DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.08.015

# 热带假丝酵母肉毒碱乙酰基转移酶基因的删除及功能鉴定

张利华[1,2]，陈献忠[*1,2]，陈 振[1,2]，沈 微[1,2]，樊 游[1,2]

(1. 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学生物工程学院，江苏 无锡 214122)

**摘要**：缺乏高效基因删除技术是限制热带假丝酵母菌株代谢工程育种的重要因素。论文发展了一种新型的基因删除技术并利用该技术成功删除了肉毒碱乙酰基转移酶的两个等位基因。首先PCR扩增标记基因(*URA3*)的3′端324 bp序列作为基因删除辅助序列(gda序列)，同向插入到*URA3*基因的5′端，在此基础上构建两端含有*CAT*基因同源臂序列的基因删除突变盒，转化宿主菌XZX，获得*CAT*基因单拷贝和双拷贝敲除的突变株。PCR鉴定和DNA测序结果表明，获得的*URA3*基因弹出后的突变株，仅在基因组重组位点上残留一个gda序列。进一步鉴定了突变株的生理性能，单拷贝敲除菌株CAT活性较亲本下降80%，但在葡萄糖或烷烃上的生长性能并不受显著影响。双拷贝缺失菌株CAT活性完全丧失，不能利用烷烃生长，同时在葡萄糖培养基中的生长受到显著影响，最终生物量达到7.56($OD_{600}$)，仅为出发菌株的57.8%。

**关键词**：热带假丝酵母；肉毒碱乙酰基转移酶；基因敲除；*URA3*基因；基因删除辅助序列

**中图分类号**：TQ 920.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)08—0880—08

# Carnitine Acetyltransferase Gene Disruption and Function Analysis in *Candida tropicalis*

*ZHANG Lihua*[1,2]，*CHEN Xianzhong*[*1,2]，*CHEN Zhen*[1,2]，*SHEN Wei*[1,2]，*FAN You*[1,2]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract**: Development of gene deletion method is critical for metabolic engineering of diploid yeast *Candida tropicalis*. In this study, an efficient genetic manipulation method was developed and using this method two allelic *CAT* genes were sequentially deleted successfully. The *CAT* gene deletion cassette arm-gda-URA3-arm which contains a functional *URA3* gene flanked by a 324 bp gene disruption auxiliary (gda) sequence direct repeat derived from downstream of the *URA3* gene, and homologous arms of *CAT* gene, was constructed. The growth properties and enzymatic activity

**收稿日期**：2016-01-05

**基金项目**：教育部留学回国人员科研启动项目(1014130201150030)。

* **通信作者**：陈献忠(1980—)，男，安徽界首人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事发酵工程专业领域研究。

E-mail:xzchen@jiangnan.edu.cn

**引用本文**：张利华，陈献忠，陈振，等. 热带假丝酵母肉毒碱乙酰基转移酶基因的删除及功能鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(08)：00-00.

of various mutants were characterized. Transformants were isolated from minimal medium plates and sprayed on the 5-FOA selection medium plates again. The resulting mutant strains, in which *URA3* marker was pop-out via recombination of gda sequence, were confirmed by PCR and DNA sequencing. After excision, only one copy of the gda sequence remains behind at the recombinant locus. Single *CAT* mutant and double *CAT* mutant strains were obtained and characterized. Deletion of one *CAT* genes could decrease enzyme activity significantly however growth profile was similar with parent strain on either glucose or alkane medium. Moreover, the growth of double *CAT* genes mutant strain was completely deficient compared to the parent strain using glucose as substrate. In summary, An efficient gene deletion strategy was developed using gda fragment derived from *URA3* gene as gene disruption auxiliary sequence. Using this strategy, *CAT* gene knockout mutants were constructed and its function was investigated.

**Keywords**: *Candida tropicalis*, carnitine acetyltransferase, gene disruption, *URA3* gene, gene disruption auxiliary sequence

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种二倍体非常规假丝酵母，能够产生芽管和假菌丝[1]，不存在有性生殖阶段，仅存在准性生殖过程[2]，遗传背景相对于酿酒酵母等常规酵母更为复杂。目前，热带假丝酵母已经被成功运用于长链二元有机酸的工业化生产中[3]，并且在微生物发酵法生产木糖醇[4-5]、生物乙醇[6]、氢气[7]以及工业有机废水处理等方面展现出很高的应用潜力。

代谢工程是工业微生物育种的重要手段，然而热带假丝酵母的遗传操作相较于模式酵母菌株更为困难。Hara 等人[8]以密码子优化的潮霉素 B 抗性基因作为筛选标记对 *C. tropicalis* M12103A 双拷贝的 *URA3* 基因进行连续敲除，高弘等人[9]则依次用潮霉素 B 和 G418 作为筛选标记，对双拷贝的 *CAT* 基因进行破坏，而 Lu[10]和 Chen[11]等人则采用基于白假丝酵母密码子优化的诺尔丝菌素抗性基因作为筛选标记对热带假丝酵母进行多基因连续破坏。然而，龚毅等人[12]的研究表明热带假丝酵母 CT750 菌株对 G418、潮霉素和腐草霉素等抗生素的敏感性较差，不能作为该菌株的显性筛选标记。笔者前期实验结果也表明潮霉素或腐草霉素作为选择标记转化热带假丝酵母 ATCC20336 也很难成功(未发表)。此外，热带假丝酵母存在密码子偏好性，将CUG 密码子翻译成丝氨酸，而非通用密码子的亮氨酸[13]，进一步限制了抗性基因作为筛选标记的普适性。

Haas 等人[14]通过亚硝基胍诱变筛选获得尿嘧啶营养缺陷型菌株，然后将其作为宿主建立了最早的热带假丝酵母 DNA 整合转化系统。利用该转化系统，Picataggio 等人[15]对热带假丝酵母 β 氧化途径的限速酶 *POX4* 和 *POX5* 两对等位基因进行了连续敲除，获得了 β 氧化途径阻断的工程菌株，建立了连续的基因敲除系统。然而，在利用该技术进行多基因删除时，每完成一个基因的单拷贝敲除，就必需通过自发突变或者分子手段来破坏 *URA3* 标记，从而达到在同一细胞中连续使用同一筛选标记的目的，这即延长了育种周期，增加了工作量，又增加了多基因敲除的难度。Cheng 等人[16]通过发展一种源于酿酒酵母的 Ura-blaster 基因连续敲除系统，成功完成了对热带假丝酵母 *FAOT* 基因的单拷贝和双拷贝敲除。这套 Ura-blaster 基因连续敲除系统中，*URA3* 基因两侧分别插入了一段源于沙门氏菌(*Salmonella*)的 1.1 kb 的 *HisG* 直接重复序列，当携带靶基因同源臂的删除盒整合到染色体后，随着酵母染色体的复制，两段 *HisG* 序列会发生同源重组从而环化弹出 *URA3* 基因，达到重复利用标记基因的目的。本实验室项峥等人[17]也利用这套转化系统对 *PDC* 基因进行了连续敲除，进一步验证了该方法的普适性。此外，以一些 Ura-blaster 的变形形式(如以 *leu*、*glu* 和 *trp* 等基因片段替代 *HisG* 序列) 也被应用于热带假丝酵母的基因删除[18-19]，丰富了 Ura-blaster 基因删除系统在热带假丝酵母中的应用。然而，构建 DNA 删除盒中较长的重复序列不仅增加了分子操作的难度，而且在 PCR 扩增时由于有一定几率发生重复片段的重组，从而也降低了制备目的

片段的效率。

本研究选用热带假丝酵母 ATCC20336 的尿嘧啶营养缺陷型突变菌株 XZX 为宿主,构建了以 gda 片段作为基因删除辅助序列的肉毒碱乙酰基转移酶(CAT)基因删除突变盒(CAT1-gda-URA3-CAT1 和 CAT2-gda-URA3-CAT2),利用双交换的原理,通过氯化锂转化法两次转化宿主菌株,获得 CAT 基因单拷贝敲除和双拷贝敲除突变株,并对 CAT 的基本功能进行了分析,探讨其在热带假丝酵母烷烃代谢中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与引物** 本实验所涉及到的菌株和引物见表 1 与表 2。热带假丝酵母尿嘧啶营养缺陷型菌株 XZX 由本实验室经野生型热带假丝酵母 ATCC20336 通过化学诱变获得[17]。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本实验所用到的菌株

Table 1 Strains used in this paper

| 菌株名称 | 基因型 | 来源 |
|---|---|---|
| *C. tropicalis* XZX | *ura3/ura3 CAT/CAT* | 本研究中心保藏 |
| *C. tropicalis* 01 | *ura3/ura3 cat::gda324-URA3/CAT* | 本研究 |
| *C. tropicalis* 02 | *ura3/ura3 cat::gda324/CAT* | 本研究 |
| *C. tropicalis* 03 | *ura3/ura3 cat::gda324/cat::gda324-URA3* | 本研究 |
| *C. tropicalis* 04 | *ura3/ura3 cat::gda324/cat::gda324* | 本研究 |

表 2 本实验所用到的引物

Table 2 Primers used in this paper

| 引物名称 | 引物序列(5′→3′) | 酶切位点 |
|---|---|---|
| CATU | GTTTAACTTTAAGTTGTCGC | |
| CATR | TACAACTTAGGCTTAGCATCA | |
| rCATU | AACTGCAGCCAAAATTCAGCCAACCAGT | *Pst* I |
| rCATR | GCTCTAGAAGATGATTCAACCAGGCGAAC | *Xba* I |
| CAT2ndU | CTGAAGGCTCCGACATCACC | |
| CAT2ndR | CAACCTTGTCGGCGCTGCTA | |
| rCAT2ndU | AACTGCAGATCTGTTTTGACCGTCCCCGTG | *Pst* I |
| rCAT2ndR | GCTCTAGATCTTGCCTTTCGACATCAACCC | *Xba* I |
| Ugda324 | AACTGCAGACTAAGCTTCTAGGACGTCAT | *Pst* I |
| Dgda | GCGTCGACACCCGATTTCAAAAGTGCAGA | *Sal I* |
| CATLD | AATAGAAACTAGCAATCGGAA | |

注:酶切位点部分用下划线标出

**1.1.2 主要试剂及工具酶** 限制性内切酶 *Pst* I、*Sal* I 和 *Xba* I,T4 DNA 连接酶等工具酶以及克隆载体 pMD18-T 载体、pMD18-T Simple 载体均购自大连宝生物工程有限公司;5-氟乳清酸(5-FOA)购自 Amresco(美国),酵母粉和蛋白胨购自 OXOID(英国),酵母氮基(YNB)购自 Bio Basic Inc(加拿大),其他试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

**1.1.3 培养基** MM 培养基、SM 培养基以及 2× FOA 培养基均参照文献 [17];十二烷培养基:YNB 0.67%,硫酸铵 1%,十二烷 2%,尿嘧啶 0.006%。

### 1.2 方法

**1.2.1 *CAT* 基因敲除突变盒的构建** 根据 NCBI 中热带假丝酵母的 *CAT* 基因(GenBank 登录号:D84549.1)和 *URA3* 基因(GenBank 登录号:AB006207)序列设计一系列引物,引物序列和相关酶切位点见表 2。

以质粒 T-URA3[17]为模板,Ugda324/Dgda 为引物进行 PCR 扩增,获得长度为 324 bp 的基因删除辅助序列(gda 序列),经限制性内切酶 *Pst* I 和 *Sal* I 消化后插入到质粒 T-URA3 中相应的酶切位点,获得重组质粒 T-gda324-URA3。

以热带假丝酵母 XZX 菌株的染色体 DNA 为模板,CATU/CATR、*CAT2*ndU/CAT2ndR 为引物,PCR 扩增 1.9 kb 的 CAT1 和 0.9 kb 的 *CAT2* 基因片段,分别插入 pMD18-T Simple 载体中,获得重组质粒 Ts-CAT1 和 Ts-CAT2。以质粒 Ts-CAT1 为模板,rCATU/rCATR 为引物,通过反向 PCR 扩增获得具有敲除第一个 *CAT* 等位基因同源臂的线性化 DNA 片段(CAT1-Ts-CAT1);以质粒 Ts-CAT2 为模板(*CAT2* 基因片段位于两个 CAT1 同源臂之间),rCAT2ndU/rCAT2ndR 为引物,反向 PCR 获得携带敲除第二个 *CAT* 等位基因同源臂的 DNA 片段(CAT2-Ts-CAT2)。

用限制性内切酶 *Pst* I 和 *Xba* I 消化质粒 T-gda324-URA3,回收 gda324-URA3 片段,然后分别插入到经相应酶消化的 CAT1-Ts-CAT1 和 CAT2-Ts-CAT2 片段,获得重组质粒 Ts-CAT1-gda324-URA3 和 Ts-CAT2-gda324-URA3。以重组质粒 Ts-CAT1-gda324-URA3 为模板,CATU/CATR 为引物,通过 PCR 获得敲除第一个 *CAT* 等位基因的敲除盒 CAT1-gda324-URA3-CAT1;以 Ts-CAT2-gda324-URA3 为模板,CAT2ndU/CAT2ndR 为引物,PCR 扩增获得敲除第二个 *CAT* 等位基因的敲除突变盒 CAT2-gda324-URA3-CAT2。

**1.2.2 酵母的转化与鉴定** 热带假丝酵母的转化参考文献[17]。将第一个基因敲除突变盒转化 XZX 菌株,在基本培养基上筛选转化子,挑取单菌落提取基因组 DNA,以 CATU 和位于 *CAT1* 基因片段下游的引物 CATLD 为引物进行 PCR 鉴定,验证正确的转化子命名为 01 菌株;01 菌株的 *URA3* 标记基因剔除后获得突变菌株,命名为 02 菌株,然后将 01 菌株和 02 菌株送上海生工生物工程有限公司测序。转化第二个 *CAT* 基因敲除突变盒进入 02 菌株,以 CAT2ndU/CATR 为引物进行 PCR 鉴定,验证正确的菌株命名为 03;03 菌株丢失标记基因获得 04 菌株,然后送上海生工生物工程有限公司测序。

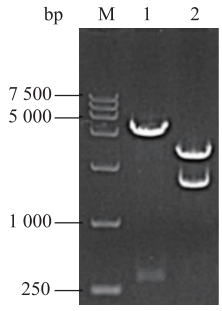
**1.2.3 标记基因的剔除** 将 01 菌株的单菌落接种于 SM 液体培养基中,30 ℃、200 r/min 摇瓶培养,待菌体达到对数生长期的后期时,直接吸取 200 μL 涂布 2×FOA 平板,将平板置于 30 ℃培养,3 d 后挑取 2×FOA 平板上单菌落转接到 2×FOA 培养基培养,提取染色体 DNA 并进行 PCR 鉴定。保藏 *URA3* 标记基因弹出的突变菌株,并用于第二个 *CAT* 等位基因的敲除。03 菌株按照同样的方法剔除标记基因。

**1.2.4 CAT 酶活测定** 将热带假丝酵母突变株 02、04 和亲本菌株 XZX 单菌落分别接种于 SM 液体培养基中培养,待菌体达到一定浓度后转接到添加了 2%的十二烷的 SM 液体培养基中诱导培养 48 h。参考文献[20]制备 CAT 粗酶液,CAT 酶活性测定参考文献[21]报道的 DTNB 法。

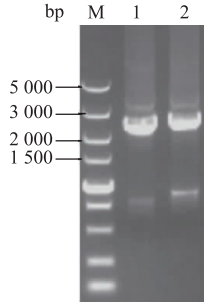
## 2 结果与分析

### 2.1 *CAT* 基因敲除质粒的构建

设计方案构建携带 *CAT* 基因敲除突变盒的重组质粒 Ts-CAT1-gda324-URA3 和 Ts-CAT2-gda324-URA3。分别用 *Pst* I/*Sal* I(329 bp、4 933 bp)和 *Pst* I/*Xba* I(1 923 bp、3 339 bp)双酶切质粒 Ts-CAT1-gda324-URA3 进行鉴定,限制性酶切产物大小与理论值一致,表明重组质粒 Ts-CAT1-gda324-URA3 构建正确(图 1(a));重组质粒 Ts-CAT2-gda324-URA3 转化大肠杆菌 JM109 后,*Xba* I 酶切位点发生 Dam 甲基化,不便于用限制酶切鉴定,重组质粒经 DNA 测序分析正确。




M-15 000 bp DNA marker;1-*Pst* I/*Sal* I双酶切产物;
2-*Pst* I/*Xba* I双酶切产物
(a)基因敲除质粒Ts-CAT1-gda324-URA3的酶切鉴定




M-5 000 bp DNA marker;1-敲除盒CAT1-gda324-URA3-CAT1;
2-敲除盒CAT2-gda324-URA3-CAT2
(b)基因敲除突变盒的PCR鉴定

**图 1 基因敲除质粒与敲除突变盒的鉴定**

**Fig. 1 Identification of recombinant plasmids and disruption cassettes**

### 2.2 *CAT* 基因敲除突变盒的鉴定与获得

基因敲除突变盒的获取方式如图 2(a)所示。以鉴定正确的重组质粒为模板,CATU/CATR 或 CAT2ndU/CAT2ndR 为引物,通过 PCR 扩增出 *CAT* 基因敲除突变盒 CAT1-gda324-URA3-CAT1(2 570 bp)和CAT2-gda324-URA3-CAT2(2 646 bp)(图 1(b)),PCR 产物经纯化后用于酵母转化。

### 2.3 热带假丝酵母 *CAT* 基因的敲除

热带假丝酵母 *CAT* 基因敲除流程如图 2(b)所示。通过氯化锂转化法将敲除盒 CAT1-gda324-URA3-CAT1 转化热带假丝酵母 XZX 菌株,从 MM 培养基平板上挑取长出的转化子单菌落培养后,提取染色体 DNA,以 CATU/CATLD 为引物进行 PCR 鉴定,阳性转化子 PCR 产物大小为 2.7 kb(图 3,泳道 1),对照(以 XZX 菌株染色体 DNA 为模板)大小为 2.0 kb(图 3,泳道 3),鉴定正确菌株命名为 01。测序分析发现 01 菌株中的一个 *CAT* 基因位点被敲除盒 CAT1-gda324-URA3-CAT1 替换(测序结果未列出)。

为重复利用 *URA3* 基因作为筛选标记进行双拷贝的 *CAT* 基因敲除,将 01 菌株涂布 2×FOA 平板,经过 3 d 培养后筛选 *URA3* 基因随机丢失的突变株。提取 2×FOA 平板上突变株染色体 DNA,以 CATU/CATLD 为引物进行 PCR 鉴定,产物大小为 1.1 Kb 的突变株为 *URA3* 标记基因弹出突变株(图 3,泳道 2),命名为 02。测序分析发现单拷贝的 gda 序列和两个同向 gda 序列之间的 URA3 基因片段丢失,仅残留单拷贝的 gda 序列。

将第二个敲除盒 CAT2-gda324-URA3-CAT2 转化 02 菌株,按照上述方法提取染色体 DNA,以 CAT2ndU/CATR 为鉴定引物进行 PCR 验证,敲除盒正确整合的转化子扩增产物为 3.0 kb(图 3,泳道4),对照菌株 PCR 产物大小为 1.3 kb(图 3,泳道 6),鉴定正确菌株命名为 03。03 菌株涂布 2×FOA 平板,筛选获得标记基因丢失菌株,经 PCR 鉴定和 DNA 测序分析验证正确的菌株命名为 04(图 3,泳道 5)。

### 2.4 *CAT* 基因敲除对菌株生长的影响

分别将热带假丝酵母突变株 02、04 和 XZX 菌株的种子液以一定比例接种于 SM 液体培养基或将种子用无菌水洗涤后接入十二烷培养基中培养,定时取样测定 $OD_{600}$,结果如图 4 所示。当葡萄糖为唯一碳源时,*CAT* 基因单拷贝缺失菌株 02 的生长状

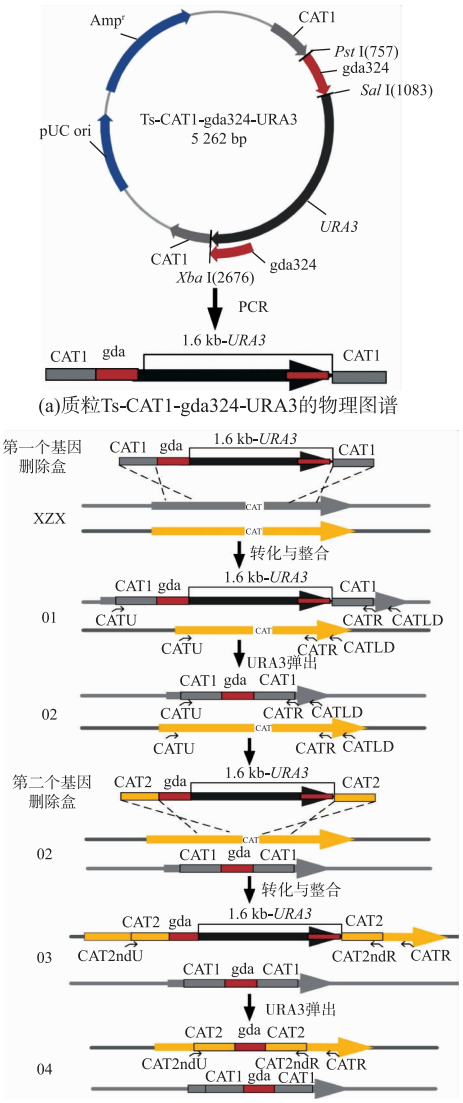
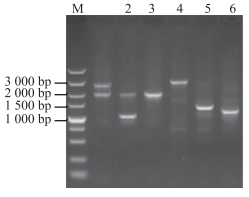



**图 2 热带假丝酵母 *CAT* 基因敲除流程图**

**Fig. 2 Sequential gene disruption of *CAT* in *C. tropicalis***



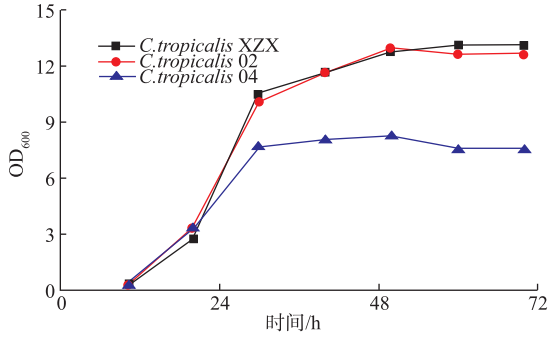

M-5 000 bp DNA marker;1-01 菌株 PCR 产物;2-02 菌株 PCR 产物;3-XZX 菌株 PCR 产物;4-03 菌株 PCR 产物;5-04 菌株 PCR 产物;6-XZX 菌株 PCR 产物。泳道 1-3 所用引物为 CATU/CATLD;泳道 4-6 所用引物为 CAT2ndU/CATR

**图 3 *CAT* 基因敲除菌株的 PCR 鉴定**

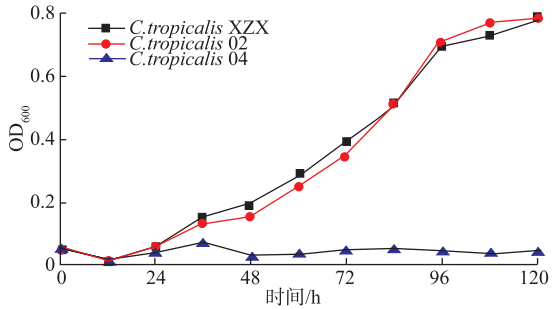
**Fig. 3 PCR identification of *CAT* gene knockout mutants**

况与亲本一致,而 *CAT* 双拷贝敲除菌株的生物量明显下降(4(a))。02 菌株在以十二烷为唯一碳源时,

生长状况与亲本菌株差异不明显,而 *CAT* 基因的双缺失导致 04 菌株无法代谢烷烃(图 4(b))。结果表明热带假丝酵母 *CAT* 基因不仅是烷烃 β 氧化过程所必需,而且 *CAT* 双拷贝缺失也显著影响突变株在以葡萄糖为碳源的培养基中的生长。由于葡萄糖的代谢过程并不需要 *CAT* 的参与,具体的机理值得进一步研究。




(a)菌株以葡萄糖为唯一碳源时的生长情况




(b)菌株以十二烷为唯一碳源时的生长情况

**图 4　菌株 02、04 和 XZX 的生长曲线**

**Fig. 4　Comparison of the growth characteristics of 02, 04 and XZX**

### 2.5　*CAT* 基因缺失的功能鉴定

为了考察 *CAT* 基因的敲除对突变株中相应酶活力的影响,分别将 02、04 和 XZX 菌株接种于添加了 2%十二烷的 SM 液体培养基中诱导 *CAT* 基因表达,然后测定胞内的 CAT 酶活力,结果如图 5 所示。相比于亲本菌株,02 菌株的 CAT 活力下降了约 80%,而在 *CAT* 双缺失菌株中,几乎检测不到 CAT 活性,表明热带假丝酵母中的肉毒碱乙酰基转移酶活性完全由双拷贝的 *CAT* 基因控制。但是,*CAT* 基因单拷贝缺失突变株 02 在烷烃为碳源的培养基中的生长速率并没有受到显著影响(图 4(b)),推测染色体中单个 *CAT* 基因的表达已经满足了烷烃 β 氧化所需的酶活水平。

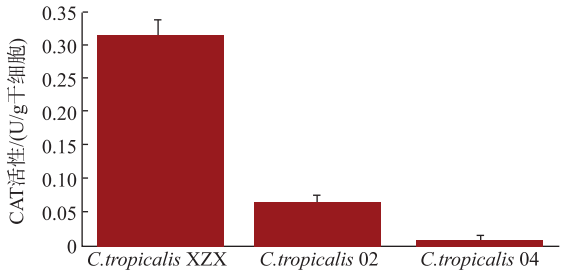



**图 5　热带假丝酵母转化子胞内 CAT 活性分析**

**Fig. 5　Assay of CAT activity in each strain**

## 3　结论与讨论

传统的热带假丝酵母基因连续删除系统中,为达到重复利用单一标记基因对同一菌株进行连续基因删除的目的,通常在 *URA3* 基因两侧插入两个同向重复的 *HisG* 序列,从而在随后的染色体复制过程中随机同源重组,剔除 *URA3* 基因和单拷贝的 *HisG* 序列[5,16-17]。然而两个 1.1 kb 的 *HisG* 重复序列很容易在 PCR 扩增过程中发生高频率的同源退火反应,从而剔除 *URA3* 基因,导致 PCR 扩增基因删除突变盒时效率较低,而且两个 *HisG* 重复序列还可能导致基因敲除突变盒长度过大,增加 PCR 扩增和后续转化的难度。

本研究发展了一种更为高效的多基因删除策略,即直接从 *URA3* 基因的 3′ 端扩增一段短片段(gda 序列)作为基因删除辅助序列,直接插入 *URA3* 基因的 5′ 端(gda-URA3),然后在两侧连接靶基因的同源臂,利用同源重组的原理对热带假丝酵母菌株进行连续的基因敲除。在所构建的基因敲除突变盒中,gda 序列与 *URA3* 基因中的 3′ 端序列形成同向重复(图 2),该重复序列可以在染色体复制过程中发生随机的同源重组,从而特异性的剔除单拷贝的 gda 序列和两段同向的 gda 序列之间的 *URA3* 基因片段。利用此策略,本文成功删除了热带假丝酵母菌株双拷贝的 *CAT* 基因。进一步验证了 *CAT* 基因删除对细胞的生理影响,结果表明 02 菌株的酶活性相比于亲本菌株损失了约 80%,单拷贝 *CAT* 基因的敲除对菌体生长代谢的影响作用不明显,推测在热带假丝酵母烷烃代谢过程中少量的 CAT 酶活性足以完成中间产物在线粒体和过氧化物酶体之间的转移。另外,02 菌株十二碳二元有机酸的摇瓶发酵并不能大量积累有机酸(数据未列出),表明该菌株中的 β 氧化途径仍能正常进行。另外,实验结

果表明双拷贝 *CAT* 基因不仅导致 β 氧化途径的中断，而且显著影响菌株在葡萄糖为碳源的生长性能。关于 CAT 与葡萄糖代谢之间的关系，尚未有确切的文献报道，这将是我们后续工作的一个关注点。此外，本研究所采用的基因删除辅助序列的大小、位置等因素对基因删除效率的影响也是后续研究的重点。

目前，工业化生产木糖醇主要通过玉米芯等农副产品的水解、氢化工艺生产[22]，但是该方法生产过程复杂、安全要求高[23]。热带假丝酵母菌的生物转化法是具有潜力的木糖醇生产方法。利用本文建立的基因删除策略改造热带假丝酵母的木糖代谢途径，提高木糖醇转化效率，是未来发酵法生产木糖醇的研究方向。

## 参考文献：

[1] LONG Y, YANG S, XIE Z, et al. Identification and characterization of phenol hydroxylase from phenol-degrading *Candida tropicalis* strain JH8[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 2014, 60(9): 585-591.

[2] BLANDIN G, OZIER K O, WINCKER P, et al. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*[J]. **FEBS letters**, 2000, 487(1): 91-94.

[3] CHEN Yuantong. Commercial trial research for dodecanedioic acid production [J]. **Microbiology China**, 1998, 25(4): 244-245. (in Chinese)

[4] LI Z, GUO X X, FENG X D, et al. An environment friendly and efficient process for xylitol bioconversion from enzymatic corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*[J]. **Chemical Engineering Journal**, 2015, 263: 249-256.

[5] KO B S, KIM J, KIM J H. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(6): 4207-4213.

[6] JIN Yi, WANG Zhen, LV Zhe, et al. Ethanol production from undetoxified steam-exploded corn stover using *Candida tropicalis* [J]. **Acta Energiae Solaris Sinica**, 2014, 35(5): 899-903. (in Chinese)

[7] ZHU D L, MA Y C, WANG G C, et al. Identification of *Candida tropicalis* BH-6 and synergistic effect with *Pantoea agglomerans* BH-18 on hydrogen production in marine culture[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015, 175(5): 2677-2688.

[8] HARA A, ARIE M, KANAI T, et al. Novel and convenient methods for *Candida tropicalis* gene disruption using a mutated hygromycin B resistance gene[J]. **Archives of Microbiology**, 2001, 176(5): 364-369.

[9] 高弘. 生物催化生产十三碳二元酸中 β- 氧化途径的代谢调控[D]. 北京：清华大学，2005.

[10] LU W, NESS J E, XIE W, et al. Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2010, 132(43): 15451-15455.

[11] CHEN Y L, YU S J, HUANG H Y, et al. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis* [J]. **Eukaryotic Cell**, 2014, 13(7): 844-854.

[12] GONG Yi, JIANG Hua, YANG Shengli. Construction of a new vector-host system in *Candida tropicalis* [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 1997, 13(3): 309-312. (in Chinese)

[13] UEDA T, SUZUKI T, YOKOGAWA T, et al. Unique structure of new serine tRNAs responsible for decoding leucine codon CUG in various *Candida* species and their putative ancestral tRNA genes[J]. **Biochimie**, 1994, 76(12): 1217-1222.

[14] HAAS L, CREGG J, GLEESON M. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida tropicalis* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1990, 172(8): 4571-4577.

[15] PICATAGGIO S, DEANDA K, MIELENZ J. Determination of *Candida tropicalis* acyl coenzyme A oxidase isozyme function by sequential gene disruption[J]. **Molecular and Cellular Biology**, 1991, 11(9): 4333-4339.

[16] CHENG Q, SANGLARD D, VANHANEN S, et al. *Candida* yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type haemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism[J]. **Biochimica et Biophysica Acta–Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2005, 1735(3): 192-203.

[17] XIANG Zheng, CHEN Xianzhong, ZHANG Lihua, et al. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of *URA3* gene[J]. **Hereditas**, 2014, 10: 1053-1061. (in Chinese)

[18] AHMAD I, SHIM W Y, KIM J H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by

co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**,2013,36(9):1279-1284.

[19] AHMAD I,SHIM W Y,JEON W Y,et al. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**,2012,35(1-2):199-204.

[20] UEDA M,TANAKA A,FUKUL S. Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases in alkane-grown yeast *Candida tropicalis*[J]. **European Journal of Biochemistry**,1982,124(1):205-210.

[21] KAWAMOTO S,UEDA M,NOZAKI C,et al. Localization of carnitine acetyltransferase in peroxisomes and in mitochondria of *n*-alkane-grown *Candida tropicalis*[J]. **FEBS letters**,1978,96(1):37-40.

[22] QIAN Yong,DAI Jun,PEN Qijun. Competitive adsorption of xylose and xylitol on ion-exchange resin [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**,2004,23(1):79-83.(in Chinese)

[23] LI Geng,ZHANG Kechang,XU Rou,et al. Optimation of composition of industrial raw material medium on bioconversion of xylose to xylitol by yeast[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**,1996,15(4):318-321.(in Chinese)

## 会　议　消　息

**第二届微生物,病毒与免疫国际研讨会**(CMVI 2018)

第二届微生物,病毒与免疫国际研讨会(CMVI 2018)将于 2018 年 12 月 1–3 日在三亚举行。本届大会将继续遵循学术性、国际性的原则,特邀国内外微生物,病毒与免疫领域内的学者专家前来参会,并做出精彩的报告。本次大会旨在为行业内专家和学者分享技术进步和业务经验,聚焦微生物,病毒与免疫学领域的前沿研究,提供一个交流的平台。

大会官网:http://www.engii.org/conference/CMVI2018/

会议时间:2018–12–01 至 2018–12–03　　会议地点:海南海口 三亚

主办单位:Engineering Information Institute

在线投稿: http://www.engii.org/RegistrationSubmission/default.aspx?ConferenceID=1037

邮箱投稿:Rolinrolin@126.com

联系人:张老师　　电话:15527752170　　Email:Jenny09157@163.com

**2018 年食品安全与环境工程国际研讨会**(FSEE 2018)

2018 年食品安全与环境工程国际研讨会(FSEE2018)将于 2018 年 11 月 30 日–12 月 2 日在中国广州隆重举行,由广东食品药品职业学院与广东省国际学术交流研究院联合主办。本次论坛旨在为从事食品安全与环境工程研究的专家学者、工程技术人员、技术研发人员提供一个共享科研成果和前沿技术,了解学术发展趋势,拓宽研究思路,加强学术研究和探讨,促进学术成果产业化合作的平台。

所有的投稿都必须经过 2–3 位组委会专家审稿,经过严格的审稿之后,最终所有录用的论文将由 EI 目录系列期刊出版,见刊后由期刊社提交至 EI 检索,目前该期刊 EI 检索非常稳定。

推荐 10 篇优秀论文到 SCI 期刊征稿,录满截止,欢迎投稿。(只能通过邮箱投稿,并且投稿的时候务必备注 SCI)

征文主题:(1)食品安全;(2)食品科学与工程;(3)环境科学与环境工程;(4)其他相关领域。

大会官网:www.gdaiae.org/FSEE2018　　大会时间:2018 年 11 月 30 日–12 月 2 日

大会地点:中国广州　　收录检索:EI & SCI

联系人:徐老师　　Email :FSEE@gdaiae.org　　电话:18893733035