

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.04.005

文章编号:2095-6002(2019)04-0035-07

引用格式:王定康,张敏,黄钧,等.盐胁迫对鲁氏酵母菌生理特性的影响[J].食品科学技术学报,2019,37(4):35-41.

WANG Dingkang, ZHANG Min, HUANG Jun, et al. Effect of salt stress on physiological characterization of *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(4):35-41.

## 盐胁迫对鲁氏酵母菌生理特性的影响

王定康, 张敏, 黄钧, 金垚, 周荣清, 吴重德\*

(四川大学轻工科学与工程学院/皮革化学与工程教育部重点实验室, 四川成都 610065)

**摘要:**研究了盐胁迫对鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii* CGMCC 3791)细胞生理特性的影响,结果表明,盐胁迫使细胞生长受到抑制,单位(每克)菌体乙醇含量从11.64 mg增加到19.20 mg(120 g/L NaCl)。分析细胞胞内pH值和胞内活性氧(ROS)水平,结果表明:盐胁迫使细胞胞内pH值水平降低,胞内活性氧(ROS)水平增加,同时胞内抗氧化酶系(过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶,以及谷胱甘肽过氧化物酶)的活力提高,从而抵御由盐胁迫引起的氧化胁迫。研究了盐胁迫对鲁氏酵母菌胞内谷胱甘肽(GSH)含量的影响,结果表明,随着盐质量浓度增加,胞内GSH含量增加,在120 g/L盐质量浓度下,GSH含量显著增加了73.4%。考察了外源添加GSH对细胞生长的影响,发现添加0.5 g/L GSH的鲁氏酵母菌,在120 g/L盐质量浓度下生物量提高了15%。本研究可对深入认识鲁氏酵母菌耐盐生理机制及进一步提高其耐盐性能提供理论支持。

**关键词:**鲁氏酵母菌;盐胁迫;细胞生理特性;胞内微环境;谷胱甘肽

**中图分类号:**TS201.3

**文献标志码:**A

鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)广泛存在于传统发酵食品如豆瓣、酱油等生产过程中,在产品产醇、产香、增鲜等方面具有重要作用<sup>[1-2]</sup>。在食品发酵过程中,鲁氏酵母菌可以产生风味物质,如异戊醇、异丁醇、活性戊醇等重要的芳香杂醇类物质,以提高食品品质<sup>[3]</sup>。然而,在发酵食品生产过程中,鲁氏酵母菌经常受到多种环境胁迫,包括盐胁迫、酸性胁迫和酒精胁迫等,特别是盐胁迫引起的渗透胁迫会导致细胞结构和生理的损伤<sup>[4]</sup>;同时盐胁迫也会引起细胞内活性氧(ROS)的形成,从而影响胞内氧化还原稳态的变化,而维持氧化还原稳态被认为是细胞耐盐性能的重要因素之一<sup>[5]</sup>。研究表明,细胞会采取一些策略来抵御盐胁迫,比如调节细胞内微环境、细胞膜和细胞代谢等<sup>[6]</sup>。He等<sup>[7]</sup>研究了嗜盐四链球菌盐胁迫耐受机制,发现盐胁迫使

细胞内脯氨酸、甘氨酸甜菜碱和海藻糖含量升高。Sara等<sup>[8]</sup>通过补充油酸和麦角固醇,发现可以降低酿酒酵母胞内活性氧的含量,从而降低对细胞膜的氧化损伤。谷胱甘肽(GSH)是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽,在生物系统中具有抗氧化、增强免疫、细胞解毒活性和营养调节等作用<sup>[9]</sup>。Zhang等<sup>[10]</sup>研究发现,GSH可以通过调节细胞生理功能,提高旧金山乳杆菌的抗冷冻胁迫性能。

近些年,对鲁氏酵母菌耐盐机制尚未充分研究,为发挥食品微生物鲁氏酵母菌的生理功能和提高其生物制造效率,有必要深入认识鲁氏酵母菌盐胁迫耐受的生理机制。本文拟研究盐胁迫对鲁氏酵母菌生理特性的影响,希望为进一步认识鲁氏酵母菌的耐盐机制,提升其盐胁迫抗性,强化其发酵生产性能奠定理论基础。

收稿日期:2019-06-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31871787;31671849)。

第一作者:王定康,男,硕士研究生,研究方向为微生物生理学与系统生物学。

\*通信作者:吴重德,男,副教授,博士,主要从事食品微生物及传统发酵食品方面的研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株

鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*),由本实验室从百年老字号酿造企业的酱醪中分离,经26S rDNA和ITS区域序列测序、鉴定、命名,并保藏于中国普通微生物菌种保藏中心,保藏编号为CGMCC NO. 3791。

#### 1.1.2 实验试剂

HEPES-K 细胞裂解液,购自雷根生物公司; BCECF AM 荧光探针,购自北京百奥莱博科技有限公司;过氧化氢酶 CAT 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 SOD 测定试剂盒、过氧化物酶 POD 测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX 测定试剂盒,均购自南京建成生物公司;蛋白浓度测定试剂盒,购自碧云天生物技术研究所。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

GL-20G-II 型高速冷冻离心机,上海安亨科学仪器厂;92-IIN 型超声波破碎粉碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计,上海沪粤明科学仪器有限公司;SW-CJ-2G 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;JJ500 型分析天平,常熟双杰测试仪器厂;F-7100 型荧光分光光度计,日本日立公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 培养基及盐胁迫实验

YPD 培养基:10 g/L 酵母膏,20 g/L 蛋白胨,20 g/L 葡萄糖,pH 值为 6.0。

从甘油管中将菌种 *Z. rouxii* 以体积分数为 5% 的接种量接种于新鲜的 YPD 培养基中,30 ℃ 静置培养 24 h,至对数中期获得种子液。将体积分数为 5% 的种子液接种于不同 NaCl 质量浓度(0、60、120 g/L)的新鲜 YPD 培养基中,30 ℃ 静置培养 36 h,至对数中后期,进行后续生理数据测定分析。

#### 1.3.2 鲁氏酵母菌生物量和乙醇含量测定

菌体生物量的测定:取不同盐浓度下培养至对数中后期的细胞,10 000 g 离心 5 min,用蒸馏水洗菌两次,105 ℃ 烘干 2 h,测定干细胞重量。

乙醇含量测定:参考文献[11]所述的方法与步骤。

#### 1.3.3 胞内 pH 值测定

参考文献[12]所述的方法,取 5 mL 生长至对数中后期的细胞,10 000 g 离心 5 min,用 50 mmol/L

HEPES-K (pH 值 8.0)缓冲液洗涤 2 次,重悬于等体积的相同缓冲液,加入 1 μL BCECF AM,30 ℃ 温水浴 20 min。用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)洗涤 3 次后重悬于等体积的该缓冲液中。根据文献[13-14]所述方法用荧光分光光度计测定菌悬液荧光强度( $I_{total}$ )和上清液荧光强度( $I_{filtrate}$ ),其中激发波长为 488 nm 和 440 nm,发射波长为 535 nm,狭缝宽度均为 5 nm。荧光强度计算公式见式(1)。

$$I = [(I_{490})_{total} - (I_{490})_{filtrate}] / [(I_{440})_{total} - (I_{440})_{filtrate}], \quad (1)$$

再根据  $\lg I$  的值由标准曲线计算胞内 pH 值。

#### 1.3.4 胞内活性氧水平及抗氧化酶系活力测定

取 5 mL 生长至对数中后期的细胞,10 000 g 离心 5 min,收集菌体,用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)洗涤 3 次,重悬于等体积的该缓冲液中。将样品用超声细胞破碎仪破碎,破碎条件参照文献[15]的方法,破碎后 10 000 g 离心 5 min,取上清液。采用南京建成生物公司的活性氧(ROS)试剂盒测定胞内 ROS 含量,并用相关抗氧化酶试剂盒测定抗氧化酶活力,具体操作参照说明书进行,用紫外分光光度计检测其吸光值。

#### 1.3.5 胞内 GSH 含量测定

细胞提取和破碎方法同 1.3.4,采用南京建成生物公司的还原型 GSH 试剂盒测定胞内 GSH 含量,具体操作参照说明书进行,用紫外分光光度计检测其吸光值。

### 1.4 数据处理

论文数据均为 3 次重复实验的平均值。采用软件 SPSS 19.0 对数据进行统计学分析,以 One-way ANOVA 进行显著性检验,并采用软件 Origin 8.5 对实验数据绘图。

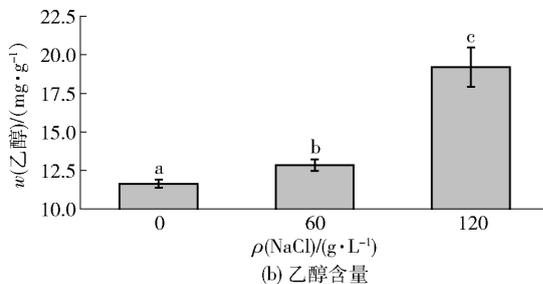
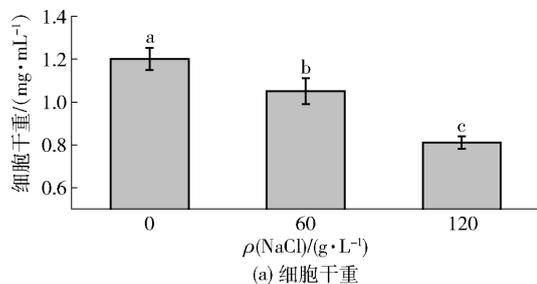
## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫对鲁氏酵母菌生长和代谢的影响

考察了不同盐浓度胁迫对鲁氏酵母菌生长和代谢的影响,结果如图 1。鲁氏酵母菌在无盐培养条件下生长性能良好,细胞干重可达 1.2 mg/mL。随着盐质量浓度增加至 120 g/L,生物量逐渐下降,细胞干重降到 0.81 mg/mL,表明盐胁迫会对鲁氏酵母菌的生长产生抑制作用,但该菌具有一定的耐盐性能。然而,随着盐质量浓度从 0 增加到 120 g/L,发酵液中单位(每克)菌体的乙醇含量却逐渐升高,从

11.64 mg 增加到 19.20 mg, 这说明盐胁迫下鲁氏酵母菌单位菌体的乙醇含量增加, 可能与盐胁迫后生成乙醇的代谢通量增强有关。李明达等<sup>[16]</sup>的研究也表明, 盐胁迫下酿酒酵母合成乙醇代谢途径的碳流量增

加了 23.32%, 可能是因为较高的盐浓度抑制了酵母的有氧呼吸作用, 增加了厌氧发酵产物乙醇的通量, 这与本研究中 120 g/L 盐质量浓度下乙醇含量显著增加的结果一致。



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) ( $n = 3$ )。

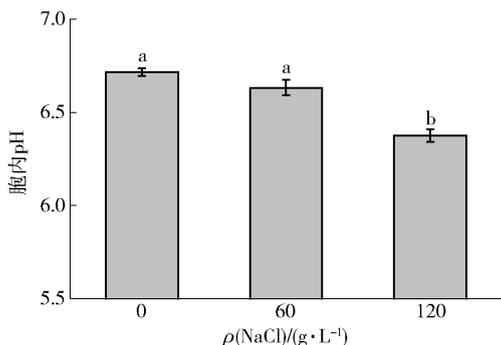
图 1 盐胁迫对鲁氏酵母菌细胞干重和乙醇含量的影响

Fig. 1 Changes of biomass and ethanol content in *Z. rouxii* under salt stress

## 2.2 盐胁迫对鲁氏酵母菌胞内 pH 值的影响

测定了鲁氏酵母菌盐胁迫后胞内 pH 水平的变化情况, 见图 2。图 2 显示, 鲁氏酵母菌胞内 pH 值随着盐浓度的增加而降低, 在 120 g/L 盐质量浓度下较为显著。据报道, 细胞胞内 pH 值与细胞生长活力有关, pH 值的减小伴随着细胞生长活力减弱<sup>[17]</sup>, 细胞在 120 g/L 盐质量浓度下, 胞内 pH 值降低与其生长性能降低的结果相一致。赵春燕等<sup>[14]</sup>研究发现, 乳酸链球菌素产生菌在酸胁迫条件下, 胞内 pH 值水平降低, 其生长也受到一定抑制。张娟<sup>[18]</sup>报道了冷冻胁迫会导致旧金山乳杆菌胞内 pH 水平降低, 发现 GSH 能显著改善冷冻胁迫造成的胞内 pH 值的下降。

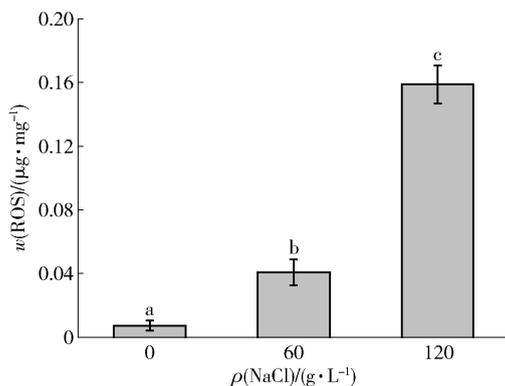
中主要的氧自由基的统称, 包括超氧阴离子自由基、羟自由基、脂氧自由基、二氧化氮和一氧化氮自由基, 并且高浓度的活性氧簇对细胞机体有毒害作用<sup>[19]</sup>。本研究考察了盐胁迫对鲁氏酵母菌胞内活性氧 ROS 水平的影响(图 3), 结果表明, 随着盐胁迫浓度增加, 胞内活性氧 ROS 水平急剧增加, 特别是在高盐浓度(120 g/L)时最为明显, 比 NaCl 浓度为 0 时提高了 21 倍。说明高盐环境会同时引起细胞内氧胁迫, 从而对细胞造成氧化损伤<sup>[20]</sup>。



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) ( $n = 3$ )。

图 2 鲁氏酵母菌盐胁迫下胞内 pH 水平变化

Fig. 2 Changes of intracellular pH in *Z. rouxii* under salt stress



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) ( $n = 3$ )。

图 3 鲁氏酵母菌盐胁迫下胞内 ROS 水平变化

Fig. 3 Changes of intracellular ROS level in *Z. rouxii* under salt stress

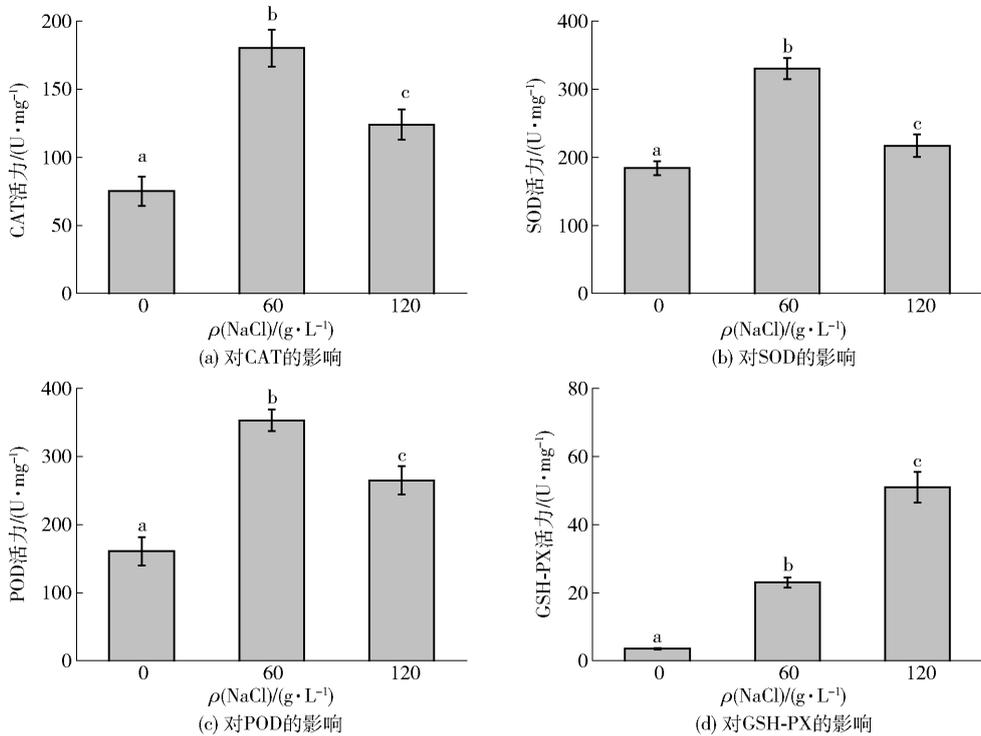
## 2.3 盐胁迫对鲁氏酵母菌胞内活性氧水平和抗氧化酶系活力的影响

微生物细胞自身具有抵御 ROS 损伤的能力, 如过量表达抗氧化酶系, 包括过氧化氢酶 (CAT), 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD), 以及 GSH 过氧化物酶 (GSH-PX); 此外, 还有低分子量的抗氧化剂如 GSH 等都可以帮助机体抵御氧化损伤<sup>[21]</sup>。本研究考察了盐胁迫对鲁氏酵母菌抗氧化酶系活性的影响, 实验结果如图 4。测定了 CAT、SOD、POD

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是生物体

以及 GSH-PX 的活性,研究结果表明,鲁氏酵母菌的抗氧化酶系的活力在盐胁迫后均有显著性提高,在 60 g/L NaCl 时,POD 酶活力提高,比未经盐胁迫的活性提高了 1.8 倍;继续提高盐质量浓度至 120 g/L,酶活性略有降低。可能是细胞机体为了分解体内的活性氧,提高了抗氧化酶系的活力,这可能是 *Z. rouxii* 具有较高耐盐性能的原因之一<sup>[22]</sup>。Farhangi-

Abriz 等<sup>[23]</sup>报道了盐胁迫会导致胞内活性氧的过量产生,破坏细胞膜,而细胞的抗氧化酶系活性的提高在保护细胞免受氧化损伤方面发挥重要作用。此外,Jakubowski 等<sup>[24]</sup>研究发现,随着酵母菌中抗氧化物质含量增加,比如超氧化物歧化酶 SOD 的活力增加等,酵母菌在进入稳定期后会对氧化损伤的增强做出适应性反应。



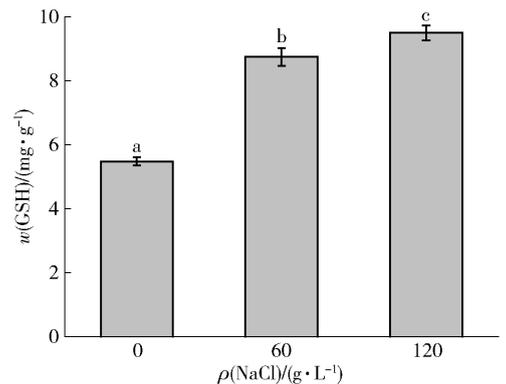
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) ( $n = 3$ )。

图4 盐胁迫对鲁氏酵母菌胞内抗氧化酶活力的影响

Fig. 4 Effects of salt stress on intracellular antioxidant enzymes activity in *Z. rouxii*

## 2.4 盐胁迫对鲁氏酵母菌胞内 GSH 含量的影响

GSH 有助于维持细胞内氧化还原稳态,保护细胞免受氧化损伤<sup>[25]</sup>。本研究考察了盐胁迫后鲁氏酵母菌细胞内 GSH 含量变化,实验结果见图 5。图 5 显示,盐胁迫后鲁氏酵母菌胞内 GSH 的含量逐渐增加,在 120 g/L 盐质量浓度时,GSH 含量显著增加,与无盐条件相比增加了 73.4%,有助于鲁氏酵母菌维持胞内氧化还原反应,并通过酶促反应维持体内稳态,从而抵御盐胁迫<sup>[26]</sup>。相似的结果在对热带假丝酵母的研究中也有报道,Ilyas 等<sup>[27]</sup>发现热带假丝酵母菌在重金属离子胁迫条件下,胞内 GSH 的含量显著高于非胁迫状态下的,而氧化应激引起的 GSH 积累的可能是细胞存活的一个重要因素。



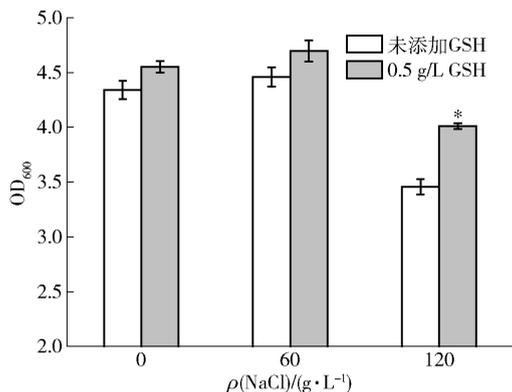
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) ( $n = 3$ )。

图5 鲁氏酵母菌盐胁迫下胞内 GSH 含量变化

Fig. 5 Changes of intracellular glutathione content in *Z. rouxii* under salt stress

## 2.5 添加 GSH 对鲁氏酵母菌生长性能的影响

为了进一步研究 GSH 对鲁氏酵母菌耐盐性能的影响,考察了不同盐浓度下外源添加 GSH 对鲁氏酵母菌生长性能的影响,结果如图 6。图 6 显示,在低盐条件下,添加 0.5 g/L GSH 的鲁氏酵母菌与未添加相比,生物量无显著区别。随着盐浓度的提高,在 120 g/L NaCl 质量浓度条件下,添加 0.5 g/L GSH 使得鲁氏酵母菌的生物量提高了 15%。这说明,添加 GSH 能够提高鲁氏酵母菌盐胁迫下的生长性能。相似的结果在其他微生物研究也有报道,Zhang 等<sup>[4]</sup>研究了乳酸乳球菌的耐盐性能,发现在 5 mol/L 盐浓度下,含 GSH 的乳酸乳球菌细胞存活率显著高于对照组细胞。Lee 等<sup>[28]</sup>研究发现,唾液乳杆菌在添加 GSH 的低 pH 值培养基中,比对照组生长速度快,生长性能更强。



\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) ( $n = 3$ )。

图 6 外源添加 GSH 对鲁氏酵母菌生长性能的影响

Fig. 6 Effect of exogenous glutathione addition on growth of *Z. rouxii* under salt stress

## 3 结论

研究了盐胁迫对鲁氏酵母菌 (*Zygosaccharomyces rouxii* CGMCC 3791) 细胞生理特性的影响。分别考察了盐胁迫对鲁氏酵母菌生长代谢以及胞内微环境 (胞内 pH 值、胞内活性氧和抗氧化酶系水平等) 的影响。研究表明,盐胁迫抑制了鲁氏酵母菌生长,提高了单位菌体的乙醇含量;同时研究发现,盐胁迫导致胞内 pH 水平降低,胞内活性氧水平和抗氧化酶系活力和胞内 GSH 含量均显著升高,从而可帮助细胞抵御盐胁迫及盐胁迫引起的氧胁迫。此外,通过外源添加 GSH,使鲁氏酵母菌在 120 g/L 盐浓度质量下生物量提高了 15%。本研究结果有助于了解鲁氏酵母菌盐胁迫条件下

的生理特性及盐胁迫响应机制,可为进一步提高鲁氏酵母菌的耐盐性能,提升其食品微生物制作的效率提供理论基础。

## 参考文献:

- [1] XIN L, KANG Y, YU C, et al. Exponential feeding strategy of high-density cultivation of a salt-tolerant aroma-producing yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in stirred fermenter [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 111: 18–23.
- [2] YUZUKI M, MATSUSHIMA K, KOYAMA Y. Expression of key hydrolases for soy sauce fermentation in *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(1): 92–94.
- [3] 卫永华, 齐威, 王春玲, 等. 耐盐酵母在酱油中的应用及其耐盐机理的研究 [J]. *中国酿造*, 2012, 31(4): 25–28.  
WEI Y H, QI W, WANG C L, et al. Application of salt-tolerant yeast in soy sauce fermentation and its salt-tolerant mechanism [J]. *China Brewing*, 2012, 31(4): 25–28.
- [4] ZHANG Y, ZHANG Y, ZHU Y, et al. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3177–3186.
- [5] HOSSAIN M S, DIETZ K J. Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7): 548.
- [6] HE B, MA L, HU Z, et al. Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus oryzae* in response to salinity stress [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2017, 102(2): 897–906.
- [7] HE G, DENG J, WU C, et al. A partial proteome reference map of *Tetragenococcus halophilus* and comparative proteomic and physiological analysis under salt stress [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(21): 12753–12763.
- [8] SARA L, GIACOMO Z, SEVERINO Z, et al. Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(3): 229–235.
- [9] WU G, FANG Y Z, YANG S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health [J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(3): 489–492.

- [10] ZHANG J, LI Y, CHEN W, et al. Glutathione improves the cold resistance of *Lactobacillus sanfranciscensis* by physiological regulation [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 285–292.
- [11] 李岭卓, 李锐, 熊小毛, 等. 发酵液中乙醇含量的测定方法 [J]. 酿酒科技, 2018(4): 126–128.  
LI L Z, LI R, XIONG X M, et al. Determination of ethanol content in fermenting liquid [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2018(4): 126–128.
- [12] 吴重德. 干酪乳杆菌抵抗酸胁迫的生理机制解析 [D]. 无锡: 江南大学, 2012.  
WU C D. Study on the physiological mechanisms of acid stress tolerance in *Lactobacillus casei* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [13] 王爱英, 李军. 超临界 CO<sub>2</sub> 处理腐生酵母菌细胞内外 pH 值的变化 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 45–49.  
WANG A Y, LI J. Determination of extracellular and intracellular pH of saprophytic yeast suspension under supercritical carbon dioxide treatment [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 45–49.
- [14] 赵春燕, 李籽潼, 乌日娜, 等. 酸胁迫对乳酸链球菌素产生菌 *Lactococcus lactis* LN26 的影响 [J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(4): 487–490.  
ZHAO C Y, LI Z T, WU R N, et al. Effect of acid stress on *Lactococcus lactis* LN26 [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2014, 45(4): 487–490.
- [15] 尹亚辉, 安文涛, 董亮, 等. 不同世代酿酒酵母胞内抗氧化酶活性变化 [J]. 食品科技, 2013, 38(8): 38–41.  
YING Y H, AN W T, DONG L, et al. Changes of antioxidant enzyme activities in different algebraic of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 38–41.
- [16] 李明达, 陈霞, 韩丹, 等. 盐胁迫条件下酿酒酵母的代谢通量分析 [J]. 吉林大学学报(理学版), 2010, 48(4): 699–703.  
LI M D, CHEN X, HAN D, et al. Metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under salt stress conditions [J]. Journal of Jilin University (Science Edition), 2010, 48(4): 699–703.
- [17] 刘树臣, 谢澜漪, 李春, 等. 热带假丝酵母细胞内 pH 的测定及其与生长代谢活性的关系 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 279–283.  
LIU S C, XIE L Y, LI C, et al. Measurement of intracellular pH in long-chain dicarboxylic acid-producing yeast *Candida tropicalis* and its growth activity [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(2): 279–283.
- [18] 张娟. 谷胱甘肽对乳酸菌胁迫抗性的调控机制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.  
ZHANG J. Regulation mechanism of glutathione on stress resistance of lactic acid bacteria [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
- [19] 周方方, 吴正钧, 艾连中, 等. 蛋白组学技术在乳酸菌环境胁迫应激研究中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 101–106.  
ZHOU F F, WU Z J, AI L Z, et al. The progress of proteomics technology and its application in lactic acid bacteria's responses to environmental stress [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(8): 101–106.
- [20] MATSUO R, MIZOBUCHI S, NAKASHIMA M, et al. Central roles of iron in the regulation of oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Curr Genet, 2017, 63(5): 895–907.
- [21] 付瑞燕, 陈坚, 李寅. 谷胱甘肽/谷胱甘肽过氧化物酶系统在微生物细胞抗氧胁迫系统中的作用 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 770–775.  
FU R Y, CHEN J, LI Y. The function of glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 770–775.
- [22] LI C, XU Y, JIANG W, et al. Effect of sodium chloride and cadmium on the growth, oxidative stress and antioxidant enzyme activities of *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. Journal of Ocean University of China, 2014, 13(3): 460–466.
- [23] FARHANGI-ABRIZ S, TORABIAN S. Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 137: 64–70.
- [24] JAKUBOWSKI W, BILIŃSKI T, BARTOSZ G. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 28(5): 659–664.
- [25] POPHALY S D, SINGH R, POPHALY S D, et al. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 114.
- [26] 李成龙, 刘向红, 吴也可. 细菌中谷胱甘肽的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(12): 21–24.  
LI C L, LIU X H, WU Y K. Research progress of glutathione in bacteria [J]. China Medical Herald, 2018,

15(12): 21–24.

- [27] ILYAS S, REHMAN A. Oxidative stress, glutathione level and antioxidant response to heavy metals in multi-resistant pathogen, *Candida tropicalis* [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2015, 187 (1):

4115.

- [28] LEE K, PI K, KIM E B, et al. Glutathione-mediated response to acid stress in the probiotic bacterium, *Lactobacillus salivarius* [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32 (7): 969–972.

## Effect of Salt Stress on Physiological Characterization of *Zygosaccharomyces rouxii*

WANG Dingkang, ZHANG Min, HUANG Jun, JIN Yao, ZHOU Rongqing, WU Chongde\*  
(College of Biomass Science and Engineering/Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering,  
Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** The effects of salt stress on the physiological characterization of *Zygosaccharomyces rouxii* CG-MCC 3791 were studied, the results showed that salt stress inhibited cell growth and the ethanol content increased from 11.64 mg to 19.20 mg (120 g/L NaCl). Analysis of intracellular pH and reactive oxygen species (ROS) levels showed that salt stress led to the decrease in intracellular pH and increase in ROS level. Meanwhile, the activities of intracellular antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, peroxidase and glutathione peroxidase) were increased to resist oxygen stress induced by salt stress. The effect of salt stress on the intracellular glutathione (GSH) content of *Z. rouxii* was measured, and the results showed that the intracellular GSH content increased with the increase of salt concentration. At 120 g/L salt concentration, the GSH content increased significantly by 73.4%. Then the effect of exogenous addition of glutathione on cell growth was investigated, and the results showed that the biomass of cells increased by 15% at 120 g/L salt concentration by adding 0.5 g/L glutathione. This study may provide theoretical support for in-deep understanding the salt-tolerant physiological mechanisms of *Z. rouxii* and further improvement of its salt tolerance.

**Keywords:** *Zygosaccharomyces rouxii*; salt stress; cell physiological characterization; intracellular micro-environment; glutathione

(责任编辑:叶红波)