

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 博士学位论文

乳酸片球菌工程菌协同代谢全谱

非葡萄糖单糖的机制与应用研究

何妮玲

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: 2024. 5. 24 论文答辩日期: 2024. 5. 29

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

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：何妮玲

日期：2024年6月2日

指导老师签名：

日期：2024年5月31日

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，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：何妮玲

2024 年 6 月 2 日

乳酸片球菌工程菌协同代谢全谱非葡萄糖单糖的机制与应用研究

摘要

生物基可降解材料聚乳酸是替代石油基塑料最重要的材料。聚乳酸生产所需的高光学纯度和高化学纯度的乳酸单体主要以粮食淀粉为碳源进行发酵生产，乳酸经过缩聚和解聚反应合成丙交酯，再经开环聚合反应合成高分子量聚乳酸。该聚乳酸生产工艺路线存在着生产成本高、造成粮食威胁的问题。因此，来源广泛、廉价易得和可再生的农作物秸秆等木质纤维素生物质是替代粮食淀粉的重要原料选择。但是，以木质纤维素原料合成乳酸和丙交酯的产业化应用仍然存在诸多关键技术障碍，如：（1）预处理过程中产生的抑制物不仅会降低发酵微生物的发酵效率，还会阻碍丙交酯的合成；（2）微生物对木质纤维素中木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖等非葡萄糖单糖的转化效率低下，导致全糖的不完全转化，不仅大幅降低了乳酸得率，残糖的存在还严重阻碍了丙交酯的合成，使得高纯度乳酸单体的获得必须进行高强度、高成本的下游纯化操作。据此，本论文一方面在干法生物炼制技术平台上，以生物脱毒方法实现高浓度抑制物的降解，以两株具有代谢木质纤维素来源所有单糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）能力的乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）工程菌为发酵菌株，实现了纤维素乳酸与淀粉来源的乳酸接近的高转化指标，并首次成功实现了纤维素丙交酯的合成；另一方面，对乳酸片球菌工程菌全糖协同代谢合成乳酸的机制进行了多层面的分析和验证，发现了一个特殊的糖转运蛋白在全糖协同代谢过程中发挥核心作用，并通过适应性进化、转录组分析、定点突变和代谢途径改造等手段，阐明了乳酸片球菌工程菌株的全糖协同代谢机制。

本论文第一部分针对严重影响纤维素乳酸纯度和产量的抑制物和残糖障碍，使用生物脱毒方法将高浓度的弱酸类、呋喃类和酚醛类抑制物降解为水和二氧化碳；使用具有全糖利用能力的 L-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY15，将木质纤维素来源的所有己糖（葡萄糖、甘露糖、半乳糖）和戊糖（木糖、阿拉伯糖）同步转化为 L-乳酸和 D-乳酸并使残糖浓度降至极低（1.2-1.6 g/L），实现了木质纤维素来源的全糖协同代谢合成目标产物的目标。以上措施解除了抑制物和残糖对于聚合级乳酸纯度和产量的负面影响。发酵得到的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸的产量达到~127 g/L、光学纯度达到 99.07%-99.60%，经过常规纯化步骤后，得到了符合聚合级要求的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸。

本论文第二部分以论文第一部分研究得到的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别作为聚合单体，测试了其合成纤维素 L-和 D-丙交酯的可行性。将纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别

经过缩聚和解聚反应来合成 L-丙交酯和 D-丙交酯，并对合成的纤维素丙交酯进行了结构和性质上的鉴定。纤维素 L-和 D-丙交酯的结构、性质和元素组成等各项指标均与淀粉来源的 L-和 D-丙交酯标品的特征一致，纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的手性纯度分别达到 98.99%和 99.99%。本研究首次实现了木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成，为木质纤维素生物质生产生物可降解的聚乳酸材料奠定了基础。

本论文第三部分针对乳酸片球菌工程菌 *P. acidilactici* ZY271 协同代谢己糖和戊糖全转化为乳酸的现象进行了机制解析。通过对 *P. acidilactici* 工程菌中的糖代谢和糖转运蛋白基因的转录水平分析，发现糖代谢步骤不是己糖和戊糖代谢的限速步骤，并成功挖掘到了一个转录水平显著上调的甘露糖转运蛋白基因簇 *manXYZ*；之后通过基因的敲除、弱化表达和基因转录水平分析，验证了 *manXYZ* 基因簇在己糖（葡萄糖和甘露糖）和戊糖（木糖和阿拉伯糖）的转运和磷酸化过程中的主导作用，证明了 *manXYZ* 是解除非葡萄糖单糖转运限速步骤的关键基因簇。本研究为揭示葡萄糖和非葡萄糖单糖协同代谢机制、解决非葡萄糖单糖的利用难题提供了解决思路和方法。

本论文第四部分针对第三部分发现的甘露糖转运蛋白基因簇 *manXYZ* 异常上调表达的现象进行了机制探索，证明了两个参与调控 *manXYZ* 表达的转录调控蛋白（CcpA 和 RS07020）中的氨基酸突变是造成 *manXYZ* 基因簇表达上调的关键因素。通过蛋白序列分析，发现特定进化途径获得的 *manXYZ* 表达上调突变菌株伴随着 CcpA 和 RS07020 转录调控蛋白突变；通过氨基酸的定点突变和基因转录水平分析，验证了 CcpA 蛋白的 T65I 突变和 RS07020 蛋白的 E159G 突变不仅对提高 *P. acidilactici* 中己糖和戊糖的共代谢速率起着极为重要的作用，而且是诱发 *manXYZ* 基因簇上调表达的关键突变。本研究阐明了乳酸片球菌工程菌的全糖协同代谢机制。

本论文第五部分针对高浓度钠离子抑制发酵细胞活性的问题，通过分别过表达 4 个异源的 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因，成功筛选得到了一株钠离子耐受性显著提高的乳酸片球菌工程菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)。与出发菌株相比，工程菌株在混合糖为碳源的合成培养基和麦秆酶水解糖化液中的乳酸钠产量提高了 24%-31%，最终 L-乳酸钠产量达到 121.1 g/L-132.4 g/L。基因转录分析结果表明，在高浓度钠离子的胁迫下，RS02775 基因的过表达使得 *P. acidilactici* 中负责葡萄糖和木糖磷酸化的基因的表达水平明显提高，有效缓解了钠离子对于糖磷酸化反应的抑制作用。本研究为高浓度的 L-乳酸钠发酵提供了一个有效方法。

综上所述，本论文针对严重影响聚合级的纤维素乳酸生产和丙交酯合成的抑制物和残糖障碍，一方面，以生物脱毒技术实现了高浓度抑制物的降解，以具有木质纤维素来源全糖协同代谢能力的乳酸片球菌工程菌为发酵菌株，实现了高浓度、高光学纯度的纤维素乳酸生产，使得残糖浓度降至很低，首次实现了木质纤维素来源的 L-和 D-丙交酯的合成；另一方面，对乳酸片球菌工程菌的全糖协同代谢合成乳酸的机制进行了深入挖掘，发现了一个特殊的甘露糖转运蛋白基因簇在全糖协同代谢过程中发挥核

心作用，阐明了乳酸片球菌工程菌株的全糖协同代谢机制，为解决其它生物炼制菌株的非葡萄糖的利用难题提供了解决思路和方法。

关键词：乳酸；全糖协同代谢机制；*manXYZ* 基因簇；转录调控蛋白突变；木质纤维素

Study on the Mechanism and Application of Simultaneous Metabolism of Full-spectrum Non-glucose Sugars by the Engineered *Pediococcus acidilactici*

Abstract

Biodegradable polylactic acid is the most important material to replace petroleum-based plastics. Lactic acid monomer with high optical and chemical purity required for polylactic acid production is mainly produced by fermentation using grain starch as carbon source. Lactide is synthesized by polycondensation and depolymerization of lactic acid, and polylactic acid with high molecular weight is synthesized by ring-opening polymerization of lactide. The problems of high production cost and food threat are existed in this production process of polylactic acid. Therefore, lignocellulosic biomass such as crop straw, which is widely available, cheap and renewable, is an important raw material choice to replace grain starch. However, there are still many key technical obstacles in the industrial application of synthesizing lactic acid and lactide from lignocellulosic biomass. The obstacles include: (i) The inhibitors produced in the pretreatment process not only reduce the fermentation efficiency of microorganisms, but also hinder the synthesis of lactide; (ii) The conversion efficiency of non-glucose sugars (xylose, arabinose, mannose and galactose) from lignocellulose by fermentation microorganisms is low, resulting in the incomplete conversion of sugars, which not only greatly reduces the lactic acid yield, but also seriously hinders the synthesis of lactide. The downstream purification step with high intensity and high cost is required to obtain the high-purity lactic acid monomer. Therefore, on the one hand, this paper realized the degradation of high-concentration inhibitors by biodegradation method on the dry process bio-refining technology platform; Two engineered *Pediococcus acidilactici* strains were used as fermentation strains, which possess the utilization capacity of full-spectrum sugars (glucose, xylose, arabinose, mannose and galactose) from lignocellulose, and achieved the production of cellulosic lactic acid with a high conversion index close to that of starch-derived lactic acid. The synthesis of cellulosic lactide was achieved successfully for the first time. On the other hand, the mechanism of simultaneous conversion of full-spectrum sugars to lactic acid by engineered *P. acidilactici* was analyzed and verified in multiple aspects, and a special sugar transporter was found to play a central role in simultaneous metabolism of full-spectrum sugars. The mechanism of simultaneous metabolism of full-spectrum sugars was elucidated by adaptive evolution, transcriptome analysis, site-specific mutation and metabolic pathway modification.

In the first part, in terms of the inhibitors seriously affecting the purity and yield of cellulosic lactic acid, a biodegradation method was used to degrade high concentration of weak acids, furans and phenolic inhibitors to water and carbon dioxide; The engineered *P. acidilactici* ZY271 for L-lactic acid fermentation and *P. acidilactici* ZY15 for D-lactic acid fermentation with full-spectrum sugar utilization capability were used to simultaneously

convert the hexose (glucose, mannose, galactose) and pentose (xylose, arabinose) from lignocellulose into L-lactic acid and D-lactic acid, and the residual sugar concentration was reduced to an extremely low level (1.2-1.6 g/L), achieving the goal of converting full-spectrum sugar from lignocellulose to target product. The above measures eliminated the negative influence of inhibitors and residual sugars on the purity and yield of polymerization-grade lactic acid. The titer of cellulosic L-lactic acid and D-lactic acid obtained by fermentation reached ~127 g/L, and the optical purity reached 99.07%-99.60%. After conventional purification, cellulosic L-lactic acid and D-lactic acid that meet the purity requirements for polymerization were obtained.

In the second part, the feasibility of synthesizing cellulosic L-lactide and D-lactide using cellulosic L-lactic acid and D-lactic acid as monomer was tested. Cellulosic L-lactide and D-lactide were synthesized by condensation and depolymerization reaction of cellulosic L-lactic acid and D-lactic acid, respectively. The structure and properties of the synthesized cellulosic lactide were identified. The structure, properties and elemental composition of cellulosic L- and D-lactide were consistent with the characteristics of the starch-derived L- and D-lactide standard samples. The chiral purity of cellulosic L-lactide and D-lactide was 98.99% and 99.99%, respectively. This study achieved the synthesis of L-lactide and D-lactide from lignocellulosic biomass for the first time, which laid a foundation for the production of biodegradable polylactic acid from lignocellulosic biomass.

In the third part, the mechanism of the simultaneous conversion of hexose and pentose into lactic acid by *P. acidilactici* ZY271 was analyzed. By analyzing the transcriptional levels of sugar metabolism and transporter genes in *P. acidilactici*, it was found that the sugar metabolism step was not the rate-limiting step of hexose and pentose metabolism, and a mannose transporter gene cluster *manXYZ* was discovered with significantly up-regulated expression. Then, *manXYZ* was verified to play a leading role in the transport and phosphorylation process of hexose (glucose and mannose) and pentose (xylose and arabinose) by gene knockout, weakened expression and transcriptional analysis. Therefore, *manXYZ* was proved to be the key gene cluster to remove the rate-limiting step of non-glucose sugar transport. This study provides a way to reveal the mechanism of simultaneous metabolism of glucose and non-glucose sugars, and provides solutions to solve the problem of non-glucose sugar utilization.

In the fourth part, we explored the mechanism of the up-regulated expression of *manXYZ* gene cluster found in the third part, and proved that the amino acid mutations in two transcriptional regulatory proteins (CcpA and RS07020) involved in the regulation of *manXYZ* expression are the key factors to cause the up-regulated expression of *manXYZ*. By the protein sequence analysis, it was found that the up-regulated expression of *manXYZ* in mutant strains obtained by specific adaptive evolution was accompanied by CcpA and RS07020 protein mutations. By site-specific mutation of amino acids and gene transcriptional analysis, T65I mutation in CcpA and E159G mutation in RS07020 protein were proved not only to play a very important role in increasing the co-utilization rate of hexose and pentose by *P. acidilactici*, but also to be the key mutations to induce up-regulation of *manXYZ* expression. This study clearly clarified the mechanism of simultaneous metabolism of full-spectrum sugars in the engineered

P. acidilactici.

In the fifth part, aiming at the problem of that high concentration of Na^+ inhibits the activity of fermentation cells, a engineered strain of *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) with significantly improved Na^+ tolerance was successfully screened by overexpression of four heterologous Na^+/H^+ antiporter genes. Compared with the original strain, the sodium lactate yield of the engineered strain increased by 24-31% in synthetic medium with mixed sugars as carbon source and wheat straw enzymatic hydrolysate, and the sodium lactate titer reached 121.1-132.4 g/L. The results of gene transcription analysis showed that the overexpression of RS02775 gene significantly increased the expression level of the genes responsible for glucose and xylose phosphorylation in *P. acidilactici* under the stress of high-titer Na^+ , effectively alleviating the inhibition of Na^+ on sugar phosphorylation reactions. This study provides an effective method for the fermentation of high-titer L-sodium lactate.

In summary, this paper aims at inhibitors and residual sugars that seriously affect the synthesis of cellulosic lactic acid and lactide. On the one hand, a biodegradation method was applied to achieve the degradation of high-titer inhibitors. The engineered *P. acidilactici* strains with the ability to metabolize full-spectrum sugars from lignocellulose were used as fermentation strains, and achieved the production of cellulosic lactic acid with high concentration and high optical purity. Also, the concentration of residual sugars was reduced to a very low level. The synthesis of lignocellulose-derived L- and D-lactide was realized for the first time. On the other hand, the mechanism of the simultaneous conversion of full-spectrum sugars into lactic acid by engineered *P. acidilactici* was deeply explored, and a special mannose transporter gene cluster was found to play a central role in the simultaneous metabolism process of full-spectrum sugars, clearly clarifying the mechanism of simultaneous metabolism of full-spectrum sugars by engineered *P. acidilactici*. This study provides a way to solve the problem of non-glucose sugar utilization in other biorefinery strains.

Key words: lactic acid; the simultaneous metabolism of full-spectrum sugars; *manXYZ* gene cluster; transcriptional regulatory protein mutation; lignocellulose

目录

第 1 章 前言	1
1.1 聚乳酸及其聚合单体乳酸和丙交酯	1
1.1.1 聚乳酸	1
1.1.2 乳酸	2
1.1.3 丙交酯	3
1.2 木质纤维素生物炼制生产聚合级乳酸面临的挑战	4
1.2.1 木质纤维素生物炼制	4
1.2.2 光学纯乳酸发酵与发酵微生物菌株	6
1.2.3 抑制物阻碍发酵微生物的生长和发酵	11
1.2.4 发酵微生物对非葡萄糖单糖的低效利用	11
1.2.5 金属离子对发酵的影响	12
1.2.6 木质纤维素的复杂组分对于聚合级乳酸纯度的影响	12
1.3 发酵微生物共利用己糖和戊糖的研究进展	13
1.3.1 改造微生物糖代谢路径的进展	13
1.3.2 改造微生物糖转运通道的进展	15
1.4 本论文的立题依据和主要研究内容	17
第 2 章 乳酸片球菌工程菌株共利用木质纤维素来源的己糖和戊糖生产纤维素 L-和 D-乳酸	19
2.1 引言	19
2.2 材料与方法	19
2.2.1 菌株、培养基和培养条件	19
2.2.2 酶和试剂	20
2.2.3 原料和生物炼制过程	20
2.2.4 光学纯 L-乳酸和 D-乳酸发酵	21
2.2.5 纤维素 L-乳酸和 D-乳酸的纯化	21
2.2.6 发酵产物的检测	22
2.2.7 乳酸纯化过程中的杂质检测	22
2.2.8 光学纯 L-和 D-乳酸的得率计算	22
2.2.9 L-乳酸和 D-乳酸的光学纯度检测	23
2.3 结果与讨论	23
2.3.1 利用生物脱毒真菌降解抑制物	23
2.3.2 <i>P. acidilactici</i> 工程菌的己糖和戊糖代谢能力探究	24

2.3.3	<i>P. acidilactici</i> 工程菌共利用合成培养基中的全糖生产 L-和 D-乳酸	26
2.3.4	<i>P. acidilactici</i> 工程菌共利用木质纤维素中的全糖生产 L-和 D-乳酸	27
2.3.5	纤维素 L-和 D-乳酸的纯化	31
2.4	本章小结	35
第 3 章	木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成	36
3.1	引言	36
3.2	材料与方法	36
3.2.1	试剂	36
3.2.2	L-和 D-丙交酯的合成及纯化	36
3.2.3	L-和 D-丙交酯的分析表征	37
3.3	结果与讨论	38
3.3.1	纤维素乳酸合成 L-和 D-丙交酯	38
3.3.2	L-和 D-丙交酯的鉴定	38
3.4	本章小结	43
第 4 章	乳酸片球菌工程菌株己糖和戊糖的全糖协同代谢机制解析	44
4.1	引言	44
4.2	材料与方法	46
4.2.1	菌株、培养基和培养条件	46
4.2.2	酶和试剂	47
4.2.3	质粒与重组菌株构建	47
4.2.4	原料与生物炼制过程	56
4.2.5	己糖和戊糖利用能力的发酵评估	56
4.2.6	荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析	56
4.2.7	HPLC 分析	57
4.3	结果与讨论	57
4.3.1	木糖适应性进化触发了 <i>P. acidilactici</i> 非葡萄糖单糖代谢路径的快速代谢	57
4.3.2	糖代谢步骤不是限制 <i>P. acidilactici</i> 己糖和戊糖共利用的关键步骤	61
4.3.3	糖转运蛋白基因簇 <i>manXYZ</i> 在 <i>P. acidilactici</i> ZY271 中呈现异常显著的表达上调	64
4.3.4	<i>manXYZ</i> 基因簇的转运功能在己糖和戊糖共利用发挥的关键作用	67
4.3.5	<i>manXYZ</i> 基因簇的磷酸化功能在己糖和戊糖共利用发挥的关键作用	72
4.4	本章小结	77
第 5 章	乳酸片球菌工程菌协同利用非葡萄糖单糖的关键转录调控因子的挖掘	78
5.1	引言	78

5.2 材料与方法	79
5.2.1 菌株、培养基与培养条件	79
5.2.2 酶与试剂	79
5.2.3 质粒与重组菌株构建	79
5.2.4 不同糖条件下的适应性进化实验	83
5.2.5 转录调控因子的基因序列测序和序列比对	83
5.2.6 己糖与戊糖共利用速率的发酵评估	83
5.2.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析	83
5.2.8 HPLC 分析	83
5.3 结果与讨论	84
5.3.1 适应性进化诱发转录调控蛋白的氨基酸突变	84
5.3.2 转录调控蛋白的氨基酸突变促进己糖和戊糖共利用	89
5.3.3 转录调控蛋白的氨基酸突变诱发 <i>manXYZ</i> 转录水平的上调	90
5.3.4 讨论	94
5.4 本章小结	95
第 6 章 构建 Na ⁺ 耐受性乳酸片球菌工程菌株以生产高浓度乳酸钠的研究	97
6.1 引言	97
6.2 材料与方法	98
6.2.1 菌株、培养基和培养条件	98
6.2.2 酶和试剂	98
6.2.3 表达质粒和重组菌株构建	98
6.2.4 原料和生物炼制过程	99
6.2.5 乳酸钠发酵	99
6.2.6 HPLC 分析	99
6.2.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析	99
6.3 结果与讨论	103
6.3.1 <i>P. acidilactici</i> 的 Na ⁺ 耐受能力考察	103
6.3.2 过表达 Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白基因以构建 Na ⁺ 耐受性重组菌株	103
6.3.3 在 Na ⁺ 胁迫下的 <i>P. acidilactici</i> 重组菌的糖代谢和乳酸生成基因的转录水平分析	108
6.4 本章小结	110
第 7 章 结论与展望	111
7.1 结论	111
7.2 创新点	112
7.3 展望	112

参考文献	114
附录 I	131
学术成果	132
致谢	133

第 1 章 前言

1.1 聚乳酸及其聚合单体乳酸和丙交酯

1.1.1 聚乳酸

塑料污染是 21 世纪面临的最严重和最紧迫的环境污染问题之一。石油基塑料的大量使用造成“白色污染”问题^[1], 更严重的是, 会导致大量 CO₂ 的排放, 加剧全球变暖^[2]。据统计, 2019 年石油基塑料生产导致 CO₂ 的释放量达到 8.5 亿 t, 到 2050 年, 预计塑料生产和焚烧产生的 CO₂ 排放量将达到 280 亿 t, 占全球 CO₂ 排放量的 10%-15%^[2]。作为世界上最大的碳排放国, 我国提出了“双碳”目标, 以减缓碳排放对环境造成的严重污染。研究表明, 将石油基塑料转向可再生能源供应的塑料可减少 62% 的 CO₂ 排放量^[3]。因此, 使用可再生、零碳甚至负碳排放的生物基聚合材料来替代石油基塑料, 是国家达到双碳目标的重要内容。

聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 是一种可再生、生物可降解、符合碳中和要求的高分子材料^[4], 目前被认为是最有希望替代传统的石油基塑料的聚合物材料, 也是近年来发展速度最快的生物可降解材料之一。聚乳酸具备很多优异的性能, 例如高机械强度、生物降解性、生物相容性、生物吸收性、节能性、低毒性和易加工性, 广泛应用于农业、医疗、包装和纺织品等多种行业^[5-9]。在包装行业, 被用作塑料袋、餐具和一次性打包盒等; 在农业方面, 被用作农业地膜和植物生长促进剂等; 在纺织品制造行业, 被用作纤维填充物和粘合剂纤维等; 在生物医学领域, 可以用于制造药物输送基质、可溶解的缝合线和手术滑钉等医疗材料^[9, 10]。

由于其聚合单体乳酸中的不对称碳原子的存在, 聚乳酸存在三种立体化学形式, 包括聚 L-丙交酯 (poly (L-lactide), PLLA)、聚 D, L-丙交酯 (poly (D, L-lactide), PDLLA) 和聚 D-丙交酯 (poly (D-lactide), PDLA)。目前, PLA 的聚合已经在许多研究中被报道, 其主要的三种合成方式是直接缩聚法、两步法和开环聚合法 (ring-opening polymerization, ROP) ^[11] (图 1.1)。直接缩聚法生成的 PLA 分子量低, 两步法 (如固态聚合法) 虽然能生成高分子量 PLA, 但由于涉及酯键水解过程, 受到缩聚平衡反应的限制^[12]。开环聚合法能够更精准地控制聚乳酸的相对分子质量, 得到高品质的聚乳酸。因此, 丙交酯的开环聚合是最常使用的 PLA 生产方法, 该方法是在高温、添加催化剂的条件下催化乳酸生成丙交酯, 进一步开环聚合生成聚乳酸。PLA 的主要生产商也采用开环聚合法, 例如处于世界领先水平的 NatureWorks、CargillDowPolymers (CDP) 和 Total-Corbion 公司, PLA 的年产量为 8-18 万吨^[13, 14]。

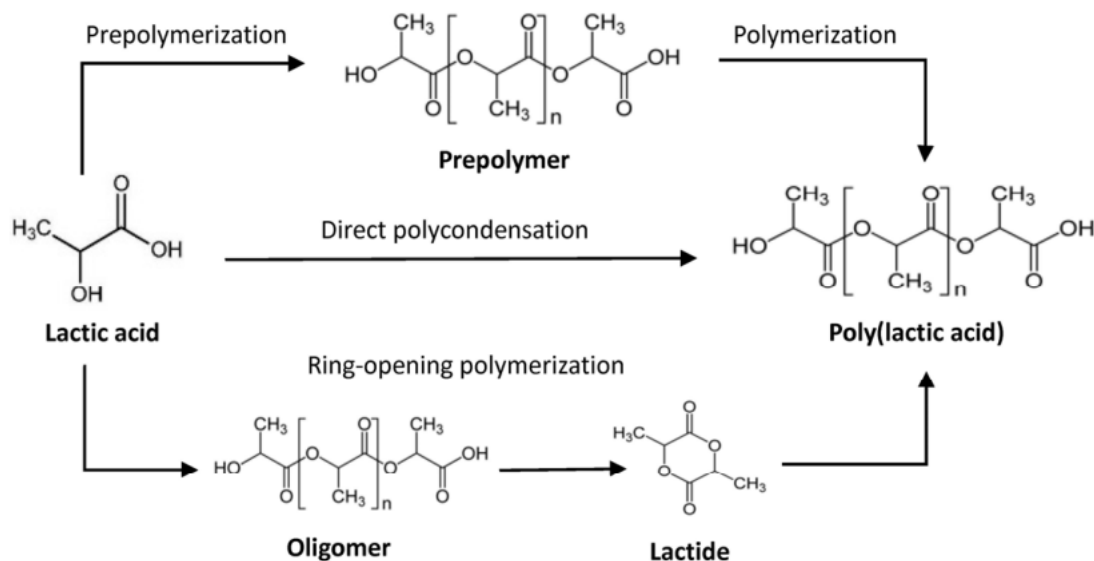
图 1.1 乳酸到 PLA 的合成路径^[11]

Fig. 1.1 The synthetic pathway from lactic acid to PLA

1.1.2 乳酸

乳酸是聚乳酸的起始聚合单体，化学式为 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ，由于碳原子的不对称性，乳酸分为 L-乳酸和 D-乳酸两种旋光异构体（图 1.2）。乳酸广泛应用于化学品、医药、化妆品和食品等行业^[15]，而最为重要的应用是作为生物可降解塑料聚乳酸材料的聚合单体。

乳酸的生产方式分为化学合成法和微生物发酵法^[16, 17]。化学合成法主要是通过乳腈在强酸下水解得到乳酸，成本昂贵，且会产生 D, L-混合型的外消旋乳酸。微生物法是在微生物体内通过 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶分别催化丙酮酸得到 L-乳酸和 D-乳酸。与化学合成法相比，微生物发酵法具有生产条件缓和、生产成本低、可生产单一 L-或 D-乳酸等优点，利用微生物发酵法生产的乳酸约占每年乳酸产量的 90%^[17]。目前微生物法生产乳酸的原料主要为淀粉类粮食作物（如玉米、小麦、木薯和甘蔗等），其成本占据了总生产成本的 40%-70%^[18]，导致乳酸的生产成本高。由于聚乳酸的大规模应用，乳酸的市场需求量正在急剧增加，据统计，到 2028 年，乳酸单体的生产需求将达到约 50.2 亿美元^[19]，并且以每年 8% 的涨幅持续增长。快速增加的乳酸需求量预示着淀粉类粮食原料的消耗量将达到高位，从而带来粮食短缺的安全问题。因此，寻求更为廉价、可再生和来源广泛的原料来替代淀粉生产乳酸是降低其生产成本和避免造成粮食安全问题的主要方向。

为了降低聚乳酸及其前体的生产成本，同时避免对世界粮食资源安全造成威胁，本论文计划使用非粮性质的木质纤维素生物质原料来代替淀粉原料进行聚乳酸前体的生产。木质纤维素生物质是世界上储量最为丰富的资源，每年以植物形式产生的生物质约有 1500-1700 亿吨，其来源广泛且稳定，包括农业废弃物（玉米秸秆、小麦秸秆、稻秆、甘蔗渣等）、林业废弃物（木料、树枝、云杉片等）和工业废弃物（啤酒糟、化学纸浆）

等^[20, 21]。综上所述，木质纤维素是一种可再生的碳水化合物，具有生产速度快、价格低廉和来源广泛等优点，其非粮性质也可以确保不会对粮食资源供应造成威胁。因此，木质纤维素生物质是最有潜力替代淀粉原料生产聚乳酸及其前体的资源。

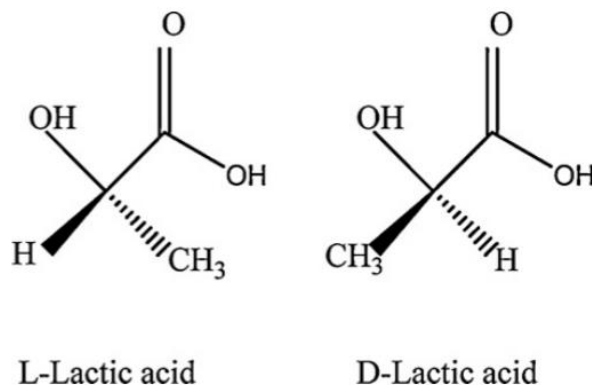


图 1.2 乳酸的两种旋光异构体

Fig. 1.2 Two types of optical isomers of lactic acid

1.1.3 丙交酯

丙交酯是乳酸的环状二聚体，分子式为 $C_6H_8O_4$ ，是开环聚合法合成高分子量聚乳酸的关键前体，具有非常重要的工业价值。由于丙交酯分子结构中含有两个不对称碳原子，因此具有三种光学异构体形式（图 1.3）^[22, 23]：（1）L-丙交酯（L-lactide），由两个 L-乳酸分子脱水形成；（2）D-丙交酯（D-lactide），由两个 D-乳酸分子脱水形成；（3）内消旋-丙交酯（meso-lactide），由一个 L-乳酸分子和一个 D-乳酸分子脱水形成。此外，等量的 L-丙交酯和 D-丙交酯通过物理混合可得到外消旋丙交酯（D, L-lactide），但无旋光性。L-和 D-丙交酯的理化性质相似，熔点为 $95-98\text{ }^\circ\text{C}$ 。D, L-丙交酯的熔点最高（ $122-126\text{ }^\circ\text{C}$ ），而内消旋丙交酯的熔点最低（ $53-54\text{ }^\circ\text{C}$ ）^[24]。

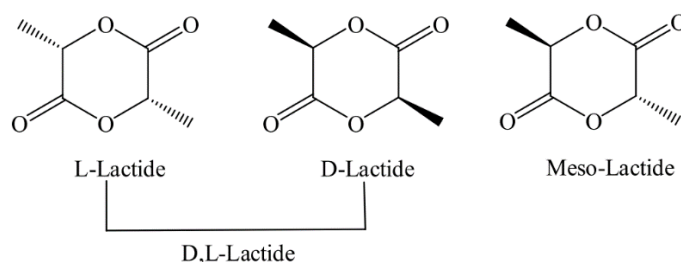


图 1.3 丙交酯的三种光学异构体^[22]

Fig. 1.3 Three types of optical isomers of lactide^[22]

目前，以乳酸为原料合成丙交酯的方法主要有一步法和两步法。其中，一步法可分为一步气相法和一步液相法，一步气相法即汽化的乳酸单体在常压、惰性气体保护下通过催化反应一步合成丙交酯，但存在丙交酯生产强度低的缺点，暂不具备经济可行性；一步液相法即乳酸溶液在催化剂作用下进行脱水缩合直接生成丙交酯，其转化率（80%

以上)和光学纯度较高(99%以上),是有潜力实现丙交酯工业化的重要方法,但目前该方法离工业应用仍然有一段距离^[25]。

目前,工业上主要采取两步法合成丙交酯,第一步是在不使用其它溶剂的基础上,将乳酸进行脱水缩合形成低分子量的乳酸低聚物(分子量低于 3000);第二步是对乳酸低聚物进行解聚反应形成丙交酯(环状二聚体),最后通过蒸馏得到丙交酯^[26, 27]。整个过程需要在高温、负压和催化的条件下进行。在第一步中,高温、负压的环境是为了移除生成的水;在第二步中,高温、负压的条件则是为了加快解聚反应的进行,通过蒸馏的方式移除丙交酯,以避免发生逆反应、降低丙交酯收率^[27]。这也缩短了乳酸低聚物在严苛反应条件的时间,避免发生不必要的外消旋反应。另外,催化剂的选择也尤为重要。在生产丙交酯的过程中,最常选择锌和锡的混合物作为金属催化剂,如辛酸亚锡、氧化锌和氯化锌等^[28-30]。

1.2 木质纤维素生物炼制生产聚合级乳酸面临的挑战

1.2.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素由纤维素、半纤维素和木质素构成,以上组分分别约占其干重的 35%-55%、20%-40%和 10%-25%,此外,还包含少量的蛋白质、脂质和灰分等^[31]。纤维素, $(C_6H_{10}O_5)_x$, 是通过 β -(1,4)糖苷键连接形成的无支链线性聚合物,具有致密的晶体结构,难以被降解^[32]。半纤维素, $(C_5H_8O_4)_m$, 是一种由游离单糖构成的支链多糖,游离单糖包括五碳糖(木糖和阿拉伯糖)和六碳糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖)^[21]。与纤维素相比,半纤维素的无定形性质和低聚合度使得其更容易被纤维素酶水解。木质素是由松柏醇、香豆醇和芥子醇的单体组成的杂聚物,其填充在纤维素和半纤维素之间的空隙并将它们连接起来,从而表现出 3D 交联的稳定分子结构,赋予其生物抵抗性^[33]。由于结构的复杂性,木质纤维素需要经过预处理、脱毒、酶水解工段才能释放出可发酵单糖,进而被微生物发酵转化成生物基化学品,该过程被称为木质纤维素的生物炼制过程。

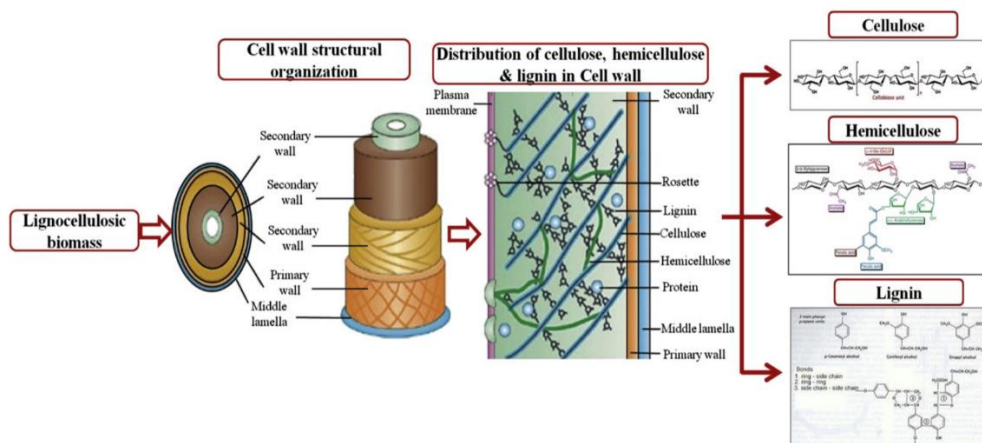


图 1.4 木质纤维素的结构图^[34]

Fig.1.4 The diagram of lignocellulose structure^[34]

木质纤维素的生物抗性是生物炼制的最大障碍。因此,通过预处理方法破坏其抗性是促进下游的高效酶糖化和实现乳酸高产的关键步骤。预处理的作用是破坏植物细胞壁结构,使得被半纤维素和木质素覆盖的纤维素暴露出来,增大纤维素酶和纤维素的接触面积,促使酶水解有效进行。理想的预处理方法应具备以下优点^[35,36]:(1)降低物质结晶度、提高孔隙率;(2)有效去除木质素;(3)防止抑制物形成;(4)避免糖的降解;(5)能耗和成本低。常规预处理方法包括物理法、化学法和物理化学法,这些方法各有优点和局限性。物理法主要采用机械处理(切碎和碾磨)、微波辐射、脉冲电场和超声波处理的方法^[37,38],优点是可以有效减小木质纤维素的粒径,但缺点是高能耗、高成本,不适用于工业应用^[39,40]。物理化学法如蒸汽爆破法具有低能耗、低成本的优点,但存在处理设备特殊、只降解部分半纤维素、产生有毒的抑制物以及处理高木质素含量的生物质效果差等问题^[41,42]。化学法中使用最为广泛的方式是稀酸预处理和稀碱预处理,其中,稀碱预处理是通过在碱性溶液中浸泡木质纤维素来降解木质素的方法^[37,43,44],优点是有效脱除木质素、去除半纤维素、产生的抑制物少,缺点是中和预处理物料所用试剂费用高、反应时间长、可发酵糖损失较多。稀酸预处理一般使用稀硫酸(0.1%-2.5%, w/w)在高温条件下对木质纤维素进行处理^[45,46],其优点是可将半纤维素降解成寡糖和单糖,有效破坏结晶结构,但其缺点是^[47]:(1)产生的酸性废水不仅腐蚀设备,还会造成环境污染问题;(2)葡萄糖和木糖等可发酵单糖被酸过度降解为抑制物,不仅造成可发酵糖的损失,产生的抑制物也会对发酵细胞造成毒害作用。

预处理过程由于强烈的预处理条件,会不可避免地会产生各种类型的有毒的抑制物,常见的抑制物主要有以下三类^[18,47]:(1)呋喃醛类,如糠醛和 5-羟甲基糠醛(5-HMF),由己糖和戊糖脱水产生;(2)弱酸类,如乙酸、甲酸和乙酰丙酸,分别来自于半纤维素的乙酰基水解以及糠醛和 5-HMF 的降解;(3)酚类抑制物,如香草醛、丁香醛和 4-羟甲基苯甲醛等,来源于木质素的降解(图 1.5)。这些抑制物的存在一方面会抑制发酵微生物的生长活性和降低发酵效率^[48,49],如呋喃醛类抑制物对于微生物的毒性体现在其可以抑制糖酵解路径的关键酶活性、降低胞内的 ATP 和 NAD(P)H 水平、破坏细胞膜等;另一方面,抑制物还会抑制纤维素酶的催化活性,降低酶水解效率和发酵效率。为了解除抑制物对发酵微生物发酵活性以及纤维素酶活性的抑制作用,研究者们开发了各种脱毒手段以去除抑制物,常用的脱毒方法包括水洗法^[50,51]、碱法脱毒^[52,53]、离子交换吸附法^[54,55]、膜吸附法^[56,57]和生物脱毒法^[58,59]。水洗法和碱法脱毒对抑制物的去除效果好,但会伴随大量的废水产生和糖损失。离子交换吸附法和膜吸附法去除抑制物的效果好,但是设备和滤膜的成本较高,不适合工业的大规模使用。生物法主要指通过微生物进行抑制物的降解,具有反应温和、减少生产成本、低能耗、不添加化学试剂等优点,是一种十分有潜力的脱除抑制物的方法^[60]。

预处理后的木质纤维素的主要成分为纤维素和半纤维素,因此需要通过酶水解将纤维素和半纤维素转化为可发酵的单糖,再用于微生物发酵生产化学品。纤维素酶是水解纤维素的酶系,包括内切-1,4- β -葡聚糖酶(负责切割纤维素链的 β -1,4-糖苷键,以释放

还原和非还原性末端)、外切-1,4- β -D-葡聚糖酶(作用于还原和非还原末端以释放纤维二糖)和 β -葡糖苷酶(水解纤维二糖以释放葡萄糖)[61]。由于半纤维素比纤维素更为复杂,因此半纤维素酶系种类更多[61],这些酶协同作用使半纤维素水解为木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖。稀酸预处理可以有效降解木质纤维素绝大部分的半纤维素成分,因此只需添加纤维素酶来进行后续的酶水解。预处理过程中产生的抑制物会抑制纤维素酶的活性,因此在进行酶解步骤之前,需要将物料中的抑制物成分去除干净。

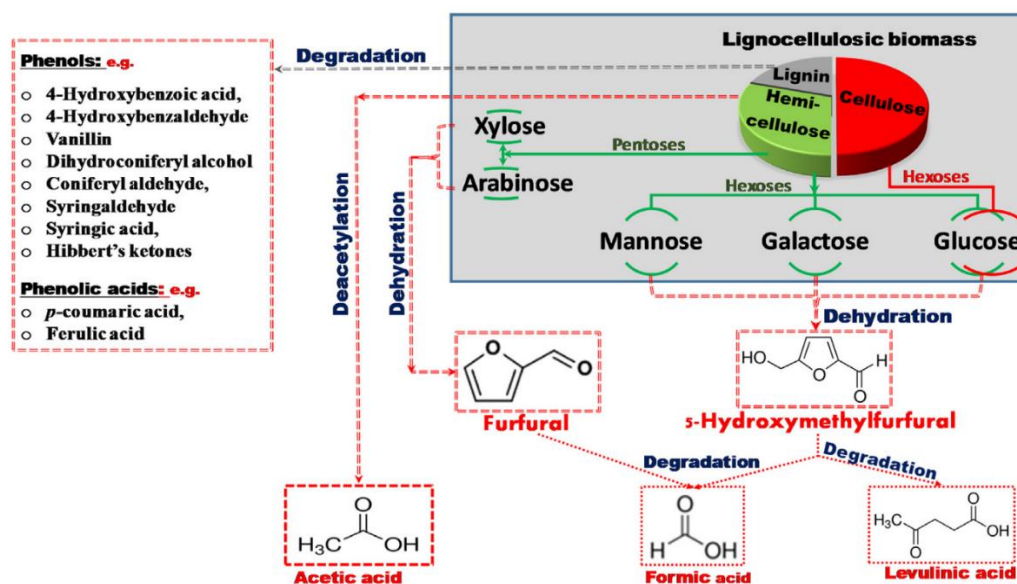


图 1.5 木质纤维素的组分及抑制物来源^[18]

Fig 1.5 Lignocellulosic components and inhibitor sources^[18]

本实验室针对以上生物炼制过程中存在的缺陷和不足进行了改进。为了避免稀酸预处理的废水产生,本实验室开发了一种干式稀酸预处理技术^[62, 63],该技术在传统稀酸预处理的基础上,将物料和硫酸的固液比由 1:10 升高至 2:1,同时将水用量降至原来的 1/20,不仅成功实现了无游离废水产生,还降低了对反应器的腐蚀性;同时,使用螺带式搅拌桨解决了高固含量原料、稀硫酸和蒸汽的混合和传质问题,通过去除物料与稀硫酸的预浸步骤,简化了预处理工艺。为了克服传统脱毒方法的缺陷,本实验室开发了一种固态生物脱毒法^[64, 65],利用自主筛选得到的一株树脂枝胞霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 将大部分有毒的抑制物降解为二氧化碳和水,过程中基本没有可发酵糖损失,具有零能耗、零废水产生、抑制物代谢能力强、适用于各种木质纤维素原料的优点。

1.2.2 光学纯乳酸发酵与发酵微生物菌株

在木质纤维素体系下,微生物发酵方式主要有两种,分别为分步糖化与发酵(SHF)和同步糖化与发酵(SSF)^[36, 66, 67]。SHF 是指糖化和发酵分开进行,即预处理原料经糖化步骤优先释放出大量的可发酵糖,再用于微生物发酵,其优点是糖化和发酵能够在最佳的温度、pH 条件下进行,但缺点是:(1)高浓度的可发酵糖会对纤维素酶和发酵

微生物分别产生产物抑制和底物抑制,降低酶解和发酵效率;(2)复杂的操作步骤增加了设备和时间成本。SSF 指糖化和发酵在一个反应器中同时进行,当涉及到己糖和戊糖的共发酵时,又被称为是同步糖化与共发酵(SSCF),其优点是糖化过程中产生的可发酵糖能够被微生物及时利用,解决了高浓度糖对于糖化和微生物发酵效率的抑制问题,还具有节省设备和时间成本的优点,已广泛应用于实验室和工业规模;但也有一些缺点,即糖化和发酵在同一个温度和 pH 条件下进行,而纤维素酶的最适温度和 pH 值范围在 40-50 °C 和 4.5-5^[66,68],这要求发酵微生物具备耐高温和耐酸的能力,其应用范围受到了限制。

目前,用于生产乳酸发酵的微生物主要分为细菌(如 *Lactobacillus* sp.、*Bacillus* sp.、*Pediococcus acidilactici*、*Escherichia coli* 和 *Corynebacterium glutamicum* 等)和真菌(*Rhizopus* sp.、*Saccharomyces cerevisiae* 和 *Kluyveromyces* sp.等)^[1]。在利用木质纤维素来发酵生产乳酸的过程中,木质纤维素原料在预处理过程会不可避免地产生抑制物,这要求乳酸发酵菌株具备一定的抑制物耐受性,能适应复杂的木质纤维素体系。近十年来,用于木质纤维素体系的进行 L-乳酸和 D-乳酸的发酵菌株主要有 *Lactobacillus* sp.、*P. acidilactici*、*E. coli*、*Bacillus* sp.、*S. cerevisiae* 和 *K. marxianus*。对于纤维素 L-乳酸的发酵, Qureshi 等^[69]使用 *L. casei* ATCC 334 对经离子液体和稀硫酸联合预处理的甘蔗渣进行 SSF,最终 L-乳酸的产量、产率和生产率分别为 204.1 g/L、76.2 g/g 和 3.1 g/L/h; Baral 等^[70]和 Nalawade 等^[71]分别使用 *B. coagulans* NCIM 5648 对经稀碱预处理的甘蔗渣进行 SHF,最终 L-乳酸的产量、产率和生产率分别为 51.2-69.2 g/L、0.76-0.81 g/g 和 1.75-2.88 g/L/h; Chen 等^[72]使用 *B. coagulans* LA-15-2 对经稀乙二胺预处理的稻草进行 SSF,最终 L-乳酸的产量、产率和生产率分别为 92.5 g/L、0.58 g/g 和 2.01 g/L/h; 酵母菌如 *S. cerevisiae* 和 *K. marxianus* 分别利用经稀碱预处理的荞麦皮和玉米芯残渣进行 SSF 和 SSCF,最终 L-乳酸的产量、产率和生产率分别为 34.0-103.0 g/L、0.57 g/g 和 1.42-1.44 g/L/h。对于纤维素 D-乳酸的发酵, Zhang 等^[73,74]使用 *L. plantarum* 工程菌株对经稀碱预处理的玉米秸秆进行 SSF 和 SSCF,最终纤维素 D-乳酸的产量、产率和生产率分别为 27.3-61.4 g/L、0.68-0.77 g/g 和 0.32-0.75 g/L/h, D-乳酸的光学纯度均超过 99.5%; Karnaouri 等^[75]使用 *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* 对经有机溶剂预处理的山毛榉木进行 SSF,最终纤维素 D-乳酸的产量、产率和生产率分别为 62.0 g/L、0.69 g/g 和 0.86 g/L/h; Utrilla 等^[76]使用 *E. coli* AV03 对经稀硫酸预处理的玉米秸秆进行 SHF,最终纤维素 D-乳酸的产量、产率和生产率分别为 60 g/L、1.11 g/g 和 1.25 g/L/h。从这些结果可以看出,目前已经使用多种木质纤维素原料实现了 L-乳酸和 D-乳酸的生产,纤维素乳酸的产量、产率和生产率与以淀粉等粮食作物为原料生产的 L-乳酸和 D-乳酸的相应指标的差距在逐渐缩小,但是现有乳酸生产菌株依旧存在光学纯度低、非葡萄糖单糖利用速率低、难以适应复杂的木质纤维素体系以及发酵与糖化步骤的温度、pH 不匹配的问题。

为了得到适用于木质纤维素的光学纯乳酸生产菌株,本实验室针对前期工作中筛选得到的一株对抑制物具有良好耐受性的野生型 *Pediococcus acidilactici* DQ2,进行了一系

列的代谢工程改造。首先对其分别进行了 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶基因的敲除，得到了只生产 L-乳酸和 D-乳酸的 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26，这两株重组菌株显示出了良好的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸发酵性能，其乳酸产量、产率和生产率分别达到 76.8-77.7 g/L、0.58-0.65 g/g、1.02-1.06 g/L/h，乳酸的光学纯度为 99.3-99.9%^[77]。为了弥补这两株菌株不能利用木糖的不足，Qiu 等^[78, 79]将一条异源的木糖代谢路径分别引入至 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 中，再经过长时间的木糖条件下的适应性进化，分别得到了具备同步利用木糖和葡萄糖能力的 L-乳酸工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸工程菌株 *P. acidilactici* ZY15。在对经干式稀酸预处理的小麦秸秆和玉米秸秆进行 SSCF 后，纤维素 L-乳酸和 D-乳酸的产量、产率和生产率分别达到 97.3-130.8 g/L、0.65-0.68 g/g、1.01-1.82 g/L/h，光学纯度为 99.2%-99.6%。由于 *P. acidilactici* 的生长条件（42 °C，pH 5.5）与纤维素酶的最适温度（50 °C）和 pH（4.8）高度适配，因此，*P. acidilactici* ZY271 成功运用于适合工业化的生产模式，即在单一的反应器中同时进行连续的酶水解和乳酸发酵（连续 SSCF 模式），纤维素 L-乳酸的产量、产率和生产率分别达到 107.5 g/L、0.29 g/g 和 2.69 g/L/h^[80]。除麦秆和玉米秸秆外，*P. acidilactici* 还适用于甘蔗渣^[81]、玉米芯^[82]和软木^[83]等多种各种木质纤维素原料，具有广谱的原料适用性。与其它乳酸生产菌株相比，*P. acidilactici* 具备的优越发酵性能使其在工业生产乳酸上具有巨大的应用潜力。

表 1.1 不同发酵微生物利用木质纤维素生物质生产 L-乳酸和 D-乳酸

Table 1.1 The production of chiral L-lactic acid and D-lactic acid by different fermentative microorganisms from lignocellulosic biomass

Microorganisms	Feedstocks	Pretreatment methods	Optical isomer	Process organization	Optical purity (%)	LA titer (g/L)	LA yield (g/g)	Productivity (g/L/h)	References
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	Sugarcane bagasse	Ionic liquid and diluted H ₂ SO ₄	L-LA	SSF	NA	204.1	0.76 ^b	3.1	[69]
<i>Bacillus coagulans</i> NCIM 5648	Sugarcane bagasse	Dilute NaOH	L-LA	SHF	NA	69.2	0.76 ^a	2.88	[70]
<i>Bacillus coagulans</i> NCIM 5648	Sugarcane bagasse	Dilute NaOH	L-LA	SHF	NA	51.2	0.81 ^a	1.75	[71]
<i>Bacillus coagulans</i> LA-15-2	Rice straw	Dilute ethylenediamine	L-LA	Fed-batch SSF	NA	92.50	0.58 ^b	2.01	[72]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BK01	Buckwheat husk	Dilute H ₂ SO ₄	L-LA	SSF	NA	34.0	~0.57 ^c	1.42	[84]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YKX071	Corn cob residue	Dilute NaOH	L-LA	Fed-batch SSCF	99.5	103.0	~0.57 ^b	1.44	[85]
<i>Pediococcus acidilactici</i> TY112	Corn stover	Dilute H ₂ SO ₄	L-LA	SSCF	99.89	77.7	0.65 ^a	1.06	[77]
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271	Wheat straw	Dilute H ₂ SO ₄	L-LA	SSCF	99.6	130.8	0.68 ^c	1.82	[79]
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271	Wheat straw	Dilute H ₂ SO ₄	L-LA	Continuous SSCF	99.5	107.5	0.29 ^b	2.69	[80]
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826-Δ <i>ldhL1</i> -pLEM- <i>xylAB</i>	Corn stover	Dilute NaOH	D-LA	Fed-batch SSF	~99.7	61.4	0.77 ^b	0.32	[74]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Corn stover	Dilute NaOH	D-LA	SSCF	99.5	27.3	0.68 ^b	0.75	[73]

NCIMB 8826 Δ ldhL1- pCU-PxyLAB									
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus	Beechwood	Mild oxidative organosolv	D-LA	SSF	NA	62	0.69 ^b	0.86	[75]
<i>Escherichia coli</i> AV03	Corn stover	Dilute H ₂ SO ₄	D-LA	SHF	NA	~60	1.11 ^d	1.25	[76]
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZP26	Corn stover	Dilute H ₂ SO ₄	D-LA	SSCF	99.32	76.8	0.58 ^a	1.02	[77]
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY15	Corn stover	Dilute H ₂ SO ₄	D-LA	SSCF	99.2	97.3	0.65 ^c	1.01	[78]
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZP26	Softwood	Steam	D-LA	SSF	NA	44.5	NA	2.26	[86]
<i>Pediococcus acidilactici</i> XH11	Sugarcane bagasse	Dilute H ₂ SO ₄	D-LA	SSCF	NA	57.0	0.58 ^b	0.50	[81]
<i>Pediococcus acidilactici</i> XH11	Corn cob	Dilute H ₂ SO ₄	D-LA	SSCF	NA	61.9	0.48 ^b	0.64	[82]

注: ^a表示 g/g 葡萄糖, ^b表示 g/g 干物料, ^c表示 g/g 葡萄糖和木糖, ^d表示 g/g 葡萄糖、木糖和阿拉伯糖; NA 表示未检测; LA (lactic acid), 乳酸; SSF (separate hydrolysis and fermentation), 分步糖化与发酵; SSF (simultaneous saccharification and fermentation), 同步糖化与发酵; SSCF (simultaneous saccharification and co-fermentation), 同步糖化与共发酵。

1.2.3 抑制物阻碍发酵微生物的生长和发酵

木质纤维素的大多数预处理操作会不可避免地产生呋喃醛类（5-HMF 和糠醛）、弱酸类（乙酸、甲酸和乙酰丙酸）和酚类抑制物（香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛和香草酸等），这些抑制物对于发酵微生物均会产生毒害作用，其毒性作用机制各不相同。呋喃醛类抑制物通常对微生物菌株产生多种毒性^[87-89]，包括抑制糖酵解和发酵过程中的酶活性、破坏细胞能量和降低细胞内 ATP 和 NAD(P)H 水平、增加自由基的产生和导致细胞膜损伤等。弱酸类抑制物对于微生物的毒性体现在破坏膜的质子梯度、解除质子泵的偶联、破坏膜完整性和细胞内氧化还原稳态、诱导阴离子积累等^[48, 90-92]。酚类抑制物的毒性体现在破坏细胞膜的疏水性、增加膜流动性、促进活性氧积累等^[48, 93]。总体来看，这些毒性抑制物主要是通过抑制微生物细胞生长或纤维素酶的催化活性来抑制微生物的发酵效率。

近年来，研究者们也采取了一些措施来解除抑制物对于发酵微生物的负面影响^[48, 49]，一方面是对预处理木质纤维素采取脱毒操作来去除抑制物；另一方面是采取措施在微生物层面上提高菌株对于抑制物的耐受性，主要的措施有基因和代谢工程改造、适应性进化和随机诱变。脱毒操作能够有效去除大部分抑制物，但常规的脱毒手段还会伴随着大量可发酵糖的损失、废水产生等缺点，目前没有一种方法能去除所有的抑制物，这就要求菌株具备对抑制物的耐受性。绝大多数的微生物不具备天然耐受抑制物的能力，对于这些菌株，研究者们通过基因和代谢工程改造（如过表达抑制物耐受性基因）^[94, 95]、适应性进化^[96, 97]和随机诱变^[98, 99]的方法一定程度上提高了菌株对于抑制物的耐受性，但耐受性改造针对的抑制物种类和浓度有限、实验耗时长，而且还会给细胞带来额外的负担，如蛋白表达的代谢负担和表达诱导剂的成本等。基于以上考虑，本研究一方面采用实验室前期筛选得到的生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 来选择性地降解抑制物为 CO₂ 和 H₂O，同时保留可发酵单糖^[64, 65]；另一方面，选用乳酸片球菌作为发酵菌株，其对木质纤维素来源的主要抑制物（糠醛、5-HMF 和乙酸）具有高耐受性，对低浓度的甲酸和香草醛也具备一定的耐受性^[77]，同时工程菌 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 具备共利用葡萄糖和木糖的能力^[78, 79]，是生产光学纯乳酸的优良菌株。

1.2.4 发酵微生物对非葡萄糖单糖的低效利用

木质纤维素的发酵单糖来自于纤维素和半纤维素的水解，主要包括葡萄糖和 4 种非葡萄糖单糖（甘露糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖），其中，非葡萄糖单糖含量较高，约占总单糖含量的 30%-40%。因此，实现葡萄糖和非葡萄糖单糖的快速协同共利用和全谱代谢是木质纤维素生物炼制生产生物基化学品的经济性转化的基础。目前，针对非葡萄糖单糖，绝大多数的发酵微生物存在以下三点问题：（1）存在碳分解代谢物阻遏效应（carbon catabolite repression, CCR）^[100]，绝大多数微生物工程菌株优先利用葡萄糖，非葡萄糖代谢过程在葡萄糖全部代谢或接近代谢完全后才开始启动；（2）大多数微生物工程菌株的非葡萄糖单糖（以木糖为代表）的代谢速率远远低于葡萄糖代谢速率；（3）大多数生物炼制菌株不能代谢来源于木质纤维素来源的所有五种单糖，如甘露糖和半乳糖

等。前两个问题使得非葡萄糖单糖（主要是木糖和阿拉伯糖）全部代谢所需发酵时间大幅度延长至常规发酵的 2-3 倍，使得工程菌株基本失去了其非葡萄糖单糖利用的工业应用价值。后一个问题不仅使得目标发酵产品的得率降低，而且使得发酵液中存在高浓度的残糖，当发酵产物是乳酸、琥珀酸等生物聚合物的单体化学品时，分离提纯的高难度和高成本直接使其失去了在聚合工业应用的可行性。

1.2.5 金属离子对发酵的影响

在以木质纤维素为原料进行发酵时，预处理过程中化学试剂（酸或碱液）和发酵过程中 pH 中和剂（NaOH 和 KOH 等溶液）的添加会导致发酵液中富集大量 Na^+ 和 K^+ 等金属离子^[101, 102]，这些金属离子不仅会抑制发酵微生物的生长，还会抑制其发酵效率，从而降低木质纤维素到发酵产品的转化效率。作为发酵中常用的中和剂，NaOH 的添加引入的钠离子对不同的发酵微生物的发酵效率均有抑制作用。在乙醇发酵过程中，*Zymomonas mobilis* 对钠离子较为敏感，低浓度（0.175 M）的钠离子显著抑制了 *Z. mobilis* 的生长和乙醇发酵效率^[103]。同样地，0.45 M 的 Na^+ 的加入使得 *S. cerevisiae* 的细胞生产率下降了 80%^[104]。然而，与乳酸钠发酵相比，钠离子对乙醇发酵菌株的胁迫是较为温和的，因为在乙醇发酵过程中， Na^+ 的添加主要是为了上游加工或发酵过程中的 pH 调节。而在生产木质纤维素来源的乳酸钠的过程中，NaOH 溶液作为 pH 中和剂加入到发酵液中作为乳酸钠产物的一部分，高浓度的乳酸钠发酵不可避免地导致大量钠离子的富集，导致乳酸钠的主要生产菌株（乳酸菌）在乳酸钠发酵过程中受到更强的 Na^+ 胁迫。因此，提高乳酸菌对于钠离子的耐受性对于高浓度的纤维素乳酸钠的生产是十分必要的。

1.2.6 木质纤维素的复杂组分对于聚合级乳酸纯度的影响

高纯度（>99%）的光学纯乳酸是合成丙交酯及高分子量聚乳酸的前提条件^[105]。目前，未有文献显示成功从木质纤维素来源的乳酸合成丙交酯，这是由于在以木质纤维素为原料生产乳酸时，木质纤维素中的复杂成分严重影响乳酸的纯度，导致后续乳酸聚合反应的失败。这些杂质成分主要是预处理过程产生的抑制物、发酵液中的残糖、木质素残渣、微生物细胞、色素、蛋白质和金属离子。常规的杂质成分可以通过简单的分离纯化操作进行去除，如微生物细胞和蛋白质可以通过离心操作去除，色素可以通过活性炭吸附去除，金属离子可以通过阳离子交换树脂去除。抑制物的组成较为复杂，包括呋喃醛类（5-HMF、糠醛）、弱酸类（乙酸和甲酸）和酚类抑制物（香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛等）。通过常规的分离纯化操作难以将抑制物去除干净，残留的抑制物杂质对乳酸纯度造成严重影响，导致后续乳酸聚合反应的失败。残糖主要来源于发酵微生物对于非葡萄糖单糖的不完全利用和低效利用^[73, 106, 107]，包括木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖，残糖杂质不仅会降低乳酸的纯度，还会对后续丙交酯的合成造成不利影响。残糖和抑制物难以通过常规的分离手段去除，需要高强度和高成本的分离纯化操作，不利于工业应用。因此，抑制物和残糖是木质纤维素来源的乳酸合成丙交酯的两大关键障碍，也是生产高纯度的聚合级乳酸的关键难题。因此，有必要寻找一种简单有效、低成本的方法来去除残糖和抑制物以获得高纯度的聚合级乳酸。

1.3 发酵微生物共利用己糖和戊糖的研究进展

木质纤维素来源的可发酵单糖主要包括三种己糖（葡萄糖、甘露糖和半乳糖）和两种戊糖（木糖和阿拉伯糖），其中四种非葡萄糖单糖含量约占总糖含量的 30%-40%。然而，大多数的发酵微生物对于非葡萄糖单糖的利用十分低效，存在非葡萄糖单糖代谢晚于葡萄糖启动、非葡萄糖单糖代谢速率远低于葡萄糖和不能利用木质纤维素来源的所有可发酵单糖这三点问题（详见 1.2.4 部分）。针对以上问题，目前大多数研究集中于改善戊糖（木糖和阿拉伯糖）的利用上，而对己糖（甘露糖和半乳糖）利用的研究较少。为了改善微生物对于非葡萄糖单糖的利用，目前主要采取了两条路径，第一条路径为优化和增强非葡萄糖单糖的代谢路径，第二条路径为增强非葡萄糖单糖的转运效率，但效果均有限。

1.3.1 改造微生物糖代谢路径的进展

木糖是木质纤维素来源可发酵糖中含量最高的非葡萄糖单糖，因此也是生物炼制微生物菌株代谢过程改造的主要目标单糖。木糖代谢主要有两条代谢途径，其中，真菌主要通过木糖还原酶-木糖醇脱氢酶路径（氧化还原酶路径）两步将木糖转化为木酮糖，再经过木酮糖激酶和磷酸戊糖途径（Pentose phosphate pathway, PPP 途径）完成木糖的同化代谢，但该路径存在的主要障碍是木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的辅酶偏好性不同导致胞内的氧化还原代谢失衡，造成木糖醇积累，木糖同化速率和目标产物得率较低^[108, 109]；而细菌主要通过木糖异构酶路径一步将木糖转化为木酮糖，再经过木酮糖激酶和 PPP 路径完成木糖的代谢，该路径的优点是无需辅酶参与，仅需一步即可将木糖转化为木酮糖。近年来，细菌的木糖异构酶路径已经被成功引入到酿酒酵母等真菌中，实现了木糖至木酮糖的一步转化，解决了木糖醇积累的问题，在细菌和真菌中均通过合理的木糖代谢路径构建实现了木糖的利用^[110-112]。为进一步增强木糖利用能力，许多研究通过优化和增强木糖的代谢路径来加快木糖的利用速率。Mao 等^[113]通过在 *C. glutamicum* 中过表达不同菌种来源的 *xylAB*，发现过表达来自 *Xanthomonas campestris* 的 *xylAB* 和内源的 *tkt*、*tal* 基因加速了木糖的利用，使得菌株的木糖利用速率由 2.19 g/L/h 升高至 2.31 g/L/h。Kim 等^[114]在 *S. cerevisiae* 中过表达来自 *Scheffersomyces stipitis* 的木糖还原酶基因(*XYL1*)，使得菌株的木糖利用速率由 1.14 g/L/h 升高至 1.74 g/L/h。Jo 等^[115]在 *C. glutamicum* BL-1 pXylAB 中过表达了转醛醇酶基因 (*tal*)，使得菌株的木糖利用速率约由 0.8 g/L/h 升至 1.3 g/L/h。因此，木糖代谢路径的增强一定程度上加快了菌株对于木糖的代谢，但木糖代谢速率仍远低于葡萄糖代谢速率。在木糖代谢工程改造的基础上，木糖的适应性进化策略用于进一步改善菌株对于木糖的代谢能力。Agrawal 等^[116]通过在 *Z. mobilis* 中表达了木糖的代谢关键基因后，接着在高浓度木糖条件下对 *Z. mobilis* 工程菌株进行了 80 天的适应性进化，进化菌株在葡萄糖存在的条件下，木糖最大比消耗速率由 0.45 g/g DCW/h 升高至 1.80 g/g DCW/h。Sarkar 等^[117]对整合了木糖代谢路径的 *Z. mobilis* ATCC ZW658 在木糖浓度递增（30-100 g/L）的培养环境下进行了 200 天的适应性进化，在葡萄糖存在的条件下，进化菌株的木糖比摄取速率由 0.13 g/g/h 升高至 1.34 g/g/h，并发现适应性

进化诱发的木糖代谢关键酶酶活的改变和基因突变可能是其木糖代谢加快的原因。木糖代谢路径的增强和适应性进化策略的结合在一定程度上增强了发酵微生物对于木糖的代谢，但微生物的木糖的利用能力仍然远远不如葡萄糖。

阿拉伯糖是含量第二丰富的非葡萄糖单糖，目前已通过代谢工程改造的方法在酵母和多种细菌中实现了阿拉伯糖的利用。阿拉伯糖代谢主要分为氧化还原酶（Arabinose oxidoreductase, AO）路径和异构酶（Arabinose isomerase, AI）路径^[118, 119]，与木糖的氧化还原路径类似，真菌中的阿拉伯糖的 AO 路径存在严重的辅因子不平衡的问题，与之相比，异构酶途径具有所需酶较少、不需辅因子的优点。因此，将细菌的异构酶途径引入至真菌是增强真菌阿拉伯糖代谢能力的一个重要措施。在真菌中，研究者们采取了一系列措施来提高 *S. cerevisiae* 的阿拉伯糖代谢能力，包括将不同细菌（*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* 和 *Lactobacillus plantarum*）来源的阿拉伯糖代谢基因（*araA*, *araB* 和 *araD*）进行组合表达^[120-123]、过表达非氧化的磷酸戊糖途径基因（*TAL1*、*TKL1*、*RPE1* 和 *RKII*）^[121, 123, 124]和适应性进化^[122, 123]，最终菌株的阿拉伯糖代谢速率得到一定提高，但阿拉伯糖的代谢依旧较慢。在细菌中，有研究将来自 *E. coli* 的阿拉伯糖代谢基因（*araABD*）分别引入至 *Z. mobilis*^[125]和 *C. glutamicum*^[126]中，成功实现了阿拉伯糖的利用。但是不管是在真菌还是细菌中，阿拉伯糖的代谢速率比木糖的代谢速率更低，导致发酵时间大大延长^[122, 127, 128]，使得阿拉伯糖的实际利用价值大打折扣。

甘露糖含量约占木质纤维素来源的总单糖的 0.5%-13%，在软木（如云杉）中其含量高达 13%，是含量第二丰富的己糖，也是不可忽视的可发酵糖^[129, 130]。因此，高效利用甘露糖对于实现全糖转化尤为重要。在细菌中，甘露糖一般被 mannose-PTS、glucose-PTS 和 fructose-PTS 转运系统转运至胞内并磷酸化为 6-磷酸-甘露糖；在酵母中，甘露糖一般被己糖激酶催化成 6-磷酸-甘露糖；6-磷酸-甘露糖进一步被磷酸甘露糖异构酶异构化为 6-磷酸-果糖，最后进入糖酵解途径^[129, 131-133]。一些菌株天然具有代谢甘露糖的能力，如 *Bacillus spp.*^[134]、*E. coli*^[135]、*C. glutamicum*^[131]、*S. cerevisiae*^[136, 137]和 *Lipomyces starkeyi*^[138]，但是甘露糖的代谢普遍较慢。有少数研究通过引入甘露糖代谢路径来实现甘露糖的利用，如将 *E. coli* 的磷酸甘露糖异构酶基因 *pmi* 分别引入至 *Z. mobilis*^[139]和 *Ralstonia eutropha*^[140]中。也有少数研究通过强化甘露糖代谢路径来提高甘露糖的利用速率，如过表达异源的 *pmi* 基因^[141]，但最终甘露糖的利用依旧不如葡萄糖。

半乳糖的含量约占木质纤维素来源的总单糖的 0.5%。主要有两种代谢路径，分为 Leloir 途径和 tagatose-6-P 途径^[142]，但在多数菌株中不存在 tagatose-6-P 路径。在 Leloir 途径中，半乳糖经高亲和力的半乳糖渗透酶（GalP）转运至胞内，被半乳糖变旋酶（GalM）修饰为 α -半乳糖，再被半乳糖激酶（GalK）磷酸化为半乳糖-1-磷酸；接着经过半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶（GalT）和 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶（GalE）的催化得到 α -葡萄糖-1-磷酸；最后被磷酸葡萄糖变位酶（PGM）转化为葡萄糖-6-磷酸并进入糖酵解路径^[143]。一些菌株天然具有利用半乳糖的能力，如 *S. cerevisiae*^[144]、*Bacillus spp.*^[134]、*Lactococcus lactis*^[143]和 *E. coli*^[145]等。少数研究也通过强化半乳糖代谢路径来提高其利用

能力。Neves 等^[146]过表达了半乳糖代谢基因 *galPMKT* 和磷酸葡萄糖变位酶基因(*pgm*)，使得 *Lactococcus lactis* 中的半乳糖代谢速率加快了 50%。Lim 等^[147]在 *E. coli* 中过表达了 *pgm* 基因，一定程度上提高了菌株的半乳糖的代谢速率。Lee 等^[148]在 *S. cerevisiae* 中过表达了 *PGM2* 基因，使得菌株的半乳糖代谢速率提高了 70%，但半乳糖的代谢速率依旧低于葡萄糖，使得发酵时间延长至 2-3 倍。

综上所述，优化和增强发酵微生物中非葡萄糖单糖的代谢路径对于糖利用能力的提高十分有限，非葡萄糖单糖的代谢速率依旧远远不如葡萄糖的代谢速率，非葡萄糖单糖的低效代谢问题仍然没有被彻底解决。

1.3.2 改造微生物糖转运通道的进展

除了糖代谢方面，糖转运也被认为是阻碍非葡萄糖单糖利用的一大障碍。因此，提高微生物的非葡萄糖单糖转运能力也是增强糖利用的一种重要策略。针对木糖的转运，采取的策略主要有两种，包括异源表达戊糖转运蛋白、将原有的己糖转运蛋白改造为专一的木糖转运蛋白。其中，异源表达戊糖转运蛋白一定程度上提高了微生物利用木糖的能力。Sasaki 等^[149]过表达了异源的阿拉伯糖转运蛋白基因 *araE*，使得 *C. glutamicum* 在无氧条件下的木糖利用速率由 1.50 g/L/h 升高至 3.75 g/L/h。Kim 等^[114]在 *S. cerevisiae* DXX 中过表达了来自 *B. subtilis* 的阿拉伯糖转运蛋白基因 *araE*，使得其木糖利用速率由 1.74 g/L/h 提高至 2.47 g/L/h；Yim 等^[150]过表达了来自 *E. coli* 的木糖转运蛋白基因 *xylE*，使得 *C. glutamicum* 在 20 g/L 的木糖条件下的木糖利用速率由~0.4 g/L/h 升至~0.6 g/L/h。Dunn 等^[151]在 *Z. mobilis* 中过表达了来自 *E. coli* 的 *xylE* 基因，使得其在 50 g/L 的木糖条件下的木糖利用速率由 0.37 g/L/h 升高至 0.48 g/L/h，但这种提高只有在高浓度（50-100g/L）的木糖条件下才出现。Sarkar 等^[152]在 *Z. mobilis* 中异源表达了来自 *E. coli* K-12 的 ABC 类转运蛋白基因簇 *xylFGH*，在葡萄糖存在的条件下，菌株的木糖比摄取速率由 1.37 g/g/h 提高至 2.04 g/g/h。以上研究表明在发酵微生物中引入异源的戊糖转运蛋白有利于改善木糖的利用能力，但大多数戊糖转运蛋白并非木糖的专一性转运蛋白，存在木糖亲和力低、木糖转运能力较差的缺陷，因此，该策略对于木糖利用能力的改善有限。

为了进一步提高木糖的转运能力，一些研究者通过定点突变和替换部分蛋白氨基酸的方式将原有的糖转运蛋白改造为专一的木糖转运蛋白。Shin 等^[153]将 *S. cerevisiae* 中的葡萄糖转运蛋白 Hxt2 进行了改造，包括替换蛋白 N-端的第 1-49 位氨基酸残基、将氨基酸残基 N361 突变成 T361，使得菌株对于木糖的转运专一性优于葡萄糖，最终在葡萄糖和木糖条件下，木糖的利用速率有了轻微的提高（由 0.7 g/L/h 升高至 0.9 g/L/h）。Nijland 等^[154]将 *S. cerevisiae* 中内源的葡萄糖转运蛋白 HXT36 的氨基酸残基 N367 突变为 A367，使得转运蛋白对于木糖的亲和力提高了 4.3 倍（ K_m 值由 108 mM 降至 25 mM），在葡萄糖存在的条件下，木糖的消耗速率由 0.15 g/L/h 升高至 0.27 g/L/h，但是葡萄糖的利用速率显著下降（1.82 g/L/h 降低至 0.93 g/L/h）。Vasylyshyn 等^[155]将 *Ogataea polymorpha* 中的低亲和力葡萄糖转运蛋白 Hxt1 中的氨基酸残基 N358 突变为 A358，同时将蛋白 N-末端的泛素化靶点赖氨酸残基替换成精氨酸残基，使得菌株的木糖利用速率升高了 73%

(由~0.19 g/L/h 升高至~0.32 g/L/h)。Sarkar 等^[152]将来自 *E. coli* K-12 的木糖转运蛋白 XylE 进行定点突变 (N325F) 得到了突变的 XylE*蛋白, 并在 *Z. mobilis* 中异源表达了 XylE*蛋白, 最终使得菌株对于木糖的比摄取速率由 1.37 g/g/h 提高至 1.97 g/g/h。以上结果表明, 将原有的糖转运蛋白改造为专一的木糖转运蛋白, 在不同程度上增强了转运蛋白对于木糖的亲合力和转运能力, 进一步提高了木糖的利用速率, 但是木糖的利用仍然远低于葡萄糖。总的来说, 提高木糖的转运效率对于木糖利用的改善是有限的, 木糖的低效利用仍然没有得到解决。

针对阿拉伯糖, 一些研究通过增强阿拉伯糖的转运能力来提高阿拉伯糖的利用, 如表达阿拉伯糖转运蛋白基因 (*AraT*、*Stp2*、*Gal2*、*LAT-1* 和 *MtLAT-1*)^[123, 156, 157]一定程度上增强了菌株对于阿拉伯糖的利用能力, 但是阿拉伯糖的代谢速率比木糖的代谢速率更低, 使得发酵时间进一步延长。针对甘露糖, 少数研究通过增强甘露糖的转运能力来提高菌株利用甘露糖的能力。Zhang 等^[141]在 *Clostridium tyrobutyricum* 中过表达自身的甘露糖转运蛋白基因 *glcG*, 使得甘露糖代谢速率提高了 117%, 但甘露糖代谢速率远不如葡萄糖代谢速率。Sasaki 等^[131]在 *C. glutamicum* 中过表达了对于甘露糖有低亲和力的 fructose-PTS 转运蛋白基因 *ptsF*, 使得菌株能够同步利用葡萄糖和甘露糖, 但重组菌株的葡萄糖和甘露糖的总消耗速率低于出发菌株。针对半乳糖, Kwon 等^[158]在 *S. cerevisiae* 中过表达了己糖转运蛋白基因 *ScGAL2* 和 *ScGAL2-N376F*, 使得菌株的半乳糖代谢速率提高了约 90%, 但半乳糖代谢速率仅达到葡萄糖代谢速率的 60%。Lim 等^[147]过表达了半乳糖渗透酶基因 *galP*, 使得半乳糖的利用速率轻微提高 (约 7%)。

综上所述, 针对发酵微生物对非葡萄糖的低效利用问题, 不管是增强糖代谢路径还是增强糖转运能力, 对于提高菌株的非葡萄糖单糖利用能力的效果是有限的, 菌株的非葡萄糖单糖的代谢速率远远低于葡萄糖, 使得非葡萄糖单糖的实际利用价值大打折扣。针对发酵微生物对非葡萄糖的不完全利用问题, 通过过表达戊糖代谢基因和戊糖转运蛋白基因, 已经实现了葡萄糖和戊糖 (木糖和阿拉伯糖) 的共利用, 但戊糖的利用速率依旧远低于葡萄糖代谢速率, 造成发酵效率低和发酵时间过长的问题。对于己糖 (甘露糖和半乳糖), 只有少数菌株 (*S. cerevisiae*、*E.coli* 和 *Bacillus spp* 等) 天然具有利用甘露糖和半乳糖的能力, 少数研究通过过表达己糖代谢路径的相关基因和己糖转运蛋白基因一定程度上提高了甘露糖和半乳糖的代谢速率, 但由于甘露糖会与葡萄糖竞争己糖转运蛋白, 半乳糖的代谢往往受到葡萄糖的抑制, 在葡萄糖存在时, 甘露糖和半乳糖的利用效率低下, 因而甘露糖和半乳糖无法代谢完全。但对于生物炼制菌株而言, 彻底转化低浓度的甘露糖和半乳糖是其必须面临的一个问题, 否则, 残糖的存在会严重影响发酵产品的纯化以及后续聚合物产品的合成。综上所述, 非葡萄糖单糖的低效利用和不完全利用问题亟待解决。

1.4 本论文的立题依据和主要研究内容

随着社会经济的发展，石油基聚合物材料的大量使用对全球的生态环境造成了严重的破坏，使用可再生、零碳甚至负碳排放的生物基聚合材料来替代石油基塑料，是国家达到双碳目标的重要内容。聚乳酸是替代石油基塑料的可生物降解聚合物中最重要的生物基材料。目前聚乳酸生产所需的高光学纯度和高化学纯度的乳酸单体全部以粮食淀粉为碳源进行发酵生产，不仅导致乳酸的生产成本高，还会对粮食安全造成威胁。因此，聚乳酸对石油基塑料的大规模替代需要大量非粮碳水化合物原料生产光学纯乳酸单体。本研究选择来源广泛、廉价易得和非粮性质的木质纤维素生物质来作为替代原料，聚焦于高光学纯度和高化学纯度的聚乳酸前体（乳酸和丙交酯）的生产。

目前，木质纤维素原料以生物炼制技术合成乳酸和丙交酯的产业化应用仍然存在诸多关键技术障碍，包括：（1）预处理过程中产生的抑制物不仅会抑制发酵微生物的活性，降低乳酸的发酵指标，残留抑制物还会严重阻碍丙交酯和聚乳酸的合成；（2）发酵微生物对木质纤维素中的非葡萄糖单糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）的转化效率低下，导致非葡萄糖单糖的不完全利用，不仅大幅降低了乳酸得率，残糖的存在还严重阻碍了丙交酯的合成，导致必须进行成本高昂和高强度的下游纯化才能获得用于聚合的高纯度乳酸。因此，残糖和抑制物是利用木质纤维素生产高纯度的聚合级乳酸和合成丙交酯的两大关键障碍。针对以上关键问题，本论文一方面在干法生物炼制技术平台上，以生物脱毒方法和具有全糖代谢能力的乳酸片球菌工程菌来分别解除抑制物和残糖对于聚合级乳酸生产和丙交酯合成的负面影响；另一方面，对乳酸片球菌工程菌的全糖协同代谢合成乳酸的机制进行了深入挖掘和多层面的分析。具体研究内容分为以下五个方面：

（1）针对严重影响纤维素乳酸纯度和产量的抑制物和残糖障碍，利用生物脱毒技术将预处理产生的大部分抑制物转化为二氧化碳和水，解除抑制物对乳酸纯度的负面影响；使用两株具有全糖代谢能力的 L-乳酸发酵工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY15 协同利用木质纤维素来源的葡萄糖和非葡萄糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）生产高浓度、高光学纯度的 L-乳酸和 D-乳酸，解除残糖对于乳酸纯度的影响。经常规的分离纯化操作后，得到了符合聚合级纯度要求的纤维素 L-和 D-乳酸。

（2）以研究（1）中得到的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别作为聚合单体，测试其合成纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的可行性。通过乳酸的解聚和缩聚反应来合成 L-丙交酯和 D-丙交酯，对合成的木质纤维素来源的丙交酯的结构和各项性质进行鉴定，并与淀粉来源的商品丙交酯标品的结构和性质进行比对。

（3）针对工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 协同代谢己糖和戊糖全转化为乳酸的现象进行机制解析。对 *P. acidilactici* 工程菌株中的糖代谢和糖转运蛋白基因进行转录水平分

析, 挖掘出表达水平异常上调的甘露糖转运蛋白基因簇 *manXYZ*。通过基因敲除、基因的弱化表达和基因转录水平的分析, 验证 *manXYZ* 基因簇在(葡萄糖、甘露糖、半乳糖)和戊糖(木糖和阿拉伯糖)转运和磷酸化过程中的关键作用, 为揭示葡萄糖和非葡萄糖单糖协同代谢机制和解决非葡萄糖单糖的利用难题提供解决思路和方法。

(4) 针对研究(3)中发现的 *manXYZ* 基因簇在多糖协同代谢中的作用进行机制挖掘。筛选可能参与调控 *manXYZ* 基因簇表达的转录调控蛋白, 对木糖适应性进化前后的菌株的转录调控蛋白进行氨基酸序列分析和对比, 寻找氨基酸残基发生突变的转录调控蛋白。通过定点突变实验和基因转录水平分析, 研究转录调控蛋白的氨基酸突变对 *manXYZ* 基因簇表达量的影响以及对己糖和戊糖共利用的影响, 进一步阐明乳酸片球菌工程菌的葡萄糖和非葡萄糖单糖的协同代谢机制。

(5) 针对高浓度钠离子抑制发酵细胞活性的问题, 通过过表达 4 个异源的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因来提高 *P. acidilactici* ZY271 耐受钠离子的能力, 筛选出钠离子耐受能力显著提高的重组菌株。将筛选得到的重组菌株在合成培养基和麦秆酶水解糖化液中进行高浓度的 L-乳酸钠发酵, 并对重组菌株中糖代谢和乳酸生成路径上的关键基因进行转录水平的分析, 为高浓度的 L-乳酸钠发酵提供有效方法。

第 2 章 乳酸片球菌工程菌株共利用木质纤维素来源的己糖和戊糖生产纤维素 L-和 D-乳酸

2.1 引言

木质纤维素生物质由于其来源广泛、可再生和价格低廉的特点，在替代淀粉作物原料生产聚乳酸单体（光学纯 L-和 D-乳酸）方面具有巨大潜力^[159]。最近的研究表明，纤维素乳酸和淀粉来源的乳酸在产量和得率方面的生产性能差距已经逐渐缩小^[78, 79, 160-162]。然而，纤维素乳酸的高光学纯度和高纯度的基本要求尚不满足丙交酯的合成^[105, 163]，因此木质纤维素来源的丙交酯的合成至今尚未成功。丙交酯合成的主要障碍是预处理、脱毒、酶水解和发酵这一系列生物炼制链中产生的残糖和抑制物这两类杂质。第一类杂质是预处理过程中产生的抑制物，包括呋喃醛类（糠醛，5-羟甲基糠醛）、弱有机酸（乙酸）以及酚醛类抑制物（香草醛、4-羟基苯甲醛和丁香醛）^[164, 165]。这些抑制物不仅会降低发酵微生物的发酵效率，在乳酸单体中的残留抑制物还会阻碍丙交酯和聚乳酸的合成。第二类杂质是残糖，如木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖，残糖的产生主要是因为发酵微生物对非葡萄糖单糖的不完全利用。非葡萄糖单糖的含量约占木质纤维素来源的可发酵糖总量的 30%-40%，大多数生物炼制菌株对于非葡萄糖单糖的利用速率远低于葡萄糖，造成非葡萄糖单糖的低效利用和不完全利用^[17, 83, 106, 166]，导致大量残糖的产生。残糖的存在严重阻碍了高纯度的聚合级乳酸的生产和丙交酯的合成，必须进行成本高昂和高强度的下游纯化才能获得高纯度的聚合级乳酸。因此，抑制物和残糖是阻碍高纯度的纤维素乳酸生产和纤维素丙交酯合成的两大关键障碍。

本章节针对严重影响纤维素乳酸的纯度和产量的抑制物和残糖，首先，在生物炼制平台上，通过独特的生物脱毒技术降解了大部分的弱酸类、呋喃类和酚醛类抑制物，解除了抑制物对于聚合级乳酸纯度和产量的影响；然后，分别使用一株 L-乳酸发酵工程菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271 和 D-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY15 将木质纤维素来源的葡萄糖和非葡萄糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）协同和完全地转化为高浓度和高光学纯度的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸，并将残糖浓度降至极低，解除了残糖对于聚合级乳酸纯度和产量的影响。最后，利用麦秆原料同步糖化和共发酵得到的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸产物中基本不含残糖和抑制物，经常规分离纯化后的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸达到了聚合级 L-乳酸和 D-乳酸的要求，为下一步合成木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成提供了高光学纯度和高化学纯度的 L-乳酸和 D-乳酸聚合单体。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株、培养基和培养条件

工程菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271 为整合了木糖代谢途径的 L-乳酸发酵菌株^[79]，保存在中国普通微生物保藏中心（CGMCC），保藏编号为 13611。工程菌株 *P.*

acidilactici ZY15 为整合了木糖代谢途径的 D-乳酸发酵菌株^[78]，保藏在 CGMCC，保藏编号为 13612。*Amorphotheca resinae* ZN1 为本实验室之前分离得到的一株脱毒真菌 (CGMCC, 7452)^[64, 165]。

P. acidilactici 培养于 MRS 培养基中，培养条件为 150 rpm，42 °C。*A. resinae* ZN1 培养于 28 °C 和 PDA 培养基中。

本章节使用的培养基具体如下：

(1) 简化 MRS 培养基（用于种子培养）：20 g/L 葡萄糖、10 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、5 g/L 无水乙酸钠、2 g/L K_2HPO_4 、0.58 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 0.25 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。固体培养基需添加 15 g/L 的琼脂粉。

(2) 简化 MRS 培养基（用于合成培养基发酵）：10 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、5 g/L 无水乙酸钠、2 g/L K_2HPO_4 、0.58 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 0.25 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。糖的种类和浓度根据发酵实验来进行调整。

(3) PDA 培养基：将 400 g 去皮、切碎的土豆在 2 L 的去离子水中煮沸半小时，之后用纱布过滤得到上清液，并加入 40 g 葡萄糖和 30 g 琼脂粉，定容至 2 L。

2.2.2 酶和试剂

商业纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购于 Novozymes 公司 (Beijing, China)。按照 NREL 方法^[167]和 Ghose 等^[168]的方法分别测得滤纸酶活和纤维二糖酶活为 203.2 FPU/mL 和 4900 CBU/mL。按照 Bradford 法^[169]测得蛋白浓度为 87.3 mg/mL。

葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、活性炭和其它试剂购于泰坦科技 (Shanghai, China)。酵母粉和蛋白胨购自 Oxoid (Hampshire, UK)，阳离子交换树脂 IRA-120 购于 Sigma-Aldrich (Missouri, USA)。

2.2.3 原料和生物炼制过程

小麦秸秆原料于 2018 年春季收割于河南南阳，经水洗除尘后，晾干，再经粉碎机研磨，粉碎的秸秆过筛（筛网直径为 10 mm）后，储存于密封袋里。根据 NREL^[170, 171]的两步酸解法测得小麦秸秆中的纤维素含量为 35.79%，木聚糖含量为 22.55%，阿拉伯糖聚糖和甘露聚糖的总含量为 5.67%，半乳聚糖的含量为 0.62%，木质素和灰分含量分别为 21.61% 和 8.60%。

按照本实验室之前的研究对小麦秸秆进行干酸预处理^[62, 63]，具体操作为：将干秸秆和 4% (w/w) 的稀硫酸一起加入到 20 L 的预处理反应器（配备螺带浆）中，固液比为 2: 1，最终的硫酸用量为每 1000 g 的干秸秆中加入 25 g 的硫酸。加入了硫酸的小麦秸秆在 175 °C、50 rpm 下处理 5 min。在整个预处理过程中，没有废水产生。

利用 20% (w/w) 的氢氧化钙溶液将预处理后的小麦秸秆的 pH 调至 5-6，再对其进行固态生物脱毒以去除预处理过程中产生的抑制物。固态生物脱毒的操作如下：将培养好的 *A. resinae* ZN1 种子按照 10% (w/w) 的接种量接入至预处理后的小麦秸秆中，混合均匀，再加入至 15 L 的生物反应器中（配备螺带浆）进行脱毒 2-3 天，脱毒条件为 28 °C、通气量为 0.8-1.0 vvm，直至抑制物（乙酸、5-羟甲基糠醛、羟甲基糠醛

等) 被去除干净。按照 NREL 的两步酸解法^[170, 171], 测得经预处理、脱毒后的小麦秸秆中含有 36.2% (w/w) 的纤维素和 1.7% (w/w) 的半纤维素。

2.2.4 光学纯 L-乳酸和 D-乳酸发酵

L-和 D-乳酸的发酵实验均在厌氧条件下进行, 所有发酵实验均做了两组平行实验。

单糖的摇瓶发酵实验: 五种单糖条件下的发酵目的是为了测试 *Pediococcus acidilactici* 对于己糖和戊糖的代谢能力。摇瓶发酵在含有简化 MRS 培养基的 250 mL 锥形瓶中进行, 发酵体系为 50 mL, 分别以葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖为单一碳源, 糖浓度均为 40 g/L。将培养好的 *P. acidilactici* 种子液以 10% (v/v) 的接种量接入至锥形瓶中, 在 42 °C、150 rpm 下进行发酵, 摇瓶中添加 0.6 g CaCO₃/g 糖调节 pH。

混合糖发酵实验: L-乳酸和 D-乳酸的发酵在含有 600 mL 简化 MRS 培养基的 3 L 生物反应器中进行, 以混合糖为碳源, 混合糖浓度是按照 30% (w/w) 固含量的麦秆在预糖化 6 h 后的初始糖浓度设置的, 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖的浓度分别为 70 g/L、50 g/L、8 g/L、2 g/L 和 2 g/L。将培养好的 *P. acidilactici* 种子液按照 10% (v/v) 的接种量加入至 3 L 生物反应器中, 在 42 °C、150 rpm、pH 为 5.5 的条件下发酵 72 h, 发酵期间以 25% (w/w) 的 Ca(OH)₂ 溶液作为 pH 中和剂。

麦秆条件下的同步糖化共发酵 (SSCF): 首先对小麦秸秆进行预糖化以释放出一部分可发酵糖, 预糖化的具体步骤为: 将固含量为 30% (w/w) 的经预处理、脱毒后的小麦秸秆分多次加入至 5 L 生物反应器中, 按 4 mg 蛋白/g 干物料的使用量加入纤维素酶 Cellic CTec 2, 并在 50 °C, 150 rpm 下预糖化 6 h。预糖化结束后, 将温度降至 42 °C, 往生物反应器中同时加入 *P. acidilactici* 种子液和营养物质, 营养物质为 10 g/L 蛋白胨、15 g/L 酵母粉、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 0.25 g/L 一水硫酸锰。在 42 °C、150 rpm、pH 为 5.5 的条件下进行同步糖化与共发酵, 发酵期间以 25% (w/w) 的 Ca(OH)₂ 溶液作为 pH 中和剂。

2.2.5 纤维素 L-乳酸和 D-乳酸的纯化

纤维素乳酸的分离纯化分为五个步骤, 包括固液分离、活性炭脱色、结晶、酸化和阳离子树脂吸附。首先是纤维素 L-乳酸的纯化, 第一步为固液分离, 具体方法为: 将得到的纤维素 L-乳酸钙发酵液在 12000 rpm 离心 10 min, 以去除固体的木质素残渣和细胞。第二步为脱色, 具体方法为: 将 10% (w/v) 的活性炭加入至 L-乳酸钙溶液中, 在水浴摇床中 (60 °C, 150 rpm) 脱色 1 h, 然后通过真空过滤除去活性炭粉末; 使用超纯水 (发酵液的一半体积) 对过滤后的活性炭滤饼进行洗涤, 回收洗涤液, 以回收滤饼上残留的乳酸钙。第三步为结晶, 首先利用真空旋转蒸发仪将 L-乳酸钙溶液在 70 °C 下浓缩至 150-200 g/L, 浓缩后的 L-乳酸钙溶液在 4 °C 进行过夜结晶; 使用无水乙醇对结晶进行洗涤, 待结晶自然风干; 对结晶进行称重, 每克结晶中加入 1 mL 的超纯水, 加热至结晶完全溶解。第四步为酸化, 通过添加 50% (w/w) 的硫酸将乳酸钙酸化为游离的乳酸, 反应直至 pH 恒定后停止; 对得到的固液混合物进行真空过滤, 以分离硫酸钙沉淀和粗乳酸溶液。第五步是阳离子树脂吸附, 目的是去除金属离子 (如 Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、

Fe³⁺和 Na⁺)，通过蠕动泵以 2 mL/min 的速率将粗乳酸溶液泵入直径为 20 mm 的层析柱中，层析柱上装有活化后的阳离子交换树脂 Amberlite IR-120(H)，用于吸附金属离子；收集流出液，即纯化后的 L-乳酸，后续用于 L-丙交酯的合成。

纤维素 D-乳酸的纯化步骤与纤维素 L-乳酸的步骤基本一致，只有在活性炭脱色步骤进行了部分改进，由原来的一次脱色变为两次脱色。第一次脱色使用 7% (w/v) 的活性炭进行脱色，再进行真空过滤以除去活性炭，使用超纯水（超纯水的体积为发酵液体积的 1/4）对得到的活性炭滤饼进行水洗，回收滤出液，得到初步脱色的 D-乳酸钙溶液。第二次脱色将活性炭的用量减少为 3% (w/v)，其余步骤与一次脱色一致，脱色后的纤维素 D-乳酸钙溶液再进行后续的纯化步骤，以得到纯化后的纤维素 D-乳酸。

2.2.6 发酵产物的检测

在乳酸发酵过程中定期收集样品，样品在 12000 rpm 下离心 5 min，取得的上清经 0.22 μm 的滤膜进行过滤除菌，再进行各物质含量的检测。

样品中的葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛和乳酸的含量检测使用的是配备了 Aminex HPX-87H 色谱柱的 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)。检测条件为：0.005 M 的 H₂SO₄ 溶液为流动相，流速为 0.6 mL/min，柱温为 65 °C。

阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖的含量检测使用的是配备了 Aminex HPX-87P 色谱柱的 HPLC (refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)。检测条件为：流动相为灭菌后的超纯水，流速为 0.6 mL/min，柱温为 80 °C。

4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛的含量检测使用的是配备了紫外检测器 UV/Vis detector SPD-20A 和 YMC-Pack ODS-A column 色谱柱的 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)。检测方法参照梯度洗脱法^[172]，Pump B 是 100%乙腈，Pump A 为 1%的甲酸水溶液，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 270 nm。

2.2.7 乳酸纯化过程中的杂质检测

总酚含量的检测方法参照 Folin & Ciocalteu 法^[173]和 Gu 等人的方法^[174]，在 10 mL 试管中分别加入 0.5 mL 的发酵液、1 mL 15% (v/v) 的福林酚试剂和 4 mL 0.7 M 的 NaCO₃ 溶液，混匀后，于室温下反应 2 h。反应结束后，在 765 nm 下进行样品的吸光度测定，按照没食子酸的标准曲线来计算总酚的浓度。

蛋白质含量的检测采用的是 Bradford 法^[169]，使用标准牛血清白蛋白 BSA 为标准品。金属离子 (Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺和 Pb²⁺) 的含量检测参照的是 Han 等人的方法^[175]，使用的是配备了同步电荷耦合检测器的等离子体发射光谱仪 (725 ICP-OES, Agilent)。

2.2.8 光学纯 L-和 D-乳酸的得率计算

在单糖和混合糖条件下的发酵过程中，L-/D-乳酸的得率定义为实际发酵得到的 L-/D-乳酸与理论上得到的 L-/D-乳酸的比值，计算公式为：

$$\text{L-/D-乳酸得率} = \frac{[\text{LA}] \times V - [\text{LA}]_0 \times V_0}{[\text{Sugar}] \times 1} \times 100\%$$

公式中的 $[LA]$ 和 $[LA]_0$ 分别表示发酵结束和开始时所对应的 L-/D-乳酸浓度 (g/L), V 和 V_0 分别表示发酵结束和开始时所对应的发酵体积 (L)。[Sugar]是发酵培养基中的初始糖的总量 (g)。

2.2.9 L-乳酸和 D-乳酸的光学纯度检测

L-乳酸和 D-乳酸的光学纯度的检测使用的是试剂盒 Megazyme D-/L-Lactic Acid Kit (Megazyme International Ireland, Bray, Wicklow, Ireland), 按照操作说明加好反应体系后, 使用分光光度计 Biomate 3S (Thermo Scientific, DE, USA) 检测 340 nm 下的 NADH 的增加量来分别测定 D-/L 乳酸的含量, 最后计算 D-/L 乳酸的光学纯度。

2.3 结果与讨论

2.3.1 利用生物脱毒真菌降解抑制物

抑制物是阻碍高纯度的聚合级乳酸生产的第一个障碍, 因此, 需要被完全去除以消除其负面影响。传统的脱毒方法 (如水洗或过碱中和) 不仅会产生大量有毒的废水、导致大量的可溶性糖损失, 而且不能完全地去除抑制物^[130, 176, 177]。我们采用本实验室开发的干酸预处理技术, 将预处理后麦秆的半纤维素 (木聚糖、甘露聚糖、阿拉伯聚糖和半乳聚糖) 水解了约 90%, 同时很好地保留了纤维素组分 (表 2.1)。由于预处理过程中没有废水和废气的排出, 小麦秸秆经过预处理后, 物料中产生了高浓度的抑制物, 每克干物料中含有 22.4 ± 2.8 mg 乙酸、 1.5 ± 0.1 mg 糠醛、 3.3 ± 1.2 mg HMF、 0.1 ± 0.0 mg HBA、 0.3 ± 0.0 mg 香草醛和 1.3 ± 0.1 mg 丁香醛。为了去除抑制物, 我们使用了自主筛选得到的生物脱毒真菌 *A. resinae* ZN1 来选择性地将抑制物彻底转化为二氧化碳和水。经生物脱毒后, 预处理麦秆中的呋喃醛 (糠醛和 HMF)、弱有机酸 (乙酸) 抑制物被完全降解, 大部分的酚醛抑制物 (HBA、香草醛和丁香醛) 被降解, 只剩下少量的酚类抑制物 (HBA、香草醛和丁香醛的含量分别为 0.1 ± 0.0 mg/g DM、 0.2 ± 0.0 mg/g DM 和 0.5 ± 0.0 mg/g DM), 这部分酚类抑制物在后期的纯化过程中被完全去除。同时, 在生物脱毒过程中, 绝大多数的可发酵糖得以保留, 没有明显的糖损失。通过生物脱毒技术去除了抑制物, 解除了抑制物对于纤维素乳酸纯度和产量的影响。

表 2.1 预处理、脱毒前后小麦秸秆中的糖和抑制物的含量

Table 2.1 Sugars and inhibitors contents of wheat straw before and after dry acid pretreatment and biodegradation

Components	Virgin wheat straw (mg/g DM)	After pretreatment (mg/g DM)	After biodegradation (mg/g DM)
Polysaccharides			
Cellulose	357.9±2.7	364.5±6.9	359.9±1.4
Xylan	225.5±4.2	24.0±1.7	24.9±1.4
Arabinan + Mannan*	56.7±4.0	2.5±1.6	1.9±0.5
Galactosan	6.2±0.5	2.0±0.2	2.7±1.4
Fermentable monosaccharide sugars			
Glucose	14.1±0.44	28.9±0.2	17.6±2.6
Xylose	ND	136.7±5.2	122.2±7.3
Arabinose + Mannose*	ND	16.6±0.6	15.7±0.4
Galactose	ND	4.1±0.0	1.1±0.3
Inhibitors			
Acetic acid	ND	22.4±2.8	ND
Furfural	ND	1.5±0.1	ND
5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	ND	3.3±1.2	ND
4-Hydroxybenzaldehyde (HBA)	ND	0.1±0.0	0.1±0.0
Vanillin	ND	0.3±0.0	0.2±0.0
Syringaldehyde	ND	1.3±0.1	0.5±0.0

注：ND，表示 HPLC 未检测到；*，由于阿拉伯糖和甘露糖的峰在 Aminex HPX-87P 柱上的停留时间非常接近，甘露糖的小峰与阿拉伯糖的峰重叠，因此甘露糖和阿拉伯糖作为一个组分来进行含量的测定。

2.3.2 *P. acidilactici* 工程菌的己糖和戊糖代谢能力探究

木质纤维素原料在经过预处理和酶水解后，主要会释放出葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。但大多数生物炼制菌株转化非葡萄糖单糖的效率低下，难以将木质纤维素来源的这五种单糖完全地、协同地转化至乳酸，导致乳酸发酵液中产生大量残糖。残糖不仅会对乳酸的纯度造成负面影响，还会严重阻碍后续丙交酯的合成^[105]。因此，残糖是阻碍聚合级乳酸生产的第二大障碍，因此，有必要寻找合适的乳酸生产菌株来完全转化木质纤维素来源的所有单糖为乳酸以去除残糖。

在之前的研究中，Qiu 等^[78, 79]分别在 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 中构建了一条异源的木糖代谢路径，得到了 L-乳酸发酵工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸发酵工程菌株 *P. acidilactici* ZY15，这两株工程菌株均展现出了良好的木糖代谢能力。我们在此基础上，全面地探究了 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 对于

己糖和戊糖的代谢能力 (图 2.1), 以评估其对于木质纤维素来源的全糖的代谢能力。结果显示, *P. acidilactici* ZY271 不仅能代谢木糖, 还能实现葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖到 L-乳酸的转化, 其葡萄糖、甘露糖和半乳糖代谢速率分别为 1.43 g/L/h、1.03 g/L/h 和 0.66 g/L/h, 其木糖和阿拉伯糖的利用速率分别为 1.30 g/L/h 和 1.36 g/L/h, L-乳酸得率高达 0.85-0.96 g/g 糖 (图 2.1a)。同样地, *P. acidilactici* ZY15 也能代谢葡萄糖 (1.67 g/L/h)、木糖 (0.93 g/L/h)、阿拉伯糖 (0.94 g/L/h)、甘露糖 (1.44 g/L/h) 和半乳糖 (0.66 g/L/h), D-乳酸得率为 0.77-0.96 g/g 糖。以上结果表明, 工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 具有代谢木质纤维素来源的己糖和戊糖的能力, 可作为全谱代谢己糖和戊糖的潜力菌株。

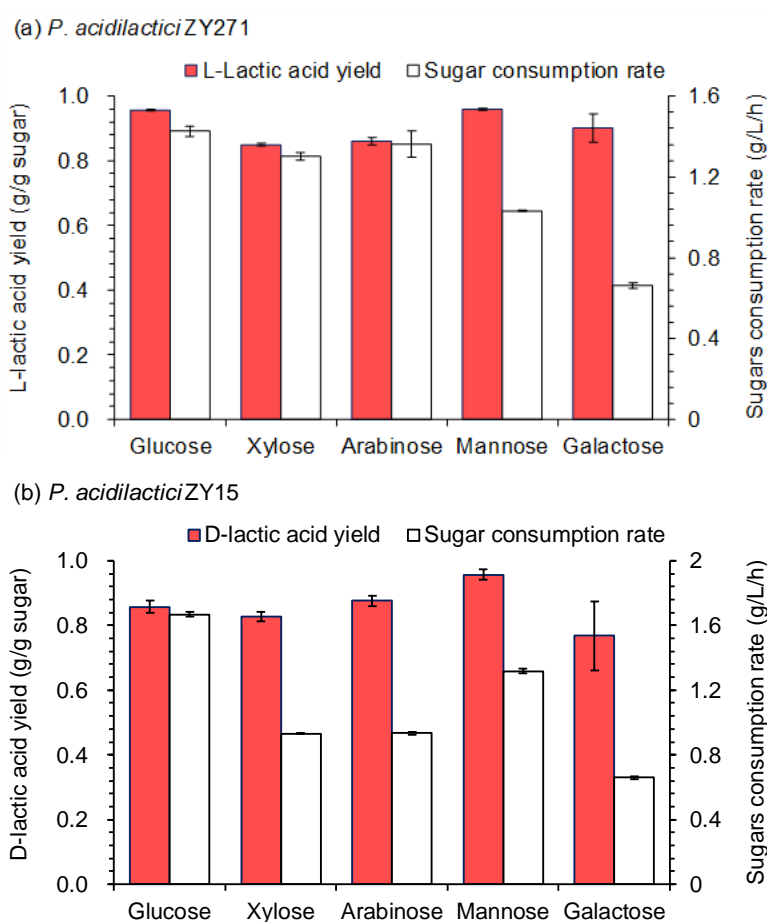


图 2.1 *P. acidilactici* 工程菌株利用单糖进行 L-和 D-乳酸的发酵

(a) *P. acidilactici* ZY271; (b) *P. acidilactici* ZY15

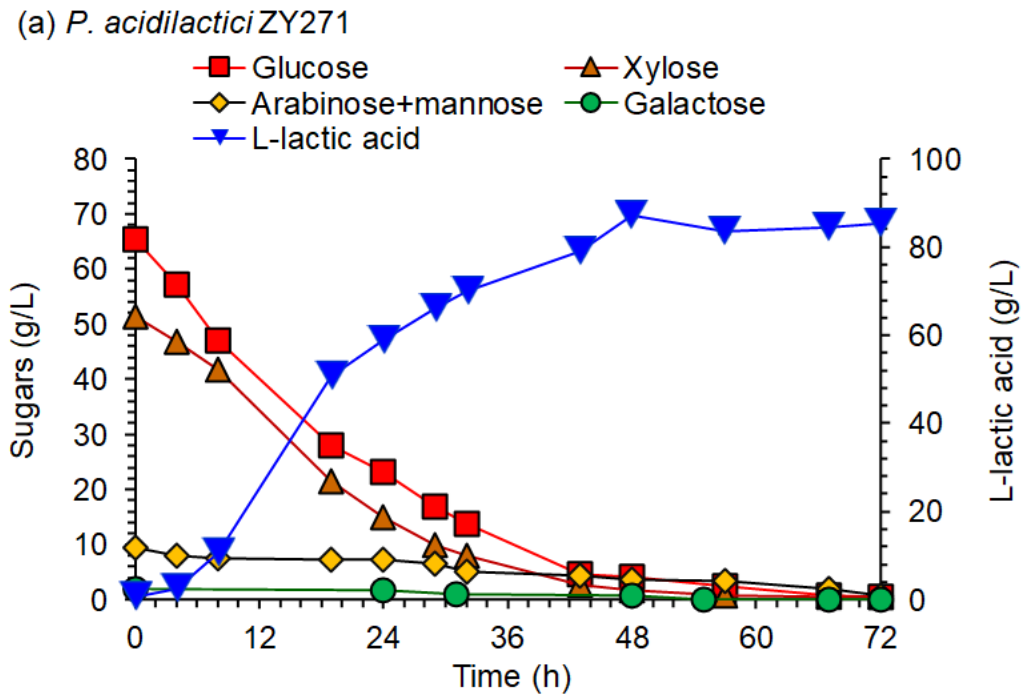
Fig. 2.1 Chiral L- and D-lactic acid fermentation by engineered *P. acidilactici* strains using single sugar

(a) *P. acidilactici* ZY271; (b) *P. acidilactici* ZY15

发酵条件: 发酵使用的 MRS 培养基分别以葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖为碳源, 糖浓度为 40 g/L; 42 °C, 150 rpm, 发酵 24 h; 添加 0.6 g CaCO₃/g 糖调节 pH。

2.3.3 *P. acidilactici* 工程菌共利用合成培养基中的全糖生产 L-和 D-乳酸

为探究工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 对于己糖和戊糖的同步代谢和全谱代谢能力，我们在以混合糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）为碳源的合成培养基条件下进行了 L-和 D-乳酸的发酵（图 2.2）。结果表明，工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 同时代谢葡萄糖和四种非葡萄糖单糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖），并将这五种单糖都转化成了 L-乳酸（85.4 g/L），使得残糖浓度降至极低。在发酵 72 h 后，残留的葡萄糖、木糖、阿拉伯糖+甘露糖和半乳糖浓度分别为 0.39 g/L、0.44 g/L、0.69 g/L 和 0.12 g/L，总残糖浓度只有 1.64 g/L（图 2.2 a）。同样地，工程菌株 *P. acidilactici* ZY15 也实现了葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖的协同代谢和全谱代谢（图 2.2 b），最终 D-乳酸的产量为 81.1 g/L，残糖浓度只有 2.06 g/L。以上结果表明，在发酵过程中，工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 以协同速率同步转化全谱的木质纤维素来源的可发酵单糖为 L-乳酸和 D-乳酸，使得发酵后的残糖浓度降至极低，是克服残糖障碍、生产高纯度乳酸的优良发酵菌株。



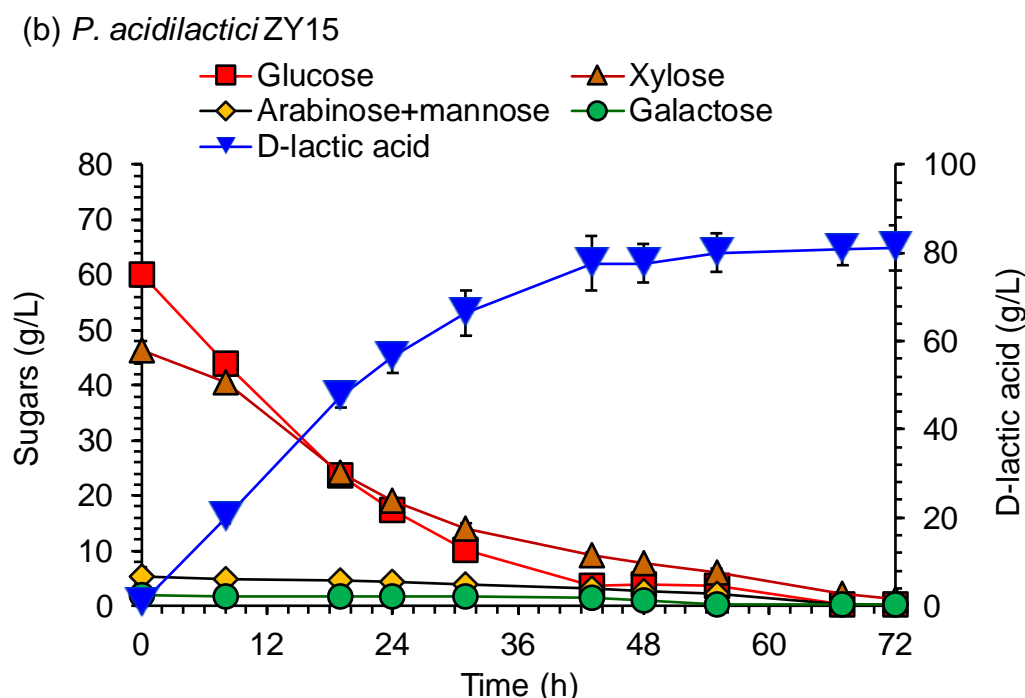


图 2.2 *P. acidilactici* 工程菌株共利用合成培养基的己糖和戊糖生产 L-乳酸和 D-乳酸

(a) *P. acidilactici* ZY271; (b) *P. acidilactici* ZY15

Fig. 2.2 Hexose and pentose co-utilization by engineered *P. acidilactici* strain in synthetic medium to produce L-lactic acid and D-lactic acid

(a) *P. acidilactici* strain ZY271; (b) *P. acidilactici* ZY15

发酵条件：发酵使用的 MRS 培养基中含有~70 g/L 葡萄糖、~50 g/L 木糖、~8 g/L 阿拉伯糖、~2 g/L 甘露糖和~2 g/L 半乳糖；3 L 生物反应器，42 °C、150 rpm 下发酵 72 h；添加 25% (w/w) 的 Ca(OH)₂ 溶液为中和剂，调节 pH 至 5.5。

2.3.4 *P. acidilactici* 工程菌共利用木质纤维素中的全糖生产 L-和 D-乳酸

为了研究工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 是否能在木质纤维素体系下实现己糖和戊糖的共代谢和全糖代谢以生产 L-和 D-乳酸，我们以 30% (w/w) 固含量的小麦秸秆为原料，进行了同步糖化与共发酵（图 2.3）。结果显示，工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 在发酵过程中协同地代谢纤维素和半纤维素来源的己糖（葡萄糖、甘露糖和半乳糖）和戊糖（木糖和阿拉伯糖），最终将这主要的五种可发酵单糖均转化成了高浓度（126.8 g/L）的 L-乳酸，残糖浓度降至极低，总残糖浓度为 1.2 g/L（葡萄糖：0.3 g/L，木糖：0.4 g/L，阿拉伯糖+甘露糖：0.2 g/L，半乳糖：0.3 g/L）。同样地，工程菌株 *P. acidilactici* ZY15 也将木质纤维素来源的五种单糖同步转化为 127.1 g/L 的 D-乳酸，最终总残糖浓度低至 1.6 g/L（葡萄糖：0.1 g/L，木糖：1.1 g/L，阿拉伯糖+甘露糖：0 g/L，半乳糖：0.4 g/L）。同时，在发酵液中未检测到抑制物（糠醛，5-羟甲基糠醛和乙酸）。经检测，纤维素 L-乳酸和 D-乳酸的光学纯度分别达到了 99.60%和 99.07%。L-和 D-乳酸发酵工程菌株的使用有效地将乳酸发酵液中的残糖浓度降至极低（1.2-1.6 g/L），最终发酵得到高浓度、高光学纯度的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸。除本研究外，尚未有研究显示发酵微生物将木质纤维素来源的己糖和戊糖全转化为高浓度和高光学纯度的乳酸。如

表 2.2 所示, 进化菌株 *B. coagulans* 利用稻秆中的葡萄糖和木糖生产了 92.5 g/L 的 L-乳酸, 但木糖代谢滞后于葡萄糖^[72]; 进化菌株 *L. casei* 仅展示出了利用甘蔗渣中的葡萄糖生产 L-乳酸 (204.1 g/L) 的能力, 但没有数据显示其能利用其它 4 种非葡萄糖单糖 (木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖) ^[69]; 工程菌株 *K. marxianus* 和 *S. cerevisiae* 共利用玉米芯残渣和荞麦壳中的葡萄糖和木糖生产了 34-103 g/L 的 L-乳酸, 但木糖的代谢速率远低于葡萄糖代谢速率^[84, 85]; 工程菌株 *L. plantarum* 共利用玉米秸秆和高粱秆中的葡萄糖和木糖生产了 22-61.4 g/L 的 D-乳酸, 但是菌株木糖利用远慢于葡萄糖^[73, 74]; 工程菌株 *E. coli* 展现出了共利用玉米秸秆中葡萄糖、木糖和阿拉伯糖的能力, 但没有数据显示其能利用甘露糖和半乳糖, 而且菌株的木糖和阿拉伯糖的代谢远慢于葡萄糖, 最终残糖的浓度较高 (~7 g/L), D 乳酸的产量较低 (~60 g/L) ^[76]。综上所述, 其它生物炼制菌株存在非葡萄糖单糖利用速率低、不能代谢全部非葡萄糖单糖 (木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖) 的问题, 在利用木质纤维素原料生产乳酸时势必会剩余相当量的可发酵糖, 降低乳酸产量的同时增加了后续乳酸分离纯化的难度和成本; 而本研究中的工程菌株 *P. acidilactici* 同步转化全谱的木质纤维素来源的葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖为高浓度的 L-乳酸和 D-乳酸, 很好地克服了残糖对于生产高纯度乳酸的阻碍, 降低了后续乳酸分离纯化的难度。

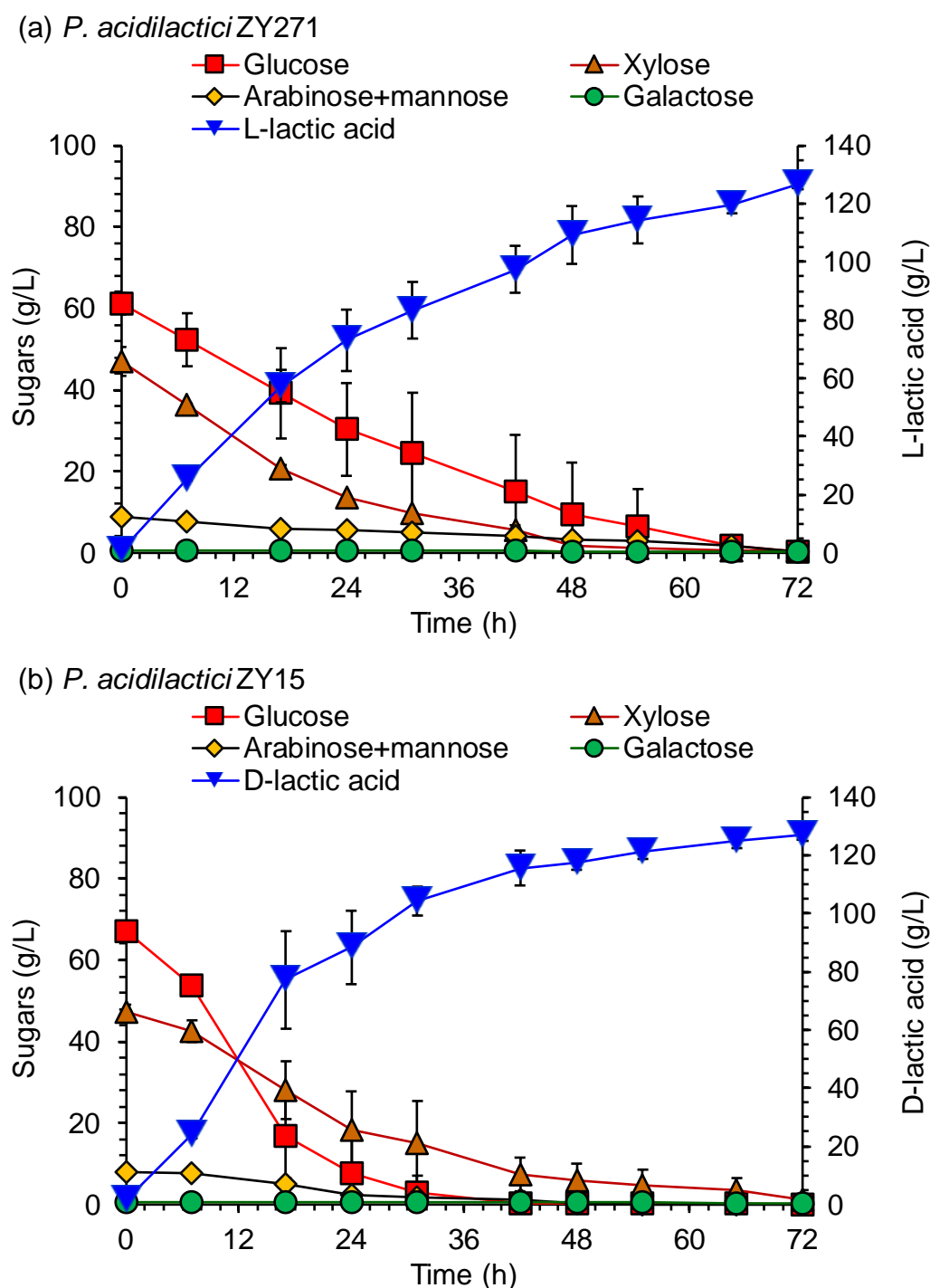


图 2.3 *P. acidilactici* 工程菌株利用麦秆进行同步糖化与共发酵生产 L-和 D-乳酸
(a) *P. acidilactici* ZY271; (b) *P. acidilactici* ZY15

Fig. 2.3 Simultaneous saccharification and co-fermentation by engineered *P. acidilactici* using wheat straw to produce L- and D-lactic acid

(a) *P. acidilactici* ZY271; (b) *P. acidilactici* ZY15

发酵条件：使用经稀酸预处理和脱毒后的麦秆为原料，固含量为 30% (w/w)；Cellic CTec2 纤维素用量为 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干物料，50 °C、150 rpm 下预糖化 6 h 后开始 SSCF；42 °C，150 rpm，发酵 72 h，使用 25% (w/w) 的 Ca(OH)₂ 溶液为中和剂，调节 pH 至 5.5。

表 2.2 发酵微生物利用木质纤维素生产 L-和 D-乳酸

Table 2.2 Fermentative microorganisms produce L- and D-lactic acid from lignocellulosic biomass

Microorganisms	Feedstocks	Sugar utilizations					Optical isomer	LA titer (g/L)	Optical purity (%)	Sources
		Glucose	Xylose	Arabinose	Mannose	Galactose				
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	Sugarcane bagasse	✓	×	×	×	×	L-LA	204.1	NA	[69]
<i>Bacillus coagulans</i> LA-15-2	Rice straw	✓	✓	×	×	×	L-LA	92.5	NA	[72]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YKX071	Corn cob residue	✓	✓	×	×	×	L-LA	103.0	99.5	[85]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BK01	Buckwheat husk	✓	✓	×	×	×	L-LA	34.0	NA	[84]
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826 $\Delta dhL1$ -pLEM- <i>xylAB</i>	Corn stover	✓	✓	×	×	×	D-LA	61.4	~99.7	[74]
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826 $\Delta dhL1$ -pCU-P <i>xylAB</i>	Corn stover	✓	✓	×	×	×	D-LA	27.3	99.5	[73]
<i>Escherichia coli</i> AV03	Corn stover	✓	✓	✓	×	×	D-LA	~60	NA	[76]
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271	Wheat straw	✓	✓	✓	✓	✓	✓	126.8	99.6	This study
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY15	Wheat straw	✓	✓	✓	✓	✓	✓	127.1	99.1	This study

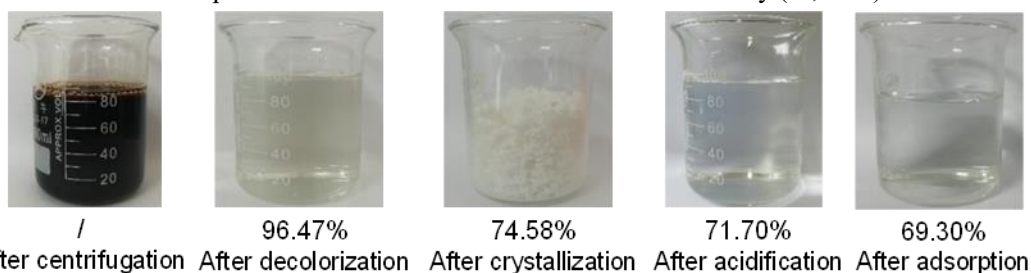
NA, not available; ✓, capable; ×, not capable or not determined.

2.3.5 纤维素 L-和 D-乳酸的纯化

为得到高纯度的、符合聚合要求的 L-乳酸和 D-乳酸，我们按照常规的纯化步骤来对木质纤维素来源的 L-乳酸发酵液和 D-乳酸发酵液进行分离纯化。纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别经过固液分离、脱色、结晶、酸化和阳离子交换树脂吸附这五步常规的步骤来进行分离纯化（图 2.4 和图 2.5），过程中没有增加额外的分离纯化步骤（如分子蒸馏操作）。固液分离步骤主要是通过离心来去除不溶性木质素残渣、发酵细胞和纤维素酶蛋白等固体物质；脱色是通过活性炭吸附来去除木质素衍生的有色化合物，得到的乳酸钙溶液通过真空旋转蒸发仪来进行浓缩；过饱和的溶液在低温条件下（4 °C）结晶成固体沉淀；得到的乳酸钙结晶用水溶解后，经过硫酸的酸化后得到游离的乳酸和不溶的硫酸钙沉淀，通过过滤操作去除硫酸钙沉淀，得到乳酸溶液；最后将乳酸溶液通过阳离子交换树脂来去除金属离子。

经分离纯化后，纤维素 L-乳酸的总回收率为 $69.3\% \pm 0.4\%$ （图 2.4 a）。纤维素 L-乳酸的损失（21.9%）主要出现在结晶步骤，原因是在结晶过程中，没有对母液进行 L-乳酸的重复回收，这一点在实际工业操作中可以通过重复回收来减少乳酸损失。在随后的纯化步骤中，没有观察到明显的 L-乳酸的损失。同时，我们监测了纤维素 L-乳酸在纯化过程中的杂质含量的变化，包括蛋白质、糖、总酚、乙酸和金属离子等杂质（图 2.4 b）。针对残糖，在进行脱色、结晶操作后，纤维素 L-乳酸中的残糖含量降低至 $5.5 \pm 1.1 \text{ mg/g}$ 乳酸，其含量在后续的纯化过程中保持稳定。针对蛋白质，蛋白质含量在前两步纯化过程中处于较低水平（ $\sim 0.6 \text{ mg/g}$ ），在结晶阶段由于蛋白质与钙发生共沉淀，蛋白质的含量略微提高至 $1.7 \pm 0.2 \text{ mg/g}$ ，在酸化和吸附步骤后，蛋白质含量又降低至 $\sim 0.6 \text{ mg/g}$ 。针对酚类物质，在活性炭脱色后，纤维素 L-乳酸发酵液中的总酚类物质（ $30.0 \pm 2.3 \text{ mg/g}$ ）被完全去除。针对乙酸，在活性炭脱色、结晶后，乙酸含量由 $18.7 \pm 0.8 \text{ mg/g}$ 降低至 $6.0 \pm 2.1 \text{ mg/g}$ ，即去除了 70% 的乙酸。针对金属离子，在结晶步骤后， Ca^{2+} 浓度升高至 $450.4 \pm 9.7 \text{ mg/g}$ ，但在经过硫酸酸化后，由于形成了硫酸钙沉淀， Ca^{2+} 浓度降低至 $9.0 \pm 0.0 \text{ mg/g}$ ，最后经过阳离子树脂吸附后， Ca^{2+} 浓度降低至 $2.8 \pm 0.1 \text{ mg/g}$ ；其它的离子在经过纯化后基本上被去除， Na^+ 浓度降低至 $1.0 \pm 0.0 \text{ mg/g}$ ， Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 浓度被完全去除， Cu^{2+} （ $< 0.03 \text{ mg/g}$ ）和 Pb^{2+} （ $< 0.3 \text{ mg/g}$ ）的含量均低于检出限。在经过以上纯化步骤后，纤维素 L-乳酸发酵液中残留的糖、蛋白质、酚类物质、乙酸和金属离子等杂质均被去除，纯化后的纤维素 L-乳酸可以用于纤维素 L-丙交酯的合成。

(a) Cellulosic L-lactic acid purification illustration and L-lactic acid recovery (% , w/w)



(b) Impurity contents in cellulosic L-lactic acid during purification process

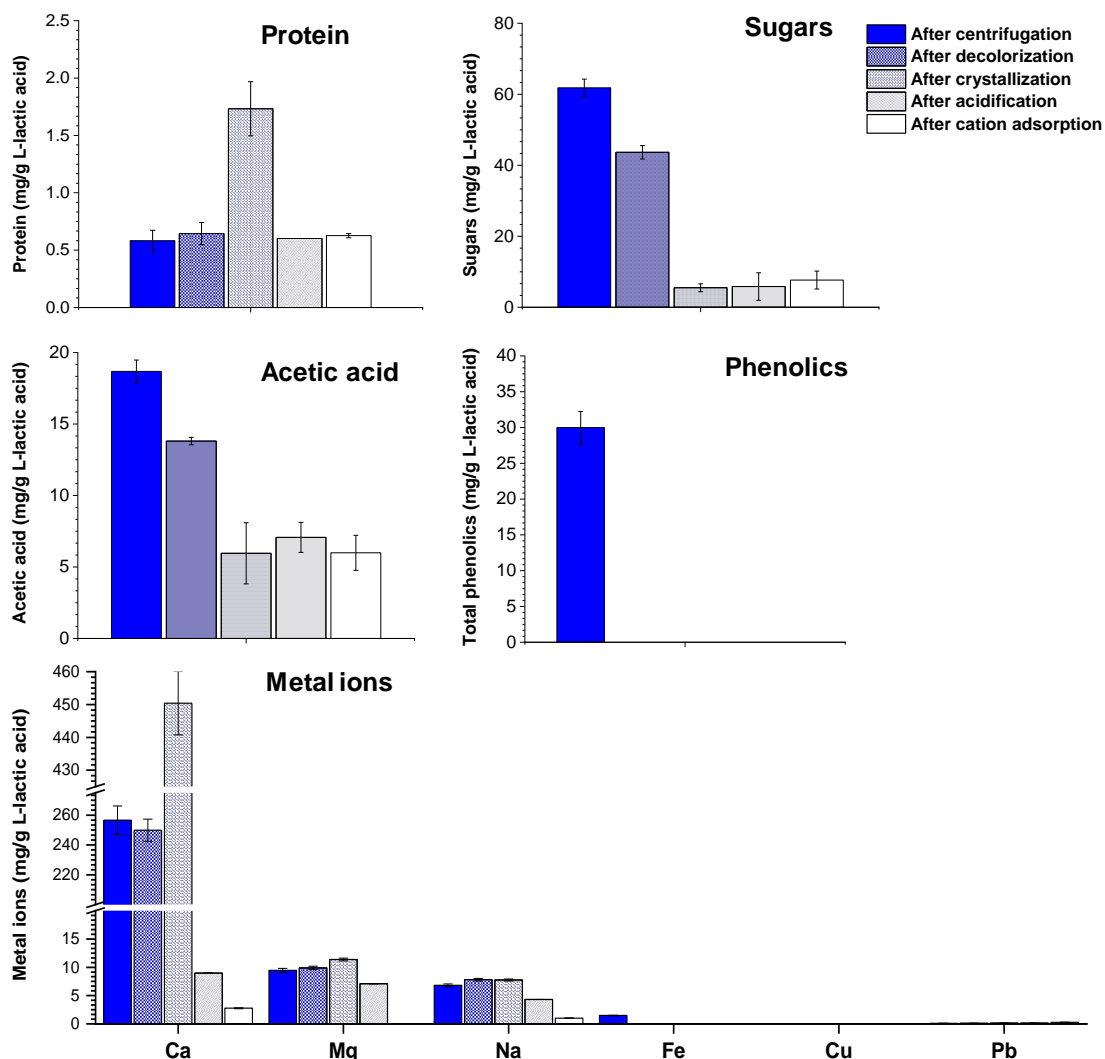


图 2.4 纤维素 L-乳酸中的杂质在纯化过程中的变化

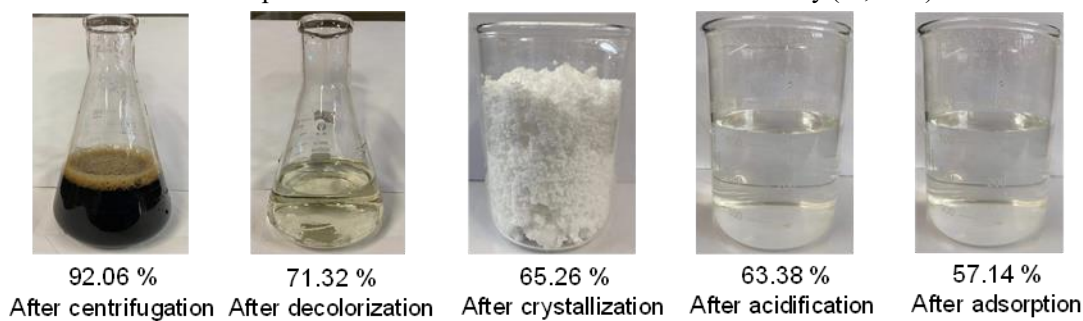
(a) 纤维素 L-乳酸的纯化过程和 L-乳酸回收率 (% , w/w); (b) 纯化过程中的杂质含量变化

Fig. 2.4 Impurities changes in cellulosic L-lactic acid during the purification process

(a) The purification process of cellulosic L-lactic acid and L-lactic acid recovery (% , w/w); (b) Impurity content changes in each step of the purification

纤维素 D-乳酸发酵液经过基本一致的纯化步骤（固液分离、脱色、结晶、酸化和吸附）以去除糖、蛋白质、酚类物质和离子杂质（图 2.5 b）。跟纤维素 L-乳酸纯化过程唯一不同的一点是，将活性炭脱色步骤由一步法改进为两步法，以得到更好的纯化效果。在经过纯化后，纤维素 D-乳酸中的总残糖（ 43.0 ± 3.4 mg/g 乳酸）、蛋白质（ 3.1 ± 0.2 mg/g）、酚类抑制物（ 29.6 ± 1.4 mg/g）、乙酸（作为发酵营养盐， 9.4 ± 2.2 mg/g）均被完全去除。残糖、蛋白质和乙酸的完全去除可能是由于使用了改进的两步法进行脱色，与之前的一次性添加 10%（w/v）的活性炭的脱色不同，此次分两次添加 7%（w/v）和 3%（w/v）的活性炭来进行脱色，以达到重复吸附纤维素 D-乳酸中的杂质成分的目的。事实证明，两步法脱色对于杂质去除的效果更好。另外，在改良了脱色步骤后，纤维素 D-乳酸钙晶体更容易从母液中析出，而且，晶体表面附着的杂质更少，杂质被去除得更为彻底。针对离子成分，经纯化后，高浓度的 Ca^{2+} （ 305.8 ± 12.0 mg/g）和 K^{+} （ 69.4 ± 2.8 mg/g）被有效去除，其含量降低至 3.6 mg/g 以下； Na^{+} （ 20.7 ± 1.5 mg/g）和 Cl^{-} （ 32.6 ± 2.3 mg/g）的浓度也降至 2.8 mg/g 以下；低浓度的 Mg^{2+} （ 5.7 ± 0.3 mg/g）被完全去除。同样地，在活性炭脱色后，纤维素 D-乳酸的损失率较高（~21%），而在其它的纯化步骤中均未观察到明显的 D-乳酸损失。这是由于在脱色过程中，我们只对活性炭滤饼进行了一次水洗来进行 D-乳酸的回收，一定量的 D-乳酸残留在活性炭滤饼上，造成 D-乳酸的损失。在之后的研究中，可以对活性炭滤饼进行多次水洗的操作来回收滤饼中的 D-乳酸以减少其损失。总的来说，经过以上的纯化步骤，纤维素 D-乳酸发酵液中残留的糖、蛋白质、酚类物质和金属离子等杂质被去除，得到了纯化后的纤维素 D-乳酸，可以用于后续的纤维素 D-丙交酯的合成。

(a) Cellulosic D-lactic acid purification illustration and D-lactic acid recovery (% , w/w)



(b) Impurity contents in cellulosic D-lactic acid during purification process

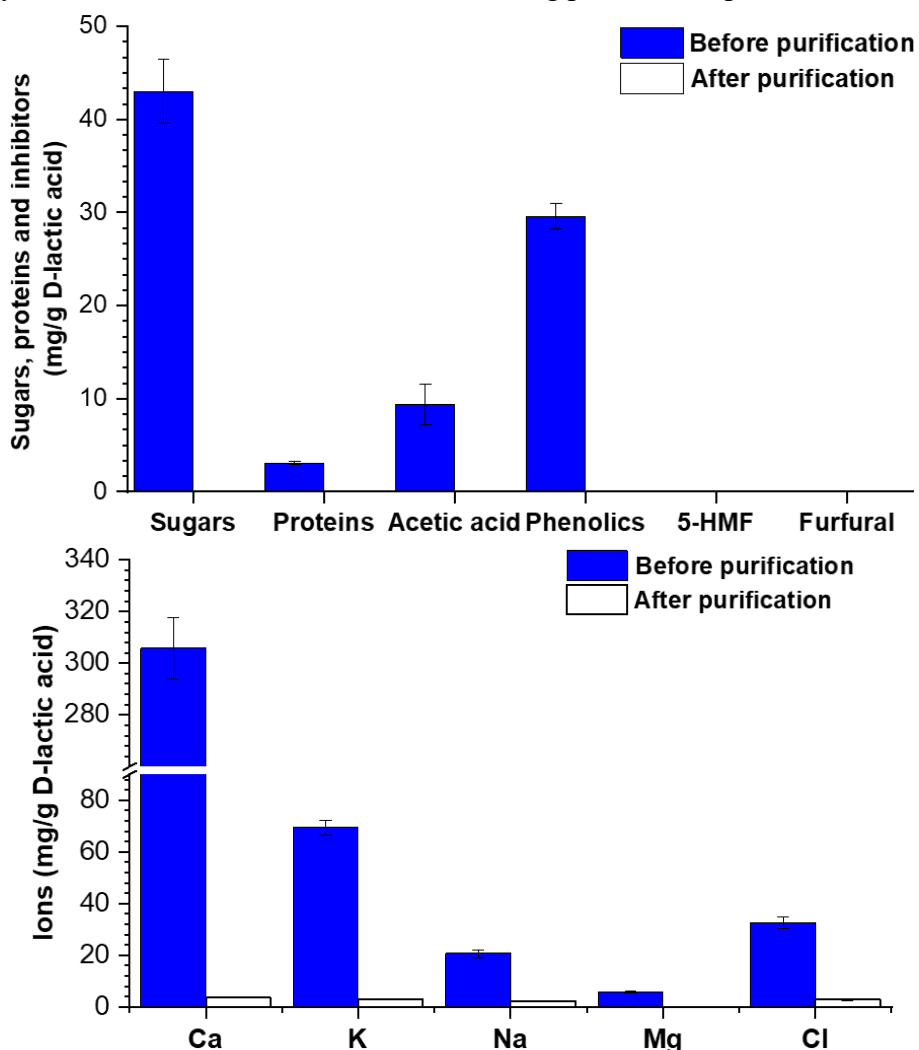


图 2.5 纤维素 D-乳酸在纯化过程中的杂质含量的变化

(a) 纤维素 D-乳酸的纯化过程和 D-乳酸回收率 (% , w/w); (b) 纯化过程中的杂质含量变化

Fig. 2.5 Impurities changes in cellulosic D-lactic acid during the purification process

(a) The purification process of cellulosic D-lactic acid and D-lactic acid recovery (% , w/w); (b) Impurity content changes in each step of the purification

2.4 本章小结

本章节针对严重影响纤维素乳酸的纯度和产量的抑制物和残糖成分，分别使用了独特的生物脱毒技术和具有全糖利用能力的乳酸发酵工程菌株来去除抑制物和残糖，解除了抑制物和残糖对于聚合级乳酸纯度和产量的负面影响。发酵得到的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别经常规的纯化步骤后，最终成功得到了高浓度、高光学纯度的纤维素 L-乳酸和纤维素 D-乳酸。

本章主要的研究结论如下：

(1) 使用独特的生物脱毒技术将大部分的呋喃醛、弱有机酸和酚醛类抑制物转化为二氧化碳和水，同时保留了绝大部分可发酵糖，解除了抑制物对于聚合级乳酸纯度和产量的影响。

(2) 经发酵测试，工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 均具有全谱代谢木质纤维素来源的葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖的能力。在以麦秆为原料的同步糖化与共发酵过程中，这两株工程菌株以高度协同的速率同步代谢葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖，最终将残糖降至极低 (1.2-1.6 g/L)，纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别达到 126.8 g/L 和 127.1 g/L，光学纯度为 99.60% 和 99.07%。

(3) 发酵得到的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸经过常规的固液分离、脱色、结晶、酸化和吸附的纯化步骤后，发酵液中的杂质成分（糖类、蛋白质、总酚类物质和金属离子）得到有效去除，纯化后的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸达到了聚合级乳酸的要求。

第 3 章 木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成

3.1 引言

聚乳酸(PLA)分为聚 L-丙交酯(PLLA)和聚 D-丙交酯(PDLA), 高分子量的 PLLA 和 PDLA 的合成主要通过两步法^[178], 包括乳酸合成丙交酯和丙交酯的开环聚合。丙交酯是高分子量聚乳酸的关键前体, 丙交酯的合成分为两步: 乳酸进行脱水缩合形成低分子量的乳酸低聚物, 乳酸低聚物再进行解聚反应形成丙交酯^[11, 27, 178]。

木质纤维素生物质是替代淀粉原料生产聚乳酸前体的最佳原料, 但目前尚未有文献表明木质纤维素来源的乳酸成功合成了丙交酯。以木质纤维素来源的乳酸合成丙交酯的主要障碍有以下两个: (1) 木质纤维素预处理过程中产生的抑制物杂质难以去除, 残留在乳酸溶液中的抑制物严重阻碍了乳酸的聚合反应; (2) 发酵微生物对非葡萄糖的低效利用和不完全利用导致残糖的产生, 残糖杂质的存在严重阻碍了乳酸的解聚和缩聚反应。因此, 抑制物和残糖两大杂质是使用纤维素乳酸合成丙交酯的关键障碍。在第二章中, 通过使用生物脱毒技术去除了抑制物; 同时使用具有全糖代谢能力的工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 以协同代谢速率实现了木质纤维素来源的己糖和戊糖的全谱代谢, 将残糖浓度降至极低; 克服了残糖和抑制物两大障碍, 得到了高光学纯度和高浓度的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸。

在本研究中, 将第二章纯化得到的纤维素 L-和 D-乳酸分别作为聚合单体, 探究了其合成纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的可行性。通过 L-和 D-乳酸的解聚和缩聚反应, 首次成功合成了木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯。将淀粉来源的 L-和 D-丙交酯标品与纤维素 L-和 D-丙交酯进行了性质和结构上的比较, 结果表明, 木质纤维素来源的丙交酯的各项特征(结构、性质和组成)均与淀粉来源的丙交酯标品的特征一致。此研究首次实现了木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成, 为木质纤维素生物质生产生物可降解型的聚乳酸材料奠定了基础。

3.2 材料与方法

3.2.1 试剂

淀粉原料发酵生产的商品 L-乳酸(纯度为 90%)和 D-乳酸(纯度为 90%)购自 Macklin (Shanghai, China)。辛酸亚锡购自 Adamas (Shanghai, China), 其它试剂购自 General Reagent Co (Shanghai, China)。

3.2.2 L-和 D-丙交酯的合成及纯化

L-丙交酯与 D-丙交酯的合成方法一致。L-丙交酯的合成及纯化步骤如下, D-丙交酯的合成只需将以下的 L-乳酸换成 D-乳酸。

(1) 脱水: 将纯化得到的纤维素 L-乳酸在旋转蒸发仪上进行浓缩, 直至液体呈现微黄色。接着, 再进行脱水处理以去除游离水, 具体为: 将纤维素 L-乳酸倒入至三口圆

底玻璃烧瓶中（烧瓶放置在带有磁力搅拌装置的油浴锅中，烧瓶上接有分水器、冷凝管和接收瓶），在 0.005 MPa 和 80 °C 下维持 0.5-1 h。

(2) 缩聚：将三口烧瓶的压力变为常压，向三口烧瓶中加入 3% (w/w) 的辛酸亚锡催化剂来进行 L-乳酸的缩聚反应，温度缓慢升至 150 °C 并保持 1-2 小时，此过程将体系中的水分完全去除，直到颜色变为深褐色，即生成乳酸低聚物。

(3) 解聚：在真空条件 (0.098 MPa) 下将温度快速升高至 240-260 °C，开始进行乳酸低聚物的解聚反应。更换接收瓶进行蒸馏，直至无馏出物产生，蒸出的液体呈现淡黄色，经冷凝管冷却后得到结晶 (L-丙交酯产物)。用超纯水洗涤结晶并进行真空过滤，得到粗 L-丙交酯。

(4) 纯化：将适量无水乙醇加入至粗 L-丙交酯中，在 40 °C 下进行溶解，然后将得到的粗 L-丙交酯溶液在 4 °C 的条件下进行重结晶。以上步骤重复两次，获得的晶体呈现白色针状，最后将晶体置于真空冷冻干燥机 (CoolSafe Pro 55-9, LaboGene, Danmark) 中干燥 12 小时，得到精制的 L-丙交酯。

3.2.3 L-和 D-丙交酯的分析表征

(1) 核磁共振氢谱 (¹H NMR) 表征

L-丙交酯和 D-丙交酯的分子结构通过核磁共振仪 (Ascend 600, Bruker, Germany) 来进行表征，使用氘代氯仿 (CDCl₃) 作为溶剂，共振频率为 600 Hz，扫描次数为 64 次。

(2) 红外吸收光谱 (FT-IR) 测定

通过傅里叶变换光谱仪 (6700, Nicolet, USA) 和 KBr 压缩法在 399-3999 cm⁻¹ 下测定 L-丙交酯和 D-丙交酯的官能团和进行结构表征。

(3) 熔点测定

熔点的测定参照祖恩峰^[179]所述的方法，简单来说，在氮气保护下，通过差示扫描量热仪 (DSC 8500, PerkinElmer, USA) 以 10 °C/min 的加热速率得到 L-丙交酯和 D-丙交酯样品的 DSC 曲线，曲线中的最大吸热峰对应的温度即为熔点。

(4) 相对分子质量的测定

通过 ESI-高分辨飞行时间质谱仪 (XEVO G2 TOF, Waters, USA) 来测定 L-丙交酯和 D-丙交酯的相对分子质量。

(5) 元素含量分析

通过元素分析仪 (Vario EL Cube, Elementar, Germany) 来测定已知质量的 L-丙交酯和 D-丙交酯的碳和氢元素含量。

(6) 手性纯度测定

L-丙交酯和 D-丙交酯的手性纯度是通过 HPLC (U3000, Thermo Scientific, USA) 来测定的，色谱柱为 C18 柱 (Hypersil GOLD, Thermo Scientific, USA)，检测器为 DAD 检测器，检测波长为 254 nm，柱温为 30 °C。流动相为 15% (v/v) 乙腈，流速为 0.5 ml/min。分析前，将 L-丙交酯和 D-丙交酯的样品溶于乙腈中。

L-丙交酯的手性纯度定义为 L-丙交酯峰面积值与 L-丙交酯、D-丙交酯和内消旋丙

交酯峰总面积值的比值，计算公式如下：

$$\text{Chiral purity} = \frac{S_{\text{L-lactide}}}{S_{\text{L-lactide}} + S_{\text{D-lactide}} + S_{\text{meso-lactide}}} \times 100\%$$

公式中的 $S_{\text{L-lactide}}$ 表示 L-丙交酯的峰面积， $S_{\text{D-lactide}}$ 表示 D-丙交酯的峰面积， $S_{\text{meso-lactide}}$ 表示内消旋丙交酯的峰面积。D-丙交酯的手性度计算只需把公式中的分子部分换成 $S_{\text{D-lactide}}$ 。

3.3 结果与讨论

3.3.1 纤维素乳酸合成 L-和 D-丙交酯

本研究的目的是探究木质纤维素来源的乳酸合成丙交酯的可行性，并将合成的纤维素丙交酯与淀粉来源的丙交酯进行结构与性质上的比较。首先，将纯化的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别在辛酸亚锡催化剂的作用下进行乳酸的缩聚和乳酸低聚物的解聚反应，成功合成了纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯。同时，对购买的淀粉来源的商品 L-乳酸和 D-乳酸分别进行同样的解聚和缩聚反应以得到淀粉来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯标品。接着，分别对合成的纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯样品进行纯化，即用无水乙醇溶剂重结晶三次，得到精制的纤维素 L-丙交酯（图 3.1a，右）和 D-丙交酯（图 3.2a，右）。

3.3.2 L-和 D-丙交酯的鉴定

以淀粉来源的 L-丙交酯标准品为对照，对合成的纤维素 L-丙交酯的结构、性质和组成进行了各项表征（图 3.1）。纯化后的纤维素 L-丙交酯呈白色针状，外观与淀粉来源的 L-乳酸合成的 L-丙交酯样品一致。经 ESI-高分辨飞行时间质谱仪测定，纤维素 L-丙交酯的相对分子质量为 144.0581，与 L-丙交酯的标准品的相对分子质量（144.0587）一致（图 3.1 b）。H-NMR 谱图显示纤维素 L-丙交酯存在两个吸收峰，分别为 $\delta=1.67 \sim 1.68$ 处的二重峰（强度比为 1:1）和 $\delta=5.03 \sim 5.06$ 处的四重峰（强度比为 1:3:3:1），与 L-丙交酯标准品的谱图一致（图 3.1 c）。 $\delta=1.60$ 处的水峰是样品干燥不充分导致的。 $\delta=7.27$ 处的单峰是 CDCl_3 溶剂峰。经测定，纤维素 L-丙交酯的碳（C）和氢（H）元素含量分别为 $49.71\% \pm 0.16\%$ 和 $5.67\% \pm 0.33\%$ ，与理论值（C 为 50.00%，H 为 5.50%）基本一致。

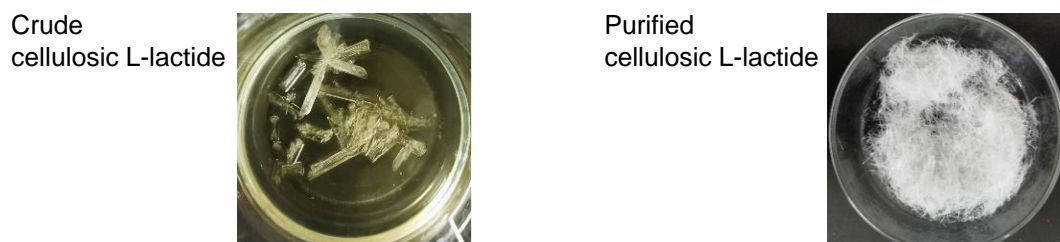
为了表征纤维素 L-丙交酯的结构，利用 KBr 压片法对其进行了红外光谱图测定，结果如 3.1 d 图所示。从图中可以看出， 1764 cm^{-1} 处的峰为酯 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动峰； 1272 cm^{-1} 处的峰为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的酯反对称伸缩振动峰； 1099 cm^{-1} 处对应 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的酯对称伸缩振动峰； 2999 cm^{-1} 处对应的是 $-\text{CH}_3$ 的伸缩振动峰； 1457 cm^{-1} 和 1385 cm^{-1} 处分别对应的是 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}$ 的弯曲振动峰； 2933 cm^{-1} 处的峰为 $-\text{CH}$ 的伸缩振动峰； 935 cm^{-1} 和 651 cm^{-1} 的峰为环骨架振动峰，证实了纤维素 L-丙交酯中的环状结构。以上的谱图特征均与 L-丙交酯的标准品的谱图特征一致，说明纤维素 L-丙交酯与 L-丙交酯标准品的结构是一致的。

通过差示扫描量热仪对纤维素 L-丙交酯的熔点进行测定，得到的 DSC 曲线如图 3.1 e 所示，纤维素 L-丙交酯的最大吸热峰处的熔点为 $96.02 \text{ }^\circ\text{C}$ ，接近于 L-丙交酯标准品的

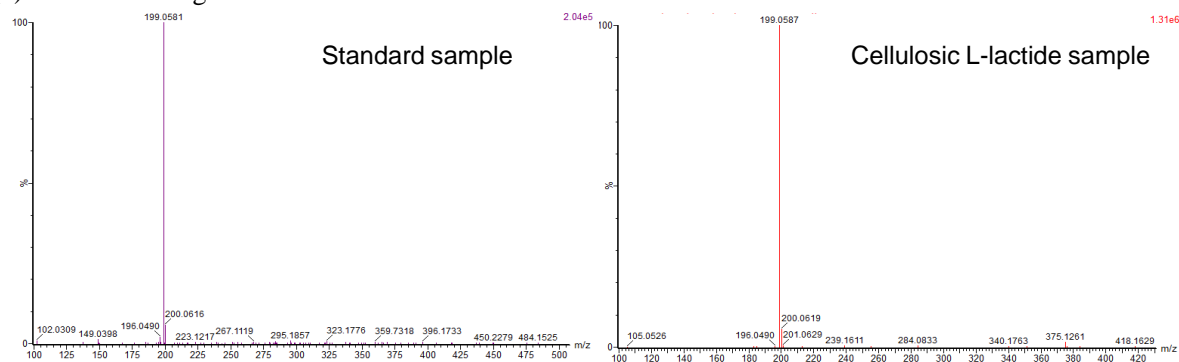
熔点 (97.67 °C), 并且与先前报道的熔点值 (95-98 °C) 一致^[180, 181]。经 HPLC 测定, 纤维素 L-丙交酯的手性纯度为 98.99%, 这表明在 L-丙交酯合成过程中使用的辛酸亚锡催化剂的手性选择性不太理想, 产生了少量内消旋丙交酯, 从而降低了其手性纯度。

综上所述, 纤维素 L-丙交酯的表征数据与淀粉来源的 L-丙交酯标准品以及之前研究报道的数据一致^[180-182], 说明成功合成了纤维素 L-丙交酯。

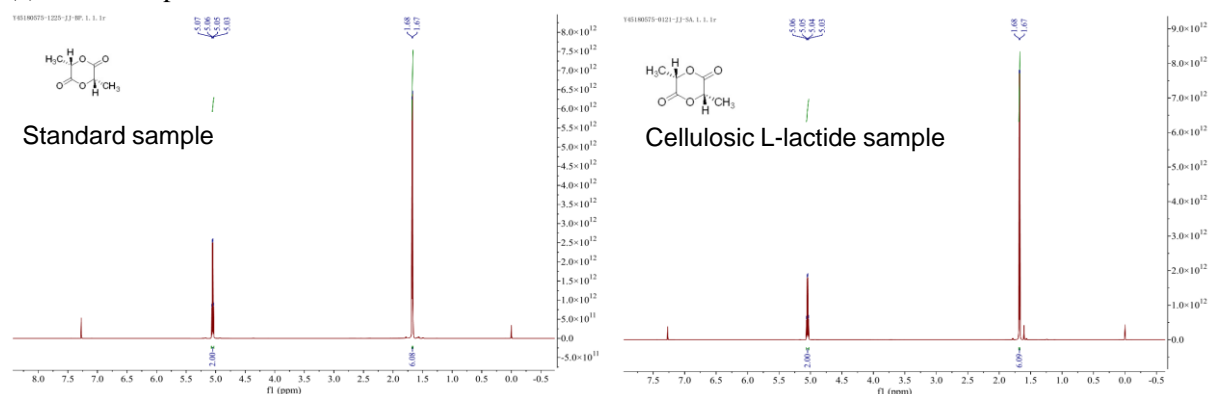
(a) L-lactide products synthesized from purified cellulosic L-lactic acid



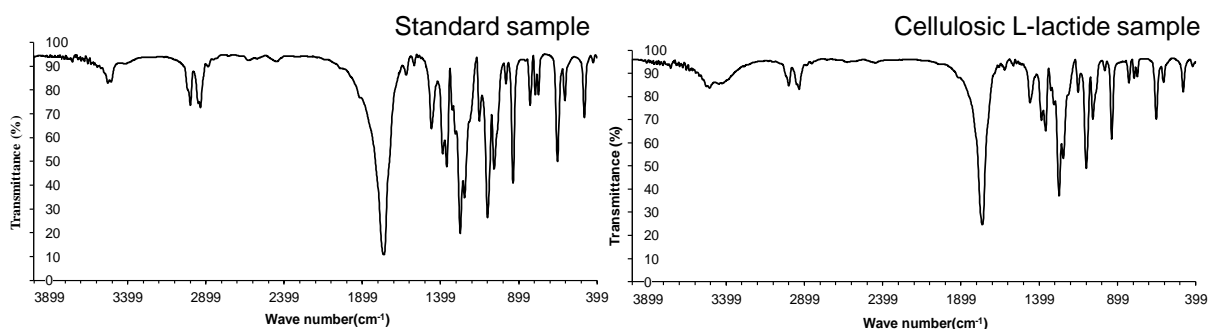
(b) Molecular weight



(c) ¹H NMR spectrum



(d) FT-IR spectrum



(e) DSC curve

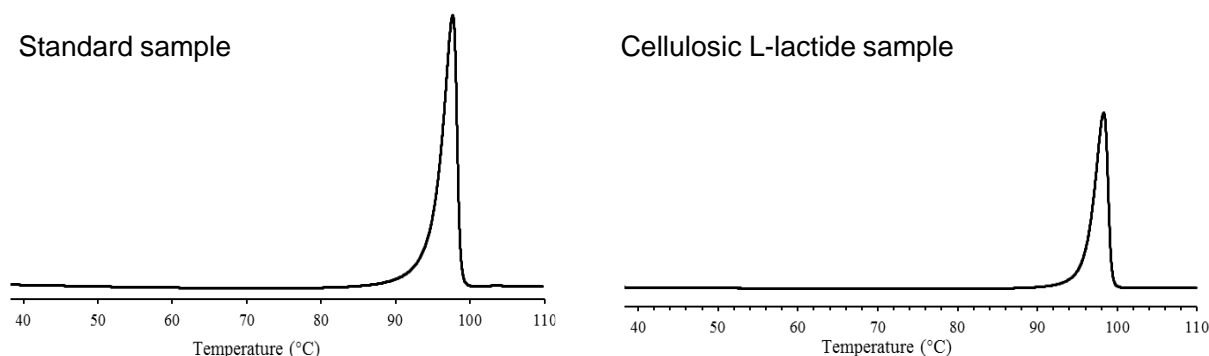


图 3.1 纤维素 L-乳酸合成的 L-丙交酯的各项特征鉴定

(a) 合成和纯化后的 L-丙交酯； (b) MS 谱图（分子量）； (c) ^1H NMR 谱图； (d) FT-IR 谱图； (e) DSC 曲线（熔点）

Fig. 3.1 Characterizations of the purified cyclic L-lactide synthesized from cellulosic L-lactic acid
(a) Visual appearance of cyclic L-lactide; (b) MS-spectra giving molecular weight; (c) ^1H NMR spectrum;
(d) FT-IR spectrum; (e) DSC curve giving melting point

注：对照组使用的是淀粉来源的商品 L-乳酸合成的 L-丙交酯样品。

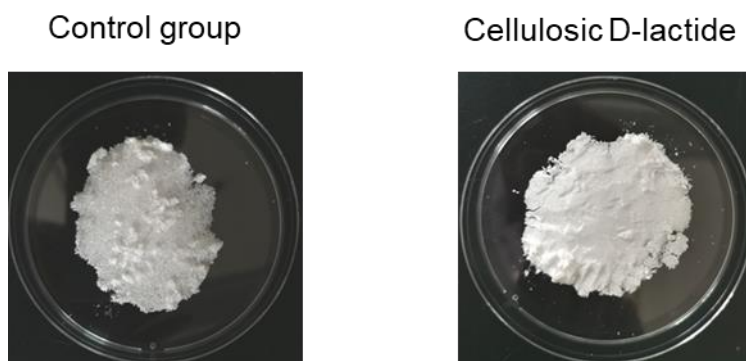
以淀粉来源的 D-丙交酯标准品为参照，对合成的纤维素 D-丙交酯的结构、性质和组成进行了表征。纯化后的纤维素 D-丙交酯呈白色粉末状，外观与淀粉原料生产的 D-乳酸合成的 D-丙交酯标准品一致。经测定，纤维素 D-丙交酯的相对分子质量为 144.0581，与淀粉来源的 D-丙交酯的相对分子质量（144.0581）一致。H-NMR 谱图上显示纤维素 D-丙交酯和淀粉来源的 D-丙交酯的特征峰也是一致的，具体为：在 $\delta=1.63\sim 1.64$ 处出现二重峰， $\delta=5.03\sim 5.06$ 处出现四重峰，强度比分别为 1:1 和 1:3:3:1。经元素分析仪测定，纤维素 D-丙交酯的碳元素和氢元素含量分别为 $49.72\% \pm 0.00\%$ 和 $5.49\% \pm 0.01\%$ ，与淀粉来源的 D-丙交酯的元素含量（C: $49.76\% \pm 0.02\%$ ，H: $5.39\% \pm 0.12\%$ ）基本一致。

红外光谱图显示，纤维素 D-丙交酯的特征峰与淀粉来源的 D-丙交酯的特征峰是一致的，谱图上包括以下特征峰：酯 C-O-C 的伸缩振动峰（ 1099 cm^{-1} 和 1272 cm^{-1} ）、-CH 的弯曲振动峰（ 1384 cm^{-1} ）、-CH₃ 的弯曲振动峰（ 1457 cm^{-1} 和）、C=O 的伸缩振动峰（ 1766 cm^{-1} ）、-CH 的伸缩振动峰（ 2933 cm^{-1} ）、-CH₃ 的伸缩振动峰（ 2998 cm^{-1} ）和环骨架振动峰（ 651 cm^{-1} 和 935 cm^{-1} ）。纤维素 D-丙交酯的熔点为 $96.1\text{ }^\circ\text{C}$ ，与其他研究中显示的数值（ $95\text{--}98\text{ }^\circ\text{C}$ ）^[24]和对照组的熔点（ $95.2\text{ }^\circ\text{C}$ ）相当。最后，对纤维素 D-丙交酯的手性纯

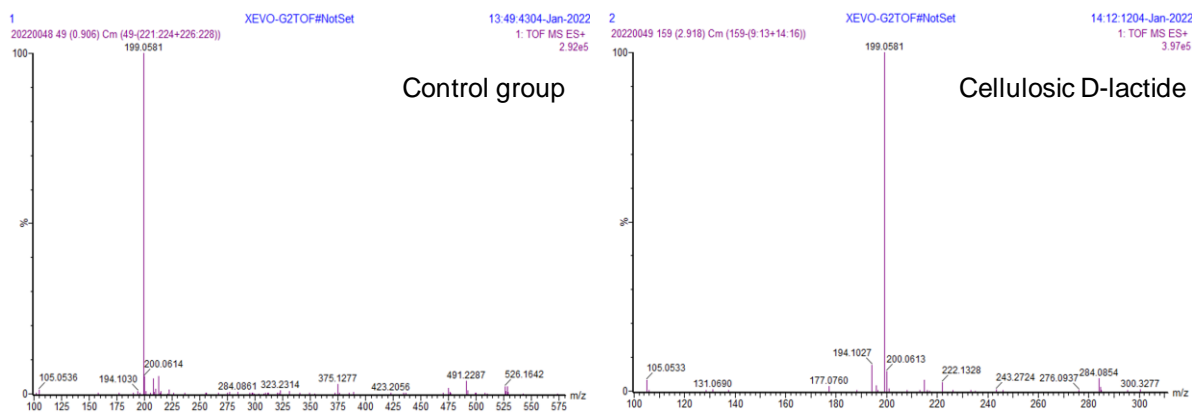
度进行了测定，其手性纯度高达 99.99%。

综上所述，纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的各项表征结果均与淀粉来源的丙交酯标准品一致，本研究是首次成功实现木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成。

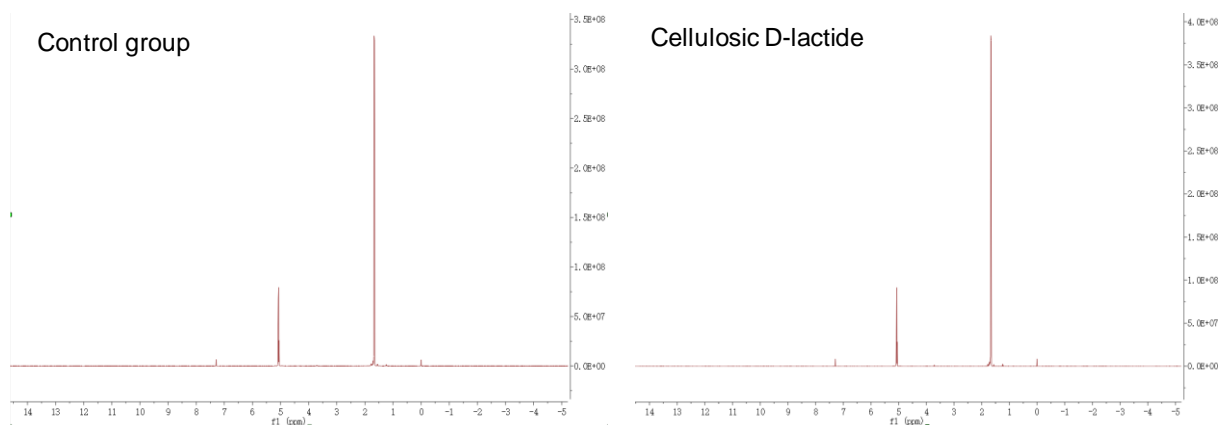
(a) D-lactide samples from starch-derived D-lactic acid (control) and cellulosic D-lactic acid



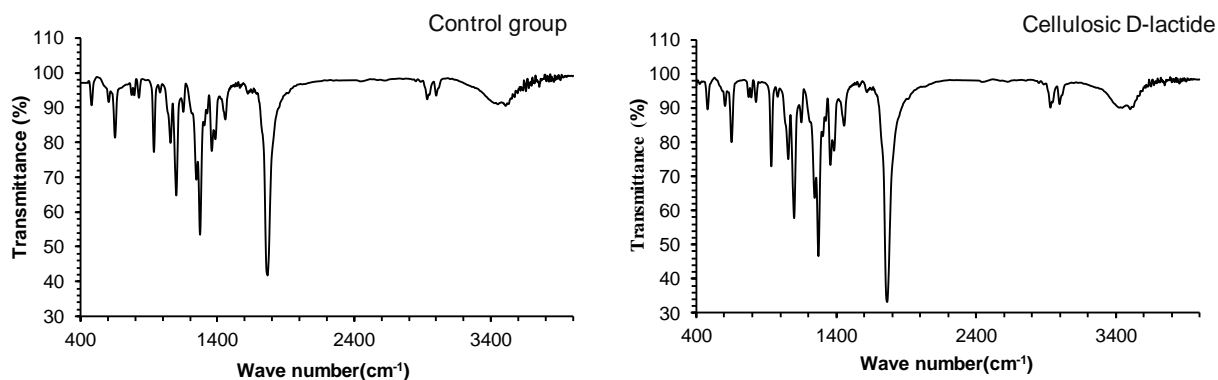
(b) Molecular weight



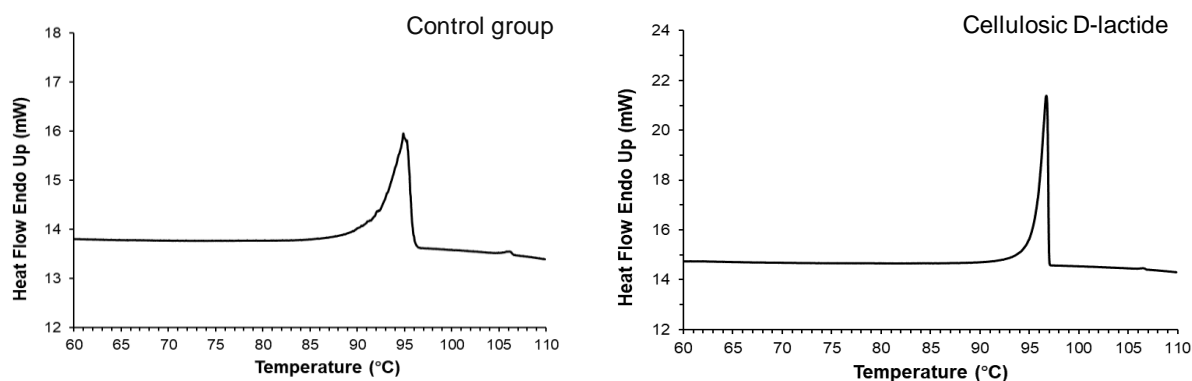
(c) ¹H NMR spectrum



(d) FT-IR spectrum



(e) DSC curve



(f) Chiral purity

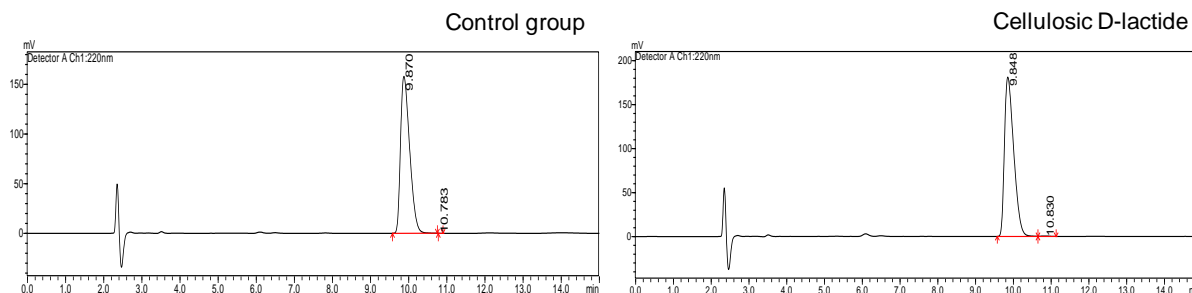


图 3.2 纤维素 D-乳酸合成的 D-丙交酯的各项特征鉴定

(a) 合成和纯化后的 D-丙交酯；(b) MS 谱图（分子量）；(c) ^1H NMR 谱图；(d) FT-IR 谱图；(e) DSC 曲线（熔点）；(f) 手性纯度

Fig. 3.2 Characterizations of the purified cyclic D-lactide synthesized from cellulosic D-lactic acid (a) Visual appearance of cyclic D-lactide; (b) MS-spectra giving molecular weight; (c) ^1H NMR spectrum; (d) FT-IR spectrum; (e) DSC curve giving melting point; (f) Chiral purity

注：对照组使用的是淀粉来源的商品 D-乳酸合成的 D-丙交酯样品。

本研究的主要目的是评估由纤维素手性乳酸合成手性丙交酯的可行性，使用的丙交酯合成的实验装置（250 mL 三口玻璃圆底烧瓶）不适用于丙交酯产物的定量测定，因此，没有进行精确的丙交酯的得率的计算。在丙交酯合成的过程中，我们发现，当圆底烧瓶中合成的丙交酯在 240-260 °C 下气化进行下一步的回收时，由于装置的保温不充分，大量的丙交酯样品积聚在装置的入口部分和冷凝管中。在接收瓶中仅回收了一小部分丙交酯（约占总量的 10%-20%），而残留在装置入口部分和冷凝管中的丙交酯固体无法完全收集用于丙交酯的产率计算。这种现象在利用木质纤维素来源和淀粉来源的乳酸合成丙交酯的过程中均出现过，说明装置需要进一步改进。当对装置和催化剂进行改进后，可以对合成的丙交酯进行准确的定量和得率计算。

3.4 本章小结

本章节从纯化后的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸出发，验证纤维素乳酸合成丙交酯的可行性，并对木质纤维素来源和淀粉来源的丙交酯进行结构、性质和组成上的鉴定和比较，结果发现木质纤维素来源的 L-乳酸和 D-乳酸分别成功合成了 L-丙交酯和 D-丙交酯，且纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的各项表征结果均与标准品一致。本章主要研究结论如下：

（1）使用常规纯化步骤的纤维素 L-乳酸和纤维素 D-乳酸分别作为聚合单体，在经过脱水、缩聚、解聚反应后，首次成功合成了木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯。

（2）将纯化后的纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯进行分子结构、性质和组成上的表征，结果表明其核磁共振氢谱图、红外光谱图、熔点、相对分子质量和元素组成均与淀粉来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯标品的各项表征结果均一致。纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的手性纯度分别为 98.99% 和 99.99%。

第 4 章 乳酸片球菌工程菌株己糖和戊糖的全糖协同代谢机制解析

4.1 引言

木质纤维素中的可发酵单糖为纤维素和半纤维素来源的己糖（葡萄糖、甘露糖、半乳糖）和戊糖（木糖和半乳糖）。其中，非葡萄糖单糖约占总单糖的 30%-40%，因此，实现葡萄糖和非葡萄糖单糖的高效共利用是木质纤维素生物炼制生产生物基化学品的经济性转化的基础。针对木糖的利用，目前通过将细菌和少量真菌的木糖异构酶路径成功引入至酿酒酵母等真菌中，解决了真菌中的木糖氧化还原路径中存在的木糖醇积累、木糖同化速率较低的问题；通过合理的木糖代谢路径构建，在细菌和真菌中均实现了木糖的利用^[110-112]。针对阿拉伯糖的利用，类似地，将细菌中的阿拉伯糖异构酶路径引入至酵母（*S. cerevisiae*）中，解决了阿拉伯糖氧化还原酶路径中存在的辅因子不平衡的问题，改善了菌株的阿拉伯糖代谢^[121, 183]，通过引入异源的阿拉伯糖异构酶基因也实现了 *Z. mobilis* 和 *C. glutamicum* 等细菌的阿拉伯糖代谢^[126, 184]。针对甘露糖和半乳糖的利用，少数菌株天然具有利用甘露糖和半乳糖的能力，如 *E. coli*^[135, 145]、*S. cerevisiae*^[136, 137, 144] 和 *Bacillus spp*^[134]，但甘露糖和半乳糖代谢速率较慢。虽然通过戊糖代谢路径的构建实现了部分菌株中（*Z. mobilis*、*C. glutamicum*、*S. cerevisiae* 和 *E. coli*）木糖和阿拉伯糖的利用^[122, 127, 128, 149, 185]，但是非葡萄糖单糖的利用依旧存在诸多问题。

目前，对大多数生物炼制菌株而言，非葡萄糖单糖的利用仍然存在以下三点关键问题：（1）由于碳分解代谢物阻遏效应（carbon catabolite repression, CCR），绝大多数微生物工程菌株优先利用葡萄糖，非葡萄糖单糖的代谢在葡萄糖全部代谢后才开始启动；（2）在葡萄糖和非葡萄糖单糖的共利用过程中，非葡萄糖单糖的代谢速率远远低于葡萄糖代谢速率；（3）不能代谢来源于木质纤维素来源的所有五种单糖，如甘露糖和半乳糖等。前两个问题使得非葡萄糖单糖全部代谢所需发酵时间大幅度延长至常规发酵的 2-3 倍，非葡萄糖单糖的利用效率低，使得目前已有的发酵菌株基本失去了其非葡萄糖单糖利用的工业应用价值。后一个问题不仅使得目标发酵产品的得率降低，而且导致发酵液中残留大量可发酵糖，当发酵产物是乳酸、琥珀酸等生物聚合物的单体时，分离提纯的高难度和高成本直接排除了其在聚合工业应用的可行性。因此，提高菌株的非葡萄糖单糖利用能力是提高产品发酵指标和降低产品分离纯化成本的必要策略。

针对第一点问题，解除 CCR 效应的研究集中在木糖的利用上，使用的方法主要有：敲除或突变抑制木糖代谢基因表达的全局调控基因（*ptsG*、*crp*、*ccr*、*hprK* 和 *ccpA* 基因）^[186-188]、敲除转录阻遏因子（如 *xylR* 基因）^[186, 189] 和过表达木糖代谢的转录激活因子（如 *mtlR*）^[190]，CCR 效应的解除使得菌株能够同时利用葡萄糖和木糖，但木糖代谢仍然不如葡萄糖。针对第二点问题，目前主要采取了两条路径来改善非葡萄糖单糖的利用。第一条路径是强化非葡萄糖单糖的代谢路径，增强木糖代谢的措施包括广泛筛选不同菌株来源的木糖异构酶基因 *xylA* 和木酮糖激酶基因 *xylB*^[113, 191]、对关键酶编码基因进

行密码子优化、强化关键酶表达量、工程菌定向进化等方法来增强木糖异构酶活性^[150, 192]，但进展改善有限，木糖利用速率仍然远低于葡萄糖利用速率；增强阿拉伯糖代谢的措施包括：筛选和组合表达不同菌株来源的阿拉伯糖代谢基因（*araA*、*araB* 和 *araD*）^[120-123]、过表达磷酸戊糖途径基因（*TAL1*、*TKL1*、*RPE1* 和 *RK11*）^[121, 123, 124]和适应性进化^[122, 123]，一定程度上提高了阿拉伯糖的代谢速率，但进展有限；增强甘露糖代谢的研究较少，主要是表达异源和自身的磷酸甘露糖异构酶基因 *pml*^[141]，但甘露糖的利用速率依旧远低于葡萄糖代谢速率；增强半乳糖代谢的措施主要是过表达半乳糖代谢基因（*galPMKT*）^[146]和磷酸葡萄糖变位酶基因（*pgm* 和 *PGM2*）^[147, 148]，但半乳糖的代谢依旧较慢。因此，优化和增强发酵微生物中非葡萄糖单糖的的代谢路径对于糖利用能力的提高有限。第二条路径是提高非葡萄糖单糖的转运效率，包括强化异源戊糖转运蛋白表达、将已有糖转运蛋白改造成专一的木糖转运蛋白等。针对于木糖，目前通过表达异源的戊糖转运蛋白（*araE* 和 *xylE* 等），一定程度上提高了 *C. glutamicum*、*Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 等菌株对于木糖的转运效率，但这些戊糖转运蛋白对于木糖的亲合力较低，对木糖转运能力的改善有限^[114, 149, 151]；将菌株内源的己糖转运蛋白定点突变成为专一的木糖转运蛋白也在一定程度上提高了木糖的转运能力^[153, 154]，但是木糖转运速率仍然不能与葡萄糖匹配。针对阿拉伯糖，通过表达阿拉伯糖转运蛋白基因（*AraT*、*Stp2*、*Gal2*、*LAT-1* 和 *MtLAT-1*）^[123, 156, 157]一定程度上增强了菌株对于阿拉伯糖的利用能力，但是阿拉伯糖的代谢速率比木糖的代谢速率更低；针对甘露糖，过表达 PTS 糖转运蛋白基因（*glcG* 和 *ptsF*）对甘露糖的利用提高有限；针对半乳糖，通过过表达己糖转运蛋白基因（*ScGAL2* 和 *ScGAL2-N376F*）^[158]和半乳糖渗透酶基因（*galP*）^[147]一定程度上提高了半乳糖的代谢速率，但半乳糖代谢仍然较慢。因此，提高非葡萄糖单糖的转运效率对糖利用的改善是有限的，非葡萄糖单糖的低效利用问题没有得到彻底解决。

针对第三点问题，目前，非葡萄糖单糖的利用研究主要集中在戊糖（木糖和阿拉伯糖）上，通过戊糖转运蛋白基因（*xylE* 和 *araE*）的表达、木糖代谢基因（*xylA* 和 *xylB*）、阿拉伯糖代谢基因（*araA*、*araB* 和 *araD*）的过表达和全局调控基因（如 *ptsG*）的敲除等已经实现了 *Z. mobilis*、*C. glutamicum*、*S. cerevisiae* 和 *E. coli* 中的葡萄糖、木糖和阿拉伯糖的共利用^[122, 127, 128, 149, 185]，但木糖的利用速率远低于葡萄糖，阿拉伯糖的利用速率又远低于木糖，使得阿拉伯糖利用失去了实际意义。针对己糖（甘露糖和半乳糖）的利用的研究较少，少数菌株如 *S. cerevisiae*、*E. coli*、*Bacillus spp* 和 *C. glutamicum* 显示出利用甘露糖和半乳糖的能力，但由于甘露糖跟葡萄糖竞争己糖转运蛋白、半乳糖的代谢往往受到葡萄糖的抑制，甘露糖和半乳糖在葡萄糖的存在，导致甘露糖和半乳糖代谢不完全和意义有限^[129, 131, 135]。对于乳酸这类聚合单体产品而言，残糖的存在会严重影响后续纯化和聚合的进行，因此彻底转化低浓度的甘露糖和半乳糖是必须面对的一个问题。综上所述，非葡萄糖单糖的低效利用和不完全利用问题仍然没有得到彻底解决。

在前期工作中，本实验室通过代谢工程改造对一株高温生物炼制发酵体系中分离获得的野生型 *Pediococcus acidilactici*^[77]，经过木糖代谢路径的构建和适应性进化后得到了

一株高光学纯度和高产量的 L-乳酸发酵工程菌株 *P. acidilactici* ZY271^[79]，具备了将木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖等非葡萄糖单糖与葡萄糖共代谢转化生成单一 L-乳酸的性能，从而实现了木质纤维素来源的己糖和戊糖的全谱代谢。该菌株的一个突出的特点是其不具备严格的碳分解阻遏效应，木质纤维素来源的木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖等全部非葡萄糖单糖的糖代谢速率以及 L-乳酸生成速率均与葡萄糖相近，所有可发酵单糖的发酵速率保持高度协同和同步，较为彻底地解决了生物炼制菌株的非葡萄糖单糖代谢障碍，但其异于绝大多数木糖代谢工程菌株的全糖协同代谢内在机制尚不清晰。这一机制的正确解析，不仅可以对从木质纤维素生物质高效合成乳酸的生物炼制工业菌株提供进一步的改进途径，更重要的是，可以将该多糖协同共利用的机制应用于其它生物炼制菌株中，以彻底解决木质纤维素非葡萄糖单糖利用的经典难题。

本研究旨在解析工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 中协同代谢己糖和戊糖全转化为乳酸的的机制。首先，通过比较适应性进化前后 *P. acidilactici* 菌株的己糖和戊糖的利用速率，确定了木糖条件下的适应性进化是解除非葡萄糖单糖利用限速步骤的关键因素；之后通过对 *P. acidilactici* 工程菌株中的糖代谢和糖转运蛋白基因的转录水平分析，发现糖代谢步骤不是己糖和戊糖代谢的限速步骤，并发现和筛选得到一个转录水平出现异常显著上调、编码甘露糖 PTS 转运蛋白的 *manXYZ* 基因簇；之后研究了 *manY*、*manZ* 基因的敲除和 *manX* 基因的弱化表达对于己糖和戊糖利用和其它糖转运及磷酸化基因转录水平的影响，验证了 *manXYZ* 基因簇在（葡萄糖、甘露糖、半乳糖）和戊糖（木糖和阿拉伯糖）的转运和磷酸化过程中的关键作用，确定了 *manXYZ* 是解除非葡萄糖单糖转运限速步骤和实现己糖和戊糖协同代谢的关键基因簇。本研究成功筛选到一个转录水平异常上调的 *manXYZ* 基因簇，并验证了该基因簇是 *P. acidilactici* ZY271 实现己糖和戊糖共利用的关键因素，为揭示葡萄糖和非葡萄糖单糖协同代谢机制和解决非葡萄糖单糖的利用难题提供了解决思路和方法，为木质纤维素原料替代淀粉原料工业化生产各种生物基化学品奠定坚实基础。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株、培养基和培养条件

本章节使用的菌株见表 4.1。乳酸片球菌 *P. acidilactici* TY112 是在野生菌株 *P. acidilactici* DQ2 中敲除了 D-乳酸脱氢酶基因得到的 L-乳酸生产菌株^[77]。乳酸片球菌工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 是在 *P. acidilactici* TY112 中引入了异源的木糖代谢路径的 L-乳酸生产菌株^[79]。*P. acidilactici* 的培养条件和培养基成分见 2.2.1。在培养携带敲除质粒的 *P. acidilactici* 时，需在培养基中添加终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的红霉素。

在质粒构建过程中使用的大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-Blue 培养于 LB 培养基中，培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm。LB 培养基的成分为：10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉和 10 g/L 氯化钠，固体培养基需添加 20 g/L 的琼脂粉。在培养携带敲除质粒的 *E. coli* 时，需在培养基中添加终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的红霉素。

生物脱毒菌株树脂枝胞霉 *A. resiniae* ZN1 的培养条件和使用的培养基见 2.2.1。

4.2.2 酶和试剂

纤维素酶 Cellic CTec 2.0 和化学试剂的来源见 2.2.2。基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒均购于上海捷瑞生物公司 (Shanghai, China)。DNA 聚合酶和 DNA 连接酶购于 Takara 公司 (Otsu, Japan)，限制性内切酶购于 Thermo Scientific (Wilmington, DE, USA)。核酸染料购于天能科技公司 (Shanghai, China)，无缝克隆试剂盒购于汉恒生物公司 (Nanjing, China)。RNA 提取试剂盒购于天根生化科技公司 (Beijing, China)，RNA 反转录试剂盒和 SYBR Green 荧光染料试剂购于 Toyobo 公司 (Toyobo, Osaka, Japan)。

电转化所使用的试剂：

(1) 缓冲液 I：称取 41.08 g 蔗糖、0.37 g $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 和 0.04 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ，溶于 180 mL 去离子水，使用 HCl 溶液调节 pH 至 7.5。

(2) 缓冲液 II：称取 17.12 g 蔗糖和 10 mL 甘油，溶于 80 mL 去离子水中。

(3) 复苏液：称取 17.12 g 蔗糖，溶于 90 mL MRS 培养基中。

(4) 40 mM D/L-苏氨酸：将 0.48 g D/L-苏氨酸粉末加入至 4 mL 去离子水中，溶解后，使用 0.22 μm 水系滤膜进行过滤除菌。

(5) Tris-HCl 缓冲液：称取 242 mg Tris，溶解于去离子水中，并定容至 200 mL，使用浓 HCl 调节 pH 至 8.0。

(6) 溶菌酶母液：将 4 mg 溶菌酶粉末溶于 4 mL Tris-HCl 缓冲液中，使用 0.22 μm 水系滤膜进行过滤除菌。

(7) 红霉素母液：将 200 mg 红霉素粉末加入至 4 mL 无水乙醇中，溶解后，使用 0.22 μm 有机系滤膜进行过滤除菌。

4.2.3 质粒与重组菌株构建

本章节构建的重组菌株和重组质粒和见表 4.1 和 4.2，使用的 PCR 引物序列见表 4.3。敲除质粒 pSET4E 用于基因敲除和基因的 RBS 序列替换。质粒 pSET4E- $\Delta manY$ 用于 *manY_RS07035* 基因的敲除，其构建方法为：以 *P. acidilactici* ZY271 的基因组为模板，分别扩增 *manY* 基因上游同源臂 (*manY-up*, ~930 bp) 和下游同源臂 (*manY-down*, ~930 bp)，使用重叠延伸 PCR 的方式将上游和下游同源臂两个片段进行融合，得到融合片段 $\Delta manY$ ；再将 $\Delta manY$ 片段通过酶切连接的方式插入至质粒 pSET4E 的 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切位点之间，得到敲除质粒 pSET4E- $\Delta manY$ 。质粒 pSET4E- $\Delta manZ$ 的构建与上述方法一致。

质粒 pSET4E- $\Delta manY$ - $\Delta manZ$ 用于 *manY* 和 *manZ* 基因的双敲除，其构建过程为：以 *P. acidilactici* ZY271 的基因组为模板，分别扩增 *manY* 基因的上游同源臂 (*manYZ-up*, ~860 bp) 和 *manZ* 基因敲除部分的下游同源臂 (*manYZ-down*, ~860 bp)，使用重叠延伸 PCR 的方式将上游和下游同源臂两个片段进行融合，得到融合片段 $\Delta manY$ - $\Delta manZ$ ；通过无缝克隆的方式将融合片段 $\Delta manY$ - $\Delta manZ$ 连接至经 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切处理后的线性化

质粒 pSET4E 上，得到敲除质粒 pSET4E- $\Delta manY$ - $\Delta manZ$ 。

质粒 pSET4E-*manX*_RBS 4.49 用于替换 *manX_RS07040* 基因的 RBS 序列以弱化其表达，使用 RBS calculator (<https://www.denovodna.com/software/doLogin>) 对 RBS 序列 (4.49 a.u.) 的替换序列进行设计，其构建过程具体如下：以 *P. acidilactici* ZY271 的基因组为模板，分别扩增 *manX_RS07040* 的 RBS 序列替换部分的上游同源臂 (*manX*_RBS 4.9-up, ~1040 bp) 和下游同源臂 (*manX*_RBS 4.9-down, ~1010bp)，使用重叠延伸 PCR 的方式将上游和下游同源臂两个片段进行融合，得到融合片段 *manX*_RBS 4.49；通过无缝克隆的方式将融合片段 *manX*_RBS 4.49 连接至经 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切处理后的线性化质粒 pSET4E 上，得到整合质粒 pSET4E-*manX*_RBS 4.49。以上重组质粒均经过测序验证正确后再进行使用。

表 4.1 本章节使用的菌株

Table 4.1 Strains used in this chapter

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	Host for plasmid	Lab stock
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Biodetoxification fungus	[64]
<i>Pediococcus acidilactici</i> TY112	L-lactic acid producing strain with D-lactate dehydrogenase encoding gene (<i>ldhD</i>) deficiency	[77]
<i>P. acidilactici</i> TY112- Δ <i>pkt::(tkl_tal)</i> - Δ <i>ackA2::xylAB</i>	Integration of the xylose assimilation pathway in the genome of <i>P. acidilactici</i> TY112	[79]
<i>P. acidilactici</i> ZY271	The adaptive evolved strain of <i>P. acidilactici</i> TY112- Δ <i>pkt::(tkl_tal)</i> - Δ <i>ackA2::xylAB</i> in MRS medium using 40g/L xylose as carbon source	[79]
<i>P. acidilactici</i> ZY271- Δ <i>manY</i>	<i>manY_RS07035</i> gene knockout in <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271- Δ <i>manZ</i>	<i>manZ_RS07030</i> gene knockout in <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271- Δ <i>manY</i> - Δ <i>manZ</i>	Knockout of both of <i>manY_RS07035</i> and <i>manZ_RS07030</i> genes in <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271- <i>manX</i> _RBS 4.49	RBS with 4.49 a.u. substitution of <i>manX_RS07040</i> in <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study

表 4.2 本章节使用的质粒

Table 4.2 Plasmids used in this chapter

Plasmids	Characteristics	Sources
pSET4E	Em ^r replacing Spc ^r marker of pSET4S, temperature sensitive vector	[77]
pSET4E- Δ <i>manY</i>	Vector for knockout of the <i>manY_RS07035</i> gene in the genome of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study
pSET4E- Δ <i>manZ</i>	Vector for knockout of the <i>manZ_RS07030</i> gene in the genome of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study
pSET4E- Δ <i>manY</i> - Δ <i>manZ</i>	Vector for knockout of both of <i>manY_RS07035</i> and <i>manZ_RS07030</i> genes in the genome of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study
pSET4E- <i>manX</i> _RBS 4.49	Vector for RBS with 4.49 a.u. substitution of <i>manX_RS07040</i> in the genome of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This study

表 4.3 本章节使用的 PCR 引物

Table 4.3 The primers used in this chapter

Primers	Sequences (5'-3')
<i>manY</i> -up-F	CGGGATCCGGTGAACAAGAAGACGTTAAGGCC
<i>manY</i> -up-R	TTATGTTGGCCTCCTTGATTATTAATCCCTCCGTTTTTTTAGTTATTTTTTTGTTTATTAAGCTCA
<i>manY</i> -down-F	CGGAGGATTAATAATCAAGGAGGCCAACATAAAATGCAAGAAAA
<i>manY</i> -down-R	GCTCTAGAAACGTGTAGTAAGTGAAGTACAACACCAAG
<i>manZ</i> -up-F	CGGGATCCCTAAACAAAAAATAACTAAAAAACGGAGGATTAATAATCATGGC
<i>manZ</i> -up-R	ACCGGGTCACCATTTATGTTGGCCTCCTTCTAGTATTTGTCG
<i>manZ</i> -down-F	GCCAACATAAATGGTGACCCGGTATTCTGGT
<i>manZ</i> -down-R	GCTCTAGATTCTCCACGGAATTTGAATGTAGTTTTT
<i>manYZ</i> -up-F	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCAAGAAGCAATTGCTTCTTTTAGTAACCAAGA
<i>manYZ</i> -up-R	CGGTAAACCAGAATACCGGGTCACCAGATTATTAATCCTCCGTTTTTTTAGTTATTTTTTTGTTTA
<i>manYZ</i> -down-F	ACTAAAAAACGGAGGATTAATAATCTGGTGACCCGGTATTCTGGTTTACCGTTAAGCCAATT
<i>manYZ</i> -down-R	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGATTCCCTCCACGGAATTTGAATGTAGTTTTTTACGTT
<i>manX</i> _RBS 4.9-up-F	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCGCTAACTCAGTTAACGCGTCGACTGGCTAAAC
<i>manX</i> _RBS 4.9-up-R	TTTCAACTGTAACAAATAGAAATACATCTACTATATAAGCGATATGGTAGGAATTATCATTG
<i>manX</i> _RBS 4.9-down-F	TTTCAACTGTAACAAATAGAAATACATCTACTATATAAGCGATATGGTAGGAATTATCATTG
<i>manX</i> _RBS 4.9-down-R	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTCAATGCCATGATTATTAATCCTCCGTTTTTTTA

注：下划线表示酶切位点。

表 4.4 本章节使用的 qRT-PCR 引物
Table 4.4 The qRT-PCR primers used in this chapter

Gene	Function annotation	Primer sequence (5'-3')	
		Forward	Reverse
Two selected genes of primers for glucose metabolism			
<i>16S rRNA</i>	16S ribosomal RNA	GTCCATGCCGTAACGATGATT	CTTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
<i>glk_RS03525</i>	glucokinase	CATGCTCGGTTTGGCACT	TGAAGAACGCACGGTAGA
<i>pgi_RS06095</i>	glucose-6-phosphate isomerase	CGCAAGCAAGGAATACAC	TTACCTTCGGATTCACCC
Four selected genes of primers for xylose metabolism			
<i>xylA_RS08535</i>	xylose isomerase	CACATCAATACGATACGGACGC	CACATCAATACGATACGGACGC
<i>xylB_RS08540</i>	xylulokinase	GGTTACCTTGGCAGCTGGATAT	GGAGTCCGTTCTCCAACGATGT
<i>tkt_RS01570</i>	transketolase	TTGGGAGCACGTTCTTTGTCTT	TTCAATCGGCTCATGAGTTGGT
<i>tal_RS01575</i>	transketolase	CAATCACCACGGTAGAACAGGT	CTTTC AATCAAATGATGCGGAT
Three selected genes of primers for arabinose metabolism			
<i>araA_RS03030</i>	L-arabinose isomerase	GATACACCGCATTACAA	CTTCATTAAGCGATCCAAA
<i>araB_RS03020</i>	ribulokinase	TGCAAACCCAGCTTTATT	TTGAGGGCGTCTGATAGA
<i>araD_RS03025</i>	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase	TTCCTGCTGTATTGGTTAG	GTTTACGGTAGTAGTGCTTAT
A selected gene of primers for mannose metabolism			
<i>mpi_RS06020</i>	mannose-6-phosphate isomerase	AACTTGCCGACTGGATTA	TGCTTTGTTGGGTTTCTA
Five selected genes of primers for galactose metabolism			
<i>galK_RS03135</i>	galactokinase	TTCGCAGTTGGAATGGGTAA	CGGCGTTCGTTGTATTTAGAGT
<i>galT_RS03145</i>	UDP-glucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	GGCTTCCAATACTCACCG	TCAGCATTACTGCCCCACA
<i>galE_RS03140</i>	UDP-glucose 4-epimerase	CGACTACAATACGCCTGAC	GAAGAACCGAGGTTGAATA
<i>ugp_RS02045</i>	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	CCGCAGTTGATGAAGCAC	GCGTCGGTTAATTGGATT
<i>pgm_RS02055</i>	phosphoglucomutase	CACAACGTATGGCTACCA	TCTGCGTACTTAGTTTGACTT
Nine selected genes of primers for metabolism of 6-P-fructose to lactic acid			
<i>pfk_RS04655</i>	6-phosphofructokinase	CAGAACACGGATACAATACA	TACTTGAACCGCAAACAC
<i>fba_RS06105</i>	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	CTGCTGGATACAGCTCAG	TCTTCTTACCACCGATT
<i>gap_RS02120</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GTTGGAACGAAGACGAGGTA	CCATTTGGCAAGTGAAGC

<i>pgk_RS02125</i>	phosphoglycerate kinase	ACAGCAATGAAGGCAGAA	TTGTCAAGTAAGTGGTCTGA
<i>gpm_RS06970</i>	2,3-diphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	GGTTACTGCCTTACTGGGTT	CCTGGTCCGAAATCTGTTC
<i>eno_RS02135</i>	phosphopyruvate hydratase	TCAAGATGGGTGCTGCTA	CCTGAACGGTGAGATACG
<i>eno_RS07940</i>	phosphopyruvate hydratase	AAGGGATGGCAAATTCAA	CACGGTAAAGTCCGCAAC
<i>pyk_RS04650</i>	pyruvate kinase	TTCGTAAGCCTCAAGACG	CAACACCCATGTCACCAC
<i>ldh_RS07220</i>	L-lactate dehydrogenase	AAAGCCAGGTGAAACACG	TTCCTTAGGGAAGCCAGA
Forty-two selected genes of primers for PTS sugar transporter			
<i>ptsI_RS02715</i>	phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase	TTATCAACCATACAACCCATCC	ACTCATCCAAACCAAGACCC
<i>ptsH_RS02710</i>	phosphocarrier protein HPr	ACAAGCAGCAAGCAAGTTCA	CGTCACCGTCAGCAGAGAT
<i>RS02570</i>	PTS system mannose/fructose/sorbose family transporter subunit IID	GGGTTGAAATACGGGTATC	TAAGTGTTTAAAGGCTGGG
<i>RS02565</i>	PTS sugar transporter subunit IIC	CATAATGATCTCACGTCCAA	AGTGCTGCTCCCACCT
<i>RS02560</i>	PTS sugar transporter subunit IIB	ACGGACGGCTGCTTT	CGTTATCCGCTGTTGA
<i>gfrD_RS02260</i>	PTS system mannose/fructose/sorbose family transporter subunit IID	CCGCTAGGCATTTTCG	CGATCCCGGTAGCAAT
<i>gfrC_RS02255</i>	PTS sugar transporter subunit IIC	CAATAGCAAGGGACTCGA	TAACGCAAACCGTAAGC
<i>RS02250</i>	PTS sugar transporter subunit IIB	AACCGACGGAAAGATTG	CTCCCTCATCGTTAGTCAA
<i>gfrA_RS00715</i>	PTS mannose/fructose/sorbose family, IIA component	GTAGCAGGTCTTAATTTACCACTAT	ATCTTTCCAATAAGTCATTACAGAA
<i>RS00720</i>	PTS sugar transporter subunit IIB	TAATGATGAAGTCGCTGGAGA	CTGTATTTTGTTCGCTTAGA
<i>RS00725</i>	PTS sugar transporter subunit IIC	TTTGTCCCAAGGGGTAA	CCGCCACTTTGAATAGC
<i>RS00730</i>	PTS system mannose/fructose/sorbose family transporter subunit IID	GCCCTTATCGGCAATC	ACGGTCCTAGAAAGAAACCT
<i>RS02275</i>	PTS sugar transporter subunit IIA	GCATGGAAAATCAGCCA	TTTGAAATCTACGGCCG
<i>RS02980</i>	PTS sugar transporter subunit IIA	CCATCAAATACGCGGTAA	GCCAACTTGAAAGCAAC
<i>lacE_RS08495</i>	PTS transporter subunit EIIC	TGTTTGGGTTGGTGGAG	AATGTTGAAAATGGCCG
<i>RS08500</i>	PTS sugar transporter	GTGGTGGGATGAGTTCG	GGTGCGAGGAGGACAA
<i>RS08655</i>	PTS sugar transporter subunit IIC	TTTGGTCTGCCAGTAGTTT	CCATCCGAGGGTGAATA
<i>manX_RS07005</i>	PTS system, mannose-specific IIB component	AAAATTTATCACGATCCCC	GACCTCTTCCTTACCGACT
<i>manZ_RS08225</i>	PTS system, mannose-specific IID component	TCGTCATCATGTGGTTCC	CATCTTTCCTAAGTGCGC

<i>manY_RS08230</i>	PTS system, mannose-specific IIC component	GCAATACAACCGTTCGG	AGAGTTCGTGCGCCATGA
<i>RS08235</i>	PTS sugar transporter subunit IIB	GTCCGGCAGGAGTAGATT	GGGCGTTTAACCACGA
<i>manX_RS08245</i>	PTS system, mannose-specific IIA component	CGGAACTCCATCAAACG	CCATTCCCATCATTACTTG
<i>manX_RS07040</i>	PTS system, mannose-specific IIB component	GAGGCACTCCATTCAATCA	GGCAAGTTCAAACCAGCA
<i>manY_RS07035</i>	PTS system, mannose-specific IIC component	GGAATGGTTGTTGCCGTAG	CAAAGCCAAGTGCGAAGA
<i>manZ_RS07030</i>	PTS system, mannose-specific IID component	CAATCCTCGGTATGTTTCATCT	AGTTTGCCCAGTCAATGTAAG
<i>celC_RS02590</i>	PTS system, cellobiose-specific IIA component	GCGCTTGATAAAGTAGCA	TGTCTTGAGCATGGGTAA
<i>celB_RS02585</i>	PTS system, cellobiose-specific IIC component	GTTGCTTTTCTTTCCCGT	GCTACAAACATTCCCCCAG
<i>celA_RS02580</i>	PTS system, cellobiose-specific IIB component	GCTTCATCGGGTTTTATG	CTTTTTTGAGTGCTTCG
<i>celC_RS01080</i>	PTS system, cellobiose-specific IIA component	TTAACGGAGGGAACGC	CCCGGAAAGTAATGGC
<i>celA_RS01075</i>	PTS system, cellobiose-specific IIB component	CGTTGACGCGGAAAT	ATGCCGTAGTCTTGCATAT
<i>celB_RS00115</i>	PTS system, cellobiose-specific IIC component	CCAAACCATCCCATACAT	TCATAACCACCGGAAAAC
<i>celB_RS08300</i>	PTS system, cellobiose-specific IIC component	AACCTTATTGGATCCGTTG	TGATGTTGGGAATCTCTTG
<i>celB_RS00870</i>	PTS system, cellobiose-specific IIC component	TGGTGGTGCTGGTGAAA	CCCGAAGATGATCGGTT
<i>gatA_RS08185</i>	PTS system, galactitol-specific IIA component	ATTTATCTTTATGCTTGCTTTG	TCTTTGATTACTTGTGGTTTT
<i>gatC_RS08190</i>	PTS system, galactitol-specific IIC component	AGCTCCGCTCGTAACTG	TGGTCCAAACTCCTCCA
<i>gatB_RS08195</i>	PTS system, galactitol-specific IIB component	ATGAAAACACTAATGGTCTG	CTTTATCCTGATTTACTCCG
<i>RS00530</i>	PTS system, galactose-specific IIC component	CCCAGCAGGTTTGAGC	AAGCAGCATTGCGTTTC
<i>RS00535</i>	PTS system, galactose-specific IIB component	TTGTGGTGCTGGTGTTAAT	CAAGGTCAGGATGGTTGAT
<i>RS00540</i>	PTS system, galactose-specific IIA component	AGTCGCCGACGACTTAG	TCCCACCACCGATAAAT
<i>fruA_RS00585</i>	PTS system, fructose-specific IIC component	ATGCAACGAATCCAACAG	GAGCTAACTTCAACGGCC
<i>fruA_RS05180</i>	PTS system, fructose-specific IIC component	CCGTAATGGTAGGTGGG	GCTTCGCGTTCTTGTTTC
<i>RS02985</i>	PTS fructose transporter subunit IIBC	TTCCTGTTTGGGGTAGC	ACGTTTAGATCTGGGCG
Twenty selected genes of primers for ABC sugar transporter			
<i>RS01155</i>	ABC transporter permease	TTTTACCATAACCGTCATCT	CTGTCACTAATCCTTTCCCA
<i>RS01530</i>	ABC transporter	TGCTAAGGCGGTTTCG	TGGGAGCAAAGGCAAT
<i>RS04940</i>	ABC transporter	TTATGTGGATTGGGCTTTC	GCTGGCTAAACAACTGCT
<i>RS03265</i>	ABC transporter permease	GATGCAGAAATGGCACAA	GCAACCAGGCCGTAAT
<i>RS04060</i>	ABC transporter permease	TGGTGATTCAGGCAACC	TCCCATAGCCACGATTT
<i>RS04065</i>	ABC transporter permease subunit	GCTATTTTCGGCTCCC	CAAAGCCCGACAACG

<i>RS00090</i>	FtsX-like permease family protein	CGTGGAGCACAAATCGC	CGCTGGTGGTAATACGG
<i>RS05970</i>	ABC transporter permease	CAAGCGCCTATCAACG	TCATTACAATCGGTCCTAAC
<i>RS02310</i>	energy-coupling factor transporter transmembrane component T	GGCATTCTTTTACC	AAACTTACCACGCATCAT
<i>RS01525</i>	ABC transporter ATP-binding protein	TGAAGTGGAGCGGATGT	GCAGCGTCTTTAGTAGCC
<i>RS01130</i>	ATP-binding cassette domain-containing protein	CAAGAAAGAACGCCAACA	CCAGTGCCTGAGCTAAAT
<i>RS01055</i>	ATP-binding cassette domain-containing protein	CGGAAGCCTATCTGGTG	GCAGTAATCCGTTCTTGG
<i>RS00945</i>	ABC transporter ATP-binding protein	AGCCACCGTGGGTAAG	GGCCGTTCTTGGGAT
<i>RS07710</i>	ABC transporter ATP-binding protein/permease	TACATTATGCTGGCCTTCT	CCGTTTCGGCAACACTA
<i>RS06035</i>	ABC transporter ATP-binding protein/permease	GGACGGCGATGGATT	AAGTTAGCGTCGGTCTTAA
<i>RS01715</i>	ATP-binding cassette domain-containing protein	ATGGTGGCGGGTGAA	CCTAAAGCCGGAATCAA
<i>RS02315</i>	ABC transporter ATP-binding protein	CGTCACGGAAGAAATCG	CCGCCCCGAAAGTTGA
<i>RS04055</i>	ATP-binding cassette domain-containing protein	GGGGTGGTAAGCGAGTT	CGACTTCTAAGCGACTTCA
<i>RS04945</i>	ABC transporter ATP-binding protein	ACAGGCAATGTTGGGTC	CGGCAATTTGCTGGAT
<i>uup_RS04550</i>	BC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein	GTGCGGGTAAATCTTCT	TGGGCTCCATCTTCTGA

Thirteen selected genes of primers for MFS sugar transporter

<i>RS01885</i>	MFS transporter	GGCATGAAAGTCATCAAGC	CATCCCCAACAAAAGAAAC
<i>RS01165</i>	MFS transporter	ATTGTCGCTAGTATTTGTCG	AATGATGTTCTAACGCTGT
<i>iolF_RS03435</i>	MFS transporter	ATCCAGTAATGGAAGGAGC	TGTAGCGGAATAACAAACG
<i>oxlT_RS04075</i>	OFA family MFS transporter	GCCAAGGATAGCAAACAG	TCCCAGAAAACACACCAA
<i>blt_RS07645</i>	MFS transporter	CTTAATCGGAGCGTGCTT	CCCTGGTTATTTTTGCCT
<i>RS00065</i>	MFS transporter	TAAGTTCACGAGGCGGTC	CCAAAATTCCAAAGGAGG
<i>RS00570</i>	MFS transporter	ACAATCAAGCCCCAATA	CATTAACGAAGGCATCCA
<i>RS00780</i>	oligosaccharide MFS transporter	CTATTGTTTTTGGCATCAC	TAGCGTCTACTTCACCAGCT
<i>RS02870</i>	MDR family MFS transporter	TAGGAGTTGGGTTTGGG	ATGTTGATCGTGCCGTT
<i>RS03015</i>	D-xylose proton-symporter	ATGGCGTTTGTATGCTTGG	CCGCTTCGTTACGGATGTA
<i>glcU_RS06100</i>	GRP family sugar transporter	GATAAGAGCGATTCCACGAC	TCCGAGCAACATTCCAAC
<i>RS03120</i>	lactose/raffinose/galactose permease	CATTTGGAACGGATGAAAC	TTCCCAGCAACAGGACTATG
<i>RS01490</i>	MFS transporter	AGTGGCAAGTTAAGAACCC	CCAATCCCCTGTAAGAGAA

P. acidilactici 感受态细胞的制备方法:

(1) 用接种环蘸取少量 *P. acidilactici* 菌液在 MRS 平板上进行划线操作, 平板在 42 °C 培养 2 天。

(2) 挑取 *P. acidilactici* 单菌落至 5 mL MRS 培养基中, 在 42 °C 和 150 rpm 下培养 12 h。

(3) 按 2% (v/v) 的接种量将菌液转接至含有 600 μ L 40 mM D/L-苏氨酸溶液的 20 mL MRS 培养基中, 在 42 °C, 150 rpm 下培养至 OD₆₀₀ 为 0.9-1。

(4) 取 1 mL 菌液, 在 4 °C, 10000 rpm 下离心 5 min, 弃去上清。

(5) 加入 1 mL 缓冲液 I 清洗菌体, 4 °C, 10000 rpm 下离心 5 min, 弃去上清, 重复一次。

(6) 加入 100 μ L 缓冲液 I 将菌体吹打混匀, 再加入 50 μ L 0.1 mg/mL 的溶菌酶溶液, 于 37 °C 水浴处理 30 min。

(7) 加入 1 mL 缓冲液 I 悬浮菌体, 4 °C, 10000 rpm 下离心 5 min, 弃去上清, 重复该步骤一次。

(8) 加入 80 μ L 缓冲液 II 吹打混匀菌体, 得到 *P. acidilactici* 感受态细胞, 置于冰上待用。

电转化方法:

(1) 在 *P. acidilactici* 感受态细胞中加入 10 μ L 敲除质粒 (约 200 ng/ μ L), 混匀后冰浴 15 min。

(2) 将感受态细胞加入至预冷 1 h 后的干燥电击杯 (1 mm) 中, 在 25 μ F、200 Ω 和 2000 V 的条件下进行电转化。

(3) 将电击后的液体转移至 900 μ L 复苏液中, 置于 28 °C, 150 rpm 下孵育 5-6 h, 10000 rpm 下离心 5 min, 弃去 900 μ L 上清, 再将剩余的菌液混匀后, 均匀地涂布在含有红霉素的 MRS 平板上 (MRSE 平板), 于 28 °C 培养约 3 天。

筛选阳性克隆:

利用设计好的质粒上的通用验证引物, 对平板上长出的单菌落进行菌落 PCR 验证, 筛选得到条带大小正确的阳性克隆, 即为敲除质粒成功转入至 *P. acidilactici* 的重组菌株。

基于热敏型同源重组系统进行基因敲除与整合, 即通过两次同源重组进行基因的敲除, 具体过程如下:

单交换筛选: 将质粒电转化成功的 *P. acidilactici* 阳性克隆接入至 5 mL MRSE (含有终浓度为 5 μ g/mL 的红霉素) 培养基中, 28 °C, 150 rpm 下培养 24-36 h, 使质粒大量复制。将该菌液按 1% (v/v) 的接种量转接入 5 mL MRSE 培养基中, 42 °C, 150 rpm 下培养 12 h。将菌液稀释 10⁶ 倍, 吸取 200 μ L 菌液均匀涂布于 MRSE 平板上, 将 MRSE 平板置于 42 °C 培养 24-36 h, 对平板上长出的单菌落进行菌落 PCR 验证以筛选出阳性克隆, 确定质粒整合至其基因组上。

双交换筛选: 将单交换成功的单菌落接种于含有 5 mL MRS 液体培养基, 28 °C,

150 rpm 下培养 24 h, 将培养好的菌液稀释 10^6 倍, 取 200 μ L 菌液均匀涂布于 MRS 平板上, 于 28 $^{\circ}$ C 培养约 3 天。蘸取平板上的同一单菌落对应地点在 MRS 平板和 MRSE 平板上, 于 42 $^{\circ}$ C 培养 24 h。筛选只在 MRS 平板上生长, 而在 MRSE 平板上不生长的菌落。此时存在基因回复突变和敲除成功两种可能性, 因此需要进行菌落 PCR 验证和测序验证筛选得到基因成功敲除或基因成功整合的阳性克隆子。

4.2.4 原料与生物炼制过程

小麦秸秆的组分和与生物炼制过程见 2.2.3。

4.2.5 己糖和戊糖利用能力的发酵评估

摇瓶发酵实验: 发酵在含有 50 mL 简化 MRS 培养基 (不加葡萄糖) 的 250 mL 锥形瓶中进行, 根据实验需求在培养基中额外加入五种混合糖 (终浓度为 70 g/L 葡萄糖、50 g/L 木糖、8 g/L 阿拉伯糖、2 g/L 甘露糖和 2 g/L 半乳糖) 或以上单糖 (终浓度为 40 g/L)。将培养好的 *P. acidilactici* 种子液按照 10% (v/v) 的接种量接入至 MRS 培养基中, 发酵条件为 42 $^{\circ}$ C, 150 rpm。按照 0.6 g/g 糖的比例加入 CaCO_3 粉末来调节 pH。

反应器发酵实验: 发酵在含有 600 mL 简化 MRS 培养基 (不加葡萄糖) 的 3 L 反应器中进行, 以混合糖为碳源, 糖浓度分别为: 70 g/L 葡萄糖、50 g/L 木糖、8 g/L 阿拉伯糖、2 g/L 甘露糖和 2 g/L 半乳糖。*P. acidilactici* 的接种量为 10% (v/v), 发酵条件为 42 $^{\circ}$ C, 150 rpm。发酵过程使用 25% (w/w) 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液将 pH 调节至 5.5。

麦秆下的同步糖化共发酵 (SSCF) 实验参照 2.2.4。

4.2.6 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

qRT-PCR 实验步骤包括菌体的收集、RNA 的提取和 RNA 的反转录, 获得的 cDNA 用于 qRT-PCR 分析。糖代谢基因和糖转运蛋白基因的转录水平分析使用菌株 *P. acidilactici* TY112 为对照组, 菌株 *P. acidilactici* ZY271 为实验组; *manXYZ* 基因簇在木糖适应性进化前后的转录水平分析使用重组菌株 *P. acidilactici* TY112- Δ *pkt::(tkl-tal)-\Delta**ackA2::xylAB* 为对照组, 进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 为实验组; 推定的己糖和戊糖转运蛋白基因和磷酸化基因的转录水平分析使用菌株 *P. acidilactici* ZY271 为对照组, 菌株 *P. acidilactici* ZY271- Δ *manY-\Delta**manZ* 为实验组。qRT-PCR 分析均以 16S rRNA 为内参基因, 基因的相对表达水平经 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[193] 计算得到。qRT-PCR 实验的具体步骤如下:

(1) 菌体的收集: *P. acidilactici* 在含有 50 mL 简化 MRS 培养基的 250 mL 锥形瓶中培养, 根据实验需求分别以单糖和混合糖为碳源, 单糖分别为 40 g/L 葡萄糖、40 g/L 木糖、11 g/L 阿拉伯糖、11 g/L 甘露糖和 11 g/L 半乳糖, 混合糖为 70 g/L 葡萄糖、50 g/L 木糖、8 g/L 阿拉伯糖、2 g/L 甘露糖和 2 g/L 半乳糖。培养条件为 42 $^{\circ}$ C, 150 rpm, 接种量为 10% (v/v), 培养过程中使用 5 M 的 NaOH 溶液将 pH 调节至 5.5。菌体的收集在对数生长期的中后期 (6-12 h) 进行, 将培养好的菌液在 10000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 min, 弃去上清, 再用灭菌的超纯水洗涤菌体 2 次, 离心后去上清, 收集好的菌体于 -80 $^{\circ}$ C 冻存。所有实验均有 2 个重复。

(2) RNA 提取: 将收集的菌体置于研钵中, 用液氮冷冻后, 立即进行菌体的研磨, 充分研磨至粉末状后进行 RNA 的提取。RNA 的提取使用的是 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech., Beijing, China), RNA 的纯度和浓度通过微量光度分光计 Nano 300 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) 进行检测。

(3) RNA 的反转录: 将质量达标的 RNA 稀释至约 500 ng/uL, 使用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 试剂盒 (Toyobo, Osaka, Japan) 将 RNA 反转录成 cDNA。

(4) qRT-PCR 反应: 将稀释 40 倍的 cDNA 作为模板, 使用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) 进行 qRT-PCR 反应。反应体系如表 4.5 所示, 反应在 Applied Biosystems Quantstudio 1 仪器 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 上进行, 反应程序为: 预变性 (95 °C) 60 s, 变性 (95 °C) 15 s, 退火 (55 °C) 15 s, 延伸 (72 °C) 30 s, 共计 40 个循环, 再进行熔解曲线分析, 由 65 °C 升温至 95 °C, 升温速率为 0.1 °C/s。qRT-PCR 目的基因的引物设计通过软件 Primer Premier 5 完成, 引物如表 4.4 所示。以 16S rRNA 基因为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对转录水平。

表 4.5 qRT-PCR 反应体系

Table 4.5 The reaction system of qRT-PCR

反应体系	加入体积 (μL)
无菌水	6.4
SYBR Green Mix	10
上游引物	0.8
下游引物	0.8
cDNA 模板 (稀释 40 倍)	2

4.2.7 HPLC 分析

单糖、抑制物和乳酸的检测见 2.2.6。

4.3 结果与讨论

4.3.1 木糖适应性进化触发了 *P. acidilactici* 非葡萄糖单糖代谢路径的快速代谢

木质纤维素来源的可发酵单糖主要为五种, 分别为葡萄糖和四种非葡萄糖单糖 (木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖), 非葡萄糖单糖的含量占总单糖的 30%-40%。在前期工作中, 我们通过代谢工程改造将一条异源的木糖代谢路径构建至 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 中, 得到了重组菌株 TY112- $\Delta pkt::(\text{tkl}-\text{tal})-\Delta \text{ackA2}::\text{xylAB}$ (简称 G0)。该菌株启动了木糖的代谢, 但其木糖代谢速率很慢。为了提高木糖的代谢速率, 将该菌株在以木糖为唯一碳源的培养基中经过了长期的适应性进化, 最后得到了一株木糖代谢能力显著提高的进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 (简称 G1) [79]。 *P. acidilactici* ZY271 在合成培养基中的五种单糖的协同代谢, 以及以干酸预处理和生物脱毒后麦秆

为原料进行同步糖化与共发酵中的五种单糖的协同代谢如图 4.1 所示。在合成培养基中（图 4.1 a），*P. acidilactici* ZY271 在接种后立即启动所有单糖的代谢转化，接着以高度协同的代谢速率同步代谢所有单糖，最终在接种后 56 小时的时间点上完成全部单糖的代谢转化，实现了葡萄糖和其它四种非葡萄糖单糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）的全谱代谢。L-乳酸在经历 4 小时的延滞期（单糖消耗用于细胞生长）后开始大量积累，并在发酵 48 小时达到产量峰值。以干酸预处理和生物脱毒的麦秆为碳源的同步糖化与共发酵也出现了同样的全糖代谢现象（图 4.1 b），*P. acidilactici* ZY271 在接种后立即启动所有单糖的高度协同代谢（单糖消耗和 L-乳酸积累未见明显的延滞期）。由于单糖释放和代谢同步进行，且麦秆原料总糖含量比合成培养基高出约 40%，其单糖完全转化的时间稍长（66 小时），最终实现了麦秆中所有可发酵单糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）的全谱代谢。L-乳酸生成未见明显的延滞期，并在全糖代谢过程中持续积累，即使在表观的所有单糖归零后仍显示继续增加的趋势，表明此过程的限速步骤可能是酶解糖化步骤而非单糖代谢步骤。菌株 *P. acidilactici* ZY271 中展示的木质纤维素来源所有可发酵单糖的高度协同共代谢现象是非常罕见的。由于碳分解代谢阻遏效应的存在，绝大多数的生物炼制菌株的非葡萄糖单糖的代谢大幅度滞后于葡萄糖代谢，使得占总糖 30%-40% 的非葡萄糖单糖利用效率低下甚至没有实际应用价值。本文所研究的 *P. acidilactici* ZY271 不仅高度协同代谢葡萄糖和非葡萄糖单糖，还实现了全糖代谢，表明其不存在明显的碳分解代谢阻遏效应。因此，需要进一步对其己糖和戊糖协同共利用的机制进行解析，为彻底解决其它生物炼制菌株中非葡萄糖单糖的低效利用问题提供思路和方法。

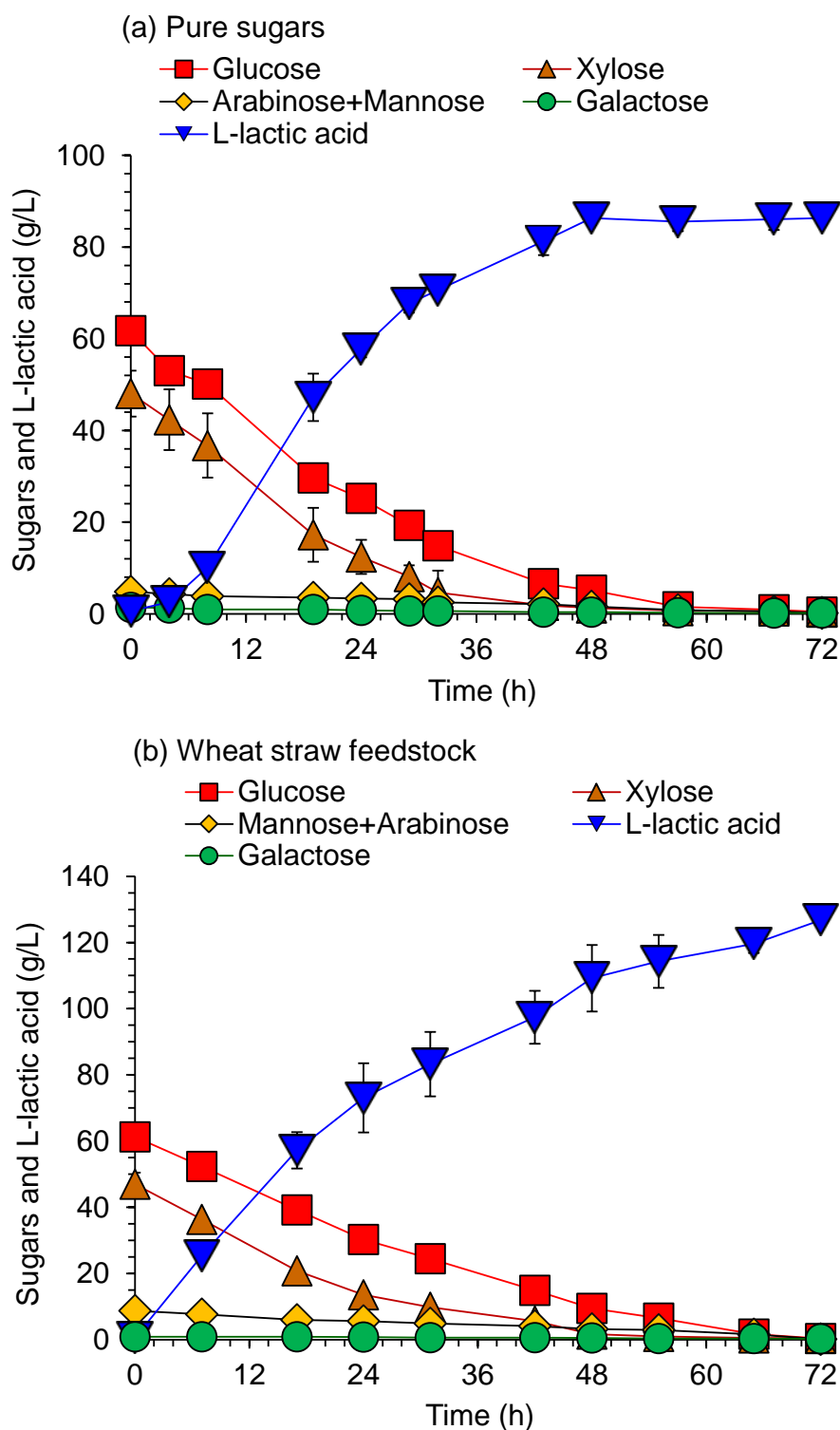


图 4.1 *P. acidilactici* ZY271 以合成培养基和麦秆为原料的己糖和戊糖共利用

(a) 以混合糖为碳源的发酵；(b) 以麦秆为原料的同步糖化共发酵 (SSCF)

Fig. 4.1 The hexose and pentose sugar co-consumption by *P. acidilactici* ZY271 using synthetic medium and wheat straw as feedstock

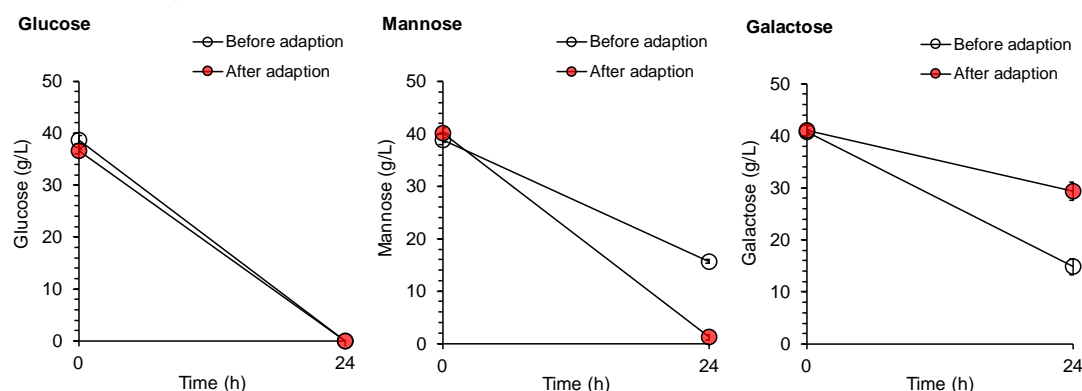
(a) The fermentation using mixed sugars as carbon source; (b) SSCF using wheat straw as feedstock

发酵条件: (a) 使用混合糖为碳源的简化 MRS 培养基; 3 L 罐, 42 °C, 150 rpm; (b) 使用 30% (w/w) 固含量的经预处理和脱毒后的小麦秸秆, Cellic CTec 2.0 酶用量为 4 mg 蛋白/g 干物料, 50 °C、150

rpm 下预糖化 6 h; 5 L 罐, 42 °C, 150 rpm 下进行 SSCF; 以上发酵均使用 25% (w/w) 的 Ca(OH)₂ 溶液为中和剂, 调节 pH 至 5.5。

为了挖掘 *P. acidilactici* ZY271 实现非葡萄糖单糖与葡萄糖的协同快速利用的机制, 我们对 *P. acidilactici* ZY271 的构建过程进行了分析, 以找出解除 *P. acidilactici* ZY271 中的非葡萄糖单糖利用限制的关键原因。*P. acidilactici* ZY271 的构建过程分为两步, 包括木糖途径的构建和以木糖为唯一碳源的长时间适应性进化。在构建了木糖代谢路径后, 重组菌株 G0 的木糖代谢十分缓慢; 经过以木糖为唯一碳源的长时间适应性进化后, 进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 的木糖代谢能力显著提高。显然, 重组菌株 G0 的适应性进化在解除木糖代谢的限速步骤上起到了关键的作用。因此, 我们对适应性进化前的菌株 G0 和进化后的菌株 *P. acidilactici* ZY271 分别进行了以木糖和阿拉伯糖为唯一碳源的摇瓶发酵 (图 4.2 b), 以比较戊糖代谢能力的变化。结果表明, 进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 的阿拉伯糖和木糖代谢速率分别为 1.11 g/L/h 和 1.10 g/L/h, 与重组菌株 G0 相比, *P. acidilactici* ZY271 的阿拉伯糖的代谢速率基本不变, 木糖代谢速率显著提高, 提高了 83.5%。同时, 我们也探究了木糖适应性进化对于己糖 (葡萄糖、甘露糖和半乳糖) 代谢能力的影响 (图 4.2 a)。结果表明, 进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 的葡萄糖、甘露糖和半乳糖的代谢速率分别为 1.53 g/L/h、1.62 g/L/h 和 0.49 g/L/h, 与菌株 G0 相比, 葡萄糖代谢速率基本不变, 甘露糖代谢速率提高了 68.5%, 而半乳糖代谢速率下降了 54.8%, 这说明木糖适应性进化有利于甘露糖的代谢, 对葡萄糖代谢无明显影响, 而不利于半乳糖的代谢。总的来说, 木糖条件下的适应性进化显著提高了 *P. acidilactici* 对于木糖和甘露糖的利用速率, 说明木糖的进化解除了木糖和甘露糖利用的限速步骤, 即木糖和甘露糖的转运步骤或者是代谢步骤。适应性进化是非葡萄糖单糖代谢强化的常用手段^[116, 117, 122, 123], 但是以往的提供都是以稳定代谢速率、而非大幅度提供木糖代谢速率为目标, 目前尚未有报道发现对工程菌株的适应性进化实现了木糖代谢的本质性大幅提高并触发了其它非葡萄糖单糖的有效代谢。这一结果意味着 *P. acidilactici* 很可能具备某种对适应性进化特别敏感的特殊机制。

(a) Hexose sugars



(b) Pentose sugars

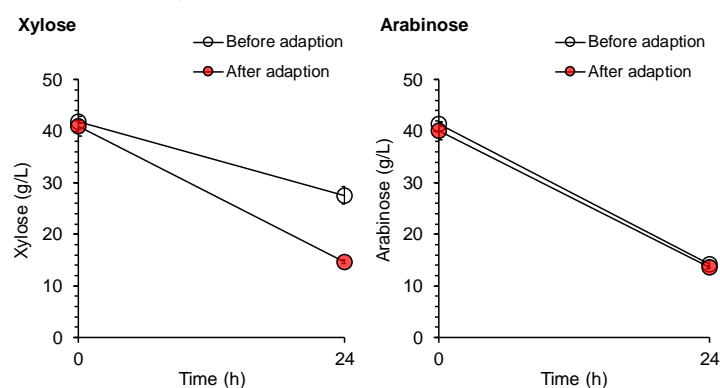


图 4.2 木糖适应性进化前后的 *P. acidilactici* 的己糖和戊糖代谢能力比较

(a) 葡萄糖、甘露糖和半乳糖；(b) 木糖和阿拉伯糖

Fig. 4.2 The comparison of hexose and pentose consumption of the *P. acidilactici* before and after the evolved adaption under xylose condition

(a) Glucose, mannose and galactose; (b) Xylose and arabinose

发酵条件：发酵使用单糖为碳源的简化 MRS 培养基；42 °C，150 rpm 下发酵 24 h；摇瓶中添加 0.6 g/g 糖的 CaCO₃ 粉末调节 pH。

4.3.2 糖代谢步骤不是限制 *P. acidilactici* 己糖和戊糖共利用的关键步骤

葡萄糖的存在会抑制其它非葡萄糖单糖（尤其是戊糖）的糖代谢基因或糖转运基因的表达，使得糖代谢或糖转运步骤成为非葡萄糖单糖利用的限速步骤，导致非葡萄糖单糖的低效利用^[188]。我们推测 *P. acidilactici* ZY271 实现协同快速代谢己糖和戊糖的关键原因是解除了戊糖利用的关键限速步骤，即解除了糖代谢步骤或者糖转运步骤的限制，使得糖代谢基因或糖转运基因的表达不再受到抑制。为了找到非葡萄糖单糖利用的限速步骤，我们以出发菌株 *P. acidilactici* TY112 为对照，参照 *P. acidilactici* 的糖代谢及转运路径（图 4.3），分别对戊糖（木糖和阿拉伯糖）和己糖（葡萄糖、甘露糖和半乳糖）的代谢和转运基因及乳酸生成的关键基因进行了转录水平变化的分析（图 4.4），以找出发生显著上调表达的基因。糖代谢基因的转录水平变化如图 4.4 所示，与出发菌株 *P. acidilactici* TY112 相比，*P. acidilactici* ZY271 中的葡萄糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖到 L-乳酸合成的基因的表达水平变化幅度较小，其表达水平分别为菌株 *P. acidilactici* TY112 的 1.9-5.0、0.5-1.4、0.5-1.6 和 0.5-3.5 倍，木糖到 L-乳酸合成路

径中的由 6-磷酸果糖至 L-乳酸的相关基因的转录水平只有轻微上调（上调倍数为 1.1-2.8）。由于出发菌株 *P. acidilactici* TY112 不具备木糖代谢路径，我们以整合了木糖代谢路径的菌株 G0 为对照组，对 *P. acidilactici* ZY271 中的木糖代谢关键基因（*xylA_RS08535*、*xylB_RS08540*、*ikt_RS01570* 和 *tal_RS01575*）单独进行了转录水平的分析，其转录水平分别上调了 2.4、3.6、1.2 和 1.8 倍，基因表达上调幅度较小。综上所述，己糖和戊糖的代谢基因的表达水平变化较小，说明木糖和甘露糖代谢能力的大幅提高不是由于糖代谢基因转录水平的变化。因此，糖代谢步骤不是 *P. acidilactici* ZY271 限制非葡萄糖单糖利用的关键步骤。

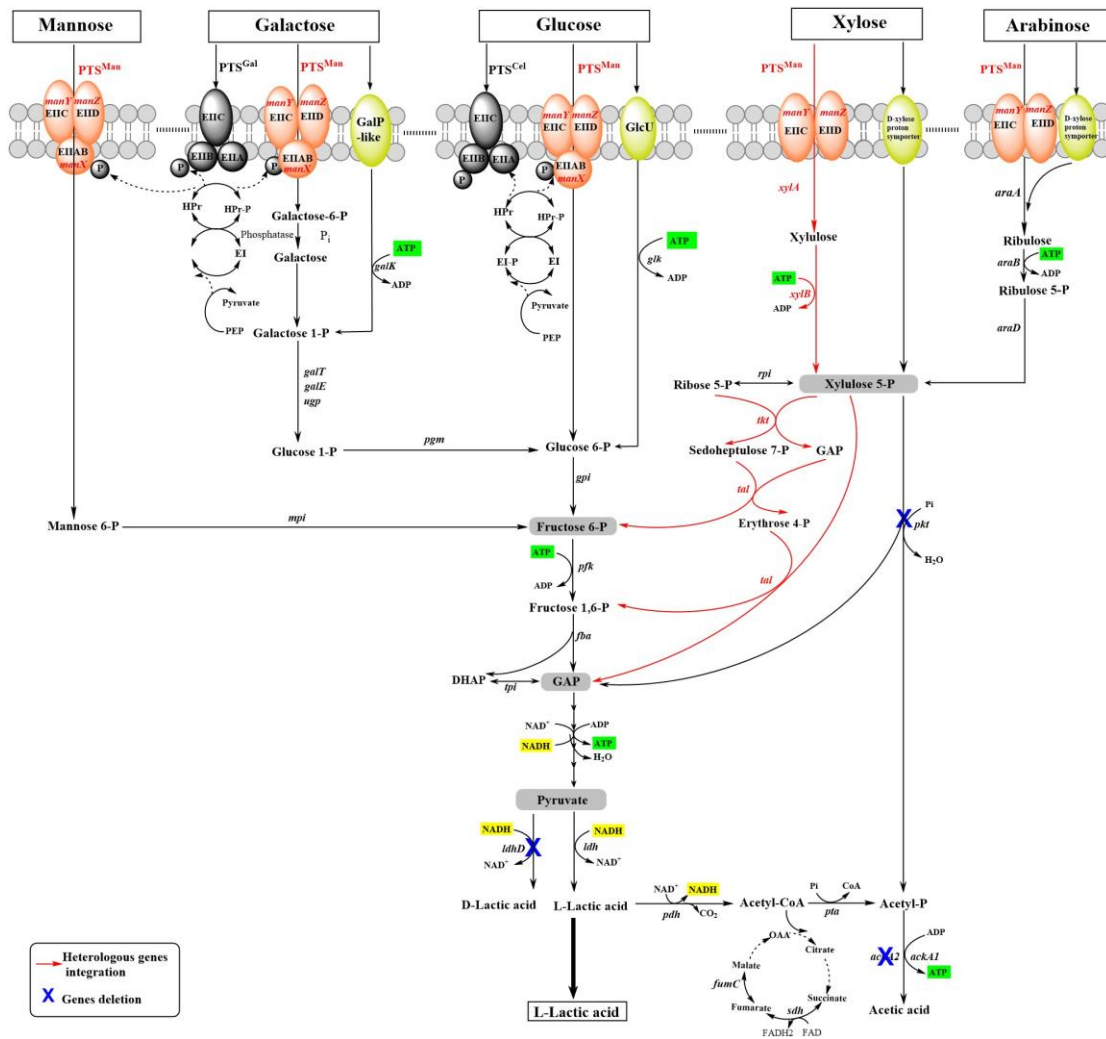


图 4.3 推测的 *P. acidilactici* ZY271 中的己糖和戊糖转运及代谢路径图

Fig. 4.3 The presumptive transport and metabolic pathways of hexose and pentose sugars in *P. acidilactici* ZY271

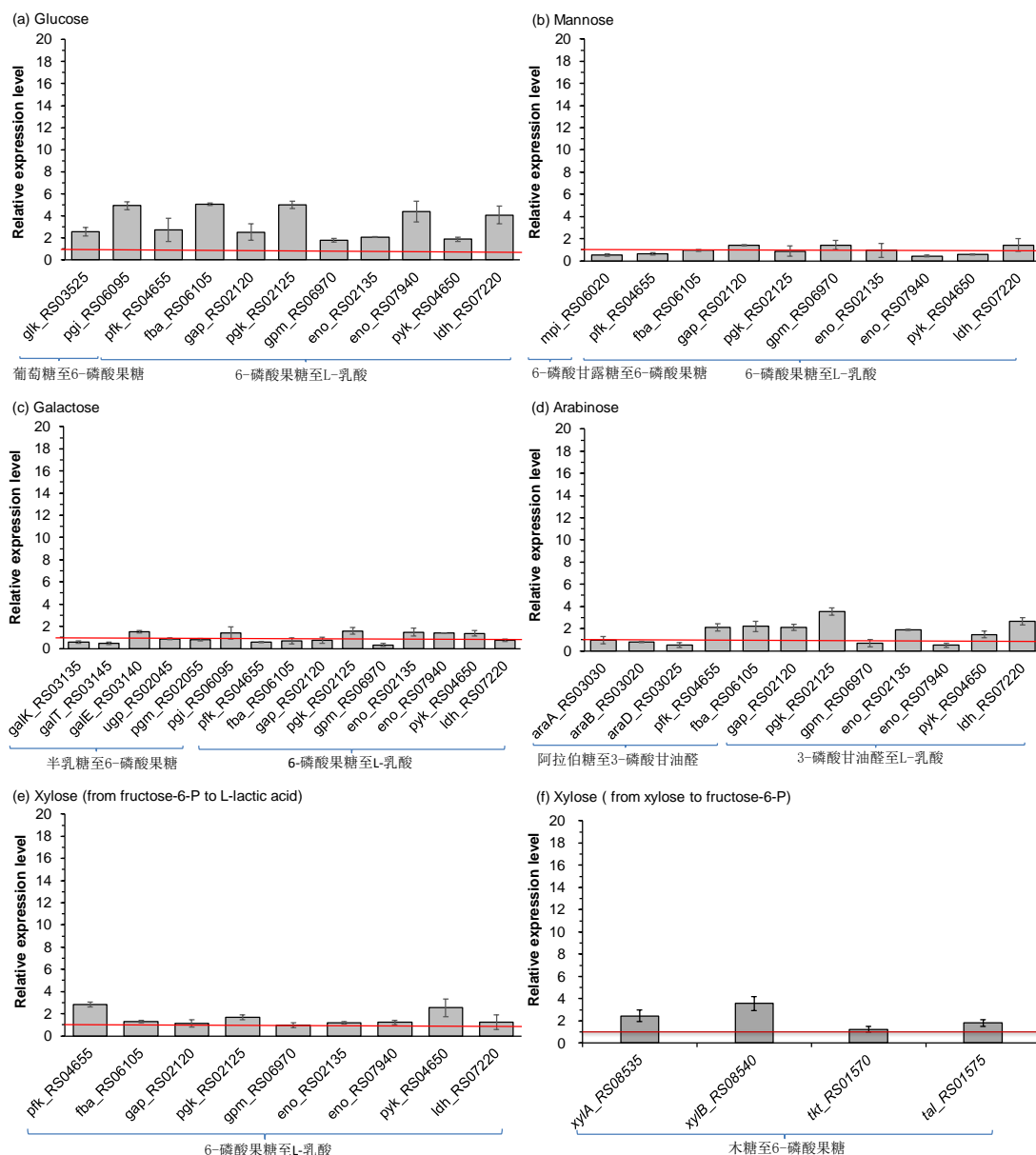


图 4.4 *P. acidilactici* ZY271 的己糖和戊糖代谢基因的转录水平分析

(a) 葡萄糖；(b) 甘露糖；(c) 半乳糖；(d) 阿拉伯糖；
 (e) 木糖（6-磷酸果糖至 L-乳酸）；(f) 木糖（木糖至 6-磷酸果糖）

Fig. 4.4 The relative expression level of the hexose and pentose metabolism genes in *P. acidilactici* ZY271

(a) Glucose; (b) Mannose; (c) Galactose; (d) Arabinose; (e) Xylose (from fructose-6-P to L-lactic acid); (f) Xylose (from xylose to fructose-6-P)

注：*P. acidilactici* 在以单糖为碳源的简化 MRS 培养基中进行培养和收集；(a) - (e) 以 *P. acidilactici* TY112 为对照组，*P. acidilactici* ZY271 为实验组；(f) 以 G0 菌株为对照组，*P. acidilactici* ZY271 为实验组；16S rRNA 为内参基因，*P. acidilactici* ZY271 中的基因相对表达水平经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得到。

4.3.3 糖转运蛋白基因簇 *manXYZ* 在 *P. acidilactici* ZY271 中呈现异常显著的表达上调

为了验证糖转运步骤是否是 *P. acidilactici* 中限制非葡萄糖单糖利用的关键步骤, 我们对 *P. acidilactici* ZY271 中糖转运蛋白基因的转录水平进行了分析 (图 4.5)。在目的基因的选择上, 参照了细菌中主要的三类糖转运蛋白家族^[194], 分别为 ABC (ATP-binding cassette transporters)、PTS (phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system) 和 MFS (Major Facilitator Superfamily) 转运蛋白家族。文献表明, 在细菌中, 葡萄糖的转运蛋白主要为葡萄糖-PTS (glucose-PTS, PTS^{Glu})、甘露糖-PTS (Mannose-PTS, PTS^{Man})、纤维二糖-PTS (cellobiose-PTS, PTS^{Cel}) 和果糖-PTS (fructose-PTS, PTS^{Fru}) 转运蛋白以及 MFS 类的葡萄糖渗透酶 (如 GlcU 和 Gif) 进行的^[143, 195, 196]; 甘露糖的转运蛋白为甘露糖-PTS 转运蛋白^[196]; 半乳糖的转运蛋白主要为半乳糖渗透酶 GalP 和半乳糖-PTS (galactose-PTS, PTS^{Gal}) 转运蛋白^[143]; 木糖的转运蛋白主要为 ABC (如 XylFGH) 和 MFS (如 XylE 和 AraE) 转运蛋白^[152, 197], 在一些菌株中也发现 PTS 糖转运蛋白参与木糖的转运^[198]; 阿拉伯糖转运蛋白为 MFS 转运蛋白 (如 AraE) 和 ABC 转运蛋白 (如 AraFGH)^[199]。根据 *P. acidilactici* ZY271 的基因组注释信息, 我们发现在 *P. acidilactici* 中没有葡萄糖-PTS 转运蛋白, 也没有明确的木糖和阿拉伯糖的转运蛋白, 因此初步筛选得到一些 PTS 转运蛋白 (甘露糖-PTS、纤维二糖-PTS、果糖-PTS 和半乳糖-PTS 转运蛋白) 以及 ABC 和 MFS 中可能与糖相关的转运蛋白基因, 并对这些基因进行了转录水平变化的分析。结果如图 4.5 所示, 在以含己糖 (葡萄糖、甘露糖和半乳糖) 和戊糖 (木糖和阿拉伯糖) 的混合糖为碳源时, 与出发菌株 *P. acidilactici* TY112 相比, *P. acidilactici* ZY271 中的 MFS 和 ABC 这两类糖转运蛋白基因无明显表达上调或下调。令人意外的是, PTS 转运系统中的一个负责编码甘露糖-PTS 转运蛋白的 *manXYZ* 基因簇出现了异常的显著上调表达, 基因簇中的 *manX_RS07040*、*manY_RS07035* 和 *manZ_RS07030* 分别上调表达了 27.5、15.7 和 5.1 倍, 说明该基因簇极有可能在己糖和戊糖的转运上发挥了关键作用。*manXYZ* 基因簇表达的显著上调可能是解除 *P. acidilactici* ZY271 中非葡萄糖单糖代谢限制的关键因素。

为了明确造成 *manXYZ* 基因簇表达上调的具体改造步骤, 我们分别研究了木糖代谢路径的构建和木糖条件下的适应性进化这两个步骤对于 *manXYZ* 基因表达量的影响 (图 4.6)。结果显示, 在分别以单糖以及混合糖为唯一碳源时, 与出发菌株 *P. acidilactici* TY112 相比, 构建了木糖代谢路径的重组菌株 G0 的 *manX_RS07040*、*manY_RS07035* 和 *manZ_RS07030* 基因的表达水平没有明显变化, 这说明, 木糖代谢路径的构建对于 *manXYZ* 基因簇的表达量没有显著影响; 而在经历了长时间的木糖适应性进化后, 进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 中的 *manX_RS07040*、*manY_RS07035* 和 *manZ_RS07030* 基因的表达水平出现显著上调, *manX_RS07040*、*manY_RS07035* 和 *manZ_RS07030* 基因显著上调表达了 4.9-119.1 倍, 这说明长时间的木糖适应性进化诱发了基因簇 *manXYZ* 的表达水平显著上调。

综上所述，木糖条件下的适应性进化促使一个编码甘露糖转运蛋白的 *manXYZ* 基因簇显著上调表达，这可能是解除菌株 *P. acidilactici* ZY271 中非葡萄糖单糖代谢限速步骤的关键因素。

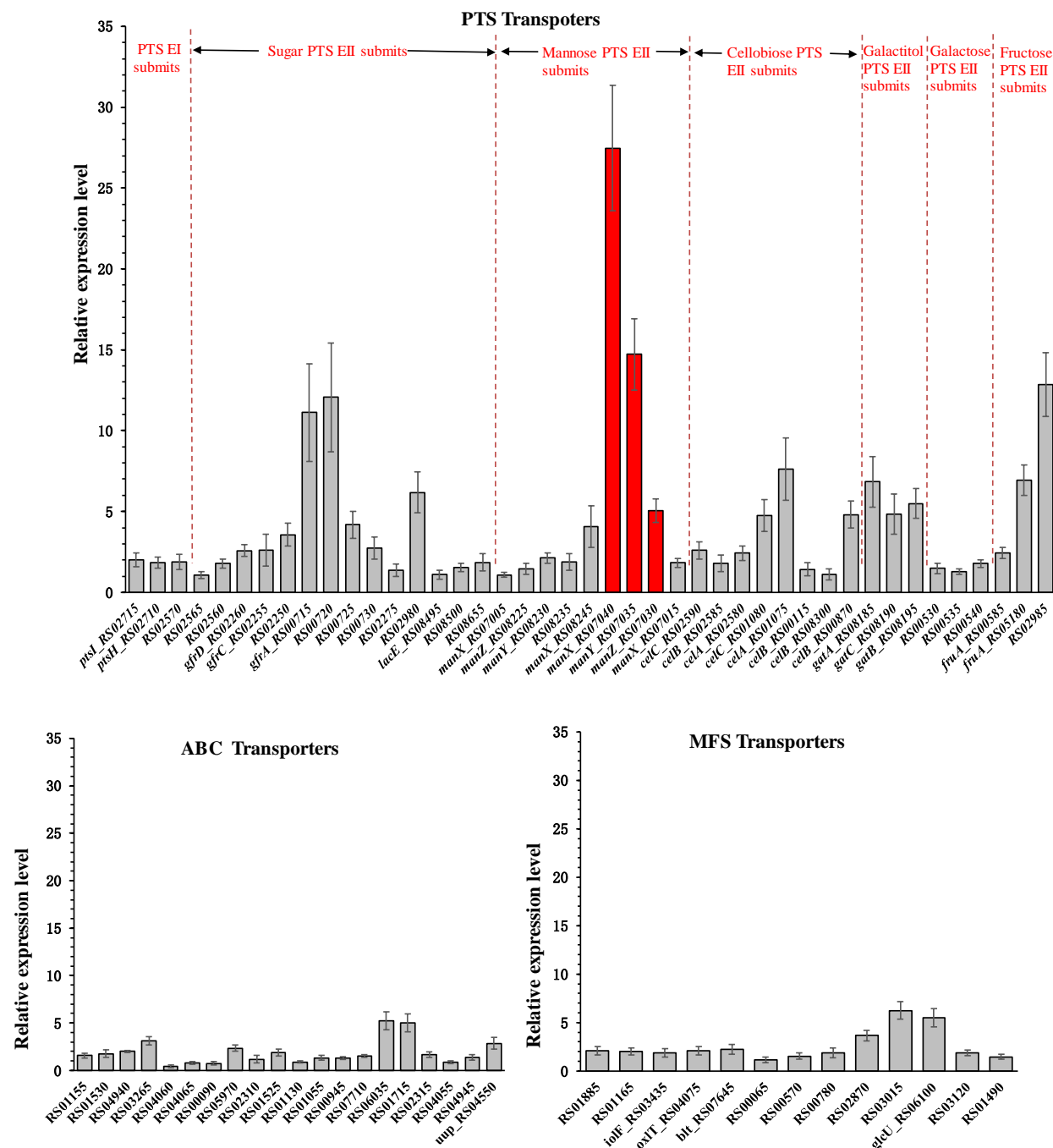


图 4.5 *P. acidilactici* ZY271 中的 PTS、ABC 和 MFS 类糖转运蛋白基因的转录水平分析

Fig. 4.5 Transcriptional analysis of PTS, ABC and MFS-type sugar transporter genes under mixed sugars in *P. acidilactici* ZY271

注：*P. acidilactici* 在以混合糖为碳源的简化 MRS 培养基中进行培养和收集；以菌株 *P. acidilactici* TY112 为对照组，实验组 *P. acidilactici* ZY271 中的相对基因表达水平经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得到。

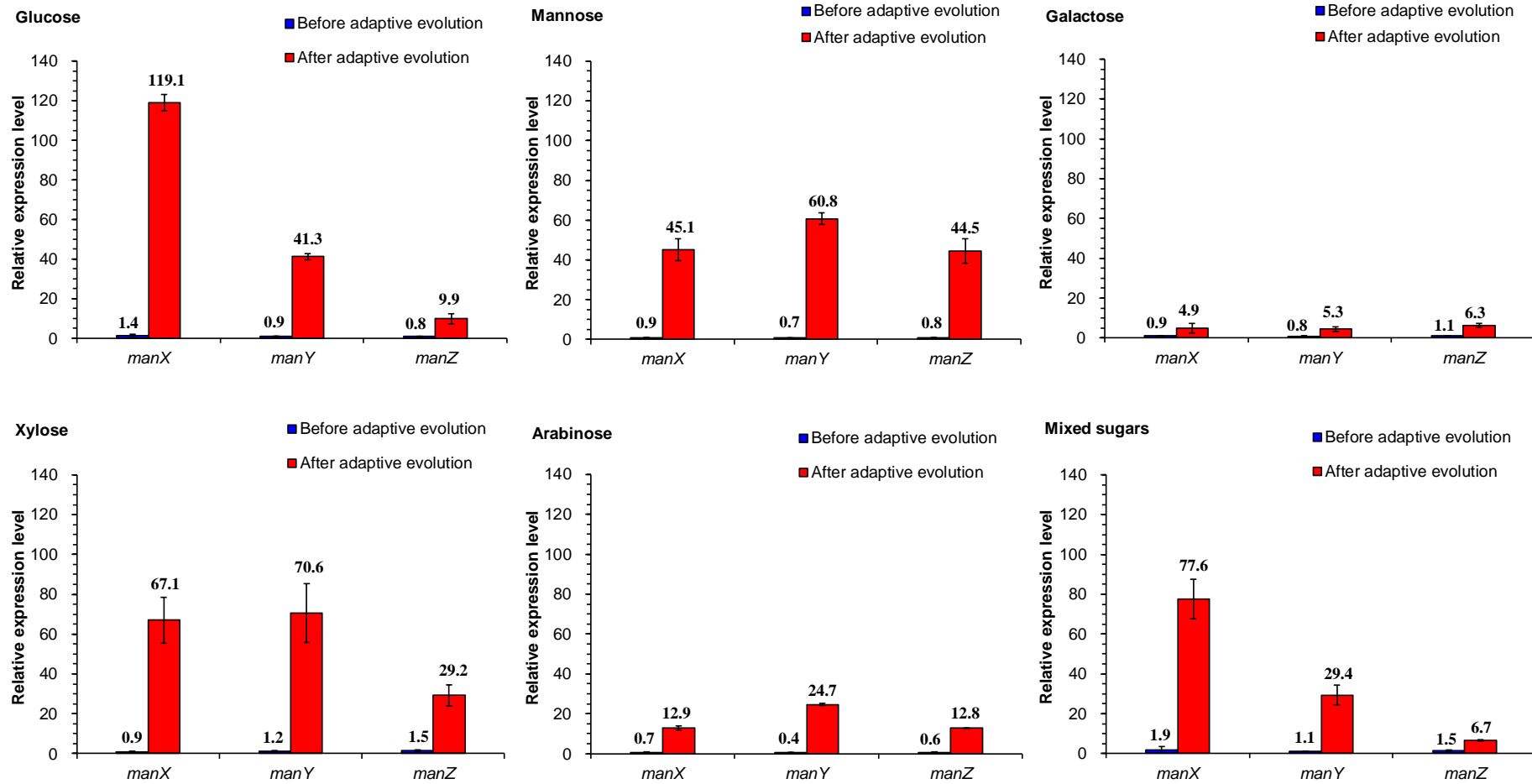


图 4.6 基因 *manX*、*manY* 和 *manZ* 在木糖适应性进化前后的转录水平分析

Fig. 4.6 Transcriptional analysis of *manX*, *manY* and *manZ* gene before and after the adaptive evolution under xylose condition

注：*P. acidilactici* 分别在以单糖和混合糖为碳源的简化 MRS 培养基中进行培养和收集；以菌株 *P. acidilactici* TY112 为对照组，未进化菌株 *P. acidilactici* TY112- Δ *pkt::(tkl-tal)-\Delta**ackA2::xylAB* (G0 菌株) 和进化后的菌株 *P. acidilactici* ZY271 分别为实验组，基因的相对表达水平经 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得到。

4.3.4 *manXYZ* 基因簇的转运功能在己糖和戊糖共利用发挥的关键作用

为了研究 *manXYZ* 基因簇在己糖和戊糖利用中的作用，我们首先对 *manXYZ* 基因簇的功能进行了分析。文献表明，*manXYZ* 基因簇负责编码甘露糖-PTS 转运系统 (mannose-PTS, PTS^{man}) 中的碳源特异性组分 Enzyme II (EII) 复合体，通常直接参与己糖（葡萄糖和甘露糖）的转运及磷酸化的过程^[200]。EII 复合体由 EIIAB（由 *manX* 基因编码）、EIIC（由 *manY* 基因编码）和 EIID（由 *manZ* 基因编码）组成，其中，亲水结构域 EIIAB 接收并传递来自 PTS 系统的通用 Enzyme I 组分的高能磷酸基团，跨膜结构域 EIIC 和 EIID 负责识别并转运糖。简单来说，EIIAB 接受来自 PEP 的磷酸基团并发生磷酸化，磷酸化的 EIIAB (P~EIIAB) 激活 EIIC 和 EIID，EIIC 和 EIID 识别、结合特异性的糖，此时，P~EIIAB 将磷酸基团传递给被转运的糖底物，因此，该过程实现了糖的转运及磷酸化。

为了明确 *manXYZ* 基因簇分别在己糖和戊糖的转运和磷酸化方面发挥的作用，我们分别敲除了负责糖转运的 *manY*、*manZ* 基因和弱化表达了负责糖磷酸化的 *manX* 基因，以探究其分别在糖转运和糖磷酸化方面对于己糖和戊糖利用的影响。首先研究了 *manY* 和 *manZ* 基因的敲除对于菌株 *P. acidilactici* ZY271 的己糖和戊糖利用速率的影响。首先在以单糖为唯一碳源的合成培养基中进行了发酵测试，结果如图 4.7 所示，针对己糖的利用，与出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 相比，*manY* 和 *manZ* 基因的单敲除和双敲除使得菌株的葡萄糖和甘露糖的利用速率分别下降了 40%-45% 和 36%-54%，葡萄糖和甘露糖的利用速率下降近一半，说明 *manY* 和 *manZ* 在葡萄糖和甘露糖的转运过程中发挥了重要作用；但基因 *manY* 和 *manZ* 的敲除使得菌株的半乳糖利用速率上升了 18%-34%，说明基因 *manY* 和 *manZ* 的敲除反而有利于 *P. acidilactici* 对于半乳糖的利用，结合图 4.2 中适应性进化使得菌株的半乳糖的代谢速率下降 54.8% 的结果，说明适应性进化导致的 *manY* 和 *manZ* 的过量表达不利于半乳糖的利用。对于戊糖的利用，*manY* 和 *manZ* 基因的单敲除和双敲除使得菌株的木糖利用速率下降 48%-67%，阿拉伯糖的利用速率降低了 40%-64%，这说明 *manY* 和 *manZ* 是木糖和阿拉伯糖的主要转运通道。其次，为了研究 *manY* 和 *manZ* 基因簇对于己糖和戊糖的共利用的影响，我们在以混合糖为碳源的合成培养基中进行了发酵测试，研究了 *manY* 和 *manZ* 基因对于葡萄糖和木糖共利用速率的影响。结果表明，*manY* 和 *manZ* 基因的单敲除和双敲除使得菌株的葡萄糖和木糖的利用速率分别下降了 25%-30% 和 21%-30%，这说明 *manY* 和 *manZ* 基因的转运功能在葡萄糖和木糖的共利用中发挥了重要作用。总的来说，*manY* 和 *manZ* 基因编码的 EII^{CD}^{man} 蛋白在己糖（葡萄糖和甘露糖）和戊糖（木糖和阿拉伯糖）的转运过程中均发挥了重要作用。

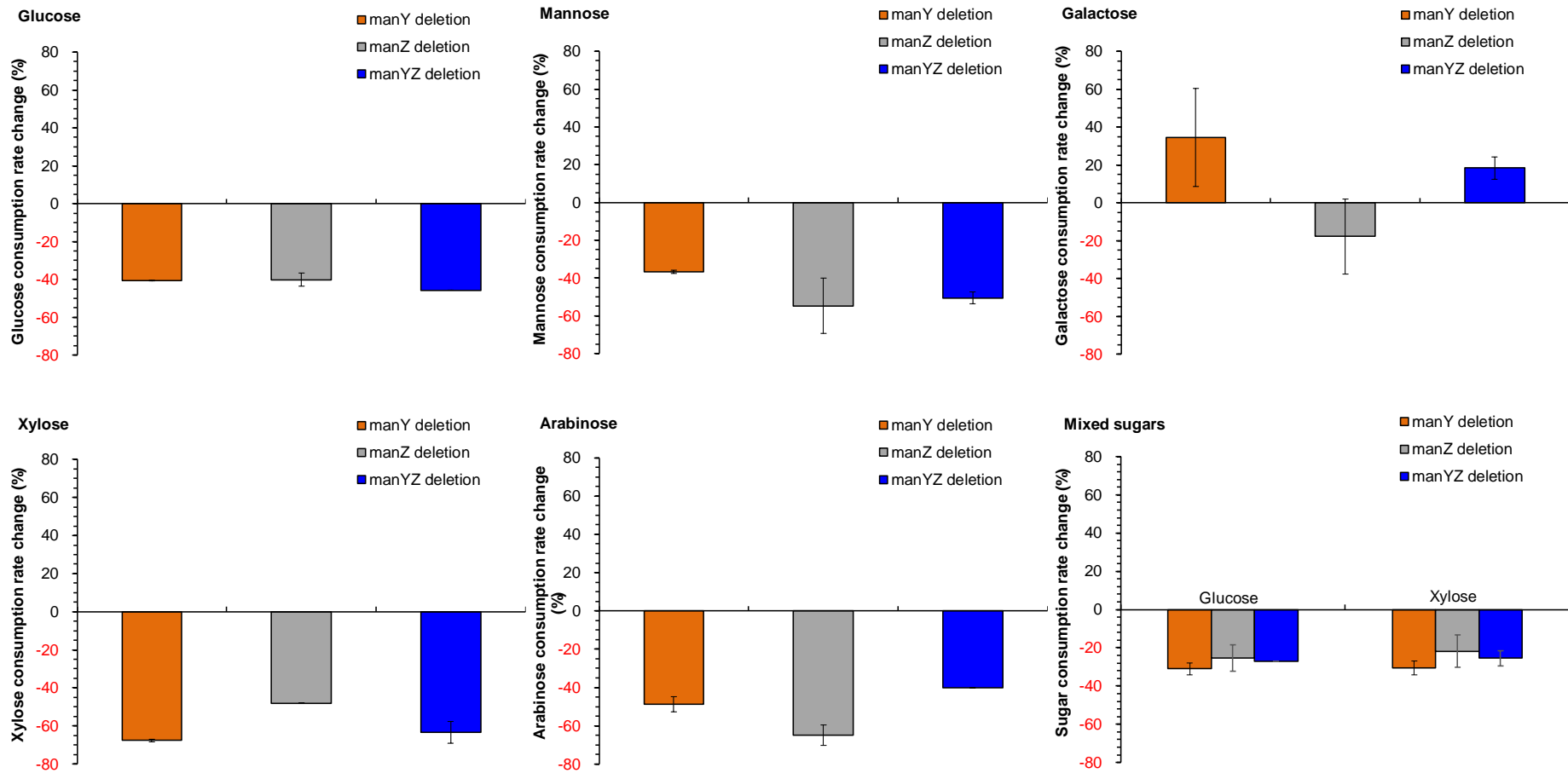


图 4.7 *manY* 和 *manZ* 基因的敲除对于 *P. acidilactici* ZY271 的己糖和戊糖利用速率的影响

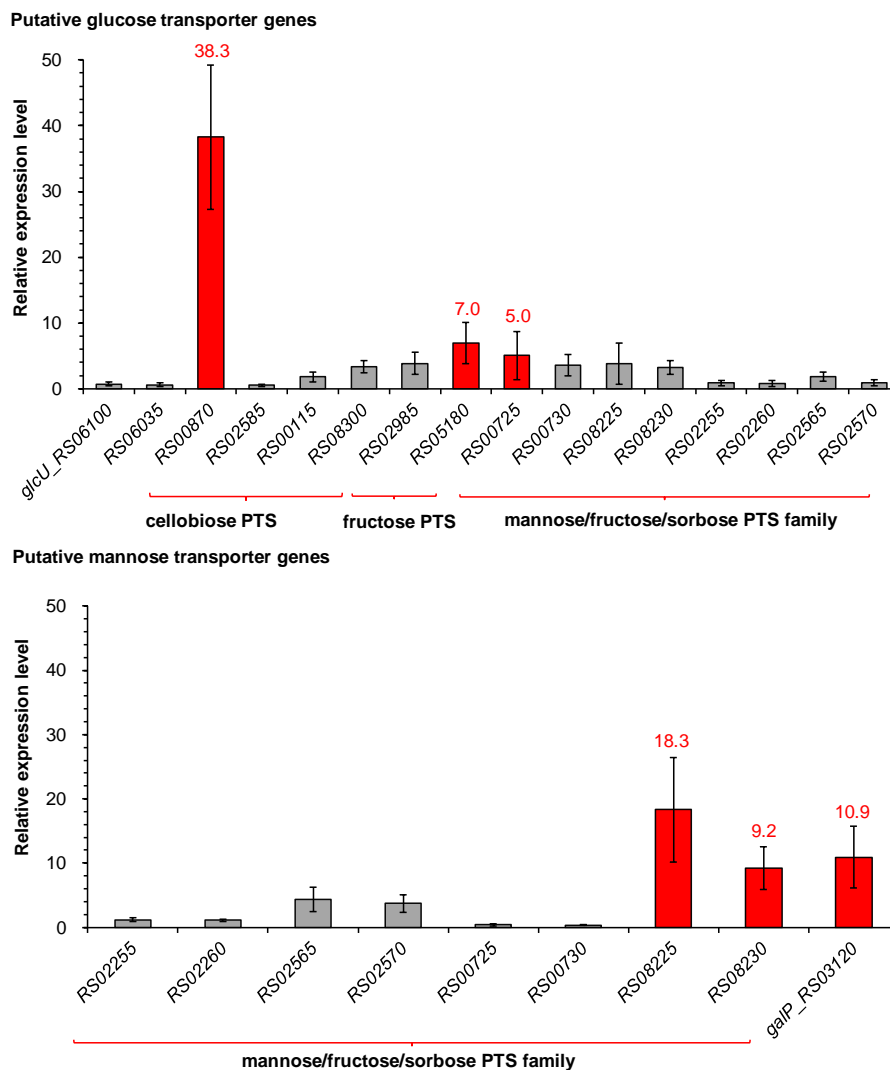
Fig. 4.7 Changes of sugar consumption rates of hexoses and pentoses in *P. acidilactici* ZY271 after the knockout of gene *manY* and *manZ*

发酵条件：发酵在简化 MRS 培养基中进行，分别以单糖和混合糖为碳源；42 °C, 150 rpm 条件下发酵 24 h，在培养基中按照 0.6 g/g 糖的比例加入 CaCO₃ 粉末来调节 pH；糖利用速率变化表示与 *P. acidilactici* ZY271 相比，重组 *P. acidilactici* 菌株的糖利用速率增加或减少的百分比。

由于 *manY* 和 *manZ* 的敲除没有使得 *P. acidilactici* ZY271 的己糖和戊糖利用能力完全丧失, 说明除了 *manY* 和 *manZ* 编码的 EIICD^{man} 蛋白外还有其它的糖转运蛋白在发挥作用。为了研究其它的糖转运蛋白在己糖和戊糖的转运过程中发挥的作用, 我们以 *P. acidilactici* ZY271 为对照组, 以敲除了 *manY* 和 *manZ* 基因的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271- Δ *manY*- Δ *manZ* 为实验组, 研究了其它糖转运蛋白基因的表达水平变化(图 4.8), 一方面尝试挖掘出其它潜在的己糖和戊糖转运基因, 另一方面, 侧面反映 *manY* 和 *manZ* 基因在糖转运过程中发挥的作用。针对葡萄糖转运, 我们筛选了可能负责葡萄糖转运的 MFS 类 (*glcU* 和 *RS06035* 基因) 和 PTS 类的 16 个糖转运基因进行了转录水平的分析。结果表明, 在敲除 *manY* 和 *manZ* 基因之后, 大部分糖转运蛋白基因的表达水平没有明显变化, 只有 3 个基因出现了明显的表达水平上调, 分别是编码 cellobiose-PTS 转运蛋白的 *RS00870* 基因、fructose-PTS 转运蛋白的 *RS05180* 基因和 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白的 *RS00725* 基因, 其表达显著上调了 38.3 倍、7 倍和 5 倍, 这说明这 3 个基因可能是除了 *manY* 和 *manZ* 基因外负责转运葡萄糖转运的主要基因。因此, 除了 *manY* 和 *manZ* 基因编码的 EIICD 蛋白之外, 葡萄糖的转运通道很可能还有 cellobiose-PTS、fructose-PTS 和 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白, 这就能解释 *manY* 和 *manZ* 基因的敲除使得 *P. acidilactici* ZY271 的葡萄糖利用速率下降 45%, 但不会使得其葡萄糖利用能力完全丧失的现象。针对甘露糖转运, 我们筛选了可能负责甘露糖转运的 PTS 和 MFS 类的 9 个转运基因进行了转录水平分析, 只有编码 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白的 *RS08230* 和 *RS08225* 基因以及 MFS 类的 *galP_RS03120* 基因的表达水平分别上调了 18.3 倍、9.2 倍和 10.9 倍, 说明这三个基因可能是除了 *manY* 和 *manZ* 基因外负责甘露糖转运的主要基因; 结合 *manY* 和 *manZ* 基因的敲除使得甘露糖的利用速率下降了 50.5% 的结果, 说明 *manY* 和 *manZ* 基因和这三个转运蛋白基因可能各承担约一半的甘露糖转运通量。针对半乳糖转运, 只有编码 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白的 4 个基因的表达水平显著上调, 其中, *RS08225*、*RS08230*、*RS02260* 和 *RS02570* 基因分别表达上调了 66.3、19.4、5.3 和 8.2 倍; 编码 galactose-PTS 转运蛋白的 *RS00530* 基因表达上调了 130.7 倍, 编码 MFS 转运蛋白的 *galP_RS03120* 基因表达上调了 34.4 倍; 这说明 mannose/fructose/sorbose PTS、galactose-PTS 转运蛋白基因和 *galP_RS03120* 可能都参与了半乳糖的转运, 结合 *manY* 和 *manZ* 的敲除使得菌株半乳糖的利用速率上升了 18%-34% (图 4.7) 的结果, 说明 *manY* 和 *manZ* 的表达负调控了 galactose-PTS 转运蛋白基因、*galP_RS03120* 和 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白基因的表达, 从而导致半乳糖的利用速率下降。

针对木糖转运, 我们筛选了可能负责木糖转运的 20 个编码 ABC 类、MFS 类和 PTS 转运基因进行转录水平的分析, 结果表明, 大部分转运蛋白基因的表达水平均没有明显变化, 只有 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白中的 *RS08225* 基因和 MFS 类的 *RS01455* 基因表达分别上调了 3.8 和 3.2 倍, 说明这两个基因是除 *manYZ* 基因外最有可能的木糖转运通道, 结合 *manY* 和 *manZ* 基因的敲除使得木糖的利用速率下降 63.4% 的

结果, 可以确定 *manY* 和 *manZ* 基因编码的 EIICD^{man} 蛋白是 *P. acidilactici* 中主要的转运通道, *RS08225* 和 *RS01455* 编码的转运蛋白可能是木糖转运的辅助通道。针对阿拉伯糖转运, 结果表明, 大部分转运蛋白基因的表达水平变化较小, 只有 MFS 类的 *RS01455* 基因和 *RS07420* 基因表达分别上调了 6.3 和 5.8 倍, 说明这两个基因编码的转运蛋白很可能是除了 *manY* 和 *manZ* 基因外的阿拉伯糖的转运通道, 结合 *manY* 和 *manZ* 基因的敲除使得阿拉伯糖的利用速率下降了 40% 的结果, 说明 *manY* 和 *manZ* 基因编码的 EIICD^{man} 蛋白是不可或缺阿拉伯糖转运通道, *RS01455* 和 *RS07420* 基因编码的转运蛋白则可能是额外的阿拉伯糖转运通道。以上的转录水平分析再次印证了 *manY* 和 *manZ* 编码的 EIICD^{man} 蛋白是葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖的主要转运通道。



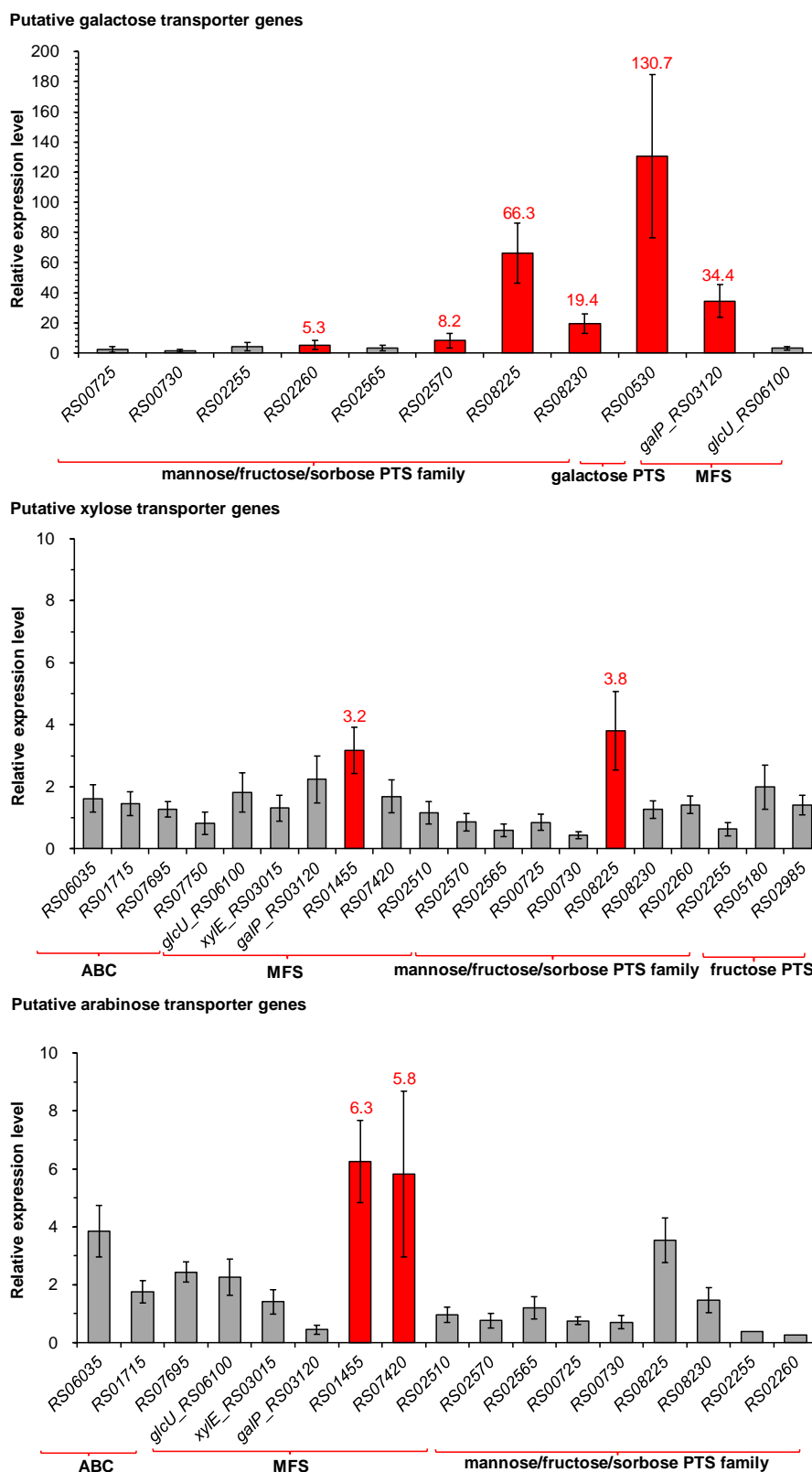


图 4.8 推定的己糖和戊糖转运蛋白基因的转录水平分析

Fig. 4.8 Transcriptional level analysis of putative hexose and pentose transporter genes

注: *P. acidilactici* 在以单糖为碳源的简化 MRS 培养基中进行培养和收集; 基因的转录水平分析以 *P. acidilactici* ZY271 菌株为对照组, *P. acidilactici* ZY271- $\Delta manY$ - $\Delta manZ$ 菌株中的基因的相对表达水平经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得到。

4.3.5 *manXYZ* 基因簇的磷酸化功能在己糖和戊糖共利用发挥的关键作用

manX 基因编码甘露糖-PTS 转运蛋白中的 EIIAB，其负责将磷酸基团传递给糖底物，使糖进行磷酸化反应。为了研究该基因的磷酸化功能在己糖和戊糖的利用中发挥的作用，我们选择将 *manX* 基因进行弱化表达，即通过替换 *manX* 基因的 RBS 序列的方式来削减 EIIAB 蛋白的酶活性，简单来说，我们将 *manX* 的原始 RBS 序列（翻译起始速率为 240.08 au）替换成翻译起始速率为 4.49 au 的 RBS 4.49，得到的重组菌株命名为 *P. acidilactici* ZY271-*manX*_RBS 4.49，并探究了 *manX* 基因的弱化表达对于己糖和戊糖代谢速率的影响（图 4.9）。以单一糖为碳源的合成培养基发酵结果显示，在弱化表达 *manX* 后，相较于菌株 *P. acidilactici* ZY271，重组菌株 *P. acidilactici* ZY271-*manX*_RBS 4.49 的葡萄糖和甘露糖的利用速率分别下降了 27%、32%，这说明 *manX* 基因在葡萄糖和甘露糖的磷酸化过程中发挥了重要作用；但 *manX* 基因的弱化表达反而使得半乳糖的利用速率上升了 75%，说明 *manX* 基因的弱化表达有利于半乳糖的利用。对于戊糖而言，*manX* 基因的弱化表达使得菌株的木糖和阿拉伯糖利用速率分别降低了 55%和 35%，这说明 *manX* 也参与了木糖和阿拉伯糖的磷酸化过程，并发挥了重要的作用。同时，我们也探究了 *manX* 基因的弱化表达对于己糖和戊糖共利用的影响。以混合糖为碳源的合成培养基发酵结果显示，*manX* 基因的弱化表达对葡萄糖的利用速率基本没有影响，但导致木糖的利用速率下降了 25%，再次印证了 *manX* 基因在木糖的利用过程中发挥了重要作用，有利于改善木糖与葡萄糖的共利用。我们也尝试将 *manX* 基因敲除，但并未成功，说明 *manX* 基因可能在糖利用的过程中是不可或缺的。以上结果说明 *manX* 在己糖和戊糖的利用过程中均发挥着关键的作用，有可能直接或间接地参与了己糖和戊糖的磷酸化过程。

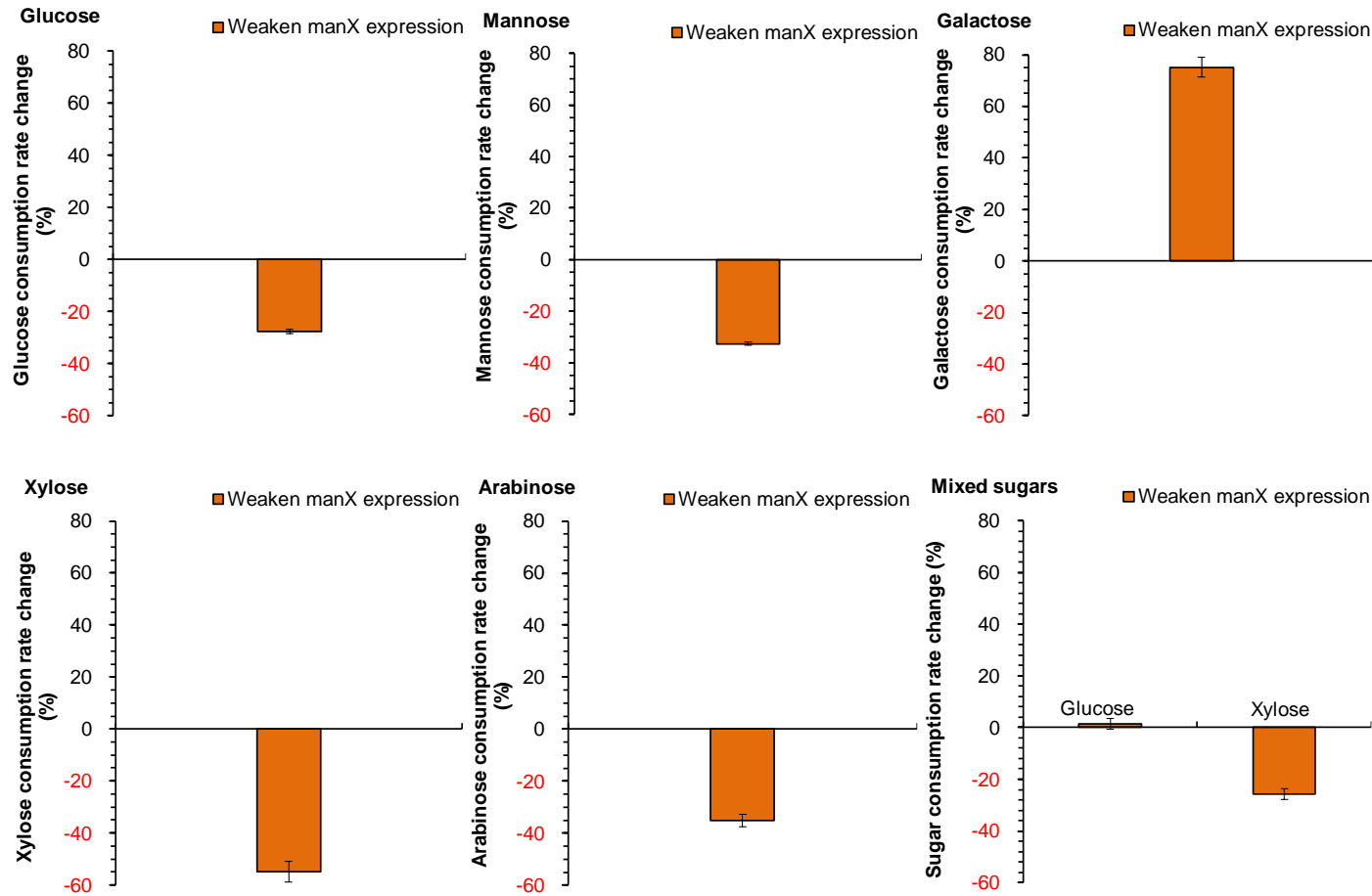


图 4.9 *manX* 基因的弱化表达对于 *P. acidilactici* ZY271 的己糖和戊糖利用速率的影响

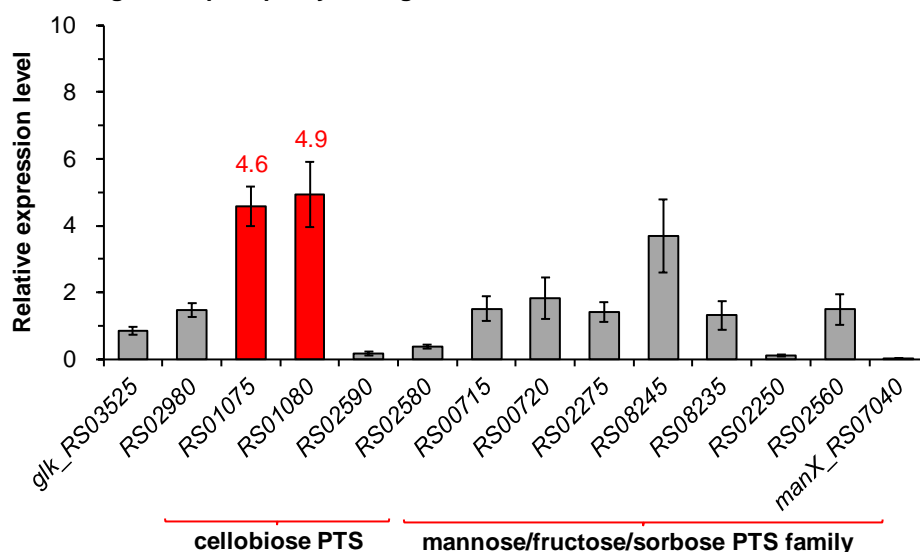
Fig. 4.9 Changes of sugar consumption rates of hexoses and pentoses in *P. acidilactici* ZY271 after the weaken expression of gene *manX*

发酵条件：发酵在简化 MRS 培养基中进行，分别以单糖和混合糖作为碳源；42 °C，150 rpm，发酵 24 h，培养基中加入 0.6 g CaCO₃ 粉末/g 糖调节 pH。

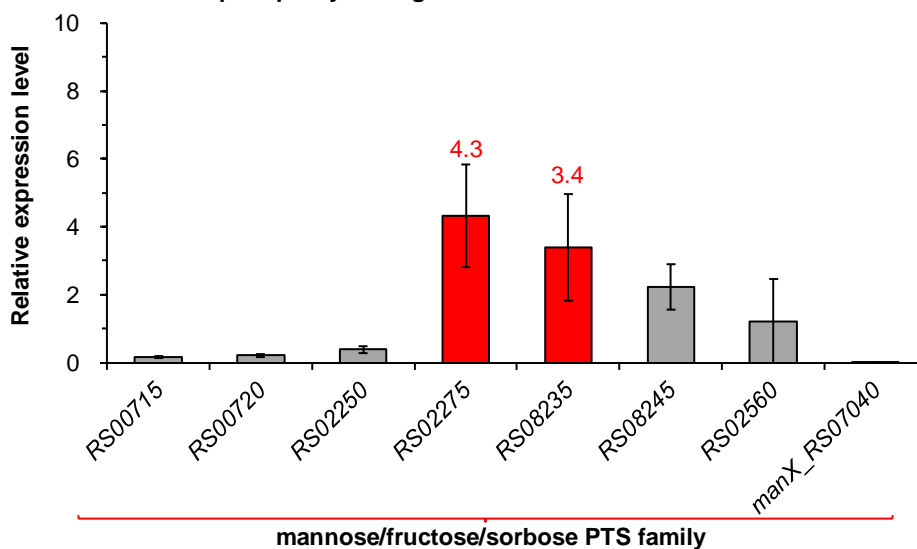
manX 基因的弱化表达使得己糖和戊糖的利用能力下降, 但没有使得其糖利用能力丧失, 说明除了 *manX* 基因外, 还有其它的糖磷酸化基因也在发挥作用。为了研究其它的磷酸化基因在己糖和戊糖磷酸化过程中发挥的作用, 我们以 *P. acidilactici* ZY271 为对照组, 在菌株 *P. acidilactici* ZY271- Δ *manY*- Δ *manZ* (*manX* 基因的表达水平下降为原来的 0.01-0.02 倍, 基本不表达) 中探究了除 *manX* 外的其它糖磷酸化基因的表达水平变化, 以挖掘出其它的糖磷酸化基因 (图 4.10)。针对葡萄糖的磷酸化, 我们筛选了葡萄糖激酶基因 *glk_RS03525* 和 PTS 转运蛋白中可能参与葡萄糖磷酸化的 14 个基因, 大部分糖磷酸化基因的表达没有明显变化, 只有 cellobiose-PTS 转运蛋白中的 *RS01075* 和 *RS01080* 基因的表达水平明显上调了约 5 倍, 这说明这两个基因很可能是除了 *manX* 基因之外参与葡萄糖磷酸化的主要基因。针对甘露糖的磷酸化, 只有 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白家族的 *RS02275* 和 *RS08235* 基因的表达水平分别上调了 4.3 倍和 3.4 倍, 说明这两个基因很可能是除 *manX* 基因外主要负责甘露糖磷酸化的基因。针对半乳糖磷酸化基因, *galK_RS03135* 的基因表达水平没有明显变化, mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白家族的磷酸化基因 *RS08235* 的表达水平上调了 79.1 倍, galactose-PTS 转运系统中的磷酸化基因 *RS00535* 和 *RS00540* 的基因表达分别上调了 69.6 和 10.1 倍, 该结果说明除 *manX* 外, 主要的半乳糖磷酸化基因可能是 *RS08235*、*RS00535* 和 *RS00540*。

针对木糖的磷酸化, 我们筛选了 10 个可能参与木糖磷酸化的基因, 分别为木糖异构酶基因 (*xyIA_RS08535*)、木酮糖激酶 (*xyIB_RS08540*) 和来自 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白家族的磷酸化基因来进行转录水平的分析, 结果表明, 所有糖磷酸化基因的表达水平均没有明显变化, 这说明在 *manX* 的弱化表达对木糖的磷酸化步骤影响较小, *manX* 基因不直接参与木糖的磷酸化。结合 *manX* 的弱化表达导致木糖代谢速率下降的结果 (图 4.9), 我们推测 *manX* 基因的弱化可能是通过影响 *manY* 和 *manZ* 基因的最佳转运活性, 从而影响木糖的利用。针对阿拉伯糖的磷酸化, 我们筛选了 *araA_RS03030*、*araB_RS03020*、*araD_RS03025* 和 mannose/fructose/sorbose PTS 转运蛋白家族的磷酸化基因进行了转录水平分析。结果表明, 所有糖磷酸化基因的表达水平均没有明显变化, *manX* 的弱化表达对阿拉伯糖的磷酸化步骤影响较小, 结合 *manX* 的弱化使得阿拉伯糖代谢速率下降的结果, 表明 *manX* 基因的弱化可能是通过影响转运蛋白基因 *manY* 和 *manZ* 的活性, 从而影响阿拉伯糖的利用。以上结果表明, *manX* 基因的弱化表达激活了葡萄糖、甘露糖和半乳糖的其它磷酸化基因的表达, 说明 *manX* 基因参与了己糖的磷酸化过程; *manX* 基因的弱化表达对戊糖 (木糖和阿拉伯糖) 磷酸化基因表达的影响较小, 结合 *manX* 基因的弱化表达使得戊糖的利用速率降低的结果, 说明 *manX* 基因不直接参与戊糖的磷酸化, 对戊糖利用速率的影响可能是通过影响转运蛋白基因 *manY* 和 *manZ* 的转运活性来实现的, 有待进一步研究。

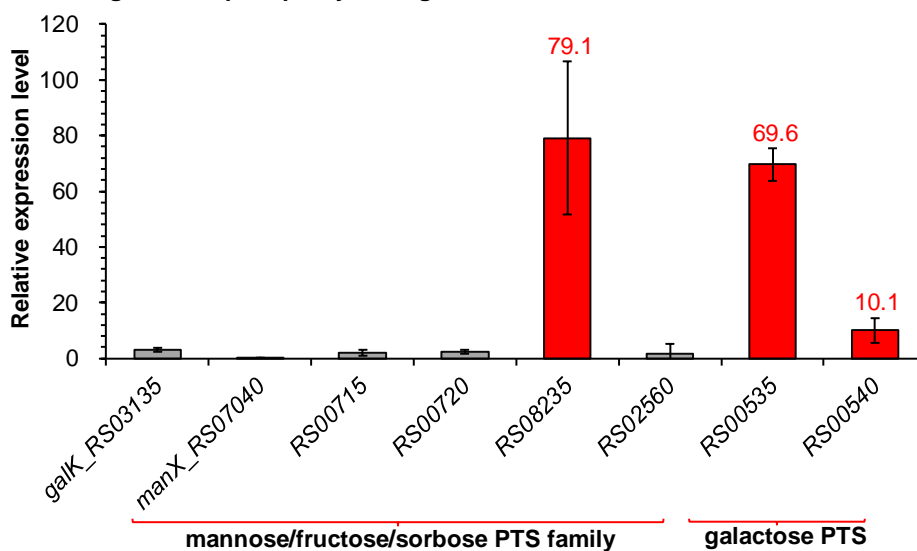
Putative glucose phosphorylation genes



Putative mannose phosphorylation genes



Putative galactose phosphorylation genes



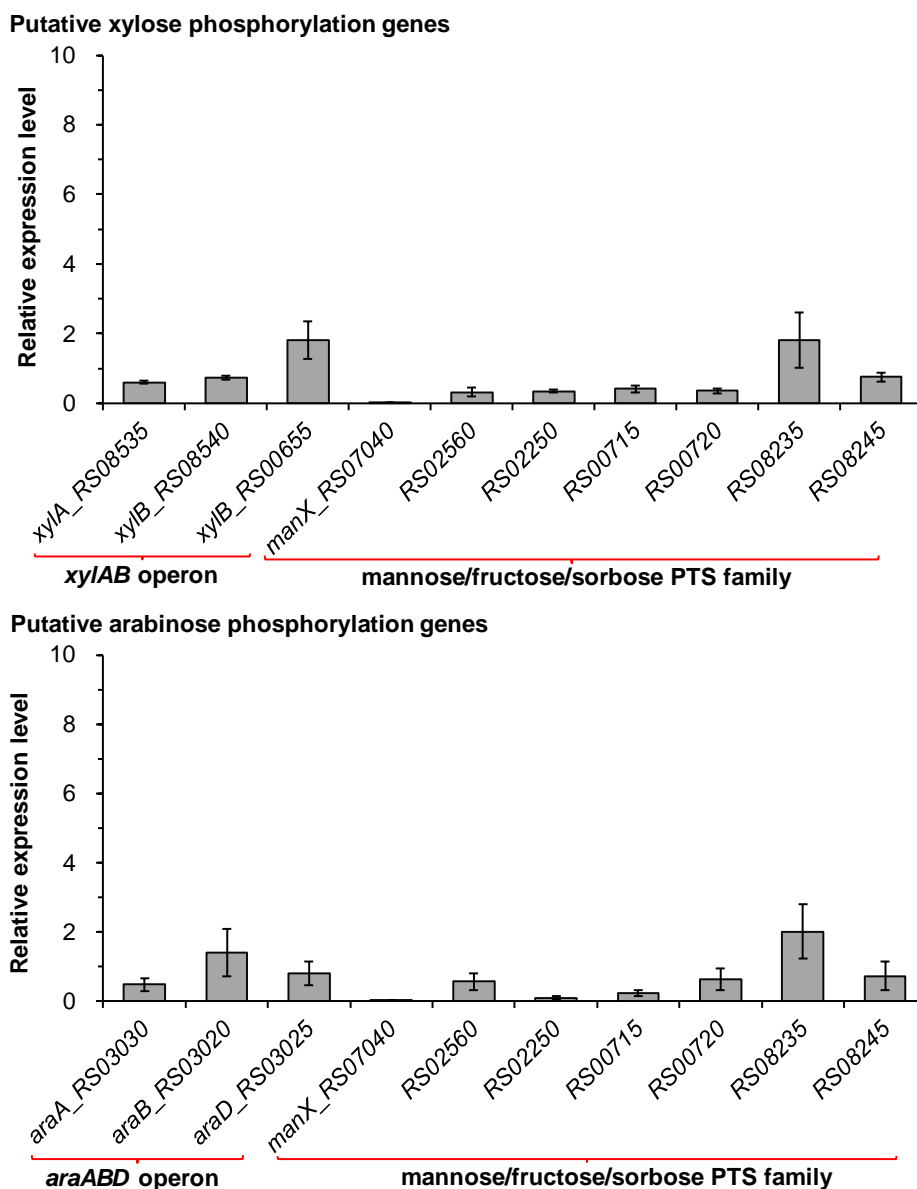


图 4.10 推定的己糖和戊糖磷酸化基因的转录水平分析

Fig. 4.10 Transcriptional level analysis of putative hexose and pentose phosphorylation genes

注: *P. acidilactici* 分别在以单糖为碳源的简化 MRS 培养基中进行培养和收集; 以 *P. acidilactici* ZY271 菌株为对照组, *P. acidilactici* ZY271- Δ manY- Δ manZ 菌株中的基因的相对表达水平经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得到。

以上实验结果说明 *manXYZ* 基因簇在己糖（葡萄糖和甘露糖）的转运及磷酸化过程均发挥了主要作用，虽没有直接参与戊糖（木糖和阿拉伯糖）的磷酸化过程，但在戊糖的转运中发挥了关键作用，证明 *manXYZ* 基因簇是 *P. acidilactici* ZY271 实现己糖和戊糖共利用的关键基因簇。

4.4 本章小结

本章节旨在乳酸片球菌工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 协同代谢己糖和戊糖全转化为乳酸的现象进行了机制解析，成功挖掘了一个表达水平异常上调的甘露糖转运蛋白基因簇 *manXYZ*，通过基因的敲除和弱化表达以及转录水平的分析确定了 *manXYZ* 基因簇在（葡萄糖、甘露糖、半乳糖）和戊糖（木糖和阿拉伯糖）的转运和磷酸化过程中的关键作用，确定了 *manXYZ* 是解除非葡萄糖单糖转运限速步骤的关键基因簇。本章主要的研究结论如下：

（1）以木糖为唯一碳源的长时间适应性进化解除了木糖和甘露糖代谢的限速步骤，使得 *P. acidilactici* ZY271 实现了己糖和戊糖的快速协同共利用。

（2）通过对己糖和戊糖代谢基因的转录水平分析，发现糖代谢基因不是限制 *P. acidilactici* 共利用己糖和戊糖的关键步骤。

（3）通过对己糖和戊糖转运基因的转录水平水平分析，发现和筛选得到一个转录水平出现异常显著上调、编码甘露糖 PTS 转运蛋白的 *manXYZ* 基因簇。通过对 *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的敲除或弱化表达实验，结合除 *manXYZ* 外的其它糖转运和磷酸化基因的转录水平分析，验证了 *manXYZ* 基因簇在己糖和戊糖的转运中发挥了主导作用，在己糖的磷酸化过程中发挥了重要作用，确定了 *manXYZ* 是解除 *P. acidilactici* ZY271 中非葡萄糖单糖转运限速步骤的关键基因簇。

第 5 章 乳酸片球菌工程菌协同利用非葡萄糖单糖的关键转录调控因子的挖掘

5.1 引言

木质纤维素来源的可发酵单糖主要为葡萄糖和四种非葡萄糖单糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）^[130]，以戊糖为代表的非葡萄糖单糖的低效利用是生物炼制菌株面临的经典难题。非葡萄糖单糖的低效利用不仅大幅降低了发酵产品得率，还会造成发酵产品中存在大量非葡萄糖残糖，残糖的存在严重阻碍了生物基聚合物的高纯度聚合级单体的生产，必须进行成本高昂的高强度下游纯化才能获得用于聚合的高纯度单体。因此，实现葡萄糖和非葡萄糖单糖的共利用是木质纤维素生物炼制生产生物基化学品的经济性转化的基础。目前，主要通过敲除或突变转录调控因子、强化非葡萄糖单糖代谢路径和增强糖转运蛋白的转运能力来提高发酵菌株对于非葡萄糖单糖的代谢速率^[201-203]，但以上措施对非葡萄糖单糖利用的改善有限，非葡萄糖单糖的代谢速率仍然远远低于葡萄糖的代谢速率。

在前期工作中，通过代谢工程和适应性进化得到了一株乳酸片球菌工程菌 *P. acidilactici* ZY271^[79]，该菌株具有罕见的木质纤维素来源所有单糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）协同代谢和全谱代谢能力。本论文第四章对工程菌 *P. acidilactici* ZY271 协同代谢己糖和戊糖全转化为乳酸的现象进行了机制解析，成功挖掘了一个表达水平异常上调的甘露糖-PTS 转运蛋白基因簇 *manXYZ*，证明了 *manXYZ* 是己糖和戊糖的转运和磷酸化过程中均发挥了主要作用，是提高非葡萄糖单糖利用能力的关键基因簇。为了进一步解析 *P. acidilactici* ZY271 的己糖和戊糖协同利用机制，需要进一步挖掘 *manXYZ* 基因簇出现异常上调表达的机制。

转录调控因子在调控己糖和戊糖的转运蛋白基因的表达方面发挥重要作用。*manXYZ* 基因簇编码的是甘露糖 PTS 转运蛋白的 EnzymeII (EII) 复合体，其负责识别并转运特异性糖，并同时将糖进行磷酸化。研究表明，在革兰氏阳性菌中，PTS 转运蛋白的表达主要受含有特殊 PRD 结构域（PTS regulation domains）的转录调控激活因子的调控，这类转录激活因子通过与转运基因操纵子序列结合、协助启动子与 sigma-RNA 聚合酶复合物结合，从而激活基因的表达。该类转录激活因子的关键氨基酸突变和失活直接影响相关糖转运蛋白基因的转录^[204-207]。另外，分解代谢物阻遏蛋白（catabolite control protein A, CcpA）作为转录抑制因子参与了一些 PTS 转运蛋白基因的表达调控，主要通过与其操纵子的启动子结合来抑制基因表达。CcpA 的失活和保守氨基酸残基的突变激活相关糖转运蛋白基因的表达^[207,208]。因此，转录调控因子能直接参与调控 PTS 转运蛋白的表达，转录调控因子的突变或失活是改变糖转运蛋白基因表达水平的一个重要因素。

本章节针对甘露糖转运蛋白 *manXYZ* 基因簇在全糖协同代谢中的作用进行了机制挖

掘。通过转录调控蛋白的序列分析,发现经特定进化途径获得的 *manXYZ* 上调突变菌株伴随着 CcpA 和 RS07020 转录调控蛋白突变;通过氨基酸的定点突变实验和基因转录水平分析,验证了 CcpA 的 T65I 突变和 RS07020 的 E159G 突变对提高 *P. acidilactici* 中己糖和戊糖的共代谢速率起着极为重要的作用,同时发现 CcpA 和 RS07020 蛋白参与了 *manXYZ* 基因簇的转录调控,CcpA 的 T65I 突变和 RS07020 蛋白的 E159G 突变是诱发 *manXYZ* 基因簇表达发生上调的关键因素。本研究通过对 *P. acidilactici* 中调控己糖和戊糖转运的关键转录调控因子的挖掘,明确了转录调控因子的关键氨基酸突变在提高非葡萄糖单糖的利用能力发挥的关键作用,为解决其它生物炼制菌株中非葡萄糖单糖的低效利用问题提供了解决思路。

5.2 材料与方法

5.2.1 菌株、培养基与培养条件

本章节使用的菌株见表 5.1。*P. acidilactici* 的培养方法与培养基成分见 2.2.1。

5.2.2 酶与试剂

使用的酶和试剂的来源见 4.2.2。

5.2.3 质粒与重组菌株构建

本章节使用的菌株和质粒见表 5.1 和 5.2。质粒 pSET4E-*ccpA**用于 *ccpA* 基因的定点突变,作用是将进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 (G1 菌株) 和 G2 菌株中 *ccpA* 基因的突变位点进行碱基替换,使得 CcpA 蛋白中发生的氨基酸突变 I65 恢复成 T65、P150 恢复成 S150。其构建过程具体如下:以重组菌株 *P. acidilactici* TY112- Δ *pkt::(tkl_tal)-\Delta**ackA2::xylAB* (G0 菌株, *ccpA* 基因未发生突变) 的基因组为模板,利用设计好的定点突变引物(已将突变碱基进行替换)分别扩增包含 *ccpA* 碱基突变位点的上游同源臂 (*ccpa-up*, ~710 bp) 和下游同源臂 (*ccpa-down*, ~700 bp),使用重叠延伸 PCR 的方式将上游和下游同源臂两个片段进行融合,得到融合片段 *ccpA**;通过无缝克隆的方式将融合片段 *ccpA**连接至经 XbaI 和 SalI 酶处理后的线性化质粒 pSET4E 上,得到质粒 pSET4E-*ccpA**。质粒 pSET4E-*RS07020**用于 *RS07020* 基因的定点突变,目的是将进化菌株 *P. acidilactici* ZY271 (G1 菌株) 中发生了碱基突变的 *RS07020* 基因恢复成原来未发生突变的 *RS07020**基因,使得 RS07020 蛋白中的氨基酸残基 G159 突变回 E159,其构建过程具体如下:以未发生突变的 G0 菌株的基因组为模板,利用设计好的定点突变引物(已将突变碱基进行替换)分别扩增包含 *RS07020* 碱基突变位点的上游同源臂 (*RS07020-up*, ~710 bp) 和下游同源臂 (*RS07020-down*, ~710 bp),通过无缝克隆的方式将两个片段同时连接至经 XbaI 和 BamHI 酶切处理后的线性化质粒 pSET4E 上,得到质粒 pSET4E-*RS07020**。以上重组质粒均通过测序验证,序列验证正确后再进行使用。

P. acidilactici 感受态的制作、质粒的电转化、单交换和双交换筛选操作见 4.2.3。

表 5.1 本章节使用的菌株

Table 5.1 The strains used in this chapter

Strains	Characteristics	Sources
<i>P. acidilactici</i> TY112- $\Delta pkt::(tkl_tal)-\Delta ackA2::xylAB$ (G0)	Integration of the xylose assimilation pathway in the genome of <i>P. acidilactici</i> TY112	[79]
<i>P. acidilactici</i> ZY271(G1) G2	The adapted strain of <i>P. acidilactici</i> TY112- $\Delta pkt::(tkl_tal)-\Delta ackA2::xylAB$ under xylose condition Another adapted strain of <i>P. acidilactici</i> TY112- $\Delta pkt::(tkl_tal)-\Delta ackA2::xylAB$ under xylose condition	[79] Lab stock
CcpA(65IT)	Site-directed mutation of CcpA protein from amino acid residue I65 to T65 in strain G1	This study
CcpA(150PS)	Site-directed mutation of CcpA protein from amino acid residue P150 to S150 in strain G2	This study
RS07020(159GE)	Site-directed mutation of RS07020 protein from amino acid residue G159 to E159 in strain CcpA(65IT)	This study

注：I65 的 I 表示异亮氨酸，T65 的 T 表示苏氨酸，P150 的 P 表示脯氨酸，S150 中的 S 表示丝氨酸，数字 65 和 150 分别代表 CcpA 蛋白的第 65 位和第 150 位氨基酸残基（由蛋白 N 端的第一个甲硫氨酸开始排序）；G159 中的 G 表示甘氨酸，E159 中的 E 表示谷氨酸，数字 159 表示 RS07020 蛋白的第 159 位氨基酸残基。

表 5.2 本章节使用的质粒

Table 5.2 The plasmids used in this chapter

Plasmids	Characteristics	Sources
pSET4E	Em ^r replacing Spc ^r marker of pSET4S, temperature sensitive vector	[77]
pSET4E- <i>ccpA</i> *	Vector for point mutation of CcpA from amino acid residue I65 to T65 in strain G1 and P150 to S150 in strain G2	This study
pSET4E- <i>RS07020</i>	Vector for point mutation of RS07020 from amino acid residue G159 to E159 in strain CcpA(65IT)	This study

表 5.3 本章节使用的定点突变引物

Table 5.3 The primers for site-directed mutation used in this chapter

Primers	Sequences (5'-3')
<i>ccpa</i> -up-F	CCGGGGATCCTCTAGAATGCGGTTGCGCGC
<i>ccpa</i> -up-R	CCAGTGTCGTACATTG G GTGGCCAATTGAACTAATTTGTGGGCGCACCATCTTAGTTAAGT
<i>ccpa</i> -down-F	ACTTAACTAAGATGGTGCGCCACAAATTAGTTCAATTGGCCAC C CAATGTACGACACTGG
<i>ccpa</i> -down-R	ATGCCTGCAGGTTCGAGGTTTCGTTTCATCCTCTTCTTCGG
<i>RS07020</i> -up-F	AGCTCGGTACCCGGGGATCGCTCATTTCGACATGGCGGC
<i>RS07020</i> -up-R	ACGTTTTCCCTGAC T CCGTTGGTCCGA
<i>RS07020</i> -down-F	GG A GTCAGGGAAAACGTACTTTGCCAACGCAAT
<i>RS07020</i> -down-R	TGCAGGTCTACTTAGGTTCCCTGCCGGTTAGACGC

注：红色字体表示碱基突变位点。

表 5.4 本章节使用的测序引物

Table 5.4 The sequencing primers used in this chapter

Genes	Function annotation	Primer sequences (5'-3')	
		Forward	Reverse
<i>ccpa_RS05600</i>	catabolite control protein A	GAACCCGTTCAATCGGATC	AATCTGTGCCGTAGCGTTA
<i>RS07020</i>	sigma-54-dependent transcriptional regulator	TGACGGTTGGTGCCTTAAT	CCTGTGATGTTTTCTGTGGTT
<i>RS08220</i>	GntR family transcriptional regulator	CGGATGACTTCTACCAAGG	ATTCCGTAATGGTCGCTTT
<i>RS05190</i>	DeoR/GlpR family DNA-binding transcription regulator	TAAGCGGAACGGGTTGAC	CGTTTCTTGTTGAGCGTGAA
<i>RS03010</i>	GntR family transcriptional regulator	CCGCGAAATTGATCGAACT	TCGTGTTGTAAGAACGGGAG
<i>RS02600</i>	PRD domain-containing protein	GTCTAAGCGTTATGGCTTCAT	GTACATCTATGTATGCCCGG
<i>RS03110</i>	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	TGGATATCATCCGCACCC	TGCCACGTTCCACCATAG
<i>RS07055</i>	RNA-binding transcriptional accessory protein	GGTTGATGCAGTAGATGACC	GTAGTAGTCCGGCGCTTAGA
<i>RS08340</i>	LacI family DNA-binding transcriptional regulator	TCCGACCACTTTATGCTGG	CCGAGGATTAACGGAATCAAG
<i>RS00675</i>	AraC family transcriptional regulator	CCGAGGTGAATCATGAACC	ACTTGGAATTAGCATCCGC

注：以上引物用于转录调控因子的基因序列扩增及测序。

5.2.4 不同糖条件下的适应性进化实验

适应性进化实验在含有 20 mL 简化 MRS 培养基的 100 mL 锥形瓶中进行，分别在三种不同糖条件下进行，即分别以单一木糖（40 g/L）、混合糖（40 g/L 木糖和 40 g/L 葡萄糖）和 25%（w/w）固含量的麦秆水解液为碳源，每种糖条件下做两组适应性进化实验。具体过程为：分别挑取 G0 菌株的两个单菌落 G0-1 和 G0-2 作为出发菌株，将培养好的菌液按 10%（v/v）的接种量分别接入到三种不同糖条件下的 MRS 培养基中，在 42 °C、150 rpm 条件下培养，每 24 h 转接一次，培养基中加入 CaCO₃（0.6 g/g 糖）调节 pH。25%（w/w）固含量的麦秆水解液的制备过程为：将 25%（w/w）固含量的经预处理和脱毒后的麦秆加入至 3 L 罐中，加入 4 mg 蛋白/干物料的纤维素酶进行水解反应（12 h），反应条件为 50 °C，150 rpm，pH 5.5，得到的糖化醪进行离心得到上清液，再经过滤纸过滤得到水解液。麦秆水解液的糖组分主要为：63.3 g/L 葡萄糖、33.4 g/L 木糖、8.7 g/L 阿拉伯糖+甘露糖和 0.9 g/L 半乳糖。

5.2.5 转录调控因子的基因序列测序和序列比对

参考菌株 *P. acidilactici* ZY271（G1 菌株）的基因组信息（NCBI: NZ_CP082111.1），筛选出与可能与糖利用相关的转录调控因子；在目的基因的上游和下游约 500 bp 处设计引物，分别以 G0 菌株、G1 菌株和 G2 菌株的基因组为模板，PCR 扩增出筛选的转录调控因子的基因片段；将扩增得到的基因片段交由擎科生物公司（Beijing, China）进行测序，得到基因的序列；以 G0 菌株的基因序列为对照，利用 NCBI 网站比对菌株 G0、G1 和 G2 的转录调控因子基因序列，筛选得到基因发生突变的转录调控因子。

5.2.6 己糖与戊糖共利用速率的发酵评估

发酵在含有 50 mL 简化 MRS 培养基的 250 mL 锥形瓶中进行，以终浓度为 40 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖为碳源。将培养好的 *P. acidilactici* 种子液按 10%（v/v）的接种量接入 MRS 培养基中，在 42 °C 和 150 rpm 条件下发酵 24 h，按照 0.6 g/g 糖的比例在培养基中加入 CaCO₃ 粉末来调节 pH。发酵过程中取样检测葡萄糖和木糖的含量变化。糖代谢速率的变化为氨基酸突变菌株相对于 G0 菌株的糖利用速率的变化百分数。

5.2.7 荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析

菌体的收集、RNA 的提取和反转录实验见 4.2.6。在菌体收集过程中，根据实验需求分别以单一木糖（40 g/L）、两种糖（40 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖）以及混合糖为碳源进行菌液的培养，混合糖为 70 g/L 葡萄糖、50 g/L 木糖、8 g/L 阿拉伯糖、2 g/L 甘露糖和 2 g/L 半乳糖。qRT-PCR 分析以 G0 菌株为对照组，氨基酸突变菌株为实验组，以 16S rRNA 基因为内参基因，使用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *manX_RS07040*、*manY_RS07035* 和 *manZ_RS07030* 的相对转录水平。qRT-PCR 使用的引物见表 4.4。

5.2.8 HPLC 分析

葡萄糖和木糖的检测方法见 2.2.6。

5.3 结果与讨论

5.3.1 适应性进化诱发转录调控蛋白的氨基酸突变

针对 *P. acidilactici* ZY271 中 *manXYZ* 基因簇的表达异常上调的现象，我们从转录调控因子的角度来进行机制解析。由于转录调控因子直接调控糖转运蛋白的表达水平^[209-211]，其氨基酸突变会影响相关糖转运蛋白的表达水平^[204, 205]，从而影响菌株的糖利用能力。在细菌中，含有特殊 PRD 结构域（PTS regulation domains）的转录调控激活因子参与调控 PTS 转运蛋白的表达^[204-206]，以 CcpA 蛋白为代表的 LacI 家族的转录调控因子^[212, 213]和 GntR 家族的转录调控因子被证实参与了糖转运蛋白的表达调控^[211]，以上转录蛋白的氨基酸突变会影响相关糖转运蛋白的表达水平。因此，我们根据 *P. acidilactici* ZY271 的基因组注释（NCBI: NZ_CP082111.1）和蛋白结构域的预测，从中筛选得到可能参与调控糖转运蛋白表达的 8 个转录调控因子，分别为含有 PRD 结构的 RS07020 和 RS02600、属于 LacI 家族的 CcpA、RS03110 和 RS08340、属于 GntR 家族的 RS08220、RS03010 和 RS05190 蛋白，我们研究了其氨基酸序列是否发生突变。由于 *P. acidilactici* ZY271（G1 菌株）的 *manXYZ* 基因簇的大幅度表达上调发生在以木糖为唯一碳源的适应性进化后，因此，我们以未进化菌株 G0 的基因序列为参照，针对进化后得到的 G1 菌株和同一条件进化得到的另一株 G2 菌株，进行了转录调控因子的氨基酸残基突变情况的监测（表 5.5）。结果表明，进化菌株 G1 和 G2 中出现了两种不同的突变情况。在进化菌株 G1 中，由 *ccpA* 和 RS07020 基因编码的转录调控蛋白 CcpA 和 RS07020 均发生了氨基酸残基的突变，CcpA 蛋白的苏氨酸 Thr65 突变成异亮氨酸 Ile65（T65→I65，简称 T65I，数字代表编码蛋白的氨基酸序号，氨基酸序列见附录 I），RS07020 蛋白中的谷氨酸 Glu159 突变成甘氨酸 Gly159（E159→G159，E159G）。在进化菌株 G2 中，只有 CcpA 蛋白发生了突变，CcpA 蛋白的丝氨酸 Ser150 突变成脯氨酸 Pro150（S150→P150，S150P）。CcpA 蛋白属于 LacI-GalR 转录因子家族，其在调节糖转运和糖代谢相关蛋白的转录水平方面起重要作用^[212]，其基因突变可能导致调控的糖转运蛋白基因的表达水平发生上调，使糖利用能力提高。RS07020 基因位于 *manXYZ* 操纵子的下游 845 bp 处，其编码的蛋白是一种 sigma-54 依赖型的转录激活因子，含有特定的 PRD（PTS regulation domains）结构域，可能直接参与调控 PTS 转运蛋白基因操纵子的转录，其突变可能导致 *manXYZ* 的表达量发生变化。因此，以上两种转录调控蛋白均有可能参与 *manXYZ* 基因转录水平的调控，其氨基酸残基突变可能直接影响 *manXYZ* 基因簇的转录。

为了验证 CcpA 和 RS07020 蛋白的氨基酸突变在适应性过程中是否具有必然性和普遍性，一方面，我们重复了菌株 G1 和 G2 的适应性进化过程，重新对 G0 菌株进行了以木糖为唯一碳源的长时间适应性进化；另一方面，增加了两种不同糖条件下（混合糖和麦秆水解液）的适应性进化作为对照组，以探究适应性进化是否会导致 CcpA 和 RS07020 蛋白发生同样的氨基酸突变。具体来说，我们选取了 G0 的两个单菌落

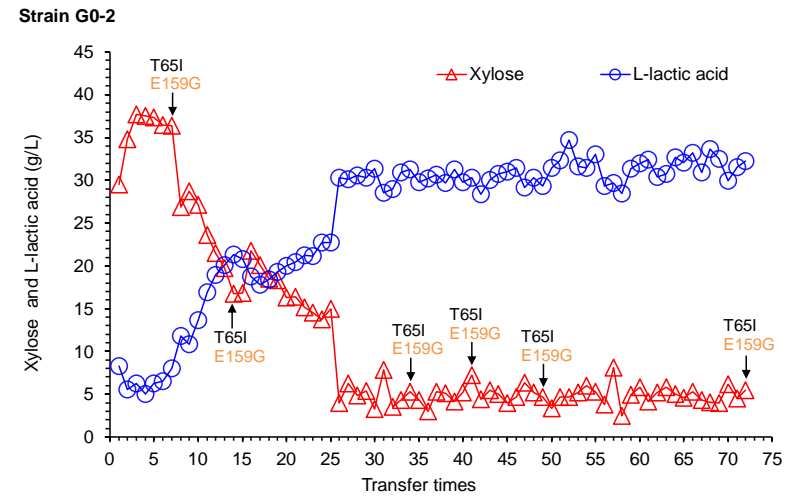
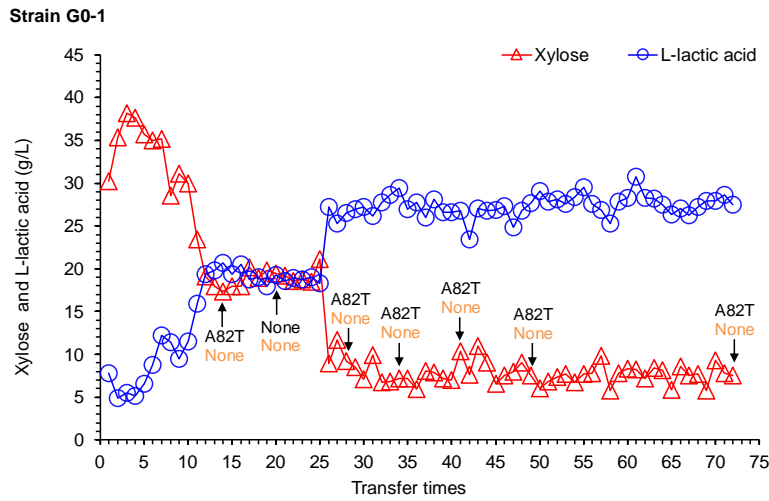
(G0-1 和 G0-2) 作为出发菌株, 在三种不同的糖条件下, 即单一木糖 (40 g/L)、混合糖 (40 g/L 木糖和 40 g/L 的葡萄糖) 和 25% (w/w) 固含量的麦秆水解液条件下, 分别进行了长时间的适应性进化 (图 5.1)。在适应性进化过程中, 监测了菌株的糖消耗和乳酸生成情况, 同时监测了菌株的 CcpA 和 RS07020 蛋白的氨基酸残基突变情况。结果如图 5.1 a 所示, 在木糖条件下的进化中, G0-1 和 G0-2 菌株在转接了 8 次后, 其木糖代谢能力均出现明显的提升; 同时, CcpA 和 RS07020 蛋白发生了氨基酸残基突变。在菌株 G0-1 的进化过程中, CcpA 蛋白的丙氨酸 82 突变成苏氨酸 82 (A82→T82, A82T), 且 A82T 突变一直稳定存在于菌株中, 但 RS07020 蛋白没有发生突变; 在 G0-2 菌株的进化过程中, CcpA 蛋白的苏氨酸 65 突变成异亮氨酸 65 (T65→I65, T65I), RS07020 蛋白的谷氨酸 159 突变成甘氨酸 159 (E159→G159, E159G), 且这两个突变一直稳定存在于菌株中。这些结果说明以木糖为唯一碳源的适应性进化容易诱发 CcpA 和 RS07020 蛋白发生突变, 值得注意的是, G0-2 菌株中出现的 CcpA (T65I) 和 RS07020 (E159G) 突变与之前在木糖条件下进化得到的 G1 菌株中的突变是一致的, 说明这两个突变在木糖条件下的适应性进化过程中具有可重复性, 且其伴随着木糖代谢能力的提高而发生。作为对照, 在分别以混合糖 (葡萄糖和木糖) 和 25% (w/w) 固含量麦秆水解液为碳源的进化过程中 (图 5.1 b 和 5.1 c), 菌株 G0-1 和 G0-2 在转接 30 次后, 菌株的木糖代谢能力依旧没有明显提高, 进化过程中也没有发现 CcpA 和 RS07020 蛋白的突变, 这说明 CcpA 和 RS07020 蛋白的突变在适应性进化中不具备普遍性, 只有特定条件下的适应性进化才能诱发其突变。以上结果说明只有木糖条件下的适应性进化容易诱发 CcpA 和 RS07020 蛋白发生氨基酸突变, 其中, CcpA 的 T65I 和 RS07020 的 E159G 突变具有可重复性, 且突变伴随着木糖代谢能力的提高而发生, 说明这些突变可能是提高菌株木糖代谢能力的关键因素。

表 5.5 适应性进化 *P. acidilactici* 突变菌株中的转录调控因子的氨基酸残基突变情况Table 5.5 Amino acid residue mutation of transcriptional regulation factors in adaptively evolved *P. acidilactici* mutants

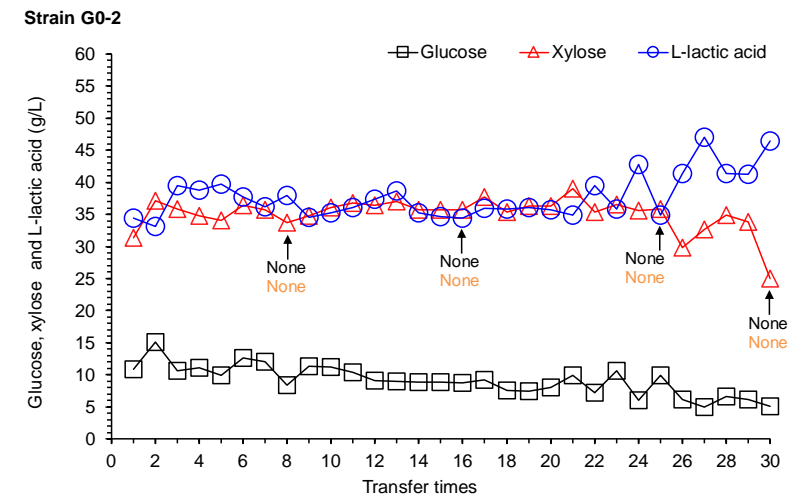
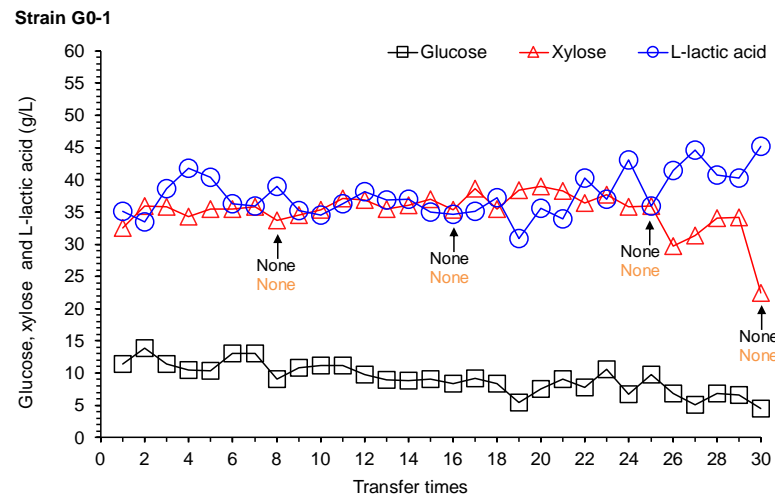
Strains and evolution profiles	Sugar consumption rate changes	CcpA	RS07020	RS02600	RS08220	RS03010	RS03110	RS08340	RS05190
G0 (Control)	/	/	/	/	/	/	/	/	/
G1, 66 transfers in xylose	Glucose: ↑ 10.6% Xylose: ↑ 58.6%	T65→I65	E159→G159	None	None	None	None	None	None
G3, 72 transfers in xylose	Glucose: ↑ 2.2% Xylose: ↑ 82.5%	T65→I65	E159→G159	None	None	None	None	None	None
G2, 66 transfers in xylose	Glucose: ↑ 3.7% Xylose: ↑ 54.8%	S150→P150	None	None	None	None	None	None	None

注：菌株 G0 是引入了木糖代谢路径的重组菌株 *P. acidilactici* TY112- Δ *pkt::(tkl-tal)-\Delta**ackA2:::xylAB*；菌株 G1 和 G2 是由 G0 菌株的两个单菌落出发，在 40 g/L 木糖为碳源的 MRS 培养基中经过 66 次转接后分别得到的进化菌株（于 2018 年获得）；G3 菌株是重复 G1 和 G2 菌株的适应性进化过程，从 G0 菌株的单菌落出发，在 40 g/L 木糖为碳源的 MRS 培养基中转接 72 次获得的进化菌株（于 2023 年获得）；菌株每 24 h 转接一次；糖消耗速率变化的摇瓶发酵实验在含混合糖（40 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖）的简化 MRS 培养基中进行，42 °C、150 rpm 下发酵 24 h，在摇瓶中加入 0.6 g CaCO₃ 粉末/g 糖来调节 pH。糖耗率变化定义为菌株 G1-G3 相对于菌株 G0 的糖耗速率增加或减少的百分比。

(a) The adaptive evolution using xylose as carbon source



(b) The adaptive evolution using glucose and xylose as carbon source



(c) The adaptive evolution using wheat straw hydrolysate as carbon source

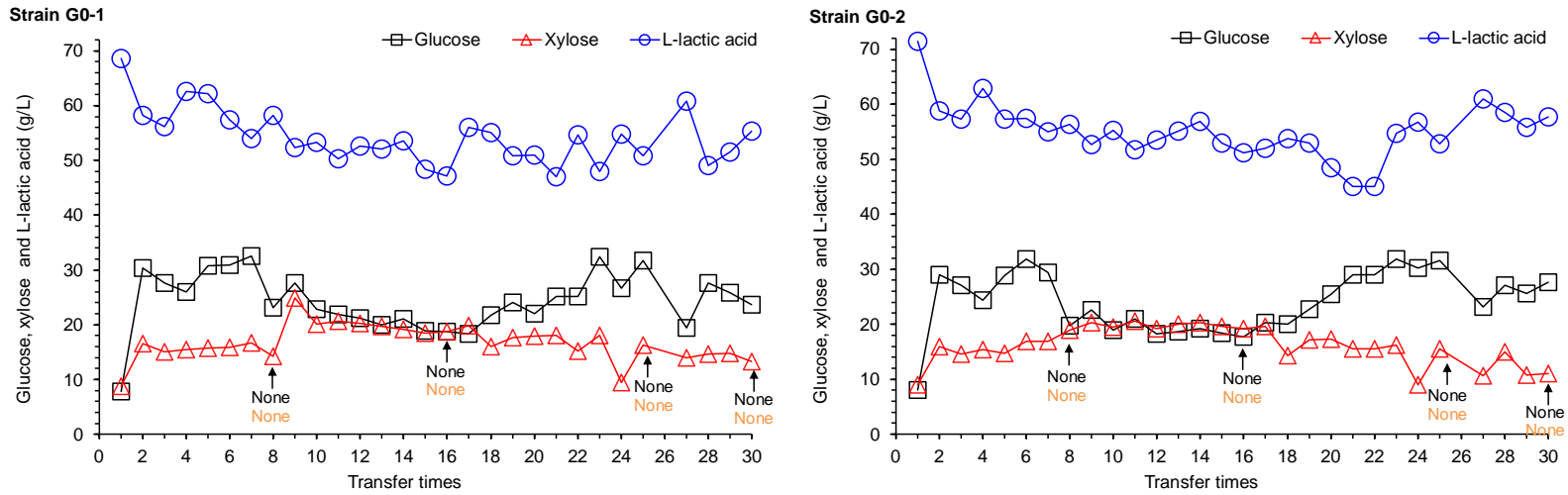


图 5.1 G0 菌株在不同糖条件下的适应性进化

(a) 木糖; (b) 葡萄糖和木糖; (c) 麦秆水解液

Fig. 5.1 The adaptive evolution of strain G0 under different sugar conditions

(a) Xylose; (b) Glucose and xylose; (c) Wheat straw hydrolysate

进化条件: 进化在含有不同糖的简化 MRS 培养基中进行, 分别以 40 g/L 木糖、混合糖 (40 g/L 木糖和 40 g/L 葡萄糖) 和 25% (w/w) 固含量的麦秆水解液作为碳源; 每种糖条件下做两组适应性进化, 出发菌株分别为 G0 菌株的两个单菌落 G0-1 和 G0-2; 42 °C、150 rpm 条件下培养, 每 24 h 转接一次, 培养基中加入 CaCO₃ (0.6 g/g 糖) 调节 pH。图中箭头表示进化菌株的 CcpA 蛋白 (黑色字体) 和 RS07020 蛋白 (橙色字体) 在不同时期的氨基酸突变情况, None 表示没有发生突变。

5.3.2 转录调控蛋白的氨基酸突变促进己糖和戊糖共利用

为了研究菌株 G1 和 G2 中转录调控蛋白 CcpA 和 RS07020 的突变是否与己糖和戊糖共代谢能力的提高有关, 我们先后针对 CcpA 和 RS07020 蛋白的突变位点进行了定点突变实验, 以探究突变位点对己糖和戊糖利用能力的影响。结果如图 5.2 a 所示, 以未驯化菌株 G0 的糖代谢速率为基准, 含有 CcpA (T65I) 和 RS07020 (E159G) 突变的进化菌株 G1 的木糖代谢速率提高了 42.8%, 葡萄糖代谢速率有轻微提高; 在将 CcpA 的 I65 突变回 T65 后, 木糖的代谢速率下降了 7.7%, 葡萄糖代谢速率基本不变, 说明 CcpA 中的 T65I 突变略微提高了木糖的代谢速率。接着, 我们在 CcpA 回复突变的基础上, 继续将 G1 菌株的 RS07020 的 G159 突变回 E159 后, 重组菌株的木糖代谢速率显著降低了 32.1%, 葡萄糖代谢速率降低了 12.7%。这些结果说明 CcpA 蛋白和 RS07020 蛋白中发生的氨基酸突变 (T65I 和 E159G) 有利于提高葡萄糖和木糖的共利用速率, 尤其是木糖的利用速率。针对 G2 菌株中发生的 CcpA 蛋白的另一氨基酸突变 (S150P), 我们也对其进行了定点突变实验来验证该突变对于己糖和戊糖利用速率的影响。结果如图 5.2 b 所示, 以未进化菌株 G0 的糖代谢速率为基准, 含有 CcpA (S150P) 突变的进化菌株 G2 的木糖代谢速率提高了 65.1%, 葡萄糖代谢速率轻微下降; 当 CcpA 的 P150 突变回 S150 时, 重组菌株的葡萄糖和木糖的代谢速率分别下降了 15.1% 和 26.9%, 这说明 CcpA 蛋白的 S150P 突变也是有效突变, 其对于提高木糖和葡萄糖的共利用速率具有积极效果。S150P 的突变虽然降低了木糖的代谢速率, 但其代谢速率没有降低至出发菌株 G0 的水平, 说明菌株 G2 中可能还存在其它因素的变化来协同地提高木糖和葡萄糖的共利用能力, 比如其它转录调控因子的突变或者糖转运蛋白基因表达量的变化, 在之后的研究中可以进行进一步的挖掘。

总的来说, 进化菌株 G1 中的 CcpA (T65I) 和 RS07020 (E159G) 突变是提高菌株木糖和葡萄糖代谢速率、实现高度协同代谢木糖和葡萄糖的关键因素, 进化菌株 G2 中的 CcpA (S150P) 突变也一定程度上提高了菌株的木糖和葡萄糖的共利用速率。

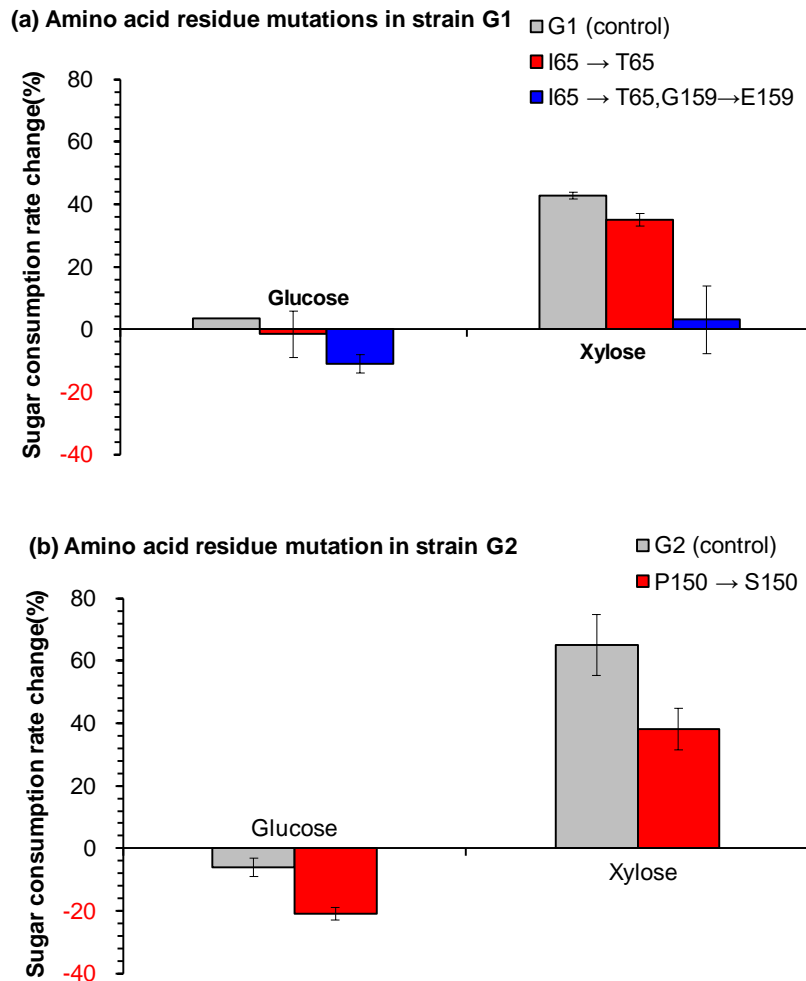


图 5.2 CcpA 和 RS07020 蛋白的氨基酸残基突变对于葡萄糖和木糖共利用速率的影响

(a) 菌株 G1 中的氨基酸残基突变； (b) 菌株 G2 中的氨基酸残基突变

Fig. 5.2 The influence on xylose and glucose utilization rate by the amino acid residue mutations of CcpA and RS07020 protein

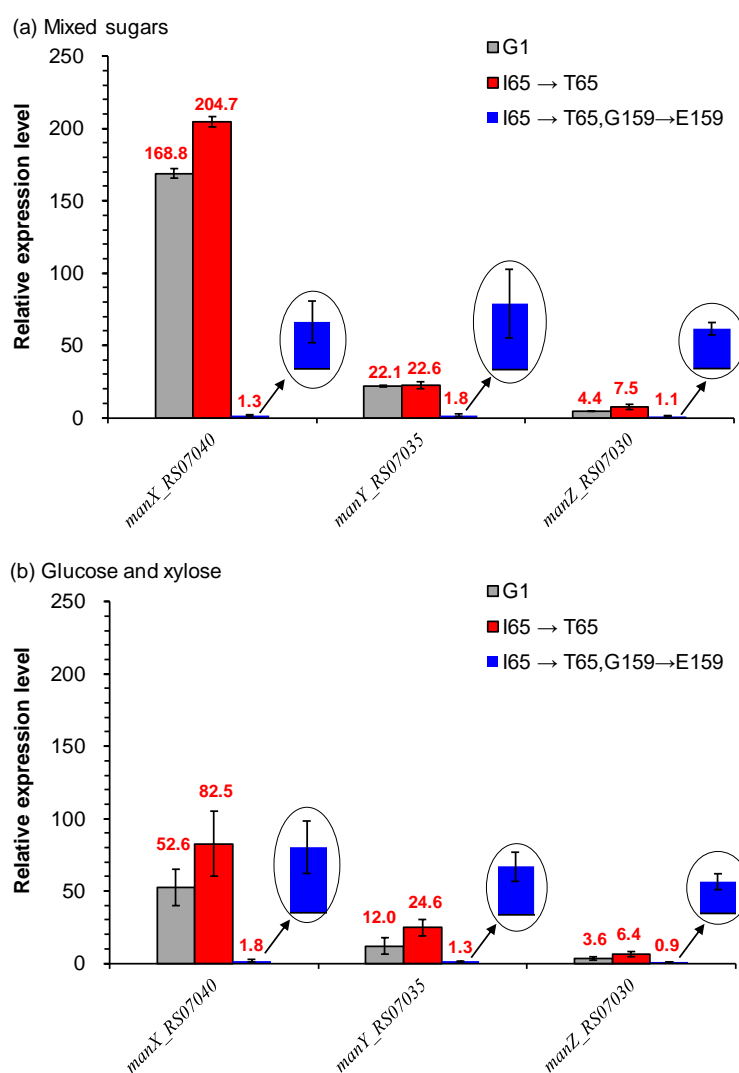
(a) Amino acid residue mutations in strain G1; (b) Amino acid residue mutations in strain G2

发酵条件: 发酵使用混合糖为碳源的简化 MRS 培养基, 混合糖为 40 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖; 42 °C、150 rpm 下发酵 24 h, 在培养基中添加 CaCO₃ 粉末 (0.6 g/g 糖) 调节 pH; 糖代谢速率的变化为各突变菌株相对于 G0 菌株的糖利用速率的变化。

5.3.3 转录调控蛋白的氨基酸突变诱发 *manXYZ* 转录水平的上调

为了研究转录调控蛋白 CcpA 和 RS07020 蛋白的氨基酸残基突变是否与 *manXYZ* 基因簇转录水平的提高有直接联系, 我们对氨基酸定点突变前后的菌株进行了 *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的转录水平的分析。结果如图 5.3 所示, 在混合糖条件下, 以不含突变的菌株 G0 为对照组, 含有 CcpA (T65I) 和 RS07020 (E159G) 突变的菌株 G1 中的 *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的转录水平上调了 4.4-168.8 倍; 当把 CcpA 蛋白中的 I65 突变回 T65 时, *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的转录水平依旧是显著的上调状态(上调了 7.5-204.7 倍); 在此基础上, 继续将 RS07020 的 G159 突变回 E159 时, *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的转

录水平出现急剧下降，其转录水平（上调倍数为 1.1-1.8 倍）基本降低至菌株 G0 中相应基因的转录水平。在两种糖（葡萄糖和木糖）以及单一木糖条件下，*manX*、*manY* 和 *manZ* 基因表达水平的变化规律是一样的，当将 CcpA 蛋白和 RS07020 蛋白均进行回复突变后，*manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的转录水平由显著上调状态（上调了 3.6-268.1 倍）转变为表达水平基本不变的状态（0.8-1.8 倍）。以上结果说明，CcpA 蛋白和 RS07020 蛋白参与了菌株 G1 中的 *manXYZ* 基因簇的表达调控，其中，菌株 G1 中的 CcpA 蛋白的单独突变不能导致 *manXYZ* 的转录水平发生显著变化，当 CcpA 和 RS07020 蛋白同时发生突变时，*manXYZ* 的转录水平出现显著变化。这说明，CcpA 蛋白的 T65I 和 RS07020 的 E159G 突变是诱发 *manXYZ* 表达显著上调的直接原因。



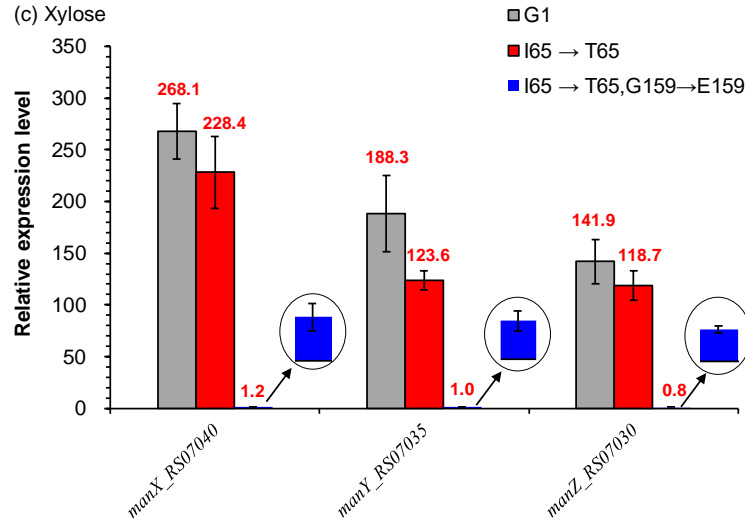


图 5.3 菌株 G1 中 CcpA 和 RS07020 蛋白的氨基酸残基突变对于 *manXYZ* 表达量的影响

(a) 混合糖条件下; (b) 葡萄糖和木糖条件下; (c) 木糖条件下

Fig. 5.3 Effect on the expression of *manXYZ* by amino acid residue mutation of CcpA and RS07020-encoding proteins in strain G1

(a) Mixed sugars condition; (b) glucose and xylose condition; (c) xylose condition

注: qRT-PCR 实验以菌株 G0 菌株为对照组, 菌株 G1 和进行了点突变的重组菌株为实验组, 内参基因为 16S rRNA, 基因的相对表达量为相对于对照组而言实验组的 *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的表达量变化。

针对菌株 G2 中出现的 CcpA 蛋白的氨基酸残基突变 (S150 突变成 P150), 我们也研究了 S150P 突变对于 *manXYZ* 基因簇的转录水平的影响。结果如图 5.4 所示, 在混合糖条件下, 以菌株 G0 为对照组, 含有 S150P 突变的进化菌株 G2 的 *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的表达水平是 G0 菌株的 0.5-0.8 倍; 当把 CcpA 蛋白中的 P150 突变回 S150 时, *manX*、*manY* 和 *manZ* 基因的转录水平仍然是 G0 菌株的 0.5-0.8 倍。在以两种糖 (葡萄糖和木糖) 和单一木糖为碳源时, 也出现了同样的现象, 这说明 CcpA 蛋白氨基酸突变位点 S150 的突变不会对 *manXYZ* 的表达量造成显著影响, 这也印证了 CcpA 蛋白的单一突变不能导致 *manXYZ* 表达量出现显著上调的结论。结合 CcpA 的 S150P 突变提高己糖和戊糖的共利用能力的现象, 说明菌株 G2 中 CcpA 的 S150P 突变可能导致其它转运蛋白基因的表达水平发生上调, 或者还存在别的转录调控因子发生突变, 与 CcpA 的突变协同地提高菌株的己糖和戊糖共利用能力, 在之后的工作中可以进一步研究。

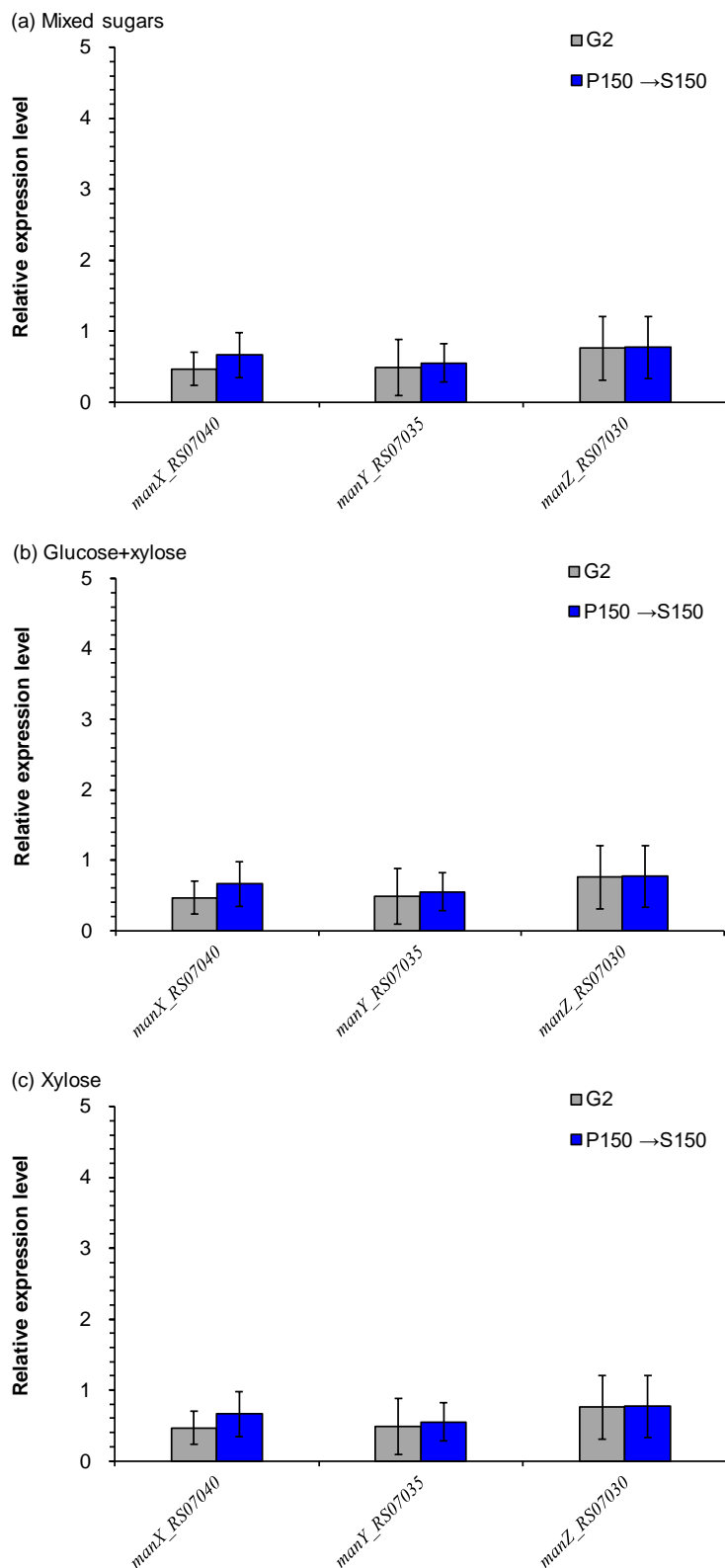


图 5.4 菌株 G2 中 CcpA 蛋白的氨基酸残基突变对于 *manXYZ* 表达量的影响

(a) 混合糖条件下；(b) 葡萄糖和木糖条件下；(c) 木糖条件下

Fig. 5.4 Effect on the expression of *manXYZ* by amino acid residue mutation of CcpA protein in strain G2

(a) Mixed sugars condition; (b) glucose and xylose condition; (c) xylose condition

注：qRT-PCR 实验以菌株 G0 菌株为对照组，菌株 G2 和进行了定点突变的重组菌株为实验组，内参基因为 16S rRNA，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达水平。

综上所述, CcpA 的 T65I 突变和 RS07020 蛋白的 E159G 突变导致进化菌株 G1 中的 *manXYZ* 基因簇异常上调表达, 从而提高了菌株 G1 对于己糖和戊糖的共利用能力。

5.3.4 讨论

非葡萄糖单糖的低效利用和不完全利用一直是生物炼制菌株利用木质纤维素原料生产工业化学品的关键障碍, 尽管研究者们开展了许多关于改善非葡萄糖单糖利用的研究, 但进展有限, 非葡萄糖单糖的利用难题始终没有得到彻底解决。糖的利用包括糖转运和糖代谢过程, 目前的大多数研究主要集中于改造和强化糖代谢路径来改善菌株对于非葡萄糖单糖的利用。针对含量较高的戊糖(木糖和阿拉伯糖), 研究者们采取广泛筛选不同菌株来源的基因、密码子优化、强化关键酶表达量和工程菌定向进化等方式来强化木糖和阿拉伯糖的异构酶路径, 但效果有限^[113, 120-123, 150]。之后研究者发现糖转运是限制非葡萄糖单糖利用的一个重要因素, 提高菌株的糖转运能力成为另一个改善非葡萄糖单糖利用的方向。通过引入异源戊糖转运蛋白、挖掘新的戊糖转运蛋白和将菌株内源的糖转运蛋白改造成为专一的戊糖转运蛋白等策略^[114, 149, 153, 157], 戊糖的利用能力得到一定提高, 但戊糖的代谢速率仍然远低于葡萄糖的代谢速率, 戊糖的低代谢速率导致其丧失了工业应用的价值。针对于己糖(甘露糖和半乳糖)的利用, 少数研究通过过表达己糖转运蛋白的方法有限地改善了甘露糖和半乳糖的利用^[147, 158], 但由于甘露糖跟葡萄糖竞争己糖转运蛋白、半乳糖的代谢受到葡萄糖的抑制, 甘露糖和半乳糖往往代谢不完全。因此, 以上措施均未解决非葡萄糖单糖的利用难题。在本研究中, *manXYZ* 基因簇编码的甘露糖 PTS 转运蛋白被证明在(葡萄糖和甘露糖)和戊糖(木糖和阿拉伯糖)的转运和磷酸化过程中均发挥着关键作用, 这个特殊的糖转运蛋白具备的全糖转运能力是解除非葡萄糖单糖转运限速步骤的关键因素, 说明糖转运步骤是改善非葡萄糖单糖利用的关键步骤。

碳分解代谢物阻遏(CCR)是指在葡萄糖存在时, 其分解代谢物会抑制其它糖利用基因的表达, 从而影响其它可发酵糖利用的现象^[100]。CCR 普遍存在于各种发酵微生物中, 但不同微生物的 CCR 调控模式差距较大, CCR 的调控元件分为正调控和负调控因子。例如, 在 *E.coli* 中介导 CCR 调控的主要模式有两种, 第一种是诱导物排斥(负调控)^[214], 即在葡萄糖和乳糖同时存在时, 葡萄糖的磷酸化过程会抑制 β -半乳糖苷透性酶活性, 导致乳糖诱导物不能被转运至胞内, 从而抑制了乳糖操纵子的表达, 导致乳糖在葡萄糖消耗完才能被利用; 第二种是转录激活子 CRP 的正调控^[215], 即在葡萄糖存在时, CRP 无法与 cAMP 形成复合体, 从而无法激活其它糖利用基因的表达, 导致其它糖类的代谢受到抑制。在 *S.cerevisiae* 中, CCR 的调控元件主要是负调控因子 Mig1, 在葡萄糖存在时, Mig1 与辅阻遏因子形成的复合体与抑制基因的启动子结合, 从而抑制其它糖代谢基因的转录^[216]。与上述菌株不同, 在本研究中的工程菌 *P.acidilactici* ZY271 中未发现严格的 CCR 作用, 主要体现为工程菌 *P.acidilactici* 在葡萄糖存在时, 仍然协同地代谢木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖这四种非葡萄糖单糖, 其非葡萄糖单糖的利用速率基本与葡萄糖一致。这可能是由于 *manXYZ* 编码的特

殊糖转运蛋白的表达没有受到 CCR 的调控, 使得该转运蛋白主导的非葡萄糖单糖的转运和磷酸化过程在葡萄糖存在时仍然能够正常进行, 非葡萄糖的利用没有受到葡萄糖及其代谢物的抑制作用。

适应性进化是非葡萄糖单糖代谢强化的常用手段^[116, 117, 122, 123], 但是以往的研究都是以稳定代谢速率、而非大幅度提高木糖代谢速率为目标, 目前尚未有报道发现对工程菌株的适应性进化实现了木糖代谢的本质性大幅提高并触发了其它非葡萄糖单糖的有效代谢。在本研究中, 经过木糖适应性进化的 *P. acidilactici* ZY271 具备了木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖等非葡萄糖单糖与葡萄糖的高度协同的共代谢的性能, 其原因在于木糖条件下的适应性进化诱发了具有全糖转运功能的甘露糖转运蛋白(由 *manXYZ* 编码)发生显著的表达上调, 提高了菌株的非葡萄糖转运能力, 解除了糖利用的转运限速步骤, 从而有效地改善了非葡萄糖的利用。因此, 木糖的适应性进化在激活糖转运蛋白表达、改善非葡萄糖单糖的利用方面具有重要作用。

总的来说, *P. acidilactici* ZY271 高度协同共代谢葡萄糖和非葡萄糖单糖的关键在于解决了非葡萄糖单糖的转运难题, 从而解除了糖利用的转运限速步骤, 使得非葡萄糖单糖的利用能力显著提高。因此, 只有解决了非葡萄糖单糖的转运问题, 才能真正地解决多糖协同代谢的难题。在未来的工作中, 可以通过以下措施来解决非葡萄糖单糖的转运难题, 如通过特定条件下的适应性进化策略在不同的生物炼制菌株中挖掘内源的专一性糖转运蛋白、引入外源的糖转运蛋白以及通过转录调控因子激活内源糖转运蛋白的表达等。

5.4 本章小结

本章节针对 *P. acidilactici* ZY271 中的甘露糖转运蛋白 *manXYZ* 基因簇在全糖协同代谢中的作用进行了机制挖掘, 通过转录调控蛋白的序列分析, 发现特定进化途径获得的 *manXYZ* 上调突变菌株伴随着 RS07020 和 CcpA 转录调控蛋白突变; 通过氨基酸定点突变实验和基因转录水平变化的分析, 发现参与 *manXYZ* 表达调控的 RS07020 和 CcpA 的关键氨基酸突变有利于提高 *P. acidilactici* 己糖和戊糖的共利用速率, 也是诱发 *manXYZ* 基因簇表达水平上调的直接原因。本章主要的研究结论如下:

(1) 通过比较出发菌株(G0)和木糖条件下的适应性进化后菌株的转录调控因子的氨基酸序列, 发现木糖条件下的适应性进化促使转录调控蛋白 CcpA 和 RS07020 发生关键氨基酸突变, 并且 CcpA 的 T65I 和 RS07020 的 E159G 突变在特定木糖条件下的适应性进化中具有一定的必然性, 但在其它混合糖条件下的适应性进化中不具有普遍性。

(2) 通过氨基酸的定点突变实验, 验证了 CcpA 的 T65I 突变和 RS07020 蛋白的 E159G 突变是提高 *P. acidilactici* 中己糖和戊糖(尤其是木糖)的共利用代谢速率的关

键因素；CcpA 的 S150P 突变也对 *P. acidilactici* 中己糖和戊糖的共利用代谢速率的提高具有积极作用。

(3) 通过比较氨基酸定点突变前后菌株中的 *manXYZ* 基因簇的转录水平, 发现 CcpA 的 T65I 突变和 RS07020 蛋白的 E159G 突变是诱发 *manXYZ* 基因簇表达发生上调的关键因素。

(4) 合适条件下的适应性进化能够诱发菌株中发生转录调控因子的氨基酸突变, 解除对非葡萄糖单糖转运蛋白基因的表达抑制, 是改善非葡萄糖单糖利用的重要手段。

第 6 章 构建 Na⁺耐受性乳酸片球菌工程菌株以生产高浓度乳酸钠的研究

6.1 引言

乳酸钠作为一种生物基化学品,广泛应用于食品、制药和化妆品行业^[217,218]。目前,乳酸钠的生产主要通过微生物发酵法,具体为:在乳酸发酵的过程中添加氢氧化钠溶液来中和乳酸以获得乳酸钠。高产量的乳酸钠对于降低下游的纯化成本至关重要。然而,随着乳酸钠浓度的升高,发酵液中富集的钠离子(Na⁺)浓度也越来越高,高浓度的Na⁺会对发酵细胞的活力和发酵效率造成强烈的抑制作用^[104,219,220]。因此,由于Na⁺的抑制作用,乳酸钠的生产存在发酵效率低、生产成本高的问题。

为了缓解高浓度Na⁺对发酵微生物的渗透压胁迫,通常使用Na⁺/H⁺逆向转运蛋白来介导胞内的Na⁺向胞外转运^[221,222]。针对乙醇发酵菌株,Yang等^[223]在*Zymomonas mobilis*中过表达了Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因*nhaA*(*ZMO0119*),提高了菌株对于Na⁺的耐受性。Liu等^[224]通过敲除*ZMO0119*基因启动子区域的一个小片段提高了菌株*Z. mobilis*对于乙酸钠的耐受性。Gao等^[221]在*Z. mobilis*中过表达了*ZMO0119*基因,提高了菌株在含大量钠离子的木质纤维素水解液中的乙醇发酵性能。一些植物也利用Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因来外排Na⁺以提高其耐盐性。Yang等^[225]通过分别过表达*SOS1*和*SOS3*基因,有效提高了转基因拟南芥的Na⁺耐受性。Ma等^[226]发现在高Na⁺胁迫下,共表达拟南芥的*SOS1*、*SOS2*和*SOS3*基因有效改善了转基因植株的生长,减少了根系Na⁺的积累。Xu等^[227]证明,在缺乏Na⁺转运蛋白的酵母中表达来自小麦的*TaSOS1*基因,使得细胞内的Na⁺浓度明显降低,菌株的耐盐性得到提高。这些结果表明,Na⁺/H⁺逆向转运蛋白通过减少细胞内的Na⁺,有效地缓解了Na⁺对细胞的胁迫作用。然而,钠离子对乙醇发酵菌株的胁迫相对来说较为温和,因为钠离子的添加主要是作为pH中和剂来调节乙醇发酵过程中的pH,因此,发酵液中的钠离子浓度较低。相较于乙醇发酵,由于Na⁺是发酵产物(乳酸钠)的组成部分(按分子质量百分比计算,约占乳酸钠的20%),因此,在乳酸钠的发酵过程中,发酵液中会不可避免地富集高浓度的Na⁺,这也就导致乳酸钠的主要生产菌株,即乳酸菌,在乳酸钠发酵过程中会受到更强的Na⁺胁迫作用。目前尚无研究尝试使用Na⁺/H⁺逆向转运蛋白来缓解Na⁺对于乳酸菌的胁迫作用以提高乳酸钠的发酵能力。

在本章中,我们尝试在L-乳酸生产菌株*Pediococcus acidilactici* ZY271中过表达Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因,从而提高L-乳酸钠的发酵性能。由于Na⁺/H⁺逆向转运蛋白是一种由特异性的信号肽引导定位的膜蛋白,来自*Z. mobilis*的异源Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因在乳酸菌中很难得到正确表达。因此,我们分别过表达了4个来自*P. acidilactici* DSM20284的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因,目的是增强*P. acidilactici*菌株跨膜转运Na⁺的能力,使得Na⁺由胞内转运至胞外,从而缓解Na⁺对于细胞的胁迫作用。结果表明,过表达了Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因*RS02775*的重组菌株*P. acidilactici* ZY271(pZY36e-

RS02775)对于钠离子的耐受性最强,与出发菌株相比,重组菌株的糖耗速率明显加快,乳酸钠的产量显著提高。在合成培养基和麦秆为发酵原料的条件下,重组菌株的乳酸钠产量分别达到 121.1 g/L 和 132.4 g/L,与出发菌株相比,乳酸钠产量分别提高了 23.7% 和 30.7%。转录水平分析结果表明,在高浓度钠离子的胁迫下,*RS02775* 基因过表达使得 *P. acidilactici* 中负责葡萄糖和木糖磷酸化的基因的表达水平显著提高,有效缓解了钠离子对于糖磷酸化反应的抑制作用,使得菌株的糖利用速率和乳酸生成速率加快。本研究为高浓度的乳酸钠发酵提供了一种有效方法。

6.2 材料与方法

6.2.1 菌株、培养基和培养条件

本章使用的菌株见表 6.1。具有木糖代谢能力的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 的来源见 2.2.1。在质粒构建过程中使用的 *E. coli* XL1 Blue 保存于本实验室。 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *RS02775*、*RS02845*、*RS06435* 和 *RS08600* 来源于 *P. acidilactici* DSM 20284,该菌株购于德国微生物菌种保藏中心 DSMZ (Scheiweg, Germany)。

P. acidilactici、*A. resinae* ZN1 和 *E. coli* 的培养条件和培养基成分见 2.2.1 和 4.2.1。携带表达质粒 pZY36e 的 *E. coli* 和 *P. acidilactici* 菌株在培养过程中需添加红霉素,终浓度分别为 200 ug/mL 和 5 ug/mL。

6.2.2 酶和试剂

使用的酶和试剂的来源见 2.2.2 和 4.2.2。

6.2.3 表达质粒和重组菌株构建

本章构建的质粒和使用的引物如表 6.1 和表 6.2 所示,引物的合成由擎科生物公司 (Beijing, China) 完成。

PldhD 启动子来源于 *P. acidilactici* ZP26 基因组中 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 起始密码子上游约 300 bp 的序列,在表达质粒 pMG36e 的酶切位点 *EcoRI* 和 *XbaI* 之间插入 *PldhD* 启动子以替换质粒的原始启动子 *P32*,得到表达质粒 pZY36e。 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因均来源于 *P. acidilactici* DSM 20284,以 *P. acidilactici* DSM 20284 的基因组为模板,分别扩增得到四个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *RS02775*、*RS06435*、*RS02845* 和 *RS08600*。使用 *XbaI* 和 *PstI* 内切酶分别对表达质粒 pZY36e 和 *RS06435* 基因片段进行酶切处理,再通过连接酶将两者进行连接,得到重组质粒 pZY36e-*RS06435*。使用 *XbaI* 和 *SalI* 内切酶分别对质粒 pZY36e 和三个基因片段 (*RS02775*、*RS02845* 和 *RS08600*) 进行酶切处理,再使用连接酶将质粒和基因连接在一起,分别得到重组质粒 pZY36e-*RS02775*、pZY36e-*RS02845* 和 pZY36e-*RS08600*。以上重组质粒的构建均在 *E. coli* XL1 Blue 中进行,重组质粒均经过擎科生物公司测序验证,验证正确后再进行下一步的电转化。

P. acidilactici ZY271 感受态细胞的制作和表达质粒的电转化方法见 4.2.3。制作完 *P. acidilactici* ZY271 感受态后,将空载质粒 pZY36e 和四个重组质粒 (pZY36e-*RS06435*、

pZY36e-RS02775、pZY36e-RS02845 和 pZY36e-RS08600) 分别电转化至 *P. acidilactici* 中, 电转后的菌株置于 42 °C 培养。利用设计好的表达质粒上的通用验证引物, 对平板上长出的单菌落进行菌落 PCR 验证, 筛选得到条带大小正确的阳性克隆, 即为表达质粒成功转入至 *P. acidilactici* ZY271 的重组菌株。

6.2.4 原料和生物炼制过程

小麦秸秆原料和生物炼制过程见 2.2.3。

6.2.5 乳酸钠发酵

合成培养基的乳酸钠发酵: 发酵在含有 600 mL 简化 MRS 培养基的 3 L 生物反应器中进行, 葡萄糖和木糖浓度分别为 100 g/L 和 50 g/L。将培养好的 *P. acidilactici* 种子液按照 10% (v/v) 的接种量加入至 3 L 生物反应器中 (加入终浓度为 5 µg/mL 的红霉素), 在 42 °C, 150 rpm 的条件下发酵 72 h, 期间添加 13.5 M NaOH 溶液调节 pH 至 5.5。

麦秆条件下的同步糖化共发酵 (SSCF): 首先对 25% (w/w) 固含量的经预处理和脱毒后的麦秆进行预糖化, 预糖化的具体操作见 2.2.5。在结束预糖化后, 在 5 L 反应器中接入培养好的 *P. acidilactici* 种子液 (加入终浓度为 5 µg/mL 的红霉素防止质粒丢失), 进行同步糖化共发酵, 发酵条件为 42 °C, 150 rpm, 期间添加 13.5 M NaOH 溶液调节 pH 至 5.5。

6.2.6 HPLC 分析

定期从发酵液中收集样品, 样品在 12000 rpm 下离心 3 min, 取上清, 上清经 0.22 µm 的滤膜进行过滤除菌后用于 HPLC 分析。葡萄糖、木糖和乳酸的检测见 2.2.6。

6.2.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

以携带空载质粒的菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e) 作为对照组, 过表达了 RS02775 基因的工程菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 为实验组, 分别进行菌体的收集。将培养好的 *P. acidilactici* 种子液接入含有 600 mL 简化 MRS 培养基的 3 L 罐中, 以 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖作为混合碳源, 42 °C、150 rpm 条件下培养 12 h 后进行菌体的收集, 培养期间添加 13.5 M NaOH 溶液调节 pH 至 5.5。菌体的收集、RNA 的提取、反转录实验和 qRT-PCR 反应见 4.2.6, qRT-PCR 实验使用的引物见表 6.3。 *P. acidilactici* 的 16S rRNA 基因作为内参基因, 以携带空载质粒的菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e) 作为对照组, 工程菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) 为实验组, 各基因的转录水平的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

表 6.1 本章节所用的菌株和质粒

Table 6.1 Strains and plasmids used in this chapter

Strains	Description	Sources
<i>E. coli</i> XL1-blue	Host for plasmid construction	Stratagene
<i>A. resinae</i> ZN1	Biodetoxification fungus	[64]
<i>P. acidilactici</i> DSM 20284	Wild strain	DSMZ (Scheiwig, Germany)
<i>P. acidilactici</i> ZY271	Engineered for L-lactic acid fermentation	[79]
<i>P. acidilactici</i> ZY271 (pZY36e)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring the empty plasmid pZY36e	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271(RS02775)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring the plasmid pZY36e-RS02775	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271(RS02845)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring the plasmid pZY36e-RS02845	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271(RS06435)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring the plasmid pZY36e-RS06435	This work
<i>P. acidilactici</i> ZY271(RS08600)	<i>P. acidilactici</i> ZY271 harboring the plasmid pZY36e-RS08600	This work
Plasmids	Description	Sources
pZY36e	Expression plasmid with <i>PldhD</i> replacing <i>P32</i> promoter of pMG36e	[228]
pZY36e-RS02775	RS02775 was inserted into pZY36e at <i>Xba</i> I and <i>Sal</i> I sites	This work
pZY36e-RS02845	RS02845 was inserted into pZY36e at <i>Xba</i> I and <i>Sal</i> I sites	This work
pZY36e-RS06435	RS06435 was inserted into pZY36e at <i>Xba</i> I and <i>Pst</i> I sites	This work
pZY36e-RS08600	RS08600 was inserted into pZY36e at <i>Xba</i> I and <i>Sal</i> I sites	This work

表 6.2 用于基因表达的引物

Table 6.2 Primers used for expression genes

Primers (Sequences 5'-3')	
<i>PldhD</i> -F	CCGGAATTC TGCTCTGGTGTGCAGACCAGAC
<i>PldhD</i> -R	CTAGTCTAGATGTAATATTACCCCTTCTTTTTTA
<i>RS02775</i> -F	CTAGTCTAGAATGAATATTTTGATTTC AACCTTT
<i>RS02775</i> -R	ACGCGTCGACTTAAACCATTTGATTTTG TGGA
<i>RS02845</i> -F	CTAGTCTAGAATGGAAAAGAAAACGCGCAA
<i>RS02845</i> -R	ACGCGTCGACCTAGGCTGCAGAACGTTTTGC
<i>RS06435</i> -F	CTAGTCTAGAATGCAAAGGTAAGGACACG
<i>RS06435</i> -R	AACTGCAGTTAATCAGAGCTTGCCCTACTTC
<i>RS08600</i> -F	CTAGTCTAGATTGAACGTTTTATTTTTCATT
<i>RS08600</i> -R	ACGCGTCGACTTACGCGTAAATGTAATCG

注：下划线表示酶切位点。

表 6.3 用于 qRT-PCR 分析的引物

Table 6.3 Primers of qRT-PCR analysis

Genes	Primer sequence (forward)	Primer sequence (reverse)
<i>16S rRNA</i>	GTCCATGCCGTAAACGATGATT	CTTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
<i>manX_0095</i>	TCAACAGCGGAATAACGG	TCAACAGCGGAATAACGG
<i>manX_0101</i>	ACCGACGGAAGATTGGG	TTCGCTAGGAACTTGTTGGATA
<i>manX_1353</i>	TACGCTGATAATGACGAG	AACAACGGTCCTAGAAAG
<i>manX_1749</i>	GGCTAAGGACGACAAACA	TGGTCAAACGCCAATACG
<i>glk</i>	CATGCTCGGTTTGGCACT	TGAAGAACGCACGGTAGA
<i>gpi</i>	CGCAAGCAAGGAATACAC	TTACCTTCGGATTCACCC
<i>xylA</i>	CACATCAATACGATACGGACGC	CACATCAATACGATACGGACGC
<i>xylB</i>	GGTTACCTTGGCAGCTGGATAT	GGAGTCCGTTCTCCAACGATGT
<i>tkl</i>	TTGGGAGCACGTTCCTTTGTCTT	TTCAATCGGCTCATGAGTTGGT
<i>tal</i>	CAATCACCGGTAGAACAGGT	CTTTCAATCAAATGATGCGGAT
<i>pfk</i>	CAGAACACGGATACAATACA	TACTTGAACCGCAAACAC

<i>fba</i>	CTGCTGGATACAGCTCAG	TCTTCTTACCACCGATT
<i>gap</i>	GTTGGAACGAAGACGAGGTA	CCATTTGGCAAGTGAAGC
<i>pgk</i>	ACAGCAATGAAGGCAGAA	TTGTCAAGTAAGTGGTCGA
<i>gpm_0753</i>	GGTACTGCCTTACTGGGTT	CCTGGTCCGAAATCTGTTC
<i>gpm_1569</i>	CAGCAGTTCGCCACATA	TTCATTCCTCCATCACG
<i>eno_0126</i>	TCAAGATGGGTGCTGCTA	CCTGAACGGTGAGATACG
<i>eno_1046</i>	AAGGGATGGCAAATTCAA	CACGGTAAAGTCCGCAAC
<i>pyk</i>	TTCGTAAGCCTCAAGACG	CAACACCCATGTCACCAC
<i>ldh</i>	AAAGCCAGGTGAAACACG	TTCCTTAGGGAAGCCAGA
<i>pdhA</i>	GATACGCAATCTCCACCC	TGCCATCTACAGCCCACT
<i>pdhC</i>	CAATGCCTTCGGTTCGTG	TTCAGCAGCCTTTGGAGC
<i>pdhD</i>	ATCATCATGGTGGTGGG	TGTCTACGCCGTTCTTCT
<i>pta</i>	GATCAGTGGAGCCTTCCTCATG	AAGCAACCTTAGGGTCAATTCC
<i>ackA1</i>	CAATTACGGCGATTAAGGATGG	CCAAAGAAACGTCGATGTCTC

6.3 结果与讨论

6.3.1 *P. acidilactici* 的 Na⁺耐受能力考察

为了评估 *P. acidilactici* 对于钠离子的耐受能力，在培养基中添加额外的氯化钠以营造不同浓度的 Na⁺ 环境，考察了 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 对于 Na⁺ 的耐受性能。Na⁺ 的浓度梯度分别设置为 0 g/L、5 g/L、15 g/L 和 25 g/L，分别对应 0 M、0.22 M、0.65 M 和 1.09 M 的 Na⁺。结果如图 6.1 所示，随着 Na⁺ 浓度的增加，*P. acidilactici* 菌株对于葡萄糖和木糖的利用率逐渐降低，乳酸钠的产量也逐渐降低。当 Na⁺ 浓度达到 1.09 M 时，*P. acidilactici* 的糖利用能力和 L-乳酸钠的产量出现急剧下降，乳酸钠产量下降至 2.0 g/L。1.09 M Na⁺ 相当于 122 g/L 的乳酸钠，一般被认为是乳酸发酵的较低浓度。以上结果表明，*P. acidilactici* 菌株对 Na⁺ 高度敏感，因此需要提高 *P. acidilactici* 菌株对于高浓度钠离子的耐受性来实现高浓度乳酸钠的发酵。

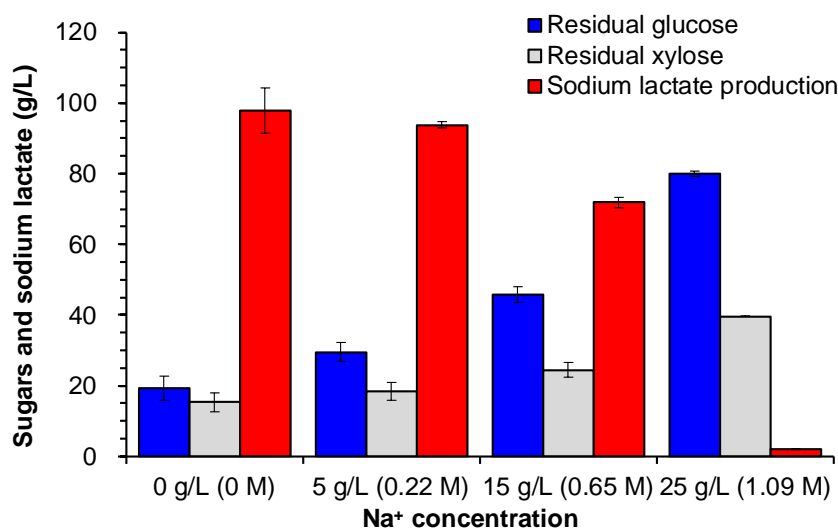


图 6.1 对出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 的 Na⁺耐受能力考察

Fig. 6.1 The Na⁺ tolerance evaluation of strain *P. acidilactici* ZY271

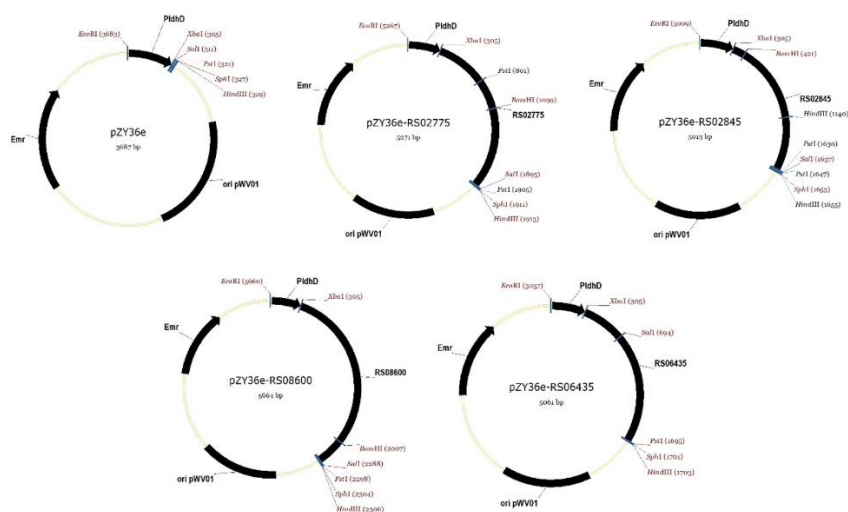
发酵条件：发酵使用 MRS 培养基，碳源为 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖，培养基中添加了 NaCl 以营造不同浓度梯度的 Na⁺ 环境；1 L 罐，42 °C，150 rpm，发酵 72 h，使用 13.5 M 的 NaOH 溶液为中和剂，调节 pH 至 5.5。

6.3.2 过表达 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因以构建 Na⁺耐受性重组菌株

为了提高 *P. acidilactici* 对 Na⁺ 的耐受性和乳酸钠的生产水平，我们试图通过过表达 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因来增强菌株由胞内向胞外跨膜转运 Na⁺ 的能力，以降低高浓度 Na⁺ 对于细胞的胁迫作用。首先，我们在与 *P. acidilactici* ZY271 高度同源的 *P. acidilactici* DSM20284 的基因组（参照 NCBI 基因组: NZ_GL397067.1）中筛选到了 4 个 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因，分别为 *RS02775*、*RS02845*、*RS06435* 和 *RS08600*，这些基因负责钠离子由胞内向胞外的跨膜运输。接着，我们分别将这四个基因构建至表达质粒 pZY36e 中，分别得到了重组质粒 pZY36e-*RS02775*、pZY36e-*RS02845*、pZY36e-*RS06435* 和 pZY36e-

RS08600 (图 6.2 a)。将以上 4 个重组质粒和空载质粒 pZY36e 分别电转化至菌株 *P. acidilactici* ZY271 中, 得到了 4 株重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02775*)、*P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02845*)、*P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS06435*) 和 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS08600*) 以及对照菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e)。最后, 我们对这 4 株重组菌株在高浓度的钠离子条件下进行了乳酸钠发酵性能的评估 (图 6.2 b)。发酵结果显示, 4 株重组菌株均表现出了更好的耐受钠离子的能力, 乳酸钠产量分别为 121.2 g/L、87.9 g/L、92.9 g/L 和 102.4 g/L, 均优于出发菌株 (77.3 g/L), 其中, 过表达 *RS02775* 基因的重组菌株表现出最佳的乳酸钠发酵性能 (121.2 g/L)。因此, 重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02775*) 被选为后续研究的重点。

(a) Construction of expression plasmids for Na⁺ antiporter genes



(b) Sodium lactate fermentation by *P. acidilactici* recombinants overexpressing Na⁺/H⁺ antiporter genes

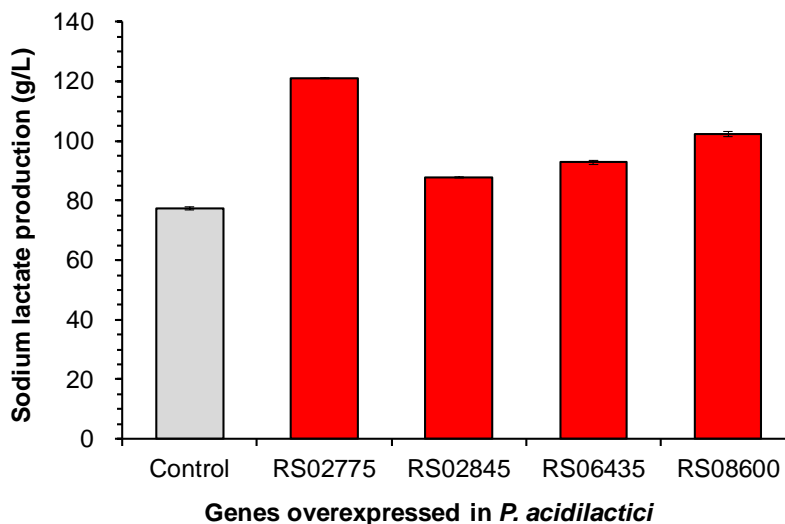


图 6.2 过表达了 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的重组菌株的乳酸钠的发酵评估

(a) Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因的表达质粒构建；(b) 过表达 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因的重组菌株的乳酸钠生产

Fig. 6.2 The fermentation evaluation of *P. acidilactici* recombinants overexpressing Na⁺/H⁺ antiporter genes

(a) Construction of expression plasmids for Na⁺/H⁺ antiporter genes; (b) Sodium lactate fermentation by *P. acidilactici* recombinants overexpressing Na⁺/H⁺ antiporter genes

发酵条件：发酵使用简化 MRS 培养基，碳源为 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖；3 L 罐，42 °C，150 rpm，发酵 72 h，使用 13.5 M 的 NaOH 溶液为中和剂，调节 pH 至 5.5。

为进一步评估 *RS02775* 基因对于钠离子的转运能力,我们对过表达了 *RS02775* 基因的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS07020*)进行了合成培养基和木质纤维素条件下的乳酸钠发酵评估(图 6.3)。首先,使用了以葡萄糖和木糖为混合碳源的合成培养基来进行 L-乳酸钠的发酵,结果如图 6.3 a 所示,重组菌株的 L-乳酸钠产量为 121.1 g/L,比出发菌株的 L-乳酸钠产量(97.9 g/L)高了约 24%。之后使用木质纤维素原料来进行 L-乳酸钠的发酵(图 6.3 b),即使用 25% (w/w) 固含量的经预处理和脱毒后的小麦秸秆进行了同步糖化与共发酵,重组菌株的 L-乳酸钠产量达到 132.4 g/L,比出发菌株的乳酸钠产量(101.3 g/L)高了约 31%。以上结果表明,Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 *RS02775* 的过表达显著缓解了高浓度钠离子对于 *P. acidilactici* ZY271 细胞的胁迫作用,显著提高了在合成培养基和木质纤维素条件下的乳酸钠产量。我们对目前研究和本研究中的乳酸钠生产情况进行了比较。Tian 等^[229]使用菌株 *B. coagulans* DSM1/pNW33N 以葡萄糖为碳源发酵生产的 L-乳酸钠产量和生产率分别为 99.6 g/L、1.8 g/L/h; Abdel-Rahman 等^[230]使用菌株 *Enterococcus faecium* QU 50 以木糖为碳源生产的 L-乳酸钠的产量和生产率分别为 30.0 g/L、1.05 g/L/h; 以上指标均低于本研究中的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS07020*)以葡萄糖和木糖为碳源时的 L-乳酸钠产量(121.1 g/L)和生产率(1.7 g/L/h)。Nancib 等^[231]和 Ohkouchi 等^[232]利用 *Lactobacillus* sp. 分别以枣渣和食物废弃物为原料生产的 L-乳酸钠产量和生产率分别为 60.6-111.0 g/L、0.9-1.3 g/L/h; Kong 等^[233]利用工程菌 *Kluyveromyces marxianus* 以玉米芯残渣为原料生产的 L-乳酸钠的产量和生产率分别为 128.1 g/L、1.4 g/L/h。以上指标均不如本研究中重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS07020*)的 L-乳酸钠产量(132.4 g/L)和生产率(1.8 g/L/h)。本研究为高浓度的 L-乳酸钠发酵提供了一个有效方法。

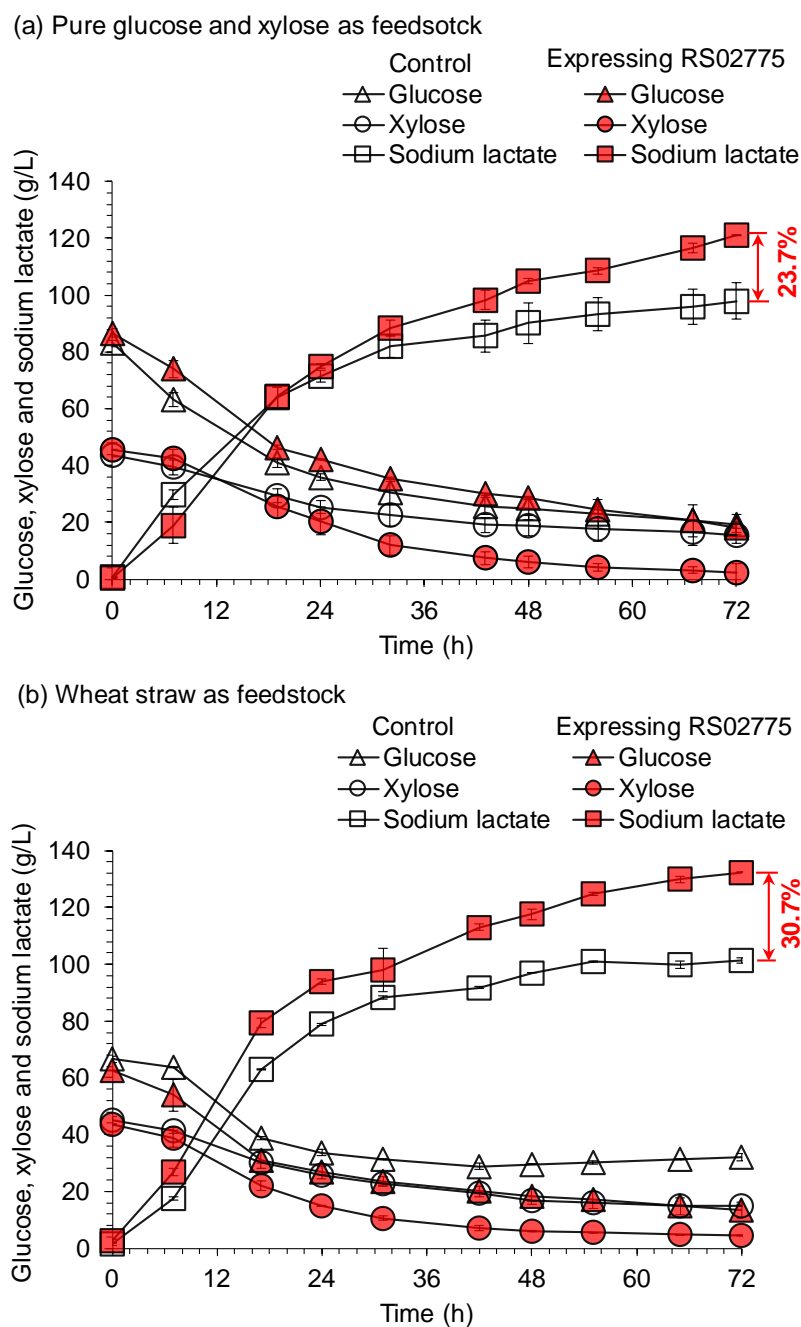


图 6.3 *P. acidilactici* 出发菌株和工程菌株在合成培养基和麦秸条件下的乳酸钠发酵性能比较

(a) 合成培养基; (b) 小麦秸秆

Fig. 6.3 Comparison of sodium lactate fermentation performance of parental and engineered *P. acidilactici* strain using synthetic medium and wheat straw as feedstock

(a) Synthetic medium; (b) Wheat straw

发酵条件: (a) 发酵在简化 MRS 合成培养基中进行; (b) 麦秆条件下的同步糖化共发酵在 5 L 发酵罐中进行, 固含量为 25% (w/w), Cellic CTec2 纤维素用量为 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干物料, 50 °C, 150 rpm 下预糖化 6 h 后开始 SSCF; 出发菌株为 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e), 工程菌株为 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS07020); 42 °C, 150 rpm 发酵 72 h, 使用 13.5 M 的 NaOH 溶液调节 pH 至 5.5。

6.3.3 在 Na⁺胁迫下的 *P. acidilactici* 重组菌的糖代谢和乳酸生成基因的转录水平分析

针对 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 *RS02775* 的过表达缓解了钠离子对细胞的胁迫作用、提高了乳酸钠产量的现象,我们研究了 *P. acidilactici* 重组菌株中葡萄糖和木糖代谢路径和乳酸生成路径上的相关基因的转录水平的变化。具体来说,我们以出发菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e)为对照组,对过表达了 *RS02775* 的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS07020*)中的糖代谢、乳酸生成及乙酸生成路径的相关基因进行了转录水平变化的分析。结果如图 6.4 所示,与对照组相比,重组菌株中的几个与糖代谢和乳酸合成直接相关的重要基因的转录水平显著上调了 10 倍以上,具体如下:(1)负责葡萄糖磷酸化的 *manX_0095*、*manX_1353* 和 *manX_1749* 的表达水平分别上调了 14.45、17.45 和 101.69 倍,负责木糖磷酸化的基因 *xylB* 的表达水平上调了 19.42 倍;(2)在乳酸合成路径上的烯醇酶基因 *eno_1046* 的表达水平上调了 20.05 倍;(3)乙酸合成相关的丙酮酸脱氢酶基因 (*pdhA* 和 *pdhD*) 和磷酸乙酰转移酶基因 (*pta*) 的表达水平分别上调了 11.88、14.95 和 15.42 倍。

manX 基因编码的是甘露糖 PTS 系统中的 Enzyme IIAB (EIIAB) 蛋白,该蛋白是乳酸菌中非常重要的葡萄糖磷酸化酶,*xylB* 基因编码的木酮糖激酶,是木糖代谢的关键酶。糖磷酸化步骤是糖转运至胞内的第一步代谢,*manX_1749*、*manX_0095*、*manX_1353* 和 *xylB* 基因的显著上调表达表明,*RS02775* 的过表达解除了高 Na⁺渗透压对于糖磷酸化反应的抑制作用,恢复了磷酸化酶 EIIAB 和木酮糖激酶的活性,使得糖代谢速率显著提高。烯醇化酶基因 *eno* 的表达上调激活了果糖-6-磷酸向 L-乳酸的转化,增加了 L-乳酸的合成通量,使得乳酸钠产量显著提高。虽然丙酮酸到乙酸合成路径上的丙酮酸脱氢酶基因 *pdhA/D* 和磷酸乙酰转移酶基因 *pta* 的表达水平也出现上调,但负责乙酰磷酸转化为乙酸的乙酸激酶基因 *ackA2* 在之前的工作中已被完全敲除,残留的 *ackA1* 基因编码的乙酸激酶活性较低^[79]。因此,乙酸的生成没有明显增加,而 *pdh* 基因上调表达合成的乙酰辅酶 A 可能进入了不完整的 TCA 循环。

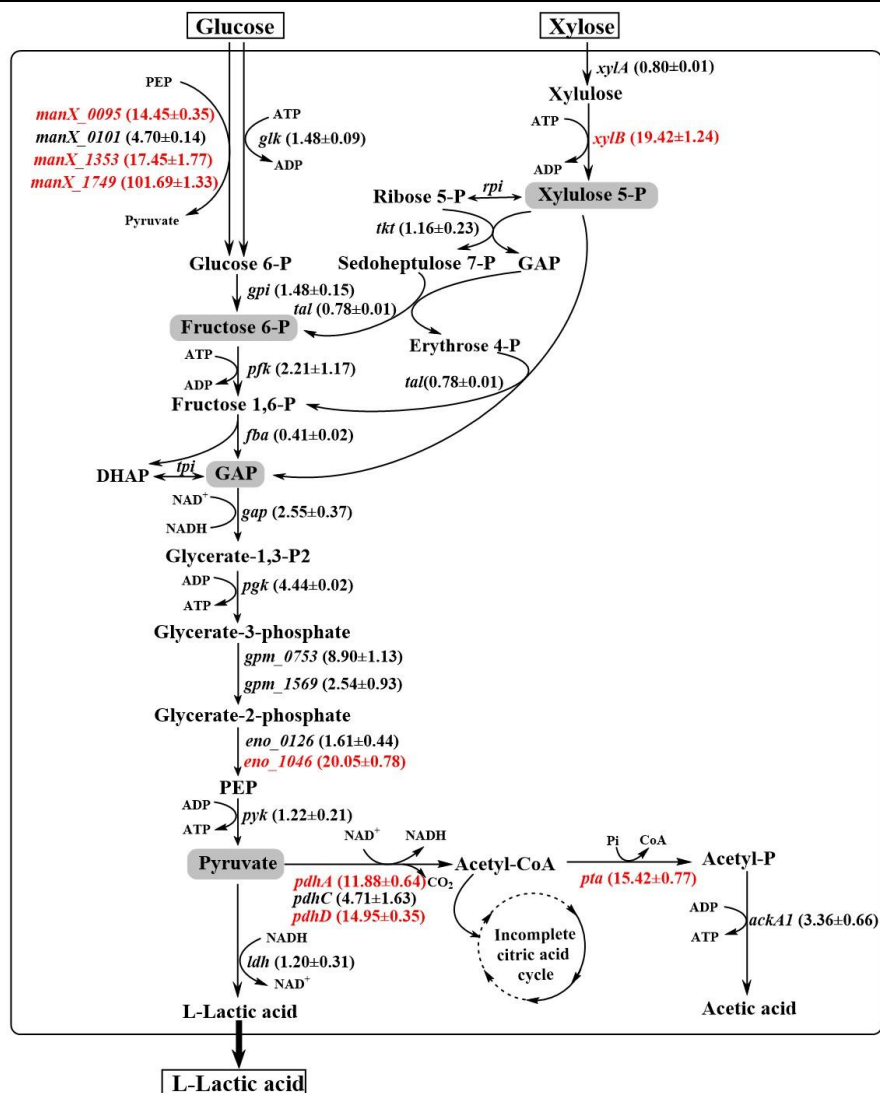


图 6.4 高 Na⁺胁迫下的 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)中糖代谢、L-乳酸生成及乙酸合成路径上的基因的转录水平分析

Fig. 6.4 Transcriptional analysis on the genes of sugar metabolism, L-lactic acid generation and acetic acid synthesis in *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775) under high Na⁺ stress

注：qRT-PCR 实验以菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e)为对照组，重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-RS02775)为实验组，内参基因为 16S rRNA，每组实验都有三个平行；图中括号内的值表示重组菌株中的基因的相对表达量变化。

6.4 本章小结

高浓度的乳酸钠发酵带来的高浓度的钠离子抑制了发酵菌株的细胞活性和发酵效率。为了实现高效的乳酸钠发酵，在本章节中，我们通过过表达 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *RS02775* 来提高菌株对于钠离子的耐受性，成功得到了一株钠离子耐受性显著提高的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02775*)，乳酸钠的产量得到显著提高。本章节的主要研究结论如下：

(1) *P. acidilactici* 对钠离子高度敏感，在高浓度乳酸钠的发酵过程中，高浓度的钠离子严重抑制了 *P. acidilactici* 的糖利用和乳酸发酵性能。

(2) 分别将 4 个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因在 *P. acidilactici* ZY271 中进行过表达，其中过表达了 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *RS02775* 的重组菌株 *P. acidilactici* ZY271(pZY36e-*RS02775*) 对于钠离子的耐受性最强，糖利用和乳酸钠的生成能力均有显著提高。在合成培养基和 25% (w/w) 固含量的麦秆为发酵原料的条件下，重组菌株的乳酸钠产量分别为 121.1 g/L 和 132.4 g/L，与出发菌株相比，其乳酸钠的产量提高了 24% 和 31%。本研究为高浓度的乳酸钠发酵提供了一种有效方法。

(3) 转录分析结果表明，在高浓度钠离子的胁迫下，*RS02775* 基因的过表达使得 *P. acidilactici* 中负责葡萄糖和木糖磷酸化的基因的表达水平明显提高，有效缓解了钠离子对于糖磷酸化反应的抑制作用，使得糖利用速率和乳酸生成速率加快。

第 7 章 结论与展望

7.1 结论

聚乳酸是替代石油基塑料的可生物降解聚合物中最重要的生物基材料。目前聚乳酸生产所需的高纯度乳酸单体依赖于昂贵和有限的粮食淀粉原料，造成生产成本低、威胁粮食安全的问题。本研究旨在廉价易得、可再生和非粮性质的木质纤维素生物质来作为替代原料，聚焦于生产高化学纯度和高光学纯的聚乳酸前体，即乳酸和丙交酯。

目前，使用木质纤维素原料合成乳酸和丙交酯的过程中仍然存在诸多障碍，包括：（1）预处理过程中产生的抑制物不仅会降低乳酸的发酵指标，残留的抑制物作为杂质成分存在于乳酸单体中，会严重阻碍后续丙交酯和聚乳酸的合成；（2）发酵微生物对木质纤维素中的非葡萄糖单糖（木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖）的转化效率低下，不仅大幅降低了乳酸得率，乳酸单体中的残糖还严重阻碍了丙交酯的合成。因此，残糖和抑制物是利用木质纤维素生产高纯度的聚合级乳酸和合成丙交酯的两大关键障碍。针对以上关键问题，本论文一方面，使用生物脱毒技术和具有全糖代谢能力的乳酸片球菌工程发酵菌株来分别解除抑制物和残糖对于聚合级乳酸生产和丙交酯合成的负面影响；另一方面，对乳酸片球菌工程菌中的全糖协同代谢合成乳酸的机制进行了深入挖掘和多层面的分析。

本论文的主要结论如下：

（1）克服了严重影响纤维素乳酸纯度和产量的抑制物和残糖障碍，获得了高纯度的聚合级纤维素乳酸。在干法生物炼制技术平台上，使用生物脱毒方法降解了大部分的弱酸类、呋喃类和酚醛类抑制物；使用具有全糖利用能力的 L-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY15 作为发酵菌株，协同和完全地转化木质纤维素来源的葡萄糖和四种非葡萄糖单糖，实现了高浓度和极低残糖浓度的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸的生产；通过常规的分离纯化后，得到了符合聚合纯度要求的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸。

（2）首次实现了木质纤维素来源的 L-和 D-丙交酯的合成。使用纯化后的纤维素 L-乳酸和 D-乳酸分别作为聚合单体进行解聚和缩聚反应后，实现了纤维素 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成，且 L-和 D-丙交酯的结构、性质和元素组成等各项指标均与淀粉原料制备的 L-和 D-丙交酯标品的特征一致。

（3）成功解析了 *P. acidilactici* ZY271 协同代谢己糖和戊糖全转化为乳酸的机制，成功挖掘了一个表达水平异常上调的甘露糖转运蛋白基因簇。通过糖代谢和糖转运蛋白基因的转录水平分析，在 *P. acidilactici* ZY271 中发现和筛选得到一个转录水平出现异常显著上调、编码甘露糖 PTS 转运蛋白的 *manXYZ* 基因簇；通过基因的敲除、弱化表达和

基因的转录水平分析,发现 *manXYZ* 基因簇在己糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖)和戊糖(木糖和阿拉伯糖)的转运和磷酸化过程中发挥主导作用,确定了 *manXYZ* 是解除非葡萄糖单糖转运限速步骤的关键基因簇。

(4) 成功解析了 *manXYZ* 基因簇异常表达上调的调控机制,清晰阐明了乳酸片球菌工程菌的全糖协同代谢机制。通过转录调控蛋白的序列分析,发现特定的木糖适应性进化诱发了 *P. acidilactici* 中的 *manXYZ* 表达上调,同时伴随着 CcpA 和 RS07020 转录调控蛋白突变;通过氨基酸的定点突变实验和基因转录水平分析,发现 CcpA 的 T65I 突变和 RS07020 蛋白的 E159G 突变是诱发 *manXYZ* 基因簇表达发生上调的关键因素,也是提高 *P. acidilactici* 工程菌中己糖和戊糖共代谢速率的重要原因。

(5) 成功构建了一株钠离子耐受性显著提高的乳酸片球菌重组菌株,实现了高浓度的乳酸钠发酵。通过异源过表达 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,发现 RS07020 的过表达有效提高了 *P. acidilactici* 对于钠离子的耐受性;与出发菌株相比,重组菌株在以纯糖为碳源的合成培养基和麦秆酶水解糖化液中的乳酸钠产量提高了 24%-31%,乳酸钠的产量达到 121.1-132.4 g/L。

7.2 创新点

(1) 使用生物脱毒技术和具有全糖利用能力的乳酸片球菌工程菌株分别克服了阻碍木质纤维素来源的丙交酯合成的两大障碍(抑制物和残糖),首次实现了木质纤维素来源的 L-丙交酯和 D-丙交酯的合成,为利用木质纤维素生产生物可降解的聚乳酸材料奠定了基础。

(2) 成功解析了工程菌 *P. acidilactici* ZY271 中协同代谢葡萄糖和非葡萄糖单糖的机制,发现表达显著上调的转运蛋白基因簇 *manXYZ* 是解除非葡萄糖单糖利用的限速转运步骤的关键因素,为解决其它菌株中非葡萄糖单糖的利用难题提供了解决思路和方法。

(3) 成功构建了一株钠离子耐受性显著提高的工程菌株,实现了高浓度的乳酸钠发酵,为高浓度的乳酸钠生产提供了一个有效方法。

7.3 展望

本论文一方面通过合成生物学的方法克服了聚乳酸前体生产面临的关键障碍,首次成功实现了木质纤维素来源的丙交酯的合成;另一方面,清晰地阐明了乳酸片球菌工程菌协同和全代谢木质纤维素来源的己糖和戊糖的机制。但本论文仍然存在一些需要进一步研究的问题:

(1) 糖转运机制的研究工作需要进一步完善。在接下来的工作中,可以对本研究中获得的木糖适应性进化菌株进行转录组分析和基因组重测序,全面挖掘关键差异基因,重点关注糖转运蛋白的表达量变化和转录调控因子的突变情况,探究转录调控蛋白突变规律以及与糖转运蛋白表达调控之间的关系,进一步完善非葡萄糖单糖转运的调控机制。

(2) 探究特异性糖转运蛋白对改善其它菌株中的非葡萄糖单糖利用的作用。对其

它生物炼制菌株（如谷氨酸棒状杆菌、皮状丝孢酵母和运动发酵单胞菌等）进行特定条件的适应性进化以提高菌株对于木糖、阿拉伯糖等非葡萄糖单糖的利用能力，挖掘出不同菌株中特异性的全糖转运蛋白，通过增强内源的全糖转运蛋白表达或者引入异源的全糖转运蛋白来增强菌株对非葡萄糖单糖的转运能力，从而解决非葡萄糖的利用难题。

（3）尝试利用转录调控因子对糖转运蛋白表达的调控作用来改善非葡萄糖的利用。在其他生物炼制菌株中（如谷氨酸棒状杆菌、皮状丝孢酵母和运动发酵单胞菌等）筛选与 CcpA 和 RS07020 蛋白同类型的转录调控因子，尝试对其关键氨基酸位点进行点突变以增强非葡萄糖单糖转运蛋白的表达，进一步提高菌株对非葡萄糖单糖的利用能力。

参考文献

- [1] Balasubramanian VK, Muthuramalingam JB, Chen YP, Chou JY. Recent trends in lactic acid-producing microorganisms through microbial fermentation for the synthesis of polylactic acid[J]. *Archives of Microbiology*. 2023, 206(1):31.
- [2] 李梓昱, 杨倩倩, 蒋海云, 张巍然, 吴威, 吴国华, 曾海兰. 碳中和目标背景下包装行业发展的对策[J]. *包装工程*. 2023, 44(11): 175-187.
- [3] Shen M, Huang W, Chen M, Biao S, Zeng GM, Zhang YX. (Micro)plastic crisis: Un-ignorable contribution to global greenhouse gas emissions and climate change[J]. *Journal of Cleaner Production*. 2020, 254: 120138.
- [4] 邹君, 凌秀琴. 可生物降解性高分子材料——聚乳酸[J]. *广西化纤通讯*. 2000, (02): 35-37.
- [5] Okamoto M, John B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds[J]. *Progress in Polymer Science*. 2013, 38(10-11): 1487-503.
- [6] Rasal RM, Janorkar AV, Hirt DE. Poly(lactic acid) modifications[J]. *Progress in Polymer Science*. 2010, 35(3): 338-56.
- [7] Zhao QN, Ding Y, Yang B, Ning NY, Fu Q. Highly efficient toughening effect of ultrafine full-vulcanized powdered rubber on poly(lactic acid)(PLA)[J]. *Polymer Testing*. 2013, 32(2): 299-305.
- [8] Saeidlou S, Huneault MA, Li HB, Park CB. Poly(lactic acid) crystallization[J]. *Progress in Polymer Science*. 2012, 37(12): 1657-77.
- [9] Mehta R, Kumar V, Bhunia H, Upadhyay SN. Synthesis of poly(lactic acid): a review[J]. *Journal of Macromolecular Science*. 2005, 45(4): 325-349.
- [10] 王婧, 崔反东. 聚乳酸的合成及应用研究[J]. *江西化工*. 2023, 39(04): 5-8.
- [11] Hu Y, Daoud WA, Cheuk KKL, Lin CS. Newly developed techniques on polycondensation, ring-opening polymerization and polymer modification: focus on poly(lactic acid)[J]. *Materials (Basel)*. 2016, 9(3).
- [12] Gupta AP, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers-poly lactide: a critique[J]. *European Polymer Journal*. 2007, 43(10): 4053-4074.
- [13] Sanglard P, Adamo V, Bourgeois JP, Chappuis T, Vanoli E. Poly(lactic acid) synthesis and characterization[J]. *Chimia*. 2012, 66(12).
- [14] 闫东雨. 聚乳酸市场技术分析[J]. *信息记录材料*. 2023, 24 (09): 8-11.
- [15] Zhang ZS, Tsapekos P, Alvarado-Morales M, Zhu XY, Zervas A. Enhanced fermentative lactic acid production from source-sorted organic household waste: focusing on low-pH microbial adaptation and bio-augmentation strategy[J]. *Science of The Total Environment*. 2022, 808.
- [16] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications[J]. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2): 163-72.

- [17] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119(1): 10-18.
- [18] Abdel-Rahman MA, Sonomoto K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid[J]. *Journal of Biotechnology*. 2016, 236: 176-92.
- [19] Sudhakar MP, Dharani G. Evaluation of seaweed for the production of lactic acid by fermentation using *Lactobacillus plantarum*[J]. *Bioresource Technology Reports*. 2022, 17.
- [20] Chen HY, Liu JB, Chang X, Chen DM, Xue Y, Liu P, Lin HL, Han S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals[J]. *Fuel Processing Technology*. 2017, 160: 196-206.
- [21] Ojo A. An Overview of lignocellulose and its biotechnological importance in high-value product production[J]. *Fermentation*. 2023, 9(11).
- [22] 刘敏. 光学纯 L-丙交酯的合成工艺与纯化研究[D]. 哈尔滨理工大学. 2008.
- [23] Chen Z, Xie C, Xu Z, Wang YL, Zhao HP, Hao HX. Determination and correlation of solubility data and dissolution thermodynamic data of L-lactide in different pure solvents[J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2012, 58(1): 143-150.
- [24] Cunha BLC, Bahu JO, Xavier LF, Crivellin S, de Souza SDA, Lodi L, Jardini AL, Filho RM, Schiavon MIRB, Concha VOC, Severino P, Souto EB. Lactide: production routes, properties, and applications[J]. *Bioengineering (Basel)*. 2022, 9(4).
- [25] Wang Z. China's Polylactic acid industry: current status and development strategies[J]. *Chinese Journal of Engineering Science*. 2021, 23(6).
- [26] Vink ETH, Davies S. Life Cycle Inventory and impact assessment data for 2014 ingeo™ polylactide production[J]. *Industrial Biotechnology*. 2015, 11(3): 167-180.
- [27] Van Wouwe P, Dusselier M, Vanleeuw E, Sels B. Lactide synthesis and chirality control for polylactic acid production[J]. *ChemSusChem*. 2016, 9(9): 907-921.
- [28] 程超, 贾晓凤, 罗建成. 氧化锌-辛酸亚锡催化制备丙交酯的工艺研究[J]. *河南科学*. 2010, 28 (09): 1097-1099.
- [29] 陈佳, 王远亮. 合成丙交酯的催化剂研究进展[J]. *化学研究与应用*. 2007, (04): 358-360.
- [30] 褚艳红, 张国宝, 赵根锁, 余守志. L-丙交酯的制备工艺研究[J]. *河南科学*. 2008, (12): 1474-1476.
- [31] Sharma S, Tsai ML, Sharma V, Sun PP, Nargotra P, Bajaj BK, Chen CW, Dong CD. Environment friendly pretreatment approaches for the bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value-added products[J]. *Environments*. 2022, 10(1).
- [32] Brethauer S, Shahab RL, Studer MH. Impacts of biofilms on the conversion of cellulose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104(12): 5201-5212.
- [33] Abraham A, Mathew AK, Park H, Choi O, Sindhu R, Parameswaran B, Pandey A, Park JH, Sang, BI. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from

- lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*. 2020, 301: 122725.
- [34] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38(4): 522-550.
- [35] Houfani AA, Anders N, Spiess AC, Baldrian P, Benallaoua S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars- a review[J]. *Biomass and Bioenergy*. 2020, 134: 105481.
- [36] Jatoi AS, Abbasi SA, Hashmi Z, Shah AK, Shah MS, Bhatt ZA, Maitlo G, Hussain S, Khandro GA, Usto MA, Iqbal A. Recent trends and future perspectives of lignocellulose biomass for biofuel production: a comprehensive review[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021, 13(8): 6457-6469.
- [37] Mankar AR, Pandey A, Modak A, Pant KK. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances[J]. *Bioresource technology*. 2021, 334: 125235.
- [38] Srivastava N, Rawat R, Singh Oberoi H, Ramteke PW. A Review on fuel ethanol production from lignocellulosic biomass[J]. *International Journal of Green Energy*. 2014, 12(9): 949-960.
- [39] Kumar B, Bhardwaj N, Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: an emerging biorefinery concept[J]. *Fuel Processing Technology*. 2020, 199.
- [40] Wagle A, Angove MJ, Mahara A, Wagle A, Mainali B, Martins M, Goldbeck R, Raj Paudel S. Multi-stage pre-treatment of lignocellulosic biomass for multi-product biorefinery: a review[J]. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2022, 49.
- [41] Esquivel-Hernandez DA, Garcia-Perez JS, Lopez-Pacheco IY, Iqbal HMN, Parra-Saldivar R. Resource recovery of lignocellulosic biomass waste into lactic acid - trends to sustain cleaner production[J]. *Journal of Environmental Management*. 2022, 301: 113925.
- [42] Yankov D. Fermentative lactic acid production from lignocellulosic feedstocks: from source to purified product[J]. *Frontiers in Chemistry*. 2022, 10: 823005.
- [43] Cheng YS, Zheng Y, Yu CW, Dooley TM, Jenkins BM, VanderGheynst JS. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162(6): 1768-1784.
- [44] McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment[J]. *Bioresource technology*. 2010, 101(17): 6718-6727.
- [45] Solarte-Toro JC, Romero-García JM, Martínez-Patiño JC, Ruiz-Ramos E, Castro-Galiano E, Cardona-Alzate CA. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019, 107: 587-601.
- [46] Zheng Y, Zhao J, Xu F, Li Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2014, 42: 35-53.
- [47] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-

- products and strategies for minimizing their effects[J]. *Bioresource technology*. 2016, 199: 103-112.
- [48] Wang S, Sun X, Yuan Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review[J]. *Bioresource technology*. 2018, 258: 302-309.
- [49] Shan W, Yan Y, Li Y, Hu W, Chen J. Microbial tolerance engineering for boosting lactic acid production from lignocellulose[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2023, 16(1): 78.
- [50] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jonsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77-9:91-103.
- [51] Wu D, Li Q, Wang D, Dong Y. Enzymatic hydrolysis and succinic acid fermentation from steam-exploded corn stalk at high solid concentration by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 170(8): 1942-1949.
- [52] Persson P, Andersson J, Gorton L, Larsson S, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50 (19): 5318-5325
- [53] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, Preston JF, Ingram LO. Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 69(5): 526-536.
- [54] López-Linares JC, Romero I, Cara C, Castro E. Bioconversion of rapeseed straw: enzymatic hydrolysis of whole slurry and cofermentation by an ethanogenic *Escherichia coli*[J]. *Energy & Fuels*. 2016, 30(11): 9532-9539.
- [55] Zhu JY, Zhu W, Obryan P, Dien BS, Tian S, Gleisner R, Pan XJ. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86(5): 1355-1365.
- [56] Brás T, Guerra V, Torrado I, Lourenço P, Carvalheiro F, Duarte LC, Neves LA. Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diano-filtration[J]. *Process Biochemistry*. 2014, 49(1): 173-180.
- [57] Pan L, He M, Wu B, Wang Y, Hu G, Ma K. Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production[J]. *Journal of Cleaner Production*. 2019, 227: 1185-1194.
- [58] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J, Bothast RJ. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(1): 125-131.
- [59] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, De Winde JH, Ruijsenaars HJ. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate[J]. *Microbial Biotechnology*. 2010, 3(3): 336-343.
- [60] 杨莉, 谭丽萍, 刘同军. 木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展[J].

- 生物工程学报. 2021, 37 (01): 15-29.
- [61] Guo H, Zhao Y, Chang JS, Lee DJ. Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review[J]. *Bioresource Technology*. 2023, 367: 128252.
- [62] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.
- [63] He YQ, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation[J]. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360-364.
- [64] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3.
- [65] He YQ, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [66] Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources[J]. *Molecules*. 2021, 26(3).
- [67] Jin M, Sarks C, Bals BD, Posawatz N, Gunawan C, Dale BE, Balan V. Toward high solids loading process for lignocellulosic biofuel production at a low cost[J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 114(5): 980-989.
- [68] Saha K, R UM, Sikder J, Chakraborty S, da Silva SS, dos Santos JC. Membranes as a tool to support biorefineries: applications in enzymatic hydrolysis, fermentation and dehydration for bioethanol production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 74: 873-890.
- [69] Qureshi AS, Ji X, Khushk I, Mirjatt AN, Tunio AA, Huang Y. Ionic liquid and diluted sulfuric acid combinatorial pretreatment for efficient sugarcane bagasse conversion to L-lactic acid[J]. *Industrial Crops and Products*. 2023, 204.
- [70] Pratibha B, Anushka P, Vinod K, Akhilesh KK, Deepti A. Expeditious production of concentrated glucose-rich hydrolysate from sugarcane bagasse and its fermentation to lactic acid with high productivity[J]. *Food and Bioproducts Processing*. 2020, 124:72-81.
- [71] Nalawade K, Baral P, Patil S, Pundir A, Kurmi AK, Konde K, Patil S, Agrawal D. Evaluation of alternative strategies for generating fermentable sugars from high-solids alkali pretreated sugarcane bagasse and successive valorization to L (+) lactic acid[J]. *Renewable Energy*. 2020, 157: 708-717.
- [72] Chen H, Huo W, Wang B, Wang Y, Wen H, Cai D, Zhang C, Wu Y, Qin P. L-lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of dilute ethylenediamine pre-treated rice straw[J]. *Industrial Crops and Products*. 2019, 141.

- [73] Zhang Y, Kumar A, Hardwidge PR, Tanaka T, Kondo A, Vadlani PV. D-lactic acid production from renewable lignocellulosic biomass via genetically modified *Lactobacillus plantarum*[J]. *Biotechnology Progress*. 2016, 32(2): 271-278.
- [74] Zhang Y, Vadlani PV, Kumar A, Hardwidge PR, Govind R, Tanaka T, Kondo A. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(1): 279-288.
- [75] Karnaouri A, Asimakopoulou G, Kalogiannis KG, Lappas A, Topakas E. Efficient D-lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* through conversion of organosolv pretreated lignocellulosic biomass[J]. *Biomass and Bioenergy*. 2020, 140.
- [76] Utrilla J, Vargas-Tah A, Trujillo-Martinez B, Gosset G, Martinez A. Production of D-lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains[J]. *Bioresource Technology*. 2016, 220: 208-214.
- [77] Yi X, Zhang P, Sun J, Tu Y, Gao Q, Zhang J, Bao J. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock[J]. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121.
- [78] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock[J]. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369-1376.
- [79] Qiu ZY, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation[J]. *Bioresource Technology*. 2018, 249: 9-15.
- [80] Zhang B, Li J, Liu X, Bao J. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production[J]. *Industrial Crops and Products*. 2022, 187.
- [81] Qiu Z, Han X, Fu A, Jiang Y, Zhang W, Jin C, Li D, Xia J, He J, Deng Y, Xu N, Liu X, He A, Gu H, Xu J. Enhanced cellulosic d-lactic acid production from sugarcane bagasse by pre-fermentation of water-soluble carbohydrates before acid pretreatment[J]. *Bioresource Technology*. 2023, 368.
- [82] Qiu Z, Han X, He J, Jiang Y, Wang G, Wang Z, Liu X, Xia J, Xu N, He A, Gu H, Xu J. One-pot D-lactic acid production using undetoxified acid-pretreated corncob slurry by an adapted *Pediococcus acidilactici*[J]. *Bioresource Technology*. 2022, 363: 127993.
- [83] Campos J, Bao J, Liden G. Optically pure lactic acid production from softwood-derived mannose by *Pediococcus acidilactici*[J]. *Journal of Biotechnology*. 2021, 335: 1-8.
- [84] Jang B-K, Ju Y, Jeong D, Jung S-K, Kim C-K, Chung Y-S, Kim S-R. L-lactic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae* with improved organic acid tolerance[J]. *Journal of Fungi*. 2021, 7(11).
- [85] Kong X, Zhang B, Hua Y, Zhu Y, Li W, Wang D, Hong J. Efficient L-lactic acid production from corncob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast[J]. *Bioresource Technology*. 2019, 273: 220-230.

- [86] Campos J, Almqvist H, Bao J, Wallberg O, Liden G. Overcoming extended lag phase on optically pure lactic acid production from pretreated softwood solids[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023, 11: 1248441.
- [87] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2007, 82(4): 340-349.
- [88] Wang S, He Z, Yuan Q. Xylose enhances furfural tolerance in by improving NADH recycle [J]. *Chemical Engineering Science*. 2017, 158: 37-40.
- [89] Allen SA, Clark W, McCaffery JM, Cai Z, Lanctot A, Slininger PJ, Liu ZL, Gorsich SW. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3:2.
- [90] Wu B, Qin H, Yang Y, Duan G, Yang S, Xin F, Zhao C, Shao H, Wang Y, Zhu Q, Tan F, Hu G, He M. Engineered *Zymomonas mobilis* tolerant to acetic acid and low pH via multiplex atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 10.
- [91] Jayakody LN, Chinmoy B, Turner TL. Trends in valorization of highly-toxic lignocellulosic biomass derived-compounds via engineered microbes [J]. *Bioresource Technology*. 2022, 346: 126614.
- [92] Guaragnella N, Antonacci L, Passarella S, Marra E, Giannattasio S. Achievements and perspectives in yeast acetic acid-induced programmed cell death pathways[J]. *Biochemical Society Transactions*. 2011, 39(5): 1538-1543.
- [93] Keweloh H, Weyrauch G, Rehm H J. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990, 33(1): 66-71.
- [94] Wang X, Miller EN, Yomano LP, Zhang X, Shanmugam KT, Ingram LO. Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* strains engineered for the production of ethanol and lactate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(15): 5132-5140.
- [95] Wang S, Cheng G, Joshua C, He Z, Sun X, Li R, Liu L, Yuan Q. Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*[J]. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 250.
- [96] Jiang T, Qiao H, Zheng Z, Chu Q, Li X, Yong Q, Ouyang J. Lactic acid production from pretreated hydrolysates of corn stover by a newly developed *Bacillus coagulans* strain[J]. *PLoS One*. 2016, 11(2): e0149101.
- [97] Qureshi AS, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. *Bioresource Technology*. 2015, 189: 399-404.
- [98] Ma K, He M, You H, Pan L, Hu G, Cui Y, Maeda T. Enhanced fuel ethanol production from rice straw hydrolysate by an inhibitor-tolerant mutant strain of *Scheffersomyces stipitis*[J]. *RSC Advances*. 2017, 7(50): 31180-31188.

- [99] Hou X, Yao S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012, 93(6): 2591-2601.
- [100] Magasanik B. Catabolite repression[J]. Cold spring harbor symposia on quantitative biology. 1961, 26: 249-256.
- [101] Lynd LR, Baskaran S, Casten S. Salt accumulation resulting from base added for pH control, and not ethanol, limits growth of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture[J]. Biotechnology Progress. 2001, 17(1): 118-125.
- [102] Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, McMillan JD, Wooley RJ. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics[J]. Enzyme and Microbial Technology. 2000, 27, 240-247.
- [103] Vriesekoop F, Rasmusson M, Pamment NB. Respective effects of sodium and chloride ions on filament formation and growth and ethanol production in *Zymomonas mobilis* fermentations[J]. Letters in Applied Microbiology. 2002, 35(1): 27-31.
- [104] Maiorella BL, Blanch HW, Wilke CR. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering. 1984, 26(10): 1155-1166.
- [105] Joglekar HG, Rahman I, Babu S, Kulkarni BD, Joshi A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid[J]. Separation and Purification Technology. 2006, 52(1): 1-17.
- [106] Abdel-Rahman MA, Hassan SE-D, Alrefaey HMA, Elsakhawy T. Efficient co-utilization of biomass-derived mixed sugars for lactic acid production by *Bacillus coagulans* Azu-10[J]. Fermentation. 2021, 7(1).
- [107] Hama S, Mizuno S, Kihara M, Tanaka T, Ogino C, Noda H, Kondo A. Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*[J]. Bioresource Technology. 2015, 187: 167-172.
- [108] Zhao Z, Xian M, Liu M, Zhao G. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms[J]. Biotechnology for Biofuels. 2020, 13: 21.
- [109] Gao M, Ploessl D, Shao Z. Enhancing the co-utilization of biomass-derived mixed sugars by yeasts[J]. Frontiers in Microbiology. 2018, 9: 3264.
- [110] Kawaguchi H, Vertes AA, Okino S, Inui M, Yukawa H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2006, 72(5): 3418-3428.
- [111] Qi X, Zha J, Liu GG, Zhang W, Li BZ, Yuan YJ. Heterologous xylose isomerase pathway and evolutionary engineering improve xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Microbiology. 2015, 6: 1165.
- [112] 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[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2020, 8(16): 6315-6322.
- [113] Mao Y, Li G, Chang Z, Tao R, Cui Z, Wang Z, Tang Y-j, Chen T, Zhao X. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinate from lignocellulosic hydrolysate[J]. Biotechnology for Biofuels. 2018, 11(1).
- [114] Kim H, Lee H-S, Park H, Lee D-H, Boles E, Chung D, Park Y-C. Enhanced production of xylitol from xylose by expression of *Bacillus subtilis* arabinose:H⁺ symporter and *Scheffersomyces stipitis* xylose reductase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology. 2017, 107: 7-14.
- [115] Jo S, Yoon J, Lee SM, Um Y, Han SO, Woo HM. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* to improve xylose utilization and succinate production[J]. Journal of Biotechnology. 2017, 258: 69-78.
- [116] Agrawal M, Mao Z, Chen RR. Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain[J]. Biotechnology and Bioengineering. 2011, 108(4): 777-785.
- [117] Sarkar P, Mukherjee M, Goswami G, Das D. Adaptive laboratory evolution induced novel mutations in *Zymomonas mobilis* ATCC ZW658: a potential platform for co-utilization of glucose and xylose[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2020, 47(3): 329-341.
- [118] Ye S, Kim JW, Kim SR. Metabolic engineering for improved fermentation of L-arabinose[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019, 29(3): 339-346.
- [119] Saxena A, Hussain A, Parveen F, Ashfaque M. Current status of metabolic engineering of microorganisms for bioethanol production by effective utilization of pentose sugars of lignocellulosic biomass[J]. Microbiological Research. 2023, 276: 127478.
- [120] Wiedemann B, Boles E. Codon-optimized bacterial genes improve L-arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology. 2008, 74(7): 2043-2050.
- [121] Becker J, Boles E. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2003, 69(7): 4144-4150.
- [122] Wang X, Yang J, Yang S, Jiang Y. Unraveling the genetic basis of fast l-arabinose consumption on top of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering. 2019, 116(2): 283-293.
- [123] Wang C, Shen Y, Zhang Y, Suo F, Hou J, Bao X. Improvement of L-arabinose fermentation by modifying the metabolic pathway and transport in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BioMed Research International. 2013, 2013: 461204.
- [124] Wisselink HW, Toirkens MJ, del Rosario Franco Berriel M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT, van Maris AJ. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose [J]. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73(15): 4881-4891.
- [125] Deanda K, Zhang M, Eddy C, Picataggio, S. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering[J]. Applied and

- Environmental Microbiology. 1996, 62(12): 4465-4470.
- [126] Schneider J, Niermann K, Wendisch VF. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology. 2011, 154(2-3): 191-198.
- [127] Mohagheghi A, Evans K, Chou Y-C, Zhang M. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2002, 98-100:885-898.
- [128] Lawford HG, Rousseau JD. Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for cofermentation of glucose, xylose, and arabinose[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2002, 98: 429-448.
- [129] Madhavan A, Srivastava A, Kondo A, Bisaria VS. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Critical Reviews in Biotechnology. 2011, 32(1): 22-48.
- [130] Aden A, Ruth M, Ibsen K, Jechura J, Neeves K, Sheehan J, Wallace B. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. NREL/TP-510-32438[R]. NREL: Golden, CO. 2002.
- [131] Sasaki M, Teramoto H, Inui M, Yukawa H. Identification of mannose uptake and catabolism genes in *Corynebacterium glutamicum* and genetic engineering for simultaneous utilization of mannose and glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, 89(6): 1905-1916.
- [132] Rodrussamee N, Lertwattanasakul N, Hirata K, Suprayogi, Limtong S, Kosaka T, Yamada M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011, 90(4): 1573-1586.
- [133] Sun T, Altenbuchner J. Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology. 2010, 192(8): 2128-2139.
- [134] Petrova P, Petlichka S, Petrov K. New *Bacillus* spp. with potential for 2,3-butanediol production from biomass[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2020, 130(1): 20-28.
- [135] Vinuselvi P, Lee S K. Engineered *Escherichia coli* capable of co-utilization of cellobiose and xylose[J]. Enzyme and Microbial Technology. 2012, 50(1): 1-4.
- [136] Larsson S, Cassland P, Jonsson LJ. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2001, 67(3): 1163-1170.
- [137] Brandberg T, Franzen CJ, Gustafsson L. The fermentation performance of nine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures in dilute-acid wood hydrolysate[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2004, 98(2): 122-125.
- [138] Yang X, Jin G, Gong Z, Shen H, Song Y, Bai F, Zhao ZK. Simultaneous utilization of

- glucose and mannose from spent yeast cell mass for lipid production by *Lipomyces starkeyi*[J]. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 383-387.
- [139] Weisser P, Kramer R, Sprenger GA. Expression of the *Escherichia coli* pmi gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62(11):4155-41161.
- [140] Schwart S, Hetzler S, Broker D, Steinbuchel A. Extension of the substrate utilization range of *Ralstonia eutropha* strain H16 by metabolic engineering to include mannose and glucose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(4): 1325-1334.
- [141] 张慧滢. 酪丁酸梭菌可发酵糖转运及代谢调控研究与应用[D]. 华南理工大学. 2022.
- [142] Grossiord B, Vaughan EE, Luesink E, de Vos WM. Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria[J]. *LAIT*. 1998, 78(1):77-84.
- [143] Solopova A, Bachmann H, Teusink B, Kok J, Kuipers OP. Further elucidation of galactose utilization in *Lactococcus lactis* MG1363[J]. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9: 1803.
- [144] Linden T; Peetre J, Hahnagerdal B. Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58(5):1661-1669.
- [145] Horvath P, Hunziker A, Erdossy J, Krishna S, Semsey S. Timing of gene transcription in the galactose utilization system of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(49): 38062-38068.
- [146] Neves AR, Pool WA, Solopova A, Kok J, Santos H, Kuipers OP. Towards enhanced galactose utilization by *Lactococcus lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(21): 7048-7060.
- [147] Lim HG, Seo SW, Jung GY. Engineered *Escherichia coli* for simultaneous utilization of galactose and glucose[J]. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 564-567.
- [148] Lee KS, Hong ME, Jung SC, Ha SJ, Yu BJ, Koo HM, Park SM, Seo JH, Kweon DH, Park JC, Jin YS. Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering[J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108(3): 621-631.
- [149] Sasaki M, Jojima T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 85(1): 105-115.
- [150] Yim SS, Choi JW, Lee SH, Jeong KJ. Modular Optimization of a hemicellulose-utilizing pathway in *Corynebacterium glutamicum* for consolidated bioprocessing of hemicellulosic biomass[J]. *ACS Synthetic Biology*. 2016, 5(4): 334-343.
- [151] Dunn KL, Rao CV. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*[J]. *Applied Microbiology*

- and Biotechnology. 2014, 98(15): 6897-6905.
- [152] Sarkar P, Goswami G, Mukherjee M, Das D. Heterologous expression of xylose specific transporter improves xylose utilization by recombinant *Zymomonas mobilis* strain in presence of glucose[J]. Process Biochemistry. 2021, 102: 190-198.
- [153] Shin HY, Nijland JG, de Waal PP, Driessen AJM. The amino-terminal tail of Hxt11 confers membrane stability to the Hxt2 sugar transporter and improves xylose fermentation in the presence of acetic acid [J]. Biotechnology and Bioengineering. 2017, 114(9): 1937-1945.
- [154] Nijland JG, Shin HY, de Jong RM, de Waal PP, Klaassen P, Driessen AJM. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels. 2014, 7:168.
- [155] Vasylyshyn R, Kurylenko O, Ruchala J, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, Rapoport A, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast[J]. Microbial Cell Factories. 2020, 19(1).
- [156] Subtil T, Boles E. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters[J]. Biotechnology for Biofuels. 2011, 4:38
- [157] Li J, Xu J, Cai P, Wang B, Ma Y, Benz JP, Tian C. Functional analysis of two L-arabinose transporters from filamentous fungi reveals promising characteristics for improved pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2015, 81(12): 4062-4070.
- [158] Kwon DH, Kim SB, Park JB, Ha SJ. Overexpression of mutant galactose permease (ScGal2_N376F) effective for utilization of glucose/xylose or glucose/ galactose mixture by engineered *Kluyveromyces marxianus*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2020, 30(12): 1944-1949.
- [159] Wyman CE, Dale BE. Producing biofuels via the sugar platform[J]. Chemical Engineering Progress. 2015, 111(3): 45-+.
- [160] Cubas-Cano E, González-Fernández C, Ballesteros M, Tomás-Pejó E. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2018, 12(2): 290-303.
- [161] Nwamba MC, Sun F, Mukasekuru MR, Song G, Harindintwali JD, Boyi SA, Sun H. Trends and hassles in the microbial production of lactic acid from lignocellulosic biomass[J]. Environmental Technology & Innovation. 2021, 21.
- [162] Poudel P, Tashiro Y, Sakai K. New application of *Bacillus* strains for optically pure L-lactic acid production: general overview and future prospects[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2016, 80(4): 642-654.
- [163] Inkinen S, Hakkarainen M, Albertsson AC, Sodergard A. From lactic acid to poly(lactic acid) (PLA): characterization and analysis of PLA and its precursors[J]. Biomacromolecules. 2011, 12(3): 523-532.

- [164] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2004, 66(1): 10-26.
- [165] Yi X, Gao Q, Zhang L, Wang X, He Y, Hu F, Zhang J, Zou G, Yang S, Zhou Z, Bao J. Heterozygous diploid structure of *Amorphotheca resinae* ZN1 contributes efficient biodegradation on solid pretreated corn stover[J]. Biotechnology for Biofuels. 2019, 12: 126.
- [166] Kim JH, Block DE, Mills DA. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, 88(5): 1077-1085.
- [167] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. laboratory analytical procedure. Technical report NREL/TP510-42628[R]. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 1996.
- [168] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry. 1987, 59: 257-268.
- [169] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry. 1976, 72(1): 248-254.
- [170] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Technical report NREL/TP-510-42623[R]. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2008.
- [171] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical report NREL/TP-510-42618[R]. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2012.
- [172] 周平平. 生物炼制发酵微生物的呋喃醛和酚醛抑制物脱毒机制和应用研究[D]. 华东理工大学. 2019.
- [173] Ainsworth E A, Gillespie K M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin-ciocalteu reagent[J]. Nature Protocols. 2007, 2(4): 875-877.
- [174] Gu H, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues[J]. Bioresource Technology. 2014, 157: 6-13.
- [175] Han X, Hong F, Liu G, Bao J. An approach of utilizing water-soluble carbohydrates in lignocellulose feedstock for promotion of cellulosic L-lactic acid production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2018, 66(39): 10225-10232.
- [176] Dong H, Bao J. Metabolism: biofuel via biodegradation[J]. Nature Chemical Biology. 2010, 6(5): 316-318.
- [177] Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Dudgeon D. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.

- Technical report NREL/TP-5100-47764[R]. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2011.
- [178] Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Filho RM. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices-a review[J]. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(1): 321-328.
- [179] 祖恩峰. L-丙交酯的合成、表征及共聚[D]. 西北工业大学. 2006.
- [180] Agrawal AK, Bhalla R. Advances in the production of poly(lactic acid) fibers: a review [J]. *Journal of Macromolecular Science*. 2003, 43(4): 479-503.
- [181] Masutani K, Kimura Y. Poly(lactic acid) science and technology: processing, properties, additives and applications[M]. The Royal Society of Chemistry. 2014, 1-36.
- [182] Rahmayetty, Sukirno, Prasetya B, Gozan M. Synthesis and characterization of L-lactide and polylactic acid (PLA) from L-lactic acid for biomedical applications[C]. *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics. 2017, 1817: 020009.
- [183] Jacob S, Dilshani A, Rishivanthi S, Khaitan P, Vamsidhar A, Rajeswari G, Kumar V, Rajak R, Din M, Zambare V. Lignocellulose-derived arabinose for energy and chemicals synthesis through microbial cell factories: a review[J]. *Processes*. 2023, 11(5).
- [184] Deanda K, Zhang M, Eddy C, Picataggio S. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering[J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62(12): 4465-4470.
- [185] Jarmander J, Hallstrom BM, Larsson G. Simultaneous uptake of lignocellulose-based monosaccharides by *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014, 111(6): 1108-1115.
- [186] Fu H, Zhang H, Guo X, Yang L, Wang J. Elimination of carbon catabolite repression in *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from lignocellulosic hydrolysates[J]. *Bioresource Technology*. 2022, 357: 127320.
- [187] Yuan X, Tu S, Lin J, Yang L, Shen H, Wu M. Combination of the CRP mutation and *ptsG* deletion in *Escherichia coli* to efficiently synthesize xylitol from corncob hydrolysates[J]. *Home | Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104(5): 2039-2050.
- [188] 李燕军, 赵岩, 黄龙辉, 李娟, 谢希贤, 陈宁. 微生物同步利用葡萄糖和木糖代谢工程概述[J]. *发酵科技通讯*. 2017, 46(01): 54-59.
- [189] Sievert C, Nieves LM, Panyon LA, Loeffler T, Morris C, Cartwright RA, Wang X. Experimental evolution reveals an effective avenue to release catabolite repression via mutations in XylR [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017, 114(28): 7349-7354.
- [190] 陈莉莉, 屈春云, 傅宏鑫, 王菊芳. 转录因子 MtlR 介导嗜热厌氧杆菌 SCUT27 木糖代谢途径的激活[J]. *生物技术*. 2021, 31(04): 321-328.
- [191] Meiswinkel TM, Gopinath V, Lindner SN, Nampoothiri KM, Wendisch VF. Accelerated pentose utilization by *Corynebacterium glutamicum* for accelerated production of lysine, glutamate, ornithine and putrescine[J]. *Microbial Biotechnology*. 2012, 6(2): 131-140.

- [192] Kwak S, Jo JH, Yun EJ, Jin YS, Seo JH. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains[J]. *Biotechnology Advances*. 2019, 37(2): 271-283.
- [193] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method[J]. *Methods*. 2001, 25(4): 402-408.
- [194] Jeckelmann JM, Erni B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria[J]. *Pflügers Archiv*. 2020, 472(9): 1129-1153.
- [195] Castro R, Neves AR, Fonseca LL, Pool WA, Kok J, Kuipers OP, Santos H. Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease[J]. *Molecular Microbiology*. 2009, 71(3): 795-806.
- [196] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system[J]. *Microbial Cell Factories*. 2005, 4(1): 14.
- [197] Song S, Park C. Utilization of D-ribose through D-xylose transporter[J]. *FEMS Microbiology Letters*. 1998, 163(2): 255-261.
- [198] Chaillou S, Pouwels PH, Postma PW. Transport of D-xylose in *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum*: Evidence for a mechanism of facilitated diffusion via the phosphoenolpyruvate mannose phosphotransferase system[J]. *Journal of Bacteriology*. 1999, 181(16): 4768-4773.
- [199] 叶菁, 许敬亮, 肖波, 袁振宏, 徐惠娟, 杨柳, 李谢昆. 谷氨酸棒杆菌戊糖代谢利用研究进展[J]. *中国生物工程杂志*. 2012, 32(11): 132-136.
- [200] Jeckelmann JM, Erni B. The mannose phosphotransferase system (Man-PTS) -mannose transporter and receptor for bacteriocins and bacteriophages[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. 2020, 1862(11): 183412.
- [201] Wu Y, Shen X, Yuan Q, Yan Y. Metabolic engineering strategies for co-utilization of carbon sources in microbes[J]. *Bioengineering (Basel)*. 2016, 3(1).
- [202] Kim J, Hwang S, Lee SM. Metabolic engineering for the utilization of carbohydrate portions of lignocellulosic biomass[J]. *Metabolic Engineering*. 2022, 71: 2-12.
- [203] Geng B, Jia X, Peng X, Han Y. Biosynthesis of value-added bioproducts from hemicellulose of biomass through microbial metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering Communications*. 2022, 15.
- [204] Moye ZD, Zeng L, Burne RA. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Oral Microbiology*. 2014, 6.
- [205] Zeng L, Burne RA. Transcriptional regulation of the cellobiose operon of *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Bacteriology*. 2009, 191(7): 2153-2162.
- [206] Nie X, Yang B, Zhang L, Gu Y, Yang S, Jiang W, Yang C. PTS regulation domain-containing transcriptional activator CelR and sigma factor sigma(54) control cellobiose utilization in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Molecular Microbiology*. 2016, 100(2):

- 289-302.
- [207] Zeng L, Chakraborty B, Farivar T, Burne RA. Coordinated regulation of the EII(Man) and *fruR* Operons of *Streptococcus mutans* by global and fructose-specific pathways[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2017, 83(21).
- [208] Zeng L, Burne RA. Multiple sugar: phosphotransferase system permeases participate in catabolite modification of gene expression in *Streptococcus mutans*[J]. Molecular Microbiology. 2008, 70(1): 197-208.
- [209] Engels V, Wendisch VF. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology. 2007, 189(8): 2955-2966.
- [210] Gaurivaud P, Laigret F, Garnier M, Bové JM. Characterization of FruR as a putative activator of the fructose operon of *Spiroplasma citri*[J]. Fems Microbiology Letters. 2001, 198(1): 73-78.
- [211] Li Z, Xiang Z, Zeng J, Li Y, Li J. A GntR family transcription factor in *Streptococcus mutans* regulates biofilm formation and expression of multiple sugar transporter genes[J]. Frontiers in Microbiology. 2018, 9: 3224.
- [212] 吴艳, 顾阳, 任聪, 杨晟, 姜卫红. 微生物分解代谢物控制蛋白 CcpA 的研究进展[J]. 生命科学. 2011, 23 (09): 882-890.
- [213] Mota L J, Sarmiento LM, de Sa-Nogueira I. Control of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis* by AraR in vivo: crucial roles of operators, cooperativity, and DNA looping[J]. Journal of Bacteriology. 2001, 183(14): 4190-4201.
- [214] 马婉晴, 章珍, 刘悦琳, 王华忠. 大肠杆菌分解代谢产物阻遏效应研究进展[J]. 遗传. 2010, 32 (06): 571-576.
- [215] 张旭, 李宜奎, 祁庆生. 大肠杆菌碳分解代谢抑制及混合 C 源共利用的研究进展[J]. 生物加工过程, 2014, 12 (01): 109-116.
- [216] Michael JD, James AW, Mark J. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. Molecular Biology of the Cell[J]. 1997,8:1603-1618.
- [217] Papadopoulos LS, Miller RK, Ringer LJ, Cross HR. Sodium lactate effect on sensory characteristics, cooked meat color and chemical composition[J]. Journal of Food Science. 56(3): 621-626.
- [218] Wiegers EC, Rooijackers HM, Tack CJ, Philips BW, Heerschap A, van der Graaf M, de Galan BE. Effect of lactate administration on brain lactate levels during hypoglycemia in patients with type 1 diabetes[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2019, 39(10): 1974-1982.
- [219] Vriesekoop F, Rasmusson M, Pamment NB. Respective effects of sodium and chloride ions on filament formation and growth and ethanol production in *Zymomonas mobilis* fermentations[J]. Letters in Applied Microbiology. 2002, 35(1): 27-31.
- [220] Wu X, Altman R, Eiteman MA, Altman E. Effect of overexpressing *nhaA* and *nhaR* on sodium tolerance and lactate production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Engineering. 2013, 7(1).
- [221] Gao X, Gao Q, Bao J. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas*

- mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene *ZMO0119*[J]. Journal of Biotechnology. 2018, 282: 32-37.
- [222] Mager T, Rimon A, Padan E, Fendler K. Transport mechanism and pH regulation of the Na^+/H^+ antiporter NhaA from *Escherichia coli*: an electrophysiological study[J]. Journal of Biological Chemistry. 2011, 286(26): 23570-23581.
- [223] Yang S, Land ML, Klingeman DM, Pelletier DA, Lu TY, Martin SL, Guo HB, Smith JC, Brown SD. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010, 107(23): 10395-10400.
- [224] Liu YF, Hsieh CW, Chang YS, Wung BS. Effect of acetic acid on ethanol production by *Zymomonas mobilis* mutant strains through continuous adaptation[J]. BMC Biotechnology. 2017, 17(1): 63.
- [225] Yang Q, Chen ZZ, Zhou XF, Yin HB, Li X, Xin XF, Hong XH, Zhu JK, Gong Z. Overexpression of *SOS* (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant. 2009, 2(1): 22-31.
- [226] Ma DM, WR WX, Li HW, Jin FX, Guo LN, Wang J, Da HJ, Xu X. Co-expression of the *Arabidopsis SOS* genes enhances salt tolerance in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.)[J]. Protoplasma. 2014, 251(1): 219-231.
- [227] Xu H, Jiang X, Zhan K, Cheng X, Chen X, Pardo JM, Cui D. Functional characterization of a wheat plasma membrane Na^+/H^+ antiporter in yeast[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2008, 473(1): 8-15.
- [228] Qiu Z, Fang C, Gao Q, Bao J. A short-chain dehydrogenase plays a key role in cellulosic D-lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*[J]. Bioresource Technology. 2020, 297: 122473.
- [229] Tian W, Qin J, Lian C, Yao Q, Wang X. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH[J]. BMC Microbiology. 2022, 22(1).
- [230] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Sakai K, Sonomoto K. *Enterococcus faecium* QU 50: a novel thermophilic lactic acid bacterium for high-yield L-lactic acid production from xylose[J]. Fems Microbiology Letters. 2014, 362(2): 1-7.
- [231] Nancib A, Nancib N, Boubendir A, Boudrant J. The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*[J]. Brazilian Journal of Microbiology. 2015, 46(3): 893-902.
- [232] Ohkouchi Y, Inoue Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011[J]. Bioresource Technology. 2006, 97(13): 1554-1562.
- [233] Kong X, Zhang B, Hua Y, Zhu Y, Li W, Wang D, Hong J. Efficient L-lactic acid production from corncob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast[J]. Bioresource Technology. 2019, 273: 220-230.

附录 I

G1 菌株中转录调控蛋白 CcpA 和 RS07020 的氨基酸序列

1、CcpA 的氨基酸序列

MSKQTITIYDVAREAGVSMATVSRVVNGNPNVKPDTRKKVNEVIERLDYHPNAVARG
LASKKSTIIGVILPDITEMFFAALARGIDDIASMYKYNIILENSDEDVDKKVEVLENLLA
KQVDGVIYMGNNAIDDLREALKSARTPVVFAGSVDDKHALPSVSIDNEAAVYESVRK
LIENKNKKVAFVSGPLSQPVNGKFRIEGYKRALAESNIDFDESLVFETTNTYEDGIKLA
SQIASSDITAAFVANDRLAVGLLNGLQDLNVKVPEEFEIMTSNNTNLTKMVRPQISSIG
HPMYDTGAVAMRLLTKLMNKEEVEERNITLPFDMVFRQSTK

2、RS07020 的氨基酸序列

MKRQERIYQYVLEHTEPASADEANRQNGLTTSMIADALKIARSNVSKELNDLVRQRK
LFKISGRPVRYCQLALNEDDPLAQDPSEYHIEDGISGMELGKKKLAGKLDKPTAAKQ
LSVHKDIFDRMIGKDQSMKNQIEQAKAAMLYPPRGLNTLIIGPTGSGKTYFANAMFDF
AQARNLLSKDQQLVTFNCADYAHNPELLMSHLFGYVKGAFTGADDEQDGLIQEADG
GMLFLDEVHRLPPEGQEMIFYFMDHGTYSRLGETAKTHHANVRLVCATTEDPESTLL
QTFVRRIPITIQLPFNRKSPEERIELLRSLVTIEANRTNKEITLTEDVVQALLGSVITYGN
VGQLKSNIQLVCAKGLNNGNEGKIMITSDDLPSNIKDGLLNLASNRQELGAISKLLE
PYMVVKPGASYATPVTRKDSYELPYNLYEIIIGDKAMMLREEGLDQENINNFITTDINL
HLKSFYKNDLDTVNAESKLAEIVDKGIINFTKQIQPKVENRLNYRFKDNFIYAMSLHIS
SFIKRIQSGKPMRLMGNDLMAMVKDYPEELEVAKSIKESLEQRYGLPIPESESYLAV
LLISLKTVPSTSTGKVGIVVAAHGSNTASSMAQVVSQLLSDNSIQAFDMPLDMNPQVAY
KGIVDRVRAADQGEGLVLLVDMGSLSTFGPKITEETQIPVKVIDMVTAMVLEATR
ASFIDSNLDEIYAELREFHGYSRVAITDEGQSMEDDQAVAMLSGKPKAVIAVCSTGEGT
AQKIKGILDQLLLQNLIEDIKVFPISIVNMHQAIEEINQKYTIVATTGVMDEPVGVPFMP
LQSLQGGGEKQVRLAERSELSWVFDEKDAKLTRSVCRQYLSKYFVFLNADKFADI
LWNYVDYLAQSRQVEFSEFRINLIMHVA GAVERQLTNNPMQVNAAELAEVQEQPW
FKAVQEADDQFLQRIQIKMTLGEEFYIKLLETWQEKNDTILNEMEKNQ

学术成果

已发表论文:

1. **Niling He**¹, Jia Jia¹, Zhongyang Qiu, Chun Fang, Gunnar Lidén, Xiucan Liu, Jie Bao*. Cyclic L-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation. **Biotechnology and Bioengineering**, 2022, 119(7):1903-1915. (SCI IF=3.8, 对应本论文第二章和第三章)
2. **Niling He**¹, Mingxing Chen¹, Zhongyang Qiu, Chun Fang, Gunnar Lidén, Xiucan Liu, Bin Zhang, Jie Bao*. Simultaneous and rate-coordinated conversion of lignocellulose derived glucose, xylose, arabinose, mannose, and galactose into D-lactic acid production facilitates D-lactide synthesis. **Bioresource Technology**, 2023, 377, 128950. (SCI IF=11.4, 对应本论文第二章和第三章)
3. **Niling He**, Chun Fang, Zhongyang Qiu, Jie Bao*. Increasing sodium lactate production by enhancement of Na⁺ transmembrane transportation in *Pediococcus acidilactici*. **Bioresource Technology**, 2021, 323:124562. (SCI IF=11.4, 对应本论文第六章)

准备发表论文:

1. **Niling He**, Jie Bao*. An unregulated transporter gene cluster *manXYZ* triggers the full, complete and simultaneous utilization of all lignocellulose derived sugars in engineered *Pediococcus acidilactici*. In preparation. (对应本论文第四章和第五章)

致谢

时光匆匆，转眼间六年的硕博研究生生活即将画上句号。在这六年的时间里，我收获良多。在科研上，我从一个“实验小白”成长为能够独立开展科研工作的人，学会了辩证地看待问题、分析问题和解决问题。在生活上，我从想法幼稚逐渐走向成熟，在面对工作和学习上的不如意时，我逐渐学会了自我开导与鼓励自己，这也让我能够更加有勇气和信心面对未来的生活和工作。在此期间，我要感谢所有帮助过我的人，我能顺利完成学业离不开大家对我的帮助与支持。

首先要感谢鲍杰老师。作为我的科研引路人，鲍老师认真对待科研工作的态度以及对科研的热爱深深地感染了我。在课题研究方面，我一路上遇到了许多的挫折和难题，是鲍老师教会我在遇到困难时不能逃避，只有直面难题、思考解决措施才能克服难题，是鲍老师的悉心指导和鼓励让我一一度过了实验上的难关。鲍老师对待每个学生都十分负责和耐心，尤其在论文写作方面，鲍老师花费了大量的时间来指导我们，不厌其烦地告诉我们论文中存在的问题，锻炼了我们的论文写作能力和逻辑思维能力。在科研方面我也有许多做得不好的地方，非常感谢鲍老师对我的帮助与包容，在此祝愿鲍老师身体健康、工作顺利。

其次，我要感谢我的父母和好朋友。感谢你们一直无条件地支持着我，在我遇到困难踌躇不前的时候，一直鼓励着我。感谢你们对我的包容，有时候我会因为压力太大而对你们宣泄一些消极的情绪，是你们一直耐心地听我诉说，包容我的坏脾气，让我收拾好自己的心情，重新出发。你们对我的爱一直是我前进的动力。

最后我要感谢实验室的伙伴们。感谢金慈师兄、方纯师姐、颜钊师兄、王雅师姐、韩涛师兄、张斌师兄、刘祺师姐对我实验和生活上的帮助，你们对待科研十分认真、努力和刻苦，为实验室营造了浓厚的科研氛围，也是我一直以来学习的榜样；感谢华珂君、孙鲁欢、张翼、贾佳、和展宝睿，作为同一届的同学，我们一直相互鼓励，一起拥有过许多快乐和美好的回忆；我还要感谢李治斌师弟、郭晓梦师妹和韩庆美师妹，感谢你们对我实验和生活上的支持和帮助，在一开始指导你们实验时，我对你们的要求比较严格，希望你们不要介意；最后感谢张凌霄、刘娇、王安、韩莹、徐迎迎、宋卓琳、冀娇、武师南、陈峙苇、王洁、王新茹以及其他各位师弟师妹们对我的支持和帮助，也感谢你们对我的尊重和信任。最后，希望生物炼制实验室和同学们都能发展地越来越好。