



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115478024 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 17

(21) 申请号 202211344795.9
(22) 申请日 2022.10.31
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115478024 A

(43) 申请公布日 2022.12.16
(83) 生物保藏信息
CGMCC No. 25730 2022.09.16

(73) 专利权人 齐鲁工业大学
地址 250399 山东省济南市长清区大学路
3501号

(72) 发明人 徐丽丽 鲍晓明 夏天晴 王赞
李在禄 曾杜文 邱晨曦

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218
专利代理师 李桂存

(51) Int. Cl.
C12N 1/18 (2006.01)

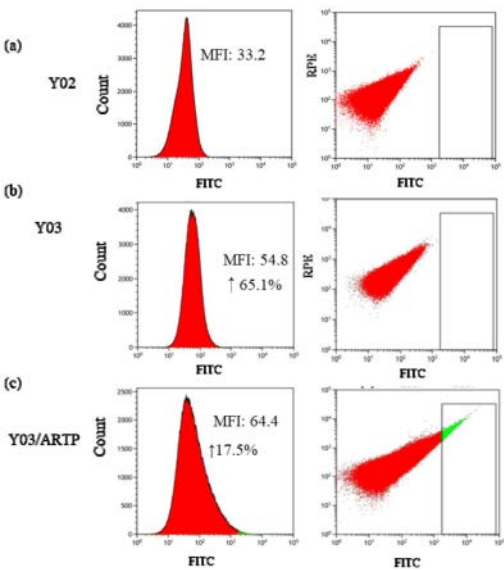
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 108893417 A, 2018.11.27
CN 106635851 A, 2017.05.10
CN 112680370 A, 2021.04.20
CN 101928674 A, 2010.12.29
CN 103820337 A, 2014.05.28
陈皓 等.高核糖核酸酵母选育的研究进展
.2022,第47卷(第1期),第206-210页.
Yu Sasano 等.Molecular breeding of
Saccharomyces cerevisiae with high RNA
content by harnessing essential ribosomal
RNA transcription regulator.2017,第7卷
卷第1-11页.

审查员 蔡玉品
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称
一株非转基因高核酸酿酒酵母菌株及其应
用

(57) 摘要
本发明涉及生物工程领域,尤其涉及一株核
酸含量较高的非转基因酿酒酵母及其应用。本申
请通过对选育技术做改进,筛选生长情况良好、
核酸含量提高的高rRNA合成酿酒酵母菌株,经过
多轮迭代诱变及规模化初筛,生长、荧光值及RNA
含量测定复筛,表达体系消除等步骤,最终获得
一株核酸含量较高的非转基因酿酒酵母菌株
YM83,该菌株核酸含量高于现在市场上使用的大
部分酿酒酵母,能够稳定遗传,为非转基因酿酒
酵母,可以应用于安全要求较高的核糖核酸、核
苷酸、核苷酸衍生物以及酵母抽提物等的制备及
生产中,上述产物可被广泛应用于食品、医药、保
健品、农业以及畜牧养殖等行业,拥有良好的市
场前景。



1. 一株非转基因高核酸酿酒酵母菌株, 其特征在于, 所述的菌株为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 于2022年09月16日保藏在“中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心”, 保藏编号为CGMCC No.25730。

2. 根据权利要求1所述的非转基因高核酸酿酒酵母菌株, 其特征在于, 所述的菌株为酿酒酵母工业菌株。

3. 权利要求1所述的非转基因高核酸酿酒酵母菌株的应用, 其特征在于, 应用于核糖核酸、核苷酸、核苷酸衍生物以及酵母抽提物的制备中。

一株非转基因高核酸酿酒酵母菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,尤其涉及一株核酸含量较高的非转基因酿酒酵母及其应用。

背景技术

[0002] 核糖核酸(简称RNA)不仅在细胞中作为执行重要的生物学功能,对人与动物生长、健康也有极其重要的作用,在医药、保健品、食品和养殖业等诸多领域具有广阔的应用开发前景。RNA的降解物核苷酸可作为医药中间体,其衍生物是多种药物的有效成分,具有促进动物生长、维护肠道健康、提升人与动物的免疫力等保健功效,可制成保健品或饲料添加剂;RNA经多酶促定向转化制备的5'-鸟苷酸和5'-肌苷酸(I+G)是非常有效的食品增味剂,具有呈味作用,与味精混合时会产生协同作用,其鲜度可以提高数十倍,可用作食品增味剂;酵母经细胞自溶及定向酶解技术制成酵母抽提物,其中其富含多种天然呈味核苷酸如5'-肌苷酸(5'-IMP)和5'-鸟苷酸(5'-GMP)(I+G,也被称为呈味核苷酸二钠)、蛋白质、多肽、以及氨基酸等,具有富含营养的特性,能产生很好地鲜味叠加效果,可以减少钠盐的添加且是有效的味精替代性调味品,已成为新一代强化营养保健型食品增味剂,已被广泛应用于休闲食品、肉制品、方便面、酱油等食品调味领域,越来越受到市场的青睐。

[0003] 由于RNA的生产大部分为微生物发酵所得,因此生产RNA相关产品的关键是菌种,以各菌种的核酸含量以及菌种自身性质来说,目前对菌株核酸含量提升的研究主要集中在假丝酵母,美国及日本的部分专利公布了利用变异的假丝酵母菌株来分别获得超过细胞干重12%及20%以上核糖核酸的酵母细胞,但假丝酵母对人类和动物的健康仍存在安全隐患。酿酒酵母不产生任何毒素,是食品安全级微生物,生长传代速度较快,易培养,并且酿酒酵母本身营养较高,含有丰富的蛋白质、核酸和糖类等营养成分,是公认最理想的RNA来源,提取完核酸的酵母菌体还可作为优质的蛋白质添加至饲料中,酿酒酵母的核酸含量平均在6%~8%,高于大部分菌株,但仍需要进一步提升才能满足市场需求。

[0004] 酿酒酵母至少产生三种主要的RNA,有核糖体RNA(rRNA)、信使RNA(mRNA)和转运RNA(tRNA),其中,rRNA含量最多。因此,提高细胞内rRNA水平是构建高核酸酵母菌株的关键。人们常通过培养条件优化,添加谷氨酰胺、天冬氨酸,或通过限制培养条件中硫酸钾等策略提升酵母的RNA含量,如中国专利申请CN102559522B公开了一种“高核酸面包酵母及其制备方法”,该方法在面包酵母扩大培养过程中添加谷氨酰胺和天冬氨酸,面包酵母的RNA含量大于12.0%;中国专利申请CN101760437A公开了一种“高核酸面包酵母及其制备方法”,该方法通过控制扩大培养的培养时间等条件,得到了RNA达到了9.5%以上的面包酵母。这些技术通过逐个测定菌株RNA含量进行筛选,未提及rRNA的含量是否有提高。近年来也有一些研究通过基因工程等手段提高菌株的核糖体生物合成进而提高酵母的核酸含量,如日本Harashima课题组敲除了酿酒酵母上游激活因子(UAF)中的RRN10基因,酵母的生长变差,然后利用EMS诱变处理RRN10基因缺失菌株,筛选到生长变好的抑制子,其比生长速率和RNA含量均有不同程度的提高[Chuwattanakul et al., Construction of a *Saccharomyces*

cerevisiae strain with a high level of RNA. J Biosci Bioeng. 2011, 112(1):1-7.].这种基于生长的育种策略涉及转基因问题,需要使用遗传背景较简单、且有筛选标记的酵母实验室菌株(单倍体)作为育种出发菌株;国内肖冬光教授课题组在酿酒酵母中超表达了对核糖体基因转录起作用的*FHL1*, *IFH1*和对核糖体生物合成起作用的*SSF2*,敲除细胞生长负调节因子*HRP1*,重组菌株的RNA含量提升至11.68%[Guo et al., Increased RNA production in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously overexpressing *FHL1*, *IFH1*, and *SSF2* and deleting *HRP1*. Appl Microbiol Biotechnol . 2020, 104(18):7901-7913.];中国专利申请 CN108841737B公开了“一株含有Rpf1基因的产核酸酿酒酵母工程菌及其构建方法与应用”,该方法超表达了酿酒酵母核仁RNA结合蛋白基因Rpf1,摇瓶发酵后,选育菌株核酸含量达11.39%;中国专利申请CN108660085B超表达液泡蛋白分选受体Pep1基因,摇瓶发酵后,选育菌株核酸含量达14.70%。中国专利申请发明CN112175850A公开了“一种高产核酸的工业酿酒酵母及其应用”,该方法超表达葡萄糖转运蛋白YHR094C,敲除YOR185C和YGR088W基因,选育得到的酿酒酵母核酸含量达18.94%。

[0005] 总体而言,目前高核酸酵母工业菌株育种尚缺乏直接反映RNA合成变化的高通量筛选体系以及转基因等问题。经检索,目前利用高通量筛选技术选育的高rRNA合成、且能直接用于工业化生产的高核酸酵母菌株尚未有相关专利和相关文献的报道。

发明内容

[0006] 针对目前市场上的酿酒酵母菌株产核酸能力不足、核酸产量不高、转基因等问题,通过对选育技术做改进,筛选生长情况良好、核酸含量提高的高rRNA合成酿酒酵母菌株,经过多轮迭代诱变及规模化初筛,生长情况和荧光强度复筛,再次测定RNA含量,以及表达体系消除等步骤,最终获得一株核酸含量较高的非转基因酿酒酵母菌株YM83,该菌株核酸含量高于现在市场上使用的大部分酿酒酵母;能够稳定遗传,为非转基因酿酒酵母,可以应用于安全要求较高的核糖核酸、核苷酸、核苷酸衍生物以及酵母抽提物等的制备及生产中,上述产物可被广泛应用于食品、医药、保健品、农业以及畜牧养殖等行业,拥有良好的市场前景。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一株非转基因高核酸酿酒酵母菌株,所述的菌株为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*,于2022年09月16日保藏在“中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心”,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏编号为CGMCC No. 25730。

[0009] 进一步地,所述的菌株通过如下步骤获得:将能反映rRNA合成变化的含有新型蛋白质表达体系的质粒转入出发菌株,利用常压室温等离子体(ARTP)诱变处理含有表达体系的酵母细胞,基于流式细胞分选技术规模化初筛荧光强度显著提升细胞,复筛生长情况和荧光强度均显著提升的菌株,再次测定RNA含量,消除带有新型蛋白表达体系的质粒,菌株稳定性测试。

[0010] 优选地,所述的菌株为酿酒酵母工业菌株。

[0011] 上述非转基因高核酸酿酒酵母菌株的应用,应用于核糖核酸、核苷酸、核苷酸衍生物以及酵母抽提物的制备中。

[0012] 本发明的有益效果

[0013] 本发明的菌株的核酸含量高于现在市场上使用的大部分酿酒酵母,在YPD培养基中摇瓶培养4 h和14 h,核酸含量分别能够达到0.252 g/g-DCW和0.209 g/g-DCW,与诱变前菌株相比,分别提高了18.5%和22%;与诱变前菌株Y03相比,YM03的18S rRNA和yEGFP3的转录水平分别提升了2.24倍和6.14倍;高于现在市场上使用的大部分酿酒酵母,并能够稳定遗传,为非转基因酿酒酵母,可以应用于安全要求较高的核糖核酸、核苷酸、核苷酸衍生物以及酵母抽提物等的制备及生产中,上述产物可被广泛应用于食品、医药、保健品、农业以及畜牧养殖等行业,拥有良好的市场前景。本发明所涉及的菌株和所采用的筛选策略为进一步选育高核酸酵母新品系提供了技术参考。

附图说明

[0014] 图1为流式细胞仪分析含有新型表达体系的酿酒酵母工业菌株细胞的荧光分布直方图

[0015] (a) 出发菌株Y02; (b) 含Pol I & IRES介导的GFP表达的菌株Y03; (c) 菌株Y03经ARTP诱变后的细胞;方框区域表示荧光强度> 1800 a.u.;MFI表示平均荧光强度。

[0016] 图2为Y02菌株的ARTP诱变致死率曲线。

[0017] 图3为菌株Y02和YM03的生长和荧光强度。(a):生长曲线;(b):荧光强度。

[0018] 图4为菌株Y02和YM03在摇瓶培养4 h和14 h的核酸含量。

[0019] 图5为菌株Y02和YM03的18S rRNA和yEGFP3的转录水平。

[0020] 图6为YM03菌株消除质粒pMIGK前后在含有400 mg/L G418的平板上生长情况。

[0021] 图7为YM83连续传代前后的生长和核酸含量测定,(a):生长曲线;(b):摇瓶培养4 h和14 h的核酸含量;YM83n:YM83菌株经连续传代10代以上。

具体实施方式

[0022] 实施例1:高通量筛选荧光强度阈值确定:

[0023] 构建了用于高核酸酵母高通量筛选的、适于酿酒酵母工业菌株的、RNA聚合酶I和IRES介导的新型蛋白表达体系质粒pMIGK,转入出发菌株(该菌株为申请人实验室保存的酿酒酵母工业菌株Y02)中,利用400 mg/L G418筛选转化子,经验证得到重组菌株Y03。

[0024] 将Y03在含有400 mg/L YPD培养基中活化后,由起始OD₆₀₀为0.2左右培养至对数中期(OD₆₀₀为1.0左右),然后利用MoFlo™ XDP高效细胞分选仪检测分别检测Y02和Y03菌株的荧光强度,分析了这两个菌株的50万个细胞,出发菌株Y02的平均荧光强度(MFI)为33.2 a.u.(图1a),重组菌株Y03的 MFI增加至54.8 a.u.(图 1b),与Y02相比,Y03的荧光分布往右漂移,MFI提高了61.5%,表明RNA聚合酶I和IRES介导的新型蛋白表达体系质粒pMIGK在酿酒酵母工业菌株中成功表达,将Y03菌株产生的最大荧光强度1800 a.u.作为后续高通量筛选时使用的荧光强度阈值。

[0025] 实施例2:ARTP诱变处理

[0026] 将转化pMIGK的Y02菌株接种至含有400 mg/L G418的YPD液体中,振荡培养12~24小时,活化2次后,再次转接菌液到新鲜的含有400 mg/L G418的YPD中,调整起始浓度OD₆₀₀至0.2左右,30℃培养震荡培养至对数中期(OD₆₀₀为1.0左右)。取1 mL菌液,8000 r/min离心,弃去上清液,用生理盐水洗涤2次后,利用含有5%甘油的生理盐水稀释制成菌体浓度在

$10^6 \sim 10^7$ 之间的菌悬液,取10 μL 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,置于ARTP诱变育种仪(无锡思清源生物科技有限公司)中进行诱变处理,诱变仪工作气体为99.99%高纯氦气,射频功率为90 W、氦气流量为10 SLM,样品与等离子体发射源之间的距离固定为3.5 mm,通过调整处理时间绘制致死率曲线,如图2所示,处理时间为20 s时,细胞的致死率可达到90%,诱变效果最佳。因此,我们选用该处理条件对Y03进行ARTP诱变处理,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,把附着在载片上的菌体充分洗脱制成菌悬液,将菌悬液接入含有400 mg/L G418的YPD液体培养基中,使其恢复生长。

[0027] 实施例3:高荧光强度细胞的规模化分选

[0028] 将实施例2诱变前后的细胞在含有400 mg/L G418的YPD液体培养基中培养12 h,调整起始 OD_{600} 至0.2左右,30℃培养至对数中期(OD_{600} 为1.0左右),取培养液8000 r/min离心2 min,弃去上清,然后用1 $\times$ PBS缓冲液洗涤2次,然后用500 μL 1 $\times$ PBS缓冲液重悬制成细胞悬液,使用MoFlo™ XDP高效细胞分选仪的 FITC通道中在激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$ 、发射波长 $\lambda_{\text{em}}=507 \text{ nm}$ 的条件下测量其荧光强度(荧光强度单位为 a.u.),分别分析了50万个细胞,与诱变前细胞相比,诱变后的细胞荧光分布进一步往右漂移,MFI提升至64.4 a.u.,与诱变前细胞相比,提升了17.5%(图1c)。设置Y03菌株的最大荧光强度1800 a.u.作为高通量筛选诱变后细胞的荧光强度阈值,高于1800 a.u.的细胞被分选至含有液体培养基的96孔板中(注意进行流式细胞分选时,Y03菌株细胞悬液也需要至少分选3个细胞到96孔板上,作为对照)。

[0029] 实施例4:生长情况和荧光强度复筛:

[0030] 将分选后的96孔板置于30℃条件下培养12 h,将96孔板放在Biotek Synergy Neo2多功能荧光酶标仪中,在600 nm处测定生长情况,在激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=495 \text{ nm}$ 、发射波长 $\lambda_{\text{em}}=510 \text{ nm}$ 的条件下测定绿色荧光强度,结果如图3所示,在分选的细胞中,有一个孔的 OD_{600} 和荧光值均高于对照菌株Y03(图3a和b)。

[0031] 实施例5:总RNA含量测定复筛:

[0032] 将诱变前菌株Y03以及荧光强度较高且生长情况较好菌株YM03分别接种至含有400 mg/L G418的YPD液体培养基中,振荡培养12~24 h,转接菌液到新鲜的含有400 mg/L G418的YPD中,调整起始 OD_{600} 0.2左右,30℃摇瓶培养4 h和14 h,收集菌体,一部分用于细胞干重测定,另收集1mL菌液,并利用高氯酸法测定RNA含量,YM03在培养4 h和14 h的核酸含量能够达到0.252 g/g-DCW和0.209 g/g-DCW,与诱变前菌株Y03相比,分别提高了18.5%和22%(图4),说明利用该筛选策略筛选到的荧光强度提高的菌株YM03为核酸含量提高的菌株。

[0033] 实施例6:荧光定量PCR检测18S rRNA和yEGFP3转录水平

[0034] 将诱变前菌株Y03以及荧光强度较高且生长情况较好菌株YM03分别接种至含有400 mg/L G418的YPD液体培养基中,30℃振荡培养12~24 h,转接菌液到新鲜的含有400 mg/L G418的YPD中,调整起始 OD_{600} 0.2左右,30℃摇瓶培养4 h收集菌体,采用UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒(上海生物工程有限公司)提取总RNA,然后利用RNA free DNase I于37℃反应30 min去除基因组DNA,经过DNase I消化的RNA为模板,利用反转录试剂盒(HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper),南京诺唯赞生物科技股份有限公司

司)进行反转录,然后再以上述cDNA为模板,以18S rRNA-F(5'-CCTGAGAAACGGCTACCA-3')和18S rRNA-R(5'-ATTGTC ACTACCTCCCTGAATTAGGA-3')、*yEGFP3*-F(5'-CCAGTTCCATGGCCAACCTTA-3')和*yEGFP3*-R(5'-GCTCTGGTCTTGTAGTTACCG-3')以及*ACT1*-F(5'-CAAACCGCTGCTCAATCTTC-3')和*ACT1*-R(5'-AGTTTGGTCAATACCGGCAG-3')为引物,利用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)分别进行实时荧光定量PCR,选择看家基因*ACT1*为内标,比较诱变前后菌株Y03和YM03的胞内18S rRNA合成情况和新型蛋白表达体系中绿色荧光蛋白基因*yEGFP3*的转录水平,PCR 反应条件:95℃,3min,95℃,15s,61℃,15s,72℃,30s,共40个循环;72℃ 5min。结果如图5所示,与诱变前菌株Y03相比,YM03的18S rRNA和*yEGFP3*的转录水平分别提升了2.24倍和6.14倍,说明诱变促进了酵母胞内rRNA合成和表达体系绿色荧光蛋白的表达。

[0035] 实施例7:高通量筛选体系的消除将实施例5所获得的YM03菌株接到YPD液体培养基中,30℃连续培养、转接传代10次以上,将传代前后的菌液涂布到含有400 mg/L G418的YPD平板上,30℃培养2~3 d,结果如图6所示,传代前的YM03有菌落长出,传代后的无菌落生长,表明含有新型蛋白表达体系的质粒被消除了,最终获得非转基因高核酸酵母菌株YM83。

[0036] 实施例8:高核酸酵母菌株的遗传稳定性测试:

[0037] 将YM83接种至YPD液体培养基中,连续传代10次以上,之后将连续传代前后的菌株接种至YPD液体培养基中,30℃摇瓶培养,测定生长曲线、以及4 h和14 h的核酸含量,测试传代前后菌株的遗传稳定性,结果见图7,从中可以看出:传代前后菌株的生长情况基本相当(图7a),不管是培养4 h还是14 h传代前后菌株的RNA含量均变化不大(图7a),菌株保持较好的稳定性。

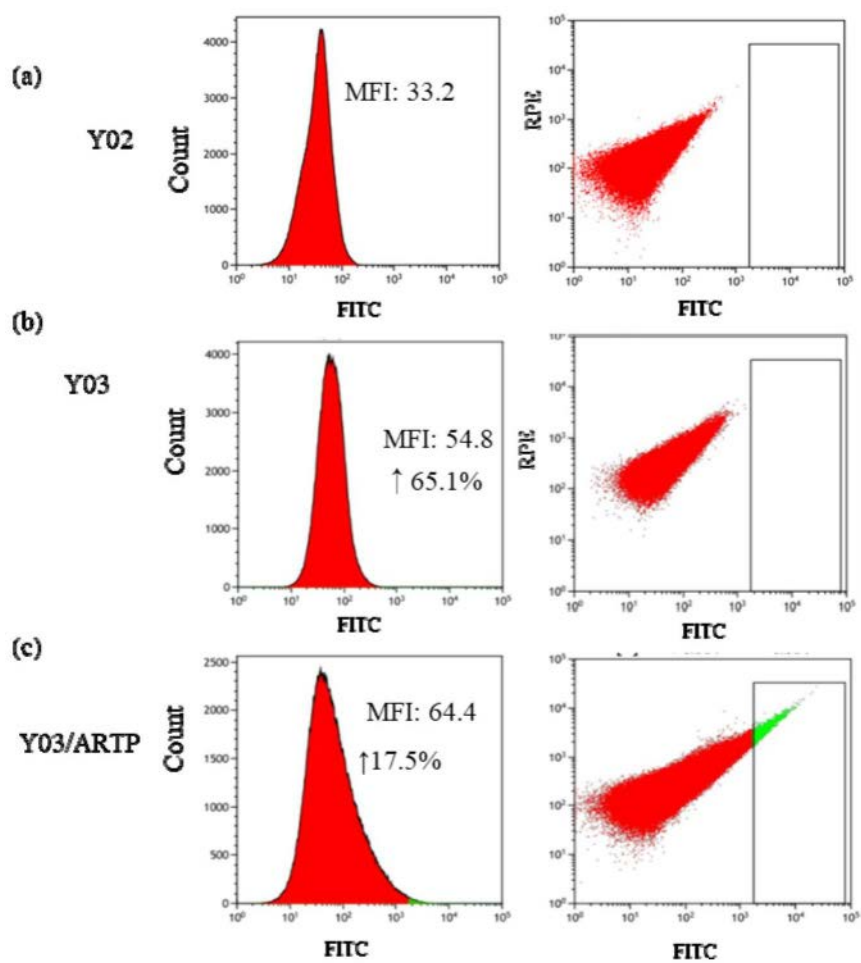


图1

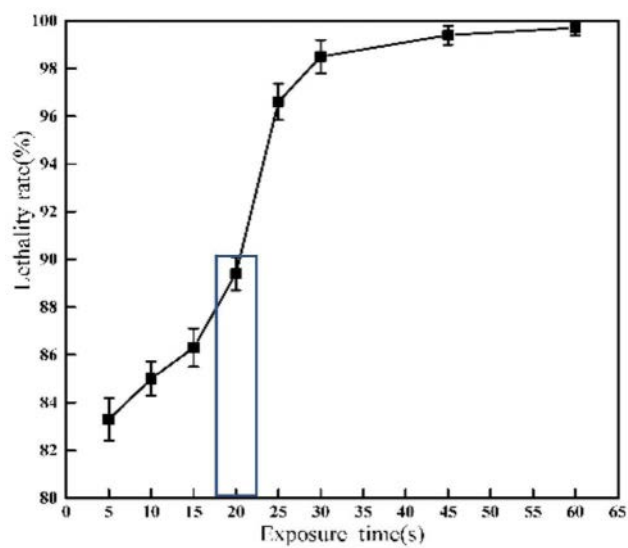


图2

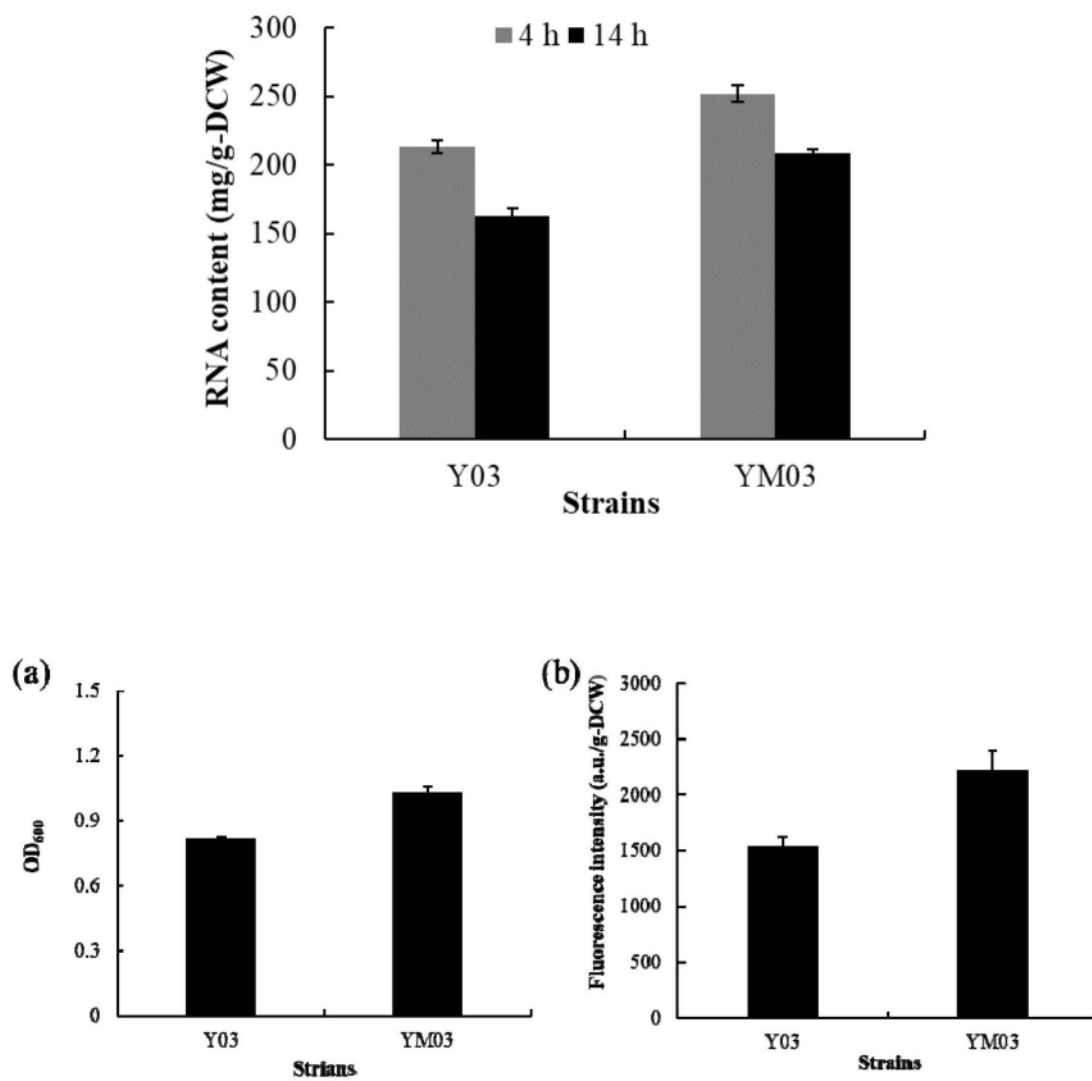


图3

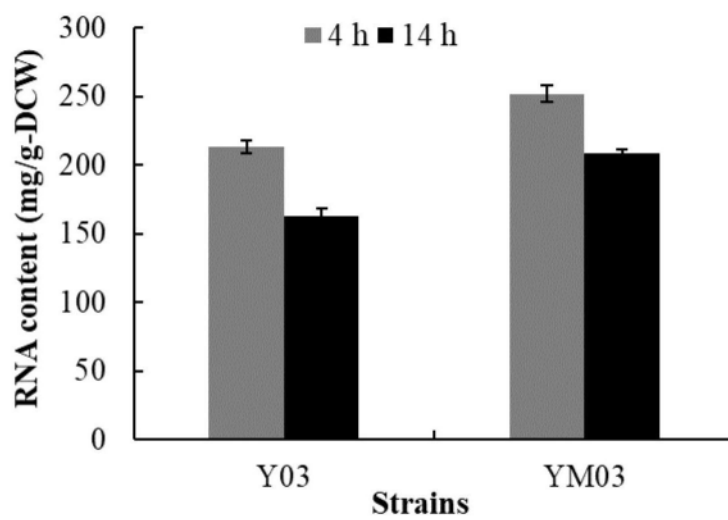


图4

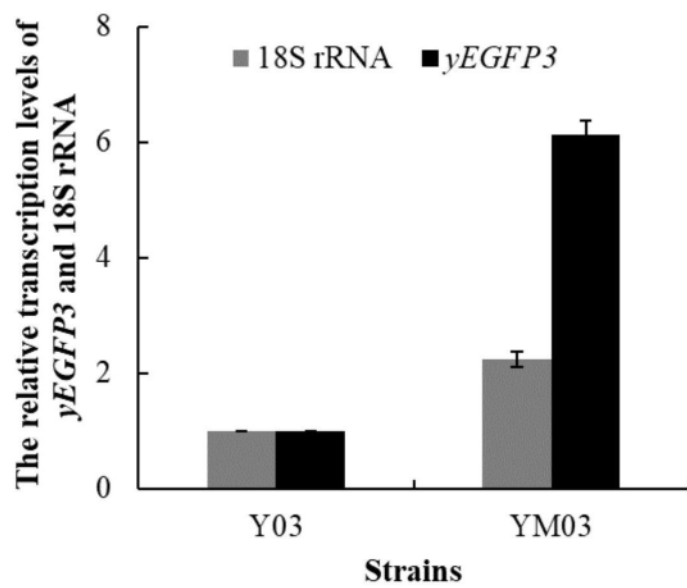


图5

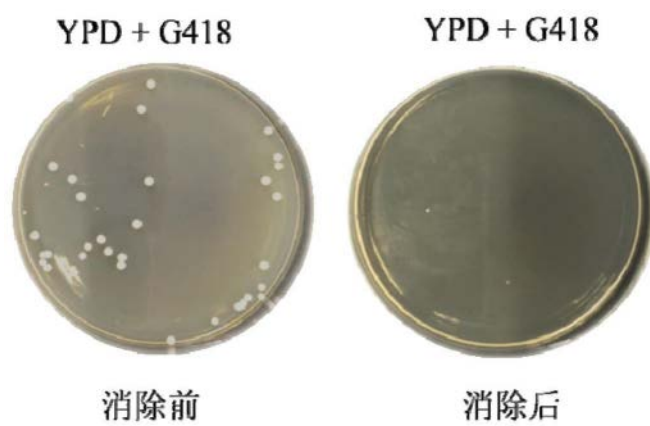


图6

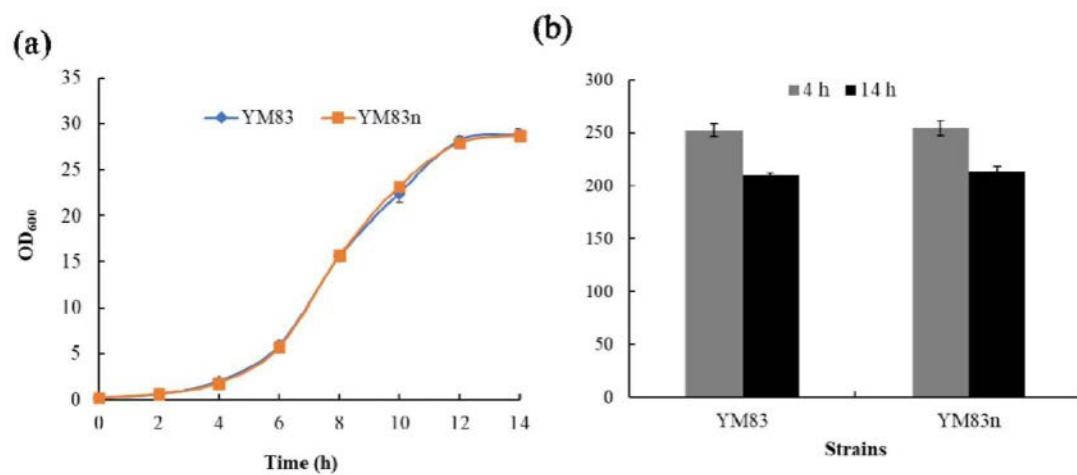


图7