

转录因子 *MSN2* 基因过表达对酿酒酵母耐受性的影响

李潇, 董胜胜, 付肖蒙, 王鹏飞, 董健

(天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要: cAMP 信号通路在调控酵母细胞代谢、增殖、分化及压力抗性的获得过程中具有重要的作用。工业应用中对酵母的耐受性有很高的要求, 在发酵过程中, 胁迫环境如高温、高渗透压、营养饥饿和高浓度酒精毒性等不可避免, 故而提高酵母菌种的耐受性, 可以提高菌种的发酵性能, 降低发酵过程中的能量消耗。本文构建的突变株在工业应用方面具有重要的意义。以实验室现有菌种 AY12a 为出发菌株, *URA3* 基因作筛选标记, 利用胞内重组, 在 *MSN2* 基因的 N 端加上强启动子 *PGK1_p* 以实现基因的过表达, 最终通过 PCR 验证, 成功构建突变株 AY12a-*msn2*。对酵母进行耐受性的测定, 发现 AY12a-*msn2* 不具有的耐高温性能。同时将突变株与 AY12a 进行玉米高温浓醪发酵, 并测定发酵完成后的酒度、残糖、48 h 细胞存活率、CO₂ 失重及发酵时间。结果发现突变株 AY12a-*msn2* 酒度下降, 残糖含量上升, 48 h 细胞存活率上升, 发酵时间较长。

关键词: 酿酒酵母; cAMP 信号通路; 基因过表达; 耐受性; 乙醇

文章编号: 1673-9078(2018)09-95-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.015

Investigation on Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* of Overexpression of Transcription Factor *MSN2* Gene

LI Xiao, DONG Sheng-sheng, FU Xiao-meng, WANG Peng-fei, DONG Jian

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

Abstract: For the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the cAMP signal transduction pathway plays an important role in the control of metabolism, proliferation, differentiation and acquisition of stress resistance. During the fermentation process, stress environments such as high temperature, high osmotic pressure, nutrient starvation, high alcohol toxicity, etc. are unavoidable. There is a high requirement for yeast tolerance in industrial applications. It can increase the fermentation performance of strains and reduce the energy consumption during fermentation. The constructed mutant has great significance in industrial application. Based on the existing strain AY12a in the laboratory, the strong promoter *PGK1_p* was added to the N-terminus of *MSN2* gene to achieve overexpression of the gene by using the intracellular recombination method, using *URA3* gene as the screening marker. The mutant AY12a-*msn2* was successfully constructed by PCR verification. The results showed that the mutant had no temperature tolerance. The mutant and AY12a were tested for very high gravity (VHG) fermentation, and the alcohol content, residual sugar, 48 h cell survival rate, CO₂ weight loss and fermentation time were determined. The results showed that the alcohol content decrease, the residual sugar content and the survival rate of 48 h cells increased. The mutant had longer fermentation time.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; camp signal pathway; overexpression gene; stress-tolerance; ethanol

酵母多数普遍存在于富含糖类的环境中, 例如水果(苹果、葡萄和桃子等)、蔬菜、花蜜和植物分泌物(如仙人掌的汁液)中, 以及果园和部分富含石油的土壤中。目前最常见且应用最为广泛的酵母菌种当属

收稿日期: 2018-03-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016 YFD0400505); 中国国家自然科学基金项目(31471724)

作者简介: 李潇(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 真核细胞信号转导理论研究

通讯作者: 董健(1980-), 女, 博士, 副教授, 博士后, 研究方向: 酿造酒(白酒、啤酒)用酵母育种与真核细胞信号转导理论研究

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

Ras-cAMP 信号通路对酵母细胞的胁迫抗性具有很大的调节作用, *MSN2* 基因属于 Ras-cAMP 信号通路中的压力调控因子, Ras-cAMP 信号通路活性的提高就会抑制一些与压力响应元件相关基因的表达, 其中转录因子 *MSN2* 对压力响应元件相关的一些基因的表达是必须的, 是 Ras-cAMP 信号通路抑制压力响应相关基因表达的靶标^[1]。

MSN2 是锌指蛋白, 在对温度敏感型 *snf1* 突变株多拷贝抑制物进行分离的过程中得到 *MSN2* 基因^[2]。*Msn2p* 和 *Msn4p* 这两个反式作用元件在 STRE 介导的

基因表达方面发挥作用。转录因子 *Msn2p* 及其同系物 *Msn4p* 与 STRE 结合, 在营养饥饿、热休克、氧化应激、DNA 损伤和渗透休克似乎介导基因激活^[3]。当 *MSN4* 过量表达时可以像 *MSN2* 一样抑制突变 *snf1* 的热敏性^[4]。*MSN2* 和 *MSN4* 在压力条件下调节大约 200 个基因的表达。这两个蛋白有 41% 的一致性, 在大小和氨基酸序列上很相似, 虽然这两个基因的单缺失菌株没有明显的表型特征, 但是双缺失的菌株对碳源饥饿、热击、渗透压及氧化压力条件都有超级敏感性, 而过量表达这两个基因能降低对饥饿和热击的敏感度^[5,6]。

以实验室现有菌株 AY12a 为出发菌株, 通过使用胞内同源重组方法过表达 *MSN2* 基因, 具体内容如下:

以实验室菌株 AY12a 为出发菌株, 通过胞内同源重组法, 以 *URA3* 基因作为筛选标记, 将 *PGK1_p* 启动子插入 *MSN2* 基因的 N 端, 经醋酸锂转化, 抗性板 SD 筛选正确转化子, 通过 PCR 验证获得过表达基因的 a 型 (基因型为 AY12a-*msn2*)。从生长性能, 高温、15% (V/V) 乙醇的耐受性、6% NaCl 和 5% 乙酸等指标考察突变株 AY12a-*msn2* 的综合耐受性的改变, 同时将突变株与出发菌株进行玉米高温浓醪发酵实验, 并测定发酵完成后的酒度、残糖、48 h 细胞存活率、CO₂ 失重和发酵时间。比较突变株及亲本菌株的发酵性能, 研究过表达基因对酿酒酵母浓醪发酵性能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验菌株

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AY12a-*msn2*: 本实验室培育; 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AY12a: 本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

酵母浸粉 (生化试剂), 北京奥博星生物技术有限公司; 葡萄糖 (分析纯), 天津市永大化学试剂开发中心; 琼脂粉 (生化试剂), Solarbio 公司; 胰蛋白胨 (生化试剂), 天津市英博生化试剂有限公司; 氯化钠 (分析纯), 天津市北方化玻购销中心; DL5000 DNA Marker (生化试剂), TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒, 宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.3 仪器

台式离心机 T gL-16C, 上海安亭科技仪器厂; Bioscreen C 全自动生长曲线分析仪, 芬兰 Oy Growth Curves Ab 公司; UVmini-1240 岛津紫外分光光度计, 岛津仪器 (苏州) 有限公司。

IS-RDS3 恒温摇床, 上海制成仪器制品有限公司; AB204-S 型分析天平, 梅特勒-托利多仪器上海公司; HS-1300-V 型超净台, 苏州安泰空气技术有限公司; AgilentGC 7890, StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪, Biometra 公司。

1.1.4 主要培养基

(1) YEPD 培养基

葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸粉 1%, pH 自然, 115 °C 灭菌 20 min。

固体培养基需再添加 2% 琼脂粉。

(2) 耐盐培养基 (m/V):

葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸粉 1%, NaCl 6%, 115 °C 灭菌 15 min。

(3) 耐酒精培养基 (m/V):

葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸粉 1%, 115 °C 灭菌 15 min, 待冷却至室温, 加入 15% Vol 的无水乙醇。

(4) 耐乙酸培养基 (m/V):

葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, 115 °C 灭菌 15 min, 待冷却至室温, 加入 5% 的乙酸。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的构建

1.2.1.1 引物的设计与合成

根据 NCBI 中 GenBank 报道的 *S. cerevisiae* S288C 菌株的 *MSN2* 和 *URA3* 基因序列设计 PCR 反应的上下游引物, 用以构建敲除和验证敲除基因的菌株, 同时用以构建过表达和验证过表达基因的菌株。三引物用来验证菌株的单双倍体, 文中所有用到的引物序列如表 1 所示。

1.2.1.2 酵母基因组的提取

取新鲜酵母液体培养物, 离心收集菌体, 提取其基因组 DNA, 作为 PCR 的模板, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.1.3 过表达基因酿酒酵母突变株的构建

本文研究以 *MSN2* 基因作为靶基因, 野生型酿酒酵母工业菌株 AY12a 为亲本菌株, *URA3* 基因为筛选标记, 在 *MSN2* 基因的 N 端加入强启动子 *PGK1_p*, 以实现 *MSN2* 基因的过表达。构建过程示意图如图 1 所示。

表 1 PCR 引物设计

Table 1 PCR primer design

引物名称	序列 (5'-3')	退火温度/°C
MAT-F	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	55
MAT-α	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	55
MAT-a	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	55
MSN2 上同源臂 U	TTTCGCTCTTGGTATCCGTACCTCAC	55
MSN2 上同源臂 D	CCTTATATGTAGCTTTCGACATTTTAGATCTAGTTCTTCTATGAGC	60
MSN2-URA3 U	GCTCATAGAAGAAGACTAGATCTAAAATGTCGAAAGCTACATATAAGG	60
MSN2-URA3 D	CAGTTTTGGATAGATCAGTTAGATTAGTTTTGCTGGCCGCATCTTC	60
MSN2-PGK1p U	GAAGATGCGGCCAGCAAAACTAATCTAACTGATCTATCCAAAAGCTG	60
MSN2-PGK1p D	GAAATCATGGTCGACCGTCATGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG	60
MSN2 下同源臂 U	CTACTTTTTACAACAAATATAAAAACATGACGGTGCACCATGATTTT	60
MSN2 下同源臂 D	TTAAATGTCTCCATGTTTTTTATGAG	55
验证 MSN2 上同源臂-URA3 U	CAATTTCCCCTCTACAGAC	55
验证上同源臂 MSN2-URA3 D	CTAAACCCACACCGGGTGTGTC	55
验证 URA3-PGK1p U (MSN2)	CATGCAAGGGCTCCCTAGC	55
验证 URA3-PGK1p D (MSN2)	GAGCCGTCGCTAGGACCTTG	55
验证 PGK1p-MSN2 U	CGTCACAATTGATCCCTCCC	55
验证 PGK1p-MSN2 D	CAGACTTCCGCCTCCGAAGG	55
Real-Time PCR		
RT-U	ACGATATGCTGCCGAATTC	55
RT-D	TAGTCGCCACTTTCGCAATA	55

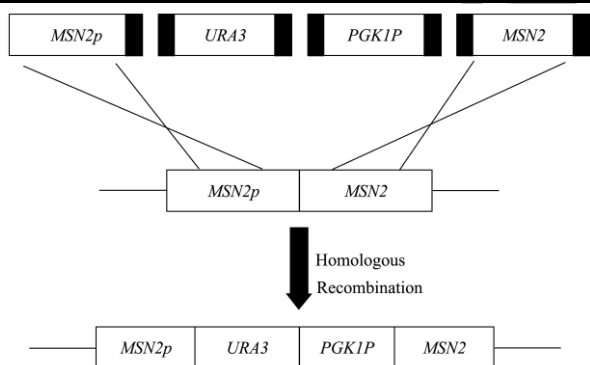


图 1 过表达 MSN2 基因的流程

Fig.1 Overexpression of MSN2 gene flow chart

1.2.1.4 目的片段的扩增

以亲本菌株 AY12a 为模板, 利用引物对 MSN2 上同源臂 U 和 MSN2 上同源臂 D、MSN2-URA3U 和 MSN2-URA3D、MSN2-PGK1pU 和 MSN2-PGK1pD、MSN2 下同源臂 U 和 MSN2 下同源臂 D 进行 PCR 扩增带有部分同源的四个基因片段。

1.2.2 突变株的获得

用酵母醋酸锂转化法^[7]将得到的四个目的基因片段化转入原菌 AY12a 内, 得到过表达后的 AY12a-*msn2* 菌株。

1.2.3 Real-Time PCR

酵母 RNA 的提取及 RNA 的反转录均按照产品说明书进行操作, 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 通过 $\Delta\Delta C(t)$ 值法对目的基因及内参基因 ACT1 进行基因表达量的分析。

1.2.4 突变株 AY12a-*msn2* 耐受性的测定

1.2.4.1 酿酒酵母细胞生长曲线的测定

本实验采用全自动生长曲线测定仪测定 OD₆₀₀ 吸光值, 操作步骤如下:

(1) 挑取斜面菌种 1 环接至 5 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C, 180 r/min 培养 12 h。

(2) 吸取上述培养好的菌液 40 μL 接入装有 360 μL 液体 YEPD 培养基的 100 孔板的孔中, 将 100 孔板置于设定的温度下培养, 以 YEPD 液体培养基为空白对照, 每隔 0.5 h 测定 600 nm 处的吸光值, 以时间为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标, 绘制生长曲线图。

1.2.4.2 酿酒酵母细胞耐受性的测定^[8]

(1) 从斜面挑取一环酵母菌泥, 接入 5 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C, 180 r/min 过夜培养。测 OD₆₀₀ 值, 取适量菌液转接入 5 mL 新鲜 YEPD 液体培养基中, 使其初始 OD₆₀₀ 值为 0.15。

(2) 将上述细胞培养 4~6 h 至生长对数期。测量

OD₆₀₀ 值, 用 YEPD 液体培养基调整所有细胞 OD₆₀₀=1, 以保证所有细胞初始菌体浓度一致。

(3) 移液枪分别移取 100 μL 的菌液于 1.5 mL 离心管中, 实验组做在 55 °C 水浴 4 min 热击处理, 对照组不做任何处理。

(4) 将实验组和对照组分别用无菌水稀释相同的浓度梯度, 按照浓度递减的顺序, 每个稀释度取 2 μL 的菌液整齐的滴于 YEPD 固体培养基平板上, 超净台晾干后, 封口膜封好倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养 1~3 d, 观察菌体的生长, 比较不同菌株的耐热情况。

(5) 移取 2 μL 对照组的菌液整齐的滴于含有 6% NaCl 的 YEPD 培养基平板上, 超净台晾干后, 封口膜封好倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养 1~3 d, 观察菌体生长, 比较不同菌株的耐盐性情况。

(6) 移取 2 μL 对照组的菌液整齐的滴于含有 15% (V/V) 的乙醇的 YEPD 培养基平板上, 超净台晾干后, 封口膜封好倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养 1~3 d, 观察菌体生长, 比较不同菌株的耐乙醇情况。

(7) 移取 2 μL 对照组的菌液整齐的滴于含有 5% (V/V) 的乙酸的 YEPD 培养基平板上, 超净台晾干后, 封口膜封好倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养 1~3 d, 观察菌体生长, 比较不同菌株的耐乙酸性情况。

1.2.4.3 高温浓醪酒精发酵酒精浓度的测定

利用酒精比重计 (标温 20 °C) 来对酒精产量进行测定。

准确量取 100 mL 发酵液加入 1 L 蒸馏瓶中, 加入 100 mL 蒸馏水后放置于蒸馏装置上进行蒸馏, 保持冷却水开启, 用 100 mL 容量瓶收集馏出液, 定容至 100 mL, 混匀后将其倒入 100 mL 量筒中, 用酒精计 (标温 20 °C) 测酒精度, 同时测量温度, 最后换算成 20 °C 时的酒精度。

1.2.4.4 还原糖的测定

使用斐林试剂法^[9]对发酵完成后的还原糖进行测定。

(1) 斐林试剂的标定

吸取斐林试剂甲、乙液各 5 mL, 置于 250 mL 三角瓶中, 准确加入 20 mL 空白液 (蒸馏水), 并用滴定管预先加入适量的 0.1% 标准葡萄糖溶液, 使后面滴定时消耗标准葡萄糖溶液的量控制在 1 mL 以内, 摇匀。待加热至沸腾后, 立即用 0.1% 标准葡萄糖溶液滴定至蓝色消失, 此滴定操作需在 1 min 内完成, 记下滴定葡萄糖溶液的体积 V_0 。

(2) 预实验

同上吸取斐林试剂甲、乙液各 5 mL, 20 mL 自来水, 置入 250 mL 三角瓶中, 加入体积为 V_1 mL 试样

稀释液和适量的 0.1% 标准葡萄糖溶液, 摇匀后滴定, 以下同标定时操作, 总耗糖量为 V_2 mL。

(3) 正式测定

吸取斐林试剂甲乙液各 5 mL, 20 mL 自来水, 置于 250 mL 三角瓶中, 加入 V_1 mL 试样稀释液及 $(V_2 - V_1)$ mL 0.1% 标准葡萄糖溶液, 摇匀滴定, 以下同标定时操作, 总耗糖量为 V mL。按式 1 计算还原糖的浓度。

$$\text{还原糖(以葡萄糖计)} = \frac{(V_0 - V) \times C \times n}{V_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: V -斐林试剂测定值(mL); V_0 -斐林试剂标定值(mL); V_1 -所取试样稀释液体积(mL); C -标准葡萄糖溶液浓度(g/mL); n -试样稀释倍数。

1.2.4.5 细胞存活率的测定

次甲基蓝是一种生物燃料, 可鉴别细胞的死活。当酵母细胞浸于次甲基蓝溶液时, 色素渗入细胞内, 活细胞内的还原酶能使其脱色, 但死细胞内的还原酶由于失活, 不发生脱色作用, 故被染成蓝色。

当发酵进行至 48 h, 将发酵液摇匀, 吸取样液 2 mL, 过 3 层纱布以滤去玉米残渣, 用 5 mL 无菌水洗涤滤布上的残渣, 将菌液稀释至合适梯度, 取 100 μL 稀释后的菌液与 900 μL 的次甲基蓝染色剂混合均匀, 静置 5 min 以充分染色, 移液枪吸取 100 μL 加入到血球计数板 (填满血球计数板) 即可, 在显微镜下观察数菌, 按式 2 计算酿酒酵母发酵 48 h 后的细胞存活率。

$$X = \frac{C_2 - C_1}{C_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: X -酿酒酵母发酵 48 h 后细胞存活率, %; C_1 -血球计数板中经过次甲基蓝染色剂染色后着色的细胞数; C_2 -血球计数板中全部的细胞数。

1.2.5 玉米原料高温浓醪酒精发酵^[10-12]

(1) 玉米水解液的制备

称取 1500 g 的玉米粉, 加入 4500 mL 65 °C~70 °C 的自来水, 静置放置 20 min, 使玉米颗粒充分吸水膨胀。加入液化酶 (α -淀粉酶) 0.9 mL, 于 85 °C~90 °C 下液化 1.5 h, 期间前 30 min 不断搅拌, 使得玉米粉充分溶解。液化完成后转入 60 °C 水浴锅中, 并加入 3 mL 糖化酶, 在 55 °C~60 °C 下糖化 20 h。糖化完成后, 将糖化液用四层滤布过滤, 得到澄清滤液, 分装, 高压蒸汽灭菌 105 °C, 时间 20 min, 即为玉米水解液, pH 自然。

(2) 种子培养基的配制

一级种子培养基: 8 Bix 的玉米水解液, 添加 0.5% 的酵母浸粉, 每支试管分装 5 mL, 105 °C 灭菌 20 min, 待液体凉透, 分别接入一环菌, 30 °C 恒温静置培养 24 h。

二级种子培养基：12 Bix °的玉米水解液，添加0.5%的酵母浸粉，每个锥形瓶分装45 mL，105 °C灭菌20 min，将一级种子液全部倒入100 mL锥形瓶，30 °C恒温静置培养16 h。

(3) 同步糖化玉米原料高温浓醪酒精发酵

称取100 g玉米粉于事先洗净、干燥且称重的500 mL三角瓶中，加入200 g 60 °C~70 °C的自来水和0.2 mL的淀粉酶，调节pH至5.5~5.8，搅拌均匀，沸水浴液化，料液温度达到90 °C开始计时液化90 min，液化过程中不断搅拌，液化结果以碘试无蓝色且呈红棕色为准。液化完成后冷却至38 °C左右，调节pH至4.2~4.4，加入0.2 mL的糖化酶，0.36 g尿素，15 mL二级种子液，搅拌均匀，并用35 °C左右的自来水补足液化过程中损失的水，将发酵瓶用普通封口膜封好，再加一层PE手套，橡皮筋缠紧，30 °C，160 r/min条件下培养12 h，后转入38 °C，160 r/min条件下进行摇床发酵。在此过程中，每隔12 h称重一次，两次差值小于1 g即可蒸酒。待发酵48 h，测48 h细胞存活率，且此时将发酵温度改为30 °C。

1.2.6 数据统计分析

每组实验做三个平行，并使用SPSS 11.5和EXCEL 2013软件对实验数据进行差异显著性检验分析(ANOVA)。

2 结果与讨论

2.1 目的片段扩增验证

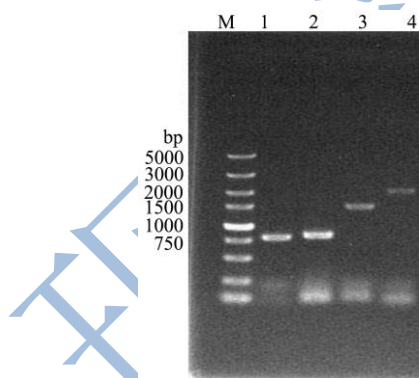


图2 带有同源臂的MSN2片段扩增验证

Fig.2 Verification of MSN2 fragment amplification with homologous arm

注：用引物对MSN2上同源臂U和MSN2上同源臂D、MSN2-URA3U和MSN2-URA3D、MSN2-PGK1_pU和MSN2-PGK1_pD、MSN2下同源臂U和MSN2下同源臂D PCR扩增得到是四个特异性的片段。M：DL5000 Marker；泳道1：822 bp；泳道2：851 bp；泳道3：1523 bp；泳道4：2140 bp。

以亲本菌株AY12a为模板，利用引物对MSN2上

同源臂U和MSN2上同源臂D、MSN2-URA3U和MSN2-URA3D、MSN2-PGK1_pU和MSN2-PGK1_pD、MSN2下同源臂U和MSN2下同源臂D进行PCR扩增带有部分同源四个基因片段，其片段长度大小如下图2所示。与预期片段大小一致，可用于下一步实验。

2.2 突变株获得的验证

精提阴性对照AY12a基因组及粗提基因组验证正确的菌株基因组，分别利用验证引物进行验证。利用引物对验证MSN2上同源臂-URA3U和验证MSN2上同源臂-URA3D、验证PGK1_p-MSN2U和验证PGK1_p-MSN2D、验证URA3-PGK1_pU-MSN2和验证URA3-PGK1_pD-MSN2进行过表达MSN2基因菌株进行定点验证，MSN2基因扩增出大小为1126 bp、3006 bp、1433 bp的特异性片段，与预期大小一致，且阴性对照PCR后无此条带，结果如图3所示。

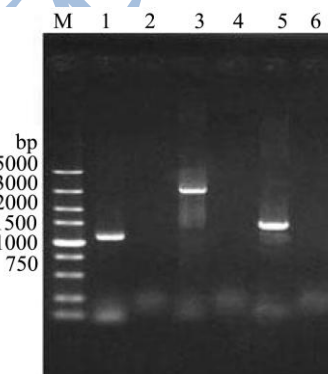


图3 定点PCR验证MSN2电泳图谱

Fig.3 Verified MSN2 by PCR using specific primers

注：利用引物对验证MSN2上同源臂-URA3U和验证MSN2上同源臂-URA3D、验证PGK1_p-MSN2U和验证PGK1_p-MSN2D、验证URA3-PGK1_pU-MSN2和验证URA3-PGK1_pD-MSN2得到的验证片段。M：DL5000 Marker；泳道1：1126 bp；泳道3：3006 bp；泳道5：1433 bp，泳道2，4，6为阴性对照。

2.3 RT-PCR 结果

为了进一步验证MSN2基因过表达成功，提取重组菌AY12a-*msn2*及亲本菌株AY12a的总RNA并反转录成cDNA，按照方法1.2.3以其为模板进行实时荧光定量PCR对MSN2基因表达量进行分析。从图4结果看出AY12a-*msn2*菌株MSN2基因的表达量是亲本菌株AY12a的4.43倍，结果差异显著($p < 0.05$)。实验结果表明过表达MSN2基因后，导致其转录水平的增加，RT-qPCR结果能够说明MSN2基因过表达成功。

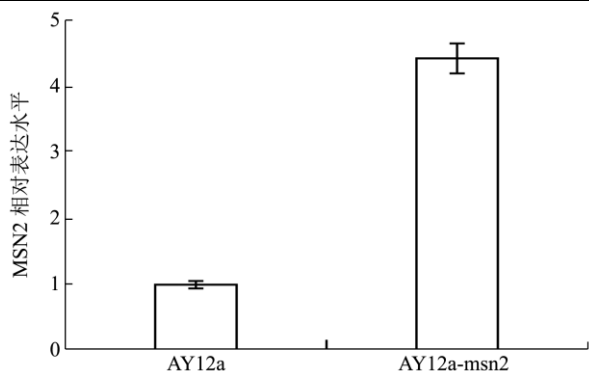


图4 AY12a 和 AY12a-*msn2* 中的 *MSN2* 基因相对表达水平的比较

Fig.4 Comparison of relative expression levels of *MSN2* gene in AY12a and AY12a-*msn2*

2.4 酿酒酵母基因突变株与亲本菌株生长性能的比较

能的比较

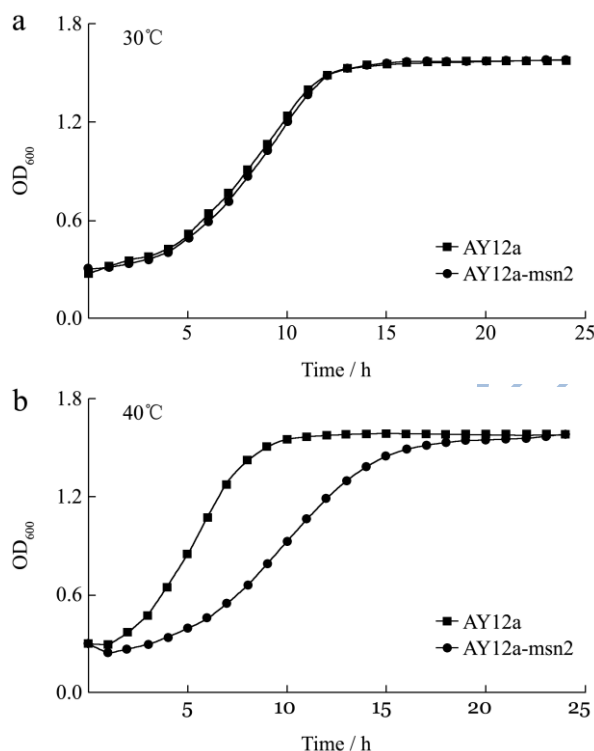


图5 菌株的生长曲线

Fig.5 Growth curve of strains

利用生长曲线测定仪对亲本菌株 AY12a 和 AY12a-*msn2* 突变菌株在进行生长曲线的测定。挑取一环 AY12a 和 AY12a-*msn2* 菌泥接种于 5 mL YPED 液体培养基中, 过夜培养后, 按照 1.2.4.1 方法对亲本菌株和突变株在 30 °C 和 40 °C 下进行生长曲线的测定, 结果如图 5 所示。

图 5 是亲本菌株和各个突变株的生长趋势。根据各个菌株的生长速度和最终菌体浓度可以看出, 在 30 °C 的培养条件下 AY12a-*msn2* 与亲本菌株 AY12a 的

生长速度相比, 生长性能基本相一致; 当生长温度改为 40 °C 时, 高温对突变株 AY12a-*msn2* 的生长影响较大, 较亲本菌株 AY12a 菌体浓度没有明显的提高, 且生长对数期延长。具体的生长情况需要用玉米高温浓醪发酵验证。

2.5 酿酒酵母基因突变株与亲本菌株耐受性的比较

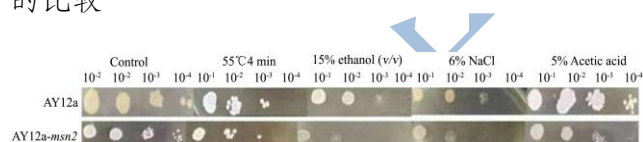


图6 菌株的耐受性

Fig.6 Stress tolerance of strains

按照材料与方法中 1.2.4.2 中所描述的方法测定出发菌株 AY12a 以及突变菌株 AY12a-*msn2* 在 55 °C (4 min) 热击、15% (V/V) 的乙醇、6% 的 NaCl 及 5% (V/V) 乙酸的胁迫环境下进行耐受性分析。结果如图 6 所示。

根据图 6 可知, 在没有生长压力的 YEPD 平板上, 出发菌株 AY12a 和突变株 AY12a-*msn2* 的生长情况基本上是一致的, 可见用做耐受性实验的出发菌株以及突变菌株的初始菌体浓度基本上保持是一致的。在 55 °C (4 min) 热击处理造成的环境压力下, 出发菌株 AY12a 和突变菌株的生长都受到了很大程度的抑制。但相比出发菌株, 在相同的稀释倍数下, AY12a-*msn2* 比 AY12a 的菌落数较少, 说明其热击抗性弱于出发菌株 AY12a; 在 15% (V/V) 的乙醇和 6% 的 NaCl 造成的环境压力下, 相同的稀释倍数下, AY12a-*msn2* 突变株的菌落数低于原菌; 在 5% (V/V) 乙酸造成的环境压力下, 相比出发菌株 AY12a, 突变菌株 AY12a-*msn2* 没有较大的变化说明 5% (V/V) 的乙酸对这些突变株的生长没有胁迫性。

2.6 酿酒酵母基因突变株与亲本菌株的玉米

原料高温浓醪酒精发酵

表 2 突变菌株的发酵性能和细胞存活率

Table 2 Fermentation performance and survival ratios of

	mutant strains	
	AY12a	AY12a- <i>msn2</i>
20 °C 酒度%/(V/V)	15.41 ± 0.20	15.03 ± 0.30
残糖/(g/L)	11.02 ± 0.10	19.50 ± 0.20
48 h 细胞存活率/%	50.81 ± 1.70	88.31 ± 1.20
发酵时间/h	72.00	96.00
CO ₂ 总失重/g	36.82 ± 0.30	35.50 ± 0.40

按照方法 1.2.4, 将改造后的菌株 AY12a-*msn2* 和出发菌株 AY12a 进行玉米高温浓醪发酵。待发酵进行 48 h 后, 将发酵液摇匀, 取样液, 用三层纱布滤去玉米渣, 用无菌水稀释至合适倍数, 按照方法 1.2.4.5 进行次甲基蓝染色后, 放大倍数×400 显微镜下检测 48 h 细胞存活率。待发酵完成后, 按照方法 1.2.4.3 测定发酵液中乙醇含量, 按照方法 1.2.4.4 测定发酵液中残糖的含量。结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 在 38 °C 浓醪发酵中, 突变株 AY12a-*msn2* 的酒度相比出发菌株 AY12a 有所下降, 残糖含量明显上升, 48 h 主发酵完成后的细胞存活率有较大提高, 且发酵时间延长。这与细胞生长曲线的测定结果是一致的, 且与耐受性实验也大致相符。酵母细胞发酵时间的延长, 常伴随着细胞耐受性的增加, 比如高乙醇, 高温, 高渗透压等等, 但 AY12a-*msn2* 突变株没有取得预期的效果。

2.7 小结

本实验以 *MSN2* 基因为靶基因, 酿酒酵母 AY12a 作为出发菌株, 通过胞内重组法, 在 *MSN2* 基因的 N 端加上一个强启动子 *PGK1_p*, 从而实现基因的过表达, 今而调控细胞耐受性, 获得突变株 AY12a-*msn2*。

酿酒酵母菌株的生长性能分析结果显示, 突变株 AY12a-*msn2* 在 40 °C 的生长条件下, 生长趋势明显慢于 AY12a 且最终的 AY12a-*msn2* 细胞浓度低于 AY12a。酿酒酵母菌株的胁迫环境耐受性能分析结果显示, 相比出发菌株 AY12a, 耐温性的结果显示为 AY12a-*msn2* 较弱。38 °C 下的玉米浓醪发酵结果表明突变株 AY12a-*msn2* 的乙醇产量下降, 与理论不相一致, 可能与基因的遗传背景和个体差异有关。

3 结论

3.1 本文以实验室现有菌种 AY12a 为出发菌株, *URA3* 基因为筛选标记, 利用胞内重组法来实现 *MSN2* 基因的过表达, 成功构建过表达 *MSN2* 基因的突变菌株 AY12a-*msn2*。

3.2 对突变株 AY12a-*msn2* 进行耐受性的测定, 发现突变株 AY12a-*msn2* 表现出较差的耐高温性。同时将突变株与出发菌株 AY12a 进行玉米原料高温浓醪发酵实验, 并测定发酵完成后的各个参数。突变株 AY12a-*msn2* 的乙醇含量较出发菌株下降, 残糖含量增加, 且其发酵时间延长。

参考文献

[1] Boymarchotte E, Perrot M, Bussereau F, et al. Msn2p and

Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(5): 1044

[2] Fabrizio P, Pletcher S D, Minois N, et al. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Febs Letters, 2004, 557(1-3): 136

[3] Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, et al. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(5): 1044-1052

[4] Martínezpastor M T, 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) [J]. Embo Journal, 1996, 15(9): 2227-2235

[5] Görner W, Durchschlag E, Martínezpastor M T, et al. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity [J]. Genes & Development, 1998, 12(4): 586

[6] Garreau H, Hasan R N, Renault G, et al. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology, 2000, 146(9): 2113-2120

[7] Gietz R D, Woods R A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method [J]. Methods Mol Biol., 2006, 313: 107-120

[8] 刘向勇, 张小华, 鲍晓明. 酿酒酵母工业菌株胁迫条件耐受性分析[J]. 中国酿造, 2016, 35(1): 8-11

LIU Xiang-yong, ZHANG Xiao-hua, BAO Xiao-ming. Stress tolerance of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2016, 35(1): 8-11

[9] 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. Improvement on determination of reducing Sugar by Fielin Reagent [J]. China Brewing, 2010, 29(5): 160-161

[10] 刘代武, 彭涛, 邬善远, 等. 玉米酒精浓醪发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2005, 2: 87-89

LIU Dai-wu, PENG Tao, WU Shan-yuan, et al. Study on the fermentation technology of corn alcohol concentrated mash [J]. Brewing Technology, 2005, 2: 87-89

- [11] 段钢,许宏贤,钱莹,等.酸性蛋白酶在玉米酒精浓醪发酵上的应用[J].食品与发酵工业,2005,31(8):34-38
DUAN Gang, XU Hong-xian, QIAN Ying, et al. Application of acid protease in strong mash fermentation of corn alcohol [J]. Food and Fermentation Industry, 2005, 31(8): 34-38
- [12] 肖冬光,许葵,李瑞青.酒精浓醪发酵生产工艺的优化[J].酿酒科技,2004,6:40-42
XIAO Dong-guang, XU Kui, LI Rui-qing. Optimization of production process of ethanol concentrated mash fermentation [J]. Brewing Technology, 2004, 6: 40-42

现代食品科技