



## 高通量筛选诱变菌株降低黄酒发酵氨基甲酸乙酯前体积累

程艳, 堵国成, 周景文, 陈坚\*

工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】氨基甲酸乙酯是发酵食品中普遍存在的一种潜在危害物。黄酒中氨基甲酸乙酯的前体主要是尿素和乙醇。本研究通过高通量筛选策略降低黄酒发酵过程中尿素的积累, 从而降低氨基甲酸乙酯积累。【方法】以一株黄酒生产工业菌株酿酒酵母 XZ-11 为研究对象, 采用 ARTP 诱变和高通量筛选策略, 获得尿素积累量较低菌株。使用实时定量 PCR 技术检测氮代谢中尿素代谢和转运相关基因(*DUR1,2* 和 *DUR3*)的变化。【结果】筛选得到一株尿素高效稳定性利用菌株 5-11C。其尿素积累量比酿酒酵母 XZ-11 降低了 50.6%。实时定量荧光 PCR 结果表明, 与尿素代谢和转运相关的基因(*DUR1,2* 和 *DUR3*)表达量分别提高了 3.3 和 2.2 倍。【结论】高通量筛选策略可以用于降低黄酒生产过程中氨基甲酸乙酯前体尿素的含量。由于未采用基因工程手段, 避免了可能的法规问题, 消费者易于接受, 在发酵食品行业具有较好的应用前景。

**关键词:** 酿酒酵母 XZ-11, 高通量筛选, ARTP, 超高速流式分选系统, 实时定量 PCR

氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate, EC), 又名尿烷或乌拉坦, 曾被广泛应用于动植物生长促进剂和抑制剂<sup>[1]</sup>。EC 于 2007 年被列为与甲醛等级的 2A 类致癌物质<sup>[2]</sup>。发酵食品中由于不同的原因会积累一定的 EC, 从而对食用安全性带来一定的影响。黄酒中的 EC 主要是由发酵过程中产生的尿素与乙醇自发产生的。尿素是氮代谢和尿素循环中的关键物质, 受到氮代谢阻遏效应(Nitrogen catabolite repression, 简称 NCR)调控<sup>[3]</sup>。当发酵培养基中无酿酒酵母偏好型氮源(谷氨酰胺、天冬酰胺等)存在时, 尿素可以进一步被尿素水解酶水解为二氧化碳和氨; 当有偏好型氮源存在时, 尿素利用的转运蛋白和水解酶的表达会受到强烈抑制。由于细胞内大量的尿素积累对细胞有害, 尿素会通过胞内尿素透性酶转运到胞外并积累, 在生产和贮存过程中与乙醇自发形成 EC。

因此, 降低尿素浓度是消除黄酒中 EC 致癌物质的首要选择。为了解决这一问题, 已开展了大量酿酒酵母氮代谢相关的调控。大量的研究表明, 偏好型氮源阻遏尿素利用是通过将氮源转化成谷

胺等)存在时, 尿素可以进一步被尿素水解酶水解为二氧化碳和氨; 当有偏好型氮源存在时, 尿素利用的转运蛋白和水解酶的表达会受到强烈抑制。由于细胞内大量的尿素积累对细胞有害, 尿素会通过胞内尿素透性酶转运到胞外并积累, 在生产和贮存过程中与乙醇自发形成 EC。

基金项目: 国家“973 项目”(2012CB720802); 国家自然科学基金(31130043); 江苏省重点研发计划(BE2016689)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-13; 修回日期: 2016-12-28

氨酸和谷氨酰胺两种不同的途径<sup>[4]</sup>。通过调节 NCR 效应相关的基因解除氮代谢阻遏,使尿素和 EC 分别降低 63%和 72%<sup>[5]</sup>。在黄酒中添加经过改造后的脲酶<sup>[6]</sup>,可以降解 95.8%的尿素<sup>[7]</sup>。由于尿素主要是通过氮代谢中精氨酸分解所得,通过抑制酿酒酵母的精氨酸代谢<sup>[8]</sup>或敲除编码精氨酸酶的 *CARI* 基因<sup>[9-10]</sup>,也可以阻断尿素的生成。但是这通常会造成精氨酸的大量积累从而影响黄酒风味<sup>[11]</sup>。过量表达酿酒酵母尿素代谢相关基因 *DURI,2* 降低尿素浓度<sup>[12-13]</sup>,同时调节编码尿素转运相关的基因 *DUR3*<sup>[14-15]</sup>,也可显著减少尿素积累。大量的研究表明,通过代谢工程调控氮源代谢,可以显著降低尿素浓度,但同时也存在一些问题。在技术层面的主要问题包括发酵液中精氨酸的大量积累、菌株生长缓慢等,在实际产品生产和销售过程中,基因工程菌存在着稳定性差、易污染和潜在的食品安全问题。

本文采用等离子诱变(Atmospheric and room temperature plasma, ARTP)<sup>[16-17]</sup>,在室温常压下的大量等离子体使细胞发生突变,然后借助于超高速流式分选系统<sup>[18-19]</sup>等高通量筛选方法获取尿素积累量较低菌株。通过实时定量 PCR 检测与尿素代谢(*DURI,2*)和转运相关基因(*DUR3*)表达调控变化,发现与尿素代谢和转运相关的基因(*DURI,2*和 *DUR3*)表达量分别提高了 81.2%和 30.1%。结果表明,高通量筛选策略可以用于降低黄酒生产过程中氨基甲酸乙酯前体尿素的含量。由于未采用基因工程手段,避免了可能的法规问题和消费者接受程度问题,具有较好的应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** *Saccharomyces cerevisiae* XZ-11 由浙

江某黄酒公司提供。

**1.1.2 引物:** 表 1 为本研究使用的引物,均由 Beacon Designer 7 软件设计。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** MoFlo Astrios EQ 超高速流式分选系统,美国 Beckman 公司; ARTP 仪,无锡思清源生物科技有限公司; Freedom EVO 200 移液工作站,瑞士 Tecan 公司; Cytation3 酶标仪,美国 BioTek 公司; 安捷伦 1260 高效液相色谱,美国 Agilent 公司; LightCycler 480 II 实时定量 PCR 扩增仪,瑞士 Roche 公司; NanoDrop ND-2000 分光光度计,美国 Thermo 公司; PCR 仪,美国 BioRad 公司; 离心机,美国 Eppendorf 公司; 细菌总 RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit,德国 Qiagen 公司; 反转录试剂盒 PrimeScript<sup>RT</sup> Reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒、DNA marker,大连 TaKaRa 公司。

### 1.2 培养基

**1.2.1 种子培养基(YPD)(g/L):** 葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母粉 10。

**1.2.2 初筛培养基(g/L):** 葡萄糖 20, YNB(无氨基酸和硫酸铵) 1.74, 硫酸铵 5, 谷氨酸 5, 谷氨酰胺 5, 尿素 5。

表 1. RT-qPCR 中使用的引物

Table 1. Primers used in RT-qPCR

Primers	Sequences (5'→3')
<i>GLN3</i> -F	CTAATAACTTAATGCGTCACAA
<i>GLN3</i> -R	GGTAATATCGGAACAACAGA
<i>GATI</i> -F	CTGATATGAATATGACTATGAAC
<i>GATI</i> -R	TCCAGAATGATGATCTATTG
<i>DURI,2</i> -F	AAGAAGTAATGGTGGTGAAG
<i>DURI,2</i> -R	AAGTAATAATAACTGGCTCATCA
<i>DUR3</i> -F	AACGATAAGGAACAAGAAGAAGAA
<i>DUR3</i> -R	CCAAGGTTAGGCTCAATCAAT
<i>ACT1</i> -F	TGGATTCTGGTATGTTCT
<i>ACT1</i> -R	GTCAATATAGGAGGTTATGG

**1.2.3 复筛培养基(g/L):** 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 硫酸铵 5, 谷氨酸 5, 谷氨酰胺 5, 尿素 5。

**1.2.4 检测培养基(g/L):** YNB 合成培养基(无氨基酸和硫酸铵) 1.74, 尿素 0.6, 葡萄糖 20。

**1.2.5 黄酒发酵培养基:** 糯米 100 g, 生曲 14 g, 熟曲 4 g, 水 170 g。

初筛和复筛培养基用于高通量筛选; 检测培养基用于尿素积累稳定性检测。

### 1.3 ARTP 诱变

本研究采用恒温等离子诱变技术<sup>[17]</sup>对酿酒酵母 XZ-11 诱变处理。将 XZ-11 涂布在 YPD 平板上, 于 30 °C 恒温培养箱中培养 24 h。以控制菌体终浓度  $OD_{600}=0.1$  转接到含有 20 mL 的 YPD 培养基中(250 mL 锥形瓶), 220 r/min 在 30 °C 条件下振荡培养 12 h。

取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL EP 管中, 8000 r/min, 离心 2 min, 弃去上清液。用生理盐水洗涤 2 次后, 稀释制成菌体浓度在  $10^6-10^7$  之间的菌悬液, 取 10  $\mu$ L 菌悬液均匀涂布于无菌的载片表面。然后将载片置于 ARTP 诱变育种系统的载台上, 在入射功率为 100 W、氦气流量为 10 SLM 条件下, 分别照射 30、50、70、90、110、130、150 s。样品处理完毕, 用镊子将载片放到装有 1 mL 生理盐水的 EP 管中, 持续充分振荡 1 min, 把附着在载片上的菌体充分洗脱形成菌悬液, 对照组中直接加 10  $\mu$ L 菌液至 1 mL 生理盐水中。

### 1.4 超高速流式分选系统分选

本研究采用碘化丙啶(Propidium iodide, 简称 PI)对酿酒酵母细胞进行染色。PI 可进入死细胞内与 DNA 结合而产生荧光<sup>[20]</sup>, 而无法大量进入活细胞。根据这一特性, 用超高速流式分选系统分析

死细胞与活细胞<sup>[21]</sup>, 计算百分比并分选活细胞。将 ARTP 处理后的菌悬液与过滤除菌的 PI (10 mg/L) 以 1:1 混合后, 4 °C 避光反应 20 min, 过滤后于超高速流式分选系统中上样。根据超高速流式分选系统检测荧光特性分析死细胞, 分选活细胞至 96 孔板中。根据公式(1)计算致死率。

$$\text{致死率} = \frac{A-S}{A} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

其中, A: 未处理的细胞总数(0 s), S: ARTP 处理后流式细胞检测出的活细胞总数。所有的总数是通过超高速流式分选系统检测荧光的特性统计获得(计数量不小于 1000)。

### 1.5 高通量筛选策略

本研究建立高通量筛选策略快速筛选出尿素积累量较低菌株, 尿素高通量检测初筛: 将流式分选的活细胞在 96 孔板摇床中培养, 900 r/min 在 30 °C 条件下振荡培养 56 h。在 96 孔板离心机中 4000 r/min 离心 10 min, 用移液工作站转移 80  $\mu$ L 的上清液到 96 孔板中, 并立即加入 20  $\mu$ L 二乙酰一肟硫胺脲(6 g/L 二乙酰一肟和 0.3 g/L 的硫胺脲)和 100  $\mu$ L 磷酸高铁铵(6 g/L)。置于金属浴中 100 °C 反应 10 min 后, 用移液工作站转移至 96 孔板中, 并用酶标仪检测 525 nm 下的吸光值。根据吸光值筛选突变菌株, 尿素积累量较低菌株其吸光值低。高效液相色谱复筛: 将初筛菌以终浓度  $OD_{600}=0.1$  转接到含有 20 mL 的复筛培养基中(250 mL 锥形瓶), 于 30 °C 条件下 220 r/min 培养 56 h。8000 r/min 离心 5 min, 取上清液用高效液相色谱(HPLC)检测尿素浓度, 筛选出尿素积累量较低的菌株。尿素积累稳定性检测: 将复筛菌株涂布于 YPD 平板中, 于 30 °C 条件下恒温培养 12 h, 转接到新的 YPD 平板中同条件下传代培养, 重复 5 次。将每次传代培养菌以终浓度  $OD_{600}=0.1$  转接到含有 20 mL

的尿素利用检测培养基中(250 mL 锥形瓶), 于 30 °C 条件下 220 r/min 培养 56 h。8000 r/min 离心 5 min, 取上清液用高效液相色谱(HPLC)检测尿素, 来确定高通量筛选菌株的遗传稳定性。

### 1.6 模拟黄酒发酵

将培养至对数期的菌株以 10% (V/V)的接种量接入至模拟黄酒发酵培养基中, 摇匀, 加上发酵栓, 置于恒温培养箱, 30 °C 培养 5 d 后, 温度降至 15 °C, 培养 15 d, 以出发菌株作为对照, 发酵结束后, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于检测尿素和乙醇含量。

### 1.7 检测尿素含量

黄酒中尿素含量通过高效液相色谱-荧光检测器检测<sup>[22]</sup>。色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 35 °C; 流速为 1 mL/min; 进样量 20 μL; 流动相: 乙腈和 0.02 mol/L 乙酸钠; 荧光检测器的激发波长和发射波长分别为 213 nm 和 308 nm。

### 1.8 乙醇检测

黄酒中乙醇含量通过高效液相色谱-视差检测器检测<sup>[23]</sup>。色谱柱: 有机酸柱 300 mm×7.8 mm (Aminex HPX-87H, Bio-RAD); 柱温 45 °C; 流速 0.6 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相: 5 mmol/L 硫酸。

### 1.9 实时定量 PCR (RT-qPCR)

将酿酒酵母细胞活化后转接到 YPD 培养基中, 30 °C (200 r/min)培养 12 h。种子液于 4 °C 条件下 10000 r/min 离心 5 min, 收集菌体后立即置于液氮中研磨, 并用酵母总 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 提取酵母总 RNA。将酵母总 RNA 用 gDNase 42 °C 处理 3 min, 除去基因组 DNA。随后用 RNA 反转录试剂盒制备 cDNA。以

所得酵母 cDNA 为模板, 利用 LightCycler480II 系统进行荧光定量 PCR。所用引物见表 1。以 *ACT1* 基因为内参基因。基因表达变化的计算采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[24]</sup>。表达变化量 2 倍以上的基因才被认为发生了显著变化。RT-qPCR 反应采用 20 μL 体系, 95 °C 40 s、95 °C 5 s 和 55 °C 30 s, 50 个循环。

## 2 结果分析

### 2.1 ARTP 诱变致死率曲线

生物诱变广泛运用于生物发酵工业中, 包括物理诱变如紫外诱变<sup>[25]</sup>、化学诱变<sup>[26]</sup>等。ARTP 诱变通过控制等离子体强度破坏其 DNA 结构, 进而改变其生物特性。近年来, 由于常温常压等离子体诱变术(ARTP)具有操作简单安全且诱变效率高优点, 引起了广泛关注<sup>[16]</sup>, 已广泛运用于微生物育种<sup>[27-28]</sup>。ARTP 诱变对微生物细胞和 DNA 具有显著的影响, 细胞暴露在大量活跃等离子体下会导致大量细胞死亡。同时, 过程中会有少量细胞通过自我修复形成新的突变。为了获得有效的突变率, 较高的致死率十分必要。图 1 是酿酒酵母 XZ-11 不同处理时间下的致死率曲线, 根据诱变

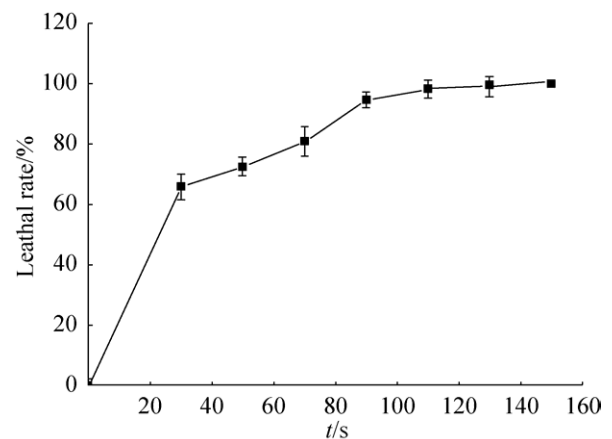


图 1. 致死率曲线

Figure 1. The lethality curve. Error bars are standard deviation from biological triplicates.

后死活细胞比, 一般选取致死率 90% 较佳<sup>[29]</sup>。因此, 选取的处理时间为 100–120 s。

## 2.2 高通量尿素检测

目前, 尿素检测方法有直接比色法、酶联反应法、高效液相色谱法等<sup>[30]</sup>。直接比色法包括二乙酰一肟法<sup>[31]</sup>、二甲基苯甲醛法和二甲氨基苯甲醛法<sup>[32]</sup>等。酶偶联反应法涉及两种酶(脲酶, 谷氨酸脱氢酶), 其成本高、稳定性较差。高效液相色谱-荧光检测器法检测精准性高、检测浓度范围较广, 但难以用于高通量检测。常规比色法检测范围窄、稳定性差, 国标法二乙酰一肟法耗时久、稀释倍数高, 且需在比色管中沸水浴条件下进行, 所需样品体积大。此外, 沸水浴会导致反应体系体积损失, 数据波动较大、回收率吻合度差、检测范围较窄、不适合大批量检测等。本研究采用优化后的二乙酰一肟显色法, 即二乙酰一肟硫酸胺、磷酸高铁铵和样品以 1:5:4 混合后发生反应, 缩合成红色二嗪化合物 4,5-二甲基-2 咪唑酮。用酶标仪检测最大吸收峰 525 nm 处的值, 获得标准曲线和回收率。如图 2 所示, 尿素浓度与  $OD_{525}$

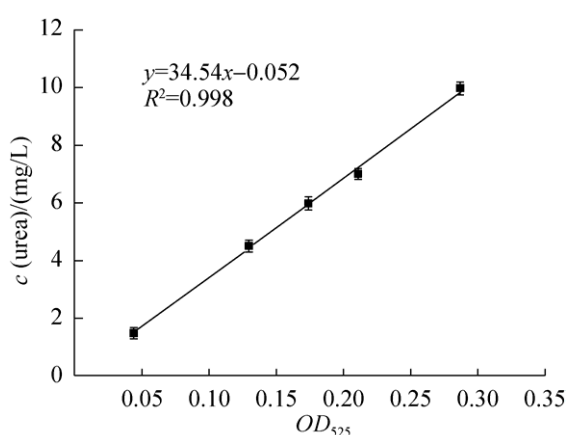


图 2. 高通量尿素检测标准曲线

Figure 2. Calibration curve of high-throughput urea detecting. Error bars are standard deviation from biological triplicates.

关系为  $y=34.54x-0.052(R^2=0.998)$ , 在黄酒中加标回收测定, 回收率为 98.20%–101.18%, 平均回收率为 99.47%。实验证明, 优化后的二乙酰一肟显色法适用于发酵体系中尿素含量的高通量检测。

## 2.3 高通量筛选

高通量筛选发展迅速, 已普遍实现微量化、智能化<sup>[33]</sup>。超高速流式分选系统分选结合移液工作站节约了大量人力物力, 解决了高通量筛选复杂化和工作量大等问题。移液工作站可实现微量大批量转移, 具有高效和低试剂成本优点<sup>[34]</sup>。本研究通过连续 10 次 ARTP 诱变处理菌株, 用 PI 染色后结合超高速流式分选系统分选出 38400 株活细胞, 最后采用优化后的二乙酰一肟显色法检测 38400 株诱变菌株尿素积累情况。结果如图 3-A 所示, 与出发菌株相比, 162 株显示出低  $OD_{525}$  值, 根据方程  $y=34.54x-0.052(R^2=0.998)$  计算尿素浓度。从初筛中选取 10 株低尿素积累量菌转接到复筛培养基中进行复筛, 复筛中获得 5 株尿素积累量较低菌株, 如图 3-B 所示, 分别是 1-11A、8-8C、2-12、8-9H 和 5-11C。它们的尿素积累量分别比出发菌株降低了 11.2%、24.5%、42.4%、46.1% 和 55.5%。此外, 分别对这 5 株菌进行连续传代培养 6 代, 检测尿素。如表 2 所示, 5 株菌株 1-11A、8-8C、2-12、8-9H 和 5-11C 在 6 次传代培养中基本保持稳定, 这说明高通量筛选菌株具有高效稳定的尿素利用能力。

## 2.4 模拟黄酒发酵验证

为了进一步确定诱变菌株在黄酒中尿素积累量, 对诱变复筛菌株进行模拟黄酒发酵验证。复筛菌株 1-11A、8-8C、2-12、8-9H 和 5-11C 进行模拟黄酒发酵, 以 XZ-11 为对照株。结果如图 4, 相较于出发菌株 XZ-11, 高通量筛选菌株 1-11A、

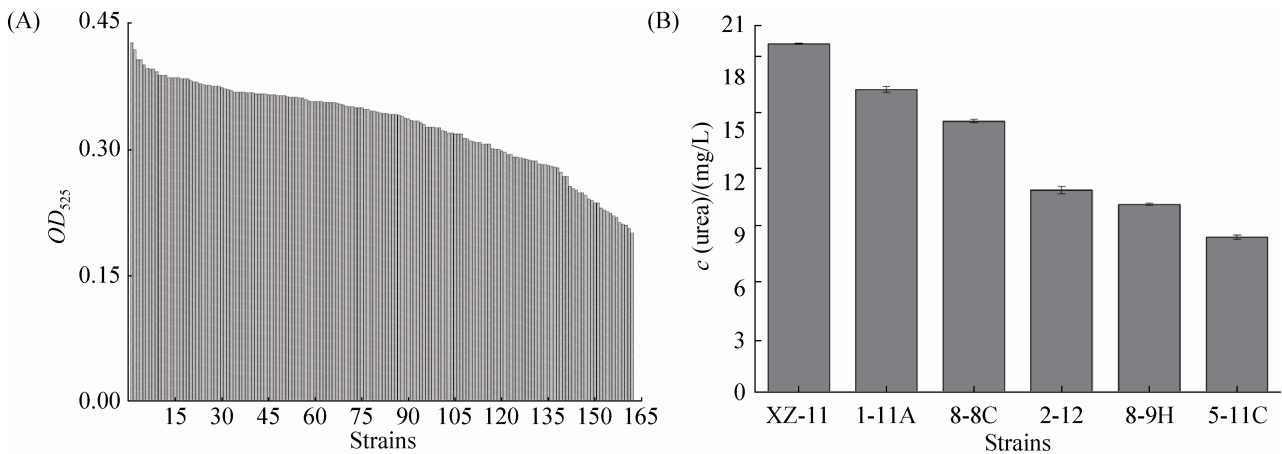


图 3. 低积累尿素酿酒酵母的典型高通量筛选结果

Figure 3. Typical high-throughput screening process of the reduced urea accumulation *S. cerevisiae* strains. A: The first screening obtained 162 from 38400 strains by the method of high-throughput urea detecting, and 0 is the control. B: The second screening obtained 5 from 162 strains, and XZ-11 is the control strain. Error bars are standard deviation from biological triplicates.

表 2. 尿素积累稳定性测定

Table 2. The stability of urea accumulation

Strains	<i>c</i> (urea)/(mg/L)					
	1 <sup>st</sup> subculture	2 <sup>nd</sup> subculture	3 <sup>rd</sup> subculture	4 <sup>th</sup> subculture	5 <sup>th</sup> subculture	6 <sup>th</sup> subculture
Wild	14.90±0.15	15.00±0.08	14.90±0.10	15.10±0.05	15.50±0.18	14.80±0.06
1-11A	12.50±0.02	12.50±0.05	12.60±0.12	12.60±0.10	12.60±0.15	12.50±0.09
8-8C	10.10±0.06	10.30±0.10	10.60±0.11	10.80±0.07	10.70±0.10	10.40±0.07
5-11C	9.20±0.02	9.30±0.05	9.70±0.12	9.70±0.07	9.30±0.10	9.00±0.03
2-12	10.10±0.22	10.40±0.24	10.70±0.03	10.40±0.06	10.90±0.07	10.60±0.16
8-9H	10.80±0.10	10.20±0.04	10.80±0.15	10.40±0.09	10.20±0.13	10.00±0.10

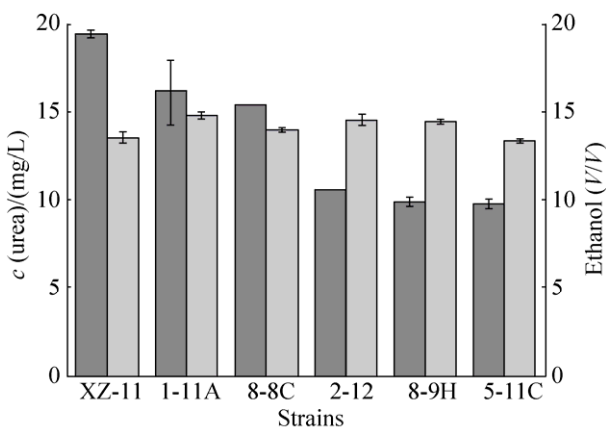


图 4. 黄酒中尿素积累情况

Figure 4. The accumulation of urea in rice wine. Error bars are standard deviation from biological triplicates.

8-8C、2-12、8-9H 和 5-11C 尿素积累量均有所降低，尿素积累量分别比出发菌株 XZ-11 降低了 16.4%、20.5%、45.2%、49.2% 和 50.6%，说明此结果与高通量复筛结果相吻合，进一步验证了高通量筛选结果的可靠性，并且可应用于黄酒发酵。图中 4 株高通量筛选菌在模拟黄酒中乙醇含量平均比出发菌株高 6%，说明高通量筛选菌株的黄酒发酵产乙醇并未受到影响。

## 2.5 实时定量 PCR 分析

针对高通量获得菌株 8-8C、5-11C、8-9H、1-11A 和 2-12 与氮代谢相关的基因(*GLN3*、*GATI*、

*DUR1,2*、*DUR3*)的表达变化,进一步使用实时定量 PCR 进行验证。以 XZ-11 为对照菌株, *ACT1* 基因为内参基因。如图 5 所示,实验结果表明,在 YPD 培养基中,尿素积累量较低菌株 8-8C、5-11C、8-9H、1-11A 和 2-12 与氮代谢相关基因表达量均有提高。

氮代谢阻遏效应主要是指由于偏好性氮源的存在激活了一些 TOR 途径中相关的 *TORP1* 和 *TORP2* 基因表达从而抑制 *GLN3* 和 *GAT1* 的表达<sup>[35]</sup>,进而阻遏了与尿素代谢与转运相关的基因 *DUR1,2* 和 *DUR3* 的表达。根据氮代谢阻遏效应选取 4 个基因 *GLN3*、*GAT1*、*DUR1,2* 和 *DUR3*。实时定量 PCR 的结果(图 5)显示,尿素积累降低 50.6% 的 5-11C 菌株,与尿素代谢相关基因 *GLN3*、*GAT1*、*DUR1,2*、*DUR3* 分别上调了 3.6、5.3、3.3 和 2.2 倍。尿素积累量降低 45.1% 的 8-9H 与尿素代谢相关基因 *GLN3*、*GAT1*、*DUR1,2* 和 *DUR3* 上调倍数分别为 2.6、9.5、2.1 和 1.3。1-11A、2-12 和 8-8C 菌株的 *GLN3*、*GAT1*、*DUR1,2*、*DUR3* 有些表达量提高,但也有部分不明显的下调。由此可知,

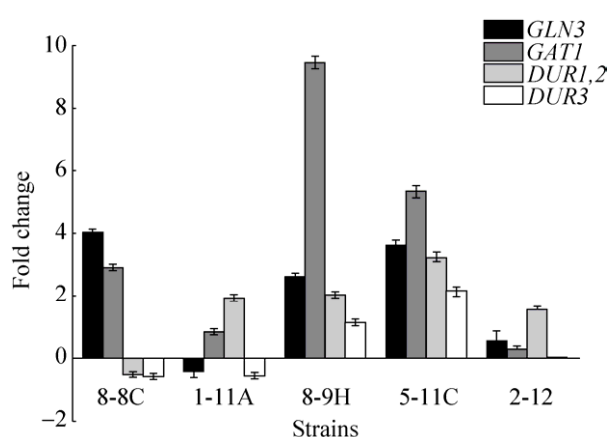


图 5. 代谢阻遏效应相关基因表达

Figure 5. The expression of nitrogen catabolite repression gene. Error bars are standard deviation from biological triplicates.

尿素积累与尿素代谢相关基因(*GLN3*、*GAT1*、*DUR1,2*、*DUR3*)表达有关,主要表现在尿素积累量越低其尿素代谢相关基因表达量越高。

### 3 讨论

尿素作为 EC 生成的重要前体,通过解除氮代谢阻遏效应降低胞外尿素浓度是降低黄酒中 EC 含量的首要选择。氮代谢阻遏效应调控等分子手段是目前降低黄酒中氨基甲酸乙酯的普遍采用的策略,该策略旨在解除氮代谢阻遏效应,进一步通过降低尿素来降低氨基甲酸乙酯。目前国内外在酿酒酵母氮代谢调控方面已经做了大量研究。Guo 等<sup>[10]</sup>通过敲除 *CARI* (编码精氨酸酶)使酒中尿素和 EC 分别降低了 77.89% 和 73.78%,Wu 等<sup>[13]</sup>采用过量表达 *DUR1,2* 和敲除 *CARI* 的手段使黄酒中尿素得到降低,Zhao 等<sup>[36]</sup>通过研究氮代谢阻遏效应中相关基因的核定位发明了提高非偏好型氮源的利用改造方法,但是基因工程菌存在着稳定性差、易污染和潜在的食品安全问题。

近年来,随着等离子诱变 ARTP、超高速流式分选系统、全自动移液工作站、多孔板摇床的开发利用,为高通量筛选开拓道路,使高通量筛选受到广泛青睐。目前尚未见有关高通量筛选降低氨基甲酸乙酯的研究,本文通过高通量筛选策略从 38400 株诱变菌中渐次通过初筛、复筛、稳定性检测和模拟黄酒发酵验证实验获得了尿素积累量较低菌株 1-11A、8-8C、2-12、8-9H 和 5-11C,其尿素积累量分别降低了 16.4%、45.1%、20.5%、49.2% 和 50.6%。实时定量 PCR 检验与氮代谢相关基因表达调控结果显示,尿素积累量较低的菌株与尿素代谢相关基因表现比较活跃。尿素积累降低 50.6% 的 5-11C 菌株,与尿素代谢相关基因 *GLN3*、

*GAT1*、*DUR1,2* 和 *DUR3* 分别上调 3.6、5.3、3.3 和 2.2 倍。本文结果与 Zhao 等<sup>[5]</sup>通过敲除 *Ure2p* (NCR 效应中的一种阻遏蛋白)使尿素积累量降低 63% 且与尿素代谢相关基因 (*GLN3*、*GAT1*、*DUR1,2*、*DUR3*)变得活跃一致。由此可以推断出, 通过高通量筛选策略获得尿素代谢和转运相关的调控基因表达量提高菌株, 从而降低了尿素积累。因此, 本研究通过高通量筛选降低黄酒发酵过程中氨基甲酸乙酯前体物质的积累, 避免了可能的法规问题, 消费者易于接受, 具有较好的应用前景和重要的研究意义, 可适用于食品行业。

## 参 考 文 献

- [1] Haddow A, Sexton WA. Influence of carbamic esters (urethanes) on experimental animal tumours. *Nature*, 1946, 157(3900): 500–503.
- [2] Lachenmeier DW. Consequences of IARC re-evaluation of alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate on food control. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 2007, 103(7): 307–311.
- [3] Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology*, 1999, 12(1): 35–71.
- [4] Zhao XR, Zou HJ, Fu JW, Chen J, Zhou JW, Du GC. Nitrogen regulation involved in the accumulation of urea in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2013, 30(11): 437–447.
- [5] Zhao XR, Zou HJ, Fu JW, Zhou JW, Du GC, Chen J. Metabolic engineering of the regulators in nitrogen catabolite repression to reduce the production of ethyl carbamate in a model rice wine system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 392–398.
- [6] Liu J, Xu Y, Nie Y, Zhao GA. Optimization production of acid urease by *Enterobacter* sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(4): 651–657.
- [7] Yang YQ, Kang Z, Zhou JL, Chen J, Du GC. High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 301–308.
- [8] Suizu T, Iimura Y, Gomi K, Takahashi K, Hara S, Yoshizawa K, Tamura G. Construction of urea non-producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *CAR1* gene. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(2): 537–539.
- [9] Kitamoto K, Oda-Miyazaki K, Gomi K, Kumagai C. Mutant isolation of non-urea producing sake yeast by positive selection. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 75(5): 359–363.
- [10] Guo XW, Li YZ, Guo J, Wang Q, Huang SY, Chen YF, Du LP, Xiao DG. Reduced production of ethyl carbamate for wine fermentation by deleting *CAR1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(5): 671–679.
- [11] Yoshiuchi K, Watanabe M, Nishimura A. Breeding of a non-urea producing sake yeast with killer character using a *kar1-1* mutant as a killer donor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000, 24(3): 203–209.
- [12] Zhu XY, Lu J, Xie GF. Constitutive expression of *DUR1,2* gene in Chinese rice wine yeast. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(17): 173–175, 183. (in Chinese)  
朱旭亚, 陆健, 谢广发. 脲基酰胺酶基因在黄酒酵母中的整合型表达. *食品工业科技*, 2012, 33(17): 173–175, 183.
- [13] Wu DH, Li XM, Lu J, Chen J, Zhang L, Xie GF. Constitutive expression of the *DUR1,2* gene in an industrial yeast strain to minimize ethyl carbamate production during Chinese rice wine fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(1): fnv214.
- [14] ElBerry HM, Majumdar ML, Cunningham TS, Sumrada RA, Cooper TG. Regulation of the urea active transporter gene(*DUR3*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(15): 4688–4698.
- [15] Navarathna DHMLP, Das A, Morschhäuser J, Nickerson KW, Roberts DD. *DUR3* is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase *DUR1,2*. *Microbiology*, 2011, 157(1): 270–279.
- [16] Zhang X, Zhang XF, Li HP, Wang LY, Zhang C, Xing XH, Bao CY. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387–5396.
- [17] Zeng WZ, Du GC, Chen J, Li JH, Zhou JW. A high-throughput screening procedure for enhancing  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* by random mutagenesis. *Process Biochemistry*, 2015, 50(10): 1516–1522.
- [18] Black CB, Duensing TD, Trinkle LS, Dunlay RT. Cell-based



- screening using high-throughput flow cytometry. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2011, 9(1): 13–20.
- [19] Tu R, Martinez R, Prodanovic R, Klein M, Schwaneberg U. A flow cytometry-based screening system for directed evolution of proteases. *Journal of Biomolecular Screening*, 2011, 16(3): 285–294.
- [20] Chan LL, Wilkinson AR, Paradis BD, Lai N. Rapid image-based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods. *Journal of Fluorescence*, 2012, 22(5): 1301–1311.
- [21] Hohenblum H, Borth N, Mattanovich D. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *Journal of Biotechnology*, 2003, 102(3): 281–290.
- [22] de Perre C, McCord B. Trace analysis of urea nitrate by liquid chromatography-UV/fluorescence. *Forensic Science International*, 2011, 211(1/3): 76–82.
- [23] Castellari M, Sartini E, Spinabelli U, Riponi C, Galassi S. Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol, and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and UV-refractive index double detection. *Journal of Chromatographic Science*, 2001, 39(6): 235–238.
- [24] Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, Arifin Y, Walsh MC, Piper MDW, De Winde JH, Pronk JT, Daran JM. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(4): 604–620.
- [25] Ghazi S, Sepahy AA, Azin M, Khaje K, Khavarinejad R. UV mutagenesis for the overproduction of xylanase from *Bacillus mojavensis* PTCC 1723 and optimization of the production condition. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2014, 17(11): 844–853.
- [26] Labrou NE. Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution. *Current Protein & Peptide Science*, 2010, 11(1): 91–100.
- [27] Liu B, Sun Z, Ma XN, Yang B, Jiang Y, Wei D, Chen F. Mutation breeding of extracellular polysaccharide-producing microalga *Cryptocodinium cohnii* by a novel mutagenesis with atmospheric and room temperature plasma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4): 8201–8212.
- [28] Ma YF, Yang HQ, Chen XZ, Sun B, Du GC, Zhou ZM, Song JN, Fan Y, Shen W. Significantly improving the yield of recombinant proteins in *Bacillus subtilis* by a novel powerful mutagenesis tool (ARTP): alkaline  $\alpha$ -amylase as a case study. *Protein Expression and Purification*, 2015, 114: 82–88.
- [29] Schubert WW, Beaudet RA. Determination of lethality rate constants and D-values for heat-resistant *Bacillus Spores* ATCC 29669 exposed to dry heat from 125 °C to 200 °C. *Astrobiology*, 2011, 11(3): 213–223.
- [30] Francis PS, Lewis SW, Lim KF. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21(5): 389–400.
- [31] Chen L, Ma J, Huang Y, Dai MH, Li XL. Optimization of a colorimetric method to determine trace urea in seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2015, 13(6): 303–311.
- [32] Li CJ, Li K, Qiao S, Wang CC, Ran M. The improvement of colorimetry of determination for microurea by para-dimethylaminobenzaldehyde. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science)*, 2010, 33(3): 410–413. (in Chinese)  
李川江, 李珂, 乔澎, 王聪聪, 冉鸣. 对二甲氨基苯甲醛比色法测定微量尿素的改进. *四川师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 33(3): 410–413.
- [33] Merten CA. Screening Europe 2010: an update about the latest technologies and applications in high-throughput screening. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2010, 10(5): 559–563.
- [34] Litten BA, Smith R, Banfield E. An automated 1536-well microplate format cytochrome P450 inhibition assay using a tecan freedom EVO workstation with integrated innovadyne nanodrop II dispenser. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2010, 15(1): 58–64.
- [35] Crespo JL, Hall MN. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(4): 579–591.
- [36] Zhao XR, Zou HJ, Chen J, Du GC, Zhou JW. The modification of *Gat1p* in nitrogen catabolite repression to enhance non-preferred nitrogen utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21603.

# High-throughput screening of mutant strain to reduce the accumulation of ethyl carbamate precursor in rice wine fermentation

Yan Cheng, Guocheng Du, Jingwen Zhou, Jian Chen\*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Ethyl carbamate is a common potential hazard in different fermented foods. Urea and ethanol are the major precursors of ethyl carbamate in rice wine. In this study, the accumulation of urea was reduced based on a high-throughput screening strategy, therefore decrease the accumulation of ethyl carbamate in rice wine. [Methods] An industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* XZ-11 was used for the study. Lower urea accumulating strains were achieved by using Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis and high-throughput screening strategy. RT-*q*PCR analysis was used to detect the change of *DUR1,2* and *DUR3*, two important urea metabolism and transport genes. [Results] A mutant strain 5-11C was obtained with the capacity of both efficiently urea using and genetic stability. The accumulation of urea was 50.6% lower than that of *S. cerevisiae* XZ-11. RT-*q*PCR results showed that the expression levels of *DUR1,2* and *DUR3* increased 3.3 and 2.2 folds, respectively. [Conclusion] High-throughput screening strategy can be applied to obtain mutants with reduced accumulation of ethyl carbamate precursor in rice wine.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae* XZ-11, high-throughput screening, ARTP, MoFlo Astrios EQ, RT-*q*PCR

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Program for the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program, 2012CB720802), by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (31130043) and by the Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2016689)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Received: 13 November 2016; Revised: 28 December 2016