

过表达 tRNA 基因 *tL(CAA)K* 提高酿酒酵母乙酸耐受性

赵姝一, 袁冰, 王雪晴, 陈洪奇, 赵心清, 白凤武

微生物代谢国家重点实验室 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室 上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200240

赵姝一, 袁冰, 王雪晴, 等. 过表达 tRNA 基因 *tL(CAA)K* 提高酿酒酵母乙酸耐受性. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4293-4302.

Zhao SY, Yuan B, Wang XQ, et al. Overexpression of a leucine transfer RNA gene *tL(CAA)K* improves the acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4293-4302.

摘要: 乙酸是木质纤维素类生物质水解液中的常见毒性抑制物, 选育乙酸耐受性好的酿酒酵母菌株, 有利于高效利用木质纤维素类生物质, 发酵生产生物燃料和生物基化学品。目前对酿酒酵母抗逆性的研究多集中在转录水平, 但对转运 RNA (Transfer RNA, tRNA) 在耐受性中的作用研究较少。在对酿酒酵母抗逆性研究过程中发现, 一些转运 RNA 基因在耐受性好的酿酒酵母菌株中转录明显上调。本文深入分析了精氨酸 tRNA 基因 *tR(ACG)D* 和亮氨酸 tRNA 基因 *tL(CAA)K* 过表达对酿酒酵母耐受木质纤维素水解液的影响。结果表明, 在 4.2 g/L 乙酸胁迫条件下进行乙醇发酵时, 过表达 *tL(CAA)K* 的菌株生长和发酵性能均优于对照酵母菌株, 乙醇生产强度比对照菌株提高了 29.41%, 但过表达 *tR(ACG)D* 基因的菌株生长和代谢能力较对照菌株明显降低, 体现了不同 tRNA 的不同调控作用。进一步分析发现, 过表达 *tL(CAA)K* 的重组酵母菌株乙酸耐受性调控相关基因 *HAA1*、*MSN2* 和 *MSN4* 等胁迫耐受性相关转录因子编码基因的转录水平上调。本文的研究为选育高效利用木质纤维素资源进行生物炼制的酵母菌株提供了新的改造策略, 也为进一步揭示酿酒酵母 tRNA 基因表达调控对抗逆性的影响提供了基础。

关键词: 酿酒酵母, 乙酸胁迫, tRNA, 木质纤维素类生物质, 乙醇发酵

Overexpression of a leucine transfer RNA gene *tL(CAA)K* improves the acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

Shuyi Zhao, Bing Yuan, Xueqing Wang, Hongqi Chen, Xinqing Zhao, and Fengwu Bai

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China

Abstract: Acetic acid is a common inhibitor present in lignocellulosic hydrolysate. Development of acetic acid tolerant strains may improve the production of biofuels and bio-based chemicals using lignocellulosic biomass as raw materials.

Received: December 10, 2020; **Accepted:** January 27, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21978168).

Corresponding author: Xinqing Zhao. Tel: +86-21-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21978168) 资助。

Current studies on stress tolerance of yeast *Saccharomyces cerevisiae* have mainly focused on transcription control, but the role of transfer RNA (tRNA) was rarely investigated. We found that some tRNA genes showed elevated transcription levels in a stress tolerant yeast strain. In this study, we further investigated the effects of overexpressing an arginine transfer RNA gene *tR(ACG)D* and a leucine transfer RNA gene *tL(CAA)K* on cell growth and ethanol production of *S. cerevisiae* BY4741 under acetic acid stress. The *tL(CAA)K* overexpression strain showed a better growth and a 29.41% higher ethanol productivity than that of the control strain. However, overexpression of *tR(ACG)D* showed negative influence on cell growth and ethanol production. Further studies revealed that the transcriptional levels of *HAA1*, *MSN2*, and *MSN4*, which encode transcription regulators related to stress tolerance, were up-regulated in *tL(CAA)K* overexpressed strain. This study provides an alternative strategy to develop robust yeast strains for cellulosic biorefinery, and also provides a basis for investigating how yeast stress tolerance is regulated by tRNA genes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, acetic acid stress, tRNA, lignocellulosic biomass, ethanol fermentation

木质纤维素类生物质材料具有来源广泛、储量丰富、价格低廉,而且其生物炼制与粮食和耕地无竞争关系等优势,因此,研究木质纤维素类生物质的生物炼制对社会可持续发展具有重要意义^[1]。木质纤维素类生物质原料在酶解产生可发酵糖之前需要首先进行预处理,这一过程经常产生多种对发酵微生物生长和代谢具有抑制作用的物质,包括弱酸类、酚类和呋喃醛类抑制物等,其中乙酸是木质纤维素类生物质预处理过程产生的主要抑制物^[2]。乙酸进入细胞后可造成胞内酸化,对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 等发酵微生物产生毒性,抑制其生长和发酵^[3]。酿酒酵母广泛用于木质纤维素生物炼制相关研究,利用酿酒酵母生产纤维素乙醇引起了国内外的广泛关注。研究表明,毒性浓度的乙酸抑制酿酒酵母多个关键的代谢过程,存在复杂的耐受性调控机制^[4]。目前提高乙酸胁迫条件下发酵性能的方法包括菌株驯化和遗传改造,以及过程工程手段(例如添加金属离子)等^[5],其中驯化的缺点是需要的时间长,而且菌株性能可能不够稳定;而添加化学物质存在增加成本等问题。因此,研究酿酒酵母乙酸耐受性的分子机制,并进一步通过代谢工程改造提高酿酒酵母环境胁迫耐受性,对于选育高效发酵木质纤维素原料水解液生产生物燃料和化学品的菌株具有重要意义。

目前对酿酒酵母乙酸耐受性机制的研究多集中在转录调控,但蛋白翻译对环境胁迫的适应也

有重要影响,其中转运 RNA (Transfer RNA, tRNA) 的丰度是影响胁迫条件下选择性翻译的重要因素^[6]。研究发现, tRNA 丰度不受 mRNA 丰度影响,即细胞可以改变其 tRNA 丰度选择性地影响特定转录物的翻译速率,以增加在不同胁迫条件下所需蛋白的水平^[7]。但是,对于乙酸胁迫条件下 tRNA 丰度调控酵母代谢和细胞生长的研究还未见报道。

本课题组前期研究表明,过表达组蛋白 H4 甲基转移酶编码基因 *SET5* 提高了酿酒酵母的乙酸耐受性^[8],并在与对照菌株的比较转录组分析结果中发现大量差异表达的 tRNA 基因。本文对其中两个 tRNA 基因进行了分析,并探讨了作用机理,为进一步选育高效利用木质纤维素水解液进行生物转化的重组酵母提供了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 和酿酒酵母模式菌株 *S. cerevisiae* BY4741 由本实验室保存。

1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 琼脂粉 20 (配制固体培养基时添加); YPD 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 琼脂粉 20 (配制固体培养基时添加); 液体发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 酵母粉 4, 蛋白胨 3 (未调 pH, 初始 pH 为 5.8)。

乙酸胁迫条件下酿酒酵母乙醇发酵培养基：在液体发酵培养基中添加终浓度为 4.2 g/L 的乙酸(未调 pH, 初始 pH 为 3.5)。

1.3 构建重组酵母菌株

委托北京擎科生物科技有限公司分别将所选择的 2 个 tRNA 基因 *tR(ACG)D* 基因片段和 *tL(CAA)K* 基因片段克隆至 pHO 整合表达载体(酶切位点为 *Pac I* 和 *Xma I*)^[9], 并转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 。将提取的表达质粒经 *Not I* 酶切线性化, 然后使用化学转化方法^[10]转化到宿主酿酒酵母 BY4741 中, 利用含 G418 抗生素(固体培养基添加 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的抗性 YPD 平板筛选得到目的基因过表达的阳性酿酒酵母重组菌株, 并经培养后提取其基因组作为模板, 利用验证引物 BHO-F (5'-AAATGGCGTCGTACGACTGTAATTGCTTTT-3') 和 BHO-R (5'-GCGCGCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCCCA-3') 进行 PCR 验证。将获得的 PCR 产物经过测序验证, 选择正确的酿酒酵母转化子进行后续分析。

1.4 菌种活化、耐受性检测及乙醇发酵

1.4.1 菌种活化

将野生型酵母菌株 BY4741、含有空载体的对照酵母菌株 BHO 及重组酵母菌株 BHO-*tR(ACG)D* 和 BHO-*tL(CAA)K* 接种至 YPD 种子培养基中进行活化, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下培养至对数期进行下一步实验。

1.4.2 乙醇发酵性能评价

比较野生型菌株 BY4741、对照菌株 BHO、重组菌株 BHO-*tR(ACG)D* 和 BHO-*tL(CAA)K* 分别在乙酸胁迫条件下的生长和乙醇发酵性能。发酵方法如下: 菌株经活化后, 当最终 OD_{600} 为 0.1 时接种至含 100 mL 乙酸耐受性检测液体发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下培养。每隔 12 h 取样, 测定发酵过程中菌体生物量、残糖、乙醇和甘油浓度, 每批实验每个菌株

进行 3 次独立重复实验, 每次实验设置 3 个平行得到一致的实验结果。

1.5 发酵参数及代谢物的测定

乙醇发酵过程中残糖浓度、乙醇浓度、乙醇得率 ($Y_{E/CS}$)、乙醇生产强度 ($P_{E/T}$) 以及甘油的测定及分析方法参见文献[11]。

1.6 RNA 提取及实时定量分析

利用 Magen 酵母 RNA 提取试剂盒分别提取 4.2 g/L 乙酸胁迫条件下发酵过程中重组菌株 BHO-*tR(ACG)D*、BHO-*tL(CAA)K* 和对照菌株 BHO 对数生长中期 (48 h) 细胞的总 RNA。参照 TSINGKE GoldenstarTM RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2 试剂盒方法将提取的 RNA 反转录为 cDNA; Real-time PCR 参照 2 \times T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) 试剂盒方法进行, 将所得数据进行基因相对表达量的分析, 选择 *ALG9* 作为管家基因内参^[12]。本文使用的实时定量引物见表 1。

1.7 胞内氨基酸检测

采用全自动高速氨基酸分析仪 (Hitachi L-8900, 日本) 测定酿酒酵母细胞内氨基酸组成。收集在乙酸胁迫条件下液体发酵培养基中生长到对数中期 (48 h) 的酵母细胞, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞。经无菌蒸馏水洗涤 2 次后, 将细胞颗粒悬浮于 800 μL 100 mmol/L HCl 溶液中。然后将 500 μL 0.5 mm 直径的玻璃珠加入悬浮液中, 在-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的金属模块中于 50 Hz 下, 匀浆 110 s, 停止 10 s, 振荡重复 5 次。在 12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后, 将 400 μL 上清液与 200 μL 16.7% (W/V) 磺基水杨酸充分混合, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。将混合物在 15 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min, 收集上清液, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 1.70-2.20。上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后上样分析。最终氨基酸含量采用细胞干重 (DCW) 进行归一化处理。细胞经两次洗涤, 并在 45 $^{\circ}\text{C}$ 孵育超过 48 h, 用于测定每个样品的 DCW。

表 1 本文所用的 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
rt-tL(CAA)K-F	TTGTTTGGCCGAGCGGTCTA
rt-tL(CAA)K-R	ACGATACCTGAGTATCCCACAGTT
rt-ALG9-F	GGAATTATTGCCTTCTGCCGTTGC
rt-ALG9-R	AGACCCAGTGGACAGATAGCGTAG
rt-HAA1-F	GTGTGGGCGAAGTTAGCGTTCC
rt-HAA1-R	TGCAGCGGTTGCGGTTGTAC
rt-PMA1-F	CCGTCCGGTGCTGCTTACTTGG
rt-PMA1-R	ACAGTGTATGGTTCGTGCAAGGAC
rt-MSN2-F	GCTGGGGTTACGAAGGAAAGAAGG
rt-MSN2-R	TGGGACAAATGTGACAGTGAACG
rt-MSN4-F	TCTCAAGTCATCTCCGGCTCAGG
rt-MSN4-R	TTTAGCGGCAGCAGAGGCATTATC
rt-CAR1-F	CGAACAGATTCCCCTTGACC
rt-CAR1-R	TATCAGCGTGGGCGTCTATC
rt-PRO3-F	TGTGCGGTGGTGTCTACTCAG
rt-PRO3-R	AAGCCGTAGCAGCATCCATGTTCC
rt-ADY2-F	TTCAGCCTTCGCGTTGACGAC
rt-ADY2-R	AGCACAACCGACGACAACATTAGG
rt-JEN1-F	CGTGGTTGTCTGCGGCTTGG
rt-JEN1-R	GGTGATGTCCTTGGTTGGTCTGTC
rt-PUT1-F	TCATGTGTCGGTACTTGGCAGTTG
rt-PUT1-R	AGCACCACGAACCAGTTTCAGC
rt-TRM4-F	GCTGCTCCTGGCTCCAAAACCTG
rt-TRM4-R	TCTTCTGGCATCGGCATCATTAGC
rt-RPL22A-F	GTCGGTAACTTGGGTAACGCTGTC
rt-RPL22A-R	ACCAGAGAACTTGGCAGTGGAAC

2 结果与分析

2.1 乙酸胁迫条件下 tRNA 基因差异表达分析

对 *SET5* 基因过表达酵母菌株和对照菌株在乙酸胁迫下的转录组进行比较分析,发现大量转录有差异的 tRNA 基因,具体见表 2。

由表 2 可以看出,大量转运 RNA 基因在 *SET5* 过表达菌株中转录水平发生明显变化,其中,表达水平提高最显著的 tRNA 基因是编码精氨酸 tRNA 的基因 *tR(ACG)D*,其将 CGU、CGC 以及 CGA 密码子解码为精氨酸。研究表明,该基因是非必需基因,其缺失突变体在低葡萄糖 (0.025%葡

表 2 乙酸胁迫条件下 *SET5* 过表达菌株中转录水平显著变化的 tRNA 基因Table 2 The tRNA genes show significant changes at the transcription level in *SET5* overexpression strain under acetic acid stress

Genes	Log ₂ Fold change	P value	Description
<i>tR(ACG)D</i>	6.02	0.000	tRNA-Arg
<i>tL(CAA)K</i>	4.73	0.032	tRNA-Leu
<i>tG(GCC)D2</i>	4.02	0.000	tRNA-Gly
<i>tG(GCC)O1</i>	3.67	0.001	tRNA-Gly
<i>tK(UUU)P</i>	3.20	0.012	tRNA-Lys
<i>tT(AGU)H</i>	3.05	0.022	tRNA-Thr
<i>tI(AAU)II</i>	2.88	0.040	tRNA-Ile
<i>TRT2</i>	2.76	0.000	tRNA-Thr
<i>tR(ACG)L</i>	2.20	0.014	tRNA-Arg
<i>tN(GUU)F</i>	2.02	0.014	tRNA-Asn
<i>tN(GUU)P</i>	1.87	0.000	tRNA-Asn
<i>tR(UCU)G3</i>	1.84	0.000	tRNA-Arg
<i>tH(GUG)E2</i>	1.75	0.000	tRNA-His
<i>tG(GCC)G1</i>	1.64	0.012	tRNA-Gly
<i>tQ(UUG)D3</i>	1.63	0.003	tRNA-Gln
<i>tE(UUC)C</i>	1.62	0.000	tRNA-Glu
<i>tE(UUC)J</i>	1.30	0.004	tRNA-Glu
<i>tN(GUU)N1</i>	1.29	0.000	tRNA-Asn
<i>TGA1</i>	1.26	0.006	tRNA-Ala
<i>tA(UGC)E</i>	1.24	0.046	tRNA-Ala
<i>tD(GUC)B</i>	1.13	0.011	tRNA-Asp
<i>tW(CCA)P</i>	1.03	0.000	tRNA-Trp
<i>tG(GCC)P1</i>	-1.23	0.022	tRNA-Gly
<i>tR(ACG)J</i>	-1.27	0.007	tRNA-Arg
<i>tV(AAC)E2</i>	-1.29	0.014	tRNA-Val
<i>tV(AAC)K1</i>	-1.84	0.013	tRNA-Val
<i>tG(GCC)D1</i>	-5.12	0.004	tRNA-Gly
<i>tL(UAG)J</i>	-5.27	0.002	tRNA-Leu

萄糖)的营养条件下生长缓慢^[13]。此外,编码亮氨酸 tRNA 的基因 *tL(CAA)K* 也明显上调。该基因也是非必需基因,在还原剂 1,4-二硫苏糖醇的作用下,其缺失突变体的生长速度快于野生型^[13]。有研究报道,在过氧化氢胁迫条件下, m⁵C 甲基转移酶 Trm4p 响应胁迫,增加了带有 m⁵C 修饰的 tRNA^{LEU(CAA)}的比例,表明氧化胁迫诱导的 tRNA 甲基化修饰对翻译过程的重编程作用^[14]。但是,

目前对乙酸胁迫条件下 tRNA 基因转录变化的研究还未见报道。已知 *SET5* 编码组蛋白 H4 甲基转移酶^[15]，但对其如何调控 tRNA 基因的转录水平还没有研究报道。本研究发现在乙酸胁迫条件下，*SET5* 过表达引起 tRNA 基因转录的变化，提示该组蛋白修饰酶对乙酸胁迫的调控可能和 tRNA 基因表达量的变化有关。

2.2 重组菌株的乙酸耐受性和乙醇发酵性能

为了研究特定 tRNA 基因的过表达是否影响酿酒酵母的乙酸耐受性，构建了分别过表达 *tR(ACG)D* 和 *tL(CAA)K* 基因的重组菌株。在无胁迫的条件下，过表达菌株生长表型和发酵性能与对照菌株无明显差别，表明过表达基因 *tR(ACG)D*、*tL(CAA)K* 没有影响菌株的正常生长（结果未显示）。对所获得的重组菌株进行抑制物耐受性评价，由图 1A 可得，在乙酸浓度为 4.2 g/L 的胁迫条件下（未调 pH，初始 pH 为 3.50），过表达基因 *tL(CAA)K* 菌株的生长速度明显快于对照菌株，表明过表达 *tL(CAA)K* 能够促进酵母菌株乙酸胁迫条件下的生长。由于添加乙酸的同时也会造成发酵环境 pH 的降低，因此添加乙酸对菌株生长造成的胁迫影响可能是分子态乙酸导致的，也可能是低 pH 的环境导致的。测量发酵液中添加 4.2 g/L 乙酸时的初始 pH 值为 3.5，并进行了用 HCl 调初始 pH 值 3.5 条件下的发酵实验，观察到菌株生长并未表现出延滞期，且生长状态无差别。综上所述可知，在 4.2 g/L 乙酸胁迫下，初始 pH 3.50 的酸性环境对菌株生长无影响，是分子态乙酸产生了主要胁迫（结果未显示）。

葡萄糖消耗以及乙醇产生如图 1B、1C 所示，重组菌株 BHO-*tL(CAA)K* 的葡萄糖消耗速率及乙醇生产强度均快于对照菌株。96 h 结束发酵时，*tL(CAA)K* 基因过表达菌株基本消耗完葡萄糖，而对照菌株和 *tR(ACG)D* 基因过表达菌株仍有大量葡萄糖残余（表 3）。菌株 BHO-*tL(CAA)K* 的乙醇产量为 42.49 g/L，高于对照菌株的乙醇产量

32.94 g/L；但菌株 BHO-*tR(ACG)D* 生成的乙醇量只有 23.11 g/L，低于对照组。分析发酵 96 h 的乙醇生产强度，对照菌株 BHO 为 0.34 g/(L·h)，而过表达 *tL(CAA)K* 后乙醇生产强度达到 0.44 g/(L·h)，提高乙醇生产强度达 29.41%，表明重组菌株 BHO-*tL(CAA)K* 在含有 4.2 g/L 乙酸的发酵培养基中生长状态及乙醇发酵性能均优于对照菌株。

对重组酵母和对照菌株乙醇发酵副产物甘油浓度进行分析，在 4.2 g/L 乙酸胁迫下，重组菌株 BHO-*tL(CAA)K* 发酵液中甘油含量比对照菌株提高了 22.3%（图 1D）。甘油作为乙醇发酵过程中的主要代谢副产物之一，其生物合成有助于细胞的氧化还原平衡和高渗胁迫耐受性，也和氧化胁迫等其他胁迫耐受性有关^[16]，推测 *tL(CAA)K* 过表达可能调控碳代谢中甘油的合成，提高乙酸胁迫条件下酵母的发酵效率。

2.3 过表达 *tL(CAA)K* 菌株关键基因的实时定量分析

已知多个基因的表达和乙酸耐受性密切相关，包括乙酸耐受性调控相关基因 *HAA1*^[17-18]、质子转运蛋白基因 *PMA1*^[19] 等，本文选择了和乙酸耐受性相关的已报道关键基因进行了实时定量分析，结果如图 2 所示。在重组菌株中，*tL(CAA)K* 基因的相对表达量是对照菌株的 17.5 倍，证明 *tL(CAA)K* 基因在重组菌株中成功过表达。重组菌株 BHO-*tL(CAA)K* 中与乙酸耐受性机制相关的基因 *HAA1*、*MSN2*、*MSN4*、*ADY2*、*JEN1* 转录水平上调，分别是对照菌株的 2.5、1.2、5.0、2.6、2.4 倍。转录因子 Haa1p 可以调控约 80% 的乙酸耐受性基因的激活^[17-18]，也能直接调控 *MSN4*^[18]。过表达 *HAA1* 可提高酿酒酵母的乙酸耐受性^[20]。研究表明，*MSN2* 和 *MSN4* 编码的胁迫相关转录因子也和酿酒酵母乙酸耐受性相关^[21]，因此这 3 个关键转录因子编码基因过表达对提高乙酸耐性起到关键作用，推测 *tL(CAA)K* 通过上调 *HAA1*、*MSN2* 和 *MSN4* 这 3 个关键的转录因子提高重组酵母的乙酸

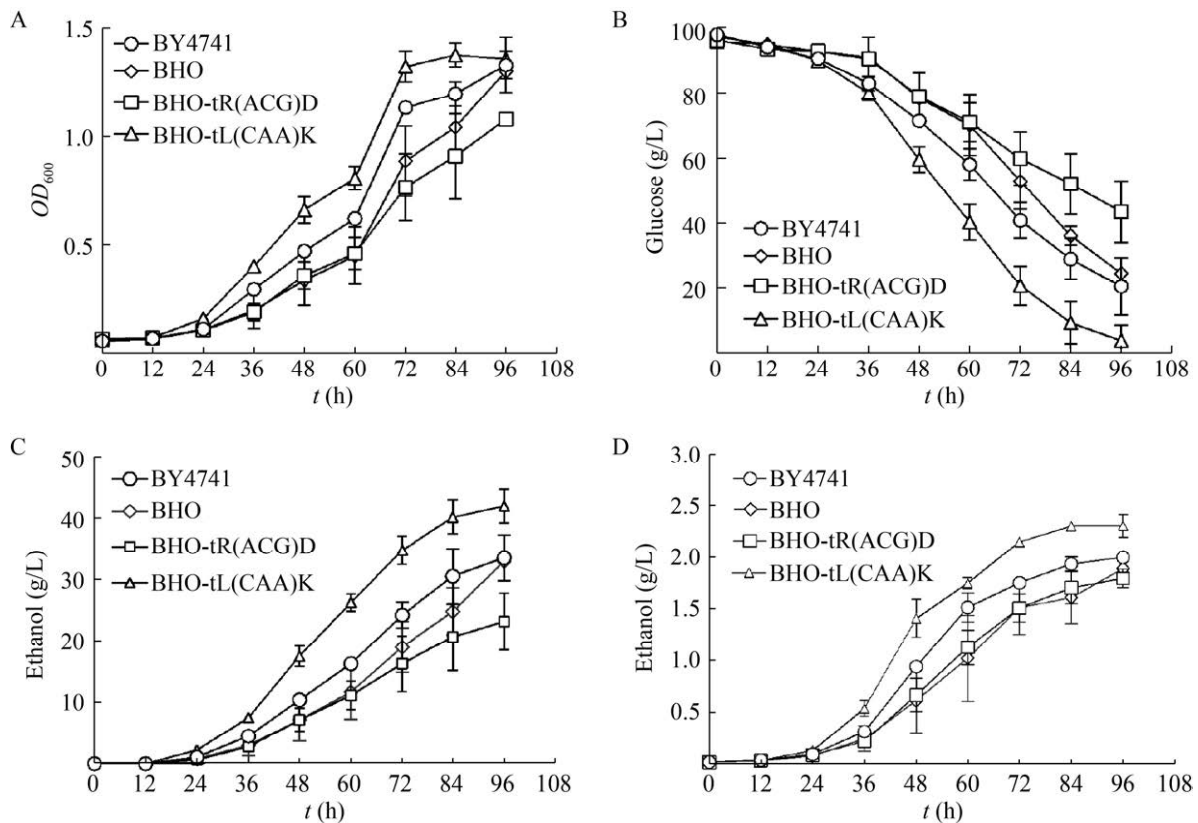


图1 酿酒酵母 BY4741、BHO 与 BHO-tR(ACG)D、BHO-tL(CAA)K 在 4.2 g/L 乙酸添加下的生长 (A)、残糖 (B) 及乙醇浓度 (C)、甘油产量 (D) 的变化

Fig. 1 The profiles of cell growth (A), residual sugar (B), ethanol production (C) and glycerol production (D) of *Saccharomyces cerevisiae* strains BY4741, BHO, BHO-tR(ACG)D and BHO-tL(CAA)K when 4.2 g/L acetic acid was supplemented.

表3 乙酸胁迫下分别过表达 *tR(ACG)D*、*tL(CAA)K* 对酿酒酵母 BY4741 乙醇发酵的影响

Table 3 Effects of overexpressing *tR(ACG)D* or *tL(CAA)K* on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress

Strains	S_i (g/L)	S_f (g/L)	S_c (g/L)	E_{max} (g/L)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Y (%)	$Y_{E/T}$ (g/(L·h))
BY4741	98.07	20.43	78.24	33.46	0.43	0.84	0.35
BHO	97.46	24.51	73.03	32.94	0.45	0.88	0.34
BHO-tR(ACG)D	96.42	43.46	53.64	23.11	0.43	0.84	0.24
BHO-tL(CAA)K	95.96	3.80	92.11	42.49	0.46	0.90	0.44

Fermentation time: 96 h; S_i : initial glucose concentration; S_f : the sugar concentration when fermentation was finished; S_c : consumed sugar; E_{max} : maximal ethanol concentration; $Y_{E/S}$: ethanol yield, g(ethanol)/g(glucose/sugars); Y: ratio of ethanol yield to the theoretical value of 0.511 g (ethanol)/g (glucose); $Y_{E/T}$: ethanol productivity. 4.2 g/L acetic acid was added.

耐受性。由 *PM1* 编码的质膜 ATPase 是胞质酸碱度和质膜电位的主要调节因子之一，可以将质子泵出细胞以恢复胞内的 pH^[19]。已有报道表明，*PM1* 的过表达增强了酿酒酵母对各种类型胁迫的耐受性^[19]。但是在本研究中，未发现 *PM1* 转录水

平有明显变化，提示 *tL(CAA)K* 过表达提高耐性的机制和质子转运无关。本课题组前期研究表明，羧酸转运蛋白编码基因 *ADY2* 和 *JEN1* 的敲除也可以增强酿酒酵母对乙酸的耐受性^[22-23]。在乙酸胁迫条件下，BHO-tL(CAA)K 与对照菌株相比，*PM1*

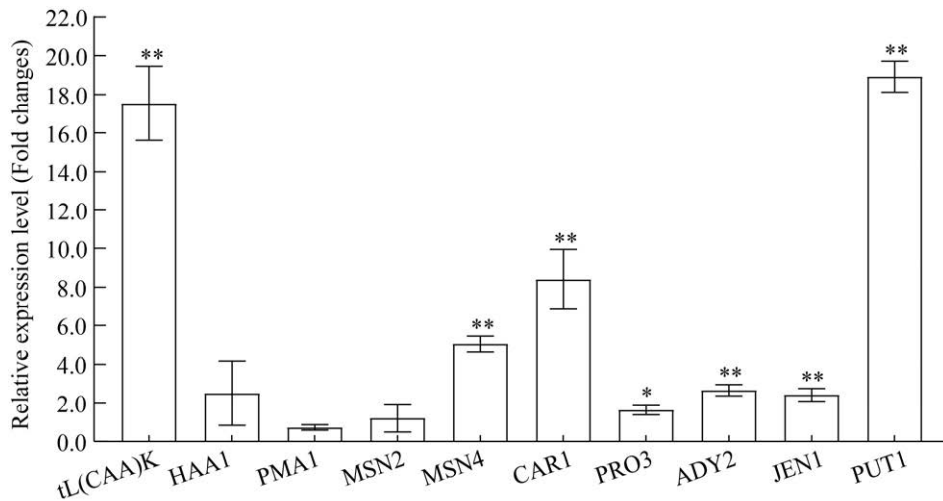


图 2 乙酸胁迫下重组酵母中 *tL(CAA)K* 和其他关键基因的转录水平与对照菌株的比较

Fig. 2 Transcription levels of *tL(CAA)K* and other key genes in the recombinant yeast overexpressing *tL(CAA)K* under acetic acid stress when compared to the control strain. *: $P \leq 0.05$. **: $P \leq 0.01$. *tL(CAA)K*: leucine tRNA (tRNA-Leu); *HAA1*: transcriptional activator gene involved in adaptation to weak acid stress; *PMA1*: plasma membrane P2-type H^+ -ATPase gene, pumps protons out of cell, major regulator of cytoplasmic pH and plasma membrane potential; *MSN2*: and *MSN4*: genes encoding stress-responsive transcriptional activator; *CAR1*: arginase gene, catabolizes arginine to ornithine and urea; *PRO3*: gene encoding delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase, catalyzes the last step in proline biosynthesis; *ADY2*: acetate transporter gene required for normal sporulation; *JEN1*: gene encoding monocarboxylate/proton symporter of the plasma membrane; *PUT1*: proline oxidase gene.

转录无显著差异, 而 *ADY2* 和 *JEN1* 的转录提高, 推测重组菌株乙酸耐受性提高和阻止乙酸吸收无关。另外, 有文献报道, 促进酵母细胞将乙酸转化为乙酰辅酶 A 可达到解毒作用^[24], 但是, 检测发酵液中乙酸的浓度未发现重组菌株和对照菌株的差异 (数据未显示), 因此推测重组菌株乙酸耐受性提高和进一步转化利用无关。

Car1p 参与酿酒酵母降解精氨酸, 能催化精氨酸水解为鸟氨酸和尿素, 在尿素循环中起到重要作用。研究表明, 敲除 *CAR1* 可以提高酿酒酵母的乙醇耐受性^[25]。过表达 *CAR1* 是否提高酿酒酵母菌株的乙酸耐受性有待深入研究。本研究中检测到过表达 *tL(CAA)K* 菌株中 *CAR1* 的转录水平提高了 8.4 倍, 可能对于重组菌株乙酸耐受性提高有积极作用, 有待进一步验证。同时也观察到在过表达 *tL(CAA)K* 的菌株中编码脯氨酸合成酶的基因 *PRO3* 转录水平表达上调, 该基因编码的

酶在胞内脯氨酸的合成的最后一步起关键作用^[26]。另外, 转录水平提高最显著的基因 *PUT1* 编码脯氨酸氧化酶, 在催化线粒体内脯氨酸降解中发挥重要作用, 将脯氨酸氧化为 δ 1-吡咯啉-5-羧酸盐, 最终降解为谷氨酸参与三羧酸循环, 为菌株生长供能^[26]。目前线粒体中的脯氨酸降解机理尚未阐明, *PUT1* 过表达与酵母乙酸耐受性的关系目前还没有研究报道, 值得进一步深入分析。由于以上氨基酸合成和降解酶基因转录发生明显变化, 我们检测了胞内氨基酸的含量, 结果将在下文进一步讨论。

2.4 过表达 *tL(CAA)K* 菌株在乙酸胁迫下的胞内氨基酸检测

氨基酸代谢和酿酒酵母乙酸耐受性有密切关系^[4], 有研究表明, 酿酒酵母吸收赖氨酸和抵抗氧化胁迫耐受性相关^[27]。由于氨基酸代谢和蛋白翻译密切相关, 因此对乙酸胁迫下酵母菌株胞内

的氨基酸含量进行了检测, 探究 tRNA 过表达对氨基酸代谢的影响。由图 3 可看出, 丙氨酸、精氨酸和甘氨酸等含量在过表达 *tL(CAA)K* 的菌株中比对照菌株低, 而重组菌株中亮氨酸、脯氨酸和谷氨酸等含量上升。其中胞内氨基酸含量发生显著变化的为: 天冬氨酸含量显著下降 ($P \leq 0.05$), 鸟氨酸含量显著上升 ($P \leq 0.01$)。在乙酸等抑制物存在的条件下, 细胞产生氧化胁迫造成蛋白质变性, 而脯氨酸和带电荷的氨基酸 (如精氨酸和谷氨酸) 可以抑制蛋白质的变性, 有助于细胞恢复正常的生理代谢功能, 是良好的应激保护物质^[26]。在转录水平检测到脯氨酸合成酶基因 *PRO3* 和脯氨酸氧化酶基因 *PUT1* 转录水平均上调, 而重组菌

株胞内脯氨酸含量上升, 提示 *PUT1* 编码的脯氨酸降解酶没有发挥作用, 推测 *Put1p* 可能存在转录后或者翻译后调控, 导致其酶活不一定提高, 且脯氨酸降解过程发生在线粒体, 细胞器区格化水平可能也存在调控的机制。本研究提示, 后续需要深入进行蛋白水平和酶活水平的分析, 全面揭示相关的分子机制。鸟氨酸是由 *CARI* 编码的精氨酸酶催化精氨酸水解生成的, 重组菌株 BHO-*tL(CAA)K* 中 *CARI* 转录水平提高 (图 2) 可能催化精氨酸水解为鸟氨酸, 这与胞内氨基酸检测结果中精氨酸含量下降、鸟氨酸含量显著提高一致, 因此推测鸟氨酸含量的提高可能是菌株乙酸耐受性提高的重要影响因素之一。研究表明, 天冬氨酸

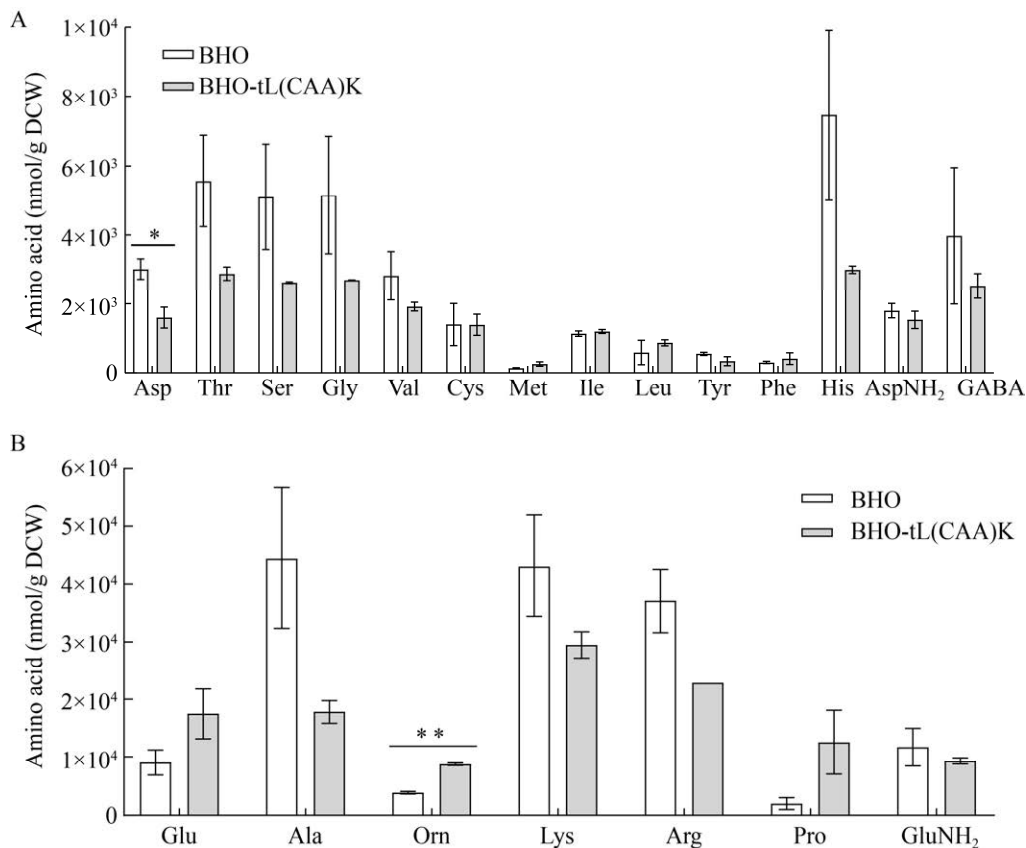


图 3 酿酒酵母 BHO 与 BHO-*tL(CAA)K* 在添加 4.2 g/L 乙酸条件下的胞内氨基酸含量

Fig. 3 The intracellular amino acid content of *S. cerevisiae* strains BHO and BHO-*tL(CAA)K* when 4.2 g/L acetic acid was supplemented. (A) The content of amino acid is less than 1×10^4 mol/g DCW. (B) The content of amino acid is higher than 1×10^4 mol/g DCW. *: $P \leq 0.05$. **: $P \leq 0.01$.

的积累可有效增强乳酸菌的弱酸胁迫耐受性^[28], 而本研究结果中重组酵母天冬氨酸含量下降与菌株胁迫耐受性提高是否有关仍需进一步探究。

本文为首次报道特定 tRNA 基因过表达能提高乙酸耐受性。目前尚不清楚 tRNA 丰度的变化如何调控菌株乙酸胁迫耐受性, 深入的机理分析还有待进一步研究。除 tRNA 丰度外, 研究还表明在逆境胁迫下, tRNA 可裂解成不稳定的片段、空载 tRNA 和 tRNA 的修饰等都与生物应激反应中细胞整体代谢的基因表达调控有着密切的关系^[6,29]。在前期研究中发现, 亮氨酸 tRNA^{Leu(CAA)}甲基化酶基因缺失提高了酿酒酵母短暂过氧化氢冲击胁迫的敏感性^[14], 本文报道了特定 tRNA 基因过表达提高了酿酒酵母在长期乙酸胁迫条件下的生长和乙醇发酵性能。目前不清楚该 tRNA 表达量的提高和其甲基化是否共同影响酿酒酵母的乙酸耐受性, 此外, 菌株中 tRNA 表达量变化如何影响生长也值得进一步探究。理解相关分子机理, 有利于在翻译调控水平定向调控菌株的胁迫耐受性, 构建高效发酵菌株, 提高木质纤维素类生物质的生物转化效率。

3 结论

过表达酿酒酵母编码亮氨酸转运 RNA 的 *tL(CAA)K* 基因能显著提高酿酒酵母细胞对乙酸的耐受性, 提高乙酸胁迫条件下的乙醇产率, 从而改善发酵性能, 且胞内天冬氨酸含量显著下降, 鸟氨酸含量显著提高, 同时催化精氨酸水解为鸟氨酸的 *Car1p* 编码基因转录水平提高。此外, 与乙酸耐受性相关的关键转录因子基因 *HAA1*、*MSN2* 和 *MSN4* 转录水平也上调。本文的研究结果为进一步研究不同 tRNA 基因表达量变化对酿酒酵母环境胁迫耐受性的影响提供了基础, 也为利用 tRNA 基因构建高效发酵菌株提供了新的思路。

REFERENCES

[1] 赵建, 曲音波. 木质纤维素资源生物精炼技术研究

进展. 生命科学, 2014, 26(5): 489-496.

Zhao J, Qu YB. Progress in biorefinery technology of lignocellulosic resources. Chin Bull Life Sci, 2014, 26(5): 489-496 (in Chinese).

[2] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. Bioresour Technol, 2016, 199: 103-112.

[3] Giannattasio S, Guaragnella N, Zdravlević M, et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. Front Microbiol, 2013, 4: 33.

[4] 赵心清, 张明明, 徐桂红, 等. 酿酒酵母乙酸耐受性分子机制的功能基因组进展. 生物工程学报, 2014, 30(3): 368-380.

Zhao XQ, Zhang MM, Xu GH, et al. Advances in functional genomics studies underlying acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 368-380 (in Chinese).

[5] Zhang MM, Chen HQ, Ye PL, et al. Development of robust yeast strains for lignocellulosic biorefineries based on genome-wide studies//Sá-Correia I, Ed. Yeasts in Biotechnology and Human Health. Cham: Springer, 2019, 58: 61-83.

[6] Advani VM, Ivanov P. Translational control under stress: reshaping the translome. Bioessays, 2019, 41(5): 1900009.

[7] Torrent M, Chalancon G, De Groot NS, et al. Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions. Sci Signal, 2018, 11(546): eaat6409.

[8] Zhang MM, Zhao XQ, Cheng C, et al. Improved growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid by overexpression of *SET5* and *PPRI*. Biotechnol J, 2015, 10(12): 1903-1911.

[9] He LY, Zhao XQ, Bai FW. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the *FLO1*-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. Appl Energy, 2012, 100: 33-40.

[10] Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc, 2007, 2(1): 38-41.

[11] Wang L, Zhao XQ, Xue C, et al. Impact of osmotic

- stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 133.
- [12] Teste MA, Duquenne M, François JM, et al. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 99.
- [13] Bloom-Ackermann Z, Navon S, Gingold H, et al. A comprehensive tRNA deletion library unravels the genetic architecture of the tRNA pool. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004084.
- [14] Chan CTY, Pang YLJ, Deng WJ, et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun*, 2012, 3: 937.
- [15] Green EM, Mas G, Young NL, et al. Methylation of H4 lysines 5, 8 and 12 by yeast Set5 calibrates chromatin stress responses. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(3): 361-363.
- [16] Pählman AK, Granath K, Ansell R, et al. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3555-3563.
- [17] Mira NP, Henriques SF, Keller G, et al. Identification of a DNA-binding site for the transcription factor Haa1, required for *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid stress. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 6896-6907.
- [18] Mira NP, Becker JD, Sá-Correia I. Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid. *Omics*, 2010, 14(5): 587-601.
- [19] Lee Y, Nasution O, Mi Lee Y, et al. Overexpression of *PMAL* enhances tolerance to various types of stress and constitutively activates the SAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(1): 229-239.
- [20] Swinnen S, Henriques SF, Shrestha R, et al. Improvement of yeast tolerance to acetic acid through Haa1 transcription factor engineering: towards the underlying mechanisms. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 7.
- [21] Mira NP, Palma M, Guerreiro JF, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microb Cell Fact*, 2010, 9(1): 79.
- [22] Zhang MM, Zhang KY, Mehmood MA, et al. Deletion of acetate transporter gene *ADY2* improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* against multiple stresses and enhanced ethanol production in the presence of acetic acid. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1461-1468.
- [23] de Kok S, Nijkamp JF, Oud B, et al. Laboratory evolution of new lactate transporter genes in a *jen1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* and their identification as *ADY2* alleles by whole-genome resequencing and transcriptome analysis. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(3): 359-374.
- [24] Ding J, Holzwarth G, Penner MH, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* increases acetic acid tolerance. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362(3): 1-7.
- [25] Cheng YF, Du ZL, Zhu H, et al. Protective effects of arginine on *Saccharomyces cerevisiae* against ethanol stress. *Sci Rep*, 2016, 6: 31311.
- [26] Takagi H. Metabolic regulatory mechanisms and physiological roles of functional amino acids and their applications in yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(8): 1449-1462.
- [27] Olin-Sandoval V, Yu JSL, Miller-Fleming L, et al. Lysine harvesting is an antioxidant strategy and triggers underground polyamine metabolism. *Nature*, 2019, 572(7768): 249-253.
- [28] Wu CD, Zhang J, Du GC, et al. Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(9): 4083-4093.
- [29] Bąkowska-Żywicka K, Mleczko AM, Kasprzyk M, et al. The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(12): 1186-1200.

(本文责编 陈宏宇)