

## 酿酒酵母 *YBR019C* 基因缺失突变体的分析 \*

# Research on *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Deficient in *YBR019C*

黄艳燕, 郭 铃, 陈 东, 龙思宇, 李检秀, 陆 琦, 孙 靛, 黄日波 \*\*

HUANG Yan-yan, GUO Ling, CHEN Dong, LONG Si-yu, LI Jian-xiu, LU Qi, SUN Liang, HUANG Ri-bo

(广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】研究目的基因 *YBR019C* 缺失对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株糖代谢和乙醇发酵的影响。【方法】以酿酒酵母野生菌 NF1002 为出发菌株, 选择 2 号染色体上的基因 *YBR019C* 为目的基因, 以质粒 pUG6 和 pUG66 为模板进行 PCR, 构建带有 Cre/loxP 系统的酿酒酵母 *YBR019C* 基因敲除组件, 并转化酿酒酵母 NF1002, 利用筛选标记 *Kan<sup>r</sup>* 和 *Ble<sup>r</sup>* 与 *YBR019C* 基因进行同源重组, 筛选 *YBR019C* 双倍体缺陷型菌株。利用蔗糖和甘蔗糖蜜为碳源, 对突变菌进行发酵特性的研究。【结果】成功获得 *YBR019C* 双倍体缺陷型菌株 NF-ybr。碳源同化实验表明, 突变株和野生菌均能利用葡萄糖和蔗糖, 不能利用乳糖和木糖; 但相比野生菌, 突变株利用棉子糖和麦芽糖的能力有所下降, 而且完全不能利用半乳糖。蔗糖发酵实验表明: 突变株 NF-ybr 与野生菌株相比, 在发酵终点乙醇浓度提高 10.7%, 发酵周期有所延长。按目前甘蔗糖蜜乙醇生产的发酵工艺, 突变株在 30℃ 发酵 72h 的醪液乙醇含量为 12.52%, 低于野生菌的 13.89%。【结论】*YBR019C* 基因的缺失影响了菌株对糖份的利用, 导致乙醇发酵能力不及野生菌。本研究为菌株高效快捷的基因改造提供了参考。

**关键词:** 酿酒酵母 *YBR019C* 基因敲除 甘蔗糖蜜 乙醇

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2014)02-0108-07

**Abstract:**【Objective】Our study focuses on the saccharometabolism and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain NF1002.【Methods】*YBR019C* on Chromosome II was chosen to be modified by PCR with pUG6 and pUG66 plasmids as templates. After homologous recombination of Cre/loxP mediated marker and *YBR019C*, *YBR019C* deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* strain NF1002 was constructed.【Results】Glucose and sucrose can be utilized for metabolism at both mutant and wild strains except lactose and xylose. However, only part of raffinose and maltose and few galactose can be utilized at the mutant strain. Results

of sucrose fermentation at mutant strain NF-ybr displayed that ethanol content reached 13.68% (V/V) at the end of fermentation, which was 10.7% higher than that for the wild strain. Furthermore, according to the industrial processes for ethanol fermentation of sugarcane molasses, ethanol content was 12.015% (V/V) at 30℃ for 72h, lower than that of the wild strain.【Conclusion】Saccharometabolism of *Saccharomyces cerevisiae* strain NF1002 was affected by deletion of gene

收稿日期: 2013-11-17

修回日期: 2013-12-17

作者简介: 黄艳燕(1982-), 女, 助理研究员, 主要从事酶工程和基因工程研究。

\* 广西科学院基本科研业务项目(基金编号: 11YJ24SW06); 八桂学者建设工程专项经费项目资助。

\*\* 通讯作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事分子酶工程研究。Email: rbhuang@gxas.ac.cn。

YBR019C, showing less ethanol production. Our research provided advice on modification of *Saccharomyces cerevisiae* strains on an efficient way.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, YBR019C, gene deletion, sugarcane molasses, ethanol

**【研究意义】**随着石油资源的日益匮乏,石油价格的不断上涨,以及人们对环境问题的日益关注,许多国家开始选择燃料乙醇作为可持续替代燃料。我国在2001年已公布车用乙醇汽油国家标准并正式批准在国内发展燃料乙醇试点<sup>[1]</sup>,多个省市推广使用乙醇汽油,乙醇汽油的产业迅速蓬勃发展。目前,国内燃料乙醇的生产工艺主要采用微生物发酵法,以淀粉质和糖蜜废液等糖质原料为碳源,以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等微生物发酵生产乙醇,然而在发酵过程中存在高酒精浓度、高温酸性、高糖、高渗透压、易污染等环境条件,大大抑制了酿酒酵母的生长和发酵能力,从而降低酿酒酵母产乙醇的效率<sup>[2]</sup>。因此在基因组学和生物信息学的基础上,利用现代分子生物学、遗传学技术在分子水平上改造酿酒酵母菌株,是改善酿酒酵母生理生化特性、提高菌株的葡萄糖利用率、发酵速率及乙醇耐受度最有效的途径之一。**【前人研究进展】**酿酒酵母作为分子生物学研究的三大模式生物之一,对许多基因的转录调控相关问题的研究具有其它生物无可比拟的独特优势。1996年,酿酒酵母全基因组测序完成,人类第一次获得了真核细胞生物基因组的完整核苷酸序列,标志着酿酒酵母基因组学和生物信息学进入了全面发展的时代<sup>[3]</sup>。比较基因组学(Comparative Genomics)是基于基因组图谱和测序,通过对已知的基因和基因组结构进行比较,来了解基因的功能、表达机理和物种的进化<sup>[4]</sup>。近年来,研究者已趋向于从基因组水平上对菌株进行快速改造,并从调控子组学<sup>[5]</sup>、代谢组学<sup>[6]</sup>等方面入手,对菌株功能进行精细、高效的改造。随着功能基因组学的发展,酿酒酵母功能基因组学的研究也日益向工业化方向发展。通过对酿酒酵母基因突变体的系统鉴定,科学家发现基因序列微小的改变能导致相应的基因功能的改变。因此通过对酿酒酵母功能基因组学的研究,找到其基因水平上存在的差异,并运用基因工程手段构建新的菌株,提高生物乙醇的生产效率,对生物乙醇的发展具有重大的意义。Stambuk等<sup>[7]</sup>比对5株工业上用于甘蔗乙醇发酵酵母菌株的全基因组序列,分析它们的基因拷贝数变异,发现5株菌株中调控VB6和VB1生物合成的端粒基因SNO和SNZ都有显著的扩增,这些基因拷贝数的增加使酵母菌能够在微生物供应有限并且糖浓度很高的环境下生长。随着研究的深入,基因敲除技术也在不断地发展和完善,其中loxP-Marker-loxP

序列组件和Cre/loxP系统已被广泛应用于酿酒酵母基因功能的分析<sup>[8]</sup>。宋浩雷等<sup>[9]</sup>利用loxP-Marker-loxP序列组件和Cre/loxP系统对酿酒酵母*sfal*基因进行敲除,乙醇产量提高8%,Takagi等<sup>[10]</sup>采用基因敲除方法,增加L-脯氨酸的积累,促进酵母酒精耐受性的提高。通过自主研发,我们从甘蔗糖蜜废液选育出产酒能力和生产速率不同的系列酿酒酵母菌株<sup>[11]</sup>,并进行了全基因组测序。通过对其全基因组序列进行比对分析,运用高性能计算机、相关生物软件和现有基因数据库对菌株进行比较基因组学和功能基因组学的研究,从基因组水平上对酿酒酵母乙醇代谢进行分析,找出它们的表达差异点,构建了初步识别的酿酒酵母糖蜜乙醇发酵相关调控基因数据库。由此识别出酿酒酵母甘蔗糖蜜乙醇发酵的关键调控基因,这些基因的发现为甘蔗糖蜜乙醇发酵高产酿酒酵母菌株的改造提供了重要的信息。YBR019C基因是与糖代谢相关的重要调控基因之一,它位于酿酒酵母二号染色体,其编码的酶蛋白gal10具有差向异构酶和变旋酶双重酶功能,前者能将UDP-半乳糖转化为UDP-葡萄糖,与半乳糖代谢相关;后者能催化葡萄糖和半乳糖在 $\alpha$ 型和 $\beta$ 型之间转换。同时gal10也和氨基糖代谢和核苷酸糖代谢相关<sup>[12]</sup>。**【本研究切入点】**本研究从数据库中选择表达差异基因中的YBR019C作为改造目的基因,利用Cre/loxP系统两种筛选标记*Kan<sup>r</sup>*和*Ble<sup>r</sup>*与野生菌NF1002染色体DNA发生同源重组,构建YBR019C基因双倍体缺陷型菌株NF-ybr。**【拟解决的关键问题】**通过碳源同化实验和甘蔗糖蜜乙醇发酵实验,研究YBR019C基因的缺失对菌株糖份利用和乙醇发酵的影响,为对菌株进行高效快捷的基因改造提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

酿酒酵母NF1002和大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 由国家非粮生物质能源工程技术研究中心保藏。酿酒酵母NF1002是从甘蔗糖厂糖蜜废液中分离得到。质粒pUG6和pUG66分别携带*Kan<sup>r</sup>*和*Ble<sup>r</sup>*抗性基因,两端带有loxP位点,购自宝赛生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂

rTaq酶购自TaKaRa公司,G418购自上海生工

生物工程有限公司, Zeocin 购自 Invitrogen 公司, 其它试剂均为国产分析纯; 引物由上海英骏公司合成, 序列测定由 TaKaRa 公司完成。甘蔗糖蜜来自广西凭祥市丰浩酒精有限公司, 锤度 83.5°Bx, 总糖含量 49.5%(W/V), 非发酵糖含量 4.29%(W/V)。

### 1.1.3 引物设计

根据引物设计的原则和要求, 设计了 5 对引物(表 1), 其中引物 L1、L2 含有 44bp、45bp 序列, 分别与 YBR019C 基因上下游序列同源, 另外的 20bp、22bp 序列是扩增筛选标记的正反向引物。

### 1.1.4 培养基

(1) YPD 培养基: 蛋白胨 20g/L, 酵母粉 10g/L, 葡萄糖 20g/L, 固体培养基添加 20g/L 琼脂粉; (2) 筛选培养基: 在 YPD 培养基中添加终浓度为 150 $\mu$ g/mL 的 G418 或 10 $\mu$ g/mL 的 Zeocin; (3) 发酵培养基: 蛋白胨 20g/L, 酵母粉 10g/L, 蔗糖 20g/L; (4) 甘蔗糖蜜培养基: 将甘蔗糖蜜稀释至一定锤度, 添加 0.2%(W/W) 尿素和 0.02%(W/W) 磷酸, 用浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节 pH 值至 3.8~4.0, 现配现用。

## 1.2 方法

### 1.2.1 酿酒酵母 NF1002 基因组 DNA 的提取

挑取单菌落接种于 20mL YPD 培养基, 28℃ 摇瓶培养过夜, 取 10mL 菌液并离心 (5000r/min, 5min), 收集菌体。提取 NF1002 基因组 DNA<sup>[13]</sup>, 通过琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 引物序列

Table 1 List of primers

引物 Primer	序列 Sequence	设计原则与要求 Principle of design
L1	5'-GCTGGCAAATCAGGAAAATCTGTAGACA ATCTTGGACCCGTAAGcagctgaagcttctgtactc-3'	大写字母: 与 YBR019C 基因上游序列同源; 小写字母: 扩增筛选标记的正向引物 The capital letters; Homology with the upstream sequence of YBR gene The lowercase; Forward primer for the resistance marker
L2	5'-GCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCCGA GCAGTGC GCGCGAGggccactagtgatctgatatac-3'	大写字母: 与 YBR019C 基因下游序列同源; 小写字母: 扩增筛选标记的反向引物 The capital letters; Homology with the downstream sequence of YBR gene The lowercase; Reverse primer for the resistance marker
YBR1	5'-CAGGAAAATCTGTAGACAATCTTGGACCCG-3'	扩增 YBR019C 基因上游引物 Forward primer for YBR upstream sequence
YBR2	5'-CACACACTGTGGTAGAGCTAATTGAGAATGG-3'	扩增 YBR019C 基因下游引物 Reverse primer for YBR downstream sequence
A	5'-TGTGAACACTGTATAGCCAGTCCTTCGG-3'	位于 YBR019C 基因上游 Located in the upstream of YBR gene
B	5'-CCAATGGTCTTGGTAATTCCTTTGCGC-3'	位于 YBR019C 基因下游 Located in the downstream of YBR gene
KanC	5'-GTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGC-3'	位于 Kan <sup>r</sup> 基因 Located in the Kan <sup>r</sup> gene
KanD	5'-CGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAA-3'	位于 Kan <sup>r</sup> 基因 Located in the Kan <sup>r</sup> gene
BleC	5'-TTT GCA CTG CCG GTA GAA CT CCG-3'	位于 Ble <sup>r</sup> 基因 Located in the Bler gene
BleD	5'-CGA ATT GCT TGC AGG CAT CTC ATG-3'	位于 Ble <sup>r</sup> 基因 Located in the Bler gene

### 1.2.2 YBR019C 基因的 PCR 验证

以酿酒酵母 NF1002 基因组 DNA 为模板, 用引物 YBR1 和 YBR2 进行 PCR, PCR 条件为 95℃ 2min, (94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1.5min) × 30 个循环, 72℃ 10min。通过琼脂糖凝胶电泳检测分析 PCR 产物。

### 1.2.3 质粒 DNA 的制备

用 CaCl<sub>2</sub> 法制备大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 分别转化质粒 pUG6 和 pUG66<sup>[14]</sup>。挑取克隆子, 液体培养, 用试剂盒提取质粒 DNA 并进行酶切验证。

### 1.2.4 基因敲除组件的构建

以 pUG6 质粒 DNA 为模板, 用引物 L1-L2 进行 PCR 扩增 YBR019C 基因敲除组件 ybr-1。PCR 条件为 95℃ 2min, (94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 2min) × 30 个循环, 72℃ 10min。纯化回收目的片段, 送 TaKaRa 公司测序。

### 1.2.5 YBR019C 基因的敲除

1.2.5.1 基因敲除组件的转化 制备酵母感受态细胞, 使用醋酸锂转化方法<sup>[15]</sup> 转化 ybr-1 到酿酒酵母 NF1002 中。转化得到的菌体用 1mL 1mol/L 的山梨醇静置培养 1h 后离心去除上清液, 用 1mL YPD 重悬菌体, 28℃ 培养 3~4h。离心去除上清液, 用 0.5mL YPD 重悬细胞, 涂布含有 150 $\mu$ g/mL G418 的 YPD 平板上, 28℃ 培养 2~3d。

1.2.5.2 克隆子的 PCR 验证 挑取转化平板上较大的菌落,接种于含有 150 $\mu$ g/mL G418 的 YPD 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180r/min 的摇床培养过夜。收集菌体,提取菌体基因组 DNA 作为模板,用引物 A-KanC 和 B-KanD 进行 PCR 验证,PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 2min,(94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 2min) $\times$ 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。纯化回收目的片段,并送 TaKaRa 公司测序。

1.2.5.3 另一条等位基因的敲除 以获得的 YBR019C 基因单倍体敲除菌株为出发菌株,利用质粒 pUG66 构建带有 *Ble<sup>r</sup>* 抗性标记的基因敲除组件 ybr-2,并转化 YBR019C 基因单倍体敲除菌株,敲除另一条等位基因,获得 YBR019C 双倍体基因缺失菌株 NF-ybr。

#### 1.2.6 突变株 NF-ybr 遗传稳定性试验

挑取 PCR 验证正确的突变株单克隆,接种于含有 150 $\mu$ g/mL G418 的 YPD 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180r/min 的摇床培养过夜。继续转接于同样的 YPD 液体培养基,于 28 $^{\circ}$ C、180r/min 的摇床培养过夜,如此传代 10 次。收集第 10 代菌体,提取菌体基因组 DNA 作为模板,使用引物 L1-L2、A-KanC、B-KanD、A-BleC、B-BleD 进行 PCR 验证。PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 2min,(94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1.5min) $\times$ 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

#### 1.2.7 突变株 NF-ybr 碳源同化实验

将活化菌株接种至 YPD 培养基,培养至对数期菌龄,取 2mL 菌液,12,000r/min $\times$ 5min 离心,弃上清液,加 2mL 无菌蒸馏水洗涤菌体 3 次,最后收集菌体悬浮于同体积的无菌蒸馏水中。按文献[16]的生长图谱方法进行菌株的碳源同化实验,考察各种糖份的利用能力。

#### 1.2.8 突变株 NF-ybr 生长曲线的测定

菌株于 YPD 培养基 30 $^{\circ}$ C、180r/min 下培养过夜活化 2 次,再培养至对数生长期菌龄,菌数 10<sup>8</sup> 个/mL,接种于 YPD 培养基,定时取样,用血球计数板计数,绘制生长曲线。

#### 1.2.9 突变株 NF-ybr 在蔗糖中的乙醇发酵

菌株用 YPD 培养基培养过夜活化 2 次,再培养至对数期菌龄,菌数 10<sup>8</sup> 个/mL,接种于蔗糖发酵培养基,在 30 $^{\circ}$ C、180r/min 条件下发酵至菌浓度达 2 $\times$ 10<sup>8</sup> 个/mL,再静止发酵至终止。定时取样测定发酵液的乙醇浓度。

#### 1.2.10 突变株 NF-ybr 在甘蔗糖蜜中的乙醇发酵

将活化菌株接种至 YPD 培养基培养至对数期后,接种于甘蔗糖蜜培养基进行糖蜜酒精发酵,按目

前甘蔗糖蜜酒精生产的发酵工艺进行。菌液接种于 100mL 的 25 $^{\circ}$ Bx 甘蔗糖蜜培养基,接种量 5%,培养 12h 后补料同体积、55 $^{\circ}$ Bx 的甘蔗糖蜜培养基启动酒精发酵。发酵前 24h 均以 180r/min 摇动,此后静置发酵至 72h,定时抽样测定醪液的菌数、乙醇浓度、总糖含量以及还原糖含量。

#### 1.2.11 乙醇浓度的测定

以乙腈为内标,采用气相色谱法测定酒精含量。发酵液 12000r/min $\times$ 5min 离心,取上清液 0.6mL,加入等量 10%乙腈,补蒸馏水至 2.0mL 体积,上气相色谱仪测定,根据乙醇和乙腈的峰面积计算酒精含量(% ,V/V)。酒精含量(% ,V/V)=(乙醇峰面积/乙腈峰面积) $\times$ 0.9936,式中:0.9936 为换算常数,根据同一条件下测定乙醇和乙腈的标准曲线回归方程求得。

气相色谱条件:FID 检测器,加热口温度 250 $^{\circ}$ C,柱箱温度 100 $^{\circ}$ C,检测器温度 325 $^{\circ}$ C,以氮气为载气,进样口分流比 50:1,氮气总流量 70.5mL/min,检测器氢气流量 40mL/min,空气流量 450mL/min。

#### 1.2.12 糖含量测定

取发酵醪液 0.2mL 于 2mL 离心管中,加入 1.8mL 蒸馏水和 5mg 碱性醋酸铅,反复倒置摇匀,12000r/min $\times$ 5min 离心,取上清 0.1mL,用 DNS 法测定还原糖。另取上清液 1.0mL,加入 100 $\mu$ L 6mol/L 盐酸,摇匀,70 $^{\circ}$ C 水解 15min,冰水浴冷却,加 120 $\mu$ L 20%的 NaOH 溶液中和,离心,取上清液 100 $\mu$ L,用 DNS 法测定总糖。DNS 法测定还原糖按美国能源部的方法<sup>[17]</sup>进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建的基因敲除组件

分别以质粒 pUG6 和 pUG66 为模板,用 L1-L2 引物 PCR 扩增 YBR019C 基因敲除组件 ybr-1 和 ybr-2,琼脂糖凝胶电泳检测分析结果(图 1)显示,大小分别为 1697bp 和 1268bp,与预计片段大小相符。对基因敲除组件进行测序,通过比对发现,测序结果与引物和 pUG6、pUG66 已知基因序列完全一致。

### 2.2 克隆子验证

挑取 G418 平板和 Zeocin 平板上的克隆子单菌落,液体培养后提取基因组 DNA 作为模板,分别用 A-B、L1-L2、YBR1-YBR2、A-KanC、B-KanD 和 L1-L2、YBR1-YBR2、A-BleC、B-BleD 两组引物进行 PCR 验证,琼脂糖凝胶电泳检测分析结果(图 2)显示,获得了预计目的条带。图 2(a)表明 ybr1 敲除组件与目标基因 YBR019C 发生了正确的同源重组;图

2(b)表明 ybr2 敲除组件与另一条等位基因 YBR019C 发生了正确的同源重组。对突变株连续传代 10 次后,提取基因组 DNA 作为模板,用引物 L1-L2、A-KanC、B-KanD、A-BleC 和 B-BleD 进行 PCR 验证,琼脂糖凝胶电泳检测分析结果(图 2c)显示,获得了预计目的条带,表明所构建的突变株遗传稳定。

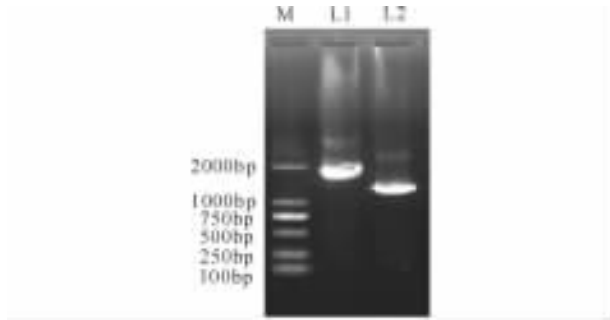


图 1 YBR019C 基因敲除组件 ybr-1 和 ybr-2 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of YBR019C gene targeting cassettes ybr-1 and ybr-2

M: DL2000 DNA marker; L1: ybr-1, 1697bp; L2: ybr-2, 1268bp.

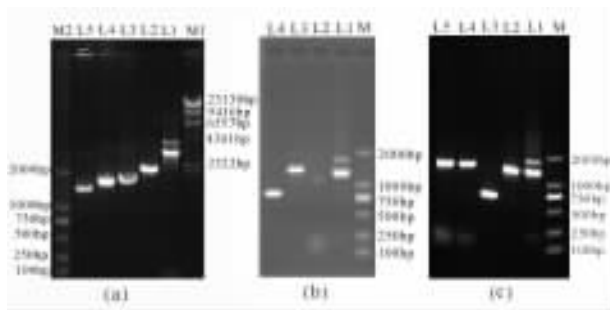


图 2 克隆子 PCR 验证电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of colonies verified by PCR

(a) M1:  $\lambda$ -Hind III marker; M2: DL2000 marker; L1: A-B, 3400bp, 2615bp; L2: YBR1 - YBR2, 2100bp; L3: L1 - L2, 1697bp; L4: A-KanC, 1557bp; L5: B-KanD, 1427bp.

(b) M: DL2000 marker; L1: L1-L1, 1698bp, 1268bp; L2: YBR1-YBR2; L3: A-BleC, 1320bp; L4: B-BleD, 781bp.

(c) M: DL2000 marker; L1: L1-L1, 1698bp, 1268bp; L2: A-BleC, 1320bp; L3: B-BleD, 781bp; L4: B-KanD, 1427 bp; L5: A-KanC, 1557bp.

### 2.3 突变株 NF-ybr 对糖的同化能力

野生菌株 NF1002 和突变菌株 NF-ybr 的碳源同

表 2 野生菌 NF1002 和突变株 NF-ybr 碳源同化实验结果

Table 2 Carbon metabolism of wild strain NF1002 and mutant NF-ybr

菌株 Strains	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	棉子糖 Raffinose	麦芽糖 Maltose	乳糖 Lactose	半乳糖 Galactose	木糖 Xylose
NF1002	+++	+++	+++	+++	0	++	0
NF-ybr	+++	+++	++	+	0	0	0

注:“+++”表示能完全同化,“++”表示能大部分同化,“+”表示只能部分同化,“0”表示不能同化。

Note:“+++”: Metabolism completely; “++”: Metabolism major partly; “+”: Metabolism minor partly; “0”: Un-capability to metabolism.

化实验结果(表 2)显示,对测定的葡萄糖、蔗糖、棉子糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖和木糖等 7 种糖份,突变株和野生菌一样,均不能同化乳糖和木糖,能完全同化葡萄糖和蔗糖。野生菌对棉子糖和麦芽糖也能完全同化,对半乳糖能大部分同化。而突变株不能同化半乳糖,对棉子糖的同化能力下降,对麦芽糖只能部分同化。

### 2.4 突变株 NF-ybr 生长曲线的测定

野生菌株 NF1002 和基因突变菌株 NF-ybr 的生长曲线如图 3 所示,两株菌的整个生长周期的趋势一致,培养至 24h,两株菌的菌数均达到最大,但突变株生长速度明显比野生菌要慢,整个生长周期的菌数都比野生菌要低,突变株的最大菌数为  $1.75 \times 10^8$  个/mL 与野生菌的  $2.88 \times 10^8$  个/mL 相比,降低了 0.4 倍。

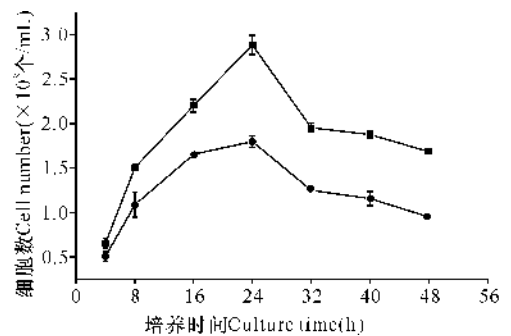


图 3 NF1002 和 NF-ybr 生长曲线

Fig. 3 Growth curve of NF1002 and NF-ybr

■: NF1002; ●: NF-ybr.

### 2.5 突变株 NF-ybr 发酵产乙醇分析

以蔗糖为碳源,野生型出发菌株 NF1002 和突变株 NF-ybr 的乙醇发酵曲线如图 4 所示。出发菌 NF1002 发酵乙醇产量更高,发酵至 48h 乙醇浓度达到最大值 14.08%。随后乙醇浓度逐渐下降,至发酵终点 72h,受高浓度乙醇的毒性影响,乙醇产量降至 12.36%。尽管突变株的发酵速率比出发菌低,但其乙醇浓度随着发酵时间的推移一直在升高,至发酵终点 72h 达到 13.68%,比野生型菌株高 10.69%。

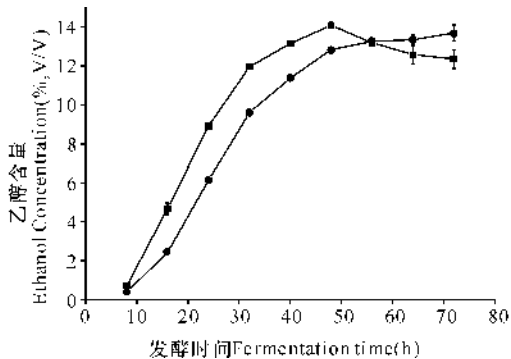


图4 NF1002和NF-ybr发酵产乙醇曲线

Fig. 4 Ethanol production of NF1002 and NF-ybr

■: NF1002; ●: NF-ybr.

## 2.6 突变株 NF-ybr 在甘蔗糖蜜中的生长情况

突变菌株和野生菌株在甘蔗糖蜜中的生长情况(图5)与在YPD中的生长情况大致相同,NF1002和NF-ybr均在发酵12h后菌数达到最大值,分别为 $3.56 \times 10^8$ 个/mL和 $2 \times 10^8$ 个/mL,之后菌数快速下降。培养至48h,菌数基本保持不变。与野生菌NF1002相比,突变株NF-ybr的最大菌数仅为野生菌的56%。

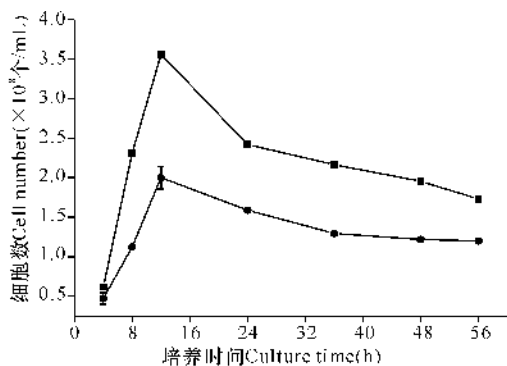


图5 NF1002和NF-ybr在甘蔗糖蜜中的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of NF1002 and NF-ybr in sugarcane molasses

■: NF1002; ●: NF-ybr.

## 2.7 突变株利用甘蔗糖蜜发酵产乙醇的能力

比较突变株与野生菌株在发酵温度30℃、发酵时间72h下发酵甘蔗糖蜜产乙醇的结果(图6)显示,突变株的产乙醇的能力比野生菌要低。NF1002和NF-ybr发酵72h的醪液乙醇含量分别为13.89%(V/V)和12.015%(V/V)。对照野生菌NF1002残留总糖和残留还原糖含量分别为3.95%和2.965%,突变株NF-ybr的残留总糖含量和残留还原糖含量分别为4.82%和4.005%,均比野生菌残糖含量高。

广西科学 2014年4月 第21卷第2期

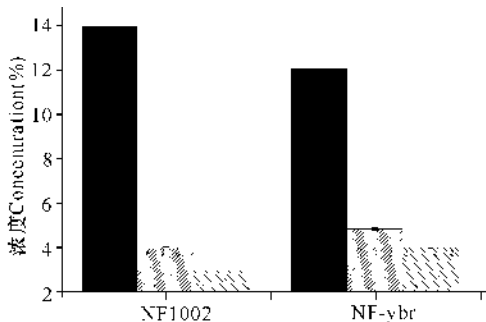


图6 NF1002和NF-ybr发酵甘蔗糖蜜醪液酒精含量及残糖含量

Fig. 6 Ethanol production and residual sugar concentration in broth of NF-1002 and NF-ybr fermenting sugarcane molasses

■:乙醇; ▨:残留总糖; ▩:残留还原糖。  
■: Ethanol; ▨: Residual Local sugar; ▩: Residual reduced sugar.

## 3 讨论

伴随着研究技术进步,生物信息时代的到来,尤其是计算机技术作为一种生物学研究手段的广泛应用,酿酒酵母乙醇相关基因的代谢调控机理的研究深入到基因组学的层次。在全基因组测序以及序列比对分析的基础上,我们构建了初步识别的酿酒酵母糖蜜乙醇发酵相关调控基因数据库。本研究从数据库中初步选择与基础代谢相关的YBR019C基因作为改造目的基因,从发酵糖蜜酒精工业用酿酒酵母菌株NF1002出发,利用Cre/loxP系统在PCR基础上构建了YBR019C基因双倍体缺失菌株NF-ybr。YBR019C基因编码的酿酒酵母二磷酸尿核苷差向异构酶,是Leloir途径上的关键酶<sup>[18]</sup>。人体中若是差向异构酶发生突变将导致代谢半乳糖的缺陷<sup>[19]</sup>。碳源同化实验结果也表明突变株NF-ybr不能利用半乳糖,说明YBR019C基因已被正确替换。而且突变株对棉子糖和麦芽糖的吸收利用受到基因敲除的影响。YBR019C基因的缺失还导致突变株生长缓慢,Takagl H等<sup>[20]</sup>报道,PRO1基因敲除后突变株对乙醇的耐受性提高,同时酵母生长速率减慢,可见基因敲除对细胞生长有一定的影响。酿酒酵母利用蔗糖发酵乙醇,尽管乙醇产量没有明显下降,但发酵周期有所延长。利用甘蔗糖蜜发酵乙醇时,发酵液中的高浓度底物和酒精对酵母的生长和发酵会产生抑制作用<sup>[21]</sup>,加之基因敲除的影响,突变株NF-ybr对甘蔗糖蜜的适应性需要更长的时间,对其中糖份的利用能力不如野生菌株,乙醇的产量也不及野生菌株。由此可见,在酵母菌株乙醇代谢途径上,YBR019C基因是一个不可或缺的调控因子,该基因的缺失,影响了菌株对糖份的利用。

对不同发酵性能的系列酿酒酵母菌株进行全基因组测序,进行比较基因组学和蛋白组学分析,找出它们的表达差异点,进行功能分析,构建数据库,根据数据库提供的信息,有针对性地选择拟改造基因,结合 Cre/loxP 基因敲除系统,可以快捷地对酵母菌株进行改造。本研究也证实,该研究方法是可行的,为菌株高效快捷的基因改造提供了参考。从基因组学的角度研究工业酵母菌乙醇发酵功能,提高生物乙醇生产效率,将是乙醇燃料研究领域的一个重要方向。我们下一步将在此研究基础上,从数据库中筛选更多基因进行改造,以期获得具有工业应用价值的酿酒酵母工程菌。

#### 参考文献:

[1] 李苗苗,于淑娟. 甘蔗生产燃料乙醇的发展现状及前景展望[J]. 酿酒科技,2007,6(5):111-113.  
Li M M, Yu S J. Present studies and the prospect of fuel ethanol production by sugarcane[J]. *Liquor-making Science and Technology*,2007,6(5):111-113.

[2] Basso L C, de Amorim H V, de Oliveira A J, et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil[J]. *FEMS Yeast Res*,2008,8(7):1155-1163.

[3] 周璐,李越中,李健. 酿酒酵母基因组学研究进展[J]. 生命科学,1999,2(11):87-91.  
Zhou L, Li Y Z, Li J. Advances in studies of genomics of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*,1999,2(11):87-91.

[4] 李伟,印莉萍. 基因组学相关概念及其研究进展[J]. 生物学通报,2000,11(35):1-3.  
Li W, Yin L P. The concept and its research progress in genomics[J]. *Bulletin of Biology*,2000,11(35):1-3.

[5] Omura F, Fujita A, Miyajima K, et al. Engineering of yeast Put4 permease and its application to lager yeast for efficient praline assimilation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2005,69:1162-1171.

[6] Raab R M, Tyo K, Stephanopoulos G. Metabolic engineering[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*,2005,100:1-17.

[7] Stambuk B U, Dunn B, Alves S L, et al. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis[J]. *Genome Res*,2009,19:2271-227.

[8] Wendland J. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures[J]. *Curr Genet*,2003,44:115-123.

[9] 宋浩雷,郭晓贤,王艳尊,等. 敲除 *sfa1* 基因提高酿酒酵母乙醇合成能力的研究[J]. 微生物学通报,2007,34(3):421-425.

Song H L, Guo X X, Wang Y Z, et al. Disrupting *sfa1* gene to enhance biosynthesis of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology China*,2007,34(3):421-425.

[10] Takagi H, Matsui F, Kawaguchi A, et al. Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline[J]. *Biosci, Bioeng*,2007,103:377-380.

[11] 陆琦,张穗生,吴仁智,等. 三株甘蔗糖蜜酒精高产酵母菌株的筛选[J]. 广西科学,2010,17(4):368-372,376.  
Lu Q, Zhang S S, Wu R Z, et al. Screening three high-yield *Saccharomyces cerevisiae* strains for alcohol fermentation of sugarcane molasses [J]. *Guangxi Sciences*,2010,17(4):368-372,376.

[12] Majumdar S, Ghatak J, Mukherji S, et al. UDPgalactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*: A bifunctional enzyme with aldose 1-epimerase activity [J]. *Eur J Biochem*,2004,271(4):753-759.

[13] Cheng H R, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts[J]. *Biotechnology Lett*,2006,28:55-59.

[14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社,2002:96-99.  
Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. The Third Edition. Beijing: Science Press,2002:96-99.

[15] Gietz R D, Woods R A. *Methods in enzymology* [M]. [s. l.]:[s. n.],2002,350:87-96.

[16] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社,2005:166.  
Du L X, Lu F P. *Microbiology laboratory technology* [M]. Beijing: China Light Industry Press,2005:166.

[17] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Measurement of cellulose activities[M]. [s. l.]: Laboratory Analytical Procedure, Lap- 006, NREL Golden Co,1996.

[18] Scott A, Timson D J. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose mutarotase/UDP-galactose 4-epimerase protein, *Gal10P* [J]. *FMES Yeast Res* 2007,7:366-371.

[19] Timson D J. The structural and molecular biology of type III galactosemia[J]. *IUBMB Life*,2006,58:83-89.

[20] Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, et al. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Environ Microbiol*,2005,71(12):8656-8662.

[21] Gu Y S, Qiao M, Zhou Q, et al. Hyper production of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium[J]. *Tsinghua Science and Technology*,2001,6(3):225-230.

(责任编辑:陈小玲)