

研究报告

酿酒酵母对数生长后期代谢重构的全基因组表达谱芯片分析

叶燕锐, 唐语谦, 陈宏运, 郑穗平, 潘力, 林影

华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510006

摘要: 为了探讨酵母进入对数生长后期以后酒精生产速度降低的原因, 我们利用酵母表达谱芯片技术对酿酒酵母细胞从对数生长中期进入对数生长后期时的全基因组表达谱进行了分析, 发现酵母在对数生长中期的表达谱非常稳定, 而一旦进入对数生长后期, 则出现明显的代谢重构现象。许多氨基酸合成和代谢相关的基因、离子转移以及与能量的生成和储存等功能相关的基因出现了不同程度的上调; 而许多涉及酵母转座和 DNA 重组的基因则表达下调; 一些中心代谢途径也发生了代谢重构, 包括: 琥珀酸和 α -酮戊二酸生成途径基因的一致上调, 都与氨基酸合成和代谢相关基因表达的结果相吻合。结果表明: 由于氨基酸合成的需求量增加, 进入对数生长后期酵母的代谢转向 TCA 循环和乙醛酸循环, 导致酒精的生产速率降低。

关键词: 酿酒酵母, 对数生长后期, 表达谱, 代谢重构

Global Expression Profiling of *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic Remodeling in Post-log Phase

Yanrui Ye, Yuqian Tang, Hongyun Chen, Suiping Zheng, Li Pan, and Ying Lin

School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: For the purpose of revealing the mechanism of the reduction of yeasts ethanol production rate after entrance of post-log phase, we used microarray to study expression profiles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during the transition from mid-log growth phase to post-log growth. The results demonstrate that the global pattern of gene expression is very stable during the mid-log phase. However, a dramatic metabolic remodeling was found when the yeast enters post-log phase, during which many of amino acid synthesis and metabolism related genes are up-regulated, moreover, ion transport, energy generation and storage related genes are also up regulated during this phase, while a large number of genes involved in transposition and DNA recombination are repressed. Central metabolic pathways also engage in metabolic remodeling, within which the genes involved in succinate and α -ketoglutarate synthesis pathways are up regulated, accordance with those of amino acid synthesis and metabolism. These results demonstrate that the increasing demand for amino acids in post-log phase lead to a metabolic transition into TCA cycle and glyoxylate cycle, which subsequently reduce the ethanol production rate. This suggests a global insight into the process of yeast ethanol fermentation.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, post-log phase, expression profiling, metabolic remodeling

Received: March 15, 2008; **Accepted:** April 10, 2008

Corresponding author: Ying Lin. Tel: +86-20-39380698; E-mail: feylin@scut.edu.cn

酿酒酵母是发酵法生产燃料酒精的主要菌种之一。发酵生产酒精过程中, 随着可利用营养的消耗和各种代谢物的生成, 酵母细胞逐渐处于各种不利于维持发酵活力甚至生存的胁迫下, 最终导致发酵速度减慢、发酵时间延长、设备利用效率降低和成本的增加。

在生产中可以通过从工艺角度控制发酵醪中酵母的数量和从菌种角度提高酵母的发酵性能这两个方面解决这一问题。用于酒精发酵的酵母要求能在高渗透压、高温、高浓度酒精等胁迫条件下正常发酵; 酒精发酵效率由酵母酒化酶系的活力决定, 而酒化酶系的活力又在很大程度上取决于酵母的生理状态和酵母的数量。一般发酵罐中酵母细胞数量宜控制在 $(0.8\sim 2.5) \times 10^8$ 个/mL^[1-3], 这时酵母处于对数生长期的后期, 对于各种胁迫的耐性比对数生长期前期和中期高, 最后进入稳定期, 处于稳定期的酵母对于外界胁迫的耐性比其它时期都要高^[4]。

无论是从工艺上进行调整还是从菌种上进行改良, 都涉及酿酒酵母本身的生长和代谢的机理, 需要使酵母处于一个可以适应环境胁迫的代谢状态。酵母在葡萄糖限制的培养基中生长到进入二次生长 (diauxic growth) 期, 会出现代谢重构的现象^[5]。酵母在种子培养基 (丰富培养基) 中培养并从对数生长期中期进入对数生长期后期这一阶段, 由于生长速度明显减慢, 也会出现代谢重构的现象。而此时酵母对环境胁迫耐性的提高, 则可能与其代谢重构有关。为了了解进入对数生长期后期以后酵母产酒精速度下降的原因, 本文利用表达谱芯片研究酿酒酵母的全基因组表达谱变化, 分析进入对数生长期后期的代谢重构现象。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种和培养基

新桥酵母为酿酒酵母属 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的耐热酵母, 本实验室保存。酵母在 YPD 培养基 (1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 2 葡萄糖) 中培养。

1.2 酵母长 Oligo 芯片

酵母长 Oligo 芯片在博奥生物有限公司 (北京) 点制。芯片上包含约 6400 条基因的 70-mer 探针, 该 Oligo 库探针根据酵母基因组的 ORF 序列 (<http://genomewww.stanford.edu/Saccharomyces/>) 设

计。探针的详细资料可参见 Operon 公司的网站 (<http://www.Operon.com>)。

1.3 酵母生长的测定

过夜活化的酵母接种于装有 60 mL YPD 的 250 mL 三角瓶中, 使初始的 $A_{600} \approx 0.1$, 30°C, 200 r/min 培养, 每小时取样测定 600 nm 处的吸光度 A_{600} 。

1.4 取样与 RNA 提取

在培养到 5 h 时 ($A_{600} \approx 1$), 6000 r/min 离心收集菌体, 重悬于 50 mL YPD 培养集中, 30°C, 200 r/min 继续培养。5.25 h、6 h (对数生长期中期) 和 8 h (对数生长期后期) 时取样, 6000 r/min 离心, 用无菌水洗涤 1 次, 在液氮中速冻 10 min 以上, -80°C 保存备用。

RNA 采用常规的热酸性酚法提取。

1.5 荧光染料标记 DNA 和芯片杂交

总 RNA 用品芯® cRNA 扩增标记试剂盒 (博奥生物有限公司, 北京) 经过一系列酶反应得到荧光染料 (Cy3-和 Cy5-dCTP) 标记的 DNA。具体步骤如下: 以 2 μg 纯化的总 RNA 为起始, 含有 T7 启动子序列的 T7 Oligo(dT) primer 为引物, 使用 CbcScript 酶合成 1st-strand cDNA; 用 RNase H 将杂合链中的 RNA 切断, 用 DNA Polymerase 以 RNA 短片段为引物, 合成 2nd-strand cDNA; 以纯化的双链 cDNA 为模板, 利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA; 以纯化的 cRNA 为模板, Random Primer 为引物, 用 CbcScript II 酶进行反转录; 纯化的 DNA 再以 Random Primer 为引物, 用 Klenow Fragment 在合成 DNA 互补链的过程中掺入带有荧光基团的 dNTP (Cy3-dCTP 和 Cy5-dCTP)。

将标记的 DNA 调整至 38.4 μL, 配成 80 μL 杂交液 (3 × SSC, 0.2% SDS, 25% 甲酰胺和 5 × Denhart's), 含有标记 DNA 的杂交液在 95°C 变性 5 min 后, 于 BioMixer™ II 芯片杂交仪 (博奥生物有限公司, 北京) 中, 42°C 杂交过夜, 并依次用两种洗液清洗 (0.2% SDS, 2 × SSC, 42°C, 4 min 和 0.2% SSC, 42°C, 4 min)。

1.6 扫描和数据分析

芯片用 LuxScan™ 10K-A 双通道激光共聚焦扫描仪进行扫描。用 LuxScan 3.0 软件进行数据的提取。

芯片的信号值用博奥生物有限公司提供的程序 BoaoAnalyzer, 进行片间校正和片内归一化及信号可信度标记, 数据采用 Lowess 归一化^[6]。荧光强度 <400 的为弱表达, 400 ~ 800 的为临界表达 (M), >800

的为表达(E)。

1.7 差异表达基因的定义

所有芯片的表达数据均为样本与共同对照(5.25h)的比值,如果比值 >2.0 ,或 <0.5 ,并且经SAM软件(<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>)进行one class方法检验, $P<0.05$ 的基因,认为是差异表达基因。

2 结果与分析

新桥酵母在2 h后进入对数生长期,在8h后开始从对数生长中期转入对数生长后期(图1)。为了研究酵母对数生长后期和对数生长中期的表达谱,我们以5.25 h为共同对照,分别分析了5.25 h、6 h(对数生长中期)和8 h时(对数生长后期)酵母的表达谱。

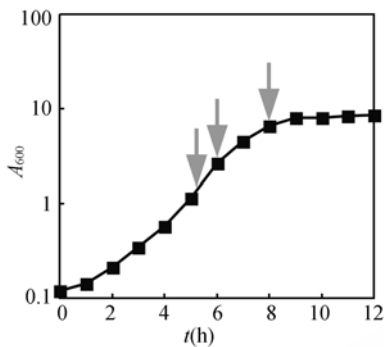


图1 新桥酵母的对数生长期

Fig. 1 Log phase of *Saccharomyces cerevisiae* Xinqiao. Arrows points to the sampling time of mid-log phase (5.25 h, 6 h) and post-log phase (8 h), respectively.

5.25 h的自身比较实验结果的差异基因数为28,假阳性的发现率小于0.5%,6 h和5.25 h时酵母的表达谱非常相似,差异基因数为45个,差异小于1%,表明处于对数生长中期的酵母代谢相当稳定。而8 h时的表达谱与5.25 h时相比,出现了非常大的差异,表现出明显的代谢重构现象,表达差异大于2的基因有近1200个,约63%(741个)基因表达上调,约37%(437个)基因表达下调。在这些差异表达的基因中,有约300个为未知功能或功能不明确的基因。

2.1 差异表达基因的GO terms富集度分析

将对数生长后期的差异表达基因按上调和下调分别进行GO terms富集度分析,取 P 值 <0.01 的富集结果,分别列于表1和表2。从表1可以看出,表达分别上调和下调基因,其生物学功能均比较集中。表达上调的基因主要涉及氨基酸合成和代谢、

离子的转运、酵母芽孢的形成及能量的转化和储存等几个方面。

酵母细胞生长到一定阶段,外界环境的营养条件发生了变化,此时细胞的生理状态和胞内的代谢受到环境影响而发生变化,对降解蛋白和合成新蛋白的需求导致酵母细胞内氨基酸的合成和代谢加速。酵母从比生长速率较高的对数生长中期转入速率较低的对数生长后期,这一过程对酵母体内造成的直接影响是其代谢的重构,在生理上体现出来的是生长速度开始下降(图1),另一方面,由于细胞内外条件的变化,导致对外界营养物质的吸收条件也发生了改变,因此表达负责胞内外离子水平的重新平衡以及维持的一系列基因。

从对数生长中期进入对数生长后期,表达下调的基因大部分是核酸水平的代谢途径(表2)。酵母转座、DNA重组和核酸代谢等途径相关的基因的表达受到抑制。可能正是因为这个原因,导致在外界营养的缺乏时,酵母细胞生长速度减慢。涉及DNA重组基因表达受到抑制,也造成了酵母中转座相关的基因表达的下调。由于复制转座作用是酿酒酵母 $MATa$ 和 $MAT\alpha$ 接合型频繁转换的原因,芯片结果(表3)表明,进入对数生长后期以后,酵母开始以减数分裂的方式进行繁殖。

2.2 代谢重构加速氨基酸和氮的代谢

在上调的700多个基因中,许多氨基酸合成和代谢相关的基因显著上调,其中最明显的是精氨酸合成途径中的基因(表1)。在酵母和其它物种中,氨基酸的合成在转录调节因子 $ARGR1$ 和 $ARGR2$ 的作用下,由共同的调控机制所控制^[7],而精氨酸的合成除此之外还受另外一套独立的系统所调控^[8]。从对数生长中期向对数生长后期转换时,精氨酸合成途径中涉及的10个基因表达全部上调(表3),而其它如谷氨酸等的氨基酸合成和代谢途径中许多基因也出现上调的情况,也说明氨基酸的合成是受共同调控的。

2.3 代谢重构对酵母中心代谢途径的影响

在YPD培养集中处于对数生长中期的酵母全基因组表达的形式非常稳定,而进入对数生长后期,则出现代谢重构的现象^[9]。本实验的结果也发现了这一现象。考虑到酿酒酵母在发酵前期生产酒精的速度较快,到后期酒精的产量只能缓慢地积累。因此有必要

表 1 对数生长后期上调基因的 GO terms 富集度分析
Table 1 GO terms enrichment of genes up regulated in post-log phase

GO terms	No. of up regulated genes	No. of background genes	P-value
arginine biosynthetic process	10	10	9.67E-08
glutamine family amino acid metabolic process	18	42	3.54E-05
spore wall assembly	18	43	5.50E-05
glutamine family amino acid biosynthetic process	14	27	5.77E-05
electron transport	15	32	0.00011
urea cycle intermediate metabolic process	10	15	0.00018
oxidative phosphorylation	18	46	0.00019
ion transport	31	117	0.00039
amino acid biosynthetic process	28	107	0.00179
ascospore formation	29	114	0.00220
mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	7	9	0.00268
amine biosynthetic process	29	116	0.00321
nitrogen compound metabolic process	47	234	0.00360
sporulation	31	129	0.00368
cation transport	26	99	0.00379
nitrogen compound biosynthetic process	29	117	0.00385
generation of precursor metabolites and energy	38	175	0.00447

表 2 对数生长后期下调基因的 GO terms 富集度分析
Table 2 GO terms enrichment of genes down regulated in post-log phase

GO terms	No. of down regulated genes	No. of background genes	P-value
transposition, RNA-mediated	82	137	3.95E-63
DNA recombination	91	245	5.24E-47
DNA metabolic process	107	480	2.50E-32
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	178	1591	1.32E-16
metabolic process	284	3602	8.03E-08
primary metabolic process	267	3324	9.81E-08
cellular metabolic process	278	3521	1.71E-07
cellular process	338	4678	8.76E-06
macromolecule metabolic process	227	2855	5.97E-05

表 3 减数分裂部分相关基因在对数生长后期的表达
Table 3 Meiosis related genes expressed in post-log phase

Gene name	Description	Fold increase
SPO19	meiosis-specific GPI-protein	15.70
REC104	meiosis-specific protein	8.37
IME2	Serine/threonine protein kinase involved in activation of meiosis	4.66
ISC10	Meiosis-specific protein required for spore formation	4.01
SPO73	Meiosis-specific protein of unknown function	3.88
MSH4	meiosis specific protein	2.90
MPC54	Component of the meiotic outer plaque, assembled during meiosis II	2.62
WTM2	transcriptional modulator, regulation of meiosis	2.46
RED1	meiosis-specific protein involved in similar chromosome synapsis and chiasmata formation	2.43
DON1	Meiosis-specific component of the spindle pole body, forms a ring-like structure at the leading edge of the prospore membrane during meiosis II	2.26

考察酵母在生长时期转换过程中碳架去向, 包括甘油、乙醇等主要代谢途径的重构情况。图 2 所示为酿酒酵母中心代谢途径简图, 在图中以葡萄糖作为出发的代谢物, 经一系列途径后转化成各种代谢产物。

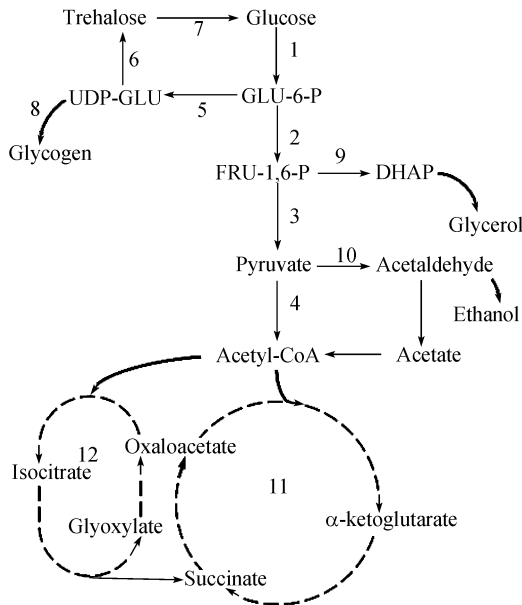


图 2 酿酒酵母的中心代谢途径示意图

Fig. 2 Central pathways of *S. cerevisiae*

Only key metabolic intermediates are displayed. Arrows point to major directions of metabolic flows. Reversible reactions are not displayed.

Numbers 1-12 represent to different pathways. 1: Glucose to glucose-6-phosphate; 2: Glucose-6-phosphate to fructose-1, 6-diphosphate; 3: Fructose-1, 6-diphosphate to pyruvate; 4: Pyruvate to acetyl-CoA; 5: Glucose-6-phosphate to uridine diphosphate glucose; 6: Uridine diphosphate glucose to trehalose; 7: Trehalose to glucose; 8: Uridine diphosphate glucose to glycogen and glycogen degradation; 9: Fructose-1,6-diphosphate to glycerol and glycerol degradation; 10: Pyruvate to acetate and ethanol, and degradation of acetate and ethanol; 11: TCA cycle; 12: Glyoxylate cycle

图 3 给出了在图 2 中的 1~12 条途径涉及的基因表达比值。总的来看, 在这些途径中大部分的基因, 并没有表现出差异表达。特别是从果糖-1, 6-二磷酸到乙酰辅酶 A 的过程, 这是图 2 中其它途径的“中心途径”, 编码催化这些过程酶类的基因均没有差异表达。从葡萄糖到葡萄糖-6-磷酸的途径中, 编码 3 种激酶的基因也没有差异表达, 只是 *GLK1* 的表达稍有下调, 说明酵母在这个时期对于葡萄糖的利用并未明显减少, 但酵母的生长速度明显减慢 (图 1)。从葡萄糖-6-磷酸与果糖-1, 6-二磷酸之间的转换来看, *FBP1* 编码果糖-1, 6-二磷酸酶, 催化果糖-1, 6-二磷酸向果糖-6-磷酸的转化, 而 *Pfk1p* 和 *Pfk2p* 催化的则是此转化的逆反应。从图 3 可以看出, *PFK1* 和 *PFK2* 表达显著下调, 而 *FBP1* 略有上调, 这样的结

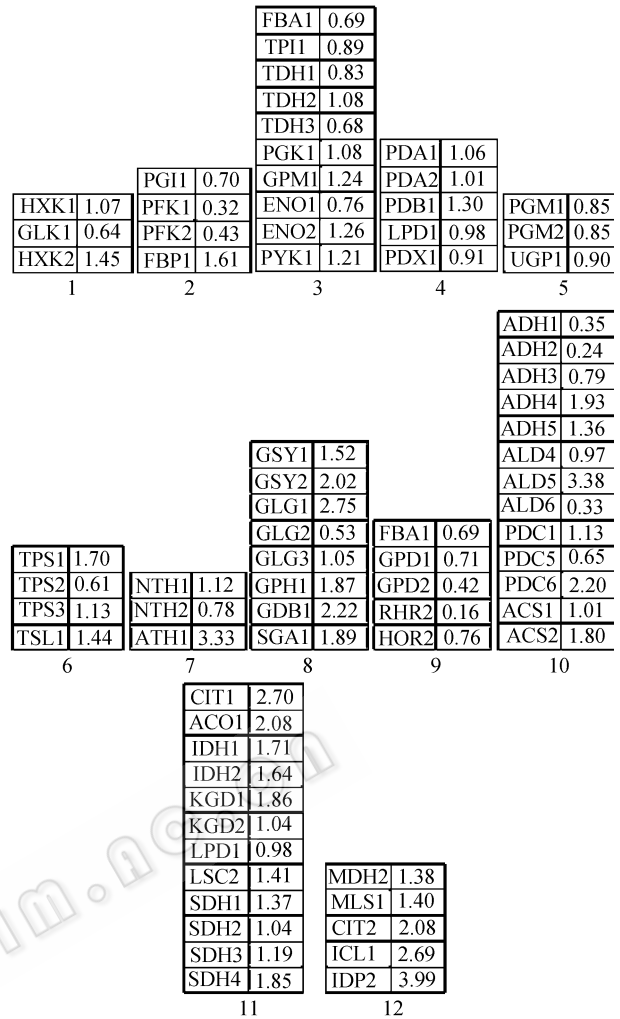


图 3 酿酒酵母的中心代谢途径相关基因的表达比值

Fig. 3 Expression ratios of genes related to the central pathways of *S. cerevisiae*

Numbers 1 ~ 12 represent to corresponding pathways in Fig. 2

果是反应向着葡萄糖-6-磷酸积累的方向进行。从尿苷二磷酸葡萄糖向海藻糖和糖原转化的途径来看, 糖原生成和代谢途径的酶类, 其基因表达多数上调, 而海藻糖代谢的酸性海藻糖酶基因明显上调, 可以看出此时糖原和海藻糖的合成和代谢速度有所加快, 也就是说酵母开始利用葡萄糖以外的碳源进行代谢。

甘油是维持酵母细胞内渗透压的重要物质, 在其合成途径中, *Gpd2p* 是 *Gpd1p* 的同工酶, 与 *Gpd1p* 不同的是 *Gpd2p* 的活性依赖于 NAD^+ 。*Rhr2p* 和 *Hor2p* 也是同工酶, 但是 *RHR2* 的表达却下调得非常严重。可能酵母处在一个需要节省能量的时期, 而此时也不需要更多的甘油来维持渗透压, 因此只需其中一个同工酶维持一定的表达。从丙酮酸生成乙醇有 5 种同工酶。*ADH1* 和 *ADH2* 的表达均明显下调, 只有 *ADH4* 表达上调。*Adh1p* 是正常情况下将

乙醛转化成酒精时起主要作用的同工酶。Adh2p 的 K_m 值比其它同工酶都低, 主要催化乙醇向乙醛的转化。Adh4p 与其它同工酶不同的是, 它是以二聚体的形式存在^[10], 并且一般在实验室表达水平较低, 而在工业酿酒酵母中则表达量很高^[11]。

TCA 循环和乙醛酸循环近一半的基因表达上调, 可能与氨基酸合成和代谢许多相关基因表达上调有关。这些表达上调的基因中, Cit2p、Aco1p 和 Icl1p 催化合成琥珀酸, Idp2p、Aco1p 以及 Cit2p 则催化合成 α -酮戊二酸。而琥珀酸和 α -酮戊二酸作为各种氨基酸的前体, 必须不断地积累, 才能满足活跃的氨基酸合成和代谢。

3 讨论

我们采用酵母全基因组表达谱芯片检测了酿酒酵母在 YPD 培养基中从对数生长中期向对数生长后期转换时的表达谱, 发现与酵母比生长速率减慢对应的是其表达谱反映出来的代谢重构。

当酵母处于环境胁迫下, 就会产生响应, 并逐渐适应这样的环境^[12], 当酵母从对数中期进入对数后期, 由于培养液中的营养是逐步缓慢地消耗的, 而酵母的比生长速率也是慢慢降低。因此对于环境造成的胁迫, 酵母没有表现出非常强烈的响应, 实际上, 在我们所有芯片的表达比值中, 上调最多的是 15.70 倍, 下调最多的是 14.30 倍。酵母显得很容易适应从一个生长时期向下一个时期的转换。尽管酵母的响应并不强烈, 但是用全基因组表达谱芯片对这一转换过程的代谢重构进行检测, 同样可以发现很多有意义的现象。比如在这个过程中, 氨基酸合成和代谢的基因表达上调, 意味着需要更多的前体, 使得葡萄糖到丙酮酸后的流向转向了 TCA 循环和乙醛酸循环, 而不利于流向生产更多乙醇的方向, 这可能是除了营养缺乏和乙醇浓度抑制之外, 造成发酵中后期乙醇生产速度下降的原因之一。

微生物发酵是一个非常复杂的过程, 受外界各种各样因素以及菌种自身的影响很大, 且限于对微生物生长和发酵过程许多代谢调控机理的了解还不够深入, 大多数的发酵过程对于我们来说还是一个“黑箱”。DNA 芯片可以高通量地分析菌种在不同条件下的全基因组转录水平, 近年在研究微生物许多代谢调控机理方面应用非常广泛, 并且取得了不

错的效果, 也许可作为打开这个“黑箱”的“钥匙”。

REFERENCES

- [1] Jones AM, Thomas KC, Ingledew WM. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**(5): 1242–1246.
- [2] Zhong YL, Sun Yong, Shen Jing. Industrial Application of Flocculating Yeast A82-1 in Alcohol Producing. *Sugarcane and Canesugar*, 1998, **6**: 42–45.
钟娅玲, 孙勇, 沈静. A82-1 絮凝酵母在糖蜜酒精发酵中的工业应用报告. *甘蔗糖业*, 1998, **6**: 42–45.
- [3] Tang YQ, Zhong YL, Shen Jing, et al. Study of Alcohol Fermentation Character of a Thermotolerant Flocculating Yeast HK-3. *Food and Fermentation Industries*, 1997, **23**(5): 16–20.
汤岳琴, 钟娅玲, 沈静, 等. 耐高温絮凝酵母 HK-3 糖蜜原料发酵生产酒精特性. *食品与发酵工业*, 1997, **23**(5): 16–20.
- [4] Elliott B, Futcher B. Stress resistance of yeast cells is largely independent of cell cycle phase. *Yeast*, 1993, **9**: 33–42.
- [5] Brauer MJ, Saldanha AJ, Dolinski K, et al. Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, **16**: 2503–2517.
- [6] Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(4): e15.
- [7] Delforge J, Messenguy F, Wiame JM. The Regulation of Arginine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. The Specificity of argR Mutations and the General Control of Amino-Acid Biosynthesis. 1975, *European Journal of Biochemistry*, **57**(1): 231–239.
- [8] Messenguy F, Dubois E. Participation of transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms in the control of arginine metabolism in yeast. 1983, *Molecular and General Genetics*, **189**(1): 148–156.
- [9] DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. 1997, *Science*, **278**: 680–685.
- [10] Drewke C, Ciriacy M. Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. 1988, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **950**(1): 54–60.
- [11] Dickinson JR, Salgado LEJ, Hewlins MJE. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. 2003, *Journal of Biological Chemistry*, **278**(10): 8028–8034.
- [12] Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. 2000, *Molecular Biology of the Cell*, **11**(12): 4241–4257.