



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112011472 A

(43) 申请公布日 2020.12.01

(21) 申请号 202010773739.1 *C12N 15/53* (2006.01)

(22) 申请日 2020.08.04 *C12N 15/65* (2006.01)

(83) 生物保藏信息 *C12N 15/66* (2006.01)

CGMCC No.19586 2020.04.20 *C12N 15/81* (2006.01)

(71) 申请人 中国石油化工股份有限公司 *C12N 15/04* (2006.01)

地址 100027 北京市朝阳区朝阳门北大街 *C12R 1/865* (2006.01)

22号

申请人 中石化上海工程有限公司

四川大学

(72) 发明人 汤岳琴 缪晔 谢彩云 陈栋

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 郎祺

(51) Int. Cl.

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

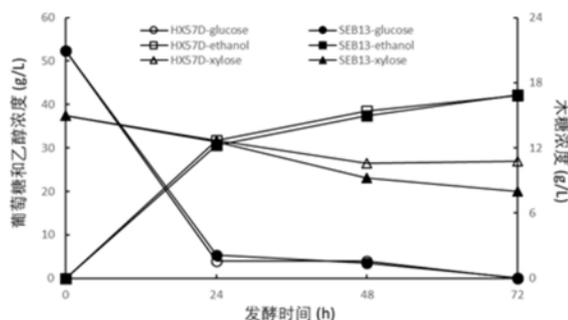
权利要求书2页 说明书9页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株及构建方法

(57) 摘要

本发明提供了一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株及构建方法,该酿酒酵母菌株为SEB13,分类命名为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*,保藏编号为CGMCC No.19586。本发明以发酵性能优良的工业酿酒酵母菌株作为出发菌株,结合基因定点突变、基因工程、交配和进化工程手段构建了一株具有XR-XDH途径的木糖发酵性能优良且具有优良抑制物耐受的酵母菌株SEB13,该菌株具有较高的木糖消耗速率和乙醇生成速率,为秸秆燃料乙醇工业化生产提供了优良菌株来源,具有很好的工业应用潜力。



1. 一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株,其特征在于,为SEB13,分类命名为酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*,保藏编号为CGMCC No.19586,保藏日期为2020年04月20日,保藏单位为中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

2. 一种如权利要求1所述酿酒酵母菌株的构建方法,包括如下步骤:

步骤一,含双位点突变XYL1基因和KanMX基因的质粒pKX1 (D) X2XK的构建:

(1) 以pXR作为模板,用第一引物对扩增得到双碱基突变的XYL1片段1,用第二引物对扩增得到双碱基突变的XYL1片段2;用所述XYL1片段1和XYL1片段2为模板,用第三引物对进行融合PCR,得到双突变XYL1片段;

(2) 将所述XYL1双突变片段与pKX1X2XKS同时进行双酶切,纯化后连接得到质粒pBX1 (D) X2XK;

(3) 以质粒pKX1X2XKS为模板,采用第三引物对扩增出KanMX片段;将此KanMX片段和所述质粒pBX1 (D) X2XK同时酶切、连接,筛选并测序得到质粒pKX1 (D) X2XK;

步骤二,木糖代谢单倍体菌株的构建:

(1) 以所述质粒pKX1 (D) X2XK为模板扩增出片段XYL1 (D) -XYL2-XKS1;

(2) 将所述XYL1 (D) -XYL2-XKS1转化到单倍体菌株KFG4-6B,得到XR双突变重组菌株,命名为HX57D;

步骤三,单倍体菌株交配和二倍体菌株混合菌株进化工程:

(1) 取等量的所述HX57D与KFG5-5C新鲜酵母细胞,混合均匀、接种到培养基中,培养;

(2) 培养完成,确定为二倍体后,然后以木糖为唯一碳源进行驯化;

步骤四,取驯化过程中保存的菌液进行突变菌株分离和筛选,得到上述具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株。

3. 根据权利要求2所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,步骤一中所述第一引物对的序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.2;所述第二引物对的序列为SEQ ID No.3和SEQ ID No.4;所述第三引物对的序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.3。

4. 根据权利要求2所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,步骤一(2)中所述XYL1双突变片段与pKX1X2XKS同时进行Apa I、Xho I双酶切。

5. 根据权利要求2所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,步骤一(3)中所述KanMX片段和pBX1 (D) X2XK质粒同时用Apa I酶切。

6. 根据权利要求2所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,步骤二(1)中所述扩增所采用的引物序列为SEQ ID No.6和SEQ ID No.7。

7. 根据权利要求2所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,步骤二(2)中所述转化采用方法为醋酸锂法。

8. 根据权利要求2所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,在驯化之前,将待驯化菌株在2%YPD平板上过夜活化,取适量菌体接种到含100mL 5%YPD的500mL三角瓶中,在恒温摇床中以30℃、160r/min条件预培养16h;然后9,000g离心1min收集菌体。

9. 根据权利要求8所述的酿酒酵母菌株的构建方法,其特征在于,所述驯化包括如下阶段:

第一阶段,将所述菌体以接种量 $OD_{660}=0.1$ 接种到含2%YNBX的培养基中,每24小时转

接一次；

第二阶段，将第一阶段得到的菌液以接种量 $OD_{660}=0.01$ 接种到2%YNBX培养基，每48h或24h传代一次；

第三阶段，将第二阶段得到的菌液以接种量 $OD_{660}=0.01$ 接种到4%YNBX，每24h传代一次，直至监测数据在连续5次转接中没有明显变化，停止转接，保存菌液。

10. 根据权利要求9所述的酿酒酵母菌株的构建方法，其特征在于，所述驯化的条件为 35°C 、 $200\text{r}/\text{min}$ 。

一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株及构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物重组技术领域,尤其涉及一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株及构建方法。

背景技术

[0002] 生物液体燃料生物乙醇被认为是一种可替代化石燃料汽油的清洁能源,基于我国发展燃料乙醇需遵循“不与人争粮,不与粮争地”的原则,含有大量可发酵糖的秸秆等废弃生物质将成为燃料乙醇生产的主要原料。秸秆水解液含有以葡萄糖和木糖为代表的六碳糖和五碳糖,将它们发酵转化成乙醇,实现全糖利用,是进行秸秆燃料乙醇生产的基础。同时,由于秸秆原料预处理和水解过程中会产生多种副产物如小分子有机酸、呋喃醛类、酚醛类物质,它们会显著抑制乙醇发酵微生物的生长和发酵,因此构建具有抑制物耐受力且能同时发酵葡萄糖和木糖的可工业化应用的微生物菌株对于秸秆原料的燃料乙醇生产至关重要。

[0003] 酿酒酵母作为传统的乙醇工业生产微生物,具有鲁棒性且乙醇产率高,但是它不能利用木糖。在酿酒酵母中异源表达树干毕赤酵母的木糖代谢XR-XDH(木糖还原酶-木糖醇脱氢酶)途径,同时高表达酿酒酵母内源XK(木酮糖激酶),能够赋予酿酒酵母代谢木糖的能力。但由于XR偏好NADPH而XDH只利用NAD⁺作为辅酶导致该途径辅酶不平衡,中间代谢产物木糖醇大量积累,乙醇收率偏低。因此如何降低该途径木糖醇的积累同步提升木糖代谢速率以及乙醇收率是获得优秀木糖发酵菌株的关键。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷,提供一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株及构建方法,以发酵性能优良的工业酿酒酵母菌株作为出发菌株,结合基因定点突变、基因工程、交配和进化工程手段构建了一株具有XR-XDH途径的木糖发酵性能优良且具有优良抑制物耐受的酵母菌株,为秸秆燃料乙醇工业化生产提供了优良菌株来源。

[0005] 本发明为解决上述技术问题采用以下技术方案:

[0006] 本发明的第一方面是提供一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株,其为SEB13,分类命名为酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*,保藏编号为CGMCC No.19586,保藏日期为2020年04月20日,保藏单位为中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0007] 本发明的第二方面是提供上述具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株的构建方法,包括如下步骤:

[0008] 步骤一,含双位点突变XYL1基因(编码XR)和KanMX基因的质粒pKX1(D)X2XK的构建:

[0009] (1) 以pXR作为模板,用第一引物对扩增得到双碱基突变的XYL1片段1,用第二引物对扩增得到双碱基突变的XYL1片段2;用XYL1片段1和XYL1片段2为模板,用第三引物对进行融合PCR,得到双突变XYL1片段;

[0010] (2) 将上述XYL1双突变片段与pKX1X2XKS同时进行双酶切,纯化后连接得到pBX1(D) X2XK质粒;

[0011] (3) 以质粒pKX1X2XKS为模板,采用第三引物对扩增出KanMX片段;将此KanMX片段和pBX1(D) X2XK质粒同时酶切、连接,筛选并测序得到质粒pKX1(D) X2XK;

[0012] 步骤二,木糖代谢单倍体菌株的构建:

[0013] (1) 以质粒pKX1(D) X2XK为模板扩增出片段XYL1(D)-XYL2-XKS1;

[0014] (2) 将XYL1(D)-XYL2-XKS1片段转化到单倍体菌株KFG4-6B,得到XR双突变重组菌株,命名为HX57D;

[0015] 步骤三,单倍体菌株交配和二倍体菌株混合菌株进化工程:

[0016] (1) 取等量的HX57D与KFG5-5C新鲜酵母细胞,混合均匀、接种到培养基中,培养;

[0017] (2) 培养完成,确定为二倍体后,然后以木糖为唯一碳源进行驯化;

[0018] 步骤四,取驯化过程中保存的菌液进行突变菌株分离和筛选,得到上述具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株。

[0019] 进一步地,步骤一中第一引物对的序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.2;第二引物对的序列为SEQ ID No.3和SEQ ID No.4;第三引物对的序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.3。

[0020] 进一步地,步骤一(2)中XYL1双突变片段与pKX1X2XKS同时进行Apa I、Xho I双酶切。

[0021] 进一步地,步骤一(3)中KanMX片段和pBX1(D) X2XK质粒同时用Apa I酶切。

[0022] 进一步地,步骤二(1)中扩增所采用的引物序列为SEQ ID No.6和SEQ ID No.7。

[0023] 进一步地,步骤二(2)中转化采用方法为醋酸锂法。

[0024] 进一步地,在驯化之前,将待驯化菌株在2%YPD平板上过夜活化,取适量菌体接种到含100mL 5%YPD的500mL三角瓶中,在恒温摇床中以30℃、160r/min条件预培养16h;然后9,000g离心1min收集菌体。

[0025] 进一步地,驯化包括如下阶段:

[0026] 第一阶段,将菌体以接种量 $OD_{660}=0.1$ 接种到含2%YNBX的培养基中,每24小时转接一次;

[0027] 第二阶段,将第一阶段得到的菌液以接种量 $OD_{660}=0.01$ 接种到2%YNBX培养基,每48h或24h传代一次;

[0028] 第三阶段,将第二阶段得到的菌液以接种量 $OD_{660}=0.01$ 接种到4%YNBX,每24h传代一次,直至监测数据在连续5次转接中没有明显变化,停止转接,保存菌液。

[0029] 进一步地,驯化的条件为35℃、200r/min。

[0030] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0031] 本发明以发酵性能优良的工业酿酒酵母菌株作为出发菌株,结合基因定点突变、基因工程、交配和进化工程手段构建了一株具有XR-XDH途径的木糖发酵性能优良且具有优良抑制物耐受的酵母菌株SEB13,该菌株具有较高的木糖消耗速率和乙醇生成速率,为秸秆

燃料乙醇工业化生产提供了优良菌株来源,具有很好的工业应用潜力。

附图说明

[0032] 图1为本发明一实施中在0.06g干细胞/L接种量条件下利用4%YPX发酵的结果图;

[0033] 图2为本发明一实施中在0.3g干细胞/L接种量条件下利用10%YPDX发酵的结果图;

[0034] 图3为本发明一实施例中在2g干细胞/L接种量条件下利用秸秆预处理物料的发酵结果图。

具体实施方式

[0035] 本发明提供了一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株SEB13,现已进行保藏,其分类命名为酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*,保藏编号为CGMCC No.19586,保藏日期为2020年04月20日,保藏单位为中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0036] 下面通过具体实施例和附图对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。

[0037] 以下实施例使用的材料如下:

[0038] (1) 培养基

[0039] LB培养基:5g/L酵母浸出粉、10g/L蛋白胨、10g/L氯化钠,用NaOH调至pH 7.4;根据实验需要添加100μg/mL氨苄青霉素(Amp)。

[0040] 2%YPD培养基:10g/L酵母浸出粉、20g/L蛋白胨、20g/L葡萄糖。

[0041] MX+G418培养基:1.7g/L无氨基酸氮源、20g/L木糖、5g/L硫酸铵,并添加100μg/mL G418作为筛选压力。

[0042] 5%YPD培养基:10g/L酵母浸出粉、20g/L蛋白胨、50g/L葡萄糖。

[0043] 2%YPX培养基:10g/L酵母浸出粉、20g/L蛋白胨、20g/L木糖。

[0044] 4%YPX培养基:10g/L酵母浸出粉、20g/L蛋白胨、40g/L木糖。

[0045] 10%YPDX培养基:10g/L酵母浸出粉、20g/L蛋白胨、60g/L葡萄糖、40g/L木糖。

[0046] 2%YNBX培养基:6.7g/L YNB w/o AA,20g/L木糖。

[0047] 4%YNBX培养基:6.7g/L YNB w/o AA,40g/L木糖。

[0048] (2) 秸秆预处理物料:纤维素81.5g/L、葡萄糖4.19g/L、木糖14.83g/L、甲酸5.28g/L、乙酸4.01g/L,总酚3.41g/L。

[0049] 上述培养基中若为固体培养基,则在灭菌前加入20g/L的琼脂粉。木糖需与其它成分分开灭菌。

[0050] (3) 菌株和质粒的信息如表1所示:

[0051] 表1菌株和质粒信息表

菌株和质粒	基因型	来源
<i>S. cerevisiae</i> 菌株		
KFG4-6B	<i>MATa</i> , 来自 KF7 的单倍体, <i>ho Flo+</i>	[参考文献 2]
HX62W	KFG4-6B, <i>ura3::XYL1-XYL2-XKS1-kanMX</i>	本发明
HX57D ^a	KFG4-6B, <i>ura3::mXYL1(D)-XYL2-XKS1-kanMX</i>	本发明
KFG5-5C	<i>MATa</i> , 来自 KF7 的单倍体, <i>ho Flo+</i>	[参考文献 2]
[0052] Z1-Z20	<i>MATa/a</i> , HX57D 和 KFG5-5C 杂交得到的二倍体	本发明
Z4X-21-18	<i>MATa/a</i> , 从进化的 Z1-20 群落分离的克隆	本发明
质粒		
pXR	<i>P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}</i>	[参考文献 1]
pKX1X2XKS	<i>loxP-kanMX-loxP-P_{TDH3}-XYL1-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3}</i>	[参考文献 1]
pKX1(D)X2XK	<i>loxP-kanMX-loxP-P_{TDH3}-XYL1(D)-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XYL2-T_{TDH3}-P_{TDH3}-XKS1-T_{TDH3}</i>	本发明

[0053] ^a mXYL1 (D), 双位点突变XR (K270R/N272D) .

[0054] (4) 引物序列的信息如表2所示:

[0055] 表2引物序列信息表

Primers	Sequences (5'-3')
[0056] M13-47	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC (SEQ ID No. 1)
RV-M	GAGCGGATAACAATTCACACAGG (SEQ ID No. 3)

	K270RN272D-F	GCCATCATTCCAAGGTCCGACACTGTCCC (SEQ ID No. 4)
	K270RN272D-R	GGGACAGTGTTCGGACCTTGAATGATGGC (SEQ ID No. 2)
	Kan-XKS1-R	GTTGACGCTAACATTCAACGCTAG (SEQ ID No. 5)
	URA-F	TATTCTTAACCCAACCTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGA AACGAAGATAAATCATGTTCGAAAGCTACATATAAGGAAC GGCTGCAGGTTCGACAACCCTTAATATA (SEQ ID No. 6)
[0057]	URA-R	TGAAGCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTT ATAATACAGTTTTTTTAGTTTTGCTGGCCGCATCCGACTCA CTATAGGGCGAATT (SEQ ID No.7)
	MAT-P1	CCTCTACTGTGGAGGCACC (SEQ ID No. 8)
	MAT-PA	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG (SEQ ID No. 9)
	MAT-P α 1	GCACGGAATATGGGACTACTTCG (SEQ ID No. 10)

[0058] 实施例1

[0059] 本实施例提供一种具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株SEB13的构建方法,包括如下步骤:

[0060] 步骤一,含双位点突变XYL1基因(编码XR)和KanMX基因的质粒pKX1(D)X2XK的构建:质粒pKX1X2XKS为现有质粒,表达树干毕赤酵母XYL1、XYL2(编码XDH)、酿酒酵母内源XKS1(编码XK)和KanMX抗性基因^[1]。通过突变引物对质粒pKX1X2XKS中的XYL1基因进行定点双突变。以pXR^[1]作为模板,用引物M13-47和N272DK270R-R扩增得到双碱基突变的XYL1片段1,用引物RV-M和N272DK270R-F扩增得到双碱基突变的XYL1片段2。用单突变片段1、2为模板,用引物M13-47、RV-M进行融合PCR,得到双突变XYL1(N272DK270R)片段。将XYL1双突变片段与pKX1X2XKS同时用Apa I、Xho I双酶切,纯化后连接得到pBX1(D)X2XK质粒。以质粒pKX1X2XKS为模板,引物RV-M和Kan-XKS1R扩增出KanMX片段。将此KanMX片段和pBX1(D)X2XK质粒同时用Apa I酶切、连接,在LB+Kan平板上筛选并测序得到pKX1(D)X2XK质粒。

[0061] 步骤二,木糖代谢单倍体菌株的构建:质粒pKX1X2XKS和pKX1(D)X2XK分别含有野生型和双突变XYL1。以这两个质粒为模板,用带有URA3上下游序列作为同源臂的引物URAF、URAR扩增出片段XYL1(W)-XYL2-XKS1和XYL1(D)-XYL2-XKS1。将XYL1(W)-XYL2-XKS1和XYL1(D)-XYL2-XKS1片段通过醋酸锂法转化到单倍体菌株KFG4-6B^[2],在2%YPD+G418平板上进行筛选,得到的转化子经PCR验证确认三个基因正确转入URA3位点。分别将XR野生型和XR双突变重组菌株分别命名为HX62W和HX57D。

[0062] 步骤三,单倍体菌株交配和二倍体菌株混合菌株进化工程

[0063] 取等量的HX57D与KFG5-5C^[2]新鲜酵母细胞,混合均匀、接种于2%YPD液体培养基中,30℃摇床培养,镜检观察接合子的形成情况。镜检杂交完成后吸取适量菌液,稀释涂布于MX平板,30℃培养3~4天。挑取较大的单菌落,在显微镜下观察细胞形态,挑选出椭圆形细胞,再利用引物MAT-P1、MAT-PA和MAT-P α 1进行PCR扩增,确认是否为二倍体。随机选取20

株双倍体菌株依次命名为Z1~Z20。

[0064] 将20株双倍体混合以木糖为唯一碳源进行驯化。将待驯化菌株在2%YPD平板上过夜活化,取适量菌体接种到含100mL 5%YPD的500mL三角瓶中,在恒温摇床中以30℃、160r/min条件预培养16h。9,000g离心1min收集菌体,无菌水洗涤两次,用0.3M EDTA分散菌体,测量OD₆₆₀。在35℃、200r/min条件下进行以下三个阶段驯化:第一阶段,将OD₆₆₀为0.1的菌体接种到含100mL 2%YNBX培养基的300mL三角瓶中,每24h取2mL发酵液接种到新的2%YNBX中进行下一轮生长,共转接6次;第二阶段,以初始OD₆₆₀=0.01接种到2%YNBX培养基,每48h或24h传代一次;第三阶段,降低接种量、提高木糖浓度,以初始OD₆₆₀=0.01接种到4%YNBX,每24h传代一次。当监测数据在连续5次转接中没有明显变化,停止转接。保存菌液,用于发酵评价和突变菌株分离。

[0065] 步骤四,从第二阶段驯化中选择第12次转接和第23次转接的细胞群落样品,分别命名为Z20-12、Z20-23;从第三阶段驯化中选择第7次转接和第21次转接的细胞群落样品,分别命名为Z4X-7和Z4X-21,对上述细胞群落进行批次发酵评估:在初始接种量为0.02g干细胞/L条件下,利用4%YPX培养基发酵48h后的结果如表3所示。由表3可知,与亲本菌株HX57D相比,各阶段的细胞群落在细胞生长、木糖利用及乙醇产量上均有明显的提升。其中Z4X-21表现最佳,木糖消耗速率和乙醇生成速率均提高了1.7倍,而乙醇收率没有下降。对细胞群落Z4X-21进行了突变菌株分离,并通过初筛和复筛得到木糖发酵性能优良的突变菌株,命名为SEB13。具体的突变菌株分离和筛选如下:

[0066] (1) 5,000g离心1min收集团落细胞。经无菌水洗涤后加入0.1M EDTA分散菌体,并用无菌水稀释1,000倍。

[0067] (2) 取10μL点板于4%YNBX平板,利用MSM300显微操作系统分离单细胞,30℃培养3~4d。挑取较大的菌落划线于2%YPD平板并编号。

[0068] (3) 突变菌株经试管初筛后进行三角瓶发酵复筛:单菌在2%YPD平板上过夜活化,取适量菌体接种到含20mL 5%YPD培养基的100mL三角瓶中,以30℃、160r/min条件预培养16h。9,000g离心1min收集菌体,无菌水洗涤2次。以初始干重0.08g干重/L接种于含20mL 4%YNBX培养基的100mL三角瓶中,在恒温摇床中以35℃、200r/min条件发酵48h,测定细胞湿重和代谢物浓度。

[0069] 上述木糖发酵性能优良的突变菌株SEB13现已进行保藏,其分类命名为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*,保藏编号为CGMCC No.19586,保藏日期为2020年04月20日,保藏单位为中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0070] 表3进化工程各阶段细胞群落的批次发酵结果

	菌株	木糖消耗速率 (g/L/h)	乙醇生成速率 (g/L/h)	木糖醇收率 (g/g 消耗木 糖)	乙醇收率(g/g 消耗木糖)
[0071]	HX57D	0.28	0.09	0.08	0.31
	Z20-12	0.75	0.21	0.13	0.29
	Z20-23	0.75	0.22	0.15	0.29
	Z4X-7	0.76	0.24	0.15	0.32
	Z4X-21	0.76	0.25	0.18	0.32

[0072] 实施例2

[0073] 本实施例提供批次发酵评价的试验过程,包括如下步骤:

[0074] (1) 利用4%YPX和10%YPDX培养基进行发酵评价。菌株在2%YPD固体培养基中活化培养24h,取适量菌体接种于含100mL 5%YPD液体培养基的500mL三角瓶中,30℃、160r/min预培养12~16h,9,000g离心1min收集菌体,无菌水洗涤两次,按一定接种量接种到含有100mL4%YPX或10%YPDX培养基的300mL三角瓶中,在35℃恒温水浴锅中以200r/min转速发酵48h。

[0075] (2) 利用含高浓度抑制物的秸秆预处理物料进行预糖化-同步糖化发酵评价。物料总固含量约20%,pH调整为5.5。使用诺维信CTec2在50度预糖化8小时后,接入2g干重/L细胞在35度条件下进行同步糖化发酵。定时取样分析葡萄糖、木糖、木糖醇、乙醇含量。

[0076] 验证实施例1

[0077] 本验证实施例比较了表达野生型XYL1和双位点突变XYL1的单倍体菌株发酵能力,具体的操作过程和结果如下:

[0078] 利用4%YPX培养基,在初始接种量为8g干细胞/L条件下,比较XR野生型菌株HX62W和XR双突变菌株HX57D的发酵能力。两菌株的酶活分析结果和发酵结果见表4和表5。

[0079] 如表4所示,HX62W的XR倾向于亲和NADPH,其[NADPH-XR]/[NADH-XR]酶活性比值为1.37。XR突变后对NADPH的亲合性下降,HX57D的[NADPH-XR]/[NADH-XR]比值为1.02。HX57D的XR与XDH的绝对酶活比HX62W有所提升。双突变XR改变了XR的辅酶亲和性和绝对酶活性,并且影响下游XDH的酶活性。如表5所示,与HX62W相比,HX57D的木糖消耗速率提高了12%,木糖醇收率下降了44%,乙醇收率提高了13.4%。XR双突变菌株HX57D的发酵性能优良,木糖消耗速率达到3.819g/L/h,木糖醇收率为0.116g/g木糖,乙醇收率达到0.33g/g木糖。

[0080] 表4 XR野生型、单、双突变菌株的XR、XDH酶活水平

	菌株	NADPH-XR (U/mg)	NADH-XR (U/mg)	[NADPH]/[NADH]	XDH (U/mg)
[0081]	HX62W	1.32±0.01	0.96±0.01	1.37	8.53±0.05

[0082]	HX57D	1.62±0.02	1.6±0.05	1.02	12.72±0.77
--------	-------	-----------	----------	------	------------

[0083] 注:所有数据均是基于8h发酵结果计算,结果为两次重复实验平均值±SD。

[0084] 表5野生型、双突变XR菌株的木糖发酵特性

[0085]	菌株	木糖消耗速	木糖醇生成速	木糖醇收率	乙醇生成速	乙醇收率
		率 (g/L/h)	率 (g/L/h)	(g/g 木糖)	率 (g/L/h)	(g/g 木糖)
	HX62W	3.405±0.005	0.713±0.030	0.209±0.008	0.991±0.011	0.291±0.003
	HX57D	3.819±0.044	0.443±0.001	0.116±0.001	1.259±0.016	0.330±0.008

[0086] 注:所有数据均是基于8h发酵结果计算,结果为两次重复实验平均值±SD。

[0087] 验证实施例2

[0088] 本验证实施例的目的是评估单倍体交配获得的二倍体菌株发酵性能,具体的操作过程和结果如下:

[0089] 选择20株二倍体(Z1~Z20)中10株和单倍体亲本HX57D进行批次发酵比较。在0.473g干细胞/L接种量条件下,利用2%YPX培养基进行发酵,结果如表6所示。

[0090] 表6 HX57D及其二倍体的发酵能力比较

[0091]	菌株	木糖消耗速	木糖醇生成	木糖醇收率	乙醇生成速	乙醇收率
		率 (g/L/h)	速率 (g/L/h)	(g/g 木糖)	率 (g/L/h)	(g/g 木糖)
	HX57D	0.393	0.016	0.041	0.123	0.312
	Z1	0.370	0.028	0.075	0.110	0.298
	Z2	0.349	0.028	0.079	0.104	0.297
	Z3	0.352	0.024	0.067	0.104	0.296
	Z6	0.362	0.030	0.082	0.108	0.300
	Z8	0.342	0.027	0.078	0.107	0.314
	Z9	0.359	0.026	0.073	0.104	0.289
	Z10	0.355	0.025	0.071	0.079	0.222
	Z11	0.355	0.030	0.084	0.106	0.299
	Z16	0.357	0.027	0.076	0.094	0.263
[0092]	Z20	0.360	0.031	0.085	0.074	0.206

[0093] 注:所有数据均是基于48h发酵结果计算。

[0094] 由表6可知,和HX57D相比,所有二倍体的生长都有所下降,木糖消耗减慢,木糖醇积累增多,乙醇收率下降。

[0095] 验证实施例3

[0096] 本验证实施例利用合成培养基和秸秆预处理原料,对SEB13和其出发菌株HX57D的发酵性能进行了评价,结果如图1-3所示。

[0097] 由图1可知,相比出发菌株HX57D,SEB13的木糖消耗速率和乙醇生成速率提升了4.6倍,乙醇收率约0.33g/g消耗糖。

[0098] 由图2可知,相比HX57D,SEB13的葡萄糖消耗速率提高了1.36倍,发酵18小时后木糖的消耗比例达到92%。木糖消耗速率达到2.05g/L/,是HX57D的8.3倍。

[0099] 由图3可知,尽管预处理物料含有高浓度的抑制物(乙酸、甲酸和酚类物质的总浓度大于12.5g/L),在前24小时,大部分葡萄糖被利用,两菌株间无显著差异。木糖的利用受到抑制,但SEB13的木糖利用能力优于HX57D,发酵72小时时木糖消耗比例约50%。发酵72小时,两菌株的乙醇浓度相似,约为42g/L,乙醇收率达到0.38g/g总糖。

[0100] 上述结果表明,SEB13菌株具有优良的木糖利用能力且具有优秀的抑制物耐受能力,具有很好的工业应用潜力。

[0101] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对该实用进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

[0102] 参考文献

[0103] [1]M.Tomitaka,H.Taguchi,K.Fukuda,T.Akamatsu,K.Kida,Isolation and characterization of a mutant recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with high efficiency xylose utilization,J.Biosci.Bioeng.116(6)(2013)706-15.

[0104] [2]M.Tomitaka,H.Taguchi,M.Matsuoka,S.Morimura,K.Kida,T.Akamatsu,Potent L-lactic acid assimilation of the fermentative and heterothallic haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* NAM34-4C,J.Biosci.Bioeng.117(1)(2014)65-70.

序列表

<110> 中国石油化工股份有限公司

中石化上海工程有限公司

四川大学

<120> 一株具有XR-XDH途径的可快速发酵木糖的酿酒酵母菌株及构建方法

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

cgccagggtt ttcccagtca cgac 24

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gggacagtgt cggaccttgg aatgatggc 29

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gagcggataa caatttcaca cagg 24

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gccatcattc caaggtccga cactgtccc 29

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gttgacgcta acattcaacg ctag 24

<210> 6

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

tattcttaac ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa acgaagataa atcatgtcga 60
aagctacata taaggaacgg ctgcaggtcg acaaccctta atata 105

<210> 7

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tgaagctcta atttgtgagt ttagtataca tgcatttact tataatacag ttttttagtt 60
ttgctggccg catccgactc actatagggc gaatt 95

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

cctctactgt ggaggcacc 19

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

actccacttc aagtaagagt ttg 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gcacggaata tgggactact tcg 23

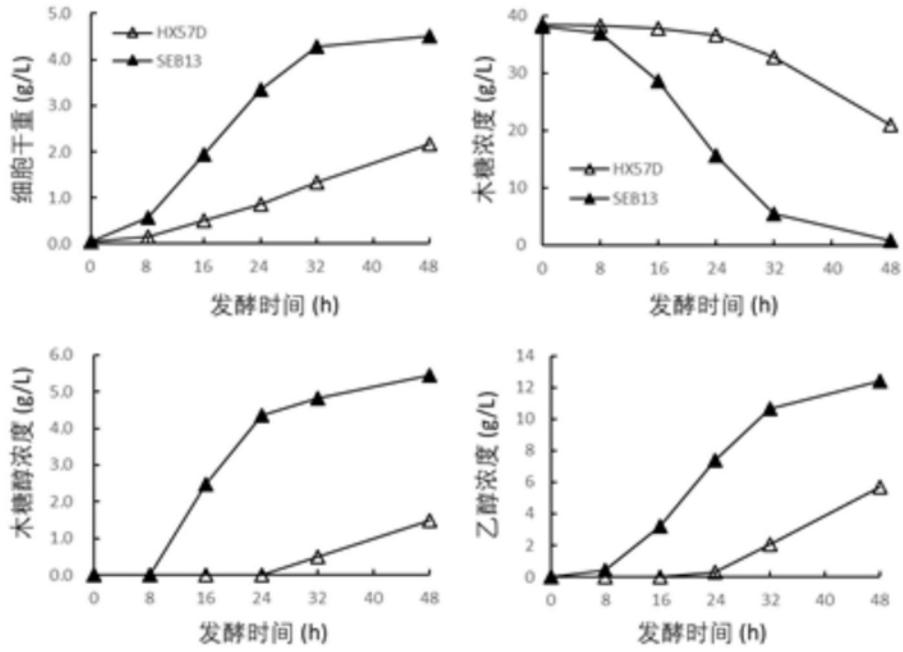


图1

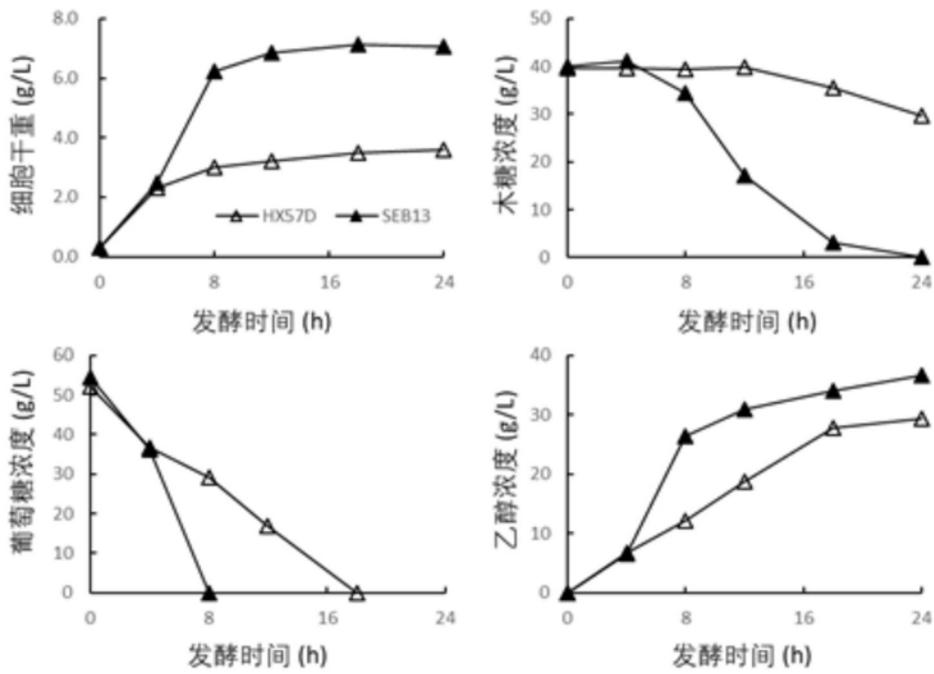


图2

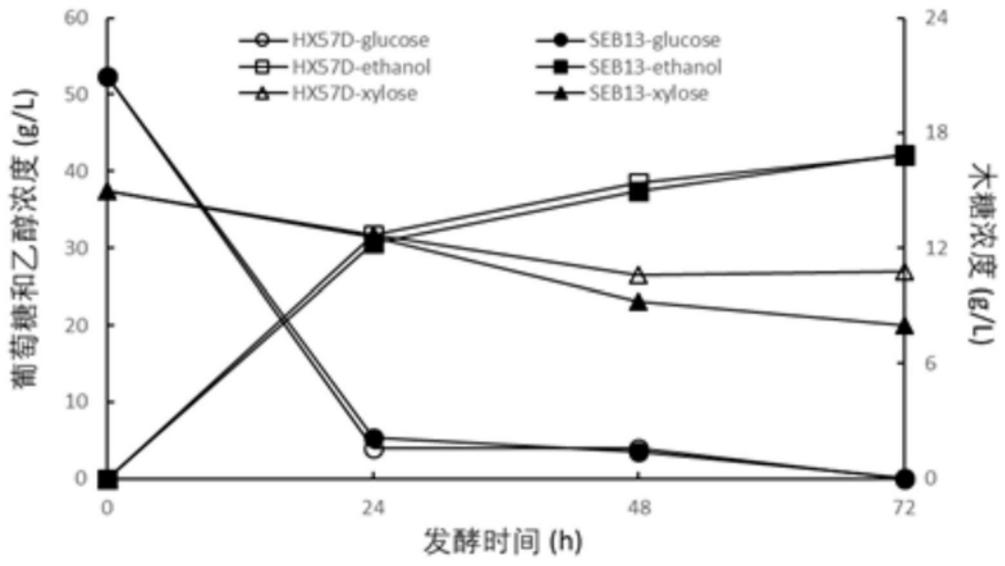


图3