

转醛醇酶基因差异表达影响酵母发酵木糖及耐受乙酸性能

肖琴 曾维怡 汤岳琴* 木田建次

(四川大学 建筑与环境学院 四川 成都 610065)

摘要:【目的】木糖发酵是纤维素燃料乙醇生产的一个关键瓶颈,同时木质纤维素水解液中的乙酸严重抑制酿酒酵母的木糖发酵过程,因此通过基因工程手段提高菌株对木糖的利用以及对乙酸的耐受性具有重要意义。本研究以非氧化磷酸戊糖途径(PPP途径)中关键基因转醛醇酶基因(*TAL1*)为研究对象,探讨了3种不同启动子 P_{TDH3} 、 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} ,控制其表达对菌株利用木糖和耐受乙酸的影响。【方法】通过同源重组用3种启动子替换酿酒酵母基因工程菌NAPX37的*TAL1*基因的启动子 P_{TAL1} ,再通过孢子分离和单倍体交配构建了纯合子,利用批次发酵比较了在以木糖为唯一碳源和混合糖(葡萄糖和木糖)为碳源条件下,3种启动子控制*TAL1*基因表达导致的发酵和乙酸耐受能力的差异。【结果】启动子 P_{TDH3} 、 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 在不同程度上提高了*TAL1*基因的转录水平,提高了菌株对木糖的利用速率及乙酸耐受能力,提高了菌株在60 mmol/L乙酸条件下的葡萄糖利用速率。在以木糖为唯一碳源且无乙酸存在、以及混合糖为碳源的条件下, P_{AHP1} 启动子控制*TAL1*表达菌株的发酵结果优于 P_{TDH3} 和 P_{UBI4} 启动子的菌株, P_{AHP1} 启动子控制的*TAL1*基因的转录水平比较合适。在木糖为唯一碳源且乙酸为30 mmol/L时, P_{UBI4} 启动子控制*TAL1*基因表达的菌株发酵结果则优于 P_{AHP1} 和 P_{TDH3} 启动子菌株,此时 P_{UBI4} 启动子控制的*TAL1*的转录水平比较合适。【结论】启动子 P_{TDH3} 、 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 不同程度地提高*TAL1*基因的表达,在不同程度上改善了酵母菌株的木糖发酵速率和耐受乙酸性能,改善程度受发酵条件的影响。

关键词: 纤维素燃料乙醇, *TAL1* 基因, 木糖发酵, 乙酸耐受性

Effect of differential expression of transaldolase gene on xylose fermentation and acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strain

XIAO Qin ZENG Wei-Yi TANG Yue-Qin* KIDA Kenji

(College of Architecture and Environment, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: [Objective] Xylose fermentation is crucial in lignocellulosic ethanol production. Acetic acid generated during pretreatment process seriously inhibits xylose fermentation of yeast strain. The effect of differential expression of transaldolase gene (*TAL1*), one key gene in oxidative pentose phosphate pathway (PPP), on xylose utilization as well as acetic acid tolerance of

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170093)

*通讯作者: ✉: tangyq@scu.edu.cn

收稿日期: 2013-12-05; 接受日期: 2014-02-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-28

genetically engineered xylose-fermenting strain NAPX37 was studied. **[Methods]** The promoter of *TAL1* gene (P_{TAL1}) of the strain NAPX37 was separately replaced with three promoters, P_{TDH3} , P_{AHP1} and P_{UBI4} , through homologous recombination. By subsequent sporulation, spore segregation and mating, three homozygotes in which P_{TAL1} were replaced with P_{TDH3} , P_{AHP1} or P_{UBI4} were constructed. The fermentation capacity and acetic acid tolerance of the three homozygotes and the original strain NAPX37 were compared through batch fermentation using xylose or the mixture of glucose and xylose as carbon source. **[Results]** Three promoters, P_{TDH3} , P_{AHP1} and P_{UBI4} , increased the transcription level of *TAL1* gene differentially, which not only improved xylose consumption rate and acetic acid tolerance significantly, but also improved glucose consumption rate under the condition of 60 mmol/L of acetic acid. When xylose was used as sole carbon source without acetic acid or when mixed sugar was used, the strain with P_{AHP1} -controlled *TAL1* gene showed better fermentation results than strains with P_{TDH3} - or P_{UBI4} -controlled *TAL1* gene, indicating the expression level of P_{AHP1} -controlled *TAL1* gene was most appropriate. When xylose was used as sole carbon source under the condition of 30 mmol/L of acetic acid, the strain with P_{UBI4} -controlled *TAL1* gene showed best fermentation results among all strains, indicating the most suitable expression level of P_{UBI4} -controlled *TAL1* gene. **[Conclusion]** Three promoters, P_{TDH3} , P_{AHP1} and P_{UBI4} , overexpressed *TAL1* gene, which improved xylose fermentation rate and acetic acid tolerance of strain NAPX37 differentially. However, the fermentation condition affected the level of improvement.

Keywords: Lignocellulosic ethanol, *TAL1* gene, Xylose fermentation, Acetic acid tolerance

作为一种清洁可再生能源, 燃料乙醇被认为是一种典型的可替代运输燃油的液体燃料。以农作物秸秆为代表的木质纤维素生物质具有廉价、可再生、来源丰富等特点, 是未来燃料乙醇产业化生产的重要原料^[1]。木质纤维素类生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成, 其中纤维素和半纤维素需要水解转化为葡萄糖、木糖等可被微生物利用的单糖后才能被发酵转化为乙醇。木质纤维素水解过程不可避免的会产生如有机酸、呋喃衍生物、酚类化合物等小分子抑制剂, 影响微生物的生长和发酵。如果采用物理、化学方法进行脱毒, 则过程较复杂且成本较高^[2], 因此, 构建具有优秀抑制剂耐受能力的工业菌株, 是解决这一问题的有效手段之一。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是传统的乙醇生产菌株, 与其他微生物相比具有优良的产乙醇能力与环境耐受力, 在乙醇生产中被广泛使用。然而, 野生型酿酒酵母不能利用由木质纤维素水解产生的戊糖, 对水解过程产生的抑制剂耐受力也较弱。因此, 构建具有戊糖发酵能力及优秀抑制物耐受能力的工业酵母菌株, 在燃料乙醇生产中具有重

要意义。乙酸是半纤维素水解过程产生的含量最高的有机酸, 对酵母活性抑制程度强, 特别是对菌株的木糖利用影响显著^[3]。在环境 pH 低于乙酸的 pKa 值时, 乙酸在溶液中主要是以亲脂性的未解离形式存在, 通过简单扩散的方式进入中性的细胞质中, 水解成氢离子和相应的阴离子进而引起细胞的酸化, 破坏细胞内 pH 的内稳态, 干扰细胞内酶的功能, 降低细胞的代谢活性^[4-7]。木糖发酵菌株必须具备较好的乙酸耐受性才能获得良好的发酵效果。

一般通过外源导入木糖还原酶基因(*XYL1*)和木糖醇脱氢酶基因(*XYL2*)或木糖异构酶基因(*XYL4*)赋予酿酒酵母转化木糖为木酮糖的能力, 木酮糖在酵母木酮糖激酶的催化下生成 5-磷酸木酮糖进入磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway, PPP), 通过 PPP 途径中间代谢产物 3-磷酸甘油醛及 6-磷酸果糖和 EMP 途径相偶联, 木糖被最终转化成乙醇。酿酒酵母中 PPP 途径主要在生物合成代谢中发挥作用, 关键基因的表达一般处于较低水平。高表达 PPP 途径中的关键基因往往可以提高菌株代谢木糖的速率^[8]。由 *TAL1* 基因编码的转醛

醇酶是酿酒酵母 PPP 途径中一个关键酶,催化 7-磷酸景天庚酮糖和 3-磷酸甘油醛转化为 6-磷酸果糖和 4-磷酸赤藓糖,该反应是木糖发酵过程中的一个限速步骤^[9]。酵母菌株被敲除 *TAL1* 后,利用木糖生长和发酵的能力急剧下降^[10]。Hasunuma 等的研究表明,乙酸的存在导致胞内 7-磷酸景天庚酮糖显著积累,降低木糖代谢通量;提高 *TAL1* 基因的表达,可以降低乙酸存在条件下胞内 7-磷酸景天庚酮糖的积累,提高菌株的木糖发酵能力^[11]。

基因的适度表达对整个细胞代谢有重要影响,表达过高会造成代谢途径的代谢流不平衡,反而可能会影响发酵效率。彭炳银等^[12]研究了在启动子 P_{TEF1} 、 P_{PGK1} 和 P_{HXX2} 控制下木酮糖激酶的差异表达对酿酒酵母木糖代谢的影响,结果表明在适度水平下较高的木酮糖激酶水平更有利于木糖向乙醇的转化,但过高的木酮糖激酶水平反而会抑制细胞利用木糖生长的能力。目前尚未有针对 *TAL1* 基因差异表达对木糖发酵影响的研究报道。本研究以具有木糖发酵能力的工业酿酒酵母基因工程菌株 NAPX37 为出发菌株,分别使用 3 种启动子,磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子(P_{TDH3})、硫氧还蛋白过氧化物酶基因的启动子(P_{AHP1})和多聚泛素基因启动子(P_{UBI4})控制 *TAL1* 基因的表达,研究不同启动子控制下 *TAL1* 基因的表达对菌株发酵木糖性能和乙酸耐受的影响。启动子 P_{TDH3} 是酵母利用葡萄糖产乙醇途径中的一个强启动子,常用于基因在酵母中的高表达^[11],而启动子 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 是在前期工作中发现的启动基因转录水平不受碳源种类显著影响的且表达基因能力明显优于 P_{TAL1} 的启动子。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本文使用的出发菌株 *Saccharomyces cerevisiae* NAPX37 是具有絮凝性的二倍体工业酵母,异源表达毕赤酵母的木糖还原酶基因和木糖醇脱氢酶基因,并高表达酿酒酵母的木酮糖激酶基因^[13],能发酵木糖产生乙醇。本文所用的菌株与

质粒信息见表 1。

1.2 培养基

产孢子培养基组成(g/L): 葡萄糖 0.5, 醋酸钾 20, 酵母粉 2; 2% YPDA 组成(g/L): 腺嘌呤 0.04, 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 20; 2%或 5% YPD、4% YPX、10% YPDX 培养基^[11]含糖量(g/L)分别为: 葡萄糖 20 或葡萄糖 50、木糖 40、糖 100 (木糖 40 和葡萄糖 60)。所有培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 15 min 使用。

| 表 1 酿酒酵母菌株和质粒 Table 1 Characteristics of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains and plasmids | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 菌株和质粒 Strains and plasmids | 基因型 Genotype | 来源 Reference |
| Strains | | |
| NAPX37 | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{TAL1}-TAL1/P_{TAL1}-TAL1</i> | [13] |
| NAPX37 TDH3p | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{TAL1}-TAL1/P_{TDH3}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 AHP1p | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{TAL1}-TAL1/P_{AHP1}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 UBI4p | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{TAL1}-TAL1/P_{UBI4}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 TDH3p-B(a) | <i>MATa</i> , <i>P_{TDH3}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 TDH3p-O(α) | <i>MATa</i> , <i>P_{TDH3}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 AHP1p-B(a) | <i>MATa</i> , <i>P_{AHP1}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 AHP1p-O(α) | <i>MATa</i> , <i>P_{AHP1}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 UBI4p-B(a) | <i>MATa</i> , <i>P_{UBI4}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 UBI4p-O(α) | <i>MATa</i> , <i>P_{UBI4}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 TDH3p-4 | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{TDH3}-TAL1/P_{TDH3}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 AHP1p-4 | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{AHP1}-TAL1/P_{AHP1}-TAL1</i> | This study |
| NAPX37 UBI4p-3 | <i>MATa/MATa</i> , <i>P_{UBI4}-TAL1/P_{UBI4}-TAL1</i> | This study |
| Plasmids | | |
| pBlu-LTKTL-TDH3 | TDH3 promoter, <i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP</i> | [14] |
| pBlu-LTKTL-AHP1 | AHP1 promoter, <i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP</i> | This study |
| pBlu-LTKTL-UBI4 | UBI4 promoter, <i>loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP</i> | This study |

1.3 批次乙醇发酵

用接种环取一环于 2% YPD 培养基上活化 24 h 后的菌体, 接种于装有 100 mL 5% YPD 培养基的 500 mL 三角瓶中, 160 r/min、30 °C 摇床预培养 16 h。取 10 mL 预培养液(预培养液 10%接种)接种到装有 90 mL 发酵培养基, 或 5 g 湿菌体接种到装有 100 mL 发酵培养基的 300 mL 三角瓶中(50 g 湿菌体/L 接种), 置于 35 °C 水浴中, 200 r/min 磁力搅拌进行发酵。按需要在发酵培养基中添加不同浓度乙酸。定时取样分析残糖、乙醇、木糖醇及酵母浓度。

1.4 目标启动子片段的获取及质粒的构建

用限制性内切酶 *EcoR* I 酶切质粒 pBlu-LTKTL-TDH3^[14], 回收 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP* 片段, 与用 *EcoR* I 线性化后的质粒 pBluescript II KS(+)^[15]连接(Ligation high ver.2, Toyobo, Japan), 构建含 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP* 的质粒 pBlu-LTKTL。

以菌株 NAPX37 的基因组为模板, 分别用引物对 ScAHP1-Spe I -F/ScAHP1-Not I -R 和 ScUBI4-Spe I -F/ScUBI4-Not I -R 扩增出启动子 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 片段, 用 *Spe* I 和 *Not* I 进行双酶切并回收片段。将 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 片段分别连接到质粒 pBlu-LTKTL 上获得质粒 pBlu-LTKTL-AHP1 和 pBlu-LTKTL-UBI4。

以质粒 pBlu-LTKTL-TDH3、pBlu-LTKTL-AHP1 和 pBlu-LTKTL-UBI4 为模板, 利用引物对 TAL1-loxP/TAL1-TDH3p、TAL1-loxP/TAL1-AHP1p 和 TAL1-loxP/TAL1-UBI4p 及高保真酶 Prime STARHS DNA Polymerase [宝生物工程(大连)有限公司]扩增, 分别获得片段 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}*、*loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{AHP1}* 和 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{UBI4}*。利用 Sanprep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]对 PCR 产物进行纯化后用于酵母的转化。

1.5 酵母转化

利用 PEG/LiAc 方法^[16]分别将片段 *loxP-P_{TEF}*

kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}、*loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{AHP1}* 和 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{UBI4}* 同源重组到菌株 NAPX37 的基因组上, 将 P_{TAL1} 启动子替换成 P_{TDH3}、P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子。提取转化子的基因组 DNA, 用引物对 F-TAL1-UP800/R-TAL1-DOWN200 进行 PCR 扩增, 确认目标片段是否导入目标位置。目标片段若成功导入到目标位置会扩增出 3 000 bp 的 PCR 产物。用 10% YPDx 在 35 °C 条件下进行批次发酵, 筛选出葡萄糖和木糖消耗速率快, 乙醇产率高的转化子。

1.6 高表达 *TAL1* 基因的纯合子菌株的获取

由于目标片段只将单侧 *TAL1* 基因的启动子置换了, 获得的转化子均为杂合子。通过获取杂合子的单倍体然后再交配获取纯合子。将 1.5 中获得的转化子在产孢子培养基上培养 2–3 d 后, 挑取菌体用蜗牛酶(1 U/μL)处理 20 min, 利用显微操作系统(Singer MSM300 System, Singer Instruments, UK)挑取单个孢子培养 2 d, 筛选具有 G418 抗性的菌株。与已知性别的单倍体菌株交配, 确定具有 G418 抗性菌株的性别, 用 10% YPDx 进行批次发酵, 筛选发酵性能优秀的 *MATa* 和 *MATα* 单倍体菌株。将 *MATa* 和 *MATα* 单倍体菌株同时接种到 2% YPDA 液体培养基中 30 °C 培养过夜, 利用显微操作系统挑取形态为二倍体的细胞, 培养 2 d, 再利用产孢子培养基确认是否为二倍体。提取基因组, 用引物 F-TAL1-UP800/R-TAL1-DOWN200 进行 PCR 扩增, 确认是否为纯合子。利用 10% YPDx 进行批次发酵, 筛选发酵性能优秀的纯合子菌株。

1.7 高表达 *TAL1* 基因纯合子菌株的发酵性能评价

按表 2 进行批次乙醇发酵, 比较了菌株 NAPX37 和 *TAL1* 启动子分别被置换成 P_{TDH3}、P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子的纯合子的木糖发酵能力和耐受乙酸能力。每一条件下的批次发酵均重复 2 次, 取平均值。

1.8 转醛醇酶基因转录水平分析

收集酵母细胞, 利用 Yeast RNAiso Kit 试剂盒

| 表 2 批次发酵条件 | | | |
|---------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Table 2 Batch fermentation condition (35 °C, 200 r/min) | | | |
| pH | 发酵培养基 Fermentation medium | 乙酸添加量 Acetic acid (mmol/L) | 接种量 Inoculation quantity |
| 5.0 | 4% YPX | 0, 30, 60 | Preculture 10% |
| 5.0 | 4% YPX | 0, 30, 60 | 50 g wet cells/L |
| 5.0 | 10% YPDX | 0, 30, 60 | Preculture 10% |
| 4.0 | 4% YPX | 0, 30, 60 | Preculture 10% |
| 4.0 | 10% YPDX | 0, 30, 60 | Preculture 10% |

[宝生物工程(大连)有限公司]提取总 RNA，利用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]进行反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板，使用试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II [宝生物工程(大连)有限公司]配置实时定量 PCR 反应体系，所用引物见表 3^[10]。

使用 Eco™ real-time PCR system (Illumina, USA) 进行实时定量 PCR 反应。选择 *ACT1* 作为参比基因^[10]，以 *ACT1* 转录水平为 1 计算 *TAL1* 基因的相对转录水平。以菌株 NAPX37 基因组 DNA 为模板，分别用引物对 P-TAL1F/P-TAL1R 和 P-ACT1F/P-TAL1R 扩增 *TAL1* 和 *ACT1* 基因片段，分别与载体 pMD-19 [宝生物工程(大连)有限公司]进行连接，构建质粒 P-TAL1 和 P-ACT1，用于制作定量 PCR 标准曲线。

1.9 分析方法

用细胞干重表示发酵过程中酵母的生物量，采用干燥法测定。取发酵液 5 mL，离心后分别收集上清液和菌体，用蒸馏水洗涤菌体 3 次，将其置于 105 °C 的烘箱中干燥至恒重后称重。用 0.45 μm 的滤膜过滤上清液，用于分析残糖、乙醇和木糖醇。

| 表 3 PCR 引物及其序列 | |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Table 3 PCR primers and sequences | |
| 引物 Primers | 碱基序列 Base sequences (5'→3') |
| ScAHP1-SpeI-F | GGACTAGTGGCCTGAATTCTCTTTTATGAG |
| ScAHP1-NotI-R | TTGCGGCCGCAAGTTTGTGTGGTTATTGGT |
| ScUBI4-SpeI-F | GGACTAGTGGCCTGAATTCATTGAGATCCT |
| ScUBI4-NotI-R | TTGCGGCCGCAATCAGTCTCGCAATATTTTC |
| TAL1-loxP* | <u>AACAATCTAATTAATTCGAAAACAAGAACCGAAACGCGAAGGCCGCCAGCTGAA</u> GCTTCG |
| TAL1-TDH3p* | <u>TGTTAGCAACCTTTTGTTTCTTTTGAGCTGGTTCAGACATTTTGTTTGTGTTATGTGT</u> GTTTATTCG |
| TAL1-AHP1p* | <u>TGTTAGCAACCTTTTGTTTCTTTTGAGCTGGTTCAGACATGTTTGTGTTGTTATT</u> GGTAG |
| TAL1-UBI4p* | <u>TGTTAGCAACCTTTTGTTTCTTTTGAGCTGGTTCAGACATAATCTATTAGTTAAAG</u> TAAAGTGGG |
| F-TAL1-800 | CTCTCAACCTGACTACAGAG |
| R-TAL1-200 | GCAACATCGATCAACTTGGC |
| P-TAL1F | ATGTCTGAACCAGCTCAAAAGAAAC |
| P-TAL1R | TTAAGCGGTAACCTTCTTTTCAATCAAG |
| RT-TAL1F | GACACTGGTGATTTCGGCTCT |
| RT-TAL1R | TGGCGTAAGTTGGTTGCTTG |
| P-ACT1F | GAAATGCAAACCGCTGCTCA |
| P-ACT1R | GAACCACCAATCCAGACGGA |
| RT-ACT1F | AAACCGCTGCTCAATCTTCTTC |
| RT-ACT1R | TGGGGCTCTGAATCTTTCGT |

注：*：标有下划线的碱基序列为同源重组序列。
Note：*: Underlined sequences are sequences for homologous recombination.

利用 LC-10AD VP 高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan)分析木糖和葡萄糖浓度^[17], 检测器为 RF-10A_{XL}, 炉温为 150 °C, 柱温为 65 °C; 利用 SCL-10A VP 高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan)测定木糖醇的浓度, 检测器是 RID-10A, 炉温为 35 °C, 0.05 mmol/L H₂SO₄ 作为移动相, 流速为 0.6 mL/min。利用 GC 353B 气相色谱仪(GL sciences, Japan)测定乙醇的浓度^[17], 用异丙醇作为内标, 氦气作为载气, 氢气作为燃气, 炉温为 50 °C, 注射器和检测器温度均为 180 °C。

2 结果与分析

2.1 不同启动子控制下高表达 *TAL1* 基因的纯合子酵母菌株的构建

分别将含有目标启动子片段 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{TDH3}*、*loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{AHP1}* 和 *loxP-P_{TEF}-kanMX-T_{TEF}-loxP-P_{UBI4}* 导入二倍体基因工程菌株 NAPX37 中。利用 10% YPD_X 进行批次发酵筛选出葡萄糖和木糖消耗快、乙醇收率高的转化子 NAPX37 TDH3p、NAPX37 AHP1p 和 NAPX37 UBI4p。利用 PCR 确认 3 株转化子中片段导入情况, 结果见图 1。可以看出, 由 3 株转化子均扩增出 3 000 bp 和 1 000 bp 左右的两

个片段, 说明只有一套染色体上的 *TAL1* 基因的启动子被置换成目标启动子, 而另一套染色体上仍是 *TAL1* 基因的启动子 P_{TAL1}。

分别将转化子 NAPX37 TDH3p、NAPX37 AHP1p 和 NAPX37 UBI4p 在产孢子培养基培养, 挑取单个孢子培养, 对能够在含 100 mg/L G418 的 2% YPD 培养基上生长的单倍体进行性别确认, 获取性别分别为 *MATa* 和 *MATα* 的含有目标启动子片段的单倍体菌株。利用 10% YPD_X 进行批次发酵, 分别获得发酵性能优秀的单倍体酵母 NAPX37 TDH3p-B (a)、NAPX37 TDH3p-O (α)、NAPX37 AHP1p-B (a)、NAPX37 AHP1p-O (α)、NAPX37 UBI4p-B (a)和 NAPX37 UBI4p-O (α)。

将含同一启动子的, 性别分别为 *MATa* 和 *MATα* 的单倍体进行交配获得二倍体菌株, 通过批次发酵筛选出发酵性能优秀的高表达 *TAL1* 基因的菌株 NAPX37 TDH3p-4、NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 UBI4p-3。利用 PCR 确认 *TAL1* 基因启动子区域情况, 结果见图 1。可以看出, 有 3 株二倍体只扩增出 3 000 bp 左右的产物, 说明菌株 NAPX37 TDH3p-4、NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 UBI4p-3 均为纯合子, 它们两套染色体上的 *TAL1* 基因的启动子部分均被目标启动子所置换。

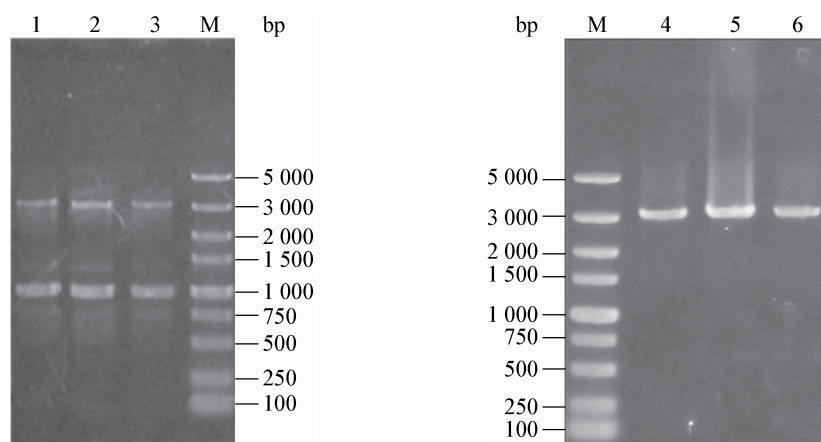


图 1 利用 PCR 确认 *TAL1* 基因启动子被目标启动子置换情况

Figure 1 Check of replacement of *TAL1* promoter with P_{TDH3}, P_{AHP1} and P_{UBI4} promoters by PCR amplification

Note: 1: NAPX37 TDH3p; 2: NAPX37 AHP1p; 3: NAPX37 UBI4p; 4: NAPX37 TDH3p-4; 5: NAPX37 AHP1p-4; 6: NAPX37 UBI4p-3; M: Marker DL5000.

2.2 *TAL1* 基因表达程度对酿酒酵母基因工程菌发酵木糖及耐受乙酸性能的影响

2.2.1 以木糖作为单一碳源条件下,不同启动子控制 *TAL1* 基因表达对酿酒酵母发酵及乙酸耐受性能的影响:以含 4%木糖的 YPX 为发酵培养基,考察了乙酸浓度、pH 和接种量对发酵的影响。

接种量为 10%的前培养液、初始 pH 5.0 时,各菌株在不同乙酸浓度条件下的发酵结果见图 2 和表 4。可以看出,在不添加乙酸条件下(图 2A、B),菌株 NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 TDH3p-4 利用木糖速度最快,其次是 NAPX37 UBI4p-3, NAPX37 最慢,各菌株在前 24 h 的木糖利用速率分

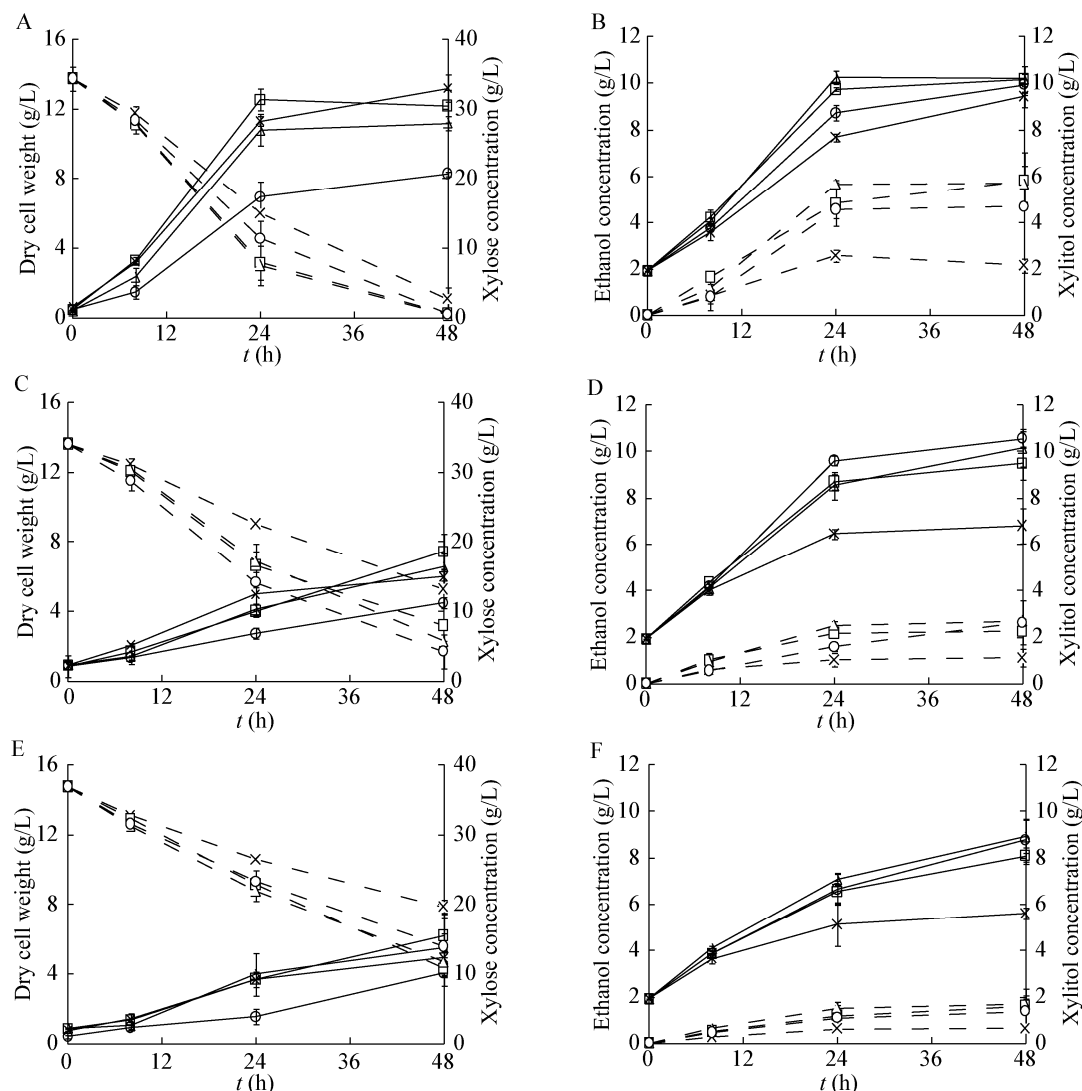


图2 pH 5.0 条件下以木糖为唯一碳源时,不同乙酸浓度条件下高表达 *TAL1* 基因的菌株和出发菌株的木糖发酵能力和耐受乙酸能力比较

Figure 2 Comparison of xylose fermenting and acetate tolerant capacity of *TAL1* gene overexpressed strains and their parent strain at pH 5.0 with different acetate concentrations using xylose as sole carbon source

注: ×: NAPX37; □: NAPX37 TDH3p-4; △: NAPX37 AHP1p-4; ○: NAPX37 UBI4p-3. 实线: 细胞干重、乙醇浓度; 虚线: 木糖浓度、木糖醇浓度. A、B: 0 mmol/L 乙酸; C、D: 30 mmol/L 乙酸; E、F: 60 mmol/L 乙酸; 数值是进行 2 次独立发酵实验的平均值.
Note: ×: NAPX37; □: NAPX37 TDH3p-4; △: NAPX37 AHP1p-4; ○: NAPX37 UBI4p-3. Full line: Dry cell weight, ethanol concentration; Dot line: Xylose concentration, xylitol concentration. A, B: 0 mmol/L acetic acid; C, D: 30 mmol/L acetic acid; E, F: 60 mmol/L acetic acid; Data are means of two independent fermentation experiments.

表 4 以木糖作为唯一碳源, 发酵 24 h 后的木糖消耗速率、乙醇产率、木糖醇和乙醇收率^a
Table 4 Xylose consumption rate, ethanol productivity, and xylitol and ethanol yields after 24 h fermentation with different acetate concentrations using xylose as sole carbon source^a

| 菌株 Strains | 木糖消耗速率 Xylose consumption rate [g/(L·h)] | | | 木糖醇收率(基于消耗的木糖) Xylitol yield (g/g, based on consumed xylose) | | | 乙醇产率 Ethanol productivity [g/(L·h)] | | | 乙醇收率(基于消耗的木糖) Ethanol yield (g/g, based on consumed xylose) | | |
|-------------------|---------------------------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| | 0 mmol/L | | | 30 mmol/L | | | 60 mmol/L | | | 0 mmol/L | | |
| | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L |
| NAPX37 | 0.777±0.059 | 0.480±0.001 | 0.434±0.008 | 0.138±0.008 | 0.138±0.025 | 0.088±0.024 | 0.059±0.008 | 0.241±0.006 | 0.190±0.009 | 0.134±0.039 | 0.311±0.032 | 0.396±0.019 |
| NAPX37 TDH3p-4 | 1.122±0.054 | 0.729±0.131 | 0.583±0.007 | 0.180±0.029 | 0.126±0.029 | 0.126±0.026 | 0.084±0.030 | 0.326±0.003 | 0.283±0.013 | 0.194±0.020 | 0.291±0.017 | 0.393±0.053 |
| NAPX37 AHP1p-4 | 1.146±0.032 | 0.706±0.061 | 0.622±0.056 | 0.207±0.009 | 0.149±0.009 | 0.149±0.023 | 0.103±0.028 | 0.348±0.011 | 0.276±0.025 | 0.216±0.011 | 0.304±0.019 | 0.391±0.002 |
| NAPX37 UBI4p-3 | 0.972±0.117 | 0.831±0.011 | 0.566±0.067 | 0.196±0.007 | 0.079±0.007 | 0.079±0.009 | 0.080±0.008 | 0.284±0.013 | 0.321±0.009 | 0.198±0.028 | 0.294±0.022 | 0.386±0.006 |

注: ^a: 表中数据是 2 次独立批次发酵实验的平均值±标准差。
Note: ^a: Data are averages of two separate batch fermentation experiments±s.

别为 1.146、1.122、0.972 和 0.777 g/(L·h)。4 株菌株在 24 h 时的乙醇浓度则分别为 10.3、9.7、8.7 和 7.7 g/L。木糖消耗速率越快，乙醇浓度越高。与出发菌株 NAPX37 相比，菌株 NAPX37 TDH3p-4、NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 UBI4p-3 的木糖利用速率分别提高了约 44%、47%和 25%，乙醇生成速率分别提高了 35%、44%和 33% (表 4)。对发酵 24 h 后的菌体分析了 *TAL1* 基因的转录情况，结果表明， P_{TDH3} 、 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子不同程度地提高了 *TAL1* 基因的转录水平(1.9–3.5 倍，表 5)，可以认为 3 种启动子均高表达了 *TAL1* 基因，从而提高了菌株的木糖利用速率，加快了发酵速度。在无乙酸存在条件下，虽然 P_{TDH3} 和 P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 的转录水平高于 P_{AHP1} 启动子(表 5)，但 P_{AHP1} 启动子控制 *TAL1* 转录水平(0.7 左右)更有利于木糖发酵产乙醇。从木糖醇和乙醇收率可以看出，与菌株 NAPX37 相比，高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株的木糖醇收率提高了 30%–50%，同时乙醇收率略有下降，2.2%–6.1%。该结果表明，高表达 *TAL1* 基因大幅度提高了木糖代谢速率，但同时也提高了木糖醇的积累，尽管对乙醇收率影响不显著。

在添加 30 mmol/L 乙酸条件下(图 2C、D)，与无乙酸条件相比，各菌株利用木糖的速率明显下降，高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株与出发菌株间的差异更显著。与出发菌株 NAPX37 相比，菌株

NAPX37 TDH3p-4、NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 UBI4p-3 发酵前 24 h 的木糖利用速率分别提高了约 52%、47%和 73%，乙醇生成速率分别提高了 49%、45%和 69% (表 4)。在 3 株启动子控制 *TAL1* 基因表达菌株中，菌株 NAPX37 UBI4p-3 的发酵速率最快。在 30 mmol/L 乙酸条件下，各个启动子控制 *TAL1* 的转录水平都有所降低， P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 的转录水平下降到 0.7 左右(表 5)，但菌株 NAPX37 UBI4p-3 发酵结果更优于 NAPX37 TDH3p-4 和 NAPX37 AHP1p-4，表明在有乙酸条件下， P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 基因的表达程度比较合适，过高或过低都会降低菌株对木糖的利用速率。菌株 NAPX37 UBI4p-3 在 30 mmol/L 乙酸条件下的木糖利用速率和乙醇生成速率均高于菌株 NAPX37 在无乙酸条件下的结果，表明通过 P_{UBI4} 启动子高表达 *TAL1* 基因使菌株具备了耐受 30 mmol/L 乙酸的能力。与无乙酸条件相比，在 30 mmol/L 乙酸条件下，各菌株的木糖醇收率均下降，而乙醇收率增加。各菌株的乙醇收率从无乙酸条件下的 0.3 左右提高到接近 0.4，说明乙酸的存在减少了木糖醇的积累，提高了乙醇的收率。在 30 mmol/L 乙酸条件下，菌株 NAPX37 UBI4p-3 的木糖醇收率和出发菌株相近，低于菌株 NAPX37 TDH3p-4 和 NAPX37 AHP1p-4，表明在有乙酸条件下，相比于 P_{TDH3} 和 P_{AHP1} 启动子， P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 基因的表达减少了木糖醇的积累。

| 表 5 pH 5.0 条件下以木糖为唯一碳源发酵 24 h 后各菌株 <i>TAL1</i> 基因的转录水平比较 ^a Table 5 Transcription level of <i>TAL1</i> gene after 24 h-fermentation with different acetate concentrations using xylose as sole carbon source ^a | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------|-------------|
| 菌株 Strains | 添加乙酸浓度 Concentration of acetic acid added | | |
| | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L |
| NAPX37 | 0.393±0.050 | 0.239±0.024 | 0.100±0.036 |
| NAPX37 TDH3p-4 | 1.291±0.002 | 1.081±0.158 | 1.077±0.046 |
| NAPX37 AHP1p-4 | 0.760±0.018 | 0.556±0.137 | 0.529±0.005 |
| NAPX37 UBI4p-3 | 1.356±0.233 | 0.748±0.044 | 0.714±0.144 |

注：^a：转醛醇酶基因的表达水平=*TAL1* 的拷贝数/*ACT1* 的拷贝数，数据是二次独立实验的平均值±标准差。
Note: ^a: Expressional level of *TAL1*=Copies of *TAL1*/Copies of *ACT1*, data are averages of two separate experiments±s.

当乙酸添加量提高到 60 mmol/L 时, 各菌株的木糖利用速率进一步降低。所有菌株 *TAL1* 的转录水平进一步降低, 但 P_{TDH3} 、 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 的转录水平仍远高于出发菌株(表 5)。尽管高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株间的 *TAL1* 转录水平有明显差异, 但发酵结果没有显著差异。高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株和出发菌株的差异则仍比较明显(图 2E、F)。相比于出发菌株, 高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株的木糖利用速率和乙醇生成速率分别提高了 30%–43%和 45%–61%。与乙酸浓度为 30 mmol/L 条件相比, 高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株间的差异缩小。与乙酸浓度为 30 mmol/L 条件下的结果相比, 除菌株 NAPX37 UBI4p-3 维持和 30 mmol/L 乙酸条件下相同收率外, 其他 3 株菌株木糖醇的收率进一步下降。高浓度的乙酸减少了木糖醇的积累。对于乙醇收率, 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株(0.333–0.349)显著高于出发菌株(0.308), 同时 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株和出发菌株的变化趋势不一样。3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株的乙醇收率低于 30 mmol/L 乙酸条件下的乙醇收率, 但是显著高于无乙酸条件下的乙醇收率(表 4), 但出发菌株的乙醇收率低于 30 mmol/L 乙酸条件下的乙醇收率, 但是和无乙酸条件下的乙醇收率基本相同。以上结果表明, 高表达 *TAL1* 基因对菌株在高浓度乙酸条件下的乙醇积累有利。

在 3 个乙酸浓度条件下, 菌株 NAPX37 UBI4p-3 的菌体量只有其它 3 株菌株 1/2 左右, 因此菌株 NAPX37 UBI4p-3 的单位菌体的木糖利用速率显著高于其它 3 株菌株, 可以认为在木糖为唯一碳源条件下, P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 的转录可以显著提高菌体利用木糖的速率。

接种量为 50 g 湿菌体/L、初始 pH 为 5.0 时, 4 菌株在不同乙酸浓度条件下的发酵结果表明, 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株优于出发菌株(由于篇幅原因, 数据未列出)。在 3 个乙酸条件下, 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株间差异均不显著, 菌株 NAPX37 UBI4p-3 的乙醇浓度和乙醇收率稍有优

势。与接种量为 10%的前培养液条件下的发酵结果相比, 4 株菌株的木糖消耗速率显著提高, 在乙酸为 0、30 和 60 mmol/L 条件下, 发酵前 8 h 3 株高表达 *TAL1* 基因菌株的木糖消耗速率分别达到约 4.55、4.34 和 3.53 g/(L·h), 而出发菌株则达到 4.16、3.91 和 2.96 g/(L·h)。50 g 湿菌体/L 的高菌体浓度是获得如此高的木糖消耗速率的主要原因。上述菌株的木糖消耗速率显著高于高表达 *TAL1* 基因的菌株 MT8-1X/TAL^[11]和 MT8-1X/TAL-p δ H^[18]。

接种量为 10%的前培养液、初始 pH 为 4.0 时, 在各浓度乙酸的条件下, 发酵受抑制的程度明显强于 pH 为 5.0 的情况(由于篇幅原因, 数据未列出)。3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株的木糖发酵能力和耐受乙酸的性能均好于出发菌株 NAPX37, 但是 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株间的木糖发酵能力的差异不明显。

以上结果表明, 以木糖为唯一碳源时, 无论有无乙酸存在或乙酸浓度是高还是低、pH 是 5.0 还是 4.0、接种量高还是低, 3 株高表达 *TAL1* 基因菌株的木糖利用速率均高于出发菌株 NAPX37, 说明高表达 *TAL1* 基因可以有效地提高菌株对木糖的利用速率。3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株间的差异因发酵条件而异。低接种量时菌株间差异明显, 高接种量时差异较小; pH 5.0 条件下菌株间差异比 pH 4.0 显著。无乙酸存在条件下, 菌株 NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 TDH3p-4 的木糖利用速率较菌株 NAPX37 UBI4p-3 高, 而在 30 mmol/L 乙酸条件下, 菌株 NAPX37 UBI4p-3 的木糖利用速率明显优于菌株 NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 TDH3p-4, 合适的 *TAL1* 基因表达水平更有利于木糖发酵。 P_{UBI4} 启动子控制 *TAL1* 的转录可以显著提高单位菌体利用木糖的速率。高表达 *TAL1* 基因, 在无乙酸条件下, 降低了菌株的乙醇收率, 但当乙酸存在时菌株的乙醇收率提高, 在 60 mmol/L 乙酸条件下则高于出发菌株。因此, 高表达 *TAL1* 基因可以提高菌株在高浓度乙酸条件下发酵木糖的乙醇收率。

2.2.2 以葡萄糖和木糖作为碳源,不同启动子控制 *TAL1* 基因表达对酿酒酵母发酵及乙酸耐受性能的影响: 以含葡萄糖和木糖的 10% YPD_X 为发酵培养基,考察了乙酸浓度和 pH 对发酵的影响。

在 pH 5.0、乙酸浓度为 0 和 30 mmol/L 条件下,3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株 NAPX37 TDH3p-4、NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 UBI4p-3 的发酵能力均略优于出发菌株 NAPX37,但 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株的葡萄糖和木糖消耗能力没有显著差异。当乙酸浓度提高到 60 mmol/L 时,4 株菌株间基本没有差异(由于篇幅原因,数据未列出)。在相同的乙酸浓度下,所有菌株的木糖利用速率均高于以木糖作为唯一碳源时的木糖利用速率。以不添加乙酸的情况,菌株 NAPX37 UBI4p-3 为例,混合糖发酵前 24 h 的木糖利用速度为 1.12 g/(L·h),明显高于木糖为单独碳源时的 0.96 g/(L·h)。在相同的乙酸浓度条件下,混合糖发酵过程中单位发酵液体积的酵母干重是木糖发酵过程的约 2 倍,菌株优先利用葡萄糖快速生长和繁殖,加快了木糖利用速率。

pH 4.0 条件下的发酵结果如图 3 和表 6 所示。在不添加乙酸的情况下(图 3A、B),4 株菌株在 8 h 内利用完葡萄糖,高表达 *TAL1* 基因的 3 株菌株在 48 h 之内利用完木糖,而出发菌株 NAPX37 在 48 h 时还残留约 7 g/L 的木糖没有被消耗。发酵前 24 h,菌株 NAPX37 AHP1p-4 的木糖利用速率和乙醇生成速率最快,其次是 NAPX37 TDH3p-4 和 NAPX37 UBI4p-3,最后是出发菌株 NAPX37(表 6)。与以木糖为唯一碳源,不添加乙酸的情况类似, P_{TDH3} 、 P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子不同程度地提高了 *TAL1* 基因的转录(表 7), P_{AHP1} 启动子控制 *TAL1* 表达优于 P_{TDH3} 和 P_{UBI4} 启动子。与出发菌株 NAPX37 相比,菌株 NAPX37 TDH3p-4 和 NAPX37 AHP1p-4 的木糖醇的积累稍高,而菌株 NAPX37 UBI4p-3 稍低;3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株的乙醇收率均低于出发菌株,其中菌株 NAPX37 UBI4p-3 的乙醇收率是 3 菌株中最高的,与其较低的木糖醇积累有关。

在 30 mmol/L 乙酸存在条件下(图 3C、D),4 株菌株在 8 h 内利用完葡萄糖,对木糖的利用速率低于无乙酸条件下的木糖利用速率。发酵前 24 h,菌株 NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 TDH3p-4 的木糖利用速率和乙醇生成速率高于菌株 NAPX37 UBI4p-3 和出发菌株 NAPX37。此时由 P_{AHP1} 和 P_{TDH3} 启动子控制 *TAL1* 基因表达的菌株优于 P_{UBI4} 启动子菌株。与无乙酸添加条件下的结果相比, P_{TDH3} 和 P_{UBI4} 控制的 *TAL1* 基因的转录水平明显下降。从发酵结果看, P_{AHP1} 和 P_{TDH3} (*TAL1* 基因的转录水平接近 0.7)比 P_{UBI4} 和出发菌株的启动子更合适(表 7)。无乙酸条件,各菌株的木糖醇收率降低而乙醇收率升高,表明乙酸的存在有利于乙醇的积累。

在 60 mmol/L 乙酸存在条件下(图 3E、F),木糖利用受到严重抑制,同时葡萄糖的利用也受到影响。 P_{TDH3} 控制的 *TAL1* 基因转录水平进一步降低,但 3 个启动子控制的 *TAL1* 基因的转录水平仍高于出发菌株(表 7)。乙酸添加没有对 P_{AHP1} 控制的 *TAL1* 基因的转录水平有显著影响。在发酵 8 h 后,葡萄糖仍有剩余,其中菌株 NAPX37 TDH3p-4 和 NAPX37 AHP1p-4 剩余较少,其次是菌株 NAPX37 UBI4p-3,而出发菌株 NAPX37 剩余葡萄糖最多。该结果表明,虽然只改变了 PPP 途径中的 *TAL1* 基因的表达,高表达 *TAL1* 基因也提高了菌株的葡萄糖利用速率。在 60 mmol/L 乙酸条件下,所有菌株的木糖利用都受到严重抑制,但 3 株高表达 *TAL1* 基因的菌株稍优于出发菌株,菌株 NAPX37 AHP1p-4 的木糖利用速率相对稍高。与 30 mmol/L 乙酸条件相比,各菌株的木糖醇收率进一步降低而乙醇收率进一步提高。4 株菌株的乙醇收率达到 0.48 左右,而在 30 mmol/L 条件下只有 0.45 左右,在无乙酸条件下仅为 0.41 左右。由于使用 10% YPD_X 的情况下,乙醇主要由葡萄糖转化而来,特别是 60 mmol/L 乙酸条件下,因此可以认为乙酸的存在提高了单位葡萄糖的乙醇收率,乙酸浓度越高,乙醇收率提高越明显。

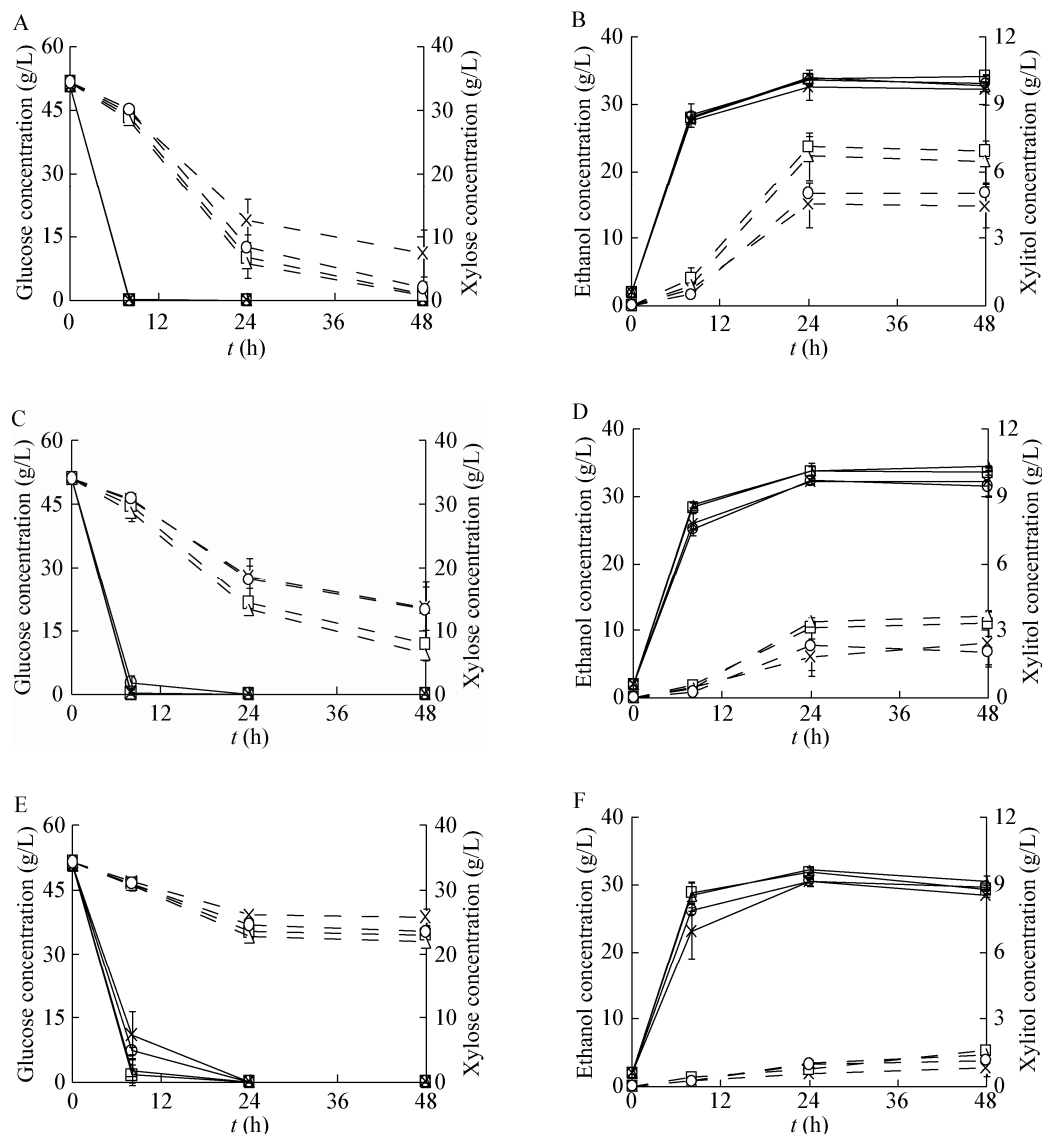


图3 pH 4.0 条件下以葡萄糖和木糖为碳源时, 不同乙酸浓度条件下高表达 *TAL1* 基因的菌株和出发菌株的木糖发酵能力和耐受乙酸能力比较

Figure 3 Comparison of fermenting and acetate tolerant capacity of *TAL1* gene overexpressed strains and their parent strain at pH 4.0 with different concentration of acetate using glucose and xylose as carbon sources

注: ×: NAPX37; □: NAPX37 TDH3p-4; △: NAPX37 AHP1p-4; ○: NAPX37 UBI4p-3. 实线: 葡萄糖浓度、乙醇浓度; 虚线: 木糖浓度、木糖醇浓度. A、B: 0 mmol/L 乙酸; C、D: 30 mmol/L 乙酸; E、F: 60 mmol/L 乙酸; 数值是进行 2 次独立发酵实验的平均值.

Note: ×: NAPX37; □: NAPX37 TDH3p-4; △: NAPX37 AHP1p-4; ○: NAPX37 UBI4p-3. Full line: Glucose concentration, ethanol concentration; Dot line: Xylose concentration, xylitol concentration. A, B: 0 mmol/L acetic acid; C, D: 30 mmol/L acetic acid; E, F: 60 mmol/L acetic acid; Data are means of two independent fermentation experiments.

表 6 以木糖和葡萄糖作为碳源发酵 24 h 后的木糖消耗速率、乙醇产率、木糖醇和乙醇收率
Table 6 Xylose consumption rate, ethanol productivity, and xylitol and ethanol yields after 24 h-fermentation with different concentration of acetate using glucose and xylose as carbon sources^a

| 菌株 Strains | 木糖消耗速率 Xylose consumption rate [g/(L·h)] | | | 木糖醇收率(基于消耗的木糖) Xylitol yield (g/g, based on consumed xylose) | | | 乙醇产率 Ethanol productivity [g/(L·h)] | | | 乙醇收率(基于消耗的糖) Ethanol yield (g/g, based on consumed sugar) | | |
|-------------------|---------------------------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L | 0 mmol/L | 30 mmol/L | 60 mmol/L |
| NAPX37 | 0.914±0.144 | 0.643±0.077 | 0.342±0.036 | 0.204±0.014 | 0.115±0.040 | 0.067±0.013 | 1.275±0.080 | 1.264±0.019 | 1.188±0.024 | 0.421±0.006 | 0.457±0.006 | 0.484±0.003 |
| NAPX37 TDH3p-4 | 1.157±0.015 | 0.818±0.022 | 0.446±0.013 | 0.256±0.021 | 0.158±0.019 | 0.068±0.028 | 1.326±0.032 | 1.324±0.052 | 1.245±0.003 | 0.406±0.012 | 0.450±0.021 | 0.487±0.001 |
| NAPX37 AHP1p-4 | 1.194±0.094 | 0.864±0.016 | 0.482±0.006 | 0.232±0.019 | 0.162±0.012 | 0.090±0.013 | 1.333±0.052 | 1.330±0.028 | 1.262±0.016 | 0.403±0.004 | 0.445±0.007 | 0.486±0.005 |
| NAPX37 UBI4p-3 | 1.093±0.090 | 0.662±0.140 | 0.406±0.023 | 0.190±0.003 | 0.141±0.038 | 0.100±0.001 | 1.319±0.035 | 1.266±0.018 | 1.193±0.011 | 0.412±0.001 | 0.455±0.016 | 0.474±0.000 |

注：^a：表中数据是 2 次独立批次发酵实验的平均值±标准差。
Note：^a：Data are averages of two separate batch fermentation experiments±s.

| 表 7 pH 4.0 条件下葡萄糖和木糖共发酵 24 h 后各菌株 <i>TAL1</i> 基因的转录水平比较 ^a | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------|-------------|
| Table 7 Transcription level of <i>TAL1</i> gene after 24 h-fermentation with different concentration of acetate using glucose and xylose as carbon sources at pH 4.0 ^a | | | |
| 菌株 Strains | 添加乙酸浓度 Concentration of acetic acid added (mmol/L) | | |
| | 0 | 30 | 60 |
| NAPX37 | 0.481±0.059 | 0.249±0.045 | 0.223±0.015 |
| NAPX37 TDH3p-4 | 1.300±0.050 | 0.667±0.054 | 0.389±0.125 |
| NAPX37 AHP1p-4 | 0.715±0.080 | 0.690±0.099 | 0.684±0.289 |
| NAPX37 UBI4p-3 | 1.498±0.062 | 0.338±0.115 | 0.338±0.016 |

注: ^a: 转醛醇酶基因的表达水平=*TAL1* 的拷贝数/*ACT1* 的拷贝数, 数据是二次独立实验的平均值±标准差。
Note: ^a: Expressional level of *TAL1*=Copies of *TAL1*/Copies of *ACT1*, data are averages of two separate experiments ±s.

以上结果表明,以葡萄糖和木糖即混合糖为碳源发酵时,无论有无乙酸存在或乙酸浓度是高还是低、pH 是 5.0 还是 4.0、3 株高表达 *TAL1* 基因菌株的木糖利用速率均高于出发菌株 NAPX37,说明高表达 *TAL1* 基因可以有效地提高菌株在混合糖条件下对木糖的利用速率。在 3 个乙酸条件下,菌株 NAPX37 AHP1p-4 和 NAPX37 TDH3p-4 的木糖利用速率均高于菌株 NAPX37 UBI4p-3,表明在混合糖发酵条件下,P_{AHP1} 和 P_{TDH3} 启动子控制 *TAL1* 基因表达可以有效提高菌株的木糖利用速率和乙酸耐受性。在乙酸浓度为 60 mmol/L 时葡萄糖的消耗情况表明,P_{AHP1} 和 P_{TDH3} 启动子控制 *TAL1* 基因表达的同时,可以有效地提高菌株对葡萄糖的消耗速率。

3 结论

本研究使用 P_{TDH3}、P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子替换酿酒酵母基因工程菌 NAPX37 的 *TAL1* 基因的启动子 P_{TAL1},通过孢子分离和单倍体交配构建了纯合子,考察了在木糖为唯一碳源和混合糖(葡萄糖和木糖)为碳源条件下,不同启动子控制 *TAL1* 基因表达对菌株发酵木糖和耐受乙酸能力的影响。结果表明,P_{TDH3}、P_{AHP1} 和 P_{UBI4} 启动子不同程度地提高了 *TAL1* 基因的转录水平,提高了菌株对木糖的利用速率以及耐受乙酸的能力,同时也提高了菌株在高浓度乙酸条件下对葡萄糖的消耗速率。碳源的种类影响不同启动子控制的 *TAL1* 基因的转录对乙酸的响应。无论是木糖还是混合糖情况下,原启动子

P_{TAL1} 控制的 *TAL1* 基因表达水平都较低,乙酸的添加使 *TAL1* 基因的转录水平进一步下降;乙酸对 P_{AHP1} 启动子控制的 *TAL1* 基因的转录水平影响相对较小,而对 P_{UBI4} 启动子控制的 *TAL1* 基因的转录水平影响较大。在只有木糖存在条件下,乙酸对 P_{TDH3} 启动子控制的 *TAL1* 基因的转录影响相对较小;在混合糖情况下,乙酸的存在则显著降低 P_{TDH3} 启动子控制的 *TAL1* 基因的转录水平。乙酸为 30 mmol/L 条件下,过高或过低的转录水平都会降低菌株对木糖的利用速率,控制 *TAL1* 基因的转录水平在 0.7 左右可以获得相对更高的木糖利用速率。

参 考 文 献

[1] 林贝,赵心清,葛旭萌,等. 玉米秸秆酸解副产物对重组酿酒酵母6508-127发酵的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7): 61-67.

[2] Lin FM, Qiao B, Yuan YJ. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3765-3776.

[3] Bellissimi E, van Dijken JP, Pronk JT, et al. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(3): 358-364.

[4] Mira NP, Palma M, Guerreiro JF, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 79.

[5] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 25-33.

- [6] Mira NP, Teixeira MC, Sá-Correia I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view[J]. Journal of Integrative Biology, 2010, 14(5): 525-540.
- [7] Wright J, Bellissimi E, Hulster Ede, et al. Batch and continuous culture - based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. EMS Yeast Research, 2011, 11(3): 299-306.
- [8] Jeppsson M, Johansson B, Hahn-Hägerdal B. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(24): 1604-1609.
- [9] Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Hägerdal B, et al. High activity of xylose reductase and xylitol dehydronegase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 73(5): 1039-1046.
- [10] Matsushika A, Goshima T, Fujii T, et al. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(1): 16-25.
- [11] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 2.
- [12] 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.
- [13] Liu ZS, Wu XL, Kida K, et al. Corn stover saccharification with concentrated sulfuric acid: effects of saccharification conditions on sugar recovery and by-product generation[J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 224-233.
- [14] Tomitaka M, Taguchi H, Fukuda K, et al. Isolation and characterization of a mutant recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with high efficiency xylose utilization[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(6): 706-715.
- [15] Altling-Mees MA, Short JM. pBluescript II: gene mapping vectors[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(22): 9494.
- [16] Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method[J]. Methods in Enzymology, 2002, 350: 87-96.
- [17] Tang YQ, An MZ, Liu K, et al. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(4): 909-914.
- [18] Sanda T, Hasunuma T, Matsuda F, et al. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 7917-7924.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。