

异柠檬酸脱氢酶基因调控对拉格酵母抗自溶性能的影响

叶可嘉^{1,2}, 吴豪博^{1,2}, 刘春风^{1,2}, 钮成拓^{1,2}, 郑飞云^{1,2}, 李崎^{1,2}, 王金晶^{1,2*}

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 酿酒科学与工程研究室, 江苏 无锡 214122

叶可嘉, 吴豪博, 刘春风, 钮成拓, 郑飞云, 李崎, 王金晶. 异柠檬酸脱氢酶基因调控对拉格酵母抗自溶性能的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3451-3463.

YE Kejia, WU Haobo, LIU Chunfeng, NIU Chengtuo, ZHENG Feiyun, LI Qi, WANG Jinjing. Manipulation of isocitrate dehydrogenase genes affects the anti-autolytic ability of lager yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3451-3463.

摘要: 啤酒酵母的自溶会影响啤酒的风味和品质, 对酵母自溶的调控是工业啤酒生产的迫切需求。前期在啤酒酵母自溶的研究中发现柠檬酸循环相关基因对酵母自溶有较大影响。为探究柠檬酸循环中异柠檬酸脱氢酶基因调控对自溶的影响, 在典型拉格啤酒酵母(*Saccharomyces pastorianus* H.) Pilsner 中对 *IDP1* 和 *IDP2* 基因进行了破坏和过表达。结果发现 *IDP1* 基因的破坏能提高酵母的抗自溶能力, 自溶 96 h 抗自溶指数为 8.40, 比原始菌提高了 1.5 倍。*IDP1* 基因的破坏提高还原型辅酶II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的供应, NADPH/NADP⁺ 的比值为 1.94, 发酵结束时胞内 ATP 水平比原始菌提高 1.8 倍, 活性氧(reactive oxygen species, ROS) 相比原始菌减少 10%。*IDP2* 基因的缺失造成酵母快速自溶和 NADPH 供应的减少, 自溶 96 h 抗自溶指数为 4.03, NADPH/NADP⁺ 的比值为 0.89。发酵结束时胞内 ATP 水平相比原始菌减少 8%, ROS 是原始菌的 1.3 倍。本研究进一步阐释了柠檬酸循环相关基因对酵母自溶的调控机理, 为选育自溶性能可控的优良酵母提供了理论基础。

关键词: 拉格酵母; 抗自溶性能; 柠檬酸循环; NADPH

资助项目: 国家自然科学基金(31771963)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31771963).

*Corresponding author. E-mail: jjwang@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-09-30; Accepted: 2023-01-10; Published online: 2023-01-13

Manipulation of isocitrate dehydrogenase genes affects the anti-autolytic ability of lager yeast

YE Kejia^{1,2}, WU Haobo^{1,2}, LIU Chunfeng^{1,2}, NIU Chengtuo^{1,2}, ZHENG Feiyun^{1,2}, LI Qi^{1,2}, WANG Jinjing^{1,2*}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Laboratory of Brewing Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Yeast autolysis affects the flavor and quality of beer. The regulation of yeast autolysis is a need for industrial beer production. Previous studies on brewer's yeast autolysis showed that the citric acid cycle-related genes had a great influence on yeast autolysis. To explore the contribution of isocitrate dehydrogenase genes in autolysis, the *IDP1* and *IDP2* genes were destroyed or overexpressed in typical lager yeast Pilsner. The destruction of *IDP1* gene improved the anti-autolytic ability of yeast, and the anti-autolytic index after 96 h autolysis was 8.40, 1.5 times higher than that of the original strain. The destruction of *IDP1* gene increased the supply of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and the NADPH/NADP⁺ ratio was 1.94. After fermentation, intracellular ATP level was 1.8 times higher than that of the original strain, while reactive oxygen species (ROS) was reduced by 10%. The destruction of *IDP2* gene resulted in rapid autolysis and a decrease in the supply of NADPH. Anti-autolytic index after 96 h autolysis was 4.03 and the NADPH/NADP⁺ ratio was 0.89. After fermentation, intracellular ATP level was reduced by 8% compared with original strain, ROS was 1.3 times higher than that of the original strain. The results may help understand the regulation mechanism of citric acid cycle-related genes on yeast autolysis and provide a basis for the selection of excellent yeast with controllable anti-autolytic performance.

Keywords: lager yeast; anti-autolytic ability; citric acid cycle; NADPH

酵母自溶是一种发生在酵母生长稳定期后期的生理现象。当酵母细胞衰老,生长环境恶化,或受到环境压力刺激时,胞内能量代谢发生紊乱最终导致细胞壁破裂,胞内蛋白质、核酸等大分子物质被分解并向胞外溶出^[1]。

拉格酵母是工业啤酒酿造中常用的酿造菌种,生产过程中酵母长期处于各种复杂环境压力中(图 1),容易造成细胞器损伤从而影响酵母活力^[2]。酵母的自溶会给啤酒的风味、品质带来不同程度的影响:发酵过程中酵母的提前自溶会影响风味稳定性、啤酒胶体稳定性、泡沫

性能等;在特定酿造过程中如二次发酵、橡木桶陈酿等酿造工艺中,酵母自溶时溶出的核苷酸、多肽、多糖等物质,能够带来面包、烘焙等特征香气(与使用的酵母品种相关),为啤酒带来独特的风味;同时,由于酵母胞内物质的溶出,增加了啤酒胶体的密度和黏度,起到增加酒体的作用^[3]。

研究发现柠檬酸循环与酵母细胞的活力有密切的关系,而细胞自身的活力又与其对外界环境的抗性相关^[4]。在啤酒发酵过程中,编码细胞质苹果酸脱氢酶、柠檬酸合酶、微管相关

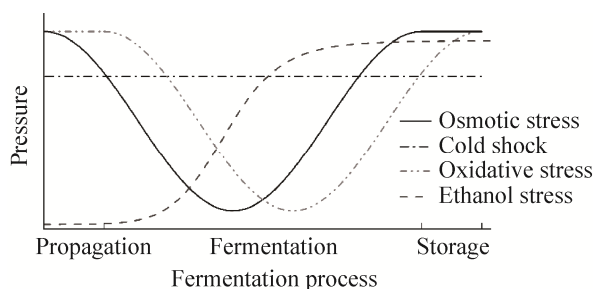


图1 拉格酵母在发酵过程中的环境压力变化
Figure 1 Pressure changes of lager yeast during fermentation process.

蛋白、NADPH 依赖型异柠檬酸脱氢酶的 *MDH2*、*CIT3*、*IRC15* 和 *IDP2* 等基因发生显著下调，还原型辅酶 II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 合成等代谢途径速度减缓，影响酵母细胞活力，加速了细胞的衰老自溶过程^[5]。异柠檬酸脱氢酶是柠檬酸循环的关键限速酶，*IDH1* 和 *IDH2* 基因编码 NADH 依赖型异柠檬酸脱氢酶，参与细胞的有氧呼吸，为代谢提供能量；*IDP1* 和 *IDP2* 基因编码 NADPH 依赖型异柠檬酸脱氢酶，与 *ZWF1* 基因共同影响 NADPH 的供应。*IDP2* 基因的缺失降低细胞质中 NADPH/NADP⁺ 的比值，减弱谷胱甘肽、硫氧还蛋白等抗氧化系统的活性，酵母在含油酸或乙酸的环境中生长受限，细胞寿命缩短，抗氧化和抗衰老能力下降^[6]。*IDP2* 基因的表达水平影响 α -酮戊二酸、谷氨酸等含碳化合物的合成，这些含碳化合物的不足会影响酵母的生长能力和生理性能^[7]。前期研究发现，拉格啤酒酵母在自溶过程中，*IDP1*、*IDP2* 基因的表达量下调。异柠檬酸脱氢酶为合成谷氨酸等多种代谢反应提供重要的前体物质 α -酮戊二酸，同时也提供辅因子 NADPH，为细胞提供还原力^[7]。同时，工业啤酒生产中酵母的回收再利用要求啤酒酵母具有较高的活力，研究发现寿命较长的啤酒酵母中胞内累积的活性氧

(reactive oxygen species, ROS) 较少^[8]，传代发酵过程中产生的氧化损伤也相对较少^[5]。酵母自溶伴随酵母的衰老产生，线粒体是能量代谢的场所，控制胞内的 ATP 和 ROS，与酵母的寿命、衰老及各种抗氧化系统有关^[9]。*ACO1* 基因编码的乌头酸酶参与线粒体 DNA 的包装和维护^[10]，*ACH1* 基因关系到细胞在低 pH 下的耐受性和细胞的提前凋亡^[11]，这些基因的调控影响了酵母的衰老和自溶过程。

本研究以典型拉格啤酒酵母 Pilsner 为对象，通过调控 *IDP1* 和 *IDP2* 基因的表达，讨论基因调控对菌株的发酵性能、生理活力、抗自溶能力的影响，分析异柠檬酸脱氢酶基因的调控对酵母自溶性能的影响机制，为进一步选育自溶性能可控的优良酵母提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和培养基

拉格型啤酒酵母 (*Saccharomyces pastorianus* H.) Pilsner (三倍体, II 型), 大肠杆菌 (*Escherichia coli* C.) JM109: 实验室保藏; 克隆载体 YEp352, 质粒 pUG6: 实验室保藏。

YPD 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酪蛋白胨 20, 酵母粉 10。固体培养基添加琼脂粉 20 g/L; 筛选转化子时, 抗性筛选培养基添加 G418 至终浓度为 200 mg/L。

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10。固体培养基添加琼脂粉 15 g/L; 筛选转化子时, 抗性筛选培养基添加氨苄青霉素至终浓度为 100 mg/L。

12 °P 麦汁发酵培养基: 制备方法参考文献^[12] 所述。

1.1.2 实验试剂

葡萄糖、琼脂粉、氯化钠、氯化钾、柠檬

酸钠、一水合柠檬酸、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、盐酸等试剂均购于国药集团上海化学试剂公司。酪蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉等试剂及酵母总 RNA 抽提纯化试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。PrimeSTAR[®] Max DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I、*Nhe* I、PrimeScript[™] RT 试剂盒、TB Green Premix Ex *Taq* II 试剂盒购于宝日生物技术(北京)有限公司。NADP⁺/NADPH 检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。ATP 检测试剂盒购于 Promega 公司。

柠檬酸盐缓冲液(模拟自溶液): 将 7.35 g 柠檬酸钠和 5.25 g 一水合柠檬酸溶于 400 mL 超纯水中, 加入 1 mol/L 柠檬酸溶液使得 pH 达到 4.0, 最终用容量瓶定容到 500 mL, 得到浓度为 0.05 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液。

PBS 缓冲液: 将 0.24 g 磷酸二氢钾、1.44 g 磷酸氢二钠、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾溶于 800 mL 超纯水中, 加入浓盐酸调整 pH 至 7.4, 最终用容量瓶定容到 1 L。

1.2 仪器和设备

T100 Thermal Cycler PCR 仪、CFX Connect Real-Time PCR 仪、变性梯度凝胶电泳仪、Gene Pulser Xcell 电穿孔仪, 购自伯乐(Bio-Rad)公司; SW-CJ-1C μ 双人单面净化工作台, 购自苏州净化设备有限公司; QYC2012 恒温摇床, 购自太仓市强乐实验设备有限公司; SPX-250 生化培养箱, 购自上海跃进医疗器械有限公司; 超声破碎仪, 购自 Sonics 公司; 化学发光酶标仪, 购自上海闪谱生物科技有限公司; Bio-Tek 多功能酶标仪, 购自伯腾仪器有限公司; NanoDrop 分光光度计, 购自赛默飞世尔科技有限公司; 全自动啤酒分析仪, 购自安东帕(上海)商贸有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 重组菌株的构建

根据 NCBI 数据库中酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288c 的基因组设计引物(表 1), 以 pUG6 质粒为模板, 使用引物对 *IDP1*-KOF/*IDP1*-KOR, *IDP2*-KOF/*IDP2*-KOR 扩增 *IDP1* 和 *IDP2* 基因的敲除盒, 该基因敲除盒包含 G418 抗性基因以及 *IDP1* 和 *IDP2* 上下游同源臂基因。PCR 产物经过电泳验证及纯化后, 使用电击转化法将基因敲除片段转入啤酒酵母 Pilsner 中, 在含有 200 mg/L G418 的 YPD 平板上培养 2 d, 筛选阳性转化子进行 PCR 验证。使用该法构建 *Pil-idp1 Δ 和 *Pil-idp2 Δ 基因破坏菌株。**

以 Pilsner 酵母基因组为模板, 使用引物对 *IDP1*-BF/*IDP1*-BR, *IDP2*-BF/*IDP2*-BR 扩增得到两端带有 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点的 *IDP1* 和 *IDP2* 基因片段。克隆载体 YEp352 含有 *Amp^R* 和 *KanMX* 基因片段, 含有 YEp352 的大肠杆菌具有氨苄青霉素抗性, 含有 YEp352 的酵母具有 G418 抗性。目的片段经纯化后, 使用 *Nhe* I 和 *Xho* I 限制性内切酶将克隆载体 YEp352 和 *IDP1*、*IDP2* 基因片段进行双酶切。酶切产物使用 T4 DNA 连接酶连接转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 在氨苄青霉素抗性平板上筛选阳性转化子。将构建好的过表达载体电转入 Pilsner 感受态细胞, 在含有 200 mg/L G418 的抗性平板上培养 2 d, 筛选阳性转化子进行 PCR 验证。使用该法构建 *Pil-idp1* 和 *Pil-idp2* 过表达菌株。

1.3.2 基因表达量的测定

将酵母菌在 YPD 培养基中培养 24 h, 收集酵母细胞进行 RNA 提取并反转录为 cDNA, 参考 TB Green Premix Ex *Taq* II 试剂盒说明书, 以酵母细胞 cDNA 为模板, 以 *ACT1* 为参比基因, 进行 qRT-PCR 实验。通过求解 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值测定菌株的基因表达量。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
IDP1-KOF	CGGGTCACGCGCGGATTTTGACTCACATAATTCCACTTGCCCATATAAAGAGGGACTCATATG ATCGTACGCTGCAGGTCGACAAC	86
IDP1-KOR	GTTGTTACCGCAAGCCAAAGCCAAGTCCTTCGTCATGATACCGTCTTGCTGAACTGTGTTCA AAGGCCGCATAGGCCACTAGTG	84
IDP2-KOF	CTACACTCTTGACTTGTCGACTACAGTCGCTGCTCAGGCACGAGAATAGGAGGTAAGAAGG GTACGCTGCAGGTCGACAAC	81
IDP2-KOR	GCGTCAATGAACTCCTCGGTAGTGACATAAGCGGATCTTTCAGACTTACCGAGAATGAGCGC CGCCGCATAGGCCACTAGTG	82
IDP1-F	GGACTCTGCTAAAGACCATAACAAGG	26
IDP1-R	GAATTAGAACAGCTTGGTGATAGCCC	26
IDP2-F	GATACCTTTCAGGGCTAGGAATAGTG	26
IDP2-R	GTAGGTTGTAACGAACTCCAGATG	24
IDP1-BF	CTAGCTAGCATGAGTATGTTATCTAGAAGATTATTTTCC	39
IDP1-BR	CCGCTCGAGGTAGATTGGGCTACGTAAATTCGATTA	36
IDP2-BF	CTAGCTAGCATGACAAAGATTAAGGTAGCTAACCC	35
IDP2-BR	CCGCTCGAGTTACAATGCAGCTGCCTCGAAC	30
KANMX-F	CCTCACAGACGCGTTGAATTG	20
KANMX-R	GTTCAACAGGCCAGCCATTAC	20

1.3.3 啤酒发酵实验

本研究中的啤酒发酵实验均在锥形瓶中进行。酵母菌株经过活化及扩大培养后,以 1.2×10^7 CFU/mL 的浓度接种至装有 150 mL 12 °P 麦汁的 250 mL 锥形瓶中,在 11 °C 下静置发酵。每个锥形瓶需扣上单向排气阀并加无菌水密封,以此模拟厌氧发酵过程。记录每日的二氧化碳排放情况即发酵失重,当 24 h 内的失重小于 0.15 g 时发酵结束。使用全自动啤酒分析仪测定发酵液的发酵度和酒精度。

1.3.4 模拟自溶实验

发酵结束后收集酵母泥,用无菌水洗涤 1 次,在 100 mL 的柠檬酸盐缓冲液(模拟自溶液)中加入 1 g 酵母泥,静置于 28 °C 的培养箱中模拟自溶 96 h,每隔 24 h 测定酵母的死亡率、 A_{260} 和 A_{280} 的吸光值,啤酒酵母的抗自溶指数计算方法为抗自溶指数 = $(A_{260}/A_{280})/\text{死亡率}^{[13]}$ 。

1.3.5 啤酒酵母胞内 NADPH、NADP⁺、ROS 及 ATP 含量测定

发酵结束后收集酵母细胞,用 PBS 缓冲液洗涤细胞并将浓度调整至 $OD_{600}=1$ 。使用超声破碎仪破碎细胞(破碎 3 s,间隔 10 s,30 个循环,破碎期间保持冰浴)。细胞破壁后,使用 NADP⁺/NADPH 检测试剂盒测定 NADP⁺ 和 NADPH 的含量,并计算 NADPH/NADP⁺ 的比值。

将破壁的酵母细胞 $8\ 000 \times g$ 离心 5 min,在 96 孔板中加入 100 μL 上清液和 100 μL ATP 检测液,混匀后使用酶标仪检测反应液的化学发光值。

取 1 mL 酵母菌液,加入 1 mL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA),28 °C 孵育 30 min,每隔 3–5 min 颠倒混匀,使探针和细胞充分接触。反应结束后用 PBS 缓冲液洗涤细胞除去未结合的探针,使用 Bio-Tek 多功能酶

标仪检测荧光强度, $\lambda_{ex}=488\text{ nm}$, $\lambda_{em}=525\text{ nm}$, 增益为 80。

2 结果与分析

2.1 异柠檬酸脱氢酶基因重组菌株的构建

以拉格啤酒酵母 Pilsner 基因组为模板, 构建 *IDP1* 和 *IDP2* 基因重组菌株。从 pUG6 质粒上扩增 *IDP1* 和 *IDP2* 基因敲除盒, 大小为 1 734 bp 和 1 727 bp, 将基因敲除盒电转入 Pilsner 感受态细胞, 筛选阳性转化子进行 PCR 验证。如图 2 所示, 至少有一个拷贝的目的基因片段被 G418 抗性基因片段替代。使用引物对 *IDP1*-F/*IDP1*-R 扩增 *Pil-idp1 Δ* 基因组, 获得 2 个条带, 长度为 2 282 bp 的条带含有 G418 抗性基因, 长度为 1 836 bp 的条带含有 *IDP1* 基因。使用引物对 *IDP2*-F/*IDP2*-R 扩增 *Pil-idp2 Δ* 基因组, 获得 2 个条带, 长度为 2 157 bp 的条带含有 G418

抗性基因, 长度为 1 752 bp 的条带含有 *IDP2* 基因。结果说明一部分 *IDP1* 和 *IDP2* 基因已经被成功破坏, 将基因破坏菌株命名为 *Pil-idp1 Δ* 和 *Pil-idp2 Δ* 。从 Pilsner 基因组上扩增获得目的基因片段, 与克隆载体 YEp352 连接得到目的基因的过表达质粒。将质粒转化入 Pilsner 感受态细胞, 筛选阳性转化子, 进行 PCR 验证。如图 2 所示, *IDP1* 和 *IDP2* 基因的过表达质粒成功导入酵母细胞, 将过表达菌株命名为 *Pil-idp1* 和 *Pil-idp2*。

2.2 重组菌的基因表达情况

IDP1 和 *IDP2* 基因编码的是 NADPH 依赖型异柠檬酸脱氢酶, 参与多种物质的生物合成, 对这 2 个基因的调控会影响柠檬酸循环的其他基因, 使用 qRT-PCR 测定重组菌株中相关基因的表达量, 结果如表 2 所示。以 Pilsner 基因组为基准, *Pil-idp1 Δ* 中 *IDP1* 基因的表达量为

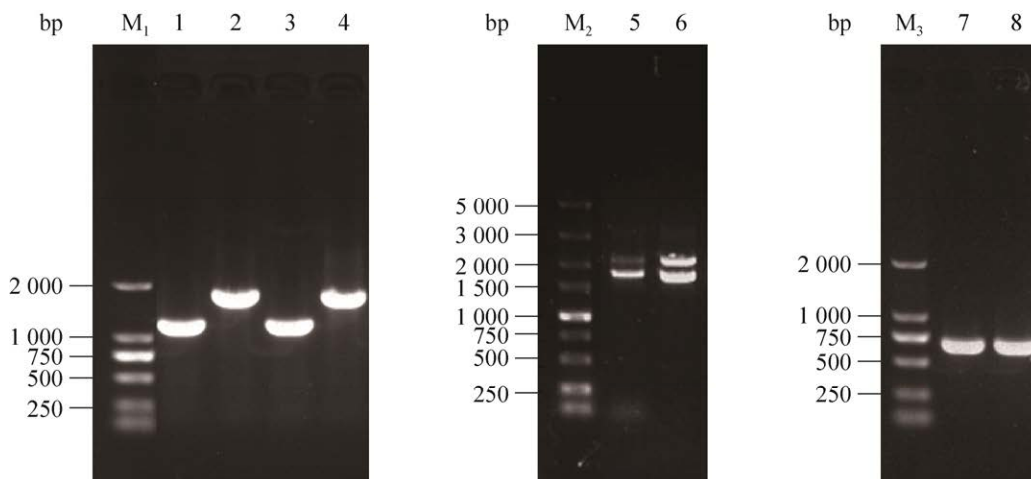


图 2 基因破坏菌株 *Pil-idp1 Δ* 和 *Pil-idp2 Δ* 和基因过表达菌株 *Pil-idp1* 和 *Pil-idp2* 的验证

Figure 2 Verification of the mutant *Pil-idp1 Δ* , *Pil-idp2 Δ* and mutant *Pil-idp1*, *Pil-idp2*. Lane M₁: DNA marker DL2000; Lane 1: Primer pair *IDP1*-F/*KANMX*-R, 1 162 bp; Lane 2: Primer pair *KANMX*-F/*IDP1*-R, 1 732 bp; Lane 3: Primer pair *IDP2*-F/*KANMX*-R, 1 164 bp; Lane 4: Primer pair *KANMX*-F/*IDP2*-R, 1 687 bp. Lane M₂: DNA marker DL5000; Lane 5: Primer pair *IDP1*-F/*IDP1*-R, 2 282 bp including *KanMX*, 1 836 bp including *IDP1*; Lane 6: Primer pair *IDP2*-F/*IDP2*-R, 2 157 bp including *KanMX*, 1 752 bp including *IDP2*. Lane M₃: DNA marker DL2000; Lane 7: Primer pair *KANMX*-F/*KANMX*-R (*Pil-idp1*), 673 bp; Lane 8: Primer pair *KANMX*-F/*KANMX*-R (*Pil-idp2*), 673 bp.

表 2 重组菌株柠檬酸循环相关基因的表达量分析

Table 2 Expression of citric acid cycle-related genes of recombinant strains

Gene	Pilsner ($2^{-\Delta C_i}$)	Pil- <i>idp1</i> Δ vs. Pilsner ($2^{-\Delta\Delta C_i}$)	Pil- <i>idp2</i> Δ vs. Pilsner ($2^{-\Delta\Delta C_i}$)	Pil- <i>idp1</i> vs. Pilsner ($2^{-\Delta\Delta C_i}$)	Pil- <i>idp2</i> vs. Pilsner ($2^{-\Delta\Delta C_i}$)	Description
<i>IDP1</i>	0.120±0.001	0.121±0.004	4.840±1.010	3.329±0.456	0.826±0.058	Isocitrate dehydrogenase (NADPH dependent form)
<i>IDP2</i>	2.397±0.011	1.970±0.167	0.052±0.002	1.133±0.325	5.516±0.619	Isocitrate dehydrogenase (NADH dependent form)
<i>IDH1</i>	0.407±0.014	5.327±0.021	2.467±0.355	0.762±0.123	1.371±0.042	Aconitase
<i>IDH2</i>	1.794±0.093	4.550±0.592	0.722±0.062	2.854±0.368	3.453±0.395	Isocitratylase
<i>ACO1</i>	0.068±0.006	1.249±0.136	3.304±0.184	2.206±0.257	2.225±0.098	
<i>ICL1</i>	0.059±0.005	2.614±0.171	0.214±0.036	0.870±0.023	0.519±0.072	

Results are shown as mean of three parallel cultures ($n=3$). $2^{-\Delta\Delta C_i}>1$ represents overexpression, and $2^{-\Delta\Delta C_i}<1$ represents knockdown.

0.121, Pil-*idp1* 中 *IDP1* 基因的表达量为 3.329。Pil-*idp2* Δ 中 *IDP2* 基因的表达量为 0.052, Pil-*idp2* 中 *IDP2* 基因的表达量为 5.516。

IDP1 基因的破坏导致 *IDP2*、*IDH1* 和 *IDH2* 基因的表达量提高。*IDP1* 和 *IDP2* 基因编码的异柠檬酸脱氢酶分别位于线粒体和细胞质中。*IDP1* 基因的破坏激发了细胞质异柠檬酸脱氢酶的酶活, 异柠檬酸被转运到线粒体外被 *IDP2* 编码的酶分解, 避免异柠檬酸盐的累积。*IDP1* 基因在生长过程中与 *IDH1* 和 *IDH2* 基因同时表达, *IDH1* 和 *IDH2* 基因表达量的提高使线粒体通过柠檬酸循环释放更多能量, 对细胞应对环境压力有益。

IDP2 基因的破坏导致 *IDP1* 基因的表达量提高。此时细胞质中异柠檬酸的进一步分解途径无法进行, 因此异柠檬酸不再被转运到细胞质中, 而是在线粒体中转变为 α -酮戊二酸。细胞通过 α -酮戊二酸在线粒体和细胞质中相互运输, 维持碳源的平衡。由于细胞质中异柠檬酸供应减少, 以异柠檬酸作为碳源的乙醛酸途径受到抑制, 编码异柠檬酸裂解酶的 *ICL1* 基因表达减少。

2.3 重组菌的发酵能力分析

为研究基因调控对啤酒发酵性能的影响, 将出发菌株和重组菌株置于 12 °P 麦汁中在

11 °C 条件下进行啤酒发酵实验。当每日失重小于 0.15 g 时结束发酵, 分析发酵液中酒精度和发酵度, 结果如图 3 所示。从图中可以发现, 所有重组菌株的酒精度和发酵度与出发菌株 Pilsner 相比没有显著差异, *IDP1* 和 *IDP2* 的调控没有显著影响酵母的发酵性能, 可以进行后续模拟自溶和生理状态研究。

2.4 重组菌的抗自溶指数分析

啤酒发酵后期, 啤酒酵母面临着低 pH、高乙醇浓度胁迫、代谢废物累积和营养物质匮乏等多种不良的环境压力。发酵结束后收集啤酒酵母转入模拟自溶液, 诱发酵母快速自溶, 通过评价抗自溶指数^[14]比较不同酵母菌株抗自溶能力的差异。抗自溶指数=(A_{260}/A_{280})/死亡率, 这一指数能够表征酵母抗自溶能力的好坏, 抗自溶指数数值越低, 代表自溶程度越高, 抗自溶能力越差。死亡率是描述酵母自溶的重要指标, 在 96 h 的模拟自溶实验中, 各菌株的死亡率变化如图 4A 所示。所有菌株的死亡率随时间增大, 96 h 后 Pilsner 的死亡率达到 30%, Pil-*idp1* Δ 一直保持较低的死亡率, 96 h 后死亡率仅有 19%, 而 Pil-*idp2* Δ 的死亡率为 44%。*IDP1* 的破坏降低了酵母的死亡率, 而 *IDP2* 的破坏使酵母快速死亡。2 个基因的过表达对死亡率没有太大影响, 96 h 后过表达菌株的死亡率与出

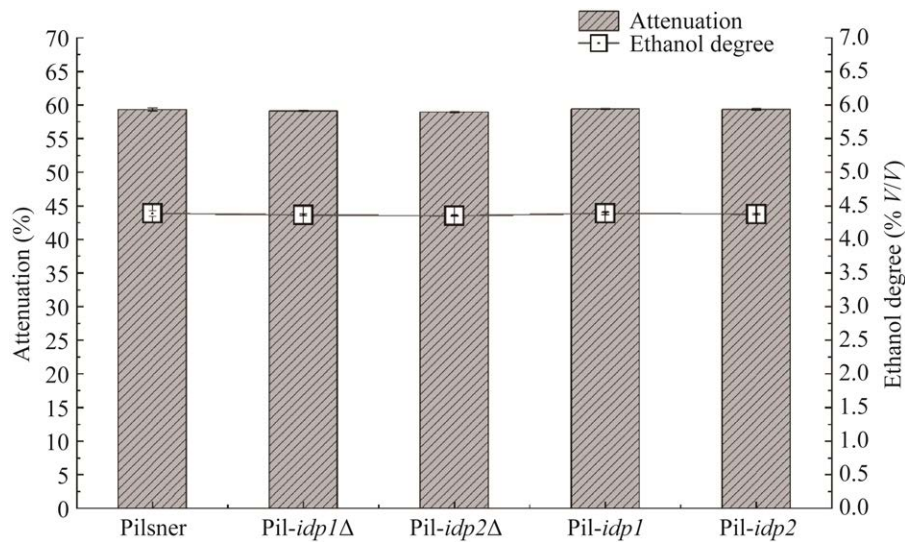


图3 出发菌株与重组菌株的发酵能力分析

Figure 3 Fermentation performance of original strain and recombinant strains.

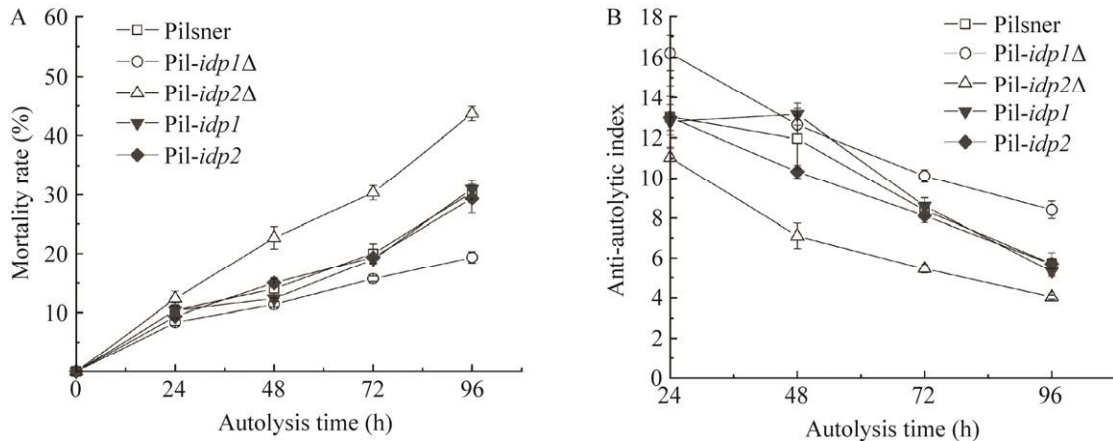


图4 出发菌株与重组菌株的死亡率(A)和抗自溶指数(B)的比较

Figure 4 Mortality rate (A) and anti-autolytic index (B) of original strain and recombinant strains.

发菌株类似。各菌株的抗自溶指数如图 4B 所示, 发酵结束时, 各菌株的抗自溶指数比较发现 $Pil-idp1\Delta > Pilsner > Pil-idp2 > Pil-idp1 > Pil-idp2\Delta$ 。同时, $Pil-idp1\Delta$ 的抗自溶指数在过程中下降缓慢, 自溶 96 h 后 $Pil-idp1\Delta$ 的抗自溶指数为 8.40, 是出发菌 Pilsner 的 1.5 倍。 $Pil-idp2\Delta$ 的抗自溶指数下降快速, 96 h 后下降至 4.03, 是出发菌的 70%。基因过表达菌株在模拟自溶时的表现与出发菌株 Pilsner 类似, 抗自溶指数稳定下降。由此发现

基因 $IDP1$ 的破坏能提高菌株的抗自溶能力, 基因 $IDP2$ 的破坏使菌株的抗自溶能力显著下降。

2.5 异柠檬酸脱氢酶基因调控影响酵母生理活性

2.5.1 胞内辅因子含量分析

细胞内的氧化还原平衡由 NADH 和 NADPH 调控, 其中 NADPH 主要参与合成代谢, 在生物合成中起负氢离子供体的作用。在发酵结束后收集酵母细胞, 检测胞内的 NADPH 和 $NADP^+$ 含

量并计算 NADPH/NADP⁺ 的比值。该比值能反应胞内还原力的供应情况和细胞应对氧化压力时的状态。结果如图 5 所示, 发酵结束时, Pilsner 的胞内 NADPH/NADP⁺ 比值为 1.19, *Pil-idp1Δ* 的比值为 1.94, 是 Pilsner 的 1.63 倍, 胞内高水平的 NADPH 可以提供充足的还原力, 为抗氧化系统提供能量帮助酵母应对模拟自溶时的恶劣环境。另一方面, *Pil-idp2Δ* 的 NADPH/NADP⁺ 比值为 0.89, 说明胞内的 NADP⁺ 含量多, 造成的氧化损伤多。过表达菌株 *Pil-idp1* 和 *Pil-idp2* 的 NADPH/NADP⁺ 比值与 Pilsner 接近。对 *IDP1*、*IDP2* 基因的调控影响酵母胞内的 NADPH 含量, 破坏 *IDP1* 基因能够提高 NADPH/NADP⁺ 的比值, 增加还原力的供应, 从而提高酵母的抗自溶能力^[7]。

2.5.2 基因调控对胞内 ROS 含量的影响

ROS 随着线粒体呼吸产生, 当细胞发生氧化应激反应时, 会引起 ROS 的大量积累^[15]。ROS 的检测结果使用相对荧光单位(relative fluorescence unit, RFU)表示。检测发酵结束后酵

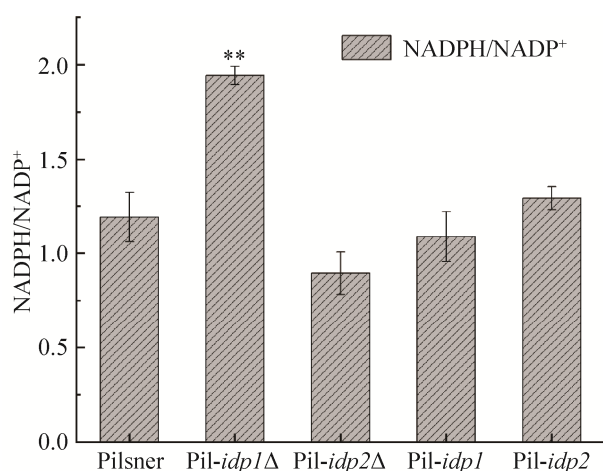


图 5 发酵结束时出发菌株与重组菌株的 NADPH/NADP⁺ 比值

Figure 5 NADPH/NADP⁺ ratio of original strain and recombinant strains at the end of fermentation. Statistical significance was determined by SPSS; **: $P < 0.01$.

母胞内的 ROS 含量, 结果如图 6 所示。发酵结束时, 出发菌株 Pilsner 胞内 ROS 含量为 1 292 RFU, *Pil-idp1Δ* 胞内 ROS 含量为 1 163 RFU, 是所有菌株中最低。而 *Pil-idp2Δ* 胞内 ROS 含量显著升高为 1 645 RFU; *Pil-idp1* 胞内 ROS 含量为 1 476 RFU, *Pil-idp2* 为 1 266 RFU。菌株中累积的 ROS 加速了酵母的衰老, 可能引发酵母的快速自溶。*Pil-idp1Δ* 在发酵结束时的抗自溶指数最高, *Pil-idp2Δ* 的抗自溶指数最低, 较低的胞内 ROS 积累可能是酵母提高抗自溶能力的原因。

2.5.3 基因调控对胞内 ATP 水平的影响

ATP 是细胞基本的能量来源, 主要由线粒体呼吸作用产生, ATP 水平的高低间接反映了酵母细胞的活力^[15-16]。检测各酵母菌株的 ATP 水平(图 7), 结果发现, 发酵结束时 Pilsner 的 ATP 水平为 2 506 RFU, *Pil-idp1Δ* 的 ATP 水平为 4 477 RFU, 是 Pilsner 的 1.79 倍。*Pil-idp2Δ* 的 ATP 水平为 2 320 RFU, 较 Pilsner 有所下降。*Pil-idp1* 的 ATP 水平与 Pilsner 接近, *Pil-idp2* 的

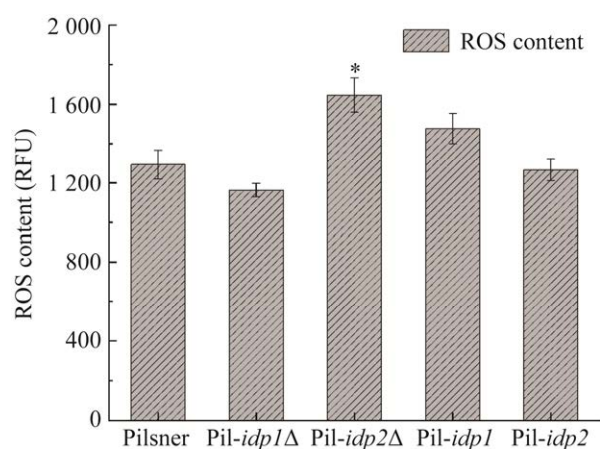


图 6 发酵结束时出发菌株与重组菌株的胞内 ROS 含量

Figure 6 Intracellular ROS content of original strain and recombinant strains at the end of fermentation. Statistical significance was determined by SPSS; *: $P < 0.05$.

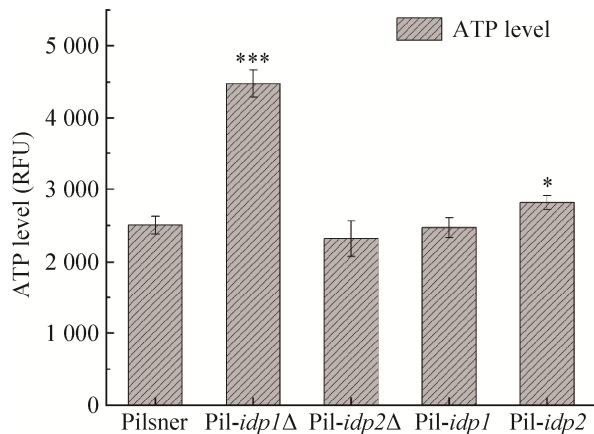


图 7 发酵结束时出发菌株与重组菌株的胞内 ATP 水平

Figure 7 Intracellular ATP level of original strain and recombinant strains at the end of fermentation. Statistical significance was determined by SPSS; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

ATP 水平略高于 Pilsner (2 816 RFU)。IDP2 基因的过表达对生物合成和 NADPH 的合成代谢有利，此时细胞能量较为充足，因此 Pil-*idp2* 的 ATP 水平比 Pilsner 高。高 ATP 水平为酵母细胞提供了较高的活力，为其在自溶过程中抵御恶劣环境提供了保障，提高其抗自溶能力。

3 讨论

柠檬酸循环负责酵母的有氧呼吸，是各种生理活动的基础。前期研究发现，啤酒酵母的柠檬酸循环相关基因 *ACO1*、*IDP1*、*IDP2*、*ACH1* 在自溶过程中表达量有明显差异，这些基因与酵母衰老及时序寿命有重要联系^[17]。自溶是伴随酵母衰老发生的生理现象，影响酵母的活力及发酵性能。啤酒酵母是啤酒酿造的核心微生物，其生理代谢影响发酵过程，衰老及自溶的发生可能导致啤酒质量的下降和风味的异常。柠檬酸循环的关键酶，NADPH 依赖型异柠檬酸脱氢酶 IDP1 和 IDP2 参与多种生物合成过程，在酵母抗衰老和应对氧化损伤中必不可少^[18]。

拉格酵母 Pilsner 是工业啤酒酿造中常用的菌种，为 II 型三倍体菌株。文献报道拉格酵母分为 I 型与 II 型，I 型酵母通常为三倍体菌株，而 II 型酵母通常为四倍体菌株^[19]。本研究发现 Pilsner 与报道不符，可能是长期使用和保藏过程中的基因水平转移等原因使其分型及倍性发生变化。本文以拉格酵母 Pilsner 为研究对象，研究异柠檬酸脱氢酶编码基因 *IDP1* 和 *IDP2* 与酵母自溶之间的关系。NADPH 对酵母细胞的生长和维持细胞活力十分重要，在氨基酸、脂肪酸、固醇类及脱氧核糖核苷酸的合成过程中提供负氢离子供体^[18,20]，为硫氧还蛋白和谷胱甘肽抗氧化系统提供还原力^[21]，帮助维持细胞内的氧化还原稳态，对酵母的时序寿命有重要贡献^[22]。

研究发现，线粒体内的异柠檬酸通过 *IDP1*、*IDH1* 等基因编码的酶转变为 α -酮戊二酸，*IDP1* 基因的破坏导致线粒体内异柠檬酸的累积，此时异柠檬酸被转运到线粒体外，由 *IDP2* 基因编码的异柠檬酸脱氢酶负责分解为 α -酮戊二酸^[23]。Pil-*idp1*Δ 中 *IDP2* 基因的表达量上调，*IDP2* 基因的过量表达提高胞质 NADPH 的含量，能够特异性地增强硫醇依赖性抗氧化系统的活性，增强酵母的抗氧化能力^[24]。同时，破坏 *IDP1* 基因可能对磷酸戊糖途径产生调控作用^[25]，磷酸戊糖途径与 NADPH 依赖型异柠檬酸脱氢酶共同承担细胞内 NADPH 的供应。有文献报道磷酸戊糖途径与异柠檬酸脱氢酶之间存在一种相互补偿的机制^[26]，*IDP1* 基因的缺失会进一步激活磷酸戊糖途径，通过 *ZWF1* 基因编码的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶促进 NADPH 的再生，使细胞内的谷胱甘肽维持在还原状态，这有利于细胞应对各类胁迫压力带来的应激反应，这可能是 *IDP1* 破坏使重组菌株抗自溶能力提高的原因。*IDP2* 编码的异柠檬酸脱氢酶负责

细胞质中大分子合成时将异柠檬酸转变为 α -酮戊二酸的这一步骤。该酶的失活使这步反应无法顺利进行, NADPH 也不能随此反应产生。Pil-*idp2* Δ 中由于基因功能的破坏, 导致胞内 ROS 含量升高, 使酵母的抗氧化能力下降, 出现氧化应激反应^[24]。前期研究发现啤酒酵母的自溶与其自身的生理活性有较大的相关性^[27-28], *IDP1* 与 *IDP2* 基因的调控改变了酵母的生理活性, 使其对氧化应激做出应答, 导致其抗自溶能力发生相应的改变。本研究中过表达 *IDP1* 与 *IDP2* 基因后两个基因的表达量提高水平不高, 因此对胞内的 NADPH/NADP⁺ 的影响并不显著, 可能是其抗自溶能力与原始菌株区别不大的原因。

线粒体是能量代谢的场所, 为细胞提供 ATP 的同时也产生 ROS。发酵结束后细胞内 ATP 和 ROS 的含量体现线粒体活力和酵母的生理状态, 继而影响细胞的抗自溶能力^[8]。胞内 ROS 低、ATP 水平高的酵母能更好地抵御环境胁迫。ROS 的累积会引发 DNA 损伤及蛋白质、脂类的破坏, 造成酵母的提前衰老和凋亡^[29], ROS 的减少可以延长酵母的时序寿命^[30]。本研究与原始菌株 Pilsner 相比, *IDP1* 基因破坏的酵母胞内 ROS 含量低、ATP 水平高, 其抗自溶能力较 Pilsner 高, 说明了发酵结束时 Pil-*idp1* Δ 胞内氧化应激反应不剧烈, 细胞没有提前老化或代谢紊乱, 在自溶过程中能够维持较高的活力、更缓慢的衰老速度和更强的抗胁迫能力^[31]。*IDP2* 基因的破坏导致胞内 ROS 含量的累积, 发酵结束时胞内 ROS 的稳态难以维系, 因此在自溶过程中氧化损伤严重, 其抗自溶能力也相应降低^[32]。

本研究在拉格啤酒酵母中探究了 NADPH 依赖型异柠檬酸脱氢酶与酵母自溶之间的关系, 进一步理解能量代谢对酵母自溶的影响。

研究发现, 与出发菌株相比, 异柠檬酸脱氢酶 *IDP1* 基因的破坏显著提高酵母的抗自溶能力, 自溶 96 h 后死亡率为 19%, 是 Pilsner 的 63%, 抗自溶指数为 8.40, 比 Pilsner 提高了 1.5 倍。*IDP1* 基因的破坏使 NADPH 的合成得到强化, NADPH/NADP⁺ 的比值相比 Pilsner 提高 1.6 倍, 胞内 ROS 积累降低了 10%, ATP 含量提高了 79%。*IDP2* 基因的破坏使细胞快速自溶, 96 h 后死亡率为 44%, 比 Pilsner 高 46%, 抗自溶指数为 4.03, 是 Pilsner 的 70%。*IDP2* 基因的破坏减少了 NADPH 的产生, 造成 ROS 的累积, ATP 水平的下降。2 个基因的表达并没有对酵母的抗自溶性能造成过多的影响。研究结果显示异柠檬酸脱氢酶编码基因的调控影响了拉格啤酒酵母的抗自溶能力, 为酵母自溶能力的全局调控提供依据。

REFERENCES

- [1] 王金晶, 李梦琦, 侯丹, 许维娜, 郑飞云, 刘春风, 钮成拓, 李崎. Lager 啤酒酵母 *RLM1* 基因调控对其抗自溶性能的影响[J]. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1059-1070.
WANG JJ, LI MQ, HOU D, XU WN, ZHENG FY, LIU CF, NIU CT, LI Q. Regulations of *RLM1* gene affect the anti-autolytic ability of lager yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(6): 1059-1070 (in Chinese).
- [2] GIBSON BR, LAWRENCE SJ, LECLAIRE JPR, POWELL CD, SMART KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(5): 535-569.
- [3] WANG JJ, LI MQ, ZHENG FY, NIU CT, LIU CF, LI Q, SUN JY. Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(9): 137.
- [4] RIES LNA, JOSÉ de ASSIS L, RODRIGUES FJS, CALDANA C, ROCHA MC, MALAVAZI I, BAYRAM Ö, GOLDMAN GH. The *Aspergillus nidulans* pyruvate dehydrogenase kinases are essential to integrate carbon source metabolism[J]. G3 Genes|Genomes|Genetics, 2018, 8(7): 2445-2463.

- [5] WANG JJ, FU XR, LI MQ, ZHENG FY, NIU CT, LIU CF, LI Q. Metabolic energy variation of yeast affects its antioxidant properties in beer brewing[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2021, 1(3): 311-322.
- [6] MINARD KI, MCALISTER-HENN L. Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31(6): 832-843.
- [7] CONTRERAS-SHANNON V, LIN AP, McCAMMON MT, MCALISTER-HENN L. Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(6): 4469-4475.
- [8] PREISS R, TYRAWA C, van der MERWE G. Autophagy gene overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* perturbs subcellular organellar function and accumulates ROS to accelerate cell death with relevance to sparkling wine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(19): 8447-8464.
- [9] FLECK CB, BROCK M. Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification[J]. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 2009, 46(6/7): 473-485.
- [10] GUIROLA M, JIMÉNEZ-MARTÍ E, ATRIAN S. On the molecular relationships between high-zinc tolerance and aconitase (Aco1) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metallomics*, 2014, 6(3): 634-645.
- [11] EISENBERG T, SCHROEDER S, ANDRYUSHKOVA A, PENDL T, KÜTTNER V, BHUKEL A, MARIÑO G, PIETROCOLA F, HARGER A, ZIMMERMANN A, MOUSTAFA T, SPRENGER A, JANY E, BÜTTNER S, CARMONA-GUTIERREZ D, RUCKENSTUHL C, RING J, REICHELT W, SCHIMMEL K, LEEB T, et al. Nucleocytoplasmic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme a stimulates autophagy and prolongs lifespan[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(3): 431-444.
- [12] 李梦琦. 啤酒酵母抗氧化基因的挖掘[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020.
- LI MQ. Mining antioxidant genes in lager yeast[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [13] 许维娜, 王金晶, 陈希, 李崎. 啤酒酵母自溶液中的物质变化及酵母自溶评价指标探索[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(6): 574-580.
- XU WN, WANG JJ, CHEN X, LI Q. Changes in autolysis solution of brewer's yeasts and the evaluation of autolysis[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(6): 574-580 (in Chinese).
- [14] XU WN, WANG JJ, LI Q. Microarray studies on lager brewer's yeasts reveal cell status in the process of autolysis[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(5): 714-728.
- [15] SONG SB, HWANG ES. High levels of ROS impair lysosomal acidity and autophagy flux in glucose-deprived fibroblasts by activating ATM and erk pathways[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 761.
- [16] LA AL, DU H, TAIDI B, PERRÉ P. A predictive dynamic yeast model based on component, energy, and electron carrier balances[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(9): 2728-2740.
- [17] WAUTERS R, BRITTON SJ, VERSTREPEN KJ. Old yeasts, young beer-The industrial relevance of yeast chronological life span[J]. *Yeast (Chichester, England)*, 2021, 38(6): 339-351.
- [18] MOHAMMAD K, DAKIK P, MEDKOUR Y, McAULEY M, MITROFANOVA D, TITORENKO VI. Some metabolites act as second messengers in yeast chronological aging[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 860.
- [19] WENDLAND J. Lager yeast comes of age[J]. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(10): 1256-1265.
- [20] CHO HJ, CHO HY, PARK JW, KWON OS, LEE HS, HUH TL, KANG BS. NADP⁺-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase provides NADPH in the presence of cadmium due to the moderate chelating effect of glutathione[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018, 23(6): 849-860.
- [21] HORN T, BETTRAY W, SLUSARENKO AJ, GRUHLKE MCH. S-allylmercaptogluthione is a substrate for glutathione reductase (E.C. 1.8.1.7) from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2018, 7(7): 86.
- [22] ISAKOVA EP, MATUSHKINA IN, POPOVA TN, DERGACHEVA DI, GESSLER NN, KLEIN OI, SEMENIKHINA AV, DERYABINA YI, la PORTA N, SARIS NE L. Metabolic remodeling during long-lasting cultivation of the *Endomyces magnusii* yeast on oxidative and fermentative substrates[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 91.
- [23] YANG L, CLUETT WR, MAHADEVAN R. EMILiO:

- a fast algorithm for genome-scale strain design[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(3): 272-281.
- [24] CONTRERAS-SHANNON V, MCALISTER-HENN L. Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 423(2): 235-246.
- [25] RAAB AM, GEBHARDT G, BOLOTINA N, WEUSTER-BOTZ D, LANG C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(6): 518-525.
- [26] PARTOW S, HYLAND PB, MAHADEVAN R. Synthetic rescue couples NADPH generation to metabolite overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 43: 64-70.
- [27] 丁华建, 段鸿绪, 王金晶, 李崎, 李永仙, 郑飞云, 刘春风, 钮成拓. 两株 lager 啤酒酵母在传代及自溶过程中生理性能差异的比较[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 57-64.
- DING HJ, DUAN HX, WANG JJ, LI Q, LI YX, ZHENG FY, LIU CF, NIU CT. Comparison of physiological performance differences between two lager yeasts during serial re-pitching and autolysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(10): 57-64 (in Chinese).
- [28] WANG JJ, DING HJ, ZHENG FY, LI YX, LIU CF, NIU CT, LI Q. Physiological changes of beer brewer's yeast during serial beer fermentation[J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2019, 77(1): 10-20.
- [29] YANG SS, LIAN GJ. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2020, 467(1): 1-12.
- [30] THOMAS VC, KINKEAD LC, JANSSEN A, SCHAEFFER CR, WOODS KM, LINDGREN JK, PEASTER JM, CHAUDHARI SS, SADYKOV M, JONES J, ABDEL GHANI SM, ZIMMERMAN MC, BAYLES KW, SOMERVILLE GA, FEY PD. A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during β -lactam stress[J]. *mBio*, 2013, 4(4): e00437-e00413.
- [31] DAHIYA R, MOHAMMAD T, ALAJMI MF, REHMAN MT, HASAN GM, HUSSAIN A, HASSAN MI. Insights into the conserved regulatory mechanisms of human and yeast aging[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 882.
- [32] GIANCASPERO TA, DIPALO E, MICCOLIS A, BOLES E, CASELLE M, BARILE M. Alteration of ROS homeostasis and decreased lifespan in *S. cerevisiae* elicited by deletion of the mitochondrial translocator FLX1[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 101286.

(本文责编 郝丽芳)