



酿酒酵母 *SRP40* 基因对细胞耐受性影响的研究

邵文举, 鲁尚昆, 张爱利*

河北工业大学化工学院, 天津 300130

邵文举, 鲁尚昆, 张爱利. 酿酒酵母 *SRP40* 基因对细胞耐受性影响的研究. 微生物学报, 2022, 62(3): 1150–1165.

Shao Wenju, Lu Shangkun, Zhang Aili. Effect of *SRP40* gene on cell tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1150–1165.

摘要:【目的】本论文研究酿酒酵母 *srp40*³⁹ 突变基因对酵母细胞异丁醇耐受性的影响。【方法】首先, 以酿酒酵母野生型 W303-1A 和突变株 EMS39 染色体 DNA 为模板克隆野生型 *SRP40* 基因和 *srp40*³⁹ 突变基因; 然后, 将野生型 *SRP40* 基因和 *srp40*³⁹ 突变基因分别连接到质粒 YCplac22 上, 构建质粒 YCplac22-*SRP40* 和 YCplac22-*srp40*³⁹。将质粒 YCplac22-*SRP40*、YCplac22-*srp40*³⁹ 以及 YCplac22 空质粒分别转化入野生型酿酒酵母 W303-1A 中, 分别得到 W303-1A-*SRP40* 工程菌、W303-1A-*srp40*³⁹ 工程菌和 W303-1A-control 工程菌。将 3 株工程菌分别置于含 1.0% 异丁醇、1.3% 异丁醇、8.0% 乙醇和 0.5% 异戊醇的 CM 培养基中进行发酵, 测定细胞密度 (OD_{600}) 和生长情况, 并计算 2–10 h 的比生长速率 (μ)。将 3 株工程菌于 55 °C 热激 4 min 后做稀释实验 (dilution), 观察它们在平板上的生长情况。最后, 对野生型 *SRP40* 基因、*srp40*³⁹ 突变基因的氨基酸序列进行生物信息学分析。【结果】在不含异丁醇 (0% 异丁醇) 的培养基中, 3 株工程菌无明显差异。在含 1.0% 异丁醇和 1.3% 异丁醇的 CM 培养基中, 发酵 24 h 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度分别是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.12 倍和 1.06 倍, 是工程菌 W303-1A-control 的 1.10 倍和 1.10 倍; 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率 (μ) 分别是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.07 倍和 1.10 倍, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.10 倍和 1.10 倍。在含 8.0% 乙醇和 0.5% 异戊醇的 CM 培养基中, 发酵 24 h 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度分别是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.12 倍和 1.01 倍, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.17 倍和 1.07 倍; 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率 (μ) 分别是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.37 倍和 1.07 倍, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.31 倍和 1.09 倍。工程

基金项目: 国家自然科学基金 (21978065, 21206028); 教育部“春晖计划”合作科研项目 (Z2017012)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21978065, 21206028) and by the Cooperative Scientific Research Project of “Chunhui Program” of Ministry of Education, China (Z2017012)

*Corresponding author. E-mail: zhangaili@tju.edu.cn

Received: 9 July 2021; Revised: 1 November 2021; Published online: 19 November 2021

菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 在热激后生长仍优于其他 2 株菌。生物信息学分析发现, Srp40³⁹ 蛋白与硅藻的胸膜蛋白-1 具有相似的结构。【结论】本研究发现酿酒酵母 *srp40*³⁹ 突变基因能够提升细胞的异丁醇耐受性, 此外对提升细胞的乙醇耐受性、异戊醇耐受性和耐热性也有一定的作用。同时, 我们发现 Srp40³⁹ 蛋白与硅藻的胸膜蛋白-1 具有相似的结构, 说明其可能具有胸膜蛋白-1 的功能, 推测该蛋白在细胞壁维持方面有作用。这些研究将为提高酿酒酵母对乙醇、异丁醇、异戊醇和高温等的抗逆性提供新思路。

关键词: 酿酒酵母; SRP40; 异丁醇; 乙醇; 耐受性

Effect of *SRP40* gene on cell tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

SHAO Wenju, LU Shangkun, ZHANG Aili*

School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

Abstract: [Objective] In this study, the effect of the mutant *srp40*³⁹ gene on isobutanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* was studied. [Methods] Firstly, the wild-type *SRP40* gene and the mutant *srp40*³⁹ gene were respectively cloned from the chromosome DNAs of the wild-type strain W303-1A and the mutant EMS39 of *S. cerevisiae*. Then, *SRP40* and *srp40*³⁹ were respectively ligated to YCplac22 to construct the recombinant plasmids YCplac22-*SRP40* and YCplac22-*srp40*³⁹. The obtained recombinant plasmids and the YCplac22 empty plasmid were respectively transformed into the wild-type strain W303-1A to construct the engineering strains W303-1A-*SRP40*, W303-1A-*srp40*³⁹, and W303-1A-control. The three engineering strains were then fermented in the complete media containing 1.0% isobutanol, 1.3% isobutanol, 8.0% ethanol, and 0.5% isoamyl alcohol, respectively. The cell density (OD_{600}) was measured, and the specific growth rate in 2–10 h was calculated. The three engineering strains were heated at 55 °C for 4 min and then diluted for observation of cell growth on the plate. Finally, the amino acid sequences of *SRP40* and *srp40*³⁹ were analyzed by bioinformatics tools. [Results] In the medium without isobutanol (0% isobutanol), the three strains showed no significant difference. After fermentation for 24 h in the complete media containing 1.0% isobutanol and 1.3% isobutanol, W303-1A-*srp40*³⁹ showed the cell density 1.12 and 1.06 times that of W303-1A-*SRP40*, and 1.10 and 1.10 times that of W303-1A-control, respectively; the specific growth rate of W303-1A-*srp40*³⁹ was 1.07 and 1.10 times as high as that of W303-1A-*SRP40*, and 1.10 and 1.10 times as high as that of W303-1A-control, respectively. After fermentation for 24 h in the complete media containing 8.0% ethanol and 0.5% isoamyl alcohol, W303-1A-*srp40*³⁹ showed the cell density 1.12 and 1.01 times that of W303-1A-*SRP40*, and 1.17 and 1.07 times that of W303-1A-control, respectively; W303-1A-*srp40*³⁹ showed the specific growth rate 1.37 and 1.07 times as high as that of W303-1A-*SRP40*, and 1.31 and 1.09 times as high as that of W303-1A-control, respectively. Moreover, W303-1A-*srp40*³⁹ still grew better than the other two strains after heat shock. The bioinformatics analysis showed that Srp40³⁹ protein had a similar structure to the pleuralin-1 of diatom. [Conclusion]

We found that the *srp40*³⁹ mutant gene can enhance the tolerance of *S. cerevisiae* to isobutanol, and plays a role in enhancing the tolerance to ethanol, isoamyl alcohol, and heat. Srp40³⁹ protein has a similar structure with the pleuralin-1 of diatom, which indicates that Srp40³⁹ protein may have the function of pleuralin-1 and play a role in cell wall maintenance. These findings will provide new ideas for improving the tolerance of *S. cerevisiae* to ethanol, isobutanol, isoamyl alcohol, and high temperature.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; *SRP40*; isobutanol; ethanol; tolerance

随着能源日益匮乏和环境问题逐渐加剧,生物异丁醇作为清洁能源备受瞩目。异丁醇相较于乙醇有着更高的能量密度、低吸湿性和低蒸汽压,有望成为替代乙醇的第二代生物燃料^[1]。酿酒酵母由于其简便的遗传操作、在低pH下生长的能力、对噬菌体的免疫力以及易于分离的特性^[2],并且自身可以通过 Ehrlich 途径合成异丁醇^[3],因此常作为产异丁醇的底盘菌株。

在酿酒酵母中,异丁醇作为缬氨酸合成通路的副产物产生,所以在酿酒酵母中的产量并不高。近年来,很多研究者通过对酿酒酵母异丁醇合成代谢通路进行疏通优化,实现了酿酒酵母异丁醇产量的提高。研究者主要通过对酿酒酵母异丁醇合成代谢通路中所需的基因过表达^[4],或者对副产物途径的基因进行敲除^[5],并对基因过表达或敲除的菌株维持辅因子平衡^[6],实现碳流量最大化地流向异丁醇合成路径,从而提高异丁醇产量。随着异丁醇产量的提高,其对细胞的毒害也加大,较高的异丁醇浓度会抑制细胞生长甚至造成细胞死亡,因此限制了酿酒酵母产异丁醇所能达到的最高产率^[7]。为了使酿酒酵母获得更高的异丁醇产量,提升酿酒酵母对异丁醇的耐受性是很有必要的。有研究表明,在提升酿酒酵母异丁醇耐受性的同时,也会提升酿酒酵母异丁醇的产量^[8]。

近年来,多种手段用于提升酿酒酵母对异丁醇的耐受性。热休克蛋白具有稳定细胞膜和参与蛋白质折叠、装配等作用^[9]。在醇的压力下,酵母细胞会产生热休克蛋白来做出应激,从而增加酿酒酵母对醇类的耐受性^[10]。通过对热休克蛋白家族基因 *HSP* 表达量进行调整,可以增加酿酒酵母对异丁醇的耐受性^[11]。对酿酒酵母诱导氮饥饿的 *GLN3* 基因进行缺失,可以消除酿酒酵母对氮饥饿的控制反应,同时也能提高酿酒酵母对异丁醇的耐受性^[8]。酿酒酵母对异丁醇的耐受机理较为复杂,且尚未有一个统一的认知,在复杂的耐受机制尚未揭示的情况下,通过适应性进化可以有效提高酿酒酵母对异丁醇的耐受性^[12-13]。相对于适应性进化,诱变技术具有突变率高、突变范围广和操作简单等特点,已经成为创制新品种的重要手段。通过物理方法(如紫外照射、等离子体处理等)^[14-15]或者化学诱变剂^[16]对原始菌株进行诱变,再通过表型筛选,可以实现菌株快速进化获得目标菌株。

本课题组前期通过甲基磺酸乙酯(EMS)对酿酒酵母 W303-1A 进行随机诱变,筛选出一株在 3%异丁醇培养基上生长良好的酿酒酵母突变株 EMS39^[17],为了探究该突变菌株高异丁醇耐受性的分子机制,我们对该突变株进行了全基因组测序。测序结果表明, *SRP40* 基因上含有多个突变。为了探究 *SRP40* 基因突变是否会

对酿酒酵母异丁醇耐受性产生影响,本研究首先以突变株酿酒酵母 EMS39 和野生型酿酒酵母 W303-1A 的染色体 DNA 为模板扩增出 *srp40*³⁹ 突变基因和野生型 *SRP40* 基因,然后将 *srp40*³⁹ 突变基因和野生型 *SRP40* 基因分别连接到质粒载体 YCplac22 上并导入酿酒酵母 W303-1A 中,通过将工程菌置于不同异丁醇浓度下生长并比较比生长速率,研究 *SRP40* 基因突变对酿酒酵母异丁醇耐受性的影响。同时,我们研究了 *SRP40* 基因突变对酿酒酵母乙醇、异戊醇和热激抗性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

本研究所用的菌种和质粒如表 1 所示。

1.1.1 YPD 液体培养基

10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖, 蒸馏水定容, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 YPD 固体培养基

10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖, 15 g/L 琼脂粉, 蒸馏水定容, pH 自然,

121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 LBA 液体培养基

5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl, 蒸馏水定容, pH 值为 7.5, 121 °C 灭菌 20 min 后添加终浓度为 100 μg/mL 氨苄青霉素。

1.1.4 LBA 固体培养基

5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl, 15 g/L 琼脂粉, 蒸馏水定容, pH 值为 7.5, 121 °C 灭菌 20 min 后添加终浓度为 100 μg/mL 氨苄青霉素。

1.1.5 完全选择培养基(CM)

6.7 g/L 无氨基酸酵母氮源(yeast nitrogenbase without amino acids), 20 g/L 葡萄糖, 2 g/L 除去标记氨基酸的氨基酸混合物, pH 值为 5.6, 固体培养基添加 2%琼脂, pH 值为 6.5, 蒸馏水定容, 121 °C 灭菌 20 min。

含异丁醇、乙醇或异戊醇的完全选择培养基: 在完全选择培养基中加入体积分数为 1.0%、1.3%的异丁醇或 8.0%的乙醇、0.5%的异戊醇。

1.2 引物

本文所用到的引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 具体如表 2 所示。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Features	Sources
<i>E. coli</i> DH5α	Host of gene cloning	[18]
W303-1A	<i>MATa leu2-3, 112 ura3-1 trp1-92 his-11, 15 ade2-1 can1-100</i>	[19]
EMS39	Unknown mutant	Laboratory preservation
W303-1A-control	W303-1A, containing plasmid YCplac22	This study
W303-1A- <i>SRP40</i>	W303-1A, containing plasmid YCplac22- <i>SRP40</i>	This study
W303-1A- <i>srp40</i> ³⁹	W303-1A, containing plasmid YCplac22- <i>srp40</i> ³⁹	This study
Ycplac22	<i>Amp^r TRP1</i>	[20]
Ycplac22- <i>srp40</i> ³⁹	<i>Amp^r TRP1</i>	This study
Ycplac22- <i>SRP40</i>	<i>Amp^r TRP1</i>	This study

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction site
SRP40-U	GGGCCCGAATTCCTACGTCGTCCTCTTCACTT	<i>EcoR</i> I
SRP40-D	GTACACAGGAGAATTCCTTTAC	<i>EcoR</i> I
SRP40+&-400.LOWER1-1	AAGATGACGATGACCCGCT	None
SRP40+&-400.LOWER1-2	CCGACGAGATCAAAGAGG	None
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAGT	None
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	None

The underline indicates restriction enzyme sites.

1.3 *srp40*³⁹ 基因序列克隆

将保藏于-80 °C 条件下的突变型酿酒酵母 EMS39 接种在 YPD 固体培养基上, 置于 30 °C 下活化培养 48 h, 挑取单菌落接种到 5 mL YPD 液体培养基中, 置于 30 °C、200 r/min 下过夜培养 16 h 后, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体并提取突变型酿酒酵母 EMS39 染色体 DNA。以提取的突变型酿酒酵母 EMS39 染色体 DNA 为模板, SRP40-U、SRP40-D 为引物扩增 *srp40*³⁹ 基因, 扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳验证条带是否正确, PCR 产物进行酚氯仿纯化。

1.4 *SRP40* 基因序列克隆

将保藏于-80 °C 条件下的野生型酿酒酵母 W303-1A 接种在 YPD 固体培养基上, 置于 30 °C 下活化培养 48 h, 挑取单菌落接种到 5 mL YPD 液体培养基中, 置于 30 °C、200 r/min 下过夜培养 16 h 后, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体并提取野生型酿酒酵母 W303-1A 染色体 DNA。以提取的酿酒酵母 W303-1A 染色体 DNA 为模板, SRP40-U、SRP40-D 为引物扩增 *SRP40* 基因, 扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳验证条带是否正

确, PCR 产物进行酚氯仿纯化。

1.5 YCplac22-*SRP40* 和 YCplac22-*srp40*³⁹ 表达载体构建及鉴定

在扩增 *SRP40*、*srp40*³⁹ 基因时, 上下游引物引入了 *EcoR* I 酶切位点, 所以用 *EcoR* I 分别对质粒载体 YCplac22 和 *SRP40*、*srp40*³⁹ 基因片段进行酶切, 酶切反应置于 37 °C 30 min, 酶切完成后将酶切产物置于 60 °C 5 min, 对限制性内切酶进行热失活。酶切后的载体和基因片段经 T₄ 连接酶过夜连接 16 h, 将连接体系全部转入感受态大肠杆菌 DH5 α , 细胞涂布于 LBA 固体培养基, 置于 37 °C 培养 24 h。随机挑取单克隆接种于 3 mL LBA 液体培养基中, 置于 37 °C、200 r/min 过夜培养 14 h, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体并以 CTAB 法提取质粒。用 *EcoR* I 对提取的质粒进行酶切, 酶切后的质粒进行琼脂糖凝胶电泳筛选阳性克隆。将阳性克隆转入感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于 LBA 固体培养基, 置于 37 °C 培养 24 h。挑取单克隆接种于 5 mL LBA 液体培养基中, 置于 37 °C、200 r/min 过夜培养 14 h, 取适量菌液送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

1.6 YCplac22-*SRP40* 和 YCplac22-*srp40*³⁹ 重组质粒转化酿酒酵母

从培养基上挑取酿酒酵母单菌落接种到

5 mL YPD 液体培养基中, 置于 30 °C、200 r/min 过夜培养 16 h 后, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体。菌体用 1 mL 无菌水水洗 2 次后收集菌体, 再用 1 mL 无菌水重悬混匀后取 100 μ L 离心收集菌体用于转化。采用醋酸锂法转化酿酒酵母细胞, 体系为 50% PEG4000 240 μ L、LiAc 36 μ L、ss-DNA 50 μ L、ddH₂O 32 μ L、质粒 DNA 2 μ L。体系高速振荡混匀后 42 °C 水浴 30 min, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体完全弃去上清液, 用 100 μ L 无菌水重悬菌体, 将细胞涂布在省缺色氨酸的 CM 固体培养基上, 置于 30 °C 培养 3–4 d。

1.7 耐醇性测试

挑取省缺色氨酸的 CM 固体培养基上的酿酒酵母单菌落, 接种至 5 mL 省缺色氨酸的 CM 液体培养基中, 置于 30 °C、200 r/min 过夜培养 16 h, 吸取适量菌液测量该发酵种子液在波长 600 nm 处的吸光值 OD_x , 发酵初始 OD_{600} 值设为 0.65, 取发酵种子液体积 V_x 转接至 40 mL 含不同异丁醇、乙醇和异戊醇浓度的省缺色氨酸的 CM 液体培养基中振荡混匀。发酵种子液体积 V_x 计算(公式 1):

$$V_x = 40 \cdot OD_{\text{初始}} / (OD_x - OD_{\text{初始}}) \quad (\text{公式 1})$$

发酵置于 30 °C、200 r/min 条件下, 发酵前 12 h 每隔 2 h 取 1 次样测量 OD_{600} 值, 24 h 后每隔 1 d 取 1 次样测量 OD_{600} 值。

1.8 耐热性测试

挑取省缺色氨酸的 CM 固体培养基上的酿酒酵母单菌落, 接种至 5 mL 省缺色氨酸的 CM 液体培养基中, 置于 30 °C、200 r/min 过夜培养 16 h 后测量其 OD_{600} 值, 取适量菌液稀释至 $OD_{600}=1$, 稀释后总体积为 1 mL。将稀释至 $OD_{600}=1$ 的菌液混匀后取 200 μ L 置于 55 °C 热激 4 min, 热激后的菌液取 2 μ L 以 10 的倍数梯度稀释, 依次得到 OD_{600} 为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、

10^{-4} 、 10^{-5} 的菌液。取梯度稀释后各个浓度的菌液 5 μ L 由高到低点到省缺色氨酸的 CM 固体培养基上, 静置晾干后置于 30 °C 培养 2 d。

1.9 比生长速率计算

比生长速率(μ)计算选取细胞生长的对数期, 选取 2 h 和 10 h 的值来进行比生长速率(μ)的计算(公式 2)。

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad (\text{公式 2})$$

其中 X_1 、 X_2 代表 t_1 、 t_2 时的细胞密度。

1.10 耐异丁醇工程菌遗传稳定性实验

将 1.6 得到的异丁醇耐受性较好的工程菌接种于省缺色氨酸的 CM 液体培养基中, 连续传代 5 次。每次传代均在 30 °C、200 r/min 培养 24 h。传至第 5 代后, 按照方法 1.7 进行重复实验。

1.11 生物信息学分析

利用 ExPASy 网站上的 ProtParam 工具在线分析目的蛋白的理化性质 (<https://web.expasy.org/protparam/>); 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 和 I-TASSERL (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 网站在线预测分析蛋白的二级结构和三级结构; 利用 SuperPose (<http://superpose.wishartlab.com/>) 对蛋白的三级结构进行比对。

2 结果与分析

2.1 *SRP40* 和 *srp40*³⁹ 基因序列克隆及 YCplac22-*SRP40* 和 YCplac22-*srp40*³⁹ 表达载体构建

以提取的突变型酿酒酵母 EMS39 和野生型酿酒酵母 W303-1A 染色体 DNA 为模板, *SRP40*-U/*SRP40*-D 为引物进行扩增, 得到预期大小的目的片段, *srp40*³⁹ 和 *SRP40* 基因片段大小均为 2 183 bp, 结果如图 1 所示。将 *SRP40* 和

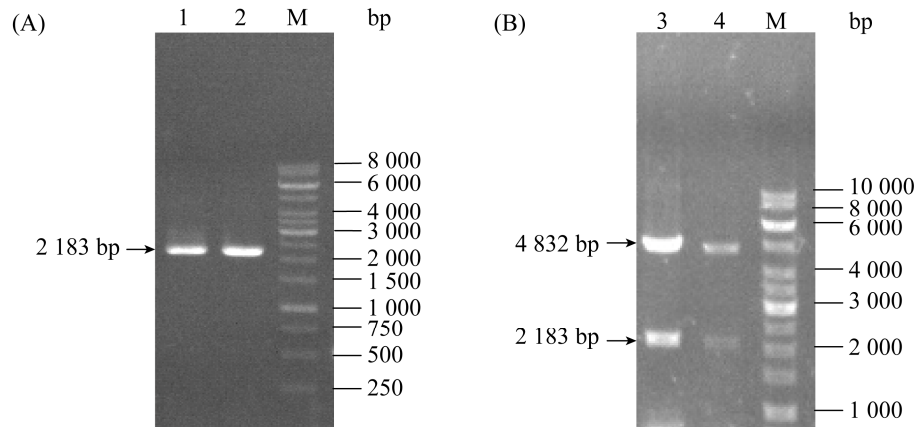


图 1 *SRP40*、*srp40*³⁹ 基因及质粒 YCplac22-*SRP40*、YCplac22-*srp40*³⁹ 构建

Figure 1 *SRP40*, *srp40*³⁹ gene and construction of plasmid YCplac22-*SRP40*, YCplac22-*srp40*³⁹. A: electrophoretogram of *SRP40* and *srp40*³⁹ gene. M: DNA marker; lane 1: *SRP40* gene; lane 2: *srp40*³⁹ gene. B: plasmid verified electrophoretogram of YCplac22-*SRP40* and YCplac22-*srp40*³⁹. M: DNA marker; lane 3: YCplac22 vector and *SRP40* gene; lane 4: YCplac22 vector and *srp40*³⁹ gene.

*srp40*³⁹ 基因片段与质粒载体 YCplac22 连接后, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于 LBA 固体培养基, 随机挑取单克隆培养并提取相应质粒, *EcoR* I 单酶切筛选出正确重组子, 结果如图 1 所示, *SRP40* 和 *srp40*³⁹ 基因片段大小为 2 183 bp, YCplac22 载体片段大小为 4 832 bp。

2.2 YCplac22-*srp40*³⁹ 测序

为了确定 *srp40*³⁹ 基因片段上的突变位点, 将筛选出的阳性克隆重新转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 细胞涂布于 LBA 固体培养基上, 挑取单克隆接种于 LBA 液体培养基过夜培养, 取一部分菌液提取质粒后酶切验证, 验证为正确克隆后将剩余菌液取适量送往公司测序。测序引物分别为 M13 Forward、SRP40+&-400.LOWER1-1、SRP40+&-400.LOWER1-2、M13 Reverse, 测序结果与 W303-1A 基因组的 *SRP40* 基因做对比。测序结果和比对结果表明, *srp40*³⁹ (NMDC 登记号: NMDCN0000NMU) 开放阅读框(ORF)共 1 160 bp, 从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA 共有 5 个突变: 其中 4 个为碱基替换突变,

1 个为碱基缺失。*SRP40*³⁹ ORF 序列中 570、711 bp 处 2 个碱基替换突变为同义突变, 442 bp 处 1 个碱基替换突变造成相应的氨基酸突变为 S148P。1 018 bp 处的 1 个碱基缺失造成移码突变, 1 050 bp 处的 1 个碱基替换突变位于移码突变中。*srp40*³⁹ 中 1 018 bp 处的碱基缺失造成翻译提前终止, 使得翻译的氨基酸残基数目比野生型 *SRP40* 基因氨基酸残基数目少 34 个。

2.3 耐受性测试

2.3.1 耐异丁醇测试

将质粒 YCplac22、YCplac22-*SRP40* 和 YCplac22-*srp40*³⁹ 分别转化酿酒酵母 W303-1A 细胞, 得到 W303-1A-control、W303-1A-*SRP40* 和 W303-1A-*srp40*³⁹ 3 株工程菌。将这 3 株菌分别接种到 5 mL 省缺色氨酸的 CM 液体培养基中, 过夜培养后, 以初始 $OD_{600}=0.65$ 转接至 40 mL 含有 0%、1.0%、1.3% (*V/V*) 异丁醇的省缺色氨酸的 CM 液体培养基中。发酵置于 30 °C、200 r/min 条件下, 发酵前 12 h 每隔 2 h 取 1 次样测量 OD_{600} 值, 24 h 后每隔 1 d 取 1 次样测量

OD_{600} 值, 以时间为横坐标, 以细胞密度为纵坐标绘制菌株生长曲线。如图 2A 所示, 在 0% 异丁醇浓度下, 3 株工程菌在发酵的 24 h 内的生长差异很小, 在 24 h 后, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度低于工程菌 W303-1A-*SRP40* 和对照菌 W303-1A-control。如图 2C 所示, 在 1.0% 异丁醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 在发酵的 108 h 内细胞密度都明显高于工程菌 W303-1A-*SRP40* 和对照菌 W303-1A-control, 而工程菌 W303-1A-*SRP40* 和对照菌 W303-1A-control 的细胞密度差异不大, 且在 24 h 后工程菌 W303-1A-*SRP40* 细胞密度略低于对照菌 W303-1A-control。3 株菌株都在 24 h 达到稳定期, 发酵到 24 h, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.12 倍, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.10 倍。如图 2E 所示, 在 1.3% 异丁醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 在发酵的前 24 h 内细胞密度要高于 W303-1A-*SRP40* 和 W303-1A-control, 而 W303-1A-*SRP40* 和 W303-1A-control 菌株的细胞密度差异不大, 且 W303-1A-*SRP40* 菌株的细胞密度在发酵前 24 h 内略低于 W303-1A-control 菌株。发酵进行到 24 h, W303-1A-*srp40*³⁹ 和 W303-1A-control 菌株达到最高细胞密度, 24 h 后逐渐出现衰减; W303-1A-*SRP40* 菌株细胞密度在 24 h 后出现略微增高后趋于稳定。发酵到 24 h, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.06 倍, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.10 倍。

将各个菌株 2 h 和 10 h 测得的细胞密度代入公式: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$, 可得出各菌株的比生长速率(μ)。如图 2B 所示, 在 0% 异丁醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率是工程菌 W303-1A-*SRP40* 和对照菌的

1.02 倍, 3 株工程菌的比生长速率几乎无差异。如图 2D 所示, 在 1.0% 异丁醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率是对照菌的 1.10 倍, 是工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.07 倍, 而工程菌 W303-1A-*SRP40* 与对照菌的比生长速率差异不大。如图 2F 所示, 在 1.3% 异丁醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率是对照菌和工程菌 W303-1A-*SRP40* 的 1.10 倍。

在无异丁醇下进行发酵时, 3 株工程菌在 24 h 前生长曲线几乎重合, 说明 3 株工程菌生长差异不大, 并且到发酵后期, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度要低于其他 2 株菌。当添加了 1.0% 和 1.3% 异丁醇进行发酵时, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度要高于其他 2 株菌, 这说明 *srp40*³⁹ 突变基因能够提高酿酒酵母对异丁醇的耐受性。工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率在 1.0% 和 1.3% 异丁醇浓度下, 都要高于工程菌 W303-1A-*SRP40* 和对照菌 W303-1A-control, 说明工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 在异丁醇抑制下仍能保持较快的生长速率, 也进一步说明工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的异丁醇耐受性要优于其他 2 株菌。

2.3.2 耐乙醇、异戊醇测试

将 3 株工程菌分别接种到 5 mL 省缺色氨酸的 CM 液体培养基中, 过夜培养后, 以初始 $OD_{600}=0.65$ 转接至 40 mL 含有 8.0% 乙醇(V/V) 和 0.5% (V/V) 异戊醇的省缺色氨酸的 CM 液体培养基中。发酵置于 30 °C、200 r/min 条件下, 发酵前 12 h 每隔 2 h 取 1 次样测量 OD_{600} 值, 24 h 后每隔 1 d 取 1 次样测量 OD_{600} 值, 以时间为横坐标, 以细胞密度为纵坐标绘制菌株的生长曲线。如图 3A 所示, 在 8% 乙醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 在发酵的 108 h 内细胞密度都明显高于工程菌 W303-1A-*SRP40* 和对照菌 W303-1A-control, 而工程菌 W303-1A-*SRP40*

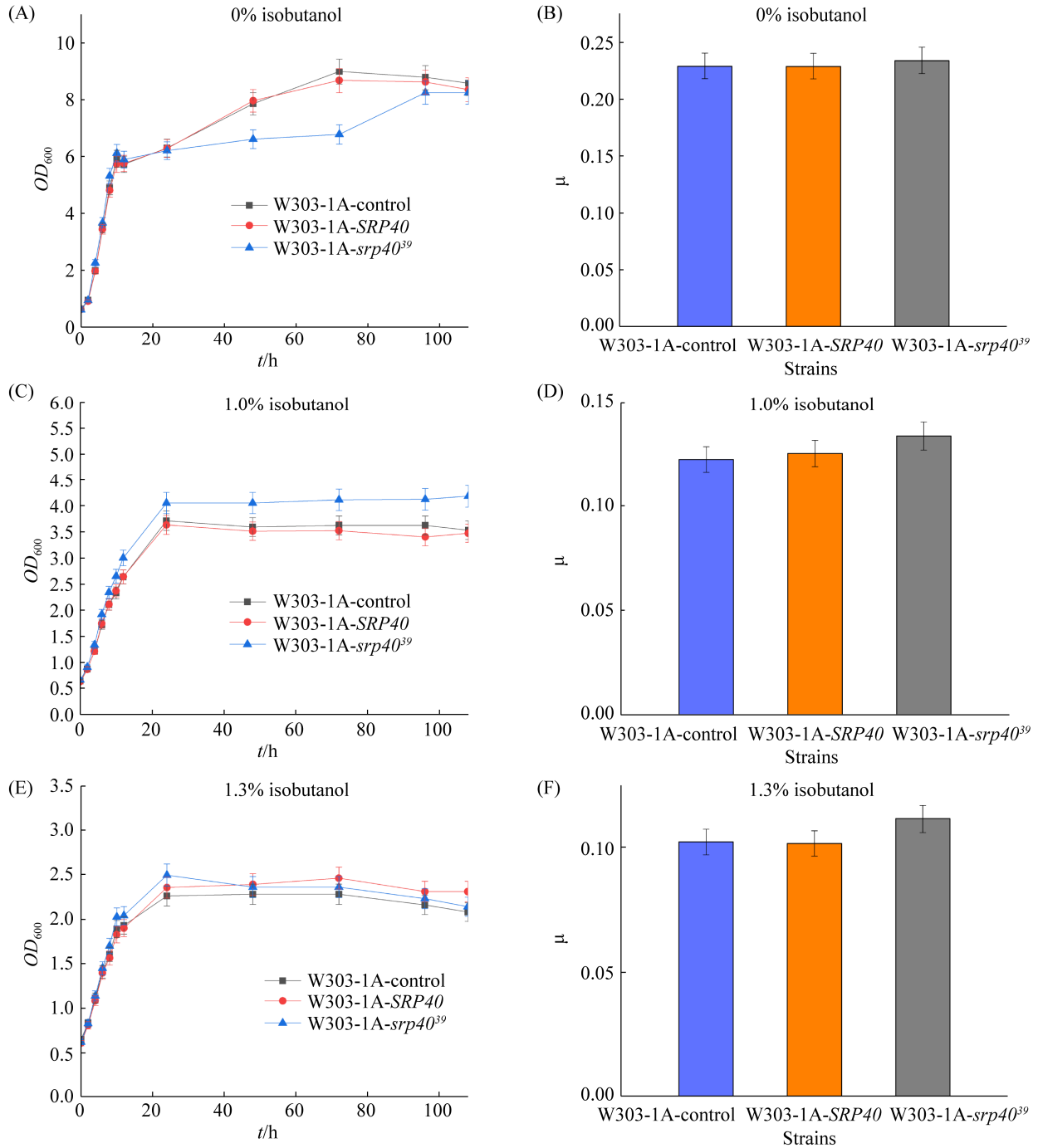


图 2 菌株 W303-1A-control、W303-1A-SRP40 和 W303-1A-srp40³⁹ 生长和比生长速率情况

Figure 2 Growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-srp40³⁹. A, B: growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-srp40³⁹ in 40 mL CM minus tryptophan without isobutanol. C, D: growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-srp40³⁹ in 40 mL CM minus tryptophan+1.0% isobutanol. E, F: growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-srp40³⁹ in 40 mL CM minus tryptophan+1.3% isobutanol. μ : specific growth rates. Data are presented as mean value and standard deviations of three independent biological replicates.

和对照菌 W303-1A-control 的细胞密度在发酵 24 h 内差异很小, 在 24 h 后工程菌 W303-1A-SRP40 细胞密度略高于对照菌 W303-1A-control。3 株菌株的细胞密度都在 24 h 后逐渐走向衰减, 发酵到 24 h, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度是工程菌 W303-1A-SRP40 的 1.12 倍, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.17 倍。如图 3C 所示, 在 0.5% 异戊醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 和 W303-1A-SRP40 在发酵的 108 h 内细胞密度

都略高于对照菌 W303-1A-control, 而工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 和 W303-1A-SRP40 在发酵的 108 h 内细胞密度差异较小。3 株菌株的细胞密度都在 24 h 后逐渐走向衰减, 发酵到 24 h 时, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的细胞密度与工程菌 W303-1A-SRP40 无明显差异, 是对照菌 W303-1A-control 的 1.05 倍。

如图 3B 所示, 在 8.0% 乙醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率是对照菌的 1.31 倍, 是工程菌 W303-1A-SRP40 的 1.37 倍。

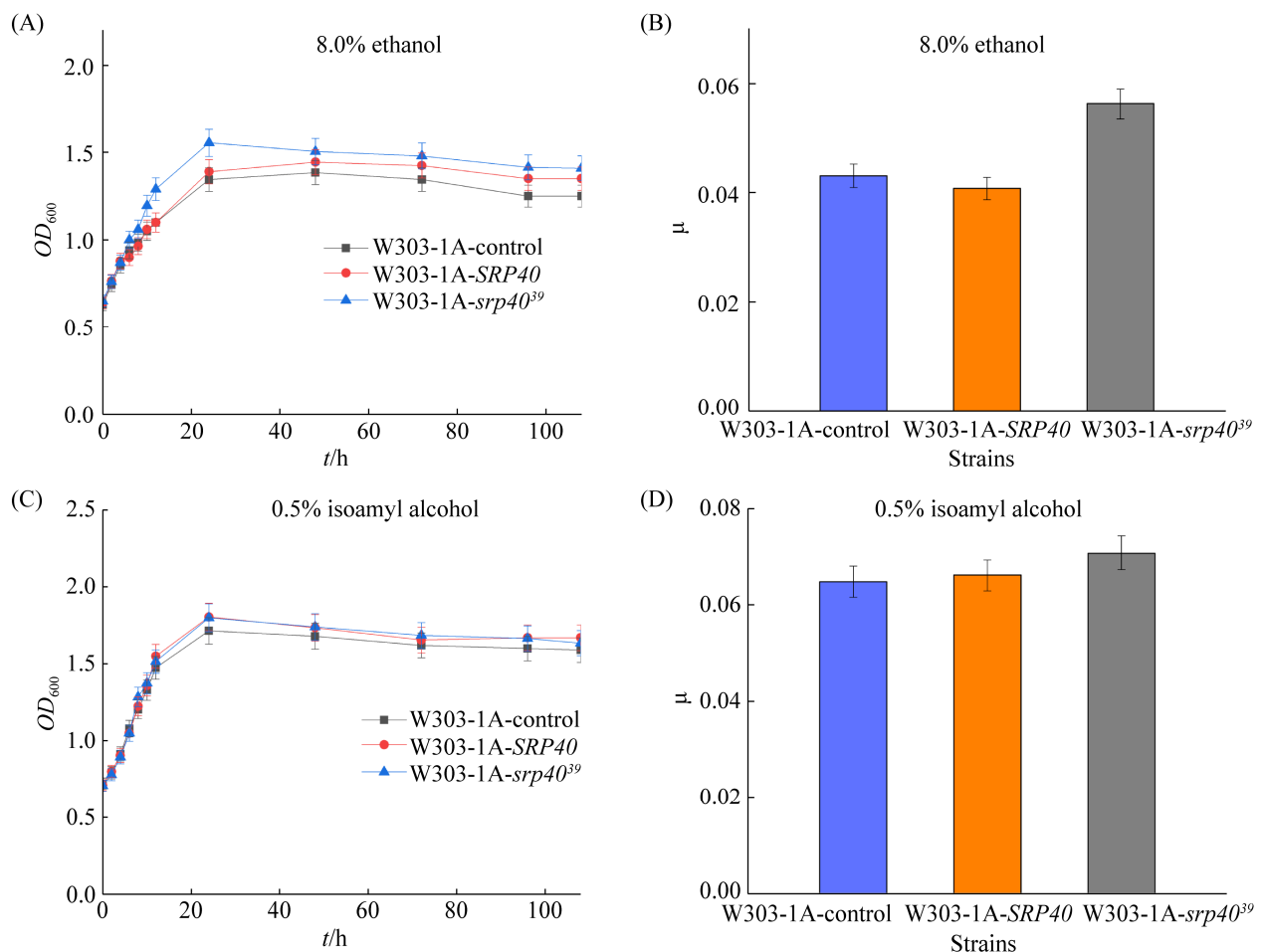


图 3 菌株 W303-1A-control、W303-1A-SRP40 和 W303-1A-*srp40*³⁹ 生长和比生长速率情况

Figure 3 Growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-*srp40*³⁹. A, B: growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-*srp40*³⁹ in 40 mL CM minus tryptophan+8.0% ethanol. C, D: growth and specific growth rates of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-*srp40*³⁹ in 40 mL CM minus tryptophan+0.5% isoamyl alcohol. μ : specific growth rates. Data are presented as mean value and standard deviations of three independent biological replicates.

如图 3D 所示, 在 0.5% 异戊醇浓度下, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的比生长速率是对照菌的 1.09 倍, 是工程菌 W303-1A-SRP40 的 1.07 倍。

此结果表明, *srp40*³⁹ 突变基因对提高酿酒酵母乙醇和异戊醇耐受性也有一定的作用, 在提升酿酒酵母乙醇耐受性方面有着较为明显的作用, 而在提升异戊醇耐受性方面效果较小。

2.3.3 耐热性测试

将 3 株工程菌分别接种到 5 mL 省缺色氨酸的 CM 液体培养基中, 过夜培养后测其 OD_{600} 值, 各取适量菌液稀释至 $OD_{600}=1$ 。取稀释至 $OD_{600}=1$ 的菌液 200 μ L, 55 $^{\circ}$ C 热激 4 min, 热激后的菌液取 2 μ L 梯度稀释, 取各个梯度浓度的菌液 5 μ L 点到省缺色氨酸的 CM 固体培养基上。如图 4A 所示, 在无热激条件下, 3 株工程菌的生长差异不大, 说明 3 株工程菌的起始浓度一致。如图 4B 所示, 在 55 $^{\circ}$ C 热激 4 min 条件下, 3 株工程菌受到了不同程度的抑制, 但工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 的生长要优于其他 2 株菌。在 10^{-3} 稀释倍数下, 对照菌 W303-1A-control 无菌落长出, 工程菌 W303-1A-SRP40 菌落较为稀少, 而工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 有比较密集的菌落长出, 这说明 *srp40*³⁹ 突变基因也能够提高酿酒酵母的耐热性。

2.4 耐异丁醇工程菌遗传稳定性实验

对耐异丁醇的工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 进行遗传稳定性实验, 结果如图 5 所示, 经过 5 次传代, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 在 1.0% 异丁醇浓度下, 生长仍优于工程菌 W303-1A-SRP40、W303-1A-control, 所以工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 遗传稳定性良好, 多次传代后仍能保持稳定遗传。

2.5 Srp40、Srp40³⁹ 蛋白生物信息学分析结果

2.5.1 Srp40、Srp40³⁹ 理化性质

根据 ExPASy 网站在线分析结果表明, Srp40 蛋白的分子式为 $C_{1522}H_{2437}N_{457}O_{750}S_2$, 相对分子质量为 39 202, 理论等电点为 4.25, 为酸性蛋白。Srp40 蛋白共含 386 个氨基酸, 其中含量最高的为丝氨酸, 占总氨基酸的 46.6%, 其次为谷氨酸和天冬氨酸, 占比为 10.4% 和 9.6%; 带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为 77 个, 带正电荷的残基总数(Arg+Lys)为 37 个。不稳定指数为 109.7 (>40), 为不稳定蛋白。亲水指数为 19.77, 亲水性平均值为 -1.366, 为亲水蛋白。Srp40³⁹ 蛋白的分子式为 $C_{1363}H_{2181}N_{407}O_{699}S_2$, 相对分子质量为 35 518, 理论等电点为 4.09, 为酸性蛋白。Srp40³⁹ 蛋白共含 352 个氨基酸,

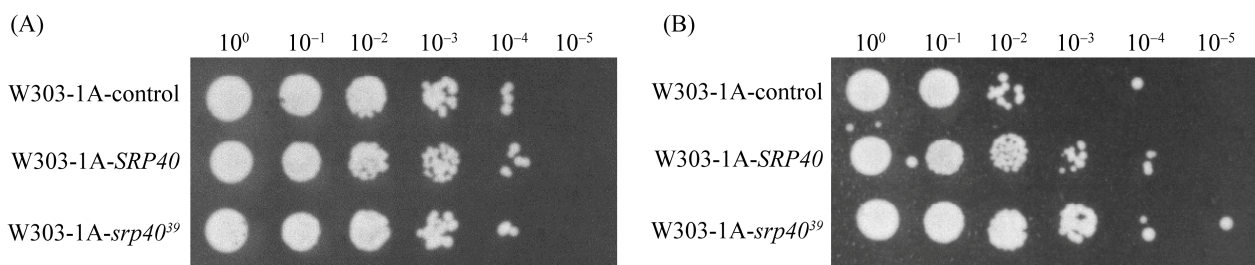


图 4 菌株 W303-1A-control、W303-1A-SRP40 和 W303-1A-*srp40*³⁹ 耐热性情况

Figure 4 Heat resistance of strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-*srp40*³⁹. A: strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-*srp40*³⁹ were not treated by heat shock; B: strains W303-1A-control, W303-1A-SRP40 and W303-1A-*srp40*³⁹ were heated at 55 $^{\circ}$ C for 4 min.

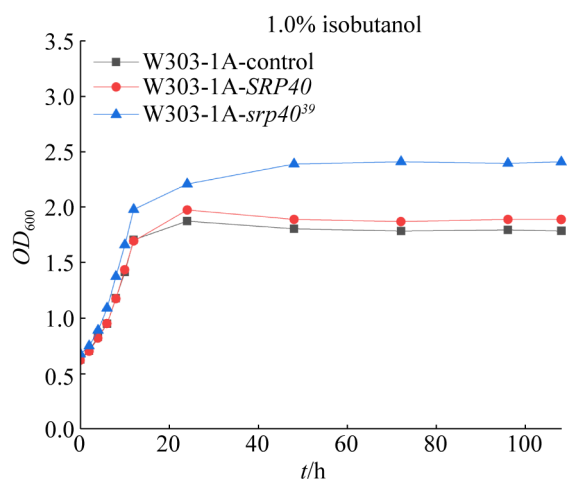


图5 传代稳定性实验

Figure 5 Progeny stability verification.

其中含量最高的为丝氨酸, 占总氨基酸的 49.7%, 其次为谷氨酸和天冬氨酸, 占比为 11.1% 和 9.9%; 带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为 72 个, 带正电荷的残基总数(Arg+Lys)为 28 个。不稳定指数为 118.65 (>40), 为不稳定蛋白。亲水指数为 18.89, 亲水性平均值为-1.368, 为亲水蛋白^[21]。Srp40、Srp40³⁹理化性质如表 3 所示。上述结果表明, Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白均为不稳定的酸性亲水蛋白。

2.5.2 Srp40、Srp40³⁹ 蛋白结构预测

SOPMA 预测二级结构结果显示, Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白的二级结构均由 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规则卷曲组成。Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白的二级结构具体组成如表 4 所示。I-TASSERL 预测的 Srp40、Srp40³⁹ 蛋白三级结构如图 6 所示, 其中 Srp40 蛋白模型信任值 C-score=-0.96,

TM-score=0.59±0.14, Srp40³⁹ 蛋白模型 C-score=-0.92, TM-score=0.6±0.14。将 Srp40³⁹ 蛋白三级结构模型与 PDB 库中的蛋白模型进行比对, 结果发现, Srp40³⁹ 蛋白与硅藻的胸膜蛋白-1 具有相似的结构, 利用 SuperPose 对 Srp40³⁹ 蛋白和硅藻的胸膜蛋白-1 结构比对得出的总 RMSD 值为 4.29, 说明 2 个蛋白较为相似。上述结果表明, 2 个蛋白结构相似, 可能具有相似的功能, 而硅藻的胸膜蛋白-1 在组成硅藻细胞壁方面有作用^[22], 我们推测工程菌 W303-1A-srp40³⁹ 所具有的耐受性可能与细胞壁维持有关。

3 讨论与结论

酵母在遭受异丁醇胁迫时, 会改变多种基因的表达水平或者生理状态来抵抗或者适应异丁醇压力。但酿酒酵母异丁醇耐受机制较为复杂, 许多与异丁醇耐受性相关的基因尚未揭示, 通过物理或化学随机诱变的方式来获得异丁醇耐受性菌株, 再通过基因组测序和逆向工程的方法, 筛选出一些与异丁醇耐受性相关的突变基因。

EMS 是一种烷基化剂, 通过 A-T 转化为 G-C 诱导点突变^[23]。EMS 诱变应用领域广泛, 在植物育种方面尤为突出^[24-25]。除了植物育种外, EMS 诱变也常被用于提升菌株的产酶活性^[16,26-27]。EMS 诱变同样适用于耐受醇类的菌株筛选。通过 EMS 随机诱变, 再通过表型筛选, 可得到醇类耐受菌株。Mobini-Dehkordi 等^[28]利用 EMS 对一株商业酿酒酵母进行了诱变, 在

表3 Srp40、Srp40³⁹ 蛋白理化性质Table 3 Physicochemical properties of Srp40 and Srp40³⁹ proteins

Names	Molecular weight	pI	Negatively charged residues	Positively charged residues	Instability index	Aliphatic index	GRAVY
Srp40	39 202	4.25	77	37	109.7	19.77	-1.366
Srp40 ³⁹	35 518	4.09	72	28	118.65	18.89	-1.368

表 4 Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白二级结构组成
Table 4 Secondary structural composition of Srp40 and Srp40³⁹ proteins

Names	α -helix/ %	Extended strand/%	β -turn/%	Random coil/%
Srp40	16.32	4.66	3.89	75.13
Srp40 ³⁹	19.89	2.84	2.27	75.00

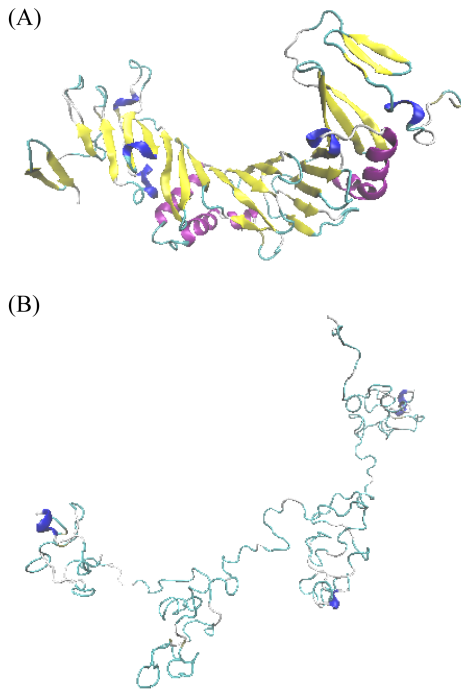


图 6 Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白三级结构
Figure 6 The tertiary structure of Srp40 and Srp40³⁹ proteins. A: Srp40; B: Srp40³⁹.

分离的众多突变株中, 有 6 株可在添加 10% (*V/V*)乙醇的固体需氧低蛋白胨(ALP)培养基上生长, 这是 EMS 应用于分离耐高浓度乙醇的酿酒酵母突变株的首次报道。同样的机理也可用于耐受异丁醇酿酒酵母菌株的筛选。本课题组前期利用 EMS 对酿酒酵母进行随机诱变, 并在逐渐提高异丁醇浓度的培养基上进行筛选, 成功获得一株可耐受 3%异丁醇的酿酒酵母突变株 EMS39^[17]。后续我们通过基因组测序发现酿酒酵母突变株 EMS39 的 *SRP40* 基因上含有多

个突变, 我们扩增出该突变基因并连接到质粒载体上, 然后将重组质粒转入酿酒酵母中, 得到工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹。通过在含有异丁醇、乙醇和异戊醇的培养基中进行发酵, 结果表明, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 对异丁醇、乙醇和异戊醇均有一定的耐受性。此外, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 还表现出良好的耐热性, 耐高温的酿酒酵母对工业生产生物燃料有较大实用价值。有研究表明, 酵母 Srp40 是 Nopp140 的功能同源物^[29], Nopp140 家族蛋白在核糖体的生物合成和核质转运中发挥作用, 在核糖体生物发生过程中, Nopp140 被认为有助于组装小核仁核糖核蛋白(snoRNP)复合物^[30]。在缺乏 SnoRNPs 的核仁中 RNA 聚合酶 I 的转录会被抑制, 这使得 rRNA 修饰和转录之间产生了反馈机制^[31], 而缺失 *SRP40* 基因的菌株会造成 snoRNAs 减少^[32]。*SRP40* 突变基因也可能对 snoRNAs 造成影响, 进而影响 RNA 聚合酶, 而 RNA 聚合酶的改变能够提高酵母的耐受性^[33]。

通过生物信息学对 Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白理化性质和结构进行预测, 结果表明 Srp40 和 Srp40³⁹ 蛋白均为不稳定的酸性亲水蛋白, 且两者的理化性质差异较小。Srp40³⁹ 蛋白与硅藻的胸膜蛋白-1 具有相似的结构, 所以 Srp40³⁹ 蛋白与硅藻的胸膜蛋白-1 可能具有相似的功能。硅藻的胸膜蛋白-1 在组成硅藻细胞壁方面有作用, Srp40³⁹ 蛋白也可能在细胞壁组成方面有作用。酿酒酵母细胞壁在维持胞内渗透压、防止机械损伤和维持细胞形态等方面有重要作用^[34]。酿酒酵母细胞壁的维持能够使酿酒酵母获得良好的抗逆性和细胞活性^[35-37]。Srp40³⁹ 蛋白可能通过改变细胞壁组成或结构的稳定, 提高酿酒酵母的醇类耐受性和热激抗性。

本研究构建了 2 个重组质粒 YCplac22-*SRP40* 和 YCplac22-*srp40*³⁹, 其中 YCplac22-*srp40*³⁹

质粒带有 *srp40*³⁹ 突变基因, YCplac22-SRP40 质粒带有野生型 *SRP40* 基因。将质粒 YCplac22-SRP40、YCplac22-*srp40*³⁹ 和 YCplac22 分别导入酿酒酵母 W303-1A 中, 得到工程菌 W303-1A-SRP40、W303-1A-*srp40*³⁹ 和 W303-1A-control。将 3 株工程菌分别置于含有 1.0%、1.3% 异丁醇或者 8.0% 乙醇、0.5% 异戊醇的省缺色氨酸的 CM 液体培养基中进行发酵对比, 结果发现, 工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 无论是在何种醇类环境下, 相比对照均具有较好的生长表现。此外, 本研究还将 3 株工程菌在 55 °C 下热激 4 min 后进行稀释实验, 发现工程菌 W303-1A-*srp40*³⁹ 也具有一定的耐热性。上述结果表明, 突变基因 *srp40*³⁹ 对提高酿酒酵母的抗逆性具有一定的作用。最后, 我们对 Srp40³⁹ 蛋白的氨基酸序列进行了生物信息学分析, 发现 Srp40³⁹ 蛋白与硅藻的胸膜蛋白-1 具有相似的结构, 而硅藻的胸膜蛋白-1 在细胞壁的组成方面有作用, 根据蛋白相似的结构具有相似的功能, 我们推测 W303-1A-*srp40*³⁹ 所具有的耐受能力可能与细胞壁维持有关。

参考文献

- [1] Brooks KP, Snowden-Swan LJ, Jones SB, Butcher MG, Lee G, Anderson DM, Frye JG, Holladay JE, Owen J, Harmon L, Burton F, Palou-Rivera I, Plaza J, Handler R, Shonnard D. Low-carbon aviation fuel through the alcohol to jet pathway. *Biofuels for Aviation*. Amsterdam: Elsevier, 2016: 109–150.
- [2] Kuroda K, Ueda M. Cellular and molecular engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biobutanol production. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(3): fnv247.
- [3] Kondo T, Tezuka H, Ishii J, Matsuda F, Ogino C, Kondo A. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 2012, 159(1/2): 32–37.
- [4] Chen X, Nielsen KF, Borodina I, Kielland-Brandt MC, Karhumaa K. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 1–12.
- [5] Li W, Chen Sj, Wang JH, Zhang CY, Shi Y, Guo XW, Chen YF, Xiao DG. Genetic engineering to alter carbon flux for various higher alcohol productions by *Saccharomyces cerevisiae* for Chinese Baijiu fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(4): 1783–1795.
- [6] Ida K, Ishii J, Matsuda F, Kondo T, Kondo A. Eliminating the isoleucine biosynthetic pathway to reduce competitive carbon outflow during isobutanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1–9.
- [7] Kanno M, Katayama T, Tamaki H, Mitani Y, Meng XY, Hori T, Narihiro T, Morita N, Hoshino T, Yumoto I, Kimura N, Hanada S, Kamagata Y. Isolation of butanol- and isobutanol-tolerant bacteria and physiological characterization of their butanol tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(22): 6998–7005.
- [8] Kuroda K, Hammer SK, Watanabe Y, Montañó López J, Fink GR, Stephanopoulos G, Ueda M, Avalos JL. Critical roles of the pentose phosphate pathway and GLN₃ in isobutanol-specific tolerance in yeast. *Cell Systems*, 2019, 9(6): 534–547.
- [9] Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Récnacq M, Boucherie H. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology: Reading, England*, 1994, 140(Pt 11): 3031–3038.
- [10] Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, Imamura T, Shimoi H, Ito K. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(3): 313–320.
- [11] Crook N, Sun J, Morse N, Schmitz A, Alper HS. Identification of gene knockdown targets conferring enhanced isobutanol and 1-butanol tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* using a tunable RNAi screening approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23): 10005–10018.
- [12] González-Ramos D, Van Den Broek M, Van Maris AJ, Pronk JT, Daran JMG. Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal

- an essential role of protein degradation. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 48.
- [13] Davis López SA, Griffith DA, Choi B, Cate JHD, Tullman-Ereck D. Evolutionary engineering improves tolerance for medium-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 90.
- [14] Gong JJ, Siede W. SBF transcription factor complex positively regulates UV mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(4): 1009–1014.
- [15] Cai M, Wu YZ, Qi H, He JZ, Wu ZZ, Xu HJ, Qiao MQ. Improving the level of the tyrosine biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through HTZ1 knockout and atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(1): 49–62.
- [16] Angelov AI, Karadjov GI, Roshkova ZG. Strains selection of baker's yeast with improved technological properties. *Food Research International*, 1996, 29(3/4): 235–239.
- [17] 温智慧, 李敬知, 冯瑞琪, 苏意德, 张爱利. EMS 诱变高异丁醇耐受性酿酒酵母的筛选. *中国酿造*, 2018, 37(10): 66–71.
Wen ZH, Li JZ, Feng RQ, Su YD, Zhang AL. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* with high isobutanol tolerance by EMS mutagenesis. *China Brewing*, 2018, 37(10): 66–71. (in Chinese)
- [18] Hanahan D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA Cloning A Practical Approach*. 1985: 109–135.
- [19] Thomas BJ, Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 1989, 56(4): 619–630.
- [20] Gietz RD, Akio S. New yeast *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 1988, 74(2): 527–534.
- [21] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005: 571–607.
- [22] De Sanctis S, Wenzler M, Kröger N, Malloni WM, Sumper M, Deutzmann R, Zdravec P, Brunner E, Kremer W, Kalbitzer HR. PSCD domains of pleuralin-1 from the diatom *Cylindrotheca fusiformis*: NMR structures and interactions with other biosilica-associated proteins. *Structure*, 2016, 24(7): 1178–1191.
- [23] French CT, Ross CD, Keysar SB, Joshi DD, Lim CU, Fox MH. Comparison of the mutagenic potential of 17 physical and chemical agents analyzed by the flow cytometry mutation assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2006, 602(1/2): 14–25.
- [24] Shah D, Kamili AN, Wani AA, Majeed U, Wani ZA, Sajjad N, Ahmad P. Promoting the accumulation of scopolamine and hyoscyamine in *Hyoscyamus niger* L. through EMS based mutagenesis. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0231355.
- [25] Serrat X, Esteban R, Guibourt N, Moysset L, Nogués S, Lalanne E. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining tilling mutant populations. *Plant Methods*, 2014, 10(1): 5.
- [26] Khattab AA, Bazaraa WA. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, 32(7): 289–294.
- [27] Ribeiro O, Magalhães F, Aguiar TQ, Wiebe MG, Penttilä M, Domingues L. Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered Bugs*, 2013, 4(5): 322–331.
- [28] Mobini-Dehkordi M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Ghaedi K, Tavassoli M, Akada R. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(4): 403–408.
- [29] Yang YF, Meier UT. Genetic interaction between a chaperone of small nucleolar ribonucleoprotein particles and cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(26): 23553–23560.
- [30] Kelly S, Singleton W, Wickstead B, Ersfeld K, Gull K. Characterization and differential nuclear localization of Nopp140 and a novel Nopp140-like protein in trypanosomes. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(5): 876–879.
- [31] Yang Y, Isaac C, Wang C, Dragon F, Pogacic V, Meier UT. Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11(2): 567–577.

- [32] Verheggen C. Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *The EMBO Journal*, 2001, 20(19): 5480–5490.
- [33] Qiu ZL, Jiang RR. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 1–13.
- [34] Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2006, 23(3): 185–202.
- [35] Liu ZL, Wang X, Weber SA. Tolerant industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* posses a more robust cell wall integrity signaling pathway against 2-furaldehyde and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde. *Journal of Biotechnology*, 2018, 276/277: 15–24.
- [36] Udom N, Chansongkrow P, Charoensawan V, Auesukaree C. Coordination of the cell wall integrity and high-osmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(15): e00551–e00519.
- [37] 杨歌, 王金晶, 李佳, 郑飞云, 刘春风, 李永仙, 钮成拓, 李崎. FKS 家族基因对酿酒酵母压力耐性的影响. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(10): 126–134.
- Yang G, Wang JJ, Li J, Zheng FY, Liu CF, Li YX, Niu CT, Li Q. Effects of FKS family genes on the ability of *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(10): 126–134. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)