

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(1):104-113; 4 January 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.013

## 休哈塔假丝酵母中甲酸抑制的目标基因发掘

蔡鹏<sup>1,2,3</sup>, 熊许洁<sup>1,2,3</sup>, 徐勇<sup>1,2,3\*</sup>, 勇强<sup>1,2</sup>, 朱均均<sup>1,2</sup>, 余世袁<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>南京林业大学化工学院, <sup>2</sup>江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室, <sup>3</sup>林木遗传与生物技术教育部重点实验室, 江苏南京 210037

**摘要:**【目的】探究甲酸对木糖乙醇发酵模式菌株休哈塔假丝酵母基因转录的影响规律,发掘抑制的目标基因及抑制特征。【方法】基于该酵母葡萄糖、木糖代谢转录组的研究成果,结合细胞代谢途径和人工基因比对筛选出乙醇发酵相关基因,再通过 RQ-PCR 对梯度甲酸抑制条件下的上述基因进行定量分析,进而发掘出甲酸抑制的目标基因。【结果】共筛选出 42 个相关基因,经 RQ-PCR 定量分析最终确定受甲酸显著抑制的基因 10 个,上调基因 5 个。【结论】在基因转录水平上,休哈塔假丝酵母中甲酸显著抑制的基因按照抑制强度降序排列为 *XYL2*、*ACS*、*RKI*、*TAL*、*GND1*、*TKL*、*ZWF1*、*XYL1*、*PDH* 和 *PDC*,按照上调强度降序排列为 *ALD*、*GLK*、*MDH*、*PFK*、*ADH*。

**关键词:** 休哈塔假丝酵母, 木糖乙醇发酵, 甲酸抑制物, 目标基因, 实时定量 PCR

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2014)01-0104-10

纤维素燃料乙醇是生物能源领域的研发热点和重点,其大规模工业化生产仍然面临着 3 个重要的技术瓶颈,其中抑制物条件下的木糖高效乙醇发酵是关键性的障碍之一<sup>[1-3]</sup>。木质纤维原料必须首先经过一定的预处理将纤维素和半纤维素水解成可发酵的单糖,然后才能进入后续的乙醇发酵环节。受预处理过程中高温、酸或碱条件的激烈作用,原料中多种组分不可避免地会降解生成酸、醛和酚等小分子产物,它们会抑制乙醇发酵微生物,如酵母细胞的生长和发酵性能<sup>[4-5]</sup>。目前,由于前期对抑制物的细胞分子响应途径及代谢调控机制的基础研究薄弱,导致缺乏有效的理论指导,现有的菌株在真实水

解液中的木糖乙醇发酵性能均不能满足工业化生产的要求<sup>[3-7]</sup>。

本文以木糖乙醇发酵的模式菌株休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)为实验材料,选取木质纤维原料水解液中含高且毒性强的甲酸抑制物作为研究目标<sup>[8-9]</sup>。基于前期的该酵母细胞糖发酵转录组大规模测序及转录谱对比研究的成果<sup>[10]</sup>,结合酵母的经典糖发酵代谢途径和人工基因搜索比对,初步筛选出木糖代谢和乙醇发酵的相关基因。然后采用实时荧光定量 PCR 技术(RQ-PCR)对上述基因在甲酸抑制条件下的转录本变化进行定量分析,进而发掘出与甲酸抑制物响应的目标

**基金项目:**江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX12\_0528);国家自然科学基金项目(31070514);国家“863 计划”(2012AA022304);江苏省高校优势资源学科建设工程资助项目(PAPD)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-85428537;E-mail: xuyong@njfu.edu.cn

**作者简介:**蔡鹏(1988-),男,江苏南通人,硕士研究生,主要从事基因工程的研究。E-mail: 376600578@qq.com

**收稿日期:**2013-04-17; **修回日期:**2013-07-06

基因,并探索它们的转录调控特征,期望为后续的酵母木糖乙醇发酵抑制物的分子调控机制及代谢工程等相关研究提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**休哈塔假丝酵母 *C. shehatae* NL12, 由 (*Candida shehatae*) ATCC 22984 菌株出发经过梯度添加甲酸的木糖液定向驯化选育并保藏<sup>[8,10]</sup>。

**1.1.2 培养基:**酵母活化培养基 (g/L): 木糖 20, 酵母膏 5, 蛋白胨 10; 发酵培养基 (g/L): 木糖 50, 硫酸铵 5, 磷酸二氢钾 3, 硫酸镁 0.5, 以 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液配制。

**1.1.3 酵母细胞 RNA 提取和纯化的试剂:** Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBRPremix Ex Taq™ (Tli RnaseH Plus) 购于 TaKaRa 公司; 焦碳酸乙二酯 (DEPC) 购于捷瑞公司; 木糖购于 Sigma 公司。其它试剂购买于国药集团和南京化学试剂有限公司。RQ-PCR 及 PCR 反应的引物均由华大基因公司合成。

**1.1.4 主要仪器:** 美国 ABI Step One Plus real-time PCR system; 德国 Eppendorf Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪; 德国 Eppendorf 5804R 离心机; 北京六一仪器厂 DYY-8B 稳压稳流电泳仪; Tanon GIS System 凝胶成像仪; Thermo Nanodrop 1000 紫外分光光度计; 上海精密科学仪器有限公司 723N 型可见分光光度计; 美国 NBS 公司 INNOVA 40R 型台式恒温振荡摇床; 美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (HPLC)。

### 1.2 酵母葡萄糖、木糖发酵的转录组测序<sup>[10]</sup>

应用 454 GS FLX Titanium 高通量基因测序平台同步测定 *C. shehatae* NL12 葡萄糖、木糖发酵的转录组, 采用 Trinity Software 和 BWA 软件进行转录组测序数据分析, 并采用 blast2 go 分析流程<sup>[11]</sup> 对 BLAST 分析结果进行 GO 数据库的转录本功能注释分析。

### 1.3 添加甲酸的木糖发酵

**1.3.1 酵母活化:** 在 250 mL 摇瓶中加入 50 mL 活化培养基, 以 0.25 μm 封口膜封口灭菌后接入 *C. shehatae* NL12 平板单克隆, 于 170 r/min 和 30℃ 条

件下培养至对数中期。4℃、3214 × g 离心 10 min 回收酵母转入发酵培养基。

**1.3.2 木糖发酵:** 在发酵培养基中加入适量甲酸, 以 30% NaOH 调节 pH 值 5.0 - 6.0, 接入酵母至细胞吸光度值  $OD_{600} = 10.0$ , 于 170 r/min 和 30℃ 条件下发酵, 定时吸取 1.0 mL 发酵液进行分析。以 HPLC 分析发酵液组成, 并在 600 nm 处测定细胞浊度。所有数据均采用两平行实验结果, 控制平行误差在 5% 以内。以不添加甲酸为空白对照。

### 1.4 酵母细胞 RNA 提取

采用 1.3.2 方法发酵 9 h, 取 8 mL 发酵液, 4℃、3214 × g 离心 5 min 回收细胞, 立即加入液氮冷冻并保存于 -80℃。采用 Trizol 液氮研磨法提取酵母 RNA, 以 Thermo Nanodrop 1000 紫外分光光度计检测并控制 RNA 的  $A_{260}/A_{280} = 1.90 - 2.10$ , 同时采用电泳检测 RNA 完整性<sup>[12-13]</sup>。

### 1.5 cDNA 合成

在 Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪上采用 TaKaRa 反转录试剂盒 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 合成。gDNA 去除步骤的反应条件: 42℃ 处理 2 min 后立即至于冰上; 反转录反应条件: 37℃ 反应 15 min, 85℃ 反应 5 s 后立即置于冰浴或转入 -20℃ 保藏。

### 1.6 RQ-PCR 检测

根据本实验室前期研究所公布的 *C. shehatae* 糖代谢转录组测序数据 (GenBank 登录号: SRA053160), 结合经典糖代谢途径及人工基因搜索比对, 初步筛选出与木糖乙醇代谢相关的 42 个基因序列片段。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*) 基因为 RQ-PCR 的内参基因, 采用 primer premier 5.0 设计 PCR 扩增引物 (见表 1 和表 2), 控制扩增片段长度范围为 100 - 250 bp。RQ-PCR 扩增体系: SYBR Premix Ex Taq™ II (2 ×) 10.0 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.8 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.8 μL, ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL, cDNA 模板 2.0 μL (或 dH<sub>2</sub>O 作为阴性对照), dH<sub>2</sub>O 6.0 μL, 总体积 20 μL。扩增条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。循环结束后绘制溶解曲线, 条件为 95℃ 15 s, 60℃ 1 min (每个循环的温度递增 0.2℃, 最终升至 95℃), 95℃ 15 s。数据分析采用比较 Ct 法 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法)<sup>[13-14]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 甲酸对酵母木糖发酵性能的抑制

实验室前期研究报道, 1.2 g/L 甲酸即可严重影响 *C. shehatae* 的木糖利用率和乙醇得率<sup>[8]</sup>。采用梯度增浓的方式添加甲酸定向驯化选育获得 *C. shehatae* NL12, 在木糖中的甲酸耐受性能可提高至 3.0 g/L, 提高幅度达到 261%, 此时酵母木糖发酵性能基本不受影响。在含 5.0 g/L 甲酸的发酵液中, *C. shehatae* NL12 的发酵性能受到一定程度的抑制, 但酵母细胞仍然能够正常代谢木糖生产乙醇, 同时逐渐消耗发酵培养基中的甲酸。随着甲酸的初始浓度增至 8.0 g/L 时, 酵母木糖发酵的反应动力学受到明显的抑制(图 1)。主要表现为: 细胞的生长和乙醇发酵的迟滞期显著延长, 乙醇得率明显下降, 甲酸不能被消耗, 浓度基本维持恒定。培养至 30 h

时, 木糖的利用率仅为 15.8%, 较空白对照下降 84%, 细胞增长速率为非抑制条件下的 14.2%, 同时乙醇的发酵生产能力衰减超过 50%。当发酵液中甲酸浓度提升至 10.0 g/L 时, 酵母细胞即处于应激休眠状态, 此时木糖消耗率低于 1%, 同时发酵液中无法检测到乙醇的生成。

基于技术经济性考虑, 在实际工业生产中要求木质纤维原料水解液的乙醇发酵质量浓度至少达到 4% - 5%<sup>[15-16]</sup>, 即木糖发酵的总糖浓度至少要达到 100 g/L。在典型的木质纤维原料水解液中, 甲酸与木糖的质量比可高达 0.15 - 0.2:1<sup>[15-17]</sup>, 同时水解液中还存在的一些其他抑制物可能与甲酸产生协同抑制作用。相对于其它小分子酸类抑制物甲酸难以脱除, 因此即使是 *C. shehatae* NL12 在纯木糖中的甲酸耐受发酵性能距离实际工业化生产仍然存在较大的差距, 亟待进一步提高或者进行脱毒。

### 2.2 甲酸抑制潜在目标基因的筛选

采用 454 GS FLX Titanium 高通量基因测序技术获取了 *C. shehatae* 葡萄糖、木糖发酵产乙醇的转录组数据, 然后经过 BLAST 自动搜索比对和 GO 数据注释分析得到了基因的相关生物学功能信息<sup>[10]</sup>。基于该研究结果, 结合酵母的糖代谢途径, 包括糖跨膜转运、糖酵解途径 (EMP)、磷酸戊糖途径 (PPP)、乙醇发酵和三羧酸循环 (TCA), 本文从转录组数据中初步筛选出 32 个酶基因, 它们都与酵母木糖至乙醇发酵代谢途径的催化酶或功能蛋白质直接相关, 可能是甲酸抑制的潜在目标基因。

根据对转录组测序基因的分析 and 比对, 按照基因表达量将上述 32 条基因片段分为 2 大类。以 FPKM 值为标准, 将在 2 个文库中表达丰度均达到 70 以上拷贝的基因序列归为高丰度表达基因, 其他归为低丰度表达基因。分析结果显示, 其中高丰度表达的基因片段共有 21 条, 低丰度表达基因片段共 11 条(见表 1)。经过与 KEGG 数据库比对, 发现上述基因并未能覆盖细胞内糖至乙醇代谢通路中的全部反应步骤。分析其原因, 可能与转录组序列比对分析时的比对参数设置较高有关(90%), 导致部分基因序列未能获得功能注释。

基于以上, 以休哈塔假丝酵母近缘物种 *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 (*Pichia stipitis*) 基因组测序数据为比对目标生物<sup>[18]</sup>, 将序列比较 blast 的相似度要求下调为 70%, 从转录组中搜索和比对

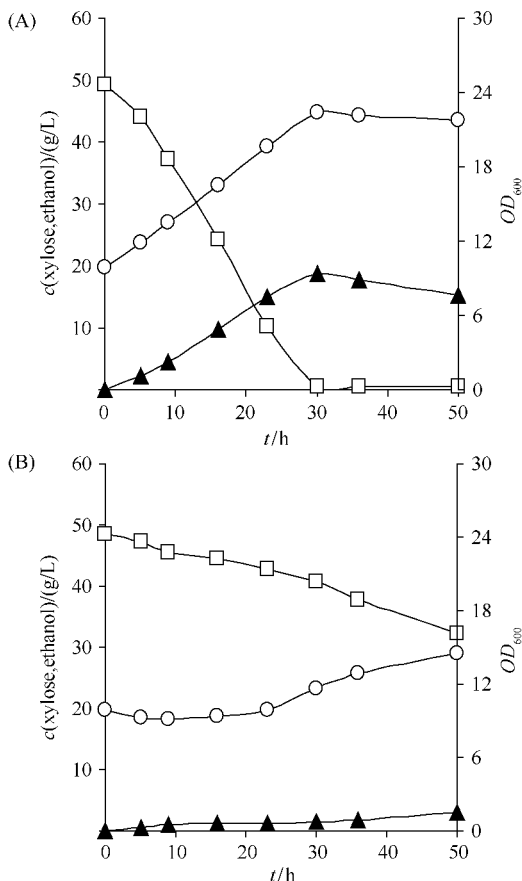


图 1. 甲酸对 *C. shehatae* NL12 菌株木糖发酵性能的影响  
Figure 1. Comparison of xylose fermentation performances between the control and the formic acid containing medium. A: the control; B: the formic acid containing medium (8.0 g/L of formic acid). symbol: □ xylose; ▲ ethanol; ○ OD<sub>600</sub>.

发现了 10 条新的潜在目标基因片段 (见表 2)。至此, 共筛选得到 42 条基因片段, 其中 96% 的序列长度超过 800 bp, 基本上涵盖了酵母细胞参与糖代谢

的 EMP 途径、PPP 途径、TCA 循环、乙醇发酵和木糖跨膜转运 5 大代谢途径所对应的主要酶基因, 可作为甲酸等抑制物作用的潜在目标基因。

表 1. 基于转录组数据分析的潜在目标基因筛选及 RQ-PCR 引物设计

Table 1. The potential target genes based on transcriptome sequencing data analysis and primers

No.	gene name	RQ-PCR primers (5'→3')	FPKM-G	FPKM-X	similarity / %
high expression genes					
1	6-phosphofructokinase	F-CCGTTGTTATCCTCACCTCTATCG R-TGACGCTGTCAAGCAATCTGC	200.8	85.7	73
2	glucokinase	F-CAGCCATTGTTTCTCCTGTC R-TTCAGTTGGAAGCCAGGATAG	34.1	456.3	79
3	hexokinase	F-GAACTTTCACCGTCAGCG R-GTAAAGTTGGTTCCTCCTAAGTCA	42.6	79.5	76
4	acetyl-CoA synthetase	F-TTTTCAACAGCCAACCAAGC R-GTAAACAAGCATTTAACTCACCTCC	28.3	74.4	79
5	PEP carboxykinase	F-GGTGGTTGTTACGCTAAGTGTCT R-AATGTTAGTTGGGTGAGTGTCC	500.1	28.2	83
6	dihydrolipoyl dehydrogenase	F-ACCTAACCAGGCGACTTCC R-CAGAACCAAGCAGCAGCACA	79.6	25.0	82
7	phosphoglucomutase	F-CAGGCGACAACAGCCATAA R-CGCCGATTCCATTCCCTACT	102.8	65.0	78
8	phosphoglycerate mutase	F-ATCGGTGACATCAGATACAAGA R-GTGAGCAGCAATCAAGACAG	26.0	413.9	88
9	fructose-bisphosphatase	F-TGGGTTACTGCCAACTCCAC R-ACAGACGGCGTAACGACCAC	58.0	228.9	84
10	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	F-ATCAAACCTTCCTCGATTCCG R-CATCATCACTGCTCCATCCTCC	2172.9	2171.7	88
11	fructose-bisphosphate aldolase	F-TCTCATCGTCCGTTTCTTCG R-CCTACGGTATCCCAGTCCGTG	455.5	1171.1	85
12	glucose-6-phosphate isomerase	F-CCTTGACTTGTTCCTCGTTCTTA R-TGATCCCAACTGACTTCATTCTT	21.4	119.3	83
13	triose-phosphate isomerase	F-AGATCGTCCGACTGGTCC R-TGTGGGTCTCTGAGCGTCT	40.1	264.5	77
14	phosphoglycerate kinase	F-ACCACCTCCAATGATAACGG R-TGCTGGTCCAAAAGTCTAACG	1825.7	3919.1	86
15	malate dehydrogenase	F-CGACTCAAGAAAGCCAGGTATG R-CAAGACTTCGGCAGCAATAGG	14.1	76.7	77
16	succinate dehydrogenase	F-AAGTCCFTGGAGGTGTCGGTAT R-CACTGTGGTCTATGGTCTTGG	70.7	18.7	82
17	transketolase	F-CTGGTGCCGTCAGATTAGC R-ACAGCGATGTTTGGAGTAGC	46.4	94.8	82
18	aconitate hydratase	F-GTCAAGATGCTACCGCTCAG R-TCAATGGCTCTGGCTAAATC	103.0	50.1	87
19	oxoglutarate dehydrogenase	F-GGAAGCCGAAGATGGTGTAGT R-AAACGAGGGTCAGTGGTAAA	100.9	13.9	82
20	citrate-synthase	F-ATGGAGTCTCGTAAAGTATTTTC R-AAGCACGTTGAAGATTTGATTG	99.2	210.3	89
21	alcohol dehydrogenase	F-GGCTGGGAACTCGGTGACTA R-TCGGCTTTAGCACAGTTTGG	6375.3	3244.7	85
low expression genes					
1	pyruvate dehydrogenase	F-ATTCACTGGTGTATCCGTGTCCC R-TTCGGTGTGCAAGTTCAATTCTG	33.8	37.7	86

续表 1

No.	gene name	RQ-PCR primers (5'→3')	FPKM-G	FPKM-X	similarity/%
2	aldehyde dehydrogenase	F-GTGTTCCTAAGGGTGATGTTGCC R-AATGGAGTAGATTACAGCGTCT	2.5	5.0	84
3	acetyl-CoA carboxylase	F-TCCCATTTGACTGCTACTGACG R-GCCACCCTCTACTTGACGACCT	0.0	5.8	80
4	6-phosphogluconolactonase	F-GGCGTGCGATGAACAGGTA R-ATTGCATCCCGTTGCTTCC	1.9	24.6	81
5	ribulose-phosphate 3-epimerase	F-AATCATTTGCCAGCTTGAGACAG R-GAAACACCGACCTTCATACCG	9.5	5.7	76
6	glucose-6-phosphate dehydrogenase	F-CCATCGTCATCTTCGGTGCTT R-TCTTCTAAGTGGGATCTGGCGTAA	9.5	20.6	79
7	phosphogluconate dehydrogenase	F-GACTTGCCCTTGCGTTCTGTT R-TTGATCGGTTTGCCGTTAT	40.4	40.3	87
8	ribose-5-phosphate isomerase	F-GTAGACGACGGTGAACCCAGA R-TGTGTAACAGGCCAAGAAGG	4.6	16.5	82
9	fumarate hydratase	F-AAGGAAGCAGCACCATCAGC R-CGAGCCAGGTTCTCTATCA	25.4	16.6	84
10	succinate-CoA ligase	F-ACCGTTCTGCCGCCTTATTG R-GAAGTGACCCTTACCACGACCA	16.3	23.0	84
11	isocitrate dehydrogenase	F-AGTGAACCTCGGTGGGAGGA R-CCAGGTGCCAACTTCGGTAGA	50.9	28.2	85

F: forward primer; R: reverse primer

表 2. 基于人工对比获得的潜在目标基因及 RQ-PCR 引物

Table 2. The potential target genes base on manual gene blast analysis and primers

No.	gene name	RQ-PCR primers (5'→3')	FPKM-G	FPKM-X	similarity/%
1	xylose reductase	F-GAAGCTCGACAAATCTACCGC R-TCTCTTGACACCTTACCGACT	29.6	3390.4	99
2	xylitol dehydrogenase	F-GGTGCTGCAACCCACATCTT R-ACCGACTTGGACGAAACGAC	619.9	2011.8	99
3	xylulokinase	F-AGTAGTCAAGCCATTTATCCTCAA R-GTATCATCCGTAAGATGGGTTCTA	64.1	3578	77
4	Xylose transporter similar to GXSI	F-CCCTTCTGCTTCACTTCTCTCC R-AACAGCACCTCTGATCCACTTTG	44.4	1247	84
5	pyruvate kinase	F-GTGGCAGAGACTGGCTTAG R-CTGAGACAGACGGTGTATGGTT	7.4	85.5	85
6	transaldolase	F-GCTGTTGCGACTACTTGACTG R-AGGTAGCCTCGTCATCAACATAA	232.7	523.2	86
7	enolase	F-GGACGCTTGGGTTCACTTCTA R-AATGGTGTGTCTTCGGTTTC	424.0	1675.0	88
8	pyruvate decarboxylase	F-GACCCAGAAGCCCAAGACGA R-TGGCAGCGACCTTAGCAATC	10.5	128.8	83
9	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	F-GGATGTTGCTGGTATTCTGTT R-CTGTGAATGTAGAGGCAATGGA	10.6	52.0	78
10	succinyl-coa synthetase	F-ATGATACCCTCGGTCTCCTCG R-GTATTATGCCATCTCACATCCACA	43.1	9.1	83

F: forward primer; R: reverse primer

### 2.3 甲酸抑制目标基因的发掘

同步提取和纯化 *C. shehatae* NL12 甲酸抑制及空白对照样本中的细胞 RNA, 采用 RQ-PCR 定量检测和对比分析上述潜在的目标基因。结果显示, 各

个实测基因的 RQ-PCR 的 3 平行样本的  $C_t$  值重现性好, 基因表达稳定, 且溶解曲线均为单一峰型, 显著性统计学参数  $p$ -value 均小于 0.05。这说明 RQ-PCR 扩增特异性强, 无非特异性扩增和引物二聚体

的形成, 检测结果准确可靠。

根据 RQ-PCR 的检测结果对 42 条候选基因在 8.0 g/L 甲酸培养时转录水平的抑制强度 (抑制表达量/非抑制表达量) 进行评价。以基因转录本表达差异值 0.4 (抑制强度) 为标准, 在 42 个候选基因中受甲酸强烈抑制的基因共 14 个, 分别为 *PGM* (0.399)、*XYL2* (0.386)、*GXS1* (0.371)、*ACS* (0.359)、*RKI* (0.346)、*TAL* (0.344)、*GND1* (0.330)、*TKL* (0.312)、*ZWF1* (0.299)、*PGLS* (0.287)、*XYL1* (0.271)、*PDH* (0.249)、*PDC* (0.115) 和 *ALDH* (0.081); 与甲酸响应表现为转录本上调的基因共 5 个, 包括 *ALD* (1.606)、*GLK* (1.422)、*MDH* (1.258)、*PFK* (1.241) 和 *ADH* (1.192)。

为了进一步探究并验证甲酸对于上述 19 个基因的抑制特征及规律, 本文继续测定了 5.0 g/L 和 10.0 g/L 甲酸浓度条件下这些基因的转录本表达

差异 (图 2)。结果表明, 在各种甲酸浓度条件下, 甲酸对 19 个基因的转录表达调控规律总体上一致。其中, *XYL2*、*ACS*、*RKI*、*TAL*、*GND1*、*TKL*、*ZWF1*、*XYL1*、*PDH*、*PDC* 和 *PGM* 等 11 个基因的转录表达为明显的甲酸抑制特征。除 *PGM* 基因的转录存在一定的波动性且抑制响应强度较弱以外, 其它 10 个基因的抑制强度均随着甲酸浓度的上升呈稳定增强的趋势。至甲酸浓度达到 10.0 g/L 时, 它们被抑制强度都超过 10 倍以上, 即表现为显著抑制, 因此可以确定这 10 个基因为甲酸显著抑制的目标基因; *ADH*、*GLK*、*MDH*、*PFK* 和 *ALD* 等 5 个基因随着甲酸浓度升高, 转录表达总体上呈上调趋势, 可确定为甲酸上调基因; *GXS1*、*PGLS* 和 *ALDH* 等 3 个基因在低浓度甲酸条件下表现为上调, 而当甲酸浓度超过 8.0 g/L 以上时又表现为抑制, 故暂时还不能确定它们对甲酸的响应及调控规律。

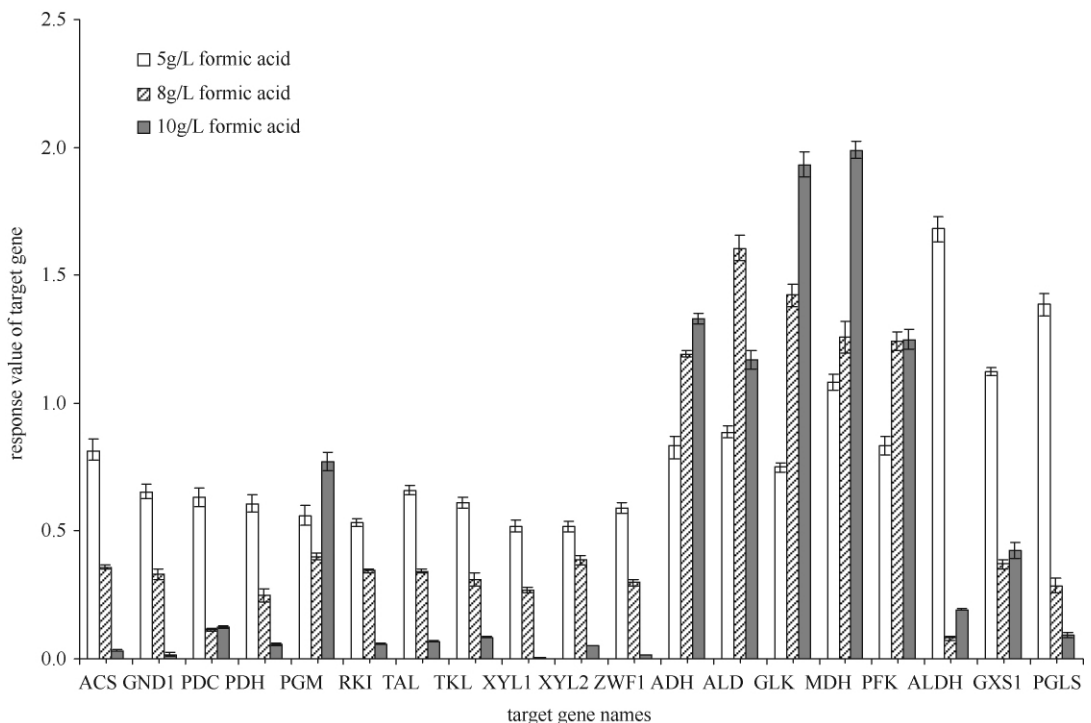


图 2. 甲酸浓度对目标基因转录表达的影响

Figure 2. The transcript profiles of the target genes responsible to various concentration of formic acid. *ACS*, acetate-CoA synthetase; *GND1*, phosphogluconate dehydrogenase; *PDC*, pyruvate decarboxylase; *PDH*, pyruvate dehydrogenase; *PGM*, phosphoglucomutase; *RKI*, ribose-5-phosphate isomerase; *TAL*, transaldolase; *TKL*, transketolase; *XYL1*, xylose reductase; *XYL2*, xylitol dehydrogenase; *ZWF1*, glucose-6-phosphate dehydrogenase; *ADH*, alcohol dehydrogenase; *ALD*, fructose-bisphosphate aldolase; *GLK*, glucokinase; *MDH*, malate dehydrogenase; *PFK*, 6-phosphofruktokinase; *ALDH*, aldehyde dehydrogenase; *GXS1*, High-affinity sugar transporter; *PGLS*, 6-phosphogluconolactonase.

### 3 讨论

在木质纤维原料的预处理过程中,甲酸主要来自半纤维素的甲氧基水解及羟甲基糠醛、糠醛的深度分解反应<sup>[4, 19]</sup>,它与乙酸、乙酰丙酸并称为3种主要的酸类抑制物。一般通过蒸发浓缩、离子交换和吸附剂等脱毒处理能够脱除部分抑制物,其中甲酸、乙酸和乙酰丙酸的脱除率可分别达到26.2%, 49.5%和98.4%<sup>[20]</sup>。由此可见,相比而言甲酸难以脱除且毒性更强,因此它成为酵母木糖发酵产乙醇的主要抑制物之一<sup>[9]</sup>。甲酸抑制条件下的木糖发酵动力学显示,即使采用碱中和将甲酸转变成甲酸阴离子也会对休哈塔假丝酵母的木糖发酵过程产生抑制作用。虽然在低浓度时 *C. shehatae* NL12 在发酵木糖产乙醇的同时可逐渐消耗部分甲酸根,但是当甲酸浓度超过一定阈值后则会对酵母的细胞生长速率、木糖利用速率和乙醇得率均产生强烈的抑制作用。目前,我们对甲酸抑制的作用机制及目标对象研究工作薄弱,导致脱毒技术等相关研究进展缓慢,严重制约了木质纤维原料水解液的木糖乙醇发酵技术的突破。酵母等真核细胞的表达调控主要发生在分子转录水平,因此探究酵母细胞对甲酸抑制的响应目标基因,对于后续的分调控机制、代谢工程、菌种改良及发酵工艺等相关研究都具有基础性的指导意义。

本文的研究结果进一步证实,基于高通量转录组测序技术对酵母细胞中受环境因子调控的目标基因的筛选具有高效、准确的优势<sup>[10]</sup>。尽管参与葡萄糖、木糖乙醇发酵代谢的各个酶基因在转录丰度上(转录本拷贝数)存在着差异,但是基于它们的转录组数据筛选与甲酸或其它抑制物响应的相关基因时,无论丰度高低上述基因都值得关注,它们都有可能形成木糖发酵产乙醇的瓶颈。

基于转录组研究和 RQ-PCR 验证,从42个潜在的目标基因中初步确定19个与甲酸抑制物显著响应的基因。3种浓度梯度甲酸抑制条件下酵母木糖发酵反应体系的基因转录本表达测定结果表明,11个基因的转录表达可被甲酸抑制,其中10个基因被高浓度甲酸显著抑制,5个基因可被甲酸上调,另有3个基因在不同浓度甲酸抑制条件下的转录表达呈现出波动性。

结合酵母细胞生化及木糖微生物代谢的研究成果,对甲酸强烈抑制的目标基因的分步骤进行响应和调控机制的探索(图3):(1)木糖还原酶(*XYL1*)、木糖醇脱氢酶(*XYL2*)是木糖经过跨膜转运进入戊糖磷酸途径(PPP)的第一类关键酶,这2种酶基因的转录受到甲酸抑制后,会从源头上削弱酵母细胞的跨膜转运、糖酵解的木糖代谢能力,进而抑制木糖的乙醇发酵;(2)同时,甲酸会抑制PPP途径中的转酮醇酶(*TKL*)、转醛醇酶(*TAL*)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*ZWF1*)、磷酸葡萄糖酸脱氢酶(*GND1*)和核糖-5-磷酸异构酶(*RKI*)等5种主要酶基因的转录。而PPP途径是酵母细胞内木糖代谢的必由途径,这必然严重削弱了细胞的糖酵解代谢速率<sup>[21]</sup>;(3)丙酮酸脱羧酶(*PDC*)和乙醇脱氢酶(*ADH*)直接负责催化乙醇生成的“出口”代谢反应。其中,甲酸表现为对丙酮酸脱羧酶基因的强烈抑制,这会直接导致糖酵解产物丙酮酸脱羧生成乙醛(乙醇)的代谢流减弱,与发酵实验结果吻合。但是,乙醇脱氢酶基因在甲酸刺激下却表现为上调趋势,这与发酵动力学的研究结果存在矛盾,故该基因在甲酸抑制下的转录响应机制还有待后续更深入的研究;(4)丙酮酸脱氢酶(*PDH*)和乙酰辅酶A合成酶(*ACS*)负责催化丙酮酸进入TCA循环的第一步,催化木糖代谢产物丙酮酸快速进入TCA循环进而被消耗。TCA循环抑制就会导致细胞木糖代谢速度下降,同时TCA循环也对于细胞内ATP含量变化有着至关重要的作用。甲酸对于这2种酶基因的扰动使得TCA循环被抑制,进而减少了细胞内ATP的生成<sup>[22]</sup>。根据Palmqvist的假说<sup>[4]</sup>,甲酸(根)等有机酸的抑制作用主要是通过破坏细胞膜上的H<sup>+</sup>浓度梯度完成的,细胞需要额外消耗ATP将细胞内甲酸水解生成的H<sup>+</sup>泵出细胞外来维持细胞内pH环境的稳定,ATP大量消耗又无法及时得到补充可能是细胞代谢迟滞的最主要瓶颈<sup>[23]</sup>。同时,TCA循环又是细胞内糖类、脂肪酸和某些氨基酸相互转变的代谢枢纽,甲酸通过对TCA循环的干扰进而对细胞的生长产生抑制影响。对TCA循环参与基因的RQ-PCR实验结果与上述理论相符。

基于以上,我们可最终确定在 *C. shehatae* 酵母木糖乙醇发酵体系中,受甲酸显著抑制的基因为 *XYL2*、*ACS*、*RKI*、*TAL*、*GND1*、*TKL*、*ZWF1*、*XYL1*、*PDH* 和 *PDC*;被甲酸上调的基因为 *ADH*、*GLK*、*MDH*、*PFK*

和 *ALD*。

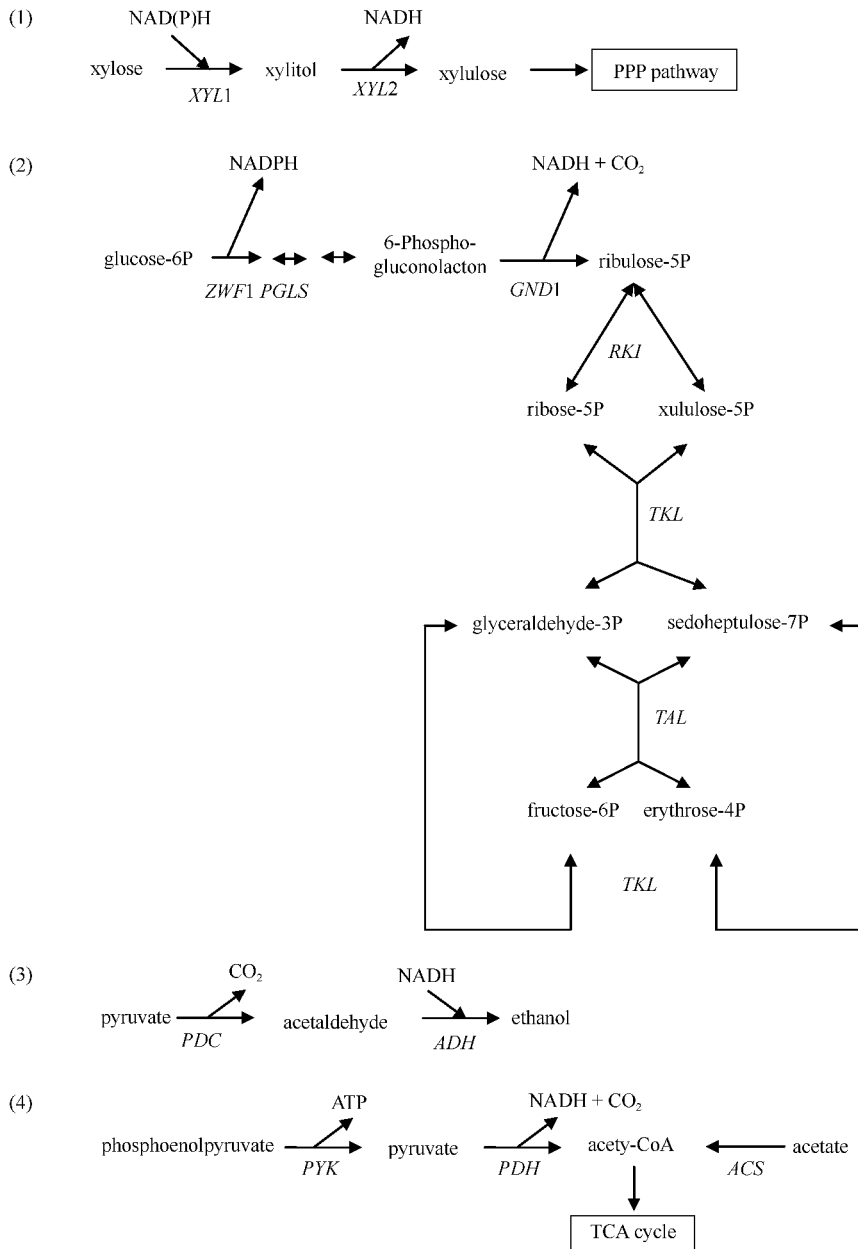


图 3. 部分甲酸调控基因所控制的代谢途径

Figure 3. The metabolic pathways related to the some target genes regulated by formic acid.

### 参考文献

[1] Fairley P. Introduction: Next generation biofuels. *Nature*, 2011, 474: 2-5.

[2] Sanderson K. Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*, 2011, 474: 12-14.

[3] Xu Y, Shen C, Qiu X, Cai P, Huang M, Yu S. Screening and analysis of genes related to xylose fermentation to ethanol in *Candida tropicalis*. *China*

*Biotechnology*, 2011, 24 (6) : 61-69. (in Chinese)

徐勇, 沈翀, 邱兴天, 蔡鹏, 黄敏仁, 余世袁. 热带假丝酵母木糖乙醇发酵相关基因的筛选与分析. *中国生物工程杂志*, 2011, 24 (6) : 61-69.

[4] Eva P, Barbel HH. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 25-33.

[5] Daniel L, Manfred A, Thomas H, Steffen R, Susanne Z. Development and optimization of single and combined



- detoxification processes to improve the fermentability of lignocellulose hydrolyzates. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 455-461.
- [6] Vleet JV, Jeffries TW. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 009, 20:300-306.
- [7] Eva P, Barbel HH. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 17-24.
- [8] Xiong X, Xu Y, Zhang X, Yong Q, Yu S. Ethanol fermentation performance by *Candida shehatae*. *Journal of Microbiology*, 2011, 31 (6) : 43-48. (in Chinese)  
熊许洁, 徐勇, 张晓燕, 勇强, 余世袁. 休哈塔假丝酵母乙醇发酵性能的研究. 微生物学杂志, 2011, 31 (6) : 43-48.
- [9] Tomohisa H, Kyung-mo S, Tomoya A, Kazuya Y, Fumio M, Akihiko K. Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentrations by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90: 997-1004.
- [10] Xiong X, Cai P, Xu Y, Yong Q, Yu S. Transcript profile of converting xylose and glucose to ethanol by *Candida shehatae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (4) : 338-345. (in Chinese)  
熊许洁, 蔡鹏, 徐勇, 勇强, 余世袁. 休哈塔假丝酵母转化木糖和葡萄糖为乙醇的发酵转录谱. 微生物学报, 2013, 53 (4) : 338-345.
- [11] Conesa A, Otáñez S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talon M, Dopazo J. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (10) : 3420-3435.
- [12] Tania N, Rebecca EH, Stephen AB. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 2006, 1:1559-1582.
- [13] Thomas DS, Kenneth JL. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_t$  method. *Nature Protocols*, 2008, 3: 1101-1108.
- [14] Kenneth JL, Thomas DS. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Method*, 2001, 25: 402-408.
- [15] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56: 17-34.
- [16] Gregg D, Saddler JN. Bioconversion of lignocellulosic residue to ethanol: Process flowsheet development. *Biomass and Bioenergy*, 1995, 9: 287-302.
- [17] Zhu J, Yong Q, Chen S, Xu Y, Zhang X, Yu S. Identification of degraded products from steam-exploded corn stalk. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2009, 29 (2) : 22-26. (in Chinese)  
朱均均, 勇强, 陈尚研, 徐勇, 张晓萍, 余世袁. 玉米秸秆蒸汽爆破降解产物的分析. 林产化学与工业, 2009, 29 (2) : 22-26.
- [18] Jeffries TW, Griforeiv IV, Griwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Schmutz J, Lindquist E, Dehal P, Shapiro H, Jin YS, Passoth V, Richardson PM. Genome sequence of the lignocellulose-bioconversion and xylofermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, 2007, 25:317-326.
- [19] Simona L, Eva P, Barbel HH, Charlotte T, Kerstin S, Guido Z, Nils ON. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24: 151-159.
- [20] Zhu JJ, Yong Q, Xu Y, Yu SY. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresource Technology*. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 1663-1668.
- [21] Ronald EH, Jeffrey AM, Michael JB, Nancy NN, Michael AC, Stephen RH. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. *Yeast*, 2011, 28: 645-660.
- [22] Chen F, Zhou J, Shi Z, Liu L, Du G, Chen J. Effect of acetyl-CoA synthase gene overexpression on physiological function of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (9) : 1172-1179. (in Chinese)  
陈孚江, 周景文, 史仲平, 刘立明, 堵国成, 陈坚. 乙酰辅酶A合成代谢对酿酒酵母生理功能的影响. 微生物学报, 2010, 50 (9) : 1172-1179.
- [23] Li BZ, Yuan YJ. Transcriptome shifts in response to furfural and acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86: 1915-1924.

# Discovery of the target genes inhibited by formic acid in *Candida shehatae*

Peng Cai<sup>1,2,3</sup>, Xujie Xiong<sup>1,2,3</sup>, Yong Xu<sup>1,2,3\*</sup>, Qiang Yong<sup>1,3</sup>, Junjun Zhu<sup>1,3</sup>, Yu Shiyuan<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, <sup>2</sup> Jiangsu Key Lab of Biomass-based Green Fuels and Chemicals, <sup>3</sup>Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology MEC, Nanjing 210037, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] At transcriptional level, the inhibitory effects of formic acid was investigated on *Candida shehatae*, a model yeast strain capable of fermenting xylose to ethanol. Thereby, the target genes were regulated by formic acid and the transcript profiles were discovered. [Methods] On the basis of the transcriptome data of *C. shehatae* metabolizing glucose and xylose, the genes responsible for ethanol fermentation were chosen as candidates by the combined method of yeast metabolic pathway analysis and manual gene BLAST search. These candidates were then quantitatively detected by RQ-PCR technique to find the regulating genes under gradient doses of formic acid. [Results] By quantitative analysis of 42 candidate genes, we finally identified 10 and 5 genes as markedly down-regulated and up-regulated targets by formic acid, respectively. [Conclusion] With regard to gene transcripts regulated by formic acid in *C. shehatae*, the markedly down-regulated genes ranking declines as follows: xylitol dehydrogenase (*XYL2*), acetyl-CoA synthetase (*ACS*), ribose-5-phosphate isomerase (*RKI*), transaldolase (*TAL*), phosphogluconate dehydrogenase (*GND1*), transketolase (*TKL*), glucose-6-phosphate dehydrogenase (*ZWF1*), xylose reductase (*XYL1*), pyruvate dehydrogenase (*PDH*) and pyruvate decarboxylase (*PDC*); and a declining rank for up-regulated gens as follows: fructose-bisphosphate aldolase (*ALD*), glucokinase (*GLK*), malate dehydrogenase (*MDH*), 6-phosphofructokinase (*PFK*) and alcohol dehydrogenase (*ADH*).

**Keywords:** *Candida shehatae*, xylose fermentation to ethanol, formic acid inhibitor, target genes, RQ-PCR

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the Jiangsu Province Ordinary University Graduate Students Scientific Research Innovation Projects (CXLX12\_0528), by the National Natural Science Foundation of China (31070514), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA022304) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-85427537; E-mail: xuyong@njfu.edu.cn

Received: 17 April 2013 / Revised: 6 July 2013