[文章编号] 1003－4684(2025)01-0076-06

组氨酸对 *Starmerella bacillaris* R5 香草醛耐受性的影响

王 睿[1]，姚 兰[2]，杨海涛[1]

(1 湖北工业大学材料与化学工程学院，湖北 武汉 430068；2 湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为了增强酵母对香草醛的耐受性，并探究其潜在机理，以 *Starmerella bacillaris* R5 为研究对象，评估外源组氨酸的添加对 R5 菌株香草醛耐受情况的影响，并进一步通过酵母测定胞内的过氧化氢、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶(SOD)的活性，以及细胞膜的通透性和胞内活性氧的变化，来揭示组氨酸对提高酵母香草耐受性的机理。结果表明，添加组氨酸可缩短 R5 菌株的生长延滞期，提高其对香草醛的耐受性。具体而言，胞内过氧化氢含量降低 79.37%，SOD 酶活性提升 17.78% ，而 CAT 酶活性提高 1405 倍。此外，PI 染色的细胞数目降低了 79.17%，ROS 染色细胞数降低了 48.89%。这说明组氨酸的添加能够减少菌株胞内活性氧含量和降低氧化胁迫，有效提高了 *Starmerella bacillaris* R5 对香草醛的耐受性。

[关键词] 组氨酸；香草醛；*Starmerella bacillaris*；耐受性；乙醇生产

[中图分类号] TS7 [文献标识码] A

生物乙醇因其可持续、可再生、易于生产和无毒性的优势，被视为化石燃料最理想的替代品[1]。而木质纤维原料在预处理过程中，会产生包括香草醛在内的酚类化合物、糠醛等呋喃醛化合物和乙酸等有机酸。这些物质会抑制酵母的生长[2]。香草醛属于含愈创木基的酚类化合物，即使在低浓度条件下也可对酿酒酵母产生强烈的抑制作用，常被作为研究酚类化合物对酵母影响的代表性物质。香草醛可以通过氧化反应引起细胞内的氧化应激反应[3]，导致 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子发生氧化损伤[4]；它还能抑制细胞翻译进程，造成大量未被翻译的 mRNA 与信使核蛋白积累，形成细胞质加工小体和胁迫斑粒[5-6]。此外，香草醛还能引发细胞凋亡反应，导致细胞死亡和功能障碍，对细胞的生长和发育产生不利影响。

目前，提高酵母香草醛耐受性方法主要有基因工程改造和适应性进化[7-10]，这些方法虽取得了一定的进展，但都需要长时间的实验观察，且基因工程可能会使酵母失去其原有的优良特性。而向培养基中添加保护剂的方法不仅可以缩短实验周期，还不会损害酵母原有特性。氨基酸作为微生物生长发育不可或缺的物质，不仅作为氮源，一些生糖氨基酸起到了保护作用[11-15]，且易于透过生物膜的短肽被吸收利用，减少能量消耗。然而，关于通过添加氨基酸来提高酵母对香草醛耐受性的研究尚未见报道。

Starmerella bacillaris 是一种非酿酒酵母菌，常用于葡萄酒酿造，也是本实验室从梨子表面筛选得到的一种耐高糖酵母。在前人研究的基础上，本研究旨在探究组氨酸对 *Starmerella bacillaris* 在香草醛胁迫下的生长延滞期和乙醇产量的影响，并通过测定酵母胞内过氧化氢和过氧化氢酶、超氧化物歧化酶，以及细胞膜通透性及胞内活性氧的变化，揭示组氨酸提高酵母对香草耐受性的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 菌种保藏方法

*Starmerella bacillaris R*5，实验室保藏。

1.2 耐香草醛能力测定

菌种保藏斜面培养基：10 g/L 酵母浸粉，20 g/L 蛋白胨，20 g/L 葡萄糖，20 g/L 琼脂，115℃灭菌 20 min。

在 YEPD 培养基中加入不同浓度的香草醛(0、

[收稿日期] 2023－08－08

[基金项目] 湖北省教育厅重点项目(D20211404)，湖北省中青年科技创新团队计划项目(T2022011)

[第一作者] 王 睿(1999－)，女，湖北黄冈人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为生物质资源工程。

[通信作者] 杨海涛(1979－)，男，湖北广水人，湖北工业大学教授，研究方向为生物质资源工程及木质素化学。

1.0、2.0、3.0 g/L)，研究香草醛对 *Starmerella bacillaris* R5 的潜在影响。

评估在香草醛胁迫(3.0 g/L)条件下，不同浓度组氨酸(0 、100、500、1000 mg/L)对 *Starmerella bacillaris* R5 的保护效果。

采用 DNS 法测定葡萄糖的含量，使用生物传感器检测乙醇的含量。

1.3　胞内过氧化氢含量、过氧化氢酶活、超氧化物歧化酶活的测定

1)过氧化氢含量

$$n(H_2O_2) = 10 \times (\Delta A_{测定管} - \Delta A_{空白管}) \div (\Delta A_{标准管} - \Delta A_{空白管})$$

2)过氧化氢酶活力

$$A_{CAT} = \Delta A \times 271 \div V_{样} \div T \times N$$

式中：271 为斜率倒数，常数，直接使用；$V_{样}$ 为取样量，0.1 mL；T 为反应时间，60 s；N 为样本测试前稀释倍数。

3)超氧化物歧化酶活力

$$A_{SOD} = \frac{(A)_{对照} - A_{对照空白}) - (A_{测定} - A_{测定空白})}{A_{对照} - A_{对照空白}} \times 100\% \div 50\% \times \frac{反应体系\ 0.24\ mL}{稀释倍数\ 0.02\ mL}$$

1.4　细胞膜通透性和胞内活性氧含量检测

细胞膜完整性的测定，使用流式细胞仪(Becton- Dickinson)监测酿酒酵母在香草醛胁迫和组氨酸补充下的生理应激反应。碘化丙啶(PI)用于监测膜完整性，2′，7′-二氯荧光素二乙酸酯(DCFDA)用于测定 ROS 的积累。

1.5　数据处理

研究中所有实验均重复 3 次，以确保结果的可靠性和重复性。实验数据的统计分析采用“均值±标准差”的形式，以准确反映数据的集中趋势和离散程度。此外，实验结果的图形表示是通过使用 OriginPro 2019b 软件(Northampton，MA，USA)和 FlowJo_V10 软件精心绘制的。这些工具数据处理和图形绘制功能强大，便于观察和分析数据趋势。

2　结果与讨论

2.1　香草醛对 *Starmerella bacillaris* R5 菌株的生长及产乙醇的影响

图 1 为 R5 菌株在不同香草醛浓度下的生长曲线，可以看出香草醛对 R5 菌株的生长有明显的抑制作用。当香草醛浓度为 3 g/L 时，菌株延滞期最长约为 60 h；而在 4 g/L 香草醛浓度下，菌株没有生长迹象。说明香草醛浓度越大，对 R5 菌株的抑制效果越强，这与前期关于抑制物影响酿酒酵母生长的结果一致：5 mmol/L 的香草醛对葡萄糖消耗和乙醇产率具有显著抑制作用，与对照组相比，发酵 8 h时分别下降 31.4%和 29.8%；当香草醛浓度为 30 mmol/L 时，细胞生长被完全抑制[16]。

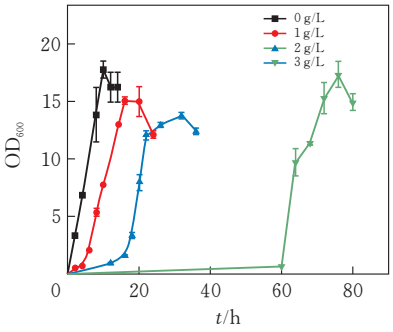
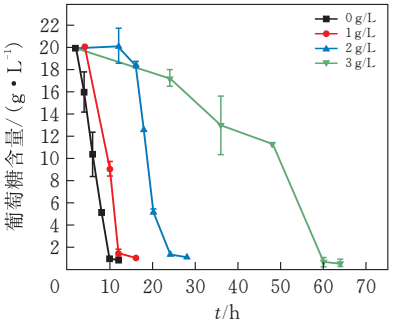


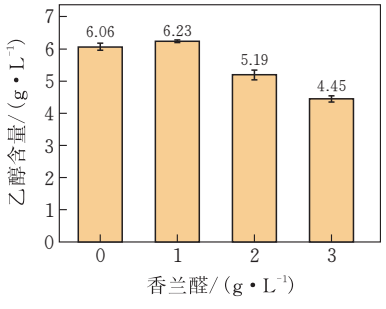
图 1　R5 菌株在不同香草醛浓度下生长曲线

图 2a 为 R5 菌株在不同香草醛浓度下的糖耗曲线。由图可得，香草醛浓度越大，细胞开始消耗葡萄糖的时间越迟，对酵母细胞的生理活动影响越大，这与前期生长曲线的结果一致。图 2b 为 R5 菌株在不同香草醛浓度下最高乙醇产量柱状图，空白组(香草醛浓度 0 g/L)最高乙醇产量 6.06 g/L，且乙醇的最大产量随着香草醛浓度增加而减少。

结合生长曲线和糖耗曲线得出，低浓度香草醛对 R5 菌株影响较小，高浓度表现出明显的抑制效果，3 g/L 香草醛对 R5 菌株的抑制作用较大。



(a) 香草醛对酵母糖耗的影响



(b) 香草醛对酵母产乙醇的影响

图 2　香草醛对 R5 菌株发酵性能的影响

2.2　组氨酸对 R5 菌株耐受香草醛的影响

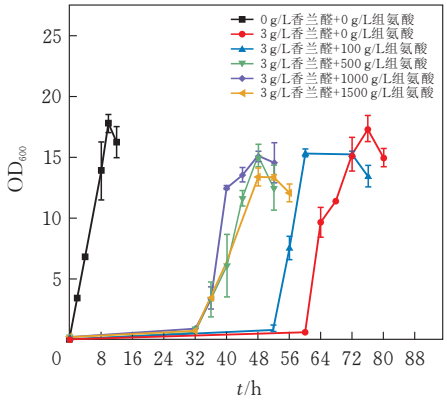
在 3 g/L 香草醛胁迫下，在培养基中添加不同浓度的组氨酸，分析添加组氨酸对 R5 菌株香草醛耐受性的影响。

图 3a 为 R5 菌株在添加不同浓度组氨酸 (3 g/

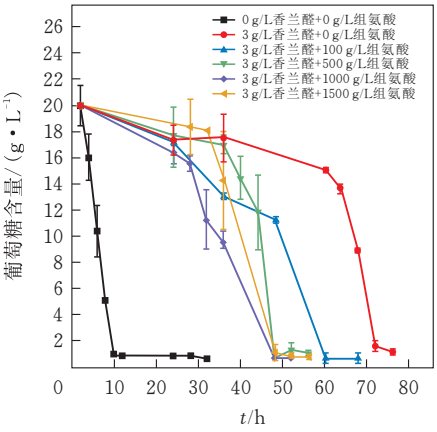
L 香草醛）的培养基中生长的情况。在 3 g/L 香草醛浓度下，添加组氨酸后的 R5 菌株，其延滞期明显缩短，分别缩短了 8 h(100 mg/L)、26 h(500 mg/L)、28 h(1000 mg/L)、28 h(1500 mg/L)。因此，向培养基中添加一定浓度的组氨酸，可以有效提高酵母细胞对香草醛的耐受性，促进酵母细胞的生长发育。

图 3b 为 3 g/L 香草醛浓度下，向培养基中添加不同浓度组氨酸后 R5 菌株的糖耗曲线。分析曲线得出，葡萄糖的消耗与生长曲线的趋势基本一致，即延滞期葡萄糖的消耗速度很慢，30 h 内只消耗了 4 g/L左右的葡萄糖，且添加不同浓度的氨基酸对前期糖耗影响不大。中后期(30～48 h)葡萄糖消耗速率相差较大，500、1000 和 1500 mg/L 在48 h左右葡萄糖消耗殆尽。

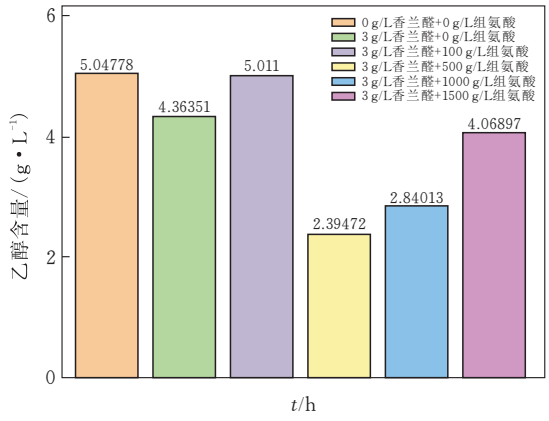
图 3c 描绘了在 3 g/L 香草醛浓度下，组氨酸对 R5 菌株在香草醛胁迫下产乙醇能力的影响。可以明显看出，当组氨酸浓度为 500 mg/L 时，其最大乙醇产量仅为 2.39 g/L。这一现象可能归因为葡萄糖代谢通路中转化为乙醇的分支酶活性受到抑制，这一点还需要进一步研究来证实。与对照组(3 g/L 香草醛＋0 mg/L 组氨酸)相比，100 mg/L 组氨酸的处理使乙醇产量提高了 15%。



(a)组氨酸对酵母生长的影响



(b) 组氨酸对酵母糖耗的影响



(c) 组氨酸对酵母产乙醇的影响

图 3 组氨酸对 R5 在香草醛胁迫下生长及发酵性能的影响

前期研究表明，当额外添加 500 和 1000 mg/L 脯氨酸时，在混合抑制剂(糠醛、乙酸和苯酚)胁迫下，延滞期没有明显缩短，生物量略有提高；而添加 1500 mg/L 脯氨酸后，延滞期缩短 12 h，显著提高了菌株对混合抑制剂的耐受性。另外，添加 1000 mg/L肌醇能将延滞期缩短了 20 h，展现出明显的生长优势[19]。这些结果与本文的发现基本一致，进一步证实了组氨酸的加入对于提高酵母的香草醛耐受性，优势更加明显。

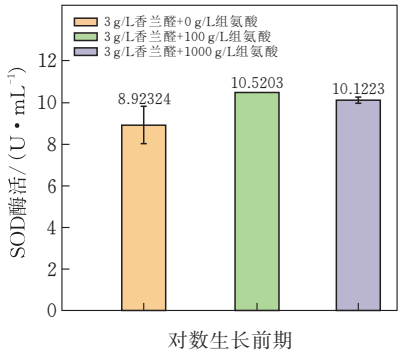
2.3 组氨酸提高 R5 菌株香草醛耐受性的机理

2.3.1 酵母细胞内过抗氧化系统分析 超氧化物歧化酶(SOD)是机体超氧自由基清除因子，能够催化超氧负离子和氢离子的反应，生成过氧化氢和水。过氧化氢是对机体有害的活性氧，需要在过氧化氢酶作用下继续分解为完全无害的水。前期研究表明，经过 3 h 香草醛处理的热带假丝酵母样品中，过氧化物酶基因和超氧化物歧化酶基因呈现上调的表达情况。这说明在香草醛处理过程中，细胞内的过氧化物酶系统在清除自由基方面起到了关键作用[20]。为进一步解析组氨酸提高酵母 R5 香草醛耐受性的机理，分别测定了对数生长期的前期酵母胞内抗氧化酶活及过氧化氢的含量。

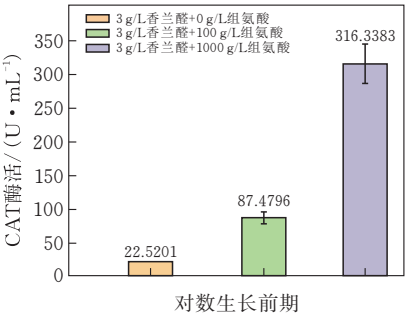
胞内超氧化物歧化酶活的结果（图 4a）可以清晰看出，相较对照组，培养基中添加组氨酸的 R5 菌株在前期胞内外超氧化物歧化酶含量有所提高，在添加 100 mg/L 组氨酸条件下，胞内 SOD 含量提高了 17.78% ；添加 1000 mg/L 组氨酸条件下，胞内 SOD 含量提高了 13.45% 。图 4b 可以明显看出添加 100 mg/L 组氨酸条件下，胞内 CAT 酶活提高了 388 倍；添加 1000 mg/L 组氨酸条件下，胞内 CAT 酶活提高了 1405 倍。这说明组氨酸可以通过提高酵母的抗氧化性能来增强菌株的香草醛耐受性。

图 4c 清晰展示了 R5 菌株在 3 g/L 香草醛胁

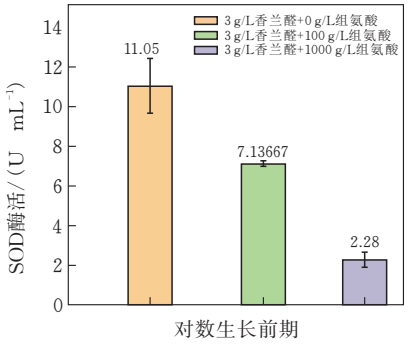
迫下对数生长期前期胞内过氧化氢含量的变化。图中可见，对照组 R5 菌株在对数生长期前期胞内过氧化氢含量较高。与对照组相比，添加组氨酸的 R5 菌株胞内外过氧化氢含量明显降低。具体而言，在添加 100 mg/L 组氨酸条件下，胞内过氧化氢含量减少了 35.41%；而在添加 1000 mg/L 组氨酸条件下，胞内过氧化氢含量更是减少了 79.37%。这些结果表明，实验组 R5 菌株受到的氧化胁迫小于对照组，即添加组氨酸通过减少酵母胞内的氧化胁迫，有效提高了菌株对香草醛的耐受性。



(a)对 SOD 酶活的影响



(b)对 CAT 酶活的影响



(c)对过氧化氢浓度的影响

图 4　组氨酸对 R5 在香草醛胁迫下胞内抗氧化酶活和过氧化氢含量的影响

2.3.2　组氨酸对 R5 在香草醛胁迫下细胞膜和活性氧水平的影响　酚类化合物可以改变酵母细胞膜结构，增加细胞膜的通透性和流动性，从而破坏细胞膜的结构和功能[21]，为了解析组氨酸提高 R5 香草醛耐受性的机制，对比了在香草醛胁迫下不同浓度组氨酸加入后细胞膜通透性的变化。图 5 为 R5 菌株于对数生长期前期，在 3 g/L 香草醛胁迫下添加不同浓度组氨酸后的碘化丙啶(PI)染色图。细胞死亡后，细胞膜通透性增大，使得 PI 染料能够进入细胞内部并插入 DNA 分子中。由图可得，在 3 g/L 香草醛胁迫下，实验组菌株染色细胞比例低于对照组菌株，实验组菌株 PI 染色分别为 1.07%和 0.27%，表明这部分细胞失去活性，相对于对照组菌株 1.3%而言，死亡细胞比例减少，即细胞死亡率有所下降，说明添加组氨酸可提高酵母细胞膜的完整性，增强了对香草醛的耐受性。这一机制与麦角甾醇通过提高酿酒酵母细胞膜的完整性而增强其糠醛耐受性的机理相似[1]。

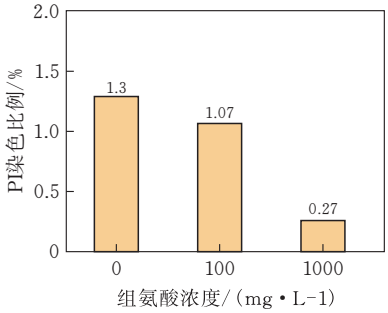
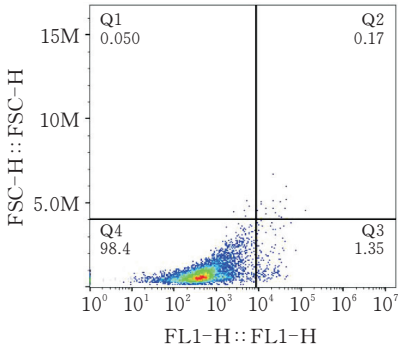


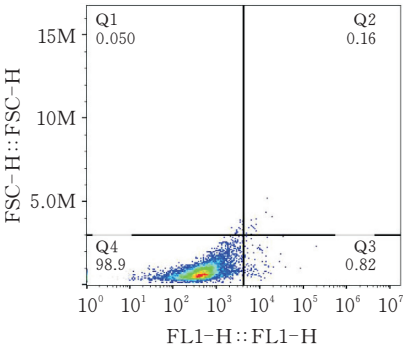
图 5　R5 菌株在不同组氨酸浓度条件下细胞膜通透性对比(3 g/L 香草醛)

先前的研究结果揭示，香草醛可以触发细胞内的 ROS 积累，并且这种积累与香草醛浓度呈剂量依赖关系。香草醛所引发的氧化损伤进一步导致线粒体的断裂和片段化[3]。

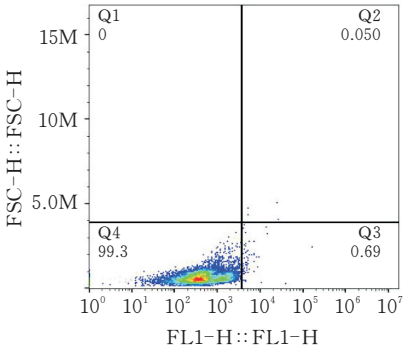
图 6 展示了 R5 菌株在 3 g/L 香草醛胁迫下对数生长期前期，添加不同浓度组氨酸后的 ROS 染料（2，7-二氯荧光素二乙酸酯）染色情况。活性氧，包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等，是细胞内外环境中具有高度反应性的氧分子，过量的活性氧会对细胞造成损害，与细胞内的生物大分子发生氧化反应，导致其结构和功能的改变。因此，细胞内的活性氧水平能体现出细胞受到自由基损伤的情况。



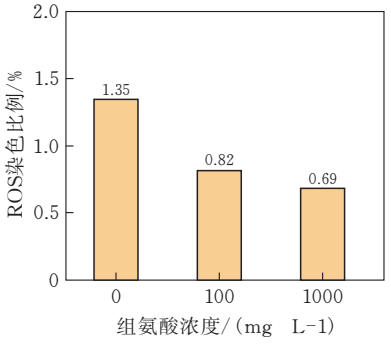
(a)对照菌株(3 g/L 香草醛)



(b)实验菌株(3 g/L 香草醛+100 mg/L 组氨酸)



(c)实验菌株(3 g/L 香草醛+1000 mg/L 组氨酸)



(d)R5 菌株(3 g/L 香草醛)

图 6 在不同组氨酸浓度条件下 ROS 染色情况

由图 6a 可见,在香草醛(3 g/L)胁迫下,实验组菌株的活性氧含量有所降低,对照组菌株 ROS 染色比例为 1.35%,而实验组菌株 ROS 染色比例分别为0.82%和 0.69%,说明添加了组氨酸后,胞内活性氧含量降低,从而增强对香草醛的耐受性。这一发现与前述抗氧化体系及过氧化氢的研究结果一致。

3 结论

本研究以香草醛作为生物质预处理液中的抑制剂,模拟胁迫环境,以 *Starmerella bacillaris* R5 为研究对象,探讨添加组氨酸对其香草醛耐受性的影响。研究结果表明,添加组氨酸能够提高 R5 菌株对高浓度香草醛(3 g/L)的耐受性,特别是添加 1000 mg/L 组氨酸时,可缩短 28 h 的生长延滞期。与对照组菌株相比,实验组菌株胞内过氧化氢含量降低,SOD 和 CAT 酶活提高。另外,添加组氨酸后,菌株细胞膜通透性有所降低,胞内活性氧含量减少。总的来说,添加组氨酸能缓解香草醛的氧化胁迫响应,提高 R5 细胞对香草醛的耐受性,并在一定程度上能缩短生长延滞期。

[参 考 文 献]

[1] YAO L, CUI P P, CHEN X, et al. A combination of deep eutectic solvent and ethanol pretreatment for synergistic delignifcation and enhanced enzymatic hydrolysis for biorefnary process [J]. Bioresource Technology, 2022, 350: 126885-126892.

[2] JIA Y P, ZHANG Q Y, DAI J,et al. Ergosterol supplementation improves furfural tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol and its underlying mechanism [J]. BioResoures, 2022, 18(01), 228-246.

[3] NGUYEN T T M, IWAKI A, OHYA Y, et al. Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biosci Bioeng, 2014, 117(01): 33-38.

[4] DURANT S, KARRAN P. Vanillins-a novel family of DNA-PK inhibitors[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31 (19): 5501-5512.

[5] IWAKI A, KAWAI T, YAMAMOTO Y,et al. Biomass Conversion Inhibitors Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural Induce Formation of Messenger RNP Granules and Attenuate Translation Activity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Environ Microb, 2013, 79(05): 1661-1667.

[6] KATO K, YAMAMOTO Y, IZAWA S. Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2011, 28(05): 339-347.

[7] WANG X, LIANG Z, HOU J,et al. Identification and functional evaluation of the reductases and dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* involved in vanillin resistance[J]. BMC Biotechnology, 2016,16:31.

[8] JAYAKODY L N, JIN Y S. In-depth understanding of molecular mechanisms of aldehyde toxicity to engineer robust *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(07):2675-2692.

[9] DA SILVERIRAL F A, DE OLIVEIRA SOLARES D L, BANG K W, et al. Assessment of ethanol tolerance of Kluyveromyces marxianus CCT7735 selected by adaptive laboratory evolution [J]. Applied microbiology and biotechnology,2020,104(17):7483-7494.

[10] ALMARIO M P, REYES L H, KAO K C. Evolutionary engineering of Saccharomyces cerevisiae for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass [J]. Biotechnology and bioengineering, 2013,110

(10)：2616-2623.

[11] 任梦梦. 甲硫氨酸添加对嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium aotearoense*)产乙醇的影响及机制研究[D]. 广州：华南理工大学，2019.

[12] POLGAR L. The catalytic triad of serine peptidases [J]. Cell Mol Life Sci.，2005，62 (19-20)：2161-2172.

[13] DALET K，BRIAND C，CENATIEMPO Y，et al. The rpoN gene of Enterococcus faecalis directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins [J]. Curr Microbiol. 2000，41 (06)：441-443.

[14] KULIS-HORN R K，PERSICKE M，KALINOWSKI J. Histidine biosynthesis，its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microb Biotechnol，2014，7 (01)：5-25.

[15] MATTHEWS DE. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans [J]. J Nutr，2007，137 (6 Suppl 1)：1549S-1555S.

[16] 苟梓希，李云成，谢采芸，等. 工业酿酒酵母菌株 KF-7 对发酵抑制物的耐受性[J]. 应用与环境生物学报，2015，21 (02)：248-255.

[17] WANG X，BAI X，CHEN D F，et al. Increasing proline and myo-inositol improves tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to the mixture of multiple lignocellulose-derived inhibitors [J]. Biotechnology for biofuels，2015，8 (01)：142-154.

[18] 吴岚. 热带假丝酵母对玉米秸秆水解液中抑制物耐受机制的研究[D]. 成都：四川农业大学，2018.

[19] DIAO L，LIU Y，QIAN F，et al. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution [J]. BMC Biotechnol Adv，2013，31(06)：851-861.

The Effect of Histidine on the Tolerance of *Starmerella Bacillis* R5 to Vanillin

WANG Rui[1]，YAO Lan[2]，YANG Haitao[1]

(1 *School of Material and Chemistry Engineering，Hubei Univ. of Tech.，Wuhan* 430068，*China*；
2 *School of Biological Engineering and Food，Hubei Univ. of Tech.，Wuhan* 430068，*China*)

Abstract：The development of renewable energy can reduce the dependence of human society on fossil fuels. Bioenergy，which is renewable，has received increasing attention in recent years. At present，the inhibitors generated during biomass pretreatment，especially vanillin，could inhibit yeast growth and reduce ethanol productivity. In order to improve the tolerance of yeast to vanillin，this study was focused on *Starmerella bacilli* R5. Furthermore，different concentrations of histidine on the tolerance of R5 strain to vanillin and the underlying mechanism was investigated by comparing intracellular hydrogen peroxide，catalase，SOD，cell membrane permeability，and reactive oxygen species. The results showed that adding of histidine could enhance the tolerance of R5 strains to high concentrations of vanillin by reducing lag phase. Compared with the control group，adding histidine showed a 79.37% decrease in intracellular hydrogen peroxide content，an increase in SOD enzyme activity of 17.78%，and a 1405 fold increase in CAT enzyme activity. The number of cells stained with PI decreased by 79.17%，while the number of cells stained with ROS decreased by 48.89%. The results indicate that the addition of histidine can reduce the intracellular reactive oxygen species content of the strain and reduce oxidative stress to increase vanillin tolerance of *Starmerella bacilli* R5.

Keywords：histidine；Vanillin；*Starmerella bacillis*；tolerance；ethanol production

[责任编校：张　众]