

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 硕士学位论文

乳酸片球菌代谢工程改造合成琥珀酸
及低 pH 耐受性的研究

张凌霄

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

申请学位级别: _____ 硕士 _____ 专业名称: _____ 生物化工 _____

论文定稿日期: _____ 2024. 5. 31 _____ 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

学位论文使用授权声明

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

论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（__年__月__日至__年__月__日）

学位论文作者签名：

指导老师签名：

日期： 年 月 日

日期： 年 月 日

作者声明

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

论文作者签名：

年 月 日

乳酸片球菌代谢工程改造合成琥珀酸及低 pH 耐受性的研究

摘要

琥珀酸是生物基聚合物材料 (PBS) 合成的重要前体。以木质纤维素为原料替代粮食淀粉, 通过生物炼制技术生产琥珀酸具有重要意义。目前, 木质纤维素琥珀酸发酵菌株主要面临着以下问题: (1) 半纤维素处理后产生戊糖不能被有效利用; (2) 木质纤维素预处理后产生的有毒物质抑制菌种的发酵性能; (3) 较低的发醇温度使得发醇速率降低、染菌风险提高。本文以一株重要的工程菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271 作为出发菌株, 利用其对木质纤维素体系的极强适应性、耐高温 (42-48°C) 以及可利用木质纤维素来源全部单糖的特征, 通过代谢工程改造策略在 *P. acidilactici* ZY271 中引入外源还原 TCA (rTCA) 生产琥珀酸路径, 以期实现在木质纤维素体系下生产琥珀酸。作为一株有机酸生产微生物, *P. acidilactici* 在发醇过程中需要添加中和剂以维持发醇最适 pH, 后期在产品分离时产生大量无机盐废弃物。因此, 提高菌株对低 pH 的耐受性, 使其可以在较低 pH 条件下进行有机酸发醇, 减少中和剂的用量或不使用中和剂, 具有重要的实际应用价值。本研究主要包括以下两部分内容:

第一部分工作是将异源 rTCA 路径引入 *P. acidilactici* ZY271 中, 构建琥珀酸生产路径。在 NCBI 数据库中对 *P. acidilactici* ZY271 全基因组 (GeneBank 登入号: NZ_CP082111) 进行检索, 发现缺少催化 C3 到 C4 酶基因以及苹果酸脱氢酶 (*mdh*) 基因。将候选的 *mdh* 进行诱导表达与蛋白酶活鉴定, 结果表明来自 *Corynebacterium glutamicum* B253 的 *mdh1* 所表达的蛋白酶活最高 (67 U/mg)。通过同源重组方式将其整合到 *ackA_RS01275* 位点, 打通草酰乙酸到苹果酸路径, 将重组菌株命名为 M1。进一步以表达质粒的方式, 将来自 *C. glutamicum* B253 的 PEP 羧化激酶 (*pck*) 导入 M1 中, 构建重组菌种 M2。M1 菌株进行添加前体的发醇验证, 但并没有生成琥珀酸。在添加琥珀酸合成前体 (苹果酸) 时, 发现菌株乳酸生产速率比未添加苹果酸组提高 30%, 最终乳酸得率为 1.03 g/g 葡萄糖, 高于理论得率, 出发菌株 ZY271 也出现相同的情况 (得率为 1.12 g/g)。这是由于基因组中存在苹果酸的消耗路径 (苹果酸乳酸酶, *mleS*), 将苹果酸催化生成乳酸。最后对所构建路径未产生琥珀酸原因进一步讨论探究。

第二部分工作是通过适应性进化的手段提高 *P. acidilactici* 在低 pH 胁迫下耐受性。适应性进化培养基中的糖浓度是按照 30% 固含量小麦秸秆水解液中的单糖浓度所设计的, 在摇瓶中进行三个阶段共计 160 次传代的适应性进化实验, 获得一株稳定的适应性进化菌株 ALE1, 同时证明了交替进化策略在整个适应性进化过程中起到关键性的作用。用 30% 固含量小麦秸秆水解液作为原料, 以乳酸生产性能为标准对适应性进化菌株进行发醇评价。结果表明, ALE1 在低 pH (4.6) 条件下的发醇性能与在 pH 5.0 下一致, 得到 108.5 g/L 的乳酸, 比对照菌株产量提高了 43%。当 pH 降低到 4.4 时, ALE1 得到 85.2 g/L 的乳酸, 与对照菌株相比提高 115%。这说明通过适应性进化方式, 使菌株对

低 pH 胁迫作用建立起一定耐受性，提高了菌株在低 pH 条件下的发酵性能。在适应性进化以及发酵验证过程中，发现菌株木糖代谢能力较差，同时进行提高木糖消耗能力的适应性进化实验，经过 30 次传代，获得一株性能稳定的菌株。发酵验证结果表明，菌株在低 pH 条件下的木糖消耗能力有一定的提高。

通过本论文的研究，在 *P. acidilactici* ZY271 表达 *mdh* 与 *pck* 基因，构建了生产琥珀酸路径；并通过适应性进化的方式提高了菌株在低 pH 条件下的耐受性，为菌株利用木质纤维素体系生产琥珀酸奠定基础。

关键词：木质纤维素；琥珀酸；代谢改造；低 pH 耐受性；适应性进化；

Metabolic engineering of *Pediococcus acidilactici* for succinic acid production and resistance under low pH conditions

Abstract

Succinic acid is an important precursor for synthesizing biobased polymeric materials (PBS). It is important to produce succinic acid by biorefinery technology using lignocellulose as a raw material instead of grain starch. Currently, lignocellulosic succinic acid fermentation strains mainly face the following problems: (1) the production of pentose sugar after hemicellulose treatment cannot be effectively utilized; (2) toxic substances produced by lignocellulosic pretreatment inhibit the fermentation performance of the strains; and (3) lower fermentation temperatures result in a lower rate of fermentation and a higher risk of bacterial contamination. In this paper, an important engineered bacterium, *Pediococcus acidilactici* ZY271, was used as the starting strain to introduce an exogenous Reduced TCA (rTCA) production pathway in *P. acidilactici* ZY271 through a metabolic engineering modification strategy, to achieve succinic acid production in lignocellulosic systems. As an organic acid-producing microbial strain, *P. acidilactici* requires the addition of a neutralizer during fermentation to maintain the optimum pH of the fermentation, which later generates a large amount of inorganic salt waste during product isolation. Therefore, it is of great practical value to improve the tolerance of strains to low pH so that they can perform organic acid fermentation under low pH conditions. This study consists of two main parts:

The first part of the work was to construct the succinate production pathway by introducing the heterologous rTCA pathway into *P. acidilactici* ZY271. A search of the entire genome of *P. acidilactici* ZY271 in the NCBI database (GeneBank Access Number: NZ_CP082111) revealed the absence of the catalytic C3 to C4 enzyme gene as well as the malate dehydrogenase (*mdh*) gene. The candidate *mdh* was subjected to inducible expression and protease activity characterization, which showed that *mdh1* from *Corynebacterium glutamicum* B253 expressed the highest protease activity (67 U/mg). Gene was integrated into the *ackA_RS01275* site by homologous recombination to open the oxaloacetate to malate pathway, and the recombinant strain was named M1. The PEP carboxykinase (*pck*) from *C. glutamicum* B253 was further introduced into M1 as an expression plasmid to construct recombinant strain M2. The M1 strain was verified for fermentation with added precursors, but succinic acid was not produced. With the addition of succinic acid synthesis precursor (malate), it was found that the lactic acid production rate of the strain was 30% higher than that of the group without added malate, and the final lactic acid yield was 1.03 g/g glucose, which was higher than the theoretical yield. The same occurs in the departure strain ZY271(1.12 g/g), which is due to the presence of a malate-consuming pathway (malolactic enzyme, *mleS*) in the genome, which catalyzes the production of malic acid to lactic acid. Finally, a series of knockout plasmids were constructed for the *mleS* gene, and the reasons why the constructed pathway did not produce succinate were further discussed and explored.

The second part of the work was to improve the tolerance of *P. acidilactici* to low pH stress through adaptive evolution. The sugar concentration in the adaptation evolution medium was designed based on the concentration of monosaccharides in 30% solid loadings (w/w) wheat straw hydrolysate. Adaptive evolution experiments were conducted in shake flasks through three stages totaling 160 passages, resulting in the isolation of a stable adaptive evolution strain, ALE1, and demonstrating the crucial role of alternating evolution strategy throughout the adaptive evolution process. The fermentation performance of the evolved strain was evaluated based on lactic acid production using 30% solid loadings (w/w) wheat straw hydrolysate as the substrate. The results indicated that ALE1 exhibited consistent fermentation performance at low pH (4.6), producing 108.5 g/L of lactic acid, a 43% increase compared to the control strain at pH 5.0. When pH was further reduced to 4.4, ALE1 produced 85.2 g/L of lactic acid, a 115% increase compared to the control strain. This demonstrates that adaptive evolution enabled the strain to develop a certain tolerance to low pH stress, thereby enhancing its fermentation performance under low pH conditions. During the adaptive evolution and fermentation validation processes, it was observed that the strain had poor xylose metabolism capability. Therefore, adaptive evolution experiments were conducted to improve xylose consumption capability, resulting in the isolation of a strain with stable performance after 30 passages. Fermentation validation results showed that the strain exhibited improved xylose consumption capability under low pH conditions.

Through the research in this thesis, a succinic acid production pathway was constructed by expressing the *mdh* and *pck* genes in *P. acidilactici* ZY271; and the tolerance of the strain under low pH conditions was improved by means of adaptive evolution, which lays the foundation for the production of succinic acid by the strain using the lignocellulosic system.

Keywords: Lignocellulose; Succinic acid; Metabolic engineering; Low pH tolerance; Adaptive evolution;

目录

第 1 章 前言	1
1.1 生物基琥珀酸	1
1.1.1 琥珀酸概述	1
1.1.2 以琥珀酸为前体的生物聚合材料	2
1.1.3 琥珀酸的合成方式	2
1.1.4 琥珀酸生产菌株	2
1.1.5 琥珀酸生物合成路径	3
1.2 代谢工程改造微生物合成琥珀酸研究进展	5
1.2.1 合成路径强化	5
1.2.2 竞争路径敲除	6
1.2.3 氧化还原平衡改造	7
1.3 木质纤维素原料制备琥珀酸	10
1.3.1 琥珀酸发酵原料	10
1.3.2 木质纤维素生物炼制过程	11
1.3.3 木质纤维素琥珀酸生产存在的问题	14
1.4 产酸菌株在低 pH 胁迫下耐受性的研究	15
1.4.1 低 pH 对菌株的胁迫作用	15
1.4.2 适应性进化提高菌株低 pH 下耐受性研究	15
1.5 立题依据及主要研究内容	16
第 2 章 代谢改造乳酸片球菌生产琥珀酸	17
2.1 引言	17
2.2 材料与方法	17
2.2.1 菌种及质粒	17
2.2.2 培养基及培养条件	24
2.2.3 重组质粒构建	24
2.2.4 重组菌株构建	25
2.2.5 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE	27
2.2.6 MDH 蛋白酶活鉴定	28
2.2.7 基因的同源重组	28
2.2.8 琥珀酸发酵实验	29
2.2.9 样品检测与标准曲线测定	30
2.3 结果与讨论	31
2.3.1 MDH 的诱导表达以及蛋白酶活鉴定	31

2.3.2 草酰乙酸到苹果酸路径构建.....	32
2.3.3 C3 到 C4 路径的构建.....	33
2.3.4 琥珀酸发酵验证.....	35
2.4 本章小结.....	41
第 3 章 乳酸片球菌低 pH 值条件下抗逆性研究.....	43
3.1 引言.....	43
3.2 材料与方法.....	43
3.2.1 菌株、培养基和培养条件.....	43
3.2.2 适应性进化.....	44
3.2.3 适应性进化菌株在低 pH 条件下发酵评价.....	44
3.2.4 发酵产物、细胞活力以及 pH 值的测定.....	45
3.3 结果与讨论.....	45
3.3.1 出发菌种在不同 pH 条件下发酵能力考查.....	45
3.3.2 低 pH 条件下适应性进化.....	47
3.3.3 低 pH 条件下发酵性能评价.....	49
3.3.4 适应性进化提高菌株在低 pH 条件下木糖代谢速率.....	51
3.4 本章小结.....	52
第 4 章 结论与展望.....	53
4.1 结论.....	53
4.2 展望.....	54
参考文献.....	55
硕士期间研究成果.....	65
致谢.....	66

第1章 前言

1.1 生物基琥珀酸

1.1.1 琥珀酸概述

琥珀酸，学名为丁二酸或亚乙基二羧酸（Succinic acid, Butanedioic acid），是一种重要的四元二羧酸（ $C_4H_6O_4$ ）。琥珀酸是一种“古老”的有机化合物，最早是由瑞典科学家从琥珀中所提取出来，因此得名琥珀酸。有趣的是，琥珀的透明程度也与琥珀酸的含量有关。琥珀酸具有两种构型，分别以单聚体或者三聚体的形式结合在一起^[1]，能溶于水，微溶于乙醇，几乎不溶于石油醚^[2]。琥珀酸是生物体内关键路径——TCA 循环（Tricarboxylic acid Cycle）的中间代谢物，因此普遍存在于人体、动植物与微生物中。

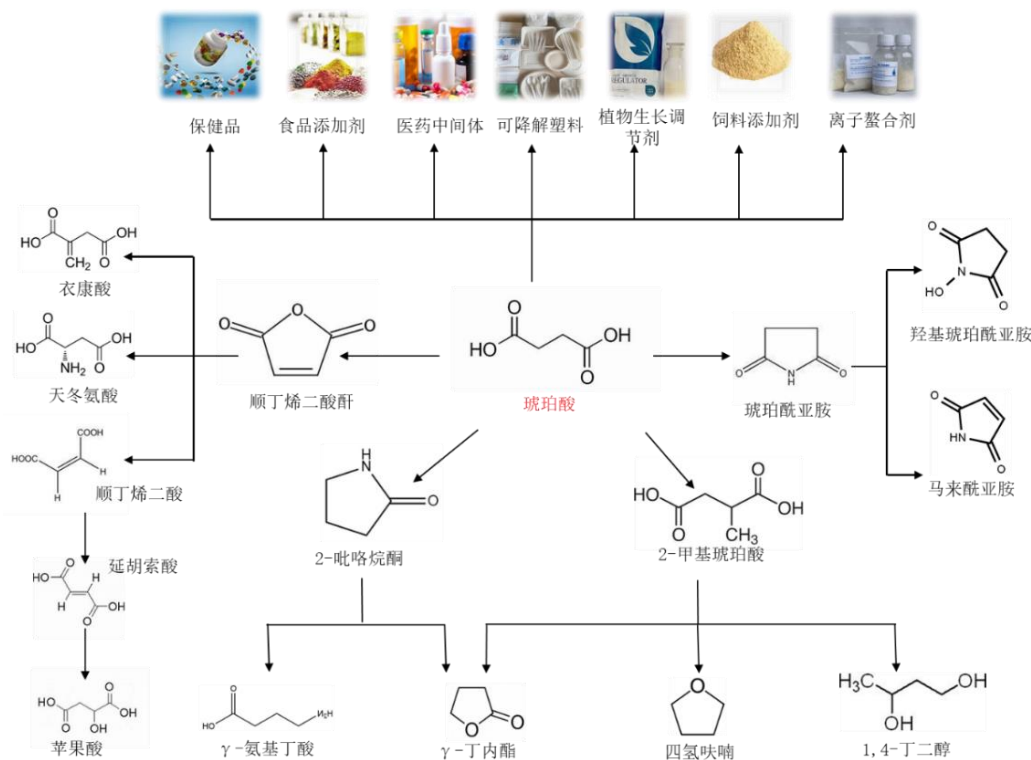


图 1.1 琥珀酸的应用

Figure 1.1 Application of succinic acid

琥珀酸被美国食品药品监督管理局（U.S. Food and Drug Administration, FDA）认定为 GRAS（Generally Recognized as Safe），并广泛地应用于医疗、食品、农业以及生物可降解塑料等诸多领域^[3]。在化工行业，琥珀酸是生产其他高附加值化学品的 C4 平台化合物。目前许多精细化学品合成都是以不可再生资源作为原料，琥珀酸可以替代这些资源实现大约 250 种化工产品生产^[4]（图 1.1）。

早在 2004 年，美国能源部（US Department of Energy, DOE）发表的一篇报告中^[5]（Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I - Results of Screening for Potential

Candidates from Sugars and Synthesis Gas) 就将琥珀酸确定为 12 种增值生物基平台化学品之一, 以及最具潜力的大宗产品的第一位。

1.1.2 以琥珀酸为前体的生物聚合材料

全球每年大约生产 1.6 亿吨的石油基聚合材料, 其中大部分使用后被丢弃到人类生存环境中, 这些废弃物很难自然降解, 导致严重的“白色污染”^[6]。因此环境友好型的可降解生物聚合材料应运而生, 其中就包括以琥珀酸为前体的 PBSA (聚丁二酸己二醇酯) 和 PBS (聚丁二酸丁二醇酯)。以 PBS 为例, 其具有良好的性能, 力学性能与 PP (聚丙烯) 以及 ABS 等石油基塑料接近^[7]。而且琥珀酸相较于其他的生物基聚合物单体来说价格更为便宜, 因此在可降解塑料市场中具有巨大的发展潜力, 已广泛用于食品包装^[8]、一次性餐具、生物医学材料^[9]等诸多领域。

近几年来, 以 PBS 为主的生物基聚合材料市场规模不断扩大。单体琥珀酸的市场潜力估计高达 27.5 万吨/年, 而基于琥珀酸的高聚物市场规模预计为 3500 万吨/年^[10]。

1.1.3 琥珀酸的合成方式

琥珀酸生产方式主要有化学合成与生物合成两种。通过化学方法合成琥珀酸的技术已十分的成熟, 以石油基化学品为原料, 通过多种途径进行合成^[11], 包括: (1) 正丁烷合成顺酐后催化加氢; (2) 顺丁烯二酸催化加氢或者电解还原; (3) 石蜡在以钙和锰为催化剂的作用下氧化; (4) 氯乙酸甲酯氰化水解等。

然而化学合成存在反应条件剧烈、环境污染严重以及存在安全隐患等诸多问题^[12]。如今随着石化资源日益枯竭、庞大的人口与环境压力亟待解决, 借助各种优良的工业底盘细胞通过生物发酵法生产琥珀酸及其他化学品, 是解决目前人类面临问题的关键一招。

生物基琥珀酸 (Biosuccinate) 是通过微生物细胞工厂利用各种碳源发酵所获得的。最早是由密歇根生物技术所的 Zeikus 提出^[13]。Zeikus 等人^[14]分离出一株天然代谢琥珀酸的微生物 *Actinobacillus succinogenes*, 其琥珀酸产量达到 110 g/L。从此, 开启了生物基琥珀酸代替石油基琥珀酸的研究热潮。在近 25 年的研究中, 生物基琥珀酸发酵菌株的性能及其发酵工艺不断优化和完善, 国内外也先后建立起许多规模化的生物基琥珀酸生产工厂。然而, 一方面琥珀酸生产速度依然达不到 DOE 所制定的 2.5 g/L/h 目标^[15], 另一方面所使用的发酵原料大多以葡萄糖和粮食生物质为主, 在成本上还无法与石油基琥珀酸相竞争。因此需要寻找更为廉价的原料, 开发更具优良性能的发酵菌株, 进一步降低生物基琥珀酸生产成本, 从而实现石油基琥珀酸的替代。木质纤维素是地球上极其丰富的含糖非粮生物质资源, 其来源广泛、价格低廉却未被充分利用^[16]。以木质纤维素作为原料生产琥珀酸可显著降低发酵的生产成本, 逐渐成为生物基琥珀酸发展的方向。

1.1.4 琥珀酸生产菌株

琥珀酸合成菌株可分为 (1) 天然琥珀酸生产菌株; (2) 代谢改造琥珀酸生产菌株。

自然界中有部分微生物在厌氧条件下以琥珀酸作为代谢终产物，这一类微生物被称为天然的琥珀酸生产菌，可积累大量的琥珀酸。目前已鉴别并用于琥珀酸生产的菌种有：*Anaerobiospirillum succiniproducens*（产琥珀酸厌氧螺菌）、*Mannheimia succiniciproducens*（产琥珀酸曼氏杆菌）、*Actinobacillus succinogenes*（产琥珀酸放线杆菌）以及 *Basfia succiniciproducens*（琥珀巴菲亚菌）等。以 *A. succiniproducens* 为例，该微生物最早是从反刍动物瘤胃中分离出来^[17]，被 DSMZ（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures）列为生物安全一级微生物。*A. succiniproducens* 对高浓度的琥珀酸具有良好的耐受性^[18]，可利用碳源十分广泛。Wang 等人^[19]报道了 *A. succiniciproducens* CGMCC1593 菌株以葡萄糖为原料，厌氧发酵产生 60.2 g/L 的琥珀酸，同时在甘蔗糖蜜水解液中发酵产生了 50.6 g/L 的琥珀酸^[20]。除上述原料外，该菌株还能以单一木糖^[21]、奶酪乳清^[18]、棉秆^[22]以及小麦秸秆水解液^[23]进行厌氧发酵生成琥珀酸，同时伴有乙醇和乳酸等副产物的生成。但由于这类菌株遗传背景不清晰，缺少相应的基因工具进行代谢改造，对氮源和维生素等营养成分尤为挑剔而且最适生长 pH 接近中性，目前很难应用于工业生产^[24]。

随着代谢工程改造策略的兴起，集中在琥珀酸代谢路径构建的工作也日益增多。这一类菌株大都并不以琥珀酸为代谢终产物，需要通过一系列理性设计在细胞中构建或强化琥珀酸代谢路径，实现琥珀酸生产，由于遗传背景清晰且基因改造工具相对成熟，通过代谢工程改造即可获得较高浓度的琥珀酸，而且极大程度的减少副产物的生成。代谢改造琥珀酸生产菌包括大部分模式微生物，例如：*Escherichia coli*（大肠杆菌）、*Corynebacterium glutamicum*（谷氨酸棒杆菌）、*Saccharomyces cerevisiae*（酿酒酵母）、*Yarrowia lipolytica*（解脂也氏酵母）以及部分乳酸菌（乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis*）等。随着代谢工程技术的发展，一些非模式菌株因其独特的优势，展现出琥珀酸生产的潜力。许多研究以其为出发菌株，建立并运用相应的代谢改造工具，开发出一系列琥珀酸合成细胞工厂，例如：植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*^[25]、黑曲霉 *Aspergillus niger*^[26]、蓝细菌^[27,28]以及上述天然琥珀酸生产微生物等。通过相应的代谢工程改造，获得高产琥珀酸的优良菌株，是目前琥珀酸生物合成的研究热点。

1.1.5 琥珀酸生物合成路径

琥珀酸生物合成主要依靠三条路径：（1）氧化 TCA 路径（oTCA pathway），该路径主要依靠 TCA 循环，因此在有氧条件下活跃，但是由于反应步骤较多受到许多限制；（2）还原 TCA 路径（rTCA pathway），主要在缺氧条件下活跃；以及（3）3-羟基丙酸路径（3 HP pathway）。其详细的合成路径如图 1.2 所示。

在有氧条件下，氧化 TCA 路径琥珀酸理论得率为 1 mol/mol 葡萄糖^[29]。在厌氧条件下，通过 rTCA 路径生产琥珀酸，过程中需要固定二氧化碳，在理想状态下，微生物生产 1 kg 琥珀酸至少可以固定 0.37 kg 二氧化碳^[19]。该过程可减少温室气体的排放，符合国内外制定的关于“碳中和”与“碳达峰”战略目标。同时在还原力充足条件下，1 mol 的葡萄糖会生成 2 mol 的琥珀酸，是生物合成琥珀酸的主要路径^[30]。然而受到胞内

NADH 的限制, 难以达到理论产率^[31]。由于本研究的出发菌株 *P. acidilactici* 主要在厌氧条件下生长与发酵, 因此本小节主要介绍 rTCA 生产琥珀酸路径。

在 rTCA 路径中, 主要是由磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate PEP) 或者丙酮酸在 C3 到 C4 作用下固定二氧化碳, 催化生成草酰乙酸或者苹果酸, 再经过一系列酶的催化反应下最终生成琥珀酸。rTCA 中实现 C3 到 C4 的酶主要有四种: 丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PYC)、磷酸烯醇式丙酮酸 PEP 羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PPC)、PEP 羧化激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PCK) 以及苹果酸酶 (malic enzyme, MAE)^[15]。

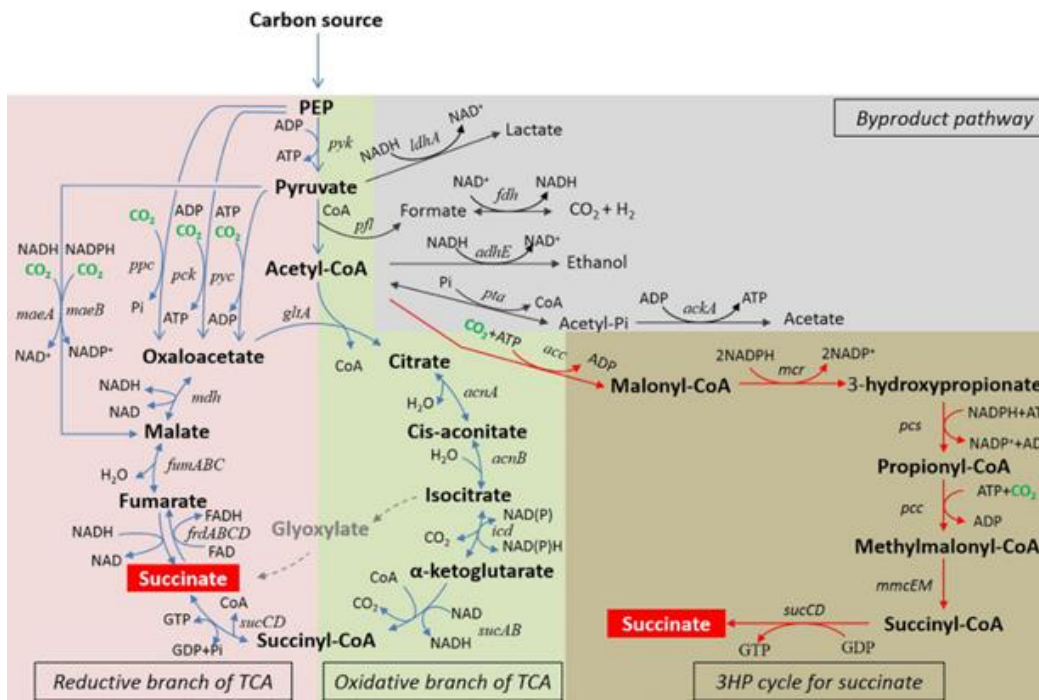


图 1.2 琥珀酸生物合成路径^[30]

Figure 1.2 succinic acid biosynthetic pathway

rTCA 生产琥珀酸第一条路径依赖磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 (PCK, EC 4.1.1.32), 该路径主要存在于细菌与真菌中^[32]。PCK 可以催化 ADP、 HCO_3^- 以及 PEP 生成 ATP 与草酰乙酸。该路径会伴随着能量的产生, 因此更有利于细胞生长与琥珀酸生产^[15]。随后在苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 的作用下生成富马酸, 该过程需要消耗 1 分子的 NADH。苹果酸被富马酸水合酶 (fumarate hydratase, FumABC) 转化为富马酸。最后需要 1 分子 NADH, 在富马酸还原酶 (fumarate reductase, FrdABCD) 的催化下, 最终生成琥珀酸。有研究表明, PCK 只有在高浓度 CO_2 或者 HCO_3^- 才具有催化活性^[33], 因此通过 PCK 路径来合成琥珀酸时需要关注 HCO_3^- 的转运及平衡的问题^[34]。

以 PEP 为起点合成琥珀酸的第二条路径是通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PPC, EC 4.1.1.31) 来实现的。PPC 以 Mg^{2+} 作为辅因子, 催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 与 HCO_3^- 盐反应生成草酰乙酸与无机磷酸盐^[35]。与 PCK 路径相比除了固定 CO_2 的蛋白酶不同之外, 其余催化过程是一致的, 该过程需要依靠 PPC 固定 CO_2 。有研究表明, 敲除 *ppc* 基

因会使得 *E. coli* 在含有 CO₂ 的环境中生长状况变差且琥珀酸产量降低 70%左右^[24]，这说明 PPC 在固定 CO₂ 生产琥珀酸的过程中起到较为关键的作用。PPC 主要作用于草酰乙酸的回补路径中^[36]，在厌氧条件下，会将一部分 PEP 转化为琥珀酸^[37]。然而，过度表达 *ppc* 会导致琥珀酸生产能力变差^[38]，这是由于 PPC 催化过程中会消耗 PEP，影响其他代谢或者调控系统正常运行（例如：PTS 转运系统等）。因此通过 PPC 路径生产琥珀酸时，需要控制 *ppc* 基因的表达水平。

C3 到 C4 过程也可以从丙酮酸出发，通过丙酮酸羧化酶（PYC, EC 6.4.1.1）以及苹果酸酶（MAE）的作用，实现琥珀酸的生产。

PYC 催化丙酮酸在固定 CO₂ 的同时消耗 ATP 生成草酰乙酸和 ADP，进一步催化生成琥珀酸。与 PPC 一样，PYC 在草酰乙酸的回补路径中起到关键作用。然而 PYC 催化过程需要消耗能量，因此过度表达可能会影响菌体正常生长与代谢^[39]。苹果酸酶催化丙酮酸生成苹果酸，该过程需要消耗 1 分子 NADH（MaeA, EC 1.1.1.38）或者 1 分子的 NADPH（MaeB, EC 1.1.1.40）。有研究表明 MAE 催化的反应是可逆的，并且更倾向于催化生成丙酮酸，因此会影响琥珀酸生产^[40]。强化丙酮酸激酶（pyruvate kinase, PYK, EC 2.7.1.40）使微生物细胞积累大量丙酮酸，可能会克服苹果酸酶催化过程的不利平衡。四种 rTCA 生产琥珀酸路径主要内容如表 1.1 总结。

表 1.1 rTCA 四种路径的比较

Table 1.1 Comparison of the four pathways of rTCA

名称	PCK 路径	PPC 路径	PYC 路径	MAE 路径
底物	PEP, CO ₂	PEP, CO ₂	丙酮酸, CO ₂	丙酮酸, CO ₂
关键酶	PCK	PPC	PYC	MAE
反应步数	4	4	4	3
NADH	-2	-2	-2	-2
ATP	+1	0	-1	0
E C	4.1.1.32	4.1.1.31	6.4.1.1	1.1.1.38/39

1.2 代谢工程改造微生物合成琥珀酸研究进展

通过代谢工程改造生产琥珀酸策略主要有：（1）强化琥珀酸合成路径；（2）敲除或弱化竞争路径；（3）胞内 ATP 与还原力代谢平衡改造等。需要指出的是，往往几种策略同时使用才能取得较为理想的改造效果。

1.2.1 合成路径强化

琥珀酸合成路径的强化，主要是针对 1.1.5 所述的四种催化 C3 到 C4 酶基因，以及 rTCA 生产琥珀酸路径中相关基因（*mdh*、*fum* 以及 *frd*）。合成路径强化是代谢工程改造微生物合成琥珀酸最为常见的方法^[41]。

Okino 等人^[42]在 *C. glutamicum* (Δ *ldhA*) 中强化 *pyc* 基因表达，在厌氧条件下间歇添加碳酸氢钠和葡萄糖，最终产生 146 g/L 琥珀酸，得率为 0.97 g/g 葡萄糖，与之前仅

敲除副产物路径菌株相比琥珀酸产量提高了 7 倍^[43]。Litsanov 等人^[44]对出发菌种 *C. glutamicum* ATCC13032 进行分子改造, 在敲除乳酸和乙酸等副产物生成基因前提下 ($\Delta cat \Delta pqo \Delta pta-ackA \Delta ldhA$), 过表达 *pyc* 基因, 同时将来自 *Mycobacterium vaccae* 的甲酸脱氢酶(FDH, formate dehydrogenase)基因整合到基因组上, 用于维持胞内还原力的平衡, 最终将携带甘油醛 3-磷酸脱氢酶基因 (*gapA*) 的表达质粒导入, 获得一株优异的琥珀酸生产菌株, 通过两阶段 (有氧条件下生长, 厌氧条件下发酵) 补料分批发酵的方式最终产生 133.9 g/L 琥珀酸, 得率为 1.09 g/g 葡萄糖。天津大学的王庆昭^[45]对 *E. coli* 进行了一系列代谢工程改造, 其中过表达来自 *Rhizobium* 的 *pyc*, 使琥珀酸得率提高到 0.8 g/g 葡萄糖。

除了利用上述模式菌株外, 东京农业大学的 Tsuji 等人^[25]报道了代谢改造 *L. plantarum* 用于琥珀酸生产, 通过在 *L. plantarum* 过表达 *pyc* 和 *pck* 基因, 48 h 获得 6.57 g/L 的琥珀酸。同时在本文中指出 PCK 是合成琥珀酸的关键酶, PCK 催化过程中生成 ATP, 在微生物生长方面起到了关键性的作用。

蓝细菌等光合自养微生物是将 CO₂ 转化为有机化合物的天然生物催化剂^[46]。这类生物通过光合作用进行生长代谢过程中, 不会积累琥珀酸, 但在黑暗或者营养限制条件下会以琥珀酸作为代谢终产物^[47], 该过程称为光合自养生物的自发酵。Durall 等人^[27]在黑暗缺氧条件下利用 *Synechocystis* PCC 6803 进行琥珀酸发酵, 最终仅产生 1.8 g/L 的琥珀酸。Iijima 等人^[28]在 *Synechocystis* PCC 6803 过表达琥珀酸合成路径上的苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*), 通过自发酵最终产生 4.2 g/L 的琥珀酸。

1.2.2 竞争路径敲除

竞争路径主要分为 (1) 竞争丙酮酸流向的副产物生成路径, 例如: 乳酸脱氢酶 (*ldh*) 生产乳酸路径以及乙酸激酶 (*ackA*) 生产乙酸路径等; (2) 以琥珀酸及其中间产物为前体的消耗路径, 例如: 消耗琥珀酸的琥珀酸脱氢酶 (*sdh*) 以及消耗苹果酸的苹果酸乳酸酶 (*mleS*) 等路径。

Zhu 等人^[48]对 *E. coli* W1485 的乳酸和甲酸生产路径进行敲除 ($\Delta ldhA \Delta pfl$), 并且对全局转录调控因子 Cra 进行饱和突变后, 在重组菌中过表达, 最终获得 79.8 g/L 的琥珀酸, 并且在发酵过程中没有检测到乳酸与甲酸的存在。Jiang 等人^[49]敲除 *E. coli* AFP111 的 *pflB*、*ldhA* 以及 *ptsG* 基因, 以葡萄糖作为发酵底物, 经过两阶段补料分批发酵, 产生 101.2 g/L 的琥珀酸。Olajuyin 等人^[50]敲除 *E. coli* K-12 的 *ldhA*、*pflB*、*poxB* 以及 *pta-ackA* 基因, 发酵产生 22.4 g/L 琥珀酸, 产量相较于野生型提高 6 倍。Yuzbashev 等人^[51]敲除 *Y. lipolytica* Y-3314 中消耗琥珀酸的琥珀酸脱氢酶 (*sdh1*、*sdh2*), 最终产生 45.4 g/L 琥珀酸, 比对照组琥珀酸产量提高 4 倍。

天然琥珀酸生产微生物以琥珀酸作为代谢终产物, 但同时伴随着大量副产物生成。因此通过代谢工程改造策略敲除副产物竞争路径, 理论上可以获得高指标琥珀酸。然而由于遗传背景不清晰, 没有成熟的基因改造工具, 对这类微生物进行代谢工程改造十分困难。来自 KAIST (韩国科学技术院) 的 Lee 及其团队做了大量的工作, Lee 团队

分离出一株新型的天然琥珀酸生产菌 *M. succiniciproducens*^[52], 进行了全基因组测序^[53]、绘制代谢路径图^[54]以及建立蛋白组学参考图^[55], 同时开发了一系列代谢改造工具^[56,57], 构建了一株天然生产琥珀酸的模式微生物。利用所构建的基因工具敲除 *ldhA*、*pflB* 以及 *pta-ackA* 副产物生成路径, 得到的重组菌株不产生任何副产物, 以葡萄糖为原料进行厌氧补料分批发酵, 最终产生 52.4 g/L 的琥珀酸^[32]。Ahn 等人^[24]在此工作基础上, 过表达来自 *C. glutamicum* 的 *mdh* 基因, 并改变发酵策略, 进行两阶段补料分批发酵, 最终产生 134.3 g/L 的琥珀酸。将甲酸脱氢酶基因 (*fdh*) 引入到该模式生物中, 实现蔗糖和甲酸的共代谢, 最终生成 76.1 g/L 的琥珀酸^[58]。

敲除竞争路径可能会面临着菌体正常代谢受阻以及氧化还原平衡失衡等诸多问题, 进而影响琥珀酸的生产。王庆昭在敲除 *E. coli* 的 *ldhA* 与 *adhE* 时, 发现大肠杆菌生长异常缓慢^[45]。有研究表明^[59], 敲除苹果酸乳酸酶 *mleS* (消耗苹果酸的基因, 催化苹果酸生成乳酸) 会导致发酵菌株在低 pH 环境下发酵性能变差。

1.2.3 氧化还原平衡改造

微生物胞内氧化还原平衡对于发酵菌种的正常生长以及高效生产目标产物来说, 具有重要的意义。胞内的氧化还原平衡主要通过 NADH/NAD^+ 来反映, 该比值受多种因素影响, 比如发酵菌株的生理状态、所用碳源的氧化状态以及与 NADH/NAD^+ 相关酶的表达水平等^[60]。将 *E. coli* 中乳酸脱氢酶 (*ldh*)、丙酮酸-甲酸裂解酶 (*pfl*) 以及乙酸代谢相关基因 (*ackA*) 进行敲除, 构建重组菌株 *E. coli* NZN111^[61], 由于大部分副产物路径被敲出, 被认为是琥珀酸生产绝佳候选菌株。但是发酵结果表明, 菌株 NZN111 在厌氧条件下无法生产琥珀酸, 并在细胞内积累大量丙酮酸和 NADH ^[62,63], NADH/NAD^+ 比出发菌种高出三倍^[63]。

同时单纯 NADH 的缺乏也会对生产琥珀酸产生负面影响。从图 1.2 可知, 生成 1 分子的琥珀酸需要 2 分子 NADH , NADH 的不足会严重限制琥珀酸的生产。Balzer 等人^[64]在 *E. coli* 中引入来自 *Candida boidinii* (博伊丁假丝酵母) 的甲酸脱氢酶基因 (*fdh1*), FDH 催化甲酸氧化成 CO_2 的同时会产生 NADH , 为琥珀酸的生产提供额外的还原力, 加快琥珀酸生产速率。Tan 等人^[65]从磷酸戊糖代谢路径 (PPP) 入手, 通过模块化工程策略优化 PPP 路径相关基因的表达水平, 提高 PPP 路径的效率, 产生更多的 NADPH 。同时过表达 *sthA* 基因, 提高 NADPH 转化为 NADH 的效率, 为琥珀酸生产提供足够的还原力, 最终琥珀酸得率高达 1.61 mol/mol 葡萄糖, 接近理论产率。此外, 利用不同氧化状态的碳源也可以解决 NADH 不足的问题, 在山梨醇代谢过程中可以产生更多的 NADH ^[66], 有研究以山梨醇作为发酵原料提高了菌株琥珀酸生产速率^[67]。

表 1.2 代谢工程改造微生物生产琥珀酸总结

Table 1.2 Summary of succinic acid production by metabolically engineered modified microorganisms

菌株	代谢改造策略	底物	发酵方式	浓度 g/L	文献
<i>E. coli</i> W1485	敲除 <i>pfl</i> 、 <i>ldh</i> ；对全局调控因子 <i>Cra</i> 进行饱和突变后并过表达	葡萄糖	两阶段补料 分批发酵	79.8	[48]
<i>E. coli</i> TUQ2	敲除 <i>ptsG</i> 、 <i>iclR</i> 等基因；过表达 <i>pyc</i> 以及来自 <i>Candida</i> 的 <i>fdh</i>	葡萄糖	厌氧发酵	34.5	[45]
<i>E. coli</i> SBS550MG	敲除 <i>adhE</i> 、 <i>ldhA</i> 、 <i>iclR</i> 以及 <i>ackA-pta</i> ；过表达来自 <i>Candida boidinii</i> 的 <i>fdh</i> 以及来自 <i>Lactococcus lactis</i> 的 <i>pyc</i>	葡萄糖	厌氧发酵	2.1	[64]
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	敲除 <i>ldh</i> 、 <i>pta-ackA</i> 、 <i>actA</i> 、 <i>poxB</i> 以及 <i>ptsG</i> ；过表达 <i>pyc</i> 和 <i>ppc</i> ；敲除自身 <i>pck</i> 基因同时过表达来自 <i>M. succiniciproducens</i> 的 <i>pck</i> ；过表达 NCg10275 基因	葡萄糖	两阶段补料 分批发酵	155.2	[68]
<i>C. glutamicum</i>	敲除 <i>ldhA</i> ；过表达 <i>pyc</i>	葡萄糖	厌氧发酵， 间歇添加 HCO_3^- 和 葡 萄糖	146.0	[42]
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	敲除 <i>cat</i> 、 <i>pqo</i> 、 <i>pta-ackA</i> 、 <i>ldhA</i> ；过表达 <i>pyc</i> 、 <i>gapA</i> 以及来自 <i>M. vaccae</i> 的 <i>fdh</i>	葡萄糖	两阶段补料 分批发酵	133.9	[44]
<i>M. succiniciproducens</i> MBEL55E	敲除 <i>ldhA</i> 、 <i>pflB</i> 以及 <i>pta-ackA</i>	葡萄糖	厌氧补料分 批发酵	52.4	[32]
<i>M. succiniciproducens</i> PALK	敲除 <i>ldhA</i> 以及 <i>pta-ackA</i> ；过表达来自 <i>C. glutamicum</i> 的 <i>mdh</i> 基 因	葡萄糖	两阶段补料 分批发酵	134	[24]
<i>M. succiniciproducens</i> PALFK	敲除 <i>ldhA</i> 、 <i>fruA</i> 和 <i>pta-ackA</i>	蔗糖和甘油	厌氧补料分 批发酵	78.4	[69]

<i>M. succiniciproducens</i> LPK7	过表达 <i>fdh</i> ; 敲除 <i>ldhA</i> 、 <i>pflB</i> 和 <i>pta-ackA</i>	蔗糖和甲酸	厌氧补料分 批发酵	76.1	[70]
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	过表达 <i>mdh</i> 基因	糖原	两阶段发酵	4.2	[28]
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	敲除 <i>ldh</i> ; 过表达 <i>pck</i> 、 <i>pyc</i> 、 <i>mae</i>	葡萄糖	厌氧发酵	6.57	[25]
<i>Y. lipolytica</i> Y-3314	敲除 <i>ach</i> ; 过表达 <i>pck</i> 和 <i>scs2</i>	甘油	有氧补料分 批发酵	110.7	[71]
<i>Y. lipolytica</i> Y-3314	敲除 <i>sdh1</i> 、 <i>sdh2</i> 和 <i>suc2</i>	甘油	有氧补料分 批发酵	45.4	[51]
<i>A. niger</i> ATCC1015	构建 CRISPR-Cas9 系统, 敲除 <i>gox</i> 和 <i>oah</i> 基因; 过表达来自 <i>A. niger</i> 的 C4-二羧酸转运蛋白 AnDCT 以及来自 <i>A. carbonarius</i> 的 C4-二羧酸转运蛋白 AcDCT	甜菜糖蜜/ 麦秆水解液	有氧发酵	23.0/9.0	[26]

1.3 木质纤维素原料制备琥珀酸

木质纤维素主要来自农业生产过程中产生的废弃物，例如小麦、玉米以及水稻等作物秸秆，它们是极为重要的非粮含糖生物质资源，被誉为“尚未完全开发的宝藏”。我国自古迄今就是农业生产大国，根据国家统计局 2023 年发表的数据显示，全国粮食播种面积 118969 千公顷，其中谷物（小麦、稻谷以及玉米）耕地面积占我国总耕地面积的 84%。2023 年我国谷物类粮食产量为 64143.0 万吨，至少产生 9 亿吨以上的秸秆。农业生产技术发展迅速，但秸秆利用技术相对弱后，目前秸秆主要用于制作家畜饲料和沼气燃料，以及还田提高土壤肥力。但依然存在着大量秸秆就地焚烧的现象，引起环境污染，造成资源浪费。近几年以来，我国出台了多项政策，力求加快非粮生物质原料的利用与转化。基于木质纤维素资源，通过生物发酵生产琥珀酸，实现生物基琥珀酸对石油基琥珀酸的升级与代替，在全球范围内是一项具有经济和环境效益的事业。

1.3.1 琥珀酸发酵原料

目前国内外已有多家公司投资建设不同产能的琥珀酸生产工厂^[72]。在 2010 年，BioAmber 公司于法国建立 3000 t/y 琥珀酸生产示范工厂，基于代谢工程改造的 *E. coli*，以小麦淀粉为原料生产琥珀酸。2015 年，该公司与日本 Mitsui 公司合作在加拿大建立 50000 t/y 的生物基琥珀酸生产工厂。荷兰 Reverdia 公司开发了一株具有低 pH 耐受性的酵母用于琥珀酸发酵，并在 2012 年建设了 10000 t/y 琥珀酸生产工厂。国内的华恒生物也于 2017 年建立年产 10000 t 的生物基琥珀酸工厂。目前生物基化学品企业依然面临着原料结构单一的问题，上述生物基琥珀酸生产工厂，皆以粮食淀粉作为发酵原料，一方面增加了琥珀酸生产成本，另一方面面临着粮食安全危机。因此，要想大规模取代石油基琥珀酸，必须寻找更具经济效益的原料。利用非粮生物质原料制备琥珀酸及其他大宗化学品成为研究热点^[73]。常见的非粮生物质有：甘蔗糖蜜（主要含有蔗糖、葡萄糖以及果糖）^[74]、乳清原料（乳糖）、菊芋、工业生产过程中的含糖有机废弃物以及木质纤维素资源等。

甘蔗糖蜜中还有大量蔗糖，Chan 等人^[75]将蔗糖利用相关基因 *cscKB* 和 *cscA* 在 *E. coli* KJ122 中过表达。直接利用甘蔗糖蜜进行发酵，72 h 内产生 56 g/L 的琥珀酸。Ma 等人^[76]构建细胞表面展示系统，将 *cscA* 基因与 *OmpC* 锚定基序融合表达，将 CscA 蛋白酶定位在 *E. coli* 细胞膜表面，利用蔗糖和甘蔗糖蜜进行两阶段发酵验证，36 h 内分别生成 41 g/L 和 36.3 g/L 琥珀酸。

乳清不仅可以作为发酵碳源，其中的牛乳蛋白也可以充当微生物发酵氮源^[77]。Lee 等人^[78]以 *M. succiniciproducens* MBEL55E 作为出发菌株，利用乳清作为发酵原料，同时将培养基中的酵母粉替换成玉米浆，降低发酵成本，进行分批发酵，最终产生 13 g/L 的琥珀酸。Wang 等人^[79]利用乳清作为发酵碳源，以 *A. succinogenes* 作为出发菌种，探究了不同初始乳清浓度，pH 值与接种量对琥珀酸生产的影响，最终琥珀酸得率为 0.57 g/g。

江南大学的郑璞团队在拓展琥珀酸发酵原料方面做了许多工作，以菊芋^[80]、废糖蜜^[81]以及白酒酒糟^[82]等作为原料，通过 *A. succinogenes* 发酵分别得到 98.2 g/L、46.0 g/L 以及 28.8 g/L 的琥珀酸。木薯淀粉作为一种非粮淀粉，价格便宜^[83]，是琥珀酸发酵良好原料。张敏等人^[84]以其作为发酵原料，对 SSF 条件进行摇瓶优化，确定最佳的底物浓度、发酵温度以及糖化酶的添加量，最终利用 *E. coli* 发酵产生 61.2 g/L 的琥珀酸。中科院的 Olajuyin^[85]利用代谢改造 *E. coli* KLPPP（敲除 *ldhA*、*poxB*、*pflB* 以及 *pta-ackA* 并过表达 *ppc*）利用红巨藻水解液（含有葡萄糖和半乳糖）发酵产生 22.4 g/L 琥珀酸；对毒箭藤（主要葡萄糖、木糖、阿拉伯糖以及半乳糖）预处理方式进行优化，利用 *E. coli* K3OS（敲除 *ldhA*、*poxB*、*pflB* 以及 *pta-ackA* 并过表达 *sthA*）发酵产生 14.4 g/L 琥珀酸；同时本文还介绍了利用可可椰子水和大象草茎为原料进行琥珀酸发酵。

目前已有多种非粮生物质原料运用到琥珀酸生产过程中，但由于其本身性质以及处理工艺的影响，产生的可发酵单糖浓度较低，难以实现高指标的琥珀酸发酵。木质纤维素主要成分纤维素与半纤维素中含有大量可发酵单糖，通过生物炼制过程将其释放，是具有潜力的发酵原料。Li 等人^[86]通过酸解和酶解法处理 2000 g 小麦秸秆获得 447 g 可发酵单糖（293 g 葡萄糖与 154 g 木糖），利用定点诱变技术将 *A. succinogenes* 的副产物生成基因 *pta-adh* 进行突变，利用突变菌株在含有 64 g/L 可发酵糖的生物反应器中发酵，最终产生 56 g/L 的琥珀酸。郑璞^[87]用稀碱预处理小麦秸秆，并利用纤维素酶生产菌株 *Trichoderma reesei* SW09-1（里氏木霉），将预处理后的小麦秸秆进行酶解，同时额外补加一定量的纤维素酶，最终产生 67.6 g/L 的还原糖，利用 *A. succinogenes* 进行 SSF 产生 35 g/L 琥珀酸。目前利用木质纤维素生产琥珀酸的浓度大都低于 80 g/L^[87]，这是由于受到生物炼制工艺以及发酵菌株的限制，木质纤维素水解液固含量较低，难以实现高指标琥珀酸发酵。

1.3.2 木质纤维素生物炼制过程

木质纤维素是植物细胞壁的主要组成部分^[88]。其结构与组成如图 1.3 所示，一般来说，主要是由 35-50%纤维素（Cellulose）、20-35%半纤维素（Hemicellulose）以及 10-25%木质素（Lignin）构成^[89]，同时含有一定量的灰分以及果胶等其他成分。纤维素是 D-葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的同聚糖^[90]。半纤维素是一种异聚糖，由己糖（葡萄糖、半乳糖、甘露糖）与戊糖（阿拉伯糖、木糖）组成。木质素主要成分为松柏醇、芥子醇以及香豆醇，它们通过氧化偶联方式形成^[88]。其中木质素的溶解度很低，而且难以降解^[91]，因此目前以木质纤维素作为原料进行琥珀酸发酵大都集中在对纤维素与半纤维素处理上。

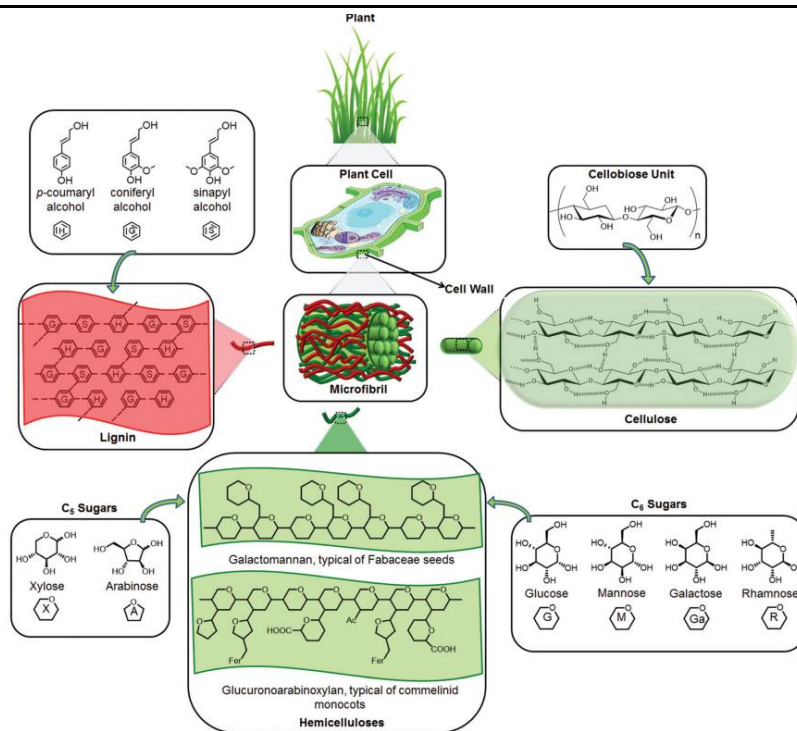
图 1.3 木质纤维素主要成分和结构^[92]

Figure 1.3 Main composition and structure of lignocellulose

木质纤维素的生物炼制过程主要包括预处理、糖化、脱毒、微生物发酵以及下游产物纯化^[93]。

木质纤维素很难直接转化为可被利用的单糖进行生物基化学品的生产^[94]，这是由于纤维素、半纤维素以及木质素这三种主要组分的相互作用形成致密且复杂的晶体结构，赋予了木质纤维素高度的生物顽抗性^[95]。预处理的目的是破坏木质纤维素致密的结构，以稀酸和稀碱预处理为主的化学预处理方法是目前应用最为广泛的^[96]。其中稀碱预处理较为温和，产生较少的抑制物^[96,97]，然而难以使木质纤维素结构完全破坏，影响后续可发酵糖的浓度。稀酸预处理可以更好地水解半纤维素，初步释放出用于琥珀酸发酵的单糖，但处理过程中会产生大量的酸性废水，增加后期处理成本且对生物炼制反应器产生较强的腐蚀^[98]，较为剧烈的处理方式在损耗可发酵糖的同时也会产生大量抑制物。本实验室开发了一种干式稀酸预处理法^[99]，在预处理反应器中添加少量硫酸与秸秆等物料，充分搅拌后通入热蒸汽进行预处理反应。这种预处理方式解决了传统稀酸预处理产生大量酸性废液的弊端，而且可以获得较高固含量的预处理物料，经过后续进一步处理可获得高浓度可发酵单糖，更具有工业应用的实际意义。而且预处理后的物料由于 pH 较低且含有大量抑制物，因此不易染菌，可以长时间储存^[100]。

预处理过程中会产生大量的抑制物^[101]，主要为糠醛（Furfural）和 5-羟甲基糠醛（HMF）等呋喃类物质，香草醛和丁香醛等醛类物质以及甲酸与乙酰丙酸等酸性物质（图 1.4）。这些抑制物会对琥珀酸生产菌株产生极强的胁迫，抑制其发酵性能，这就极大限制了菌株利用木质纤维素体系生产琥珀酸，因此木质纤维素物料必须进行脱毒

处理。脱除抑制物的方法主要有水洗^[102]、吸附^[103]、碱化处理^[104]以及生物脱毒等。生物脱毒法解决了其他方式在脱毒过程中产生大量工业废水的弊端^[103]。本实验室在先前的研究中先后分离出两株生物脱毒菌。其中利用树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 开发了固态生物脱毒法，该生物脱毒菌可优先利用物料中的抑制物，接种到固态物料中可快速生长，控制好脱毒时间即可保留绝大部分单糖^[105]。另外分离出一株宛氏拟青霉 *Peacilomyces variotii* FN95^[106]，可直接在生物反应器中进行液态生物脱毒，减少发酵的整体时间，而且反应过程可控，脱去抑制物同时可保留大量糖。

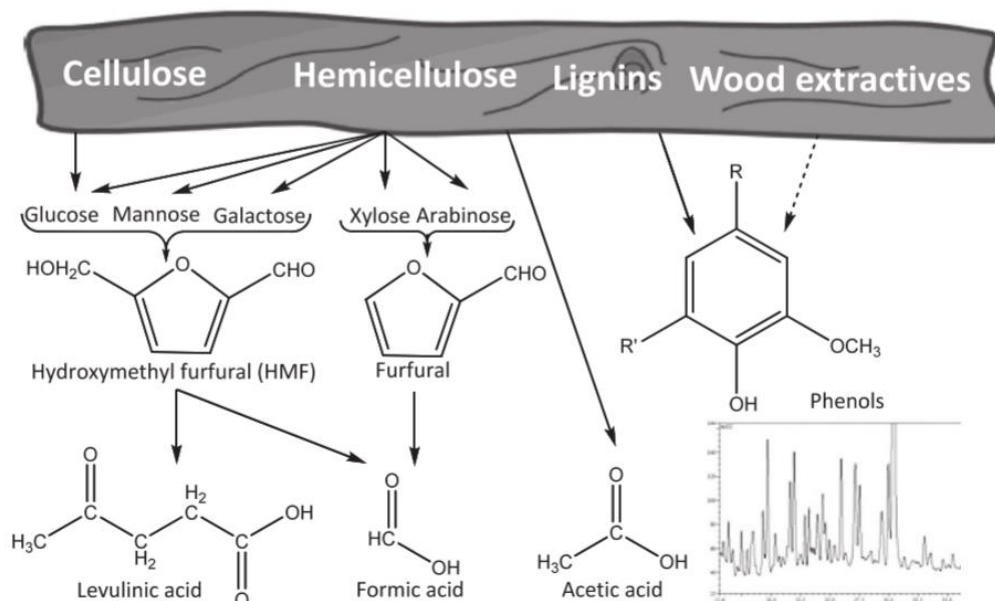


图 1.4 木质纤维素来源的抑制物^[107]

Figure 1.4 Inhibitors of lignocellulosic origin

糖化是用纤维素酶进一步将木质纤维素水解释放其中的可发酵单糖。木质纤维素糖化与发酵策略主要包括：分步糖化与发酵（SHF）和同步糖化与发酵（SSF）^[108]。SHF 是指在不同生物反应器中进行糖化与发酵过程，保证纤维素酶和菌株在各自适合的温度、pH 以及搅拌转速等发酵条件下进行酶解与发酵。但是糖化过程产生的高浓度糖会导致纤维素酶活力下降，同时也会对发酵菌株产生底物抑制效应。SSF 是指糖化与发酵过程同时进行，释放出单糖直接被发酵菌株所利用，进行产品生产^[109]。这就缓解了 SHF 过程中高浓度底物对于纤维素酶活力以及发酵菌株的抑制作用，缩短了生物炼制的整体时间。在高固体含量物料 SSF 过程中，搅拌是影响酶水解效率的关键，本实验室采用自主设计携带螺带搅拌桨生物反应器进行 SSF，促进高固含量物料与纤维素酶的结合^[110]，提高酶解效率进而获得高浓度的可发酵单糖。目前已完成在 30%固含量 SSF 生产纤维素乙醇^[111]以及高指标手性乳酸等工作。

本实验室建立的基于干式稀酸预处理^[16]、生物脱毒^[112]、高固含量条件下 SSF^[113]的干法生物炼制平台，为微生物利用木质纤维素生产琥珀酸奠定了良好的平台基础。

1.3.3 木质纤维素琥珀酸发酵存在的问题

木质纤维素在水解后会大量产生还原性单糖，同时也伴随着大量的抑制物的产生。微生物以木质纤维素为原料生产琥珀酸难点在于（1）绝大部分发酵菌株对于木质纤维素来源的全部单糖，尤其是戊糖，难以利用或利用效率低；（2）处理过后的木质纤维素产生的抑制物会对发酵菌株造成极大的胁迫，破坏细胞膜影响正常生长与代谢^[114]。解决琥珀酸发酵菌株的上述问题是实现木质纤维素体系下琥珀酸发酵关键^[115]。

木质纤维素中戊糖主要为木糖和阿拉伯糖，在半纤维素水解液中戊糖含量能占到50%以上，却很少被微生物所利用^[116]。微生物细胞工厂能够高效利用戊糖可以提高木质纤维素基化学品生产过程的经济效益。潘浩等人^[117]在 *C. glutamicum* ATCC13869 之中构建出木糖和阿拉伯糖代谢路径，利用麦秆水解液在有氧条件下发酵制备琥珀酸，发现重组菌可以利用水解液中戊糖，最终产生 4.03 g/L 的琥珀酸。天津大学的李桂莹^[118]以经过代谢工程改造的琥珀酸生产菌 *C. glutamicum* SAZ3 作为出发菌株，异源引入木糖代谢相关基因 (*xylAB*、*tal* 以及 *tkt*)，以木糖为唯一碳源进行琥珀酸发酵，得率为 0.98 g/g 木糖。最后引入 *E. coli* 中阿拉伯糖利用基因 (*araBAD*)，在混合糖（葡萄糖、木糖以及阿拉伯糖）合成培养基中厌氧发酵，最终产生 36.2 g/L 琥珀酸。

在引入其他糖代谢途径时还应该注意葡萄糖抑制效应（CCR, Carbon Catabolite Repression），即在混合碳源的环境下，菌株优先利用提供最高生长速率的碳源的现象^[119]。Kawaguchi 等人^[120]在谷氨酸棒杆菌中构建出木糖和阿拉伯糖利用路径，在琥珀酸发酵过程中出现 CCR 效应，极大延长了发酵时间。而且木糖和阿拉伯糖浓度较低时，单糖消耗速率出现明显下降趋势。在之前的研究中^[121]发现，磷酸转移酶系统 PTS 失活可以实现葡萄糖和木糖的同时消耗。Liang 等人^[122]构建了一株敲除 *pflB*、*ldhA*、*ppc* 和 *ptsG* 基因的 *E. coli*，同时表达了 *pck* 基因，用于消除胞内 ATP 的不平衡带来的影响，以甘蔗渣水解液为原料进行发酵，36 h 内获得 87 g/L 的琥珀酸，更为重要的是实现木糖与葡萄糖的同步利用。本实验室在纤维素乙醇发酵过程筛选出的一株耐高温的木质纤维素依赖型乳酸片球菌^[123]，经过代谢改造敲除 D-乳酸脱氢酶^[124]，异源引入戊糖代谢路径^[125]，构建了一株可利用木质纤维素来源全部单糖生产 L-乳酸的优良菌株。利用上述干法生物炼制过程，实现以小麦秸秆为原料，在 30%固含量条件下进行 SSCF，获得了 126.7 g/L 的 L-乳酸，得率高达 62.3%^[126]。而且该生物炼制菌株可以同步消耗各种单糖，解除了 CCR 效应，其相关机制依然在研究中，可能与胞内 CcpA 蛋白等因素有关。

除了戊糖利用方面的问题外，高固含量的木质纤维素水解液中含有大量抑制物，限制菌株的生长与发酵。在低固含量木质纤维素水解液中发酵，可以减少抑制物对发酵菌株的抑制作用，但难以实现高指标琥珀酸发酵，不具有工业应用价值。谢慧等人^[127]通过稀酸（AT）和蒸汽爆破（SE）两种方式预处理玉米秸秆，分别制得相应的物料水解液，利用 *A. succinogenes* 菌株发酵生产琥珀酸。由于 SE 处理方式更为剧烈，产生大量抑制物，使得菌株在发酵过程受到极大的抑制，没有生成琥珀酸。而 AT 处理后的发酵原料也存在一定的抑制物，最终仅产生 22.69 g/L 的琥珀酸，比对照低 32.69%。

随后通过 D301 树脂对 SE 水解液进行脱毒处理, 发现脱毒后的发酵液可以被发酵菌株所利用, 产生 25.32 g/L 琥珀酸。有研究表明, 当发酵液中抑制物糠醛浓度超过 1.5 g/L 时琥珀酸生产就会收到抑制, 而 HMF 浓度超过 1 g/L 时就会对发酵产生影响^[128], 产生抑制的浓度与菌株的种类有关。黄秀梅等人^[128]同样利用 *A. succinogenes* 发酵, 将得到的玉米秸秆水解液同时使用氢氧化钙与活性炭进行脱毒, 琥珀酸产量达 67 g/L, 比未脱毒发酵体系的发酵产量提高 25%。木质纤维素来源的抑制物对琥珀酸发酵菌株产生极大的胁迫, 影响琥珀酸发酵。本实验室利用 *P. variotii* FN89 进行液态生物脱毒, 由于脱毒过程可控, 减少了发酵单糖的损耗, 同时在发酵罐中即可完成脱毒过程, 减少整体发酵周期。本研究所用的乳酸片球菌是从木质纤维素原料中分离出来的, 对木质纤维素来源抑制物具有一定耐受性。实验室前期的工作提供了具有良好发酵性能菌株以及高效的生物炼制平台, 为木质纤维素体系下琥珀酸生产提供有力支持。

1.4 产酸菌株在低 pH 胁迫下耐受性的研究

弱有机酸在较低 pH 条件下生产更具有经济效益^[51], 琥珀酸生物合成过程中, 除了原料成本外, 琥珀酸后期纯化成本也是不可忽视的^[14]。在琥珀酸发酵过程中, 需要添加中和剂来维持菌株发酵最适 pH, 后期需要将琥珀酸盐转化为游离酸, 在低 pH 进行琥珀酸发酵可以减少中和剂的使用, 降低分离纯化成本。*P. acidilactici* ZY271 在进行高指标 L-乳酸生产过程中, 会通过 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH, 后期在分离过程中加入硫酸将乳酸置换出来, 该过程产生大量难以处理的 CaSO_4 。然而目前用于有机酸生产的工程细菌大都难以在低 pH 条件下生长代谢^[129], 因此提高菌株在低 pH 胁迫下耐受性, 获得可在低 pH 条件下生产有机酸的优良菌株具有极大的工业应用价值。

1.4.1 低 pH 对菌株的胁迫作用

低 pH 环境会对有机酸发酵菌株产生极大的胁迫。这是由于小分子羧酸可通过简单扩散的方式进入细胞内^[130], 在胞内进一步解离对菌株造成一系列不利的影响。有研究表明, 在低 pH 环境中, 微生物的细胞膜成分会发生改变, 通过增加单不饱和脂肪酸的比例来降低细胞膜的流动性, 以抵抗低 pH 的影响^[131]。胞内 pH 发生改变, 会导致一些必需蛋白质变性失活, 影响菌株的正常代谢^[131], 同时还会对 DNA 造成不可逆的损伤^[132]。在低 pH 条件下活性氧 (例如: 过氧化氢与超氧化物) 会发生大量积累现象, 进而导致生物大分子受损^[133]。

1.4.2 适应性进化策略提高菌株低 pH 耐受性研究

提高产酸菌株在低 pH 条件下的耐受性策略主要包括 (1) 理性设计; (2) 适应性进化。通过理性设计的方案往往获得效果并不理想, 有研究在乳酸菌中过表达 L-乳酸脱氢酶增强乳酸通量, 表达酸损伤修复基因以及 ATP 酶基因, 但效果甚微^[134]。

适应性进化作为一种高效的方法, 已经广泛的应用于提高生物炼制菌株在高温、高盐以及高浓度抑制物等胁迫环境下耐受性^[135]。冯文婧等人^[136]建立人工筛选酸性系统, 通过改变系统乳酸和琥珀酸的浓度以及不断降低 pH, 筛选出一株可在 pH 2.5 环境

下生长的酿酒酵母。有研究将 *Lactobacillus pentosus*（戊糖乳杆菌）在以木糖为唯一碳源的培养基中，低 pH 条件下进行长期驯化，获得一株可耐受低 pH 胁迫的驯化菌株，在不控制发酵 pH 情况下，驯化菌株的木糖消耗速率和乳酸生产速率与对照菌株相比分别提高 1.6 倍和 2.2 倍^[137]，证明了驯化菌株在低 pH 条件下利用半纤维素（含有大量木糖）生产乳酸的潜力。Zhang 等人^[138]对 *Lactobacillus casei*（干酪乳杆菌）在几种不同 pH 条件下（5.5、5.0、4.6 以及 4.3）进行长时间的传代驯化，获得一株性状稳定的低 pH 值耐受菌株，在低 pH 条件下（pH 4.3）乳酸产量比出发菌株提高 18%。

1.5 立题依据及主要研究内容

本研究以优异的木质纤维素高指标手性乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 为出发菌株，在该工程菌株中引入外源的琥珀酸生产基因，构建 rTCA 生产琥珀酸路径。同时，为了减少有机酸发酵过程中和剂的使用，本研究还通过适应性进化方式提高 *P. acidilactici* 在实际物料体系，低 pH 条件下的耐受性，提高菌株的发酵性能，为木质纤维素体系下琥珀酸发酵奠定了基础。

本论文具体工作总结如下两部分：

（1）在 *P. acidilactici* ZY271 引入 TCA 生产琥珀酸路径的相关基因，构建琥珀酸生产路径。将来自 *C. glutamicum* B253 的 *mdh1* 整合到基因组上，以表达质粒的方式将 *pck1* 导入到重组菌中，构建 rTCA 生产琥珀酸路径，并对重组菌在琥珀酸发酵中出现的问题进行了探究。

（2）通过适应性进化的方式提高有机酸生产菌株 *P. acidilactici* 在低 pH 下的耐受性，证明了交替进化策略在适应性进化过程中起到关键性作用。最终，在实际物料体系下进行了发酵评价，结果表明，适应性进化菌株在低 pH 胁迫下的耐受性以及发酵性能有所提高。

第2章 代谢改造乳酸片球菌生产琥珀酸

2.1 引言

目前人类面临着资源短缺以及环境污染等诸多问题，因此通过生物发酵法生产琥珀酸等大宗化学品具有经济与环境效益^[7]。生物基琥珀酸大都以粮食淀粉为原料，一方面生产成本昂贵，一方面面临着“与民争粮，与粮争地”困境，这就极大限制了生物基琥珀酸的发展。木质纤维素资源是地球上分布广泛、储量丰富且价格低廉的可再生资源，开发木质纤维素体系琥珀酸发酵的细胞工厂具有重要意义。本研究出发菌种 *P. acidilactici* ZY271 是实验室经过一系列理性设计和适应性进化所获得的优良菌株，具有耐高温、对木质纤维素体系具有很好的耐受性以及可以利用木质纤维来源全部单糖等优点，是利用木质纤维素发酵液生产琥珀酸优良的候选菌株。生物合成琥珀酸主要通过三种路径，其中依靠 rTCA 路径生产琥珀酸最为常见，厌氧条件下 rTCA 生产琥珀酸路径包括两部分：（1）C3 到 C4 路径：以丙酮酸或 PEP 为底物，固定 CO₂ (HCO₃⁻) 生成草酰乙酸或苹果酸；（2）琥珀酸生产路径：以草酰乙酸或苹果酸为底物，经过一系列酶的催化生成琥珀酸。然而 ZY271 菌株中缺少 C3 到 C4 基因以及 *mdh* 基因，需要异源表达。*C. glutamicum* 中 rTCA 路径相关酶具有较高的活性，经过代谢改造，可得到目前最高琥珀酸浓度^[68]；*L. plantarum* 是一种乳酸菌 (LAB)，该菌中 rTCA 路径相对完整，有关于其代谢改造生产琥珀酸的报道^[25]。这两种微生物是优异的基因供体。

本研究尝试在 ZY271 中构建琥珀酸生产路径。首先通过诱导表达和体外无细胞催化实验，验证不同来源的 MDH 酶活力大小，发现来自 *C. glutamicum* B253 的 MDH1 催化活性最高，构建表达框 *PldhD_mdh1*，并将其整合到基因组的 *ackA3* 位点，构建重组菌 M1；其次，以表达质粒的形式将 *pck* 导入，获得 M2 菌株，构建一条从 PEP 到琥珀酸的生产路径；最后进行琥珀酸发酵验证，但并没有目标产物生成，对其原因进一步讨论探究。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌种及质粒

本章节使用菌种、引物以及所构建质粒如表 2.1 所示。本章进行分子改造的微生物 *P. acidilactici* ZY271 保存于中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC)，注册编号为 13611^[139]，菌株 *P. acidilactici* ZP26 提供基因组用于扩增 D-乳酸脱氢酶启动子 *PldhD*，保存于 CGMCC，注册编号为 8665。基因供体菌 *C. glutamicum* S9114 以及 *C. glutamicum* B253 购买于上海工业微生物研究所^[140]，*L. plantarum* ATCC8014 购自美国典型微生物保藏中心。引物设计是通过 SnapGene 软件完成，引物合成以及测序工作是由北京擎科生物科技股份有限公司协助完成。

表 2.1 本章所用菌种、质粒以及引物

Table 2.1 Strains, plasmids and primers used in this chapter

Strains	Characteristics	Sources
Departure strains		
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271	Metabolically modified strains in our laboratory have the ability to utilize lignocellulosic feedstocks for homolactic fermentation and produce large quantities of L-lactic acid.	Lab stock
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZY15	Metabolically modified strains in our laboratory have the ability to utilize lignocellulosic feedstocks for homolactic fermentation and produce large quantities of D-lactic acid.	Lab stock
<i>Pediococcus acidilactici</i> ZP26	D-lactic acid production strain with L-lactate dehydrogenase encoding gene (<i>ldh</i>)	Lab stock
<i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2	Wild-type strain	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> BL21	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Corynebacterium glutamicum</i> B253	Wild-type strain, Gene donor bacteria	Lab stock
<i>Corynebacterium glutamicum</i> S9114	Wild-type strain, Gene donor bacteria	Lab stock
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	Wild-type strain, Gene donor bacteria	Lab stock

Inducible expression plasmid system		
<i>E. coli</i> BL21 pET28a- <i>mdh1</i>	<i>E. coli</i> BL21 carrying pET28a- <i>mdh1</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> BL21 pET28a- <i>mdh2</i>	<i>E. coli</i> BL21 carrying pET28a- <i>mdh2</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> BL21 pET28a- <i>mdh3</i>	<i>E. coli</i> BL21 carrying pET28a- <i>mdh3</i> expressing vector	This study
rTCA pathway construction		
<i>E. coli</i> XL1 Blue pSET4e- Δ <i>ackA3</i> ::PldhD_ <i>mdh1</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pSET4e- Δ <i>ackA3</i> -PldhD_ <i>mdh1</i> knockout vector	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271- Δ <i>ackA3</i>	<i>ackA3</i> deficient of <i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271- Δ <i>ackA3</i> ::PldhD_ <i>mdh1</i>	Integration of the expression cassette PldhD_ <i>mdh1</i> into <i>ackA3</i> locus of <i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271- Δ <i>ackA3</i>	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pZY36e- <i>pck1</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pZY36e- <i>pck1</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pZY36e- <i>pck3</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pZY36e- <i>pck3</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pZY36e- <i>pyc1</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pZY36e- <i>pyc1</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pZY36e- <i>pyc2</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pZY36e- <i>pyc2</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pZY36e- <i>pyc3</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pZY36e- <i>pyc3</i> expressing vector	This study

<i>P. acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i> -pZY36e- <i>pck1</i>	<i>P. acidilactici</i> ZY271- Δ <i>ackA3</i> ::PldhD_ <i>mdh1</i> carrying pZY36e- <i>pck1</i> expressing vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pSET4e- Δ <i>mleS</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pSET4e- Δ <i>mleS</i> knockout vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pSET4e- Δ <i>mleS</i> ::PldhD_ <i>pck1</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pSET4e- Δ <i>mleS</i> ::PldhD_ <i>pck1</i> knockout vector	This study
<i>E. coli</i> XL1 Blue pSET4e- Δ <i>mleS</i> ::PldhD_ <i>pck3</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue carrying pSET4e- Δ <i>mleS</i> ::PldhD_ <i>pck3</i> knockout vector	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i> - Δ <i>mleS</i>	<i>mleS</i> deficient of <i>P. acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i>	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i> - Δ <i>mleS</i> :: <i>pck1</i>	Integration of the expression cassette PldhD_ <i>pck1</i> into <i>mleS</i> locus of <i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i> - Δ <i>mleS</i>	This study
<i>P. acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i> - Δ <i>mleS</i> :: <i>pck3</i>	Integration of the expression cassette PldhD_ <i>pck3</i> into <i>mleS</i> locus of <i>Pediococcus acidilactici</i> ZY271:: <i>mdh1</i> - Δ <i>mleS</i>	This study
Plasmids	Characteristics	Sources
pET28a	Expression plasmid for <i>E. coli</i> , T7 promoter, Km ^r	Lab stock
pSET4e	Temperature-sensitive plasmids, Em ^r resistance	[124]
pZY36e	Expression plasmid for <i>P. acidilactici</i> , Em ^r	[125]
pET28a- <i>mdh1</i>	<i>mdh1</i> overexpressing vector	This work
pET28a- <i>mdh2</i>	<i>mdh2</i> overexpressing vector	This work
pET28a- <i>mdh3</i>	<i>mdh3</i> overexpressing vector	This work

pSET4e- Δ <i>ackA3</i>	Plasmid for integration of the <i>ackA3</i> gene of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
pSET4e- Δ <i>ldh</i>	Plasmid for integration of the <i>ldh</i> gene of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
pSET4e- Δ <i>ldhD</i>	Plasmid for integration of the <i>ldhD</i> gene of <i>P. acidilactici</i> ZY15	This work
pSET4e- Δ <i>mleS</i>	Plasmid for integration of the <i>mleS</i> gene of <i>P. acidilactici</i> ZY271	This work
pSET4e- Δ <i>ackA3</i> ::PldhD_ <i>mdh1</i>	PldhD promoter from <i>P. acidilactici</i> ZP26, <i>mdh1</i> from <i>C. glutamicum</i> B253	This work
pSET4e- Δ <i>mleS</i> ::PldhD_ <i>pck1</i>	Integration of the PldhD_ <i>pck1</i> expression frame into the <i>P. acidilactici</i> ZY271 site of <i>mleS</i>	This work
pSET4e- Δ <i>mleS</i> ::PldhD_ <i>pck3</i>	Integration of the PldhD_ <i>pck3</i> expression frame into the <i>P. acidilactici</i> ZY271 site of <i>mleS</i>	This work
Primers	Sequences (5'-3')	
YZ-36e-F	CAAGGCGCTAAATATACCCG	
YZ-36e-R	ATCTCAACAATGTGAAGTCAGC	
YZ-28a-F	CAGCAGCCAACTCAGCTTC	
YZ-28a-R	GCTGGCAAGTGTAGCG	
YZ-SET4e-F	GTCACAGCTTGTCTGTAAGC	
YZ-SET4e-R	ACCGTATTACCGCCTTTGA	
<i>mdh1</i> -28a-F	<u>GCGGATCCGAATTCGAGCTCATGAATTC</u> CCCCGCAGAACGT	
<i>mdh1</i> -28a-R	<u>GGTGGTGGTGCTCGAGTTAGAGCAAGTCGCGCACTGC</u>	
<i>mdh2</i> -28a-F	<u>CGAGCTCATGAATTC</u> CCCCGCAGAAC	
<i>mdh2</i> -28a-R	<u>CTCGAGCGGTTAGAGCAAGTCGCGCAC</u>	
<i>mdh3</i> -28a-F	<u>GCGGATCCGAATTCGAGCTCATGGTAAAACGATACAATAGCAAAAAAATTGAACAAC</u>	
<i>mdh3</i> -28a-R	<u>GGTGGTGGTGCTCGAGTTAATCAACATATTGCGCGTAGTCGATCC</u>	
up- <i>ackA3</i> - F	<u>AGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCAATTCGCTTCTTTGGTGAAAAACTTTTCGGGA</u>	
up- <i>ackA3</i> -R	<u>TGCAATCCCAATTCTCGAGCGGCGGGATCCCCTAATTACCTTCCTGAAAATCTTTATTG</u>	
down- <i>ackA3</i> - F	<u>GAAGGTAATTAGGGGATCCCGCCGCTCGAGAATTGGGATTGCAAATAGTACGTTTGATTA</u>	

down- <i>ackA3</i> - R	<u>CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAAATCTGCAGCATA</u> CGCGCCAATGTAATGTT
PldhD- Δ <i>ack</i> -F	<u>GATTTTCAGGAAGGTAATTAGGGGATCTGCTCTGGTGTGCAGACCAGACG</u>
PldhD(<i>mdh1</i>)- Δ <i>ack</i> -R	<u>CTGCGGGGAATTCAT</u> TGTAATATTACCCCTTTCTTTTTTAATCAATATAAATGTACCACTAATG
<i>mdh1</i> - Δ <i>ack</i> -F	<u>GGGGTAATATTACA</u> ATGAATTCCCCGCAGAACGT
<i>mdh1</i> - Δ <i>ack</i> -R	<u>AATCCCAATTCTCG</u> ATTAGAGCAAGTCGCGCACTG
<i>g-ackA</i> -up-F	GTTTCAGCGATTGATACAGGAA
<i>p-ackA</i> -down-R	CCATGATTACGCCAAGCTT
<i>p-up-ackA</i> -F	GAATTCGAGCTCGGTACC
<i>g-down-ackA</i> -R	ACCTGCAGTAAAGACTAACG
<i>secYZ-ackA3</i> -F	CCAAGAACATATTTTAATGGTATGCCA
<i>secYZ-ackA3</i> -R	CGACTCTACTTCCGAGACTT
<i>pyc1</i> -36e-F	<u>AAAAAAGAAAGGGGTAATATTACATCTAGG</u> TGTCGACTAACACATCTTCAACGCTTCC
<i>pyc2</i> -36e-R	<u>ACTTTGCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG</u> ATTAGGAAACGACGACGATCAAGTCGCCACC
<i>pyc2</i> -36e-F	<u>AAAAAAGAAAGGGGTAATATTACATCTAGG</u> TGTCGACTCACACATCTTCAACGCTTCC
<i>pyc2</i> -36e-R	<u>ACTTTGCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG</u> ATTAGGAAATGACGACGATCAAGTCGCCACC
<i>pyc3</i> -36e-F	<u>AAAAAAGAAAGGGGTAATATTACATCTAGG</u> TGAAGAAAGTATTAATTGCTAACCGTGG
<i>pyc3</i> -36e-R	<u>ACTTTGCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG</u> ATTATTGTGGTGCAATCTCGAGCAGCAAGT
<i>pck1</i> -36e-F	<u>GTAATATTACATCTAG</u> ATGACTACTGCTGCAATCAGGGGCCTTCAGGGTG
<i>pck1</i> -36e-R	<u>ATGCCTGCAGGTCG</u> ATTAAGCGTGAGCTGCTGAAATGCGGGCCTTCAGAG
<i>pck3</i> -36e-F	<u>ATTACATCTAG</u> ATGAGCACTAAAATTCTTATCAATTAGC
<i>pck3</i> -36e-R	<u>AGGTCG</u> ACTATTTTGTAATTGGTTGTTTTAATTGATCTTG
PldhD- Δ <i>mleS</i> -F	<u>AAAGCAAAGCTCTAG</u> TGCTCTGGTGTGCAGAC
PldhD(<i>pck1</i>)- Δ <i>mleS</i> -R	<u>TTGCAGCAGTAGTC</u> ATTGTAATATTACCCCTTTCTTTTTTAATCAATATAAATGTACC
PldhD(<i>pck3</i>)- Δ <i>mleS</i> -R	<u>GAATTTTTAGTGCTC</u> ATTGTAATATTACCCCTTTCTTTTTTAATCAATATAAATGTACC
<i>pck1</i> - Δ <i>mleS</i> -F	<u>AGGGGTAATATTACA</u> ATGACTACTGCTGCAATCAGG
<i>pck1</i> - Δ <i>mleS</i> -R	<u>GTTTTTCTAACTCG</u> ATTAAGCGTGAGCTGCTG

<i>pck3-ΔmleS</i> -F	<u>AAAGGGGTAATATTACA</u> ATGAGCACTAAAAATTCTTATCAATTAGCC
<i>pck3-ΔmleS</i> -R	<u>GTTTTCTAACTCGACT</u> ATTTTGTAATTGGTTGTTTTAATTGATCT
<i>up-mleS</i> -F	<u>CCGGGGATCCTCTAG</u> TTTGGTAAACCACGTTAGGT
<i>up-mleS</i> -R	<u>TAACTCGAGCGGTCTAGAGCT</u> TTTGCTTTCCTCCAATTTTT
<i>down-mleS</i> -F	<u>AAAGCTCTAGACCGCTCGAG</u> TTAGAAAAACGGTTATTCTT
<i>down-mleS</i> -R	<u>CTTGCAATGCCTGCAGGTCGA</u> ACCATGTAGAAGTGTTTCTT
<i>g-mleS</i> -up-F	TAAAACCCACCCCTACGT
<i>p-mleS</i> -down-R	CGCAACGCAATTAATGTGA
<i>p-mleS</i> -up-F	GATTAAGTTGGGTAACGCCAG
<i>g-mleS</i> -down-R	GCACCTTTACCTTTCCTAATGTATC
<i>secYZ-mleS</i> -F	CAACAAAGAATTGCCGATTTGAT
<i>secYZ-mleS</i> -R	CGTCGCAAAATTGTGCC

其中双下划线表示在无缝克隆中载体与基因一致的同源序列，下划线表示酶切位点。

2.2.2 培养基及培养条件

本章主要使用的培养基及其配方为：（1）Luria-Bertani（LB）培养基：蛋白胨 10 g/L、酵母粉（YE）5 g/L、氯化钠（NaCl）10 g/L；（2）MRS 培养基：葡萄糖 20 g/L、酵母粉（YE）10 g/L、蛋白胨 10 g/L、醋酸钠（无水乙酸钠）5 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、七水合硫酸镁 0.5 g/L 以及一水合硫酸锰 0.25 g/L。配制固体培养基时需额外添加 2%琼脂。上述培养基经过灭菌（115°C，20 min）后备用，其中蛋白胨与酵母粉（YE）购买于 OXIDE 公司，其余均购于上海探索平台。

E. coli 培养：（1）液体培养：使用 LB 液体培养基，培养条件为 37°C，200 rpm，以 10%（v/v）接种量进行转接；（2）固体培养：在 LB 固体平板上划线或涂布，在 37°C 培养箱静置培养一段时间，长出菌落；（3）携带 pET28a 重组质粒（抗性为卡那霉素）菌株培养：LB 液体培养基中添加 0.1%（v/v）50 mg/mL 卡那霉素（称取 250 mg 卡那霉素溶于 5 mL dd H₂O 中，用 0.22 μm 水系滤头过滤除菌），37°C，200 rpm 培养。配制带有卡那霉素抗性的 LB 固体平板（LK）时，需要在 LB 培养基中添加 0.1%（v/v）50 mg/mL 卡那霉素，将携带质粒的重组菌涂布或划线后放于 37°C 培养箱中静置培养，长出菌落；（4）携带 pZY36e 或 pSET4e 重组质粒（抗性为红霉素）菌株培养：LB 液体培养基中添加 0.4%（v/v）50 mg/mL 红霉素（用无水乙醇溶解，0.22 μm 有机系滤头过滤除菌），放于 37°C，200 rpm 摇床中培养。配制固体 LE 平板需要在 LB 培养基中添加 0.8%（v/v）50 mg/mL 红霉素，涂布或划线后 37°C 静置培养。

P. acidilactici 培养：（1）液体培养：MRS 液体培养基，培养条件为 42°C，150 rpm，以 10%（v/v）接种量进行转接；（2）固体培养：在 MRS 固体平板划线或涂布，42°C 静置培养一段时间。（3）重组菌培养：MRS 液体培养基中添加 0.01%（v/v）50 mg/mL 红霉素，表达质粒放于 42°C，敲除质粒放于 30°C，150 rpm 进行培养。固体 MRSE 平板配制时需要在 MRS 培养基中添加 0.01%（v/v）红霉素，培养的温度条件如上所述，静置培养一段时间。

2.2.3 重组质粒构建

本章所构建质粒以及所用引物表 2.1 所示。

构建 pET28a 表达质粒系统，诱导不同来源的苹果酸脱氢酶基因（*mdh*）进行表达，通过体外无细胞催化实验，验证其是否具有蛋白酶活。通过 *mdh*-28a-F/R 引物扩增不同来源的 *mdh* 基因，利用限制性内切酶 Sall 和 XbaI 将 *mdh2* 基因进行酶切，并同时使用两种限制酶将 pET28a 线性化，本章所利用的限制性内切酶均购买于赛默飞科技公司（Thermo Fisher Scientific），通过 T4 DNA Ligase（连接酶购自 Takara 生物医药技术公司）在 16°C 水浴中处理 30-40 min，得到 pET28a-*mdh2* 表达质粒。*mdh1* 与 *mdh3* 通过无缝克隆方式与线性化的 pET28a 进行连接，构建 pET28a-*mdh1* 与 pET28a-*mdh3* 表达质粒，无缝克隆试剂盒购于汉恒生物（上海）科技有限公司。其中 *mdh1* 基因来自 *C. glutamicum* B253，*mdh2* 来自 *C. glutamicum* S9114，*mdh3* 来自 *L. plantarum* ATCC8014。

用于 rTCA 琥珀酸合成路径构建的表达质粒构建如下：通过 *pyc1*(36e)-F/R、*pyc2*(36e)-F/R 以及 *pyc3*(36e)-F/R 扩增来自 *C. glutamicum* B253 的 *pyc1*、*C. glutamicum* S9114 的 *pyc2* 以及 *L. plantarum* ATCC8014 的 *pyc3*，同时用相应的引物扩增 *pck1* 与 *pck3* 基因。分别将 *pyc1*、*pyc2*、*pyc3*、*pck1* 以及 *pck3* 基因整合到 pZY36e 的 XbaI 与 SalI 位点，得到五种表达质粒 pZY36e-*pyc1*、pZY36e-*pyc2*、pZY36e-*pyc3*、pZY36e-*pck1* 和 pZY36e-*pck3*。

将 *mdh1* 整合至基因组的 *ackA3* (*ackA_RS01275*) 位点，需要构建整合质粒。利用 up-*ackA3*-F/R 以及 down-*ackA3*-F/R 将 *P. acidilactici* ZY271 基因组 *ackA_RS01275* 上下游大约 800 bp 的同源臂扩增出来，并同时在上游的 3'端引入 BamHI 酶切位点，在下游的 5'端引入 XhoI 酶切位点，通过融合 PCR 手段将上下游进行连接，构建 up-down-*ackA3* 融合片段。用限制性内切酶 BamHI、XbaI 将 pSET4e 敲除质粒进行线性化，通过无缝克隆的方式将线性化 pSET4e 与 up-down-*ackA3* 融合片段进行连接，构建 pSET4e- Δ *ackA3* 敲除质粒。以 *C. glutamicum* B253 基因组为模板，利用 *mdh1*- Δ *ack*-F/R 扩增 *mdh1* 基因，利用 PldhD(*mdh1*)- Δ *ack*-F/R 扩增来自 *P. acidilactici* ZP26 的 D-乳酸脱氢酶启动子 PldhD，通过融合 PCR 方式构建 PldhD_*mdh1* 表达框，将 pSET4e- Δ *ackA3* 通过 BamHI、XhoI 进行酶切，以无缝克隆方式连接 PldhD_*mdh1* 表达框，构建 pSET4e- Δ *ackA3*::PldhD_*mdh1* 敲除质粒。

将 *pck1* 与 *pck3* 基因整合到 *mleS* 位点整合质粒构建过程如下：扩增得到 *P. acidilactici* ZY271 基因组中 *mleS* 基因上下游 800 bp 左右片段序列，同时在上游的 3'端引入 XhoI 位点，在下游的 5'端引入 XbaI 位点，通过融合 PCR 方式构建 up-down-*mleS* 片段。将融合片段插入到 pSET4e 的 XbaI 和 SalI 位点之间获得 pSET4e- Δ *mleS* 敲除质粒。然后以表达质粒 pZY36e-*pck1* 和 pZY36e-*pck3* 为模板扩增得到 PldhD_*pck1* 与 PldhD_*pck3* 表达框，分别整合到 pSET4e- Δ *mleS* 的 XhoI 与 XbaI 位点得到 pSET4e- Δ *mleS*::*pck1* 与 pSET4e- Δ *mleS*::*pck3* 整合质粒。

用于基因扩增的高保真酶 Prime STAR HS 购买于 Takara 公司，用于菌落 PCR 验证的 Tag Master Mix(Dye Plus)购自诺唯赞（南京）公司。本章所用的试剂盒：PCR 产物（质粒酶切）回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒以及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司；细菌基因组提取试剂盒购于天根生化科技（北京）有限公司。

2.2.4 重组菌株构建

E. coli 感受态是通过氯化钙法 (CaCl_2) 制备。主要试剂为 0.1 M CaCl_2 溶液（称取 2.22 g 的氯化钙加入 200 mL 去离子水，灭菌条件 115°C，20 min，放于 4°C 冰箱保存）。

(1) 菌体培养过程：挑取 *E. coli* XL1 Blue 或 *E. coli* BL21 划线平板中的单菌落于含有 5 mL LB 试管中，37°C，200 rpm 条件下培养 12 h，转接 200 μ L 于含有新鲜的 5 mL LB 试管中，37°C，200 rpm 培养 2 h 左右。

(2) 感受态制备: 吸取 1 mL 菌液到 EP 管中, 4°C, 12000 rpm 离心 3 min, 去掉上清液, 加入 800 μ L-1000 μ L 0.1 M CaCl₂ 溶液吹打混匀, 4°C, 12000 rpm 离心 3 min, 再次去掉上清液, 最后加入 100 μ L CaCl₂ 溶液轻轻吹打混匀, 放到冰上备用。

(3) 转化: 将 2.2.3 所构建的质粒 (10 μ L 体系) 加入到含有 100 μ L 感受态的 EP 管中, 轻轻吹打混匀, 冰浴 30 min, 随后 42°C 水浴锅中热激 60 s-90 s, 立即冰浴 2 min, 在超净工作台中加入 1000 μ L LB 培养基, 在 37°C, 200 rpm 摇床中复苏 40 min 到 1 h。复苏完成后, 12000 rpm 离心 3 min, 在超净工作台中吸除上清 900 μ L, 剩下液体吹打混匀, 涂布在 LE 或 LK 抗性平板上, 于 37°C 培养箱中培养 1 d 左右。长出单菌落利用表 2.1 中相应质粒的验证引物进行菌落 PCR 验证, 对阳性菌落进行培养, 提取质粒进一步进行测序。

P. acidilactici 乳酸片球菌感受态的制备:

(1) 电转所需溶剂制备:

Electrotransfer buffer solution I (EBS1): 20.538 g 蔗糖、0.186 g K₃PO₄ · 3 H₂O、0.04 g MgCl₂ · 6 H₂O 溶于 180 mL 去离子水中, 超声溶解后用盐酸调节溶液 pH 到 7.5。

Electrotransfer buffer solution II (EBS2): 17.115 g 蔗糖、10 mL 甘油加到 80 mL 去离子水中。

复苏液 (sMRS 培养基): 17.115 g 蔗糖溶于 90 mL 的 MRS 培养基中, MRS 培养基配方见 2.1.2。

D/L-苏氨酸: 苏氨酸母液浓度为 40 mM, 称取 0.47648 g D/L-苏氨酸溶解于 4 mL 去离子水中, 用 0.22 μ m 水系滤膜过滤除菌, 并于 -20°C 保存。

1 mg/mL 溶菌酶母液: 5 mg 溶菌酶干粉 (放置于 -20°C 保存) 溶解于 5 mL Tris-HCl (pH 8.0, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌)。溶菌酶应现用现配, 放置冰上保存。

(2) 感受态制备与质粒电转化:

将 *P. acidilactici* 在 MRS 固体平板上进行划线, 在 42°C 隔水式恒温培养箱培养 24 h-36 h 长出单菌落。挑单菌落于含有 5 mL MRS 液体培养基的试管中, 在 42°C, 200 rpm 摇床中培养 12 h。12 h 后在新鲜的 20 mL MRS 液体培养基中加入 600 μ L-1000 μ L 40 mM D/L-苏氨酸, 摇匀后再接入 400 μ L 的菌液, 42°C, 200 rpm 培养 5-6 h 至 OD₆₀₀ 为 1.5 左右。

取 1 mL 菌液于 EP 管中, 离心机提取降至 4°C, 10000 rpm 离心 5 min, 弃去上清, 达到富集菌体的目的。加入 1 mL EBS1, 转速为 10000 rpm, 温度 4°C, 离心 5 min, 弃上清, 重复两次, 这一步目的主要是清洗菌体。用 100 μ L EBS1 重悬菌体, 并加入 10 μ L 溶菌酶母液 (配方如上所述), 37°C 水浴催化 30 min 左右, 这一步主要是处理菌体的细胞壁。加入 1 mL EBS1 吹打混匀, 4°C, 10000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 再加入 1 mL EBS1 重悬菌体, 相同条件离心去除上清, 这一步主要是除去残留的溶菌酶溶液并获得感受态细胞。加入 80 μ L 的 EBS2 吹打混匀, 加入 20 μ L 的所需导入的质粒, 立刻冰浴 15 min。将混合菌液加入到预冷的电击杯中, 用电转仪 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

对感受态细胞进行电击，条件为 25 μF ，2000 V，200 Ω 。在超净工作台中加入 900 μL 的复苏液，复苏 4 h-6 h（表达质粒复苏 4 h，42 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm；敲除质粒复苏 6 h，30 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm），复苏完成后 10000 rpm 离心 5 min，在超净台中除去 800 μL -900 μL 的上清，剩余液体吹打混匀后涂布在 MRSE 平板上，携带表达质粒平板放在 42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养，携带敲除质粒平板放在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行培养，几天后长出单菌落，进行菌落 PCR 的验证，将阳性菌落进行划线保种并进一步测序验证。

2.2.5 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE

(1) 主要溶液配制：

Lower-Tris (pH 8.8): 121.14 g Tris base 溶于 750 μL dd H₂O 中，超声溶解后用浓盐酸调 pH 至 8.8，补水至 1 L，后续用于配制分离胶；

Upper -Tris (pH 8.8): 121.14 g Tris base 溶于 750 μL dd H₂O，用盐酸调 pH 至 6.8，补水至 1 L，后续用于配制浓缩胶；

30% aa: N, N-亚甲基双丙烯酰胺 1 g 和丙烯酰胺 29 g 溶于 100 mL dd H₂O；

10% APS: 0.1 g 过硫酸铵溶于 1 mL dd H₂O，需要现用现配；

10 \times 电泳缓冲液：甘氨酸 144 g、Tris base 29 g、SDS 10 g，溶于 1 L dd H₂O 中，使用时用 dd H₂O 稀释 10 倍；

蛋白电泳染色液：称取 1.0 g 考马斯亮蓝 R 250 固体在洁净的烧杯中，加入 400 mL 乙醇使其充分溶解，室温超声 2 h 以上，再加入 100 mL 冰醋酸，继续超声 1 h 以上，混匀后加入 dd H₂O 补充到 1 L，超声混匀。装入棕色试剂瓶或者用锡纸包裹，注意避光保存。

脱色液：用于蛋白胶染色后的脱色，50 mL 乙酸溶于 450 mL dd H₂O 中。

蛋白胶的配制：下层为分离胶，配方为 1.26 mL H₂O、2.5 mL 30% aa、1.25 mL lower-Tris、50 μL 10% APS、5 μL TEMED。上层为浓缩胶：1.46 mL H₂O、0.42 mL 30% aa、0.625 mL Upper-Tris、25 μL 10% APS、2.5 μL TEMED。

(2) 诱导表达：

通过 2.2.4 大肠杆菌感受态制备方法，将构建的 pET28a-mdh 质粒导入 *E. coli* BL21 中，构建出重组菌株 *E. coli* BL21 pET28a-mdh。在 LK 平板上划线，分离出单菌落。

挑取单菌落于 5 mL 含有 0.1% (v/v) 卡那霉素的 LB 培养基 (LK) 中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 培养 12 h 后，转接 1% (v/v) 于 5 mL 新鲜 LK 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 培养 3 h，在试管中加入 0.6 μL IPTG (IPTG 加入量的计算：IPTG 母液浓度 200 mg/mL，终浓度 0.1 mmol/L，IPTG 分子量 238.3 g/mol，装液量 5 mL，计算得 5 mL 体系加入 IPTG 0.6 μL)，置于 30 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 的摇床中，诱导 8 h。

取 1 mL 菌液于无菌 EP 管中，4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 rpm，离心 10 min，收集上清液于新的 EP 管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，加入 1 mL PBS (磷酸盐平衡生理盐水) 将沉淀进行吹洗，使菌体重新悬浮，再次离心 10 min，倒掉上清，加入 1 mL PBS 使菌体重新悬浮，可放置冰上或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，若长时间保存也可放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

利用超声波细胞破碎机 (JY92-IIN 宁波新芝生物科技有限公司) 在冰上进行细胞破碎。破碎完成之后 12000 rpm 离心 5 min, 收集上清, 将沉淀用 1 mL PBS 重新悬浮, 制备破碎细胞上清与沉淀样品。

将破碎细胞上清和沉淀样品稀释两倍, 取 40 μ L 稀释样品加入 10 μ L 的 Protein Loading Buffer (购买于北京全式金生物技术有限公司, TransGen Biotech Co., LTD), 加热煮沸 5 min。

按照上述蛋白胶配制方法进行配胶, 加完分离胶后进行水封, 等分离胶凝固后将水倒出, 配制并加入浓缩胶, 凝固后放于电泳槽中, 加入电泳缓冲液并进行点样。加压 90 V 跑 30 min 左右, 使得各样品在浓缩胶的同一位置, 再加压到 120 V, 2 h 左右将样品跑开。将胶样放在托盘中并加入考马斯亮蓝染色液, 用振荡器染色 1 h 30 min。染色液回收, 先用水冲洗 2-3 次, 清洗胶样。再加入脱色液, 用振荡器脱色过夜, 用可见光观察条带情况。

2.2.6 MDH 蛋白酶活鉴定

利用试剂盒检测诱导表达的 MDH 蛋白酶活, 本章所使用 NAD-苹果酸脱氢酶检测试剂盒购买于北京博奥森生物技术有限公司。

其原理是 NAD 型的苹果酸脱氢酶催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸, 同时生成 NAD^+ , 导致 340 nm 处的吸光度下降, 通过紫外分光光度计 (BioMate 3S, Thermo Scientific) 记录吸光度变化, 通过酶标仪 (Epoch 2, BioTek) 绘制蛋白标准曲线 (按照 Bradford 方法), 并测得 MDH 蛋白总浓度。MDH 蛋白酶活是按照样本蛋白浓度所计算的, 每 mg 蛋白每分钟 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

将紫外分光光度计预热 30 min 以上, 调节检测波长至 340 nm, 用 ddH₂O 校零。测定前将 AK374-B 在 25°C 水浴 10 min 以上。按照 20 μ L 样品、760 μ L AK374-A、10 μ L AK374-B 以及 10 μ L AK374-C 的顺序加入到 1 mL 石英比色皿中, 吹打混匀后立即记录 20 s 时 340 nm 处的吸光值 A1 和 1 min 20 s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$, 酶活计算公式如下:

$$\text{NAD-MDH(U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

其中, $V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, 8×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 10³ L/mol/cm; d : 比色皿半径, 1 cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL; Cpr : 样本蛋白浓度; T : 反应时间, 1 min。

2.2.7 基因的同源重组

将构建的敲除质粒按照 2.2.4 方法导入 *P. acidilactici* ZY271 中, 通过同源双交换的方式将宿主内源基因敲除并整合外源基因, 实现外源基因的稳定遗传。

首先需要通过菌落 PCR 验证敲除质粒导入受体菌中, 将阳性菌落在含有 0.01% 红霉素的 MRS 培养基中 (MRSE), 30°C, 150 rpm 培养 12 h 后进行保种。然后以 10% (v/v) 的接种量转接到新鲜的 MRSE 培养基中, 在 30°C, 150 rpm 摇床中培养 24 h-48 h, 该过程可以使得温敏性质粒大量的扩增, 更有利于质粒整合到基因组上。随后转接

到（10%）新鲜的 MRSE 培养基中，在 42°C，150 rpm 条件下培养 12 h；最后在超级工作台中将菌液稀释 10⁶ 倍，取 200 μL 涂布在 MRSE 固体平板上，在 42°C 隔水式恒温培养箱中培养 24 h-48 h 长出单菌落，通过菌落 PCR 验证质粒是否整合到目标基因位点。这一步称为单交换。

将单交换验证正确的菌落，首先接种在 MRSE 液体培养基中，42°C，200 rpm 培养 12 h 后进行保种。随后转接到新鲜的 MRS 培养基中，30°C 培养 24 h-36 h；将菌液稀释 10⁶，振荡混匀后吸取 200 μL 稀释液涂布在 MRS 固体平板上，培养 1 d 左右。将在 MRS 固体平板上长出的单菌落分别一一对应点至 MRS 平板与 MRSE 平板上，在 42°C 培养箱中放置 24 h。在 MRSE 平板上无菌落生成而在 MRS 平板上生长的菌落，可能是目的菌株亦或是发生回复突变，需要进行双交换菌落 PCR 验证，并进一步测序验证。单双交换的过程如图 2.1 所示（以 *PldhD_mdh1* 整合到 *ackA3* 位点为例），单交换的方式可能有两种，这里以下游同源臂交换为例进行说明。

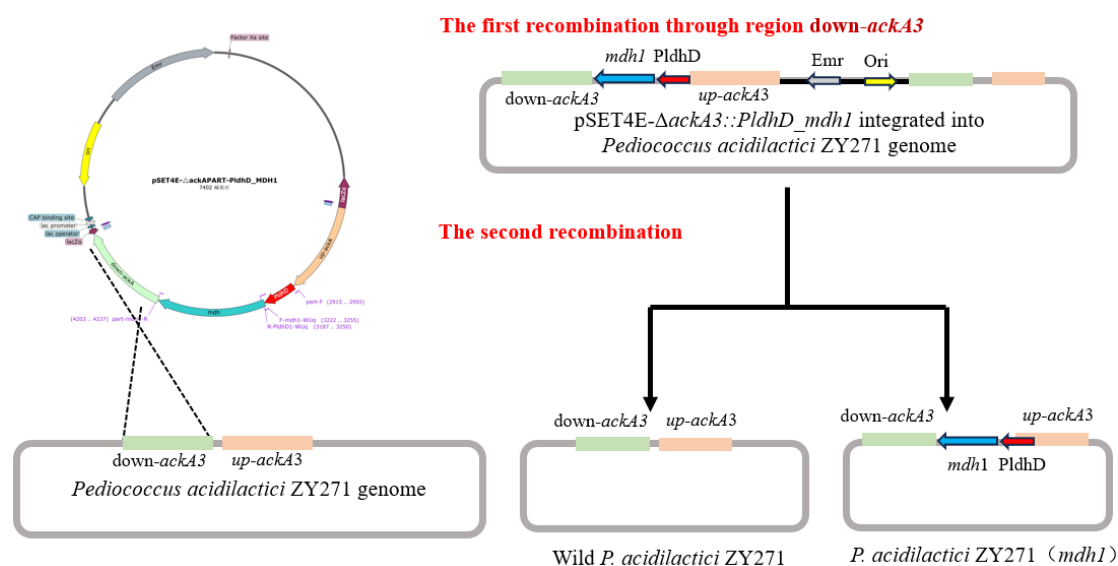


图 2.1 单双交换过程-将 *PldhD_mdh1* 表达框整合到 *ackA_RS01275* 位点

Figure 2.1 Single-double exchange process-integration of the *PldhD_mdh1* expression frame into the *ackA_RS01275* locus

2.2.8 琥珀酸发酵实验

种子液培养：将冻存管里 *P. acidilactici* 转到含有 20 mL MRS 培养基摇瓶中，在 42°C，150 rpm 摇床中培养 6 h，以 10%（v/v）的接种量转接到新鲜 MRS 培养基中，同样的条件培养 6 h，获得二级种子液。如果是培养携带质粒的重组菌，则培养基中加入相应量的抗生素。同时，为了防止菌体絮凝，种子液培养过程中需要添加 1%（v/v）糖化酶。

发酵营养盐配制：12.5 g/L 蛋白胨，12.5 g/L YE，6.25 g/L 醋酸钠，2.5 g/L 柠檬酸氢二胺，2.5 g/L 磷酸氢二钾，0.625 g/L 七水合硫酸镁，0.3125 g/L 一水合硫酸锰。按实验浓度设计添加相应质量的草酰乙酸和苹果酸。

发酵糖母液配制：按照发酵培养基所需糖浓度配制糖母液，例如：培养基中糖浓度需要 80 g/L，那么糖母液的浓度为 400 g/L（营养盐与糖母液体积比为 4:1）。

发酵过程：在 250 mL 锥形瓶里添加 40 mL 发酵营养盐，添加 10 mL 糖母液，充分摇匀后添加 5 mL 种子液，42°C，150 rpm 培养，按照糖浓度多少设计时间间隔进行取样。需要添加一定量的 CaCO₃ 维持发酵过程中的 pH（0.6 g CaCO₃/g 糖）。

2.2.9 样品检测与标准曲线测定

发酵过程中每隔一定时间取 1 mL 样品到灭过菌的 EP 管中，12000 rpm 离心 5 min，按照一定比例稀释后通过 0.22 μm 滤膜过滤，利用高效液相色谱（HPLC, High performance liquid chromatography）检测。本实验主要检测的成分有葡萄糖、木糖、乳酸、草酰乙酸、苹果酸以及琥珀酸，都是通过装备有 HPX-87H 高效液相色谱柱以及 RID-10A 示差检测器的 HPLC 进行检测，流动相是 5 mM 硫酸，柱温控制在 65°C，流速 0.6 mL/min。

通过上述条件来绘制琥珀酸发酵路径上主要代谢物（草酰乙酸、苹果酸和琥珀酸）的标准曲线。通过制备 4 g/L、2 g/L、1 g/L、0.5 g/L、0.25 g/L、0.125 g/L、0.0625 g/L 的浓度梯度标准品，记录出峰时间以及出峰面积，绘制标准曲线（图 2.2）。

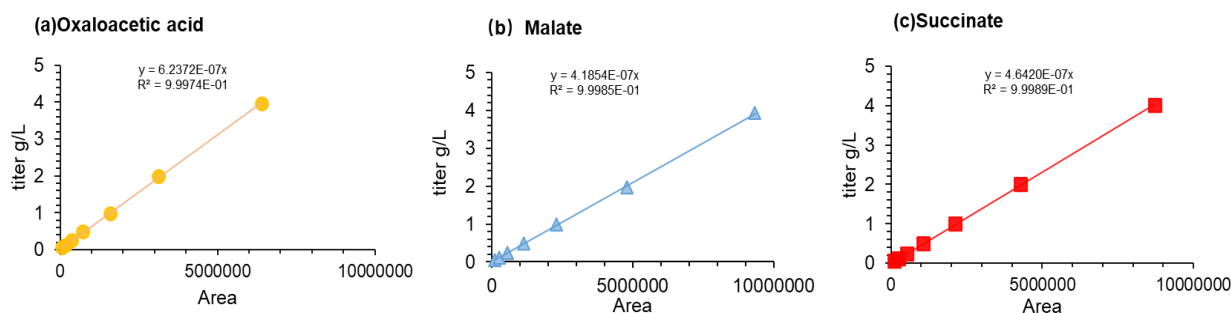


图 2.2 草酰乙酸、苹果酸和琥珀酸标准曲线

Figure 2.2 Standard curves for oxaloacetic acid, malic acid and succinic acid

三种成分の出峰时间以及浓度计算公式如表 2.2 所示。在后续发酵过程中，发现葡萄糖与草酰乙酸出峰时间重合。

表 2.2 草酰乙酸、苹果酸和琥珀酸 R.T.与浓度计算公式

Table 2.2 Formulas for calculating R.T. and concentration of oxaloacetic acid, malic acid and succinic acid

名称	出峰时间 R.T.	浓度计算公式
草酰乙酸	8.1	$y = 6.2372 \times 10^{-7} x$
苹果酸	9.6	$y = 4.1854 \times 10^{-7} x$
琥珀酸	11.7	$y = 4.6420 \times 10^{-7} x$

2.3 结果与讨论

2.3.1 MDH 的诱导表达以及蛋白酶活鉴定

为了验证所选择 MDH 能否行使相应催化功能，通过在 *E. coli* BL21 中构建 pET28a 表达系统，通过 IPTG 诱导重组菌株表达 MDH 蛋白，并通过 NAD-苹果酸脱氢酶检测试剂盒进行体外无细胞催化，验证蛋白酶活力大小，具体的步骤如 2.2.5 与 2.2.6 所述。

通过 pET28a 系统所表达 MDH 的蛋白大小应在 40 kDa 左右。如图 2.3 所示，分别在 BL21/pET28a-mdh1 与 BL21/pET28a-mdh2 对应细胞破碎上清样品中（3 与 5 号泳道）检测出相应的条带，说明 MDH1 与 MDH2 在 *E. coli* 中成功诱导表达，并以游离蛋白的形式存在，没有形成包涵体。但 MDH3 并没有在细胞破碎上清以及沉淀出现相应的条带。

用检测试剂盒鉴定诱导蛋白的酶活，如图 2.4 所示。来自 *C. glutamicum* B253 以及 *C. glutamicum* S9114 的 MDH 与对照相比出现明显的 340 nm 处吸光值的变化，说明具有催化草酰乙酸生成苹果酸的活性。通过酶活计算公式，计算出 MDH1 与 MDH2 的蛋白酶活分别为 67 U/mg 和 48 U/mg。对照也有相应的吸光度变化，经过计算为 10 U/mg，推测原因为 NADH 在反应过程中自然降解，也可能是由于 *E. coli* 中本身具有苹果酸脱氢酶导致吸光度变化，后续可将携带 6×His 标签的诱导蛋白纯化后，再次测定蛋白酶活。由于 MDH3 没有成功诱导表达，因此 MDH3 并没有展现出相应的催化活性（6.79 U/mg）。

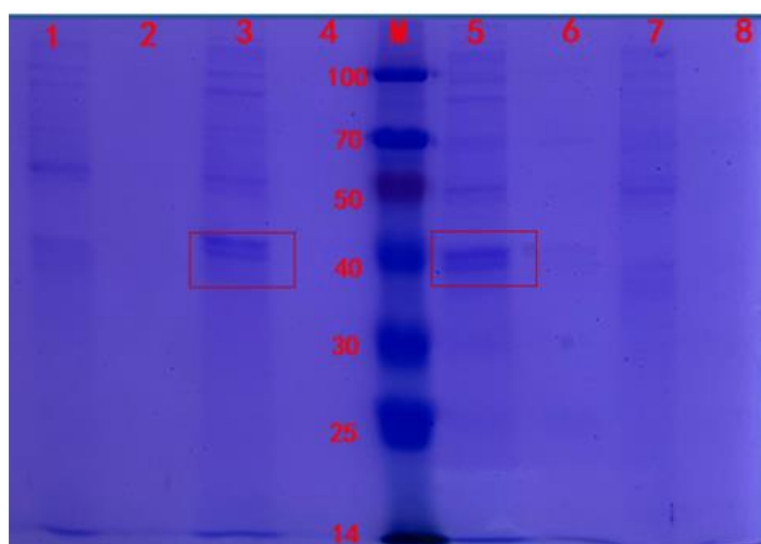


图 2.3 MDH 诱导表达 SDS-PAGE 电泳图

（其中：1, 2: BL21/pET28a-mdh3 破碎上清与破碎沉淀；3, 4: BL21/pET28a-mdh2 破碎上清与破碎沉淀；5, 6: BL21/pET28a-mdh1 破碎上清与破碎沉淀；7, 8: BL21/pET28a(对照)破碎上清与破碎沉淀。）

Figure 2.3 SDS-PAGE electropherogram of MDH induced expression

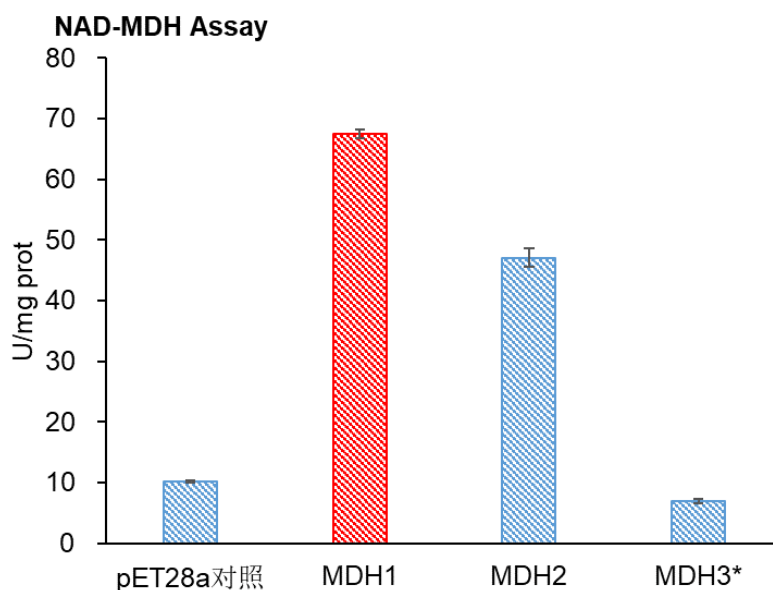


图 2.4 MDH 酶活鉴定

Figure 2.4 MDH enzyme activity identification

2.3.2 草酰乙酸到苹果酸路径构建

P. acidilactici ZY271 全基因组序列已上传到 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库, GeneBank 登入号为 NZ_CP082111。通过数据库对 ZY271 菌株的 rTCA 生产琥珀酸路径相关基因进行检索, 发现缺少了 C3 到 C4 的酶基因以及 *mdh* 基因。本研究将 rTCA 琥珀酸生成路径构建分为两部分, 第一部分是琥珀酸生成路径构建, 涉及从草酰乙酸到琥珀酸路径上相应酶基因 (*mdh*); 第二部分是 C3 (丙酮酸、PEP) 到 C4 (草酰乙酸、苹果酸) 酶基因异源表达。

以 2.3.1 蛋白酶活检测的结果为依据, 将 *mdh1* 基因整合到 *P. acidilactici* ZY271 的 *ackA_RS01275* (*ackA3*) 位点, 质粒构建方法如 2.2.3 所述, 按照 2.2.7 的方式进行同源重组。

单交换的目的是将质粒整合到基因组相应位点, 存在两种交换方式 (即基因上游同源臂交换或下游同源臂交换)。通过表 2.1 中的引物 (*g-ackA-up-F* & *p-ackA-up-R*、*p-ackA-up-F* & *g-ackA-up-R*) 进行验证。一般来说, 上下游引物分别在基因组和质粒上各设计一个 (共两对验证引物), 因此通过菌落 PCR 样品是否有电泳条带, 可以直观的反映出单交换的结果。如图 2.5 中所示, 3、5 以及 7 号孔道出现相应条带, 说明发生单交换过程将质粒整合到基因组上, 其具体大小与交换顺序以及验证引物位置有关。

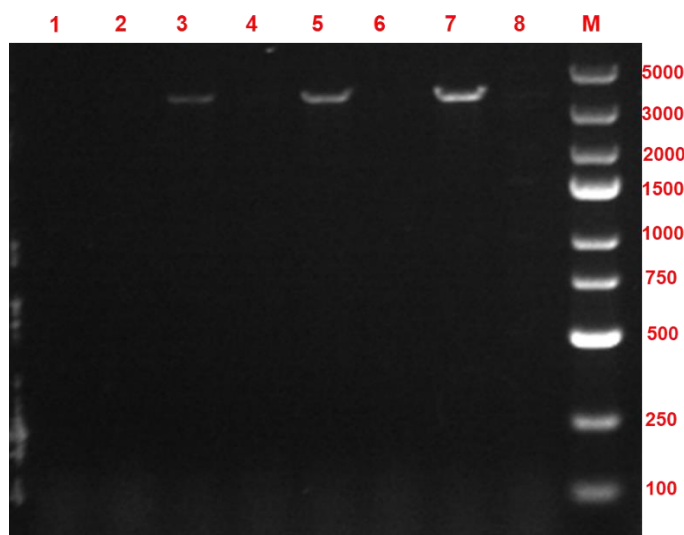


图 2.5 敲除质粒整合到基因组上完成单交换的验证

Figure 2.5 Integration of the knockout plasmid into the genome to complete single exchange validation

双交换验证引物是在 *P. acidilactici* ZY271 基因组上设计的，*secYZ-ackA-F* 位于基因组 *up-ackA3* 上游处，*secYZ-ackA-R* 位于基因组 *down-ackA* 下游处。发生同源双交换后基因长度为 3746 bp，而回复突变基因大小应为 2550 bp，因此通过电泳条带位置可以进行区分。如图 2.6 所示，大部分条带位于 2000-3000 bp 之间，发生回复突变，而 11 和 15 号样品条带位于 3000-5000 bp 之间，可能是发生双交换的目的菌株。将阳性菌落进行保种后，通过进一步的测序验证，测序结果显示，实现 *ackA3* 基因敲除并整合 *PldhD_mdh1* 表达框，构建 *P. acidilactici* ZY271- Δ *ackA3*::*PldhD_mdh1* 重组菌株，将其命名为 M1。

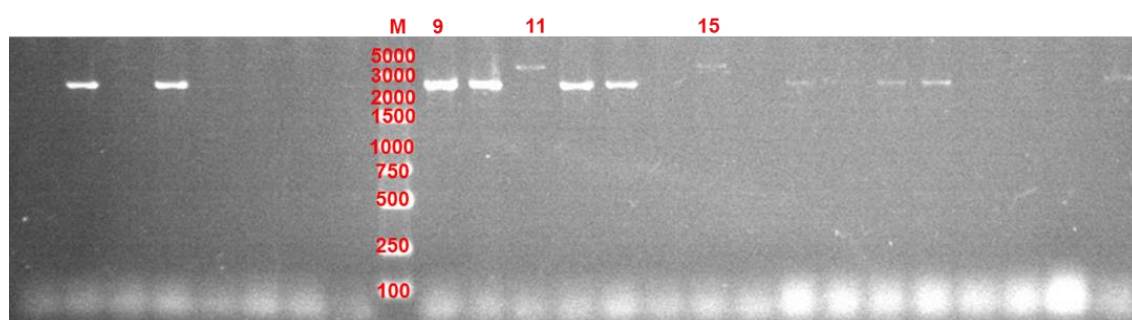
图 2.6 *PldhD_mdh1* 表达框整合到 *ackA3* 位点完成双交换的验证

Figure 2.6 Double exchange validation of *PldhD_mdh1* expression frame integration into the *ackA3* locus

2.3.3 C3 到 C4 路径的构建

催化 C3 到 C4 的酶如 1.1.5 所述，而在 *C. glutamicum* 和 *L. plantarum* 中主要依靠丙酮酸羧化酶 PYC 和 PEP 羧化激酶 PCK 来实现的。按照 2.2.3 的方法构建六种携带催化 C3 到 C4 基因的表达质粒，如图 2.7 所示。

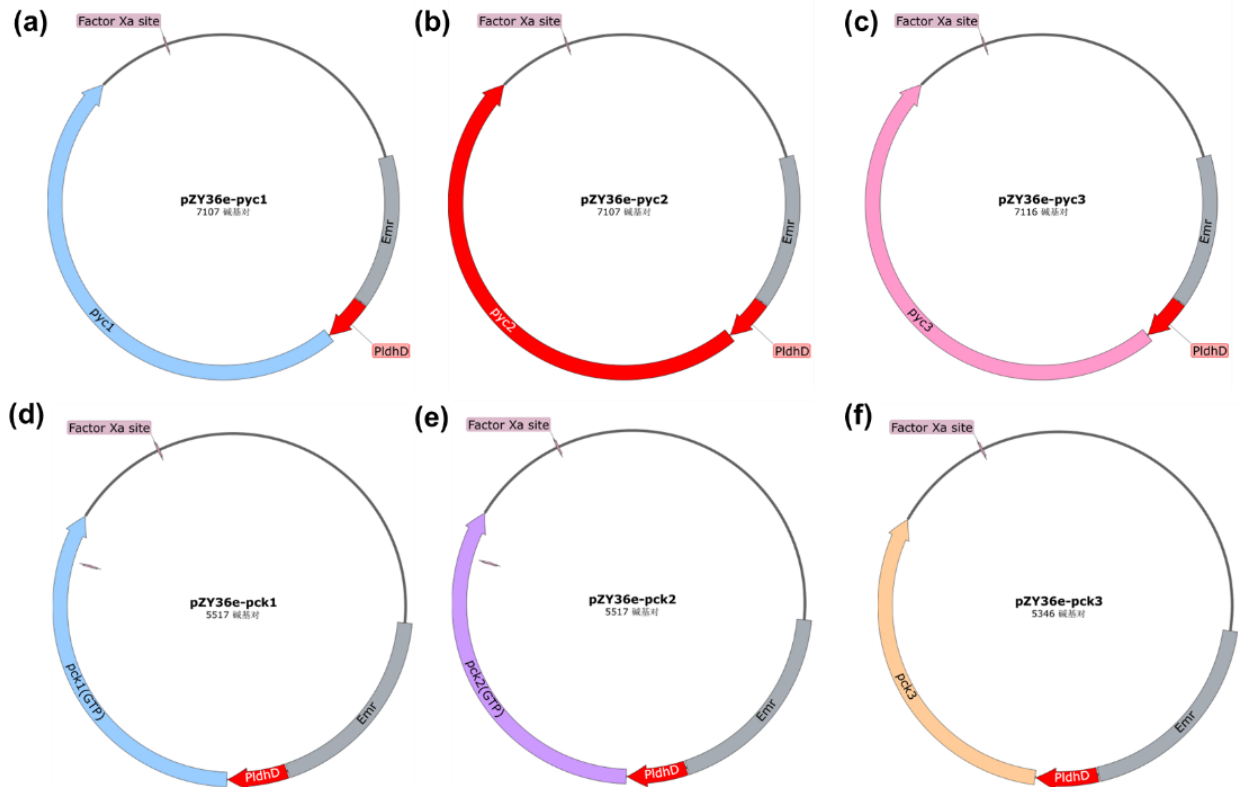
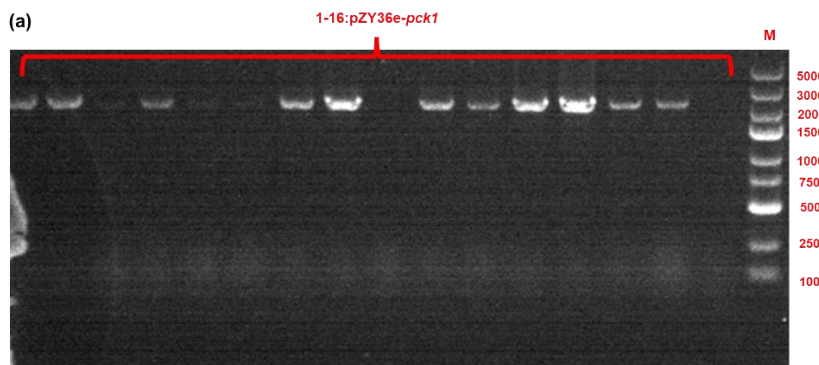


图 2.7 携带不同 C3 到 C4 基因的表达质粒图谱

(a) pZY36e-pyc1; (b) pZY36e-pyc2; (c) pZY36e-pyc3; (d) pZY36e-pck1; (e) pZY36e-pck2; (f) pZY36e-pck3。其中：1 来自 *C. glutamicum* B253，2 来自 *C. glutamicum* S9114，3 来自 *L. plantarum* ATCC8014。

Figure 2.7 Mapping of expression plasmids carrying different C3 to C4 genes

PCK 催化过程中会生成 ATP，有利于菌体的生长。首先将 pZY36e-pck1 导入到 M1 中，重组质粒验证大小为 2441 bp，同时验证 PldhD_mdh1 是否依然位于基因组上，PldhD_mdh1 表达框大小应为 1323 bp。如图 2.8 所示，质粒验证的条带位于 2000-3000 bp 之间，而基因验证条带在 1000-1500 bp 之间，通过进一步测序，证实了 pZY36e-pck1 导入到 M1 中，构建重组菌 *P. acidilactici* ZY271::mdh1-pZY36e-pck1，将其命名为 M2。



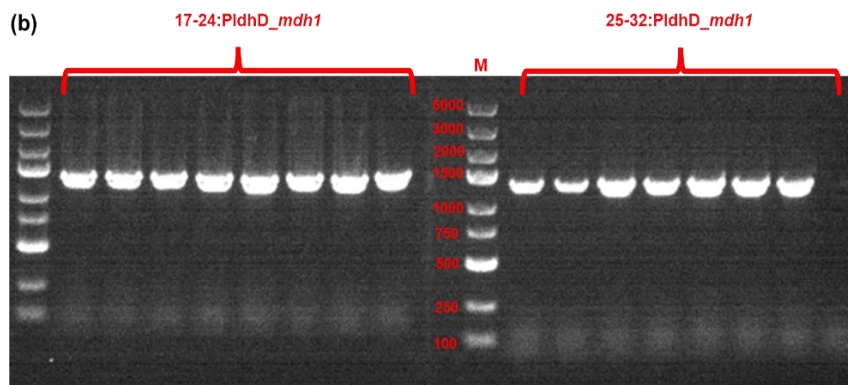


图 2.8 表达质粒 pZY36e-pck1 导入 M1 中菌落 PCR 验证

(a) 质粒验证; (b) PldhD_mdh1 基因验证

Figure 2.8 PCR validation of colonies expressing plasmid pZY36e-pck1 imported into M1

2.3.4 琥珀酸发酵验证

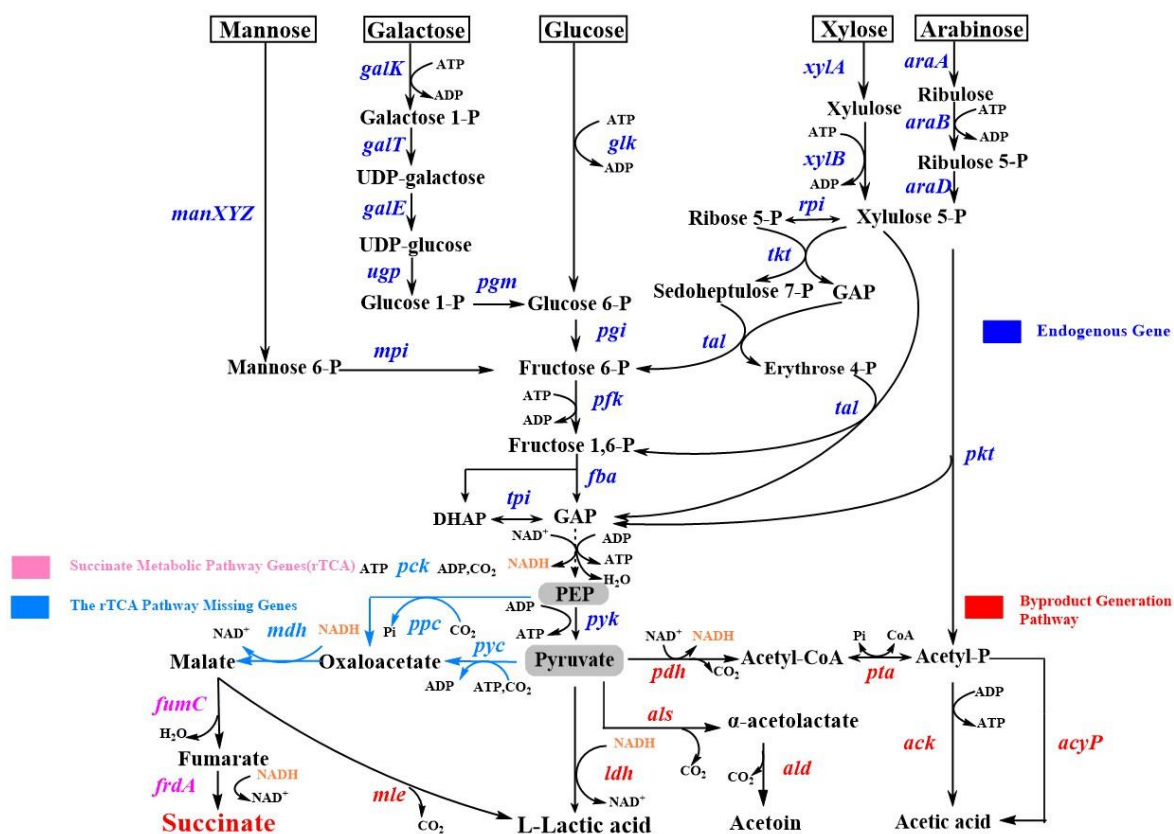


图 2.9 P. acidilactici ZY271 琥珀酸合成路径构建

Figure 2.9 P. acidilactici ZY271 succinic acid synthesis pathway construction

将 *mdh* 基因整合到 *ackA3* 位点，并以表达质粒的形式将 *pck* 导入重组菌中，在菌株 ZY271 构建 rTCA 生产琥珀酸路径，如图 2.9 所示。

首先以 M1 (*P. acidilactici* ZY271::*mdh1*) 作为发酵菌株，在含有 80 g/L 葡萄糖合成培养基中添加 2 g/L 草酰乙酸，进行添加前体的琥珀酸发酵实验，以 *P. acidilactici* ZY271 作为对照，共发酵 72 h，每 24 h 取样。

如图 2.10 所示, 发酵前期并没有检测到草酰乙酸, 这是由于较高浓度的葡萄糖遮盖草酰乙酸的出峰。当葡萄糖消耗完全后, 实验组和对照组均没有检测到草酰乙酸存在, 这说明草酰乙酸被发酵菌种所利用, 然而在发酵过程中没有检测到苹果酸和以及目的产物琥珀酸的生成。结果显示, 改造菌株 M1 相较于对照菌株, 葡萄糖的消耗速率以及 L-乳酸生产速率出现一定的降低, 可能由于代谢改造导致菌株的稳定性变差。M1 菌株在添加 2 g/L OAA 培养基中产生 73.7 g/L 的乳酸, 在仅含有葡萄糖的培养基中 72 h 内产生 71.5 g/L 的乳酸。

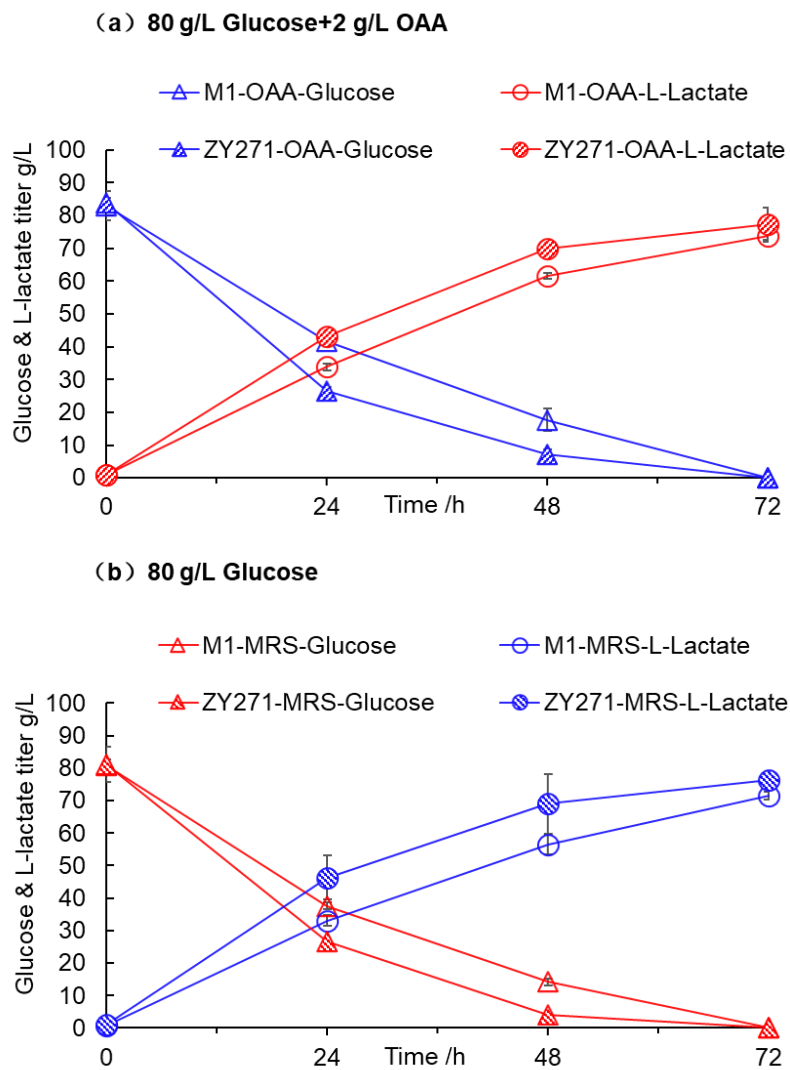


图 2.10 *P. acidilactici* ZY271 与 M1 菌株在含有 80 g/L 葡萄糖合成培养基中添加前体发酵验证

(a) 添加 2 g/L OAA; (b) 未添加前体

Figure 2.10 Validation of *P. acidilactici* ZY271 versus M1 strain fermented with the addition of precursors in synthetic medium containing 80 g/L glucose

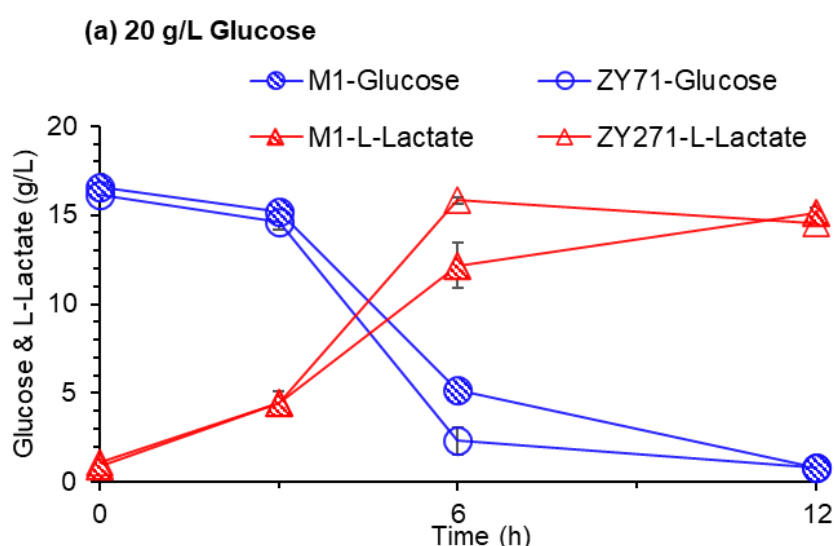
发酵条件: 80 g/L 葡萄糖, 2 g/L 草酰乙酸, 0.6 g/g (葡萄糖) 碳酸钙用于调节 pH, 共发酵 72 h, 每 24 h 取一次样, 共进行三组平行实验。

考虑到较高浓度的葡萄糖会影响前体物质的检测，而且会生成过多的乳酸。我们降低发酵葡萄糖的浓度，提高前体草酰乙酸添加量，同时添加苹果酸进行发酵验证。进行三组实验，第一组 20 g/L 葡萄糖的合成培养基中不添加前体；第二组添加 5 g/L 草酰乙酸 (OAA)；第三组添加 5 g/L 苹果酸 (MAL)。以 *P. acidilactici* ZY271 作为对照，进行发酵验证，每 3 h 取样，共发酵 12 h。

与在含有 80 g/L 葡萄糖合成培养基发酵结果相似，相较于对照菌种 ZY271，经过代谢改造菌株 M1 耗糖与产酸速率有明显的下降，最终 M1 菌株产生 15.2 g/L 的乳酸，生产速率为 1.2 g/L/h，得率为 0.9 g/g 葡萄糖 (图 2.11 (a))。

通过图 2.11 (b) 分析可知，由于草酰乙酸出峰时间与葡萄糖相近，导致添加 5 g/L 草酰乙酸实验组的葡萄糖的计算浓度高于其他组的浓度。草酰乙酸在发酵过程中被消耗，但没有检测出苹果酸或琥珀酸产生。添加 5 g/L 的草酰乙酸对菌株乳酸生产没有影响，M1 在 12 h 内产生 14.6 g/L 的 L-乳酸，生产速率为 1.2 g/L/h。由于草酰乙酸与葡萄糖合峰，使得乳酸得率偏低。

在含有 5 g/L MAL 的合成培养基中进行发酵。如图 2.11 (c) 所示，苹果酸的添加会加快 ZY271 与 M1 菌株产酸速率，前 6 h 内，添加 MAL 实验组的菌株的乳酸生产速率分别达到 2.7 g/L/h (M1) 和 3.0 g/L/h (ZY271)，比未添加 MAL 组的乳酸生产速率提高了 30%左右。最终，ZY271 产生 17.2 g/L 乳酸，M1 产生 17.0 g/L 乳酸，均高于其他条件下的乳酸产量。得率分别为 1.03 g/g 葡萄糖与 1.12 g/g 葡萄糖，高于乳酸的理论得率 (1 g/g 葡萄糖)。苹果酸在前 6 h 被消耗完全，但没有琥珀酸的生成，可能存在其他路径消耗苹果酸，并转化为乳酸。



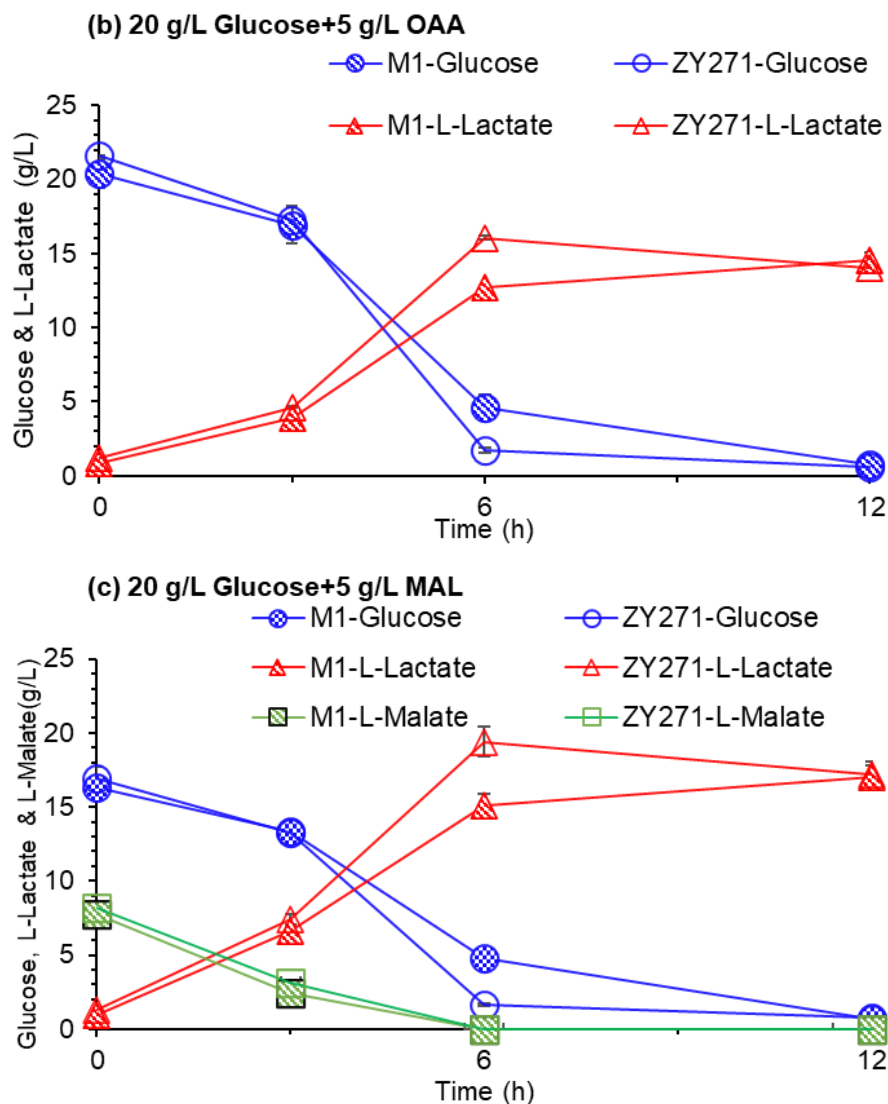


图 2.11 *P. acidilactici* ZY271 与 M1 在含有 20 g/L 葡萄糖合成培养基中添加前体发酵验证

(a) 未添加前体 (b) 添加 5 g/L OAA (c) 添加 5 g/L MAL

Figure 2.11 *P. acidilactici* ZY271 and M1 were verified by the addition of precursors in a synthesis medium containing 20 g/L glucose

发酵条件: 20 g/L 葡萄糖, 5 g/L 草酰乙酸, 5 g/L 苹果酸, 0.6 g/g (葡萄糖) 碳酸钙用于调节 pH, 共发酵 12 h, 每 3 h 取一次样, 共进行三组平行实验。

前体物质草酰乙酸与苹果酸在发酵过程中被消耗, 但是并没有检测到苹果酸与琥珀酸生成。为了验证是否由于较高浓度的乳酸影响琥珀酸的检测, 将发酵样品中添加一定质量的琥珀酸, 通过添加量与计算量是否有差异进行判断。

将样品 12 h-MAL-M1-2 稀释 5 倍, 1 mL 稀释样品添加 1.7 mg 的琥珀酸 (纯度 99%), 观察葡萄糖以及乳酸浓度的变化。如图 2.12 所示, 琥珀酸的添加量为 1.683 g/L, 与通过 HPLC 获得数据一致。同时添加琥珀酸前后, 对于葡萄糖和 L-乳酸的浓度无影响, 这说明发酵过程中并没有琥珀酸生成。

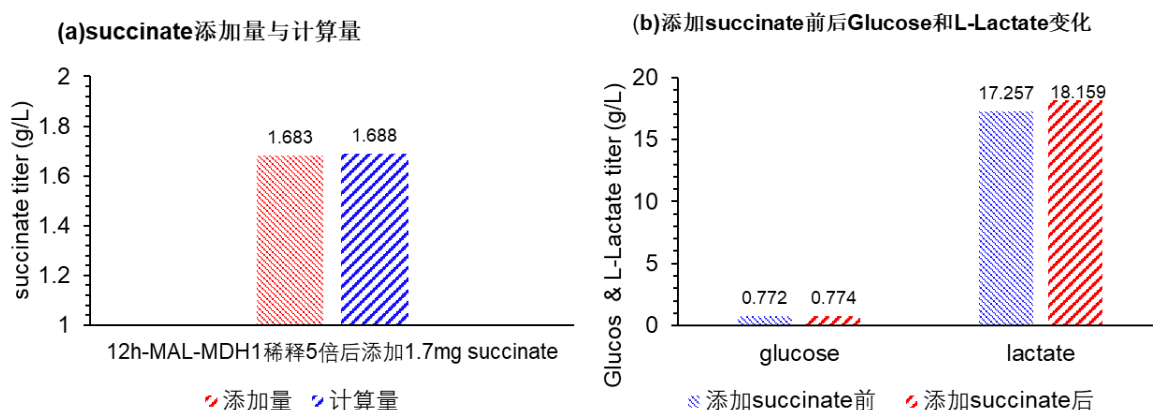


图 2.12 添加 Succinate 后样品各组分浓度变化

(a) Succinate 添加计算量与实际量 (b) 添加 Succinate 前后葡萄糖和 L-乳酸变化

Figure 2.12 Changes in concentration of components after succinic acid addition

将 *mdh1* 整合到乙酸激酶 *ackA3* 位点, 构建 M1 菌株, 添加前体进行发酵验证, 并没有生成苹果酸或是琥珀酸。将 *pck1* 以表达质粒形式导入 M1 中构建重组菌 M2 (*P. acidilactici* ZY271::*mdh1*-pZY36e-*pck1*), 对重组菌 M2 进行发酵验证。

在含有 20 g/L 葡萄糖的合成培养基中进行发酵验证, 共发酵 12 h, 每 3 h 取样。如图 2.13 所示, M1 与 M2 发酵过程中, 葡萄糖的消耗与乳酸生成并没有明显的差异, 葡萄糖 12 h 可消耗完全。重组菌 M2 在过程中没有检测到苹果酸或琥珀酸的生成, 可能由于乳酸生成路径过强, 导致碳通量难以流向琥珀酸生产路径。

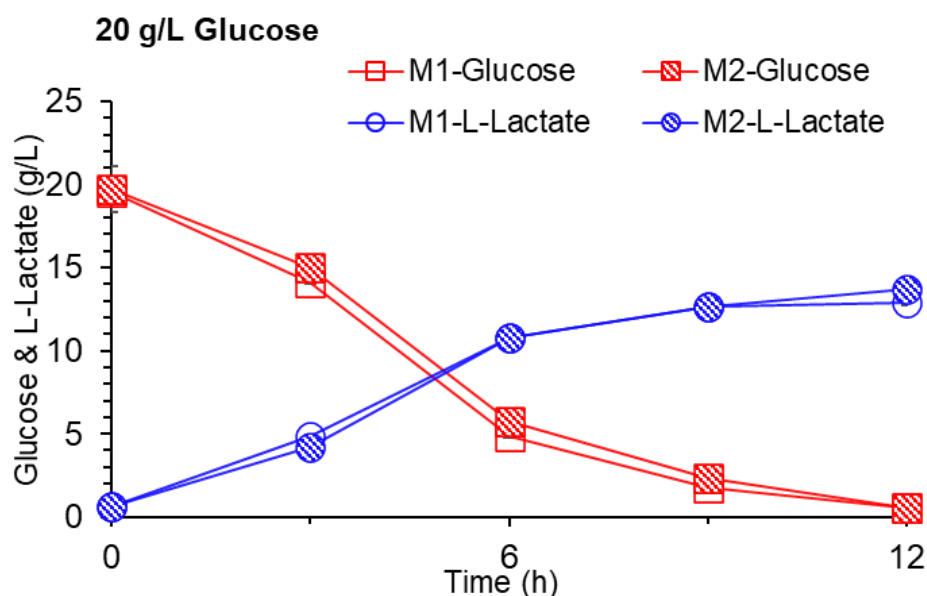


图 2.13 M1 与 M2 在 20 g/L 葡萄糖合成培养基中发酵验证

Figure 2.13 Validation of M1 and M2 fermentation in 20 g/L glucose synthesis medium

发酵条件: 20 g/L 葡萄糖, 0.6 g/g (葡萄糖) 碳酸钙用于调节 pH, 共发酵 12 h, 每 3 h 取一次样, 共进行三组平行实验。

所构建的路径并没有产生琥珀酸，M1 重组菌在添加草酰乙酸时没有苹果酸的生成，极大可能与乳酸路径过强导致 NADH 缺乏有关。在添加苹果酸进行发酵时会加快乳酸的生成速率，最终提高乳酸的产量。在 NCBI 基因组数据库进行检索，找到了名为 malolactic enzyme (JJE68_RS07520) 基因，通过 SMART 进行蛋白结构域进行预测，如图 2.14 所示，是一种依赖 NAD⁺ 的蛋白酶。苹果酸乳酸酶 (MLE EC 4.1.1.101) 可以催化苹果酸生成乳酸，常用于葡萄酒发酵过程中改善其风味。因此，添加的苹果酸通过苹果酸转运蛋白 (malate permease JJE68_RS01400) 进入胞内，再通过 MLE 催化生成乳酸，这就极大影响了琥珀酸发酵，需要进一步将 MLE 进行敲除。

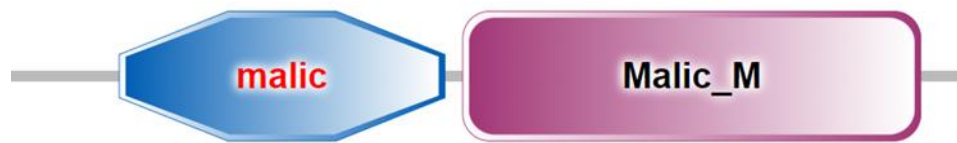


图 2.14 苹果酸酶蛋白结构域简图

Figure 2.14 Sketch of the structural domain of the malic enzyme protein

目前已完成 pSET4e- $\Delta mleS$ 敲除质粒的构建工作，后续按照 2.2.7 的方法，实现 *mleS* 的敲除，并再次添加前体进行发酵验证。同时将携带 *pck* 与 *pyc* 的表达质粒导入重组菌中，C3 到 C4 酶的协同表达与 L-乳酸生产路径竞争碳通量，可能更有利于琥珀酸的生产。最终将催化 C3 到 C4 过程的基因整合到 ZY271 基因组上，实现稳定遗传，已完成 pSET4e- $\Delta mleS$::PldhD_ *pck1* 和 pSET4e- $\Delta mleS$::PldhD_ *pck3* 质粒构建工作 (图 2.15)。

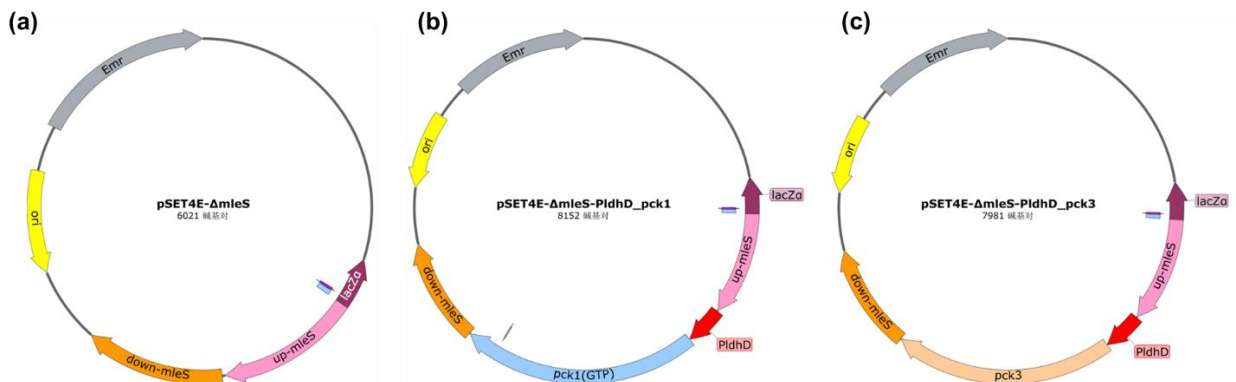


图 2.15 针对 *mleS* 基因构建的敲除质粒图谱

(a) pSET4E- $\Delta mleS$; (b) pSET4e- $\Delta mleS$::PldhD_ *pck1*; (c) pSET4e- $\Delta mleS$::PldhD_ *pck3*。

Figure 2.15 Mapping of knockout plasmids constructed against the *mleS* gene

对于本研究的出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 来说，L-乳酸的代谢路径是琥珀酸合成的主要竞争路径。在前期研究中，我们设法首先将乳酸脱氢酶进行敲除，构建一株可在木质纤维素体系下生产其他高价值产品的底盘细胞，但在改造过程中发现敲除 *ldh* 极为困难，这是由于敲除 *ldh* 基因可能会影响胞内氧化还原平衡以及碳代谢。在 2.3.2 中，我们将来自 *C. glutamicum* B253 的 *mdh1* 整合到 *ackA*_RS01275 位点，在催化草酰乙酸

生成苹果酸时，会消耗 1 mol NADH，可以消除 *ldh* 敲除后 NAD^+ 不足以及 NADH 过剩带来的影响，后续敲除 *ldh* 基因可能会更容易。目前已完成 pSET4e- Δ *ldh* 敲除质粒构建工作。

PCK 主要是通过结合 HCO_3^- 实现 C3 (PEP) 到 C4 (草酰乙酸) 过程，在 *P. acidilactici* 发酵过程中会添加 CaCO_3 ，一方面是为了维持 pH，另一方面也可以提供 CO_2 或者 HCO_3^- ，然而可能提供量较为有限，于是直接提供 HCO_3^- 进行发酵验证。在 10 g/L 葡萄糖的合成培养基中添加 15 g/L 的 NaHCO_3 ，以 M2 作为出发菌株，每 2 h 取样，共发酵 6 h，对照组未添加 NaHCO_3 。

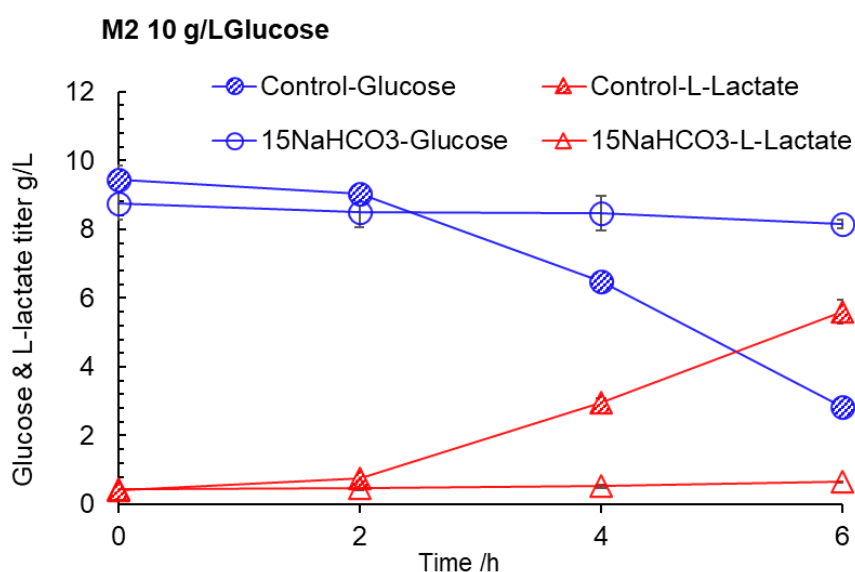


图 2.16 重组菌 M2 在含有 10 g/L 葡萄糖合成培养基中添加 15 g/L NaHCO_3 进行发酵验证

Figure 2.16 Validation of fermentation of recombinant bacterium M2 in a medium containing 10 g/L glucose synthesis medium supplemented with 15 g/L NaHCO_3

发酵条件：10 g/L 葡萄糖，15 g/L NaHCO_3 ，共发酵 6 h，每 2 h 取一次样，共进行三组平行实验。

结果如图 2.16 所示，提供过量的 NaHCO_3 并没有实现琥珀酸的生产，反而由于添加 15 g/L 导致发酵培养基 pH 到 7.2，严重影响了菌体的正常生长，6 h 内几乎不消耗葡萄糖。因此想要直接通过过量 NaHCO_3 来满足 PCK 的需求，对于 *P. acidilactici* 来说是困难的。如何提高胞内 HCO_3^- 的水平也是后续需要注意的问题，可以考虑将自由扩散进胞内的 CO_2 转化成 HCO_3^- ，碳酸酐酶可以加快两者之间的转化速率，可能对琥珀酸生产具有积极作用。

2.4 本章小结

本章主要在菌株 *P. acidilactici* ZY271 异源引入 rTCA 生产路径相关基因，构建琥珀酸生产路径，但是在发酵验证过程中并没有检测到琥珀酸的生成。本章的主要结论如下：

(1) 将不同来源的 *mdh* 进行诱导表达, 发现来自两株 *C. glutamicum* 的基因成功诱导表达; 检测相应的蛋白酶活, 其中来自 *C. glutamicum* B253 的 MDH1 蛋白酶活最高 (67 U/mg)。

(2) 将 *PldhD_mdh1* 表达框并整合到 *ackA_RS01275* 位点上, 构建重组菌株 M1 (*P. acidilactici* ZY271::*mdh1*), 以表达质粒的形式将来自 *C. glutamicum* B253 的 *pck1* 基因导入 M1 中, 获得重组菌 M2 (*P. acidilactici* ZY271::*mdh1*-pZY36e-*pck1*), 在 ZY271 中构建从 PEP 为起点生产琥珀酸的路径。

(3) M1 菌株添加前体进行发酵, 并没有检测出琥珀酸的产生。由于 MLE 的存在, 在添加苹果酸进行发酵过程中, 发现乳酸的产率相较于未添加苹果酸组的产率提高 30%, 而且乳酸得率大于理论得率。由于乳酸生产路径竞争 NADH, 导致 M2 菌株在发酵过程中并未检测到苹果酸的生成。后续需进一步敲除 *mleS* 以及 *ldh* 基因, 强化琥珀酸生产路径相关基因, 同时在改造过程中应注意胞内的氧化还原平衡以及 HCO_3^- 的水平。

第3章 适应性进化策略提高乳酸片球菌在低 pH 胁迫下抗逆性

3.1 引言

琥珀酸和乳酸等弱有机酸在低 pH 条件下发酵更具有经济效益^[51]，这是由于菌株在发酵过程中需要大量中和剂以维持环境 pH，后期需要将有机酸置换出来，增加了后期分离纯化成本，在低 pH 条件下发酵可以减少中和剂的使用。然而在低 pH 条件下，发酵菌种会受到极端酸性环境的胁迫作用，抑制菌株的生长与发酵过程。因此提高菌株在低 pH 值条件下的抗逆性，对于生产琥珀酸或者其他酸类产品的细胞工厂具有重要意义。

本研究的出发菌株 *P. acidilactici* ZB220 是在 ZY271 基础上经由全糖代谢进化而来，具有良好的糖代谢能力。前期在 30% 实际物料 SSCF 过程中，发现当发酵 pH 维持在 4.8 时，相较于最适 pH 出现明显的发酵水平下降的现象。当发酵 pH 降低到 4.6 时，耗糖与产酸能力下降更为明显。当 pH 继续降低到 4.4 及以下时，乳酸发酵难以进行，菌体受到极大的胁迫作用。

本章主要解决实际物料发酵过程中低 pH 胁迫对菌株性能的影响，通过适应性进化的策略，以期提高 *P. acidilactici* 在低 pH 条件下的抗逆性。通过在摇瓶中模拟实际物料糖浓度进行传代进化，根据发酵情况改变进化策略。在适应性进化过程中，发现交替进化策略提升菌株在低 pH 耐受性方面发挥着极为重要作用，最终获得一株发酵性能稳定的适应性进化菌株 ALE1。最后在 30% 固含量实际物料体系不同 pH 条件下进行发酵验证实验，结果表明，相较于出发菌株，ALE1 在低 pH 条件下发酵性能有所提升。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株、培养基和培养条件

本章所用出发菌种 *P. acidilactici* ZB220 是在 *P. acidilactici* ZY271 基础上通过全糖代谢（包括木质纤维素来源全部单糖）适应性进化而来，保存在 CGMCC 中，编号为 M2023151。宛式拟青霉 *Peacilomyces variotii* FN89 是本实验室从木质纤维素物料中分离得到的生物脱毒真菌，用于木质纤维素水解液脱毒过程，保存于 CGMCC 中，注册编号为 17665。*P. variotii* FN89 对木质纤维素来源的抑制物具有良好的耐受性，并且可以优先利用抑制物（有机酸、呋喃醛）进行生长^[112]。

P. acidilactici ZB220 使用 MRS 培养基进行种子液的制备，培养基配方以及培养条件详情见 2.2.2。

P. variotii FN89 生物脱毒菌培养方式如下：

(1) 固体培养：用 PDA 平板进行培养。PDA 平板配方为：称取 200 g 削皮切块的土豆，放置于 1 L dd H₂O 中，加热煮沸 50-60 min。待稍微冷却后用四层滤布过滤获得土豆提取液，加入 10 g 葡萄糖以及 10 g 琼脂，115°C，20 min 进行灭菌。待培养基稍冷却后倒在空培养皿中，平板凝固后放于 4°C 冰箱保存备用。用接种环蘸取 *P. variotii* 孢

子并在 PDA 平板上进行划线, 37°C 培养 3-5 d, 获得带有 *P. variotii* 孢子的平板, 放于 4°C 冰箱保存。

(2) 液体培养: 使用 SM 培养基进行培养。SM 液体培养基成分: 磷酸二氢钾 2 g/L、硫酸铵 1 g/L、七水合硫酸镁 1 g/L、酵母粉 (YE) 1 g/L、氯化钙 0.5 g/L 以及葡萄糖 40 g/L。

在含有 *P. variotii* 孢子的固体平板中接入 10 mL 的 SM 液体培养基, 用涂布棒将孢子尽可能刮取, 随后转接到 100 mL SM 培养基中, 在 37°C 摇床中, 转速为 750 rpm, 培养 24 h 获得脱毒菌液, 转接到含有 1 L 实际物料的中用于生物脱毒。

3.2.2 适应性进化

适应性进化是在 100 mL 摇瓶中不断传代进行的, 培养温度 42°C, 转速 150 rpm, 每 8 h 用 5 M NaOH 调节到指定 pH 值, 每 24 h 传代一次 (接种量为 10% v/v)。包括混合糖进化和单一木糖进行的进化实验, 模拟 30% 固含量小麦秸秆中含有的单糖及其浓度。

适应性进化所用培养基包括营养盐和糖母液两部分。营养盐配方为: 12.5 g/L 酵母粉 (YE)、12.5 g/L 蛋白胨、6.25 g/L 醋酸钠 (无水乙酸钠)、2.5 g/L 柠檬酸氢二铵、2.5 g/L 磷酸氢二钾、0.625 g/L 七水合硫酸镁以及 0.31 g/L 一水合硫酸锰, 超声溶解后用 L-乳酸调节至所需 pH。混合糖母液浓度为 350 g/L 葡萄糖、250 g/L 木糖、40 g/L 阿拉伯糖、10 g/L 甘露糖以及 10 g/L 半乳糖。木糖母液浓度为 250 g/L 木糖。在 100 mL 摇瓶中先后加入 16 mL 营养盐和 4 mL 糖母液 (体积比 4:1), 摇匀后加入 2 mL 菌液 (10% v/v 接种量)。

混糖条件下低 pH 适应性进化过程共分为三个阶段:

第 I 阶段: 营养盐初始 pH 用 L-乳酸调节到 4.8 (初始 pH 大约 6.4), 每 8 h 用 5 M 的 NaOH 调节 pH 到 4.8, 每 24 h 转接一次, 共进行 46 次传代。

第 II 阶段: 营养盐用 L-乳酸将初始 pH 调节为 4.6, 每 8 h 用 5 M 的 NaOH 调节 pH 到 4.6, 每 24 h 转接一次, 共进行 47 次传代。

第 III 阶段: 进行交替进化实验, 未调节 pH 的初始培养基与 pH 4.6 的培养基隔天交替使用, 每 8 h 调节到相应的 pH (5.5 或 4.6), 每 24 h 转接一次, 共进行 68 次传代。

上述第 III 阶段发酵性能较为稳定后, 从中转接 2 mL (10% v/v) 至以木糖为唯一碳源的培养基中进行交替 pH (5.5 和 4.6) 进化实验, 以期提高菌株在低 pH 条件下木糖的消耗能力, 每 8 h 调节 pH 到指定值, 每 24 h 转接一次, 共进行 30 次传代。

3.2.3 适应性进化菌株在低 pH 条件下发酵评价

发酵评价是以经过预处理的小麦秸秆为原料, 通过同步糖化共发酵 (SSCF) 进行的, 预处理后的小麦秸秆原料是由上海凯赛生物科技有限公司 (Cathay Biotech Inc.) 提供, 根据 NREL 组分测定方法^[141], 测得其中纤维素含量为 34.65% (w/w), 半纤维素含量为 22.91% (w/w), 木质素含量为 21.36% (w/w), 其中各组分均按照干重计算。首先将预处理后的小麦秸秆与一定量的 CaCO₃ 进行充分混合, 将物料 pH 调节到 5.0-5.5

左右,可放于4°C冰箱保存。将物料和灭菌后超纯水以30%固含量体系加入到5 L糖化罐中,设置温度50°C(糖化酶的最适温度),搅拌转速设置为200 rpm,加入4 mg/g(粗蛋白/干物料DM)纤维素酶Cellic CTec3,预糖化12 h,其中纤维素酶Cellic CTec3购买于Novozymes(China)。

将糖化液倒入3 L发酵罐中,设置温度为37°C,搅拌转速设置为750 rpm。待发酵液温度降至37°C左右接入*P. variotii* FN89培养液,培养液制备方式见3.2.1,设置通气量2 L/min。脱毒大约1 d左右,当发酵液pH稳定并趋于下降时说明脱毒完成,关闭通气,将温度升至50°C,搅拌转速降至200 rpm。一段时间后将温度降至42°C,以10%(v/v)接种量接入*P. acidilactici*发酵种子液(100 mL),以25%(w/w)Ca(OH)₂作为中和剂用于控制pH稳定,以出发菌株作为对照。

3.2.4 发酵产物、细胞活力以及pH值的测定

从摇瓶或者发酵罐中取1 mL左右的发酵样品,12000 rpm离心5 min后,吸取上清于EP管中,可放于-20°C保存。样品中的葡萄糖、木糖、乳酸测定方法如2.2.9所述。

样品离心后得到的细胞沉淀,加入1 mL dd H₂O将沉淀悬浮,12000 rpm离心5 min,倒掉上清液达到清洗细胞的目的。用1 mL dd H₂O重新悬浮沉淀,将菌体原液稀释10倍后,通过分光光度计(Thermo Biomate 3S, Thermo Fisher Scientific)测定600 nm处的吸光度,通过OD₆₀₀来评价细胞生长情况。

pH测定是通过pH计(FiveEasy Plus FE28, Mettler toledo)进行测定,使用前应使用pH标定液进行两点校准。

活细胞生长量是通过稀释涂布后计算CFU来表征的,取1 mL发酵液(摇瓶或发酵罐),稀释10⁸倍后涂布于MRS平板上,在42°C培养箱中培养24-48 h长出清晰可见的单菌落,计算其CFU。

3.3 结果与讨论

3.3.1 出发菌种在不同pH条件下发酵能力考查

为了探究乳酸片球菌在实际物料中耐受pH的极限,以30%固含量小麦秸秆为原料在不同pH条件下进行SSCF,考虑到*P. acidilactici*生长最适pH(5.5)以及纤维素酶的最适酶解pH(4.7-5.3),将发酵pH设置为5.5、5.0、4.8、4.6、4.4以及4.0,考查出发菌种在不同pH条件下的发酵能力,指导下一步的适应性进化实验。

如图3.1所示,在pH 5.5以及5.0条件下,葡萄糖在48 h前就可以消耗完全,但菌株在pH 5.0条件下葡萄糖消耗速率低于pH 5.5时的消耗速率。木糖72 h内没有完全消耗,在pH 5.5与5.0条件下分别残留8.7 g/L和13.3 g/L。最终分别产生113 g/L和108 g/L的L-乳酸,这说明在pH 5.0环境中对菌株的胁迫作用较弱。

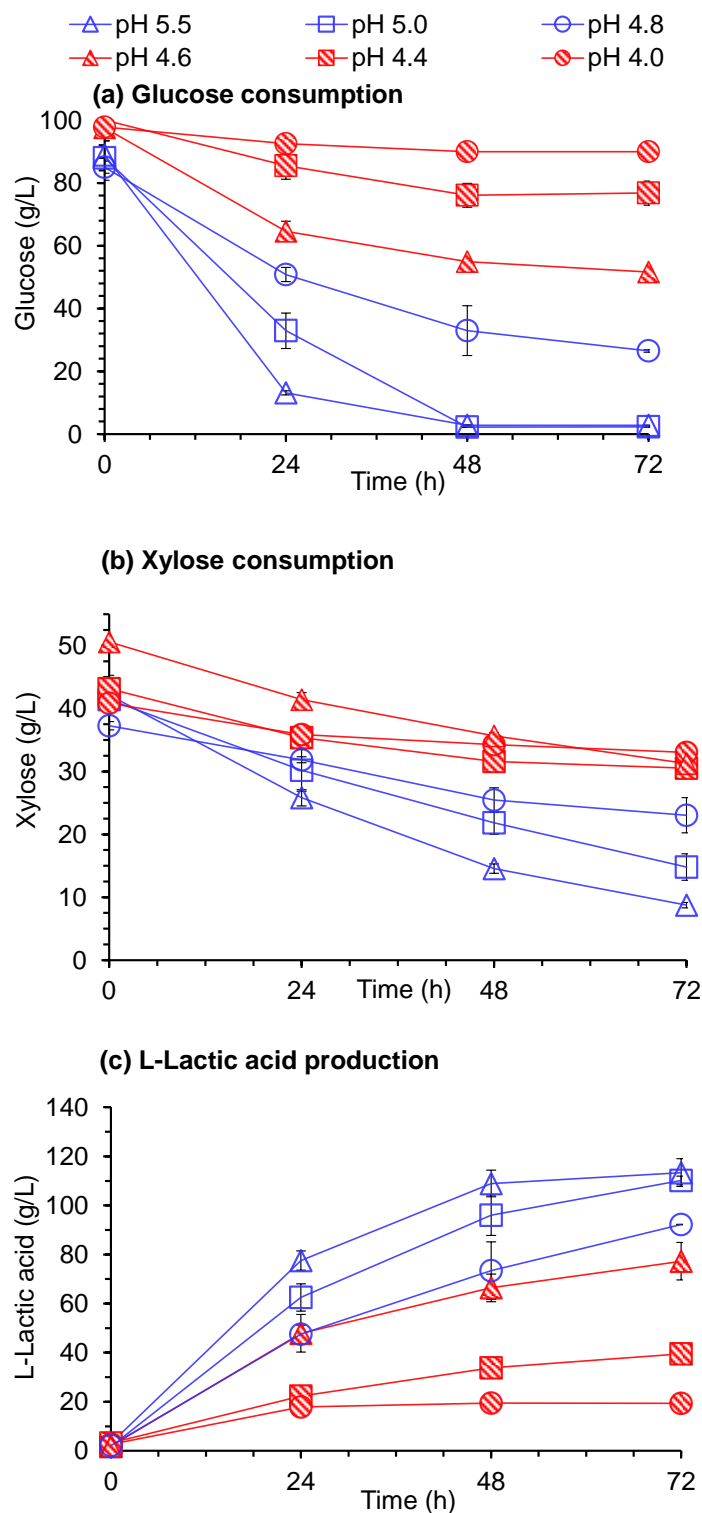


图 3.1 出发菌株在 30%固含量实际物料不同 pH 条件下的发酵性能

(a)葡萄糖消耗; (b)木糖消耗; (c)L-乳酸生产

Figure 3.1 Fermentation performance of the departure strain under different pH conditions of 30% solids real material

发酵条件: 发酵是在含有 1 L 30%固含量小麦秸秆水解液的 3 L 生物反应器中进行的, 以 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为中和剂调节 pH, 发酵 pH 控制在 5.5、5.0、4.8、4.6、4.4 以及 4.0 条件下。共发酵 72 h, 每 24 h 取样, 培养条件: 42°C, 200 rpm。

当发酵培养基 pH 降低到 4.8 时, *P. acidilactici* 发酵性能下降。葡萄糖在 72 h 内并没有完全消耗, 最终仅生成 74.5 g/L L-乳酸, 比在 pH 5.5 条件下产量降低了 52%。当发酵 pH 设置为 4.6 时, 菌株发酵能力进一步的下降。这说明在 pH 4.8 与 4.6 的条件下, 较低的 pH 对菌株产生较强的胁迫作用, 影响了菌株的发酵性能。

发酵 pH 降低到 4.4 时, 菌株受到严重的胁迫, 最终仅产生 39.6 g/L 乳酸。而 pH 在 4.0 时, 发酵菌株几乎不利用单糖发酵生产乳酸, 最终乳酸产量仅有 19.4 g/L。

通过在 30%固含量麦秆水解液中不同 pH 条件下的发酵实验可知, pH 4.8 与 4.6 是生物炼制菌株 *P. acidilactici* ZB220 发酵性能下降的临界 pH, 因此在进行摇瓶适应性进化时, 选择 pH 4.8 与 pH 4.6 作为进化的 pH 条件。

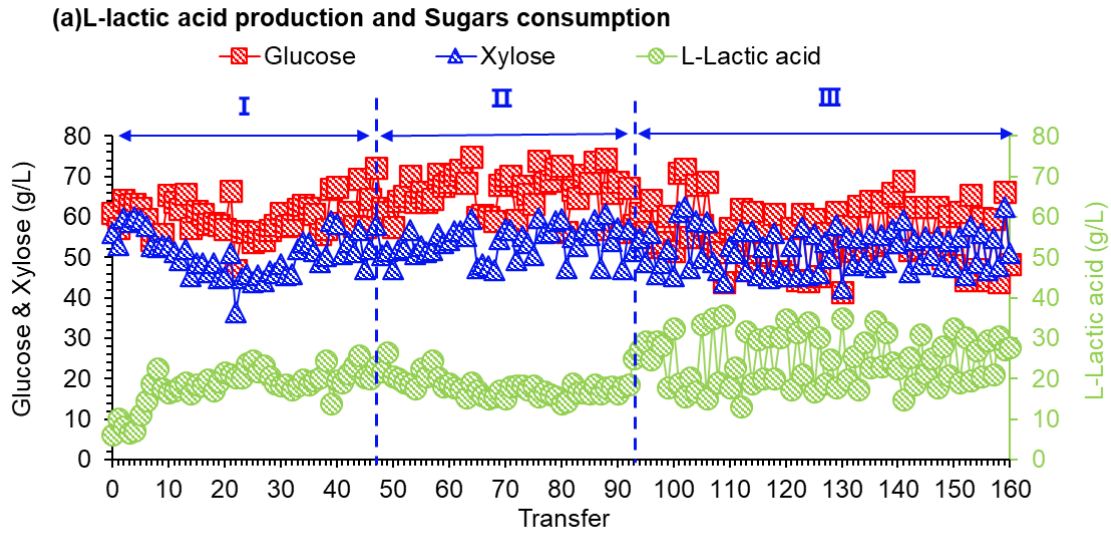
3.3.2 低 pH 条件下适应性进化

为了提高乳酸片球菌在高固含量发酵液低 pH 条件下的发酵性能, 进行长时间的适应性进化, 策略如 3.2.2 所述。如图 3.2 所示, 整个适应性进化分为三个阶段, 共计 160 天。

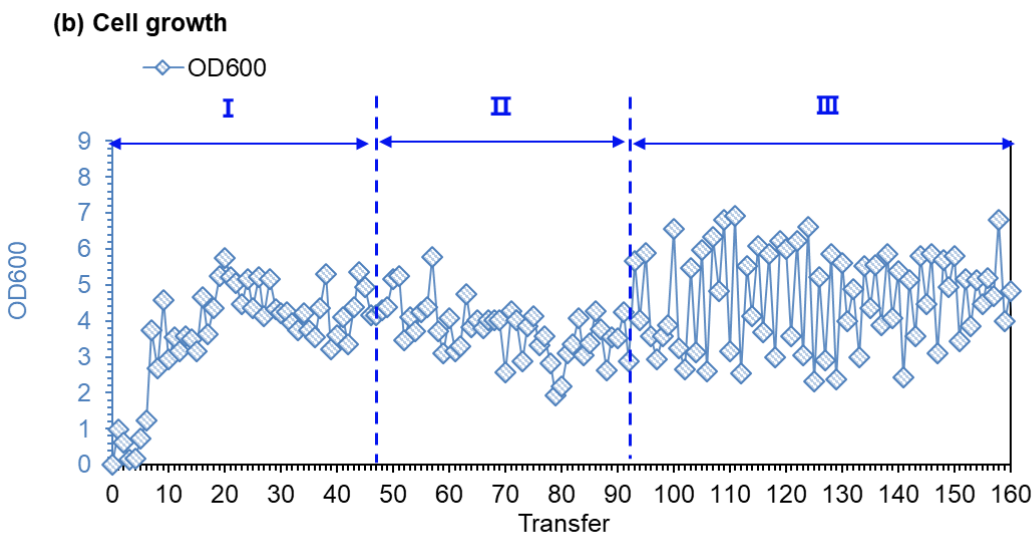
阶段I是在初始 pH 为 4.8 的合成培养基中进行的, 适应性进化初期较低的 pH 使得菌株耗糖、产酸以及生长受到严重抑制, 24 h 消耗少量葡萄糖, 而木糖几乎不利用, L-乳酸产量低 (排除用于调节培养基初始 pH 所添加的 L-乳酸)。从第 7 代开始, 菌体生长状况出现明显的改善, 耗糖与产酸能力相较于出发菌株出现一定的提升, 经过 46 次传代后微生物逐渐适应较低 pH 环境。

随后将 pH 降低到 4.6 进行阶段II的进化实验, 在该 pH 条件下, 30%实际物料 SSCF 中, 菌株发酵能力出现明显下降。在摇瓶适应性进化过程中发现, 随着转接到 pH 4.6 环境中, 葡萄糖消耗能力降低, L-乳酸产量与阶段I相比也出现一定的下降。一直到该阶段结束时, 并没有像I阶段 (第 7 代) 那样出现明显发酵能力和菌体生长提升的现象, 一直维持在较低水平。在持续 pH 为 4.6 的适应性进化过程中, 对进化菌株进行发酵评价, 以 30%固含量小麦秸秆为原料在 pH 4.6 条件下进行发酵。如图 3.3 所示, 进化菌株相较于出发菌株并没展现出相应耐受性, 反而发酵能力出现明显的下降, 最终产生 53.2 g/L 的乳酸, 与对照相比减少了 35%。于是经过 47 传代, 待菌株较为稳定后改变单一 pH 条件的进化策略。

交替进化策略可以使菌株在不断变化的环境条件下逐渐适应并生长, 从而可以高效地提高微生物在低 pH 条件以及其他极端环境下的抗逆性。前两个阶段适应性进化使得菌株逐渐适应较低的 pH 环境, 但发酵验证结果显示, 连续单一条件的进化效果并不理想, 随后进行交替进化实验 (阶段III)。在交替进化的前期, 菌株在最适 pH (5.5) 与低 pH (4.6) 环境下耗糖与产酸能力有较为明显的差别。随着适应性进化的进行, 低 pH 条件下的发酵水平出现明显提高, 整体的耗糖与产酸能力出现提升。该阶段进行 68 次传代并趋于稳定, 将性能稳定的进化菌株命名为 ALE1。



Glucose 70 g/L , Xylose 50 g/L , Arabinose 8 g/L , Galactose 2 g/L , Mannose 2 g/L; tranfer every 24 h;



Glucose 70 g/L , Xylose 50 g/L , Arabinose 8 g/L , Galactose 2 g/L , Mannose 2 g/L; tranfer every 24 h;

图 3.2 *P. acidilactici* ZB220 低 pH 条件下的适应性进化生长代谢情况

(a)葡萄糖、木糖消耗与乳酸生产; (b)菌体生长 (OD₆₀₀)

Figure 3.2 Adaptive evolution of growth metabolism of *P. acidilactici* ZB220 under low pH conditions
 适应性进化策略: 阶段I: pH 4.8; 阶段II: pH 4.6; 阶段III: 交替 pH 进化 (pH 4.6 & 5.5)。每 8 h 用 5 M NaOH 条件 pH 到指定值, 每 8 h 转接一次, 42°C, 150 rpm。葡萄糖 70 g/L、木糖 50 g/L、阿拉伯糖 8 g/L、甘露糖 2 g/L 以及半乳糖 2 g/L。数据来源单次转接的终点。

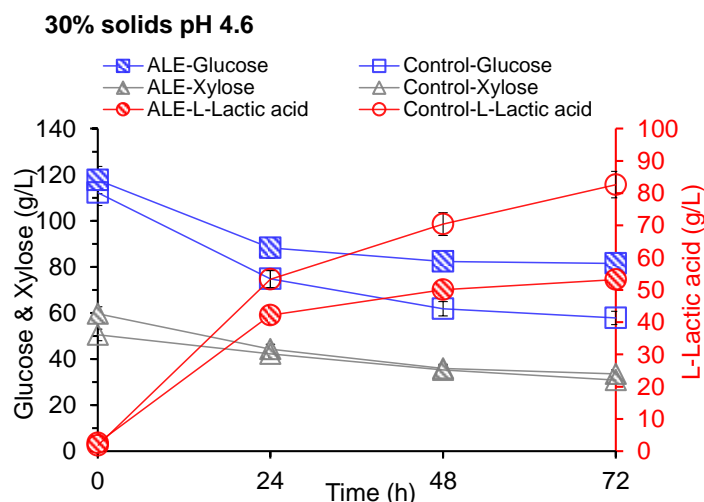


图 3.3 阶段II (pH 4.6) 长期进化菌株与出发菌株在 30%固含量物料 pH 4.6 条件下的发酵评价
 Figure 3.3 Evaluation of fermentation of long term evolved(Stage II (pH 4.6)) and starting strains at pH 4.6 of 30% solids material

发酵条件：发酵是在含有 1 L 30%小麦秸秆水解液的 3 L 生物反应器中进行的，用 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 控制 pH 维持在 4.6，以出发菌株作为对照，共发酵 72 h，每 24 h 取样。

3.3.3 低 pH 条件下发酵性能评价

在 3.3.2 中，将持续在 pH 4.6 条件下的进化菌株进行发酵验证，结果表明并没有获得相应的耐受性，反而长期生长在低 pH 的环境中，菌株发酵能力受到极大的抑制（图 3.3）。随后改变适应性进化策略，经过长期交替适应性进化获得一株性能稳定的进化菌株 ALE1，将 ALE1 和出发菌株在木质纤维素体系下进行发酵验证，以乳酸生产和单糖消耗作为评价指标。在 30%实际物料体系下进行 SSCF，控制不同的发酵 pH 条件，探究出发菌株与 ALE1 发酵能力的区别。

将发酵 pH 设置为 5.0、4.6、4.4 与 4.0。如图 3.4 所示，在 pH 5.0 条件下，由于产生的胁迫作用较弱，出发菌株与进化菌株的单糖消耗量与乳酸产量基本相同。当发酵 pH 降低到 4.6 时，出发菌株发酵性能出现明显降低，而 ALE1 菌株依然保持与 pH 5.0 条件下相似的发酵性能，最终产生 108.5 g/L 的 L-乳酸，比该 pH 值条件下出发菌株乳酸产量提高 43%。在 pH 4.4 条件下，相较于在 pH 5.0 环境中，ALE1 出现发酵能力的下降现象，但最终也可产生 85.2 g/L 的乳酸，比对照乳酸产量高 115.2%。通过在实际物料体系中进行发酵验证，发现当在较低 pH 环境中，进化菌株在糖耗产酸等方面展现良好的性能，提高了产酸菌株在低 pH 胁迫下的耐受性。但是当 pH 持续降低到 4.0 时，菌株依然受到极大的胁迫，因此还需要进一步交替进化提高乳酸片球菌在极端 pH 值下的耐受性。

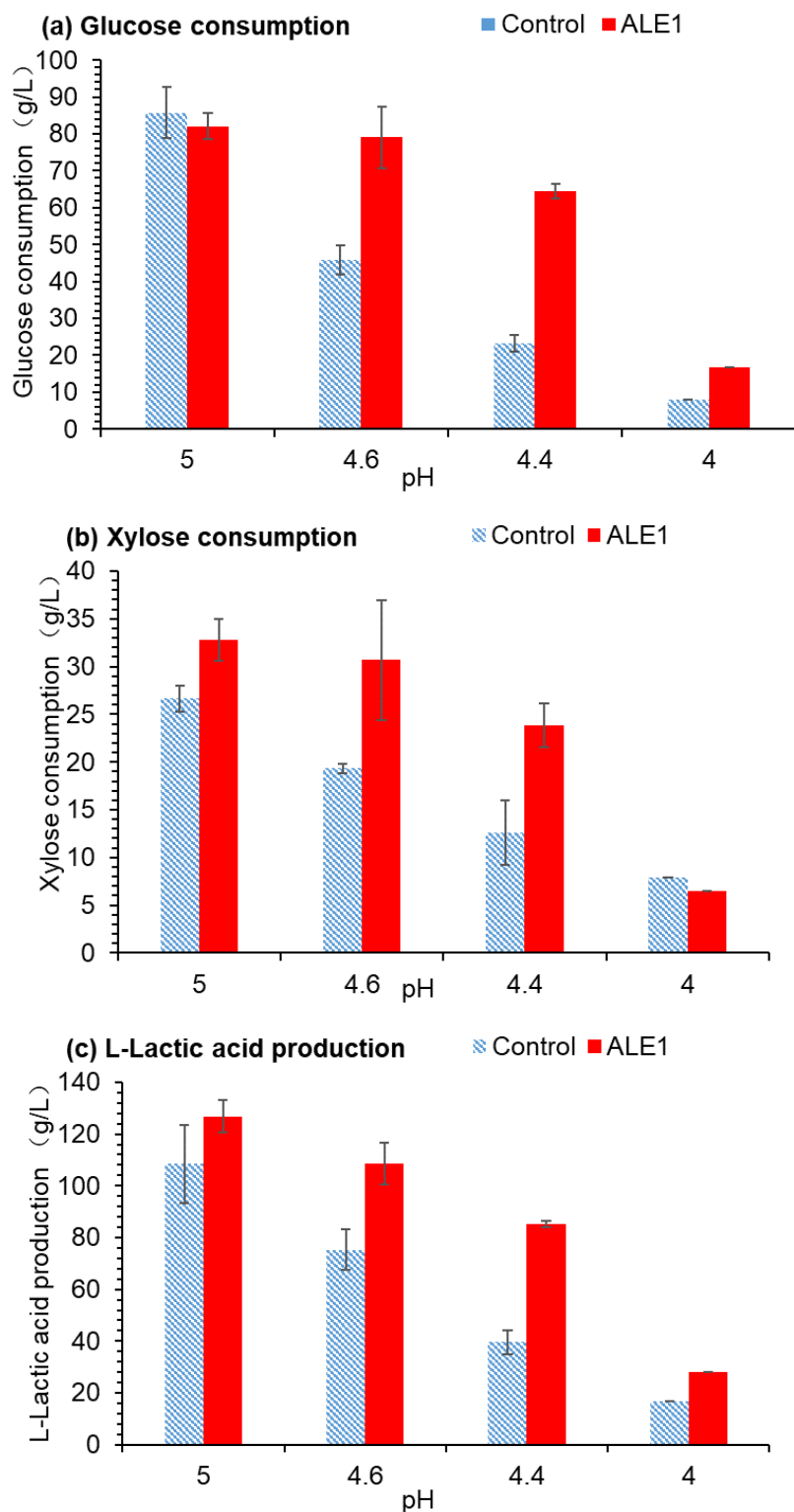


图 3.4 适应性进化菌株 (ALE1) 与出发菌株在不同 pH 条件下同步糖化共发酵评价

(a) 葡萄糖消耗; (b) 木糖消耗 (c) L-乳酸生产。

Figure 3.4 Evaluation of SSCF of an adaptively evolved strain (ALE1) and a departure strain under different pH conditions

发酵条件: 发酵是在含有 1 L 30%小麦秸秆水解液的 3 L 生物反应器中进行的, 以 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH, 发酵 pH 控制为 5.0、4.6、4.4 以及 4.0, 以出发菌株作为对照, 总共发酵 72 h, 每 24 h 取样, 42°C, 200 rpm。

3.3.4 适应性进化提高菌株在低 pH 条件下木糖代谢速率

在适应性进化以及发酵验证过程中，发现进化菌株木糖消耗能力较差，于是将全糖持续进化过程中（第Ⅲ阶段）的菌株转接到仅以木糖为碳源的培养基中，在低 pH 条件下进行木糖消耗能力适应性进化，其培养基配方如 3.2.2 所述。

低 pH 条件下木糖适应性进化依然维持着交替进化策略。如图 3.5 所示，前期发现，在两种 pH 条件下菌株消耗少量木糖，产酸能力也受到一定的影响，发酵性能较低可能与环境变化有关。随着适应性进化的进行，从第 11 代开始，正常 pH 条件下菌株的木糖消耗能力与乳酸生产你能力出现小幅度提升。第 17 代开始，正常 pH 条件下菌株的耗糖与产酸能力出现明显的提升，木糖在 24 h 内可以消耗 25 g/L 左右，产生 20 g/L 的乳酸。随着进化的进行，菌株在低 pH 条件下的发酵能力也有一定的提升，整体的耗糖与产酸能力提高。进行 30 次传代，性能趋于稳定，将其命名为 ALE2。

Low pH and xylose adaptive evolution of *P. acidilactici*

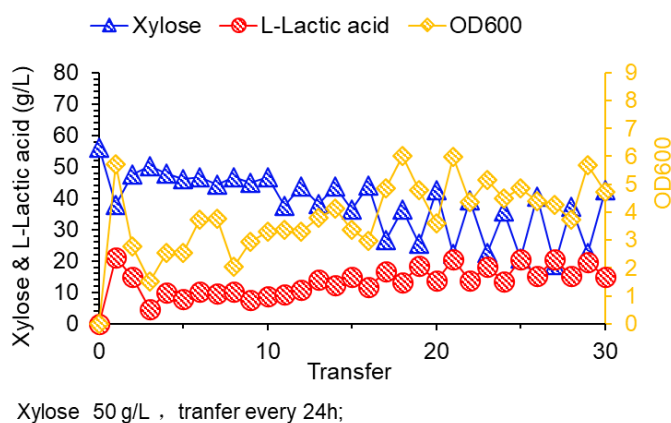


图 3.5 菌株在单一木糖低 pH 条件下的适应性进化生长代谢情况

Figure 3.5 Adaptive evolution of growth metabolism of strains under the condition of single xylose at low pH

适应性进化策略：交替 pH 进化（pH 4.6 & 5.5）。每 8 h 用 5 M NaOH 条件 pH 到指定值，每 8 h 转接一次，42°C，150 rpm，木糖 50 g/L。数据来源单次转接的终点。

将 ALE2 在 30%固含量实际物料中进行发酵验证，控制 pH 在 4.6，以出发菌种作为对照，进行发酵验证。如图 3.6 所示，经过长时间在低 pH 条件下适应性进化，ALE2 获得较高的木糖代谢能力，72 h 内消耗木糖 36 g/L，比对照菌株提高 89%，比未进行木糖进化的 ALE1 菌株提高 20%。而且保留了在低 pH 条件下较高的葡萄糖消耗能力和乳酸生产能力。综上，通过交替进化策略，使得菌株获得在低 pH 条件下高效代谢木糖的能力。

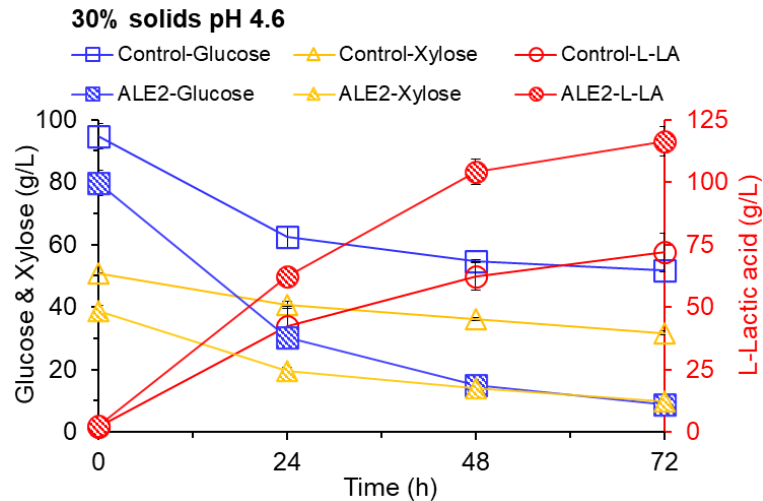


图 3.6 木糖适应性进化菌株在 pH 4.6 条件下同步糖化共发酵评价

Figure 3.6 Evaluation of xylose-adapted evolutionary strains for SSCF at pH 4.6

发酵条件：在含有 1 L 30% 物料的 3 L 生物反应器中，控制 pH 为 4.6，以 25% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH，以出发菌株作为对照，每 24 h 取样，共发酵 72 h，42°C，200 rpm。

3.4 本章小结

本章节主要通过适应性进化的策略提高 *P. acidilactici* ZB220 在高固含量实际物料体系，低 pH 值条件下的抗逆性与发酵能力，并通过麦秆物料 SSCF 对进化菌株进行发酵评价。本章主要内容及结论如下：

(1) 出发菌株在实际物料体系下，控制不同的 pH 值进行发酵验证。结果表明，在 pH 为 4.8 与 4.6 时，发酵性能出现明显的下降，因此选择 pH 4.8 与 4.6 作为低 pH 适应性进化条件。

(2) 通过合成培养基中，进行长时间低 pH 条件的适应性进化实验，获得一株较为稳定进化菌株 ALE1。同时证明了交替进化策略在适应性进化过程中起到关键性的作用，相较于单一 pH 条件适应性进化，菌株在不同 pH 条件下交替传代，能更快适应其环境，获得优良特性。

(3) 通过在 30% 实际物料中同步糖化共发酵，进行发酵评价。相较于出发菌株，进化菌株在低 pH 条件下的发酵能力出现明显的提升，而且在 pH 4.6 胁迫环境下，表现出与正常 pH (5.0) 条件下相似发酵能力，证明了进化菌株在低 pH 条件下具有耐受性，保持较高的发酵性能。

(4) 在适应性进化和发酵验证过程中，发现木糖代谢能力较差，于是进行长期低 pH 条件下木糖消耗能力的适应性进化实验。经过 30 次传代，获得一株性能稳定的进化菌株 ALE2，进行实际物料 SSCF 发酵验证，相较于出发菌种，木糖消耗量提高 89%，与 ALE1 相比提高 20%。

第4章 结论与展望

4.1 结论

目前已形成工业化的生物基琥珀酸生产工厂，大都以粮食淀粉作为发酵原料，较高的原料成本限制着生物基琥珀酸的发展。木质纤维素分布广泛而且价格低廉，是生物基琥珀酸发酵良好原料。本研究出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 可以利用木质纤维素来源的全部单糖，而且具有一定的木质纤维素依赖性，是在木质纤维素体系下生产琥珀酸优异的候选菌株。通过异源引入 rTCA 琥珀酸生产路径相关基因，在 *P. acidilactici* ZY271 中构建琥珀酸代谢路径，以期实现琥珀酸的生产。另外，弱有机酸在低 pH 环境中发酵，减少中和剂使用的同时降低后期分离纯化的成本。但是发酵菌株 *P. acidilactici* 最适 pH 为 5.5，当发酵 pH 低于 5.0 时会受到环境的胁迫，影响菌体生长与代谢。本论文另一部分工作则采用适应性进化的方式提高 *P. acidilactici* 在实际物料体系，低 pH 条件下的耐受性，获得一株可在低 pH 环境中进行有机酸发酵的工业菌株。

本论文主要结论如下：

(1) 经过诱导表达和蛋白酶活鉴定，确定将来自 *C. glutamicum* B253 苹果酸脱氢酶 (*mdh1*) 整合到 ZY271 基因组中，构建草酰乙酸到苹果酸路径；并以表达质粒的形式将 *pck1* 基因导入重组菌，在 *P. acidilactici* ZY271 构建一条由 PEP 生成琥珀酸的代谢路径。

(2) 重组菌 M1(*P. acidilactici* ZY271::*mdh1*) 在合成培养基中添加草酰乙酸与苹果酸进行发酵，并没有检测到琥珀酸的生成。添加 5 g/L 的苹果酸会加快乳酸的生成，前 6 h 乳酸生产速率为 2.68 g/L/h，比对照提高 30% 左右，而且得率 (1.01 g/g 葡萄糖) 超过乳酸的理论得率。重组菌 M2(*P. acidilactici* ZY271::*mdh1* pZY36e-*pck1*) 在发酵过程中也没有产生琥珀酸以及中间产物。添加苹果酸会提高乳酸产量，这是由于 MLE 催化作用，构建针对 *mleS* 的敲除质粒。对 M2 菌株进一步添加 NaHCO₃ 进行琥珀酸发酵验证，但由于添加 NaHCO₃ 使得培养基 pH 升到 7.2，严重影响了 *P. acidilactici* 生长与发酵。由于 *mleS* 与 *ldh* 基因的存在，与所构建的琥珀酸生产路径竞争碳通量与还原力，使得重组菌目前难以生成琥珀酸。

(3) 为了提高 *P. acidilactici* 在高固含量物料体系，低 pH 条件下的耐受性，通过在摇瓶中模拟 30% 固含量小麦秸秆的糖浓度进行传代进化，经过三个阶段共 160 次传代，获得一株性能稳定的进化菌株，同时在适应性进化过程中发现交替进化策略比长时间单一条件进化更加有效。通过 30% 固含量麦秆 SSCF 进行发酵验证，结果表明，进化菌株在低 pH 环境中相较于出发菌株耗糖与产酸都有明显的提升，并且在 pH 4.6 条件下能够维持与正常 pH (5.0) 相似的发酵性能。在适应性进化以及发酵验证过程中，发现菌株木糖代谢能力较弱，为了进一步提高木糖利用能力，进行以木糖为唯一碳源的适应性进化，经过 30 次传代，菌株在低 pH 实际物料体系中的木糖消耗能力有所提升。

4.2 展望

本研究在 *P. acidilactici* ZY271 中引入琥珀酸代谢相关基因，构建相关的代谢路径，同时通过适应性进化的方式提高菌株在低 pH 条件下的耐受性。但还有一些其他问题需要深入研究。

(1) 目前所构建的琥珀酸生产路径无法得到相应的产物，由于苹果酸乳酸酶的存在，使得添加的苹果酸不断转化为乳酸，后续需要将该基因进行敲除，并添加前体进行发酵验证后续路径基因是否可以行使相应功能。乳酸生产路径 (*ldh*) 是琥珀酸生产最大的竞争对手，敲除 *ldh* 导致胞内还原力以及碳代谢不平衡，本研究引入 *mdh* 基因，可能会弥补敲除 *ldh* 带来的影响，同时也可以考虑异源引入其他产生 NADH 路径（例如：甲酸生产路径）提供额外的还原力，如何提高胞内 CO_2 或 HCO_3^- 水平也是需要关注的问题。将本研究在 *P. acidilactici* ZY271 构建的 rTCA 路径不断完善，最终实现在实际物料中生产琥珀酸。同时作为一株非模式工业菌株，需要进一步开发更加高效的遗传工具，提高其改造效率。

(2) 交替进化策略提高了菌株在低 pH 条件下的耐受性，其机制还需要进一步通过转录组分析，同时指导理性设计，进一步提高生物炼制菌株在低 pH 值胁迫下的耐受性。而且在发酵验证过程中发现，当 pH 降低到 4.0 时，适应性进化菌株相较于出发菌株具有一定耐受性，但与其在 pH 5.0 条件下发酵相比，依然出现发酵性能大幅度下降的情况，后续可降低适应性进化的 pH 值继续进行交替进化实验，提高生物炼制菌株在极端 pH 值胁迫下的耐受性。

参考文献

- [1] 姜振楠. 羧酸转运蛋白工程改造解脂耶氏酵母高效生产丁二酸[D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [2] 董承普. 连续式电解合成丁二酸中的过程控制[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014.
- [3] 臧运芳. 我国丁二酸行业的现状与发展趋势[J]. 化工管理, 2019(30): 16-17.
- [4] 朱年青. 谷氨酸棒杆菌高产琥珀酸的代谢工程改造[D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [5] Wieschalka S, Blombach B, Bott M, et al. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(2): 87-102.
- [6] Shah A A, Hasan F, Hameed A, et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(3): 246-265.
- [7] 钱伯章. 可生物降解聚酯及其应用[J]. 聚酯工业, 2011, 24(04): 8-14.
- [8] 伍换, 蒋小良, 周伟光, 等. 可降解食品包装高分子材料[J]. 橡塑技术与装备, 2024, 50(02): 46-49.
- [9] Tan L, Chen Y, Zhou W, et al. Novel poly(butylene succinate-co-lactic acid) copolyesters: Synthesis, crystallization, and enzymatic degradation[J]. Polymer Degradation and Stability, 2010, 95: 1920-1927.
- [10] Bretz K, Kabasci S. Feed-control development for succinic acid production with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(5): 1187-1192.
- [11] 张耀, 邱晓曼, 陈程鹏, 等. 生物法制造丁二酸研究进展[J]. 化工学报, 2020, 71(05): 1964-1975.
- [12] Louasté B, Eloutassi N. Succinic acid production from whey and lactose by *Actinobacillus succinogenes* 130Z in batch fermentation[J]. Biotechnology Reports, 2020, 27: 23-31.
- [13] Zeikus J G. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 1980, 34: 423-464.
- [14] Zeikus J G, Jain M K, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5): 545-552.
- [15] Zhu L W, Tang Y J. Current advances of succinate biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(8): 1040-1048.
- [16] 何燕青. 预处理与生物脱毒过程强化对木质纤维素干法生物炼制技术的促进[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [17] Thuy N T H, Kongkaew A, Flood A, et al. Fermentation and crystallization of succinic acid from *Actinobacillus succinogenes* ATCC55618 using fresh cassava root as the main substrate[J]. Bioresource Technology, 2017, 233: 342-352.
- [18] Wan C X, Li Y B, Shahbazi A, et al. Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130z[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 145(1-3): 111-119.

- [19] Wang D, Li Q A, Song Z Y, et al. High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2011, 86(4): 512-518.
- [20] Liu Y P, Zheng P, Sun Z H, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1736-1742.
- [21] Bradfield M F A, Mohagheghi A, Salvachúa D, et al. Continuous succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* on xylose-enriched hydrolysate[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 181-197.
- [22] Li Q, Yang M, Wang D, et al. Efficient conversion of crop stalk wastes into succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(9): 3292- 3294.
- [23] Zheng P, Dong J J, Sun Z H, et al. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(8): 2425-2429.
- [24] Ahn J H, Seo H, Park W, et al. Enhanced succinic acid production by *Mannheimia* employing optimal malate dehydrogenase[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1970-1981.
- [25] Tsuji A, Okada S, Hols P, et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 53(2): 97-103.
- [26] Yang L, Henriksen M M, Hansen R S, et al. Metabolic engineering of *Aspergillus niger* via ribonucleoprotein-based CRISPR-Cas9 system for succinic acid production from renewable biomass[J]. Biotechnol Biofuels, 2020, 13(1): 206-217.
- [27] Durall C, Kukil K, Hawkes J A, et al. Production of succinate by engineered strains of *Synechocystis* PCC 6803 overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase and a glyoxylate shunt[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 39-52.
- [28] Iijima H, Watanabe A, Sukigara H, et al. Four-carbon dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Metabolic Engineering, 2021, 65: 88-98.
- [29] Lin H, Bennett G N, San K Y. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(2): 148-156.
- [30] Liu X T, Zhao G, Sun S J, et al. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10-23.
- [31] 唐文秀, 王学明, 郭亮, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产琥珀酸[J]. 化工进展, 2022, 41(02): 938-950.
- [32] Lee S J, Song H, Lee S Y. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1939-1948.

- [33] Kwon Y D, Lee S Y, Kim P. Influence of gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* under high bicarbonate condition[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(9): 1448-1452.
- [34] Xiao M Y, Zhu X N, Bi C H, et al. Improving Succinate Productivity by Engineering a Cyanobacterial CO₂ Concentrating System (CCM) in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(9): 188-197.
- [35] Millard C S, Chao Y P, Liao J C, et al. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(5): 1808-1810.
- [36] Keseler I M, Collado-Vides J, Santos-Zavaleta A, et al. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39: 583-590.
- [37] Kai Y, Matsumura H, Inoue T, et al. Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(3): 823-828.
- [38] Tan Z G, Zhu X N, Chen J, et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improvement of succinate production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(16): 4838-4844.
- [39] 陈园园, 程慧, 李宁娜, 等. 丙酮酸羧化酶对酿酒酵母积累琥珀酸的作用探究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 38-44.
- [40] Lee S H S. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(3): 286-290.
- [41] Lin H, San K Y, Bennett G N. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(4): 515-523.
- [42] Okino S, Noburyu R, Suda M, et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(3): 459-464.
- [43] Okino S, Inui M, Yukawa H. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(4): 475-480.
- [44] Litsanov B, Brocker M, Bott M. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [45] 王庆昭. 高产琥珀酸大肠杆菌的代谢工程[D]. 天津:天津大学, 2006.

- [46] Tan J S, Lee S Y, Chew K W, et al. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 116-129.
- [47] Osanai T, Shirai T, Iijima H, et al. Genetic manipulation of a metabolic enzyme and a transcriptional regulator increasing succinate excretion from unicellular cyanobacterium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1064-1072.
- [48] Zhu L W, Xia S T, Wei L N, et al. Enhancing succinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* by engineering its global transcription factor, catabolite repressor/activator (Cra)[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 526-537.
- [49] Jiang M, Liu S-W, Ma J-F, et al. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 1298-1300.
- [50] Olajuyin A M, Yang M H, Liu Y L, et al. Efficient production of succinic acid from *Palmaria palmata* hydrolysate by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 653-659.
- [51] Yuzbashev T V, Yuzbasheva E Y, Sobolevskaya T I, et al. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(4): 673-682.
- [52] Lee P C, Lee S Y, Hong S H, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(5): 663-668.
- [53] Lee S Y, Kim J M, Song H, et al. From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(1): 11-22.
- [54] Lee J W, Lee S Y, Song H, et al. The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium[J]. *Proteomics*, 2006, 6(12): 3550-3566.
- [55] Hong S H, Kim J S, Lee S Y, et al. The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(10): 1275-1281.
- [56] Jang Y S, Jung Y R, Lee S Y, et al. Construction and characterization of shuttle vectors for succinic acid-producing rumen bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(17): 5411-5420.
- [57] Kim J M, Lee K H, Lee S Y. Development of a markerless gene knock-out system for *Mannheimia succiniciproducens* using a temperature-sensitive plasmid[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 278(1): 78-85.
- [58] Ahn J H, Bang J, Kim W J, et al. Formic acid as a secondary substrate for succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(12): 2837-2847.
- [59] Sun L, Zhang Q, Kong X, et al. Highly efficient neutralizer-free L-malic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource technology*, 2023, 370: 128580-128590.

- [60] Singh A, Lynch M D, Gill R T. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(6): 347-354.
- [61] Singh A, Soh K C, Hatzimanikatis V, et al. Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(1): 76-81.
- [62] Wu H, Li Z-M, Zhou L, et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(24): 7837-7843.
- [63] Ma J F, Gou D M, Liang L Y, et al. Enhancement of succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* with co-expression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase and pyruvate carboxylase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(15): 6739-6747.
- [64] Balzer G J, Thakker C, Bennett G N, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to minimize byproduct formate and improving succinate productivity through increasing NADH availability by heterologous expression of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 20: 1-8.
- [65] Tan Z G, Chen J, Zhang X L. Systematic engineering of pentose phosphate pathway improves *Escherichia coli* succinate production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 262-274.
- [66] Berríos-Rivera S J, Sánchez A M, Bennett G N, et al. Effect of different levels of NADH availability on metabolite distribution in *Escherichia coli* fermentation in minimal and complex media[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(4): 426-432.
- [67] Chatterjee R, Millard C S, Champion K, et al. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 148-154.
- [68] Chung S C, Park J S, Yun J, et al. Improvement of succinate production by release of end-product inhibition in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 157-164.
- [69] Lee J W, Yi J, Kim T Y, et al. Homo-succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 409-417.
- [70] Ahn J H, Bang J, Kim W J, et al. Formic acid as a secondary substrate for succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(12): 2837-2847.
- [71] Cui Z Y, Gao C J, Li J J, et al. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 126-133.
- [72] Jansen M L A, Van Gulik W M. Towards large scale fermentative production of succinic acid[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30: 190-197.

- [73] 吴昊, 马江锋, 吴明科, 等. 非粮生物质制备生物基丁二酸的研究进展[J]. 广西科学, 2015, 22(01): 20-26.
- [74] Roukas T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production[J]. Process Biochemistry, 1998, 33: 805-810.
- [75] Chan S, Kanchanatawee S, Jantama K. Production of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2012, 103(1): 329-336.
- [76] Ma J F, Li F, Liu R M, et al. Succinic acid production from sucrose and molasses by metabolically engineered *E. coli* using a cell surface display system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 91: 240-249.
- [77] 张九花, 奚永兰, 徐蓉, 等. 利用甘蔗糖蜜与乳清粉厌氧发酵制备丁二酸[J]. 化工进展, 2012, 31(12): 2756-2760.
- [78] Lee P C, Lee S Y, Hong S H, et al. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2003, 26(1): 63-67.
- [79] Wan C, Li Y, Shahbazi A, et al. Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130Z[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 145(1-3): 111-119.
- [80] 董晋军, 郑璞, 倪晔, 等. 菊芋原料同步糖化发酵生产丁二酸[J]. 食品与生物技术学报, 2008(05): 78-82.
- [81] 董晋军, 郑璞, 孙志浩, 等. 利用甘蔗糖蜜半连续发酵生产琥珀酸[J]. 化工学报, 2008(06): 1490-1495.
- [82] 周小兵, 郑璞. 以白酒酒糟为原料发酵产丁二酸[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(02): 7-10.
- [83] 高金宝, 刘桂芳, 贾士儒. 以木薯为原料直接发酵柠檬酸工艺研究及工业化放大[J]. 天津科技大学学报, 2008(02): 43-46.
- [84] 张敏, 马江锋, 徐冰, 等. 利用木薯淀粉为原料发酵生产丁二酸的研究[J]. 中国酿造, 2011(07): 29-32.
- [85] Olajuyin A M. 大肠杆菌利用废弃生物质高效生产丁二酸的代谢工程研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [86] Li X J, Zheng Z, Wei Z J, et al. Screening, breeding and metabolic modulating of a strain producing succinic acid with corn straw hydrolyte[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2009, 25(4): 667-677.
- [87] 郑璞. 玉米秸秆生物炼制丁二酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [88] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels[J]. Nature, 2008, 454(7206): 841-845.
- [89] Narron R H, Kim H, Chang H-M, et al. Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 39-46.

- [90] Zhou C H, Xia X, Lin C X, et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(11): 5588-5617.
- [91] 张翼. 皮状丝孢酵母的酚醛耐受性及纤维素油脂发酵研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2021.
- [92] Isikgor F H, Becer C R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(25): 4497-4559.
- [93] Downing M, Eaton L M, Graham R L, et al. U.S. Billion-Ton Update: Biomass Supply for a Bioenergy and Bioproducts Industry[R]. United States, 2011: Medium: ED.
- [94] Pan X J, Xie D, Gilkes N, et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121: 1069-1079.
- [95] Hong J, Ye X H, Zhang Y H P. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications[J]. *Langmuir*, 2007, 23(25): 12535-12540.
- [96] Kim J S, Lee Y Y, Kim T H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 42-48.
- [97] Kim K H, Hong J A. Dynamic extraction of spearmint oil components by using supercritical CO₂[J]. *Separation Science and Technology*, 2000, 35(2): 315-322.
- [98] Xu C P, Arancon R a D, Labidi J, et al. Lignin depolymerisation strategies: towards valuable chemicals and fuels[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(22): 7485-7500.
- [99] Zhang J, Wang X S, Chu D Q, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [100] Zhang J, Shao S, Bao J. Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock and ethanol fermentability evaluation[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 201: 355-359.
- [101] Chen X, Li Z H, Zhang X X, et al. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(3): 591-604.
- [102] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N O, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 77-9: 91-103.
- [103] Dong H W, Bao J. Metabolism biofuel via biodetoxification[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(5): 316-318.
- [104] Mohagheghi A, Ruth M, Schell D J. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(8): 1806-1811.
- [105] He Y Q, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 19-31.

- [106] Zhang B, Khushik F A, Zhan B R, et al. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 4105-4118.
- [107] Jönsson L J, Alriksson B, Nilvebrant N O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 16-25.
- [108] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(4): 1109-1117.
- [109] Keshwani D R, Cheng J J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(4): 1515-1523.
- [110] He Y Q, Zhang L P, Zhang J, et al. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 1-13.
- [111] Zhang J, Zhu Z N, Wang X F, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3: 26-40.
- [112] Ahmed F. 低 pH 耐受性生物脱毒真菌的分离及其在纤维素乙醇发酵上的应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2022.
- [113] 张建. 木质纤维素原料生物转化生产纤维素乙醇过程的关键技术研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [114] Pienkos P T, Zhang M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates[J]. *Cellulose*, 2009, 16(4): 743-762.
- [115] Ladisch M R, Svarczkopf J A. Ethanol production and the cost of fermentable sugars from biomass[J]. *Bioresource Technology*, 1991, 36(1): 83-96.
- [116] Jeffries T W, Jin Y S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2000, 47: 221-268.
- [117] 潘浩, 干逸彬, 戚采轩, 等. 麦秸秆水解液好氧发酵制备琥珀酸的研究[J]. *山东化工*, 2021, 50(04): 1-6.
- [118] 李桂莹. 高效利用戊糖产琥珀酸谷氨酸棒杆菌的构建[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [119] Sun J X, Sun X F, Zhao H B, et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2004, 84: 331-339.
- [120] Kawaguchi H, Sasaki M, Vertès A A, et al. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77(5): 1053-1062.
- [121] Nichols N N, Dien B S, Bothast R J. Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(1-2): 120-125.
- [122] Liang L Y, Liu R M, Li F, et al. Repetitive succinic acid production from lignocellulose hydrolysates by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 405-412.

- [123] 楚德强. 高温发酵木质纤维素生产乙醇和乳酸[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [124] 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]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [125] 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]. 上海: 华东理工大学, 2018.
- [126] Qiu Z Y, Gao Q Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 9-15.
- [127] 谢慧, 张东, 张兆昆, 等. 稀酸和蒸汽爆破预处理玉米秸秆对琥珀酸发酵的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(5): 57-62.
- [128] 黄秀梅, 李建, 陈可泉, 等. 利用玉米秸秆水解液厌氧发酵产丁二酸的研究[J]. *中国酿造*, 2009(06): 31-34.
- [129] Andersson C, Helmerius J, Hodge D, et al. Inhibition of succinic acid production in metabolically engineered *Escherichia coli* by neutralizing agent, organic acids, and osmolarity[J]. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(1): 116-123.
- [130] Serrazanetti D I, Guerzoni M E, Corsetti A, et al. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(7): 700-711.
- [131] Fozo E M, Kajfasz J K, Quivey R G. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2004, 238(2): 291-295.
- [132] Van De Guchte M, Serror P, Chervaux C, et al. Stress responses in lactic acid bacteria[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1-4): 187-216.
- [133] Long A, Huang W L, Qi Y P, et al. Low pH effects on reactive oxygen species and methylglyoxal metabolisms in Citrus roots and leaves[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 477-493.
- [134] 颜钊. 酚类抑制物、高温和低 pH 值胁迫下的生物炼制菌株适应性进化研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2021.
- [135] Komesu A, Maciel M R W, Maciel R. Separation and purification technologies for lactic acid - A brief review[J]. *Bioresources*, 2017, 12(3): 6885-6901.
- [136] 冯文婧, 杜宇辉, 刘家亨, 等. 一株耐受低 pH、高浓度乳酸及琥珀酸菌株的筛选与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(11): 2171-2181.
- [137] Cubas-Cano E, González-Fernández C, Tomás-Pejó E. Evolutionary engineering of *Lactobacillus pentosus* improves lactic acid productivity from xylose-rich media at low pH[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288-296.
- [138] Zhang J, Wu C D, Du G C, et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(2): 283-289.

- [139] Qiu Z Y, Gao Q Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1369-1376.
- [140] 黄振. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产聚 3-羟基丁酸和脂肪烃[D]. 上海: 华东理工大学, 2020.
- [141] Sluiter A D, Hames B R, Ruiz R O, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass[C], 2004.

硕士期间研究成果

已发表论文:

Zhibin Li, **Lingxiao Zhang**, Niling He, Bin Zhang, Jie Bao*. Competition between biodegradation fungus and lactic acid bacterium in the biorefinery processing chain for production of cellulosic L-lactic acid. *Bioresources and Bioprocessing*.

致谢

在本文完成之际，对这三年来给予我帮助的老师、同学以及家人朋友们表示感谢。

首先，特别感谢鲍杰老师。鲍老师治学严谨，思维缜密，学识渊博，为人正直，在实验思路与论文撰写等方面给予我极大的帮助。同时，在生活方面也给予我极大的帮助。鲍老师实事求是科研作风以及认真负责的工作态度是我学习的榜样。在此，祝愿鲍老师及家人幸福快乐，万事顺心，工作顺利。

其次，感谢张斌老师在实验和生活中对我的帮助。张老师科研能力强，为人随和。我在生活中遇到的困难，张老师总能给与关怀与帮助。在我整个三年研究生生涯里，张老师对我的实验提出许多宝贵意见。在此，祝张老师工作顺利，生活美满。

此外，我要感谢生物炼制实验室每一位朋友。感谢李治斌师兄在科研和生活中对我的帮助，从刚进实验室的分子培训实验到课题的开展，师兄给予我耐心的指导。感谢何妮玲师姐、张翼师兄、王雅师姐、王安师兄、徐迎迎师姐、刘祺师姐、韩涛师兄、宋卓琳师姐、冀娇师姐对我的帮助。感谢同一级的武师南、韩莹、刘娇、韩庆美和陈峙苇三年以来的陪伴。感谢研二和研一的师弟师妹在科研生活中对我的帮助。感谢已经毕业的杨虎成师兄、任大宇师兄和郭晓梦师姐。祝你们事业有成，万事顺意。

最后，感谢我的父母和朋友对我的支持与帮助。感谢我已故的爷爷对我的无私支持，没能见到您最后一面是我此生的遗憾。

行文至此，近二十年求学之路告一段落，但关于人生的学习才刚刚开始。回过头来发现自己也走了挺长的路，感谢自己一路上的坚持，感谢这几年帮助过我的人，最后祝我们心之所向，无所不成。

张凌霄

2024年5月7日 于上海