

研究报告

## 硫酸锌添加对酿酒酵母乙酸胁迫条件下全局基因转录的影响

陈洪奇<sup>1</sup> 于欣水<sup>1</sup> 张明明<sup>1</sup> 白凤武<sup>1,2</sup> 赵心清<sup>2\*</sup>

(1. 大连理工大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

(2. 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

**摘要:**【目的】利用转录组测序研究硫酸锌添加提高絮凝酿酒酵母 SPSC01 乙酸胁迫耐性的分子机理。【方法】在 10.0 g/L 乙酸胁迫条件下, 添加 0.03 g/L 硫酸锌, 取对数期酿酒酵母细胞, 与不添加硫酸锌的对照组细胞进行比较转录组分析。【结果】添加硫酸锌的实验组与对照组相比较, 50 个基因转录水平上调, 162 个基因转录水平下调, 这些转录水平变化明显的基因涉及糖代谢、甲硫氨酸合成、维生素合成等多条代谢途径, 此外, 转录水平变化的基因还包括抗氧化酶基因等关键胁迫响应基因。【结论】硫酸锌添加可改变酿酒酵母全局基因转录水平, 提高抗氧化酶及其他胁迫耐受性相关基因的表达, 影响细胞氧化还原平衡和能量代谢, 通过对多基因转录的调控提高酿酒酵母乙酸耐受性。

**关键词:** 酿酒酵母, 转录组, 乙酸耐受性, 硫酸锌添加

## Impact of zinc sulfate supplementation on global gene expression profiling of *Saccharomyces cerevisiae* in response to acetic acid stress

CHEN Hong-Qi<sup>1</sup> YU Xin-Shui<sup>1</sup> ZHANG Ming-Ming<sup>1</sup> BAI Feng-Wu<sup>1,2</sup> ZHAO Xin-Qing<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Objective] To study the molecular mechanisms underlying improved acetic acid stress tolerance of the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* SPSC01 by zinc sulfate supplementation. [Methods] Global gene expression profiling was studied by comparative transcriptomic analysis using yeast cells of the log phase cells that were grown with or without 0.03 g/L zinc sulfate addition in the presence of 10.0 g/L acetic acid. [Results] Transcription levels of 50 genes were up-regulated and 162 genes were down-regulated when zinc sulfate was added in the fermentation medium. Genes involved in carbohydrate metabolism, methionine synthesis, and vitamin biosynthesis were up-regulated. In addition, genes encoding the antioxidant enzymes and other stress responsive genes were also up-regulated. [Conclusion] Zinc sulfate addition affected global gene transcription of *S. cerevisiae*, exerting positive effects on the expression of antioxidant

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 21376043)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

Received: September 23, 2016; Accepted: November 16, 2016; Published online (www.cnki.net): December 05, 2016  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376043)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-09-23; 接受日期: 2016-11-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-05

enzymes, stress tolerance and redox balance, as well as energy metabolism. Our results indicate that zinc sulfate supplementation improves acetic acid tolerance of *S. cerevisiae* by regulating multiple genes and metabolic pathways.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Transcriptome, Acetic acid tolerance, Zinc sulfate supplementation

酿酒酵母广泛用于食品生产及酿造领域,也是生物乙醇生产广泛使用的微生物。选育具有良好发酵活性的酵母菌有利于提高生产效率,促进细胞循环使用,加强生产的经济性。但是,酿酒酵母在生长和发酵过程中,经常受到多种环境胁迫条件的影响,如木质纤维素水解液中的抑制物(乙酸、糠醛、酚类物质等)、高温及高渗透压等,这些环境胁迫条件抑制酿酒酵母细胞生长及代谢,进一步影响乙醇生产效率。因此,酿酒酵母细胞对环境胁迫因素的反应和耐受性机制一直是国内外学者研究的重点<sup>[1-4]</sup>。在纤维素水解液抑制物中,乙酸含量普遍较高。在纤维素原料水解液中的浓度受所使用的生物质种类及预处理技术的影响而不同,但浓度大约在 1-10 g/L<sup>[5]</sup>。因此,研究酿酒酵母乙酸耐受性对提高木质纤维素乙醇生产效率具有重要意义。

乙酸的存在会延长酿酒酵母的发酵时间进而导致乙醇发酵效率的降低,对乙酸毒性分子机理的研究表明,高浓度乙酸会引起细胞内质子梯度的改变,造成能量枯竭<sup>[6]</sup>;同时乙酸会引起细胞氧化胁迫,主要表现在胞内活性氧物质(ROS)的过量积累。过多活性氧导致细胞内 DNA、蛋白质等损伤<sup>[7]</sup>。外源保护性物质的添加可以降低细胞内活性氧水平,提高酿酒酵母细胞对乙酸的耐受性。本课题组前期研究表明,发酵培养基中添加硫酸锌能提高酿酒酵母对乙酸耐受性<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究还发现,在发酵液中添加硫酸锌能够降低细胞内 ROS,提高发酵效率<sup>[9]</sup>。但是,锌离子提高酿酒酵母对乙酸耐受性的分子机制目前并不清楚。因此,本文比较了外源添加硫酸锌的条件下酿酒酵母细胞和没有添加硫酸锌的对照组细胞全局基因转录的差异,研究硫酸锌在乙酸存在条件下提高酿酒酵母乙酸耐性的分子机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

自絮凝酿酒酵母 SPSC01,由本实验室保存。YPD 液体培养基(g/L):葡萄糖 20.0,酵母浸粉 10.0,蛋白胨 20.0。YPD 固体培养基(g/L):YPD 液体培养基中添加终浓度为 20.0 g/L 的琼脂粉。酵母菌种子培养基(g/L):葡萄糖 30.0,酵母粉 4.0,蛋白胨 3.0。发酵培养基及培养条件见参考文献[8]。

### 1.2 主要试剂和仪器

提取 RNA 试剂盒、实时定量试剂盒,宝生物(大连)有限公司。韩国 KoBio Tech KF-2.5L 发酵罐, KoBio Tech Co. Ltd。

### 1.3 种子活化和批次发酵

实验方法参照文献[8],发酵罐 pH 控制恒定为 4.5,每 12 h 取样一次,测定生物量、乙醇产量和残糖。实验重复 3 次,文中结果为 3 次的平均值。

### 1.4 乙酸胁迫条件下硫酸锌添加转录组学测定

培养实验组和对照组的酿酒酵母生长到对数中期,分别取 4 mL 菌液于 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用无菌水洗涤 1 次,在液氮中速冻 10 min 以上,-80 °C 保存备用。转录组测定委托深圳华大基因。将提取的总 RNA 用带有 Oligo (dT)的磁珠富集 mRNA,并将 mRNA 打断成短片段,构建文库,使用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪进行测序。测序所得的数据经过滤得到 Clean reads,比对得到参考序列酿酒酵母模式菌株 S288c 的基因组序列。比对结束后,进行基因和转录本定量分析、基于基因表达水平的各项分析,并对筛选出的样品间差异表达基因,进行 GO 功能显著性富集分析、Pathway 显著性富集分析、聚类、蛋白互作网络和转录因子等更深入的挖掘分析。

### 1.5 转录组变化的基因 RT-qPCR 验证

采用 TransGen Biotech 试剂盒提取总 RNA, 经过 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒反转录为 cDNA 后, 采用 SYBR® Premix ExTaq™ II (TliRNaseH Plus) 试剂盒进行实时定量检测。实验中使用的引物序列见表 1, 选择 *ALG9* 作为内参<sup>[10]</sup>。实时定量 PCR 反应条件及相对定量方法见参考文献[11]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 锌离子对自絮凝酵母 SPSC01 乙酸胁迫耐受性的影响

在 10.0 g/L 乙酸胁迫条件下, 添加 0.03 g/L 硫酸锌能显著提高酿酒酵母 SPSC01 菌株的生长速率, 并能明显提高生物量积累, 结果见图 1A。此外, 添加硫酸锌的实验组细胞生长的延迟期缩短, 添加硫酸锌的延滞期为 12 h, 比对照菌株的延滞期缩短 12 h。本课题组前期研究发现, 在

15.0 g/L 高浓度乙酸存在条件下, 硫酸锌也能缩短 SPSC01 发酵的延滞期<sup>[8]</sup>。添加硫酸锌的实验组乙醇发酵时间缩短, 也和前期研究结果一致<sup>[8]</sup>。但是目前对于硫酸锌对乙酸的保护作用机制还不清楚, 目前有研究表明, 锌离子可作为多个蛋白的辅助因子或结构的组成成分<sup>[12]</sup>, 可通过对多个蛋白的表达或活性的影响, 影响酿酒酵母细胞全局代谢调控网络。为了研究硫酸锌对基因的影响, 将乙酸胁迫下硫酸锌添加培养基中生长的细胞与不添加的对照进行转录组分析, 比较二者的基因表达差异。

### 2.2 转录组中表达水平变化基因的 RT-qPCR 验证及分析

随机选取在转录组数据中表达水平变化比较显著的 6 个基因, 包括 *THI20*、*CTT1*、*INO1*、*OPI3*、*PET18* 和 *HUG1*, 用实时定量 PCR 进行验证, 由表 2 可以看出, 所选基因的表达水平变化与转录组数据均保持一致, 表明转录组数据准确可靠。

表 1 实时定量 PCR 引物  
Table 1 The primers for RT-qPCR analysis

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物 Primer (5'→3')
<i>ALG9</i>	rtALG9-F	ATCGTGAAATTGCAGGCAGCTTGG
	rtALG9-R	CATGGCAACGGCAGAAGGCAATAA
<i>OPI3</i>	rtOPI3-F	GGTGACTATTTCCGGCATCCT
	rtOPI3-R	CGCAGGCTTTCCTTTGTAA
<i>PET18</i>	rtPET18-F	CATCCCTCACCAAGGAAGAA
	rtPET18-R	CACGAGCCCATCTCCAATAG
<i>INO1</i>	rtINO1-F	TGGGACATCAATAACGCAGA
	rtINO1-R	GGCTTCACCAAGGACATCTT
<i>THI20</i>	rtTHI20-F	TAAAAAGGTTGCGGACGGTA
	rtTHI20-R	CCC GCGATA CAATGA ACTCT
<i>CTT1</i>	rtCTT1-F	CGTTGGTGGTGAAAGTGGA
	rtCTT1-R	TCTGAGGAAGAAGACGGGAGT
<i>HUG1</i>	rtHUG1-F	GCAATTCCTTGACGATGT
	rtHUG1-R	AACGTGATCCTTGGGGAATA

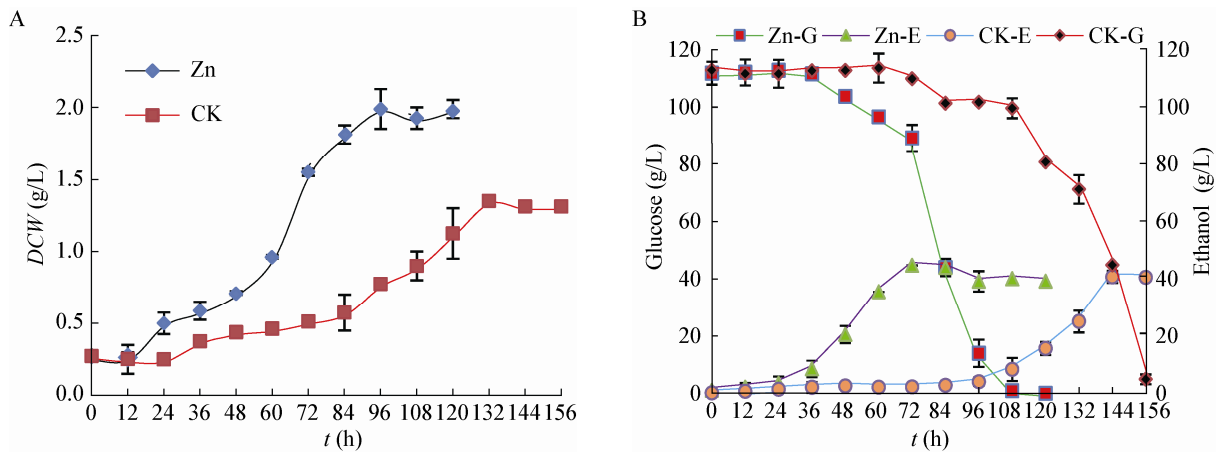


图 1 硫酸锌添加对自絮凝酵母 SPSC01 乙酸胁迫条件下生长和乙醇发酵的影响

Figure 1 Effect of zinc sulfate supplement on cell growth and ethanol fermentation of the flocculating yeast SPSC01 under acetic acid stress

注: A: 酵母生物量积累曲线; B: 酵母葡萄糖消耗和乙醇产生曲线. CK: 不添加硫酸锌的对照组; Zn: 硫酸锌添加组; G: 葡萄糖消耗; E: 乙醇产生.

Note: A: Growth curve; B: Glucose consumption and ethanol production. CK: Control group without zinc sulfate supplementation; Zn: Experimental group with zinc sulfate addition; G: Glucose consumption; E: Ethanol production.

对以上验证的几个关键基因的功能进行分析, 初步探讨硫酸锌添加对酿酒酵母细胞代谢的影响. *THI20* 是硫胺素(维生素 B1)生物合成相关的基因, 参与硫胺素代谢合成途径, 其产物具有 3 种酶活性, 分别为羟甲基嘧啶(HMP)激酶活性、磷酸羟甲基嘧啶(HMP-P)激酶和硫胺素激酶活性, *THI20* 在硫胺

素合成中起到关键作用<sup>[13]</sup>. 硫胺素可作为多种酶的辅酶, 同时在细胞内具有抗氧化胁迫作用, 硫胺素能与氧自由基和超氧自由基发生作用, 产生二硫键而使细胞免受活性氧物质作用<sup>[14]</sup>. *PET18* 基因编码的蛋白具体分子功能目前还不清楚, 但是有研究表明, 该基因涉及参与硫胺素的生物合成途径<sup>[13]</sup>, 因

表 2 RT-qPCR 分析验证转录组变化的基因  
Table 2 RT-qPCR analysis of genes in transcriptomic results

基因 Gene	基因功能 Gene function	实时定量结果(倍数) RT-PCR results (Fold)	转录组结果(倍数) Transcriptome results (Fold)
<i>CTT1</i>	Cytosolic catalase T; has a role in protection from oxidative damage by hydrogen peroxide	10.20	1.62
<i>INO1</i>	Inositol-3-phosphate synthase; involved in synthesis of inositol phosphates and inositol-containing phospholipids	4.41	6.21
<i>OPI3</i>	Methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase; catalyzes the last two steps in phosphatidylcholine biosynthesis; also known as phospholipid methyltransferase	2.55	1.83
<i>PET18</i>	Protein of unknown function; has weak similarity to proteins involved in thiamin metabolism; expression is induced in the absence of thiamin	6.39	2.04
<i>HUG1</i>	Ribonucleotide reductase inhibitor; intrinsically disordered protein that binds to and inhibits Rnr2p; involved in the Mec1p-mediated checkpoint pathway; transcription is induced by genotoxic stress and by activation of the Rad53p pathway	3.23	1.98
<i>THI20</i>	Trifunctional enzyme of thiamine biosynthesis, degradation and salvage; has hydroxymethylpyrimidine (HMP) kinase, HMP-phosphate (HMP-P) kinase and thiaminase activities	9.95	2.52

此该基因可能也参与细胞内活性氧的清除,进而保护细胞在乙酸存在下免受损伤。*CTT1* 基因编码细胞质内过氧化氢酶,该酶能分解  $H_2O_2$ ,具有保护细胞免受  $H_2O_2$  的氧化损伤作用<sup>[15]</sup>。在乙酸胁迫条件下细胞内会产生活性氧(ROS),这些活性氧物质可在超氧化物歧化酶 Sod1p 和 Sod2p 催化下转化成  $H_2O_2$  对细胞产生氧化损伤<sup>[16]</sup>,有研究表明,硫酸锌添加能降低乙酸胁迫条件下酵母细胞内 ROS 积累<sup>[9]</sup>,对酿酒酵母细胞起到保护作用。*CTT1* 表达上调可能与硫酸锌添加条件下活性氧的清除有关。*INO1* 基因编码肌醇-3-磷酸合酶,参与细胞内肌醇磷酸和肌醇磷酸酯的生物合成过程。前期研究表明硫酸锌参与酿酒酵母细胞内磷脂的合成调控<sup>[17]</sup>,磷脂对于细胞维持正常的代谢作用起到关键作用。在转录组数据分析中发现还有很多和脂肪与磷脂合成相关的基因发生变化,比如 *OPI3* 基因,该基因编码亚甲基脂酰磷脂合成酶,参与细胞内磷脂酰胆碱的合成。表明硫酸锌能影响细胞内磷脂及脂肪的合成与降解,进而影响细胞的内部结构的稳定性,使酿酒酵母细胞对外界的胁迫环境具有较强的抵

抗力。*HUG1* 基因编码产物可以抑制核苷酸还原酶 Rnr2p,乙酸毒性能导致细胞内 DNA 的损伤<sup>[18]</sup>,推断添加硫酸锌的细胞 DNA 损伤不显著,所以 *HUG1* 基因表达上调阻断 DNA 修复所需酶的表达,节省蛋白合成所需的能量。更多表达水平变化的基因将在下文详细讨论。

### 2.3 转录组中表达水平变化的基因涉及代谢途径分析

选择表达上调倍数大于 1.5 倍的基因为上调的基因,表达下调倍数小于 0.8 倍为下调基因。分析表明,添加硫酸锌的实验组与对照组相比,50 个基因转录水平上调,162 个基因转录水平下调,这些表达水平变化的基因涉及糖代谢、甲硫氨酸合成、维生素合成等多条代谢途径,以及抗氧化酶基因等关键胁迫响应基因。为了研究硫酸锌对酿酒酵母 SPSC01 菌株的保护机制,对转录组数据中表达水平显著变化的基因进行参与代谢途径分析发现,这些表达变化的基因主要参与的代谢途径包括 ATP 结合转运蛋白(ABC transporters)、糖酵解途径、脂肪酸途径、胁迫响应相关基因、维生素代谢途径等,结果如图 2 所示。

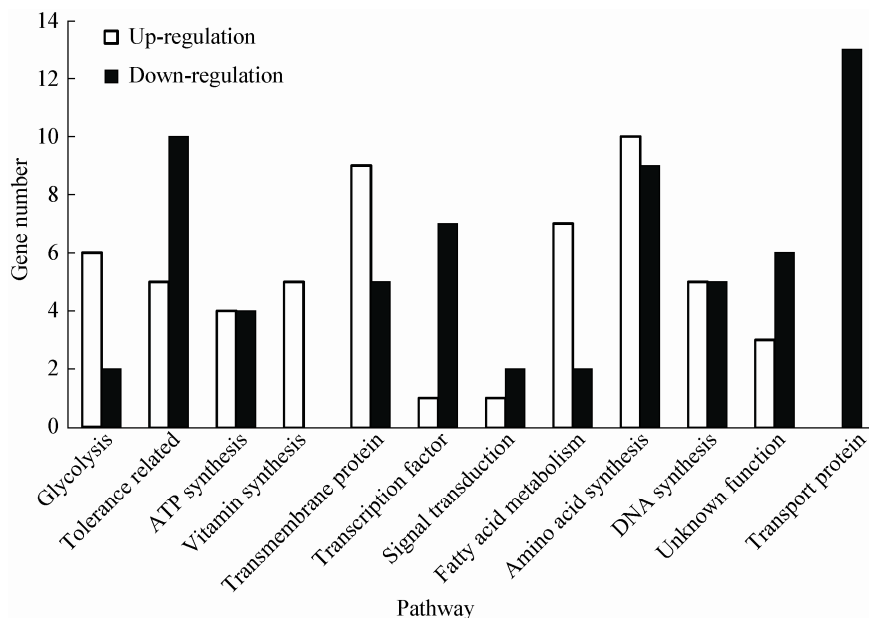


图 2 转录组中表达水平变化明显的基因所关联的代谢途径分析

Figure 2 Pathway enrichment for differentially expressed genes in the transcriptomic results

## 2.4 硫酸锌添加与能量代谢途径基因转录水平分析

在表达水平显著变化的基因中, 有 12 个基因涉及到糖代谢途径, 其中包括糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径和乙醇代谢途径, 其中有 4 个基因显著上调, 8 个基因显著下调, 结果见表 3。显著上调的 4 个基因 *HXT9*、*IMA2*、*IMA3*、*IMA4* 编码的基因产物参与葡萄糖的转运和麦芽糖的分解, 与糖的利用有关。*HXT9* 基因编码的蛋白具有转运葡萄糖到细胞内的作用, 其上调表达表明添加硫酸锌后, 在乙酸胁迫条件下可能使葡萄糖的转运能力增强, 葡萄糖的快速供应, 使细胞内能够有足够多的葡萄糖用于细胞内代谢, 产生大量 ATP。有报道乙酸胁迫下 ATP 产生受到抑制<sup>[6]</sup>, 硫酸锌添加可缓解 ATP 的缺乏, 保证细胞正常代谢。乙酸可引起酿酒酵母细胞胞内酸化, ATP 对维持胞内 pH 具有重要作用<sup>[19]</sup>。本文研究结果表明, 硫酸锌添加提高乙酸耐性的机理与促进 ATP 的合成有关。在糖代谢的途

径中 *PDC5* 基因明显的下调, 有研究发现该基因被硫胺素抑制, 参与氨基酸的代谢合成途径中<sup>[20]</sup>。本文的转录组发现 *THI20* 等与硫胺素合成相关基因的显著上调, 推测在锌离子添加的条件下, 细胞内硫胺素的合成大量产生, 而硫胺素抑制 *PDC5* 基因的表达<sup>[21]</sup>, 由此导致该基因在此条件下表达量下调。在添加硫酸锌的条件下该基因的表达明显下调, 具体影响机理和对细胞代谢的作用还有待进一步研究。

## 2.5 硫酸锌添加与耐受性相关基因转录水平分析

由于乙酸对酿酒酵母细胞的毒性主要表现在会引起细胞的氧化胁迫, 产生大量的活性氧类物质, 进而致使细胞内蛋白质、脂肪、DNA 等损伤, 因此细胞在乙酸胁迫条件下会产生保护机制, 一些与胁迫响应相关基因表达会明显的上调, 保护细胞免受乙酸的氧化胁迫<sup>[4]</sup>。结果如表 4 所示。明显上调的 5 个基因有 *CTT1*、*TSA2*、*HSP12*、*GTO3* 和 *TIR4*。如 2.2 所述, *CTT1* 基因在抵抗氧化胁迫中起

表 3 硫酸锌添加对能量代谢途径基因转录水平的影响

Table 3 Effect of zinc sulfate supplementation on transcription levels of genes related to energy metabolism

基因 Gene	基因功能 Gene function	差异 Difference	倍数 Fold
<i>HXT9</i>	Putative hexose transporter that is nearly identical to Hxt11p	Up	1.63
<i>IMA2</i>	Isomaltase (alpha-1,6-glucosidase/alpha-methylglucosidase); preferred specificity for isomaltose, alpha-methylglucoside, and palatinose, but also exhibits alpha-1,2 glucosidase activity on sucrose and kojibiose, and can cleave the 1,3-alpha linkage of nigerose and turanose and the alpha-1,5 linkage of leucrose <i>in vitro</i>	Up	1.52
<i>IMA3</i>	Alpha-glucosidase	Up	1.51
<i>IMA4</i>	Alpha-glucosidase	Up	1.50
<i>TDH3</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), isozyme 3	Down	0.59
<i>GND1</i>	6-Phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating); catalyzes an NADPH regenerating reaction in the pentose phosphate pathway; required for growth on D-glucono-delta-lactone and adaptation to oxidative stress	Down	0.72
<i>SOL3</i>	6-Phosphogluconolactonase; catalyzes the second step of the pentose phosphate pathway	Down	0.67
<i>IDH1</i>	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase; complex catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle	Down	0.61
<i>IDH2</i>	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase; complex catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle	Down	0.61
<i>FUM1</i>	Fumarase; converts fumaric acid to L-malic acid in the TCA cycle	Down	0.68
<i>DAL7</i>	Malate synthase	Down	0.69
<i>PDC5</i>	Minor isoform of pyruvate decarboxylase; key enzyme in alcoholic fermentation, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde, regulation is glucose-and ethanol-dependent	Down	0.39

表 4 硫酸锌添加对环境胁迫耐受性相关基因转录水平的影响  
Table 4 Effect of zinc sulfate supplementation on transcription levels of genes related to stress tolerance

基因 Gene	基因功能 Gene function	上调倍数 Fold of up-regulation
<i>CTT1</i>	Cytosolic catalase T; has a role in protection from oxidative damage by hydrogen peroxide stress	1.62
<i>TSA2</i>	Stress inducible cytoplasmic thioredoxin peroxidase; cooperates with Tsa1p in the removal of reactive oxygen, nitrogen and sulfur species using thioredoxin as hydrogen donor	1.55
<i>HSP12</i>	Plasma membrane protein involved in maintaining membrane organization; involved in maintaining organization during stress conditions; induced by heat shock, oxidative stress, osmostress, stationary phase, glucose depletion, oleate and alcohol	1.52
<i>GTO3</i>	Omega class glutathione transferase; putative cytosolic localization	1.59
<i>TIR4</i>	Cell wall mannoprotein; expressed under anaerobic conditions and required for anaerobic growth	1.60

关键作用。*TSA2* 基因编码硫氧还原蛋白,其功能是清除细胞内的活性氧、活性氮和氧化型硫,该基因受到 Hap1p、Rox1p 和 Hap2/3/5p 转录因子控制<sup>[22]</sup>。有研究表明 *TSA2* 基因与细胞内液泡 ATP 合成酶的缺失有关<sup>[23]</sup>,液泡 ATP 合成酶的缺失会引起细胞的氧化胁迫,编码液泡 ATP 合成酶的基因缺失诱导 *TSA2* 表达,通过活化其他的保护机制抵抗氧化胁迫。由于乙酸存在条件下能产生大量的 ROS, *TSA2* 的表达能够清除细胞内多余的活性氧类物质。*HSP12* 为热激蛋白家族中的一员,绝大多数的热激蛋白均与氧化胁迫耐受性相关,且该基因编码细胞质酶蛋白,对于细胞在氧化胁迫、高渗、热胁迫等胁迫条件下维持细胞质膜的稳定性起到重要作用<sup>[24]</sup>。*GTO3* 为谷胱甘肽转移酶,众所周知谷胱甘肽是细胞内维持氧化还原动态平衡的不可缺少的物质,谷胱甘肽具有两种形态,分别为氧化型和还原型,两种状态之间动态改变,维持细胞内的氧化还原平衡。*GTO3* 基因编码的蛋白对于细胞运输谷胱甘肽具有重要作用,因此与细胞内的氧化胁迫密切相关<sup>[25]</sup>。*TIR4* 基因为编码细胞壁中甘露糖蛋白的基因,对维持细胞壁在胁迫条件下的稳定性具有重要作用<sup>[26]</sup>。综上所述,添加硫酸锌能明显引起酵母细胞内编码氧化还原酶类基因、细胞壁和细胞膜中某些物质的编码基因及胁迫响应基因的上调,因此,锌离子的抗氧化胁迫机制之一是引起细胞内抗氧化胁迫相关基因的表达,进而维持细胞内的氧化还原动态平衡,提高酿酒酵母细胞在乙酸胁迫下的耐受性。

## 2.6 硫酸锌添加与甲硫氨酸合成相关基因转录水平分析

由图 2 发现,硫酸锌的添加会明显影响细胞内参与氨基酸代谢相关基因的表达,其中最为显著的是参与甲硫氨酸合成途径的基因。如图 3 所示,参与该代谢途径的绝大部分基因显著上调,如 *MET3*、*MET5*、*MET6*、*MET10*、*MET14*、*MET16*、*MET17* 及 *SAM2*。甲硫氨酸在细胞体内起到清除 ROS 的作用,进而改变细胞内的氧化还原状态,在氧化胁迫的条件下,通过改变胞内磷酸戊糖途径,进而影响细胞内 NADPH 的产生<sup>[27]</sup>。甲硫氨酸清除 ROS 的作用机理是直接与 ROS 作用使其硫转化为亚砷,进一步甲硫氨酸亚砷通过甲硫氨酸亚砷还原酶还原为甲硫氨酸,通过该机制保护细胞免受氧化胁迫<sup>[27]</sup>。另一方面甲硫氨酸对细胞的作用通过影响磷酸戊糖途径在细胞内积累还原力 NADPH 来保护细胞免受氧化胁迫。此外, *SAM2* 是 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶,而 *S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM)是细胞内重要的辅因子,是绝大多数甲基化酶的甲基供体,也参与膜磷脂的合成<sup>[28]</sup>。有研究表明, *SAM2*<sup>[29]</sup>与酿酒酵母乳酸胁迫有关,但其与乙酸胁迫的关系还没有研究报道。添加硫酸锌导致甲硫氨酸合成途径中相关基因表达明显上调,提示硫酸锌添加可以诱导甲硫氨酸合成相关的基因表达,维持细胞内氧化还原平衡,或者通过影响 SAM 的合成,调整酿酒酵母细胞整体代谢,进而降低酿酒酵母细胞在乙酸存在条件下受到的胁迫损伤。

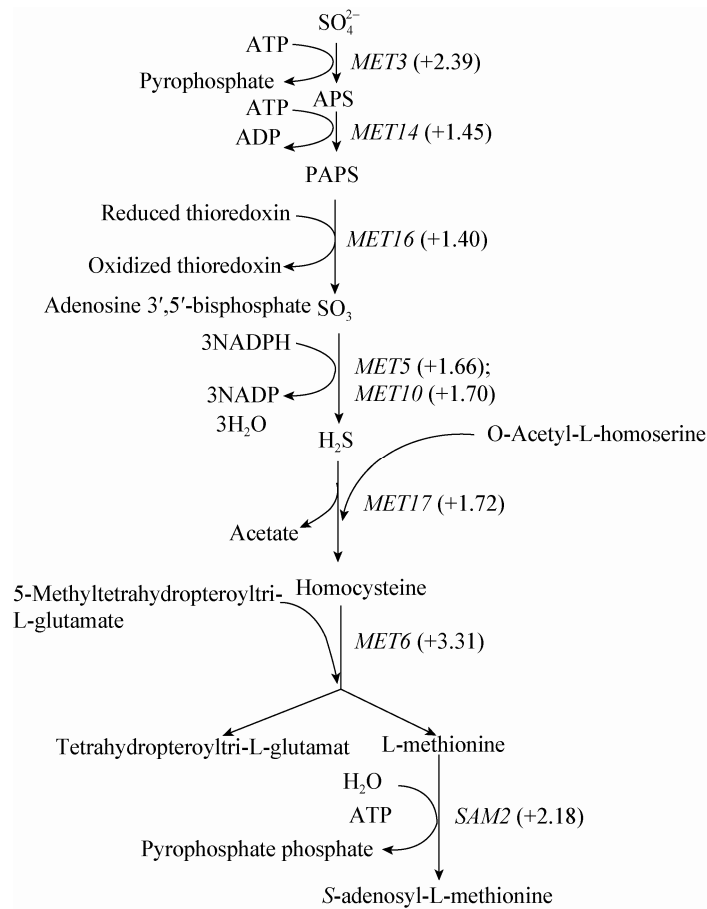


图3 硫酸锌添加与对照组酵母细胞乙酸胁迫条件下甲硫氨酸合成途径基因转录变化  
Figure 3 Changes of methionine pathway genes by zinc sulfate addition under acetic acid stress

研究表明, 硫酸锌添加可降低乙酸毒性条件下活性氧的积累, 可促进具有抗氧化作用的丙氨酸的积累, 也可提高甘氨酸、丝氨酸和缬氨酸的积累<sup>[9]</sup>。但是, 代谢物谱分析未发现胞内甲硫氨酸积累在硫酸锌添加的酵母中增多, 可能甲硫氨酸迅速被蛋白合成及其他代谢消耗。本文的转录组分析也未发现丙氨酸合成酶基因转录发生上调, 提示硫酸锌对丙氨酸合成的调控不是在转录水平。锌离子在细胞内是许多蛋白的重要辅助因子, 在很多生物代谢过程中起到重要作用, 因此, 锌离子对细胞代谢不仅局限在转录水平调控, 在转录后修饰、蛋白翻译、翻译后修饰等其他水平可能也存在调控, 因此, 酿酒酵母细胞“锌状态(Zinc status)”对环境胁迫耐受性的影响体现在不同的调

控水平。本文研究表明硫酸锌添加对乙酸胁迫条件下多个关键功能基因的转录产生了影响, 结合对硫酸锌添加在乙酸胁迫条件下蛋白组的分析, 将进一步全面理解硫酸锌添加提高酿酒酵母乙酸胁迫耐性的分子机制的认识。

国内外学者通过对关键基因的改造, 提高了酿酒酵母的乙酸耐性<sup>[30-32]</sup>。转录组学分析可提供代谢工程改造的靶点。在获得本文的比较转录组学信息后, 我们对 *PET18* 基因进行了过表达和敲除, 在 *S. cerevisiae* BY4741 宿主中研究其对乙酸耐性的影响, 但是未发现获得的突变株乙酸耐性和野生菌存在差异, 目前不清楚是否和宿主的遗传背景有关(未发表结果)。未来可继续对转录组数据进行深入分析, 寻找可能的靶点基因, 比如



*SAM2*、*GTO3* 以及转录水平变化较大的多个未知功能基因等, 将这些未知功能基因进行过表达或者敲除, 研究其对酿酒酵母菌株环境胁迫耐受性的影响。利用组学信息挖掘的靶基因对工业酿酒酵母进行代谢工程改造, 可提高酿酒酵母菌株对纤维素水解液中多种抑制物的耐受性, 提高纤维素水解液的发酵效率。

### 3 结论

在乙酸胁迫条件下, 添加硫酸锌能引起酿酒酵母细胞全局基因表达的协同变化, 上调表达的基因包括 *CTT1*、*HSP26*、*TSA1* 等胁迫响应基因的表达, 进而对酵母细胞起到氧化胁迫保护作用。此外, 硫酸锌添加的细胞磷脂合成途径基因表达上调, 甲硫氨酸和脂肪酸合成途径基因表达上调, 中心碳代谢基因也出现差异性表达, 提示硫酸锌添加可从抵抗氧化胁迫、改变细胞氧化还原平衡、改变细胞能量代谢等不同机制提高酿酒酵母的乙酸耐性。

### 参考文献

- [1] Madhavan A, Srivastava A, Kondo A, et al. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2012, 32(1): 22-48
- [2] Zhao XQ, Bai FW. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 144(1): 23-30
- [3] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6: 151
- [4] Zhao XQ, Zhang MM, Xu GH, et al. Advances in functional genomics studies underlying acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(3): 368-380 (in Chinese)  
赵心清, 张明明, 徐桂红, 等. 酿酒酵母乙酸耐性分子机制的功能基因组进展[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 368-380
- [5] Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2: 26
- [6] Guo ZP, Olsson L. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate[J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(8): 1234-1248
- [7] Rasmussen AK, Chatterjee A, Rasmussen LJ, et al. Mitochondria-mediated nuclear mutator phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(14): 3909-3917
- [8] Xu GH, Zhao XQ, Li N, et al. Improvement of acetic acid tolerance of self-flocculating yeast by zinc supplementation[J]. CIESC Journal, 2012, 63(6): 1823-1829 (in Chinese)  
徐桂红, 赵心清, 李宁, 等. 锌离子提高絮凝酵母乙酸胁迫耐受性[J]. 化工学报, 2012, 63(6): 1823-1829
- [9] Wan C, Zhang M, Fang Q, et al. The impact of zinc sulfate addition on the dynamic metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to long term acetic acid stress treatment and identification of key metabolites involved in the antioxidant effect of zinc[J]. Metallomics, 2015, 7(2): 322-332
- [10] Teste MA, Duquenne M, François JM, et al. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10: 99
- [11] Wei XW, Ma C, Xiong L, et al. Effect of vacuolar proteinase B on high temperature ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1841-1846 (in Chinese)  
魏小文, 马翠, 熊亮, 等. 液泡蛋白酶 B 对酿酒酵母高温乙醇发酵效率的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1841-1846
- [12] Zhao XQ, Bai FW. Zinc and yeast stress tolerance: micronutrient plays a big role[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 158(4): 176-183
- [13] Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii IV, et al. Antioxidant properties of thiamine[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2000, 130(9): 874-876
- [14] Herrero E, Ros J, Bellí G, et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2008, 1780(11): 1217-1235
- [15] Lushchak VI, Gospodaryov DV. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Cell Biology International, 2005, 29(3): 187-192
- [16] Thepnok P, Ratanakhanokchai K, Soontorngun N. The novel zinc cluster regulator Togl plays important roles in oleate utilization and oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 450(4): 1276-1282
- [17] Onozuka M, Konno H, Kawasaki Y, et al. Involvement of thiaminase II encoded by the *THI20* gene in thiamin salvage of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8(2): 266-275
- [18] Ribeiro GF, Côrte-Real M, Johansson B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock[J]. Molecular Biology of the Cell, 2006, 17(10): 4584-4591
- [19] Giannattasio S, Guaragnella N, Ždravlečić M, et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 33
- [20] Mohamed LA, Tachikawa H, Gao XD, et al. Yeast cell-based analysis of human lactate dehydrogenase isoforms[J]. Journal of Biochemistry, 2015, 158(6): 467-476
- [21] Agarwal PK, Uppada V, Noronha SB. Comparison of pyruvate decarboxylases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(21): 9439-9449
- [22] Wong CM, Ching YP, Zhou Y, et al. Transcriptional regulation of yeast peroxiredoxin gene *TSA2* through Hap1p, Rox1p, and Hap2/3/5p[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2003, 34(5):

- 585-597
- [23] Diab HI, Kane PM. Loss of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) activity in yeast generates an iron deprivation signal that is moderated by induction of the peroxiredoxin *TSA2*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(16): 11366-11377
- [24] Ghosh A. Small heat shock proteins (HSP12, HSP20 and HSP30) play a role in *Ustilago maydis* pathogenesis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 361(1): 17-24
- [25] Garcerá A, Barreto L, Piedrafita L, et al. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as L-Cys thioltransferases[J]. Biochemical Journal, 2006, 398(2): 187-196
- [26] Abramova N, Sertil O, Mehta S, et al. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(9): 2881-2887
- [27] Campbell K, Vowinckel J, Keller MA, et al. Methionine metabolism alters oxidative stress resistance via the pentose phosphate pathway[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2016, 24(10): 543-547
- [28] Fontecave M, Atta M, Mulliez E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2004, 29(5): 243-249
- [29] Dato L, Berterame NM, Ricci MA, et al. Changes in *SAM2* expression affect lactic acid tolerance and lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 147
- [30] Wu XC, Zhang LJ, Jin XN, et al. Deletion of *JJJ1* improves acetic acid tolerance and bioethanol fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1097-1106
- [31] Zhang JG, Liu XY, He XP, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *FPS1* aquaglyceroporin gene[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(2): 277-284
- [32] Zheng DQ, Liu TZ, Chen J, et al. Comparative functional genomics to reveal the molecular basis of phenotypic diversities and guide the genetic breeding of industrial yeast strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 2067-2076

(上接 p.1294)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

- 3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。
- 3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>