

国内酿酒酵母分子遗传与育种研究 40 年

何秀萍

(中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室 北京 100101)

摘要：酿酒酵母作为最简单的真核生物，是研究真核生物基本生命规律的重要模式系统，也是生物产业领域非常重要的微生物细胞工厂。在《微生物学通报》创刊 40 周年之际，本文综述了国内 40 年来在酿酒酵母分子遗传学与育种研究的重要进展，如分子遗传学研究手段的建立、重要功能基因的分析、重要生命过程的遗传基础和调控机制，以及酵母菌育种技术的建立与应用等。

关键词：酿酒酵母，分子遗传，育种技术

Research progress of molecular genetics and breeding of *Saccharomyces cerevisiae* in China in the past 40 years

HE Xiu-Ping

(CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: As a unicellular organism, *Saccharomyces cerevisiae* is an ideal model system for illumination of substantial cellular functions of eukaryotes. Meanwhile, this organism is also an important microbial cell factory in biotechnology. On the occasion of the 40th anniversary of the magazine Microbiology China, the research advances of molecular genetics and breeding of *S. cerevisiae* in china in the past 40 years, such as tools for genetic manipulation, functional analysis of specific genes, the genetic basis and regulatory mechanism underlying the important biological processes, development and application of breeding approaches, were reviewed here.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Molecular genetics, Breeding technology

酵母菌，特别是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，作为最简单的真核生物，是真核生物遗传学、生物化学、分子生物学以及代谢调控等方面研究的重要模式系统。同时也是传统和现代生物技术领域非常重要的工业微生物，在生物基产品，诸如生物能源、精细化工产品、医药及中间体，工业用酶制剂和蛋白质药物，以及发酵食品和饲料添

加剂等的生产中得到广泛应用。早在公元前 6 000 年时已有利用酵母进行酿酒的记载。20 世纪 30 年代中期以酵母菌为模式系统研究真核生物生物学特征及其变化规律日益受到重视。酵母菌所拥有的易培养、遗传调控简洁精确、以及反向遗传学研究的技术突破等特征使其在 1970 年后成为分子生物学研究的重要实验系统。特别是 1996 年酿酒酵母

*通讯作者: Tel: 86-10-64807356; 信箱: hexp@im.ac.cn

收稿日期: 2013-11-22; 接受日期: 2014-01-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-15

基因组计划(Yeast genome project)的完成, 有关酵母菌分子遗传学、基因功能及其表达调控、代谢调控及代谢工程改造等研究取得了巨大的进展, 一些新的技术和方法应运而生, 推动了酵母菌育种技术的发展。伴随国际上相关研究的快速发展, 近 40 年来国内在酿酒酵母基础和应用研究方面也获得了重要进展。

1 酿酒酵母分子遗传学研究

遗传学的发展经历了细胞遗传学、微生物遗传学和分子遗传学等不同发展阶段。1953 年沃森(Watson)和克里克(Crick)有关 DNA 双螺旋结构模型理论的诞生将遗传学研究推进到分子水平, 是遗传学发展到分子遗传学的重要转折点。但有关真核生物分子遗传学研究直到 20 世纪 70 年代才开始。1967 年美国芝加哥大学的 Sinclair 等首次发现酿酒酵母质粒的存在, 但到 1972 年才由澳大利亚国立大学的 Clark-Walker 分离到首个酿酒酵母质粒, 即 2μ 质粒^[1], 以该质粒为基础构建的一系列质粒载体为酵母菌分子遗传学研究奠定了基础。1978 年 Hinnen 等首次报道了酵母菌遗传转化^[2], 从此酵母菌分子遗传学研究得到迅速发展。20 世纪 80 年代, 酵母菌分子遗传学的研究在我国逐渐开展起来。中国科学院上海细胞生物学研究所的龚启惠等(1982 年)从酿酒酵母中分离到 2μ 质粒, 并对其结构特点进行了初步分析^[3]。中国科学院微生物研究所的蔡金科等(1983 年)从酿酒酵母中分离到两类新型的比 2μ 质粒小的 DNA 质粒 pSC1 和 pSC2^[4]。倪津等(1986 年)构建了自主复制型大肠杆菌-酵母菌穿梭质粒载体 pCN60, 其高转化效率、高遗传稳定性为酿酒酵母基因克隆和表达调控研究奠定了基础^[5]。复旦大学的霍克克、李育阳等(1992 年)构建了基于 2μ 质粒的附加体型大肠杆菌-酵母菌穿梭质粒载体 pHC11^[6]。敖万远和李育阳(1993 年)构建了酵母菌与大肠杆菌穿梭定点突变载体系统, 可以进行目标基因的定点突变及突变体富集, 进而通过对突变株表型分析研究基因的功能^[7]。高向东和李育阳(1998

年)利用酿酒酵母 2μ 质粒中的 FLP-FRT 位点特异性重组系统实现了染色体 DNA 的位点特异性删除及定点整合, 可用于研究基因功能、上游调控区的组织结构及调控基因的表达^[8]。中国科学院微生物研究所的毛小洪和蔡金科(1990 年)对国外报道的酵母完整细胞转化法进行改进, 提高了转化效率(不同类型的质粒转化效率为 $2\times 10^4\sim 7\times 10^4/\mu\text{g DNA}$), 同时实验操作的时间也缩短到 1.5 h^[9]。上海医药工业研究院的胡又佳等(1998 年)对完整细胞转化法进行进一步改进, 使转化率提高到 $10^6/\mu\text{g DNA}$ ^[10]。武汉大学的郑鹄志、沈萍等(2005 年)通过荧光标记技术对酵母菌转化过程及影响转化效率的因素进行了研究^[11]。这些研究为国内酵母菌分子遗传学和基因工程研究奠定了材料和技术基础。

随后, 参与酵母菌多种生物学过程的基因及其表达调控的研究得到开展。中国科学院微生物研究所恽定辉、蔡金科等(1989 年)利用质粒载体 pCN60 克隆到酵母菌色氨酸合成酶基因, 并实现了在酵母菌中的功能性表达^[12]。杨艳卿、蔡金科等(1989 年)利用质粒载体 pCN60 从酿酒酵母中克隆到磷酸甘油酸激酶基因, 并确定了其主要的限制性内切酶酶切图谱^[13]。张博润、谭华荣等(1995 年)从酿酒酵母中克隆到超氧化物歧化酶基因^[14]。中国科学院上海生物化学研究所的吴建生、敖世洲等(1998 年)从酿酒酵母中克隆到一个新的 *PHO80* 关联基因 *PAP1* 基因, 并对其序列特征进行了分析^[15]。中国科学院微生物研究所的郭文洁、张博润等(2002 年)分离到酿酒酵母絮凝基因^[16], 随后刘楠、李娥娥、常琦、何秀萍等对其序列特征, 特别是中间重复序列变化对絮凝表型、絮凝特性遗传稳定性等的影响进行了研究, 为解决酵母菌絮凝特性的遗传不稳定性及指导絮凝特性的可控应用奠定了基础^[17-22]。清华大学的王觉选、周兵等(2007 年)通过对酿酒酵母基因缺失突变株的筛选和分析, 鉴定到多个与线粒体功能有关的参与金属离子平衡的基因^[23]。中国科学院生物化学和细胞生物学研究所的周金秋课题组(2005-2012 年)对酿酒酵母端粒复制、延伸、结构完

整性及其与染色体和线粒体 DNA 稳定性和细胞衰老间的关系进行了系统研究^[24-30]。武汉大学高向东课题组(2013 年)研究了酿酒酵母极性生长和出芽繁殖过程中 Rho GTP 酶的功能及其调控机制^[31-32]。北京大学汤超等(2013 年)通过实时监测单个酿酒酵母细胞内 Sic1 在不同条件下的降解动态,发现上游激酶 Cln1/2-Cdk1 决定 Sic1 降解开始的时间,与降解速率无关;而下游激酶 Clb5/6-Cdk1 通过一个双抑制反馈环确保自身功能在有和无之间准确转换,控制 Sic1 降解速率,从而决定酵母菌 G1 期向 S 期的转换。阐释了酿酒酵母细胞周期中 G1/S 期转换的分子机制^[33]。

2 酿酒酵母育种技术的发展

伴随着酵母菌基础研究从细胞水平逐步发展到分子水平,酿酒酵母育种技术也逐渐从传统育种手段发展到基因工程、代谢工程及合成生物学技术阶段。

2.1 传统育种技术

传统的酿酒酵母育种技术主要包括自然筛选、诱变、细胞杂交和原生质体融合等方法。从特定的自然或人工环境中分离和筛选有特定功能的酵母菌是酵母菌资源收集、应用和进一步功能改造的基础。近 40 年来,国内研究人员从土壤、海洋、植物叶片、果皮等各类基物中分离收集到大量的酿酒酵母菌株,通过自然筛选的方式从中获得有实际应用潜力的酵母菌株是早期酵母菌育种的主要手段,同时也是其它酵母菌育种技术发展的基础^[34-35]。在 20 世纪 50 年代,微生物定向变异研究成为微生物学的一个重要发展方向,利用物理(紫外线、射线等)和化学手段诱发菌株发生变异,并通过定向筛选获得优良菌株逐渐成为微生物育种的重要手段。中国科学院微生物研究所的薛禹谷和刘心明(1962 年)研究了 γ -射线对酿酒酵母生理特性方面的影响,探讨了辐射剂量和酵母菌存活率等方面的关系^[36]。山东大学鲍晓明和高东(1984 年)用溴化乙锭处理酿酒酵母获得呼吸缺陷型突变体,提高了产酒

精能力^[37]。中国科学院微生物研究所的张博润、蔡金科等研究了硫酸二乙酯和 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍对酿酒酵母的诱变效应,获得多种营养缺陷型菌株^[38]。此后诱变技术在高赖氨酸含量、耐酸、耐糖、高产乙醇、高产海藻糖等优良酵母菌株的选育中得到应用^[39-42]。20 世纪 90 年代后,一些新的诱变技术,如离子注入、微波、激光、双向复合磁场、高压和太空环境等的出现为酿酒酵母诱变育种提供了更多的选择,并在一定程度上改善了菌株对传统诱变源的抗性饱和等问题。例如,厦门大学赖素聪等(1993 年)利用不同波长的氩离子处理酿酒酵母,选育到乙醇产量提高,双乙酰含量降低的优良啤酒酵母^[43];中国科学院等离子体物理研究所的王纪等(1998 年)通过离子注入诱变筛选到麦角甾醇高产酵母菌,其麦角甾醇得率较出发菌提高了 55%-60%^[44];蒋耀庭利用高压静电场处理酿酒酵母导致乙醇脱氢酶发生变化,筛选到乙醇产量提高的酵母菌^[45];马旭光和张宗舟对航天诱变后的啤酒酵母进行复壮和筛选,获得发酵力和生长速率明显提高的突变菌株^[46];潘明和周永进(2008 年)以微波辐射技术对啤酒酵母菌进行诱变,获得双乙酰合成能力明显降低的酵母菌^[47]。

酿酒酵母具有典型的有性生殖过程,可以通过生孢和单倍体分离技术很容易地获得具有不同交配型(a 型或 α 型)的孢子或单倍体菌株。具有不同交配型的孢子或菌株在细胞本身分泌的信息素引导下相互结合,发生核融合,并通过进一步的减数分裂或有丝分裂将遗传性状按一定规律传给后代,这个过程称为杂交。在杂交过程中,有的性状会出现分离或重新组合,从而产生具有各种新性状的重组体,因此杂交技术作为定向培育新菌株的一种技术手段逐渐得到重视。蔡金科等于 20 世纪 70 年代在国内率先进行酵母菌的杂交研究,建立了酵母菌杂交的有效方法,即孢子之间杂交法、孢子和细胞杂交法、细胞之间杂交法以及群体杂交法等^[48-49],此后该技术在不同用途酿酒酵母优良菌种的选育中

得到应用^[50-56]。杂交育种仅限于具有不同交配型的亲本之间的重组,当具有优良特性的亲本为相同交配型时,或对于那些缺乏或难于完成有性或准性生殖的菌种而言,杂交育种就表现出明显的局限性。

1959 年 Eddy 等报道利用蜗牛消化液处理酵母细胞成功获得原生质体^[57], 1974 年 Kao 和 Michayluk 发现 PEG 具有融合性质^[58], 1977 年国外报道 PEG 能够诱导酿酒酵母原生质体融合,使同种酵母菌不受接合型等位基因(即交配型)的影响而形成杂合子^[59]。在国内,山东大学高东等(1983 年)首次报道了酿酒酵母原生质体的制备^[60]。同年,中国科学院微生物研究所的谭蓓英和王花报道了酿酒酵母和产朊假丝酵母原生质体的形成、再生和属间融合^[61]。中国科学院上海植物生理研究所的楼纯菊等(1985 年)进行了酿酒酵母单倍体和双倍体的原生质体融合,获得酒精产量提高的三倍体菌株^[62]。南开大学的汪和睦和中国科学院微生物研究所的张博润等(1986 年)借助电场诱导提高了酿酒酵母原生质体融合效率^[63-64]。上述研究开启了原生质体融合技术在酵母菌育种领域的广泛应用,如酵母底物利用范围的扩展、环境胁迫抗性改造、重要代谢产物的合成优化等^[65-69]。2002 年美国 Maxygen 公司的研究人员提出一种以诱变和多轮原生质体融合为核心的基因组改组技术(Genome shuffling),可以通过同时进行多位点重组将优良特性聚合在一个菌株中,显著提高育种效率^[70]。福州大学的王灏、孟春等(2007 年)将基因组改组技术应用于酿酒酵母,提高了菌株在较高温度下的发酵性能^[71]。随后基因组改组技术在提高酿酒酵母胁迫抗性、乙醇产量等方面得到广泛应用^[72-74]。

2.2 育种新技术

随着对酵母菌生理代谢功能及其调控机制理解的不断深入,以及从分子水平对酵母菌进行遗传操作的技术手段的发展和完善,酵母菌育种逐渐进入理性设计时代,即通过调控特定基因功能实现对酵母菌生理代谢功能的定向改造。20 世纪 70 年代

末,基因工程技术逐渐被国内研究者所认识 and 理解。1983 年中国科学院上海细胞生物学研究所的匡达人介绍了国外关于酵母菌分子生物学研究的最新进展和动向。同年,卫生部上海生物制品研究所的何葆光等和复旦大学的李育阳、美国休斯敦贝勒医学院的黎志豪等利用酵母菌磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 启动子实现了乙型肝炎表面抗原在酿酒酵母中的表达,开启了国内利用酿酒酵母表达具有重要应用价值的蛋白的研究^[75]。1985 年中国科学院上海生物化学研究所的敖世洲等在大肠杆菌内考察了酿酒酵母不同 DNA 片段启动基因表达的能力,并讨论了这些 DNA 片段应用于酵母表达载体构建的可能性^[76]。次年,中国科学院微生物研究所的倪津、蔡金科等报道了酵母菌-大肠杆菌穿梭载体的构建及其遗传转化效率和遗传稳定性^[5]。上述研究为酿酒酵母基因工程育种奠定了载体基础。中国科学院微生物研究所的恽定方、蔡金科等(1989 年)从酿酒酵母中分离到色氨酸合成酶基因 *TRP5*, 该基因在 *trp5* 型酿酒酵母中表达,不但恢复了菌株色氨酸合成能力,而且合成色氨酸的量是 *TRP5* 供体菌株的 2 倍多^[12], 该研究是酿酒酵母基因工程育种的雏形。复旦大学的张绍松、陈永青等(1995 年)以酵母整合型载体 YIp5 为基础构建了以 rDNA 为整合位点表达枯草芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的重组酿酒酵母,为解决基因工程育种中重组菌株的遗传稳定性问题奠定了基础^[77]。此后基因工程技术成为酿酒酵母生理代谢功能定向改造的重要手段,在提高底物利用能力和目标产物合成能力等方面极大推动了酿酒酵母育种研究的开展^[78-81]。随着基因工程技术在酵母菌育种中的广泛应用,一些新的方法也不断被报道,复旦大学的李琳、黄伟达等(2005 年)依据酿酒酵母内含子剪切序列特点设计了一系列表达载体,可以依据代谢条件的变化实现启动子的切换,从而实现目标基因的稳定表达^[82]。天津科技大学的侯丽华等(2013 年)通过在酿酒酵母工业菌株中表达负责交配型基因转换

的位点特异性核酸内切酶,实现了工业菌株交配型的转换,为通过杂交构建多倍体工业菌株奠定了基础^[83]。

但对于食品或饲用微生物而言,基因工程技术的生物安全性问题受到极大关注。酵母菌,特别是酿酒酵母,作为食品发酵或饲料添加剂中最常用的微生物种类,其遗传改造的安全性问题尤为重要。中国科学院微生物研究所的郭雪娜、张博润等于2003年首次在国内报道了工业酵母菌遗传修饰中使用的自克隆技术,即来源于某个物种的遗传物质通过分子生物学操作返回到该物种中的遗传操作技术。通过自克隆技术构建酵母工程菌的遗传操作过程中未引入细菌等外源DNA片段或抗生素基因,因此具有生物安全性^[84]。张吉娜、张博润等(2005年)首先利用自克隆技术对啤酒酵母进行遗传修饰,将来源于啤酒酵母的谷胱甘肽合成途径关键酶基因 *GSH1* 插入到缬氨酸生物合成途径中 α -乙酰乳酸合成酶基因 *ILV2* 内部,替换其部分编码序列,同时用来源于啤酒酵母的硫酸铜抗性基因 *CUP1* 为筛选标记,获得的重组菌株没有任何外源DNA片段。同时 *GSH1* 拷贝数的增加提高了细胞合成谷胱甘肽的能力,增强了产品的抗老化能力;而且由于 *ILV2* 被破坏阻断了双乙酰合成前体 α -乙酰乳酸的合成,降低了产品中双乙酰含量,缩短了产品的后熟期^[85]。此后国内研究者将该技术应用于啤酒酵母、葡萄酒酵母和面包酵母等食品工业菌株的遗传修饰中,获得一系列具有新型功能特点的酵母菌株,扩展了原料的使用范围、提高了原料的代谢利用率、改善了风味物质组成平衡和产品的保鲜能力、以及菌株絮凝特性等^[86-90]。

对于由单一或少数基因所决定的生理或代谢功能而言,利用普通的基因工程技术实现其功能的改造是可行的。但多数情况下,微生物所表现出的生物功能涉及到复杂的代谢和调控网络,是多酶协同作用的结果,利用基因工程对单一或几个酶促反应的改造常常不能达到理想的效果。基于此,1991

年美国加州理工学院的 Bailey、麻省理工学院的 Stephanopoulos 和 Vallino 提出了代谢工程的概念^[91-92]。代谢工程是基因工程的重要分支,关注的是对细胞代谢及调控网络、物质转运和能量代谢等的系统研究,强调多酶反应的协同和整合效应。1996年中国科学院上海生物工程中心的郁静怡和杨胜利在国内最先介绍了代谢工程的概念及其应用^[93]。山东大学的鲍晓明、曲音波等(1997年)在国内最先利用代谢工程思路,以不同的相对表达方向调控来源于树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)的木糖还原酶和木糖醇脱氢酶基因的表达水平,并过表达内源转醛酶和转酮酶,在酿酒酵母中建立了木糖代谢途径,赋予了酿酒酵母发酵木糖产乙醇能力^[94]。随后,该研究团队利用代谢工程策略不断优化酿酒酵母重组菌的木糖代谢途径,使木糖利用率和乙醇产率明显提高^[95-99]。天津大学查键、元英进等(2013年)在酿酒酵母中表达来源于粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的纤维糊精转运蛋白基因 *cdt-1*、葡萄糖苷酶基因 *gh1-1* 和来源于树干毕赤酵母(*Scheffersomyces stipites*)的木糖还原酶基因 *XYL1*,并优化 *cdt-1* 和 *XYL1* 的表达水平,以纤维二糖和木糖混合物为底物实现了乙醇和木糖醇的共发酵平衡^[100]。上述研究为酿酒酵母利用生物质原料发酵生产生物能源产品及其他生物基产品奠定了重要基础。此外,国内研究者还利用代谢工程育种策略在酿酒酵母中建立和优化了紫杉醇^[101]、青蒿素中间体^[102]、延胡索酸^[103]、白僵菌素^[104]等的合成途径。

代谢工程育种的效果取决于多基因的联合协同表达,因此需要精确调控和协调代谢途径中每个酶的表达量;而对于缺乏天然合成途径的高附加值产品,要实现其生物制造,就需要人工装配所需要的各个功能元件,并实现其适配性。近年来,合成生物学的出现为解决代谢工程育种中的上述问题提供了新的思路 and 工具^[105]。中国科学院大连化学物理研究所的杨薇、赵宗保等(2013年)在酿酒酵母

中构建了香紫苏醇的人工合成途径,研究结果为其他萜类化合物的异源生物合成提供了一定的参考^[106]。浙江大学的谢文平、于洪巍等(2013 年)采用分散整合策略在酿酒酵母中建立了可控的类胡萝卜素合成途径,实现了类胡萝卜素在酿酒酵母中的高效合成^[107]。中国科学院武汉植物园李倩、章焰生等(2013 年)在酿酒酵母中表达红发夫酵母(*Xanthophyllomyces dendrorhous*)的八氢番茄红素合成酶及番茄红素环化酶基因 *crtYB* 和八氢番茄红素脱氢酶基因 *crtI* 使细胞获得合成 β -胡萝卜素的能力,进一步通过优化上述基因密码子,并表达金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 HMG-CoA 还原酶,使 β -胡萝卜素合成能力提高 200%^[108]。随着系统生物学、生物信息学的快速发展,以及电脑辅助设计工具的开发,合成生物学将为代谢工程育种提供更加系统、更加精确的设计和改造工具。

3 结束语

酿酒酵母作为现代生物技术研究的重要模式系统,其育种技术的发展是近 40 年来国内微生物育种技术发展的写照。不同的育种技术在其发展的鼎盛时期为选育酵母菌优良菌株、推动相关产业的发展和技术升级发挥了非常重要的作用。同时,新技术的出现总是已有技术方法不断发展的结果,不同技术方法的融合和综合运用才是微生物育种最有效的手段。未来,将在基因组、功能基因组、转录组和代谢组等信息基础上,利用系统生物学技术,发掘新的功能基因,建立先进的代谢工程技术和微生物育种新技术和新方法,选育具有重大工业应用价值的优良酵母菌株。借助先进的高通量筛选平台和过程优化平台,实现从功能基因到优良菌株,再到重要生物产品的高效生物制造。

由于篇幅所限,没能提及更多国内同行所开展的相关研究,在此深表歉意。

致谢:感谢中国科学院微生物研究所酵母菌分子遗传与育种研究组张博润研究员、王肇悦副研究员、郭雪娜博士、程艳飞博士和白雪晶博士在资料查询

和整理过程中给予的帮助。

参考文献

- [1] Clark-Walker GD. Isolation of circular DNA from yeast[J]. Proceeding of National Academy Sciences USA, 1972, 69(2): 388-392.
- [2] Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast[J]. Proceeding of National Academy Sciences USA, 1978, 75(4): 1929-1933.
- [3] 龚启惠, 黄雾, 何俊坤, 等. 酵母质粒的结构、功能及其基因表达: I. 从单倍体酵母菌株 7209-1A (*Saccharomyces cerevisiae*)中纯化的质粒及其鉴定[J]. 实验生物学报, 1982, 15(1): 75-79.
- [4] 蔡金科, 刘玉方, 张博润. 两类新型 DNA 质粒 pSC1和 pSC2 的分离与观察[J]. 微生物学报, 1983, 23(40): 339-342.
- [5] 倪津, 刘玉方, 蔡金科. 酵母菌基因工程载体 pCN 系杂种质粒的构建及其特性的研究[J]. 微生物学报, 1986, 26(2): 127-133.
- [6] 霍克克, 虞兰兰, 陈新杰, 等. 酵母高稳定载体的构建及人- α A 干扰素在酵母中的高表达及分泌[J]. 中国科学 B 辑, 1992, 22(9): 922-929.
- [7] 敖万远, 李育阳. 酵母与大肠杆菌穿梭定点突变载体系统的构建及应用[J]. 生物工程学报, 1993, 9(1): 48-53.
- [8] 高向东, 李育阳. 酿酒酵母位点特异性 DNA 切离及定点整合的研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(5): 439-444.
- [9] 毛小洪, 蔡金科. 酵母完整细胞快速高效转化法[J]. 生物工程学报, 1990, 6(2): 102-107.
- [10] 胡又佳, 高枫, 朱春宝, 等. PEG/LiAc 转化酵母细胞方法的改进[J]. 生物技术, 1998, 8(5): 22-26.
- [11] Zheng HZ, Liu HH, Chen SX, et al. Yeast transformation process studied by fluorescence labeling technique[J]. Bioconjugate Chemistry, 2005, 16(2): 250-254.
- [12] 恽定辉, 刘玉方, 蔡金科. 酵母菌色氨酸合成酶基因的克隆与表达[J]. 微生物学报, 1989, 29(3): 174-179.
- [13] 杨艳卿, 刘玉方, 郭子剑, 等. 酿酒酵母磷酸甘油酸激酶基因(*PGK1*)的分子克隆和特性研究[J]. 生物工程学报, 1989, 5(4): 279-283.
- [14] 张博润, 黄英, 田宇清, 等. 酿酒酵母超氧化物歧化酶(SOD)基因的克隆和表达[J]. 生物工程学报, 1995, 11(1): 77-80.
- [15] 吴健生, 夏战贤, 曹铮, 等. 酵母 *PAP1*与 *PHO85*激酶复合物对 *PHO4*的磷酸化[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(1): 14-20.
- [16] 郭文洁, 何秀萍, 铁翠娟, 等. 絮凝基因的克隆和在工业啤酒酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 110-113.
- [17] 何秀萍, 郭文洁, 张博润. 絮凝基因(*FLO1G*)的序列测

- 定及分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 242-245.
- [18] Liu N, Wang DL, Wang ZY, et al. Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2007(7): 1362-1370.
- [19] Liu N, Wang DL, Wang ZY, et al. Deletion of tandem repeats causes flocculation phenotype conversion from Flo1 to newFlo in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2009(16): 137-145.
- [20] 李娥娥, 常琦, 郭雪娜, 等. 衔接重复序列对酵母菌絮凝蛋白的功能调控作用[J]. 微生物学报, 2012, 52(1): 69-76.
- [21] 常琦, 岳峰, 郭雪娜, 等. *FLO1*基因内重复序列对酵母菌絮凝能力及稳定性影响[J]. 微生物学报, 2012, 52(11): 1360-1368.
- [22] Li EE, Yue F, Chang Q, et al. Deletion of intragenic tandem repeats in unit C of *FLO1* of *Saccharomyces cerevisiae* increases the conformational stability of flocculin under acidic and alkaline conditions[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53428.
- [23] Wang JX, Wang XX, Fang Y, et al. Genome-wide screening of yeast metal homeostasis genes involved in mitochondrial functions[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 277(6): 673-683.
- [24] Chen YB, Yang CP, Li RX, et al. Def1p is involved in telomere maintenance in budding yeast[J]. Journal of Biology Chemistry, 2005, 280(26): 24784-24791.
- [25] Yang CP, Chen YB, Meng FL, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Est3p dimerizes *in vitro* and dimerization contributes to efficient telomere replication *in vivo*[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(2): 407-416.
- [26] Meng FL, Hu Y, Shen N, et al. Sua5p a single-stranded telomeric DNA-binding protein facilitates telomere replication[J]. EMBO Journal, 2009, 28(10): 1466-1478.
- [27] Qian W, Wang J, Jin NN, et al. Ten1p promotes the telomeric DNA-binding activity of Cdc13p: implication for its function in telomere length regulation[J]. Cell Research, 2009, 19(7): 849-863.
- [28] Chen XF, Meng FL, Zhou JQ. Telomere recombination accelerates cellular aging in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS Genetics, 2009, 5(6): e1000535.
- [29] Zhang ML, Tong XJ, Fu XH, et al. Yeast telomerase subunit Est1p has guanine quadruplex-promoting activity that is required for telomere elongation[J]. Nature Structure Molecular Biology, 2010, 17(2): 202-209.
- [30] Peng J, Zhou JQ. The tail-module of yeast mediator complex is required for telomere heterochromatin maintenance[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(2): 581-593.
- [31] Liao Y, He F, Gong T, et al. Msb1 interacts with Cdc42, Boi1 and Boi2 and may coordinate Cdc42 and Rho1 fuctions during early stage of bud development in budding yeast[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66321.
- [32] Gong T, Liao Y, He F, et al. Control of polarized growth by the Rho family GTPase Rho4 in budding yeast: requirement of the N-terminal extension of Rho4 and regulation by the Rho GTPase-activating protein Bem2[J]. Eukaryot Cell, 2013, 12(2): 368-377.
- [33] Yang X, Lau KY, Sevim V, et al. Design principals of the yeast G1/S switch[J]. PLoS Biology, 2013, 11(10): e1001673.
- [34] 李明霞, 唐荣观. 我国各类基物上的酵母菌分布及其尿素酶活性[J]. 真菌学报, 1983, 2(4): 228-236.
- [35] 喻致祥, 关少华, 朱恩善, 等. 酿造猕猴桃果酒用酵母的筛选[J]. 中国酿造, 1987(1): 19-23.
- [36] 薛禹谷, 刘心明. γ -射线对酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 的生理影响[J]. 微生物学报, 1962, 8(4): 429-436.
- [37] 鲍晓明, 高东. 酵母菌呼吸缺陷型的选育[J]. 华中农学院学报, 1983, 3(2): 44-47.
- [38] 张博润, 刘书锋, 王永红, 等. 两种化学诱变剂对酵母菌的诱变效应[J]. 遗传, 1985, 7(5): 12-13.
- [39] 林德球, 陈云波. 双重突变型选育高赖氨酸酵母菌株的初步研究[J]. 遗传, 1987, 9(5): 23-26.
- [40] 何秀良, 段俊英, 柴明, 等. 耐酸耐糖高产乙醇单倍体酵母菌株的选育[J]. 微生物学杂志, 1989, 9(3): 50-54.
- [41] 刘玉方, 蔡金科. 高含量赖氨酸酵母的选育和培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 1989, 16(5): 267-269.
- [42] 贾惠鹃, 马莺. 海藻糖生产菌株的诱变选育[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(5): 3-5.
- [43] 赖素聪, 杨栋, 杨胜利, 等. 不同波长 Ar⁺激光对啤酒酵母菌的诱变效应[J]. 激光生物学, 1993, 2(4): 370-372.
- [44] 王纪, 蒋海波, 姚建铭. 离子注入麦角甾醇酵母选育及发酵工艺[J]. 微生物学杂志, 1998, 8(4): 25-28.
- [45] 蒋耀庭. 高压静电场对酿酒酵母菌的作用研究[J]. 中国酿造, 2004(6): 20-21.
- [46] 马旭光, 张宗舟. 航天诱变啤酒酵母菌株的复壮与筛选[J]. 中国酿造, 2008(11): 72-75.
- [47] 潘明, 周永进. 微波技术选育啤酒酵母菌种的探讨[J]. 中国酿造, 2008(11): 78-80.
- [48] 蔡金科, 张博润, 刘蕙萍. 酵母菌杂交育种: 酵母菌麦芽糖基因对麦芽糖发酵力的效应[J]. 遗传学报, 1978, 5(1): 9-17.
- [49] 蔡金科, 张博润, 刘蕙萍. 酵母菌杂交育种: 酵母菌麦芽糖发酵等效异位基因系的遗传分析[J]. 遗传学报, 1978, 5(2): 89-98.
- [50] 蔡金科, 张博润, 刘玉方. 酵母菌杂交育种 IV: 高产酒精酵母杂交育种[J]. 微生物学报, 1982, 22(1): 48-54.
- [51] 蔡金科, 刘玉方, 张博润. 酵母菌杂交育种 V: 药用酵母的杂交育种[J]. 微生物学报, 1985, 25(2): 124-128.
- [52] 张博润, 田宇清, 黄英, 等. 酵母超氧化物歧化酶高产菌的选育[J]. 微生物学报, 1994, 34(4): 279-284.
- [53] He XP, Huai WH, Tie CJ, et al. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains[J]. Journal of Industrial

- Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(1): 39-44.
- [54] 郭雪娜, 付秀辉, 何秀萍, 等. 富锌酵母的选育及培养条件研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 240-243.
- [55] 郭雪娜, 付秀辉, 何秀萍, 等. 高生物量富铬酵母的选育研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(7): 28-31.
- [56] 姜天笑, 徐曼, 王振, 等. 优良面包酵母菌株的杂交育种[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 550-554.
- [57] Eddy AA, Williamson DH. Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast[J]. Nature, 1959, 183(4668): 1101-1104.
- [58] Kao KN, Michayluk MR. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts[J]. Planta, 1974, 115(4): 355-367.
- [59] Ferenczy L, Maráz A. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nature, 1977, 268(5620): 524-525.
- [60] 高东, 王金盛, 施安辉, 等. 酿酒酵母单倍体的分离及其原生质体制备、融合、再生的研究—(1)单倍体的分离及原生质体的制备[J]. 中国酿酒, 1983(2): 13-17.
- [61] 谭蓓英, 王花. 酿酒酵母和产阮假丝酵母原生质体的形成、再生和属间融合[J]. 真菌学报, 1983, 2(2): 110-117.
- [62] 楼纯菊, 沈永强, 焦瑞身, 等. 酿酒酵母单倍体与双倍体原生质体的融合[J]. 真菌学报, 1984, 4(2): 118-124.
- [63] 汪和睦, 鲁玉瓦, 武延宽, 等. 电场诱导营养缺陷型酵母原生质体的融合[J]. 生物工程学报, 1986, 2(3): 44-51.
- [64] 张博润, 姜书勤, 徐婉学, 等. 相同交配型酵母原生质体电融合剂融合体的分析[J]. 生物工程学报, 1986, 2(4): 29-34.
- [65] 张博润, 蔡金科. 酵母菌属间原生质体融合获得能发酵乳糖生产酒精的融合体[J]. 微生物学报, 1990, 30(3): 182-188.
- [66] 方霭棋, 李绍兰, 陈有为, 等. 耐热酵母与酿酒酵母原生质体融合的研究[J]. 生物工程学报, 1990, 6(3): 224-229.
- [67] 张零花, 杨桂菊, 张润清, 等. 用细胞融合的方法选育耐高酒精度的酿酒酵母[J]. 生物技术, 1992, 2(5): 8-13.
- [68] 张博润, 何秀萍, 铁翠娟, 等. 麦角固醇高产菌株的构建及其培养优化条件的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 46-51.
- [69] 范秀英, 郭雪娜, 付秀辉, 等. 高生物量富硒酵母的选育及培养条件初步优化[J]. 生物工程学报, 2003, 19(6): 720-724.
- [70] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature, 2002, 415(6872): 644-646.
- [71] 王灏, 王航, 孟春, 等. 基因组改组技术选育耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 705-708.
- [72] Gong GL, Wang CL, Chen MH, et al. Genome shuffling to improve the ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136S: S311-312.
- [73] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(1): 139-147.
- [74] Lu Y, Cheng YF, He XP, et al. Improvement of robustness and ethanol production of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* under co-stress of heat and inhibitors[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(1): 73-80.
- [75] 何葆光, 黄培仁, 戴耀勋, 等. 乙型肝炎表面抗原基因在啤酒酵母中的表达[J]. 自然世界, 1983, 6(11): 879-880.
- [76] 敖世洲, 王静英, 李载平. 酵母启动基因在大肠杆菌中的克隆和表达[J]. 生物工程学报, 1985, 1(3): 20-25.
- [77] 张绍松, 陈永青, 郑伟军, 等. 枯草芽孢杆菌 *bglS* 基因在酵母染色体上整合[J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 266-271.
- [78] 刘玉方, 陈玉梅, 蔡金科. 扣囊拟内孢霉 α -淀粉酶基因的克隆和在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学报, 1995, 35(6): 404-409.
- [79] He XP, Zhang BR, Tan HR. Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(10): 773-778.
- [80] Fan XY, He XP, Guo XN, et al. Increasing glutathione formation by functional expression of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(5): 415-417.
- [81] Ding WT, Zhang GC, Liu JJ. 3' truncation of the *GPD1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield and productivity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(10): 3273-3281.
- [82] Li L, Shen S, Jiang P, et al. Usage of an intronic promoter for stable gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40(5): 347-352.
- [83] Hou LH, Li XY, Wang C, et al. Construction of ploidy series of *Saccharomyces cerevisiae* by the plasmid YCplac33-GHK[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2013, 40(3): 393-397.
- [84] 郭雪娜, 何秀萍, 傅秀辉, 等. 工业酵母菌的遗传修饰研究进展及其应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(10): 47-51.
- [85] 张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 942-946.
- [86] Wang ZY, He XP, Zhang BR. Over-expression of *GSH1* gene and disruption of *PEP4* gene in self-cloning industrial brewer's yeast[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(3): 192-199.
- [87] Wang DL, Wang ZY, Liu N, et al. Genetic modification of industrial yeast strains to obtain controllable NewFlo

- flocculation property and lower diacetyl production[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(11): 2013-2018.
- [88] Wang ZY, Wang JJ, Liu XF, et al. Recombinant industrial brewing yeast strains with *ADH2* interruption by using self-cloning *GSH1+CUPI* cassette[J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(4): 574-581.
- [89] Wang JJ, Wang ZY, He XP, et al. Integrated expression of the α -amylase, dextranase and glutathione gene in an industrial brewer's yeast strain[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 223-231.
- [90] Hao RY, Liu YL, Wang ZY, et al. Construction of self-cloning, indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced glycerol and glutathione production[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(9): 1711-1717.
- [91] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering[J]. Science, 1991, 252(5013): 1668-1675.
- [92] Stephanopoulos G, Vallino JJ. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction[J]. Science, 1991, 252(5013): 1675-1681.
- [93] 郁静怡, 杨胜利. 代谢工程[J]. 生物工程学报, 1996, 12(2): 109-112.
- [94] 鲍晓明, 高东, 曲音波, 等. 木糖代谢基因表达水平对酿酒酵母重组菌株产物形成的影响[J]. 生物工程学报, 1997, 13(4): 355-361.
- [95] 鲍晓明, 高东, 王祖农. 嗜热细菌木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 49-54.
- [96] Wang Y, Shi WL, Liu XY, et al. Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(11): 885-890.
- [97] Hou J, Shen Y, Li XP, et al. Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45(2): 184-189.
- [98] Zhang XR, Shen Y, Shi WL, et al. Ethanolic cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7093-7099.
- [99] Peng BY, Shen Y, Li XW, et al. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(1): 9-18.
- [100] Zha J, Li BZ, Shen MH, et al. Optimization of *CDT-1* and *XYL1* expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68317.
- [101] 王伟, 孟超, 朱平, 等. 代谢工程酵母菌合成紫杉烯的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(8): 103-108.
- [102] 孔建强, 王丽娜, 朱平, 等. 酵母代谢工程菌生产青蒿素中间体的研究[C]. 2008全国药用真菌学术研讨会论文集, 2008.
- [103] Xu GQ, Chen XL, Xu N, et al. Fumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by *In Silico* aided metabolic engineering[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52086.
- [104] Yu DY, Xu FC, Zi JC, et al. Engineered production of fungal anticancer cyclooligomer depsipeptides in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2013(18): 60-68.
- [105] 王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1296-1302.
- [106] 杨薇, 周雍进, 刘武军, 等. 构建酿酒酵母工程菌合成香紫苏醇[J]. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1185-1192.
- [107] Xie WP, Liu M, Lv XM, et al. Construction of a controllable β -carotene biosynthetic pathway by decentralized assembly strategy in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Bioengineering, 2013, DOI:10.1002/bit.25002.
- [108] Li Q, Sun ZQ, Li J, et al. Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 345(2): 94-101.