

## 不同宿主来源的重组酿酒酵母混合糖代谢比较

左颀<sup>1</sup> 张明明<sup>1</sup> 程诚<sup>1</sup> 赵心清<sup>1\*</sup> 刘海军<sup>2</sup> 徐友海<sup>2</sup> 朱庆伟<sup>2</sup> 白凤武<sup>1\*</sup>

(1. 大连理工大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

(2. 中国石油天然气股份有限公司吉林石化公司研究院 吉林 吉林 132021)

**摘要:** 【目的】研究不同工业酿酒酵母宿主背景对重组酵母木糖利用效率的影响。【方法】将木糖利用途径的木糖还原酶(XR)、木糖醇脱氢酶(XDH)和木酮糖激酶(XK)编码基因串联后分别转入3株不同的工业酿酒酵母中,得到重组酵母ZQ1、ZQ5和ZQ7。分别对3个木糖途径代谢基因的表达水平、酶活和重组菌株的木糖发酵效率进行比较。【结果】重组菌株在木糖代谢基因转录、酶活性和木糖利用性能方面有很大差异,其中ZQ5木糖代谢能力最强,ZQ7其次,ZQ1木糖利用能力最弱。ZQ7在初始木糖浓度为20 g/L时木糖利用速率快于ZQ5,表明木糖浓度对重组菌发酵性能评价具有影响。【结论】不同菌株的遗传背景和木糖浓度对重组菌木糖利用的影响很大,评价重组酵母的木糖利用需考虑宿主的遗传背景和底物浓度的影响。

**关键词:** 酿酒酵母, 木糖代谢, 宿主遗传背景, 染色体整合

## Comparison of glucose/xylose cofermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using different hosts

ZUO Qi<sup>1</sup> ZHANG Ming-Ming<sup>1</sup> CHENG Cheng<sup>1</sup> ZHAO Xin-Qing<sup>1\*</sup> LIU Hai-Jun<sup>2</sup>  
XU You-Hai<sup>2</sup> ZHU Qing-Wei<sup>2</sup> BAI Feng-Wu<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning, 116023, China)

(2. Research Institute of Jilin Petrochemical Company, Ltd., PetroChina, Jilin, Jilin, 132021, China)

**Abstract: [Objective]** This study aims to investigate the influence of different genetic backgrounds of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose utilization of the recombinant yeast strains. **[Methods]** Three xylose recombinant strains designated as ZQ1, ZQ5 and ZQ7 were constructed by employing xylose reductase (XR), xylitol dehydrogenase (XDH) and xylulose kinase (XK) encoding genes via chromosome integration, and in the meantime, transcription levels of three genes and their corresponding enzyme activities as well as sugar mixture fermentation were also investigated. **[Results]** Gene expression levels and enzyme activities were significantly different in the three recombinant strains; in addition, xylose utilization capabilities of the three strains also varied. ZQ5 showed the highest ability in both gene expression and fermentation capability, which was followed

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021205, 2012AA101805); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No. NCET-11-0057); 国家国际科技合作专项项目(No. 2013DFA60470-1)

\*通讯作者: 赵心清: Tel: 86-411-84706319; Fax: 86-411-84706329; ✉: xqzhao@dlut.edu.cn

白凤武: ✉: fwbai@dlut.edu.cn

收稿日期: 2013-09-06; 接受日期: 2013-10-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

by ZQ7, whereas ZQ1 showed the poorest xylose utilization efficiency. However, xylose utilization rate of ZQ7 outperformed ZQ5 when initial xylose concentration was 20 g/L. **[Conclusion]** Genetic background and initial xylose concentration exert control on xylose utilization in the recombinant strains, which should be considered in evaluation of the performance of recombinant strains.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Xylose utilization, Genetic background of the host strains, Chromosome integration

利用来源丰富、价格低廉的木质纤维素原料生产生物燃料和生物基化学品受到国内外学者的普遍关注<sup>[1-3]</sup>。酿酒酵母具有生物安全性和良好发酵性能,但是不具备代谢木糖的能力。因此,利用基因工程手段改造酿酒酵母,赋予其利用木糖的能力是纤维素生物转化研究的热点。目前较成熟的研究策略是通过基因工程手段将外源木糖代谢途径基因导入酿酒酵母,其中木糖还原酶(XR)-木糖醇脱氢酶(XDH)的改造策略被广泛采用<sup>[4]</sup>。

调整木糖代谢途径的基因表达促使重组酿酒酵母更有效利用木糖,需要考虑很多影响因素。基因的拷贝数<sup>[4]</sup>、启动子的类型<sup>[5]</sup>、不同基因表达量的比例<sup>[6]</sup>等都直接影响木糖代谢途径基因的表达。此外,国外不同研究小组均发现,酿酒酵母宿主的遗传背景对木糖发酵性能具有显著影响<sup>[7-10]</sup>,但国内目前还没有关于不同宿主遗传背景对木糖利用能力影响的报道。本文将木糖代谢途径通过染色体整合在不同的工业酿酒酵母中表达,并对木糖代谢途径基因的转录水平、酶活水平和重组菌株的木糖利用能力进行了比较,发现宿主背景和培养基初始木糖浓度都能够影响木糖利用性能的评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保存。XR 和 XDH 基因克隆自树干毕赤酵母 *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 (购于日本 RIKEN BioResource Center)。XKS1 基因克隆自酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288C (瑞典 Chalmers 大学 Jens Nielson 教授惠赠)。工业酿酒酵母 *S. cerevisiae* 6525、*S. cerevisiae* 4126 和 *S. cerevisiae* 6508 为加拿大滑铁卢大学 Dr. Jana Otrubo 惠赠,*S. cerevisiae*

6525 的基因组 DNA 用于同源重组中上下游同源臂的扩增模板。启动子  $P_{PGK1}$ 、 $P_{ADH1}$ , 终止子  $T_{CYC1}$  克隆自实验室酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288c。pUC18 质粒(本实验室保存)用于 PCR 亚克隆载体构建, pAUR135 质粒(大连宝生物公司)用作木糖途径代谢基因的染色体整合载体。

### 1.2 生长培养基、筛选培养基和发酵培养基

Luria-Bertani 培养基用于大肠杆菌的生长,添加 100 mg/L 氨苄青霉素用作大肠杆菌转化子筛选<sup>[11]</sup>。标准 YPD 培养基用于酵母菌的种子培养基<sup>[12]</sup>。

酵母转化子筛选第一步所用为 YPD-Aba<sup>+</sup> (添加 2.5 mg/L 金担子素, 2%琼脂粉)平板,然后将挑取的单菌落转到 YPGal 平板培养基(g/L, 半乳糖 20, 蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 琼脂粉 20)进行第二轮筛选。

酿酒酵母重组菌株的发酵培养基为 YP 培养基(g/L, 蛋白胨 20, 酵母提取物 10), 分别加入 20、30、40、50 g/L 浓度的木糖, 同时加入终浓度为 40、60、80、100 g/L 浓度的葡萄糖, 使发酵培养基中的葡萄糖和木糖终浓度比例均为 2:1。

### 1.3 木糖代谢途径基因整合载体的构建

构建染色体整合载体所需的片段相应的引物序列信息详见表 1。

将构建的串联木糖代谢途径基因  $PsXR$ 、 $PsXDH$  和  $ScXK$  整合到酵母第 16 条染色体的 YPRCdelta15 位点, 用酶切连接方式将各片段连接, 分子克隆操作参照文献[11]。木糖代谢途径基因的整合载体图谱如图 1 所示。

### 1.4 基因转化和筛选

本实验中工业酿酒酵母的转化采用电转化方法<sup>[13]</sup>, 重组质粒用 *Spe* I 线性化后, 将木糖代谢途径基因片段转入感受态细胞内。

表 1 本文所用引物 Table 1 All the primers used in this study		
引物名称 Primer name	模板 DNA Template DNA	引物序列 Sequences (5'→3')
20up-F	6525	TCCCCCGGGCCAGGCGCCTTTATATCAT
20up-R	6525	CGGGGTACCTGGGGCCCTTTGCGAAACCCTATGCTCT
20down-F	6525	TTCGAGCTCTCCCGCGCAATGGAAGGTCGGGATGAG
20down-R	6525	CGGAATTCATAAAGCAGCCGCTACCAAA
PGK1 <sub>p</sub> -PsXR-F	S288c	TGGGGCCCCAACTCAAGACGCACAGA
PGK1 <sub>p</sub> -PsXR-R	S288c	TTGGCGCGCCTGTAAGTTTCACGAGGTTCTA
PsXR-F	10742	TTGGCGCGCCATGCCTTCTATTAAGTTGAACTCT
PsXR-R	10742	TGCTCCGGATAAGACGAAGATAGGAATCTTGT
CYC1 <sub>t</sub> -PsXR-F	S288c	TGCTCCGGATTACATTCACGCCCTCC
CYC1 <sub>t</sub> -PsXR-R	S288c	TTGGCGCGCGCAAATTAAAGCCTTCG
PGK1 <sub>p</sub> -PsXDH-F	S288c	TTGGCGCGCCAACTCAAGACGCACAGA
PGK1 <sub>p</sub> -PsXDH-R	S288c	TTGCCTNAGGTGTAAGTTTCACGAGGTTCTA
PsXDH-F	10742	TTGCCTNAGGATGACTGCTAACCCTTCCTTG
PsXDH-R	10742	TGGCGGCCGTTACTCAGGGCCGTC AATG
CYC1 <sub>t</sub> -PsXDH-F	S288c	TGGCGGCCGTTACATTCACGCCCTCC
CYC1 <sub>t</sub> -PsXDH-R	S288c	CTAGCTAGCGCAAATTAAAGCCTTCG
ADH1 <sub>p</sub> -ScXK-F	S288c	CTAGCTAGCAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGG
ADH1 <sub>p</sub> -ScXK-R	S288c	ATAAGAATGCGGCCGCGCGCGGAGGGGTGTTAC
ScXK-F	S288c	ATAAGAATGCGGCCGCATGTTGTGTTCAGTAATTCAGAGAC
ScXK-R	S288c	CCAATGCATTTAGATGAGAGTCTTTTCCAGTTC
CYC1 <sub>t</sub> -ScXK-F	S288c	CCAATGCATTACATTCACGCCCTCC
CYC1 <sub>t</sub> -ScXK-R	S288c	TCCCCGCGCGCAAATTAAAGCCTTCG

注: 6525: 工业酿酒酵母 *S. cerevisiae* 6525; S288c: 实验室酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288c; 10742: 树干毕赤酵母 *S. stipitis* JCM 10742.  
Note: 6525: *S. cerevisiae* 6525; S288c: *S. cerevisiae* S288c; 10742: *S. stipitis* JCM 10742.

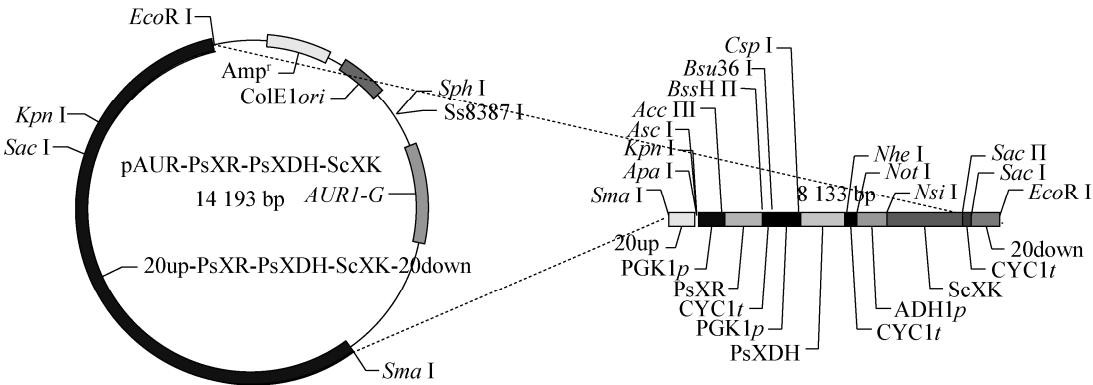


图 1 染色体整合载体 pAUR-PsXR-PsXDH-ScXK 的构建  
Figure 1 Construction of chromosomal integration plasmid pAUR-PsXR-PsXDH-ScXK

1.5 mRNA 的制备和半定量 RT-PCR

酵母 RNA 提取采用经典热酚法<sup>[14]</sup>。cDNA 的合成参考大连宝生物公司的产品说明书 (PrimeScript RT-PCR Kit)。以 *ACT1* 基因作为内参，均一化后的基因表达量用以比较 3 个基因在不同重组菌株中的表达量。

1.6 粗酶液的制备和相应酶活性的检测

粗酶液的制备和酶活的检测方法参考 Eliasson 等<sup>[15]</sup>。每个酶活实验重复 3 次，取平均值作为酶活数据。

1.7 野生型菌株的乙醇耐性和乙酸耐性比较

将-80℃保存的工业酿酒酵母在 YPD 培养基中活化 2 次，达到对数期时测 *OD*<sub>600</sub> 值，调整一致后将 2 μL 的原菌液和依次十倍稀释浓度的菌液点在含有 3 g/L 乙酸和 10%乙醇的 YPD 平板上，培养 24 h 后，比较野生型宿主菌耐受性能力的差别。

1.8 摇瓶发酵

活化 2 次后的菌液接入含 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中，30℃、200 r/min 进行限氧发酵。发酵培养基参考 1.2 配制，初始接种量 *OD*<sub>600</sub> 为 2.0。

1.9 发酵产物分析

高效液相检测方法参照文献<sup>[16]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 野生型工业酿酒酵母的抗性比较

由于乙醇和乙酸是纤维素乙醇发酵的主要抑制性物质<sup>[17-18]</sup>，因此重组菌株宿主的选择需要考虑乙酸和乙醇的耐受性。如图 2 所示，在含有 3 g/L 乙酸的平板上，3 株工业酿酒酵母菌株的抗性能力依次为 *S. cerevisiae* 6525>*S. cerevisiae* 6508>*S. cerevisiae* 4126；而在 10%乙醇平板上，菌株的抗性能力依次为 *S. cerevisiae* 4126>*S. cerevisiae* 6508>*S. cerevisiae* 6525。耐性的差别结果表明 3 株工业酵母具有不同耐性机制，可能存在基因表达的不同调控方式。

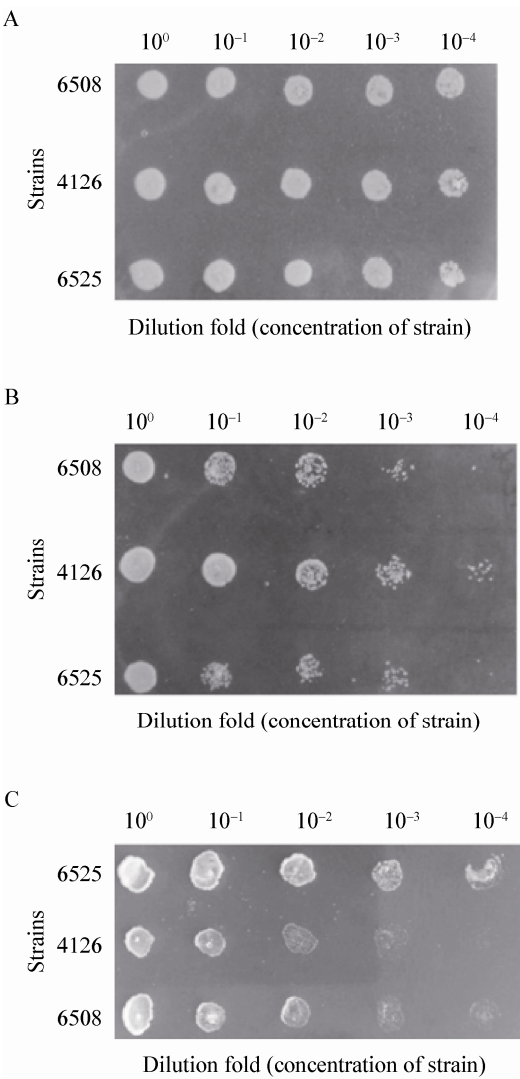


图 2 野生型酿酒酵母 6508、4126、6525 在 YPD 培养基(A)、含有 3 g/L 乙酸(B)和 10%乙醇的 YPD (C)培养基上生长的比较

Figure 2 Cell growth of wild-type strains *S. cerevisiae* 6508, *S. cerevisiae* 4126 and *S. cerevisiae* 6525 under YPD medium (A), YPD medium containing 3 g/L acetic-acid (B) and YPD medium with 10% ethanol (C)

2.2 木糖代谢途径基因染色体整合载体的构建

利用染色体整合方式将木糖代谢途径相关基因转入酿酒酵母，酿酒酵母中常用的染色体整合位点有 *URA3*<sup>[19]</sup>、*AURI-C*<sup>[20]</sup>、Delta 序列区域<sup>[21]</sup>和 *rDNA* 位点<sup>[4]</sup>等。文献中将同一报告基因插入 20 个不同酵母染色体的位点来检测基因表达量的差

异,发现当插入第 16 条染色体的 YPRCdelta15 位点时,报告基因的表达量达到所有位点基因表达量的最高值,因此本文将串联的 *PsXR*、*PsXDH*、*ScXK* 基因整合在文献[22]中提到第 16 条染色体的 YPRCdelta15 位点,以得到基因表达量较高的重组木糖代谢途径。染色体整合载体使用商品化的染色体穿梭载体 pAUR135,该载体带有 *GIN11M86* 致死基因,可在半乳糖诱导下表达,导致带有载体的转化子死亡,只保留经过同源重组的不带有任何外源序列的转化子,因此可以循环使用载体上的抗性标记。本文为首次报道利用 pAUR135 载体和 YPRCdelta15 位点进行酿酒酵母重组木糖代谢途径的遗传改造。

2.3 木糖代谢途径基因在不同宿主菌株的转录水平比较

对重组菌中木糖代谢相关基因的表达水平进行检测,发现重组酿酒酵母 ZQ5 中的 3 个木糖代谢途径基因的表达量最高(图 3)。从同一基因在不同宿主的表达水平结果来看,ZQ5 中的 *XR*、*XDH* 和 *XK* 基因表达量最高;ZQ7 次之,ZQ1 中 3 个基因的表达量都最低。不同基因表达的比例在 ZQ1 和 ZQ5 中比较相似,从高到低都是 *XR*>*XDH*>*XK*,但在 ZQ7 中是 *XR*>*XK*>*XDH*。说明即使导入相同的木糖代谢途径,在不同宿主菌中的表达量也存在明显差别。

2.4 木糖代谢途径基因在重组酿酒酵母中的酶活比较

木糖代谢途径相关酶活测定结果显示,ZQ5

中 3 个基因的酶活水平最高,其次是 ZQ7,重组菌 ZQ1 中的酶活最低(表 2)。酶活的测定结果与 2.3 中测定的 mRNA 的差异结果基本吻合,表明 3 个木糖代谢途径基因在基因转录水平和翻译水平之间存在偶联性。

2.5 木糖酿酒酵母重组菌株在混合糖中的发酵

纤维素原材料水解液常因为预处理方法的不同,产生的葡萄糖和木糖的含量不同,因此本实验采用 4 种不同浓度的混合糖培养基发酵,以检测木糖酿酒酵母重组菌株的发酵能力是否存在差别,结果见图 4。3 株木糖酿酒酵母重组菌在 10 h 之内均可以消耗完培养基中葡萄糖,因此葡萄糖代谢的曲线完全重合(未发表数据)。

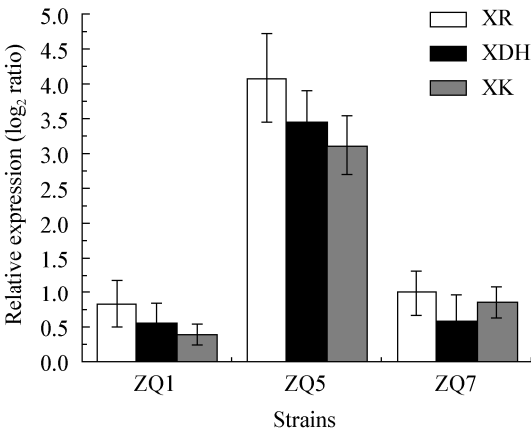


图 3 ZQ1、ZQ5 和 ZQ7 的 3 个木糖代谢途径基因转录水平表达量  
Figure 3 Transcription levels of XR, XDH and XK encoding genes in ZQ1, ZQ5, ZQ7

表 2 木糖酿酒酵母重组菌株 ZQ1、ZQ5 和 ZQ7 的酶活比较 Table 2 Enzyme activities in recombinant strains ZQ1, ZQ5 and ZQ7				
重组菌株 Strains	PsXR-NADPH 酶活 PsXR-NADPH (U/mg protein)	PsXR-NADH 酶活 PsXR-NADH (U/mg protein)	PsXDH-NAD <sup>+</sup> 酶活 PsXDH-NAD <sup>+</sup> (U/mg protein)	ScXK-NADH 酶活 ScXK-NADH (U/mg protein)
ZQ1	0.12±0.02	0.03±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01
ZQ5	0.43±0.04	0.18±0.03	0.37±0.03	0.30±0.03
ZQ7	0.14±0.01	0.03±0.01	0.08±0.02	0.11±0.03

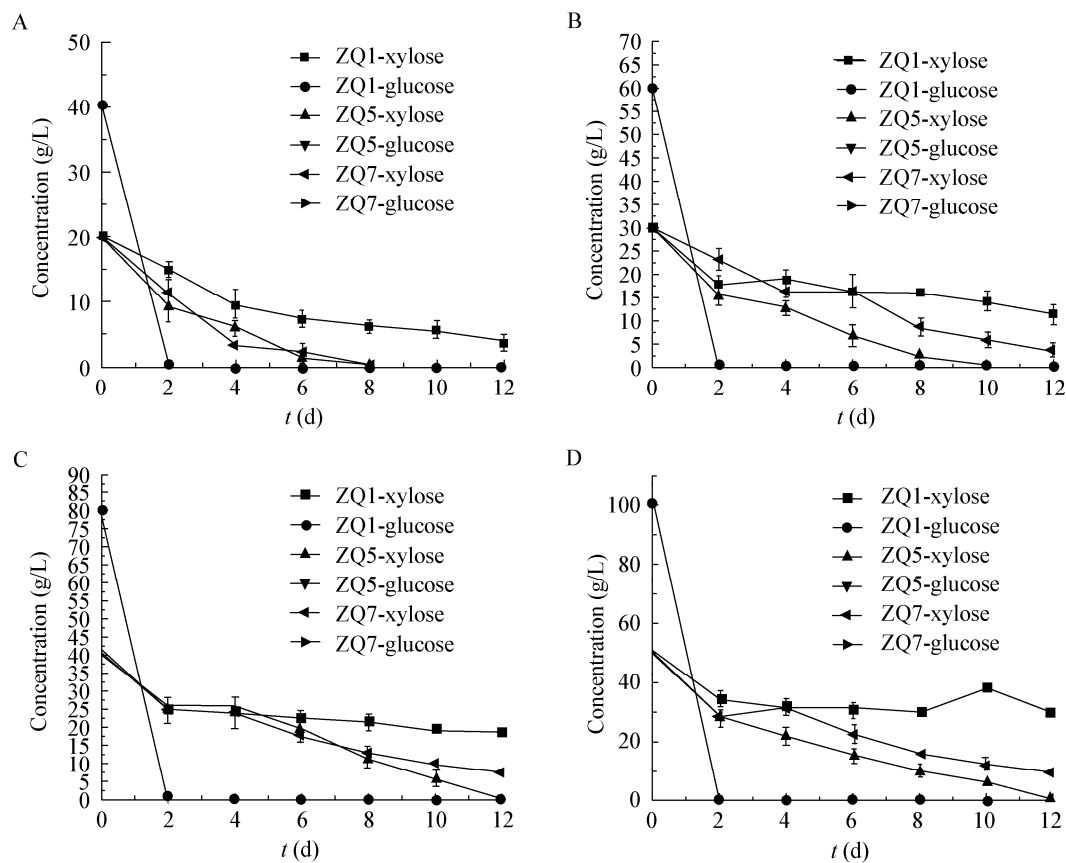


图 4 木糖重组酿酒酵母 ZQ1、ZQ5 和 ZQ7 在不同浓度混合糖中的限氧发酵

Figure 4 Oxygen-limited fermentation in different sugar mixtures by recombinant strains ZQ1, ZQ5 and ZQ7

注：A：20 g/L 木糖和 40 g/L 葡萄糖；B：30 g/L 木糖和 60 g/L 葡萄糖；C：40 g/L 木糖和 80 g/L 葡萄糖；D：50 g/L 木糖和 100 g/L 葡萄糖。

Note: A: Medium containing 20 g/L xylose and 40 g/L glucose; B: Medium containing 30 g/L xylose and 60 g/L glucose; C: Medium containing 40 g/L xylose and 80 g/L glucose; D: Medium containing 50 g/L xylose and 100 g/L glucose.

由于葡萄糖抑制效应，在木糖和混合糖同时存在条件下，重组菌首先利用葡萄糖，木糖代谢受到抑制。但我们观察到在有葡萄糖存在时木糖的代谢速率比葡萄糖耗尽后的木糖代谢速率快(图 4)，可能是因为葡萄糖耗尽后细胞的能量不足，所以生长和木糖代谢缓慢。从图 4 所示的木糖消耗曲线来看，ZQ5 在 3 株重组菌中木糖利用能力最好，可以完全消耗 20–50 g/L 的木糖。ZQ7 的木糖发酵能力弱于 ZQ5，但在木糖浓度为 20 g/L 时，ZQ7 在第 4 天就可以消耗约 80% 的木糖，而 ZQ5 在 4 d 内消耗了约 70%。但木糖浓度升高至 30–50 g/L 时，ZQ5 木糖代谢能力最强。以 *S. cerevisiae* 6525 为宿

主的 ZQ1 在 3 株重组酵母中木糖代谢能力最差(图 3)。木糖消耗未产生乙醇，产物为木糖醇，ZQ7 在初始木糖 20 g/L 时木糖醇得率最高(0.82 g/g)。有报道表明 XDH 活性高有利于木糖转化成乙醇<sup>[23]</sup>，在接下来的实验中将尝试通过构建 rDNA 同源片段实现多拷贝整合，以及提高 XDH 活性改善木糖共发酵能力。

目前国内对不同宿主背景下重组菌木糖利用速率的差异比较还未见报道，国外相关工作只研究了利用不同宿主获得的重组菌木糖利用的差异<sup>[8-9]</sup>，而没有对影响酿酒酵母重组菌株木糖代谢能力的具体原因进行深入的分析。唯一相关的报

道是近期利用细胞全局转录分析对不同宿主的木糖重组菌进行比较<sup>[7]</sup>,结果发现酿酒酵母重组菌中木糖的代谢与碳代谢和胁迫反应等调节机制相关。对两种宿主的重组菌木糖代谢条件下的全局转录分析结果表明,其中一株菌中 15 个转录因子为关键的调节模块,而另外一株菌有 5 个转录因子是关键的,但 Gcn4p、Rpn4p 和 Yap1p 这 3 个分别负责氨基酸生物合成、变性或聚集蛋白的降解和氧化胁迫的转录因子,是在两个不同宿主的重组菌中都很关键的调节蛋白<sup>[7]</sup>。由于不同宿主背景下细胞对木糖代谢调控的机理存在差异,为理性选择良好宿主菌带来了一定困难。进一步深入研究控制木糖代谢的关键基因,揭示全局调控的分子机制,将有助于构建性能更好的木糖发酵重组酵母。

研究不同宿主对木糖发酵影响时,应关注菌株对乙酸等胁迫条件的耐受性,如果原料水解液中存在较高浓度的乙酸,ZQ7 是更为理想的重组酵母,因为其宿主菌具有较好的乙酸耐性。当水解液中的木糖浓度较高(高于 20 g/L),ZQ5 是较为理想的发酵菌株。因此,在发酵纤维素原料水解液时,可根据菌种的发酵性能和胁迫耐性综合因素做出选择。此外,本文发现宿主和初始木糖浓度均对重组菌的选择具有重要影响,这些结果为进一步优化木糖重组酿酒酵母菌的选育提供研究基础。

## 参 考 文 献

- [1] Demeke MM, Dietz H, Li YY, et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 89.
- [2] Oh EJ, Ha SJ, Kim SR, et al. Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 15: 226-234.
- [3] 徐勇, 王荣, 朱均均, 等. 木糖高效生物转化的新出路[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(5): 113-119.
- [4] Zhang X, Shen Y, Shi WL, et al. Ethanol

cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 7104-7110.

- [5] 彭炳银, 陈晓, 沈煜, 等. 不同启动子控制下木酮糖激酶的差异表达及其对酿酒酵母木糖代谢的影响[J]. *微生物学报*, 2011, 51(7): 914-922.
- [6] Zha J, Hu ML, Shen MH, et al. Balance of *XYL1* and *XYL2* expression in different yeast chassis for improved xylose fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 355.
- [7] Feng XY, Zhao HM. Investigating host dependence of xylose utilization in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using RNA-seq analysis[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 1-17.
- [8] Matsushika A, Inoue H, Murakami K, et al. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(8): 2392-2398.
- [9] Hector RE, Dien BS, Cotta MA, et al. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(9): 1193-1202.
- [10] Fujii T, Matsushika A, Goshima T, et al. Comparison of the performance of eight recombinant strains of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* as to bioethanol production from rice straw enzymatic hydrolyzate[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(7): 1579-1582.
- [11] Joseph S, David W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. *A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- [13] Thompson JR, Register E, Curotto J, et al. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation[J]. *Yeast*, 1998, 14(6): 565-571.
- [14] Collart MA, Oliviero S. Preparation of yeast RNA[A]//*Current Protocols in Molecular Biology*[M]. 2001, Chapter 13: Unit13. 12.
- [15] Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, et al. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3381-3386.
- [16] Eliasson A, Hofmeyr JHS, Pedler S, et al. The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial*

- Technology, 2001, 29(4/5): 288-297.
- [17] 李洪兴, 张笑然, 沈煜, 等. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1321-1328.
- [18] 张秋美, 赵心清, 姜如娇, 等. 酿酒酵母乙醇耐性的分子机制及基因工程改造[J]. 生物工程学报, 2009, 25(4): 481-487.
- [19] Bengtsson O, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2: 9.
- [20] Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, et al. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(3): 296-299.
- [21] Kato H, Matsuda F, Yamada R, et al. Cocktail delta-integration of xylose assimilation genes for efficient ethanol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(3): 333-336.
- [22] Flagfeldt DB, Siewers V, Huang L, et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2009, 26(10): 545-551.
- [23] Kim SR, Ha SJ, Kong II, et al. High expression of *XYL2* coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 336-343.
- ~~~~~

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsP14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00; 优先数字出版日期([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): 2014-00-00

(下转 p.1442)