

休哈塔假丝酵母转化木糖和葡萄糖为乙醇的发酵转录谱

熊许洁^{1,2,3}, 蔡鹏^{1,2,3}, 徐勇^{1,2,3*}, 勇强^{1,3}, 余世袁^{1,3}

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

摘要: 【目的】探究木糖发酵典型菌株休哈塔假丝酵母在己糖和戊糖发酵中的转录谱及差异, 筛选出与木糖利用和乙醇发酵代谢途径及调控相关的关键性酶和功能蛋白质基因。【方法】应用新一代高通量测序技术 454 GS FLX Titanium 分别构建了休哈塔假丝酵母木糖、葡萄糖发酵的 cDNA 文库, 并进行 De novo 转录组的表达序列标签大规模测序和序列比较分析, 进而挖掘出该酵母中参与木糖代谢和乙醇发酵的相关基因。【结果】分别对木糖和葡萄糖发酵样本进行二分之一 RUN 测序并各自得到 60 万条 reads, 序列平均长度 400 bp。共拼接得到 7250 条(木糖)和 7168 条(葡萄糖) contigs, 并利用 BLAST 对木糖样品和葡萄糖样品中的 2421 个基因(contig)和 2456 个基因(contig)进行了功能注释和 GO 分类。通过两个文库间的序列对比分析, 共发现 158 个基因属于差异表达状态 ($P < 0.05$)。基于经典的糖酵解及乙醇发酵途径筛选出与木糖乙醇发酵相关的候选基因, 并且比较分析其转录水平的差异。【结论】基于大规模转录谱测序和比较分析首次筛选出休哈塔假丝酵母中参与木糖代谢和乙醇发酵的基因群, 可为后续分子生物学及代谢调控研究提供基础数据。

关键词: 休哈塔假丝酵母, 木糖代谢, 乙醇发酵, 转录谱, 表达序列标签

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)04-0338-08

木糖是木质纤维原料中含量仅次于葡萄糖的糖平台化学物, 含量可达到原料的 18% – 30% 以上^[1-2], 因此木糖的高效利用是木质纤维资源生物炼制大规模商业化生产的关键环节之一^[3-5]。休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 具有良好的木糖或混合糖共发酵产乙醇的能力, 最高乙醇得率可以达到 0.35 – 0.41g 乙醇/g 消耗糖^[6-7], 同时较其它天然微生物菌株而言还具有更好的耐抑制物发酵能力, 因而它是最具有工业化应用前景的木糖发酵

菌株之一。

目前, 对于休哈塔假丝酵母分子生物学及代谢网络的了解仅限于少数几个基因, 如木糖还原酶、木糖醇脱氢酶, 尚无基因组测序和转录组比较的相关研究报道, 其糖代谢网络、调控节点及分子机制尚不清楚^[8]。本文应用 454 GS FLX Titanium 高通量测序技术, 首次分别构建了休哈塔假丝酵母发酵单一木糖、葡萄糖的 cDNA 文库, 并且对转录谱进行大规模 EST (expressed sequence tag) 测序, 在此基础上拼

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070514); 江苏省科技支撑项目 (BE2011838); 江苏省高校优势资源学科建设工程资助项目 (PAPD)

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

作者简介: 熊许洁 (1987 -), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事生物化工的研究。E-mail: littlexiongbaby@163.com

收稿日期: 2012-10-12; **修回日期:** 2013-01-09

接、比较、分析和筛选出与酵母细胞中木糖代谢、葡萄糖代谢及乙醇发酵相关的潜在基因,为后续的相关研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:休哈塔假丝酵母 *C. shehatae* NL02, 来源于美国 ATCC 22984, 经南京林业大学生物化工研究所木糖长期驯化后保藏。

1.1.2 培养基:①酵母活化培养基 (g/L): 木糖或葡萄糖 10.0, 蛋白胨 3.0, 酵母浸膏 5.0; ②增殖培养基 (g/L): 木糖或葡萄糖 20.0, 蛋白胨 3.0, 酵母浸膏 5.0; ③发酵培养基 (g/L): 采用适量浓度的单一木糖、葡萄糖为碳源, 添加硫酸铵 5.0, 磷酸二氢钾 3.0, 硫酸镁 0.5 作为无机氮源并以柠檬酸缓冲液调节 pH 5.0 - 6.0。

1.1.3 主要试剂和仪器:Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。mRNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。cDNA Synthesis System Kit 和 AMPure Bead 购自 Roche 公司。454 GS FLX Titanium 测序仪是 Roche 公司产品。

1.2 酵母糖发酵及细胞收集^[14]

在 250mL 三角瓶中加入 50mL 活化培养基并以 0.25 μm 封口膜封口, 经 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 25 min 后冷却至 30 $^{\circ}\text{C}$ 。由试管斜面接入菌种, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 条件下进行摇荡培养至对数生长期后期, 于 3050 \times g 离心 5 min 回收酵母, 立即用液氮冷冻, 存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 酵母 RNA 提取和反转录

采用 Trizol 试剂分别提取发酵液中的酵母总 RNA, 以 Oligotex[®] mRNA kit 分离纯化 mRNA; 以 2 μg mRNA 为模板, 用氯化锌进行随机断裂后采用 cDNA Synthesis System Kit 反转录合成 cDNA 并对其进行扩增和末端补平, 扩增条件: 70 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min; 16 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; 16 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 采用 AMPure Bead 去除体系中小于

300 bp 的片段。

1.4 文库构建和测序

应用高通量测序平台 454 GS FLX Titanium 对 cDNA 样品测序。5 μg 双链 cDNA 片段的两端添加特异性衔接子 A 和 B, 变性为单链连接到磁珠上, 经 emPCR 富集后, 置于 PicoTiterPlate 板上, 上机测序^[9]。

1.5 序列拼接和转录本表达量计算

采用 GS-FLX Software 去除衔接子区域和低质量序列、屏蔽 PCR 引物, 测序的 EST 序列以 Trinity Software 进行拼接。通过 BWA 软件将原始 read 数据与拼接转录本序列进行比对, 采用 cufflink 软件计算得到木糖和葡萄糖样本各自拼接转录本的表达量。根据拼接 Contig 计算每个转录本的丰度 (表达量), 并以 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 衡量每条转录本的表达量。

1.6 功能注释、分类和代谢途径分析

使用 blastx 程序将拼接所得的长度大于 200 bp 的 Contigs 与 Gene Ontology 数据库所下载得到的非冗余序列进行同源比对 (E 值 $< 1e - 3$), 并采用 blast2go 分析流程 (<http://www.blast2go.org/>) 对 BLAST 分析结果进行 GO 数据库的转录本功能注释分析^[10-12]。GO 数据库包括 GenPept、Swissprot、PIR、PDF、PDB 和 NCBI RefSeq 的序列信息资源。根据 Gene Ontology (GO) 数据库的信息, 对序列 (按分子功能、细胞组分、生物学过程) 进行分类^[13]; 根据 KEGG pathway 数据库的信息, 对序列参与的代谢途径进行注释。对所有注释信息整理, 搜索与木糖代谢和乙醇发酵相关的基因。

2 结果

2.1 休哈塔假丝酵母糖发酵性能的比较分析

前期摇瓶振荡发酵结果显示^[14], 休哈塔假丝酵母发酵葡萄糖时的糖利用速率和乙醇浓度等重要生产性能指标都明显高于木糖, 但是乙醇得率却低于木糖。其中, 在葡萄糖中的乙醇发酵浓度可以达到

61.9 g/L,对应的乙醇得率为75.2%;而木糖发酵产乙醇浓度最高值为45.7 g/L,糖利用率和乙醇得率分别为94.8%和87.3%,具有进一步提升及生产应用的潜力^[15-17]。结合当前对*P. stipitis*等木糖发酵近缘菌株的细胞学研究可以推测:造成两种单糖发酵性能差异的主要成因之一与*C. shehatae*细胞膜上葡萄糖和木糖跨膜转运体系的差异有关^[18-19],即酵母细胞膜上负责木糖跨膜转运的载体蛋白质为低亲和性蛋白,属于易化扩散具有转运速率饱和性的限制。因而即使木糖的跨膜转运为被动运送,但是受到环境木糖浓度的调控,当培养基中木糖浓度超过一定阈值时,其转运速率受载体蛋白的限制并不能提高;同时,受细胞内其它某些酶或活性蛋白质的表达水平的限制,最终导致木糖的利用速率和乙醇发酵浓度下降。基于以上可知,筛选和弄清限制木糖代谢的关键酶或蛋白质,进而疏通乙醇发酵通路是提高休哈塔假丝酵母生产性能的基础和关键。酵母菌等真核细胞的表达调控主要在转录水平^[20-21],因此开展转录谱研究是发现这些关键基因的有效手段。

2.2 EST 测序与序列分析

采用454 GS FLX Titanium高通量测序技术分别对葡萄糖、木糖培养条件下的休哈塔假丝酵母的转录组进行测序,分别获得60万条reads,平均长度为400 bp。所得高通量测序数据提交至GenBank Sequence Read Archive(SRA),登录号SRA053160。通过Trinity软件进行拼接,获得:葡萄糖有7250条Contigs,木糖有7168条Contigs。

通过BLAST搜索比对,分别对木糖样品和葡萄糖样品中的2421个基因(contig)和2456个基因(contig)进行了功能注释。通过对BLAST分析结果进行GO数据库的转录本功能注释分析,分别获得了休哈塔假丝酵母在木糖样本和葡萄糖样本中的contig的GO分类信息。对木糖样本中的2421个基因(contig)进行注释,共得到23099个功能,其中12549个归入生物学过程(biological process),4850个归入分子功能(molecular function),5725个归入细胞组分(cellular component);对葡萄糖样本中的2456个基因(contig)进行注释,共得到23860个功

能,其中12849个归入生物学过程(biological process),4977个归入分子功能(molecular function),6034个归入细胞组分(cellular component)。在GO分类体系中分子功能、生物学过程和细胞组分3个大的类别被划分为更为详细的42个小的类别,这一分类结果显示了休哈塔假丝酵母在不同糖代谢中基因表达谱的总体情况(图1)。

2.3 代谢途径分析

通过与KEGG pathway数据库比对,对休哈塔假丝酵母的contig进行生物通路的注释分析,其中在木糖样品中共有890条Contig被注释为405种蛋白质(酶),在葡萄糖样品中共有755条Contig注释为395种蛋白质(酶)。根据KEGG注释结果,可以关联到糖代谢及乙醇生成的5大代谢途径,分别为:糖跨膜转运、糖酵解途径、磷酸戊糖途径、丙酮酸途径、TCA循环途径和乙醇生成步骤。

2.4 差异表达基因分析

通过将葡萄糖样品和木糖样品的原始测序数据比对到拼接文件,并计算得到各自的基因表达谱,基于此结果进一步计算两样本的基因差异表达的程度。最终发现158个基因属于差异表达状态($P < 0.05$),根据绝对值 $[\log_2(\text{木糖的FPKM值}/\text{葡萄糖的FPKM值})]$ 可分为5大类表达量不同的差异基因,其中在木糖中高效表达的差异基因有74个,在葡萄糖中高效表达的差异基因有84个(表1)。

基于上述结果,仅针对细胞内糖跨膜转运、糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环和乙醇发酵等代谢途径,共同筛选出转录谱差异分析的候选基因如下:XYL1、XYL2、PCK、DLD、ICL、GDH2、PFK、TDH、GPM、HXK、GLK、ALD、MDH、UGA2和UGA22。以各基因表达量的相对差异构建出休哈塔假丝酵母糖代谢和乙醇发酵的代谢调控转录谱如图2所示。结果显示,在木糖发酵体系中,XYL1、XYL2、GDH2、PFK、TDH、GPM、HXK和GLK基因被木糖诱导高效转录;而在葡萄糖发酵体系中,PCK、DLD、ICL、ALD、MDH、UGA2和UGA22基因被葡萄糖诱导高效转录。

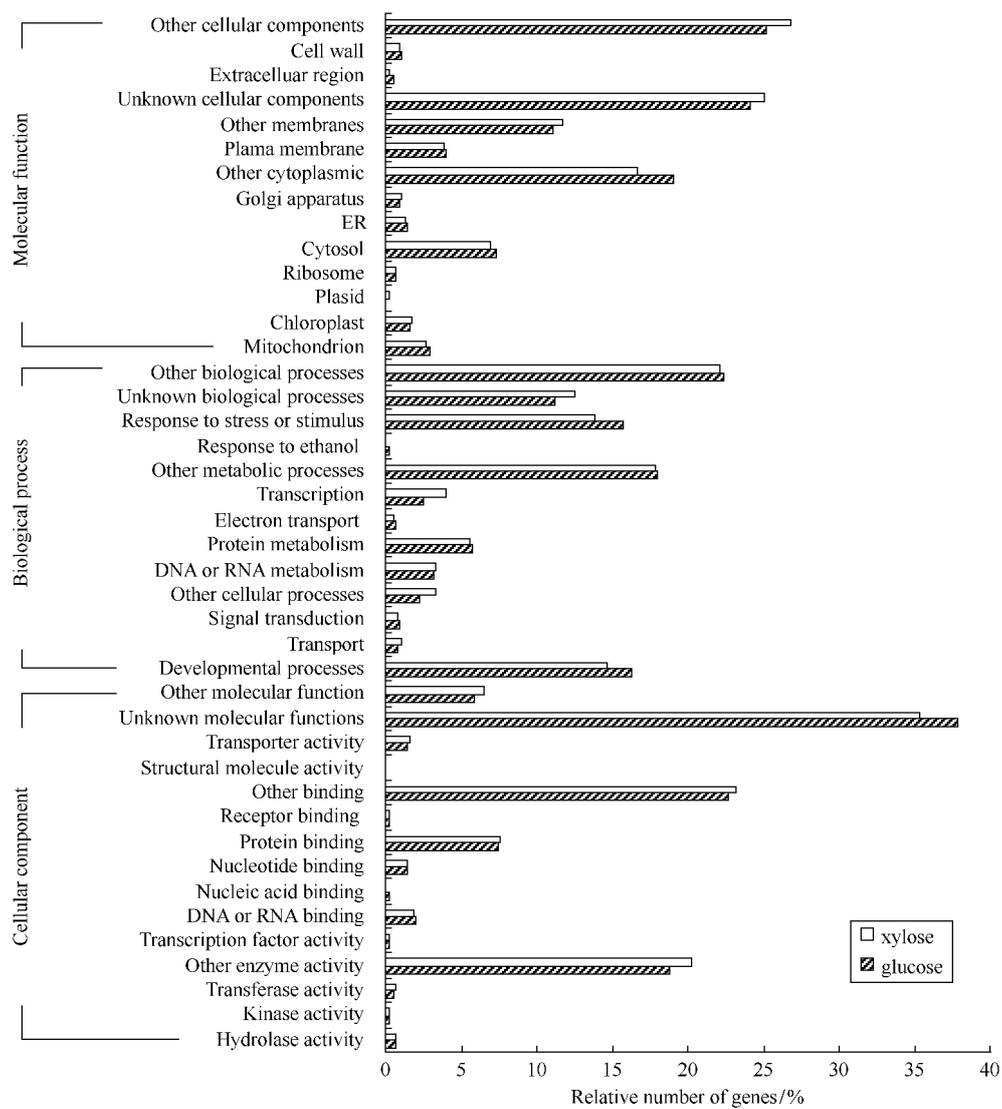


图 1. 注释 Contig 的 GO 分类

Figure 1. Gene Ontology (GO) classification of annotated contigs.

表 1. 高丰度表达的差异基因

Table 1. Differentially expressed genes with high level in xylose or glucose fermentation

| Differentially expressed value ^a | Contig sequences | |
|---|------------------|---------|
| | Xylose | Glucose |
| ≥ 5 | 21 | 26 |
| 4 - 5 | 18 | 15 |
| 3 - 4 | 32 | 38 |
| 2 - 3 | 3 | 4 |
| 0 - 1 | 0 | 1 |
| Total | 74 | 84 |

^a $a = \log_2 (FPKM1 / FPKM2)$. FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) means the gene expression frequency.

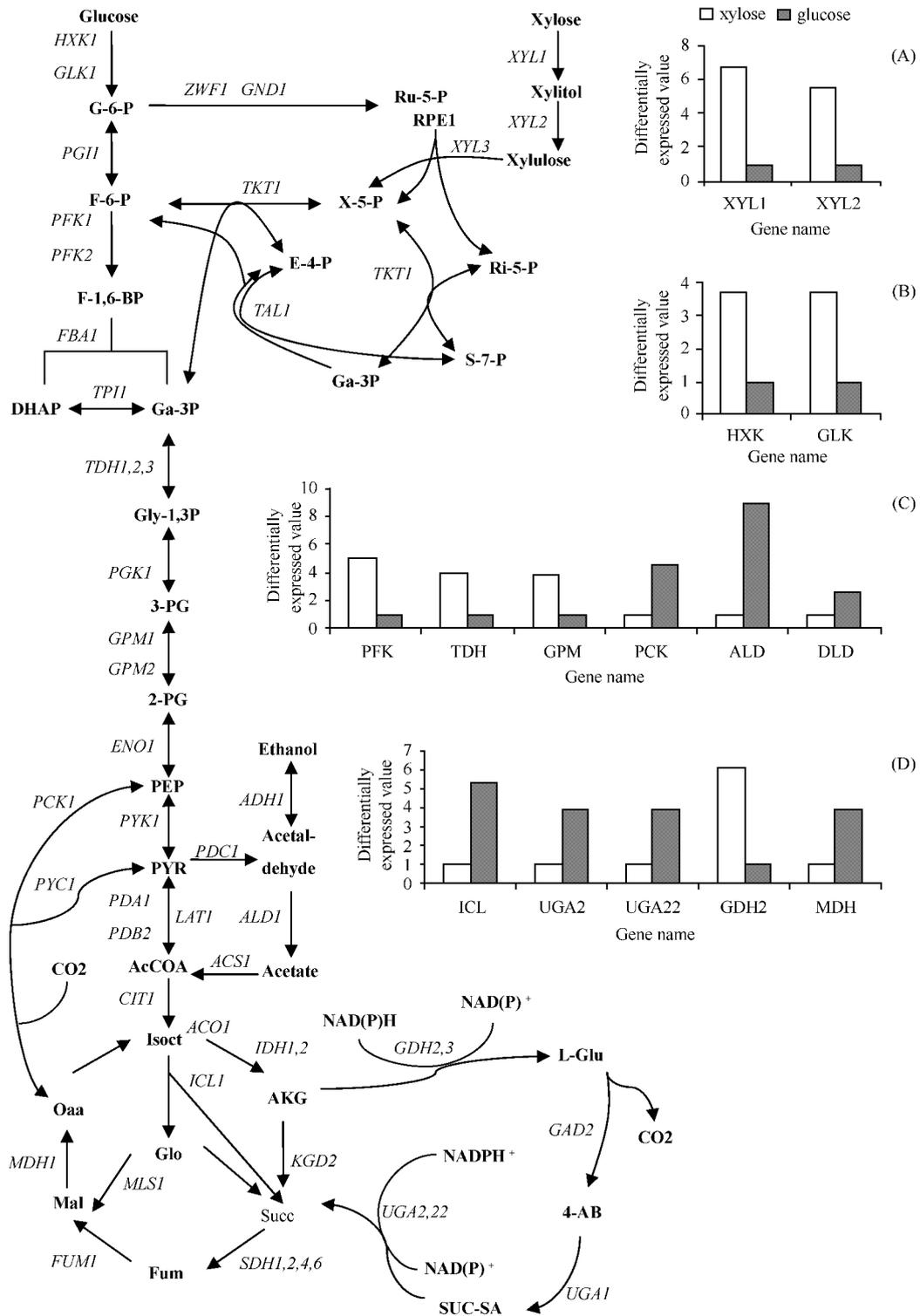


图 2. 休哈塔假丝酵母糖发酵产乙醇的基因转录谱 [24]

Figure 2. Comparison of the transcript profile of sugar fermentation to ethanol between xylose and glucose in *Candida shehatae*. A. xylose entry pathway including 2 genes: XYL1, xylose reductase; XYL2, xylitol dehydrogenase; B. glucose entry pathway including 2 genes: HXK, hexokinase; GLK, glucokinase; C. glycolysis and fermentation pathway including 6 genes: PFK, phosphofructokinase; TDH, phosphoglyceraldehyde dehydrogenase; GPM, phosphoglycerate mutase; PCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; ALD, aldehyde dehydrogenase; DLD, dihydrolipoyl dehydrogenase; D. tricarboxylic acid cycle pathway including 5 genes: ICL, isocitrate lyase; UGA2, UGA22, succinate glyceraldehyde dehydrogenase; GDH, glutamate dehydrogenase; MDH, malic dehydrogenase.

3 讨论

休哈塔假丝酵母细胞内已经具备了较完备的糖发酵产乙醇的功能蛋白质和催化酶的基因及代谢网络,具有葡萄糖乙醇发酵的生产能力^[22-23]。目前亟需解决的关键问题是如何调控上述基因在木糖发酵体系中的高效表达,进而提高其发酵木糖产乙醇的生产性能^[24-25]。

本研究结果显示,相对于基因芯片及其它同类转录谱研究技术而言,454高通量测序技术具有测序片段长、测序数据量大、高覆盖度、信息丰富、实验周期短等优势,可以为休哈塔假丝酵母糖代谢和乙醇发酵的转录谱研究提供更加可靠和完整的数据;同时,基于转录谱大规模测序的比较分析方法更适宜于筛选和挖掘未知酵母等微生物中与糖类代谢和乙醇生物合成代谢相关的关键基因和差异基因。

通过大规模的转录谱测序从休哈塔假丝酵母中初步筛选出158个与葡萄糖和木糖发酵产乙醇代谢相关的差异性表达基因。在此基础上,结合GO数据库和KEGG数据库注释进一步发掘出15个与木糖代谢和乙醇生成相关的重要差异基因:木糖还原酶、木糖醇脱氢酶、NAD-依赖型谷氨酸脱氢酶、磷酸果糖激酶、磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶、己糖激酶、葡萄糖激酶、乙醛脱氢酶、二氢硫辛酸脱氢酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧(化)激酶、异柠檬酸裂合酶、苹果酸脱氢酶、琥珀酸甘醛脱氢酶。其中,受木糖诱导高效表达的基因有XYL1、XYL2、GDH2、PFK、TDH、GPM、HXK和GLK基因;被葡萄糖诱导转录的基因是PCK、DLD、ALD、ICL、MDH、UGA2和UGA22基因。

木糖还原酶和木糖醇脱氢酶是酵母内负责催化木糖进入磷酸戊糖途径的必需酶,实际测定XYL1和XYL2基因的表达受木糖诱导,这与前期文献报道吻合。磷酸烯醇式丙酮酸羧(化)激酶主要参与催化磷酸烯醇式丙酮酸至草酰乙酸的反应,而二氢硫辛酸脱氢酶为丙酮酸脱羧酶复合体的固有酶组分,它们均直接负责催化丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶A进入三羧酸循环;ALD、ICL、MDH、UGA2和UGA22基因均与三羧酸循环有关。转录谱分析结果也表明,PCK、DLD、ALD、ICL、MDH、UGA2和UGA22等7种基因在葡萄糖中的表达量均高于木

糖,这从转录水平上可以解释造成酵母发酵葡萄糖与木糖的性能差异:PCK等基因的高效转录可以将葡萄糖的代谢中间产物快速导入三羧酸循环,但却不导向乙醇发酵途径。因此,休哈塔假丝酵母总体上表现为对葡萄糖利用的速率快,但乙醇得率反而低于木糖。

本文基于转录谱大规模测序的数据,目前只是针对细胞内糖跨膜转运、糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环和乙醇发酵代谢途径进行了差异基因的比较分析,仅占筛选所得158个基因总数的约10%,后续还需要对剩余更多的基因进行功能研究和信息发掘。在此基础上,结合实时定量PCR等技术可进一步研究上述基因受各种环境因子影响下的定量表达规律及转录调控机制,进而构建出它们的分子调控网络。这将为后续戊糖发酵产乙醇酵母等微生物菌株的转录组学、分子生物学及代谢工程等相关研究提供基础数据。

参考文献

- [1] Rodriguez LC, O'Connell D. Biofuels: Balance the blend of food and fuel. *Nature*, 2011, 476(7360): 283-283.
- [2] Rodney JB, Nancy N, Bruce SD. Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(5): 867-875.
- [3] Sanderson K. Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*, 2011, 474(7352): 12-14.
- [4] Li Y, Zhang Z, Lei Z, Yang Y, Utsumi M, Sugiura N. Influence of metal addition on ethanol production with *Pichia stipitis* ATCC 58784. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36(4): 491-497.
- [5] Fairly Peter. Introduction: Next generation biofuels. *Nature*, 2011, 474(7352): 2-5.
- [6] Galbe M, Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(6): 618-628.
- [7] Sánchez S, Bravo V, Castro E, Moya AJ, Camacho F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002, 77(6): 641-648.
- [8] Lu P, Davis BP, Hendrick J, Jeffries TW. Cloning and disruption of the β -isopropylmalate dehydrogenase gene (LEU2) of *Pichia stipitis* with *URA3* and recovery of the

- double auxotroph. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49 (2) : 141-146.
- [9] Margulies M, Egholm M, Altman W, Attiya S, Bader J, Bemben LA, Berka J, Braveman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in micro-fabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, 437(7957) : 376-380.
- [10] Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (10) : 3420-3435.
- [11] Conesa A, Stefan Götz. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 2008 (1) : 619-832.
- [12] Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 2005, 21 (18) : 3674-3676.
- [13] Berardini TZ, Mundodi S, Reiser R, Huala E, Garcia-Hernandez M, Zhang P, Mueller LM, Yoon J, Doyle A, Lander G, Moseyko N, Yoo D, Xu I, Zoeckler B, Montoya M, Miller N, Weems D, Rhee SY. Functional annotation of the *Arabidopsis* genome using controlled vocabularies. *Plant Physiology*, 2004, 135 (2) : 745-755.
- [14] Xiong XJ, Xu Y, Zhang XY, Yong Q, Yu SY. Ethanol Fermentation Performance by *Candida shehatae*. *Journal of Microbiology*, 2011, 31 (6) : 43-48. (in Chinese)
熊许洁,徐勇,张晓燕,勇强,余世袁. 休哈塔假丝酵母乙醇发酵性能的研究. 微生物学杂志, 2011, 31 (6) :43-48.
- [15] Parekh SR, Yu SY, Wayman M. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipites* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1986, 25 (3) : 300-304.
- [16] Wayman M, Parekh S. Ethanol and sugar tolerance of *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, 1985, 2(12) : 909-912.
- [17] Li Y, Park JY, Shiroma R, Ike M, Tokuyasu K. Improved ethanol and reduced xylitol production from glucose and xylose mixtures by the mutant strain of *Candida shehatae* ATCC 22984. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166 (7) : 1781-1790.
- [18] Buziol S, Becker J, Baumeister A, Jung S, Mauch K, Reuss M, Boles E. Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transports of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2002, 2 (3) : 283-291.
- [19] Meinander NQ, Hahn-Hagerdal B. Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant, XYL1-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: A comparison of different sugars and ethanol as cosubstrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 63 (5) : 1959-1964.
- [20] Bruce F. Transcriptional regulatory networks and the yeast cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14 (6) : 676-683.
- [21] Blount BA, Weenink T, Ellis Y. Construction of synthetic regulatory networks in yeast. *FEBS Letters*, 2012, 586 (15) : 2112-2121.
- [22] Saddler JN. Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Wallingford. UK: CAB International, 1993: 131-135.
- [23] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56 (1-2) : 17-34.
- [24] Jeffries TW, Griforeiv IV, Griwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Schmutz J, Lindquist E, Dehal P, Shapiro H, Jin YS, Passoth V, Richardson PM. Genome sequence of the lignocellulose-bioconversion and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, 2007, 25 (3) : 317-326.
- [25] Xu Y, Shen C, Qiu XT, Cai P, Huang MR, Yu SY. Screening and analysis of genes related to xylose fermentation to ethanol in *Candida tropicalis*. *China Biotechnology*, 2011, 24 (6) : 61-69. (in Chinese)
徐勇,沈翀,邱兴天,蔡鹏,黄敏仁,余世袁. 热带假丝酵母木糖乙醇发酵相关基因的筛选与分析. 中国生物工程杂志, 2011, 24 (6) :61-69.

Transcript profile of converting xylose and glucose to ethanol by *Candida shehatae*

Xujie Xiong^{1,2,3}, Peng Cai^{1,2,3}, Yong Xu^{1,2,3*}, Qiang Yong^{1,3}, Shiyuan Yu^{1,3}

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

Abstract: [Objective] We detected and analyzed transcript profile differences between hexose and pentose fermentation by *Candida shehatae*, a typical xylose fermenting yeast strain. On this basis, the encoding genes of key enzymes and functional protein were screened for discovering candidates of metabolism and regulation. [Methods] To discover the key genes of xylose metabolism and ethanol fermentation in *Candida shehatae*, we performed a new high throughout de novo transcriptome sequencing technology on Roche 454 GS FLX Titanium platform. Two cDNA libraries were constructed and sequenced for xylose and glucose fermentation for comparison of its expressed sequence tags differences. [Results] Second sequencing run resulted in 600000 reads with the average length of 400bp for each cDNA library. We got 7250 and 7168 contigs by assembly, and annotated 2412 and 2456 unique genes by BLAST and Gene Ontology analysis for xylose and glucose respectively. By comparison, we identified 158 genes as different expression genes candidates at $p < 0.05$ for xylose metabolism and ethanol fermentation in *Candida shehatae*. [Conclusions] The group genes for xylose metabolism and ethanol fermentation in *Candida shehatae* was discovered by using transcript profile sequencing and comparison. It will provide fundamental data for the relative research on molecular biology and metabolic regulation.

Keywords: *Candida shehatae*, xylose metabolism, ethanol fermentation, transcript profile, expressed sequence tag

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070514), by the Jiangsu Province Science and Technology Supported Program (BE2011838) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

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

Received: 12 October 2012/Revised: 9 January 2013

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2013 年 4 月统计

| 时间 | 刊期 | 卷号 | 期号 |
|-------------|---------|---------|--------|
| 1953 - 1956 | 半年刊 | 1 - 4 | 1 - 2 |
| 1957 - 1958 | 季刊 | 5 - 6 | 1 - 4 |
| 1959 | 季刊 | 7 | 1 - 2 |
| 1959 - 1962 | 停刊 3 年 | | |
| 1962 | 季刊 | 8 | 3 - 4 |
| 1963 - 1965 | 季刊 | 9 - 11 | 1 - 4 |
| 1966 | 季刊 | 12 | 1 - 2 |
| 1966 - 1972 | 停刊 6 年半 | | |
| 1973 - 1988 | 季刊 | 13 - 28 | 1 - 4 |
| 1989 - 2007 | 双月刊 | 29 - 47 | 1 - 6 |
| 2008 - 2012 | 月刊 | 48 - 52 | 1 - 12 |
| 2013 | 月刊 | 53 | 1 - 4 |