

# 鲁氏接合酵母对高盐和高温胁迫响应的 差异性与共性分析

刘梦奇, 闫珍珍, 胡娜, 陈雄, 李欣\*

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程教育部重点实验室, 湖北省工业微生物重点实验室,  
湖北省工业发酵协同创新中心, 湖北 武汉 430068)

**摘要:** 针对高温 (40 °C) 和高盐 (18% NaCl) 逆境设计了最低营养需求全合成培养基, 分析了鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 在长期逆境下生长的营养需求差异, 重点解析了酵母细胞从生长适应期到对数生长初期阶段有机酸、氨基酸和糖类物质的代谢及基因表达差异。研究结果显示, 遭遇高盐压力的鲁氏接合酵母细胞更需要外源氨基酸, 而补充维生素和氨基酸有助于缓解酵母细胞的高温压力。鲁氏接合酵母针对高盐和高温逆境采用了差异明显的有机酸、氨基酸和糖代谢策略。*MSN4* (逆境转录因子基因) 和 *HOG1* (高渗调控蛋白基因) 响应高盐, 而 *HSF1* (热激调控蛋白基因) 和 *SOD1* (超氧化物歧化酶基因) 对高温响应。本研究加深了对耐盐鲁氏接合酵母耐温机制的理解, 有助于双抗新能力酿造酵母菌株的研制。

**关键词:** 鲁氏接合酵母; 高盐逆境; 高温逆境; 全合成培养基; 营养需求; 代谢差异; 基因表达

## Differences and Commonalities in Responses of *Zygosaccharomyces rouxii* to High Salt and High Temperature Stress

LIU Mengqi, YAN Zhenzhen, HU Na, CHEN Xiong, LI Xin\*

(Key Laboratory of Fermentation Engineering of Ministry of Education, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Hubei Province,  
Hubei Province Industrial Fermentation Collaborative Innovation Center, College of Bioengineering and Food,  
Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract:** Complete synthetic minimal media for *Zygosaccharomyces rouxii* growth were designed for high temperature (40 °C, HTS) and high salt stress (18% NaCl, HSS) in this study, and the difference in the nutritional requirements of *Z. rouxii* cells under long-term adverse environmental conditions was analyzed. The differences in the metabolism and gene expression of organic acids, amino acids and sugars during the period from the growth adaptation stage to the early logarithmic stage were highlighted between HSS and HTS conditions. The results showed that *Z. rouxii* cells exposed to HSS needed more exogenous amino acids, vitamin and amino acid supplementation alleviated HTS-induced damage in yeast cells. The adversity transcription gene *MSN4* and the hypertonic regulatory protein gene *HOG1* responded to high salt, while the heat shock regulatory protein gene *HSF1* and the superoxide dismutase gene *SOD1* responded to high temperature. In summary, different strategies for organic acid, amino acid and sugar metabolism were adopted by *Z. rouxii* in response to HSS and HTS. This study deepens the understanding of the mechanism of temperature tolerance in salt-tolerant *Z. rouxii*, which will contribute to the development of new brewing yeast cells with tolerance to both high salt and temperature.

**Keywords:** *Zygosaccharomyces rouxii*; high salt stress; high temperature stress; complete synthetic medium; nutritional needs; metabolic differences; gene expression

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230411-099

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0079-10

引文格式:

刘梦奇, 闫珍珍, 胡娜, 等. 鲁氏接合酵母对高盐和高温胁迫响应的差异性与共性分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 79-88.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230411-099. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31871789); 湖北省工业发酵协同创新中心资助项目 (2022KF26)

第一作者简介: 刘梦奇 (1995—) (ORCID: 0009-0006-3487-9553), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物酿造。

E-mail: 1594718183@qq.com

\*通信作者简介: 李欣 (1980—) (ORCID: 0000-0002-5425-4431), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品风味调控。

E-mail: 51545530@qq.com

LIU Mengqi, YAN Zhenzhen, HU Na, et al. Differences and commonalities in responses of *Zygosaccharomyces rouxii* to high salt and high temperature stress[J]. Food Science, 2024, 45(2): 79-88. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20230411-099. <http://www.spkx.net.cn>

鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 是一种重要的产香食品酵母, 在酱油酿造中发挥着重要作用<sup>[1-3]</sup>, 也是食品腐败微生物之一<sup>[4]</sup>。长期以来, 鲁氏接合酵母具备两种截然相反的特点, 对高浓度盐的高耐受性和对高温的高敏感性。该酵母的耐盐机理备受研究者的关注, 明确了高盐下酵母细胞的生理变化特点, 筛选和鉴定出一系列耐盐相关基因和蛋白<sup>[5-7]</sup>。然而, 鲁氏接合酵母耐温、耐盐特性差异研究较少, 影响了双重抗性优良菌株的构建。

微生物对逆境的响应机理研究对理解微生物与环境的互作<sup>[8]</sup>和构建高水平或新性状菌株<sup>[9]</sup>非常重要。作为食品酿造中常见的微生物, 酵母细胞逆境响应机制研究采用两种策略。第1种策略聚焦模式酵母细胞, 主要是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[10-12]</sup>, 以期获得普遍性的酵母耐受机制; 第2种策略围绕具有特异性状的酵母物种, 如马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)<sup>[13-14]</sup>、鲁氏接合酵母<sup>[15-16]</sup>、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 等<sup>[17-18]</sup>, 探索特定种属酵母的独特的耐受机制。在各种逆境中, 除了高浓度的不同外源物外 (如乙酸、乳酸、高糖等)<sup>[19-23]</sup>, 作为环境基本参数之一的温度是研究工作者持续关注的压力因子。针对这些环境压力, 研究者们从基因、转录、蛋白和生理等不同层面和视角分析了酵母细胞对逆境的响应<sup>[24-27]</sup>。作为酵母对外界环境响应的重要一环, 逆境调控基因, 如 *HSF1* (热休克转录因子1)、*MSN2/MSN4* (SNF1突变蛋白2和4的多重拷贝抑制子)、*HOG1* (有丝分裂原激活蛋白激酶) 和 *SOD1* (超氧化物歧化酶1) 的变化决定了细胞的生理状态和参与特定环境响应的基因集。虽然 *HSF1p* 是典型的热激蛋白, 但当酿酒酵母遭遇甲萘醌刺激后, 该蛋白充当了细胞拯救基因的激活剂, 通过维持氧化还原稳态和蛋白稳定避免细胞的氧化损伤<sup>[28]</sup>。作为静止期糖酵解基因的主要调节因子, *MSN4* 的缺失显著减少了酿酒酵母对热激的响应或降低 *NaCl* 诱导的 *NTH1* 活性, 并且下调高渗透胁迫条件下细胞乙醛酶 I (glyoxalase 1, *GLO1*) 的表达水平<sup>[29-31]</sup>。*HOG1* 对细胞在逆境下的存活至关重要。*HOG1* 基因的失效会增强海洋酵母汉斯德巴氏酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 对高浓度 *NaCl* 的敏感性<sup>[32]</sup>。过表达 *HOG1* 提高了酿酒酵母 *SPSC01* 对逆境的耐受能力以及生物乙醇的产量<sup>[33]</sup>。对 *SOD1* 基因而言, 该基因的缺失可显著改变酿酒酵母细胞应答真菌细胞壁抑制剂 CFW (Calcofluor Write) 胁迫的全基因组转录表达谱<sup>[34]</sup>, 同时降低酿酒酵母细胞在高温和高渗透压逆境

下的耐受性<sup>[35]</sup>。然而, 这些逆境调控基因在鲁氏接合酵母适应不利环境时的作用尚未可知。此外, 耐温机制研究中所普遍采用的短时间高温刺激<sup>[36-39]</sup>并不能真实反映酿造过程中鲁氏接合酵母所遭遇的长时间高温压力。同时, 在绝大部分研究中使用的酵母细胞通用培养基为酵母提取物蛋白胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YEPD), 其营养丰富但物质组成不清的特性给寻找逆境耐受关键基因带来干扰。

基于以上考虑, 本研究针对酿造产香鲁氏接合酵母, 确定了全合成最少营养组分的培养基, 基于此探索酵母细胞在长时期 (120 h) 的高盐 (18% *NaCl*) 和高温 (40 °C) 胁迫下对营养需求特点, 并进一步研究从适应期到对数生长初期的有机酸代谢、氨基酸代谢、胞内相容抗逆物质和重要逆境响应调控基因表达等方面的两种逆境响应差异。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

鲁氏接合酵母 2013310 (中国典型培养物保藏中心 CCTCC M 2013310) 是功能酵母和酿造微生物实验室从中国传统食品酿造中分离出的 1 株酵母菌株。

全合成生长通用培养基 (葡萄糖 20.0 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、脯氨酸 8.0 g/L、无氨基酵母氮源 (yeast nitrogen base without amino acids, YNB) 培养基 1.7 g/L) 被用于酵母生长对照。YEPD 固体培养基 (酵母粉 10.0 g/L、蛋白胨 20.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L 和琼脂 15.0 g/L) 被用于种子液的制备, 115 °C、20 min 灭菌。

全合成鲁氏接合酵母生长培养基 (葡萄糖 20.0 g/L、脯氨酸 4.0 g/L、磷酸二氢钾 1.0 g/L、无水硫酸镁 0.5 g/L、泛酸钙 1.0 mg/L 和叶酸 1.0 mg/L) 被用于正常生理环境下鲁氏接合酵母细胞的培养。高盐逆境全合成培养基为添加有 18% *NaCl* 的全合成鲁氏接合酵母生长培养基。高温逆境全合成培养基是含有 30% 葡萄糖的全合成鲁氏接合酵母生长培养基, 110 °C、20 min 灭菌。

以上试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Labconco FreeZone 12 L 冻干机 北京中科科仪仪器有限公司; ZXMP-A1230 恒温恒湿箱 上海智城分析仪器制造有限公司; 高速冷冻离心机 艾本德中国有限公司; 高压蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司医疗设

备厂; JY02S紫外分析仪 北京君意东方电泳设备有限公司; 7890B型气相色谱 美国安捷伦公司; NanoDrop One C微量分光光度计 美国赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 种子细胞的制备和培养条件

在30℃静置培养2 d的鲁氏接合酵母种子瓶中加入适量无菌水, 轻微振荡混匀, 制成种子细胞悬液。所有培养条件下的初始 $OD_{600\text{ nm}}$ 均为 $0.5 \pm 0.1$ 。除高温逆境培养温度为40℃外, 其他酵母细胞培养温度均为30℃。所有培养条件下酵母细胞振荡培养转速和培养周期均为200 r/min和120 h。

#### 1.3.2 样品的处理与检测

通过测定600 nm波长处的吸光度评判鲁氏接合酵母的生长情况<sup>[40]</sup>。取培养液4℃、12 000 r/min离心5 min, 上清液和细胞沉淀分开收集, 放入液氮淬灭1 min, -80℃保存备用。酵母细胞壁破碎采用物理破壁方法, 具体步骤如下: 淬灭后的酵母细胞泥中加入2 mL 40%乙醇溶液和玻璃珠(湿菌体与玻璃珠质量比为1:5), 涡旋振荡20 min, -4℃、8 000 r/min离心5 min。所有上清液转移至2 mL离心管, -4℃、12 000 r/min离心5 min, 留上清液。分别取400、500  $\mu\text{L}$ 和400  $\mu\text{L}$ 上清液至气相瓶, 冻干后用于胞内糖类、氨基酸和有机酸的检测。硅烷化衍生方案、氨基酸的检测和有机酸的检测及其相应气相色谱条件均参考Wei Yangjian等<sup>[41]</sup>的方法。硅烷化衍生标准品包括甘油、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、酮戊二酸、木糖、木糖醇、鼠李糖、柠檬酸/异柠檬酸、果糖、半乳糖、草乙酸、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、油酸酰胺、阿魏酸、芥酸酰胺、蔗糖、乳糖、海藻糖、棉子糖。氨基酸标准品包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸/天冬酰胺/丝氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、色氨酸。胞内外代谢物标准品包括正丁醇、乙偶姻、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸。

#### 1.3.3 逆境下的鲁氏接合酵母营养需求分析

考虑到作为蛋白质辅基的维生素的重要生理功能, 选择了7种维生素(硫胺素、核黄素、烟酸、吡哆醇、生物素、钴胺素和抗坏血酸)添加到培养基中。逆境下的细胞可能遭遇能量物质供给不足, 考察7种能量相关物质(AMP、ADP、ATP、GMP、IMP、GMP和UMP)对鲁氏接合酵母细胞生长能力的影响。作为主要代谢途径之一的丙酮酸溢流代谢和三羧酸循环代谢在逆境下的酵母细胞中代谢活性可能下降, 导致有机酸供给不足, 因此, 8种有机酸也是研究对象之一, 包括丙酮酸、丙酸、丁酸、草酰乙酸、反丁烯二酸、柠檬酸、苹果酸和 $\alpha$ -酮戊二酸。同时, 基于逆境下酵母细胞可能出现氨基酸供应不足的问题, 选择14种氨基酸(组氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬氨

酸、酪氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、精氨酸、半胱氨酸和谷氨酸)添加到培养基中。培养基中维生素、有机酸和能量相关物质的终质量浓度均为1.0 mg/L。氨基酸终质量浓度为4.0 g/L。

#### 1.3.4 总RNA提取及反转录cDNA

无菌条件下收集200 mg湿菌体, 放入无RNA酶的2 mL EP管内, 快速放入液氮中速冻5~10 min, 随后贮存在-80℃超低温冰箱中备用。总RNA提取试剂盒用于提取总RNA。对RNA的浓度和纯度进行微量分光光度计检测。采用R23-01逆转录试剂盒获得cDNA, 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)条件为50℃反应15 min, 85℃变性5 s。

#### 1.3.5 real-time PCR测定

采用Q711试剂盒进行real-time PCR, 相关参数按照说明书。计算:  $\Delta\text{Ct}$ (循环阈值) =  $\text{Ct}$ (目标基因) -  $\text{Ct}$ (管家基因 $ENO1$ ),  $-\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (对照样品) -  $\Delta\text{Ct}$ (循环阈值); 最终以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算其倍数变化。内参基因为 $ENO1$ 。

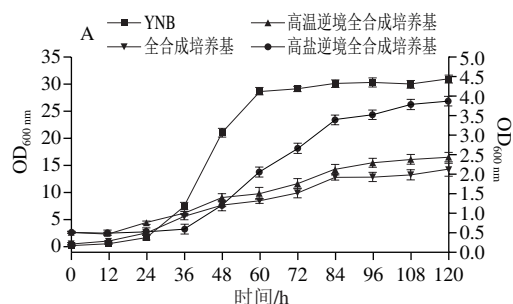
### 1.4 数据处理与统计分析

所有实验重复3次。使用Excel软件进行统计分析(计算平均值, 确定标准差), 并使用Origin Pro 2019b及GraphPad Prism 9软件绘制变化图。使用SPSS Statistics 23.0软件确定方差分析的显著差异。通过标准品的保留时间, 对检测的有机酸、氨基酸、糖类物质进行定性分析; 采用内标法对气相色谱数据进行定量分析。

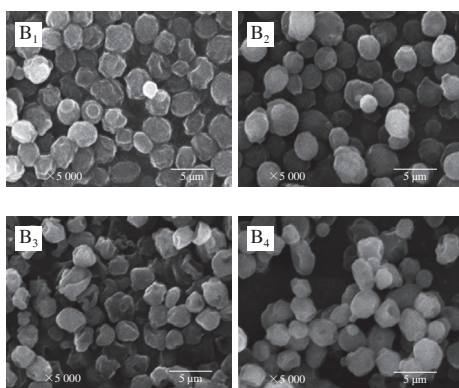
## 2 结果与分析

### 2.1 建立全合成最低营养生长培养基

为了规避逆境非必要营养物质对代谢分析和基因表达分析的干扰, 同时也为寻找逆境必须营养物提供干净背景, 以YNB为对照培养基和出发培养基, 选取酵母最适葡萄糖为唯一碳源, 以脯氨酸为唯一氮源, 采用单因素递减策略对微量元素进行评估, 建立鲁氏接合酵母最低营养需求的全合成培养基。鲁氏接合酵母在全合成培养基中及其不同逆境下的生长曲线如图1A所示。







左轴表示YNB、全合成培养基的 $OD_{600\text{ nm}}$ ；右轴表示高温、高盐逆境全合成培养基的 $OD_{600\text{ nm}}$ 。下标1~4.分别表示全合成培养基0、24 h, 高盐逆境全合成培养基48、8 h。

图1 高温(40℃)和高盐胁迫(18% NaCl)下鲁氏接合酵母2013310在全合成培养基中的生长变化(A)和显微镜观察(B)

Fig. 1 Growth changes of *Z. rouxii* 2013310 under HTS and HSS (A) and microscopic observation (B) of *Z. rouxii* 2013310 cultured in complete synthetic medium

鲁氏接合酵母2013310在YNB培养基培养120 h的最大 $OD_{600\text{ nm}}$ 达到 $31.01 \pm 0.72$ , 而在全合成培养基中培养120 h最大 $OD_{600\text{ nm}}$ 只有 $14.22 \pm 1.23$ 。同时, 该酵母在全合成培养基的高温和高盐逆境下培养120 h的最大 $OD_{600\text{ nm}}$ 只有 $2.44 \pm 0.13$ 和 $3.87 \pm 0.12$ 。此外, 与YNB培养基相似, 酵母细胞在全合成培养基中的生长曲线也显示出清晰的适应期(0~12 h)、增殖期(12~84 h)和稳定期(84~120 h)。由此可见, 全合成培养基能满足鲁氏接合酵母在正常生理环境下的生长增殖需求。鲁氏接合酵母在高盐逆境下需要大约36 h适应环境, 而在高温环境下的适应期只有大约2 h。同时, 在48 h时, 高盐逆境下的鲁氏接合酵母进入了对数生长前期, 而高温下的酵母细胞在4 h已经处于对数生长前期。可见, 该酵母对高温环境的适应能力比高盐逆境好。鉴于鲁氏接合酵母在两种逆境下的不同生长曲线, 高温逆境前12 h和高盐逆境前48 h(适应期和对数生长初期)被用来研究鲁氏接合酵母对两种逆境的响应差异。

通过扫描电镜观察鲁氏接合酵母2013310在全合成培养基及不同逆境下的形态学差异(图1B)。在全合成培养基培养下, 鲁氏接合酵母菌体主要呈圆形的单细胞状态(与正常状态下酵母形态一致), 部分表面有褶皱, 有明显的出芽现象。发酵24 h后菌体全部呈圆形或椭圆形, 表面圆润饱满, 光滑无褶皱。在高盐条件下, 酵母在48 h对数前期细胞缩小, 表面出现严重的褶皱变化, 大部分呈单细胞存在。在高温条件下的酵母在发酵8 h后, 细胞大小较全合成培养基0 h较为接近, 但存在部分细胞表面出现褶皱, 且分布似乎有絮凝的趋势, 这可能与高温对酵母细胞壁蛋白质结构影响有关<sup>[42]</sup>。高盐胁迫比高温胁迫对全合成培养基培养条件下酵母细胞形态影响更

为显著; 而相对于高温逆境, 该酵母在高盐条件展现出更高的生长活性。

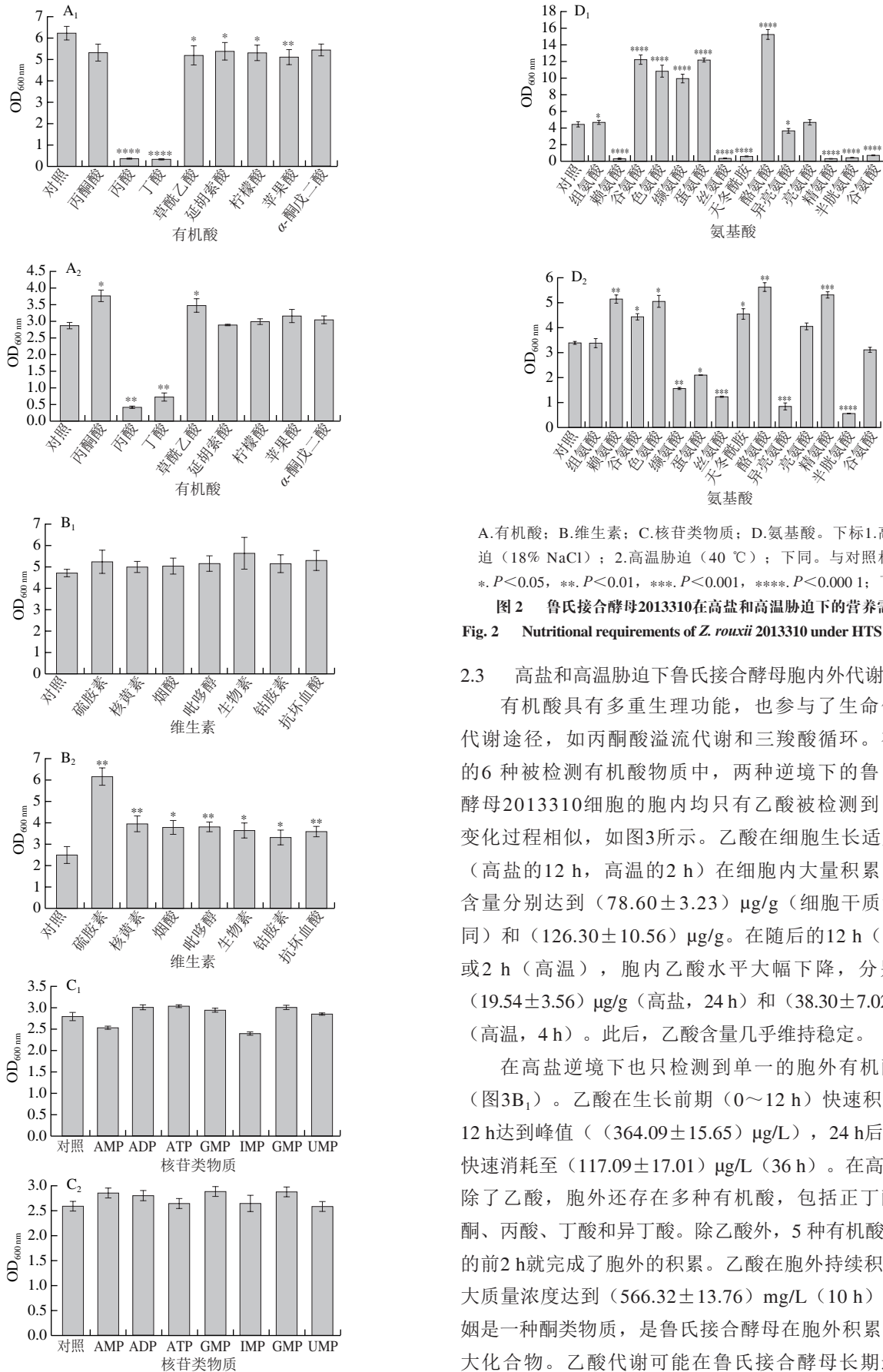
## 2.2 鲁氏接合酵母逆境条件下的营养需求差异

酵母细胞对营养物质的获取只有两条途径, 自身合成或转运外源营养物。微生物基因表达和代谢在逆境下会发生剧烈变化, 对营养物的需求应该会发生相应的调整。考虑到高温逆境和高盐逆境可能会关闭某些营养物的自身合成途径, 使得酵母细胞对营养物获取的方式发生变化, 因此, 分析全合成培养基中8种有机酸、7种维生素、7种核苷类物质和14种氨基酸对酵母细胞生长的影响, 将有助于阐明鲁氏接合酵母在面对高温逆境和高盐逆境时的营养需求差异。

高盐逆境下的鲁氏接合酵母2013310的生长不需要额外有机酸, 但丙酮酸和草酰乙酸却能促进高温逆境下酵母细胞的增殖, 较对照分别提高了34.5%和24.2%(图2A)。无论是高盐还是高温逆境, 鲁氏接合酵母2013310对丙酸和正丁酸敏感。这两种有机酸几乎完全抑制了高盐逆境下酵母细胞的生长。高温逆境下, 添加丙酸、正丁酸的鲁氏接合酵母2013310  $OD_{600\text{ nm}}$ 较对照( $OD_{600\text{ nm}}=2.81$ )分别降低了85.1%、74.0%。高盐逆境下, 不同类型维生素对鲁氏接合酵母高盐胁迫下生长无显著效果(图2B<sub>1</sub>); 高温逆境下, 维生素的添加, 在整体上促进了菌体生长, 其中添加硫胺素菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 较对照( $OD_{600\text{ nm}}=2.51$ )提高了1.47倍(图2B<sub>2</sub>)。不同类型核苷酸在两种条件下对鲁氏接合酵母2013310生长均无显著影响(图2C)。

氨基酸的添加对高盐和高盐胁迫下的鲁氏接合酵母2013310生长有明显影响(图2D)。高盐逆境下, 蛋氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、色氨酸均能缓解菌体所受高盐胁迫,  $OD_{600\text{ nm}}$ 较对照分别提高2.72、3.40、2.73倍和2.42倍; 高温逆境下, 能缓解细胞所受胁迫的氨基酸有赖氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、亮氨酸和精氨酸, 其 $OD_{600\text{ nm}}$ 较对照分别提高52.0%、31.1%、49.2%、34.5%、66.2%、19.4%和57.1%。丝氨酸和半胱氨酸均并不利于鲁氏接合酵母2013310耐受高盐和高盐胁迫。

总体而言, 遭遇高盐压力的鲁氏接合酵母细胞更需要外源氨基酸, 而补充维生素和氨基酸有助于缓解酵母细胞的高温压力。这些结果也表明, 鲁氏接合酵母的维生素和氨基酸自我合成代谢被高温压力所抑制。同时, 谷氨酰胺、色氨酸、酪氨酸是鲁氏接合酵母细胞在两种环境压力下均需要的氨基酸。缬氨酸和蛋氨酸是鲁氏接合酵母细胞在高盐压力下生长所需的独特氨基酸, 而赖氨酸、天冬酰胺和精氨酸是高温压力下鲁氏接合酵母细胞所需的独特氨基酸。由于氨基酸是蛋白质的重要组成部分<sup>[43]</sup>, 蛋白质又参与酶的形成、物质的转运及稳定细胞结构等<sup>[44]</sup>, 这表明有必要从蛋白层面进一步研究鲁氏接合酵母对高盐和高盐压力响应的机理。



A.有机酸; B.维生素; C.核苷类物质; D.氨基酸。下标1.高盐胁迫 (18% NaCl); 2.高温胁迫 (40 °C); 下同。与对照相比, \*.*P*<0.05, \*\*.*P*<0.01, \*\*\*.*P*<0.001, \*\*\*\*.*P*<0.000 1; 下同。

图2 鲁氏接合酵母2013310在高盐和高盐胁迫下的营养需求

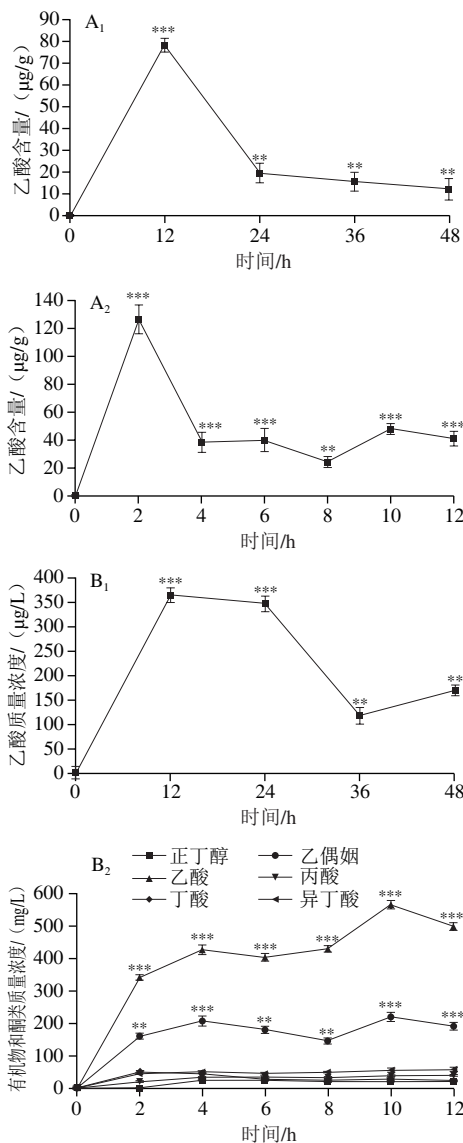
Fig. 2 Nutritional requirements of *Z. rouxii* 2013310 under HTS and HSS

### 2.3 高盐和高盐胁迫下鲁氏接合酵母胞内外代谢物差异

有机酸具有多重生理功能,也参与了生命体核心代谢途径,如丙酮酸溢流代谢和三羧酸循环。在选取的6种被检测有机酸物质中,两种逆境下的鲁氏接合酵母2013310细胞的胞内均只有乙酸被检测到,而且变化过程相似,如图3所示。乙酸在细胞生长适应前期(高盐的12 h,高温的2 h)在细胞内大量积累,最高含量分别达到(78.60±3.23) μg/g(细胞干质量,下同)和(126.30±10.56) μg/g。在随后的12 h(高盐)或2 h(高温),胞内乙酸水平大幅下降,分别降为(19.54±3.56) μg/g(高盐,24 h)和(38.30±7.02) μg/g(高温,4 h)。此后,乙酸含量几乎维持稳定。

在高盐逆境下也只检测到单一的胞外有机酸乙酸(图3B<sub>1</sub>)。乙酸在生长前期(0~12 h)快速积累并在12 h达到峰值((364.09±15.65) μg/L),24 h后乙酸被快速消耗至((117.09±17.01) μg/L(36 h)。在高温下,除了乙酸,胞外还存在多种有机酸,包括正丁醇、丙酮、丙酸、丁酸和异丁酸。除乙酸外,5种有机酸在培养的前2 h就完成了胞外的积累。乙酸在胞外持续积累,最大质量浓度达到((566.32±13.76) mg/L(10 h)。乙偶姻是一种酮类物质,是鲁氏接合酵母在胞外积累的第二大化合物。乙酸代谢可能在鲁氏接合酵母长期适应高

温高盐压力中起着重要的作用,是有机酸代谢的关键环节。推测乙酸的存在有利于乙酰辅酶A的合成,因为乙酰辅酶A是一种重要的抗逆中间代谢物<sup>[45]</sup>。同时,考虑到全合成培养基的特点,胞外有机酸的出现源于胞内有机酸代谢及其分泌。相比于高盐压力,糖代谢在高温压力下更活跃。可见,鲁氏接合酵母针对高盐 and 高温逆境采用了不同的有机酸代谢策略。无论是高盐还是高温胁迫,鲁氏接合酵母均不会在胞内积累有机酸,这应该是避免有机酸的伤害,与前面营养需求研究结果一致。

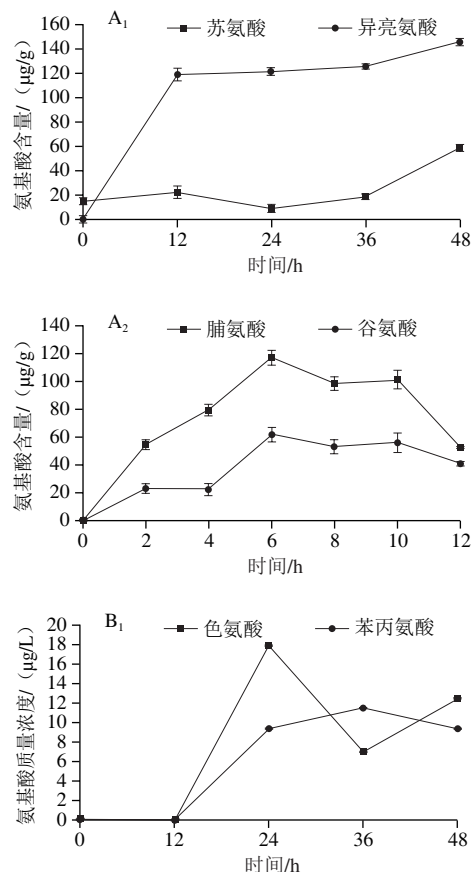


A.细胞内代谢物; B.细胞外代谢物。

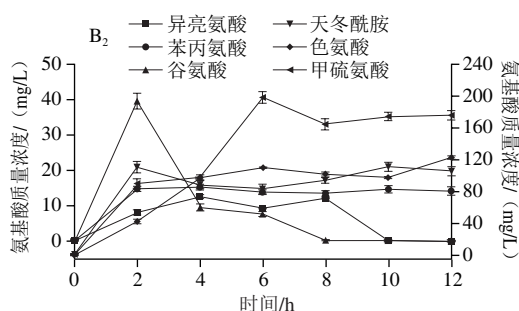
图3 高盐和高温胁迫下鲁氏接合酵母2013310胞内外代谢物的差异  
Fig.3 Differences in intracellular and extracellular metabolites in *Z. rouxii* 2013310 under HTS and HSS

2.4 高盐和高温胁迫下鲁氏接合酵母氨基酸代谢的差异  
由于本研究使用的是最低营养需求的全合成培养基,除脯氨酸外其他氨基酸只能来自细胞自身代谢过

程。鲁氏接合酵母2013310氨基酸代谢对高盐压力和高温压力的响应差异巨大,如图4所示。鉴于脯氨酸与其他氨基酸在含量上存在巨大差异,胞外脯氨酸的变化未在胞外氨基酸图中呈现。高盐压力下,只检测到4种氨基酸(苏氨酸、异亮氨酸、色氨酸和苯丙氨酸)(图4A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>),远低于高温压力下的7种氨基酸(脯氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、色氨酸和蛋氨酸)(图4A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>)。异亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸参与了鲁氏接合酵母对高盐和高温的响应。苏氨酸只参与高盐压力响应,脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、蛋氨酸只参与高温压力响应。异亮氨酸和脯氨酸分别是高盐压力和高温压力下酵母胞内主要响应的氨基酸。高盐压力下,异亮氨酸在0~12h快速积累至(119.34±0.56) μg/g,然后,基本在121.80 μg/g附近波动;高温条件下,脯氨酸含量在0~6h快速积累至峰值((117.30±5.18) μg/g),然后呈下降趋势。色氨酸和蛋氨酸分别是高盐压力和高温压力下酵母胞外主要响应的氨基酸。高盐逆境下,培养24h色氨酸快速积累至(17.97±0.01) μg/L,36h下降至(7.04±0.01) μg/L;高温压力下,甲硫氨酸含量在0~6h快速累积并在6h达到峰值((197.50±7.48) mg/L),8h存在小幅下降至(164.10±6.85) mg/L,后维持稳定。结合营养需求差异分析(图2B<sub>2</sub>),色氨酸是值得关注的鲁氏接合酵母耐受逆境的氨基酸。







A.细胞内氨基酸; B.细胞外氨基酸。左轴表示异亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸质量浓度; 右轴表示天冬酰胺、色氨酸、甲硫氨酸质量浓度。

图4 高盐和高温胁迫下鲁氏接合酵母胞内外氨基酸的差异

Fig. 4 Differences in intracellular and extracellular amino acids in *Z. rouxii* 2013310 under HTS and HSS

### 2.5 高盐和高温胁迫下鲁氏接合酵母抗逆代谢物的差异

微生物合成抗逆代谢产物来抵御环境压力是一种重要的压力响应机制。如图5所示,鲁氏接合酵母胞内糖代谢对高盐和高温逆境产生了两种截然不同的响应。高盐逆境下的鲁氏接合酵母细胞内只有鼠李糖和半乳糖(图5A)。在适应初期的12 h,酵母细胞大量积累鼠李糖,而半乳糖在胞内只有少量增加,但二者在24 h下降。进入细胞生长期时,这两种糖的胞内浓度显著上升。与之不同,高温逆境下鲁氏接合酵母胞内存在葡萄糖、海藻糖、木糖醇和甘油(图5B)。传统上的抗逆保护剂(海藻糖和甘油)在鲁氏接合酵母胞内只有极少量的积累,最大含量分别为(369.00±21.01) μg/g和(268.10±21.18) μg/g(8 h),而木糖醇水平却显著上升((1788.20±100.56) μg/g, 8 h)。这表明对鲁氏接合酵母2013310而言,木糖醇,而非海藻糖和甘油,是其高温压力下的抗逆保护剂。Wei Yangjian等<sup>[41]</sup>的研究也证实了处于稳定期的鲁氏接合酵母在高温环境下会大量合成木糖醇。然而,本研究结果表明,高盐压力下的鲁氏接合酵母细胞内没有葡萄糖。这可能是两个因素导致的:其一,高盐下的鲁氏接合酵母对外源葡萄糖的转运能力不强<sup>[46]</sup>,导致胞内葡萄糖浓度处于检测线之下;其二,对高盐环境下的鲁氏接合酵母而言,葡萄糖可能并不是最适碳源,胞内葡萄糖被快速转化成其他糖类物质。全合成培养基中添加木糖醇、海藻糖、甘油对鲁氏接合酵母在高盐环境下的生长均有促进作用,相比空白对照,OD<sub>600 nm</sub>分别提高了115.4%、217.0%、223.9%(数据未显示)。

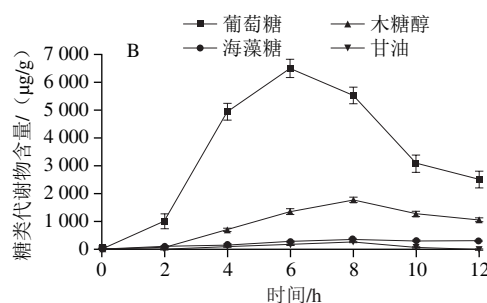
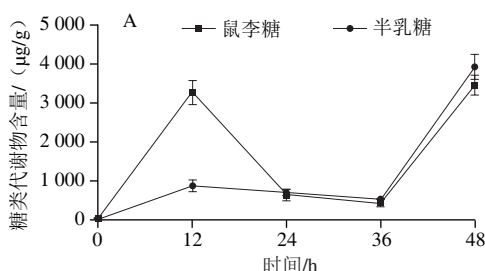


图5 高盐胁迫(A)和高温胁迫(B)下鲁氏接合酵母2013310糖类代谢物的差异

Fig. 5 Differences in intracellular carbohydrate metabolites in *Z. rouxii* under HSS (A) and HTS (B)

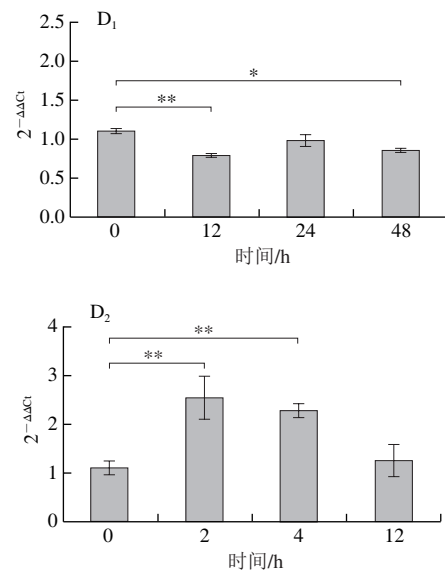
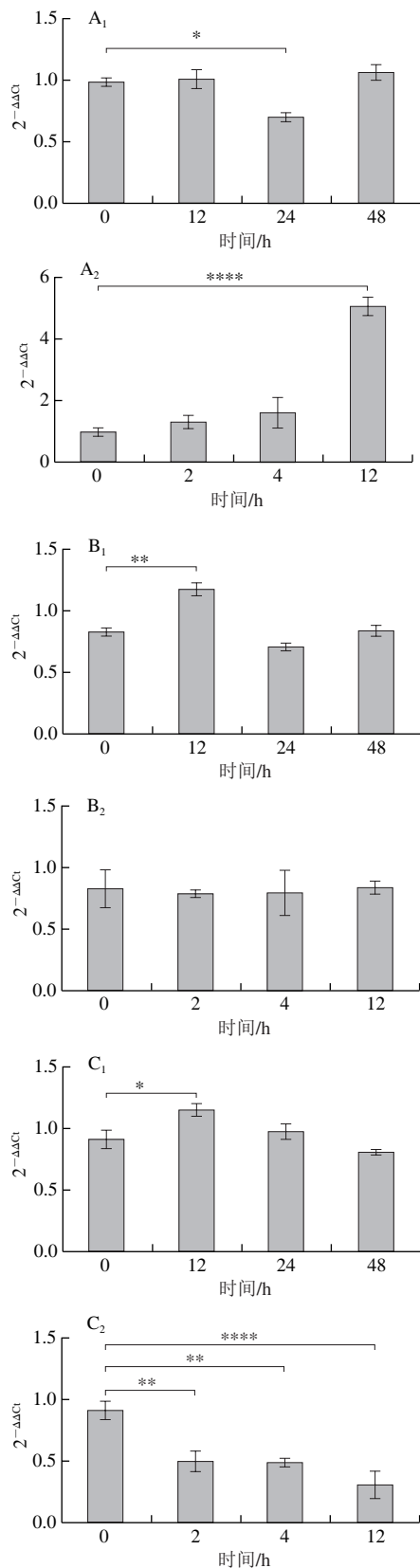
### 2.6 相关基因在高盐和高温胁迫下的时间表达差异

全局调控基因在生命体响应外界环境变化中扮演重要角色。营养需求和代谢层面所展示的鲁氏接合酵母2013310对高盐和高温逆境的响应差异说明两种逆境下的相关全局调控基因和抗逆基因表达存在不同。4种常见的逆境响应调控基因在两种逆境下的时序表达差异如图6所示。

在高盐逆境下,热激调控蛋白基因*HSF1*表达量除在24 h下调29.3%外,其他培养时间的表达量没有显著改变。逆境调控响应基因*MSN4*以及渗透胁迫响应基因*HOG1*表达量均在12 h上调,分别为初始的1.4、1.3倍。氧化胁迫调控基因*SOD1*转录表达水平在整个培养阶段均低于初始对照。可见,*MSN4*和*HOG1*是两个主要参与鲁氏接合酵母对高盐适应生长的调控基因,且主要在适应初期(12 h)发生响应。Dhar等<sup>[47]</sup>通过对实验室进化所构建的耐盐酿酒酵母中的压力响应基因表达分析发现*MSN4*的表达水平显著上调。在对汉斯德巴氏酵母的盐和氧化压力进行分析时,Laura等<sup>[48]</sup>发现用200 mmol/L NaCl处理该酵母10 min已能导致*MSN2*和*HOG1*上调。*HOG1*蛋白参与基因表达的现象在极端耐盐的黑酵母*Hortaea werneckii*中也能观察到<sup>[49]</sup>,这些结果与鲁氏接合酵母相似。虽然高盐常常被认为会引起氧化胁迫,然而鲁氏接合酵母细胞并没有遭遇氧化胁迫,这可能是研究采用的低营养环境导致。

在高温逆境下,热激调控蛋白基因*HSF1*表达量随培养时间延长持续上调,在12 h上调到最大值(5.1倍)。逆境调控响应基因*MSN4*相对转录水平在12 h内无显著变化。渗透胁迫响应基因*HOG1*转录水平随培养时间延长持续下调,2、4、12 h分别下调41.7%、43.8%、69.3%。氧化胁迫调控基因*SOD1*转录水平在培养2 h上调至2.3倍,但随后上调水平逐渐回落。可见,除*MSN4*外,其他3种调控基因均参与了鲁氏接合酵母对高温逆境的适应。与酿酒酵母*HSF1*在热刺激初期大量上调而后恢复至正常水平的现象不同<sup>[50]</sup>,鲁氏接合酵母在高温逆境下持续增加*HSF1*表达用于满足增殖期间蛋白体系稳定的需要。虽然30%葡萄糖达不到超渗水平,但该浓度对*HOG1*的表达产

生抑制效应,引起了氧化胁迫(*SOD1*表达上调)。考虑到不同逆境之间存在交联关系<sup>[48]</sup>,鲁氏接合酵母中高温抑制高渗而激活氧化胁迫的机理还有待深入研究。



A. *HSF1*; B. *MSN4*; C. *HOG1*; D. *SOD1*。

图6 鲁氏接合酵母2013310相关基因对高盐逆境和高温逆境的响应

Fig. 6 Responses of genes in *Z. rouxii* 2013310 to HTS and HSS

### 3 结论

温度压力和盐压力是鲁氏接合酵母在酱油高盐固态发酵过程中遭遇的主要逆境<sup>[51]</sup>。与其他环境压力不同,微生物对这两种逆境无法通过采用降解压力因子的方式缓解。本研究基于低营养全合成培养基,在营养、代谢和转录3个层面分析了鲁氏接合酵母2013310从生长适应期到对数生长初期的高盐和高温逆境响应。总体而言,该酵母采用了不同的策略来适应高温和高盐逆境。遭遇高盐压力的鲁氏接合酵母细胞更需要外源氨基酸,而补充维生素和氨基酸有助于缓解酵母细胞的高温压力。谷氨酰胺、色氨酸、酪氨酸和乙酸代谢对酵母细胞适应高温和高盐逆境极其重要。本研究加深了对耐盐鲁氏接合酵母耐温机制的理解。同时,微生物不同抗性之间存在交互作用<sup>[52-53]</sup>。鲁氏接合酵母耐高盐的特性与对温度的高敏感性之间的关联性有待研究,这将有助于为双抗逆新型鲁氏接合酵母细胞株的构建提供方向和着力点。

### 参考文献:

- [1] DAI J, LI K, SONG N, et al. *Zygosaccharomyces rouxii*, an aromatic yeast isolated from chili sauce, is able to biosynthesize 2-phenylethanol via the Shikimate or Ehrlich pathways[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 597454. DOI:10.3389/fmicb.2020.597454.
- [2] GUO J, LUO W, WU X M, et al. Improving RNA content of salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis and its application in soy sauce brewing[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(12): 180. DOI:10.1007/s11274-019-2743-5.



- [3] LI Y C, DU W, MENG F B, et al. Tartary buckwheat protein hydrolysates enhance the salt tolerance of the soy sauce fermentation yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128382. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128382.
- [4] IACUMIN L, COLAUTTI A, COMI G. *Zygosaccharomyces rouxii* is the predominant species responsible for the spoilage of the mix base for ice cream and ethanol is the best inhibitor tested[J]. Food Microbiology, 2022, 102: 103929. DOI:10.1016/j.fm.2021.103929.
- [5] PEI R Q, LV G B, GUO B R, et al. Physiological and transcriptomic analyses revealed the change of main flavor substance of *Zygosaccharomyces rouxii* under salt treatment[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 990380. DOI:10.3389/fnut.2022.990380.
- [6] GUO H, QIU Y, WEI J P, et al. Genomic insights into sugar adaptation in an extremophile yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3157. DOI:10.3389/fmicb.2019.03157.
- [7] TEKARSLAN-SAHIN S H, ALKIM C, SEZGIN T. Physiological and transcriptomic analysis of a salt-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant obtained by evolutionary engineering[J]. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2018, 18(1): 55-65. DOI:10.17305/bjbm.2017.2250.
- [8] SANTIAGO A M, GONCALVES D L, MORANO K A. Mechanisms of sensing and response to proteotoxic stress[J]. Experimental Cell Research, 2020, 395(2): 112240. DOI:10.1016/j.yexcr.2020.112240.
- [9] LI M W, LANG X Y, MORAN CABRERA M, et al. CRISPR-mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2-phenylethanol biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2021, 14(1): 3. DOI:10.1186/s13068-020-01852-3.
- [10] ENDRES L, ROSE R E, DOYLE F, et al. 2'-*O*-Ribose methylation of transfer RNA promotes recovery from oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS ONE, 2020, 15(2): e0229103. DOI:10.1371/journal.pone.0229103.
- [11] PEETERMANS A, FOULQUIE-MORENO M R, THEVELEIN J M. Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 8(6): 111-130. DOI:10.15698/mic2021.06.751.
- [12] SARDI M, PAITHANE V, PLACE M, et al. Genome-wide association across *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals substantial variation in underlying gene requirements for toxin tolerance[J]. PLoS Genet, 2018, 14(2): e1007217. DOI:10.1371/journal.pgen.1007217.
- [13] KARIM A, GERLIANI N, AIDER M. *Kluyveromyces marxianus*: an emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 333: 108818. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818.
- [14] SUZUKI T, HOSHINO T, MATSUSHIKA A. High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 129: 109359. DOI:10.1016/j.enzmictec.2019.109359.
- [15] LI X, ZHANG Y, ZABED H M, et al. High-level production of *D*-arabitol by *Zygosaccharomyces rouxii* from glucose: metabolic engineering and process optimization[J]. Bioresource Technology, 2023, 367: 128251. DOI:10.1016/j.biortech.2022.128251.
- [16] SONG N, XIA H L, YANG Q, et al. Differential analysis of ergosterol function in response to high salt and sugar stress in *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. FEMS Yeast Research, 2022, 22(1): foac040. DOI:10.1093/femsyl/foac040.
- [17] XU P, QIAO K J, STEPHANOPoulos G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(7): 1521-1530. DOI:10.1002/bit.26285.
- [18] GAJDOS P, HAMBALKO J, SLANY O, et al. Conversion of waste materials into very long chain fatty acids by the recombinant yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2020, 367(6): fnaa042. DOI:10.1093/femsle/fnaa042.
- [19] PERLI T, WRONSKA A K, ORTIZ-MERINO R A, et al. Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2020, 37(4): 283-304. DOI:10.1002/yea.3461.
- [20] SCHULER M H, ENGLISH A M, XIAO T, et al. Mitochondrial-derived compartments facilitate cellular adaptation to amino acid stress[J]. Molecular Cell, 2021, 81(18): 3786-3802. DOI:10.1016/j.molcel.
- [21] ZHANG W P, DU G C, ZHOU J W, et al. Regulation of sensing, transportation, and catabolism of nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2018, 82(1): e00040-17. DOI:10.1128/MMBR.00040-17.
- [22] ENRIQUEZ-HESLES E, SMITH D L Jr., MAQANI N, et al. A cell-nonautonomous mechanism of yeast chronological aging regulated by caloric restriction and one-carbon metabolism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100125. DOI:10.1074/jbc.RA120.015402.
- [23] GUAN N Z, LIU L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 51-65. DOI:10.1007/s00253-019-10226-1.
- [24] ALSAMMAR H F, NASEEB S, BRANCIA L B, et al. Targeted metagenomics approach to capture the biodiversity of *Saccharomyces* genus in wild environments[J]. Environmental Microbiology Reports, 2019, 11(2): 206-214. DOI:10.1111/1758-2229.12724.
- [25] DUMAN-SCHEEL M. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) as an interfering RNA expression and delivery system[J]. Current Drug Targets, 2019, 20(9): 942-952. DOI:10.2174/1389450120666181126123538.
- [26] MORARD M, BENAVENT-GIL Y, ORTIZ-TOVAR G, et al. Genome structure reveals the diversity of mating mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids, and the genomic instability that promotes phenotypic diversity[J]. Microbial Genomics, 2020, 6(3): e000333. DOI:10.1099/mgen.0.000333.
- [27] RIBEIRO R A, BOURBON-MELO N, SA-CORREIA I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 953479. DOI:10.3389/fmicb.2022.953479.
- [28] KIM I S, KIM H, KIM Y S, et al. HSF1-mediated oxidative stress response to menadione in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377Y3 by using proteomic approach[J]. Advances in Bioscience & Biotechnology, 2013, 4(1): 44-54. DOI:10.4236/abb.2013.41007.
- [29] REITERW, KLOPF E, WEVER V D, et al. Yeast protein phosphatase 2A-Cdc55 regulates the transcriptional response to hyperosmolarity stress by regulating MSN2 and MSN4 chromatin recruitment[J]. Molecular & Cellular Biology, 2013, 33(5): 1057-1072. DOI:10.1128/MCB.00834-12.
- [30] KUANG Z, JI H, BOEKE J D. Stress response factors drive regrowth of quiescent cells[J]. Current Genetics, 2018, 64(4): 807-810. DOI:10.1007/s00294-018-0813-0.
- [31] INOUE Y, MAETA K, NOMURA W. Glyoxalase system in yeasts: structure, function, and physiology[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011, 22(3): 278-284. DOI:10.1016/j.semedb.2011.02.002.
- [32] SÁNCHEZ N S, CALAHORRA M, GONZÁLEZ J, et al. Contribution of the mitogen-activated protein kinase HOG1 to the halotolerance of

- the marine yeast *Debaryomyces hansenii*[J]. *Current Genetics*, 2020, 66(6): 1135-1153. DOI:10.1007/s00294-020-01099-3.
- [33] YE P L, WANG X Q, YUAN B, et al. Manipulating cell flocculation-associated protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* enables improved stress tolerance and efficient cellulosic ethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 348: 126758. DOI:10.1016/j.biortech.2022.126758.
- [34] 张小华, 刘向勇, 卞伟华, 等. 酵母*SOD1*基因缺失突变体应答真菌细胞壁抑制剂CFW的转录组学分析[J]. *河南农业科学*, 2016, 45(1): 76-79. DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2016.01.016.
- [35] 张小华, 刘向勇, 王群林, 等. 酿酒酵母*SOD1*、*SOD2*基因缺失对胁迫耐受性的影响[J]. *中国酿造*, 2012, 31(9): 246. DOI:10.1016/j.cjcb.170226.
- [36] PHONG H X, KLANRIT P, DUNG N T P, et al. High-temperature ethanol fermentation from pineapple waste hydrolysate and gene expression analysis of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 13965. DOI:10.1038/s41598-022-18212-w.
- [37] HUANG C J, LU M Y, CHANG Y W, et al. Experimental evolution of yeast for high-temperature tolerance[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(8): 1823-1839. DOI:10.1093/molbev/msy077.
- [38] LI C S, LIU Q Y, WANG Y Q, 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]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 222. DOI:10.1186/s13068-021-02071-0.
- [39] WANG Y D, LIN Y P, LU X Y, et al. Selection and application of novel high temperature inducible promoters in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(1): 1-5. DOI:10.1016/j.jbiosc.2020.02.006.
- [40] LEE S J, RAMESH R, DE BOOR V, et al. Cost-effective and rapid lysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells for quantitative western blot analysis of proteins, including phosphorylated eIF2 $\alpha$ [J]. *Yeast*, 2017, 34(9): 371-382. DOI:10.1002/yea.3239.
- [41] WEI Y J, YAN Z Z, LIU M Q, et al. Metabolic characteristics of intracellular trehalose enrichment in salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 935756. DOI:10.3389/fmicb.2022.935756.
- [42] 丁华建, 王金晶, 朱佳琪, 等. 酿酒酵母在传代过程中生理变化研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(3): 311-319. DOI:10.13345/j.cjcb.170226.
- [43] RYU B, SHIN K H, KIM S K. Muscle Protein hydrolysates and amino acid composition in fish[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(7): 377. DOI:10.3390/md19070377.
- [44] DUBE C D, GUIOT S R. Characterization of the protein fraction of the extracellular polymeric substances of three anaerobic granular sludges[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 23. DOI:10.1186/s13568-019-0746-0.
- [45] SON S M, PARK S J, LEE H, et al. Leucine signals to mTORC1 via its metabolite acetyl-coenzyme A[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 29(1): 192-201. DOI:10.1016/j.cmet.2018.08.013.
- [46] BIZZARRI M, CASSANELLI S, DUSKOVA M, et al. A set of plasmids carrying antibiotic resistance markers and Cre recombinase for genetic engineering of nonconventional yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Yeast*, 2019, 36(12): 711-722. DOI:10.1002/yea.3438.
- [47] DHAR R, SÄGESSER R, WEIKERT C, et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to saline stress through laboratory evolution[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2011, 24(5): 1135-1153. DOI:10.1111/j.1420-9101.2011.02249.x.
- [48] LAURA R M, JOSE R, CARMEN M. Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(11): 170. DOI:10.1007/s11274-019-2753-3.
- [49] VAUPOTI T, PLEMENITA A. Differential gene expression and *HOG1* interaction with osmoresponsive genes in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 280. DOI:10.1186/1471-2164-8-280.
- [50] VERGHESE J, ABRAMS J, WANG Y Y, et al. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(2): 115-158. DOI:10.1128/MMBR.05018-11.
- [51] DEVANTHI P V P, GKATZIONIS K. Soy sauce fermentation: microorganisms, aroma formation, and process modification[J]. *Food Research International*, 2019, 120: 364-374. DOI:10.1016/j.foodres.2019.05.037.
- [52] YANG H, YAO S J, ZHANG M, et al. Heat adaptation induced cross protection against ethanol stress in *Tetragenococcus halophilus*: physiological characteristics and proteomic analysis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 686672. DOI:10.3389/fmicb.2021.686672.
- [53] WANG D K, ZHANG M, HUANG J, et al. Heat preadaptation improved the ability of *Zygosaccharomyces rouxii* to salt stress: a combined physiological and transcriptomic analysis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(1): 259-270. DOI:10.1007/s00253-020-11005-z.