

## 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\*

王 灏 王 航 孟 春\*\* 郭养浩

(福州大学药物生物技术与工程研究所 福州 350002)

**摘要** 当以 f4、f5、f6 作为出发菌株,用酵母菌原生质体紫外诱变的方法,在不同温度下,用含有不同浓度乙醇的平板筛选,分别获得了在耐高温和耐乙醇性状有较大提高的 f4.2、f5.1、f6.2、f4.5 等正突变菌株。以这些菌株作为出发菌株,进一步用硫酸二乙酯诱变,获得了 f5.1.1、f4.2.1 两个乙醇耐受性能较高的菌株。在建立了上述不同突变株后,通过基因组改组(genome shuffling)的方法,将上述不同特性的菌株经过两轮 genome shuffling,获得了耐高温性能和耐乙醇性能都较好的酵母菌株。经过摇瓶发酵后证明, R24 株在 35℃ 发酵过程中,发酵液中的最高乙醇浓度 12.93%(W/V)比原始出发菌株 f4 在 35℃ 的发酵液中最高乙醇浓度 8.11% 提高了近 5%。

**关键词** 酿酒酵母, 基因组改组, 耐乙醇浓度, 耐高温, 正突变株

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)04-0705-04

Study of Breeding *Saccharomyces cerevisiae* with Improved Temperature and Ethanol Tolerance by Genome Shuffling\*

WANG Hao WANG Hang MENG Chun\*\* GUO Yang-Hao

(Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002)

**Abstract** By UV induced mutagenesis of protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* strain f4, f5 and f6, and screening on plates containing different concentration of ethanol at different temperature, we obtained improved strains, such as f4.2, f5.1, f6.2, f4.5. By using a DES to deal with all the improved strains, we obtained two mutants, f5.1.1 and f4.2.1 which have improved ethanol tolerance. We made use of genome shuffling to generate improved strains in this work. We shuffled twice these improved strains by protoplast fusion and finally obtained strains with higher temperature and ethanol tolerance. we also identified shuffled strains that produced more ethanol by shake-flask experiments. At the 35℃, the ethanol yield of R24 strain got to 12.93% (W/V), and were almost 5% higher than that of stain f4.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, Genome shuffling, Ethanol-tolerance, Temperature-tolerance, Improved strains

作为生产燃料乙醇或酿酒的生产菌株,酿酒酵母的耐高温、耐乙醇性能的高低直接与生产效益相关。特别是在我国南部的生产企业,提高酵母的耐高温性能可减少生产过程中因维持发酵温度的成本。

高温通常会引起酵母细胞内各种成分,如脂肪酸、磷脂、麦角固醇等的变化。而这些成份的变化,反过来就会影响细胞本身正常的生理活动。从而表现出高温对酵母细胞有毒性,温度越高,越易引起酵母早衰、死亡<sup>[1]</sup>。同时高温也增加了乙醇对酵母细胞的毒害作用。乙醇作为酵母菌发酵的重要

的产物,发酵液中乙醇累积到一定浓度会对酵母细胞产生毒害作用,且这种负作用随着温度的增加而增加。在发酵过程中,要提高发酵液中乙醇的含量,减少分离过程中的成本,就必须提高酵母菌对乙醇的耐受性。

最近的研究表明,酵母菌耐高温和耐酒精的生化机理十分复杂,酿酒酵母的耐高温和耐高乙醇浓度性状并不是由一个或数个基因控制,它涉及到大量的基因产物及其相关的代谢途径<sup>[1]</sup>。在高温和乙醇对酵母细胞作用机制完全阐明以前,用基因工程等理性育种手段,很难同时提高酵母菌的耐高温和

\* 福建省自然科学基金(No. C0510006)

\*\* 通讯作者 Tel 0591-87893046, Fax 0591-87893046, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

收稿日期: 2006-11-27, 修回日期: 2007-04-11

耐乙醇性能。

genome shuffling 技术是指将具有不同正突变的不同菌株的全基因组进行随机重组,快速选育出具有较大改进的杂交菌株的方法。Ying-Xing Zhang 等已成功通过基因组改组的方法提高弗氏链霉菌的泰乐菌素的产量<sup>[2]</sup>;Ranjan Patnaik 等人通过基因组改组技术使得乳杆菌的耐酸性能有了较大提高<sup>[3]</sup>。genome shuffling 非常适合于生化反应机理还没有阐明的菌种表型的改变以及优良性状的组合。在国内目前鲜有利用 genome shuffling 技术改良各种工业菌株的报道。本文则经过诱变获得酿酒酵母具不同耐受性的正突变株的基础上,用 genome shuffling 的技术获得在耐高温和耐高乙醇性能上比原始出发菌株有较大提高的融合株,并进一步通过摇瓶发酵试验证明其在发酵过程中乙醇产量较出发菌株有较大的提高。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

f4、f5、f6 三株酿酒酵母均为本实验室保藏。

**1.1.1 培养基** (1)液体培养基:葡萄糖 10%、酵母膏 0.5%、蛋白胨 0.5%、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.13%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.065%、 $\text{CaCl}_2$  0.006%、pH 4.5~5.0,  $6 \times 10^4$  Pa 灭菌 20 分钟。(2)固体培养基:液体培养基中含 2% 琼脂。(3)高渗培养基:液体培养基中含 17% 蔗糖。

**1.1.2 试剂及溶液**:前处理液:含 0.05mol/L EDTA 和 0.2% 巯基乙醇;35% PEG-6000 液;硫酸二乙酯:购于国药集团化学试剂有限公司;缓冲液:Tris-HCl 缓冲液中加入 17% 蔗糖;蜗牛酶:购于厦门星隆达化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 紫外诱变原生质体** 原生质体制备的方法参阅文献[4],紫外诱变的方法参阅文献[5]。

**1.2.2 化学诱变** 取 5 mL 酵母细胞培养液,以 3000 r/min 离心 10min,用无菌生理盐水洗涤沉淀,离心后向沉淀中加入 0.2 mol/磷酸缓冲液(pH7.2)20mL,硫酸二乙酯(DES)0.2 mL,混匀后于 30℃下震荡 30min,然后加入终止剂 25% 硫代硫酸钠 0.2 mL,终止诱变,3000 r/min 离心 10min,再用磷酸缓冲液洗涤沉淀 2 次,最后用生理盐水将菌体稀释,涂布于筛选平板上<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 基因组改组** 所谓 Genome shuffling 是将各正突变株分别制备原生质体后等量混合,在 35% PEG-6000 的促融下对各正突变株的全基因组进行随机 shuffling,并通过定向筛选的方向获得了在耐高温或耐乙醇性状上有提高的融合株。然后,在获得有提高的突变株的基础上,再将这些有提高的突变株与通过诱变获得正突变株进一步用同样方法进行一次 shuffling,通过筛选以获得耐高温或耐乙醇性状上更进一步提高的融合株<sup>[2]</sup>。

**1.2.4 筛选** 将处理后的细胞,在 30℃、35℃和 38℃等不同温度下,分别涂布含 7%、9%、11%、13% 等乙醇浓度(V/V)的平板来进行筛选。为了降低平板培养基中的乙醇挥发,我们采用透明胶带先将培养皿封住,然后再将平板放置在密封袋内密封培养。将平板上生长出菌落的时间也作为衡量菌株耐受性的初筛标志。最先生长出菌落的菌株,在同等条件下,其耐受性能最好。

## 2 结果

### 2.1 紫外诱变原生质体

以 f4、f5、f6 三株菌株为出发菌株,分别进行原生质体紫外诱变。在紫外灯的功率为 30W,照射距离为 10cm,照射时间 5s 的条件下,原生质体的致死率约为 92.5%。使用在不同温度下含不同乙醇浓度的平板进行筛选。综合平板上菌株生长出来的时间、平板中乙醇浓度以及培养温度来筛选正突变菌株。

我们以 f4 菌株为出发菌株经过筛选获得了 f4.2 株、f4.5、f4.6 菌株,以 f5 菌株为出发菌株获得了 f5.1、f5.2、f5.3 菌株,以 f6 菌株为出发菌株获得了 f6.2 菌株。如表 1 所示。就温度耐受性而言,原始出发菌株,在 38℃条件下,培养基中乙醇浓度为 3%就不能生长。而 f4.6 和 f5.3 株能耐受 38℃ 5% 乙醇浓度,它们是在耐高温性状方面有提高的正突变株。对乙醇耐受性来说,原始出发菌株在 30℃下,10%乙醇浓度的平板上不能生长出菌落来,而 f5.1 和 f4.2 则是在 30℃条件下,分别能耐受 10%和 12% 乙醇浓度,相对原始出发菌株,它们在耐乙醇性状方面有一定地提高。在 35℃条件下,原始出发菌株最高耐受乙醇的浓度为 7%。而 f4.5、f5.2、f6.2 菌株,在 35℃条件下,含 9% 乙醇浓度的平板上能够生长。它们是在耐高温和耐乙醇浓度性能上同时

有一定提高的突变株。

表 1 紫外诱变突变株的高温及乙醇浓度的耐受性							
strains	f4.2	f5.1	f4.5	f5.2	f6.2	f4.6	f5.3
temperatue(℃)	30	30	35	35	35	38	38
Ethanol concentration(V/V)	12%	10%	9%	9%	9%	5%	5%
Time(d)	4	4	5	5	4	4	4

2.2 硫酸二乙酯作为诱变剂的化学诱变

我们分别以紫外诱变得到的 f6.2、f4.2、f4.5、f4.6、f5.1、f5.2、f5.3 作为出发菌株,通过硫酸二乙酯诱变。30℃的条件下,在以 f4.2 株作为出发菌株时,我们获得了突变株 f4.2.1,在以 f5.1 菌株作为出发菌株时,我们获得了突变株 f5.1.1。对于其它菌株作为出发菌株,未能筛选在高温和乙醇浓度方面有效提高的新突变株。表 2 所示为化学诱变后所得两株菌株在 30℃时,耐平板中乙醇浓度。由表 2 可以看出,新获得的两株菌株是在 30℃下,在提高了 2%乙醇浓度的平板上,菌落长出的天数比出发

菌株少 4d。所以我们认为与出发菌株相比,新获得的菌株在耐平板中的乙醇浓度方面,均提高了 2%。

表 2 化学诱变突变株的耐受性				
strains	f4.2	f4.2.1	f5.1	f5.1.1
temperature(℃)	30	30	30	30
Ethanol concentration(V/V)	14%	14%	12%	12%
Time(d)	9	5	9	5

2.3 Genome shuffling

2.3.1 第一次 Genome shuffling:我们将上述的通过紫外诱变原生质体法和硫酸二乙酯诱变得到的菌株 f6.2、f4.2、f4.5、f4.6、f5.1、f5.2、f5.3 和 f4.7、f5.5 菌株同时制备原生质体后,等量混合,用 35% PEG(6000)介导进行 Genome shuffling。采用 35℃,含乙醇浓度为 9%、11%和 13%三个梯度平板的筛选。经过 shuffling 后,获得了 R1 到 R10 共 10 个菌株。如表 3 所示。

表 3 第一次 shuffling 得到菌株的乙醇耐受性										
strains	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Ethanol concentration(V/V)	9%	11%	11%	11%	11%	11%	13%	13%	13%	13%
Time(d)	4	5	5	4	6	6	9	8	8	8

虽然 R1 菌株是耐受 9%乙醇浓度,但在平板上长出菌落的天数为 4d,且在后面两天内,菌落生长较快,菌落直径迅速长大。而 f4.5、f5.2、f6.2 虽然也在第 4 天长出菌落,但在菌落生长出来的后面几天内,菌落生长比较缓慢,且菌落直径一直较小,所以认为 R1 是有一定提高的菌株。至于 R2~R6 菌株,是在 11%乙醇浓度的平板上筛选出的菌株,且菌落长出天数大致与出发菌株一致,这些都是在 35℃下,耐受平板中乙醇浓度提高的菌株。同出发菌株在 35℃,含 13%乙醇浓度的条件下不能生长相比,R7~R10 虽然菌落在平板上生长出来的时间较

长,但最终有菌落出现,所以是在耐高温和耐乙醇浓度方面同时有一定提高的菌株。

2.3.2 第二次 Genome shuffling:在通过第一次 Genome shuffling 得到了上述菌株以后,我们又进行了一次 shuffling,我们将上次得到的 10 株和菌株 f6.2、f4.2、f4.5、f4.6、f5.1、f5.2、f5.3、f4.7、f5.5 作为出发菌株,同时制备原生质体,经过等量混合、用 35%PEG(6000)介导进行 Genome shuffling,涂布在筛选平板上。筛选平板的条件同第一次 shuffling 相同。最后经过筛选,共得到 14 株有了提高的菌株。

表 4 第二次 shuffling 得到菌株的乙醇耐受性及菌落长出天数														
Strains	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R25
Ethanol concentration	9%	9%	11%	11%	11%	11%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%
Time(d)	3	2	4	4	4	3	8	8	8	7	7	6	6	6

如表4所示。R11和R12菌株是在35℃下9%乙醇浓度的平板上筛选的菌株,但其菌落生长天数却是只有2、3天,明显优于第一轮 Genome shuffling 所获得的菌株。对于其它的菌株来说,其在相应的乙醇浓度的平板上,从平板上生长的天数都比出发菌株相应减少,它们都是有一定提高的菌株。

## 2.4 摇瓶发酵

经过在不同温度下含不同乙醇浓度平板的筛选,我们得到了一系列的菌株。与原始的出发菌株相比,在平板上生长无论是耐高温还是耐乙醇浓度都有了较大提高。为了检验所筛选的菌株在发酵过程中产乙醇的能力,我们在35℃下用摇瓶进行发酵实验,对比各个菌株发酵液中最高乙醇浓度。从图1可以看出,最初的出发菌株在摇瓶发酵过程中最高乙醇浓度仅为8.18%(W/V),经过诱变的方法得到的突变株,发酵液中乙醇最高浓度比出发菌株的最高浓度一般都高出2%~3%左右,而经过 Genome shuffling 技术最终获得的菌株,其发酵液中乙醇最高浓度又比其出发菌株的最高浓度一般都高出2%左右,相比最初的出发菌株 f4, R24 菌株最高浓度约提高了5%。达到12.93%(W/V)。经过7次传代,冷冻保存7个月后,再经摇瓶发酵检测后,其发酵液中最高乙醇浓度为12.87%和12.95%,获得的融合菌株在遗传性状基本保持稳定。

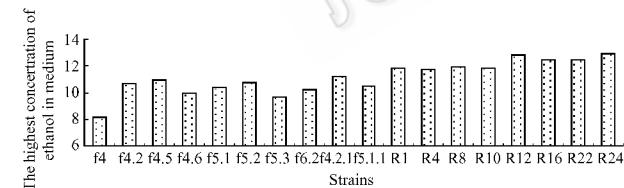


图1 35℃条件下,几种菌株发酵液中最高乙醇浓度

## 3 讨论

单一诱变技术一般具有位点特异性,紫外诱变对DNA的作用机理主要表现为相邻的胸腺嘧啶成为二聚体。硫酸二乙酯作为烷化剂主要引起碱基

的错误配对而使DNA分子发生改变。分别对菌株进行紫外诱变和硫酸二乙酯诱变时,二者作用于DNA上的位点可能不相同,对出发菌株采取紫外诱变和硫酸二乙酯复合诱变的方法,可能得到在不同位点上突变的菌株,进而筛选出理想的菌株。本文依靠复合诱变,获得了f4.2.1、f5.1.1两个菌株,在乙醇耐受性上比其出发菌株提高了2%。

Genome shuffling 是将不同正突变的菌株经原生质体融合后通过DNA分子的重组,将不同的菌株的优良性状集中到同一株菌株的一种方法。这种方法的优点在于控制某性状或代谢途径还不清楚的情况下,对已有的具有不同性状的菌株进行遗传改造,使人们在不涉及清楚的遗传机理的情况下获得不同性状都提高的菌株。我们的工作也证明了能够通过 Genome shuffling 的方法将酵母菌耐高温性能和耐高乙醇的性能能够集中于同一菌株,从而选育出既耐受较高高温又耐受较高乙醇的菌株。

我们最终的目的是选育出在高温下能够产生较高乙醇的酵母菌菌株。本着高产的生产菌株必须耐受高乙醇浓度的思路,用平板筛选的方法先提高其耐高温和耐高乙醇浓度的特性,我们首先从平板上筛选酵母菌的耐高温和耐高乙醇的菌株,然后通过摇瓶的方法筛选高产的生产菌株,实验的结果证明该思路可用于高产乙醇菌株的筛选。

## 参考文献

- [1] 王滨,张国政,路福平,等. 天津轻工业学院学报, 2001, 36(1):18~22.
- [2] Ying-Xin Zhang, Kim Perry, Victor A. Nature, 2002, 415(2):644~646.
- [3] Ranjan Patnaik, Susan Louie, Vesna Gavrilovic et al. Nature biotechnology, 2002, 20(7):707~711.
- [4] 邓红梅. 贵州大学学报, 2002, 19(3):227~231.
- [5] 赵华. 酿酒, 2004, 31(2):26~28.
- [6] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种[M]. 北京: 科学出版社, 2003. pp.89.