

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学 学位论文

树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 生物降解木质纤维素来源呋喃醛  
和芳香醛的实验研究

冉红

指导教师姓名:

鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别:   硕士   专业名称:   生物化工  

论文定稿日期:   2014. 04. 15   论文答辩日期:   2014. 05. 23  

学位授予单位:   华东理工大学  

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席:

评 阅 人:

## 作 者 声 明

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

论文作者签名：

2014 年 月

## 树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 生物降解木质纤维素来源呋喃醛和芳香醛的实验研究

### 摘要

呋喃醛和芳香醛类抑制物是木质纤维素预处理过程中产生的对酶水解和发酵过程有严重抑制作用的副产物。脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 具有高效降解这些木质纤维素衍生物的能力已得到证实, 经 *A. resinae* ZN1 脱毒后极大地提高了后续发酵过程中生物乙醇及生物化学品的得率。本文通过改变发酵条件研究 *A. resinae* ZN1 降解呋喃醛中糠醛和 5-羟甲基糠醛 (5-HMF), 芳香醛中香草醛、松柏醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛的代谢路径及代谢性能。实验发现对于呋喃醛类物质: (1) 在氧气存在的条件下, *A. resinae* ZN1 将糠醛/5-HMF 同时转化为糠醇/5-羟甲基糠醇和糠酸/5-羟甲基糠酸。无氧时糠醛/5-HMF 只被降解为糠醇/5-羟甲基糠醇; (2) 氧气存在时, 葡萄糖能够增加糠醛和 5-HMF 的降解速率; (3) 在有氧条件下, 当糠醛/5-HMF 浓度降低到阈值时, 葡萄糖才会降解。对于芳香醛 (香草醛、松柏醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛) 类物质: (1) 在氧气存在的条件下, *A. resinae* ZN1 将芳香醛类物质同时转化为相应的芳香醇和芳香酸。在无氧条件下, 芳香醛类物质基本不被降解; (2) 在含氧培养基中, 葡萄糖抑制香草醛、松柏醛和 4-羟基苯甲醛的降解, 却极大程度的促进丁香醛的转化; (3) 高浓度的香草醛和松柏醛抑制葡萄糖的降解, 而高浓度的 4-羟基苯甲醛/丁香醛可以和葡萄糖同时被 *A. resinae* ZN1 降解。本文以实验为基础, 给出 *A. resinae* ZN1 对呋喃醛和芳香醛类物质的代谢路径及降解性能, 为提高生物脱毒效率及脱毒菌株的发展提供重要的信息。

**关键字:** 木质纤维素; 脱毒; 呋喃醛; 芳香醛; 代谢路径

## Experimental Study of Biodegradation of Furan Aldehydes and Aromatic Aldehydes Derived from Lignocellulose by *Amorphotheca resinae* ZN1

### Abstract

Furan aldehydes and aromatic aldehydes are degradation products of lignocellulose during pretreatment operations. The two aldehydes compounds significantly inhibit the consequent enzymatic hydrolysis and fermentation processes. The biodegradation fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 had demonstrated its excellent capacity on degrading lignocellulose derived inhibitors and helped the fermentation processes to achieve high yield of ethanol and biochemicals. The degradation pathways and performance of furan aldehydes (furfural and 5-hydroxymethylfurfural) and aromatic aldehydes (vanillin, coniferyl aldehyde, syringaldehyde and 4-hydroxybenzaldehyde) by *A. resinae* ZN1 were investigated by changing various culture conditions. In this thesis, the phenomenons of furan aldehydes degradation was investigated. The results include: (1) *A. resinae* ZN1 converts furfural/5-HMF into furfuryl/5-HMF alcohols and furoic/5-HMF acids simultaneously at aerobic condition, and only the corresponding furfuryl/5-HMF alcohols are obtained at anaerobic condition; (2) the existence of glucose accelerates the degradation rate of furfural and HMF by *A. resinae* ZN1 and the cell mass growth rate at aerobic culture; (3) glucose is not consumed before furfural or 5-HMF is degraded to a low threshold concentration when oxygen exist in tne culture. For degradation of aromatic aldehydes (vanillin, coniferyl aldehyde, syringaldehyde and 4-hydroxybenzaldehyde), the results include: (1) *A. resinae* ZN1 converts aromatic aldehydes into aromatic alcohol and aromatic acid simultaneously at aerobic condition, and aromatic aldehydes was not to be degraded without oxygen; (2) glucose inhibits the degradation of vanillin, coniferyl aldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde, but improves the degradation rate of syringaldehyde at aerobic condition; (3) the high concentration of vanillin and coniferyl aldehyde inhibit the conversion of glucose, but the high level of 4-hydroxybenzaldehyde and syringaldehyde are degraded with glucose at the same time. The pathways of furan aldehydes and aromatic aldehydes were proposed based on the experimental results. This work provides important information for detoxification enhancement and strain modification.

**Key words:** lignocellulose; detoxification; furan aldehydes ; aromatic aldehydes; pathways

## 目录

引言.....	1
第一章 文献综述.....	2
1.1 生物乙醇的研究现状.....	2
1.2 木质纤维素的组成及预处理方法的研究.....	2
1.3 木质纤维素预处理过程中形成的抑制物.....	4
1.4 抑制物的抑制作用及机理.....	7
1.4.1 呋喃醛的抑制作用及机制.....	7
1.4.2 有机酸类物质的抑制作用及机制.....	8
1.4.3 芳香醛的抑制作用及机制.....	10
1.5 现有的脱毒方法.....	11
1.5.1 物理脱毒法.....	12
1.5.2 化学脱毒法.....	12
1.5.3 生物脱毒法.....	12
1.6 脱毒菌株代谢抑制物路径的研究.....	17
1.6.1 呋喃醛类抑制物的代谢路径研究.....	17
1.6.2 芳香醛类物质的代谢路径研究.....	20
1.6.3 有机酸类抑制物的代谢路径研究.....	20
1.7 树脂枝孢霉 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 的研究.....	20
1.8 选题依据及研究现状.....	21
第 2 章 材料和方法.....	23
2.1 菌株、试剂与仪器设备.....	23
2.1.1 菌种.....	23
2.1.2 实验试剂及仪器.....	23
2.1.3 种子培养基和发酵培养基.....	23
2.2 实验方法.....	25
2.2.1 菌种保藏.....	25
2.2.2 种子活化.....	25
2.2.3 发酵种子的培养.....	26
2.2.4 呋喃醛类物质的上罐实验.....	26
2.2.5 芳香醛类物质的 GC-MS 样品准备.....	26
2.2.6 芳香醛类物质的发酵实验.....	27
2.3 分析方法.....	28
第 3 章 <i>A. resinae</i> ZN1 的呋喃醛代谢路径研究.....	29

3.1	<i>A. resinae</i> ZN1 降解糠醛和 5-HMF 的空白对照实验 .....	29
3.2	<i>A. resinae</i> ZN1 在以糠醛或 5-HMF 为唯一碳源的无氧降解研究 .....	32
3.3	<i>A. resinae</i> ZN1 在不同通气量中以糠醛为唯一碳源的降解研究 .....	33
3.4	<i>A. resinae</i> ZN1 在通气量不同时以 5-HMF 为唯一碳源的降解研究 .....	35
3.5	<i>A. resinae</i> ZN1 在含葡萄糖的培养基中对糠醛和 5-HMF 的无氧降解研究 .....	36
3.6	不同通气量对 <i>A. resinae</i> ZN1 在含葡萄糖的培养基中对糠醛降解的影响 .....	37
3.7	不同通气量对 <i>A. resinae</i> ZN1 在含葡萄糖的培养基中对 5-HMF 降解的影响 .....	39
3.8	<i>A. resinae</i> ZN1 对糠醛和 5-HMF 代谢路径及代谢性能分析 .....	40
第四章 <i>A. resinae</i> ZN1 的芳香醛代谢路径研究 .....		43
4.1	<i>A. resinae</i> ZN1 降解芳香醛的空白对照实验及 GC-MS 分析 .....	43
4.2	<i>A. resinae</i> ZN1 对香草醛降解路径的研究 .....	45
4.3	<i>A. resinae</i> ZN1 对松柏醛降解路径的研究 .....	47
4.4	<i>A. resinae</i> ZN1 对丁香醛降解路径的研究 .....	49
4.5	<i>A. resinae</i> ZN1 对 4-羟基苯甲醛的降解路径的研究 .....	51
4.6	<i>A. resinae</i> ZN1 对芳香醛类物质代谢路径的分析 .....	53
第 5 章 结论与展望 .....		57
5.1	结论 .....	57
5.2	展望 .....	57
参考文献 .....		58
致谢 .....		63

## 引言

木质纤维素生物质如农业残留（小麦秸秆和玉米芯），木头及能源作物是地球上丰富的可再生性资源，而成为生产生物乙醇最有前景的原料。但是由于它的组成结构复杂，对外界的物理、化学和生物作用有很强的抵抗力，所以在发酵前必须经过预处理步骤。然而，几乎所有的预处理方法都不可避免的产生各种类型的副产物。这些副产物主要包括三大类：呋喃醛、芳香醛和有机酸，它们对后续发酵微生物都有强烈的抑制作用，这些物质的存在会使乙醇生产菌株的发酵性能下降。常用的一些物理和化学脱毒法虽然能将这些抑制物降解，但通常会致使大量木质纤维素有效成分的损失，并且产生大量的废水。生物脱毒法由于条件温和，能完全降解预处理后木质纤维素原料中的抑制物，糖类损失小和基本没有废水产生等优点而备受关注。本实验室从预处理后的秸秆中筛选得到一株具有较强代谢抑制物能力的树脂枝孢霉菌—*Amorphotheca resinae* ZN1，它能够快速降解预处理后的木质纤维素原料中的呋喃醛，芳香醛和有机酸类抑制物。实验室之前对于 *A. resinae* ZN1 的研究主要集中在它对抑制物的降解效率上，关于它作为脱毒菌株降解这些抑制物的代谢路径和代谢机理并没有做过研究。因此本研究选取木质纤维素中典型的呋喃醛（糠醛和 5-HMF）和芳香醛（香草醛、松柏醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛）类物质为研究对象，通过改变通气状况和葡萄糖的量来研究 *A. resinae* ZN1 降解这些抑制物代谢路径和 *A. resinae* ZN1 代谢性能。通过对降解产物的检测和实验现象的分析，得到了 *A. resinae* ZN1 代谢呋喃醛和芳香醛的代谢路径和氧气及葡萄糖对于代谢路径的影响。

## 第一章 文献综述

### 1.1 生物乙醇的研究现状

生物乙醇作为汽车燃料是现阶段使用最广泛的生物能源,随着全球变暖和化石能源减少等问题,生物乙醇的重要性已慢慢凸显出来。许多国家都在政策和经济上给予生物质生产生物乙醇了许多支持。全球生物乙醇市场已进入一个快速的、过渡的增长阶段<sup>[1,2]</sup>。多种不同的生物质,如农作物小麦、玉米、甘蔗等和一些农作物残留如小麦秸秆、玉米芯、甘蔗渣等都可以通过不同的生物转化工艺生产生物乙醇。粮食作物生产生物乙醇只在少数国家实现了工业化,像巴西主要使用甘蔗为原料生产生物乙醇,而美国则通过玉米发酵生产生物乙醇<sup>[3,4]</sup>。美国 2010 年的乙醇产量达到 128.2 亿加仑(48.52 万亿升)占到了世界生产量的 50%左右;2011 年乙醇的量已达到 139 亿加仑(52.61 万亿升)<sup>[3]</sup>。尽管以玉米和糖类为原料生产的生物乙醇是代替交通运输所用汽油的理想原料。但是,它们目前很难能替代全世界每年接近一万亿吨的石油消耗。而且,人们担心使用粮食作为生产生物乙醇的原料将会导致粮食危机。这些都使得科学家们更趋向于采用木质纤维素作为生产生物乙醇的主要原料。在过去几十年里,利用非粮食作物生产生物乙醇的工艺得到了迅速发展,使得未来大规模利用木质纤维素生产生物乙醇成为可能<sup>[5]</sup>。木质纤维素生物质每年可生产 4420 亿升的生物乙醇,如果将所有的农作物残留和浪费掉的农作物加起来,每年可生产生物乙醇 4910 亿升,是现在全世界生物乙醇生产的 16 倍左右<sup>[6,7]</sup>。稻秸是一种全世界最为丰富木质纤维素的废料之一,每年的产量达到 7.3 亿吨,完全转化后能够产生 2050 亿升乙醇<sup>[8]</sup>。木质纤维素的多年生作物(如灌木和不可食用的草本植物)也是获得高产率,低成本和低环境影响率生物乙醇极有潜力的原料。松树由于极高的结合糖含量,是一种生产生物乙醇最有潜力的原料。大多数生物质原料中的木质素都占到了 27%,但草本植物中木质素的量大大减少,相信经过处理后产生的抑制物更少<sup>[9]</sup>,也是一种理想的原料。

随着中国经济的迅速发展,中国已成为世界第二大能源消耗国。原油进口的严重依赖和以煤为主的能源结构,使我国面临极大的能源安全威胁和环境污染问题。中国政府已经意识到发展生物能源的重要性,对生物能源的研究给予了大力的支持。在近几十年里,我国的生物乙醇产业得到了迅速的发展。然而生物能源的生产成本很高,使得其经济可行性并不高。降低生产成本不仅要降低原料成本,增加转化效率和减少工厂和设备投入。更重要的是让生物乙醇的生产与农村经济的发展和增加就业岗位相结合<sup>[10,11]</sup>,走出一条特色的中国生物乙醇生产之路。

### 1.2 木质纤维素的组成及预处理方法的研究

所有的木质纤维素生物质都是由三种基本的聚合物组成:纤维素 $(C_6H_{10}O_5)_x$ ,半纤维素如木糖 $(C_5H_8O_4)_m$ ,木质素 $[C_9H_{10}O_3 \cdot (OCH_3)_{0.9-1.7}]_n$ <sup>[12,13]</sup>。纤维素纤维使木头更加坚硬,它占到木头干重的 40 - 50 wt%。纤维素是由  $\beta$ -D-葡萄糖单元通过  $\beta$ -1,4-糖苷键相连的

直链聚合物。第二种木头中的主要化合物是半纤维素，它主要是由多糖组成。它占到木头干重的 25 - 35%，软木中有占到了 28%，硬木中占到了 35%。半纤维素由葡萄糖，甘露糖，半乳糖，木糖，阿拉伯糖等多种单糖组成。木糖是大多数硬木中的主要戊糖衍生物，而阿拉伯糖是农作物残留和其他草本作物中戊糖的主要衍生物<sup>[14]</sup>。木质素是存在于特定的植物细胞壁中的高度分支，多取代，单核芳香族聚合物。木质素在各种软木和硬木中的含量从 20%-40%，在草本植物中含量在 10%到 40%之间<sup>[15]</sup>。这些成分中只有纤维素和半纤维素可以被转化为发酵可利用的糖类物质。想要将这些成分从木质纤维素中提取出来预处理成为必不可少的步骤，通过预处理可以降低木质纤维素的结晶度，增加生物原料的空隙，更有利于获得发酵可利用的成分。有效的预处理过程能提高酶解效率，减少糖类物质的损失和降低抑制物的形成。

目前，预处理方法有很多。针对不同的生物质原料，预处理方法也不同。主要包括以下几种方法：(1)物理法，如高温裂解法、微波处理法、粉碎减小生物质尺寸等；(2)化学法，如有机溶剂法、稀酸浸泡和碱溶液浸泡等；(3)物理化学法，如氨纤维爆破、蒸汽爆破、超临界处理技术等；(4)有机溶剂法，采用乙醇、甲醇、丙酮等有机溶剂溶解木质素；(5)生物预处理法，利用白腐真菌或其分泌的漆酶和过氧化物酶降解木质素<sup>[16]</sup>。下图 1.2 以小麦秸秆为例展示了木质纤维素生物质常用的一些预处理方法<sup>[17]</sup>。

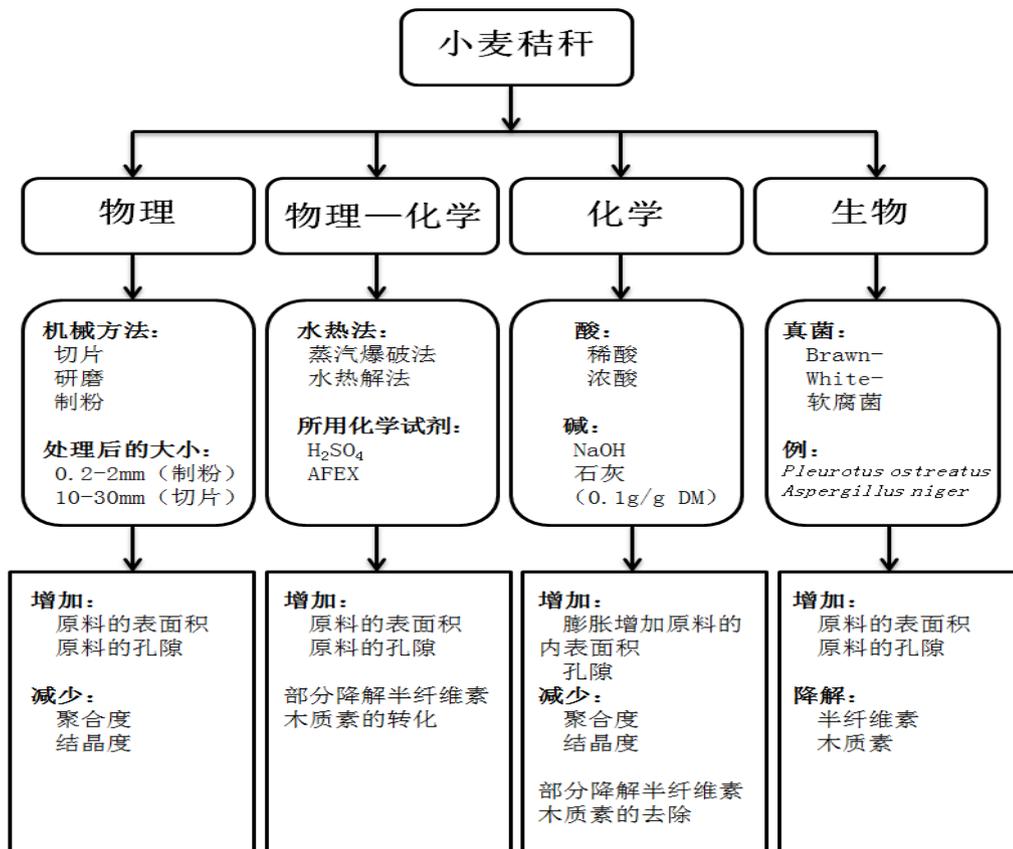


图 1.2 小麦秸秆预处理常用的方法<sup>[17]</sup>

Fig 1.2 The common pretreatment methods of wheat straw

高强度的机械、化学或物理化学的预处理步骤是打开木质纤维素超级结构，实现木

质纤维素中纤维素和半纤维素水解生产可发酵单糖的先决条件<sup>[18]</sup>。目前使用的所有的预处理方法,包括技术可行的蒸汽膨爆、稀酸、稀碱等方法,以及仍停留在实验室阶段的离子液体、微波等方法,几乎都不可避免地会使木质纤维素降解产生各种小分子化合物<sup>[19,20]</sup>。这些小分子化合物对后续发酵过程中的能源微生物的生长和代谢形成了强烈抑制,极大的限制了木质纤维素生产乙醇的进程。即使目前主流的酶水解技术,预处理形成的大量抑制物分子也对绝大多数能源微生物已达到致死剂量,常常使发酵难以正常进行<sup>[21]</sup>。

### 1.3 木质纤维素预处理过程中形成的抑制物

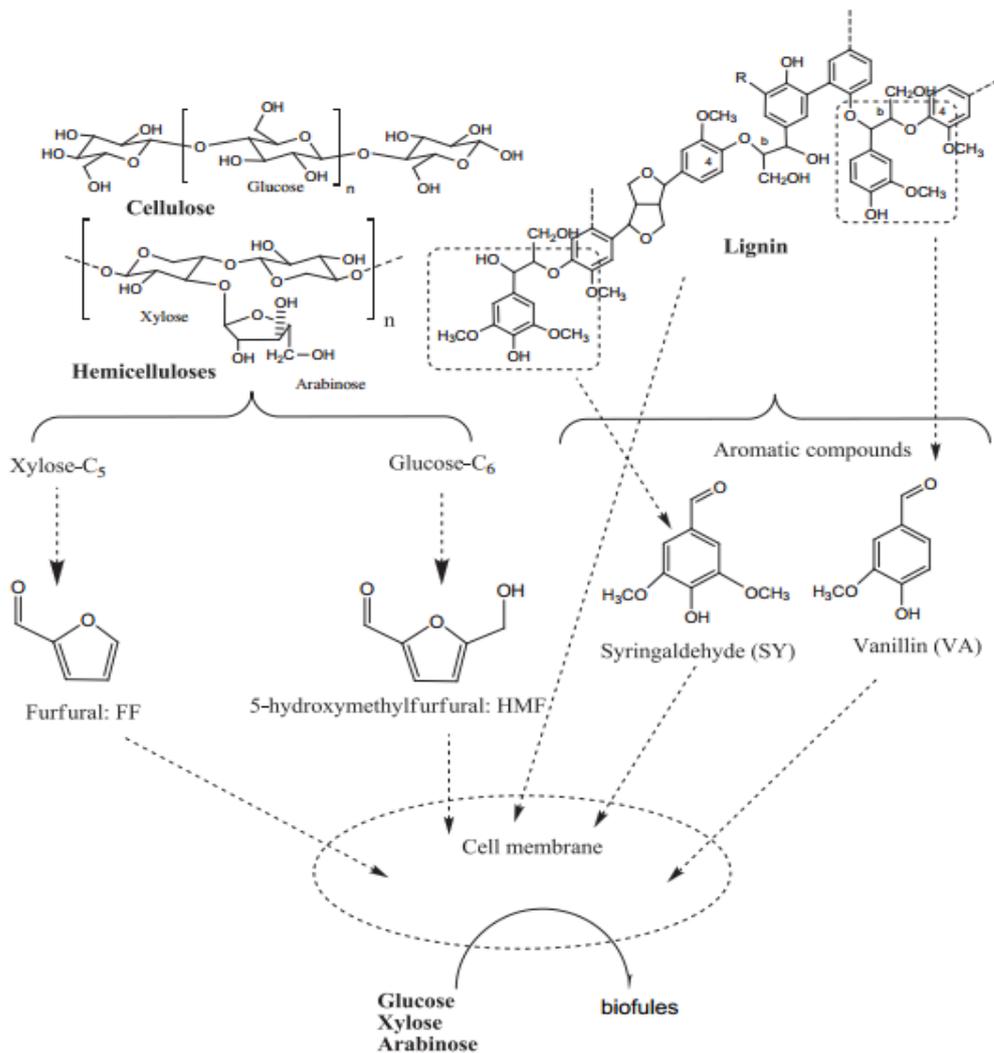


图1.3 木质纤维素的结构和它们经预处理后形成的对应的抑制物<sup>[22]</sup>

Fig 1.3 Structure of lignocellulose and the corresponding inhibitors obtained from pretreatment of lignocellulosic materials.

木质纤维素降解产生的芳烃类物质主要有呋喃类化合物(糠醛和5-HMF)及一些由木质素溶解,水解和氧化解离形成的芳香醛类化合物如图1.3所示<sup>[22]</sup>。木质纤维素预处理过程中副产物的形成与所用原料的种类和预处理的条件(温度,时间,压力,pH,氧

化还原条件和催化剂的添加) 都有很大的关系。在高温预处理条件下, 产生的可发酵碳水化合物和副产物的种类及浓度, 主要依赖于预处理的温度, 时间和 pH。在酸处理条件下, 木质纤维素中的部分成分会被降解为高浓度的糠醛(戊糖降解)和5-HMF(己糖降解)。乙酸由木质纤维素结构中半纤维素水解后产生。羟基羧酸类, 如羟基乙酸和乳酸主要来自一些碱性碳水化合物的降解。甲酸是由糖类和木质素降解产生, 而乙酰丙酸是由5-HMF的降解产生<sup>[22]</sup>。而存在于水解液中的酚类化合物的种类不仅和预处理条件有关, 与原料中羟基(H)、愈创木基(G)和丁香基(S)基团的含量也有极大的关系。表1.3.1给出了小麦秸秆预处理过程中常见的一些酚类化合物<sup>[19]</sup>。其中最常见酚类物质有香草醛, 松柏醛, 丁香醛和4-羟基苯甲醛。这些酚类物质根据它们甲基化程度和功能基团(醛, 酮, 酸和其他)的不同分为三类: 愈创木酚类(G族), 羟基类(H族), 丁香基类(S族)。软木材料处理后会生成G族物质, 而硬木和草本原料预处理后会生成H、G和S族的酚类抑制物<sup>[23]</sup>。硬木酸水解液中的H族酚类物质浓度比柳树水解液(其中苯二酚含量高)和杨树水解液中(其中4-羟基苯甲醛和4-羟基苯甲酸含量高)的高。白杨和柳树属于白杨属, 用蒸汽爆破法主产生的酚类抑制物会被预处理产生的4-羟基苯甲酸酯化。白杨的蒸汽爆破法或酸水解的云杉或碱性湿法氧化的小麦秸秆都会产生苯酚低聚物(多酚)。小麦秸秆水解液中苯酚单体的浓度比预期的低, 是由于小麦秸秆经过湿氧化法处理后的液体部分中的酚类物质进一步氧化成羧酸类。木质素中的紫丁香基单元比愈创木基单元对于湿水解更敏感。因此, 经预处理的桦木水解液中的丁香基酚比愈创木酚更多<sup>[19]</sup>。

降解产物功能基团的形成与预处理的方法有很大的关系, 例如, 氧化酸性条件下更容易形成芳香醛; 原料的酸水解会产生丙苯衍生物; 松, 橡树, 柳枝稷, 云杉的酸水解的半纤维素部分发现了二氢松柏醇。希伯特酮是丙酮衍生物, 它存在于酸性预处理后原料的水解液中。用烧碱法处理的小麦秸秆中的半纤维素和木质素转变为肉桂酸和阿魏酸。小麦秸秆的碱性湿法氧化也会产生肉桂酸衍生物, 但是由于共轭双键的氧化解离也会形成4-羟基苯甲酸和香草酸。柳树经蒸汽预处理后会生成低浓度的酚类二聚体, 而且在蒸汽预处理和酶水解的桦木水解液中, 这些酚类二聚体的量占到了总酚的61%<sup>[24]</sup>。表1.3.2给出了纤维素水解液中愈创木基(G), 羟基(H)和丁香基(S)衍生物单体和二聚体的分布。也对酚酮, 醛和其他酚类物质在总酚中的定量分布给出了相对百分比<sup>[19]</sup>。

表 1.3.1 小麦秸秆预处理后常见的芳香类抑制物<sup>[19]</sup>

Table 1.3.1 The aromatic inhibitors of wheat straw after pretreatment

羟基类 化合物 (H)	分 子 量	参考文献	愈创木基类 化合物 (G)	分 子 量	参考文献	丁香基 类化合 物 (S)	分 子 量	参考文献
苯酚	94	Clark et al. 1984; Klinke et al. 2002	愈创木酚	124	Buchert et al. 1990; Jönsson et al. 1998; Klinke et al. 2002	二甲氧 基苯酚	154	Buchert et al.1990; Klinke et al. 2002
4-羟基 苯甲醛	122	Ando et al. 1986; Buchert et al. 1990; Jönsson et al. 1998; Klinke et al. 2002; Barquinero et al. 1980	香草醛	152	Ando et al. 1986; Buchert et al.1990; Clark et al.1984; Jönsson et al. 1998; Klinke et al. 2002	丁香醛	182	Buchert et al. 1990; Larsson et al. 1999b; Tran et al.1985;
4-羟基 苯甲醇	124	NA	香草醇	156	Tran and Chambers 1986;	丁香醇	184	NA
4-羟基 苯甲酸	138	Ando et al. 1986; Jönsson et al. 1998; Klinke et al. 2002.	香草酸	168	Ando et al. 1986; Klinke et al.2002; Tran et al.1985	丁香酸	198	Ando et al. 1986; Buchert et al. 1990; Jönsson et al. 1998; Klinke et al. 2002;
对羟基 苯乙酮	136	Buchert et al. 1990; Klinke et al. 2002	松柏醛	178	Buchert et al. 1990; Clark et al. 1984; Larsson et al.1999b;	乙酰丁 香酮	196	Klinke et al. 2002; Tran et al.1985; Fenske et al.1999
肉桂酸	164	Ando et al. 1986; Klinke et al. 2002; Barquinero et al.1980;	阿魏酸	194	Klinke et al. 2002	芥子醇	210	Buchert et al. 1990; Tran et al.1985.

表 1.3.2. 在纤维素水解液中愈创木基 (G), 羟基 (H) 和丁香基 (S) 衍生物单体和二聚体的分布。酚酮, 醛和其他酚类物质在总酚中的相对百分比<sup>[19]</sup>。

Table 1.3.2. The distribution of monomeric and dimeric phenols in guaiacyl (G), hydroxyl (H) and syringyl (S) derivatives in hemicellulose hydrolysates. The relative percentages of total phenols quantified of phenol ketones, aldehydes, acids and other phenols.

原料	H (%)	G (%)	S (%)	酮类 <sup>a</sup> (%)	醛类 (%)	酸类 (%)	其他 <sup>b</sup> (%)	总量 (g/l)/(%DM)	预处理方法	参考文献
<b>软木</b>										
云杉(挪威云杉)	3	97	0	33(32)	33	9	26	0.46/NA	Acid steaming	Larsson et al. 1999b
松树(辐射松)	29	51	0	0	17	0 <sup>c</sup>	83(3)	2.56/NA	Acid (SO <sub>2</sub> ) steaming	Clark and Mackie 1984
<b>硬木</b>										
柳树(黄花柳)	29	51	0	0	17	0 <sup>c</sup>	83(3)	2.56/NA	Acid (SO <sub>2</sub> ) steaming	Jönsson et al. 1998
北美鹅掌楸(杨树属)	4	32	63	72	21	4 <sup>d</sup>	2	0.25/0.25	Acid steaming	Fenske et al. 1998
杨树(杨树属)	67	5	27	0	25	75	0	1.35/NA	STEX	Ando et al. 1986
桦木(桦木属)	1	14	24	3(2)	23	3	71(61)	0.29/NA	Steaming & enzymehydrolysis	Buchert et al. 1998
红橡木(南美红栎)	0	27	73	24(18)	40	16	20	1.13/0.39	Acid hydrolysis	Tran and Chambers 1986
<b>草本原料</b>										
小麦秸秆(小麦)	18	49	33	20	29	45	7	0.27/0.48	Alkaline WO	Klinke et al. 2002
小麦秸秆(小麦)	32	64	3	0	1	99	0	0.10/0.40	Soda pulping	Lawther et al. 1996b
甘蔗渣	39	18	43	0	10	90	0	1.06/NA	Soda pulping	Barquerino et al. 1980
柳枝稷	5	68	27	69	12	5 <sup>d</sup>	14	0.14/0.14	Acid steaming	Fenske et al. 1998
玉米秸	10	44	46	60(56)	30	10 <sup>d</sup>	0	0.11/0.11	Acid steaming	Fenske et al. 1998

DM 最初干重, STEX 蒸汽爆破法, WO 湿法氧化, NA 不可用的. (a) 希伯特酮的比例如括号中表示. (b) 酚类和酚醇等. 总酚中的比例在括号中给出. (c) 表示未被定量. (d) 芳香酸含量可能更高, 中性 pH 值有利于它们的提取。

## 1.4 抑制物的抑制作用及机理

### 1.4.1 呋喃醛的抑制作用及机制

预处理过程中由糖类脱水会产生大量的呋喃类抑制物。木质纤维素水解液中的呋喃类物质主要有糠醛和 5-HMF, 它们浓度都在 0-5.0 g/L, 进一步降解会产生乙酰丙酸和甲酸。糠醛和 5-HMF 也是水解液中对后续发酵菌株抑制作用最大的物质。因此, 了解这些抑制物对遗传和代谢的作用机制, 对于提高生产乙醇菌株的耐受性十分重要。一般醛

类物质都是高活性分子，容易形成活性氧（ROS）。呋喃醛也不例外，它们能引起线粒体内的 ROS 浓度升高，从而导致 DNA 突变、蛋白质的错误折叠和破碎、膜的破坏和细胞凋亡<sup>[25]</sup>。

糠醛是木质纤维素水解液中最主要的一种抑制物。它不仅毒性强，而且能同时与水解液中其它抑制物一起对发酵微生物产生协同抑制作用。因此，对发酵菌株有很强的抑制作用。糠醛具有很强的疏水性，疏水性是有机化合物毒性的一个标记，高的疏水性破坏膜的完整性。将大肠杆菌放在含有糠醛的培养基中可以明显地观察到细胞膜被破坏，细胞内的一些位点也有可能被糠醛破坏，它对细菌和酵母显示细胞毒性特点。糠醛也是一种膳食诱变剂，研究者们一直在研究它能否引起DNA突变。一系列的实验发现糠醛能与DNA分子发生反应，在试管中用糠醛处理双链DNA会导致含有两个到三个腺嘌呤或胸腺嘧啶的单链DNA破坏。研究还发现用高浓度或低浓度的糠醛处理质粒观察到质粒有插入，复制或缺失的现象，说明糠醛对微生物的DNA也有极强的破坏作用<sup>[25, 26]</sup>。

糠醛对微生物生长的影响比对乙醇生产的影响更大，它能够关闭细胞复制，使细胞停止增殖。研究发现糠醛对树干毕赤酵母和酿酒酵母的生长都有抑制作用，在某种程度上增加接种量能够降低糠醛的这种影响。不同浓度的糠醛对微生物的影响也不同，当糠醛浓度在0.5 g/L时，对毕赤酵母的生长基本没有影响，而浓度达到2.0 g/L时则表现出较强的毒性。Delgenes et al. 发现糠醛浓度在0.5, 1.0和 2.0 g/L时，会使树干毕赤酵母的生长率分别降低25%, 47%和 99 %<sup>[27]</sup>。Nigam也发现当糠醛浓度在0.25 g/L时，对微生物的生长基本没有抑制。当浓度达到1.5 g/L时，会对乙醇的得率和生产力产生抑制作用，使它们分别下降90.4 %和 85.1 %。糠醛和5-HMF与乙酸协同作用时，会严重影响树干毕赤酵母，管囊酵母和大肠杆菌的生长<sup>[28]</sup>。提高微生物的适应能力是一种抵抗高浓度糠醛的有效方法，在这个过程中会形成新的酶和辅酶帮助糠醛的降解。

5-HMF对发酵微生物的毒性也很强，会使膜的通透性变低。5-HMF的副作用在1938年就有报道，Mashevitskaya和Plevako发现5-HMF阻碍微生物*Monilia murmanica*的生长<sup>[29]</sup>。之后又有研究发现5-HMF会抑制单细胞蛋白生产菌株的性能。5-HMF对酿酒酵母的影响之前也有报道，当5-HMF的浓度在1.0-5.0 g/L时，会影响细胞的生长率，发酵效率和细胞的结构。研究发现5-HMF的毒性通常小于糠醛，Sanchez and Bautista发现5-HMF在2.0 g/L时只延长了细胞生长的延滞期，对微生物并没有产生很强的抑制作用。几项研究表明这可能是由于5-HMF被酵母转化，Tokarev and Sharkov报道在酵母培养基中5-HMF的浓度有70%的减小，Sanchez and Bautista 报道季也蒙假丝酵母也能将5-HMF同化。也有一些关于酿酒酵母转化5-HMF路径的报道，Nemirovskii et al. 报道了假丝酵母能将5-HMF转化为5-羟甲基糠醇和5-羟甲基糠酸。这些转化都有助于降低5-HMF的毒性<sup>[30]</sup>。

#### 1.4.2 有机酸类物质的抑制作用及机制

木质纤维素生物质预处理产生的有机酸类衍生物能抑制后续糖化过程中发酵菌株的生长和代谢，它会使生物能源发酵的产率，效价和生产率下降。在预处理过程中会产

生各种各样的有机酸：乙酸是由半纤维素的主要成分乙酰木聚糖的水解产生，其它的酸（甲酸，乙酰丙酸等）是由糖的降解产生<sup>[31]</sup>。

研究发现水解液中乙酸的浓度很高。乙酸的浓度与所处理的木质纤维素的种类和预处理的条件都有关系。水解液中乙酸浓度通常在 1.0 g/L 到 10.0 g/L。尽管甲酸在水解液中浓度低于乙酸，但它对大肠杆菌的抑制作用大于乙酸。水解液中其它弱酸的浓度都非常低，关于它们的文献报道也非常少<sup>[32-34]</sup>。乙酸主要抑制细胞量，并不抑制发酵本身。未解离的乙酸分子透过细胞膜进入细胞内，立刻解离成阴离子和质子。这些解偶联组分破坏细胞的 pH 浓度梯度，而且当这些解偶联产生的质子穿过细胞膜时并不能产生 ATP，积累在细胞内的阴离子也会影响细胞的膨压<sup>[35]</sup>。弱酸也会使胞内的一些氨基酸的量下降。将大肠杆菌培养在弱酸培养基中，可明显发现谷氨酸和天冬氨酸的浓度下降。而谷氨酸是生长过程中一种重要的抗渗透物。当将细菌培养在弱酸培养基中也发现赖氨酸、精氨酸、谷氨酸和蛋氨酸的浓度也相应降低。将蛋氨酸添加在培养基中能部分减少乙酸的毒性<sup>[36]</sup>。

细胞外的 pH 对于弱酸的毒性也有很大的影响。将 *E. coli* K011 培养在含有 5.0 g/L 的乙酸 LB 培养基中，当培养基的最初 pH 为 7.0 时产生的乙醇浓度是 pH 为 6.0 的两倍，是 pH 为 5.5 的三倍。当 *E. coli* LY01 生长在最初 pH 为 6.0 的乙酸，或甲酸，或乙酰丙酸的培养基中相比于空白对照，其生长率分别下降了 0%，35%和 10%（IC<sub>50</sub>，为自然 pH 条件下测得的值）。其中甲酸由于高的渗透性可能对微生物毒性最强<sup>[37]</sup>。

乙酸是预处理水解液中含量最高的有机酸，它在大肠杆菌中研究较多。众所周知乙酸是一种由于“溢出代谢”而产生的自然发酵产品，它会抑制细胞生长。在基本培养基中当乙酸浓度达到 0.5 g/L 时，就会使细胞生长下降 50%。但是，在大肠杆菌 K011 的发酵中，乙酸浓度达到 12.0 g/L 时，对乙醇的得率也并没有太大的影响。一些研究者试图用数学模型来描述微生物生长与乙酸之间的关系，得出了多种结论。Koh et al. 针对分批反应中特殊的生长率（ $\mu$ ）提出以下方程<sup>[38]</sup>：

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = \frac{1}{1+k \cdot [\text{Ac}]}$$

k，为不变值，其范围在依据菌株和培养基的不同在 0.125 g/L 到 0.366 g/L 之间。Luli 和 Strohl 给出了一个指数衰减模型<sup>[39]</sup>：

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} = e^{-k[\text{Ac}]}$$

不变值 k 为 0.6 g/L 乙酸，在摇瓶和发酵罐上 Nakano et al. 报道了一个线性趋势，在摇瓶中的特殊生长率比发酵罐中任意给定乙酸浓度低四倍左右，这可能是由于发酵罐中溶氧控制较好的缘故。根据不同菌株和培养基，IC<sub>50</sub> 的值在乙酸抑制生长 50%时，其范围在 2.75 g/L 到 8 g/L。

甲酸和乙酰丙酸对于微生物合成大分子物质和生长的抑制作用已被证实，它使得 DNA 等大分子合成速率变慢。在固定相中进行测试时发现 DNA 修复缺陷型菌株对弱酸非

常敏感。但是缺陷型菌株在生长阶段对有机酸并没有表现出过度敏感。加上并没有 SOS 反应,说明这些弱酸对 DNA 并没有产生破坏作用。由弱的有机酸引起的细胞内含物质的泄漏远比不上抗生素(多粘菌素 B)甚至乙醇对细胞膜引起的泄漏。弱酸会减少细胞内的氨基酸的量,许多不同氨基酸的前体,如谷氨酸和天冬氨酸的浓度在存在弱酸的大肠杆菌中都会很低。谷氨酸作为一种保护渗透物对于细胞的生长非常重要,当把微生物接种在含稀酸的培养基中,细胞内的赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和蛋氨酸浓度会降低。添加蛋氨酸混合物会降低稀酸对微生物的毒性<sup>[38, 39]</sup>。

#### 1.4.3 芳香醛的抑制作用及机制

木质素占到各种原料水解后的 30%。在预处理过程中木质素转化为芳香类物质,它们中多数都含有羧基、甲酰或羟基功能团。在预处理过程中也产生了酮类物质,由于其浓度非常低( $<0.05\%$ )且能被多种脱毒处理降解完全,所以通常不作为主要抑制物考虑<sup>[40]</sup>。多数木质素及其衍生物都不能被降解,鹅掌楸经预处理后最多只有 15%的木质素转化为可溶性组分。芳香单体包括酸,醇,醛在稀酸处理后浓度在 0-3.0 g/L。木质素经预处理后产生的多种衍生物还需要进一步分析,用大肠杆菌对其进行研究获得的信息还比较有限。因此,应该采用比较普遍的方法对其进行研究。

现有的实验表明在拥有相同的功能团时,芳香类物质的毒性比脂肪族和咪唑类化合物都要高。木质素衍生物的毒性与它的分子量成反比。分子量小的芳香类物质比分子量大的芳香类物质对微生物更加致命。这些化合物破坏细胞膜,破坏细胞的选择性和酶的分布,同时也会影响细胞生长和葡萄糖同化。在大肠杆菌 MC1022 的实验中发现香草醛能够抑制细菌生长及膜的活性,同时破坏  $K^+$  的浓度梯度, Terada 也观察到弱酸芳香类物质通过将质子转移回线粒体改变电化学梯度。之后, Klinke et al. 研究了芳香类和弱酸对微生物的影响机理。芳香类化合物的存在即使是极低浓度 (0.1 g/L), 对于微生物也是致命的。Klinke et al. 还发现 4-羟基苯甲醛, 香草醛, 4-羟基苯乙酮和香草乙酮能使酵母的乙醇生产能力下降 37 - 53%<sup>[24]</sup>。0.1 g/L 的芳香类物质就可以导致假丝酵母不能生长和将木糖转化为葡萄糖。检测芳香类物质对多种微生物(休哈塔假丝酵母, 树干毕赤酵母, 酿酒酵母和运动假单胞菌)糖的利用率的影响,发现香草醛 (1.0 g/L) 对木糖和己糖发酵酵母的生长和乙醇的利用率都有很强的抑制效果,运动发酵单胞菌对 4-羟基苯甲醛 (0.5 g/L) 最为敏感, Tran et al. 证明  $C_6 - C_9$  有机酸对毕赤酵母的抑制效果是  $C_9$  壬酸  $> C_8$  辛酸  $> C_6$  己酸, 芳族类物质是香草醛  $>$  丁香醛, 香草酸  $>$  丁香酸<sup>[41]</sup>。

实验表明除氢醌外的醇类物质会导致膜的破坏,芳香酸能造成细胞膜的部分泄漏,而芳香醛对细胞膜的作用不明显。用香草醛处理细胞后有 29% 的细胞膜遭到破坏,但隔夜放置后 13% 的细胞膜得到修复<sup>[42]</sup>。此外,这项研究还表明在这个过程中 ATP 的产生并没有受到大的影响。之前的报道表明膜的破坏对抑制物毒性作用贡献并不大。下图为各抑制物的作用机制<sup>[43]</sup>。

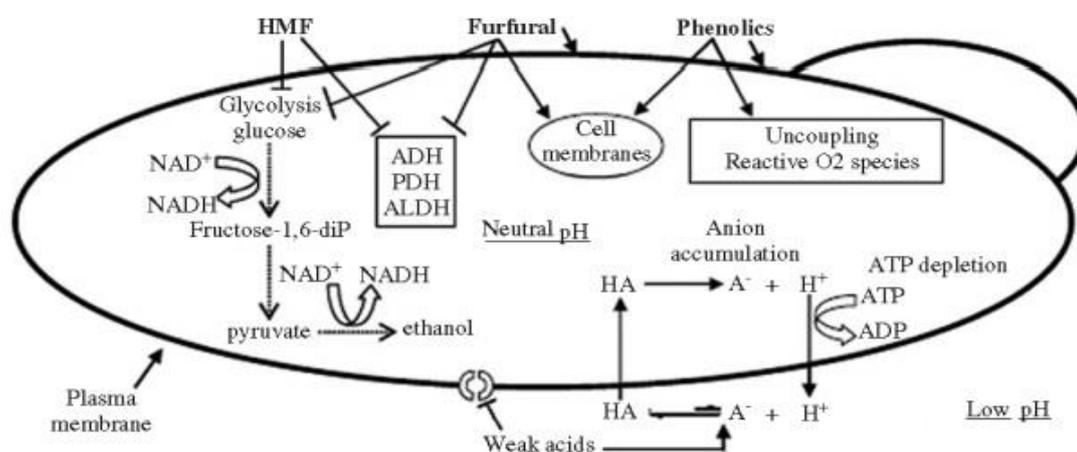
图 1.4 各抑制物的作用机制<sup>[43]</sup>

Fig. 1.4 The inhibition mechanism of the inhibitors

### 1.5 现有的脱毒方法

由于存在着多种抑制物，与没有进行脱毒的水解液相比，经过脱毒的水解液具有更高的乙醇得率和生产能力。因此，脱毒过程是调节木质纤维素原料，使它更利于发酵的重要步骤。Taherzadeh et al. 通过多种方法来确定木质纤维素水解液中的抑制物，并试图将抑制物的毒性降低到最低。研究发现主要有四种缩小抑制物毒性的方法：（1）在水解的过程中避免抑制物的产生；（2）在发酵前对水解液进行脱毒；（3）开发能够抵抗抑制物的微生物菌株；（4）将抑制物转化为不干扰微生物生长的产品。许多作者也报道了一些能够耐受高浓度抑制物和将抑制物降解的新型基因工程菌株，然而这些化合物对于这些菌株的抑制作用还很难确定。物理，化学和生物方法被用来将这些抑制物转化为低毒性物质和降低它们的浓度。每种脱毒方法的效果都取决于木质纤维素的类型和所用的发酵菌种。因为不同的木质纤维素水解液所含的抑制物的量不同，不同的菌株对于抑制物的抵抗能力也不相同。在使用一种脱毒方法之前，必须充分考虑水解液的组分<sup>[30]</sup>。

对预处理过程中产生的抑制物进行脱除的方法主要包括物理脱毒法，如水洗、闪蒸和蒸发；化学脱毒法，如有机溶剂萃取法，离子交换吸附、过碱化调节、活性炭吸附；生物脱毒法，如漆酶脱毒法，生物降解法等<sup>[44, 45]</sup>。但是，这些物理和化学的脱毒方法往往伴随着大量水资源的浪费和废水排放，以及纤维素固体颗粒和可发酵性糖分的损失<sup>[46]</sup>。例如超施石灰脱毒法，就有文献报道它的成本占到乙醇生产成本的 22%。这种方法的使用会导致单糖的大量损耗，降低后期乙醇得率<sup>[47]</sup>。使用离子交换法也会使糖损失 26% 左右<sup>[40]</sup>。近几年来，一种新颖的利用具有特殊降解功能的微生物来脱除抑制物的“生物脱毒”法引起了人们的高度重视。这一方法条件温和、抑制物转化彻底、耗能低、废水少，脱毒后的物料不经灭菌即可直接进入发酵。但生物脱毒周期较长<sup>[48]</sup>，高效脱毒菌株的选择特别重要。

### 1.5.1 物理脱毒法

要想减少存在于水解液中可挥发性化合物如乙酸,糠醛和香草酸的浓度,通过真空蒸发水解产物是一种有效的物理脱毒方法。然而,这种方法也会使不挥发性抑制物(提取物和木质素衍生物)的浓度增加,因而增加对后续发酵菌株的抑制。Parajo et al.用这种方法处理木头水解液,发现提取物和木质素衍生物的浓度都有明显增加。真空蒸发后水解液的体积减少了1/3,酵母的发酵必须时间(消耗90%木糖的时间)也从24h增加到94 h。Larsson et al.发现想要去除木头半纤维素水解液中全部的糠醛,需要通过真空蒸发减少水解液90%的体积,而5-HMF的浓度只减小了4%。Silva et al.以真空蒸发法处理的秸秆水解液(含木糖90 g/L)为微生物生产木糖醇的原料,发现其中不挥发的物质对微生物的毒性很强,极大地阻碍了木糖的转化<sup>[49]</sup>。Converti et al.也发现真空蒸发法能很有效的移除半纤维素水解液中的乙酸,糠醛和其他挥发性的物质,极大提高木糖醇的生产效率。Rodrigues et al.用真空蒸发法处理用活性炭处理前或后的甘蔗渣水解液,结果显示98%的糠醛被移除,但由于乙酸以游离态存在于水解液中,因此,只有部分被移除<sup>[50]</sup>。

### 1.5.2 化学脱毒法

化学预处理方法包括有毒抑制物的沉淀和在一定pH条件下的离子化以降低抑制物的毒性。早在1945年,Leonard和Hajny就报道可以用Ca(OH)<sub>2</sub>增加木质纤维素水解液pH到9.0-10.0的碱处理法来降解水解液中的抑制物。Ca(OH)<sub>2</sub>调节水解液的pH后由于使水解液中的一些有毒化合物沉淀,发酵效果会比用NaOH调节pH的水解液更好。与此结果相同,采用Ca(OH)<sub>2</sub>将云杉水解液的pH调节到5.5的原料,乙醇得率和生产率高于用NaOH调节pH的云杉水解液。而Van et al.报道先用Ca(OH)<sub>2</sub>调节甘蔗渣水解液的pH,之后再NaOH调节得到的发酵结果会比单独只用一种碱液调节pH的发酵结果好,因为它能使更多的有毒化合物沉淀。用Ca(OH)<sub>2</sub>将pH调节到10,再用H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>调节到6.5,能去除蔗糖半纤维素水解液中的部分酚类和其他化合物,提高木糖醇得率到0.48 g/L。Nilvebrant用NaOH和Ca(OH)<sub>2</sub>将云杉水解液的pH调节为10,使希伯特酮的浓度降低了22%,使得糠醛和5-HMF的浓度降低了20%。然而,乙酸的浓度并未受到影响。Martinez et al.报道用Ca(OH)<sub>2</sub>将蔗糖渣的pH调节为9.0,能够有效的减小抑制物的影响<sup>[50,51]</sup>。

### 1.5.3 生物脱毒法

生物脱毒是指用特定的酶和微生物对木质纤维素水解液中有毒物质进行脱除的方法。变色栓菌的漆酶和其他氧化还原酶都可以用于木质纤维素水解液的脱毒,从而提高葡萄糖的消耗和乙醇的得率,这些酶对于抑制物的脱毒机理可能是由于低分子量酚类聚合物的氧化。很多种生物方法都被用来降解木质纤维素中的脂肪酸,呋喃醛和芳香醛类物质。在进行发酵前采用能降解这些抑制物的酶类,如漆酶或能降解这些抑制物的自然菌株或经过基因改造的菌株对原料进行脱毒,能够有效提高发酵菌株的性能。酵母菌和

其他一些微生物都存在着降解这些抑制物的能力,通过驯化和基因工程可以提高这些菌株的降解能力<sup>[52]</sup>。

**微生物脱毒:**包括酵母,真菌和细菌在内的多种微生物本身就具有脱除抑制物的能力。它们已经被用在酵母发酵生产乙醇前的脱毒中,表 1. 5. 3 给出了一些用于酸预处理的木质纤维素水解液的脱毒菌株<sup>[58]</sup>。Okuda et al. 研究了一种可以对建房废木 (WHW) 水解液进行脱毒的耐辐射嗜热菌,发现乙醇生产效率明显比用氢氧化钙处理的高很多。液相分析确定糠醛, 5-HMF 和酚类化合物都存在于 WHW 水解液中。研究还发现这种菌株生长迅速,对抑制物有较强的脱除作用,而且仅消耗了 5%的发酵糖类。Nichols et al. 分离得到一株白腐真菌,木生锥毛壳菌 NRRL 30616 能代谢玉米秸秆水解液中的糠醛, 5-HMF, 芳香族和脂肪族的酸, 醛。在最近的研究中, López et al. 分离到一些在基础培养基中能够以阿魏酸, 糠醛和 5-HMF 的混合物为碳源和能源的微生物。主要有五种: 外链甲基杆菌, 假单胞菌, 金黄杆菌, 不动杆菌, 金黄节杆菌和一种真菌 *C. ligniaria* C8 NRRL30616。然而其中只有 *C. ligniaria* C8 NRRL30616 能有效的降解玉米秸秆水解液中的糠醛和 5-HMF<sup>[52, 53]</sup>。

据报道丝状真菌中的里氏木霉和一些酿酒酵母,都能够有效地降解木质纤维素水解液中的呋喃类抑制物。对于水解液中的乙酸和苯甲酸及其衍生物都能有效地移除。经过里氏木霉处理后发酵菌株的乙醇生产能力提高了3倍,乙醇得率提高了4倍左右。然而这类微生物生长率很低,且会消耗水解液中的糖类物质。像在Larsson et al. 的研究中发现,用里氏木霉对稀酸预处理后的云杉水解液进行脱毒效果比离子交换,碱性石灰法和漆酶处理法都好。然而,这种微生物却导致水解液中35%的发酵糖类被消耗<sup>[54]</sup>。关于利用不同的酿酒酵母菌株脱毒的报道也有许多。Schneider et al. 成功筛选出了只降解亚硫酸制浆废液中乙酸,而不利用D-木糖、D-葡萄糖、D-甘露糖和D-果糖的突变酵母菌株。这株突变酵母菌能利用木质纤维素水解液进行发酵,在24 h左右木质纤维素水解液中的乙酸就降低到不再抑制乙醇生产的浓度。Talebnia et al. 在稀释率为0.5每小时的连续培养中,采用固定酿酒酵母原位脱毒法对云杉的木质纤维素水解液进行脱毒,并成功的进行了乙醇的生产。水解液的毒性非常强,悬浮的酵母只有在稀释率为0.1每小时时才能发酵,而细胞损失达到了75%。胶囊保护细胞不受水解液中抑制物的影响,增加了菌体原位脱毒的能力。胶囊酵母细胞乙醇的生产率在0.44 g/g,水解液中的5-HMF转化率在48%-71%。在稀释率为0.1-0.2每小时和部分稀释率较高的情况下,水解液中的糠醛能够被全部降解。糠醛和5-HMF能被降解为相应的醇类物质,胶囊能降低细胞失活率和降低生产成本<sup>[55]</sup>。

多种其他的细菌和酵母也具有部分转化糠醛为糠醇或糠酸的能力,像毕赤酵母 *Aspergillus ascendens*和突变的大肠杆菌 NAR30均能在有氧的条件下将糠醛降解。Boopathy et al. 报道糠醛脱磷孤菌能在无氧条件下将糠醛转化为甲烷或乙酸/CO<sub>2</sub>或乙酸/CO<sub>2</sub>和甲烷。糠醛脱磷孤菌是从含有高浓度糠醛的厌氧池中分离得到,它能在只含有糠醛或糠醇或糠酸的基础培养基中培养,利用糠醛或糠醇或糠酸为唯一碳源和能源生长。

除此之外,乙醇生产菌株大肠杆菌 K011和大肠杆菌 LY01, 和产酸克雷伯菌P2菌株均能将糠醛完全转化为糠醇。这些菌株利用糠醛还原酶将糠醛转化为低毒性的糠醇, 预示着这些酶类对于降低糠醛的毒性起着非常重要的作用<sup>[21]</sup>。

**酶脱毒:**另一种有效的生物脱毒方法是酶脱毒法, 它有很多优势: 首先, 相比于微生物脱毒酶脱毒受温度影响更小, 即使在对微生物生长极为不利的高温下也可以达到有效脱毒。其次, 粗酶或纯酶的催化效率相比于微生物催化要高出好几倍; 最后, 酶脱毒需要的条件温和 (pH 5, 常温), 单位成本比其他脱毒方法更低。但是酶脱毒也有一些缺点: 第一, 脱毒时间长; 第二, 酶的生产成本高。虽然采用了各种现代生物技术进行改造, 但商业用酶成本依然很高。除了利用一些植物生产脱毒酶类外, 一些真菌 (特别是担子类的白腐真菌) 也常用来生产脱毒的酶类, 如漆酶和氧化物酶。漆酶是一种结合多个铜离子的蛋白质, 属于铜蓝氧化酶, 能氧化酚类和芳香胺类, 将分子氧变成水。对于木质纤维素的生物脱毒, Jonsson et al. 报道利用从变色栓菌 (白腐真菌担子属) 中提取的漆酶和木质素过氧化物酶, 能将用蒸汽和SO<sub>2</sub>预处理过的柳树半纤维素水解液中的许多种酚类物质降解, 并使之后的乙醇生产效率提高2-3倍。漆酶处理具有选择性, 几乎能够完全移除单体酚类物质和酚酸。在280nm处存在着吸收峰, 说明芳香类脂肪酸的存在, 它们的量并没有减少。然而, 在所有波长范围内都可以检测到大尺寸物质吸收峰的增加和小尺寸物质吸收峰的减少。因此, 推测脱毒可能是将低分子量的多聚物氧化<sup>[44]</sup>。

据报道用变色栓菌氧化酶/漆酶处理稀酸云杉水解液是移除酚类最有效的方法。通过漆酶对甘蔗渣水解液进行脱毒提高了休哈塔假丝酵母 NCIM 3501 的乙醇生产率。用漆酶处理后的乙醇生产率比采用离子交换法及活性炭吸附脱毒都要高。甘蔗渣的稀酸水解液用漆酶处理后减少了 77.5%的酚类物质, 但对于呋喃类和乙酸的浓度并没有影响。脱毒的各种方法检测发现漆酶脱毒法能减少稀酸水解液中的 4-羟苯乙酮, 4-羟基苯甲酸, 香草酸, 肉桂酸, 丁香酸和阿魏酸, 但也会使总糖浓度减少。

**基因及代谢工程菌脱毒:**一些基因工程酵母比野生菌株具有更强的抑制物耐受性, 如过度表达抵抗特定抑制物的酶和转换辅因子的基因。基因工程菌能够对水解液进行不同程度的脱毒和战胜发酵期间抑制物的抑制作用。酿酒酵母对 5-HMF 的脱除依赖于 NADPH 和 NADH, 它们在细胞中的量与菌株的活性有关。同时, 有研究表明酿酒酵母对于抑制物的耐受性与磷酸戊糖途径的 ZWF1, GND1, RPE1 和 TKL1 基因有关。通过使酵母中的还原酶和脱氢酶, 磷酸戊糖途径基因的过量表达来减少酸性木质纤维素中抑制物的基因工程手段已经用在酵母的改造上。通过使同源和异源的还原酶和脱氢酶编码基因过量表达来提高酵母对木质纤维素水解液的耐受性, 达到了抵抗特定的一些抑制物的效果<sup>[21]</sup>。表 1.5.4 给出了一些经过基因工程手段使脱毒性能提高的菌株<sup>[21]</sup>。

漆酶和多功能酶由于对多种底物的特异性作用, 并能够以分子氧取代 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为最终的电子受体已经受到关注。漆酶对于木质纤维素水解液的脱毒展示在表 1.5.5 中<sup>[56]</sup>。

表 1.5.3 用于酸预处理的木质纤维素水解液的脱毒菌株<sup>[56]</sup>

Table 1.5.3 Summary of biodegradation microorganisms of acid pretreated lignocellulose hydrolysates

水解产物	脱毒微生物	脱毒条件	脱毒效果	参考文献
建房废木	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	50° C, 24 h	降解了水解液中的酚类, 糠醛和 HMF 提高了乙醇生产效率	Okuda <i>et al.</i> , 2008 Naoyuki <i>et al.</i> , 2008
玉米秸秆	<i>Coniochaeta ligniaria</i> C8	30° C, 24 h	移除了呋喃类, 酚类, 芳香酸和脂肪酸; 提高了木糖的利用率	Nichols <i>et al.</i> , 2008
柳树	<i>Trichoderma reesei</i>	-	移除了乙酸, 糠醛和苯甲酸衍生物	Palmqvist <i>et al.</i> , 1997
玉米秸秆	<i>Coniochaeta ligniaria</i> C8	30° C, 5 days	有效的移除了糠醛和 HMF	Lopez <i>et al.</i> , 2004
云杉	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 NRRL11460		有效的移除了糠醛和 HMF	Larsson <i>et al.</i> , 1999
亚硫酸制浆废液	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutant		选择性的降解乙酸	Schneider, 1996
云杉	Encapsulated <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and furfural		HMF 的有效降解	Talebna and Taherzadeh, 2006

表 1.5.4 改变目标基因以提高菌的性能<sup>[21]</sup>

Table 1.5.4 Targeted genetic engineering for strain improvement.

基因-酶	菌	鉴定	实验条件	菌株的提高	文献
ADH6	酿酒酵母	微阵列分 析	基础培养基的分批 厌氧/有氧培养, 以 1.5 g/l	HMF 的摄取率提高了 4 倍  HMF 的摄取率提高了 4 倍 和乙醇的生产率提高了 20%	Petersson et al., 2006  Almeida et al., 2008a
MUT-ADH1	酿酒酵母  TMB3000 菌株	蛋白纯化, MS, 基因分 离	添加 20mM 的 5-HMF, 基础培养基半通氧 云杉水解液的分批 发酵	延滞期缩短和 5-HMF 转 化率提高 2 倍  HMF 的摄取率提高了 4 倍 和乙醇的生产率提高了 18%	Laadan et al., 2008  Almeida et al., 2008a
ADH7	酿酒酵母	微阵列分 析	生长在最小培养基 中添加 40mM 的 5-HMF	在 94h 后结束延滞期, 空 白实验在 156 h 时菌体也 没有生长迹象	Larroy, 2002;  Liu et al., 2008;  Petersson et al., 2006
XYL1	树干毕赤酵母	蛋白纯化	生长在最小培养基 中	细胞内的 5-HMF 浓度升 高	Almeida et al., 2008b
ZWF1	酿酒酵母	一个酿酒 酵母基因 干扰库的 筛选	生长在 SD 培养基中 补充 50mM 的糠醛	在对于空白菌株致死剂 量的糠醛浓度下, 菌株依 然能够生长	Gorsich et al., 2006
FFR	大肠杆菌 LY01	蛋白纯化	数据不能使用		Gutiérrez et al., 2006

ADH6, 醇脱氢酶 6; ADH7, 醇脱氢酶 7; 5-HMF, 5-羟甲基糠醛; FFR, 糠醛还原酶; MUT-ADH1, 突变醇脱氢酶 1; SD, 合成培养基; XYL1, 木糖还原酶; ZWF1, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶

表 1.5.5 用酶对稀酸水解液进行脱毒的总结<sup>[56]</sup>

Table 1.5.5 Summary of biot detoxification of acid pretreated lignocellulose hydrolysates using enzymes.

水解液	酶	作用	文献
柳树	来自变色栓菌的漆酶	选择性的降解酚类单体物质, 增加乙醇生产率。	Jonsson et al., 1998
云杉	来自变色栓菌的漆酶	特异性的降解酚类物质, 增加乙醇得率。	Larsson et al., 1999
甘蔗渣	来自粪生黑蛋巢菌的漆酶	选择性的移除酚类物质, 总糖损失可以忽略不计, 增加乙醇得率。	Chandel et al., 2007
甘蔗渣	来自多色革盖菌属 (栓菌属) 的漆酶	移除 80% 的酚类物质, 增加乙醇得率。	Martin et al., 2002

Martin et al. 利用基因工程菌（木糖利用酵母）对漆酶和超施石灰法处理的蔗糖渣酶水解液进行发酵，比较水解液的组成和发酵性能。他们发现通过漆酶处理后有 80% 的酚类物质被特异性的移除。而超施石灰法只移除了乙酸，糠醛和 5-HMF，及部分酚类物质。脱毒处理对糖浓度的影响很小，两种处理方法都能提高乙醇的得率和生产率。这些结果表明对水解液的脱毒对于提高微生物的发酵性能非常重要。想要使漆酶成功应用到脱毒过程中，就需要大幅度的降低漆酶的生产成本。大量不同的酵母菌株已通过工程的手段改造生产大量低成本的漆酶。在白腐菌中漆酶的异源生产使得漆酶可以分泌到胞外，战胜了工业上利用原始菌株生产漆酶经常遇到的问题<sup>[44]</sup>。

生物脱毒法中的微生物脱毒是一种非常有潜力的木质纤维素水解液脱毒方法，虽然目前还存在着如脱毒菌株脱毒时间长，效率低，只针对单一或几种抑制物有效，脱毒菌株会消耗掉培养基中大量的糖类物质，降低生物乙醇得率等问题。但随着新型优良脱毒菌株的不断发现，基因工程技术的不断提高，相信这些问题在不久的将来都会迎刃而解。

## 1.6 脱毒菌株代谢抑制物路径的研究

### 1.6.1 呋喃醛类抑制物的代谢路径研究

1964 年，Kakinuma 和 Yamatodani 第一次分离出了能降解呋喃类化合物的微生物，证明了微生物降解呋喃类化合物的可能性。之后许多研究者又发现了大量的能以呋喃类化合物为碳源的微生物，其中的几种微生物能将糠酸转化成谷氨酸<sup>[57]</sup>。自从 Kakinuma 和 Yamatodani 的报道后，几十种可降解呋喃类物质的微生物已被证实，如表 1.6.1 所示<sup>[57]</sup>。

表 1.6.1 降解呋喃类抑制物菌种的概述<sup>[57]</sup>

Table 1.6.1 An overview of degradation strains of furan

Strain	Year	Substrate	Order <sup>a</sup>	Reference
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	2010	Furfural and HMF	F Leotiomycetes incertae sedis	Zhang et al. (2010)
<i>Cupriavidus basilensis</i> HMF14	2010	Furfural and HMF	- Burkholderiales	Wierckx et al. (2010)
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	2010	Furfural and HMF	+ Actinomycetales	Wierckx et al. (2010)
<i>Telluria mixta</i>	2010	Furfural and HMF	- Burkholderiales	Wierckx et al. (2010)
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	2010	Furfural and HMF	- Burkholderiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Burkholderial phymatum</i> STM815	2010	Furfural and HMF	- Burkholderiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	2010	Furfural and HMF	- Rhizobiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	2010	Furfural	- Rhizobiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM2831	2010	Furfural and HMF	- Rhizobiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	2010	Furfural	- Rhodobacterales	Koopman et al. (2010b)
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	2010	Furfural	- Burkholderiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	2010	Furfural	- Burkholderiales	Koopman et al. (2010b)
<i>Ralstonia eutropha</i>	2008	Furfural	- Burkholderiales	Yu and Stahl (2008)
<i>Pseudomonas putida</i>	2008	Furfural	- Pseudomonales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Serratia plymouthica</i>	2008	Furfural	- Enterobacteriales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	2008	Furfural	- Rhizobiales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	2008	Furfural	- Rhizobiales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Leifsonia xyli</i> ssp. <i>xyli</i>	2008	Furfural	+ Actinomycetales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Agromyces aurantiacus</i>	2008	Furfural	+ Actinomycetales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Coniochaeta ligniaria</i>	2008	Furfural	F Coniochaetales	Trifonova et al. (2008a)
<i>Coniochaeta ligniaria</i> c8	2004	Furfural and HMF	F Coniochaetales	Lopez et al. (2004)
<i>Methylobacterium extorquens</i>	2004	Furfural and HMF <sup>b</sup>	- Rhizobiales	Lopez et al. (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp.	2004	HMF <sup>a</sup>	- Pseudomonadales	Lopez et al. (2004)
Acinetobacter-like	2004	Furfural <sup>a</sup>	- Pseudomonadales	Lopez et al. (2004)
<i>Flavobacterium indologenes</i>	2004	Furfural and HMF <sup>b</sup>	- Flavobacteriales	Lopez et al. (2004)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2004	Furfural and HMF <sup>b</sup>	- Xanthomonadales	Lopez et al. (2004)
<i>Desulfovibrio</i> sp.	1991	Furfural <sup>c</sup>	- Desulfovibrionales	Boopathy and Daniels (1991)
<i>Pseudomonas putida</i> Fu-1	1989	Furfural	- Pseudomonadales	Koenig and Andreesen (1989)
<i>Escherichia coli</i> K-12 NAR30, NAR40	1986	2-Furoic acid	- Enterobacteriales	Abdulrashid and Clark (1987)
<i>Desulfovibrio</i> sp. strain f-1	1983	Furfural <sup>c</sup>	- Desulfovibrionales	Brune et al. (1983)
<i>Pseudomonas putida</i> F2	1969	2-Furoic acid	- Pseudomonadales	Trudgill (1969)
<i>Pseudomonas</i> sp. 5863	1964	2-Furoic acid	- Pseudomonadales	Kakinuma and Yamatodani (1964)

大多数降解呋喃类衍生物的菌,都可以采用以糠醛和 5-HMF 为唯一碳源的方法富集,而且大多属于需氧型革兰氏阴性菌,是一个相对小数量的属。这也预示着呋喃醛的分解代谢只能在少数微生物中发现。然而,也注意到最近发现的这些菌种降解呋喃类物质的酶与 *Cupriavidus basilensis* HMF14 编码降解呋喃类物质酶的基因具有同源性。1969 年, Trudgill 用 *Pseudomonas putida* F2 第一次对生物化学方法氧化糠醛进行报道。这条代谢路径之后被 Koopman et al. 证实和修正。在这条“Trudgill 代谢路径中”,糠醛首先被醛脱氢酶氧化成糠酸。随后糠酸又通过糠酰辅酶 A 复合体结合到辅酶 A 上,之后糠酰辅酶 A 在 C<sub>5</sub> 位点上被糠酰辅酶 A 脱氢酶羟基化。得到有酯环结构的烯醇辅酶 A 与其酮式结构相互转化。这个酯环由于水解作用(自然或酶催化)打开,之后其它烯醇式互变异构形成 2-氧化戊二醛辅酶 A。它又通过水解作用释放 2-氧化戊二酸,其可直接进入三羧酸循环<sup>[57]</sup>。

应该注意到糠醛和 5-羟甲基糠醛的降解路径其实就是糠酸和 5-羟甲基-2-糠酸的降解路径。酶的鉴定发现在呋喃醛代谢过程中醛脱氢酶并没有特异性,尽管 5-HMF 降解路

径中的氧化还原酶都能氧化糠醛和 5-HMF 中的醇和醛的结构。上游降解路径的酶包含呋喃醛和醇的氧化的酶，可能是一种通用的，广泛的特异性脱氢酶，可以保护细胞免受醛类的毒害。最近的研究以证实，*C. basilensis* HMF14 能利用“Trudgill 代谢路径”代谢糠酸。此外，我们也能在基因水平上了解这条代谢路径的全貌。如图 1.6.1 所示<sup>[16]</sup>。

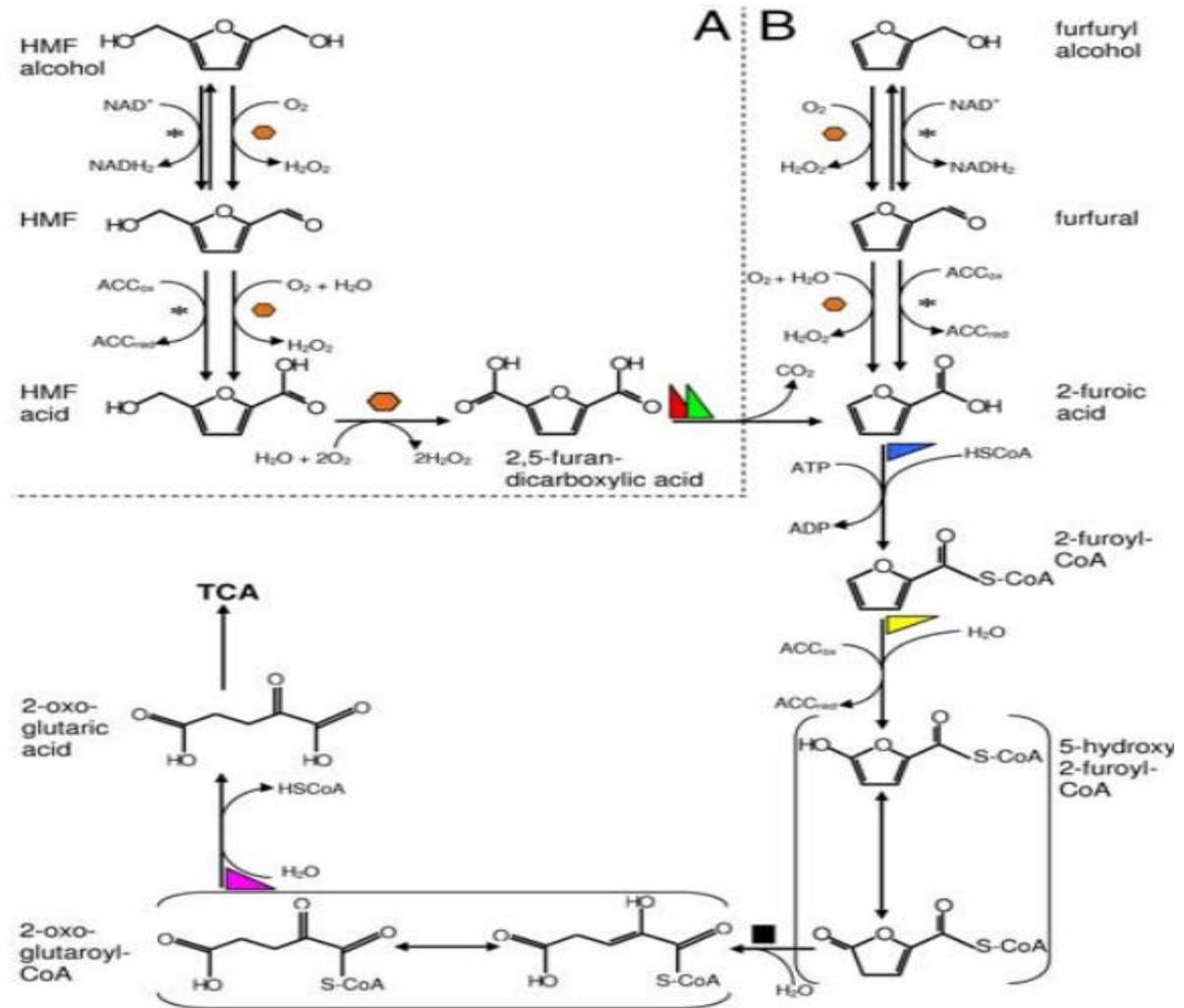


图 1.6.1 *Cupriavidus basilensis* HMF14 中糠醛和 5-羟甲基糠醛的代谢路径。着色符号代表酶：橙色六边形，糠醛/5-羟甲基糠醛氧化还原酶；红色和绿色三角形，2,5-二羧酸呋喃脱羧酶；蓝色三角形，2-呋喃酰基辅酶 A 合成酶；黄色三角形，呋喃酰基脱氢酶；紫色三角形，酮戊二酰基辅酶 A 水解酶；黑色正方形，该步骤可能出现了一个自发的酯水解反应，又有可能是由一个普遍的内酯酶催化；\*，该反应既可以被 hmfH (由 hmfh 编码的特异性氧化还原酶) 也可以被非特异性的脱氢酶催化；ACC，受体，其被氧化表示为下标 (ox)，而被还原则表示为下标 (red)<sup>[16]</sup>。

Fig 1.6.1 The metabolic pathway of HMF (A) and furfural (B) by *C. basilensis* HMF14. Colored hexamers and triangles indicate enzymes with the following activities: orange hexagon, furfural/HMF oxidoreductase; red and green triangles, 2,5-furan-dicarboxylic acid decarboxylase; blue triangle, 2-furoyl-CoA synthetase; yellow triangle, furoyl-CoA dehydrogenase; purple triangle, 2-oxoglutaryl-CoA hydrolase. black square, indicates a lactone hydrolysis that may occur spontaneously, or may be catalyzed by a generic lactone hydrolase. Double-pointed arrows indicate keto-enol tautomerizations. Reactions marked with (\*) can be catalyzed either by hmfH or by (probably nonspecific) dehydrogenases. ACC; acceptor, which is oxidized (ox) or reduced (red) .

### 1.6.2 芳香醛类物质的代谢路径研究

与呋喃醛类物质相似，芳香醛类物质对生物量，比生长率的影响比乙醇产率高。低分子量的芳香醛类物质与高分子量的芳香醛类物质相比对酿酒酵母的毒性更高。取代基的位置与化合物的毒性也有很大的相关性。芳香醛类物质中的芳香醛，酚酮，酚酸的疏水性不同，疏水性也能影响酿酒酵母乙醇产率。在酿酒酵母和大肠杆菌的实验中发现，醛和酮类芳香类物质比酸类芳香类物质毒性更强，醇类芳香类物质毒性最弱<sup>[58]</sup>。

关于芳香醛类物质的代谢路径，在一些微生物中已有报道。1983 年，Pometto 和 Crawford 研究发现香草醛可在香草醛脱氢酶的作用下降解成香草酸。香草酸又在加氧酶的作用下分解成 3, 4-龙胆酸和甲醛，然后再进一步代谢。4-羟基苯甲醛经 4-羟基苯甲醛脱氢酶转化为 4-羟苯酸酯<sup>[59]</sup>。在研究吉利蒙念球菌时发现，丁香醛则转化为丁香酸和丁香醇类物质。4-羟苯乙酮能在 4-羟苯乙酮加氧酶的作用下变成乙酰氧基苯酚，乙酰氧基苯酚则在芳香酯酶的作用下转化成苯二酚及乙酸<sup>[60]</sup>。苯二酚则在酚二加氧酶的作用下转变成 1, 2, 4-苯三酚。4-羟基苯甲酸既可以在 4-羟基苯甲酸羟化酶的作用下转变成苯二酚，又可以在 4-羟基苯甲酸加氧酶的作用下转变成 3, 4-龙胆酸<sup>[61]</sup>。各种芳香醛类物质在不同的微生物中的代谢路径也不相同，不同的培养条件下的转化路径也不相同，还需进一步的研究。

### 1.6.3 有机酸类抑制物的代谢路径研究

由于有机酸的结构较为简单，所以关于它的代谢路径的报道并不是很多。一般认为甲酸和乙酸直接进入细胞，与乙酰辅酶 A 结合转变成相应的甲酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A，之后进入代谢循环路径，成为碳水化合物和脂肪新陈代谢的中心。有文献报道乙酰丙酸先与乙酰辅酶 A 结合转变成乙酰丙酸辅酶 A，在被裂解成甲酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A，再进入 TCA 代谢循环<sup>[37]</sup>。

## 1.7 树脂枝孢霉 *Amorphotheca resiniae* ZN1 的研究

“煤油真菌”广泛存在于航空燃油中，由于它们的存在可能会导致燃油系统故障而受到重视。*Amorphotheca resiniae* 类煤油真菌是最早在航空煤油中发现并分离得到，它可利用的碳源种类十分广泛。可采用不同的碳源对其进行培养，在实验中发现煤油真菌的最适碳源排序为：木糖>麦芽糖>纤维二糖>甘露糖>半乳糖>葡萄糖，其中大部分组分是木质纤维素中半纤维素的成分。煤油真菌可优先利用木糖，而木糖在高温高压处理的过程中，有少量转化成了糠醛，因此煤油真菌也许会优先利用糠醛，再利用木糖和葡萄糖<sup>[62]</sup>。该结论也为煤油真菌的生物脱毒过程提供了线索。

Lee 等在研究四种不同来源的煤油真菌时，发现树枝枝孢霉菌在添加了正己烷到正十八烷等烷烃的 Bushnell and Haas 营养盐(含 1%葡萄糖)中，无法利用正己烷、正庚烷和正辛烷，但是可以代谢壬烷到十八烷中的烷烃。短链烷烃对于该菌种的孢子发芽有抑制作用，而长链烷烃可以促进其生长，但其实烷烃链的长短和其生长状况并没有多大的

联系<sup>[63]</sup>。在随后的研究中, The 发现短链脂肪酸对于树枝枝孢霉菌的生长有抑制作用。可能是由于短链脂肪酸会使树枝枝孢霉菌细胞内的大量钾离子外流、蛋白泄露和内源呼吸被抑制, 造成其生长严重受抑制<sup>[64]</sup>。

Walker 等研究了树脂枝孢霉 *Amorphotheca resiniae* 代谢正构烷烃的方式。下图为该实验组得出的烷烃代谢途径<sup>[65]</sup>:

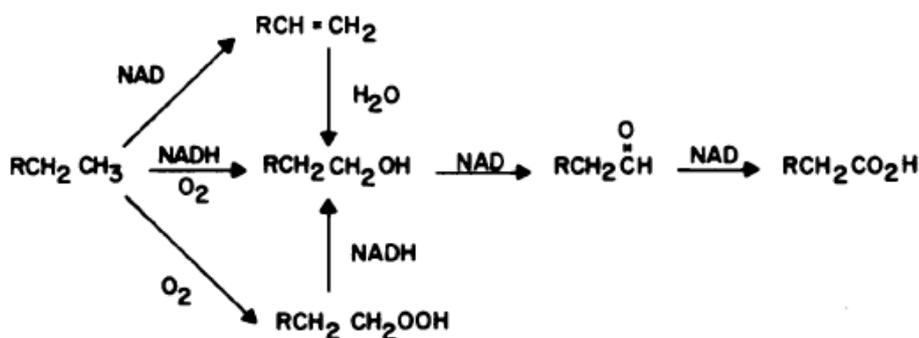


图 1.7 煤油真菌代谢烷烃的路径<sup>[65]</sup>

Fig 1.7 The pathways of alkane by Kerosene Fungus

## 1.8 选题依据及研究现状

近年来关于生物脱毒菌株代谢呋喃醛类抑制物的研究较多, Nichols et al. 分离到一株白腐真菌, *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616, 它能够将糠醛转化为糠醇和糠酸<sup>[66]</sup>。Taherzadeh et al. 研究酿酒酵母 CBS 8066 时, 发现它能够将 5-HMF 转化为一种未知化合物  $C_4H_9O-CO-COH (COOH) -CH_3$ , 之后再将其转变为 5-羟甲基糠醇<sup>[30]</sup>。Liu et al. 通过进化工程重新设定酿酒酵母 NRRL Y-50049 的表达程序, 加强了 Y-50049 的基因背景和使 Y-50049 能维持自身更好氧化还原平衡, 使得 Y-50049 能够忍受和降解高浓度的糠醛和 5-HMF。同时发现 Y-50049 能将糠醛和 5-HMF 分别降解为糠醇和 5-羟甲基糠醇<sup>[67]</sup>。Koopman et al. 采用基因工程的手段通过改造恶臭假单胞菌 S12 将高浓度 (6.3 g/L) 的 5-HMF 快速转化为 FDCA, 但这种转化只能在营养丰富, 抑制物单一的合成培养基中进行<sup>[68]</sup>。

本实验室在前期工作中从预处理后玉米秸秆物料中筛选到了一株树脂枝孢菌 *A. resiniae* ZN1, 它能够快速降解多种呋喃醛、芳香醛和有机酸类物质及它们的衍生物<sup>[16, 62, 69]</sup>。并且已经在以玉米秸秆为起始原料的乙醇、乳酸和油脂发酵过程中得到了有效应用, 以其零废水排放、近似零能耗和零纤维素损失显示了实现彻底微生物脱毒的强大潜力。*A. resiniae* 又称为 *Cladosporium resiniae*, 是一类存在于航空煤油输送管线中的较为罕见的煤油真菌 (kerosene fungus), 对其特性的了解仅限于上世纪 70 年代的基础微生物学研究<sup>[62]</sup>。因此, 从实验角度揭示和阐明 *A. resiniae* ZN1 降解各种抑制物的代谢路径, 是进一步提高菌种脱毒效率和菌种改造的重要基础和前提条件。

本文选取了在水解液中含有较高, 对乙醇生产菌株有强力抑制作用的两类典型抑制

物呋喃醛（糠醛和 5-HMF）和芳香醛（香草醛、松柏醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛）进行 *A. resinae* ZN1 降解路径的研究。通过改变实验条件，检测积累代谢产物的方法来研究其代谢路径：（1）分别在有氧和无氧条件下以选取的抑制物为唯一碳源，以研究氧气对于抑制物降解路径的重要影响及 *A. resinae* ZN1 利用抑制物的情况；（2）无氧和有氧条件下以葡萄糖为碳源，研究氧气对 *A. resinae* ZN1 降解抑制物的代谢路径及生长的影响。同时通过与（1）中抑制物的降解情况对比，研究葡萄糖对抑制物降解的影响；（3）通过加大通气量分别考察了以抑制物为唯一碳源和以葡萄糖为碳源的情况下，研究溶氧大小对 *A. resinae* ZN1 降解抑制物效率的影响。通过这些条件的变化，以期从实验角度充分了解 *A. resinae* ZN1 的代谢路径，以及为之后进一步的提高脱毒效率，挖掘 *A. resinae* ZN1 中的有用基因提供信息。

## 第 2 章 材料和方法

### 2.1 菌株、试剂与仪器设备

#### 2.1.1 菌种

本研究中所用的脱毒菌株树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 为本实验室筛选获得, 保存于中国普通微生物保存中心, 编号为 CGMCC 7452。该菌的分子生物学和微生物学鉴定见文献<sup>[20]</sup>。

#### 2.1.2 实验试剂及仪器

在本实验中用到的试剂见表 2.1, 仪器见表 2.1.1。

#### 2.1.3 种子培养基和发酵培养基

*A. resinae* ZN1 用 PDA 试管斜面进行保存和传代。PDA 培养基的制作: 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水 1000 mL。煮沸 1 h, 之后用 8 层纱布过滤, 保留滤液。将滤液补水至 1 L, 并添加葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 分装入试管中, 给每个试管加上胶塞。115 °C 灭菌 20 min, 将灭菌后的试管倾斜放在超净工作台上, 打开紫外灯, 待斜面完全凝固后放入 4 °C 冰箱保存备用。

实验中用到的培养基有种子培养基, 发酵培养基和无机盐培养基。种子培养基, 用于斜面种子的活化和培养, 为发酵实验提供活力较强的菌种; 发酵培养基, 用于以葡萄糖为碳源的发酵实验, 以研究葡萄糖对 *A. resinae* ZN1 降解抑制物的影响; 无机盐培养基, 用于以抑制物为唯一碳源时的发酵实验。

种子培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L, Yeast Extract 1.0 g/L, Glucose 20.0 g/L。

发酵培养基, 呋喃醛类 (糠醛和 5-HMF) 的发酵培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L, Yeast Extract 1.0 g/L, Glucose 20.0 g/L。灭菌后加入过滤除菌的糠醛 (约 1.0 g/L) 或 5-HMF (约 1.0 g/L)。芳香醛类 (香草醛、松柏醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛) 的发酵培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L, Yeast Extract 1.0 g/L, Glucose 5.0 g/L。

无机盐培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L。

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
糠酸	CP	上海金山亭新化工试剂有限公司
糠醇	CP	国药试剂
5-羟甲基糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠醇	AR	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠酸	AR	百灵威
松柏醛	AR	Sigma 公司
松柏醇	AR	阿法莎(天津)化学公司
阿魏酸	AR	阿拉丁
香草醛	AR	阿拉丁
香草酸	AR	生工生物
原儿茶酸	AR	百灵威
丁香醛	BP	生工生物
丁香醇	AR	阿法莎(天津)化学公司
丁香酸	BP	生工生物
4-羟基苯甲醛	CP	生工生物
4-羟基苯甲醇	AR	阿达玛斯试剂
4-羟基苯甲酸	AR	阿拉丁
硅烷化试剂	HPLC 级	上海安谱科学仪器有限公司
磷酸二氢钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
七水硫酸镁	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
无水氯化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
酵母粉	BR	安琪酵母股份有限公司
琼脂粉	AR	中国惠心生化试剂有限公司
滤纸	AR	杭州特种纸业有限公司
乙腈	HPLC 级	星可化工有限公司
氢氧化钠	AR	上海振兴化工厂
盐酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司

表 2.1.1 实验设备

Table 2.1.1 Experiment equipments

仪器名称	规格	生产厂家
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海-恒科学仪器有限公司
电子天平	BS423S	梅特勒-托利多国际贸易有限公司
电子天平	BS224S	梅特勒-托利多国际贸易有限公司
自动高温灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
全自动高温高压灭菌锅	TOMY-SX-700	天美科技有限公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	Millipore 公司
超声波清洗机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
高效液相色谱	LC-20AT	岛津
生物传感分析仪	SBA-40D	山东省科学院生物研究所
洁净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏净化
Eppendorf 台式离心机	5415R	Eppendorf
Eppendorf 台式离心机	5418	Eppendor
储水式电热水器	ESH-50MS	松下
pH 计	PHS-3C	上海精密仪器科学有限公司
荣事达冰箱	BCD-191CR	合肥荣事达电冰箱有限公司
冰箱	SC-329GA	海尔公司
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo 公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备有限公司
循环水真空泵	SHZ-DIII	上海大研仪器有限公司
低温冷却循环泵	DLSB	上海鹰迪仪器设备有限公司
显微镜	XSP-8C	上海精密仪器仪表有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
GC-MS	Agilent 6890	安捷伦科技有限公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 菌种保藏

在培养了 4 天的 PDA 斜面中加入 2 ml 脱脂牛奶，制成均匀的浓菌液。将菌液分装入灭菌后的安瓿管中，每瓶 0.3 ml。之后放入超低温冰箱（-80 °C）中冷冻 24 小时，取出安瓿管放入真空冷冻干燥箱中，冷冻干燥 6 小时。后抽真空封口，保藏于 4°C 冰箱中备用。

### 2.2.2 种子活化

从 4 °C 的冰箱中取一支 *A. resinae* ZN1 的冻存管，用无菌水使冻存管中的孢子充分悬浮。取 0.1ml 孢子悬浮液加入 PDA 平板中，用涂布棒使孢子充分分布在平板上。将 PDA 平板置于 28 °C 恒温培养箱中培养 4 天，培养得到第一代种子。将第一代种子转接入相同的 PDA 平板上，转接培养两次，得到第三代种子。将第三代种子接入 PDA 斜面中，

培养得到活化后的菌种。将种子斜面保藏在 4 °C 冰箱中备用。

### 2.2.3 发酵种子的培养

发酵种子-1 (含葡萄糖的发酵实验): (1). 取种子斜面 2 支, 每支加入 10 mL 无菌去离子水洗孢子, 用力摇晃种子斜面, 使更多的孢子悬浮于去离子水中; (2). 洗下的孢子悬浮液加入到 200 mL 灭菌后的发酵培养基中, 将发酵培养基放入 28 °C 恒温箱中培养两天得到发酵种子。

发酵种子-2 (抑制物为唯一碳源的发酵实验): (1). 取种子斜面 2 支, 每支加入 10 mL 无菌去离子水洗孢子, 用力摇晃种子斜面, 使更多的孢子悬浮于去离子水中; (2). 洗下的孢子悬浮液加入到 200 mL 灭菌后的发酵培养基中, 将发酵培养基放入 28 °C 恒温箱中培养四天; (3). 四天后合成培养基中菌膜已达到一定的厚度, 用药勺取出菌膜, 依次放入两瓶盛有 250 mL 的无菌去离子水的三角瓶中清洗两次, 以去掉残留在菌膜上的葡萄糖; (4). 清洗后将菌膜取出放入 200 mL 无机盐培养基中, 用药勺将菌膜充分搅碎, 制成以抑制物为唯一碳源的发酵种子。

### 2.2.4 呋喃醛类物质的上罐实验

呋喃醛类物质 (糠醛和 5-HMF) 的代谢实验在 3 L 发酵罐 (保兴生物科技有限公司, 上海, 中国) 中进行, 初始培养基装液量为 1 L, 接种量 20% (v/v), 发酵温度 28 °C, 转速 100 rpm。有氧实验通过调节通气量来控制不同的溶氧水平。进行厌氧发酵时, 在接种前以 0.3 L/min 的速率向发酵罐中通氮气 30 min, 以排除培养基中和罐内的氧气。接种后再继续通入氮气 10 min, 以去除加入的种子培养基所带入的氧气。每次取样过程中均通 10 min 氮气, 以保证罐内的无氧环境。在发酵过程中, 用 2 mol/L 的 HCl 和 NaOH 维持发酵体系的 PH 在 5.5, 并每隔 8 h 取样, 取样后保存在 4 °C 冰箱, 以备后续的分析。

### 2.2.5 芳香醛类物质的 GC-MS 样品准备

对于非挥发性和热不稳定的物质, 采用甲基硅烷化是做 GC 的理想方法。与最初化合物相比三甲基硅烷衍生物更稳定, 极性更低, 耐热性能更好。在甲基硅烷化的过程中, 初始化合物中-OH, -COOH, -NH, -NH<sub>2</sub> 或-SH 中的活性氢被三甲基硅烷基取代。芳香醛类物质大多都对热不稳定, 在做 GC 前需要进行硅烷化。*A. resinae* ZN1 降解芳香醛类物质的代谢产物 GC-MS 样品的准备: 样品分为对照样品即 *A. resinae* ZN1 降解芳香醛类物质 0 小时的样品; 实验组样品即 *A. resinae* ZN1 降解芳香醛类抑制物 32 小时后的样品。准备两个装有 20 mL 无机盐培养基的 100 mL 三角瓶, 使用发酵种子-2, 将种子用两层纱布过滤。向每瓶培养基中加入少量的芳香醛类抑制物, 用超声震荡使抑制物完全溶解于培养基中, 再向每瓶培养基中加入 4 mL 种子液。取其中一瓶用滤纸过滤除去菌体, 作为 0 小时的对照样品。将另一瓶放入 28 °C 恒温培养箱中静置培养 32 h 后, 采用同样的方法过滤除菌。从两瓶过滤除菌后的样品中, 分别取出 10 mL 加入悬蒸瓶中,

60 °C 旋转蒸发器中悬蒸 1 h 得到抑制物及其产物的结晶。向两瓶晶体中加入 5 ml 的乙腈，使抑制物溶解。再加入 2 g 的无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ，用药匙充分搅拌以除去残留在晶体中的水分。从每瓶样品中分别取 3 ml，13200 r/min 离心 5 min。取 2 ml 上清液加入圆底试管中，在向每瓶中加入 1 ml 的硅烷化试剂。充分混合后，放入 80 °C 的油浴中反应 1 h 后，作为 GC-MS 检测样品。

### 2.2.6 芳香醛类物质的发酵实验

芳香醛类物质的有氧实验：在 100 ml 三角瓶中进行，准备 40 个 100 ml 的三角瓶，灭菌备用。将培养好的发酵种子-1 或发酵种子-2 用力摇晃，使菌种尽量均匀。用两层纱布将种子液过滤，除去大的菌膜和菌丝，之后分装在两个三角瓶中，每瓶 100 ml。一瓶用于称量种子液的重量的，通过真空泵用滤纸（已烘干称重）过滤得到菌体，将滤纸放入 80 °C 的烘箱中烘干，8 h 后称量滤纸和菌体的质量。与此同时与发酵种子对应的准备 1 L 有糖或无糖培养基，灭菌后加入芳香醛类抑制物（香草醛 0.4 g，松柏醛 0.4 g，4-羟基苯甲醛 0.4 g，丁香醛 0.4 g）。将另一瓶 100 ml 的菌种加入培养基中，充分混合后快速分装入 40 个小三角瓶中，每瓶装液量在 20 ml。每隔 8 h 取两瓶，进行取样，取样后样品保藏于 -20 °C 冰箱中。剩余发酵液，通过真空抽滤烘干测菌体干重。芳香醛类物质有氧有糖实验操作过程如图 2.2 所示。

芳香醛类物质的厌氧实验：在厌氧瓶中进行，其他操作步骤均与有氧实验相同，不同的是分装完培养基后，每瓶发酵液通入氮气（0.3 L/min）两分钟，以排除培养基和瓶中的氧气。之后放置于 28 °C 恒温培养箱中静置培养，并每隔 8 h 取样，取样后保存在 -20 °C 冰箱，以备后续的分析。

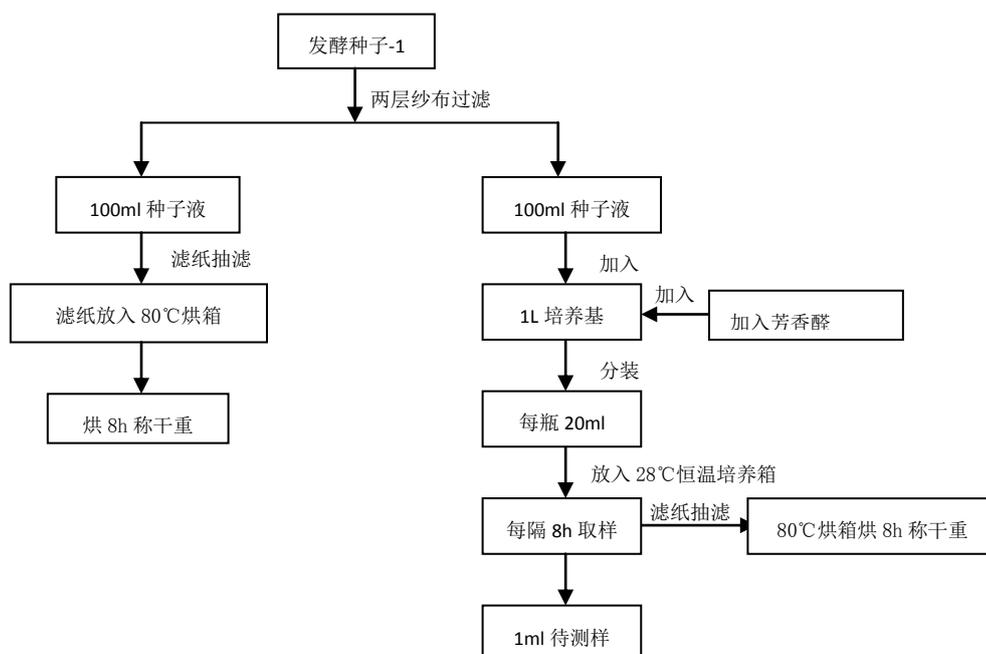


图 2.2 芳香醛类物质有氧实验操作过程图

Fig. 2.2 The experimental process of aromatic compounds

### 2.3 分析方法

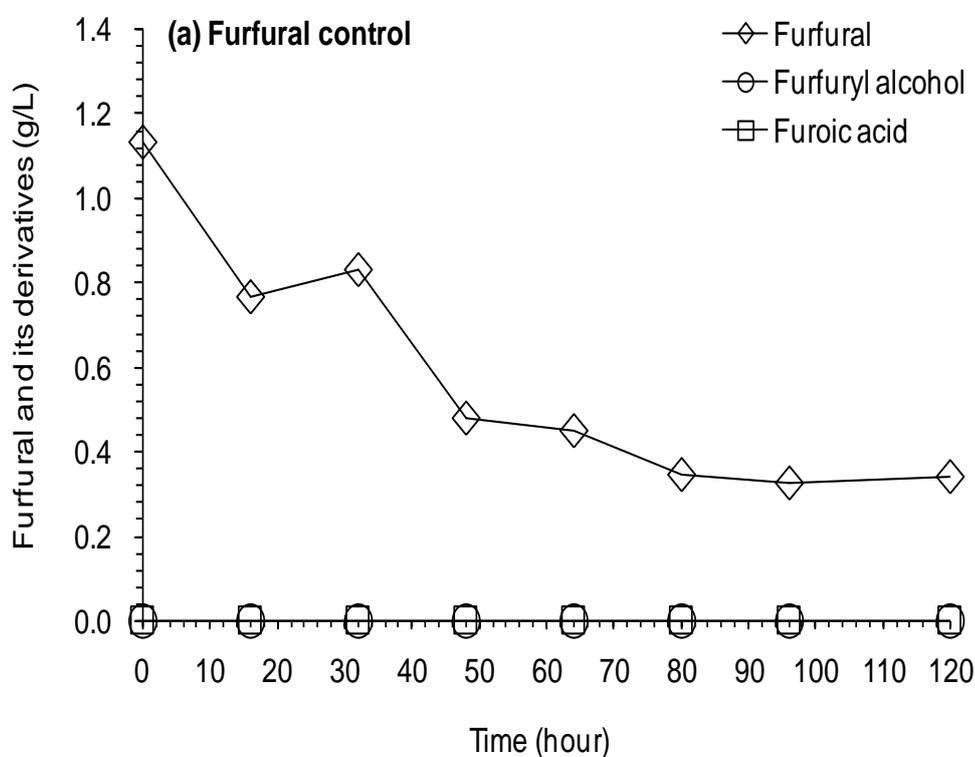
芳香醛类物质及它们的衍生物通过GC-MS (QP5000, Shimadzu, Agilent 19091S-433) 进行定性分析, 使用HP-5质谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 氦气作为载气, 流速为1.4 ml/min。柱温变化过程: 80 °C维持3 min, 然后温度以8 °C/min增加到280 °C, 进样温度250 °C, 注入1 μl的样品无分流检测。呋喃类和芳香醛类物质通过RP-HPLC (Reversed-phase HPLC, LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行定量分析。RP-HPLC色谱柱为YMC-Pack ODS-A柱 (LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A, Shimadzu, Toyoto, Japan)。糠醛, 糠醇, 糠酸分析条件: 流动相流速1.0 mL/min, 进样量20 μL, 柱温35 °C, 流动相为乙腈: 超纯水=50: 50, 检测波长为220 nm。5-HMF, 5-羟甲基糠醇, 5-羟甲基糠酸则采用梯度洗脱法: 流动相条件0-15 min, 乙腈浓度从5%递增至100%; 15-20 min, 乙腈浓度从100%降到5%; 20-30 min, 乙腈浓度保持在5%。流动相流速0.6 mL/min, 检测波长230 nm。芳香醛类物质香草醛, 松柏醛, 丁香醛和4-羟基苯甲醛, 及它们的降解产物香草酸, 阿魏酸, 松柏醇, 丁香酸, 丁香醇, 4-羟基苯甲醇和4-羟基苯甲酸等也采用梯度洗脱法: 1-4 min, 乙腈: 0.1%甲酸水溶液=10: 90 (A液); 4-20 min, 乙腈: 0.1%甲酸水溶液=35: 65 (B液); 之后用A溶液冲10 min。检测波长270 nm。

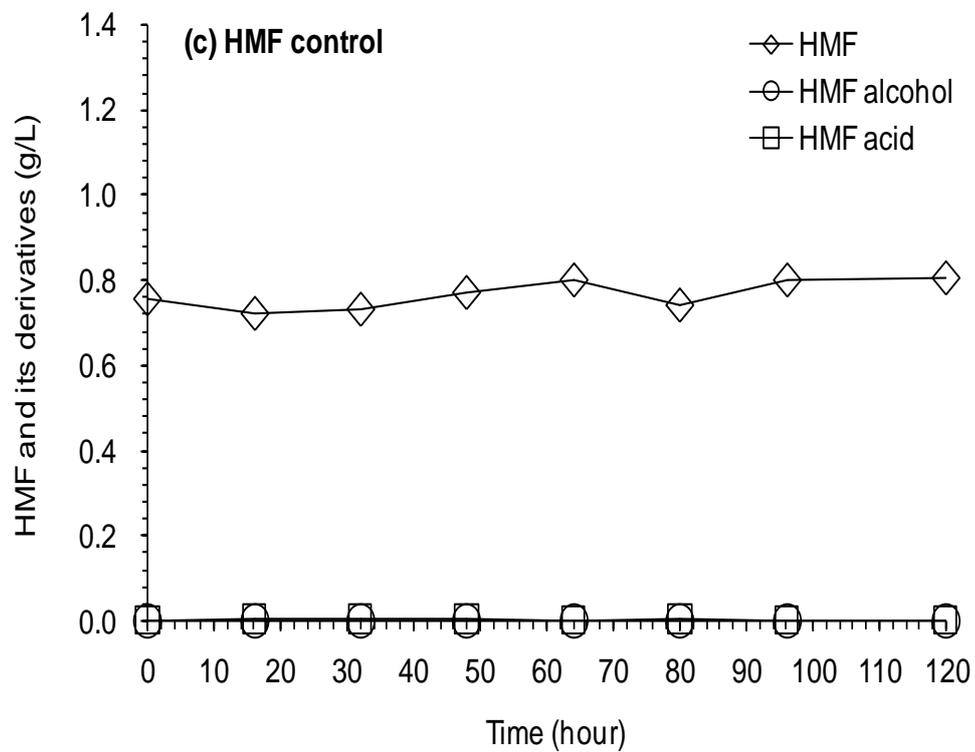
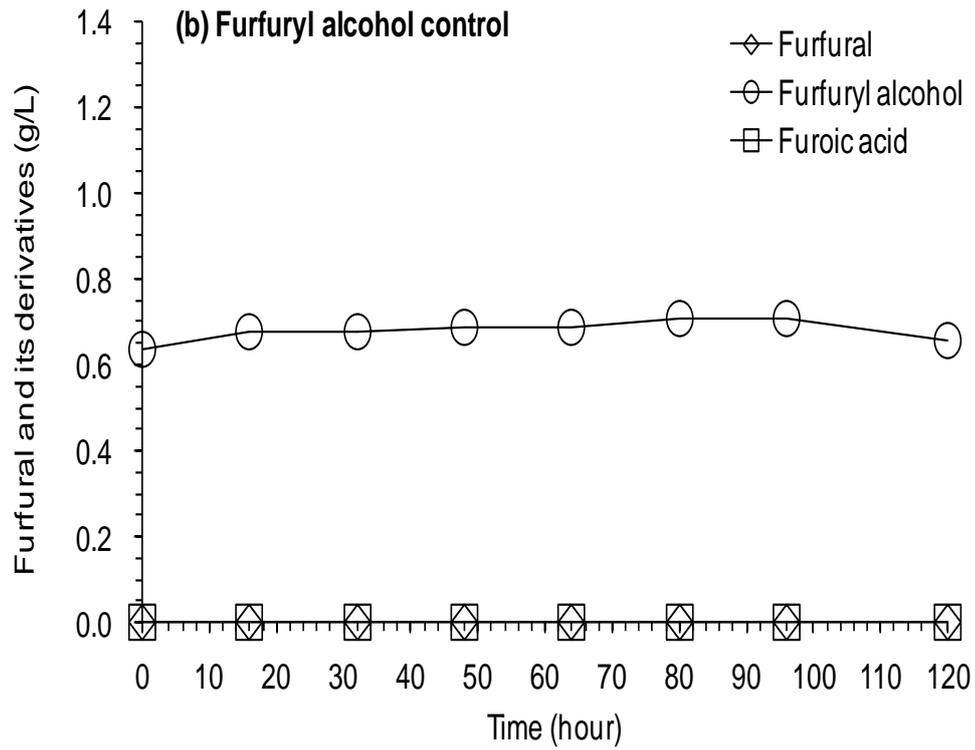
葡萄糖通过 HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Toyoto, Japan) 测定。HPLC 的配置和工作条件为: Bio-Rad HPX-87H 柱, 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 柱温为 65 °C 流速为 0.6 mL/min。所有样品, 进样前均在 13,200 rpm 的条件下离心 6 min, 并通过 0.22 μm 的滤膜过滤。

### 第 3 章 *A. resinae* ZN1 的呋喃醛代谢路径研究

#### 3.1 *A. resinae* ZN1 降解糠醛和 5-HMF 的空白对照实验

*A. resinae* ZN1 降解糠醛和 5-HMF 的代谢路径通过捕捉在不同发酵条件下产生的不同中间代谢产物获知。但众所周知，糠醛属于易挥发性物质，在通入大量空气后，部分糠醛可能被气体带走，从而导致其浓度的降低影响检测结果的准确性。5-HMF 虽然稳定，但也有可能在通气量大的情况下由于挥发而浓度减小。所以，为了排除实验结果是由非生物因素引起的可能性。首先做了一组糠醛，5-HMF 及其衍生物的空白对照实验。主要选择了四种可能挥发的物质：糠醛，糠醇，5-HMF，5-羟甲基糠醇进行空白对照试验。实验结果如图 3.1 所示。





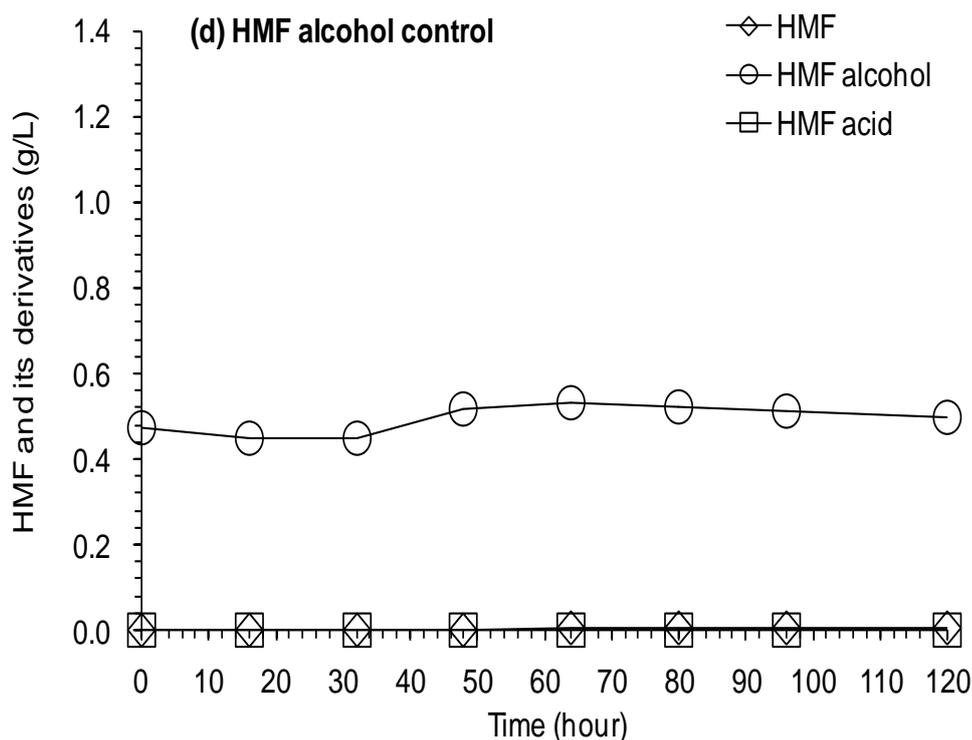
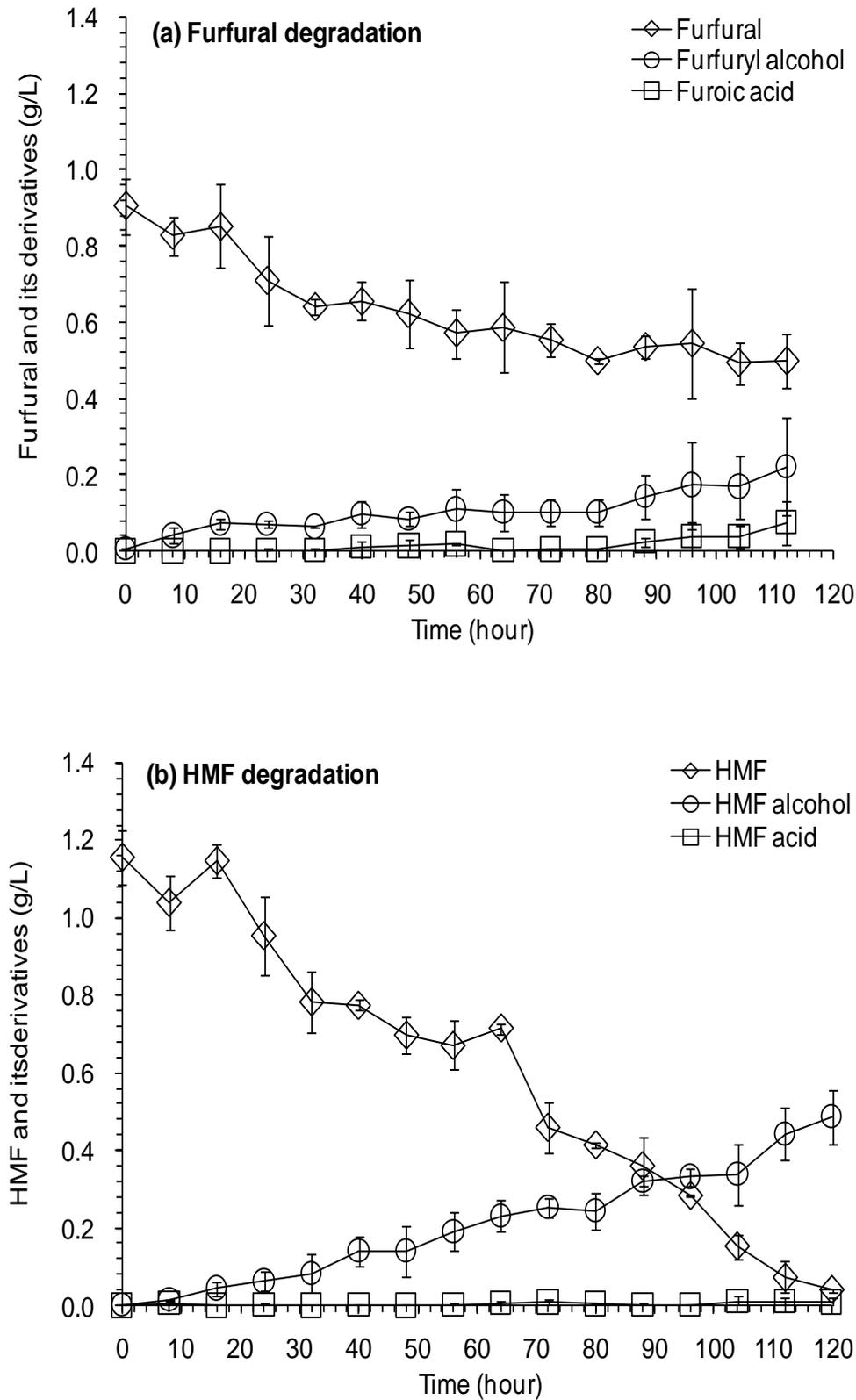


图 3.1 糠醛，糠醇，5-HMF 和 5-羟甲基糠醇的空白对照试验。实验条件：无机盐培养基，通气量 0.625 vvm，温度 28 °C，pH 5.5，转速 100 rpm。

Figure 3.1 Control experiments on furfural, furfuryl alcohol, 5-HMF and HMF alcohol degradation under no microbe existence. Conditions: inorganic salt medium, air rate at 0.625 vvm, 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

从图 3.1(a) 可以看出糠醛的浓度受通气的影响较大。在通气量为 0.625 vvm 的条件下，在 48 h 内就有近 50% 的糠醛被挥发掉。但在培养基中并没有检测到糠醇和糠酸的存在，说明氧气单独作用下并不能将糠醛氧化。而且当糠醛浓度下降到 0.3 g/L 左右时，糠醛的浓度就保持稳定不再减小。说明通入大量的空气并不能将培养基中的糠醛完全挥发。而从图 3.1(b) 可以看出通入氧气后，糠醇的浓度在培养基中保持稳定，在 120 h 内，浓度也并没有减小，在培养基中也并未检测到它的产物。综上所述，氧气并不能将糠醛和糠醇氧化降解。大的通气量对糠醛的浓度有较大的影响，但不能完全消除培养基中的糠醛。氧气对糠醇的浓度基本没有影响。

从图 3.1(c) 和图 3.1(d) 可以看出 5-HMF 和 5-羟甲基糠醇的浓度在 120h 内都基本保持稳定，在 120h 内也没有检测到 5-羟甲基糠酸的存在。这些都说明氧气并不能直接将 5-HMF 和 5-羟甲基糠醇氧化。之前也有一些关于氧气将糠醛和 5-HMF 转化的文献，但在这些转化的过程中都会涉及到高温和催化剂的参与，单纯的氧化作用是不存在的。

3.2 *A. resinae* ZN1 在以糠醛或 5-HMF 为唯一碳源的无氧降解研究图 3.2 在厌氧条件下 *A. resinae* ZN1 以糠醛或 5-HMF 为唯一碳源的降解研究。(a)糠醛;(b)5-HMF。

实验条件: 接种量 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 转速 100 rpm。

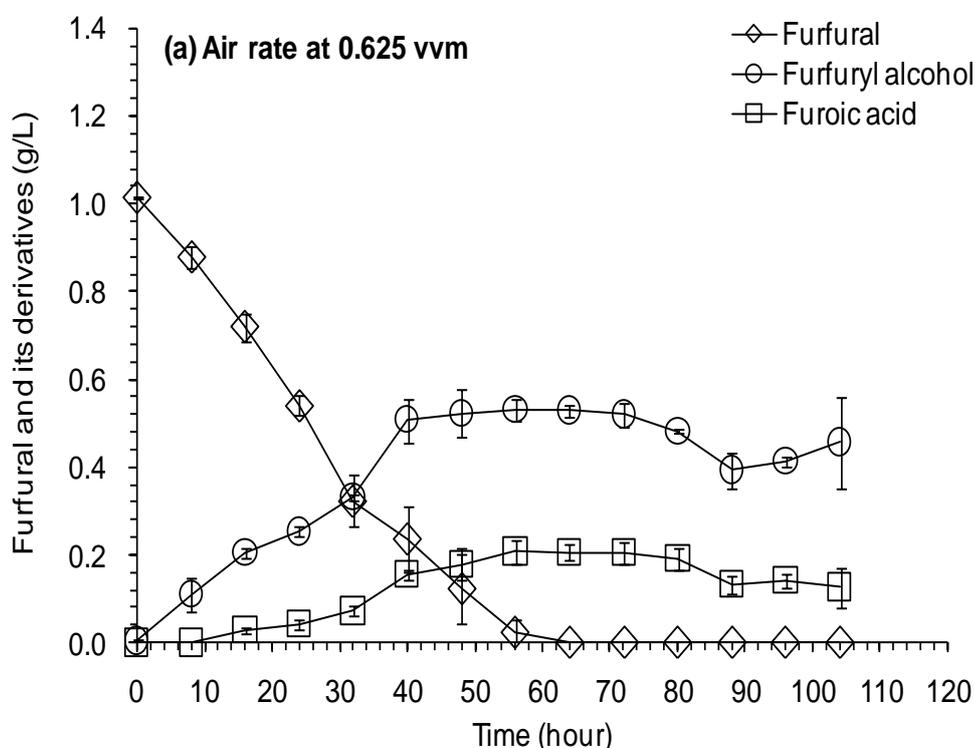
Figure 3.2 Degradation of furfural and 5-HMF by *A. resinae* ZN1 at anaerobic condition without glucose.

(a) furfural; (b) 5-HMF. Conditions: inoculum ratio 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

图 3.2 展示了在严格厌氧条件下, *A. resiniae* ZN1 以糠醛或 5-HMF 为唯一碳源下的生长及对抑制物的降解情况。从图 3.2 (a) 可以看出在无氧条件下, *A. resiniae* ZN1 对糠醛的降解极其缓慢, 在发酵到近 120 h 的时候, 糠醛的浓度也只减小了 50% 左右。相应的在发酵一开始就检测到培养基中糠醇的存在, 而且其浓度随着糠醛浓度的降低不断提高。可见它们之间存在着良好的线性关系。糠酸的浓度只在发酵后期, 近 80 h 左右有一个小幅度的升高。从图 3.2 (b) 可知 5-HMF 的降解与糠醛的类似, 但降解速率稍快一些。在 60 h 的时候就有近一半的 5-HMF 被降解, 在发酵结束 120 h 时 5-HMF 基本被完全降解。与糠醛的降解相同, 5-HMF 一旦开始降解就在培养基中检测到了 5-羟甲基糠醇的存在。而且, 随着 5-HMF 的降解 5-羟甲基糠醇的浓度不断上升。在发酵后期, 108 h 时检测到了极微量 5-羟甲基糠酸的存在。在厌氧条件下, 培养基始终处于澄清状态, 并没有观察到菌体量有大幅度的增加。最终得到的糠醇和糠酸为消耗掉糠醛的 70% 左右, 5-羟甲基糠醇只是最初培养基中 5-HMF 的 40% 左右, 通过显微镜观测发现, 培养基中菌体浓度有一定的增加。说明 *A. resiniae* ZN1 能将糠醛和 5-HMF 转化为可为其生长提供原料和能源的物质。

### 3.3 *A. resiniae* ZN1 在不同通气量中以糠醛为唯一碳源的降解研究

在实际脱毒过程中, 氧气起着非常重要的作用。但氧气对脱毒效果有多大的影响并不是十分清楚, 通气量越大, 是否脱毒效果越好。本实验针对单一抑制物糠醛, 研究氧气对糠醛降解的影响。结果如图 3.3 所示。



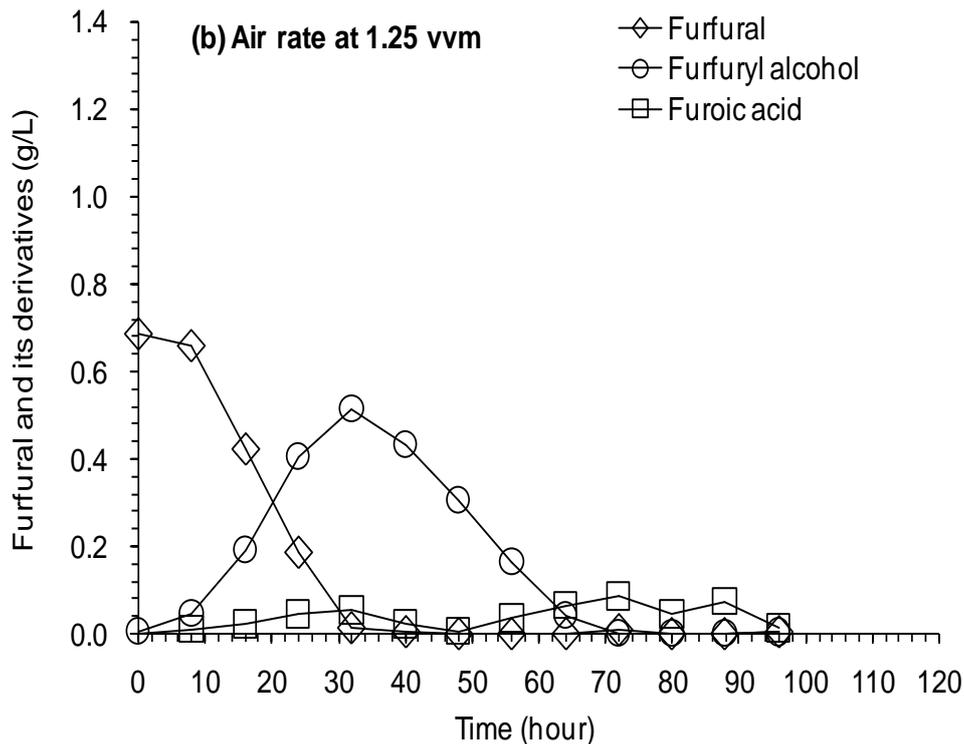


图 3.3 在不同的通气情况下, *A. resiniae* ZN1 以糠醛为唯一碳源的降解实验。(a) 通气量为 0.625 vvm; (b) 通气量为 1.25 vvm。实验条件: 接种量 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 转速 100 rpm。  
Figure 3.3 Degradation of furfural by *A. resiniae* ZN1 at aerobic condition without glucose. (a) Air rate at 0.625 vvm; (b) Air rate at 1.25 vvm. Conditions: inoculum 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

图 3.3 展示了在以糠醛为唯一碳源时, 在不同通气量情况下 *A. resiniae* ZN1 对糠醛的降解。从图 3.3 (a) 可以看出, 当在培养基中通入氧气后与图 3.2 (a) 完全厌氧条件相比糠醛的降解速率有很大的提高。只用了 64 h, 培养基中近 1.0 g/L 的糠醛基本完全被降解。在发酵初期糠醛开始降解时, 糠醇和糠酸的浓度就有所增加。在 64 h 时有约 72% 的糠醛被转化为糠醇和糠酸, 最多只有 28% 的糠醛被菌体利用和挥发掉。在糠醛完全转化为糠醇和糠酸后, 糠醇开始降解。但, 糠酸的浓度并没有因糠醇的降解而增加, 说明 *A. resiniae* ZN1 不一定将糠醇直接转化为糠酸。图 3.3 (b) 中通气量为图 3.3 (a) 中的两倍, 通气量增加到 1.25 vvm 的结果。从图 3.3 (b) 看出糠醛的降解速率进一步增加, 在 30 h 左右糠醇和糠酸的浓度增加到 0.6 g/L 左右, 糠醛的转化率达到 83%。进一步的增大通气量增加了糠酸的降解速率, 糠酸在培养基中始终没有大的积累。在发酵后期通过显微镜观察发现, 在两种通气条件下菌体浓度都有所增加, 在发酵 48 h 左右, 发酵罐壁上吸附了大量的孢子, 说明 *A. resiniae* ZN1 菌将部分糠醛用于菌体的生长。

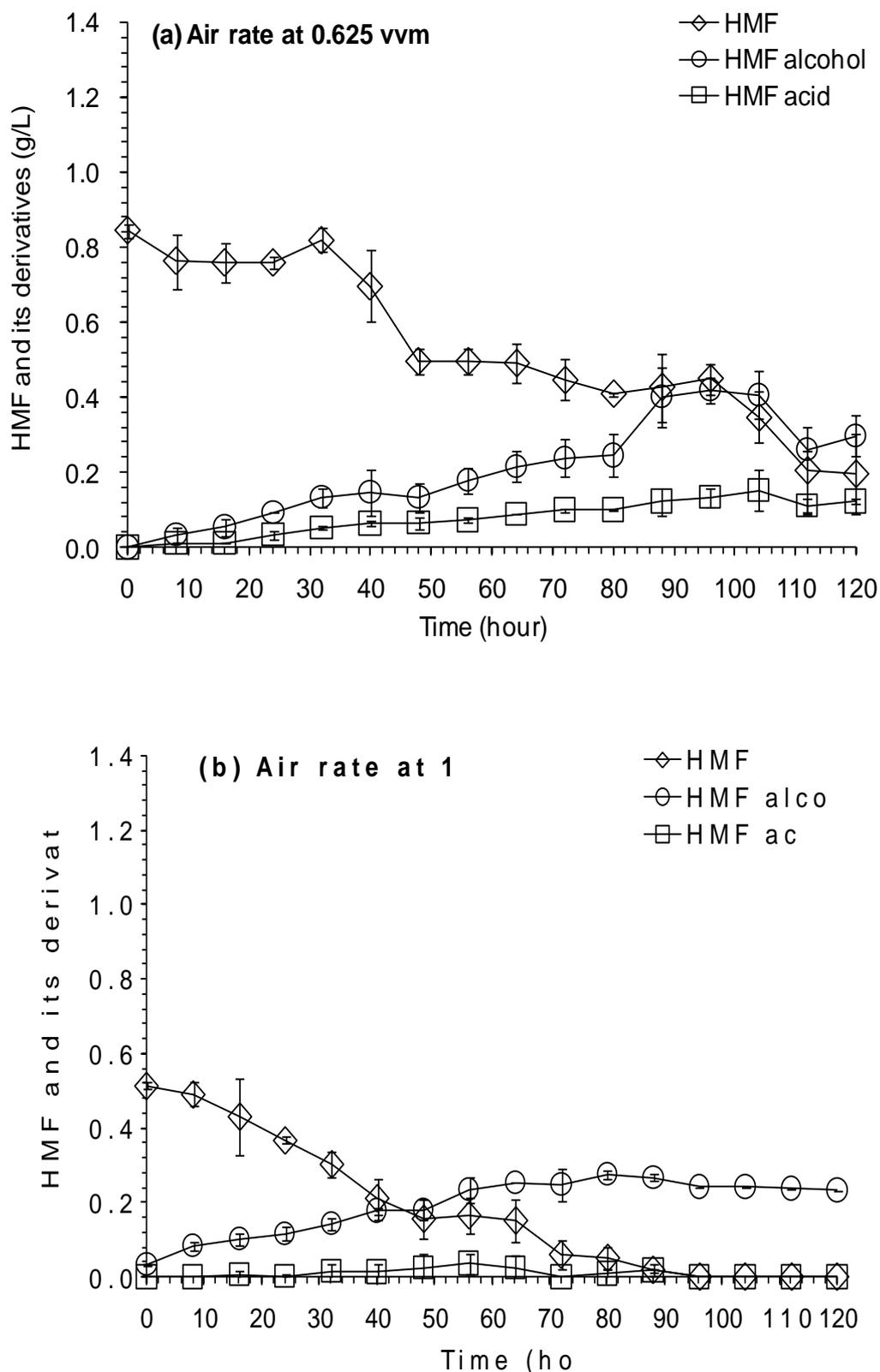
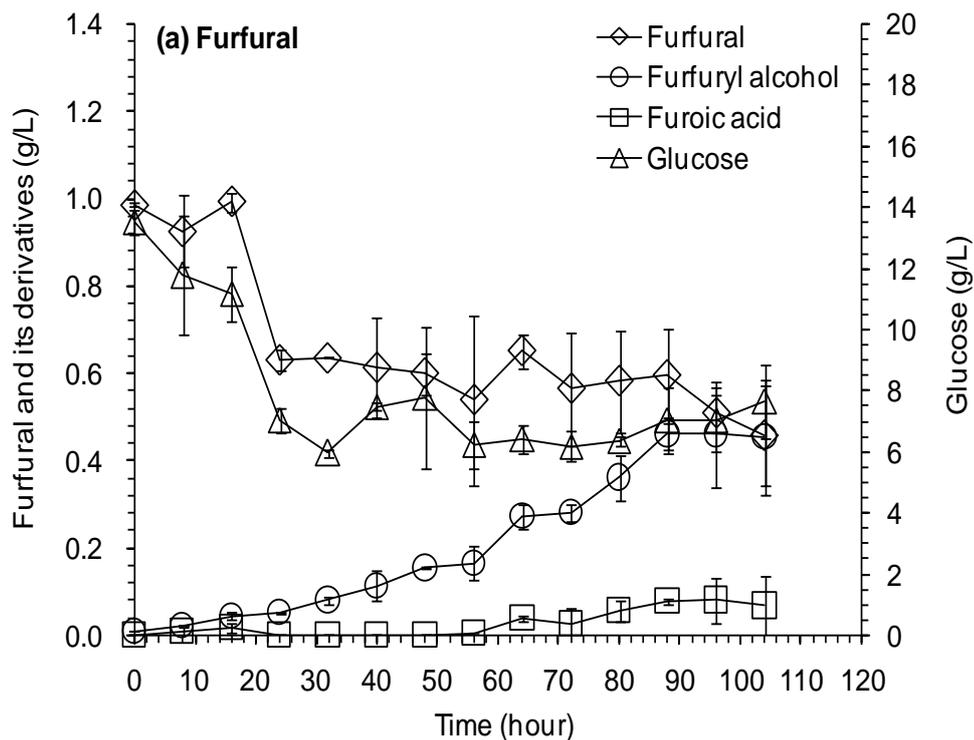
3.4 *A. resinae* ZN1 在通气量不同时以 5-HMF 为唯一碳源的降解研究

图 3.4 *A. resinae* ZN1 以 5-HMF 为唯一碳源时降解实验。(a) 通气量为 0.625 vvm; (b) 通气量为 1.25 vvm。实验条件: 接种量 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 转速 100 rpm。

Figure 3.4 Degradation of 5-HMF by *A. resinae* ZN1 at aerobic condition without glucose. (a) Air rate at 0.625 vvm; (b) Air rate at 1.25 vvm. Conditions: inoculum 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

图 3.4 展示了在不同通气条件下 (0.625 vvm 和 1.25 vvm), *A. resiniae* ZN1 对 5-HMF 的降解实验。在两种通气条件下 5-HMF 的降解浓度与 5-羟甲基糠醇和 5-羟甲基糠酸增加的浓度相当。与图 3.1 (c-d) 中 5-HMF 和 5-羟甲基糠醇浓度始终保持不变相比, 在加入 *A. resiniae* ZN1 之后, *A. resiniae* ZN1 起到了对 5-HMF 较强的降解作用。而与图 3.2 (b) 的严格厌氧条件相比较, 氧气的增加并没能明显提高 5-HMF 的降解速率。差别较大的是在厌氧条件下, 在培养基中并未检测到 5-羟甲基糠酸的存在。增大通气量到 0.625 vvm 时, 5-HMF 一降解就产生了 5-羟甲基糠醇和 5-羟甲基糠酸, 5-羟甲基糠酸在培养基中有明显的积累。5-羟甲基糠醇在 104 h 开始降解后, 也并未使 5-羟甲基糠酸的浓度有所增加, 说明 5-羟甲基糠醇也并不是直接转化为 5-羟甲基糠酸的。发现增大通气量到 1.25 vvm, 与糠醛情况相似培养基中的 5-羟甲基糠酸积累量明显小于通气量为 0.625 vvm 时培养基中的 5-羟甲基糠酸的量。这可能是由于通气量增加使得 5-羟甲基糠酸迅速被降解的缘故。与糠醛通入氧气后情况相符, 通过显微镜观察发现培养基中的菌体量有明显增加。说明菌体将部分 5-HMF 转化为可供菌体生长的原料及能源。

### 3.5 *A. resiniae* ZN1 在含葡萄糖的培养基中对糠醛和 5-HMF 的无氧降解研究



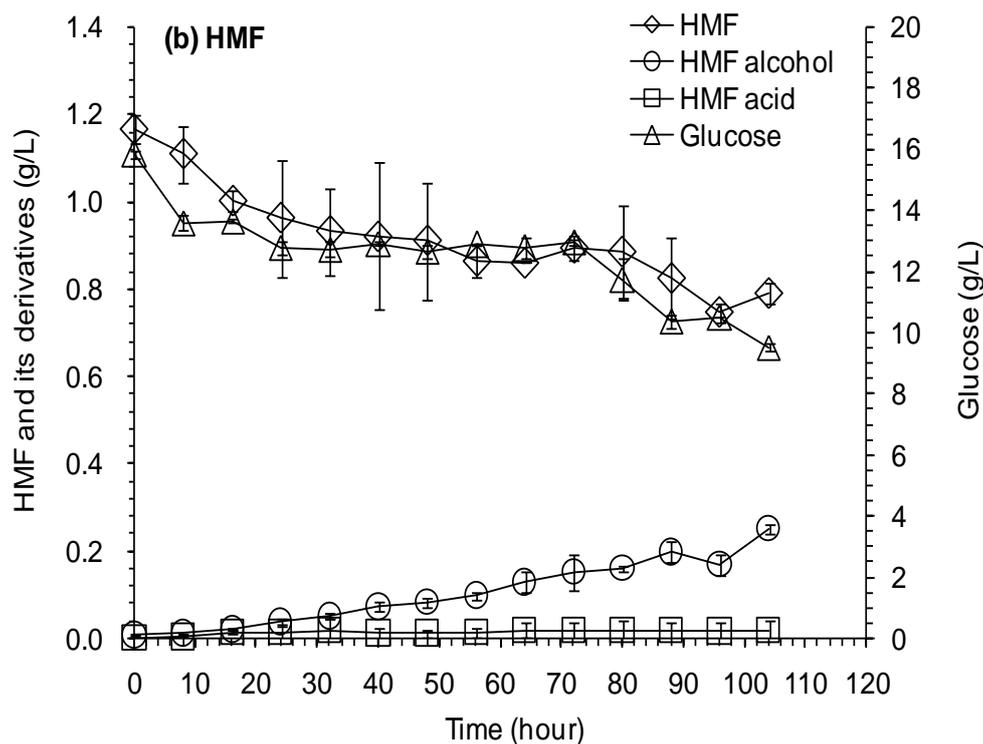


图 3.5 在含有葡萄糖的培养基中 *A. resiniae* ZN1 对糠醛和 5-HMF 的降解。(a) 糠醛；(b) 5-HMF。  
实验条件：接种量 20% (v/v)，28 °C，pH 5.5，转速 100 rpm。

Figure 3.5 Degradation of furfural and 5-HMF by *A. resiniae* ZN1 at anaerobic conditions with glucose. (a) furfural; (b) 5-HMF. Conditions: inoculum 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

图 3.5 展示了在培养基中存在葡萄糖的条件下，糠醛和 5-HMF 的降解情况。与图 3.2 中未加入葡萄糖的情况相比，加入葡萄糖后使糠醛和 5-HMF 的降解速率更加缓慢。与图 3.2 (a) 中糠醛的降解情况相似，在发酵后期培养基中也检测到了少量糠酸的存在。而与图 3.2 (b) 相比，在葡萄糖存在的情况下，5-羟甲基糠酸并未出现在培养基中。在无氧条件下，葡萄糖的降解也相当缓慢，在发酵后期也只检测到少量菌体量的增加。

### 3.6 不同通气量对 *A. resiniae* ZN1 在含葡萄糖的培养基中对糠醛降解的影响

图 3.6 为加入葡萄糖后调节通气量对糠醛降解的影响实验。在两种通气条件下，糠醛在 60-70 h 内均被完全降解，而且降解速率并没有特别大的差别。与图 3.5 (a) 中完全厌氧情况相比，通入空气后大大提高了糠醛的降解速率。与图 3.3 (a) 在相同通气条件下无葡萄糖的情况相比较，在培养基中加入葡萄糖并未明显提高糠醛的降解速率。在通气量为 0.625 vvm 时，如图 3.6 (a) 所示，糠醛一开始降解，就在培养集中检测到了糠醇和糠酸的存在。随着糠醛的不断降解，糠醇和糠酸的浓度不断增加，在 56 h 时达到最大值。随后糠醇浓度不断减小，糠酸的浓度并没因糠醇浓度减小而增加，说明糠醇和糠酸间可能没有直接转化关系。在发酵结束 (120 h) 时，培养基中的糠醛及其衍生物都基本被完全降解。图 3.6 (b) 中当进一步增大通气量 1.25 vvm，可以看出通气量的进一步增加也并未使糠醛的降解速率有所提高。糠醛的降解和其衍生物的形成情况与

通气量为 0.625 vvm 相似。由于糠醛对细胞内多种酶都有较强的抑制作用，特别是糖酵解酶类。所以葡萄糖在糠醛浓度较高时，其降解速率极其缓慢，只有当糠醛降低到较低浓度或完全降解其降解速率才有大幅度提高。在葡萄糖存在的情况下，培养到 32h 后培养基中菌体浓度就大幅度的增加，培养基从澄清状变为粘稠的灰黑色。

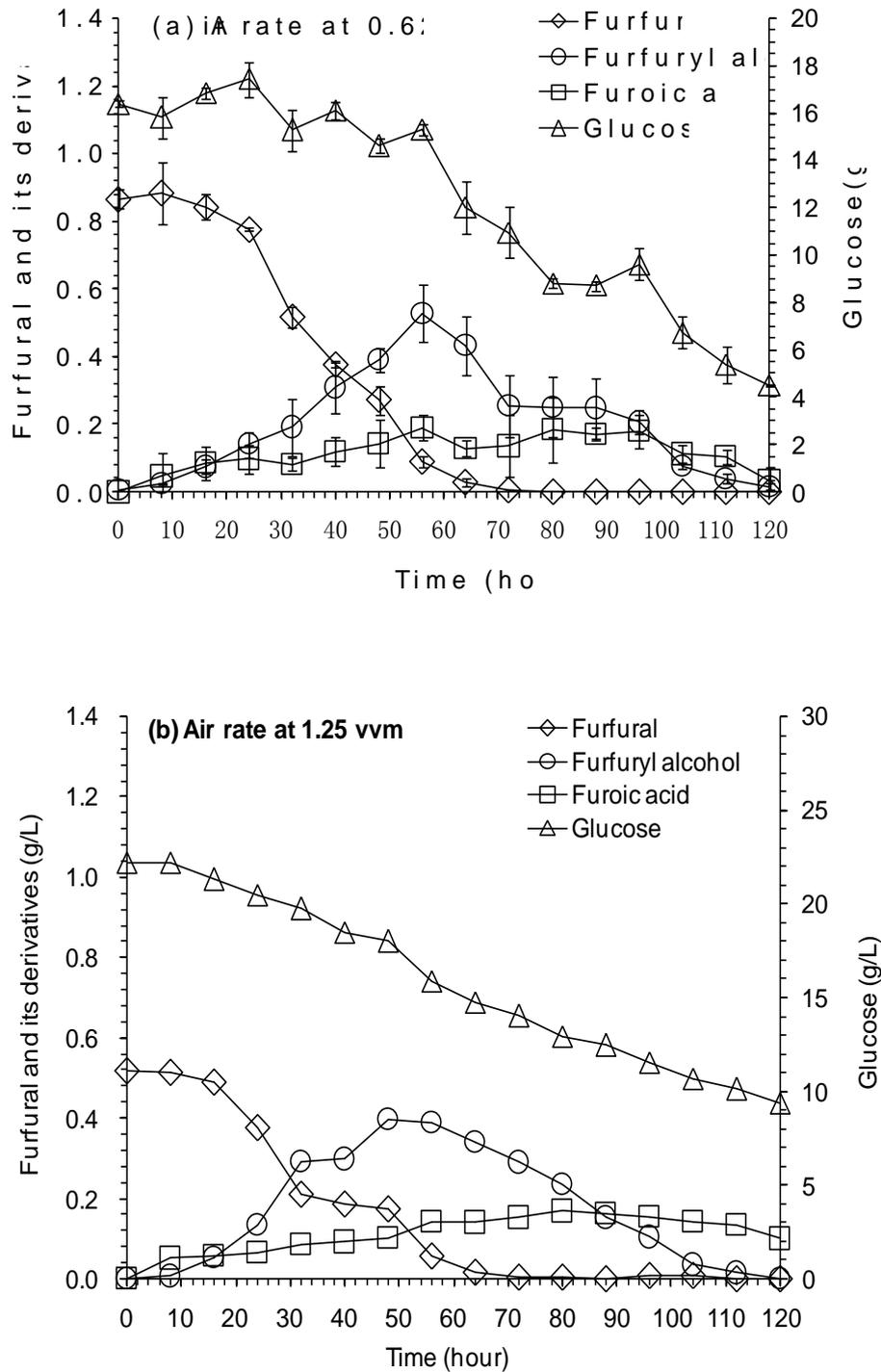


图 3.6 在含葡萄糖的培养基中不同的通气条件对 *A. resiniae* ZN1 降解糠醛的影响。(a) 通气量为 0.625 vvm; (b) 通气量为 1.25 vvm。实验条件：接种量 20% (v/v), 28°C, pH 5.5, 转速 100 rpm。

Figure 3.6 Degradation of furfural by *A. resiniae* ZN1 at aerobic conditions with glucose. (a) Air rate at 0.625 vvm; (b) Air rate at 1.25 vvm. Conditions: inoculum 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

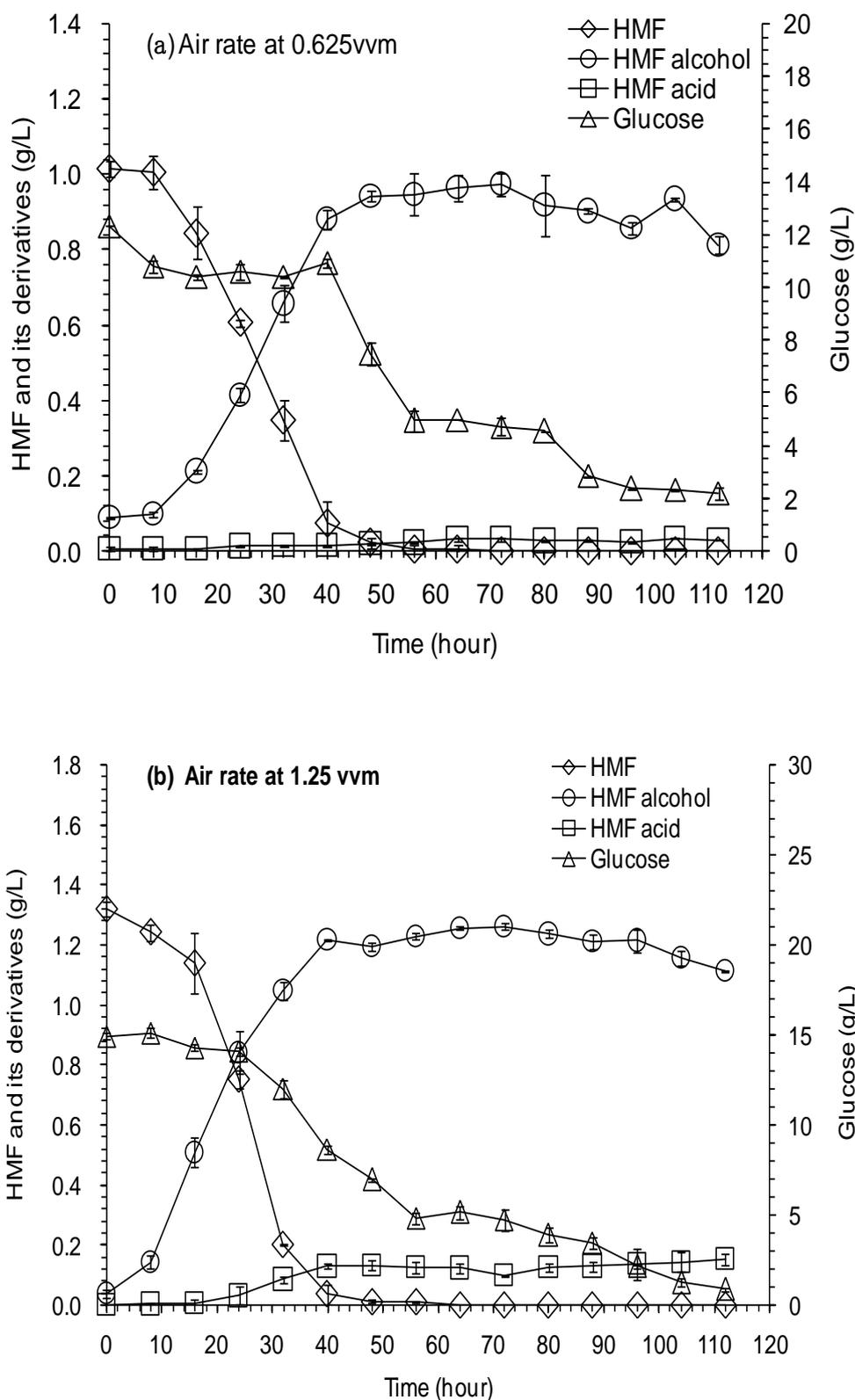
3.7 不同通气量对 *A. resiniae* ZN1 在含葡萄糖的培养基中对 5-HMF 降解的影响

图 3.7 *A. resiniae* ZN1 在含有葡萄糖的培养基中对 5-HMF 的降解受不同通气量的影响。(a) 通气量 0.625 vvm; (b) 通气量 1.25 vvm。实验条件: 接种量 20% (v/v), 28 °C, pH 5.5, 转速 100 rpm.

Figure 3.7 Degradation of 5-HMF by *A. resiniae* ZN1 at aerobic conditions with glucose. (a) Air rate at 0.625 vvm; (b) Air rate at 1.25 vvm. Conditions: inoculum 20%(v/v), 28 °C, pH 5.5, 100 rpm.

图 3.7 是在含有葡萄糖的培养基中不同通气情况下, *A. resinae* ZN1 对 5-HMF 的降解情况研究。与图 3.5 (b) 5-HMF 在严格厌氧条件下的降解相比, 增加通气使 5-HMF 的降解速率明显提高。在这种条件下, 5-HMF 在 40 h 左右就基本降解完全, 降解速率相对于厌氧情况提高了 4 倍左右, 在 0.02 g/(L·h)。在通气量为 0.625 vvm 时, 伴随着 5-HMF 的降解, 5-羟甲基糠醇的浓度不断提高。在 40 h 时, 5-羟甲基糠醇的转化率在 90% 以上, 5-羟甲基糠酸的浓度始终很低, 在整个发酵过程中没有大的变化。5-羟甲基糠醇在达到最大值后, 在培养基中浓度没有大的变化, 保持稳定。在葡萄糖存在的情况下, *A. resinae* ZN1 将毒性较强的 5-HMF 转化为低毒性的 5-羟甲基糠醇, 消除了抑制物对菌体的毒性。5-羟甲基糠醇产生后基本没有降解, *A. resinae* ZN1 开始大量利用葡萄糖生长。在增加通气量为 1.25 vvm 后, 如图 3.7 (b) 所示, 5-HMF 的降解是时间并未被缩短, 只是提高了 5-HMF 的降解速率。在通气量为 0.625 vvm 时, 5-HMF 的降解速率在 0.024 g/(L·h), 通气量增加到 1.25 vvm 时, 5-HMF 的降解速率达到了 0.032 g/(L·h)。在两种通气条件下, 5-羟甲基糠醇的变化趋势基本相同。而 5-羟甲基糠酸在增大通气量后, 有一个相对明显的量的增加。

图 3.6 和图 3.7 也给出了一个很有趣的现象, 在通有氧气的培养基中, 葡萄糖在发酵初期降解是十分缓慢的。但当培养基中的抑制物(糠醛和 5-HMF)的浓度降低到一定值或基本被降解完后, 葡萄糖的消耗速率才迅速增加。这说明 *A. resinae* ZN1 可以先于葡萄糖利用培养基中的抑制物。因此, 这对在脱毒过程中保留有效葡萄糖, 提高后续发酵乙醇产率提供了依据。

### 3.8 *A. resinae* ZN1 对糠醛和 5-HMF 代谢路径及代谢性能分析

关于糠醛和 5-HMF 在不同微生物中的生物降解路径在许多文献中都有报导, 本文认真研究了 *A. resinae* ZN1 在木质纤维素生物炼制过程中对抑制物糠醛和 HMF 的代谢路径。发现一些有趣的结果, 总结如下:

(1) 在所有的实验条件下, *A. resinae* ZN1 都会首先将糠醛转化为糠醇。在氧气充足的情况下, *A. resinae* ZN1 将糠醛转化为糠醇和糠酸。在无氧气存在的条件下, *A. resinae* ZN1 只能将糠醛转化为糠醇, 糠酸的量极少或难以检测到。

(2) 与 5-HMF 的降解情况相同, 在所有的实验条件下 *A. resinae* ZN1 首先将 HMF 转化为 5-羟甲基糠醇。在不含葡萄糖的培养基中, 通入氧气时 *A. resinae* ZN1 能将 HMF 转化为 5-羟甲基糠醇和 5-羟甲基糠酸。但加入葡萄糖后 HMF 只被转化为 5-羟甲基糠醇, 在厌氧条件下 5-HMF 也只被降解成 5-羟甲基糠醇。

(3) 在实验的过程中, 明显观察到 *A. resinae* ZN1 比起葡萄糖的利用优先利用糠醛和 5-HMF。当培养基中糠醛和 5-HMF 的浓度较高时, *A. resinae* ZN1 基本不利用葡萄糖。只有当培养基中的糠醛或 5-HMF 降低到极低浓度或完全降解时, *A. resinae* ZN1 才开始利用葡萄糖。

根据以上 *A. resinae* ZN1 降解抑制物的实验结论和之前对于 Koopman et al. [28]

关于 *Cupriavidus basilensis* HMF14 对糠醛和 5-HMF 降解代谢路径的研究。推测 *A. resiniae* ZN1 代谢糠醛和 5-HMF 的代谢路径如下：

(1) 在所有实验中 *A. resiniae* ZN1 首先利用乙醇脱氢酶或醛脱氢酶将糠醛/5-HMF 转化为糠醇/5-羟甲基糠醇（如图 3.8 中框 A/B 所示），而不是相应的酸（糠酸/5-羟甲基糠酸）。这可能是由于糠醛/5-HMF 和糠酸/5-羟甲基糠酸对微生物的毒性比糠醇/5-羟甲基糠醇都强，所以 *A. resiniae* ZN1 将毒性很强的糠醛/5-HMF 转化为毒性较弱的糠醇/5-羟甲基糠醇，更有利于 *A. resiniae* ZN1 的生长。也可能是由于 *A. resiniae* ZN1 中的醛脱氢酶比醇脱氢酶对糠醛/5-HMF 更敏感，所以 *A. resiniae* ZN1 更倾向于将糠醛/5-HMF 转化为糠醇/5-羟甲基糠醇。

(2) 在有氧条件下，*A. resiniae* ZN1 在乙醇脱氢酶或醛还原酶的作用下将糠醇还原为糠醛。之后在醛氧化酶的作用下，*A. resiniae* ZN1 又将糠醛转化为糠酸（如图 3.8，框 A 和 B 所示）。这两步转化过程中，糠醛都保持在基本不影响菌体生长和代谢的较低浓度。

(3) 在厌氧情况下，*A. resiniae* ZN1 将糠醛转化为糠醇，糠酸很难检测到。氧气对于糠醛/5-HMF 转化为糠酸/5-羟甲基糠酸是非常重要的。在厌氧条件下，氧气依赖型醛氧化酶可能失去了将糠醛/5-HMF 转化为糠酸/5-羟甲基糠酸的活性。

(4) 根据 Koopman et al. 关于 *Cupriavidus basilensis* HMF14 的分析，据估计，5-羟甲基糠酸被醛氧化酶氧化成 2,5-呋喃-二羧酸。之后被 2,5-呋喃-二羧酸脱羧酶转化成糠酸（图 3.8 框 C）。经过这两步的转化，框 B 中 5-HMF 的降解路径加入到糠醛的代谢路径框 A 的最后一步糠酸的形成。之后，经过六步转化糠酸转化为 2-0-戊二酸之后加入 TCA 循环参与最终降解（图 3.8 中 B 和 D）。

(5) *A. resiniae* ZN1 先于葡萄糖利用糠醛和 5-HMF 作为碳源，可能是由于糠醛和 5-HMF 对于中心碳代谢的抑制。只有糠醛和 5-HMF 的浓度降低到阈值以下时，葡萄糖利用和细胞生长中的糖酵解和 TCA 循环才不会受到抑制。这种特性可以帮助保留生物脱毒过程中的葡萄糖，为后续生物乙醇的生产提供更多的原料。

(6) *A. resiniae* ZN1 降解糠醛/5-HMF 有较强的辅因子依耐性，5-HMF 的降解主要依赖于辅因子 NADPH 的氧化，而 NADPH 主要依靠磷酸戊糖途径产生，磷酸戊糖途径的主要原料为葡萄糖<sup>[70,71]</sup>。也许与酵母葡萄糖代谢相似，*A. resiniae* ZN1 在 HMF 的存在下也能促进葡萄糖代谢基因 *ZWF1*, *GND1* 和 *GND2* 的表达，从而提高细胞内 NADPH 的浓度加快 HMF 的降解速率。糠醛的降解主要依赖于 NADH 的氧化，NADH 在细胞内的水平与培养基中葡萄糖的浓度无关，而受氧气的影响很大。这就解释了为什么葡萄糖对 5-HMF 的降解影响很大，而对糠醛没有什么影响<sup>[72]</sup>。

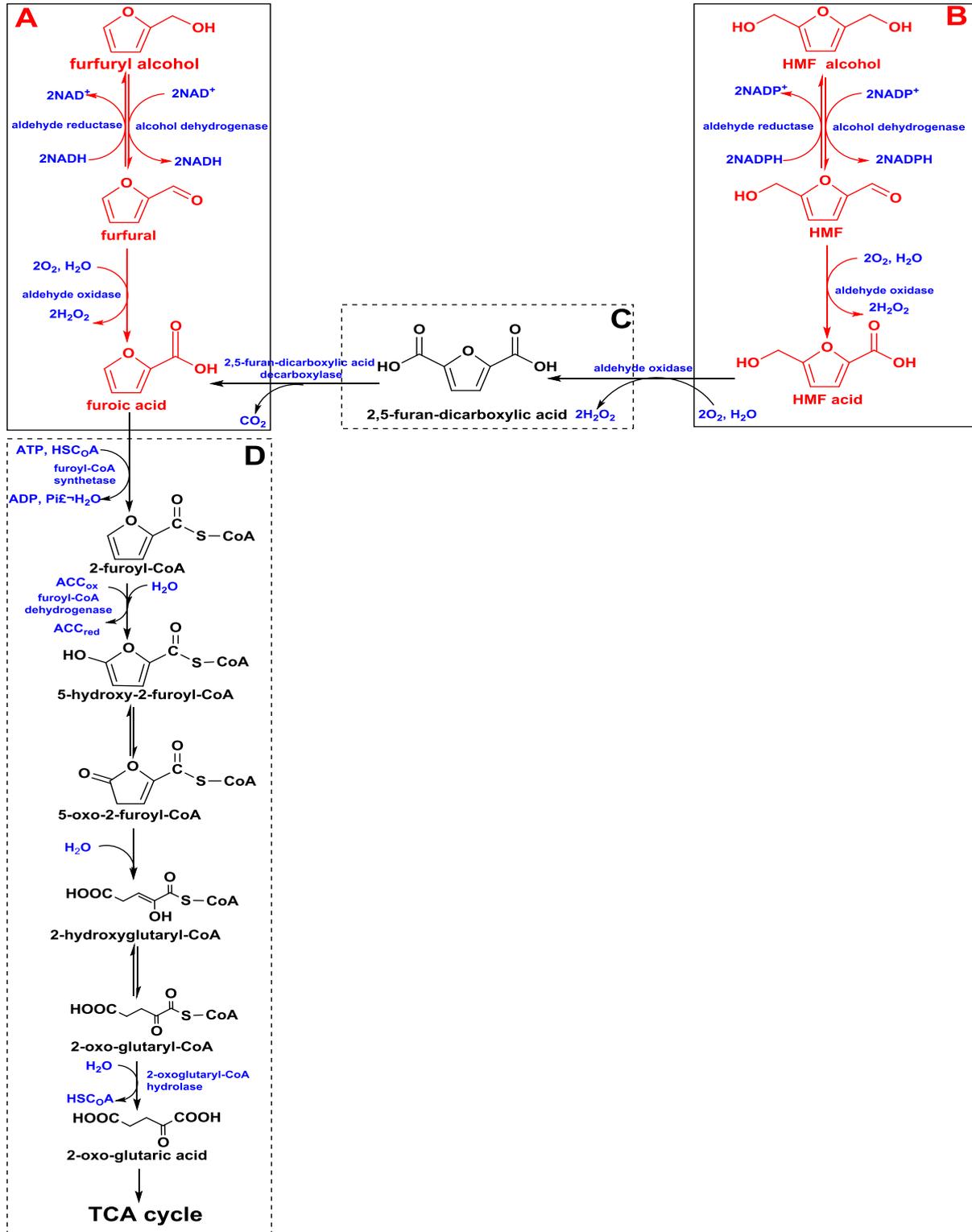


图 3.8 *A. resiniae* ZN1 降解糠醛和 5-HMF 的代谢路径。实心框 A 和 B：从实验现象中得出的代谢路径（A，糠醛；B，5-HMF）。虚线框 C 和 D，蓝色的酶和绿色的底物，红色的化合物均是根据之前的文献报道及化学反应推测得到。

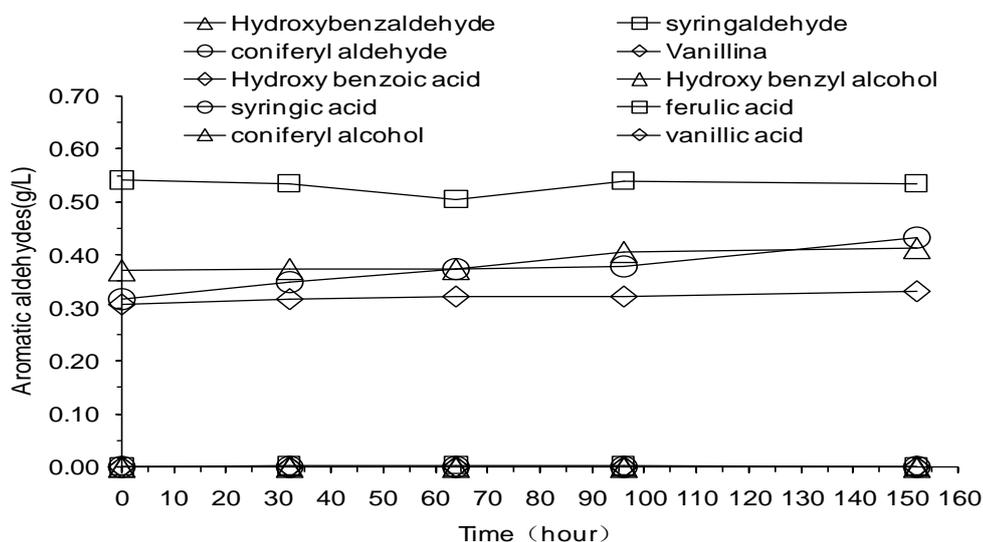
Figure 3.8 The degradation pathway of furfural and 5-HMF by *A. resiniae* ZN1. Solid boxes (A and B), the metabolic pathway were speculated from experimental phenomena (A, furfural; B, 5-HMF). Dotted boxes (C and D), blue of the enzymes and green substrates, red compounds were speculated on the basis of the existing literatures and chemical reactions.

## 第四章 *A. resinae* ZN1 的芳香醛代谢路径研究

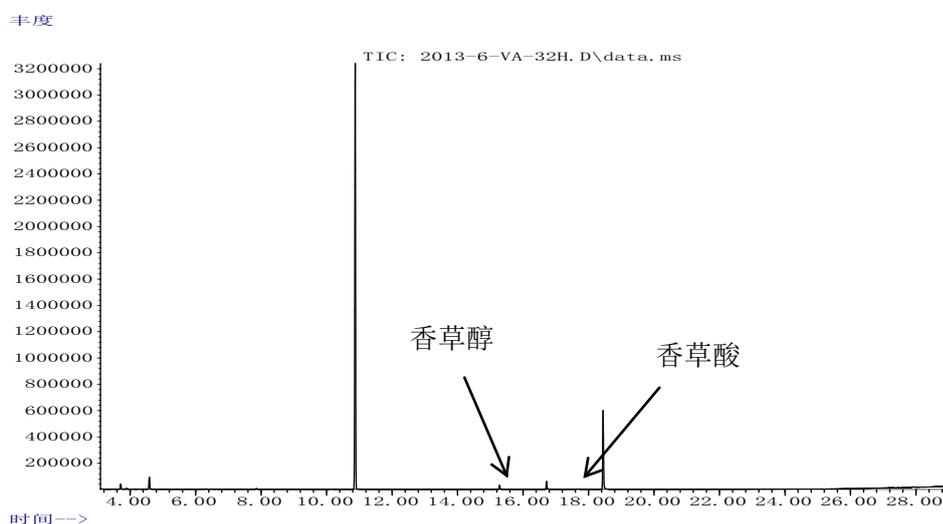
### 4.1 *A. resinae* ZN1 降解芳香醛的空白对照实验及 GC-MS 分析

芳香醛类物质也是在木质纤维素预处理过程中产生的对发酵微生物有很强抑制作用的副产物，它们往往在极低的浓度就会对发酵菌株产生致命的影响。对于将它们从木质纤维素原料中脱除的研究并不是很多，实验发现 *A. resinae* ZN1 对木质纤维素水解液中的各种芳香醛类物质都有一定的降解作用，但是其脱毒效果及代谢路径还不是十分清楚。接下来的实验将选取木质纤维素水解液中常见，浓度较高，抑制作用较强的一些芳香醛类物质进行研究。主要选取了三大芳香醛类物质中 G 族的香草醛和松柏醛，H 族的 4-羟基苯甲醛和 S 族的丁香醛。首先，为了证实芳香醛类物质的降解不是氧气的作用，做了一组空白对照实验。其次，通过 GC-MS 分析寻找这些芳香醛类物质可能的降解产物。

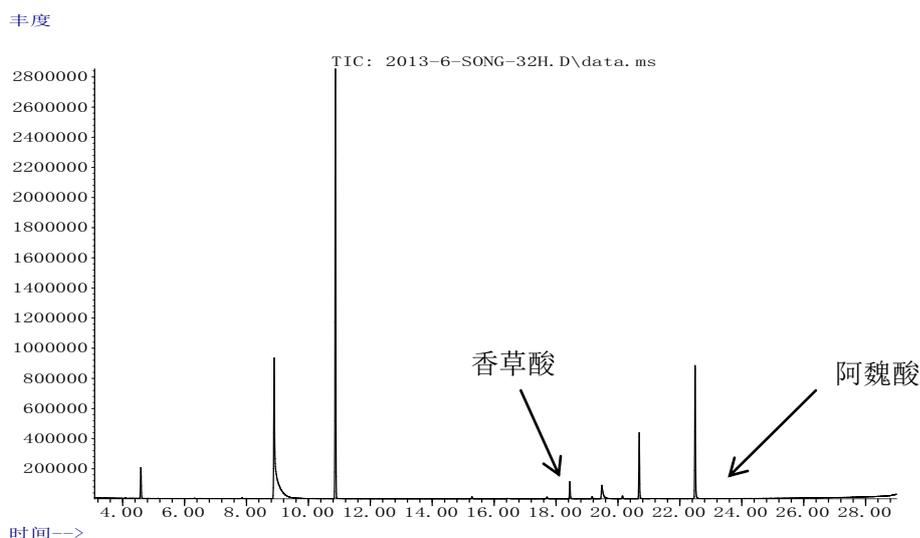
(a) 芳香醛类化合物降解的空白对照实验；



(b) 香草醛 GC 图；



(c) 松柏醛 GC 图;



(d) 4-羟基苯甲醛 GC 图;

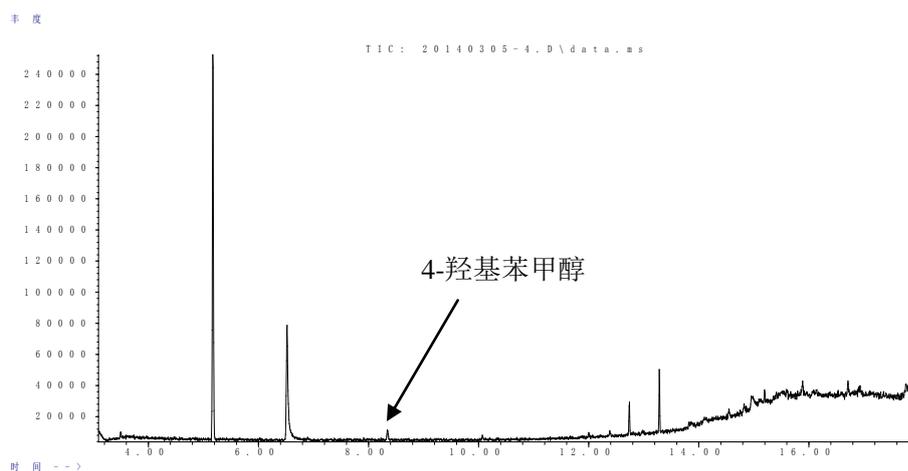


图 4.1 *A. resinae* ZN1 降解香草醛，松柏醛，丁香醛和 4-羟基苯甲醛 32h 后的 GC-MS 分析和空白对照实验。(a) *A. resinae* ZN1 代谢芳香醛类物质的空白无氧对照实验；(b) *A. resinae* ZN1 代谢香草醛的 GC-MS 分析；(c) *A. resinae* ZN1 代谢松柏醛的 GC-MS 分析；(d) *A. resinae* ZN1 代谢 4-羟基苯甲醛的 GC-MS 分析；实验条件：无机盐培养基，28 °C，静置培养。

Figure 4.1 The GC-MS analysis of the degradation of vanillina, coniferyl aldehyde, syringaldehyde and hydroxybenzaldehyde by *A. resinae* ZN1 and the control experiments. (a) the control experiments; (b) The GC-MS of vanillina; (c) The GC-MS of coniferyl aldehyde; (d) The GC-MS of hydroxybenzaldehyde.

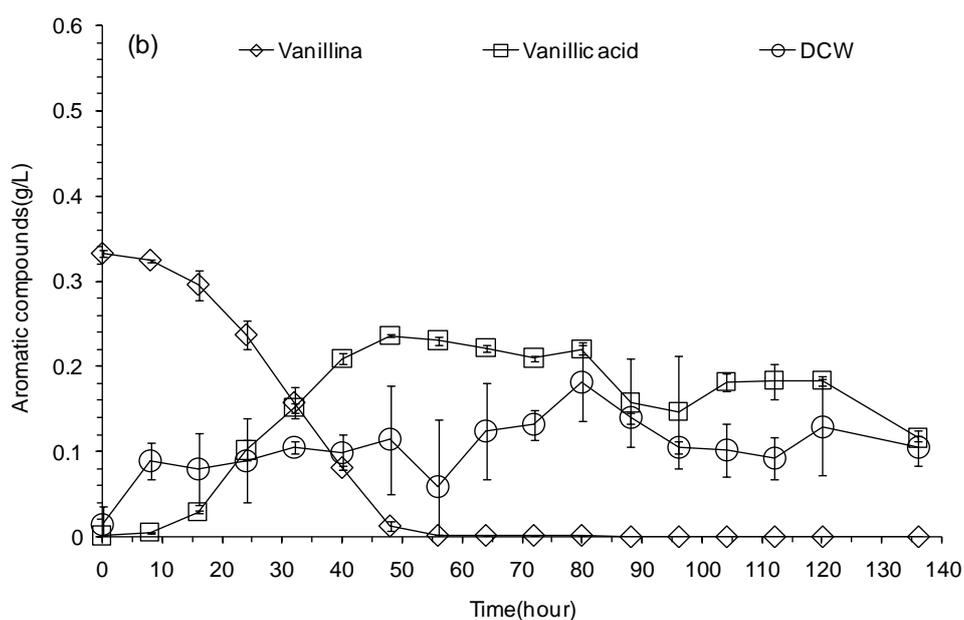
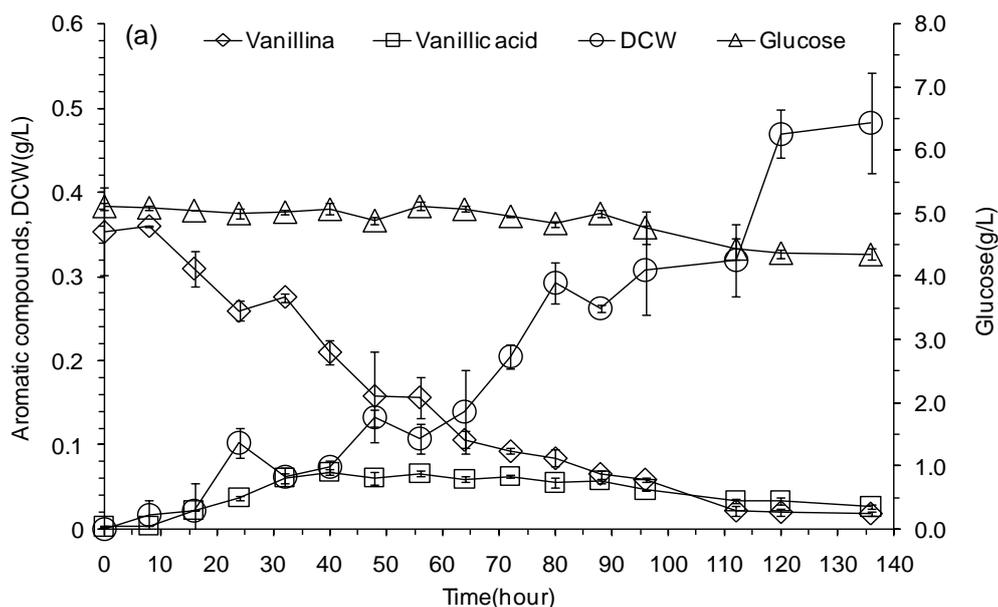
Conditions: inorganic salt medium, 28 °C, stationary culture.

从图 4.1(a)可以看出，香草醛，松柏醛，丁香醛和 4-羟基苯甲醛在只有氧气作用下，它们的浓度在 152 h 的培养中并未减小。它们可能的降解产物在培养基中也并未检测到。说明氧气的单独作用并不能将这些酚类物质氧化。在接下来的实验中，如果它们降解可以证实是 *A. resinae* ZN1 的生物作用。在后期可以看到，所有抑制物的浓度都

有所增加, 这是由培养基中水分蒸发所引起。

GC-MS 分析结果: (1) 香草醛经过 32 h 降解后, 在培养基中检测到香草酸和香草醇的存在, 如图 4.1 (b) 所示; (2) 松柏醛经过 32 h 降解后, 培养基中有一定量阿魏酸和香草酸的积累, 如图 4.1 (c) 所示; (3) 4-羟基苯甲醛经过 32 h 降解后, 在培养基中检测到 4-羟基苯甲醇的积累, 如图 4.1 (d) 所示。但这种条件并不适合丁香醛的检测, 通过 HPLC 检测到了丁香酸和丁香醇的存在。

#### 4.2 *A. resinae* ZN1 对香草醛降解路径的研究



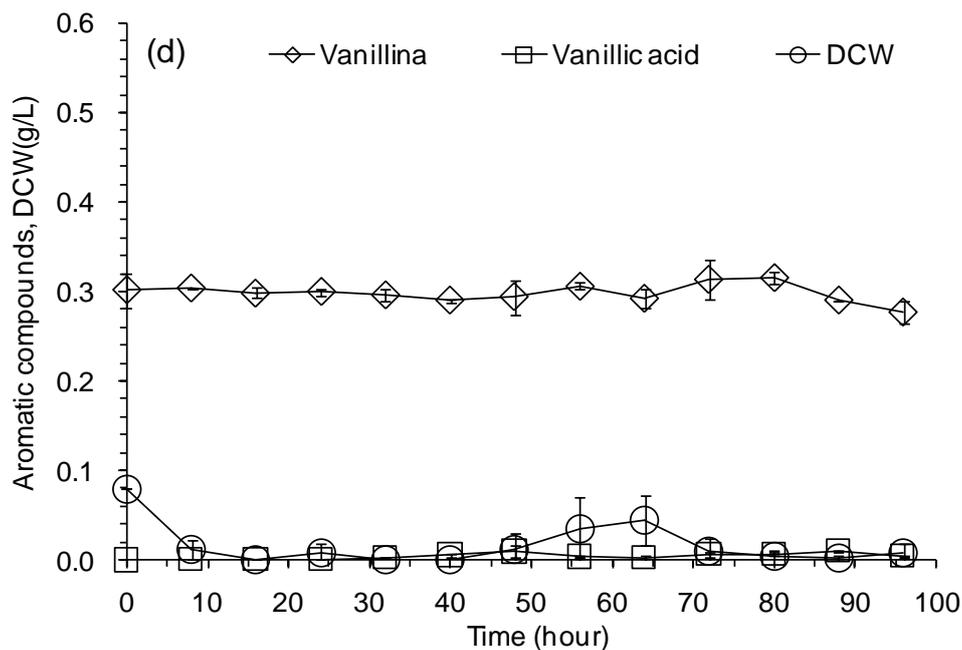
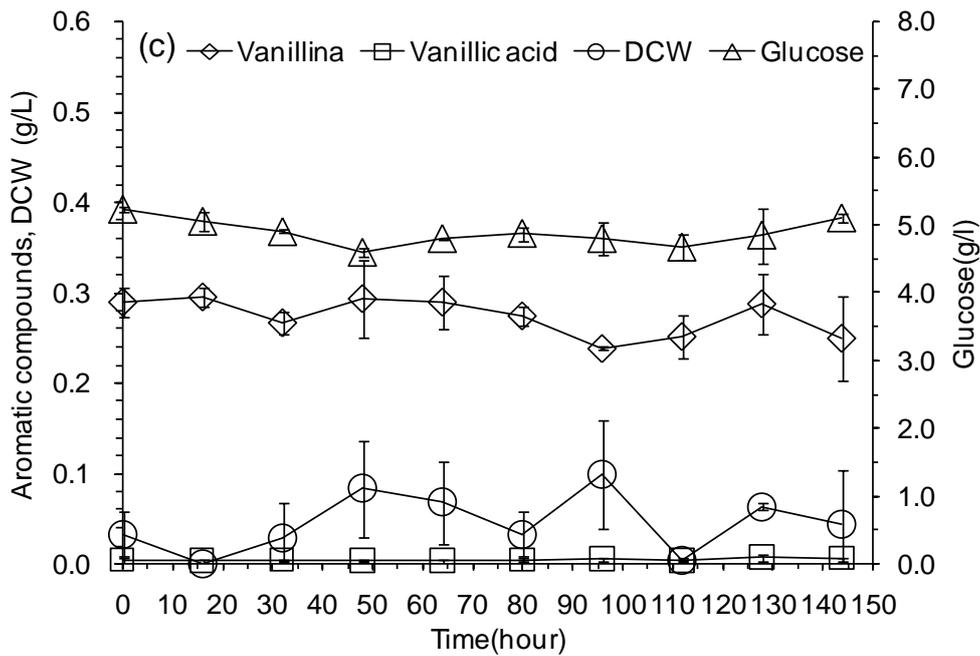


图 4.2 *A. resinae* ZN1 在不同条件下对香草醛的降解。(a) +O<sub>2</sub>, +Glucose; (b) +O<sub>2</sub>, -Glucose; (c) -O<sub>2</sub>, +Glucose; (d) -O<sub>2</sub>, -Glucose。实验条件: 恒温培养箱 28 °C, 静置培养。

Fig 4.2 The degradation of vanillina by *A. resinae* ZN1 at different conditions. (a) +O<sub>2</sub>, +Glucose; (b) +O<sub>2</sub>, -Glucose; (c) -O<sub>2</sub>, +Glucose; (d) -O<sub>2</sub>, -Glucose. Conditions: 28 °C, stationary culture.

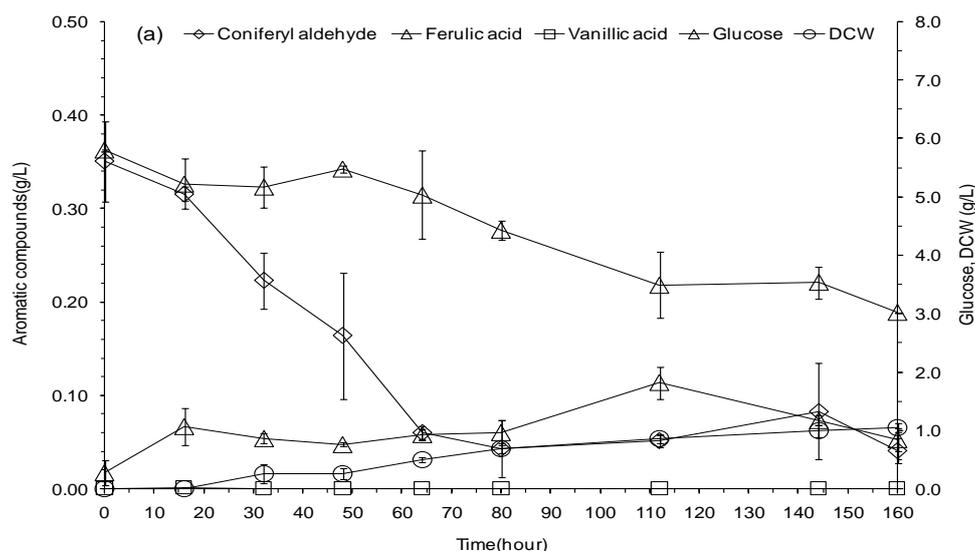
由 4.2 (a) 图可以看出, 在葡萄糖存在的情况下, *A. resinae* ZN1 降解香草醛的总体速率并不是很快。但在前 64 h 内香草醛的降解速率比较快, 在 0.004 g/(L·h) 左右, 香草醛的浓度相比于初始浓度减少了 70%。当香草醛的浓度降低到 0.1 g/L 后, 其降解速率迅速下降, 只有之前的 1/4 左右。在香草醛浓度降到 0.002 g 后, 它的量就

基本保持稳定。在香草醛开始降解时，在培养基中就检测到香草酸的存在，但其浓度在 32 h 内增长到 0.06 g/L 后就保持稳定。在香草醛浓度降低到 0.1 g/L 以下时，香草酸才有少量的降解。在其浓度减少到 0.03 g 左右后，与香草醛降解情况相同，它的浓度不再减小。最终只有 20% 的香草醛转化为香草酸。在这种条件下，葡萄糖的代谢情况与呋喃醛类物质中葡萄糖的降解相似。在香草醛浓度较高时，葡萄糖的浓度一直保持稳定。在香草醛的浓度减小到 0.1 g/L 以下时，葡萄糖的降解速率迅速提高。菌体量也由香草醛降解时的缓慢增长，变为高效利用葡萄糖而迅速增加。

图 4.2 (b) 为香草醛在氧气存在而无葡萄糖影响的条件下，*A. resinae* ZN1 对香草醛的降解曲线图。与图 4.2 (a) 相比，可以看出培养基中不存在葡萄糖更有利于香草醛的降解，0.3 g/L 左右的香草醛在 56 h 左右完全降解，降解速率提高了近 2 倍。香草醛一经降解就在培养基中检测到香草酸的存在，香草酸的浓度随着香草醛浓度的减小而不断提高。在 48 h 的时候达到最大值 0.24 g，香草醛的转化率在 70% 左右。由空白对照实验可知香草醛在只有氧气的作用下，其浓度不变。可以推测 *A. resinae* ZN1 利用了一部分香草醛进行了生长。从菌体干重不断增加也可以看出，*A. resinae* ZN1 可以利用香草醛作为唯一碳源和能源生长。

由图 4.2 (c) 和图 4.2 (d) 可以看出，香草醛的降解受到氧气影响极大。无氧条件下，香草醛基本不降解，与培养基中葡萄糖是否存在无直接关系。通过 HPLC 分析发现培养基中基本没有香草酸的存在，说明氧气是香草醛降解的必要条件。没有氧气的存在，*A. resinae* ZN1 很难将香草醛降解。在培养的过程中，培养基一直保持澄清状，通过称干重也发现菌体量基本没有增加。

### 4.3 *A. resinae* ZN1 对松柏醛降解路径的研究



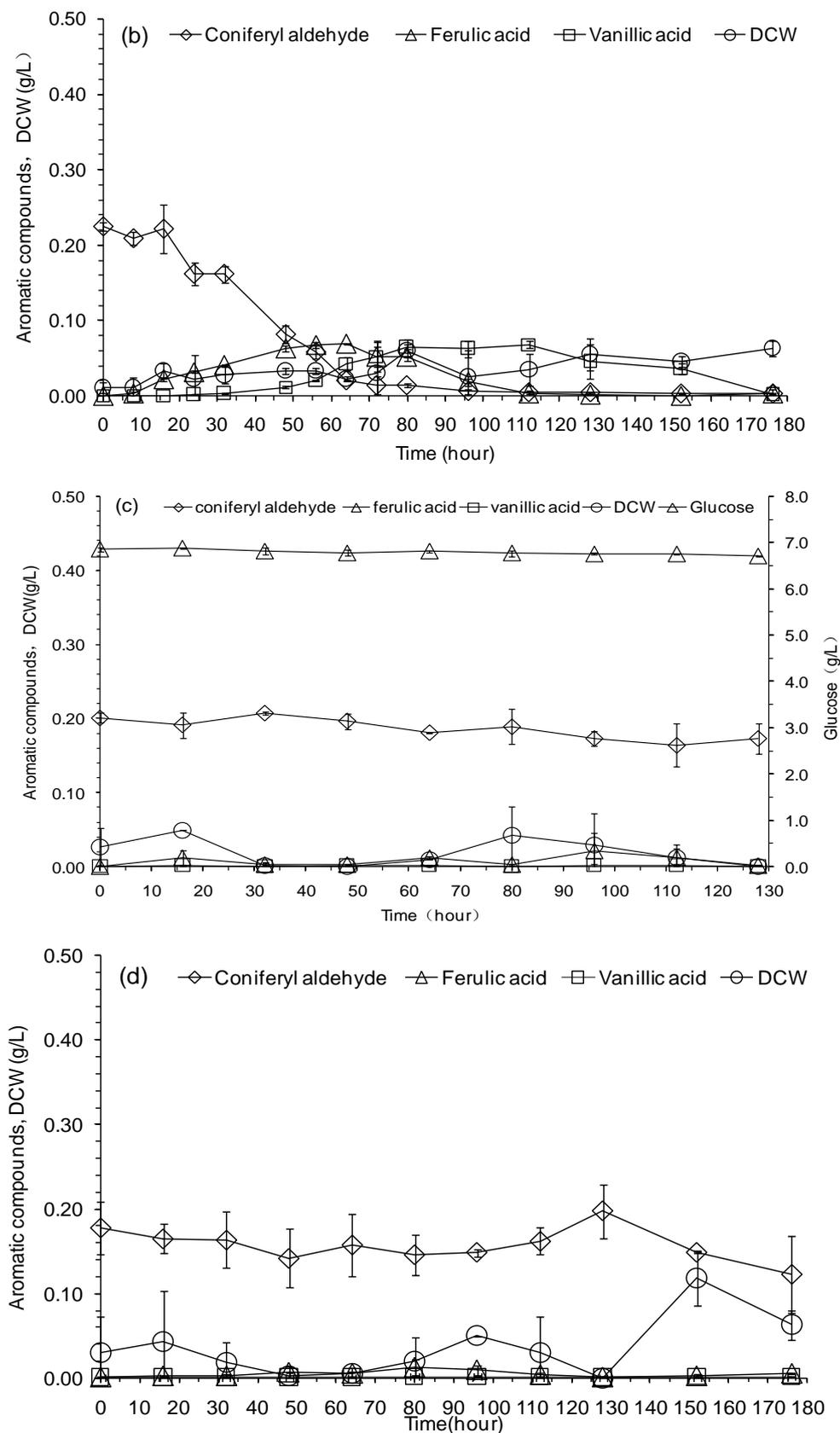


图 4.3 *A. resiniae* ZN1 在不同条件下对松柏醛的降解。(a)  $+O_2$ , +Glucose; (b)  $+O_2$ , -Glucose; (c)  $-O_2$ , +Glucose; (d)  $-O_2$ , -Glucose。实验条件：恒温培养箱 28  $^{\circ}C$ ，静置培养。

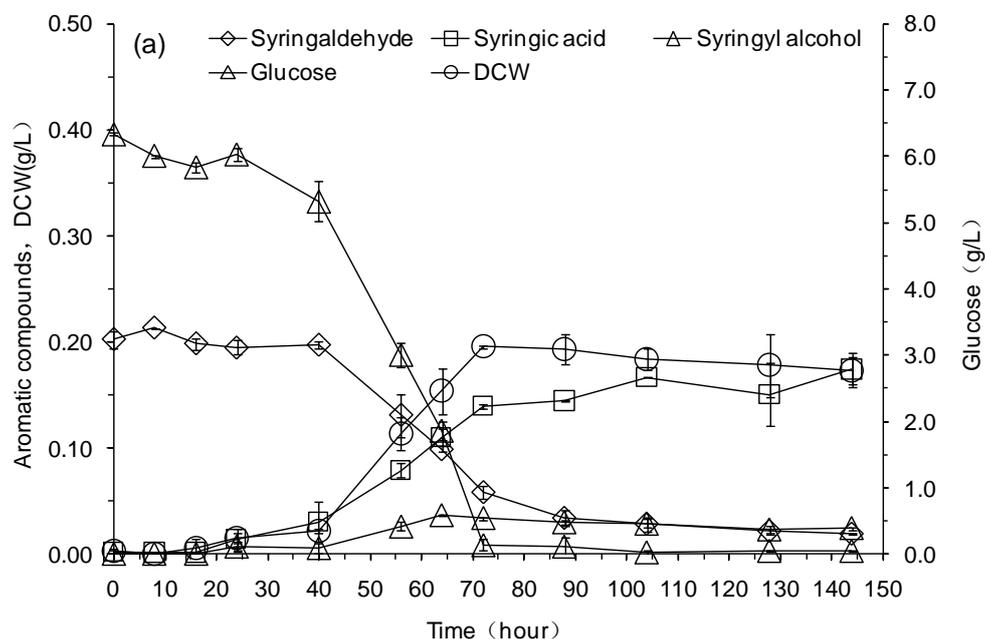
Fig 4.3 The degradation of coniferyl aldehyde by *A. resiniae* ZN1 at different conditions. (a)  $+O_2$ , +Glucose; (b)  $+O_2$ , -Glucose; (c)  $-O_2$ , +Glucose; (d)  $-O_2$ , -Glucose. Conditions: 28  $^{\circ}C$ , stationary culture.

由图 4.3 (a) 可以看出松柏醛的降解与香草醛图 4.2 (a) 在相同条件下的降解情况相同, 在发酵前 64 h 松柏醛迅速降解, 降解速率达到  $0.05 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。当浓度小于  $0.1 \text{ g/L}$  之后, 松柏醛就在培养基中保持稳定。似乎低浓度的松柏醛对 *A. resiniae* ZN1 的代谢的抑制作用很小, 在松柏醛浓度低于  $0.1 \text{ g/L}$  时, 葡萄糖开始迅速降解。菌体量也在葡萄糖开始降解后迅速增加, 在 80 h 可以看到培养基表层形成了一层菌膜, 随着培养时间的延长菌膜的厚度不断增加。松柏醛一降解就检测到培养基中阿魏酸的存在, 阿魏酸的浓度随着松柏醛的降解不断增加, 在 112 h 达到最大值  $0.11 \text{ g/L}$ , 之后阿魏酸的浓度有不断减小。在整个培养过程中并未检测到香草酸的存在, 可能由于 *A. resiniae* ZN1 在葡萄糖存在时有较强的代谢作用, 香草酸一经产生就立刻被降解。

图 4.3 (b) 为 *A. resiniae* ZN1 在无葡萄糖有氧气作用下对松柏醛的降解研究。与香草醛的降解情况 4.2 (b) 相似, 在不含葡萄糖的培养基中松柏醛的降解更加彻底, 在 112 h 在培养基中就基本检测不到松柏醛的存在。松柏醛降解的过程中, 在 16 h 就检测到阿魏酸浓度有明显的上升。伴随着松柏醛的进一步降解, 在 24 h 后检测到了香草酸的存在。阿魏酸的浓度在 64 h 达到最大  $0.07 \text{ g/L}$ , 之后在培养基中的浓度不断减小。随着阿魏酸的降解香草酸的浓度进一步提高, 在阿魏酸完全降解后, 香草酸的浓度才有下降趋势。图 4.3 (b) 很好的展示出了松柏醛的降解路径, 松柏醛先被 *A. resiniae* ZN1 转化为阿魏酸, 之后阿魏酸又被代谢成香草酸。香草酸被菌体进一步吸收利用, 产生供菌体生长的碳源和能源。在松柏醛降解的过程中, 明显检测到菌体量的不断提高。

图 4.3 (c) 与图 4.3 (d) 中松柏醛的降解状况也与香草醛的相似, 在没有氧气存在的条件下, 松柏醛也很难被降解。但, 可以看到即使没有氧气存在, 培养基中仍检测到了低浓度的阿魏酸的存在, 可能是由于菌体内仍存在少量的氧气所致。在整个培养过程中, 培养基始终保持澄清状态, 菌体干重也并没有明显增长。

#### 4.4 *A. resiniae* ZN1 对丁香醛降解路径的研究



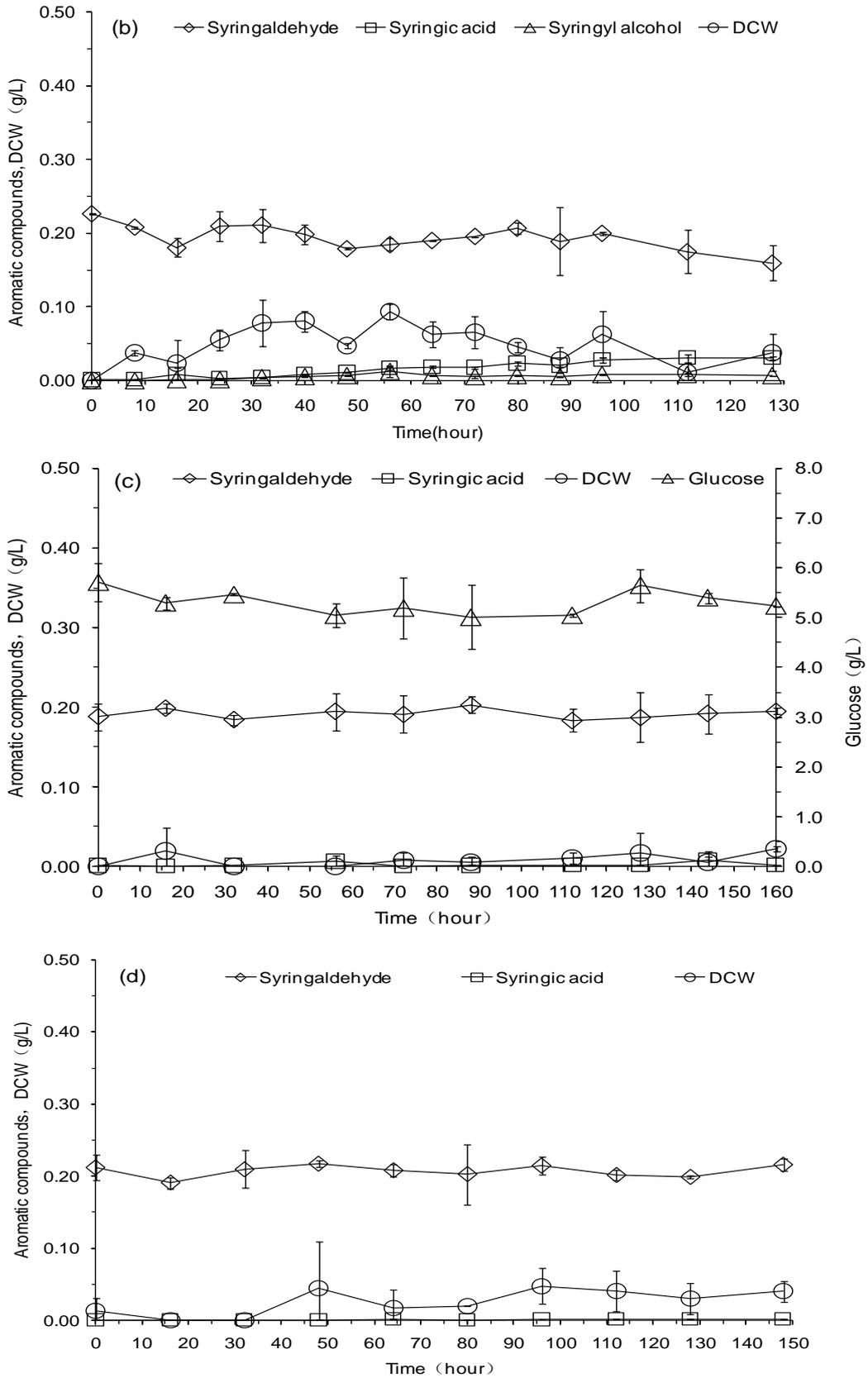


图 4.4 *A. resiniae* ZN1 在不同条件下对丁香醛的降解。(a)  $+O_2, +Glucose$ ; (b)  $+O_2, -Glucose$ ; (c)  $-O_2, +Glucose$ ; (d)  $-O_2, -Glucose$ 。实验条件：恒温培养箱 28  $^{\circ}C$ ，静置培养。

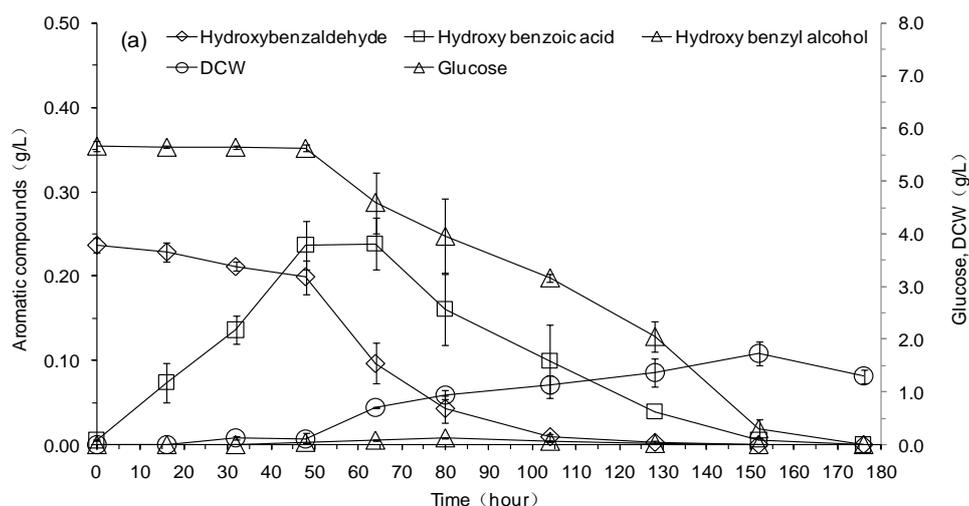
Fig 4.4 The degradation of syringaldehyde by *A. resiniae* ZN1 at different conditions. (a)  $+O_2, +Glucose$ ; (b)  $+O_2, -Glucose$ ; (c)  $-O_2, +Glucose$ ; (d)  $-O_2, -Glucose$ . Conditions: 28  $^{\circ}C$ , stationary culture.

从图 4.4 (a) 可以看出, 丁香醛的降解情况与香草醛和松柏醛不同。 *A. resinae* ZN1 需要经过很长的适应期才能利用丁香醛。而当丁香醛的浓度降低到 0.05 g/L 以下时, 基本不再降解, 其浓度长时间保持稳定。在丁香醛降解的过程中, 在培养基中检测到丁香酸和丁香醇的存在。在 72 h 时, 丁香醛的转化率达到 95% 以上。丁香酸和丁香醇几乎同时出现在培养基中, 丁香酸在培养基中的浓度相比于丁香醇高出很多, *A. resinae* ZN1 更倾向于将丁香醛转化为丁香酸。在培养初期葡萄糖就开始缓慢降解, 在 24 h 时, 培养基中的菌体量已有明显增加。24 h 后丁香醛和葡萄糖的降解速率都迅速增加, 它们几乎被 *A. resinae* ZN1 同时降解。葡萄糖在 72 h 左右被完全降解, 之后菌体量也基本保持稳定不再增加。从图 4.4 (a) 可以看出丁香醛并未对葡萄糖的降解产生抑制作用。

图 4.4 (b) 展示了在去除葡萄糖后, *A. resinae* ZN1 在含有氧气的培养基中对丁香醛的降解情况。与图 4.2 (b) 中香草醛和图 4.3 (b) 中松柏醛的降解情况不同, 在葡萄糖不存在的情况下, 丁香醛的降解速率极其缓慢, 只有图 4.4 (a) 中丁香醛降解速率的 1/5 左右。整个培养过程中丁香醛的浓度都没有大的变化, 在 128 h 左右, 与最初的浓度相比丁香醛只降解了 0.07 g 左右, 只有 30% 的丁香醛被 *A. resinae* ZN1 转化。在丁香醛降解的过程中检测到少量的丁香酸和丁香醇的存在, 丁香醛转化为其衍生物的转化率只有 50%。在培养的过程中, 发现菌体量有少量增加。由空白对照实验可知, 氧气的单独作用对丁香醛的浓度基本无影响。综上可知, *A. resinae* ZN1 能利用丁香醛做为唯一碳源生长。

与香草醛和松柏醛的降解情况相同, 在没有氧气存在的条件下, 如图 4.4 (c) 和图 4.4 (d) 所示丁香醛并不能被 *A. resinae* ZN1 降解。可见氧气对于丁香醛的降解起着至关重要的作用。

#### 4.5 *A. resinae* ZN1 对 4-羟基苯甲醛的降解路径的研究



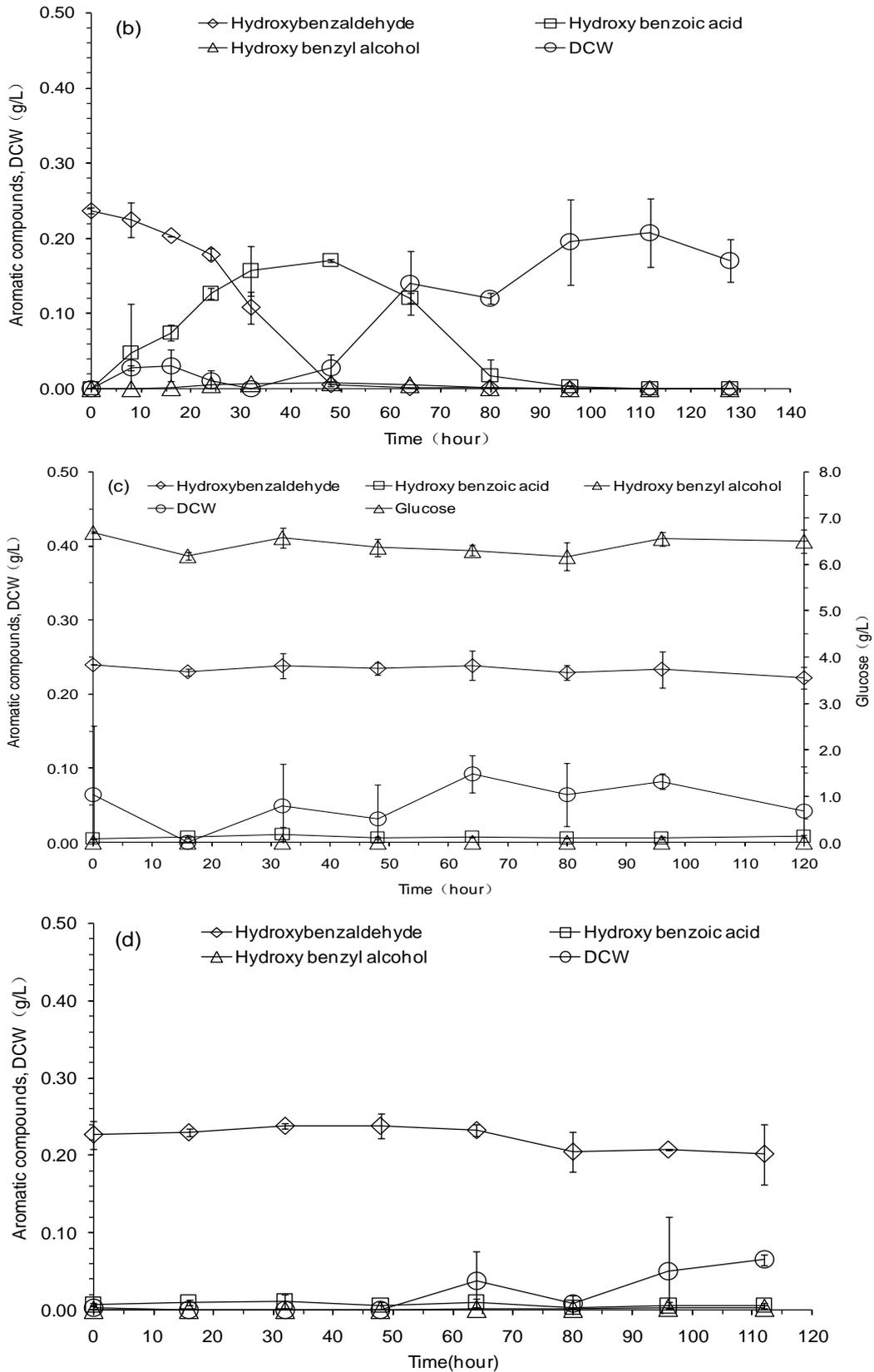


图 4.5 *A. resiniae* ZN1 在不同条件下对 4-羟基苯甲醛的降解。(a)+O<sub>2</sub>, +Glucose; (b)+O<sub>2</sub>, -Glucose; (c) -O<sub>2</sub>, +Glucose; (d) -O<sub>2</sub>, -Glucose。实验条件: 恒温培养箱 28 °C, 静置培养。

Fig 4.5 The degradation of hydroxybenzaldehyde by *A. resiniae* ZN1 at different conditions. (a) +O<sub>2</sub>, +Glucose; (b) +O<sub>2</sub>, -Glucose; (c) -O<sub>2</sub>, +Glucose; (d) -O<sub>2</sub>, -Glucose. Conditions: 28 °C, stationary culture.

由图 4.5 (a) 可以看出, 在氧气和葡萄糖都存在的情况下, *A. resiniae* ZN1 对 H 族 4-羟基苯甲醛的降解与 G 族的香草醛和松柏醛, S 族的丁香醛都不同。在发酵初期 *A. resiniae* ZN1 对 4-羟基苯甲醛的降解速率较低, 经过一段时间的适应, 到 48 h 后丁香醛开始进入快速降解的阶段, 降解速率相对于初始降解速率提高 4 倍左右。4-羟基苯甲醛降解后产生了大量的 4-羟基苯甲酸, 它的浓度与最初 4-羟基苯甲醛的浓度相当, 在 48 h 达到最大浓度后, 便开始降解, 降解速率在 0.003 g/(L·h)。在 4-羟基苯甲酸降解的过程中发现 4-羟基苯甲醇在培养基中有少量的积累, 在 172 h 左右, 培养基中的抑制物都基本降解完全。葡萄糖在培养的前 48 h 都没有明显的降解, 浓度保持稳定。之后葡萄糖随着 4-羟基苯甲醛的降解, 而一起被降解, 可见 4-羟基苯甲醛对葡萄糖的降解并无明显的抑制作用。在培养初期, 葡萄糖未开始降解前, 培养基中菌重基本没有增长, 之后随着葡萄糖的降解 *A. resiniae* ZN1 的量不断增长。

图 4.5 (b) 为 *A. resiniae* ZN1 对 4-羟基苯甲醛在有氧气存在, 而未添加葡萄糖的培养基中的降解曲线。与图 4.2 (b) 香草醛和图 4.3 (b) 中松柏醛的降解情况相同, 没有葡萄糖的存在更利于 4-羟基苯甲醛的降解, 相比于葡萄糖存在时的 3 倍左右, 4-羟基苯甲醛的转化率也在 80% 左右, 4-羟基苯甲醛较为完全的转化成了 4-羟基苯甲醇和 4-羟基苯甲酸。4-羟基苯甲酸的浓度在 48 h 达到最大浓度 0.17 g 左右就不再增加, 开始迅速降解。在 4-羟基苯甲醛降解的过程中检测到少量 4-羟基苯甲醇的存在, 但 4-羟基苯甲醇的浓度并未随着 4-羟基苯甲酸的降解而降解。菌体量在 4-羟基苯甲醛降解的过程中并未增加, 而在 4-羟基苯甲酸降解的过程中迅速增加, 说明 4-羟基苯甲醛转化为 4-羟基苯甲酸后, *A. resiniae* ZN1 将 4-羟基苯甲酸转化为可供其生长的碳源和能源。

图 4.5 (c) 和图 4.5 (d) 均为在无氧条件下, *A. resiniae* ZN1 对 4-羟基苯甲醛的降解, 与其他芳香醛类物质的降解情况相同。在无氧条件下, 4-羟基苯甲醛是难以被降解的, 氧气是它们降解的必要条件。

#### 4.6 *A. resiniae* ZN1 对芳香醛类物质代谢路径的分析

**G 族:** 关于芳香醛类物质对于生物乙醇生产菌株的抑制作用及机理的文献报道有很多, 但是关于脱毒菌株对于芳香醛类物质代谢路径的文献报导很少。它们主要集中在假单胞菌属将一些酚类物质转化成有实用价值的香料香草醛和有防腐剂潜力的香草酸上。所以根据文献报导, 特别是 Gioia et al. 通过代谢工程的手段研究荧光假单胞菌将阿魏酸转化为香草醛的代谢路径的研究<sup>[73]</sup>, 以及 Ashengroph et al. 关于一株新分离得到的菌株 *Pseudomonas resinovorans* SPR1 将丁子香酚转化为香草醛和香草酸的研究和我们做的关于 *A. resiniae* ZN1 代谢实验<sup>[74]</sup>推测 *A. resiniae* ZN1 代谢松柏醛和香草醛的路径如下:

(1) 由图 4.2 (a), (b) 可以看出随着香草醛的不断降解, 培养基中香草酸的量不断积累。它们之间的转化呈良好的线性关系, 可知香草醛被 *A. resiniae* ZN1 代谢成了香草酸。在香草醛代谢实验的 GC-MS 检测中, 检测到了香草醇的存在, 可能由于香草醇

在培养基中达不到一定量的积累或是其产生后存在于细胞内，所以通过 HPLC 并未检测到。但是，就像 Liu 报道的，一些微生物能将一类物质（如醛类）都转化为另一类物质（如醇类或酸类）物质<sup>[75]</sup>。*A. resiniae* ZN1 似乎也遵守这个规律，在一定的条件下可以将醛类物质同时转化为相应的醇和酸。

(2) 在松柏醛的代谢过程中，通过 GC-MS 分析检测到松柏醛代谢产物阿魏酸和香草酸的存在。从图 4.3 (a) 和 4.3 (b) 可以看出，有氧条件下，松柏醛一开始降解在培养基中就检测到了阿魏酸的存在。说明 *A. resiniae* ZN1 在发酵初期即将松柏醛转化为阿魏酸，在松柏醛降解的过程中也同时检测到了松柏醇的存在。与 *A. resiniae* ZN1 代谢糠醛，5-HMF 和香草醛相似，*A. resiniae* ZN1 也将松柏醛转化为相应的醇和酸。从 4.3 (b) 可以看出在 32 h 后，培养基中的香草酸浓度渐渐积累。在 64 h 后，它的浓度随着阿魏酸的降解进一步增加，由此也可以推测出阿魏酸的进一步降解产生了香草酸。阿魏酸降解为香草酸必定经过复杂的脱羧过程，*A. resiniae* ZN1 具有将香草醛转化为香草酸的能力，所以推出 *A. resiniae* ZN1 可能先将阿魏酸降解为香草醛后，再将香草醛代谢为香草酸。推出的 *A. resiniae* ZN1 代谢 G 族酚类化合物的代谢路径如下图：

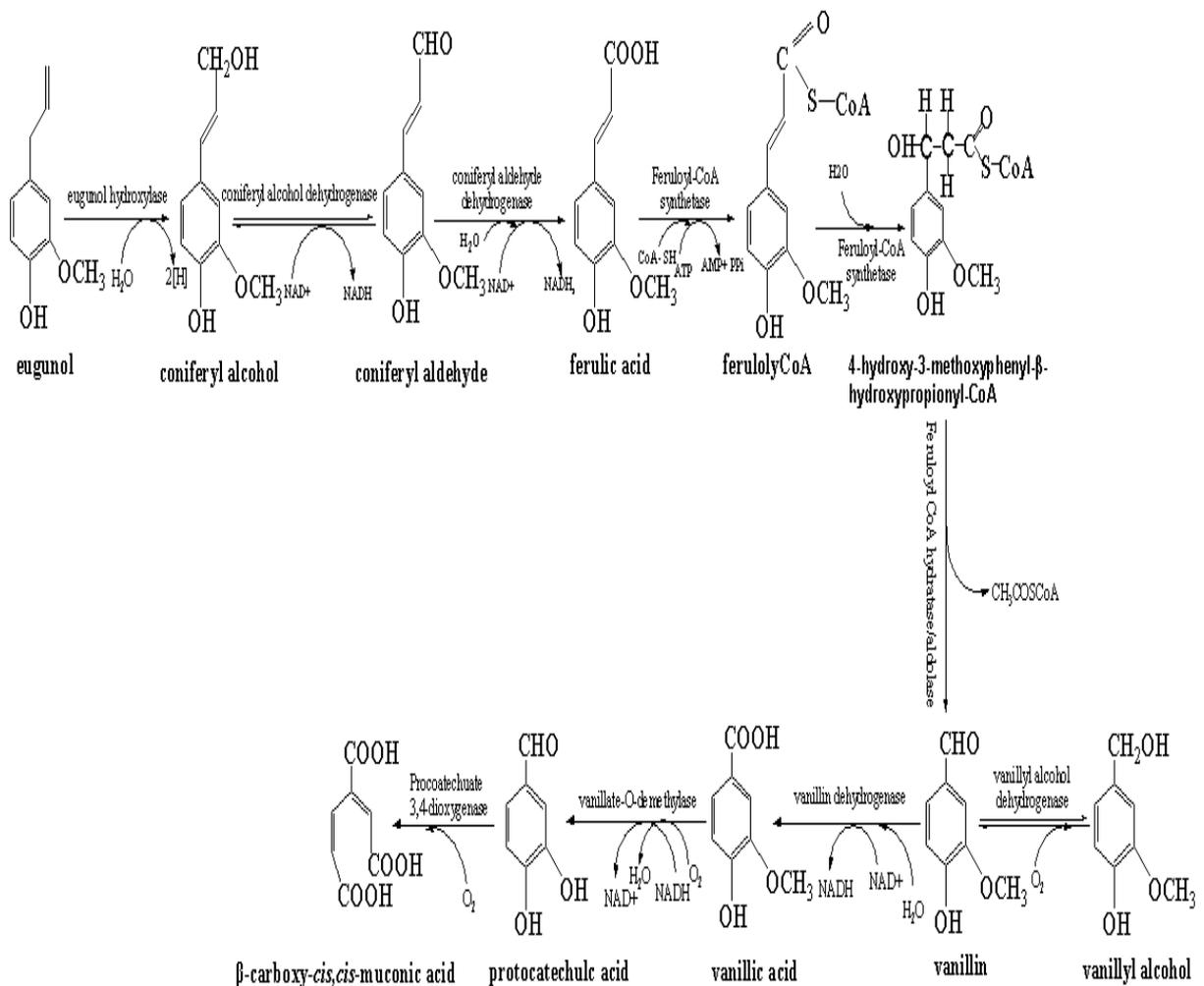


图 4.6.1 *A. resiniae* ZN1 代谢愈创木酚族 (G 族) 酚类物质代谢路径的研究

Fig 4.6.1 The analysis of guaiacol group by *A. resiniae* ZN1

**S 族:** 根据实验现象及相关数据, 以下给出 *A. resinae* ZN1 对丁香醛的代谢路径和代谢性能: (1) 由图 4.4 (a) 可以看出在葡萄糖存在的条件下, 随着丁香醛的降解培养基中同时产生了丁香酸和丁香醇。与 *A. resinae* ZN1 代谢醛类物质为相应的醇类物质和酸类物质的规律相符;

(2) 图 4.4 (b) 当培养基中去除葡萄糖后, 可以看出 *A. resinae* ZN1 代谢丁香醛的能力几乎降到了零。可见丁香醛对应于 *A. resinae* ZN1 的毒性很大, 也可能是 *A. resinae* ZN1 并不能利用丁香醛为唯一碳源生长。

(3) 由图 4.4 (c-d) 可知, 在没有氧气存在的条件下, *A. resinae* ZN1 基本失去了代谢丁香醛的能力, 可见氧气对于 *A. resinae* ZN1 代谢丁香醛的重要性。综上所述, 推测 *A. resinae* ZN1 代谢丁香醛的过程如下:

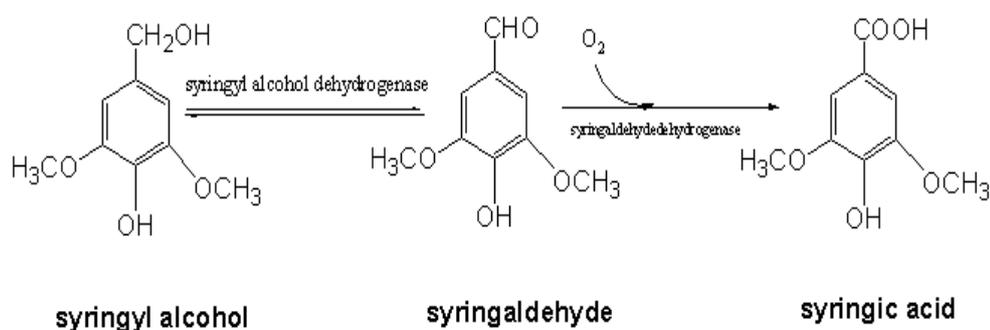


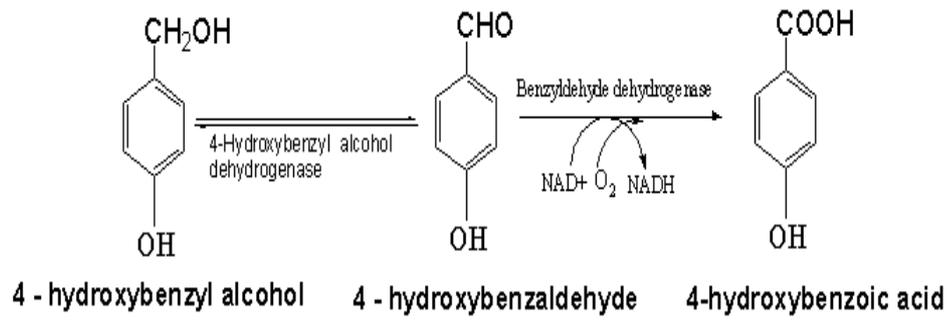
图 4.6.2 *A. resinae* ZN1 代谢丁香族 (S 族) 酚类物质代谢路径的研究

Fig 4.6.2 The analysis of syringyl group by *A. resinae* ZN1

**H 族:** 根据实验现象及相关数据, 以下给出 *A. resinae* ZN1 对 4-羟基苯甲醛的代谢路径和代谢性能: (1) 由图 4.5 (a) 可以看出在葡萄糖存在的情况下 *A. resinae* ZN1 能够较好的降解 4-羟基苯甲醛, 基本将 4-羟基苯甲醛完全转化为 4-羟基苯甲酸, 在 30 h 后检测到培养基中存在着少量的 4-羟基苯甲醇。

(2) 与 4.5 (a) 相同, 4-羟基苯甲醛开始降解时几乎被完全转化为 4-羟基苯甲酸, 在发酵中期, 培养基中才有少量 4-羟基苯甲醇的积累。

(3) 在无氧培养条件下, 如图 4.5 (c-d) 所示, 培养基中基本没有 4-羟基苯甲酸和 4-羟基苯甲醇的积累。综上所述, *A. resinae* ZN1 对 4-羟基苯甲醛的降解路径推测如下:

图 4.6.3 *A. resinae* ZN1 代谢羟基族 (H 族) 酚类物质代谢路径的研究Fig 4.6.3 The analysis of hydroxyl groups by *A. resinae* ZN1

## 第 5 章 结论与展望

### 5.1 结论

呋喃醛类物质中的糠醛和 5-HMF 是木质纤维素原料在预处理过程中产生的两种浓度很高, 毒性很强的抑制物, 对后续发酵微生物有极大地抑制作用。芳香醛类物质虽然在木质纤维素水解液中浓度较低, 但其在微量时就对微生物有致死作用。本文通过一系列实验手段证实 *A. resiniae* ZN1 是一株优良的脱毒菌株, 对呋喃醛和芳香醛类抑制物均有良好的脱除作用, 能够帮助后续发酵菌株更好的利用木质纤维素生产乙醇及其他生物化学品。分析研究发现, *A. resiniae* ZN1 能将对微生物毒性较强的呋喃醛和芳香醛类物质转变成相应的低毒性的醇类和酸类衍生物。如将呋喃醛中的糠醛/5-HMF 转化为糠醇/5-羟甲基糠醇和糠酸/5-羟甲基糠酸, 芳香醛类物质中的香草醛转变为香草醇; 松柏醇降解为松柏醇, 阿魏酸和香草酸; 丁香醛转变为丁香醇和丁香酸; 4-羟基苯甲醛降解为 4-羟基苯甲醇和 4-羟基苯甲酸。这些抑制物的降解受氧气的影响极大, 一般氧气的添加都能极大地提高抑制物的降解速率。而葡萄糖只能提高 5-HMF 和丁香醛的降解速率, 对其他抑制物的降解无作用或者阻碍它们的降解。*A. resiniae* ZN1 在抑制物存在时一般优先利用抑制物作为碳源生长, 在其浓度降低到一定阈值时才会消耗培养基中的葡萄糖。这为后期提高葡萄糖的利用率, 生产有用的生物制品提供了可能。

### 5.2 展望

本文的研究主要集中在 *A. resiniae* ZN1 对单一抑制物的降解研究上。但实际的木质纤维素预处理原料一般包含多种抑制物, 这些抑制物通常对微生物具有协同抑制作用。*A. resiniae* ZN1 同时降解多种抑制物的效果和作用机制还需要进一步研究。

本文研究抑制物的代谢路径, 主要是通过改变发酵条件捕捉可能的中间代谢产物, 再经过 GC-MS 和 HPLC 分析检测确定中间代谢产物的种类和浓度。但是只有在培养基中达到一定量积累的代谢产物才能被检测到, 所以一些在培养基中量极低或只存在于细胞中而并不会被菌体排出体外的代谢产物可能被忽略。因此, 这方面的研究也需要进一步加强。

本研究只集中在检测培养基中抑制物代谢后产生的产物, 而忽略了将抑制物降解用到的酶和细胞内可能的基因变化。这需要用到基因检测的手段, 更加准确的研究抑制物对于 *A. resiniae* ZN1 基因的影响。

## 参考文献

- [1] Demirbas A. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Convers Manage*. 2009, 50: 2239–2249.
- [2] Sims REH, Mabee W, Saddler JN, Taylor M. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour Technol*. 2010, 101: 1570–1580.
- [3] Searchinger T, Heimlich R, Houghton RA, Dong F, Elobeid A, Fabiosa J, Tokgoz S, Hayes D, Yu TH. Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science*. 2008, 319: 1238–1240.
- [4] Pimentel D. Ethanol fuels: energy balance, economics, and environmental impacts are negative. *Natural Resources Res*. 2003, 12: 127–34.
- [5] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006, 69: 627–42.
- [6] Kim S, Dale BE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg*. 2004, 26: 361–75.
- [7] Bohlmann GM. Process economic considerations for production of ethanol from biomass feedstocks. *Ind Biotechnol*. 2006, 2: 14–20.
- [8] Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Tech*. 2006, 40: 138–44.
- [9] Hamelinck CN, Hooijdonk G, Faaij APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenerg*. 2005, 28: 384–410.
- [10] Wu CZ, Yin XL, Yuan ZH, Zhou ZQ, Zhuang XS. The development of bioenergy technology in China. *Energy*. 2010, 35: 4445–4450.
- [11] Qiu HG, Huang JK, Yang J, Rozelle S, Zhang YH, Zhang YL. Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy. *Appl Energ*, 2010, 87: 76–83.
- [12] Demirbas A. Estimating of structural composition of wood and non-wood biomass samples. *Energy Sources*. 2005, 27: 761–767.
- [13] Arin G, Demirbas A. Mathematical modeling the relations of pyrolytic products from lignocellulosic materials. *Energy Sources*. 2004, 26: 1023–1032.
- [14] Mohan D, Pittman CU, Steele PH. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy Fuels*. 2006, 20: 848–889.
- [15] Yaman S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. *Energy Convers Manage*. 2004, 45: 651–71.
- [16] Koopman F, Wierckx N, Winde JH, Ruijsenaars HJ. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *PNAS*. 2010, 16:1-6.
- [17] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol*. 2010, 101: 4744–4753.

- [18] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*. 2007, 315: 804-807.
- [19] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biot*. 2004, 66: 10-26.
- [20] Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, Berhow MA, Kurtzman CP, Gorsich SW. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004, 31: 345-352.
- [21] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit Rev Biotechnol*. 2011, 31: 20-31.
- [22] Barakat A, Monlau F, Steyer JP, Carrere H. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour Technol*. 2012, 104: 90-99.
- [23] Campbell MM, Sederoff R. Variation in lignin content and composition: mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol*. 1996, 110: 3-13.
- [24] Klinke HB, Ahring BK, Schmidt AS, Thomsen AB. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour Technol*. 2002, 82: 15-26.
- [25] Hadi SM, Shahabuddin, Rehman A. Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutat Res*. 1989, 225: 101-106.
- [26] Rahman SA, Hadi SM. Reaction of furfural and methylfurfural with DNA: use of single-strand-specific nucleases. *Food Chem Toxicol*. 1991, 29: 719-721.
- [27] Delgenes J, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb Technol*. 1996, 19: 220-225.
- [28] Nigam JN. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol*. 2001, 87: 17-27.
- [29] Mashevitskaya SG, Plevako EA. The decomposition products of sugars interfering with the development of fungi. *J Appl Chem (USSR)*. 1938, 11: 511-514.
- [30] Taherzadeha MJ, Gustafssona L, Niklasson C, Liden G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000, 53: 701-708.
- [31] Tucker MP, Farmer JD, Keller FA, Schell DJ, Nguyen QA. Comparison of yellow poplar pretreatment between NREL digester and suns hydrolyzer. *Appl Biochem Biotechnol*. 1998, 70: 25-35.
- [32] Aparicio MPG, Ballesteros I, Gonzalez A, Oliva JM, Ballesteros M, Negro MJ. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic

- hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006, 129: 278-288.
- [33] Martin C, Alriksson B, Sjode A, Nilvebrant NO, Jonsson LJ. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007, 137: 339-352.
- [34] Schmidt AS, Thomsen AB. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresour Technol*. 1998, 64: 139-151.
- [35] Roe AJ, McLaggan D, Davidson I, Byrne CO, Booth IR. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J Bacteriol*. 1998, 180: 767-772.
- [36] Underwood SA, Buszko ML, Shanmugam KT, Ingram LO. Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 2004, 70: 2734-2740.
- [37] Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol Bioeng*. 1999, 66: 203-210.
- [38] Koh BT, Nakashimada U, Pfeiffer M, Yap MGS. Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotechnol Lett*. 1992, 14: 1115-1118.
- [39] Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol*. 1990, 56: 1004-1011.
- [40] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O, Jonsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocelluloses hydrolyzates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol*. 1999, 77: 91-103.
- [41] Tran AV, Chambers RP. Red oak derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Scheffersomyces stipitidis* CBS 5776. *Biotechnol Lett*. 1985, 7: 841-846.
- [42] Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J Appl Microbiol*. 2004, 97: 104-113.
- [43] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hagerdal BH, Liden G, Grauslund MFG. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2007, 82:340-349.
- [44] Jonsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hagerdal BH. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998, 49: 691-697.
- [45] Gong CS, Chen CS, Chen LF. Pretreatment of sugar cane bagasses hemicellulose hydrolyzate for ethanol production by yeast. *Appl Biochem Biotechnol*. 1993, 40: 83- 88.
- [46] Dong HW, Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nat Chem Biol*. 2010, 6: 316-318.
- [47] Horvath IS, Sjode A, Alriksson B, Jonsson LJ, Nilvebrant NO. Critical conditions for improved fermentability during overliming of acid hydrolysates from spruce. *Appl Biochem Biotechnol*. 2005, 124: 1031-1044.
- [48] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca*

- resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [49] Silva CJSM, Roberto IC. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Biotechnol Tech*. 1999, 13: 743–747.
- [50] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technol*. 2010, 101: 4851–4861.
- [51] Palmqvist E, Hagerdal BH. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technol*. 2000, 74: 17-24.
- [52] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technol*. 2004, 93: 1–10.
- [53] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J, Bothast RJ. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004, 64: 125–131.
- [54] Buchert J, Puls J, Poutanen K. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. *Appl Biochem Biotechnol*. 1989, 20/21: 309-318.
- [55] Talebnia F, Taherzadeh MJ. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. *J Biotechnol*. 2006, 125: 377–384.
- [56] Almeida JRM, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund MF, Gorsich S, Liden G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009, 82:625–638
- [57] Wierckx N, Koopman F, Ruijsenaars HJ, Winde JH. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, 92: 1095-1105.
- [58] Klinken HB, Olsson L, Thomsen AB and Ahring BK. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnol Bioeng*. 2003, 81: 738–747.
- [59] Cortez DV, Roberto IC. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. *Bioresource Technol*. 2010, 101: 1858–1865.
- [60] Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J*. 1953. 53: 110-7.
- [61] Berkel WJ, Eppink MH, Middelhoven WJ, Vervoort J, Rietjens IM. Catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* proceeds through initial oxidative decarboxylation by a FAD-dependent 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase. *FEMS. Microbiol Lett*. 1994, 121: 207-15.
- [62] Sheridan JE, Tan YL, Nelson J. Studies on the ‘Kerosene Fungus’ *Cladosporium resinae*

- (Lindau) De Vries Part III. Morphology, taxonomy and physiology. *Tuatara*. 1972, 19: 130 - 165.
- [63] Teh JS, Lee KH. Utilization of n-Alkanes by *Cladosporium resinae*. *Appl Environ Microb*. 1973, 25: 454-457.
- [64] Teh JS. Toxicity of Short-Chain Fatty Acids and Alcohols Towards *Cladosporium resinae*. *Appl Environ Microb*. 1974, 28: 840-844.
- [65] Walker JD, Cooney JJ. Pathway of n-alkane oxidation in *Cladosporium resinae*. *J Bacteriol*. 1973, 115: 635-639.
- [66] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, Walsum GPVW, Dien BS, Iten LB. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme Microb Tech*. 2008, 42: 624-630.
- [67] Liu ZL, Ma MG, Song MZ. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol Genet Genomics*. 2009, 282: 233-244.
- [68] Koopman F, Wierckx N, Winde JHD, Ruijsenaars HJ. Efficient whole-cell biotransformation of 5-(hydroxymethyl)furfural into FDCA, 2,5-furandicarboxylic acid. *Bioresour Technol*. 2010, 101: 6291-6296.
- [69] Huang X, Wang YM, Liu W, Bao J. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresour Technol*. 2011, 102: 9705-9709.
- [70] Nilsson A, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hagerdal B, Liden G. Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. *Appl Environ Microbiol*. 2005, 71: 7866-7871.
- [71] Wahlbom CF, Hagerdal BH. Furfural, 5-Hydroxymethyl Furfural and Acetoin Act as External Electron Acceptors During Anaerobic Fermentation of Xylose in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2002, 78: 172-178.
- [72] Siso MIG, Picas MAF, Cerdan ME. Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Kluyveromyces fragilis* mutants. *FEBS Lett*, 1996. 387: 7-10.
- [73] Gioiacci DD, Luziatelli F, Negroni A, Ficca AG, Fava F, Ruzzi M. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *J Biotechnol*. 2011, 156:309-316.
- [74] Ashengroph M, Nahvi I, Esfahani HZ, Momenbeik F. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. *New Biotechnol*. 2011, 28: 656-664.
- [75] Liu. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, 90: 809-825.

## 致谢

时光荏苒，短暂的三年研究生生活接近尾声。非常感谢陪我一起度过这三年时光的老师和同学，特别感谢我的导师—鲍杰老师的悉心指导。鲍老师是一位思维活跃，学术渊博，科研严谨认真的人。无论是本研究课题的确立，还是我在实验过程中遇到问题的解决，还有到最后论文的撰写都给了我无数启发和帮助。在此，我表示我最崇高的敬意和感谢。在研究生期间，鲍老师一直对我严格要求，让我养成了对今后学习和工作都十分有帮助的良好习惯。在以后的工作中，我会继续努力，不忘记老师的教诲。

感谢张老师，高老师平时对我学术研究上的指导和帮助。在遇到实验研究的问题时，与他们讨论，总能给我许多启迪；

感谢何燕青师兄一直的帮助和指导，他是一个思维十分活跃的人。在我实验出现问题和实验现象无法解释时，总能给我帮助；

感谢易霞和王霞的帮助，虽然我们做的课题不一样，但是一直以来你们对自己课题深入的研究，总能从侧面帮助我，给我启迪；

感谢我的父母和姐姐，弟弟对我生活上和精神上的支持，有了他们才让我有如此幸福的生活。

再次感谢帮助过我的所有老师和师兄妹们，谢谢你们！