

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学 博士学位论文

产油酵母在超离心力胁迫适应性进化中的  
行为表征和信号通路分析

刘祺

指导教师姓名: 鲍杰 教授 华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: \_\_\_\_\_ 论文答辩日期: \_\_\_\_\_

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

## 学位论文使用授权声明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华东理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。保密论文在解密后遵守此规定。  
论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日至\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日）

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

指导老师签名：

日期： 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。所提交的学位论文，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：

年 月 日

## 产油酵母在超离心力胁迫适应性进化中的行为表征和信号通路分析

### 摘要

产油酵母是一类生长快速、底物谱广泛的非逸出型代谢真菌，是进行微生物油脂生产最有前景的细胞工厂。以木质纤维素生物质为原料，通过糖平台生物炼制技术进行微生物油脂生产，是生物航煤、生物柴油可持续碳中和生产的重要选择。野生型产油酵母油脂含量通常较低、在木质纤维素环境生长状态较差，很难达到工业生产的要求。目前已经尝试了包括常规诱变、代谢工程改造等各种方法获得具有工业应用潜力的高油脂含量产油酵母，但是取得的进展依然十分有限。

针对目前培育高油脂含量产油酵母的困难，课题组前期开发了一种超离心力胁迫适应性进化方法，获得了数株具有工业应用潜力的高油脂含量和高油脂产量的“超级”皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 突变菌株，显著改变了产油酵母皮状丝孢酵母的细胞形态，细胞体积极度扩张、细胞油脂含量显著提升，最终以木质纤维素为碳源的微生物油脂产量提高 7-8 倍。虽然超离心力胁迫适应性进化方法在应用上获得了显著的成效和成功，但迄今导致产油酵母形态和代谢行为发生巨大变化的内在机制没有进行深入的探究。这一方法与目前应用的各种微生物育种方法截然不同，其内在机制认识的欠缺极大阻碍了今后进一步提升该方法的效率和开发相关代谢工程改造的策略。该方法的机制分析需要达成以下目标：(1) 超离心力胁迫适应性进化对于产油酵母的细胞生长、细胞结构和油脂积累的代谢行为的精确表征，以揭示超离心力胁迫形成“超级”产油酵母的潜在机制；(2) 深入挖掘产油酵母细胞在持续超速离心力胁迫下，诱发细胞结构和油脂代谢变化的细胞表面感受器蛋白发生的信号感知、信号转导通路和后续的代谢调控机制。针对以上待解决的问题，本论文首先对超离心力胁迫适应性进化后获得的两株突变皮状丝孢酵母菌株进行了细胞形态、结构、油脂合成能力等完整的表征，突变菌株实现了木质纤维素生物质批次发酵生产微生物油脂的最高指标；随后对超离心力胁迫适应性进化促进油脂合成的机制进行了多层面的研究分析，通过对超离心力胁迫适应性进化获得的多株不同的典型产油酵母的组学分析、蛋白互作网络分析和分子生物学实验，鉴定了一条产油酵母在外界超离心力胁迫下促进油脂合成的重要机械力信号转导通路。

本论文第一部分对前期研究经超离心力胁迫适应性进化筛选所获得的两株产油皮状丝孢酵母突变体 *T. cutaneum* MP11 (超离心力胁迫和筛选) 和 YY52 (超离心力和纤维素酶双重胁迫，以及超离心力筛选) 进行了详细的表征和分析。两株突变体在限氮培养基和非限氮培养基中连续传代的表型均维持稳定。对比于出发菌株，经长周期超离心力胁迫适应性进化筛选后的两株突变菌株的油脂积累能力、细胞形态、细胞壁结构等特性均发生了稳定、显著且相似的变化。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 胞内油脂含量从原始菌株的 34.0% 显著提升到了 67.8% 和 70.2%；*T. cutaneum* MP11 和 YY52 均呈现多核形态，细胞体积显著增大，相比于出发菌株均增大将近两个数量级；细胞壁显著变薄，细

胞壁中的葡聚糖、甘露聚糖含量分别下降了 61.2%、40.2%和 91.7%、56.9%。

两株突变菌株的全基因组重测序和转录分析共同揭示了细胞壁代谢相关基因的突变,尤其是葡聚糖降解酶基因的突变和转录上调可能是细胞壁组分和细胞体积发生变化的关键因素。脂质合成关键基因的突变和转录水平的上调则可能是促进油脂合成大幅提升的重要原因。基因突变和转录调控的结果表明超离心力作为强大胁迫触发基因突变并获得稳定表型变化的作用。对 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的纤维素油脂发酵性能进行评价, *T. cutaneum* MP11 和 YY52 能够实现葡萄糖和木糖的同步代谢生产高指标的微生物油脂。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 利用玉米秸秆的纤维素油脂产量分别达到 40.3 g/L 和 58.4 g/L, 相比出发菌株分别提高 3.9 倍和 5.7 倍, 是目前使用木质纤维素生物质为原料批次发酵生产微生物油脂的最高指标。

本论文第二部分旨在探究产油酵母响应超离心力胁迫的关键机制。首先对皮状丝孢酵母野生菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行不同强度离心力和离心时间的胁迫刺激,用以验证超离心力是否为细胞形态和代谢改变的重要因素。结果表明更长时间的超离心力刺激会显著缩短细胞发生形态变化的传代次数,这表明细胞存在对外界超离心力胁迫的响应通路。进一步对两株典型的产油酵母菌株圆红冬胞酵母 *Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1389 和解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* DSM 3286 进行超离心力胁迫适应性进化。结果表明,该方法仍可以实现其细胞体积的增大和油脂含量的提高,这表明,产油酵母对外界超离心力胁迫的响应通路具有相对保守性。

随后,通过转录组学和蛋白互作网络分析挖掘传递超离心力胁迫刺激的重要机械力信号转导通路。对超离心力胁迫适应性进化获得的皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母和圆红冬胞酵母进行差异转录组分析,糖代谢和脂肪酸代谢是三株进化菌株表达量均有明显变化的代谢通路。在糖代谢和脂质代谢路径中,三株进化菌株中表达量均出现显著上调的五个基因 (*TKT*、*ACL*、*ACC*、*FAS1*、*FAS2*) 可能是超离心力胁迫下机械力信号通路被激活后调控的效应基因。蛋白质互作网络分析表明,仅 TORC2 机械力信号转导通路中的核心激酶 Ypk1 与上述五个基因均有相互作用关系,其中 Ypk1 与 *FAS1* 基因(脂肪酸合成酶 1)的蛋白相关性权重值最高,在 0.6 以上。因此推测,以 Ypk1 为核心激酶的 TORC2 机械力信号通路对产油酵母传递外界超离心力胁迫信号并调节脂质合成有重要作用。

进一步通过生化实验验证 TORC2 机械力信号转导通路对超离心力胁迫信号传递的重要作用。转录组学分析和免疫印迹实验(Western blot)结果进一步表明,在超离心力刺激下, TORC2 机械力信号通路中激活因子 Slm1 表达量提高 2 倍以上,同时受 Slm1 激活的 TORC2 主要激酶底物 Ypk1 的磷酸水平上升,使其下游效应基因如 *FAS1* 和 *ACC* 表达显著上调,从而提高了胞内油脂含量。通过直接添加机械力信号感受器蛋白 TORC2 特异性抑制剂会导致超离心力胁迫刺激下 Ypk1 磷酸化程度降低,同时细胞对外界超离心力刺激不敏感。最后,尝试在皮状丝孢酵母中建立基因操作系统,以期直接验证 TORC2 信号通路传递超离心力胁迫刺激的重要作用。但由于皮状丝孢酵母极强的抗逆性和极低

同源重组效率等原因,以抗生素抗性筛选和尿嘧啶营养缺陷筛选的基因操作系统均未成功搭建。

本论文第三部分使用了超离心力胁迫适应性进化的方法叠加酚类抑制物胁迫,同步提高皮状丝孢酵母的木质纤维素衍生抑制物耐受性和油脂积累能力。最终获得的进化菌株 *T. cutaneum* MS28 在木质纤维素水解液中的生物量提高了 2 倍以上、油脂含量提高了 3 倍以上。进化菌株醛脱氢酶基因表达量普遍上调了 2 倍以上,其在木质纤维素体系中具有更活跃的糖代谢和油脂合成代谢,这些因素共同使 *T. cutaneum* MS28 可以利用未完全脱毒木质纤维素水解液生产高指标的纤维素微生物油脂。*T. cutaneum* MS28 纤维素油脂产量达到了 33.8 g/L,是出发菌株的 6 倍左右,其油脂生产效率达到理论值的 82% 以上。

本论文第四部分以经超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 为研究对象,从糖转运和糖代谢两方面分析了其实现木质纤维素来源全部单糖快速、协同代谢的原因。通过对两株突变菌株转录水平的分析,挖掘出三个转录水平显著上调的糖转运蛋白基因。由于未成功在皮状丝孢酵母中搭建基因操作系统,在酿酒酵母中对挖掘的三个糖蛋白基因进行异源表达验证其功能。尽管重组酿酒酵母菌株其木糖代谢速率有所提高,但纤维素乙醇的产量没有明显改善。该研究丰富了酿酒酵母的异源戊糖转运体的候选基因库,但该糖转运蛋白在皮状丝孢酵母中的功能仍需进一步探究。

综上所述,为了探究超离心力胁迫适应性进化中产油酵母细胞行为变化的内在机制,本研究对超离心力胁迫适应性进化获得的两株形态和代谢发生明显变化的突变皮状丝孢酵母菌株进行了详细的表征,评价了其纤维素油脂的发酵性能。通过差异转录组分析、蛋白质互作网络分析、蛋白质磷酸化水平检测等方法,鉴定出了一条在产油酵母中传递超离心力胁迫信号并促进胞内油脂积累的关键机械力信号转导通路 Slm1/2(感受器激活因子)-TORC2(感受器蛋白)-Ypk1(核心激酶)。由于皮状丝孢酵母缺乏有效的基因操作系统,后续研究将在解脂耶氏酵母模式菌中进行通路上关键基因的亚细胞定位、敲除和过表达,验证该信号通路在超离心力胁迫下的激活和调控作用,以期产油酵母的代谢调控提供一类新的调控靶点和基因元件。

**关键词:** 产油酵母; 适应性进化; 超离心力胁迫; 木质纤维素; 纤维素油脂

## Study on Behavioral Changes and Mechanisms of Oleaginous Yeasts in response to Ultra-centrifugation Stress in Adaptive Evolution

### Abstract

Oleaginous yeasts, a class of fast-growing, none-metabolite escape fungi with a broad metabolic substrate spectrum, are the most promising cell factories for microbial lipid production. Microbial lipid as the precursor production from lignocellulosic biomass by biorefinery platform is an important option for the sustainable carbon-neutral production of aviation fuel and biodiesel. However, the wild-type oleaginous yeasts usually have low content of lipid and poor growth in lignocellulosic hydrolysate, making it difficult to meet the requirements for industrial production. Various methods have been attempted to obtain high lipid content oleaginous yeasts with the potential for industrial application, such as general metabolic engineering, mutagenesis, etc., yet little progress had made.

Facing the difficulties in screening the oleaginous yeasts with higher lipid content, the previous study obtained several “super” *Trichosporon cutaneum* cell factory with high lipid content and lipid production capacity by adopting an ultra-centrifugation stress adaptive evolution method. This method significantly changed the cell morphology, enlarged the cell volume and improved the lipid content of *T. cutaneum*. The lipid titer from lignocellulose increased by 7-8-fold than the parental strain. Although this method has been applied with remarkable effectiveness and success, the key mechanism of ultra-centrifugation stress adaptive evolution in oleaginous yeast that responds to the external stress and improves the lipid accumulation has not been investigated in depth. This method is very different from the current microbial breeding methods, and the lack of understandings of the intrinsic mechanisms greatly hinders the further enhancement of the efficiency of this method and the development of relevant metabolic engineering strategies in the future. The mechanistic analysis of this method needs to achieve the following objectives: (1) the effects of ultra-centrifugation stress adaptive evolution on the physiological characteristic of oleaginous yeast, especially cell growth, cell structure and lipid accumulation, need to be further characterized to reveal the potential mechanism in the formation of “super” oleaginous yeast cells. (2) In-depth exploration of signal sensing, signaling pathways and subsequent metabolic regulatory mechanisms induce the changes in cell structure and lipid metabolism in oleaginous yeast cells under constant sustained ultra-centrifugation force stress. Aiming at these problems, this thesis firstly carried out a complete characterization of cell morphology, cell structure, lipid content, etc., of two evolved *T. cutaneum* strains obtained by ultra-centrifugation stress adaptive evolution. The highest titer of the cellulosic microbial lipid batch fermentation from lignocellulose was recorded. Subsequently, a multifaceted study was conducted to investigate the potential mechanism of promoting lipid synthesis by ultra-centrifugation stress force adaptive evolution. An important mechanical force signaling pathway that promotes lipid synthesis under ultra-centrifugation

force was identified in oleaginous by transcriptomic analysis, protein interaction analysis and molecular biology experiments.

The first part of this thesis provides detailed characterizations of two high lipid content mutant *T. cutaneum* strains, namely *T. cutaneum* MP11 (ultra-centrifugation stimulation and fractionation only) and YY52 (ultra-centrifugation stimulation and fractionation, cellulase stress during the culture process), which were obtained after long-term ultra-centrifugation stress adaptive evolution. The two mutants showed stable phenotype after successive transfers in synthetic medium (nitrogen limited medium) or YPD medium. The two evolved strains showed stable, significant and similar changes in lipid accumulation, cell morphology, cell wall structure, etc., compared to the parental strain. The intracellular lipid content of *T. cutaneum* MP11 and YY52 increased from 34.0% of the parental strain to 67.8% and 70.2%, respectively. Both the two evolved strains showed multinucleate morphology, with the cell volume increasing nearly two orders of magnitude compared to the parental strain. Moreover, the cell wall of the evolved strains was thinned, and the content of glucan and mannan decreased by 61.2%, and 40.2%, 91.7% and 56.9%, respectively.

Whole-genome resequencing and transcriptional analysis of the two mutant strains jointly showed that the mutations and up-regulations of the genes related to cell wall metabolism, especially the mutation in glucan-degrading enzyme gene, were the potential critical factors for the changes in cell wall structure. The mutations and up-regulation of the lipid synthesis genes, on the other hand, were also important for the enhanced lipid accumulation. The results of mutations and transcriptional analysis suggested that the ultra-centrifugation stress played a key role in triggering gene mutation and obtaining stable phenotype. Furthermore, the cellulosic lipid fermentation performance of *T. cutaneum* MP11 and YY52 was evaluated, showing that the two evolved strains can simultaneously consume glucose and xylose to produce high-titer microbial lipid. The cellulosic lipid titer reached 40.3 g/L and 58.4 g/L from corn stover by *T. cutaneum* MP11 and YY52, which were 3.9-fold and 5.7-fold higher than the parental strain and the highest titer of the cellulosic microbial lipid batch fermentation from lignocellulose in the reported studies.

The second part of this thesis aims to investigate the key mechanism of oleaginous yeasts in response to the ultra-centrifugation stress. Firstly, the parental *T. cutaneum* strain was stimulated by different centrifugation forces and times to verify whether the ultra-centrifugation stress is an important factor to change the cell morphology and metabolism. The results showed that more sustained ultra-centrifugation stimulation time significantly shortened the transfer numbers in which the cells morphology significantly changed, suggesting that the existence of a signaling pathway in response to the external ultra-centrifugation force. The ultra-centrifugation stress adaptive evolution was conducted on two other typical oleaginous yeasts, *Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1389 and *Yarrowia lipolytica* DSM 3286. The results showed that this method still can improve the lipid content in these two yeasts, indicating that the signaling pathway response to the external ultra-centrifugation stress was relatively conserved.

Transcriptome analysis and protein interaction analysis were used to investigate the important mechanical force signaling pathway. The transcriptional analysis of the high lipid content mutants of *T. cutaneum*, *R. toruloides* and *Y. lipolytica* showed that the differentially expressed genes were mostly enriched in sugar metabolism and fatty acid metabolism. Five genes (*TKT*, *ACL*, *ACC*, *FAS1*, *FAS2*) that showed significant up-regulation of expression in all three evolved strains might be effector genes regulated by the mechanical force signaling pathway under ultra-centrifugation force stress. Protein interaction network showed that only Ypk1, the core kinase in the TORC2 mechanical force signaling pathway, interacted with all five of the above genes, with Ypk1 having the highest protein correlation weight value of above 0.6 with the *FAS1* gene (fatty acid synthase 1). Therefore, it is hypothesized that the TORC2 mechanical force signaling pathway, with Ypk1 as the core kinase, plays an important role in response to external ultra-centrifugation stress and regulate lipid synthesis.

The important role of TORC2 mechanical force signaling pathway in response to external ultra-centrifugation stress was further verified by biochemical experiments. The results of transcriptomic analysis and Western blot showed that the expression level of Slm1, the activator of TORC2, was increased more than 2-fold by ultra-centrifugation force stress. The phosphorylation level of Ypk1, the main substrate of TORC2, was also increased, which led to the up-regulations of its downstream effector genes, such as *FAS1* and *ACC*, and increased intracellular lipid content. The addition of TORC2 inhibitor resulted in a decrease in Ypk1 phosphorylation level and a weaker response to ultra-centrifugation stress in the cells. Finally, much attempts were made to establish a genetic manipulation system in *T. cutaneum*, with a view to directly verifying the important role of TORC2 signaling pathway in response to ultra-centrifugation force. However, due to the extreme resistance and low homologous recombination efficiency of *T. cutaneum*, neither the genetic manipulation system based on antibiotic resistance screen nor the uracil nutritional defect screen were not successfully constructed.

The third part of this thesis aimed to simultaneously improve the lipid accumulation capacity and inhibitors tolerance by ultra-centrifugation stress adaptive evolution plus the addition of phenolic aldehydes. The finally obtained evolved strain *T. cutaneum* MS28 showed more than 2-fold increase in dry cell weight and 3-fold increase in lipid content in lignocellulosic hydrolysate. The transcriptional analysis showed that the aldehyde dehydrogenase expressions were generally up-regulated more than 2-fold in *T. cutaneum* MS28. The evolved strain also had more active sugar metabolism and lipid synthesis shunts in lignocellulosic hydrolysate with residual phenolic aldehydes inhibitors, enabling to produce high-titer cellulosic microbial lipid. The cellulosic lipid titer reached 33.8 g/L by *T. cutaneum* MS28, which was about 6 times higher than that of parental strain. The cellulosic lipid yield of *T. cutaneum* MS28 reached more than 82% of the theoretical yield.

The fourth part of this thesis aims to investigate the phenomenon which is the rapid and synergistic consumption of all lignocellulose-derived sugars by the evolved strains *T. cutaneum* MP11 and MS28, in terms of sugar transporter and sugar metabolism. Three significantly up-regulated sugar transporters were unearthed by transcriptional analysis. Since the genetic

manipulation system was not successfully established in *T. cutaneum*, the three sugar transporters were heterologously expressed in *Saccharomyces cerevisiae* to validate their functions in vivo. Although the recombinant *S. cerevisiae* showed an increase in the rate of xylose consumption, the cellulosic ethanol production was not significantly improved. This study enriched the candidate gene pool of heterologous pentose transporters in *S. cerevisiae*, but their functions in *T. cutaneum* need to be further investigated.

In summary, in order to investigate the intrinsic mechanism underlying the changes in cell behaviors of oleaginous yeasts during the ultra-centrifugation stress adaptive evolution, this study firstly carried out a detailed characterizations of two mutant *T. cutaneum* strains obtained by ultra-centrifugation stress adaptive evolution with obvious changes in cell morphology and metabolism, and evaluated their cellulosic lipid fermentation performance. Subsequently, a key mechanical force signaling pathway that transmits ultra-centrifugation stress signals and promotes intracellular lipid accumulation in oleaginous yeast was identified by differential transcriptome analysis, protein interactions analysis, and protein phosphorylation level measurement. This is the first study to characterize and uncover the cell behaviors changes and intrinsic key mechanical force signaling pathway Slm1/2-TORC2-Ypk1 in oleaginous yeast under mechanical force stress. However, since *T. cutaneum* lacks an effective genetic manipulation system, further work would be conducted by subcellular localizing, knocking out, and overexpressing the key genes in TORC2 signaling pathway in *Y. lipolytica*, which has a mature genetic manipulation system, to validate the key roles of TORC2 signaling pathway under ultra-centrifugation stress. Finally, we hope to provide a new class of regulatory targets and gene elements for the metabolic regulation of oleaginous yeast.

**Keywords:** Oleaginous yeast; Adaptive evolution; Ultra-centrifugation force; Lignocellulose; Cellulosic lipid

## 目录

第 1 章 前言 .....	1
1.1 生物柴油、生物航煤及其油脂原料 .....	1
1.2 产油酵母中微生物油脂的合成 .....	2
1.2.1 产油酵母的种类 .....	2
1.2.2 脂滴 .....	3
1.2.3 脂质代谢途径 .....	4
1.3. 提高产油酵母油脂积累方法的研究进展 .....	5
1.3.1 代谢工程改造 .....	5
1.3.2 诱变和适应性进化 .....	6
1.3.3 基于胞内油脂含量的高通量筛选 .....	8
1.4 酵母对外界机械应力胁迫的响应 .....	10
1.4.1 机械应力与细胞信号转导 .....	10
1.4.2 Wsc1/2/3 和 Mid2/Mtl1 机械力信号感受器及通路 .....	11
1.4.3 Mid1/Cch1 机械力信号感受器及通路 .....	12
1.4.4 黏蛋白 Msb2 和质膜感受器 Sho1 复合体机械力信号感受器及通路 .....	12
1.4.5 TORC2 机械力信号感受器及路通 .....	12
1.4.6 TORC2 的同源物和功能 .....	13
1.5 产油酵母利用木质纤维素生产微生物油脂 .....	14
1.5.1 木质纤维素生物炼制 .....	14
1.5.2 产油酵母的酚醛抑制 .....	17
1.5.3 产油酵母的戊糖利用 .....	18
1.6 本文的立题依据和主要研究内容 .....	20
第 2 章 超离心力胁迫适应性进化获得的突变皮状丝孢酵母细胞形态结构和代谢表征 .....	22
2.1 引言 .....	22
2.2 材料与方法 .....	22
2.2.1 菌株和培养基 .....	22
2.2.2 生物质原料和试剂 .....	23
2.2.3 生物质原料预处理和脱毒 .....	23
2.2.4 小麦秸秆水解液的制备 .....	24
2.2.5 显微镜的制片和观察 .....	24
2.2.6 细胞壁组分检测 .....	24
2.2.7 细胞体积的测量和密度检测 .....	25
2.2.8 胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 的检测 .....	25
2.2.9 全基因组重测序和转录组测序 .....	26
2.2.10 RT-qPCR .....	26
2.2.11 微生物油脂发酵 .....	26
2.2.12 微生物油脂的提取和检测 .....	26
2.2.13 分析方法 .....	27
2.3 结果与讨论 .....	27
2.3.1 超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株遗传稳定性的鉴定 .....	27

2.3.2	超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株纤维素油脂的积累能力.....	29
2.3.3	超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株的显微形态和结构表征.....	30
2.3.4	重测序与转录分析初步揭示突变细胞形态变化的原因.....	33
2.3.5	突变菌株纤维素油脂发酵性能的评价.....	47
2.4	本章小节.....	48
第3章	产油酵母传递超离心力胁迫刺激的信号转导通路的探究.....	50
3.1	引言.....	50
3.2	材料方法.....	50
3.2.1	菌株与培养基.....	50
3.2.2	酶和试剂.....	51
3.2.3	不同产油酵母菌株的超离心力胁迫适应性.....	51
3.2.4	显微镜的制片和观察.....	51
3.2.5	细胞表征检测.....	51
3.2.6	敲除盒与质粒的构建.....	52
3.2.7	皮状丝孢酵母的 NTG 诱变.....	53
3.2.8	皮状丝孢酵母的转化.....	53
3.2.9	RT-qPCR.....	53
3.2.10	转录组测序.....	53
3.2.11	免疫印迹实验.....	53
3.3	结果与讨论.....	54
3.3.1	皮状丝孢酵母在不同刺激强度下的超离心力胁迫适应性进化.....	54
3.3.2	超离心力胁迫适应性进化在其他产油酵母中的扩展.....	58
3.3.3	在产油酵母细胞中传递离心力胁迫信号通路的初步挖掘.....	60
3.3.4	TORC2 机械力信号通路传递超离心力胁迫信号.....	67
3.3.5	皮状丝孢酵母抗生素抗性筛选和营养缺陷型筛选的基因操作系统的初步探究.....	71
3.4	本章小结.....	78
第4章	水解液中超离心力胁迫适应性进化构建高抑制物耐受性皮状丝孢酵母.....	79
4.1	引言.....	79
4.2	材料与方法.....	80
4.2.1	菌株和培养基.....	80
4.2.2	生物质原料和试剂.....	80
4.2.3	玉米秸秆水解液的制备.....	80
4.2.4	水解液中的超离心力胁迫适应性进化.....	80
4.2.5	细胞体积和密度的测量.....	81
4.2.6	细胞壁组分检测.....	81
4.2.7	微生物油脂发酵.....	81
4.2.8	微生物油脂的检测.....	81
4.2.9	RT-qPCR.....	81
4.2.10	分析方法.....	81
4.3	结果与讨论.....	81
4.3.1	皮状丝孢酵母在水解液中的超离心力胁迫适应性进化.....	81
4.3.2	突变菌株抑制物耐受性的检测.....	82
4.3.3	突变菌株细胞壁组分的改变.....	85

4.3.4 以玉米秸秆为原料的纤维素油脂发酵评价 .....	86
4.4 本章小节 .....	90
第 5 章 突变皮状丝孢酵母木质纤维素来源全糖协同代谢的初步探究 ....	91
5.1 引言 .....	91
5.2 材料和方法 .....	92
5.2.1 菌株和培养基 .....	92
5.2.2 生物质原料和试剂 .....	92
5.2.3 质粒构建 .....	93
5.2.4 酿酒酵母重组菌株构建 .....	94
5.2.5 RT-qPCR 实验 .....	96
5.2.6 胞内木糖和阿拉伯糖的检测 .....	96
5.2.7 生物质原料预处理和脱毒 .....	96
5.2.8 乙醇发酵 .....	96
5.2.9 分析方法 .....	97
5.3 结果与讨论 .....	97
5.3.1 突变皮状丝孢酵母木质纤维素来源全糖代谢能力的评价 .....	97
5.3.2 突变皮状丝孢酵母糖转运和糖代谢基因表达水平的检测和分析 .....	99
5.3.3 在酿酒酵母中初步验证突变皮状丝孢酵母己糖戊糖共代谢能力提高的原因 .....	103
5.3.4 在酿酒酵母中整合表达来源于皮状丝孢酵母的糖转运蛋白基因 .....	110
5.4 本章小结 .....	112
第 6 章 结论与展望 .....	114
6.1 结论 .....	114
6.2 创新点 .....	115
6.3 展望 .....	115
参考文献 .....	117
附录 I .....	138
附录 II .....	146
附录 III .....	150
附录 IV .....	152
学术成果 .....	156
致谢 .....	157

## 第 1 章 前言

### 1.1 生物柴油、生物航煤及其油脂原料

化石燃料的枯竭和有害温室气体的大量排放促使研究人员将更多的研究重点放在开发更环保的可再生生物燃料，用于取代部分化石燃料。液体生物燃料的生产和消费有助于应对气候变化、促进农业多样性、能源安全和农村发展，其中生物柴油和生物航煤是重要的可再生生物燃料<sup>[1, 2]</sup>。

柴油由于具有良好的动力性能被广泛应用于汽车、机车、船舶和工业领域<sup>[1]</sup>，这造成了大量的石油消耗和温室气体排放<sup>[3]</sup>。生物柴油是动植物油或废弃油脂等甘油三酯原料与短链醇进行酯交换反应生成的脂肪酸单酯<sup>[4]</sup>。生物柴油由于其可再生、可生物降解、绿色环保等特点被广泛关注<sup>[5, 6]</sup>。研究表明，生物柴油比传统的石油柴油有高十六烷值、高润滑性、低硫含量等明显优势<sup>[7-9]</sup>。2023 年，我国国家能源局发布了《关于组织开展生物柴油推广应用试点示范的通知》将对符合条件的生物柴油试点示范项目优先纳入制造业的长期贷款项目予以支持，各项政策将共同推动生物柴油行业的发展。

煤油因其较高的安全性、低温下良好的流动性等优势成为航空业最适合的燃料<sup>[2]</sup>。且随着航空碳税制度的建立，碳减排是航空业面临的最大挑战之一<sup>[10]</sup>。使用可持续航空燃料（SAFs）是减少航空部门温室气体排放的一个最有前途的解决方案。生物航煤是植物油脂、餐饮废油、动物脂肪等甘油三酯原料通过加氢、裂解、脱羧、重整、异构化等步骤制备的烃类化合物，其成分与煤油接近<sup>[11]</sup>。生物航煤相比于传统航煤具有明显的减碳效应，其碳排放指标会降低 70%以上<sup>[10]</sup>。预计至 2030 年，生物航煤全球市场规模将超过 1800 万吨，价值达数百亿美元<sup>[1, 11]</sup>。目前，我国已初步形成了生物航煤生产、认证、应用体系。我国首套年产 10 万吨生物航煤装置，在中石化镇海炼化分公司成功进行规模化生产。

油脂是生物柴油和生物航煤生产最重要的原料，其成本占据总成本约 70%-90%<sup>[12]</sup>。油脂原料的选择取决于其产量、可获得性、区域位置等因素<sup>[2]</sup>。例如，在东南亚国家，棕榈油是最常用于生物燃料生产的油脂原料；美国、阿根廷、荷兰和巴西使用大豆油作为部分油脂原料；英国和中国则主要使用废弃食用油脂作为油脂原料<sup>[13]</sup>。大豆、菜籽等油料作物产能有限，其作为生物燃料的原料油脂会带来“与民争粮”的问题；棕榈油生产需要大量劳动力、耕地且需要大量砍伐树木，欧盟将逐步禁用棕榈基生物燃料<sup>[1]</sup>。此外，餐饮废弃油脂由于其产能受限，成本居高不下。因此，生物燃料原料油脂的巨大缺口迫切需要开发可用的大宗非粮油脂原料<sup>[14]</sup>。

微生物具有代谢活力强、培养不受季节影响、易于品种改良等优势<sup>[15]</sup>。微生物油脂是指由微藻、酵母等以碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂等为原料积累的甘油三酯以及少量的甾醇酯、磷脂和糖脂<sup>[16]</sup>。微生物油脂在脂肪酸组成上与动植物油脂相近，以 C16 和 C18（油酸、棕榈酸、亚油酸和硬脂酸）为主，因此有极大潜力代替动植物油脂用于

生物燃料的生产<sup>[17]</sup>。微藻可以通过光合作用固定二氧化碳进行可持续的油脂生产，但由于其培养周期长、生物量小、油脂提取率低等问题难以实现大规模工业化生产<sup>[18]</sup>。相比于微藻，产油酵母具有培养条件灵活、生长速度快、基因工程手段更成熟等优势<sup>[19]</sup>。为了实现微生物油脂的大规模工业化生产，迫切需要开发以非粮生物质为原料生产微生物油脂的生产菌株和技术路线。

## 1.2 产油酵母中微生物油脂的合成

### 1.2.1 产油酵母的种类

产油酵母具有对培养环境更好的适应性、底物利用谱更广等优势使其成为生产微生物油脂最佳的细胞工厂<sup>[19]</sup>。通常将胞内油脂含量达 20%以上的酵母称为产油酵母，脂质含量最高可以达到细胞干重的 80%<sup>[20]</sup>。目前已有超过 160 种产油酵母被鉴定<sup>[21]</sup>。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*)、粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、斯达氏油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 等产油酵母菌因其生物量大、底物适宜性强、油脂含量高以及遗传操作灵活等优势而受到广泛关注<sup>[22]</sup>。

解脂耶氏酵母可从多种环境中被分离出来。*Y. lipolytica* 天然油脂成分中富含多不饱和脂肪酸，可通过定向改造高效生产二十二碳六烯酸 (DHA) 等高附加值产品<sup>[20]</sup>。美国生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/194>) 收录多株 *Y. lipolytica* 全基因组注释信息，为高效的 CRISPR-Cas9 基因操作工具的搭建提供了基础。解脂耶氏酵母以木糖作为唯一碳源的糖代谢能力较差，限制了其利用木质纤维素原料生产油脂的潜力<sup>[23]</sup>。

圆红冬孢酵母于 1944 年被确认为产油酵母，是高效合成油脂和多种类胡萝卜素的微生物油脂工厂。*R. toruloids* 够利用各种廉价原料，耐受甚至可以代谢多种有毒性的木质纤维素水解副产物，因此具有搭建木质纤维素原料生物炼制平台的巨大潜力<sup>[24]</sup>。Zhu 等对单倍体模式菌株 *R. toruloids* NP11 进行了全基因组测序和注释<sup>[25]</sup>。再此基础上进一步利用遗传操作工具提高胞内油脂、萜烯类化合物、各种高价值酶等产量<sup>[26,27]</sup>。*R. glutinis* 属于红酵母 (*Rhodotorula*) 属的另一个物种，它也具有生产油脂、和类胡萝卜素的巨大潜力<sup>[28]</sup>。

斯达氏油脂酵母属于产油酵母属，其能够实现多种碳源的同时利用 (葡萄糖、木糖、乙酸等)，这种特性使得 *L. starkeyi* 能够消耗混合基质 (如不同性质的废水和木质纤维素水解物) 持续发酵积累微生物油脂等产品<sup>[22]</sup>。不过，*L. starkeyi* 属于非常规酵母目前仅有极少研究同通过同源双交换的方式进行基因操作，还未开发出基因编辑系统<sup>[29]</sup>。

皮状丝孢酵母属于隐球酵母菌科，曾用名为皮肤新毛孢杆菌 (*Cutaneotrichosporon cutaneum*)，是一种饲料酵母<sup>[30]</sup>。早在 1978 年，Moon 等利用 *T. cutaneum* 以奶酪副产物—乳清干酪为原料发酵生产单细胞蛋白 (single cell protein) <sup>[31]</sup>。*T. cutaneum* 能够利用多种碳源 (葡萄糖、木糖、乳糖等) 快速生长并产生脂质，且能够同化戊糖<sup>[32]</sup>。本实验室前期研究中，Wang 等研究发现，相比于其他产油酵母如解脂耶氏酵母、粘红酵母等，

*T.cutaneum* 具对木质纤维素来源的抑制物（甲酸、乙酸、5-羟甲基糠醛等）具有一定的耐受性，因此 *T.cutaneum* 具有利用木质纤维素原料生产微生物油脂的巨大潜力<sup>[33]</sup>。Gao 等检测 *T.cutaneum* 积累的胞内微生物油脂的脂肪酸组成，油酸(C18:1)、棕榈酸(C16:0)和硬脂酸(C18:0)的总和占全部脂肪酸 90%以上<sup>[34]</sup>，与动植物油脂组分类似，可以作为生产生物柴油的油脂原料<sup>[35]</sup>。除了木质纤维素来源的可发酵糖外，*T.cutaneum* 还能高效利用工业有机废水<sup>[36,37]</sup>、高氨氮废水<sup>[38]</sup>、工业粗甘油<sup>[39]</sup>、挥发性脂肪酸<sup>[40]</sup>、酒糟水水解液<sup>[41]</sup>和高盐海水<sup>[42]</sup>等成分复杂的廉价原料积累胞内油脂。*T.cutaneum* 是一种典型的二态酵母，Zhu 等研究了氮源等基础培养因素对 *T. cutaneum* 二态性转变的影响。在限氮条件下，*T. cutaneum* 细胞呈现小球状的酵母态<sup>[43]</sup>。Wang 等进一步揭示了 *T. cutaneum* 细胞二态性转化的相关信号转导通路，为从形态学方面提高产油酵母的油脂积累提供了一定的理论基础<sup>[44]</sup>。本实验室完成了野生皮状丝孢酵母菌株 *T.cutaneum* ACCC 20271 的全基因组测序和注释<sup>[45]</sup>。*T.cutaneum* 属于环境微生物，对目前常用的真菌抗生素（潮霉素、G418 遗传霉素、博莱霉素、丝诺菌素）均有较强抗性，因此难以选择分子操作系统中的筛选标记。且 *T.cutaneum* 作为非常规酵母进行同源双交换的几率较低，因此目前还未有 *T.cutaneum* 基因操作系统构建的相关论文研究。

### 1.2.2 脂滴

微生物合成的 TAGs 大部分作为能量组分储存在称为脂滴（droplets）的亚细胞器中<sup>[46]</sup>（图 1.1）。脂滴具有独特的超微结构，其普遍特征是存在一个疏水的核心，该核心主要由 TAGs、甾醇酯（SEs）和其它中性脂质组成<sup>[47]</sup>。疏水核心被磷脂单层包裹，磷脂单层中含有大量的整体蛋白和外周蛋白<sup>[48]</sup>。在很长一段时间中，脂滴仅被认为是细胞内脂质储存的结构，有助于细胞的能量代谢：在高能量供应期间，脂滴被大量合成；而当能量水平下降时，他们被分解以提供细胞营养<sup>[49]</sup>。但越来越多的研究表明，脂滴的表面蛋白使其具有了多种细胞生物学功能，并被认为是脂质代谢、能量稳态和细胞信号转导的动态枢纽<sup>[50]</sup>，在防止脂质毒性和氧化应激方面发挥着重要的作用<sup>[51]</sup>。

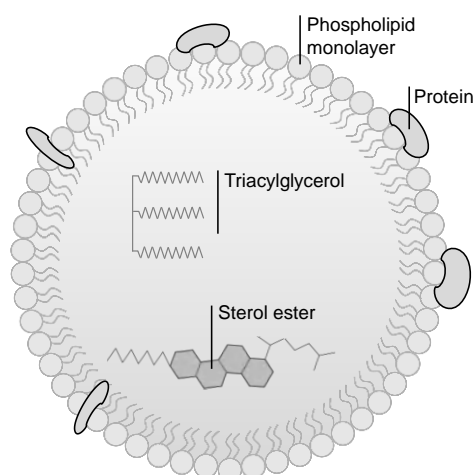


图 1.1 脂滴的组成

Fig. 1.1 Composition of lipid droplets

### 1.2.3 脂质代谢途径

酵母中的脂质通常要在必须营养元素耗尽的情况下（如氮、磷元素）才会大量积累<sup>[52]</sup>。如图 1.2 所示，氮限制导致 AMP（单磷酸腺苷）分解为肌苷 5'-单磷酸（IMP）和氨（ $\text{NH}_4^+$ ）<sup>[53]</sup>。较低的 AMP 浓度会降低异柠檬酸脱氢酶的活性（IDH），导致线粒体中柠檬酸的积累<sup>[54]</sup>。积累在线粒体中的柠檬酸通过柠檬酸/苹果酸穿梭机制输出到细胞质中，并在柠檬酸裂解酶（ACL）的催化下分解成草酰乙酸和乙酰辅酶 A<sup>[55]</sup>。其中，草酰乙酸被转化为苹果酸，苹果酸随后被苹果酸酶（ME）转化为丙酮酸并产生还原力 NADPH；部分胞质中的乙酰辅酶 A 将通过乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）转化为丙二酰辅酶 A<sup>[56]</sup>。随后，乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 通过脂肪酸合成酶（FAS1/2）合成酰基辅酶 A。脂肪酸分子被转运到内质网中并通过 Kennedy 通路形成 TAGs。与 *Y. lipolytica*、*R. toruloides* 相比，*T. cutaneum*、*L. starkeyi*、*R. glutinis* 等可以利用木糖作为碳源积累油脂<sup>[57]</sup>。木糖可以通过木糖还原酶和木糖醇脱氢酶（XR, XDH）或木糖异构酶（XI）转化为木酮糖，木酮糖通过内源性的木糖激酶（XK）转化为木酮糖-5-磷酸和甘油醛-3-磷酸，进入戊糖磷酸途径（PPP）。木酮糖-5-磷酸在磷酸转酮酶（PK）的催化下进一步转化为乙酰磷酸（Acetyl-p）并进一步转化为乙酰辅酶 A，成为脂质合成的前体<sup>[57]</sup>。

在酵母 TAGs 的从头合成过程中，乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）、脂酰辅酶 A 合成酶（FAS1/2）和二酰基甘油酰基转移酶（DGAT）是至关重要的调节酶<sup>[55]</sup>。在氮限制的条件下，ATP 依赖型柠檬酸裂解酶（ACL）活性的增加会使得脂肪酸合成前体乙酰辅酶 A 的供应增加<sup>[58]</sup>；异柠檬酸裂解酶（ICL）和顺乌头酸酶（ACO）活性降低会产生过量柠檬酸用于合成乙酰辅酶 A<sup>[59]</sup>；异柠檬酸脱氢酶（IDH）活性的降低最终也会导致过量柠檬酸的积累<sup>[60]</sup>。除此之外，构建甘油为底物的油脂非从头合成途径、加强糖代谢相关基因表达、敲除脂质降解基因等方法也是提高产油酵母脂质生产的有效手段<sup>[61, 62]</sup>。

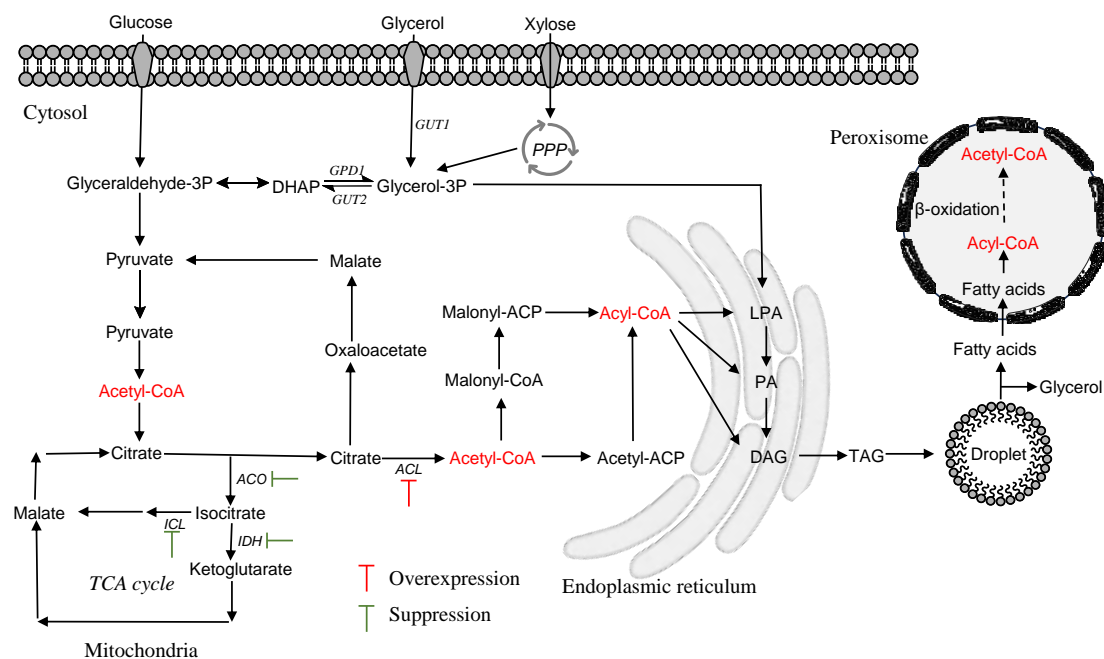


图 1.2 产油酵母脂质合成与代谢

Fig. 1.2 Lipid synthesis and metabolism of oleaginous yeast

### 1.3. 提高产油酵母油脂积累方法的研究进展

#### 1.3.1 代谢工程改造

微生物油脂大规模生产需要基于三点：胞内 TAG 的累积能力、脂肪酸的组成以及利廉价碳源的利用，其中的重点是提高油脂发酵菌株的油脂合成能力<sup>[63]</sup>。部分产油酵母如野生解脂耶氏酵母等其胞内脂质的含量不足 40%，远没有达到自身油脂合成能力的上限<sup>[19]</sup>，因此在搭建成熟的操作系统的基础上可以通过代谢流径的调控，控制其更加高效地进行油脂合成。

##### (1) 增强油脂合成途径

目前，已有很多关于过表达碳代谢和 TAG 合成相关基因以增强产油酵母油脂合成能力的研究。Yan 等在解脂耶氏酵母中通过过表达内源性  $\Delta 12$  去饱和酶和外源性  $\Delta 15$  去饱和酶增加游离脂肪酸的生成，最终重组菌株油脂含量提升至 77.8%。除了增加碳通量流向油脂合成外，也通过代谢工程手段改善油脂合成的其他限制条件<sup>[64]</sup>。Wang 等在圆红冬孢酵母中异源表达透明颤菌血红蛋白（*Vitreoscilla hemoglobin*, VHb）基因以增加油脂发酵中的氧气供给，最终重组菌种在 5 L 发酵罐中进行高密度油脂发酵油脂产量提高 72.0%<sup>[65]</sup>。

##### (2) 抑制油脂降解途径

敲除或者抑制脂质分解代谢途径相关基因是提高油脂积累的另一种方式。靶基因通常是脂肪酸  $\beta$ -氧化和 TAG 降解途径的重要酶基因。在产油酵母模式菌株 *Y. lipolytica* 中有 6 个酰基辅酶 A 氧化酶（POX1-6），催化脂肪酸  $\beta$ -氧化的第一步也是限速步骤。上述 6 个酶基因以及 GUT2 基因（编码甘油-3-磷酸脱氢酶，催化甘油醛-3-磷酸转化为磷酸二

羟丙酮)的敲除使 *Y. lipolytica* 细胞油脂含量提高 4 倍<sup>[66]</sup>。敲除 POX1-6 或 MFE (多功能酶, 参与脂肪酸  $\beta$ -氧化途径) 酶基因以及过表达 GPD (甘油-3-磷酸脱氢酶) 基因 *Y. lipolytica* 油脂含量可以提高 65-75%<sup>[67]</sup>。Friedlander 等在 *Y. lipolytica* 中异源表达两个不同来源的 DGAT (二酰基甘油酰基转移酶) 基因的基础上敲除脂肪酶基因 TGL3, 最终分批补料油脂发酵产量达到 85 g/L<sup>[68]</sup>。

### (3) 增加 NADPH 供应

脂质生成所需的高能电子由 NADPH 提供, 还原力 NADPH 再生是油脂合成的关键因素<sup>[62]</sup>。NADPH 由磷酸戊糖途径中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD) 和磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (PGD)、苹果酸酶 (ME) 提供<sup>[69]</sup>。Bandhu 等过表达苹果酸酶, 将产油酵母粘质红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) 的油脂产量提高 1.18 倍<sup>[70]</sup>。Qiao 等人在 *Y. lipolytica* 中通过代谢工程改造将糖酵解途径产生的 NADH 转化为脂质合成所需要的 NADPH 或乙酰辅酶 A, 主要过程包括: 过表达 ACC (乙酰辅酶 A 羧化酶) 和 DGAT 基因, 异源表达两个来源不同的 GPD, 异源表达来自卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides*) 的 ME 基因, 最终高密度发酵油脂产量达到 99 g/L<sup>[71]</sup>。

### 1.3.2 诱变和适应性进化

酵母的随机诱变指使用物理或化学诱变剂导致生物体 DNA 的改变, 并选择具有所需性状的突变体。物理诱变包括将微生物细胞暴露于辐射 (紫外线、离子束、X 射线和  $\gamma$  射线等)、大气和室温等离子体 (ARTP) 等<sup>[72-74]</sup>; 化学诱变是使用化学物质与 DNA 发生反应, 导致碱基配对错误、碱基置换和移码突变等<sup>[75]</sup>, 烷化剂是提高产油微生物油脂含量的最常用的诱变剂, 包括甲烷磺酸乙酯 (EMS)、甲烷磺酸甲酯 (MMS)、硫酸二乙酯 (DES) 和亚硝基胍 (NTG) <sup>[76]</sup>。

对弯曲隐球菌 (*Cryptococcus curvatus*)、*R. toruloides* 利用 UV (2W/m<sup>2</sup>, 200s) 进行诱变并利用浅蓝菌素进行筛选, 突变菌株的油脂产量提高 5.6%-33.0%<sup>[77, 78]</sup>。Bessadok 等对 *R. mucilaginosa*、*Y. lipolytica*、汉斯德巴氏酵母菌 (*Debaryomyces hansenii*)、纤细假丝酵母 (*Candida tenuis*) 进行 EMS (75mM) 诱变, 突变后 *R. mucilaginosa* 和 *Y. lipolytica* 的胞内油脂含量分别提高 36.4%和 13.3%, 但是 *D.hansenii* 和 *C.tenuis* 的油脂含量没有提高<sup>[72]</sup>。诱变育种虽然容易操作、变异效率高, 但是存在较多缺点, 如突变方向不确定导致有利突变有限、突变体难以集中多个优良性状导致需要检测大量样品的性质等<sup>[79]</sup>。

适应性实验室进化 (Adaptive laboratory evolution, ALE) 是指微生物适应人为的不利条件以达到菌株改良的目的<sup>[80]</sup> (如图 1.3)。在 ALE 过程中, 微生物在压力条件下 (如高温、高渗透压、营养限制) 长时间 (数周至数年) 迭代培养, 产生更适应环境条件的性状<sup>[81]</sup>。这种适应导致多种突变的积累, 包括单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) 和小的插入和缺失 (insertion-deletion, InDel) 等, 从而进化出具有目的性状的菌株, 如生长速度快、油脂含量高、对有毒化合物具有耐受性强或者在极端条件下具有生存能力等。虽然在 ALE 进程中会产生多种表型, 但在压力选择下只有获得优势表型的菌株能够存活下来, 最终导致整个细胞群体的进化<sup>[82]</sup>。与代谢工程改

造相比，ALE 不需要考虑复杂的代谢网络，只需要根据目的性状设计环境压力。ALE 引起整个基因组的不稳定导致多个基因的改变，使进化菌株更具环境适应性从而有利于工业应用菌株的培养<sup>[83]</sup>。代谢工程改造的效率依赖于基因操作工具的开发，大部分产油酵母如 *R. toruloides*, *L. starkeyi* 等均属于非常规酵母，虽然具有较大的工业应用潜力但是遗传操作工具的开发进展缓慢，因此代谢工程改造的研究进展受到阻碍<sup>[84]</sup>。

目前较多研究集中于通过适应性进化提高酵母的某些特定性状，如乙酸耐受性、耐热性等。通过适应性进化手段仅提高产油酵母油脂积累能力的研究较少。Díaz 等对 *R. toruloides* 在固含量为 20% (w/w) 的未脱毒麦秆水解液中进行适应性进化，获得的油脂积累能力和糖代谢能力提高的进化菌株作为下一步代谢工程改造的出发菌株<sup>[85]</sup>。Park 等同样对 *R. toruloides* 进行适应性进化，培养基为高糖培养基 (C/N=100) 中添加 5-羟甲基糠醛 (HMF) 和糠醛，通过 16 轮传代培养，木质纤维素水解液中生物量和油脂产量均有提高<sup>[86]</sup>。Sun 等在氯化钠浓度逐渐提高的培养基中对皮状丝孢酵母进行适应性进化，提高了菌株在高盐条件下的生物量和油脂积累，进化后菌株在高盐海水 (盐度为 3.5%) 中的油脂发酵产量达到 31.7 g/L<sup>[42]</sup>。ALE 的一个关键因素是环境压力：如果压力过低导致 ALE 进化效率低、拉长进化时长；而如果压力过高导致微生物无法存、实验终止<sup>[87]</sup>。Daskalaki 等对 *Y. lipolytica* 在营养限制交替 (氮镁元素限制、无碳源) 的环境中进行适应性进化，在氮镁元素限制条件下积累更多油脂的细胞在无碳源的条件下分解油脂能够维持更好的生长，该压力环境下细胞的油脂合成能力提高，由于营养双限制对生长抑制较强最初几代细胞生物量显著降低，最终进化菌株脂质含量提高 30%。在该研究中，被环境压力选择出的无碳源条件下生长较好的细胞，其油脂分解能力也较强，导致进化菌株油脂产量非常有限，且整个培养周期较长 (超过 100 代)<sup>[88]</sup>。

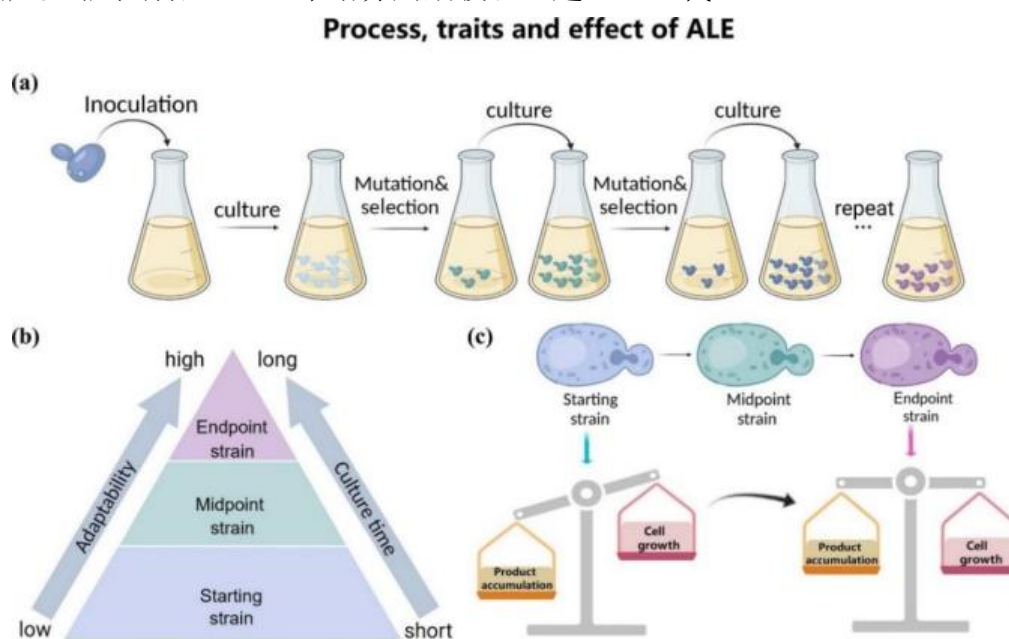


图 1.3 ALE 流程及特点示意图<sup>[84]</sup>

Fig. 1.3 Schematic illustration of ALE workflow and schematic of its trait and effect: (a) a schematic of the typical process of ALE; (b) the relationship between evolutionary time and adaptability; (c) effect obtained from the use of ALE technology on strains

### 1.3.3 基于胞内油脂含量的高通量筛选

野生型的产油酵母的胞内空间、脂质合成能力弱，常规的化学/物理诱变、适应性进化、以及代谢工程改造对酵母胞内油脂积累提高的效果有限。微生物培养过程中，自然突变或者压力选择下的适应性进化均会导致蛋白合成和代谢物浓度的显著变化，从而产生高性能和低性能突变的亚群体。因此基于脂质性质与定量的高通量筛选方法可以用于在群体细胞中筛选得到高油脂含量突变体，并进一步用于基因组规模的分析以及代谢工程元件的开发。

流式细胞仪可配备荧光激活细胞筛选设备 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)，根据荧光强度分离出具有理想特性的突变体细胞<sup>[89]</sup>。FACS 分离和富集高脂质含量突变细胞的方在产油微藻中使用较普遍<sup>[89-92]</sup>。Unrean 等人首次报道了结合代谢进化和 FACS 筛选高油脂合成能力的解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 突变细胞。野生型解脂耶氏酵母首先通过在蔗渣水解液中进行了 20 次的传代进化。在这个过程中，每轮进化结束后，培养液静置 1 h，从而可以特异性的分离出漂浮在培养液表面的具有高浮力特性的细胞亚群，将这些高浮力细胞转接至下轮进化中。使用 FACS 对 BODIPY 染色的后高浮力细胞群体进行了快速筛选，获得的突变株油脂产量和含量分别是原始菌株的 1.5 倍和 1.2 倍，其脂肪酸组成中的油酸和亚油酸含量明显升高。这项研究表明利用选择性进化的方案对细胞代谢进行遗传微调并结合基于荧光的高通量筛选可作为筛选高产油酵母突变体的有效方法<sup>[93]</sup>。经 FACS 筛选的具有高油脂含量的细胞可用于进一步的研究，如单细胞基因组学等<sup>[91]</sup>。Patterson 等人在解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 中表达了 Hermes DNA 转座子，获得了超过 50 万个 Hermes 随机插入突变。使用 FACS 对基于 BODIPY 染色的高油脂含量突变体进行筛选富集，分析突变体的脂质含量和 Hermes 插入位置，实现了对产油酵母的基因功能分析<sup>[94]</sup>。Pačnik 等人选择了两株脂质含量相差两倍的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株，经过杂交、产孢和萌发后，使用 FACS 筛选具有最高脂质含量的细胞亚群。对该群体进行全基因组测序后鉴定出了三个基于等位基因特异性的与酿酒酵母脂质积累有关的基因<sup>[95]</sup>。此外，也可以对产油酵母进行化学诱变后，使用 FACS 筛选高脂质含量突变体<sup>[96]</sup>。

微流体平台可以与荧光激活细胞筛选方法结合，用于产油微生物的高通量筛选<sup>[97]</sup>。基于微滴的微流体技术具有培养尺寸缩放的优势。在这个方法中，微生物细胞被划分并在单个微流体内培养。通过荧光染色后进行活细胞筛选，可对单个细胞的脂质含量和细胞生长状况进行高通量检测<sup>[98]</sup>。一般来说，细胞在培养前需要先封装成油包水液滴或凝胶微滴 (gel microdroplets, GMD)。然而，由于 FACS 仪器与非水悬液不相容，FACS 不能直接用于油中包裹微滴的细胞筛选。油包水微滴需要进行额外的步骤或设备来乳化或合并微滴，才可以用于 FACS 筛选，这一步骤通常耗时且影响细胞活性<sup>[99, 100]</sup>。Li 等人提出了使用明胶作为水凝胶材料，为细胞培养和油脂积累生成个体微环境。明胶的热响应性可保证其在固体和液体形态之间的转变，有利于细胞培养及回收<sup>[101]</sup>。Tanaka 等对斯达氏酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 进行紫外诱变培养后封装成凝胶微滴。微滴经 BODIPY

染色后通过 FACS 可同时测定斯达氏酵母的生长和脂质含量，最终获得了一个比野生型生长延迟 10 倍的突变体<sup>[102]</sup>。

相比于碳水化合物、蛋白质、核苷酸等其它胞内成分相比，脂质密度相对较低，仅为 0.88-0.90 g/mL<sup>[103]</sup>。因此随着脂质含量的升高，单个细胞的密度会趋于降低，这使得基于细胞密度差异来进行高油脂含量突变体的筛选具备了可能性。Hassanpour 等人基于淀粉（淀粉密度大约为 1.5 g/mL）和 TAGs 之间的密度差异，采用简单的重力沉降的方法来从微藻混合培养液中分别富集高淀粉和高脂质积累的种群。在培养结束后静置 3 min，将反应器中 30%的底部培养液（淀粉含量较高）和上层培养液（脂质含量较高）分别接种至新的反应器中。重复重力筛选及培养的过程，直至两个生物反应器中淀粉与蛋白质以及脂质与蛋白质的比率保持稳定。最终获得的稳定种群中淀粉含量提高了 3.42 倍，脂质含量提高了 3 倍<sup>[104]</sup>。

Brakke 于 1951 年首次提出了可以采用密度梯度离心的方法来分离马铃薯黄矮病毒颗粒。在密度梯度离心的方法中，蔗糖、Percoll（经聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒混悬液）、或氯化铯等介质被加入到离心管内，形成由高（底部）到低（顶部）的连续或不连续的密度梯度。生物样品首先通常放置于顶部，然后进行高速离心。当样品密度与周围的蔗糖、Percoll、氯化铯溶液的密度相匹配时，会停止移动<sup>[105]</sup>。因此在靠近底部的样品有相对较高的密度，而在靠近顶部的样品则有相对较低的密度<sup>[106]</sup>。Eroglude 等提出了基于密度梯度离心的方法，该方法可以原位快速定量原核或真核细胞样品中脂质、碳氢化合物以及生物聚合物的含量。该研究表明密度梯度离心的方法可以用于筛选对目的产物过度积累的微生物，并用于监测微生物培养过程中产品含量的变化<sup>[107]</sup>。Bracero 等人将密度梯度离心与尼罗红荧光染色相结合，进一步证实密度梯度离心的方法可以从小球藻（*Chlorella sp.*）中快速分离高脂质含量细胞群体<sup>[108]</sup>。密度梯度离心的方法也可以应用于对基因组突变体的大规模筛选中，从而可以鉴定出对脂质积累含量有显著影响的基因。Kamisaka 等人对酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）进行转座子诱变后进行密度梯度离心，较轻密度部分的酵母细胞被收集。通过对脂质含量较高突变体的转座子插入位点进行分析和验证，从而发现了五个影响脂质积累的关键 ORFs（开放阅读框）<sup>[109]</sup>。通过对解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）或斯达氏酵母（*Lipomyces starkeyi*）进行甲磺酸乙酯（EMS, ethyl methanesulfonate）诱变，构建突变体库。随后进行 3-5 代的密度梯度离心筛选和转接，最终获得的突变体油脂产量是出发菌株的 1.5 倍左右<sup>[110, 111]</sup>。

适应性进化是改良菌株性状最有效率的方法，除了环境压力外另一个关键在于定向选择和高通量筛选。高通量筛选能够准确在进化后的多基因型群体中获得目的性状的细胞。因此将环境压力下的进化和高通量筛选相结合、交替进行，是培育高油脂含量细胞的最好思路。

## 1.4 酵母对外界机械应力胁迫的响应

### 1.4.1 机械应力与细胞信号转导

无论是简单的微生物还是复杂的哺乳动物，都会不断接触到来自细胞内部或环境的大量生化或者物理信号。为了应对应力调节胞内微环境，它们进化出了特定的受体蛋白来感知不同的信号，并通过相互关联的信号网络将信息传递给效应蛋白<sup>[112]</sup>。与哺乳动物细胞不同，许多微生物和植物细胞除了细胞膜外，还有较坚硬的细胞壁来对抗物理应力。多数观点认为细胞壁承受了机械应力下胞内增大的膨压以保护细胞，增大的膨压将质膜向外推，并吸收外部的物理机械力，作用于细胞表面的应力具体分为以下三类<sup>[113]</sup>：

#### (1) 压缩应力

这是一种正交于细胞壁的单位面积上的受力。它会导致细胞变平，细胞壁变薄，并使的细胞壁沿着表面平面的某些轴线变得紧缩。这种应力可能是由移动到细胞上的外部物体造成的，也可能是细胞在刚性障碍物上生长时自然产生的，因此该应力既来自内部的张力压力，也来自邻近细胞的挤压。

#### (2) 拉伸应力

这种应力通常与向外推挤细胞壁的压力有关。它使细胞壁受到横向拉力，也可能导致细胞壁局部或整体变薄。酵母菌/真菌附着的基质膨胀也会拉伸细胞，从而产生拉伸应力。

#### (3) 剪切应力

这种应力可能是由于细胞表面的流体流动对细胞壁产生了与流动平行的作用力，使细胞壁受到剪切力。这种应力基本上与流体的粘度和细胞表面的流体流速除以细胞高度成正比。菌落中的非液体剪切应力也可能来自细胞之间的相互粘连，以及菌落中不同部位和不同移动速度带来的细胞群体扩张或者重新排列。

细胞结构和生理代谢较简单的微生物可以作为研究机械传导基本原理的模型生物。在酵母，如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中研究和鉴定机械传感器家族有助于解释细胞如何协调极性生长和细胞壁合成，以及它们如何在不断变化的环境中平衡内部和外部环境。这些新出现的机制对理解酵母或真菌的丝状体生长和病原体入侵具有重要意义<sup>[113]</sup>。酵母细胞通过将物理的力刺激转化为生化信号来实现对应力的生理生化反应，例如细胞周期和细胞壁的变化等。胞膜表面的感受器蛋白接收力信号，并引起信号蛋白的磷酸化程度的改变或者细胞质液中的钙离子浓度增加<sup>[114]</sup> (图 1.4)，将信号逐级传递给效应基因。

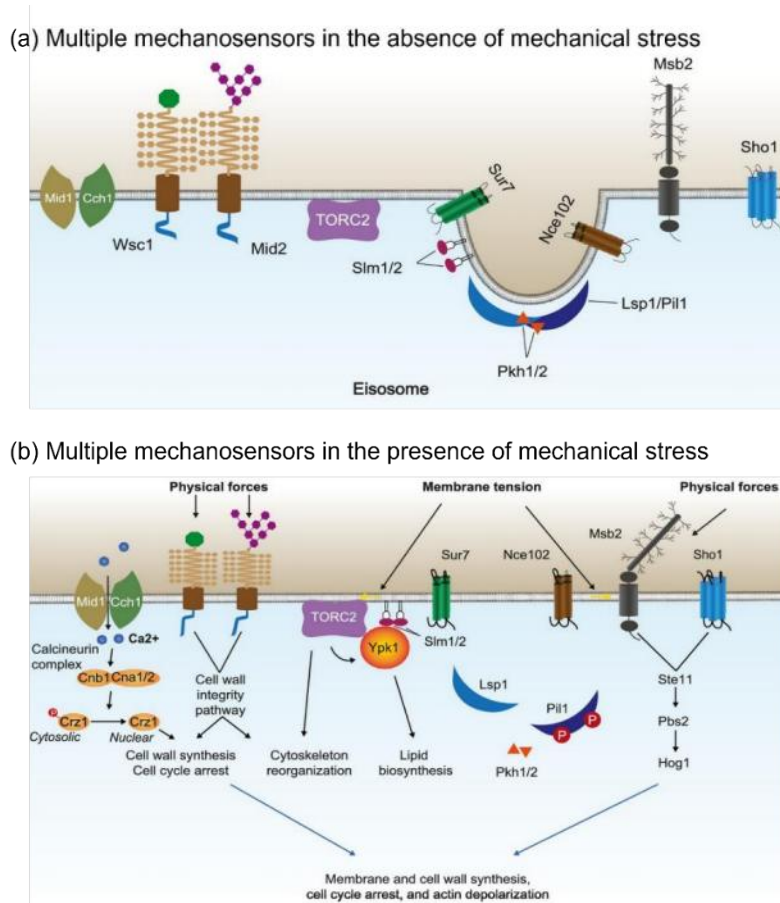


图 1.4 机械力传感器传递机械力信号<sup>[113]</sup>

Fig. 1.4 Mechanosensors translate mechanical forces into biochemical signaling pathways: (a) Multiple mechanosensors in the absence of mechanical stress; (b) Multiple mechanosensors in the presence of mechanical stress

#### 1.4.2 Wsc1/2/3 和 Mid2/Mtl1 机械力信号感受器及通路

一类重要的感受器蛋白—Wsc 家族和 Mid 家族，属于单次跨膜表面膜蛋白（single-pass cell-surface proteins），它们具有富含丝氨酸/苏氨酸（Serine/Threonine Rich, STR）的细胞外结构域和较短的胞质尾区。其功能类似于纳米弹簧，收到机械应力时，胞外纳米弹簧被压缩，这种构象变化随后通过胞质内的尾区转化为细胞内的生化信号。Wsc1 有一个短的胞质尾部，该尾部在多个位点上发生组成型磷酸化<sup>[115]</sup>。当细胞外力挤压细胞壁时，导致 Wsc1/2/3 的弹簧状 STR 结构域压缩，进而导致胞质尾部位点去磷酸化，引发下游信号传递；一旦应力降低、细胞壁得到修复，STR 结构域可能会向后延伸，从而停止应力信号的传导<sup>[116]</sup>。在酿酒酵母、粟酒裂殖酵母和白色念珠菌（*Candida albicans*）以 Wsc1/2/3 为感受器蛋白的机械力信号转导途径高度保守。该通路感受器蛋白聚在细胞极化生长的部位，是细胞壁完整性（Cell Wall Integrity, CWI）途径的上游调节因子，通过 CWI 途径可调节细胞壁合成代谢以应应力环境<sup>[116, 117]</sup>。响应应力刺激时阻止细胞周期的进程以及使微丝骨架（actin cytoskeleton）去极化来阻止极化生长，从而使细胞在应力环境中存活下来<sup>[115]</sup>。此外，招募交换因子 Rom1 或 Rom2（Rom1/2），并通过丝裂

原活化蛋白激酶途径 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 磷酸化转录调节因子 SBF (Swi4/6 cell cycle box-binding factor) 和 Rlm1, 从而实现细胞壁的重塑<sup>[118, 119]</sup>。与 Wsc1 一样, Wsc2 及其相似的 Wsc3 也参与调控细胞壁完整性途径和热休克反应 (Heat Shock Response, HSR), Mtl1 的主要作用是在葡萄糖饥饿和氧化应激时通过调控细胞完整性途径维持细胞存活<sup>[120]</sup>。

#### 1.4.3 Mid1/Cch1 机械力信号感受器及通路

另一类机械力感受器蛋白属于拉伸激活离子通道 (stretch-activated ion channels)。由 Mid1 和 Cch1 组成并形成复合物, 可感知细胞壁或者质膜上的多种机械信号。当细胞壁受损、质膜上机械应力增加等情况下, Mid1/Cch1 复合物使钙离子快速流入细胞质<sup>[121, 122]</sup>, 目前机械应力作用下打开 Mid1/Cch1 通道的分子机制仍不清楚。Ca<sup>2+</sup>内流激活了多个靶标, 包括细胞骨架成分和钙调磷酸酶复合物 (calcineurin) 等。钙调磷酸酶复合物是细胞内 Ca<sup>2+</sup>的主要靶标, 敲除钙调磷酸酶亚基基因的细胞对多种环境应激条件敏感<sup>[123]</sup>。被激活的钙调蛋白使转录因子 Crz1 去磷酸化, 导致其快速发生核转位<sup>[124, 125]</sup>, 从而开启相关转录程序以加强细胞壁重塑从而应对机械应力<sup>[126]</sup>。从原核细胞到人类细胞均存在钙离子通道, 是细胞内对机械应力的一种保守反应机制<sup>[127]</sup>。在动物细胞中, Piezo1 和 Piezo2 是机械力传感器蛋白, 可将质膜上的力信号转化为阳离子流入细胞质<sup>[128]</sup>。在植物中的 piezo 的同源蛋白定位在液泡上, 并在顶端生长过程中通过液泡来调节膨压以应对胁迫环境<sup>[129]</sup>。

#### 1.4.4 黏蛋白 Msb2 和质膜感受器 Sho1 复合体机械力信号感受器及通路

酵母细胞也可以通过由粘蛋白 Msb2 和质膜传感器 Sho1 组成的模块感知机械应力。敲除 Msb2 或 Sho1 的细胞在封闭的微小环境中增殖扩增到高密度时会裂解死亡<sup>[130]</sup>。此外, 高渗透压下, Msb2 和 Sho1 调节下游元件通过阻止水分外流和增加甘油合成来增加膨压从而保护细胞<sup>[131]</sup>。因此, Msb2/Sho1 模块感知与高渗透条件相关的机械压力。Msb2 有一个高度糖基化的胞外结构域, 具有自我抑制功能<sup>[132]</sup>。作用于细胞表面的机械力可能通过启动 Msb2 的自我抑制功能从而将机械信号转化为细胞内的生物信号。文献表明, 该功能的开启需要 Ysp1 (天冬氨酸蛋白酶), Yps1 通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定在质膜上, 通过切割 Msb2 的胞外结构域介导自我抑制功能的开启<sup>[132]</sup>。而 Yps1 接受应力信号的具体机制需要进一步研究。

#### 1.4.5 TORC2 机械力信号感受器及通路

雷帕霉素靶复合体 2 (Target of rapamycin 2, TORC2) 也是生物体中进化保守的机械力感受器蛋白, 通过感知机械应力导致的质膜张力的变化触发信号传递。在应力下通过其下游的关键激酶 Ypk1 调节细胞骨架的重塑和鞘脂合成来维持膜张力和内部膨压的平衡<sup>[133]</sup>。以 TORC2 为感受器蛋白的信号转导通路也和 Wsc/Mid2 通路一样具有在机械应力下传递信号调节细胞周期、极性生长和细胞壁完整性的功能<sup>[134]</sup>。TORC2 机械力信号通路的信号转导和质膜张力的变化紧密相关 (如图 1.5), 机械应力诱发的膜张力变化在

不同的质膜结构域之间重新分配 Slm1/2 蛋白。增加了 Slm1/2 与 TORC2 的结合并激活了 TORC2<sup>[133]</sup>。详细来说, TORC2 作为感受器蛋白以点状定位在质膜上, Slm1/2 是 TORC2 的激活蛋白。静息状态下, TORC2 被“限制”在 MCT 结构 (membrane compartments containing TORC2) 中, Slm1/2 蛋白分布在质膜中的由 BAR 蛋白复合体 (Bin、Amphiphysin 和 Rvs) 组成的沟状内陷结构 (eisosomes) 中。当细胞膜张力增大时, 处于 eisosomes 中的 Slm1/2 被释放到胞质并与“限制”在 MCT 中的 TORC2 结合, 从而激活 TORC2 信号并招募 TORC2 的主要激酶底物 Ypk1<sup>[135]</sup>, 激酶 Ypk1 与 Pkc1 共同激活下游的效应基因; 当细胞膜张力降低时, 细胞中的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PtdIns (4,5) P<sub>2</sub>) 自发重组形成离散的内陷膜结构域, 使 TORC2 聚集隔离并失活, 同时重新定位 Slm1/2<sup>[136]</sup>。对酵母细胞中 Slm1/2 的亚细胞定位表明, 约 60% 的 Slm1/2 呈点状聚集定位于细胞内膜, 而只有约 40% 的 Slm1/2 弥散于胞质空间<sup>[137]</sup>。这一过程的阐明表明 TORC2 复合体使用不同的机制来感知膜张力的增加和减少, 以维持应力下质膜的平衡。这一通路的组成及其在膜张力增加后的信号传导在生物体进化中是保守的, 在哺乳动物中细胞膜张力增加也能诱导 mTORC2 信号通路。膜脂中固醇和鞘脂含量的减少会降低 TORC2 的活性<sup>[138, 139]</sup>, 这表明 TORC2 调控脂质代谢且 TORC2 的活性与脂质平衡相关。

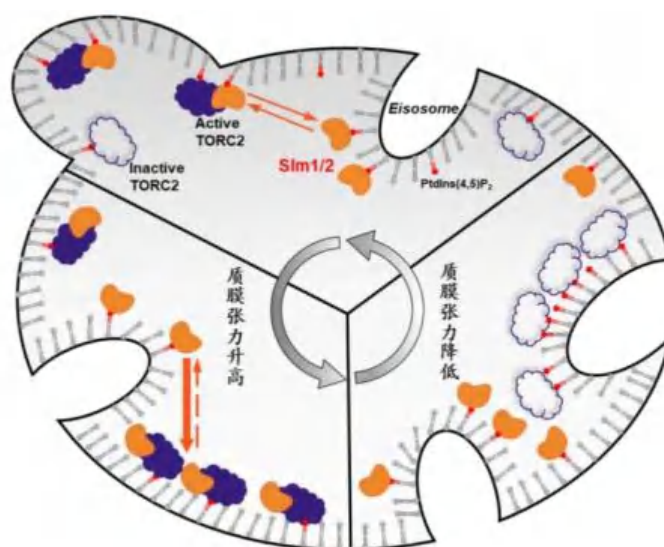


图 1.5 机械应力下 Slm1/2 调控 TORC2 的激活和失活

Fig. 1.5 Slm1/2 regulates the activation and deactivation of TORC2 under mechanical stress

#### 1.4.6 TORC2 的同源物和功能

酵母中 TORC2 与哺乳动物的 mTORC2 同源, TORC2/mTORC2 的亚基包括 TOR/MTOR, Lst8/MLST8, Avo3/RICTOR, Avo1/hSIN1, Bit61 和 Bit2/ (PROTOR-1 和 PROTOR-2), Avo2 (酵母特有) 以及 DEPTOR (脊椎动物特有)<sup>[134]</sup>。TORC2 复合物在真核生物中广泛保守, 但是在寄生虫<sup>[140]</sup>以及植物细胞中缺失 TORC2<sup>[141]</sup>。

mTORC2 受到 GTPases 的调控, Ras 家族相关的 GTPase—RIT 蛋白可以与 mTORC2

结合并激活 mTORC2 以应对氧化应激。在酵母中氧化应激也会激活 TORC2 及下游的信号通路以应对不良环境<sup>[142]</sup>。哺乳细胞中 mTOR2 可以通过磷酸化某些特定的结构域来增强多种 AGC 激酶（蛋白激酶组，包括蛋白激酶 PKA, 蛋白激酶 PKG 和蛋白激酶 PKC）的活性，包括 AKT、SGK1、PKC 等。mTORC2 的活性与细胞脂肪合成和癌症发展有关，其影响着胞内乙酰辅酶 A 的含量、脂肪酸合成酶的活性，对于维持细胞能量存贮和葡萄糖代谢稳态起着重要的作用。在酵母中，TORC2 的主要底物为 AGC 激酶 Ypk1（SGK1 同源物）。Ypk1 有许多已知的靶标，包括调节复杂鞘脂生物合成的 Orm1/2 同源物和神经酰胺合成酶的亚基以及甘油外排泵 Fps1 和甘油-3-磷酸脱氢酶 Gpd1 等。在应力下，TORC2/Ypk1 通过磷酸化以上底物，协同调节细胞膨压和质膜张力以维持细胞存活<sup>[134]</sup>。除了调节质膜张力，TORC2 通过 Ypk1 额外调节了 G2/M 细胞周期转变<sup>[143]</sup>、肌动蛋白骨架和内吞作用<sup>[144]</sup>、基因组完整性<sup>[145]</sup>和戊糖磷酸途径<sup>[146]</sup>。TORC2 的另一个主要的磷酸化底物是 Pkc1（PKC 同源物），主要功能是调节下游细胞壁完整性途径<sup>[147]</sup>。因此，TORC2 在调节真核生物生理的多个方面发挥着核心作用。

## 1.5 产油酵母利用木质纤维素生产微生物油脂

### 1.5.1 木质纤维素生物炼制

目前由微生物油脂制备的生物燃料其成本方面仍无法与化石燃料相竞争。木质纤维素生物质被认为是最有潜力的替代化石燃料的资源，其通过植物的光合作用利用二氧化碳、水和阳光产生<sup>[148]</sup>。木质纤维素生物质没有明确的分类，大概可分为四类，即农业废弃物、林木废弃物、草本植物和杂草以及工业和城市废弃物<sup>[149]</sup>。农业废弃物是最大的木质纤维素生物质资源，包括小麦秸秆、玉米秸秆和甘蔗渣等<sup>[150]</sup>。产油酵母由于其高效的油脂合成能力成为潜在的可再生生物燃料的重要开源，产油酵母利用木质纤维素生物质积累胞内甘油三酯并进一步获得生物柴油等高附加值油脂产品，是解决目前化石燃料紧缺的可行思路<sup>[151]</sup>。木质纤维素原料利用的难点首先是由于其致密的结构造成的，木质素作为外层的包裹结构阻碍了水解酶对纤维素的降解，因此木质纤维素原料制备生物柴油的整个工艺较复杂，包括的主要操作单元有：预处理、水解/糖化、油脂发酵和下游油脂提取<sup>[149]</sup>。

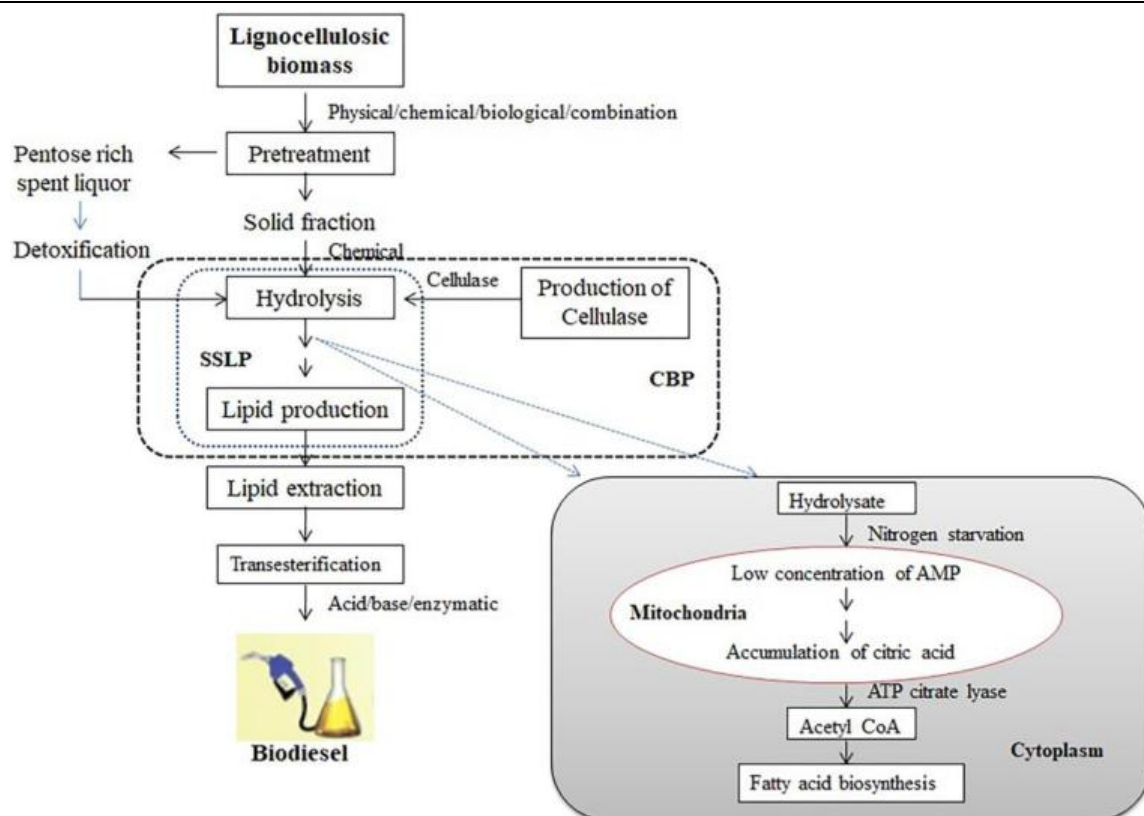


图 1.4 产油微生物利用木质纤维素生物质中合成油脂的化学示意图<sup>[149]</sup>

Fig. 1.4 Schematic diagram of lipid biosynthesis from lignocellulosic biomass using oleaginous microorganisms

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素（共同构成全纤维素）和木质素聚合物组成，以及少量的淀粉、果胶、灰分等<sup>[152, 153]</sup>，其结构组成如图 1.5 所示，木质素包裹在外层起到抗压作用，半纤维素贯穿于木质素和纤维素纤维之间，起着连接二者的作用，进而形成非常牢固的纤维素-半纤维素-木质素网络结构。纤维素是一种两亲性长链均聚物，由 10,000 多个葡萄糖分子通过（1-4）糖苷键连接而成。半纤维素是由一条主链和其他侧链组成的多相聚合物。主链由相同（同聚）或不同（异聚）的糖单元组成，其长度比纤维素短<sup>[154]</sup>。侧链很短，主要以（1-4）糖苷键连接，少数以（1-3）糖苷键连接，这些糖苷键较易被水解，产物主要是六碳糖（葡萄糖、甘露糖和半乳糖）、五碳糖（木糖和阿拉伯糖）以及少量的尿酸和脱氧六碳糖（如鼠李糖和岩藻糖）<sup>[155, 156]</sup>。在农作物秸秆和废弃物中木聚糖是主要的半纤维素，占木质纤维素生物质的 12%-37%<sup>[157]</sup>。木质素是木质纤维素中含量仅次于纤维素的有机聚合物<sup>[158]</sup>。木质素可分为三种不同类型的苯丙烷单元（单木质素），即愈创木基木质素（G）、紫丁香基木质素（S）和对羟基苯基木质素（H），分别来源于松柏醇（Coniferyl alcohol）、芥子醇（Sinapyl alcohol）和香豆醇（p-Coumaryl alcohol）通过醚键（ $\beta$ -O-4、 $\alpha$ -O-5、4-O-5）和碳碳键（ $\beta$ - $\beta$ 、 $\beta$ -1、 $\beta$ -5、5-5）连接形成<sup>[159, 160]</sup>。此外，木质素含有丰富的芳环结构、脂肪族和芳香族羟基等活性基团<sup>[161]</sup>。

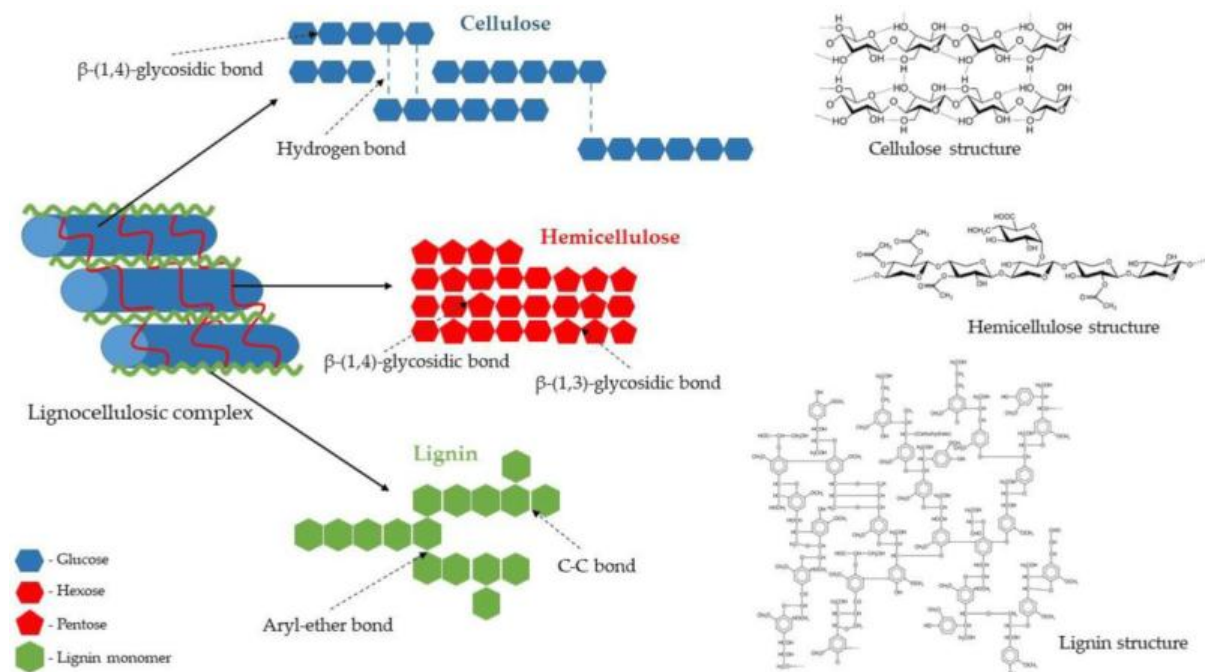
图 1.5 木质纤维素的结构示意图<sup>[162]</sup>

Fig. 1.5 A schematic structure of the lignocellulosic complex

### (1) 预处理

纤维素的结晶度、木质素的疏水性以及半纤维素和木质素对纤维素的“包裹封装”使木质纤维素具有较强的顽固性<sup>[163]</sup>。为了进行后续的酶水解获得可发酵糖用于微生物发酵，需要进行预处理步骤，包括机械处理（切割或研磨）和预处理<sup>[164]</sup>。木质纤维素预处理的方法很多，包括化学法（酸、碱、有机溶剂等）、物理法以及物理化学结合法等<sup>[164]</sup>。其他方法相比，酸、碱以及酸与碱结合等化学预处理技术在近年来最受青睐。其中，酸预处理可以有效地打断木质素和半纤维素之间的糖苷键，溶解大部分半纤维素（超过90%），并去除部分木质素。酸、碱法预处理的优点是能够使用常用化合物、在工业水平上的应用更加灵活并且可发酵糖损失较少，但是对设备有一定腐蚀性、产生较多废水<sup>[165, 166]</sup>。

本实验在稀酸预处理的基础上开发了干酸预处理，将粉碎的木质纤维素原料和稀酸置于含有螺带式搅拌桨的预处理反应器中，实现了物料、稀酸与低压蒸汽的高度混合，原料被酸充分吸收使利用率超过70% (w/w)。干酸预处理与普通稀酸预处理相比产生的糠醛和5-羟甲基糠醛(5-HMF)更少，并且整个过程中没有任何废水产生<sup>[167]</sup>。

### (2) 脱毒

酸、碱以及有机溶剂处理是常用的几种预处理木质纤维素原料的方法。其中酸预处理使纤维素和半纤维素组分分离并溶解半纤维素，是使纤维素更容易在后续过程被水解获得可发酵糖的方式，因此应用较广泛<sup>[158]</sup>。在典型的酸预处理中酸降解半纤维素生成的戊糖和糠醛酸脱水形成糠醛(Furfural)并进一步在高温和浓酸条件下降解为甲酸<sup>[168]</sup>，产生的己糖脱水形成5-羟甲基糠醛(5-HMF)也可能在预处理条件下进一步降解为甲酸

和乙酰丙酸<sup>[169]</sup>；半纤维素中的乙酰基团被酸水解形成乙酸；木质素的三种酚类化合物在酸预处理中醚键等断裂形成酚醛抑制物主要包括香草醛、香草酸、对羟基苯甲醛（4-HBA）、丁香醛、丁香酸、阿魏酸等<sup>[170-174]</sup>。酸处理对于反应装置的腐蚀会导致重金属离心的产生，抑制发酵菌株的生长和代谢<sup>[175]</sup>。

本实验室基于上游干酸预处理技术开发了固态生物脱毒和液态生物脱毒两种方式。固态脱毒在预处理后的物料上接种脱毒菌株，脱毒菌株优先利用抑制物减少发酵糖的损失<sup>[167]</sup>。进一步在固体生物脱毒的基础上开发了液体脱毒，重置了生物炼制的顺序，将酶促糖化步骤提前至生物脱毒之前。向预处理、糖化后的水解液浆中接种脱毒菌株进行深层液态生物脱毒转化。脱毒重点可以根据浆液 pH 的变化可视化脱毒终点，脱毒结束时全部的糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）和 80% 以上的乙酸在 24 h 内有效去除，且可发酵糖的损失可以忽略不计<sup>[176]</sup>。

### （3） 酶解与发酵

木质纤维素预处理后的酶解是发酵前的最后一步。最常用的酶是纤维素酶和半纤维素酶，它们可将纤维素和半纤维素分别转化为葡萄糖以及戊糖和己糖的混合物<sup>[177]</sup>。纤维素酶是多组分酶系，主要分为内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶。内切葡聚糖酶攻击纤维素的无定形区和低结晶区，产生还原端和非还原端；外切葡聚糖酶从还原端或非还原端切下纤维二糖单位；葡萄糖苷酶将纤维二糖水解成两个葡萄糖分子。半纤维素酶可完全降解半纤维素，包括多种酶，如产生木寡糖的内切-1,4-木聚糖酶和分解木聚糖产生木糖的木聚糖酶<sup>[178]</sup>。其他具有辅助作用的酶包括魏酸酯酶、半乳糖苷酶和-L-阿拉伯呋喃糖苷酶等，它们有助于水解半纤维素侧链<sup>[178, 179]</sup>。纤维素酶和半纤维素的协同作用提高了纤维素和半纤维素转化为游离糖的速度。

有多重因素均能抑制酶水解的效率，如高浓度的糖以及水解过程中酶和木质素的非特异性结合等，在木质纤维素材料转化方面，同步糖化共发酵（SSCF）是目前降低高浓度糖抑制酶解效率和生产成本的有效方法。这种方法将水解糖化和微生物代谢物的生物合成整合在一个阶段，减少了生产时间、酶负荷以及设备污染的风险，与单独的阶段相比，产量更高<sup>[180]</sup>。

#### 1.5.2 产油酵母的酚醛抑制

木质纤维素在预处理过程中会产生多种小分子副产物，严重抑制下游酶水解效率和产油酵母菌株的生长代谢。这些抑制物主要产生于反应条件剧烈的预处理过程中，包括糖类过度降解产生的呋喃醛类抑制物，如糠醛和 5-羟甲基糠醛（5-HMF）；乙酰基和某些醛类化合物氧化产生的弱酸，如乙酸、甲酸、乙酰丙酸；木质素组分的过度降解产生的如 4-羟基苯甲醛、香草酸和丁香醛。达到一定阈值浓度时，这些抑制物对纤维素酶糖化和菌株生长代谢均有明显抑制作用<sup>[181, 182]</sup>。

糠醛和 5-HMF 在预处理过程中产生的含量较高，两者的溶解性较强。当糠醛浓度达到 2.0 g/L、5-HMF 浓度达到 4.0 g/L 时，对酶水解有显著抑制效果<sup>[183]</sup>。研究表明，虽然皮状丝孢酵母对木质纤维素衍生的抑制物具有较高耐性，但是当培养基中存在浓度达

0.5 g/L 以上的糠醛就会对其生长和油脂积累产生显著的抑制作用<sup>[183]</sup>。糠醛可以直接抑制醇脱氢酶、醛脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和其他一些参与糖酵解的关键酶基因的表达量<sup>[184]</sup>。此外,糠醛能够造成 DNA 损伤或降解、抑制蛋白质和 RNA 的合成<sup>[185,186]</sup>、影响辅因子 NADH 和 NADPH 的再生以及降低单糖的转运速率等<sup>[187]</sup>。乙酰基和某些醛类化合物氧化产生的弱酸,如乙酸、甲酸、乙酰丙酸等导致 pH 值降低,影响生长代谢。例如,乙酸可以以未解离的形式穿透细胞膜,抑制细胞代谢<sup>[164]</sup>。木质素组分在预处理条件下过度降解的副产物主要是三种典型的脂肪族酚醛,即 4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛,分别对对应羟基苯基(H)、愈创木酚基(G)和紫丁香基(S)的降解<sup>[169,188]</sup>。与以上其他两类化合物(呋喃醛、弱酸类)相比,酚醛抑制物在预处理后的木质纤维素原料中的浓度相对较低,然而通常它们对微生物生长和代谢的抑制作用更强。酚醛抑制物会严重损伤细胞膜的完整性,从而影响细胞膜的选择透过性<sup>[189]</sup>。在酚醛抑制物中,香草醛显著影响预处理后的酶水解过程且对微生物的毒性最大。常见的产油酵母,如斯达氏油脂酵母、粘红酵母和圆红冬孢酵母,在香草醛浓度达 0.5 g/L 以上时严重影响其生长和油脂积累<sup>[190]</sup>。

不同的酵母由于代谢和细胞壁组分的差异等因素,对木质纤维素来源的抑制物有不同的耐受能力。各种抑制物对产油酵母生长和代谢的影响值得进一步研究。某些产油酵母对特定的抑制物具有一定的转化能力。皮状丝孢酵母能完全降解甲酸、乙酸、香草醛和 4-羟基苯甲醛,但是对糠醛和 4-羟基苯甲醛相对敏感,高浓度的混合抑制物仍然会对产油酵母的油脂发酵性能造成严重的不良影响<sup>[33]</sup>。产油微生物的抑制物耐受性是木质纤维素原料制备微生物油脂最直接的技术障碍<sup>[191]</sup>。因此,理想的产油酵母菌株在具有较强的油脂积累能力的同时,还应具有较强的抑制物耐受性。Sha 等和 Wang 等分别采用适应性进化的方法增强脂解耶氏酵母对香草酸和阿魏酸的耐受性,菌株的抑制物耐受性均显著提高。并进一步通过组学分析抑制物耐受性提高的原因,但是作者均没有评价菌株在适应性进化前后菌株的油脂积累能力<sup>[192,193]</sup>。Liu 等对圆红冬孢酵母进行麦秆水解液中的适应性进化以提高抑制物的耐受性,进化结束后超过一半的进化菌株在水解液中的生长能力比出发菌株更差<sup>[194]</sup>。Zhou 等对解脂耶氏酵母进行了三种酚醛抑制物(4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛)的适应性进化以提高菌株的抑制物耐受性,抑制物作为胁迫压力下的适应性进化增强了菌株对酚醛抑制物的转化能力。但是较高浓度抑制物的进化导致了菌株的生长状态变差,不利于油脂的积累<sup>[195]</sup>。以上案例说明抑制物耐受性的增强和油脂积累的增强通常并不协同。在含有抑制物的培养基中进行适应性进化外,需要引入一种高效的筛选方法来分离高油脂含量的细胞,从而同时提高产油酵母对抑制剂的耐受性和油脂的产量

### 1.5.3 产油酵母的戊糖利用

木质纤维素作为最为丰富的可再生能源,对其的有效利用是实现绿色生物经济的重要途径。木质纤维素经酶水解后一般会得到以葡萄糖、木糖为主,少量阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、纤维二糖和部分寡糖等多种糖的混合糖液<sup>[196]</sup>。目前常见的产油酵母不能利

用木质纤维素来源的全部种类的单糖,尤其是不能利用占到可发酵糖总数达 30%的戊糖,造成了纤维素资源的极大浪费<sup>[197]</sup>。缺乏相关的糖代谢基因或者相关基因的表达量极低导致产油酵母菌株利用木糖的能力极不稳定<sup>[191]</sup>。目前已经在模式产油酵母菌株解脂耶氏酵母上搭建了高效的木糖代谢途径<sup>[198]</sup>, Li 等在解脂耶氏酵母中异源表达来源于树干毕赤酵母的木糖还原酶(XYL1)和木糖醇脱氢酶(XYL2)基因并结合木糖为唯一碳源的适应性进化(饥饿培养),最终获得的菌株利用木糖发酵微生物油脂的产量达 15 g/L 以上<sup>[199]</sup>。Zhang 等在解脂耶氏酵母中利用组合策略,包括增强木糖代谢关键基因的表达(增强 PPP 途径和增加细胞质 NADPH 供应等),实现了木糖代谢速率提高约 30%<sup>[200]</sup>。

葡萄糖和木糖是木质纤维素水解产物的主要成分,两者的质量浓度比约为 2:1,在 20% (w/w) 固含量条件下通过干酸生物炼制技术制备的木质纤维水解液中,约有 60 g/L 葡萄糖和 30 g/L 木糖<sup>[201]</sup>。一些产油酵母可以利用木糖积累油脂,如圆红冬孢酵母(*Rhodotorula toruloides*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)等,但是当葡萄糖和木糖同时存在的条件下,葡萄糖基本被消耗完全时才开启木糖的利用,这样的现象称为分解代谢物阻遏也被称为葡萄糖效应<sup>[202]</sup>。酵母通过两种不同的运输系统运输单糖分子:高效率、低亲和力的促进扩散和高亲和力、能量依赖的质子同向转运体<sup>[203]</sup>。产油酵母,如粘红酵母的细胞膜上对木糖亲和力更高的糖转运蛋白属于木糖-质子同向运输体(xylose/H<sup>+</sup> symporter),该系统的质子泵利用 ATP 酶释放的能量,不断将 H<sup>+</sup>逆浓度梯度泵到膜外形成 pH 差,膜内外的质子电化学梯度可以作为物质转运的动力,推动细胞内 H<sup>+</sup>的输出和外界 K<sup>+</sup>的输入,以维持膜内外的质子梯度,木糖与质子沿着这个梯度进行单糖分子和质子的同向转运。该糖转运蛋白在木糖条件下表达量提高以完成木糖跨膜运输;在非木糖条件下相关转录调控因子关闭其表达,其他转运蛋白的表达量提高以转运其他单糖;在葡萄糖和木糖同时存在时该膜蛋白的表达在开启后被抑制,并在己糖被消耗完全后被重新开启<sup>[204]</sup>。产油酵母菌株进行纤维素微生物油脂生产当木糖代谢被葡萄糖抑制时,发酵后剩余的木糖不仅带来原料浪费、生产周期增长、转化率降低的弊端也使整个发酵过程的调控变得复杂,因此改善分解代谢物阻遏以期实现木糖和葡萄糖的共转化进行脂质积累具有重要意义。Zhao 等对斯达氏产油酵母(*Lipomyces starkeyi*)的产油培养基进行优化,以期提高葡萄糖和木糖的共代谢能力,虽然油脂分积累能力有所提高,但是并没有清楚地展示在培养基优化前后两种糖的代谢模式<sup>[205]</sup>。Anschau 等对 *L. starkeyi* 在葡萄糖和木糖混合液中分别进行了三种模式(分批、补料分批、重复补料分批)的培养。在葡萄糖 20 g/L 和木糖 45 g/L 的培养基中进行连续培养时,可实现木糖和葡萄糖的共同转化,但是糖代谢速率较低仍有约一半的葡萄糖和木糖在发酵结束时剩余在培养基中<sup>[206]</sup>。

葡萄糖分解代谢物阻遏是工业产油酵母菌株进行实际生产的较大阻碍,目前现有的技术依旧较难实现己糖戊糖共代谢的较大优化。鉴定能够同时进行葡萄糖和木糖共代谢的菌株尤为重要。文献表明,极其少数的产油酵母,如皮状丝孢酵母、发酵性丝孢酵母(*Trichosporon fermentans*)、西表岛囊担酵母(*Cystobasidium iriomotense*)能够明确地同

时同化葡萄糖和木糖<sup>[207]</sup>。但是这些菌株共代谢葡萄糖和木糖的速率有限。Hu 等人研究发现皮状丝孢酵母菌株 *T. cutaneum* AS 2.571 在葡萄糖和木糖为混合碳源的合成培养基中实现了两者的共代谢，且两者的代谢速率与初始培养基中两组分的浓度比基本一致，但是在实际的木质纤维素体系中木糖的代谢速率相比于合成培养基中显著下降，发酵结束后有约 1/4 木糖被剩余<sup>[207, 208]</sup>。木质纤维素水解物中的糠醛和羟甲基糠醛可通过 NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> 依赖性氧化还原反应被菌株转化为醇或酸的衍生物。这些生化过程可能会打破酵母菌木糖代谢中的辅因子平衡<sup>[209]</sup>。此外，木质纤维素水解液的成分极其复杂，一些其他的未知成分可能影响糖转运或者糖代谢系统。

能够高效地进行己糖和戊糖的共代谢是理想的木质纤维素微生物油脂工业应用菌株的特性，其共代谢机制的探究和扩展具有重要意义，尤其是将其关键基因元件应用在戊糖代谢较差的菌株中，实现目的菌株戊糖代谢速率的提高。目前，在戊糖代谢能力较强的菌株中挖掘重要的糖转运体是改善酿酒酵母木糖代谢能力的有效手段。Wang 等在酿酒酵母中引入 8 个异源糖转运蛋白，包括来自产油酵母菌株皮状细胞酵母转运的蛋白 TCT1 和 TCT2，但是这两个转运蛋白转运木糖的能力较差，来自季也蒙迈耶氏酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*) 的糖转运蛋白转运木糖的效率较高并进行了该蛋白关键氨基酸残基的定点诱变，最终获得的酿酒酵母重组子解除了葡萄糖分解代谢阻遏但是其葡萄糖代谢速率显著降低<sup>[210]</sup>。Jiang 等在酿酒酵母中异源表达来自里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的 3 个候选糖转运蛋白，其中 Xltr1p 具有比内源性酵母转运蛋白 Gal2p 更高的木糖转运活性，但是通过定点突变得到的木糖高效转运体失去了转运葡萄糖的能力<sup>[211]</sup>。

目前绝大部分的研究集中于在产油酵母中构建高效的木糖代谢途径、改善葡萄糖和木糖同时存在下的葡萄糖代谢阻遏问题，鲜有报道提及产油酵母木质纤维素来源的全部混合糖的协同代谢及其扩展应用。木质纤维素来源的全糖代谢对于产油酵母更加彻底地利用木质纤维素生物质资源至关重要，进一步提高了纤维素微生物油脂产品的经济性，并且可以扩展到以纤维素乙醇为代表的其他的木质纤维素来源的产品。

## 1.6 本文的立题依据和主要研究内容

产油酵母是生产微生物油脂的最适细胞工厂。但野生型产油酵母由于天然胞内空间的限制，油脂积累能力远远达不到工业生产指标。目前已经尝试了各种方法来获得高油脂含量产油酵母，包括代谢工程改造、诱变、细胞筛选等方法，但进展十分有限。实验室前期以 *T. cutaneum* ACCC 20271 为出发菌株，提出了使用超离心力胁迫适应性进化的方法提高其油脂含量。该方法依据于高油脂含量细胞密度较低，离心后会聚集在发酵液上层。通过不断吸取和转接上层细胞，并逐步提高超离心力胁迫时离心力的大小。进一步通过在培养过程中添加纤维素酶使细胞壁强度削弱，强化细胞对外界的应激和细胞扩张。在持续 200 天的适应性进化的进程中发现两株进化菌株 *T. cutaneum* MP11 (仅进行离心胁迫和筛选) 和 *T. cutaneum* YY52 (离心胁迫和筛选、纤维素酶胁迫) 在超离心力胁迫下细胞形态发生变化，脂质小体的积累增加。但是超离心力胁迫适应性进化对于产

油酵母细胞生理代谢特征,尤其是对生长、细胞结构和油脂积累的影响有待进一步表征;产油酵母细胞响应超离心力胁迫并促进油脂积累的关键原因需要进一步明确。为了解决上述问题,本研究包括以下几个方面:

(1) 以经超离心力胁迫适应性进化获的两株形态变化巨大的突变皮状丝孢酵母为研究对象,对其细胞的油脂合成能力、形态和显微结构进行表征。通过全基因组重测序和转录分析揭示细胞形态和油脂积累能力发生变化的关键因素,并利用两株突变菌株生产高指标的纤维素微生物油脂。

(2) 探究了产油酵母细胞响应超离心力胁迫并促进胞内油脂积累的内在机制。首先对皮状丝孢酵母施加不同强度的超离心力刺激,验证细胞是否存在对外界超离心力的响应;随后在圆红冬孢酵母和解脂耶氏酵母上开展超离心力胁迫适应性进化,验证潜在机械力信号转达通路是否保守;进一步通过差异转录组分析、蛋白质互作网络分析、蛋白磷酸化水平检测等实验,挖掘和验证传递超离心力胁迫刺激的重要机械力信号通路。最后通过尝试在皮状丝孢酵母中建立基因操作系统,进一步在胞内验证该信号转导通路的重要性。

(3) 以皮状丝孢酵母为出发菌株,通过超离心力胁迫适应性进化并叠加酚醛抑制物胁迫,用以同时提高皮状丝孢酵母对木质纤维素衍生的酚醛抑制剂耐受性和胞内微生物油脂的积累。通过细胞表征、重测序和转水平的分析阐释进化后的细胞酚醛抑制物耐受性和油脂含量提高的原因。最后利用该突变菌株生产高指标的纤维素微生物油脂。

(4) 从糖转运和单糖分解代谢两方面分析了通过超离心力胁迫进化获得的两株突变菌株糖代谢能力提高的原因。将转录显著上调的糖转运蛋白基因在酿酒酵母中异源表达以验证糖代谢显著提高的原因。最后将其中糖转运能力较好的糖转运蛋白基因进行多拷贝整合表达以提高酿酒酵母的木糖摄取能力。

## 第 2 章 超离心力胁迫适应性进化获得的突变皮状丝孢酵母细胞形态结构和代谢表征

### 2.1 引言

本实验室前期建立了超离心力适应性进化筛选手段,根据胞内油脂含量不同导致细胞密度变化,简单、高效地获得了高产油脂突变皮状丝孢酵母。在离心过程中,密度较轻、油脂含量较高的细胞在离心力方向上移动缓慢,形成不同脂质含量的细胞梯度。移取上层细胞就可以筛选出油脂含量较高的细胞,从而实现全通量的高油脂含量细胞的筛选<sup>[212]</sup>。并进一步在超离心力进化方法中增加纤维素酶作为一个新的胁迫压力。纤维素酶使细胞壁强度削弱,强化细胞对外界的应激和细胞扩张<sup>[213]</sup>。最终获得了两株高油脂含量进化菌株 *T. cutaneum* MP11 (仅进行离心胁迫和筛选) 和 *T. cutaneum* YY52 (离心胁迫和筛选、纤维素酶胁迫)。

超离心力除了基于细胞密度的筛选作用外,更重要的是其作为巨大的胁迫应力(45,000 g)会引发基因突变和转录调控的变化。在以上两种超离心力胁迫进化进程中记录细胞形态,均发现细胞在应力作用下其形态和油脂积累能力发生了改变。通过适应性进化手段培育目标性状的菌株,在鉴定其选择压力移除后表型稳定的基础上,需要进一步通过分子检测技术分析进化菌株基因组的变异情况,提供关于基因突变和适应性进化的详细信息<sup>[214, 215]</sup>。而非遗传物质的变化可以通过转录调控的层面反应相关基因的表达水平<sup>[216]</sup>。通过对应力胁迫适应性进化后获得的菌株进行全面表征和多组学分析有不仅助于揭示与优良性状相关的重要基因,也有助于后续对应力响应机制的进一步挖掘。

在本研究中,首先对通过超离心胁迫进化获得的两株进化菌株 *T. cutanrum* MP11 和 YY52 进行无压力条件下表型稳定性的鉴定。进一步对两株进化菌株的细胞结构进行全面表征。通过全基因组重测序得到的突变位点和基因转录水平的分析挖掘了细胞形态变化和脂质积累的关键基因。最后利用两株胞内空间巨大的突变菌株以木质纤维素为原料发酵生产高指标的纤维素油脂。本研究证明了超离心力作为强大胁迫触发基因突变并获得稳定表型变化的重要作用。同时也为筛选有木质纤维素工业应用潜力的产油酵母细胞底盘提供依据。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 菌株和培养基

*T. cutaneum* ACCC 20271 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心。其全基因组已上传 DDBJ/EMBL/GenBank, 编号为 LTAL00000000<sup>[45]</sup>。

*T. cutaneum* MP11 由出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 通过长周期超离心力适应性进化筛选获得<sup>[212]</sup>, 菌株已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC, <http://www.cgmcc.net>), 注册号为 20481。

*T. cutaneum* YY52 由出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 通过长周期超离心力胁迫附加纤维素酶适应性进化获得<sup>[213]</sup>，在适应性进化培养中添加纤维素酶。

生物脱毒菌株 *Amorphotheca resinae* ZN1 和 *Paecilomyces variotii* FN89 保藏编号分别为 CGMCC 7452C 和 CGMCC 17665<sup>[217, 218]</sup>。

酵母培养 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 培养基: 葡萄糖 20.0 g/L, 蛋白胨 20.0 g/L, 酵母提取物 10.0 g/L (固体培养基另加 20.0 g/L 琼脂粉)

皮状丝孢酵母超离心力进化培养基 (合成培养基): 葡萄糖 60.0 g/L, 酵母提取物 1.0 g/L, 磷酸二氢钾 2.0 g/L, 七水硫酸镁 1.0 g/L, 硫酸铵 0.44 g/L。

木质纤维素体系下微生物油脂发酵营养盐组分为磷酸二氢钾 1.0 g/L、酵母提取物 0.5 g/L、七水硫酸镁 0.5 g/L 和硫酸铵 0.22 g/L 硫酸铵。

木质纤维素体系下微生物油脂和单细胞蛋白联产发酵营养盐组分为 1.0 g/L 磷酸二氢钾、1.0 g/L 七水硫酸镁、26.0 g/L 硫酸铵。

生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 和 *P. variotii* FN89 保存于 PDA (Potato Dextrose Agar Medium) 平板上。使用 SM (supplemental medium) 培养基 (15.0 g/L 葡萄糖, 5.0 g/L 木糖, 1.0 g/L 酵母提取物, 2.0 g/L 磷酸二氢钾, 1.0 g/L 硫酸铵和 1.0 g/L 七水硫酸镁) 进行种子液培养。

### 2.2.2 生物质原料和试剂

小麦秸秆采收于 2018 年, 产自山东省滨州市。玉米秸秆采收于 2020 年, 产自河南省南阳市。根据 NREL LAP 组分测定方法<sup>[219]</sup>, 小麦秸秆中纤维素含量为 32.5% (w/w), 半纤维素含量为 21.2% (w/w), 灰分含量为 8.1% (w/w); 玉米秸秆中纤维素含量为 34.4% (w/w), 半纤维素含量为 23.6% (w/w), 灰分含量为 4.3% (w/w)。将预处理后的生物质原料中和至 pH 为 5.5, 接种 *A. resinae* ZN1 种子进行生物脱毒去除抑制物。

纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自诺维信 (北京) 生物技术有限公司, 根据 Brandford 方法<sup>[220]</sup>测得酶蛋白含量为 81.5 mg/mL, 根据 NREL 方案测得滤纸酶活为 256.0 FPU/mL<sup>[221]</sup>。

Hoechst 33258 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。酵母提取物和蛋白胨购自 Oxoid (Hamp shire, UK)。葡萄糖等其他基础试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 2.2.3 生物质原料预处理和脱毒

根据本实验室的干式稀酸法对小麦秸秆进行预处理<sup>[222]</sup>, 具体实验步骤如下, 原料经过粗切至 1-2 cm 长度, 按照固液比 2: 1 与硫酸溶液共同投入配备有螺旋搅拌桨的 20 L 预处理反应器中。硫酸的用量为 4.5% (DM, w/w)。整个预处理过程在 175°C 下维持 5 min。随后从反应器底部排出预处理物料。

固态脱毒 (先脱毒后糖化): 将 *A. resinae* ZN1 的孢子洗下接入 200 g 小麦秸秆物料中培养 7 天左右作为脱毒种子, 将脱毒种子以 10% (w/w) 的接种比转移至 5 L 生物反应器中进行小麦秸秆物料的生物脱毒, 脱毒条件为 28°C, 通气量 0.8 vvm, 时间为 72 h<sup>[223]</sup>。

液态脱毒（先糖化后脱毒）：将经过一系列处理的物料转入 5 L 生物反应器中进行糖化，转速为 200 rpm，温度为 50°C，纤维素酶用量为 4 mg 纤维素酶蛋白每克麦秆干物质。糖化 12 h 后，将水解液转入 3 L 生物反应器中，以 10%接种量加入 *P. variotii* FN89 菌液进行生物脱毒。脱毒结束后，立即将生物反应器温度升温至 50°C，保持 12 h 即可灭活发酵液中的 *P. variotii* FN89<sup>[176]</sup>。

#### 2.2.4 小麦秸秆水解液的制备

对干酸预处理和生物脱毒后的小麦秸秆进行糖化，固含量为 15% (w/w)，纤维素酶用量为 6 mg 蛋白/干物质。在 5 L 发酵罐中进行糖化反应，反应条件设置为 50°C，150 rpm，48 h，糖化结束后将糖化液转移出反应器离心去除不溶性残渣，115°C 下灭菌 20 分钟，灭活纤维素。以上步骤后得到澄清的水解液。

#### 2.2.5 显微镜的制片和观察

扫描电镜制片：样本离心收集后，PBS 洗 1-2 次，用浓度为 2.5% (v/v) 戊二醛溶液固定细胞(4°C 过夜)，用清水或 PBS 清洗未固定的细胞，用梯度浓度的乙醇溶液(30%-100%)脱水处理，放入真空冷冻干燥箱中冷冻干燥 4 h，喷金后用于成像。拍摄采用场发射扫描电镜 Nova NanoSEM 450 (美国 FEI 公司)。

透射电镜制片：样本离心收集后，PBS 洗 1-2 次，使用新鲜配置的 2.5% 戊二醛溶液在 4°C 下固定 12 h，用清水或 PBS 洗去未固定的细胞，并用梯度浓度的乙醇溶液洗脱。将脱水后的样品浸入环氧丙烷和树脂的混合物并进行环氧树脂包埋，最后切片用于呈像。拍摄采用透射电子显微镜 JEM-1400 Flash (日本电子 JEOL)。

荧光共聚焦显微镜制片：样本离心收集后，PBS 洗 1-2 次，取米粒大小的菌体用 PBS 或清水重悬，加入 1/1000 (v/v) 的 Hoechst 33258 (翌圣生物科技，上海) 避光孵育 10-30 min 后制片观察。拍摄采用搭载 VIHENT LED 荧光模块的奥林巴斯显微镜 (Olympus BX51)。

#### 2.2.6 细胞壁组分检测

细胞壁中聚糖组分的测定参考 Manners 等<sup>[224]</sup> (1973) 提出的方法，具体方法是：离心取菌体，使用超纯水洗涤重悬两次。菌体冷冻干燥后取 100 mg 干重菌体于具塞试管中。加入 1 mL 4% (w/w) 硫酸溶液，30°C 水浴酸解 1 h。加入 28 mL 超纯水，121°C 酸解 1 h。中和后测定其中的葡萄糖、甘露糖含量，换算可得细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖含量。

细胞壁中几丁质组分的测定参考 Domer 等人<sup>[225]</sup> (1971) 提出的方法，具体方法是：离心取菌体，使用超纯水洗涤重选两次。菌体冷冻干燥后取 50 mg 于旋蒸瓶中，加入 6 M HCl 高温 105°C 酸解 24 h，50°C 下旋转蒸发后加超纯水溶解。称量 0.5 mL 处理后的溶液与 0.5 mL 混合液 1 (碳酸氢钠溶解于乙酰丙酮至终浓度 1.5 M)，高温煮沸后与混合液 2 (30 mL 45% 盐酸和 30 mL 乙醇溶解 1.6 g 4-甲基苯甲醛) 和 3.5 mL 乙醇三者充分混合后放置 1 h，分光光度计在波长为 520 nm 下检测吸光度并绘制 N-乙酰葡萄糖胺标曲，

计算待测样品中几丁质含量。

### 2.2.7 细胞体积的测量和密度检测

使用 Nano Measurer 软件（1.2 版本）分析细胞直径。亲本 *T. cutaneum* ACCC 20271 细胞形状近似为圆柱体，根据公式（4-1）计算体积（V）：

$$V = \pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 h \quad (2-1)$$

公式（1）中， $D$  为细胞短直径； $h$  是细胞的长直径。

近似纺锤型的 *T. cutaneum* YY52 胞体的体积参照公式（4-2），近似两个底部相连的锥体体积相计算其体积。

$$V = \frac{1}{3} \pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 h \quad (2-2)$$

其中， $D$ ：细胞的短直径； $h$ ：细胞的长度。细胞体积的测量时取 100 个以上细胞体积的平均值。计算细胞体积时只选择成熟细胞，不包括未成熟（小）细胞和分裂时的细胞。

使用 Nano Measurer 软件（1.2 版本）分析细胞直径。亲本 *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* MS28 细胞形状近似为圆柱体，根据公式（2-3）计算体积（V）：

$$V = \pi \left( \frac{D}{2} \right)^2 h \quad (2-3)$$

其中， $D$  为细胞短直径； $h$  是细胞的长直径。细胞体积的测量时取 100 个以上细胞体积的平均值。计算细胞体积时只选择成熟细胞，不包括未成熟（小）细胞和分裂时的细胞。

使用密度计 DMA 4500M（奥地利，安东帕）测量发酵液和上清液的密度。检测湿细胞密度的样本取自发酵液中的细胞，细胞收获后 12,000 g 离心 30 min，收集离心后沉淀的所有细胞用于检测<sup>[226, 227]</sup>，湿细胞的密度（ $\rho_w$ , kg/m<sup>3</sup>）根据公式（2-4）计算：

$$\frac{w}{\rho_b} = \frac{w_1}{\rho_w} + \frac{(w - w_1)}{\rho_s} \quad (2-4)$$

其中， $\rho_b$  是发酵液的密度（kg/m<sup>3</sup>）； $\rho_s$  是上清液的密度（kg/m<sup>3</sup>）； $w$  是发酵液的重（kg）； $w_1$  是湿细胞重量（kg）。离心后，假定细胞为紧密堆积的球体。致密堆积的细胞与含有液体的湿细胞的体积比假设为 0.74<sup>[228]</sup>。细胞密度（ $\rho_c$ , kg/m<sup>3</sup>）的计算公式为公式（2-5）：

$$\rho_c \times 0.74 + \rho_s \times 0.26 = \rho_w \times 1 \quad (2-5)$$

### 2.2.8 胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 的检测

使用索莱宝（北京）生物科技有限公司的 Acetyl-CoA Analysis Kit 试剂盒测定胞内乙酰辅酶 A 的含量。使用碧云天（上海）生物科技有限公司的 NADPH Assay Kit 试剂盒测定胞内 NADPH 的含量。

### 2.2.9 全基因组重测序和转录组测序

*T. cutaneum* MP11 和 YY52 的全基因组在派森诺(上海)生物科技公司进行重测序。构建的 DNA 文库插入大小为 400 bp, 使用 Illumina NovaSeq 平台进行测序。

使用 Trizol 试剂 (RNAiso Plus, TAKARA, Otsu, Japan) 提取两株 *T. cutaneum* (*T. cutaneum* ACCC 20271 和 *T. cutaneum* YY52) 的总 RNA。RNA 测序由派森诺(上海)生物科技公司使用 Illumina HiSeq 2000 系统完成。

### 2.2.10 RT-qPCR

使用天根生化科技(北京)有限公司的 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒提取总 RNA。使用东洋纺(上海)生物科技有限公司的 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 进行 DNA 的去除和反转录反应。使用东洋纺(上海)生物科技有限公司的 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒并利用 BioRad CFX 96 (美国伯乐) 进行 qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Tranion PCR) 实验。肌动蛋白 Actin 基因作为内参基因, 用于 RNA 总量差异的归一化处理, 转录水平使用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算。RT-qPCR 所用引物见附录 I 中表 1。

### 2.2.11 微生物油脂发酵

微生物油脂发酵的第一次活化是从 YPD 固体平板挑取 *T. cutaneum* MP11 单菌落至装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 三角瓶, 第二次活化是取 5 mL 菌液至装有 50 mL YPD 培养基的 500 mL 三角瓶中, 两次活化均在 30°C、180 rpm 摇床培养 24 h。

微生物油脂的 SHF 发酵 (异步糖化发酵) [212]: 在小麦秸秆水解液中进行微生物油脂的 SHF, 1 L 小麦秸秆水解液转移至 5 L 发酵罐 (配有螺带桨叶) 中, *T. cutaneum* 种子液以 10% (v/v) 接种后油脂发酵在 30°C、1 vvm、600 rpm 下进行, 额外添加的营养盐见 2.2.1。用 4 M 盐酸自动调节 pH 至 5.5。

微生物油脂的 SSCF 发酵 (同步糖化共发酵) [229]: 以玉米秸秆为原料进行微生物油脂的 SSCF。首先对原料进行预处理、固态生物脱毒。物料转移至 5 L 发酵罐 (配有螺带桨叶) 中, 在 4 mg 纤维素酶/g 干物质、固体含量为 30% (w/w) 的条件下进行 12 h 预糖化。同步糖化共发酵时将物料转移至另一个配有直叶桨的 5 L 反应器中, 发酵条件为 30°C、1 vvm、600 rpm, 额外添加的营养盐见 2.2.1, 用 4 M 盐酸自动调节 pH 至 5.5。

### 2.2.12 微生物油脂的提取和检测

使用差重法检测菌体干重 (DCW), 样品收集后离心, 用清水洗涤 2 次, 放入 65°C 烘箱, 放置 12-24 h 至恒重。

使用氯仿-甲醇提取法 [231] 测定微生物油脂的产量, 向乘有烘干菌体的玻璃皿中加入 5 mL 浓度为 4 M 的盐酸溶液, 室温裂解 3 h 以上。将盐酸裂解后的菌体转移至 50 mL 离心管中, 沸水浴 15 min 后立即至冰上冷却 10 min。加入 20 mL 氯仿和甲醇 (2: 1, v/v) 溶液, 封口后 30°C, 180 rpm 萃取 2 h 后高速离心。离心后移取下层含油脂的氯

仿层转移至圆底旋蒸瓶，80°C下旋蒸后置于65°C烘箱，烘干约12 h后称重。用差重法计算油脂重量和细胞干重，细胞油脂含量等于油脂重量除以细胞干重。

### 2.2.13 分析方法

葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖等均通过 HPLC (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) 检测，配件为 RID-10A 型示差折光检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 HPX-87H 型色谱柱 (Bio-rad, USA)，流动相为 5 mM 硫酸溶液，流速为 0.6 mL/min。

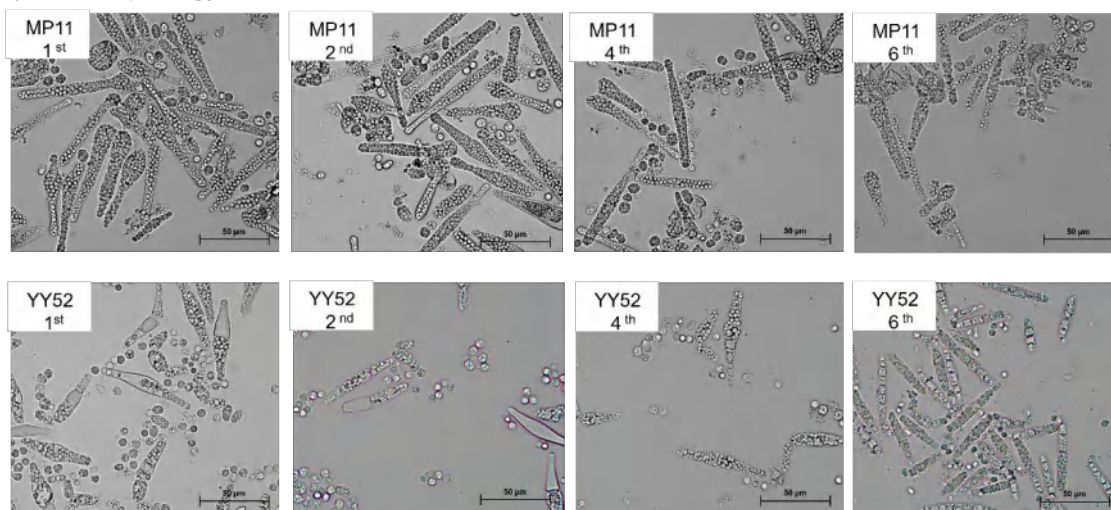
## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株遗传稳定性的鉴定

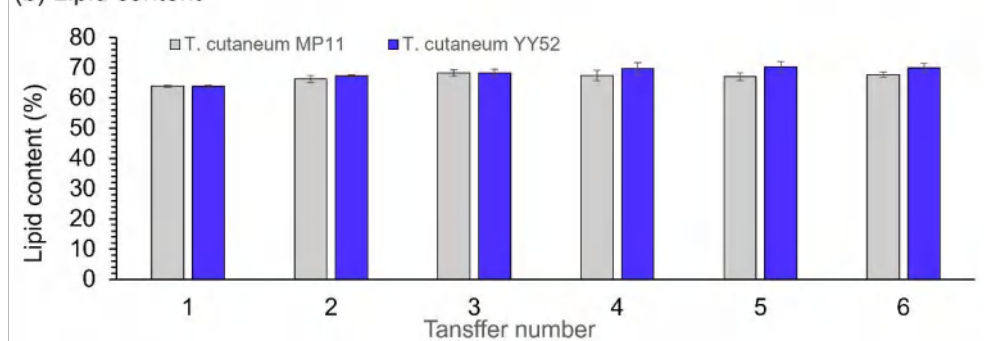
*T. cutaneum* MP11 和 YY52 是分别在超离心力胁迫筛选和超离心力胁迫筛选附加纤维素酶条件下获得的进化菌株，适应性进化中记录的细胞形态显示两株菌株在应力胁迫下均发生巨大的形态变化，在两株进化菌株进行单菌落分离后，首先要进行的是遗传稳定性的鉴定，在解除应力条件下进行连续传代培养。

首先在去除超离心力和纤维素酶应力的合成培养基（保持氮限制）中对两株突变菌株进行普通传代培养。培养时不加入纤维素酶、转接时不进行超离心力胁迫，每代培养结束后直接吸取发酵液接种至新的培养基进行下一代的培养，连续传代 6 次，验证其表型的遗传稳定性（图 2.1）。在合成培养基进行了 6 次普通转接培养后，发现两株进化菌株的形态和油脂积累基本维持不变，*T. cutaneum* MP11 维持一端略鼓起的巨大长棒状且胞内充满致密的油脂小体；*T. cutaneum* YY52 维持巨大的梭形且胞内充满油脂小体。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 活化后接入合成培养基适应环境后，油脂含量逐渐升高并维持在较高水平。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 的油脂含量在合成培养基中培养至 96 h 时，油脂含量最高分别达到 67.8%和 70.2%。

(a) Cell morphology



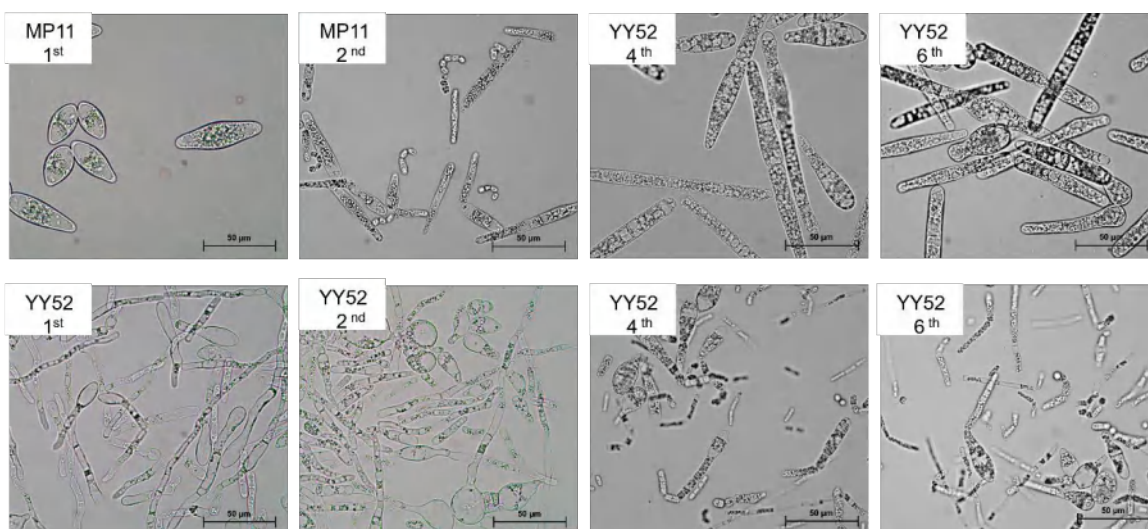
(b) Lipid content

图 2.1 无胁迫压力下连续培养验证突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的遗传稳定性Fig. 2.1 Genetic stability of *T. cutaneum* MP11 and YY52 in several rounds of cultivation under stress-free pressure: (a) Cell morphology. (b) Lipid content

实验条件：菌株活化后转接至合成培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30℃，180 rpm 的条件下培养 96 h，连续转接 6 次。

上述遗传性状稳定性验证所采用的培养环境是利于油脂积累的氮限制条件。进一步在解除胁迫应力和氮限制的 YPD 培养基中进行无压力传代，记录其细胞形态和油脂含量（图 2.2）。传代培养在富氮的 YPD 中进行，*T. cutaneum* MP11 在固体 YPD 平板上活化后转入第一代液体 YPD 培养基，细胞形态呈巨大的椭球型。在第二代开始转变为长棒状，由于解除氮限制，皮状丝孢酵母作为二态酵母细胞在富氮条件下趋于菌丝态，*T. cutaneum* MP11 在后续传代培养中细胞形态更加延长。*T. cutaneum* YY52 转入液体 YPD 培养基后细胞呈现一端膨起的类菌丝状，并在后续传代中逐渐转变为中间鼓起的棒状或者纺锤形。由于富氮条件下不利于油脂的积累，*T. cutaneum* MP11 和 YY52 的油脂含量在适应富氮环境后分别稳定在 45% 和 40% 左右。在氮限和非氮限的条件下均进行了 6 次无压力传代后，发现进化菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的形态和油脂积累无退化现象、基本维持稳定不变，这表明两株菌株具有一定的遗传稳定性。

(a) Cell morphology



(b) Lipid content

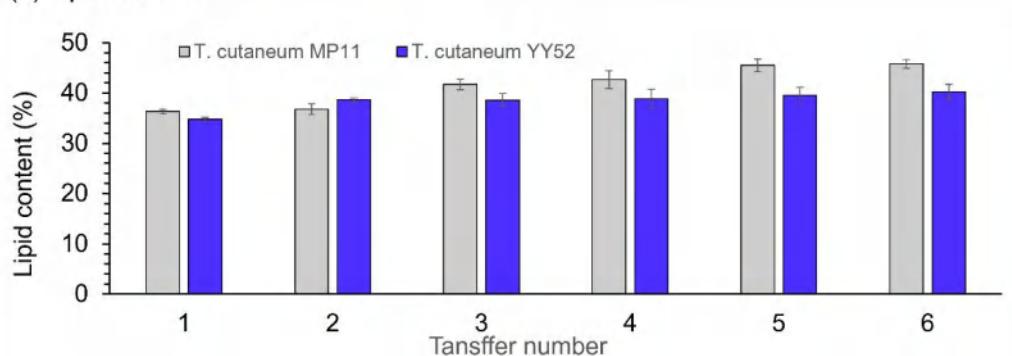
图 2.2 在 YPD 培养基下连续培养验证突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的遗传稳定性

Fig. 2.2 Genetic stability of *T. cutaneum* MP11 and YY52 in several rounds of cultivation in YPD medium: (a) Cell morphology. (b) Lipid content

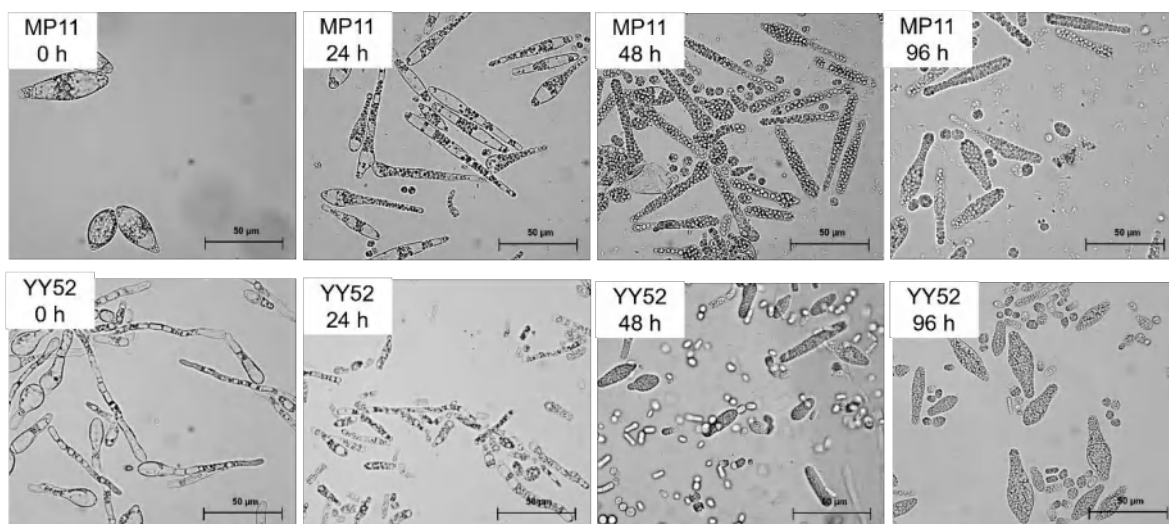
实验条件：菌株活化后转接至 YPD 培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 24 h，连续转接 6 次。

### 2.3.2 超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株纤维素油脂的积累能力

我们所设计的菌株在胁迫条件下适应性进化的最终目的是为了培育具有木质纤维素工业应用潜力的高产油酵母细胞。因此，需要进一步评价两进化菌株在木质纤维素环境中的生长和油脂积累能力。图 2.3 展示了进化菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 在小麦秸秆水解液中的细胞形态、生长状态和油脂积累能力。在种子 YPD 培养基中（图 2.3 a，0 h），*T. cutaneum* MP11 和 YY52 分别呈现椭球型和一段膨大的交联菌丝态。转入小麦秸秆水解液中培养 24 h 后，两株进化细胞均开始由菌丝态转变为利于油脂积累的酵母态，并在培养 24 h 至 48 h 迅速积累脂质小体。培养至 48 h 时，*T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞进一步变为长杆状或巨大的椭圆形。培养至 96 h 时，*T. cutaneum* MP11 呈长棒状或者一端膨起的棒球杆状；*T. cutaneum* YY52 细胞呈膨大的纺锤形，并且两进化细胞内均有致密的脂质小体充满整个胞内空间。图 2.3 b 表明，进化菌株 *T. cutaneum* MP11

和 YY52 在木质纤维素水解液中均有显著增强的生长能力和油脂积累能力。 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 在木质纤维素水解液中培养至 96 h 时，积累的生物量是出发菌株的 3.7 倍和 4.1 倍，积累的胞内油脂含量分别是出发菌株的 2.1 倍和 2.3 倍。

(a) Cell morphology change



(b) Cell growth and lipid accumulation

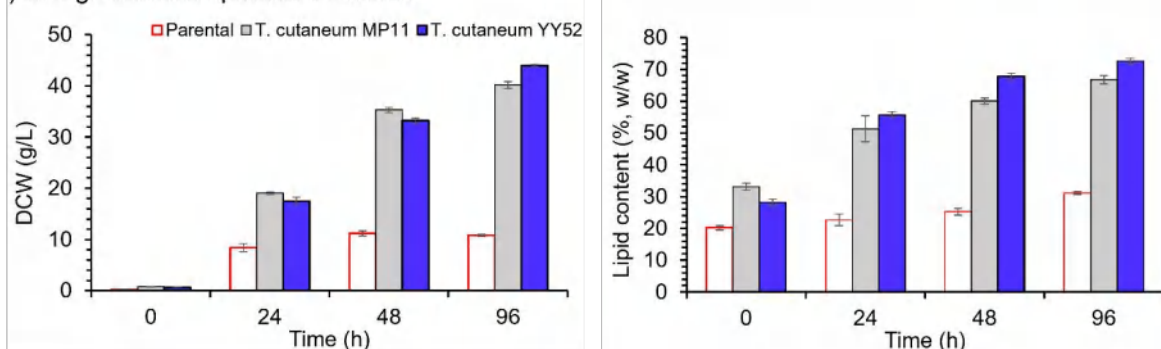


图 2.3 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 在木质纤维素水解液中生长能力和微生物油脂的积累能力

Fig. 2.3 Growth performance and lipid accumulation of *T. cutaneum* MP11 and YY52 in lignocellulose hydrolysate: (a) Cell morphology change; (b) Cell growth and lipid content

实验条件：菌株活化后转接至固含量为 15% (w/w) 小麦秸秆水解液，发酵 3 L 发酵罐中进行发酵，30°C，600 rpm 的条件下培养 96 h。

### 2.3.3 超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株的显微形态和结构表征

进一步通过显微成像观察超离心力胁迫进化获得的两株进化菌株的微观形态和结构。场发射扫描电子显微镜 (FESEM) 图像和细胞核染色后的荧光显微镜 (FMI) 图像显示 (图 2.4)，*T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞均呈多核细胞样单元，并有隔膜分隔。这种多核形态的酵母态细胞明显区别于皮状丝孢酵母在普通的不适宜生长的应力环境下产生的厚垣孢子，或者普通的菌丝态以及假菌丝态。厚垣孢子呈现圆球状且内含无性生殖产生的蜂窝状的圆形孢子，普通的假菌丝其“子细胞”间有“细腰”，整体呈现较细的藕节状。而 *T. cutaneum* MP11 培养至成熟的细胞时呈粗棒状(尾部有鼓起)，*T. cutaneum*

YY52 呈纺锤形。这种多核态细胞的形成可能是在出芽时细胞伸长而不脱离相邻细胞时发生的特殊细胞增殖。

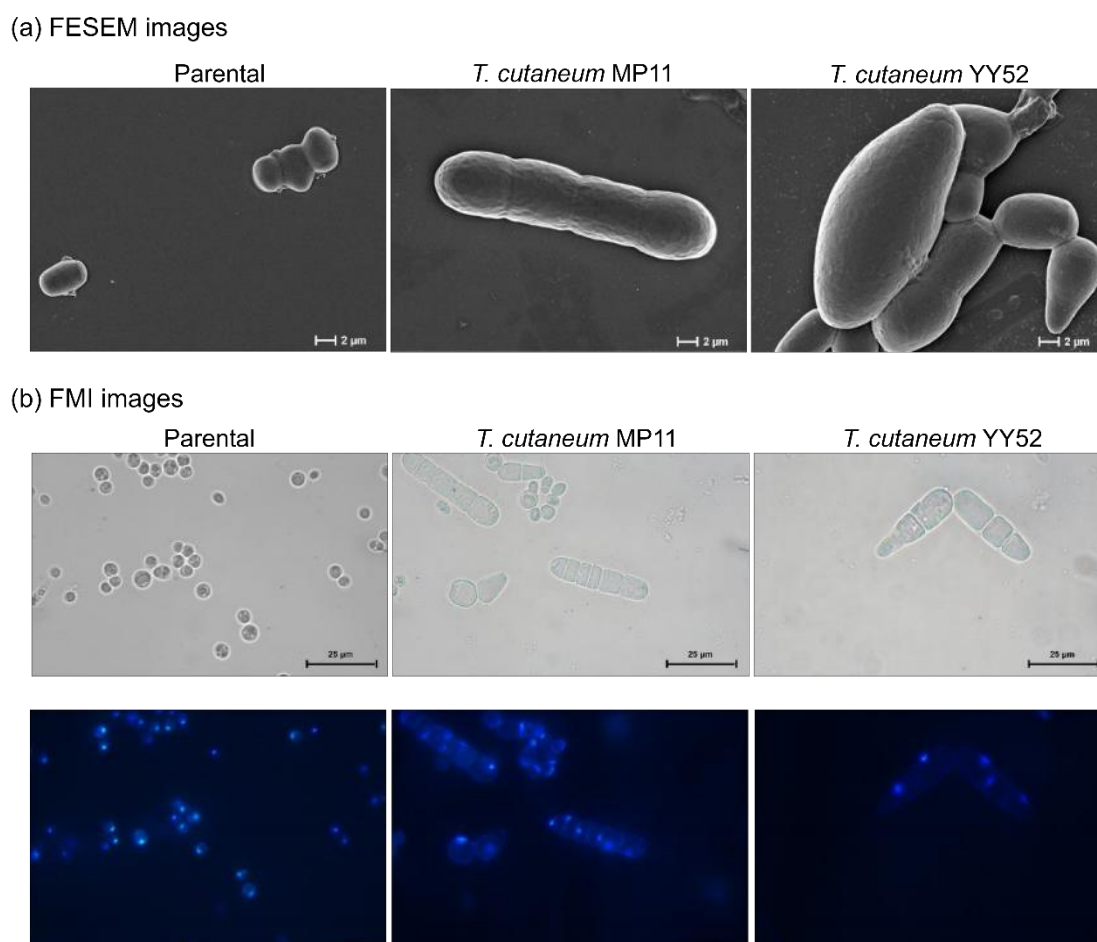


图 2.4 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的微观形态和核观察

Fig. 2.4 Micromorphology and nuclear observations of *T. cutaneum* MP11 and YY52: (a) FESEM images; (b) FMI images

实验条件：培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 96 h，透射电镜、场发射扫描电镜的制片见 2.2.5。

胞内产物大量积累的一个关键性限制条件是胞内空间<sup>[232, 233]</sup>。细胞壁中各组分的紧密排列维持了细胞壁较强的刚性和较小的弹性，是限制细胞体积的关键因素<sup>[234]</sup>。产油酵母细胞壁与普通酵母细胞壁类似，可以分为内外两层，甘露糖蛋白是外层的主要成分；葡聚糖和几丁质复合体是内层的主要组分。内层的葡聚糖和几丁质复合体构成细胞壁的纤维状三维支架<sup>[235]</sup>。其中，占到细胞壁总组分 40% 以上的葡聚糖分别与甘露糖蛋白和几丁质共价连接形成交联结构，是维持细胞形态和抗应力性能的最重要组分<sup>[236]</sup>。酵母细胞壁通过在应力环境中调整细胞壁组分维持形态和细胞功能的完整。长期施加在细胞表面的超离心力和纤维素酶均对细胞壁有物理或者化学作用，为了适应强大的应力刺激，势必会导致细胞壁重塑 (remodeled) 时细胞壁组分的发生改变，从而影响细胞体积和形态。如图 2.5 所示，两进化菌株细胞中葡聚糖和甘露糖组分均显著降低。*T. cutaneum*

MP11 中葡聚糖聚糖、甘露聚糖和几丁质含量分别减少了 61.2%、40.2%和 11.9%；*T. cutaneum* YY52 细胞壁的葡聚糖和甘露聚糖含量分别减少了 91.7%，56.9%，几丁质的含量略微升高保持相对稳定。细胞壁中葡聚糖和甘露聚糖含量的减少降低了细胞壁的结构强度，从而为细胞形态、体积的变化提供可能。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 相比于出发菌株，细胞体积扩大了将近两个数量级（ $5.0 \times 10^{-15} \text{ m}^3$  vs.  $6.7 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ 、 $5.4 \times 10^{-15} \text{ m}^3$  vs.  $6.7 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ ）。相应的，*T. cutaneum* YY52 的细胞密度（ $990.6 \text{ kg/m}^3$ ）也比出发菌株（ $1069.5 \text{ kg/m}^3$ ）和发酵液密度（ $1010.9 \text{ kg/m}^3$ ）更低。与不添加纤维素酶胁迫、只经超离心力胁迫进化获得的 *T. cutaneum* MP11 相比，*T. cutaneum* YY52 在超离心力和纤维素酶双重胁迫下，细胞壁葡聚糖含量更低、细胞平均体积更大、细胞密度更低、脂质含量更高。上述结果表明，细胞的形态大小很可能和细胞壁组分尤其是细胞壁中葡聚糖的组分密切相关。

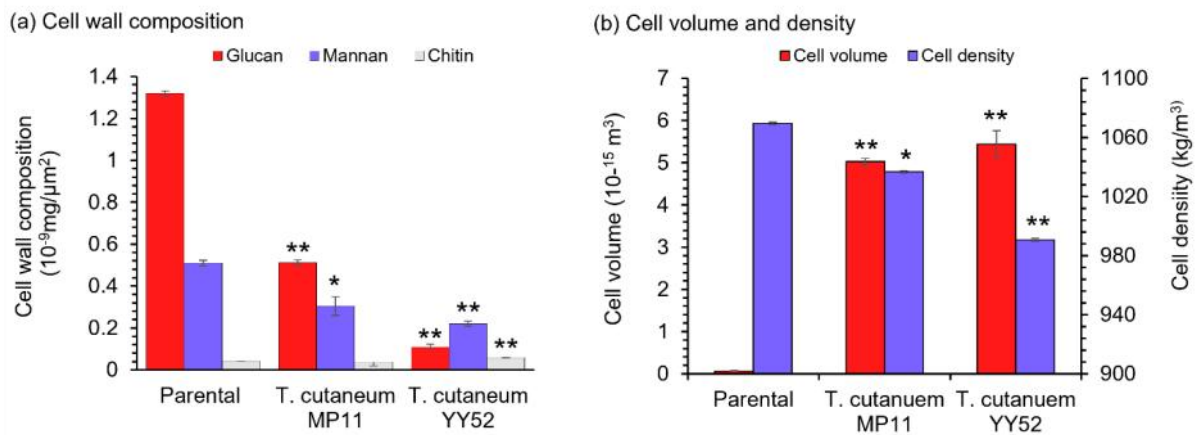


图 2.5 *T. cutaneum* YY52 和 MP11 的细胞壁组成、体积和密度

Fig. 2.5 Cell wall compositions, cell volume and density of parental, *T. cutaneum* YY52 and *T. cutaneum* MP11: (a) Cell wall composition. (b) Cell volume and density

实验条件：菌株活化后转接至合成培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 96 h。

使用透射电子显微镜 (TEM) 进一步观察了细胞壁结构 (图 2.6)。TEM 结果表明，脂质体几乎占据了 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的整个胞内空间。两株突变菌株的细胞壁（葡聚糖层和几丁质交联的内层、甘露聚糖外层）相比于出发菌株均显著变薄，*T. cutaneum* MP11 外层“鞭毛状”的甘露聚糖基本消失。葡聚糖和几丁质的含量，尤其是葡聚糖的含量决定了细胞壁的厚度、强度等<sup>[236]</sup>。在细胞壁组分的测量中两株菌株的葡聚糖含量均明显降低 (图 2.5)，这很可能是细胞壁完整性遭到破坏并使细胞体积扩大的重要原因。在对培养至 96 h 的出发菌株进行 TEM 切片时，由于细胞壁非常厚，细胞壁和细胞质之间出现了质壁分离 (狭窄的明亮空间)，两株进化菌株的制片均未出现此现象。此外，在制备显微观察样品时，大量形态异常巨大的 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞会破碎成细胞碎片。这些现象均表明，进化菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞壁结构与出发菌株相比发生了显著变化，具有更薄、更脆弱的细胞壁。由于细胞壁具有致密的聚

糖结构，产油酵母对外界化学或者物理作用的裂解处理耐受性强<sup>[237]</sup>。这使得实际工业生产中从菌体中回收脂质成为繁琐和高成本的过程。超离心力胁迫适应性进化获得的 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞易发生自发破裂的这一特点可能有利于胞内油脂的提取。

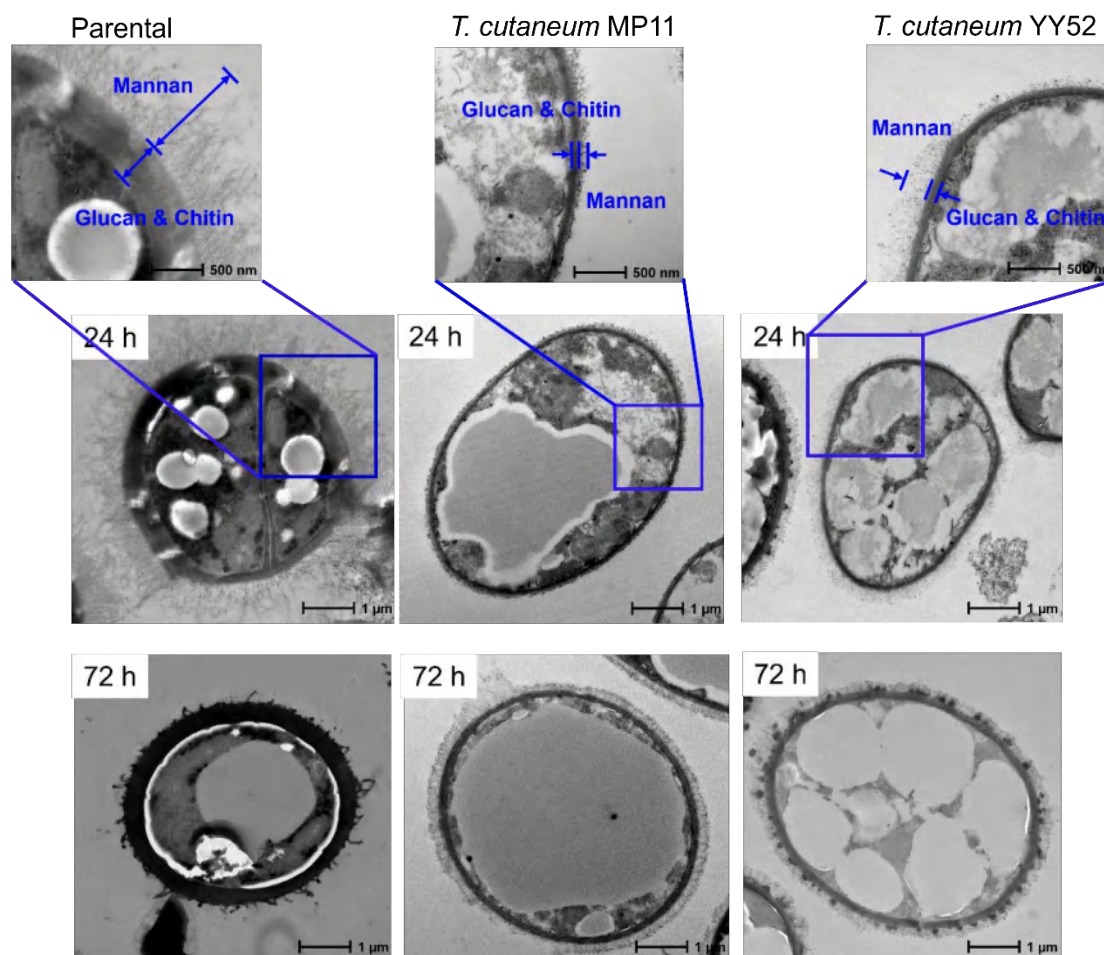


图 2.6 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的胞内和细胞壁结构观察

Fig. 2.6 Microscale observation of intracellular and cell wall structure of *T. cutaneum* MP11 and YY52  
实验条件：菌株活化后转接至合成培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 72 h，透射电镜、场发射扫描电镜的制片见 2.2.5。

注：透射电镜制片时切片步骤产生随机的横截面，图中两突变菌株切片时造成较小的横截面。

### 2.3.4 重测序与转录分析初步揭示突变细胞形态变化的原因

通过超离心力胁迫适应性进化获得的进化菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 在表型和代谢特性上显示出了遗传稳定性。并且两株菌株多个生理特征（细胞体积、细胞壁组分等）相似且与出发菌株产生极大差异。因此，适应性进化过程中反复、高强度的应力胁迫一定导致了基因组上的可遗传突变和转录调控的变化。分别对 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的基因组进行了全基因组重测序。以期待挖掘出在两株进化菌株中均发生突变的基因或者同类的突变基因以揭示细胞发生变化的根本原因。

在 *T. cutaneum* MP11 鉴定出 1473 个单核苷酸多态性(SNPs)、945 个小缺失点(InDels)

和 124 个拷贝数变异 (CNV)。筛选出重测序结果中的外显子区域的突变和拷贝数变异, 如表 2.1)。编码外囊体 (胞泌复合体) 亚基 Sec 8p 的基因 *Trcu\_04577* 发生突变。在酵母的细胞分离过程中, 通过外囊体将水解酶输送到细胞隔膜<sup>[238]</sup>。之前的研究表明, Sec8p 参与了对粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中繁殖体 shmoos 形态的调控, 在  $\Delta$ sec8 缺失突变体中观察到大量增大的 shmoos<sup>[239]</sup>。因此, *Trcu\_04577* 的突变可能与 *T. cutaneum* MP11 细胞多核、多隔膜结构的形成有关。编码蛋白激酶 C (PKC) 亚基的基因 *Trcu\_04302* 的突变也可能与 *T. cutaneum* MP11 细胞体积的异常膨大有关, PKC 是调控生长增殖的重要蛋白激酶<sup>[240]</sup>。PKC 对应激反应诱导的细胞骨架变化和细胞壁完整性具有调控作用<sup>[241]</sup>。超离心力作为机械应力可能会通过机械力感受器蛋白 Wsc1/2/3 或者雷帕霉素复合体 2 (TORC2), 将刺激信号传递给激酶 PKC 并进一步影响细胞壁完整性和细胞骨架等。编码 MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) 激酶 SSK2 的基因 *Trcu\_03394* 在外显子区域发生突变, SSK2 所处于的 HOG 途径 (高渗透压应答途径) 参与应力胁迫下的细胞应答<sup>[242]</sup>。因此编码 PKC 和 SSK2 的基因突变可能是细胞应力下发生形态变化的原因。编码细胞壁代谢途径的相关基因如编码几丁质合成酶的基因 *Trcu\_00765* 和编码内切葡聚糖酶的基因 *Trcu\_01919* 均发生突变, 这可能是 *T. cutaneum* MP11 细胞壁内层显著变薄的重要原因。除了以上所述的突变基因直接调控细胞壁完整性、细胞骨架、细胞周期 (如 PKC 等) 或者有相关论文佐证 (如 Sec8) 与细胞特异形态相关, 还有一些其他突变基因如 *Trcu\_05105* (STYX, 丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸相互作用蛋白基因)、*Trcu\_04230* (ATG13, 自噬相关蛋白 13) 可能会间接影响细胞的表型, 突变基因与表型的关系有进一步挖掘的空间。油脂合成相关基因的突变在下文中单独讨论。

表 2.1 *T. cutaneum* MP11 中检测到的发生在外显子的突变和拷贝数变异

Table 2.1 Mutations located in the exon region and copy number variations detected in *T. cutaneum* MP11. Mutant genes might associated with adaptively evolved phenotypes were shown in bold. The same mutant genes in *T. cutaneum* YY52 are shown in italics.

Gene ID	Type	Start position	End position	Annotation
<i>Trcu_00312</i>	SNP	1877264	1877264	peroxisomal membrane protein
<i>Trcu_04118</i>	SNP	3794103	3794103	DNA-directed RNA polymerases I
<i>Trcu_03613</i>	SNP	1256695	1256695	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease
<i>Trcu_03114</i>	SNP	4793342	4793342	translation initiation factor 2 subunit 3, EIF2S3
<b>Trcu_03394</b>	SNP	<b>71863</b>	<b>71863</b>	<b>SSK2; mitogen-activated protein kinase kinase kinase</b>
<b>Trcu_04302</b>	SNP	<b>4831405</b>	<b>4831405</b>	<b>protein kinase C subunit, PKC<math>\epsilon</math></b>
<i>Trcu_04737</i>	SNP	288134	288134	aspartate-semialdehyde dehydrogenase
<i>Trcu_05105</i>	SNP	2008832	2008832	serine/threonine/tyrosine-interacting protein, STYX
<i>Trcu_00992</i>	SNP	5583067	5583067	drebrin-like protein, DBNL
<b>Trcu_04577</b>	InDel	<b>826232</b>	<b>826232</b>	<b>exocyst complex component, Sec8p</b>
<b>Trcu_03394</b>	InDel	<b>71860</b>	<b>71860</b>	<b>SSK2; mitogen-activated protein kinase kinase kinase</b>

续表 2.1 *T. cutaneum* MP11 中检测到的发生在外显子的突变和拷贝数变异

Trcu_00173	CNV	1056403	1059249	nucleoporin GLE1
Trcu_00320	CNV	1858079	1860137	inosine triphosphate pyrophosphatase, ITPA
Trcu_00476	CNV	2685702	2688074	L-iditol 2-dehydrogenase
<i>Trcu_02439</i>	<i>CNV</i>	<i>1245863</i>	<i>1248412</i>	<i>tRNA-splicing endonuclease subunit Sen2</i>
Trcu_03265	CNV	5653197	5656094	hypothetical protein
<b>Trcu_03701</b>	CNV	<b>1649763</b>	1652014	<b>long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL, fadD</b>
Trcu_03742	CNV	1877387	1879703	hypothetical protein
<b>Trcu_00765</b>	<b>CNV</b>	<b>4338421</b>	<b>4340310</b>	<b>chitin synthase, CHS1</b>
<b><i>Trcu_01919</i></b>	<b><i>CNV</i></b>	<b><i>455728</i></b>	<b><i>456726</i></b>	<b><i>endoglucanase</i></b>
Trcu_04211	CNV	4336476	4337576	hypothetical protein
Trcu_04217	CNV	4352412	4353239	ESCRT-II complex subunit VPS22
Trcu_04208	CNV	4386413	4387486	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase, ribH
Trcu_04215	CNV	4383929	4385460	ketol-acid reductoisomerase
Trcu_04227	CNV	4400582	4403520	hypothetical protein
Trcu_04232	CNV	4391406	4396676	small nucleolar RNA-associated protein 10, UTP10
<i>Trcu_00623</i>	<i>CNV</i>	<i>3471942</i>	<i>3474234</i>	<i>hypothetical protein</i>
Trcu_04236	CNV	4398008	4399403	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2
Trcu_04237	CNV	4396721	4397098	U3 small nucleolar RNA-associated protein 10
Trcu_04221	CNV	4416103	4417358	alcohol dehydrogenase, adhP
Trcu_04229	CNV	4419446	4420841	ribonuclease P
Trcu_04234	CNV	4412278	4413769	myosin V, MYO5
Trcu_04238	CNV	4409028	4409481	histone H4
Trcu_04228	CNV	4427950	4429919	hexaprenyl-diphosphate synthase, hexPS
Trcu_04233	CNV	4424485	4427042	protein KRI1
Trcu_04235	CNV	4430598	4432109	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
Trcu_04218	CNV	4372739	4374990	proton-dependent oligopeptide transporter, POT
Trcu_04220	CNV	4340750	4343151	hypothetical protein
Trcu_04226	CNV	4389319	4391151	WD repeat-containing protein 45, WDR45
Trcu_04223	CNV	4469370	4471726	hypothetical protein
Trcu_04222	CNV	4475938	4479618	insulysin
Trcu_04230	CNV	4485325	4487155	autophagy-related protein 13, ATG13
Trcu_04231	CNV	4483173	4484108	hypothetical protein
Trcu_04242	CNV	4489791	4491555	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2
Trcu_04249	CNV	4493921	4495107	myo-inositol 2-dehydrogenase, iolG
Trcu_04239	CNV	4526070	4527750	ribosome assembly protein RRB1
Trcu_04250	CNV	4524893	4525667	small subunit ribosomal protein S7
Trcu_04251	CNV	4528285	4530235	lipase ATG15

续表 2.1 *T. cutaneum* MP11 中检测到的发生在外显子的突变和拷贝数变异

Trcu_04246	CNV	4503932	4507735	WD repeat-containing protein 24
Trcu_04253	CNV	4519959	4522680	hypothetical protein
Trcu_04248	CNV	4579835	4581010	peptidyl-prolyl isomerase E (cyclophilin E)
Trcu_05534	CNV	4377836	4379419	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, HMGCL
Trcu_02188	CNV	1691793	1694612	SH3 domain-containing YSC84-like protein 1
Trcu_01315	CNV	308006	309631	alcohol dehydrogenase (NADP+), ADH

*T. cutaneum* YY52 与出发菌株相比共鉴定出 1443 个单核苷酸突变 (SNPs), 938 个小的插入缺失突变 (InDels) 和 131 个拷贝数变异 (CNV)。在 *T. cutaneum* YY52 的外显子区域的 SNPs、InDels 和 CNV 共有 34 个。筛选与细胞表征变化和油脂代谢相关的突变 (表 2.2), 发现编码 Myt1 激酶蛋白的基因 *Trcu\_01149* 发生位于外显子区域的突变, Myt1 是 wee 激酶家族成员之一, 在真核体细胞中负向调控细胞的有丝分裂, 在调控细胞周期、丝氨酸/苏氨酸激酶活性、DNA 损伤修复、细胞信号转导过程中发挥重要作用<sup>[243]</sup>。编码线粒体分布与形态蛋白(MDM10)的基因 *Trcu\_02414* 发生外显子区域的突变。MDM10 是一种在细胞中起重要作用的蛋白质, 主要负责维持线粒体的形态和分布。它在细胞内的线粒体功能、能量代谢以及细胞生长和分裂等过程中发挥关键作用<sup>[244]</sup>。编码 Myt1 和 MDM10 的基因突变可能是 *T. cutaneum* YY52 细胞形态变化的原因。

在 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 均检测到编码内切葡聚糖酶的基因 *Trcu\_01919*、编码 tRNA 剪接内切酶 2 (Sen2) 的基因 *Trcu\_02439* 和编码假定蛋白的基因 *Trcu\_00623* 在外显子区域发生突变。*Trcu\_01919* 直接参与细胞壁代谢影响细胞壁中葡聚糖组的含量, 因此该突变与细胞壁直接相关。*Trcu\_02439* 所编码的 Sen2 负责介导前体-tRNA(pre-tRNA) 中内含子的去除<sup>[245]</sup>, 该基因的突变可能通过影响蛋白质的合成影响整个代谢过程。因此较难判断 Sen2 基因的突变和突变细胞具体表型的关系, 有待进一步的实验验证。

表 2.2 *T. cutaneum* YY52 中检测到的发生在外显子的突变和拷贝数变异

Table 2.2 Mutations located in the exon region and copy number variations detected in *T. cutaneum* YY52. Mutant genes might associated with adaptively evolved phenotypes were shown in bold. The same mutant genes in *T. cutaneum* YY52 are shown in italics.

Gene ID	Type	Start position	End position	Annotation
Trcu_00270	SNP	1683582	1683582	intracellular protein transport protein USO1
Trcu_00716	SNP	4032594	4032594	cytochrome c peroxidase
Trcu_05327	SNP	3356332	3356332	Hybrid signal transduction histidine kinase K., DHKK
Trcu_00992	SNP	5583067	5583067	drebrin-like protein
Trcu_04339	SNP	5006291	5006291	ATP-binding cassette, sub-family E, member 1
<b>Trcu_01149</b>	<b>SNP</b>	<b>6370388</b>	<b>6370388</b>	<b>membrane-associated tyrosine-and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase , Myt1, PKMYT</b>

续表 2.2 *T. cutaneum* YY52 中检测到的发生在外显子的突变和拷贝数变异

Trcu_01397	SNP	725244	725244	23S rRNA (uridine2552-2'-O)-methyltransferase
<b>Trcu_04595</b>	<b>SNP</b>	<b>911723</b>	<b>911723</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase</b>
Trcu_00716	SNP	403259	403259	cytochrome c peroxidase
<b>Trcu_02579</b>	<b>InDel</b>	<b>1966583</b>	<b>1966583</b>	<b>triacylglycerol lipase</b>
Trcu_02090	InDel	1315574	1315574	26S proteasome regulatory subunit N11
Trcu_00449	InDel	167626	167626	partner of Y14 and mago
<b>Trcu_01919</b>	<b>InDel</b>	<b>455267</b>	<b>455267</b>	<b>Endoglucanase</b>
<b>Trcu_02066</b>	<b>InDel</b>	<b>1203562</b>	<b>1203562</b>	<b>Citrate synthase</b>
Trcu_00269	CNV	1669634	1671530	hypothetical protein
Trcu_00431	CNV	2440441	2442640	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3
Trcu_00590	CNV	3232147	3234469	AP-1-like transcription factor
<i>Trcu_00623</i>	<i>CNV</i>	<i>3471599</i>	<i>3474234</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>Trcu_02439</i>	<i>CNV</i>	<i>1245863</i>	<i>1248412</i>	<i>tRNA-splicing endonuclease subunit Sen2</i>
Trcu_03265	CNV	5653197	5656094	hypothetical protein
Trcu_04033	CNV	3476247	3478992	LAS seventeen-binding protein 5
Trcu_04810	CNV	487923	496290	hypothetical protein
Trcu_05089	CNV	1913945	1916096	hypothetical protein
Trcu_02079	CNV	1214355	1217114	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
Trcu_02115	CNV	1394999	1396490	5-hydroxyisourate hydrolase
Trcu_02176	CNV	1625884	1627008	hypothetical protein
Trcu_01318	CNV	433733	434881	inositol-polyphosphate multikinase
Trcu_01621	CNV	361065	361655	ecotropic viral integration site 5 protein
Trcu_01665	CNV	17741	21716	ATP synthase subunit 9
Trcu_00978	CNV	5510181	5513119	yeast amino acid transporter
Trcu_03163	CNV	5148000	5150614	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2
Trcu_04792	CNV	470573	472145	U2 small nuclear ribonucleoprotein B
<b>Trcu_02414</b>	<b>CNV</b>	<b>1170096</b>	<b>1173853</b>	<b>mitochondrial distribution and morphology protein 10</b>
Trcu_04652	CNV	1172137	1174214	DNA-3-methyladenine glycosylase II

以上结果仅筛选和分析了位于外显子区域的突变，基因组 90% 的单核苷酸突变均发生在非编码区<sup>[246]</sup>，因此需要对非编码区的突变位点进行整理分析。多组学的联合的分析有助于进一步阐释细胞现象。*T. cutaneum* YY52 是双重胁迫因素（超离心力附加纤维素酶）下获得的突变菌株，进一步强化了细胞体积扩张、细胞壁减薄、油脂合成提升的机制。进一步通过差异转录组学和基因组学联合探究 *T. cutaneum* YY52 细胞发生巨大变化的原因。使用  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ ，显著性  $P\text{-value} < 0.05$  为阈值，*T. cutaneum* YY52 和出发菌株的差异表达基因（DEGs）有 1716 个。其中上调基因 935 个，下调基因 781 个(图 2.7a)。KEGG 富集后分析显示超过 60% 的差异表达基因参与了代谢过程(图 2.7b)。

进一步对差异表达的基因进行 GO (Gene ontology) 富集分析, 分别归入生物学过程 (Biological Process)、细胞组分 (Cellular Component) 和分子功能 (Molecular Function) 3 类。富集 p-value 值最小的前 50 个条目全部集中在 BP 和 CC, 差异基因的产物主要涉及生物过程, 如代谢、信号转导以及在细胞中产生位置变化等 (图 2.8)。

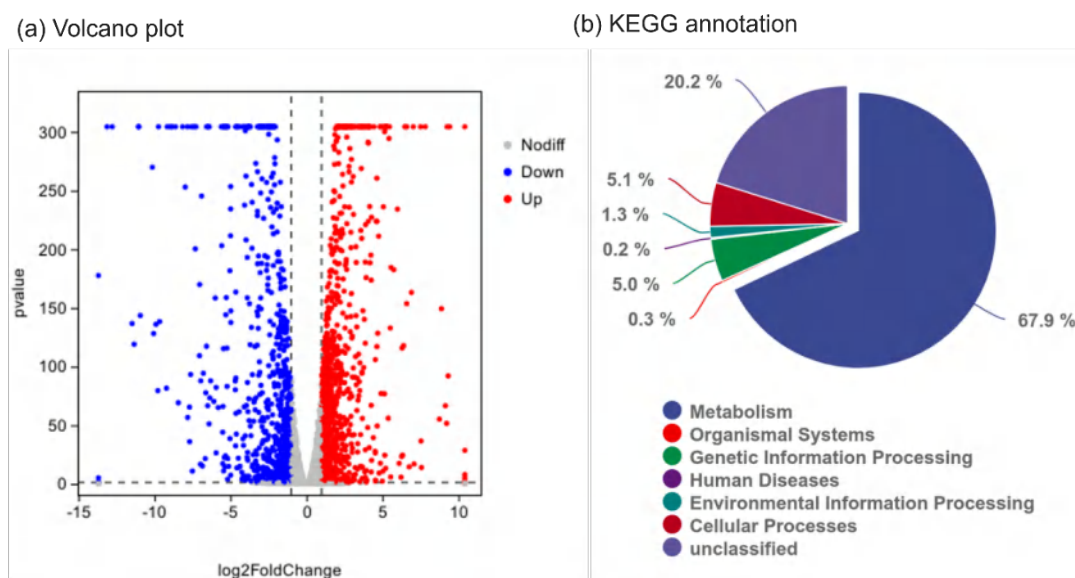


图 2.7 *T. cutaneum* YY52 和出发菌株的转录组分析

Fig. 2.7 Comparative transcriptome analysis of *T. cutaneum* YY52 compared with parental: (a) Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) of *T. cutaneum* YY52. The data for all detected transcripts were plotted as log<sub>2</sub>(Fold Change) versus the p-value; (b) KEGG annotation of proteins encoded by DEGs in *T. cutaneum* YY52 compared with the parental

实验条件: 菌株在 30°C, 180 rpm 的条件下培养 24 h 后收集菌体, 洗涤后液氮速冻用于转录组分析。

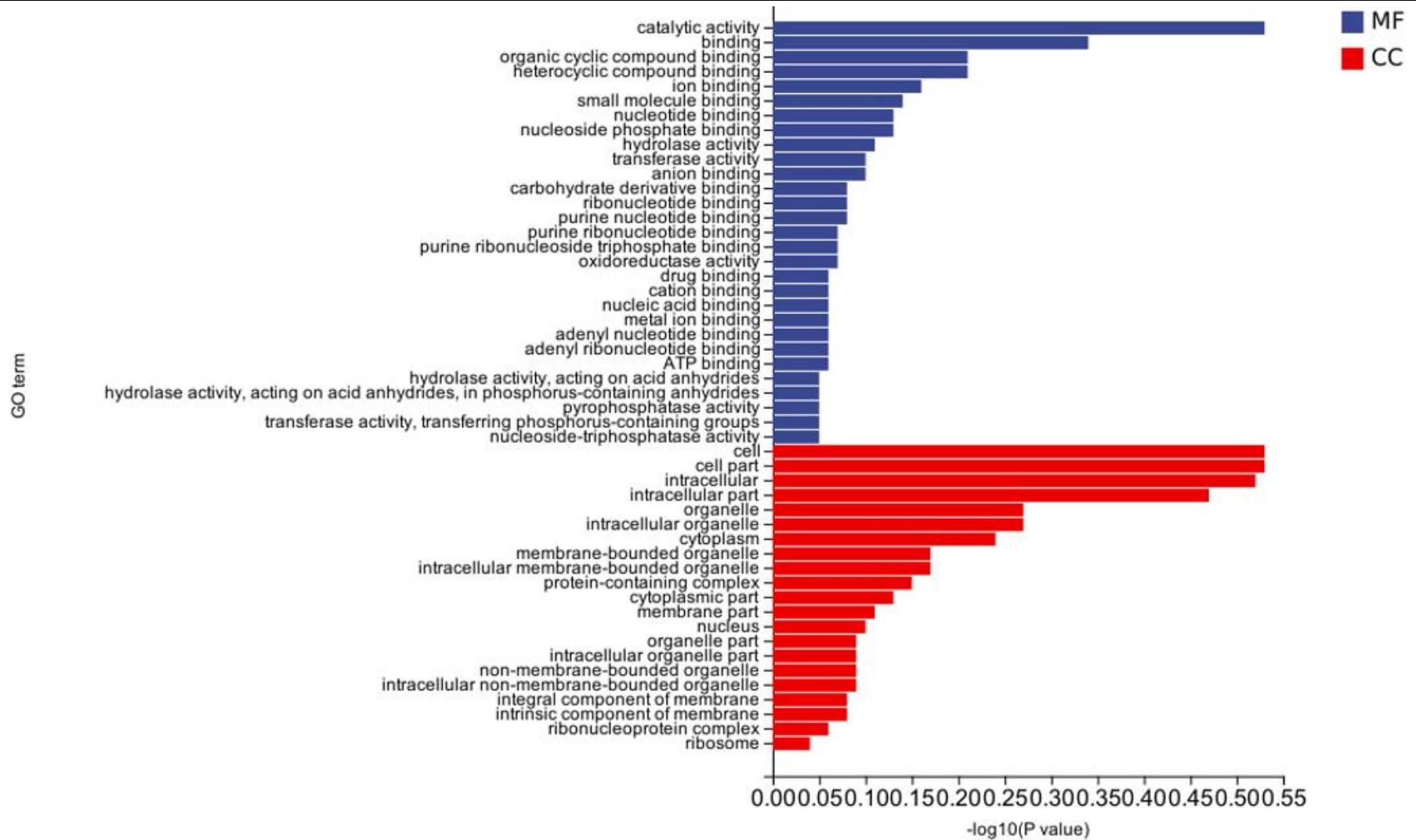


图 2.8 *T.cutaneum* YY52 差异表达基因的 GO 富集

Fig. 2.8 Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) for *T. cutaneum* YY52. The top 50 GO term with minimum P-value of higher enrichment degree were presented.

将 *T. cutaneum* YY52 中全部的突变位点（1443 个 SNPs、938 个 InDels 和 131 个 CNV）与 DEGs 进行比对，筛选出 17 个发生 SNP 突变的 DEGs、22 个发生 InDel 突变的 DEGs、5 个发生 CNV 变异的 DEGs（表 2.3）。在以上结果中依旧重点关注与细胞结构、生长以及脂质生物合成相关的基因。编码内切葡聚糖酶基因 *Trcu\_01919* 在 *T. cutaneum* YY52 和 MP11 的外显子区域均发生突变（表 2.1 和表 2.2），且它的转录水平显著上调 185.8 倍。其突变和转录水平的显著升高很可能会直接导致细胞壁内层厚度降低。编码细胞壁完整性途径中核心激酶 Slt2 基因 *Trcu\_00031* 发生转录下调以及突变。细胞壁完整性途径 CWI 在细胞感知环境压力时通过激活下游转录因子从而调控细胞壁组分保证细胞的完整<sup>[247]</sup>，其突变可能会削弱细胞壁在应力下的代偿机制，从而导致细胞壁更加脆弱。此外，编码 cAMP/PKA 信号转导通路中传导胁迫信号的小 G 蛋白的基因 *Trcu\_02150* 发生突变且转录水平显著上调 19.5 倍。酵母的 cAMP/PKA 信号转导通路负调控包括细胞壁完整性途径在内的胁迫响应<sup>[248]</sup>。基因 *Trcu\_00031* 和 *Trcu\_02150* 的突变和转录水平的变化可能会导致细胞在纤维素酶和超速离心胁迫下激活的细胞壁补偿途径被抑制从而影响细胞壁的结构和细胞形态。与细胞生长发育有关的基因突变可能会引起细胞形态的改变。编码细胞外信号调节信号转导通路中的核心激酶（ERK1/2）的基因 *Trcu\_02872*，在 *T. cutaneum* YY52 中发生突变且它的转录水平显著上调 35.1 倍。ERK1/2 通过各种胞外信号被激活，进入细胞核作用于各种转录因子,和细胞的存活、恶性增殖、形态等密切相关<sup>[249]</sup>，目前 ERK1/2 也是癌症研究的热点基因，其突变和转录水平的变化可能会导致细胞形态和增殖发生巨大改变。

通过两株经过超离心力胁迫进化后形态发生巨大变化的菌株全基因组重测序的对比，以及全基因组重测序联合转录组分析共同揭示了与细胞形态变化有关的重要基因。细胞形态的变化可能与应力作用下维持细胞完整性的细胞壁代谢相关的突变和转录调控相关，例如在两株菌株中均发生突变的编码内切葡聚糖酶基因 *Trcu\_01919*，调控细胞壁完整性途径的基因（*Trcu\_04302*、*Trcu\_00031*、*Trcu\_02150* 等），以及调控细胞生长相关基因（*Trcu\_04577*、*Trcu\_02872* 等）的突变有关。

表 2.3 在 *T. cutaneum* YY52 中同时发生突变和转录水平变化的基因

**Table 2.3** Genes with both mutations and differential transcriptional expression in *T. cutaneum* YY52. Differential transcription genes might associated with adaptively evolved phenotypes were shown in bold.

Gene ID	Symbol	Description	log2FoldChange	P value	Mutation type
Trcu_05327	DHKK	Hybrid signal transduction histidine kinase K	-2.736385253	3.8881E-195	Exonic SNP
<b>Trcu_02872</b>	<b>ERK1/2</b>	<b>mitogen-activated protein kinase 2</b>	<b>5.133074628</b>	<b>1.45536E-77</b>	<b>Upstream SNP</b>
Trcu_04421	A1Q1_00413	apoptosis-inducing factor homolog A	6.908341245	6.1477E-164	Upstream SNP
Trcu_04134	ADH3	alcohol dehydrogenase 3	-2.073667088	5.05252E-17	Intergenic SNP
Trcu_01781	NIT4	nitrilase/nitrile hydratase	5.213039318	0	Intergenic SNP
Trcu_01192	FRE3	ferric-chelate reductase	5.021734101	0	Intergenic SNP
Trcu_02480	A1Q1_00137	hypothetical protein	1.982051608	7.4165E-12	Intergenic SNP
Trcu_04763	NUD13	nudix hydrolase 13	-1.096911684	1.52011E-13	Upstream SNP
Trcu_04704	A1Q1_06330	beta-etherase	2.02626489	4.57086E-20	Downstream SNP
Trcu_05367	4CL1	4-coumarate--CoA ligase 1	1.886706068	2.9351E-220	Intergenic SNP
<b>Trcu_04595</b>	<b>ACC</b>	<b>acetyl-CoA carboxylase</b>	<b>3.872247781</b>	<b>9.6445E-190</b>	<b>Exonic SNP</b>
Trcu_05078	PHO84	inorganic phosphate transporter	3.663452434	1.70439E-05	Intergenic SNP
Trcu_00476	LAD	L-arabinitol 4-dehydrogenase	2.048488	1.09325E-15	Intergenic SNP
Trcu_04901	BAT1	amino-acid permease BA	-4.022864811	3.77163E-41	Downstream SNP
Trcu_00151	CNAG_07739	hypothetical protein	3.577607821	9.1748E-217	Intergenic SNP
Trcu_04444	AMDS	acetamidase	-3.177110911	6.73785E-06	Intergenic SNP
Trcu_00716	CCPR	cytochrome c peroxidase	2.957491219	6.55971E-35	Exonic SNP
<b>Trcu_02066</b>	<b>CS</b>	<b>citrate synthase</b>	<b>3.446344116</b>	<b>8.30016E-76</b>	<b>Exonic InDel</b>
Trcu_03104	A1Q2_04877	hypothetical protein	8.746621007	5.62842E-56	Upstream InDel
<b>Trcu_01919</b>	<b>EGL1</b>	<b>endoglucanase 1</b>	<b>7.537977668</b>	<b>2.28619E-37</b>	<b>Exonic InDel</b>
Trcu_02267	A1Q1_05240	hypothetical protein	7.079796477	9.2553E-18	Intergenic InDel
Trcu_02828	GGT2	glutamate-pyruvate transaminase	7.029565472	0	Intronic InDel

续表 2.3 在 *T. cutaneum* YY52 中同时发生突变和转录水平变化的基因

Trcu_02128	DGDA	2,2-dialkylglycine decarboxylase	-1.98331366	7.91192E-38	Intergenic InDel
Trcu_04976	RDR1	RNA-dependent RNA polymerase 1	-1.04448999	1.46598E-43	Intronic InDel
Trcu_00107	A1Q1_05473	Spherulin-4	5.214582569	4.00425E-14	Upstream InDel
Trcu_00849	PPK6	serine/threonine-protein kinase ppk6	-1.133851026	2.09458E-46	Intergenic InDel
Trcu_04218	PTR2	peptide transporter	4.632892919	2.9455E-261	Intergenic InDel
Trcu_03675	YVC1	calcium channel	-4.069797435	1.6363E-224	Intronic InDel
Trcu_05660	AHK2	histidine kinase 2	-1.035383709	1.38376E-55	Downstream InDel
Trcu_04482	SYF2	pre-mRNA-splicing factor	-1.113264617	8.05838E-64	Intronic InDel
Trcu_01162	POX18	oleate-induced peroxisomal protein POX18	-1.413382449	7.31257E-81	Intergenic InDel
Trcu_00962	HADH	2-hydroxyacid dehydrogenase	3.769774659	6.5726E-100	Intergenic InDel
Trcu_01504	A1Q1_05810	hypothetical protein	-1.254644334	2.4468E-148	Upstream InDel
Trcu_03279	IF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	-2.4091375	8.4727E-128	Intronic InDel
Trcu_02176	A1Q1_05173	amino acid transport system protein	3.714018423	8.30016E-76	Upstream InDel
<b>Trcu_05085</b>	<b>DGAT</b>	<b>Phospholipid: diacylglycerol acyltransferas</b>	<b>4.13258073</b>	<b>1.16224E-31</b>	<b>Intergenic InDel</b>
Trcu_02106	GSTB	glutathione S-transferase	-1.488576355	3.2548E-134	Downstream InDel
Trcu_04313	AMDS	acetamidase	-11.4671488	1.9071E-137	Upstream InDel
Trcu_02657	PPA	acid phosphatase	-1.587935585	0.007499918	Intergenic InDel
<b>Trcu_00031</b>	<b>SLT2</b>	<b>MAP kinase</b>	<b>-1.033616555</b>	<b>6.39092E-14</b>	<b>deletion CNV</b>
Trcu_03509	RSB1	long-chain base transporter	-4.014783833	0.000540124	deletion CNV
<b>Trcu_02150</b>	<b>RAS2</b>	<b>RAS small monomeric GTPase</b>	<b>4.288879151</b>	<b>7.31095E-21</b>	<b>deletion CNV</b>
Trcu_02115	CNBF1580	5-hydroxyisourate hydrolase	-1.524659322	8.9965E-143	deletion CNV
Trcu_01318	A1Q1_08237	hypothetical protein	1.062677656	1.54077E-56	deletion CNV
Trcu_00156	BPH1	Beige protein	-1.073383608	5.0037E-60	deletion CNV

以上两株突变菌株突变位点的分析结果以及细胞壁微显微结构的展示（图 2.6）均显示细胞壁的合成与降解在细胞体积和形态变化中起重要作用。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 关于细胞壁代谢相关基因的转录水平结果如图 2.9 所示，两株菌株中编码甘露聚糖合成相关的酶基因 *Trcu\_02121* 的下调以及编码甘露聚糖合成相关的酶基因 *Trcu\_03942* 和 *Trcu\_08522* 的表达上调，可能会导致细胞壁外层的“鞭毛”状的甘露聚糖层变薄。在酵母细胞中支撑细胞壁强度的最主要成分是葡聚糖，在 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 中除了上文分析过的在两株突变菌株均发生突变和转录水平上调的内切编码葡聚糖酶基因 *Trcu\_01919*，编码外切葡聚糖酶的基因 *Trcu\_05082* 也在两株突变菌株中发生 4 倍以上的上调。几丁质代谢中编码几丁质合成酶亚基的 *Trcu\_00765* 基因在 *T. cutaneum* MP11 发生了突变（表 2.1）并发生转录水平下调。在 *T. cutaneum* YY52 中几丁质降解相关酶基因表达不活跃或者发生下调（*Trcu\_00189*、*Trcu\_02203* 和 *Trcu\_04046*）可能是细胞在超离心力和纤维素酶胁迫应力下启动的细胞壁代偿机制，这也与上文中 *T. cutaneum* YY52 细胞壁中几丁质含量略有上升的数据相对应。

*T. cutaneum* MP11 和 YY52 中细胞壁合成以及降解酶基因的突变和转录变化以及信号通路中调控细胞壁完成途径的重要基因的突变可能导致细胞壁中内层的（葡聚糖/几丁质）和外层（甘露聚糖）均显著变薄，从而可能导致更脆弱的细胞壁结构和更大的细胞体积，这些变化均有利于胞内油脂的积累。

Gene ID	Annotation	Log2 Fold change	
		MP11	YY52
<b>Mannan synthesis</b>			
Trcu_02121	mannan polymerase II complex HOC1 subunit	-2.4	-0.5
Trcu_00947	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	0.4	0.5
Trcu_01890	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	1.4	-0.9
Trcu_02036	dolichyl-phosphate-mannose mannosyltransferase	0	0
Trcu_02921	dolichyl-phosphate-mannose mannosyltransferase	0.9	-0.4
Trcu_02955	dolichyl-phosphate-mannose mannosyltransferase	-0.7	0.5
<b>Mannan degradation</b>			
Trcu_04499	phosphomannomutase	1.2	0.1
Trcu_01427	mannosyl-oligosaccharide 1	0.9	0.8
Trcu_00284	Alpha-1,2-mannosidase	0.8	-1.0
Trcu_00569	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase	-0.4	1.8
Trcu_03942	alpha-mannosidase Man2c1	2.3	2.0
Trcu_00855	beta-mannosidase Manb	3.0	2.1
<b>Glucan synthesis</b>			
Trcu_04136	1,3-beta-glucan synthase	0.6	-1.0
Trcu_00077	1,4-alpha-glucan branching enzyme	0.6	1.2
Trcu_03380	1,4-alpha-glucan branching enzyme	-0.2	1.4
<b>Glucan degradation</b>			
Trcu_05665	Beta-1,3-1,4-glucanase	-0.3	-0.6
Trcu_05082	Exo-beta-1,3-glucanase	2.8	2.0
Trcu_02840	endo-1,3(4)-beta-glucanase	-0.8	2.1
Trcu_00501	endo-1,3(4)-beta-glucanase	-0.6	-1.0
Trcu_03502	Endoglucanase C	3.2	-1.4
Trcu_01919	Endoglucanase 1	3.7	7.5
Trcu_02186	Endoglucanase 1	-0.4	0.3
Trcu_03961	beta-glucosidase	0.7	1.4
Trcu_02890	Beta-glucosidase	1.9	3.3
Trcu_02915	Beta-glucosidase	1.1	4.7
Trcu_03972	Glucosidase	1.7	4.0
<b>Chitin synthesis</b>			
Trcu_01104	chitin synthase 1	1.0	1.4
Trcu_02202	chitin synthase 1	-1.5	0.2
Trcu_02791	chitin synthase 1	2.4	2.4
Trcu_04533	chitin synthase 1	-0.2	-0.5
Trcu_05206	chitin synthase 1	0.3	0.5
Trcu_00765	chitin synthase 6	-0.9	0.6
<b>Chitin degradation</b>			
Trcu_00189	chitinase 1	-0.8	-0.3
Trcu_02203	chitinase 2	0.8	-2.8
Trcu_04046	chitinase 3	-0.2	0

图 2.9 *T. cutaneum* MP11 和 Y52 与出发菌株相比在细胞壁代谢中关键基因的表达差异

Fig. 2.9 Transcriptional levels of differentially expressed genes (DEGs) involved in cell wall metabolism. The transcriptional levels of DEGs in Log2 Fold change were represented by color gradations  
 实验条件：样品在 30°C，180 rpm 的条件下培养 24 h 后收集菌体，洗涤后液氮速冻用于转录组或者 RT-qPCR 分析。*T. cutaneum* MP11 数据来自于 RT-qPCR 实验，*T. cutaneum* YY52 数据来源于差异转录组分析。

在 *T. cutaneum* MP11 和 Y52 中检测到多个关于油脂合成重要基因的突变。在 *T. cutaneum* MP11 中编码长链酰基-CoA 合成酶 (ACSL) 的基因 *Trcu\_03701* (表 2.1) 以及 *T. cutaneum* YY52 中编码柠檬酸合酶 (CS) 基因 *Trcu\_02066*、编码乙酰辅酶 A 羧化酶基

因 *Trcu\_04595* 和编码二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT) 的基因 *Trcu\_05085* 发生突变以及转录水平的上调。根据差异转录组和 RT-qPCR 数据绘制了 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的中心碳代谢和脂质生物合成途径中基因差异表达的代谢网络图 (图 2.10)。胞内脂质的积累高度依赖于细胞内乙酰辅酶 A 通量、NADPH 供应、以及游离脂肪酸和甘油三酯的合成能力。相比于原始菌株, *T. cutaneum* MP11 和 YY52 中葡萄糖和木糖利用相关基因以及糖酵解途径相关基因的表达水平均出现上调, 这表明两株菌株的糖代谢能力明显提高。葡萄糖分解代谢均整体活跃, 经过糖酵解途径生成的丙酮酸进入三羧酸循环 (TCA), 生成油脂合成的重要前体乙酰辅酶 A。丙酮酸脱氢酶复合物基因 (PDHA 和 PDHB) 均显著上调, 这可能有利于脂质前体乙酰 CoA 的合成。TCA 循环中的顺乌头酸酶 (ACO) 转录水平下调以及柠檬酸合酶 (CS) 和柠檬酸盐裂解酶 (ACL) 转录水平上调, 说明 TCA 途径在异柠檬酸点上被打断, 柠檬酸积累并从线粒体被排出裂解为大量乙酰辅酶 A。通过实验进一步测定出 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的胞内乙酰-CoA 的含量比亲本高 2.2-19.4 倍 (图 2.11a), 值得注意的是, NADPH 再生相关的基因中, 苹果酸酶 (ME) 和异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 基因均在两株突变株中表达上调。异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 基因的表达上调可能导致还原力 NADPH 供应增加, 这一现象似乎与之前研究中的结论一较弱的 IDH 活性有利于脂质合成相矛盾<sup>[60]</sup>, 这说明还原力对脂肪酸合成过程的重要性。通过实验进一步证实, *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的 NADPH 含量比亲本高 7.7-15.9 倍 (图 2.11b)。两株突变菌株中, 脂肪酸合成途径的所有基因均上调显著, 甘油三酯合成途径的 3 个重要酶基因 (GPAT、LPAT 和 DGAT), 在 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 中表达均显著上调。

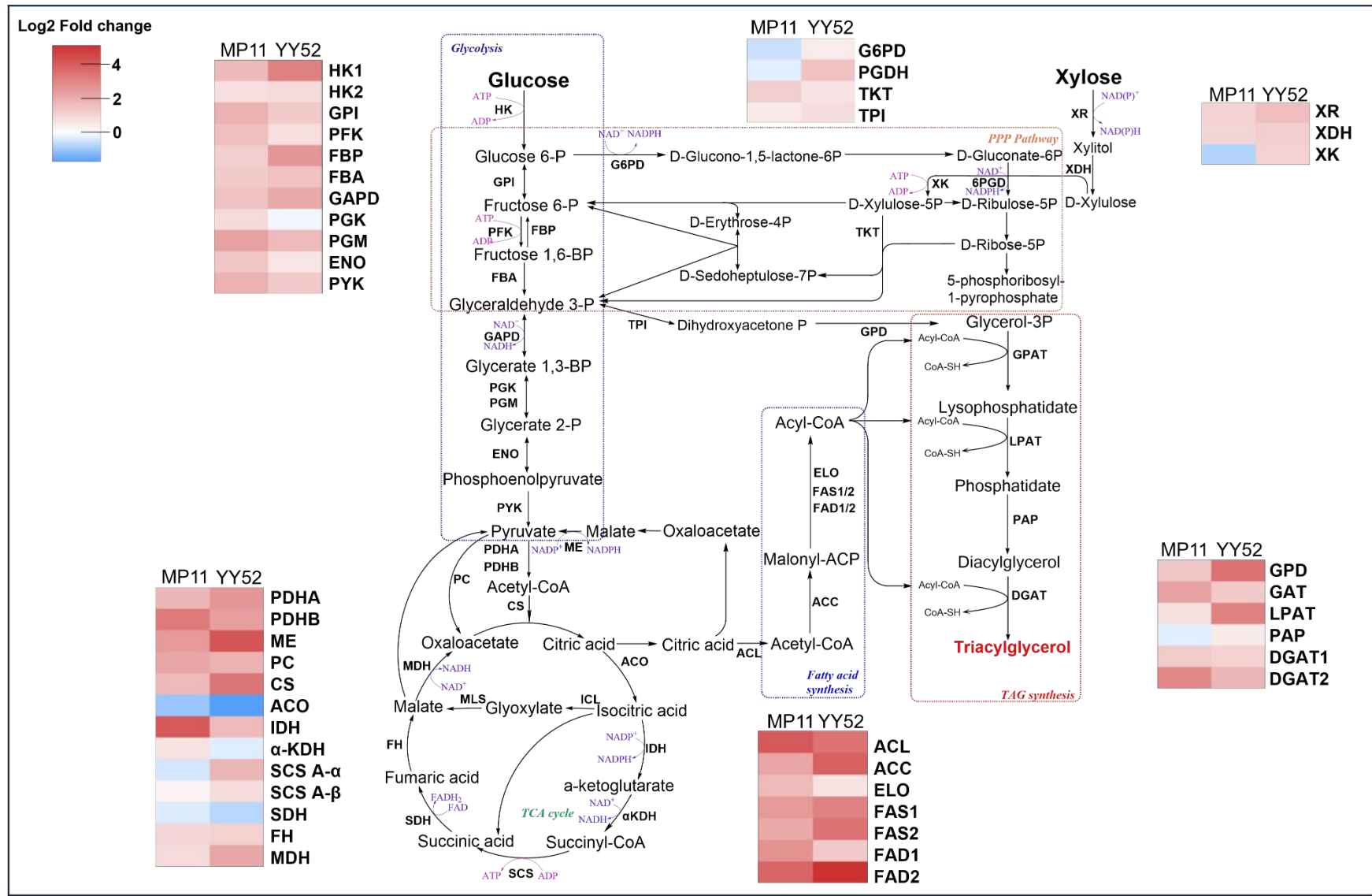


图 2.10 突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 在脂质合成中关键基因的表达差异

Fig. 2.10 Transcriptional analysis of mutant *T. cutaneum* MP11 and YY52 compared with the parental involved in lipid metabolism

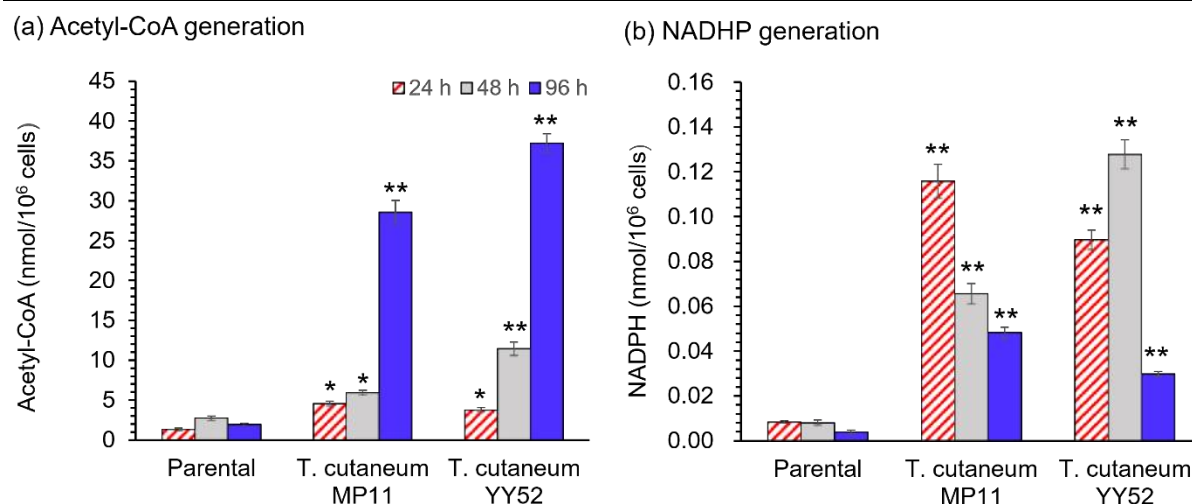


图 2.11 油脂合成相关的胞内乙酰-CoA 和 NADPH 含量

Fig. 2.11 Experimentally measured intracellular metabolites related to lipid synthesis: (a) Experimentally measured intracellular Acetyl-CoA; (b) Experimentally measured intracellular NADPH

实验条件：培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 72 h，分别在 24 h、48 h、72 h 取样检测。

转录组和全基因组重测组的结果在基因层面上进一步揭示了 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞形态变化以及脂质合成能力提高的原因。调控细胞壁完整性途径的重要基因的突变以及转录水平的变化以及葡聚糖、甘露聚糖降解基因的显著上调导致了细胞壁对应组分含量的显著降低（图 2.5），降低了细胞壁强度（图 2.6），为胞内空间的扩展创造了条件。脂质合成前体乙酰 CoA 合成相关基因的突变和表达上调、NADPH 供给相关基因以及甘油三酯合成相关基因的显著上调促进了胞内油脂的积累。这些关键基因为代谢工程改造高产产油酵母提供了潜在的靶点。

### 2.3.5 突变菌株纤维素油脂发酵性能的评价

*T. cutaneum* MP11 和 YY52 脆弱的细胞壁和巨大的胞内空间有利于胞内油脂的积累。两株菌株以玉米秸秆为原料，通过同步糖化共发酵的方法（SSCF）生产纤维素油脂（图 2.12）。*T. cutaneum* MP11 经过 96 h 发酵，纤维素油脂的产量达到了  $40.3 \pm 1.3$  g/L，油脂体积分数达到 4.5% (v/v)，是出发菌株的 3.9 倍（图 2.12a）。

经过 120 h 发酵，*T. cutaneum* YY52 纤维素油脂的产量达到了  $58.4 \pm 0.1$  g/L，油脂体积分数达到 6.5% (v/v)，是出发菌株的 5.7 倍（图 2.12b）。微生物油脂的得率为 0.20 g/g 玉米秸秆（干重），相当于每使用 5.4 吨玉米秸秆即可生产 1 吨微生物油脂。该突变菌株的纤维素油脂发酵指标实现了木质纤维素生物质批次发酵生产微生物油脂的最高指标。发酵结束时 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 消耗完所有的葡萄糖和木糖，但是出发菌株还剩余 65.3 g/L 葡萄糖和 58.3 g/L 木糖。两株突变菌株实现了葡萄糖和木糖的快速、协同代谢。

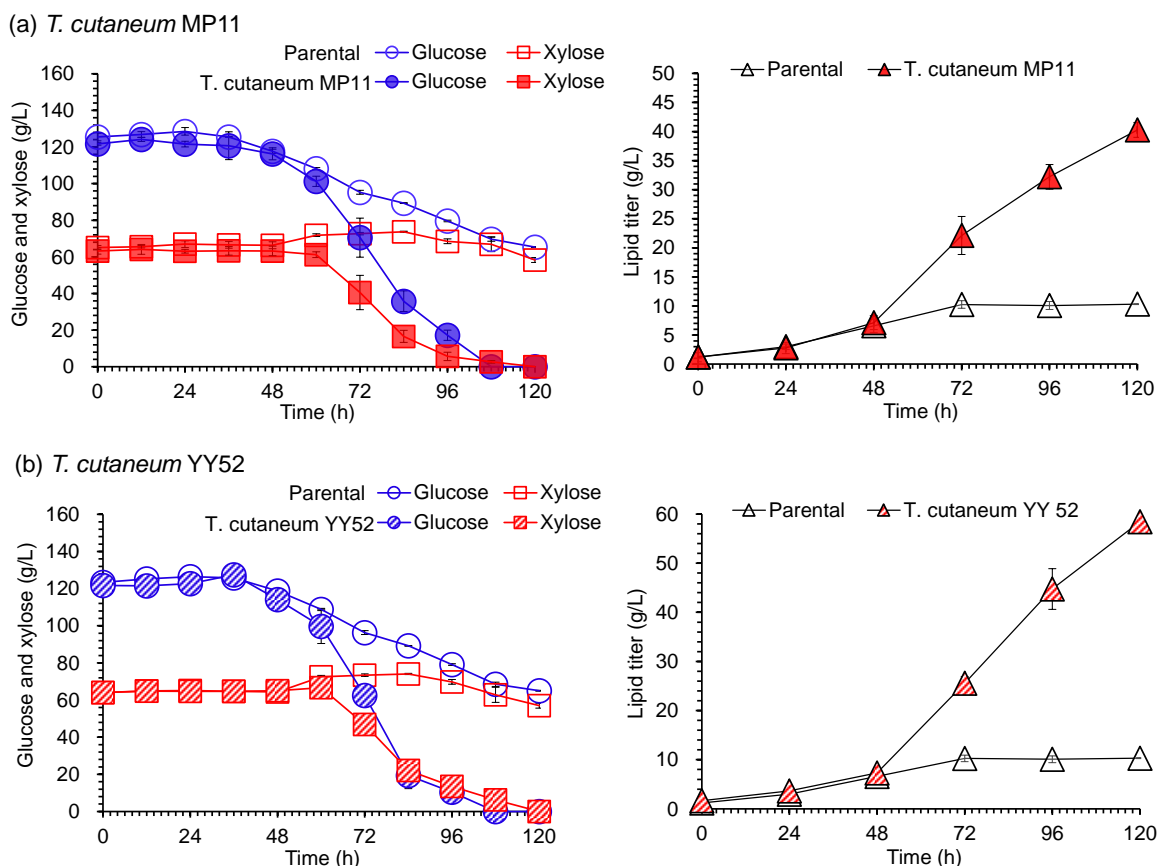


图 2.12 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 利用玉米秸秆同步糖化共发酵生产微生物油脂

Fig. 2.12 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of corn stover by *T. cutaneum* MP11 (a) and YY52 (b)

实验条件：预处理和生物脱毒后的麦秆原料预水解 12 h（30%（w/w）固体含量）。以 10%（v/v）接种量接种，同步糖化共发酵在 30°C, 600 rpm 的条件下进行 120 h。

## 2.4 本章小节

本实验室前期建立的超离心力胁迫适应性进化，能够进行高效的油脂细胞突变。对两株突变菌株进行了无压力下的遗传稳定性检测。对细胞形态、细胞壁等表征显示两株菌株实现了惊人的细胞体积膨胀近两个数量级、木质纤维素水解液中油脂积累能力显著提高、细胞壁显著变薄且细胞壁中葡聚糖和甘露聚糖显著降低。全基因组重测序和转录分析揭示细胞形态发生变化的关键因素。最终评价了突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 以木质纤维素为原料生产纤维素油脂的发酵性能。本章主要的研究结论如下：

(1) 对超离心力胁迫进化获得的突变酵母菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 进行无压力条件下的连续培养，应力解除后细胞形态和油脂含量均维持稳定，两株菌株具有遗传稳定性。

(2) 对进化获得的 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 突变细胞进行细胞生长、细胞形态、细胞壁显微结构的表征，两个菌株具有非常相似的特征。长期、反复作用的超离心力使细胞积累更高的生物量和胞内油脂，细胞体积均增大将近两个数量级，细胞呈现多

核样细胞单元，细胞壁显著变薄且细胞壁中葡聚糖和甘露聚糖组分显著降低。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 细胞壁中的葡聚糖、甘露聚糖含量分别下降了 61.2%、40.2%和 91.7%、56.9%。。

(3) 两株突变菌株的全基因组重测序和转录分析揭示了影响细胞壁代谢的相关基因的突变和转录调控的变化，尤其是葡聚糖降解酶基因的突变和显著上调是细胞壁和细胞体积变化的关键因素。脂质合成中乙酰辅酶 A 合成、NADPH 再生以及甘油三酯合成关键酶基因的突变和转录水平的上调则是促进油脂合成大幅提升的重要原因。基因突变和转录调控的结果再次证明超离心力作为强大胁迫触发基因突变并获得稳定表型变化的作用。

(4) 突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 能够快速、协同代谢木质纤维素来源的葡萄糖和木糖生产高指标的纤维素油脂。*T. cutaneum* MP11 和 YY52 批次纤维素油脂发酵的产量分别达到  $40.3 \pm 1.3$  g/L 和  $58.4 \pm 0.1$  g/L，是目前使用木质纤维素生物质为原料批次发酵生产微生物油脂的最高指标。

## 第3章 产油酵母传递超离心力胁迫刺激的信号转导通路的探究

### 3.1 引言

野生型产油酵母胞内空间小、脂质合成能力较弱。常规的化学/物理诱变、适应性进化、密度梯度离心筛选以及常规的代谢工程改造等对提高产油酵母胞内油脂积累的效果有限<sup>[68, 77, 110, 250]</sup>。前期研究中,通过对野生型皮状丝孢酵母进行长周期超离心力胁迫适应性进化,最终获得的突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的细胞体积扩张至出发菌株的近两个数量级,脂质合成速率显著提高<sup>[212, 213]</sup>。进化过程中细胞反复处于超离心力场中,超速离心产生的巨大的物理应力胁迫,导致基因组的不稳定并诱发可遗传的突变。同时存在于细胞表面的感受器蛋白能感知刺激并将物理信号转变为生化信号,进一步影响生长和代谢<sup>[251]</sup>。产油酵母细胞响应超离心力胁迫内在的信号通路及其代谢调控机制值得进一步探究。

单细胞真菌—酵母也进化出了复杂的保守信号通路去感知内在和外在的机械应力,并在相关通路调控下协调适当的细胞响应,如细胞生长、分裂和代谢调控等<sup>[251]</sup>。目前对于酵母细胞机械力信号转导的研究仅局限于出芽酵母模式菌株,如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等模式菌株<sup>[113]</sup>,其代谢相对简单且遗传背景相对清晰。在非模式产油酵母细胞中对机械力信号转导通路作用的验证暂无研究报道。挖掘机械力信号转导通路在产油酵母代谢调控等方面的应用,能够为产油酵母育种开辟新的研究方向。

本研究首先通过对皮状丝孢酵母施加不同强度的超离心力探究其表型变化。其次,尝试将超离心力胁迫适应性进化的方法从皮状丝孢酵母扩展至两种典型的产油酵母—圆红冬胞酵母和解脂耶氏酵母中,从而验证超离心力胁迫促进细胞形态扩张和油脂积累的现象是产油酵母的普遍性特征。在确认超离心力是导致细胞形态扩张和油脂积累的关键因素后,首先通过转录组学分析和蛋白质互作网络分析提出了一条可能的产油酵母细胞响应超离心力胁迫的信号转导通路;最后,通过 Western blot、TORC2 感受器小分子抑制剂添加等实验,验证了该信号通路是产油酵母细胞的形态变化和油脂合成的关键信号转导通路,从而为以后人工激活相关信号通路提供了重要的理论基础和基因元件。

### 3.2 材料方法

#### 3.2.1 菌株与培养基

*T. cutaneum* ACCC 20271 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心。其全基因组已上传 DDBJ/EMBL/GenBank, 编号为 LTAL00000000<sup>[45]</sup>。

*Rhodospiridium toruloides* CGMCC 2.1389 由大连理工大学赵宗保教授课题组惠赠。

*Yarrowia lipolytica* DSM 3286 由华东理工大学花强教授课题组惠赠。

以上酵母菌株活化所用的 YPD 培养基和超离心力进化培养基(合成培养基)见 2.2.1

### 3.2.2 酶和试剂

棕榈酰肉碱 (PalmC) 购自麦克林 (上海) 生化科技有限公司。Hoechst 33258 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。皮状丝孢酵母 Ypk1 的兔源多克隆抗体由金斯瑞 (南京) 生物科技有限公司定制。内参蛋白小鼠 Actin 多克隆抗体 (Beta Actin Monoclonal Antibody, 货号: 60008-1-Ig)、辣根过氧化物标记的山羊抗小鼠二抗 (HRP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 货号: SA00001-1) 和辣根过氧化物标记的山羊抗兔二抗 (HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit, 货号: SA00001-2) 均购自 Proteintech (美国, 芝加哥) 的国内代理拓然 (上海) 生物科技有限公司。商用的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物 (50x) 购自碧云天 (上海) 生物技术有限公司。

Western blot 配制蛋白胶所用试剂如 PMSF 等以及转膜阶段所用的商业化试剂如 SDS running buffer、转膜缓冲液、超敏 ECL 发光液等均购自生工生物工程 (上海) 有限公司。

葡萄糖等培养基所需试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 3.2.3 不同产油酵母菌株的超离心力胁迫适应性

皮状丝孢酵母不同强度的离心力胁迫适应性进化参照本实验室前期建立的方法<sup>[212]</sup>, 接种出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 在合成培养基中培养 5 d 后, 取 20 mL 培养液于灭菌的 50 mL 离心管内, 在高强度离心力场下 (53,000 g, Bechman J-26) 离心胁迫 0.7-30 min; 或者在不同的离心强度下 (1,000 g-53,000 g) 离心 3 min, 离心后取 5 mL 上层细胞悬液用做下一轮传代种子液。

圆红冬孢酵母的超离心力胁迫适应性进化: 第一阶段 (1-9 代), 在合成培养基中培养 6 d 后, 取 20 mL 培养液于灭菌的 50 mL 离心管内, 在离心力场下 (Bechman J-26) 离心胁迫 1-10 min, 离心力从 2,000 g 逐渐提升至离心机最大离心力 53,000 g。离心后从上清中吸取 5 mL 细胞悬液进行转接。第二阶段 (10-25 代) 超离心维持 53,000 g, 离心时间为 10-20 min。超离心力胁迫至 15 代后为了获取密度更低、油脂含量更高的细胞在离心时加入轻介质玉米油, 离心后取上层 5 mL 油层 (含油密度较低的高含油量细胞) 作为种子转入下一代培养基中继续传代。

解脂耶氏酵母的超离心力胁迫适应性进化: 第一阶段 (1-13 代), 在合成培养基中培养 6 d 后, 取 20 mL 培养液于灭菌的 50 mL 离心管内, 在离心力场下 (Bechman J-26) 离心胁迫 3-10 min, 离心力从 2,000 g 开始, 每 1-2 代提高 1,000-2,000 g, 提高至 10,000 g, 离心后从上清中吸取 5 mL 细胞悬液进行转接; 第二阶段 (13-15 代) 超离心力快速提升至 53,000 g, 每次离心刺激 30 min; 第三阶段 (15-25 代) 超离心力维持在 53,000 g, 每次离心刺激 30 min。

### 3.2.4 显微镜的制片和观察

荧光共聚焦显微镜制片和观察见 2.2.5

### 3.2.5 细胞表征检测

细胞体积检测见 2.2.7

油脂含量检测见 2.2.12

细胞壁组分检测见 2.2.6

细胞世代的检测：计算细胞分裂一次所需的平均时间。首先绘制菌株的生长曲线，选择在对数生长期的至少 3 个时间点，在每个时间点取样检测细胞个数，每个时间点至少取 20 个样本计数，带入公式 (3-1)

$$G = 1/R = (t_2 - t_1)/3.322(\lg x_2 - \lg x_1) \quad (3-1)$$

其中， $t_2$ ：后一个时间点； $t_1$ ：前一个时间点； $x_2$ ：后一个时间点的细胞个数； $x_1$ ：前一个时间点细胞个数。

### 3.2.6 敲除盒与质粒的构建

本章所构建的质粒见附录 II 中表 1，构建质粒所用引物见附录 II 中表 2。

皮状丝孢酵母以潮霉素抗性基因 *HPH* 为筛选标记的基因敲除盒的构建。分别通过 PCR 扩增出 *URA3* 基因 ORF 上下游各 2000bp 作为上下游同源臂，并通过 PCR 扩增出 1026 bp 潮霉素抗性基因 *HPH*，将上下游同源臂和 *HPH* 基因进行三片段融合 PCR，将获得的融合 PCR 产物进一步进行大体系的巢式 PCR 以扩增正确融合的敲除盒 DNA 片段。纯化回收 PCR 产物后用于皮状丝孢酵母转化。

皮状丝孢酵母以潮霉素抗性基因 *HPH* 为筛选标记的 CRISPR-Cas9 编辑质粒的构建。出发商业质粒为解脂耶氏酵母的编辑质粒 pCRISPRyl，通过 PCR 扩增出皮状丝孢酵母内源性的 LEUp 启动子（异丙基苹果酸脱氢酶基因 ORF 上游 1053 bp）和潮霉素抗性基因 *HPH*（1026 bp），并进行融合 PCR。通过 PCR 扩增出皮状丝孢酵母内源性 TEFp 启动子（转录延伸因子基因 ORF 上游 988 bp）和 *CYCt* 终止子（细胞色素 C ORF 下游 248 bp）。最后与 pCRISPRyl 质粒的剩余 3 部分进行多片段的无缝克隆（ClonExpress®MultiS One Step Cloning Kit，诺唯赞），将编辑质粒中重要的基因元件更换为皮状丝孢酵母内源性的元件，完成皮状丝孢酵母编辑质粒 pCRISPRtc 的构建。在进行靶点连接时，对 pCRISPRtc 质粒中 SCR1'-tRNAGly 启动子和 gRNA 骨架中间的 *AvrII* 酶切位点进行酶切，线性化后与经过合成的高温后自然退火的靶点进行连接。

皮状丝孢酵母以 *URA3* 基因为筛选标记的 GFP 表达质粒 pUC19-LEUp-GFP<sup>(NSL)</sup>-*URA3*。NSL 序列为：aaaaggccggcggccacgaaaaaggccggcaggcaaaaaagaaaaag。GFP 基因的启动子和终止子选择内源性的 LEUp(1053 bp)和 *CYCt*(248 bp)，筛选标记为内源 *URA3* 基因 ORF 及其上下游各 717 bp 和 522 bp 序列作为启动子和终止子构成完整的 *URA3* 基因表达结构，质粒构建的方式为无缝克隆酶（ClonExpress®MultiS One Step Cloning Kit，诺唯赞）的多片段拼接克隆方式。

以上所有改造和构建质粒在重组步骤完成后均通过化学转化的过程均由 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  构建完成，重组质粒转入 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  后进行阳性克隆的筛选，提取阳性克隆的质粒进行测序确认后才可以进行下一步。

### 3.2.7 皮状丝孢酵母的 NTG 诱变

出发菌株活化后在 20 mL YPD 液体培养基中培养 OD600 至 1.0 左右，离心收集细胞用无菌水或者 PBS 洗 1-2 遍，将菌体接种至含油 10 mL YPD 液体培养基的 50 mL 离心管中，中并按照致死率实验得出的 NTG 添加量加入 NTG 诱变剂，诱变培养在 37°C，200 rpm 条件下培养 30-40 min。离心收集菌体，并用无菌水洗涤 2 次后在 20 mL 液体 YPD 中培养 2-3 h。培养结束后用液体 MM 培养基洗涤菌体 2-3 次并接种至 MM 液体培养基培养 6 h，6 h 后加入终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的制霉菌素培养 2-3 h。结束后收集菌体并用无菌水洗涤 1-2 次，接种至液体 YPD 培养基培养 8-12 h，收集洗涤菌体后在 0.3% (w/v) 5-氟乳清酸的 MM 固体培养基中涂布，待长出单菌落后在固体 MM 和 SM 培养基上进行正负筛选和进一步的复筛和验证。

### 3.2.8 皮状丝孢酵母的转化

活化后的皮状丝孢酵母接种至液体 YPD 培养基中，30°C，180 rpm 条件下培养至 OD600 约为 10，取 300  $\mu\text{L}$  菌液收集、无菌水洗涤后重悬于 100  $\mu\text{L}$  0.3M 的醋酸锂中，并加入终浓度为 10 mM 的 Tris-HCl 和终浓度为 1 mM 的 EDTA (pH=8)。以上悬浮液中加入 5  $\mu\text{L}$  鲑鱼精 DNA (浓度 10 mg/mL)，最后加入 2  $\mu\text{g}$  左右的质粒或者线性化 FNA 片段和 15  $\mu\text{L}$  含油 5% (v/v) 的巯基乙醇和三醋酸甘油酯。以上混合液在室温静置放置 30 min。将 150  $\mu\text{L}$  50% 聚乙二醇 4000 加入至混合物中并继续室温放置 30 min，放置 37°C 恒温水浴锅中保持 15 min。热处理后加入 1 mL 无菌水，离心后取适量菌液涂布于筛选平板上。

### 3.2.9 RT-qPCR

在 30°C 下，培养出发菌株和待测进化菌株。12 h 后收集细胞。参照 2.2.10 的方法进行 RNA 提取和定量、逆转录反应和 RT-qPCR 实验。RT-qPCR 所用引物见附录 I 中表 2。

### 3.2.10 转录组测序

使用 Trizol 试剂 (RNAiso Plus, TAKARA, Otsu, Japan) 提取两株皮状丝孢酵母、圆红冬孢酵母和解脂耶氏酵母进化菌株和对应原始菌株的总 RNA。RNA 测序由擎科 (北京) 生物科技有限公司使用 Illumina HiSeq 2000 系统完成。

### 3.2.11 免疫印迹实验

首先进行 SDS-PAGE，配置 7.5% 分离胶倒入制胶槽并用水封层。分离胶凝固后去除上层水加入浓缩胶并插上梳子，随后将胶转移至电泳槽后加入 1 $\times$  SDS running buffer。加样后，电压 80 V 运行直至条带跑至两层胶交界处，电压调至 100 V，完成电泳。

跑胶结束后切胶并于提前预冷的转膜液中浸泡，使用 PVDF 转膜，转膜条件为 100V，90 min。转膜结束后使用 1 $\times$  TBST 溶液洗膜两次。洗膜结束后使用 5% 脱脂奶粉 (使用 1 $\times$  TBST 溶液溶解)，封闭至少 1 h，1 $\times$  TBST 溶液洗脱三次，每次 5 min。加入 5% BSA (使用 1 $\times$  TBST 溶液溶解) 稀释的一抗，4°C 孵育过夜。一抗体孵育结束，用 1 $\times$  TBST 溶液洗膜三次，每次 5-10 min。加入 5% 脱脂奶粉 (使用 1 $\times$  TBST 溶液溶解) 稀释的二

抗, 室温避光孵育至少 1 h。二抗孵育完毕后  $1\times$ TBST 洗膜三次, 每次 5-10 min。将膜置于 1 mL 超敏发光液中显影, 最后曝光拍摄。

### 3.3 结果与讨论

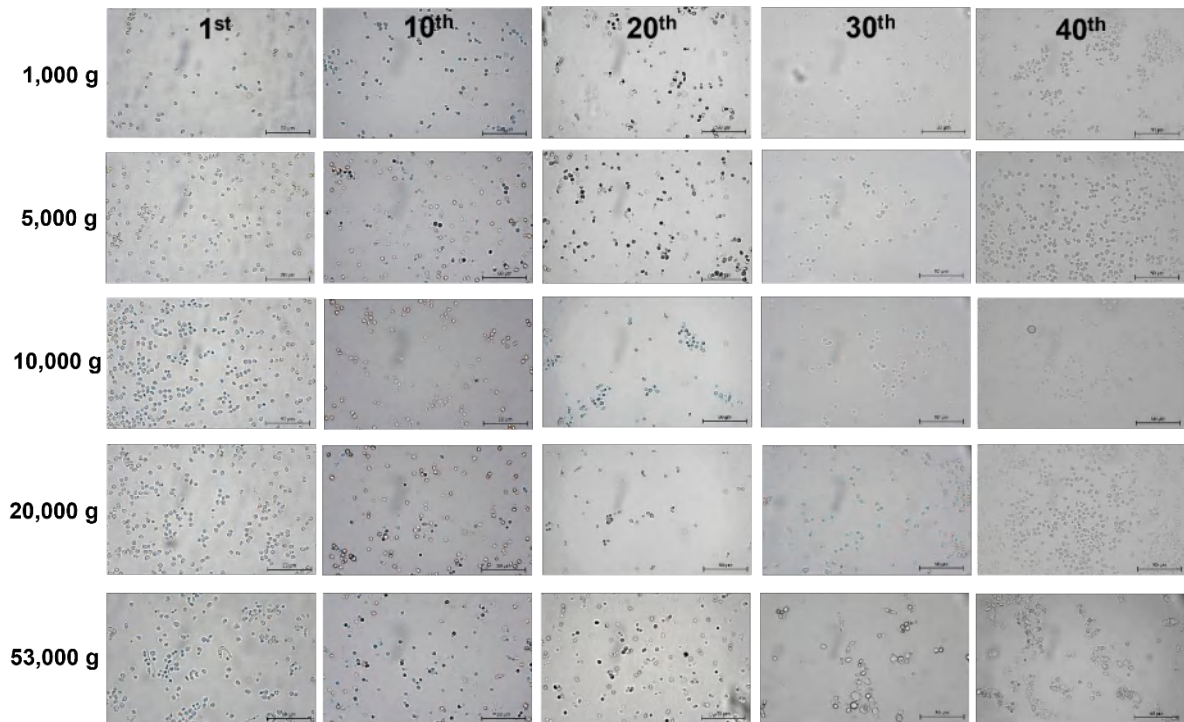
#### 3.3.1 皮状丝孢酵母在不同刺激强度下的超离心力胁迫适应性进化

前期研究发现对产油皮状丝孢酵母细胞进行长周期、反复的超离心力胁迫适应性进化, 可获得细胞体积增大近两个数量级的突变酵母菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52。两株突变株细胞壁均显著变薄, 细胞壁组分中葡聚糖和甘露聚糖的组分明显减少, 胞内油脂含量增加了 3 倍以上。我们初步认为, 超离心力作为机械应力对细胞表面直接产生物理胁迫, 高强度力作用下的胁迫进化可能导致基因组的不稳定性并产生可遗传的基因突变。此外, 细胞对外界超离心力可能存在信号转导通路, 从而实现将外界机械力信号转化为胞内的生化信号, 调控细胞生理代谢。

为了验证超离心力改变了产油皮状丝孢酵母的生理代谢, 进一步对皮状丝孢酵母细胞开展不同强度的超离心力胁迫适应性进化, 记录不同强度超离心力刺激下细胞的变化。第一组设置不同的超离心力 (1,000 g, 5,000 g, 10,000 g, 20,000 g, 53,000 g), 离心时间均为 3 min。每代培养培养后在转接时进行离心刺激, 离心后转移上层发酵液作为种子液转接入下一代培养的培养基中。每代观察记录细胞形态 (如图 3.1a), 离心力较小 ( $< 20,000$  g) 时, 在整个进化过程的 40 代内细胞形态均没有变化, 呈现与出发菌株相同的小球状。离心力设置为 53,000 g 时, 在离心胁迫适应性进化传代至第 30 代时, 部分细胞开始出现体积略微增大的现象, 且极少数的细胞有多核结构 (如图 3.1b)。

第二组实验设置不同的离心时间 (0.7 min, 3 min, 10 min, 20 min, 30 min), 离心力设置为离心机承载的最大离心力 53,000 g, 每代观察记录细胞形态 (如图 3.2a), 较短离心时间 ( $< 3$  min), 即较低强度的超离心刺激下, 细胞连续刺激下, 细胞形态和胞内油脂含量没有显著变化。而在持续的高强度超离心力胁迫刺激下 (离心时间  $\geq 10$  min), 细胞经历较短次数 (30 代内) 的超离心刺激, 即有较为明显的形态变化。每次超离心刺激时间为 30 min 时, 细胞刺激进化传代至第 20 代时细胞集团中部分细胞即变为体积巨大的椭圆形, 且胞内充满脂质小体。进一步对胁迫培养至第 30 代的细胞核进行核染色观察 (图 3.2b), 随着离心刺激强度的增加胞内脂滴的数量增多, Hoechst 亲核染料更难和细胞核结合且脂滴具有自发荧光产生干扰, 因此核染色效果变差。但是依旧可以观察到高强度离心刺激的菌株 (离心时间  $\geq 10$  min) 部分细胞呈多核细胞样单元, 该现象与之前的研究中通过超离心胁迫进化获得的稳定突变株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的细胞形态基本一致。高强度的超离心刺激影响了细胞的增殖。

(a) Morphological change stimulated by different centrifugation force



(b) Nuclear staining images

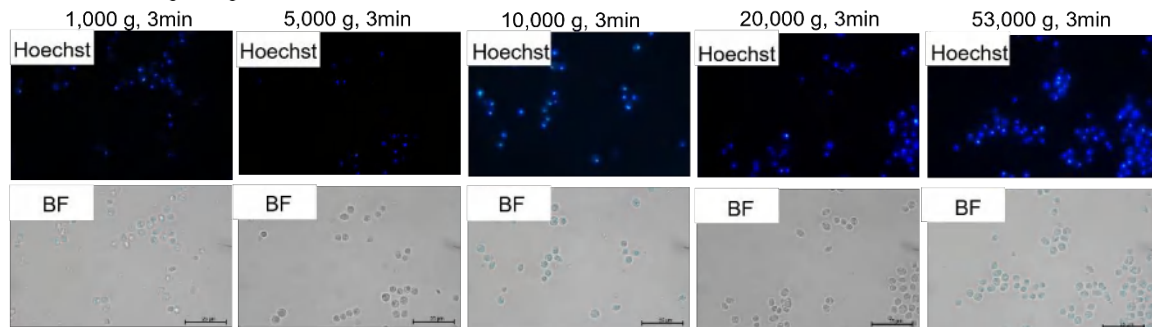
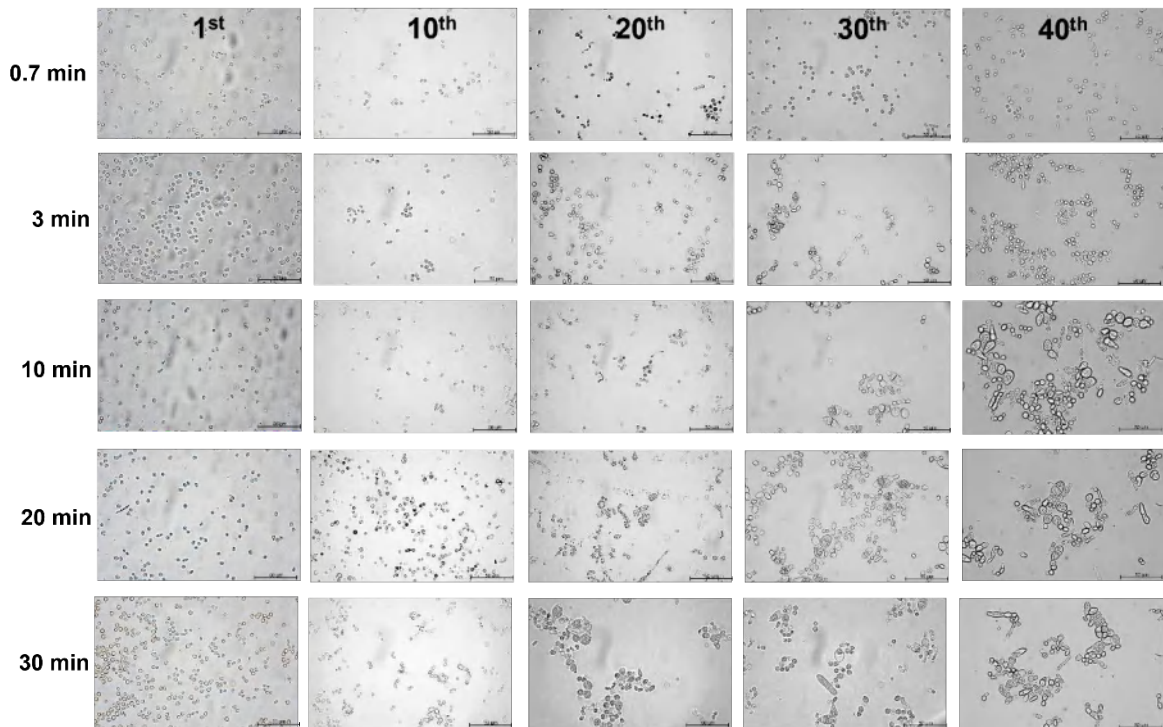


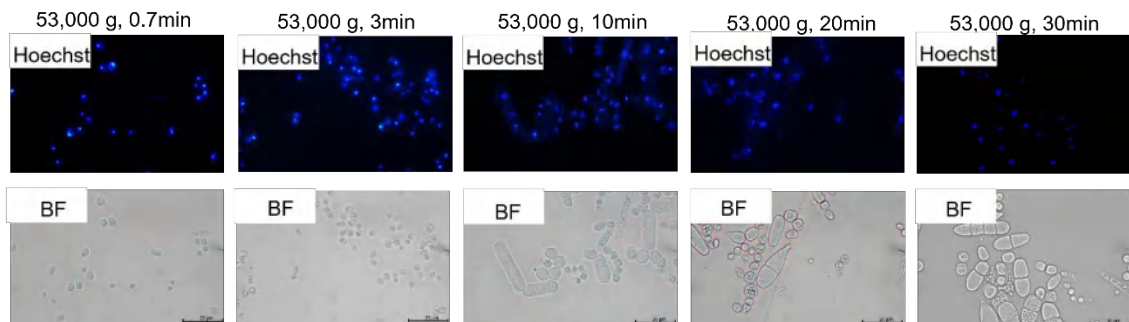
图 3.1 不同离心力的 *T. cutaneum* 离心力胁迫适应性进化

Fig. 3.1 Adaptive evolution of centrifugation stress in *T. cutaneum* with different ultracentrifugation force: (a) Morphological change stimulated by different centrifugation force; (b) Nuclear staining images  
 实验条件：离心力胁迫进化在合成培养基中进行，方法如 3.2.3 所示。离心胁迫至 30 代获得的菌株活化后转移至合成培养基，培养 96 h 用于核染色的荧光显微镜拍照。

(a) Morphological change stimulated by different ultracentrifugation time



(b) Nuclear staining images

图 3.2 不同超离心力时间的 *T. cutaneum* 超离心力胁迫适应性进化Fig. 3.2 Adaptive evolution of ultracentrifugation stress in *T. cutaneum* with different ultracentrifugation force time: (a) Morphological change stimulated by different ultracentrifugation time; (b) Nuclear staining images

实验条件：超离心力胁迫进化在合成培养基中进行，方法如 3.2.3 所示。超离心胁迫至 30 代获得的菌株活化后转移至合成培养基，培养 96 h 用于核染色的荧光显微镜拍照。

对上述不同强度的离心胁迫实验第二组，即在更持续的超离心力下，使用不同离心刺激时间获得的各组细胞（53,000 g, 0.7 min；53,000 g, 3 min；53,000 g, 10 min；53,000 g, 20 min；53,000 g, 30 min）进行更为详细地表征。选取离心刺激传代至 30 代的各组菌株进行实验。在光学显微镜下观察，经过超离心力刺激获得的进化菌株整体形态不均（图 3.2a），平均细胞体积较出发菌株明显增大。如图 3.3a 和 b，最持续超离心力（53,000 g, 30 min）胁迫刺激获得的细胞体积显著增大 52.5 倍，同时油脂含量提高 3.2 倍。超离心作为巨大的机械力胁迫影响细胞壁合成代谢。经过强超离心力刺激（离心时间 $\geq 10\text{min}$ ）获得的细胞，单位表面积的甘露聚糖含量减少 76.8-79.4%，葡聚糖含量减少 79.2-87.9%，

几丁质含量减少 50.2-67.1% (如图 3.3c)。对亲本和各进化菌株进行 Hoechst 染色观察细胞核, 高强度离心胁迫 (离心时间 $\geq 10\text{min}$ ) 后“异形”大细胞呈多核形态 (图 3.2b), 超离心刺激可能改变细胞周期。通过检测细胞世代 (细胞倍增一代的时间) 反应细胞周期, 最大超离心力 (53,000 g, 30 min) 刺激获得的细胞的细胞周期较亲本细胞增长 34.9% (如图 3.3d)。

以上结果表明, 超离心力刺激会显著影响细胞的体积、细胞壁组成、细胞增殖和油脂积累能力。更持续的离心力胁迫刺激导致了细胞更为快速的行为特征和代谢改变, 这表明产油酵母细胞存在对外界离心力的响应机制。

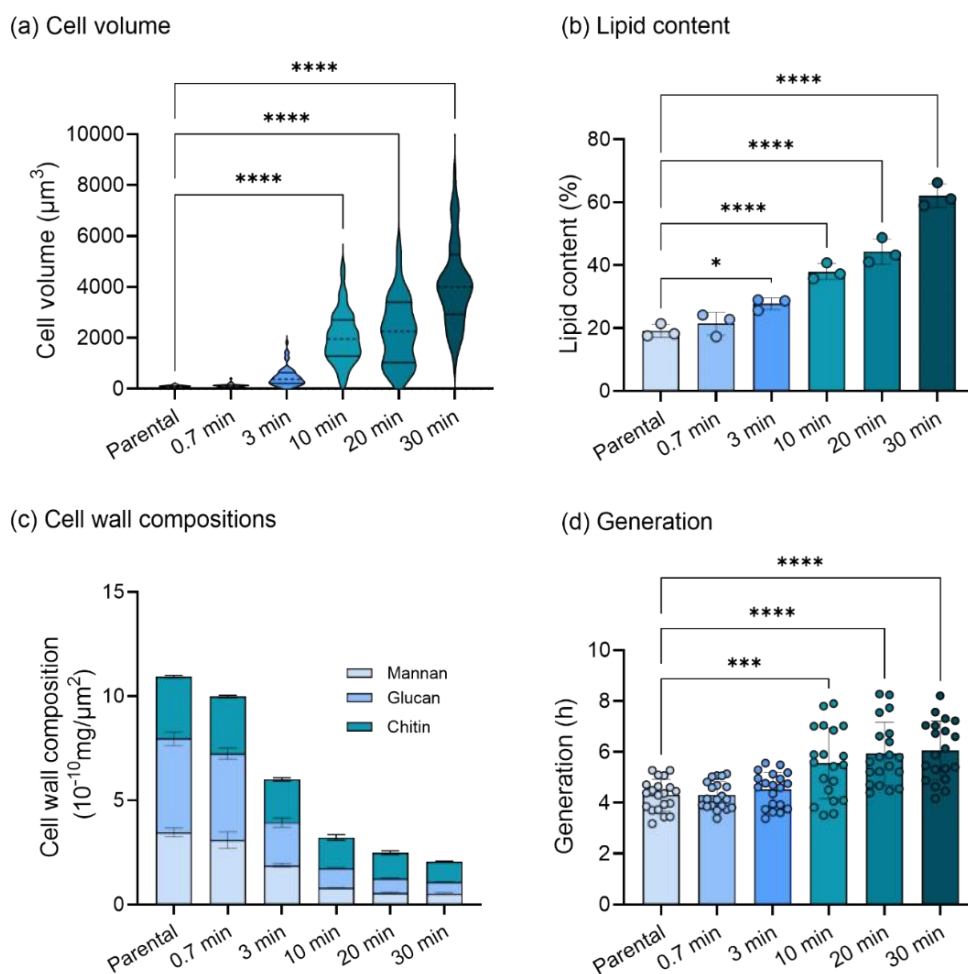


图 3.3 不同强度的超离心力刺激适应性进化后皮状丝孢酵母的表征

Fig. 3.3 Cell characterization of *T. cutaneum* after adaptive evolution with different intensities of ultra-centrifugation force stimulation: (a) Cell volume; (b) Lipid content; (c) Cell wall compositions; (d) Generation (\*indicates  $P \leq 0.05$ , \*\* indicates  $P \leq 0.01$ , \*\*\* indicates  $P \leq 0.001$  and \*\*\*\* indicates  $P \leq 0.0001$  between the evolved strain and parental, by Dunnett's t test)

实验条件: 不同强度离心力胁迫进化获得的菌株在活化后转移至合成培养基培养 96 h 进行细胞体积、油脂含量、细胞壁组成的检测。活化后的菌体转移至合成培养基根据所选检测的时间点检测细胞世代时间。

### 3.3.2 超离心力胁迫适应性进化在其他产油酵母中的扩展

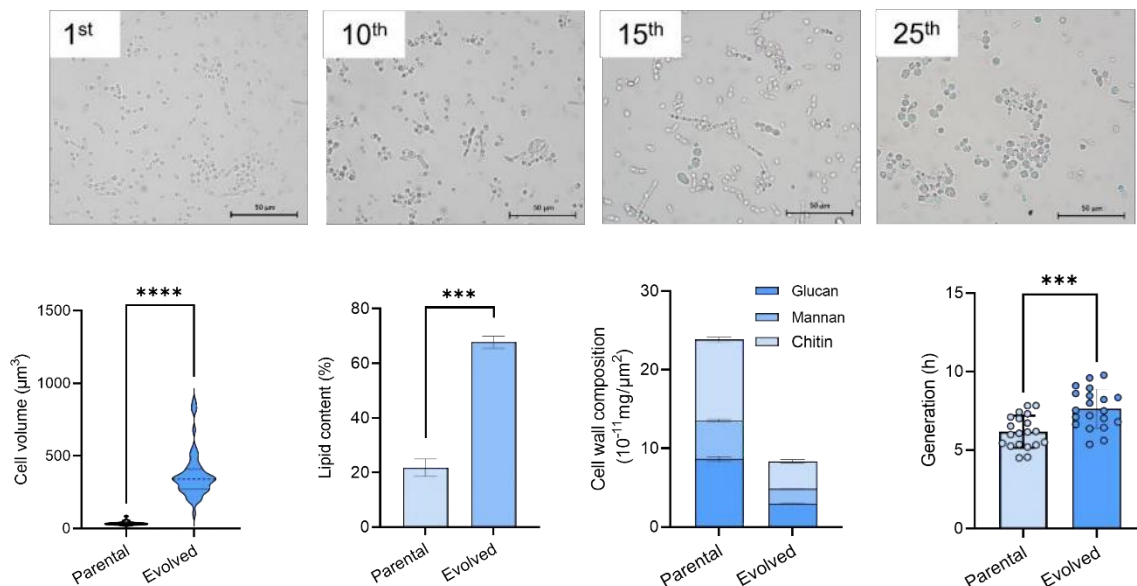
为了验证该超离心应力胁迫进化的方法以及潜在信号转导通路的保守性,进一步尝试在其他产油酵母中进行超离心胁迫适应性进化。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种典型的非模式产油酵母菌株,被广泛用于多种高附加值油脂衍生物的合成生物学研究。*Y. lipolytica* DSM3286 是一株野生型的解脂耶氏酵母, Luttermann 等<sup>[252]</sup>对其完整基因组进行了重新测序。之前的研究表明, *Y. lipolytica* DSM3286 是生产柠檬酸最好的宿主菌之一,因此其代谢倾向于逸出型<sup>[253]</sup>。野生型的解脂耶氏酵母脂质含量通常较低,不超过 30%,经过复杂的代谢工程改造和发酵工艺的优化其脂质含量可以达到 70%以上<sup>[254]</sup>。尽管如此,这种代谢工程改造通常难以平衡菌株生长和脂质积累,虽然通过分批补料操作可以获得较高的脂质含量,但其发酵周期较长且得率较低<sup>[255]</sup>。在此,对 *Y. lipolytica* DSM3286 在限氮合成培养基中进行超离心胁迫适应性进化。根据皮状丝孢酵母不同强度的超离心力胁迫进化实验结果,高强度、长时间的超离心力胁迫刺激可以显著缩短细胞发生变化的传代次数。因此,进化进程中超离心力快速提升至离心机最大离心力(53,000 g),并根据细胞生长状态调整增加离心刺激的时间(10-30 min)。传代时对细胞形态和胞内脂质小体进行光学显微镜观察(图 3.4a),细胞由最初的只有细胞核的“空胞”椭球形,逐渐一部分因为氮限制造成的营养不足呈菌丝态并开始积累油脂小体,最后在离心刺激下细胞体积显著增大且油脂小体充满整个胞内空间。选择超离心力胁迫进化至第 25 代的进化菌株进行表征,经计算经超离心胁迫进化后的细胞体积是出发菌株的 10.3 倍;超离心力胁迫刺激下,油脂含量从最初的 21.7%提升至 67.7%,显著提高了 3.1 倍;细胞壁中各组分含量显著降低,葡聚糖、甘露聚糖和几丁质的含量分别降低 65.9%、63.2%和 68.9%。细胞世代时间增长 22.6%。

圆红冬胞酵母(*Rhodospiridium toruloides*)为典型的产油红酵母,因其在积累油脂的过程中会天然生产酵母红素、番茄红素、类胡萝卜素等红色萜类化合物而得名<sup>[256]</sup>。提高圆红冬胞酵母的脂质含量,会为萜类化合物的生产提供更加充足的前体和储存空间。之前的研究表明,经筛选、代谢改造和发酵工艺优化的圆红冬胞酵母油脂含量相对较高,最高可达到 70%以上<sup>[19]</sup>。本研究尝试对野生型圆红冬胞酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 进行同样地超离心力胁迫适应性进化(图 3.4b)。同解脂耶氏酵母的进化过程一样,在进化过程中快速将离心力提升至离心机最大离心力(53,000 g),并根据细胞生长状态调整增加离心刺激的时间(10-30 min)。从光学显微镜镜检照片可以看出,细胞在整个过程中逐渐增大、胞内油脂逐渐充满整个胞内空间。在不经任何发酵调整和代谢改造的前提下,经过 25 代的超离心力胁迫刺激,进化细胞的平均体积是出发菌株的 8.9 倍;其脂质含量可以提高 4.2 倍,从 15.2%提高到 63.4%;细胞壁组分中葡聚糖、甘露聚糖和几丁质含量降低 81.8%-88.9%;细胞世代时间有所增长。

综上所述,两株典型的产油酵母菌株在超离心力胁迫适应性进化后均导致了了体积增大、细胞壁聚糖组分减少、细胞周期增长的现象,与上文第二章中皮状丝孢酵母经超离心胁迫适应性进化的结果类似。这表明超离心力胁迫适应性进化的方法能够实现多种

产油酵母的形态扩张、细胞壁减薄和高油脂积累，也说明了产油酵母对外界超离心力胁迫潜在的响应通路可能是相对保守的。

(a) *Y. lipolytica*



(b) *R. toruloides*

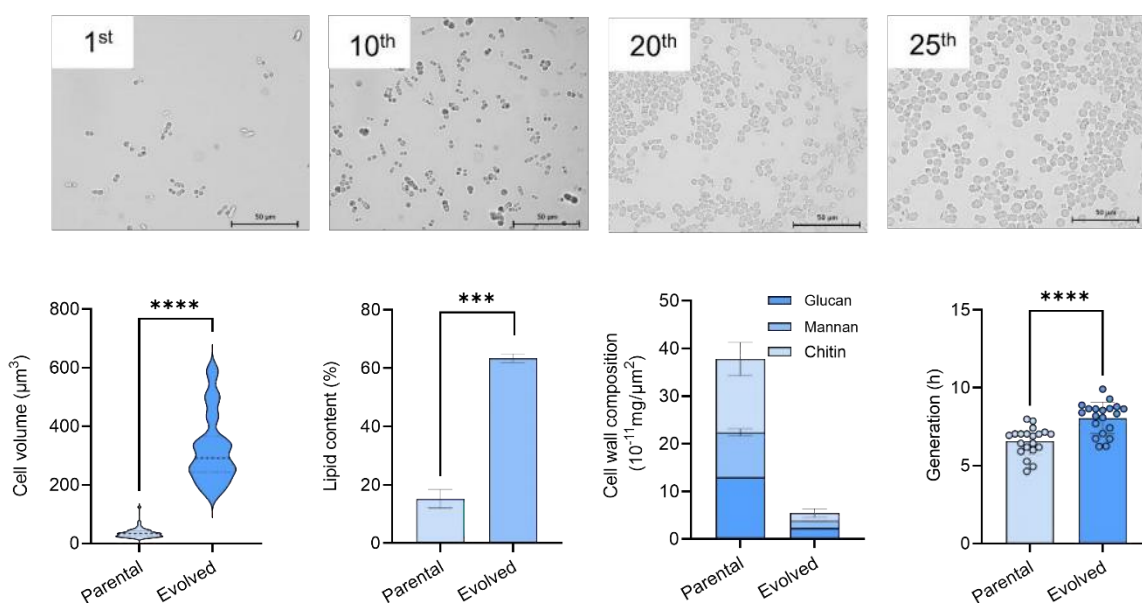


图 3.4 解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母经超离心力胁迫适应性进化获得的进化细胞的表征

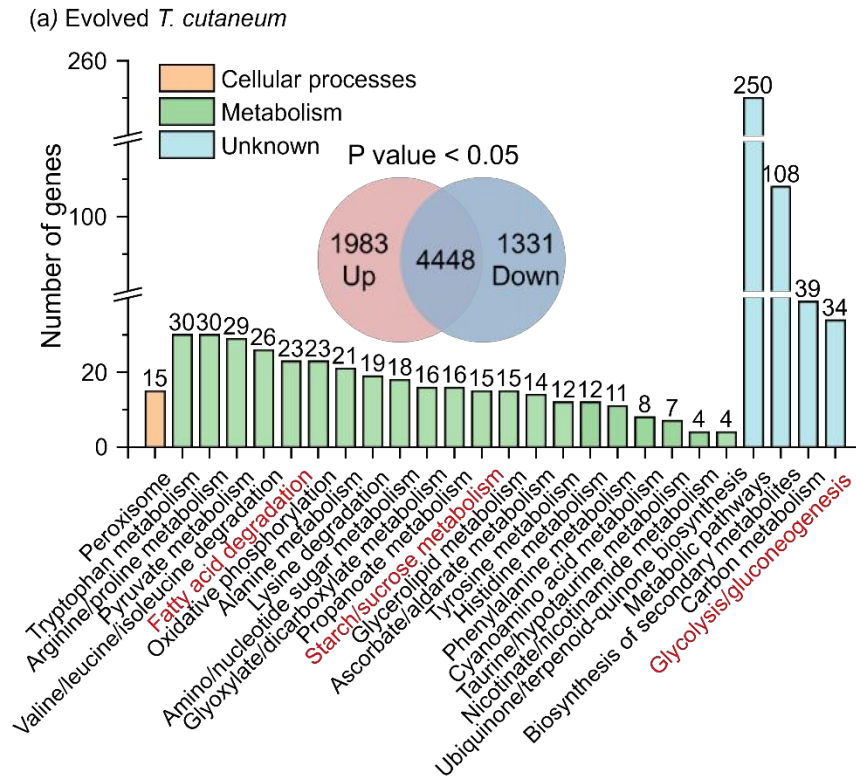
Fig. 3.4 Characterization of *Y. lipolytica* *R. toruloides* evolved cells obtained by stress of ultra-centrifugation fractionation: (a) *Y. lipolytica*; (b) *R. toruloides*. (\* indicates  $P \leq 0.05$ , \*\* indicates  $P \leq 0.01$ , \*\*\* indicates  $P \leq 0.001$  and \*\*\*\* indicates  $P \leq 0.0001$  between the evolved strain and parental, by Dunnett's t test)

实验条件：超离心力胁迫适应性进化获得的解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母在活化后转移至合成培养基培养 120 h 进行细胞体积、油脂含量、细胞壁组成的检测。

### 3.3.3 在产油酵母细胞中传递离心力胁迫信号通路的初步挖掘

通过超离心力胁迫适应性进化，皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母的细胞体积和油脂含量均出现非常显著的变化，这表明产油酵母对外界离心力的响应现象和相关的信号转导通路可能是相对保守的。我们进一步尝试通过转录组学和蛋白质互作网络分析挖掘响应超离心应力的信号转导途径。

对通过超离心力胁迫适应性进化获得的高油脂含量的皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母、圆红冬孢酵母进化菌株，分别以其对应的原始菌株作为对照组，进行差异转录组学分析，用 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ ，显著性  $P\text{-value} < 0.05$  为阈值，基于 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库进行 DEGs (差异转录基因) 的富集分析。富集结果中将微生物领域不关注的途径，例如人类疾病 (Human Diseases) 和 Drug Development (药物开发) 等舍去。根据以上三株进化菌株的 DEGs 富集结果发现 (图 3.5)，发生明显变化的 DEGs 大多富集到了与代谢有关的通路上，其中糖代谢 (Glycolysis/gluconeogenesis, Starch/sucrose metabolism) 和脂肪酸代谢 (Fatty acid metabolism, Fatty acid biosynthesis, Fatty acid degradation,) 是三株菌株均有明显变化的通路 (红色字体标注)。



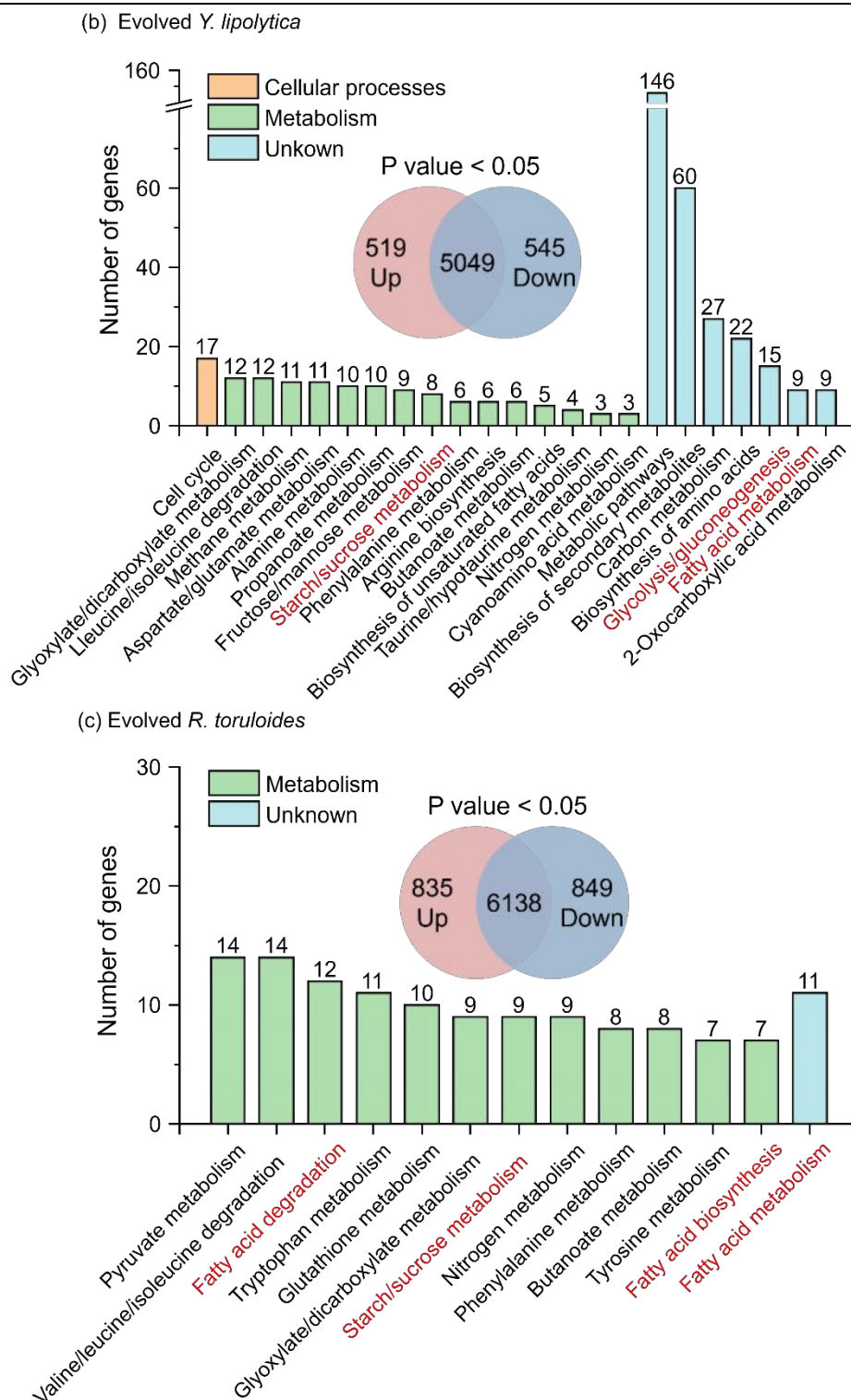


图 3.5 超离心力胁迫进化获得的 *Y. lipolytica*、*R. toruloides* 和 *T. cutaneum* 进化菌株与出发菌株相比的差异表达基因的 KEGG 富集

Fig. 3.5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) for evolved *Y. lipolytica*, *R. toruloides*, *T. cutaneum* cells by ultracentrifugation force stress in adaptive evolution.

KEGG 的富集结果表明，经超离心力胁迫适应性进化后三株菌株的糖代谢和脂肪酸代谢（脂质合成）路径上基因的表达量均发生了显著变化。进一步整理了从糖酵解到甘油三酯的合成路径上的所有酶基因的表达水平（表 3.1），转酮酶基因（*TKT*），ATP-柠檬

酸裂解酶基因 (*ACL*), 乙酰辅酶 A 羧化酶基因 (*ACC*), 脂肪酸合成酶 1 基因 (*FAS1*) 和脂肪酸合成酶 2 基因 (*FAS2*) 基因在以上经超离心力胁迫适应性进化获得的三株进化菌株中均出现了 2.0-17.1 倍的显著上调 (图 3.6), 而油脂合成路径上的其他酶基因没有如此显著且一致的变化。因此我们推测, 在三株进化菌株中表达量均出现显著上调的五个基因 (*TKT*、*ACL*、*ACC*、*FAS1*、*FAS2*) 可能是超离心力胁迫刺激下机械力信号通路被激活后调控的重要效应基因。

表 3.1 超离心力胁迫适应性进化获得的 *Y. lipolytica*、*R. toruloides* 和 *T. cutaneum* 糖代谢和油脂合成相关的差异转录基因

Table 3.1 Differential transcription genes (DEGs) related to sugar metabolism and lipid synthesis in *T. cutaneum*, *Y. lipolytica* and *R. toruloides* obtained by ultracentrifugation stress adaptive evolution. DEGs that were upregulated in all three evolved strains were bolded and labeled in red.

Gene ID	<i>T. cutaneum</i>		<i>Y. lipolytica</i>		<i>R. toruloides</i>	
	Log2 FC	P value	Log2 FC	P value	Log2 FC	P value
<b>(a) Glycolysis</b>						
HK1	1.56	1.28E-17	2.70	5.96E-09	0.59	1.38E-04
HK2	1.18	2.75E-18	-0.99	1.27E-13	0.97	6.99E-11
GPI	1.57	1.30E-20	1.10	1.36E-19	0.30	8.50E-02
PFK	0.67	5.04E-28	1.09	7.55E-26	-0.55	3.72E-04
FBP	1.09	1.08E-23	0.06	6.68E-01	1.06	2.07E-06
FBA	1.56	7.05E-15	1.25	7.87E-30	0.89	1.99E-05
GAPD	-0.67	4.64E-02	0.71	5.01E-11	0.89	1.80E-05
PGK	-0.36	3.29E-24	0.82	2.94E-13	-0.03	8.88E-01
PGM	0.88	2.05E-12	0.11	3.24E-01	-0.55	1.20E-03
ENO	1.03	2.02E-13	0.97	5.02E-18	-0.03	8.80E-01
PYK	0.67	7.85E-03	0.88	5.47E-17	-0.16	4.40E-01
<b>(b) TCA cycle</b>						
PDHA	1.36	4.06E-08	1.08	4.89E-23	-0.03	8.80E-01
PDHB	2.89	9.84E-10	1.29	1.72E-33	0.85	8.88E-06
ME	2.18	4.06E-08	-0.16	2.68E-01	1.28	4.55E-13
PC	0.38	1.80E-10	-0.52	9.06E-06	0.40	3.39E-02
CS	1.89	7.38E-24	0.35	2.38E-03	0.60	2.95E-04
ACO	-1.08	8.25E-06	-0.28	1.64E-02	-1.28	4.65E-11
IDH	3.00	1.91E-06	0.14	1.93E-01	0.21	1.83E-01
$\alpha$ -KDH	0.67	1.76E-18	-0.34	3.92E-03	1.08	5.92E-10
SCS- $\alpha$	-0.38	8.93E-27	-0.04	7.27E-01	-0.05	8.32E-01
SCS- $\beta$	0.67	1.47E-20	0.17	1.54E-01	-0.32	9.64E-02
SDH	0.89	1.70E-14	0.50	9.24E-06	-1.03	3.28E-09
FH	1.09	1.00E-15	0.19	6.95E-02	0.75	5.42E-04
MDH	0.56	3.14E-11	-0.01	9.23E-01	0.94	2.68E-05
<b>(c) PPP pathway</b>						
G6PD	0.78	1.05E-22	0.46	5.83E-05	0.53	1.33E-03
6PGD	-0.56	1.33E-08	0.23	1.18E-01	-2.60	1.67E-44
<b>TKT</b>	1.03	6.11E-05	3.58	2.44E-72	1.39	6.22E-01

续表 3.1 超离心力胁迫适应性进化获得的 *Y. lipolytica*、*R. toruloides* 和 *T. cutaneum* 糖代谢和油脂合成相关的差异转录基因

TPI	0.67	7.86E-02	0.99	2.08E-15	0.13	4.69E-01
(d) Fatty acid synthesis						
<b>ACL</b>	3.78	7.54E-12	2.80	8.04E-141	1.74	1.04E-17
<b>ACC</b>	2.48	2.10E-10	1.70	5.72E-39	2.09	3.10E-25
ELO	1.14	5.99E-09	0.97	5.02E-18	2.32	3.24E-26
<b>FAS1</b>	3.78	5.71E-13	4.10	1.86E-167	2.96	2.83E-22
<b>FAS2</b>	1.78	4.00E-14	1.71	2.74E-43	1.14	1.23E-24
FAD1	2.19	3.68E-04	1.59	5.72E-39	-0.13	9.64E-01
FAD2	1.93	6.13E-15	1.95	2.17E-58	0.45	5.16E-02
(e) TAG synthesis						
GPD	1.29	1.08E-14	0.71	5.01E-11	1.68	3.57E-18
GPAT	1.38	8.25E-13	0.72	1.10E-09	-0.32	7.13E-02
LPAT	0.83	2.24E-15	0.96	3.90E-16	0.76	1.04E-04
PAP	-0.67	4.09E-08	0.09	4.70E-01	0.45	1.70E-02
DGAT1	1.37	8.20E-04	-0.91	2.50E-11	1.26	8.41E-10
DGAT2	-0.78	3.64E-02	-0.51	3.52E-06	N/A	N/A

通过文献调研，总结了酵母（酿酒酵母、粟酒裂殖酵母和白色念珠菌）中的机械力感受器蛋白及下游调控通路（图 3.6），根据不同的感受器蛋白和传导机制分为 4 类。

第一类是纳米弹簧类感受器机械力信号通路，该通路的感受器蛋白含有纳米弹簧一样的细胞外结构域（富含丝氨酸/苏氨酸，STR 结构域）。当其感受到机械应力时，胞外纳米弹簧被压缩，通过胞质内的尾区转化为细胞内的生化信号。感受器将信号通过 Rom1/2 触发丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）级联途径，下游的 MAPK 激酶（Slt2）激活两个靶转录因子 Rlm1 和 SBF（Swi4/6 cell cycle box-binding factor）复合物，进而调控下游效应基因的表达。这种包含纳米弹簧样结构域的保守机械传感器分为 Wsc1/2/3 家族和 Mid2/Mtl1 家族<sup>[118]</sup>。第二类是拉伸激活离子通道感受器机械力信号通路。Mid1/Cch1 复合物使钙离子在接受应力信号时流入细胞质，该信号被钙调蛋白（calmodulin）捕捉并进一步激活钙调磷酸酶（calcineurin, CaN），CaN 通过 Cnb1 和 Cna1/2 磷酸化转录因子 Crz1，进而调控下游基因的表达<sup>[123]</sup>。第三类是雷帕霉素蛋白复合体 2（TORC2）感受器机械力信号通路。当细胞感受到机械力信号时，激活因子 Slm1/2 从胞膜解离并释放至胞质激活 TORC2，TORC2 通过下游激酶 Ypk1 在应力下调控肌动蛋白重塑和鞘磷脂的合成等以平衡膜张力和内部膨压<sup>[133, 134]</sup>。研究表明，哺乳细胞中与 TORC2 同源的 mTORC2 的活性与细胞脂肪合成和细胞恶性增殖有关，影响着胞内乙酰辅酶 A 的含量，对于维持细胞能量存贮和葡萄糖代谢稳态起着重要的作用<sup>[134]</sup>。第四类是黏蛋白 Msb2 和质膜感受器 Sho1 组成的感受器模块所属的机械力信号通路，在机械应力下将信号传递给 MAPK 激酶 Hog1，进而高渗环境下通过阻断水分外流和增加胞内甘油合成来增加胞内膨压以维持生存<sup>[130]</sup>。*T. cutaneum*、*Y. lipolytica* 和 *R. toruloides* 基因组中均未注释出 Msb2 相关信息，因此在后续分析中暂不分析 Msb2 和 Sho1 复合体所属的机械力信通路。

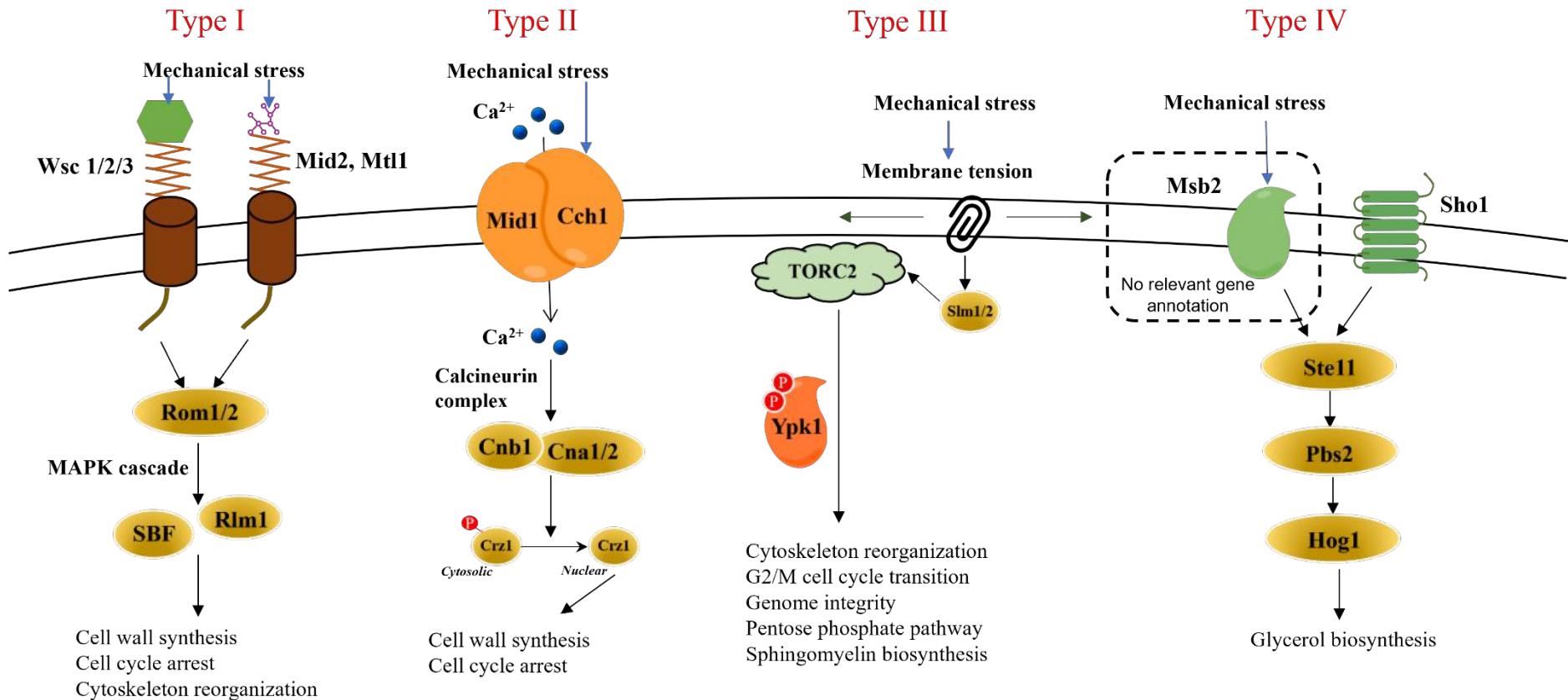


图 3.6 酵母中四类机械力信号转导途径

Fig. 3.6 Four kinds of mechanical force signal transduction pathways in yeast

注：Msb2 在以上三种产油酵母基因组中均未被注释出。

为了探究以上三类机械力信号通路 (*T. cutaneum*, *Y. lipolytica* 和 *R. toruloides* 基因组中均未注释出 Msb2 相关信息, 暂不分析 Msb2 和 Sho1 复合体所属的机械力信通路) 是否与五个在三株产油酵母进化细胞中表达量均出现显著上调的基因 (*TKT*、*ACL*、*ACC*、*FAS1*、*FAS2*) 编码的蛋白存在相互作用关系。选择信号通路中主干通路上末端最终作用于效应基因的转录调控因子和核心激酶, 分别是转录调控因子 Rlm1 和 SBF (纳米弹簧型感受器机械力信号通路, Type I)、转录调控因子 Crz1 (拉伸离子通道型感受器机械力信号通路, Type II)、激酶 Ypk1 (TORC2 感受器机械力信号通路, Type III) 与表达上调的 5 个基因编码的蛋白进行蛋白质互作网络分析。蛋白质互作网络分析在 GeneMANIA (<https://genemania.org/>) 网站进行, 互作网络预测结果如图 3.7 所示。我们进一步整理了以上所选择的转录调控因子或激酶与 *TKT*、*ACL*、*ACC*、*FAS1*、*FAS2* 蛋白之间互作相关性的权重值 (表 3.2)。结果表明, 仅 Ypk1 与上述五个基因均有相互作用关系, 其中 Ypk1 与脂肪酸合成酶 *FAS1* 的物理相互作用 (Physical interactions) 的相关性权重值达到了 0.606。Rlm1 虽然与 *FAS1*、*FAS2*、*ACC* 和 *TKT* 四个蛋白有相互作用, 但其相关性权重值较低, 均低于 0.02, 且相互作用方式仅限于共表达 (Co-expression) 和共定位 (Co-localizations)。进一步对互作网络中的基因进行聚类分析, Ypk1 也参与了脂质合成过程 (lipid biosynthetic process)。因此推测, 以 Ypk1 为核心激酶的 TORC2 机械力信号通路对产油酵母传递外界超离心力胁迫信号并调节脂质合成有重要作用。

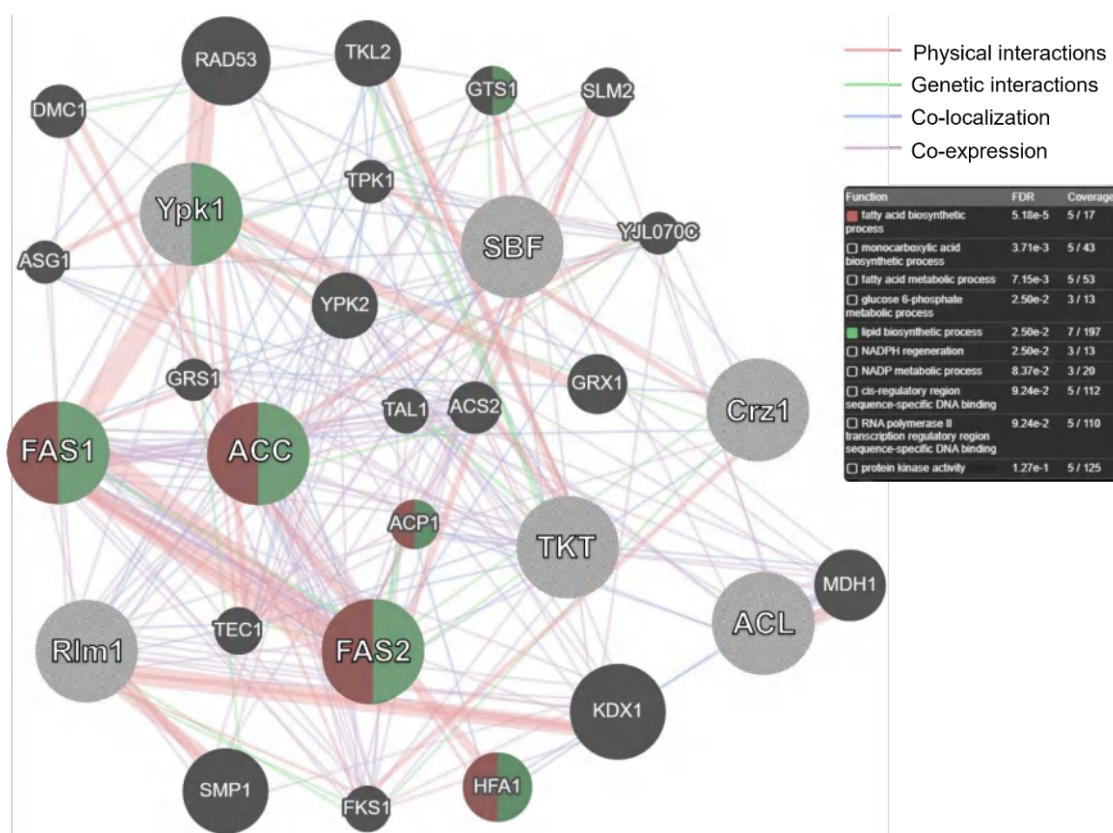


图 3.7 蛋白互作网络预测

Fig. 3.7 Predicted map of protein interactions

注: 使用 GeneMANIA 蛋白质网络预测工具数据库。所示蛋白信息来源于酿酒酵母数据库。

表 3.2 机械力信号通路核心激酶和转录调控因子与五个潜在效应基因的蛋白质相互作用相关性权重值

Table 3.2 The weight values of protein interaction between the core kinases and transcriptional regulation factors of mechanical force signaling pathways and five potential effector genes

Signaling pathway category	Gene1	Gene2	weight value	Network catalog
<b>Type I</b>	Rlm1	FAS2	0.016845947	Co-expression
	Rlm1	ACC	0.016504863	Co-expression
	Rlm1	FAS1	0.01624329	Co-expression
	Rlm1	FAS2	0.007917543	Co-expression
	Rlm1	TKT	0.001277139	Co-localization
	SBF	ACC	0.017060848	Co-expression
	SBF	TKT	0.012801694	Co-expression
	SBF	FAS2	0.01001435	Co-expression
<b>Type II</b>	Crz1	FAS2	0.007383004	Genetic Interactions
	Crz1	FAS1	0.001261034	Co-localization
	Crz1	FAS2	0.001261034	Co-localization
<b>Type III</b>	Ypk1	FAS1	0.6065378	Physical Interactions
	Ypk1	FAS1	0.027513178	Other
	Ypk1	ACL	0.014803931	Co-expression
	Ypk1	TKT	0.009079384	Other
	Ypk1	FAS1	0.00889354	Co-expression
	Ypk1	ACC	0.007146077	Co-expression
	Ypk1	FAS1	0.001261034	Co-localization
	Ypk1	FAS2	0.001261034	Co-localization

进一步整理总结了经过超离心胁迫适应性进化获得的 *T. cutaneum*, *Y. lipolytica* 和 *R. toruloides* 菌株中 3 类转导通路中重要基因的转录水平。结果如图 3.8, 经过超离心力胁迫适应性进化获得的 *T. cutaneum*, *Y. lipolytica* 和 *R. toruloides* 细胞中通过膜张力变化导致信号传递的 TORC2 感受器 (Type III) 的激活因子 Slm1 的表达量提高 2.6-7.2 倍。同时受 Slm1 激活的 TORC2 的主要激酶底物 Ypk1 的转录水平分别在 *T. cutaneum*, *Y. lipolytica* 分别上调 4.7 和 2.2 倍。而其他的感受器类型 (纳米弹簧和离子通道) 所属的机械力信号通路 (Type I、Type II) 中的各个重要基因转录水平基本没有显著和一致的变化。通过蛋白互作网络分析和基因转录水平变化结果进一步表明, 在超离心力刺激下, TORC2 机械力信号通路被激活, 使其下游效应基因如 *FAS1* 和 *ACC* 表达水平显著上调。

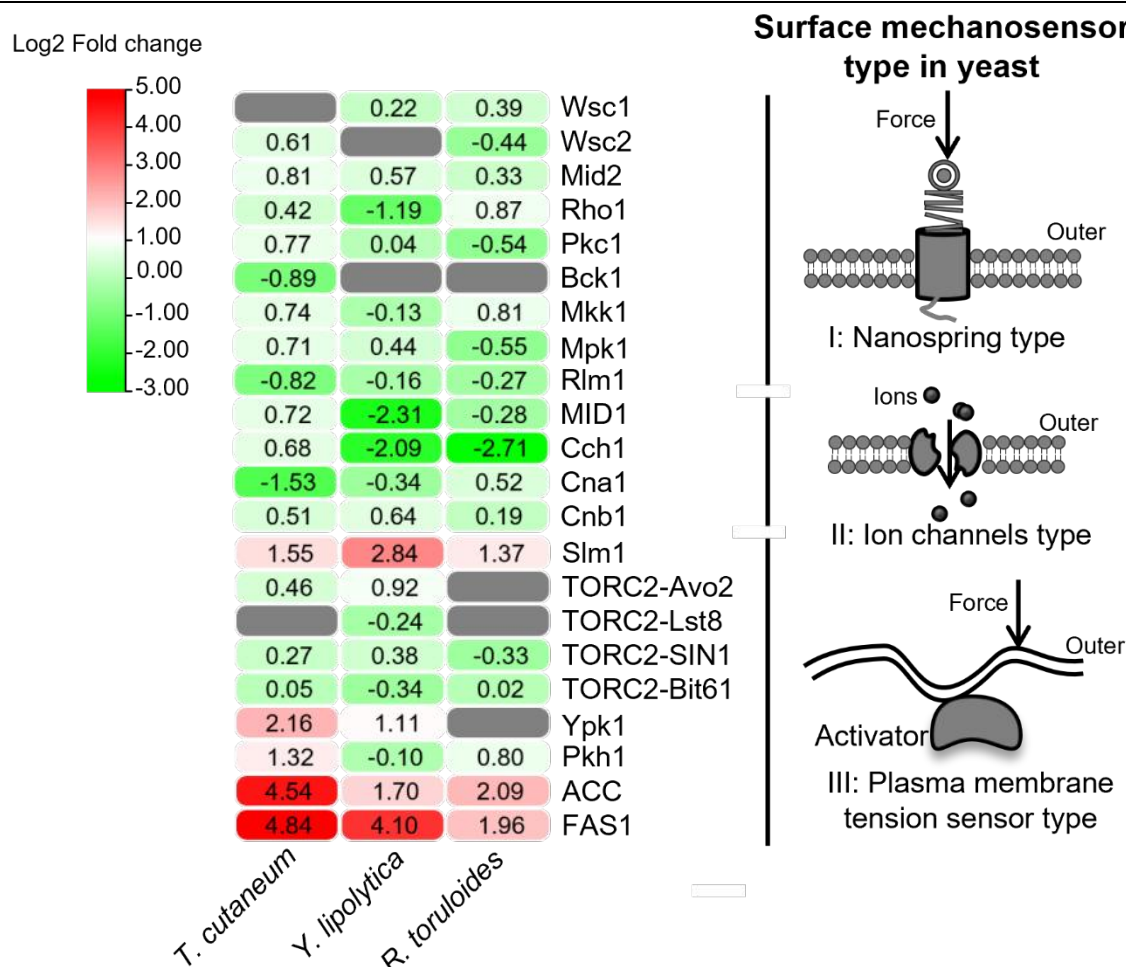


图 3.8 超离心力胁迫适应性进化获得的 *T. cutaneum*、*Y. lipolytica* 和 *R. toruloides* 中不同类型机械力信号通路中重要基因的转录水平

Fig. 3.8 Transcriptional levels of important genes in different types of mechanical force signaling pathways in evolved *T. cutaneum*, *Y. lipolytica* and *R. toruloides* obtained by ultracentrifugation stress adaptive evolution. Unannotated genes were indicated by gray color blocks

总结以上研究内容，通过生物信息学分析挖掘出了目前报道的酵母细胞传递外界机械力胁迫的诸多保守的信号转导通路。通过蛋白质互作网络分析，发现 TORC2 机械力信号通路中的核心激酶 Ypk1 与经超离心胁迫后菌株中表达量明显上调的脂肪酸合酶 FAS1 有较强的物理互作关系。经超离心力胁迫进化后的三株产油酵母菌株中 TORC2-Ypk1 机械力信号通路中 TORC2 激活因子 Slm1 和核心激酶 Ypk1 的表达量出现了显著上调。据报道，Ypk1 还参与调控了糖代谢、细胞壁组分、细胞增殖等多个过程<sup>[113]</sup>，经过超离心力刺激获得的进化菌株细胞壁和细胞增殖也发生了显著变化。因此，以 TORC2 为感受器的机械力信号通路极有可能传递了超离心力的胁迫刺激。但是该推论需要进一步的实验结果的支持。

### 3.3.4 TORC2 机械力信号通路传递超离心力胁迫信号

以 TORC2 为感受器蛋白的机械力信号转导通路中，外界的机械力信号刺激通过感受器激活因子 Slm1/2 从胞膜到胞质的定位变化完成信号传递的第一步，Slm1/2 达到胞

质与感受器蛋白 TORC2 结合后,被激活的 TORC2 蛋白进一步通过磷酸化的方式激活核心激酶 Ypk1,最终由 Ypk1 直接激活油脂合成的重要酶基因如乙酰辅酶 A 合成酶基因 (*ACC*) 和脂肪酸合成酶 1 基因 (*FAS1*) 等。因此, Ypk1 作为 TORC2 机械力信号转导通路的核心激酶,其磷酸化水平影响着其下游调控基因的功能强度。通过免疫印迹实验 (Western blot, WB) 可以检测胞内 Ypk1 的磷酸化程度,进而表示 TORC2 机械力信号通路的激活程度。值得注意的是, TORC2 基因在哺乳动物细胞和酵母中是相对保守的,在植物细胞、寄生虫等中不存在<sup>[133]</sup>。解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母基因组上虽然有明确的 TORC2 蛋白的基因注释,但 Ypk1 均没有明确的注释 (后续研究通过序列比对在解脂耶氏酵母中基本确定了 Ypk1 基因)。皮状丝孢酵母中 TORC2 机械力信号通路上的各类基因基本均有明确的注释。因此,本论文选择皮状丝孢酵母为研究对象,通过 WB 实验探究不同强度超离心力胁迫获得的皮状丝孢酵母进化菌株中 TORC2 下游核心激酶 Ypk1 的磷酸化水平。

由于 WB 实验大部分开展于模式菌株,如酿酒酵母。皮状丝孢酵母为典型的非模式产油酵母,其胞内油脂含量较多,这极大影响了总蛋白的提取和 SDS-PAGE 的实验效果。此外,在高油脂含量产油酵母中的 WB 实验也没有相应的实验步骤参考,这极大加重了实验难度。因此,首先探究了 WB 实验中 SDS-PAGE 步骤中合适的胞内蛋白的上样量。结果表明 (图 3.9),以  $\beta$ -actin 蛋白为实验对象。产油酵母 WB 实验较合适的胞内总蛋白上样量为 30-40  $\mu\text{g}$ ,此时  $\beta$ -actin 蛋白条带较为清晰。

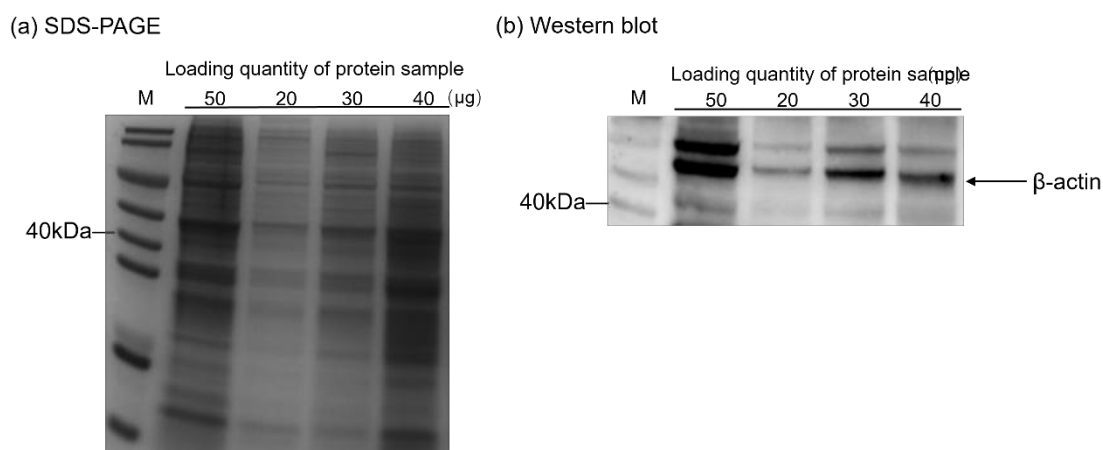


图 3.9 产油酵母 Western blot 实验胞内总蛋白上样量探究

Fig. 3.9 Exploration of total intracellular protein uploading quantity of oleaginous yeast in Western blot experiments

实验条件: 菌株活化后转接至合成培养基中, 培养 36 h 后进行胞内蛋白的提取和 WB 实验。蛋白提取后使用 BCA 试剂盒检测浓度, Western blot 实验中 SDS-PAGE 的蛋白上样量分别为 20  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$ , 40  $\mu\text{g}$  和 50  $\mu\text{g}$ 。

采用建立的 WB 实验方法, 对出发菌株以及经不同刺激时间 (53,000 g, 0.7 min; 53,000 g, 3 min; 53,000 g, 10 min; 53,000 g, 20 min; 53,000 g, 30 min) 的超离心力胁迫获得

的菌株中 Ypk1 的磷酸化程度进行表征。如图 3.10, 超离心刺激至第 20 代的各进化菌株细胞, 随着离心刺激时间的增加即离心刺激强度的增大, Ypk1 的磷酸化程度增加; 细胞持续进行超离心力刺激, 离心刺激传代至 40 代时, 3 株经较强超离心力刺激下 (53,000 g, 10 min; 53,000 g, 20 min; 53,000 g, 30 min) 获得的细胞表型趋于一致 (图 3.2a), 与此同时这 3 株菌株中 Ypk1 磷酸化水平趋于一致且明显高于出发菌株和较低强度离心刺激获得的细胞 (图 3.10)。

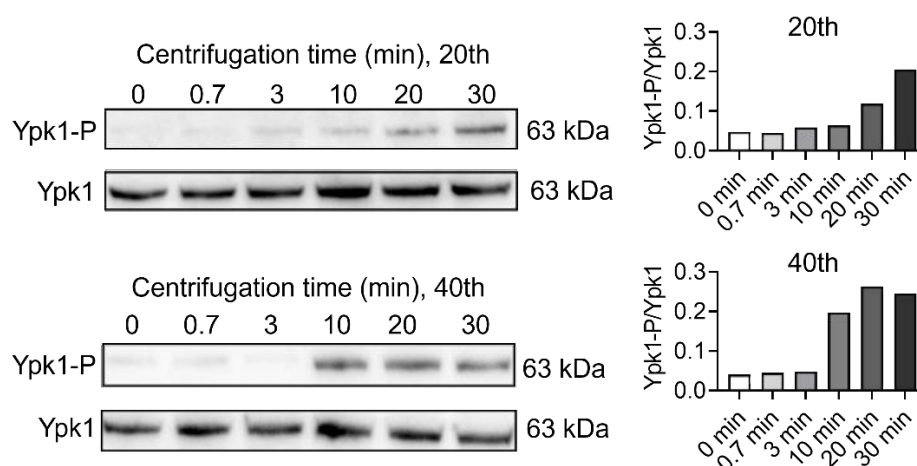


图 3.10 不同持续时间的离心力胁迫刺激获得的菌株中 Ypk1 的磷酸化程度

Fig. 3.10 Phosphorylation levels of Ypk1 in strains obtained by different time of ultra-centrifugation force stress

实验条件: 不同强度离心力胁迫进化获得的菌株在合成培养基培养 36 h 后进行 Western blot 实验。Western blot 实验中由于抗体剥离后二次孵育抗体的效果不佳, 胞内蛋白进行 SDS-PAGE 后分别孵育磷酸化抗体和 Ypk1 总抗体。

细胞接受外界机械力信号时, 首先发生变化的是细胞膜张力, 膜张力的增加进而引发后续处于内陷细胞膜结构中的 Slm1/2 被释放到胞质并与感受器蛋白 TORC2 结合, 从而强力激活感受器蛋白 TORC2。Riggi 等<sup>[136]</sup>通过高通量筛选化合物, 识别酵母细胞中特异性干扰 TOR 信号的小分子, 发现棕榈酰肉碱 (Palmitoylcarnitine, PalmC) 能够专一性地通过降低膜张力抑制 TORC2 的活性, 而且对 TORC1 没有抑制作用。进一步在超离心力胁迫适应性进化实验中加入 PalmC 阻断 TORC2 机械力信号通路, 通过细胞表型、TORC2 机械力信号中重要基因的转录水平和激酶 Ypk1 的磷酸化程度的变化, 探究 TORC2 信号通路在响应外界超离心力并调控下游生理代谢的重要作用。

PalmC 是一种作用时间极短、依赖剂量的 TORC2 活性抑制剂<sup>[136]</sup>。因此在实验中, 在超离心刺激前即刻加入足够剂量 (10  $\mu$ M) 的 PalmC 抑制剂, 在最大离心力 53,000 g 条件下进行刺激。为了使实验现象与对照组区分更为明显, 将实验进程拉长便于观察细胞表型变化, 将离心时间设置为 10 min。该实验设置平行实验组避免误差。根据图 3.11 所示, 对照组中不添加 PalmC 抑制剂, 细胞在超离心力刺激到第 15 代时细胞体积开始

明显增大、胞内充满致密的油脂小体，感受器下游激酶 Ypk1 及其下游控制的油脂合成相关基因的转录水平显著提高（图 3.12a），Ypk1 的磷酸化程度增加（图 3.12b）；实验组添加 PalmC，细胞超离心力刺激至 20 代，细胞形态没有显著变化（图 3.11），Ypk1 及其下游油脂合成基因转录水平基本无变化（图 3.12a），Ypk1 的磷酸化程度较低、与没有进行超离心刺激的出发菌株基本一致（图 3.12b）。结果表明在 TORC2 活性受到抑制时超离心力刺激的信号传递基本被中断，进一步支撑了 TORC2 机械力信号途径参与了超离心力刺激信号传递对于油脂代谢的调控作用。我们认为，超离心力作为强大的机械力胁迫激活了 TORC2 机械力信号通路，导致效应基因—油脂合成相关基因的活跃，显著增加的油脂含量和细胞体积也会使得细胞膜张力增加，使更多激活因子 Slm1/2 被释放到胞质，进而激活下游机械力响应通路中的效应基因，使表型稳定。

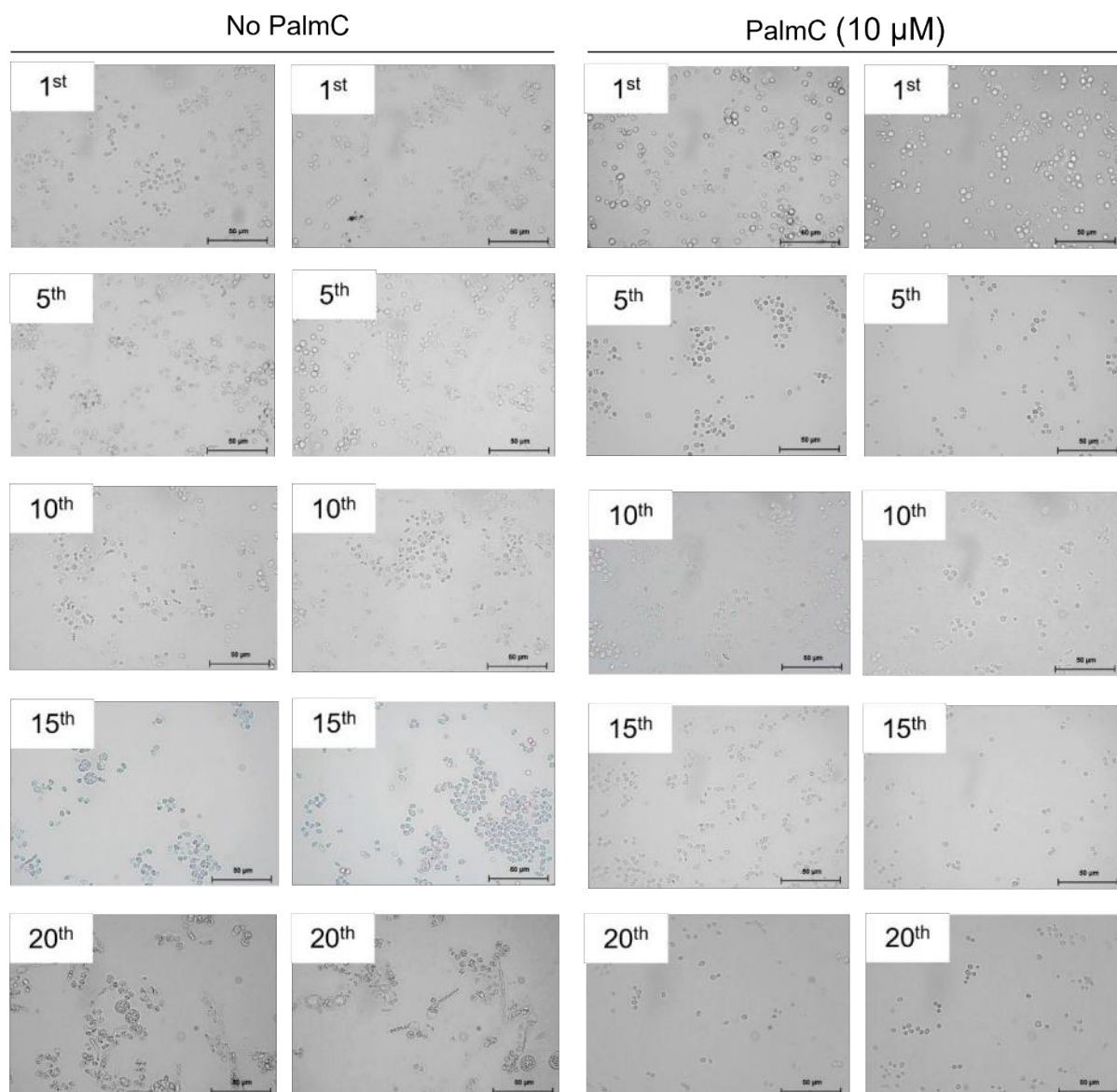
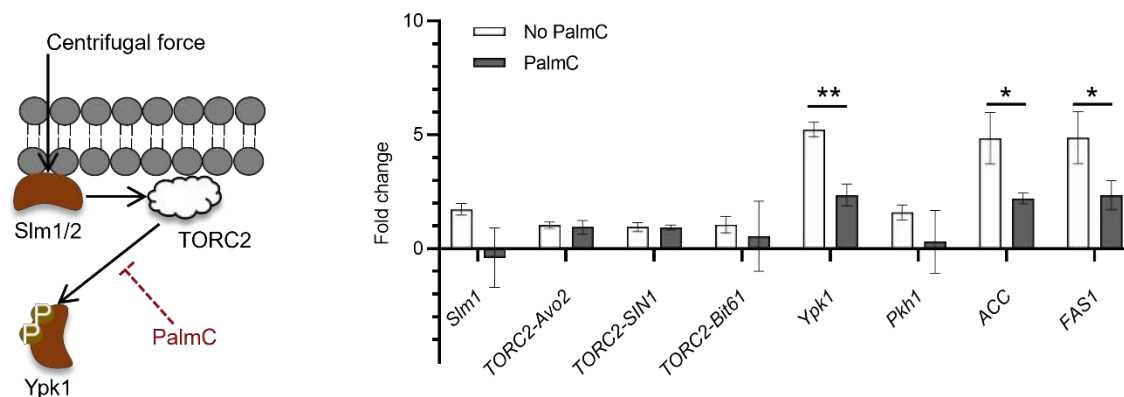


图 3.11 TORC2 抑制剂 PalmC 条件下的 *T. cutaneum* 超离心力胁迫适应性进化

Fig. 3.11 Ultra-centrifugation force stress of *T. cutaneum* under the TORC2 inhibitor PalmC during the adaptive evolution

实验条件: PalmC 抑制剂条件下的超离心力胁迫进化中在每次超离心刺激前加入 10  $\mu$ M PalmC 后立即离心刺激, 其余步骤与超离心力胁迫进化一致

(a) The transcriptional levels of genes related to TORC2



(b) The phosphorylation levels of Ypk1

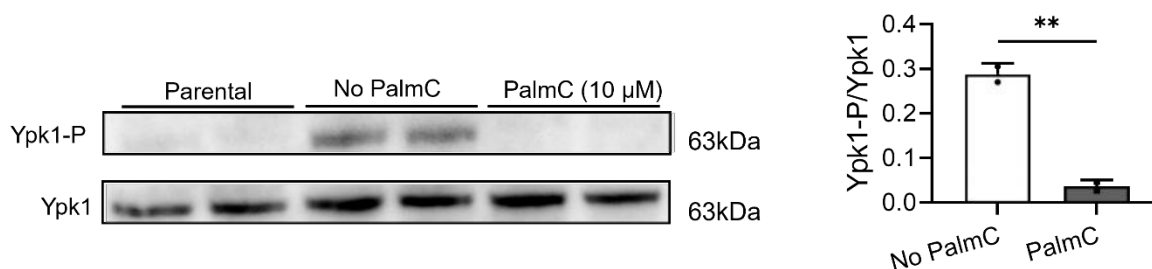


图 3.12 TORC2 抑制剂 PalmC 条件下的 TORC2 机械力信号通路

Fig. 3.12 TORC2 mechanical force signaling pathway under TORC2 inhibitor PalmC: (a) The transcriptional levels of genes related to TORC2 mechanical force signaling pathway; (b) The phosphorylation levels of Ypk1. The gene expression levels were normalized against the parental strain *T. cutaneum* ACCC 20271. Each RT-qPCR was performed at least three times (\*,  $P \leq 0.05$  and \*\*,  $P \leq 0.01$  between the evolved strain and parental, by Student's t test).

实验条件: PalmC 抑制剂条件下的超离心力胁迫进化获得的菌株在活化后转移至合成培养基分别培养 12 h 和 36 h 进行 RT-qPCR 实验和 Western blot 实验

### 3.3.5 皮状丝孢酵母抗生素抗性筛选和营养缺陷型筛选的基因操作系统的初步探究

尽管通过 WB 实验、转录分析、TORC2 抑制剂添加下的超离心力胁迫等实验基本证实了机械力信号转导通路 Slm1/2-TORC2-Ypk1 在细胞响应外界超离心力胁迫中有重要作用, 但缺乏在胞内更为直接的证据。为了更加充分的验证该信号通路的重要性, 我们尝试对激活因子 Slm1/2 或核心激酶 Ypk1 进行直接敲除, 再进行超离心力适应性进化验证猜想。

皮状丝孢酵母属于环境微生物、非常规酵母, 其具有较强的抗逆性, 目前仍未有文献研究报道其基因操作系统的成功构建, 这极大增加了该工作的难度。首先, 在搭建基因操作系统构建载体质粒时, 需要根据实验条件和后续的筛选方法选择合适的筛选标记。真菌常用的抗生素筛选标记有潮霉素、G418、博来霉素和诺尔丝菌素。首先探究皮状丝

孢酵母野生菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 对以上 4 种抗生素的敏感性以确定合适的抗性筛选标记 (图 3.13a)。结果表明, 皮状丝孢酵母对 4 种抗生素均不敏感, 在各抗生素浓度为 800  $\mu\text{g/ml}$  的基础培养基中仅培养 36 h, OD600 均能达到 1 左右。相比之下, 潮霉素和 G418 的抑制效果相对较好, 潮霉素在浓度达到 800  $\mu\text{g/ml}$  时, OD600 降至 1 以下。根据在不同浓度潮霉素和 G418 平板上的划线的结果 (图 3.13b), *T. cutaneum* 对潮霉素更敏感, 潮霉素的工作浓度确定为 950  $\mu\text{g/ml}$ 。

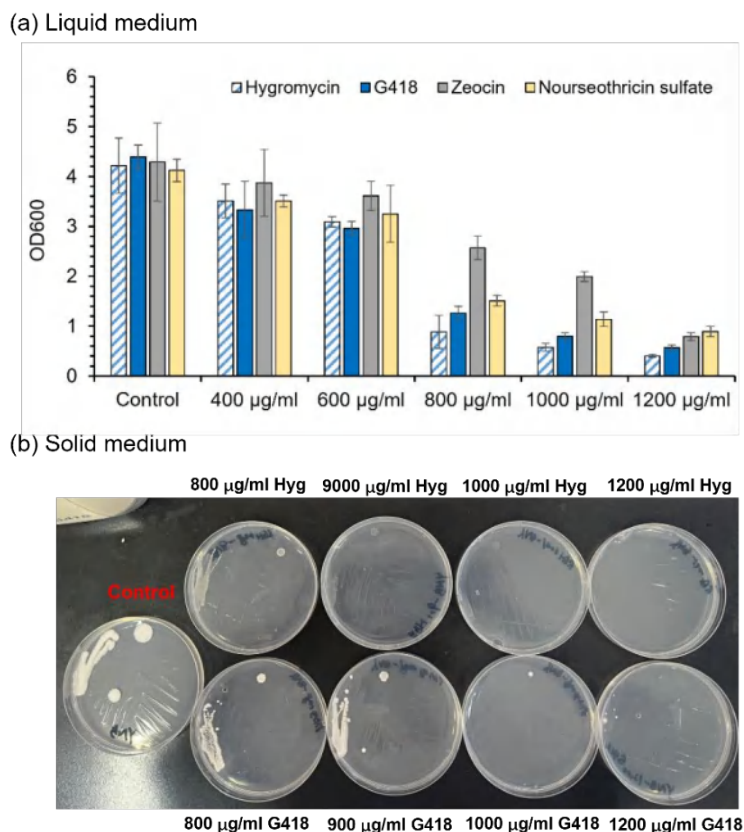


图 3.13 *T. cutaneum* ACCC 20271 对不同抗生素敏感性的测试

Fig. 3.13 Susceptibility of *T. cutaneum* ACCC 20271 to different antibiotics: (a) Sensitivity testing in liquid medium; (b) Sensitivity testing in solid medium

实验条件: 菌株活化后分别转接至 MM 液体培养基、在固体 MM 培养基上划线, 培养 36 h 后检测 OD600 以及观察生长情况。

进一步以潮霉素磷酸转移酶基因 (Hygromycin B phosphotransferase gene, *HPH*) 作为抗性筛选基因构建基因操作系统。首先尝试较为简单的同源双交换基因操作系统 (图 3.14a)。转化后对在含有 950  $\mu\text{g/ml}$  潮霉素的筛选板长出的单菌落进行 *URA3* 基因、*HPH* 基因和左右交叉验证。经过 5 轮以上的转化和验证均未获得 *URA3* 基因敲除的转化子。下一步, 尝试构建 CRISPR-Cas9 基因编辑系统 (图 3.14b)。编辑质粒 pCRISPRtc 的出发质粒为解脂耶氏酵母中编辑效率较高的商业质粒 pCRISPRy1。将出发质粒中的筛选标记更换为 HygR 潮霉素抗性, 并将 Cas9 蛋白基因的启动子和终止子均更换为皮状丝孢酵母内源性的启动子 TEFp 和 CYCt。靶基因选择易于通过表型进行初步筛选的

*URA3* 基因（图中）、*PEX10* 基因（过氧化物酶体生物合成因子 10 基因，编辑后无法利用长链脂肪酸）、*ADE2* 基因（磷酸核糖甲酰胺咪唑羧化酶基因，编辑后嘌呤前体积累使细胞呈粉色）等。每个靶基因均通过 Synthego Design Tool 网站预测设计 3 条以上 sgRNA 序列。但是，多轮实验依旧均未获得靶基因成功编辑的菌株。

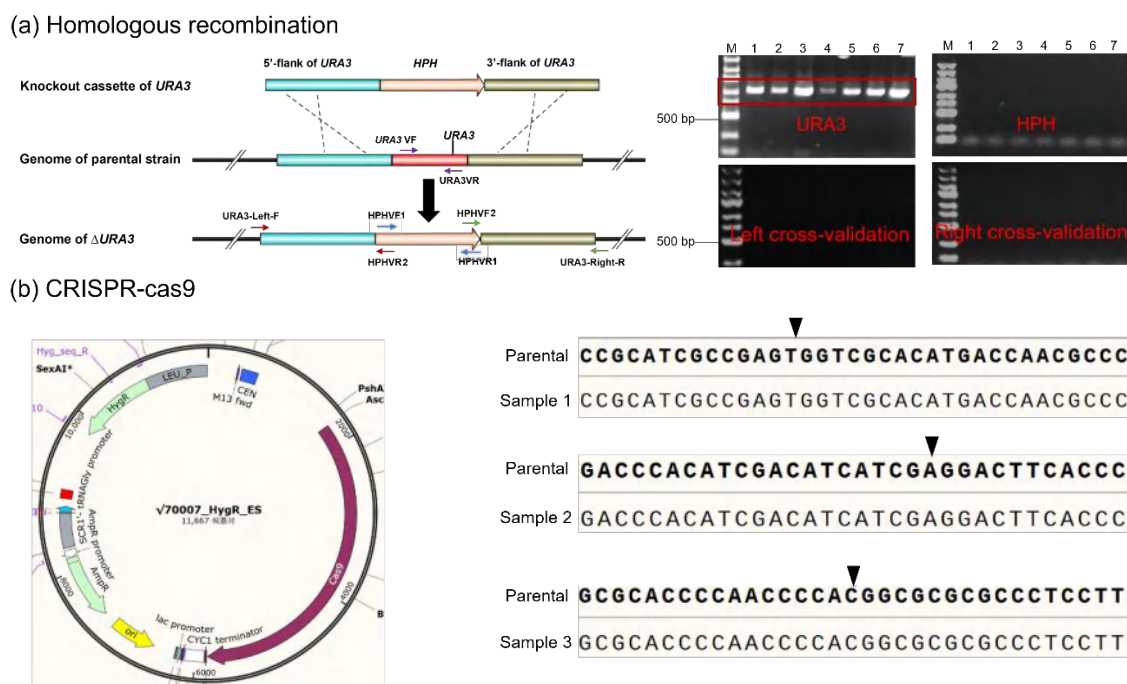


图 3.14 在 *T. cutaneum* ACCC 20271 中探究搭建同源双交换和 CRISPR-Cas9 的基因操作系统  
 Fig. 3.14 Construction of a homologous recombination and CRISPR-Cas9-based gene operating system in *T. cutaneum* ACCC 20271

总结以上实验结果，以潮霉素 *HPH* 抗性基因为筛选标记构建的同源双交换或者 CRISPR-Cas9 基因操作系统，潮霉素的工作浓度已达到 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右，但是转化后仍有假阳性出现，最终均未获得目的基因敲除或者目的基因被成功编辑的转化子。因此，下一步尝试搭建基于营养缺陷型筛选的基因操作系统。*URA3* 是常用的营养缺陷型筛选标记基因，其编码的 5-单磷酸脱羧酶是尿嘧啶合成途径的关键酶，同时可以催化 5-氟乳清酸（5-FOA）合成有细胞毒性的 5-氟尿嘧啶单磷酸盐，因此 *URA3* 基因缺失的突变株在不添加尿嘧啶的培养基（MM 培养基）中无法生长，在添加尿嘧啶的培养基（SM 培养基）和添加 5-FOA 的培养基中可以正常生长。计划通过 NTG（1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍）诱变，将出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 诱变为 *URA3* 营养缺陷型，再利用 *URA3* 作为选择性标记，搭建基因操作系统。

首先进行 NTG 致死率的检测，结果如图 3.15 所示，选择致死率为 90%左右对应的 NTG 浓度为 0.2  $\text{mg}/\text{mL}$ 。NTG 诱变结束后将复苏后的菌液涂布在 0.3% 5-FOA 筛选平板上（图 3.16a），等待长出单菌落后连续进行两次 MM 培养基和 SM（MM 培养基添加尿嘧啶）培养基的正负筛选（图 3.16bc），筛选得到的 *URA3* 基因突变株重新进行 5-FOA 致死性检测以排除假阳性（图 3.16d）并继续进行多代 MM 和 SM 正负筛选以筛选获得

稳定的突变株。获得表型稳定的突变株进行基因测序，共获得了 9 株 URA3 基因对应氨基酸发生变化的突变株（图 3.17）。

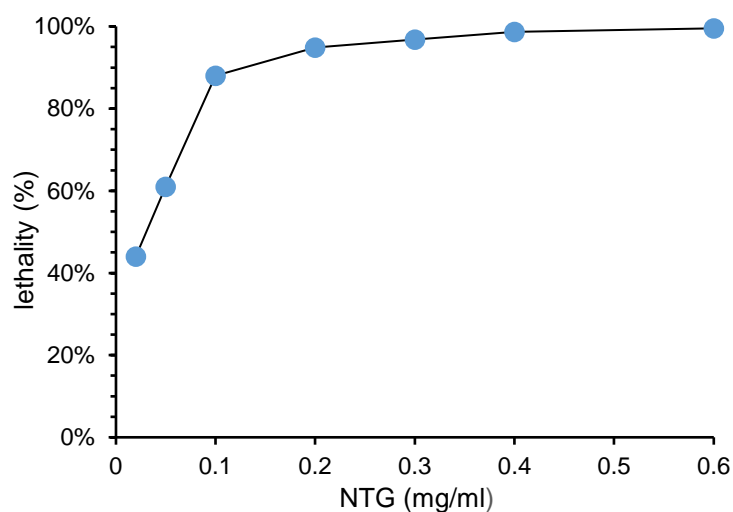


图 3.15 皮状丝孢酵母 NTG 致死率

Fig. 3.15 NTG lethality of *T. cutaneum*

实验条件：致死性实验在 YPD 培养基中进行，NTG 诱变方法见 5.2.4，每次诱变结束后涂布在 YPD 平板上，3 d 后计数菌落并计算致死率

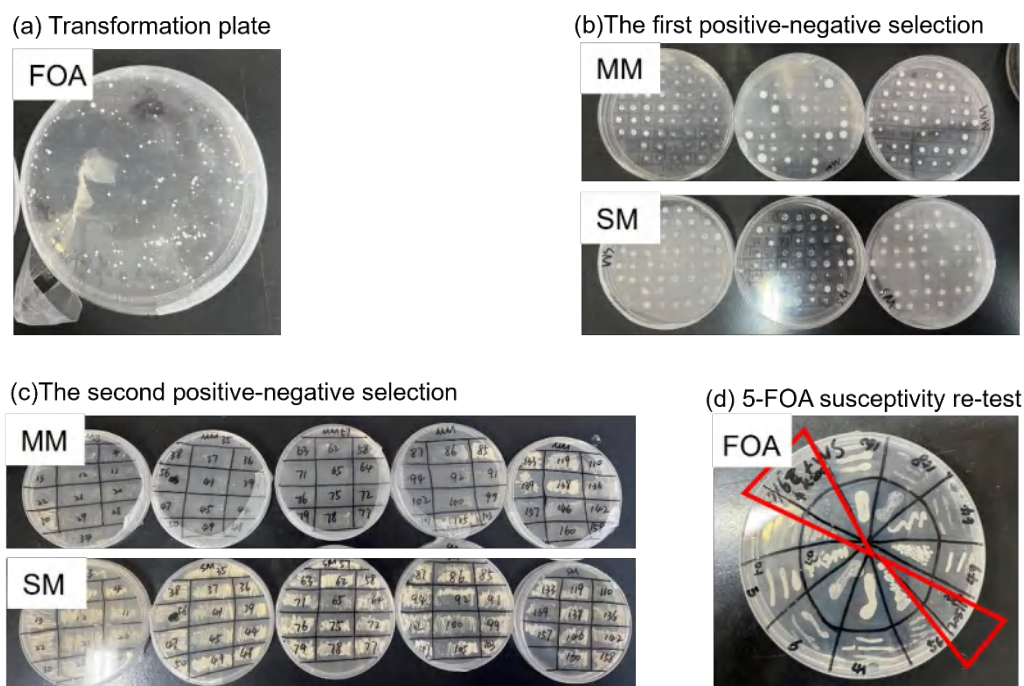


图 3.16 皮状丝孢酵母 URA3 基因突变株的筛选

Fig. 3.16 Screening for URA3 mutant *T. cutaneum* strains: (a) Transformation plate; (b) The first positive-negative selection; (c) The second positive-negative selection; (d) 5-FOA susceptibility re-test.

Colonies circled in red are control strains

实验条件：转化培养和筛选培养在对应的培养基中进行，培养 3 d 直至长出菌落。



图 3.17 URA3 基因突变株中的突变位点

Fig. 3.17 NTG Mutation sites in mutant strains of the URA3 gene

注：6、49、64、158 号转化子 URA3 基因外显子区域有多个突变位点

将生长状态和胞内油脂积累与出发菌株最为接近的 64 号 URA3 突变株作为出发菌株构建皮状丝孢酵母基因表达系统。首先选择构建最简单的游离表达系统，构建表达质粒 pUC19-LEUp-GFP<sub>(NSL)</sub>-URA3 (图 3.18a)。为了排除产油酵母中脂质小体自发荧光对实验的干扰，将 GFP 序列后加入 NSL 核定位信号。通过醋酸锂化学转化法将质粒转入皮状丝孢酵母感受态细胞中。提取质粒经过 PCR 验证后观察 GFP 的表达情况(图 3.18b)，菌丝态的转化子细胞核中有 GFP 绿色荧光，表明该构建质粒能够在皮状丝孢酵母中进行复制并进行基因表达。但是，并不是所有的菌丝均有荧光，可能是由于皮状丝孢酵母染色体外游离的自主复制的质粒拷贝数有限，或者所选择的基于 BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project Searches) 神经网络启动子预测的 LEUp (异丙基苹果酸脱氢酶) 启动基因表达的效果较差。

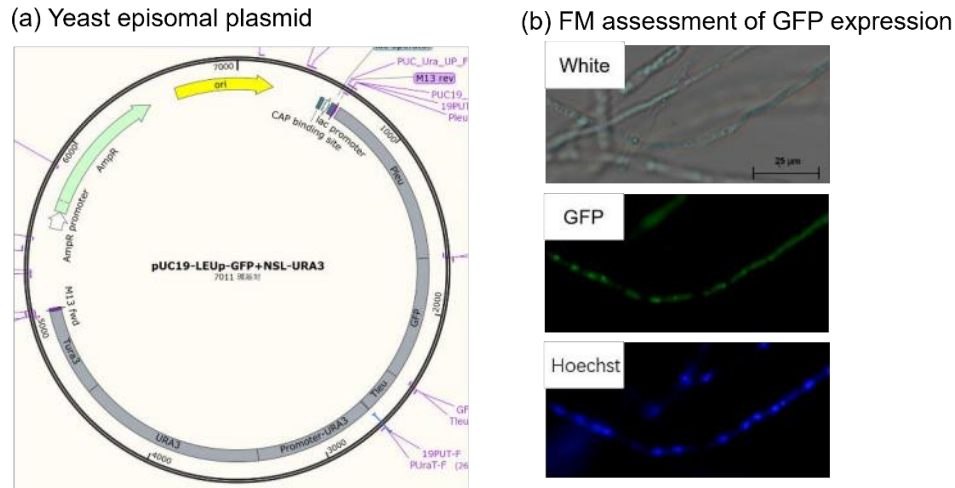


图 3.18 URA3 基因突变株游离表达 GFP 基因

Fig. 3.18 Episomal e

xpression of GFP gene in URA3 gene mutant strain: (a) Yeast episomal plasmid; (b) FM (Fluorescence microscopic) assessment of GFP expression.

实验条件：转化子在 MM 培养基中培养 24 h 收集、洗涤后分别进行白光下的拍摄、暗场中选择蓝色滤色片拍摄 GFP 蛋白定位，暗场中选择紫外滤色片拍摄 Hoechst 染色核定位。

在进行目的基因的表达前需要验证质粒在 URA3 基因突变株中的稳定性，因此对获得的游离质粒转化子进行了连续传代，每代均通过试剂盒提取游离质粒进行 PCR 验证。我们在传代的过程中发现，随着 6 个转化子的传代，质粒开始丢失（图 3.19a）。在液体 MM 培养基培养至第 3 代时，质粒全部丢失。但是，菌株依旧能在不含有尿嘧啶的 MM 培养基中生长，与之对照的出发菌株 URA3 基因突变菌株（64 号突变株）无法在 MM 培养基中生长（图 3.19b）。通过荧光显微镜也无法观察到 GFP 绿色荧光。我们思考出现这样状况可能的原因：（1）出发菌株（64 号 URA3 基因突变株）混有野生型的 *T. cutaneum* ACCC 20217 或者其他 URA3 基因未突变的 *T. cutaneum* 菌株；（2）出发菌株（64 号 URA3 基因突变株）在转化过程中在营养较丰富的完全培养基进行复苏，突变位点发生回复，性状丢失；（3）游离质粒在皮状丝孢酵母中拷贝数较低，连续传代时质粒拷贝数持续降低但仍可以维持尿嘧啶的合成能力。我们对传代后 6 个转化子 URA3 基因突变位点进行检测，发现 URA3 基因突变位点依旧存在，排除了以上（1）和（2）的猜想。对于猜想（3）我们通过将转化子在完全培养基中连续传代进行质粒的丢失，以观察被质粒表达弥补的尿嘧啶合成能力是否随之失去。如果质粒完全丢失，转化子恢复尿嘧啶合成缺陷，说明转化子中可能依旧存在极低拷贝数的游离质粒。结果表明，在完全培养基中连续传代 5 次以丢失质粒后，转化子依旧可以在不含尿嘧啶的培养基中生长。这样的结果目前并没有相对合理的解释，设计这样简单的实验验证猜想（3）并不严谨，有待后续进一步的探究。我们也进一步尝试以 URA3 基因突变株为出发菌株，通过转化高浓度线性化 DNA 片段以避免质粒丢失的问题来进行基因敲除或者过表达，但是多轮实验均未获得稳定遗传的转化子。以上结果说明，皮状丝孢酵母超强的抗逆性、较低的同源双交换效率、高

油脂含量导致的转化效率低下以及缺乏质粒载体构建可参考的基本基因元件，使皮状丝孢酵母进行基因操作系统的搭建非常困难，需要进一步继续探究。

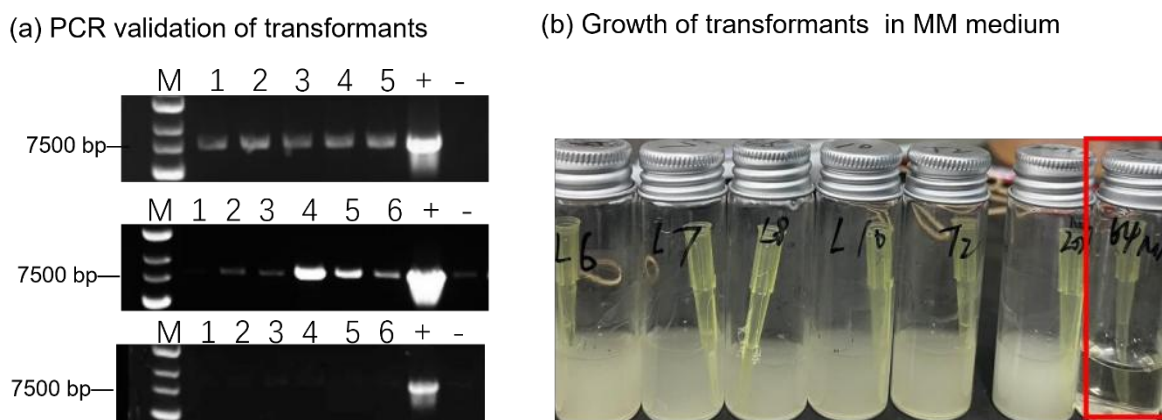


图 3.19 转化子的游离表达质粒在传代中稳定性的检测

Fig. 3.19 Genetic stability of episomal plasmids of transformants in the transfer cultivation

实验条件：转化子在 MM 培养基中进行传代培养，每次培养 24 h 后以 10% (v/v) 接种量转入下一代培养基中连续培养。

注：图 3.19b 中各转化子连续传代 3 次后质粒丢失但是依旧可以在 MM 培养基中生长，红色方框圈出的出发菌株（64 号 URA3 基因突变株）无法在 MM 培养基中生长。

综上所述，相比于解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母，由于皮状丝孢酵母中有完整的 TORC2 机械力信号转导通路基因注释，是进一步进行胞内功能验证的更好的宿主菌株。我们非常希望通过在皮状丝孢酵母中建立可用的基因操作系统，对 TORC2 机械力信号通路中的激活因子 Slm1/2 或核心激酶 Ypk1 进行基因敲除，从而可以更直接的验证该信号通路对细胞传递外界超离心力胁迫刺激的重要作用。但皮状丝孢酵母进行基因操作系统的搭建非常困难，即使获得了皮状丝孢酵母尿嘧啶营养缺陷突变株并可以完成基于营养缺陷筛选的基因游离表达，但是质粒在胞内仍无法稳定存在。

在后续的研究中，我们通过收集了大量 Ypk1 的基因序列，在解脂耶氏酵母中进行序列比对，基本确定了解脂耶氏酵母的 Ypk1 基因和其磷酸化位点。对解脂耶氏酵母原始菌株 *Y. lipolytica* DSM3286 采用 Cre-LoxP 系统和 CRISPR-Cas9 系统进行基因操作，均可以有效实现目的基因的敲除和编辑，如增强同源双交换打靶效率的 *KU70* 基因的敲除和编辑。进一步的研究也成功实现了 TORC2 激活因子 Slm1 基因的敲除。这表明在胞内进一步对 TORC2 机械力信号通路的功能性验证有了良好的宿主和基因操作工具。后续研究我们将尝试在解脂耶氏酵母中敲除或者过表达 Slm1 和 Ypk1 等基因，进一步通过超离心力胁迫适应性进化验证不同工程菌的形态和代谢变化，从而证明该信号通路对传递外界超离心力刺激的重要作用。最终可通过对该信号通路的基因进行过表达或进行蛋白突变，有望实现对该信号通路的人工调控或直接激活，从而挖掘出一类新的用于代谢调控的基因元件。在解脂耶氏酵母的工作将在后续研究中逐步发表。

### 3.4 本章小结

本研究在前期提出的超离心力胁迫适应性进化基础上,探究了产油酵母响应机械力胁迫的关键机制。表征了皮状丝孢酵母在不同超离心力强度适应性进化中的形态生理差异。进一步在其他产油酵母上扩展和验证了超离心力胁迫进化方法的有效性。最后通过差异转录组分析、蛋白质互作网络分析和蛋白磷酸化水平的检测等均揭示了超离心力胁迫下产油酵母细胞巨大的生理变化与 TORC2 机械力信号转导通路有着密切的联系。本章主要的研究结论如下:

(1) 对皮状丝孢酵母野生菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 进行不同强度离心力和离心时间的胁迫刺激后表明,持续时间更长的超离心力胁迫刺激会显著缩短细胞发生形态变化的传代次数并有效提高了油脂含量,这表明细胞存在对外界离心力的响应通路。

(2) 进一步对两株典型的产油酵母菌株圆红冬胞酵母 *R. toruloides* CGMCC 2.1389 和解脂耶氏酵母 *Y. lipolytica* DSM 3286 进行了超离心力胁迫适应性进化,结果表明该方法仍可以实现其细胞体积的增大和油脂含量的提高,这表明产油酵母对外界离心力的响应通路是相对保守的。

(3) 通过转录组学和蛋白互作网络分析挖掘传递超离心力胁迫刺激的重要机械力信号转导通路。对超离心力胁迫适应性进化获得的皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母和圆红冬胞酵母进行差异转录组分析,糖代谢和脂肪酸代谢在三株进化菌株中均较为活跃。糖代谢和脂质代谢中表达量在三株进化菌株中均出现显著上调的 5 个基因(*TKT*、*ACL*、*ACC*、*FAS1*、*FAS2*)可能是超离心力胁迫下机械力信号通路被激活后调控的效应基因。蛋白互作网络分析表明,仅 TORC2 机械力信号通路中核心激酶 Ypk1 与以上 5 个基因编码的蛋白有相互作用关系,其中 Ypk1 与脂肪酸合成酶 FAS1 的物理互作相关性最强,其互作相关性权重值达 0.6 以上。基因转录水平变化结果进一步表明,在超离心力胁迫刺激下, TORC2 机械力信号通路可能被激活,通过关键激酶 Ypk1 调控下游效应基因如 *FAS1* 和 *ACC* 表达上调。

(4) 进一步验证 TORC2 机械力信号通路传递超离心力胁迫信号。生化实验结果表明,经超离心力胁迫刺激时长越长的菌株中 TORC2 底物激酶 Ypk1 的磷酸化程度越高。通过添加机械力信号感受器蛋白 TORC2 特异性抑制剂 PalmC,会导致超离心力胁迫刺激下 Ypk1 磷酸化程度降低,同时细胞对外界超离心力刺激不敏感。以上结果支撑了 TORC2 机械力信号途径参与了超离心力胁迫信号传递对于油脂代谢的调控作用。

(5) 尝试在皮状丝孢酵母中建立可用的基因操作系统,以期进一步在胞内验证 TORC2 信号通路响应外界超离心力胁迫的重要作用。但在皮状丝孢酵母中,通过抗生素抗性筛选的同源双交换基因操作系统和 CRISPR-Cas9 基因编辑系统均未成功搭建。通过诱变获得的尿嘧啶营养缺陷型突变株虽然可以完成游离质粒的表达,但是质粒在胞内仍无法稳定存在。后续研究将在解脂耶氏酵母中对 TORC2 机械力信号通路传递超离心力胁迫刺激的重要性进行进一步的探究。

## 第4章 水解液中超离心力胁迫适应性进化构建高抑制物耐受性皮状丝胞酵母

### 4.1 引言

由产油酵母生产的微生物油脂被认为是生物柴油或者油脂化学品原料的最具潜力的替代品<sup>[257-259]</sup>。微生物油脂的生产总成本中超过 70%与发酵原料和基质有关<sup>[260, 261]</sup>。为了降低原料成本,目前主要的研究方向是利用生物炼制工艺从廉价的木质纤维素生物质中生产微生物油脂<sup>[262]</sup>。首先,预处理是改变木质纤维素组分以后持续释放可发酵糖的重要步骤<sup>[179]</sup>。然而,在预处理操作过程中,纤维素、半纤维素和木质素的过度降解会产生呋喃醛、有机酸和酚醛等有毒化合物。这些有毒化合物对下游发酵过程中产油酵母的生长和代谢有很强的抑制作用<sup>[263, 264]</sup>。为了消除预处理后生物质中的有毒化合物,采用了各种化学或物理的脱毒方法。然而,这些方法大多存在一些缺点,如可发酵糖的损失等<sup>[265, 266]</sup>。利用特殊微生物进行生物脱毒被认为是最合适的方法之一。本实验室开发的利用真菌如树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 等进行生物解毒,可有效去除 5-羟甲基糠醛(HMF)、糠醛和乙酸,且可发酵糖的损失可忽略不计(低于 2%)<sup>[222]</sup>。然而,脱毒菌株降解木质素衍生的酚醛时,(以 4-羟甲基苯甲醛(4-HBA)、香草醛和丁香醛为代表),生物脱毒速度较慢、脱毒不彻底,不可避免地会造成可发酵糖的额外损失<sup>[223]</sup>。

代谢工程和适应性化是提高产油酵母对抑制物耐受性的有效工具<sup>[212, 267]</sup>。但是代谢工程往往难以平衡细胞生长、脂质合成和抑制物耐受性这三个重要因素<sup>[268]</sup>。与代谢工程相比,适应性进化在选择压力下通过多代培养更容易实现这三者的平衡。在选择压力下,优良的细胞表型得以保持,而不理想的性状逐渐被淘汰。细胞在迭代培养中可重新配置其新陈代谢,以逐步强化不断进化后的性状<sup>[269]</sup>。因此,在含有抑制物的培养基中进行适应性进化可以提高产油酵母对酚醛抑制物的耐受性<sup>[195, 270]</sup>。然而,在已报道的适应性进化研究中,抑制物耐受性的提高和脂质积累的增强通常是不同步的。除了在含有抑制物的培养基中进行适应性进化外,需要进一步加强对细胞的突变和筛选,因此引入一种高效的突变和筛选方法,从而同时提高产油酵母对抑制物的耐受性和脂质的积累。

在之前的研究中创新性地提出的一种简易、有效的超离心力胁迫适应性进化的方法,对皮状丝胞酵母进行了高效的突变和全通量精准筛选。本研究进一步将超离心力胁迫和抑制物两个胁迫因素叠加,在含有低浓度酚醛抑制物的玉米秸秆水解液中进行皮状丝胞酵母的超离心力胁迫适应性进化,旨在提高其对酚醛抑制物的耐受性,也可同时提高产油酵母细胞的脂质合成。最后,转录分析进一步揭示了最终获得的菌株其抑制物耐受性增强和脂质合成能力提高的重要基因。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 菌株和培养基

*T. cutaneum* ACCC 20271 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心，作为亲本进行适应进化。其全基因组已上传 DDBJ/EMBL/GenBank，编号为 LTAL00000000<sup>[45]</sup>。

*Paecilomyces variotii* FN89 保藏编号为 CGMCC 17665，用于生物脱毒<sup>[222]</sup>。

相关培养基见 2.2.1

### 4.2.2 生物质原料和试剂

玉米秸秆采收于 2019 年，产自河南省南阳市，根据 NREL LAP 组分测定方法，测得玉米秸秆纤维素含量为 33.9 (w/w)，半纤维素含量为 17.8% (w/w)。玉米秸秆物料磨碎后需经本实验室建立的干酸预处理和生物脱毒进行处理，具体方法见 2.2.3。

纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自诺维信（北京）生物技术有限公司。香草醛，丁香醛，4-羟甲基苯甲醛，葡萄糖等其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 4.2.3 玉米秸秆水解液的制备

接种脱毒菌株 *P. variotii* FN89 对预处理过后的玉米秸秆进行固态生物脱毒，预处理和生物脱毒方法见 2.2.3。在生物脱毒过程中，包括乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛内的抑制物在 36 h 内被迅速去除，但仍有约 20% 的酚醛抑制物残留，其中包括 4-羟甲基苯甲醛、香草醛和丁香醛。脱毒后，添加 5.5 mg/g 纤维素酶，在 20% (w/w) 的固含量、50°C 条件下水解残留有酚醛抑制物的玉米秸秆原料，水解过程持续 48 h。水解后得到的浆液经离心和过滤后收集澄清的上清液，并加入营养盐见 2.2.1。该玉米秸秆水解液含有 80.1 g/L 葡萄糖、21.2 g/L 木糖、0.8 g/L 半乳糖、2.0 g/L 甘露糖和 0.8 g/L 和阿拉伯糖。经检测该水解液残留有 0.08 g/L 4-羟甲基苯甲醛、0.13 g/L 香草醛和 0.07 g/L 丁香醛。

### 4.2.4 水解液中的超离心力胁迫适应性进化

在固含量为 20% (w/w) 的玉米秸秆水解液中培养 *T. cutaneum* ACCC 20271，培养 5 d 结束后取 20 mL 液体于离心机 (Bechman Coulter Avanti J-26 XP) 中离心 3 min。整个适应性进化共进行 70 次离心转接，离心力从 1,000 g 逐渐增加到 12,000 g。油脂含量较高的细胞密度较轻，因此离心胁迫筛选后油脂含量较高的细胞会漂浮在液面上层，移取 5 mL 含有较轻细胞的上层液体作为下一轮培养的种子。将最终获得的细胞悬液在 YPD 平板上分离出单个菌落，该单拷贝菌落表现出稳定的表型特征，被命名为 *T. cutaneum* MS28。

*T. cutaneum* 菌株活化后将其在合成培养基上培养 24 h，然后稀释至 OD<sub>600</sub> 为 1.0。随后将细胞悬液按 0×、10×、100×和 1000×梯度稀释。用移液枪吸取 4 μL 稀释后的种子液滴加到含有不同酚醛抑制物 (4-羟甲基苯甲醛、香草醛和丁香醛) 的合成培养基平板上培养 3 d。

#### 4.2.5 细胞体积和密度的测量

细胞体积和密度的计算见 2.2.7

#### 4.2.6 细胞壁组分检测

细胞壁中葡聚糖、甘露聚糖几丁质组分的测定见 2.2.6

#### 4.2.7 微生物油脂发酵

出发菌株和突变菌株 *T. cutaneum* MS28 的种子活化见 2.2.11。

同步糖化共发酵发酵 (SSCF) 微生物油脂发酵的方法见 2.2.11。

#### 4.2.8 微生物油脂的检测

油脂的提取采用氯仿-甲醇提取法，具体方法见 2.2.12

#### 4.2.9 RT-qPCR

在 30°C 下，在玉米秸秆水解液中培养出发菌株和突变菌株 *T. cutaneum* MS28，培养 24 h 后收集细胞。参照 2.2.6 的方法进行 RNA 提取和定量、逆转录反应和 RT-qPCR 实验。RT-qPCR 所用引物见附录 I 中表 3。

#### 4.2.10 分析方法

葡萄糖、木糖、4-羟甲基苯甲醛、香草醛、丁香醛等使用 HPLC (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) 检测，色谱柱为 Bio-Rad HPX-87H，采用示差检测器 (RID-10A)，流动相为 5 mM 硫酸，流速为 0.6 mL/min，柱温为 65°C。

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 皮状丝孢酵母在水解液中的超离心力胁迫适应性进化

整个适应性进化过程在玉米秸秆水解液中进行，共持续 350 天（合计 70 次转接）。离心力从 1,000 g 逐步增加到 12,000 g（图 4.1a）。皮状丝孢酵母细胞的脂质含量从最初的 23.3% 大幅度提高到 76.8%（图 4.1b）。进化过程中细胞干重从 7.6 g/L 逐渐提高到 15.5 g/L（图 4.1c）。最终获得的细胞性状改变巨大且遗传稳定的突变菌株其脂质含量较高，其细胞密度较低，甚至低于玉米秸秆水解液的密度（表 4.1）。随着离心转接的进行，离心后的细胞团逐渐从发酵液底部“移动”到发酵液上层（图 4.1d）。

与此同时，长周期的离心力适应性进化也改变了皮状丝孢酵母的细胞形态。光学显微镜观察显示（图 4.1e），进化菌株 *T. cutaneum* MS28 呈现较大的椭圆形，而出发菌株则为小球状。进化菌株 *T. cutaneum* MS28 的平均细胞体积是出发菌株的 14 倍（ $1.39 \times 10^{-15} \text{ m}^3$  vs.  $9.70 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ ）（表 4.1）。切片电镜观察显示（图 4.1f），脂质小体几乎占据了进化菌株 *T. cutaneum* MS28 的整个胞内空间，且细胞壁比出发菌株明显变薄。

表 4.1 *T. cutaneum* MS28 与出发菌株的细胞参数比较Table 4.1 Cell parameters of *T. cutaneum* MS28 compared to parental strain in hydrolysate.

	Parental	<i>T. cutaneum</i> MS28
Cell radius (m)	$2.85 \times 10^{-6}$	$6.93 \times 10^{-6}$
Cell volume (m <sup>3</sup> )	$9.70 \times 10^{-17}$	$1.39 \times 10^{-15}$ (~14 folds)
Cell density (kg/m <sup>3</sup> )	1156.3	992.1 (lower than broth) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> The density of clarified hydrolysate was 1025.6 kg/m<sup>3</sup>.

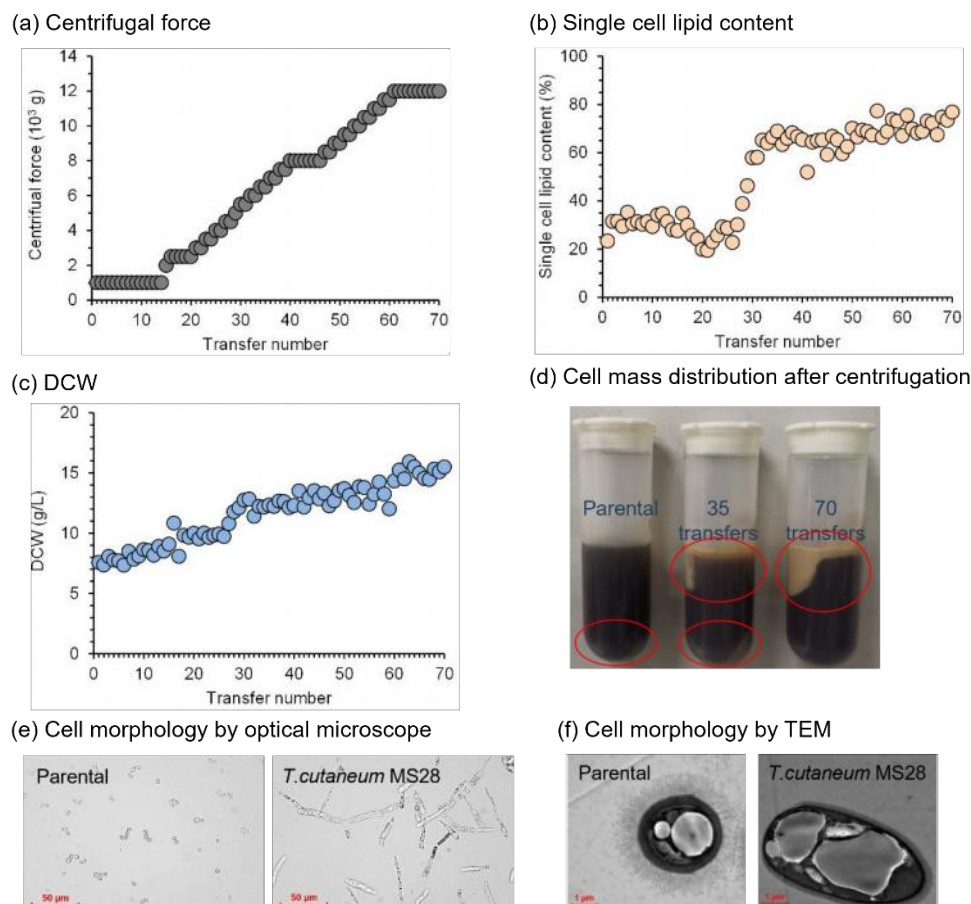
图 4.1 在玉米秸秆水解液中的 *T. cutaneum* 超离心力胁迫适应性进化

Fig. 4.1 Adaptive evolution of *T. cutaneum* in corn stover clarified hydrolysate combined with centrifugation stress: (a) The changes of centrifugal force; (b) The changes of single cell lipid content; (c) The changes of dry cell mass; (d) The cell mass distribution after centrifugation; The morphology of *T. cutaneum* by optical microscope (e) and TEM (f)

实验条件：适应性进化具体方法如 4.2.4 所示；显微镜观察中样本的制备方法如 2.2.7 所示。

#### 4.3.2 突变菌株抑制物耐受性的检测

在生物炼制的脱毒环节中，脱毒菌株如树脂枝孢霉等虽然能够降解多数抑制物，但是对于酚类化合物（HBA、香草醛和丁香醛等）降解能力较差，并不能将其完全脱除，因此产油酵母发酵菌株酚类耐受能力的提高至关重要。在合成培养基中添加 HBA、香草醛、丁香醛和混合酚醛抑制物，用来评价 *T. cutaneum* MS28 对抑制物的耐受性（图 4.2）。在单独测试的三种木质纤维素来源的酚醛抑制物中，HBA 对 *T. cutaneum* 菌株的生长抑

制作用较强（图 4.2a）。在添加单一或混合抑制物的情况下，*T. cutaneum* MS28 的菌体生长和油脂含量均高于出发菌株。相比于出发菌株，*T. cutaneum* MS28 分别在 HBA、香草醛、丁香醛为碳源的培养基上干重和油脂产量增加了 19.4%和 73.9%、64.5%和 94.1%以及 87.5%和 81.3%（图 4.2a, b, c）。在三种主要的酚醛抑制物中，丁香醛对 *T. cutaneum* 具有较高的毒性，并且其在预处理后的木质纤维素原料中含量较高<sup>[271]</sup>，在水解液中长期进化后，*T. cutaneum* MS28 在香草醛中油脂的积累能力显著提高（图 4.2b）。实验证明了 *T. cutaneum* MS28 在三种酚醛抑制物存在下均具有更高的细胞活力和油脂积累能力。

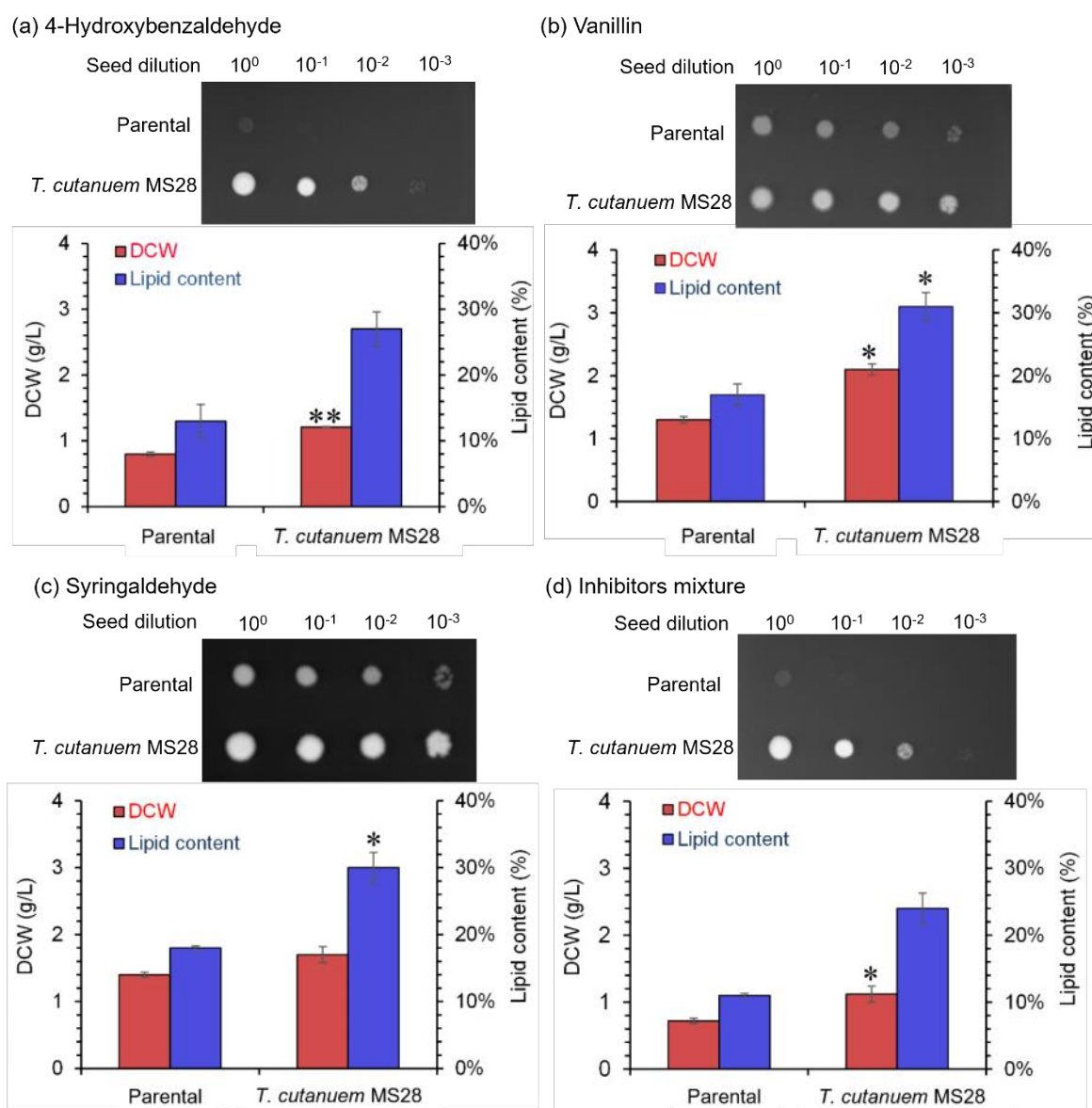


图 4.2 *T. cutaneum* MS28 在合成培养基中对酚醛抑制物耐受性评价

Fig. 4.2 Phenolic aldehyde inhibitors tolerance of *T. cutaneum* MS28 in synthetic medium: (a) 0.6 g/L 4-HBA; (b) 0.5 g/L vanillin; (c) 0.5 g/L syringaldehyde; (d) above inhibitors mixture (\*,  $P \leq 0.05$  and \*\*,  $P \leq 0.01$  between the mutant strain and parental, by Student's t test)

实验条件：在 YPD 培养基中活化 24 h 后，抑制物耐受性实验在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，在 30°C，180 rpm 的条件下培养 120 h

进一步从基因转录水平的角度进一步探究 *T. cutaneum* MS28 显著增强的抑制物耐受能力。*T. cutaneum* MS28 对酚醛抑制物耐受性的提高有很大可能与酚醛降解相关基因的转录变化有关。在酚醛抑制物降解过程中,其首先被醇脱氢酶或者醛还原酶通过可逆反应转化为相应的醇类化合物,然后低浓度酚醛在醛脱氢酶的作用下转化为相应的酚酸(图 4.3a)。对酚醛抑制物转化相关的基因进行了转录水平的测定(图 4.3b-d)。结果表明,与出发菌株相比 *T. cutaneum* MS28 编码醛脱氢酶的基因普遍上调了 2 倍以上。编码醛脱氢酶的基因 *Trcu\_01775* 显著上调了 18.8 倍,该基因表达量的显著提高可能在酚醛抑制物的转化上起到了重要作用,进而提高了 *T. cutaneum* MS28 的酚醛抑制物耐受性。

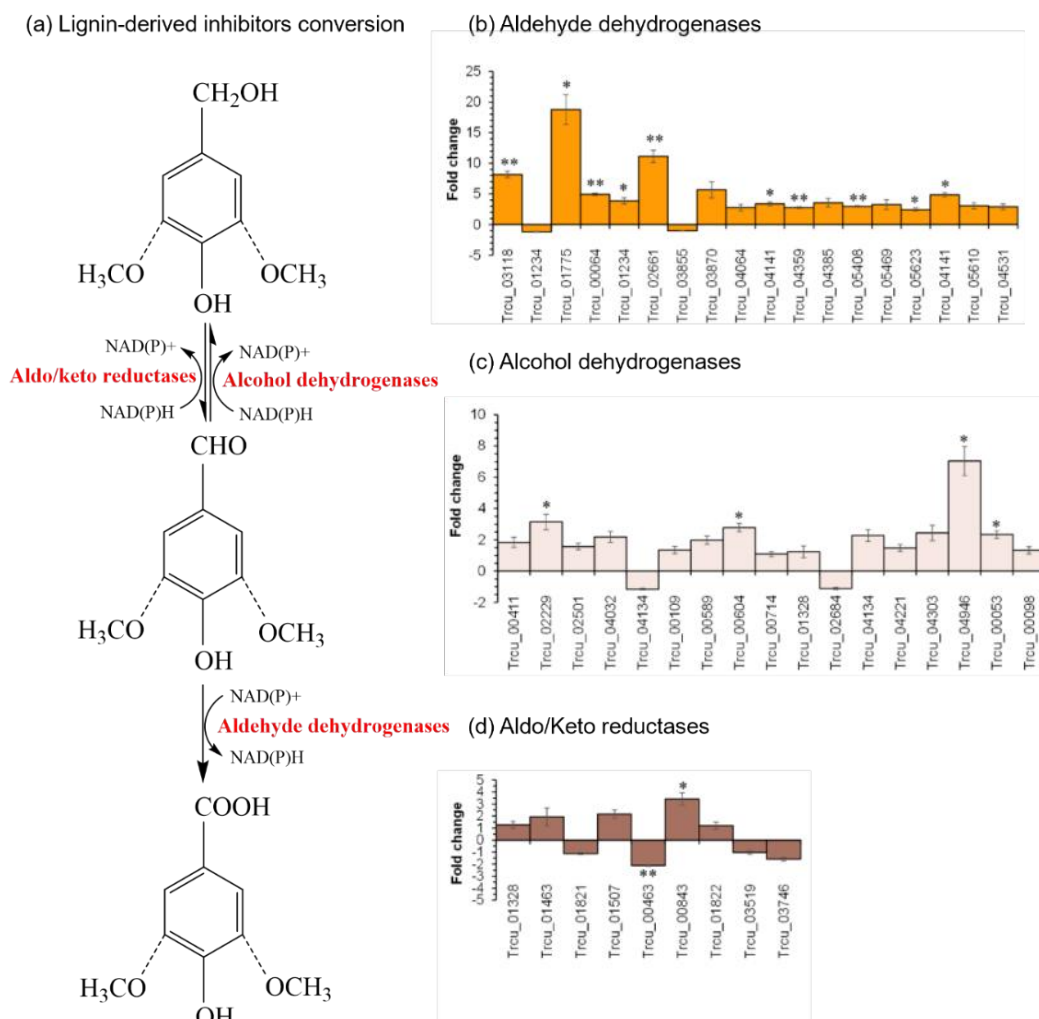


图 4.3 *T. cutaneum* MS28 中与酚醛转化有关基因的转录分析

Fig. 4.3 Transcriptional analysis of the genes responsible for phenolic aldehyde conversion in *T. cutaneum* MS28: (a) The pathway of lignin-derived inhibitors conversion; (b) The differential expressions of aldehyde dehydrogenases; (c) The differential expressions of alcohol dehydrogenases; (d) The differential expressions of aldo/keto reductase. Each RT-qPCR was performed at least three times (\*,  $P \leq 0.05$  and \*\*,  $P \leq 0.01$  between the mutant strain and parental, by Student's t test).

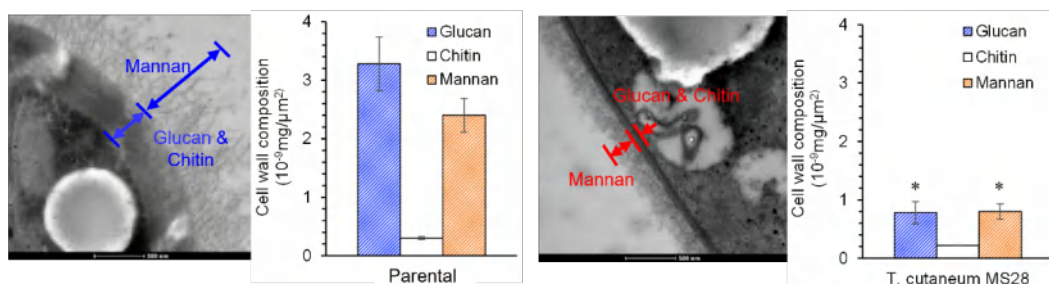
实验条件: 菌株活化后转接至玉米秸秆水解液, 培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行, 30°C, 180 rpm 的条件下培养 24 h, 提取 mRNA 反转录进行 RT-qPCR 实验。

### 4.3.3 突变菌株细胞壁组分的改变

酵母细胞壁主要由 $\beta$ -葡聚糖、甘露聚糖、几丁质和蛋白质组成。细胞壁的组成和结构会随着环境压力的变化而发生动态变化。Gu等<sup>[272]</sup>发现,在多种酚酸抑制物存在的情况下,酿酒酵母经过适应性进化后,相比于出发菌株,进化菌株的细胞壁和细胞膜更厚,而细胞体积更小。前期关于超离心力胁迫适应性进化的研究发现,长期反复作用的超离心力作为强大的胁迫因素使细胞壁变薄、脆弱有利于获得体积更大的进化细胞。本研究中将抑制物胁迫和超离心力胁迫筛选相结合,以期获得抑制物耐受力增强且有利于脂质体积的更大体积的进化细胞。皮状丝孢酵母细胞通过在水解液中的长周期超离心力胁迫适应性进化后,通过透射电镜(TEM)观察发现,*T. cutaneum* MS28 菌株细胞壁的甘露聚糖层、葡聚糖层和几丁质层显著变薄(图 4.4ab)。进一步的测定表明,相比于出发菌株,进化菌株细胞壁的葡聚糖、几丁质和甘露聚糖含量分别减少了 76.2%、26.7%和 66.7%。目前从产油酵母中提取油脂要首先经过细胞裂解,但由于细胞壁中含有较高的葡聚糖和几丁质而导致细胞壁变得坚硬而难以破碎。通过长周期超离心力胁迫,使进化菌株中的葡聚糖和几丁质含量降低,细胞壁变薄,这将有利于微生物油脂工业化生产中的细胞裂解和脂质提取。

通过 RT-qPCR 进一步测定了与细胞壁成分合成和降解相关基因的转录水平变化(图 4.4c)。结果表明,*T. cutaneum* MS28 中编码 1,3(4)- $\beta$ -葡聚糖酶、内切葡聚糖酶 C、几丁质酶和 1,2- $\alpha$ -甘露糖苷酶的基因 *Trcu\_02840*、*Trcu\_03502*、*Trcu\_02203* 和 *Trcu\_01427* 分别显著上调了 13.1 倍、8.4 倍、5.1 倍和 6.5 倍。而编码与几丁质和甘露糖合成有关的几丁质合成酶、甘露糖-1-磷酸转移酶和甘露糖转移酶基因 *Trcu\_04533*、*Trcu\_01890* 和 *Trcu\_02036* 则分别下调了 2.6 倍、1.6 倍和 1.1 倍。这些参与细胞壁组分合成和降解的相关基因的转录水平变化,促进了细胞壁结构在高强度离心力胁迫下的重塑以获得细胞体更易拉伸、体积更大的进化细胞。

(a) Cell wall morphology and composition



(b) Transcriptional level of the genes responsible for synthesis and degradation of cell wall in evolved strain

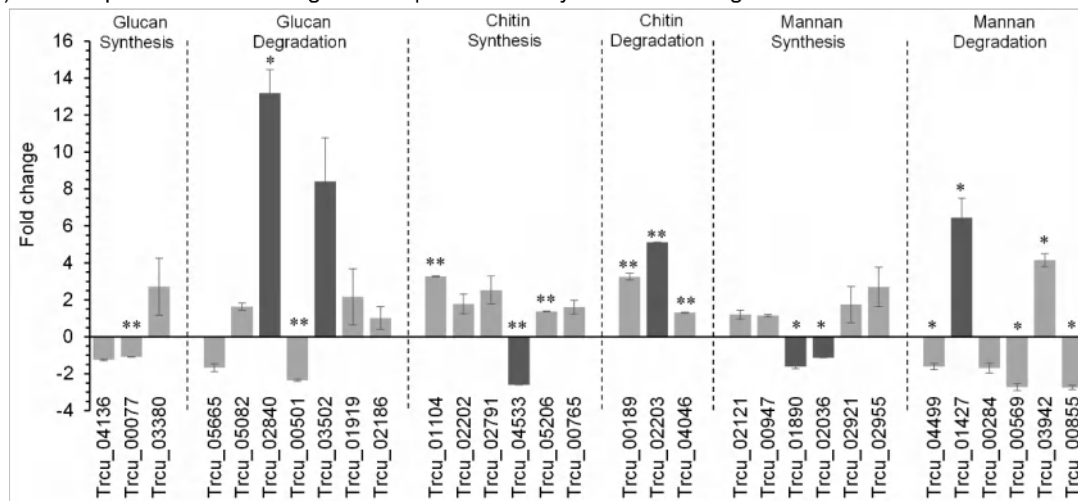


图 4.4 长周期超离心力胁迫适应性进化后细胞壁特征的变化

Fig. 4.4 Long-term adaptive evolution changed the cell wall characterizations: (a) Cell wall structure and compositions. (b) Transcriptional level changes of the genes related to cell wall component synthesis and degradation. The gene expression levels were normalized against the parental strain *T. cutaneum* ACCC 20271. Each RT-qPCR was performed at least three times (\*,  $P \leq 0.05$  and \*\*,  $P \leq 0.01$  between the mutant strain and parental, by Student's t test)

实验条件：菌株活化后转接至固含量为 20% (w/w) 玉米秸秆水解液，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 24 h，提取 mRNA 反转录进行 RT-qPCR 实验，（投射显微镜的制片和拍摄见 2.2.7）。

#### 4.3.4 以玉米秸秆为原料的纤维素油脂发酵评价

使用玉米秸秆为原料评价了出发菌株和进化菌株 *T. cutaneum* MS28 生产纤维素油脂的发酵指标 (图 4.5)。由于培养基中存在大量木质素固体残渣，因此无法进行细胞生长情况的测定。在 72 h 的同步糖化与发酵 (SSCF) 过程中，突变菌株 *T. cutaneum* MS28 消耗了包括葡萄糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖在内的所有可发酵糖 (图 4.5a-d)，最终纤维素油脂产量达到了  $33.8 \pm 0.1$  g/L，是出发菌株的 6 倍左右 ( $5.9 \pm 0.5$  g/L) (图 4.5e)。 *T. cutaneum* MS28 的油脂得率达到理论得率的 82% 以上 (油脂的理论得率为 0.33 g/g 糖)，油脂产率为 11.3 g/L/d。将进化菌株 *T. cutaneum* MS28 从木质纤维素原料生产油脂的性能与其他研究进行了比较 (表 4.2)。进化菌株 *T. cutaneum* MS28 在油脂产量、产率和得率方面均有一定优势。虽然目前有些关于产油酵母油脂发酵工艺的研究通过分批补料的方式获得了相对较高的油脂产量，但制备含高浓度糖的木质纤维素水解液通常需要进行

高能耗的固液分离和浓缩操作，导致其生产成本大大增加。

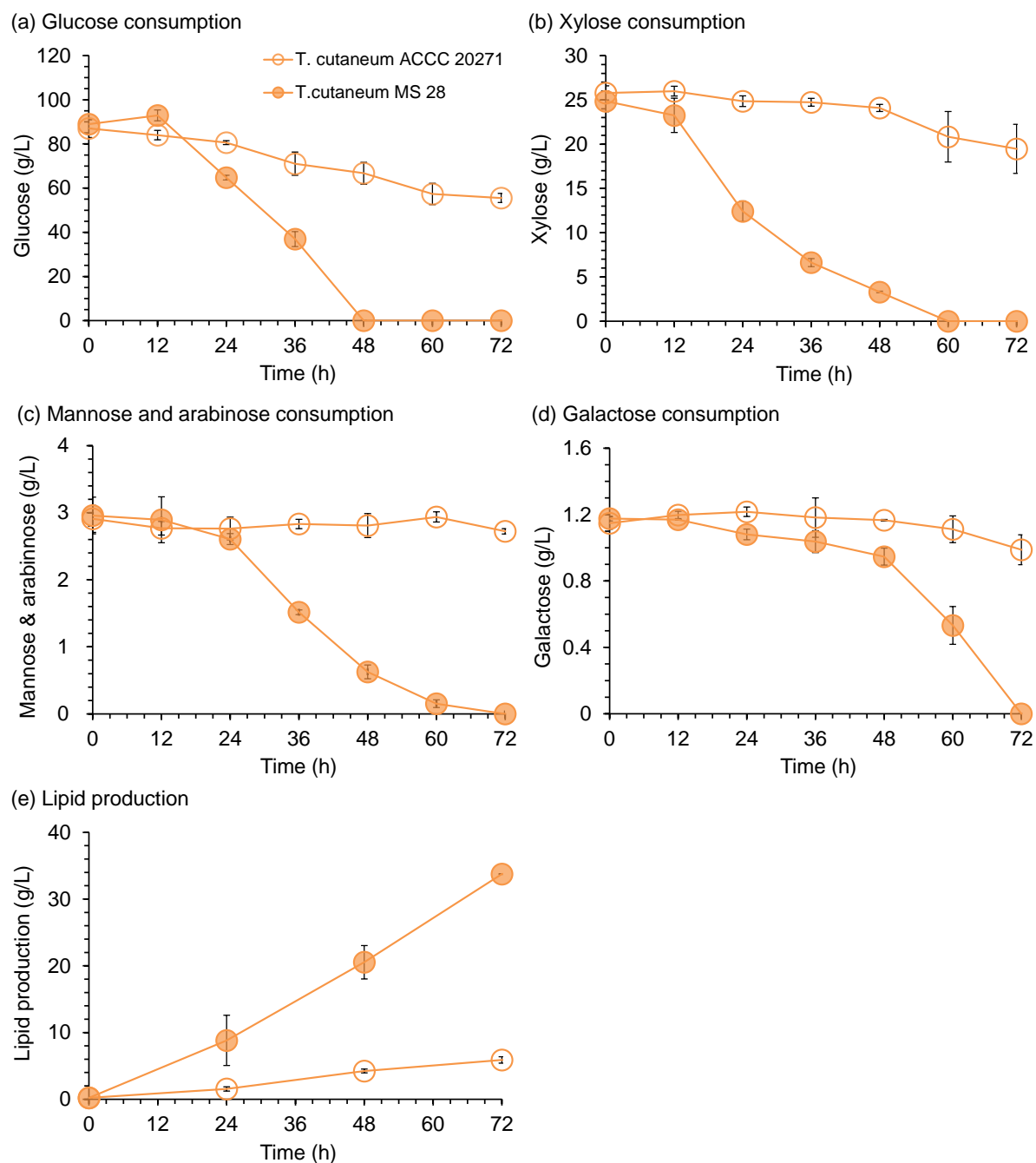


图 4.5 *T. cutaneum* MS28 纤维素油脂发酵评价

Fig. 4.5 Cellulosic lipid production of *T. cutaneum* MS28 by SSCF: (a) Glucose consumption; (b) Xylose consumption; (c) Mannose and arabinose consumption; (d) Galactose consumption; (e) Lipid accumulation and cell growth. The parental *T. cutaneum* ACCC 20271 was used as control. The residual time (~16.5 min) of mannose and arabinose peaks in HPLC with HPX-87P column and RID-10A detector was close, therefore the two were calculated as the sum of the two sugars

实验条件：预处理和生物脱毒后的玉米原料预水解 12 h（30%（w/w）固体含量）。以 10%（v/v）接种量接种，同步糖化共发酵在 30°C, 600 rpm 的条件下进行 72 h。

表 4.2 纤维素油脂发酵性能比较

Table 4.2 Cellulosic lipid production performances by batch fermentation.

Strain	Feedstock	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L/d)	Refs
<i>Mortierella isabellina</i> DSM1414	Corn cob	11.6	0.11	0.61	[273]
<i>Schizochytrium</i> sp. HX-308	Corn straw	5.3	0.13	2.1	[274]
<i>Lipomyces starkeyi</i> AS 2.1560	Sigmacell cellulose	9.5	/	2.4	[275]
<i>Solicoccozyma terricola</i> DBVPG 5870	Cardoon stalks	13.8	~0.13	1.4	[276]
<i>Lipomyces tetrasporus</i> Y-11562	Corn stover	29.0	0.15	8.1	[277]
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosum</i> ATCC 20509	Corn stover	14.4 <sup>a</sup>	0.24	3.6	[278]
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Jerusalem artichoke	17.2 <sup>a</sup>	/	9.1	[279]
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosum</i>	Waste paper	16.4	0.19	4.1	[280]
<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	Corn stover	5.9	0.05	2.0	This study
<i>T. cutaneum</i> MS28	Corn stover	33.8	0.27	11.3	This study

Notes: <sup>a</sup> Only the results of batch fermentation were adopted.

突变菌株 *T. cutaneum* MS28 在纤维素油脂发酵过程中的糖代谢和脂质积累能力显著加强，进一步探究了与木质纤维素来源糖的代谢和脂质合成相关的关键基因表达水平的变化（图 4.6）。总体而言，*T. cutaneum* MS28 中与糖代谢有关的基因均出现了上调。而在其他研究中，酚类抑制物的存在则会降低菌株对葡萄糖的摄取和消耗。说明了在水解液中进行超离心力胁迫适应性进化构建高抑制物耐受性产油酵母细胞策略的有效性。与油脂合成的关键基表达水平也发生了显著变化。与脂肪酸和三酰甘油合成相关的基因表达水平上调了 3-89 倍。脂质合成前体的供应也得到了加强。编码磷酸丙糖异构酶的 *tpiA* 基因表达量上调了 130.9 倍，这有利于从 3-磷酸甘油醛高效合成脂质前体磷酸二羟基丙酮。编码 ATP 依赖性柠檬酸裂解酶（ACL）、乙酰辅酶 A 合成酶（ACS）和苹果酸酶（ME）的基因也显著上调了 8-131 倍，这有助于产生更多的乙酰辅酶 A 和 NADPH 作为脂质合成前体。

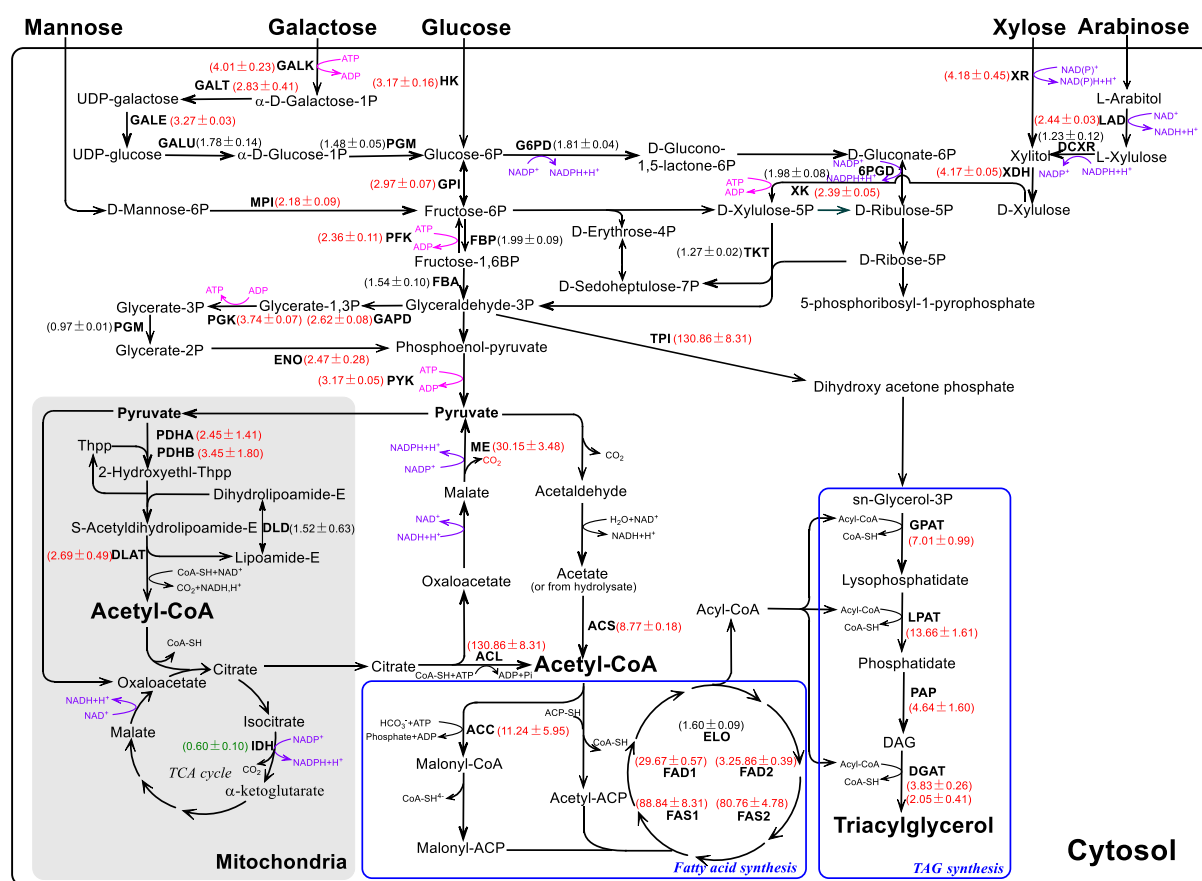


图 4.6 *T. cutaneum* MS28 中糖代谢和脂质合成有关基因的转录水平

Fig. 4.6 Transcriptional analysis of the genes involved in central carbon metabolism of lipid biosynthesis in *T. cutaneum* MS28 compared to the parental strain. The gene expression levels were normalized against the parental strain *T. cutaneum* ACCC 20271. Each RT-qPCR was performed at least three times.

实验条件：菌株活化后转接至固含量为 20% (w/w) 的玉米秸秆水解液，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，30°C，180 rpm 的条件下培养 24 h，提取 mRNA 反转录进行 RT-qPCR 实验。

#### 4.4 本章小节

在之前的研究中提出的一种极其简易的超离心力胁迫适应性进化的方法，对皮状丝孢酵母进行了高效的突变和全通量精准筛选。由于木质纤维素来源的抑制物对菌株生长和代谢的抑制，很难同时提高产油酵母的抑制物耐受性和油脂积累能力。本研究将超离心力和抑制物两个胁迫压力叠加，在含有低浓度酚醛的玉米秸秆水解物中进行皮状丝孢酵母的超离心力胁迫适应性进化，旨在同时提高其对抑制剂的耐受性和脂质的积累。本章的主要研究结论如下：

(1) 在玉米秸秆水解液中进行超离心力胁迫适应性进化，整个传代过程共进行 70 次转接，菌株在水解液中的生物量提高 2 倍以上，油脂含量提高 3 倍以上。实现了抑制物耐受性和油脂合成能力的同步提高。

(2) 对获得的突变菌株进行不同方面的表征，*T. cutaneum* MS28 相比于出发菌株表现出更大的细胞体积、更薄的细胞壁、更高的脂质含量、更强的酚醛抑制物耐受性、更多的脂质合成前体生成以及更活跃的糖代谢，这些显著变化共同为纤维素油脂的生产提供了积极因素。同时为改善产油酵母的酚醛耐受性和脂质积累提供了可参考的靶标基因。

(3) 经水解液中的超离心力胁迫适应性进化获得的 *T. cutaneum* MS28 在纤维素油脂发酵过程中的糖代谢和脂质积累能力显著加强，利用玉米秸秆为原料发酵纤维素油脂产量达到了  $33.8 \pm 0.1$  g/L，是出发菌株的 6 倍左右 ( $5.9 \pm 0.5$  g/L)。油脂得率达到理论得率的 82% 以上。

## 第5章 突变皮状丝孢酵母木质纤维素来源全糖协同代谢的初步探究

### 5.1 引言

生物炼制技术（预处理、生物脱毒、酶水解等）可以将木质纤维素水解为各类己糖和戊糖。木质纤维素来源的可发酵糖中戊糖占到30%左右，主要是木糖和阿拉伯糖<sup>[209]</sup>。能够协同利用己糖和戊糖是发酵菌株的理想特性。截止目前，只有少数的微生物天然具有代谢戊糖的能力，产油酵母中皮状丝孢酵母（*T. cutaneum*）、发酵性丝孢酵母（*T. fermentans*）、粘红酵母（*R. glutinis*）等可以代谢戊糖，但是这些酵母依旧普遍存在分解代谢物阻遏（carbon catabolite repression, CCR）、底物偏好性等戊糖代谢问题。微生物利用木质纤维素可发酵糖中戊糖的速率显著低于己糖，导致发酵结束后发酵液中有大量戊糖剩余，浪费原料的同时也为后续产品的分离带来较大困难<sup>[281]</sup>。因此，构建能够高效共利用混合糖特别是木糖和葡萄糖的高产产油酵母菌株，并研究其实现己糖和戊糖共代谢的机制对于纤维素油脂的工业生产至关重要。

先前的研究发现，野生皮状丝孢酵母出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 虽然可以同时代谢木质纤维素来源的葡萄糖和木糖，但是木糖的利用速率显著低于葡萄糖，且在葡萄糖基本全部消耗完毕木糖的代谢速率才会显著提升<sup>[37]</sup>。经过超离心力胁迫适应性进化获得的两株突变皮状丝孢酵母细胞表现出优良的木质纤维素油脂发酵特性，尤其是其利用木质纤维素来源的原料进行同步糖化共发酵时能够快速、协同利用木质纤维素来源的己糖和戊糖<sup>[212, 282]</sup>。因此，研究突变皮状丝孢酵母细胞的糖代谢机制并将其利用在戊糖代谢能力较差的其他发酵菌株，如酿酒酵母，具有重要的意义。

酿酒酵母是传统的乙醇生产菌株，具有生物量高、木质纤维素衍生抑制物耐受性较强等优势，天然的酿酒酵母菌株无法代谢戊糖。木糖和阿拉伯糖代谢途径被引入酿酒酵母使其拥有了初步代谢戊糖生产纤维素乙醇的能力<sup>[283]</sup>。但是，酿酒酵母的木糖代谢速率远远葡萄糖<sup>[284]</sup>。酵母中没有特定的戊糖转运体，其对戊糖的摄取依赖于己糖转运体，因此存在葡萄糖竞争性抑制，这是木糖和阿拉伯糖的利用率低于葡萄糖的重要原因之一<sup>[285]</sup>。天然可以代谢戊糖的微生物是优良的戊糖转运蛋白的来源<sup>[286]</sup>。

本研究验证了经超离心力胁迫适应性进化获得两株突变高产产油酵母，糖代谢能力大幅度提高，能够实现木质纤维素来源全部单糖的快速、协同同化转变为微生物油脂。从活跃的糖转运和单糖分解代谢两方面分析了突变菌株糖代谢能力提高的原因。挖掘出突变菌株中转录水平均显著上调的三个糖转运蛋白基因。由于未成功搭建皮状丝孢酵母操作系统，因此在酿酒酵母中进行异源表达以验证突变皮状丝孢酵母菌株己糖戊糖协同代谢能力提高的关键原因。最后选择木糖转运能力最好的糖转运蛋白基因在酿酒酵母染色体多拷贝位点进行整合。本研究为木质纤维素可发酵糖的全组分利用以及酿酒酵母工程菌的构建打下了基础。

## 5.2 材料和方法

### 5.2.1 菌株和培养基

*T. cutaneum* ACCC 20271 购自中国农业微生物菌株保藏管理中心。其全基因组已上传 DDBJ/EMBL/GenBank, 编号为 LTAL00000000<sup>[45]</sup>。

*T. cutaneum* MP11 由出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 通过长周期超离心力胁迫适应性进化筛选获得<sup>[212]</sup>, 菌株已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC, <http://www.cgmcc.net>), 注册号为 20481。

*T. cutaneum* MS28 由 *T. cutaneum* ACCC 20271 经水解液中超离心力胁迫适应性进化获得<sup>[282]</sup>。

#### 生物脱毒菌株及其培养基见 2.2.1

本节所用酿酒酵母原始菌株和涉及的重组改造菌株如附录III表 1 所示

大肠杆菌 LB (Luria-Bertani) 培养基: 氯化钠 10.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L (固体培养基另加 20.0 g/L 琼脂粉)。培养带有氨苄抗性质粒的大肠杆菌时, 在液体培养基中添加终浓度为 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的氨苄青霉素, 在固体培养基中添加终浓度为 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的氨苄青霉素。

酵母 YPD 培养基详见 2.2.1, 培养带有抗性基因游离表达质粒的酿酒酵母时, 在液体培养基中添加终浓度为 250  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 G418 (Geneticin, 遗传霉素), 在固体培养基 (固体平板) 中筛选转化子时添加终浓度为 400  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 G418。

酵母 MM (Minimal medium) 培养基: YNB (Yeast Nitrogen Base) 无氨基氮源 6.7 g/L, 硫酸铵 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L。

酵母 SM (Supplemental medium) 培养基: 在以上 MM 培养基中另外添加 0.2% 尿嘧啶。

酿酒酵母合成培养基: 各单糖浓度见结果与讨论小节中各图表注释, 其余营养盐成分为磷酸二氢钾 2.0 g/L, 硫酸铵 2.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L。

酵母 SD (synthetic dropout medium) 培养基: 单糖 (麦芽糖、葡萄糖、阿拉伯糖) 20.0 g/L, YNB 无氨基酵母氮源 6.7 g/L, DO Supplement-Ura 添加剂 10% (v/v)。

以木质纤维素为原料的乙醇发酵营养盐组分为磷酸二氢钾 2.0 g/L, 硫酸铵 2.0 g/L, 酵母提取物 10.0 g/L。

### 5.2.2 生物质原料和试剂

#### 玉米秸秆原料来源和组分见 2.2.2

纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自诺维信 (北京) 生物技术有限公司。DNA 提取试剂酚购自索莱宝 (北京) 科技有限公司。YNB 无氨基酵母氮源购自铂尚生物技术(上海)有限公司。DO Supplement-Ura 添加剂购自百奥莱博 (北京) 科技有限公司。鲑鱼精 DNA 购自碧云天 (上海) 生物科技有限公司。制霉菌素、NTG、Tris (三羟甲基氨基甲烷) 和 EDTA 均购自阿达玛斯 (瑞士) 试剂有限公司。葡萄糖、甘露糖等单糖试剂以及氯仿等

基础分析试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 5.2.3 质粒构建

本章所构建的质粒见附录 II 中表 1, 所用引物见附录 II 中表 2, 重组菌株见附录 III 中表 1。

本章所用到的表达质粒是以商业质粒 pYES2 为出发质粒进行改造。将 pYES2 的筛选标记由 URA3 更改为 *Saccharomyces cerevisiae* Z100 可以使用的 KanMX (G418)。具体方法是首先, 使用限制性内切酶 NcoI 和 NheI 对 pYES2 进行双酶切, 酶切后利用 PCR 产物纯化试剂盒 (捷瑞生物工程(上海)有限公司) 进行酶切产物的纯化回收。然后, 以质粒 pUG6 为模板, 通过 PCR 反应, 在引物两端加上上一步中 pYES2 双酶切酶切位点两端的 Linker 序列, 将 1357 bp 长度的 KanMX 扩增, 扩增后的 PCR 产物纯化回收。最后, 利用 ClonExpress® II 无缝克隆试剂盒 (诺唯赞 (南京) 生物科技股份有限公司) 将带有 Linker 的 KanMX 基因与双酶切产物进行重组。通过以上步骤将 pYES2 的筛选标记由 URA3 更换为 G418。第二步改造, 使用限制性内切酶 AgeI、XbaI 将 pYES2-KanMX 进行双酶切, 酶切后利用 PCR 产物纯化试剂盒行酶切产物的纯化回收。然后以 *S. cerevisiae* Z100 基因组为模板, 过 PCR 反应, 在引物两端加上上一步中 pYES2-KanMX 双酶切酶切位点两端的 Linker 序列, 将 629 bp 长度的 PGK1p 启动子和 851 bp 的 TDH3p 启动子扩增, 扩增后的 PCR 产物纯化回收。最后, 利用无缝克隆试剂盒带有 Linker 的 PGK1p 启动子和 TDH3p 启动子基因分别与双酶切产物进行重组。通过以上步骤将质粒原本的 GAL2p (半乳糖激酶) 启动子更换为 PGK1p 和 TDH3p 启动子, 获得质粒 pYES2-KanMX-TDH3p 和 pYES2-KanMX-PGK1p。

改造质粒 pYES2-KanMX-TDH3p 和 pYES2-KanMX-PGK1p 表达绿色荧光蛋白基因的表达质粒构建方法是利用限制内切酶 XbaI 分别对 pYES2-KanMX-TDH3p 和 pYES2-KanMX-PGK1p 进行单酶切, 酶切酶切后利用 PCR 产物纯化试剂盒行酶切产物的纯化回收, 然后, 以质粒 pFA6a-kanMX6-GAL1p-GFP 为模板, 通过 PCR 反应, 在引物两端加上上一步单酶切酶切位点两端的 Linker 序列, 将 741 bp 长度的 GFP 基因扩增, 扩增后的 PCR 产物纯化回收。最后, 利用无缝克隆试剂盒将带有 Linker 的 GFP 基因与酶切产物进行重组。

利用改造好的质粒 pYES2-KanMX-TDH3p 进行候选糖转运蛋白的亚细胞定位的相关质粒的构建方法是首先对质粒进行单酶切 (酶切位点 XbaI) 后纯化回收, 通过 PCR 反应, 在引物两端加上上一步单酶切酶切位点两端的 Linker 序列, 将去除终止密码子 TAA、在基因最后引入限制性酶切位点 XbaI 的糖蛋白基因 (*Trcu\_00722*、*Trcu\_02200*、*Trcu\_01509*) 基因进行扩增, 获得的 PCR 片段进行纯化回收, 将以上两个纯化产物重组, 在获得测序正确的 pYES2-KanMX-TDH3p-*Trcu\_00722*XbaI、pYES2-KanMX-TDH3p-*Trcu\_02200*XbaI、pYES2-KanMX-TDH3p-*Trcu\_01509*XbaI 三个质粒后继续对其进行单酶切 (XbaI), 酶切后纯化回收, 通过 PCR 反应, 在引物两端加上上一步单酶切酶切位点两端的 Linker 序列, 将 GFP 基因进行扩增, 将 PCR 片段进行纯化回收, 将以上两个纯

化产物进行重组，最终获得三个候选糖转运蛋白亚细胞定位的质粒 pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_00722-GFP、pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_02200-GFP、pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_01509-GFP。利用改造好的表达质粒 pYES2-KanMX-TDH3p 进行候选糖转运蛋白基因 (*Trcu\_00722*、*Trcu\_02200*、*Trcu\_01509*) 游离表达质粒的构建与上述 GFP 基因表达质粒的构建方式一致，酶切位点同样选择 XbaI。最终获得三个候选糖转运蛋白基因的游离表达质粒 pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_00722、pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_02200、pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_01509。在 EBY.VW4000 菌株中游离表达 *Gal2*、*Trcu\_00722*、*Trcu\_02200*、*Trcu\_01509* 基因的质粒构建方式也如上所示 (保留 Ura3 筛选标记)。

本章使用的整合质粒是以商业质粒 pUG6 为出发质粒进行改造，构建方法如下。首先对 pUG6 进行改造，引入启动子，使用限制性内切酶 EcoRI 进行单酶切，酶切后利用 PCR 产物纯化试剂盒行酶切产物的纯化回收，以 *S. cerevisiae* Z100 基因组为模板，通过 PCR 反应，在基因最后引入 EcoRI 酶切位点并在引物两端加上上一步中质粒 pUG6 酶切位点两端的 Linker 序列，将 TDH3p 扩增并进行纯化回收，将以上两步骤的片段进行重组，获得质粒 pUG6-TDH3p。第二步引入终止子 CYC1t (细胞色素 C)，使用限制性内切酶 EcoRI 进行单酶切，酶切后纯化回收，以 *S. cerevisiae* Z100 基因组为模板，通过 PCR 反应，在基因最前面引入 EcoRI 酶切位点并在引物两端加上上一步质粒 pUG6-TDH3p 酶切位点两端的 Linker 序列，将 CYC1t 扩增并进行纯化回收，将以上两步骤的片段进行重组，获得质粒 pUG6-TDH3p-CYC1t。第三步引入 18srDNA 上下游同源臂，方法同上，获得质粒 pUG6-rDNAup-TDH3p-CYC1t-rDNAdown，所用到的单酶切位点分别是 SalI 和 XhoI。最后一步是将 *Trcu\_02200* 基因引入到启动子和终止子之间构成完整的整合质粒 pUG6-rDNAup-TDH3p-Trcu\_02200-CYC1t-rDNAdown，方法同上。

以上所有改造和构建质粒在重组步骤完成后均通过化学转化的过程均由 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  构建完成，重组质粒转入 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  后进行阳性克隆的筛选，提取阳性克隆的质粒进行测序确认后才可以进行下一步。

#### 5.2.4 酿酒酵母重组菌株构建

本章所构建的重组菌株见附录III中表 1。

酿酒酵母菌株的重组菌株构建主要分为三步，分别是酿酒酵母感受态的制作，酿酒酵母电转化步骤和阳性克隆筛选。以下对三个部分做详细叙述。

##### (1) 酿酒酵母感受态的制作

①从超低温冰箱取出保存在 30% (v/v) 甘油中的酿酒酵母甘油种，在 YPD 平板上划线并置于 30°C 下培养至长出单菌落；

②从第一步的平板种挑取单克隆接种至 5-10 mL YPD 液体培养基培养过夜，培养容器选择灭菌后的 50 mL 离心管，为了获得更多的感受态培养容器也可选择 100 mL 三角瓶，直到 OD600 达 1.5-2.5；

③在 250 mL 三角瓶中，用 50 mL 左右的液体 YPD 稀释上一步获得的菌液至 OD600

大约为 0.3 左右, 继续置于 30°C 摇床培养直至 OD600 达到 1.2-1.6 (上限不超过 1.6), 此过程需要 3-4 h 左右;

④将上一步获得的酿酒酵母细胞转移至 50 mL 离心管并预冷离心机, 在 4°C 下 3,000 rpm 离心 3 min 收集细胞;

⑤离心收集细胞后用预冷的 20-25 mL 1 M 山梨醇溶液重悬细胞, 用移液枪吹打重悬时操作手法务必轻柔, 完全重悬后 4°C 下 3,000 rpm 离心 3 min;

⑥用 16 mL 1 M 山梨醇、2 mL 10xTE 和 2 mL 1 M 醋酸锂将上一步中离心后的菌体重悬;

⑦将上一步在混合溶液中重悬的菌体放置于 30°C、200 rpm 的摇床复苏 30 min, 复苏后加入 200  $\mu$ L 1 M DTT, 同上复苏条件继续复苏 10-15 min;

⑧复苏后将菌液置于 4°C 的离心机, 3,000 rpm 离心 3 min, 弃尽上清液后用预冷的 20-25 mL 1 M 山梨醇重悬菌体 2 次;

⑨最后一次重悬离心后弃尽上清液, 加入预冷的 500  $\mu$ L 山梨醇, 在冰上每管 100  $\mu$ L 分装至无菌 EP 管中, 酿酒酵母细胞感受态尽量现配现用。

## (2) 酿酒酵母细胞电化学转化步骤

①将浸泡在 75% (v/v) 中的间距为 0.1 cm 的电转杯 (BioRad, USA) 取出, 甩干液体后放置于超净台, 打开吹风至电极杯中残余液体全部吹干;

②将电转仪 (Gene Pulser Xcell, BioRad, USA) 的电转参数设置为 1.5 kv, 5 ms;

③取出新鲜制备或者冻存在超低温冰箱的酿酒酵母感受态置于冰上, 融化后将感受态和待转质粒混匀 (质粒添加量为 0.5-2  $\mu$ g, 体积一般不超过感受态 1/10), 混合是注意手法轻柔, 可用枪头轻轻搅动;

④吸取质粒和感受态混合好的液体转移至电转杯的狭缝中;

⑤将电转杯放入仪器中并启动, 电击完成后迅速加入 1 mL 预冷的 1 M 山梨醇将点击后的细胞轻轻地吹悬起来转移至 50 mL 离心管或摇菌管中;

⑥加入 2 mL YPD 液体培养基, 在 30°C、200 rpm 条件下进行 2 h 左右的复苏;

⑦复苏后离心收集菌体, 用灭过菌地超纯水洗 2 遍, 取适量地菌液在抗性板上涂布;

⑧涂布后将平板置于 30°C 培养箱培养 24-48 h 后进行阳性克隆验证

## (3) 酿酒酵母阳性克隆筛选

①游离表达菌株筛选验证: 用表达质粒地通用引物或者以质粒上的目的基因设计引物, 挑取待测候选转化子进行菌落 PCR, 初步确定阳性后将候选转化子解种至液体 YPD 中培养 24-48 h 后, 用酵母提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 提取质粒进一步进行目的基因的 PCR 验证;

②整合菌株筛选验证: 提取待测酵母菌落的 DNA 方法如下: 取平板上的菌落用少量液氮磨碎, 加入 700  $\mu$ L 的真菌提取液 (Tris-HCl 2.42 g/L, 乙酸钠 1.36 g/L, EDTA 1.86 g/L, SDS 5 g/L 灭菌后常温保存), 混匀后室温静置 15 min, 加入 350  $\mu$ L 氯仿和 350  $\mu$ L DNA 提取试剂酚充分混匀后 12,000 rpm 离心 10 min, 离心后转移上清至另一 EP 管中

加入 600  $\mu\text{L}$  氯仿充分混匀后 12,000 rpm 离心 10 min, 离心后转移上清至另一 EP 管中加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀后置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中充分沉降 DNA, 1 h 后 12,000 rpm 离心 10 min, 离心后弃上清加入 1 mL 75% (v/v) 乙醇, 12,000 rpm 离心 10 min, 重复上一步, 弃去上清后放入  $65^{\circ}\text{C}$  金属浴中将乙醇和水充分挥发, 加入 30  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 并检测 DNA 浓度。以所提出的基因组 DNA 为模板进行目的基因的 PCR 验证, 在分别在左、右同源臂和目的基因上设计验证 PCR 引物进行左、右交叉 PCR 验证。

### 5.2.5 RT-qPCR 实验

$30^{\circ}\text{C}$  下, 以不同单糖或者混合糖为碳源的合成培养基培养出发菌株和两株突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 MS28。24 h 后收集细胞。参照 2.2.6 的方法进行 mRNA 提取和定量、逆转录反应和 RT-qPCR 实验。以基因 *ALG9* (甘露糖基转移酶基因) 为内参基因。RT-qPCR 所用引物见附录 I 中表 4。

### 5.2.6 胞内木糖和阿拉伯糖的检测

将细胞转移到含 20 g/L 麦芽糖的 SD 培养基中, 在  $30^{\circ}\text{C}$  下培养 10 h。然后, 收集细胞并重新接于含有 20 g/L 木糖或 20 g/L 阿拉伯糖的 SD 培养基中。培养至 OD<sub>600</sub> 约为 20 后, 培养 30、60 和 120 min 后, 分别收集 10 mL 样品后用预冷的 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次, 重悬于 5 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 并在  $37^{\circ}\text{C}$  下 250 rpm 搅拌 2 d, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤得到胞内的糖, 最后用高效液相色谱法 (HPLC) 测定含量<sup>[287]</sup>。

### 5.2.7 生物质原料预处理和脱毒

玉米秸秆的预处理和固态生物脱毒见 2.2.3。

### 5.2.8 乙醇发酵

以葡萄糖和木糖为碳源的合成培养基中的乙醇发酵在 3 L 发酵罐中进行, 种子液的活化在 YPD 培养基中连续进行两次, 每次 24 h, 以 10% (v/v) 接种量将种子液接种至发酵罐的培养基中, 培养基除单糖外营养盐成分见 5.2.1, 发酵时发酵罐参数设置为  $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, 添加 5 M 氢氧化钠自动调节 pH 至 5.5

以木质纤维素原料同步糖化共发酵 (SSCF) 方式进行乙醇发酵时种子液活化 3 次, 第一次在 YPD 培养基中进行培养 24 h, 第二次在 5% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液 (玉米秸秆水解的制备方法见 3.2.3) 中进行, 除营养盐 (组分见 5.2.1) 外额外添加 5 mg 蛋白/g 干物质的纤维素酶, 第三次在 10% (w/w) 固含量玉米秸秆水解液中进行, 额外添加 5 mg 蛋白/g 干物质的纤维素酶。经预处理和脱毒后的预糖化过程在 5 L 发酵罐 (配有螺带桨叶) 中进行, 固含量为 30% (w/w), 在  $50^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm, 添加 4 mg 蛋白质/g 干物质条件下进行 12 h, 同步糖化共发酵时将预糖化后的物料转移至配有直叶桨的 3 L 反应器中, 发酵条件为  $30^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm, 额外添加的营养盐见 5.2.1, 用 5 M 氢氧化钠调节 pH 至 5.5。

### 5.2.9 分析方法

葡萄糖、木糖、乙醇等通过 HPLC (LC-20AD, Shimazu, Kyoto, Japan) 检测, 配件为 RID-10A 型示差折光检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 HPX-87H 型色谱柱 (Bio-rad, USA), 流动相为 5 mM 硫酸溶液, 流速为 0.6 mL/min。

使用紫外分光光度计 (BIOMATE 3S; Thermo, Waltham, MA, USA) 检测细胞的 OD600 以表示细胞的生长量

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 突变皮状丝孢酵母木质纤维素来源全糖代谢能力的评价

与出发菌株相比, 经超离心力胁迫适应性进化获得的两株突变皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 的糖代谢能力显著提高。能够进行木质纤维素来源可发酵糖的高效协同代谢 (图 2.13a 和图 4.5)。本研究首先在不同单糖为唯一碳源和混合糖为碳源的合成培养基中对亲本菌种和突变菌株 *T. cutaneum* MP11 进行糖耗和生长情况的探究。图 5.1 发酵结果表明, 原始菌株木质纤维素来源的所有单糖均有一定的利用能力。但是两株突变菌株对各种单糖的利用速率更快、生长情况更好。发酵结束时, 两株突变菌株基本消耗完所有的己糖和戊糖, 而出发菌株仍有 30 g/L 以上的各类单糖的剩余。在混合糖条件下 (图 5.2), 野生出发菌株能够同时利用己糖和戊糖, 但是己糖和戊糖的代谢速率相差较大, 发酵结束时仍有较多残糖。两株突变菌株有更突出的木质纤维素来源的全部单糖快速、协同代谢能力, 尤其是戊糖代谢能力突出, 144 h 发酵结束后基本没有残糖剩余。*T. cutaneum* MP11 和 MS28 具有利用木质纤维素原料进行微生物油脂生产的优越性能。

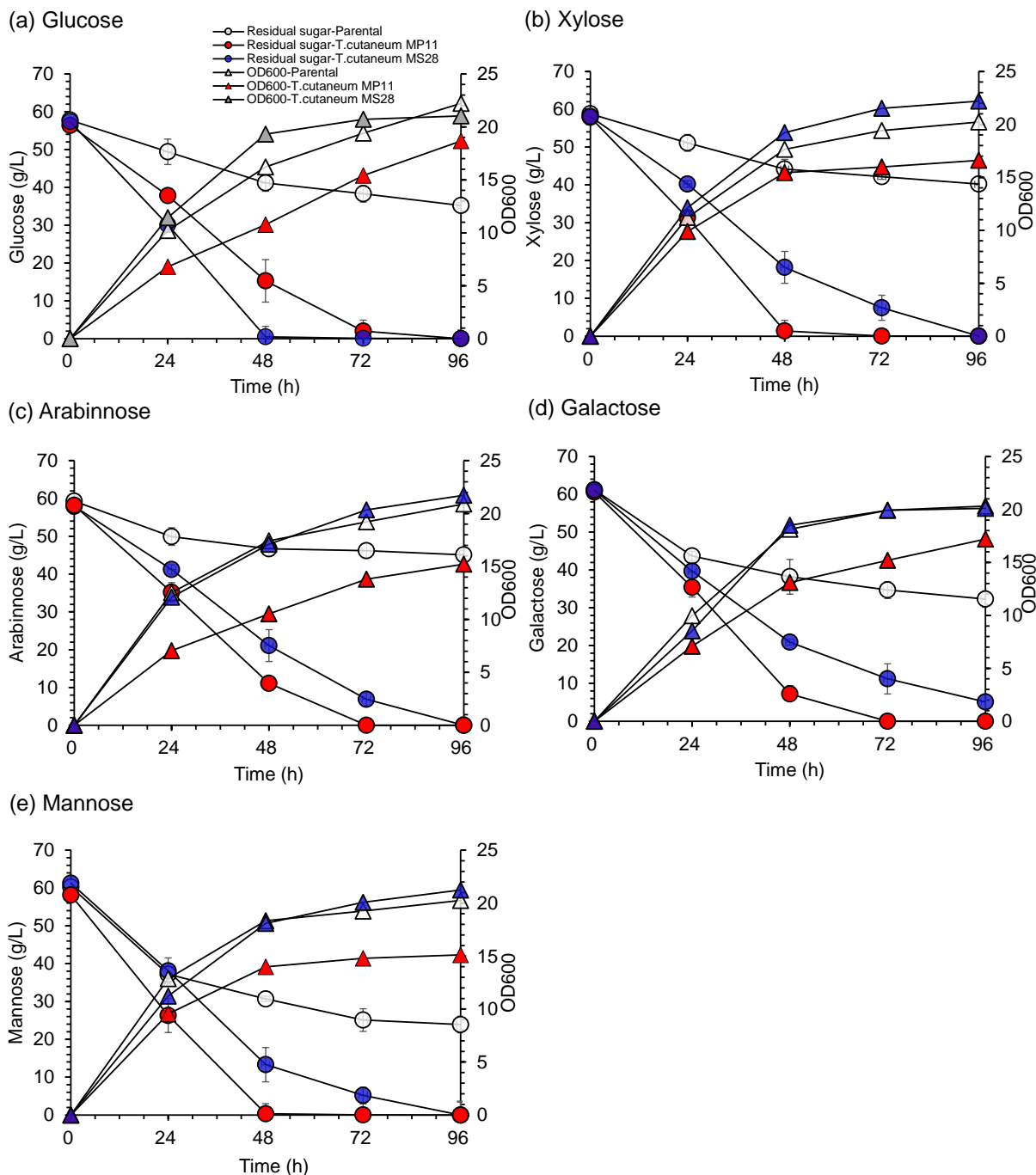


图 5.1 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 在不同单糖为唯一碳源条件下的生长与糖耗情况

Fig. 5.1 The growth and sugar utilization of *T. cutaneum* MP11 and MS28 using different lignocellulosic sugars as sore carbon source: (a) Glucose; (b) Xylose (c) Arabinose; (d) Galactose; (e) Mannose

实验条件：菌株活化后用 PBS 洗一次后转接至合成培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，在 30°C，180 rpm 的条件下发酵培养 96 h，初始各单糖的浓度均为 60 g/L

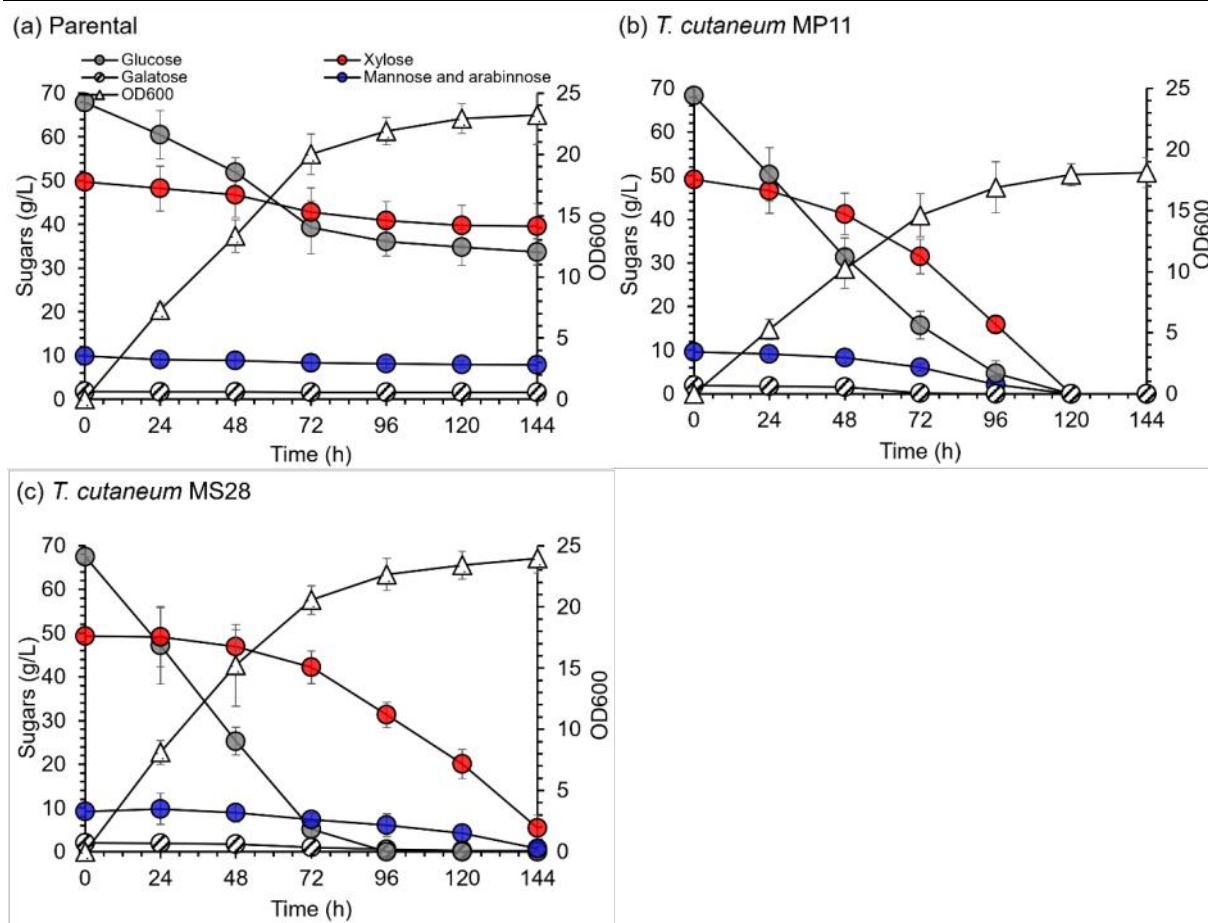


图 5.2 出发菌株、*T. cutaneum* MP11 和 MS28 在混合单糖中的生长与糖耗情况

Fig. 5.2 The growth and sugar utilization of parental, *T. cutaneum* MP11 and MS28 using mixed sugar:

(a) Parental; (b) *T. cutaneum* MP11; (c) *T. cutaneum* MS28

实验条件：菌株活化后用 PBS 洗一次后转接至合成培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，在 30°C，180 rpm 的条件下发酵培养 144 h，初始混合糖液中各单糖浓度分别为 70 g/L 葡萄糖，50 g/L 木糖，8 g/L 阿拉伯糖，2 g/L 半乳糖和 2 g/L 甘露糖。

### 5.3.2 突变皮状丝孢酵母糖转运和糖代谢基因表达水平的检测和分析

糖类转化主要涉及两步，第一步糖类通过转运系统被运至胞内，第二步通过糖代谢转化为其他代谢产物。我们首先对 *T. cutaneum* MP11 的全基因组重测序结果进行分析，由于糖代谢是生命体最基本的代谢之一，涉及的基因网络非常大，因此主要筛选糖转运体基因、单糖分解代谢路径上的酶基因以及直接调控糖代谢的关键基因，没有找到与这三项相关的导致编码的蛋白质氨基酸序列发生改变的突变位点。

下一步我们将研究目标转变为糖代谢相关基因转录水平的检测。酵母将单糖运输至胞内通过糖转运蛋白实现，酵母中的糖转运体均属于协助转运超家族 (major facilitator superfamily, MFS)。据出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 的基因组注释筛选出 17 个 MFS 家族候选基因 (表 5.1)。葡萄糖代谢主要通过糖酵解途径进行，参考其他酵母各类单糖 (木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖) 的代谢途径找到不同单糖代谢的重要基因。

表 5.1 皮状丝孢酵母中编码 MFS 家族糖转运蛋白的基因

Table 5.1 Candidate genes encoding MFS sugar transporter proteins in *T. cutaneum*

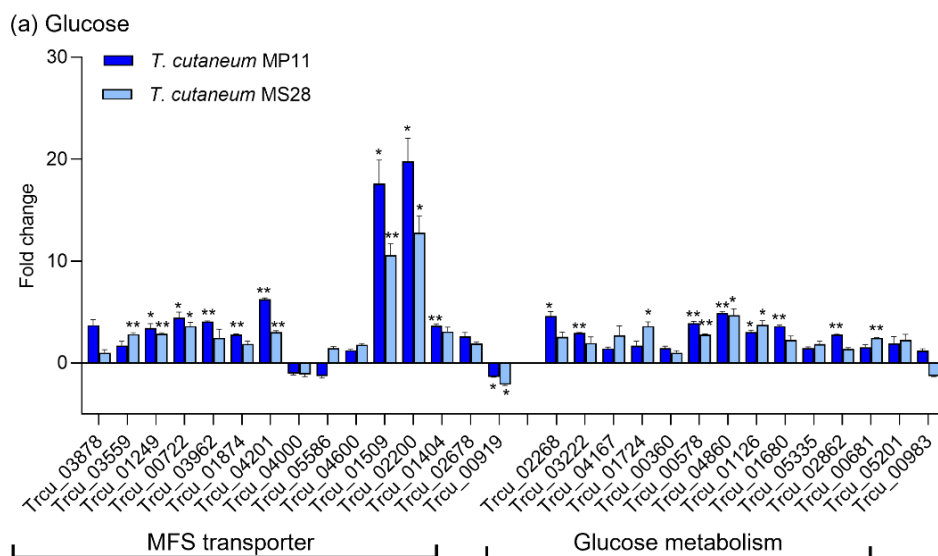
Gene ID	Description
Trcu_03878	hexose transporter
Trcu_03559	GDP-mannose transporter 1
Trcu_02200	hexose transporter
Trcu_00722	hexose transporter
Trcu_03962	sugar transport protein
Trcu_01874	hexose transporter
Trcu_04201	glucose transport 3
Trcu_04000	glucose sensor
Trcu_05586	glucose transport 1
Trcu_04600	monosaccharide transporter
Trcu_01509	hexose transporter
Trcu_01249	lactose permease
Trcu_01404	sugar transporter
Trcu_02678	sugar transporter STL1
Trcu_00919	glucose transporter

在以木质纤维素来源的混合糖（木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖）为碳源和各组分单糖为唯一碳源的培养基中培养出发菌株、突变产油酵母 *T. cutaneum* MP11 和 MS28，以原始菌株为对照组设计 RT-qPCR 实验，探究糖转运蛋白和糖代谢重要基因的转录水平。首先分析糖转运相关基因的实验结果，在两株突变株中，不同单糖培养条件下糖转运蛋白基因的表达水平基本均有一定水平的提高。值得注意的是，*Trcu\_02200*、*Trcu\_01509* 在不同单糖为唯一碳源培养条件下均有明显上调，在 *T. cutaneum* MP11 中 *Trcu\_02200*、*Trcu\_01509* 在以不同单糖为底物的培养条件下，它们的转录水平显著上调 6.4-28.4 倍；在 *T. cutaneum* MS28 中 *Trcu\_02200*、*Trcu\_01509* 基因在以不同单糖为底物的培养条件下，它们的转录水平显著上调 3.6-16.0 倍。尤其是在以木糖为唯一碳源的培养基中，*T. cutaneum* MP11 和 MS28 的 *Trcu\_02200* 基因转录水平的上调尤为明显，分别显著上调 28.4 和 16.0 倍。在模拟木质纤维素水解液条件的混合糖条件下，在 15 个被检测的糖转运蛋白中超过一半的糖转运蛋白基因在 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 中均上调 2 倍以上，其中 *Trcu\_00722* 基因上调幅度最高，在 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 中分别上调 15.2 和 15.6 倍。

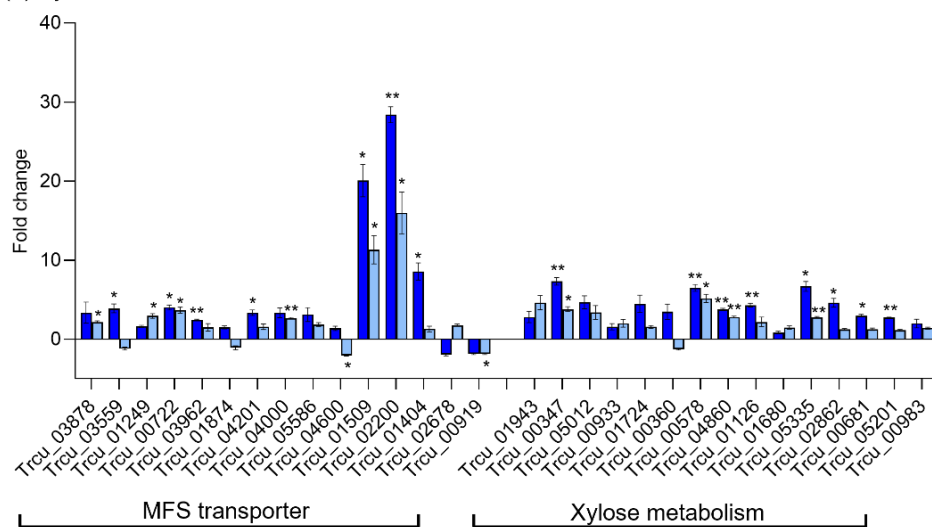
糖类转化的第二步是单糖分解代谢。在不同单糖为唯一碳源培养条件下，分解代谢路径上的被测酶基因基本均发生转录上调，（图 5.3a-e）。木糖为唯一碳源的培养条件下（图 5.3b），*T. cutaneum* MP11 和 MS28 中 *Trcu\_01943*、*Trcu\_00347*、*Trcu\_05012* 基因编码的木糖还原酶、木糖醇脱氢酶、木酮糖激酶分别上调 2.8-7.1 倍和 3.4-4.6 倍，这三个

重要的催化木糖转化为磷酸木酮糖的基因转录水平的提高使木糖代谢更高效地进入磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP)。糖酵解途径中限速酶己糖激酶和 6-磷酸果糖激酶编由 *Trcu\_02268*、*Trcu\_03222* 和 *Trcu\_00360* 编码，在葡萄糖和甘露糖为唯一碳源条件下，突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 中这三个基因分上调 1.1-4.6 倍。除葡萄糖外的其他单糖经代谢转变为糖酵解的中间物后也进入糖酵解途径。*T. cutaneum* MP11 中该途径被测的 11 个酶基因中，木糖、阿拉伯糖、半乳糖分别为唯一碳源培养条件下转录水平上调的数量分别为 11 个、10 个和 10 个，其中木糖为唯一碳源条件下显著上调 ( $P < 0.05$ ) 的基因有 7 个。以不同单糖混合作为碳源的培养条件下，两株突变株中糖代谢相关基因基本均发生转录水平的上调，被测糖代谢相关基因中转录水平上调基因数均超过 90%。

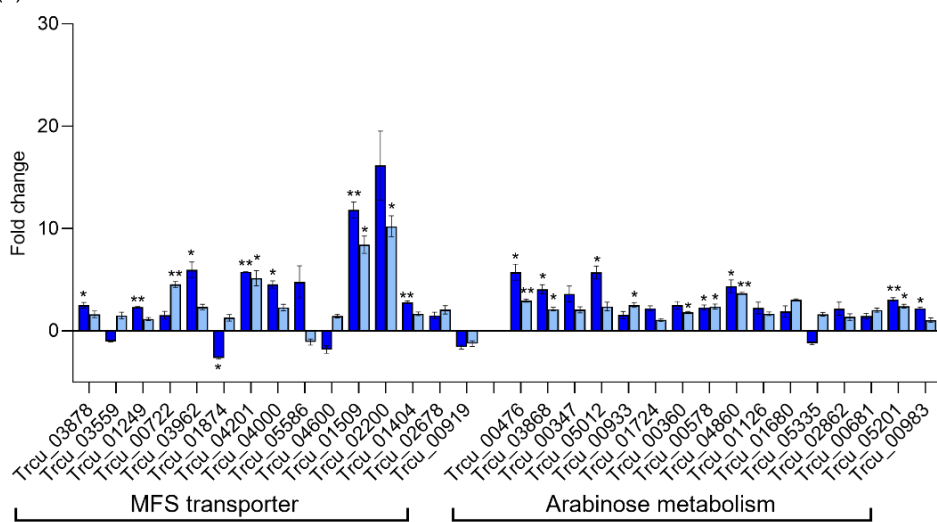
总结来说，在突变株 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 中糖转运蛋白基因和单糖分解代谢酶基因均发生明显的转录水平的上调，尤其是糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 以及糖酵解和各单糖分解代谢途径中关键酶基因的表达上调十分显著，表达活跃的糖转运和后续的单糖分解代谢途径相关基因共同导致了显著增强的糖代谢能力，进而有更多的乙酰辅酶 A 前体用于油脂合成。而突变菌株增强的脂质积累能力也需要更多的碳通量进入脂质合成代谢途径，进一步通过调控上调糖代谢相关基因的表达，促进了糖同化能力的提高。其中，突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 中三个糖转运蛋白的显著上调是否是糖代谢能力提高的决定性因素以及三个糖转运蛋白的扩展应用值得进一步探究。



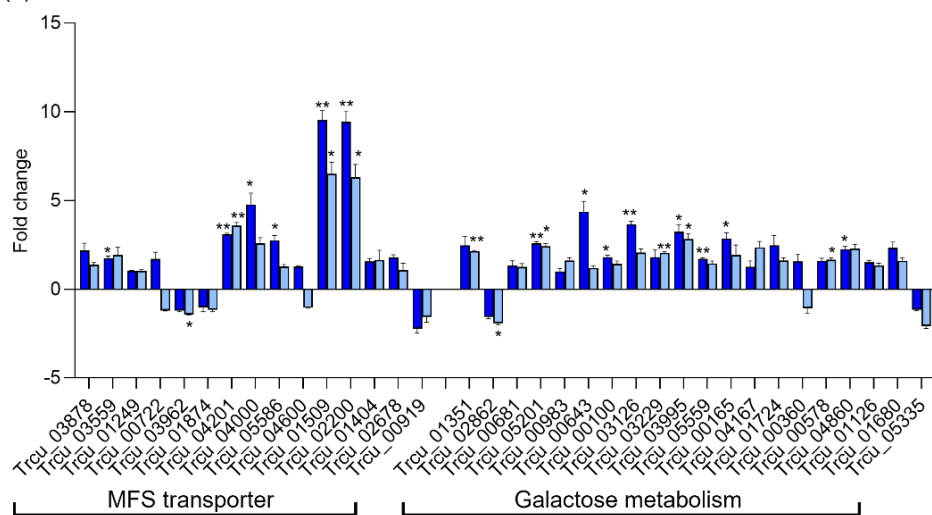
(b) Xylose



(c) Arabinose



(d) Galactose



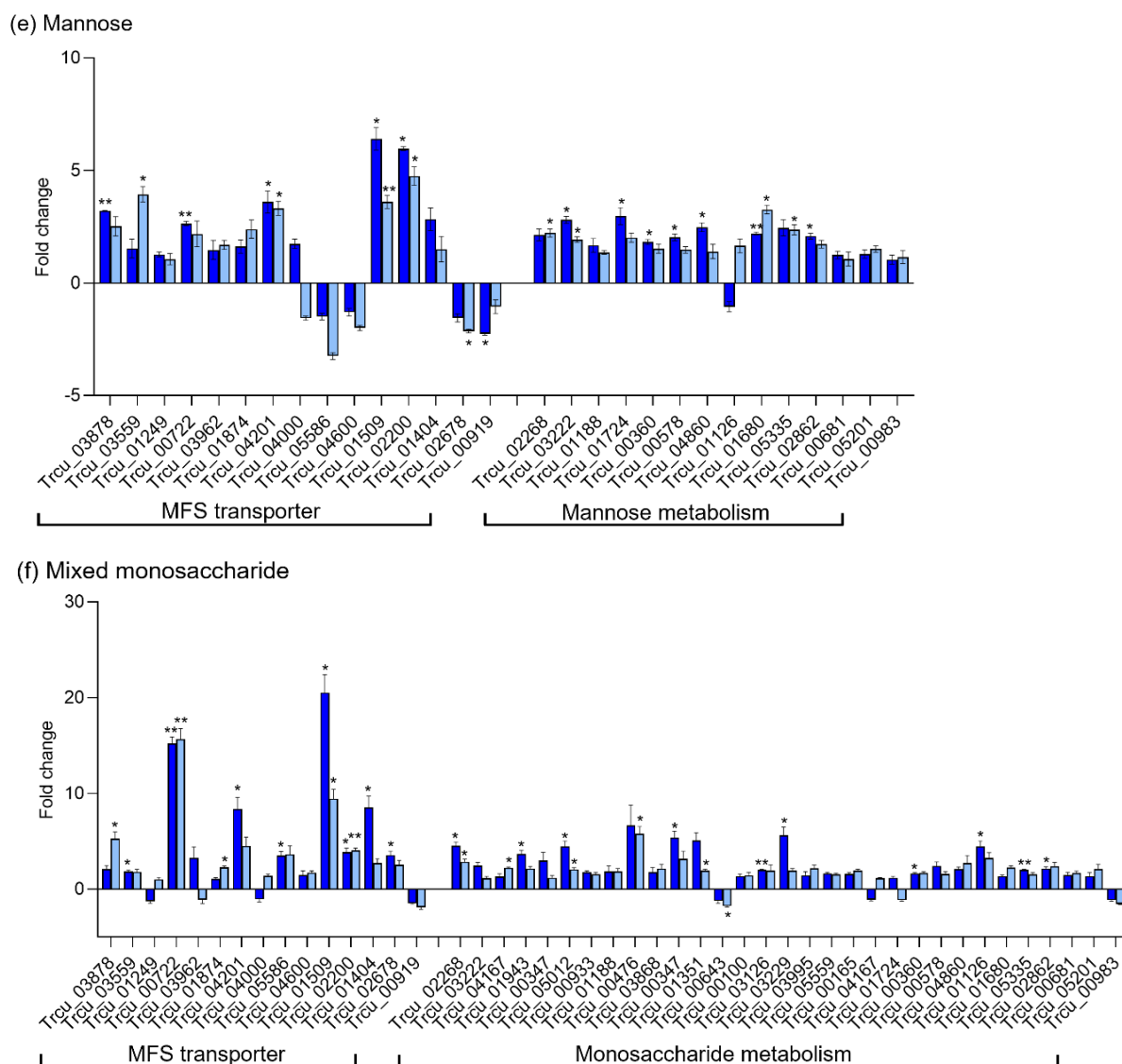


图 5.3 以不同单糖为唯一碳源和混合糖条件下 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 中 MFS 超家族糖转运蛋白和糖代谢相关基因的转录水平分析

Fig. 5.3 Transcriptional analysis of the genes related to MFS superfamily transporter proteins and sugar metabolism using different monosaccharides or mixed sugars in mutant *T. cutaneum* MP11 and MS28: (a) Glucose; (b) Xylose; (c) Arabinose; (d) Galactose; (e) Mannose; (f) Mixed monosaccharide (\*,  $P \leq 0.05$  and \*\*,  $P \leq 0.01$  between the mutant strain and parental, by Student's t test)

实验条件：菌株活化后转接至合成培养基，培养在装液量为 10% 的 500 mL 摇瓶中进行，在 30°C，180 rpm 的条件下培养 12 h，提取 mRNA 反转录进行 RT-qPCR 实验

注：(a), (b), (c), (d), (e) 实验中各单糖培养浓度均为 20 g/L，混合糖条件模拟 30% (w/w) 固含量木质纤维素水解液（葡萄糖 100 g/L，木糖 30 g/L，阿拉伯糖 2 g/L，半乳糖 2 g/L，甘露糖 2 g/L，）

### 5.3.3 在酿酒酵母中初步验证突变皮状丝孢酵母己糖戊糖共代谢能力提高的原因

我们试图在皮状丝孢酵母中搭建基因操作系统进而通过基因敲除或者过表达以验证高表达的三个糖转运蛋白基因 *Trcu\_01509*，*Trcu\_00722* 和 *Trcu\_02200* 是否是突变菌株糖代谢能力提高的关键因素。但是由于皮状丝孢酵母的基因操作系统未成功搭建因此

我们将三个糖转运蛋白基因在酿酒酵母中进行异源表达, 在进行验证实验的同时, 也能够尝试提高酿酒酵母的木糖代谢能力。

根据基因注释分析 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 均编码己糖转运蛋白(表 5.1)。酵母单糖转运蛋白并非具有严格的底物特异性, 与其结构相似的单糖均可被转运, 只是底物的亲和力大小不同<sup>[285]</sup>, 其对于戊糖的转运主要靠己糖转运蛋白来实现。在木糖代谢能力大幅度提升的突变菌中转录水平显著上调的 *Trcu\_00722p*、*Trcu\_01509p* 和 *Trcu\_02200p* 可能是高亲和力的戊糖转运体。

对三个糖转运蛋白 *Trcu\_00722p*、*Trcu\_01509p* 和 *Trcu\_02200p* 构建系统发育进化树进行系统发育多样性分析(图 5.4)。*Trcu\_00722p*、*Trcu\_01509p* 和 *Trcu\_02200p* 属于不同的分支, 使用 ClustalW 对候选三个糖转运蛋白的支系图进行比对, 利用软件 MEGA11 的近邻相接法进行计算。结果表明, *Trcu\_02200p* 与 *Gxf1p* 和缘关系相近, *Gxf1p* 是酿酒酵母中相对高效的异源木糖转运体<sup>[288]</sup>, *Trcu\_00722p* 与汉斯德巴氏酵母的 *DEHA2C11374p* 转运蛋白亲缘关系较近。*Trcu\_01509p* 与阿氏丝孢酵母中的 *Hxt1p* 亲缘关系相近, *Hxt1p* 是 *Hxt* (己糖转运蛋白家族) 中高效的木糖转运体。糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 在不同单糖和混合糖培养条件下均有明显的转录水平的上调, 且亲缘关系上与目前广泛研究的酿酒酵母内源的己糖转运家族(HXT)较远, 因此值得进一步研究

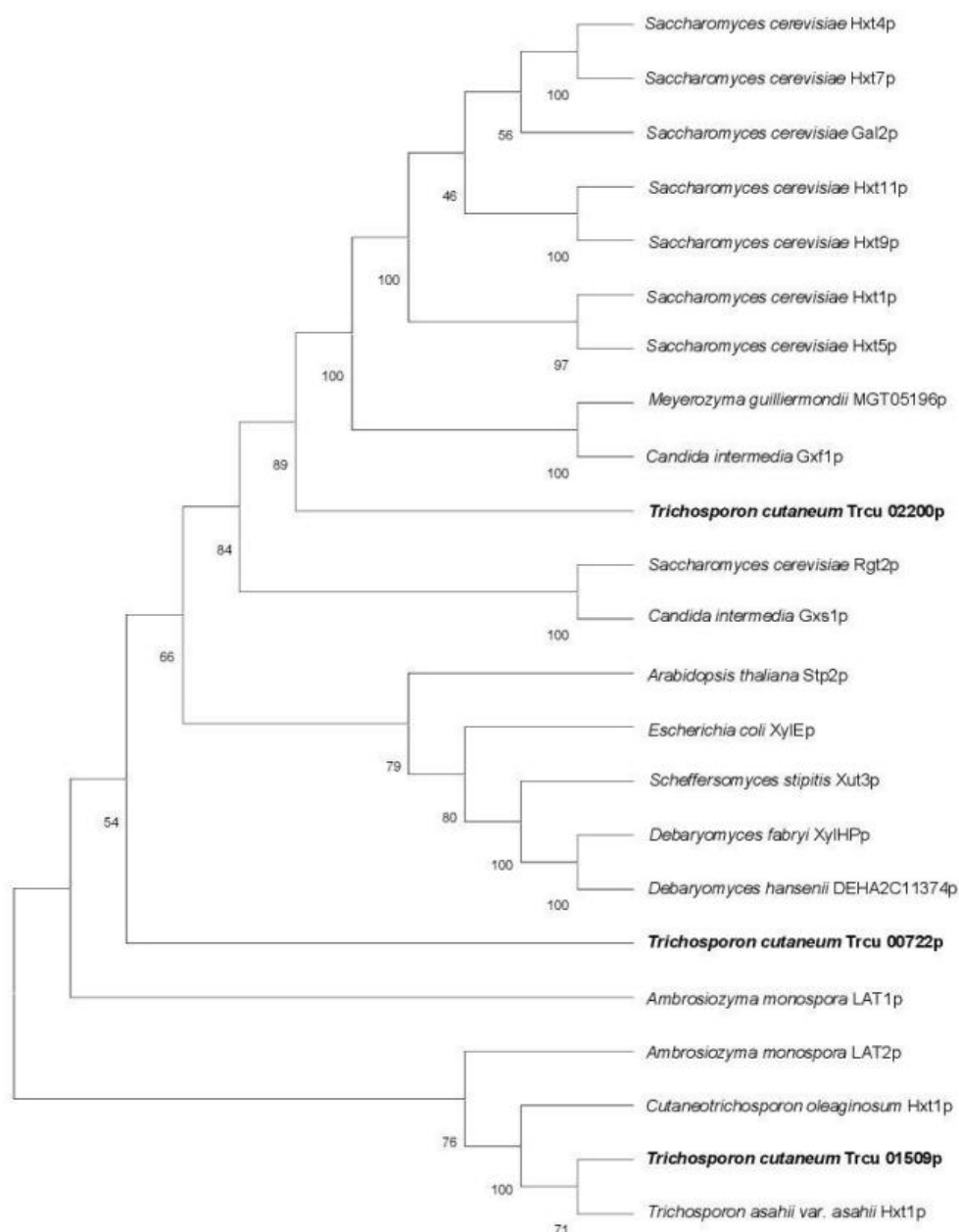


图 5.4 候选糖转运蛋白的系统发育树

Fig. 5.4 Phylogenetic tree of the candidate sugar transporters

首先构建酿酒酵母的基因表达系统，根据材料方法中 5.2.3 构建了本实验室酿酒酵母菌株适用的以 KanMX (G418) 作为筛选标记的表达质粒，后续考虑到外源基因表达的稳定性，选择将质粒中的启动子从诱导型的 GAL2 (半乳糖激酶) 启动子更换为启动力较强的组成型启动子。启动子选择两个酿酒酵母中最常用的强组成型启动子 TDH3p (3-磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子) 和 PGK1p (3-磷酸甘油酸激酶基因启动子)。将构建完成的分别以 TDH3p 和 PGK1p 作为启动子表达 GFP (绿的荧光蛋白) 基因的游离表达质粒转入 *S. cerevisiae* Z100，并利用荧光显微镜进行观察，与转入空载质粒 (pYES2-KanMX-TDH3p/pYES2-KanMX-PGK1p) 的对照菌株相比，如图 5.5a，两个酿酒酵母游

离表达菌株 pYES2-KanMX-TDH3p-GFP 和 pYES2-KanMX-PGK1p-GFP 核内均有绿色荧光。进一步通过 RT-qPCR 实验检测了以上两株游离表达菌株中 *GFP* 基因的荧光强度, 如图 5.5b 表明, 以 TDH3p 作为启动子的游离表达菌株 *GFP* 基因的表达量更高, 因此将 TDH3p 启动子作为后续游离表达质粒和整合型质粒的启动子。

(a) Fluorescence image

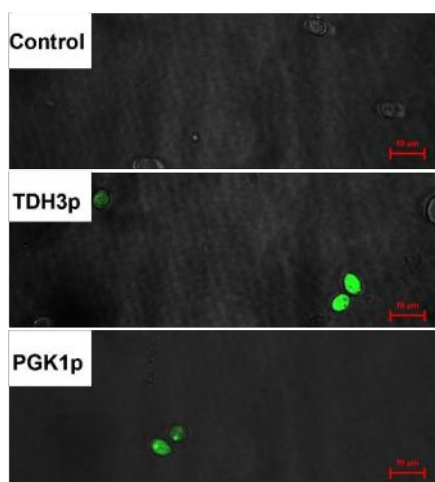
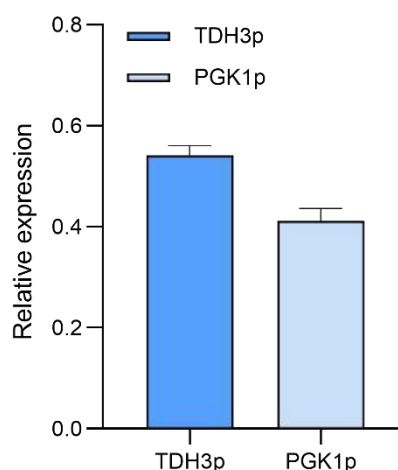
(b) Relative expression of *GFP* under different promoters

图 5.5 表达质粒启动子的比较

Fig. 5.5 Comparison of promoters in expression plasmid: (a) The fluorescence microscopy images of *S. cerevisiae* strains episomally expressing *GFP* genes under different promoters. (b) Relative expression of *GFP* genes under different promoters in *S. cerevisiae*. *ALG9* was used as an internal reference gene, and the relative expression was the expression of the *GFP* gene under different promoters in expressing strains compared to the internal reference gene

实验条件: 菌株活化后转接至 YPD 培养基, 培养在装液量为 10% 的 100 mL 的摇瓶中进行, 30°C, 180 rpm 的条件下培养 24 h, 培养时加入终浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 G418。培养结束后收集菌体洗涤、制片分别进行白光下的拍摄、暗场中激光器选择 488 nm 的 *GFP* 绿色荧光蛋白的拍摄。显微镜使用尼康共聚焦显微镜 (A1R)。

本实验前期经过高温适应性进化获得的能够代谢木糖的菌株酿酒酵母 *S. cerevisiae* Z100 具有纤维素乙醇的工业生产潜力。将绿色荧光蛋白融合到 Trcu\_00722、Trcu\_01509 和 Trcu\_02200 的 3'端, 验证其在酿酒酵母中的位置。将无终止密码子的 Trcu\_00722、Trcu\_01509 和 Trcu\_01249 的 cDNA 片段分别插入改造后的质粒 pYES2-KanMX-TDH3p 的 TDH3p(3-磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子)后, 得到 pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_00722、pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_01509、pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu\_02200。将上述三个质粒转入 *S. cerevisiae* Z100 中, 利用荧光显微镜进行观察, 结果表明, 如图 5.6, *S. cerevisiae* Trcu\_02200-GFP, *S. cerevisiae* Trcu\_00722-GFP、*S. cerevisiae* Trcu\_01509-GFP 的荧光集中表达在细胞表面, 其余不在细胞膜上的发光物质可能是膜蛋白从内质网、高尔基体分泌过程的动态残留, 以上结果表明来源于皮状丝孢酵母的转运蛋白 Trcu\_00722p、Trcu\_01509p 和 Trcu\_02200p 能准确靶向细胞膜, 在酿酒酵母中应该具有糖转运的功能。

因此, *S. cerevisiae* Z100 可以作为验证这三个在皮状丝孢酵母中表达显著上调的糖转运体的宿主菌株, 也有望进一步通过提高糖摄取能力进而提高纤维素乙醇的产量。

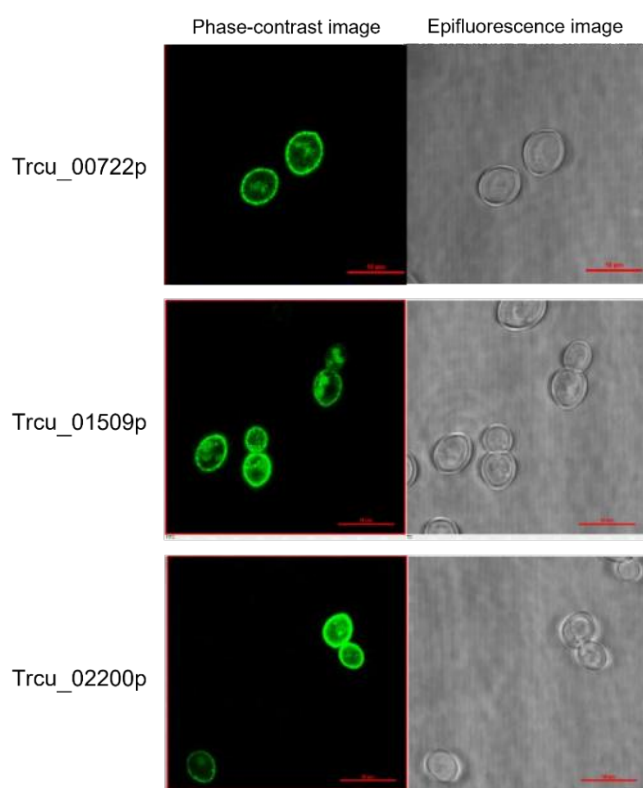


图 5.6 表达融合蛋白 Trcu\_00722p-GFP、Trcu\_01509p-GFP 和 Trcu\_02200p-GFP 的酿酒酵母菌株的荧光显微图像

Fig. 5.6 The fluorescence image of strain expressing fusion protein Trcu\_00722p-GFP, Trcu\_01509p-GFP and Trcu\_02200p-GFP

实验条件: 菌株活化后转接至 YPD 培养基, 培养在装液量为 10% 的 100 mL 的摇瓶中进行, 30°C, 180 rpm 的条件下培养 24 h, 培养时加入终浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 G418。培养结束后收集菌体洗涤、制片分别进行白光下的拍摄、暗场中激光器选择 488 nm 的 GFP 蛋白定位的拍摄。显微镜使用尼康共聚焦显微镜 (A1R)。

糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 在皮状丝孢酵母的基因组中均被注释为己糖转运蛋白, 其转运戊糖的能力有待进一步验证。未经代谢工程改造构建木糖或阿拉伯糖代谢通路的 *S. cerevisiae* 不能在木糖或阿拉伯糖上生长, 但可以将二者转化为对应的糖醇<sup>[284]</sup>。因此, 可以通过测定木糖和阿拉伯糖以及对应糖醇在细胞内的积累量来评估三个糖转运蛋白的戊糖转运能力。在内源性糖转运蛋白全部敲除的酿酒酵母突变体 EBY.VW4000 中进行该实验<sup>[289]</sup>, 以 *S. cerevisiae* 内源性的转运木糖能力较好的糖转运蛋白 Gal2p 为对照, 将基因 *Gal2* 和三个糖转运蛋白基因在 EBY.VW4000 中进行表达, 结果如图 5.7 所示, 在只转入空载质粒 pYES-KanMX 的对照菌株中三个时间点均基本检测不到木糖或阿拉伯糖。表达来源于皮状丝孢酵母的三个糖转运蛋白 Trcu\_00722p、Trcu\_01509p 和 Trcu\_02200p 使菌株 EBY.VW4000 在胞内积累了木糖或阿

拉伯糖，并且其中 *Trcu\_02200p* 的戊糖转运能力略逊色于 *Gal2p*，相对较好。通过以上实验初步证实了来源与皮状丝孢酵母的 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 基因编码的蛋白可以行使糖转运的功能。

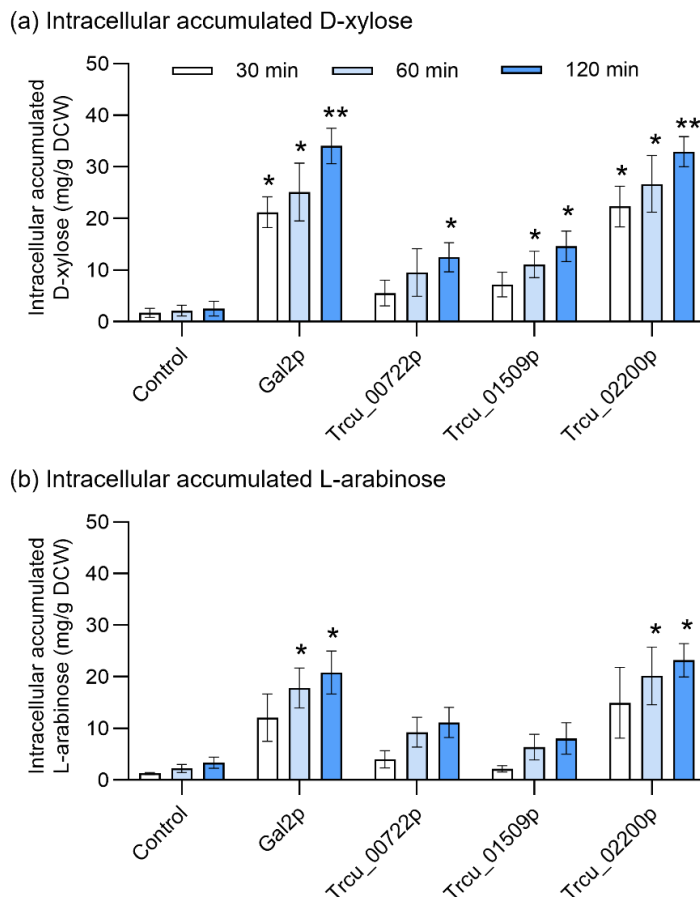


图 5.7 糖转运蛋白的戊糖转运能力

Fig. 5.7 The pentose transport capacity of the transporters: (a) Intracellular accumulated D-xylose; (b) Intracellular L-arabinose

实验条件：菌株活化后转接至 SD 培养基，培养在装液量为 10% 的 100 mL 摇瓶中进行，该实验的具体检测方法见 5.2.6

进一步将来源于皮状丝孢酵母的糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 在 *S. cerevisiae* Z100 中进行表达，以验证表达活跃的糖转运体是否是皮状丝孢酵母糖代谢能力显著提升的原因。以出发菌株 *S. cerevisiae* Z100 转入空载质粒作为对照，进行糖代谢能力和乙醇生产能力的检测。发酵验证实验在 3 L 发酵罐中进行，初始葡萄糖和木糖的浓度均为 40 g/L。发酵过程中 OD、葡萄糖代谢速率、木糖代谢速率和乙醇产量如图 5.8 所示。在 *S. cerevisiae* Z100 中异源游离表达糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 后木糖代谢速率分别为 0.19 g/L/h，0.24 g/L/h 和 0.28 g/L/h。与原始菌株相比 (0.21 g/L/d)，分别降低了 11.3%、升高了 14.6% 和 31.6%。异源表达以上三个糖转运蛋白后，4h 内葡萄糖代谢速率分别为 4.1 g/L/h，4.1 g/L/h 和 4.0 g/L/h，与

原始菌株相比 (3.9 g/L/h), 分别升高了 5.1%、5.1%和 2.6%。从结果可以看出, 表达以上三个糖转运蛋白基因葡萄糖和木糖的代谢速率有所提高, 但是提高的程度相对有限, 没有解除酿酒酵母出发菌株的葡萄糖代谢阻遏效应。因此这三个糖转运蛋白的高表达不是皮状丝孢酵母糖己糖和戊糖协同代谢能力显著提高的根本原因。

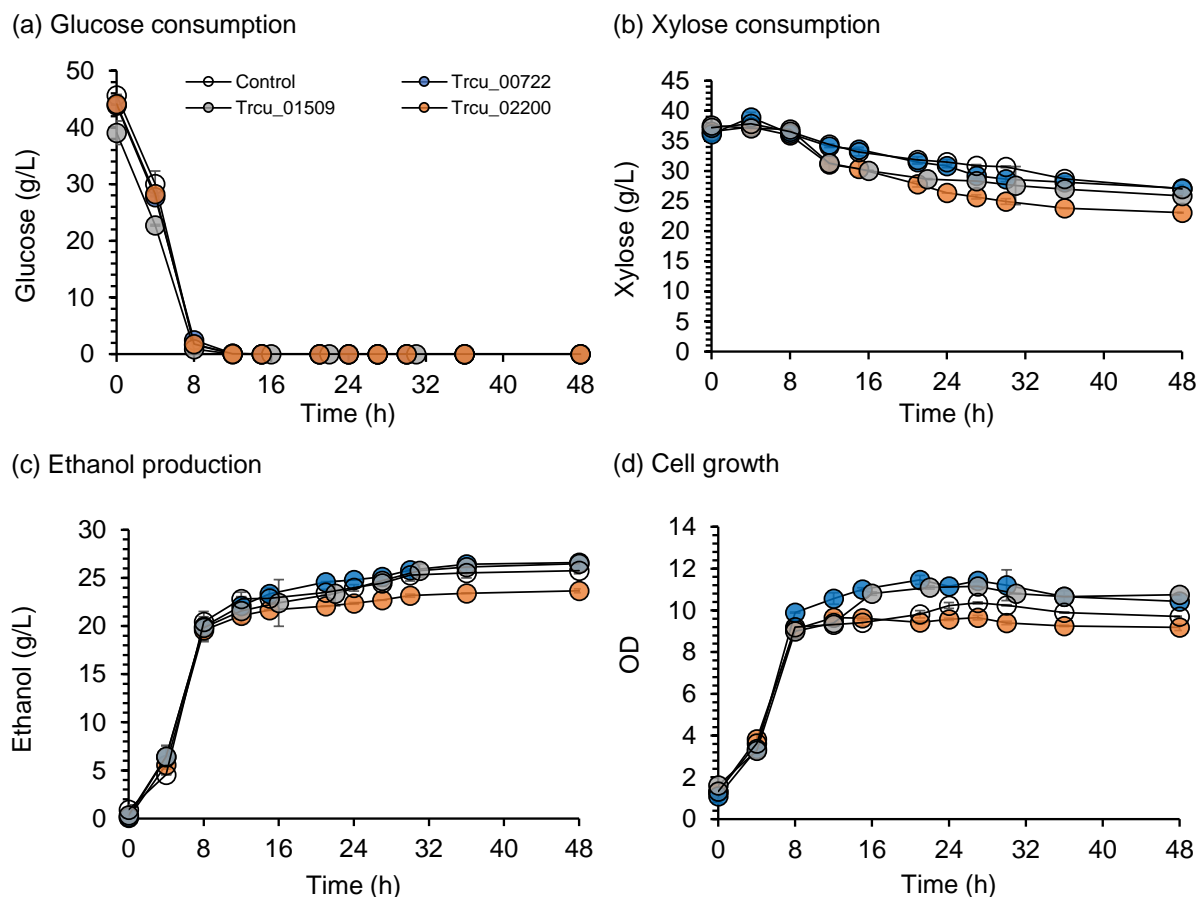


图 5.8 异源表达糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*, *Trcu\_02200* 和 *Trcu\_01509* 的 *S. cerevisiae* Z100 的发酵特性

Fig. 5.8 The fermentation characteristics of the *S. cerevisiae* Z100 strains heterologously expressing gene *Trcu\_00722*, *Trcu\_02200* and *Trcu\_01509*. The strain glucose consumption: (a), xylose consumption (b), ethanol production (c) and growth (d) in anaerobic fermentation.

实验条件: 发酵在 3 L 发酵罐中进行, 培养基为酿酒酵母合成培养基, 发酵条件为 30°C, 200 rpm, 自动控制 pH 至 5.5, 发酵时加入终浓度为 400 μg/ml 的 G418

总结以上实验结果, 为了验证突变皮状丝孢酵母己糖和戊糖协共代谢能力提高的关键原因, 将其表达水平显著上调的糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 在酿酒酵母 *S. cerevisiae* Z100 中表达。结果表明, 异源表达后并未实现 CCR 效应的解除或者缓解, 分析可能的原因。首先, 可能是由于异源表达使蛋白失去了特殊的结构导致功能受到影响。第二, 其他因素是提高皮状丝孢酵母突变菌株糖代谢能力的根本原因。虽然未发现 *T. cutaneum* MP11 重测序结果中有与糖转运和糖代谢直接相关的基因突变, 但是作为生命体的基本代谢途径, 糖代谢的调控机制网络较复杂。突变菌株 *T. cutaneum*

MP11 和 MS28 中调控或者影响糖代谢的相关基因的突变可能导致糖转运和单糖代谢途径的高度活跃。值得注意的是,联系第三章中关于产油酵母细胞在超离心力胁迫下信号转导通路的相关分析,超离心力胁迫下信号转导通路被激活后对代谢活动的调控可能是进化菌株糖代谢能力提高的主要原因。通过超离心力胁迫适应性进化获得的圆红冬孢酵母、解脂耶氏酵母和皮状丝孢酵母均有糖代谢和油脂代谢相关途径活跃的共性特征(图 3.5)。超离心胁迫应力下获得的突变菌株己糖和戊糖协同代谢能力提升的根本原因仍需要进一步的挖掘。

#### 5.3.4 在酿酒酵母中整合表达来源于皮状丝孢酵母的糖转运蛋白基因

在 *S. cerevisiae* Z100 中异源表达源于皮状丝孢酵母的糖转运蛋白基因 *Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 后木糖代谢速率有所提升(5.8b),但是两者比较之下糖转运蛋白 *Trcu\_02200p* 可能具有更好的木糖转运能力(图 5.7a)。因此,在 *S. cerevisiae* Z100 中进一步整合表达 *Trcu\_02200* 基因以尝试提高 *S. cerevisiae* Z100 的木糖代谢能力。

在酿酒酵母中对 *Trcu\_02200* 基因游离表达后乙醇产量与原始菌株相比差异不显著,原因可能是酿酒酵母游离表达质粒的拷贝数有限。因此,进一步对 *Trcu\_02200* 基因进行多拷贝整合表达。酿酒酵母发生同源重组的几率较高,增加外源基因拷贝数的有效方式是将同源重组位点选择在重复序列上。酿酒酵母基因组上核糖体 DNA (rDNA) 有 100 个以上重复单元,因此将 18srDNA 选择为 *Trcu\_02200* 基因的多拷贝整合位点以最大限度提高酿酒酵母的木糖代谢速率。以商业载体 pUG6 为骨架,在其中引入 18srDNA 上下游同源臂构建 rDNA 介导的多拷贝整合载体。鉴定获得阳性转化子后对整合菌株进行木质纤维素体系(玉米秸秆为原料)中木糖代谢能力和乙醇生产能力的探究(如图 5.9)。将整合菌株命名为 *S. cerevisiae* *Trcu\_02200*,如图 5.9a, 12 h 内, *S. cerevisiae* *Trcu\_02200* 葡萄糖代谢速相比于出发菌株率提高 5.4%,发酵至 96 h 木糖利用速率相比于出发菌株提高了 25.8%(图 5.9b)。但是在整合表达后菌体的生长量没有提高,同时乙醇产量与出发菌株相比并没有明显改善。这个结果对于通过提高糖代谢能力提高乙醇产量的目的来说是相对有限的。

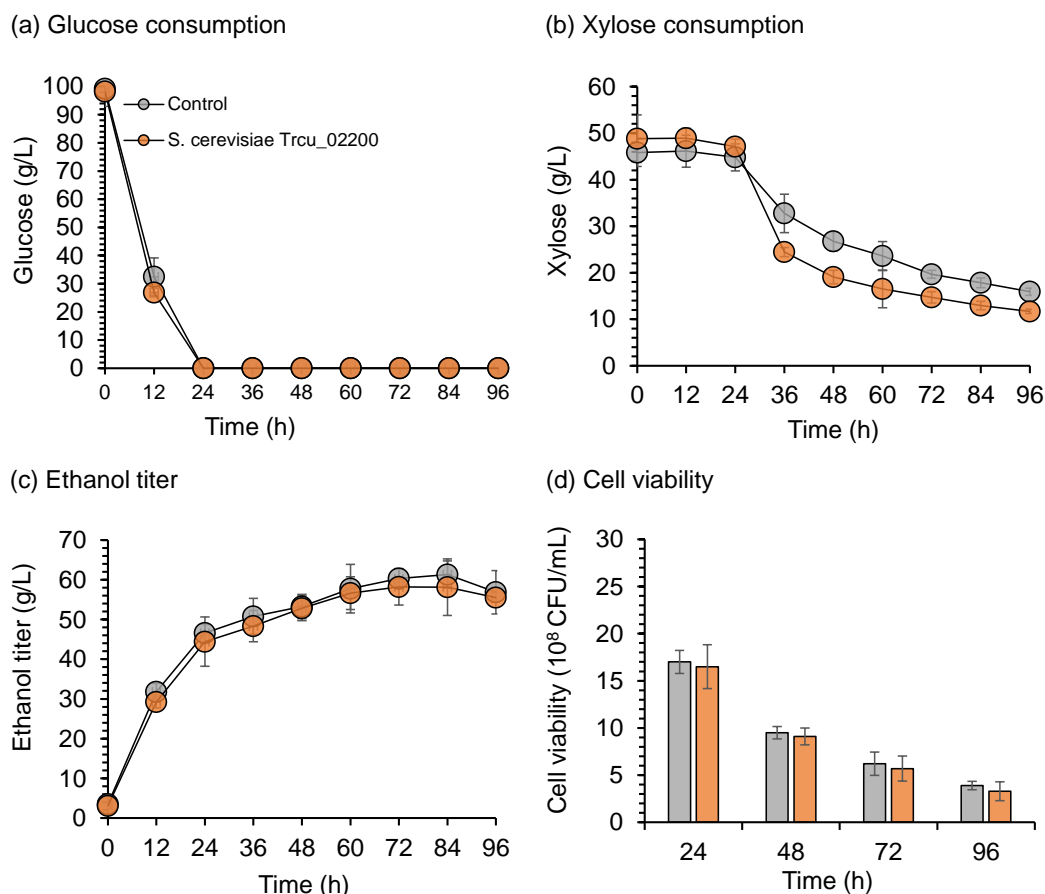


图 5.9 整合表达糖转运蛋白基因 *Trcu\_02200* 的酿酒酵母菌株在木质纤维素体系中的糖代谢和乙醇发酵性能

Fig. 5.9 Fermentation characteristics of *S. cerevisiae* Z100 integrating the heterologous sugar transporter gene *Trcu\_02200* using 30% (w/w) solids loading corn stover. The strains glucose consumption (a), xylose consumption (b), ethanol production (c) and growth (d) in anaerobic fermentation.

实验条件：预处理和生物脱毒后的玉米秸秆原料预水解 12 h（30%（w/w）固体含量）。以 10%（v/v）接种量接种，同步糖化共发酵在 30°C, 200 rpm 的条件下进行 96 h。

以上关于来源于皮状丝孢酵母的 *Trcu\_02200p* 在酿酒酵母中异源表达的结果，虽然提高了木糖代谢效率，但是菌体的生长和乙醇产量没有提高并没有提高反而略有下降。这样的发酵结果从乙醇产量来看相对有限，进一步探究其原因。MFS 型转运蛋白分为两类：第一种，不消耗能量且借助糖浓度梯度的单向异化扩散型（Facilitator/Uniporter），属于被动运输，木糖转运的特点是对木糖的亲合性较低，但转运效率较高；第二种不依赖糖浓度梯度、但需偶联质子浓度消耗 ATP 能量的质子同向协同型（ $H^+$ -linked symporter），属于主动运输，木糖转运的特点是对木糖有较高亲和力，但转运效率较低<sup>[285]</sup>。酿酒酵母中内源性的己糖转运体均属于第一种<sup>[285]</sup>。将在 *EBY.VW4000* 中异源游离表达 *Gal2*、*Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200* 的菌株培养至 OD600 为 1.2 用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次，洗涤后重悬于 20 mL 稀盐酸溶液中并调至 pH 为 5.0，加入 500  $\mu$ L 400 g/L 的木糖溶液，记录此时的 pH 值，持续取样并检测 pH 值，通过胞外环境 pH 的变化判断三个转运蛋白的类型。实验结果如 5.10 所示，原点是木糖溶液加入时间点，纵坐标  $\Delta$  pH 是环境初始

pH 值和检测值的差值。转运蛋白 *Trcu\_02200p* 表达菌株在检测时间段内细胞溶液 pH 明显升高,说明糖摄取的过程伴随质子内泵。*Trcu\_02200p* 属于质子同向转运体,而 *Gal2p*、*Trcu\_00722p*、*Trcu\_01509p* 表达菌株细胞溶液的 pH 没有明显变化,因此这两个蛋白属于 MFS 家族的单向异化扩散型蛋白。

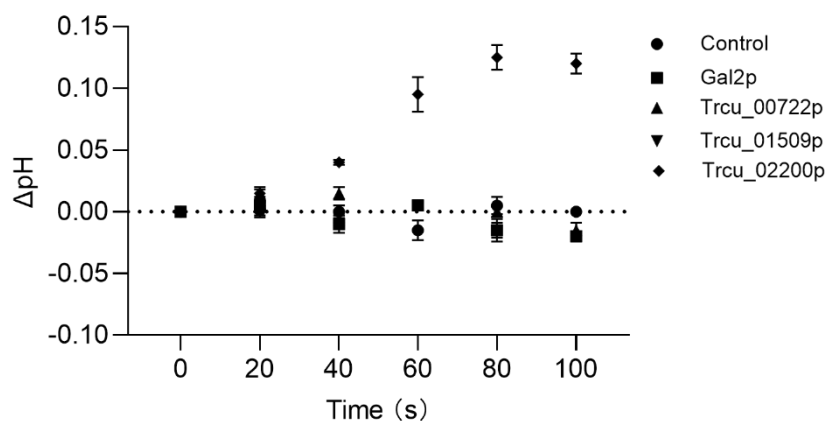


图 5.10 胞外 pH 值的变化指示转运体类型

Fig. 5.10 The type of transporter was indicated by the change of extracellular pH

实验条件: 菌株活化后洗涤并转移至稀盐酸中进行实验, 取样时保持无菌操作。

## 5.4 本章小结

木质纤维素来源的可发糖中除了葡萄糖外,除了己糖外还有约 30%的戊糖,提高戊糖,尤其是木糖的利用效率,是高效利用木质纤维素原料的前提。野生的产油酵母菌株皮状丝孢酵母虽然可以同时利用葡萄糖和木糖,但是其协同利用的速率有限。前期研究中经超离心力胁迫适应性进化获得的两株突变皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 己糖和戊糖共代谢能力显著提升,这一优良的发酵性能值得进一步探究。本研究首先检测了两株突变菌株利用木质纤维素来源的各种单糖的代谢速率,进一步检测并分析了糖转运蛋白和糖代谢相关基因的转录水平。挖掘出两株突变菌株中转录水平均显著上调的三个糖转运蛋白基因,并在酿酒酵母中进行异源表达以验证突变皮状丝孢酵母己糖戊糖共代谢能力提高的关键原因,同时有望提高酿酒酵母的木糖代谢能力。本章主要的研究结论如下:

(1) 在不同单糖为唯一碳源和混合糖条件下验证了 *T. cutaneum* MP11 和 MS28 能够实现己糖和戊糖的快速、协同利用。两株突变菌株中糖转运和糖代谢相关基因转录水平的检测发现,糖转运蛋白和各单糖分解代谢上的基因基本均有转录水平的上调。活跃的糖转运和单糖分解代谢共同导致了显著增强的糖代谢能力。

(2) 通过不同单糖为唯一碳源和混合糖条件下两株突变菌株转录水平的检测,挖掘出 3 个转录水平显著上调的糖转运蛋白基因 *Trcu\_00722*、*Trcu\_01509* 和 *Trcu\_02200*。将以上三个候选糖转运蛋白基因在 *S. cerevisiae* Z100 中进行表达, *Trcu\_01509p* 和

Trcu\_02200p 均能增强酿酒酵母的木糖代谢。但是并未解除或者缓解酿酒酵母的葡萄糖代谢阻遏效应。因此以上高表达的糖转运蛋白基因并不是突变皮状丝孢酵母己糖、戊糖共代谢能力提高的根本原因。根据第三章关于超离心力胁迫对产油酵母细胞行为变化机制的探究，超离心力胁迫下机械力信号转导通路被激活后对代谢活动，包括糖代谢的调控可能是进化菌株糖代谢能力提高的原因。超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株己糖和戊糖协同代谢能力提升的根本原因仍需要进一步的挖掘。

(3) 将糖转运能力相对较强的 Trcu\_02200p 在 *S. cerevisiae* Z100 多拷贝位点进行整合后，木糖代谢有一定程度的提高，但是菌株的生长和乙醇产量没有明显改善。这样的结果对于乙醇发酵来说相对有限。最后鉴定出 Trcu\_02200p 属于消耗能量的质子同向转运体。

## 第6章 结论与展望

### 6.1 结论

产油酵母由于其鲁棒性强、油脂积累能力强、糖代谢能力强是进行微生物油脂生产最具前景的细胞工厂。以木质纤维素生物质为原料,通过生物炼制糖平台生产微生物油脂,有望为生物柴油和生物航煤生产提供重要的可再生前体。目前已经尝试了各种方法来获得以木质纤维素为原料生产微生物油脂的高油脂含量产油酵母,包括代谢工程改造法、诱变法等,但进展十分有限。课题组前期研究提出了一种超离心力胁迫适应性进化的方法,有效提高了产油酵母的油脂积累能力。本文旨在阐释超离心力胁迫适应性进化方法在细胞中的用作机制。本论文的主要结论如下:

(1) 表征了经超离心力胁迫适应性进化获得的突变菌株 *T. cutaneum* MP11 和 YY52 的生理特征。两株突变菌株的细胞形态、细胞壁结构等特性均发生了稳定、显著且相似的变化。其油脂积累能力显著提高,体积增大近两个数量级,细胞壁组分中葡聚糖含量和甘露聚糖含量显著降低。全基因组重测序和转录分析共同揭示了细胞壁代谢相关基因的突变和转录调控的显著上调,尤其是葡聚糖降解酶基因的突变和高表达可能是细胞壁组分变化的关键因素。脂质合成关键基因的突变和转录水平的上调则可能是促进油脂合成大幅提升的重要原因。两株突变菌株利用玉米秸秆为原料发酵生产纤维素油脂的产量分别达到 40.3 g/L 和 58.4 g/L,实现了木质纤维素生物质批次发酵生产微生物油脂的最高指标。

(2) 探究了超离心力胁迫适应性进化方法中离心时间和离心强度因素对细胞形态和代谢的影响。通过作用时间较长的超离心力胁迫在较短进化周期实现了皮状丝孢酵母细胞体积的增大、细胞壁组分的改变和油脂含量的增多。超离心力胁迫适应性进化的方法进一步实现了圆红冬孢酵母和解脂耶氏酵母的细胞体积扩张和油脂含量增加。超离心力是改变产油酵母细胞形态和代谢的关键因素。

(3) 鉴定了一条在产油酵母中保守的传递超离心力胁迫信号并促进油脂积累的机械力信号通路。通过转录组分析和蛋白互作网络分析,初步挖掘出了以 Ypk1 为核心激酶的 TORC2 机械力信号通路对产油酵母传递超离心力胁迫信号并调节脂质合成有重要作用。基因表达量分析和关键激酶磷酸化水平的检测等实验表明,在超离心力胁迫下,激活因子 Slm1 表达量上调,同时受 Slm1 激活的 TORC2 主要激酶底物 Ypk1 的磷酸水平上升,使其下游效应基因如 *FAS1* 和 *ACC* 表达显著上调,从而提高了胞内油脂含量。通过直接添加机械力信号感受器蛋白 TORC2 特异性抑制剂会导致超离心力胁迫刺激下 Ypk1 磷酸化程度降低,同时细胞对外界超离心力刺激不敏感。证明了产油酵母中 Slm1/2-TORC2-Ypk1 机械力信号通路响应外界超离心力胁迫刺激从而促进胞内油脂积累的重要作用。

(4) 采用木质纤维素来源的酚醛抑制物胁迫和超离心力胁迫结合的适应性进化

方法,同步提高了产油酵母抑制物耐受性和油脂积累能力。以皮状丝孢酵母为出发菌株,在玉米秸秆水解液中进行超离心力胁迫适应性进化。最终获得的突变菌株 *T. cutaneum* MS28 实现了对木质纤维素衍生抑制物耐受性和油脂积累能力的同步提高。转录分析表明突变菌株在木质纤维素体系中具有更活跃的糖代谢和油脂合成代谢,使其可以利用生物炼制技术生产高指标的纤维素微生物油脂。

(5) 探究了两株经超离心胁迫进化获得的突变菌株糖代谢能力显著提高的原因。两株突变菌株均具有活跃的糖转运和单糖分解代谢。经对突变菌株糖代谢和糖转运蛋白转录水平的分析,挖掘出三个转录水平显著上调的糖转运蛋白基因。在酿酒酵母异源表达和多拷贝整合表达上述三个糖转运蛋白基因,在一定程度上提高了木糖代谢速率。

## 6.2 创新点

(1) 超离心力胁迫适应性进化实现了对皮状丝孢酵母、解脂耶氏酵母和圆红冬孢酵母的形态扩张和油脂含量的显著提高,验证了该方法在产油酵母中的普适性,实现了该机制在其他产油酵母中的扩展和应用。

(2) 对不同超离心力胁迫时间的进化菌株进行了完整的细胞表征,表明持续性的超离心力胁迫是获得胞内空间显著增大、油脂积累能力显著增强并实现全通量筛选的有效手段。

(3) 鉴定了一条传递超离心刺激并调控胞内油脂积累的重要机械力信号转导通路 *Slm1/2-TORC2-Ypk1*。将机械力胁迫用于产油酵母的代谢调控中,可有效在较短周期内实现细胞体积十到百倍的增加以及油脂含量的急剧升高,这是常规代谢工程改造难以企及的。

## 6.3 展望

本研究鉴定出了一条在产油酵母响应外界离心力刺激从而调控脂质积累和形态变化的关键机械力信号转导通路,该条信号通路在酵母中具有一定的保守性。但是本研究也存在一些有待深入研究的问题:

(1) 本研究虽然通过超离心胁迫进化菌株的转录水平和蛋白磷酸化水平上的变化证明了细胞变化与 *TORC2* 机械力信号转导通路具有密切关系,但是机械力信号通路的鉴定最终需要落实到感受器或者感受器激活因子的基因敲除等验证性实验,因此需要建立皮状丝孢酵母的基因编辑工具。建立基因编辑系统也能够对第二章中组学发现的高产油脂机制进行验证,对关键基因进行敲除和过表达,使其向着更高油脂产量的方向改变。

(2) 鉴于解脂耶氏酵母具有成熟的基因操作系统,后续研究我们首先将尝试在解脂耶氏酵母中对 *Slm1* 在离心前后的定位变化进行表征,用以验证该信号通路在超离心力作用下的激活开关;进一步将尝试在解脂耶氏酵母中敲除或过表达 *Slm1* 和 *Ypk1* 等基因,进一步通过超离心力胁迫适应性进化验证不同工程菌的形态改变和代谢变化,从而证明该信号通路对响应外界超离心力刺激的重要作用。最终可通过对该信号通路的基

因进行过表达或进行蛋白突变，有望实现对该信号通路的人工调控或直接激活，从而挖掘出一类新的用于代谢调控的基因元件。

(3) 本研究提出和验证的超离心力场迭代进化方法相对耗时较长、工作量较大。积极的思路是通过代谢工程改造手段，对产油酵母的机械力信号调控通路进行主动改造。可以对机械力响应通路激活因子 *Slm1/2* 进行脱离细胞膜定位的表达以及表达强度调控，使其在细胞膜张力不变（非超离心力场胁迫）的状态下在胞质中自由迁移，强力激活机械力感受器蛋白 *TORC2* 并强化胞内油脂合成，最终实现对机械力信号转导通路的人工激活。

(4) 鉴于 *TORC2* 机械力信号通路在酵母细胞中的保守特性，有望应用该技术升级更多工业酵母底盘，实现微生物单细胞油脂之外的其它胞内产物高产，例如单细胞蛋白、聚羟基脂肪酸、 $\beta$ -类胡萝卜素等。

(5) 本研究所使用的超离心力胁迫进化方法，通过叠加了新的胁迫因素，可以更加高效的进行细胞突变、缩短进化进程。将低温培养和超离心力进化结合，低温下脂肪酸去饱和脂肪酶活性升高，通过低温下的超离心力胁迫适应性进化调整脂肪酸组成，获得产量更高的高附加值多不饱和脂肪酸；在高氨氮下进行超离心力胁迫进化，在保证菌体量更大的前提下提高油脂产量，从而实现微生物油脂的更加高产。

(6) 本研究第五章主要从糖转运和糖代谢两方面分析了经超离心力胁迫进化获得的两株突变菌株己糖和戊糖共代谢能力提高的原因。但糖转运和单糖分解代谢过程的变化可能并不是糖代谢能力提高的根本原因。超离心胁迫相关的 *TORC2* 机械力信号通路中核心激酶 *Ypk1* 除了调控脂质合成也同时调控戊糖代谢，因此 *TORC2* 机械力信号通路对糖代谢的调控也有待进一步探究。

## 参考文献

- [1] Hasan M, Abedin MZ, Amin MB, Nekmahmud M, Oláh J. Sustainable biofuel economy: A mapping through bibliometric research. *Journal of Environmental Management*. 2023, 336: 117644.
- [2] Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010, 14(2): 578-597.
- [3] Liow MY, Gourich W, Chang MY, Loh JM, Chan ES, Song CP. Towards rapid and sustainable synthesis of biodiesel: A review of effective parameters and scale-up potential of intensification technologies for enzymatic biodiesel production. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2022, 114: 1-18.
- [4] Crabbe E, Nolasco-Hipolito C, Kobayashi G, Sonomoto K, Ishizaki A. Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. *Process Biochemistry*. 2001, 37(1): 65-71.
- [5] Hassan T, Rahman MM, Rahman MA, Nabi MN. Opportunities and challenges for the application of biodiesel as automotive fuel in the 21st century. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2022, 16(5): 1353-1387.
- [6] Zhu Y, Fan H. Use of biodiesel in non-road mobile machineries for low-carbon construction: Policy review and lifecycle analysis. *Journal of Cleaner Production*. 2023, 421: 138543.
- [7] Rana VS, Das M. Fatty acid and non-fatty acid components of the seed oil of *Celastrus paniculatus* Willd. *International Journal of Fruit Science*. 2017, 17(4): 407-414.
- [8] Fassinou WF, Sako A, Fofana A, Koua KB, Toure S. Fatty acids composition as a means to estimate the high heating value (HHV) of vegetable oils and biodiesel fuels. *Energy*. 2010, 35(12): 4949-4954.
- [9] Watsuntorn W, Chuengcharoenphanich N, Niltaya P, Butkumchote C, Theerachat M, Glinwong C, Qi W, Wang Z, Chulalaksananukul W. A novel oleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* CU-TPD4 for lipid and biodiesel production. *Chemosphere*. 2021, 280: 130782.
- [10] Kurzawska-Pietrowicz P, Jasiński R. A Review of Alternative Aviation Fuels. *Energies*. 2024, 17(16): 3890.
- [11] Cabrera E, de-Sousa JMM. Use of Sustainable Fuels in Aviation—A Review. *Energies*. 2022, 15(7): 2440.
- [12] Rashid U, Anwar F, Knothe G. Evaluation of biodiesel obtained from cottonseed oil. *Fuel Processing Technology*. 2009, 90(9): 1157-1163.
- [13] Changmai B, Vanlalveni C, Ingle AP, Bhagat R, Rokhum SL. Widely used catalysts in biodiesel production: a review. *RSC Advances*. 2020, 10(68): 41625-41679.
- [14] Qin L, Liu L, Zeng AP, Wei D. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1507-1519.
- [15] Legodi LM, Moganedi KLM. Selection of oleaginous yeasts isolated from sugarcane

- bagasse as the potential producers of single cell oils and other metabolites. *Annals of Microbiology*. 2023, 73.
- [16] Bonturi N, Matsakas L, Nilsson R, Christakopoulos P, Miranda E, Berglund K, Rova U. Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies*. 2015, 8(6): 5040-5052.
- [17] Yao Q, Chen H, Wang S, Tang X, Gu Z, Zhang H, Chen W, Chen Y Q. An efficient strategy for screening polyunsaturated fatty acid-producing oleaginous filamentous fungi from soil. *Journal of Microbiological Methods*. 2019, 158: 80-85.
- [18] Ma X, Mi Y, Zhao C, Wei Q. A comprehensive review on carbon source effect of microalgae lipid accumulation for biofuel production. *Science of The Total Environment*. 2022, 806: 151387.
- [19] Salvador-López JM, Vandeputte M, Van-Bogaert INA. Oleaginous yeasts: Time to rethink the definition. *Yeast*. 2022, 39(12): 553-606.
- [20] Abeln F, Chuck CJ. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial Cell Factories*. 2021, 20(1): 221.
- [21] Lamers D, van Biezen N, Martens D, Peters L, vande Zilver E, Jacobs-van DN, Wijffels RH, Lokman C. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology*. 2016, 16(1): 45.
- [22] Zhang L, Lee JTE, Ok YS, Dai Y, Tong YW. Enhancing microbial lipids yield for biodiesel production by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* fermentation: A review. *Bioresource Technology*. 2022, 344: 126294.
- [23] Niehus X, Crutz-Le CAM, Sandoval G, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 11.
- [24] Sunder S, Gupta A, Kataria R, Ruhel R. Potential of *Rhodospiridium toruloides* for fatty acids production using lignocellulose biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024, 196(5): 2881-2900.
- [25] Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H, Lin X, Yang F, Zhou YJ, Jin G, Ye M, Zou H, Zhao ZK. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*, 2013, 4(1): 1930.
- [26] Liu S, Zhang M, Ren Y, Jin G, Tao Y, Lyu L, Zhao ZK, Yang X. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for limonene production. *Biotechnology for Biofuels*. 2021, 14(1): 243.
- [27] Jiao X, Lyu L, Zhang Y, Huang Q, Zhou R, Wang S, Wang S, Zhang S, Zhao ZK. Reduction of lipid-accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through CRISPR/Cas9-mediated inactivation of lipid droplet structural proteins. *FEMS Microbiology Letters*. 2021, 368(16): 111.
- [28] Spagnuolo M, Yaguchi A, Blenner M. Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019, 57: 73-81.
- [29] Dai Z, Pomraning KR, Panisko EA, Hofstad BA, Campbell KB, Kim J, Robles AL, Deng

- S, Magnuson JK. Genetically engineered oleaginous yeast *lipomyces starkeyi* for sesquiterpene  $\alpha$ -zingiberene production. *ACS Synthetic Biology*. 2021, 10(5): 1000-1008.
- [30] Chen H, Qu Y, Gao P, Shi H. SCP production from steam-exploded hemicellulose hydrolysate: Strains and fermentation conditions. *Acta Microbiologica Sinica*. 1993, 33(3): 236-238.
- [31] Moon NJ, Hammond EG, Glatz BA. Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein1. *Journal of Dairy Science*. 1978, 61(11): 1537-1547.
- [32] Hu C, Wu S, Wang Q, Jin G, Shen H, Zhao ZK. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4(1): 25.
- [33] Wang J, Gao Q, Zhang H, Bao J. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 892-901.
- [34] Gao Q, Cui Z, Zhang J, Bao J. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2014, 152: 552-556.
- [35] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 2002, 51: 1-51.
- [36] Wang C, Huang C, Chen XF, Zhang HR, Xiong L, Li XM, Guo HJ, Qi GX, Lin XQ, Chen XD. Lumping kinetics of ABE fermentation wastewater treatment by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2017, 47(9): 860-866.
- [37] Wang J, Hu M, Zhang H, Bao J. Converting chemical oxygen demand (COD) of cellulosic ethanol fermentation wastewater into microbial lipid by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, 182(3): 1121-1130.
- [38] Zhang B, Ren D, Liu Q, Liu X, Bao J. Coproduction of single cell protein and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling. *Bioresource Technology*. 2023, 384: 129345.
- [39] Zhang X, Chen J, Idossou V, Tyagi RD, Li J, Wang H. Lipid accumulation from *Trichosporon oleaginosus* with co-fermentation of washed wastewater sludge and crude glycerol. *Fuel*. 2018, 226: 93-102.
- [40] Liu J, Zhou W, He Q, Zhao M, Gong Z. Microbial lipid production from high concentration of volatile fatty acids via *Trichosporon cutaneum* for biodiesel preparation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022, 194(7): 2968-2979.
- [41] V-Sreeharsha R, Sai-Tejaswini G, Venkata-Mohan S. Dual-stage biorefinery to convert spentwash hydrolysate into oleochemicals using *Trichosporon cutaneum* and *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2022, 354: 127146.
- [42] Sun L, Shao S, Bao J. Microbial lipid fermentation of *Trichosporon cutaneum* in high saline water. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021, 8(1): 71.
- [43] Zhu L B, Wang Y, Zhang ZB, Yang HL, Yan RM, Zhu D. Influence of environmental and nutritional conditions on yeast–mycelial dimorphic transition in *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017, 31(3): 516-526.

- [44] Wang Y, Yan R, Tang L, Zhu L, Zhu D, Bai F. Dimorphism of *Trichosporon cutaneum* and impact on its lipid production. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12(1): 203.
- [45] Wang J, Gao Q, 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.
- [46] Welte-Michael A. Expanding roles for lipid droplets. *Current Biology*. 2015, 25(11): 470-481.
- [47] Zhao Y, Shi W, Li X, Ma H. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets. *Chemical Communications*. 2022, 58(10): 1495-1509.
- [48] Meyers A, Weiskittel TM, Dalhaimer P. Lipid droplets: Formation to breakdown. *Lipids*. 2017, 52(6): 465-475.
- [49] Schepers J, Behl C. Lipid droplets and autophagy—links and regulations from yeast to humans. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2021, 122(6): 602-611.
- [50] Wang L, Liu J, Miao Z, Pan Q, Cao W. Lipid droplets and their interactions with other organelles in liver diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2021, 133: 105937.
- [51] Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018, 20(3): 137-155.
- [52] McNeil BA, Stuart DT. *Lipomyces starkeyi*: an emerging cell factory for production of lipids, oleochemicals and biotechnology applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018, 34(10): 147.
- [53] Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*. 2013, 15: 1-9.
- [54] Takaku H, Matsuzawa T, Yaoi K, Yamazaki H. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104(14): 6141-6148.
- [55] Chattopadhyay A, Maiti MK. Chapter One: Lipid production by oleaginous yeasts. *Advances in Applied Microbiology*. 2021: 1-98.
- [56] Kamineni A, Shaw J. Engineering triacylglycerol production from sugars in oleaginous yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020, 62: 239-247.
- [57] Lee JW, Yook S, Koh H, Rao CV, Jin YS. Engineering xylose metabolism in yeasts to produce biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2021, 67: 15-25.
- [58] Zhang H, Zhang L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP:citrate lyase from *Mus musculus*. *Journal of Biotechnology*. 2014, 192: 78-84.
- [59] Morin N, Cescut J, Beopoulos A, Lelandais G, Le-Berre V, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. Transcriptomic analyses during the transition from Biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Plos One*. 2011, 6(11): e27966.
- [60] Yang F, Zhang S, Zhou YJ, Zhu Z, Lin X, Zhao ZK. Characterization of the mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase of the oleaginous yeast *Rhodospiridium*

- toruloides*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012, 94(4): 1095-1105.
- [61] Dourou M, Aggeli D, Papanikolaou S, Aggelis G. Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018, 102(6): 2509-2523.
- [62] Sundaramahalingam MA, Sivashanmugam P, Rajeshbanu J, Ashokkumar M. A review on contemporary approaches in enhancing the innate lipid content of yeast cell. Chemosphere. 2022, 293: 133616.
- [63] Mondal S, Halder SK, Mondal KC. State-of-art engineering approaches for ameliorated production of microbial lipid. Systems Microbiology and Biomanufacturing. 2023, 4(1): 20-38.
- [64] Yan FX, Dong GR, Qiang S, Niu YJ, Hu CY, Meng YH. Overexpression of  $\Delta 12$ ,  $\Delta 15$ -desaturases for enhanced lipids synthesis in *Yarrowia lipolytica*. Frontiers in Microbiology. 2020, 11: 289.
- [65] Wang S, Kamal R, Zhang Y, Zhou R, Lv L, Huang Q, Qian S, Zhang S, Zhao ZK. Expression of Vhb improved lipid production in *Rhodospiridium toruloides*. 2020, 13(17):10
- [66] Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, Le-Dall MT, Hapala I, Papanikolaou S, Chardot T, Nicaud JM. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology. 2008, 74(24): 7779-7789.
- [67] Dulermo T, Nicaud JM. Involvement of the G3P shuttle and  $\beta$ -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. Metabolic Engineering. 2011, 13(5): 482-491.
- [68] Friedlander J, Tsakraklides V, Kamineni A, Greenhagen EH, Consiglio AL, MacEwen K, Crabtree DV, Afshar J, Nugent RL, Hamilton MA, Joe-Shaw A, South CR, Stephanopoulos G, Brevnova EE. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. Biotechnology for Biofuels. 2016, 9(1): 77.
- [69] Liu N, Qiao K, Stephanopoulos G.  $^{13}\text{C}$  Metabolic flux analysis of acetate conversion to lipids by *Yarrowia lipolytica*. Metabolic Engineering. 2016, 38: 86-97.
- [70] Bandhu S, Bansal N, Dasgupta D, Junghare V, Sidana A, Kalyan G, Hazra S, Ghosh D. Overproduction of single cell oil from xylose rich sugarcane bagasse hydrolysate by an engineered oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IIPL32. Fuel. 2019, 254: 115653.
- [71] Qiao K, Wasylenko TM, Zhou K, Xu P, Stephanopoulos G. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. Nature Biotechnology. 2017, 35(2): 173-177.
- [72] Bessadok B, Santulli A, Brück T, Sadok S. Species disparity response to mutagenesis of marine yeasts for the potential production of biodiesel. Biotechnology for Biofuels. 2019, 12(1): 129.
- [73] Muthuraj M, Selvaraj B, Palabhanvi B, Kumar V, Das D. Enhanced lipid content in *Chlorella sp.* FC2 IITG via high energy irradiation mutagenesis. Korean Journal of Chemical Engineering. 2019, 36(1): 63-70.
- [74] Qu F, Jin W, Zhou X, Wang M, Chen C, Tu R, Han Sf, He Z, Li SF. Nitrogen ion beam

- implantation for enhanced lipid accumulation of *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater. *Biomass and Bioenergy*. 2020, 134: 105483.
- [75] Mahajan D, Sengupta S, Sen S. Strategies to improve microbial lipid production: Optimization techniques. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 22: 101321.
- [76] Park BG, Kim J, Kim EJ, Kim Y, Kim J, Kim JY, Kim BG. Application of random mutagenesis and synthetic FadR promoter for de novo production of  $\omega$ -Hydroxy Fatty Acid in *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, 9: 624838.
- [77] Yamada R, Kashihara T, Ogino H. Improvement of lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through UV mutagenesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017, 33(5): 99.
- [78] Yamada R, Yamauchi A, Kashihara T, Ogino H. Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. *Biochemical Engineering Journal*. 2017, 128: 76-82.
- [79] Arora N, Yen HW, Philippidis GP. Harnessing the power of mutagenesis and adaptive laboratory evolution for high lipid production by oleaginous microalgae and yeasts. *Sustainability*. 2020, 12(12).
- [80] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22(4): 590-594.
- [81] Li X, Yuan Y, Cheng D, Gao J, Kong L, Zhao Q, Wei W, Sun Y. Exploring stress tolerance mechanism of evolved freshwater strain *Chlorella sp.* S30 under 30 g/L salt. *Bioresource Technology*. 2018, 250: 495-504.
- [82] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12(1): 64.
- [83] Wang G, Li Q, Zhang Z, Yin X, Wang B, Yang X. Recent progress in adaptive laboratory evolution of industrial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2023, 50(1): 23.
- [84] Chen C, Li YW, Chen XY, Wang YT, Ye C, Shi TQ. Application of adaptive laboratory evolution for *Yarrowia lipolytica*: A comprehensive review. *Bioresource Technology*. 2024, 391: 129893.
- [85] Díaz T, Fillet S, Campoy S, Vázquez R, Viña J, Murillo J, Adrio JL. Combining evolutionary and metabolic engineering in *Rhodospiridium toruloides* for lipid production with non-detoxified wheat straw hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(7): 3287-3300.
- [86] Park G W, Shin S, Kim S J, Lee JS, Moon M, Min K. Rice straw-derived lipid production by HMF/furfural-tolerant oleaginous yeast generated by adaptive laboratory evolution. *Bioresource Technology*. 2023, 367: 128220.
- [87] Cheng D, Li X, Yuan Y, Yang C, Tang T, Zhao Q, Sun Y. Adaptive evolution and carbon dioxide fixation of *Chlorella sp.* in simulated flue gas. *Science of The Total Environment*. 2019, 650: 2931-2938.

- [88] Daskalaki A, Perdikouli N, Aggeli D, Aggelis G. Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(20): 8585-8596.
- [89] Erashima M, Freeman ES, Jinkerson RE, Jonikas MC. A fluorescence-activated cell sorting-based strategy for rapid isolation of high-lipid *Chlamydomonas* mutants. *The Plant Journal*. 2014, 81(1): 147-159.
- [90] Cagnon C, Mirabella B, Nguyen HM, Beyly-Adriano A, Bouvet S, Cuiné S, Beisson F, Peltier G, Beisson LY. Development of a forward genetic screen to isolate oil mutants in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 178.
- [91] Velmurugan N, Sung M, Yim SS, Park MS, Yang JW, Jeong KJ. Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry. *Bioresource Technology*. 2013, 138: 30-37.
- [92] Xie B, Stessman D, Hart JH, Dong H, Wang Y, Wright DA, Nikolau BJ, Spalding MH, Halverson LJ. High-throughput fluorescence-activated cell sorting for lipid hyperaccumulating *Chlamydomonas reinhardtii* mutants. *Plant Biotechnology Journal*. 2014, 12(7): 872-882.
- [93] Unrean P, Champreda V. High-throughput screening and dual feeding fed-batch strategy for enhanced single-cell oil Accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *BioEnergy Research*. 2017, 10(4): 1057-1065.
- [94] Patterson K, Yu J, Landberg J, Chang I, Shavarebi F, Bilanchone V, Sandmeyer S. Functional genomics for the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2018, 48: 184-196.
- [95] Pačnik K, Ogrizović M, Diepold M, Eisenberg T, Žganjar M, Žun G, Kužnik B, Gostinčar C, Curk T, Petrovič U, Natter K. Identification of novel genes involved in neutral lipid storage by quantitative trait loci analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2021, 22: 110.
- [96] Lee K, Lee YJ, Chang HN, Jeong KJ. Engineering *Trichosporon oleaginosus* for enhanced production of lipid from volatile fatty acids as carbon source. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2019, 36(6): 903-908.
- [97] Zheng G, Gu F, Cui Y, Lu L, Hu X, Wang L, Wang Y. A microfluidic droplet array demonstrating high-throughput screening in individual lipid-producing microalgae. *Analytica Chimica Acta*. 2022, 1227: 340322.
- [98] Bae S, Kim CW, Choi JS, Yang JW, Seo TS. An integrated microfluidic device for the high-throughput screening of microalgal cell culture conditions that induce high growth rate and lipid content. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, 405(29): 9365-9374.
- [99] Kim HS, Hsu SC, Han SI, Thapa HR, Guzman AR, Browne DR, Tatli M, Devarenne TP, Stern DB, Han A. High-throughput droplet microfluidics screening platform for selecting fast growing and high lipid-producing microalgae from a mutant library. *Plant Direct*. 2017, 1(3).
- [100] Ohan J, Pelle B, Nath P, Huang JH, Hovde B, Vuyisich M, Dichosa AEK, Starkenburg

- SR. High-throughput phenotyping of cell-to-cell interactions in gel microdroplet picocultures. *BioTechniques*. 2019, 66(5): 218-224.
- [101] Li M, van-Zee M, Riche CT, Tofig B, Gallaher S D, Merchant SS, Damoiseaux R, Goda K, Carlo DD. A gelatin microdroplet platform for high-throughput sorting of hyperproducing single-cell-derived microalgal clones. *Small*. 2018, 14(44).
- [102] Tanaka Y, Nakamura A, Suzuki Y, Maruta K, Shida Y, Ogasawara W. Using gel microdroplets to develop a simple high-throughput screening platform for oleaginous microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 2022, 358: 46-54.
- [103] Belitz HD, Grosch W. Lipids. *Food Chemistry*. 1999: 152-236.
- [104] Hassanpour M, Abbasabadi M, Ebrahimi S, Hosseini M, Sheikhabglou A. Gravimetric enrichment of high lipid and starch accumulating microalgae. *Bioresource Technology*. 2015, 196: 17-21.
- [105] Brakke MK, Nickell LG. Secretion of  $\alpha$ -amylase by *Rumex* virus tumors in vitro properties and assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1951, 32(1): 28-41.
- [106] Mizuhima S, Miura T, Ishida M. Fractionation by density gradient centrifugation of membranous organelle of *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biochemistry*. 1967, 61(1): 146-148.
- [107] Eroglu E, Melis A. "Density equilibrium" method for the quantitative and rapid in situ determination of lipid, hydrocarbon, or biopolymer content in microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 102(5): 1406-1415.
- [108] Bracero V, Rosado W, Govind NS. Rapid procedure for separating high-lipid containing *Chlorella sp.*. *Caribbean Journal of Science*. 2014, 48(1): 76-80.
- [109] Kamisaka Y, Noda N, Tomita N, Kimura K, Kodaki T, Hosaka K. Identification of genes affecting lipid content using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*. 2006, 70(3): 646-653.
- [110] Liu L, Pan A, Spofford C, Zhou N, Alper HS. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2015, 29: 36-45.
- [111] Yamazaki H, Kobayashi S, Ebina S, Abe S, Ara S, Shida Y, Ogasawara W, Yaoi K, Araki H, Takaku H. Highly selective isolation and characterization of *Lipomyces starkeyi* mutants with increased production of triacylglycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(15): 6297-6308.
- [112] Puerner C, Kukhaleishvili N, Thomson D, Schaub S, Noblin X, Seminara A, Bassilana M, Arkowitz RA. Mechanical force-induced morphology changes in a human fungal pathogen. *BMC Biology*. 2020, 18(1): 122.
- [113] Mishra R, Minc N, Peter M. Cells under pressure: how yeast cells respond to mechanical forces. *Trends in Microbiology*. 2022, 30(5): 495-510.
- [114] Minc N, Boudaoud A, Chang F. Mechanical forces of fission yeast growth. *Current Biology*. 2014, 24(12): 1436.
- [115] Lodder AL, Lee TK, Ballester R. Characterization of the *wsc1* protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1999, 152(4): 1487-1499.

- [116] Davi V, Tanimoto H, Ershov D, Haupt A, De-Belly H, Borgne LR, Couturier E, Boudaoud A, Minc N. Mechanosensation dynamically coordinates polar growth and cell wall assembly to promote cell survival. *Developmental Cell*. 2018, 45(2): 170-182.e177.
- [117] Cruz S, Muñoz S, Manjón E, García P, Sanchez Y. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiology Open*. 2013, 2(5): 778-794.
- [118] Kock C, Arlt H, Ungermann C, Heinisch JJ. Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. *Cellular Microbiology*. 2016, 18(9): 1251-1267.
- [119] Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, 94(25): 13804-13809.
- [120] Petkova MI, Pujol-Carrion N, Arroyo J, García-Cantalejo J, Torre-Ruiz M.A. Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 Inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress . *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(25): 19521-19531.
- [121] Fischer M, Schnell N, Chattaway J, Davies P, Dixon G, Sanders D. The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Letters*. 1998, 419(2-3): 259-262.
- [122] Mishra R, van-Drogen F, Dechant R, Oh S, Jeon NL, Lee SS, Peter M. Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, 114(51): 13471-13476.
- [123] Cyert MS. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 311(4): 1143-1150.
- [124] Cai L, Dalal CK, Elowitz MB. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature*. 2008, 455(7212): 485-490.
- [125] Polizotto RS, Cyert MS. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *The Journal of Cell Biology*. 2001, 154(5): 951-960.
- [126] Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. 2011, 189(4): 1145-1175.
- [127] Tisi R, Rigamonti MG, Groppi S, Belotti F. Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous. *AIMS Molecular Science*. 2017, 3(4): 505-549.
- [128] Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010, 330(6000): 55-60.
- [129] Radin I, Richardson RA, Coomey JH, Weiner ER, Bascom CS, Li T, Bezanilla M, Haswell ES. Plant PIEZO homologs modulate vacuole morphology during tip growth.

- Science. 2021, 373(6554): 586-590.
- [130] Delarue M, Poterewicz G, Hoxha O, Choi J, Yoo W, Kayser J, Holt L, Hallatschek O. SCWISh network is essential for survival under mechanical pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, 114(51): 13465-13470.
- [131] O'Rourke SM, Herskowitz I. A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* Requires the Msb2 Protein and Functions in Parallel with the Sho1 Branch. *Molecular and Cellular Biology*. 2002, 22(13): 4739-4749.
- [132] Vadaie N, Dionne H, Akajagbor DS, Nickerson SR, Krysan DJ, Cullen PJ. Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *Journal of Cell Biology*. 2008, 181(7): 1073-1081.
- [133] Berchtold D, Piccolis M, Chiaruttini N, Riezman I, Riezman H, Roux A, Walther TC, Loewith R. Plasma membrane stress induces relocation of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nature Cell Biology*. 2012, 14(5): 542-547.
- [134] Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, Loewith R. TORC2 Structure and Function. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016, 41(6): 532-545.
- [135] Niles BJ, Mogri H, Hill A, Vlahakis A, Powers T. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, 109(5): 1536-1541.
- [136] Riggi M, Niewola-Staszewska K, Chiaruttini N, Colom A, Kusmider B, Mercier V, Soleimanpour S, Stahl M, Matile S, Roux A, Loewith R. Decrease in plasma membrane tension triggers PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> phase separation to inactivate TORC2. *Nature Cell Biology*. 2018, 20(9): 1043-1051.
- [137] Fadri M, Daquinag A, Wang S, Xue T, Kunz J. The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Molecular Biology of the Cell*. 2005, 16(4): 1883-1900.
- [138] Aronova S, Wedaman K, Aronov PA, Fontes K, Ramos K, Hammock BD, Powers T. Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell Metabolism*. 2008, 7(2): 148-158.
- [139] Babst M. Eisosomes at the intersection of TORC1 and TORC2 regulation. *Traffic*. 2019, 20(8): 543-551.
- [140] van-Dam TJP, Zwartkruis FJT, Bos JL, Snel B. Evolution of the TOR pathway. *Journal of Molecular Evolution*. 2011, 73(3): 209-220.
- [141] Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B. TOR signalling in plants. *Biochemical Journal*. 2015, 470(1): 1-14.
- [142] Niles BJ, Powers T. TOR complex 2-Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*. 2014, 25(24): 3962-3972.
- [143] Gaubitz C, Oliveira TM, Prouteau M, Leitner A, Karuppasamy M, Konstantinidou G, Rispal D, Eltschinger S, Robinson GC, Thore S, Aebersold R, Schaffitzel C, Loewith R. Molecular basis of the rapamycin insensitivity of target of rapamycin complex 2.

- Molecular Cell. 2015, 58(6): 977-988.
- [144] Rispal D, Eltschinger S, Stahl M, Vaga S, Bodenmiller B, Abraham Y, Filipuzzi I, Movva NR, Aebersold R, Helliwell SB, Loewith R. Target of rapamycin complex 2 regulates actin polarization and endocytosis via multiple pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290(24): 14963-14978.
- [145] Shimada K, Filipuzzi I, Stahl M, Helliwell S, Studer C, Hoepfner D, Seeber A, Loewith R, Movva N, Gasser S. TORC2 signaling pathway guarantees genome stability in the face of DNA strand breaks. *Molecular Cell*. 2013, 51(6): 829-839.
- [146] Kliegman JI, Fiedler D, Ryan CJ, Xu YF, Su XY, Thomas D, Caccese MC, Cheng A, Shales M, Rabinowitz JD, Krogan NJ, Shokat KM. Chemical genetics of rapamycin-insensitive TORC2 in *S. cerevisiae*. *Cell Reports*. 2013, 5(6): 1725-1736.
- [147] Nomura W, Inoue Y. Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2 protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 2015, 35(7): 1269-1280.
- [148] Shaheena S, Chintagunta AD, Dirisala VR, Sampath KNS. Extraction of bioactive compounds from *Psidium guajava* and their application in dentistry. *AMB Express*. 2019, 9(1): 208.
- [149] Chintagunta AD, Zuccaro G, Kumar M, Kumar SPJ, Garlapati VK, Postemsky PD, Kumar NSS, Chandel AK, Simal-Gandara J. Biodiesel production from lignocellulosic biomass using oleaginous microbes: Prospects for integrated biofuel production. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12: 658384.
- [150] Yousuf A. Biodiesel from lignocellulosic biomass—prospects and challenges. *Waste Management*. 2012, 32(11): 2061-2067.
- [151] Valdés G, Mendonça RT, Aggelis G. Lignocellulosic biomass as a substrate for oleaginous microorganisms: A Review. *Applied Sciences*. 2020, 10(21): 7698.
- [152] Carrillo I, Mendonça RT, Ago M, Rojas OJ. Comparative study of cellulosic components isolated from different Eucalyptus species. *Cellulose*. 2018, 25(2): 1011-1029.
- [153] Borand MN, Karaosmanoğlu F. Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: A review. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 2018, 10(3): 033104.
- [154] Usmani Z, Sharma M, Gupta P, Karpichev Y, Gathergood N, Bhat R, Gupta VK. Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. *Bioresource Technology*. 2020, 304: 123003.
- [155] Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4775-4800.
- [156] Lim WS, Lee JW. Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood. *Bioresource Technology*. 2013, 140: 306-311.
- [157] Naidu DS, Hlangothi SP, John MJ. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 179: 28-41.

- [158] Zhang T, Jiang D, Zhang H, Lee DJ, Zhang Z, Zhang Q, Jing Y, Zhang Y, Xia C. Effects of different pretreatment methods on the structural characteristics, enzymatic saccharification and photo-fermentative bio-hydrogen production performance of corn straw. *Bioresource Technology*. 2020, 304: 122999.
- [159] 赵烁, 李莹, 王震, 陈丽. 木质纤维素预处理方法的研究进展. *中国造纸*. 2024, 43: 29-38.
- [160] de-Lima DR, Silveira MHL, Del-Rio L, Ramos LP. Pretreatment processes for cellulosic ethanol production: Processes integration and modeling for the utilization of lignocellulosics such as sugarcane straw. *Green Fuels Technology: Biofuels*. 2016: 107-131.
- [161] Wong SS, Shu R, Zhang J, Liu H, Yan N. Downstream processing of lignin derived feedstock into end products. *Chemical Society Reviews*. 2020, 49(15): 5510-5560.
- [162] Broda M, Yelle DJ, Serwańska K. Bioethanol production from lignocellulosic biomass—challenges and solutions [J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8717.
- [163] Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, Welton T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*. 2013, 15(3).
- [164] Woiciechowski AL, Neto CJD, Vandenberghe LPS, Neto DPC, Novak Sydney ACN, Letti LAJ, Karp SG, Torres LAZ, Soccol CR. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance—Conventional processing and recent advances. *Bioresource Technology*. 2020, 304: 122848.
- [165] Singh J, Suhag M, Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 117: 624-631.
- [166] Solarte-Toro JC, Romero-García JM, Martínez-Patiño JC, Ruiz-Ramos E, Castro-Galiano E, Cardona-Alzate CA. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019, 107: 587-601.
- [167] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360-364.
- [168] Danon B, vander-Aa L, Jong W. Furfural degradation in a dilute acidic and saline solution in the presence of glucose. *Carbohydrate Research*. 2013, 375: 145-152.
- [169] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103-112.
- [170] Saravanan A, Kumar PS, Jeevanantham S, Karishma S, Dai-Viet NV. Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2022, 344: 126203.
- [171] Du B, Sharma LN, Becker C, Chen SF, Mowery RA, van-Walsum GP, Chambliss CK.

- Effect of varying feedstock–pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 107(3): 430-440.
- [172] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 49(6): 691-697.
- [173] Martín C, Klinke HB, Marcet M, García L, Hernández E, Thomsen AB. Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. 2007, 61(5): 483-487.
- [174] Mitchell VD, Taylor CM, Bauer S. Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. *BioEnergy Research*. 2014, 7(2): 654-669.
- [175] Watson NE, Prior BA, Lategan PM, Lussi M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1984, 6(10): 451-456.
- [176] Han T, Zhang B, Yang H, Liu X, Bao J. Changes in pH values allow for a visible detection of the end point in submerged liquid biodetoxification during biorefinery processing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023, 11(46): 16608-16617.
- [177] Zhao Y, Wang Y, Zhu JY, Ragauskas A, Deng Y. Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 99(6): 1320-1328.
- [178] Zhang Y, Yang J, Luo L, Wang E, Wang R, Liu L, Liu J, Yuan H. Low-cost cellulase-hemicellulase mixture secreted by *Trichoderma harzianum* EM0925 with complete saccharification efficacy of lignocellulose. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(2): 371.
- [179] Kumar D, Singh B, Korstad J. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 73: 654-671.
- [180] Liu CG, Xiao Y, Xia XX, Zhao XQ, Peng L, Srinophakun P, Bai FW. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnology Advances*. 2019, 37(3): 491-504.
- [181] Yu Y, Xu Z, Chen S, Jin M. Microbial lipid production from dilute acid and dilute alkali pretreated corn stover via *Trichosporon dermatis*. *Bioresource Technology*. 2020, 295: 122253.
- [182] Hsu TC, Guo GL, Chen WH, Hwang WS. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4907-4913.
- [183] Yu Z, Du Y, Shang X, Zheng Y, Zhou J. Enhancing fermentable sugar yield from cassava residue using a two-step dilute ultra-low acid pretreatment process. *Industrial Crops and Products*. 2018, 124: 555-562.
- [184] Zhao X, Peng F, Du W, Liu C, Liu D. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of

- biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012, 35(6): 993-1004.
- [185] Liu LZ, Ma M, Song M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009, 282(3): 233-244.
- [186] Modig T, LidÉN G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 2002, 363(3): 769-776.
- [187] Almeida JRM, Bertilsson M, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Carbon fluxes of xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains are affected differently by NADH and NADPH usage in HMF reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84(4): 751-761.
- [188] Rodriguez A, Ersig N, Geiselman GM, Seibel K, Simmons BA, Magnuson JK, Eudes A, Gladden JM. Conversion of depolymerized sugars and aromatics from engineered feedstocks by two oleaginous red yeasts. *Bioresource Technology*. 2019, 286: 121365.
- [189] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 16.
- [190] Chen X, Li Z, Zhang X, Hu F, Ryu DDY, Bao J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3): 591-604.
- [191] Jin M, Slininger PJ, Dien BS, Waghmode S, Moser BR, Orjuela A, Sousa LdC, Balan V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*. 2015, 33(1): 43-54.
- [192] Sha Y, Zhou L, Wang Z, Ding Y, Lu M, Xu Z, Zhai R, Jin M. Adaptive laboratory evolution boosts *Yarrowia lipolytica* tolerance to vanillic acid. *Journal of Biotechnology*. 2023, 367: 42-52.
- [193] Wang Z, Zhou L, Lu M, Zhang Y, Perveen S, Zhou H, Wen Z, Xu Z, Jin M. Adaptive laboratory evolution of *Yarrowia lipolytica* improves ferulic acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021, 105(4): 1745-1758.
- [194] Liu Z, Radi M, Mohamed ETT, Feist AM, Dragone G, Mussatto SI. Adaptive laboratory evolution of *Rhodospiridium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution. *Bioresource Technology*. 2021, 304: 122848
- [195] Zhou L, Xu Z, Wen Z, Lu M, Wang Z, Zhang Y, Zhou H, Jin M. Combined adaptive evolution and transcriptomic profiles reveal aromatic aldehydes tolerance mechanisms in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2021, 329: 124910.
- [196] den-Haan R, van-Rensburg E, Rose SH, Görgens JF, van-Zyl WH. Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015, 33: 32-38.
- [197] Pauly M, Keegstra K. Cell wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*. 2008, 54(4): 559-568.

- [198] Ledesma-Amaro R, Nicaud JM. Metabolic engineering for expanding the substrate range of *Yarrowia lipolytica*. Trends in Biotechnology. 2016, 34(10): 798-809.
- [199] Li H, Alper HS. Enabling xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* for lipid production. Biotechnology Journal. 2016, 11(9): 1230-1240.
- [200] Zhang Y, Li M, Zhu R, Xin Y, Guo Z, Gu Z, Guo Z, Zhang L. Installing xylose assimilation and cellodextrin phosphorolysis pathways in obese *Yarrowia lipolytica* facilitates cost-effective lipid production from lignocellulosic hydrolysates. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 2023, 16: 186.
- [201] Jin C, Hou W, Yao R, Zhou P, Zhang H, Bao J. Adaptive evolution of gluconobacter oxydans accelerates the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. Bioresource Technology. 2019, 289: 121623.
- [202] Hsiao H, Chang L, P. Ueng P, Tsao TG. Sequential utilization of mixed monosaccharides by Yeasts. Applied and Environmental Microbiology. 1982, 43(4): 840-845.
- [203] Leandro-Maria J, Gonçalves P, Spencer-Martins I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. Biochemical Journal. 2006, 395(3): 543-549.
- [204] Höfer M, Misra PC. Evidence for a proton/sugar symport in the yeast *Rhodotorula gracilis* (*glutinis*). Biochemical Journal. 1978, 172(1): 15-22.
- [205] Zhao X, Kong X, Hua Y, Feng B, Zhao Z. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. European Journal of Lipid Science and Technology. 2008, 110(5): 405-412.
- [206] Anschau A, Xavier MCA, Hernalsteens S, Franco TT. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. Bioresource Technology. 2014, 157: 214-222.
- [207] Hu C, Wu S, Wang Q, Jin G, Shen H, Zhao ZK. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 2011, 4: 25.
- [208] Virolle MJ, Tanimura A, Sugita T, Endoh R, Ohkuma M, Kishino S, Ogawa J, Shima J, Takashima M. Lipid production via simultaneous conversion of glucose and xylose by a novel yeast, *Cystobasidium iriomotense*. Plos One, 2018, 13(9): e0202164.
- [209] Ciriacy PKM. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 1993, 38: 776-783.
- [210] Wang C, Bao X, Li Y, Jiao C, Hou J, Zhang Q, Zhang W, Liu W, Shen Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. Metabolic Engineering. 2015, 30: 79-88.
- [211] Jiang Y, Shen Y, Gu L, Wang Z, Su N, Niu K, Guo W, Hou S, Bao X, Tian C, Fang X. Identification and characterization of an efficient d-xylose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2020, 68(9): 2702-2710.
- [212] Liu Q, Lu M, Jin C, Hou W, Zhao L, Bao J. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* into a favorable space for lipid accumulation. Biotechnology and Bioengineering. 2022, 119(6):

- 1509-1521.
- [213] Liu Q, Li Y, Hou W, Zhang B, Bao J. Cellulase mediated stress triggers the mutations of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* with super-large spindle morphology and high lipid accumulation. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(8): 2300091.
- [214] Lynch M, Ackerman MS, Gout JF, Long H, Sung W, Thomas WK, Foster PL. Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate. *Nature Reviews Genetics*. 2016, 17(11): 704-714.
- [215] Mavrommati M, Daskalaki A, Papanikolaou S, Aggelis G. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2022, 54: 107795.
- [216] Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*. 2019, 56: 1-16.
- [217] Zhang J, Zhu, ZN, Wang XF, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [218] Zhang B, Zhan B, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2021, 170: 113791.
- [219] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples: NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory. 2008.
- [220] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1): 248-254.
- [221] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities: Laboratory Analytical Procedure No. 006. National Renewable Energy Laboratory. 1996.
- [222] Zhang B, Khushik FA, Zhan B, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021, 118(10): 4105-4118.
- [223] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [224] Manners D, Masson A, Patterson J, Björndal H, Lindberg B. The structure of a  $\beta$ -(1-6)-d-glucan from yeast cell walls. *The Biochemical journal*. 1973, 135: 31-36.
- [225] Domer JE. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *histoplasma capsulatum* and *blastomyces dermatitidis*. *Journal of Bacteriology*. 1971, 107(3): 870-877.
- [226] Delahaye M, Lawrence K, Ward SJ, Hoare M. An ultra scale-down analysis of the recovery by dead-end centrifugation of human cells for therapy. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(5): 997-1011.
- [227] Fu Z, Verderame TD, Leighton JM, Sampey BP, Appelbaum ER, Patel PS, Aon JC.

- Exometabolome analysis reveals hypoxia at the up-scaling of a *Saccharomyces cerevisiae* high-cell density fed-batch biopharmaceutical process. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13(1): 32.
- [228] Conway JH, Sloane NJA. Sphere Packings, Lattices and Groups. *Zeitschrift Für Kristallographie-Crystalline Materials*. 1990, 191(3-4): 286-286.
- [229] Liu W, Wang Y, Yu Z, Bao J. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 13-18.
- [230] Zhang B, Ren DY, Liu Q, Liu XC, Bao J. Coproduction of single cell protein and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling. *Bioresource Technology*. 2023, 384: 129345.
- [231] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957, 226(1): 497-509.
- [232] Wang Y, Wu H, Jiang X, Chen GQ. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metabolic Engineering*. 2014, 25: 183-193.
- [233] Timoumi A, Guillouet S E, Molina-Jouve C, Fillaudeau L, Gorret N. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(9): 3831-3848.
- [234] Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJC, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272(28): 17762-17775.
- [235] Depree J, Emerson GW, Sullivan PA. The cell wall of the oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Journal of General Microbiology*. 1993, 139(9): 2123-2133.
- [236] Kiemle SN, Zhang X, Esker AR, Toriz G, Gatenholm P, Cosgrove DJ. Role of (1,3) (1,4)- $\beta$ -glucan in cell walls: Interaction with cellulose. *Biomacromolecules*. 2014, 15(5): 1727-1736.
- [237] Dong T, Knoshaug EP, Pienkos PT, Laurens LML. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy*. 2016, 177: 879-895.
- [238] Wang H, Tang X, Liu J, Trautmann S, Balasundaram D, McCollum D, Balasubramanian MK, Pringle J. The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*. 2002, 13(2): 515-529.
- [239] Sharifmoghadam MR, De-Leon N, Hoya M, Curto MA, Valdivieso MH. Different steps of sexual development are differentially regulated by the Sec8p and Exo70p exocyst subunits. *FEMS Microbiology Letters*. 2010, 305(1): 71-80.
- [240] Biswas S, Dijck PV, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, 71(2): 348-376.
- [241] Perez P, Calonge TM. Yeast protein kinase C. *The Journal of Biochemistry*. 2002, 132(4): 513-517.

- [242] Takekawa M, Posas F, Saito H. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *The EMBO Journal*. 1997, 16(16): 4973-4982.
- [243] Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, Hanada SI, Kozutsumi R, Mori M, Tachibana K, Kishimoto T. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nature Cell Biology*. 2002, 4(2): 111-116.
- [244] Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon LA. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Molecular Biology of the Cell*. 2003, 14(11): 4618-4627.
- [245] Paushkin SV, Patel M, Furia BS, Peltz SW, Trotta CR. Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell*. 2004, 117(3): 311-321.
- [246] Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, Tsunoda T, Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nature Genetics*. 2016, 48(6): 700.
- [247] Soriano-Carot M, Baño MC, Igual JC. The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Division*. 2012, 7: 1.
- [248] Portela P, Rossi S. cAMP-PKA signal transduction specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 2020, 66(6): 1093-1099.
- [249] Zhao Y, Tang H, Zeng X, Ye D, Liu J. Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, 98: 36-44.
- [250] Shi S, Zhao H. Metabolic engineering of oleaginous yeasts for production of fuels and chemicals. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 2185.
- [251] Wang M, Yang Y, Han L, Xu F, Li F. Cell mechanical microenvironment for cell volume regulation. *Journal of Cellular Physiology*. 2019, 235(5): 4070-4081.
- [252] Luttermann T, Rückert C, Wibberg D, Busche T, Schwarzhans JP, Friehs K, Kalinowski J. Establishment of a near-contiguous genome sequence of the citric acid producing yeast *Yarrowia lipolytica* DSM 3286 with resolution of rDNA clusters and telomeres. *NAR Genomics and Bioinformatics*. 2021, 3(4): 85.
- [253] Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, 92(4): 737-744.
- [254] Chattopadhyay A, Mitra M, Maiti MK. Recent advances in lipid metabolic engineering of oleaginous yeast. *Biotechnology Advances*. 2021, 53: 107722.
- [255] Fontanille P, Kumar V, Christophe G, Nouaille R, Larroche C. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*. 2012, 114: 443-449.
- [256] Wen Z, Zhang S, Odoh CK, Jin M, Zhao ZK. *Rhodospiridium toruloides*-A potential red yeast chassis for lipids and beyond. *FEMS Yeast Research*. 2020, 20(5): 38.

- [257] Ghazani SM, Marangoni AG. Microbial lipids for foods. *Trends in Food Science & Technology*. 2022, 119: 593-607.
- [258] Ali SS, Al-Tohamy R, Koutra E, El-Naggar AH, Kornaros M, Sun J. Valorizing lignin-like dyes and textile dyeing wastewater by a newly constructed lipid-producing and lignin modifying oleaginous yeast consortium valued for biodiesel and bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*. 2021, 403: 123575.
- [259] Szczepańska P, Hapeta P, Lazar Z. Advances in production of high-value lipids by oleaginous yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2022, 42(1): 1-22.
- [260] Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(9): 3651-3667.
- [261] Di-Fidio N, Dragoni F, Antonetti C, De-Bari I, Raspolli-Galletti AM, Ragaglini G. From paper mill waste to single cell oil: Enzymatic hydrolysis to sugars and their fermentation into microbial oil by the yeast *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*. 2020, 315: 123790.
- [262] Singh S, Pandey D, Saravanabhupathy S, Daverey A, Dutta K, Arunachalam K. Liquid wastes as a renewable feedstock for yeast biodiesel production: Opportunities and challenges. *Environmental Research*. 2022, 207: 112100.
- [263] Bharathiraja B, Sridharan S, Sowmya V, Yuvaraj D, Praveenkumar R. Microbial oil—A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource Technology*. 2017, 233: 423-432.
- [264] Liu Z, Fels M, Dragone G, Mussatto SI. Effects of inhibitory compounds derived from lignocellulosic biomass on the growth of the wild-type and evolved oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Industrial Crops and Products*. 2021, 170: 113799.
- [265] Raj T, Chandrasekhar K, Morya R, Kumar PA, Jung JH, Kumar D, Singhania RR, Kim SH. Critical challenges and technological breakthroughs in food waste hydrolysis and detoxification for fuels and chemicals production. *Bioresource Technology*. 2022, 360: 127512.
- [266] Guo H, Zhao Y, Chang JS, Lee DJ. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. *Bioresource Technology*. 2022, 361: 127666.
- [267] Chattopadhyay A, Mitra M, Maiti MK. Recent advances in lipid metabolic engineering of oleaginous yeasts. *Biotechnology Advances*. 2021, 53: 107722.
- [268] Trentacoste EM, Shrestha RP, Smith SR, Glé C, Hartmann AC, Hildebrand M, Gerwick WH. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, 110(49): 19748-19753.
- [269] Tsirigka A, Theodosiou E, Patsios SI, Tsourekis A, Andreadelli A, Papa E, Aggeli A, Karabelas AJ, Makris AM. Novel evolved *Yarrowia lipolytica* strains for enhanced growth and lipid content under high concentrations of crude glycerol. *Microbial Cell Factories*. 2023, 22(1): 62.
- [270] Liu Z, Radi M, Mohamed ETT, Feist AM, Dragone G, Mussatto SI. Adaptive laboratory

- evolution of *Rhodosporidium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution. *Bioresource Technology*. 2021, 333: 125171.
- [271] Hu M, Wang J, Gao Q, Bao J. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Biotechnology*. 2018, 281: 81-86.
- [272] Gu H, Zhu Y, Peng Y, Liang X, Liu X, Shao L, Xu Y, Xu Z, Liu R, Li J. Physiological mechanism of improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to lignin-derived phenolic acids in lignocellulosic ethanol fermentation by short-term adaptation. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12(1): 268.
- [273] Ivančić-Šantek M, Grubišić M, Galić-Perečinec M, Beluhan S, Šantek B. Lipid production by *Mortierella isabellina* from pretreated corn cobs and effect of lignocellulose derived inhibitors on growth and lipid synthesis. *Process Biochemistry*. 2021, 109: 46-58.
- [274] Wang LR, Zhang ZX, Nong FT, Li J, Huang PW, Ma W, Zhao Q-, Sun XM. Engineering the xylose metabolism in *Schizochytrium sp.* to improve the utilization of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2022, 15(1): 114.
- [275] Gou Q, Tang M, Wang Y, Zhou W, Liu Y, Gong Z. Deficiency of  $\beta$ -glucosidase beneficial for the simultaneous saccharification and lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020, 190(2): 745-757.
- [276] Aiello D, Sannino C, Giannoni T, Fabbrizi G, Gelosia M, Nicolini A, Turchetti B, Cotana F, Buzzini P. Triacyl glycerols from yeast-catalyzed batch and fed-batch bioconversion of hydrolyzed lignocellulose from cardoon stalks. *Fermentation*. 2021, 7(4): 315.
- [277] Slininger PJ, Dien BS, Kurtzman CP, Moser BR, Bakota EL, Thompson SR, O'Bryan PJ, Cotta MA, Balan V, Jin M, Sousa L C, Dale BE. Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016, 113(8): 1676-1690.
- [278] Wang X, Wang Y, He Q, Liu Y, Zhao M, Liu Y, Zhou W, Gong Z. Highly efficient fed-batch modes for enzymatic hydrolysis and microbial lipogenesis from alkaline organosolv pretreated corn stover for biodiesel production. *Renewable Energy*. 2022, 197: 1133-1143.
- [279] Zhao X, Wu S, Hu C, Wang Q, Hua Y, Zhao ZK. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodosporidium toruloides* Y4. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010, 37(6): 581-585.
- [280] Gong Z, Zhao M, He Q, Zhou W, Tang M, Zhou W. Synergistic effect of glucose and glycerol accelerates microbial lipid production from low-cost substrates by *Cutaneotrichosporon oleaginosum*. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024, 14(1): 859-867.
- [281] Kim SR, Ha SJ, Wei N, Oh EJ, Jin YS. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*. 2012, 30(5): 274-282.
- [282] Liu Q, Zhang B, Hu M, Bao J. Simultaneous enhancement of lignin-derived inhibitor

- tolerance and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* by adaptive evolution. *Process Biochemistry*. 2024, 137: 20-29.
- [283] Hahn-hägerdal B, Eliasson AC, Christensson C, Wahlbom FJA, Microbiology E. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66: 3381-3386.
- [284] Peng B, Shen Y, Li X, Chen X, Hou J, Bao XM. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 2012, 14(1): 9-18.
- [285] Leandro MJ, Fonseca CS, Gonçalves P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Research*. 2009, 9(4): 511-525.
- [286] Queiroz SS, Oliva B, Silva TF, Segato F, Felipe MGA. Integrated bioinformatics, modelling, and gene expression analysis of the putative pentose transporter from *Candida tropicalis* during xylose fermentation with and without glucose addition. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022, 106(12): 4587-4606.
- [287] Du J, Li S, Zhao H. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. *Molecular BioSystems*. 2010, 6(11): 2150-2156.
- [288] Leandro MJ, Spencer-Martins I, Gonçalves P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. *Microbiology*. 2008, 154(6): 1646-1655.
- [289] Wiczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 1999, 464(3): 123-128.

## 附录 I

## RT-qPCR 实验引物

表 1 第二章 RT-qPCR 实验引物

Table 1 Primers for qRT-PCR in Chapter 2

Gene ID	Annotation		Forward and reverse primer (5'-3')
Trcu_02121	mannan polymerase II complex HOC1 subunit	CCTCCTTGATGCGGTTGAT	CCCGTCCAAGACGTTTGC
Trcu_00947	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	CCTCCTTGATGCGGTTGAT	CCCGTCCAAGACGTTTGC
Trcu_01890	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	GACGCCGGGGCCAATGGCG	GCGTCCGCCAAGGTCGG
Trcu_02036	dolichyl-phosphate-mannose mannosyltransferase	GGAACGGCACAAAGTGGA	GTCTGTTGATTGCGGGATG
Trcu_02921	dolichyl-phosphate-mannose mannosyltransferase	GGAACGGCACAAAGTGGA	CTGCTCCGTGGACAAGG
Trcu_02955	dolichyl-phosphate-mannose mannosyltransferase	CTCGTGGGTGACCTTCTTCT	TTGTCATTGGCTGCTTCT
Trcu_04499	phosphomannomutase	GGATCTCGGTGAATCCCTC	AGTTTGAAAAGTTTGACAAG
Trcu_01427	mannosyl-oligosaccharide 1	CATCCACGAGCCGAACAT	GCATACTACCGCTACCTCCA
Trcu_00284	Alpha-1,2-mannosidase	GAGGCTCTTGACATACTTCT	CTCCGTCTCGGCGACTTC
Trcu_00569	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase	GGCAAAGGGCGTAAGGAAT	CGTGCAGATCAACCCACCA
Trcu_03942	alpha-mannosidase Man2c1	CGCAGCAGCCTTGTTTT	GCCACCCTCAGAATTGCC
Trcu_00855	beta-mannosidase Manb	CCTTGGCATTACGACTTGC	ACGGTCTCGGTGCAGAAGC
Trcu_04136	1,3-beta-glucan synthase	ATCGGGACCACAATGAGC	CATCCCCTTCTTTGACCG
Trcu_00077	1,4-alpha-glucan branching enzyme	TATGTGTGCGGGGTGGTA	AATCTACCAGCGGCTTCTG

---

Trcu_03380	1,4-alpha-glucan branching enzyme	GCAACGTCGACACCGATA	GGGCTGGTCTTCTGTTCATC
Trcu_05665	Beta-1,3-1,4-glucanase	GAACGCCTCCTTGAATGC	TGACGACATGCTCCTTGC
Trcu_05082	Exo-beta-1,3-glucanase	ATCCAAGCAGCGGTAAAG	AACGCCATGTGGCACTAC
Trcu_00501	endo-1,3(4)-beta-glucanase	CTGTGGTCCTGTCCCGAT	ACTCTCGAGGCCACTTGC
Trcu_03502	Endoglucanase C	ATTCAGCTTAGCCCTCTTGG	GTGCGCCAGACACTCATGT
Trcu_01919	Endoglucanase 1	CGGCATTCGCAAGACAC	ACCAGTCGTGCTACAAGCA
Trcu_02186	Endoglucanase 1	TACGTCGTCTCAAAGGCG	CTCCTGACCGAGTTTGGGA
Trcu_01104	chitin synthase 1	ACCCCAAACATCCTCCTC	GCAGGCAGATGGAGAAGA
Trcu_02202	chitin synthase 1	CGGGAGACAGGCTTTGAT	GACCAGAACCGCACGTTC
Trcu_02791	chitin synthase 1	TTGATGCGGATGTTGTCC	TGCACGACTTGTCTTGGG
Trcu_04533	chitin synthase 1	CCAGATGGGAAGCGAGAG	CACCAGGACAAGCCGATC
Trcu_05206	chitin synthase 1	CACCTGAAGGATACCCGC	TTCTCACCGAAGCAAAGG
Trcu_00765	chitin synthase 6	CTGGGGGTGGGTCCTCTACGTT	TTACACGGCTGTCGGTTCCTC
Trcu_00189	chitinase 1	GCGGTCAATCGAGTAGCT	CGTTCTGCAACACGCAA
Trcu_02203	chitinase 2	TGCCAGAACATCACCGAG	GCGTTGGCAGCGTTAGT
Trcu_04046	chitinase 3	CAGATCGAGCAGCCCTTA	GGCTTCGTTTCGCAACTG
Trcu_02268	hexokinase	CACATTGTCGCCACCG	AGGATCTTGAGTGCCTCGTGT
Trcu_03222	glucose-6-phosphate isomerase	GTATCGCCGCCATTGTCT	GTGCGTCGTAATCTTCTTGC
Trcu_04167	fructose-1,6-bisphosphatase I	AAGACTGAGGAGCAGGTTGT	CATGATCGAGTTGGTGGG
Trcu_01724	6-phosphofructokinase 1	GCGGCATCTTCGGCTAC	GTGGATCGAGGTGGGGAC

---

Trcu_00360	triosephosphate isomerase	CAACGCTCAAGCCTACCA	TGCTCCACCAGACATTCG
Trcu_00578	fructose-bisphosphate aldolase, class II	CCACCATTGAGGAGAAGGACTG	GTTGACCGAGCCGCCGTA
Trcu_04860	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	CGACACTCAGTTCGCCTACC	TGGTCTTCTCACCTCACG
Trcu_01126	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	CCACCAAGCCCTTCAACA	GACGACTGGGACGAAGTGAG
Trcu_01680	phosphoglycerate kinase	GACGGCCCTTCGCACAA	GGACACGGAACGCCATAC
Trcu_05335	phosphoglycerate- phosphoglycerate mutase	TCCACATTGAGGAGGAGGGC	GTCGCCGAGCGAAGTAAGC
Trcu_02862	probable phosphoglycerate mutase	CCCCGTTCCCTTCATTATCTC	ACTTGCCGGTCATCTCCTCA
Trcu_00681	probable phosphoglycerate mutase	GGTGCGGCTTCCCTATCCA	GGGCTCCTTGAGCGTGTTGT
Trcu_03622	probable phosphoglycerate mutase	ACCCGCATATCCGAGTGGC	GCCGTCTTGAGGCTGTAGGG
Trcu_03969	enolase	GGCGAGACGCTCACCGAGTT	GGAGGGCATTGCCAAACAGC
Trcu_05201	pyruvate kinase	TTCATTGCCGACCTTGCC	CGGTGGTGCCCTTGAGAGA
Trcu_00983	hexokinase	GGCTCGCCTCATCTCCAA	ACGGGATAGACACCACGC
Trcu_01943	xylose reductase	AGACACTCCCGTCGCTCCTCA	TGTTGATAAGGGCGTTGTCTG
Trcu_00347	xylitol dehydrogenase	CGCACCGGGATCAAAGGT	GTGTTGCAGTAGCGGAAGACG
Trcu_05012	xylulokinase	GGCCAAGAACCCACGAT	TTGTACGCCACGCCGACC
Trcu_00933	transketolase	CTCCGCTCCAAGGGTCTCAA	AGGCAGGGATAACCGATGTGC
Trcu_03868	xylulose reductase	GCAACACGGGTCTCAAGCA	GGTCGAGTTGGCAATGTCCT
Trcu_00347	xylitol dehydrogenase	GGCCAAGAACCCACGAT	TTGTACGCCACGCCGACC

---

表 2 第三章 RT-qPCR 实验引物  
Table 2 Primers for qRT-PCR in Chapter 3

Gene symbol	Annotation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase	AAGGCAAAGGAGGCTCTC	TAGCGGTAGGCGACAATG
FAS1	fatty acid synthase	TTCATCGAGGTTGGTCCC	CTTGTGGTTCTTGGCGTG
GPD	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AAGCGCCTGCACCACCTGT	TCGCCTGGACGTTGAGGAA
ACC	acetyl-CoA carboxylase	AAGCTCAACTCGATGGGC	CGTAAGCACGCGAAGTCT
Wsc2	cell wall integrity and stress response component 2	GCACCGAAGATGTCTACGAGTT	TCCTGGTTTGGATCGCTTTT
Mid2	mating pheromone-induced death protein 2	ACCCGTACTGGAATGAAAAC	AATCCCTGGTCCTTCCTCTT
Rho1	GTP-binding protein rhoA	TGAGGTCGATGGCAAGAAGG	CCGCGAAACAGATAAGGATGA
Pkc1	protein kinase C	GCTCGCAAAGCTCCAGATGA	GAAACCAAACCCGCTGTCCC
Bck1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase	CCCACCTATTGTCGCCATCC	CCATGCTTCCCAAAGTGCTG
Mkk1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	CTCGCGTCGGCAGGACCATC	GCACCACCAGCACCAGCACC
Mpk1	mitogen-activated protein kinase 7	CCGACTCCTGCACCACTTCC	CCTCGTACAGGTACACCTCGTTG
Rlm1	SRF-type transcription factor RlmA	TGCGGCGTCACTGTTTCTATC	CGTGCCCTCGTAGTCATTGTAT
Slm1	Slm1 PH domain	AAGGAGTGGCCGACATTGAG	CCTCGCCAAGGAACTGGTTT
TORC2	Target of rapamycin complex 2 subunit bit61	CGATCGACTCGCGGACGGAG	GCCCATCCTTTCGCACCATG
Ypk1	AGC/Akt protein kinase 1 (Ypk1 homologue)	CATACGGCGTCGTCGTCTCG	CGCCTTCGTCGGCAAATA
Pkh1	serine/threonine-protein kinase PKH1	GACTTCCTCCTTGGTAGCCG	GAAATGTAGCCTGATGCTGATTC

Mid1	calcium channel subunit	GCGTGATTCTCAACCGGAGCT	TCACGAGCGGTGTCTGGAAC
Cch1	calcium channel subunit	CTACATCCGCCGCAAGGACT	CGCAGCAGGTTCTGGGACAGT
Cna1	calcineurin catalytic subunit A	AGCGCCAGCCATGTATCTCC	GCTCCTCAGTCAGACGACCCTC
Cnb1	Calcineurin subunit B	CATCTTTGACGAGGAGACTGGG	TAAGAATCATCGGCAGAAACG

表 3 第四章 RT-qPCR 实验引物  
Table 3 Primers for qRT-PCR in Chapter 4

Gene ID	Annotation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Trcu_03118	Aldehyde dehydrogenase	TCATCCCCGGTGTCTTTGACG	ATCGGGCATAGCGAGAAGAC
Trcu_01234	Aldehyde dehydrogenase	AACGAGGCCGATGTCGATGC	ACCCGCATTGACATAACTTCG
Trcu_01775	Aldehyde dehydrogenase	GTATCTTCATCAACAACAAG	CGCGTGATCCGTGCAAAGCT
Trcu_02661	Aldehyde dehydrogenase	CGATGGAGGCCATGGACGAC	ACGTCCTAGCCTAGGATTAG
Trcu_03855	Aldehyde dehydrogenase	GATGTCGTGCACCCGGCCAC	ACGTAGGATAGGACCAGTGAA
Trcu_03870	Aldehyde dehydrogenase	CGGGCAGGTGGCGCAGGGCG	ACGTTAGATCGATTCTGAAGA
Trcu_04064	Aldehyde dehydrogenase	GCCGCCGCCAGCCCGCCGCTG	GGGCTAGGTAGCCGATGATT
Trcu_04141	Aldehyde dehydrogenase	CAACAAATGGAGAAGCGCATC	ACCGCAGTTAGCAGATTACCA
Trcu_04359	Aldehyde dehydrogenase	CTCCTCAACAAGCTTGCCGA	GGCTTAGTCGGATGTGACCT
Trcu_04385	Aldehyde dehydrogenase	GCTCGTCGAGGTTTCCCACGC	GTGCCGTAGCTTAGCCGAAG
Trcu_05408	Aldehyde dehydrogenase	AGTTTGAGGCCGAGACGGACC	ACCGTGTGACCCAGTGACGGA
Trcu_05469	Aldehyde dehydrogenase	GGCAAGGTGATCGGCTCGTGC	GGTAGATGCCGATGCGAGAGT

---

Trcu_05623	Aldehyde dehydrogenase	GTGAATCCCGCGACGGGGGA	ACGTGCTAGGGATCGATTTAG
Trcu_05610	Aldehyde dehydrogenase	TACCCAGGCCACGCCGGC	AGCGGTATTACACAGTCTATT
Trcu_04531	Aldehyde dehydrogenase	AGCCCTTCCCAGCGTACGCAT	AGCGATGCGTAAGTCGATATT
Trcu_00411	Alcohol dehydrogenase	GATCACTGGGACGTGGGAAAG	GACGTGATCTATGCTAGTAGA
Trcu_02229	Alcohol dehydrogenase	GTGATCAAGGTCCAGCGCCCCT	GCTATCTCAGGTCGATAGCTA
Trcu_02051	Alcohol dehydrogenase	CTCTCAAGTTCTCGCAGAGC	GGGACTTCTAGCGATCACAT
Trcu_04032	Alcohol dehydrogenase	CCCCTGCATTGCTGGTCACGA	GTCGATTAGGGATCAAGCTA
Trcu_04134	Alcohol dehydrogenase	GGGCACGAGGGCGCGGGCTT	CGAGGGCTTTAGGCTAGATC
Trcu_00109	Alcohol dehydrogenase	TTTGCCGGTTCGCGTCGCTGCCA	TGATCGATTGATCCAGATCG
Trcu_00589	Alcohol dehydrogenase	CTTCGATCCCCGCTCGCACGCTC	ACGTGTGATAGCTAGGGAT
Trcu_00604	Alcohol dehydrogenase	ACAACGACGACGGTGACTACG	AGCGATTAGCTAGGTAGCTAG
Trcu_00714	Alcohol dehydrogenase	CGCCGCCTAATGCTCCGTGTC	GAAACGATTAGCTAGCTTAGT
Trcu_01328	Alcohol dehydrogenase	TGTTTGTTTGTTTACCACAAAG	TTCTAGCTAGCTAGCTAGTAG
Trcu_02264	Alcohol dehydrogenase	CCGCGCACAACCTCCGCTCGA	ATGATCTAGAGATGTCGCTAG
Trcu_04134	Alcohol dehydrogenase	GGTATCCCGACCGAGCCCGGA	TTTGAACACACGTCGATGCT
Trcu_04221	Alcohol dehydrogenase	AAAGGCGTCGGATACGTCGCCA	ATCGATCGATATAGCTAGTA
Trcu_04303	Alcohol dehydrogenase	GTGGGAAAGGGTCGCGTTTCGC	GTAGTAGCCTAGCTAGGTAGA
Trcu_04946	Alcohol dehydrogenase	CCAGCACGACAACTTCCCCGCC	AGATCTAGCTCCTCGATATCG
Trcu_00053	Alcohol dehydrogenase	TGCGGCTCGGACAACTCGGGTC	CGATCGATTAGCTAGCTAGGA
Trcu_00098	Alcohol dehydrogenase	GACATCTGCAAGGGCGGCAAC	CGCGCGGGCTAGATCTAGCTA

---

Trcu_01328	Aldehyde reductase	TGTCTGCAAAGTGTGGAGGGGG	ACGATCGATGGTGATTATTAGC
Trcu_01463	aldehyde reductase AKR1	TCCGGCGTCGACCGCAAGGACA	GCGATTACGATTCGATTTGCA
Trcu_01821	Aldose reductase A	ACGGCAACGAGGCCGAGGTCG	TTCGATATAGCTAGCTAGATC
Trcu_01507	aldehyde reductase	GGCCGGCAGCAAGGATGTTACT	ACGATCGATCGATAGCTATTGT
Trcu_00463	Aldo-keto reductase	AAGGCCGCGCTCGAGGCCGGGT	GCTAGGTAGCTTAGCTAGCTAA
Trcu_00843	Aldo-keto reductase	ATTGACGGCGCGCTCTGCTACG	AAGCTAGCTTGATCGATCCAA
Trcu_01822	Aldose reductase A	AACTCTTGCAGGCAACGAGGC	GCGATTTCGATTAGCTAGGGAT
Trcu_03519	indole-3-acetaldehyde reductase	GCAAGGCGCTCAAAGCGTGGGG	TATCTGATCGGATCGATTAGCT
Trcu_03746	Aldo-keto reductase	CACAACGAGCACCCACGTCGCG	CGATGCTAGAGAGATCGAGGTA
Trcu_00476	L-arabinitol-4-dehydrogenase	GTGTTTGGCGGCAAGGTGT	CGAGTGGCTTGAGGTTGATGAG
Trcu_01351	galactokinase	GACCTGTGCCTCAAGAATGGC	GGCTCGTACTCGCGGGTAAT
Trcu_00643	glucose-hexose-phosphate uridylyltransferase	TCTTGCCCGTTCCCGTAC	GGATAGAAGTGGAGGTGGATGT
Trcu_00100	UDP-glucose 4-epimerase	CATTTACGGCTCGGACTGGG	TGCGGTTGGACGCCTTCTC
Trcu_03126	UDP-glucose 4-epimerase	CCAACATCTTCTCCAAGTGCG	TTCTGTGCCAGTGTCGGGTC
Trcu_03229	UDP-glucose 4-epimerase	CACTGGAACCACCGTCAGC	GACTGTGGCATTGGAACCC
Trcu_03995	UDP-glucose 4-epimerase	GCTGAAGACGCCGAGAACA	GAACCATTCGCCACCATAGAA
Trcu_05559	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	AGCTCGGCGAGGACTTTAA	GGTGGCGACAATGATGCA
Trcu_00165	phosphoglucomutase	CAAGCTCTTTGCCTCGTCC	GCCGTCAATGGGGTCAGT
Trcu_01188	mannose-6-phosphate isomerase	CTGTACGACCCGCCATT	TGCTGAATCCCCACGAAA

---

表 4 第五章 RT-qPCR 实验引物  
Table 4 Primers for qRT-PCR in Chapter 5

Gene ID	Annotation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Trcu_03878	Galactose transporter	ACGAGAATGGCGAGTACGT	CGTAGCTAGGTAGCTAGCTAA
Trcu_03559	GDP-mannose transporter 1	CCCTCGTCGCGCGAGCAGGCG	GAGCTAGCTTGATCGAAAGCA
Trcu_01249	hexose transporter	GGCCATTTTCGGAGCAGTGCC	CGATGCTATTATCTTTAGCTAA
Trcu_00722	High-affinity glucose transporter	ACAGGTGCCGTCGTCTCGGTC	CGATAGATATATACGTAAGGC
Trcu_03962	sugar transport protein	GCATCCCTGCGAGTCTTATCG	TTAGCTAAATCGATCGGTAGC
Trcu_01874	hexose transporter	CAAGGTCGCGACTTTTGGCTC	CGTAGAGAGCTATAGCTAGAA
Trcu_04201	Glucose transport 3	GCATTCTCTCGATCGTCCTCACC	CGATCGGGCTAGGCTAGCAA
Trcu_04000	glucose sensor	AAGGCCTCGTCTCCATTGTG	CGATAAATCGGGCTAGCTAGA
Trcu_05586	Glucose transport 1	CGCGGCGCGCTCCTCGTCGTCG	TTACCCTAGGCTATCGAAATA
Trcu_04600	monosaccharide transporter	TAGGTCGACGTACCTCCGTCAA	ACGATAGCTTTCGATTACGGG
Trcu_01509	hexose transporter	ACACATGGCAGAATTACTTCAA	CCGATTAGCTTAGCCTAGGCC
Trcu_02200	Lactose permease	AGCCTCTCAACAACAAGGCAGA	CGGGCTAGCTTAGCTTAAAGCT
Trcu_01404	Sugar transporter	GAAGCAGTTCCTGTTCCAGTT	CGGCTAATCGATTTTACGGATA
Trcu_02678	Sugar transporter STL1	CGCTTCTTCAAGGAGGAATCGT	ACCCCGATTTCGATTTCGGATCGT
Trcu_04201	High-affinity glucose transporter	CAAGTATGTCGAGGACGGCGAT	CCGTAGCTTAGCTTTAGTTGAA
Trcu_04000	High-affinity glucose transporter	TGGCCCTTCTGTGTGCTTTGGCA	GGATTGCTAGGGTAGCTTAAAC
Trcu_00919	Glucose transporter	GCACGTTTTTCTGCCATTAC	TAGTTCGATTTCGGTATTCGAAG

## 附录 II

## 质粒构建

表 1 本论文涉及的质粒

Table 1 The recombinant plasmids involved in this thesis

Plasmids	Characteristics	Sources
pYES2	Expression vector for <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , It contains the URA3 gene for selection in yeast and 2 $\mu$ origin for high-copy maintenance	Lab stock
pUG6	Integration plasmid, Gene KanMX source	Lab stock
pFA6a-kanMX6-GAL1p-GFP	Gene GFE source	Lab stock
pUC19- LEUp-GFP <sub>(NSL)</sub> -URA3	Expression of GFP in <i>T. cutaneum</i>	This work
pCRISPRyl	Editing plasmid for CRISPR-Cas9 in <i>Y. lipolytica</i>	This work
pCRISPRtc	Editing plasmid for CRISPR-Cas9 in <i>T. cutaneum</i>	This work
pYES2-KanMX	It contains the G418 gene for selection	This work
pYES2-KanMX-PGK1p	It contains the PGK1p promoter	This work
pYES2-KanMX-TDH3p	It contains the TDH3 promoter	This work
pYES2-KanMX-PGK1p-GFP	Expression of GFP gene	This work
pYES2-KanMX-TDH3p-GFP	Expression of GFP gene	This work
pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_00722XbaI	Subcellular localization for Trcu_00722p	This work
pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_02200XbaI	Subcellular localization for Trcu_02200p	This work
pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_01509XbaI	Subcellular localization for Trcu_01509p	This work

pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_00722-GFP	Subcellular localization for Trcu_00722p	This work
pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_02200-GFP	Subcellular localization for Trcu_02200p	This work
pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_01509-GFP	Subcellular localization for Trcu_01509p	This work
pUG6-TDH3p	It contains the TDH3p promoter	This work
pUG6-TDH3p-EcoRI-CYC1t	It contains the CYC1t terminator	This work
pUG6-rDNAup-TDH3p-EcoRI-CYC1t-rDNAdo	It contains the 18srDNA	This work
pUG6-rDNAup-TDH3p-Trcu_02200 CYC1t-rDNAdo	The integration plasmid of gene <i>Trcu_02200</i>	This work

表 2 重组质粒的构建引物

Table 2 Primers for the construction of recombinant plasmids

Primers	Sequences (5'-3')
PUC19-F	AACACAGCGCCTTAGACCGagcttATGCGTCTGAGGATTGTCA
PUC19-R	TGAGGCTGCCGCCGTCGTtggcgtaatcatggcatagctgt
LEUp-F	ACGACGGCGGCAGCCTCAACG
LEUp-R	CTCGCTAGTCAGCGCTCACGTCTTG
LEUp-GFP-F	CGTGAGCGCTGACTAGCGAGATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCA
LEUp-GFP-R	CCTGGTGGACATGGTCGTTTATAGCTTGGATTTGTACAATTCA
LEUt-F	ACGACCATGTCCACCAGGGCAT
LEUt-R	CGGTCTAAGGCGCTGTGTTAAGGA

---

URA3-F	GCCTTAGACCGagcttGTTGGCCGATTCATTAATGCAG
URA3-R	CGGCATCAGAGCAGATTGTACT
Linker-KanMX-F	cctttagcggcttaactgtgcctTCTGTTTAGCTTGCCTCGTCC
Linker-KanMX-R	tctttgacagcttatcatcgataaATGGCGGCGTTAGTATCGAA
Linker-PGK1p-F	gcgtcctcgtcctcaccggtTTTTGGCTTCACCCTCATACT
Linker-PGK1p-R	tacatgatgcggccctctagaTTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGA
Linker-TDH3p-F	tgcgtcctcgtcctcaccggtCCTCATCAGTAAGACCCGTTG
Linker-TDH3p-R	tacatgatgcggccctctagaTTTGTTTGTATGTGTGTTTATTC
Linker-PGFP-F	ttacaacaaataaaacaaATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCA
Linker-PGFP-R	actaattacatgatgcggccc TTATAGCTTGGATTTGTACAATTCA
Linker-TGFP-F	acataaacaacaaatctagaATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCA
Linker-TGFP-R	actaattacatgatgcggcccTTATAGCTTGGATTTGTACAATTCA
Linker-00722XbaI-F	aaacacacataaacaacaaaATGGTAGACTTTGTCCCAAGCG
Linker-00722XbaI-R	tacatgatgcggccctctagaAGCGAGATGGGAAGCCTC
Linker-722GFP-F	atcgaggcttcccatctcgtATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCA
Linker-722GFP-R	actaattacatgatgcggcccTTATAGCTTGGATTTGTACAATTCA
Linker-02200XbaI-F	aaacacacataaacaacaaaATGTCCGTTGACAACAAGGACGACA
Linker-02200XbaI-R	tacatgatgcggccctctaga AGCCTGACCCTCCTCGCGCATCG
Linker-200GFP-F	tacatgatgcggccctctaga AGCCTGACCCTCCTCGCGCATCG
Linker-200GFP-R	tacatgatgcggccctctaga AGCCTGACCCTCCTCGCGCATCG

---

Linker-01509XbaI-F	aaacacacataaacaacaaaATGGTTGCTGTTAGCGCCG
Linker-01509XbaI-R	aaacacacataaacaacaaaATGGTTGCTGTTAGCGCCG
Linker-509GFP-F	gtcgaaggtggactctgtgATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCA
Linker-509GFP-R	actaattacatgatgcggcccTTATAGCTTGGATTTGTACAATTCA
Linker-00722-F	aaacacacataaacaacaaaATGGTAGACTTTGTCCCAAGCG
Linker-00722-R	actaattacatgatgcggcccTTAAGCGAGATGGGAAGCCTC
Linker-02200-F	aaacacacataaacaacaaaATGGCCGGCAGTTCAAAGG
Linker-02200-R	actaattacatgatgcggcccTTACATCCTCTGCTCCTTGAGCT
Linker-01509-F	aaacacacataaacaacaaaATGGTTGCTGTTAGCGCCG
Linker-01509-R	actaattacatgatgcggcccTTACACAGAGTCCACCTTTTCGA
TDH3p-EcoLinker-F	cttcgtacgctgcaggtcgacCCTCATCAGTAAGACCCGTTG
TDH3p-EcoLinker-R	agttatattaagggttgaattcTTTGTGTTTATGTGTGTTTATTC
Linker-CYC1t-F	cataaacaacaaagaattcTCATGTAATTAGTTATGTCACGCTT
Linker-CYC1t-R	acgaagttatattaagggttGCAAATTAAAGCCTTCGAGC
rDNA-up-F	ttcgtacgctgcaggtcgacAAGGACTCAAGGTTAGCCAGAAG
rDNA-up-R	aacgggtcttactgatgaggAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
rDNA-down-F	tgtcgaaaacgagctctcgagCGTAAGGTGCCGAGTGGGTC
rDNA-down-R	acgaagttatattaagggttGTGGCTCTTGGCGAACCAGGAC
Linker-Z02200-F	ttttacaacaaataaaaaca ATGGCCGGCAGTTCAAAGG
Linker-Z02200-R	tataggagaccggcagatgaattcTTACATCCTCTGCTCCTTGAGCT

---

## 附录 III

## 重组菌株

表 1 重组菌株

Table 1 Recombinant strains

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab Stock
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z100	Evolved from high-temperature adaptation, Ability to utilize xylose	Lab Stock
EBY.VW4000	hxt17 $\Delta$ hxt13 $\Delta$ ::loxPhxt15 $\Delta$ ::loxP hxt16 $\Delta$ ::loxP hxt14 $\Delta$ ::loxP hxt12 $\Delta$ ::loxP hxt9 $\Delta$ ::loxP hxt11 $\Delta$ ::loxPhxt10 $\Delta$ ::loxP hxt8 $\Delta$ ::loxP hxt514::loxP hxt2 $\Delta$ ::loxP hxt367 $\Delta$ ::loxP gal2 $\Delta$ stl1 $\Delta$ ::loxP agt1 $\Delta$ ::loxP ydl247w $\Delta$ ::loxP yjr160c $\Delta$ ::loxP	Lab Stock
<i>T. cutaneum</i> pUC19- LEUp-GFP-URA3	<i>T. cutaneum</i> harboring the plasmid pUC19- LEUp-GFP-URA3	This work
<i>S. cerevisiae</i> pYES2-TDH3p-Trcu_00722-GFP	<i>S. cerevisiae</i> Z100 harboring the plasmid pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_00722-GFP	This work
<i>S. cerevisiae</i> pYES2-TDH3p-Trcu_02200-GFP	<i>S. cerevisiae</i> Z100 harboring the plasmid pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_02200-GFP	This work
<i>S. cerevisiae</i> pYES2-TDH3p-Trcu_01509-GFP	<i>S. cerevisiae</i> Z100 harboring the plasmid pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_01509-GFP	This work
<i>S. cerevisiae</i> pYES2-TDH3p-Trcu_00722	<i>S. cerevisiae</i> Z100 harboring the plasmid pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_00722	This work
<i>S. cerevisiae</i> pYES2-TDH3p-Trcu_02200	<i>S. cerevisiae</i> Z100 harboring the plasmid pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_02200	This work
<i>S. cerevisiae</i> pYES2-TDH3p-Trcu_01509	<i>S. cerevisiae</i> Z100 harboring the plasmid pYES2-KanMX-TDH3p-Trcu_01509	This work
<i>S. cerevisiae</i> Trcu_02200	The expression cassette is integrated at the site of 18srDNA in <i>S. cerevisiae</i> Z100	This work
EBY.VW4000 pYES2-TDH3p	EBY.VW4000 harboring the plasmid pYES2-TDH3p	This work
EBY.VW4000 pYES2-TDH3p-Gal2	EBY.VW4000 harboring the plasmid pYES2-TDH3p-Gal2	This work

---

EBY.VW4000 pYES2-TDH3p-Trcu_00722	EBY.VW4000 harboring the plasmid pYES2-TDH3p-Trcu_00722	This work
EBY.VW4000 pYES2-TDH3p-Trcu_01509	EBY.VW4000 harboring the plasmid pYES2-TDH3p-Trcu_01509	This work
EBY.VW4000 pYES2-TDH3p-Trcu_02200	EBY.VW4000 harboring the plasmid pYES2-TDH3p-Trcu_02200	This work

---

## 附录 IV

## 缩略词词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ACC	acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
ACL	ATP-dependent citrate lyase	ATP 依赖型柠檬酸裂解酶
ACO	aconitase	顺乌头酸酶
ACS	acetyl-CoA synthetase	乙酰辅酶 A 合成酶
CS	citrate synthase	柠檬酸合酶
DCXR	L-xylulose reductase	L-木酮糖还原酶
DGAT1/2	diacylglycerol acyl-transferase1/2	二酰基甘油酰基转移酶 1/2
DLAT	dihydrolipoamide acetyltransferase	二氢硫辛酰胺转移酶
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase	二氢硫辛酰胺脱氢酶
ELO	fatty acid elongase	脂肪酸延长酶
ENO	enolase	烯醇化酶
FAD1/2	delta-9 (12) fatty acid desaturase	$\Delta$ -9 (12) 脂肪酸去饱和酶
FAS1/2	fatty-acid synthase complex protein 1/2	脂肪酸合酶复合体 1/2
FBA	fructose-bisphosphate aldolase	果糖二磷酸醛缩酶
FBP	fructose-1,6-bisphosphatase	果糖-1,6-二磷酸酶
FESEM	field emission scanning electron microscope	场发射扫描电子显微镜

---

FH	fumarate hydratase	富马酸水合酶
GALE	UDP-glucose 4-epimerase	UDP-葡萄糖 4-差向异构酶
GALK	galactokinase	半乳糖激酶
GALT	UDP-glucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	UDP 葡萄糖-己糖-1-磷酸尿苷酰转移酶
GALU	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶
GAPD	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油醛脱氢酶
GAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase	甘油-3-磷酸酰基转移酶
GPD	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油脱氢酶
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	葡萄糖-6-磷酸异构酶
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
HPH	Hygromycin-B-phosphotrans ferase	潮霉素磷酸转移酶基因
HK1/2	Hexokinase1/2	己糖激酶 1/2
ICL	isocitrate lyase	异柠檬酸裂解酶
IDH	isocitrate dehydrogenase	异柠檬酸脱氢酶
$\alpha$ KDG	$\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase	$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
LAD	L-arabinitol 4-dehydrogenase	L-阿拉伯糖醇-4-脱氢酶
LPAT	lysophosphatidic acid acyltransferase	溶血磷脂酸酰基转移酶
MDH	malate dehydrogenase	苹果酸脱氢酶
ME	malic enzyme	苹果酸酶

---

MLS	malate synthase	苹果酸合酶
MPI	mannose-6-phosphate isomerase	甘露-6-磷酸异构酶
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（氧化型辅酶 II）
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（还原型辅酶 II）
MDH	malate dehydrogenase	苹果酸脱氢酶
PAP	phosphatidic acid phosphatase	磷脂酸磷酸酶
PAP	phosphatidic acid phosphatase	磷脂酸磷酸酶
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸缓冲盐溶液
PC	pyruvate carboxylase	丙酮酸羧化酶
PDH	pyruvate dehydrogenase	丙酮酸脱氢酶
PFK	6-phosphofructokinase	6-磷酸果糖激酶
6PGD	phosphogluconate dehydrogenase	磷酸葡萄糖酸脱氢酶
PGK	phosphoglycerate kinase	磷酸甘油酸激酶
PGM	phosphoglycerate mutase	磷酸甘油变位酶
PPP	pentose phosphate pathway	磷酸戊糖途径
PYK	pyruvate kinase	丙酮酸激酶
SCS- $\alpha$	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	琥珀酰辅酶 A 合成酶 $\alpha$ 亚基
SCS- $\beta$	succinyl-CoA synthetase beta subunit	琥珀酰辅酶 A 合成酶 $\beta$ 亚基
SDH	succinate dehydrogen	琥珀酸脱氢酶
SSCF	simultaneous saccharification and co-fermentation	同步糖化共发酵

---

TCA	tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
TEM	Transmission Electron Microscope	透射电子显微镜
TKT	transketolase	转酮醇酶
XDH	xylitol dehydrogenase	木糖醇脱氢酶
XK	xylulokinase	木酮糖激酶
XR	xylose reductase	木糖还原酶

---

## 学术成果

### 已发表论文:

1. **Qi Liu**<sup>1</sup>, Minping Lu<sup>1</sup>, Ci Jin<sup>1</sup>, Weiliang Hou, Jie Bao<sup>\*</sup>. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* into a favorable space for lipid accumulation. **Biotechnology and bioengineering**. 2022, 119 (6): 1509-1521. (SCI IF=3.8, 对应本论文第二章)
2. **Qi Liu**, Yuanyuan Li, Weiliang Hou, Bin Zhang, Jie Bao<sup>\*</sup>. Cellulase mediated stress triggers the mutations of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* with super-large spindle morphology and high lipid accumulation. **Biotechnology Journal**. 2023, 18(8): e2300091. (SCI IF=4.7, 对应本论文第二章)
3. Bin Zhang<sup>1</sup>, Dayu Ren<sup>1</sup>, **Qi Liu**<sup>1</sup>, Xiucui Liu, Jie Bao<sup>\*</sup>. Coproduction of single cell protein and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling. **Bioresource Technology**. 2023, 384: 129345. (SCI IF=11.4, 对应本论文第二章)
4. **Qi Liu**<sup>1</sup>, Bin Zhang<sup>1</sup>, Mingshan Hu, Jie Bao<sup>\*</sup>. Simultaneous enhancement of lignin-derived inhibitor tolerance and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* by adaptive evolution. **Process Biochemistry**. 2024, 137: 20-29. (SCI IF=4.4, 对应本论文第四章)

### 准备发表论文:

1. **Qi Liu**, Bin Zhang, Shaokai Li, Xinru Wang, Binyan Zhang, Jie Bao<sup>\*</sup>. Iterative short-duration centrifugal force activates conserved TORC2-Ypk1 mechanical force signaling pathway in typical oleaginous yeasts leading to dramatic cell physiological properties transformation. **Nature Communications**. (In preparation, 对应本论文第三章)

### 申请专利:

1. 鲍杰, 刘祺, 张斌。产木质纤维素基微生物油脂皮状丝孢酵母突变株及其应用。专利申请号:2023104000226。

## 致谢

四年博士阶段的求学生涯即将结束，回首这个阶段的学习生活感慨良多。从刚进入实验室时局促茫然，到如今可以为师弟师妹们的实验出谋划策；从做人做事多在听从他人见解时的摇摆不定，到现在内心自洽有自己坚定的想法。这四年不仅是科研能力逐步完善的过程也是成为一个真正意义上的成熟的人的过程。这个过程有太多给予我帮助和鼓励的师长和朋友，最后在这里对他们表示深深的感谢。

首先，感谢我的导师鲍杰教授。鲍老师作为我的导师，是博士阶段科研的领路人，鲍老师培养了我的科研思维，也锻炼了我的写作能力。鲍老师对于科研的纯粹追求和严谨的治学态度深刻影响实验室的每一个人。每周鲍老师主持的组会都会重新帮助每一位学生梳理实验思路，在这个讨论的过程中我们收获良多。四年的求学生涯有这样一位领路的师长，非常幸运，再次感谢鲍老师的培养和教导。另外也要感谢实验室张斌老师的帮助，张老师在实验思路和论文写作方面为我提供了很多建议。

其次，感谢我的父母和家人，我的爸爸妈妈一直非常支持我的求学道路，在我非常焦虑时总会宽慰我、给予我非常多的理解。虽然爸爸妈妈已经年迈、无法再为我的人生指路，但是父母的理解和支持永远是最大的抚慰。也感谢我的丈夫，同为科研工作者我们彼此理解工作的不易，谢谢你的体谅和理解。

最后感谢我们生物能源与生物炼制实验室的同学们。感谢我的师弟师妹张翼、任大宇、王新茹、李少凯、张兵言，感谢你们在实验上对我的支持和帮助。感谢王雅和赵凌轩，作为同窗好友我们一起度过了非常愉快的同窗时光。感谢实验室的其他同学和师弟师妹，希望生物能源与生物炼制实验室在你们的带领下越来越好！

刘祺

2024年11月8日