

三种选育高乙醇耐受性工业酿酒酵母方法的比较

李倩^{1,2}, 赵心清¹, Jin-Soo Kim³, 白凤武¹

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

2 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622

3 ToolGen, Inc, Seoul, 153-023, South Korea

李倩, 赵心清, Jin-Soo Kim, 等. 三种选育高乙醇耐受性工业酿酒酵母方法的比较. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1672-1675.

Li Q, Zhao XQ, Kim JS, et al. Comparison of three approaches to breed industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved ethanol tolerance. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1672-1675.

摘要: 由于乙醇耐受性受多基因控制, 因此需要从全基因组水平进行改造以期得到高乙醇耐受的突变体。文中分别使用紫外诱变、等离子体诱变及人工转录因子3种方法对工业酿酒酵母 Sc4126 进行改造, 获得了乙醇耐受性提高的突变体, 并比较了3种方法的正突变率。人工转录因子文库转化的方法获得了最多数量的乙醇耐受性突变体, 高出紫外诱变和等离子体诱变方法 1~2 个数量级, 且遗传稳定。研究表明, 人工转录因子技术可以用于对工业酿酒酵母快速进行基因组工程改造。

关键词: 人工转录因子文库, 紫外诱变, 介质阻挡等离子体诱变, 乙醇耐受性, 酿酒酵母

Comparison of three approaches to breed industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved ethanol tolerance

Qian Li^{1,2}, Xinqing Zhao¹, Jin-Soo Kim³, and Fengwu Bai¹

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

2 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

3 ToolGen, Inc., Seoul, 153-023, South Korea

Abstract: Ethanol tolerance is related to the expression of multiple genes, and genome-based engineering approaches are much more efficient than manipulation of single genes. In this study, ultraviolet (UV) mutagenesis, dielectric barrier

Received: February 4, 2013; **Accepted:** March 25, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076040), Program for New Century Excellent Talents, Ministry of Education, China (No. NCET-11-0057).

Corresponding author: Xinqing Zhao. Tel: +86-411-84706319; E-mail: xqzhao@dlut.edu.cn.

国家自然科学基金 (No. 21076040), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-11-0057) 资助。

网络出版时间: 2013-07-11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130711.1737.001.html>

discharge (DBD) air plasma mutagenesis, and artificial transcription factor (ATF) technology were adopted to treat an industrial yeast strain *S. cerevisiae* Sc4126 to obtain mutants with improved ethanol tolerance. Mutants with high ethanol tolerance were obtained, and the ratio of positive mutants was compared. Among the three approaches, the rate of positive mutation obtained by ATF technology was 10- to 100-folds of that of the two other methods, with highest genetic stability, suggesting the ATF technology promising for rapid alteration of phenotypes of industry yeast strains for efficient ethanol fermentation.

Keywords: artificial transcription factor (ATF) library, ultraviolet (UV) mutagenesis, dielectric barrier discharge (DBD) air plasma, ethanol tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母的乙醇耐性对于超高浓度发酵及连续发酵过程中保持较高的细胞活性非常重要。但酿酒酵母乙醇耐性机制复杂,与乙醇耐性相关的基因有 200 多个^[1-2],依靠传统的单基因操作或局部代谢支路改造很难得到理想的表型,因此本实验考虑使用人工转录因子(锌指蛋白文库)^[3-4]来获得工业酿酒酵母的高乙醇耐受突变体,并比较其与传统的物理化学诱变方法的正突变率及遗传稳定性等指标。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

工业酿酒酵母 Sc4126, 本实验室保存。

YPD 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10; 固体培养基添加 2% (V/V) 琼脂粉。

SD 基本培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 不含氨基酸的酵母氮碱 (YNB) 6.7。

人工转录因子相关实验固体和液体培养基分别添加 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 蛋白胨 8, 酵母粉 6。

所有摇瓶培养条件为 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min。平板均在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 2~5 d。

1.2 方法

1.2.1 三种育种方法处理菌体

紫外诱变 (UV) 参考文献[5]处理菌体,选取合适照射时间使存活率在 50%与 10%左右。等离子

体诱变 (Plasma) 参考文献[6]处理菌体,选取合适处理时间使存活率在 50%和 10%左右。人工转录因子 (ATF) 文库由韩国 ToolGen 公司 Jin-Soo Kim 教授提供^[4],结构如图 1 所示。电转锌指蛋白文库质粒到 Sc4126 中,筛选使用 G418。

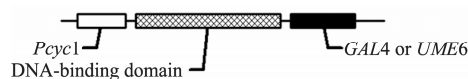


图 1 人工转录因子文库主要元件

Fig. 1 Key elements of the artificial transcription factor library (ATF).

1.2.2 乙醇耐性突变株的筛选和验证

YPD 培养基过夜活化宿主菌 Sc4126 后添加无水乙醇使终浓度达到 20% (V/V) 培养不同时间涂布 YPD 平板,选择无菌落长出时对应的处理时间 T_0 来作为耐性筛选条件。

将 3 种方法得到的突变株用 YPD 培养基从各自的平板上完全洗下来,加入无水乙醇至终浓度 20% (V/V),乙醇冲击 T_0 时间后涂布含 10% 乙醇的 YPD 平板。

复筛时将每种育种方法得到的突变株中菌落最大的挑出,在 YPD 中过夜培养后调整菌株 OD_{600} 至相同数值,一方面点滴 10% (V/V) 乙醇平板和普通 YPD 平板,另一方面以 20% (V/V) 接种量转接到含 20% (V/V) 乙醇的 SD 基本培养基冲击 1~5 h 计算存活率,从而定性和定量评估突变体乙醇耐受性。

1.2.3 突变株遗传稳定性验证

在每种突变方法获得的突变株中随机选取 15

个突变体, 接入 YPD 培养基 24 h 培养后以 1% (V/V) 接种量接至新鲜 YPD 中, 如此传代 10 次。将最后一次传代的菌体与活化培养的元代突变株调至相同的 OD_{600} 值, 进行两组验证: 一组稀释合适倍数涂布含 10% (V/V) 乙醇 YPD 平板, 培养 3 d 后计算菌落形成单位 (CFU); 另一组分别接入含 8% (V/V) 乙醇的发酵培养基中培养 36 h 后, 测量 OD_{600} 。如果在两组实验中, 最后一次传代的突变株与元代突变株的结果差异均在 40% 以上, 则认为此突变株发生了回复突变。

2 结果与分析

2.1 三种改造方法菌体处理条件的确定

确定了乙醇时间 T_0 为 2.5 h。人工转录因子文库使用了两种效应域: 激活域 (Gal4 转录因子) 和抑制域 (Ume6 转录因子)^[4]。根据两种物理诱变存活曲线, 考虑到过高的致死率容易导致高比例的负突变^[5], 选择存活率接近 50% 和 10% 的处理时间进行后续实验, 即紫外诱变分别选择 45 s 和 90 s 处理, 等离子体诱变分别选择 1.5 min 和 3.5 min。

2.2 三种育种方法效果比较

每种方法出发菌落数都在 10 000 株以上, 通过足够大的样本量保证结果有统计意义。一般微生物的自发突变率仅有 10^{-6} ~ 10^{-8} ^[7], 如表 1 所示, 几种育种方法效率达到 10^{-4} 以上, 其中人工转录因子文库技术正突变率更是高达 10^{-2} , 比自发突变率高了至少 4 个数量级, 也高出紫外诱变和等离子体诱变 1~2 个数量级。在两种人工锌指蛋白文库中, 锌指序列后接抑制元件 Ume6 的突变比率比后接激活域 Gal4 的高 26%, 推测可能原因是与乙醇耐性相关的天然锌指蛋白多是通过抑制靶基因表达发挥功能, 这与 Ume6 抑制元件功能相似, 因此导入这类锌指蛋白的菌株更易筛选得到乙醇耐性提高的表型^[8-9]。

进一步对每种方法得到的菌落直径最大的突变体进行了乙醇耐受的定性与定量测试。图 2 为乙醇平板点滴实验结果, 在 10% (V/V) 平板上对照菌只能生长 1~2 个稀释梯度, 而突变株均可以生长

3~4 个稀释梯度。如图 3 所示 20% (V/V) 乙醇冲击实验结果, 3 种方法获得的突变株较对照乙醇耐受性有了显著提高。以 1 h 为例, UV 诱变、ATF 方法和等离子体诱变得到的突变体分别较对照存活率提高了 23.4%、19.1% 和 14.5%, 3 种方法均达到了提高乙醇耐性的目的。

2.3 三种育种方法获得的突变株遗传稳定性比较

在每组 15 个突变株中, 紫外诱变组有 7 个发生回复突变, 等离子体诱变组有 4 个, 而人工转录因子组只有 1 个回复, 远低于物理诱变, 说明人工转录因子方法得到的突变株较两种物理诱变方法有遗传稳定的特点。

表 1 三种诱变方法效率比较

Table 1 Efficiency of three mutagenesis approaches using *S. cerevisiae* Sc4126

Method	Number of total colonies	Number of positive colonies	Rate of positive colonies
UV-45 s	12 830	19	1.49×10^{-3}
UV-90 s	11 450	12	1.05×10^{-3}
Plasma-1.5 min	10 270	5	4.87×10^{-4}
Plasma-3.5 min	11 580	10	8.64×10^{-4}
ATF-Gal4	11 780	98	8.32×10^{-3}
ATF-Ume6	10 500	117	1.11×10^{-2}

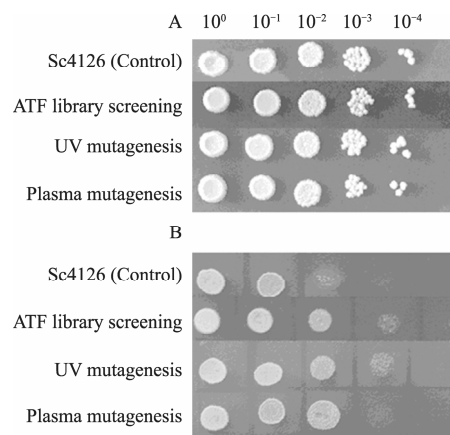


图 2 突变体乙醇耐性的比较

Fig. 2 Analysis of ethanol tolerance of mutants on YPD plates (A) and YPD plates with 10% (V/V) ethanol supplement (B).

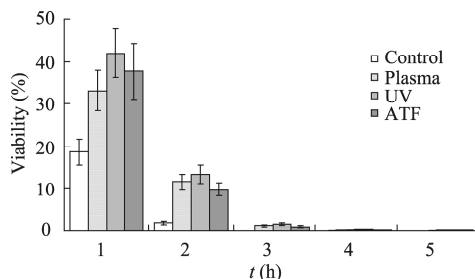


图3 紫外诱变 (UV)、等离子体诱变 (Plasma) 和人工转录因子方法 (ATF) 筛选到的突变体在 20% (V/V) 乙醇冲击下细胞存活率曲线

Fig. 3 Viability of mutants obtained by UV treatment, plasma mutagenesis and ATF screening under ethanol-shock treatment at the concentration of 20% (V/V).

3 结论与展望

利用人工转录因子 (人工锌指蛋白) 文库技术成功获得 200 余株乙醇耐性提高的工业酿酒酵母, 正突变率高达 10^{-2} , 相比紫外诱变、介质阻挡等离子体诱变, 具有正突变率高且回复突变率低的优点。人工转录因子手段还可以进行酿酒酵母其他胁迫耐性表型的改造, 如耐高温和高渗等。获得好的微生物突变体后, 可考虑使用诱导型启动子来控制效应域的转录, 从而控制基因转录的强度和表达时间, 达到对生长和代谢的协同控制。

致谢: 感谢修志龙教授提供介质阻挡等离子体设备; 感谢陈慧黠博士对等离子体诱变部分的实验给予的帮助和指导; 感谢博士生王亮提供的实验思路和实验协助。

REFERENCES

- [1] Ma M, Liu LZ. Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(3): 829–845.
- [2] Zhang QM, Zhao XQ, Jiang RJ, et al. Ethanol tolerance in yeast: molecular mechanisms and genetic engineering. *Chin J Biotech*, 2009, 25(4): 481–487 (in Chinese).
- [3] 张秋美, 赵心清, 姜如娇, 等. 酿酒酵母乙醇耐性的分子机制及基因工程改造. *生物工程学报*, 2009, 25(4): 481–487.
- [4] Sera T. Zinc-finger-based artificial transcription factors and their applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7/8): 513–26.
- [5] Park KS, Lee DK, Lee H, et al. Phenotypic alteration of eukaryotic cells using randomized libraries of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(10): 1208–1214.
- [6] Li Q, Zhao XQ, He LY, et al. Isolation of auxotrophic mutants of self-flocculating industrial yeast for ethanol fermentation. *Ind Microbiol*, 2009, 39(5): 44–48 (in Chinese).
- [7] 李倩, 赵心清, 贺雷雨, 等. 自絮凝工业酒精酵母营养缺陷型的筛选和鉴定. *工业微生物*, 2009, 39(5): 44–48.
- [8] Chen HX, Bai FW, Xiu ZL. Oxidative stress induced in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to dielectric barrier discharge plasma in air at atmospheric pressure. *IEEE Transactions Plasma Sci*, 2010, 38(8): 1885–1891.
- [9] Li RJ. Research Progress of microbial mutation breeding techniques. *J Hebei Agri Sci*, 2009, 13(10): 73–76 (in Chinese).
- [10] 李荣杰. 微生物诱变育种方法研究进展. *河北农业科学*, 2009, 13(10): 73–76.
- [11] Martinez-Pastor M, Marchler G, Schüller C, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*, 1996, 15: 2227–2235.
- [12] Böhm S, Frishman D, Mewes HW. Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(12): 2464–2469.

(本文责编 郝丽芳)