

黄酒酵母一个新基因的鉴定及其对酵母抗逆性能的影响

王明月 余雯雯 张璐 梁新乐 李余动*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310018)

摘要 该文鉴定了一个来自黄酒酵母菌株D2的新基因 $g5170$, 并研究了其对黄酒酵母环境胁迫耐受性与发酵性能的影响。生物信息学分析发现, 此基因编码的蛋白质含有酰胺酶(amidase)保守功能域, 并在YPD培养条件下有较高的基因表达量。利用Cre/loxP系统构建了基因 $g5170$ 的敲除菌株, 通过扩增带有 $g5170$ 基因上下游同源序列和 kan^r 筛选标记的基因敲除组件, 并通过醋酸锂法转化到黄酒酵母菌株D2获得阳性克隆子, 然后将质粒pSH65转到阳性克隆子中, 半乳糖诱导pSH65表达Cre酶切除 kan^r 筛选标记。重复此实验过程, 最终获得两个 $g5170$ 基因拷贝完全缺失菌株D2 $\Delta g5170$ 。梯度生长实验显示, 与原始菌株相比, 敲除菌株对高糖浓度、高温耐受性无明显变化, 但对乙醇胁迫的耐受性显著降低, 而过表达 $g5170$ 的重组酵母菌株对乙醇的耐受性明显比对照菌株强。模拟黄酒发酵实验结果表明, 敲除菌株D2 $\Delta g5170$ 的生长速率、乙醇产量及理化指标与原始菌株相似。因此, $g5170$ 基因可能与黄酒酵母适应乙醇胁迫有关, 并有助于提高酵母的黄酒发酵性能。

关键词 基因敲除; 新基因; 乙醇胁迫; 酿酒酵母

The Identification of a Novel Gene and Its Effect on Stress Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* Chinese Rice Wine Strain

Wang Mingyue, Yu Wenwen, Zhang Lu, Liang Xinle, Li Yudong*

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract They identified a putative gene $g5170$ from *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), a Chinese rice wine strain D2, and characterized its effects on stress tolerance and fermentation performance. A protein encoded by $g5170$ contains an amidase domain, and was over-expressed in growth culture in YPD medium. A knockout strain D2 $\Delta g5170$ is constructed by using Cre/loxP system. A disruption cassette of $g5170$ with a short flanking homologous regions to $g5170$ and kan^r as selectable marker was amplified and transformed into *S. cerevisiae* through LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Positive transformants were screened on G418 plates and verified by PCR. The kan^r marker was removed by transforming plasmid pSH65 into the positive transformants and inducing expression of Cre recombinase by galactose. The procedure was repeated to obtain the knockout strain D2 $\Delta g5170$, in which two $g5170$ copies were completely deleted. Compared to a wild type strain, mutant D2 $\Delta g5170$ showed no significant alterations of tolerance to heat stress and osmotic stress, but exhibited significant lower tolerance to ethanol stress. In contrast, over-expression of $g5170$ in *S. cerevisiae* resulted in enhanced tolerance

收稿日期: 2018-03-08 接受日期: 2018-05-28

国家自然科学基金(批准号: 31671836)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-28008900, E-mail: lyd@zjhu.edu.cn

Received: March 8, 2018

Accepted: May 28, 2018

This work was supported by Natural Science Foundation of China (Grant No.31671836)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008900, E-mail: lyd@zjhu.edu.cn

网络出版时间: 2018-07-30 10:33:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180730.1033.004.html>

to ethanol stress. Simulation of rice wine fermentation showed that the growth rate, ethanol production and other parameters of the mutant were similar to that of the wild strain. These results suggested that *g5170* was associated with ethanol stress response, which might impact fermentation performance of *S. cerevisiae* in rice wine production.

Keywords gene knockout; novel gene; ethanol tolerance; *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)是与人类生活最密切的微生物之一, 长期广泛应用于各种含酒精发酵食品的生产, 如啤酒、葡萄酒及黄酒等^[1]。在酿酒过程中, 酵母细胞要经受不同的环境因子胁迫, 如低溶氧、低pH、高糖浓度及高乙醇浓度等, 尤其是产物乙醇积累造成的毒性是影响酵母发酵效率的关键因素^[2]。酵母菌在长期的进化过程中形成了精确而敏感的适应机制, 能够准确地感受环境变化, 并激活胞内信号传导途径诱导表达应激基因来适应环境胁迫压力, 如过量表达热激蛋白, 增加海藻糖浓度及调节膜脂组成等^[3-4]。酿酒酵母是第一个完成全基因组测序的真核模式生物^[1], 而以Illumina HiSeq平台为代表的二代高通量测序技术的发展, 很多酿酒酵母菌株的基因组已经测序完成, 如致病菌株YJM789、葡萄酒菌株AWRI1631和日本清酒菌株Kyokai no.7等^[5-6]。这些基因组数据将有助于揭示近缘酵母菌株为适应自然环境变化的分子进化机制, 如染色体重组、基因复制和基因移位等^[4]。组学技术使人们可以从全局上理解酵母菌株相关性状(如乙醇耐受性、发酵性能等)的分子机制, 有助于通过基因工程构建优良的酵母菌株^[7]。

黄酒是我国特色传统发酵食品, 其酿造是以糯米等谷物为主要原料, 利用酵母菌和其他微生物共同糖化发酵, 将糖等底物转化成酒精的开放式发酵

过程。黄酒酿造过程中产生很高的酒精度, 发酵结束时酒精度可达到20%, 而其他酒类(葡萄酒、白酒和啤酒)发酵结束时酒精度一般只有10%左右^[3]。黄酒酵母具有较高的耐高渗、耐乙醇性能, 是长期适应我国传统黄酒酿造的高浓醪液环境及其自身遗传变异的结果。然而, 相对其他酒类酵母(如日本清酒、葡萄酒等), 黄酒酵母在基因水平的研究报道较少, 最近我们通过二代测序技术完成了一株黄酒酵母菌株的基因组测序^[8]。本文进一步在黄酒酵母菌株D2的基因组注释中分析鉴定了一个新基因序列*g5170*, 采用Cre/*loxP*基因敲除技术^[9], 构建了缺失该基因的黄酒酵母菌株, 初步功能研究表明, 该基因与酵母菌株的乙醇耐受性相关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 本研究中所使用的菌株、质粒如表1所示, 引物序列如表2所示。

1.1.2 酶与试剂 PCR相关试剂及酶购于TaKaRa公司; G418、Zeocin购自生工生物工程(上海)股份有限公司; PEG3350及鲑鱼精DNA购于Sigma公司; 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 其余试剂均为进口或国产的分析纯试剂。

1.1.3 培养基 LB培养基的组成包括: 酵母粉5 g/L、

表1 文中所用主要菌株及质粒
Table 1 Main strains and plasmids used in this paper

菌株或质粒 Strain or plasmid names	基因型 Genotype descriptions	来源 Sources
D2	<i>g5170</i>	Laboratory
D2Δ <i>g5170</i> *	<i>g5170 2A1</i>	This study
D2Δ <i>g5170</i>	<i>g5170 2A0</i>	This study
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Laboratory
BY4741+pYES2	pYES2	This study
BY4741+pYES2+ <i>g5170</i>	pYES2+ <i>g5170</i>	This study
<i>E. coli</i> DH5α	—	Laboratory
pUG6	<i>kan^r, loxP</i>	Zhejiang University
pSH65	Zeocin	Zhejiang University
pYES2	<i>EcoR I, BamH I, Ampicillin, URA3</i>	Zhejiang University

表2 文中所用到的引物
Table 2 Primers used in this paper

引物 Primers	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	备注 Notes
g5171S	CTC GCC TGA CTG CGT TTG	Located downstream of <i>g5170</i>
g5171A	CAT CGG CTC GTC ACC ACT	Located within <i>g5170</i>
g5169S	GAA GCA CCC TCG ACT GG	Located upstream of <i>g5170</i>
g5169A	GGT AGC GAA GGC GGA TA	Located within <i>g5170</i>
KN1S	ACT TAT AAA TTG TGC CAG AGG TCA TTA CCA TAG TAA TAC TC	From directly upstream of <i>g5170</i>
	AGG TCG ACA ACC CTT AAT	Derived from upstream of <i>loxP</i>
KN1A	AAA GGT CAG GAT TACA GTT TAA TTT TGT TCT CTT ATT TCT TGA T	From directly downstream of <i>g5170</i>
	CTG ATA TCA CCT AAT	Derived from downstream of <i>loxP</i>
KN2S	TTT CTT TAG GGA AAT CTC ACA AAA GGA TGT AAG ATA GAA G	From directly upstream of <i>g5170</i> *
	AG GTC GAC AAC CCT TAA T	Derived from upstream of <i>loxP</i>
KN2A	ATT ATC GAT ATG CAG CTA TTT CCT TTT CTA CCG TTG GCT TT	From directly downstream of <i>g5170</i> *
	A TCT GAT ATC ACC TAA TA	Derived from downstream of <i>loxP</i>
KNS	CCG TGT CAC GAA ATT AGA T	Located within <i>g5170</i>
KNA	GAG ACT TAT GGC GAT GGT A	Located within <i>g5170</i>
YZS	AGC CGG ATT TCT TAC TTA CT	Located upstream of <i>g5170</i>
KA	TAG ATT GTC GCA CCT GAT T	Located within <i>kanMX</i>
g5170+p+S	CGG GAT CCT TTA GGG CGA CGA AAT AT	Located downstream of <i>g5170</i> on pYES2
g5170+p+A	CGG AAT TCA ATT GTG CCA GAG GTC AT	Located upstream of <i>g5170</i> on pYES2

蛋白胨10 g/L、氯化钠10 g/L, 混匀后于121 °C灭菌30 min, 固体培养基添2%(w/v)的琼脂; YPD培养基的组成包括: 葡萄糖20 g/L、蛋白胨20 g/L、酵母粉10 g/L, 加蒸馏水至1000 mL, 混匀后115 °C灭菌20 min, 固体培养基添2%(w/v)的琼脂; YPG诱导培养基的组成包括: 酵母提取物10 g/L、半乳糖20 g/L、蛋白胨20 g/L, 混匀后于115 °C高压灭菌20 min; SD培养基的组成包括: 葡萄糖20 g/L、YNB 6.7 g/L; SG培养基的组成包括: 半乳糖20 g/L、YNB 6.7 g/L。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 蛋白质的理化参数, 如氨基酸组成、分子量及等电点等, 由ExPASy网站在线工具ProParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行分析, 而保守功能域由在线软件SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)进行分析。基因表达分析的RNA-Seq测序数据来自文献[8], 并以基因组可视化软件IGV(<https://www.broadinstitute.org/igv/>)显示测序reads的覆盖度。

1.2.2 构建基因*g5170*敲除的菌株 依据Cre/loxP系统基因敲除技术的原理, 以质粒pUG6作为模板,

使用引物KN1A和KN1S进行PCR得到*g5170*基因敲除组件, 该组件经过测序分析验证后, 再转化D2酿酒酵母细胞, 获得转化的阳性克隆子。再将质粒pSH65转化阳性克隆子, 经过半乳糖诱导表达产生Cre酶, 切除抗性标记*kan^r*基因, 在YPD培养基中连续传代以诱导丢失质粒pSH65, 最后得到*g5170*基因缺失的菌株D2Δ*g5170*。

1.2.3 构建过表达基因*g5170*的酵母重组子 选择目的基因*g5170*及载体质粒pYES2共有的有效双酶切位点, 分别对目的片段及载体质粒进行双酶切, 得到具有相同末端的目的片段以及开环载体。通过核酸连接酶对二者进行连接, 连接产物转化DH5α大肠杆菌。通过氨苄抗性平板筛选阳性克隆子。从阳性克隆子提取质粒, 采用PCR扩增并测序分析验证。结果表明, 成功获得阳性克隆子(带有*g5170*目的片段的重组质粒)。最后将得到的重组质粒通过醋酸锂转化法转入BY4741酵母菌株中, 通过*ura*筛选得到阳性酵母重组子BY4741+pYES2+*g5170*, 同时将pYES2空载体转入BY4741酵母菌株中得到对照菌株BY4741+pYES2。

1.2.4 环境胁迫耐受性分析 平板点样定性分析: 取指数期的D2、D2Δg5170*和D2Δg5170新鲜培养液, 调整菌液 D_{600} 为0.5, 然后依次10倍稀释到 10^{-4} , 五个梯度的菌液各取0.4 μL按菌浓度从高到低的顺序横向依次点在有胁迫因子的平板上。酒精胁迫浓度是10%、16%、20%, 葡萄糖胁迫浓度是40%, 温度胁迫条件是40 °C。

液体发酵酒精耐受性定量分析: 挑取D2和D2Δg5170菌株单菌落, 液体活化两次, 达到指数期时1%接种于200 mL YPD液体培养基, 30 °C、180 r/min培养10 h, 取菌液100 μL, 将浓度稀释至原来的 10^{-6} 倍, 取200 μL涂布平板, 以此时的酵母菌存活率为100%。然后加入10%乙醇, 此后每2 h取样, 以同样的稀释倍数稀释后涂布平板, 放入30 °C培养箱培养48 h, 计数平板上的单菌落数, 计算酵母细胞的存活率。

1.2.5 敲除基因g5170菌株的生长速率测定 挑取D2和D2Δg5170菌株单菌落, 液体活化两次, 达到指数期时以2%的接种量接种于50 mL YPD液体培养基, 30 °C、200 r/min振荡培养, 每4 h取样检测其 D_{600} 值。

1.2.6 敲除基因g5170菌株的黄酒发酵能力分析 平板上挑取单菌落接种到3 mL YPD培养基中, 30 °C、220 r/min培养过夜, 用血球计数板计数待用。取600 g生糯米, 加适量水, 高出米面10 mm, 浸泡3天, 大火蒸至九分熟, 然后凉水冲洗冷却, 晾干后折算成熟糯米重量, 分装到6个1 000 mL三角瓶中, 再加入170 mL无菌水和17%(w/v)的生麦曲, 然后分别接种D2和D2Δg5170两种菌, 每种两个平行, 使细胞的终浓度达到 10^7 /mL, 然后放入30 °C培养箱静置培养, 每隔24 h称CO₂失重, 待失重小于2 g时, 加上发酵栓, 进入后发酵阶段, 后发酵温度为15 °C, 静置培养约15天。后发酵结束后, 将发酵液用纱布过滤, 滤液再于10 000 r/min离心10 min取上清, 留待下一步测定酒精度、总糖、总酸、氨基酸态氮、尿素等指标分析用。

1.2.7 过表达基因g5170的酵母重组子的酒精耐受性定量分析 挑取BY4741+pYES2和BY4741+pYES2+g5170菌株单菌落, 分别接种于30 mL SD+AA+URA(含氨基酸与尿素的合成培养基)的液体培养基活化培养至指数期, 测菌液 D_{600} 值, 稀释至相同 D_{600} 值(0.1)后分别接种于含0%、2%、4%、6%、8%酒精的10 mL SG+AA+URA(加氨基酸与尿素的SG合成培养基)试管液体培养基中, 30 °C、200 r/min振荡培养, 每

6~12 h取样检测 D_{600} 值。

1.2.8 实验数据统计分析 所有实验数据进行3次测定, 不同培养条件下菌株的存活率或生长差异分析(*t*-test)及结果作图都由Origin Pro 9.0完成。

2 结果

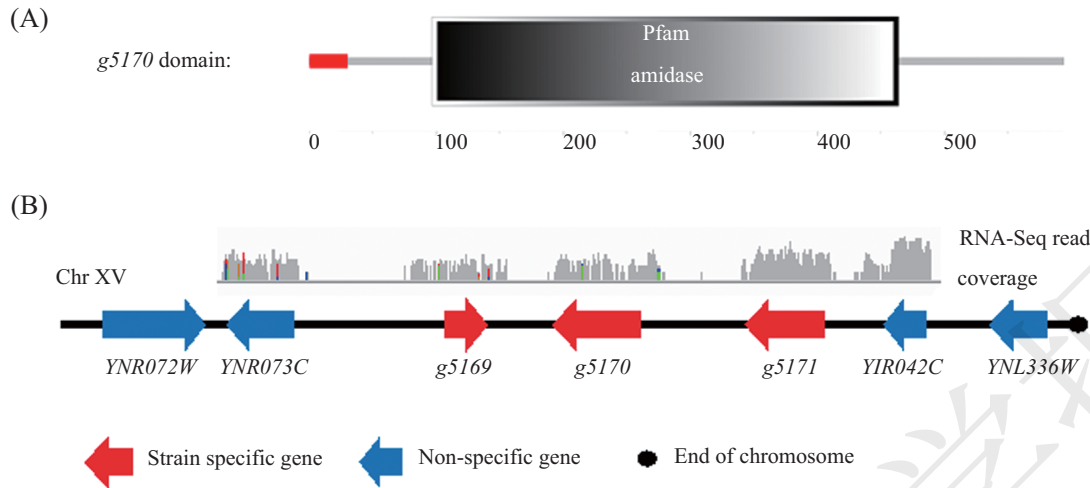
2.1 黄酒酵母新基因g5170的生物信息学分析

通过对一株具有优良抗逆性能的黄酒酵母菌株的基因组测序, 并与模式实验菌株S288c的基因组序列进行比较分析, 我们鉴定了一些在黄酒酵母菌株中存在但在模式实验菌株S288c中不存在的潜在新基因^[8]。其中新基因g5169/g5170/g5171位于染色体XV末端(图1), PCR验证这些序列确实只存在于黄酒酵母菌株D2, 而不存在于标准实验室酿酒酵母BY4741(图2A)。泳道1、2、3是以g5169S/g5169A为引物进行PCR结果, 泳道4、5、6是以g5171S/g5171A为引物进行PCR结果。结果显示, 泳道1和4没有条带, 说明酵母菌株BY4741中不存在基因g5170。泳道2、3产物的大小是1 398 bp及泳道5产物的大小是1 045 bp, 与预期产物大小一致, 证实D2中存在新基因g5170序列。

生物信息学分析预测基因g5170的编码蛋白质的氨基酸序列长度为594 aa, 分子量约为65.8 kDa, 等电点(pI)为4.93。通过功能域在线分析软件SMART分析, 结果表明, 此蛋白的N-端含有一个信号肽, 并含有酰胺酶(amidase)功能域的保守序列(图1A)。酰胺酶是一种可催化酰胺基(CO-NH₂)水解生成羧酸、胺或氨反应的水解酶, 预示此基因对黄酒酵母菌株的生长与代谢可能有重要作用。虽然基因g5170在模式酿酒酵母菌S288c中不存在同源序列, 但酰胺酶保守序列也存在于其他类型酿酒酵母菌, 如日本清酒菌株K7、我国的白酒菌株YJSH1等, 而在其他物种也有相关同源序列, 如*Bacillus subtilis*、*Neurospora crassa*、*Schizosaccharomyces pombe*等^[10]。通过在YPD培养条件下的RNA-Seq表达数据分析发现, 此基因的表达水平与临近已知基因YNR073C、YIR042C等的表达水平相近(图1B), 但其对黄酒酵母菌株的影响还未知, 有待进一步研究。

2.2 构建敲除基因g5170的菌株

本研究采用Cre/loxP基因敲除系统构建黄酒酵母菌株D2的基因敲除菌株。基因敲除实验过程(参见实验方法1.2.2)中各步骤的PCR验证结果如图2所

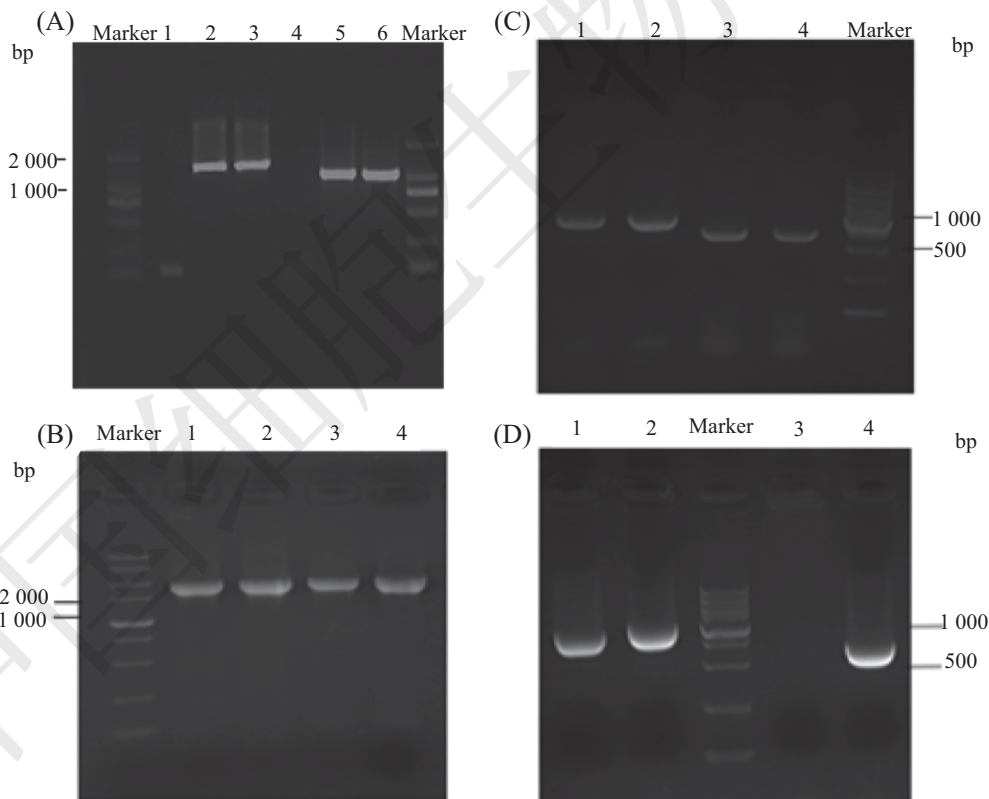


A: 功能域分析, 红色区域为信号肽; B: 基因在基因组中的位置及其相对表达量; 红色ORF为三个可能的新基因, 基因上方为RNA-Seq read的覆盖度。

A: functional domain analysis, the red region is the signal peptide; B: the location of the gene in the genome and its relative expression. The red ORF is three possible new genes, above the gene is the coverage of RNA-Seq read.

图1 黄酒酵母菌株D2的新基因*g5170*序列与基因表达分析

Fig.1 Gene sequence and expression analysis of a novel gene *g5170* from *S. cerevisiae* Chinese wine strain D2



A: 基因*g5170*验证; 泳道1~3引物为*g5169S/g5169A*, 泳道4~6引物为*g5171S/g5171A*; 其中泳道1、4的模板为BY4741, 泳道2、3、5、6的模板为D2。B: 敲除组件构建; 泳道1~2引物为KN1S/KN1A; 泳道3~4引物为KN2S/KN2A; 模板为pUG6。C、D: 阳性克隆子鉴定; 泳道1、2引物为YZS/KA, 泳道3、4引物为KNS/KNA; 模板为阳性克隆。

A: gene *g5170* validation; lane 1-3: primers are *g5169S/g5169A*, lane 4-6: primers are *g5171S/g5171A*, the template of lane 1 and 4 are BY4741, the template of lane 2-6 is D2. B: construction of knockout module; lane 1-2: primers are KN1S/KN1A, lane 3-4: primers are KN2S/KN2A, template is pUG6. C-D: positive clones; lane 1-2: primers are YZS/KA; lane 3-4: primers are KNS/KNA, template is positive clone.

图2 基因敲除PCR验证

Fig.2 The verification of gene knockout by PCR

示。图2B是基因 $g5170$ 及其另一拷贝基因 $g5170^*$ 基因敲除组件的构建。以KN1S/KN1A和KN2S/KN2A为引物, 进行PCR获得带有2个 $loxP$ 位点和 kan^r 筛选标记基因片段的两个敲除组件KN1与KN2, 电泳结果表明, 条带大小与理论预计(1 616 bp)一致。

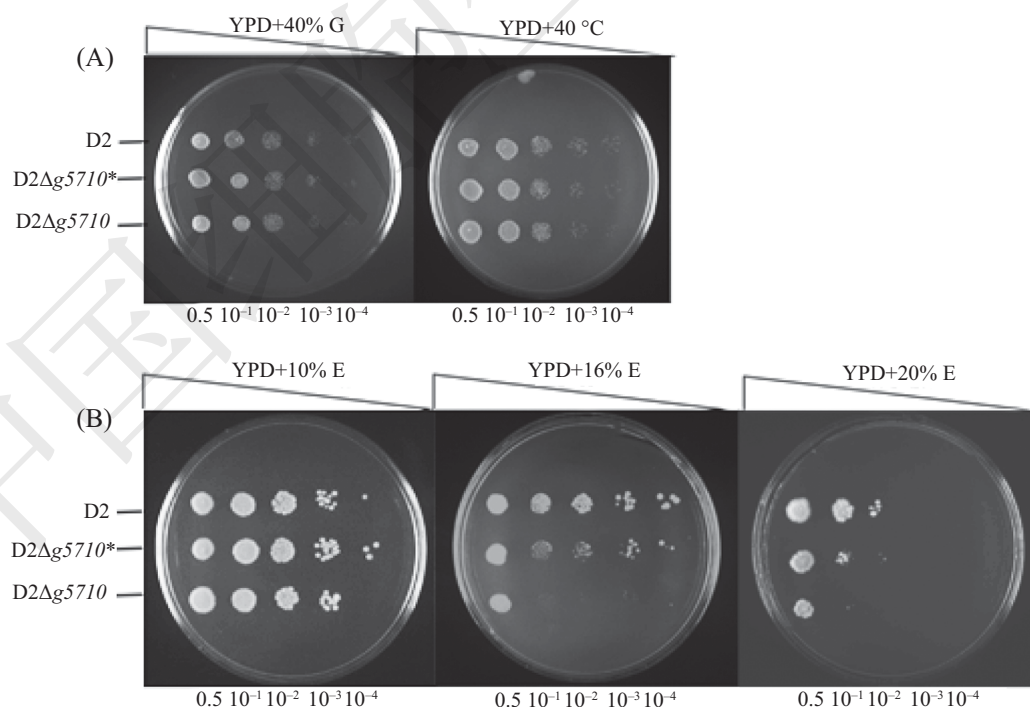
采用LiAc/SS Carrier DNA/PEG高效酵母转化法^[12]将敲除组件KN1导入受体酵母D2后, 利用G418抗性筛选阳性克隆子, 然后进行PCR验证。图2C是阳性克隆子验证的结果。泳道1、2是以YZS和KA为引物进行PCR, 大小与预期847 bp大小一致, 说明敲除组件KN1已经发生了正确的同源重组。然而以设计在新基因内部的引物KNS和KNA基因PCR仍然显示条带且大小与预期(668 bp)相同, 说明阳性克隆子中还存在一个拷贝的新基因 $g5170$ 。

为了敲除另一拷贝, 必须进行第二次敲除。进行第二次敲除之前, 先将质粒pSH65质粒转入阳性克隆子中, 质粒pSH65在YPG培养基中半乳糖的诱导下会产生Cre重组酶, 切除敲除组件KN1方向相同的2个 $loxP$ 位点间的序列, 留下1个 $loxP$ 位点。通过平板影印法, G418、zeocin抗性平板筛选G418抗性丢失zeocin抗性存在的菌株, 然后在YPD培养基

连续传代丢失质粒pSH65, 获得zeocin抗性丢失的菌株D2 $\Delta g5170^*$ 。再以D2 $\Delta g5170^*$ 为出发菌株, 将另一拷贝基因敲除组件KN2导入, 阳性克隆子的验证结果如图2D所示: 泳道1、2是以YZS和KA为引物进行PCR, 大小与预期847 bp大小一致, 说明敲除组件KN2已经发生了正确的同源重组; 泳道3、4是以KNS和KNA为引物进行PCR, 泳道3不存在条带, 说明该转化子两个拷贝的 $g5170$ 基因都已经成功敲除, 泳道4存在条带, 说明该转化子没有敲除成功。最终挑取阳性克隆子3作为出发菌株, 导入质粒pSH65重复第一次抗性切除过程, 得到新基因缺失的目的菌株D2 $\Delta g5170$, 用于后续新基因功能的研究。

2.3 敲除基因 $g5170$ 的酵母菌株在不同胁迫条件下的生长实验

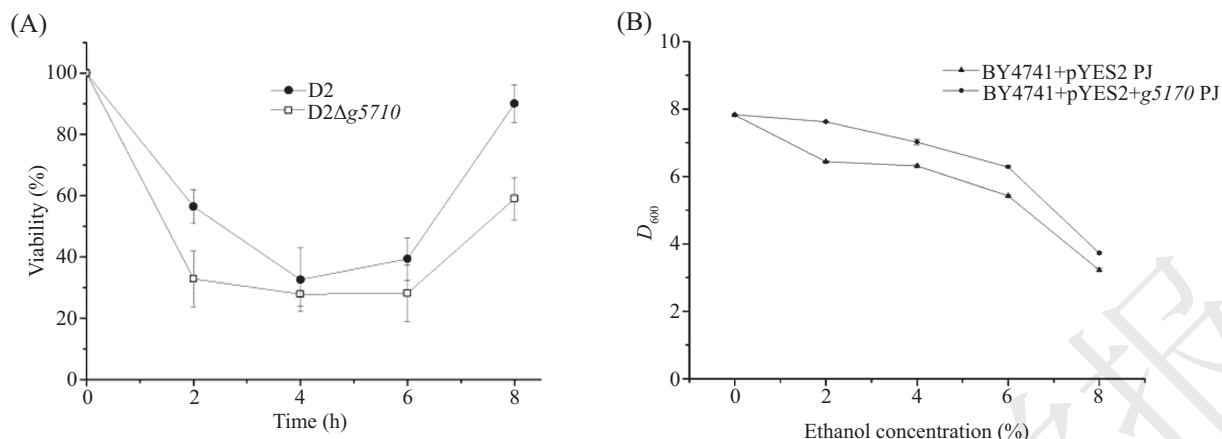
采用平板梯度生长实验, 研究黄酒酵母菌株 $g5170$ 基因敲除对不同环境胁迫耐受性的影响。三株菌株(原始菌株D2, 单拷贝 $g5170$ 基因敲除菌株D2 $\Delta g5170^*$ 与双拷贝 $g5170$ 基因敲除菌株D2 $\Delta g5170$)在高糖环境和高温环境具有相同的敏感性(图3A), 表示新基因 $g5170$ 对高温和高糖环境的耐受性没有作用。图3B是三株菌株在不同酒精浓度环境下的生



A: 高糖浓度与高温环境; B: 不同的乙醇浓度环境胁迫条件。10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴分别表示在初始菌液浓度 D_{600} 值为0.5的前提下稀释的倍数指数。
A: high sugar concentration and high temperature environment; B: different ethanol concentration environmental stress conditions. 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, respectively, represents the serial dilution index from the initial concentration of broth concentration D_{600} value of 0.5.

图3 基因敲除菌株和原始菌株在不同环境条件下的耐受性

Fig.3 Tolerance of gene knockout and original strains under different environmental conditions



A: 基因敲除菌株在10%(v/v)乙醇处理后菌株存活率比较; B: 过表达重组菌株在不同酒精度的初始环境下的生长情况比较。

A: comparison of the survival rate of the knockout strains after treatment with 10% (v/v) ethanol; B: comparison of the growth of the overexpressed recombinant strain under the different initial alcohol environment.

图4 基因g5170重组酵母菌株在不同酒精胁迫下的生长分析

Fig.4 Growth analysis of g5170 recombinant yeast strain under different alcohol stress

长情况,在酒精含量为10%时,三株菌株表现出相同的生长状况,当酒精浓度在16%及以上时,三株菌株表现出很大的差别,原始菌株D2比g5170基因敲除菌株对乙醇的耐受性高,基因g5170两个拷贝都敲除的D2Δg5170菌株耐受性最弱。

为验证基因敲除菌株对乙醇胁迫耐受性的影响,进一步比较基因敲除菌株与原始菌株在10%乙醇作用不同时间后的存活率(图4A)。在乙醇处理2、4、6、8 h后,基因敲除菌株相对原始菌株的存活率都降低了1.160~1.710倍。两菌株存活率数据的统计分析表明,两菌株的总体存活率有显著的统计差异(双尾t检验 $p=1.29e-4$),说明基因g5170确实与菌株的乙醇耐受性有关联。

2.4 过表达基因g5170的酵母重组子的酒精耐受性

为进一步验证基因g5170与酵母菌株的乙醇耐受性有关联,本研究构建了基因g5170的过表达重组酵母菌株(方法1.2.3),并对过表达基因重组酵母菌在不同酒精浓度环境下的生长情况做了比对研究。SD+AA+URA液体培养基平行培养BY4741+pYES2与BY4741+pYES2+g5170菌株,由图4B可以看出在不同初始酒精浓度环境下培养48 h后,BY4741-pYES2+g5170菌株的生长情况都比BY4741+pYES2菌株好,说明前者在酒精环境下生长情况比后者强,进一步验证了g5170影响酵母菌株的乙醇耐受性。

2.5 基因g5170敲除菌株的生长速率测定及黄酒发酵实验

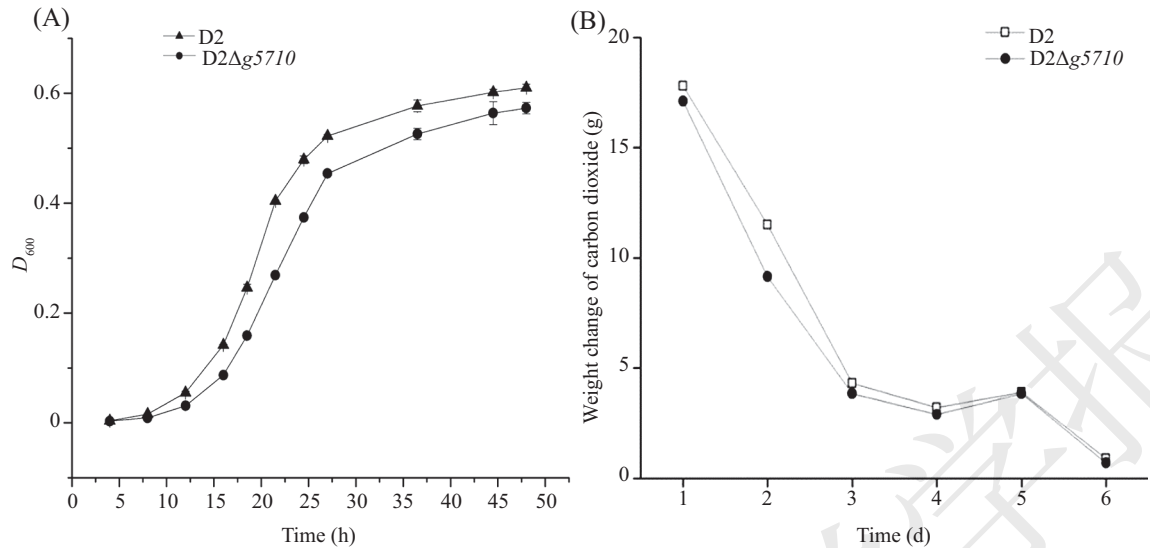
YPD液体培养基平行培养D2和D2Δg5170菌株,

并绘制生长曲线(图5A)。从图中可以看出,在0~8 h, D2Δg5170和D2生长速度基本相同,进入指数期后D2Δg5170生长速率下降, D2生长速率上升。随着培养基成分的消耗及酒精含量的增加,在达到稳定期后, D2Δg5170和D2的生长速度变慢,但是D2仍然保持生长优势。因此,菌株生长曲线比较结果表明, D2Δg5170相比D2可能对高浓度酒精环境的耐受性能有所降低。

为进一步研究基因敲除菌株对发酵黄酒品质的影响,我们检测了基因敲除菌株和原始菌株在模拟黄酒发酵条件下发酵过程的理化指标。从CO₂失重情况看(图5B),两菌株发酵过程在前酵阶段的前3天, D2的发酵稍微比D2Δg5170快,但之后趋势相同,说明虽然D2Δg5170对黄酒发酵环境的应激反应比D2稍慢,前期发酵能力有所下降,但后期发酵能力基本相同。黄酒发酵结束后,各种指标测定结果如表3所示。两菌株所产黄酒的各理化指标没有很大的差别,特别是底物总糖、产物酒精、氨基酸态氮含量等基本相同。然而,菌株D2Δg5170较原始菌株D2的尿素产量降低,说明g5170基因敲除菌株能降低有害物质氨基甲酸乙酯(EC)的前体尿素的含量,有助于工业化发酵生产优质黄酒产品。

3 讨论

黄酒酵母菌株D2是一株具有较高抗逆性能的菌株,能够在高浓度糖与乙醇条件下达到较高的乙醇发酵效率^[3]。通过对此株黄酒酵母菌株的基因组



A: 在YPD培养基中的生长曲线; B: 模拟黄酒发酵过程中二氧化碳失重情况。
A: growth curve in YPD medium; B: simulated carbon dioxide weight loss in rice wine fermentation process.

图5 菌株D2和D2Δg5170的生长及发酵曲线
Fig.5 Growth and fermentation curves of strain D2 and D2Δg5170

表3 各菌株发酵结束后的理化指标
Table 3 Physical and chemical indexes of each strain after fermentation

菌株 Strains	总糖(g/L) Total sugar (g/L)	总酸(g/L) Total acid (g/L)	氨基氮(g/L) Amino acid nitrogen (g/L)	乙醇浓度(g/L) Alcohol content (g/L)	尿素(g/L) Urea (mmol/L)
D2	0.218±0.011	2.265±0.113	0.455±0.009	132.000±0.350	0.319±0.016
D2Δg5170	0.242±0.012	2.693±0.134	0.445±0.006	135.000±0.002	0.291±0.015

测序与基因注释发现, 黄酒酵母基因组中含有一个潜在的新基因g5170^[8]。为研究此基因的生物功能, 本研究利用Cre/loxP系统基因敲除方法, 成功构建了基因敲除菌株D2Δg5170。Cre/loxP基因敲除系统可以重复利用抗性标记基因, 解决了工业酿酒酵母缺少有效筛选标记的问题, 已被广泛应用于酿酒酵母的基因功能验证^[9,11]。敲除基因(Δg5170)对黄酒酵母菌株耐受不同环境胁迫条件的实验结果表明, 基因缺失菌株对乙醇的耐受性能显著降低, 而对高糖浓度、温度等胁迫的耐受性能没有受到影响。过表达g5170的重组菌株对乙醇的耐受性明显比对照菌株强, 表明此基因可能与黄酒酵母的乙醇胁迫耐受性有关, 但其如何提高菌株乙醇耐受性的具体机制还有待进一步研究。

近年来的研究表明, 酵母菌对环境胁迫的耐受性能与其乙醇产量密切相关^[13-14]。理解酵母菌对乙醇耐受的分子机理将有助于通过系统生物学、代谢工程等方法提高酵母菌乙醇发酵效率, 如Alper等^[15]

对转录调控因子Spt15进行突变, 获得乙醇耐受性显著提高的突变体, 从而提高乙醇产量。由于酵母菌的乙醇耐受性能受复杂基因调控网络的精细调节^[14], 虽然基因芯片、基因敲除等技术已被广泛应用于鉴定乙醇耐受相关基因, 仍有许多未知乙醇耐受基因有待挖掘。值得注意的是, 研究表明, 通过比较不同表型的近缘菌株是鉴定特定表型有关基因的有效方法^[16], 而高通量测序技术的发展使在基因组水平上研究不同生物表型差异的分子机制成为可能。黄酒酵母长期适应我国传统黄酒酿造环境, 具有较高的耐乙醇性能。本研究通过比较黄酒酵母与实验室模式酵母菌株的基因组差异, 鉴定了一个与乙醇耐受相关的新基因g5170, 进一步研究此基因的功能将有助于揭示黄酒酵母的乙醇耐受机制, 提高乙醇发酵效率与酿酒业的酿造水平。

参考文献 (References)

1 Goffeau A, Barrel BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann

- H, *et al.* Life with 6000 Genes. *Science* 1996; 274(5287): 546-67.
- 2 Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31(5): 535-69.
- 3 杨鲁君, 蒋予箭, 李余动. 黄酒酵母优良抗逆菌株的筛选、鉴定及发酵特性研究. *中国食品学报*(Yang Lujun, Jiang Yujian, Li Yudong. Screening, identification and fermentation characteristics of an excellent resistant strain of rice wine yeast. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*) 2013; 13(9): 71-7.
- 4 Querol A, Fernández-Espinar MT, del Olmo M lí, Barrio E. Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol* 2003; 86(1): 3-10.
- 5 Akao T, Yashiro I, Hosoyama A, Kitagaki H, Horikawa H, Watanabe D, *et al.* Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. *DNA Res* 2011; 18(6): 423-34.
- 6 Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 2009; 458(7236): 337-341.
- 7 张晓阳, 李余动, 吴雪昌. 酿酒酵母的“组学”技术研究进展及其在工程菌株构建中的应用. *中国生物技术杂志*(Zhang Xiaoyang, Li Yudong, Wu Xuechang. Research progress of "omics" technology and its application in construction of engineering strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *China Biotechnology*) 2011; 31(8): 139-44.
- 8 Li Y, Zhang W, Zheng D, Zhou Z, Yu W, Zhang L. *et al.* Genomic evolution of *Saccharomyces cerevisiae* under Chinese rice wine fermentation. *Genome Biol Evol* 2014; 6(9): 2516-26.
- 9 Delneri D, Tomlin GC, Wixon JL, Hutter A, Sefton M, Louis EJ, *et al.* Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-lox P system. *Gene* 2000; 252(1): 127-35.
- 10 Yoshida S, Hashimoto K, Tanaka-Kanai K, Yoshimoto H, Kobayashi O. Identification and characterization of amidase-homologous AMI1 genes of bottom-fermenting yeast. *Yeast* 2007; 24(12): 1075-84.
- 11 Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2007; 2(1): 38-41.
- 12 林晓华, 柯崇榕, 吴毕莎, 郑永标, 李力, 陈由强, 等. 酿酒酵母SNF4基因敲除缺失菌株的构建. *生物工程学报*(Lin Xiaohua, Ke Songrong, Wu Bisha, Zheng Yongbiao, Li Li, Chen Youqiang, *et al.* Construction of SNF4 gene knockout strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese Journal of Biotechnology*) 2011; 27(4): 572-8.
- 13 Kasavi C, Eraslan S, Arga KY, Oner ET, Kirdar B. A system based network approach to ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol* 2014; 8(1): 90.
- 14 Pais TM, Foulquié-Moreno MR, Hubmann G, Duitama J, Swinnen S, Goovaerts A, *et al.* Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. *PLoS Genet* 2013; 9(6): e1003548.
- 15 Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 2006; 314(5805): 1565-8.
- 16 Borneman AR, Desany BA, Riches D, Affourtit JP, Forgan AH, Pretorius IS, *et al.* Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 2011; 7(2): e1001287.