

• 食品生物技术 •

线粒体自噬基因对酿酒酵母抗氧化性能的影响

程万琪^{1,2}, 侯骞尧^{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

程万琪, 侯骞尧, 刘春风, 钮成拓, 郑飞云, 李崎, 王金晶. 线粒体自噬基因对酿酒酵母抗氧化性能的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3464-3480.

CHENG Wanqi, HOU Qianqiao, LIU Chunfeng, NIU Chengtuo, ZHENG Feiyun, LI Qi, WANG Jinjing. Effect of mitophagy related genes on the antioxidant properties of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3464-3480.

摘要: 线粒体自噬是指细胞通过自噬的机制选择性地清除线粒体的过程, 对维持细胞内稳态具有重要作用。为探究线粒体自噬基因对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞抗氧化性能的影响, 本研究分别构建了线粒体自噬相关基因 *ATG8*、*ATG11*、*ATG32* 的缺失和过表达菌株, 发现在过氧化氢(H_2O_2)胁迫 6 h 后, 过表达 *ATG8*、*ATG11* 基因显著降低了细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, 分别仅为初始状态的 61.23%和 46.35%, 并显著提高了菌株线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)含量, 有助于提高菌株的抗氧化性能。另一方面, 基因 *ATG8*、*ATG11*、*ATG32* 的缺失会导致线粒体损伤及细胞活力显著下降, 同时造成胞内 ROS 失衡, H_2O_2 胁迫 6 h 后, 其胞内 ROS 含量显著升高至初始状态的 174.27%、128.68%和 200.92%。结果表明, *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 可能是调控酵母抗氧化能力的潜在靶点。本研究为进一步研究通过调节线粒体自噬提高酵母抗氧化活性提供了新的线索。

关键词: 线粒体自噬; *ATG* 基因; 氧化应激; 抗氧化性能

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: 2022-10-27; Accepted: 2023-02-27

Effect of mitophagy related genes on the antioxidant properties of *Saccharomyces cerevisiae*

CHENG Wanqi^{1,2}, HOU Qian Yao^{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: Mitophagy is a process whereby cells selectively remove mitochondria through the mechanism of autophagy, which plays an important role in maintaining cellular homeostasis. In order to explore the effect of mitophagy genes on the antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae*, mutants with deletion or overexpression of mitophagy genes *ATG8*, *ATG11* and *ATG32* were constructed respectively. The results indicated that overexpression of *ATG8* and *ATG11* genes significantly reduced the intracellular reactive oxygen species (ROS) content upon H₂O₂ stress for 6 h, which were 61.23% and 46.35% of the initial state, respectively. Notable, overexpression of *ATG8* and *ATG11* genes significantly increased the mitochondrial membrane potential (MMP) and ATP content, which were helpful to improve the antioxidant activities of the strains. On the other hand, deletion of *ATG8*, *ATG11* and *ATG32* caused mitochondrial damage and significantly decreased cell vitality, and caused the imbalance of intracellular ROS. The intracellular ROS content significantly increased to 174.27%, 128.68%, 200.92% of the initial state, respectively, upon H₂O₂ stress for 6 h. The results showed that *ATG8*, *ATG11* and *ATG32* might be potential targets for regulating the antioxidant properties of yeast, providing a new clue for further research.

Keywords: mitophagy; *ATG* genes; oxidative stress; antioxidant properties

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是迄今为止被研究最透彻的真核单细胞微生物^[1]。从传统的酿造行业到应用目前先进的基因编辑技术进行各种生物制品的改造和发酵,酿酒酵母都发挥着不可替代的作用^[2]。在发酵过程中酿酒酵母受到多重压力,包括高渗透压、氧化压力、营养缺陷等^[3-5]。发酵过程中的氧化胁迫会影响酿酒酵母自身代谢活性,减缓发酵速率,加快酵母的衰老与自溶,从而影响发酵产物的质量及风味。

在真核生物中,线粒体作为细胞代谢的中心,通过氧化磷酸化为细胞提供能量^[6];另一

方面,线粒体是活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源。代谢过程中 ROS 的积累会导致线粒体损伤^[7-8],然而受损的线粒体会产生更多的 ROS,破坏线粒体网络,损害胞内氧化还原平衡,造成恶性循环。为维持细胞的正常状态、防止线粒体功能障碍,细胞会选择性清除受损或老化的线粒体,这一过程被称为线粒体自噬^[9]。

氧化应激是参与诱导线粒体自噬的一个关键因素^[10]。在酵母细胞中,Atg32 被确定为线粒体自噬不可缺少的受体蛋白,定位于线粒体外膜^[11]。线粒体自噬被诱导后,Atg32 能够与

Atg11 相互作用^[12]。Atg11 是参与细胞自噬的一个关键蛋白。随后它们一起与 Atg8 相互作用, 将线粒体输送到至自噬体前结构/吞噬体组装点(phagophore assembly site, PAS), 并形成自噬体。携带线粒体的自噬体最终与囊泡融合, 完成线粒体降解^[13-14]。相关研究表明, 添加抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸可抑制酵母线粒体自噬并降低 *ATG32* 的表达^[11]。另有研究报道, 热应激期间 *ATG32* 基因是酵母维持细胞呼吸及细胞活力所必需的, 同时该研究揭示了 *ATG32* 介导的线粒体自噬能够促进抗氧化物质-亚精胺的生成^[15-16]。平衡 ROS 的产生和消除是酵母细胞在发酵过程中应对各种压力的关键因素之一。研究表明, 能量代谢的波动引起 ROS 水平的波动。额外的 ROS 会造成细胞内的伤害, 导致酵母的老化、自溶和细胞活力的不可逆下降^[17-18]。

前期组学研究显示, 线粒体自噬相关基因具有调节酵母氧化应激反应的功能。过氧化氢 (H_2O_2) 是生物化学领域常用的氧化剂之一, 其

能透过细胞膜, 在胞内分解生成反应活性较高的 ROS, 诱导细胞发生氧化应激反应^[19]。本研究以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) W303 为研究对象, 通过调控线粒体自噬基因 *ATG8*、*ATG11*、*ATG32* 的表达, 讨论线粒体自噬对细胞 H_2O_2 耐受性、ROS 稳态、线粒体及细胞活力等性能的影响, 为进一步选育具有优良抗氧化性能的酵母菌株提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和培养基

本研究所用质粒和菌株如表 1 所示。

LB 培养基(g/L): 氯化钠 10, 酵母粉 5, 胰蛋白胨 10; 固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉; 抗性筛选培养基添加氨苄青霉素至终浓度为 100 mg/L。

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

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Plasmid	Description	Resource
YEp352-PAK ^[20]	A multicopy episomal plasmid	Stored in author's lab
p-CRISPR	A multicopy episomal plasmid	Stored in author's lab
YEp352-PAK- <i>ATG8</i>	Native <i>ATG8</i> with PGK1p and ADH1t expressed in YEp352-PAK	This study
YEp352-PAK- <i>ATG11</i>	Native <i>ATG11</i> with PGK1p and ADH1t expressed in YEp352-PAK	This study
YEp352-PAK- <i>ATG32</i>	Native <i>ATG32</i> with PGK1p and ADH1t expressed in YEp352-PAK	This study
p-CRISPR- <i>atg8</i>	<i>ATG8</i> specific sgRNA sequence expressed in p-CRISPR	This study
p-CRISPR- <i>atg11</i>	<i>ATG11</i> specific sgRNA sequence expressed in p-CRISPR	This study
p-CRISPR- <i>atg32</i>	<i>ATG32</i> specific sgRNA sequence expressed in p-CRISPR	This study
Strain		
<i>S. cerevisiae</i> W303	MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 leu2-112 can1-100(ATCC)	Stored in author's lab
<i>Escherichia coli</i> BL21		
W-O- <i>atg8</i>	W303 transformed with YEp352-PAK- <i>ATG8</i>	This study
W-O- <i>atg11</i>	W303 transformed with YEp352-PAK- <i>ATG11</i>	This study
W-O- <i>atg32</i>	W303 transformed with YEp352-PAK- <i>ATG32</i>	This study
W- <i>atg8</i> Δ	W303 transformed with p-CRISPR- <i>ATG8</i>	This study
W- <i>atg11</i> Δ	W303 transformed with p-CRISPR- <i>ATG11</i>	This study
W- <i>atg32</i> Δ	W303 transformed with p-CRISPR- <i>ATG32</i>	This study

1.1.2 实验试剂

葡萄糖、琼脂粉、氯化钠、氯化钾、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠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 试剂盒购于宝日医生物技术(北京)有限公司。线粒体膜电位检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。ATP 检测试剂盒购于 Promega 公司。

磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS): 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, Bio-Rad 公司; SW-CJ-1C μ 双人单面净化工作台, 苏州净化有限公司; QYC2012 恒温摇床, 太仓市强乐实验设备有限公司; SPX-250 生化培养箱, 上海跃进医疗器械厂; 超声破碎仪, Sonics 公司; 化学发光酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; Bio-Tek 多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司; NanoDrop 分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 重组菌株的构建

1.3.1 敲除菌株的构建

参照李梦琦等^[21]的研究方法, 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建酵母基因缺失菌株。所用引物如表 2 所示。以 p-CRISPR 质粒为模板, 第一对引物 NC-TY-F、C-目的基因-R,

扩增质粒中 CRISPR-F 片段, 长度约为 6 100 bp, 第二对引物 NC-TY-R、C-目的基因-F, 扩增质粒中 CRISPR-R 片段, 长度约为 4 500 bp。其中, C-目的基因-F、C-目的基因-R 引物携带目的基因相应的 sgRNA。随后将 CRISPR-F、CRISPR-R 片段, 使用 Gibson 连接酶连接, 所得产物转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 感受态, 并涂布至含有 200 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基中过夜筛选转化子。随后, 使用质粒抽提试剂盒提取转化子的质粒, 并使用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切验证(sgRNA 设计参考网站: <https://chopchop.cbu.uib.no/>)。

修复片段构建: 如图 1 所示, 以酵母 W303 基因组为模板, 分别以目的基因-Donor-F1 和目的基因-Donor-R1, 目的基因-Donor-F2 和目的基因-Donor-R2 为引物, PCR 扩增得到与目的基因编码序列前后分别同源的 500 bp 大小的 DNA 片段 Donor1 和 Donor2; 纯化后, 取等量的 PCR 产物为模板, 目的基因-Donor-F1 和目的基因-Donor-R2 为引物, 进行重叠延伸 PCR, 产物为包含目的基因编码序列前后约 1 000 bp 同源臂的修复模板^[22]。

采用电击转化法, 将验证成功的质粒及相应修复片段转入 W303 酵母感受态后, 涂布至含有 200 mg/L G418 的 YPD 平板上, 28 °C 培养 2-3 d, 挑取转化子以目的基因-Donor-F1 和目的基因-Donor-R2 为引物, 进行菌落 PCR 验证目的基因是否敲除成功。

1.3.2 过表达菌株的构建

根据 NCBI 数据库中酿酒酵母 S288c 的 *ATG8*、*ATG11*、*ATG32* 基因序列设计引物(表 2)并在两端添加 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点。使用文献[20,23]改造过的质粒 YEp352, 将 *KanMX* 基因片段插入质粒 YEp352, 命名为 YEp352-PAK, 因此含有该质粒的大肠杆菌和酵母分别具有卡

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
atg8-sgRNA	ACCGTAGGGCAATTTGTTTATG	22
atg11-sgRNA	GGGTCTATTGCCTTGAAAAGTG	22
atg32-sgRNA	TTACAAAGCCCATTTCTCGTTT	22
C-atg8-F	CATAAACAAATTGCCCTACGGT GACGAGCTTACTCGTTTCGTCC	44
C-atg8-R	ACCGTAGGGCAATTTGTTTATGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGC	57
C-atg11-F	CACTTTTCAAGGCAATAGACCCGACGAGCTTACTCGTTTCGTCC	44
C-atg11-R	GGGTCTATTGCCTTGAAAAGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGC	57
C-atg32-F	AAACGAGAAATGGGCTTGTAAAGACGAGCTTACTCGTTTCGTCC	44
C-atg32-R	TTACAAAGCCCATTTCTCGTTTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGC	57
atg8-D-F1	GGAGGTTGCCGGTATTGAACTGG	23
atg8-D-R1	CTGGAACAATAGATGGCTAATGAGTCCCCGGCCTCCGGGTGATGATATATC	51
atg8-D-F2	GATATATCATCACCCGGAGGCCGGGACTCATTAGCCATCTATTGTTCCAG	51
atg8-D-R2	CACGAATGGTACAAATCGGACAGG	24
atg11-D-F1	CCTTTTATGTGGCCAGCCGG	20
atg11-D-R1	GTGGCTCATCAGGTAATAATGCCGGTACTCAAATAAGGGCATCGC	44
atg11-D-F2	GCGATGCCCTTATTTGAGTACCGGCATTTTACCTGATGAGCCAC	44
atg11-D-R2	GCGGCCCTGGGGATCCTAATATTG	24
atg32-D-F1	CCTTTACCGCGGGCTGAAAAG	20
atg32-D-R1	CCAAACGGGGAATATAGATACGCGCCTCAGGAAGCTTACTGCACC	45
atg32-D-F2	GGTGCAGTAAGCTTCCTGAGGCGCGTATCTATATTCCCCGTTTGG	45
atg32-D-R2	CAGTGAGCCCAAAGCCAC	18
atg8-O-F	CTAGCTAGCTAGATGAAGTCTACATTTAAGTCTGAATATCCATTTG	46
atg8-O-R	CCGCTCGAGCGGCTACCTGCCAAATGTATTTTCTCCTGAG	40
atg11-O-F	CTAGCTAGCTAGATGGCAGACGCTGATGAATATAGCAC	38
atg11-O-R	CCGCTCGAGCGGTCAAACCTCCCTGGTATGAAACCACAACC	40
atg32-O-F	CTAGCTAGCTAGATGGTTTTGGAATACCAACAAAGGGAAGG	41
atg32-O-R	CCGCTCGAGCGGTTACAATAGAATATAACCCAGTGCCAAAATCCGAT	47
KanMx-F	CCTCACAGACGCGTTGAATTG	21
KanMx-R	GTTCAACAGGCCAGCCATTAC	21

那霉素抗性和 G418 抗性。YEp352-PAK 质粒同样含有 *AmpR* 基因片段, 因此导入该质粒可以使大肠杆菌具有氨基霉素抗性。带有靶位点的基因片段与 YEp352-PAK 质粒分别双酶切。产物纯化后, 使用 T4 DNA 连接酶将质粒载体与片段连接, 所得产物转化入 *E. coli* BL21 感受态中, 并涂布至含有 200 mg/L 氨基霉素的 LB 固

体培养基中过夜并筛选转化子。随后, 提取转化子所携带的质粒, 并使用 *Nhe* I 和 *Xho* I 进行双酶切验证。采用电击转化法将验证成功的质粒转入 W303 感受态后, 涂布至含有 200 mg/L G418 的 YPD 平板上, 28 °C 培养 2–3 d 后挑取阳性转化子, 使用 KanMx-F、KanMx-R 引物进行菌落 PCR 验证^[23]。

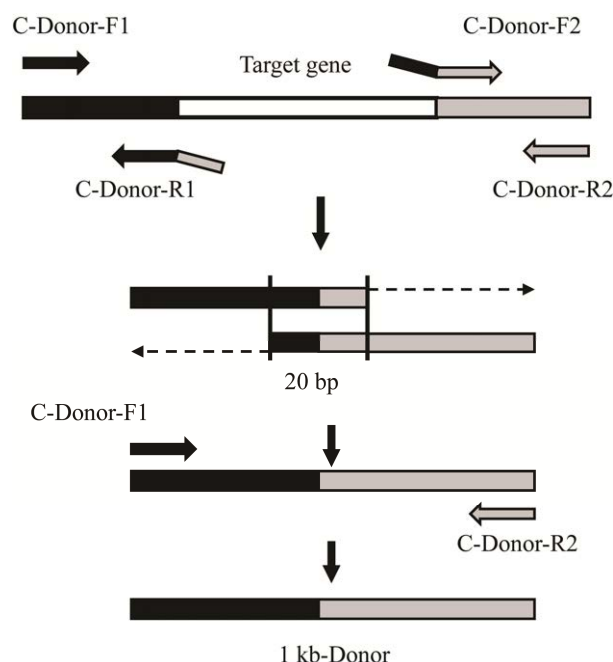


图 1 基因修复模板构建流程图

Figure 1 A schematic flowchart for constructing the gene donor.

1.4 基因表达量的测定

通过定量实时 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析确定目的基因的相对表达水平。酵母细胞在 YPD 液体培养基中培养至对数期, 使用离心柱酵母总 RNA 纯化试剂提取总 RNA 并逆转录为 cDNA。参考 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒说明书, 以酵母细胞 cDNA 为模板, *ACT1* 基因的表达作为参考, 按照计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值的方法一式 3 份测定每个目的基因的相对表达水平^[24]。

1.5 酵母抗氧化性能测定

1.5.1 抗 H_2O_2 胁迫能力分析

从固体培养基中挑取酵母单菌落于 40 mL YPD 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养至稳定期, 以 1×10^7 CFU/mL 接种量分别接种至添加 0、2、4、6 mmol/L H_2O_2 的 100 mL YPD 培养基, 28 °C、180 r/min 培养, 前 12 h 内每 4 h 取样一次, 后 12 h 内每隔 2 h 取样一次, 直至菌株生长至稳

定期, 每次取样 200 μ L, 在波长为 600 nm 处测定吸光度^[18]。

1.5.2 胞内 ROS 含量测定

从固体培养基中挑取一环酵母单菌落于 40 mL YPD 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜, 以 1% 的接种量接种至 100 mL YPD 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养至稳定期。随后在 1 mL (1×10^7 CFU/mL) 酵母菌液中加入 2 μ L 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2',7'-dichlorofluorescent yellow diacetate, DCFH-DA), 28 °C 避光反应 30 min。反应结束后用 PBS 缓冲液洗涤细胞除去未结合的探针。Bio-Tektronix 多功能酶标仪检测荧光强度 (测试条件: $\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=525$ nm)。

1.5.3 线粒体膜电位测定

取 0.5 mL 细胞样品, 用 PBS 洗涤 2 次后用无菌 YPD 液体培养基调整菌体浓度为 5×10^6 CFU/mL。随后在 0.5 mL 酵母菌液中加入 0.5 mL JC-1 染色液, 37 °C 避光反应 20 min。反应结束后用 JC-1 缓冲液洗涤细胞 2 次以除去未结合的探针, 随后加入 0.5 mL JC-1 缓冲液重悬。测试条件: $\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=590$ nm。

1.5.4 ATP 含量测定

检测方法参考文献^[17]所述。

2 结果与分析

2.1 线粒体自噬基因重组菌株的构建

以酿酒酵母 W303 基因组为模板, 根据图 1 所示流程构建 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因修复片段, 采用重叠延伸 PCR 方法, 将目的基因对应的 Donor1、Donor2 片段连接。随后将修复片段及携带特异性 sgRNA 的 p-CRISPR 质粒转入 W303 感受态中, 筛选阳性转化子进行 PCR 验证。如图 2A 所示, 修复片段成功替换了目的基因片段, *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因已经被成功破坏。基因缺失菌株命名为 W-*atg8* Δ 、W-*atg11* Δ 和 W-*atg32* Δ 。

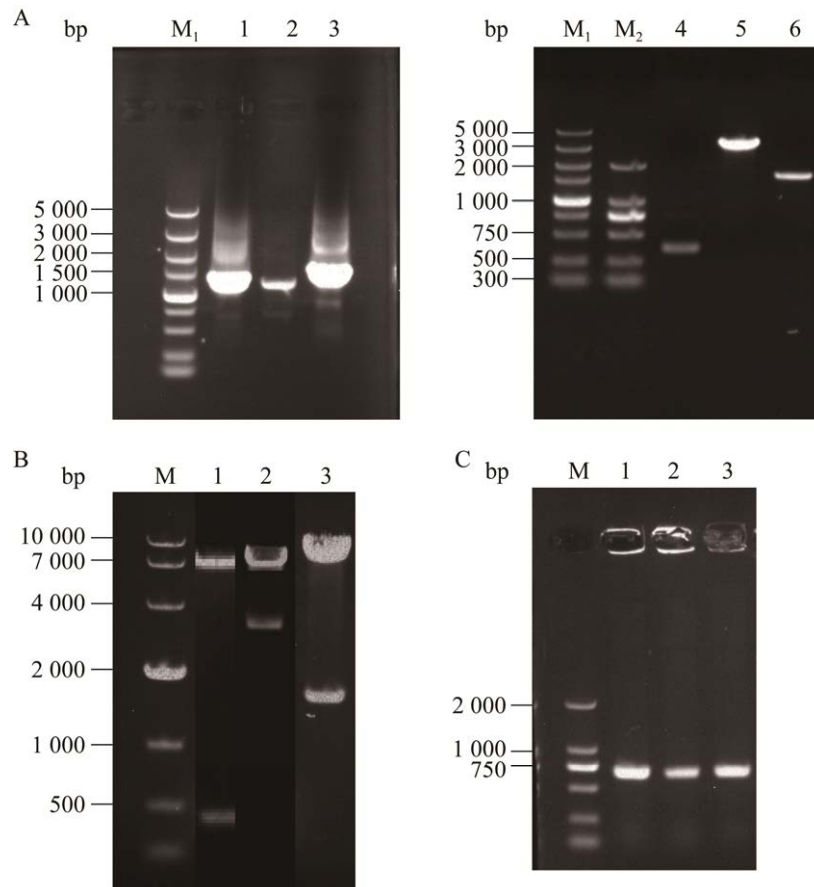


图2 菌株 *W-atg8Δ*、*W-atg11Δ* 和 *W-atg32Δ* 菌落 PCR 验证(A), 过表达质粒双酶切验证(B), 以及菌株 *W-O-atg8*、*W-O-atg11* 和 *W-O-atg32* 菌落 PCR 验证(C)

Figure 2 PCR verification of the mutant *W-atg8Δ*, *W-atg11Δ* and *W-atg32Δ* (A), double enzyme digestion of overexpression plasmid (B), and mutant *W-O-atg8*, *W-O-atg11* and *W-O-atg32* (C). A: Lane M₁: DNA marker DL5000; Lane M₂: DNA marker DL2000; Lane 1: Primer pair *atg8-D-F1/atg8-D-R2*, 1 298 bp (*W-atg8Δ*); Lane 2: Primer pair *atg11-D-F1/atg11-D-R2*, 1 209 bp (*W-atg11Δ*); Lane 3: Primer pair *atg32-D-F1/atg32-D-R2*, 1 465 bp (*W-atg32Δ*); Lane 4: Template W303, primer pair *atg8-O-F/atg8-O-R*, 354 bp; Lane 5: Template W303, primer pair *atg11-O-F/atg11-O-R*, 3 537 bp; Lane 6: Template W303, primer pair *atg32-O-F/atg32-O-R*, 1 590 bp. B: Lane M: DNA marker DL10000; Lane 1: 354 bp (*ATG8*) and 7 750 bp (YEp352); Lane 2: 3 537 bp (*ATG11*) and 7 750 bp (YEp352); Lane 3: 1 590 bp (*ATG32*) and 7 750 bp (YEp352). C: Lane M: DNA marker DL2000; Lane 1: Primer pair *KanMx-F/KanMx-R*, 750 bp (*W-O-atg8*); Lane 2: *KanMx-F/KanMx-R*, 750 bp (*W-O-atg11*); Lane 3: Primer pair *KanMx-F/KanMx-R*, 750 bp (*W-O-atg32*).

从 W303 基因组上扩增获得目的基因片段, 与酵母表达载体 YEp352-PAK 连接得到目的基因的过表达质粒。过表达质粒 YEp352-PAK-*ATG8*、YEp352-PAK-*ATG11* 和 YEp352-PAK-*ATG32* 使用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 进行双酶切验证, 结果如图 2B 所示。构建成功的质粒

经酶切后应显示为两个条带, 一条为线性化的质粒载体骨架, 长度约为 7 750 bp, 另一条为带有酶切位点的目的基因片段。将验证成功的质粒转化入 W303 感受态细胞, 筛选阳性转化子, 进行 PCR 验证。如图 2C 所示, *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的过表达质粒成功导入酵母细

胞。过表达菌株命名为 W-O-*atg8*、W-O-*atg11* 和 W-O-*atg32*。

2.2 重组菌株抗氧化胁迫能力分析

H_2O_2 是生物化学领域常用的氧化剂之一。经 H_2O_2 刺激后, 酵母会利用自身抗氧化系统调整胞内氧化还原状态以耐受一定浓度的 H_2O_2 。因此, 为了解线粒体自噬基因对重组菌株抗氧化性能的影响, 对比了出发菌株和重组菌株对不同浓度 H_2O_2 的耐受性, 结果如图 3 所示。在无氧化胁迫的情况下, 重组菌株和出发菌株生长差异不显著, 延迟期均为 8 h, 并在 26 h 后进入稳定期。随着 H_2O_2 浓度的增加, 菌株的延迟期

逐渐增加, 生长效率逐渐降低, 表明 H_2O_2 能够在一定程度上限制酵母的生长。酵母在 8 mmol/L H_2O_2 刺激下, 几乎无法生长(数据未显示)。

在不添加 H_2O_2 的情况下, 调控 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因对于重组菌株的影响不显著, 总体生长趋势与出发菌株一致。但过表达菌株的最大菌体浓度略低于相应的基因敲除菌株。在 2 mmol/L H_2O_2 刺激下, 大部分酵母菌株的延滞期增加至 16 h, 而过表达 *ATG8* 基因使重组菌株的延迟期缩短为 14 h。相比出发菌株, W-O-*atg8* 菌株已初步展现其在氧化胁迫下的生长优势, 并且其最大生物量为 3.85, 略高于出

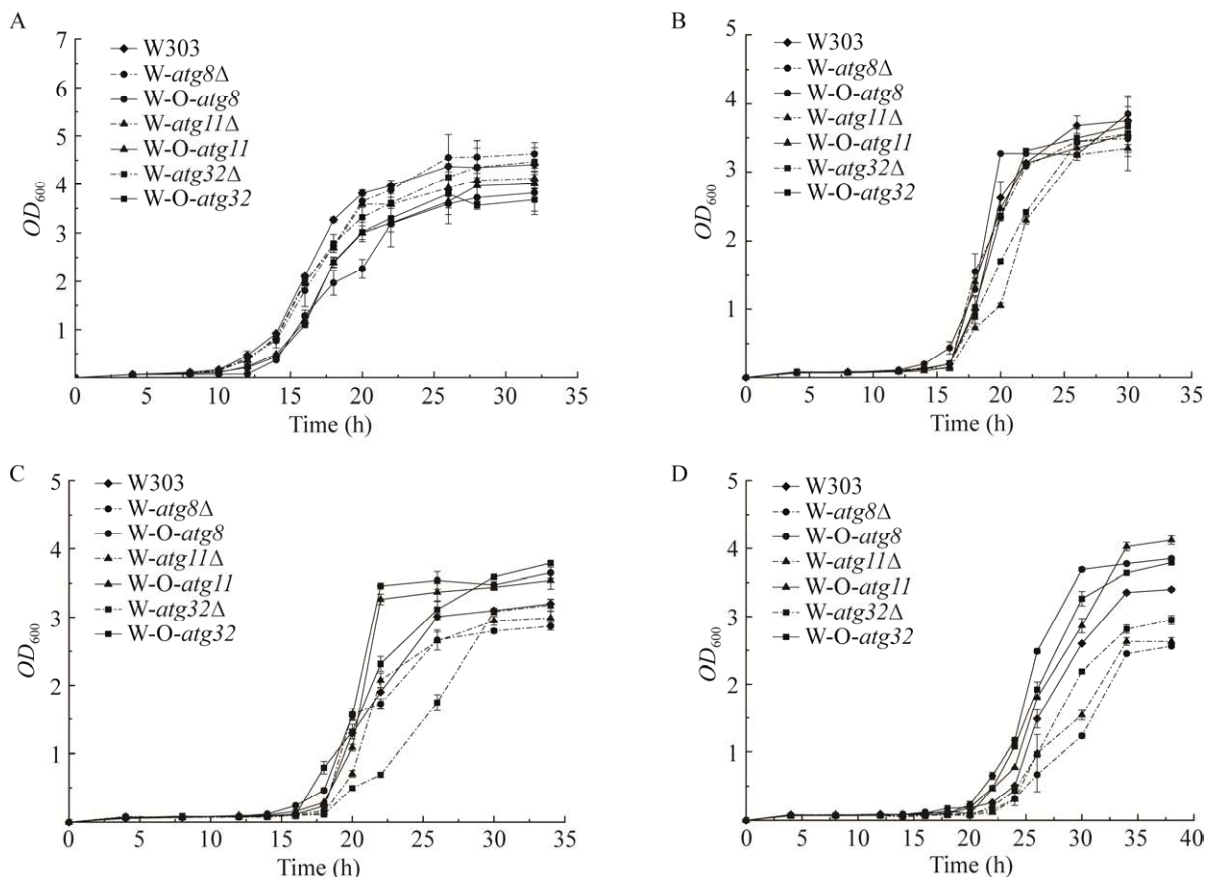


图 3 重组菌株和出发菌株在 0 mmol/L (A)、2 mmol/L (B)、4 mmol/L (C)、6 mmol/L (D) H_2O_2 胁迫下的生长情况

Figure 3 The growth of recombinant strains and the parental strain under different concentration of H_2O_2 . A: 0 mmol/L. B: 2 mmol/L. C: 4 mmol/L. D: 6 mmol/L.

发菌株。然而, 敲除 *ATG8* 基因使重组菌株的生长因氧化压力增大而受到限制。菌株 *W-atg8Δ* 最大生物量为 3.49, 略低于出发菌株。随着 H_2O_2 浓度的升高, 相较于出发菌株的生长情况, 过表达 *ATG8* 基因使菌株的生长优势更加显著, 而敲除 *ATG8* 基因使 *W-atg8Δ* 菌株的生长劣势也更为显著。出发菌株 W303 的生长延迟期随 H_2O_2 浓度的升高而增加, 分别为 16 h (4 mmol/L H_2O_2)、20 h (6 mmol/L H_2O_2), 并且在 6 mmol/L H_2O_2 刺激下, 出发菌株进入稳定期的时间延后至 34 h。过表达 *ATG8* 基因使重组菌株的延迟期均缩短了 2 h, 并且 *W-O-atg8* 菌株达到生长稳定期分别仅需 22 h (4 mmol/L H_2O_2) 和 30 h (6 mmol/L H_2O_2), 均比出发菌株提前了 4 h 到达生长稳定期。不仅如此, 过表达 *ATG8* 基因使重组菌株的最大生物量高于出发菌株, 分别为出发菌株的 1.14 倍(4 mmol/L H_2O_2) 和 1.13 倍(4 mmol/L H_2O_2)。 *ATG8* 基因的破坏使重组菌株的最大生物量显著低于出发菌株。 *W-atg8Δ* 菌株的最大生物量分别为 2.87 (4 mmol/L H_2O_2) 和 2.56 (6 mmol/L H_2O_2), 仅为出发菌株最大生物量的 89.69% 和 75.29%。

同样的, 在 4 mmol/L H_2O_2 的胁迫下, 过表达 *ATG11* 基因使重组菌株的生长效率显著高于出发菌株, 其进入稳定期的时间仅为 22 h, 相比于出发菌株, 缩短了 4 h。当 H_2O_2 浓度大于 4 mmol/L 时, 过表达菌株 *W-O-atg11* 的最大生物量均高于出发菌株, 分别为 3.54 (4 mmol/L H_2O_2) 和 4.12 (6 mmol/L H_2O_2), 是出发菌株的 1.10 倍和 1.21 倍。相反, *ATG11* 基因的缺失则显著限制了重组菌株在氧化压力下的生长。具体表现为, 在生长过程中重组菌株 *W-atg11Δ* 的生物量始终低于出发菌株的生物量, 并且 *W-atg11Δ* 最大生物量显著低于出发菌株, 分别为 3.35 (2 mmol/L H_2O_2)、2.99 (4 mmol/L H_2O_2)

和 2.63 (6 mmol/L H_2O_2), 仅为出发菌株的 89.33%、93.43% 和 77.35%。相比于出发菌株, 过表达 *ATG32* 基因使重组菌株的生长更快, 最大菌体量也高于出发菌株, 分别为 3.67 (2 mmol/L H_2O_2)、3.79 (4 mmol/L H_2O_2) 和 3.79 (6 mmol/L H_2O_2)。然而, 缺失 *ATG32* 基因造成菌株的生长受到严重抑制, 其菌体浓度显著低于出发菌株, 仅为 3.56 (2 mmol/L H_2O_2)、3.18 (4 mmol/L H_2O_2) 和 2.95 (6 mmol/L H_2O_2)。菌株在氧化胁迫条件下的生长结果表明, 上调 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的表达增强了重组菌株对 H_2O_2 耐受能力, 而 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的缺失则严重限制了重组菌株在添加 H_2O_2 环境中的生长。

2.3 线粒体自噬基因调控影响酵母抗氧化性能

2.3.1 基因调控影响胞内 ROS 稳态

ROS 作为细胞新陈代谢的天然副产物, 参与细胞呼吸链代谢以及细胞信号传导, 在维持胞内氧化还原平衡中发挥重要作用。因此, 在氧化应激条件下, 细胞调节 ROS 水平以维持细胞稳态的能力可以反映细胞的抗氧化能力。如图 4A 所示, 在 4 mmol/L H_2O_2 刺激重组菌株刺激 3 h 后, 出发菌株 W303 胞内 ROS 水平升高至初始状态的 111.07%; 刺激 6 h 后, 其 ROS 水平略有下降, 仅为初始状态的 87.54%。刺激 3 h 后, *ATG8* 和 *ATG11* 基因过表达显著缓解了氧化应激导致的胞内 ROS 水平激增, 分别为初始状态的 75.49% 和 51.79%; 在持续刺激 6 h 后, *W-O-atg8* 和 *W-O-atg11* 菌株中 ROS 相对水平仍显著低于原始菌株, 分别为初始状态的 61.23% 和 46.35%。过表达 *ATG32* 基因对氧化应激状态下维持 ROS 水平与出发菌株相比无明显差异。相反, *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因缺失显著升高了胞内 ROS 水平, 分别为初始状态

的 107.14%、133.76%、151.12% (3 h)和 174.27%、128.68%和 200.92% (6 h)。结果表明, *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因缺失使重组菌株难以维持氧化应激条件下 ROS 的产生和消除, 这严重削弱了细胞的抗氧化能力。

2.3.2 线粒体活力分析

MMP 是线粒体能量代谢的重要指标, 对维持线粒体生理功能至关重要。MMP 越高, 说明

线粒体能量代谢越快, 线粒体活力越高。在 4 mmol/L H_2O_2 胁迫下, 分别检测 0、3、6 h 各酵母菌株的 MMP 值。如图 4B 所示, 原始菌株的 MMP 随着刺激时间的增加而逐渐下降, 分别下降至原始状态的 71.07% (3 h)和 59.13% (6 h)。*ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因缺失造成菌株 MMP 显著降低, 分别下降至初始状态的 37.96%、34.76%和 45.00% (6 h)。相反, *W-O-atg8*、*W-O-atg11*

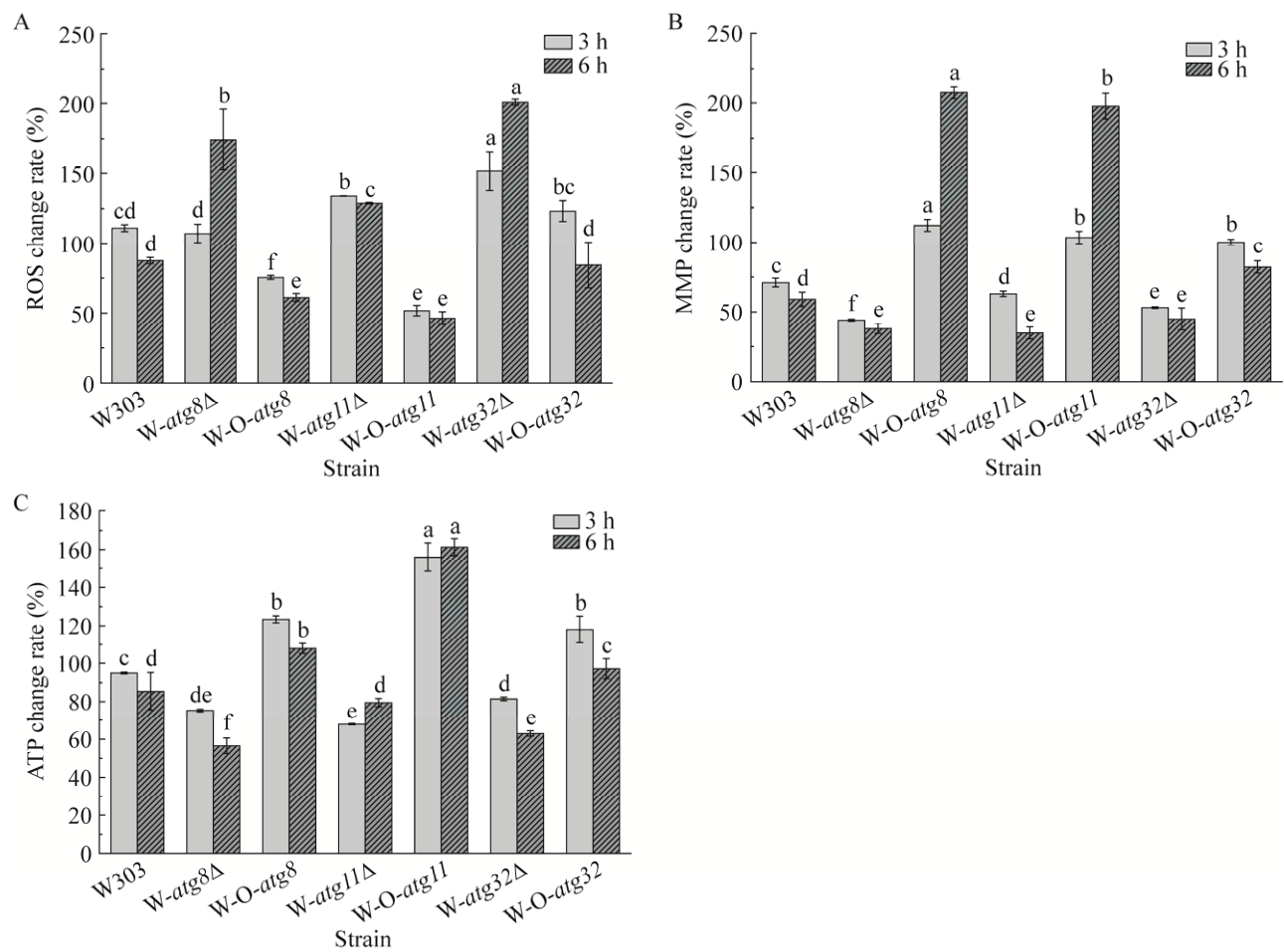


图 4 H_2O_2 刺激 3 h 和 6 h 后重组菌株和亲本菌株抗氧化指标的测定 ROS 变化率(A)、MMP 变化率(B)和 ATP 变化率(C)

Figure 4 Measurement of antioxidant properties of recombinant strains and the parental strain upon H_2O_2 stress for 3 h and 6 h. A: ROS change rate. B: MMP change rate. C: ATP change rate. Note: Values were calculated using initial state as control. Values indicate $\bar{x} \pm s$ deviation ($n=3$). Statistical significance was determined by SPSS software. Values in the same pattern column with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

菌株 MMP 随着时间的增加而逐渐升高, 分别增加至初始状态的 112.38%、103.64% (3 h) 和 207.64%、197.73% (6 h)。刺激 3 h 后, W-O-*atg32* 菌株的 MMP 较原始状态相比无明显差异, 而刺激 6 h 后, 其 MMP 值略有降低, 至初始状态的 82.30%, 但其变化率仍显著高于原始菌株 ($P < 0.05$)。结果表明, 过表达 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因有助于在氧化胁迫下保持较高的线粒体活力。

2.3.3 基因调控对胞内 ATP 水平的影响

ATP 主要由线粒体呼吸作用产生, 与 ROS 共同参与细胞氧化磷酸化为细胞提供能量。ATP 含量变化间接反应了酵母菌株的细胞活力^[25-26]。如图 4C 所示, *ATG8*、*ATG32* 缺失会造成菌株 ATP 含量显著下降, 分别下降至初始状态的 75.27%、81.45% (3 h) 和 56.56%、63.00% (6 h)。缺失 *ATG11* 基因在刺激 3 h 后, 其 ATP 变化率显著低于原始菌株; 刺激 6 h 后, 其 ATP 含量有所升高, 但仍只有其初始状态的 79.49%。另一方面, 过表达 *ATG8*、*ATG32* 会造成菌株 ATP 含量显著升高, 分别升高至初始状态的 123.39%、118.00% (3 h), 而随着刺激时间的增加, 其 ATP 含量略有降低, 但其变化率仍显著高于原始菌株, 分别为初始状态的 107.88%、97.16% (6 h)。值得注意的是, 过表达 *ATG11* 基因使菌株 ATP 含量随着刺激时间的延长而逐渐升高, 分别为初始状态的 156.02% (3 h)、161.31% (6 h)。氧化胁迫下 ATP 含量变化结果表明, 线粒体自噬相关基因的过表达可显著影响细胞 ATP 代谢水平, 对氧化应激下保持细胞活力有积极作用。

2.4 线粒体自噬途径关键基因表达量变化分析

酵母的线粒体降解依赖于—组自噬相关 (*ATG*) 基因, 其中 *ATG8*、*ATG11*、*ATG32* 基因

是酵母这一过程中不可替代的基因, 对这 3 个基因的调控会影响线粒体自噬途径中的其他基因表达, 因此使用 qRT-PCR 测定重组菌株中相关基因的表达量变化, 如图 5 所示。W-*atg8Δ*、W-*atg11Δ* 菌株中 *ATG32* 基因表达显著下调, 分别下调了 1.37 倍、2.71 倍。然而, W-*atg32Δ* 菌株中 *ATG8*、*ATG11* 基因表达量分别上调了 5.84 倍、1.47 倍。W-O-*atg8*、W-O-*atg32* 菌株中, 线粒体自噬相关基因表达量均上调, 其中 *ATG11* 基因表达量分别上调了 3.55 倍、0.85 倍。*DNMI* 基因表达量在 W-O-*atg11* 菌株中下调了 0.73 倍, 而其余重组菌株中 *DNMI* 基因表达量均有不同程度的上调。

3 讨论

线粒体是一种动态细胞器, 对维持真核细胞的生命起着重要作用^[6]。许多研究表明氧化应激会引起线粒体碎裂, 最终导致细胞代谢失衡^[27-29]。线粒体内稳态是由一个强大的过程和

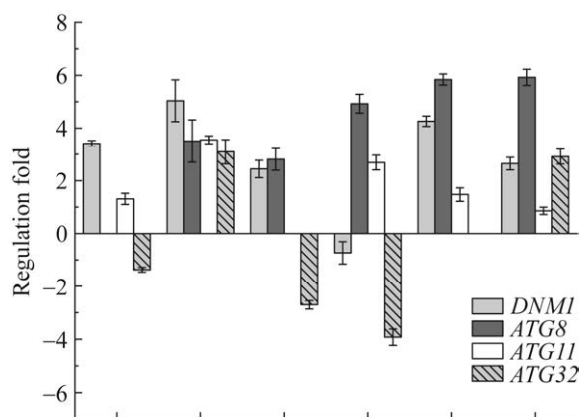


图 5 重组菌株中线粒体自噬相关基因变化情况分析

Figure 5 Regulation fold analysis of mitophagy related genes in recombinant strains. Results are shown as mean of triplicate cultures ($n=3$), regulation fold > 0 represents up-regulation, and regulation fold < 0 represents down-regulation.

系统提供的,包括重新安排线粒体蛋白质和改变线粒体蛋白质的数量,以应对不同的环境或压力情况。线粒体的质量控制发生在不同的水平上。伴侣蛋白、蛋白酶和泛素-蛋白酶系统通过监测蛋白质在分子水平上起作用^[9]。当线粒体损伤太大,无法修复时,细胞通过线粒体自噬去除功能失调或多余的线粒体,从而调节线粒体数量并维持能量代谢^[30]。

在酵母中,线粒体降解依赖于自噬相关(ATG)基因^[31]。已经证明了自噬基因包括 *ATG1*、*ATG5*、*ATG9*、*ATG12* 和 *ATG13*,均对该过程至关重要,其中 *ATG32*、*ATG8* 和 *ATG11* 基因是不可替代的^[32-33]。*Atg32* 是线粒体自噬所需的线粒体外膜蛋白,作为一种选择性受体,与 *Atg11* 结合并标记线粒体进行降解^[34],同时 *Atg32* 还招募 *Atg8* 并参与自噬体形成过程中吞噬细胞的扩张^[35-36]。*Wang* 等^[37]的研究表明使用靶向线粒体光敏剂诱导线粒体内 ROS 急速上升导致了线粒体膜电位的丧失和线粒体自噬的激活;然而,过表达抗氧化蛋白超氧化物歧化酶能够抑制光敏剂诱导的线粒体自噬。因此,氧化应激可能是诱导线粒体自噬的关键因素。另一方面,胞内高浓度的 ROS 造成线粒体膜结构受损,改变 MMP,最终引起细胞凋亡或死亡。在线粒体呼吸链紊乱的情况下,MMP 降低的同时会增加 ROS 的生成^[38]。因此酵母在氧化应激条件下维持胞内 ROS 稳态以及线粒体活力的能力可以反映出细胞的抗氧化能力。本研究发现,在氧化胁迫下 *ATG32* 的缺失导致了酿酒酵母胞内 ROS 的显著积累和 MMP 的降低,同时严重限制了重组菌株在 6 mmol/L H₂O₂ 刺激下的生长,推测 *ATG32* 基因的缺失降低了自噬效率,从而影响了酿酒酵母的抗氧化活性。同样,有研究表明当细胞在非发酵培养基中生长时,抑制 *ATG32* 表达会降低自噬效率^[11],而过表达

ATG32 的菌株中 ROS 变化结果则相反^[39]。研究表明,在乙醇胁迫下 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的缺失导致 ROS 失衡^[40-41],同样本研究发现,在氧化应激条件下 *ATG8*、*ATG11* 基因缺失不利于重组菌株维持胞内 ROS 稳态,并造成线粒体损伤、MMP 下降;相反,上调 *ATG8* 和 *ATG11* 表达对维持氧化还原稳态,保持线粒体活力产生积极影响^[42]。另一方面,上调 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的表达在无氧胁迫条件下的生长略低于出发菌株,推测在过表达菌株没有受到氧化胁迫时,过度线粒体自噬会造成一定程度上线粒体的过度消耗而导致能量产生不足,从而影响菌株的正常生长。但在高浓度 H₂O₂ 的刺激下, W-O-*atg8*、W-O-*atg11*、W-O-*atg32* 菌株的生长状况优于出发菌株,菌体浓度也更高。结果表明过表达 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因提高了菌株 H₂O₂ 耐受能力,间接反映了菌株抗氧化能力的增强。同样在氮饥饿条件下,野生型酵母细胞能够降解多余的线粒体,抑制其产生更多的 ROS,而 *ATG11*、*ATG32* 基因缺失的酵母菌株无法降解多余的线粒体。未降解的线粒体自发老化并产生额外的 ROS,形成恶性循环。因此,酵母细胞必须严格控制线粒体的数量和质量。本研究表明提高 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的表达有助于菌株提高线粒体自噬效率,从而消除受损、老化线粒体,以维持线粒体活力,满足细胞的能量需求,并防止过多的 ROS 产生^[43]。

线粒体通过氧化磷酸化产生 ATP 为机体提供代谢所需能量,同时生成副产物 ROS。ROS 的过度积累会导致 mtDNA 的突变,这可能会削弱氧化磷酸化关键蛋白的合成,进而影响 ATP 的合成^[44]。因此,ATP 的含量是反应细胞活力高低的重要参数。在氧化应激条件下,酵母维持细胞活力的能力能够间接反应出酵母抵御氧

化胁迫的能力。先前的研究表明, 疾病造成的线粒体氧化磷酸化的缺陷会造成 ATP 合成不足, 难以维持正常的细胞功能, 细胞会通过触发自噬途径来弥补氧化磷酸化的缺陷^[45]。本研究结果表明缺失 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因在严重破坏胞内 ROS 稳态的同时, 还会显著降低氧化应激条件下菌株 ATP 含量, 可能进一步导致产能衰竭和细胞衰老; 而上调 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因表达不仅能够将胞内 ROS 含量维持在一个较低的水平, 还利于菌株高效合成 ATP, 使菌株在氧化应激条件下保持较高的细胞活力。

ATG32 是整条线粒体自噬途径的关键因素, 特异地参与线粒体自噬的调控。有文献报道, 酵母在非发酵的甘油培养基中生长时, *ATG32* 的缺失几乎完全抑制了线粒体自噬的发生^[11]。相较于出发菌株, *W-atg8Δ*、*W-atg11Δ* 菌株中 *ATG32* 基因表达显著下调, 这从转录水平上解释了重组菌株抗氧化性能减弱的原因。目前研究发现, *Atg8* 在多种选择性自噬中发挥着重要作用, 且在不同组织中具有表达差异性, 从而参与诱导不同类型的选择性自噬^[46]; 同样, *Atg11* 是自噬途径货物识别所需蛋白, 参与线粒体自噬、过氧化物酶体自噬等多种自噬途径^[47-49]。本研究发现在 *W-atg32Δ* 菌株中, *ATG8*、*ATG11* 表达量上调, 推测选择性自噬途径之间可能存在相互协调补充的机制, 当线粒体自噬途径被抑制时, 其他自噬途径将被诱导以维持细胞稳态。

线粒体是高度动态的细胞器, 不断地发生融合和裂变。而裂变通常被认为是自噬的先决条件。在酵母所有参与裂变的蛋白质中, 只有 *Dnm1* 是自噬所必需的^[50]。本研究发现 *W-O-atg11* 菌株中 *DNM1* 基因表达下调。结果表明, 线粒体碎片化是将线粒体有效隔离至自噬体中必不可少的步骤, 这与哺乳动物细胞中的研究一致^[51-52]。

Mao 等^[34]报道 *Atg11* 与 *Dnm1* 相互作用, 诱导线粒体裂变, 实现高效的线粒体自噬。然而 *DNM1* 基因过度表达会导致胞内 ATP 水平失衡, 影响细胞的抗氧化性能^[19], 推测机体为平衡 *Atg11*-*Dnm1* 的相互作用, 过表达 *ATG11* 基因会造成 *DNM1* 基因表达量下调以避免线粒体过度裂变导致线粒体损伤, 抗氧化性能下降。

在氮饥饿和生长稳定阶段, 线粒体自噬有助于细胞抵御氧化压力, 维持线粒体形态并保持基因组的稳定性^[43,53]。这一过程对野生型酵母非常重要, 因为其总是处于饥饿的危险中, 且经常需要在发酵和呼吸之间进行新陈代谢的转换。李磊^[19]研究发现, 高抗氧化活性的啤酒酵母中线粒体自噬必需裂变因子 *Dnm1* 表达量显著下调, 过表达 *DNM1* 基因不利于啤酒酵母维持氧化应激状态下内源性 ATP 水平, *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因对啤酒酵母抗氧化性能的影响有待进一步研究。酿酒酵母在发酵过程中常伴随着酒精的积累, 研究表明线粒体自噬对乙醇的生产起着关键作用。在清酒的酿造过程中, 清酒酵母会通过抑制线粒体自噬来提高发酵能力。*atg32Δ* 突变株以生物量减少为代价获得了较高的发酵能量, 乙醇含量比亲本菌株提高了 2.12%, 因此抑制线粒体自噬对提高其他酿酒酵母的发酵能力具有一定的参考价值^[14]。然而在乙醇胁迫下, 缺失 *ATG11*、*ATG32* 基因会导致酿酒酵母生长能力减弱、死亡率升高、酒精产率降低、造成 H_2O_2 和超氧阴离子的积累较多以及线粒体膜受损。该结果与本研究菌株 *W-atg11Δ* 和 *W-atg32Δ* 在氧化应激下的表现相近^[40]。除 ROS 外, 活性氮对于保护细胞免受细胞应激所造成的损伤也具有重要作用。亚精胺是细胞产生活性氮所必需的, *Atg32* 介导的线粒体自噬通过促进亚精胺的产生来维持酵母热应激的耐受性和活性氮的含量, 因此线粒体

自噬与多胺生物合成、活性氮信号通路之间具有相关性^[15]。

线粒体自噬机制在进化中高度保守。在哺乳动物细胞中，BCL2L13 是酵母中 Atg32 功能性同源物^[54]，LC3 是酵母中 Atg8 的同源物^[54-55]，BCL2L13 将 LC3 招募到线粒体表面，导致自噬体的形成^[56]。随着自噬相关研究的深入，越来越多证据表明自噬在延缓细胞氧化、衰老方面发挥着重要作用。在植物细胞中发现缺失 *ATG11* 基因会造成植物的过早衰老^[57]。在哺乳动物中，线粒体自噬在线粒体质量控制中扮演着重要的角色，其功能障碍可能会导致如阿尔茨海默症、帕金森、亨廷顿氏舞蹈病等与年龄相关疾病的发生^[58]。近年来，线粒体靶向治疗已成为疾病治疗的一种新策略。例如，使用靶向线粒体抗氧化剂进行干预治疗可特异性抑制线粒体 ROS，保护线粒体免受氧化应激损伤^[59]。因此揭示线粒体自噬机制对机体抗氧化性能的影响可为线粒体靶向治疗提供参考。通过在模式菌株 W303 中调控 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 基因的表达，研究这些基因在酵母抗氧化特性中的作用。结果表明，在氧化应激条件下，*ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 的缺失导致胞内 ROS 失衡，线粒体活性及能量代谢水平显著降低。本研究从 3 个不同维度阐述了 *ATG8*、*ATG11* 和 *ATG32* 的缺失会造成酵母抗氧化能力下降，增加了对酵母线粒体自噬与氧化胁迫之间的认识，为提高酵母的抗氧化能力提供了新的策略。

REFERENCES

- [1] GOFFEAU A, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELDMANN H, GALIBERT F, HOHEISEL JD, JACQ C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSEN P, TETTELIN H, OLIVER SG. Life with 6 000 genes[J]. *Science*, 1996, 274(5287): 546-567.
- [2] WANG JJ, MAO JC, YANG G, ZHENG FY, NIU CT, LI YX, LIU CF, LI Q. The FKS family genes cause changes in cell wall morphology resulted in regulation of anti-autolytic ability in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 49-56.
- [3] GIBSON BR, LAWRENCE SJ, BOULTON CA, BOX WG, GRAHAM NS, LINFORTH RST, SMART KA. The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation[J]. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(4): 574-585.
- [4] 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.
- [5] POWELL C, QUAIN D, SMART K. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation[J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 3(2): 149-157.
- [6] BHATIA-KISSOVA I, CAMOUGRAND N. Mitophagy in yeast: decades of research[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3541.
- [7] CABISCOL E, PIULATS E, ECHAVE P, HERRERO E, ROS J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(35): 27393-27398.
- [8] IUCHI S, WEINER L. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1996, 120(6): 1055-1063.
- [9] ABELIOVICH H, ZAREI M, RIGBOLT KTG, YOULE RJ, DENGJEL J. Involvement of mitochondrial dynamics in the segregation of mitochondrial matrix proteins during stationary phase mitophagy[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2789.
- [10] FUENTE M, MIQUEL J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15(26): 3003-3026.
- [11] OKAMOTO K, KONDO-OKAMOTO N, OHSUMI Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy[J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(1): 87-97.
- [12] KANKI T, WANG K, CAO Y, BABA M, KLIONSKY DJ. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy[J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(1): 98-109.

- [13] KANKI T, FURUKAWA K, YAMASHITA SI. Mitophagy in yeast: molecular mechanisms and physiological role[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2015, 1853(10): 2756-2765.
- [14] SHIROMA S, JAYAKODY LN, HORIE K, OKAMOTO K, KITAGAKI H. Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(3): 1002-1012.
- [15] KAUR J, GOLDSMITH J, TANKKA A, EGUIGUREN SB, GIMENEZ AA, VICK L, DEBNATH J, VLAHAKIS A. Atg32 dependent mitophagy sustains spermidine and nitric oxide required for heat stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Cell Science*, 2021, 134(11): jcs253781.
- [16] PULESTON DJ, ZHANG HL, POWELL TJ, LIPINA E, SIMS S, PANSE I, WATSON AS, CERUNDOLO V, TOWNSEND AR, KLENERMAN P, SIMON AK. Autophagy is a critical regulator of memory CD8⁺ T cell formation[J]. *eLife*, 2014, 3: 03706.
- [17] 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.
- [18] ZHANG MF, WANG JJ, NIU CT, ZHENG FY, LIU CF, LI Q. Screening of thermosensitive autolytic mutant brewer's yeast and transcriptomic analysis of heat stress response[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2020, 66(11): 631-640.
- [19] 李磊. 啤酒酵母抗氧化相关蛋白组学研究及调控[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020.
LI L. Analysis and regulation of proteomics related antioxidation in brewer's yeast[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [20] 许鑫. 基于增变因子选育低乙醛啤酒酵母及机制解析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.
XU X. Application of perturbation factor for breeding lager yeast with lower acetaldehyde production and related mechanisms analysis[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [21] 李梦琦, 张可心, 郑飞云, 钮成拓, 刘春风, 李崎, 王金晶. Lager 酵母中 CRISPR-Cas9 基因敲除系统的构建[J]. *东北农业大学学报*, 2020, 51(3): 36-44, 96.
LI MQ, ZHANG KX, ZHENG FY, NIU CT, LIU CF, LI Q, WANG JJ. Construction of CRISPR-Cas9 gene deletions system in lager yeast[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2020, 51(3): 36-44, 96 (in Chinese).
- [22] ZHU MY, SUN L, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Establishment of a transient CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes* for co-production of ethanol and xylonic acid[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(3): 283-289.
- [23] XU X, LIU CF, NIU CT, WANG JJ, ZHENG FY, LI YX, LI Q. Rationally designed perturbation factor drives evolution in *Saccharomyces cerevisiae* for industrial application[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2018, 45(10): 869-880.
- [24] XU X, NIU CT, LIU CF, LI Q. Unraveling the mechanisms for low-level acetaldehyde production during alcoholic fermentation in *Saccharomyces pastorianus* lager yeast[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(7): 2020-2027.
- [25] 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.
- [26] la ANGÉLA, 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.
- [27] MAO K, KLIONSKY DJ. Mitochondrial fission facilitates mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Autophagy*, 2013, 9(11): 1900-1901.
- [28] POKORNÁ L, ČERMÁKOVÁ P, HORVÁTH A, BAILE MG, CLAYPOOL SM, GRIAC P, MALÍNSKÝ J, BALÁŽOVÁ M. Specific degradation of phosphatidylglycerol is necessary for proper mitochondrial morphology and function[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2016, 1857(1): 34-45.
- [29] ROGOV AG, OVCHENKOVA AP, GOLEVA TN, KIREEV II, ZVYAGILSKAYA RA. New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors[J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 552: 24-29.
- [30] MISHRA P, CHAN DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics[J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 212(4): 379-387.
- [31] LIU L, SAKAKIBARA K, CHEN Q, OKAMOTO K. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems[J]. *Cell Research*, 2014, 24(7): 787-795.

- [32] KIŠŠOVÁ IB, SALIN B, SCHAEFFER J, BHATIA S, MANON S, CAMOUGRAND N. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast[J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 329-336.
- [33] KONDO-OKAMOTO N, NODA NN, SUZUKI SW, NAKATOGAWA H, TAKAHASHI I, MATSUNAMI M, HASHIMOTO A, INAGAKI F, OHSUMI Y, OKAMOTO K. Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(13): 10631-10638.
- [34] MAO K, WANG K, LIU X, KLIONSKY DJ. The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy[J]. *Developmental Cell*, 2013, 26(1): 9-18.
- [35] NAIR U, YEN WL, MARI M, CAO Y, XIE ZP, BABA M, REGGIORI F, KLIONSKY DJ. A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis[J]. *Autophagy*, 2012, 8(5): 780-793.
- [36] XIE ZP, NAIR U, KLIONSKY DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(8): 3290-3298.
- [37] WANG YQ, NARTISS Y, STEIPE B, McQUIBBAN GA, KIM PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8(10): 1462-1476.
- [38] LEBIEDZINSKA M, KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, GIORGI C, KARCZMAREWICZ E, PRONICKA E, PINTON P, DUSZYNSKI J, PRONICKI M, WIECKOWSKI MR. Oxidative stress-dependent p66Shc phosphorylation in skin fibroblasts of children with mitochondrial disorders[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2010, 1797: 57.
- [39] EIYAMA A, KONDO-OKAMOTO N, OKAMOTO K. Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in yeast[J]. *FEBS Letters*, 2013, 587(12): 1787-1792.
- [40] JING HJ, LIU HH, LU Z, CUI LQ, TAN XR. Mitophagy improves ethanol tolerance in yeast: regulation by mitochondrial reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(12): 1876-1884.
- [41] JING HJ, LIU HH, ZHANG L, GAO J, SONG HR, TAN XR. Ethanol induces autophagy regulated by mitochondrial ROS in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(12): 1982-1991.
- [42] STERN M. Evidence that a mitochondrial death spiral underlies antagonistic pleiotropy[J]. *Aging Cell*, 2017, 16(3): 435-443.
- [43] KURIHARA Y, KANKI T, AOKI Y, HIROTA Y, SAIGUSA T, UCHIUMI T, KANG D. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(5): 3265-3272.
- [44] de GREY, ADNJ. The reductive hotspot hypothesis of mammalian aging-membrane metabolism magnifies mutant mitochondrial mischief[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269: 2003-2009.
- [45] LIN DS, HUANG YW, HO CS, HUNG PL, HSU MH, WANG TJ, WU TY, LEE TH, HUANG ZD, CHANG PC, CHIANG MF. Oxidative insults and mitochondrial DNA mutation promote enhanced autophagy and mitophagy compromising cell viability in pluripotent cell model of mitochondrial disease[J]. *Cells*, 2019, 8(1): 65.
- [46] WEIDBERG H, SHVETS E, ELAZAR Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80: 125-156.
- [47] KIM J, KAMADA Y, STROMHAUG PE, GUAN J, HEFNER-GRAVINK A, BABA M, SCOTT SV, OHSUMI Y, DUNN WA Jr, KLIONSKY DJ. Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole[J]. *Journal of Cell Biology*, 2001, 153(2): 381-396.
- [48] SCOTT SV, GUAN J, HUTCHINS MU, KIM J, KLIONSKY DJ. Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway[J]. *Molecular Cell*, 2001, 7(6): 1131-1141.
- [49] SUZUKI K, KONDO C, MORIMOTO M, OHSUMI Y. Selective transport of α -mannosidase by autophagic pathways[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(39): 30019-30025.
- [50] BLEAZARD W, McCAFFERY JM, KING EJ, BALE SS, MOZDY A, TIEU Q, NUNNARI J, SHAW JM. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast[J]. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(5): 298-304.
- [51] GOMES LC, Di BENEDETTO G, SCORRANO L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(5): 589-598.

- [52] TWIG G, ELORZA A, MOLINA AJA, MOHAMED H, WIKSTROM JD, WALZER G, STILES L, HAIGH SE, KATZ S, LAS G, ALROY J, WU M, PY BF, YUAN JY, DEENEY JT, CORKEY BE, SHIRIHAI OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy[J]. *The EMBO Journal*, 2008, 27(2): 433-446.
- [53] BIN-UMER MA, McLAUGHLIN JE, BUTTERLY MS, McCORMICK S, TUMER NE. Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(32): 11798-11803.
- [54] KINYA O, TOMOKAZU M, OSAMU Y. BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32[J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1932-1933.
- [55] NGUYEN TN, PADMAN BS, USHER J, OORSCHOT V, RAMM G, LAZAROU M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK₁/Parkin mitophagy and starvation[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2016, 215(6): 857-874.
- [56] CHEN M, SANDOVAL H, WANG J. Selective mitochondrial autophagy during erythroid maturation[J]. *Autophagy*, 2008, 4(7): 926-928.
- [57] LI FQ, VIERSTRA RD. *Arabidopsis* ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy[J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1466-1467.
- [58] HEMACHANDRA P, REDDY. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases[J]. *Brain Research Reviews*, 2011, 67(1/2): 103-118.
- [59] PLOTNIKOV EY, ZOROV DB. Pros and cons of use of mitochondria-targeted antioxidants[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 316.

(本文责编 郝丽芳)