

基于转录组学分析酿酒酵母 PY01 高密度培养的氧化胁迫应答机制

沈东旭¹, 翁佩芳^{1*}, 吴祖芳¹, 刘亚楠¹, 燕国梁²

(¹ 宁波大学食品与药学学院 浙江宁波 315211)

(² 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 为探究酿酒酵母 PY01 高密度培养过程中响应氧化胁迫的机制,对酿酒酵母 PY01 氧化处理(6 mmol/L H₂O₂)2 h 后进行转录组学分析。结果表明:共鉴定出 393 个差异表达基因(DEGs);基于 GO 注释与 KEGG 富集分析,已鉴定的 DEGs 参与了代谢(如氨基酸代谢、碳水化合物代谢和能量代谢等)、遗传信息和细胞过程(过氧化物酶体)等通路。在氧化胁迫下,酵母菌通过增强一些抗氧化酶,如 SOD2、SRX1 等来清除 ROS;酵母菌还通过增强糖酵解和 TCA 循环产生更多的能量,以适应氧化胁迫、修复损伤的蛋白质以及 DNA 或维持金属离子的转运。与此同时,还上调了与一般应激反应相关的分子伴侣和蛋白水解酶。这表明酿酒酵母 PY01 响应氧化胁迫的过程,是一个复杂的综合调控网络。酿酒酵母 PY01 应对氧化应激机制的发现,为设计酵母菌高效培养的控制策略,提高菌株的抗逆性和促进现代果酒等发酵工业及其它生物制品生产中利用活性酵母菌奠定了理论基础。

关键词 酿酒酵母 PY01; 发酵; 氧化胁迫; 转录组学; 机制

文章编号 1009-7848(2024)03-0027-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.003

酿酒酵母作为传统的发酵菌株,在酿酒和食品发酵中的应用已有数千年的历史^[1]。在长时间的应用中,酵母群体基因组经历了大量的系统进化、种群进化和适应性驯化等过程,具有清晰的遗传背景^[2]。如今,其常被用作发酵、生物医药、生物和燃料乙醇等方面研究的模式生物^[3-4]。果酒发酵中,酵母菌是影响果酒产品质量的关键因素^[5-6]。现代发酵工业需要大量的确保快速完整的培养、提高体积生产率和降低成本的优质酵母菌来生产可重复的产品^[7-8]。高密度培养是获得较高生物量,进而提高发酵(果酒)效率,获得相对较高的产品产量和提高品质的有效策略之一^[7-8]。

利用酵母菌进行酒类或食品发酵是一个涉及许多反应的复杂过程,进而导致发酵相关化合物的动态变化,酵母菌在该过程中发挥着重要作用,对合成多种代谢物及风味成分必不可少^[6,9-10]。然而,酵母菌在生长或发酵过程中会受到很多因素的限制,同时面临多种胁迫,包括高渗胁迫、温度胁迫、乙醇胁迫、pH 胁迫和氧化胁迫等,这些胁迫

因素中,氧化胁迫被认为是影响发酵性能最严重的因素^[3,11-15]。氧化胁迫会对酵母细胞内的 DNA、脂质和蛋白质等细胞成分和氧化-还原平衡造成重大损害,损害酵母的生理和新陈代谢。此外,ROS 通过干扰辅因子的平衡来使关键酶失活,破坏或改变目标分子的功能,进而影响果酒或食品发酵的质量^[3,15-18]。随着酿酒、腌制菜等发酵行业对酵母菌发酵菌剂需求量的增加以及菌种选育技术的提高,酵母菌耐受氧化胁迫机制的研究引起人们的关注^[11],然而目前有关酵母菌耐受氧化胁迫的研究仍然较少。随着高通量测序技术的进步以及基因组学、转录组学和代谢组学等组学技术的快速发展,使人们对酵母菌的基因背景有了更深入的了解,为研究酵母菌的细胞生理代谢等提供了重要手段,而转录组对于解释基因组的功能元件,揭示细胞和组织的分子成分以及对发育和进化的理解具有重要作用^[19]。

本文旨在通过转录组学分析,从 mRNA 水平揭示酿酒酵母 PY01(*S. cerevisiae* PY01)的氧化胁迫应答机制。

收稿日期: 2023-03-28

基金项目: 宁波市重点研发计划项目(2022Z176);国家自然科学基金面上项目(31471709)

第一作者: 沈东旭,男,硕士生

通信作者: 翁佩芳 E-mail: wzwf@163.com

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基和试剂

酿酒酵母 PY01 (*S. cerevisiae* PY01, 简称

PY01), 宁波大学食品生物技术实验室分离并保藏的果酒等发酵用菌株。

酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母浸粉 10, 蛋白胨 20, YPD 固体培养基添加 20 g/L 的琼脂粉, 自然 pH 值。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 94.85, 蛋白胨 37.92, KH_2PO_4 2.85, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, pH 4.5。

葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 上海麦克林生化科技有限公司; 蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 磷酸二氢钾, 国药集团化学试剂有限公司; TRIzol[®]试剂、总 RNA 提取试剂盒、Qubit[®]2.0RNA 分析试剂盒, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 反转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SpectraMax190 酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; UV-3300 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; pH 计, 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 德国罗氏诊断产品有限公司; Illumina NovaSeq 6000 测序仪, 上海凌恩生物科技有限公司; 生物分析仪 2100, 安捷伦(中国)科技生物有限公司; SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 江南仪器厂; BKQ-B75II 立式蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化 从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 甘油管中将 PY01 接种到 YPD 固体培养基上, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24~48 h, 挑取单菌落在 YPD 液体培养基中 $28\text{ }^\circ\text{C}$, 150 r/min 培养 18 h。

1.3.2 酿酒酵母 PY01 对 H_2O_2 的敏感性 根据前期试验基础, 将活化后的 PY01 (体积分数 8%) 接种于 20 mL 新鲜的发酵培养基中 $31\text{ }^\circ\text{C}$, 210 r/min 培养至对数生长期, 在室温下 8 000 r/min 离心 5 min。收集细胞悬液并重悬于分别含有 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mmol/L 和 8 mmol/L H_2O_2 的新鲜培养液中, $31\text{ }^\circ\text{C}$ 210 r/min 培养 18 h, 每隔 2 h 测定菌液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ [17, 20]。

1.3.3 总 RNA 的提取 将 PY01 以 8% (体积分数) 的接种量接种于 130 mL 发酵培养液中, 当细

胞生长至对数中期时, 分别取 20 mL 菌液于室温下 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体。选择一组细胞重悬在 20 mL 含 6 mmol/L H_2O_2 的新鲜培养液中作为氧化胁迫处理组 (命名为 SPY-B1-B3), 另一组细胞重悬于新鲜培养液中作为对照组 (命名为 SPY-A1-A3)。 $31\text{ }^\circ\text{C}$ 210 r/min 培养 2 h 后, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 8 000 r/min 的条件下离心 10 min, 弃去上清液。沉淀后的细胞用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 用液氮快速冷冻, 储存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 用于提取 RNA [21-22]。在提取总 RNA 时, 根据说明书使用 TRIzol[®] 试剂从细胞中提取总 RNA, 使用 DNase I (TaKara) 去除基因组 DNA。然后使用安捷伦生物分析仪 2100 测定 RNA 质量, 并使用 ND-2000 (NanoDrop Technologies) 进行定量, 最后用琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性以及基因组污染情况。选用高质量的 RNA 样品构建测序文库。

1.3.4 文库制备及 Illumina HiSeq 测序数据分析

根据 Illumina 的 TruSeqTMRNA 样品制备试剂盒, 使用 1 μg 的总 RNA 制备 RNA-seq 转录组文库。快速通过 oligo(dT) 磁珠分离 mRNA, 并使用片段缓冲液进行碎裂。根据文库构建方案进行 cDNA 合成、末端修复、A 碱基添加和连接。通过 2% 低范围超琼脂糖凝胶筛选出大小为 200~300 bp 的 cDNA 目标片段, 然后用 Phusion DNA 聚合酶 (NEB) 进行 PCR 扩增。通过 TBS380 定量后, 用 Illumina NovaSeq 6000 测序 (150bp \times 2) 对构建的文库进行测序。转录组测序与分析由上海凌恩生物科技有限公司完成。

1.3.5 转录组数据分析 FASTQ 格式的原始数据 (原始读取) 首先利用 Trimomatic 软件进行过滤, 通过去除接头序列、低质量的碱基序列以及含有 adapter 的序列来获得高质量的测序数据 (clean data)。采用 Hisat2 软件将质控后得到的高质量测序序列与酿酒酵母模式菌株 S288C 的基因组序列进行比对, 计算映射到每个基因的 reads [23]。采用每百万映射读数中每千碱基的片段 (FPKM) 计算每个基因的表达水平, 并使用 edgeR 软件分析氧化处理组与对照组的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 差异基因筛选条件 $\text{FC} \geq 2$, $\text{FDR} < 0.05$ 。为了进一步了解差异表达基因的功能, 分别利用 Goatools 和 KOBAS 进行了 GO

(Gene Ontology)功能注释和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析。

1.3.6 DEGs 的实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证 将上述获得的 RNA 样品利用 RT-qPCR 方法分析了 8 个代表性基因,以验证测序结果的有效性。使用 Primer Premier 6 软件设计引物,以 *act1* 基因为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算每个基因的相对表达量^[17,24],所用引物如表 1 所示。

1.4 数据分析

用 SPSS 22.0 软件分析显著性差异($P < 0.05$),组间比较采用单因素方差分析和 Duncan's 多重比较,利用 Origin 2019b 绘制图表。试验数据均进行 3 组生物学重复,结果用平均值(Mean)±标准差(SD)表示。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 H_2O_2 对酿酒酵母 PY01 生长的影响

为考察 PY01 对 H_2O_2 的敏感性,将过夜培养的酵母菌重悬在含 0,2,3,4,5,6,7 mmol/L 和 8 mmol/L H_2O_2 的发酵培养基中孵育,结果如图 1 所示。加入不同浓度的 H_2O_2 后酵母菌的生长受到不同程度的抑制,但随着时间的推移,抑制作用逐渐减弱。用 6 mmol/L H_2O_2 处理 2 h 几乎没有增长,而高于 6 mmol/L 在 2 h 内会出现负增长,随着时间的推移酵母菌逐渐适应氧化胁迫。因此,为了获得有效的转录组数据,用 6 mmol/L H_2O_2 处理 PY01 以研究其在氧化胁迫下的转录反应,因为 6 mmol/L 的 H_2O_2 胁迫可能会诱导细胞亚致死,而不会导致细胞死亡^[20]。

2.2 测序数据质量评估与分析

为研究 PY01 在氧化胁迫下的相关基因表达情况,共提取了 6 个总 RNA 样本。检测样本质量合格后用于转录组测序,共获得了 481 441 890 条原始序列,对数据的总体质量进行评估,结果如表 2 所示。经过质控过滤后,得到了 460 184 138 条干净序列,有效数据占比为 95.58%。统计表明,处理组与对照组的 Q30 平均值均超过 95%,低质量($Q < 30$)的碱基序列占比极低,平均 GC 含量分别为 42.28%和 42.17%,表明转录组测序数据可靠,准确性高。因此,可以进行后续分析。

表 1 本试验中用到的引物

引物	序列(5' to 3')
ACT1-F	AACCGCTGCTCAATCTTCTTC
ACT1-R	GGACATCGACATCACACTTCAT
NQM1-F	AAGAAGGCTCTCCACATCATCA
NQM1-R	ACAGGCTACTGCTTGCGTAA
HSP26-F	AGTGTCCGAGTTCCAGTTGA
HSP26-R	CTCTCCTTGACCTTGACCTTGT
AGX1-F	TCAAGATAGCGAATCAAGTTCC
AGX1-R	GAGCATAACAGCATCGACTACG
GND2-F	CTAATGTGGAGAGGTGGCTGTA
GND2-R	GCTGGAGTTGGAATACCGTAAG
ALD3-F	GCTACTGGCGAACCGATAAC
ALD3-R	TGTGTCTTGCTCCTCTCAAT
ZWF1-F	GAGGCTTACGAGGTGTTGATAA
ZWF1-R	GGACGCTCTATGTGCTTCAG
RAD51-F	TTGGTGGCGGTGAAGGTAA
RAD51-R	GCAGCAGCATCCAGAAGTC
VHT1-F	CGCATCGCCTTGCTCTATGG
VHT1-R	GCTCACGGGTGAACCAGTCT

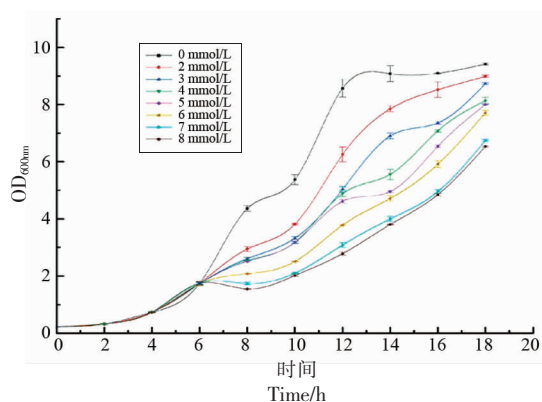


图 1 不同浓度 H_2O_2 胁迫下 PY01 的生长状况
Fig.1 The growth status of PY01 under different concentrations of H_2O_2 stress

2.3 差异表达基因的鉴定

为探究 PY01 在氧化胁迫环境中基因表达差异情况,根据 $FDR \leq 0.05$ & $FC \geq 2$ ($\log_2 FC$ (Fold-change)) 鉴定两组样品之间的 DEGs。如图 2 所示,与对照组相比,处理组共鉴定出 393 个差异基因,其中有 289 个上调基因,占总差异表达的 73.54%,104 个下调基因,占总差异表达的 26.46%;生成差异基因散点图(a)与火山图(b)表示试验组与对照组的差异基因表达水平和统计学上的显著程度。

表2 转录组测序数据统计表

Table 2 Statistical table of transcriptional group sequencing data

样品	原始序列	干净序列	干净序列占比	错误率1%	Q30/%	GC量1%
SPY-A1	113 950 658	109 300 628	95.92	0.0224	94.76	42.42
SPY-A2	71 978 336	68 081 184	94.59	0.0215	95.87	42.24
SPY-A3	86 089 820	83 508 066	97.00	0.023	94.85	42.18
SPY-B1	67 744 852	63 773 434	94.14	0.0226	95.08	42.32
SPY-B2	71 461 966	67 777 936	94.84	0.0222	95.44	42.03
SPY-B3	70 216 258	67 742 890	96.47	0.0223	95.43	42.17

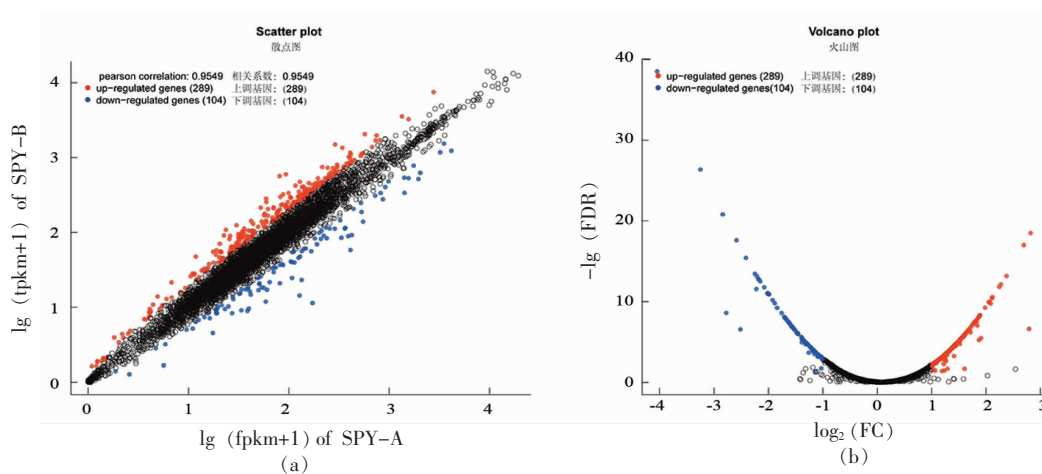


图2 差异基因散点图(a)和差异基因火山图(b)

Fig.2 Scatter map of differential genes (a) and volcano plot of differential genes (b)

2.4 差异基因的 GO 注释

将获得的 *DEGs* 与 GO 数据库进行比对并根据功能对其进行 GO 富集分析,结果如图 3 所示。GO 数据库将已鉴定的基因本体分为三大类,共有 31 个功能组,其中生物过程 (Biological Process, BP) 有 18 个功能亚类,主要集中在细胞过程 (GO:0009987)、代谢过程 (GO:0008152)、生物调节 (GO:0065007)、对刺激的反应 (GO:0050896) 等;分子功能 (Molecular Function, MF) 有 10 个功能亚类,主要注释为催化活性 (GO:0003824)、结合 (GO:0005488)、抗氧化活性 (GO:0016209) 等;细胞组分 (Cellular Component, CC) 有 3 个功能亚类,主要注释为细胞内 (GO:0005622) 和细胞解剖实体 (GO:0110165)。由上述结果可知, PY01 适应氧化胁迫是一个复杂的、综合的调节过程^[16,25]。

2.5 差异基因的 KEGG 富集分析

生物体内不同的基因通过相互协调而共同发挥其生物学功能^[22]。为了解 PY01 耐受氧化胁迫的

基本机制,利用 KEGG 数据库对差异表达基因进行富集分析 (图 4)。图 4 中横坐标表示富集到 KEGG 通路中的差异基因个数占总差异基因的比值,纵坐标表示该 KEGG 通路的功能,圆圈大小代表富集到该功能的差异基因数,颜色从蓝到红代表未修正的 *P* 值。与对照组相比,处理组的 *DEGs* 共涉及 103 条显著富集的 KEGG 通路,主要分为代谢、遗传信息过程、细胞过程、环境信息过程和有机系统 5 种类型。其中最主要的富集途径多与代谢有关,共涉及 66 条代谢通路,包括 17 条通路涉及氨基酸代谢 (ko00270, ko00220, ko00250 等)、12 条通路涉及碳水化合物代谢 (ko00620, ko00030, ko00010, ko00020 等)、6 条通路涉及脂质代谢 (ko00071, ko00600 等)、5 条通路涉及能量代谢 (ko00190, ko00910 等) 等。此外,数量较多的几个被注释的通路是与遗传信息相关的核糖体 (ko03010)、内质网中的蛋白质加工 (ko04141) 以及细胞过程的过氧化物酶体 (ko04146) 等。

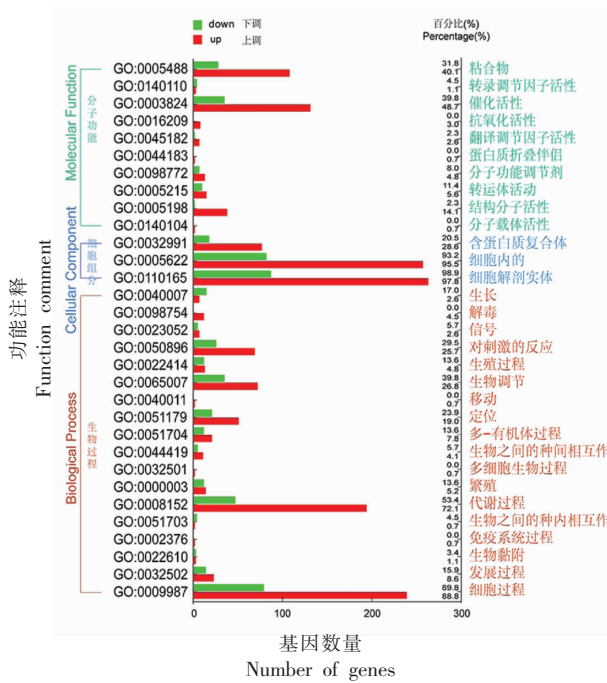


图 3 差异基因 GO 功能注释图

Fig.3 Bar chart of GO annotation of differentially expressed genes

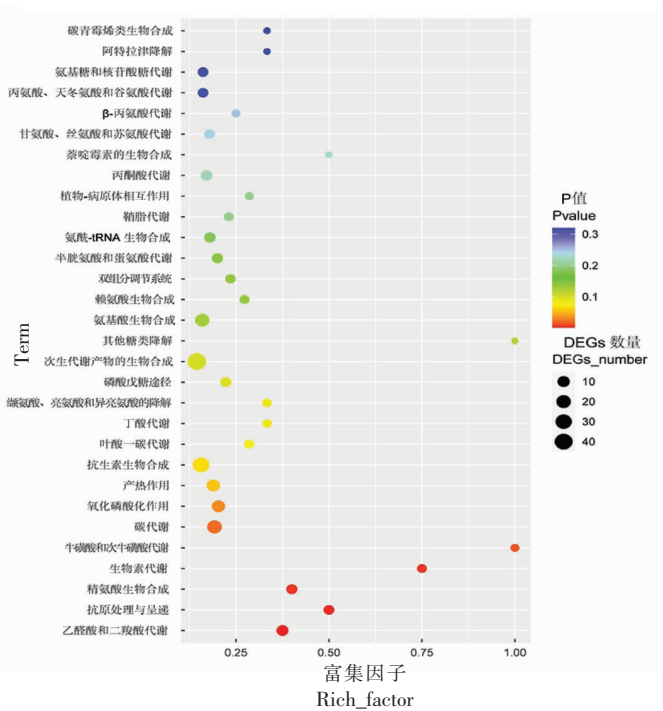


图 4 差异基因的 KEGG 富集分析气泡图

Fig.4 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis of DEGs

2.6 RT-qPCR 验证试验

基于测序结果，确定 PY01 中与耐受氧化胁迫相关基因的表达发生了显著变化。为进一步验证处理组中的 DEGs 情况，对选定的代表性差异基因 (*nqm1*、*hsp26*、*agx1*、*gnd2*、*ald3*、*zvf1*、*rad51* 和 *vht1*) 进行 RT-qPCR 试验验证，看其表达水平是否与测序结果一致。结果表明(图 5)，处理组的差异基因表达明显上调与下调。RNA-Seq 和 RT-qPCR 变化趋势显示了高度的一致性，证明了 RNA-Seq 数据的可靠性和有效性。

3 讨论

氧化胁迫是酿酒酵母生长或发酵中最常见的胁迫类型之一，当 ROS 含量与抗氧化防御系统失衡时，就会产生氧化胁迫^[18,26]。由于酵母菌响应氧化胁迫是通过复杂的、特异的和多层次的调控网络来调控的，而不是单一的代谢或信号通路^[15-16,18]，因此需要系统的分析酵母菌响应氧化胁迫的调控机制。Illumina RNA-Seq 是一种简便而有效的研究胞内综合调控网络的方法^[22]，本研究利用此技

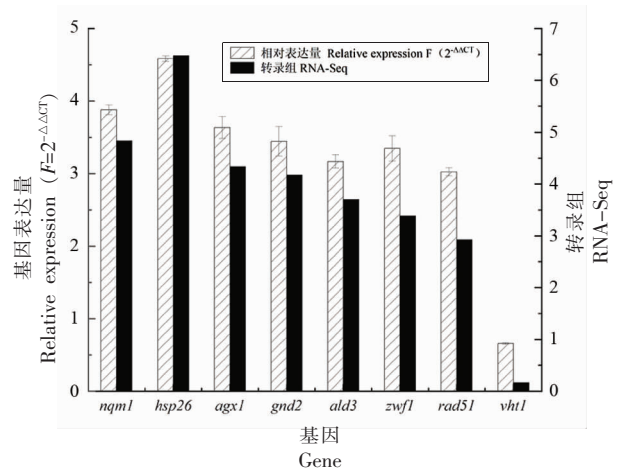


图 5 差异基因的 RT-qPCR 图

Fig.5 RT-qPCR validations of DEGs

术综合分析 PY01 响应氧化胁迫的机制，分析得到的 DEGs，大部分涉及氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、遗传信息和细胞过程(过氧化物酶体)等通路。

氨基酸不仅是组成蛋白质的成分，而且是酵母细胞在环境胁迫下生长和存活所必需的营养物

质^[14,27-28]。与对照组相比,试验组中有38个与氨基酸代谢相关的基因明显上调,这些DEGs通过调节相关酶活性来影响氨基酸代谢。例如,基因*bat2*和*sam2*参与半胱氨酸和蛋氨酸代谢的,基因*lys1*参与赖氨酸生物合成与降解,基因*leu4*参与亮氨酸生物合成过程,基因*gdh2*、*arg4*、*arg1*参与精氨酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。基因*gdh2*编码谷氨酸脱氢酶,依赖于NAD⁺(NAD-GDH;GDH2),它可将谷氨酸可逆的氧化脱氨为 α -酮戊二酸和氨^[29]。Zhao等^[15]研究发现通过替换一般转录因子中的几个氨基酸(如丝氨酸取代精氨酸)可以修饰细胞的氧化防御系统,提高酿酒酵母的抗氧化能力。因此,酵母菌通过一些氨基酸的积累与代谢来响应氧化胁迫,以维持细胞的正常功能。

碳水化合物代谢与许多生化过程相关,并且对细胞生长和应激反应有一定的影响^[30-31]。与对照组相比,与碳水化合物代谢相关的基因显著上调的有参与糖酵解的基因(*adh5*、*hxx1*和*pyk2*),参与TCA循环的基因(如*sdh9*、*mdh1*、*sdh1*和*sdh2*)。因此,在酿酒酵母PY01中,通过增强糖酵解和TCA循环产生更多的ATP来促进ROS(H₂O₂)清除,DNA和蛋白质修复,氧化损伤蛋白质的降解和金属离子转运^[20]。此外,与戊糖磷酸途径相关的基因(*zwf1*、脱羧*gnd2*和*nqm1*等)也在氧化胁迫下上调。戊糖磷酸途径是将6-磷酸葡萄糖转化为5-磷酸核酮糖,同时生成NADPH的一种葡萄糖代谢途径。在酵母细胞中,辅因子NADPH/NADP⁺对很多的生理功能都起到一定的作用,包括细胞内氧化还原平衡、能量代谢、线粒体活动和细胞周期等^[17]。NADPH是酵母细胞应对氧化应激的重要物质,戊糖磷酸代谢途径能够以NADPH的形式为细胞氧化还原平衡提供足够的还原动力;在NADPH被消耗的过程中,GSSG被谷胱甘肽还原酶还原等,因此,过表达NADPH再生的基因(*zwf1*等)可以提高酵母细胞的氧化胁迫耐受性^[17,32-33]。

脂类是细胞内重要的结构物质,在酵母菌适应环境胁迫中发挥一定作用^[34]。与对照组相比,参与脂肪酸降解的基因*adh5*、*pot1*,参与甘油酯代谢的基因*gcy1*和参与甘油磷脂代谢的基因*opi3*等

显著上调。Xia等^[30]的研究表明,酿酒酵母在低氧胁迫下,甘油磷脂途径在mRNA、蛋白质和代谢物水平上都显著上调。该途径的一些代谢产物,如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等可能通过维持细胞膜的稳定性,来减轻细胞的氧化损伤,并产生能量维持酵母生存。能量是酵母细胞生存所必需的,尤其是在胁迫环境下^[22]。与能量代谢相关的基因也显著上调,包括编码ATP合酶亚基e的基因*tim11*、编码谷氨酸脱氢酶基因*gdh2*、*fdh1*以及编码泛醇-细胞色素-c还原酶的基因*rip1*等。这些基因通过调节能量代谢为酿酒酵母在环境胁迫下的生长提供足够的能量。

酿酒酵母还可通过其它方式适应氧化胁迫,研究发现一些与遗传信息以及细胞过程相关的基因也在氧化胁迫中上调。如与核糖体相关的基因(*img1*、*mrpl11*等)以及与内质网中蛋白质加工相关的伴侣蛋白基因(*ssa1*、*ssa2*、*ssa4*和*hsp82*等)等,这些伴侣蛋白都与激活未折叠蛋白的结合活性有关,HSP82还能实现蛋白质的重组装及长折叠,SSA4与SRP依赖性共转蛋白靶向膜、易位和折叠有关等^[35]。与过氧化物酶体相关的基因,如编码过氧化氢酶T的基因*cut1*、超氧化物歧化酶的基因编码*sod2*也显著上调等。超氧化物歧化酶可将超氧阴离子转化成H₂O₂。然后被过氧化氢酶、硫氧还蛋白酶等还原成水和分子氧,从而保护细胞免受氧化胁迫^[3,18,36]。

此外,在氧化胁迫下,酵母菌上调了一些与铁离子稳态(*ggc1*、*hmx1*)、铜离子稳态(*slf1*、*pic2*)和铜离子跨膜转运(*cox17*、*pic2*)相关的基因。以前的研究表明,铁和含铁蛋白质将会在调节氧化胁迫中发挥作用,铜可以作为细胞质超氧化物歧化酶(SOD1)的辅因子,同时还存在于金属配位蛋白与金属硫蛋白中,在酿酒酵母应对氧化胁迫过程中发挥重要作用^[37-38]。醛脱氢酶(ALD编码)超家族的基因,如:*ald2*、*ald3*在氧化胁迫下也出现了明显上调。引起酵母细胞氧化胁迫的ROS不仅来源于胞外环境,而且细胞在生长、代谢等过程也能产生,特别是在线粒体中发生的一些氧化代谢^[18,29]。氧化胁迫与脂质膜的氧化降解相耦合该过程能够产生多种醛类物质。醛脱氢酶超家族的含有一些依赖于NAD(P)⁺的酶,能够清除内源与外源醛,从

而减轻酵母细胞的氧化胁迫^[22,39-40]。醛脱氢酶还能参与多胺分解代谢过程以及 β -丙氨酸生物合成过程,后者是泛酸和辅酶 A 生物合成的重要中间体^[22,41]。

4 结论

酿酒酵母 PY01 在生长和发酵过程中不可避免的会遭受氧化胁迫,阐明其细胞响应氧化胁迫的机制具有重要意义。研究表明,酿酒酵母 PY01 暴露于一定浓度 H_2O_2 时产生 393 个差异表达基因,从而影响细胞代谢通路包括碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、遗传信息、细胞过程(过氧化物酶体)等。在氧化胁迫下,酵母菌增强了 CTT1、SOD2、SRX1 和 NQM1 等抗氧化酶的表达,从而清除 H_2O_2 。为响应氧化胁迫,与铁离子稳态、铜离子稳态以及铜离子跨膜转运相关的基因以及醛脱氢酶超家族的基因发生了上调。此外,酵母菌还通过增强糖酵解和 TCA 循环产生更多的能量以响应氧化胁迫;细胞内与应激反应相关的分子伴侣和蛋白水解酶也同时上调。酿酒酵母 PY01 响应氧化胁迫机制的发现与理解,为设计酵母菌高效培养的控制策略,提高菌株的抗逆性,促进现代发酵工业中果酒以及其它生物制品生产中利用活性酵母菌奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] LAHUE C, MADDEN A, DUNN R, et al. History and domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in bread baking[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 584718.
- [2] DUAN S F, HAN P J, WANG Q M, et al. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2690.
- [3] PEREIRA P R, FREITAS C S, PASCHOALIN V M F. *Saccharomyces cerevisiae* biomass as a source of next-generation food preservatives: Evaluating potential proteins as a source of antimicrobial peptides[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(5): 4450-4479.
- [4] 韦梦婷, 王英, 刘文瑞, 等. 微囊化酿酒酵母 FM-S-115 的高密度培养[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(15): 205-210, 224.
- [5] WEI M T, WANG Y, LIU W R, et al. High cell density culture of *Saccharomyces cerevisiae* FM-S-115 in microencapsulation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(15): 205-210, 224.
- [5] OLIVEIRA M E S, PANTOJA L, DUARTE W F, et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation [J]. *Food Research International*, 2011, 44 (7): 2391-2400.
- [6] 刘沁源, 吴祖芳, 翁佩芳. 水蜜桃酒速酿酵母菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. *核农学报*, 2020, 34(7): 1480-1490.
- [6] LIU Q Y, WU Z F, WENG P F. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of yeast strains for rapid brewing of honey peach wines [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Science*, 2020, 34(7): 1480-1490.
- [7] MALAIRUANG K, KRAJANG M, SUKNA J, et al. High cell density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with intensive multiple sequential batches together with a novel technique of fed-batch at cell level (FBC)[J]. *Processes* 2020, 8(10):1321.
- [8] LI X, HUANG C, XU C Q, et al. High cell density culture of baker's yeast FX-2 based on pH-stat coupling with respiratory quotient [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(3): 389-397.
- [9] TIAN T, WU D, NG C T, et al. Uncovering mechanisms of greengage wine fermentation against acidic stress via genomic, transcriptomic, and metabolic analyses of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(17): 7619-7629.
- [10] CORDENTE A G, CURTIN C D, VARELA C, et al. Flavour-active wine yeasts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(3): 601-618.
- [11] VARELA C, SCHMIDT S A, BORNEMAN A R, et al. Systems-based approaches enable identification of gene targets which improve the flavour profile of low-ethanol wine yeast strains [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 178-191.
- [12] TAKAGI H. Molecular mechanisms and highly functional development for stress tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85(5): 1017-1037.
- [13] SAINI P, BENIWAL A, KOKKILIGADDA A, et al.

- Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 72: 1–12.
- [14] LI X, CEN N K, LIU L, et al. Collagen peptide provides *Saccharomyces cerevisiae* with robust stress tolerance for enhanced bioethanol production[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12 (48): 53879–53890.
- [15] ZHAO H W, LI J Y, HAN B Z, et al. Improvement of oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through global transcription machinery engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(5): 869–878.
- [16] CUI N, POZZOBON V, GUERIN C, et al. Effect of increasing oxygen partial pressure on *Saccharomyces cerevisiae* growth and antioxidant and enzyme productions [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(18): 7815–7826.
- [17] LI K, ZHANG J W, LIU C G, et al. Elucidating the molecular mechanism of TEMPOL-mediated improvement on tolerance under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chemical Engineering Science*, 2020, 211: 115306.
- [18] YAAKOUB H, MINA S, CALEND A, et al. Oxidative stress response pathways in *Fungi*[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(6): 333.
- [19] 张克俞, 张明明, 赵心清, 等. 关键基因过表达提高酿酒酵母抑制剂耐受性及乙醇发酵性能[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(3): 541–546.
- ZHANG K Y, ZHANG M M, ZHAO X Q, et al. Improvement of inhibitor stress tolerance and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of novel key genes[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, 24(3): 541–546.
- [20] ZHAI Z Y, YANG Y, WANG H, et al. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress[J]. *Food Microbiology*, 2020, 87: 103389.
- [21] LI R Y, MIAO Y J, YUAN S K, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* Sc131[J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 203: 103377.
- [22] ZHAO H W, CHEN J Y, LIU J J, et al. Transcriptome analysis reveals the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(29): 22923–22934.
- [23] ANDERS S, PYL P T, HUBER W. HTSeq – a python framework to work with high-throughput sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31 (2): 166–169.
- [24] ZHANG M M, ZHAO X Q, CHENG C, et al. Improved growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid by overexpression of SET5 and PPR1[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(12): 1903–1911.
- [25] AUESUKAREE C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124 (2): 133–142.
- [26] VÁZQUEZ J, GRILLITSCH K, DAUM G, et al. The role of the membrane lipid composition in the oxidative stress tolerance of different wine yeasts[J]. *Food Microbiology*, 2019, 78: 143–154.
- [27] LAIRÓN P M, ROUTLEDGE S J, LINNEY J A, et al. Lipid composition analysis reveals mechanisms of ethanol tolerance in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e00440–00421.
- [28] MAT NANYAN N S B, WATANABE D, SUGIMOTO Y, et al. Involvement of the stress-responsive transcription factor gene MSN2 in the control of amino acid uptake in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(5): foz052.
- [29] KOCAEFE-ÖZŞEN N, YILMAZ B, ALKIM C, et al. Physiological and molecular characterization of an oxidative stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by evolutionary engineering[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 822864.
- [30] XIA Z C, ZHOU X L, LI J Y, et al. Multiple-Omics techniques reveal the role of glycerophospholipid metabolic pathway in the response of *Saccharomyces cerevisiae* against hypoxic stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1398.
- [31] CHEN J H, SONG Y P, ZHANG H, et al. Genome-Wide analysis of gene expression in response to drought stress in *Populus simonii*[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31: 946–962.
- [32] LIU J D, ZHU Y B, DU G C, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to *D*-limonene-induced oxidative stress[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6467–6475.

- [33] THORPE G W, FONG C S, ALIC N, et al. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(17): 6564–6569.
- [34] MBUYANE L L, BAUER F F, DIVOL B. The metabolism of lipids in yeasts and applications in oenology [J]. Food Research International, 2021, 141: 110142.
- [35] MORANO K A, GRANT C M, MOYE-ROWLEY W S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2012, 190(4): 1157–1195.
- [36] GOŚCINIŃSKA K, SHAHMORADI GHAHE S, DOMOGAŁA S, et al. Eukaryotic elongation factor 3 protects *Saccharomyces cerevisiae* yeast from oxidative stress[J]. Genes, 2020, 11(12): 1432.
- [37] MATSUO R, MIZOBUCHI S, NAKASHIMA M, et al. Central roles of iron in the regulation of oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Current Genetics, 2017, 63(5): 895–907.
- [38] BERTERAME N M, MARTANI F, PORRO D, et al. Copper homeostasis as a target to improve *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to oxidative stress[J]. Metabolic Engineering, 2018, 46: 43–50.
- [39] CHENG J S, DING M Z, TIAN H C, et al. Inoculation-density-dependent responses and pathway shifts in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proteomics, 2009, 9(20): 4704–4713.
- [40] GAO J, HAO Y, PIAO X S, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 as a therapeutic target in oxidative stress-related diseases: post-translational modifications deserve more attention[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2682.
- [41] SINGH S, BROCKER C, KOPPAKA V, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 56: 89–101.

Oxidative Stress Response Mechanism in High Density Culture of *Saccharomyces cerevisiae* PY01 Based on Transcriptome Analysis

Shen Dongxu¹, Weng Peifang^{*}, Wu Zufang¹, Liu Yanan¹, Yan Guoliang²

¹College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang

²College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083

Abstract To investigate the mechanism of oxidative stress response during high-density culture of *Saccharomyces cerevisiae* PY01, transcriptomic analysis was performed after 2 h of oxidative treatment (6 mmol/L H₂O₂). The results showed that 393 differentially expressed genes (*DEGs*) were identified, and based on GO annotation and KEGG enrichment analysis, the identified *DEGs* were involved in metabolic (e.g. amino acid metabolism, carbohydrate metabolism and energy metabolism), genetic information and cellular processes (peroxisomes) and other pathways. Under oxidative stress, yeast scavenges ROS by enhancing several antioxidant enzymes, including SOD2, SRX1 and so on, yeast also generates more energy by enhancing glycolysis and the TCA cycle to adapt to oxidative stress, repair damaged proteins, and transport of DNA or maintain metal ions. Meanwhile, molecular chaperones and proteases associated with general stress responses are upregulated. It was shown that the response of *Saccharomyces cerevisiae* PY01 to oxidative stress is a complex, integrated regulatory network. The discovery and understanding of the mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* PY01 in response to oxidative stress has laid the theoretical foundation for designing control strategies for efficient cultivation of yeast, improving the resistance of the strain, and promoting the use of active yeasts in the production of modern fermentation industries such as fruit wines and other biological products.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae* PY01; fermentation; oxidative stress; transcriptomics; mechanism