

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

工程硕士学位论文

钠钙金属离子胁迫下的
乳酸片球菌发酵性能研究

韩庆美

指导教师姓名: 鲍杰 教授 华东理工大学

张斌 博士 华东理工大学

张明明 研究员 上海凯赛生物技术股份有限公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物与医药

论文定稿日期: 2024. 5. 24 论文答辩日期: 2024. 5. 30

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 刘文波 高级工程师

评阅人: 万俊芬 副教授

张旭 副教授

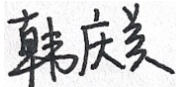
华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

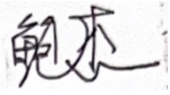
研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名：

2024 年 6 月 2 日

指导教师签名：

2024 年 6 月 3 日

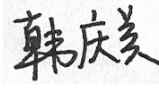
国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作者声明

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

论文作者签名：

2024 年 6 月 2 日

钠钙金属离子胁迫下的乳酸片球菌发酵性能研究

摘要

木质纤维素生物炼制生产纤维素乳酸的过程包括预处理、脱毒、糖化、发酵等多个步骤。发酵过程需添加氢氧化钙或氢氧化钠等碱性化合物中和乳酸代谢产物，从而造成发酵液中 Na^+ 、 Ca^{2+} 等金属离子在发酵液中的富集。高浓度金属离子会抑制乳酸发酵菌株的生长、代谢和乳酸发酵性能。针对这一问题，本文研究了一株重要的乳酸发酵工程菌株乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271 对 Na^+ 、 Ca^{2+} 的耐受性，及其在金属离子胁迫下的手性乳酸发酵性能，为该菌株的代谢工程改造提供金属离子耐受机制方面的依据。

本文第一部分对 *P. acidilactici* ZY271 进行了 Na^+ 耐受性基因的挖掘和测试。首先将前期研究中质粒表达时展现出优异 Na^+ 耐受能力的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因 *RS02775* 整合到 *P. acidilactici* ZY271 的基因组上，得到了一株重组菌株 *P. acidilactici* HN。发现该重组菌株在高浓度 Na^+ 胁迫下并未表现出预期的生长优势或 Na^+ 耐受能力，其发酵过程中糖耗和乳酸产量均有所下降。通过适应性进化，并没有明显改善 *P. acidilactici* HN 的钠离子耐受性。通过测定细胞内外 Na^+ 浓度，发现 *P. acidilactici* HN 有明显的 Na^+ 外排能力。通过 qRT-PCR 分析发现，*P. acidilactici* HN 的 H^+ -ATPase (F_1F_0 -ATPase) 相关基因上调表达明显。进一步推测 H^+ -ATPase 很可能与 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白一起参与了 *P. acidilactici* 对 Na^+ 的外排，后续将通过提高 H^+ -ATPase 的活性提高 *P. acidilactici* Na^+ 的耐受性。

本文的第二部分研究了 Ca^{2+} 对 *P. acidilactici* ZY271 的抑制作用，并尝试对 *P. acidilactici* ZY271 进行高浓度 Ca^{2+} 耐受性改造。首先利用生物炼制中木质素残渣燃烧形成的灰分作为中和剂使用，发现灰分可替换 100% 的碳酸钙和 40% 的氢氧化钙，并在发酵液中形成高浓度 Ca^{2+} 富集。通过 qRT-PCR 分析发现 *P. acidilactici* ZY271 在高浓度 Ca^{2+} 浓度胁迫下，DMT (drug/metabolite transporter) 家族转运蛋白编码基因 *RS00830* 显著上调表达。将该基因整合到 *P. acidilactici* ZY271 后得到重组菌株 *P. acidilactici* HD，并分别在高浓度 Ca^{2+} 、 Na^+ 培养基和麦秆水解液中测试了重组菌株的乳酸发酵性能。结果发现，在高浓度 Ca^{2+} 条件下，*P. acidilactici* HD 的糖代谢和乳酸发酵能力并没有得到明显改善。意外发现在高浓度 Na^+ 发酵条件中，*P. acidilactici* HD 的葡萄糖消耗速率有明显提升。这表明 DMT 家族转运蛋白改善了 *P. acidilactici* 对 Na^+ 的耐受性。在高浓度 Na^+ 的木质纤维素体系，提高 *P. acidilactici* ZY271 的 L-乳酸产量可能需要整合表达 DMT 家族转运蛋白和 L-乳酸脱氢酶。

综上所述，针对手性乳酸发酵菌株在木质纤维素生物炼制过程中的高浓度金属离子胁迫问题，本论文发现 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的整合表达不足以提高 *P. acidilactici* 的 Na^+ 耐受能力，可能还需要 H^+ -ATPase。通过遗传操作发现 DMT 家族转运蛋白能够提高 *P.*

acidilactici 对高浓度 Na^+ 的耐受性。本论文将为乳酸菌在高浓度金属离子胁迫下的生长代谢能力提升提供重要的实验依据。

关键词： 纤维素乳酸； Na^+ ； Ca^{2+} ； Na^+/H^+ 逆向转运蛋白； DMT 转运蛋白； H^+ -ATPase

Study on fermentation performance of *Pediococcus acidilactici* under sodium and calcium ion stress

Abstract

Biorefinery process for production of cellulosic lactic acid includes the multiple steps of pretreatment, detoxification, saccharification and fermentation. Neutralizers used in the fermentation like calcium hydroxide and sodium hydroxide might react with the lactic acid, leading to a high concentration of metal ions, such as Na^+ and Ca^{2+} . Metal ions of high concentrations in lignocellulose hydrolysates negatively affect the activity of lactic acid-producing strains, and thus resulting in decreased fermentation productivity. This study focuses on the tolerance of the engineered lactic acid-producing strain, *Pediococcus acidilactici* ZY271, toward Na^+ and Ca^{2+} stress in L-lactic acid fermentation to provide a basis for the metal ion tolerance for microbial metabolic engineering.

In the first part, the exploration of the Na^+ tolerance gene in *P. acidilactici* ZY271 was studied. First, the Na^+/H^+ antiporter gene *RS02775*, which showed excellent Na^+ efflux ability in plasmid expression, was integrated into *P. acidilactici* ZY271 to obtain a recombinant strain, *P. acidilactici* HN. The results showed that the recombinant strain did not show superiority in cell growth and Na^+ tolerance, but in contrast, the sugar consumption and lactic acid production were decreased. The Na^+ tolerance of *P. acidilactici* HN was not significantly improved by adaptive evolution. By measuring the concentration of Na^+ inside and outside the cell, the results demonstrated that *P. acidilactici* HN had obvious ability of Na^+ efflux. Through qRT-PCR analysis, the expression of H^+ -ATPase-related genes in *P. acidilactici* HN were significantly upregulated. Further speculation suggests that H^+ -ATPase might be involved in Na^+/H^+ antiporter efflux of Na^+ in *P. acidilactici* and the tolerance *P. acidilactici* to Na^+ could be further enhanced by increasing the activity of H^+ -ATPase.

The second part of the thesis aimed to investigate the inhibitory effects of Ca^{2+} on *P. acidilactici* ZY271 and attempt to construct the recombinant strain with improved tolerance to a high concentration of Ca^{2+} . In addition, the investigation of utilizing the ash produced by the combustion of lignin residue in biorefinery as a neutralizer was previously studied. The results demonstrated that the ash could replace 100% calcium carbonate and 40% calcium hydroxide as neutralizers in cellulosic L-lactic acid fermentation. But in contrast, it caused a high amount of Ca^{2+} enrichment in the fermentation broth. We found that *RS00830*, a gene encoding DMT (drug/metabolite transporter) family transporter, was significantly up-regulated in *P. acidilactici* ZY271 cultivated under high Ca^{2+} stress. Afterward, the gene was integrated into the genome of *P. acidilactici* ZY271 to obtain the recombinant strain *P. acidilactici* HD. Moreover, the performance evaluation of the lactic acid fermentation was carried out in high Na^+ and Ca^{2+} -containing MRS medium and wheat straw hydrolysate. The results indicated that *P. acidilactici* HD exhibited no significant improvement in lactic acid accumulation and glucose consumption under high concentrations of Ca^{2+} . While *P.*

acidilactici HD demonstrated an increasing glucose consumption under fermentation cultivation with a high concentration of Na^+ , indicating DMT family transporter improve the tolerance of *P. acidilactici* to Na^+ . In the cellulosic lactic acid refinery with high concentration of Na^+ , L-lactate dehydrogenase might be co-integrated with DMT family transporter to increase the L-lactic acid production of *P. acidilactici* ZY271.

In summary, in order to solve the problem of high concentration metal ion stress of chiral lactic acid fermentation strains in lignocellulose biorefining process. It was found that H^+ -ATPase may be involved in the efflux of *P. acidilactici* to Na^+ and DMT family transporter could improve the tolerance of *P. acidilactici* to high concentration Na^+ . This study will provide an important experimental basis for the improvement of growth and metabolism of lactic acid bacteria under high concentration metal ion stress.

Keywords: Cellulosic lactic acid; Na^+ ; Ca^{2+} ; Na^+/H^+ antiporter; DMT family transporter; H^+ -ATPase

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 木质纤维素生物炼制	1
1.1.1 木质纤维素概述	1
1.1.2 预处理	2
1.1.3 脱毒	3
1.1.4 糖化和发酵	3
1.2 乳酸	4
1.2.1 乳酸概述	4
1.2.2 乳酸生产	5
1.3 金属离子胁迫	7
1.3.1 金属离子胁迫的产生	7
1.3.2 金属离子对微生物的胁迫	7
1.3.3 微生物对金属离子胁迫的抗逆机理	7
1.3.4 典型乳酸发酵菌的 L-乳酸发酵水平	8
1.4 本论文立题依据和主要研究内容	9
第 2 章 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白重组乳酸片球菌的 Na^+ 转运机理研究	11
2.1 引言	11
2.2 材料与方法	11
2.2.1 菌株、培养基及培养条件	11
2.2.2 质粒构建	12
2.2.3 基因敲除与整合	13
2.2.4 胞内和胞外 Na^+ 浓度测定	16
2.2.5 适应性进化	16
2.2.6 单糖与乳酸的分析方法	16
2.2.7 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析	16
2.3 结果与讨论	19
2.3.1 重组菌株 <i>P. acidilactici</i> HN 的构建和发酵能力测试	19
2.3.2 <i>P. acidilactici</i> HN 的适应性进化及进化菌株的发酵能力评价	21
2.3.3 <i>P. acidilactici</i> HN 的 Na^+ 转运能力检测	24
2.3.4 重组菌株 <i>P. acidilactici</i> HN 在不同 pH 条件下的发酵评价	25
2.3.5 <i>P. acidilactici</i> HN 的 H^+ -ATPase 基因转录水平分析	27
2.4 本章小结	29
第 3 章 乳酸片球菌 ZY271 耐受 Na^+ 和 Ca^{2+} 的能力分析及理性改造	30

3.1 引言	30
3.2 材料与方法	30
3.2.1 菌株、培养基及培养条件	30
3.2.2 重组菌株的构建	30
3.2.3 原料、酶与试剂	30
3.2.4 焚烧灰分的制备与元素分析方法	31
3.2.5 干法生物炼制以进行乳酸生产	31
3.2.6 单糖与乳酸的分析方法	31
3.2.7 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析	31
3.3 结果与讨论	33
3.3.1 焚烧灰分作为乳酸发酵中和剂	33
3.3.2 <i>P. acidilactici</i> ZY271 对 Ca ²⁺ 的耐受能力评估	35
3.3.3 挖掘 <i>P. acidilactici</i> ZY271 Ca ²⁺ 外排相关基因	36
3.3.4 <i>P. acidilactici</i> HD 的构建和 Ca ²⁺ 耐受性发酵测试	37
3.3.5 <i>P. acidilactici</i> HD 对 Na ⁺ 的耐受性评估	40
3.3.6 <i>P. acidilactici</i> HD 糖代谢路径相关基因转录水平分析	41
3.3.7 木质纤维素体系下 <i>P. acidilactici</i> HD 对 Na ⁺ 的耐受性评估	42
3.4 本章小结	43
第 4 章 结论与展望	44
4.1 结论	44
4.2 创新点	44
4.3 展望	44
参考文献	46
附录 I 第二章 qRT-PCR 基因分析及引物	56
附录 II 第三章 qRT-PCR 基因分析及引物	57
附录 III 本研究所用主要试剂及来源	59
致谢	60
硕士期间取得成果	61

第 1 章 绪论

1.1 木质纤维素生物炼制

1.1.1 木质纤维素概述

石油、天然气和煤炭这些传统化石资源的开发推动了工业和社会经济的发展,然而,我们必须认识到这些化石燃料是有限的,随着时间的推移这些传统资源将会逐渐枯竭。此外,依赖这些传统资源会不可避免地导致大量温室气体的排放,给自然环境造成了巨大的压力。因此,为了确保资源供应的可持续性,减少环境的负面影响以及发展循环经济和实现“双碳”目标,迫切需要开发新型资源以代替传统化石资源。木质纤维素作为地球上最丰富的可再生资源,可用于制备生物基材料、生物基能源和生物基化学品,是替代石化资源的最佳原料。

木质纤维素主要成分为纤维素(30%-50%)、半纤维素(20%-30%)、木质素(15%-30%)和少量的灰分^[1-3]。其中纤维素由 D-吡喃葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键结合形成同聚多糖,大约 30 个糖链合成一个小纤维(纤丝,原纤丝)单元,之后在氢键和范德华力的共同作用下被包裹成稳固的微纤维,最后聚集形成纤维^[4]。半纤维素含量仅次于纤维素,是异质多聚体,通常由 50~200 个糖单元构成,包含木糖、阿拉伯糖和半乳糖等多种单糖^[5]。在不同种类的木质纤维素原料细胞壁中,半纤维素含量、主链与侧链的类型和长度存在差异。木质素是由对羟基苯基丙烷(H)、愈创木基丙烷(G)和紫丁香基丙烷(S)三种基本结构单元通过醚键或 C-C 连接而成的一种复合有机聚合物,在木质纤维原料中主要充当粘合剂,为植物细胞壁中的次生壁提供机械稳定性、刚性、防水性和抗菌性^[6,7]。纤维素、半纤维素和木质素这三种主要成分之间存在复杂的相互作用,其中纤维素与半纤维素通过氢键连接,木质素则通过化学键与半纤维素形成坚实的木质素-碳水化合物^[8,9]。木质纤维素除了主要的三种结构成分还有少量灰分,灰分指木质纤维素经燃烧过程后剩余的物质,在植物生长、收获和收集过程中从环境中积累的土壤灰分称为吸附灰,是预处理过程中和酸催化剂的主要原因。在植物生长过程中融入植物的矿物质和植物中产生的灰分称之为结构性灰分,如植物生长期间从土壤吸收的钾、磷、钙和镁等。不同植物类型的结构灰分含量和化学组成差异显著。这些成分共同构成了木质纤维素的复杂结构,赋予了其坚韧性和稳定性。木质纤维素生物炼制是指将价格低廉的木质纤维素转化为高附加值的生物基产品的过程,主要包括预处理、脱毒、糖化和发酵等步骤^[10-13]。

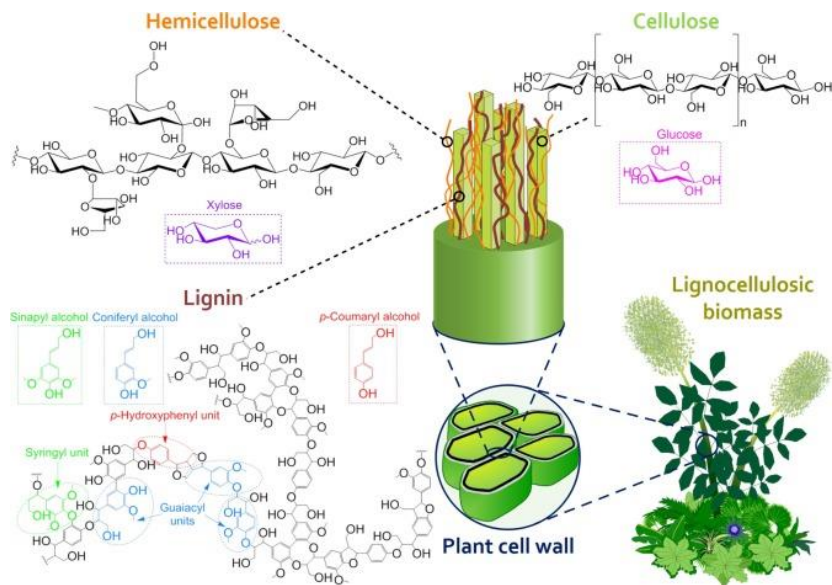


图 1.1 木质纤维素主要组分和结构示意图^[14]

Fig. 1.1 Diagram of main components and structure of lignocellulose^[14]

1.1.2 预处理

木质纤维素原料因其强大的抗降解屏障，导致后续的酶水解能力十分有限^[15, 16]，因此，预处理旨在破坏木质纤维原料的致密结构，促进生物催化剂与原料中的纤维素接触，以提高木质纤维素原料的可利用性^[17]。工业应用前景较好的预处理方法应具备以下特点^[18]：（1）能够有效地解离纤维素、半纤维素和木质素，实现高效的酶水解；（2）在预处理过程中，纤维素和半纤维素的损失较少，回收率较高；（3）预处理过程中产生的发酵抑制物较少，不会对后续发酵过程造成不利影响；（4）该预处理方法应具备清洁、安全的特点，满足环保和安全要求。

目前，针对木质纤维素的预处理方法主要可分为四种^[19, 20]：物理法、化学法、物理化学法和生物法。物理法可通过破坏细胞壁，减小纤维素粒径，并增加表面积孔径，降低纤维素结晶度与聚合度，促进表面蜡质结构与细胞壁分离，提高酶解效率^[21]。常见的操作包括磨碎、粉碎、压缩和振荡等，物理法预处理由于存在能耗高、预处理效果不理想等问题，通常不会单独使用，而是用作其他预处理方法的前处理手段，或者作为化学预处理的附属手段。化学方法致力于通过破坏木质纤维素内部结构和纤维素与木质素之间的化学键，使其更容易被水解酶吸附和水解^[22]。化学预处理较为普遍，包括碱法、酸法、有机溶剂法、水热法以及新型方法（如离子液体和低共熔溶剂法（Deep Eutectic Solvents, DES）。碱法预处理时间相对较长，通常消耗大量的水来洗涤，存在成本高，试剂废液回收难等问题。酸法应用频率较高且效果好，可以破坏木质素、溶出半纤维素，有效降低木质纤维素的结晶度，使其更容易被生物酶降解^[23, 24]。但是存在一些缺点，如酸用量比较大；纤维素降解严重，导致生成的己糖和戊糖进一步被分解，转化为糠醛和羟甲基糠醛等抑制物，这些抑制物会对后续的酶解过程和微生物发酵产生明显的抑制作用，从而影响整个纤维素降解和转化过程的效率；易造成设备严重腐蚀，对反应设备的

要求较高,不适合工业化推广应用等^[25]。水热预处理的效果与木质纤维素原料的种类相关,有些原料无法单独使用水热预处理,需要与其他预处理方法联合使用^[26]。物理化学法是结合化学、物理作用破坏木质素原料的细胞壁结构,从而提高纤维素酶的可及性的方法,蒸汽爆破是常用的物理化学法,具有成本低、污染少等特性,但是也存在不足,如部分木糖会被降解成为抑制微生物生长的物质,对设备要求较高等。生物法则是通过利用微生物或酶来将木质纤维素原料中的木质素氧化并碎片化,而对碳水化合物几乎没有降解作用,是实现木质素与纤维素、半纤维素的有效分离的方法。常见的微生物包括白腐菌、褐腐菌等,这些微生物可以产生锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和漆酶等过氧化物酶类^[22]。但是利用生物法进行预处理存在微生物产生的酶活力低、反应周期较长等问题,不太适合工业应用^[27]。

本实验室于2011年研究开发出干式稀酸预处理技术^[28],该技术采用高固液比(1:2)将秸秆与稀硫酸在装有螺带搅拌桨的反应器中混合,显著降低了水用量(90%)和蒸汽用量,实现了废水的零排放。更重要的是,该技术还能有效保留预处理过程中释放出的木糖,极大地提升了干法酸预处理技术在工业应用中的前景与潜力。

1.1.3 脱毒

经过高温高压的预处理后,木质纤维素结构被破坏,同时会产生大量有害的抑制物,如糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸和酚类等^[29]。这些抑制物会降低后续发酵微生物的活性,严重影响最终生物基产品的产量^[30]。因此,要实现木质纤维素生物物质的高效转化,必须采用适当的方法将抑制物去除。

脱毒处理是解决抑制物含量过高的关键环节。传统的脱毒方法包括水洗^[31]、碱法脱毒^[32]、活性炭吸附^[33]等。碱法脱毒存在碱用量较大,同时还会造成部分糖的损失^[29]。水洗可以有效去除预处理后物料中的抑制物,但会产生大量难以处理的酸性废水污染环境,并造成木糖的大量损失。活性炭吸附能去除呋喃类和酚类抑制物,但是需要经过固液分离操作,并存在可发酵性糖损失的弊端^[34, 35]。相比之下,生物脱毒作为一种新型脱毒方式利用微生物产生的酶降解或转化抑制物达到去除抑制物的目的^[36],具有成本低、反应条件温和且不涉及有毒有害化合物等优点,逐渐成为研究的热门课题。实验室前期筛选得到两株脱毒菌株树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1^[37]和宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89^[38],这两种微生物都具有强大的脱毒能力,特别是在低 pH 环境和高温条件下, *P. variotii* FN89 表现出更强的耐受性,而且 *P. variotii* FN89 除了适用于传统的固态脱毒,更是可以有效应用于液态脱毒过程。液态脱毒相比于固态脱毒具有耗时短、易控制、最大限度保留可发酵单糖等优点。

1.1.4 糖化和发酵

预处理和脱毒后的木质纤维素主要以纤维素和半纤维素的形式存在,但是目前为止几乎没有微生物可以直接代谢纤维素和半纤维素生产生物化学品。因此,纤维素和半纤维素必须经过进一步降解成为可发酵性单糖才能进行微生物发酵生产。常用的方法是化学水解法^[39]和酶水解法^[40]。化学水解法是通过添加酸性或碱性试剂将纤维素和半纤维素

转化为单糖,但是因酸碱的腐蚀,对反应设备要求较高。相比化学水解法,酶水解法具有产量高、反应温和、能耗低、设备要求低等优势^[41]。酶水解法所用的酶是纤维素酶和半纤维素酶。纤维素酶是一组酶的总称,其作用是将纤维素降解为葡萄糖。纤维素酶系由外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶组成,其在温和条件下发挥协同效应。内切葡聚糖酶可用于切断 β -1,4-糖苷键,释放出各种长度的短链低聚糖。外切葡聚糖酶继续分解这些短链低聚糖,将其转化为纤维二糖。最后, β -葡聚糖苷酶将纤维二糖进一步分解成葡萄糖,完成整个纤维素降解为葡萄糖的转化过程^[42]。半纤维素酶种类很多,通常有 β -木糖苷酶、 β -甘露糖酶、内切 β -1,4-木聚糖酶、 β -葡萄糖醛酸酶和 α -L-阿拉伯糖苷酶等^[43]。

木质纤维素生物炼制过程的糖化和发酵阶段分为分步糖化与发酵(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)^[44]、同步糖化与发酵(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)^[45]和同步糖化和共发酵(Simultaneous Saccharification and Cofermentation, SSCF)^[46]。SHF是糖化和发酵分开的过程,首先在经过预处理和脱毒过程的物料中加入纤维素酶以得到可发酵单糖,然后将糖化液加入到发酵体系中进行发酵,这种方法的优势在于,糖化和发酵都可以在其各自的最佳条件下进行^[47],但是随着糖化产物的积累,如葡萄糖和木糖等,它们可能会抑制纤维素酶的酶解效率,并影响微生物的发酵性能^[48, 49]。SSF是在一个容器中同时进行糖化和发酵,经过纤维素酶处理的可发酵单糖立即被微生物发酵利用,消除了糖积累对纤维素酶的抑制作用^[50]。SSCF是在SSF的基础上,利用能够同时代谢己糖和戊糖的共发酵菌株,实现了酶解与发酵的同步进行。这种方式显著提高了底物的转化率,使得整个生物转化过程更为高效。本研究采用SSCF模式进行木质纤维素乳酸发酵,能够使其在酶的催化下水解为含有葡萄糖、木糖和不溶性木质素的液态浆液,同时,菌体及时代谢各种糖类以提高发酵效率^[46]。

1.2 乳酸

1.2.1 乳酸概述

乳酸的分子式为 $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$,也称为 α -羟基丙酸(CAS 50-21-5),是最常见的羟基羧酸之一^[51]。外观呈现无色澄清或微黄色的粘性液体,几乎无臭,味微酸,广泛应用于食品、医药和化妆品等领域^[52, 53]。乳酸存在D型和L型两种形式,在生物体的代谢过程中,它们分别由DLDH(D-乳酸脱氢酶)和LLDH(L-乳酸脱氢酶)催化丙酮酸转化而来^[54, 55]。由于人体具备代谢L-乳酸的能力,但无法代谢D-乳酸^[56],因此L-乳酸的应用需求更为广泛。在工业应用中,高纯度的手性乳酸聚合成的聚乳酸无论是耐热性能还是力学性能均比混合型聚乳酸高。因此,手性乳酸的价值要远远大于D, L-混合型乳酸。

聚乳酸(PLA),又称聚丙交酯,是由多个乳酸单体间的羟基(-OH)和羧基(-COOH)缩水聚合所得。常见的合成聚乳酸的方法包括直接缩聚、共沸脱水、丙交酯开环聚合以及微生物发酵。聚乳酸材料使用后,在土壤中或水中可被微生物降解成二氧化碳和水,

可以有效减少垃圾的堆积,所以不会对周围环境产生污染,更利于环保,并能有效缓解由石油基化学品生产所带来的白色污染问题。聚乳酸在包装行业中因其优良的拉伸性能可被制作为各种塑料制品,如可作为一次性器皿和食品包装的主要材料等;在农业中因其可降解性可用作地膜、渔网等,在医学领域以它能被人体内迅速分解、对身体无毒的优点,可制成免拆手术缝合线、人造皮肤等。常见的合成聚乳酸的方法包括直接缩聚法、共沸脱水缩聚法、丙交酯开环聚合法以及微生物发酵法。直接缩聚法是在高温真空环境中通过脱水剂和催化剂促使乳酸分子间的羟基和羧基脱水缩合形成聚乳酸。丙交酯开环聚合法是首先将乳酸缩聚得到低聚物,再进行乳酸内酯交换反应形成环状二聚体丙交酯,最后经过提纯和引发剂的催化得到聚丙交酯,从而制备高分子量的聚乳酸。共沸脱水缩聚法无需额外添加扩链剂,即可获得高分子量的聚乳酸^[57]。微生物发酵法是利用经过基因工程改造的微生物直接发酵生产聚乳酸,但是产率较低,无法得到大规模应用。随着各国环保法规的加强和国际社会对减少碳排放的关注,聚乳酸作为一种环保材料,其市场需求有望持续增长^[58]。

1.2.2 乳酸生产

目前工业生产乳酸的方法主要有合成法和发酵法^[42]。合成方法制备乳酸有乳腈法、丙烯腈法和丙酸法^[59]。乳腈法是将乳腈、硫酸和水按一定比例在反应釜中混合,乳腈发生水解成为粗乳酸,加入乙醇使其酯化,经过精馏、浓缩以及分解处理得到精乳酸^[60]。丙烯腈法是丙烯腈与硫酸反应后经过分离、水解得到稀乳酸。丙酸法是丙酸经过氯化、水解后得到乳酸。这三种技术都能实现大规模乳酸生产,但使用的原材料多具有毒性且成本较高,而且产生的是混合手性的乳酸^[61],应用价值较低。

微生物生产乳酸是微生物利用葡萄糖等可发酵糖类代谢产生乳酸的方法。这一过程可分为同型乳酸发酵和异型乳酸发酵两大类。在同型乳酸发酵中,微生物主要依赖 EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) 途径来转化葡萄糖,最终仅生成乳酸这一种代谢产物。理论上,每 1 mol 的葡萄糖可以完全转化为 2 mol 的乳酸,从而实现 100%的理论转化率。然而,在微生物发酵的实际生产过程中,由于微生物会进行一系列其他生理活动,乳酸的转化率往往能达到 80%以上,即可视为同型乳酸发酵^[62]。对于异型乳酸发酵来说,微生物通过 HMP (Hexose Monophosphate Pathway) 途径来转化葡萄糖生成乳酸,同时还伴随产生乙醇、乙酸和二氧化碳等多种副产物。发酵法作为乳酸生产的一种重要方法,由于其工艺相对简单、原料供应充足且发展历史悠久,已经发展成相当成熟的技术。而且发酵法可以利用可再生的生物质作为原料,这不仅有利于资源的循环利用,还符合绿色、可持续的生产理念。此外,通过发酵法生产的乳酸通常具有高手性度,能够满足不同领域对乳酸品质的需求^[63]。因此,微生物发酵法相较于化学合成法更具发展前景,可作为一种更有利的手性乳酸生产方式^[64]。

在产酸菌种的选取中,需考虑生产成本的高低和乳酸产品的质量。因此,选取产酸速率快、糖酸转化率高,同时副产物产量少的高效菌种,不仅能够保证生产成本的控制,同时也能保证产品的质量。为此,产酸菌种选择的主要标准是:生产原料廉价,培养基

要求简单；操作工艺简便、安全性高；发酵周期短；产酸速率快，糖酸转化率高；产品副产物少。野生型菌株只有极少部分可以生产纯 L/D-LA，如 Bernardo 等^[65]在工业废水中分离出鼠李糖乳杆菌 B103，经 pH 调控发酵可获得最高产量为 143.7 g/L 的 L-乳酸。然而目前多数生产乳酸的野生菌株在实际应用中需要进行基因改造才能生产出高浓度的手性乳酸。在乳酸生产菌株中，主要有细菌和真菌两大类微生物，包括米根霉等丝状真菌^[66]、酵母^[67]、大肠杆菌^[68]以及乳酸菌^[69]。

米根霉是一种好氧菌，因其可以进行生产 L-乳酸而受到广泛关注。米根霉有发达的菌丝，可在发酵体系中形成菌丝小体，易于与产物分离，可得到高效的乳酸产品。而且其对营养要求简单，可以直接利用大多数淀粉质物料和木质纤维素原料，Park 等^[70]对废纸进行酶水解，将得到的产物作为发酵原料，原料中含有大量的葡萄糖、木糖和纤维二糖，发酵 4 天，米根霉生产的 L-乳酸产量为 49.1 g/L。但是米根霉发酵生产 L-乳酸有一些局限性，作为好氧真菌，米根霉在发酵时需要通气、无菌要求高，产量低于乳酸菌，发达的菌体形态对乳酸发酵有较大影响，而且会产生多种副产物，如酒精、琥珀酸、苹果酸等，乳酸主产物生成速率缓慢。

酵母因具有完善的基因表达调控机制、适宜进行高密度培养以及相对耐受低 pH 等特点而受到大家的青睐^[71]。酵母自身并没有 LDH，所以需要通过代谢工程方式表达外源的 LDH，使其能够生产 L-乳酸。Ilmen 等^[72]运用基因工程技术在假丝酵母中加入瑞士乳杆菌所提供的 L-乳酸脱氢酶后 L-乳酸转化率提高到 94%。Nobuhiro 等^[73]通过整合表达策略将来源于牛的 *ldh* 整合到酿酒酵母中，得到的 *ldh* 双拷贝菌株乳酸产量达到 55.6 g/L，L-乳酸对葡萄糖的产率为 0.625 g/g。

乳酸菌包括德式乳杆菌^[74]*Lactobacillus delbrueckii*、干酪乳杆菌^[75]*Lactobacillus casei* 和鼠李糖乳杆菌^[76]*Lactobacillus rhamnosus* 等，可用于 L-乳酸发酵生产。通常利用物理诱变的方式提高乳酸菌生产乳酸的能力，如 Adsul 等^[77]利用紫外诱变获得 UC-3 德式乳杆菌突变株，其 L-乳酸积累量达 90 g/L，产酸速率为 2.25 g/(L·h)。Li 等^[78]对 CICC6028 干酪乳杆菌进行氮离子注入突变，乳酸产量增加了 38.8%。但是物理诱变具有不确定性，难以准确得到改造菌株。有研究者通过理性改造提高乳酸菌的乳酸产量，Shen 等^[79]敲除植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (CAUH2-1) 中编码 D-乳酸合成的基因后，得到的工程菌株可以利用葡萄渣生产 L-乳酸，其光学纯度最高为 99.61%。Shinkawa 等^[80]在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* IL 1403 中引入木糖代谢途径，菌株可以利用木糖产生 50.1 g/L L-乳酸，光学纯度高达 99.6%，产率高达 1.58 mol/mol。

本实验室前期分离出了一株可在木质纤维素体系中高产乳酸的乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2，其具有耐受高温和高木质纤维素抑制物的特性^[81]，但是该野生菌同时生产 D-乳酸和 L-乳酸，利用价值较低。因此通过基因工程改造，分别敲除编码 D-乳酸的 *ldhD* 基因和编码 L-乳酸的 *ldhL* 基因，得到了只生产 L-乳酸的乳酸片球菌 *P. acidilactici* TY112 和只生产 D-乳酸的乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZP26^[82]。然而，这两种菌株无法有效利用木质纤维素中的大量木糖（约占总糖 30%）。因此在 *P. acidilactici*

TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 中分别引入木糖代谢途径, 得到的工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* ZY15 能够利用木糖积累高浓度的乳酸^[83]。而其中 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 用玉米秸秆进行发酵生产可以得到 130 g/L 的乳酸, 光学纯度高于 99%。

1.3 金属离子胁迫

1.3.1 金属离子胁迫的产生

木质纤维素乳酸生产过程中, 发酵时添加的氢氧化钙或氢氧化钠等中和剂, 会导致发酵环境中累积大量的 Na^+ 、 Ca^{2+} 等金属离子。高浓度的金属离子会抑制发酵菌株的生长、代谢, 进而降低乳酸产量。因此, 提高发酵菌株的 Na^+ 、 Ca^{2+} 抗逆性实现高浓度 Na^+ 、 Ca^{2+} 条件下的乳酸发酵具有重要意义。

1.3.2 金属离子对微生物的胁迫

金属离子对菌株的生长至关重要, 起着多种作用。 K^+ 在促进碳水化合物的新陈代谢方面发挥着重要作用; Mg^{2+} 作为众多酶的催化剂, 参与着复杂的生物化学反应; Na^+ 与细胞渗透调节和电解质平衡有关, 对于维持细胞的正常生理功能至关重要; Ca^{2+} 不仅在细胞内起信号传导和调节的关键作用, 还是某些酶的激活剂, 推动着各种生物化学反应的顺利进行^[84]。然而, 金属离子浓度过高会对微生物造成抑制, 如 Na^+ 浓度过高会增加环境的渗透压, 导致水分从微生物细胞内流向外部, 对细胞膜造成压力, 并且会改变细胞膜的电位, 抑制微生物的正常生长和代谢。Wang 等^[85] 研究发现, 过量的 Na^+ 可能导致黑曲霉 *Aspergillus niger* 分泌的葡萄糖淀粉酶和异麦芽糖酶活性降低, 导致糖的消耗速率和柠檬酸的产量减少。高浓度的 Ca^{2+} 会造成细胞内酶的活性改变和氧化应激增加等后果, 导致细胞死亡。华玉涛等人^[86] 研究发现, Ca^{2+} 超过 0.1 mol/L 可能减弱热带假丝酵母 *Candida tropicalis* CT1-12 细胞的增殖并抑制生长。

1.3.3 微生物对金属离子胁迫的抗逆机理

在木质纤维素乳酸生产过程中 Na^+ 和 Ca^{2+} 是富集的两种主要金属离子, 这两种金属离子对于发酵微生物的损伤很大, 而微生物会通过一些响应来应对高浓度的 Na^+ 或 Ca^{2+} 胁迫。

生物体需要 Na^+ 排出系统来维持胞内稳定适宜的 Na^+ 浓度。 Na^+ 泵广泛存在于生物系统中, 这些膜离子泵不断的将 Na^+ 泵出, 维持细胞膜内稳定的 Na^+ 浓度, 其中具有与代表性的是 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 它能够以跨膜的质子电化学梯度为动力, 催化胞内 Na^+ 泵出^[87]。 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白分为几个家族: 原核生物中的 NhaA、NhaB、NhaC、NhaD 和 NapA, 真菌中的 SOD 2 和 Nha 1, 以及拟南芥中的 AtNHX 1 和 SOS 1。其中, *E.coli* NhaA 已被广泛研究, 它在维持细胞 pH 和 Na^+ 稳态中起主要作用^[88]。此外, 嗜盐或嗜碱等极端微生物因膜系统具有较强的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性, 所以能在高 Na^+ 环境下生长^[89]。在烟草细胞中异源表达嗜碱菌 *Alkalimonas amylolytica* Na^+/H^+ 逆向转运蛋白后, 显著提高转基因植物在盐碱土壤中的生长能力^[90]; 在水稻中异源表达大肠杆菌 NhaA Na^+/H^+ 逆向转运蛋白后, 同样明显增强转基因水稻的耐盐和耐旱特性, 有效提高农作物

产量^[91];在 *Zymomonas mobilis* ZM4 中过表达内源 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZMO0119*, 显著提高了菌体生长与乙醇发酵能力^[92]。过表达 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白可有效提高生物体的 Na^+ 耐受能力。但是, 目前通过基因工程提高乳酸菌 Na^+ 耐受能力的研究还较少。

Ca^{2+} 稳态对维持生物体正常生长至关重要, 细胞内 Ca^{2+} 浓度通常比周围环境低许多倍, 原因是细胞中的 Ca^{2+} 外排蛋白和摄取系统协同作用^[93, 94]。关于 Ca^{2+} 摄取的分子机制研究很少, 并且仅限于 Ca^{2+} 通道。 Ca^{2+} 外排蛋白研究较多的是阳离子/ Ca^{2+} (CaCA) 超家族, CaCA 交换蛋白使用阳离子物质 (Na^+ 、 H^+ 、 K^+) 的逆向电化学梯度来进行 Ca^{2+} 转运。它包括五个家族: NCX (K^+ 非依赖性 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白)、NCKX (K^+ 依赖性 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白)、CAX (H^+ /阳离子交换蛋白) 和 CCX (阳离子/ Ca^{2+} 交换蛋白) 和 YRBG 家族^[95, 96]。目前关于提高微生物 Ca^{2+} 耐受的研究主要集中在过表达 Ca^{2+} 外排蛋白上。如在 *E. coli* 中过表达 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白 (*chaA*) 可提高重组菌株对 Ca^{2+} 的抗性^[97]。在拟南芥中过表达 TuCAX 1a 和 TuCAX 1b (两种 CAXs 蛋白) 能够提高转基因植物对外源 Ca^{2+} 的耐受性^[98]; 在酵母中过表达水稻的阳离子/ H^+ 交换蛋白可赋予重组菌株钙耐受性^[99]。但是根据目前 *P. acidilactici* ZY271 的全基因组测序结果来看, 并没有发现有关的 CaCA 基因注释, 所以需要挖掘其他转运 Ca^{2+} 的蛋白。除了常见的 CaCA 超家族, 还有其他类别的转运蛋白可以转运 Ca^{2+} 。Milena 等^[100]发现在耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* 中过表达结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的 P-type ATPase CtpF 编码基因 *Rv1997* 可以明显提高菌株的 Ca^{2+} 外排能力, 防止胞内 Ca^{2+} 积累。Manita 等^[101]发现铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 能够在外部 Ca^{2+} 为毫摩尔水平的的情况下维持细胞内 Ca^{2+} 为亚微摩尔水平, 说明细胞存在转运能够泵出过量的 Ca^{2+} 以维持稳态, 当分别敲除编码 metal-transporting P-type ATPase 的基因 *PA3690*、编码 Mg^{2+} transport ATPase 的基因 *PA4825* 和编码 cation-transporting P-type ATPase 的 *PA1429* 基因, 细胞将不再有外排 Ca^{2+} 的作用, 说明这几个基因编码的蛋白有外排 Ca^{2+} 的能力。Schaedler 等^[102]研究发现乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 中的多药转运蛋白 LmrP 对 Ca^{2+} 有高的选择性, 可以外排 Ca^{2+} , LmrP 可以作为 calcium/proton 逆向转运蛋白起作用。

1.3.4 典型乳酸发酵菌的 L-乳酸发酵水平

目前利用氢氧化钠调节 pH 生产 L-乳酸的菌株主要有芽孢杆菌、乳酸菌和酵母, 这些菌株生产的 L-乳酸浓度较低 (24.02-103.00 g/L) (见表 1)。本实验室构建的 *P. acidilactici* ZY271 可以生产 114.30 ± 0.90 g/L L-乳酸。

表 1 典型乳酸发酵菌的 L-乳酸发酵水平

Table 1 L-lactic acid levels by lactic acid bacteria strains

Strains	L-LA (g/L)	Yield	Sources
<i>Bacillus coagulans</i> DSM1	80.00	ND	[103]
<i>Bacillus</i> sp. 2-6	100.00	ND	[104]
<i>Enterococcus faecium</i> QU 50	47.20–50.50	1.00–1.03 ^a	[105]
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> NRRL-B445	89.20	1.7 ^a	[106]
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG18011	48.70	1.11 ^a	[107]
<i>Lactococcus lactis</i> IO-1	24.02	ND	[108]
<i>Lactobacillus</i> sp. MKT-878	80.00	99% ^b	[109]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YKX071	103.00	ND	[110]
<i>P. acidilactici</i> ZY271	114.30 ± 0.90	74.70 ± 1.30% ^b	[111]

a 表示转化率 (g/g)；b 表示得率；ND 表示未检测

1.4 本论文立题依据和主要研究内容

乳酸发酵菌株在木质纤维素生物炼制过程中会遭受到 Na^+ 和 Ca^{2+} 两种主要金属离子的胁迫。这些 Na^+ 和 Ca^{2+} 主要来源于微生物发酵过程中用于调节 pH 值的氢氧化钠或氢氧化钙碱性试剂。 Na^+ 和 Ca^{2+} 超过一定浓度后将显著抑制发酵细胞的活性，从而阻碍高效的发酵过程，这是制约木质纤维素乳酸发酵生产的关键问题。本论文通过基因工程手段对乳酸发酵菌株进行改造，并测试其在高浓度 Na^+ 和 Ca^{2+} 金属离子胁迫下的发酵性能。具体而言，本研究通过以下两方面工作展开：

(1) 探究整合有 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的 *P. acidilactici* ZY271 重组菌株在高浓度 Na^+ 胁迫下的发酵性能。将 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因 *RS02775* 整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组中，并在高浓度 Na^+ 环境下进行了发酵测试，结合菌株胞内外 Na^+ 浓度及 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白相关联的 H^+ -ATPase 转录水平，对 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白外排 Na^+ 过程进行了分析。并通过适应性进化策略提高重组菌株的 Na^+ 耐受能力。

(2) 通过理性改造提高 *P. acidilactici* 的 Ca^{2+} 耐受能力和纤维素乳酸发酵性能。首先对 *P. acidilactici* ZY271 中的 Ca^{2+} 外排基因进行挖掘，通过 qRT-PCR 分析 *P. acidilactici* ZY271 在高浓度 Ca^{2+} 发酵环境中上调表达明显的基因。通过同源重组将其整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组上得到重组菌株，探究其在高浓度 Ca^{2+} 和 Na^+ 条件下的发酵性能并对糖代谢相关基因进行转录水平分析。

技术路线如下图所示：

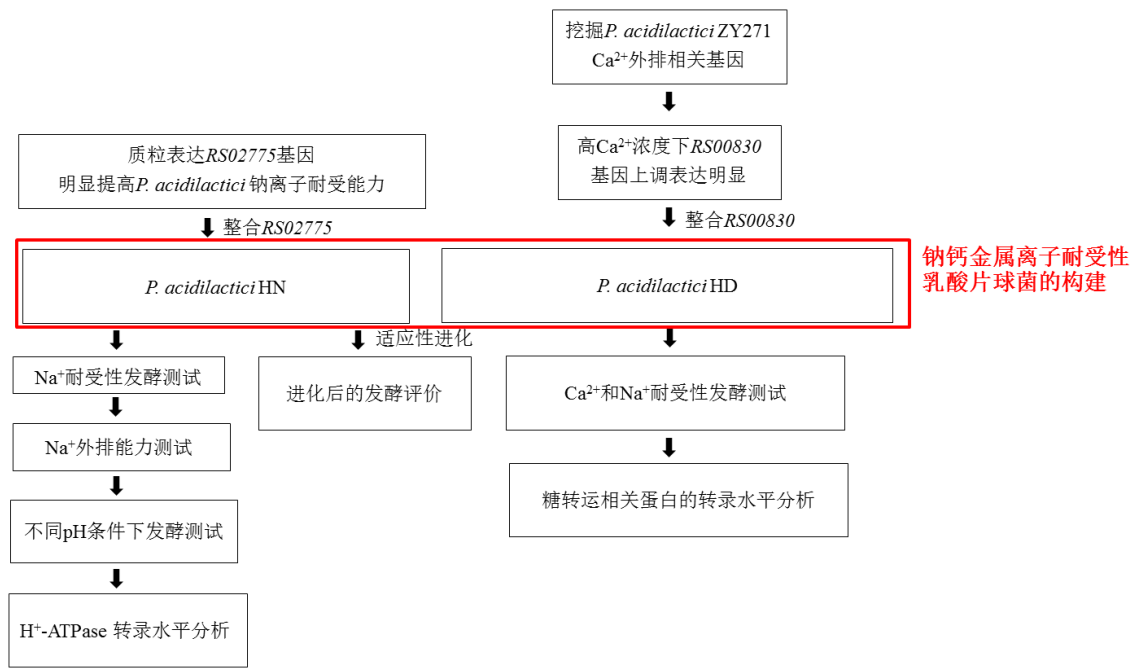


图 1.2 技术路线图

Fig 1.2 Technical Route

第2章 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白重组乳酸片球菌的 Na⁺转运机理研究

2.1 引言

微生物发酵生产乳酸时,大量的乳酸使得发酵液 pH 下降。当 pH 值低于 pKa(3.86) 时,游离的乳酸透过细胞膜进入菌体胞内,在胞内解离出 H⁺。游离的 H⁺会降低胞内 pH。因此为维持发酵菌株适宜的 pH,在乳酸发酵过程中需要添加大量的 NaOH 中和剂,这会导致高浓度 Na⁺的累积,对生物体造成渗透压胁迫,从而抑制菌体的生长和代谢。提高菌株的 Na⁺耐受性,能够有效改善其在高浓度 Na⁺条件下的乳酸发酵能力。

目前,通常利用 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白促进 Na⁺由胞内向胞外转运,从而缓解 Na⁺对生物体生长的抑制作用。相关研究表明,在植物中过表达 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白可提高转基因植物的耐盐性^[91, 92]。在微生物如运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* ZM4 中过表达 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白可提高菌株在高浓度 Na⁺发酵环境中的乙醇发酵能力^[93]。在 *P. acidilactici* 中过表达 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的 RS02775 基因可明显提高菌株的 Na⁺耐受性^[112]。但是目前基本没有整合表达 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白从而提高 *P. acidilactici* Na⁺耐受性的研究。

因此,本研究通过在 *P. acidilactici* ZY271 基因组上整合 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白编码基因 RS02775 以获得不含质粒、具有稳定遗传能力的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* HN。重组菌株在高浓度 Na⁺条件下的糖代谢和乳酸产量出现下降,通过适应性进化调整其代谢网络并没有明显改善代谢下降的情况。通过测定胞内外 Na⁺浓度,发现 *P. acidilactici* HN 在发酵前期表现出明显的 Na⁺外排能力,另外对 *P. acidilactici* HN 在高浓度 Na⁺条件下的 H⁺-ATPase 转录水平分析,发现 H⁺-ATPase 相关基因上调表达,即 H⁺-ATPase 响应 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白造成的胞内 H⁺累积。本研究将 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白在 *P. acidilactici* ZY271 中进行整合表达,没有实现预想的 *P. acidilactici* ZY271 对 Na⁺的耐受性,提出了 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白需要与 H⁺-ATPase 共同作用才能发挥作用的猜想,还需要后续进一步的研究。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株、培养基及培养条件

乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 (CGMCC13612) 培养于 MRS 培养基,培养条件为转速 150 rpm,温度设置为 42 °C。质粒 pSET4E 用于目的基因在 *P. acidilactici* ZY271 基因组上的整合,可通过在 MRS 培养基中加入 5 μg/mL 的红霉素进行重组菌株的筛选。

Escherichia coli XLI-blue 用于质粒的构建,在 LB 培养基中培养,培养条件为 200 rpm, 37 °C。对于携带 pSET4E 质粒的 *E. coli* XLI-blue 的培养,是在 LB 培养基中添加终浓度为 200 μg/mL 红霉素。

本实验所使用的培养基:

- (1) LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl

(2) 简化 MRS 培养基: 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母粉, 5 g/L NaAc (无水), 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 20 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.58 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 固体培养基则需要额外添加 20 g/L 琼脂粉。分子 MRS 需要额外添加 8 g 牛肉膏和 1 mL Tween 80。

(3) PDA 培养基: 首先将 200 g 土豆进行剥皮并切碎, 随后将其放入 1 L 去离子水中煮沸, 持续加热 30 min。之后, 使用纱布对煮沸后的混合物进行过滤, 以获取澄清的上清液。接着, 向上清液中加入 20 g 葡萄糖和 15 g 琼脂, 并继续添加去离子水至总体积达到 1 L。

电泳试剂配制:

(1) TBE 缓冲液 (10 \times): 55 g 硼酸, 40 mL 乙二胺四二酸 (EDTA), 108 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 用去离子水定容至 1 L, 超声溶解, 避光保存。

(2) TBE 缓冲液 (1 \times): 取 10 \times TBE 缓冲液稀释可得。

(3) 琼脂糖凝胶 (1.2%): 准确称取 1.2 g 琼脂糖粉末加入 100 mL 1 \times TBE 缓冲液中, 再加入 10 μ L 核酸染料。最后, 使用微波加热, 直至琼脂糖完全溶解并与试剂混合均匀。

电转化试剂配制:

(1) 缓冲液 I: 首先, 准确称取 205.4 g 蔗糖、1.86 g $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ (磷酸钾三水合物) 和 0.2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (氯化镁六水合物) 加入足够的去离子水中, 并搅拌至完全溶解后定容至 1 L。然后, 加入适量的浓盐酸, 小心调节溶液的 pH 值至 7.5。

(2) 缓冲液 II: 准确称取 171.15 g 蔗糖, 用量筒量取 100 mL 甘油, 加入去离子水定容至 1 L。

(3) 复苏液: 在 1 LMRS 中加入 171.15 g 蔗糖。

(4) Tris-HCl (10 mM): 121 mg 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶于少量去离子水, 定容至 100 mL, 加入浓盐酸调节 pH 至 8.0。

(5) 溶菌酶母液 (1mg/mL): 准确称取 1 mg 溶菌酶, 用移液枪吸取 1 mL Tris-HCl 缓冲液进行混合。为了去除溶液中的微生物, 使用规格为 0.22 μ m 的滤膜对混合液进行过滤除菌处理。

(6) D/L-苏氨酸 (40 mM): 准确称取 476 mg D/L-苏氨酸, 接着, 加入 5 mL 去离子水并进行超声处理, 以促使 D/L-苏氨酸充分溶解。使用规格为 0.22 μ m 的滤膜对混合液进行过滤除菌处理。

(7) 红霉素 (50 mg/mL): 准确称取红霉素粉末 250 mg。接着, 加入 5 mL 无水乙醇并进行充分搅拌。之后, 使用规格为 0.22 μ m 的滤膜对混合液进行过滤以去除杂质和微生物。最后, 将制备好的红霉素溶液置于 -20 $^{\circ}$ C 的低温环境中, 并确保避光保存, 以防止溶液变质或失去活性。

2.2.2 质粒构建

本章所使用的质粒、引物见表 2.1。使用试剂盒提取 *P. acidilactici* DSM 20284 和 *P.*

acidilactici ZP26 的基因组, 以其为模板扩增得到所需基因 *RS02775* 和 *PldhD* 启动子。通过部分敲除 *P. acidilactici* ZY271 基因组上的 *ackA3* 基因, 将 *RS02775* 整合到基因组上。

乙酸激酶 *ackA3* 基因敲除质粒构建如下: 以 *P. acidilactici* ZY271 基因组为模板, 以 *ackA3*-up-F/R 为引物, 扩增 *ackA3* 基因的上游约 800 bp 片段 (up-*ackA3*), 利用引物 *ackA3*-down-F/R 扩增 *ackA3* 基因下游约 800 bp 片段 (down-*ackA3*), 将 up-*ackA3* 和 down-*ackA3* 融合后插入到 pSET4E 质粒的 *Bam*H I /*Xba* I 位点, 得到用于 *ackA3* 基因敲除的质粒 pSET4E- Δ *ackA3*。

RS02775 整合至 *ackA3* 位点的整合质粒构建如下: 利用引物 *RS02775*-F/R 以 *P. acidilactici* DSM 20284 基因组为模板扩增 *RS02775* 基因, 以 *P. acidilactici* ZP26 基因组为模板利用引物 *PldhD*-F/R, 扩增 *PldhD* 启动子。将 *PldhD* 和 *RS02775* 融合后连接至 pSET4E- Δ *ackA3* 的 *Bam*H I /*Xho* I 位点之间, 得到整合质粒 pSET4E- Δ *ackA3*::*RS02775*。

2.2.3 基因敲除与整合

P. acidilactici 感受态细胞的制备与转化:

(1) 用无菌移液器取 1 μ L *P. acidilactici* ZY271 甘油冻存菌液, 划线于 MRS 平板, 于 42 $^{\circ}$ C 培养约 24 h。将 1 个 *P. acidilactici* ZY271 单菌落接种于 5 mL 液体 MRS 中, 并于 42 $^{\circ}$ C 和 150 rpm 培养 12 h;

(2) 从 (1) 中培养的菌液中取出 400 μ L 转接至含有 600 μ L 40 mM D/L-苏氨酸的 20 mL 新鲜 MRS 培养基中。在温度为 42 $^{\circ}$ C, 转速为 150 rpm 的摇床中培养, 直至 OD₆₀₀ 达到 1 (约 6 h);

(3) 将 1.5 mL 的菌液吸取至 EP 管中, 于 4 $^{\circ}$ C 和 10000 rpm 离心 5 min, 去除上清液, 保留菌体。

(4) 加入电转缓冲液 I 1 mL 并吹打混匀, 4 $^{\circ}$ C, 10000 rpm, 离心 5 min, 去上清, 重复此步骤一次;

(5) 加入电转缓冲液 I 100 μ L, 吹打混匀使菌体悬浮, 再加 20 μ L 0.1 mg/ml 溶菌酶(现用现配, 1.5 mg 溶菌酶溶于 1.5 mL Tris-HCl), 在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中处理 30 min;

(6) 加入 1 mL 电转缓冲液 I 悬浮菌体, 4 $^{\circ}$ C, 10000 rpm, 离心 5 min, 去上清, 此步骤重复一次。

(7) 加入 80 μ L 电转缓冲液 II 悬浮菌体, 得到电转感受态细胞;

(8) 在 80 μ L 电转感受态细胞中加入待转化的质粒 20 μ L, 吹打混匀, 冰上静置 15 min;

(9) 将上述混合溶液加入到电转杯中(电转杯提前干燥, 预冷 0.5 h-1 h), 放入电转仪中电击(电转仪设置参数为 2000 V, 200 Ω , 25 μ F);

(10) 取出电击液, 加入 900 μ L 复苏液, 在温度为 28 $^{\circ}$ C, 转速为 150 rpm 的摇床中培养 5-6 h;

(11) 将培养完成的菌液置于离心机中, 在 4 $^{\circ}$ C, 10000 rpm 的条件下离心 5 min。随后, 小心去除 800 μ L 上清液, 使用无菌枪头轻轻吹打剩余的菌液后均匀涂布在 MRSE

平板上。之后，将平板放入 28 °C 的培养箱中，静置培养 2 至 3 d，直至出现明显的单菌落。最后，通过菌落 PCR 对电转后的菌落进行验证，以确认实验结果。

基因敲除与整合（见图 2.1）

（1）单交换筛选：将电转化验证正确的单菌落接种到加有 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的 MRS 培养液中，在温度为 28 °C，转速为 150 rpm 的摇床中培养约 24 h 以实现质粒大量复制。接着以 1% (v/v) 接种量转接到新鲜加有 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的 MRS 培养液中，在温度为 42 °C，转速为 150 rpm 的摇床中培养 12 h 后，将菌液稀释 10^6 倍后，取 200 μL 涂布于 MRSE 平板，在 42 °C 恒温培养箱中静置培养约 24 h 长出单菌落。单交换的目的是将质粒整合至基因组上。

（2）双交换筛选：挑取（1）长出的单菌落于 5 mL MRS 液体培养基中，在温度为 28 °C，转速为 150 rpm 的摇床中培养 24 h 后，将培养液稀释 10^6 倍，取 200 μL 涂布于 MRS 平板上，在温度为 42 °C 的恒温培养箱中培养至长出单菌落后选取同一个单菌落，分别点至 MRS 和 MRSE 两种平板上，再次放入 42 °C 培养箱中培养约 20 h。如果发现单菌落在 MRS 平板上正常生长，而在 MRSE 平板上不生长，那么可能存在两种情况：一是发生了回复突变，二是基因敲除成功。进一步通过菌落 PCR 实验以及后续的测序验证来进行判断。

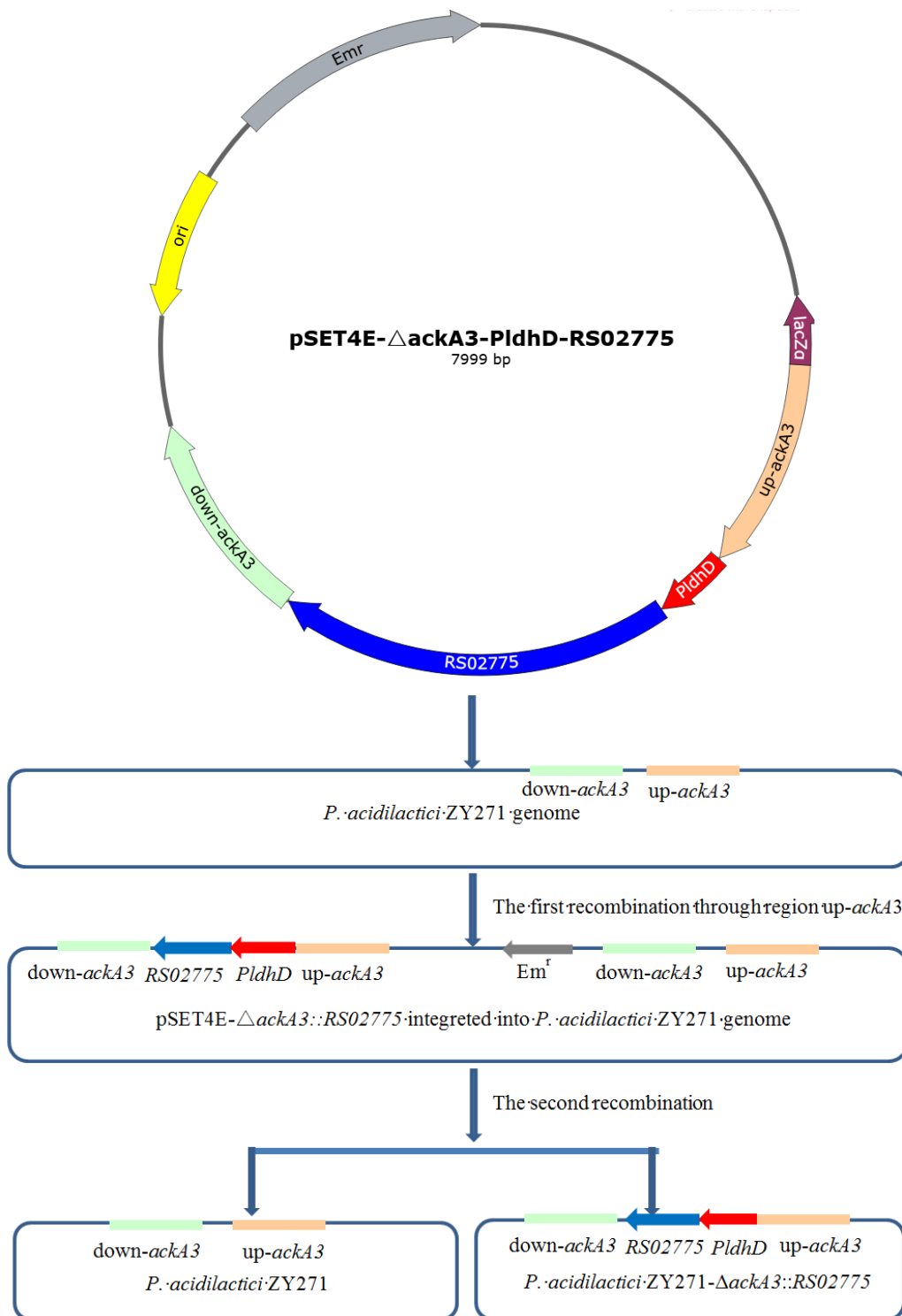


图 2.1 *RS02775* 整合至 *P. acidilactici* ZY271 基因组的 *ackA3* 位点处的同源重组过程
 Fig. 2.1 The homologous recombination process of *RS02775* integration into the *ackA3* locus of *P. acidilactici* ZY271 genome

2.2.4 胞内和胞外 Na⁺浓度测定

P. acidilactici 胞内的 Na⁺含量使用酸提取法进行定量分析^[113]。收集培养至 0、24 和 48 h 的 *P. acidilactici* 菌体细胞，使用 20 mM MgCl₂ 溶液快速洗涤 2 次。加入溶液后快速混匀后立刻离心去上清，以防止胞内 Na⁺扩散至胞外，并在 0.1 M HCl 溶液中进行酸提取 24 h。将提取液于 12000 rpm 下离心 5 min，收集的上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后在等离子体发射光谱仪（ICP-AES, Agilent 725 ES）上进行 Na⁺含量测定分析。测得的离子浓度除以细胞干重（DCW）得到 Na⁺浓度。胞外 Na⁺浓度的定量分析，则通过收集发酵液进行分析。

2.2.5 适应性进化

在 100mL 三角瓶中进行的适应性进化条件，发酵体系为 20 mL，使用初始糖浓度为 30 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖的简化 MRS 培养基。每隔 24 h 发酵后，以 10%（v/v）的接种量不断转接。添加 0.6 g 碳酸钙/g 糖进行 pH 调节，监测耗糖和乳酸的产量，直至耗糖稳定。

在 1 L 发酵罐中进行的适应性进化，发酵体系为 600 mL，使用初始糖浓度为 60 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖的简化 MRS 培养基，42 °C，200 rpm 下发酵，待葡萄糖浓度消耗至 10 g/L 左右时，以 20%-30%（v/v）的取补比取出发酵液，补充相同体积的新鲜简化 MRS 培养基（葡萄糖母液浓度为 500 g/L，木糖母液浓度 170 g/L）。使补料后发酵罐中葡萄糖为 20 g/L-25 g/L 左右，木糖浓度为 7 g/L-9 g/L。重复若干次，待乳酸浓度达到最大并保持稳定多次时发酵结束。发酵过程中使用 13.5 M NaOH 调节 pH 至 5.5。

2.2.6 单糖与乳酸的分析方法

本实验检测的主要成分有葡萄糖、木糖和乳酸，使用装配有 RID-10A 示差检测器（Shimadzu, Japan）和 Aminex HPX-87H 色谱柱（Bio-rad, USA）的高效液相色谱（HPLC）来分析。流动相为 0.005 M 的硫酸溶液，流速为 0.6 mL/min，柱温设置为 65 °C。

2.2.7 荧光实时定量 PCR（qRT-PCR）分析

采用 qRT-PCR 技术对 *P. acidilactici* ZY271 中的 H⁺-ATPase 相关基因进行分析，针对相关基因，采用了 Primer 5.0 软件来进行引物设计。附录 I 中详细列出了涉及的相关基因及其对应的引物信息。

在进行 qRT-PCR 分析之前，关键的准备工作包括收集菌体，并随后提取菌体的 RNA。为此，首先在简化 MRS 培养基中培养目标菌株，培养基体系设置为 600 mL，糖浓度为 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖。培养条件为 42 °C，150 rpm。在生长最好时（提前进行预实验确定收集菌体的最佳时间）取出培养液，并在 4 °C，12000 rpm 的条件下离心 10 min，以便有效地收集菌体。随后，将收集好的菌体迅速进行液氮冷冻，并储存于 -80 °C 冰箱中以备后续使用。收集的菌体需设置 3 个生物学重复。

首先，使用液氮对研钵进行快速冷却，紧接着立即将菌体置于冷却后的研钵中进行研磨。随后，使用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒（TIANGEN，北京）提取 RNA。使用微量分光光度计检测 RNA 的浓度并稀释至合适的浓度范围，之后利用反转录试剂盒

将 RNA 反转录为 cDNA。最后,用 SYBR qPCR Master Mix 作为荧光染料,用 QuantStudio 1PCR 仪 (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行 qRT-PCR 实验。

qRT-PCR 反应以 16SrRNA 编码基因 *RS00440* 作为内参基因,各基因转录水平经 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算得到^[114]。定义差异表达倍数 $\text{Foldchange} > 2.0$ 为显著差异上调表达, $\text{Foldchange} < 0.5$ 为显著差异下调表达。

表 2.1 本研究所用的菌株、质粒和引物

Table 3.1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E.coli</i> XLI-blue	Host for plasmid construction	Storage
<i>P. acidilactici</i> ZY271	L-lactic acid producing strain	Storage
<i>P. acidilactici</i> DSM 20284	<i>RS02775</i> gene contained	Storage
<i>P. acidilactici</i> ZP26	<i>PldhD</i> contained	Storage
<i>P. acidilactici</i> HN	Integration of the <i>RS02775</i> gene into <i>ackA3</i> locus of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
Plasmids	Characteristics	Sources
pSET4E	<i>Em^r</i> replacing <i>Spc^r</i> marker of pSET4S, temperature sensitive vector	[115]
pSET4E- Δ <i>ackA3::RS02775</i>	Plasmid for integration of the <i>RS02775</i> gene into <i>ackA3</i> locus of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
Primers	Sequence(5'-3')	
<i>PldhD</i> -F	AAAGATTTTCAGGAAGGTAATTAGGGGATCTGCTCTGGTGTGCAGACCAGACGTTGTACA	
<i>PldhD</i> -R	AAAATCATAAAGGTTGAAATCAAAATATTCATTGTAATATTACCCCTTCTTTTTTAATCAA	
<i>ackA3</i> -up-F	AGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCAATTCGCTTCTTTGGTGAAAACTTTCGGGA	
<i>ackA3</i> -up-R	TGCAATCCCAATTCTCGAGCGGCGGGATCCCCTAATTACCTTCCTGAAAATCTTTATTTG	
<i>ackA3</i> -down-F	GAAGGTAATTAGGGGATCCCGCCGCTCGAGAATTGGGATTGCAAATAGTACGTTTGATTA	
<i>ackA3</i> - down -R	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTCTAGAAATCTGCAGCATAACGCGCCAATGTAATGTT	
<i>RS02775</i> -F	TATTGATTAATAAAGAAAGGGGTAATATTACAATGAATATTTTGATTTCAACCTTTATGATT	
<i>RS02775</i> -R	CAAACGTACTATTTGCAATCCCAATTCTCGATTAAACCATTTGATTTTGTGGATCTAACACCA	

注释：下划线表示酶切位点。

2.3 结果与讨论

2.3.1 重组菌株 *P. acidilactici* HN 的构建和发酵能力测试

为了获得不含质粒的、稳定遗传的 Na^+ 耐受 L-乳酸生产菌株，本论文通过同源重组的方式，将有明显 Na^+ 外排能力的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因 *RS02775* 整合到 *P. acidilactici* ZY271 的基因组上。*ackA* 编码乙酸激酶，是乙酰磷酸生成乙酸的关键酶。乙酸是 *P. acidilactici* ZY271 产生的副产物，基本不会对菌株的正常生长造成影响。而且 Qiu 等^[116]通过敲除 *ackA2* 整合木糖代谢相关基因得到的重组菌株葡萄糖代谢没有受到影响，构建的木糖代谢途径提高了木糖的利用，最终提高了菌株的乳酸生产。因此，选择 *P. acidilactici* ZY271 的 *ackA3* 作为敲除位点。另外，启动子的选择对基因的表达水平起关键作用。Qiu 等^[83]选择了 *P. acidilactici* ZP26 内源的两个启动子 *PldhD* 和 *Pldh* 用于过表达木糖代谢相关基因，发现在 *PldhD* 控制下的基因簇 *xylAB_2911* 表现出最佳的木糖同化速率和 D-乳酸形成。因此，本论文选择启动子 *PldhD* 用于基因的过表达。具体构建策略见图 2.1，经过单双交换筛选得到的整合菌株命名为 *P. acidilactici* HN。

接着，对重组菌株的 Na^+ 耐受能力进行评估。在 100 mL 摇瓶的简化 MRS 培养基中外源添加不同浓度的 Na^+ ，分别为 0、0.22、0.65 和 0.19 M。发酵 12 h 后，从图 2.1 可以看出随着发酵体系中初始 Na^+ 浓度逐渐增加，*P. acidilactici* HN 和 *P. acidilactici* ZY271 的细胞活力以及糖耗和乳酸发酵生产均受到抑制。在 Na^+ 浓度达到 0.19 M 时，两种菌株基本不再消耗葡萄糖。无论 Na^+ 浓度高低，*P. acidilactici* HN 和 *P. acidilactici* ZY271 的细胞活力均没有明显差异，但是 *P. acidilactici* HN 的糖耗和乳酸产量均弱于 *P. acidilactici* ZY271。

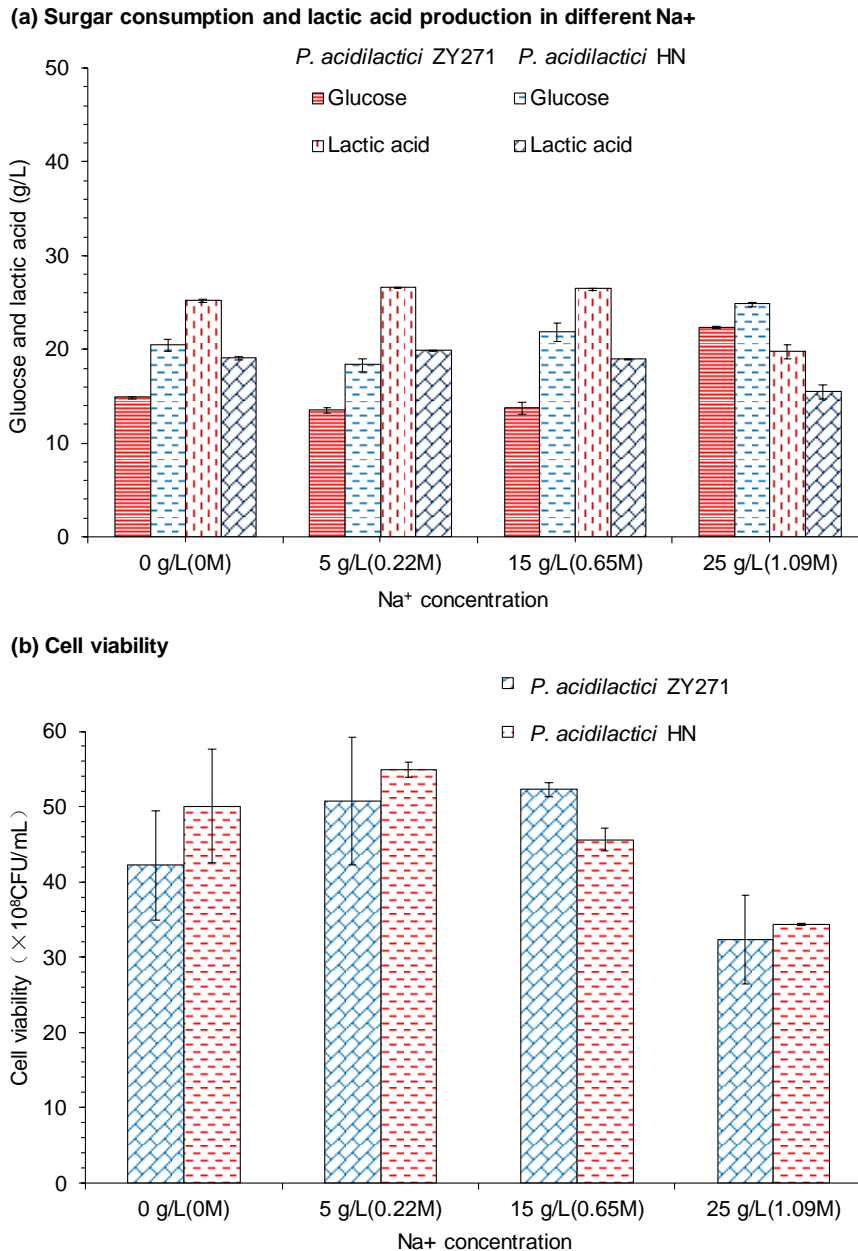


图 2.1 *P. acidilactici* HN 在不同 Na⁺浓度胁迫下的 L-乳酸发酵评价

(a) 葡萄糖消耗和 L-乳酸产量; (b) 细胞活力

Fig. 2.1 L-lactic acid fermentation performance evaluation of *P. acidilactici* HN under stress of different Na⁺ concentrations

(a) Glucose consumption and L-lactic acid production; (b) Cell viability

发酵条件: 发酵是在含有 50 mL 合成培养基的 250 mL 三角瓶中进行的, 合成培养基含有 50 g/L 葡萄糖, 额外添加不同浓度的 NaCl 营造 Na⁺梯度, 加入 0.6g CaCO₃/g 糖调节 pH, 温度为 42 °C, 转速为 150 rpm, 共发酵 12 h。

接着在 3 L 生物反应器中, 使用合成培养基, 用 13.5 M NaOH 调节 pH, 以 *P. acidilactici* ZY271 为对照菌株, *P. acidilactici* HN 为实验菌株, 对两者的葡萄糖、木糖消耗和乳酸生产能力进行监测 (图 2.2)。发酵 72 h 后, *P. acidilactici* HN 的糖耗和乳酸产量仍然比 *P. acidilactici* ZY271 低。*P. acidilactici* HN 不仅没有显示出明显的 Na⁺耐受能力,

其糖代谢反而出现了下降的情况。以上实验结果说明, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的整合可能影响了 *P. acidilactici* HN 的自身代谢。

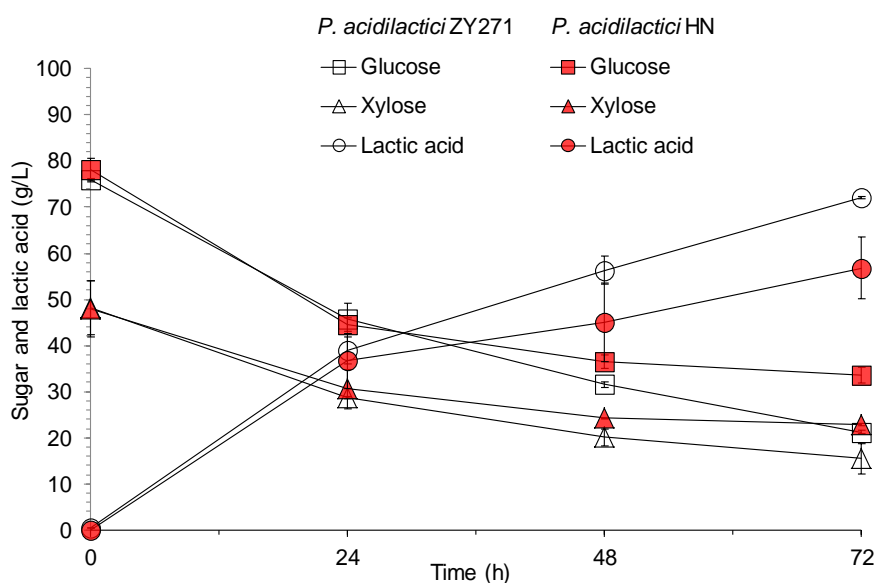


图 2.2 *P. acidilactici* HN 在 MRS 培养基中的 L-乳酸发酵评价

Fig 2.2 L-lactic acid fermentation performance evaluation of *P. acidilactici* HD in MRS medium.

发酵条件: 发酵是在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行的, 合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖, 以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 300 rpm, 共发酵 72 h, 每 24 h 取样。

2.3.2 *P. acidilactici* HN 的适应性进化及进化菌株的发酵能力评价

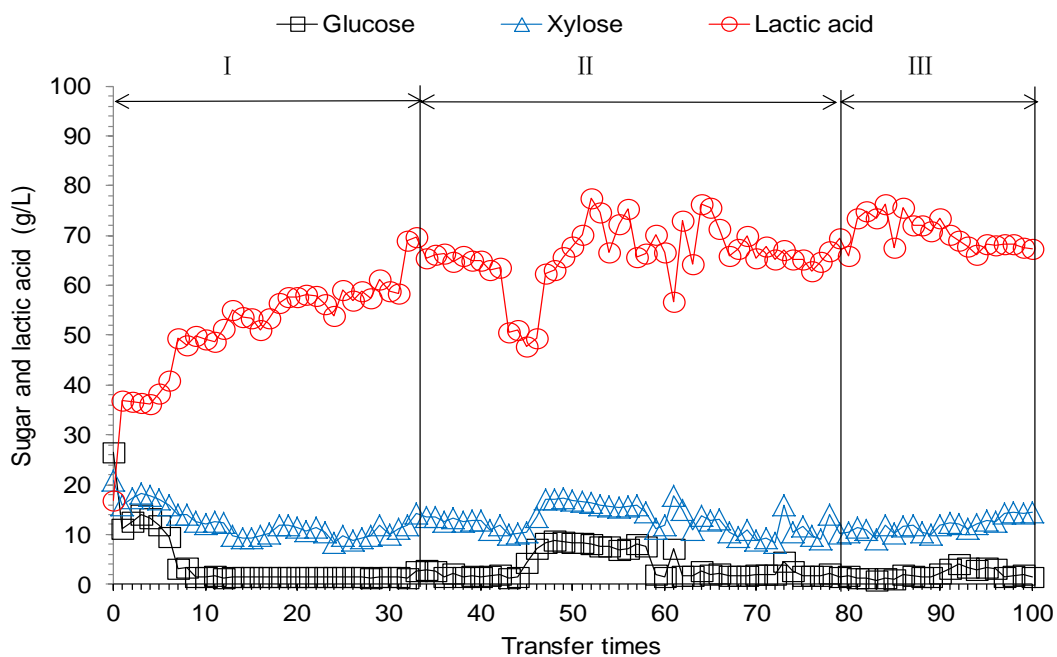
重组菌株 *P. acidilactici* HN 中的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白并没有稳定提高 Na^+ 的耐受能力。据邱忠洋^[117]研究发现, 在 *P. acidilactici* ZP26 中整合表达木糖代谢相关的基因并敲除乙酸代谢相关基因后, 菌株的木糖代谢能力出现了显著下降(48 h 内的木糖消耗从 13.4 g/L 下降到 4.5g/L)。当在木糖为唯一碳源的 MRS 培养基中进行菌株的适应性进化后, 重组菌株的木糖代谢和 D-乳酸产量得以提高。在此, 本论文尝试使用适应性进化策略来调整重组菌株的代谢网络。

一种方法是在 100 mL 三角瓶中适应性进化菌株, 并额外添加乳酸钠以营造高浓度的 Na^+ 环境(图 2.3 a)。适应性进化分为三个阶段: 第 I 阶段, 乳酸钠浓度为 20 g/L (Na^+ 为 4.1 g/L), 适应性进化至 33 代, 工程菌株对糖的代谢速率有所提高; 第 II 阶段, 增加乳酸钠浓度为 40 g/L (Na^+ 为 8.2 g/L), 适应性进化至 79 代, 重组菌株糖的代谢速率趋于稳定; 第 III 阶段, 继续增加乳酸钠浓度为 50 g/L, 适应性进化至 100 代, 重组菌株糖的代谢速率趋于稳定后停止。

另一种方法是在 1 L 发酵罐中用 13.5 M NaOH 调节 pH (图 2.3 b), 使菌株长期处于高浓度 Na^+ 环境中, 通过在发酵罐中取出发酵液再补加新鲜培养基的方式来达到适应性进化的目的。适应性进化分为八个阶段: 第 I 阶段, 按照 20% (v/v) 的取补比, 补

料后的葡萄糖浓度为 60 g/L，木糖浓度为 20.4 g/L，适应性进化 1 代后发现由于补料后糖浓度较高，菌株的生长受到强烈抑制，后续通过取出发酵液，补加相同体积不含糖的 MRS 培养基来稀释发酵液，一直到第 5 代菌株的糖耗有所提升；第 II 阶段，调整补料后的葡萄糖浓度为 25 g/L，木糖浓度为 8.5 g/L，仍然按照 20% (v/v) 的取补比，适应性进化至 11 代时菌株的糖代谢提高；第 III 阶段，增加补料后的葡萄糖浓度为 30 g/L，木糖浓度为 10.2 g/L，仍然按照 20% (v/v) 的取补比，适应性进化至 19 代时菌株的糖代谢有所下降；第 IV 阶段，减少补料后的葡萄糖浓度为 20 g/L，木糖浓度为 6.8 g/L，提高取补比为 30% (v/v)，适应性进化至 28 代时发现菌株的糖代谢提高；第 V 阶段，提高补料后的葡萄糖浓度为 25 g/L，木糖浓度为 8.5 g/L，取补比为 30% (v/v)，适应性进化至 34 代时菌株的糖代谢有所提高；第 VI 阶段，提高补料后的葡萄糖浓度为 35 g/L，木糖浓度为 11.9 g/L，取补比为 30% (v/v)，适应性进化至 38 代时发现菌株的糖代谢下降；第 VII 阶段，降低补料后的葡萄糖浓度为 30 g/L，木糖浓度为 10.2 g/L，取补比为 30% (v/v)，适应性进化至 57 代时发现菌株的糖代谢提高；第 VIII 阶段，提高补料后的葡萄糖浓度为 35 g/L，木糖浓度为 11.9 g/L，取补比为 30% (v/v)，在连续适应性进化 94 代后，重组菌株的糖耗和乳酸产量处于稳定状态，适应性进化停止。

(a) Adaptive evolution in 100 mL shake flask



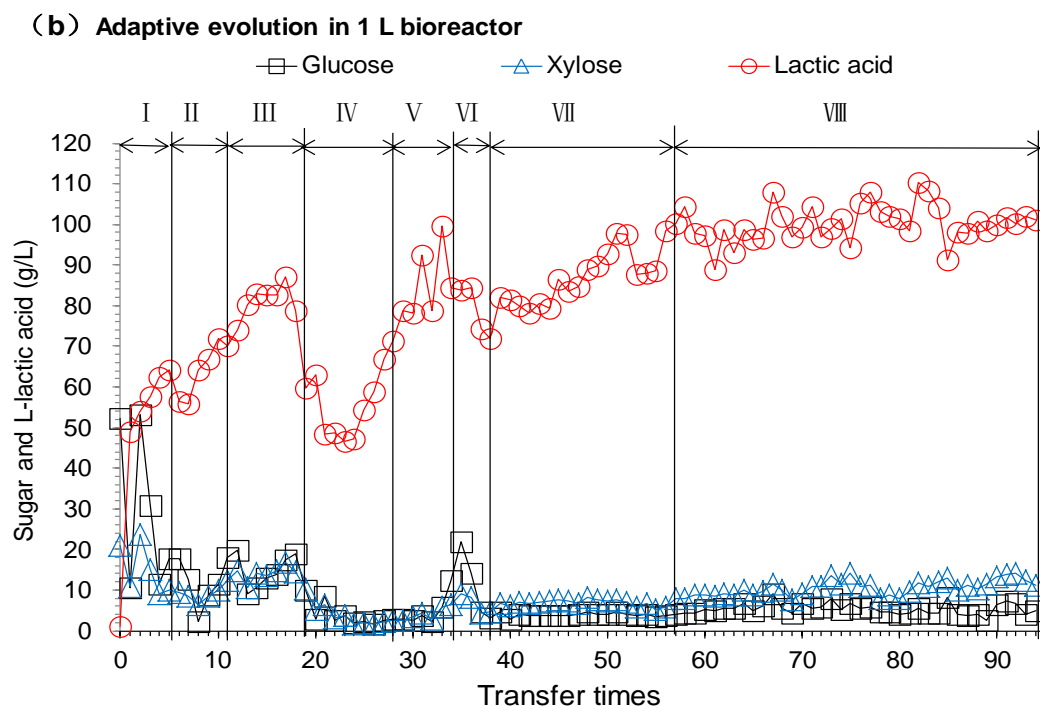


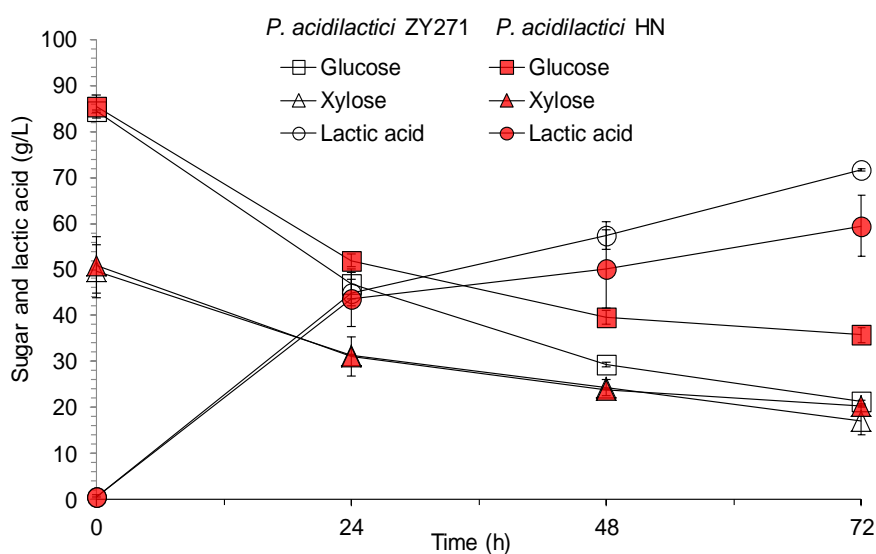
图 2.3 *P. acidilactici* HN 在高浓度 Na⁺胁迫下的适应性进化

(a) 100 mL 摇瓶中的适应性进化; (b) 1 L 发酵罐中的适应性进化

Fig. 2.3 Adaptive evolution of *P. acidilactici* HN under stress of high Na⁺ concentration
(a) 100 mL shake flask; (b) 1 L bioreactor

本论文将糖耗和乳酸产量达到稳定的进化菌株进行乳酸发酵能力评价, 在 MRS 合成培养基中比较 *P. acidilactici* HN 和原始菌株 *P. acidilactici* ZY271 的糖耗和乳酸产量(图 2.4)。结果发现, 两种适应性进化得到的菌株和 *P. acidilactici* ZY271 相比, 糖代谢和乳酸产量仍然较差。通过适应性进化调整重组菌株的代谢网络有限, 并不能有效提高 *P. acidilactici* HN 的 Na⁺耐受能力。

(a) Fermentation result of strain adapted in 100 mL shake flask



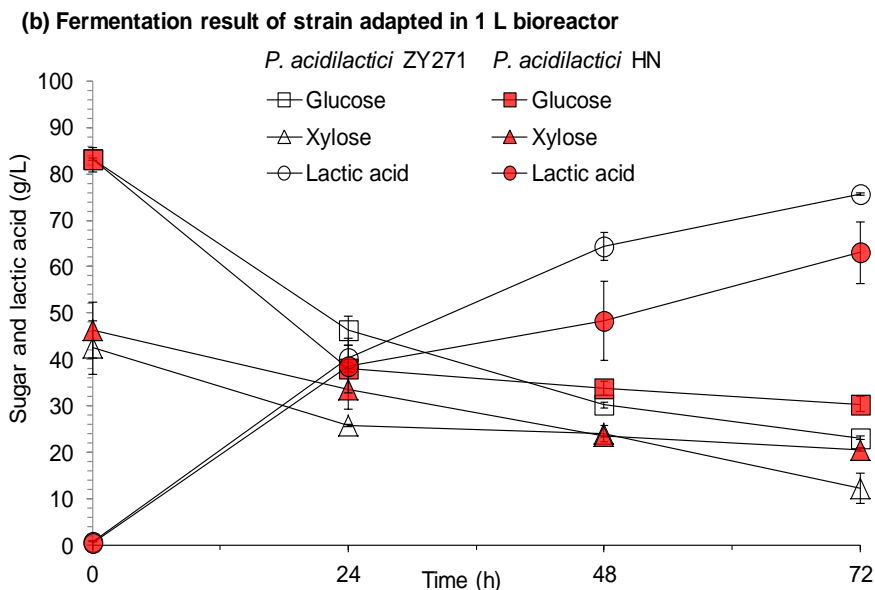


图 2.4 *P. acidilactici* HN 适应性进化后在 MRS 培养基中的 L-乳酸发酵评价

(a) 100 mL 摇瓶适应性进化菌株; (b) 1 L 发酵罐适应性进化菌株

Fig. 2.4 L-lactic acid fermentation performance evaluation of the adaptively evolved *P. acidilactici* HN in MRS medium

(a) Strain adapted in 100 mL shake flask; (b) Strain adapted in 1 L bioreactor

发酵条件：发酵是在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行的，合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖，以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5，温度为 42 °C，转速为 300 rpm，共发酵 72 h，每 24 h 取样。

2.3.3 *P. acidilactici* HN 的 Na⁺转运能力检测

为了更直观分析重组菌株 *P. acidilactici* HN 的 Na⁺外排能力，本论文对其细胞内外的 Na⁺浓度进行检测（图 2.5）。重组菌株发酵 0 h 时，培养液中几乎没有 Na⁺。显然菌株胞内也不会有过多 Na⁺，因此并没有检测 0 h 时胞内 Na⁺浓度。而在 24 h 和 48 h 时，*P. acidilactici* HN 的胞外 Na⁺明显低于 *P. acidilactici* ZY271，这是因为 *P. acidilactici* HN 的乳酸产量低于 *P. acidilactici* ZY271 导致加入发酵体系的 NaOH 较少。48 h Na⁺浓度高于 24 h，这些 Na⁺一方面源于菌株的外排，另一方面源于添加的 NaOH。24 h 时，*P. acidilactici* HN 的胞外 Na⁺与胞内外 Na⁺的比值比 *P. acidilactici* ZY271 高 19%，说明 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白在 *P. acidilactici* HN 发挥了显著的钠离子外排作用。在 48 h 时，*P. acidilactici* HN 的胞外 Na⁺与胞内外 Na⁺的比值与 *P. acidilactici* ZY271 接近，这说明了 *P. acidilactici* HN 的 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的作用受到抑制。推测 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白在 *P. acidilactici* HN 中的过表达使得 Na⁺外排的同时 H⁺内流，导致胞内 H⁺浓度变高，胞内 pH 下降，所以影响了菌株的正常代谢。

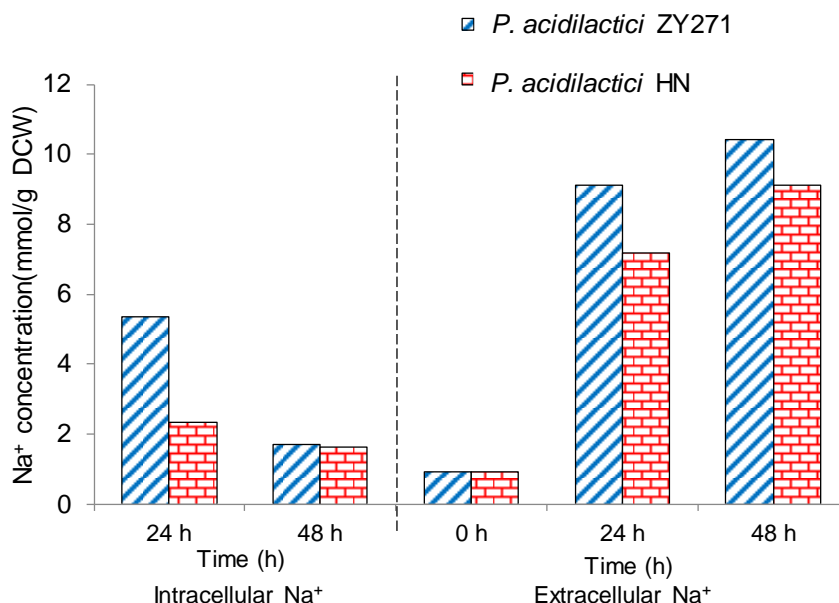


图 2.5 *P. acidilactici* HN 胞内和胞外的 Na⁺含量变化

Fig. 2.5 Changes of intracellular and extracellular Na⁺ content in *P. acidilactici* HN
 菌体培养条件: 菌体培养是在含有 600 mL 合成培养基的 1 L 发酵罐中进行, 合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖, 以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 200 rpm, 培养 12 h 收集菌体, 用酸处理法提取分析胞内 Na⁺含量, 收集发酵液用于胞外 Na⁺含量的测定。

表 2.2 *P. acidilactici* HN 胞内和胞外的 Na⁺含量比值

Table 2.2 Ratio of intracellular and extracellular Na⁺ content in *P. acidilactici* HN

Time	Strain	Ratio(Extracellular Na ⁺ /Extracellular Na ⁺ + Intracellular Na ⁺)
24 h	<i>P. acidilactici</i> ZY271	0.63
	<i>P. acidilactici</i> HN	0.75
48 h	<i>P. acidilactici</i> ZY271	0.86
	<i>P. acidilactici</i> HN	0.85

2.3.4 重组菌株 *P. acidilactici* HN 在不同 pH 条件下的发酵评价

根据上述推测, 尝试探究 *P. acidilactici* HN 在低 pH 条件下是否有发酵优势。通过在摇瓶中加入不同质量的碳酸钙 (图 2.6), 0、糖含量 (g) 20%、糖含量 (g) 40%、糖含量 (g) 60%。所调节的 pH 范围在 4.0-5.0 之间, 监测 12 h 的葡萄糖和乳酸产量变化。研究发现, 重组菌株 *P. acidilactici* HN 在以上发酵条件下的葡萄糖消耗速率和乳酸产量均弱于对照菌株。在低 pH 条件下, *P. acidilactici* HN 没有表现出发酵优势。

在高 pH 条件下, 推测胞内过多的 H⁺会顺着 H⁺梯度流出, 从而表现出发酵优势。本论文在 3 L 生物反应器中, 用 13.5 M NaOH 调节 pH 至 6.0 (图 2.7a) 和 6.5 (图 2.7b)。研究发现, 重组菌株在 pH 6.0 和 pH 6.5 条件下的糖消耗和乳酸产量均明显低于对照菌株。这些结果表明, 高 pH 条件下, 重组菌株 *P. acidilactici* HN 并没有发酵优势。这表明 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白在 *P. acidilactici* HN 中的整合表达对细胞的生长和代谢造成了一定的负面影响, 极有可能是由于 H⁺内流, 导致胞内 pH 的下降。

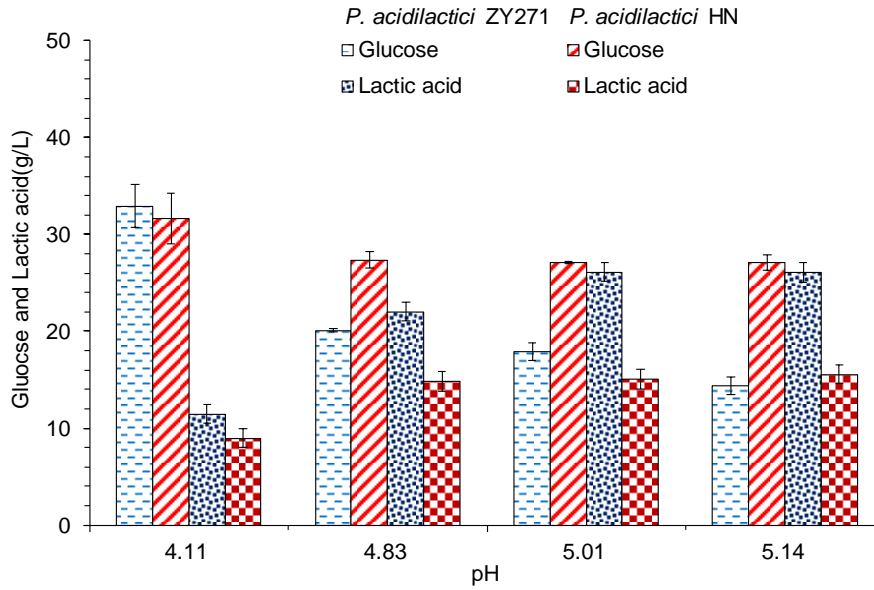
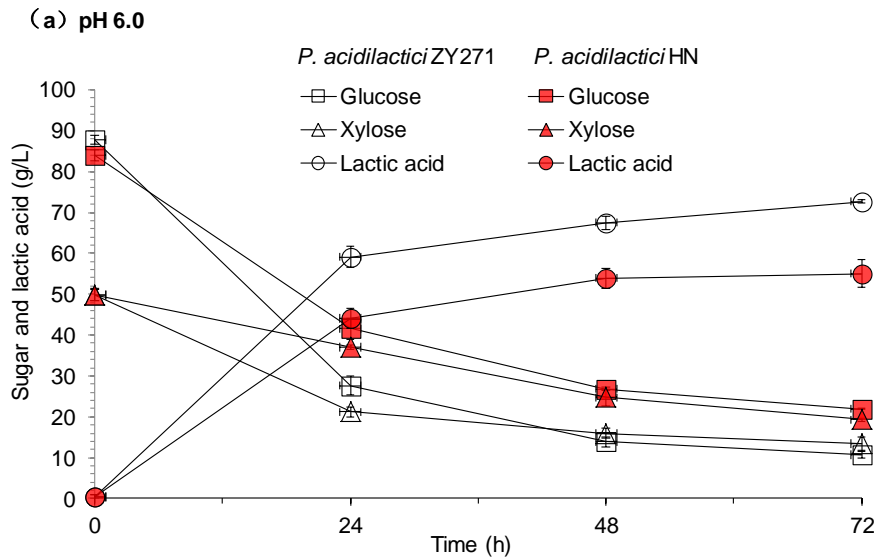


图 2.6 *P. acidilactici* HN 在低 pH 条件下的 L-乳酸发酵评价

Fig. 2.6 L-lactic acid fermentation performance of *P. acidilactici* HN at low pH.

发酵条件：发酵是在含有 50 mL 合成培养基的 250 mL 三角瓶中进行，合成培养基含有 50 g/L 葡萄糖，加入不同含量碳酸钙调节 pH，温度为 42 °C，转速为 150 rpm，共发酵 12 h，12 h 时监测 pH 值。



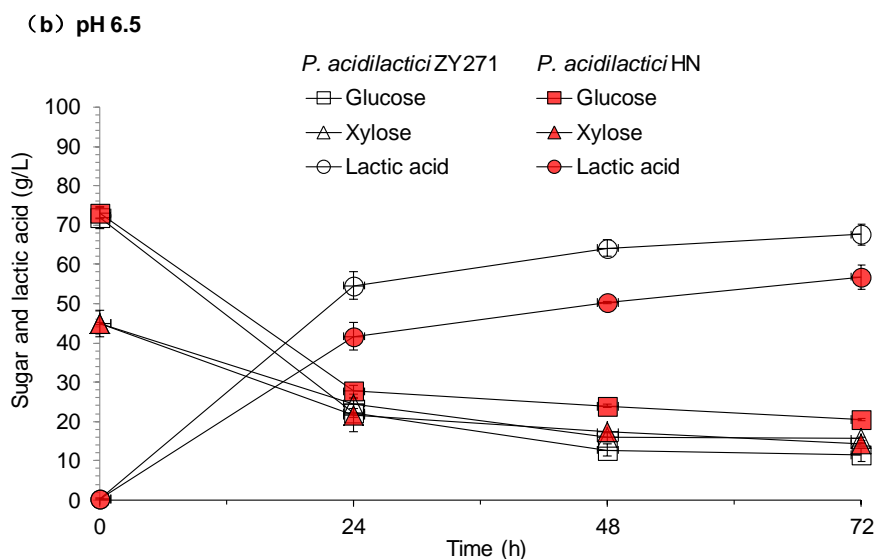


图 2.7 *P. acidilactici* HN 在高 pH 条件下的 L-乳酸发酵评价
(a) pH 6.0; (b) pH 6.5

Fig. 2.7 L-lactic acid fermentation performance evaluation of *P. acidilactici* HN at different pH values

(a) pH 6.0; (b) pH 6.5

发酵条件：发酵是在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行的，合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖，以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5，温度为 42 °C，转速为 300 rpm，共发酵 72 h，每 24 h 取样。

2.3.5 *P. acidilactici* HN 的 H⁺-ATPase 基因转录水平分析

据报道，Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在跨膜转运 Na⁺ 的过程中，往往需要依赖于 H⁺-ATPase^[118-122]。H⁺-ATPase 耦联跨膜质子动力势 (PMF) 和 ATP 的水解与合成，由 F₀ 亚基和 F₁ 亚基构成(图 2.8)。能够水解 ATP，将胞内的 H⁺ 泵出从而提高胞内 pH^[123, 124]。本论文从 H⁺-ATPase 基因转录水平对 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白整合表达导致重组菌株糖代谢下降的现象进行分析。

通过 qRT-PCR 技术，本论文分析了高浓度 Na⁺ 环境下重组菌株 *P. acidilactici* HN 相较于对照菌株 *P. acidilactici* ZY271 的 H⁺-ATPase 相关基因的转录水平(图 2.9)。结果发现，重组菌株 *P. acidilactici* HN 中 H⁺-ATPase 的 F₀ 大亚基的三个编码基因都发生明显的上调表达，而 F₁ 大亚基相关的五个基因则没有上调表达。F₀ 亚基复合体具有质子转运活性，能够促进细胞质中质子的外排，从而建立起跨膜的 H⁺ 电化学势梯度，这一梯度进一步为质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白提供驱动力，使其能够将胞内过多的 Na⁺ 排出细胞^[125]。F₁ 亚基复合体通过水解 ATP 产生能量供给 F₀ 亚基转运 H⁺^[126]。由此可见，Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在 *P. acidilactici* HN 中的过表达使得 Na⁺ 外排的同时 H⁺ 内流，导致胞内 H⁺ 浓度变高，刺激 H⁺-ATPase 上调表达。但是 H⁺-ATPase 活性低，并不能将胞内过多的 H⁺ 外排，高浓度的 H⁺ 导致胞内 pH 下降，所以菌体的糖代谢受到抑制，Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的作用在发酵后期受到影响。后续计划进一步通过提高 H⁺-ATPase 的活性来提高 H⁺ 外排能力，从而提高钠离子耐受能力。

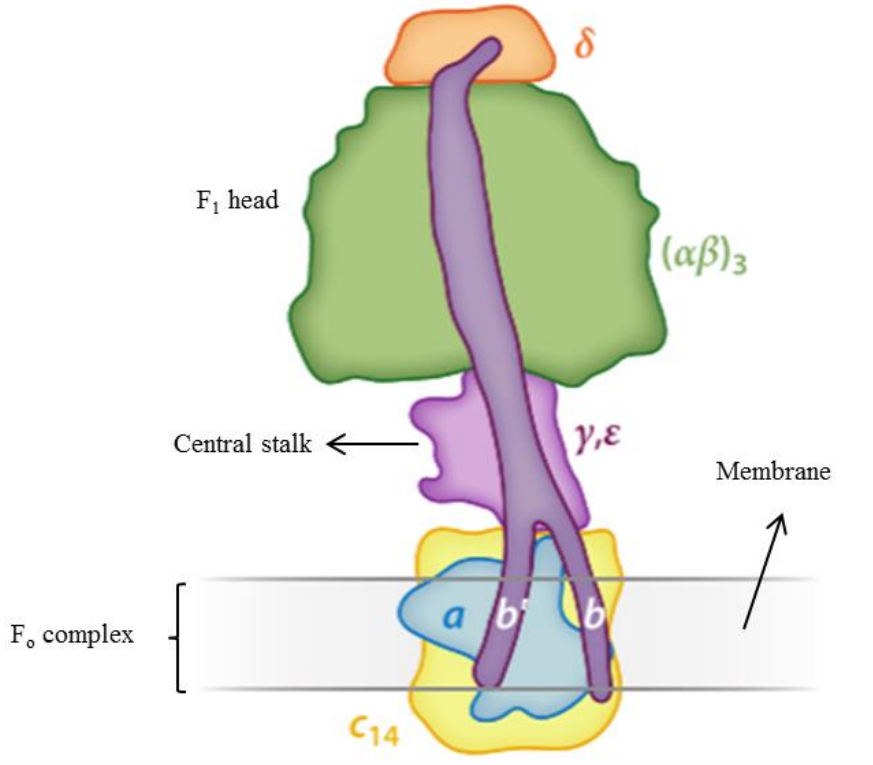


图 2.8 H⁺-ATP 酶的结构示意图^[127]

Fig. 2.8 Schematic overview of H⁺-ATPase structure^[127]

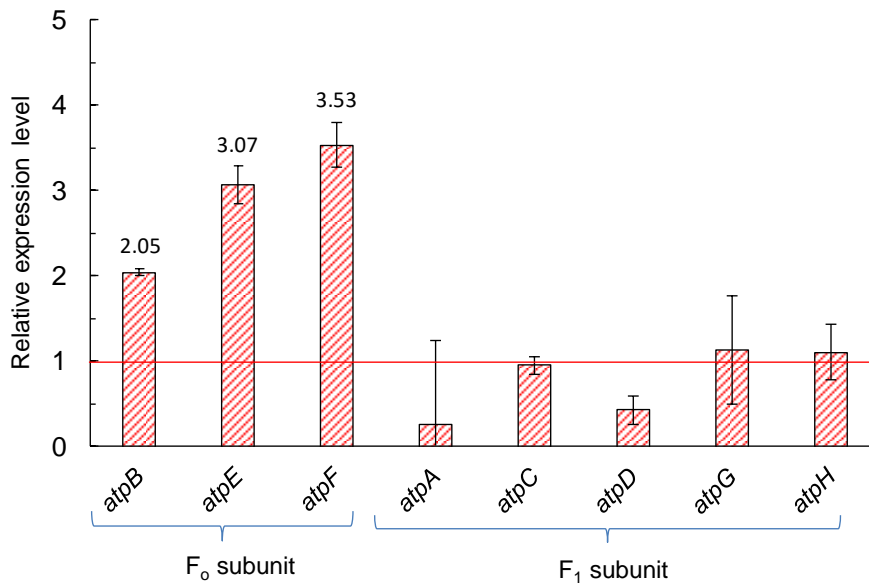


图 2.9 *P. acidilactici* HN 在高浓度 Na⁺胁迫下的 H⁺-ATPase 相关基因转录水平测试

Fig. 2.9 Transcriptional levels of the H⁺-ATPase genes in *P. acidilactici* HN under stress of Na⁺ by qRT-PCR analysis.

收集菌体条件：菌体培养是在含有 600 mL 合成培养基的 1 L 发酵罐中进行，合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖，以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5，温度为 42 °C，转速为 200 rpm，培养 12 h 收集菌体用于 qRT-PCR 实验。

2.4 本章小结

在本章实验中，通过同源重组将 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因 *RS02775* 整合到 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 的基因组上，在高浓度 Na^+ 发酵体系中测试重组菌株的发酵性能并对 Na^+ 外排能力进行分析。本章的主要结果如下：

(1) 在 Na^+ 浓度较高的发酵条件下，重组菌株 *P. acidilactici* HN 的糖代谢能力和乳酸产量与原始菌株相比出现下降。可见， Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的整合表达并没有实现理想的钠离子耐受能力。通过在 MRS 合成培养基高浓度 Na^+ 条件下的长期适应性进化培养，最终获得了两株稳定的进化菌株。进化菌株在 MRS 培养基中进行乳酸发酵时，相比于原始菌株 *P. acidilactici* ZY271，重组菌株的 *P. acidilactici* HN 的糖代谢能力和乳酸产量仍比较低。适应性进化并没有明显改善菌株的代谢网络。

(2) 测定胞内外钠离子浓度发现 *P. acidilactici* HN 有明显的 Na^+ 外排能力。推测 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在外排 Na^+ 的同时，造成了 H^+ 的内流。通过在不同 pH 条件下对 *P. acidilactici* HN 进行发酵评价，发现其没有表现出明显的发酵优势。在高浓度 Na^+ 条件下，*P. acidilactici* HN 中的 H^+ -ATPase 上调表达明显。由此得出， H^+ -ATPase 的活性较低，不足以外排 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白造成的胞内过量 H^+ ，所以导致重组菌株的代谢受到抑制。后续需要通过理性改造提高 H^+ -ATPase 的活性从而改善 *P. acidilactici* HN 的 Na^+ 耐受性。

第3章 乳酸片球菌 ZY271 耐受 Na⁺和 Ca²⁺的能力分析及理性改造

3.1 引言

在木质纤维素体系中利用乳酸发酵菌株进行 L-乳酸发酵时,发酵时添加的碱性中和剂 Ca(OH)₂ 会导致大量的 Ca²⁺富集。这些 Ca²⁺主要通过跨膜运输来实现细胞和外界营养环境的交换,所以周围环境中离子的含量变化直接影响到发酵微生物的正常生长和代谢,并影响其发酵性能。因此,提高乳酸发酵菌株在木质纤维素炼制过程中的 Ca²⁺抗逆性对于高 Ca²⁺条件下进行乳酸发酵至关重要。

微生物细胞内的 Ca²⁺稳态主要是通过细胞膜上的离子转运蛋白来实现。提高微生物 Ca²⁺金属离子抗逆性常用的方法是过表达 Ca²⁺转运蛋白。Ivey 等^[97]在 *E. coli* EP432 (敲除 Na⁺/H⁺逆向转运的菌株)中过表达 Ca²⁺/H⁺逆向转运蛋白 (chaA) 可以使重组菌拥有转运 Na⁺和 Ca²⁺的活性。Milena 等^[100]将结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的 P-type ATPase CtpF 编码基因 Rv1997 在耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* 中过表达可以明显提高菌株的 Ca²⁺外排能力,提高其 Ca²⁺耐受能力。然而,目前对提高乳酸菌耐受 Ca²⁺金属离子能力的研究报道较少。

P. acidilactici ZY271 是一株可以同时利用葡萄糖和木糖进行乳酸发酵生产的优异 L-乳酸生产菌株。在本研究中,首先分析了木质素残渣燃烧灰分作为发酵中和剂的乳酸发酵,其次测试了不同 Ca²⁺浓度对 *P. acidilactici* ZY271 的抑制作用。紧接着,在高浓度 Ca²⁺环境下利用 qRT-PCR 分析 *P. acidilactici* ZY271 显著上调表达基因并将其整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组上,最后在分别含有高浓度 Ca²⁺和 Na⁺的环境中进行 SSCF 发酵测试重组菌株的发酵性能,并对糖代谢相关基因进行分析。本研究意外提高了 *P. acidilactici* ZY271 在木质纤维素高浓度 Na⁺发酵体系下的葡萄糖代谢能力,发现了 *P. acidilactici* ZY271 中 DMT 家族转运蛋白新功能,为进一步研究 *P. acidilactici* 的 Na⁺耐受能力提供了重要的实验依据。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株、培养基及培养条件

脱毒真菌宛氏拟青霉 *Paecilomyces varioti* FN89 (CGMCC17665) 用于玉米秸秆原料干式烯酸预处理后的生物脱毒,培养于 PDA (Potato dextrose agar) 培养基中,37 °C 下培养。本章使用的其他菌株和培养基参考 2.2.1。

3.2.2 重组菌株的构建

本章所引用的质粒、引物见表 3.1。DMT 家族转运蛋白编码基因 RS00830 的整合方法参考 2.2.2 和 2.2.3。

3.2.3 原料、酶与试剂

本章 2.3.1 的灰分作为中和剂,用于乳酸生产实验所用的物料是于 2021 年春季收获

于河南省南阳市的小麦秸秆。根据 NREL 两步酸解法^[128]对其进行组分测定, 含有 34.3% 纤维素、19.3% 木聚糖、22.1% 木质素和 8.4% 的灰分。其他实验所使用的小麦秸秆由上海凯赛生物技术有限公司于 2023 年 8 月提供, 预处理后小麦秸秆中纤维素含量为 31.07%, 半纤维素含量为 0.44%, 游离葡萄糖含量为 $30.83 \text{ mg} \pm 0.57 \text{ mg/g}$, 游离木糖含量为 $136.70 \text{ mg} \pm 1.98 \text{ mg/g}$, 其中各组分均按照干重计算。

参照 Bradford 方法^[129]检测得到 Cellic CTec 3.0 的蛋白浓度为 90.1 mg/mL 。糖化酶 GA-LNEW 酶活为 103900 WU/mL 。试剂参照 2.2.1。

3.2.4 焚烧灰分的制备与元素分析方法

将纤维素乳酸发酵液进行离心以收集残渣, 离心机转速为 8000 rpm , 离心 10 min 。对固体残渣至少洗三次, 然后自然晾干至水分含量低于 $10\% (\text{w/w})$ 。使用破壁机将晾干的残渣粉碎后放入马弗炉 (SX2-2.5-10, 上海博迅工业有限公司) 中进行灼烧处理, 先在 $275 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 30 min 的预热操作, 随后将温度升至 $575 \text{ }^\circ\text{C}$ 并保持至少 4 h 。将焚烧好的灰分保存在 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中, 使用 EDS 结合场发射扫描电镜 (GeminiSEM 500) 分析其表面成分。

3.2.5 干法生物炼制以进行乳酸生产

将经过前处理的小麦秸秆原料进行干酸预处理^[28], 具体过程为: 在 20 L 预处理反应器中加入 $2:1 (\text{w/w})$ 固液比的麦秆与稀硫酸溶液, 通入蒸汽升温到 $175 \text{ }^\circ\text{C}$ 下处理 5 min , 搅拌转速为 50 rpm 。预处理后的物料需要用 CaCO_3 将 pH 调至 5.5 。然后按照 25% 或 30% 固含量将物料加入 5 L 糖化罐中进行预糖化, 在 200 rpm , $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 12 h , 期间加入纤维素酶, 用量为每 g 干物质 5 mg 蛋白, 预糖化结束后立即转入 3 L 发酵罐中, 将脱毒菌株 *P. variotii* FN89 以 $10\% (\text{v/v})$ 的接种量接入进行生物脱毒, 搅拌速度 750 rpm , 通气量 1.0 vvm , 温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱毒结束后立即停止通气并升温到 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 12 h 即可杀死 *P. variotii* FN89, 加入营养盐后接入乳酸发酵菌株。

乳酸发酵菌株种子液的制备: 从 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中取出 *P. acidilactici* 菌液的冻存管, 并将其接种到含有 20 mL 简化 MRS 培养基的 100 mL 三角瓶中。随后, $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 、转速为 150 rpm 的条件下培养 6 h 得到一级种子液, 之后将培养液按照接种量 $10\% (\text{w/w})$ 转接到 100 mL MRS 培养基中, 培养时间 6 h 得到二级种子液, 种子液制备的两次培养过程中均添加 $1\% (\text{v/v})$ 的糖化酶防止菌体絮凝, 加入 0.6 g 碳酸钙/ g 糖来调节 pH。将预先制备好的种子液加入到经过脱毒处理的水解液中, 随后进行同步糖化共发酵 (SSCF)。发酵条件设定为温度 $42 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速 300 rpm , 并维持 pH 值在 5.5 。在发酵过程中使用 $25\% (\text{w/w})$ 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液进行 pH 调节。

3.2.6 单糖与乳酸的分析方法

分析方法参照 2.2.5。

3.2.7 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析

利用 qRT-PCR 分析 *P. acidilactici* 中的 Ca^{2+} 外排蛋白编码基因和糖代谢相关基因。其他步骤参考 2.2.7, 引物见附录 II。

表 3.1 本章节所用的菌株、质粒和引物

Table 3.1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> XLI-blue	Host for plasmid construction	Storage
<i>Paecilomyces variotii</i> FN89	Biodetoxification fungus isolated in our lab	[38]
<i>P. acidilactici</i> ZY271	L-lactic acid producing strain and <i>RS00830</i> gene contained	Storage
<i>P. acidilactici</i> HD	Integration of the <i>RS00830</i> gene into <i>ackA3</i> locus of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
Plasmids	Characteristics	Sources
pSET4E	<i>Em^r</i> replacing <i>Spc^r</i> marker of pSET4S, temperature sensitive vector	[115]
pSET4E- Δ <i>ackA3</i> :: <i>RS00830</i>	Plasmid for integration of the <i>RS00830</i> gene into <i>ackA3</i> locus of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
Primers	Sequence (5'-3')	
<i>PldhD</i> -F	AAAGATTTTCAGGAAGGTAATTAGGGGATCTGCTCTGGTGTGCAGACCAGACGTTGTACA	
<i>PldhD</i> -R	AAAATCATAAAGGTTGAAATCAAATATTCATTGTAATATTACCCCTTTCTTTTAAATCAA	
<i>ackA3</i> -up-F	AGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCAATTCGCTTCTTTGGTGAAAACTTTCGGGA	
<i>ackA3</i> -up-R	TGCAATCCCAATTCTCGAGCGGCGGGATCCCCTAATTACCTTCCTGAAAATCTTTATTTG	
<i>ackA3</i> -down-F	GAAGGTAATTAGGGGATCCCGCCGCTCGAGAATTGGGATTGCAAATAGTACGTTTGATTA	
<i>ackA3</i> -down-R	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAAATCTGCAGCATAACGCGCCAATGTAATGTT	
<i>RS00830</i> -F	TAAAAAAGAAAGGGGTAATATTACATCTAGGTGAAGTTAAGGACCTTGCTTTATGTCGTC	
<i>RS00830</i> -R	CGTACTATTTGCAATCCCAATTCTCGATTATTTGCTCATCCTCATCGCAATCTT	

注释：下划线表示酶切位点。

3.3 结果与讨论

3.3.1 焚烧灰分作为乳酸发酵中和剂

为了提高木质纤维素生物质的全回收和重复利用效率，作为生物炼制过程固体废弃物最终形式的焚烧灰分的合理利用至关重要。实验室前期对生物炼制焚烧所得灰分的中和能力进行了分析，其碱性介于 CaCO_3 和 Ca(OH)_2 之间，推测可以作为生物炼制乳酸发酵过程中的碱性中和剂。

首先，分别测试了以焚烧灰分、25% (w/w) Ca(OH)_2 、 CaCO_3 及不同比例的灰分和氢氧化钙组合作为中和剂来调节乳酸发酵过程 pH 的发酵效果。如图 3.1 所示，用 CaCO_3 作为中和剂时，乳酸产量最低（只有 66.6 g/L），推测可能是因为 CaCO_3 在水中的溶解度相对较低，需要更长的时间来完全溶解，无法及时中和发酵产生的乳酸，这导致发酵菌株长时间处于低于适宜 pH 环境中，影响了其生长和代谢，因此乳酸产量较低，所以 CaCO_3 不适于用作乳酸发酵的中和剂。当用 25% (w/w) Ca(OH)_2 作为发酵中和剂时，乳酸产量达到 101.8 g/L。当完全用灰分作为中和剂时，乳酸产量为 72.8 g/L，略高于使用 CaCO_3 作为中和剂的情况，但是与使用 25% (w/w) Ca(OH)_2 作为中和剂相比，降低了约 40%。尝试将 Ca(OH)_2 溶液和焚烧灰分组合使用，随着 Ca(OH)_2 溶液的比例逐渐增加（20%-80%, w/w），乳酸产量逐渐上升，当 Ca(OH)_2 溶液的 20% (w/w) 或 40% (w/w) 替换为灰分时，乳酸发酵产量与完全用 Ca(OH)_2 溶液的乳酸产量基本一致。因此，焚烧灰分可以替代高达 40% (w/w) 的氢氧化钙用于控制发酵的 pH 值，这对于焚烧灰分的回收利用有重要价值。

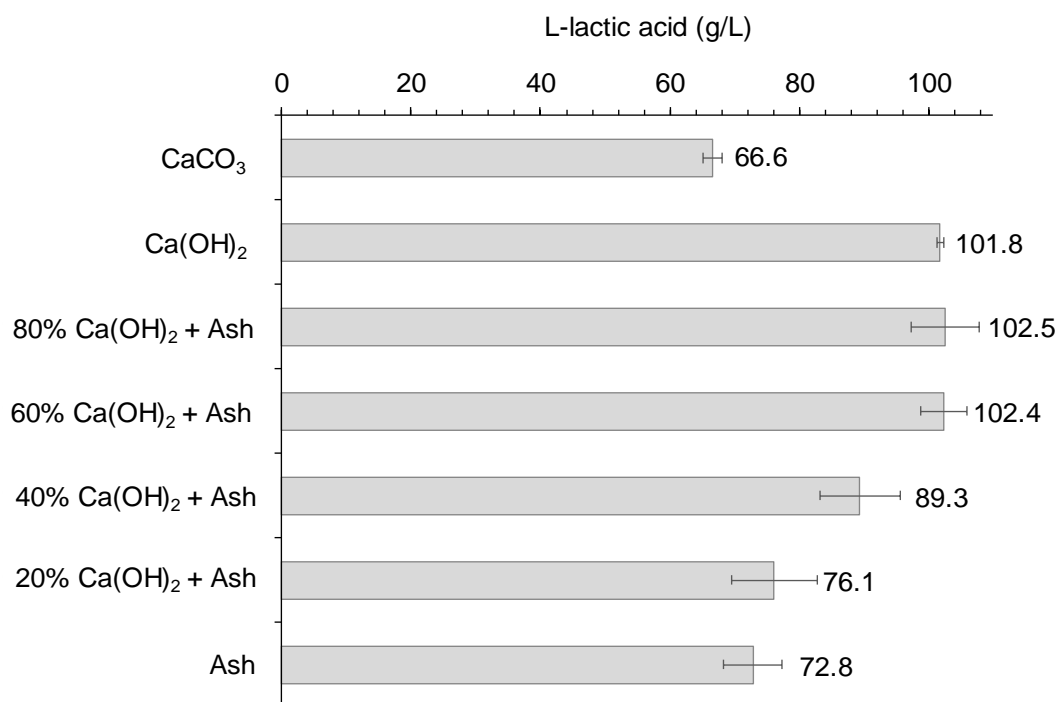


图 3.1 CaCO₃、焚烧灰分、Ca(OH)₂ 或焚烧灰分和 Ca(OH)₂ 组合控制 pH 纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 3.1 Cellulosic L-lactic acid fermentation with pH controlled by CaCO₃, combustion ash, Ca(OH)₂, or combined combustion ash and Ca(OH)₂

发酵条件：在含有 1 L 麦秆水解液（20%（w/w）固体含量）的 3 L 发酵罐中，进行 SSCF 生产 L-乳酸，以 *P. acidilactici* ZY271 作为发酵菌株，42 °C，150 rpm 共发酵 72 h，利用不同类型的中和剂控制发酵 pH 稳定在 5.5。

接着，进一步对焚烧灰分能作为碱性中和剂的原因进行了分析。对灰分的元素组成进行了分析，如图 3.2 所示，使用扫描电子显微镜-能谱仪，对焚烧灰分表面的元素成分进行扫描分析，发现其中含有 37.7 ± 0.8%（w/w）的氧、34.4 ± 3.0%（w/w）的钙、16.2 ± 1.0%（w/w）的碳、6.4 ± 1.5%（w/w）的硅和其他元素。钙的含量较高，可能是因为生物炼制过程中添加含有钙的中和剂产生的不溶性钙盐沉淀物与固体残渣混合，最终富集在焚烧灰分中，导致钙含量升高。推测这些钙元素大部分应都以碳酸钙的形式存在，因此，灰分具有调节 pH 的能力。

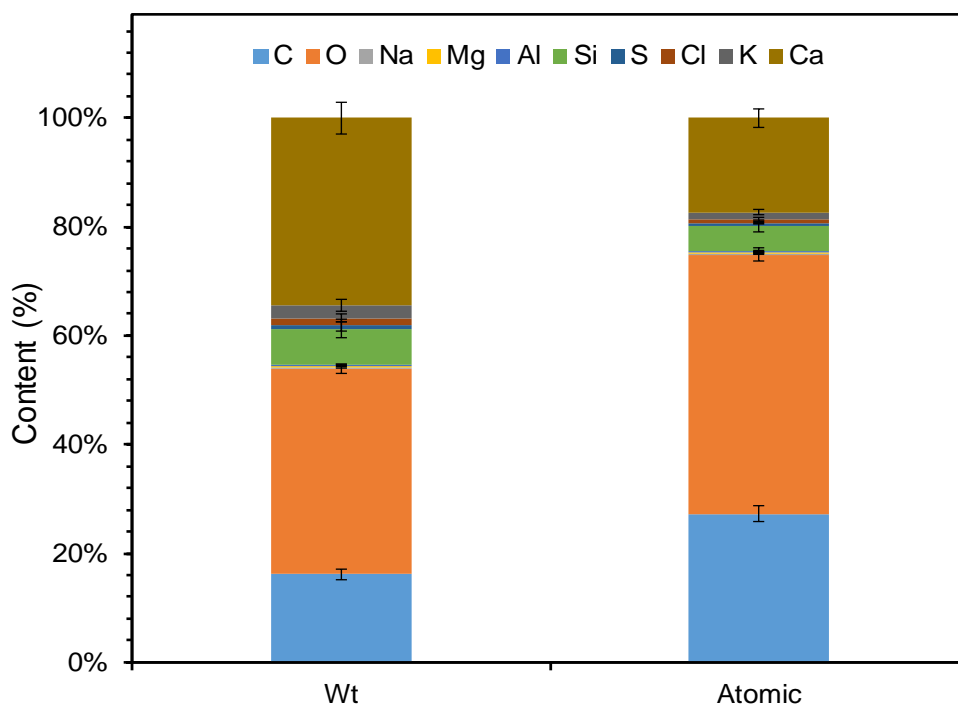


图 3.2 干法生物炼制后焚烧灰分的 EDS 分析

Fig. 3.2 EDS spectra of characterizations of combustion ash after dry biorefinery processing.

Wt (%) 表示元素质量百分比；原子 (%) 表示原子序数百分比。

3.3.2 *P. acidilactici* ZY271 对 Ca^{2+} 的耐受能力评估

在利用乳酸菌发酵生产乳酸钙时，无论是采用焚烧灰分、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 还是 CaCO_3 作为中和剂，都会造成大量的 Ca^{2+} 富集，高浓度的 Ca^{2+} 会抑制菌株的活性进而影响纤维素乳酸钙高效发酵生产。首先对 *P. acidilactici* ZY271 的 Ca^{2+} 耐受能力进行了评估。在简化 MRS 培养基中外源添加不同浓度的 Ca^{2+} ，分别是 0、0.23 M、0.37 M（折算成外源添加的乳酸钙，浓度分别为 0、50 和 80 g/L）。发酵 12 h 后，从图 3.3 可以看出，随着发酵体系中初始 Ca^{2+} 浓度的逐渐提高，发酵体系中残余的葡萄糖和木糖含量逐步增加，乳酸产量逐渐下降，从 34.9 g/L 下降到 7.2 g/L。说明随着 Ca^{2+} 浓度的增加，*P. acidilactici* ZY271 的葡萄糖和木糖代谢速率减缓，高浓度的 Ca^{2+} 会抑制菌株的代谢过程，从而影响乳酸发酵性能。

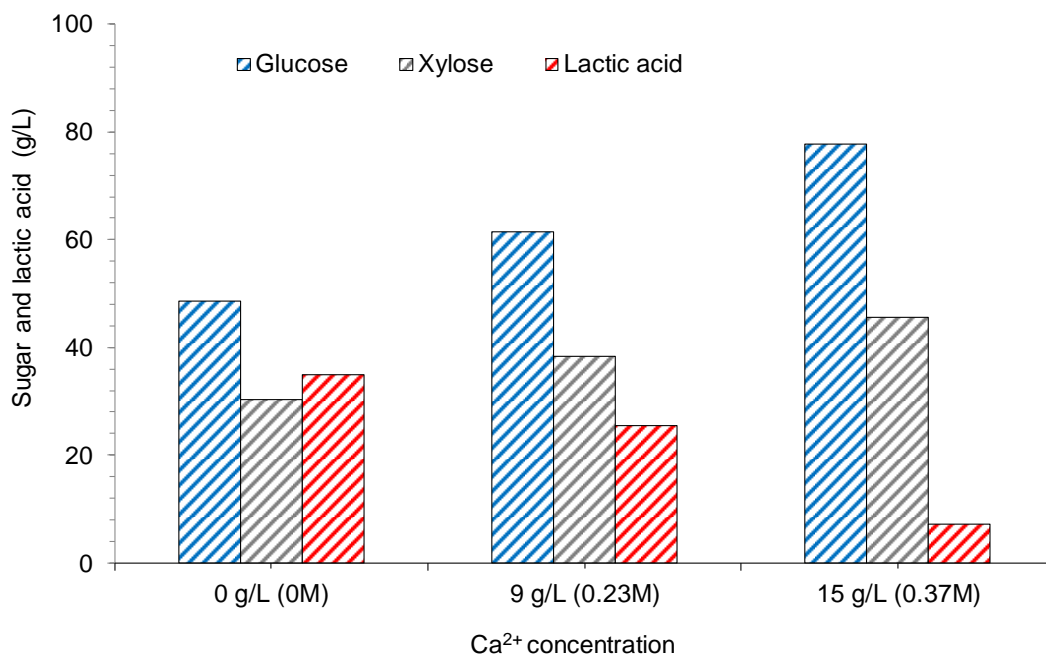


图 3.3 *P. acidilactici* ZY271 对 Ca²⁺的耐受性评价

Fig. 3.3 Tolerance evaluation of Ca²⁺ of *P. acidilactici* ZY271

发酵条件：发酵是在含有 600 mL 合成培养基的 1 L 发酵罐中进行的，合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖，加入 50 g/L、80 g/L 乳酸钙营造不同浓度 Ca²⁺ 环境，以 25% (w/w) Ca(OH)₂ 作为中和剂维持 pH 在 5.5，温度为 42 °C，转速为 200 rpm，共发酵 12 h。

3.3.3 挖掘 *P. acidilactici* ZY271 Ca²⁺外排相关基因

为了提高 *P. acidilactici* ZY271 的 Ca²⁺耐受能力，将 *P. acidilactici* ZY271 中内源性 Ca²⁺外排基因进行过表达。通过 qRT-PCR 挖掘 *P. acidilactici* ZY271 中内源性 Ca²⁺外排基因，分析在高浓度 Ca²⁺条件下上调表达明显的基因。比较分析了 *P. acidilactici* ZY271 中三种主要蛋白（Cation transporter、Multidrug transporter、P-type ATPase）编码基因的转录情况。在外源添加 0.14 M Ca²⁺（折算成乳酸钙为 30 g/L）条件胁迫下，未发现有基因出现明显的上调表达（图 3.4a），这可能是 Ca²⁺所造成的胁迫不够，因此又进行了添加 0.23 M Ca²⁺（折算成乳酸钙为 50 g/L）条件下的 qRT-PCR 分析（图 3.4b），发现 DMT 家族的 *RS00830* 基因表达上调明显（4.5 倍），说明 *RS00830* 基因编码的 DMT 家族转运蛋白响应于高浓度的 Ca²⁺胁迫，另据 Schaedler 等^[102]研究发现乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 中的多药转运蛋白 LmrP 对 Ca²⁺有高的选择性，可以外排 Ca²⁺，LmrP 可以作为 calcium/proton 逆向转运蛋白起作用，因此推测 *P. acidilactici* ZY271 中 *RS00830* 基因编码的 DMT 家族转运蛋白在高浓度 Ca²⁺环境中起 Ca²⁺外排的作用，用于维持 Ca²⁺稳态。

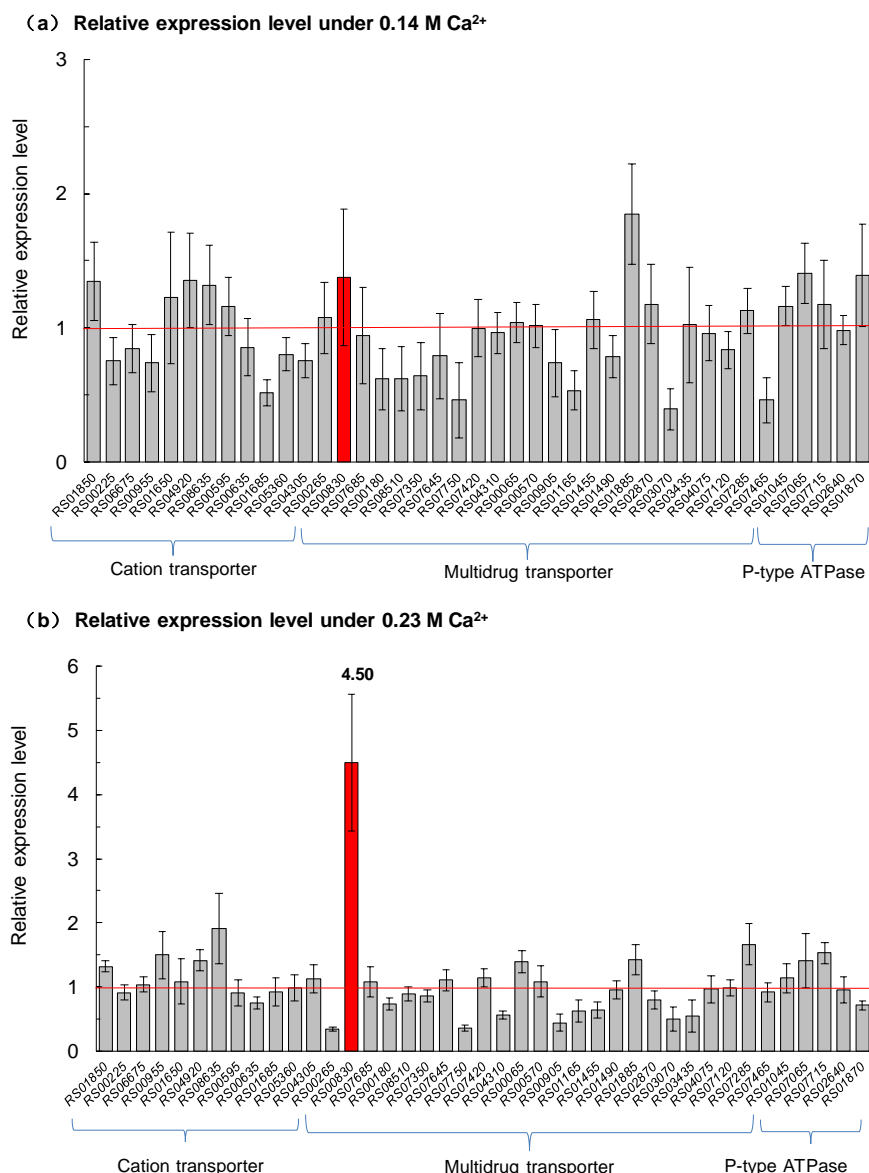


图 3.4 *P. acidilactici* ZY271 在 Ca²⁺胁迫下的金属离子转运相关基因转录水平测试

(a) 0.14 M Ca²⁺; (b) 0.23 M Ca²⁺

Fig. 3.4 Transcriptional levels of the metal ion transport genes in *P. acidilactici* ZY271 under stress of Ca²⁺ by qRT-PCR

(a) 0.14 M Ca²⁺; (b) 0.23 M Ca²⁺

收集菌体条件: 菌体培养是在含有 600 mL 合成培养基的 1 L 发酵罐中进行, 合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖, 添加不同浓度 Ca²⁺ (0、0.14 M、0.23 M), 以 25% (w/w) Ca(OH)₂ 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 200 rpm, 分别培养 6 h、5 h、7 h 后收集菌体用于 qRT-PCR 实验, 将 0 g/L Ca²⁺ 基因表达量设为 1。

3.3.4 *P. acidilactici* HD 的构建和 Ca²⁺耐受性发酵测试

从以上结果可知, 高浓度的 Ca²⁺影响乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 的糖代谢、乳酸产量和一些转运蛋白的基因表达水平。为提高菌株在高浓度 Ca²⁺发酵体系中的糖代谢能力和乳酸产量, 将在外源添加 0.23 M Ca²⁺上调表达明显的 DMT 家族转运蛋白的编码基因 RS00830 整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组上以构建耐受 Ca²⁺的重组菌株。具体

构建过程参考图 2.1, 得到重组菌株 *P. acidilactici* HD。

接着, 在含有高浓度 Ca^{2+} 的 MRS 培养基中对原始菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 RS00830 基因整合菌株 *P. acidilactici* HD 的糖消耗和乳酸发酵性能进行了比较(图 3.5)。发酵 72 h 后, *P. acidilactici* HD 的葡萄糖、木糖和乳酸产量相较于 *P. acidilactici* ZY271 并没有明显差异, 即在高浓度 Ca^{2+} 合成培养基中 *P. acidilactici* HD 并没有表现出明显的 Ca^{2+} 耐受能力, RS00830 基因编码的蛋白可能并没有明显的 Ca^{2+} 外排能力。

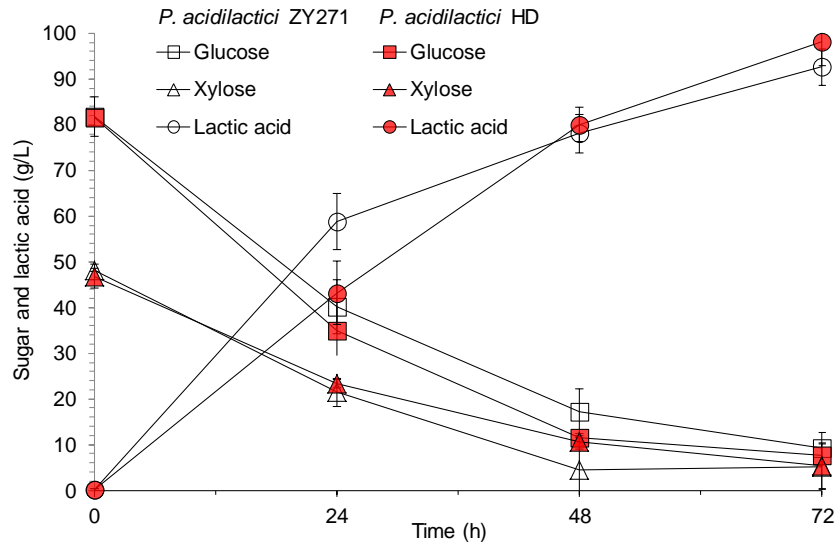


图 3.5 *P. acidilactici* HD 在 MRS 培养基中的 L-乳酸发酵评价

Fig. 3.5 L-lactic acid fermentation performance evaluation of *P. acidilactici* HD in MRS medium.

发酵条件: 发酵是在含有 1 L 合成培养基的 3 L 发酵罐中进行的, 合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖, 以 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 300 rpm, 共发酵 72 h, 每 24 h 取样。

实验最终目的是利用木质纤维进行高指标的乳酸生产, 合成培养基的成分和真实木质纤维素体系存在差异。因此使用固含量为 25% (w/w) 的小麦秸秆利用 *P. acidilactici* HD 进行同步糖化共发酵 SSCF 生产乳酸, 测试其在真实木质纤维素体系下的 Ca^{2+} 耐受能力 (图 3.6a)。发酵 72 h 后, *P. acidilactici* HD 重组菌株和 *P. acidilactici* ZY271 对照菌株相比糖耗和乳酸产量并没有表现出明显差异, 而且 25% (w/w) 的小麦秸秆产生的初始糖比较少 (葡萄糖约 70 g/L, 木糖约 40 g/L)。在 24 h 时两种菌株就已耗完所有糖, 因此也无法判断 *P. acidilactici* HD 的发酵性能。接着, 在 30% 固含量的小麦秸秆水解液体系中进行 *P. acidilactici* HD 的发酵性能测试 (图 3.6b), 发现 *P. acidilactici* HD 和 *P. acidilactici* ZY271 对照菌株相比, 葡萄糖和木糖的消耗基本一致, 乳酸的产量也并没有明显差异。30% 固含量的小麦秸秆产生的糖足以供给菌株发酵 60 h, 发酵后期菌株活力下降, 即使有更多糖菌株也可能不再消耗, 而且更高的固含量传质效率较低, 不利于进行发酵。因此, *P. acidilactici* HD 在 30% 固含量的小麦秸秆水解液中没有提高糖代谢和乳酸产量, 这说明 RS00830 基因编码的 DMT 家族转运蛋白没有起转运 Ca^{2+} 的作用。至

于 *RS00830* 基因在高浓度 Ca^{2+} 环境中上调表达明显的现象, 推测是因为 Ca^{2+} 在细胞中作为第二信使调控着细胞的增殖、代谢等多种生化过程, 并参与细胞内与细胞间的信号转导。 Ca^{2+} 浓度发生变化将引发细胞内信号途径的连锁反应, 进而诱导一系列生理变化。因此, 高浓度的 Ca^{2+} 可能正是通过信号转导途径, 触发了 DMT 家族的 *RS00830* 基因上调表达。

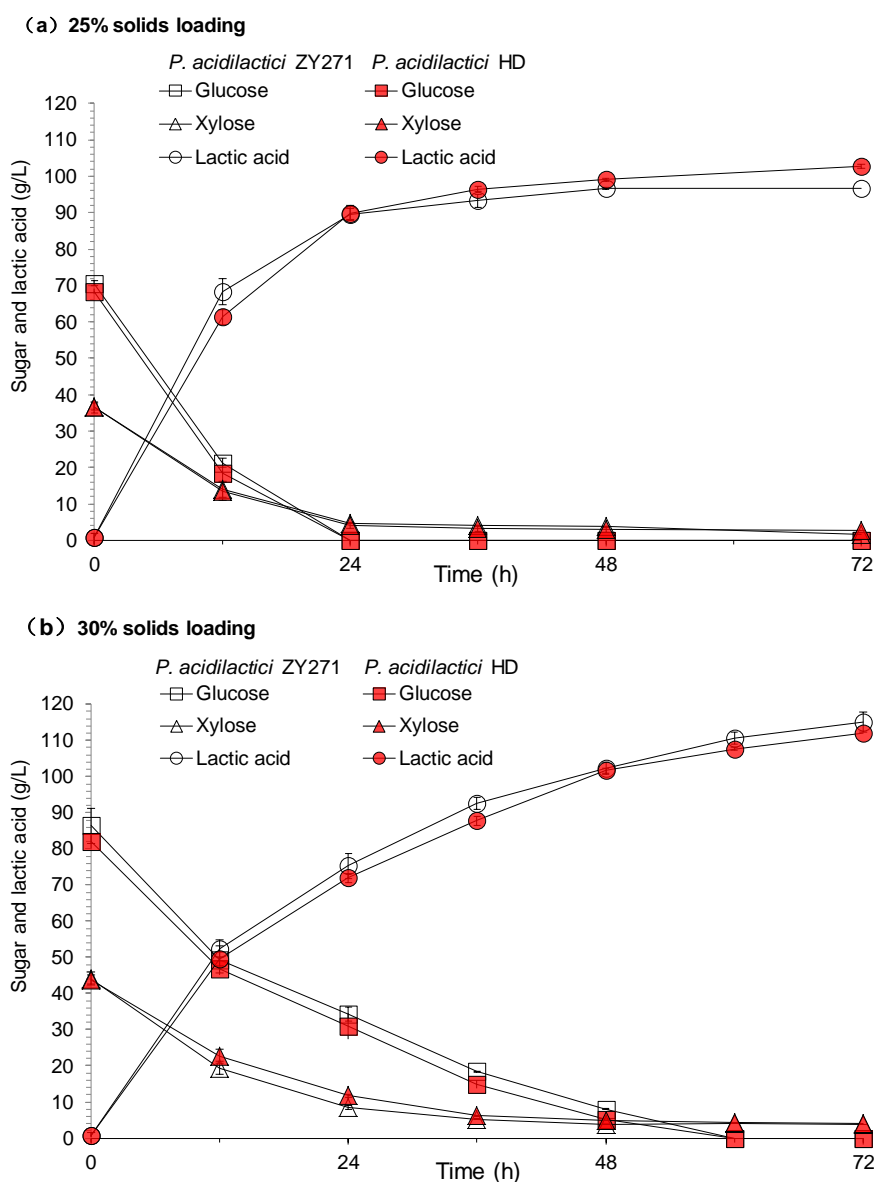


图 3.6 *P. acidilactici* HD 的小麦秸秆原料同步糖化与共发酵评价

(a) 25% (w/w) 小麦秸秆固体含量; (b) 30% (w/w) 小麦秸秆固体含量

Fig. 3.6 Simultaneous saccharification and co-fermentation of wheat straw under different solids loading by *P. acidilactici* HD

(a) 25% (w/w) solids loading; (b) 30% (w/w) solids loading

发酵条件: 发酵是在含有 1 L 麦秆水解液的 3 L 发酵罐中进行的, 以 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 300 rpm, 共发酵 72 h, 每 12 h 取样。

3.3.5 *P. acidilactici* HD 对 Na⁺的耐受性评估

据研究表明 DMT 超家族包含 14 个家族^[130], 其中 Small Multidrug Resistance (SMR) 是阳离子特异性多药外排泵, Jiang 等^[131]将嗜盐菌中的两个 Paired Small Multidrug Resistance (PSMR) 家族蛋白基因 *PsmrAB* 在 *E.coli* KNabc (缺乏三种主要 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白 NhaA, NhaB 和 ChaA) 中过表达, 发现 *PsmrAB* 基因同时存在时 *E.coli* KNabc 在 0.6 M NaCl 条件下有 Na⁺ (Li⁺) /H⁺逆向转运活性。此外, DMT 超家族中的 Major Facilitator (MF) 成员 TetA (L)^[132]和 MdfA^[133]均表现出明显的 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白活性。因此, 推测 *RS00830* 编码的 DMT 家族转运蛋白极可能具有 Na⁺/H⁺逆向转运活性。

本论文尝试探究该重组菌能否耐受高浓度 Na⁺。在 MRS 培养基中加入不同浓度的 Na⁺, 分别是 0、0.22、0.43、0.65、0.87、1.30 M (折算成乳酸钠分别为 0、25、48、73、97、146 g/L) (图 3.7), 发酵 48 h, 发现随着 Na⁺浓度的增加, *P. acidilactici* HD 和原始菌株的葡萄糖消耗能力和乳酸产量均呈下降趋势。当 Na⁺浓度达到 0.87 M 和 1.30 M 时, 菌株的代谢完全被抑制, 说明 Na⁺显著抑制乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271。在无 Na⁺的发酵环境中, *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* HD 的葡萄糖消耗和乳酸产量基本一致。随着 Na⁺浓度逐渐增加, *P. acidilactici* HD 的发酵水平都优于原始菌株。在 Na⁺浓度为 0.65 M 时, *P. acidilactici* HD 的乳酸产量比对照菌株多 1.34 倍。这说明其有明显的 Na⁺耐受能力, *RS00830* 编码的 DMT 家族转运蛋白在高浓度 Na⁺条件下能够有效外排 Na⁺, 从而维持细胞的 Na⁺平衡, 保证菌株在高浓度 Na⁺胁迫下的正常生长和代谢。

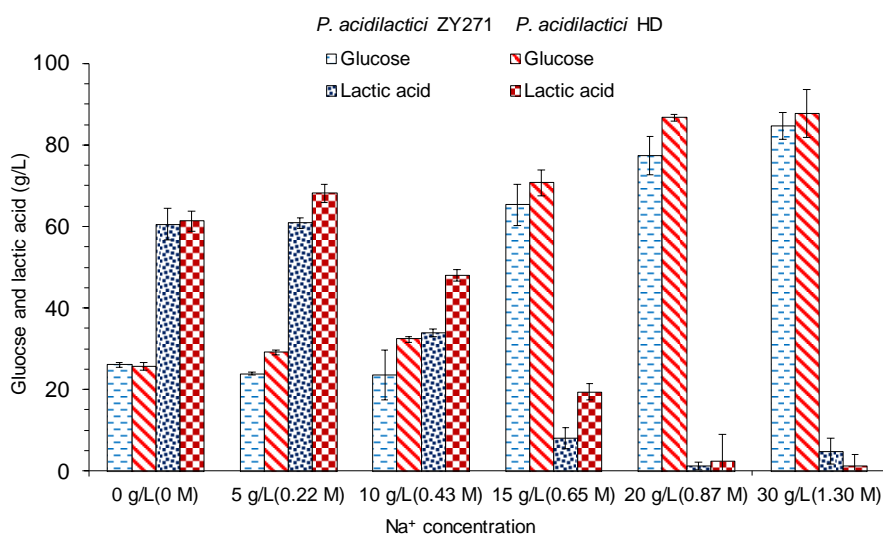


图 3.7 *P. acidilactici* HD 在不同 Na⁺浓度胁迫下的 L-乳酸发酵

Fig. 3.7 L-lactic acid fermentation performance of *P. acidilactici* HD under stress of different sodium ion concentrations.

发酵条件：发酵是在含有 50 mL 合成培养基的 250 mL 三角瓶中进行的，合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖，额外添加不同浓度的乳酸钠营造不同的 Na⁺梯度，加入 0.6g CaCO₃/g 糖调节 pH，温度为 42 °C，转速为 150 rpm，共发酵 48 h。

3.3.6 *P. acidilactici* HD 糖代谢路径相关基因转录水平分析

从木质纤维素体系中的发酵结果来看，高浓度 Na⁺胁迫环境下重组菌株 *P. acidilactici* HD 的葡萄糖代谢能力明显优于出发菌株，而木糖和乳酸产量没有明显变化。为分析这一实验结果，本论文以 *P. acidilactici* HD 为实验组，*P. acidilactici* ZY271 为对照组，在葡萄糖初始浓度为 100 g/L，木糖初始浓度为 50 g/L（接近固含量 30% (w/w) 小麦秸秆的初始糖浓度）的合成培养基中培养菌株，对其糖代谢路径上的关键基因进行了 qRT-PCR 分析(图 3.9)。从实验结果来看，葡萄糖代谢途径中从葡萄糖到葡萄糖 6-磷酸的 *manx* 基因，从葡萄糖 6-磷酸到果糖 6-磷酸的 *pgi* 基因以及从果糖 6-磷酸到 L-乳酸的 *eno1* 基因显著上调表达，而木糖代谢相关的几个关键基因和 L-乳酸脱氢酶基因没有出现明显上调表达。*manx* 基因编码 PTS 转运蛋白，此蛋白的主要作用是将各种糖及其衍生物进行磷酸化之后运输到胞内^[134]。*pgi* 基因编码葡萄糖 6-磷酸异构酶，该酶的功能是催化葡萄糖 6-磷酸生成果糖 6-磷酸，这是糖酵解途径中的一个关键步骤，它将磷酸葡萄糖异构化为能够进一步转化为丙酮酸的中间产物，因此这些基因的上调表达可以加快葡萄糖的代谢速率。*eno* 基因编码磷酸丙酮酸水合酶，该酶的功能是负责催化 2-磷酸甘油酸 (2-PG) 转化为磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)，是果糖 6-磷酸到 L-乳酸的重要一步^[135]。*ldhL* 基因编码 L-乳酸脱氢酶，是丙酮酸转化为 L-乳酸的关键酶。

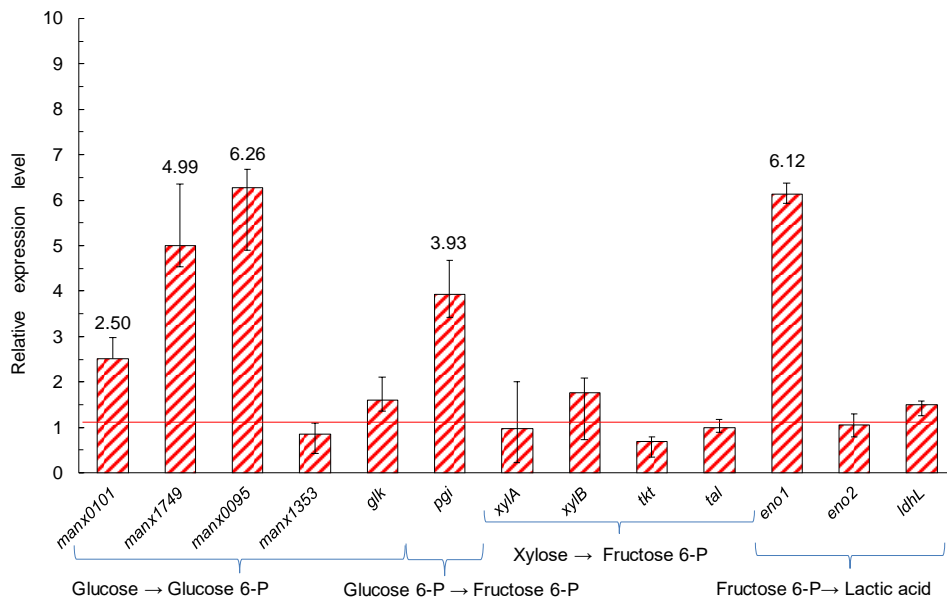


图 3.9 *P. acidilactici* HD 在 Na^+ 胁迫下的糖代谢相关基因转录水平测试

Fig. 3.9 Transcriptional levels of the sugar metabolism genes in *P. acidilactici* ZY271 under stress of Na^+ by qRT-PCR analysis.

收集菌体条件: 菌体培养是在含有 600 mL 合成培养基的 1 L 发酵罐中进行, 合成培养基含有 100 g/L 葡萄糖和 50 g/L 木糖, 以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 200 rpm, 培养 12 h 收集菌体用于 qRT-PCR 实验。

3.3.7 木质纤维素体系下 *P. acidilactici* HD 对 Na^+ 的耐受性评估

为了探究重组菌株 *P. acidilactici* HD 在真实木质纤维素体系下的 Na^+ 耐受能力, 本论文在 3 L 生物反应器中, 使用固含量为 30% (w/w) 的小麦秸秆进行 SSCF 生产乳酸, 用 13.5 M NaOH 调节 pH (图 3.8)。发酵 72 h 后, 原始菌株 *P. acidilactici* ZY271 的发酵液中还残余约 21.32 g/L 葡萄糖, 而重组菌株 *P. acidilactici* HD 的葡萄糖完全耗尽, 木糖的代谢情况及最终的 L-乳酸产量没有明显提高。推测是因为木质纤维素水解液存在的抑制物, 导致更多的糖用于了菌体的生长。

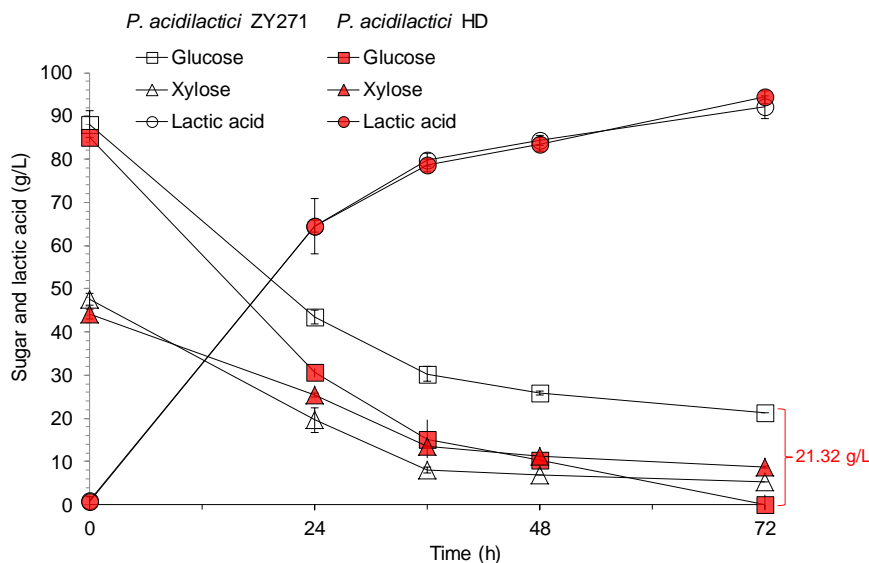


图 3.8 *P. acidilactici* HD 的小麦秸秆原料同步糖化与共发酵评价

Fig. 3.8 Simultaneous saccharification and co-fermentation of wheat straw by *P. acidilactici* HD
 发酵条件:发酵是在含有 1 L 麦秆水解液(固含量 30%(w/w))的 3 L 发酵罐中进行的,以 13.5 M NaOH 作为中和剂维持 pH 在 5.5, 温度为 42 °C, 转速为 300 rpm, 共发酵 72 h, 每 24 h 取样。

3.4 本章小结

木质纤维素发酵体系中过量的 Ca^{2+} 会对乳酸菌的糖代谢和乳酸产量造成抑制, 将在高浓度 Ca^{2+} 环境中上调表达的 DMT 家族转运蛋白编码基因 *RS00830* 整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组上, 并没有明显提高菌株的 Ca^{2+} 耐受性, 但意外发现重组菌株对 Na^{+} 的耐受能力得到提高。本章的主要结论如下:

(1) 通过 q-PCR 分析发现, 在高浓度 Ca^{2+} 的环境中存在上调表达明显的 DMT 家族转运蛋白编码基因 *RS00830*。通过同源重组的方式, 将其整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组的 *ackA3* 位点, 得到重组菌株 *P. acidilactici* HD。在合成培养基 MRS 和木质纤维素体系中, 相较于出发菌株 *P. acidilactici* ZY271, 重组菌株的糖耗和乳酸产量没有明显提高, 说明 DMT 家族转运蛋白的整合表达没有提高菌株的 Ca^{2+} 耐受性。

(2) 在高浓度 Na^{+} 发酵体系中, *P. acidilactici* HD 重组菌株葡萄糖消耗速率明显优于出发菌株。这说明相较于 Ca^{2+} 来说, *RS00830* 基因编码的 DMT 家族转运蛋白可明显提高菌株的 Na^{+} 耐受能力。通过 qRT-PCR 分析发现, 葡萄糖代谢相关基因上调表达明显, L-乳酸脱氢酶基因没有明显变化。在高固含量的木质纤维素发酵体系下, 重组菌株 *P. acidilactici* HD 的葡萄糖代谢虽然得以提高, 但是乳酸产量并没有得到改善。这说明在高浓度 Na^{+} 木质纤维素体系中提高 *P. acidilactici* HD 的 L-乳酸产量可能还需要 L-乳酸脱氢酶。此研究为 *P. acidilactici* ZY271 的 Na^{+} 耐受能力强化提供了参考, 为 DMT 家族转运蛋白功能的进一步研究提供了新的思路。

第4章 结论与展望

4.1 结论

乳酸发酵过程中的 pH 调控添加的碱液会导致高浓度 Na^+ 和 Ca^{2+} 金属离子富集, 抑制发酵菌株的生长和产物积累。针对这个重要问题, 本研究开展了以下工作: 借助 qRT-PCR 挖掘和筛选了 *P. acidilactici* ZY271 的金属离子转运相关基因, 并通过理性改造提高了 *P. acidilactici* ZY271 的 Na^+ 耐受能力; 将具有显著 Na^+ 外排能力的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的编码基因整合到 *P. acidilactici* ZY271 的基因组, 得到发酵性能稳定的重组菌株, 并评价高浓度 Na^+ 发酵环境中重组菌株的发酵性能。以下是本论文的主要结论:

(1) 将明显提高 *P. acidilactici* ZY271 Na^+ 耐受能力的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因 *RS02775* 整合到 *P. acidilactici* ZY271 基因组上, 构建得到性能稳定的重组菌株 *P. acidilactici* HN。该重组菌株在高浓度 Na^+ 环境中的糖代谢和乳酸产量均下降, 这表明将 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因整合到 *P. acidilactici* ZY271 的基因组后影响了糖代谢。在高浓度 Na^+ 环境下, *P. acidilactici* HN 的 H^+ -ATPase 相关基因有部分没有上调表达, 说明 H^+ -ATPase 的表达量可能不足以外排 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白形成的过量胞内 H^+ , H^+ 在胞内累积, 影响了菌株的正常代谢。适应性进化无法有效改善 *P. acidilactici* HN 的代谢网络。需要通过理性改造提高 *P. acidilactici* HN 的 H^+ -ATPase 活性, 进而提高菌株的 H^+ 外排能力, 达到 H^+ 和 Na^+ 的平衡。

(2) 在高浓度 Ca^{2+} 环境下, *P. acidilactici* ZY271 的金属离子转运蛋白基因的基因转录分析表明, DMT 家族转运蛋白 *_RS00830* 基因显著上调表达。将其整合到 *P. acidilactici* ZY271 的基因组后发现, 重组菌株 *P. acidilactici* HD 在高浓度 Ca^{2+} 环境中发酵能力并没有明显提高。但是意外发现其在高浓度 Na^+ 环境中展现出优异的发酵性能, 展现出显著的 Na^+ 耐受能力。通过 qRT-PCR 分析发现, 该重组菌株的葡萄糖代谢相关基因显著上调表达, L-乳酸脱氢酶基因没有明显变化。在木质纤维素发酵体系中, 该重组菌株的葡萄糖消耗速率加快而乳酸产量没有变化。在高浓度 Na^+ 的木质纤维素体系, 提高 *P. acidilactici* HD 的 L-乳酸产量可能还需要 L-乳酸脱氢酶。

4.2 创新点

通过遗传修饰技术, 本论文在 *P. acidilactici* ZY271 中过表达内源 DMT 家族转运蛋白 *RS00830* 基因, 构建了重组菌株 *P. acidilactici* HD, 在高浓度 Na^+ 条件下, 提高了乳酸的产量。本论文首次发现了 *P. acidilactici* 的 DMT 家族转运蛋白 (*RS00830*) 具有提高菌株 Na^+ 耐受的能力。为微生物 Na^+ 耐受性的研究提供了参考, 为 DMT 家族转运蛋白功能的研究提供了新思路。

4.3 展望

本论文针对 *P. acidilactici* 的 Na^+ 和 Ca^{2+} 耐受性问题展开研究。本论文发现了 *P. acidilactici* Na^+/H^+ 逆向转运蛋白外排 Na^+ 的机制比较复杂，单独表达 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白无法提高菌株的 Na^+ 耐受能力。同时发现了一种可以提高 *P. acidilactici* ZY271 Na^+ 耐受能力的内源性蛋白，为后续工作提供了基因参考依据。但是目前，本论文仅开展了基因过量表达实验，更多诸如基因互作等佐证需要进一步研究。

(1) 本论文发现，在 *P. acidilactici* 基因组上整合 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白并没有明显改善菌株的 Na^+ 耐受能力。本论文推测 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的整合表达造成胞内 H^+ 累积，而 H^+ -ATPase 的活性不足以外排过量的 H^+ 。在后续研究中，可以对 H^+ -ATPase 是否与 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白互作后才能提高 *P. acidilactici* 耐受 Na^+ 的能力进行探究。

(2) 本论文参考文献和数据库，通过 qRT-PCR 分析了 *P. acidilactici* 的部分内源性 Ca^{2+} 外排蛋白。整合表达了上调表达明显的基因，而下调表达的基因编码的蛋白也有可能提高菌株的 Ca^{2+} 耐受能力。后续研究可以尝试整合表达下调表达的基因。此外通过转录组实验，进一步考察 *P. acidilactici* 的 Ca^{2+} 外排蛋白全局转录情况。

(3) 本论文针对重组菌株 *P. acidilactici* HD 在木质纤维素体系中葡萄糖代谢速率加快但是乳酸产量没有提高的现象。在后续研究中，将进一步通过基因操作验证过表达 L-乳酸脱氢酶基因的菌株在乳酸生物炼制中的作用。

参考文献

- [1] Upton BM, Kasko AM. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: review and perspective. *Chemical Reviews*. 2016, 116 (4): 2275-2306.
- [2] Zhang ZR, Song JL, Han BX. Catalytic transformation of lignocellulose into chemicals and fuel products in ionic liquids. *Chemical Reviews*. 2016, 117 (10): 6834-6880.
- [3] Toor M, Kumar SS, Malyan SK, Bishnoi NR, Mathimani T, Rajendran K, Pugazhendhi A. An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*. 2020, 242: 125080.
- [4] Kumar V, Binod P, Sindhu R, Gnansounou E, Ahluwalia V. Bioconversion of pentose sugars to value added chemicals and fuels: Recent trends, challenges and possibilities. *Bioresource Technology*. 2018, 269: 443-451.
- [5] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015, 6 (25): 4497-4559.
- [6] Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2017, 71: 475-501.
- [7] Vanholme R, De Meester B, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019, 56: 230-239.
- [8] Mori T, Tsuboi Y, Ishida N, Nishikubo N, Demura T, Kikuchi J. Multidimensional High-Resolution Magic Angle Spinning and Solution-State NMR Characterization of ¹³C-labeled Plant Metabolites and Lignocellulose. *Scientific Reports*. 2015, 5 (1): 11848.
- [9] Si M, Sillanpaa M, Zhuo S, Zhang J, Liu M, Wang S, Gao C, Chai L, Zhao F, Shi Y. Phase separation of co-solvent promotes multiple bio-nanomaterials conversion from natural lignocellulose. *Industrial Crops and Products*. 2020, 152: 112469.
- [10] De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*. 2018, 247: 1144-1154.
- [11] Wyman CE, Dale BE. Producing Biofuels via the Sugar Platform. *Chemical Engineering Progress*. 2015, 111 (3): 45-+.
- [12] Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, Murali N. Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy & Fuels*. 2006, 20 (4): 1727-1737.
- [13] Wen JB, Xiao YQ, Liu T, Gao QQ, Bao J. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 1-12.
- [14] Soltanian S, Aghbashlo M, Almasi F, Hosseinzadeh-Bandbafha H, Nizami A-S, Ok YS,

- Lam SS, Tabatabaei M. A critical review of the effects of pretreatment methods on the exergetic aspects of lignocellulosic biofuels. *Energy Conversion and Management*. 2020, 212: 112792.
- [15] Hong J, Ye XH, Zhang YHP. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir*. 2007, 23 (25): 12535-12540.
- [16] Pan XJ, Xie D, Gilkes N, Gregg DJ, Saddler JN. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 121: 1069-1079.
- [17] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low - cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. 2007, 2 (1): 26-40.
- [18] De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 1144-1154.
- [19] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96 (18): 1959-1966.
- [20] Zhu JY, Pan XJ. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. 2010, 101 (13): 4992-5002.
- [21] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101 (13): 4851-4861.
- [22] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96 (18): 1959-1966.
- [23] Karimi K, Taherzadeh MJ. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource Technology*. 2016, 200: 1008-1018.
- [24] Jung YH, Kim IJ, Kim HK, Kim KH. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2013, 132: 109-114.
- [25] Cao S, Pu Y, Studer M, Wyman C, Ragauskas AJ. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *RSC Advances*. 2012, 2 (29): 10925-10936.
- [26] Kim SM, Dien BS, Singh V. Promise of combined hydrothermal/chemical and mechanical refining for pretreatment of woody and herbaceous biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 1-15. 9.
- [27] Kainthola J, Podder A, Fechner M, Goel R. An overview of fungal pretreatment processes for anaerobic digestion: Applications, bottlenecks and future needs. *Bioresource Technology*. 2021, 321: 124397.

- [28] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, He YQ, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102 (6): 4480-4488.
- [29] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant N-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 1-10.
- [30] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74 (1): 17-24.
- [31] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jonsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 77: 91-103.
- [32] Wu DX, Li Q, Wang D, Dong YG. Enzymatic hydrolysis and succinic acid fermentation from steam-exploded corn stalk at high solid concentration by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 170 (8): 1942-1949.
- [33] Liu Y, Liu G, Zhang J, Balan V, Bao J. Itaconic acid fermentation using activated charcoal-treated corn stover hydrolysate and process evaluation based on Aspen plus model. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2020, 10 (2): 463-470.
- [34] Kucera D, Benesova P, Ladicky P, Pekar M, Sedlacek P, Obruca S. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolyzates of spruce sawdust: comparison of hydrolyzates detoxification by application of overliming, active carbon, and lignite. *Bioengineering-Basel*. 2017, 4 (2): 53.
- [35] Dong HW, Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6 (5): 316-318.
- [36] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011, 31 (1): 20-31.
- [37] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, 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. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 1-15.
- [38] Zhang B, Khushik FA, Zhan BR, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021, 118 (10): 4105-4118.
- [39] Rinaldi R, Schuth F. Acid Hydrolysis of Cellulose as the Entry Point into Biorefinery Schemes. *Chemsuschem*. 2010, 3 (3): 296-296.
- [40] Ladisch MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 1983, 5 (2): 82-102.
- [41] Walker LP, Wilson DB. Enzymatic hydrolysis of cellulose an overview. *Bioresource Technology*. 1991, 36 (1): 3-14.
- [42] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal*

- of Biotechnology. 2011, 156 (4): 286-301.
- [43] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008, 35 (5): 377-391.
- [44] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19 (4): 1109-1117.
- [45] Ask M, Olofsson K, Di Felice T, Ruohonen L, Penttila M, Liden G, Olsson L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47 (10): 1452-1459.
- [46] Parisutham V, Kim TH, Lee SK. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*, 2014, 161: 431-440.
- [47] Paulova L, Patakova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. 2015, 33 (6): 1091-1107.
- [48] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2000, 25 (4): 184-192.
- [49] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, Kondo A. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 42: 30-39.
- [50] Hu Y, Wu HL, Yin XL, Gu HW, Xiao R, Xie LX, Liu Z, Fang H, Wang L, Yu RQ. Rapid and interference-free analysis of nine B-group vitamins in energy drinks using trilinear component modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data. *Talanta*. 2018, 180: 108-119.
- [51] Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006, 81 (7): 1119-1129.
- [52] Oshiro M, Shinto H, Tashiro Y, Miwa N, Sekiguchi T, Okamoto M, Ishizaki A, Sonomoto K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, 108 (5): 376-384.
- [53] Ouyang J, Ma R, Zheng Z, Cal C, Zhang M, Jiang T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp strain NLO1 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 475-480.
- [54] Singhvi M, Joshi D, Adsul M, Varma A, Gokhale D. D-(-)-Lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-24. *Green Chemistry*. 2010, 12 (6): 1106-1109.
- [55] Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of

- enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85 (3): 413-423.
- [56] Adnan AFM, Tan IKP. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*. 2007, 98 (7): 1380-1385.
- [57] Fukushima K, Kimura Y. An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly (lactic acid)s with high molecular weight. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*. 2008, 46 (11): 3714-3722.
- [58] Khaliq NU, Chobisa D, Richard CA, Swinney MR, Yeo Y. Engineering microenvironment of biodegradable polyester systems for drug stability and release control. *Therapeutic delivery*. 2021, 12 (1): 37-54.
- [59] Dey P, Pal P. Direct production of L-lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions. *Journal of Membrane Science*. 2012, 389: 355-362.
- [60] Pal P, Sikder J, Roy S, Giorno L. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2009, 48 (11-12): 1549-1559.
- [61] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26 (2-4): 87-107.
- [62] Castro-Aguirre E, Iniguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly (lactic acid)-Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107: 333-366.
- [63] Tamakawa H, Ikushima S, Yoshida S. Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, 113 (1): 73-75.
- [64] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2):163-172.
- [65] Bernardo MP, Coelho LF, Sass DC, Contiero J. L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, 47 (3): 640-646.
- [66] Fu YQ, Yin LF, Zhu HY, Jiang R. High-efficiency L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using a novel modified one-step fermentation strategy. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 410-417.
- [67] Hohmann S. Characterization of *pdh6* a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 1991, 173 (24): 7963-7969.
- [68] Chang DE, Jung HC, Rhee JS, Pan JG. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65 (4): 1384-1389.

- [69] Tian XW, Liu XH, Zhang YF, Chen Y, Hang HF, Chu J, Zhuang YP. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Bioresource Technology*. 2021, 323: 124549.
- [70] Park EY, Anh PN, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to L(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*. 2004, 93 (1): 77-83.
- [71] 张勤, 张梁, 丁重阳, 王正祥, 石贵阳. 代谢工程改造野生耐酸酵母生产 L-乳酸. *生物工程学报*. 2011, 27 (07): 1024-1031.
- [72] Ilmen M, Koivuranta K, Ruohonen L, Suominen P, Penttila M. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73 (1): 117-123.
- [73] Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, Nagamori E, Matsuyama T, Kitamoto K, Takahashi H. Efficient production of L-Lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71 (4): 1964-1970.
- [74] John RP, Nampoothiri KM. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2008, 24 (12): 3105-3109.
- [75] PM De Oliveira, Santos LP, Coelho LF, Avila Neto PM, Sass DC, Contiero J. Production of L (+) Lactic Acid by *Lactobacillus casei* Ke11: Fed Batch Fermentation Strategies. *Fermentation-Basel*. 2021, 7 (3): 151
- [76] Sun YQ, Liu HH, Yang Y, Zhou X, Xiu ZL. High-efficient L-lactic acid production from inedible starchy biomass by one-step open fermentation using thermotolerant *Lactobacillus rhamnosus* DUT1908. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2021, 44 (9): 1935-1941.
- [77] Adsul M, Khire J, Bastawde K, Gokhale D. Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73 (15): 5055-5057.
- [78] Li SC, Zhu ZY, Gu SB, Liu HX, Wang DD. Mutation-screening in L-(+)-lactic acid producing strains by ion implantation. *Indian Journal of Microbiology*. 2011, 51 (2): 138-143.
- [79] Shen YL, Kang BH, Lu Y, Du XY, Qin C, Li J, Zhao ZE, Yu R, Shi S, Han LJ. Production of optical pure L-lactic acid from Cabernet Sauvignon grape pomace by engineered *Lactiplantibacillus plantarum*. *Frontiers in Energy Research*. 2023, 11: 1228827.
- [80] Shinkawa S, Okano K, Yoshida S, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Improved homo L-lactic acid fermentation from xylose by abolishment of the phosphoketolase pathway and enhancement of the pentose phosphate pathway in genetically modified xylose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- 2011, 91 (6): 1537-1544.
- [81] Zhao K, Qiao QG, Chu DQ, Gu HQ, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-489.
- [82] Yi X, Zhang P, Sun JE, Tu Y, Gao QQ, Zhang J, Bao J. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121.
- [83] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369-1376.
- [84] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000, 1 (1): 11-21.
- [85] Wang JB, Zhang RJ, Mao ZG, Xue DS, Zhu ZJ, Yu HC, Cai FJ, Cai LY, Bao JW, Xu J. Full recycling of citric acid wastewater through anaerobic digestion, air-stripping and pH control. *Water Science and Technology*. 2019, 80 (6): 1196-1204.
- [86] 华玉涛, 焦鹏, 曹竹安. 钙离子对热带假丝酵母 CT1-12 细胞生长影响的初步研究. *工业微生物*. 2001 (04): 37-39.
- [87] Padan E, Venturi M, Gerchman Y, Dover N. Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 2001, 1505 (1): 144-157.
- [88] Karpel R, Olami Y, Taglicht D, Schuldiner S, Padan E. Sequencing of the gene ant which affects the sodium proton antiporter activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 1988, 263 (21): 10408-10414.
- [89] Krulwich TA. Alkaliphiles: Basic molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. *Molecular Microbiology*. 1995, 15 (3): 403-410.
- [90] Zhong NQ, Han LB, Wu XM, Wang LL, Wang F, Ma YH, Xia GX. Ectopic expression of a bacterium nhad-type Na⁺/H⁺ antiporter leads to increased tolerance to combined salt/alkali stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2012, 54 (6): 412-421.
- [91] Wu LQ, Fan ZM, Guo L, Li YQ, Chen ZL, Qu LJ. Over-expression of the bacterial nhaA gene in rice enhances salt and drought tolerance. *Plant Science*. 2005, 168 (2): 297-302.
- [92] Gao XC, Gao QQ, Bao J. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene *ZMO0119*. *Journal of Biotechnology*. 2018, 282: 32-37.
- [93] Dominguez DC, Guragain M, Patrauchan M. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*. 2015, 57 (3): 151-165.
- [94] Shemarova IV, Nesterov VP. Ca²⁺ signaling in prokaryotes. *Mikrobiologiya*. 2014, 83 (5): 511-518.
- [95] Cai XJ, Lytton J. The cation/Ca²⁺ exchanger superfamily:: Phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution*. 2004, 21 (9): 1692-1703.

- [96] Emery L, Whelan S, Hirschi KD, Pittman JK. Protein phylogenetic analysis of Ca^{2+} /cation antiporters and insights into their evolution in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2012, 3: 16842.
- [97] Ivey DM, Guffanti AA, Zemsky J, Pinner E, Karpel R, Padan E, Schuldiner S, Krulwich TA. Cloning and characterization of a putative $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268 (15): 11296-11303.
- [98] Qiao K, Wang FH, Liang S, Hu ZL, Chai TY. Heterologous expression of TuCAX1a and TuCAX1b enhances Ca^{2+} and Zn^{2+} translocation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*. 2019, 38 (5): 597-607.
- [99] Kamiya T, Akahori T, Maeshima M. Expression profile of the genes for rice cation/ H^{+} exchanger family and functional analysis in yeast. *Plant and Cell Physiology*. 2005, 46 (10): 1735-1740.
- [100] Maya-Hoyos M, Rosales C, Novoa-Aponte L, Castillo E, Soto CY. The P-type ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Heliyon*. 2019, 5 (11): e02852.
- [101] Guragain M, Lenaburg DL, Moore FS, Reutlinger I, Patrauchan MA. Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium*. 2013, 54 (5): 350-361.
- [102] Schaedler TA, Tong Z, van Veen HW. The multidrug transporter LmrP protein mediates selective calcium efflux. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287 (33): 27682-27690.
- [103] Tian WZ, Qin JY, Lian CC, Yao QS, Wang XW. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH. *BMC Microbiol*. 2022, 22 (1): 310.
- [104] Qin JY, Wang XW, Zheng ZJ, Ma CQ, Tang HZ, Xu P. Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. *Bioresource Technology*. 2010, 101(19): 7570-7576.
- [105] 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. *Fems Microbiol Lett*. 2015, 362 (2): 1-7.
- [106] 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*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015, 46 (3): 893-902.
- [107] Ohkouchi Y, Inoue Y. Direct production of L+-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. *Bioresource Technology*. 2006, 97 (13): 1554-1562.
- [108] Ahmad MN, Awang Adeni DS, Suhaili N, Bujang K. Optimisation of pre-harvest sago frond sap for the production of l-lactic acid using *Lactococcus lactis* IO-1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022, 43: 102435.

- [109] Hetényi K, Németh Á, Sevelle B. Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chemical Engineering and Processing-process Intensification*. 2011, 50 (3): 293-299.
- [110] Kong X, Zhang B, Hua Y, Zhu YL, Li WJ, Wang DM, Hong J. Efficient l-lactic acid production from corncob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast. *Bioresource Technology*. 2019, 273: 220-230.
- [111] Wei CX, Liu G, Zhang J, Bao J. Elevating fermentation yield of cellulosic lactic acid in calcium lactate form from corn stover feedstock. *Industrial Crops and Products*. 2018, 126: 415-420.
- [112] He NL, Fang C, Qiu ZY, Bao J. Increasing sodium lactate production by enhancement of Na⁺ transmembrane transportation in *Pediococcus acidilactici*. *Bioresource Technology*. 2021, 323: 124562.
- [113] Kolacna L, Zimmermannova O, Hasenbrink G, Schwar-Zer S, Ludwig J, Lichtenberg-Fraté H, Sychrova H. New phenotypes of functional expression of the mKir2.1 channel in potassium efflux-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast*. 2005,22: 1315-1323.
- [114] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*. 2001, 25(4): 402-408.
- [115] 涂毅. 木质纤维素依赖型 *Pediococcus acidilactici* DQ2 中外源功能基因的表达及基因敲除. [D]. 华东理工大学. 2013.
- [116] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 2018, 249: 9-15.
- [117] 邱忠洋. 高产木质纤维素手性乳酸的乳酸片球菌全糖代谢路径构建与抗逆性强化改造. [D]. 华东理工大学; 2020.
- [118] Kinoshita N, Unemoto T, Kobayashi H. Sodium stimulated atpase in *streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 1984, 158 (3): 844-848.
- [119] Banuelos MA, Quintero FJ, Rodriguez-Navarro A. Functional expression of the ENA1(PMR2)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 1995, 1229 (2): 233-238.
- [120] Heefner DL, Harold FM. ATP Driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982, 79 (9): 2798-2802.
- [121] Watanabe Y, Oshima N, Tamai Y. Co-expression of the Na⁺/H⁺ antiporter and H⁺-ATPase genes of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Research*. 2005, 5 (4-5): 411-417.
- [122] Zhou SF, Zhang ZM, Tang QL, Lan H, Li YX, Luo P. Enhanced V-ATPase activity contributes to the improved salt tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter AtNHX1. *Biotechnology Letters*. 2011, 33 (2): 375-380.
- [123] Futai M, Noumi T, Maeda M. ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined

- biochemical and molecular biological approaches. Annual Review of Biochemistry. 1989, 58:111-136.
- [124] Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. International Journal of Food Microbiology. 2004, 93(1): 109-113.
- [125] Shi HZ, Ishitani M, Kim CS, Zhu JK. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000, 97 (12): 6896-6901.
- [126] Futai M, Kanazawa H. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches. Microbiological reviews. 1983, 47 (3): 285-312.
- [127] Kuehlbrandt W. Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. Annual Review of Biochemistry. 2019, 88: 515-549
- [128] 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. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 2012.
- [129] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976, 72 (1): 248-254.
- [130] Jack DL, Yang NM, Saier MH, Jr. The drug/metabolite transporter superfamily. European Journal of Biochemistry. 2001, 268 (13): 3620-3639.
- [131] Jiang JQ, Wang L, Zhang H, Wu HP, Huang HP, Yang LF. Putative paired small multidrug resistance family proteins PsmrAB, the homolog of YvdSR, actually function as a novel two-component Na⁺/H⁺ antiporter. Fems Microbiology Letters. 2013, 338 (1): 31-38.
- [132] Cheng J, Guffanti AA, Krulwich TA. The chromosomal tetracycline resistance locus of *Bacillus subtilis* encodes a Na⁺/H⁺ antiporter that is physiologically important at elevated pH. Journal of Biological Chemistry. 1994, 269 (44): 27365-27371.
- [133] Edgar R, Bibi E. MdfA, An *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. Journal of Bacteriology. 1997, 179 (7): 2274-2280.
- [134] Jeckelmann JM, Erni B. Carbohydrate transport by group translocation: The bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system. Bacterial Cell Walls and Membranes. 2019, 92: 223-274.
- [135] Luo XM, Luan C, Zhou JQ, Ye YY, Zhang W, Jain R, Zhang E, Chen N. Glycolytic enzyme Enolase-1 regulates insulin gene expression in pancreatic beta-cell. Biochemical and biophysical research communications. 2024, 706: 149735-149735.

附录 I 第二章 qRT-PCR 基因分析及引物

Gene	Primer sequence(5'-3')	
	Forward	Reverse
Three selected genes of primers for H ⁺ -ATPase F ₀ subunit		
<i>16S rRNA</i>	GTCCATGCCGTAAACGATGATT	CTTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
<i>atpB</i>	CATTTTCGGGATTGGTTGC	TACGGGTTTCCGTTTCGT
<i>atpE</i>	TGGTGGTGGTATCGGTGAC	CGAAGGCTAAGATTGGCATA
<i>atpF</i>	GCGGATCGGATTTCTAATG	GTAGTTGCTTCGGCGTGAG
Five selected genes of primers for H ⁺ -ATPase F ₁ subunit		
<i>alapha</i>	AGCGATTACTTCCATTCCG	ATTTAGCTTGGGTTGCCTTA
<i>beta</i>	GGGATGGATGAACTGTCTGA	GGAATGCTTCTTCTGGGAG
<i>gamma</i>	GCTGAATATGAAACCGAACC	TGGCACCGTAAACCAAAC
<i>epsllon</i>	GAAGATGTAGTGGCGGTGAA	GCTCGCTATTATCGTGAGCT
<i>delta</i>	AGTTATTTCCGCCATTCCA	ACCGTCGTAGATCAAACCATC

附录 II 第三章 qRT-PCR 基因分析及引物

Gene	Primer sequence(5'-3')	
	Forward	Reverse
Two selected genes of primers for cation:dicarboxylase symporter family transporter		
<i>16S rRNA</i>	GTCCATGCCGTAAACGATGATT	CTTTTGAGTTTCAACCTTGCGG
<i>RS01850</i>	AGAATGGTTTCGCCTCGTC	TCGGGTGGTATGCGTTA
<i>RS00225</i>	CTCGGCCACCAGATTACG	GAAGGTCAACCCGCTCAT
One selected genes of primers for cation diffusion facilitator family transporter		
<i>RS06675</i>	GGTGCTAAGCGTTCAGG	GCAAAGTTGCGTGTTCTGA
One selected genes of primers for cation:proton antiporter		
<i>RS00955</i>	ATGACATCCTTGCGTATTG	AAAGATGGTCCGCTGCTC
Three selected genes of primers for sodium:proton antiporter		
<i>RS01650</i>	CATCAATGGCATTACGG	GGTAAGACGAGCGGCAAA
<i>RS04920</i>	AGGCTGCTTAGCGGTCTT	CATTCCGGCGTTGTTTA
<i>RS08635</i>	CTAGGTGGCGTGCTCGTT	GCTCCCATCGACTAAGAA
Four selected genes of primers for magnesium transporter		
<i>RS00595</i>	CTAGGTGGCGTGCTCGTT	GCTCCCATCGACTAAGAA
<i>RS00635</i>	TTTTCGGCTCGTAGTGGC	AATCCGGGAAGGGTCTAAC
<i>RS01685</i>	CCTGATTGCCTGCTTCCT	GTGGTTTCCGTAGACTGTGC
<i>RS05360</i>	AAAACCTACCACGCCACTTC	CAACGCCTTAGGTAGAAACAG
One selected genes of primers for magnesium-translocating P-type ATPase		
<i>RS04305</i>	TGGGACACGATGGACAAAG	GCGGGACAGATAACGAAAA
One selected genes of primers for Divalent metal cation transporter		
<i>RS00265</i>	GTTCCAAGCCCTCGACAA	GCCAACCACCAATAAATCTG
Two selected genes of primers for DMT(drug/metabolite transporter)family transporter		
<i>RS00830</i>	TAGCGACATTCCGTTCTTTC	CAGCTTCACCCATTACTACGA
<i>RS07685</i>	TAAGCCAATCACCAAAGACC	GCTATGTAACAATGCCCAGAAT
Two selected genes of primers for SMR(small multidrug resistance) transporter		
<i>RS00180</i>	AGCGTAGTGACGGTGGGT	GCTCCAATCCCTGTCCAA
<i>RS08510</i>	GCATTTCTGCGTTACTTTTCG	TAGGTTGATCGGTTCTTCC
One selected genes of primers for MATE(multidrug and toxic compound extrusion) family efflux transporter		
<i>RS07350</i>	ATTGCTTTCCCGGATGTT	GCTTCAGGTTCCCGTCTTA
One selected genes of primers for Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein		
<i>RS07750</i>	TTTTACTGTTTGTGGCTTCG	TTAACCTGGTTGGTGTCGTT
One selected genes of primers for cation-translocating P-type ATPase		
<i>RS07065</i>	TGACGAGGAGTTGGTGGG	GCATTGACCGTGGACATTAG
One selected genes of primers for HAD-IC family P-type ATPase		
<i>RS07715</i>	TAATCGCCACCGACAAGA	AGCGTAGTAACCAGCCAAGA
One selected genes of primers for copper-translocating P-type ATPase		
<i>RS02640</i>	TTGAGCACCGCAGATGTAG	AAATGAACGCCCAGAAGAG

Gene	Primer sequence(5'-3')	
	Forward	Reverse
One selected genes of primers for heavy metal translocating P-type ATPase		
<i>RS01870</i>	TGGCTAACCTAACGGAAATG	AACTGGTCGCCTACCTCAA
Eighteen selected genes of primers for MFS(Major Facilitator Superfamily)transporter		
<i>RS07420</i>	GGGGTTCTTAGCCCGATTA	CATTGCCATTGAGATTCCAG
<i>RS04310</i>	GATCGGTAGTGACCCAGACA	ACGCTGCGATAGACAAAGTAA
<i>RS00065</i>	AGGACCCGTATCACCAAGTT	GGCTATTAACAATCGCTGGA
<i>RS00570</i>	CCCCATTTGCCAGAAGAG	TTACCGATTGACAACCGAAC
<i>RS00905</i>	CTTCATCGTGGGCTGGTC	TGGCAGGCATCATTACAAA
<i>RS01165</i>	AAGTTCACCAGGCAACAAAT	GTTCTACCGCGACAAATAC
<i>RS01455</i>	CTTCATCGTGGGCTGGTC	TGGCAGGCATCATTACAAA
<i>RS01490</i>	TAGTTCATCACGGGACCATT	CGTGTCTGCCTCAATCA
<i>RS01885</i>	TGGTTGGCTTAATGTGCTG	AGTCGTTCCGATTGCTCC
<i>RS02870</i>	ACCTTAGTTGGCACTGGATTT	GTGACAACATTAGCCATACGC
<i>RS03070</i>	CGCAATTAGTTCACATCCAG	AAACGACTTGTCTCCCATCT
<i>RS03435</i>	AACTTCTGACGCAATGTATGG	ACCAGGGCAACTAAAGCAA
<i>RS04075</i>	TCCGACTGGTTGGGTGAG	GATGCCTAATGCACAAACGT
<i>RS07120</i>	CTTCCACGCAGGCTTCTC	GCACTACCACGCCGATAAG
<i>RS07285</i>	GCCCTCGGTTTCCCTATCA	ACGAACCTTCCGTGCTTT
<i>RS07465</i>	GCGGATACCCATGAACCT	AGAGCCCATCTACCAACCC
<i>RS01045</i>	AGCGGTAGTTTCTGCGTTAT	CGCACCCAGTTTGTAAAGG
<i>RS07645</i>	GCTGCTGACGTAACCACG	TCCAAGGATTAGCCCACC
Nine selected genes of primers for glucose metabolism		
<i>manx 1749</i>	GGCCCTGACGATCTCA	GTGCAGCAATTTCTTGTG
<i>manx 0095</i>	GCATGGAAAATCAGCCA	TTTGAATCTACGGCCG
<i>manx 1353</i>	GTCCGGCAGGAGTAGATT	GGGCGTTTAACCACGA
<i>manx_0101</i>	CCGACGAAAGATTGGG	TTCGCTAGGAACTTGTGGATA
<i>glk</i>	CATGCTCGGTTTGGCACT	TGAAGAACGCACGGTAGA
<i>pgi</i>	CGCAAGCAAGGAATACAC	TTACCTTCGGATTCACCC
<i>eno1</i>	TCAAGATGGGTGCTGCTA	CCTGAACGGTGAGATACG
<i>eno2</i>	AAGGGATGGCAAATTCAA	CACGGTAAAGTCCGCAAC
<i>ldhl</i>	AAATCGCTAAAGAAGAAGGC	CACCAACAGGCAATACGG
Four selected genes of primers for xylose metabolism		
<i>xylA</i>	CACATCAATACGATACGGACGC	CACATCAATACGATACGGACGC
<i>xylB</i>	GGTTACCTTGGCAGCTGGATAT	GGAGTCCGTTCTCCAACGATGT
<i>tkt</i>	TTGGGAGCACGTTCTTTGTCTT	TTCAATCGGCTCATGAGTTGGT
<i>tal</i>	CAATCACCACGGTAGAACAGGT	CTTCAATCAAATGATGCGGAT

附录III 本研究所用主要试剂及来源

名称	来源	
蛋白胨	Oxoid (UK)	
酵母粉		
葡萄糖	Tansoole (中国上海)	
木糖		
Tris-HCl (1 M)		
无水乙酸钠		
柠檬酸氢二铵		
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		
$MnSO_4 \cdot H_2O$		
NaCl		
碳酸钙		
氢氧化钙		
RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus		Takara (Japan)
反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit		Toyobo (Japan)
ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	Vazyme (中国南京)	
Prime STAR 聚合酶	Vazyme Biotech (中国南京)	
Restriction enzyme	Thermo Fisher Scientific (中国上海)	
质粒抽提试剂盒	Generay (中国上海)	
基因组提取和产物 纯化试剂盒		
核酸染料	Tanon Science (中国上海)	
红霉素	Biosharp (中国北京)	
EDTA 溶液 (0.5 M)		
琼脂糖 (粉末)	杰能科 (中国无锡)	
糖化酶		
纤维素酶 Cellic CTec 3.0	Novozymes (中国北京)	

致谢

天临六年，我的研究生学习即将要画上句号。这个过程，有艰辛，也有快乐！在此，我要对所有帮助过我的人表示真诚的感谢。

首先，我要感谢我的导师鲍杰教授。鲍老师学识渊博，治学严谨。鲍老师是我见过的对学生最用心的学者！鲍老师关心爱护学生，给我们讲做人的道理。鲍老师定期召开组会，及时解决我们科研中遇到的问题。鲍老师是“传道受业解惑”的好老师。在此，我真诚地祝愿鲍老师身体健康、桃李满天下。

其次，我要感谢张斌师兄和刘祺师姐。感谢他们在我遇到困难时，给我及时的鼓励和帮助。我要感谢何妮玲师姐和李治斌师兄教我各种实验技能。我要感谢张翼、冀娇、宋卓琳、王雅、韩涛、张翼、徐迎迎和 Eric 等师兄师姐们给我的帮助。我要感谢我的同窗刘娇、陈峙苇、韩莹、武师南和张凌霄给我的帮助。我尤其要感谢刘娇何陈峙苇给我科研和生活的帮助。我还要感谢王洁、王新茹、黄意程、渠超龙、李少凯、张兵言、郭海润等师弟师妹们，祝愿大家都科研顺利。

最后，我要感谢我至亲至爱的家人们，感谢你们一直以来的给我的理解与支持，我很爱你们！我要感谢我的闺蜜石远和于莹莹给我生活的帮助何陪伴，你们是在异乡求学的心灵港湾。我还要感谢我的舍友刘小乐、孙榕梓和徐可心！祝愿我的家人和好朋友身体康健、永远幸福。

硕士期间取得成果

已发表论文:

Bin Zhang, **Qingmei Han**, Qi Liu, Ya Wang, Jie Bao*. Recycling of waste calcium carbonate in lignocellulosic biorefining chain for chiral lactic acid production. **Bioresource Technology**. 2024, 395: 130303. (IF=11.4 对应本论文第二章)

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 陆拾壹 页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____