



松萝内生酿酒酵母菌株耐酸生理特性与分子机制探究

王慕瑶¹, 曾杜文¹, 王淇¹, 李俊², 邹岳², 赵心清^{1*}

1 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

2 伽蓝(集团)股份有限公司研发中心, 上海 200233

王慕瑶, 曾杜文, 王淇, 李俊, 邹岳, 赵心清. 松萝内生酿酒酵母菌株耐酸生理特性与分子机制探究. 微生物学报, 2022, 62(11): 4155–4164.

Wang Muyao, Zeng Duwen, Wang Qi, Li Jun, Zou Yue, Zhao Xinqing. Physiological characteristics of low pH tolerance of an endophytic *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from *Usnea* sp. and exploration of the underlying molecular mechanism. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4155–4164.

摘要: 【目的】对我国西藏地区来源的不同酵母菌株进行有机酸发酵性能测试, 此外, 对具有良好产酸性能的分离自松萝内部的酿酒酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 2-2 进行耐酸性能分析, 并探究其耐酸较强的分子机制。【方法】比较不同糖浓度培养基液体发酵培养过程中 pH 的变化, 并比较低 pH 胁迫条件下菌株的生长, 检测酿酒酵母菌株的产酸潜力和耐酸特性; 对菌株 2-2 和模式酵母菌株 S288C 进行比较基因组分析, 并利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析关键基因的转录, 探究菌株 2-2 耐酸分子机制。【结果】松萝内生酿酒酵母 2-2 在所有检测的菌株中产酸潜力较大, 耐酸性能较好。在菌株 2-2 中与胁迫耐受性相关的基因 *PDR15*、*PDR12* 和 *SURI* 在低 pH 胁迫条件下存在显著的上调或下调, 但这些基因转录变化趋势与菌株 S288C 相反。【结论】松萝内生酿酒酵母 2-2 是一株产酸耐酸性能较好的菌株, 对其独特的调节机制进行深入分析, 有希望选育性能更好的产酸酵母菌株。

关键词: 西藏来源微生物; 酿酒酵母; 松萝内生酵母; 耐酸机制; 转录调控

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFE0108500)

Supported by the National Key Research and Development Program (2022YFE0108500)

*Corresponding author. E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

Received: 9 October 2022; Revised: 24 October 2022; Published online: 28 October 2022

Physiological characteristics of low pH tolerance of an endophytic *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from *Usnea* sp. and exploration of the underlying molecular mechanism

WANG Muyao¹, ZENG Duwen¹, WANG Qi¹, LI Jun², ZOU Yue², ZHAO Xinqing^{1*}

¹ School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² Research & Development Center, JALA Group Co., Shanghai 200233, China

Abstract: [Objective] To detect the physiological characteristics related to organic acid production and low pH tolerance of the endophytic *Saccharomyces cerevisiae* 2-2 strain isolated from *Usnea* sp. in Tibet, China, and explore the molecular mechanism. [Methods] The pH of different strains was compared during liquid fermentation using different initial sugar concentrations, and the growth under stress conditions was monitored. The organic acid production potential and low pH resistance characteristics of *S. cerevisiae* strains were detected. Comparative genomic analysis was performed to explore the molecular mechanism of acid production and acid tolerance of *S. cerevisiae* strain 2-2 by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). [Results] *S. cerevisiae* 2-2 had higher acid-producing potential among the tested yeast strains, which also showed better acid tolerance than that of the model strain *S. cerevisiae* strain S288C. The transcription levels of *PDR15*, *PDR12* and *SUR1* that affect the acid stress tolerance of *S. cerevisiae* in 2-2 were up-regulated or down-regulated under acid stress conditions, but the trends of these key genes were opposite to that of the strain S288C. [Conclusion] Endophytic *S. cerevisiae* 2-2 is a strain with potential in organic acid production and shows strong tolerance to low pH. An in-depth analysis of its unique regulatory mechanism will benefit the development of acid-producing yeast strains with improved performance.

Keywords: microorganisms of Tibetan origin; *Saccharomyces cerevisiae*; *Usnea* sp.; endophytic yeast; mechanism of acid resistance; transcriptional regulation

西藏位于我国青藏高原西南部，平均海拔高于 4 000 m，具有低温、高海拔、紫外照射强烈、地形地貌多样、气候层次丰富等特点，蕴藏着丰富的生物资源，包含多种特有的动植物与独特的微生物库^[1]。对西藏来源的独特的微生物资源进行多样性分析和开发利用，对于实现可持续发展具有重要意义。酵母菌广泛应用于食品和发酵等不同领域，但是目前西藏来源酵母的相关研究报道还较少，已报道的结果多集中于发酵食品、植物及土壤等来源酵母^[1-4]。

松萝是藻类和真菌共生的复合体，属于枝状地衣，常生于深山的老树枝干或高山岩石上，是有着悠久药用历史的药材^[5]。松萝内含有多种天然活性成分，具有杀菌、抗肿瘤等多重药用价值^[5-6]。近年有研究指出，包括松萝在内的地衣除构成其本体的藻类与真菌外，同样可形成复杂的生态系统，为细菌、内生真菌、外生真菌提供生存环境^[7-8]。对松萝的内生菌的分离与挖掘，有利于加深对松萝这一特殊生态系统的了解，获得更多具有特色的酵母

菌, 进一步确定内生菌的环境胁迫耐受性响应与调控机制, 并最终用于构建综合耐受性优良的工业菌株。目前, 松萝和其他地衣来源内生酵母的研究还相对有限。本课题组在国内外首次鉴定了松萝内部分离的耐低温产油酵母 *Curvibasidium* 属菌种^[9], 另外, 近期本团队还利用扩增子测序对西藏不同地点采集的松萝内部细菌和真菌微生物组进行了分析, 发现了一些真菌在多样性方面具有很强的新颖性^[10]。此外, 我国学者还在内蒙古地衣内部发现可产油的黑酵母^[11], 国外学者对不同地衣内部的酵母多样性也进行了分析^[12], 探究了地衣来源酵母生产水解酶的应用可能性^[13]。这些研究都提示, 松萝和其他地衣来源的酵母可能具有丰富的多样性和较好的应用潜力。

有机羧酸包括乳酸、丁二酸和苹果酸等, 广泛应用于食品、化工和饲料等不同领域, 生物发酵法生产有机酸近年来引起了持续的关注。酿酒酵母和非常规酵母可用于生物法生产有机酸^[14], 但是对不同天然酵母菌株产酸和耐酸潜能的研究还比较有限, 西藏来源酵母也未发现有产有机酸相关的研究。

本文从西藏松萝样品中分离获得一株内生酿酒酵母菌株 2-2, 对其产酸以及酸性耐受性进行了验证, 并对该菌株可能的耐酸相关的关键基因在转录水平进行分析。本文的研究结果丰富了松萝内生酵母应用相关的信息, 也为进一步开发利用天然酵母菌株提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本文使用的酵母菌株和来源见表 1。本研究所用松萝酵母采用文献[11]的方法对松萝严格表面消毒后从松萝内部分离获得。所用实

表 1 本文使用的酵母菌株

Table 1 Yeast strains used in this study

| Strains | Species | Source |
|---------------------------|---------------------------------|------------------|
| A01-Y-1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Soil |
| 2-2 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Usnea</i> sp. |
| 4a-1 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| A03-Y-10 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| AC03M | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| B02 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| B02-3rd-1 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| B02-3rd-2 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| H4-1 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| H4-2nd-1 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| H4-4 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| H4-8 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| Jiutu-H1 | <i>Pichia pijperi</i> | Soil |
| Jiutu-new2-4 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| SC12 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| SC2-1 | <i>S. cerevisiae</i> | Soil |
| S288C | <i>S. cerevisiae</i> | Lab preservation |
| SPSC01 | <i>S. cerevisiae</i> | Lab preservation |
| <i>Y. lipolytica</i> Polf | <i>Yarrowia lipolytica</i> | Lab preservation |

验室模式菌株 S288C 为本实验室菌种库保藏菌种。

1.1.2 培养基

普通 YPD 培养基: 酵母浸出粉 1%, 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 自然 pH 值, 固体培养基灭菌前额外加入琼脂粉 2%; 高糖 YPD 液体培养基中葡萄糖浓度修改为 10%; 酸性胁迫液体培养基使用稀盐酸调 pH 至 2.5, 使用瓶塞密封。

以上培养基均在高压蒸汽锅 121 °C 灭菌 20 min 后使用。

1.2 菌株产酸发酵

对菌种进行 2 次活化后, 将其接种于装有 50 mL 液体 YPD 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、200 r/min 条件下培养 12 h。在 50 mL 离心管 5 mL YPD 培养液中接种种子液, 于 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h 与 48 h 后取样 5 mL, 将取样液体离心后取上清进行 pH 检测。

1.3 菌株胁迫耐性检测

对菌种进行 2 次活化后, 制备种子液。以 OD_{600} 值为 0.1 的接种量接种于装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 每个菌株接种 6 瓶, 3 瓶为自然 pH 的普通液体 YPD 培养基, 3 瓶为酸性胁迫液体培养基。30 °C、200 r/min 条件下培养并于合适时间点进行取样, 并用分光光度计检测该时间点培养基的 OD_{600} 值。

1.4 基因组测序

将松萝酵母 2-2 与实验室模式菌株 S288C 进行 2 次平板划线分离纯化后, 使用液体进行 2 次活化, 将活化后菌株以 OD_{600} 值为 0.1 的接种量接种于装有 50 mL 液体 YPD 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、200 r/min 条件下培养 5–6 h。取菌液 100 mL, 在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用无菌水洗涤沉淀后再次在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 2 min, 重复洗涤 2 次后弃上清, 用液氮迅速冷冻, 放置于干冰或者 -80 °C 冰箱中, 委托广州诺禾生物科技有限公司检测。对检测数据进行覆盖度 (coverage)、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 以及得失位 (insertion and deletion, InDel) 分析。

在自然 pH 的液体 YPD 中发酵获得对数期的菌株 2-2 和模式酵母培养液 50 mL, 在 4 °C 条件下分 2 次置于 50 mL 离心管中使用冷冻离心机 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用无菌水洗涤沉淀后再次在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 2 min, 重复洗涤 2 次后弃上清, 菌体进行转录分析。

在自然 pH 与酸性 pH (2.3) 液体 YPD 中发酵获得对数期的菌株 2-2 和模式酵母培养液, 采用上述步骤进行采样后进行总 RNA 提取与 cDNA 文库构建, 利用实时荧光定量 PCR 对 *PDR15*、*PDR12*、*RGD1* 和 *SUR1* 进行基因转录水平检测, 参考本课题组前期报道的方法进行^[15], 引物序列见表 2。

2 结果与分析

2.1 西藏松萝酵母产酸发酵结果

由于产酸会导致培养液 pH 下降, 因此通过检测比较不同菌株培养液不同条件和不同时间的 pH 值初步判断产酸性能的差异, 对比结果如图 1 所示。从图 1A 结果可见, 不同菌株在 YPD 培养基发酵 48 h 后的 pH 在 4.85–8.46 之间, 其中松萝酵母 2-2 发酵液的 pH 和多株其

表 2 所选择基因与内参基因 *ALG9* 的 RT-qPCR 引物

Table 2 RT-qPCR primers for the selected genes and the reference gene *ALG9*

| Gene | Primer of RT-qPCR | Sequences (5'→3') |
|--------------|-------------------|----------------------------|
| <i>RGD1</i> | RGD1-qpcr-F | CTAGTGCCACAGTAAGTGCGAAGTC |
| | RGD1-qpcr-R | AACAAAGCGTTAATTGCCACATCGG |
| <i>PDR15</i> | pdr15-qpcr-F | TTTCGCATACAAGGGACACCAAGG |
| | pdr15-qpcr-R | CCGCAATGGATACACGCTTTCTTTTC |
| <i>PDR12</i> | PDR12-qpcr-F | CAATCCTACGCTGCCTCCGAAG |
| | PDR12-qpcr-R | TGACTCTCGCCATAGACTCCAACC |
| <i>SUR1</i> | SUR1-qpcr-F | TAGATGACGGCTGCGAAAGGAAAC |
| | SUR1-qpcr-R | CTAGGCACAGAACCCATGACATCG |
| <i>ALG9</i> | RT-ALG9-F | GGAATTATTGCCTTCTGCCGTTGC |
| | RT-ALG9-R | AGACCCAGTGGACAGATAGCGTAG |

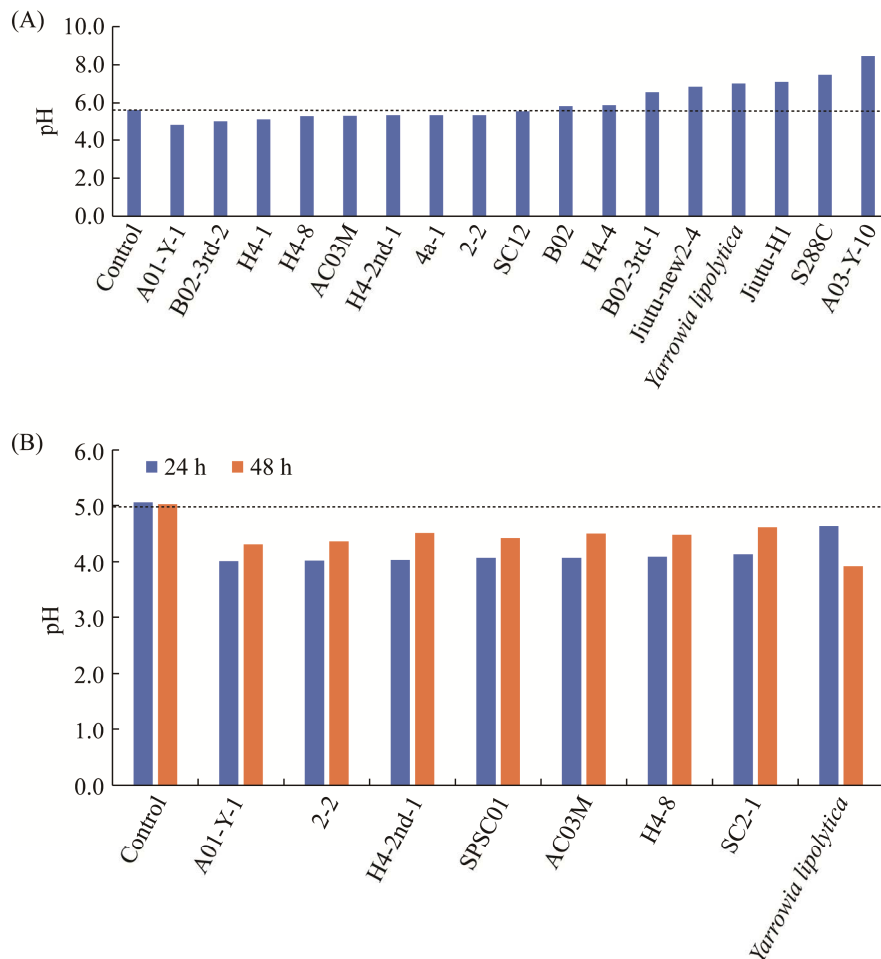


图 1 酵母菌株在 YPD 培养基中的 pH 变化检测

Figure 1 pH histogram of each strain cultured at 30 °C for 48 h in normal YPD medium. A: YPD medium; B: high-glucose YPD medium. Control: YPD medium without inoculation of any strains.

他菌株比较相对较低(5.36), 优于模式菌株 S288C 和产酸研究较多的解脂椰氏酵母 *Yarrowia lipolytica* Polf 菌株。对产酸潜力相对较好的菌株进一步利用高糖培养基进行比较研究(图 1B), 可以发现, 菌株 2-2 在 24 h 时发酵液和产酸较多的其他菌株类似 pH 较低, 明显低于空白培养基, pH 值下降相对显著; 在 48 h 时 pH 回升属于相对较少的水平, 提示保持了相对稳定的有机酸产物。对发酵液中常见的有机酸进行检测, 包括柠檬酸、丁二酸和苹果酸等, 发现浓

度都比较低, 在 0.1–0.2 g/L 之间(结果未显示), 提示后续还需要进行菌株改造和过程优化, 才有可能有应用价值。

2.2 菌株胁迫耐性检测结果

由于松萝酵母 2-2 来源的特殊性, 检测松萝酵母 2-2 与模式酵母 S288C 在无胁迫培养基以及 pH 为 2.5 的酸性胁迫培养基中生长情况, 结果如图 2 所示, 松萝酵母在无胁迫培养基中生长情况与模式酵母 S288C 相近, 但在酸性胁迫培养基中对数期出现更早, 生长相对迅速,

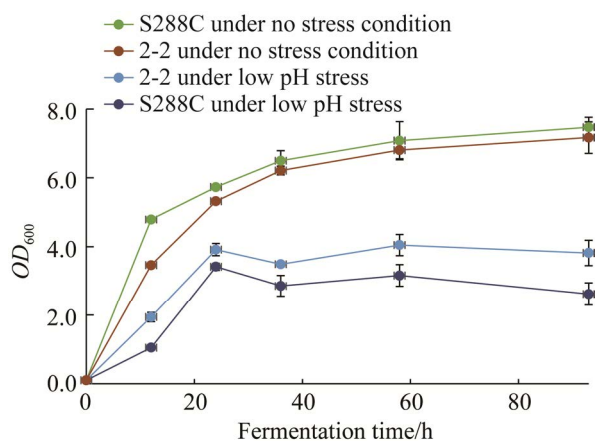


图2 松萝酵母 2-2 与模式酵母 S288C 在无胁迫与酸性条件下的生长曲线

Figure 2 Growth curves of *S. cerevisiae* 2-2 and model strain S288C in the absence and under low pH stress. Green and red: S288C and 2-2 under no stress condition; dark blue and light blue: S288C and 2-2 under low pH stress.

最终菌液浓度更高, 受酸胁迫条件的抑制效应更小, 因此其耐酸性相对优于模式酵母 S288C。

2.3 菌株组学分析结果

2.3.1 全基因组分析

将松萝酵母 2-2 测序后的基因组数据与模式酵母 S288C 进行比对分析。松萝酵母 2-2 与参考基因组 S288c 的比对分析结果显示, reads 对参考序列基因的平均覆盖度为 77, 95.4% 的 reads 与参考序列的覆盖度超过 20 \times 。菌株 2-2 与参考序列 reads 的比率为 98.3%, 比对存在 mismatch 的位点占比对区域的百分比为 0.88%。以上结果表明, 松萝酵母 2-2 基因组与参考序列的覆盖度高, 同时存在一定特异性。

松萝酵母 2-2 与参考基因组 S288c 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析结果如表3所示, 其中转换 SNP 的个数为 9 510, 颠换 SNP 的个数为 17 104, 换颠换率为 2.89%, 杂合 SNP 的个数为 10 926, 纯合 SNP 的个数为 55 688, 杂合 SNP 个数占参考序

表3 参考序列与松萝酵母 2-2 的 SNP 分析结果统计

Table 3 Statistics of SNP analysis results of the reference sequence and 2-2 from *Usnea* sp.

| ts | tv | ts/tv | Het | Hom | Het rate/% | Total |
|--------|--------|-------|--------|--------|------------|--------|
| 49 510 | 17 104 | 2.89 | 10 926 | 55 688 | 0.09 | 66 614 |

ts: transitions; tv: transversions; hom: homogenous; Het: heterogenous.

列基因组的比例为 0.09%。SNP 的总数为 66 614。SNP 在参考序列基因组上的密度为 5.48。纯合 SNP 个数为杂合 SNP 个数的 5 倍, 杂合 SNP 占比极低。

松萝酵母 2-2 与参考基因组 S288c 的 SNP 注释结果显示, 位于编码序列(coding sequence, CDS)区域的非同义突变的 SNP 为 14 454 个, 位于 CDS 区域的同义突变的 SNP 为 26 899 个, 位于基因间区的 SNP 为 25 261 个, 同义突变数量远大于非同义突变。

松萝酵母 2-2 与参考基因组 S288c 的 InDel 注释结果显示, 类型为插入(insertion)的 InDel 的个数为 2 788, 类型为删除(deletion)的 InDel 的个数为 2 485, 杂合 InDel 的个数为 781, 纯合 InDel 的个数为 4 492, 杂合 InDel 在参考序列基因组上的个数密度为 0.01%, InDel 的总数为 5 273。

松萝酵母 2-2 与参考基因组 S288c 的 SNP_InDel 基因富集结果显示, 位于 CDS 区域未引起移码的 InDel 个数为 378, 位于 CDS 区域引起移码的 InDel 个数为 198, 位于基因间区的 InDel 个数为 4 697, InDel 的总数为 5 273。位于基因间区的 InDel 占到了 InDel 的绝大部分。

2.3.2 酵母菌株关键基因的转录分析结果

鉴于松萝酵母 2-2 相较于模式酵母 S288C 更好的酸性胁迫耐受性, 使用实时荧光定量 PCR 分别检测松萝酵母 2-2 和模式酵母 S288C 中, *PDR15*、*PDR12*、*RGD1*、*SURI*^[16-19]这 4 个

已被验证与酿酒酵母酸性胁迫耐受性相关的蛋白基因在酸性条件下的表达水平变化, 结果如表 4 所示。

2.3.3 耐酸性相关蛋白 SNP 分析

对相对于模式酵母 S288C 转录变化较大、报道影响酿酒酵母菌株耐酸性的部分蛋白进行 SNP 分析, 其 SNP 突变与蛋白错义突变结果如表 5 所示。可以看到, 在基因 *RTC6*、*HTL1*、*DDR2*^[20-23]中, *RTC6* 存在 5 个 SNP, 同时存在错义突变, *HTL1* 和 *DDR2* 存在 5 个 SNP, 但是为同义突变。而在 4 个与菌株耐酸性相关的基因中都存在超过或等于 6 个 SNP, 有 3 个基因存在错义突变。其中, 结合 Alphafold 2 的结构预测,

表 4 菌株在 pH 2.3 条件下相对于自然 pH 条件酸性胁迫耐受性相关基因的表达水平变化

Table 4 Transcriptional level changes of genes related to acid stress tolerance in the strain at pH 2.3

| Gene | System name | S288C (log ₂ FC) | 2-2 (log ₂ FC) |
|--------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>PDR15</i> | YDR406W | 0.42 | -0.94 |
| <i>PDR12</i> | YPL058C | -0.75 | -0.56 |
| <i>RGD1</i> | YBR260C | -0.61 | 0.18 |
| <i>SURI</i> | YPL057C | 1.97 | -0.46 |

表 5 松萝酵母 2-2 中关键基因的 SNP 与错义突变情况

Table 5 SNP and missense mutation of key genes in *S. cerevisiae* 2-2

| Gene | System name | SNP | Missense mutation | Missense mutation site |
|--------------|-------------|-----|-------------------|------------------------|
| <i>RTC6</i> | YPL183W-A | 5 | 1 | 37 |
| <i>HTL1</i> | YCR020W-B | 1 | NO | - |
| <i>DDR2</i> | YOL052C-A | 1 | NO | - |
| <i>PDR15</i> | YDR406W | 16 | NO | - |
| <i>PDR12</i> | YPL058C | 6 | 3 | 21, 73, 1 506 |
| <i>RGD1</i> | YBR260C | 11 | 1 | 366 |
| <i>SURI</i> | YPL057C | 106 | 4 | 220, 308, 311, 315 |

-: none.

SURI 存在 4 个错义突变, 其中有 3 个错义突变集中在 SUR1 蛋白一段二级结构 α -螺旋中部。

3 讨论与结论

本研究重点关注了从西藏松萝样本中分离得到的一株酿酒酵母 2-2, 这是国内外第一次报道从松萝中发现内生酿酒酵母菌株, 同时, 我们在扩增子测序结果中也发现有酿酒酵母^[14], 进一步证明了松萝中的确存在酿酒酵母。本研究分析了松萝酵母 2-2 基因组序列和模式酿酒酵母 S288C 的全基因组、SNP 与 InDel 比对结果, 证实了该菌株在基因组水平和模式酵母存在很多差别, 具有分子多样性, 后续可对该菌株进行深入的基因组水平进化分析和性能测试, 为充分利用所分离的天然菌株作为宿主提供了基础。对该菌株以及其他菌株在不同葡萄糖培养基中的综合产酸情况进行了比较后发现, 松萝酵母 2-2 具有一定的产酸潜力, 尤其是在 48 h 后 pH 变化很小, 推测有可能是对产生的酸重新吸收比较少。但是, 该菌株产已知有机酸的产量很低, 有待进一步利用代谢工程和合成生物学技术进行改造和优化^[14]。对该菌株进行基因敲除, 发现成功率比模式酵母低很多(未发表资料), 结合基因组分析结果, 进一步提示该菌株具有独特的遗传多样性, 值得进一步深入研究。

酸性耐受性是酿酒酵母菌株工业应用的一个重要指标, 也是酿酒酵母菌株优化的一个重要方向^[24]。本研究中, 松萝酵母 2-2 相对于模式酵母 S288C 表现出更好的酸性耐受性, 并且在 pH 值为 2.5 时, 仍然能在 10 h 内快速进入对数期, 这揭示了该菌株在生产有机酸时具有特殊优势。经过基因组分析, 松萝酵母 2-2 与模式酵母 S288C 总体相似度很高, 但存在大量的单核苷酸突变, 大量的 SNP 或许是松萝酵

母性状特异性的来源。

2-2 与模式酵母 S288C 在酸性条件与无胁迫条件下转录水平的比较,发现在 4 个稳定发生转录水平变化的耐酸性相关蛋白基因 *PDR15*、*PDR12*、*RGD1*、*SURI* 中,松萝酵母 2-2 在培养基 pH 值降低为 2.3 后转录水平变化方向都与模式酵母 S288C 相反。根据酿酒酵母基因组数据库(*Saccharomyces genome database*, SGD)的信息,*PDR12* 为弱酸、低 pH 下表达量显著提高的酸性响应 ABC 家族蛋白,在菌株 2-2 中于酸性胁迫环境下却反而下调。此外,据相关研究记载,*PDR12*、*SURI* 这 2 个蛋白的基因序列在敲除后丙酸的胁迫耐受性会下降,*RGD1* 在敲除后低 pH 的耐受性会降低^[21-22]。在本研究多次重复实验中,胁迫条件下松萝酵母 2-2 的 *PDR12* 与 *SURI* 基因转录水平却相对下调,*RGD1* 则表达上调不显著。为探究松萝酵母 2-2 的酸性耐受性与转录水平的特殊变化是否是由基因水平突变造成的,对相关的基因进行 SNP 分析,发现基因 *RTC6*、*PDR12*、*RGD1* 和 *SURI* 都发生了错义突变,其中 *SURI* 基因不仅转录变化水平与对照组 S288C 及此前研究都相反^[25],还在 308-315 这连续 8 个氨基酸中发生了 3 个错义突变。推测 *PDR12* 和 *SURI* 在低 pH 胁迫条件下的下调一部分可能是由于这 2 个蛋白是通过提高酿酒酵母的丙酸化学毒性的抵抗力来提高酵母的丙酸胁迫耐受性,但是没有影响酵母对高浓度 H⁺ 的耐受性,因而在本实验中出现下调。此外,也可能是由于松萝酵母 2-2 中的错义突变影响了这 2 个基因在 H⁺ 耐受性调控网络中的功能,从而影响了低 pH 条件下 *PDR12* 和 *SURI* 基因的表达。这些研究结果一定程度地揭示了松萝酵母 2-2 酸性胁迫耐受性的分子基础,也为后续深入分析松萝酵母 2-2 的独特性提供了参考。

松萝复合体作为近年来比较受关注的特殊生态系统,其内生真菌多样性和产业应用都具有独特的研究价值。本文对西藏地区松萝样本来源的内生酿酒酵母 2-2 进行了研究,揭示了其独特的生理特征,初步探索了耐酸的分子机制,但是胁迫耐性比较复杂,深入的作用机理还需要进一步验证与深入探索。未来有可能有更多地衣来源的酵母和其他微生物被开发利用,为促进可持续发展提供基础。

致谢

感谢上海交通大学程海荣老师对产酸酵母筛选的建议,感谢上海交通大学范婷婷和杨雨晴同学对菌株分离和保存的贡献。

参考文献

- [1] 杨雨晴,王慕瑶,叶佩良,白龙,范婷婷,王雪晴,马隽尧,李俊,蒋丹丹,章漳,赵心清. 西藏来源酵母菌株的鉴定与生理特性. 应用与环境生物学报, 2021, 27(6): 1471-1475.
Yang YQ, Wang MY, Ye PL, Bai L, Fan TT, Wang XQ, Ma JY, Li J, Jiang DD, Zhang Z, Zhao XQ. Identification and physiological characteristics of yeast strains isolated from Tibet, China. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27(6): 1471-1475. (in Chinese)
- [2] Wu ZW, Bai FY. *Candida tibetensis* sp. nov. and *Candida linziensis* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species from Tibet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(Pt 5): 1153-1156.
- [3] Wang QM, Boekhout T, Bai FY. *Bensingtonia rectispora* sp. nov. and *Bensingtonia bomiensis* sp. nov., ballistoconidium-forming yeast species from Tibetan plant leaves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 8): 2039-2044.
- [4] Li AH, Yuan FX, Groenewald M, Bensch K, Yurkov AM, Li K, Han PJ, Guo LD, Aime MC, Sampaio JP, Jindamorakot S, Turchetti B, Inacio J, Fungsin B, Wang QM, Bai FY. Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species.

- Studies in Mycology*, 2020, 96: 17–140.
- [5] 杨子颖, 李婧, 苏洁, 李惠玲, 章漳, 彭锋. 松萝属地衣植物化学成分及活性作用研究进展. *林产化学与工业*, 2021, 41(3): 112–124.
Yang ZY, Li J, Su J, Li HL, Zhang Z, Peng F. Research progress on chemical constituents and activities of genus *Usnea* lichens. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2021, 41(3): 112–124. (in Chinese)
- [6] 袁中伟, 谷可欣, 张天翼, 申翰君, 周能华, 李超, 尹立子. 松萝酸对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制研究. *甘肃农业大学学报*, 2019, 54(4): 22–29.
Yuan ZW, Gu KX, Zhang TY, Shen HJ, Zhou NH, Li C, Yin LZ. Antibacterial mechanism of usnic acid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2019, 54(4): 22–29. (in Chinese)
- [7] Spribille T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabentheiner E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, McCutcheon JP. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 2016, 353(6298): 488–492.
- [8] Tuovinen V, Ekman S, Thor G, Vanderpool D, Spribille T, Johannesson H. Two basidiomycete fungi in the cortex of wolf lichens. *Current Biology*, 2019, 29(3): 476–483.e5.
- [9] 白龙, 张安琪, 朱熠婷, 王雪晴, 王慕瑶, 李俊, 章漳, 赵心清. 耐低温酵母 *Curvibasidium rogersii* 菌株在松萝样品中的首次分离鉴定及基于基因组分析的生物特性探究. *微生物学报*, 2022, 62(2): 567–578.
Bai L, Zhang AQ, Zhu YT, Wang XQ, Wang MY, Li J, Zhang Z, Zhao XQ. First isolation and identification of cold adaptive yeast *Curvibasidium rogersii* from *Usnea* lichen and genome-based studies of its biological properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 567–578. (in Chinese)
- [10] Wang Q, Li J, Yang J, Zou Y, Zhao XQ. Diversity of endophytic bacterial and fungal microbiota associated with the medicinal lichen *Usnea longissima* at high altitudes. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 958917.
- [11] Chang R, Cao W, Wang Y, Li S, Li X, Bose T, Si HL. *Melanodevriesia*, a new genus of endolichenic oleaginous black yeast recovered from the Inner Mongolia Region of China. *Fungal Systematics and Evolution*, 2022, 9: 1–9.
- [12] Cometto A, Leavitt SD, Millanes AM, Wedin M, Grube M, Muggia L. The yeast lichenosphere: high diversity of basidiomycetes from the lichens *Tephromela atra* and *Rhizoplaca melanophthalma*. *Fungal Biology*, 2022, 126(9): 587–608.
- [13] Da Silva MK, Da Silva AV, Fernandez PM, Montone RC, Alves RP, De Queiroz AC, De Oliveira VM, Dos Santos VP, Putzke J, Rosa LH, Duarte AWF. Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts from Antarctic lichens. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 2022, 94(suppl 1): e20210540.
- [14] Yin X, Li JH, Shin HD, Du GC, Liu L, Chen J. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: advances and prospects. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 830–841.
- [15] Zhang MM, Xiong L, Tang YJ, Mehmood MA, Zhao ZK, Bai FW, Zhao XQ. Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the *de novo* purine biosynthesis genes. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 116.
- [16] Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K. The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(12): 11593–11599.
- [17] Piper P, Mahé Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mühlbauer M, Coote P, Kuchler K. The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO Journal*, 1998, 17(15): 4257–4265.
- [18] Gatti X, De Bettignies G, Claret S, Doignon F, Crouzet M, Thoraval D. *RGDI*, encoding a RhoGAP involved in low-pH survival, is an Msn2p/Msn4p regulated gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 2005, 351: 159–169.
- [19] Desfarges L, Durrens P, Juguelin H, Cassagne C, Bonneu M, Aigle M. Yeast mutants affected in viability upon starvation have a modified phospholipid composition. *Yeast: Chichester, England*, 1993, 9(3): 267–277.
- [20] Romeo MJ, Angus-Hill ML, Sobering AK, Kamada Y, Cairns BR, Levin DE. *HTL1* encodes a novel factor that interacts with the RSC chromatin remodeling complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(23): 8165–8174.
- [21] Fleischer TC, Weaver CM, McAfee KJ, Jennings JL, Link AJ. Systematic identification and functional

- screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes & Development*, 2006, 20(10): 1294–1307.
- [22] Kobayashi N, McClanahan TK, Simon JR, Treger JM, McEntee K. Structure and functional analysis of the multistress response gene *DDR2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229(2): 540–547.
- [23] Andrade MA, Daruvar A, Casari G, Schneider R, Termier M, Sander C. Characterization of new proteins found by analysis of short open reading frames from the full yeast genome. *Yeast: Chichester, England*, 1997, 13(14): 1363–1374.
- [24] Tran VG, Zhao HM. Engineering robust microorganisms for organic acid production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(2): kuab067.
- [25] Mira NP, Lourenço AB, Fernandes AR, Becker JD, Sá-Correia I. The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9(2): 202–216.



赵心清，上海交通大学微生物代谢国家重点实验室和上海交通大学生命科学技术学院教授，博士生导师，入选教育部新世纪优秀人才，德国洪堡学者。获辽宁省青年科技奖和日本生物工程学会颁发的亚洲生物技术青年奖。研究方向为微生物资源开发利用、微生物代谢工程和合成生物学改造、生物燃料和生物基化学品生产。主持和作为课题骨干参加国家自然科学基金项目和科技部项目十余项，发表 90 余篇国际期刊学术论文，任 *Biotechnology Advances* 和《生物工程学报》等期刊编委会成员。在酵母菌环境胁迫耐受性机制和高效菌株选育、丝状真菌纤维素酶合成调控和高效生物转化，以及微生物基因组挖掘等研究中取得了一系列研究成果。