

硫对酵母生物富铬过程中铬胁迫的缓解作用

李函彤¹, 甲承立¹, 张书文¹, 芦晶¹, 逢晓阳¹, 刘鹭², 吕加平¹

(¹中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室, 北京 100093; ²北京市营养源研究所/系统营养工程技术研究中心, 北京 100069)

摘要:【目的】探讨酿酒酵母 YSI-3.7 在富集 Cr(III) 形成葡萄糖耐量因子(GTF)过程中自身抗氧化机制以及硫在该过程中发挥的作用, 以期揭示硫对降低铬胁迫, 进而提高生物富铬的作用机理。【方法】以高产 GTF 酿酒酵母 YSI-3.7 为目的菌株, 通过设置不同浓度的 Cr(III)、硫组合进行生物富铬, 测定不同条件下 YSI-3.7 菌株的生物富铬量以及相应氧化应激指标(如丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等)的变化, 分析硫对酵母菌体在 Cr(III) 胁迫下的改善作用。【结果】低浓度 Cr(III) (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 会刺激酵母 YSI-3.7 生长, 使其生物量增加; 而高浓度 Cr(III) (>500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对酵母生长有抑制作用。Cr(III) 浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 酵母中有机铬含量为 (725.55 \pm 55.08) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW, 总铬含量达 (1 255.53 \pm 43.75) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW; Cr(III) 浓度为 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 有机铬为 (536.25 \pm 36.89) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW, 其中, 总铬含量达 (1 812.22 \pm 38.24) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW。随 Cr(III) 浓度的增加 (0—800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 菌体中 MDA 含量从 11.83 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升高到 18.04 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。SOD 和 CAT 活力随 Cr(III) 浓度升高而降低。在较低 Cr(III) 浓度 (\leq 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 下, 谷胱甘肽(GSH)、总巯基、总抗氧化能力(T-AOC)含量均升高, 但在高浓度 Cr(III) (800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 下会降低。1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 可以缓解 Cr(III) 的胁迫作用, 此时, 酵母中蛋白质含量上升, MDA 含量降低 12.83%, CAT 活力基本无影响, SOD 活力提高 4.41%, GSH、T-AOC、GSH-Px 含量分别增加 28.83%、14.29% 和 18.80%。【结论】酵母富铬过程中, Cr(III) 胁迫作用可造成酵母膜脂过氧化程度加重。在较低铬浓度时 (\leq 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 酵母可以通过自身抗氧化酶系统缓解该胁迫作用, 其中发挥重要作用的是谷胱甘肽及其相关酶。高浓度 Cr(III) (800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 下, 膜脂过氧化程度进一步加重, 酵母自身抗氧化能力不足以抵御 Cr(III) 胁迫。硫 (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3) 可以通过提高酵母中 SOD 活力、GSH、T-AOC、GSH-Px 含量, 减轻 Cr(III) 造成的膜脂过氧化程度, 提高酵母自身抗氧化能力, 进而提高酵母生物富铬效率。

关键词: 三价铬; 硫; 酿酒酵母; 葡萄糖耐量因子; 氧化应激

Chromium (III) Stress Alleviation by Sulfur Compounds During Chromium Bio-enrichment by *Saccharomyces cerevisiae*

LI HanTong¹, JIA ChengLi¹, ZHANG ShuWen¹, LU Jing¹, PANG XiaoYang¹, LIU Lu², LÜ JiaPing¹

(¹Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193; ²Beijing Institute of Nutrition Resources, Engineering Research Centre of System-Nutrition, Beijing 100069)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to investigate the antioxidative mechanism and role of sulphur during chromium (III) enrichment by *Saccharomyces cerevisiae*. The mechanisms of alleviation chromium (III) toxicity against yeast by sulphur were revealed. 【Method】*Saccharomyces cerevisiae* YSI-3.7 was used in this study. Various incubation conditions were investigated, such as various concentrations Cr(III) and sulfate. And the corresponding biomass, total chromium content, organic chromium content and oxidative stress markers (including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)

收稿日期: 2018-09-14; 接受日期: 2019-01-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31371763)、中央级公益性科研院所基本科研业务费 (S2016JC01)

联系方式: 李函彤, Tel: 17526505132; E-mail: hantongl2011@163.com. 通信作者刘鹭, E-mail: 13910666179@163.com. 通信作者吕加平, E-mail: lvjp586@vip.sina.com

and so on), were measured and analyzed. 【Result】 Low Cr(III) concentration ($0-200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) could stimulate the growth of yeast, while high Cr(III) concentration ($>500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inhibited its growth. After *Saccharomyces cerevisiae* YSI-3.7 was incubated with $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) for 44 h, the content of organic Cr in yeast was found to be $725.55\pm55.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW and that of total Cr was $1255.53\pm43.75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW. After *Saccharomyces cerevisiae* YSI-3.7 was incubated with $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) for 44 h, the content of organic Cr in yeast was found to be $536.25\pm36.89 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW and that of total Cr was $1812.22\pm38.24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW. The content of MDA increased (from $11.83 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $18.04 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) with the increase of Cr(III) concentration ($0-800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), while the activity of SOD and CAT decreased. The content of GSH, total sulfhydryl and T-AOC increased at lower Cr(III) concentration ($\leq 500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and decreased at the high concentration ($800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The supplementation of $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 during incubation could alleviate the stress of Cr(III) against yeast. The protein content increased and MDA content decreased (12.83%) with the addition of $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 during incubation. The activity of CAT was almost unaffected. The activity of SOD was increased to 4.41%. GSH, T-AOC and GSH-Px content increased to 28.83%, 14.29% and 18.80%, respectively. 【Conclusion】 During the Cr(III) bio-enrichment process by yeast, Cr(III) stress could aggravate the lipid peroxidation of cell membrane. At low Cr(III) concentration ($0-500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), yeast could protect itself from this stress by its own antioxidant enzymes, among which glutathione and its related enzymes played an important role. At high concentration of Cr(III) ($800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the degree of membrane lipid peroxidation was aggravated and the yeast's own antioxidant capacity was not enough to protect itself from Cr(III) stress. Supplementation of S ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3) could mitigate membrane lipid peroxidation caused by Cr(III) by improving SOD activity, GSH, T-AOC and GSH-Px content in yeast, improving the antioxidant capacity of yeast itself and Cr(III) bio-enrichment by yeast.

Key words: Cr(III); S; *Saccharomyces cerevisiae*; GTF; oxidative stress

0 引言

【研究意义】作为人体必需的微量元素, Cr (III) 可以促进机体葡萄糖代谢, 降低甘油三酯和游离脂肪酸含量, 维持体内脂质代谢平衡^[1]。酵母可以通过生物吸附和转化作用将环境中的无机铬转化为有机铬。这种来源于酵母的有机铬也被称为葡萄糖耐量因子 (glucose tolerance factor, GTF) ^[2-4], 它具有吸收率高、安全性高的特点, 被认为是最安全的铬补充剂^[5]。但作为重金属, Cr (III) 对酵母的生长有两面性。一方面, 低浓度的铬可促进酵母的生长; 另一方面, 高浓度的铬可对酵母生长造成一定的氧化胁迫作用, 抑制酵母的正常生命活动、生长和 GTF 的生成。因此, 研究酿酒酵母在富集 Cr (III) 形成葡萄糖耐量因子 (GTF) 过程中自身抗氧化机制以及硫在该过程中发挥的作用, 对揭示硫降低铬胁迫, 进而提高生物富铬的作用机理具有重要意义。【前人研究进展】环境中的氧化还原剂或重金属等能刺激细胞产生超氧负离子、羟基和过氧化氢等内源性活性氧族物质 (reactive oxygen species, ROS) 等代谢产物。这些代谢产物在细胞中累积到一定程度, 可对 DNA、脂质和蛋白质等细胞组分造成一定的损害, 进而影响细胞的功能甚至造成细胞死亡^[6]。研究发现, 高浓度 Cu^{2+} 会对酵母造成胁迫作用^[7-8], 铜是氧化还原反应的活泼因子, 参与 Fenton 反应^[9], 产生有害的氢氧根离子^[10], 氢氧根离

子可引起细胞膜脂质、蛋白质的氧化以及 DNA 和 RNA 分子的解链, 导致细胞的死亡^[11]。重金属会对生物造成氧化应激, 破坏 DNA 结构, 抑制酶的功能, 破坏蛋白质在细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡和变异过程中的作用^[12-13]。据报道, Cd (II)、As (III) 和 Cr (VI) 可以在酵母中产生 ROS, 诱导酵母体内氧化应激和脂质过氧化反应而造成酵母细胞损伤^[14-16]。有研究表明, Cr (III) 容易与酵母中 DNA 和其他生物组分形成稳定的胞内配体, 特别是与抗坏血酸盐、组氨酸、谷胱甘肽、半胱氨酸等^[17]。刘鹭等^[18]研究发现, 培养液中高浓度 Cr (III) ($800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 严重抑制菌体生长; 而低浓度的 Cr (III) ($200-400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对菌体的生长具有轻微刺激作用, 但有机铬富集率较低。高氧化价态的金属在硫的作用下可以转变为低价态^[19], 硫的补充可以降低 Cr (VI) 对于酵母细胞的毒性, 促进酵母对废水液中 Cr (VI) 的吸收^[20]。【本研究切入点】关于 Cr (III) 对酵母在生成 GTF 过程中产生的氧化胁迫作用鲜有报道, 而针对缓解铬的氧化胁迫作用、提高酵母富铬含量的研究更少。本研究利用前期转录组学结果对比分析了富铬酵母和对照酵母的差异基因及其代谢通路, 发现酵母富铬过程与硫代谢和 GSH 代谢通路有密切的关系。基于以往文献报道硫吸收和 GSH 生物合成相互联系, 并在缓解重金属 Cr (VI) 对微生物的胁迫时发挥了重要的作用^[21], 本研究拟在富铬酵母发酵过程中添加不同种类的硫化合

物,对比观察富铬酵母的生长,包括富集有机铬、总铬以及体内氧化应激的变化。【拟解决的关键问题】基于转录组学对酵母富铬代谢通路的分析结果,研究不同种类的硫对酵母富铬以及体内氧化应激的影响,揭示硫对 Cr(III)胁迫下酵母生物富铬调节机制,为酵母生物富集铬生成 GTF 的发酵条件优化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌株和对照菌株均为酿酒酵母 YSI-3.7,保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC No. 2687)。YPD 培养基(大豆蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,酵母浸粉 10 g,蒸馏水 1 L, pH 5.8, 121℃, 灭菌 15 min)的大豆蛋白胨和酵母浸粉,北京奥博星生物技术公司;葡萄糖、无水亚硫酸钠、硫化钠,国药集团;硝酸、氨水和高氯酸,上海晶纯科技公司;三氯化铬(III)六水化合物,上海阿拉丁公司。

1.2 试验设计

以高产 GTF 的 YSI-3.7 为出发菌株,研究和分析不同浓度(0、200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Cr(III)对酵母富集 Cr(III)情况及氧化应激的影响,寻找酵母培养最适 Cr(III)浓度;在最适 Cr(III)浓度条件下(500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),对比研究不同种类硫化合物(Na_2SO_3 、 Na_2S 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$)对缓解 Cr(III)胁迫的氧化应激的影响;在最适硫化合物及浓度下(1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{SO}_3$),测定酵母菌体生物量、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、谷胱甘肽氧化酶(GSH-PX)、总巯基、总抗氧化能力(T-AOC)等参数,探讨硫对 Cr(III)胁迫下酵母生物富铬调节机制。

1.3 方法

1.3.1 富铬酵母 YSI-3.7 培养 将通过梯度铬平板(200、500、800 和 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III)筛选出的富铬能力最强、生物量最大的酿酒酵母 YSI-3.7 单菌落(有机铬含量 1 033.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW,总铬含量 1 603.87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW,生物量 1.041 g/100 mL YPD)接种于 YPD 培养基中培养至第 3 代,然后以 10% (v/v)接种量分别接种于含有一定铬浓度的 YPD 培养基中,于恒温培养振荡器中 28℃、200 r/min 摇瓶培养 44 h。于 4℃、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用无菌水

洗涤 3 次,称其湿重;-60℃冷冻干燥 48 h 得到冻干菌粉。

1.3.2 有机铬、总铬含量的测定 参考火焰原子吸收法^[22]。

1.3.2.1 富铬酵母菌体中有机铬测定 富铬酵母中有机铬可溶于氨水,称取 0.1 g 冻干酵母菌粉溶于 10 mL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水溶液中,于 37℃、200 r/min 提取 3 h。于 4℃、5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液于溶样杯中,加入 6 mL 浓硝酸。将其置于加热板于 160℃预加热 30 min,再加入 0.5 mL 高氯酸和 5 mL 5% (m/v) 的过硫酸铵,进行微波消解,参数如表 1 所示。消解完全后用 10% NH_4Cl 溶液定容至 25 mL,参照 GB/T15555.6—1995 火焰原子吸收光谱法测定消化液中铬含量,即为富铬酵母菌体中有机铬的含量。

1.3.2.2 富铬酵母菌体总铬测定 直接称取 0.1 g 冻干菌粉于溶样杯中,加入 6 mL 浓硝酸。将其置于加热板于 160℃预加热 30 min,再加入 0.5 mL 高氯酸和 5 mL 5% (m/v) 的过硫酸铵,进行微波消解,微波消解参数设置如表 1 所示。消解完全后用 10% NH_4Cl 溶液定容至 25 mL,参照 GB/T15555.6—1995 火焰原子吸收光谱法测定消化液中铬含量,即为富铬酵母菌体的总铬含量。

1.3.3 相关生理指标的测定

1.3.3.1 丙二醛(MDA)含量 取菌体破壁、离心后的上清液,按照丙二醛(MDA)测试盒说明书步骤进行。

1.3.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活力 取菌体破壁、离心后的上清液,按照超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒说明书步骤进行。

1.3.3.3 过氧化氢酶(CAT) 取菌体破壁、离心后的上清液,按照过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒说明书步骤进行。

1.3.3.4 谷胱甘肽(GSH, GSSG) 取菌体破壁、离心后的上清液,按照 GSH 和 GSSG 检测试剂盒说明书步骤进行。

1.3.3.5 总抗氧化能力(T-AOC) 取菌体破壁、离心后的上清液,按照 T-AOC 检测试剂盒说明书步骤进行。

1.3.3.6 总巯基 取菌体破壁、离心后的上清液,按照巯基检测试剂盒说明书步骤进行。

1.3.3.7 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 取菌体破壁、离心后的上清液,按照谷胱甘肽检测试剂盒说明书步骤进行。

1.4 数据分析

应用 SPSS16.0 对所有数据进行统计分析和绘图。

2 结果

2.1 Cr (III) 胁迫对酵母 YSI-3.7 生物富铬及氧化应
激影响

2.1.1 生物量及富铬情况 随着培养液中 Cr (III) 浓度的升高, YSI-3.7 菌体富集铬的总量升高 (包括有机铬和总铬), 生物量下降。与对照组 (Cr (III) 浓

度为 0) 酵母相比, 200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下酵母生物量分别降低 24.29%、30.71% 和 67.86%。在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下, 酵母中的有机铬含量达到 725.55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DCW, 有机铬率最高, 达到 57.79%; 酵母于 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下虽然吸附的总铬高至 1 812.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 但生物量降低较为严重, 并且有机铬率仅为 29.59% (表 1)。综合考虑菌体生物量以及富集铬的情况, Cr (III) 浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为酵母发酵富铬最佳浓度。

表 1 Cr (III) 对酵母 YSI-3.7 生物量及生物富铬的影响
Table 1 Effect of Cr (III) on YSI-3.7 growth and its chromium enrichment

	Cr (III) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	0	200	500	800
生物量 Biomass ($\text{g}/100\text{ mL}$)	1.40 \pm 0.07	1.06 \pm 0.01	0.97 \pm 0.05	0.45 \pm 0.02
有机铬 Organic chromium ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$)	0	224.74 \pm 6.41	725.55 \pm 55.08	536.25 \pm 36.89
总铬 Total chromium ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$)	0	409.04 \pm 12.65	1255.53 \pm 43.75	1812.22 \pm 38.24
有机铬/总铬 Organic/total chromium (%)	0	54.94 \pm 1.90	57.79 \pm 2.45	29.59 \pm 2.48

2.1.2 Cr (III) 胁迫对酵母 YSI-3.7 氧化应激影响 通过研究 Cr (III) 胁迫对酵母 YSI-3.7 各氧化应激指标的影响可知 (表 2), 酵母细胞中丙二醛 (MDA) 的含量随着培养基中 Cr (III) 浓度的增加而增加。MDA 的量可以反映酵母细胞内脂质过氧化的程度, 间接地反映出细胞损伤的程度。200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铬浓度下, 丙二醛含量分别比对照组增加 31.36%、42.94% 和 52.49%。

随着 Cr (III) 浓度升高, YSI-3.7 中 SOD 活力略有下降, 在 200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下, 分别比对照组下降 3.83%、7.90% 和 14.63%。在对照酵母中, CAT 的活力可达到 9.09 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$, 随着 Cr (III) 浓度升高, CAT 活力有所下降, 在 200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下, 分别比对照组下降 13.86%、48.07% 和 59.96%。

在对照酵母中, 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量随着 Cr (III) 浓度升高, 呈现先增加后减少趋势, GSH 含量于 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下达到最高 48.52 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ prot}$ 。在 200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下, 分别比对照组增加 28.01%、54.42% 和 39.53%。与 GSH 变化趋势不同, 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量随着 Cr (III) 浓度的升高而升高, 在 Cr (III) 浓度为 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时含量达到最高, 为 15.46 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ prot}$, 比对照组增加 96.69%。在 Cr (III) 浓度为 200、500

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, GSSG 的含量也高于对照组, 分别增加 21.63% 和 57.51%。GSH/GSSG 通常用来表示生物体的抗氧化能力。GSH/GSSG 的比值在对照组中为 4, 在 Cr (III) 浓度为 200、500 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时分别为 4.21、3.92 和 2.84。

Cr (III) 添加浓度为 200 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 培养基中巯基含量分别比对照组提高 38.77% 和 53.34%。在 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下, 巯基含量相对于对照组酵母降低约 7.19%。酵母细胞中总抗氧化能力 (T-AOC) 于 0—500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr (III) 浓度下持续升高。当 Cr (III) 浓度继续升高至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, T-AOC 比对照降低 56.25%。培养基中 Cr (III) 浓度从 0 升高到 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 酵母细胞中 T-AOC 持续升高, 说明在此浓度范围内, Cr (III) 胁迫使酵母细胞的抗氧化能力提高, 而当 Cr (III) 浓度升高至 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 酵母细胞的抗氧化能力降低, 并且远低于对照组。说明高 Cr (III) 对酵母造成了很大的破坏作用, 酵母自身的抗氧化能力已经不足以应对此浓度下 Cr (III) 的氧化胁迫。

2.2 不同硫化物对铬胁迫下酵母 YSI-3.7 生物量
及生物富铬的影响

由表 3 可以看出, 培养基中添加不同硫酸盐培养的酵母细胞生物量 (干重) 几乎均随着其浓度的增加而减少。其中有机铬含量随着培养基中添加 Na_2SO_3 、

表 2 Cr (Ⅲ) 对酵母细胞氧化应激的影响
Table 2 Effect of Cr (Ⅲ) on YSI-3.7 oxidative stress

检测指标 Index	Cr (Ⅲ) 浓度 Cr (Ⅲ) concentration (μg·mL ⁻¹)			
	0	200	500	800
丙二醛 MDA (nmol·mL ⁻¹)	11.83±0.38	15.54±0.41	16.91±0.33	18.04±0.44
超氧化物歧化酶 SOD (U·mg ⁻¹ prot)	8.61±0.19	8.28±0.11	7.93±0.07	7.35±0.21
过氧化氢酶 CAT (U·mg ⁻¹ prot)	9.09±0.28	7.83±0.14	4.72±0.09	3.64±0.03
还原型谷胱甘肽 GSH (μmol·g ⁻¹ prot)	31.42±1.54	40.22±1.38	48.52±2.01	43.84±1.94
氧化型谷胱甘肽 GSSG (μmol·g ⁻¹ prot)	7.86±0.21	9.56±0.32	12.38±0.52	15.46±0.61
谷胱甘肽氧化酶 GSH-Px (U·g ⁻¹ prot)	1044.51±10.22	1274.32±5.89	763.01±3.21	534.68±6.76
总巯基 -SH (μg·g ⁻¹ prot)	38.51±1.14	53.44±2.71	59.05±2.98	35.74±1.97
总抗氧化能力 T-AOC (U·g ⁻¹ prot)	0.8±0.21	0.85±0.19	1.61±0.32	0.35±0.01

表 3 硫化化合物对酿酒酵母 YSI-3.7 生物量及生物富铬的影响
Table 3 Effect of various S compounds on YSI-3.7 biomass and its chromium enrichment

含硫化物 S compound	浓度 Concentration (mmol·L ⁻¹)	生物量 Biomass (g/100 mL)	有机铬 Organic chromium (μg·g ⁻¹ ·DCW)	总铬 Total chromium (μg·g ⁻¹ ·DCW)	有机铬率 Percentage of organic chromium (%)
0	对照组 Control	1.002±0.1	755.63±4.23	1431.93±10.12	52.77±1.24
Na ₂ SO ₃	0.5	0.92±0.07	1198.16±9.43	1578.21±11.27	75.92±3.75
	1	0.85±0.08	1607.02±6.78	1876.32±9.43	85.65±2.36
	5	0.60±0.04	2052.43±10.58	2755.04±11.38	74.50±3.57
	10	0.49±0.03	609.58±4.98	1746.95±8.79	34.84±1.98
	15	0.32±0.02	477.39±2.75	740.18±8.02	64.50±1.63
Na ₂ S	0.5	1.005±0.25	895.98±5.72	1601.45±5.98	55.95±1.48
	1	1.08±0.07	1261.16±6.27	1868.74±9.98	67.75±2.32
	5	0.781±0.03	691.63±3.61	2302.31±11.54	30.04±1.03
	10	0.69±0.08	613.83±2.88	3516.62±21.32	17.46±0.98
	15	0.15±0.04	318.70±1.02	3834.02±20.98	8.31±0.45
(NH ₄) ₂ SO ₃	0.5	0.996±0.05	721.01±2.79	2101.45±14.32	34.31±1.74
	1	0.942±0.04	861.12±5.97	2868.14±16.45	30.02±1.05
	5	0.276±0.02	542.19±4.34	3000.21±18.91	18.07±1.13
	10	0.121±0.02	301.21±2.83	1812.62±13.69	16.62±0.45
	15	0.085±0.01	100.32±1.56	1367.02±9.13	7.33±0.41

对照组酵母培养采用含 500 μg·mL⁻¹ Cr (Ⅲ) 浓度 YPD 培养基；其余处理组酵母培养采用含不同浓度硫化化合物+500 μg·mL⁻¹ Cr (Ⅲ) 浓度 YPD 培养基
Control group yeast culture in 500 μg·mL⁻¹ Cr(Ⅲ) YPD medium; Other yeast culture in different concentrations of Sulfur compounds and 500 μg·mL⁻¹ Cr(Ⅲ) YPD medium

Na₂S、(NH₄)₂SO₃ 浓度的升高先增加后减少，并分别在浓度 5、1 和 1 mmol·L⁻¹ 时达到最大值。对于培养基中添加 Na₂SO₃ 和 (NH₄)₂SO₃ 的酵母而言，酵母中总铬含量随着亚硫酸盐添加浓度的升高先增加后减少，分别在 5、15 mmol·L⁻¹ 时达到最大值。而对于添加 Na₂S 的酵母，其总铬的含量在 0.5—15 mmol·L⁻¹ 浓度持续增加。对于培养基中添加 Na₂SO₃、Na₂S 的酵母，其有机铬率均先上升后下降，且均在浓度为 1 mmol·L⁻¹ 时达到最大值，分别为对照的 85.65% 和 67.75%。而对于添加 (NH₄)₂SO₃ 后发酵的酵母，其有机铬率随着其浓度升高而下降。结合细胞干重、有机铬、总铬、有机铬率等指标，当在培养基中添加

1 mmol·L⁻¹ Na₂SO₃ 时, 对于酵母富集 Cr (III) 形成有机铬最有利。此时, 酵母细胞生物量为只添加 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 的 84.83%, 总铬含量提高 31.03%, 有机铬率提高 32.88%。综上, 选择 1 mmol·L⁻¹ Na₂SO₃ 进行后续研究。

2.3 Na₂SO₃对酵母 YSI-3.7 富铬及铬胁迫下氧化应激的影响

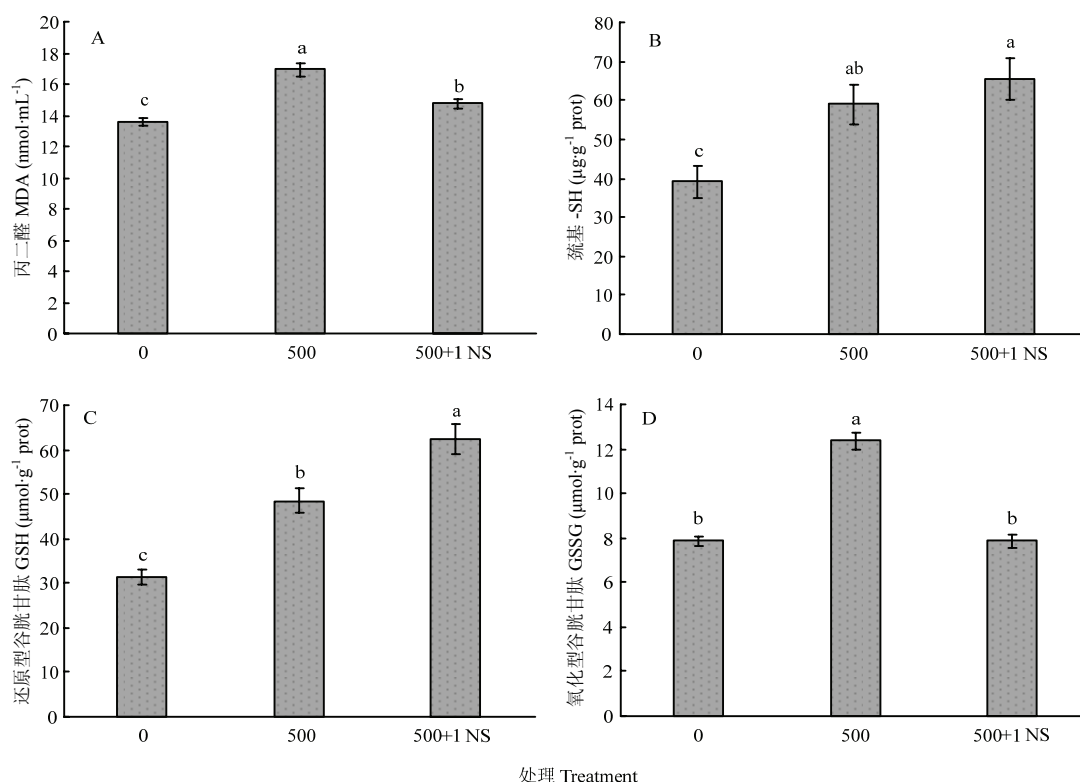
2.3.1 对应激代谢产物的影响 氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 形成脂质过氧化物, 如丙二醛。MDA 的量可以反映酵母细胞内脂质过氧化的程度, 间接地反映出细胞损伤的程度。如图 1-A 所示, 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理的酵母体内 MDA 含量为 16.91 nmol·mL⁻¹, 相比于空白组, 提高了 24.60%; 1 mmol·L⁻¹ Na₂SO₃ 可有效降低因 Cr (III) 引起的 MDA 含量, 相比于 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理组, MDA 含量降低了 12.8%。

如图 1-B 所示, 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理的酵母

体内巯基含量为 59.05 μg·g⁻¹ prot; 1 mmol·L⁻¹ Na₂SO₃ 可促进富铬酵母体内巯基含量的增加, 达到 65.51 μg·g⁻¹ prot; 相比于 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理组, 巯基含量提高了 16.87%。

如图 1-C 所示, 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理的酵母细胞内还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量为 48.52 μmol·g⁻¹ prot, 相比于对照酵母组增加了 54.42%。1 mmol·L⁻¹ Na₂SO₃ 可促进富铬酵母体内 GSH 增加至 62.51 μmol·g⁻¹ prot。相比于空白组和 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理组分别提高 98.95%和 28.83%。

如图 1-D 所示, 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理的酵母体内氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量为 12.38 μmol·g⁻¹ prot, 相比于空白酵母组增加 57.71%。1 mmol·L⁻¹ Na₂SO₃ 可促进富铬酵母体内 GSSG 降低至 7.85 μmol·g⁻¹ prot。相较于 500 μg·mL⁻¹ Cr (III) 处理组, GSSG 降低了 57.71%, 与空白组酵母体内 GSSG 含量近似。



0: Cr (III) 浓度为 0 (空白对照组); 500: Cr (III) 浓度为 500 μg·mL⁻¹; 500+1S: Cr (III) 浓度为 500 μg·mL⁻¹, Na₂SO₃ 浓度为 1 mmol·L⁻¹。下同
 0: Chromium (III) concentration is 0. 500: Chromium (III) concentration is 500 μg·mL⁻¹. 500+1 NS: Chromium (III) concentration is 500 μg·mL⁻¹, Na₂SO₃ concentration is 1 mmol·L⁻¹. The same as below

图 1 Na₂SO₃对铬胁迫下酵母氧化应激代谢产物的影响

Fig. 1 Effects of Na₂SO₃ on reactive oxygen species related intermediate metabolites by YSI-3.7

2.3.2 对酵母抗氧化能力的影响 金属离子的氧化胁迫会激活微生物机体自身抗氧化保护酶系统, 消除自由基, 维持体内自由基动态平衡^[23]。如图 2-A 所示, $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) 处理的酵母体内 SOD 含量为 $7.93\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{prot}$, 相比于空白酵母组降低 7.9%。 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 可促进富铬酵母体内 SOD 增加至 $8.28\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{prot}$, 比 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) 单独处理组提高 4.41%。空白对照组中酵母的 CAT 的活力达到 $9.09\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{prot}$; 其他两组处理相比, 酵母细胞中 CAT 活力无显著变化(图 2-B), 表明硫的添加对 SOD、CAT 的活力提高不明显。

总抗氧化能力(T-AOC)是衡量机体抗氧化酶系统和非酶促系统功能状况的综合性指标。它的大小可代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态。由图 2-C 所示, 在 Cr(III) 胁迫下, 酵母的总抗氧化能力有所提

升, 酵母发挥自身调节作用以对抗外界氧化胁迫作用; $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) 处理的酵母体内 T-AOC 含量为 $1.61\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{prot}$, 相比于空白酵母组提高 101.25%。 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 可促进富铬酵母体内 T-AOC 增加至 $1.84\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{prot}$, 分别比空白酵母和 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) 处理组中 T-AOC 含量提高 130%和 14.29%。表明硫的添加可以提高酵母的总抗氧化能力。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)可以促进过氧化氢(H_2O_2)与还原型谷胱甘肽反应生成 H_2O 和氧化型谷胱甘肽(GSSG)。由图 2-D 可知, $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III)处理的酵母体内 GSH-Px 含量为 $763.94\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{prot}$, 相比于空白酵母组降低 26.86%。 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 可使富铬酵母体内 GSH-Px 增加至 $907.53\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{prot}$, 比 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cr(III) 处理组提高 18.80%。以上结果表明, 硫的添加可以提高谷胱甘肽过氧化物酶的活力, 促进过氧化氢(H_2O_2)与还原型谷胱甘肽反应, 促进过氧化氢的分解。

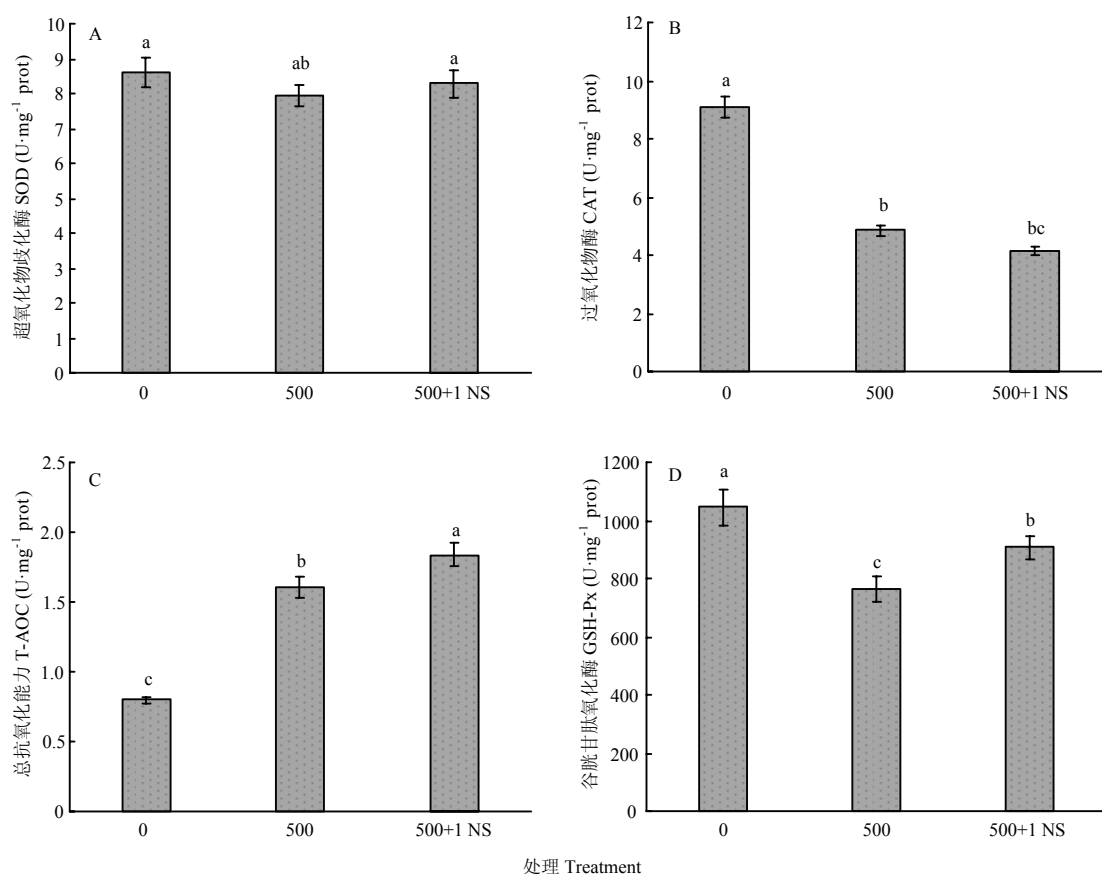


图 2 Na_2SO_3 对酵母抗氧化能力的影响

Fig. 2 Effect of Na_2SO_3 on YSI-3.7 antioxidant capacity

3 讨论

动物、植物细胞在代谢过程中不断产生自由基, 这些自由基会被细胞本身具有的防御体系所清除, 在正常生理条件下, 二者之间始终处于动态平衡。一旦平衡被打破, 机体组织内的活性氧自由基不断聚积, 使组织代谢功能出现异常并发生组织过氧化现象, 从而引发一系列病理及生理变化^[24]。过量的重金属会诱导活性氧基团 (ROS) 的产生, 如超氧离子 ($O_2^{\cdot-}$)、羟基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2) 等活跃的微粒。这些微粒能与大量细胞成分反应, 氧化核酸、蛋白质、糖类和脂肪等大分子, 引起细胞内氧化应激反应导致细胞死亡^[25]。铬和其他金属一样, 会显著诱导活性氧的产生, 可以直接或者间接地对生物体中核酸、叶绿体结构和细胞膜造成破坏^[26]。PEREIR 等^[27]在研究氧化胁迫与酵母抗逆性的关系时也发现, 在高温、饥饿、金属离子等逆境因子存在时可诱使酵母细胞产生活性氧 ROS。ROS 的清除主要包括非酶促和酶促两种机制。其中, 非酶促清除机制主要依赖于抗坏血酸、谷胱甘肽、类黄酮和生物碱等还原性物质^[28]; 而酶促清除机制则依赖于超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶等^[29]。KEUNEN 等^[30]认为, 铬 (VI) 主要通过硫转运体进入细胞, 并且竞争性地抑制硫的摄取, 导致硫饥饿, 从而引起硫摄取量的减少。在这两者竞争下, 硫的补充可以解除铬的毒性, 使酵母生长状态变好, 蛋白含量增加。GSH 等含半胱氨酸残基的巯基化合物, 具有抗氧化、提高机体免疫、重金属解毒, 维持生物细胞特定的氧化还原氛围等多种生物学功能, 是生物细胞内重要的活性物质。硫在蛋白质中的保存增加了 GSH 的合成。硫通路的激活, 不仅可以控制 GSH 的合成, 而且保存蛋白中的硫, 为 GSH 的合成提供 S 原子。

3.1 Na_2SO_3 对酵母膜脂质过氧化程度的影响

六价铬胁迫可能会导致脂质的过氧化以及细胞膜损伤, 产生氧化应激损伤^[31-32]。在胁迫下, 植物组织和器官膜脂质过氧化的主要产物是丙二醛, 细胞膜发生过氧化后细胞内电解质大量渗透。植物体内 MDA 的含量和细胞膜透性可以一定程度上反应植物受胁迫损伤的程度, 也能反映细胞膜所受伤害程度的高低^[33-34]。 Cd^{2+} 胁迫可以使美人蕉 MDA 含量升高^[35], SHAH 等^[36]在 Cd^{2+} 处理的两种水稻品种中均检测到了 MDA 的积累。杜君等报道, 铜胁迫

可以使酿酒酵母膜脂过氧化程度加剧且细胞内丙二醛含量随着铜处理浓度的增加而增加^[37]。 Al^{3+} 作用可以造成烟草细胞的膜脂过氧化^[38], 对酵母的毒性很大程度上也是膜脂过氧化造成细胞膜完整性和流动性消失引起的^[39]。本研究发现, 酵母富铬过程中, 随着 Cr (III) 浓度的升高, 酵母中 MDA 含量上升, 说明酵母细胞膜质过氧化的程度升高, 细胞膜所受伤害程度不断加深。适当浓度的 Na_2SO_3 可以使酵母细胞中 MDA 含量降低, 缓解细胞膜脂过氧化程度。有报道指出, H_2S 可以增强抗氧化酶活性, 参与调节盐胁迫下植物活性氧代谢, 显著降低 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 含量, 缓解盐胁迫引起的氧化损伤^[40-42]。

3.2 Na_2SO_3 对酵母生物富铬过程中抗氧化能力的影响

超氧化物歧化酶 (SOD) 是细胞中最重要的清除自由基的酶之一, 以 $O_2^{\cdot-}$ 为基质进行歧化反应, 将毒性较强的 $O_2^{\cdot-}$ 转化为毒性次级的 H_2O_2 和基态氧, 避免毒性更大的 $\cdot OH$ 的生成。研究表明, Cd^{2+} 使美人蕉根部 SOD 活性明显增加, Cu^{2+} 对其活性无明显影响^[35]。酿酒酵母细胞内超氧化物歧化酶活性在不同浓度铜胁迫下有不同程度的升高^[37]。本研究中添加 Na_2SO_3 后酵母中 SOD 活力比只添加 $500 \mu g \cdot mL^{-1}$ Cr (III) 略有上升, 说明 Na_2SO_3 可以通过提高酵母 SOD 活力抵抗铬胁迫。本研究还发现, Cr (III) 可降低酵母体内 CAT 含量, 使酵母体内过氧化氢分解能力减弱, 外源添加 Na_2SO_3 对 CAT 酶系没有影响。杜君等^[37]发现, 酿酒酵母细胞内氧化氢酶的活性在不同浓度铜胁迫下有不同程度的升高。三价铬和铜对酵母过氧化氢酶影响不同, 可能与酵母对不同种的金属的抗氧化能力和途径有所不同有关。

GSH 是含半胱氨酸残基的巯基化合物, 具有抗氧化、提高机体免疫、重金属解毒, 维持生物细胞特定的氧化还原氛围等多种生物学功能, 是生物细胞内重要的活性物质^[31]。生物体对重金属的抗逆性、解毒及积累作用与生物细胞内含有丰富的 GSH 和金属硫蛋白等巯基化合物有关^[42-45]。 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、Cr (III) 这些变价离子在胁迫细胞时, 与酵母细胞中的巯基化合物中巯基发生直接的配位作用^[46]。有研究表明, 镉处理诱导了水稻根系产生大量的包括还原型谷胱甘肽在内的含巯基物质。谷胱甘肽几乎是所有活细胞中抗氧化剂中最丰富的物质。铬对酵母

细胞既然存在氧化胁迫,那么,酵母细胞内必然也存在相应的反应机制来对抗或消除氧化毒性。研究结果说明低浓度的 Cr(III)可以刺激酵母产生 GSH,抵抗氧化毒性。GSH 被称为生物体中抵抗重金属压力的缓解剂^[47]。GSH 在缓解氧化毒性中具有多种功能,如:动物呼吸作用产生的 H₂O₂ 由线粒体中的谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)消除,而 GSH 就是该酶的电子供体;在植物中,GSH 也是活性氧自由基防御反应中的关键因子,并作为一种植物螯合肽底物,可以帮助植物应对金属毒性^[48-50],如抗氧化剂对巯基(-SH)的破坏,与 α -生育酚协调清除细胞中积累的氧自由基。GSH 还被发现在酿酒酵母的热激、H₂O₂、Hg、Cu 等引起的氧化胁迫中起到关键作用^[51-54]。谷胱甘肽在体内以还原型(GSH)和氧化型(GSSG)两种形式存在,正常时主要以还原型为主,具有清除自由基的能力,可在谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的催化下与过氧化物、自由基等反应,形成氧化态的 GSSG, GSSG 又可在还原型辅酶 II(NADPH)和 GSH 还原酶(GSR)的作用下还原成 GSH,形成一个循环,这个过程被认为是谷胱甘肽最重要的抗氧化机制。此外,一些报道发现,GSH 还具有其他抗性功能。有报道认为,GSH 可以保护一些同样含巯基的蛋白质及酶免受氧化,也可以作为一些酶的辅助因子或者具有调节相关氨基酸的运输等功能^[55]。还有人发现,GSH 可以直接与 Cd 等金属螯合形成复合物储存到液泡中^[13],在植物中,GSH 还是植物螯合肽的合成底物^[7]。GSH/GSSG 是氧化压力的生物标志^[56]。随着 Cr(III)浓度不断升高(0—800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),GSH/GSSG 分别为 4、4.2、3.9 和 2.8,呈先升高后下降的趋势,说明酵母对低浓度的 Cr(III)自身抗氧化能力较强,对高浓度的铬抵抗力变弱。

总抗氧化能力(T-AOC)是衡量机体抗氧化酶系统和非酶促系统功能状况的综合性指标。它的大小可代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态^[57]。在低 Cr(III)浓度下($\leq 500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),机体自身氧化应激调整,酵母细胞中总抗氧化能力升高;而高浓度 Cr(III)胁迫下,总抗氧化能力远低于对照组,酵母细胞的抗氧化能力降低,说明高 Cr(III)对酵母造成了很大的破坏作用,酵母自身氧化应激的调整无法应对此浓度下 Cr(III)的氧化胁迫。适当浓度的 Na₂SO₃使酵母细胞 T-AOC 进一步升高,表明

Na₂SO₃可以通过提高酵母总抗氧化能力防御 Cr(III)带来的氧化作用。

4 结 论

酵母在富集 Cr(III)形成 GTF 过程中,会受到 Cr(III)的氧化胁迫作用。较低浓度 Cr(III)会刺激酵母细胞生长,而较高浓度的 Cr(III)则会抑制其生长。酵母细胞的膜脂过氧化程度随 Cr(III)浓度的升高而加重。在较低浓度 Cr(III)作用下,酵母自身可通过增加 T-AOC、GSH、巯基含量以及 GSH-Px 活力以防御 Cr(III)的氧化胁迫。但在高 Cr(III)浓度下,有些未得到及时清除的自由基对细胞产生不可逆的伤害,使细胞膜脂过氧化程度大大加重,酵母自身无法抵抗其氧化胁迫作用。适当浓度 Na₂SO₃可以通过增加酵母中-SH、GSH、T-AOC 含量,提高 GSH-Px 酶活力,降低膜脂过氧化程度,从而帮助酵母细胞抵御一定浓度的 Cr(III)氧化胁迫作用,进而提高有机铬生成率。

References

- [1] 徐晨晨. 微量元素铬对营养代谢调控的研究进展. 家禽科学, 2012(1): 12-15.
XU C C. Research progress on the regulation of nutrient metabolism by trace element chromium. *Poultry Science*, 2012(1): 12-15. (in Chinese)
- [2] YEH G Y, EISENBERG D M, KAPTCHUK T J, PHILLIPS R. S. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care*, 2003, 26(4): 1277-1294.
- [3] HATFIELD M J, GILLESPIE S, CHEN Y, LI Z, CASSADY C J, VINCENT J B. Low-molecular-weight chromium-binding substance from chicken liver and American alligator liver. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 2006, 144(4): 423-431.
- [4] CHEN Y, WATSON H M, GAO J, SINHA S H, CASSADY C J, VINCENT J. B. Characterization of the organic component of low-molecular-weight chromium-binding substance and its binding of chromium. *Journal of Nutrition*, 2011, 141(7): 1225-1232.
- [5] BERNER T O, MURPHY M M, SLESINSKI R. Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food & Chemical Toxicology*, 2004, 42(6): 1029.
- [6] MOLIN M, RENAULT J P, LAGNIEL G, PIN S, TOLEDANO M, LABARRE J. Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, 43:

- 136-144.
- [7] LI H, GUO A, WANG H. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 2008, 108(1): 1-13.
- [8] FERREIRA J, DU TOIT M, DU TOIT W J. The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Australian Journal of Grape & Wine Research*, 2006, 12(1): 50-56.
- [9] 廖芸, 曾英杰, 许笑男, 钟秋平, 赵久香. 铜离子对荔枝酒降酸酵母发酵性能及醋酸代谢的影响. *食品科技*, 2014(10): 43-47.
- LIAO Y, ZENG Y J, XU X N, ZHONG Q P, ZHAO J X. Effect of copper ion on the fermentation performance and acetic acid metabolism of lychee wine yeast. *Food Science and Technology*, 2014(10): 43-47. (in Chinese)
- [10] PANDA S K. Impact of copper on reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidants in *Lemna minor*. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(3): 561-564.
- [11] GAETKE L M, CHOW C K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003, 189(1/2): 147.
- [12] LIN C C, KAO C H. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 2000, 30(2): 151-155.
- [13] BRENNAN R J, SCHIESTL R H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research*, 1996, 356(2): 171-178.
- [14] MENEZES R A, AMARAL C, BATISTA-NASCIMENTO L, SANTOS C, RODRIGUES-POUSADA C. Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. *Biochemical Journal*, 2008, 414(2): 301-311.
- [15] BEYERSMANN D, HARTWIG A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 2008, 82(8): 493-512.
- [16] HARRIS G K, SHI X L. Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutation Research*, 2003, 533(1): 183-200.
- [17] BEYERSMANN D, HARTWIG A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 2008, 82(8): 493-512.
- [18] 刘鹭, 吕加平, 高艳红. 空间搭载高产葡萄糖耐量因子(GTF)酵母的选育. *微生物学通报*, 2009, 36(2): 223-230.
- LIU L, LÜ J P, GAO Y H. Breeding of high yield glucose tolerance factor (GTF) yeast in space. *Microbiology*, 2009, 36(2): 223-230. (in Chinese)
- [19] ALEXANDER J, AASETH J. Uptake of chromate in human red-blood-cells and isolated rat-liver cells - the role of the anion carrier. *Analyst*, 1995, 120(3): 931-933.
- [20] SUMMERS A O. Damage control: Regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Current Opinion Microbiology*, 2009, 12(2): 138.
- [21] SALNIKOW K, ZHIKOVICH A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic and chromium. *Chemical Research Toxicology*, 2008, 21(1): 28-24.
- [22] PEREIRA Y, LAGNIEL G, GODAT E, BAUDOUIN-CORNU P, JUNOT C, LABARRE J. Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicological Sciences*, 2008, 106(2): 400-412.
- [23] 冯建永, 庞民好, 张金林, 刘颖超. 复杂盐碱对黄顶菊种子萌发和幼苗生长的影响及机理初探. *草业学报*, 2010, 19(5): 77-86.
- FENG J Y, PANG M H, ZHANG J L, LIU Y C. Study on complex effects on saline flaveriabidentis seed germination and seedling growth and its mechanism. *Acta prataculturae sinica*, 2010, 19(5): 77-86. (in Chinese)
- [24] 高春生, 王春秀, 张书松. 水体铜对黄河鲤肝脏抗氧化酶活性和总抗氧化能力的影响. *农业环境科学学报*, 2008, 27(3): 1157-1162.
- GAO C S, WANG C X, ZHANG S S. Effect of water copper on antioxidant enzyme activity and total antioxidant capacity of hepatopancreas in the Yellow River carp. *Journal of Agricultural Environmental Science*, 2008, 27(3): 1157-1162. (in Chinese)
- [25] GADJEV I, STONE J M, GECHEV T S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell & Molecular Biology*, 2008, 270: 87-144.
- [26] TIWARI K, DWIVEDI K, SINGH S. Chromium (VI) induced phytotoxicity and oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.): Biochemical changes and translocation of essential nutrients. *Journal of Environmental Biology*, 2009, 30(3): 389.
- [27] PEREIRA M D, HERDERIRO R S, FERNANDES P N, ELEUTHERIO E C A, PANEK A D. Targets of oxidative stress in yeast *sod* mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1620(1-3): 245-251.
- [28] APEL K, HIRTIRT H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [29] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, BREUSEGEM F V. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.
- [30] KEUNEN E, REMANS T, BOHLER S, VANGRONSVELD J, CUYPERS A. Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(10): 6894-6918.
- [31] MANGABEIRA P A, FERREIRA A S, DE ALMEIDA A A F,

- FERNANDES V F, LUCENA E, SOUZA V L, DOS SANTOS JÚNIOR A J, OLIVEIRA A H, GRENIER-LOUSTALOT M F, BARBIER F, SILVA D C. Compartmentalization and ultrastructural alterations induced by chromium in aquatic macrophytes. *Biometals*, 2011, 24(6): 1017-1026.
- [32] DAUD M K, MEI L, VARIATH M T, ALI S, LI C, RAFIQ M T, ZHU S J. Chromium (VI) uptake and tolerance potential in cotton cultivars: Effect on their root physiology, ultramorphology, and oxidative metabolism. *Biomed Research International*, 2014, 2014(2): 975946.
- [33] 赵凤斌, 王丽卿, 季高华, 李为星. 盐胁迫对 3 种沉水植物生物学指标及叶片中丙二醛含量的影响. *环境污染与防治*, 2012, 34(10): 40-44.
- ZHAO F B, WANG L Q, JI G H, LI W X. Effects of salt stress on the biological indexes of 3 submerged plants and the content of malondialdehyde in leaves. *Environmental Pollution and Prevention*, 2012, 34(10): 40-44. (in Chinese)
- [34] 孟衡玲, 张薇, 卢丙越, 何芳芳, 鲁海菊. 金银花幼苗对盐胁迫的生理响应. *江苏农业科学*, 2015, 43(4): 247-249.
- MENG H L, ZHANG W, LU B Y, HE F F, LU H J. Physiological response of *Lonicera japonica* seedlings to salt stress. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(4): 247-249. (in Chinese)
- [35] 吴灵琼, 成水平, 杨立华, 吴振斌. Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对美人蕉的氧化胁迫及抗性机理研究. *农业环境科学学报*, 2007, 26(4): 1365-1369.
- WU L Q, CHENG S P, YANG L H, WU Z B. Effects of Cd^{2+} and Cu^{2+} on oxidative stress and resistance mechanism of *Canna indica*. *Journal of Agricultural Environmental Science*, 2007, 26(4): 1365-1369. (in Chinese)
- [36] SHAH K, KUMAR R G, VERMA S, DUBEY R S. Effects of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 2001, 161(6): 1135-1144.
- [37] 杜君, 李海兰, 李慧, 战吉成, 黄卫东. 铜对葡萄酒酿酒酵母的氧化胁迫机制. *中国农业科学*, 2011, 44(2): 369-378.
- DU J, LI H L, LI H, ZHAN J C, HUANG W D. Oxidative stress of wine yeasts under copper exposure. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(2): 369-378. (in Chinese)
- [38] DEVI S R, YAMMAOTO Y, MASTUMOTO H. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated antioxidant status in cultured tobacco cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 97(1): 59-68.
- [39] 金承涛. Al^{3+} 、高温对酿酒酵母的胁迫作用及其耐性机制的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- JIN C T. The effect of Al^{3+} , high temperature stress on *Saccharomyces cerevisiae* and its tolerance mechanism research [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [40] LI J S, JIA H L, WANG J, CAO Q H, WEN Z C. Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na^+/H^+ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt stress *Arabidopsis thaliana* root. *Protoplasma*, 2014, 251(4): 899-912.
- [41] CHRISTOU A, MANGANARIS G A, PAPADOPOULOS I, FOTOPOULOS V. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 1953-1966.
- [42] SHI H T, YE T T, CHAN Z L. Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2013, 71(2): 226-234.
- [43] 安志装, 王校常, 严蔚东, 施卫明, 曹志洪. 植物螯合肽及其在重金属胁迫下的适应机制. *植物生理学报*, 2001, 37(5): 463-467.
- AN Z Z, WANG X C, YAN W D, SHI W M, CAO Z H. Phytochelatin and its adaptive mechanism under heavy metal stress. *Plant Physiology Communications*, 2001, 37(5): 463-467. (in Chinese)
- [44] 李文学, 陈同斌. 超富集植物吸收富集重金属的生理和分子生物学机制. *应用生态学报*, 2003, 14(4): 627-631.
- LI W X, CHEN T B. Physiological and molecular biological mechanisms of heavy metal absorption and accumulation in hyperaccumulators. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(4): 627-631. (in Chinese)
- [45] 郎飞波, 张国平. 植物螯合肽及其在重金属耐性中的作用. *应用生态学报*, 2003, 14(4): 632-636.
- LANG F B, ZHANG G P. Phytochelatin and its function in heavy metal tolerance of higher plants. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(4): 632-636. (in Chinese)
- [46] 王宁. 重金属胁迫与生物样品中巯基化合物的应答作用[D]. 延吉: 延边大学, 2014.
- WANG N. Heavy metal stress and the response of sulfhydryl compounds in biological samples [D]. Yanji: Yanbian University, 2014. (in Chinese)
- [47] COLEMAN J, BLAKE-KALFF M, DAVIES E. Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 1997, 2(4): 144-151.
- [48] FREEMAN J L, PERSANS M W, NIEMAN K. Increased glutathione

- biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyper accumulators. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2176-2191.
- [49] COBBETT C, GOLDSBROUGH P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53(1): 159.
- [50] NOCTOR G, GOMEZ L, VANACKER H, FOYER C H. Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1283-1304.
- [51] SUGIYAMA K, IZAWA S, INOUE Y. The Yap 1p- dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(20): 15535-15540.
- [52] IZAWA S, INOUE Y, KIMURA A. Oxidative stress response in yeast: Effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 1995, 368(1): 73-76.
- [53] WESTWATER J, MCLAREN N F, DORMER U H, JAMIESON D J. The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast*, 2002, 19(3): 233-239.
- [54] SHANMUGANATHANA, AVERY SV, WILLETTS S A. Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Letters*, 2004, 556(1-3): 253-259.
- [55] SUGIYAMA K, KAWANRA A, IZAWA S, INOUE Y. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 2000, 352(1): 71-78.
- [56] TONGUL B, KAVAKCIOGLU B, TARHAN L. Chloramine T induced oxidative stress and the response of antioxidant system in *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica*, 2017(1-2): 1-9.
- [57] MUKAI K, MORINCOTO H, OKAUCHI Y, NAGAOKA S. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. *Lipids*, 1993, 28(8): 753-756.

(责任编辑 赵伶俐)