

# 激光诱变筛选呼吸缺陷型酵母及其发酵条件优化

茅文俊<sup>1</sup> 刘真真<sup>1</sup> 朱虹<sup>1</sup> 朱融融<sup>1</sup> 孙晓宇<sup>1</sup> 姚思德<sup>2</sup> 汪世龙<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(同济大学生命科学与技术学院 上海 200092)

<sup>2</sup>(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

**摘要** 本实验利用 266 nm 激光作为诱变手段,对酿酒酵母 YE0 进行辐照诱变筛选呼吸缺陷型酵母,通过 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)筛选和气相色谱法酒精测定,最终得到一株高葡萄糖转化率呼吸缺陷型酵母 JB7。对该突变株进行鉴定和发酵条件优化,结果表明,接种量 15%,发酵温度 32℃,葡萄糖初始浓度 25%,发酵 72 h 后,酒精产量体积分数可达 12.3%,葡萄糖转化率达到 52.9%,分别比出发菌株的酒精产量(12.0%)和葡萄糖转化率(49.6%)有所提高。高于正常酵母的糖原利用率,显示了呼吸缺陷型酵母良好的应用前景。

**关键词** 激光,酿酒酵母,发酵

**中图分类号** Q345+.1, Q631, Q815

激光作为一种新型诱变因子,有着良好的应用前景。相对于传统理化因子,辐照诱变在菌株诱变中的应用越来越多<sup>[1]</sup>。激光辐照诱变不仅实验操作简单安全,而且对于细胞膜结构辐射损伤较轻,具有更高的正突变率<sup>[2]</sup>。文献[3]、[4]报道 He-Ne 激光在酵母菌和大肠杆菌等诱变工作上都有应用,然而短波长激光对微生物的诱变育种研究则少有报道。

呼吸缺陷型酵母菌株是一类线粒体 DNA 发生突变的菌株,其糖酵解酶系和醇脱氢酶系的高活性是提高酒精发酵能力的有效因素之一<sup>[5]</sup>。本实验以 266 nm 激光为诱变源,以酿酒酵母 *Saccharomyces Cerevisiae* YE0 为出发菌株,探索了 266nm 激光诱变酵母的合适剂量,通过 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)筛选、气相色谱法检测酒精浓度,以期筛选得到一株性状优良的呼吸缺陷型酵母。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 出发菌株 从上海市某酒厂酒曲中分离得到 *Saccharomyces Cerevisiae*, YE0 作出发酵母菌株。

1.1.2 激光器 诱变用激光器为四倍频的 Nd:YAG (Neodymium: Yttrium Aluminum Garnet, 即:掺钕的钇铝石榴石固体激光器)(同济大学生命科学与技术学院), EKSP LA 产,型号 NL303G,使用激光

波长为 266 nm,脉宽 3~6 ns,单脉冲激光能量为 40 mJ。

1.1.3 培养基 YPD 液体培养基:葡萄糖 10 g 蛋白胨 10 g 酵母膏 5 g 加双蒸水至 500 mL; YPD 固体培养基:葡萄糖 10 g 蛋白胨 10 g 酵母膏 5 g 琼脂 10 g 加双蒸水至 500 mL。

TTC 下层培养基:葡萄糖 15 g、蛋白胨 5 g、酵母浸膏 1.5 g、酸性磷酸钾 1.0 g、硫酸镁 0.4 g、柠檬酸 0.27 g、琼脂 30.0 g、1000 mL 水; TTC 上层筛选培养基: TTC 0.05 g、葡萄糖 5 g、琼脂 15 g、1000 mL 水。以上培养基灭菌条件为 115℃, 15 min。

### 1.2 实 验 方 法

1.2.1 激光辐照酵母半致死剂量测定与呼吸缺陷型筛出率测定 激光辐照酵母半致死剂量测定:酵母接种于 YPD 液体培养基,摇床培养 18 h,适当稀释,分别照射 0、3、5、10、30、60 s 后涂 YPD 平板, 32℃ 培养 48 h 后计数各个平板中单菌落数量,计算酵母半致死剂量,绘制曲线。

呼吸缺陷型筛出率测定:样品制备过程同上,照射时间分别取 0, 3, 7, 18, 30 s。辐照后涂板, 32℃ 培养 72 h 后经过 TTC 上层培养基覆盖培养,显色后,分别计数酵母菌落数和呼吸缺陷性酵母菌落数,由此计算呼吸缺陷型筛出率。

1.2.2 一级筛选(TTC 筛选) 将激光辐射后的菌

国家自然科学基金(30570376)、上海市教委科技创新项目(08ZZ21)和基础重点项目(06JC14068)资助

第一作者:茅文俊,男,1984年5月出生,2006年毕业于同济大学生命科学与技术学院生物技术专业,现为同济大学生命科学与技术学院在读硕士研究生,研究方向为生物化学和分子生物学

通讯联系人:汪世龙, wsl@mail.tongji.edu.cn

收稿日期:初稿 2008-10-20, 修回 2008-11-28

液适当稀释后均匀涂布于 TTC 下层培养基平板, 72h 后覆盖 TTC 上层培养基, 避光培养后, 观察其显色状态, 普通酵母染成红色, 呼吸缺陷型酵母由于缺少能与氧气竞争呼吸链中的还原氢[H], 而不能与 TTC 结合生成三苯基甲腈(TF)而呈白色<sup>[6]</sup>, 挑选菌落白色且菌落较大的克隆, 转接于液体 YPD 培养基。

1.2.3 二级筛选(气相色谱法酒精浓度测定) 一级筛选的菌株转接于发酵瓶发酵, 发酵 72 h 后, 经过蒸馏, 以气相色谱法测定其酒精浓度。根据 N2000 双通道色谱工作站自带软件计算的标准曲线, 得到酒精浓度, 本文中酒精浓度均采用体积分数表示。

1.2.4 出发菌株 YE0 和呼吸缺陷型 JB7 发酵条件探索在 32℃ 下, 取不同接种量(10%、15%、20%) 将 YE0, JB7 分别接入发酵瓶中发酵 72 h 后, 比较接种量对 2 株酵母酒精产量影响, 在确定 JB7 接种量基础上分别以培养基的葡萄糖浓度, 发酵温度和发酵时间为 3 因素, 每个因素取 3 个水平, 采用 L9 (3<sup>3</sup>) 正交试验优化 JB7 发酵条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 266 nm 激光辐照酵母存活率曲线

以酵母存活率-时间作图, 建立效应曲线(见图 1)。由图 1 可知, 266 nm 激光对酵母有很大的辐射损伤, 存活率随照射时间的增加而显著减小, 呈非线性剂量效应关系。由图中拟合曲线可见辐照 3 s 时, 酵母存活率在 50% 左右, 初步估算其半致死时间为 3 s 左右。一般认为辐射诱变剂量在存活率 10%~30% 左右时, 诱变效果相对明显, 容易获得更多的正向突变, 理化性质也可能有较多的变化<sup>[7]</sup>。本实验中激光存活率 10%~30% 所对应的曲线辐照时间为 10~25 s 左右。

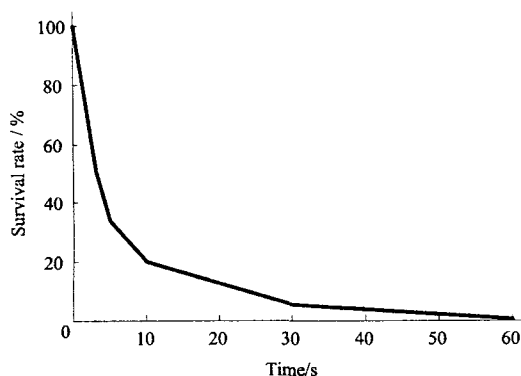


Fig.1 The survival rate of yeasts irradiated by 266 nm laser

### 2.2 呼吸缺陷型酵母筛出率

由图 2 可见, 呼吸缺陷型酵母在辐照剂量过低或过高时筛出率较低, 在 18 s 左右呼吸缺陷型酵母筛出率较高。综合考虑酵母存活率和呼吸缺陷型酵母筛出率, 为了获得较好的突变效果, 本次实验辐照时间选择为 18 s。

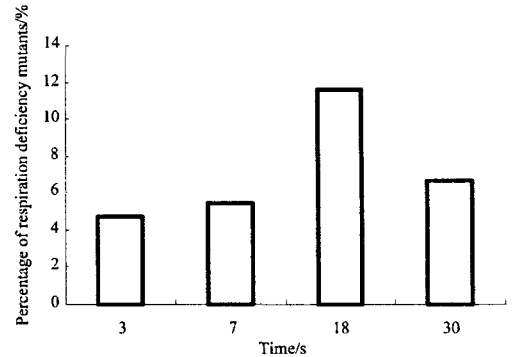


Fig.2 Screening rate of respiration deficiency mutants irradiated by laser

### 2.3 筛选结果

266 nm 激光对酵母辐照后, 其诱变酵母第一代中有 3 株菌株的酒精产量高于出发菌株, JB1、JB3、JB7 为所筛选的呼吸缺陷型突变株。由表 1 可知, 使用 266 nm 激光对酵母进行辐照是一种有效的诱变方法, 通过 TTC 初筛结合气相色谱法测定酒精浓度, 可以高效率地定向筛选高产呼吸缺陷型酵母。呼吸缺陷型真菌对于光诱导的一些分子机制更具敏感性<sup>[8]</sup>, 正常菌株的线粒体会对光诱导的分子机制产生抗氧化保护, 呼吸缺陷型真菌可能会缺失其部分功能, 使得光诱变产生更好的效果。将出发菌株 YE0 和呼吸缺陷型酵母 JB7 适当稀释后划线于 YPD 固体培养基, 于 32℃ 培养, 待 72 h 细密的单菌落长出后, 观察两者生长情况。

Table 1 Screening result of YE0 irradiated by laser

Strain No.	Ethanol yield / %
YE0	12.0
JB1	12.1
JB3	12.2
JB7	12.8

图 3 分别是 YE0 和 JB7 生长 72 h 后表观形貌图。右图呼吸缺陷型酵母 JB7 的菌落较左图出发菌株 YE0 小, 可见其生长较为缓慢。呼吸缺陷型酵母的线粒体受到破坏, 导致呼吸缺陷型酵母的呼吸功能和营养条件受到较大的影响<sup>[9]</sup>, 尽管在 Hap4p 等因子的帮助下, 呼吸缺陷型酵母可以使细胞适应其营养限制<sup>[10]</sup>, 但是其初始的生长速度仍受影响, 较出发菌株稍慢。

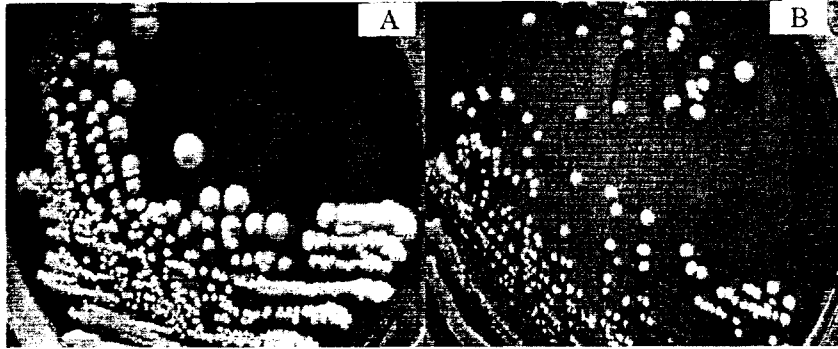


Fig. 3 Apparent shape of YE0 and JB7 (A: YE0; B: JB7)

### 2.4 激光诱变的退化现象

表 2 是呼吸缺陷型酵母 JB7 经过多次传代，其酒精产量变化情况。以 JB7 传代稳定后的酒精产量为 100%，计算其第 1, 3, 5 代的酒精相对产量。JB7 的酒精产量在传代稳定后并经发酵条件优化后，产量仍然高于出发菌株 YE0。

Table 2 Relative ethanol yield of different generations of JB7

Generation No.	1	3	5	10
Relative ethanol yield/%	108.5	105.1	100.8	100.0

呼吸缺陷性状的突变为不可逆突变，其呼吸缺陷的差异在其 tRNA 上有着缺失、点突变等各种不同表现<sup>[1]</sup>，其酒精产量也可能发生退化。激光诱变效应有多种理论，其中之一称为光活化效应<sup>[2]</sup>，认为光被呼吸链的光受体吸收是光生物反应的第一步，光对细胞的作用可能导致其 DNA、RNA、蛋白质或酶系统产生某些变异，如果变异源于蛋白质水平，而不涉及 DNA 突变，则其性状难以实现遗传稳定；DNA 变异，也要经受各种诱变条件的考验，才能最终获得遗传稳定的菌株。

### 2.5 葡萄糖酒精转化率

葡萄糖酒精转化率的计算方法为酒精产量与实际消耗葡萄糖量的比值。葡萄糖酒精转化率可以反应菌株实际利用碳源能力的高低。将 YE0 与 JB7 分别接种于发酵瓶，12%接种量，发酵 72 h 后测定其残还原糖含量，计算其葡萄糖酒精转化率。

由表 3 可见尽管呼吸缺陷型诱变酵母与对照酵母相同接种量 12%条件下发酵后酒精产量略低于出发菌株，但是其残留还原糖含量较多，其实际利用糖 22.3 g，产出 11.8%的酒精，转化率达到 52.9%，高于出发菌株，可见呼吸缺陷型酵母在线粒体部分功能障碍下，利用糖原生产酒精的专一性比正常酵母为高，显示了呼吸缺陷型酵母其良好的应用前景。

如果可以合理地优化发酵条件，使其最大限度地利用糖原，酒精产量有望进一步提高。

Table 3 Glucose transformation efficiency of YE0 and JB7

Strain name	Glucose/g	Residue reducing sugar/g	Ethanol yield/%	Transformation efficiency/%
YE0	25	0.8	12.0	49.6
JB7	25	2.7	11.8	52.9

### 2.6 发酵条件优化

正交表设计如表 4，试验结果如表 5，极差分析见表 6。接种量为 15%。

Table 4 Orthogonal design of three factors and three levels

Level	A	B	C
	Fermentation temperature /°C	Glucose concentration /%	Fermentation time /h
1	32	20	48
2	36	25	72
3	40	30	96

Table 5 Result of orthogonal experiment of JB7 mutant strain

Experiment No.	A	B	C	Ethanol yield/%
1	32	20	48	8.5
2	32	25	72	12.3
3	32	30	96	11.3
4	36	20	96	10.3
5	36	25	48	7.3
6	36	30	72	10.1
7	40	20	72	5.2
8	40	25	96	5.8
9	40	30	48	3.9

Table 6 Range analysis of orthogonal experiment of JB7 mutant strain

	A	B	C
I	32.1%	24.0%	19.7%
II	27.7%	25.4%	27.6%
III	14.9%	25.3%	27.4%
I/3	0.107	0.0800	0.0657
II/3	0.0923	0.0847	0.0920
III/3	0.0497	0.0843	0.0913
R	0.0573	0.0047	0.0263

根据极差分析,实验条件选取 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub> 为最优,即发酵温度 32℃,葡萄糖初始浓度 25%,发酵 72 h,诱变菌株发酵得到酒精产量达到最高为 12.3% (见表 5 中 2 号样品)。比出发菌株的 12.0% 有所提高。

诱变的呼吸缺陷型酵母的酒精产量一直存在争议。有研究结果认为呼吸缺陷型突变株由丙酮酸到呼吸链的代谢通路被打断,丙酮酸大量地向酒精代谢途径流动造成酒精的大量分泌与积累,因此呼吸缺陷型酵母可能是高产酒精酵母。本实验结果也显示通过 266 nm 激光诱变获得的呼吸缺陷型酵母的酒精产量较出发菌株有提高。与文献[12]一致。

### 3 结论

筛选了一株酒精产量高于出发菌株的呼吸缺陷型酵母。其葡萄糖转化率达到 52.9%,经过发酵条件优化后,酒精产量体积分数可达 12.3% 均高于出发菌株。可见 266 nm 激光作为诱变手段,有较好的诱变育菌效果。呼吸缺陷型酵母,有着自身不同于正常酵母的特点和作为工业菌株的优良特性,经进一步的筛选和发酵条件优化,将拥有良好的应用前景。

### 参考文献

- 1 李玉红,李成华,丁新春,等.辐射研究和辐射工艺学报,2004,22(1):56-60  
LI Yuhong, LI Chenghua, DING Xinchun, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2004, 22(1): 56-60
- 2 陈云琳,刘晓娟,闻建平.生物物理学报,2003,19(4):353-358  
CHEN Yunlin, LIU Xiaojuan, WEN Jianping. Acta Biophysica Sinica, 2003, 19(4): 353-358
- 3 张智维,王旭,刘金平.激光技术,2005,29(5):541-542  
ZHANG Zhiwei, WANG Xu, LIU Jinping. Laser Technol, 2005, 29(5): 541-542
- 4 Kohli R, Bose B, Gupta P K. J Photochem Photobiol B: Biol, 2001, 60(2): 136-142
- 5 毛淑红,靳根明,卫增泉,等.同位素,2006,19(1):44-47  
MAO Shuhong, JIN Genming, WEI Zengquan, *et al.* J Isot, 2006, 19(1): 44-47
- 6 冯友军,黄艳,张会敏,等.广西轻工业,2002,(5):16-18  
FENG Youjun, HUANG Yan, ZHANG Huimin, *et al.* Guangxi Light Ind, 2002, (5): 16-18
- 7 Fernandez R O, Pizarro R A. J Photochem Photobiol B: Biol, 1999, 50(1): 59-65
- 8 Chabrier-Roselló Y, Foster T H, Mitra S, *et al.* Photochem Photobiol, 2008, 84(5): 1141-8
- 9 Smart K A. Yeast, 2007, 24(11): 993-1013
- 10 Pir P, Kirdar B, Hayes A, *et al.* Yeast, 2008, 25(9): 661-72
- 11 Francisci S, de Luca C, Oliva R, *et al.* RNA, 2005, 11(6): 914-927
- 12 朱英莲,郭莉萍,许家兴,等.四川食品和发酵,2007,43(6):36-40  
ZHU Yinglian, GUO Liping, XU Jiaying, *et al.* Sichuan Food Ferment, 2007, 43(6): 36-40

## Selection of the respiration deficiency mutant yeast irritated by laser and optimization of the fermentation condition

MAO Wenjun<sup>1</sup> LIU Zhenzhen<sup>1</sup> ZHU Hong<sup>1</sup> ZHU Rongrong<sup>1</sup> SUN Xiaoyu<sup>1</sup> YAO Side<sup>2</sup> WANG Shilong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

<sup>2</sup> (Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

**ABSTRACT** A screen of respiration deficiency mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* YE0 induced by 266nm laser irradiation was studied. After the selective culture of TTC medium and determination of the alcohol yield by gas chromatographs, a respiration deficiency mutant JB7 with high glucose transformation efficiency was obtained. The results show that under the optimized fermentation conditions (inoculation amount is 15%, glucose concentration is 25%, fermentation temperature is 32℃ and fermentation time is 72h) the alcoholic yield in volume fraction is 12.3% and the glucose transformation efficiency of JB7 is 52.9%, which are higher than that of the original strain YE0 (glucose transformation efficiency is 49.6%, the alcoholic yield is 12.0%). The high glucose transformation efficiency shows a good prospect of application of the respiration deficiency yeast.

**KEYWORDS** Laser, *Saccharomyces Cerevisiae*, Fermentation

**CLC** Q345+.1, Q631, Q815