ARTP 诱变以及基因组重排筛选具有耐高温性能的酿酒酵母

赵宇，刘珊珊，陈叶福，郝爱丽，洪坤强，付肖蒙，王鹏飞，肖冬光

（工业微生物教育部重点实验室，天津市工业微生物重点实验室，天津科技大学生物工程学院，天津 300457）

摘要：在工业生产中，酿酒酵母进行高温发酵具有发酵速度快、发酵周期短、发酵原料黏度低、生产成本少并且更适用于同步糖化发酵工艺等优点，因此，选育耐高温的酿酒酵母菌株在工业应用方面具有重要意义。本研究以从工业菌种中分离出来的酿酒酵母AY12 作为出发菌株，对其进行常压室温等离子体诱变，在 37 ℃下进行初筛，得到 150 株单菌落长势较好的菌株。将其进行产孢、杂交以实现基因组重排，在 37 ℃下进行复筛，得到 137 株生长性能良好的菌株。在 35 ℃玉米水解液中发酵，进行二次复筛，从而获得具有良好发酵性能的 14 株菌株。最后，进行 35 ℃同步糖化发酵，并测定每菌株的乙醇产量和残糖含量。，最终筛选出 7 株具有良好耐高温发酵性能的菌株，其中发酵性能最好的菌株为 L-38，其同步糖化发酵完成后，乙醇产量为 16.20%（*V/V*），较出发菌株 AY12 提升了 8.00%，残糖含量为 35.50 g/L，较 AY12 降低了 32.38%。

关键词：酿酒酵母；ARTP；基因组重排；耐高温

文章篇号：1673-9078(2017)11-37-41 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.006

Screening the *Saccharomyces Cerevisiae* with High Temperature Toleranceby ARTP Mutagenesis and Genome Shuffling

ZHAO Yu, LIU Shan-shan, CHEN Ye-fu, HAO Ai-li, HONG Kun-qiang, FU Xiao-meng, WANG Peng-fei, XIAO Dong-guang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin, Tianjin Industrial Microbiology Key Laboratory, College of Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* has the advantages of fast fermentation speed, short fermentation cycle, low viscosity of fermentation raw materials and low production cost during the high temperature fermentation in industrial production, which is more suitable for simultaneous saccharification fermentation technique. Therefore, *S. cerevisiae* strain with high temperature tolerance is of great significance in the industrial application. In this study, AY12 was used as the starting strain, which was isolated from industrial strains. The strain was mutated by atmospheric and screened at 37 ℃. Then, 150 strains with good colony growth were obtained. By the way, the stains were carried out to achieve genome shuffling by sporulation and hybridization, and 137 strains with good growth performance were obtained by re-screening at 37℃. After fermentation in the corn hydrolysate at 35 ℃, 14 strains were obtained with good fermentation performance. The strains were rescreened by the simultaneous saccharification fermentation at 35 ℃, and the ethanol yield and residual sugar content of each strain were determined. Finally, 7 strains were screened with good tolerance to high temperature fermentation. L-38 was screened as the best fermentation performance strain after the simultaneous saccharification fermentation. Compared with the starting strain AY12, the ethanol yield of L-38 was 16.20% (*V/V*), which increased by 8.00%., and the residual sugar content was 35.50 g/L, which was 32.38% lower than that by AY12.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; ARTP; genome shuffling; high temperature tolerance

ARTP（常压室温等离子体）是进行高效诱变的一种新方法，属于 APNED（常压非平衡放电等离子体）[1]的一种。APNED 是由带电粒子（电子、阴离子和阳离子）、中性粒子（激发的原子或分子）、自由基、光子（可见光和紫外线）以及电磁场组成的，其中各组分的比例因等离子体的放电电压、产生方式以及气源种类的不同而略有差异[2]。ARTP 生物育种技术因其操作便捷性、安全性以及高效性等特点得到了广泛的应用，在微生物育种领域里发挥着重要的作用[3]。

收稿日期：2017-05-27

基金项目：国家重点研发项目（2016YFD0400505）；“十二五”农村领域国家科技计划（2013AA102108）

作者简介：赵宇（1991-），女，在读硕士，研究方向：现代酿造技术

通讯作者：肖冬光（1956-），男，教授，博导，研究方向：现代酿造技术

目前，ARTP 生物育种技术已经成功用于百余种微生物的性能改造，包括细菌、真菌以及微藻等，涉及生产能力、细胞生长速度及耐受性等表型的改变[4~6]。

基因组重排技术是分子定向进化在全基因组水平上的延伸，它将重组对象从单个基因扩展到整个基因组，可以在更广的范围内对菌种的目的性状进行优化组合[7]。在进行基因组重排之前，要先有一个含有不同正突变基因的基因组库。通过经典的诱变育种得到目的性状发生改变的正突变菌株，以构成所需要的基因组库，然后通过原生质体融合的方式使这些正突变菌株的基因得以随机重组，控制筛选条件筛选出目的性状得到进一步改进的菌株群作为下一轮基因组重排的出发菌株。通过多轮的随机重组，即可以快速而高效的选育出性状得到较大改进的杂交菌株。大量的研究表明，经过基因组的重排可以筛选出具有耐盐性、广谱 pH 以及高效利用淀粉水解液的融合菌株[8~10]。

本研究以从工业菌种中分离出来的菌株 AY12 作为出发菌株，对其进行 ARTP 等离子诱变从而增加基因的多样性，然后对诱变后的菌株进行基因组重排，37 ℃条件下对重排菌株进行初筛后，在 35 ℃条件下进行玉米水解液发酵测定其发酵性能，将发酵性能优良的菌株进行 35 ℃同步糖化发酵，以进行二次复筛，最后确定出具有耐高温发酵性能的酿酒酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

工业酿酒酵母 AY12，安琪酵母（伊犁）有限公司。

1.1.2 培养基与溶液

YEPD 培养基：2%葡萄糖，2%蛋白胨，1%酵母浸粉，pH 自然，115 ℃高压蒸汽灭菌 20 min。固体培养基需再添加 2%琼脂粉。

YPK 预产孢培养基：1% KAC，1%酵母浸粉，2%蛋白胨，115 ℃高压蒸汽灭菌 20 min。

高效液体生孢培养基：1% KAC，0.1%酵母浸粉，0.05%葡萄糖，50 mg/L 腺嘌呤，100 mg/L 组氨酸，50 mg/L 尿嘧啶，100 mg/L 色氨酸，100 mg/L 亮氨酸（根据需要可省却特定的氨基酸成分），在 115 ℃条件下灭菌 20 min。

软化缓冲液：10 mmol/L 二硫苏糖醇，100 mmol/L Tris-SO_4，调节 pH 至 9.4。

原生质体缓冲溶液：2.1 mol/L 山梨醇，10 mmol/L 磷酸钾，调节 pH 至 7.2。

0.5% Triton X-100：量取 0.5 mL Triton X-100 溶于少量蒸馏水并定容至 100 mL。

3%蜗牛酶：量取 3 g 蜗牛酶固体粉末溶于少量蒸馏水并定容至 100 mL。

1.1.3 主要试剂

酵母浸粉：北京奥博星生物技术有限公司；胰蛋白胨：北京奥博星生物技术有限公司；乙酸钾：天津市北方化玻购销中心；磷酸钾（分析纯）：天津市凯通化学试剂有限公司；硫酸：天津市化学试剂一厂；尿嘧啶：上海生物工程有限公司；山梨醇：北京泛基诺科技有限公司；二硫苏糖醇：北京泛基诺科技有限公司；玉米粉：市售。

1.2 仪器与设备

台式离心机 T gL-16C：上海安亭科技仪器厂；岛津紫外分光光度计 UVmini-1240：岛津仪器（苏州）有限公司；高压蒸汽灭菌锅：山东新华医疗器械厂；ARTP 等离子体诱变仪 ARTP-II 型：北京思清源生物科技有限公司；1260Infinity 型高效液相色谱仪：美国安捷伦科技公司；UV-5200 型紫外可见分光光度计：上海元析仪器有限公司；SeverEasy 型 pH 计：瑞士梅特勒托利多仪器有限公司。

1.3 分析方法

(1)同步糖化发酵酒精浓度的测定：酒精计法[11]。

(2)还原糖的测定：斐林法[12]。

(3)酿酒酵母玉米水解液发酵参数的测定：高效液相色谱法[13]。

(4)生长曲线的测定：全自动生长曲线测定仪[14]。

1.4 实验内容

1.4.1 酿酒酵母菌株 AY12-G 的 ARTP 诱变处理

取一环菌泥接入 5 mL YEPD 液体培养基中，30 ℃，180 r/min 的摇床培养 12 h 后，取菌液 500 μL 至 5 mL 新鲜的 YEPD 液体培养基中，30 ℃，180 r/min 的摇床培养 4~6 h。取适量上述菌液用生理盐水稀释 1000 倍，取 10 μL 稀释后的菌液点于 ARTP 诱变载片上进行诱变处理，处理时间分别为 20 s、30 s、40 s、50 s、60 s 和 70 s。诱变处理完成后，将处理后的载片置于加有 1 mL 无菌生理盐水的 2 mL 离心管中，漩涡震荡仪剧烈震荡 3 min，取震荡后的菌液涂布于 YEPD 平板，置于 30 ℃恒温培养箱中进行培养。绘制第一轮致死曲线，取死亡率≥60%至 100%的时间段，进行下一轮致死曲线的测定，循环数次，直至选择出合适

的诱变时间。

根据绘制出来的致死曲线选取合适的诱变时间按照上述步骤对出发菌株进行 ARTP 诱变。

1.4.2 突变菌株的基因组重排

取活化后的突变菌株，接种量 10%（*V/V*），接种于 5 mL 的 YEPD 液体培养基中，在 30 ℃，180 r/min 条件下培养约 11 h 至对数期，5000 r/min 离心 30 s 去上清收集菌体，用无菌水洗涤三次后，接种于 50 mL YPK 预产孢培养基中，28 ℃，180 r/min 条件下培养 12 h，5000 r/min 离心 30 s 去上清收集菌体，无菌水洗涤三次后，将菌体重悬于 50 mL 的高效液体生孢培养基中，28 ℃，180 r/min 条件下培养 5 d。5000 r/min 离心 30 s 去上清收集生孢后的细胞，用软化缓冲液重悬细胞使其最终浓度为 5 OD_{600}/mL，30 ℃条件下培养 10 min 后，5000 r/min 离心 30 s 去上清收集菌体，用原生质体缓冲溶液重悬细胞使其最终浓度为 25 OD_{600}/mL，加入浓度为 3%的蜗牛酶使其最终浓度为 0.5 mg/OD_{600}，30 ℃条件下反应 30 min 后，5000 r/min 离心 30 s 去上清收集菌体，用等量的 0.5%（*V/V*）的 Triton X-100 洗涤一次后，再用 0.5%（*V/V*）的 Triton X-100 重悬使孢子反应液为总体积的 1/4，用超声波震荡该体系，使子囊壁充分破裂释放出孢子，期间不断观察破壁效率，待视野中无二倍体细胞时，终止超声破碎，用无菌水洗涤三次后，重悬于 0.5%（*V/V*）的 Triton X-100 中并将其 4 ℃进行保存。将保存在 Triton X-100 中的孢子用无菌水洗涤三次后重新接入 100 mL YEPD 液体培养基中，30 ℃，100 r/min 条件下培养 24 h 使孢子进行充分接合形成二倍体菌株，将所得菌液涂布于YEPD平板上在37 ℃下培养24 h进行初筛。选出长势好的菌落进行玉米水解液发酵进行复筛，选出乙醇产量较高的菌株进行同步糖化发酵验证，最终选出耐高温性能好的重排菌株。

1.4.3 数据统计分析

对实验过程中所得到的数据进行统计分析，本文均采用的统计量为标准差[15]。标准差是指样本测量值与其算数平均数离差平方的算术平均数的平方根，用公式表示为：

$$\sigma=\sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i-\mu)^2}$$

公式中数值 x_1，x_2，x_3，.....x_N(皆为实数)，其平均值(算术平均值)为 μ，标准差为 σ。

2 结果与讨论

2.1 酿酒酵母菌株 AY12 的 ARTP 诱变结果

对酿酒酵母进行 ARTP 诱变时，一般使用对数中后期的菌进行诱变，由于此时菌株活力高，繁殖旺盛且易发生突变。为了确定菌株 AY12 对数中后期的位置，测定并绘制了 AY12 的生长曲线见图 1。由图可以看出应该对培养 4~6 h 的酵母细胞进行诱变处理。

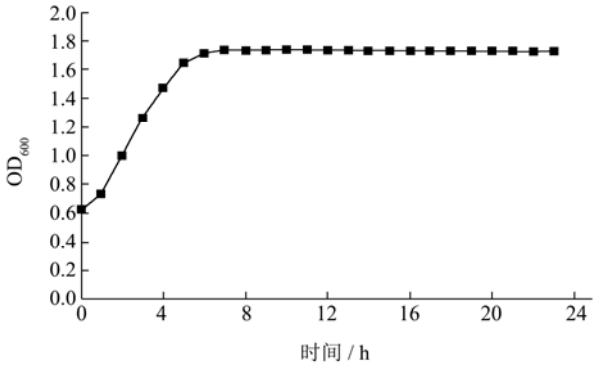


图 1 AY12 的生长曲线

Fig.1 The growth curve of AY12

诱变的致死率约为 80%时，筛选到正向突变菌株的可能性最大，对出发菌株 AY12 进行诱变处理，并绘制致死率曲线见图 2。对 AY12 进行诱变处理后，突变细胞数量比较少且容易发生回复突变，因此将诱变后的菌液接入 YEPD 液体培养基中，在 30 ℃，180 r/min 的条件下进行一段时间的稳定培养，扩大突变细胞的数量并使突变具有稳定遗传能力。将经过培养后的菌液稀释涂布到 YEPD 平板上，置于 37 ℃恒温培养箱内培养 24 h，从平板上选取较大的菌落进行保存，共筛选出突变菌株 150 株。

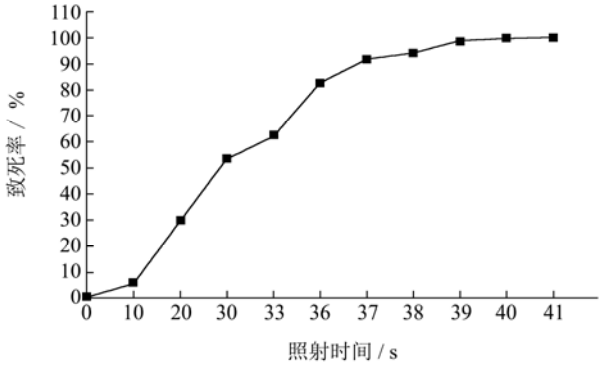


图 2 AY12 的致死率曲线

Fig.2 The death rate curve of AY12

2.2 突变菌株进行基因组重排筛选耐高温菌株

将 ARTP 诱变后筛选出来的 150 株菌进行基因组重排，以进一步提高菌株的耐高温性能。对突变菌株进行产孢以、孢子纯化以及接合，将得到细胞涂布于 YEPD 平板上，置于 37 ℃培养箱内培养 24 h，从平板上选取较大的菌落保存并进行复筛，共筛得 137 株突变株。采用 35 ℃玉米水解液发酵对 137 株突变株进行二次复筛，发酵结束后乙醇含量和残糖含量的部分结果见图 3 和图 4。

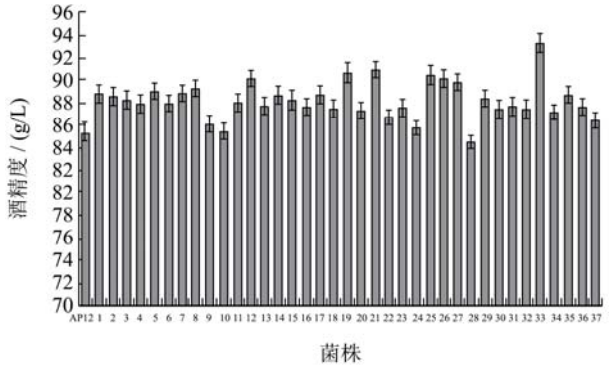


图 3 重排菌株玉米水解液发酵乙醇含量

Fig.3 The ethanol content of genome shuffling strains by corn hydrolysate fermentation

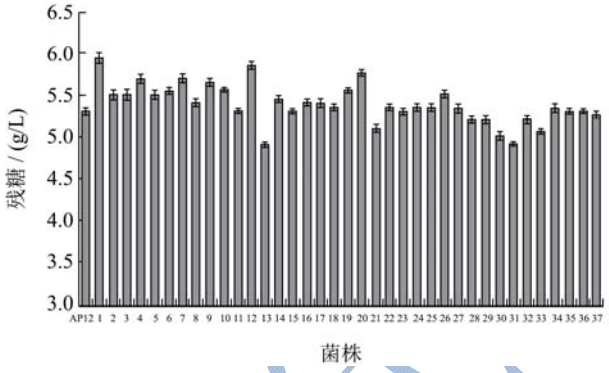


图 4 重排菌株玉米水解液发酵残糖含量

Fig. 4 The residual sugar content of genome shuffling strains by corn hydrolysate fermentation

由图可知，在进行玉米水解液发酵的 137 株菌中，共有 14 株菌的乙醇产量较出发菌株有 10%~14%的提升，残糖含量较出发菌株有小幅度的下降，即综合发酵性能较出发菌株有所提升。

将这 14 株菌命名为 L-X 并按照同步糖化发酵工艺，主发酵温度为 35 ℃进行发酵实验，并测定每菌株的乙醇产量和残糖含量见图 5 和图 6。

综合乙醇产量的提升和残糖含量的降低，从 14 株菌中选出 7 株发酵性能比较好的菌株作为后续高温驯化实验的出发菌株。这 7 株菌分别为 L-19、L-25、L-26、L-38、L-90、L-122 和 L-130，其中发酵性能最好的菌株为 L-38，其同步糖化发酵完成后，乙醇产量为 16.20%(*V*/*V*)，较出发菌株 AY12 的乙醇产量提升了 8.00%，残糖含量为 35.50 g/L，较 AY12 的残糖含量降低了 32.38%。

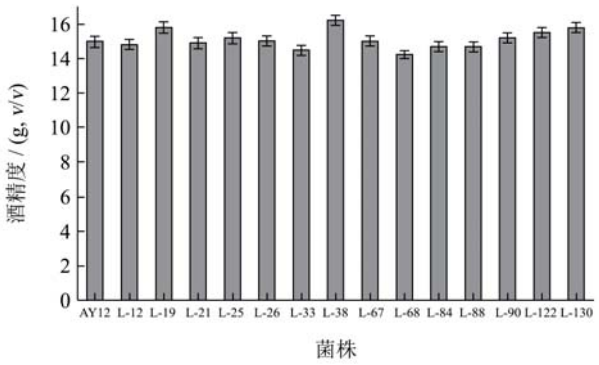


图 5 重排菌株同步糖化发酵乙醇含量

Fig.5 The ethanol content of genome shuffling strains by simultaneous saccharification fermentation

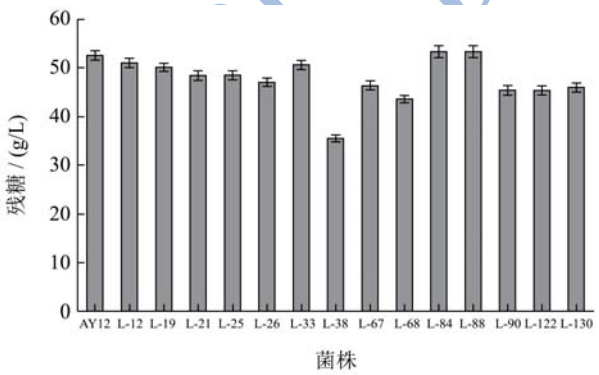


图 6 重排菌株同步糖化发酵残糖含量

Fig.6 The residual sugar content of genome shuffling strains by simultaneous saccharification fermentation

3 结论

在本研究中，我们对出发菌株 AY12 进行 ARTP 诱变以及基因组重排，目的是为了获得具有更好耐高温性能以及更适于进行同步糖化发酵的酿酒酵母菌株。由于 ARTP 诱变对生物的遗传物质损伤效果明显、损伤机制丰富，尤其是对于染色体等真核生物的遗传物质均有很强的损伤效果[16]，与传统的诱变方法相比，采用 ARTP 能够有效造成 DNA 多样性的损伤，突变率高，并易获得遗传稳定性良好的突变株，因此可以用来构建基因组重排之前需要的原始突变文库。通过乙醇产量以及残糖的含量结果，最终筛选出 L-38 为具有良好的耐高温性能菌株，较出发菌株 AY12 的乙醇产量提升了 8.00%，残糖含量降低了 32.38%。

参考文献

[1] Haertel B, Von Woedtk E T, Weltman N K, et al. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing [J]. Biomolecules & Therapeutics, 2014, 22(6):

477-490

[2] Nehra V, Kumar A, Dwivedi H K. Atmospheric non-thermal plasma sources [J]. International Journal of Engineering, 2008, 2(1): 53-68

[3] Zhang X, Zhang X F, Li H P, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396

[4] 韩蕊,燕瑾,赵利维,等.高产青霉素酰化酶巨大芽胞杆菌的诱变选育及产酶条件优化[J].微生物学通报,2015,42(9): 1762-1769
HAN Rui, YAN Jin, ZHAO Li-wei, et al. Breeding penicillin acylase from bacillus megaterium and optimization of enzyme production conditions [J]. Microbiology, 2015, 42(9): 1762-1769

[5] 范新蕾,肖成建,顾秋亚,等.ARTP 诱变选育葡萄糖氧化酶高产菌株及发酵条件优化[J].工业微生物,2015,1:15-19
FAN Xin-lei, XIAO Cheng-jian, GU Qiu-ya, et al. ARTP mutation breeding of glucose oxidase high-yield strain and optimization of fermentation conditions [J]. Industrial Microorganisms, 2015, 1: 15-19

[6] 薛刚,陈利娟,吴斌,等.ARTP 诱变选育高温蛋白酶高产菌株及其酶学性质研究[J].食品工业科技,2015,1:177-180
XUE Gang, CHEN Li-juan, WU Bin, et al. Breeding of high protease producing strains and their enzymatic properties by ARTP mutagenesis [J]. Food Science and Technology, 2015, 1: 177-180

[7] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(7): 666-668

[8] Cao Xiaohong, Hou Lihua, Lu Meifang, et al. Genome shuffling of *Zygosaccharomyces* rouxii to accelerate and enhance the flavour formation of soy sauce [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(2): 281-285

[9] Cao Xiao-hong, Hou Li-hua, Lu Mei-fang, et al. Improvement of soy-sauce flavour by genome shuffling in Candia versatilis to improve salt stress resistance [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45: 17-22

[10] Kang Jian-xiong, Chen Xi-juan, Chen Wun-ran, et al. Enhanced production of pullulan in *Aureobasidium* pullulans by a new process of genome shuffling [J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 792-795

[11] 牟建楼,王颉,张伟,等.乙醇的测定方法综述[J].酿酒,2006, 33(2):46-48
MU Jian-lou, WANG Jie, ZHANG Wei, et al. Methods for determination of alcohol [J]. Liquor Making, 2006, 33(2): 46-48

[12] 杨林娥,彭晓光,杨庆文,等.斐林试剂法测定还原糖方法的改进[J].中国酿造,2010,29(5):160-161
YANG Lin-e, PENG Xiao-guang, YANG Qing-wen, et al. Determination of reducing sugar improved method of Fehling reagent [J]. China Brewing, 2010, 29(5): 160-161

[13] 黄文连,陈叶福,付更新,等.*Spathaspora passalidarum* 突变株 U-30 木糖乙醇发酵条件研究[J].酿酒科技,2015,11:50
HUANG Wen-lian, CHEN Ye-fu, FU Geng-xin, et al. Xylose-ethanol fermentation conditions for *Spathaspora Passalidarum* Mutant U-30 [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 11: 50

[14] 郑梦林,刘明芹,闵婷.不同保鲜剂对冷鲜鸭肉中肠杆菌抑菌特性研究[J].食品科技,2015,6:142-146
ZHENG Meng-lin, LIU Ming-qin, MIN ting. Study on antibacterial properties of different fresh-keeping agents against midgut of cold and fresh duck [J]. Food Science and Technology, 2015, 6: 142-146

[15] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学(第二版)[M].北京:科学出版社,2000
LI Chun-xi, WANG Zhi-he, WANG Wen-lin. Biostatistics (second edition) [M]. Beijing: Science Press, 2000

[16] Zhang X, Zhang C, Zhou Q Q, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room temperature plasm(ARTP) and conventional mutagenesis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5639-5646