

逆境对 *GST* 基因过表达库德毕赤酵母 G43 生长及脱镉能力的影响

徐婉莹¹, 戚晓雪¹, 何晓霞², 徐莹^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003; 2. 即墨海关, 青岛 266200)

摘要: 目的 探究逆境对谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因过表达库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) G43 生长及脱镉能力的影响。**方法** 以一株高镉抗性和高镉脱除率的 *GST* 基因过表达的重组 *P. kudriavzevii* G43 为研究对象, 从生物量和脱镉率两方面评价盐、低 pH、乙醇及高温逆境条件对其生长和脱镉能力的影响。**结果** 逆境培养条件对 G43 的生长和脱镉能力影响较大。与原始菌株 *P. kudriavzevii* A16 (CK) 相比, G43 对盐、酸、乙醇及热的耐受力均有显著提升: 可耐受质量浓度为 120 g/L 的 NaCl, pH 2.5 时仍可正常生长, 培养基乙醇体积分数 10% 时仍可生长, 可耐受 43°C 高温。在不同逆境条件下, G43 的脱镉能力与原始菌株相当或者有明显提升。**结论** 重组菌株 G43 具有优异的耐受性, 不同培养条件对其脱镉效果有很大影响, 此为后续 *P. kudriavzevii* 等微生物的镉抗性和脱镉机制研究提供基础数据, 也为其在食品体系镉脱除领域的应用奠定理论基础。

关键词: 库德毕赤酵母菌; *GST* 基因; 重组菌株; 培养条件; 耐受性; 脱镉率

Effects of stress on the growth and cadmium removal ability of *Pichia kudriavzevii* G43 overexpressed *GST* gene

XU Wan-Ying¹, QI Xiao-Xue¹, HE Xiao-Xia², XU Ying^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Jimo Customs, Qingdao 266200, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of stress on the growth and cadmium removal ability of *Pichia kudriavzevii* G43 overexpressed glutathione S-transferase (GST) gene. **Methods** The effects of salt, low pH, ethanol and high temperature on the growth and cadmium removal ability of recombinant *P. kudriavzevii* G43 overexpressed *GST* gene with high cadmium resistance and high cadmium removal rate were evaluated from 2 aspect of the biomass and cadmium removal rate. **Results** Stress culture conditions had great effects on the growth and cadmium removal ability of G43. Compared with the original strain *P. kudriavzevii* A16 (CK), the tolerances of G43 to salt, acid, ethanol and heat were significantly improved: G43 could tolerate 120 g/L NaCl, pH 2.5, 10% ethanol in the medium, or temperature of 43°C. Under different stress conditions, the cadmium removal capacity of G43 was equivalent to or significantly improved to that of the original strain. **Conclusion** The recombinant strain G43 has excellent tolerances,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871786)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871786)

*通信作者: 徐莹, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、食品有害成分控制等方面的研究。E-mail: xuy@ouc.edu.cn

*Corresponding author: XU Ying, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, No.5, Yushan Road, Shinan District, Qingdao 266003, China. E-mail: xuy@ouc.edu.cn

and different culture conditions have great influences on its cadmium removal effect, which provides basic data for the subsequent study of cadmium resistance and cadmium removal mechanism of *P. kudriavzevii* and other microorganisms, and also lays a theoretical foundation for its application in the field of cadmium removal in food system.

KEY WORDS: *Pichia kudriavzevii*; *GST* gene; recombinant strain; culture conditions; tolerance; cadmium removal rate

0 引言

工业化的快速发展导致重金属污染成为环境污染中亟待解决的问题之一, 土壤、水体、大气等环境中的重金属含量不断增加甚至超标, 严重危害人类健康。其中, 镉是一种具有致癌、致畸、致突变、毒性持久且生物蓄积性强的剧毒重金属元素, 可通过食物链传递, 对人类健康构成严重危害^[1]。镉中毒会导致骨骼、肝脏、肾脏、肺部及生殖器官等损伤, 对心血管系统、免疫系统、神经发育等具有毒害作用^[2-4]。目前, 食品中的重金属问题已受到广泛关注, 关于其脱除技术也已有很多研究, 其中物理化学方法如化学沉淀法^[5]、吸附法^[6]、离子交换法^[7]、浸泡法^[8]等成本较高、操作复杂, 且存在安全性问题, 在食品重金属脱除应用中受到很大限制。微生物法脱除重金属主要是利用微生物细胞表面的多糖或细胞壁上的官能团等与重金属进行相互作用, 具有安全性高、环境友好、来源丰富、成本低廉等优点, 近年来成为学者们的研究热点^[9]。徐莹等^[10]利用海藻酸钠将酵母菌固定化, 得到的固定化微生物酵母小球不仅具有良好的重金属脱除效果, 而且在实际的液态食品物料中便于回收, 有一定应用前景。

食品加工体系复杂, 常伴随高盐、高渗透压、酸性或高温等条件, 尤其是以水产品为原料制得的食物物料多为高盐环境, 如鱼露、虾酱等^[11], 且 pH、温度等是酵母菌生长代谢过程中的重要影响因素, 影响着细胞的酶活性及代谢传递^[12-13]等。因此, 研究不同逆境对具有脱镉能力的菌株的生长和脱镉能力的影响, 对于建立食品中微生物法消减镉的技术是非常有必要的。库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)是发酵食品中常见的酵母菌^[14], 在复杂的食品环境中仍能良好生长。*P. kudriavzevii* A16 (CK)具有多种重金属离子抗性 & 良好的吸附能力^[15], 在食品体系的重金属脱除应用中有着广泛的应用前景。

谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)是细胞内发挥解毒作用的重要酶家族, 在生物体处于逆境时能保护其免受损害, 且有研究表明 *GST* 基因在微生物细胞中过表达后可提高其对重金属的抗性^[16-17]。本实验室前期研究^[18]中以诺尔斯菌素抗性基因为筛选标记, 通过电转化将 *GST* 基因过表达线性化片段转入 CK 细胞内, 且利用 rDNA 序列同源重组原理将 *GST* 基因整合到酵母染色体基因组上, 使 *GST* 基因在其中稳定表达, 最终构建并筛选出一株具有高镉抗性 & 高脱镉率的重组菌株 *P. kudriavzevii*

G43(以下简称 G43), 进一步研究发现 NaCl 预培养还可提高其镉抗性和脱镉率。基于以上内容, 本研究以生物量和脱镉率为指标来探究重组菌株 G43 对 NaCl、低 pH、乙醇及高温逆境条件的耐受性能及脱镉情况, 为后续将其应用在食品体系镉脱除方面的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌株

原始菌株 *P. kudriavzevii* A16 (CK)保藏于中国海洋大学食品化学与营养研究室; 过表达 *GST* 基因的重组菌株 G43 由本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂与培养基

NaCl、氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)、无水乙醇、无水葡萄糖、氢氧化钠、盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 蛋白胨(分析纯, 北京奥博星生物技术有限责任公司); 酵母浸粉(分析纯, 北京双旋微生物培养基制品厂); 琼脂粉(分析纯, 上海索莱宝生物科技有限公司)。

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基: 酵母浸粉 10 g/L, 无水葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 121°C 灭菌 20 min 后备用(若配制固体培养基, 则需再添加琼脂 20 g/L)。

1.1.3 主要仪器

AA-6800 型岛津原子吸收分光光度计[岛津国际贸易(上海)有限公司]; ZQTY-70V 型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); LD5-10B 型低速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司); Sartorius 普及型 pH 计[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; NIKON/Ni-E 电动荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化

将-80°C甘油保藏的重组菌株 G43 划线于 YPD 固体培养基, 28°C 培养 24 h 后接种到新的 YPD 固体斜面培养基上 28°C 培养 24 h。再从斜面上刮取适量菌体接种于 YPD 液体培养基中, 恒温培养箱中 28°C、180 r/min 培养 24 h, 即完成菌株的活化并获得一定量的种子液。

1.2.2 重组菌株 G43 的生长曲线及培养基 pH 变化测定

重组菌株 G43 经活化后, 取 2 mL 种子液接种至 50 mL YPD 液体培养基中, 28°C、180 r/min 培养。设置 13 个培养时间, 分别为: 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39 h。利用干重法测定不同培养时间下 G43 的生物量(g/L), 并绘制生长曲线, 同时测定相应培养液的 pH。

1.2.3 细胞形态观察

重组菌株 G43 和原始菌株 CK 经活化后,以 2%接种量接种至新鲜 YPD 液体培养基中,28℃、180 r/min 培养至 24 h,用电动荧光显微镜观察细胞形态。

1.2.4 逆境对重组菌株 G43 生长及脱镉能力的影响

(1) NaCl

分别吸取 1 mL 种子液于不同质量浓度 NaCl (0、20、40、60、80、100、120 g/L) 的 50 mL YPD 液体培养基中,28℃、180 r/min 培养 24 h。测定菌株的生物量(g/L)及脱镉率(%)。

(2) pH

分别吸取 1 mL 种子液于不同 pH (2.5、4.0、5.5、7.0、8.5) 的 50 mL YPD 液体培养基,28℃、180 r/min 培养 24 h。测定菌株的生物量(g/L)及脱镉率(%)。

(3) 乙醇

分别吸取 1 mL 种子液于不同体积分数乙醇(2%、6%、10%、14%、18%)的 50 mL YPD 液体培养基,28℃、180 r/min 培养 24 h。测定菌株的生物量(g/L)及脱镉率(%)。

(4) 温度

分别吸取 1 mL 种子液于 50 mL YPD 液体培养基,在不同温度(25、28、37、43、50℃)下 180 r/min 培养 24 h。测定菌株的生物量(g/L)及脱镉率(%)。

1.2.5 生物量测定

生物量的测定方法采用干重法:取不同条件下培养完的菌液 8 mL 于已烘干至恒重的 10 mL 离心管,5000 r/min 离心 10 min,取沉淀经纯水洗涤两次后,80℃烘干至恒重,称重后按照公式(1)计算生物量:

$$M = \frac{m_1 - m_0}{V} \times 1000 \quad (1)$$

式中: M 为酵母菌的生物量, g/L; m_0 为已烘干至恒重的空的 10 mL 离心管质量, g; m_1 为已烘干至恒重的菌泥和 10 mL 离心管的总重, g; V 为菌液体积, mL。

1.2.6 脱镉率测定

通过相同细胞个数的酵母菌脱镉率来反应酵母菌的脱镉能力,对于 1.2.4 中经不同条件培养 24 h 的培养液,用血球计数板计算酵母菌的浓度。取含 8×10^8 个酵母细胞的培养液于 10 mL 离心管中,5000 r/min 离心 10 min,纯水洗涤两次后获得菌泥,加入 10 mL 质量浓度为 10 mg/L 的镉离子水溶液,28℃、180 r/min 振荡吸附 2 h,离心并取上清液,用火焰原子吸收光谱法测定溶液中镉离子浓度,按照公式(2)计算:

$$R/\% = \left(1 - \frac{c_1}{c_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: R 为酵母菌的脱镉率, %; c_0 为镉离子溶液的初始镉浓度, mg/L; c_1 为吸附后镉离子溶液的镉浓度, mg/L。

1.3 数据分析

实验均重复 3 次,结果用平均值±标准偏差表示;使用 SPSS 25 对数据进行分析、Origin 2018 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 重组菌株 G43 的生长曲线及培养基 pH 变化

重组菌株 G43 的生长曲线及培养基 pH 变化情况如图 1 所示。

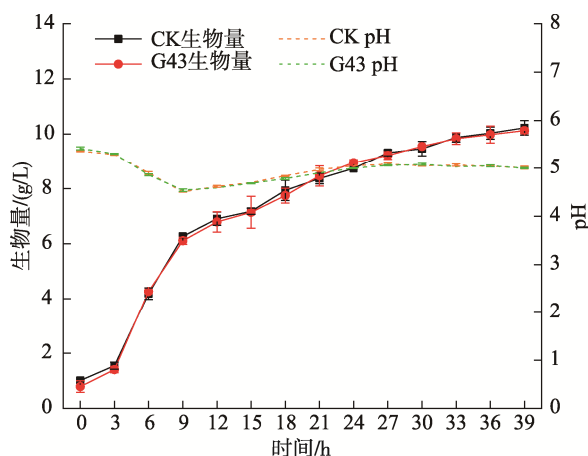


图 1 重组菌株 G43 的生长曲线和 pH 变化

Fig.1 Growth curves and pH changes of recombinant strain G43

0~3 h 处于延迟期,此时期细胞正适应新的环境,繁殖较少,因此 pH 变化不明显,主要为原始培养基的 pH (5.4 左右); 3~9 h 为对数生长期,细胞生长代谢加快,细胞数大量增加,同时培养基的营养成分被消耗而产生有机酸等物质使得培养液的 pH 下降。9~24 h,酵母菌处于对数生长后期,生物量随着培养时间增加速率减缓; 24~39 h,细胞的生长与死亡数量趋于稳定,培养液 pH 在 5.2 左右波动,说明细胞仍在生长稳定期,尚未出现大部分细胞衰亡自溶现象。重组菌株 G43 的生长曲线及培养基 pH 变化趋势与原始菌株 CK 一致,原始菌株 CK 中过表达 *GST* 基因对其进入各生长阶段的时间无显著性影响。

2.2 重组菌株 G43 的细胞形态观察

使用电动荧光显微镜放大 400 倍观察细胞形态,结果见图 2。原始菌株 CK 细胞大多数呈卵状椭圆形和杆状,繁殖方式为出芽生殖。*GST* 基因过表达后的重组菌株 G43 细胞呈椭圆形,体积变大,生长情况较好,有的正在出芽。

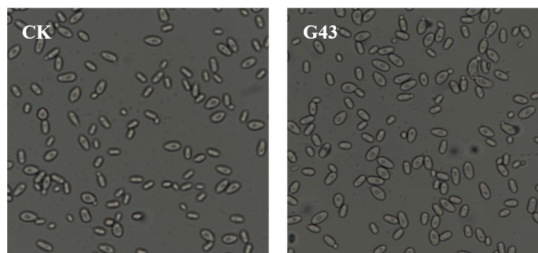


图 2 原始菌株 CK 和重组菌株 G43 的细胞形态观察(400×)
Fig.2 Observation on cell morphology of original strain CK and recombinant strain G43 (400×)

2.3 逆境对重组菌株 G43 生长及脱镉能力的影响

2.3.1 NaCl

NaCl 对重组菌株 G43 的生长及脱镉能力的影响结果见图 3, 结果表明, 重组菌株 G43 和原始菌株 CK 均具有较好的 NaCl 耐受性, 且前者对 NaCl 耐受性更强(图 3A)。NaCl 质量浓度低于 40 g/L 时, NaCl 对两株菌的生长几乎无影响。NaCl 质量浓度在 60~120 g/L 范围内时, CK 生长受到明显抑制, 其生物量随 NaCl 质量浓度的增加显著下降; 而对于 G43, NaCl 质量浓度超过 80 g/L 时, 其生物量才开始显著下降, 则 G43 对 NaCl 的耐受性高于其出发菌株。不同质量浓度 NaCl 培养后获得的酵母细胞脱镉能力也不同, 见图 3B。由于 NaCl 质量浓度 120 g/L 时两株菌的生物量较低, 50 mL 培养液中细胞数不足 8×10^8 个, 因此未进行此条件下的脱镉实验。NaCl 质量浓度低于 40 g/L 时, 重组菌株 G43 的脱镉率随 NaCl 质量浓度的增加不断降低; 当 NaCl 质量浓度在 40~100 g/L 范围内时, G43 的脱镉率随 NaCl 质量浓度的增加而增加, 并在 NaCl 质量浓度为 100 g/L 时, 脱镉率达到 47.55%。据此认为, NaCl 质量浓度对 G43 细胞的脱镉能力有很大影响。

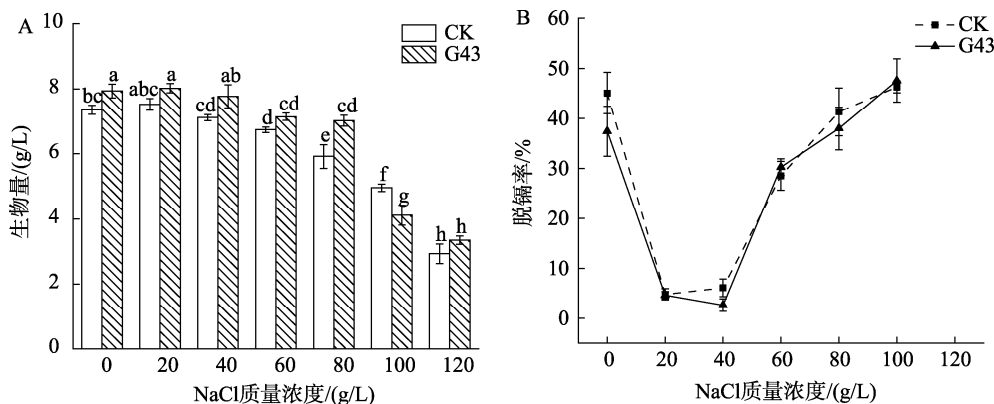
GST 在生物体中的过度表达可提高其对高低温、盐、干旱等严酷环境的耐性。通过在原始菌株 CK 中进行 *GST* 基因的过表达提高了其对 NaCl 的耐性, 与前人研究结果一致^[19-20]。随 NaCl 浓度增高, 一方面会造成酵母细胞内有害 Na^+ 的积累, 另一方面高渗透压环境会导致细胞失水, 细胞收缩变小, 从而使总的细胞表面积变小, 导致脱镉率下降, NaCl 在 40 g/L 时, 脱镉率最低。在高 NaCl 浓度下, 酵母细胞会主动进行自我调节以适应高盐环境, 通过提高胞内渗透压使得膜内外两侧渗透压一致^[21-22], 以维持细胞的正常形态。此外, 本实验室前期研究结果证实盐胁迫可以促进 *GST* 基因的上调表达^[15], 而 *GST* 又可以促进镉与 GSH 结合成 $\text{Cd}(\text{GS})_2$ ^[23], 从而提高脱镉能力。由于脱镉实验是将菌泥加入到纯镉溶液中吸附 2 h 完成的, 可以

推测脱镉的主要机制是吸附, 该脱镉能力差异和酵母细胞的细胞壁表面所带基团有关。以往的研究发现, CK 无论是与 NaCl 和镉共培养, 还是先 NaCl 预培养再与镉一起培养, 在适宜浓度时, NaCl 都能提高其镉抗性和脱镉能力^[15,24], 这与本研究结果一致。

2.3.2 pH

酵母菌通常能在 pH 3.0~7.5 范围内生长, 最适 pH 一般在 4.5~5.0。pH 是酵母菌生长代谢过程中的重要影响因素, 影响着细胞的酶活性及代谢传递^[12]等。重组菌株 G43 和原始菌株 CK 在不同 pH 条件下的生物量和脱镉率结果见图 4。两株菌在培养基 pH 2.5~8.5 的范围内均有较高的生物量, 且重组菌株 G43 的生物量总是大于 CK。在培养基 pH 2.5 时, CK 生物量显著下降, 而 G43 仍保持较高的生物量(7.88 g/L), 表明重组菌株 G43 具有比原始菌株 CK 更强的 pH 耐受能力, 可耐受至少 pH 2.5 的酸性条件。已有研究表明, 酵母在受到低 pH 胁迫下能够通过向胞外释放 GSH 的方式来响应和抵御环境 pH 的不断降低^[25], 从而使得酵母菌在较低 pH 条件下仍能正常生长, 有着较强的耐酸能力。本研究结果表明重组菌株 G43 耐酸性能优于 CK, 这是由于重组菌株 G43 在受到低 pH 环境胁迫后, 胞内 *GST* 基因转录水平和 *GST* 酶活均有明显提高, 从而提高了其抗逆能力^[26]。

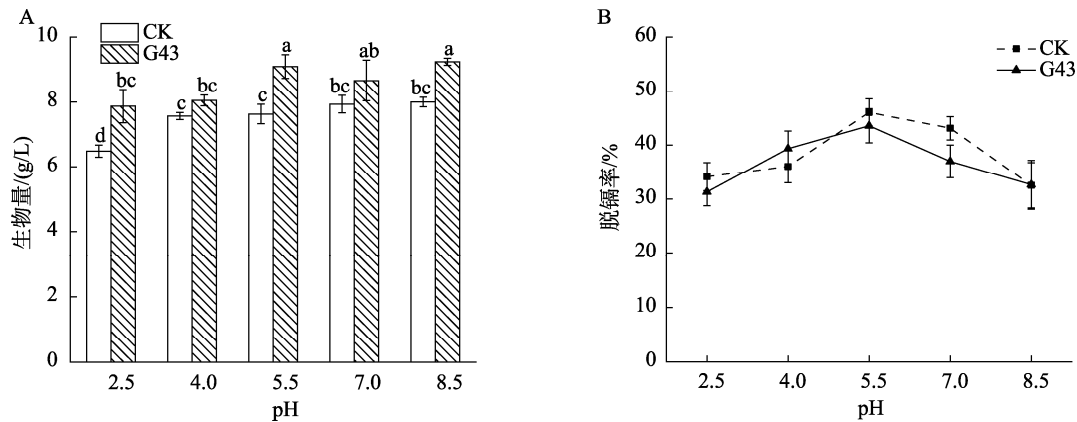
本研究中, 培养基初始 pH 也会影响酵母菌的脱镉能力。在取相同细胞个数的脱镉实验中, 初始培养基 pH 2.5~8.5 内培养 G43 获得的细胞脱镉率低于 CK(除 pH 4.0 外); 但两株菌脱镉率的变化趋势一致: 低 pH 条件下, 酵母结合位点与 H^+ 的亲合力远大于重金属离子, 从而阻碍酵母细胞对重金属离子的吸附, 导致较低的脱除率^[15]; pH 5.5 时脱镉率最大(43.561%); 当 pH 大于 5.5 时, 随着溶液 pH 不断增大, $\text{Cd}(\text{OH})_2$ 占据优势, 导致对镉的吸附降低, 从而脱镉率下降。李春生^[15]研究表明, 与正常 pH (pH 5) 相比, 低 pH 条件 CK 的镉脱除率显著下降, 本研究结果与之一致。



注: 不同小写字母表示各组数据之间差异性显著, $P < 0.05$, 下同。

图 3 NaCl 对重组菌株 G43 的生长及脱镉能力的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of NaCl on growths and cadmium removal abilities of recombinant strain G43 ($n=3$)

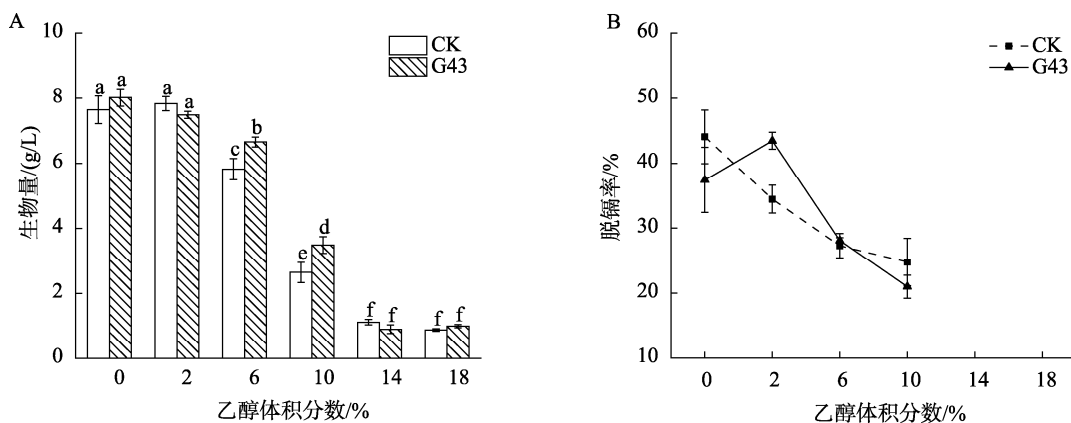
图 4 pH 对重组菌株 G43 的生长及脱镉能力的影响($n=3$)Fig.4 Effects of pH on growths and cadmium removal abilities of recombinant strain G43 ($n=3$)

2.3.3 乙醇

高浓度乙醇会破坏细胞的形态和生理功能,抑制酵母菌的生长和细胞的发育,对其造成毒害作用^[12]。*P. kudriavzevii*已在白酒、红酒、龙舌兰酒等多种高浓度酒精食品生产过程中被分离鉴定^[15],良好的耐乙醇性能可使酵母在发酵过程中易于存活。由图 5A 可知,乙醇体积分数低于 6%时对菌株生长影响不大;当高于 6%时,菌株可以生长,但受到明显抑制。乙醇体积分数 6%和 10%时,重组菌株 G43 的生物量均显著高于 CK。乙醇体积分数为 14%及以上时,两株菌生长受到严重限制。因此,两株菌可耐受乙醇的体积分数至少为 10%,且 G43 的耐乙醇性能更好。由图 5B 可知,当培养基中含有体积分数 2%的乙醇时,培养所得的重组菌株 G43 脱镉率最高(43.45%),之后其脱镉率随乙醇浓度的增大而不断降低。原始菌株 CK 的脱镉率随培养基中乙醇浓度的增加不断下降。则培养基中乙醇浓

度对酵母菌细胞的脱镉能力有显著影响,体积分数为 2%的乙醇可提高 G43 的脱镉率,高于 2%则不利于脱镉。

一般情况下,生物吸附主要利用微生物的细胞或者其代谢产物与重金属离子发生相互作用而达到脱除目的。如细胞壁表面的基团(磺酸基、羧基、磷酸基、咪唑基等)与重金属离子结合^[27],或细胞的有机酸、胞外聚合物等物质与金属离子进行络合反应^[15]。重组菌株 G43 在乙醇体积分数为 2%时的脱镉率反而比无乙醇时高,这是由于适量乙醇的存在提高了 GST 酶活^[19],并且 GST 可促进 GSH 和 Cd 的络合作用,从而使 G43 的脱镉率有所提高。已有研究表明,乙醇胁迫会使酵母细胞延滞期延长,导致细胞进入指数生长期的时间不断推迟^[28]。因此随着乙醇体积分数的不断增加,酵母生长繁殖受到严重延滞作用,甚至出现细胞死亡,在相同的 24 h 培养时间下,酵母菌细胞总表面积变小,导致脱镉率明显降低。



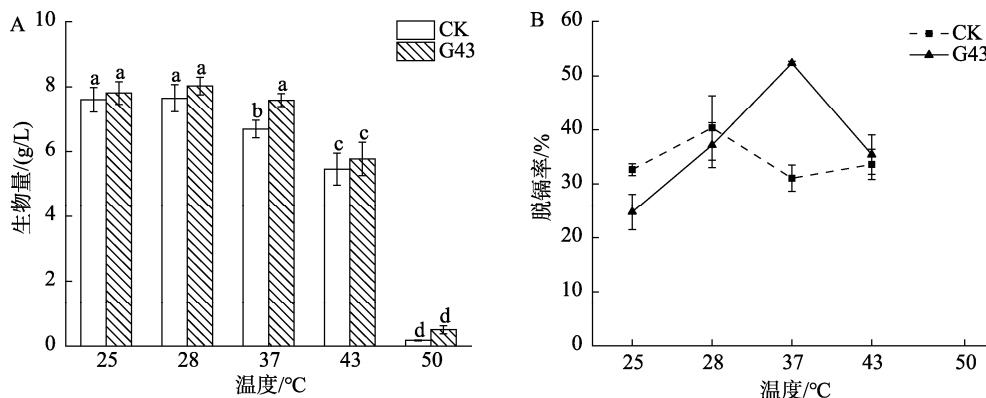
注: 14%和 18%的乙醇条件下两株菌生长严重受限,因此该条件下未进行脱镉实验。

图 5 乙醇对重组菌株 G43 的生长及脱镉能力的影响($n=3$)Fig.5 Effects of ethanol on growths and cadmium removal abilities of recombinant strain G43 ($n=3$)

2.3.4 温度

温度是影响微生物生长的重要因素之一, 会影响到胞内酶活性、细胞膜和细胞质的流动性以及酵母菌对营养物质的吸收利用等方面, 且不同酵母的最适生长温度也有所不同^[13,29]。由图 6A 可知, 原始菌株 CK 的生物量在温度高于 28°C 后显著下降; 重组菌株 G43 的生物量在 37°C 之

后显著下降, 且 37°C 时的生物量显著高于 CK, 43°C 时生长略受影响; 当温度达 50°C 时, 两株菌的生长均受到严重限制。从而重组菌株 G43 比原始菌株 CK 具有更好的耐热性能。原始菌株 CK 的脱镉率在 28°C 时最大; 重组菌株 G43 在 37°C 时脱镉率增至最大(52.35%), 明显高于其他组(图 6B)。



注: 50°C 时两株菌无法生长, 因此该条件下未进行脱镉实验。

图 6 温度对重组菌株 G43 的生长及脱镉能力的影响(n=3)

Fig.6 Effects of temperature on growths and cadmium removal abilities of recombinant strain G43 (n=3)

GST 在生物的抗逆及细胞解毒方面发挥重要作用, 当温度增高, 酵母细胞生长开始受抑制时, 重组菌株 G43 的 *GST* 基因转录水平和 *GST* 酶活都会显著提高, 从而能提高其耐高温性能和脱镉能力^[18-19]。50°C 时, 两株菌均无法生长, 这是由于高温抑制了酵母菌细胞的酶活性甚至使其失活, 导致酵母菌无法增殖。

3 讨论与结论

盐、低 pH、乙醇及高温等逆境对 *GST* 基因过表达的重组菌株 G43 的生长情况和脱镉能力均存在显著影响。与原始菌株 CK 相比, 重组菌株 G43 的综合耐受能力明显提高, 可耐受住 NaCl 质量浓度为 120 g/L、pH 2.5 的酸性、体积分数为 10% 的乙醇浓度及 43°C 的高温。SEONG 等^[30]从韩国某酒厂的土壤样品中分离并在 42°C、pH 3.0 条件下筛选出一株耐热耐酸的库德毕赤酵母 MTY1, 该菌株的耐受性高于酿酒酵母 D452-2。CHAMNIPA 等^[31]从果园中筛选出一株耐热产乙醇的库德毕赤酵母 RZ8-1, 该菌株可耐受 42°C 的高温及 10% 的乙醇条件。ARACHCHIGE 等^[32]从斯里兰卡椰子酒中分离出 17 株酵母菌中, 发现一些菌株表现出对 11% (m:V) NaCl 的耐受性, 其中一株酿酒酵母 SLY-10 能耐受住 12.5% (m:V) 的 NaCl。与这些筛选出的高耐受性菌株相比, 本研究所选具有高镉抗性和脱镉率的重组菌株 G43 耐受结果与之相当或更好。说明重组菌株 G43 具有良好的耐盐、耐酸、耐乙醇及耐热性能, 并且具有一定的脱镉能力, 为后续研究胁迫培养提高酵母菌消减镉的研究和应用提供研究基础, 也为开发食品体系中安全脱除重金属镉的高效生物吸附剂提供理论依据。

参考文献

- FAN ZH, ZOU JM, WANG Q, *et al.* Quantitative benefit and risk assessment of cadmium and nutrient levels in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2020, 28(6): 7322-7331.
- THANG NQ, HUY BT, KHANH DNN, *et al.* Potential health risks of toxic heavy metals and nitrate via commonly consumed bivalve and vegetable species in Ho Chi Minh City, Vietnam [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, 28(39): 54960-54971.
- CIESIELSKI T, WEUVE J, BELLINGER DC, *et al.* Cadmium exposure and neurodevelopmental outcomes in US children [J]. *Environ Health Persp*, 2012, 120(5): 758-763.
- 宋小旺. 铁锰氧化物生物炭吸附/钝化镉研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2020.
SONG XW. Adsorption/passivation of cadmium by Fe-Mn oxide-biochar [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2020.
- 温希, 李云翰, 毛伟杰, 等. 利用柠檬汁柑橘汁及柠檬酸去除扇贝下脚料中镉的研究[J]. *农产品加工*, 2020, (6): 1-4, 10.
WEN X, LI YH, MAO WJ, *et al.* Study on the removal of cadmium from scallop tailing by using lemon juice, orange juice and citric acid [J]. *Farm Prod Process*, 2020, (6): 1-4, 10.
- SASAKI T, ARAKI R, MICHIHATA T, *et al.* Removal of cadmium from fish sauce using chelate resin [J]. *Food Chem*, 2015, 173, 375-381.
- 陈一铭. 鲑鱼肝脏中重金属脱除技术的研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
CHEN YM. Research of removing heavy metal in squid liver [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016.
- 周显青, 张鹏举, 张玉荣, 等. 柠檬酸浸泡对蒸谷糙米碾米过程中蒸谷米镉含量和品质的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(2): 50-57.
ZHOU XQ, ZHANG PJ, ZHANG YR, *et al.* Effect of citric acid soaking on cadmium content of parboiled rice during milling and on its quality attributes before and after cooking [J]. *Food Sci*, 2020, 41(2): 50-57.
- MAN N, LI CS, ZHANG DD, *et al.* Modulation of cadmium bioaccumulation

- and enhancing cadmium tolerance in *Pichia kudriavzevii* by sodium chloride preincubation [J]. *J Basic Microbiol*, 2016, 56(7): 711–718.
- [10] 徐莹, 张丹丹, 陈鹏, 等. 去除重金属酵母小球造粒工艺: 中国, CN109762804A[P]. 2019-05-17.
XU Y, ZHANG DD, CHEN P, *et al.* Granulation technology of yeast pellets for removing heavy metals: China, CN109762804A [P]. 2019-05-17.
- [11] 刘文磊. 耐盐鲁氏酵母脱水溶液及鱿鱼内脏酶解液中重金属能力的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
LIU WL. Removal of heavy metal from aqueous solution and squid visceral enzymatic hydrolysate by *Zygoaccharomyces rouxii* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [12] 李豪, 章霞, 张静, 等. 草莓果酒酵母菌的筛选、鉴定及耐受性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 85–88.
LI H, ZHANG X, ZHANG J, *et al.* Screening, identification and tolerance of strawberry wine yeast [J]. *China Brew*, 2017, 36(2): 85–88.
- [13] 管庆林, 周笑犁, 赵娜, 等. 番茄自然发酵液中酵母菌的分离鉴定及其特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(3): 96–100, 107.
GUAN QL, ZHOU XL, ZHAO S, *et al.* Isolation and identification of yeasts from tomato natural fermentation broth and its characteristics analysis [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(3): 96–100, 107.
- [14] BOURDICHON F, CASAREGOLA S, FARROKH C, *et al.* Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 154(3): 87–97.
- [15] 李春生. 库德毕赤酵母重金属积累特性及高盐/低 pH 下耐抗性提高机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
LI CS. Heavy metal bioaccumulation characteristics and mechanism of the improved cadmium tolerance at high NaCl concentration or low pH in *Pichia kudriavzevii* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [16] KORTHEERAKUL C, KAGEYAMA H, WADITEE-SIRISATTHA R, *et al.* Molecular and functional insights into glutathione S-transferase genes associated with salt stress in *Halotheca* sp. PCC7418 [J]. *Plant Cell Environ*, 2021, 44(11): 3583–3596.
- [17] TRIPATHI A, INDOLIYA Y, TIWARI M, *et al.* Transformed yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) overexpressing rice Tau class glutathione S-transferase (*OsGSTU30* and *OsGSTU41*) shows enhanced resistance to hexavalent chromium [J]. *Metallomics*, 2014, 6(8): 1549–1557.
- [18] 张丹丹. 基于转录组学研究 *MET14/GST* 基因在提高库德毕赤酵母耐镉抗性中的作用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2020.
ZHANG DD. Role of *MET14/GST* gene in improving cadmium resistance of *Pichia kudriavzevii* A16 based on RNA-Seq [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2020.
- [19] XU J, XING XJ, TIAN YS, *et al.* Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): 1932–6203.
- [20] XU J, ZHENG AQ, XING X, *et al.* Transgenic *Arabidopsis* plants expressing grape glutathione S-transferase gene (VvGSTF13) show enhanced tolerance to abiotic stress [J]. *Biochem (Moscow)*, 2018, 83(6): 755–765.
- [21] LI CS, LIU QY, WANG YQ, *et al.* Salt stress improves thermotolerance and high-temperature bioethanol production of multi-stress-tolerant *Pichia kudriavzevii* by stimulating intracellular metabolism and inhibiting oxidative damage [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14(1): 222.
- [22] 王继花. 盐胁迫下酿酒酵母生理生化特性的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2008.
WANG JH. Study on physiological and biochemical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* under salt stress [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2008.
- [23] LI CS, YANG XQ, XU Y, *et al.* Cadmium detoxification induced by salt stress improves cadmium tolerance of multi-stress-tolerant *Pichia kudriavzevii* [J]. *Environ Pollut*, 2018, 242: 845–854.
- [24] 马宁, 徐莹, 张丹丹. 蔗糖预培养对库德毕赤酵母及酿酒酵母耐镉抗性的影响[C]. 中国食品科学技术学会第十二届年会暨第八屆中美食品业高层论坛论文摘要集, 2015.
MA N, XU Y, ZHANG DD. Different effects of sucrose preincubation on cadmium tolerance of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* [C]. Abstracts of Food Summit in China 2015 12th Annual Meeting of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015.
- [25] 江洁, 单立峰, 吴耘红, 等. pH 值和表面活性剂对酿酒酵母生物合成谷胱甘肽的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 223–226.
GANG J, SHAN LF, WU YH, *et al.* Effects of pH value and surfactants on glutathione biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Sci*, 2009, 30(19): 223–226.
- [26] SHARMA R, SAHOO A, DEVENDRAN R, *et al.* Over-expression of a rice tau class glutathione S-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92900.
- [27] HE JS, CHEN JP. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 160: 67–78.
- [28] 熊国通, 苗英杰, 吴祖芳, 等. 乙醇胁迫下酿酒酵母(*Sc131*)生长状态和基因的表达[J]. 中国食品学报, 2018, 18(8): 247–253.
XIONG GT, MIAO YJ, WU ZF, *et al.* The growth status and gene expression of *Saccharomyces cerevisiae* 131 under ethanol [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(8): 247–253.
- [29] 刘朋肖, 常煦, 成柳洁, 等. 酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯发酵条件的优化[J]. 中国食品学报, 2022, 22(2): 178–189.
LIU PX, CHANG X, CHENG LJ, *et al.* Optimization of fermentation conditions for ethyl caproate production from *Saccharomyces cerevisiae* Y3401 [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2022, 22(2): 178–189.
- [30] SEONG YJ, LEE HJ, LEE JE, *et al.* Physiological and metabolomic analysis of *Issatchenkia orientalis* MTY1 with multiple tolerance for cellulosic bioethanol production [J]. *Biotechnol J*, 2017. DOI: 10.1002/biot.201700110
- [31] CHAMNIPA N, THANONKEO S, KLANRIT P, *et al.* The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production [J]. *Braz J Microbiol*, 2018, 49(2): 378–391.
- [32] ARACHCHIGE MSA, YOSHIDA S, TOYAMA H. Thermo- and salt-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting coconut toddy from Sri Lanka [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2019, 33(1): 937–944.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



徐婉莹, 硕士研究生, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: 1242139199@qq.com



徐莹, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、食品有害成分控制等方面的研究。

E-mail: xuy@ouc.edu.cn