

絮凝基因 *FLO1* 及 *FLO1c* 高表达提高工业酿酒酵母乙酸耐受性及发酵性能

杜昭励^{1,2}, 程艳飞¹, 朱卉^{1,2}, 何秀萍¹, 张博润¹

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

杜昭励, 程艳飞, 朱卉, 等. 絮凝基因 *FLO1* 及 *FLO1c* 高表达提高工业酿酒酵母乙酸耐受性及发酵性能. 生物工程学报, 2015, 31(2): 231–241.

Du ZL, Cheng YF, Zhu H, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of flocculent gene *FLO1* and *FLO1c*. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 231–241.

摘要: 乙酸是生物质乙醇发酵过程中酵母细胞面临的重要抑制剂之一, 对细胞生长及发酵性能有强烈的抑制作用。增强酵母菌对乙酸胁迫的耐受性对提高乙醇产率具有重要意义。用分别带有完整絮凝基因 *FLO1* 及其重复序列单元 C 发生缺失的衍生基因 *FLO1c* 的重组表达质粒分别转化非絮凝型工业酿酒酵母 CE6, 获得絮凝型重组酵母菌株 6-AF1 和 6-AF1c。同时以空载体 pYCPGA1 转化 CE6 的菌株 CE6-V 为对照菌株。与 CE6-V 相比, 絮凝酵母明显提高了对乙酸胁迫的耐受性。在 0.6% (V/V) 乙酸胁迫下, 6-AF1 和 6-AF1c 的乙醇产率分别为对照菌株 CE6-V 的 1.56 倍和 1.62 倍; 在 1.0% (V/V) 乙酸胁迫下, 6-AF1 和 6-AF1c 的乙醇产率分别为对照菌株 CE6-V 的 1.21 倍和 1.78 倍。可见絮凝能力改造能明显提高工业酿酒酵母的乙酸胁迫耐受性及发酵性能, 而且 *FLO1* 内重复序列单元 C 缺失具有更加明显的效果。

关键词: 工业酿酒酵母, 絮凝基因 *FLO1c*, 乙酸胁迫耐受性, 发酵性能

Received: May 9, 2014; **Accepted:** May 23, 2014

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA022106).

Corresponding author: Xiuping He. Tel: +86-10-64807356; E-mail: hexp@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA022106) 资助。

Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of flocculent gene *FLO1* and *FLO1c*

Zhaoli Du^{1,2}, Yanfei Cheng¹, Hui Zhu^{1,2}, Xiuping He¹, and Borun Zhang¹

1 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Flocculent gene *FLO1* and its truncated form *FLO1c* with complete deletion of repeat unit C were expressed in a non-flocculent industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* CE6 to generate recombinant flocculent strains 6-AF1 and 6-AF1c respectively. Both strains of 6-AF1 and 6-AF1c displayed strong flocculation and better cell growth than the control strain CE6-V carrying the empty vector under acetic acid stress. Moreover, the flocculent strains converted glucose to ethanol at much higher rates than the control strain CE6-V under acetic acid stress. In the presence of 0.6% (V/V) acetic acid, the average ethanol production rates of 6-AF1 and 6-AF1c were 1.56 and 1.62 times of that of strain CE6-V, while the ethanol production rates of 6-AF1 and 6-AF1c were 1.21 and 1.78 times of that of strain CE6-V under 1.0% acetic acid stress. Results in this study indicate that acetic acid tolerance and fermentation performance of industrial *S. cerevisiae* under acetic acid stress can be improved largely by flocculation endowed by expression of flocculent genes, especially *FLO1c*.

Keywords: industrial *Saccharomyces cerevisiae*, flocculen gene *FLO1c*, acetic acid tolerance, fermentation performance

随着资源、能源和环境问题的日益呈现,以生物质为原料通过生物转化生产能源产品及高值化学品受到高度关注^[1]。作为生物技术领域非常重要的微生物之一,酵母菌在生物质高效转化方面的应用一直是相关领域关注的热点^[2-3]。在生物质原料预处理过程中产生的弱酸类、醛类和酚类等抑制物对细胞生长和代谢具有抑制作用。其中弱酸类化合物中的乙酸含量最高。乙酸由木质纤维素预处理过程中半纤维素脱乙酰作用生成,终浓度大约在 1–10 g/L^[4-5]。当培养基的 pH 值低于乙酸的解离常数 (pKa 4.76) 时,分子态的乙酸可通过自由扩散或水甘油通道蛋白 Fps1p 以及转运蛋白 Ady2p 和 Jen1p 转运入酵母细胞内^[6-7],从而导致胞内环境酸化

及乙酸根阴离子的积累,严重抑制细胞的生长和代谢。因此增强酵母菌的乙酸胁迫耐受性对提高底物利用率和产物产率具有重要意义^[8-9]。

酵母菌絮凝是指酵母细胞之间相互聚集形成絮状或颗粒状细胞团,并迅速沉降到发酵液底部的一种生理特性,絮凝的发生是一种无性的、钙依赖的、可逆的过程。良好的絮凝特性有利于工业发酵过程中酵母细胞和发酵液的有效分离,因此对简化生产工艺、降低生产成本、提高产品品质具有重要意义^[10-13]。絮凝的发生依赖于絮凝蛋白与邻近细胞表面寡聚甘露糖链间的结合,*FLO1* 是酿酒酵母中典型的絮凝蛋白编码基因,含有大量衔接重复序列,根据其编码氨基酸序列的一致性,这些重复序列可以划

分为 A、B、C 和 D 4 个重复单元^[14]。重复序列是基因内高度活跃的成分,通过驱动基因内或基因间的滑移和重组,改变基因内重复序列的数量或排列方式,从而影响絮凝蛋白的结构和功能^[14-15]。分别缺失 *FLO1* 内部重复序列单元 B、C、D 提高了絮凝蛋白的构象稳定性,使酵母细胞絮凝特性表现出对环境酸碱变化的广泛适应性^[16-17]。经乙醇胁迫、两性霉素 B 或过氧化氢处理后,絮凝酵母的细胞存活率是非絮凝酵母的 2-100 倍^[18],表明絮凝也可能是细胞抵抗有害环境的一种保护机制。絮凝是否能赋予

酵母菌对其他环境胁迫的耐受性,以及重复序列变化引发的絮凝特性变化是否影响酵母菌应对环境胁迫的能力目前还不清楚。本研究将完整 *FLO1* 基因与 *FLO1* 内重复单元 C 缺失的衍生基因 *FLO1c* 在工业酿酒酵母中进行表达,分析比较其对工业酿酒酵母胁迫耐受性及发酵性能的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

本研究所用菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Plasmids/strains	Description	Source or reference
Plasmids		
YCp50	<i>Escherichia coli</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> shuttle vector, Amp ^r , <i>URA3</i> , <i>CEN4</i>	This laboratory
pFA6a-KanMX6	Amplify G418 resistant gene <i>KanMX6</i>	This laboratory
pYCF1	Amplify the coding sequence and terminator of <i>FLO1</i>	[17]
pYCF1c	Amplify the coding sequence and terminator of <i>FLO1c</i>	[17]
pYCPG	Insert <i>KanMX6</i> in YCp50 at <i>Sal</i> I and <i>Apa</i> I sites	This work
pYCPGA1	Insert the promoter of <i>ADHI</i> in pYCPG at <i>EcoR</i> I and <i>BamH</i> I sites	This work
pYGAF1	Insert the coding sequence and terminator of <i>FLO1</i> in pYCPGA1 at <i>BamH</i> I and <i>Sal</i> I sites	This work
pYGAF1c	Insert the coding sequence and terminator of <i>FLO1c</i> in pYCPGA1 at <i>BamH</i> I and <i>Sal</i> I sites	This work
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	This laboratory
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
YS59	<i>MATα</i> <i>FLO1</i> <i>leu2-3,112</i> <i>his4-519</i> <i>trp1-719</i> <i>ura3-52</i>	This laboratory
CE6	Non-flocculent industrial <i>S. cerevisiae</i>	This laboratory
CE6-V	CE6 with vector pYCPGA1	This work
6-AF1	CE6 with plasmid pYGAF1	This work
6-AF1c	CE6 with plasmid pYGAF1c	This work

大肠杆菌保存和培养用 LB 培养基^[19], 筛选大肠杆菌转化子用含 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基; 酵母菌常规培养用 YPD 培养基^[20], 筛选酿酒酵母转化子用含 500 µg/mL G418 的 YPD 培养基, 比较不同乙酸浓度下细胞生长时, 将 YPD 培养基 pH 调到 4.5; 发酵培养基为 EFM 培养基 (100 g/L 葡萄糖, 6 g/L 酵母粉, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 尿素, 1 g/L 磷酸二氢钾, 15 g/L 硫酸镁, 0.55 g/L 无水氯化钙)。

1.2 主要试剂和工具酶

高保真 DNA 聚合酶 KOD 及三磷酸脱氧核苷酸混合物 (dNTPs) 购自 TOYOBO 公司, T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, DNA marker 购自全式金公司, DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自 Axygen 公司, 酵母菌质粒提取试剂盒购自 Bio-tek 公司, 氨苄青霉素购自华北制药股份有限公司, G418 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 DNA 操作和序列分析

大肠杆菌感受态细胞制备、转化及质粒 DNA 的提取参照文献^[19]进行。酵母菌基因组 DNA 提取及完整细胞转化参照文献^[20]进行。使用 OMEGA 酵母质粒提取试剂盒 (Bio-tek, 美国) 提取酵母菌质粒。絮凝基因表达水平分析参照文献^[21]进行。引物合成、序列测定由 Invitrogen 公司完成。

1.4 重组表达质粒构建

本研究所用引物序列见表 2, 以质粒 pFA6a-KanMX6 为模板, 利用引物 Kan-F 和 Kan-R 进行 PCR 扩增, 获得约 1.5 kb 的 *KanMX6*, 经

Sal I 和 *Apa* I 酶切后的 *KanMX6* 插入到载体 YCp50 上, 获得重组表达质粒 pYCPG。以酿酒酵母 YS59 的基因组为模板, 利用引物 ADH-F 和 ADH-R 克隆 *ADH1* 启动子序列, 经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切后, 插入到质粒 pYCPG 获得重组质粒 pYCPGA1。分别以质粒 pYCF1 和 pYCF1c 为模板, 利用引物 FLO1-F 和 FLO1-R 分别克隆到完整 *FLO1* 及其衍生基因 *FLO1c* 的编码序列和终止子序列, 将其连接到载体 pYCPGA1 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点之间, 分别获得重组表达质粒 pYGAF1 和 pYGAF1c。

表 2 本文所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3') ^a
Kan-F	CGCGT <u>CGAC</u> AGGCGCGCCAGATCTGTT TAGC
Kan-R	GACGGG <u>CCC</u> GCGCCGTTAGTATCGAAT CGGAC
ADH-F	GACGAAT <u>TC</u> CATAACCGCT AGAGTACTTTGAAGA
ADH-R	GACGGAT <u>CCT</u> TGTATATGAGATAGTTGAT TGTATG
FLO1-F	GACGGAT <u>CC</u> ATGACAATGCCTCATCGCT ATATGT
FLO1-R	GACG <u>T</u> CGA <u>CG</u> CATTTTTCCTCGTTAATAATAAGT

^aRestriction sites are underlined.

1.5 酵母菌絮凝能力测定

絮凝能力的常规测定参照文献^[17]进行, 所用非絮凝缓冲液为 50 mmol/L 乙酸钠 (pH 4.5), 絮凝缓冲液为含 6.8 mmol/L 氯化钙的 50 mmol/L 乙酸钠 (pH 4.5)。测定乙酸对酵母菌絮凝影响时, 在菌悬液中分别添加不同浓度乙酸。

1.6 酵母菌胁迫耐受性分析

活化后的酵母菌接种于 2 mL YPD 培养基

中, 30 °C、200 r/min 培养 16 h, 离心收集细胞, 经无菌水洗涤两次后, 细胞重悬于 2 mL 无菌水中, 并进行梯度稀释, 室温下静置 2 h。将 5 μ L 稀释度分别为 10^{-2} – 10^{-5} 的菌悬液接种于含不同浓度乙酸、乙醇或糠醛的 YPD 平板上, 30 °C 培养 2 d, 记录各菌株生长情况。

参照文献[22]分析比较各菌株在液体培养基中的乙酸胁迫耐受性。将活化后的酵母菌接种于 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 18 h, 以初始接种 OD_{600} 为 0.15 的接种量分别转接到 50 mL 含有不同浓度乙酸的 YPD 培养基 (pH 4.5) 中, 30 °C、200 r/min 培养, 定时取样测定细胞干重, 绘制生长曲线。分别取对数早期、中期和后期的数据进行分析, 以 (AM/AW)/(BM/BW) 的比值表示不同菌株的乙酸胁迫耐受性, 其中 AM 是重组菌株在乙酸胁迫条件下的细胞干重, AW 是对照菌株在乙酸胁迫条件下的细胞干重, BM 是重组菌株在无乙酸胁迫时的细胞干重, 而 BW 是对照菌株在无乙酸胁迫时的细胞干重。

1.7 酵母菌发酵性能分析

将活化后的酵母菌接种于 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 18 h, 以初始接种 OD_{600} 为 1.0 的接种量分别转接到 100 mL 含有 0, 0.6%, 0.8% 或 1.0% (V/V) 乙酸的 EFM 培养基 (pH 4.5) 中。添加乙酸后, 培养基 pH 明显降低, 具体为 3.70 (0.6%乙酸)、3.61 (0.8%乙酸) 和 3.56 (1.0%乙酸)。30 °C、150 r/min 培养 6 h 后, 进行厌氧发酵, 定时取样检测各项发酵性能指标。实验重复 3 次, 每次每个条件设 3 个重复。细胞生物量、发酵液中葡萄糖和乙醇含量测定参照文献[23]进行。

2 结果与分析

2.1 絮凝基因在工业酿酒酵母中的表达

分别用空载体 pYCPG、带有完整絮凝基因 *FLO1* 及重复序列单元 C 缺失衍生基因 *FLO1c* 的重组表达质粒 pYGAF1 和 pYGAF1c 转化工业酿酒酵母 CE6, 在含 500 μ g/mL G418 的 YPD 培养基上筛选转化子。对转化子进行 G418 抗性比较、絮凝能力目测、酵母菌质粒提取和 PCR 分析, 以及絮凝基因表达水平分析, 获得具有相同 G418 抗性和絮凝基因 *FLO1*、*FLO1c* 表达水平的重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 各 6 株, 以及 3 株带有空载体的对照菌株 CE6-V。

絮凝能力分析结果表明, 宿主菌 CE6 及空载体转化菌株 CE6-V 均没有表现出絮凝特性, 而重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 均表现出明显的絮凝特性, 絮凝能力约为酵母菌株 YS59 的 1.5 倍 (图 1)。检测的 6 株 6-AF1 之间絮凝能力没有明

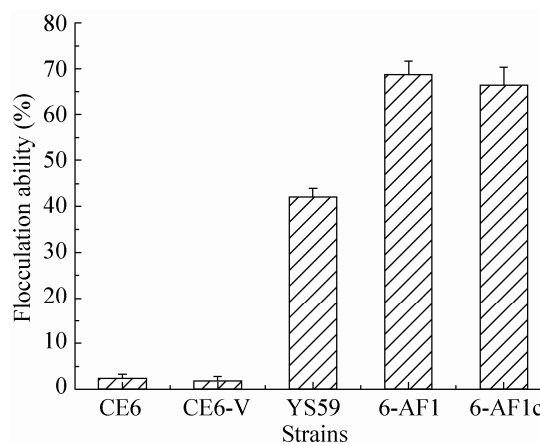


图 1 不同酵母菌株絮凝能力比较

Fig. 1 Flocculation ability of different yeast strains. The flocculation ability was analyzed using the standard method. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

显差异, 6 株 6-AF1c 之间絮凝能力也没有明显差异。其中表达 *FLO1* 内重复序列单元 C 完全缺失的衍生基因 *FLO1c* 的工业酿酒酵母 6-AF1c 的絮凝能力是表达完整絮凝基因 *FLO1* 的工业酿酒酵母 6-AF1 絮凝能力的 96.4%。与 *FLO1* 和 *FLO1c* 在实验室单倍体酵母菌株中表达的结果基本一致^[17]。

2.2 絮凝基因表达对酵母菌胁迫耐受性影响

在含不同浓度乙醇、糠醛及乙酸的 YPD 固体培养基上比较不同酵母菌株的生长情况, 发现在乙醇和糠醛胁迫条件下, 对照菌株 CE6-V 与重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 之间没有表现出明显的生长差异, 但表达絮凝基因的工业酿酒酵母在乙酸胁迫条件下的细胞生长明显优于对照菌株 (图 2)。检测的所有 6-AF1 和 6-AF1c 菌株

均表现出对乙酸胁迫的耐受性。表明絮凝基因的表达对工业酿酒酵母 CE6 的乙醇和糠醛胁迫耐受性没有明显影响, 但提高了酵母菌应对乙酸胁迫的耐受性。

进一步在含不同浓度乙酸的 YPD 液体培养基中比较不同酵母菌株的生长情况。结果发现在 0.6%–1.0% (V/V) 乙酸胁迫下, 重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 的乙酸胁迫耐受性分别是对照菌株的 1.3–2.5 倍和 1.5–2.9 倍 (图 3), 说明通过表达絮凝基因赋予工业酿酒酵母絮凝特性可以明显提高酵母菌应对乙酸胁迫的耐受性, 而且絮凝基因内重复序列单元 C 缺失使工业酿酒酵母表现出更高的乙酸胁迫耐受性。

2.3 乙酸胁迫下的发酵性能比较

乙醇发酵实验结果表明, 在无乙酸胁迫条

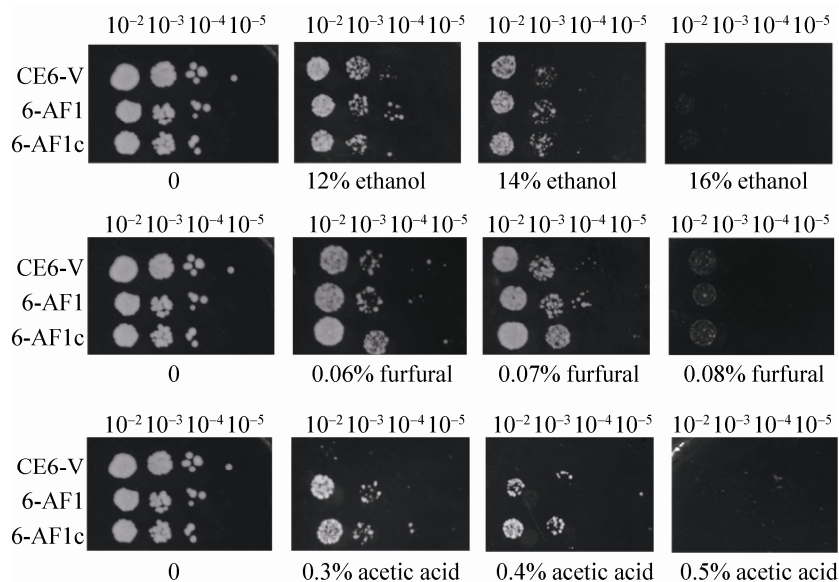


图 2 空载体转化菌株 CE6-V 及絮凝型重组酵母菌 6-AF1 和 6-AF1c 在不同胁迫条件下的生长情况

Fig. 2 Growth of yeast cells under various stress conditions. Mid-exponential cultures (OD_{600} of 1.0) of yeast strains CE6-V, 6-AF1 and 6-AF1c were diluted serially. 5 μ L of each dilution (10^{-2} – 10^{-5}) was spotted onto YPD plates or YPD plates containing different concentrations of ethanol, furfural or acetic acid and incubated at 30 $^{\circ}$ C for 48 h.

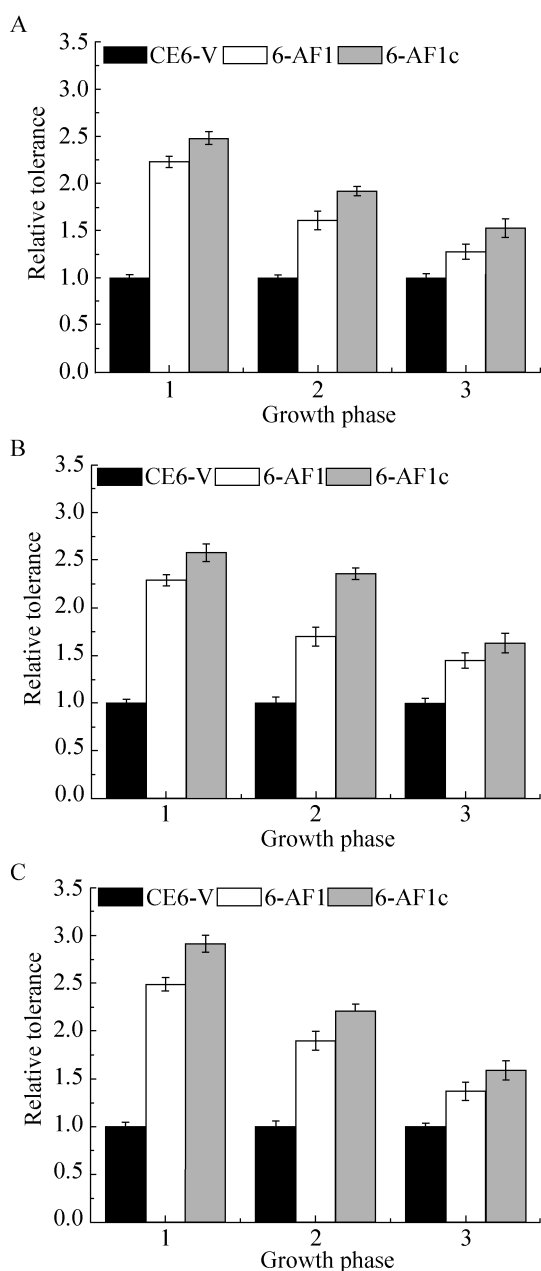


图3 酵母菌在不同乙酸胁迫下的相对生长能力比较
Fig. 3 Relative growth of different yeast strains under acetic acid stress in liquid cultures. (A) 0.6% acetic acid. (B) 0.8% acetic acid. (C) 1.0% acetic acid. Data at three time points were analyzed for each strain under different acetic acid stress, 1: early logarithmic phase; 2: middle logarithmic phase; 3: late logarithmic phase. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

件下, 对照菌株 CE6-V 与重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 表现出非常相似的发酵性能, 发酵 12 h 后葡萄糖消耗完, 乙醇浓度在 15 h 达到最高 (图 4A)。在乙酸胁迫条件下, 对照菌株和重组菌株的细胞生长和发酵速率均受到明显抑制, 但絮凝型的重组菌株表现出了更高的乙醇产率。在 0.6% (*V/V*) 乙酸胁迫条件下 (pH 3.70), 酵母菌株 CE6-V、6-AF1 和 6-AF1c 的乙醇产率分别为 1.6, 2.5 和 2.6 g/(L·h) (图 4B); 当乙酸浓度为 0.8% (*V/V*) 时 (pH 3.61), 酵母菌株 CE6-V、6-AF1 和 6-AF1c 乙醇产率分别为 0.9, 1.2 和 2.5 g/(L·h) (图 4C); 乙酸浓度增加到 1.0% (*V/V*) 时 (pH 3.56), 对照菌株 CE6-V、重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 的乙醇产量分别在 100 h、70 h 和 60 h 时达最高值, 其中 6-AF1 和 6-AF1c 的乙醇产率分别是对照菌株 CE6-V 的 1.21 倍和 1.78 倍 (图 4D)。在所有实验条件下, 带有空载体的对照菌株 CE6-V 表现出与宿主菌 CE6 相同的发酵性能。检测的所有 6-AF1 菌株之间或 6-AF1c 菌株之间发酵性能没有明显差异。添加乙酸使发酵培养基的 pH 有所降低, 增强了乙酸的细胞毒性。在乙酸毒性增加条件下, 絮凝型重组菌株 6-AF1 和 6-AF1c 表现出明显优于对照菌株的发酵性能。可见絮凝基因的表达可以明显提高工业酿酒酵母的乙酸胁迫耐受性, 缩短乙酸胁迫条件下的发酵周期; 特别是 *FLO1* 内重复序列单元 C 缺失后使这种效果更加明显, 使酵母菌株在乙酸胁迫条件下表现出更高的乙醇生产速率。

发酵结束后收集酵母细胞, 检测各酵母菌株的絮凝能力 (图 5)。宿主菌 CE6 及空载体转化菌株 CE6-V 没有表现出絮凝特性, 6-AF1 和 6-AF1c 均表现出明显的絮凝特性。在无乙酸胁迫

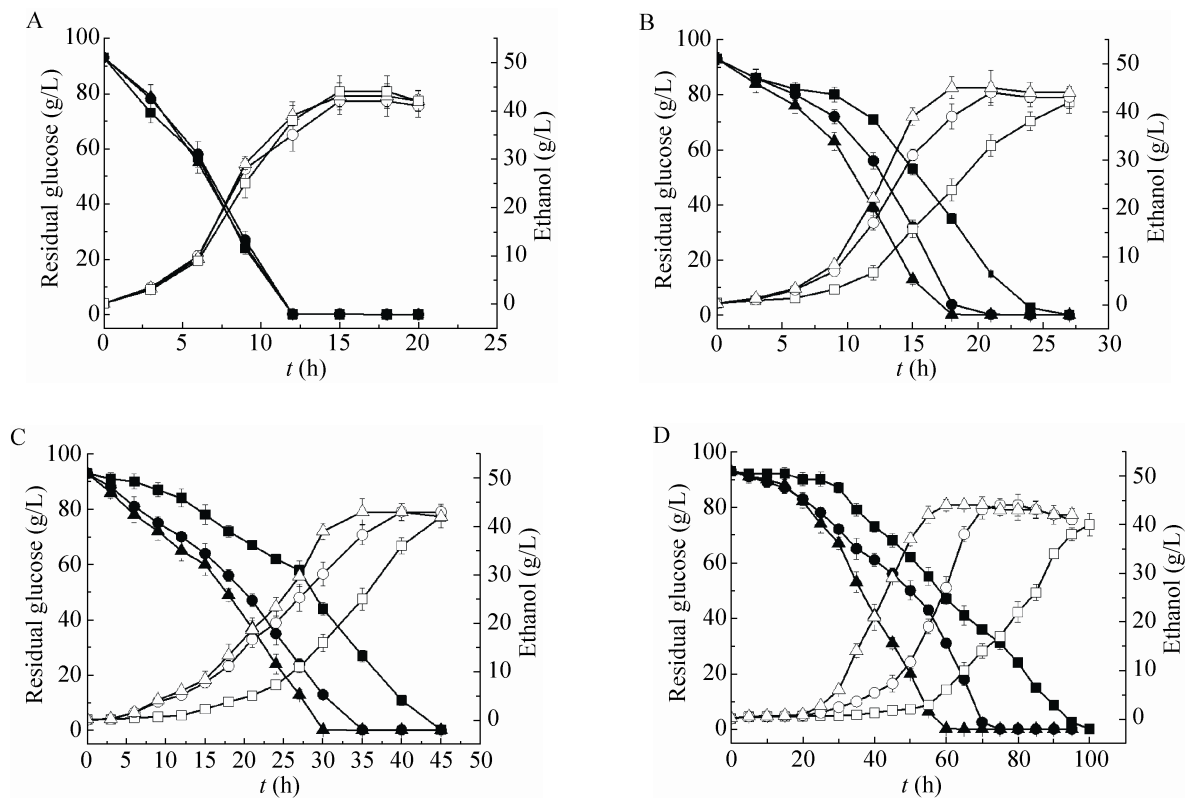


图4 酵母菌在不同乙酸胁迫下的发酵性能比较

Fig. 4 Fermentation performances of different yeast strains under acetic acid stress. (A) Fermentation without acetic acid. (B) Fermentation with 0.6% (*V/V*) acetic acid. (C) Fermentation with 0.8% (*V/V*) acetic acid. (D) Fermentation with 1.0% (*V/V*) acetic acid. CE6-V: residual glucose (■), ethanol (□); 6-AF1: residual glucose (●), ethanol (○); 6-AF1c: residual glucose (▲), ethanol (Δ). Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations ($P < 0.05$).

胁迫条件下发酵结束后, 6-AF1 和 6-AF1c 的絮凝能力是在常规 YPD 培养基中培养细胞絮凝能力的 1.4 倍。一方面发酵液中较高浓度乙醇可能增强以 *ADHIp* 为启动子的絮凝基因的表达, 另一方面发酵后期酵母细胞表面特性 (细胞壁构象、细胞表面电荷及疏水性等) 发生不同于常规 YPD 培养的变化, 从而影响细胞之间相互作用的强度^[24]。在乙酸胁迫条件下发酵结束后, 酵母细胞的絮凝能力明显降低; 而且与菌株 6-AF1c 相比, 乙酸对菌株 6-AF1 的絮凝表现出

更强的抑制作用。一方面乙酸可能影响絮凝基因的表达, 另一方面乙酸影响絮凝蛋白的构象。将无乙酸胁迫条件下发酵结束收集到的 6-AF1 和 6-AF1c 细胞重新悬浮于含不同浓度乙酸的絮凝缓冲液中, 测定絮凝能力, 结果发现不同浓度乙酸对絮凝能力的影响与相应乙酸浓度下发酵结束时菌株的絮凝能力变化趋势基本一致。说明不同乙酸胁迫下絮凝能力的变化可能主要来源于乙酸对絮凝蛋白功能的影响。而且与完整的絮凝蛋白 Flo1 相比, Flo1c 在乙酸胁迫压力

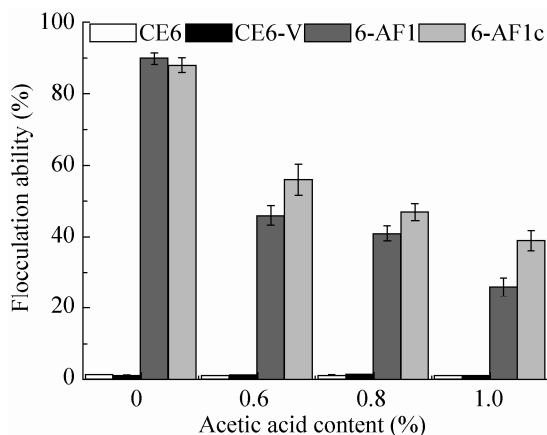


图 5 不同酵母菌株乙酸胁迫发酵结束时絮凝能力比较

Fig. 5 Flocculation ability of different strains at the end of fermentation. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

下的空间构象更稳定。这使得在高浓度乙酸胁迫条件下, 6-AF1c 表现出了比 6-AF1 更高的絮凝能力, 这可能是菌株 6-AF1c 在乙酸胁迫条件下具有更高乙醇生产速率的重要原因。

3 讨论

酵母菌在发酵过程中常常面临多种环境胁迫, 严重地制约着发酵工业的生产效率。增强发酵菌种的工业环境适应性和鲁棒性对提高生产效率、降低生产成本具有重要意义。絮凝, 作为细胞之间粘附的一种方式, 不仅是工业发酵过程提供细胞分离及产品澄清的有效方法, 同时也是细胞应对环境胁迫的一种保护机制。一方面通过絮凝形成细胞团, 外层细胞可以为内层细胞提供保护屏障, 另一方面絮凝过程的发生可能激发细胞内环境的重构, 从而产生对外环境的适应性。Smukalla 等的研究发现絮凝可以使酵母细胞在乙醇压力下的细胞存活率提

高 2 倍^[18]。在本研究中, 絮凝型重组菌株及其非絮凝原始菌株在乙醇胁迫下的细胞生长没有明显的差异, 这种与 Smukalla 等的研究结果的不一致性可能与宿主菌的遗传背景有关^[18]。然而, 本研究首次发现在工业酿酒酵母中表达絮凝基因可以明显提高酵母菌应对乙酸胁迫的耐受性, 从而缩短乙酸胁迫条件下的发酵周期, 提高产物生成速率。而且, 絮凝基因 *FLO1* 中重复序列单元 C 发生缺失使酵母菌表现出更强的乙酸胁迫耐受性和胁迫条件下更高的乙醇产率, 这与重复序列单元 C 缺失的絮凝蛋白 Flo1cp 比絮凝蛋白 Flo1p 具有更高的构象稳定性有关^[17]。乙酸胁迫条件下发酵结束后, 菌株 6-AF1c 表现出比 6-AF1 高的絮凝能力也说明了这一点。表达重复序列单元 C 缺失衍生基因 *FLO1c* 在提高工业酿酒酵母乙酸胁迫耐受性上的有效性, 不但为提高生物质乙醇发酵效率提供了技术途径, 也将为提升酵母菌所参与的其他发酵工业过程效率提供重要思路。在对酿酒酵母遗传修饰中, 宿主菌遗传背景有时对遗传修饰效果产生一定影响^[25-26]。通过对酵母菌絮凝能力的遗传改造增强酵母细胞对乙酸胁迫的耐受性是否受宿主菌遗传背景影响还需进一步研究, 以便更好地指导絮凝特性在发酵工业中的应用。

REFERENCES

- [1] Tan K, Lee K, Mohamed A. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: the case of second-generation bioethanol. *Energ Policy*, 2008, 36(9): 3360-3365.
- [2] Benjaphokee S, Hasegawa D, Yokota D, et al. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and

- ethanol. *Nat Biotechnol*, 2012, 29(3): 379–386.
- [3] Keating JD, Panganiban C, Mansfield SD. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(6): 1196–1206.
- [4] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, 82(4): 340–349.
- [5] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol*, 2000, 74(1): 25–33.
- [6] Ferrari MD, Neirrotti E, Alborno C, et al. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 40(7): 753–759.
- [7] Phowchinda O, Delia-Dupuy ML, Strehaiano P. Effects of acetic acid on growth and fermenting activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 1995, 17(2): 237–242.
- [8] Zhang JG, Liu XY, He XP, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *FPS1* aquaglyceroporin gene. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 277–284.
- [9] Zheng DQ, Wu XC, Wang PM, et al. Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Int Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(3): 415–422.
- [10] Bauer FF, Govender P, Bester MC. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(1): 31–39.
- [11] Cunha AF, Missawa SK, Gomes LH, et al. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Res*, 2006, 6(2): 280–287.
- [12] Ma K, Wakisaka M, Sakai K, et al. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. *Bioresour Technol*, 2009, 100(7): 2289–2292.
- [13] Li Q, Zhao XQ, Chang AK, et al. Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of *TPS1* encoding trehalose-6-phosphate synthase 1 for efficient ethanol production. *Metab Eng*, 2012, 14(1): 1–8.
- [14] Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, et al. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet*, 2005, 37(9): 986–990.
- [15] Sato M, Watari J, Shinotsuka K. Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. *J Am Soc Brew Chem*, 2001, 59(3): 130–134.
- [16] Li EE, Chang Q, Guo XN, et al. Regulation of tandem repeats on the function of flocculation protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52(1): 69–76 (in Chinese). 李娥娥, 常琦, 郭雪娜, 等. 衔接重复序列对酵母菌絮凝蛋白功能的调控作用. *微生物学报*, 2012, 52(1): 69–76.
- [17] Li E, Yue F, Chang Q, et al. Deletion of intragenic tandem repeats in unit C of *FLO1* of *Saccharomyces cerevisiae* increases the conformational stability of flocculin under acidic and alkaline conditions. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e53428
- [18] Smukalla S, Caldara M, Pochet N, et al. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*, 2008, 135(4): 726–737.
- [19] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [20] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, et al. *Methods in Yeast Genetics//A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [21] Yue F, Du ZL, Guo XN, et al. Effect of tandem repeats adjacent to 3'-terminal of *FLO1* on the flocculation function of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(12): 1276–1284 (in Chinese). 岳峰, 杜昭励, 郭雪娜, 等. *FLO1* 基因靠近 3'端重复序列对酵母菌絮凝蛋白功能的调控. *微生物学报*, 2013, 53(12): 1276–1284.
- [22] Ando A, Nakamura T, Murata Y, et al. Identification and classification of genes required for tolerance to freeze-thaw stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *FEMS Yeast Res*, 2007,

- 7(2): 244–253.
- [23] Lu Y, Cheng YF, He XP, et al. Improvement of robustness and ethanol production of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* under co-stress of heat and inhibitors. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(1): 73–80.
- [24] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, et al. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(3): 197–205.
- [25] Matsushika A, Inoue H, Murakami K, et al. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*, 2009, 100(8): 2392–2398.
- [26] Feng X, Zhao H. Investigating host dependence of xylose utilization in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using RNA-seq analysis. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 1–17.

(本文责编 郝丽芳)



林可霉素生物合成机制研究取得重大突破

《自然》杂志 2015 年 1 月 14 日在线发表了中科院上海有机化学研究所刘文团队在林可霉素生物合成机制方面取得的突破。

分子硫醇广泛存在于所有真核和原核生物体系中；长期以来，对其功能的理解局限于对抗各种内源性和外源性因素所引起的细胞氧化还原平衡失调。近日，上海有机所刘文团队的发现显然突破了这一认知“禁锢”：小分子硫醇不但可以充当广为人知的“保护性”角色，而且可以前所未有地扮演“建设性”的角色用于指导和参与活性功能分子的体内组装。这一发现代表了洞悉小分子硫醇在生物体系中的内在功能方面所迈出的重要一步（化学生物学），对于相关化学品的“生物制造”意义重大（合成生物学）。相关成果已于 2015 年 1 月 14 日在线发表在《自然》杂志上。

刘文团队发现，两个小分子硫醇——麦角硫因 (EGT) 和放线硫醇 (MSH) 在林可链霉菌中的相互配合精确有序地导演了含硫抗感染抗生素林可霉素的生物合成。麦角硫因作为载体介导了八碳糖单元的活化、转移和修饰；而放线硫醇则与麦角硫因发生硫醇交换而成为硫元素的供体。作为位居碳、氢、氧、氮和磷之后的第六大元素，硫元素为生命所必须并广泛存在于各种生物体系中，但是对于如何将其有效引入活性功能分子的生化机制却知之甚少。小分子硫醇通过两个罕见的 S-糖苷化反应主导了林可霉素的生物合成进程，不但代表了麦角硫因参与生化反应的首个范例，而且提供了一种放线硫醇依赖的硫元素引入的新模式。

林可霉素是一种高效广谱的抗感染抗生素，广泛用于对盘尼西林（青霉素）类抗生素敏感的细菌感染患者的临床治疗，市场需求巨大。我国是世界上最大的林可霉素生产国，仅以河南天方药业股份有限公司为例，年产量即在 1 000 吨以上。和其它大宗抗生素产品的生产相似，国内林可霉素的生产企业往往面临发酵效价偏低、产品成分复杂等问题，而采用传统菌种改造的手段难以有效解决。可以预见，以硫醇化学为核心的林可霉素生物合成机制的揭示，为合理运用生物学技术针对性地遗传改造林可霉素的工业生产菌种创造了条件，提供了在发酵过程中通过组分优化与产量提高以实现降低生产成本和减轻环境污染的理论依据。另一方面，硫醇介导的单糖活化、转移和修饰模式丰富了合成生物学的手段和元件选择，预示着单糖可以和小分子羧酸与氨基酸一样作为活性功能分子的构筑单元发生“模板式”的线性聚集，从而为通过设计和创造新的生物合成途径、在“细胞工厂”中实现含糖单元的新型生物基化学品的“生物制造”奠定了分子基础。

该研究得到国家自然科学基金委和科技部的支持，也是上海有机所“三个重大”突破项目之一。

(来源：中国科学院上海有机化学研究所)