

学校代码： 10251

学 号： Y45160426

華東理工大學

工程硕士学位论文

论文题目：超离心筛选皮状丝孢酵母油脂积累的
分子生物学机制解析及其遗传操作

工程领域：生物工程

研究方向：生物炼制

论文作者：赵瞭

学校导师：鲍杰 教授

企业导师：肖林 高级工程师

定稿日期：2019 年 04 月 09 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

工程硕士学位论文

超离心筛选皮状丝孢酵母油脂积累的
分子生物学机制解析及其遗传操作

赵瞭

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院
肖林 高级工程师 山东龙力生物科技股份有限公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物工程

论文定稿日期: 2019.4.9 论文答辩日期: 2019.5.24

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 赵黎明 教授

评 阅 人: 费 强 教授

黄亦均 高级工程师

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按____①____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：赵瞭

2019年5月29日

指导教师签名：鲍杰

2019年5月29日

国家技术转移中心负责人签名：

(公章)

年 月 日

作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：赵瞭

2019 年 4 月 9 日

超离心筛选皮状丝孢酵母油脂积累的分子生物学机制解析及其遗传操作

摘要

微生物细胞内积累的油脂是合成生物柴油与生物航煤的重要原料，油脂酵母以木质纤维素为原料进行油脂发酵为油脂生产提供了一条重要路径。皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 是一种典型的油脂酵母，具有优异的木质纤维素体系适应性。本实验室利用高含油率酵母菌株的细胞密度更低的简单原理，在木质纤维素水解液中对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行了基于离心筛选的长期适应性进化，通过逐步增加离心力筛选到了油脂生产能力显著增强的突变菌株 *T. cutaneum* MS28，其油脂产量较原始菌株提高了 2.41 倍。另外，通过降低发酵液体系的粘度与密度以极尽离心筛选强度，获得了油脂产量进一步提升的突变菌株 *T. cutaneum* WL97。

两株高产油脂酵母菌株与原始菌株相比，其细胞含油率大幅提高，可更快地利用木质纤维素体系中全部单糖进行油脂发酵，同时细胞壁显著变薄、细胞体积增大。本研究主要利用 qRT-PCR 方法，对产生这些变化的分子生物学机制进行解析。研究发现，高产油脂酵母细胞内与油脂生产所需前体物质（乙酰-CoA、NADPH）以及中间产物（脂肪酸）合成相关的部分基因发生了几十倍的上调表达差异，同时检测发现其细胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量较原始菌株明显提高，研究表明油脂合成前体物质供给的增多可能是高产菌株油脂合成能力增强的直接原因。与糖酵解以及木质纤维素来源各单糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖）代谢路径相关的基因中，多个关键基因的表达水平与原始菌株相比差异上调十分显著，这对多种单糖的快速利用起到了关键作用并为油脂合成提供了更为充足的碳源。高产菌株与细胞壁葡聚糖、几丁质合成分解相关的部分基因发生了非常显著的上调表达差异，测定细胞壁组分发现，细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖含量显著下降，几丁质含量变化较小。酵母细胞壁成分的改变可影响细胞壁的结构与功能进而影响酵母的细胞形态，为油脂积累提供更大空间，使高产菌株的油脂生产过程更具优势。

本研究首次尝试为 *T. cutaneum* 构建有效的遗传操作系统。将潮霉素抗性基因 *HYR* 作为表达框的目的基因构建单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ ，利用电转化方法将该质粒转化至 *T. cutaneum* MS28 中，筛选获得了 *HYR* 基因在基因组 *ECH1* 位点发生替换整合的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 。以工程菌株为研究对象，继续尝试在 *HYR* 位点替换整合绿色荧光蛋白基因 *GFP*，获得了潮霉素抗性消失并可释放绿色荧光的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 $\Delta HYR::GFP$ 。然而，在后续培养过程中工程菌株发生了目的基因丢失的现象，优化遗传操作系统构建过程的诸多策略均未能解决这一问题。

综上所述，本研究从分子生物学角度对超离心筛选得到的 *T. cutaneum* 高产菌株与原始菌株的油脂生产相关机制进行解析，为今后更好地对 *T. cutaneum* 进行改造和应用打下了重要基础。研究首次尝试构建 *T. cutaneum* 遗传操作系统，实现了外源基因在 *T. cutaneum* 中的表达，进一步完善后可作为今后分子生物学改造的重要工具。

关键词：*Trichosporon cutaneum*；油脂酵母筛选；qRT-PCR；细胞壁与细胞形态；遗传操作系统构建

Molecular Analysis of Lipid Biosynthesis Mechanism and Genetic Manipulation in Ultra-centrifugal Screened *Trichosporon cutaneum* Mutants

Abstract

The accumulated lipid in microorganism is a significant source of biodiesel and bio-jet fuel. Lipid fermentation of oleaginous yeast using lignocellulosic material provide an important path for lipid production. *Trichosporon cutaneum* is a typical oleaginous yeast which adapt lignocellulosic system excellently. Long-term adaptation of *T. cutaneum* ACCC 20271 in lignocellulosic hydrolysate was conducted and upper cells after centrifugation were inoculated in fresh hydrolysate to obtain lightest mutants. The lipid content of those upper cells were highest and the lipid productive capacity of them was enhanced through continuous screening until *Trichosporon cutaneum* MS28 was screened. The lipid accumulation of *T. cutaneum* MS28 was increased more than 2.4 folds than that of *T. cutaneum* ACCC 20271 and *T. cutaneum* MS28 was further screened in fermentation broth with reduced viscosity and density. *Trichosporon cutaneum* WL97 was finally screened and the lipid yield of it was much improved than parental *T. cutaneum*.

The lipid content of ultra-centrifugal screened *T. cutaneum* mutants were increased to a large extent and assimilation of all the five monosaccharides derived from lignocellulose biomass were also enhanced. Moreover, cell wall became thinner and the cell volume were enlarged in mutants. Therefore, qRT-PCR were conducted to explore probable reasons of all these changes. Among the fatty acid synthesis related genes, several genes responsible for Acetyl-CoA and NADPH production were extremely significantly up-regulated in mutants. Content of Acetyl-CoA and NADPH in parental *T. cutaneum* and mutants were consistent with the qRT-PCR result. The genes in glycolysis were significantly up-regulated partly when each monosaccharide was used as sole sugar source. The enhanced assimilation capacity of all fermentable sugars derived from lignocellulose improved the utilization of hydralysate and provided more carbon source during lipid production in mutants. In addition, genes encoding the enzymes in synthesis and degradation of glucan and chitin were significantly up-regulated in mutants. The determination of mannan, glucan and chitin content in the cell walls on the weight basis per cell surface area suggested the declined mannan, glucan and chitin content in the mutant cells. The significant variation of cell morphology was probably led by the lessened glucan and chitin content and the enlarged cell volume provided more protein and nucleic acid

for lipid biosynthesis and created the prerequisite for the final extraordinary lipid accumulation in the mutant cells.

Genetic operating system was first constructed in *T. cutaneum* mutant. Hygromycin resistance gene *HYR* was set as target gene and selectable marker in expression cassette to construct single-copy integrated plasmid pUC19- $\Delta ECH1::HYR$. The plasmid was transformed into *T. cutaneum* MS28 through electrotransformation to obtain engineered *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$. The green fluorescence protein gene *GFP* was then expressed in *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$ to examine the general applicability of the newly built system. However, engineered strains lost their target genes during continuous culture and all optimization methods failed to overcome this issue, which revealed the difficulty of the homologous recombination in *T. cutaneum*.

To sum up, molecular analysis of lipid biosynthesis mechanism was conducted in ultra-centrifugal screened *T. cutaneum* mutants to lay foundation for further metabolic engineering and utilization of *T. cutaneum*. Exogenous gene was first expressed in *T. cutaneum* and the developed genetic operating system can become effective tools in molecular engineering process.

Keywords: *Trichosporon cutaneum*; Oleaginous yeast screening; qRT-PCR; cell wall and yeast morphology; genetic operating system construction

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 木质纤维素油脂生产	1
1.1.1 木质纤维素生物炼制	1
1.1.2 油脂酵母概况	1
1.1.3 高产油脂酵母筛选方法	2
1.1.4 超离心筛选皮状丝孢酵母	3
1.2 油脂合成代谢路径	4
1.3 酵母细胞壁代谢及其对细胞形态的影响	4
1.3.1 酵母细胞形态	4
1.3.2 酵母细胞壁代谢	5
1.4 酵母遗传操作系统概况	6
1.4.1 酵母表达载体	6
1.4.2 酵母转化方法	7
1.5 本课题的研究内容与意义	8
第 2 章 超离心筛选皮状丝孢酵母油脂积累的分子生物学机制解析	10
2.1 引言	10
2.2 材料与方法	11
2.2.1 菌种与培养基	11
2.2.2 菌体干重与油脂含量测定	11
2.2.3 实时荧光定量 PCR (q-RT-PCR) 实验	11
2.2.4 胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量测定	12
2.2.5 高效液相色谱 (HPLC) 分析	12
2.2.6 透射电子显微镜 (TEM) 观察	12
2.2.7 细胞壁组分测定	12
2.3 结果与讨论	13
2.3.1 <i>T. cutaneum</i> 合成培养基油脂发酵	13
2.3.2 <i>T. cutaneum</i> 油脂合成相关基因转录水平分析	14
2.3.3 <i>T. cutaneum</i> 胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量变化	18
2.3.4 <i>T. cutaneum</i> 木质纤维素全糖利用能力验证	19
2.3.5 <i>T. cutaneum</i> 木质纤维素全糖代谢相关基因转录水平分析	21
2.3.6 <i>T. cutaneum</i> 细胞壁合成与分解相关基因转录水平分析	23

2.3.7 <i>T. cutaneum</i> 细胞壁组分变化	27
2.4 本章小结	28
第 3 章 皮状丝孢酵母遗传操作系统的构建	30
3.1 引言	30
3.2 材料与方法	30
3.2.1 菌种与培养基	30
3.2.2 试剂与试剂盒	30
3.2.3 <i>T. cutaneum</i> 感受态的制备	31
3.2.4 <i>T. cutaneum</i> 电转化流程	31
3.2.5 <i>T. cutaneum</i> 菌落 PCR 验证	31
3.3 结果与讨论	31
3.3.1 <i>T. cutaneum</i> 抗生素敏感性探究	31
3.3.2 单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ 的构建	34
3.3.3 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ 的转化与 <i>T. cutaneum</i> MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 的筛选	35
3.3.4 <i>T. cutaneum</i> MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 中绿色荧光蛋白基因 <i>GFP</i> 的表达	37
3.3.5 工程菌株稳定性验证	38
3.4 本章小结	40
第 4 章 结论与展望	41
4.1 结论与创新点	41
4.2 展望	43
参考文献	44
附录 I q-RT-PCR 考察基因及所用引物	50
附录 II 表达载体构建所用质粒及引物	54
学术成果	58
致谢	59

第 1 章 绪论

1.1 木质纤维素油脂生产

1.1.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素生物炼制是指利用农业残留物、工业废弃物、能源作物等木质纤维素物质进行高附加值产品加工生产的过程。常用的木质纤维素原料主要包括林木草本植物（白杨、柳枝稷等）、农作物废弃物（玉米秸秆、麦秆、菊芋秸秆等）以及经济作物加工废弃物（甘蔗渣等）等^[1]。木质纤维素生物炼制生产能源化学品是缓解传统石化能源压力、控制温室气体排放的有效途径^[2]。

木质纤维素主要由纤维素（占干重的 35-50%）、半纤维素（占干重的 20-35%）、木质素（占干重的 5-30%）以及少量蛋白质、矿物质、游离糖等成分组成^[3]。纤维素是葡萄糖由 β -1,4-糖苷键连接形成的一种同聚多糖，半纤维素是由多种单糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖）组成的异质多聚体，二者水解得到的可发酵糖可作为碳源用于微生物的发酵生产^[4]。木质素是以苯基丙烷结构单元组成的大分子多聚物，其包含的芳香环结构极难被生物转化利用。木质纤维素结构致密，具有很强的生物拮抗性，需要通过预处理等技术破坏其晶体结构，再将得到的纤维素、半纤维素用于后续的酶水解与微生物发酵中^[4]。本实验室自主开发了一套优越的干法生物炼制技术，解决了预处理工段高能耗、高水耗、反应器强腐蚀等问题，同时利用一株树脂枝孢霉（*Amorphotheca resinae* ZN1）在保留可发酵糖的同时，生物脱除预处理过程产生的呋喃醛和乙酸等抑制物，最终实现高固含量的同步糖化与发酵^[5]。目前利用这一技术平台已实现乙醇^[6]、乳酸^[7]、柠檬酸^[8]、油脂^[9]等化学品的高指标生产。

1.1.2 油脂酵母概况

油脂酵母是一类可积累超过自身干重 20%油脂的非传统型酵母^[10]，其所生产的油脂是生物柴油的主要来源之一。相较于化石燃料生产的柴油，生物柴油具有无硫、无毒、可降解等显著优点，是一种环境友好型清洁能源。同时，生物柴油的黏度、密度、热值、十六烷值、凝固点等特性均优于石化柴油，生物柴油替代石化柴油可缓解现今能源供需压力与大气污染问题，具有广阔的发展前景^[2]。

利用油脂微生物进行生物柴油生产已有几十年的发展历史，除油脂酵母外，研究较为深入的油脂微生物还包括诺卡氏菌（*Nocardia*）、混浊红球菌（*Rhodococcus opacus*）等油脂细菌，小克银汗霉（*Cunninghamella*）、深黄被孢霉（*Mortierella isabellinae*）、毛霉菌（*Mucor*）、曲霉菌（*Aspergillus terreus*）等真菌以及原始小球藻（*Chlorella protothecoides*）、微绿球藻（*Nannochloropsis oculata*）、斜生栅藻（*Cenedesmus obliquus*）等微藻。相比于其他油脂微生物，油脂酵母的细胞含油率高、培养条件简易、培养周期短且可利用的发酵底

物广泛,是工业化微生物油脂生产的理想菌种。目前研究报道的油脂酵母已超过 70 种,其中对于解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、油脂酵母属酵母(*Lipomyces species*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)等菌种的研究最为丰富^[11]。

提高油脂产量、降低油脂生产成本是加速油脂酵母工业化应用进程的必要条件。微生物油脂的生产与菌株种类、培养基组成(碳源种类、碳氮比、其他营养成分等)以及发酵条件(搅拌转速、通气量、温度、pH 等)等因素息息相关^[34]。大量研究也从这一角度出发,通过优化发酵过程的各个环节促进油脂的生产。实验室规模通常以粮食淀粉来源的葡萄糖作为碳源培养微生物,但这一原料价格较高且存在“与人畜争粮”的问题,不适用于大规模工业化生产。研究发现,多种油脂酵母均可在发酵废水、粗甘油、工业废弃糖蜜、木质纤维素等廉价底物中正常生长发酵,其中利用木质纤维素原料进行油脂生产是目前生物柴油的发展趋势。近年来,通过代谢工程改造的方法构建高产油脂酵母菌株的研究也取得了颇具意义的进展。目前通过该方法已成功提高了 *Y. lipolytica*^[13]、*R. toruloides*^[14]等油脂酵母的产油能力,并进一步实现了部分高附加值油脂化学品的微生物生产。

在油脂酵母细胞内,油脂主要以甘油三酯(Triglyceride, TAG)的形式储存在油脂小体中。对油脂的组成进行研究发现,其主要成分为含有 16 或 18 个碳原子的饱和脂肪酸(分别为软脂酸与硬脂酸)及不饱和脂肪酸(分别为十六碳烯酸与油酸),但不同种类油脂酵母所产油脂的含量以及脂肪酸组成存在一定差异^[15]。因此筛选油脂产量高、脂肪酸组成理想的油脂酵母一直是研究的热点与难点。

1.1.3 高产油脂酵母筛选方法

油脂是一种无色的胞内产物,直接观察菌体细胞无法判断油脂含量,这为高产油脂酵母的筛选带来了困难。针对油脂酵母的不同特性,目前用于筛选高产油脂酵母的方法主要包括:

(1) 利用可与油脂特异性结合的荧光染料对油脂酵母进行染色,在特定波长下检测染料释放的荧光强度判断胞内油脂的含量以实现筛选。K. Kimura 等人研究了尼罗红染料处理下菌体细胞油脂含量与其释放荧光强度的关系,优化了尼罗红染料的使用方法,降低了染料对菌体细胞的危害,扩大了其筛选油脂微生物的应用范围^[16]。Aurélie Capus 等人对斯鲁菲亚红酵母(*Rhodotorula slooffiae*)进行尼罗红染料染色后,利用共聚焦显微镜观察染色后油脂小体的形态并以此为依据直接筛选油脂小体更大、更多的菌株进行后续油脂发酵^[17]。由于这些方法仅适用于单细胞或单群落的筛选过程,单独使用时筛选工作量大、效率低。因此通常仅将其用于替代步骤繁复的传统微生物油脂含量测定方法(包括细胞破碎、油脂提取、油脂分离纯化等过程),对胞内油脂含量进行快速表征。

(2) 利用油脂酵母的生长以及油脂生产特性,设计特定的筛选培养基进行筛选。当

环境缺乏可利用的碳源时, 油脂作为微生物细胞内碳源的一种储存形式可以为菌体生长提供能量。Shilin Li 等人在不含碳源的固体培养基中培养不同来源土壤样品, 由于环境缺乏碳源, 胞内积累油脂最多的菌株才能够更好的生长增殖。选择在培养基中生长速度最快、生长状态最好的菌株进行分离鉴定, 最终获得包括隐球酵母在内的 31 种产油微生物^[18]。浅蓝菌素 (cerulenin) 可以通过抑制脂肪酸合酶活性抑制油脂合成过程并影响菌体的正常生长。李仁民等人将经过碳离子束辐射诱变的粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 在含有一定浓度浅蓝菌素的培养基中进行筛选, 此条件下可正常生长的菌株脂肪酸合酶活力高, 油脂生产能力也相应更强, 该方法最终筛选得到的突变菌株油脂含量相较于原始菌株提高 90%^[19]。

1.1.4 超离心筛选皮状丝孢酵母

常用的高产油脂酵母筛选方法均存在操作复杂、筛选效率低等局限。为了简化筛选操作并实现高产油脂酵母的高通量筛选, 本实验室改进了 Liu Leqian 等人筛选高油脂含量解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 的方法进行了超高离心转速下的高油脂含量皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 的筛选^[20]。

T. cutaneum 是一种典型的油脂酵母, 可耐受木质纤维素来源的多种抑制物并在木质纤维素水解液中进行正常的生长与油脂发酵, 因此具备良好的工业应用潜力^[35]。在木质纤维素水解液中对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行长期适应性驯化, 随着不断的转接培养, *T. cutaneum* ACCC 20271 向更适应木质纤维素体系的方向进化。油脂的密度低于木质纤维素水解液, 因此对 *T. cutaneum* ACCC 20271 发酵结束后的水解液进行离心处理时, 油脂含量高的菌体细胞可悬浮甚至漂浮在发酵液中, 而油脂含量低的细胞则沉降于发酵液底部。该方法可快速、有效地区分体系中所有菌体细胞油脂含量的差异。根据这一原理, 首先在较低转速下对发酵水解液进行离心, 此时大部分菌体发生沉降, 小部分油脂含量较高的菌体漂浮在发酵液上层。将上层的菌体转接至新鲜的水解液中继续培养, 发酵结束后以相同转速离心发酵液, 同样转接漂浮在发酵液上层的菌体继续培养。随着不断的离心转接, 越来越多的菌体漂浮在发酵液上层, 此时提高离心转速可使其中油脂含量相对更高的菌体保持漂浮, 而油脂含量较低的菌体再次沉降。按照这样的方法不断提高离心转速进行筛选, 油脂含量提高的突变菌株被筛选出来。当离心转速提高至一定程度后, 绝大部分细胞都漂浮在发酵液上方, 继续提高离心转速已无法实现进一步筛选, 将这一代菌株命名为 *Trichosporon cutaneum* MS28。向发酵液添加无菌水可降低体系的粘度与密度, 使发酵液上层保留油脂含量更高的菌体而使油脂含量较低的菌体细胞发生沉降。不断增加无菌水的添加比例可对 *Trichosporon cutaneum* MS28 进一步筛选, 达到离心机最高转速且已添加较高比例无菌水后, 菌体不经过离心即可全部漂浮在发酵液上方, 达到了超离心筛选的极限。最终获得油脂生产能力进一步提升的菌株, 将其命名为 *Trichosporon cutaneum* WL97^[22]。

在木质纤维素水解液中的长期适应性进化过程,可使 *T. cutaneum* ACCC 20271 发生有利于其利用木质纤维素原料进行生长与油脂发酵的变化。通过简单的离心转接过程可高效、高通量地将油脂产量提升的突变菌株筛选出来。该方法可操作性强且在较短时间内获得了能够利用木质纤维素原料进行油脂生产的高产酵母菌株,是筛选高产油脂酵母的优越工具,未来可在其他油脂微生物的筛选工作中进行推广尝试。

1.2 油脂合成代谢路径

在真核细胞内,油脂是脂肪酸贮存的高能量形式,由于游离脂肪酸对细胞具有一定毒性,胞内仅有少量脂肪酸以游离形式存在。油脂的生物合成起始于乙酰-CoA 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, *ACC*) 催化乙酰-CoA 形成丙二酰-CoA^[23],酵母中乙酰-CoA 主要由两种途径产生:(1) 培养环境中氮源的缺乏将激活细胞内腺苷单磷酸脱氨酶 (Adenosine monophosphate deaminase) 的活性并降低腺苷单磷酸 (Adenosine monophosphate, *AMP*) 浓度。腺苷单磷酸浓度的降低可抑制线粒体中异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase, *IDH*) 的活性并使柠檬酸在线粒体内累积。过剩的柠檬酸被转移到细胞质并在 ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, *ACL*) 的作用下被转化为乙酰-CoA 和草酰乙酸。(2) 细胞质中的乙酸在乙酰-CoA 合成酶 (Acetyl-CoA synthase, *ACS*) 的作用下生成乙酰-CoA。乙酸由细胞质中的丙酮酸转化而来,培养环境中的乙酸也可直接被转运至细胞内。乙酰-CoA 的这一合成途径通常仅存在于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等传统型酵母中,油脂酵母等非常规酵母中较为少见^[24]。

由乙酰-CoA 生成的丙二酰-CoA 被进一步转化为丙二酰-ACP,随后在脂肪酸合酶复合体 (Fatty acid synthase, *FAS*) 的作用下经一系列反应形成丁酰-ACP 并不断与另一个丙二酰-ACP 结合以延长碳链,直至生成软脂酸 (C16:0)、硬脂酸 (C18:0) 等中等链长脂肪酸。以上过程中存在两个还原反应,每个还原反应各需消耗 1 个 NADPH,使 NADPH 成为油脂合成的重要辅因子,与乙酰-CoA 共同制约油脂的积累^[25]。细胞质中的 NADPH 主要在苹果酸酶 (Malic enzyme, *ME*) 催化苹果酸生成丙酮酸时产生^[26],戊糖磷酸途径以及线粒体内的三羧酸循环过程也可产生部分 NADPH。

脂肪酸作为油脂合成的中间产物可在脂肪酸合酶、延伸酶、去饱和酶的作用下被进一步修饰为链长不同的脂酰-CoA,随后,脂酰-CoA 与 3-磷酸甘油结合并被逐步催化形成溶血磷脂、磷脂、甘油二酯直至甘油三酯,最终储存在油脂小体中^[27]。3-磷酸甘油主要由糖酵解的中间代谢产物磷酸二羟丙酮转化而来,胞内甘油也可经磷酸化一步生成 3-磷酸甘油。在 *S. cerevisiae* 中,研究常通过阻断甘油的生成促使更多碳源流向乙醇生产^[28]。

1.3 酵母细胞壁代谢及其对细胞形态的影响

1.3.1 酵母细胞形态

作为一种单细胞生物，菌体细胞是酵母进行生命活动的重要场所，酵母菌体细胞的形态是反映其生长与发酵性能的重要生物学特征。由于体积更大的细胞内各细胞器的体积更大，同时 DNA、蛋白质、总 RNA、总 mRNA 以及特定基因的 mRNA 的含量也更高，因此相应生物合成过程得以加强^[29]。此外，体积更大的菌体细胞可为胞内产物的积累提供更大空间，在合成胞内产物时更具优势。

在不同的环境中，酵母通过调控细胞生长周期、限制细胞形态相关基因的表达等方式维持稳定的细胞形态^[29]。当培养环境突然改变时，细胞形态也会随之发生显著变化^[30]。*S. cerevisiae* 在营养丰富的培养基中生长速度快、细胞体积大，而在营养匮乏的环境中生长缓慢、细胞体积小^[31]。将 *S. cerevisiae* 从以甘油-乙醇为碳源的培养基转移到以葡萄糖为碳源的培养基时，其发芽率会立即减少而使细胞快速调整，细胞体积变大^[32]。与之相似，将裂殖酵母 (*Schizosacharomyces. pombe*) 转移至营养匮乏的培养基时，其细胞体积也会快速减小^[33]。对于 *Y. lipolytica*，培养环境的改变可以促进其酵母态与菌丝态的二态转化。处于酵母态时，*Y. lipolytica* 的菌体细胞为近似于 *S. cerevisiae* 的椭球状，而处于菌丝态的菌体变细变长，成为更接近于霉菌的菌丝状。培养基的营养条件、pH 值、温度、溶氧浓度、渗透压、发酵罐搅拌转速等因素均可影响 *Y. lipolytica* 在两种细胞形态间的相互转化。与此同时，*Y. lipolytica* 在两种形态下的柠檬酸发酵以及产油性能也大不相同，通常用于产品发酵的 *Y. lipolytica* 多为酵母态，调节培养环境条件可控制其产品发酵过程^[34]。

1.3.2 酵母细胞壁代谢

酵母的细胞壁作为酵母细胞与培养环境的直接屏障，在抵抗环境压力、维持菌体形态等方面发挥着重要作用^[35]。酵母的细胞壁主要由外层的甘露聚糖、中间的蛋白质、内层的葡聚糖与少量几丁质组成，不同种类酵母菌细胞壁各组分的含量有所差异^[36]。

培养环境可影响酵母细胞壁的合成从而影响酵母细胞形态及其压力耐受性、抗自溶性等细胞壁功能相关特性。在较高葡萄糖浓度条件下培养白假丝酵母 (*Candida albicans*) 时，过量的碳源将通过己糖磷酸途径生产葡聚糖及甘露聚糖，增加细胞壁的厚度。而在非可发酵糖中培养时，细胞壁合成所需己糖磷酸通过高能耗的糖异生途径产生，此时的细胞壁更薄^[37]。以乳酸盐或葡萄糖作为唯一碳源培养 *C. albicans*，分别将菌体转移至高渗透压环境 (1 M NaCl) 时，两种菌体的细胞壁均变厚、细胞体积变小，但在葡萄糖中培养的 *C. albicans* 其细胞壁相对更厚、细胞更小^[38]。

酵母细胞壁中的葡聚糖主要由 β -1,3-葡聚糖骨架以及少量 β -1,6-葡聚糖组成。 β -1,3-葡聚糖是一种分枝状多聚物，其螺旋状结构赋予了细胞壁一定的弹性、灵活多变性以及良好的拉伸强度^[36]。*S. cerevisiae* 中编码 β -1,3-葡聚糖合成酶催化亚基的 *FKS* 家族基因在 β -1,3-葡聚糖合成过程中发挥着重要作用。敲除 *S. cerevisiae* 的 *FKS1* 基因时发现大量菌体细胞发生自溶。同时，*FKS1*、*FKS2* 基因的突变会导致细胞体积大幅减小且细胞存

活率、压力耐受性、抗自溶能力下降。而敲除 *FKS3* 基因可一定程度提高细胞存活率，增强其对压力的抵御能力以及抗自溶能力^[39]。 β -1,6-葡聚糖相比于 β -1,3-葡聚糖较短，它作为 β -1,3-葡聚糖与几丁质以及细胞壁甘露糖蛋白之间的灵活连接而没有固定形态。

几丁质是 N-乙酰基-D-葡萄糖胺通过 β -1,4-糖苷键相连的直链多糖，它所形成的微纤维结构有利于细胞壁拉伸强度的提高^[40]。*S. cerevisiae* 中分离得到三种几丁质合酶（Chitin synthase, *CHS*）：*CHS1*、*CHS2*、*CHS3*，*C. albicans* 中有四个编码几丁质合酶的基因（*CHS1*、*CHS2*、*CHS3*、*CHS8*），不同 *CHS* 产生的几丁质纤维结构不同，它们在细胞壁的不同位置发挥不同作用。酵母细胞壁中葡聚糖与几丁质含量的变化可改变细胞壁厚度、拉伸强度、孔隙率、渗透压耐受性等理化性质，同时影响细胞形态的维持以及体积的大小^[38]。

甘露聚糖主要在控制细胞壁孔径、渗透性等方面发挥作用，对于细胞壁弹性、拉伸强度等性质贡献较小^[41]。不同的甘露糖蛋白共同形成甘露聚糖并连接各细胞壁多糖。*S. cerevisiae* 中存在两种寡糖修饰过程。N-糖基化蛋白通过乙酰葡萄糖胺和天冬酰胺残基之间的 N-糖苷键与寡糖连接，而 O-甘露糖化蛋白通过 α -甘露糖苷键在丝氨酸或苏氨酸残基的羟基侧链与短甘露糖链连接^[42]。蛋白的甘露糖基化过程对细胞壁甘露糖的合成有重要影响。

1.4 酵母遗传操作系统概况

1.4.1 酵母表达载体

酵母遗传操作系统的构建与优化是在基因层面对酵母进行定向改造的技术基础。优越于大肠杆菌（*Escherichia coli*）等原核生物，酵母作为一种真核生物，能够对表达的蛋白进行翻译后的加工和修饰，生产具有生物学活性的蛋白。酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）是第一个实现遗传操作系统构建的酵母菌株，也是第一个完成全基因组测序的真核生物。自 1981 年在 *S. cerevisiae* 中成功表达外源人干扰素基因起，利用 *S. cerevisiae* 进行外源基因表达的研究逐渐开展^[43]。同时，为弥补 *S. cerevisiae* 遗传操作系统平台无法进行高密度培养、缺乏强启动子、表达产物分泌不足以及表达载体易丢失等问题，越来越多的研究致力于构建与完善其他酵母的遗传操作系统，目前已成功在毕赤酵母（*Pichia pastoris*）^[44]、汉逊酵母（*Hansenula polymorpha*）^[45]、乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）^[46]、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）^[47]、圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）^[48]等菌种中实现外源基因的表达。

表达载体是携带目的基因进入宿主菌株进行表达的工具，*E. coli* 等原核微生物中已发现大量功能各异的表达载体，酵母中可利用的表达载体较为有限，目前酵母中最为常用的表达载体主要有两类：

（1）整合型载体（Yeast integration plasmid, YIp）。利用酵母中较易发生同源重组的

特点, 在 YIp 上设计同源臂, 使其携带目的基因在酵母染色体的特定位点进行整合。由于整合成功的基因可随染色体基因的复制而复制, 因此目的基因的表达具有较强的稳定性, 但同时存在拷贝数较低的限制。研究发现酵母基因组 rDNA 中含有 100-200 个重复序列单元, 选择重复序列作为 YIp 整合位点可实现目的基因的多拷贝整合表达^[49]。类似方法已在 *S. cerevisiae*、*K. lactis*、*R. glutinis* 等菌株中尝试成功。

(2) 附加型载体 (Yeast episomal plasmid, YEp)。附加型载体中含有酿酒酵母 2 μ m 质粒的全部或部分序列, 能够在酵母中独立复制, 实现目的基因较高拷贝数的表达。然而如若 2 μ m 质粒功能部分序列发生缺失, YEp 则容易在复制中丢失, 因此该表达载体稳定性较差。将所有表达元件均插入至 2 μ m 质粒 *SnaBI* 位点附近的非必要区域, 可保证其功能区域的完整, 从而增强 YEp 的稳定性^[50]。

1.4.2 酵母转化方法

将携带目的基因的表达载体转化入宿主菌株是实现目的基因表达的必要步骤。酵母细胞壁较厚且结构较为致密, 难以使表达载体直接进入胞内。对细胞壁进行一定的破坏可促进表达载体的转化, 在酵母中应用的转化方法主要包括:

(1) 原生质体法。Eddy 等人于 1957 年首次利用蜗牛酶水解 *S. cerevisiae* 细胞壁获得 *S. cerevisiae* 原生质体^[51]。1978 年, Hinnen 等人在原生质体研究的基础上首次实现了 *S. cerevisiae* 的转化^[52]。失去细胞壁的酵母细胞大大方便了表达载体的进入, 但菌体生长状态、酶解处理条件等多种因素均可影响原生质体的制备, 原生质体制备效率较低。同时, 转化后需要将原生质体置于特定培养条件下促进细胞壁再生, 该方法操作步骤繁多且转化效率较低, 逐渐被其他转化方法取代^[53]。

(2) 醋酸锂 (LiAc) 转化法。为了简化原生质体法中细胞壁去除后再生步骤, 研究致力于寻求可应用于完整酵母细胞的转化方法。Ito 等人发现, 经过特定碱性阳离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 等) 与聚乙二醇 (PEG) 处理的酵母细胞易于接受外源 DNA。后续研究验证了这一结论并发现 Li^+ 的效果最佳^[54]。利用 LiAc 进行转化得到的最佳转化率为 450 个转化子/mg 质粒 DNA, 这一结果虽低于同时期原生质体法达到的转化率, 但醋酸锂转化法更为简易快捷, 得到了更多研究者的青睐并应用于多种酵母的转化中^[55]。

(3) 农杆菌转化法。农杆菌质粒上含有一段 T-DNA 序列, 该序列可随农杆菌侵染宿主细胞并整合入宿主基因组中。农杆菌可侵染大部分双子叶植物与裸子植物, 因此常用于植物细胞的转化。Lin Xinpeng 等人首次将农杆菌转化法应用于 *R. toruloides* 的转化中, 在单倍体 *R. toruloides* 与二倍体 *R. toruloides* 中均实现了外源基因的表达^[48]。Christian Görner 等人也成功利用农杆菌转化法实现了丝孢油脂酵母 (*Trichosporon oleaginosus*) 的转化, 并将该方法应用于改造 *T. oleaginosus* 生产特定脂肪酸^[56]。虽然农杆菌转化法转化效率较高, 但需要以农杆菌为媒介, 操作对象多且步骤仍较为复杂, 需要进一步改进优化。

(4) 电转化法。短暂电击可在酵母细胞壁表面形成微孔通道从而使表达载体进入细胞内。电击形成的微孔在最初几秒内逐渐增大并可稳定保持数秒,随后逐渐消失复原。该方法适用性广、操作简便,电转化条件适宜时对酵母的存活率影响较小,目前被广泛用于多种酵母的转化过程中^[57]。电转化前需要制备宿主菌株感受态,宿主酵母的生长时期、前处理剂种类、电转化参数等因素均可影响电转化效率^[58],研究通过优化相关因素可大大提高电转化效率。

1.5 本课题的研究内容与意义

油脂酵母所产油脂可作为一种生物柴油部分替代石化燃料的使用,利用油脂酵母以木质纤维素为原料生产油脂可进一步降低生物柴油生产成本,是目前生物柴油研究的发展趋势。然而,高效、高通量地筛选高产油脂酵母一直是研究的重点与难点。本实验室在木质纤维素水解液中对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行长期适应性进化,并利用超离心筛选的方法筛选油脂产量提高的突变菌株。连续转接离心后漂浮于发酵液上层的菌体细胞,由于这部分菌体在整个体系中油脂含量最高,随着离心转速的不断提高,筛选获得的突变菌株油脂含量也不断提升,以此获得了高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28。离心机达到最大转速后,向发酵液加入无菌水可降低体系的粘度与密度以增大筛选强度,不断增加无菌水的添加比例极尽筛选强度,最终获得了油脂产量进一步提升的高产菌株 *T. cutaneum* WL97。超离心筛选方法以简便的操作实现了油脂酵母的高效、高通量筛选,为工业化油脂生产提供了优良菌株,具有广阔的推广价值。

培养过程中发现,高产油脂酵母菌株相对于原始菌株发生了突出变化。高产油脂酵母菌株油脂产量与细胞含油率均大幅提升。同时,高产油脂酵母菌株在木质纤维素来源各种单糖(葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖与甘露糖)中的生长与糖利用能力更强。此外,利用透射电子显微镜(TEM)观察发现,高产油脂酵母菌株细胞壁明显变薄、细胞体积增大。对高产油脂酵母菌株与原始菌株的差异进行分子生物学机制解析有利于深入了解超离心筛选机制产生的影响,探究高产油脂酵母菌株相对于原始菌株产油性能增强的关键因素,为超离心筛选方法在其他微生物筛选中的应用提供理论基础。

本研究利用 q-RT-PCR 方法,比较高产油脂酵母菌株相对于原始菌株变化相关机制中关键基因表达水平的差异。考察油脂合成相关过程时,主要关注油脂合成所需前体物质乙酰-CoA 与 NADPH 以及中间产物脂肪酸、甘油三酯合成相关基因的表达。测定高产油脂酵母菌株与原始菌株细胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量,验证 q-RT-PCR 的实验结果。考察木质纤维素全糖代谢相关过程时,将 *T. cutaneum* 各菌株在以各种木质纤维素来源单糖(葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖与甘露糖)为唯一碳源的发酵培养基中培养,考察糖酵解与各单糖代谢相关基因表达水平的差异。考察细胞壁的变化时,主要关注细胞壁葡聚糖、几丁质与甘露聚糖合成与分解相关基因的表达。同时,测定高产油脂

酵母菌株与原始菌株的细胞壁组分，定量表示细胞壁各成分的含量变化。

由于 *T. cutaneum* 中缺乏进行分子操作的基本元件，无法对 q-RT-PCR 研究中差异表达显著的基因进行功能验证，构建 *T. cutaneum* 遗传操作系统成为必需的前提条件。同时，利用遗传操作系统定向改造高产油脂酵母菌株可将其积累的丰富油脂转化为其他高附加值化学品，进一步增加其工业化应用价值。本研究首先选择 *T. cutaneum* 适用的筛选标记，构建 *T. cutaneum* 单拷贝整合型质粒。利用电转化的方法将质粒转化入 *T. cutaneum* 并筛选成功将目的基因整合至 *T. cutaneum* 基因组的工程菌株。以工程菌株为研究对象，继续表达绿色荧光蛋白基因 *GFP*，验证以上方法对于表达其他基因的适用性。最后，为增强工程菌株的遗传稳定性对构建过程出现的问题进行优化与完善。

第 2 章 超离心筛选皮状丝孢酵母油脂积累的分子生物学机制解析

2.1 引言

皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 是一类典型的油脂酵母, 具有优异的油脂生产能力。同时皮状丝孢酵母可以耐受多种木质纤维素来源的抑制物, 很好地适应木质纤维素体系, 因而具备利用木质纤维素原料进行微生物油脂生产的潜力。在木质纤维素水解液中对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行长期适应性进化, 发酵结束后离心菌体, 绝大多数菌体在离心力的作用下沉至离心管底部, 而少量菌体由于其胞内油脂积累更多, 细胞密度更小, 在相同的离心条件下可浮于发酵液上层。将上层菌体转接继续培养, 待菌体生长稳定后提高离心转速进行离心, 可使油脂积累更多的菌体浮于发酵液上层, 得到适应性进化过程中油脂生产能力增强的高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28。随后继续对 *T. cutaneum* MS28 进行离心筛选, 达到离心机最高转速后, 为进一步增大筛选压力, 向发酵液添加一定比例无菌水以降低发酵液的粘度与密度, 从而将体系中密度更小的菌体筛选出来, 最终得到不经离心仍可漂浮于发酵液上层的高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* WL97, 其油脂产量进一步提高。

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素三部分组成。纤维素是由葡萄糖组成的同聚糖, 半纤维素是由己糖 (葡萄糖、半乳糖和甘露糖) 和戊糖 (木糖和阿拉伯糖) 组成的异聚糖。木质纤维素水解液中含有大量分解得到的单糖, 主要包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖, 微生物通常只具备葡萄糖利用能力而无法利用水解液中其他单糖, 这在降低水解液利用率的同时限制了目的产物产量的进一步提升。研究发现, *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素水解液中所有单糖均有一定利用能力, 超离心筛选得到的两株高产油脂酵母菌株对各种单糖的利用能力较原始菌株均有所提高。

观察高产油脂酵母菌株与原始菌株的细胞形态时发现, 高产油脂酵母菌株在油脂快速积累时期 (24 h 左右) 菌体细胞显著变大且发生一定程度伸长。随后菌体细胞逐渐缩短, 发酵结束时 (72 h 左右) 菌体细胞基本缩短至与原始菌株近似, 但细胞体积仍明显大于原始菌株。油脂作为一种可占细胞干重 20%-70% 的胞内产物, 它的积累与细胞形态密切相关。更大的细胞意味着胞内更大的细胞器以及代谢过程更多的相关核酸与蛋白。同时, 更大的菌体细胞可为油脂生产提供更大空间, 为油脂的进一步积累创造条件。本研究利用分子生物学手段对 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS28、*T. cutaneum* WL97 进行分析, 深入地认识 *T. cutaneum* 油脂积累机制、木质纤维素全糖利用机制, 探究高产油脂酵母菌株相对于原始菌株油脂生产能力大幅增强的分子生物学机制以及细胞形态与油脂合成间的可能联系。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌种与培养基

T. cutaneum 原始菌株: *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271, 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心。

T. cutaneum 高产油脂酵母菌株: *Trichosporon cutaneum* MS28, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 编号为 CGMCC 14780。 *Trichosporon cutaneum* WL97, 来自本实验室侯伟亮同学的筛选工作。

种子培养基为 YPD 培养基, 培养基成分为 Glucose 20 g/L、Peptone 20 g/L、YE 10 g/L。

发酵培养基为合成培养基, 培养基成分为 Glucose 60 g/L、YE 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.22 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。发酵所用摇瓶置于 30 °C 下转速为 180 rpm 的摇床中培养。

木质纤维素全糖利用发酵实验中, 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖分别作为唯一碳源, 含量均为 60 g/L, 其他成分与上述发酵培养基一致。

2.2.2 菌体干重与油脂含量测定

离心收集 25 mL 发酵液中的菌体, 去除上清液后加入 10 mL 超纯水重悬洗涤菌体, 离心再次收集菌体后将其重悬于 5 mL 超纯水中并放置于 60 °C 烘箱烘干至恒重。差重法计算菌体干重 (Dry Cell Weight, DCW)。

向烘干后的菌体加入 5 mL HCl 溶液 (4 M) 并浸泡 3 h。将菌体连同 HCl 溶液转移至 50 mL 离心管后水浴煮沸 10 min。将离心管置于冰中冷却 10 min, 加入 20 mL 氯仿-甲醇 (2:1, v/v) 溶液, 随后盖紧离心管盖并用封口膜密封。将离心管置于 30 °C、180 rpm 转速的摇床中进行 1 h 油脂萃取。在 10000 rpm 转速条件下离心 5 min, 被萃取入氯仿层的油脂沉至离心管底, 利用注射器吸取下层氯仿于干重已知的旋蒸瓶中。60 °C 条件下旋转蒸发绝大部分氯仿, 随后将旋蒸瓶置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重, 差重法计算菌体油脂含量。

2.2.3 实时荧光定量 PCR (q-RT-PCR) 实验

培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS28 以及 *T. cutaneum* WL97 种子液。将种子液以 10% 接种量接种至合成培养基中, 分别于接种后 24 h、48 h、72 h 收集菌体, 液氮速冻后将菌体保存于 -80 °C 冰箱中。以上菌体均设置 3 个生物学重复。利用液氮对菌体进行研磨, 使用 RNAiso Plus (Toyobo Co., LTD. Osaka Japan) 试剂提取 RNA 并利用分光光度计 DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 检测其质量与浓度。将质量良好、浓度适宜的 RNA 利用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 反转录试剂盒 (Toyobo Co., LTD. Osaka Japan) 合成 cDNA 并作为后续 q-RT-PCR 实验的模板。q-RT-PCR 实验以 SYBR Green (Toyobo Co., LTD. Osaka Japan) 为染料, 利用 CFX96TM

Real-Time System C10000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 仪器进行反应, 反应条件为: 95 °C 预变性 60 s, 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次后进行熔解曲线分析, 温度每 5 s 升高 0.5 °C, 由 65 °C 升至 95 °C 结束。所选内参基因为 β -actin 基因, 所用引物均经 Primer Premier 5.0 软件设计完成, 引物序列信息见附录 I。

2.2.4 胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量测定

培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS28 以及 *T. cutaneum* WL97 种子液。将种子液以 10% 接种量接种至合成培养基中, 分别于接种后 24 h、48 h、72 h 收集菌体并用液氮快速冷冻保存。样品送至苏州科铭生物技术有限公司进行菌体胞内乙酰-CoA 与 NADPH 的含量测定。

乙酰-CoA 含量测定原理: 苹果酸脱氢酶可催化苹果酸与 NAD 的反应, 生成的草酰乙酸与 NADH 可在柠檬酸合酶的作用下进一步生成柠檬酸与 CoA。苹果酸脱氢酶与柠檬酸合酶的偶联反应下, 乙酰-CoA 含量与 NADH 的生成速率成正比, 340 nm 下吸光值的上升速率可反应乙酰-CoA 含量的高低。按照细胞密度计算样品菌株胞内乙酰-CoA 的含量。

NADPH 含量测定原理: NADPH 可使黄橙色氧化型噻唑蓝 (MTT) 还原为蓝紫色甲瓚。570 nm 下检测反应后的吸光值可测定 NADPH 含量, 同样按照细胞密度计算样品菌株胞内 NADPH 含量。

2.2.5 高效液相色谱 (HPLC) 分析

利用高效液相色谱 (HPLC) 测定培养基中葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖与甘露糖的含量。HPLC 色谱柱为 HPX-87P column (Bio-rad, Hercules, CA, USA), 柱温为 80 °C。以流速为 0.6 mL/min 的无菌超纯水作为流动相, 样品进样量为 20 μ L。

2.2.6 透射电子显微镜 (TEM) 观察

培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS28 以及 *T. cutaneum* WL97 种子液。将种子液以 10% 接种量接种至合成培养基中, 分别于接种后 24 h、72 h 离心收集菌体。将菌体重悬于戊二醛溶液并于 4 °C 冰箱静置 2 h, 离心回收菌体, 将菌体再次重悬于新鲜戊二醛溶液并于 4 °C 冰箱静置过夜。将戊二醛固定后的菌体样品送至上海师范大学电镜室进行切片并利用透射电子显微镜 JZM-2100 (Jeol Co., LTD, Japan) 进行观察。

2.2.7 细胞壁组分测定

葡聚糖与甘露聚糖含量测定方法: 培养 *T. cutaneum* ACCC 20271、*T. cutaneum* MS28 以及 *T. cutaneum* WL97 种子液。将种子液以 10% 接种量接种至合成培养基中, 培养 24 h 后回收菌体。将菌体放置 -80 °C 冰箱中预冻过夜。将预冻后的菌体置于冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h。称取 100 mg 冷冻干燥后的菌体于具塞试管中, 加入 1 mL 4% 硫酸溶液并用玻璃棒搅拌菌体 1h, 整个搅拌过程于 30 °C 水浴中进行。随后, 加入 28 mL 去离子水, 将具塞试管置于高压灭菌锅中 121 °C 处理 1 h。利用 CaCO_3 中和上清液, 过滤溶液

后利用高效液相色谱测定溶液中葡萄糖、甘露糖的含量并换算得到细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖含量。换算系数为 0.9^[59]。

几丁质含量测定方法：称取 50 mg 冷冻干燥后的菌体，加入 10 mL 6 M HCl 溶液浸泡，将菌液在 105 °C 下酸解 17 h。50 °C 条件下对混合液进行旋转蒸发，随后加入 5 mL 无菌水充分溶解。取 0.5 mL 样品与 0.5 mL Solution A (1.5 M Na₂CO₃ 溶于 40 g/L 乙酰丙酮) 混合后煮沸 20 min。继续添加 3.5 mL 乙醇溶液与 0.5 mL Solution B (1.6 g 对甲基氨基甲醛溶于 30 mL 饱和盐酸及 30 mL 乙醇溶液) 室温放置 1h，利用分光光度计在 520 nm 波长下进行检测。以 N-乙酰葡萄糖胺作为标准品绘制标准曲线并计算几丁质含量^[60]。

2.3 结果与讨论

2.3.1 *T. cutaneum* 合成培养基油脂发酵

在合成培养基中培养 *T. cutaneum* ACCC 20271 原始菌株与超离心筛选得到的高产油脂菌株 *T. cutaneum* MS28 与 *T. cutaneum* WL97，发酵过程中每间隔 24 h 取一定量样品测定菌液 OD₆₀₀ 值与培养基中剩余葡萄糖含量，比较三种菌株的生长与糖利用情况。按照 2.2.2 中的方法测定菌体细胞含油率，比较三种菌株的产油能力。测定结果绘制成图 2.1、图 2.2 如下：

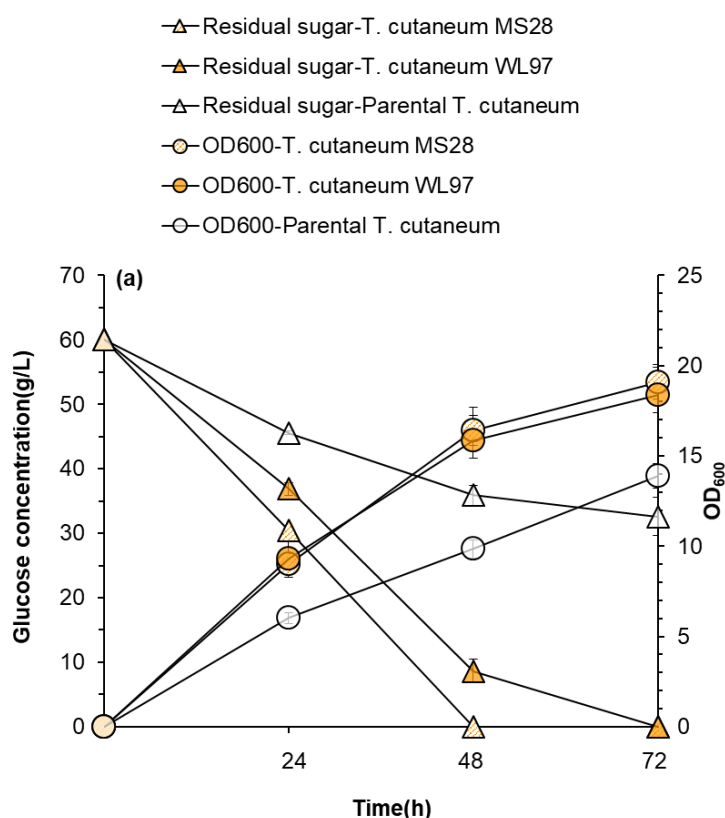


图 2.1 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株油脂发酵过程中生长与糖消耗情况

Fig. 2.1 Growth and sugar utilization of parental *T. cutaneum* and two mutants during lipid fermentation

发酵条件：利用合成培养基在 500 mL 摇瓶中进行发酵。摇瓶装液量为 10%，摇瓶置于 30 °C 下转速为 180 rpm 的摇床中培养。

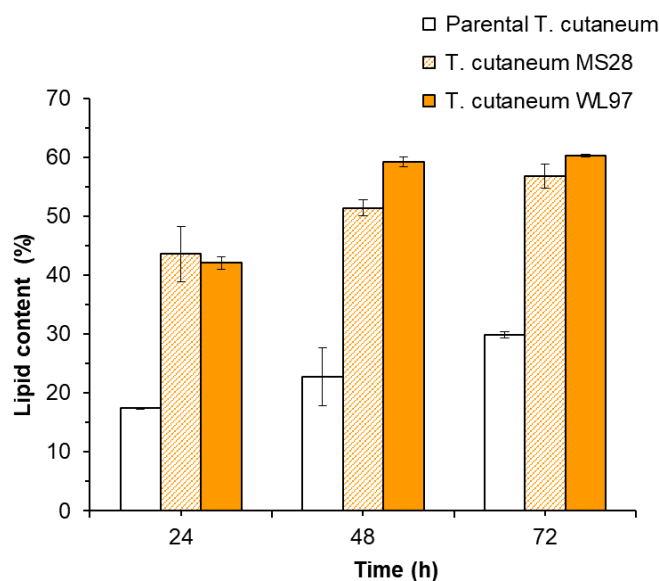


图 2.2 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株油脂发酵过程中油脂积累情况

Fig. 2.2 Lipid accumulation of parental *T. cutaneum* and two mutants during lipid fermentation

发酵条件：利用合成培养基在 500 mL 摇瓶中进行发酵。摇瓶装液量为 10%，摇瓶置于 30 °C 下转速为 180 rpm 的摇床中培养。

由发酵结果可知, *T. cutaneum* 油脂合成主要分为几个阶段, 在发酵的前 24 h 左右油脂快速积累, 发酵 48 h 后油脂积累速度减缓直至 72 h 发酵结束。两株高产油脂酵母菌株在整个油脂合成过程中生长状况较为接近且均远远优于原始菌株, 同时高产油脂酵母菌株细胞内积累的油脂相对于原始菌株大幅提高。其中, *T. cutaneum* MS28 利用糖的速率最快, 在 48 h 左右已消耗完培养基中所有葡萄糖。*T. cutaneum* WL97 虽然糖利用速率稍慢, 但在整个油脂发酵过程中菌液的 OD₆₀₀ 值更低, 因此菌体细胞含油率更高。猜测这是由于 *T. cutaneum* WL97 相对于 *T. cutaneum* MS28 将更多的碳源用于油脂积累而非菌体生长。*T. cutaneum* WL97 是在 *T. cutaneum* MS28 基础上继续筛选得到的, 能够更多地将碳源用于油脂生产可能是其油脂积累的优势所在。

2.3.2 *T. cutaneum* 油脂合成相关基因转录水平分析

高产油脂酵母菌株的油脂生产能力较原始菌株大幅提升, 研究希望深入考察三种菌株细胞油脂积累的分子生物学机制, 探究高产菌株油脂产量提高的可能原因。油脂酵母在 NADPH 持续供给还原力的条件下, 以乙酰-CoA 为前体物质逐步合成中间产物脂肪酸, 并最终与 3-磷酸甘油结合生成甘油三酯储存在胞内的油脂小体中。因此, 乙酰-CoA、NADPH、脂肪酸以及甘油三酯合成过程关键酶的作用均可对胞内的油脂积累产生重要影响。根据其他油脂酵母中油脂合成的代谢路径, 推测并绘制 *T. cutaneum* 油脂合成代谢路径如下图 2.3^[64]。研究选取油脂合成各个阶段 (24 h、48 h、72 h) 的菌体为样品, 利用 2.2.3 中实时荧光定量 PCR (q-RTRCR) 方法对油脂合成过程关键酶的基因进行分析, 考察 *T. cutaneum* MS28 与 *T. cutaneum* WL97 相较原始菌株相关基因转录水平的差异。

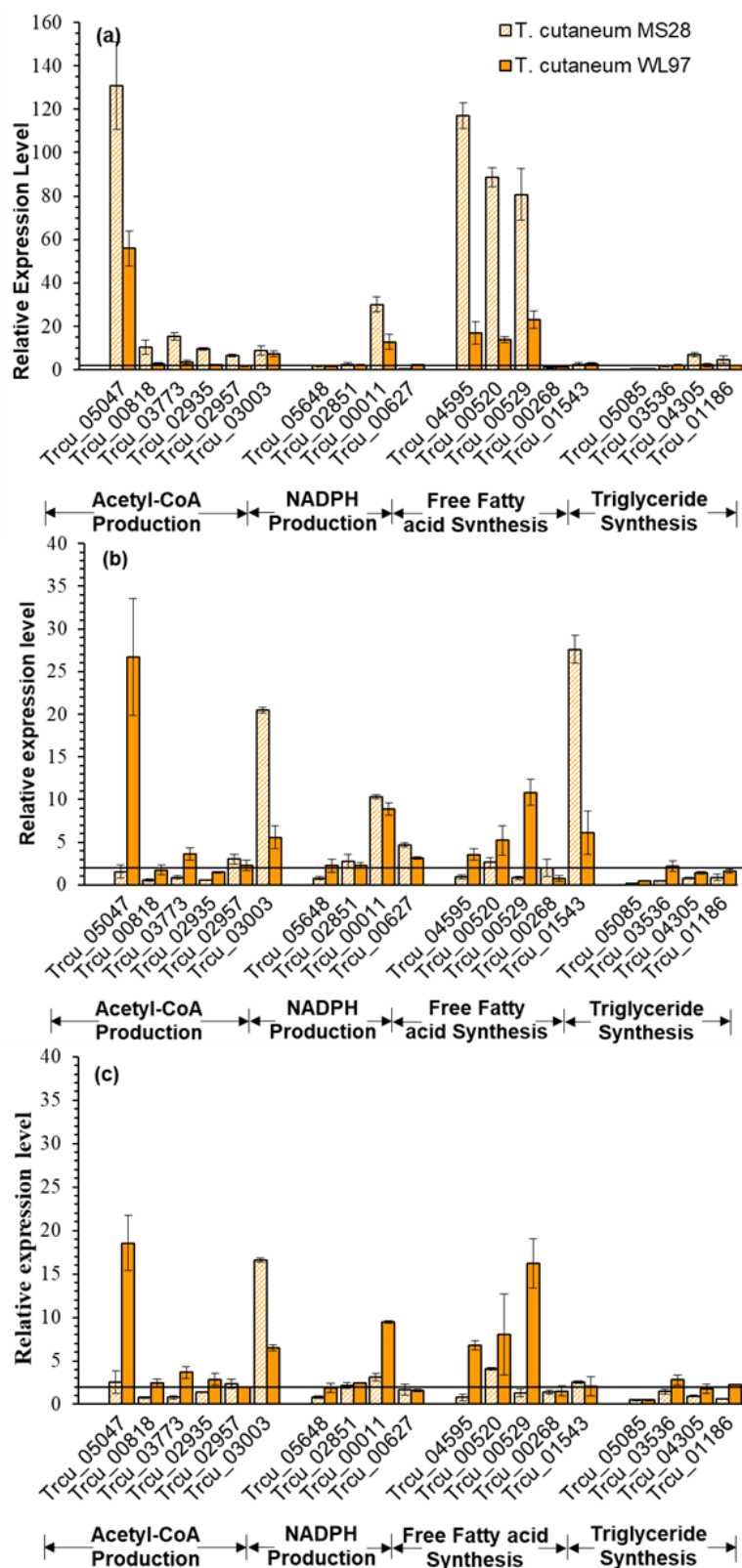


图 2.4 油脂合成不同阶段 (a, 24 h; b, 48 h; c, 72 h) 油脂合成相关基因 q-RT-PCR 实验结果

Fig. 2.4 Transcriptional analysis of genes related to lipid biosynthesis during lipid production (a, 24 h; b, 48 h; c, 72 h)

图 2.4-a 中 q-RTPCR 实验结果表明, 在油脂快速积累过程 (24 h) 中, *T. cutaneum* MS28、*T. cutaneum* WL97 与油脂合成相关的部分基因相较原始菌株发生了非常显著 (≥ 2 倍, 图中以黑线基准) 的上调表达差异, 两株高产油脂酵母菌株发生显著上调表达的基因以及发生上调表达的程度稍有不同。此时, *T. cutaneum* MS28 发生显著上调表达的水平高于 *T. cutaneum* WL97, 部分基因发生了几十倍甚至上百倍的上调表达水平差异。

与乙酰-CoA 合成相关的基因中, *Trcu_05047*、*Trcu_03003* 发生上调表达差异的程度最大。*Trcu_05047* 编码的 ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, *ACL*) 可将细胞质内的柠檬酸裂解为乙酰-CoA 和草酰乙酸。该过程被认为是油脂酵母胞内乙酰-CoA 合成的最重要途径。Dulermo 等人证实, 在解脂耶氏酵母中抑制 *ACL* 活性可降低 60%-80% 的油脂产量^[65]。*Trcu_03003* 编码的乙酰-CoA 合成酶 (Acetyl-CoA synthase, *ACS*) 催化细胞质中的乙酸生成乙酰-CoA, 这一过程是酿酒酵母等传统酵母生产乙酰-CoA 的主要方式, 鲜少在油脂酵母中存在。Koivuranta 等人通过在油脂丝孢酵母中表达外源丙酮酸脱羧酶 (Pyruvate decarboxylase, *PDC*)、乙醛脱氢酶 (Acetaldehyde dehydrogenase, *ALD*) 以及乙酰-CoA 合成酶 (Acetyl-CoA synthase, *ACS*) 构建这一路径, 成功提高了工程菌株的油脂产量^[66]。实验结果表明, 在两高产油脂酵母菌株中, 除了油脂酵母生产乙酰-CoA 常用的 *ACL* 路径得以加强外, 其它油脂酵母通常不具备的乙酰-CoA 合成路径也十分活跃。两个过程共同促进了高产油脂酵母菌株乙酰-CoA 的生产, 使其油脂合成的前体物质供应更为充足。

与 NADPH 合成相关的基因中, 编码细胞质苹果酸酶 (Malic enzyme, *ME*) 的基因 *Trcu_00011* 相对于原始菌株上调表达差异非常显著, 在 *T. cutaneum* MS28 中上调表达 30 倍左右, 在 *T. cutaneum* WL97 中上调表达 12 倍左右。而戊糖磷酸途径以及三羧酸循环过程中的相关基因在三种菌株中表达水平较低且差异不大。这一结果说明, *T. cutaneum* 油脂合成所需要的还原力可能主要是通过 *ME* 的催化作用供给的, 该结果与 Zhijie Liu 等人的研究结果一致^[67]。高产油脂酵母菌株 NADPH 合成能力的增强有利于其协同乙酰-CoA 促进油脂生产。

与脂肪酸合成相关的基因 *Trcu_04595*、*Trcu_00520*、*Trcu_00529* 上调表达差异程度均十分显著。它们分别编码脂肪酸合成代谢路径的几个关键酶, 包括乙酰-CoA 脱羧酶 (Acetyl-CoA decarboxylase, *ACCI*) 以及脂肪酸合酶 (Fatty acid synthase, *FAS*) 的两个亚基 (*FAS1* 与 *FAS2*)。*ACCI* 催化乙酰-CoA 产生丙二酰-CoA, 这一过程是脂肪酸合成的起始步骤。*FAS* 是一种功能复杂的酶复合体, 丙二酰-CoA 在 *FAS* 的作用下进行脂肪酸碳链的延长。研究结果说明高产油脂酵母菌株相较原始菌株脂肪酸合成能力得以加强。然而, 研究结果同时显示, 与甘油三酯合成相关的基因在三种菌株中的表达水平差异不大, 猜测甘油三酯的合成可能不是导致高产油脂酵母菌株油脂生产能力大幅提高的主要因素。

此外, 油脂积累中后期 (48 h、72 h) 油脂合成相关基因的转录水平显著下降, 但与原始菌株相比仍显示出明显的表达差异 (图 2.4-b、图 2.4-c)。其中编码 ATP-柠檬酸裂解酶 (*ACL*) 的基因 *Trcu_05047*、编码乙酰-CoA 合成酶 (*ACS*) 的基因 *Trcu_03003*、编码苹

果酸酶 (*ME*) 的基因 *Trcu_00011* 以及编码脂肪酸合酶两个亚基 (*FAS1* 与 *FAS2*) 的基因 *Trcu_00520*、*Trcu_00529* 上调表达超过 5 倍。此外, 在油脂快速积累的 24 h, *T. cutaneum* MS28 油脂合成相关基因相对于原始菌株上调表达差异程度比 *T. cutaneum* WL97 更为显著, 油脂积累中后期 (48 h、72 h) 二者相关基因上调表达程度趋近。结合发酵结果可知, *T. cutaneum* MS28 相较 *T. cutaneum* WL97 葡萄糖消耗速率更快, 因此发酵 24 h 时 *T. cutaneum* MS28 油脂积累速度更快, 油脂合成相关基因的表达也更为活跃。发酵中后期, *T. cutaneum* WL97 油脂积累速度加快, 此时油脂合成相关基因的表达水平与 *T. cutaneum* MS28 接近。同时, 由于整个发酵过程中 *T. cutaneum* WL97 的 OD₆₀₀ 值都较低, 因此发酵后期其菌体细胞的含油率更高。

2.3.3 *T. cutaneum* 胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量变化

在合成培养基中培养 *T. cutaneum* 原始菌株与两株高产油脂酵母菌株, 分别于发酵的 24 h、48 h、72 h 收集菌体, 按照 2.2.4 中方法测定菌体细胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量, 比较油脂合成不同阶段, 高产油脂酵母菌株相对于原始菌株油脂合成所需两个重要前体物质含量的差异。

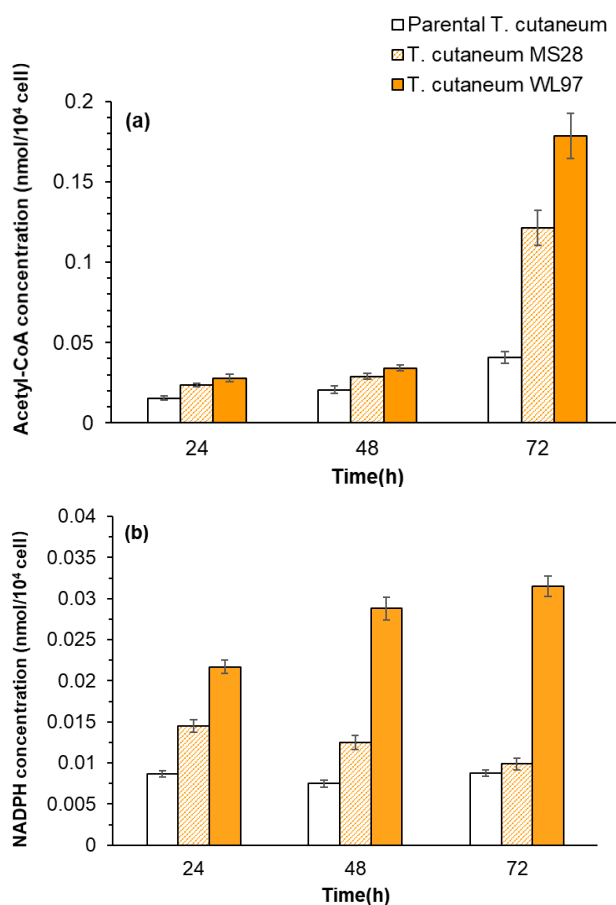


图 2.5 油脂合成不同阶段 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株胞内乙酰-CoA、NADPH 含量
Fig. 2.5 Intracellular Acetyl-CoA (a) and NADPH (b) concentration in parental *T. cutaneum* and two mutants during lipid biosynthesis

图 2.5 中测定结果显示, 在油脂合成的各个阶段, 两株高产油脂酵母菌株胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量较原始菌株均有所提高, *T. cutaneum* WL97 相对于 *T. cutaneum* MS28 胞内两物质的含量更高。其中 *T. cutaneum* WL97 胞内 NADPH 含量相对于 *T. cutaneum* MS28 有较高的提升, 这可能也是 *T. cutaneum* WL97 油脂产量更高的原因之一。然而, 油脂合成前、中期, 两株高产油脂菌株胞内乙酰-CoA 含量较原始菌株提高幅度较小, 直至油脂合成后期胞内乙酰-CoA 含量才相对于原始菌株显著提高。猜测可能的原因是, 发酵前、中期三种菌株将生产的乙酰-CoA 快速用于油脂合成, 而未能使其积累。发酵后期油脂合成速率减缓, 过剩的乙酰-CoA 累积下来, 乙酰-CoA 合成能力更强的两株高产菌株累积的乙酰-CoA 也更多。高产油脂酵母菌株胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量的提高可与 q-RTPCR 结果相对应, 研究表明乙酰-CoA 与 NADPH 合成相关基因表达水平的提高增强了胞内乙酰-CoA 与 NADPH 的供应, 促进了两株高产油脂菌株油脂产量的提升。

2.3.4 *T. cutaneum* 木质纤维素全糖利用能力验证

木质纤维素原料结构致密, 具有很强的生物拮抗性, 无法被微生物直接利用。预处理、生物脱毒、酶水解等过程可将木质纤维素原料的主要成分纤维素与半纤维素水解为能够被微生物利用的单糖。纤维素是由葡萄糖构成的一种同聚多糖, 半纤维素是由己糖(葡萄糖、半乳糖和甘露糖)与戊糖(木糖和阿拉伯糖)构成的异聚糖, 其中木聚糖、阿拉伯聚糖、半乳聚糖和甘露聚糖分别占总碳水化合物的 34.1%、5.1%、2.7%和 0.5%^[68]。绝大多数酵母可通过糖酵解途径将葡萄糖彻底分解利用, 但仅有少数酵母可以利用木糖等其他单糖, 无法有效利用全部单糖降低了木质纤维素水解液的利用率并限制了产物更高指标的生产。先前的研究发现, *T. cutaneum* ACCC 20271 可利用木质纤维素水解液中所有主要的单糖(葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖与甘露糖), 两株高产油脂酵母菌株对各种单糖利用的速率更快。本研究首先在以每种单糖为唯一碳源的合成培养基中对这一现象进行验证, 发酵过程每间隔 24 h 取一定量样品测定菌液 OD₆₀₀ 值与培养基中剩余单糖含量, 比较 *T. cutaneum* 原始菌株与两株高产油脂酵母菌株对不同单糖利用能力的差异。

图 2.6 中发酵结果表明, *T. cutaneum* 原始菌株与两株高产油脂酵母菌株对木质纤维素来源所有单糖均有一定利用能力, 能够在以各单糖为唯一碳源的环境中正常生长并进行油脂发酵。其中, 两株高产油脂酵母菌株对各单糖的利用速率更快, 在各单糖中生长状况更佳。同种菌株在不同单糖中的生长与糖消耗情况差异较小, 三种菌株对葡萄糖与甘露糖的利用速率相对均最快, 其中 *T. cutaneum* MS28 在 48 h 以内已经可以将两种单糖全部利用。发酵 72 h 内, 原始菌株可消耗 50 g/L 左右各单糖, 两株高产油脂酵母菌株可将所有单糖利用完全。研究证实了 *T. cutaneum* 木质纤维素全糖利用能力, 显示了 *T. cutaneum* 利用木质纤维素原料进行油脂生产的优越性。

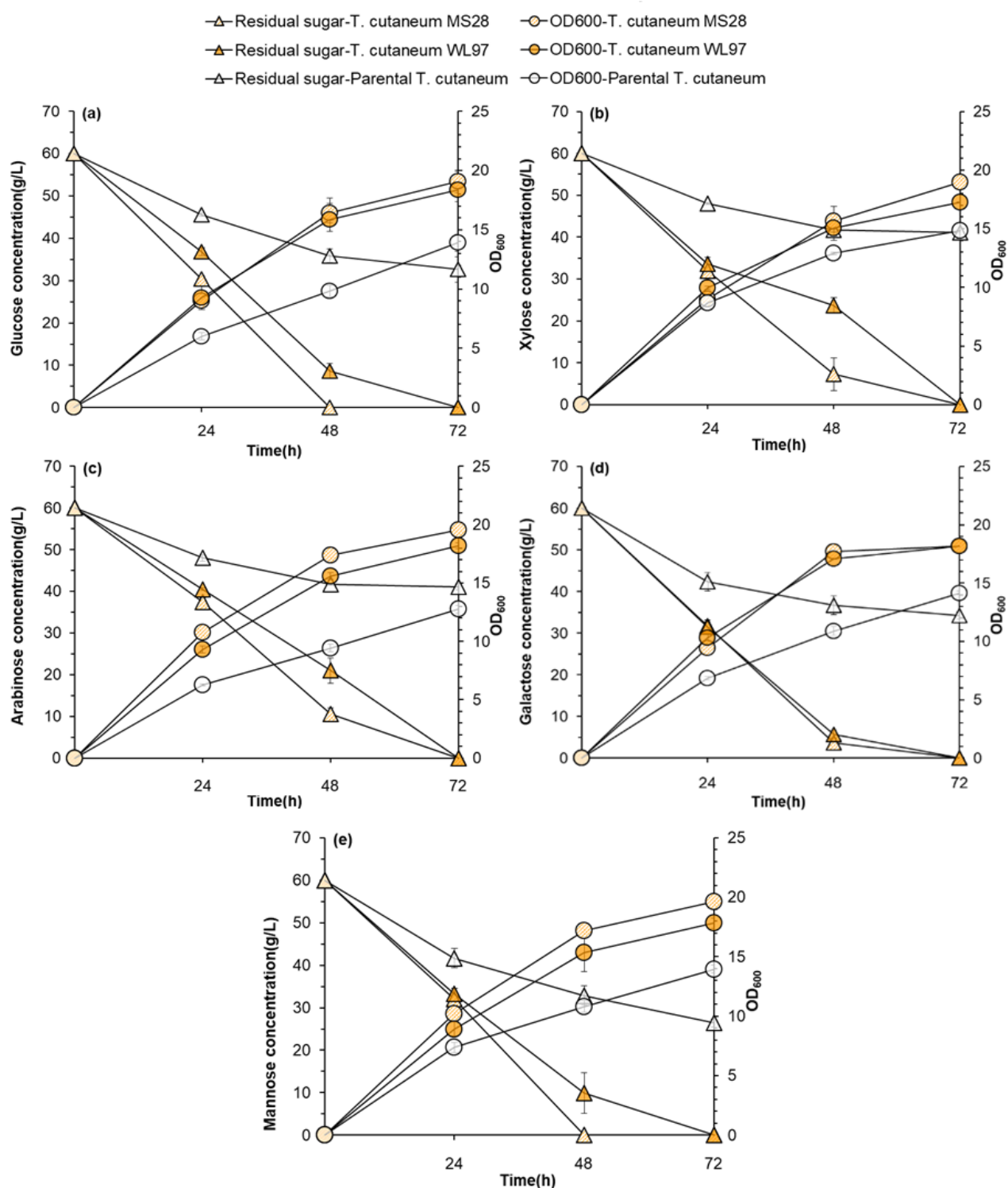


图 2.6 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株在不同单糖 (a,葡萄糖; b,木糖; c,阿拉伯糖; d,半乳糖; e,甘露糖) 为唯一碳源的合成培养基中生长与糖消耗情况

Fig 2.6 The growth and sugar utilization of parental *T. cutaneum* and two mutants using different lignocellulosic sugars (a, glucose; b, xylose; c, arabinose; d, galactose; e, mannose) as sore carbon source in synthetic medium.

发酵条件: 利用不同单糖为唯一碳源的合成培养基, 在 500 mL 摇瓶中进行发酵。摇瓶装液量为 10%, 摇瓶置于 30 °C 下转速为 180 rpm 的摇床中培养。

2.3.5 *T. cutaneum* 木质纤维素全糖代谢相关基因转录水平分析

2.3.4 中研究证实 *T. cutaneum* 具有木质纤维素全糖利用能力，葡萄糖主要通过糖酵解途径进行分解利用，猜测 *T. cutaneum* 中还具有其他各单糖的分解代谢路径。根据其酵母中糖酵解途径以及木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖的分解代谢路径，绘制 *T. cutaneum* 相关代谢路径如图 2.7。

考察糖酵解途径与各单糖代谢过程中相关基因是否如猜测发挥作用，探究两高产油脂酵母菌株全糖利用能力增强可能的分子生物学机制。在以葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖以及甘露糖为唯一碳源的合成培养基中培养 *T. cutaneum* 原始菌株与两高产油脂酵母菌株，发酵 24 h 后收集菌体，以原始菌株为对照组设计 q-RTPCR 实验，考察相关基因表达水平的差异。

通过图 2.8 中 q-RTPCR 的研究结果可以发现，以不同单糖为唯一碳源的培养条件下，两高产油脂酵母菌株相对于原始菌株与糖酵解途径以及相应单糖分解代谢路径过程关键酶基因的转录水平发生了一定变化。在以葡萄糖为唯一碳源培养时，催化 6-磷酸葡萄糖生成 6-磷酸果糖的 6-磷酸葡萄糖异构酶（Glucose-6-phosphate isomerase, *GPI*）的基因 *Trcu_04167* 以及进一步催化 6-磷酸果糖生成 1,6-二磷酸果糖的磷酸甘油激酶（Phosphoglycerate kinase, *PGK*）的基因 *Trcu_05335* 发生显著上调表达差异。在以木糖为唯一碳源培养时，木糖被分解代谢进入戊糖磷酸途径，其中催化 5-磷酸木酮糖与 5-磷酸核糖生成 7-景天庚酮糖与 3-磷酸甘油醛的转酮醇酶（Transketolase, *TKT*）的基因 *Trcu_00933* 上调表达差异显著。在以阿拉伯糖为唯一碳源的培养条件下，催化阿拉伯糖醇向木酮糖转化的阿拉伯糖醇-4-脱氢酶（L-arabinitol 4-dehydrogenase, *LAD*）的基因 *Trcu_00476* 发生显著上调表达差异。在以半乳糖为唯一碳源培养下，半乳糖分解代谢路径中的半乳糖激酶（Galactokinase, *GALK*）的基因 *Trcu_01351*、尿苷二磷酸葡萄糖 4-表异构酶（UDP-glucose 4-epimerase, *GALE*）的基因 *Trcu_03126* 上调表达差异水平显著。

值得注意的是，糖酵解过程中 3-磷酸甘油醛脱氢酶（Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*）的基因 *Trcu_01680*、烯醇酶（Enolase, *ENO*）的基因 *Trcu_05201*，尤其是磷酸甘油酸变构酶（Phosphoglycerate mutase, *PGM*）的基因 *Trcu_02862*、*Trcu_03969* 在各种培养条件下普遍发生了显著上调表达差异，显示了糖酵解过程在高产油脂酵母菌株中的突出作用。研究结果表明，高产油脂酵母菌株相对于原始菌株对于木质纤维素全糖利用能力增强的主要原因可能是糖酵解过程以及各种单糖分解代谢路径中几个关键酶基因的活跃表达。糖利用能力的提升可以为油脂合成提供更多原料与能量，有利于高产油脂酵母菌株的油脂生产。

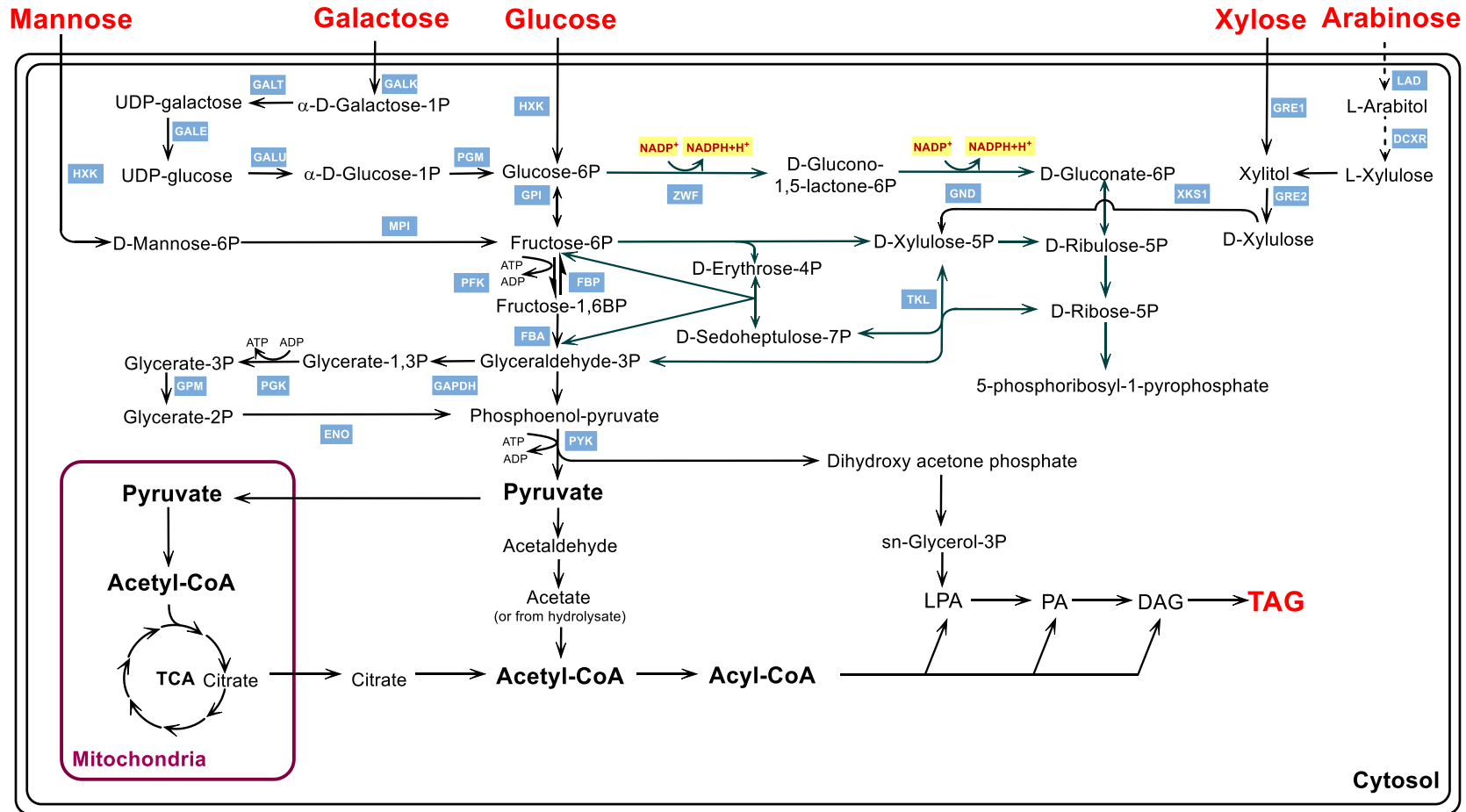


图 2.7 *T. cutaneum* 木质纤维素全糖代谢路径图

Fig. 2.7 Lignocellulosic sugars catabolic pathway map of *T. cutaneum*

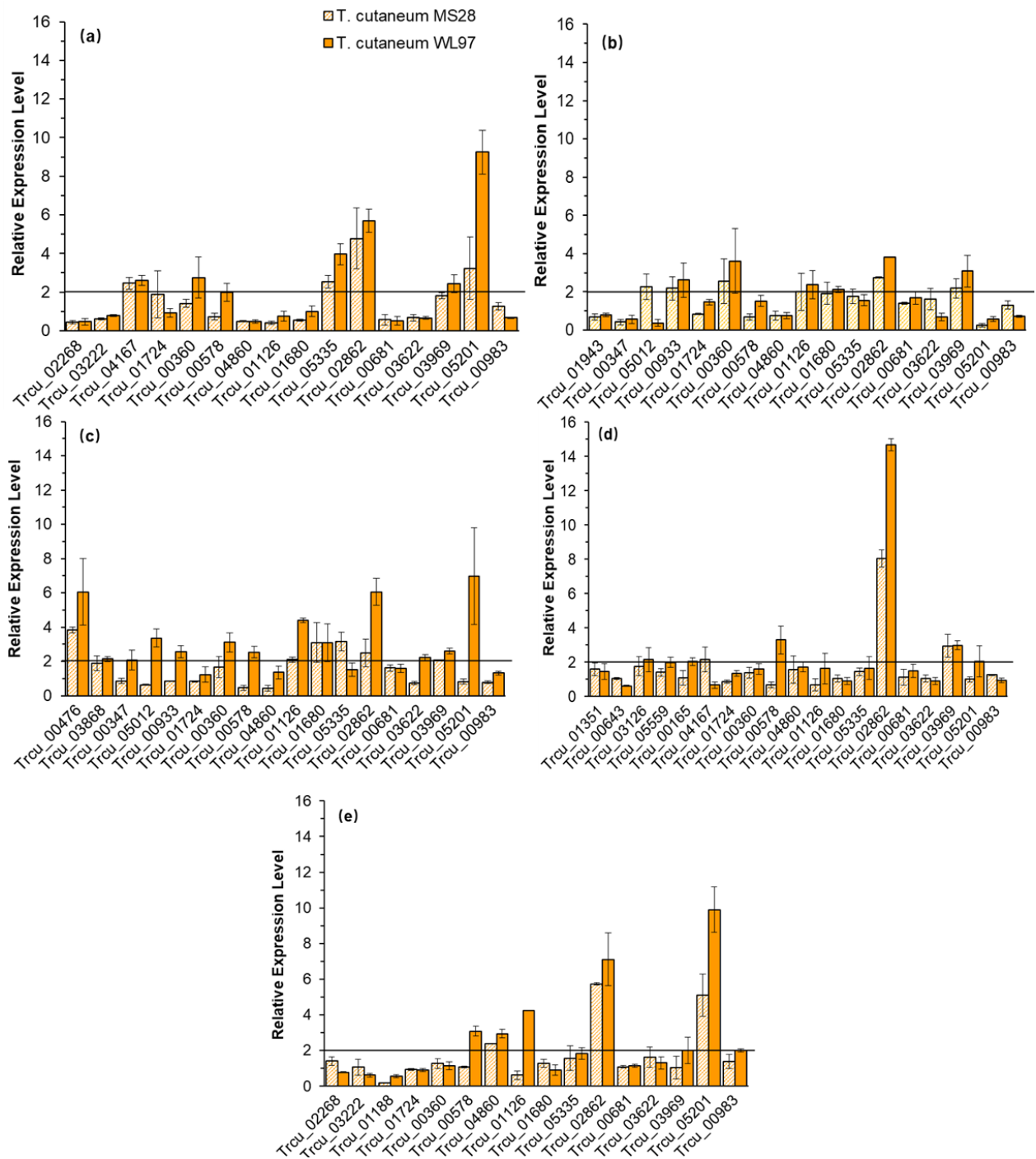


图 2.8 木质纤维素全糖代谢相关基因 q-RT-PCR 实验结果 (a,葡萄糖; b,木糖; c,阿拉伯糖; d,半乳糖; e,甘露糖)

Fig 2.8 Transcriptional analysis of the genes responsible for glycolysis and different lignocellulosic sugars (a, glucose; b, xylose; c, arabinose; d, galactose; e, mannose) degradation during lipid production

2.3.6 *T. cutaneum* 细胞壁合成与分解相关基因转录水平分析

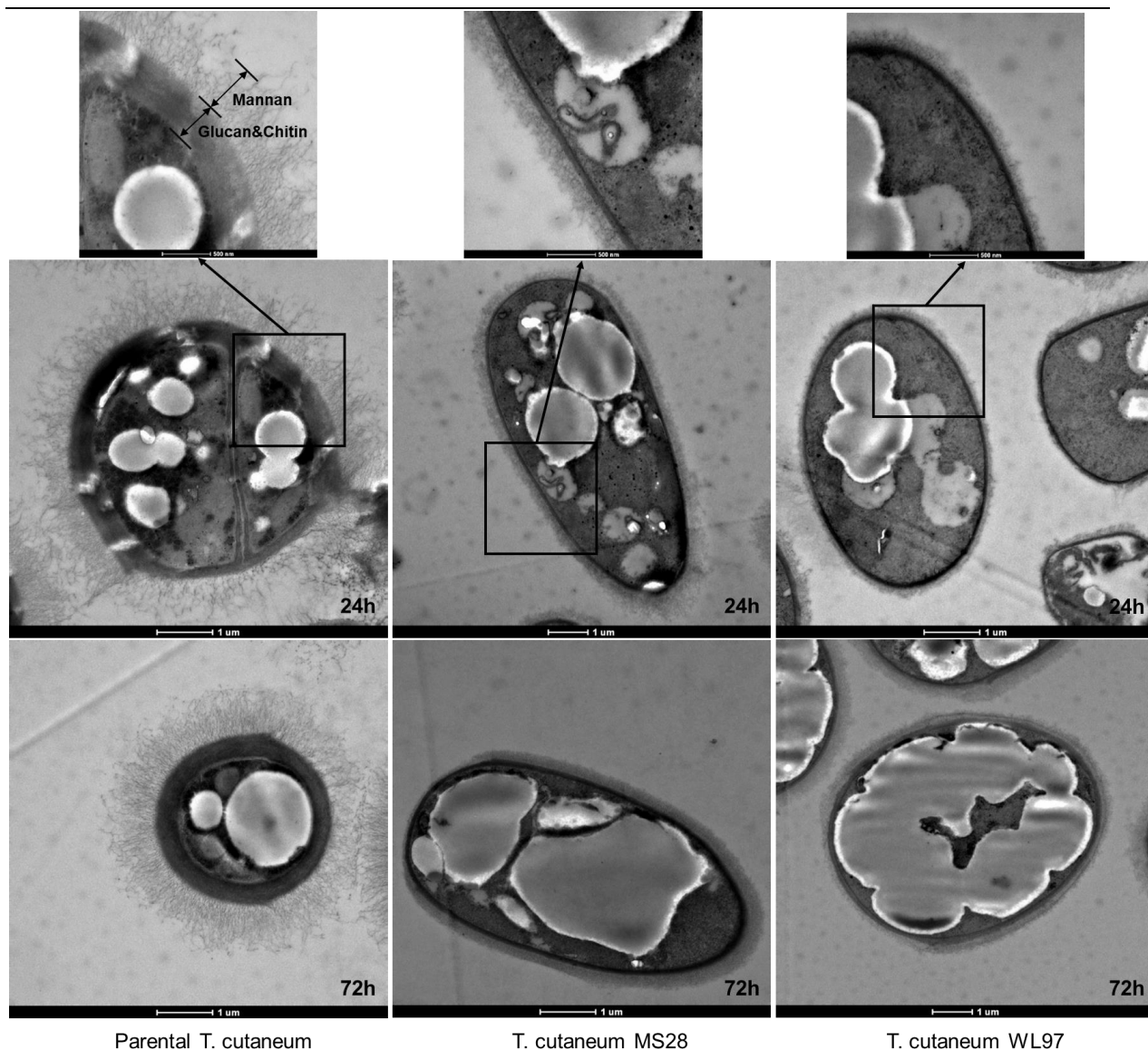
在培养 *T. cutaneum* 原始菌株与两株高产油脂酵母菌株的过程中发现，两高产油脂酵母菌株的菌体形态发生了异常突出的变化。高产油脂酵母菌株细胞出现了一定程度的伸长，细胞体积较原始菌株显著增大。据研究报道，体积更大的菌体胞内细胞器体积也

相应增大,胞内核酸、蛋白质含量更高,因而菌体细胞的代谢能力更强^[29]。此外,细胞体积可对胞内产物的积累造成一定限制,细胞体积更大的菌体可为更多胞内产物提供容纳空间。高产油脂酵母菌株油脂生产能力大幅增强是否与其细胞形态的突出变化有关,引起其细胞形态变化的原因可能有哪些。研究希望就此深入探究,首先在油脂快速积累时期(24 h)以及发酵终点(72 h)对三种菌株取样,利用透射电子显微镜(TEM)更为细致地观察细胞形态。

如 TEM 观察图 2.9 所示,油脂快速积累时期(24 h),原始菌株绝大多数细胞为近球状,而两高产油脂酵母菌株绝大多数细胞均发生一定程度伸长而变为椭球状,*T. cutaneum* MS28 相较于 *T. cutaneum* WL97 菌体细胞更长。油脂发酵结束时(72 h),原始菌株细胞仍保持近球状,而两高产油脂酵母菌株绝大多数细胞发生一定程度缩短,但细胞体积仍远大于原始菌株。同时,原始菌株与 *T. cutaneum* MS28 胞内的油脂小体均为分散、独立的个体,而 *T. cutaneum* WL97 胞内的油脂小体存在多个小的油脂小体聚集形成一个更大油脂小体的趋势,与其细胞含油率更高的特点相符。研究意外地发现,除了菌体形态,两株高产油脂酵母菌株的细胞壁相对于原始菌株也发生了突出变化,在整个油脂发酵过程中,两高产油脂酵母菌株细胞壁厚度均远远小于原始菌株。

酵母细胞壁是酵母细胞与外界环境的直接屏障,酵母细胞壁的变化可对酵母细胞环境适应力、菌体形态等方面产生重要影响。Zhang Xingchen 等人通过改造 *E. coli* 细胞壁强度增大菌体细胞体积,成功促进了其胞内聚羟基丁酸酯(PHB)的积累^[61]。*T. cutaneum* 两株高产油脂菌株细胞壁的变化可能是由于胞内油脂大量积累挤压细胞内腔造成的简单形变,也可能是菌体自身细胞壁代谢相关机制主动作用,通过改变细胞壁组成对菌体形态造成了影响。为了探明 *T. cutaneum* 细胞壁变化的分子生物学机制,研究选择 *T. cutaneum* 基因组中与细胞壁组分(葡聚糖、几丁质以及甘露聚糖)合成与分解相关的基因(主要包括相关合成酶基因、分解酶基因以及调控因子基因等)进行 q-RT-PCR 实验,考察两株高产油脂酵母菌株相对于原始菌株相关基因转录水平的差异。

图 2.10 中 q-RT-PCR 实验结果显示,*T. cutaneum* MS28、*T. cutaneum* WL97 相较原始菌株与葡聚糖、几丁质以及甘露聚糖合成与分解相关的基因中均有部分基因发生上调表达差异。其中,参与葡聚糖合成的基因 *Trcu_00780*、*Trcu_03972*,参与葡聚糖分解的 β -1,3-内切葡聚糖酶基因 *Trcu_02840*,参与几丁质合成的几丁质合成酶基因 *Trcu_02791* 参与几丁质分解的几丁质酶基因 *Trcu_02203*、*Trcu_04046* 上调表达差异十分显著(≥ 2 倍),而参与甘露聚糖合成与分解的基因上调表达差异并不突出。



Parental *T. cutaneum*

T. cutaneum MS28

T. cutaneum WL97

图 2.9 油脂发酵过程中 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株 TEM 观察图

Fig 2.9 TEM image of parental *T. cutaneum* and two mutants during lipid production.

研究表明，两高产油脂酵母菌株细胞壁各组分的代谢过程与原始菌株存在很大差异。随着油脂的快速积累，其所占据的胞内空间随之增大，此时能为油脂的积累提供更大储存空间的细胞将更有利于油脂的生产。酵母细胞壁葡聚糖与几丁质的含量决定了细胞壁强度与延伸性，进而影响着细胞的形态与体积。而甘露聚糖主要影响细胞壁渗透性与细胞壁孔隙大小，未有研究探明其对细胞形态的直接作用。结合 q-RT-PCR 的实验结果可以猜测，*T. cutaneum* MS28 与 *T. cutaneum* WL97 相较原始菌株更为卓越的油脂生产能力与其菌体形态的显著变化有关。在油脂积累过程中，两株高产油脂酵母菌株主要通过调节葡聚糖、几丁质合成与分解相关基因的表达使菌体细胞壁变薄、细胞体积增大，这为油脂的大量积累创造了条件，成为高产油脂酵母菌株油脂生产能力大幅提升的重要原因之一。

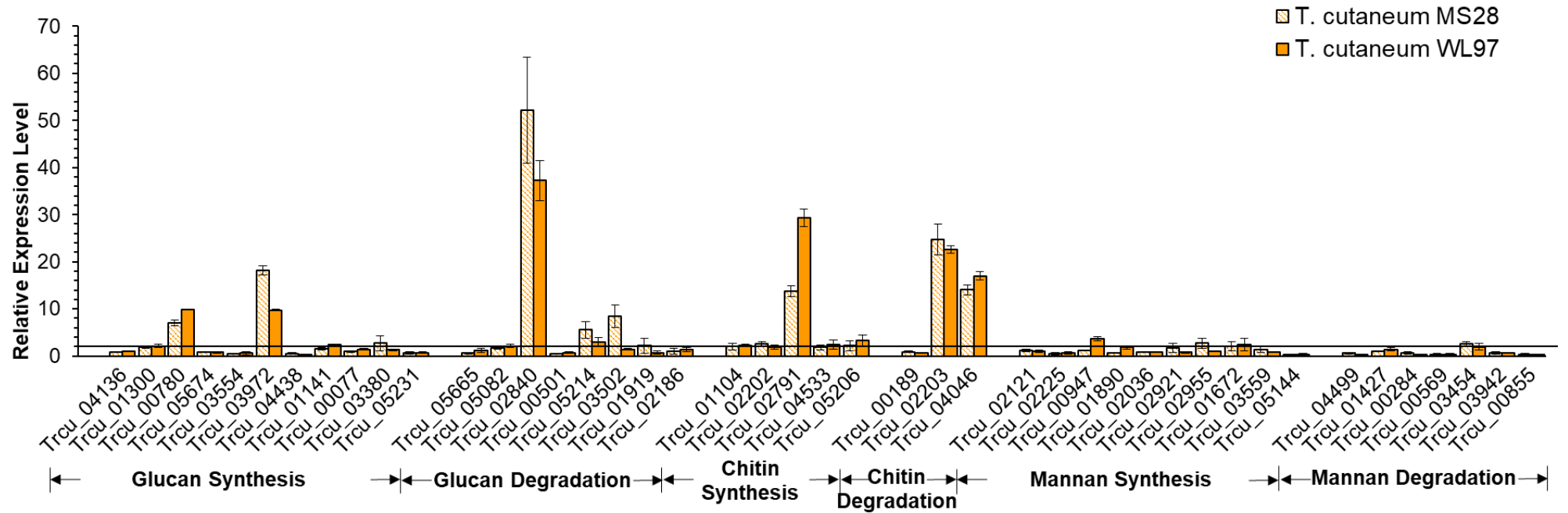


图 2.10 细胞壁合成与分解相关基因 q-RTPCR 实验结果

Fig. 2.10 Transcriptional analysis of genes related to cell wall synthesis and degradation during lipid production

2.3.7 *T. cutaneum* 细胞壁组分变化

TEM 观察发现 *T. cutaneum* 两株高产油脂酵母菌株的细胞壁相对于原始菌株明显变薄，为了排除菌体细胞个体差异造成的误差，研究按照 2.2.7 中方法进一步对原始菌株与两高产油脂酵母菌株的细胞壁组分进行了测定。然而，由于原始菌株与两高产油脂酵母菌株胞内油脂含量差异较大，以细胞壁各组分质量占细胞干重的比值作为衡量其各组分含量的方法不甚准确。因此，研究拍摄三种菌株细胞形态的照片，利用 Nano Measurer 软件测定三种菌株细胞体积并计算菌体细胞的平均表面积。单个细胞中，细胞壁各组分质量与细胞单位表面积的比值可较为准确地表示细胞壁各组分含量，计算公式如下（以葡聚糖含量的计算为例）：

$$X = \frac{M}{nS}$$

[X]: 单位表面积细胞壁葡聚糖质量, $\text{mg}/\mu\text{m}^2$;

[M]: 细胞壁葡聚糖总质量, mg ;

[n]: 菌体数;

[S]: 近似为球体时的平均细胞表面积, μm^2 ;

$$S=4\pi R^2$$

[R]: 近似为球体时的平均细胞半径, μm ;

$$R = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}}$$

[V]: 近似为球体时的平均细胞体积, μm^3 ;

$$V = \frac{4\pi R^3}{3}$$

测定三种菌株的平均细胞体积、菌体密度以及计算所得近似为球体时的平均细胞半径如表 2.1。

表 2.1 细胞壁组分计算测定参数

Table 2.1 Physical parameters of parental *T. cutaneum* and two mutants used for calculating the composition distribution of cell wall on cell surface

Physical parameters	Parental	MS28	WL97
Cell volume, $V (\mu\text{m}^3)$	8.62	28.83	29.36
Cell radius, $R (\mu\text{m})$	1.27	1.90	1.91
Yeast concentration (cfu/mg)	2.58×10^6	0.94×10^6	1.67×10^6

根据细胞壁组分计算结果绘制图 2.11，结果清晰地显示出了 *T. cutaneum* 原始菌株与两株高产油脂酵母菌株细胞壁组分间的差异。两高产油脂酵母菌株细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖含量大大低于原始菌株，几丁质在细胞壁中含量较低，三种菌株细胞壁几丁质含量较为接近。这一结果验证了 TEM 观察的现象，同时可与 q-RT-PCR 的实验结果相对

应。值得注意的是，两株高产油脂酵母菌株中与甘露聚糖合成与分解相关的基因发生差异表达的程度并不突出，但其细胞壁甘露聚糖含量确实有所降低，猜测可能是较低水平的表达差异已可减弱细胞壁甘露聚糖的合成，或者甘露聚糖层的变薄是细胞体积增大造成的形变，而并不是细胞通过调节其合成与分解的主动作用结果。此外，甘露聚糖对细胞壁强度、韧性等特性的影响较小，因此可能对细胞形态的作用也较为有限。本研究尝试了解 *T. cutaneum* 细胞壁的变化与细胞形态的关系以及最终对于油脂生产的影响，从新的角度探究促进胞内产物积累的可能分子生物学机制，所得结论还需进一步验证。

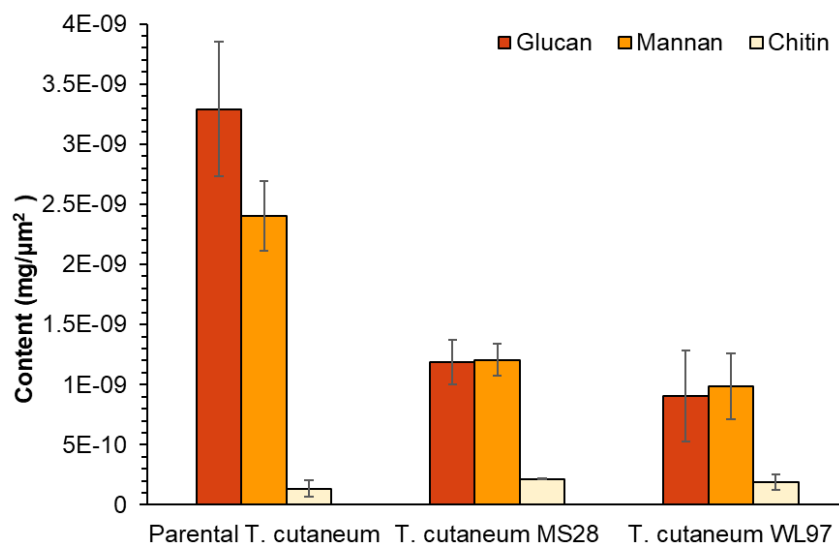


图 2.11 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株细胞壁组分

Fig. 2.11 Cell wall composition of parental *T. cutaneum* and two mutants

2.4 本章小结

本实验室利用超离心筛选方法在木质纤维素水解液中不断驯化、筛选高油脂含量 *T. cutaneum* ACCC 20271，初步获得油脂生产能力显著提升的高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28。在 *T. cutaneum* MS28 的基础上进一步筛选，极尽超离心筛选条件，最终获得油脂生产能力进一步提升的高产菌株 *T. cutaneum* WL97。两株高产油脂酵母菌株在产油能力、木质纤维素全糖利用能力、细胞形态等方面发生了突出变化。研究从分子生物学角度探究产生这些变化的可能原因，从而更为深入地了解超离心筛选机制的影响，为更好地利用 *T. cutaneum* 进行工业化油脂生产以及超离心筛选方法在其他菌种筛选中的应用创造条件。本章得到的主要结论如下：

(1) 超离心筛选获得的 *T. cutaneum* 高产油脂酵母菌株中与油脂合成的前体物质乙酰-CoA、NADPH 以及中间产物脂肪酸合成相关的部分基因相对于原始菌株发生了十分显著的表达差异。两高产油脂酵母菌株胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量的提高进一步验证了这一结果。与甘油三酯合成相关的基因在三种菌株中的表达较为相似，显示甘油三酯的合成对于两高产油脂酵母菌株油脂产量的影响较小。高产油脂酵母菌株胞内油脂合成原料供给能力的增强可能是其油脂生产能力提升的重要因素。

(2) *T. cutaneum* ACCC 20271 可利用木质纤维素水解液中由纤维素、半纤维素水解而来的全部单糖（葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖与甘露糖）。高产油脂酵母菌株相对于原始菌株对木质纤维素全糖利用的能力更强。研究发现，以木质纤维素来源各单糖为唯一碳源的培养条件下，高产油脂酵母菌株中糖酵解途径以及各单糖代谢路径几个关键酶基因的表达水平与原始菌株差异显著，这可能是高产油脂酵母菌株木质纤维素全糖利用能力增强的原因之一。最大程度地利用木质纤维素体系所有单糖可提高木质纤维素水解液的利用率，为高产油脂酵母菌株油脂积累提供更为充足的碳源。

(3) 利用 TEM 观察发现，高产油脂酵母菌株相对于原始菌株细胞发生了一定程度的伸长，细胞体积明显增大，高产油脂酵母菌株细胞壁明显变薄。高产油脂酵母菌株中与细胞壁葡聚糖、几丁质合成分解相关的部分基因发生了非常显著的上调表达差异，与甘露聚糖合成分解相关基因的表达差异并不突出。高产油脂酵母菌株细胞壁葡聚糖、甘露聚糖含量较原始菌株降低，几丁质在细胞壁中含量极低，故而在三种菌株中差异不大。猜测高产油脂酵母菌株中细胞壁代谢的变化导致了其细胞体积的增大，这为油脂的生产提供了更大空间，成为高产油脂酵母菌株油脂积累的一大优势。

第 3 章 皮状丝孢酵母遗传操作系统的构建

3.1 引言

皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 是一类典型的油脂酵母, 具有优秀的油脂生产能力。油脂及其衍生物是许多高附加值化学品的重要原料, 利用分子生物学的手段对皮状丝孢酵母进行改造, 可使其利用所产大量油脂为前体物质进行目标产物的生产。然而, 作为一种非传统型酵母, 皮状丝孢酵母的基因操作元件十分匮乏, 目前尚未出现在皮状丝孢酵母中进行遗传操作的报道。

酵母中最常使用的表达载体主要为附加型载体 (Yeast episomal plasmid, YE_p) 与整合型载体 (Yeast integration plasmid, YI_p)。YE_p 型载体含有酿酒酵母 2 μ m 质粒上与 DNA 复制有关的序列, 因而可在宿主酵母中独立复制。YI_p 型载体可将携带的目的基因整合至宿主染色体基因组中, 目的基因随宿主染色体的复制而复制。相较于 YE_p 型载体, YI_p 型载体对目的基因的表达更为稳定, 但同时存在拷贝数低的缺点。为保证工程菌株稳定的生长与遗传, 通常使用 YI_p 型载体改造工业化应用菌株。

本论文第 2 章对 *T. cutaneum* 高产油脂酵母菌株油脂积累过程进行了分子生物学机制解析, 由于缺乏有效的遗传操作系统, 表达水平差异显著的基因未能得到进一步功能验证。本章研究旨在构建高效的 *T. cutaneum* 遗传操作系统, 为代谢工程改造 *T. cutaneum* 高效生产木质纤维素油脂及其他化学品提供遗传工具。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌种与培养基

T. cutaneum 原始菌株: *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271, 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心。

T. cutaneum 高产油脂酵母菌株: *Trichosporon cutaneum* MS28。保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 编号为 CGMCC 14780。 *Trichosporon cutaneum* WL97, 来自本实验室侯伟亮同学的筛选工作。

T. cutaneum 所用培养基为 YPD 培养基, 培养基成分为 Glucose 20 g/L、Peptone 20 g/L、YE 10 g/L。

YPD 平板由添加了 20 g/L 琼脂的 YPD 液体培养基灭菌冷却制备。添加抗生素的 YPD 平板在以上培养基冷却到较低温度时加入一定浓度抗生素获得。

Escherichia coli 所用培养基为 LB 培养基, 培养基成分为 Glucose 10 g/L、NaCl 10 g/L、YE 5 g/L。

3.2.2 试剂与试剂盒

PCR 扩增所用酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、限制性核酸内切酶购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、质粒小量制备试剂盒、PCR 产

物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自上海捷瑞工程有限公司；DNA marker、核酸染料购于上海天能科技有限公司；HB-infusion 无缝克隆试剂盒购自汉恒生物科技（上海）有限公司；酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司；潮霉素 B、G418 硫酸盐、Zeocin 等抗生素购自大连美仑生物技术有限公司。

3.2.3 *T. cutaneum* 感受态的制备

(1) 取-80 °C 下冷冻保存的 *T. cutaneum* 划线至 YPD 平板上，30 °C 静置培养 24 h 后将平板上任意一个单菌落挑取至 20 mL YPD 液体培养基中，30 °C，180 rpm 摇床中培养 24 h。

(2) 取 200 μ L 菌液转接至新鲜 YPD 培养基中，在相同条件下培养 9 h。

(3) 4 °C 条件下 10000 rpm 离心 5 min 收集 1.5 mL 菌液的菌体，利用预冷无菌水清洗后再次离心，将菌体重悬至 1 mL 0.1 M 醋酸锂溶液并放入冰中冷却 10 min。

(4) 利用预冷无菌水清洗后加入 1 mL 1 M 山梨醇溶液再次离心，将菌体重悬至 1 mL 1 M 山梨醇溶液中待用。制备完成的 *T. cutaneum* 感受态需尽快转化使用。

3.2.4 *T. cutaneum* 电转化流程

(1) 将 8 μ L 质粒与 100 μ L *T. cutaneum* 感受态细胞混合后放置于冰上静置 15 min。

(2) 将混合液转移至预冷的 1 mm 电击杯中，在 1200 V、200 Ω 、25 μ F 条件下进行电击。将电击后的混合液静置 5 min 后转移至 900 μ L 复壮液（YPD: 1 M 山梨醇溶液=1:1）中，在 30 °C，180 rpm 摇床中培养 90 min。

(3) 离心浓缩菌液，将全部菌液涂布于含有 400 μ g/mL HYG 的 YPD 平板中，30 °C 培养 3 天左右可出现单菌落。

3.2.5 *T. cutaneum* 菌落 PCR 验证

T. cutaneum 细胞壁厚且结构致密，直接挑取 *T. cutaneum* 菌落进行 PCR 验证无法破碎菌体细胞暴露核酸作为扩增模板。因此进行 *T. cutaneum* 菌落 PCR 验证时，首先挑取少量菌体于装有 50 μ L NaOH（100 mM）溶液的离心管中。利用涡旋振荡器震荡破碎菌体细胞，静置 2 min 后吸取上清液作为模板进行 PCR 验证。

3.3 结果与讨论

3.3.1 *T. cutaneum* 抗生素敏感性探究

本实验室王娟等人已对 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行了全基因组测序^[69]，为在 *T. cutaneum* 中进行遗传操作奠定了基础。遗传操作系统构建过程中需要在表达载体添加合适的筛选标记，酵母常用的筛选标记主要包括真菌抗生素抗性基因、营养缺陷型基因等。*T. cutaneum* 最初分离自工业废水，具有很强的环境适应性，*T. cutaneum* ACCC 20271 不具备任何常用营养缺陷筛选特征。研究首先考察 *T. cutaneum* ACCC 20271 对几种常用真菌类抗生素的敏感性。

将 *T. cutaneum* ACCC 20271 以相同接种量接种至含有梯度浓度潮霉素 B（Hygromycin, HYG）、遗传霉素（Geneticin, G418）、博来霉素（Zeocin）的 YPD 液体

培养基中, 培养 48 h 后测定菌液 OD₆₀₀ 值。图 3.1 中测定结果显示, *T. cutaneum* ACCC 20271 对 Zeocin 十分不敏感, 含有 1200 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin 的培养基仍无法抑制 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长。*T. cutaneum* ACCC 20271 对于 HYG 及 G418 较为敏感, 但仍需要 800 $\mu\text{g/mL}$ 左右 HYG 或 G418 才能完全抑制 *T. cutaneum* ACCC 20271 的生长, 这显示了利用抗生素筛选 *T. cutaneum* ACCC 20271 转化子的难度, 同时增加了抗生素的使用成本。

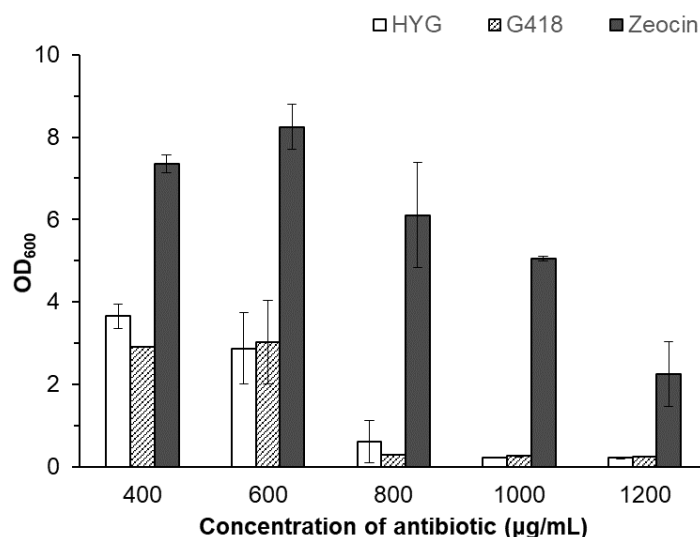


图 3.1 *T. cutaneum* ACCC 20271 在含有不同浓度 HYG、G418 或 Zeocin 的 YPD 培养基中的生长
Fig. 3.1 Growth of *T. cutaneum* ACCC 20271 in YPD medium with gradient concentration of HYG, G418 or Zeocin

T. cutaneum 原始菌株与超离心筛选获得的高产油脂酵母菌株的细胞壁组成差异较大, 酵母细胞壁的改变可影响其对外界环境的压力耐受性, 因此可能对于菌体细胞的抗生素敏感性也存在一定影响。研究尝试考察 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28 对 HYG 与 G418 的敏感性差异。

以相同接种量分别接种 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28 于含有梯度浓度 HYG 或 G418 的 YPD 液体培养基中, 测定培养 48 h 后菌液的 OD₆₀₀ 值。图 3.2 中的研究结果显示, 高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28 对 HYG 与 G418 的敏感性均明显强于原始菌株, 含有 400 $\mu\text{g/mL}$ 左右 HYG、600 $\mu\text{g/mL}$ 左右 G418 的培养基已可抑制其生长。选用 *T. cutaneum* MS28 作为遗传操作系统构建的对象可显著减少筛选抗生素的使用量, 降低筛选难度与实验成本。

研究继续考察 *T. cutaneum* MS28 在含有 HYG 或 G418 的 YPD 平板上的生长情况。将 100 μL 在 YPD 培养基中培养 24 h 的 *T. cutaneum* MS28 菌液涂布于含有梯度浓度 HYG 或 G418 的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后计算平板上菌落数。表 3.1 中研究结果表明, 虽然极少数菌体细胞对抗生素的耐受性格外强, 但含有 400 $\mu\text{g/mL}$ HYG 或 G418 的 YPD 平板已经可以杀灭绝大多数菌体细胞。经过电转化处理的菌株细胞更为脆弱, 可耐受的抗生素浓度更低, 因此 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 HYG 或 G418 可用于 *T. cutaneum* MS28 转化子的筛选。研究选择 HYG 抗性基因 *HYR* 作为表达载体的筛选标记, 转化后

用含有 400 $\mu\text{g/mL}$ HYG 的 YPD 液体培养基与 YPD 平板筛选转化子。

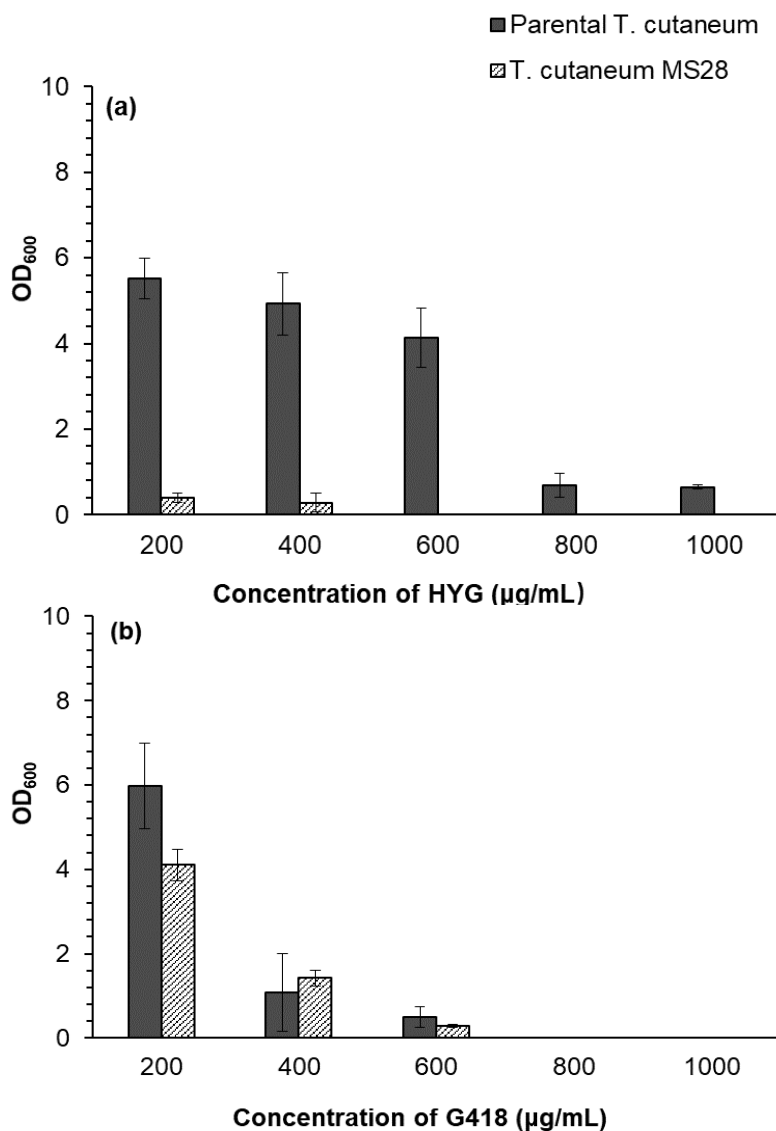


图 3.2 *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28 在含有不同浓度 HYG (a) 或 G418 (b) 的 YPD 培养基中的生长

Fig.3.2 Growth of parental *T. cutaneum* and *T. cutaneum* MS28 in YPD medium with gradient concentration of HYG(a) or G418(b)

表 3.1 高产油脂酵母菌株 *T. cutaneum* MS28 在含有不同浓度 HYG 或 G418 的 YPD 平板中的生长

Table 3.1 Growth of *T. cutaneum* MS28 in YPD solid medium with gradient concentration of HYG or G418

抗生素浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	200	400	600	800	1000
YPD-HYG 平板菌落数	+	2	2	-	-
YPD-G418 平板菌落数	+	4	3	2	-

注：“+”表示菌落数极多，“-”表示没有任何菌落

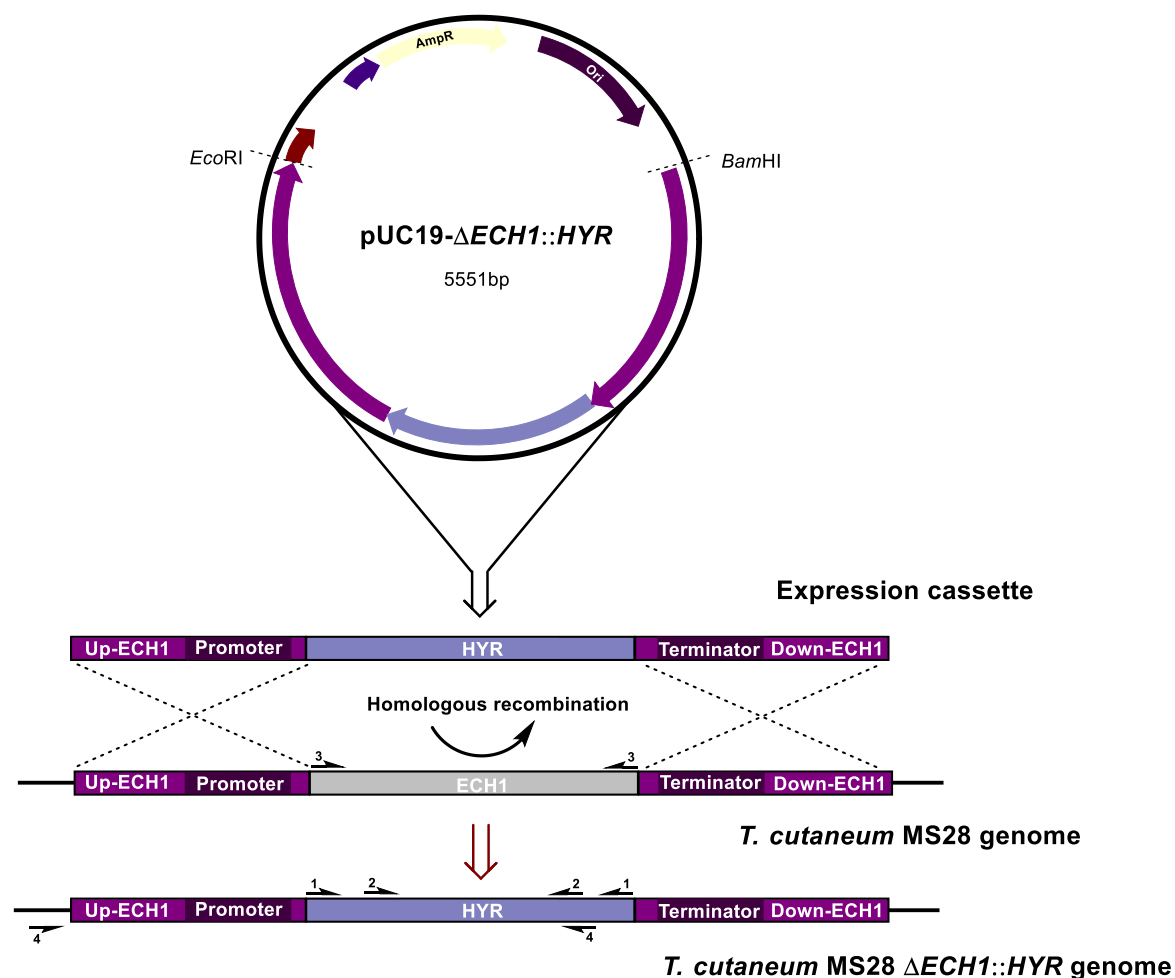
3.3.2 单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ 的构建

图 3.3 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ 在 *T. cutaneum* MS28 基因组同源重组整合 *HYR* 基因过程示意图
Fig.3.3 The homologous recombination process of pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ into *T. cutaneum* MS28 genome

T. cutaneum 是一种未经过深入研究的非传统型酵母，截止目前，尚未出现在 *T. cutaneum* 中进行遗传操作系统构建的报道，可在 *T. cutaneum* 中应用的分子操作元件十分匮乏。因此，在尝试构建适用于 *T. cutaneum* 的表达载体时，首先构建元件较为简单的单拷贝整合型质粒，选择 *T. cutaneum* 内源性基因构建目的基因表达框。

β 氧化途径是酵母细胞内脂肪酸分解代谢的重要过程，破坏 β 氧化途径可阻断脂肪酸的分解从而促进脂肪酸积累^[70]。烯酰-CoA 水合酶（Enoyl-CoA hydratase）催化反式- Δ^2 -烯酰-CoA 水合形成 3-羟脂酰-CoA，是 β 氧化途径的重要步骤之一。研究选择 Enoyl-CoA hydratase 编码基因 *ECH1* 上、下游（Up-*ECH1* 与 Down-*ECH1*）各 1000bp 左右的序列作为表达框片段的上下游同源臂。根据抗生素敏感性探究实验结果，选择 *HYG* 抗性基因 *HYR* 作为表达框片段的筛选标记，为了简化表达框元件，同时把 *HYR* 作为表达框中的目的基因，以使 *T. cutaneum* MS28 获得潮霉素抗性作为构建目标。当表达载体转化进入 *T. cutaneum* MS28 后，表达框片段可在 *T. cutaneum* MS28 基因组 *ECH1* 基因处发生同源重组，将 *HYR* 基因替换 *ECH1* 基因整合入 *T. cutaneum* MS28 基因组中。此时，

ECHI 基因的启动子 (promoter)、终止子 (terminator) 也可以分别作为目的基因的启动子与终止子调控 *HYR* 基因的表达。

设计引物 (见附录 II), 以 *T. cutaneum* MS28 基因组为模板扩增 *ECHI* 基因上、下游序列片段, 以质粒 pAN7-1 为模板扩增潮霉素抗性基因 *HYR* 片段。利用融合 PCR 技术将各片段连接形成目的基因表达框, 再利用无缝克隆的方法, 将融合得到的表达框片段插入至 pUC19 质粒 *Bam*HI 与 *Eco*RI 两个酶切位点之间获得单拷贝整合型质粒 pUC19- Δ *ECHI*::*HYR*。将构建完成的质粒送至上海捷瑞生物工程有限公司测序检验。单拷贝整合型质粒 pUC19- Δ *ECHI*::*HYR* 在 *T. cutaneum* MS28 中发生同源重组进行 *HYR* 基因整合的示意如图 3.3。

3.3.3 pUC19- Δ *ECHI*::*HYR* 的转化与 *T. cutaneum* MS28 Δ *ECHI*::*HYR* 的筛选

酵母细胞壁厚且结构致密, 相较于细菌更加难以实现外源基因的转化。目前, 研究已成功利用原生质体转化法、醋酸锂转化法、农杆菌转化法、电转化法等方法实现表达载体在酿酒酵母、解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母等酵母菌株中的转化。不同转化方法各有优劣, 本研究选择操作简便、适用性更广的电转化法进行单拷贝整合型质粒 pUC19- Δ *ECHI*::*HYR* 的转化尝试。

短暂电击可在菌体细胞壁表面形成微孔通道, 目的基因可通过该微孔通道进入宿主细胞。电击形成的微孔在电击后的最初几秒内逐渐增大, 数秒后保持稳定, 随后逐渐复原消失。电击强度过大时, 形成的微孔过多或过大均可导致菌体死亡率的增加, 而电击强度过低则无法使目的基因进入通道, 因此转化过程的各个环节均会影响最终的电转化效率。按照 3.2.3 中方法制备 *T. cutaneum* MS28 感受态, 将感受态细胞与在 *Bam*HI 酶切位点经过线性化处理的 pUC19- Δ *ECHI*::*HYR* 质粒混合, 按照 3.2.4 中方法进行电转化。

刚刚经过电击的菌体细胞壁表面存在大量微孔, 菌体较为脆弱, 将电击后的菌液加入至 1 mL 复壮液 (YPD: 1 M 山梨醇溶液=1:1) 中, 在 30 °C、180 rpm 摇床培养条件下复壮 90 min。随后将复壮后的菌液涂布于含有 400 μ g/mL 潮霉素的 YPD 平板上, 30 °C 培养箱中静置 3 天左右开始出现菌落。

按照 3.3.5 中方法对平板上的菌落进行菌落 PCR 验证, 筛选 pUC19- Δ *ECHI*::*HYR* 成功转化入 *T. cutaneum* MS28 的转化子。培养菌落 PCR 阳性的转化子并提取其基因组, 设计 PCR 引物扩增验证 *HYR* 是否整合至基因组 *ECHI* 位点, 扩增引物的位置如图 3.3 中所示。由图 3.4 中基因组 PCR 验证图可知, 整合成功的转化子基因组中, *ECHI* 基因被 *HYR* 基因替换而无法被扩增出来, *ECHI* 基因的上、下游片段变为 *HYR* 基因的上、下游片段。验证成功的菌株为成功构建的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 Δ *ECHI*::*HYR*。

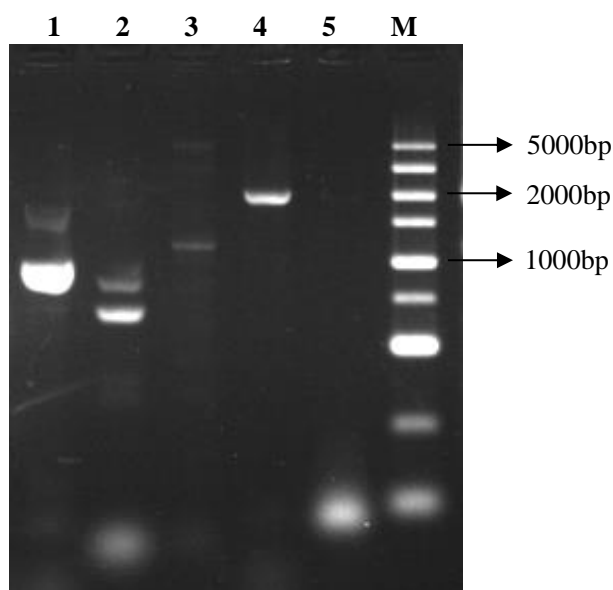


图 3.4 *T. cutaneum* MS28 Δ *ECH1::HYR* 基因组 *HYR* 整合验证核酸电泳图

泳道 1: *HYR* 基因 (1020 bp) ; 泳道 2: *HYR* 基因内部片段 (710 bp) ; 泳道 3: *ECH1* 基因 (858 bp, 未能扩增) ; 泳道 4: *HYR* 基因内部连同 *ECH1* 基因上游片段 (1917 bp) ; 泳道 5: 空白对照;

M: 5000 bp 核酸 Marker

Fig.3.4 Genome PCR result of *T. cutaneum* MS28 Δ *ECH1::HYR*

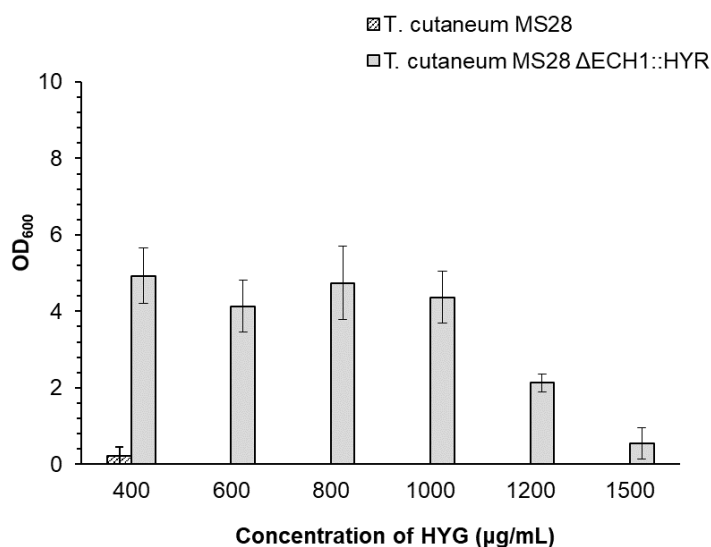


图 3.5 *T. cutaneum* MS28 与 *T. cutaneum* MS28 Δ *ECH1::HYR* 在含有不同浓度 HYG 的 YPD 培养基中的生长

Fig.3.5 Growth of *T. cutaneum* MS28 and *T. cutaneum* MS28 Δ *ECH1::HYR* in YPD medium with gradient concentration of HYG

在含有梯度浓度潮霉素的 YPD 液体培养基中培养 *T. cutaneum* MS28 与工程菌株 *T. cutaneum* MS28 Δ *ECH1::HYR*, 如图 3.5 所示, 工程菌株相对于 *T. cutaneum* MS28 对潮霉素的敏感性显著减弱, 超过 1200 $\mu\text{g/mL}$ 的潮霉素才可对其生长产生较大程度的抑制作用。

3.3.4 *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 中绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的表达

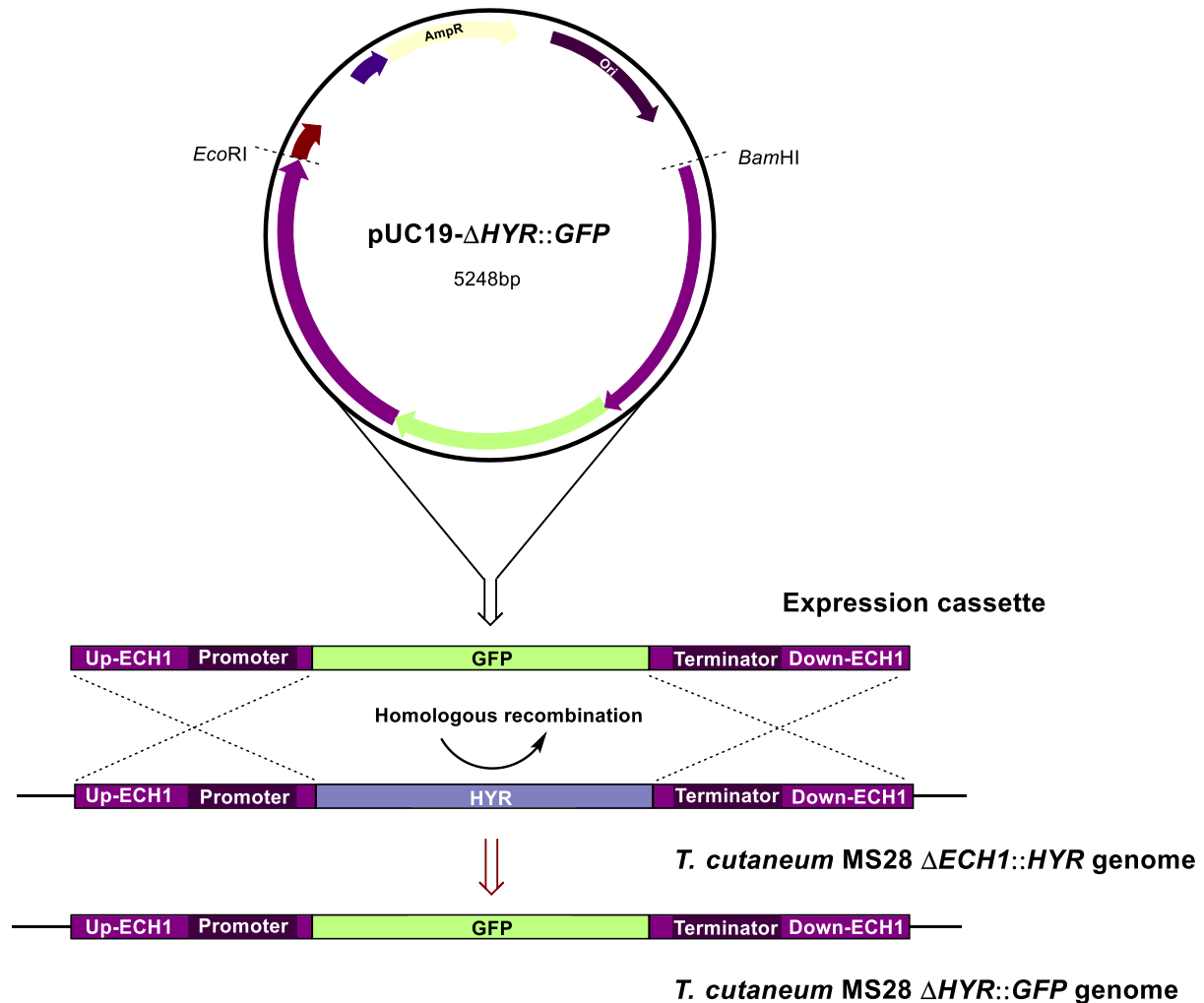


图 3.6 pUC19- Δ HYR::GFP 在 *T. cutaneum* MS28 Δ ECH1::HYR 基因组同源重组整合 *GFP* 过程示意图

Fig.3.6 The homologous recombination process of pUC19- Δ HYR::GFP into *T. cutaneum* MS28 Δ ECH1::HYR genome

3.3.2、3.3.3 中的研究将潮霉素抗性基因 *HYR* 同时作为目的基因与筛选标记构建了单拷贝整合型质粒 pUC19- Δ ECH1::HYR，利用电转化的方法将该质粒成功转化入 *T. cutaneum* MS28 中，*HYR* 基因表达框发生同源重组并将 *HYR* 基因替换整合至 *T. cutaneum* MS28 基因组 *ECH1* 基因位点，最终获得具有潮霉素抗性的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 Δ ECH1::HYR。

为验证以上方法表达其他基因的普遍适用性，研究进一步尝试在 *T. cutaneum* MS28 Δ ECH1::HYR 进行绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的表达。首先按照 3.3.2 中方法构建单拷贝整合型质粒 pUC19- Δ HYR::GFP，表达框片段上、下游同源臂与 pUC19- Δ ECH1::HYR 相同，目的基因由 *HYR* 基因更换为 *GFP* 基因。将质粒按照 3.2.4 中电转化方法转化入 *T. cutaneum* MS28 Δ ECH1::HYR。GFP 基因表达框在 *HYR* 基因位点发生同源重组，将 *GFP* 基因替换 *HYR* 基因整合入 *T. cutaneum* MS28 Δ ECH1::HYR 基因组中，过程示意如图 3.6。

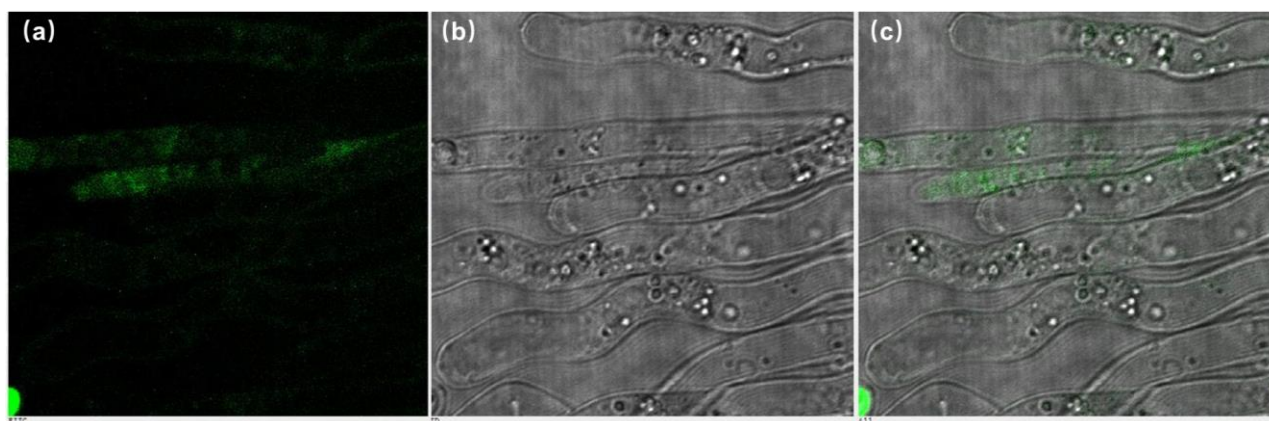


图 3.7 *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP 倒置荧光显微镜观察图

Fig.3.7 Fluorescence microscope image of *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP genome (a, GFP; b, DIC; c, Merge)

将复壮后的菌液同时点涂于含有 400 μ g/mL 潮霉素以及不含有潮霉素的 YPD 平板上，成功实现整合的转化子潮霉素抗性消失，故而仅可在不含有潮霉素的 YPD 平板上生长而无法在含有潮霉素的 YPD 平板上生长。用这样的方法对转化后的菌株进行筛选，最终获得工程菌株 *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP。

利用倒置荧光显微镜 TiE2000 (Nikon Co., LTD, Japan) 观察 *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP 菌体细胞 (激发波长 488 nm, 发射波长 509 nm), 如图 3.7 所示, *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP 菌体细胞能够发出绿色荧光, 但所释放的荧光强度较为微弱。研究表明, 整合入 *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP 基因组的 *GFP* 基因能够成功表达, 但表达水平较弱。整合入基因组的 *GFP* 基因所利用的启动子与终止子仍旧为原 *ECHI* 基因的启动子与终止子, 其表达程度的局限可能是由于 *ECHI* 基因启动子对 *GFP* 基因的启动能力较弱导致, 后续研究可尝试添加其他强启动子促进 *GFP* 基因的表达。

3.3.5 工程菌株稳定性验证

3.3.3 与 3.3.4 中的研究获得了成功表达外源基因的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 Δ ECHI::HYR 与 *T. cutaneum* MS28 Δ HYR::GFP, 然而后续研究发现, 连续培养工程菌株几代后, 插入基因组的目的基因均会发生丢失, *ECHI* 基因在原有位点重新出现。多次重复 3.3.3 中实验, 所获工程菌株的目的基因均未能进行稳定的遗传。考虑出现这一现象可能的原因有:

(1) *T. cutaneum* 基因组 *ECHI* 位点不易发生同源重组。在先前的转化筛选工作中已发现, 菌落 PCR 阳性的转化子少有能够继续在含有 400 μ g/mL 潮霉素的 YPD 液体培养基中正常生长的, 筛选工程菌株的难度较大。同时, 重复实验中常出现 *HYR* 基因在 *T. cutaneum* 基因组中随机插入的现象。这一结果表明, 表达载体可被成功转化进入宿主 *T. cutaneum* 中, 但表达框片段难以在 *ECHI* 位点发生同源重组, 即使发生同源重组, 目的基因也难以在传代过程中稳定遗传。研究可更换其他靶位点重新构建表达载体进行验证尝试。

(2) *ECHI* 基因启动子的启动效力过弱。过弱的启动子将影响目的基因的表达, 从而使工程菌株失去生存的竞争力, 当工程菌株中混入少量原始菌株时, 原始菌株能够快速进行生长增殖而占据优势。3.3.3、3.3.4 中研究选择的靶位点均为 *ECHI* 基因, 目的基因表达框在靶位点发生同源重组后原 *ECHI* 基因启动子将作为目的基因启动子调控目的基因的表达。3.3.4 中倒置荧光显微镜观察 *T. cutaneum* MS28 Δ *HYR::GFP* 时发现其所释放的荧光强度较低, 显示了目的基因启动子效力过弱的问题。研究可选择在表达框中添加强启动子进行尝试。

为解决整合基因不能稳定遗传的问题, 研究首先尝试更换不同类型靶位点基因重新构建表达载体。选择 β 氧化途径中脂酰-CoA 合成酶 (Acyl-CoA synthetase, *ACS*) 基因 *Trcu_00279* 作为靶位点构建 pUC19- Δ *ACS::HYR*。脂酰-CoA 合成酶活化脂肪酸生成脂酰-CoA, 是 β 氧化途径的起始步骤。选择醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, *ADH*) 基因 *Trcu_00411*、*Trcu_00679* 为靶位点构建 pUC19- Δ *ADH1::HYR*、pUC19- Δ *ADH2::HYR*。选择果糖代谢路径中催化 6-磷酸果糖生成 2,6-二磷酸果糖的 6-磷酸果糖-2-激酶 (6-phosphofructo-2-kinase, *PFK*) 基因 *Trcu_04140* 为靶位点构建 pUC19- Δ *PFK::HYR*。将构建成功的表达载体电转化入 *T. cutaneum* MS28 中, 转化 pUC19- Δ *ADH1::HYR*、pUC19- Δ *ADH2::HYR* 或 pUC19- Δ *PFK::HYR* 后, 含有 400 μ g/mL 潮霉素的 YPD 平板上未出现菌落生长。转化 pUC19- Δ *ACS::HYR* 后, 筛选平板出现少量菌落, 但菌落 PCR 阳性菌株仍然无法进行稳定的遗传。研究表明, 靶位点基因的类型可影响表达框同源重组的效率, 但整体而言 *T. cutaneum* 中仍较难发生同源重组, 后续可尝试选择基因组中的重复序列作为靶位点构建多拷贝整合型质粒以增加同源重组效率。

接着, 尝试为单拷贝整合型质粒 pUC19- Δ *ECHI::HYR* 的表达框添加强启动子。由于 *T. cutaneum* 中没有已经验证有效的启动子, 研究首先选择 *S. cerevisiae* 中常用的 TEF 启动子构建 pUC19- Δ *ECHI::(TEF)HYR*, 然而转化后的筛选平板上未出现菌落生长。猜测可能是 TEF 启动子无法在 *T. cutaneum* 中发挥作用。研究继续尝试利用 *T. cutaneum* 内源性启动子。考虑到 *T. cutaneum* 可快速利用培养基中的碳源进行油脂发酵, 其糖酵解途径关键酶基因的表达应十分活跃, 相关基因的内源性启动子的启动效力应较强。选择糖酵解途径中几个关键酶基因的上游 1000 bp 左右序列添加于 *HYR* 基因表达框中, 理论上该 1000 bp 左右序列中应包含各基因的启动子, 因此可作为 *HYR* 基因的启动子发挥作用。选择的基因包括 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 基因 *Trcu_01126* 与 *Trcu_01680*, 2-磷酸果糖醛缩酶 (Fructose-bisphosphate aldolase, *FBA*) 基因 *Trcu_04860*、磷酸甘油酸激酶 (Phosphoglyceric kinase, *PGK*) 基因 *Trcu_05335*、6-磷酸葡萄糖异构酶基因 (Phosphoglucosomerase, *PGI*) *Trcu_04167*^[71]。遗憾的是, 经过电转化后, 筛选平板上虽有菌落生长, 但均未能筛选得到在 *ECHI* 位点发生同源重组的工程菌株。由于无法确定内源性启动子区域的具体序列, 以上相关表达载体未能发挥作用的原因较为复杂, 后续研究可使用其他亲缘关系更近的油脂酵母的强启动子进行尝试。

3.4 本章小结

本研究首次尝试在非传统型酵母 *T. cutaneum* 中进行遗传操作。虽然成功在 *T. cutaneum* MS28 中实现了外源基因的表达, 但工程菌株在后续的培养过程中发生了目的基因丢失的现象, 工程菌株稳定性较差。研究得到的主要结论如下:

(1) *T. cutaneum* 原始菌株与高产油脂酵母菌株对真菌抗生素的耐受性差异较大, 在液体培养基中, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的 HYG、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的 G418 已可抑制 *T. cutaneum* MS28 的生长, 而至少需要 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右 HYG 或 G418 才可抑制 *T. cutaneum* 原始菌株的生长, 选择 *T. cutaneum* MS28 作为研究对象可降低转化子的筛选难度、减少抗生素的使用成本。研究选择潮霉素抗性基因 *HYR* 作为 *T. cutaneum* MS28 表达载体的筛选标记, 利用含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HYG 的 YPD 液体培养基及 YPD 平板进行转化子的筛选。

(2) 以 *T. cutaneum* MS28 β 氧化途径关键酶烯酰-CoA 水合酶的编码基因 *ECH1* 为靶位点, 设计 *ECH1* 基因上、下游各 1000 bp 左右的序列片段作为表达框的上、下游片段。利用融合 PCR 技术将上、下游片段与筛选标记 *HYR* 基因连接获得表达框片段, 利用无缝克隆技术将表达框片段插入至质粒 pUC19 中构建单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ 。将质粒电转化进入 *T. cutaneum* MS28 后筛选获得具备了潮霉素抗性的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$, 实现了外源基因在 *T. cutaneum* MS28 中的表达。

(3) 以 *HYR* 基因为靶位点构建表达绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta HYR::GFP$, 将其电转化进入 *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 中筛选获得插入了 *GFP* 基因而潮霉素抗性消失的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 $\Delta HYR::GFP$ 。在倒置荧光显微镜下观察到该菌株可释放绿色荧光, 但荧光强度较低, 可尝试添加其他强启动子促进 *GFP* 基因的表达。

(4) 工程菌株 *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 与 *T. cutaneum* MS28 $\Delta HYR::GFP$ 在后续转接培养过程中均发生了目的基因丢失的现象。研究更换整合靶位点、添加强启动子构建了其他单拷贝整合型质粒, 然而均未能获得在指定靶位点完成目的基因整合的工程菌株。这显示了外源基因在 *T. cutaneum* 中发生同源重组进行整合表达的困难性, 提高同源重组效率、增强遗传操作系统稳定性是未来研究的重点与难点。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论与创新点

本实验室通过不断提高离心强度,连续筛选转接在木质纤维素水解液中进行长期适应性进化的 *T. cutaneum* ACCC 20271, 获得了油脂生产性能大幅提升的突变菌株 *T. cutaneum* MS28 与 *T. cutaneum* WL97。高产油脂酵母菌株在油脂合成、木质纤维全糖利用、细胞形态等方面发生了显著变化。本研究利用 qRT-PCR 方法对产生这些变化的机制深入探究,并尝试构建 *T. cutaneum* 遗传操作系统,对 qRT-PCR 实验结果中表达水平发生显著差异的基因进行功能验证,并为定向改造 *T. cutaneum* 生产其他高附加值化学品创造条件。研究的主要结论与创新点包括:

(1) 超离心筛选得到的高产油脂酵母菌株中与油脂合成的前体物质乙酰-CoA、NADPH 以及中间产物脂肪酸合成相关的部分基因相对于原始菌株发生了十分显著的表达差异。两株高产油脂酵母菌株胞内乙酰-CoA 与 NADPH 含量随之提高,油脂合成原料的供应得以增强。高产油脂酵母菌株中糖酵解以及木质纤维素来源各单糖代谢路径中几个关键酶基因的表达与原始菌株差异显著。最大程度地利用木质纤维素体系中的全部单糖可提高木质纤维素水解液利用率,成为高产油脂酵母菌株油脂产量提升的重要条件。

(2) 高产油脂酵母菌株细胞在油脂快速积累时期发生了一定程度的伸长,细胞体积显著增大。油脂发酵结束时,细胞相对缩短,但细胞体积仍明显大于原始菌株。同时,在油脂积累的整个过程中高产油脂酵母菌株的细胞壁均相对于原始菌株明显变薄。qRT-PCR 结果显示,高产油脂酵母菌株与细胞壁葡聚糖、几丁质合成分解相关的部分基因发生了非常显著的上调表达差异,与甘露聚糖合成分解相关的基因表达差异并不十分显著。测定发现,细胞壁葡聚糖、甘露聚糖含量显著降低,几丁质含量变化较小。研究表明,高产油脂酵母菌株细胞壁变薄并非是胞内油脂大量积累、挤压造成的简单形变,而是通过调控细胞壁各组分代谢进行的主动作用,这为油脂提供了更大的积累空间,促进了高产油脂酵母菌株的油脂生产。本研究尝试了解 *T. cutaneum* 细胞壁的变化与细胞形态的关系以及最终对于油脂生产的影响,研究从新的角度理解胞内产物积累机制,所得结论需后续研究进一步验证。

(3) 高产油脂酵母菌株对真菌抗生素的敏感性强于原始菌株,选择高产油脂酵母菌株作为遗传操作系统构建的对象可降低筛选难度、减少抗生素使用成本。以烯酰-CoA 水合酶的编码基因 *ECH1* 为靶位点,潮霉素抗性基因 *HYR* 为目的基因与筛选标记构建单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta ECH1::HYR$ 并利用电转化方法将其转化入 *T. cutaneum* MS28 后,可在含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HYG 的 YPD 平板筛选获得具备潮霉素抗性的工程菌株 *T. cutaneum* MS28 $\Delta ECH1::HYR$ 。继续构建表达绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的单拷贝整合型质粒 pUC19- $\Delta HYR::GFP$, 转化后可筛选获得潮霉素抗性消失且可释放绿色荧光的工程菌

株 *T. cutaneum* MS28 Δ *HYR*::*GFP*。*GFP* 基因可在工程菌株中成功表达，但工程菌株所释放的荧光强度较低，*GFP* 基因的表达较弱。此外，工程菌株在后续转接培养过程中均发生了目的基因丢失的现象，这显示了初步构建的 *T. cutaneum* 遗传操作系统稳定性较差，外源基因较难在 *T. cutaneum* 中发生同源重组。

4.2 展望

本研究对超离心筛选获得的高产油脂酵母菌株相对于原始菌株的显著变化进行了分子生物学机制解析，高产油脂酵母菌株与油脂合成、木质纤维素全糖利用以及细胞壁各组分代谢相关过程的部分基因发生了十分突出的上调表达差异。相关基因表达水平的显著变化可能是高产油脂酵母菌株油脂生产能力得以提升的原因。此外，虽然研究进一步尝试在 *T. cutaneum* 中构建遗传操作系统并实现了外源基因的表达，但是工程菌株在后续培养工程中发生了目的基因丢失的现象，遗传操作系统未能成功构建，无法对 qRT-PCR 研究中发生显著变化的基因进行功能验证与利用。对于研究过程中出现的问题进行后续展望：

(1) 探究遗传操作系统构建中可能的疏漏，尝试更换表达框中靶位点基因的类型、调整表达框同源臂的长度、选择 rDNA 等重复序列作为整合位点构建多拷贝整合型质粒等方法增加目的基因发生同源重组的效率，通过添加其他强启动子等方法促进目的基因的表达，增强工程菌株稳定性。

(2) 利用成功构建的遗传操作系统对 qRT-PCR 中上调表达差异突出的基因进行敲除、过表达等遗传操作，对相关基因发挥的作用进行功能验证，探究影响高产油脂酵母菌株油脂产量显著提升的最关键因素。

(3) 对 *T. cutaneum* 原始菌株细胞壁相关基因进行改造，通过调节细胞壁各组分代谢增大细胞体积，促进油脂的积累。验证细胞壁成分变化对细胞形态的影响以及二者与油脂积累的关系。利用分子改造在更短的时间内获得油脂高产菌株，为利用油脂酵母进行工业化油脂生产提供优秀菌株。同时，可尝试将改变细胞形态促进胞内产物积累的方法应用于其他胞内产物的生产过程中。

(4) 对 *T. cutaneum* 进行定向改造，使其利用所产大量油脂及其衍生物生产其他高附加值化学品，进一步增强 *T. cutaneum* 的工业化应用价值。

参考文献

- [1] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015, 6(25): 4497-4559.
- [2] Ma Y, Gao Z, Wang Q, et al. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. *Bioresource Technology*. 2018, 263: 631-641.
- [3] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38: 522-550.
- [4] Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2007, 1: 119-134.
- [5] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of reactor corrosion by eliminating liquid-phase existence in dry dilute acid pretreatment of corn stover. *Energy & Fuels*. 2017, 31: 6140-6144.
- [6] Liu G, Zhang Q, Li HX, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115: 60-69.
- [7] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1369-1376.
- [8] Zhou PP, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresource Technology*. 2017, 224: 563-572.
- [9] Wang J, Gao QQ, Zhang HZ, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 892-901.
- [10] Meng X, Yang JM, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 2009, 34: 1-5.
- [11] Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 2014, 32: 1336-1360.
- [12] Sitepu IR, Sestric R, Ignatia L, et al. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technology*. 2013, 144(5): 360-369.

- [13] Xu P, Qiao KJ, Ahn WS, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, 113(39): 10848-10853.
- [14] Wang YN, Zhang SF, Pötter M, et al. Overexpression of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016, 180: 1497-1507.
- [15] Meesters PAEP, Huijberts GNM, Eggink G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996, 45: 575-579.
- [16] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, 56: 331-338.
- [17] Capus A, Monnerat M, Ribeiro LC et al. Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 309-317.
- [18] Li SL, Lin Q, Li XR, et al. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, 627-634.
- [19] 李仁民, 王菊芳, 马爽. 利用脂肪酸合酶抑制剂和磷酸香草醛反应筛选高产油脂酵母菌. *微生物学通报*. 2008, 35(4): 545-549.
- [20] Liu LQ, Pan A, Spofford C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2015, 29: 36-45.
- [21] Wang J, Hu MS, Zhang HZ, et al. Converting chemical oxygen demand (COD) of cellulosic ethanol fermentation wastewater into microbial lipid by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, 182: 1121-1130.
- [22] 胡明珊. 木质纤维素碳源的皮状丝孢酵母菌种筛选方法与微生物油脂发酵研究[D]. 华东理工大学, 2018.
- [23] Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, 1771: 255-270.
- [24] Flikweert MT, Van der zanden L, Janssen WMTM, et al. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*. 1996, 12(3): 247-257.
- [25] Saint-Prix F, Bo'nquist L, Dequin S. Functional analysis of the *ALD* gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*. 2004, 150: 2209-2220.

- [26] Wynn JP, Ratledge C. Malic enzyme is a major source of NADPH for lipid accumulation by *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 1997, 143: 253-257.
- [27] Sorger D, Daum G. Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2003, 61(4): 289-299.
- [28] Wang PM, Zheng DQ, Ding R, et al. Improvement of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by hetero-expression of *GAPN* and *FPS1* deletion. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2011, 86: 1205-1210.
- [29] Schmoller KM, Skotheim JM. The biosynthetic basis of cell size control. *Trends in Cell Biology*. 2015, 25(12): 793-802.
- [30] Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. 2011, 189: 1145-1175.
- [31] Turner JJ, Ewald JC, Skotheim JM. Cell size control in yeast. *Current Biology*. 2012, 22: 350-359.
- [32] Flick K, Chapman-Shimshoni D, Stuart D, et al. Regulation of cell size by glucose is exerted via repression of the *CLNI* promoter. *Molecular and Cellular Biology*. 1998, 18(5): 2492-2501.
- [33] Costello G, Rodgers L, Beach D. Fission yeast enters the stationary phase G₀ state from either mitotic G₁ or G₂. *Current Genetics*. 1986, 11: 119-125.
- [34] Timoumi A, Guillouet SE, Molina-Jouve C, et al. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102: 3831-3848.
- [35] Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006, 23: 185-202.
- [36] Cabib E, Roh DH, Schmidt M, et al. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(23): 19679-19682.
- [37] Ene IV, Adya AK, Wehmeier S, et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*. 2012, 14(9): 1319-1335.
- [38] Ene IV, Walker LA, Schiavone M, et al. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *mBio*. 2015, 6(4): 1-15.
- [39] Wang JJ, Mao JC, Yang G, et al. The *FKS* family genes cause changes in cell wall morphology resulted in regulation of anti-autolytic ability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2018, 249: 49-56.
- [40] Schmidt M. Survival and cytokinesis of *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chitin.

- Microbiology. 2004, 150: 3253-3260.
- [41] Vecchiarelli A, Puliti M, Torosantucci A, et al. In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. Cellular Immunology. 1991, 134(1): 65-76.
- [42] Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006, 70(2): 317-343.
- [43] Buckholz RG, Gleeson MAG. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. Nature Biotechnology. 1991, 9: 1067-1072.
- [44] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, Mcneil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast. 2005, 22: 249-270.
- [45] Van den Berg JA, Van der Laken KJ, Van Ooyen AJJ, et al. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. Nature Biotechnology. 1990, 8: 135-139.
- [46] Swinkels BW, Van Ooyen AJJ, Bonekamp FJ. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 1993, 64(2): 187-201.
- [47] Blazeck J, Hill A, Liu LQ, et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. Nature Communications. 2014, 5: 1-10.
- [48] Lin XP, Wang YN, Zhang SF, et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Yeast Research. 2014, 14: 547-555.
- [49] Schweizer E, Mackechnie C, Halvorson HO. The redundancy of ribosomal and transfer RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Molecular Biology. 1969, 40(2): 261-277.
- [50] 陈向岭. 同源重组技术在酿酒酵母表达载体构建中的应用[D]. 复旦大学, 2005.
- [51] Eddy AA, Williamson DH. A method of isolating protoplasts from yeast. Nature. 1957, 179(4572): 1252-1253.
- [52] Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1978, 75(4): 1929-1933.
- [53] 王明兹, 施巧琴, 周晓兰, 等. 提高酵母菌原生质体制备与再生的方法研究. 微生物学杂志. 2005, 25(3): 10-13.
- [54] Ito H, Mutata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations or thiol compounds. Agricultural and Biological Chemistry. 1984, 48(2): 341-347.
- [55] Gietz RD, Woods RA. Genetic transformation of yeast. Biotechniques. 2001, 30(4): 816-

831.

- [56]Görner C, Redai V, Bracharz F, et al. Genetic engineering and production of modified fatty acids by the non-conventional oleaginous yeast *Trichosporon oleaginosus* ATCC 20509. *Green Chemistry*. 2016, 18: 2037-2046.
- [57]Becker DM, Guarente L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymology*. 1991, 194: 182-187.
- [58]Meilhoc E, Masson JM, Teissié J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Nature Biotechnology*. 1990, 8: 223-227.
- [59]陈少峰, 望忠福. 高效液相色谱法测定酵母葡聚糖. *食品科技*. 2009, 34(7): 278-280.
- [60]Tracey MV. Chitin. *Modern Methods of Plant Analysis*. 1956, 2: 264-274.
- [61]Zhang XC, Guo YY, Liu X, et al. Engineering cell wall synthesis mechanism for enhanced PHB accumulation in *E. coli*. *Metabolic Engineering*. 2018, 45: 32-42.
- [62]Wang Y, Wu H, Jiang XR, et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metabolic Engineering*. 2014, 25: 183-193.
- [63]Jiang XR, Wang H, Shen R, et al. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. *Metabolic Engineering*. 2015, 29: 227-237.
- [64]Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*. 2013, 15(1): 1-9.
- [65]Dulermo T, Lazar Z, Rémi D, et al. Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015, 1851: 1107-1117.
- [66]Koivuranta K, Castillo S, Jouhten P, et al. Enhanced triacylglycerol production with genetically modified *Trichosporon oleaginosus*. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9: 1-15.
- [67]Liu ZJ, Gao Y, Chen J, et al. Analysis of metabolic fluxes for better understanding of mechanisms related to lipid accumulation in oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2013, 130: 144-151.
- [68]Humbird D, Davis R, Tao L, et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Basic Biologicalences*. 2011, 1-148.
- [69]Wang J, Gao QQ, Bao J. Genome sequence of *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271: an oleaginous yeast with excellent lignocellulose derived inhibitor tolerance. *Journal of Biotechnology*. 2016, 228: 50-51.
- [70]Imatoukene N, Verbeke J, Beopoulos A, et al. A metabolic engineering strategy for producing conjugated linoleic acids using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied*

Microbiology and Biotechnology. 2017, 101(11): 4605-4616.

[71]Wang YN, Lin XP, Zhang SF, et al. Cloning and evaluation of different constitutive promoters in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Yeast. 2016, 33: 99-106.

附录 I q-RT-PCR 考察基因及所用引物

表 1 油脂合成相关基因 q-RT-PCR 实验引物

Table 1 Primers for qRT-PCR of genes related to lipid biosynthesis

Abbreviation	Enzyme	Gene ID	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	
Acetyl-CoA generation	<i>ACL</i>	ATP citrate (pro-S)-lyase	Trcu_05047	GGTCTTGCTTCGGGCTAC	ACAAGGACGACACGGAGG
	<i>PDHA</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	Trcu_00818	CCCTCCTCGTCGAGTTTG	GCAATAGGGTCGTGGGTC
	<i>PDHB</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	Trcu_03773	GGATCGGAGATCATTGCC	AATGAGAGCAGTGTCGGG
	<i>LAT</i>	Dihydrolipoamide acetyltransferase	Trcu_02935	GCTCCCGAAGACCCTAAG	AGCATGAAGGTAAGGGGG
	<i>LPD</i>	Dihydrolipoamide dehydrogenase	Trcu_02957	CCAACCAGGACACTGACG	CCGAAGTTCACGACGATG
	<i>ACS</i>	Acetyl-CoA synthetase	Trcu_03003	TCTTCATCATCGCCGACC	GACGACGTCAATGCGCTC
NADPH regeneration	<i>ZWF</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Trcu_05648	ACAAGCTTCCCGGTCTTG	TCACGAACGAAGTGCGAG
	<i>GND</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase	Trcu_02851	CACCACCCAACCCTTTCC	CAAACCCCAAGCAAGT
	<i>ME</i>	Malic Enzyme	Trcu_00011	CCACCACACACATTTCCG	ATAGCCATGTGGGTTCGG
	<i>IDP1</i>	Isocitrate dehydrogenase	Trcu_00627	ACGGTGATGTCATGTCGG	TCTCCTCTCCCTTCTGCC
Free fatty acid synthesis	<i>ACC1</i>	Acetyl-CoA carboxylase	Trcu_04595	AAGCTCAACTCGATGGGC	CGTAAGCACGCGAAGTCT
	<i>FAS1</i>	Fatty acid synthase subunit beta	Trcu_00520	TTCATCGAGGTTGGTCCC	CTTGTGGTTCTTGGCGTG
	<i>FAS2</i>	Fatty acid synthase subunit alpha	Trcu_00529	TTACCTCGTTCGTTTTCG	GCACGACGCTTGATCTTG
	FabG1	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	Trcu_00268	TTCTATGTCGTGCAGGCC	CTCTTGACGCCTGCTTTG
	FabG2	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	Trcu_01543	GACACCTTCAAGCCCGAC	CTGGTCGTTGGGGAAGAC
Triglyceride synthesis	<i>LRO1</i>	phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	Trcu_05085	TACCTCCTCACGCACACG	TGCACTTCGAGTGGGTTG
	<i>DGAI</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	Trcu_03536	TTGGCACCTTTTCGCTC	TGGTGATCATTGGGATGG
	<i>GAT1</i>	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	Trcu_04305	AAGGCAAAGGAGGCTCTC	TAGCGGTAGGCGACAATG
	<i>LPIN</i>	Phosphatidate phosphatase	Trcu_01186	CCGAGGAATGGCTCAAGC	CCTTACCCTGCAGCGAGT

表 2 木质纤维素全糖代谢相关基因 q-RT-PCR 实验引物

Table 2 Primers for qRT-PCR of genes related to whole carbon source utilization

Abbreviation	Enzyme	Gene ID	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	
<i>HXK-1</i>	Hexokinase	Trcu_02268	CACATTGTCGCCACCG	AGGATCTTGAGTGCCTCGTGT	
<i>HXK-2</i>	Hexokinase	Trcu_03222	GTATCGCCGCCATTGTCT	GTGCGTCGTAATCTTCTTGC	
<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	Trcu_04167	AAGACTGAGGAGCAGGTTGT	CATGATCGAGTTGGTGGG	
<i>FBP</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase I	Trcu_01724	GCGGCATCTTCGGCTAC	GTGGATCGAGGTGGGGAC	
<i>PFK</i>	6-Phosphofructokinase	Trcu_00360	CAACGCTCAAGCCTACCA	TGCTCCACCAGACATTCG	
<i>TPI</i>	Triosephosphate isomerase	Trcu_00578	CCACCATTGAGGAGAAGGACTG	GTTGACCGAGCCGCCGTA	
<i>FBA</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	Trcu_04860	CGACACTCAGTTCGCCTACC	TGGTCTTCTCACCTCACG	
Glucose degradation	<i>GAPDH-1</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Trcu_01126	CCACCAAGCCCTTCAACA	GACGACTGGGACGAAGTGAG
	<i>GAPDH-2</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Trcu_01680	GACGGCCCTTCGCACAA	GGACACGGAACGCCATAC
	<i>PGK</i>	Phosphoglycerate kinase	Trcu_05335	TCCACATTGAGGAGGAGGGC	GTCGCCGAGCGAAGTAAGC
	<i>PGM-1</i>	phosphoglycerate mutase	Trcu_02862	CCCCGTTCCCTTCAATATCTC	ACTTGCCGGTCATCTCCTCA
	<i>PGM-2</i>	Phosphoglycerate mutase	Trcu_00681	GGTGCGGCTTCCCTATCCA	GGGCTCCTTGAGCGTGTGT
	<i>PGM-3</i>	Phosphoglycerate mutase	Trcu_03622	ACCCGCATATCCGAGTGGC	GCCGTCTTGAGGCTGTAGGG
	<i>PGM-4</i>	Phosphoglycerate mutase	Trcu_03969	GGCGAGACGCTCACCGAGTT	GGAGGGCATTGCCAAACAGC
	<i>ENO</i>	Enolase	Trcu_05201	TTCATTGCCGACCTTGCC	CGGTGGTGCCCTTGAGGA
	<i>PYK</i>	Pyruvate kinase	Trcu_00983	GGCTCGCTCATCTCCAA	ACGGGATAGACACCACGC
	Xylose degradation	<i>XYLR</i>	D-xylose reductase	Trcu_01943	AGACTCCCCTCGCTCCTCA
<i>XYLD</i>		Xylitol dehydrogenase	Trcu_00347	CGCACCGGGATCAAAGGT	GTGTTGCAGTAGCGGAAGACG
<i>XKSI</i>		xylulokinase	Trcu_05012	GGCCAAGAACCCACGAT	TTGTACGCCACGCCGACC
<i>TKT</i>		transketolase	Trcu_00933	CTCCGCTCCAAGGGTCTCAA	AGGCAGGGATACCGATGTGC
Arabinose degradation	<i>LAD</i>	L-arabinitol 4-dehydrogenase	Trcu_00476	GTGTTTGCGGCAAGGTGT	CGAGTGGCTTGAGGTTGATGAG
	<i>DCXR</i>	L-xylulose reductase	Trcu_03868	GCAACACGGGTCTCAAGCA	GGTCGAGTTGGCAATGTCCT
	<i>GRE2</i>	Xylitol dehydrogenase	Trcu_00347	GGCCAAGAACCCACGAT	TTGTACGCCACGCCGACC
	<i>XKSI</i>	Xylulokinase	Trcu_05012	CTCCGCTCCAAGGGTCTCAA	AGGCAGGGATACCGATGTGC
	<i>TKT</i>	Transketolase	Trcu_00933	GCGGCATCTTCGGCTAC	GTGGATCGAGGTGGGGAC
Galactose degradation	<i>GALK-1</i>	galactokinase	Trcu_01351	GACCTGTGCCTCAAGAATGGC	GGCTCGTACTCGCGGGTAAT
	<i>GALK-2</i>	UDP-glucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	Trcu_00643	TCTTGCCCGTTCCCGTAC	GGATAGAAGTGGAGGTGGATGTG
	<i>GALK-3</i>	UDP-glucose 4-epimerase	Trcu_00100	CATTTACGGCTCGGACTGGG	TGCGGTTGGACGCCTTCTC
	<i>GALK-4</i>	UDP-glucose 4-epimerase	Trcu_03126	CCAACATCTTCTCCAAGTGCG	TTCTGTGCCAGTGTCCGGTC

	<i>GALK-5</i>	UDP-glucose 4-epimerase	Trcu_03229	CACTGGAACCACCGTCAGC	GACTGTGGCATTGGAACCC
	<i>GALK-6</i>	UDP-glucose 4-epimerase	Trcu_03995	GCTGAAGACGCCGAGAACA	GAACCATTGCCACCATAGAA
	<i>UGP</i>	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Trcu_05559	AGCTCGGCGAGGACTTTAA	GGTGGCGACAATGATGCA
	<i>PGMI</i>	Phosphoglucomutase	Trcu_00165	CAAGCTCTTTGCCTCGTCC	GCCGTCAATGGGGTCAGT
	<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	Trcu_04167	AAGACTGAGGAGCAGTTGT	CATGATCGAGTTGGTGGG
Mannose degradation	<i>HXK-1</i>	Hexokinase	Trcu_02268	CACATTGTCGCCACCG	AGGATCTTGAGTGCCTCGTGT
	<i>HXK-2</i>	Hexokinase	Trcu_03222	GTATCGCCGCCATTGTCT	GTGCGTCGTAATCTTCTTGC
	<i>MPI</i>	Mannose-6-phosphate isomerase	Trcu_01188	CTGTACGACCCGCCATT	TGCTGAATCCCCACGAAA

表 3 细胞壁代谢相关基因 q-RT-PCR 实验引物

Table 3 Primers for qRT-PCR of genes related to cell wall synthesis and degradation

	Abbreviation	Enzyme	Gene ID	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Glucan synthesis	<i>FKSI</i>	1,3-beta-glucan synthase	Trcu_04136	CACCCCCTTCTTTGACCG	ATCGGGACCACAATGAGC
	<i>BGP</i>	1,3-beta-glucan biosynthesis-related protein	Trcu_01300	CTCGCGTACCCACCAGAC	TGCTGCCTGGCAACATC
	<i>KRE6-1</i>	Beta-glucan synthesis-associated protein	Trcu_00780	ACAGACGTCCCATCGACG	AGCGTTTGCGTCCATCTT
	<i>KRE6-2</i>	Beta-glucan synthesis-associated protein	Trcu_05674	TGCCTCTGTTGGCTGTGA	CACGACCCACCGTTCATC
	<i>YEPB-1</i>	Beta-glucan synthesis-associated protein	Trcu_03554	GTGGGTCGACTACACCCG	CGCCACCTTGAACCTGTC
	<i>YEPB-2</i>	Beta-glucan synthesis-associated protein	Trcu_03972	TGTGGGACACCAAAAAGG	TCTTGCCATTTGAGAGCC
	<i>YEPB-3</i>	Beta-glucan synthesis-associated protein	Trcu_04438	AACACGACGGACACGATC	GTTGTCACCCGCTTCGTA
	<i>AGSI</i>	Cell wall alpha-1,3-glucan synthase	Trcu_01141	GCAGGCAGATGGAGAAGA	ACCCCAAACACCCTCCTC
	<i>GBE1-1</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme	Trcu_00077	AATCTACCAGCGGCTTCTG	TATGTGTGCGGGGTGGTA
	<i>GBE1-2</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	Trcu_03380	GGGCTGGTCTTCTGTTTCATC	GCAACGTCGACACCGATA
	<i>BCR1</i>	Biofilm and cell wall regulator 1	Trcu_05231	TGATGGTCATTATGGACCACCT	CTGCGCTGGAGATTGTTGAC
Glucan degradation	<i>BGL</i>	Beta-1,3-1,4-glucanase	Trcu_05665	TGACGACATGCTCCTTGC	GAACGCCTCCTTGAATGC
	<i>EXG</i>	Exo-beta-1,3-glucanase	Trcu_05082	AACGCCATGTGGCACTAC	ACCCAAGCAGCGGTAAG
	<i>EBG-1</i>	Probable endo-1,3(4)-beta-glucanase	Trcu_02840	AACTGGGGCACTCCTGTC	TTGTTGCGGACGTAAGTCG
	<i>EBG-2</i>	Probable endo-1,3(4)-beta-glucanase	Trcu_00501	ACTCTCGAGGCCACTTGC	CTGTGGTCCTGTCCCGAT
	<i>EGE</i>	Endoglucanase E-4	Trcu_05214	CGTACTCTGTCCCGAACG	CCTGCGGATATTGTCCCT
	<i>EGC</i>	Endoglucanase C	Trcu_03502	GTGCGCCAGACACTCATGT	ATTCAGCTTAGCCCTCTTGG
	<i>EGL1-1</i>	Endoglucanase 1	Trcu_01919	ACCAGTCGTGCTACAAGCA	CGGCATTGCAAGACAC
	<i>EGL1-2</i>	Endoglucanase 1	Trcu_02186	CTCCTGACCGAGTTTGGGA	TACGTCGTCTCAAAGGCG
Chitin synthesis	<i>CHS1-1</i>	Chitin synthase	Trcu_01104	GCAGGCAGATGGAGAAGA	ACCCCAAACACCCTCCTC
	<i>CHS1-2</i>	Chitin synthase	Trcu_02202	GACCAGAACCGCACGTTC	CGGGAGACAGGCTTTGAT
	<i>CHS1-3</i>	Chitin synthase	Trcu_02791	TGCACGACTTGTCTTGGG	TTGATGCGGATGTTGTCC

	<i>CHS1-4</i>	Chitin synthase	Trcu_04533	CACCAGGACAAGCCGATC	CCAGATGGGAAGCGAGAG
	<i>CHS1-5</i>	Chitin synthase	Trcu_05206	TTCTCACCGAAGCAAAGG	CACCTGAAGGATACCCGC
Chitin degradation	<i>CHI-1</i>	Chitinase	Trcu_00189	CGTTCTGCAACACGCAA	GCGGTCAATCGAGTAGCT
	<i>CHI-2</i>	Chitinase	Trcu_02203	GCGTTGGCAGCGTTAGT	TGCCAGAACATCACCGAG
	<i>CHI-3</i>	Chitinase	Trcu_04046	GGCTTCGTTGCAACTG	CAGATCGAGCAGCCCTTA
Mannan synthesis	<i>HOC1</i>	Mannan polymerase II complex subunit	Trcu_02121	CCCGTCCAAGACGTTTGC	CCTCCTTGATGCGGTTGAT
	<i>MPR</i>	Mannose-6-phosphate receptor	Trcu_02225	CGGCTCTGGCGAAACCT	GATCAATGTCATCCTCGTCCTC
	<i>MPG1-1</i>	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	Trcu_00947	GGCAAGGGTGTTCGTCTC	CGACCGACTGTGCTGTTCC
	<i>MPG1-2</i>	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	Trcu_01890	GCGTCCGCCAAGGTCGG	GACGCCGGGGCCAATGGCG
	<i>POMT-1</i>	Mannosyltransferase	Trcu_02036	GTCTGTTGATTGCGGGATG	GGAACGGCACAAAGTGGA
	<i>POMT-2</i>	Mannosyltransferase	Trcu_02921	CTGCTCCGTGGACAAGG	GGGCGAGTACTGCGACA
	<i>POMT-3</i>	Mannosyltransferase	Trcu_02955	TTGTCATTGGCTGCTTCT	CTCGTGGGTGACCTTCTTCT
	<i>PMDU</i>	Mannose-P-dolichol utilization defect 1	Trcu_01672	AACCTCGTGCTTGCCCTCC	TTCGCCGCTCCGTCATC
	<i>GNOST1</i>	GDP-mannose transporter 1	Trcu_03559	CGGCTCCACTACCTACTCCA	GACGATACCGGCGATGC
	<i>DPM</i>	Dolichol phosphate-mannose	Trcu_05144	TCGGTCTCGCAGGCATC	GGCAGTCTTCCAGAGTTCC
Mannan degradation	<i>MANB</i>	Phosphomannomutase	Trcu_04499	AGTTTGAAAAGTTTGACAAGCAG	GGATCTCGGTGAATCCCTC
	<i>MAN1B1</i>	Alpha-1,2-mannosidase	Trcu_01427	GCATACTACCGCTACCTCCAA	CATCCACGAGCCGAACAT
	<i>MANEA</i>	Alpha-1,2-mannosidase	Trcu_00284	CTCCGTCTCGGCGACTTC	GAGGCTCTTGACATACTTCTTGC
	<i>MAN1</i>	Alpha-1,2-Mannosidase	Trcu_00569	CGTGCAGATCAACCCACCA	GGCAAAGGGCGTAAGGAAT
	<i>EDEMI</i>	Mannosidase	Trcu_03454	TCCTGGCACCTGGACGC	GCACCGCCTTGTGATGA
	<i>MAN2C1</i>	Alpha-mannosidase	Trcu_03942	GCCACCCTCAGAATTGCC	CGCAGCAGCCTTGGTTTT
	<i>MANBA</i>	bBeta-mannosidase	Trcu_00855	ACGGTCTCGGTGCAGAAGC	CCTTGGCATTACGACTTGC

附录II 表达载体构建所用质粒及引物

表 1 表达载体构建所用质粒

Table 1 Plasmids used in plasmid construction

Plasmids	Characteristics	Sources
pUC19- $\Delta ECH1::HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta HYR::GFP$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>GFP</i> into <i>HYR</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28 $\Delta ECH1::HYR$	This work
pUC19- $\Delta ACS::HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>HYR</i> into <i>ACS</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ADH1::HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>HYR</i> into <i>ADH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ADH2::HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>HYR</i> into <i>ADH2</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta PFK::HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>HYR</i> into <i>PFK</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ECH1::(TEF)HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>(TEF)HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ECH1::(GAPDH1)HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>(GAPDH1)HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ECH1::(GAPDH2)HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>(GAPDH2)HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ECH1::(FBA)HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>(FBA)HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta ECH1::(PGK)HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>(PGK)HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work
pUC19- $\Delta \Delta ECH1::(PGI)HYR$	Plasmid for integration of the expression cassette <i>(PGI)HYR</i> into <i>ECH1</i> locus of <i>T. cutaneum</i> MS28	This work

表 2 表达载体构建所用引物

Table 2 Primers used in plasmid construction

Primers	Sequences (5'-3')
$\Delta ECH1::HYR-1$	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC
$\Delta ECH1::HYR-2$	GAGTTCAGGCATGGTTGCTATGGTCTTCCTTTTGC
$\Delta ECH1::HYR-3$	ACCATAGCAACCATGCCTGAACTCACCGC
$\Delta ECH1::HYR-4$	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGGACG
$\Delta ECH1::HYR-5$	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTTCAT
$\Delta ECH1::HYR-6$	ACGGCCAGTGAATTCGATGCTCGGCAGATAGGACTG
$\Delta HYR::GFP-1$	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC
$\Delta HYR::GFP-2$	TTCTCCTTTACTCATGGTTGCTATGGTCTTCCTTTTGC
$\Delta HYR::GFP-3$	AAGACCATAGCAACCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTG
$\Delta HYR::GFP-4$	GAACCTGCGGCACACTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGT
$\Delta HYR::GFP-5$	AACTATACAAATAAGTGTGCCGCAGGTTCAT
$\Delta HYR::GFP-6$	ACGGCCAGTGAATTCGATGCTCGGCAGATAGGACTG
$\Delta ACS::HYR-1$	CGACTCTAGAGGATCCAGTCCTTGCTTTCATCCGA
$\Delta ACS::HYR-2$	TGAGTTCAGGCATGGTGTGATGTGTAGAAGCG
$\Delta ACS::HYR-3$	CACATCAACACCATGCCTGAACTCACCG
$\Delta ACS::HYR-4$	AAGGTCAATTAGAAGTATTCCTTTGCCCTCGG
$\Delta ACS::HYR-5$	AAGGTCAATTAGAAGTATTCCTTTGCCCTCGG
$\Delta ACS::HYR-6$	GACGGCCAGTGAATTCGGCAAGGAGAAGGACACCC
$\Delta ADH1::HYR-1$	GACTCTAGAGGATCCCGCGTCGGTAAACCCTGA
$\Delta ADH1::HYR-2$	AGTTCAGGCATGGTGGTGGAGGCGATGAC
$\Delta ADH1::HYR-3$	CTCCACCACCATGCCTGAACTCACCGC
$\Delta ADH1::HYR-4$	CTTTTCGGTTTCTCTCTATTTCCTTTGCCCTCGG
$\Delta ADH1::HYR-5$	AGGGCAAAGGAATAGAGAGAAACCGAAAAGTAGTTGTATG
$\Delta ADH1::HYR-6$	GACGGCCAGTGAATTCATGGTGCAAGGTGAGATCC
$\Delta ADH2::HYR-1$	CGACTCTAGAGGATCCTGGGGGATGAAGAGTGGG
$\Delta ADH2::HYR-2$	GTGAGTTCAGGCATGGTGGCAGGAACTGTGGG
$\Delta ADH2::HYR-3$	CAGTTCCTGCCACCATGCCTGAACTCACCGC
$\Delta ADH2::HYR-4$	CTATTCACAGCTTCCTATTCCTTTGCCCTCGG
$\Delta ADH2::HYR-5$	GGGCAAAGGAATAGGAAGCTGTGAATAGGAGAAACG
$\Delta ADH2::HYR-6$	ACGGCCAGTGAATTCGGTGTCCAAAATTGTTGATCG
$\Delta PFK::HYR-1$	CGACTCTAGAGGATCCGAGGGCCTGGTACAGC
$\Delta PFK::HYR-2$	GTTCAGGCATTGTGGTGGGCGGGAG
$\Delta PFK::HYR-3$	GCCCACCACAATGCCTGAACTCACCG
$\Delta PFK::HYR-4$	GAGAGTGACGAGCCTATTCCTTTGCCCTCGG
$\Delta PFK::HYR-5$	GCAAAGGAATAGGCTCGTCACTCTCCG
$\Delta PFK::HYR-6$	GACGGCCAGTGAATTCAGCAGCACCCGGC
$\Delta ECH1::(TEF)HYR-1$	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC

<i>ΔECH1::(TEF)HYR-2</i>	GCCTCCATGTCGGTTGCTATGGTCTTCCTTTTGC
<i>ΔECH1::(TEF)HYR-3</i>	CCATAGCAACCGACATGGAGGCCCAGAATACC
<i>ΔECH1::(TEF)HYR-4</i>	GTGAGTTCAGGCATGGTTGTTTATGTTTCGGATGTGATGT
<i>ΔECH1::(TEF)HYR-5</i>	GAACATAAACAACCATGCCTGAACTCACCGC
<i>ΔECH1::(TEF)HYR-6</i>	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGGACG
<i>ΔECH1::(TEF)HYR-7</i>	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTTTCAT
<i>ΔECH1::(TEF)HYR-8</i>	ACGGCCAGTGAATTTCGATGCTCGGCAGATAGGA
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-1</i>	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-2</i>	CTGGCAGACGTGGTTGCTATGGTCTTCCTTT
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-3</i>	CCATAGCAACCACGTCTGCCAGGTTCT
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-4</i>	GGTGAGTTCAGGCATGGTTCAAATATGAGAGTGTATGAGAG
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-5</i>	CTCATATTTGAACCATGCCTGAACTCACCG
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-6</i>	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGG
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-7</i>	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTT
<i>ΔECH1::(GAPDH1)HYR-8</i>	ACGGCCAGTGAATTTCGATGCTCGGCAGATAGGA
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-1</i>	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-2</i>	GCTGGGCTGGGGTTGCTATGGTCTTCCTTT
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-3</i>	ATAGCAACCCCAGCCCAGCAGCA
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-4</i>	GTGAGTTCAGGCATGATGGATTTGTTTGTGTTGAGG
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-5</i>	CAAACAAATCCATCATGCCTGAACTCACCG
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-6</i>	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGG
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-7</i>	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTT
<i>ΔECH1::(GAPDH2)HYR-8</i>	ACGGCCAGTGAATTTCGATGCTCGGCAGATAGGA
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-1</i>	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-2</i>	TGTCGGATAAGTGGGTTGCTATGGTCTTCCTTT
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-3</i>	ACCATAGCAACCCACTTATCCGACACCATCAAC
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-4</i>	TGAGTTCAGGCATTTTGGGGTACAGGTAAATGGG
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-5</i>	CTGTACCCCAAATGCCTGAACTCACCG
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-6</i>	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGG
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-7</i>	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTT
<i>ΔECH1::(FBA)HYR-8</i>	ACGGCCAGTGAATTTCGATGCTCGGCAGATAGGACTG
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-1</i>	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGCC
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-2</i>	ACATTTTAGAGGAGTGGTTGCTATGGTCTTCCTTT
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-3</i>	AGACCATAGCAACCACTCCTCTAAAATGTGCCG
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-4</i>	TGAGTTCAGGCATTTGTGGAAGATGGATGTTTCA
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-5</i>	CCATCTTCCACAATGCCTGAACTCACCG
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-6</i>	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGG
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-7</i>	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTT
<i>ΔECH1::(PGK)HYR-8</i>	ACGGCCAGTGAATTTCGATGCTCGGCAGATAGGACTG
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-1</i>	CGACTCTAGAGGATCCTCAAAGAAATCGTGAAAGAAGC

<i>ΔECH1::(PGI)HYR-2</i>	GAGCAAGTTTCTCGGTTGCTATGGTCTTCCTT
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-3</i>	ACCATAGCAACCGAGAACTTGCTCGCATACG
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-4</i>	CGGTGAGTTCAGGCATTTTGATAAGATGTAGTCCGTGGG
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-5</i>	CTACATCTTATCAAAATGCCTGAACTCACCG
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-6</i>	CTGCGGCACACCTATTCCTTTGCCCTCGG
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-7</i>	CAAAGGAATAGGTGTGCCGCAGGTT
<i>ΔECH1::(PGI)HYR-8</i>	ACGGCCAGTGAATTCGATGCTCGGCAGATAGGACT

学术成果

准备发表论文:

1. Weiliang Hou[#], **Liao Zhao**[#], Mingshan Hu[#], Jie Bao^{*}. Precise and whole-throughput screening of the lightest oleaginous yeast cells from adaptive evolution culture of cellulosic lipid. **Energy & Environmental Science**.

申请专利:

1. 鲍杰, **赵瞭**, 侯伟亮, 胡明珊, 张建。一种离心筛选具有高含油率油脂酵母菌株的方法及其应用, 专利申请号: 201910186710.0

致谢

2015 年夏天，并未下定考研决心的我参加了华东理工大学夏令营，希望为期四天的活动让我找到答案。入营第二天是学院教授的讲座活动，当天最后一个汇报的是鲍杰老师。我常常在向别人解释自己为什么最后考研并且转学生物学的时候提起那场汇报，我完全被老师对于科研事业的坚信与热爱所感染，我相信一个提到自己的课题便激动地踱步微笑的老师会是真正专注于学术的科学家，也是我最理想的导师。

考研复试得到鲍老师认可后，我如愿加入生物质能源与生物炼制实验室，开始了这三年的研究生活。与大学不同，我希望研究生期间是纯粹沉浸于学术的，希望自己能在有意义的课题中发挥价值，因而没有参加任何学生组织或课余活动，把自己的时间完整地交付于实验。实验室的老师与师兄师姐都非常自律刻苦，工作日常常忙碌到午夜，周末也少有休息。偷偷通宵赶数据的夜晚，我一个人戴着耳机提神壮胆，凌晨三点陪我在通风橱提油的是大紧的《晓松奇谈》。没有进展的汇报前夜，我会点一大杯甜品，先改 PPT 到凌晨，睡一会儿觉再起来化个好气色的妆假装底气满满。在这里我体会到了坚持工作的辛苦与快乐，让我有机会更好地认识自己，这是我异常重要的一段人生。

2018 年是个想忘记又感受清晰的黑洞，似乎所有问题都在向最坏的方向发展。最为遗憾的是经手的几个课题都未能有所进展，虽然非常感谢鲍老师从未因此对我产生怀疑，每次进展讨论都给予我最大的鼓励与认可。但不能成功推进课题始终都是我的心结，是我辜负老师信任的惭愧，希望师弟师妹在未来能够有所突破。我愿意承认这是一段有些艰难的日子，我以最差的状态迎接了新的研究与下半年的秋招。万幸课题有所结果，秋招勉强参加了三家面试也得到了第二心仪的 offer。我无法感谢苦难，但真的感谢期间带给我能量的朋友师长。

感谢鲍老师。感谢老师给予的机会和所有关心鼓励，老师是我崇拜的学者，更是我永远榜样。感谢我的畅畅，感谢你四年多的温暖陪伴，永远比我自己要更相信我，永远带给我光亮和美好。感谢我们的新干线四人组，平平师姐、邱师兄、邵帅师兄，我天天和博士们吃喝玩乐的生活终于还是要告一段落。祝福我最爱的师兄师姐幸福顺意，在河南、淮安、上海都潇洒生活，婚礼再见。感谢忍受我、开解我的朋友们，M、正武师哥、魏师兄、小易、肖和静静，你们是我珍贵的亮色。

这是我郑重选择、永不后悔的三年，人生体验派之勤勤恳恳“科研狗”，暂终。

赵 瞭

2019 年 4 月 1 日

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 伍拾玖 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____