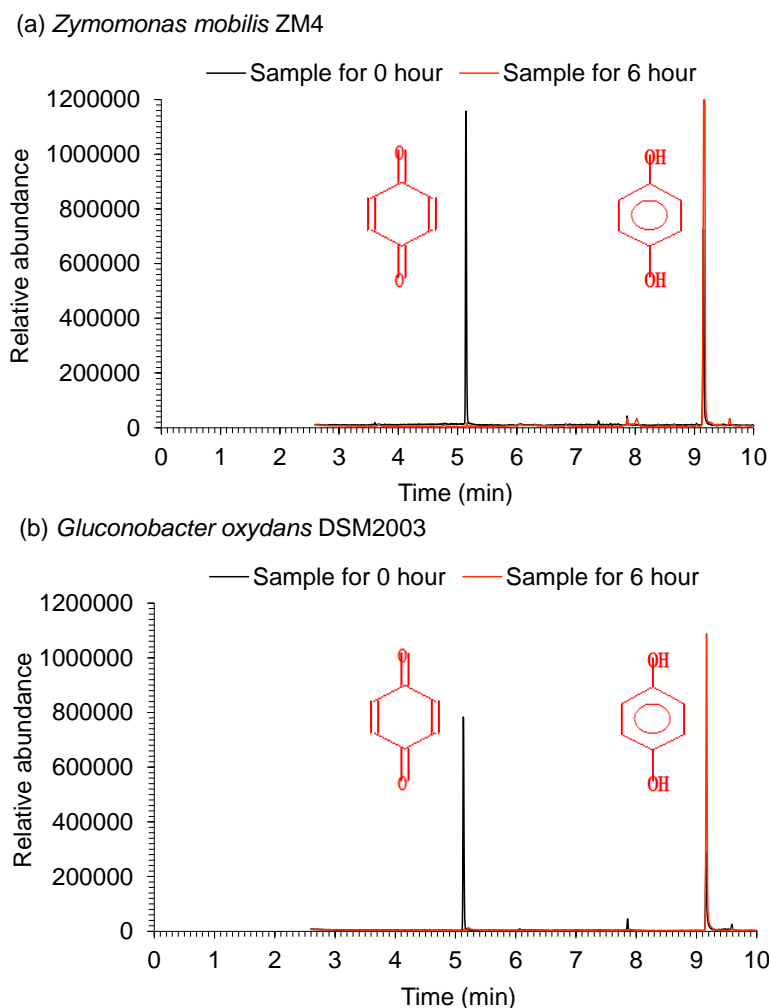


图 3.5 *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 转化 *p*-苯醌为氢醌的 GC-MS 图

(a) 具有 *p*-苯醌转化能力的 *Z. mobilis* ZM4; (b) 具有 *p*-苯醌转化能力的 *G. oxydans* DSM2003

Fig. 3.5 GC-MS analysis of *p*-benzoquinone conversion by *Z. mobilis* ZM4 and *G. oxydans* DSM2003

(a) *Z. mobilis* ZM4 with *p*-benzoquinone conversion capacity; (b) *G. oxydans* DSM2003 with *p*-benzoquinone conversion capacity.

3.3.4 运动发酵单胞菌中 *p*-苯醌耐受基因的挖掘

5 株不同生物炼制菌株对于 *p*-苯醌和氢醌的耐受性结果表明：*p*-苯醌对于发酵菌株具有高毒性，而氢醌对于发酵菌株的毒性基本可以忽略。因此，提高菌株转化高毒性的 *p*-苯醌为低毒性的氢醌是提高 *p*-苯醌耐受的关键。*Z. mobilis* 中含有丰富的氧化还原酶，这些氧化还原酶可以作用于转化多种抑制物；另外，*Z. mobilis* 的遗传背景清楚，基因的序列以及基因注释很完善^[234, 235]。选取高 *p*-苯醌耐受的 *Z. mobilis* 作为目标菌株，基于基因组注释分析以及酚醛转化为相对应酚醇的基因库，运用 qRT-PCR 技术可以有效地挖掘高效转化 *p*-苯醌为氢醌的关键基因。

从 *Z. mobilis* 8b 的基因组中选取了 20 个基因，这 20 个基因根据基因注释以及推定可能作用于转化 *p*-苯醌为氢醌的基因，包括 3 个氧化还原酶基因、6 个还原酶基因、6

个脱氢酶基因、1 个羟化酶基因以及 4 个据预测能够还原酚醛为酚醇的假定蛋白基因（表 3.2）。

通过 qRT-PCR，分析了这 20 个基因在转化 *p*-苯醌为氢醌过程中的转录情况，其中有 12 个基因对于 *p*-苯醌具有很强的响应，这 12 个基因中有 10 个基因发生了显著性的上调表达，另外两个发生了显著性的下调表达（图 3.6）。10 个显著上调表达的基因包括：1 个氧化还原酶基因 *ZMO1772*（编码 NAD(P)H 醌氧化还原酶）、3 个还原酶基因（*ZMO0833* 编码 UDP-N-编码乙酰烯丙酮葡萄糖胺还原酶、*ZMO1303* 编码吡咯啉-5-羧酸还原酶、*ZMO1984* 编码醛酮还原酶）、3 个脱氢酶基因（*ZMO1949* 编码 NAD(P)H 脱氢酶、*ZMO1696* 编码锌结合型醇脱氢酶、*ZMO1576* 编码断链脱氢酶）、1 个脂肪酸羟化酶编码基因 *ZMO1399*、两个假定蛋白编码基因 *ZMO0074* 以及 *ZMO1821*。其中 *ZMO1984*、*ZMO1576*、*ZMO1696* 以及 *ZMO1399* 在 200 mg/L 的 *p*-苯醌胁迫下分别显著上调表达了 7.54、5.01、7.86 以及 5.03 倍。

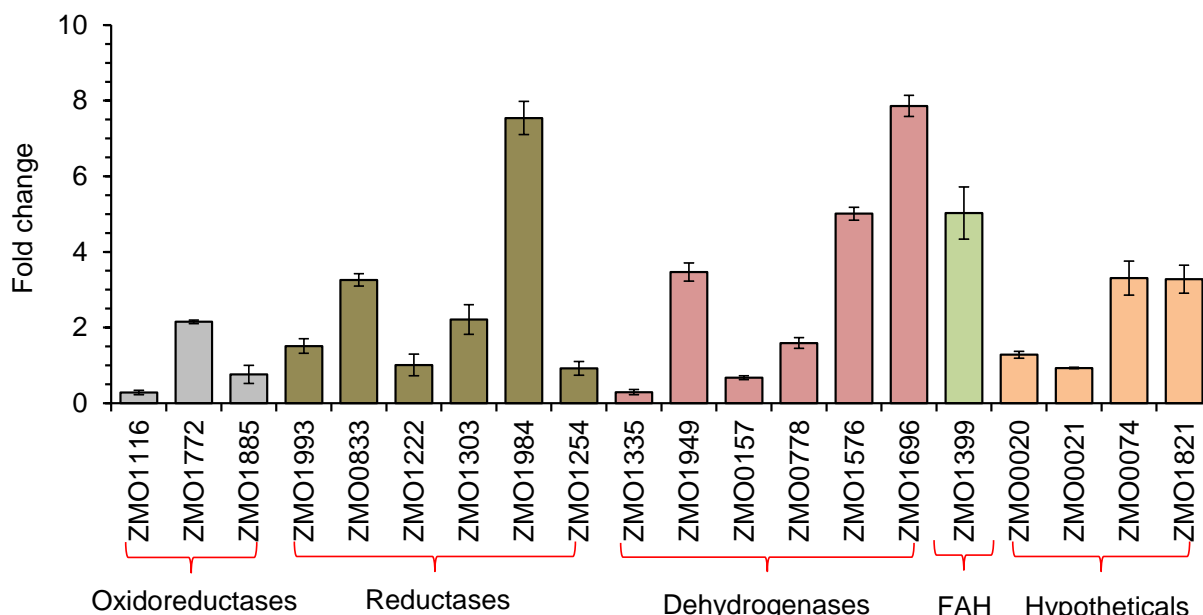


图 3.6 *Z. mobilis* 8b 中 20 个相关基因对于 200 mg/L *p*-苯醌的胁迫响应

Fig. 3.6 Transcription level analysis of the twenty selected genes in *Z. mobilis* 8b in response to 200 mg/L of *p*-benzoquinone

3.3.5 运动发酵单胞菌 8b 的 *p*-苯醌抗逆性强化以及纤维素乙醇发酵性能评估

Z. mobilis ZM4 是一株野生型菌株，只能代谢果糖、葡萄糖以及蔗糖来生产乙醇。木质纤维素原料经过酸预处理后会形成 *p*-苯醌，而在这种酸预处理过程中，木糖也会伴随着半纤维素的水解而大量产生。选取一株具有木糖利用能力的菌株用于后续的发醇更加具有应用价值，因此，选择能够利用多种碳源包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖的 *Z. mobilis* 8b 作为 *p*-苯醌抗逆性强化的出发菌株^[60]。*Z. mobilis* 8b 的 *p*-苯醌耐受强化是通过过表达在 *p*-苯醌胁迫下发生显著上调表达的基因来进行的，这些基因包括 *ZMO1949*、*ZMO1696*、*ZMO1772*、*ZMO1576*、*ZMO1399*、*ZMO0833*、*ZMO1303* 以及 *ZMO1984*。这些重组菌株

的发酵性能评估是在含有 *p*-苯醌的合成培养基以及实际的木质纤维素体系中进行的。在这些木质纤维素生物质中，玉米秸秆对于强烈的预处理过程相对敏感，在释放可发酵性糖的同时，还会比麦秆或者稻秆等产生更多的抑制物，包括酚类抑制物；同时，图 3.1 也从实验上证明了酸预处理后的玉米秸秆会产生最高含量的 *p*-苯醌。因此选用玉米秸秆作为测试用的生物质，制备的玉米秸秆水解液用于后续的发酵评估。

首先，在 *p*-苯醌添加量为 200 mg/L 的 RM 培养基中进行了重组菌株的发酵测试（图 3.7a）。在 *Z. mobilis* 8b 中过表达两个脱氢酶基因 *ZMO1949* 和 *ZMO1576*，重组菌株的细胞生长分别提高了 56%、52%，重组菌株的乙醇生产分别提高了 179%、141%；过表达锌结合型醇脱氢酶 *ZMO1696*、醛/酮还原酶 *ZMO1984*、脂肪酸水解酶基因 *ZMO1399*，重组菌株的细胞生长分别提高了 58%、53%、48%，重组菌株的乙醇生产分别提高了 192%、163%、137%；但是，过表达另外两个还原酶基因 *ZMO0883* 和 *ZMO1303* 以及一个氧化还原酶基因 *ZMO1772* 都没有显著提高重组菌株的细胞生长以及乙醇生产。

重组菌株 *p*-苯醌抗逆性能的第二个测试是在将 *p*-苯醌含量调整到 200 mg/L 的低糖水解液中进行的（图 3.7b）。在 *Z. mobilis* 8b 中过表达三个脱氢酶基因 *ZMO1576*、*ZMO1696* 以及 *ZMO1949*，细胞生长分别提高了 35%、36%、38%，乙醇生产分别提高了 56%、61%、60%；过表达水解酶基因 *ZMO1399*、还原酶基因 *ZMO1984* 以及氧化还原酶基因 *ZMO1772*，细胞生长分别提高了 31%、33%、21%，乙醇生产分别提高了 40%、54%、25%；而过表达 *ZMO0833* 和 *ZMO1303* 都不能显著提高 *Z. mobilis* 8b 的细胞生长以及乙醇生产。

重组菌株 *p*-苯醌耐受能力的第三个测试是在不额外添加 *p*-苯醌（100 mg/L）的高糖水解液中进行的（图 3.7c）。由于相对较低的 *p*-苯醌含量（大约为前两个测试 *p*-苯醌含量的一半），在高糖水解液中重组菌株的细胞生长以及乙醇生产的提升并没有在 *p*-苯醌含量高的 RM 培养基以及额外添加了 *p*-苯醌的低糖水解液中的显著。在 *Z. mobilis* 8b 中过表达 *ZMO1399*、*ZMO1576*、*ZMO1696*、*ZMO1949* 以及 *ZMO1984* 后，细胞生长提高了 17%~24%，乙醇生产提高了 24%-32%。过表达 *ZMO1772* 只是轻微地提高了细胞生长以及乙醇生产，而过表达 *ZMO0883* 和 *ZMO1303* 的情况几乎与对照一样。

重组菌株 *p*-苯醌耐受能力的最后一个测试是在 SSCF 中进行的，以稀酸预处理并生物脱毒的玉米秸秆为原料，在 30%（w/w）固体含量下进行发酵（图 3.8）。选取了在上述三个测试中 *p*-苯醌抗逆性优异的 5 株重组菌株（*ZMO1399*、*ZMO1576*、*ZMO1696*、*ZMO1949* 以及 *ZMO1984*）作为 SSCF 的发酵菌株，以携带空载质粒的菌株作为对照。如图 3.8 所示，这 5 株菌株相对于对照菌株，葡萄糖消耗以及乙醇生产都有显著地提高，其中过表达 *ZMO1696* 对于乙醇生产的提高最为明显，发酵 72 h 后乙醇产量可以达到 46 g/L，相比于对照提高了 26.2%。这些结果都证实了这些基因在真实的木质纤维素发酵过程中对于缓解 *p*-苯醌胁迫的重要作用，这些基因可以作为候选基因用于 *p*-苯醌耐受较差的菌株（酿酒酵母、乳酸片球菌等）的改造从而提高对于 *p*-苯醌的抗逆性。

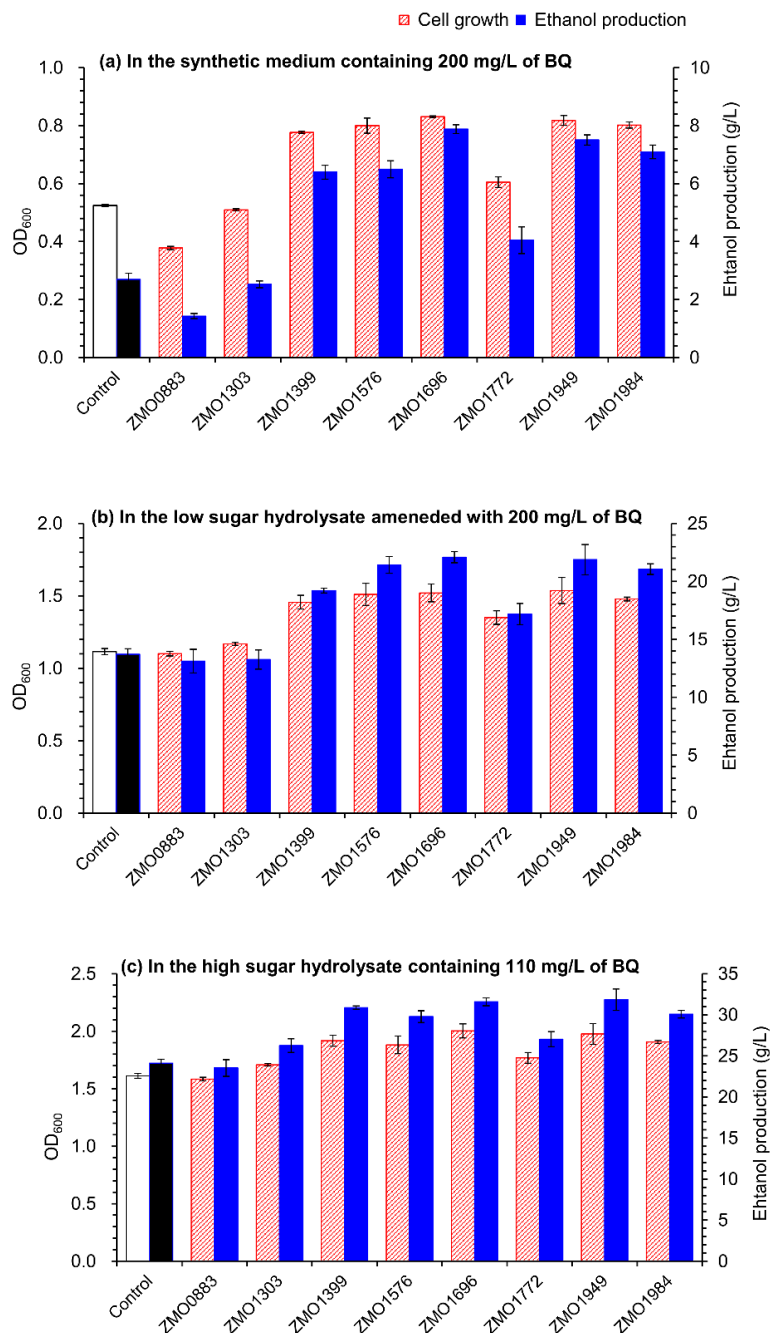


图 3.7 *Z. mobilis* 重组菌株在含有不同 *p*-苯醌浓度发酵条件下的细胞生长以及乙醇生产

(a) 在 *p*-苯醌添加量为 200 mg/L 的 RM 培养基; (b) 在 *p*-苯醌浓度提升到 200 mg/L 的低糖水解液; (c) 在 *p*-苯醌含量为 100 mg/L 的高糖水解液

Fig. 3.7 Cell growth and ethanol fermentation of *Z. mobilis* recombinants in various culture conditions containing different *p*-benzoquinone (BQ)

(a) In RM medium containing 200 mg/L BQ; (b) In low-sugar hydrolysate amended with 200 mg/L BQ; (c) In high-sugar hydrolysate containing 100 mg/L BQ without extra BQ addition.

发酵条件: 10% (v/v) 接种, 在 30 °C 条件下静置培养, RM 培养基中培养 16 h 后测定细胞生长以及乙醇生产, 低糖水解液中发酵 24 h 后测定细胞生长以及乙醇生产, 高糖水解液中发酵 72 h 后测定细胞生长以及乙醇生产。

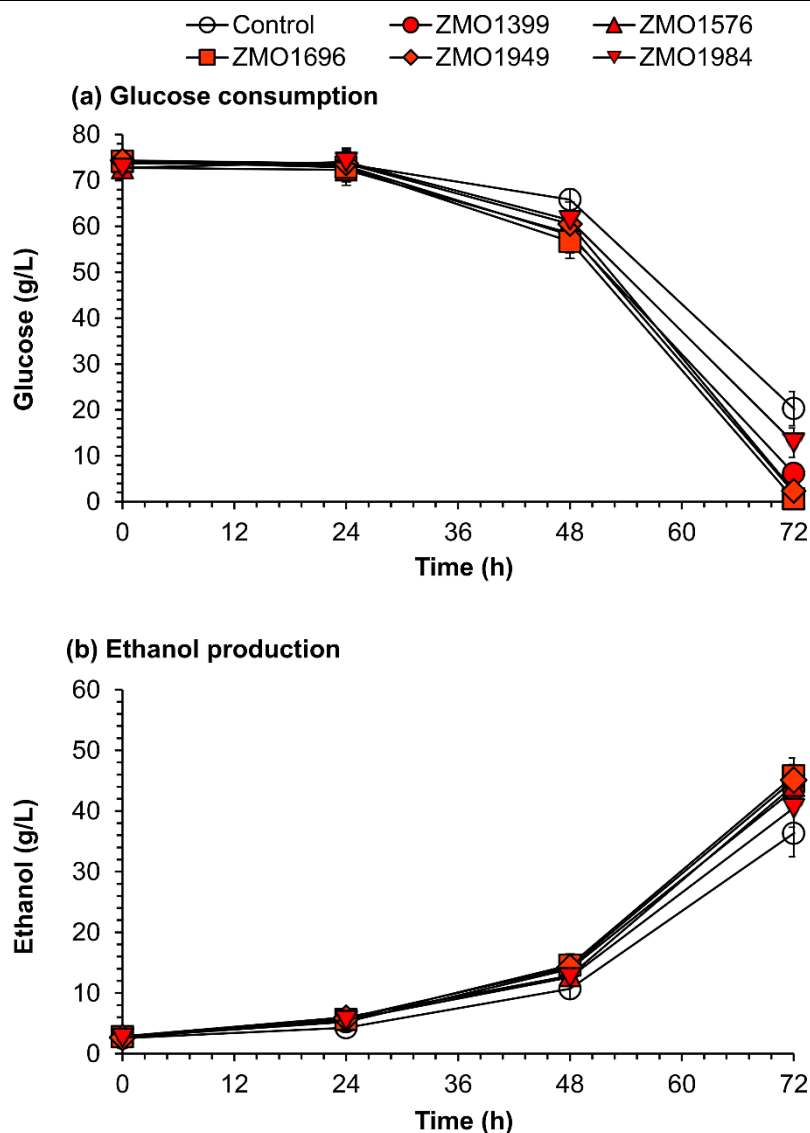


图 3.8 携带 *ZMO1399*、*ZMO1576*、*ZMO1696*、*ZMO1949* 以及 *ZMO1984* 的 *Z. mobilis* 重组菌株进行同步糖化共发酵生产纤维素乙醇

(a) 葡萄糖消耗; (b) 乙醇生产

Fig. 3.8 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of cellulosic ethanol by *Z. mobilis* recombinants harboring the *ZMO1399*, *ZMO1576*, *ZMO1696*, *ZMO1949*, and *ZMO1984* genes

(a) Glucose consumption; (b) Ethanol production.

3.4 本章小结

本章节, 首先鉴定并测定了 6 种原料经过预处理后产生的 *p*-苯醌, 然后测试了多种脱毒方式对于 *p*-苯醌的脱除效率。研究了 5 种生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的抗逆性以及转化能力, 发现了 *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 菌株对于 *p*-苯醌抗逆的机理。通过 qRT-PCR 技术, 挖掘到了 *Z. mobilis* 中在 *p*-苯醌胁迫下发生响应的基因, 并构建了多株重组菌株。最后, 在多种发酵条件下, 测试了这些重组菌株的 *p*-苯醌抗逆能力以及乙醇发酵性能。本章主要研究结论如下:

(1) 通过 GC-MS, 鉴定并测定了 6 种常见的木质纤维素原料 (玉米秸秆、玉米芯残渣、小麦秸秆、稻秆、烟草秆、葵花秆) 经过稀酸预处理后产生的 *p*-苯醌, 发现这 6 种原料中的 *p*-苯醌含量在进行 30% (w/w) 高固体含量发酵时最高可以达到 205 mg/L。

(2) 通过多种脱毒方式 (水洗过程、过碱化处理以及生物脱毒) 来进行 *p*-苯醌的脱毒。除了过碱化处理无法脱除 *p*-苯醌外, 水洗过程和生物脱毒都可以有效脱除 *p*-苯醌, 但水洗过程存在大量的废水产生以及大量可发酵性糖损失的缺点, 生物脱毒存在周期过长、木糖大量损失等缺点。

(3) 研究了 5 种发酵微生物 (*S. cerevisiae* XH7、*S. cerevisiae* DQ1、*P. acidilactici* TY112、*Z. mobilis* ZM4、*G. oxydans* DSM2003) 对于 *p*-苯醌以及氢醌的耐受能力, 结果显示 *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 菌株对于 *p*-苯醌具有良好的抗逆能力, 并且 5 种发酵微生物都对氢醌具有非常高的抗逆能力。

(4) 通过 5 种生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的转化实验, 发现 *p*-苯醌高抗逆的 *Z. mobilis* ZM4 和 *G. oxydans* DSM2003 菌株都具有将高毒性 *p*-苯醌转化为低毒性氢醌的能力, 而剩余的三株 *p*-苯醌敏感的菌株都无法转化高毒性的 *p*-苯醌。生物炼制菌株的 *p*-苯醌高抗逆机理是将高毒性的 *p*-苯醌转化为低毒性的氢醌。

(5) 基于 *Z. mobilis* 详细的基因组注释以及前期的抑制物转化研究, 借助于 qRT-PCR 技术, 从 *Z. mobilis* 中筛选到了 8 个强烈响应 *p*-苯醌胁迫的基因 (*ZMO1949*、*ZMO1696*、*ZMO1772*、*ZMO1576*、*ZMO1399*、*ZMO0833*、*ZMO1303* 以及 *ZMO1984*)。

(6) 构建了 8 株过表达上述基因的重组菌株, 并且将重组菌株在添加了 *p*-苯醌的 RM 培养基以及含有不同浓度 *p*-苯醌的水解液中进行了 *p*-苯醌抗逆测试, 最后还在真实的木质纤维素体系中进行高固体含量的 SSCF, 进一步验证了 *ZMO1399*、*ZMO1576*、*ZMO1696*、*ZMO1949* 以及 *ZMO1984* 对于提高 *p*-苯醌抗逆的功能。这些基因可以作为候选基因用于 *p*-苯醌抗逆性较差的菌株 (酿酒酵母、乳酸片球菌等) 的改造从而提高对于 *p*-苯醌的抗逆性。

第 4 章 酿酒酵母适应性进化突变株耐高温性能提升的分子机理解析

4.1 引言

通过偶联酶解与乙醇发酵过程, SSCF 是进行纤维素乙醇生产的一个有吸引力的选择^[236-238]。然而, 乙醇生产菌株发酵的温度通常为 28~30 °C, 而纤维素酶解的最适温度为 45~50 °C^[239]; 进行 SSCF 需要在温和的温度下进行来保证菌株的正常生长, 这会严重影响糖化效率以及最终的乙醇产量。另外, 大规模的乙醇发酵发酵罐容量高达 1000 m³, 传质传热不充分导致的局部区域过热会对生物炼制菌株的生长造成很大的影响。因此, 提高乙醇生产菌株的耐高温性能对于纤维素乙醇发酵至关重要。

菌株的耐高温特性是一种复杂的表型, 涉及到多种代谢反应, 理性改造的应用经常由于耐高温的复杂性而受到阻碍^[160, 174, 175]。适应性进化是一种简单且被广泛使用的策略, 通过人工设计的筛选压力, 已经被成功应用于提高发酵菌株的抑制物抗逆性^[185]、低 pH 值抗逆性^[192]、高盐抗逆性^[176]以及耐高温性能^[166]。通过适应性进化, 谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* GLY3 经过 65 天的适应性进化可以获得对高温和异丁醇的交叉耐受性, 显著提高了氨基酸的生产^[189]。酿酒酵母 *S. cerevisiae* Ethanol Red 经过长期的适应性进化可以对 39 °C 高温具有良好的抗逆性, 显著提升了高温胁迫下的乙醇发酵性能^[97]。然而, 在严苛的高温胁迫下进行适应性进化并不能有效提高菌株的高温抗逆性。

在这项研究中, 通过在适中的热胁迫 (35 °C) 下进行长达 91 天的适应性进化培养, 获得了一株耐高温性能显著提升的进化菌株 *S. cerevisiae* Z100。在 50 °C 高温下, 相比于出发菌株 *S. cerevisiae* XH7, 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 的细胞活力显著提升了; *S. cerevisiae* Z100 提升的耐高温性能促进了随后的乙醇发酵, 而出发菌株的乙醇发酵过程伴随着严重的乳酸菌污染。RNA-seq 分析发现适应性进化导致了进化菌株独特的基因转录情况。考虑到进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 提高的发酵性能, 比较分析了碳代谢通路上的基因在两株菌株中的转录情况, 结果发现, 进化菌株的碳代谢通路上的关键基因 (限速酶以及葡萄糖磷酸化酶编码基因) 在 30 °C 条件下被显著增强了, 进化菌株碳代谢的强化有助于进化菌株的耐高温性能以及发酵性能的提升。进一步的基因组重测序分析发现进化菌株中的突变要远少于出发菌株。本研究工作不仅为大规模乙醇发酵提供了一株耐高温性能优异的菌株, 而且为理性改造提高生物炼制菌株高温抗逆性提供了可供参考的候选基因。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株、培养基与培养条件

S. cerevisiae XH7 是一株经过木糖利用改造的菌株, 也是适应性进化培养的出发菌株, 培养方法见 3.2.1。

用于生物脱毒的 *A. resinae* ZN1 使用的培养基配方及培养条件见 2.2.1。

4.2.2 酶与试剂

本节使用的酶及试剂见 2.2.3。

4.2.3 木质纤维素原料及后续的生物炼制过程

本章使用的木质纤维素原料为小麦秸秆，购自河南南阳，于 2018 年春季收割。小麦秸秆中的纤维素和半纤维素含量分别为 36.2% (w/w) 和 17.0% (w/w)。小麦秸秆的前处理以及预处理过程见 2.2.2。

4.2.4 适应性进化、耐高温性能评估以及随后的乙醇发酵

生物脱毒后的小麦秸秆首先在 25% (w/w) 固体含量，总液体为 50 mL，在 150 rpm，50 °C 条件下糖化 12 h，酶的添加量为 5 mg 蛋白/g 纤维素；糖化后的醪液（不移除固体残渣）加入营养盐（10 g/L 酵母提取物、2 g/L 硫酸铵、1 g/L 硫酸镁以及 2 g/L 磷酸二氢钾）作为菌株适应性进化的培养基。*S. cerevisiae* XH7 的适应性进化是在 250 mL 三角瓶中进行的，转接量为 10% (v/v)，每 24 h 转接一次，35 °C，150 rpm，连续转接 91 次后获得了一株稳定的进化菌株 *S. cerevisiae* Z100。

酿酒酵母的高温耐受是在 50 °C，120 rpm 条件下进行的，在高温下维持 12-48 h。种子液的培养方式是按照之前的方法进行的^[46]，在 YDP 培养基中过夜活化后的种子液接入到含有 5% (w/w) 脱毒后小麦秸秆及酶液的 250 mL 摇瓶中培养 12 h，随后在含有 10% (w/w) 脱毒后小麦秸秆及酶液的 1 L 摇瓶中培养 24 h，酶用量保持为 10 mg 纤维素粗蛋白/g 纤维素。培养好的种子液以 20% (v/v) 接种量接种到预糖化后的小麦秸秆中，维持 50 °C 高温 12-48 h。

乙醇发酵是在 50 °C 高温胁迫后进行的，降温至 30 °C 进行细胞生长以及乙醇发酵，发酵期间用 4 M NaOH 控制发酵 pH 值为 5.5。

4.2.5 发酵产物测定、细胞活力检测以及葡萄糖消耗延滞期

葡萄糖、木糖、乳酸、乙酸、甘油、糠醛以及 HMF 的测定参见 2.2.9。

细胞活力的检测是通过测定发酵醪中的菌落形成单位 (Colony-Forming Units, CFU)。SSCF 中有固体物料的存在，难以进行 OD₆₀₀ 的测定。从发酵罐中取出发酵醪，通过稀释到一定浓度后 (10^{-5} ~ 10^{-6}) 取 100 μ L 均匀涂布到固体平板中，30 °C 培养两天后计数。

4.2.6 转录组分析

过夜培养的 *S. cerevisiae* XH7 和 *S. cerevisiae* Z100 种子液以 10% (v/v) 接种量接入到添加了 40 g/L 葡萄糖的 YPD 培养基中 30 °C 培养 4 h 至 OD₆₀₀ 为 2.0，然后将培养 4 h 的菌液分别放在冰水混合物以及 50 °C 热休克处理 1 h，经过处理后的细胞在 4 °C 条件下 12,000 \times g 离心 10 min，所有样品都储存在 -80 °C。

细胞样品中的 RNA 是采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 进行提取的，RNA 的纯化是通过 NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEBNext, New England) 来处理的，RNA 质量以及浓度的检测是通过 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 测定，提取达标的 RNA 放置于 -80 °C 保存。

转录组分析 (RNA sequencing, RNA-seq) 由北京博奥晶典生物有限公司 (CapitalBio Technology Co., Beijing, China) 来完成。采用 NEBNext Ultra RNA Library Prep kit (NEBNext, New England) 试剂盒来制备 cDNA 文库, 文库数据由 Illumina NovaSeq 6000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) 来进行数据处理。成对的序列会对应到 *S. cerevisiae* S288c (NCBI accession no. GCA_000146045.2) 参考基因组中。本研究首先将不同条件下的表达数值进行 \log_2 对数转化, 转化后数值绝对值大于或等于 2 的视为差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs), 以及错误发现率 (False discovery rate, FDR) 小于 0.001 才能视为显著差异表达基因。基因本体论 (Gene ontology, GO) 分析以及 KEGG 通路分析则分别通过 DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) 和 IPA (Ingenuity pathway analysis) 分析来进行。

4.2.7 基因组重测序以及 SNPs 分析

为了确定 *S. cerevisiae* XH7 和 *S. cerevisiae* Z100 在基因水平上是否发生了改变, 进行了基因组重测序分析。基因组重测序是由南京派森诺生物技术有限公司 (Personal Biotechnology Co., Nanjing, China) 完成的, DNA 文库是采用 Vazyme ND606 试剂盒插入 400 bp 序列来构建的, 通过 Illumina NovaSeq 6000 平台分析测序形成双末端序列数据。SNPs GATK 软件用于预测 SNP 发生的位点, 质量评估大于 2 的才能被视为有效的 SNPs。SNPs 分析需要先除去不合格的突变, 然后将读取的数据对应到 *S. cerevisiae* S288c 参考基因组 (NCBI GeneBank accession number GCA_002057635.1) 上。在排除发生在两株菌株中相同的突变后, 分析并比对了在两株菌株中突变的差异。同时, 为了阐明非同义突变对于蛋白质结构的影响, 我们通过在线软件 Phyre2 来预测^[262]。 α -螺旋与 β -折叠的破坏或者引入都会引起蛋白质二级结构以及三级结构的改变, 进而改变蛋白质的构象和功能^[263]。

4.3 结果与讨论

4.3.1 酿酒酵母 XH7 的长期适应性进化以及耐高温性能评估

之前的研究采用了高的温度 (42 °C~48 °C) 对酵母菌株进行了长期的适应性进化培养, 但并没有显著提高菌株的耐高温性能。因此 *S. cerevisiae* XH7 的长期适应性进化是在相对温和的温度 (35 °C) 条件下进行的, 比常规的培养温度高了 5 °C。连续转接是在装有 50 mL 小麦秸秆水解液的 250 mL 三角瓶中进行的, 每 24 h 转接一次。如图 4.1 所示, 经过 91 天大约 10^3 个细胞周期 (酿酒酵母在有氧条件下每 100 min 一个细胞周期^[262]) 的长期培养, 菌株的乙醇生产以及糖耗趋于稳定。最终获得的稳定菌株命名为 *S. cerevisiae* Z100。

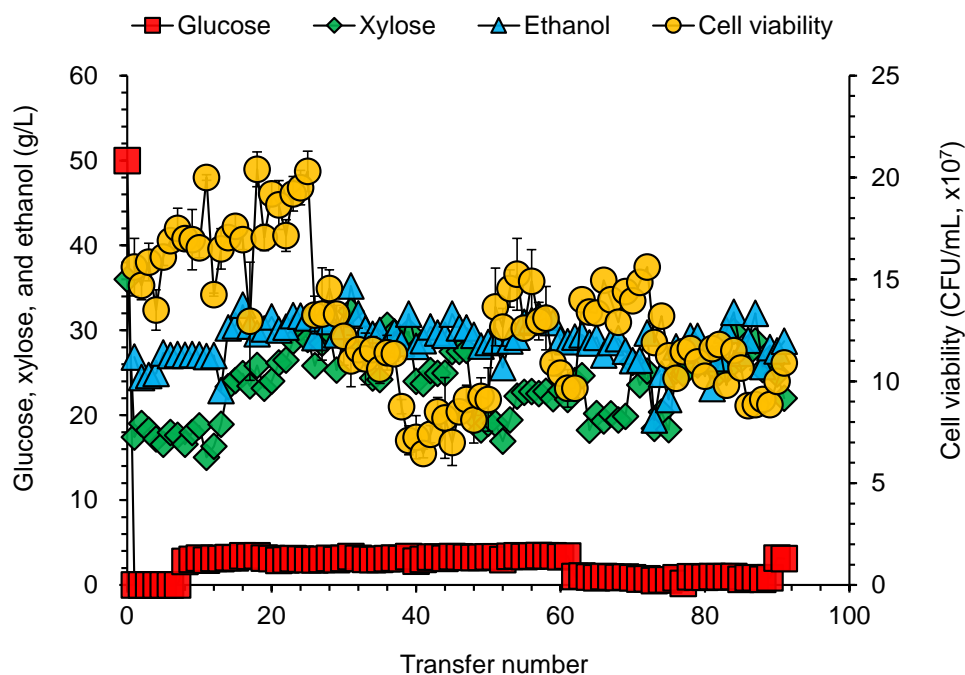


图 4.1 *S. cerevisiae* XH7 的适应性进化

Fig. 4.1 Adaptive evolution profiling for *S. cerevisiae* XH7

转接条件：脱毒后的麦秆在 25% (w/w) 固体含量下 50 °C 糖化 12 h 后，不经过固液分离，加入营养盐后直接用于 *S. cerevisiae* XH7 的连续转接培养；连续转接每 24 h 转接一次，35 °C，150 rpm，转接量为 10% (v/v)。

进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 的耐高温性能评估是通过在 50 °C 下维持 12 h、24 h 以及 48 h 来进行的 (图 4.2)。进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 50 °C 下维持 12 h 以及 24 h 后的细胞活力相比于出发菌株具有显著性的增强，而在 50 °C 下维持 48 h 后细胞活力与出发菌株基本一致 (图 4.2a)。由上述结果可以明显看出，经过长周期的适应性进化后，进化菌株的耐高温性能相比于出发菌株具有显著性的增强。进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 50 °C 下维持 12 h 以及 24 h 后的甘油生产也具有显著性的增强，分别比出发菌株高了 1.5 倍以及 3.1 倍，尽管在 50 °C 下维持 48 h 二者的甘油生产基本一样 (图 4.2b)。当两株菌株在 50 °C 下维持 48 h 后，其甘油生产基本相似，由此可以看出甘油含量与高温胁迫下的细胞活力密切相关，之前的研究也发现了甘油对于菌株在高温胁迫下的存活具有重要的意义^[264, 265]。

进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 的乙醇发酵性能是在经过 12-48 h 的高温胁迫后进行的 (图 4.3)。进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在经过 12 h、24 h 以及 48 h 高温胁迫后，其乙醇生产相比于出发菌株分别提高了 35%、130% 以及 64% (图 4.3a)。出发菌株在经过 24 h 以及 48 h 高温处理后出现了严重的乳酸菌污染，分别产生了 30 g/L 以及 18 g/L 的乳酸，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 的乙醇发酵过程中并没有乳酸的生产 (图 4.3b)。同时，进化菌株在乙醇生产过程中的细胞活力相比于出发菌株至少提升了 9 倍 (图 4.3c)。这些结果表明进化菌株提高的耐高温性能促进了高温胁迫后的乙醇发酵，降低了细菌污染的风险。

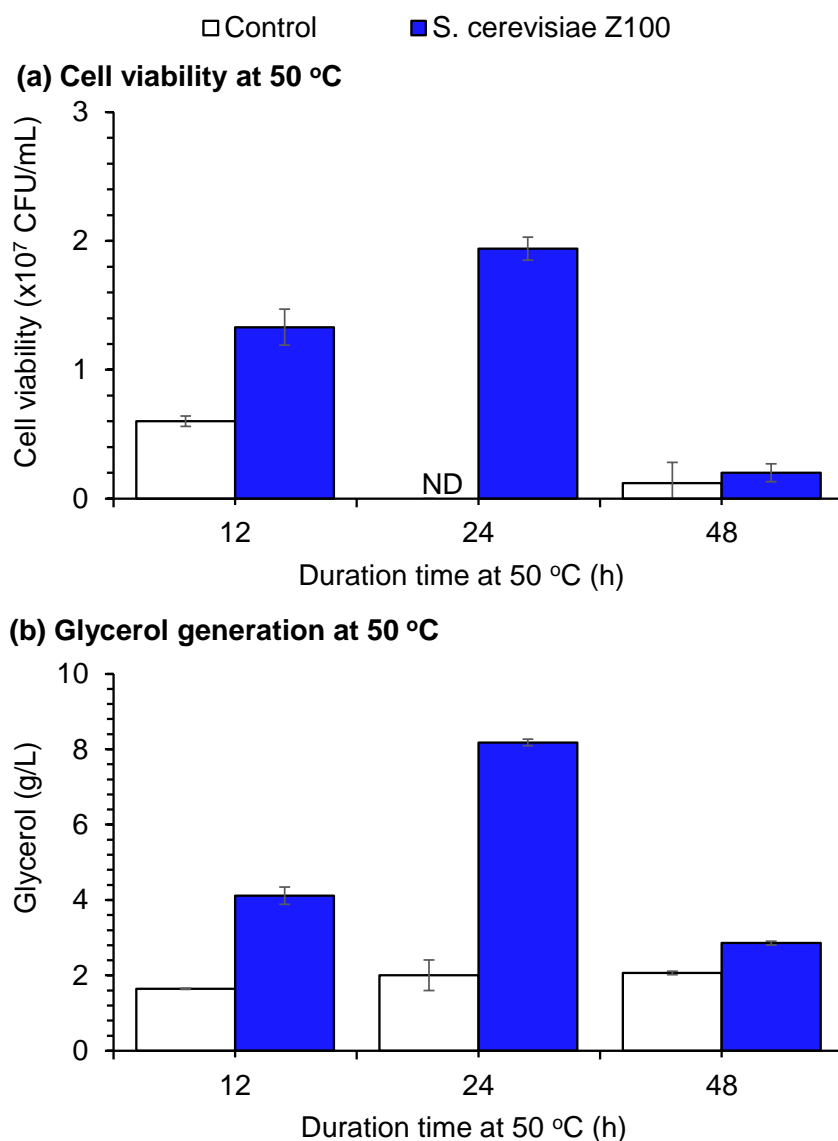


图 4.2 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 50 °C 高温不同维持时间下的细胞活力以及甘油生产
(a) 50 °C 高温条件下的细胞活力; (b) 50 °C 高温条件下的甘油生产

Fig. 4.2 Cell viability and glycerol generation of the adaptively evolved *S. cerevisiae* at 50 °C for different duration time.

(a) Cell viability at 50 °C; (b) Glycerol generation at 50 °C.

发酵条件: 出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 作为对照, ND (Not detected) 表示结果低于规定的最低检测量。

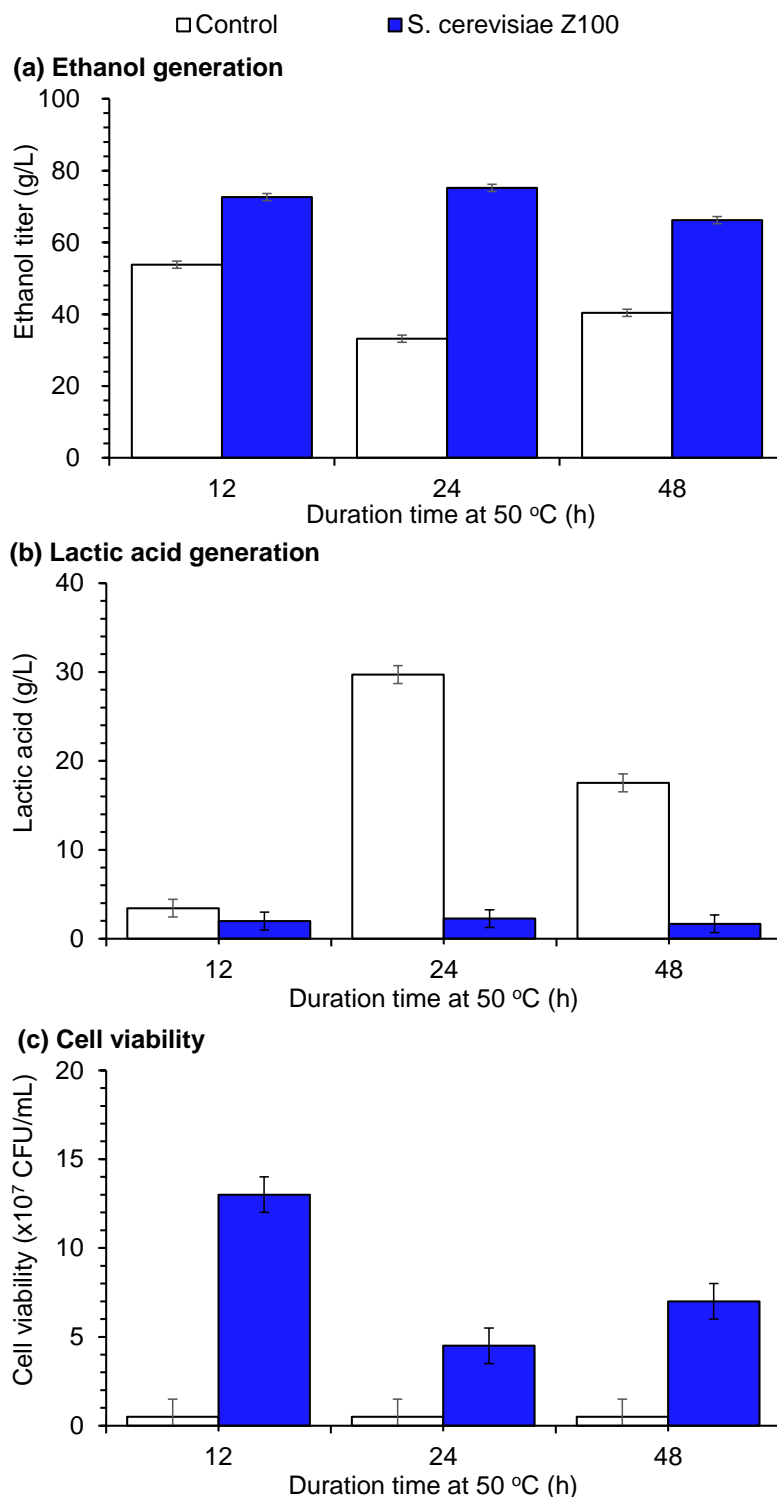


图 4.3 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 50 °C 下维持不同时间后的乙醇发酵性能

(a) 乙醇生产; (b) 乳酸生产; (c) 细胞活力

Fig. 4.3 Ethanol fermentability of the adaptively evolved *S. cerevisiae* Z100 after maintaining at 50 °C for different duration time.

(a) Ethanol generation; (b) Lactic acid generation; (c) Cell viability.

以出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 作为对照, 乙醇发酵是在 30 °C 条件下进行的, 以 30% (w/w) 固含量的麦秆作为原料。乳酸来源于乳酸菌污染。乙醇生产以及乳酸生产测定于发酵终点, 乙醇发酵 24 h 后取样测定细胞活力。

4.3.2 进化菌株和出发菌株的转录全景图

然而目前关于适应性进化提高耐高温性能以及促进发酵背后的分子机理不太清楚，希望借助于 RNA-seq 来探究进化菌株耐高温性能以及发酵性能提升背后的分子机理。

图 4.4（火山图以及韦恩图）是进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 与出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 在 30 °C 以及 50 °C 条件下的比较转录组分析情况。如图 4.5 所示，当进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 的培养温度从 30 °C 升高到 50 °C 后，高温胁迫下进化菌株中共有 1464 个 DEGs（其中有 674 个基因上调表达，790 个基因下调表达），而对于 *S. cerevisiae* XH7，高温胁迫下共有 1426 个 DEGs（其中有 687 个基因上调表达，739 个基因下调表达）。两株菌株在高温胁迫下下调的基因占主导，这表明高温胁迫下大多数基因的表达是被抑制的，Techaparin 等 2017 年 *S. cerevisiae* Y01 在 40 °C 热休克条件下的转录分析结果与我的结果一致^[240]。当以 *S. cerevisiae* XH7 为对照时，在 30 °C 条件下，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中共有 120 个 DEGs（79 个基因上调表达，41 个基因下调表达），而在 50 °C 条件下，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中共有 47 个 DEGs（19 个基因上调表达，28 个基因下调表达）。*S. cerevisiae* Z100 与 *S. cerevisiae* XH7 的转录差异主要集中于 30 °C 条件下，而且 120 个 DEGs 中几乎 2/3 的基因是上调表达的，这表明进化菌株中很多基因在 30 °C 发生了上调表达，这些基因的上调很可能是进化菌株耐高温性能提升在转录水平上的体现。

GO (Gene ontology) 分析表明生物学过程和细胞过程是这 4 种情况下富集度最高的(图 4.5)。这两株菌株在高温胁迫下的 DEGs 是基本类似的；而以出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 作为对照，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 50 °C 条件下的 DEGs 要远少于在 30 °C 条件下。

KEGG 通路分析发现，核糖体是两株菌株在高温胁迫条件下富集度最高的通路，另外次级代谢产物的合成以及抗生素的合成通路富集度也比较高(图 4.6)。以出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 作为对照，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 30 °C 条件下的 DEGs 主要富集在次级代谢产物合成以及抗生素的合成通路，而在 50 °C 条件下的 DEGs 主要富集于减数分裂以及抗生素合成通路上。

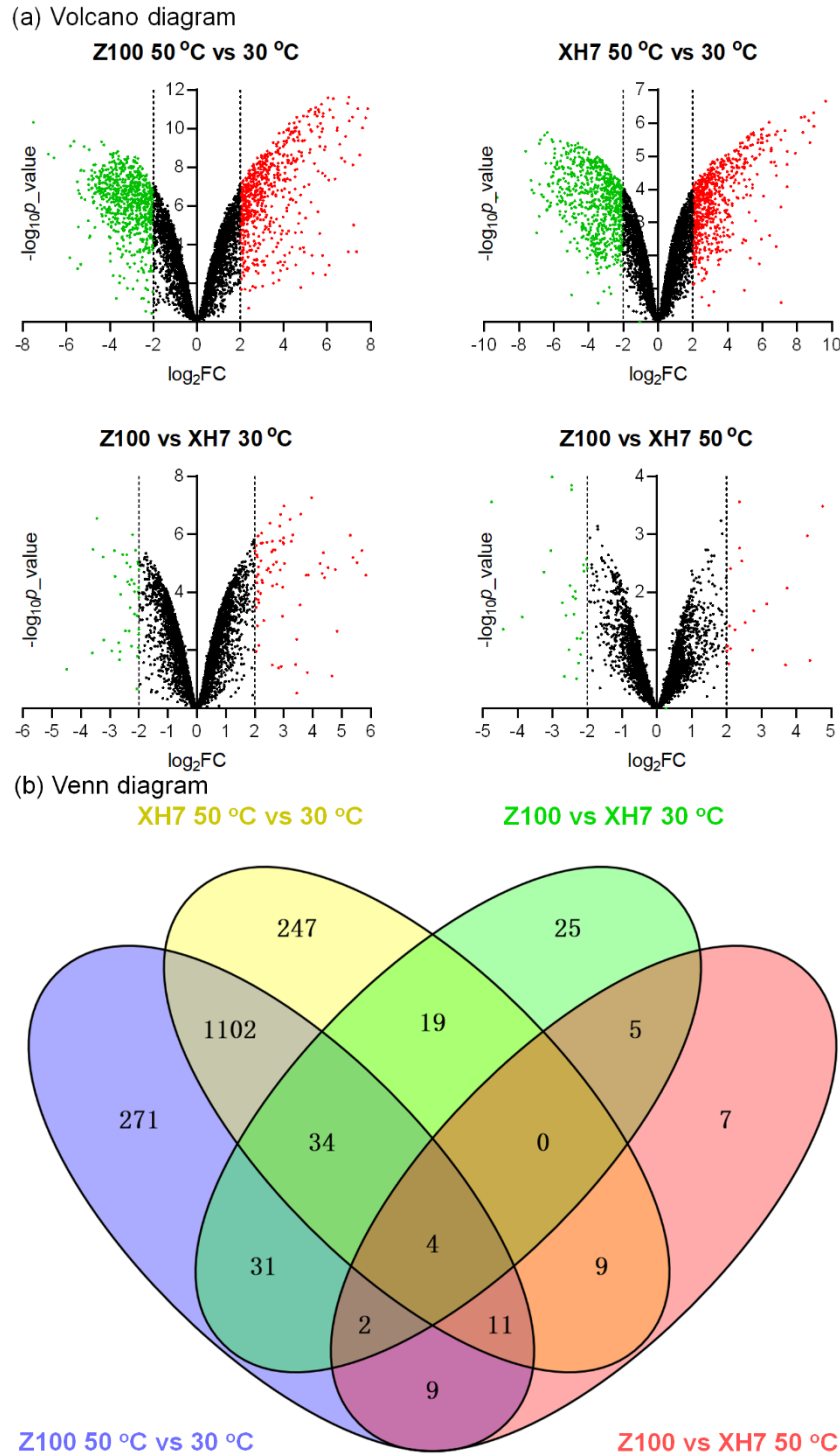


图 4.4 两株酵母菌株差异表达基因 (DEGs) 的统计分析

(a) 火山图; (b) 维恩图

Fig. 4.4 Statistics of the differentially expressed genes (DEGs) for two *S. cerevisiae* strains

(a) Volcano diagram; (b) Venn diagram.

火山图中的每一个点代表一个基因，其中红色、绿色和黑色分别代表上调表达、下调表达和无差异表达，以差异表达倍数 FC (Foldchange) \log_2 的对数作为横坐标，以 P_value 的 \log_{10} 的负对数作为纵坐标。

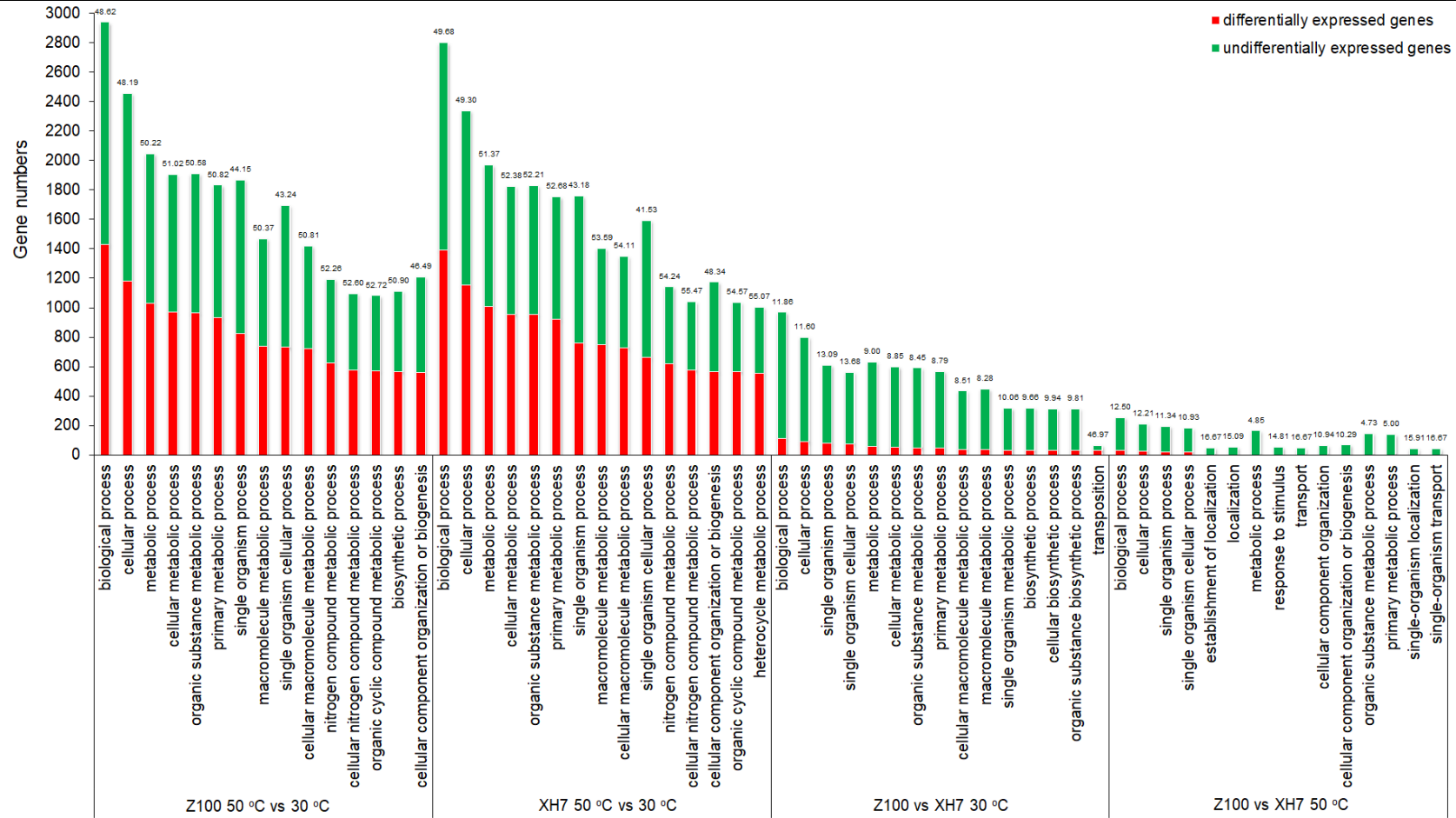


图 4.5 两株酵母菌株的基因本体论 (GO) 分析

Fig. 4.5 Gene Ontology analysis for two *S. cerevisiae* strains

红色和绿色分别代表差异表达基因 (DEGs) 和非差异表达基因, 每个条形柱上的数字表示该过程中的 DEGs 占该过程总基因的比例。横轴表示富集到的生物过程中的 GO 条目, 而纵轴表示每个 GO 条目对应的基因数量。

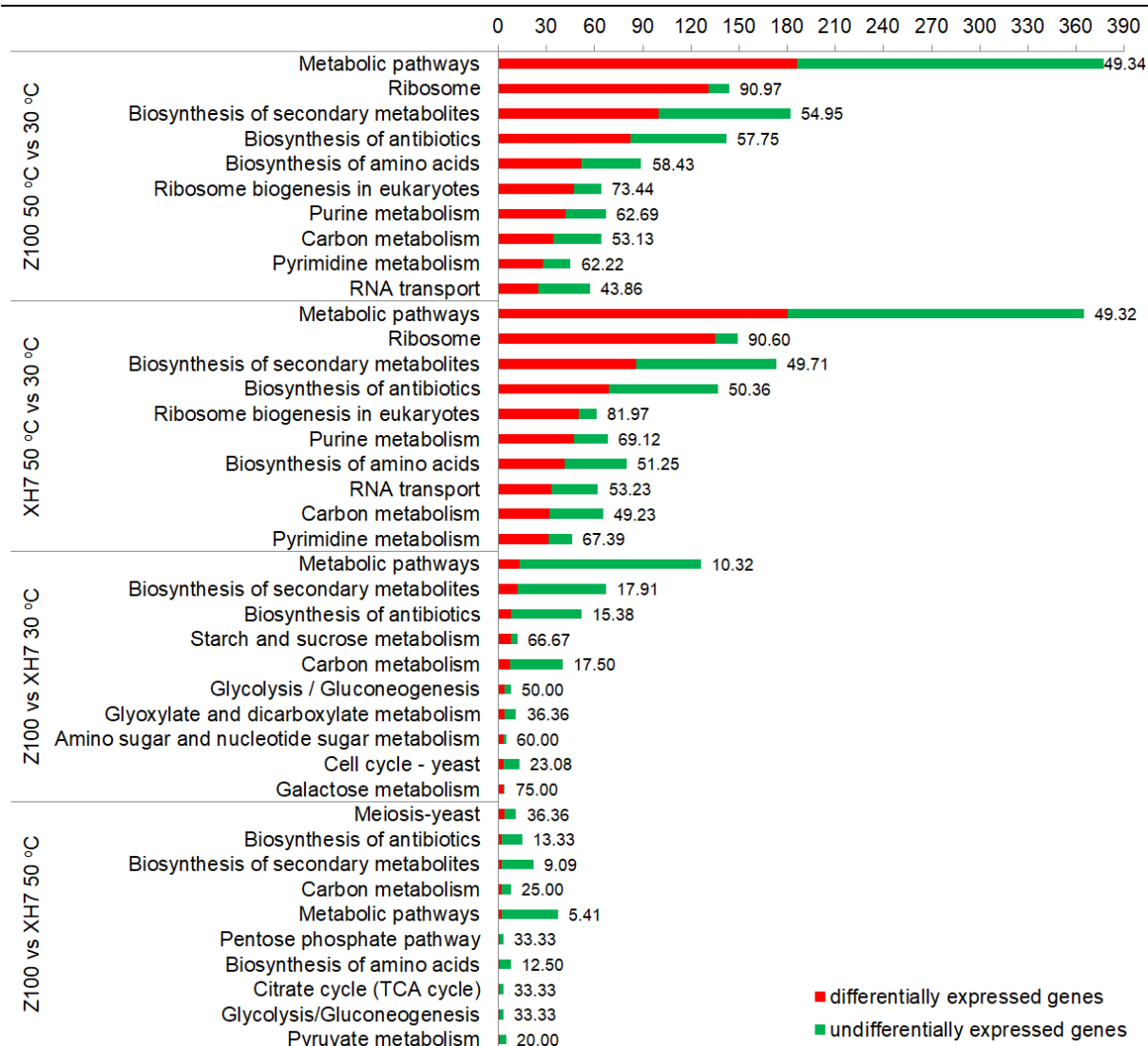


图 4.6 两株酵母菌株的 KEGG 通路分析

Fig. 4.6 KEGG pathway analysis for two *S. cerevisiae* strains

红色和绿色分别代表差异表达基因 (DEGs) 和非差异表达基因, 每个条形柱上的数字表示该过程中的 DEGs 占该过程总基因的比例。纵轴表示富集到的 KEGG 通路, 而横轴表示每个通路对应的基因数量。

4.3.3 高温胁迫和适应性进化影响了核糖体通路中基因的转录响应

核糖体通路作为两株酵母菌株在高温胁迫下的 DEGs 富集度最高的通路, 积极响应了高温胁迫 (图 4.7), 这一结果与 Feng 等 2019 年在嗜酸耐热菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922T 在高温胁迫下的通路富集结果一致^[241]。在 164 个 DEGs 中, 除了几个差异表达上调的基因 (RPL9B 和 RPP1B) 外, 大部分的基因例如 RPL3 (核糖体 60S 亚基的核心部件) 在高温胁迫下都显著下调了, 这表明核糖体通路是在整体上被抑制的, Liu 和 Qian 等^[242]以及 Techaparin 等^[240]在真核生物中的蛋白质组以及转录组结果支持了这一发现。21S_RRNA 和 RPL39 在 *S. cerevisiae* Z100 高温胁迫下的转录水平比在 *S. cerevisiae* XH7 的高, 这表明适应性进化影响了核糖体通路中基因的转录。同时,

以 *S. cerevisiae* XH7 作为对照，这两个基因在 *S. cerevisiae* Z100 的 30 °C 条件下显著下调了，而在 50 °C 下没有变化，这表明高温影响了核糖体通路中基因的转录。目前在不同的细胞中都有发现这一现象，但并没有较为详细的机制解析。

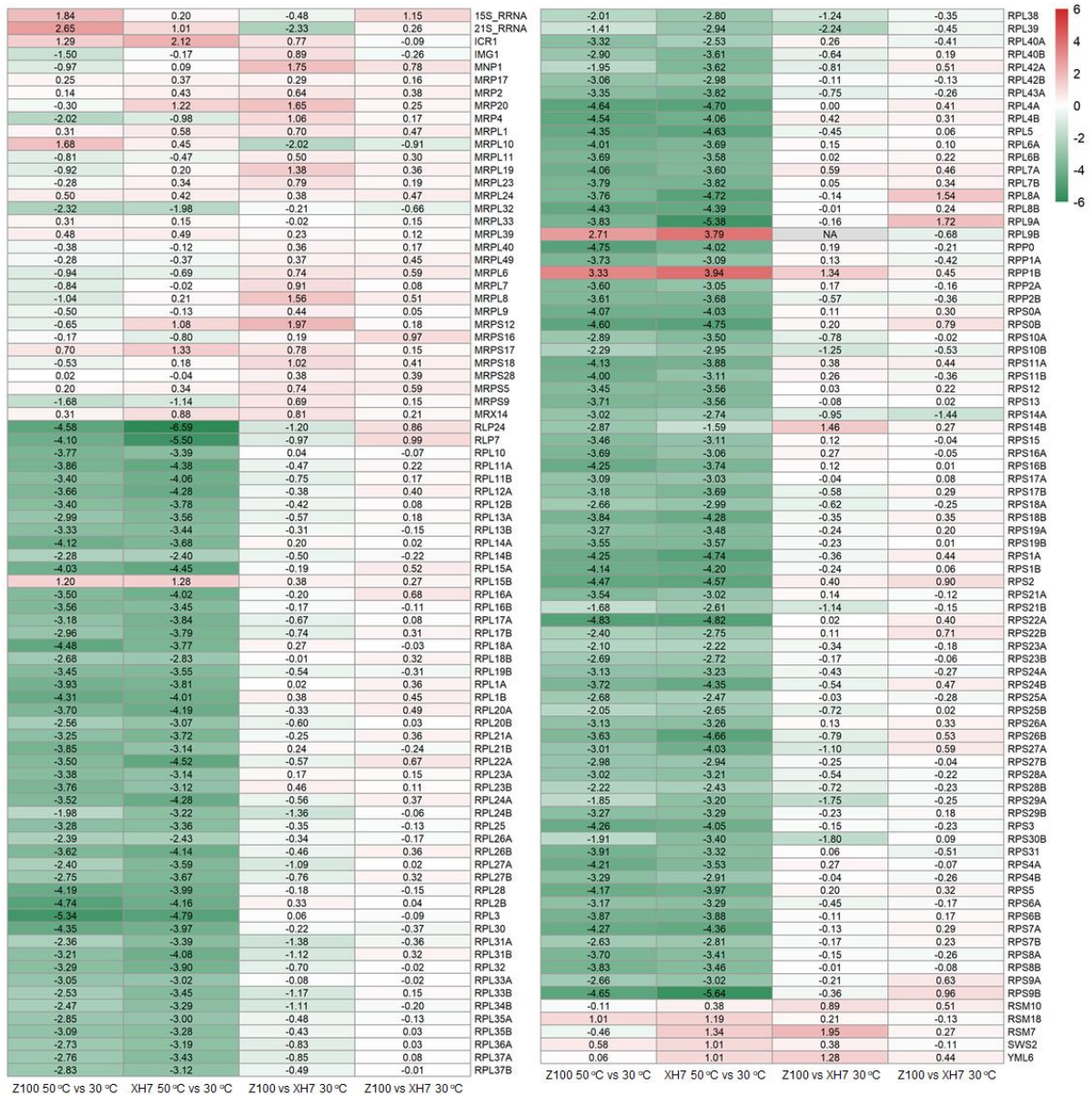


图 4.7 两株酵母菌株核糖体通路上的基因转录情况

Fig. 4.7 Gene expression profiling of ribosome pathway for two *S. cerevisiae* strains

矩形区域的数字表示在酵母菌株中的基因表达倍数变化。

4.3.4 碳代谢通路基因表达的增强有助于进化菌株耐高温性能以及发酵性能的提升

为了挖掘进化菌株高温胁迫下乙醇发酵性能提升背后的分子机理，进一步分析比较了两株酵母菌株碳代谢通路上的基因的转录情况（图 4.8）。首先，比较分析了中心碳代谢通路中的 5 个关键酶（限速酶以及葡萄糖磷酸化酶）编码基因的转录情况以及甘油代谢路径中的相关基因，包括糖酵解途径（Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP）中的

GLK1 (编码葡萄糖激酶)、HXK1 (编码己糖激酶) 以及 PYK2 (编码丙酮酸激酶), 三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA) 中的 CIT1 (编码柠檬酸合酶), 戊糖磷酸途径 (Pentose phosphate pathway, PPP) 中的 ZWF1 (编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶), 甘油代谢路径中的相关基因。在高温胁迫下, 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中上述关键酶编码基因的转录水平低于出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 中的转录水平; 然而, 以出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 为对照, 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中上述这 5 个基因在 50 °C 条件下没有变化, 而在 30 °C 条件下上调表达了。从这些结果可以看出, 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中这 5 个基因的表达水平在 30 °C 条件下得到了强化, 进而导致 *S. cerevisiae* Z100 中这些基因对于高温胁迫的响应要弱于 *S. cerevisiae* XH7, 由此可以看出 *S. cerevisiae* Z100 比 *S. cerevisiae* XH7 更加适应高温胁迫。有趣的是, 这一相同的现象也出现在海藻糖以及糖原合成通路 (碳代谢的另一重要分支) 相关基因的转录响应上。海藻糖以及糖原合成通路上的基因包括 PGM2 (磷酸葡萄糖变位酶)、GSY1 (糖原合酶)、GLC3 (1,4- α -葡聚糖分支酶)、GPH1 (糖原磷酸酶)、TSL1 (海藻糖-6-磷酸合酶) 以及 TPS1 (α , α -海藻糖-磷酸合酶) 的基因转录响应都有着类似的转录情况, *S. cerevisiae* Z100 中这些基因的表达也在 30 °C 条件下增强了。另外, 碳代谢通路中 ACH1 (乙酰-CoA 水解酶) 以及 ALD4 (醛脱氢酶) 在两株菌株中的转录情况也出现了相同的现象。尽管在 50 °C 下进化菌株中甘油的合成显著增强了, 但是转录组分析发现甘油代谢通路上的基因并没有发生显著性的差异表达, 推测可能是甘油代谢路径中的基因在基因层面发生了变化, 从而导致了甘油代谢的差异。总之, 碳代谢通路上的基因的转录响应了高温胁迫, 进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 在 30 °C 时碳代谢的强化很可能是进化菌株耐高温性能提升的潜在机理。

EMP 途径对于能量产生、碳源利用以及细胞生长具有重要作用^[242, 244]。进化菌株 EMP 途径中 GLK1、HXK1 以及 PYK2 在 30 °C 条件下的上调表达可以强化进化菌株的 EMP 途径。EMP 途径的强化不仅可以加强进化菌株中 ATP 的合成, 从而提高其耐高温性能, 而且还能够促进碳源快速流向乙醇发酵, 进而提高菌株的乙醇发酵性能。另外, 有研究发现, EMP 途径与细胞生长密切相关^[243-245], 进化菌株中 EMP 途径的增强很可能是其发酵过程中细胞活力提升的潜在机理。

进化菌株中 TCA 途径限速酶 CIT1 的基因转录在 30 °C 条件下发生了上调表达。CIT1 作为柠檬酸合酶同型二聚体中的一个保守大亚基, 在改造的酵母中会响应高温胁迫而发生上调表达, 在酵母抵抗高温胁迫的过程起到了重要作用^[246]。适应性进化后 CIT1 的表达增强有助于进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 应对高温胁迫。

PPP 途径在真核生物以及细菌中与 NADPH 还原力的再生密切相关, 被认为是供应 NADPH 的主要来源^[247]。进化菌株 PPP 途径中限速酶 ZWF1 的基因表达也在 30 °C 条件下被强化了, PPP 途径的强化能够加快胞内 NADPH 的供应。细胞中的铁氧化还原蛋白^[248]、硫氧化还原蛋白^[249]以及谷胱甘肽^[250]可以消耗胞内 NADPH 用于清除高温胁迫下产生的 ROS, 而充足的 NADPH 供应可以增加这些氧化还原蛋白以及谷胱甘肽的循环再生, 增强进化菌株抵抗高温胁迫的能力。推测 *S. cerevisiae* Z100 中 PPP 途径的强化对于

其耐高温性能的提升具有重要作用。

本次研究中,两株酵母菌株中海藻糖以及糖原合成相关的基因几乎都在高温胁迫下发生了显著的上调表达,这表明海藻糖以及糖原合成途径中的基因积极响应了高温胁迫。海藻糖作为蛋白质的稳定剂以及非特异蛋白絮凝的阻遏剂,对于菌株抵抗高温胁迫具有重要作用^[105, 115]。适应性进化增强了进化菌株中海藻糖合成关键基因 TSL1 和 TPS1 的转录响应,强化的海藻糖合成有利于进化菌株中海藻糖的积累,有助于进化菌株应对高温胁迫。An 等^[170]和 Ge 等^[251]在酵母中过表达 TSL1 和 TPS1 增强了海藻糖积累以及耐高温性能,这一结果支持了我的结论。而糖原作为主要的储备多糖,可以通过快速转化为海藻糖从而响应高温胁迫^[121]。有趣的是,糖原合成中 PGM2、GSY1、GLC3 以及 GPH1 的基因表达也在进化菌株中 30 °C 条件下得到了强化。进化菌株中糖原合成的增强不仅可以提高糖原的积累,而且还能够在高温胁迫下快速转化为海藻糖,有助于抵抗高温胁迫。这些结果表明,进化菌株中海藻糖以及糖原合成的强化很可能是其高温抗逆性以及乙醇发酵性能提升的关键分子机理。

4.3.5 出发菌株和进化菌株的基因组重测序对比

进一步进行了基因组重测序来确定高温胁迫是否造成了两株酵母菌株在基因水平上的改变(图 4.9)。与 *S. cerevisiae* S288c 参考基因组相比,进化菌株中有 1266 个 SNPs 以及 157 个插入缺失突变,出发菌株中有 4673 个 SNPs 以及 399 个插入缺失突变(图 4.9a)。对于发生于外显子区域的 SNPs,进化菌株中分别发生了 251 和 164 个同义和非同义突变,而出发菌株中分别发生了 1828 和 777 个同义和非同义突变。很明显,进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中的 SNPs 要远少于出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 中的,而这些差异来源于适应性进化后提升的耐高温性能。同时,发现两株菌株中单碱基突变差异巨大(图 4.9b),出发菌株的单碱基突变由大到小依序为: A>G (880) (表示从 A 碱基突变为 G 碱基的次数为 880 次)、G>A (847)、T>C (846) 以及 C>T (841),而进化菌株的单碱基突变由大到小依序为: C>T (220)、A>G (217)、T>C (206) 以及 G>A (197)(图 4.9b)。总之,进化菌株中的突变远少于出发菌株,这很可能是进化菌株耐高温性能提升在基因层面的体现。

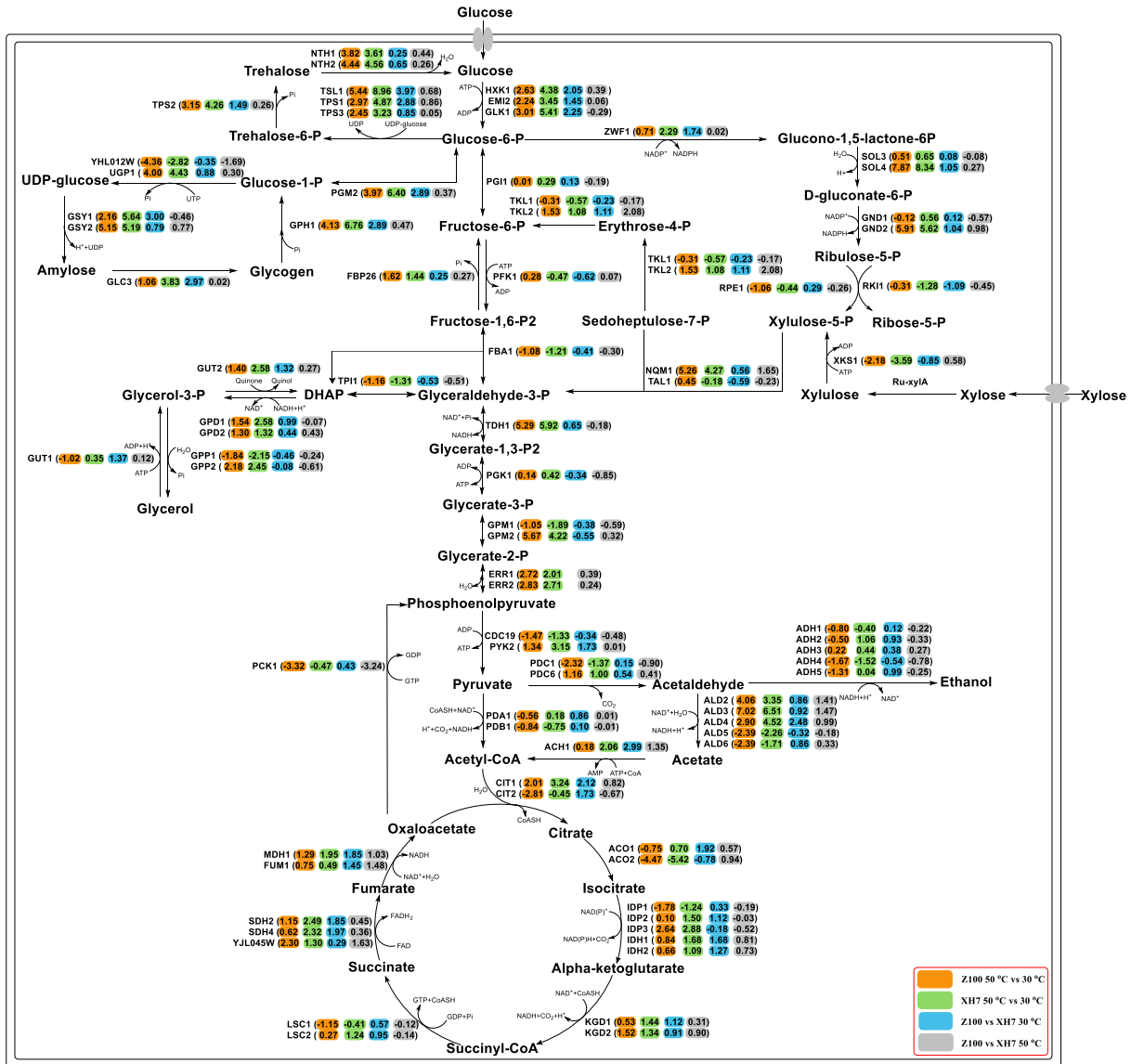
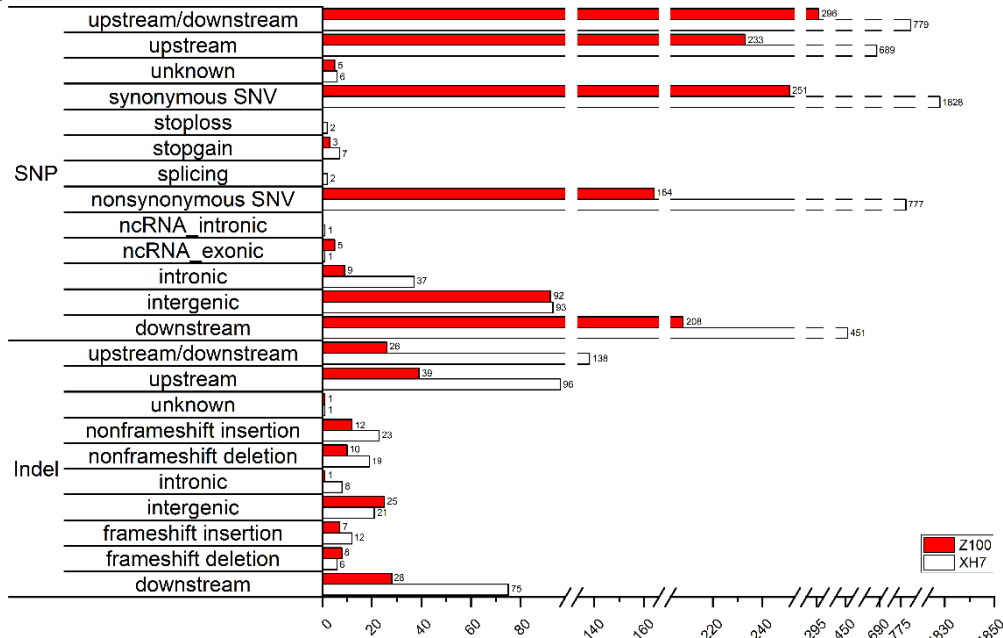


图 4.8 两株酵母菌株碳代谢通路上基因的转录情况

Fig. 4.8 Transcriptional landscapes of carbohydrate metabolism for two *S. cerevisiae* strains
 色块中的数字表示在两株酵母菌株中基因表达的倍数变化，其中的正值和负值分别表示上调和下调的情况（变化倍数的绝对值大于或等于 2）。基因的缩写如下所示：乌头酸水合酶（ACO1-2）、乙酰-CoA 水合酶（ACH1）、醇脱氢酶（ADH1-5）、醛脱氢酶（ALD2-6）、丙酮酸激酶（CDC19、PYK2）、柠檬酸合酶（CIT1-2）、己糖激酶（HXK1、EMI2、GLK1）、烯醇化酶（ERR1-2）、磷酸果糖醛缩酶（FBA1）、果糖-1,6-二磷酸酶（FBP26）、延胡索酸水合酶（FUM1）、糖原分支酶（GLC3）、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（GND1-2）、糖原磷酸化酶（GPH1）、磷酸甘油变位酶（GPM1-2）、糖原合酶（GSY1-2）、甘油-3-磷酸脱氢酶（GPD1-2、GUT2）、甘油-1-磷酸酶（GPP1-2）、甘油激酶（GUT1）、异柠檬酸脱氢酶（IDH1-2、IDP1-3）、 α -酮戊二酸脱氢酶（KGD1-2）、琥珀酰-CoA 合成酶（LSC1-2）、苹果酸脱氢酶（MDH1）、 α 、 α -海藻糖酶（NTH1-2）、转醛酮酶（NQM1）、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PCK1）、丙酮酸脱氢酶（PDA1、PDB1、PDC1、PDC6）、6-磷酸果糖激酶（PFK1）、葡萄糖-6-磷酸异构酶（PGI1）、磷酸甘油酸激酶（PGK1）、葡萄糖磷酸变位酶（PGM2）、磷酸核酮糖差向异构酶（RPE）、核糖-5-磷酸异构酶（RKI1）、木糖异构酶（Ru-xylA）、琥珀酸脱氢酶（SDH2、SDH6、YJL045W）、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶（SOL3-4）、转醛醇酶（TAL1）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（TDH1）、转酮醇酶（TKL1-2）、磷酸丙糖异构酶（TPI1）、 α 、 α -

海藻糖磷酸合酶 (TPS1、TPS3)、海藻糖磷酸酶 (TPS2)、6-磷酸海藻糖合酶 (TSL1)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (UGP1、YHL012W)、木酮糖激酶 (XKS1)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (ZWF1)。

(a) Whole landscapes of mutations



(b) Single nucleotide variation (SNV) class

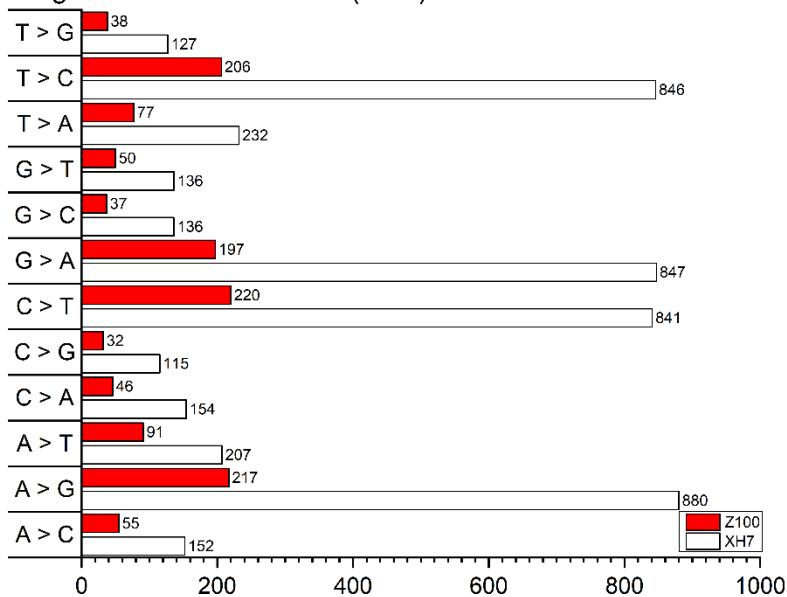


图 4.9 两株酵母菌株基因突变可视化

(a) 突变全景图; (b) 单核苷酸突变

Fig. 4.9 Visualization profile of genetic changes for two *S. cerevisiae* strains
(a) Whole landscapes of mutations; (b) Single nucleotide variation (SNV) class.

4.4 本章小结

本章节, 通过长周期的适应性进化培养, 获得了一株耐高温性能以及乙醇发酵性能显著提高的酵母菌株, 并且经过 RNA-seq 以及基因组重测序分析挖掘到了进化菌株耐

高温性能以及发酵性能提升背后的分子机理。本章节主要研究结论如下：

(1) 在 50 °C 高温下维持 12 h 以及 24 h，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 的细胞活力相比于出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 都有显著性的提升；进化菌株耐高温性能的提升不仅促进了其纤维素乙醇发酵，而且降低了染菌的风险。

(2) 在高温胁迫下，进化菌株中有 674 个基因发生上调表达，790 个基因发生下调表达；出发菌株中有 687 个基因发生上调表达，739 个基因发生下调表达。高温胁迫下，两株菌株中的基因大部分是发生了下调表达。

(3) GO 分析表明生物学过程和细胞过程是这 4 种情况下富集度最高的，KEGG 分析发现高温胁迫下核糖体通路是两株菌株中富集度最高的通路，并且核糖体通路上的大部分基因是下调表达的。

(4) 以出发菌株作为对照，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 碳代谢通路中的很多关键酶编码基因在 30 °C 条件下发生了显著的上调表达，这些关键酶包括中心碳代谢通路中的葡萄糖磷酸化激酶 (HXK1、GLK1)、限速酶 (PYK2、ZWF1、CIT1) 以及海藻糖和糖原合成通路中的关键酶 (TSL1、TPS1) 等。进化菌株碳代谢通路的增强不仅能够促进乙醇发酵性能，而且能够有助于进化菌株抵抗高温胁迫。

(5) 在基因层面上，进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中的突变要远远少于出发菌株 *S. cerevisiae* XH7 中突变，这很可能是进化菌株耐高温性能提升在基因层面的体现。

第 5 章 适应性进化以及理性改造策略提高乳酸片球菌 ZY271 的低 pH 值抗逆性

5.1 引言

随着近几年环保意识的不断增强,对于乳酸来源生物可降解塑料聚乳酸的需求量也在不断增加^[252,253]。据估计,2020 年乳酸的全球需求量就已经高达 196 万吨,然而全球的产量仅为 60 万吨,远远不足以满足乳酸的需求量^[252-255]。目前 90%的工业化乳酸都是靠微生物发酵获得的,其中大部分是利用乳酸菌(lactic acid bacterium, LAB)来进行发酵的^[254]。

微生物发酵生产乳酸($pK_a = 3.86$)的过程中,乳酸的大量积累会使得 pH 值下降,当 pH 值低于 pK_a 值时,游离的乳酸可以透过细胞膜进入胞内,在胞内解离出 H^+ 。游离的 H^+ 一方面降低胞内 pH,另一方面还会影响细胞膜的稳定性。因此,乳酸发酵过程需要添加大量的中和剂($Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$ 以及 NaOH 等)来控制合适的 pH 值(5.0~6.5)以维持 LAB 生长,而乳酸中和后乳酸钙或者乳酸钠等的乳酸盐。为了得到游离的乳酸,需要添加大量的浓硫酸,乳酸的中和和酸化过程会使得乳酸纯化过程复杂化,增加大量的工艺成本^[256]。在低 pH 值条件下进行乳酸发酵,能够大量减少中和剂的使用以及酸化过程的浓硫酸用量,能避免石膏等固体废弃物的产生,降低乳酸纯化的工艺成本^[255-257]。然而,在低 pH 值条件下生产乳酸,发酵菌株会受到低 pH 值的胁迫,低 pH 值胁迫会抑制生物炼制菌株的生长和发酵指标,降低乳酸发酵的经济性^[126, 258]。因此,提高生物炼制菌株的低 pH 值抗逆性对于在低 pH 值条件下进行乳酸发酵至关重要。

提高 LAB 的低 pH 值抗逆性常用的策略包括理性改造以及适应性进化。在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 中表达组氨酸脱羧途径以及海藻糖合成路径能够提高菌株在低 pH 值条件下的细胞存活,但是并不能显著提高菌株的乳酸发酵性能。Cubas-Cano 等 2019 年通过长周期的适应性进化培养,提高了 *L. pentosus* 在低 pH 值条件下的木糖利用能力,获得的进化菌株在 pH 值 5.0 条件下能够利用木糖生产 6.1 g/L 乳酸^[128]。Zhang 等 2012 通过在 pH 值 4.3 条件下的 MRS 培养基中对乳酸乳球菌 *L. casei* 进行适应性进化培养,进化菌株能够在 pH 值 4.3 条件下生产 17.9 g/L 乳酸^[195]。然而,目前在提高 LAB 酸耐受能力方面的研究取得的进展很有限,难以满足工厂化的需求。

P. acidilactici ZY271 是一株优异的 LAB 菌株,对于木质纤维素来源的抑制物以及高温胁迫具有很高的耐受性^[48, 49, 56, 58]。在这项研究中,采用了两种策略(适应性进化以及理性改造策略)来提高出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 值条件下的发酵性能。首先尝试了三个方面的理性改造:1. 表达内源或者外源的乳酸脱氢酶(*ldh*、*ldh3*)来提高乳酸合成通路的通量;2. 表达损伤修复相关的基因包括 *recA*(编码重组酶)、*DnaK*(分子伴侣)以及 *gshAB*(编码谷胱甘肽合成)来提高酸耐受能力;3. 表达 *ATPase-F₀*(编码 F_0F_1 -ATPase 的 F_0 大亚基)来泵出胞内的 H^+ 。另外还尝试了低 pH 值条件下的适应性

进化策略来提高 *P. acidilactici* ZY271 的酸耐受能力。理性改造策略并没有能够显著提高菌株的低 pH 抗逆性以及发酵性能，而获得的进化菌株在低 pH 值下进行低指标的乳酸发酵，其乳酸发酵性能以及细胞活力相比于出发菌株有显著性的增强。另外，通过测定进化菌株在不同 pH 值条件下的中和剂用量，发现以 NaOH 和 Ca(OH)₂ 作为中和剂，pH 值 4.0 条件下相比于 pH 值 5.5 条件下的中和剂用量分别减少了 56.3% 以及 39.8%，中和剂用量的下降能有效减少固体废弃物的产生，有利于降低后期纯化的工艺成本。本研究初步探索了提高 *P. acidilactici* ZY271 低 pH 值抗逆性的多种策略，理性改造部分的工作没有起到显著的效果，而适应性进化策略对于菌株的低 pH 值抗逆性和乳酸发酵性能提升的效果有限，不具备实际应用价值，还需要后续进一步的研究。

5.2 材料与amp;方法

5.2.1 菌株、培养基与培养条件

P. acidilactici ZY271 的培养方法以及 MRS 培养基配方见 3.2.1。携带 pZY36e 表达质粒的 *E. coli* XL1-blue 用于质粒的构建以及扩增，培养于添加了 150 μg/mL 红霉素的 LB 培养基中。

5.2.2 木质纤维素原料及后续的生物炼制过程

本章节使用的小麦秸秆的前处理以及预处理过程见 2.2.2。

5.2.3 酶与试剂

本章节使用的酶及试剂盒见 2.2.3，红霉素购买于本地供应商。

缓冲液 I 配置方法：0.02 g 六水氯化镁，20.538 g 蔗糖，0.186 g 三水磷酸钾，加水定容至 100 mL，然后浓盐酸调节 pH 至 7.5。

缓冲液 II 配置方法：称取 17.115 g 蔗糖，加入 10 mL 甘油，加水定容至 100 mL。

复苏液：称取 17.115 g 蔗糖，然后加入 90 mL 的 MRS 培养基进行溶解。上述缓冲液以及复苏液都在 115 °C 下灭菌 20 min 后使用。

5.2.4 质粒构建

本章节用到的质粒和引物见表 5.1。*PldhD* 来自 *P. acidilactici* ZP26 基因组中 *ldhD* (D-乳酸脱氢酶) 起始密码子上游 303 bp 的序列，*ldh* (L-乳酸脱氢酶)、*recA* (重组酶)、*DnaK* (分子伴侣 DnaK) 以及 *ATPase-F0* (F₀F₁-ATPase 中的 F₀ 大亚基，作用于泵出 H⁺) 都来自于 *P. acidilactici* ZY271 基因组，*ldh3* (L-乳酸脱氢酶) 来自于 *Lactobacillus acidophilus* La-14 基因组，*gshAB* (谷氨酸半胱氨酸合成酶以及谷胱甘肽合成酶) 来源于 *E. coli* K12 基因组。

表达质粒的构建方法如下：首先将 *PldhD* 启动子在 EcoRI 和 Xba I 位点通过酶切连接的方式替代 pMG36e 中的 P32 启动子形成 pZY36e 表达质粒，然后将目的基因在 Xba I、Sal I 以及 Pst I 等位点通过酶切连接的方式将目的基因构建到表达质粒中，最后在 *E. coli* XL1-blue 中扩增提取用于重组菌株的构建。

5.2.5 感受态制备、电转化以及阳性克隆的筛选

P. acidilactici 感受态制备：首先将-80 °C冻存的 *P. acidilactici* ZY271 在 MRS 平板上划线，置于 42 °C 培养箱中静置培养 48 h，挑取单菌落于 5 mL 液体 MRS 中 42 °C，150 rpm 培养 12 h。取 400 μ L 培养液转接至含有 20 mL 新鲜 MRS 培养液的 100 mL 摇瓶中，加入 600 μ L 的 40 mM D/L-苏氨酸溶液，42 °C，150 rpm 培养约 6 h 至 OD₆₀₀ 为 1.0。取 2.5 mL 菌液在 4 °C，10000 rpm，5 min 条件下分批次离心，弃上清，加入 1 mL 缓冲液 I 悬浮洗涤菌体两次。用 100 μ L 缓冲液 I 悬浮菌体，加入 10 μ L 的 1 mg/mL 溶菌酶溶液，37 °C 处理 30 min。离心 5 min 后弃上清，再加入 1 mL 缓冲液 I 悬浮洗涤细胞两次后弃上清，最后加入 500 μ L 缓冲液 II 悬浮细胞，每 80 μ L 分装得到感受态。

取 20 μ L 构建的表达质粒加入 80 μ L 感受态细胞中后混匀，冰浴放置 15 min。然后加入到提前预冷 0.5~1 h 的电击杯中，于 2000 V，200 Ω ，25 μ F 条件下进行电击，电击后的液体转移至离心管中，并加入 900 μ L 预冷的复苏液。42 °C，150 rpm 培养 3~4 h 后，菌液离心留存 100 μ L 液体，均匀地涂布在含有 5 μ g/mL 红霉素的 MRS 平板中。平板 42 °C 培养箱中培养 48 h 后进行重组菌株的验证。

5.2.6 重组菌株在低 pH 值条件下的发酵性能评估

几株重组菌株的发酵都是在含有 20 mL MRS 培养基的 100 mL 摇瓶中进行的，低 pH 环境由乳酸的不断积累而逐渐形成。以携带空载质粒的重组菌株作为对照，42 °C，150 rpm，发酵持续 48 h，测定发酵终点的 L-乳酸产量以及细胞活力。重组菌株发酵的种子培养方法：挑取重组菌株的单菌落接种到含有 5 mL MRS 培养基的 10 mL 试管中培养 12 h，然后以 10% (v/v) 接种量接种到含有 20 mL 的 MRS 的 100 mL 摇瓶中培养 6 h，最后将培养的种子液接种到含有 20 mL 的 MRS 的 100 mL 摇瓶中进行发酵，调整接种量以保持初始的 OD₆₀₀ 一致，每次试验都设置两个平行，种子培养以及发酵过程中都加入 5 μ g/mL 红霉素以维持质粒的稳定性。

5.2.7 低 pH 条件下的适应性进化

P. acidilactici ZY271 的适应性进化培养是在 MRS 培养基中进行的，整个过程一共经历了 5 个阶段共 200 次的连续转接，低 pH 值环境随着乳酸的不断积累而逐渐形成。接种量控制为 10% (v/v)，菌株培养于含有 20 mL MRS 培养基的 100 mL 三角瓶中，42 °C，150 rpm。

第 I 阶段：MRS 培养基（22 g/L 一水合葡萄糖、2 g/L 磷酸氢二钾、10 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、0.58 g/L 七水合硫酸镁、0.25 g/L 一水合硫酸锰），每 24 h 转接一次，持续了 18 次转接；

第 II 阶段：MRS 培养基，每 48 h 转接一次，持续了 27 次转接；

第 III 阶段：在外源添加 2 mL 100 g/L 的 L-乳酸降低 pH 值至 4.0 的 MRS 培养基中培养 48 h 后转接至新鲜 MRS 培养基中培养 24 h，在两种培养条件下进行交替转接，持续了 7 次转接；

第 IV 阶段：将 MRS 培养基中的乙酸钠浓度由 5 g/L 降低至 1 g/L，每 72 h 转接一次，持续了 39 次转接；

第 V 阶段：MRS 培养基，每 48 h 转接一次，持续了 109 次转接。

5.2.8 进化菌株的低 pH 值抗逆性发酵评估

进化菌株的低 pH 值抗逆性发酵评估是在含有 90 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基以及同步糖化共发酵中进行的，发酵体系都为 500 mL。发酵用的种子液培养方法如下：将进化菌株或者出发菌株从 -80 °C 冰箱取出，MRS 平板中划线活化 48 h 后，挑取单菌落于含有 20 mL MRS 培养基的 100 mL 三角瓶中 42 °C，150 rpm 培养 12 h，然后转接到含有 50 mL MRS 培养基的 250 mL 三角瓶中培养 6 h 后以 10% (v/v) 接种量接种到 1 L 发酵罐中。

进化菌株在含有 90 g/L 葡萄糖 MRS 培养基中的发酵使用 4 M NaOH 作为中和剂，温度为 42 °C，400 rpm，发酵过程的 pH 值分别控制在 5.5、5.0、4.5 以及 4.0，过程中检测葡萄糖的消耗、L-乳酸生产以及细胞活力。

进化菌株的 SSCF 以预处理并脱毒的麦秆为原料，采用 4 M NaOH 或者 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为中和剂。物料在 50 °C，500 rpm 预糖化 12 h，酶用量为 4 mg 纤维素酶粗蛋白/g 干物料，糖化结束后降温至 42 °C，400 rpm，pH 值调节至 5.5 后接入种子液，在 pH 值 5.5 条件下维持 4 h 以使得菌株能够快速生长，然后控制在不同 pH 值条件下，发酵过程中检测糖的消耗、L-乳酸生产以及细胞活力。

5.2.9 发酵产物、pH 值、细胞活力以及碱用量的计算

葡萄糖、木糖以及 L-乳酸的检测参见 3.2.9，残糖表示发酵终点葡萄糖与木糖的总和 (g/L)。适应性进化终点的 pH 值测定是采用上海精科 PHS-3C 型号的 pH 计测定的。细胞活力的检测参见 4.2.5， OD_{600} 的测定参见 2.2.9。

由于 Na^+ 以及 Ca^{2+} 几乎全部来自于中和剂的加入，基于 Na^+ 以及 Ca^{2+} 离子浓度可以计算出 NaOH 的用量 (g NaOH/g lactic acid) 以及 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的用量 (g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /g lactic acid)，此处计算的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的用量包含预处理后调节 pH 用的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 。 Na^+ 、 Ca^{2+} 的浓度是送样至华东理工大学分析测试中心进行检测的，采用的是离子色谱仪胜瀚 CIC-D120 (青岛，中国) 来进行离子浓度测定。

表 5.1 本章节所用的菌株、质粒和引物

Table 5.1 Strains, plasmids and primers used in this chapter

Strains	Characteristic	Sources
<i>E. coli</i> XL1-blue	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>P. acidilactici</i> ZY271	Parental strain for L-lactic acid fermentation	[48]
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring empty plasmid pZY36e	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e- <i>ldh</i>)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring expression plasmid pZY36e- <i>ldh</i>	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e- <i>ldh3</i>)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring expression plasmid pZY36e- <i>ldh3</i>	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e- <i>ATPase-F0</i>)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring expression plasmid pZY36e- <i>ATPase-F0</i>	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e- <i>recA</i>)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring expression plasmid pZY36e- <i>recA</i>	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e- <i>DnaK</i>)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring expression plasmid pZY36e- <i>DnaK</i>	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e- <i>gshAB</i>)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring expression plasmid pZY36e- <i>gshAB</i>	This work
Plasmids	Characteristic	Sources
pZY36e	Expression plasmid by <i>PldhD</i> promotor	[48]
pZY36e- <i>ldh</i>	Plasmid for expression of <i>ldh</i> by <i>PldhD</i> promotor	This work
pZY36e- <i>ldh3</i>	Plasmid for expression of <i>ldh</i> by <i>PldhD</i> promotor	This work
pZY36e- <i>ATPase-F0</i>	Plasmid for expression of <i>ATPase-F0</i> by <i>PldhD</i> promotor	This work
pZY36e- <i>recA</i>	Plasmid for expression of <i>recA</i> by <i>PldhD</i> promotor	This work
pZY36e- <i>DnaK</i>	Plasmid for expression of <i>DnaK</i> by <i>PldhD</i> promotor	This work
pZY36e- <i>gshAB</i>	Plasmid for expression of <i>gshAB</i> by <i>PldhD</i> promotor	This work
Primers	Sequence (5' - 3')	
<i>ldh-F</i>	TGCTCTAGAAATGTCTAATATTCAAAATCATCAAAAAGTTGT	
<i>ldh-R</i>	AAA <u>ACTGCAGT</u> TATTTGTCTTGTTTTTTCAGCAAGAG	
<i>ldh3-F</i>	CTAGTCTAGAAATGGCAAGAGTTGAAAAACCTCGT	
<i>ldh3-R</i>	ACGCGT <u>CGACTT</u> TATTGACGAACCTTAACGCCA	
<i>ATPase-F0-F</i>	TGCTCTAGAGTGGGTGGTGAATCAATTTCA	
<i>ATPase-F0-R</i>	AAA <u>ACTGCAGT</u> CATTTACTCTCACCTAAACCTTCAAT	
<i>DnaK-F</i>	CTAGTCTAGAAATGGCAAGTAATAAAAATTATTGGTATTGAC	
<i>DnaK-R</i>	ACGCGT <u>CGACTT</u> TATTTGTTGTCTTTGTTCAGGATCG	

<i>gshA-F</i>	CTAGT <u>CTAGAT</u> GCTCTGGTGTGCAGACCAGAC
<i>gshA-R</i>	ACGCGT <u>CGACT</u> CAGGCGTGTTTTCCAGCCACA
<i>gshB-F</i>	ACGCGT <u>CGACAT</u> TTGGCGATTTGGGCTAAC
<i>gshB-R</i>	AA <u>CTGCAGT</u> TACTGCTGCTGTAAACGTG
<i>recA-F</i>	ACGCGT <u>CGACG</u> TGGCAGATGAAAGAAAAGAAG
<i>recA-R</i>	AAA <u>ACTGCAGT</u> TATTTCAAGTCTAATTCAGCTTGGT

注：下划线表示酶切位点。

5.3 结果与讨论

5.3.1 理性改造提高乳酸片球菌在低 pH 值条件下的发酵性能

在低 pH 值条件下, *P. acidilactici* ZY271 的乳酸发酵性能受到强烈的抑制^[259]。为了克服酸胁迫对于乳酸发酵的抑制作用, 我们尝试了三个方面的理性改造: (i) 增加乳酸路径的通量; (ii) 修复酸胁迫造成的损伤; (iii) 泵出胞内过多的 H^+ (图 5.1)。

首先在菌株中表达了自身的 L-乳酸脱氢酶 (L-lactate dehydrogenase, *ldh*) 以及来源于嗜酸乳杆菌 *L. acidophilus* La-14 的 *ldh3* 来强化乳酸的合成。据报道, 乳酸脱氢酶 (*ldh*) 严重影响乳酸的生产, 因此我们在出发菌株中表达内源或者外源的 *ldh* 来强化在酸性条件下的乳酸生产^[82]。但发酵结果显示表达内源或者外源的 *ldh* 并没有促进重组菌株的乳酸生产。

随后还尝试了在出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 表达酸胁迫损伤修复相关的基因, 包括 *recA*、*DnaK* 以及 *gshAB* 来提高菌株的酸耐受。低 pH 值胁迫下, 菌株自身能够通过调节胞内的 *recA* (编码重组酶) 以及 *DnaK* (编码分子伴侣) 等的表达来修复大分子 (DNA 以及蛋白质等) 的损伤, 提高低 pH 值抗逆性, 而由 *gshAB* (编码谷氨酸半胱氨酸合成酶以及谷胱甘肽合成酶) 介导的谷胱甘肽合成有助于菌株抵抗酸胁迫^[155-158]。发酵结果显示, 在 *P. acidilactici* ZY271 中过表达自身的 *recA*、*DnaK* 以及外源引入谷胱甘肽合成路径都没有提高菌株的 L-乳酸发酵性能。

最后尝试了在出发菌株中过表达自身的 *ATPase-F0* 大亚基, 用于维持胞内 pH 的稳定。来源于胞内不断积累的乳酸解离出的 H^+ 会损伤 LAB 的细胞膜以及干扰胞内的生化反应, 而菌株自身具有的 *FoF1-ATPase* *F0* 大亚基能够将胞内的 H^+ 泵出到胞外来提高胞内的 pH 值^[141-143]。但是发酵结果表明在出发菌株中过表达 *ATPase-F0* 大亚基并没有起到很好的效果。

理性改造在提高 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性方面效果不太显著, 理性改造效果差可能的原因分析如下。低 pH 环境会对 LAB 造成全局性的影响, 乳酸合成路径中的糖酵解相关的基因以及乳酸脱氢酶等都受到了强烈的抑制, 因此单独表达 *ldh* 来提高乳酸生产难以明显提高乳酸合成^[267]; 酸耐受是一种复杂的表型, 涉及到很多基因之间的相互作用, 单独表达一个基因或者几个基因 (*recA*、*DnaK* 以及 *gshAB*) 来提高酸耐受难以实现^[137]; *FoF1-ATPase* 的活性对于 LAB 在低 pH 条件下的生存很重要, 而 *P. acidilactici* ZY271 的 *ATPase* 可能只在相对较高的 pH 下有活性, 这会导致过表达 *ATPase-F0* 难以正常发挥作用^[143]。目前在 LAB 中通过代谢改造来提高酸耐受性能仅能够提高菌株的细胞存活, 并不能显著提高乳酸发酵性能。开发一种能够高效获得酸耐受菌株的方法仍是一个巨大的挑战。

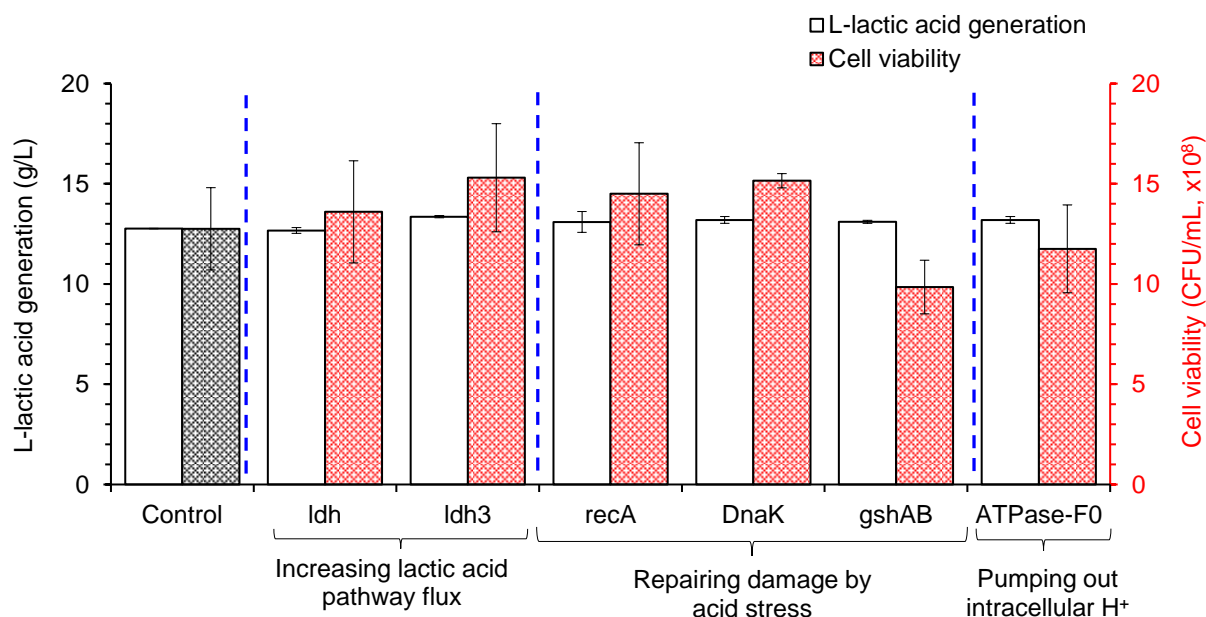


图 5.1 重组菌株在 MRS 培养基低 pH 值条件下发酵生产 L-乳酸

Fig. 5.1 L-lactic acid fermentation of various recombinants in flasks at low pH

发酵条件：重组菌株在含有 20 mL MRS 培养基的 100 mL 摇瓶发酵，以带有 pZY36e 的重组菌株作为对照，低 pH 环境随着乳酸的不断积累而形成。L-乳酸产量以及细胞活力测定于 48 h 发酵终点。

5.3.2 低 pH 值条件下的适应性进化

由于理性改造效果不显著，随后对 *P. acidilactici* ZY271 进行了长期的适应性进化，如图 5.2 所示，一共分为 5 个阶段：第 I 阶段适应性进化终点的 pH 值为 4.0 左右，并且还有至少 6 g/L 的葡萄糖没有消耗完全，随后将适应性进化培养时间从 24 h 调整到 48 h 即第 II 阶段。第 II 阶段适应性进化终点的 pH 值为 3.9 左右，但是仍有 6 g/L 左右的残糖，可能的原因是菌株的低 pH 值耐受能力较弱，难以进一步代谢糖，因此调整为外源添加 L-乳酸将 pH 值降低到 4.0，并且随后转接至 MRS 培养基中进行交替转接，即第 III 阶段。第 III 阶段适应性进化终点 pH 值为 4.0 左右，菌株 OD₆₀₀ 低于 1，难以进行正常的转接，在之前的基础上，考虑可能是乙酸钠含量太高影响了细胞的生长，调整乙酸钠浓度到 1 g/L，即第 IV 阶段。第 IV 阶段适应性进化终点 72 h 的 pH 值为 3.65 左右，但是仍有 9 g/L 的残糖，调整为与第 II 阶段一致，即第 V 阶段。第 V 阶段随着连续转接的进行，48 h 的残糖浓度以及 pH 值不断降低并趋于稳定，最后残糖浓度稳定在 2.8 g/L，pH 值稳定在 3.8 左右，细胞活力在 140-180 次连续转接过程中趋于稳定，随后有所波动。经过共 200 次连续转接，最终获得了一株稳定的进化菌株。

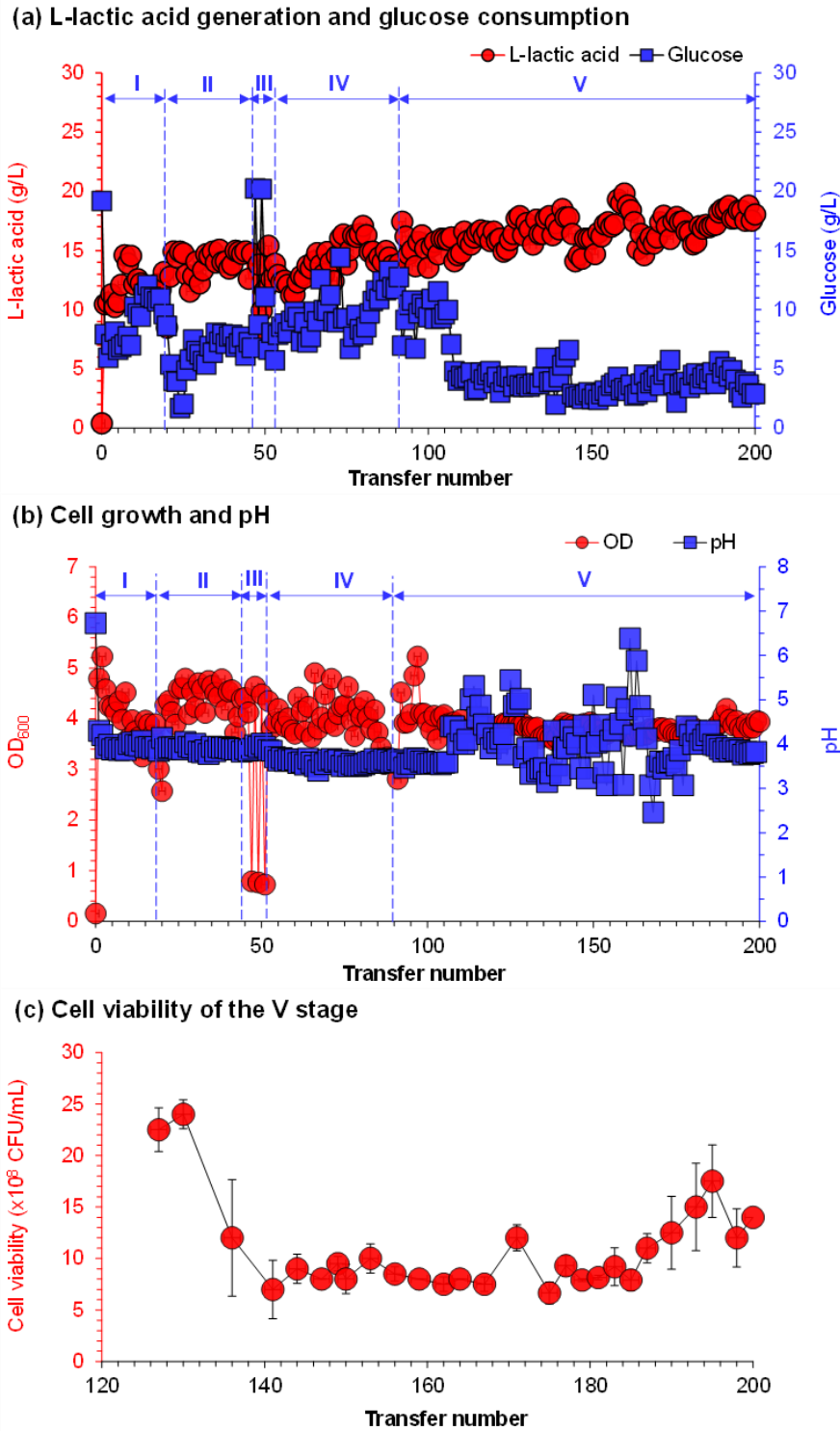


图 5.2 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 值条件下的适应性进化

(a) 细胞生长和 pH 值; (b) L-乳酸生产以及葡萄糖消耗; (c) 细胞活力

Fig. 5.2 Adaptive evolution of *P. acidilactici* ZY271 at low pH

(a) Cell growth and pH; (b) L-lactic acid production and glucose consumption; (c) Cell viability.

5 个阶段的培养条件如 5.2.7 所述, 低 pH 环境随着乳酸的不断积累而形成, OD₆₀₀、pH 值、L-乳酸生产、葡萄糖消耗以及细胞活力均测定于适应性进化的终点。

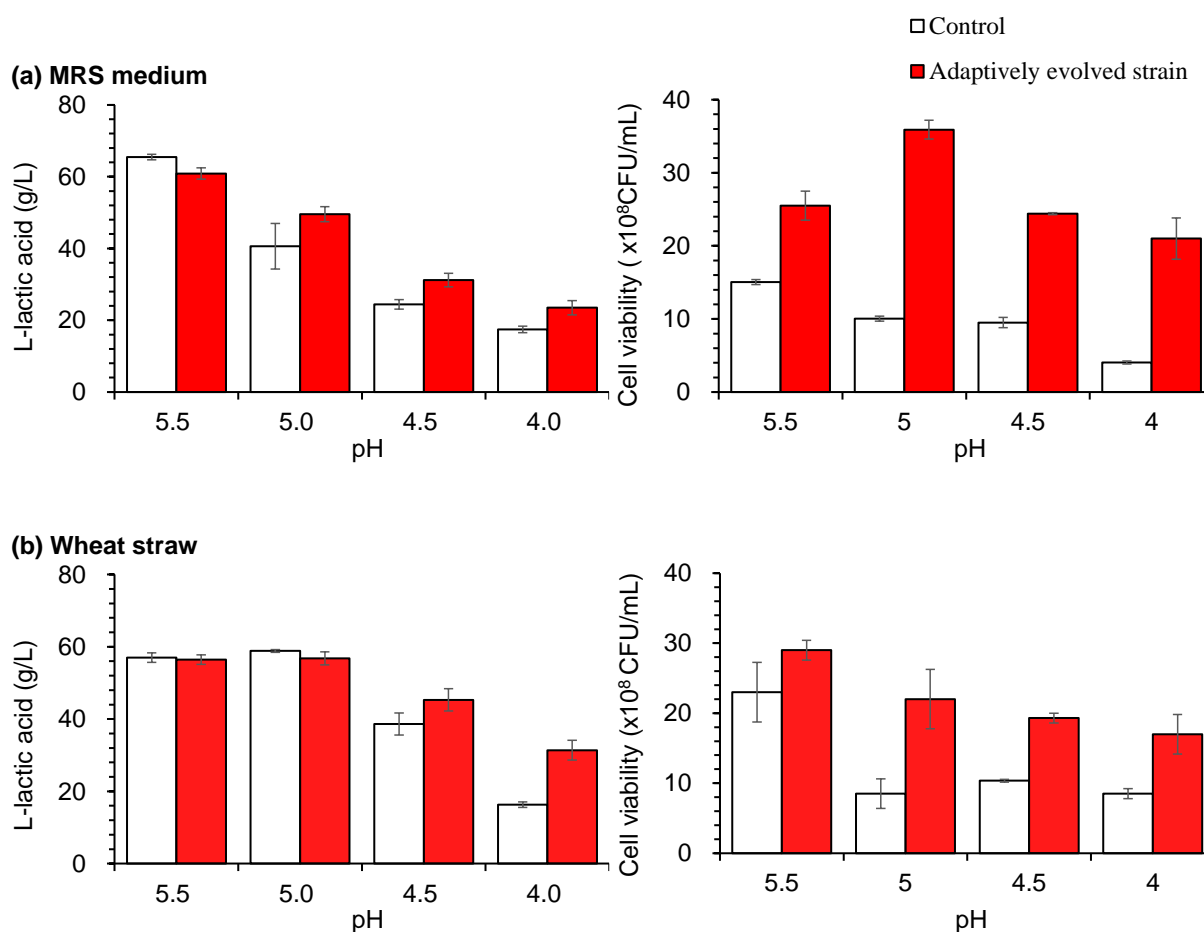


图 5.3 进化菌株在 MRS 培养基以及同步糖化共发酵中不同 pH 值条件下的 L-乳酸发酵性能

(a) L-乳酸生产; (b) 细胞活力

Fig. 5.3 L-lactic acid fermentability of the adaptively evolved *P. acidilactici* strain at different pH values in MRS medium and simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF).

(a) L-lactic acid generation; (b) Cell viability.

发酵条件：以出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 作为对照，MRS 发酵是在添加了 90 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基的 1 L 发酵罐中进行。SSCF 以脱毒后的麦秆为原料，进行 15% (w/w) 固体含量的 SSCF 生产 L-乳酸，50 °C 下糖化 12 h，调节初始 pH 值为 5.5 后接入种子液进行发酵，以 4 M NaOH 作为中和剂。L-乳酸生产以及细胞活力测定于 48 h 发酵终点。以 4 M NaOH 作为中和剂，L-乳酸生产以及细胞活力测定于发酵终点。

5.3.3 进化菌株的低 pH 值发酵性能评估

进化菌株的低 pH 值发酵性能评估是在不同 pH 值条件下的合成培养基以及木质纤维素体系中的进行的，实验最高的 pH 值选定为 5.5，主要是基于纤维素酶催化的最适 pH 值范围 (4.75-5.25)，而最低 pH 值 4.0 的选定则是基于乳酸的解离常数 ($pK_a = 3.86$)。进化菌株在低 pH 值条件下的发酵性能是在 MRS 培养基以及 SSCF 中进行评估的。低 pH 值条件下，乳酸生产菌株的细胞生长以及乳酸发酵会受到抑制^[260]。对于在 MRS 培养基中的发酵，如图 5.3a 所示，当 pH 值从 5.5 降低后，进化菌株与出发菌株在 MRS 培养基中的糖耗以及乳酸生产都显著下降了，但是进化菌株的糖耗以及 L-乳酸生产都要高

于出发菌株, 在 pH 值 4.5 以及 4.0 条件下, 进化菌株的 L-乳酸产量分别为 31.2 g/L 以及 23.5 g/L, 相比于出发菌株分别提高了 27.7% 以及 34.7%; 进化菌株的细胞活力在不同 pH 值条件下都要高于出发菌株, 在 pH 值 4.5 以及 4.0 条件下, 进化菌株的细胞活力相比于出发菌株分别提高了 1.6 倍以及 4.2 倍。从 MRS 培养基的发酵对比来看, 进化菌株在更低 pH 值条件下, 其低 pH 值抗逆性以及乳酸发酵性能的提升更加明显。对于 SSCF 发酵, 如图 5.3b 所示, 当 pH 值低于 5.0 时, 两株菌株的 L-乳酸产量都显著下降了, 但进化菌株的乳酸生产都要显著高于出发菌株。进化菌株的 L-乳酸产量在 pH 值 4.5 以及 4.0 条件下分别为 45.3 g/L 和 31.4 g/L, 相比于出发菌株分别提高了 17.2% 和 88.4%; 当 pH 值低于 5.5 时, 进化菌株的细胞活力几乎都是出发菌株的两倍以上。由 SSCF 的结果可以看出, 进化菌株在更低 pH 条件下, 其低 pH 抗逆性相比于出发菌株的提升更加显著。另外, 我们还测试了进化菌株在 pH 值 4.0 条件下不同固体含量下的 L-乳酸生产性能, 结果发现进化菌株在 pH 值 4.0 条件下的乳酸生产能力是有限的, 提高 SSCF 的固体含量会导致大量残糖无法消耗完 (图 5.4)。

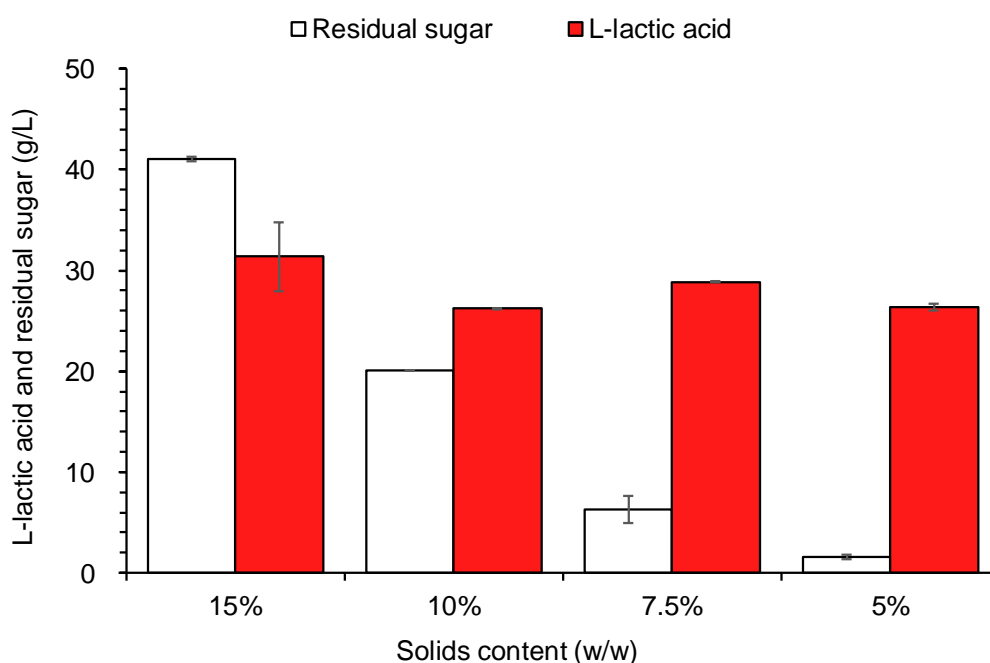


图 5.4 进化菌株在不同固体含量 pH 值 4.0 条件下的同步糖化共发酵比较

Fig. 5.4 Simultaneous saccharification and co-fermentation comparison of the evolved strain under various solids loading

发酵条件: 以脱毒后的麦秆为原料, 4 M NaOH 作为中和剂, 50 °C 下预糖化 12 h 后, 调节初始 pH 值为 5.5 后接入种子液进行发酵; 残糖浓度是发酵终点葡萄糖与木糖浓度之和, L-乳酸浓度测定于发酵终点。

5.3.4 进化菌株在低 pH 值条件下的乳酸发酵减少中和剂的使用

在 pH 值 4.0 条件下 SSCF 过程中两种不同中和剂的用量进行了测定。如图 5.5 所示, 使用 NaOH 作为中和剂时, pH 值 4.0 下 NaOH 用量为 0.16 g NaOH/g L-乳酸, 相比

于 pH 值 5.5, NaOH 用量下降了 56.3%, 而使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为中和剂时, pH 值 4.0 下 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 用量为 0.25 g $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{g}$ L-乳酸, 相比于 pH 值 5.5 条件下, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 用量下降了 39.8%。低 pH 值条件下进行乳酸发酵显著减少了中和剂的使用, 更重要的是, 能够减少后期乳酸酸化过程中强酸的用量, 降低乳酸纯化的工艺成本。

目前的研究在提高乳酸菌在低 pH 条件下的乳酸生产上取得的进展非常有限。Zhang 等 2012 通过适应性进化提高了 *L. casei* 的酸耐受能力, 获得的进化菌株仅能利用葡萄糖在 pH 值 4.3 条件下生产 17.9 g/L 的乳酸。Cubas-Cano 等 2019 通过在木糖培养基中长达 100 天的适应性进化, 得到的进化菌株在 pH 值 4.0 条件下产生了 8 g/L 乳酸。很明显, 开发一种更高效的方式来获得酸耐受的乳酸菌仍是低 pH 发酵应用的瓶颈。进一步的研究应该聚焦于结合不同的策略以及更加更高效的方法来筛选酸耐受提高的乳酸菌。之前的研究发现乳酸菌的胞内 pH 值越高, 其酸耐受能力越好, 而荧光探针(5, 6-羧荧光素琥珀酰亚胺酯)已经被证明可以用于准确测定乳酸菌的胞内 pH 值^[158, 194, 266]。将荧光探针应用到适应性进化以及化学诱变等策略上, 能够有助于筛选得到酸耐受显著提高的发酵菌株。

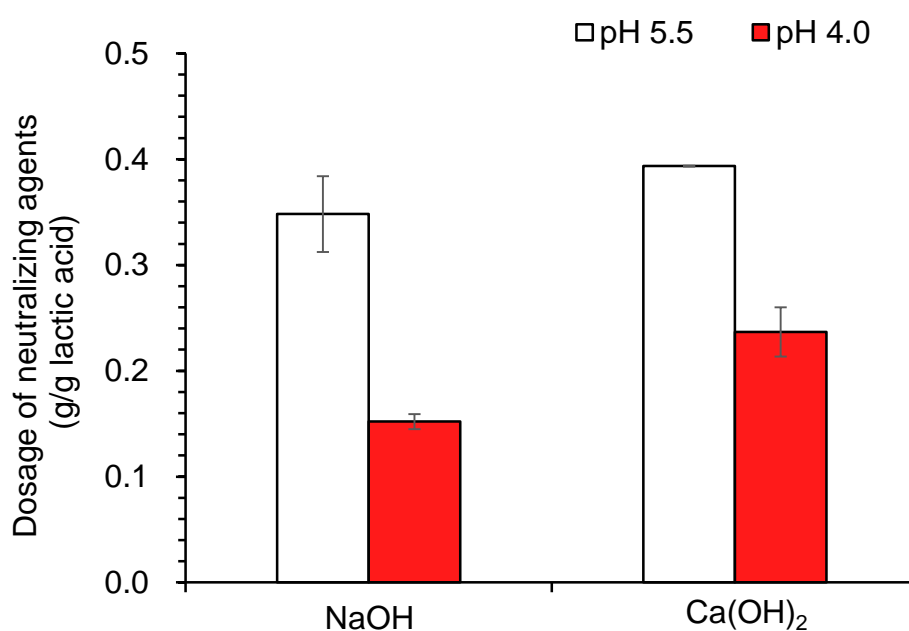


图 5.5 进化菌株使用不同中和剂在 pH 值 4.0 条件下的中和剂用量

Fig. 5.5 The dosage of neutralizing agents for cellulosic L-lactic acid fermentation in the evolved strain at pH 4.0.

发酵条件: 以在 pH 值 5.5 条件下的中和剂用量作为对照, 纤维素 L-乳酸的同步糖化共发酵是以 5% (w/w) 固含量的小麦秸秆作为原料, 酶用量为 10 mg 蛋白/g 纤维素。pH 值是通过自动添加 4 M NaOH 或者 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的液浆来调节的。

5.4 本章小结

本章节, 采用了适应性进化以及理性改造策略来提高 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性以及乳酸发酵性能, 并通过 MRS 培养基发酵以及 SSCF 来评

估进化菌株的低 pH 值抗逆性。本章节主要研究结论如下：

(1) 进行了三个方面的理性改造来提高 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性，包括 (i) 增加乳酸路径的通量；(ii) 修复游离乳酸造成的损伤；(iii) 泵出胞内过多的 H^+ ，但改造的效果并不显著。

(2) 通过在 MRS 培养基低 pH 值条件下的长期适应性进化培养，最终获得了一株稳定的进化菌株。进化菌株的 MRS 培养基发酵以及 SSCF，在进行低指标的乳酸发酵时，相比于出发菌株，L-乳酸发酵性能以及细胞活力都有提升。在 pH 值 4.0 条件下，进化菌株合成培养基发酵以及 SSCF 的 L-乳酸产量分别是 23.5 g/L 以及 31.4 g/L，相比于出发菌株分别提升了 34.7% 和 88.5%；在不同 pH 值下的 MRS 培养基发酵以及 SSCF，进化菌株相比于出发菌株，其细胞活力都有显著性的提升。

(3) 进化菌株在采用不同的中和剂进行 pH 值 4.0 条件下的 SSCF 都能显著减少中和剂的使用。使用 NaOH 作为中和剂，pH 值 4.0 条件下的 NaOH 用量相比于 pH 值 5.5 可以降低 56.3%，而使用 $Ca(OH)_2$ 则可以减少 $Ca(OH)_2$ 用量达到 39.8%。减少中和剂的使用能有效降低后续乳酸纯化过程中固体废弃物的产生以及浓硫酸的用量，减少乳酸纯化的工艺成本。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

生物炼制菌株在木质纤维素生物炼制过程中不可避免地会遭遇到来源于预处理以及发酵等工段的各种胁迫，包括预处理后产生的酚类抑制物、高温以及低 pH 值等。这些胁迫会对生物炼制菌株的生长以及发酵造成影响，导致生物炼制过程无法持续以及发酵过程难以进行。提高生物炼制菌株的胁迫抗逆性主要有两种方式，一种是理性改造策略，另一种是适应性进化策略。本论文主要利用这两种不同的策略来提高生物炼制菌株的抗逆性。为了降低这些胁迫对于生物炼制菌株的抑制作用，本研究开展了以下工作：通过长周期的适应性进化培养，提高了运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 8b 的酚醛抑制物耐受能力和纤维素乙醇发酵性能，并且借助 qRT-PCR 挖掘到了与酚醛抑制物耐受相关的关键基因。鉴定了木质纤维素中广泛存在的抑制物 *p*-苯醌，通过比较不同菌株的 *p*-苯醌耐受能力以及转化能力，挖掘到了 *Z. mobilis* 高苯醌耐受的机理，运用 qRT-PCR 筛选并鉴定了与 *p*-苯醌耐受相关的关键基因，并且通过理性改造进一步提高了 *Z. mobilis* 的 *p*-苯醌耐受能力。采用转录组分析以及基因组重测序，解析了一株经过长周期适应性得到的进化菌株耐高温性能提升的机理，筛选到了很多与高温抗逆性相关的关键基因。通过对 *P. acidilactici* 在低 pH 值条件下进行适应性进化培养，获得了一株低 pH 值抗逆性能略微提升的进化菌株，在低 pH 值条件下进行低指标的乳酸发酵，进化菌株的细胞生长以及 L-乳酸生产都有所提升。以下是本论文的主要结论：

(1) 在 25% (w/w) 固体含量玉米秸秆水解液中的长周期适应性进化培养提高了运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 的酚醛抑制物耐受能力以及纤维素乙醇发酵性能。进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的酚醛抑制物 (*p*-羟基苯甲醛、香草醛以及丁香醛) 转化能力相比于出发菌株有显著性的提升，尤其是对于毒性最大的香草醛，12 h 的转化率相比于出发菌株提高了 1.8 倍。进化菌株的高固体含量同步糖化共发酵显著缩短了葡萄糖消耗的延滞期，乙醇生产速率、木糖利用率以及乙醇产量都显著增强了。通过进一步的 qRT-PCR，挖掘到了进化菌株酚醛转化能力提升的关键基因 *ZMO3_RS07160* (编码 SDR 家族氧化还原酶)，通过在出发菌株中过表达这一基因能够在同步糖化发酵以及水解液发酵中提高发酵菌株的酚醛抑制物耐受能力。

(2) 鉴定了预处理后物料中广泛存在的 *p*-苯醌抑制物，探究并挖掘了生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的抗逆机理以及 *p*-苯醌抗逆基因。6 种常见木质纤维素原料经过预处理后都会产生高毒性的 *p*-苯醌，通过研究 5 种生物炼制菌株对于 *p*-苯醌的耐受以及转化能力，发现菌株高耐受 *p*-苯醌的机理是通过将高毒性的 *p*-苯醌转化为了低毒性的氢醌。借助于 qRT-PCR，挖掘了 *Z. mobilis* 中 *p*-苯醌耐受的关键基因 (*ZMO1399*、*ZMO1576*、*ZMO1696*、*ZMO1949* 以及 *ZMO1984*)，并通过在 *Z. mobilis* 8b 中过表达这些基因进一步提高了菌株的 *p*-苯醌抗逆性以及发酵性能。

(3) 对进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 进行了转录组分析以及基因组重测序分析，挖

掘到了进化菌株耐高温性能提升以及发酵性能提升背后的分子机理。进化菌株在 50 °C 高温下, 其细胞活力相比于出发菌株显著提高了。进化菌株提升的耐高温性能促进了随后的乙醇发酵, 乙醇生产相比于出发菌株有显著性的提升, 而出发菌株的乙醇发酵过程伴随着严重的乳酸菌污染。进一步的 RNA-seq 分析发现, 进化菌株以及出发菌株在高温胁迫下的 KEGG 分析发现, 核糖体通路上的大部分基因在两株菌株中显著下调表达。以出发菌株作为对照, 进化菌株碳代谢通路上的关键酶(限速酶以及葡萄糖磷酸化酶) 编码基因在 30 °C 条件下发生了显著性的上调表达, 这些基因的上调表达有助于进化菌株高温抗逆性能以及纤维素乙醇发酵性能的提升。基因组重测序分析发现, 进化菌株中的突变要远远少于出发菌株, 这是进化菌株与出发菌株高温抗逆性提升在基因层面上的体现。

(4) 理性改造提高 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性并没有起到显著的效果, 而经过在低 pH 值条件下的长期适应性进化培养, 进化菌株在进行低指标的乳酸发酵时展现了略微提升的低 pH 值抗逆性以及 L-乳酸发酵性能。在进行不同 pH 值下的 MRS 发酵以及 SSCF, 进化菌株的细胞活力相比于出发菌株具有显著性的提升, 而其发酵性能仅在低指标乳酸发酵时有显著的提升。在 pH 值 4.0 条件下, 进化菌株合成培养基发酵以及 SSCF 的 L-乳酸产量分别是 23.5 g/L 以及 31.4 g/L, 相比于出发菌株分别提升了 34.7% 和 88.5%。另外, 使用不同的中和剂在 pH 值 4.0 条件下发酵都能够显著降低减少中和剂的使用, 有助于减少后续乳酸纯化的固体废弃物产生以及浓硫酸的用量, 降低乳酸纯化的工艺成本。

6.2 创新点

(1) 借助于适应性进化, 成功提高了多株生物炼制菌株的胁迫抗逆性, 证明了适应性进化可以应用于提高生物炼制菌株的抑制物、高温以及低 pH 值等多种胁迫抗逆性, 为高抗逆性生物炼制菌株的构建提供了重要的策略。

(2) 借助于 qRT-PCR 以及 RNA-seq 等技术, 挖掘到了进化菌株 *Z. mobilis* Z198 酚醛抑制物耐受提高的关键基因 *ZMO3_RS07160*, 发现了进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 耐高温性能以及发酵性能提升的分子机理, 为理性改造提高生物炼制菌株的抗逆性提供了重要的候选基因。

(3) 发现并鉴定了预处理后木质纤维素原料中广泛存在的 *p*-苯醌抑制物, 发现了高抗逆菌株的 *p*-苯醌抗逆机理, 并且借助 qRT-PCR 技术, 筛选并挖掘了 *Z. mobilis* 中的 *p*-苯醌抗逆基因, 为 *p*-苯醌高抗逆菌株的理性改造提供了重要的理论指导。

6.3 展望

本研究针对生物炼制菌株在木质纤维素生物炼制过程中遭遇到的多种胁迫, 通过理性改造以及适应性进化策略, 提高了生物炼制菌株的抗逆性, 并且借助 qRT-PCR、RNA-seq 以及基因组重测序等技术, 挖掘到了很多与酚类抑制物、*p*-苯醌以及高温等抗逆相

关的关键基因，为高抗逆生物炼制菌株的构建提供了重要的技术及理论指导。但是本研究仍有很多不足以及需要改进之处。

(1) 针对进化菌株 *Z. mobilis* Z198 的酚醛抑制物抗逆性提高，挖掘了进化菌株酚醛抑制物耐受提高的关键基因，同时进化菌株的糖利用速率尤其是木糖利用速率有显著性的提升，对于糖利用相关的基因没有进行进一步的转录分析。

(2) 由于时间有限，仅在 *Z. mobilis* 8b 中验证了 *p*-苯醌转化基因的功能，并没有在其它菌株中进行验证，可以通过理性改造将这些基因应用于其它 *p*-苯醌耐受较差的生物炼制菌株，进一步验证这些基因的 *p*-苯醌转化性能。

(3) 借助于 RNA-seq 以及基因组重测序技术，挖掘到了进化菌株 *S. cerevisiae* Z100 中很多与耐高温相关的关键基因，但是缺乏对这些基因功能的进一步验证，后期的工作可以通过敲除、弱化等手段来验证挖掘到的这些基因的功能。

(4) 适应性进化策略只是略微地提升了 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值抗逆性能以及乳酸发酵性能，远远没有达到工业化应用的要求。后期可以通过优化构建手段，将诱变、适应性进化以及理性改造等策略结合起来，构建低 pH 值抗逆性能优异的菌株。

参考文献

- [1] Corma A, Iborra S, Velty A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chemical Reviews*. 2007, 107(6): 2411-2502.
- [2] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454(7206): 841-845.
- [3] Ma J, Shi S, Jia X, et al. Advances in catalytic conversion of lignocellulose to chemicals and liquid fuels. *Journal of Energy Chemistry*. 2019, 36: 74-86.
- [4] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9(9): 1621-1651.
- [5] Chen H, Liu J, Chang X, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*. 2017, 160: 196-206.
- [6] Pan XJ, Gilkes N, Saddler JN. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung*. 2006, 60(4): 398-401.
- [7] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 10.
- [8] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2(1): 26-40.
- [9] Ong RG, Chundawat SPS, Hodge DB, et al. Linking plant biology and pretreatment: understanding the structure and organization of the plant cell wall and interactions with cellulosic biofuel production. *Advances in Plant Biology*. 2014, 1: 231-253.
- [10] Zhao X, Wang LJ, Lu XB, et al. Pretreatment of corn stover with diluted acetic acid for enhancement of acidogenic fermentation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 12-18.
- [11] Peng JJ, Abomohra AEF, Elsayed M, et al. Compositional changes of rice straw fibers after pretreatment with diluted acetic acid: towards enhanced biomethane production. *Journal of Cleaner Production*. 2019, 230: 775-782.
- [12] Rattanaporn K, Tantayotai P, Phusantisampan T, et al. Organic acid pretreatment of oil palm trunk: effect on enzymatic saccharification and ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2018, 41(4): 467-477.
- [13] Ranatungaa TD, Jervisa J, Helm RF, et al. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27(1): 240-247.
- [14] Kootstra AMJ, Beeftink HH, Scott EL, et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, 46(2): 126-131.
- [15] Baral NR, Shah A. Comparative techno-economic analysis of steam explosion, dilute sulfuric acid, ammonia fiber explosion and biological pretreatments of corn stover. *Bioresource Technology*. 2017, 232: 331-343.
- [16] Yu HT, Xiao WH, Han LJ, et al. Characterization of mechanical pulverization/phosphoric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2019, 282: 69-74.

- [17] Karimi K, Taherzadeh M. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource Technology*. 2016, 200: 1008-1018.
- [18] Shao S, Zhang J, Hou WL, et al. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*. 2017, 238: 744-748.
- [19] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of reactor corrosion by eliminating liquid-phase existence in dry dilute acid pretreatment of corn stover. *Energy & Fuels*. 2017, 31(6): 6140-6144.
- [20] Han T, Zhang B, Li H, et al. Year-round storage operation of three major agricultural crop residue biomasses by performing dry acid pretreatment at regional collection depots. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, 9(13): 4722-4734.
- [21] Zhang J, Shao S, Bao J. Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock and ethanol fermentability evaluation. *Bioresource Technology*. 2016, 201: 355-359.
- [22] Jing XY, Zhang XX, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3): 696-707.
- [23] Sakai S, Tsuchida Y, Okino S, et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(7): 2349-2353.
- [24] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 25-33.
- [25] Tejirian A, Xu F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, 48(3): 239-247.
- [26] Sasaki C, Okumura R, Asakawa A, et al. Effects of washing with water on enzymatic saccharification and D-lactic acid production from steam-exploded sugarcane bagasse. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 2012, 14(3): 234-240.
- [27] Aulitto M, Fusco S, Nickel DB, et al. Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 45.
- [28] Kucera D, Benesova P, Ladicky P, et al. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolyzates of spruce sawdust: comparison of hydrolyzates detoxification by application of overliming, active carbon, and lignite. *Bioengineering-Basel*. 2017, 4(2): 53.
- [29] Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, et al. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106(2): 128-133.
- [30] Liu ZL. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90(3): 809-825.
- [31] Gao XC, Gao QQ, Bao J. Tolerance response and metabolism of acetic acid by biotransformation fungus *Amorphotheca resinae* ZN1. *Journal of Biotechnology*. 2018,

- 275: 31-39.
- [32] He YQ, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodegradation on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [33] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011, 156(4): 286-301.
- [34] Lin RC, Cheng J, Ding LK, et al. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*. 2015, 196: 250-255.
- [35] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008, 35(5): 377-391.
- [36] 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(16): 6315-6322.
- [37] Dhar KS, Wendisch VF, Nampoothiri KM. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for xylitol production from lignocellulosic pentose sugars. *Journal of Biotechnology*. 2016, 230: 63-71.
- [38] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2000, 25(4): 184-192.
- [39] Chen ZY, Liu G, Zhang J, et al. A preliminary study on L-lysine fermentation from lignocellulose feedstock and techno-economic evaluation. *Bioresource Technology*. 2019, 271: 196-201.
- [40] Zhang J, Chu DQ, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4): 718-728.
- [41] Liu W, Wang Y, Yu Z, et al. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 13-18.
- [42] Zhao K, Qiao Q, Chu DQ, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-489.
- [43] Kang L, Wang W, Pallapolu VR, et al. Enhanced ethanol production from de-ashed paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation and simultaneous saccharification and co-fermentation. *Bioresources*. 2011, 6(4): 3791-3808.
- [44] Pratto B, Chandgude V, de Sousa R, et al. Biobutanol production from sugarcane straw: defining optimal biomass loading for improved ABE fermentation. *Industrial Crops and Products*. 2020, 148: 112265.
- [45] Giang T, Lunprom S, Liao Q, et al. Enhancing hydrogen production from *Chlorella sp.* biomass by pre-hydrolysis with simultaneous saccharification and fermentation (PSSF).

- Energies. 2019, 12(5).
- [46] Liu G, Zhang Q, Li HX, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115(1): 60-69.
- [47] Jin C, Hou WL, Yao RM, et al. Adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* accelerates the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. *Bioresource Technology*. 2019, 289: 121623.
- [48] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 2018, 249: 9-15.
- [49] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369-1376.
- [50] Liu YL, Liu G, Zhang J, et al. Itaconic acid fermentation using activated charcoal-treated corn stover hydrolysate and process evaluation based on Aspen plus model. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2019, 10(2): 463-470.
- [51] He NL, Fang C, Qiu ZY, et al. Increasing sodium lactate production by enhancement of Na⁺ transmembrane transportation in *Pediococcus acidilactici*. *Bioresource Technology*. 2021, 323: 124562.
- [52] Gao XC, Gao QQ, Bao J. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene *ZMO0119*. *Journal of Biotechnology*. 2018, 282: 32-37.
- [53] Gu HQ, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresource Technology*. 2014, 157: 6-13.
- [54] Chu DQ, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *Bioenergy Research*. 2012, 5: 1020-1026.
- [55] Watcharawipas A, Sae-Tang K, Sansatchanon K, et al. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for D-lactic acid production with near theoretical yield. *FEMS yeast research*. 2021, 12(4): 1-5.
- [56] Qureshi AS, Zhang J, da Costa Sousa L, et al. Antibacterial peptide secreted by *Pediococcus acidilactici* enables efficient cellulosic open-lactic acid fermentation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, 5(10): 9254-9262.
- [57] Yi X, Zhang P, Sun JE, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121.
- [58] Qiu ZY, Fang C, Gao QQ, et al. A short-chain dehydrogenase plays a key role in cellulosic D-lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*. *Bioresource Technology*. 2020, 297: 122473.
- [59] Yang SH, Fei Q, Zhang YP, et al. *Zymomonas mobilis* as a model system for production

- of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology*. 2016, 9(6): 699-717.
- [60] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*. 1995, 267(5195): 240-243.
- [61] Zhang X, Wang TY, Zhou W, et al. Use of a Tn5-based transposon system to create a cost-effective *Zymomonas mobilis* for ethanol production from lignocelluloses. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12: 41.
- [62] Yi X, Gu HQ, Gao QQ, et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 153.
- [63] Wang X, Gao QQ, Bao J. Enhancement of furan aldehydes conversion in *Zymomonas mobilis* by elevating dehydrogenase activity and cofactor regeneration. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, 10: 24.
- [64] Mindt M, Heuser M, Wendisch VF. Xylose as preferred substrate for sarcosine production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*. 2019, 281: 135-142.
- [65] Li N, Xu S, Du GC, et al. Efficient production of L-homoserine in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 by redistribution of metabolic flux. *Biochemical Engineering Journal*. 2020, 161: 107665.
- [66] Zhou PP, Khushk I, Gao QQ, et al. Tolerance and transcriptional analysis of *Corynebacterium glutamicum* on biotransformation of toxic furaldehyde and benzaldehyde inhibitory compounds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2019, 46: 951-963.
- [67] Zhou PP, Yao RM, Zhang HS, et al. Unique glucose oxidation catalysis of *Gluconobacter oxydans* constitutes an efficient cellulosic gluconic acid fermentation free of inhibitory compounds disturbance. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019, 116(9): 2191-2199.
- [68] Zhou XL, Zhou X, Huang L, et al. Efficient coproduction of gluconic acid and xylonic acid from lignocellulosic hydrolysate by Zn(II)-selective inhibition on whole-cell catalysis by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 243: 855-859.
- [69] Yao RM, Hou WL, Bao J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 244: 1188-1192.
- [70] Li YC, Gou ZX, Zhang Y, et al. Inhibitor tolerance of a recombinant flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain during glucose and xylose co-fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017, 48(4): 791-800.
- [71] Bellido C, Bolado S, Coca M, et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(23): 10868-10874.
- [72] Ko JK, Um Y, Lee SM. Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress. *Bioresource Technology*. 2016, 222: 422-430.
- [73] Xu J, Chen YQ, Zhang HJ, et al. Effect of acetic acid on citric acid fermentation in an

- integrated citric acid-methane fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 174(1): 376-387.
- [74] Sun Y, Cheng JJ. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2005, 96(14): 1599-1606.
- [75] Saa JM, Morey J, Rubido C. An oxidative-degradation approach to para-quinones. *Journal of Organic Chemistry*. 1986, 51(23): 4471-4473.
- [76] Xie R, Tu MB, Elder T. Substituent effect of phenolic aldehyde inhibition on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Energy & Fuels*. 2016, 30(4): 3078-3084.
- [77] Gu HQ, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(9): 1770-1782.
- [78] Zhou PP, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodegradation. *Bioresource Technology*. 2017, 224: 563-572.
- [79] Stagge S, Cavka A, Jonsson LJ. Identification of benzoquinones in pretreated lignocellulosic feedstocks and inhibitory effects on yeast. *AMB Express*. 2015, 5: 9.
- [80] Qiu ZY, Fang C, He NL, et al. An oxidoreductase gene *ZMO1116* enhances the p-benzoquinone biodegradation and chiral lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Biotechnology*. 2020, 323: 231-237.
- [81] Aslan E, Guler C, Adem S. In vitro effects of some flavonoids and phenolic acids on human pyruvate kinase isoenzyme M2. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016, 31(2): 314-317.
- [82] Beloborodova N, Bairamov I, Olenin A, et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *Journal of Biomedical Science*. 2012, 19: 89.
- [83] Perrone GG, Tan SX, Dawes IW. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 2008, 1783(7): 1354-1368.
- [84] Lee YS. Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. *Archives of Pharmacal Research*. 2005, 28(10): 1183-1189.
- [85] Fedotcheva NI, Kazakov RE, Kondrashova MN, et al. Toxic effects of microbial phenolic acids on the functions of mitochondria. 2008, 180(3): 182-188.
- [86] Lindsey RH, Bromberg KD, Felix CA, et al. 1,4-Benzoquinone is a topoisomerase II poison. *Biochemistry*. 2004, 43(23): 7563-7574.
- [87] Philbrook NA, Winn LM. Benzoquinone toxicity is not prevented by sulforaphane in CD-1 mouse fetal liver cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2016, 36(8): 1015-1024.
- [88] Adeboye PT, Bettiga M, Aldaeus F, et al. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14: 149.
- [89] Shen XH, Jiang CY, Huang Y, et al. Functional identification of novel genes involved in the glutathione-independent gentisate pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied*

- and Environmental Microbiology. 2005, 71(7): 3442-3452.
- [90] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? Applied Microbiology and Biotechnology. 2012, 95(1): 77-89.
- [91] Ni B, Zhang Y, Chen DW, et al. Assimilation of aromatic compounds by *Comamonas testosteroni*: characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013, 97(13): 6031-6041.
- [92] Qi SW, Chaudhry MT, Zhang Y, et al. Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis via fructose-1,6-bisphosphatase. Proteomics. 2007, 7(20): 3775-3787.
- [93] Hu MS, Wang J, Gao QQ, et al. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. Journal of Biotechnology. 2018, 281: 81-86.
- [94] Takenaka S, Koshiya J, Okugawa S, et al. Fe-superoxide dismutase and 2-hydroxy-1,4-benzoquinone reductase preclude the auto-oxidation step in 4-aminophenol metabolism by *Burkholderia sp.* strain AK-5. Biodegradation. 2011, 22(1): 1-11.
- [95] Wang J, Gao QQ, Zhang HZ, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. Bioresource Technology. 2016, 218: 892-901.
- [96] Kitichantaropas Y, Boonchird C, Sugiyama M, et al. Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. AMB Express. 2016, 6: 107.
- [97] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. Biotechnology for Biofuels. 2013, 6: 9.
- [98] Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. Molecular Cell. 2010, 40(2): 253-266.
- [99] Szalay MS, Kovacs IA, Korcsmaros T, et al. Stress-induced rearrangements of cellular networks: consequences for protection and drug design. FEBS Letters. 2007, 581(19): 3675-3680.
- [100] Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, et al. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. Trends in Cell Biology. 2010, 20(2): 79-91.
- [101] Welch WJ, Suhan JP. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. The Journal of Cell Biology. 1985, 101(4): 1198-1211.
- [102] Vogel JL, Parsell DA, Lindquist S. Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. Current Biology. 1995, 5(3): 306-317.
- [103] Merret R, Nagarajan VK, Carpentier MC, et al. Heat-induced ribosome pausing triggers mRNA co-translational decay in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Research. 2015, 43(8): 4121-4132.

- [104] Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012, 190(4): 1157-1195.
- [105] Gao LM, Liu YQ, Sun H, et al. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121(6): 599-606.
- [106] Lindquist S, Kim G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, 93(11): 5301-5306.
- [107] Lindquist S. The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*. 1986, 55: 1151-1191.
- [108] Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, 62(6): 670-684.
- [109] Li J, Richter K, Buchner J. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011, 18(1): 61-68.
- [110] Suhane T, Laskar S, Advani S, et al. Both the charged linker region and ATPase domain of Hsp90 are essential for Rad51-dependent DNA repair. *Eukaryotic Cell*. 2015, 14(1): 64-77.
- [111] White HE, Orlova EV, Chen SX, et al. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure*. 2006, 14(7): 1197-1204.
- [112] Welker S, Rudolph B, Frenzel E, et al. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. *Molecular Cell*. 2010, 39(4): 507-520.
- [113] Carvalho AL, Cardoso FS, Bohn A, et al. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(12): 4189-4199.
- [114] Wang RM, Li N, Zheng K, et al. Enhancing acid tolerance of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM with trehalose. *FEMS Microbiology Letters*. 2018, 35(19): fny217.
- [115] Hottiger T, De Virgilio C, Hall MN, et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *European Journal of Biochemistry*. 1994, 219(1-2): 187-193.
- [116] Serrano R, Culiánz-Macia FA, Moreno V. Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae*. 1999, 78(1-4): 261-269.
- [117] Voit EO. Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology*. 2003, 223(1): 55-78.
- [118] Eleutherio E, Panek A, De Mesquita JF, et al. Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current Genetics*. 2015, 61(3): 263-274.
- [119] Trevisol ETV, Panek AD, De Mesquita JF, et al. Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Biochimica Et Biophysica*

- Acta-General Subjects. 2014, 1840(6): 1646-1650.
- [120] Neves MJ, Jorge JA, Francois JM, et al. Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. FEBS letters. 1991, 283(1): 19-22.
- [121] Lopienska-Biernat E, Stryinski R, Dmitryjuk M, et al. Infective larvae of *Anisakis simplex* (*Nematoda*) accumulate trehalose and glycogen in response to starvation and temperature stress. Biology Open. 2019, 8(3): bio040014.
- [122] Ayer A, Sanwald J, Pillay BA, et al. Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. Plos One. 2013, 8(6): 13.
- [123] Serrano R. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. Current topics in cellular regulation. 1984, 23: 87-126.
- [124] Li JR, Yu P. Expression of Cu, Zn-superoxide dismutase gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* and its resistance to oxidative stress. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2007, 136(1): 127-139.
- [125] Wood ZA, Schroder E, Harris JR, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends in Biochemical Sciences. 2003, 28(1): 32-40.
- [126] Baek SH, Kwon EY, Kim YH, et al. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016, 100(6): 2737-2748.
- [127] Park HJ, Bae JH, Ko HJ, et al. Low-pH production of D-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. Biotechnology and Bioengineering. 2018, 115(9): 2232-2242.
- [128] Cubas-Cano E, Gonzalez-Fernandez C, Tomas-Pejo E. Evolutionary engineering of *Lactobacillus pentosus* improves lactic acid productivity from xylose-rich media at low pH. Bioresource Technology. 2019, 288: 121540.
- [129] Park JS, Kim JE, Kim KS. Acid resistance and acid adaptation responses of foodborne *Escherichia coli* isolates. Journal of Food Safety. 2017, 37(4): e12352.
- [130] Wang Y, Li Y, Pei X, et al. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. Journal of Biotechnology. 2007, 129(3): 510-515.
- [131] Weusthuis RA, Mars AE, Springer J, et al. *Monascus ruber* as cell factory for lactic acid production at low pH. Metabolic Engineering. 2017, 42: 66-73.
- [132] Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey RG. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. Fems Microbiology Letters. 2004, 238(2): 291-295.
- [133] Wu CD, Zhang J, Wang M, et al. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2012, 39(7): 1031-1039.
- [134] Hang HY, Fox MH. Low pH suppresses synthesis of heat-shock proteins and thermotolerance. Radiation Research. 1994, 140(1): 24-30.
- [135] Cotter PD, Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH.

- Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2003, 67(3): 429.
- [136] Long A, Wei-Lin Huang WL, Qi YQ, et al. Low pH effects on reactive oxygen species and methylglyoxal metabolisms in citrus roots and leaves. BMC Plant Biology. 2019, 19: 477.
- [137] van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, et al. Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 2002, 82(1-4): 187-216.
- [138] Wu CD, Huang J, Zhou RQ. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013, 98(3): 1055-1063.
- [139] Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, et al. Growth of probiotic *Lactobacilli* in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. Microbiology-Sgm. 2007, 153: 291-299.
- [140] Yang X, Hang XM, Zhang M, et al. Relationship between acid tolerance and cell membrane in *Bifidobacterium*, revealed by comparative analysis of acid-resistant derivatives and their parental strains grown in medium with and without Tween 80. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015, 99(12): 5227-5236.
- [141] Futai M, Noumi T, Maeda M. ATP synthase (H^+ -ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. Annual review of biochemistry. 1989, 58: 111-136.
- [142] Konings WN. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 2002, 82(1-4): 3-27.
- [143] Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H^+ -ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. International Journal of Food Microbiology. 2004, 93(1): 109-113.
- [144] Miwa T, Abe T, Fukuda S, et al. Effect of reduced H^+ -ATPase activity on acid tolerance in *Streptococcus bovis* mutants. Anaerobe. 2000, 6(3): 197-203.
- [145] Budin-Verneuil A, Maguin E, Ehrlich SD, et al. An essential role for arginine catabolism in the acid tolerance of *Lactococcus lactis* MG1363. Lait. 2004, 84(1-2): 61-68.
- [146] Rollan G, Lorca GL, Font de Valdez G. Arginine catabolism and acid tolerance response in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough. Food Microbiology. 2003, 20(3): 313-319.
- [147] Guerzoni ME, Lanciotti R, Cocconcelli PS. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. Microbiology-Sgm. 2001, 147: 2255-2264.
- [148] Griswold AR, Chen YYM, Burne RA. Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. Journal of Bacteriology. 2004, 186(6): 1902-1904.
- [149] del Rio B, Linares DM, Ladero V, et al. Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015, 99(2): 897-905.
- [150] Chen YYM, Burne RA. Identification and characterization of the nickel uptake system

- for urease biogenesis in *Streptococcus salivarius* 57.1. *Journal of Bacteriology*. 2003, 185(23): 6773-6779.
- [151] Chen YYM, Weaver CA, Burne RA. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. *Journal of Bacteriology*. 2000, 182(16): 4667-4669.
- [152] Su MS, Schlicht S, Ganzle MG. Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10: 12.
- [153] Teixeira JS, Seeras A, Sanchez-Maldonado AF, et al. Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*. 2014, 42: 172-180.
- [154] Higuchi T, Hayashi H, Abe K. Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of Bacteriology*. 1997, 179(10): 3362-3364.
- [155] Zhu ZM, Ji XM, Wu ZM, et al. Improved acid-stress tolerance of *Lactococcus lactis* NZ9000 and *Escherichia coli* BL21 by overexpression of the anti-acid component *recT*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2018, 45(12): 1091-1101.
- [156] Lim EM, Ehrlich SD, Maguin E. Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*. *Electrophoresis*. 2000, 21(12): 2557-2561.
- [157] Li Y, Hugenholz J, Abee T, et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(10): 5739-5745.
- [158] Zhang J, Fu RY, Hugenholz J, et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(16): 5268-5275.
- [159] Godara A, Kao KC. Adaptive laboratory evolution for growth coupled microbial production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2020, 36(11): 175.
- [160] Gong ZW, Nielsen J, Zhou YJJ. Engineering robustness of microbial cell factories. *Biotechnology Journal*. 2017, 12(10): 1700014.
- [161] Kim SK, Groom J, Chung D, et al. Expression of a heat-stable NADPH-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E in *Clostridium thermocellum* 1313 results in increased hydroxymethylfurfural resistance. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, 10: 66.
- [162] Qiu ZQ, Deng ZJ, Tan HM, et al. Engineering the robustness of *Saccharomyces cerevisiae* by introducing bifunctional glutathione synthase gene. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2015, 42(4): 537-542.
- [163] Sundstrom L, Larsson S, Jonsson LJ. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in the resistance to phenolic fermentation inhibitors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 161(1-8): 106-115.
- [164] Dong ZX, Chen XL, Cai K, et al. Overexpression of the *Bacillus licheniformis* GroES enhances thermotolerance of *Bacillus subtilis* WB600. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2018, 32(6): 1527-1532.
- [165] Xu K, Yu LP, Bai WX, et al. Construction of thermo-tolerant yeast based on an artificial protein quality control system (APQC) to improve the production of bio-ethanol. *Chemical Engineering Science*. 2018, 177: 410-416.
- [166] Khatun MM, Yu X, Kondo A, et al. Improved ethanol production at high temperature by

- consolidated bioprocessing using *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered with artificial zinc finger protein. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1447-1454.
- [167] Xu K, Gao LM, Hassan JU, et al. Improving the thermo-tolerance of yeast base on the antioxidant defense system. *Chemical Engineering Science*. 2018, 175: 335-342.
- [168] Jia HY, Sun XY, Sun H, et al. Intelligent microbial heat-regulating engine (IMHeRE) for improved thermo-robustness and efficiency of bioconversion. *ACS Synthetic Biology*. 2016, 5(4): 312-320.
- [169] Sun H, Jia HY, Li J, et al. Rational synthetic combination genetic devices boosting high temperature ethanol fermentation. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017, 2(2): 121-129.
- [170] An MZ, Tang YQ, Mitsumasu K, et al. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase. *Biotechnology Letters*. 2011, 33(7): 1367-1374.
- [171] Trip H, Mulder NL, Lolkema JS. Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287(14): 11195-11204.
- [172] Wu CD, Zhang J, Du GC, et al. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress. *Bioresource Technology*. 2013, 143: 238-241.
- [173] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution--harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22(4): 590-594.
- [174] Stella RG, Wiechert J, Noack S, et al. Evolutionary engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Journal*. 2019, 14(9): e1800444.
- [175] Lee S, Kim P. Current Status and applications of adaptive laboratory evolution in industrial microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020, 30(6): 793-803.
- [176] Li XY, Yuan YZ, Cheng DJ, et al. Exploring stress tolerance mechanism of evolved freshwater strain *Chlorella sp.* S30 under 30g/L salt. *Bioresource Technology*. 2018, 250: 495-504.
- [177] Koppram R, Albers E, Olsson L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5: 32.
- [178] Aguilera J, Andreu P, Rande-Gil F, et al. Adaptive evolution of baker's yeast in a dough-like environment enhances freeze and salinity tolerance. *Microbial Biotechnology*. 2010, 3(2): 210-221.
- [179] Ying BW, Matsumoto Y, Kitahara K, et al. Bacterial transcriptome reorganization in thermal adaptive evolution. *BMC Genomics*. 2015, 16: 802.
- [180] Liu ZJ, Radi M, Mohamed ETT, et al. Adaptive laboratory evolution of *Rhodospiridium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution. *Bioresource Technology*. 2021, 333: 125171.

- [181] Peris D, Moriarty RV, Alexander WG, et al. Hybridization and adaptive evolution of diverse *Saccharomyces* species for cellulosic biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, 10: 78.
- [182] Alves RF, Zetty-Arenas AM, Demirci H, et al. Enhancing acetic acid and 5-hydroxymethyl furfural tolerance of *C. saccharoperbutylacetonicum* through adaptive laboratory evolution. *Process Biochemistry*. 2021, 101: 179-189.
- [183] Zhou LL, Xu ZX, Wen ZQ, et al. Combined adaptive evolution and transcriptomic profiles reveal aromatic aldehydes tolerance mechanisms in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2021, 329: 124910.
- [184] Kurosawa K, Laser J, Sinskey AJ. Tolerance and adaptive evolution of triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* to lignocellulose-derived inhibitors. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 76.
- [185] Wang X, Khushk I, Xiao YQ, et al. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(1): 377-388.
- [186] Hu XC, Tang XY, Bi ZQ, et al. Adaptive evolution of microalgae *Schizochytrium sp.* under high temperature for efficient production of docosahexaenoic acid. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 2021, 54: 9.
- [187] Kishimoto T, Iijima L, Tatsumi M, et al. Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution. *Plos Genetics*. 2010, 6(10): 10.
- [188] Garcia-Rios E, Lairon-Peris M, Muniz-Calvo S, et al. Thermo-adaptive evolution to generate improved *Saccharomyces cerevisiae* strains for cocoa pulp fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2021, 342: 109077.
- [189] Oide S, Gunji W, Moteki Y, et al. Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81(7): 2284-2298.
- [190] Randez-Gil F, Prieto JA, Rodriguez-Puchades A, et al. Myriocin-induced adaptive laboratory evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* reveals its potential to remodel lipid composition and heat tolerance. *Microbial Biotechnology*. 2020, 13(4): 1066-1081.
- [191] Zhang WM, Tao YX, Wu M, et al. Adaptive evolution improves acid tolerance and succinic acid production in *Actinobacillus succinogenes*. *Process Biochemistry*. 2020, 98: 76-82.
- [192] Ju SY, Kim JH, Lee PC. Long-term adaptive evolution of *Leuconostoc mesenteroides* for enhancement of lactic acid tolerance and production. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 240.
- [193] Ai C, McCarthy S, Eckrich V, et al. Increased acid resistance of the archaeon *Metallosphaera sedula* by adaptive laboratory evolution. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016, 43(10): 1455-1465.

- [194] Valli M, Sauer M, Branduardi P, et al. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(8): 5492-5499.
- [195] Zhang J, Wu CD, Du GC, et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012, 17(2): 283-289.
- [196] He YQ, Fang ZH, Zhang J, et al. De-ashing treatment of corn stover improves the efficiencies of enzymatic hydrolysis and consequent ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2014, 169: 552-558.
- [197] Sewalt VJH, Fontenot JP, Allen VG, et al. Fiber composition and in vitro digestibility of corn stover fractions in response to ammonia treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, 44(10): 3136-3142.
- [198] Ahmed F, Yan Z, Bao J. Dry biotreatment of acid pretreated wheat straw for cellulosic ethanol fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*. 2019, 6(1): 24.
- [199] Xie YJ, Hu Q, Feng GD, et al. Biotreatment of phenolic inhibitors from lignocellulose pretreatment using *Kurthia huakuii* LAM0618(T) and subsequent lactic acid fermentation. *Molecules*. 2018, 23(10): 17.
- [200] Mária M, Štefa V, Alexandra P. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass*. 1990, 23(2): 149-154.
- [201] Lee KM, Kalyani D, Tiwari MK, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2012, 123: 636-645.
- [202] Franden M, Pilath HM, Mohagheghi A, et al. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 99.
- [203] Westman JO, Taherzadeh MJ, Franzen CJ. Inhibitor tolerance and flocculation of a yeast strain suitable for second generation bioethanol production. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2012, 15(3): 14.
- [204] Brandt BA, Jansen T, Gorgens JF, et al. Overcoming lignocellulose-derived microbial inhibitors: advancing the *Saccharomyces cerevisiae* resistance toolbox. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. 2019, 13(6): 1520-1536.
- [205] FazeliNejad S, Brandberg T, Lennartsson PR, et al. Inhibitor tolerance: a comparison between *Rhizopus sp* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresources*. 2013, 8(4): 5524-5535.
- [206] LaPanse AJ, Krishnan A, Posewitz MC. Adaptive laboratory evolution for algal strain improvement: methodologies and applications. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 2021, 53: 13.
- [207] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution-principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12: 17.
- [208] Lv ZY, Zhou J, Zhang Y, et al. Techniques for enhancing the tolerance of industrial microbes to abiotic stresses: a review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2020,

- 67(1): 73-81.
- [209] Arora N, Yen HW, Philippidis GP. Harnessing the power of mutagenesis and adaptive laboratory evolution for high lipid production by oleaginous microalgae and yeasts. *Sustainability*. 2020, 12(12): 27.
- [210] Dunn KL, Rao CV. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(11): 2228-2240.
- [211] Panesar PS, Marwaha SS, Kennedy JF. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2006, 81(4): 623-635.
- [212] He MX, Wu B, Shui ZX, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(1): 189-199.
- [213] Franden MA, Pienkos PT, Zhang M. Development of a high-throughput method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*. 2009, 144(4): 259-267.
- [214] Dong HW, Fan LQ, Luo ZC, et al. Improvement of ethanol productivity and energy efficiency by degradation of inhibitors using recombinant *Zymomonas mobilis* (pHW20a-fdh). *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110(9): 2395-2404.
- [215] Ran H, Zhang J, Gao QQ, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resiniae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 51.
- [216] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618. Golden CO: National Renewable Energy Laboratory. 2012.
- [217] Zhang J, Wang X, Chu DQ, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.
- [218] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. AP-006. NREL. Analytical Procedure. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. 1996.
- [219] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [220] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1-2): 248-256.
- [221] Zhang Q, Bao J. Industrial cellulase performance in the simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of corn stover for high-titer ethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*. 2017, 4: 11.
- [222] Zhang J, Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresource Technology*. 2012, 116: 74-79.
- [223] Xia J, Liu CG, Zhao XQ, et al. Contribution of cellulose synthesis, formation of fibrils and their entanglement to the self-flocculation of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and*

- Bioengineering. 2018, 115(11): 2714-2725.
- [224] Yi X, Lin L, Mei J, et al. Transporter proteins in *Zymomonas mobilis* contribute to the tolerance of lignocellulose-derived phenolic aldehyde inhibitors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2021, 1(1): 1-11.
- [225] Agrawal R, Verma A, Singhania RR, et al. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2021, 332: 12.
- [226] Hidayatullah IM, Setiadi T, Kresnowati M, et al. Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic material. *Bioresource Technology*. 2020, 300: 5.
- [227] Wozniak JC, Dimmel DR, Malcolm EW. The generation of quinones from lignin and lignin-related compounds. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 1989, 9: 491-511.
- [228] Larsson S, Quintana-Sainz A, Reimann A, et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, 84-6: 617-632.
- [229] Lee SK, Chung SM, Lee MY, et al. The roles of ATP and calcium in morphological changes and cytotoxicity induced by 1,4-benzoquinone in platelets. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2002, 1569(1-3): 159-166.
- [230] Irons RD. Quinones as toxic metabolites of benzene. *Journal of toxicology and environmental health*. 1985, 16(5): 673-678.
- [231] Li HX, Shen Y, Wu ML, et al. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresources and Bioprocess*. 2016, 3(1): 51.
- [232] Zhang HS, Liu G, Zhang J, et al. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 123-131.
- [233] Godan TK, Rajesh RO, Loreni PC, et al. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural by *Acinetobacter oleivorans* S27 for the synthesis of furan derivatives. *Bioresource Technology*. 2019, 282: 88-93.
- [234] Yang SH, Pappas KM, Hauser LJ, et al. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nature Biotechnology*. 2009, 27: 893-894.
- [235] Yang SH, Vera JM, Grass J, et al. Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 20.
- [236] Olofsson K, Bertilsson M, Liden G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1(1): 7.
- [237] Liu G, Bao J. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing wastewater generation and energy consumption: Competing with corn ethanol. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 18-26.
- [238] Choudhary J, Singh S, Nain L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous

- saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2016, 21: 82-92.
- [239] Brown L, Torget R. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)-009; NREL: Golden, CO. Report NREL/TP-510-42629. 1996.
- [240] Techaparin A, Thanonkeo P, Klanrit P. Gene expression profiles of the thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KKU-VN8 during high-temperature ethanol fermentation using sweet sorghum juice. *Biotechnology Letters*. 2017, 39(10): 1521-1527.
- [241] Feng X, He CY, Jiao LX, et al. Analysis of differential expression proteins reveals the key pathway in response to heat stress in *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922(T). *Food Microbiology*. 2019, 80: 77-84.
- [242] Liu B, Qian SB. Translational reprogramming in cellular stress response. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*. 2014, 5(3): 301-315.
- [243] Rikhvanov EG, Varakina NN, Rusaleva TM, et al. Sodium azide reduces the thermotolerance of respiratively grown yeasts. *Current Microbiology*. 2002, 45(6): 394-399.
- [244] Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Journal*. 2011, 27(1): 441-464.
- [245] Rellinger EJ, Craig BT, Alvarez AL, et al. FX11 inhibits aerobic glycolysis and growth of neuroblastoma cells. *Surgery*. 2017, 161(3): 747-752.
- [246] Lee YJ, Hoe KL, Maeng PJ. Yeast cells lacking the *CIT1*-encoded mitochondrial citrate synthase are hypersusceptible to heat- or aging-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2007, 18(9): 3556-3567.
- [247] Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6: 27.
- [248] Giro M, Ceccoli RD, Poli HO, et al. An in vivo system involving co-expression of cyanobacterial flavodoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase confers increased tolerance to oxidative stress in plants. *Febs Open Bio*. 2011, 1: 7-13.
- [249] Cha JY, Barman DN, Kim MG, et al. Stress defense mechanisms of NADPH-dependent thioredoxin reductases (NTRs) in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2015, 10(5): 3.
- [250] Zhao MX, Wen JL, Wang L, et al. Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. *Cell Stress & Chaperones*. 2019, 24(3): 609-619.
- [251] Ge XY, Xu Y, Chen X. Improve carbon metabolic flux in *Saccharomyces cerevisiae* at high temperature by overexpressed TSL1 gene. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2013, 40(3-4): 345-352.
- [252] Abdel-Rahman MA, Sonomoto K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of Biotechnology*. 2016, 236: 176-192.
- [253] Dusselier M, Van Wouwe P, Dewaele A, et al. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energy & Environmental Science*. 2013,

- 6(5).
- [254] Kumar A, Thakur A, Panesar PS. Lactic acid and its separation and purification techniques: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019, 18(4): 823-853.
- [255] Meng KX, Zhang GY, Ding CQ, et al. Recent advances on purification of lactic acid. *The Chemical Record*. 2020, 20(11): 1236-1256.
- [256] Li CL, Gao M, Zhu WB, et al. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth. *Process Biochemistry*. 2021, 104: 142-151.
- [257] Komesu A, Maciel MRW, Maciel R. Separation and purification technologies for lactic acid - a brief review. *Bioresources*. 2017, 12(3): 6885-6901.
- [258] Liaud N, Rosso MN, Fabre N, et al. L-lactic acid production by *Aspergillus brasiliensis* overexpressing the heterologous *ldha* gene from *Rhizopus oryzae*. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14: 66.
- [259] Papadimitriou K, Alegria A, Bron PA, et al. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016, 80(3): 837-890.
- [260] Ahn YT, Kim YH, Jung EJ, et al. Resistance of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* isolated from fermented milk products to low pH and bile acid. *Korean Journal of Animal Science*. 1999, 41(3): 335-342.
- [261] Hartwell LH. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological reviews*. 1974, 38(2): 164-198.
- [262] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015, 10(6): 845-858.
- [263] Wang YB, Ping L, Luan XD, et al. A mutation in VWA1, encoding von willebrand factor a domain-containing protein 1, is associated with hemifacial microsomia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, 8: 571004.
- [264] Managbanag JR, Torzilli AP. An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*. 2002, 94(3): 384-391.
- [265] Lin PA, Hefter K, Ho KC. Modification of membrane function, protein synthesis, and heat killing effect in cultured Chinese hamster cells by glycerol and D2O1. *Cancer Research*. 1984, 44: 5776-5784.
- [266] BREEUWER P, DROCOURT JL, ROMBOUTS FM, et al. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)- carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62(1): 178-183.
- [267] Ryu AJ, Kim TY, Yang DS, et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced production of L-lactic acid by co-expression of acid-stable glycolytic enzymes from *Picrophilus torridus*. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2018, 35(8): 1673-1679.

学术成果

已发表论文:

1. **Zhao Yan**, Jian Zhang, Jie Bao*. Increasing cellulosic ethanol production by enhancing phenolic tolerance of *Zymomonas mobilis* in adaptive evolution. **Bioresource Technology**. 2021, 329: 124926. (SCI IF=7.539, 对应本论文第二章)
2. **Zhao Yan**[#], Xiaochuang Gao[#], Qiuqiang Gao, Jie Bao*. Mechanism of tolerance to the lignin-derived inhibitor p-benzoquinone and metabolic modification of biorefinery fermentation strains. **Applied and Environmental Microbiology**. 2019, 85(22): e01443-19. (SCI IF=4.792, 对应本论文第三章)
3. Faryal Ahmed[#], **Zhao Yan**[#], Jie Bao*. Dry biorefinery of acid pretreated wheat straw for cellulosic ethanol fermentation. **Bioresources and Bioprocessing**. 2019, 6:24. (SCI IF=4.578)

准备发表论文:

1. **Zhao Yan**[#], Mesfin Gebrekidan[#], Xia Yi, Jie Bao. Very high thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* acquired by adaptive evolution under mild temperature and the consequent cellulosic ethanol fermentation. 已投稿. (对应本论文第四章)
2. **Zhao Yan**, Mingxing Chen, Jia Jia, Jie Bao. A preliminary study on increasing acid tolerance of L-lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici*. In preparation. (对应本论文第五章)

申请专利:

鲍杰, 颜钊, Mesfin Gebrekidan, 张建。一株耐高温的生产纤维素乙醇的酿酒酵母菌株及其应用。专利申请号: 201911195376.1。

学术会议论文:

1. **Zhao Yan**, Jie Bao. Dry biorefining technology for production of cellulosic ethanol. BBChina project. Rostock, Germany, June 2019. (Oral presentation)
2. **Zhao Yan**, Jie Bao. Mechanism of tolerance to the lignin-derived inhibitor p-benzoquinone and metabolic modification of biorefinery fermentation strains. The 14th Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019). Taiwan, China, July 2019. (Poster)

致谢

值此定稿之际，感触颇多。五年的研究生学习充满了艰辛，但更重要的是也收获了成长和快乐。感谢龚老师推荐我来鲍老师这边读研究生，让我能够在一个学术氛围浓郁、互助友爱、充满欢乐的实验室进行学习。我的成长离不开实验室各位老师、师兄师姐的教导和关怀，离不开师弟师妹们的热心帮助，也离不开家人和朋友的无私支持。

首先，我要感谢我的导师鲍杰教授对我的科研以及生活的指导与帮助。鲍老师学识渊博、热心科研、治学严谨，对于学生的实验和研究进展非常上心，即使再忙每周都会抽出时间为每一位同学进行科研的指导，他的这份对科研的热情和学生的关怀深深感染着我。我的写作能力不是很好，鲍老师会耐心地对我进行指导，不厌其烦地提醒我在写作中需要注意的问题。在此，祝愿鲍老师及其家人身体安康、阖家幸福。

其次，感谢张建老师以及易霞老师对我实验以及论文的指导和帮助。张建老师在我刚进实验室的时候为我的实验和生活上提供了大量的指导，让我能够很快融入实验室生活。易老师为人随和，对待科研一丝不苟，每次我有疑问都会为我耐心解答，对我的转录组分析和论文撰写提供了帮助和支持，让我获益匪浅。

感谢邱忠洋师兄、周平平师姐以及韩煦身师兄对我实验的指导与帮助。邱师兄、平平师姐以及韩师兄平易近人，对待科研严谨认真，是我要学习的榜样。感谢小创师兄对我运动发酵单胞菌方面工作的指导，我的顺利毕业离不开小创师兄的帮助。感谢张强师兄在我来实验室之后，细心地指导我的实验，给我提供了很大的助力。

另外，特别感谢赵瞭同学和邵帅师兄对我生活学习上的帮助，帮助组织了实验室的很多活动，为实验室带来了很多的欢乐。感谢金慈同学这五年来的帮助，金慈同学热心助人，教会了我很多代谢改造方面的知识，一起陪我度过了五年的科研生活。感谢董维涛、李莉以及柳云龙和我度过了三年快乐的硕士生活，感谢胡明珊师姐、阚家伦师姐、魏成香师兄、谌泽宇师兄、侯伟亮师兄以及周奇圣师兄对我学习生活上的帮助，感谢方纯、郑理想、黄振、李园园、卢敏萍、韩涛、张斌、刘琪、何妮玲、展宝睿、贾佳、孙鲁欢、华珂君、张翼、李静、陈明星、李景、吴雷、徐迎迎等同学在研究生期间的帮助。

最后，感谢我的父母、妹妹、姑姑以及女朋友，我的顺利毕业离不开你们在背后默默的支持，我会努力工作来回报你们的恩情。