

糠醛和 5-羟甲基糠醛对大肠杆菌产丁二酸的影响

王丹¹, 王洪辉¹, 王競¹, 汪楠¹, 张杰¹, 邢建民²

1 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044

2 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

王丹, 王洪辉, 王競, 等. 糠醛和 5-羟甲基糠醛对大肠杆菌产丁二酸的影响. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1463-1472.

Wang D, Wang HH, Wang J, et al. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on succinic acid production by *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1463-1472.

摘要: 利用可再生生物质特别是木质纤维素水解液来生产平台化合物丁二酸, 是目前研究的热点。虽然许多研究者相继报道了木质纤维素水解液对菌株生长和丁二酸生产存在一定抑制作用, 但并没有水解液中各种抑制物对菌株影响的相关动力学研究及机理研究。我们选择了两种代表性木质纤维素水解液抑制物, 即糠醛和 5-羟甲基糠醛, 系统研究了它们对大肠杆菌的生长和丁二酸生产的影响。结果表明: 糠醛和 5-羟甲基糠醛的初始抑制浓度均为 0.8 g/L。当糠醛浓度大于 6.4 g/L, 5-羟甲基糠醛浓度大于 12.8 g/L 时, 菌株生长完全受到抑制。在最高耐受浓度下, 糠醛的存在使菌株生物量比对照菌株下降 77.8%, 丁二酸产量下降 36.1%。5-羟甲基糠醛的存在使菌株生物量比对照菌株降低 13.6%, 丁二酸产量降低 18.3%。糠醛和 5-羟甲基糠醛具有明显的协同作用。体外酶活测定表明丁二酸生产途径中关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、苹果酸脱氢酶、富马酸还原酶均受糠醛和 5-羟甲基糠醛抑制。研究结果对丁二酸生产用纤维素水解液的预处理和脱毒工艺开发具有指导作用, 有利于实现丁二酸发酵生产的工业化。

关键词: 水解液, 大肠杆菌, 丁二酸, 抑制物, 糠醛

Received: June 25, 2013; **Accepted:** September 25, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21106191), Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (No. cstcjjA50002), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2011AA02A203, 2012AA022301), Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-2), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. CQDXWL-2013-019).

Corresponding author: Dan Wang. Tel: +86-23-65111179; E-mail: dwang@cqu.edu.cn

Jianmin Xing. Tel: +86-10-62550913; E-mail: jmxing@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 21106191), 重庆市自然科学基金 (No. cstcjjA50002), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(Nos. 2011AA02A203, 2012AA022301), 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-EW-G-2), 中央高校基本科研业务费(No. CQDXWL-2013-019)资助。

Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on succinic acid production by *Escherichia coli*

Dan Wang¹, Honghui Wang¹, Jing Wang¹, Nan Wang¹, Jie Zhang¹, and Jianmin Xing²

¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

² National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Succinic acid production by fermentation from biomass, especially the lignocellulosic hydrolysate, is an alternative to chemical synthesis. Many studies report the inhibition of cell growth and succinic acid production from lignocellulosic hydrolysate, hardly is known about the actual kinetic and mechanism of the inhibition of individual factors. In this study, we studied inhibition effects of furfurals and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) on cell growth and succinic acid production of engineered *E. coli*. Cell growth and succinic acid titer were severely inhibited by furfural and HMF with both concentrations higher than 0.8 g/L. Cell growth was totally inhibited when the concentration of furfural was above 6.4 g/L, or the concentration of HMF was above 12.8 g/L. At the concentration of maximum toleration, which was 3.2 g/L, furfural decreased the cell mass by 77.8% and the succinic acid titer by 36.1%. HMF decreased the cell mass by 13.6% and the succinic acid titer by 18.3%. Activity measurements of key enzymes revealed that phosphoenolpyruvate carboxylase, malate dehydrogenase, fumarate reductase all were inhibited by furfural and HMF. This study gave a quantitative view to the succinic acid production under the inhibition of lignocellulose degradation products and will help overcome the difficulties of the lignocellulosic hydrolysate fermentation.

Keywords: lignocellulosic hydrolysate, *Escherichia coli*, succinate, inhibitor, furfural

丁二酸 (Succinate) 位列美国能源部报道的 10 种生物基平台化合物之首, 广泛运用于食品、医药、农业领域, 可作为合成 1,4-丁二醇、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮及可降解生物高分子材料聚丁二酸丁二醇酯 (PBS) 等的原料^[1-2]。微生物发酵法生产丁二酸可以摆脱化学合成法对石油的依赖, 且开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径, 受到越来越多的重视^[3-4]。以工业化为目标, 生物基丁二酸生产要求菌株具有高丁二酸产量和转化率, 可以利用廉价的可再生生物质, 从而降低成本, 与化学合成法相竞争。

目前, 许多菌株在利用葡萄糖为碳源时, 丁二酸产量和转化率都较高, 如丁二酸放线杆

菌^[5]、丁二酸厌氧螺菌^[6]、产丁二酸曼海姆菌^[7-8]和代谢工程改造的大肠杆菌^[9-14]等。然而文献报道, 在利用可再生资源, 特别是木质纤维素水解液产丁二酸时, 细胞生长和丁二酸生产都受到不同程度的抑制。Chen 等报道当丁二酸放线杆菌 NJ113 利用玉米纤维水解液产丁二酸时, 其菌株生长比采用葡萄糖为碳源有一明显的延滞期。当水解液用 CaCO₃ 中和并结合活性炭处理后, 丁二酸产量可增加 23.3%^[15]。郑璞等报道丁二酸放线杆菌可以用麦秆产丁二酸 53.2 g/L, 比以葡萄糖为碳源所能达到的最大丁二酸浓度大为降低^[3]。Hodge 等报道软木水解液即使用 Ca(OH)₂ 调节 pH 值后亦不能为大肠杆菌 AFP184 所利用, 只有用 overliming 法处理才能

获得可发酵糖液^[16]。我们也在前期研究中发现,当大肠杆菌 SD121 以玉米秸秆水解液为碳源时,菌体延滞期变长,最终丁二酸产量与以混合糖液为碳源的对照组下降较多^[17]。

木质纤维素水解过程在产生可发酵单糖的同时,不可避免地会产生许多对生物体有害的化合物^[18-19]。这些化合物是糖降解产物,如五碳糖降解产生的糠醛,六碳糖降解产生的 5-羟甲基糠醛,以及木质素降解产物,包括香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛等酚类化合物^[18,20]。在生物质乙醇研究领域,纤维素水解液抑制物的研究很多,其抑制现象和抑制机理都有大量文献报道。基于这些研究,适应性培养和基因修饰的工作在近期陆续开展,以增强乙醇产生菌株的抑制物耐受能力,这些菌株包括大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母等。虽然这些研究可以给木质纤维素水解液发酵产丁二酸提供借鉴,但不同微生物对抑制物的耐受性是否存在共同规律是很难预测的。即使对大肠杆菌而言,目前并无文献报道水解液抑制物对其乙醇生产和丁二酸生产的影响是相似的。但可以推断的一点是,正如对乙醇生产过程一样,水解液抑制物对丁二酸生产过程也存在极大影响。

本研究选择糠醛和 5-羟甲基糠醛作为典型水解液抑制物,研究其对实验室构建的大肠杆菌工程菌株 SD121 生长和丁二酸生产的影响。我们更进一步研究了其协同作用,以及对产丁二酸途径的关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、苹果酸脱氢酶、富马酸还原酶的体外酶活影响。结果可为进一步的菌种改良和脱毒工艺开发提供指导,有利于丁二酸生物制造的工业化。

1 材料与方法

1.1 菌株与实验材料

大肠杆菌 DC1515 (*pflA::Cam ldhA::Tn10 ptsG::Kan* in wild type W1485)由美国南伊利诺伊州大学 P. Clark 教授惠赠。将蓝藻磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因在 DC1515 中表达,构建出工程菌株 SD121^[17]。该菌株具有丁二酸产量和得率高的特点,同时可以发酵混合糖液和玉米秸秆水解液。基础培养基组分由 Difco 公司提供。糠醛、5-羟甲基糠醛购买自 Sigma-Aldrich 公司。PEPC、MDH 和 FRD 酶液购自 Sigma-Aldrich 公司。辅酶 NADH 和 MgSO₄ 购自 Merck 公司。

1.2 菌株培养条件

大肠杆菌种子培养为 37 °C, LB 培养基培养。从含有抗生素的 LB 平板上筛选阳性克隆。在必要的时候加入抗生素: 50 μg/mL 氨苄; 50 μg/mL 卡那霉素; 10 μg/mL 四环素; 30 μg/mL 氯霉素。发酵: 从过夜生长的 5 mL 培养基中取 200 μL 接种到新鲜的 LB 培养基中,添加合适的抗生素有氧培养。待菌体 OD₆₀₀ 达到 1, 取 1 mL 菌液接种到 50 mL 血清瓶。血清瓶里含 20 mL 发酵培养基, 0.4 g MgCO₃ (维持 pH 并提供 CO₂), 0.1 mmol/L IPTG, 合适的抗生素, 初始 pH 调为 7.0。发酵培养基成分是实验室自行优化的, 含 20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母膏, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.45 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 6 g/L NaH₂PO₄·2H₂O, 3 g/L (NH₄)₂SO₄·7H₂O, 0.2 g/L CaCl₂。IPTG 使 SD121 中的 PEPC 酶得以表达。血清瓶密封, 37 °C、150 r/min 厌氧培养 48 h。菌体生长实验, 采用 1:1 的 LB 和 M9 培养基 (维持 pH) 厌氧培养, 添加葡萄糖和抗生素, 不加 MgCO₃。

1.3 水解液制备

棉秆水解液为实验室自制。首先以气爆方式处理新疆棉花秸秆, 1.5 MPa 下处理 10 min, 然后用粉碎机粉碎秸秆, 40 目筛子筛分。样品洗涤后于 50 °C 烘干。加入纤维素酶(Novozymes), 酶活性为 1.82 滤纸酶活性(FPU)/mg 蛋白和 0.23 葡糖苷酶活性 IU/mg 蛋白。纤维素酶按 20 FPU/g 底物的量加入 12% (W/V)的样品中, 0.05 mol/L Tris-HCl 作为 pH 缓冲液。将悬浮液置于 500 mL 三角瓶中, 50 °C、120 r/min 水解 72 h。收集悬浮液, 10 000 r/min 离心 25 min。上清液即为制备的生物质水解液。

1.4 抑制物加入

5-羟甲基糠醛配置成 1.2 mol/L 储液, 通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌。糠醛直接加入培养基中至合适的浓度。在我们的实验中, 糠醛和 5-羟甲基糠醛的用量均为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.8、1.6、3.2、6.4 和 12.8 g/L。当考察两者的协同作用时, 在同一培养基中分别加入两者各 0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 g/L。对照菌株两者均不加。每次试验均采用 3 份同样的培养基, 结果取平均值。

1.5 菌株生长、发酵产物及水解液中糠醛、5-羟甲基糠醛的高效液相分析

检测 OD_{600} 的吸光值来监控细胞生长, 细胞干重(g/L) = $0.48 \times OD_{600}$ 。葡萄糖、乳糖消耗和产物(丁二酸、乳酸、甲酸、乙酸和乙醇), 水解液抑制物(糠醛, 5-羟甲基糠醛)采用高效液相检测。色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H (7.8 mm×300 mm), HP1200 工作站, 示差检测器。厌氧发酵样品于 10 000 ×g 离心 10 min,

0.22 μm 滤膜过滤, 稀释 5 倍, 上样 20 μL。流动相为 5 mmol/L 硫酸, 0.6 mL/min, 55 °C。

1.6 体外抑制物对酶活的影响

检测水解液抑制物对丁二酸生产途径关键酶 PEPC、MDH 和 FRD 的影响, 所用糠醛浓度为 0~6.4 g/L, HMF 的浓度为 0~6.4 g/L, 对应的摩尔质量浓度为糠醛 0~66.56 mmol/L, HMF 的浓度为 0~50.72 mmol/L。酶活测定实验均在 30 °C 下进行, 根据 340 nm 处辅酶 NADH 吸光度值的降低来确定酶促反应速率。1 U PEPC/MDH/FRD 酶活定义为 30 °C 时, 1 μmol/L NADH 被氧化为 NAD 所需要的酶量。

测量方法: 首先将缓冲液和辅酶加入同一离心管, 然后加入含有抑制物的样品液。样品液中的底物和抑制物在恒温器中孵化 5 min 以达到测定温度 30 °C, 最后加入待测酶液以启动反应。在孵化阶段和反应阶段, 离心管盖紧盖子以防止化合物挥发。

反应速率数据通过在线 UV-Vis 分光光度计测定, 初始线性阶段 1~3 min 是测定反应速率最为准确的阶段, 在本文中用来计算酶活。PEPC 酶活测定的混合液含 50 mmol/L HEPES (pH 7.3), 5 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 10 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L $KHCO_3$, 0.2 mmol/L NADH, 4.0 U/mL 苹果酸脱氢酶, 添加 3.0 U/L PEPC 酶引发酶促反应^[21]。MDH 酶活测定的混合液含 500 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 0.2 mmol/L NADH, 2 mmol/L 草酰乙酸, 添加 4.0 U/L MDH 酶引发酶促反应^[22]。FRD 酶活测定的混合液含 100 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.2), 5 mmol/L 富马酸, 添加 6.0 U/L FRD 酶引发酶促反应^[23]。

2 结果

2.1 不同生物质水解液中糠醛和 5-羟甲基糠醛的浓度

实验室自制棉秆水解液中糠醛和 5-羟甲基糠醛的浓度如表 1 所示。水解液中还原糖总浓度约为 92.2 g/L, 糠醛浓度为 1.52 g/L, HMF 浓度为 0.6 g/L。文献报道不同生物质水解液中总还原糖可达 46.7~217.5 g/L, 糠醛浓度为 0~2.98 g/L, HMF 浓度为 0~4.3 g/L, 见表 1。抑制物浓度与原材料、处理工艺及糖浓度相关, 但与糖浓度

并没有线性关系。我们以此为根据, 设计了本文研究的糠醛和 HMF 的浓度梯度, 如实验方法 1.4 所示。

2.2 糠醛对菌株生长及丁二酸生产的影响

糠醛对菌株 SD121 生长和丁二酸产量的影响如图 1 所示。图 1A 表明, 与不加糠醛的对照实验组相比, 加入浓度为 0.2 g/L 及以下的糠醛时, SD121 的菌体生长无明显影响。当培养基中加入 0.8 g/L 和 1.6 g/L 糠醛时, 细胞生长受到明显抑制, 最终菌体量只能达到对照菌株的

表 1 生物质水解液中糠醛和 HMF 的浓度

Table 1 Concentration of furfural and HMF in biomass hydrolysate

Biomass	Concentration of reducing sugar (g/L)	Concentration of furfural (g/L)	Concentration of HMF (g/L)	Sources
Cotton stalk	92.2	1.52	0.60	Our lab
Soft wood	110.5	—	4.30	[16]
Corn fiber	217.5	2.98	—	[15]
Wheat straw	27.8	0.80	0.06	[24]
Spruce	46.7	1.40	2.30	[25]

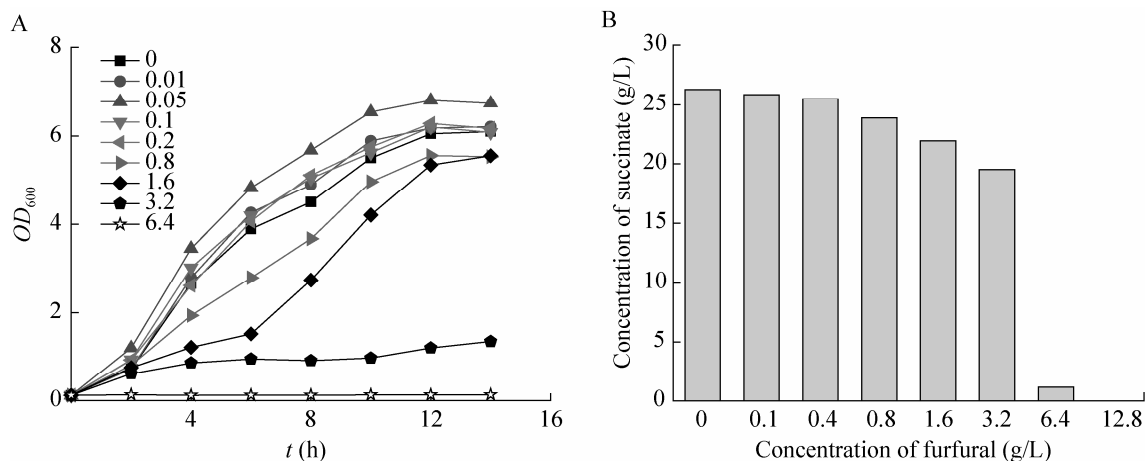


图 1 糠醛对大肠杆菌 SD121 生长(A)和丁二酸生产(B)的影响

Fig. 1 Effects of furfural on the cell growth (A) and succinic acid production (B) of engineered *E. coli* SD121. (A) Cell growth as measured at OD_{600} during growth. (B) Succinic acid production in the medium.

91.0%。当培养基中加入 3.2 g/L 糠醛时, 最终菌体 OD_{600} 只能达到 1.35, 即菌体量为 0.65 g/L, 与对照菌株相比, 下降了 77.8%。当培养基中加入 6.4 g/L 糠醛时, 菌株生长完全被抑制。图 1B 表明, 当糠醛浓度低于 0.4 g/L 时, 丁二酸生产所受影响很小。增加糠醛浓度到 3.2 g/L, 丁二酸产量由 26.3 g/L 下降为 19.5 g/L, 与对照菌株相比下降了 36.1%。当培养基中加入 6.4 g/L 糠醛时, 菌株的丁二酸产量为 1.15 g/L。加入 12.8 g/L 糠醛时, 培养基中已检测不到丁二酸, 说明此时接种进去的菌体既不生长, 也不产酸, 停止了一切代谢活动。由图 1 可以看出, 糠醛对大肠杆菌生长的影响大于其对丁二酸生产的影响, 而一定的菌体量是丁二酸生产的基础。因为我们的实验目标不是收集大肠杆菌菌体, 而是得到含有丁二酸的发酵液, 所以我们此处主要根据图 1B 确定产丁二酸大肠杆菌的糠醛最大耐受浓度为 3.2 g/L。

2.3 HMF 对菌株生长及丁二酸生产的影响

HMF 对菌株 SD121 生长和丁二酸产量的影响如图 2 所示。图 2A 表明, 与不加 HMF 的对照实验组相比, 加入的 HMF 浓度不超过 0.8 g/L 时, SD121 的菌体生长无明显影响。当培养基中加入 1.6 g/L、3.2 g/L 和 6.4 g/L HMF 时, 细胞生长受到明显抑制, 最终菌体量只能达到对照菌株 86.4%。当培养基中加入 12.8 g/L 糠醛时, 菌株生长几乎完全被抑制, 最终菌体 OD_{600} 为 0.13。图 2B 表明, 当 HMF 浓度低于 0.8 g/L 时, 丁二酸生产所受影响很小。增加 HMF 浓度到 3.2 g/L, 丁二酸产量由 26.3 g/L 下降为 21.5 g/L, 与对照菌株相比下降了 18.3%。当培养基中加入 6.4 g/L HMF 时, 菌株的丁二酸产量为 2.15 g/L。加入 12.8 g/L HMF 时, 培养基中已检测不到丁二酸, 说明此时接种进去的菌种与加入高浓度糠醛时一样, 停止了一切代谢活动。由图 2 可以看出, 在同等浓度下, HMF 对大肠杆菌生长和产丁二

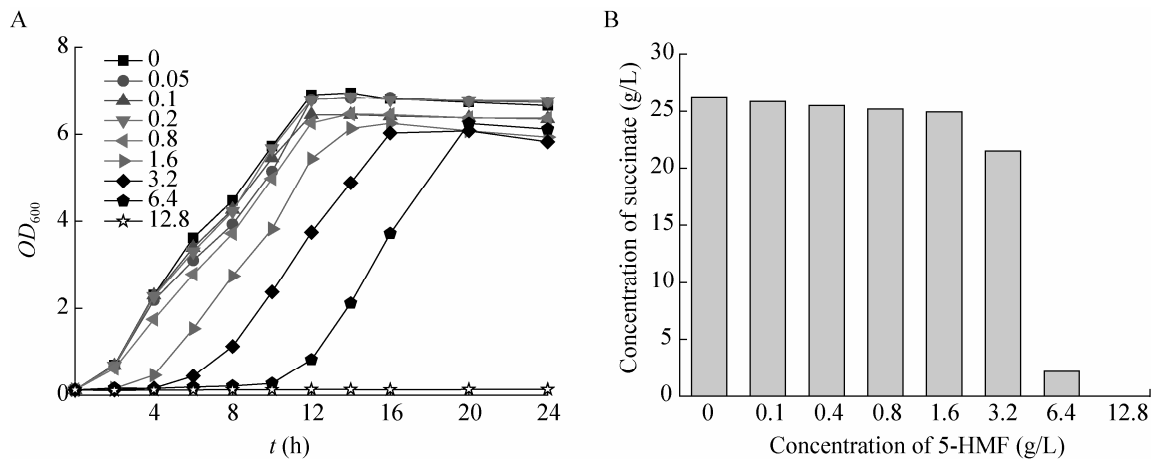


图 2 HMF 对大肠杆菌 SD121 生长(A)和丁二酸生产(B)的影响

Fig. 2 Effects of HMF on the cell growth (A) and succinic acid production (B) of engineered *E. coli* SD121. (A) Cell growth as measured at OD_{600} during growth. (B) Succinic acid production in the medium.

酸的影响比糠醛的影响要弱。与上一节实验结果类似,我们此处主要根据图 2B 确定产丁二酸大肠杆菌的 HMF 最大耐受浓度为 3.2 g/L。

2.4 糠醛和 HMF 混合物对菌株生长和丁二酸生产的影响

在同一培养基中添加不同浓度的糠醛和 HMF,以验证两者是否存在协同作用。如图 3A 所示,当两者的总浓度低于 0.8 g/L 时,菌株的生长受到的影响较小。当加入抑制物的总浓度为 1.6 或 3.2 g/L 时,细胞生长比起单独加入糠醛或 HMF 时存在一个较长的延滞期,在 4~14 h 之后才恢复生长。当添加总浓度为 3.2 g/L 的抑制物时,最终细胞 OD_{600} 达到 3.22,即细胞量为 1.55 g/L,比添加同样浓度的糠醛所得的细胞量要大。然而,此细胞密度仅为对照菌株的 53.0%,是添加同样浓度的 HMF 所得细胞量的 54.2%。从图 3B 可以看出,当抑制物总浓度低于 1.6 g/L 时,丁二酸产量与添加同样浓度的糠醛所能达到

的产量类似。但当抑制物总浓度添加量为 3.2 g/L 时,丁二酸产量降低了 40.6%,只有 15.95 g/L。结果表明,糠醛和 HMF 的添加具有协同作用,对丁二酸生产的影响尤为明显。

2.5 抑制物对丁二酸代谢途径关键酶的影响

选择丁二酸代谢途径的关键酶 PEPC、MDH 和 FRD 作为研究对象,考察了抑制物对体外酶活的影响。结果如图 4 所示,3 种酶在添加抑制物糠醛时,酶活均受影响,PEPC 的酶活受到最明显的抑制。当加入 3.328 mmol/L (0.32 g/L)糠醛时,PEPC 酶活降低 60%;当加入 16.64 mmol/L (1.6 g/L)糠醛时,PEPC 酶活降低 90%以上。然而,糠醛对 MDH 和 FRD 的影响没有其对 PEPC 的影响那么显著。当添加 3.328 mmol/L 糠醛时,MDH 酶活可维持 50%,FRD 酶活可维持 70%。在添加 66.56 mmol/L 糠醛的缓冲液中,MDH 和 FRD 的酶活仍可维持 20%以上,而此时 PEPC 酶活只有参照实验的 2.03%。

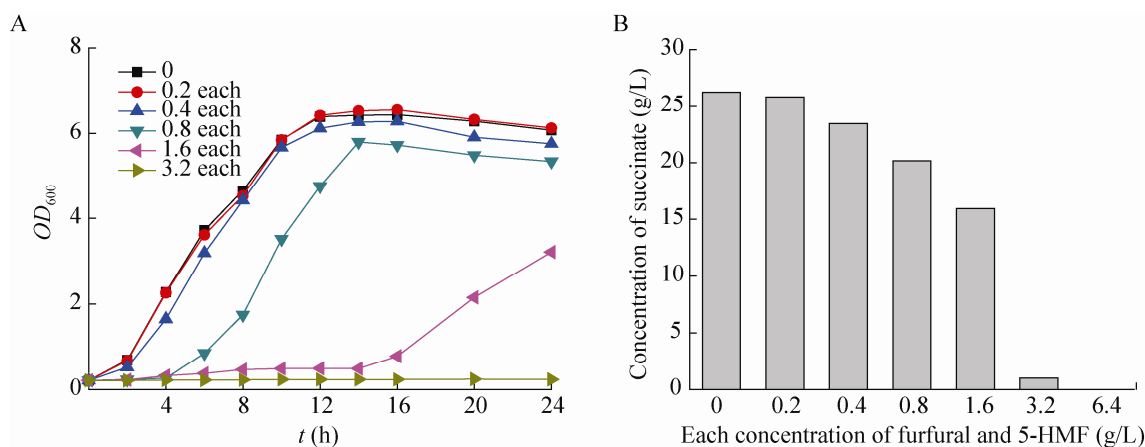


图 3 糠醛和 HMF 混合物对大肠杆菌 SD121 生长(A)和丁二酸生产(B)的影响

Fig. 3 Effects of combination of furfural and HMF on the cell growth (A) and succinic acid production (B) of engineered *E. coli* SD121. (A) Cell growth as measured at OD_{600} during growth. (B) Succinic acid production in the medium with a combined treatment of furfural and HMF.

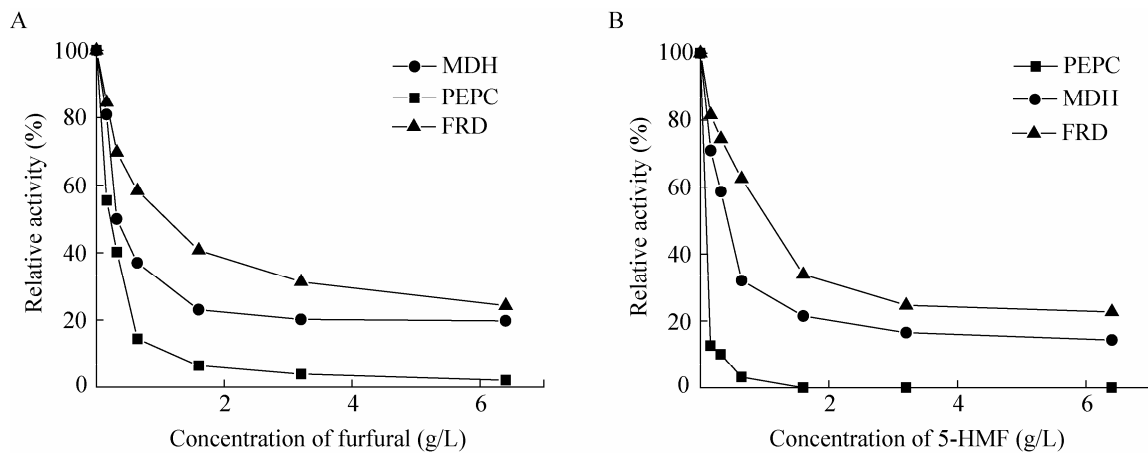


图4 抑制物对丁二酸生产途径关键酶 PEPC、MDH、FRD 的体外酶活影响

Fig. 4 Effects of furfural (A) and HMF (B) on the enzyme activities of PEPC (■), MDH (●), FRD (▲) *in vitro*.

我们也对添加不同浓度 HMF 对酶活的影响进行了检测。HMF 对 PEPC 酶的抑制作用强于糠醛。当添加 1.268 mmol/L (0.16 g/L) HMF 时, PEPC 酶活降低了 87.35%; 当添加 2.536 mmol/L (0.32 g/L) HMF 时, PEPC 酶活降低了 90% 以上。MDH 和 FRD 受 HMF 的抑制影响与其受糠醛的影响相似, 在添加 50.72 mmol/L (6.4 g/L) HMF 时, 仍能保留 14% 和 22% 的初始酶活力。

3 讨论

我们研究了抑制物糠醛和 5-羟甲基糠醛对大肠杆菌工程菌 SD121 生长和丁二酸生产的影响, 单独抑制物的浓度选择 0.01~12.8 g/L, 考察抑制物协同作用时选择各自的浓度为 0.2~6.4 g/L。综合菌体生长和丁二酸生产来考虑, 菌株 SD121 对糠醛或 HMF 的最大耐受浓度均为 3.2 g/L。结果表明, 同等浓度下糠醛对菌体生长和丁二酸生产的影响比 HMF 显著。虽然在添加 HMF 的培养基中, 菌体的延滞期比添加糠醛的对照菌株更长, 但最终所达到的细胞量却更高。

在添加糠醛的培养基中, 菌体的延滞期不明显, 但最终细胞量比对照菌株明显降低。

当同时添加两种抑制物时, 随着抑制物总浓度增加, 细胞延滞期增长, 同时丁二酸终浓度和最终细胞量降低, 结果表明两种抑制物存在明显的协同作用。当两者浓度均高于 1.6 g/L 时, 这种协同作用更为明显。许多研究者报道了在利用酿酒酵母、毕赤酵母等进行乙醇生产时, 糠醛和 HMF 对菌株和乙醇生产的影响, 以及产乙醇酵母具有的 NADH 依赖的醇脱氢酶系将抑制物转化为无毒的糠酸或者糠醇的研究^[18,21-22]。然而, 并无抑制物对丁二酸生产和抑制机理的研究报道。我们的研究表明, 当糠醛或 HMF 的浓度高于 3.2 g/L 时, 不仅产丁二酸大肠杆菌的菌体生长, 丁二酸的终浓度也受到严重抑制。这就提示当木质纤维素水解液中这两种抑制物的浓度或其总浓度大于 3.2 g/L 时, 需要对水解液进行脱毒处理, 以利于产丁二酸大肠杆菌转化水解液中还原糖产丁二酸。Hodge 等的研究很好地证实了我们的研究结果。他们

利用大肠杆菌对软木水解液进行丁二酸发酵时,发现当 HMF 浓度处于 3.5~4.2 g/L 时,菌体既不生长也不产酸,除非采用活性炭或“overliming”法进行脱毒处理^[16]。

大肠杆菌生产丁二酸的代谢途径中,通过 PEPC 酶催化三碳化合物 PEP 为 OAA 的反应被认为是最重要的反应。该酶固定 1 mol CO₂ 催化生成最初的四碳化合物 OAA, OAA 被 MDH 酶还原为苹果酸,最终由 FRD 催化生成丁二酸。因此,在我们研究抑制物对酶活影响的实验中,选择 PEPC、MDH 和 FRD 为研究对象。研究结果表明,尽管抑制物糠醛和 HMF 对 MDH 酶和 FRD 酶的抑制效果相似, HMF 对 PEPC 的抑制作用明显强于糠醛对它的抑制作用。PEPC 是大肠杆菌丁二酸生产途径的关键酶。因此该结果很好地解释了前述实验现象,即尽管 HMF 对菌体生长的影响较弱,但其对菌体产生的丁二酸最终浓度具有较强抑制作用。

已有文献表明,作为低分子有机物,糠醛和 HMF 可渗透细胞膜^[26]。因此,与我们的体外实验相似,抑制物糠醛和 HMF 也会对体内酶活产生抑制作用,抑制程度可能与体外程度类似。我们进一步思考的是细胞膜上的糖转运受体或离子转运受体是否会受抑制物影响,进一步使大肠杆菌的丁二酸生产受到影响。另外,在产丁二酸的大肠杆菌体内,糠醛和 HMF 是如何转化为无毒或低毒化合物的,该转化过程是否与产乙醇大肠杆菌的代谢过程类似。这是我们下一步要深入研究的内容。

REFERENCES

- [1] Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microbiol Technol*, 2006, 39: 352–361.
- [2] Wang D, Li Q, Song Z, et al. High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid. *J Chem Technol Biotechnol*, 2011, 86: 512–518.
- [3] Zheng P, Dong J, Sun Z, et al. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 2425–2429.
- [4] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76: 727–740.
- [5] Samuelov NS, Lamed R, Lowe S, et al. Influence of CO₂-HCO₃⁻ levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 3013–3019.
- [6] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, et al. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiol*, 1997, 167: 332–342.
- [7] Lee PC, Lee SY, Hong SH, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58: 663–668.
- [8] Lee SJ, Song H, Lee SY. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 1939–1948.
- [9] Chatterjee R, Millard CS, Champion K, et al. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2001, 67: 148–154.
- [10] Zhang X, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20180–20185.

- [11] Lin H, Bennett GN, San KY. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90: 775–779.
- [12] Sánchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield. *Metab Eng*, 2005, 7: 229–239.
- [13] Andersson C, Hodge D, Berglund KA, et al. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2007, 23: 381–388.
- [14] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *E. coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 99: 1140–1153.
- [15] Chen K, Jiang M, Wei P, et al. Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160: 477–485.
- [16] Hodge DB, Andersson C, Berglund KA, et al. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44: 309–316.
- [17] Wang D, Li Q, Yang M, et al. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation. *Process Biochem*, 2011, 46: 365–371.
- [18] Palmqvist E, Hahn-hägerdal BH. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II : inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol*, 2000, 74: 25–33.
- [19] Modig T, Lidén G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J*, 2002, 263: 769–776.
- [20] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocelluloses degradation products on industrial cellulose enzyme during cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159: 696–707.
- [21] Kodaki T, Katagiri F, Asano M, et al. Cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from a cyanobacterium, *Anacystis nidulans*, in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 1985, 97: 533–539.
- [22] Boernke WE, Millard CS, Stevens PW, et al. Stringency of substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Acta Biochim Biophys*, 1995, 332: 43–52.
- [23] Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo N, et al. Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of *Alveolar Echinococcosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52: 164–170.
- [24] Qi B, Chen X, Wan Y. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour Technol*, 2010, 10: 4875–4883.
- [25] Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:1163–1170.
- [26] Weigert B, Klein K, Rizzi M, et al. Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett*, 1988, 10: 895–900.

(本文责编 郝丽芳)