

分类号: Q81

密 级: 公开

单位代码: 10363

学 号: 2210530132

富硒酵母选育及其硒转化机制的研究

BREEDING OF SELENIUM-RICH YEAST AND THE MECHANISM OF SELENIUM TRANSFORMATION

学 生 姓 名: 汪锡武

校 内 导 师: 王洲 副教授

校 外 导 师: 孙良玉

专业学位类别: 生物与医药

研 究 方 向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：汪留武

日期：2024 年 05 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

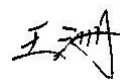
保密 ☐，在 __ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：汪锡武

指导教师签名：



日期：2024 年 05 月 30 日

日期：2024 年 05 月 30 日

富硒酵母选育及其硒转化机制的研究

摘要

硒在生物学中扮演着重要的角色，对人体健康有积极影响，因而被广泛认为是维持人体健康所必需的微量元素之一。人体主要从膳食中获取硒，但通常来说，膳食中的硒摄入量未能达到人体所需水平（55 $\mu\text{g}/\text{d}$ ）。研究指出，有机硒相较于无机硒具有更低的毒性，并且具有更高的生物利用率。微生物如细菌、酵母菌和霉菌等具有能力将无机硒转化为更易被人体吸收的有机硒和硒单质。如今，研究的主要课题是寻找在有机硒富集中发挥经济效益的微生物。选取酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）菌株为研究对象，通过高浓度亚硒酸钠胁迫，经过 ARTP 诱变和筛选获得了试验菌株 WX-01。在优化培养条件的基础上，成功选育了一株富硒酵母菌株，并运用转录组学方法深入探讨了该菌的富硒机理。本文旨在提供经验数据，以支持有关富硒酵母的探索，进而推动富硒酵母及其在食品发酵中的功效研究。本论文主要研究结果如下：

（1）通过利用实验室保存的亲本菌株 WX-01，首先通过菌种鉴定，WX-1 菌株被鉴定为 *Saccharomyces*（酵母属），然后成功优化了其生长条件。经过高浓度亚硒酸钠筛选、ARTP 诱变处理和抗亚硒酸钠平板筛选等步骤，结合生物量和硒含量的测定，最终成功筛选出了富硒优势酵母菌株。在培养条件为 35 mg/L 、加硒 8 h、培养 36 小时的情况下，酵母菌株 WX-1 的生物量达到 $5192 \pm 36 \text{ mg}/\text{L}$ ，比原菌株 WX-01 增加了 201%，硒含量达到 $1475 \pm 33 \text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ ，增加了 330%，有机硒产量和转化率分别为 7658 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 97.1%。

（2）结合酵母菌的硒代谢特性，试验分析富硒突变菌株的生理特性。通过扫描电镜结果显示，经酵母菌富集后，表面出现了少量单质硒析出。在特定区域出现了不同强度的吸收峰，红外光谱结果表明酵母细胞参与了硒蛋白的合成过程。研究指出，离子通道蛋白对酵母细胞的生理代谢和磷酸盐转运蛋白以及硒代谢中的关键酶磷酸硒合成酶（SPS）活性具有影响，进而影响细胞对无机硒的吸收和转化过程。这表明添加 K^+ 有助于维持酵母细胞的胞外 pH 稳定性和细胞内

外离子平衡，提高 SPS 的活性，从而促进酵母细胞的生长和硒代谢过程。研究发现，离子通道蛋白会影响酵母细胞的生理代谢、磷酸盐转运蛋白的活性以及硒代谢中的关键酶（磷酸硒合成酶，SPS）。这些因素最终会影响细胞对无机硒的吸收和转化。这意味着， K^+ 的添加可增强 SPS 的活性，从而促进酵母细胞的增殖和硒代谢过程，并有助于维持细胞外 pH 值的稳定性以及酵母细胞内外的离子平衡。

（3）对突变株和野生型菌株进行了转录组分析，以探索酿酒酵母富硒的机制。结果显示有 2612 个差异表达基因（DEGs）。GO 分析显示，富硒突变菌株 WX-1，细胞内氧化还原反应、跨膜运输以及 ATP 耦合质子转运相关基因的表达发生显著上调。KEGG 路径分析揭示了大量与跨膜转运、能量代谢和氨基酸代谢相关的基因上调表达，同时与 NADPH 合成和硒化合物代谢相关的基因则呈高水平表达。相比未添加 Na_2SeO_3 的组别，添加 Na_2SeO_3 的组别显示出了与阳离子平衡相关的基因。与未添加 Na_2SeO_3 的原始酵母组相比，添加 Na_2SeO_3 的诱变酵母组中发现了磷酸盐转运蛋白（PHO3、PHO8、PHO12）、ATP 合成（PYC1、CIT3、IDP2）、氨基酸代谢（LYS20、AGX1、CYS3）和 NADPH 合成（GND2、UTR1、MDH2）等相关基因表达存在显著差异。最后，通过硒代谢途径发现关键差异基因 *trr1*，其差异表达量上调了 1244.5%。

关键词：酿酒酵母，常压室温等离子体诱变技术（ARTP），硒代谢机制，转录组测序

BREEDING OF SELENIUM-RICH YEAST AND THE MECHANISM OF SELENIUM TRANSFORMATION

ABSTRACT

Selenium is an essential trace element and has important biological functions to promote human health. Although food is the body's primary source of selenium absorption, most people consume less than the recommended daily amount of 55 mg. Since the human body is unable to produce selenium on its own, choosing foods high in selenium is still a crucial tactic for addressing low selenium levels. Studies have shown that organic selenium has lower toxicity and higher bioavailability. Microbes such as bacteria, yeast, mold, and fungi are able to convert inorganic selenium into organic selenium and selenium particles that are more easily absorbed by the human body. At present, how to select microorganisms that enrich organic selenium cheaply and efficiently has become one of the focus of research. In this study, a strain of *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) was selected by ARTP mutagenesis and high concentration of sodium selenite stress. A selenium-rich yeast strain was successfully bred by optimizing the cultivation conditions, and transcriptomics techniques were used to study the mechanism of selenium accumulation in the bacterium in detail and provide experimental data for future studies on optimizing the performance of selenium-rich yeast and food fermentation. The main findings of this paper are as follows:

(1) Using laboratory strain WX-01 as the starting bacterium, you perform an initial screening with a high concentration of sodium selenite, ARTP mutagenesis and plate screening for sodium selenite resistance, observe biomass growth and selenium

content, and select the dominant high-selenium yeast. Through culture conditions of 35 mg/L of addition, selenium addition time of 8 h and 36 h of 36 h, the biomass of yeast WX-1 was increased to 5192 ± 36 mg/L, 201% higher than the original strain WX-01, the selenium content reached 1475 ± 33 μ g/g, 330% higher than the original strain, and the organic selenium yield and conversion were 7658 μ g/L and 97.1%, respectively.

(2) Combined with the selenium metabolic characteristics of yeast, the physiological characteristics of selenium-rich mutant strains were analyzed entally. First, the yeast species *Saccharomyces* was identified as the source of the WX-1 strain, indicating that following yeast enrichment, a trace amount of elemental selenium precipitated on the surface. Additionally, the IR results showed the emergence of absorption peaks in particular locations at varying intensities, suggesting that yeast cells are engaged in the synthesis of selenoproteins. Studies have shown that ion channel proteins have an impact on the physiological metabolism of yeast cells, but also affect the activity of phosphate transporters and the activity of selenophosphate synthase (SPS), a key rate-limiting enzyme of selenium metabolism, and then affect the absorption and transformation of inorganic selenium by cells. This suggests that the addition of K^+ helps to maintain the extracellular pH stability and extracellular ion balance in yeast cells and improve the SPS activity, thus promoting the growth and selenium metabolism process in yeast cells.

(3) To deeply explore the selenium-enriched mechanism in yeast, we performed a transcriptomic analysis of the mutant and starter strains, detecting a total of 2,612 differentially expressed genes (DEGs). GO analysis showed that the cellular redox-reaction, transmembrane transport, and ATP-coupled proton transport occurred in WX-1. KEGG pathway analysis showed that a large number of genes involved in transmembrane transport, energy metabolism, and amino acid metabolism were upregulated, along with high levels of genes related to NADPH synthesis and selenium compound metabolism. For genes involved in cation homeostasis, in the added Na_2SeO_3 and the Na_2SeO_3 -supplemented groups, phosphate transporter (PHO3, PHO8, PHO12), ATP synthesis (PYC1, CIT3, IDP2), amino acid metabolism (LYS20,

AGX1, CYS3), and NADPH synthesis (GND2, UTR1, and MDH2) were identified. Ultimately, the selenium metabolism pathway found the major differential gene *trr1* whose differential expression was up-regulated by 1244.5%. These findings provide crucial theoretical references for the breeding of yeast high in selenium and clarify the important differential genes following mutagenesis.

KEY WORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, atmospheric room temperature plasma mutagenesis (ARTP), selenium metabolism mechanism, transcriptome sequencing

目录

摘要	IV
ABSTRACT	VI
第一章 绪论	1
1.1 富硒微生物及其富硒产品研究进展	1
1.1.1 硒的概述	1
1.1.2 富硒产品的开发	1
1.1.3 富硒微生物	2
1.2 富硒酵母及其研究现状	3
1.2.1 富硒酵母的简介	3
1.2.2 硒在酵母中的富集途径	3
1.2.2 酵母硒耐受机制	5
1.3 富硒酵母的制备	6
1.4 富硒酵母的应用价值	8
1.5 硒的检测及表征方法	8
1.6 本课题研究的意义与研究内容	9
1.6.1 研究意义	9
1.6.2 研究内容	10
第二章 菌种筛选以及培养条件优化	12
2.1 前言	12
2.2 材料与仪器	12
2.2.1 实验材料	12
2.2.2 实验材料与仪器	12
2.2.3 实验主要试剂配置	13
2.3 实验方法	13
2.3.1 菌种鉴定	13
2.3.2 菌种活化初筛与生长曲线的测定	14
2.3.3 ARTP 诱变条件确定以及操作	14
2.3.4 ARTP 致死率	14
2.3.5 耐硒菌株的筛选	15
2.3.6 硒含量的测定方法	15
2.3.7 酵母生物量与硒含量测定	16
2.4 氢化物发生原子荧光光谱分析	16
2.4.1 原理	16
2.4.2 样品预处理	16
2.5 酵母菌富硒条件优化	16
2.5.1 硒添加浓度对酵母硒富集的影响	16
2.5.2 硒添加时间对酵母硒富集的影响	17
2.5.3 发酵时间对酵母硒富集的影响	17
2.6 结果与分析	17
2.6.1 菌种鉴定结果	17
2.6.2 酵母菌生长曲线测定	18
2.6.3 致死率曲线	19

2.6.4 耐硒菌株筛选结果分析	20
2.7 硒含量测定	22
2.7.1 硒标准曲线绘制	22
2.7.2 酵母生物量与硒含量测定	23
2.8 氢化物发生原子荧光光谱法测定酵母硒含量	23
2.8.1 硒添加浓度对酵母硒富集的影响	23
2.8.2 硒添加时间对酵母硒富集的影响	25
2.8.3 发酵时间对酵母硒富集的影响	26
2.8.4 氢化物发生原子荧光光谱法测定酵母硒含量	28
2.9 本章小结	28
第三章 基于阳离子稳态探究富硒酵母生理代谢	30
3.1 引言	30
3.2 材料与仪器	30
3.2.1 实验材料	30
3.2.2 实验材料与仪器	30
3.3 实验方法	31
3.3.1 扫描电镜观察与能谱分析	31
3.3.2 红外光谱分析	31
3.3.3 胞外 pH 测定	32
3.3.4 硒磷酸合成酶测定	32
3.3.4.1 原理	32
3.3.4.2 硒磷酸标曲的绘制	32
3.3.4.3 样品处理	32
3.3.5 数据处理与分析	33
3.4 结果与分析	33
3.4.1 表征结果分析	33
3.4.1.1 扫描电镜结果分析	33
3.4.1.2 扫描能谱结果分析	34
3.4.1.3 红外结果分析	35
3.4.2 胞外 pH 测定结果分析	36
3.4.3.1 硒磷酸合酶标准曲线	37
3.5 本章小结	39
第四章 基于转录组学分析酵母硒代谢机制	41
4.1 前言	41
4.2 实验材料	41
4.2.1 实验材料	41
4.2.2 实验材料与仪器	42
4.3 实验方法	42
4.3.1 转录组样本前处理	42
4.3.2 文库构建与数据质控	42
4.3.3 测序数据处理	42
4.3.4 转录组测序数据统计分析	43
4.3.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证	43
4.4 结果与分析	43

4.4.1 差异表达基因	43
4.4.2 差异基因的 GO 功能注释分析	44
4.4.3 差异基因的 KEGG 通路富集分析	46
4.4.4 转运蛋白差异表达基因	48
4.4.5 能量代谢差异表达基因	50
4.4.6 氨基酸代谢差异表达基因	51
4.4.7 NADPH 合成相关部分差异基因	52
4.4.8 硒耐受相关差异表达基因	53
4.4.9 RT-qPCR 验证	54
4.4.10 硒代谢途径	55
4.4.11 谷胱甘肽代谢途径	56
4.5 本章小节	58
第五章 结论与展望	59
5.1 结论	59
5.2 展望	60
参考文献	61
攻读硕士期间发表论文	70
致谢	71

第一章 绪论

1.1 富硒微生物及其富硒产品研究进展

1.1.1 硒的概述

硒（Se）是一种重要的微量元素，具有抗氧化、改善心血管和调节免疫系统的作用^[1]。通常，硒在自然界以有机硒和无机硒等两种形式存在^[2]。无机硒通常以硒酸盐（ SeO_4^{3-} ）和亚硒酸盐（ SeO_3^{2-} ）等形式存在，可以作为硒源类营养强化剂，但吸收率较低，毒性较大；有机硒则包括硒代蛋氨酸、硒代半胱氨酸等，经各种代谢产生，更易被生物体吸收利用^[3, 4]。

尽管瑞典化学家 J.J.Berzelius 早在 1817 年分离出了纯硒^[5]，但直至 1957 年，Schwar 等科学家才通过成功运用硒治疗大鼠肝细胞坏死，硒的研究才迈向重大突破^[6]。1973 年，Rotruck 等研究人员发现了抗氧化活性物质谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px），可保护人体免受氧化损伤，Awasthi 等也证实硒是构成人类红细胞 GSH-Px 的成分之一^[7]。1975 年，Schwarz 和 Folltsc 发现硒是有机体正常运作所必需的微量元素，从而引起全球广泛关注^[8]。中国科学家在 1979 年研究发现，克山病症状与硒元素缺乏有关，引发我国对硒进行广泛且深入的研究^[9]。20 世纪后半叶的人类营养专家委员会会议确认硒是生物体所必需的 14 种微量元素之一，长期缺乏硒可导致癌症等疾病^[10, 11]。研究表明微生物转化法是一种安全有效的补硒方式，可将硒元素转移到发酵食品中^[12-14]。

1.1.2 富硒产品的开发

近年来随着富硒产品的研究深入，富硒大米、富硒茶叶、富硒啤酒、富硒面粉、富硒食用菌和富硒酵母等走进人们的视野^[15-17]。目前，人体内的硒主要来源于含硒丰富的植物、富含硒的畜禽产品以及人工生产的富硒产品。富硒植物是指依托富硒土壤或者富硒资源的地区开发种植产品。例如安徽的富硒茶^[18]

与广西的富硒大米^[19]，浙江龙游在富硒区种植的莲藕、番薯^[20]等产品都已经具有了比较成熟的生产种植经验。何炎炘等通过对金针菇富硒培养使硒的有机化程度达 75%以上，富硒使菌丝体内蛋白、多糖等多种营养成分的含量呈上升趋势^[21]。魏云辉等通过对猴头菌进行富硒栽培，改进生产工艺，发现其对硒的富集能力和转化率都大大提高^[22]。此外，人工加工的硒丰富食品主要通过植物、动物和微生物将外源无机硒转化为有机硒。我国许多地区地壳中硒含量较低，富含硒的土壤相对稀缺，因此必须培育富含硒元素的植物，以满足人们日常对硒的需求。比如新疆大学以新疆本地蛹虫草和普通奶粉为原料，建立新疆地区富硒蛹虫草菌种人工栽培技术^[23]。富硒畜禽产品是通过将含有丰富硒元素的植物或微生物制成饲料，喂养动物，从而有助于改善猪、牛等动物的健康和生产性能，提高其免疫力并抑制炎症的发生^[24]。目前市面上富硒鸡蛋已经普及，Ourre 等人生产的天然鸡蛋含有 45%的有机硒，利用硒来改善鸡蛋蛋黄的色泽，并增强其抗氧化能力^[25]。微生物转化法主要是利用天然或改造的食用菌对硒离子的耐受性及生长转化特性，将无机硒转化成有机态的硒，是当下研究的热点^[26, 27]。在适宜的生长环境下，微生物可以吸收微量元素，并将其结合到有机物中。

1.1.3 富硒微生物

目前，有机硒的微生物转化主要专注于富硒酵母和富硒乳酸菌。2017 年 SAINI 等发现发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) NCDC 77 具有高硒富集能力^[28]。对于富硒乳酸菌的研究，PESCUMA 等人将无机硒添加到嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) CRL 636 和路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) CRL 1101 的培养基中，发现两种菌株均合成了 SeCys 和 SeMet^[29]。为了得到富硒能力较强的乳酸菌，易鑫利用不同浓度亚硒酸钠筛选出一株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)，优化后最佳富硒率为 84.26%^[30]。然而，乳酸杆菌并非传统的模式生物，其硒积累机制仍不为人所了解。此外，其对亚硒酸钠的耐受性远低于富硒酵母，这直接影响了该菌株对有机硒的积累。研究表明，酵母是良好的富硒载体，通过酵母的硒磷酸合酶 (SPS) 催化，将无机硒转化为硒磷酸 (SeP)，进而合成硒蛋白^[31-33]。富硒酵母与其他富硒微生物相比具有更高的硒转化效率，

RAJASHREE 利用富硒酵母分批补料发酵, 得到硒含量为 $3758 \pm 6.5 \text{ mg/L}$, 干酵母生物量为 32.09 g/L 。涂青以富硒酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) SY2 为发酵菌种, 利用 5 L 发酵罐培养富硒酵母, 其硒含量为 $1759.5 \mu\text{g/L}$, 硒转化率为 90.1% ^[34]。酵母菌主要将无机硒转化为 SeMet, 并将其插入合成硒蛋白, 其硒蛋白含量可以达到总硒量的 90%以上, 且 SeMet 占比为 70%左右, 因此工业生产中常以 SeMet 作为酵母硒产品的质控标准^[35, 36]。另外, 富硒酵母还用于家畜的饲养, 以便提高肉的品质与有机硒的积累^[24]。近年来, 越来越多的研究将富硒酵母应用于食品发酵来满足人们日常的硒摄入量^[37]。

1.2 富硒酵母及其研究现状

1.2.1 富硒酵母的简介

酵母属于酵母菌门中的一类单细胞生物, 因具有发酵条件简单, 安全无毒, 转化快等优点, 在食品和工业生产中发挥着重要的作用, 因此可以作为一种优良的富硒载体^[38]。国外研究机构自从 1970 年就开始对富硒酵母进行研究, 直到 1980 年我国也成功培育出富硒酵母菌株^[39, 40]。目前越来越多的科学家投入到酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[40]、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)^[41]、鲁氏酵母 (*Saccharomyces rouxii*)^[42]、葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*)^[43]等富硒酵母的研究中。吴竞等人比较了不同酵母之间的硒耐受能力和富硒水平, 发现酿酒酵母具有更加优良的富硒性能^[44]。酿酒酵母作为食品级的微生物, 是世界上最早实现全基因组 DNA 测序的真核微生物, 其硒代谢途径非常清晰, 因此具有更高的生物安全性^[45, 46]。

1.2.2 硒在酵母中的富集途径

在酵母细胞内, 硒的积累包括两个关键过程: 摄取和转化。为了克服细胞膜对硒离子的不透性, 富硒酵母需要主动吸收胞外的无机硒, 这一过程主要依赖于硫酸盐转运蛋白和具有更高亲和性的磷酸盐转运蛋白转运系统^[47]。据报道, 酵母细胞中存在 2 个磷酸盐转运蛋白, 分别是 PHO84 和 PHO89^[48]。PHO84 转运体在中性和酸性条件下具有活性, 而在碱性条件下, PHO89 发挥作用且具有

Na^+ 电化学梯度依赖的磷酸（Pi）转运活性^[47, 49]。这种作用可能受离子通道蛋白的影响，当环境中的 Na^+ 浓度过高时，酵母会主动消耗大量能量调节阳离子平衡，导致产生过多自由的 Pi，而 Pi 与磷酸盐转运蛋白的亲合度高于硒酸盐，从而降低了运转效率^[50, 51]。

在酵母细胞中，硒代谢是一个复杂的过程，涉及到多个关键调控基因^[27, 52, 53]。在酵母的硒积累过程中会形成五种硒的代谢前体。其中，硒半胱氨酸（SeCys）是构成硒蛋白的核心物质，类似于半胱氨酸(Cys)^[27, 54]。在乳酸菌和双歧杆菌等细菌中，硒半胱氨酸合成酶（SelA）可以通过一步反应将半胱氨酸合成硒半胱氨酸^[55, 56]。另一方面，在真核生物（如酵母）中，硒磷酸合酶（SerRS）产生 Ser- tRNA^{Sec} 以形成硒半胱氨酸。酵母细胞主动摄取亚硒离子（ SeO_3^{2-} ），并通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）或者通过谷胱甘肽还原酶（GRX）还原为 H_2Se ^[57]。在 ATP 的作用下，硒磷酸合酶（SPS2）催化 H_2Se 生成硒磷酸（SeP）^[58]。最终，通过一系列酶反应过程，SeP 被转化为 SeCys（见图 1-1）。SeCys 能够识别 UGA 密码子的翻译复合物，从而读取核苷酸序列，用于合成多肽链中的氨基酸。在读取 UGA 密码子后，Sec- tRNA^{Sec} 会被核糖体上的受位点识别，并合成硒蛋白^[59]。因此，在酵母细胞中，硒代蛋氨酸（SeMet）是硒的基本形式，存在于组织中^[60]。

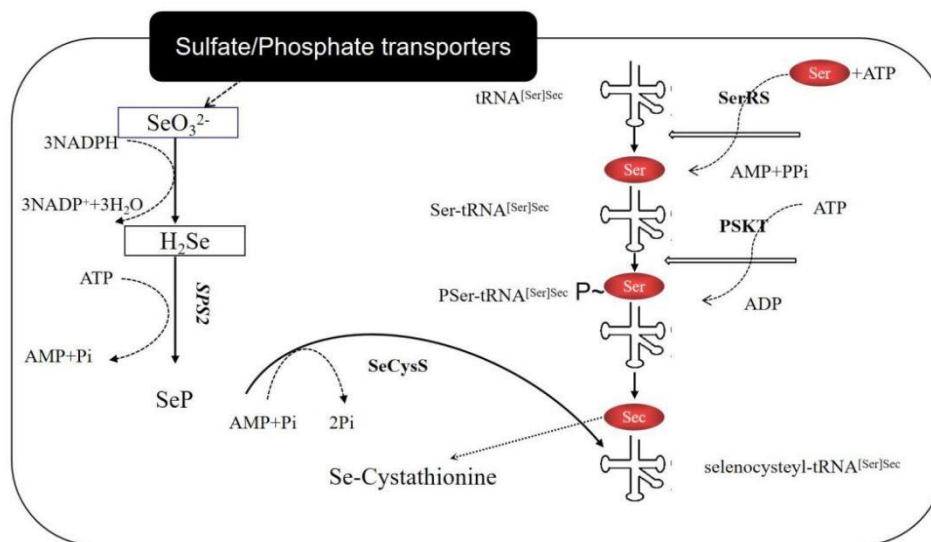


图 1-1 富硒酵母中硒半胱氨酸合成示意图

Fig.1-1 Schematic representation of selenocysteine synthesis in selenium-enriched yeast

1.2.2 酵母硒耐受机制

高硒耐受性对于微生物硒富集至关重要，因为硒在细胞内的过量积累对大多数微生物都具有毒性^[61, 62]。当浓度较高时，硒会转化为促氧化剂，表现出高细胞毒性，即氧化应激反应，对细胞结构的稳定性构成威胁^[63, 64]。这种现象会导致新陈代谢失衡，影响细胞膜组织的排列，并加剧细胞器的降解过程，导致细胞膜氧化，改变蛋白质的结构和功能，同时也会造成 DNA 的损伤^[65]。细胞内过度产生的氧自由基也可能导致形态紊乱。然而，酵母具备一套酶和非酶的防御系统，能够保护细胞内成分免受氧化应激的影响，同时还具备较强的硒转化能力和硒耐受能力，因此作为富硒微生物之一被广泛研究^[66, 67]。

研究表明，与乳酸杆菌（*Lactobacillus*）与双歧杆菌（*Bifidobacterium*）等相比，富硒酵母对亚硒酸盐的耐受性更高^[68]。在富硒环境中，酵母细胞通过磷酸盐转运蛋白吸收硒。接着，亚硒酸盐与谷胱甘肽（GSH）反应生成硒酸谷胱甘肽（GS-Se-SG）和氧化谷胱甘肽（GSSG）^[69]。然后，通过谷胱甘肽还原酶的作用，GSSG 被转化为还原谷胱甘肽（GSH）^[70]。在富硒酵母细胞中，GS-Se-SG 进一步转化为谷胱甘肽硒醇（GS-Se-H），其中一部分转化为硒化氢（ H_2Se ）和 GSSG，另一部分在超氧化物歧化酶的催化下转化为硒单质（ Se^0 ）和 GSH（图 1-2）^[71, 72]。在富硒酵母中，谷胱甘肽过氧化物酶与过氧化氢酶和超氧化物歧化酶一起保护细胞免受氧化损伤^[73, 74]。

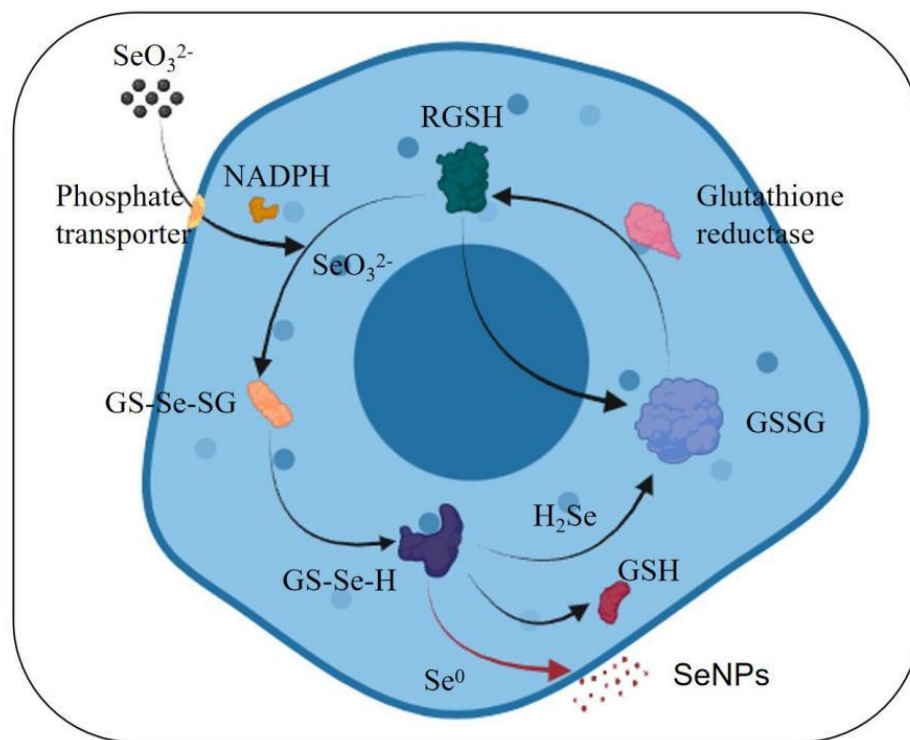


图 1-2 富硒酵母谷胱甘肽代谢示意图

Fig.1-2 Schematic diagram of glutathione metabolism in selenium-rich yeast

1.3 富硒酵母的制备

国内外对富硒酵母进行了大量研究，并将不同的富硒酵母生产方法进行了组合，如表 1-1 所示。常见的育种方式有自然育种、杂交育种、基因工程育种和诱变育种^[75, 76]。自然育种方法简便，但其缺点在于效率较低且进展缓慢。相对而言，杂交育种能够使得后代具有更强的适应性和抗逆性^[77]。然而，杂交育种具有操作复杂且需要高新技术和设备，同时育种周期长且遗传性能不稳定等缺点。而基因工程育种的主要优点是它可以根据人们的意愿对菌种进行定向修饰，并且不受物种限制^[78]。然而，通过基因工程进行选择在技术上十分复杂，难以实施。插入外源基因的表达有可能会影响酿酒酵母的特性，从而可能引发严重的生态危机。诱变育种是一种简单可行的方法，通过获得突变菌种和优良菌株来提高菌种的性能，并确保菌株的稳定性。在行业增产扩能中，优良品种的选育是至关重要的因素。诱变育种通过获取突变和优良菌株来增强菌株的性能，是一种简单而有效的方法。同时确保其遗传稳定性。在工业增产扩能的进

程中，培育优良品种至关重要，因此诱变技术得到了广泛的应用。与其他方法相比，人工诱变育种可以增加突变频率，创造原本不存在的性状，不仅操作简便而且周期短^[79-81]。

富硒酵母具有将无机硒转化为易被人体吸收的硒蛋白的能力。在未经处理的条件下，富硒酵母的总硒含量约为 300 $\mu\text{g/g}$ 。李媛媛等人通过结合紫外辐射和亚硝酸盐诱变的方法，成功提升了起始菌株的生物量和硒含量水平，取得了显著的效果^[82]。朱昌雄等人则通过耐硒驯化、DES 多次诱变及筛选等方法，使得酵母细胞的生物量提高了 149%，硒代蛋氨酸含量达到了 1650 $\mu\text{g/g}$ ^[83]。随着科学技术的进步，总硒的含量已经达到了 1200 $\mu\text{g/g}$ ^[84]。从富硒酵母到现在的高硒酵母，通过选择其他食用微生物，或改变培养工艺流程，都可以使硒的富集量增加，甚至可以达到 5000 $\mu\text{g/g}$ 。酿酒酵母作为载体酵母，是酵母产业的一个新品种，还有很大的提升空间。富硒酵母是一种营养全面的产品，其主要目的是降低动物饲料补硒和添加剂的成本，从而促进整个酵母产业链的发展。

天然酵母的本身的富硒能力并不显著。其培养主要影响因素有三点，分别是亚硒酸钠添加量、添加时间以及培养时间。

(1) 不同酵母对硒积累的影响：设置不同浓度的亚硒酸钠 YPD 液体培养基，在 YPD 液体培养基中，通过测定不同浓度的亚硒酸钠，在相同的硒浓度下分别接种了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，产朊假丝酵母 (*Candida prion*)，葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*) 和鲁氏酵母 (*Saccharomyces rouxii*)，比较了几种酵母菌株在相同硒浓度下的生长情况，从中筛选出了硒富集量高的菌株。研究结果显示，酿酒酵母表现出最强的耐硒和硒富集能力^[85]。酵母菌被视为最佳的富集硒载体，由于其具有快速生长和增殖速度、优越的微量营养素吸收能力以及短暂的发酵时间。

(2) 硒添加浓度和时间对于富硒的影响：适宜浓度硒促进酵母菌的生长代谢，当超过一定浓度时，便会抑制代谢和酶的活性。表明参与酵母物质合成的硒可能是组成物质的蛋白或者多糖，或者是参与物质合成的酶。在高浓度下的硒具有一定毒性，抑制菌种的生长和代谢^[86, 87]。

(3) 培养条件对酵母富硒的影响：pH 值和温度主要影响酶的活性，适宜的温度有利于富硒酵母酶的代谢活性。此外，发酵时间也是一个重要因素。培

养时间不仅会影响酵母的生物量，还会影响酵母的硒代谢。当发酵时间过短时，菌株尚未完全生长，导致硒的积累不足。而当发酵时间过长时，酵母次级代谢产物中的有害物质会引起酵母自噬，导致胞内的有机硒外泄，从而降低经济效益^[88]。

表 1-1 富硒酵母的国内外研究进展
Table 1-1 Research of selenium enriched yeast

菌种	处理	生物量 (g/L)	硒含量 (μg/g)
酿酒酵母	紫外诱变	10.62	1003.3
产朊假丝酵母	生长条件优化	6.87	1839.8
酿酒酵母	紫外诱变	12.10	1650.0
酵母菌	⁶⁰ Coγ射线	14.90	2531.4
产朊假丝酵母	酸胁迫	12.32	1080.0
酿酒酵母	NaN ₃ 诱变	3.45	2303.8
拉茜斯酵母	生长条件优化	4.52	1570.0

1.4 富硒酵母的应用价值

富硒酵母被广泛用于生产各种富硒食品，包括用于生产营养丰富、风味独特的面包。采用富硒酵母作为发酵剂制作的富硒面包，其硒含量约为 11.29 μg/g^[89]。此外，富硒面包在感官和气孔结构等方面表现出比普通面包更高的整体接受性，在质地特性方面则呈现出更好的弹性和内聚性，这可能是由于较高的 CO₂ 产量对面团质量的影响所致^[90]。结果表明，硒强化酵母不仅可用作硒补充剂，还可用作烘焙产品的膨松剂。

富硒酵母作为动物饲料的添加成分，有助于提高肉制品质量，并提供有助于人体吸收的有机硒^[91, 92]。研究表明，富硒酵母饲料混合喂养鸡能增强细胞的抗氧化能力和免疫力，提高鸡肉品质，促进生长^[93, 94]。另一项研究显示，富硒酵母有助于提高疫苗活性，从而保护鸡免受禽流感等病毒侵害^[95, 96]。添加硒酵母到奶牛饲料中，硒代蛋氨酸在奶牛乳腺部位循环代谢，可获得高品质富硒牛奶，后代健康状态更佳^[97, 98]。作为益生菌的富硒酵母不仅是一种硒补充剂，在保健品和药品领域也具有很高的研究价值。

1.5 硒的检测及表征方法

硒是一种非金属元素，主要可分为无机硒（如 SeO_3^{2-} 、 SeO_4^{2-} 等）和有机硒（如硒蛋白、硒肽、硒氨基酸、硒多糖等）两类。据了解，硒的形态直接影响其在生物体内的利用和活性，因此，研究硒的形态和含量对功能性研究和产品开发至关重要。目前已有多种硒的分析和检测方法，这些方法在灵敏度和适用性上有所不同，因此需要根据具体情况选择合适的检测手段。硒的定量分析方法包括紫外/可见光谱法、原子荧光光谱法、荧光光谱法、色谱法、无火焰原子吸收光谱法、电化学法、电感耦合等离子体质谱法以及质谱法^[11, 99, 100]。

硒在生物组织中的浓度很低，其作用机制也很复杂。因此，必须使用选择性和灵敏的分析方法来测量硒。目前，最有效的元素特异性分析方法包括电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）和高效液相色谱联合 ICP-MS，用于生物硒蛋白和有机组分（如蛋白质、多糖和脂质）的硒形态分析^[101-103]。此外，还可以利用紫外可见光度计、傅里叶红外光谱、扫描电镜、透射电镜、高分辨率透射电子显微镜和 X 射线能谱等方法进行研究。

1.6 本课题研究的意义与研究内容

1.6.1 研究意义

研究指出，硒元素具备抗氧化性质，可抑制病毒复制，预防细胞癌变，调节生理机能，防治克山病和骨病，保护心肝功能，同时对氧化应激具有调节作用，增强免疫力，延缓衰老进程^[38, 104]。然而，中国土壤中硒分布不均，缺乏硒元素，导致天然食品中硒含量有限，因此在膳食中强化硒的补充至关重要。在营养保健品领域，富硒酵母被认为是一种硒补充剂和食品添加剂，通过酵母中的硒代谢生产富硒食品为功能食品的开发提供了机遇和挑战。富硒酵母由于其抗氧化和抑菌效果，也逐渐应用于食品包装领域^[105, 106]。

无机硒的利用率较低，毒性较大。有机硒获取效率高的富硒酵母被视为硒食品营养的理想选择，因其安全无毒、吸收快、利用率高而备受推崇。开发生物转化率高的富硒酵母对于改善食品营养和促进公众健康具有重要意义。鉴于传统单一无机硒盐应用引发的酵母生长受限问题，提出了基于钠钾离子应激的酵母富硒调控方案，并深入探讨了调控过程和机制，为未来优化富硒酵母性能

及拓展应用领域奠定了基础。

1.6.2 研究内容

目前，国内外普遍采取使用高浓度无机硒的培养基来筛选具有富硒特性的酵母菌株。这一方法可用来直接驯化天然来源的酵母菌株，或者是经过物理化学诱变后的酵母菌株。并且在高浓度亚硒酸钠筛选的基础上，应用了常压等离子诱变技术（ARTP）进行育种^[107]。常压等离子体是微生物诱变工具，基于大气压射频辉光放电。相较于化学或紫外线诱变，ARTP 在常压和室温（25 - 40 °C）下能高效诱导 DNA 链的显著断裂。因此，采用酿酒酵母作为试验菌，在含有高浓度亚硒酸钠（120 mg/L）的 YPD 液体培养基中进行初步筛选，实验方案如图 1-3 所示。随后，通过 ARTP 诱变评估酵母在不同浓度亚硒酸钠培养基中的耐受性，并筛选出富硒酵母的优势菌株。通过氢化物原子荧光光谱法研究富硒酵母的有机硒含量，并结合扫描电子显微镜和傅立叶变换红外分析仪等工具进行详细分析，以获取富硒酵母的相关数据。此外，通过优化硒富集过程，研究了酵母硒富集性在转录组水平上的作用机制，为富硒酵母性能优化及食品发酵提供了实验数据支持。主要包括以下几个方面：

（1）以实验室保存的酿酒酵母为出发菌株，通过高浓度亚硒酸钠（120 mg/L）初筛和 ARTP 诱变处理改造基因和性状。然后测定了不同培养条件下的生物量和硒含量，并筛选和培育出了一株富硒优势酵母。

（2）阐明富硒酵母诱变后生理水平富硒能力显著提高的原因。通过扫描电镜、扫描能谱和红外光谱分析酵母在不同发酵时间下形态学的变化以及细胞中硒元素的分布规律。同时从细胞阳离子稳态的角度出发，对离子通道蛋白与磷酸盐转运蛋白和硒磷酸合酶活性的相关性进行了分析。

（3）为了深入探讨富硒酵母的作用机制（诱变后其硒转运能力显著增强），使用转录组测序技术从基因水平研究了富硒酵母在诱变前后的作用机制。通过对显著差异表达基因进行功能注释和 KEGG 通路分析，确定其硒转运和转化的关键通路以及关键差异基因。

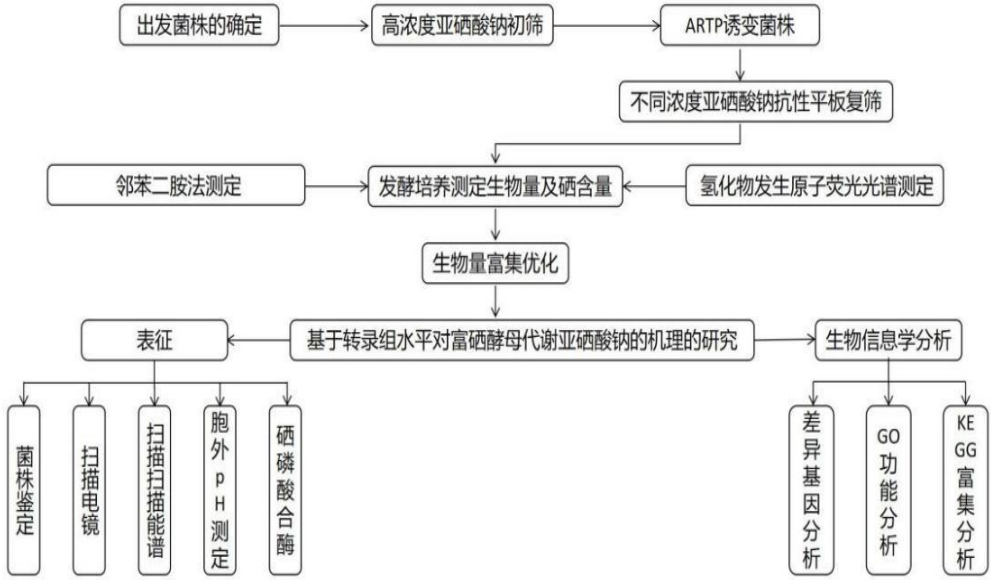


图 1-3 研究内容及技术路线

Fig.1-3 Research content and technical route

第二章 菌种筛选以及培养条件优化

2.1 前言

随着社会经济水平和生活水平的提高，越来越多的人开始考虑从食物中摄取硒。富硒酵母具有低毒、高效等优点，已成为市场上流行的硒补充剂。选择富硒食品来改善人类的低硒状态正逐渐成为一个研究课题，而目标菌株的选择至关重要。研究表明，双歧杆菌、酵母、乳酸杆菌等微生物能够将无机硒转化为有益于人体吸收的有机硒，其中酿酒酵母是理想的微生物硒转化菌株之一，因其发酵优势而被广泛应用于富硒产品中^[27]。在发酵工业中，菌种选择和发酵优化是获得高性能富硒菌种的重要步骤。通过对菌株进行压力胁迫、优化培养条件等手段，提高菌株的硒富集能力。Zhang 等人利用酸胁迫产朊假丝酵母，通过间歇培养可显著提高产朊假丝酵母的硒富集能力^[108]。考虑到菌株在传代过程中可能会发生退化，因此纯化菌株的选育是非常必要的。通过 ARTP 和硒盐胁迫的多重诱变，在本章中成功获得了高效富硒的酿酒酵母菌株作为试验菌株。同时，以筛选得到的菌株为试验对象，对发酵生产工艺进行了优化，确定了最佳亚硒酸盐浓度、加硒时间和发酵时间。这些结果为后续生产高生物量富硒酵母提供了潜在的应用前景。

2.2 材料与仪器

2.2.1 实验材料

酿酒酵母，编号 WX-01，为实验室筛选保藏菌株。

2.2.2 实验材料与仪器

主要实验药品见表 2-1。主要实验仪器见表 2-2。

表 2-1 主要实验材料

Table 2-1 Main Experimental Materials

药品名称	级别	生产厂家
氯化钾	分析纯	国药集团
葡萄糖	分析纯	国药集团
胰蛋白胨	分析纯	国药集团
氯化钠	分析纯	上海生工
琼脂粉	分析纯	国药集团
结晶紫	指示剂	国药集团
大豆蛋白胨	分析纯	上海生工
磷酸氢二钾	分析纯	国药集团
磷酸二氢钾	分析纯	国药集团
乙醇	分析纯	国药集团
酵母提取物	分析纯	美国 BD 公司
十二烷基硫酸钠	分析纯	Biotoppted
Tris	分析纯	北京索莱宝科技有限公司

表 2-2 主要实验仪器

Table 2-2 Main Experimental Instruments

仪器名称	生产厂家
高温高压灭菌锅	日本 sanyo
超纯水机	和泰
烘干机	上海精宏
Multiskan FC 型酶标仪	赛默飞世尔
pH 计	上海生工
高速离心机	赛默飞世尔
超净台	苏州净化
恒温培养箱	天津津腾实验设备有限公司
紫外分光光度计	上海一恒科学仪器有限公司
磁力搅拌器	上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司
ARTP 诱变仪	无锡源清天木生物科技公司

2.2.3 实验主要试剂配置

YPD 液体培养基、YPD 固体培养基。

YPD 液体选择培养基 (g/L): 酵母膏 (1%), 蛋白胨 (2%), 葡萄糖 (2%), 亚硒酸钠 (120 mg/L)。添加 2%琼脂, 即配制成固体培养基。

2.3 实验方法

2.3.1 菌种鉴定

通过菌种鉴定准确了解 WX-01 菌株的种属特性, 为后续试验分析铺垫。使

用 Ezup 柱酵母基因组 DNA 提取试剂盒分离 WX-1 基因组，使用引物 NL1（GT AGTCATATGCTTGTCTCTCTC）和 NL4（GCATCACAGACCTGTTATTGCCT C）将目标基因扩增，扩增产物经电泳分离。随后切取目标基因 DNA 条带，以便直接进行测序。

2.3.2 菌种活化初筛与生长曲线的测定

将 WX-01 菌种从保存管接种到配制好的 YPD 液体选择培养基（含 120 mg/L 亚硒酸钠）中进行活化初筛。随后，将活化的酵母菌悬浮液转移至 50 mL 液体 YPD 培养基中，在搅拌条件下进行培养。每隔 4 小时取 200 μ L 实验溶液，稀释后测量 OD₆₀₀ 值，并以空白培养基为对照，绘制酵母菌生长曲线。

2.3.3 ARTP 诱变条件确定以及操作

将选育的最佳耐硒菌株生长至对数生长期，然后将菌液稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.8-1.2。

将消毒过的小铁片放在超净台上，用酒精灯灼烧后使其冷却。打开 ARTP 紫外灭菌灯进行 20 分钟的灭菌。使用移液枪准确吸取 10 μ L 菌悬液涂抹均匀在小铁片上，将盛有 990 μ L 生理盐水的 2 mL EP 管固定在相应位置。将装有小铁片的灭菌培养皿转移至 ARTP 操作室内，用无菌镊子依次将小铁片放置于 ARTP 系统操作室旋转台上的对应凹槽。调整照射距离为 2 mm，气流量为 10 L/min，功率为 100 W，然后进行诱变处理^[109]。在本试验中，诱变时间分别定为 30 s，45 s，60 s，75 s，90 s，105 s 和 120 s。

2.3.4 ARTP 致死率

处理后的菌悬液经过 30 分钟培养后，在摇床培养箱中恢复培养，然后将其稀释至 10^{-6} 后滴在含有亚硒酸钠（30 mg/L）的抗性平板上，在 28 °C 下培养 36 小时。为了计算菌株的致死率，需要对每个平板上的菌落数进行计数，并绘制致死率曲线。

致死率计算公式如下：

$$\text{致死率 (\%)} = \frac{A - B}{B} \times 100 \% \quad (2-1)$$

式中：

A-未经诱变处理的平板上生长的菌落数；

B-经过诱变处理的平板上生长的菌落数。

2.3.5 耐硒菌株的筛选

实验结果表明，最佳诱变时间为 90 秒。从具备理想生长条件的单个诱变菌落中进行选择，对其进行编号并移至斜面上。为了研究菌株对硒的耐受性，将细菌悬液稀释至 10^{-5} 的比例，然后取 100 μL 的细菌悬液接种到含有不同浓度亚硒酸钠（0、30、60、90 和 120 mg/L ）的平板上。随后将这些平板在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 小时。通过筛选，保藏菌落较大且呈红色的菌株以待后期试验。

接着，将诱变后的菌落加入含有 30 mg/L 亚硒酸钠的 YPD 液体培养基中进行发酵，并在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 36 小时。在测量生物量、进行全面分析和梯度平板筛选后，确定了最佳的诱变菌株。

2.3.6 硒含量的测定方法

原理：邻苯二胺在酸性条件下与硒（IV）形成具有配位饱和结构的络合物，在 334 nm 波长处有最大吸收峰，因此选择 334 nm 为测定波长^[110]。

标准曲线：在烧杯中加入 1 mL 标准硒溶液（1000 $\mu\text{g/L}$ ），再加入 5 mL 浓硝酸，培养过夜。加入 2 mL 30% H_2O_2 ，稍许加热，冷却后定容至 100 mL，得到硒标准溶液（10 $\mu\text{g/L}$ ）^[111]。使用移液管分取硒标准溶液，在黑暗条件下反应两小时，测量体积如下：在小烧杯中逐次加入 0、0.5 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL 和 5 mL；随后添加 4 mL 的 10 g/L 邻苯二胺、1.0 mL 的 5% EDTA-2Na，并加入超纯水至总体积达到 15 mL；最后将 pH 值调节至 2.0 取 3 mL 待测液加入 2 mL 甲苯，振荡 5 min 后静置，调节紫外分光光度计波长为 334 nm，以甲苯为参比溶液，取上层有机相测定吸光度值^[112]。以硒质量浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制硒标准曲线。

酵母硒含量的测定：取 0.1000 g 富硒酵母粉，加入 5 mL 浓硝酸，按照先前的方法消化混合物，以测定酵母中的硒含量。在 50 mL 容量瓶中装入固定的消化溶液。使用移液管将 5.0 mL 移入烧杯后，按照之前的步骤进行处理。为了确定硒的含量，将所得的吸光度值代入标准曲线回归方程。

2.3.7 酵母生物量与硒含量测定

将原始菌株、活化菌株和选定的诱变菌株进行摇瓶发酵培养 36 小时。向培养基中加入浓度为 35 mg/L 的硒，将混合物在 8000 r/min 的转速下离心 10 分钟。去除上清液后，用去离子水进行三次离心，清洗沉淀物。将细菌在 60 °C 下干燥至重量稳定后，测量其生物量。保存干燥的酵母菌体以便后续测量硒含量。

2.4 氢化物发生原子荧光光谱分析

2.4.1 原理

酵母中的硒以有机和无机形式存在。利用 6 mol/L 盐酸提取无样品后，在水浴中提取，然后用环己烷进行提取，提取出的液体中的无机硒含量通过氢化物原子荧光光谱法进行测定^[113]。总硒含量按照 GB 5009.93 标准确定（氢化物原子荧光光谱法）。有机硒含量等于总硒含量与无机硒含量之差。

2.4.2 样品预处理

称取 2.5 克样品放入 50 mL 试管中，加入 20 mL 6 mol/L 盐酸。充分混合，置于恒温水浴中加热至 70 °C，搅拌提取 2 小时。冷却至室温，用 6 mol/L 盐酸稀释至 25 mL，过滤。取 12.5 mL 过滤液放入 25 mL 试管中，置于沸水浴中加热 20 分钟，冷却至室温。加入 2.5 mL 铁氰化钾溶液和 3 滴正辛醇，用水调节至恒定体积，充分混合，等待检测。同时进行空白实验使用试剂。

2.5 酵母菌富硒条件优化

2.5.1 硒添加浓度对酵母硒富集的影响

在培养基条件下，酵母在摇瓶中孵育 36 小时，温度为 28 °C，转速为 180 r/min。接着，分别加入最终浓度为 0、25、30、35 和 40 mg/L 的亚硒酸钠溶液（0.22 μ m 水膜进行过滤灭菌）。酵母经过 10 min、8000 r/min 的离心以收集，随后测定生物量和硒含量。

2.5.2 硒添加时间对酵母硒富集的影响

发酵培养物置于摇瓶中（36 h，28 °C，180 r/min）。在 0、4 和 8 小时后加入亚硒酸钠（0.22 μ m 水膜进行过滤和灭菌）。经过 10 min、8000 r/min 的离心得到酵母菌体，测定生物量和硒含量。

2.5.3 发酵时间对酵母硒富集的影响

在振荡培养瓶（28 °C，180 rpm）中进行发酵。8 小时后加入最终浓度为 35 mg/L 的亚硒酸钠溶液（0.22 μ m 水膜进行过滤灭菌）。随后在 24、36 和 48 小时分别对发酵液进行离心（8000 r/min，10 min），并进行生物量和硒含量的分析。

2.6 结果与分析

2.6.1 菌种鉴定结果

通过酵母基因组 DNA 抽提试剂盒提取目的基因，利用 NL1 和 NL4 为引物进行 PCR 扩增，并对其产物进行电泳，电泳图如图 2-1 所示。经过测序获得其扩增序列为：

```
CCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTAC
CTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTTCCTT
GTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGC
GAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG
AATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
AGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAA
AAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATC
AGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATT
```

TCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAG
CTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGA
GGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCCGT
CT。WX-1 目的基因片段为 562bp。

通过在 NCBI 上 blast 比对，WX-01 菌株被鉴定为 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母)。

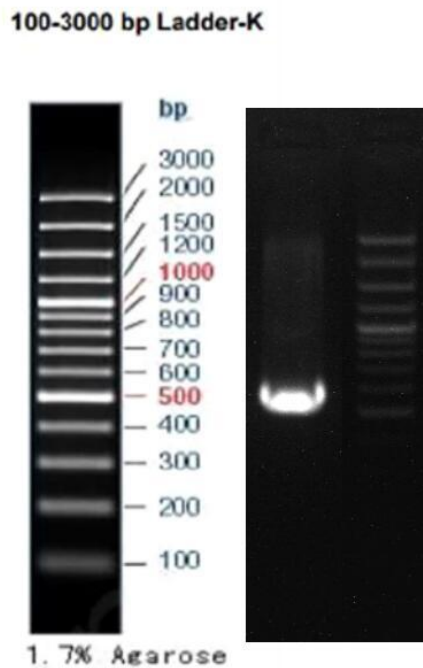


图 2-1 WX-01 菌株电泳图

Fig.2-1 Electrophoregram of the WX-1 strain

2.6.2 酵母菌生长曲线测定

原始菌株 WX-01 的生长曲线如下图 2-2 所示：在 0 到 8 小时之间，细菌呈现缓慢生长；而在 8 到 20 小时之间，细菌进入对数生长期，生长速度迅速加快，接着进入稳定生长期，菌株浓度保持稳定。由于酵母菌株在对数生长阶段具有较高的新陈代谢活性，对外界环境非常敏感。而且容易发生变异，因此选择培养 8 小时的悬浮液作为 ARTP 诱变的生物材料。

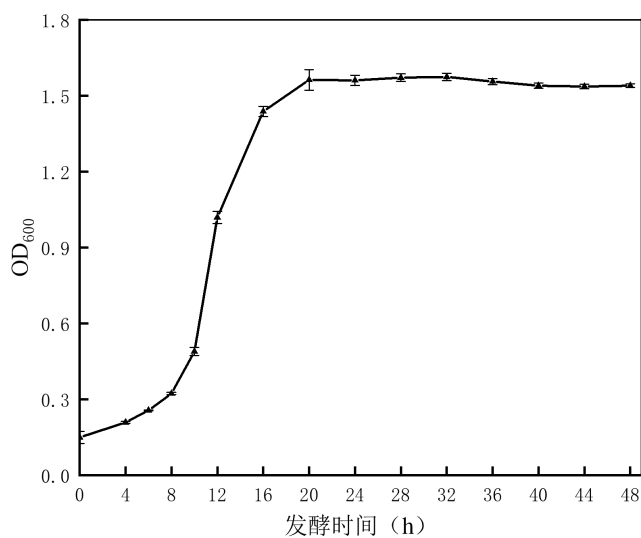


图 2-2 酿酒酵母生长曲线

Fig.2-2 Growth curves of *S. cerevisiae*

2.6.3 致死率曲线

ARTP 诱变后，收集诱变溶液并稀释至 10^{-6} 。然后涂布于亚硒酸钠（30 mg/L）的平板上。随着诱变暴露时间的延长，ARTP 诱变对 WX-01 的致死率逐渐增加，在 120 s 时致死率达到 100%。这些结果如图 2-3 所示，根据现有文献，在后续筛选中，致死率最好在 80% 至 90% 之间。因此，为提高筛选效率，确 90 s 为后续诱变处理的最佳持续时间。

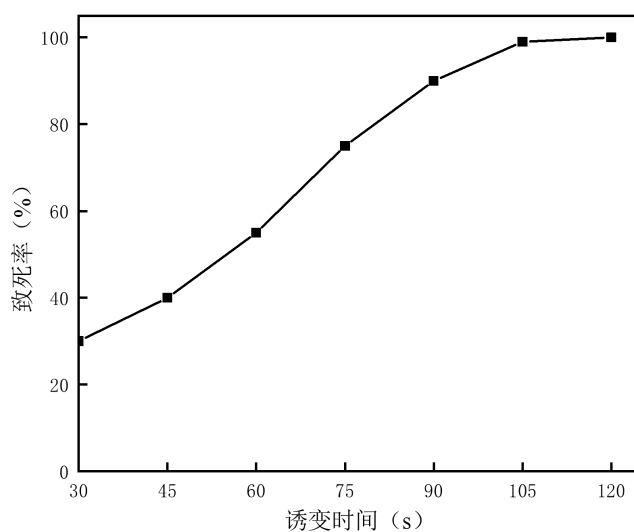


图 2-3 菌株 WX-01 ARTP 诱变致死率曲线

Fig.2-3 ARTP mutagenicity lethality curve of strain WX-01

2.6.4 耐硒菌株筛选结果分析

通过 ARTP 诱变筛选，鉴定出六株酵母菌株，分别命名为 WX-1、WX-2、WX-4、WX-5、WX-6 和 WX-8。其中，WX-1 和 WX-2 在标准平板上呈现乳白色菌落，而在低浓度亚硒酸钠的平板上则呈现零星的淡红色菌落。随着硒浓度的增加，红色菌落的出现频率逐渐增加。这两种突变菌株生长旺盛，菌落形态一致，平均菌落数超过 50 个，表明它们具有很强的硒代谢能力。

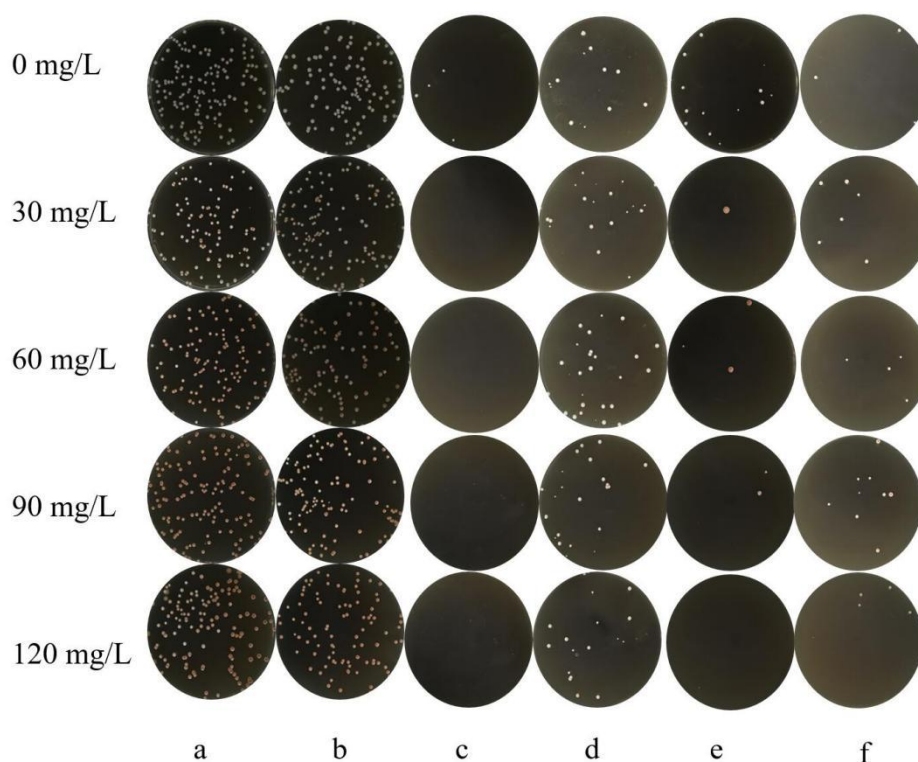


图 2-4 不同浓度亚硒酸钠平板筛选

Fig.2-4 Different concentrations of sodium selenite plate screening

注：图中平板亚硒酸钠浓度从上至下依次为 0, 30, 60, 90, 120 mg/L。a, b, c, d, e, f 分别代表诱变菌 WX-1, WX-2, WX-4, WX-5, WX-6 和 WX-8。

在液体培养条件下对每个菌株的生物量进行了测定。在相同的培养条件下，WX-1、WX-4 和 WX-5 的生物量分别是原始菌株 WX-01 的 2.30、2.70 和 2.16 倍。值得注意的是，WX-4 的生物量达到最高，为 6380 mg/L，其次是 WX-1 的 5693 mg/L，以及 WX-5 的 5403 mg/L。综合考虑 WX-01 亲本菌株和抗硒菌株的平板筛选结果，WX-1 因其出色的生物量被选定为富硒候选菌株。

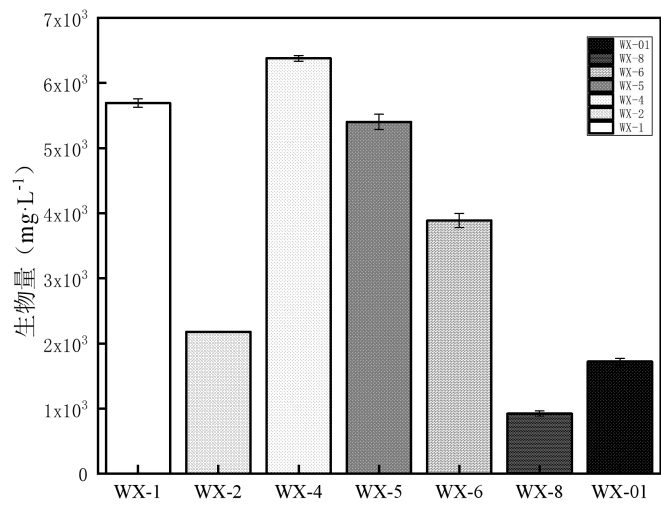


图 2-5 诱变菌发酵生物量
Fig.2-5 Fermentation biomass of mutagenic bacteria

2.7 硒含量测定

2.7.1 硒标准曲线绘制

如图 2-6 所示，通过使用紫外分光光度法制备标准硒曲线，测定菌株的硒含量。横坐标为硒标准溶液浓度，纵坐标为 334 nm 下的吸光度。

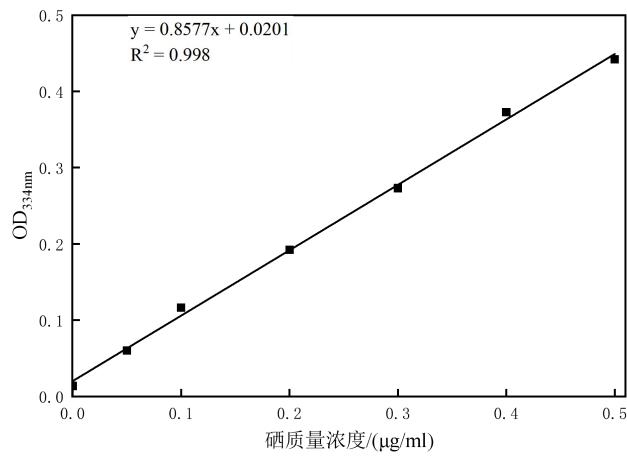


图 2-6 硒标准曲线图
Fig.2-6 Selenium standard curve

2.7.2 酵母生物量与硒含量测定

出发菌 WX-01 的生物量如图 2-6 所示, 为 1722 mg/L, 硒含量 543 $\mu\text{g/g}$ 。菌株 WX-1、WX-2、WX-4、WX-5、WX-6 和 WX-8 的生物量分为 5093 mg/L、2180 mg/L、6380 mg/L、6003 mg/L、3890 mg/L、923 mg/L, 硒含量分别为 1673 $\mu\text{g/g}$ 、1522 $\mu\text{g/g}$ 、401.7 $\mu\text{g/g}$ 、944.5 $\mu\text{g/g}$ 、444.2 $\mu\text{g/g}$ 。突变菌株 WX-1、WX-4 和 WX-5 的生物量高于原始菌株 WX-01; WX-2 和 WX-1 的硒含量高于原始菌株; 综合分析, WX-1 是诱变效果最好的菌株, 其生物量增加了 2.44 倍, 硒含量提高了 2.11 倍。在接下来的优化试验中选择 WX-1 菌株。

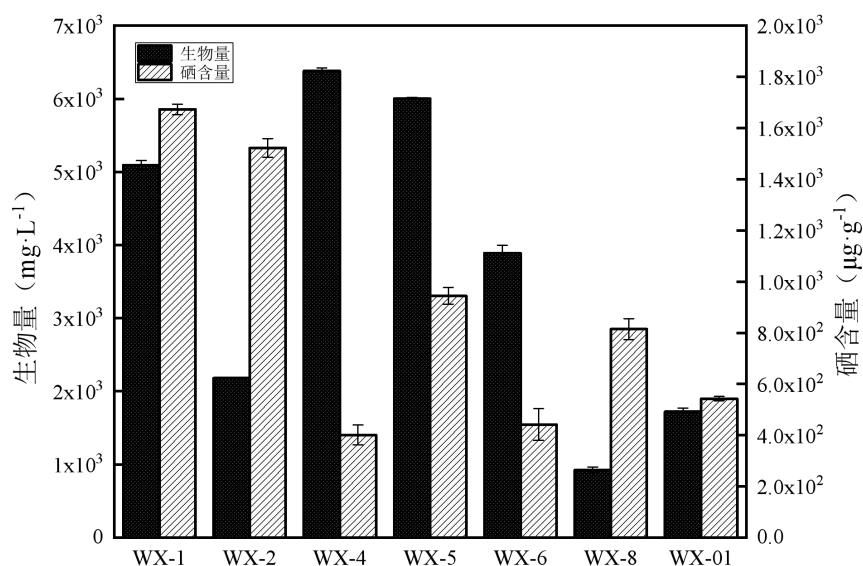


图 2-7 诱变菌生物量与硒含量

Fig.2-7 Biocontent and selenium content of mutagenic bacteria

2.8 氢化物发生原子荧光光谱法测定酵母硒含量

2.8.1 硒添加浓度对酵母硒富集的影响

根据图 2-8a 显示, 当亚硒酸钠添加量为 0 mg/L 时, WX-1 的生物量为 8630 mg/L。而当亚硒酸钠添加量提高至为 40 mg/L 时, 其生物量降至 4685 mg/L。

浓度不同的亚硒酸钠对酵母中有机硒的产量和转化产生显著影响。图 2-

8b 中的结果表明, 在添加质量浓度低于 35 mg/L 时, 产量和转化随浓度增加而增加。添加质量浓度为 25 mg/L 时, 产量为 2277 $\mu\text{g/L}$, 转化率为 90.7%; 在添加质量浓度达 30 mg/L 时, 产量为 4171 $\mu\text{g/L}$, 转化率为 93.5%。当添加质量浓度为 35 mg/L 时, 产量为 7658 $\mu\text{g/L}$, 转化率为 97.1%。酵母的硒含量在 40 mg/L 时达到 1507 $\mu\text{g/g}$, 略高于 30 mg/L 时的值 (1475 $\mu\text{g/g}$)。然而, 最佳选择的质量浓度为 35 mg/L, 因为随着亚硒酸钠浓度的增加, 生物量和有机硒转化率 (93.2%) 降低, 导致产量下降至 7060 $\mu\text{g/L}$ 。

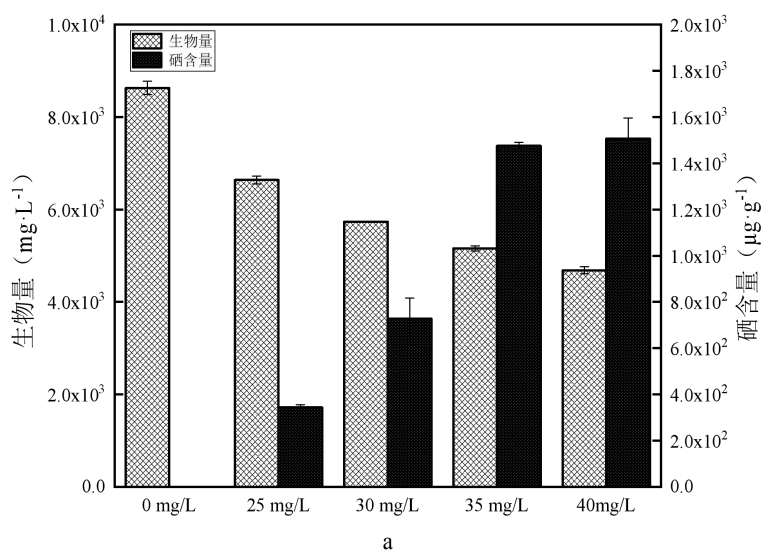


图 2-8a 不同培养浓度对酵母硒含量的影响

Fig.2-8a Effect of different culture concentrations on the selenium content of yeast

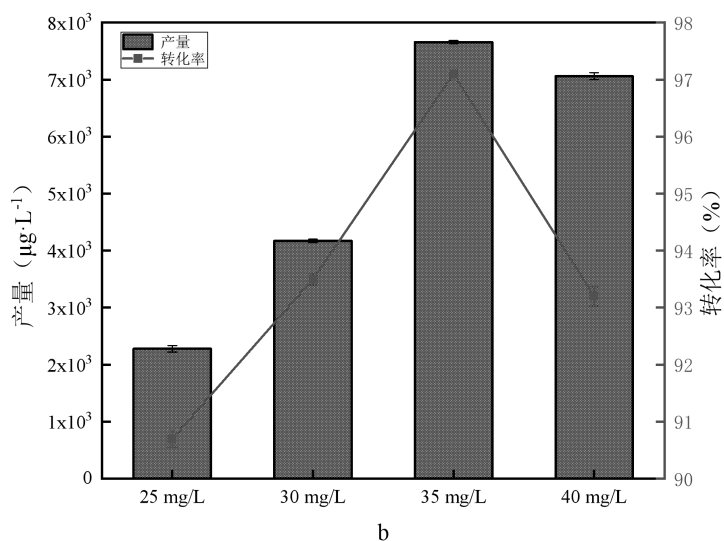


图 2-8b 不同培养浓度对酵母硒含量的影响

Fig.2-8b Effect of different culture concentrations on the selenium content of yeast

2.8.2 硒添加时间对酵母硒富集的影响

在 0-8 小时内，酵母的生物富集量分别为 5015、4980 和 5192 mg/L。如图 2-9a 所示，硒含量呈递增趋势，分别为 940、1320 和 1475 mg/g。亚硒酸钠添加时间对 WX-1 菌株的生物量影响不大，但对酵母的硒富集有一定影响，添加硒 8 小时后酵母的硒富集最高。8 小时是 WX-1 菌株进入对数生长期的开始，其特点是生长旺盛且相对适应不良外部环境。此时加入亚硒酸钠对菌株的损害最小，并能促进硒的生物转化；8 小时后，酵母菌代谢硒的相对时间明显缩短，不利于酵母菌富硒。

亚硒酸钠在不同时间点添加对酵母产量和转化率的影响主要取决于菌株在环境中的代谢能力。如图 2-9b 所示，在 0 小时添加时，由于酵母的浓度较低，无法抵御环境的影响，导致酵母的代谢能力降低，转化率降至 93.6%，产量为 4714 $\mu\text{g/L}$ 。4 小时后，酵母浓度足以抵抗亚硒酸钠的毒性，此时转化率为 97.5%，基本与 8 小时添加时相同，产量为 7574 $\mu\text{g/L}$ ，略低于 8 小时添加时的产量。由于 8 小时是酵母的对数生长期，菌株此时具有最强的代谢能力和最强的抗外部环境能力，因此最佳添加时间为 8 小时。

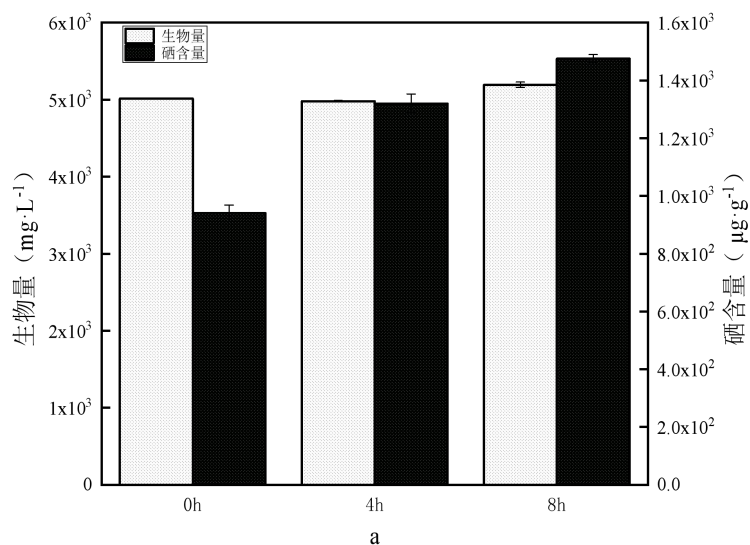


图 2-9a 不同添加时间对酵母硒含量的影响

Fig.2-9 Effect of different addition times on the selenium content of yeast

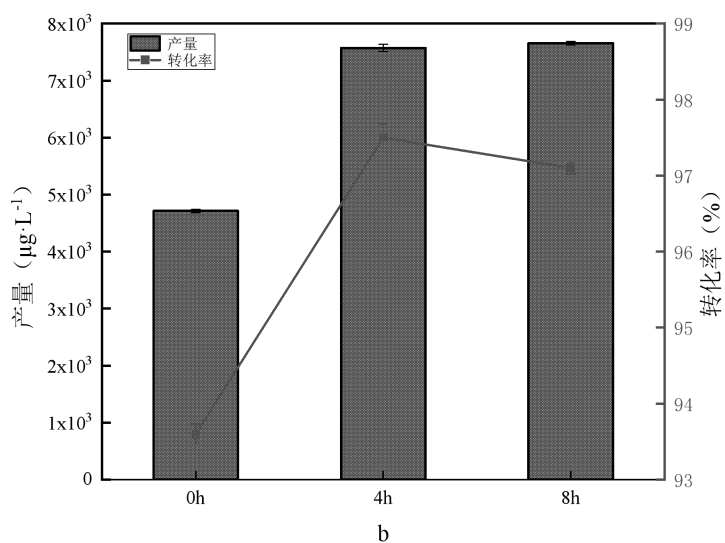


图 2-9b 不同添加时间对酵母硒含量的影响

Fig.2-9 Effect of different addition times on the selenium content of yeast

2.8.3 发酵时间对酵母硒富集的影响

根据图 2-10a 显示，在 24 - 48 小时的发酵时间内，WX-1 菌株的生物量和硒含量分别为 3886 mg/L 和 630 μg/g，5192 mg/L 和 1457 μg/g、4303 mg/L 和 567 μg/g。随着发酵时间的延长，酵母的生物量和硒含量呈现先增加后减少的趋

势；36 小时后，WX-1 菌株的生物量和硒含量达到最大值；24-36 小时后，菌株进入稳定期；36 小时后，一些菌株进入衰亡期，在代谢后期，酵母通过自发产生自噬调控来应对环境压力。

由图 2-10b 可知，由于培养时间较短，在培养 24 小时时生物积累不足，导致有机硒转化率相对较低，仅为 94.8%，产量为 2483 $\mu\text{g/L}$ 。培养 48 小时后，由于培养时间过长导致大量酵母细胞死亡，生物量下降，转化率降低，仅有 92.9%，产量为 2483 $\mu\text{g/L}$ 。因此，最佳的培养时间为 36 小时。

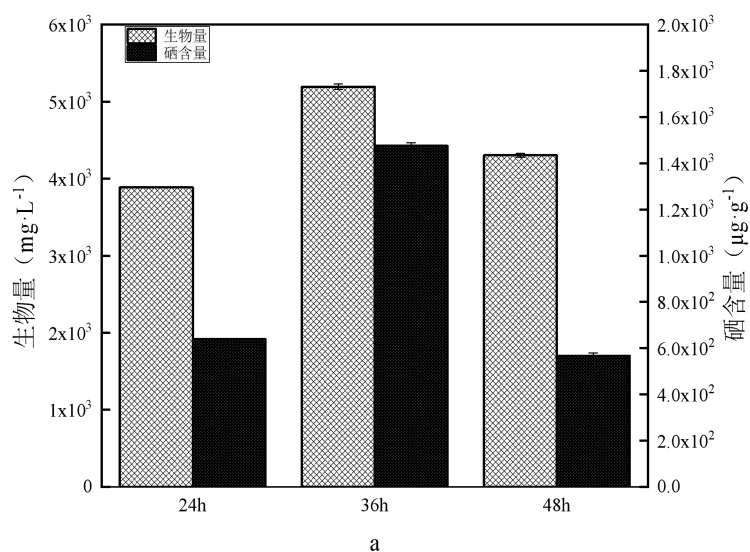


图 2-10a 不同发酵时间对酵母硒含量的影响

Fig.2-10 Effect of different fermentation times on the selenium content of yeast

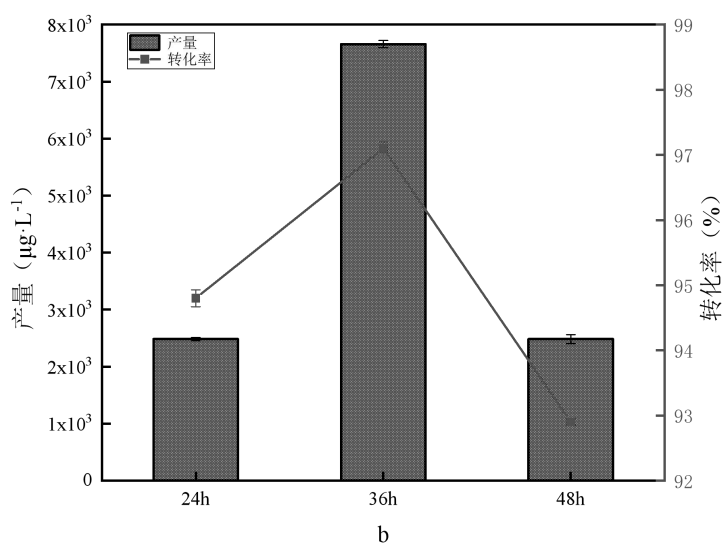


图 2-10b 不同发酵时间对酵母硒含量的影响

Fig.2-10 Effect of different fermentation times on the selenium content of yeast

2.8.4 氢化物发生原子荧光光谱法测定酵母硒含量

在优化酵母富硒条件后，确定最佳亚硒酸钠添加浓度为 35 mg/L，添加时间为 8 小时，总培养时间为 36 小时。使用原子荧光光谱法分析了在相同条件下培养的 WX-1 和 WX-01 菌株的硒含量。表 2-3 中的结果表明，培养后 WX-01 菌株的生物量达到 1722 mg/L，有机硒含量为 343 μg/g。

在培养条件不变的前题下，酵母菌株 WX-1 的生物量增加至 5192 mg/L，比原始株 WX-01 高出 2.01 倍，硒含量达到 1475 μg/g，比原始株高出 3.3 倍。因此，由于 ARTP 突变和后期的发酵条件优化，使得该菌株的富硒水平显著提高。

表 2-3 酵母硒含量数据

Table 1 Yeast selenium content data

菌株编号	生物量 (mg·L ⁻¹)	无机硒含量 (μg/g ⁻¹)	硒含量 (μg/g ⁻¹)	有机硒含量 (μg/g ⁻¹)
WX-1	5192	43	1518	1475
WX-01	1722	35	378	343

2.9 本章小结

在这个试验中，选择了一株天然具有耐硒能力的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为起始菌株，利用 ARTP 诱导酵母发生突变，通过在培养基中加入不同浓度的亚硒酸钠筛选出具有优异硒富集效果的阳性突变菌株 WX-1。在优化硒富集条件后，确定了菌株 WX-1 的最佳硒富集条件为每升加入 35 毫克的亚硒酸钠，并在 8 小时添加亚硒酸钠，发酵 36 小时。最终生物量达到 5192 ± 36 mg/L，比原始 WX-01 菌株高出 201%，硒含量达到 1475 ± 33 mg/g，比原始菌株高出 330%（通过氢化物原子荧光光谱测定）。

第三章 基于阳离子稳态探究富硒酵母生理代谢

3.1 引言

通过酿酒酵母富集转化得到的有机硒，具有安全性好、生物利用效率高等优点。然而，亚硒酸钠过量会抑制酵母的生长。酵母菌的硒富集过程包括胞外转运和胞内转化两个步骤，其中胞外转运是合成有机硒的充分条件，主要由 ABC 型转运蛋白家族中的高亲和力磷酸盐转运体承担^[114]。离子平衡对酵母细胞功能发挥的生理基础至关重要，钾钠离子通过 ABC 转运蛋白通道上的通透酶调节酵母胞内离子稳态，从而影响硒盐的胞外转运^[115]。碱金属离子水平（ K^+ 和 Na^+ ）也会影响磷酸盐转运蛋白的功能，进而调节代谢酶活性。

在富硒酵母的培养环境中发现，生物量始终不佳，胞外 pH 持续较低。可能是因为外源亚硒酸钠添加带来了过量的毒性钠，限制了酵母正常代谢^[116]。维持细胞阳离子稳态是酵母功能的基础，离子通道蛋白影响磷酸盐转运蛋白和硒磷酸合酶活性，进而影响硒盐的转运。以 ARTP 诱变得到的 WX-1 酿酒酵母菌株为试验对象，通过扫描电镜、扫描能谱、红外等表征手段研究了富硒酵母在不同发酵时间内硒蛋白的分布状态。此外，添加外源硒并引入新的碱离子钾（ K^+ ）混合培养，旨在从生理角度探究阳离子稳态对酵母富硒能力的影响。

3.2 材料与仪器

3.2.1 实验材料

富硒酵母菌株 WX-1，为实验室诱变菌株。

3.2.2 实验材料与仪器

主要实验材料，仪器如表 3-1，3-2 所示。

表 3-1 主要实验材料

Table 3-1 Main Experimental Materials

药品名称	级别	生产厂家
硒磷酸合成酶 ELISA	生化试剂	武汉赛培生物
酵母基因组试剂盒	生化试剂	郑州拜纳佛生物
氯化钾	分析纯	国药集团
葡萄糖	分析纯	国药集团
胰蛋白胨	分析纯	国药集团
氯化钠	分析纯	上海生工
琼脂粉	分析纯	国药集团
磷酸盐缓冲液速溶颗粒	分析纯	国药集团
大豆蛋白胨	分析纯	上海生工
磷酸氢二钾	分析纯	国药集团
磷酸二氢钾	分析纯	国药集团
溴化钾	分析纯	国药集团

表 3-2 主要仪器

Table 3-2 Main Instruments

仪器名称	生产厂家
全自动酶标仪	美国赛默飞
冷冻高速离心机	BBI
红外光谱仪	美国 Nicolet 公司
电热恒温鼓风干燥箱	金坛市杰瑞尔电器有限公司
隔水式恒温培养箱	宁国沙鹰科学仪器有限公司
台式低速离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
SU8020 型场发射扫描电镜 (SEM)	日本日立公司
PCR 仪	Applied Biosystems

3.3 实验方法

3.3.1 扫描电镜观察与能谱分析

WX-1 酵母菌被接种到不含硒或 30 mg/L Na_2SeO_3 的 YPD 液体培养基中进行样品处理。发酵后，无硒空白组在孵育 36 小时后取样，而含硒试验组在孵育 0、8、36 和 48 小时后取样。获得的富硒酵母经 8000 r/min 离心 10 分钟去除上清液，通过在 4℃ 添加 2.5% (v/v) 戊二醛固定后再次离心去除上清液^[117, 118]。将样品用 pH 值为 7.2 的 PBS 缓冲液洗涤两次，然后用乙醇梯度 (50%、70%、80%、90%、95%、100%) 洗脱，离心去除上清液，随后用丙酮替换乙醇两次，每次 20min^[115]。随后冷冻干燥。最后，样品喷金后进行扫描电镜分析与扫描能谱分析。

3.3.2 红外光谱分析

样品制备：溴化钾粉末与冷冻干燥的酵母菌粉末混合研磨，混合粉末经液压机制备成透明薄片^[119, 120]。硒代氨基酸和富含硒的酵母被用作试验组，KBr 被用作对照组。利用傅里叶变换红外光谱仪（FTIR）进行光谱检测。

3.3.3 胞外 pH 测定

将诱变菌 WX-1 分别添加到 YPD 液体培养基中的三个配方中：0 mg/L，35 mg/L Na₂SeO₃，以及 35 mg/L Na₂SeO₃ 与 35 mg/L KCl 混合。培养在 28 °C 和 180 r/min 的振荡条件下进行，发酵 0、10、24、36 和 48 小时后取样。测定酵母在不同培养条件下的胞外 pH 值。

3.3.4 硒磷酸合成酶测定

3.3.4.1 原理

利用微生物硒磷酸合成酶酶联免疫分析试剂盒测定胞内硒磷酸合成酶（SPS）活性。已纯化的微生物硒磷酸合成酶抗体被涂覆在微孔板上，形成固相抗体。接着，将硒磷酸合成酶顺序加入涂覆有单克隆抗体的微孔中，然后与标记 HRP 的硒磷酸合成酶抗体结合形成抗体复合物，清洗后，加入底物 TMB 以产生颜色^[121]。TMB 在酶标记过程中首先被 HRPase 转变为蓝色，随后经酸处理转变为最终的黄色^[122]。样本中的颜色深浅与硒磷酸合酶呈正相关。使用酶标记物在 450 nm 处测定吸光度，并从标准曲线计算出样品中微生物硒磷酸合酶的浓度。

3.3.4.2 硒磷酸标曲的绘制

通过以 20、10、5、2.5、1.25 和 0 ng/mL 浓度的标准品为基础，确定了 OD₄₅₀ 吸光值。标准曲线是根据标准物质的质量浓度作为水平坐标（x）和 OD 值作为垂直坐标（y）绘制的。

3.3.4.3 样品处理

将诱变菌株 WX-1 菌液分别添加到 0 mg/L, 35 mg/L Na_2SeO_3 , 以及 35 mg/mL Na_2SeO_3 与 35 mg/mL 的 KCl 混合的 YPD 液体培养基中, 摇床振荡培养 (28 °C、180 r/min), 并分别在发酵第 10、24、36、48 h 取样, 3000 r/min 离心 20 min, 用 PBS (pH7.2 - 7.4) 稀释细胞悬液 10 倍。用细胞破碎仪破碎细胞以释放细胞内成分, 然后以同样的速度再次离心 20 min。收集上清液进行待测。

3.3.5 数据处理与分析

采用 Origin 和 Office 进行数据处理、作图和数据分析。

3.4 结果与分析

3.4.1 表征结果分析

3.4.1.1 扫描电镜结果分析

在图 3-1 中展示了酵母 WX-1 硒富集后的扫描电子显微镜照片。在未添加亚硒酸钠的空白组 a 中, 细胞形态完整, 表面光滑。另一方面, 在试验组 b 中, 在添加亚硒酸钠 8 小时后, 在酵母菌表面并未清晰观察到单质硒沉淀。试验组 c 和 d 培养了 36 小时和 48 小时, 分别明显观察到硒单质吸附在酵母菌表面。随着发酵时间的推进, 试验组 d 呈现了酵母菌体部分死亡的状态, 这表明 36 小时的发酵效果比 48 小时更好。

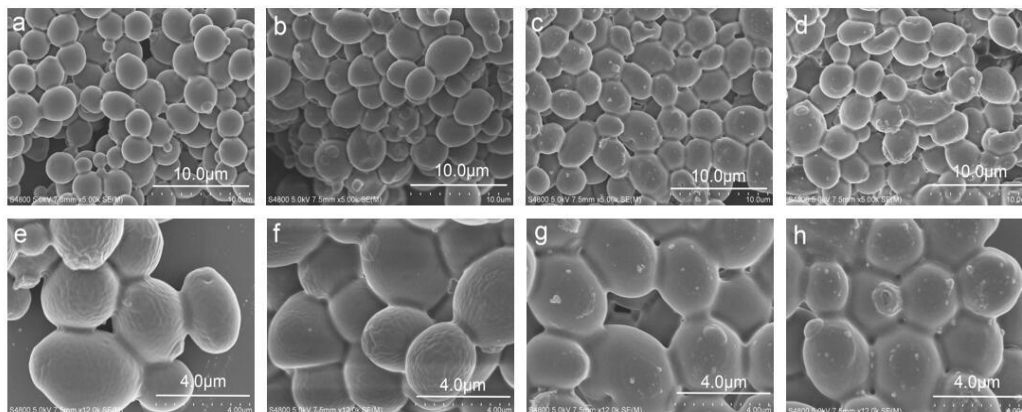


图 3-1 WX-1 菌株扫描电镜照片

Fig.3-1 Scanning electron micrograph of strain WX-1

注：a-酵母对照组（7.5 mm×5.00 k）；b-酵母加硒培养 8 h（7.5 mm×5.00 k）；c-酵母加硒培养 36 h（7.5 mm×5.00 k）；d-酵母加硒培养 48 h（7.5 mm×5.00 k）；e-酵母对照组（7.5 mm×12.0 k）；f-酵母加硒培养 8 h（7.5 mm×12.0 k）；g-酵母加硒培养 36 h（7.5 mm×12.0 k）；h-酵母加硒培养 48 h（7.5 mm×12.0 k）

Note: a-Yeast control group (7.5 mm 5.00 k); B-yeast was cultured with selenium for 8 h (7.5 mm 5.00 k); C-yeast was cultured with selenium for 36 h (7.5 mm 5.00 k); Culture of d-yeast with selenium for 48 h (7.5 mm 5.00 k); The e-yeast control group (7.5 mm 12.0 k); F-yeast was cultured with selenium for 8 h (7.5 mm 12.0 k); And g-yeast was cultured with selenium for 36 h (7.5 mm 12.0 k); And h-yeast was cultured with selenium for 48 h (7.5 mm 12.0 k)

3.4.1.2 扫描能谱结果分析

通过对酵母细胞的扫描能谱分析，探究其在不同时间段对硒的摄取量的变化。如表 3-1 显示，酵母培养时间为 0 h，测得硒含量为 0%，培养时间为 36 h 和 48 h 硒含量分别 0.68%和 0.9%。随着时间的推移，酵母细胞对于硒的摄取量越来越高，对比宏观样本（图 3-2），培养时间越长酵母逐渐呈现红色，表明酵母生成的单质硒越多。

表 3-1 酵母硒含量数据

Table 3-1 Yeast selenium content data

元素	重量 (%)	原子 (%)	元素	重量 (%)	原子 (%)	元素	重量 (%)	原子 (%)
	加硒 0 h			加硒 36 h			加硒 48 h	
C K	66.37	73.32	C K	68.69	76.39	C K	63.56	70.85
O K	30.73	25.48	O K	25.42	21.22	O K	33.90	28.36
Na K	0.00	0.00	Na K	0.34	0.20	Na K	0.00	0.00
Mg K	0.31	0.17	Mg K	0.36	0.20	Mg K	0.00	0.00
P K	1.60	0.68	P K	3.78	1.63	P K	0.80	0.34
K K	0.99	0.34	K K	0.73	0.25	K K	0.85	0.29
Se L	0.00	0.00	Se L	0.68	0.11	Se L	0.90	0.15
总量	100.00		总量	100.00		总量	100.00	

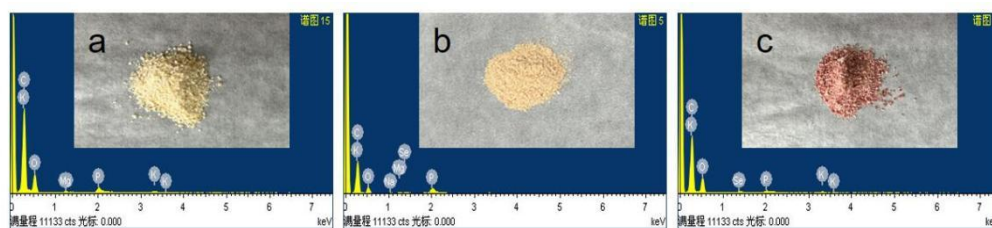


图 3-2 WX-1 菌株扫描能谱与宏观样品

Fig.3-2 WX-1 strain scanning energy profiles with macroscopic samples

注：a-加硒培养（35 mg/L）培养时间 0 h；b-加硒培养（35 mg/L）培养时间 36 h；c-加硒培养（35 mg/L）培养时间 48 h

Note: a-selenium (35 mg/L) for 0 h; 36 h for b-selenium (35 mg/L) for 46 h; c-selenium (35 mg/L) for 48 h

3. 4. 1. 3 红外结果分析

图 3-3a 中的红外光谱分析了转移到酵母细胞表面后特定官能团的变化。硒半胱氨酸、甲基硒半胱氨酸和硒代甲硫氨酸的红外光谱显示，在 1077 cm^{-1} 和 526 cm^{-1} 处有相对吸收峰。这对应于硒蛋白中 H-Se 键和 Se=O 键的伸缩振动。

在使用未加硒酵母作为对照组时，与图 3-3b 中的结果相比，三个红外光谱的峰值基本稳定，仅部分峰值发生了位移。吸收峰 3600 cm^{-1} 到 3000 cm^{-1} 的宽带属于蛋白质的键合 O-H 的伸缩振动，宽频带从 3307 cm^{-1} 偏移到 3303 cm^{-1} ，表明存在分子内或分子间的氢键控制了硒蛋白^[33]。在 2927 cm^{-1} 处的偏移是 C-H 伸展振动的峰值。 1539 cm^{-1} 代表蛋白质酰胺 II 的 N-H 基团与-CN 伸缩振动的结合运动，分别在硒富集后移动到 1543 cm^{-1} 和 1546 cm^{-1} ^[123]。 1456 cm^{-1} 代表 CH_3 的 C-H 基团的伸缩振动，宽频带偏移到 1455 cm^{-1} 和 1456 cm^{-1} 。磷酸根的映射分布在 1300 cm^{-1} 到 800 cm^{-1} 之间，其中 1242 cm^{-1} 处的吸收峰表示 P=O 基团，而这一峰的微弱偏移暗示细胞膜中的磷蛋白可能参与培养过程中的硒转运。在

1077 cm^{-1} 处和 532 cm^{-1} 的吸收峰分别由 H-Se 键和 Se=O 振动引起^[124]。本试验研究表明, 硒参与酵母蛋白的合成, 使得酵母蛋白发生结构性改变, 导致富硒酵母与未富硒酵母在部分区域出现了强度不同的吸收峰。该试验研究表明硒参与酵母蛋白质的合成, 导致酵母蛋白质的结构变化, 在硒富集和未富集的酵母中的特定区域有不同强度的吸收峰。

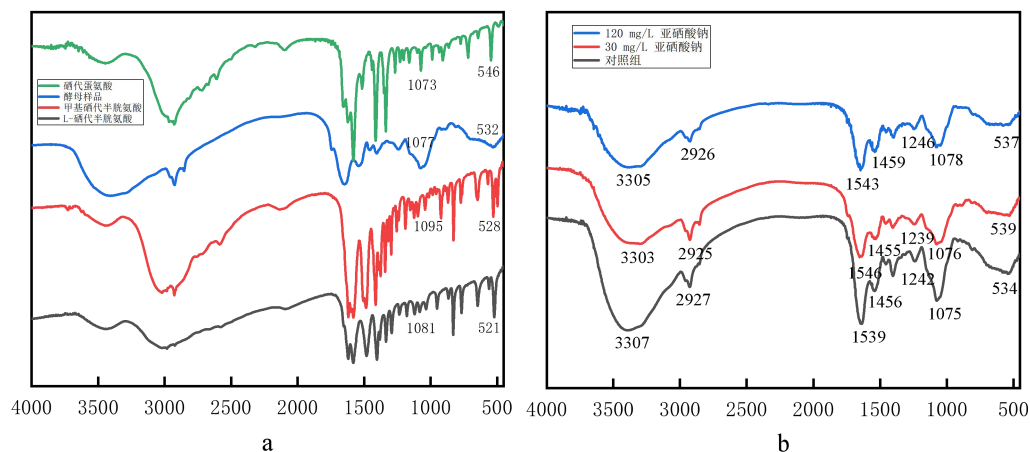


图 3-3 WX-1 菌株硒富集培养的红外光谱图

Fig.3-3 IR spectrum of selenium enrichment culture of WX-1 strain

注: 图 a 为硒代氨基酸红外图, 图 b 为富硒菌株红外图

Note: Figure a shows the infrared diagram of selenium-generation amino acids, and Figure b shows the infrared diagram of selenium-rich strains

3.4.2 胞外 pH 测定结果分析

试验组与对照组培养基初始 pH 维持在 5.3 左右。当发酵时间为 10 h, 对照组胞外 pH 下降至 4.97。试验组的胞外 pH 水平基本保持一致, 均下降至 4.7 左右。对照组胞外 pH 从发酵 10 h 开始逐渐大幅度递增, 最高 pH 达到 6.49。 Na_2SeO_3 试验组从发酵 10 h 开始, 胞外 pH 大致呈现递减趋势, 发酵 36 h 达到最低值 4.59。 Na_2SeO_3 和 K^+ 混合试验组从发酵 10 h 开始, 胞外 pH 基本维持在 5.0 左右, 为酵母细胞正常代谢 pH。

酵母细胞胞外 pH 与细胞膜内外质子交换密切相关, 这种交换依赖质子泵。在亚硒酸钠组中, 需要将多余的 Na^+ 排出体外, 因为高浓度的 Na^+ 可能对细胞造成有害影响。这会导致 ATP 水解产生过量的 Pi , 并持续泵出 H^+ , 从而降低胞外 pH。酵母细胞需要在胞内 K^+ 与 Na^+ 之间保持动态平衡, K^+ 用于补偿负电荷并激活关键代谢过程, 因此在这项试验中引入了 K^+ 来调节细胞内外的生理稳态。

[125]。K⁺有助于维持酵母质膜电位平衡与细胞内外 pH 环境的稳定性，减少自由 Pi 的产生，同时维持磷酸盐转运蛋白的活性。试验证明了磷酸盐转运蛋白的活性与离子通道蛋白活性之间的关联性。

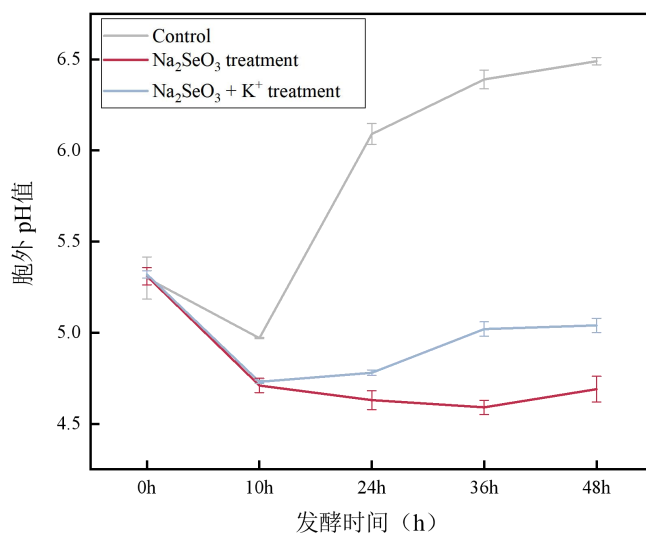


图 3-4 富硒酵母在不同时间下胞外 pH 的变化

Fig.3-4 IR spectrum of selenium enrichment culture of WX-1 strain

3.4.3 硒磷酸合酶测定结果分析

3.4.3.1 硒磷酸合酶标准曲线

为了评估和研究该菌株硒磷酸合酶（SPS）的活性，利用酶标记技术构建了硒的标准曲线。SPS 的标准曲线如图 3-5 所示，横坐标表示 SPS 标准溶液的浓度，纵坐标表示在 450 nm 波长处的吸光度数值。

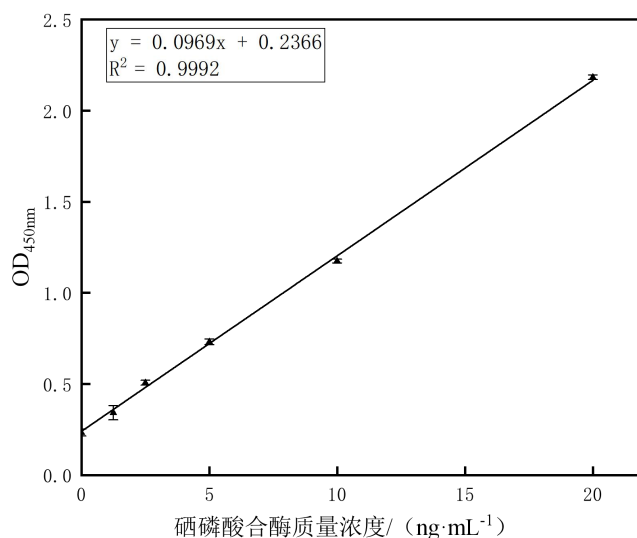


图 3-5 硒磷酸合酶标准曲线

Fig.3-5 Standard curves for selenophosphate synthase

3.4.3.2 富硒酵母的硒磷酸合酶活性分析

本试验分别在 10 h、24 h、36 h、48 h 测定 WX-1 菌株硒磷酸合酶 (SPS) 的活性, 从每个时间段来看, 试验组的 SPS 的活性均高于对照组, 并且逐步呈现上升趋势, 在 36h 达到最高值, 然后缓慢下降。对照组 SPS 的活性呈现逐步下降趋势, 由 95.8 ± 2.0 ng/mL 下降到 82.8 ± 1.9 ng/mL, 并趋于稳定。在发酵 10 h、24 h、36 h、48 h 后, 亚硒酸钠试验组所测得 SPS 的活性分别为 130.9 ± 2.4 ng/mL、 148.1 ± 0.2 ng/mL、 152.9 ± 3.5 ng/mL、 138.1 ± 0.8 ng/mL, 而 Na_2SeO_3 和 K^+ 混合试验组 SPS 的活性分别为 140.0 ± 2.6 ng/mL、 148.6 ± 3.0 ng/mL、 164.3 ± 1.0 ng/mL、 159.0 ± 0.4 ng/mL。

酵母合成硒蛋白的关键限速酶是硒磷酸合成酶 (SPS), 参与硒磷酸 (SeP) 的代谢^[126]。据报道, 酵母细胞通过摄取亚硒酸盐 (SeO_3^{2-}) 来合成硒化物 (H_2Se), 并通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 生成。 H_2Se 在 SPS 的作用下与水解 ATP 后的 γ -磷酸反应生成 SeP, 因此, SPS 的活性可以反映酵母菌株的硒蛋白代谢水平^[127, 128]。试验组的酵母细胞在 36 小时后表现出活跃的硒代谢, 而对照组的酵母细胞即使没有外源硒的诱导, 控制相关合成酶和转运蛋白的基因表达量也很低。与 Na_2SeO_3 试验组相比, Na_2SeO_3 和 K^+ 混合试验

组的 SPS 活性明显更高。这项研究指出，酵母细胞中 SeP 的合成除了需要 SPS 外，还需要保持细胞内的离子平衡。研究结果表明，酵母细胞能够维持相同水平的离子平衡，这些试验证明，维持细胞内的阳离子平衡对于富硒酵母的硒积累是有益的。

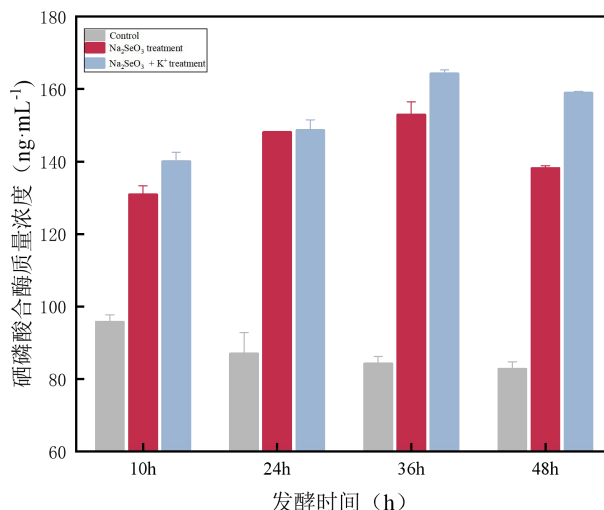


图 3-6 富硒酵母在不同时间下硒磷酸合酶活性的变化

Fig.3-6 Changes in selenophosphate synthase activity in selenium-rich yeast

3.5 本章小结

该条件下，扫描电子显微镜的结果显示，富硒酵母和未富硒酵母的表面存在明显差异，富硒酵母的表面上出现了硒沉淀。从扫描能谱分析，酵母培养时间越久，摄取的硒越多，相对应的排出胞外的单质硒就越多。

通过红外光谱研究了硒代甲硫氨酸、甲基硒蛋氨酸和硒代半胱氨酸中 H-Se 和 Se=O 键的伸缩振动，以比较硒富集酵母中相同位置的键合振动。试验结果表明，硒参与了酵母细胞的代谢过程。同时磷酸基团相对应吸收峰的振动，可能是酵母细胞膜上参与运输硒酸盐的 ABC 转运蛋白活性发生改变引起的。

通过对酵母胞外 pH 的测定推断碱金属离子影响酵母细胞质膜上负责硒盐转运的磷酸盐转运蛋白活性，从而影响细胞对无机硒的摄取与转化。当添加亚硒酸盐引入过量的 Na⁺后，细胞启动解毒效应，需要消耗大量能量来维持细胞生理稳态，释放大量的 H⁺到胞外，导致胞外 pH 降低，额外的能量消耗显然不利

于酵母硒代谢，并且会产生大量的 Pi ， Pi 对于酵母的磷酸盐转运体的亲合度高与硒酸盐，大大降低酵母利用无机硒的效率。通过试验表明添加 K^+ 有利于维持酵母胞外 pH 稳定，维持细胞内外离子稳态，有利于酵母细胞的生长与代谢。

在对酵母细胞中的硒磷酸合酶（SPS）活性进行测定后，发现 WX-1 菌株具有一定的 SPS 活性。在无外源硒的情况下，硒磷酸合酶活性较低，这表明酵母利用硒磷酸合酶系统表达的能量来促进细胞的生长和发育，这与第二章中在无外源硒的情况下酵母的生长和生物量速率最高的情况相符。添加外源硒时，SPS 活性提高一倍以上，在此基础上额外添加 K^+ ，会进一步提高酵母 SPS 活性。

第四章 基于转录组学分析酵母硒代谢机制

4.1 前言

转录组测序(RNA-seq)是基因功能和结构研究的基础,在基因挖掘、功能鉴定和遗传改良研究中起着重要作用。随着基因测序技术的发展,RNA-seq 凭借其高通量、高分辨率、高灵敏度和广泛应用的优势,已经成为转录组研究的主要方法之一。

硒在细胞内的过量积累对大多数微生物都具有毒性。当浓度较高时,硒会转化为促氧化剂,表现出高细胞毒性,即氧化应激反应,对细胞结构的稳定性构成威胁^[129]。这种现象会导致新陈代谢失衡,影响细胞膜组织的排列,并加剧细胞器的降解过程,导致细胞膜氧化,改变蛋白质的结构和功能,同时也会造成 DNA 的损伤^[130]。细胞内氧自由基的过度产生也可能引起形态学上的紊乱。然而,酵母具备一套酶和非酶的防御系统,能够保护细胞内成分免受氧化应激的影响,同时还具备较强的硒转化能力和硒耐受能力,因此作为富硒微生物之一被广泛研究^[131]。

基于前一章碱离子稳态对于酵母生理水平影响的研究,本章通过 RNA-seq 测序手段分析富硒酵母菌株 WX-1 与 WX-3 在相同处理条件下表现出基因功能的差异,该技术利用建库测序和生物信息分析,通过测定 mRNA 反转录后形成的 cDNA 来获得酵母样本的基因序列,随后将所测数据分类注释到不同功能和表达通路上,探索分子结构和基因功能,寻找关键差异基因,为富硒酵母及其代谢通路的研究提供参考价值。

4.2 实验材料

4.2.1 实验材料

富硒酵母 WX-1 和 WX-01 两株试验菌株。

4.2.2 实验材料与仪器

实验材料及仪器见 3.2.2。

4.3 实验方法

4.3.1 转录组样本前处理

本试验设置三个处理组，分别于 35 mg/L Na_2SeO_3 (WX-1)、无硒 (WX-2) 和 35 mg/L Na_2SeO_3 (WX-3) 培养条件下制备，每组设置三个生物学重复，一共 9 个样本。待发酵培养至 36 h 后，收集菌液，4000 r/min 离心 3 min，弃上清。以无菌 PBS 洗涤 3 次，液氮速冻 15 min。将试验样本放置于干冰中，快递至天津诺和致源科技有限公司进行总 RNA 提取及转录组学分析。样本测序编号如表 4-1 所示。

表 4-1 富硒酵母转录组样品
Table 4-1 Selenium-rich yeast transcriptome samples

编号	描述	备注
WX-1	35 mg/L Na_2SeO_3 , 36 h	试验组
WX-1	35 mg/L Na_2SeO_3 , 36 h	试验组
WX-1	35 mg/L Na_2SeO_3 , 36 h	试验组
WX-2	36 h	对照组
WX-2	36 h	对照组
WX-2	36 h	对照组
WX-3	35 mg/L Na_2SeO_3 , 36 h	试验组
WX-3	35 mg/L Na_2SeO_3 , 36 h	试验组
WX-3	35 mg/L Na_2SeO_3 , 36 h	试验组

4.3.2 文库构建与数据质控

提取细胞内 RNA，并通过生物分析仪对 RNA 样本进行严格的质量控制，以确保其完整性和总量。经检验合格，根据链特异性进行建库，利用高通量测序平台进行测序^[132]。

4.3.3 测序数据处理

首先，根据 Total RNA Extractor 试剂盒的操作步骤，提取酵母细胞总 RNA^[133]。接下来，使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对提取的 RNA 进行精确的检测，以评估其完整性和质量^[134]。然后，使用试剂盒制备文库。此外，使用 RT-qPCR 来准确测量文库的有效浓度，这个步骤可以使用特定的引物和探针来放大和检测文库中的目标 DNA 序列^[135]。最后，使用测序仪器进行高通量测序。测序结果将生成大量的测序数据，可用于后续的生物信息学分析和数据解读。

4.3.4 转录组测序数据统计分析

为了保证数据分析的质量和可靠性，在测序获得的原始数据上进行了过滤和处理的步骤。首先，对原始数据进行质量控制（QC），删除低质量的 reads 和带有测序接头的 reads，并使用软件 Fast QC 或 Trimmomatic 进行了质量控制和过滤^[136]。然后，将经过质控的 reads 与参考基因组（*Saccharomyces cerevisiae* S288C）进行比对，以获得 reads 的精确定位信息。接下来，进行新转录本组装，用以识别和组装在参考基因组上尚未注释的新转录本。然后，使用 subread 软件中的 Feature Counts 对基因序列进行标准化处理，获得每个基因的期望片段数，即 Fragments Per Kilobase Million（FPKM），用来量化基因的表达水平。此外，根据定义的阈值（ $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 和 $\text{padj} \leq 0.05$ ），对差异表达基因进行检测。

4.3.5 实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）验证

按照上述方法提取 RNA，随机选取 10 个 DEGs（PXA1、PHO3、CYS3、GND2、TRR1、GSH1、GLR1、GND1、PDR5、SOD1）进行 RT-qPCR 验证，实验以 Actin1 为内参基因，使用 primermer5.0 软件设计特异性引物^[137]。所有样品重复检测 3 份。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算候选基因的相对表达水平。

4.4 结果与分析

4.4.1 差异表达基因

为了探究诱变菌 WX-1 和出发菌 WX-01 在硒富集能力方面的差异，对这两组酵母菌的差异基因进行了比较。这些转录本构成了试验组 WX-1 和 WX-3，以及对照组 WX-2 和试验组 WX-1。为了消除基因长度和序列差异对结果的影响，采用 FPKM 归一化方法对不同组转录本间的基因表达差异进行统计评估。

根据火山图所示，在试验组 WX-1 与对照组 WX-2（图 4-1a）和试验组 WX-1 与试验组 WX-3（图 4-1b）的对比分析中，共有 1673 和 2612 个基因在表达上发生了显著变化，其中包括 1127 和 1347 个基因上调，以及 546 和 1265 个基因下调。

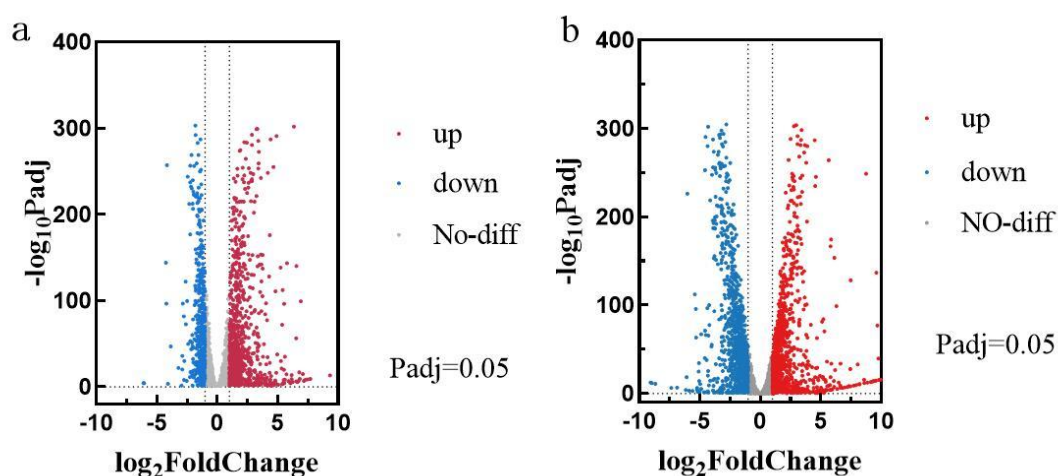


图 4-1 差异表达基因的火山图

Fig.4-1 Volcano plot of the differentially expressed genes

4.4.2 差异基因的 GO 功能注释分析

为了探究酵母硒富集过程，对差异基因进行筛选，选取最显著的 30 个生物过程绘制柱状图。图中的 x 轴表示 GO 生物过程，y 轴表示 GO 生物工程富集显著性水平，数值越高表示越显著。不同颜色分别对应于 BP（生物过程）、CC（细胞成分）和 MF（分子功能）三个 GO 子类。结果如下图 4-2 所示：

在 BP 中，表现出显著性差异的基因主要集中于 Peptide metabolic process（肽的代谢）、Peptide biosynthetic process（肽的生物合成）、Oxidoreductase activity（氧化还原过程）。在 CC 中，差异基因基因主要集中于 Ribosome（核糖体）、Cytoplasmic part（部分细胞质）、Ribonucleoprotein complex（核蛋白复合物）、Membrane（膜）、Integral component of membrane（膜的整体成分）、

Intrinsic component of membrane（膜的内在成分）。在 MF 中，主要集中于 Oxidoreductase activity（氧化还原酶活性）、Structural constituent of ribosome（核糖体的结构成分）、Structural molecule activity（结构分子活性）、Transmembrane transporter activity（跨膜转运体活性）。正如图 4-2 所示，其差异基因主要集中在 BP 和 MF 中。

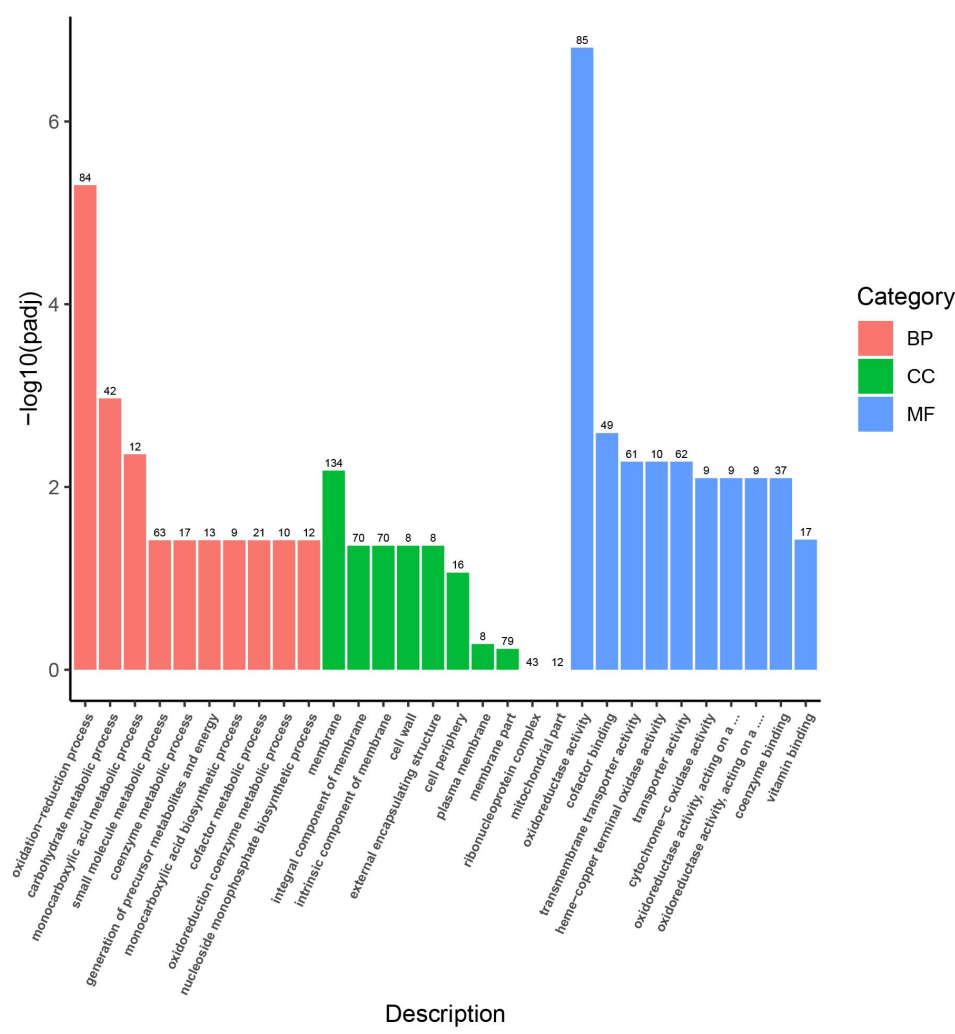


图 4-2a GO 富集分析柱状图（WX-1 vs WX-2）

Fig.4-2a Histogram of GO Enrichment Analysis（WX-1 vs WX-2）

注：图中横坐标为 GO 生物过程，纵坐标为 GO 生物工程富集的显著性水平

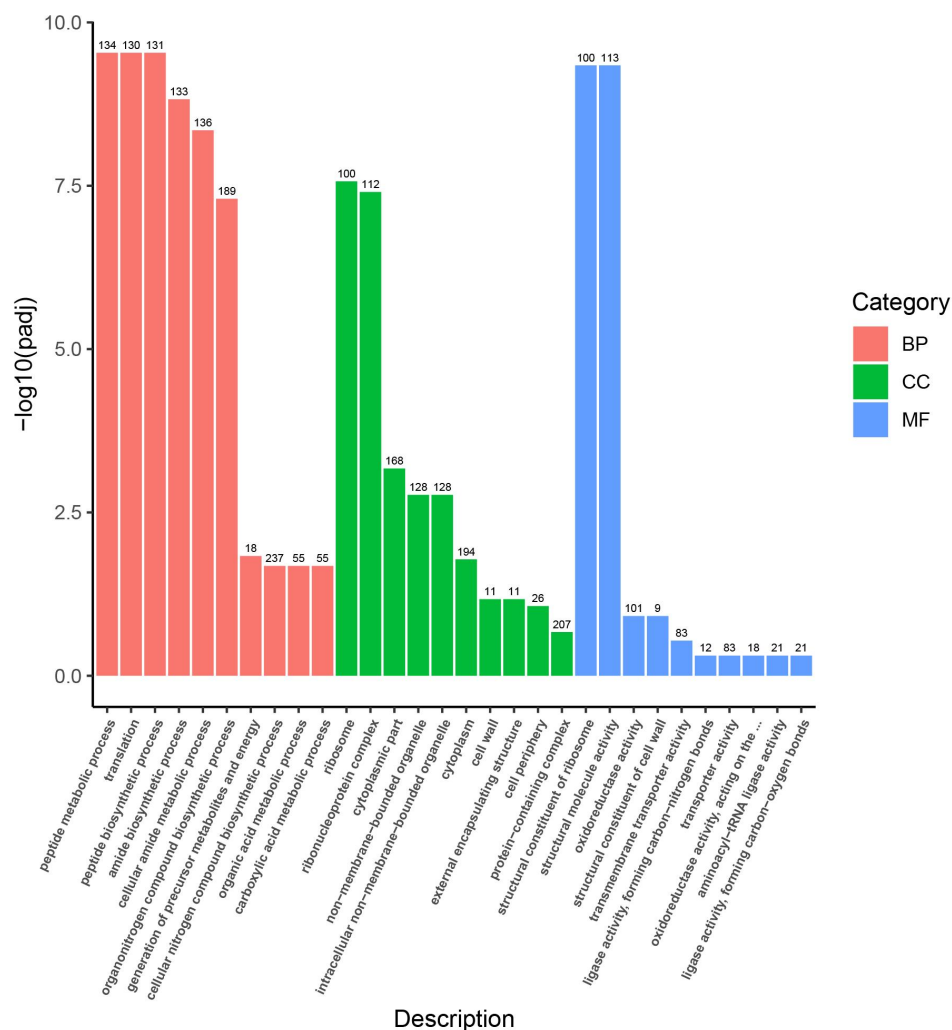


图 4-2b GO 富集分析柱状图 (WX-1 vs WX-3)

Fig.4-2b Histogram of GO Enrichment Analysis (WX-1 vs WX-3)

注：图中横坐标为 GO 生物过程，纵坐标为 GO 生物工程富集的显著性水平

4.4.3 差异基因的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集以 $P < 0.05$ 作为显著性富集的阈值^[138]。根据图 4-3 所示，其中差异基因主要参与 Oxidative phosphorylation（氧化磷酸化）、Aminoacyl-tRNA biosynthesis（氨酰基-tRNA 生物合成）、Cysteine and methionine metabolism（半胱氨酸和蛋氨酸的代谢）、Pyruvate metabolism（丙酮酸代谢）、Biosynthesis of amino acids（氨基酸生物合成）、Selenocompound metabolism（硒化合物代谢）、Peroxisome（过氧化物酶体）、ABC transporters（ABC 转运体）、Glutathione metabolism（谷胱甘肽代谢）、MAPK signaling

pathway – yeast（MAPK 信号通路-酵母）。从 KEGG 富集结果可知，能量代谢、物质转运、氨基酸合成等通路基因显著上调。

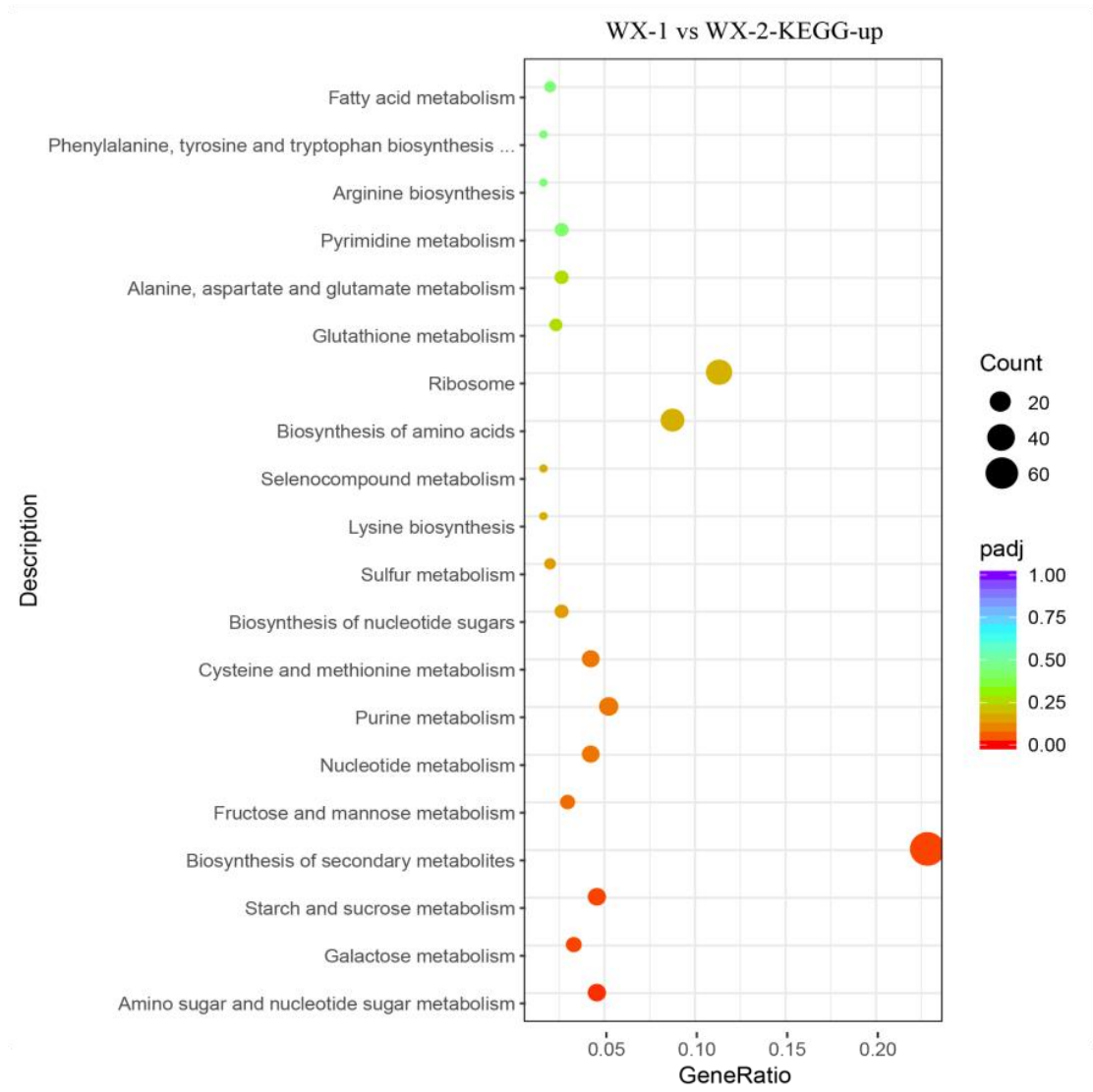


图 4-3a KEGG 富集分析散点图
Fig.4-3a Scatter plots of KEGG enrichment analysis

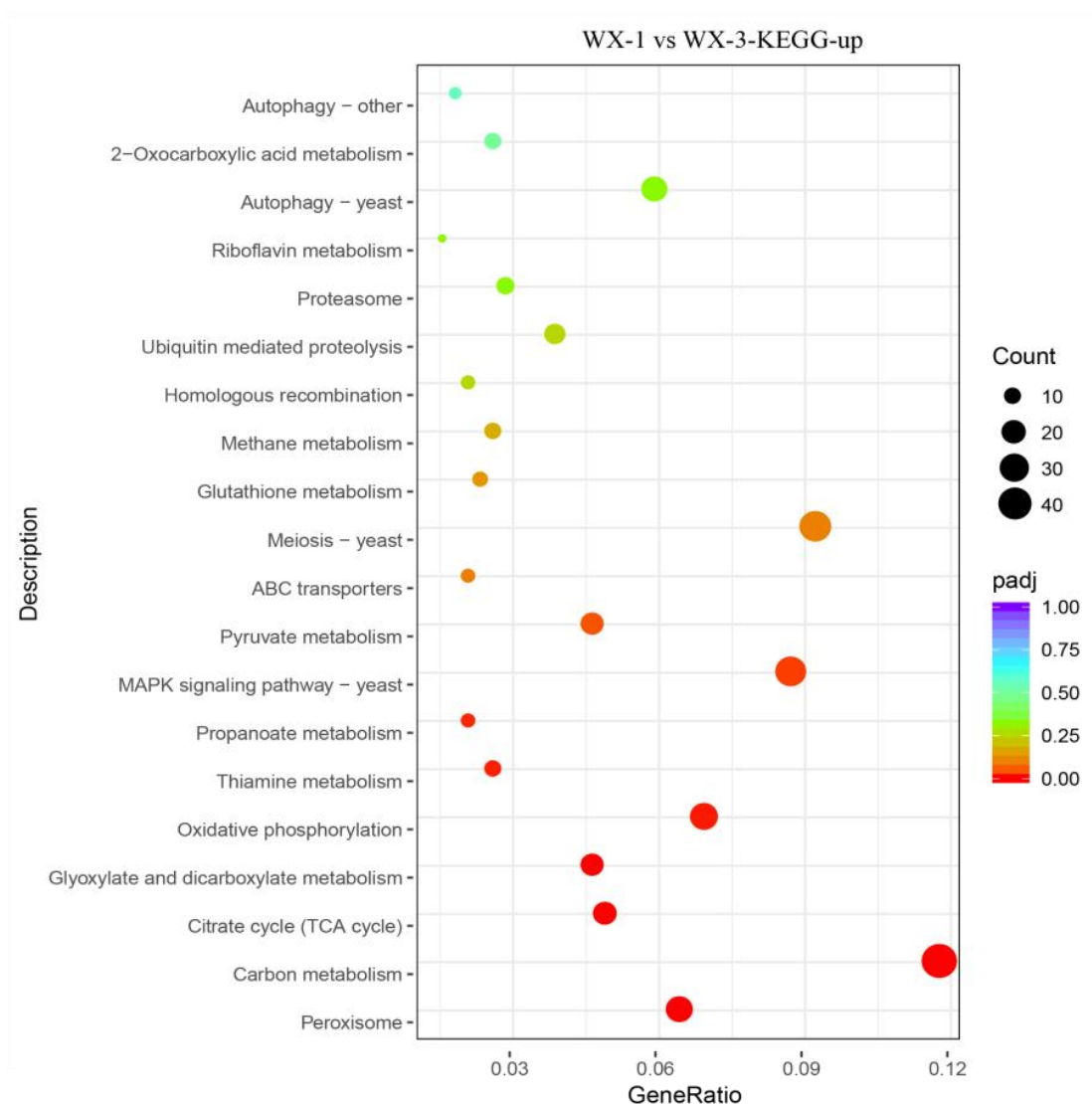


图 4-3b KEGG 富集分析散点图

Fig.4-3b Scatter plots of KEGG enrichment analysis

4.4.4 转运蛋白差异表达基因

酵母的硒富集过程需要转运蛋白的参与。这些转运蛋白主要存在于细胞膜表面，通过利用 ATP 水解释放的能量将物质转运进出细胞。这个过程涉及到主要的差异蛋白基因包括（图 4-4）：脂肪酸转运蛋白（fatty acid transporter, PXA1, PXA2），ATP 结合转运蛋白（ATP-binding transporter, SNQ2），酸性磷酸酶（acid phosphatase, PHO3, PHO12）和碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, PHO8）。

PXA1 和 PXA2 编码的转运蛋白在细胞内的脂肪酸跨膜转运中起着重要作用，同时也是过氧化物酶体膜的组成成分。与 WX-3 组相比，WX-1 组中这两个基因的差异表达分别上调了 35.1 倍和 9.3 倍。SNQ2 是一种 ABC 型外源性转运蛋白的编码基因，其表达产物主要功能是维持细胞内阳离子的稳态。SNQ2 的表达水平是 WX-3 组的 1.1 倍。另外，PHO3，PHO12，PHO8 这三个基因同属于磷酸盐家族基因，PHO3 编码的酸性磷酸酶参与含磷酸盐化合物和含硫胺素化合物的代谢过程。相比于 WX-3 组，WX-1 组中 PHO3 表达水平高出了 13.3 倍。碱性磷酸酶（PHO8）参与烟酰胺核苷酸的代谢和蛋白质去磷酸化过程。与 WX-3 组相比，其差异基因表达量增加了 118.5%。PHO12 编码的酸性磷酸酶参与蛋白去磷酸化过程，其差异基因上调 20.2 倍。

在转录组学分析中，ABC 转运蛋白基因表达差异显著，这些基因在调节硒的转运与积累中发挥着重要的作用^[139]。ABCD 家族基因参与细胞的 β 氧化过程，为细胞提供能量。诱变富硒酵母 PXA1 与 PXA2 基因的表达明显上调，表明这两组转运蛋白基因很有可能是突变位点。ABCG 家族参与维持细胞的阳离子稳态，其中 SNQ2 在 WX-2 对照组中表达量较低，验证了维持细胞阳离子稳态有利于酵母细胞硒代谢过程。酵母细胞负责通过磷酸盐转运体（PHO3、PHO12 和 PHO8）将硒转运到细胞外。在 WX-3 试验组中，PHO12 的表达量很低，但经过诱变处理后，其表达量上调，可能是影响酵母细胞富硒能力的关键因素之一。

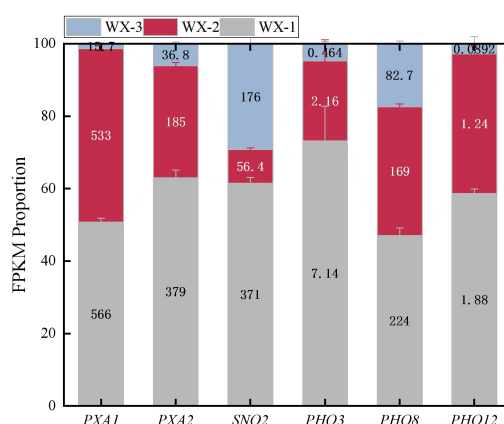


图 4-4 转运蛋白相关差异表达基因百分比堆积柱状图

Fig.4-4 Bar graph of percent transporter-associated differentially expressed genes

4.4.5 能量代谢差异表达基因

能量供应对酵母中的硒代谢非常重要，因为许多代谢过程都需要 ATP 才能发挥作用。在这个过程中，涉及到多个差异基因与能量代谢相关（图 4-5）：丙酮酸羧化酶（pyruvate carboxylase, PYC1），二氢硫酰基脱氢酶（dihydrolipoyl dehydrogenase, LPD1），柠檬酸合成酶（citrate-synthase, CIT3），异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase, IDP2, IDP3）和 ATP 合成酶（ATP synthase, ATP2）。

丙酮酸羧化酶（PYC1）是参与细胞糖异生过程的关键限速酶^[140]。诱变处理后，试验组 WX-1 组与对照组 WX-2 组的 PYC1 表达量较高，其中 WX-1 组的基因表达量比 WX-3 组高出了 3.4 倍。LPD1 属于二氢硫酰基脱氢酶基因，其表达产物具有甘氨酸脱氢酶（脱羧）活性，参与羧酸代谢过程和过氧化氢代谢过程。WX-1 差异基因表达量比 WX-3 组高出了 5.4 倍。柠檬酸合酶（CIT3）是 TCA 循环的关键限速酶，参与柠檬酸的合成过程，其基因表达量比 WX-3 组高出 95.3 倍。IDP2 和 IDP3 是异柠檬酸脱氢酶基因，其编码的蛋白参与谷氨酸的生物合成过程。WX-1 组的基因表达量分别是 WX-3 组的 52.6 倍和 5.8 倍。ATP 合成酶（ATP2）具有 ATP 水解活性和质子转运 ATP 合成酶活性，参与 ATP 合成偶联质子转运，其差异基因表达量上调了 271%。

跨膜转运依赖 ATP 水解提供能量。糖酵解和 TCA 循环是细胞产生 ATP 的重要途径^[141]。丙酮酸羧化酶在丙酮酸生产草酰乙酸的过程中起到了重要的回补作用，为 TCA 循环提供原材料^[142]。作为 TCA 循环的关键限速酶，CIT3 在诱变富硒酵母中高水平表达，其代谢水平异常活跃，为硒代谢过程提供能量和底物。IDP2 与 IDP3 同源，均是酵母过氧化物酶体 NADPH 依赖性异柠檬酸脱氢酶，为脂肪酸的代谢提供所需的 NADPH，参与谷氨酸的合成，在诱变后，WX-1 组与对照组中表达量均有上调。ATP2 编码 ATP 酶 β 亚基，参与细胞呼吸作用。LPD1 参与碳代谢过程，为酵母细胞提供能量。

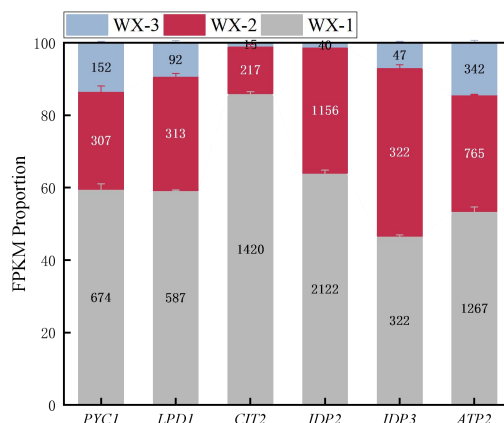


图 4-5 能量代谢相关差异表达基因百分比堆积柱状图

Fig.4-5 Bar graph of percentage of differentially expressed genes related to energy metabolism

4.4.6 氨基酸代谢差异表达基因

氨基酸代谢在硒代谢中发挥着重要作用。其中一些与氨基酸代谢相关的差异基因包括（表 4-2）：高柠檬酸合成酶（homocitrate synthase, LYS20），丙氨酸乙醛酸转氨酶（alanine-glyoxylate transaminase, AGX1），胱硫醚 γ -裂解酶（cystathionine gamma-lyase, CYS3）和胱硫醚 γ 合成酶（cystathionine gamma-synthase, STR2）。

硒在酵母中的积累过程本质上是一个蛋白质合成过程，而氨基酸代谢为硒蛋白的合成提供了物质基础。差异基因 LYS20 编码高柠檬酸合成酶，在酵母硒富集过程中，其表达量比 WX-3 组高出了 3.6 倍。丙氨酸乙醛酸转氨酶（AGX1）参与甘氨酸的生物合成过程，其差异基因表达量增加 35.6 倍。CYS3 是胱硫醚 γ 裂解酶基因，其编码蛋白具有胱硫醚 γ 裂解酶活性和半胱氨酸 S 偶联物 β 裂解酶活性，通过胱硫醚参与半胱氨酸生物合成过程以及硫化氢生物合成过程的正向调节^[143]，其表达水平提高了 21.0 倍。胱硫醚 γ 合成酶（STR2）参与硫转运，其差异基因表达量提高 1.3 倍。

经过诱变处理后，富硒酵母中与氨基酸代谢相关基因的表达量显著增加。其中，柠檬酸合成酶不仅参与赖氨酸的生物合成，还在 DNA 损伤修复中发挥关键作用，恢复组蛋白乙酰化。此外，胱硫醚 γ -裂解酶在富硒酵母中调节硫酸

盐水平，参与半胱氨酸的合成，对硒半胱氨酸和硒化氢的合成具有正向调节作用。高水平的差异基因表达表明其为重要的正向突变基因之一。另外，胱硫醚 γ 合成酶参与硒代半胱氨酸形成硒代胱硫醚的代谢，促进硒代蛋氨酸在细胞内的合成。富硒酵母细胞主要以硒代蛋氨酸为主，因此提高其表达水平对于硒代蛋氨酸的积累至关重要。

表 4-2 氨基酸代谢相关的差异表达基因

Table 4-2 Differentially expressed genes related to amino acid metabolism

DEG	FPKM (WX-1)	FPKM (WX-2)	FPKM (WX-3)	Gene Function
<i>LYS20</i>	782.22±26.20	424.04±13.48	169.27±13.27	homocitrate synthase
<i>AGX1</i>	1056.20±23.55	399.57±19.01	28.84±2.03	transaminase
<i>CYS3</i>	318.02±13.49	230.10±21.04	14.45±0.74	cystathionine gamma-lyase
<i>STR2</i>	94.19±2.59	85.53±3.40	40.72±1.87	cystathionine gamma-synthase

4.4.7 NADPH 合成相关部分差异基因

酵母细胞通过自身的调节机制，激活与 NADPH 合成相关的基因，从而促进硒的生物富集^[144]。这个过程涉及到一些主要的差异基因包括（图 4-6）：磷酸葡萄糖酸脱氢酶（phosphogluconate dehydrogenase, GND2, ZWF1），乙醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase, ALD6），NADH/NAD⁺激酶（NADH/NAD⁺ kinase, UTR1）和苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase, MDH2, MDH3），烟酰胺核苷酸腺苷酸转移酶（nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase, NMA2）。

GND2, ZWF1 均为磷酸葡萄糖酸脱氢酶，参与细胞合成 NADPH，其差异基因分别上调 54.3 倍和 0.9 倍。ALD6 是乙醛脱氢酶基因，诱导 NADP⁺活性，参与 NADPH 的再生，其表达量比 WX-3 组高 1.6 倍。参与 NADPH 生物合成过程和细胞铁平衡的 NADH/NAD⁺激酶 (UTR1) 的表达量增加了 3.3 倍。MDH2 是 L-苹果酸脱氢酶基因，其表达产物参与糖生成和蛋白质导入过氧化物酶体基质，与 WX-3 组相比，差异基因的表达量增加了 73.5 倍。MDH3 编码苹果酸脱氢酶，参与 NADH 再生和脂肪酸 β 氧化^[145]，其表达水平提高 2 倍。NMA2（烟酸核苷酸腺苷酸转移酶基因），其表达产物参与 NAD 的生物合成过程，基因表达量相差 1.6 倍。

亚硒离子通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）的还原作用生成 H₂Se，是细胞内硒代谢途径的首要反应^[146]。NADPH 在涉及细胞大分子生物合成的许多酶中起着至关重要的作用，因此需要足够水平的 NADPH 来保护细

胞免受氧化应激的损害^[147]。细胞内 NADPH 的主要酶源是由 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化的反应，GND2 编码的 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶能够加速辅因子 NADPH 的生成，可能是诱变富硒酵母关键突变基因。此外，ALD6 与 UTR1 也是 NADPH 的重要来源。MDH2 可以将苹果酸逆转为草酰乙酸，并促使烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）转化为 NADH。MDH3 是一种乙二醛酶，参与脂肪酸 β 氧化过程中形成的 NADH 的再氧化。NAD 是参与细胞生化过程和信号传导的基本代谢物，NMA2 的表达对于所有 NAD 生物合成途径至关重要。

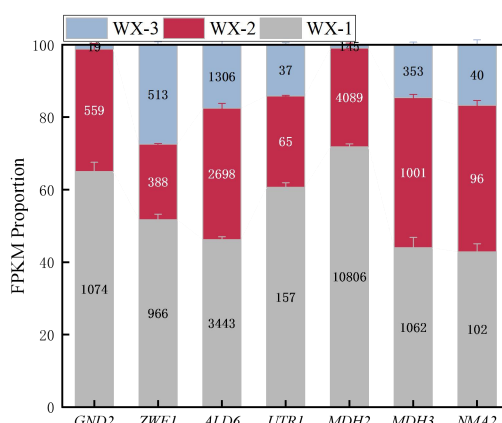


图 4-6 NADPH 合成相关差异表达基因百分比堆积柱状图

Fig.4-6 Bar graph of the percentage of stacked differentially expressed genes related to NADPH synthesis

4.4.8 硒耐受相关差异表达基因

对 KEGG 代谢途径的分析确定了富硒酵母中与硒耐受性相关的几个差异基因。这些基因包括多药转运蛋白（multidrug transporter, PDR5），二羟基丙酮激酶（dihydroxyacetone kinase, DAK2），2,4-二烯酰基-CoA 还原酶（2,4-dienoyl-CoA reductase, SPS19），超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD1）和 2-己烯基-6-甲氧基-1,4-苯醌甲基转移酶（2-hexaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone methyltransferase, COQ5）（图 4-7）。

PDR5 是 ABC 型外源性转运蛋白的基因，编码的蛋白参与细胞内阳离子稳态平衡以及通过跨膜运输解毒外源性物质^[148]。与对照组相比，PDR5 在 WX-1 中的表达水平增加了 6.1 倍。DAK2 编码二羟丙酮激酶，主要参与细胞内有毒物

质的代谢。与对照组相比，WX-1 试验组中 DAK2 的表达水平增加 2.0 倍。

SPS19 是 2,4-二烯酰基辅酶 A 还原酶（NADPH）活性蛋白基因，其表达产物参与子囊孢子的形成和脂肪酸分解代谢^[149]。与对照组相比，SPS19 基因的表达水平上调了 0.7 倍。SOD1 是一种超氧化物歧化酶，参与细胞内过渡金属离子的平衡和蛋白质的稳定；与对照组相比，WX-1 试验组的 SOD1 表达水平增加了 2.2 倍。COQ5 是 2-己烯基-6-甲氧基-1,4-苯醌甲基转移酶基因，其编码蛋白参与有氧呼吸和泛醌生物合成过程。与对照组相比，COQ5 基因表达量增加了 110%。

PDR5 是一种多效耐药性基因，在细胞解毒过程中发挥作用，维持细胞内离子平衡并清除底物。高表达的 PDR5 可能与对硒高耐受性相关。二羟基丙酮（DHA）对细胞具有毒性，而盐的加入会增强 DHA 的毒性。DAK2 在 DHA 代谢中扮演着重要角色。它参与细胞对 DHA 的处理和解毒方面发挥作用。SPS19 编码过氧化物酶体靶向的 2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶，参与细胞的 β 氧化和减数分裂过程，影响细胞的生长和繁殖。超氧化物歧化酶（SOD1）是细胞中重要的抗氧化防御系统。它能够抑制活性氧（ROS）的产生，调节细胞的代谢过程，延缓衰老。COQ5 可促进硒从细胞中挥发，并显著提高细胞对亚硒酸盐的耐受性。

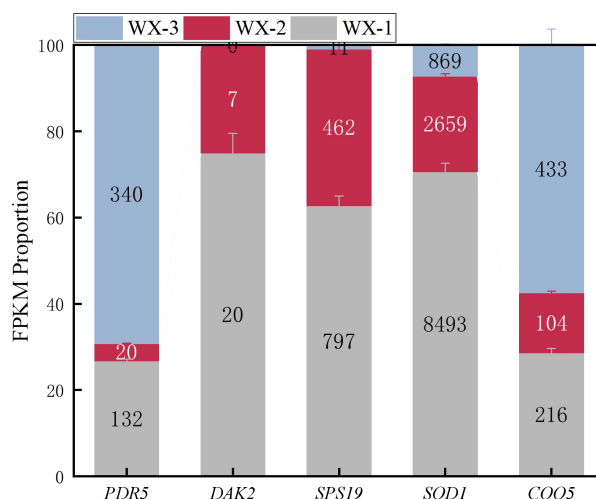


图 4-7 谷胱甘肽合成相关差异表达基因百分比堆积柱状图

Fig.4-7 Bar graph of the percentage of stacked differentially expressed genes related to glutathione synthesis

4.4.9 RT-qPCR 验证

为了验证 RNA-seq 结果的可靠性，随机选择了 10 个 DEGs 进行实时定量聚合酶链反应（RT-qPCR）实验。根据图 4-8 所示的结果，通过反转录定量聚合酶链反应（RT-qPCR）获得的差异表达基因的相对表达水平（ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ）与通过转录片段图谱（FPKM）读取的转录组结果相符。这些结果表明转录组数据是准确和可靠的。

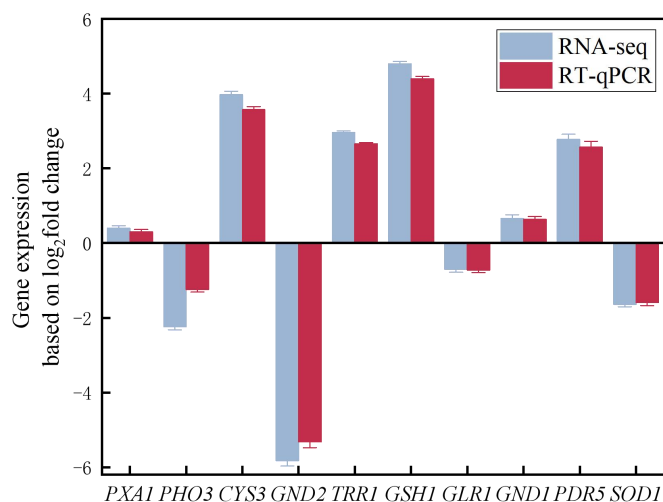


图 4-8 RT-qPCR 验证基因表达
Fig.4-8 Validation of gene expression by RT-qPCR

4.4.10 硒代谢途径

通过对酵母硒代谢途径分析（图 4-9），发现试验组 WX-1 组与对照组 WX-2 组在基因表达上存在明显的差异。在试验组中，观察到 CYS3，IRC7，HSU1 和 TRR1，MET3 等基因的上调。而在 WX-1 和 WX-3 组的对比分析中，发现差异基因为 STR2 和 TRR1。需要特别提及的是，TRR1 是最为关键的差异基因，其表达水平上调了 1244.5%。

TRR1 编码硫氧还蛋白二硫化物还原酶，是细胞内氧化还原稳态和对氧化应激反应的重要参与者。TRR1 在硒代谢中发挥全面调节作用，并增强细胞对氧化应激的抵抗力。在正常或氧化条件下，TRR1 能够显著增强过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性，从而主导细胞内的氧化还原状态。TRR1 与 NADPH 共

同构成细胞内氧化还原系统，其中 NADPH 是还原力的燃料。硫氧还蛋白二硫还原酶参与各种酶的活化和亚硒酸盐的还原，在细胞氧化还原状态的调节中起着重要的主导作用。总的来说，TRR1 在细胞内起着关键的调节作用，维持细胞的氧化还原平衡。

通过研究硒化合物代谢途径，发现富硒酵母细胞主要有两种方式将亚硒酸钠还原为硒化氢（ H_2Se ）^[146]。第一种途径是通过磷酸盐转运蛋白进入细胞，在谷胱甘肽存在的情况下形成谷胱甘肽硒化物（GS-Se-SG），然后转化为谷胱甘肽硒化物（GS-Se-H），产生 H_2Se 。另一种方式则是利用硫氧还蛋白系统，亚硒酸盐在硫氧还蛋白二硫还原酶（TRR1）的催化下与 NADPH 一步反应生成 H_2Se 。在硒化合物的代谢过程中，TRR1 同样催化甲基亚硒酸盐反应生成甲基亚硒酰，进而产生 H_2Se 。经过诱变处理后，富硒酵母的富硒能力明显提高。通过转录组学分析发现，与硒化合物代谢特别是亚硒酸盐还原有关的基因（TRR1）高度表达。研究结果表明 TRR1 是诱变富硒酵母的关键正向突变基因。毫无疑问，未来应该进一步研究硫氧还蛋白相关基因在富硒酵母的硒吸收和代谢中的功能。

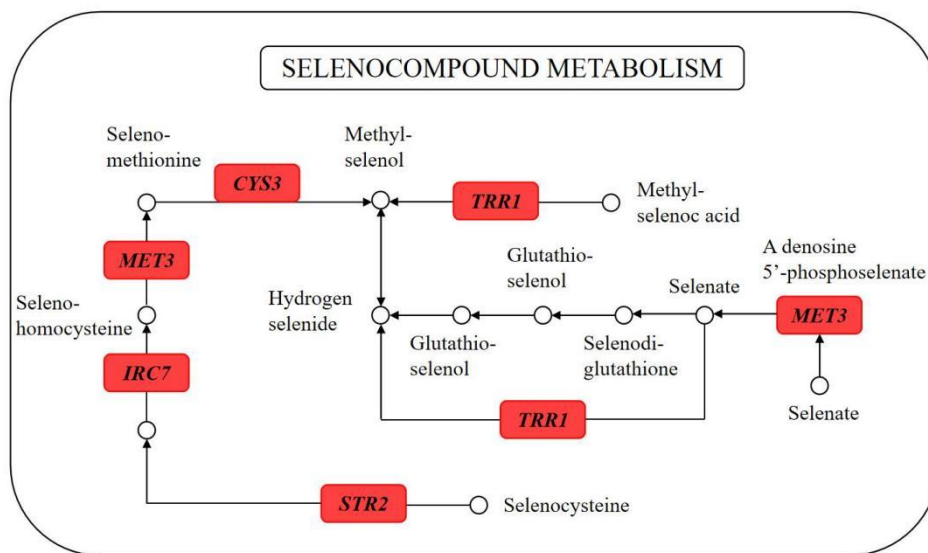


图 4-9 硒代谢途径中的基因和蛋白

Fig.4-9 Genes and proteins in the selenium metabolism pathway

4.4.11 谷胱甘肽代谢途径

经过对试验组 WX-1 组和对照组 WX-2 组进行 KEGG 代谢通路分析（图 4-10），发现在富硒酵母的硒代谢途径中存在着明显的基因差异上调。其中，最重要的差异基因是 GND1，其上调了 2605.3%。除了 GND1 外，还有 GSH1、GCG1、GLR1 等基因也显示了显著差异。

GND1 编码 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶，它是磷酸戊糖途径氧化分支中的第三个酶。该途径具有两个重要功能：一是生成核苷酸合成所需的 5-磷酸核酮糖，二是生成 NADPH。NADPH 是细胞主要的还原能力和各种还原生物合成反应所需的电子供体，特别是脂质的合成。谷胱甘肽还原酶需要 NADPH 作为电子供体来还原氧化谷胱甘肽。因此，6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶在保护细胞免受氧化压力方面发挥着重要作用。

通过研究发现，富硒 WX-1 酵母菌合成谷胱甘肽（GSH）有两条主要途径。第一种途径是通过 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GSH1）的酶促作用生成 L- γ -谷氨酰半胱氨酸，该酶催化底物合成 L- γ -谷氨酰半胱氨酸，最终在 GSH2 的存在下生成谷胱甘肽。第二种途径涉及使用氧化谷胱甘肽（GSSG）作为底物，通过谷胱甘肽还原酶（GLR1）和 NADPH 来合成还原型谷胱甘肽。在经过高浓度亚硒酸钠处理后，富硒酵母中的谷胱甘肽代谢会受到不同程度的调节，导致相关基因的表达被显著诱导。特别是与谷胱甘肽合成相关的基因 GND1 的表达被明显上调。

这些研究结果指出，富含硒的酵母可能通过谷胱甘肽介导的代谢来实现对硒的耐受性。具体而言，富硒酵母能够利用谷胱甘肽将亚硒酸盐（ SeO_3^{2-} ）还原为元素硒（ Se^0 ），以减轻硒的毒性影响。此外，已有研究证明 Se^0 经过富硒酵母体内代谢后形成纳米硒（SeNPs），其表面附着一些活性基团^[151]。因此，未来可进一步研究开发纳米硒的应用潜力。

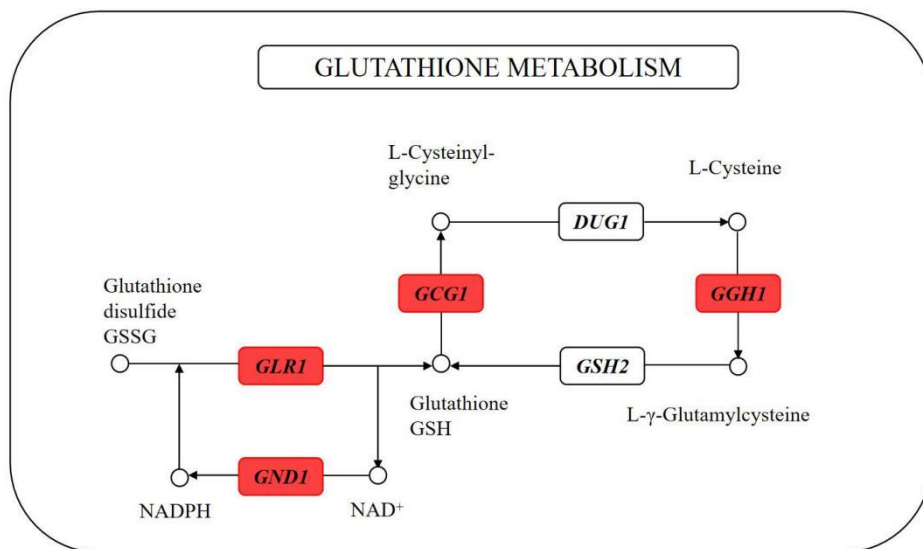


图 4-10 谷胱甘肽代谢途径中的基因和蛋白

Fig.4-10 Genes and proteins in the glutathione metabolic pathway

4.5 本章小节

这项研究从富硒酵母的胞外转运和胞内转化两个方面阐述了维持细胞阳离子平衡对富硒酵母硒积累产生的正面影响。通过进行转录组学分析，探究了富硒酵母在诱变后的关键突变基因。研究结果显示，诱变后富硒酵母中的 SNQ2 显著增加，这表明细胞维持阳离子平衡有利于硒的积累。另外，磷酸盐转运蛋白（PHO3、PHO8、PHO12）在添加亚硒酸盐后也呈明显增加趋势。同时，与 ATP 合成（PYC1, CIT3, IDP2），氨基酸代谢（LYS20, AGX1, CYS3）和 NADPH 合成（GND2, UTR1, MDH2）相关的大多数基因都被上调，并介导富硒酵母对硒的转运与吸收。在谷胱甘肽代谢途径中，GND1 基因似乎是受调控程度最高的基因。由于它与谷胱甘肽的合成密切相关，GND1 可能是硒耐受性的一个重要调控基因。另外，诱变后发现 TRR1 上调最为显著，可能是硒富硒关键调控基因，需要进一步实验证明。通过综合分析硒的胞外运输和胞内转化可能有助于阐明亚硒酸盐在诱变富硒酵母中的吸收和代谢机制。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本论文以一株酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为试验出发菌株, 通过诱变、酸胁迫和发酵优化等方法提高其富硒能力。以 WX-01 菌株作为研究对象, 旨在探究酵母硒转化机制, 涵盖了生理、代谢以及遗传等多个层面的研究。主要总结如下:

(1) 经过高浓度亚硒酸钠胁迫与 ARTP 诱变处理后, 成功获得了一株富硒水平较高的酿酒酵母菌株, 即编号为 WX-01。探究最佳的发酵培养条件可知, 在酵母发酵 8 h 后添加 35 mg/L 亚硒酸钠, 发酵 36 h 后可以使酵母硒含量达到 $1475 \pm 33 \mu\text{g/g}$, 生物量达到 $5192 \pm 36 \text{ mg/L}$, 硒含量比出发菌株提高 3 倍以上。总硒含量可达 7881.46 mg/g (干酵母), 对比现有研究, 已达到中等水平。

(2) 通过形态学对比发现, 这些酵母细胞参与硒蛋白的代谢。研究发现, 酵母 WX-1 的高富硒性能可能和钠钾离子参与的自主调控有关。红外发现细胞膜表面的磷酸基团变化, 可以推断出磷酸盐转运蛋白负责硒酸盐的转运。另外, 考虑到 SPS 是硒蛋白合成中的关键限速酶, 引入 K^+ 后提高了胞内 SPS 活性, 表明了富硒性能的提升。

(3) 通过转录样本测序结果表明, 诱变前后酵母胞外硒转运和胞内硒转化的相关基因的表达具有一定差异。在 ARTP 诱变处理条件下, 除了能量代谢、氨基酸代谢、NADPH 合成通路被显著上调外, 酵母系统中与硒转运相关的 PHO 类基因发生显著变化, 与硒化物代谢、GSH 合成通路相关的基因也发生了显著上调, 提高了菌株的富硒性能。最后, 通过硒代谢途径发现关键差异基因 *trr1*, 其差异表达量上调 1244.5%。

综上所述, 以酸胁迫、诱变、发酵优化可以获得高性能的富硒酿酒酵母菌株。从胞内外的生理水平和分子水平探讨并证实了钾离子在强化富硒应用中具有显著优势。同时, ARTP 诱变能够在短时间选育出具有高富硒能力的菌株, 这种选育与培养优化模式为后续富硒酵母的选育提供了一个新思路。

5.2 展望

利用 ARTP 诱变技术制备了高富硒性能的酵母菌，并从基因水平探究了富硒关键基因。后续还有以下内容的深层次探讨：

（1）酵母诱变后，硫氧还蛋白（TRR1）是在蛋白构象上的变化还是生物表达的变化，需要进一步确定。鉴于酵母诱变引起的硫氧还蛋白（TRR1）在蛋白结构或表达上的变化，需要进一步实验确定。

（2）需要通过全基因组测序对未知基因信息进行确定。

（3）差异显著上调的基因是否表达成功，还需要从蛋白组学进一步探究。

参考文献

- [1] PAPADOMICHELAKIS G, ZOIDIS E, PAPPAS A C, et al. Dietary organic selenium addition and accumulation of toxic and essential trace elements in liver and meat of growing rabbits [J]. Meat Science, 2018, 145: 383-388.
- [2] COLLINS R, BURROWS T, DONNELLY H, et al. Macronutrient and micronutrient intake of individuals with diabetic foot ulceration: A short report [J]. Journal of Human Nutrition and Dietetics, 2022, 35(5): 786-790.
- [3] SCHIAVON M, PILON-SMITS E A H. Selenium biofortification and phytoremediation phytotechnologies: A Review [J]. Journal of Environmental Quality, 2017, 46(1): 10-19.
- [4] MEHDI Y, HORNICK J L, ISTASSE L, et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions [J]. Molecules, 2013, 18(3): 3292-3311.
- [5] 李永春, 刘玖芬, 李雪珍, et al. 河套平原腹地土壤硒的赋存形态特征及生物有效性 [J]. 环境科学: 1-14.
- [6] 姚朝瑞, 马聘, 李大鹏, et al. 硒对亚硝酸钠导致的草鱼肝细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(05): 986-994.
- [7] 何妍萍. 硒的生理学功能与畜牧养殖中的应用 [J]. 畜牧兽医杂志, 2023, 42(02): 19-23.
- [8] 缪锦来 李, 杨炳所, 贾元印. 硒化低聚糖的药理试验研究 [J]. 中国海洋药物, 2000, (03): 25-27.
- [9] 李圆泽, 刘昊昆, 巩玉龙, et al. 饲料中添加高剂量有机硒和无机硒对异育银鲫生长性能、组织硒蓄积和血液生化指标的影响 [J]. 水生生物学报, 2023, 47(05): 702-712.
- [10] 刘娟, 卢维宏, 朱启林, et al. 天然富硒茶产地筛选评价方法的构建与应用 [J]. 中国土壤与肥料, 2023, (12): 125-135.
- [11] 聂浩亮, 黄少辉, 杨军芳, et al. 叶面施硒对冬小麦籽粒产量、蛋白质含量和硒富集影响的 Meta 分析 [J]. 中国生态农业学报(中英文), 2023, 31(12): 1997-2010.
- [12] KIELISZEK M, BLAZEJAK S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A Review [J]. Molecules, 2016, 21(5).
- [13] MEPLAN C. Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2011, 25: S11-S16.
- [14] XU X, XIA L, HUANG Q, et al. Biosorption of cadmium by a metal-resistant *filamentous fungus* isolated from chicken manure compost [J]. Environmental Technology, 2012, 33(14): 1661-1670.
- [15] 王茜, 方荣, 邓娟娟, et al. 富硒酵母功能作用研究进展及法规现状 [J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(02): 327-335.
- [16] 吴倩倩, 苏娅, 曾祥明, et al. 紫花苜蓿、白三叶硒蛋白的提取方法筛选及工艺优化 [J]. 草地学报, 2024, 32(02): 654-660.
- [17] 郁冯艳, 付佳伟, 从光雷, et al. 发酵饲料在动物生产中应用的研究进展 [J]. 饲料研究, 2024, (04): 154-157.
- [18] 李林桂. 褪黑素和硒对油菜菌核病的影响及其调控机制初步研究 [D], 2023.

- [19] 沈方科, 王亚萍, 赵雪梅, et al. 叶面喷施硒对水稻籽粒中硒含量及形态的影响 [J]. 中国土壤与肥料, 2022, (06): 144-150.
- [20] 郭元元, 陈振东, 陈琴, et al. 蔬菜富硒规律及生理生化作用研究进展 [J]. 福建农业科技, 2019, (04): 65-70.
- [21] 徐联鹏, 吴萍, 陆晨晖, et al. 富硒秀珍菇的培育及其营养品质评价 [J]. 南京晓庄学院学报, 2021, 37(06): 53-58.
- [22] 钱爱萍, 翁伯琦, 雷锦桂, et al. 添加外源硒对猪肚菇子实体蛋白质营养水平的影响 [J]. 食用菌学报, 2008, (03): 72-74.
- [23] 王彩云, 金李玲, 王琳, et al. 冬虫夏草含片质量评价研究 [J]. 今日药学, 2023, 33(07): 524-528.
- [24] ZHU C, YANG J S, NIE X Y, et al. Influences of dietary vitamin E, selenium-enriched yeast, and soy isoflavone supplementation on growth performance, antioxidant capacity, carcass traits, meat quality and gut microbiota in finishing pigs [J]. Antioxidants, 2022, 11(8).
- [25] BOU R, GUARDIOLA F, BARROETA A C, et al. Effect of dietary fat sources and zinc and selenium supplements on the composition and consumer acceptability of chicken meat [J]. Poultry science, 2005, 84(7): 1129-1140.
- [26] MANGIAPANE E, PESSIONE A, PESSIONE E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems [J]. Current Protein & Peptide Science, 2014, 15(6): 598-607.
- [27] KIELISZEK M, BLAZEJAK S, GIENTKA I, et al. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5373-5382.
- [28] SAINI K, TOMAR S K. In vitro evaluation of probiotic potential of *lactobacillus* cultures of human origin capable of selenium bioaccumulation [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2017, 84: 497-504.
- [29] PESCUA M, GOMEZ-GOMEZ B, PEREZ-CORONA T, et al. Food prospects of selenium enriched-*lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *lactobacillus reuteri* CRL 1101 [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 466-473.
- [30] 易鑫, 周琦, 欧阳祝, et al. 乳酸菌富硒优化及其活性评价 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(08): 179-186.
- [31] YANG J, HUANG K, QIN S, et al. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli* [J]. Digestive diseases and sciences, 2009, 54(2): 246-254.
- [32] PEREZ M B, LIPINSKI V M, FILLIPINI M F, et al. Distribution, accumulation and speciation of selenium at the different growth stages of four garlic clones [J]. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2021, 38(9): 1506-1519.
- [33] YE S, SHEN F, JIAO L, et al. Biosynthesis of selenoproteins by *saccharomyces cerevisiae* and characterization of its antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 3438-3445.
- [34] 涂青, 杨双全, 章之柱, et al. 富硒酵母发酵工艺的优化 [J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 140-145.

- [35] GU X, GAO C-Q. New horizons for selenium in animal nutrition and functional foods [J]. *Animal Nutrition*, 2022, 11: 80-86.
- [36] ZHU H, BIERLA K, JIN X, et al. Identification of γ -glutamyl-selenomethionine as the principal selenium metabolite in a selenium-enriched probiotic, *bifidobacterium longum*, by two-dimensional HPLC-ICP MS and HPLC-ESI Orbitrap MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(22): 6726-6736.
- [37] ALZATE A, PEREZ-CONDE M C, GUTIERREZ A M, et al. Selenium-enriched fermented milk: a suitable dairy product to improve selenium intake in humans [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(11): 761-769.
- [38] KIELISZEK M. Selenium-fascinating microelement, properties and sources in food [J]. *Molecules*, 2019, 24(7).
- [39] 李颖. 高生物量富硒酵母的制备和性能改善研究 [D], 2021.
- [40] CONGCONG W, VINOTHKANNA A, YONGKUN M, et al. Production of mulberry wine using selenium-enriched *saccharomyces cerevisiae*: implications from sensory analysis, phytochemical and antioxidant activities [J]. *Journal of food science and technology*, 2024, 61(2): 366-384.
- [41] MAREK K, STANISŁAW B, ANNA B-W, et al. Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells [J]. *Biological trace element research*, 2018, 187(1): 316-327.
- [42] 许国洋, 郑华, 高广亮, et al. 基于酵母表面展示的山羊 γ -干扰素重组富硒酵母构建及活性分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(03): 562-569.
- [43] 周洋枝, 苏蒙蒙, 路栋, et al. 酵母富硒培养条件研究进展 [J]. *农产品加工*, 2019, (01): 74-76.
- [44] 乔虹, 尹佳茗, 姜峰, et al. 桑肠杆菌菌株的富硒特性及其喷施对玉米籽粒的硒素强化 [J]. *农业工程学报*, 2018, 34(17): 284-290.
- [45] O A-O A, K E C, SAMUEL A, et al. Shelf Life study and quality attributes of cocoyam chips [J]. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*, 2017, 6(402).
- [46] RANI M, DABUR R S, KHANNA S, et al. Application of pickling for preservation of paneer [J]. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 2014, 33(3): 183-186.
- [47] CAO D, LIU Y, MA L, et al. Genome-wide identification and characterization of phosphate transporter gene family members in tea plants (*Camellia sinensis* L. O. kuntze) under different selenite levels [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 166: 668-676.
- [48] PEREZ-SAMPIETRO M, SERRA-CARDONA A, CANADELL D, et al. The yeast Aft2 transcription factor determines selenite toxicity by controlling the low affinity phosphate transport system [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6.
- [49] KANE P M. Proton transport and pH control in fungi [M]. RAMOS J, SYCHROVA H, KSCHISCHO M. *Yeast Membrane Transport*. 2016: 33-68.
- [50] SENGOTTAIYAN P, PETRLOVA J, LAGERSTEDT J O, et al. Characterization of the biochemical and biophysical properties of the *saccharomyces cerevisiae* phosphate transporter Pho89 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 436(3): 551-556.
- [51] SERRA-CARDONA A, PETREZSELYOVA S, CANADELL D, et al. Coregulated expression of the Na^+ /Phosphate Pho89 transporter and Ena1 Na^+ -ATPase allows their

- p functional coupling under high-pH stress [J].
- Molecular and Cellular Biology*
- , 2014, 34(24): 4420-4435.
- [52] MEHDI Y, HORNICK J-L, ISTASSE L, et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions [J]. *Molecules*, 2013, 18(3): 3292-3311.
- [53] KIELISZEK M, BLAZEJAK S, BZDUCHA-WROBEL A, et al. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells [J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(2): 1797-1808.
- [54] WANG Y, LIU P, CHANG J, et al. Site-specific selenocysteine incorporation into proteins by genetic engineering [J]. *Chembiochem*, 2021, 22(20): 2918-2924.
- [55] MUTHU A, SÁRI D, FERROUDJ A, et al. Microbial-based biotechnology: production and evaluation of selenium-tellurium nanoalloys [J]. *Applied Sciences*, 2023, 13(21).
- [56] XUELI J, YONGJIA H, TING L, et al. Selenium-enriched *bifidobacterium longum* DD98 relieves irritable bowel syndrome induced by chronic unpredictable mild stress in mice [J]. *Food & function*, 2023, 14(11).
- [57] PEYROCHE G, SAVEANU C, DAUPLAIS M, et al. Sodium selenide toxicity is mediated by O₂ dependent DNA breaks [J]. *Plos One*, 2012, 7(5).
- [58] SCORTECCI J F, SERRAO V H B, FERNANDES A F, et al. Initial steps in selenocysteine biosynthesis: The interaction between selenocysteine lyase and selenophosphate synthetase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 18-26.
- [59] KIELISZEK M, BLAZEJAK S, PLACZEK M. Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC 9950 yeast [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2016, 35: 90-96.
- [60] KITAJIMA T, CHIBA Y. Selenomethionine metabolism and its toxicity in yeast [J]. *Biomolecular concepts*, 2013, 4(6): 611-616.
- [61] NKAULE A N, KIPROTICH S, BRANDT L B, et al. Effects of reaction temperature and cadmium source on the optical, morphological and cytotoxic properties of CdSe/ZnSe quantum dots [J]. *ChemistrySelect*, 2023, 8(47).
- [62] TAMARA F, BEATRIZ G, DAVID V, et al. Single-cell ICP-MS for evaluating the Se-protective effect against MeHg⁺-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) [J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2023.
- [63] D. G, M. C, A. V. Awareness on medicinal applications of selenium nanoparticles among dental students [J]. *International Journal of Dentistry and Oral Science*, 2021, 8(9): 4372-4375.
- [64] ABHINAVA G, CHARAN S, DEEPAK P, et al. Topical application of nanoparticles integrated supramolecular hydrogels for the potential treatment of seborrhoeic dermatitis [J]. *Pharmaceutical development and technology*, 2020, 25(6): 21-3.
- [65] NATICCHIA M R, BROWN H A, GARCIA F J, et al. Bifunctional electrophiles cross-link thioredoxins with redox relay partners in cells [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2013, 26(3): 490-497.
- [66] PICAZO C, MATAALLANA E, ARANDA A. Yeast thioredoxin reductase trr1p controls TORC1-regulated processes [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8.

- [67] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(7): 363-383.
- [68] M A, L M L, P M M, et al. Effect of selenium on growth and antioxidant enzyme activities of wine related yeasts [J]. World journal of microbiology & biotechnology, 2015, 31(12): 1899-1906.
- [69] MINGSHI W, DAIHUA J, XUEJIAO H. Selenium nanoparticle rapidly synthesized by a novel highly selenite-tolerant strain *Proteus penneri* LAB-1 [J]. iScience, 2022, 25(9): 104904-104912.
- [70] TOBE T, UEDA K, AOKI A, et al. Selenium uptake through cystine transporter mediated by glutathione conjugation [J]. Journal of Toxicological Sciences, 2017, 42(1): 85-91.
- [71] RAVN-HAREN G, BUGEL S, KRATH B N, et al. A short-term intervention trial with selenate, selenium-enriched yeast and selenium-enriched milk: effects on oxidative defence regulation [J]. The British journal of nutrition, 2008, 99(4): 883-892.
- [72] BARTOLINI D, TORQUATO P, PIRODDI M, et al. Targeting glutathione S-transferase P and its interactome with selenium compounds in cancer therapy [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2019, 1863(1): 130-143.
- [73] EGHOGHOSOA A R, BAYO-OLUGBAMI A A, MARYANNE A T, et al. Glutamine alleviates I/R-Induced intestinal injury and dysmotility via the downregulation of xanthine Oxidase/Uric acid signaling and lactate generation in wistar rats [J]. Journal of Surgical Research, 2024, 295: 431-441.
- [74] 邹恩国, 黄天宇, 王木兰, et al. 特发性肺纤维化的发病机制及中药调节作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志: 1-18.
- [75] NORAPAT K, SHINSUKE O, TOMOYA C, et al. Targeted mutations produce divergent characteristics in pedigree sake yeast strains [J]. Microorganisms, 2023, 11(5).
- [76] 李园子, 郭慧敏, 田伏锦, et al. 酒中高级醇调控的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2024, 45(01): 160-169.
- [77] TOMOO O, AKIRA O, SHUN T, et al. Flocculation type and the lg-FLO1 gene of bottom-fermenting yeast are derived from top-fermenting yeast [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2020, 79(3): 306-313.
- [78] 王飞, 王晓宇, 赵擎豪, et al. 果酒增香酿造技术研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(13): 244-252.
- [79] 刘安, 王丹阳, 王振, et al. 高耐受性酿酒酵母的适应性驯化选育与发酵 [J]. 微生物学通报, 2024, 51(03): 1018-1032.
- [80] JIE G, XIULI H, WEIDONG H, et al. Enhancing ethanol tolerance via the mutational breeding of *pichia terricola* H5 to improve the flavor profiles of wine [J]. Fermentation, 2022, 8(4): 149-158.
- [81] WANG Q, LIU D, YANG Q, et al. Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering [J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(6): 425-431.
- [82] 李媛媛. 硒酵母高产菌株的筛选及发酵条件的研究 [D], 2013.
- [83] 邱美珍, 杜丽飞, 王红兵, et al. ^{60}Co - γ 射线诱变选育富硒酵母菌株 [J]. 激光生物学报, 2011, 20(03): 378-381.
- [84] 聂新玲. 富硒酵母的菌种选育及其富硒条件优化 [D], 2023.
- [85] 娄兴丹. 高富硒酵母的筛选与富硒过程强化研究 [D], 2018.

- [86] 张丹丹, 黄鑫磊, 程卫东. 基于前反馈神经网络分析优化 *Saccharomyces cerevisiae* L9 富硒条件 [J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(12): 36-42.
- [87] SUN M, YU Q, LIU M, et al. A novel toxicity mechanism of CdSe nanoparticles to *Saccharomyces cerevisiae*: Enhancement of vacuolar membrane permeabilization (VMP) [J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 220: 208-13.
- [88] 杨宇翔. 生物净化法大豆糖蜜成分分离提取应用研究 [D], 2023.
- [89] 余嘉莲, 丁静华, 罗晓琪, et al. 富硒平菇粉的抗癌活性评价及富硒代糖面包的研制 [J]. 现代食品科技, 2023, 39(01): 177-184.
- [90] 王岩, 张利. 紫薯桂花富硒面包的研制 [J]. 粮食与饲料工业, 2023, (03): 711-722.
- [91] 时号, 李芳宇, 肖子路, et al. 富硒酵母的功能及其在动物生产中应用的研究进展 [J]. 饲料研究, 2023, 46(16): 170-174.
- [92] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, BASTOS M D L, et al. Safety and efficacy of the feed additive consisting of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060) for all animal species (Alltech Ireland) [J]. Efsa Journal, 2021, 19(12).
- [93] 蒋玲艳, 张在, 王林果. 酿酒酵母对麻黄肉鸡生长性能和疫苗免疫应答能力的影响 [J]. 饲料研究, 2023, 46(06): 28-32.
- [94] YANG X, YANG C, TANG D, et al. Effects of dietary supplementation with selenium yeast and jujube powder on mitochondrial oxidative damage and apoptosis of chicken [J]. Poultry Science, 2022, 101(10).
- [95] KONKOL D, KORZENIOWSKA M, ROZANSKI H, et al. The Use of selenium yeast and phytobiotic in improving the quality of broiler chicken meat [J]. Foods, 2021, 10(11).
- [96] SHOJADOOST B, TAHA-ABDELAZIZ K, ALKIE T N, et al. Supplemental dietary selenium enhances immune responses conferred by a vaccine against low pathogenicity avian influenza virus [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2020, 227.
- [97] P.H. P, H.E. W, J. T. Effect of total replacement of inorganic with organic sources of key trace minerals on performance and health of high producing dairy cows [J]. Journal of Applied Animal Nutrition, 2021, 9(1): 23-30.
- [98] TóTH R J, CSAPÓ J. The role of selenium in nutrition – A review [J]. Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria, 2018, 11(1): 128-144.
- [99] 赵悦, 王冰玥, 冷小京, et al. 食品中硒的前处理方法以及检测技术 [J]. 食品安全导刊, 2023, (36): 151-156.
- [100] 曹赵云, 李洪艳, 柴爽爽, et al. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定稻米中 5 种硒形态 [J]. 粮油食品科技, 2023, 31(06): 20-27.
- [101] LIU Y, LI C, LUO X, et al. Characterization of selenium-enriched mycelia of *Catathelasma ventricosum* and their antihyperglycemic and antioxidant properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(2): 562-568.
- [102] GAMMELGAARD B, RASMUSSEN L H, GABEL-JENSEN C, et al. Estimating intestinal absorption of inorganic and organic selenium compounds by in vitro flux and biotransformation studies in caco-2 cells and ICP-MS detection [J]. Biological Trace Element Research, 2012, 145(2): 248-256.
- [103] HUANG C, HU B, HE M, et al. Organic and inorganic selenium speciation in environmental and biological samples by nanometer-sized materials packed dual-column separation/preconcentration on-line coupled with ICP-MS [J]. Journal of mass spectrometry : JMS, 2008, 43(3): 336-345.

- [104] GAO X. Selenium and human health [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10.
- [105] 徐孝楠, 马浩迪, 续炎, et al. 耐硒海洋菌株的筛选、鉴定及其产纳米硒的抗菌活性 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(24): 152-158.
- [106] 向东, 朱玉昌, 周大寨, et al. 含硒活性物质研发技术进展 [J]. *山东化工*, 2023, 52(05): 669-677.
- [107] 辛世纪, 刘静雯, 杨帆, et al. 利用 ARTP 诱变技术选育白灵菇高产菌株 [J]. *北方园艺*, 2023, (23): 115-121.
- [108] 王大慧, 徐若烺, 黎德超, et al. 酸胁迫对 S-腺苷甲硫氨酸和谷胱甘肽生物合成的影响及其生理机制 [J]. *食品科学*, 2020, 41(10): 61-67.
- [109] 汤秀娟, 吴成泽, 陈聪, et al. 高产酯酶细菌的筛选、鉴定及复合诱变选育 [J]. *中国酿造*, 2023, 42(12): 87-92.
- [110] 范明明, 周祝宇, 鲁曦. 湿法消解-紫外分光光度法对改性透明质酸中硒含量的测定 [J]. *食品科技*, 2023, 48(10): 254-261.
- [111] 涂玲飞, 李焱, 张振. 响应面优化硒化白及多糖的制备工艺及其体外抗氧化活性研究 [J]. *食品工业科技*: 1-15.
- [112] 温启华, 陆逸昊, 杨露芳, et al. 硒化天麻多糖的制备、结构表征及其抗氧化活性评价 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45(03): 18-30.
- [113] 肖兴中, 闫妞, 马朝喜, et al. 叶面喷施硒肥对南瓜果实硒含量及营养品质的影响 [J]. *中国瓜菜*: 1-16.
- [114] CAO D, LIU Y, MA L, et al. Genome-wide identification and characterization of phosphate transporter gene family members in tea plants (*Camellia sinensis* L. O. kuntze) under different selenite levels [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 166: 668-676.
- [115] ZHANG L, HU B, LI W, et al. OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice [J]. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1183-1191.
- [116] LOCASCIO A, ANDRES-COLAS N, MIGUEL MULET J, et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to investigate plant potassium and sodium transporters [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9).
- [117] 张亚玲, 宋靖靖, 刘涵, et al. 弗氏柠檬酸杆菌富硒发酵工艺优化 [J]. *食品科技*, 2023, 48(02): 21-28.
- [118] DE ALMEIDA F P, FREIRE D M G, LINS U, et al. Surface imaging of the filamentous fungus *Penicillium simplicissimum* growing in a solid-state fermentation system [J]. *Micron*, 2017, 99: 19-25.
- [119] 徐楠, 李文云, 吴青青, et al. 不同发酵时间奶酪光谱学性质的差异性分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(02): 475-482.
- [120] RUTHERFORD S H, GREETHAM G M, TOWRIE M, et al. Detection of paracetamol binding to albumin in blood serum using 2D-IR spectroscopy [J]. *Analyst*, 2022, 147(15): 3464-3469.
- [121] 江攀, 梁增奇. 增强磁共振成像联合血清肿瘤标志物对肝细胞癌肿瘤结节的诊断价值 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2022, 29(06): 674-677.
- [122] 车明璐, 严香, 王冬雨, et al. 基于 VIP/PACAP 介导的肠道免疫功能失调探讨强的松治疗免疫性血小板减少症的效应机制 [J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(21): 33-40.
- [123] XU X, BAO Y, WU B, et al. Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics [J]. *Food Chemistry*, 2019, 289: 250-258.

- [124] 刘金凤. 富硒酵母的制备及在刺参养殖中的应用 [D]; 大连工业大学, 2016.
- [125] BIDIUK V A, ALEXANDROV A I, VALIAKHMETOV A Y. Extracellular pH and high concentration of potassium regulate the primary necrosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(1).
- [126] WOLFE M D. Selenophosphate Synthetase [J]. EcoSal Plus, 2004, 1(1).
- [127] CHUNG C Z, MILLER C, SOLL D, et al. Introducing selenocysteine into recombinant proteins in escherichia coli [J]. Current protocols, 2021, 1(2): e54-e58.
- [128] HOFFMAN K S, CHUNG C Z, MUKAI T, et al. Recoding UAG to selenocysteine in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. RNA (New York, NY), 2023, 29(9): 1400-1410.
- [129] ELEUTHERIO E, BRASIL A D A, FRANCA M B, et al. Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons [J]. Fungal Biology, 2018, 122(6): 514-25.
- [130] YOSHIKAWA Y, NASUNO R, TAKAGI H. A reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-independent mechanism enhances oxidative and nitrosative stress tolerance in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity [J]. Yeast, 2021, 38(7): 414-423.
- [131] TARZE A, DAUPLAIS M, GRIGORAS I, et al. Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The Journal of biological chemistry, 2007, 282(12): 8759-8767.
- [132] ZHAO G, WANG M, LUO C, et al. Metabolome and transcriptome analyses of cucurbitacin biosynthesis in luffa (*Luffa acutangula*) [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13.
- [133] AL KADI M, JUNG N, OKUZAKI D. UNAGI: Yeast transcriptome reconstruction and gene discovery using nanopore sequencing [J]. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2022, 2477: 79-89.
- [134] FAN Y, GALE A N, BAILEY A, et al. Genome and transcriptome of a pathogenic yeast, *Candida nivariensis* [J]. G3-Genes Genomes Genetics, 2021, 11(7).
- [135] RUEDA-MEJIA M P, NAGELI L, LUTZ S, et al. Genome, transcriptome and secretome analyses of the antagonistic, yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* to identify potential biocontrol genes [J]. Microbial Cell, 2021, 8(8): 184-202.
- [136] MAKEEVA D S, LANDO A S, ANISIMOVA A, et al. Translatome and transcriptome analysis of TMA20 (MCT-1) and TMA64 (eIF2D) knockout yeast strains [J]. Data in brief, 2019, 23: 103701-103712.
- [137] 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.
- [138] WU Y, CAI M, SONG X, et al. Comparative transcriptome analysis of genomic region deletion strain with enhanced l-tyrosine production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(3): 453-460.
- [139] LI L, XIONG Y, WANG Y, et al. Effect of nano-selenium on nutritional quality of cowpea and response of ABCC transporter family [J]. Molecules, 2023, 28(3).
- [140] FU A, VAN ROOYEN L, EVANS L, et al. Glucose metabolism and pyruvate carboxylase enhance glutathione synthesis and restrict oxidative stress in pancreatic islets [J]. Cell Reports, 2021, 37(8).

- [141] MOOKERJEE S A, GERENCSEI A A, NICHOLLS D G, et al. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(17): 7189-7207.
- [142] ZHOU S, LAMA S, JIANG J, et al. Use of acetate for the production of 3-hydroxypropionic acid by metabolically-engineered *Pseudomonas denitrificans* [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 307.
- [143] PEGORARO S, FIORI S, RUDOLPH-BOHNER S, et al. Isomorphous replacement of cystine with selenocystine in endothelin: oxidative refolding, biological and conformational properties of Sec3,Sec11,Nle7 endothelin-1 [J]. *Journal of molecular biology*, 1998, 284(3): 779-792.
- [144] JUNG J, KIM Y, NA J, et al. Constitutive Oxidative Stress by SEPHS1 Deficiency Induces Endothelial Cell Dysfunction [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21).
- [145] THEODOULOU F L, CARRIER D J, SCHAEDELER T A, et al. How to move an amphipathic molecule across a lipid bilayer: different mechanisms for different ABC transporters? [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44: 774-782.
- [146] MILLER C G, HOLMGREN A, ARNER E S J, et al. NADPH-dependent and -independent disulfide reductase systems [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 127: 248-261.
- [147] MILLER C. Redox homeostasis and stress in mouse livers lacking the NADPH-dependent disulfide reductase systems [M]. 2019.
- [148] WAGNER M, DOEHL K, SCHMITT L. Transmitting the energy: interdomain cross-talk in Pdr5 [J]. *Biological Chemistry*, 2017, 398(2): 145-154.
- [149] GURVITZ A, ROTTENSTEINER H, KILPELAINEN S H, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene SPS19 [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1997, 272(35): 22140-22147.
- [150] KERR I D, HAIDER A J, GELISSEN I C. The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 164(7): 1767-1779.
- [151] MARTINEZ F G, MORENO-MARTIN G, PESCUA M, et al. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: Formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8.

攻读硕士期间发表论文

[1] 汪锡武,冯婉婷,方旭娟,程子杨,钱森和,王洲,徐康,张杰,赵文豪,张圣伟. 富硒啤酒酵母的选育及有机硒含量的测定 [J]. 食品与发酵工业,2024,50(10):48-54.

[2] 石成龙,汪锡武,李安琪,钱森和,王洲,赵世光,刘艳,薛正莲. ϵ -聚赖氨酸对阪崎克罗诺杆菌细胞结构与生物被膜形成的影响[J].生物技术通报,2022,38(09):147-157.

致谢

总觉得来日方长，毕业遥遥无期，却也到了我执笔之时。

欲买桂花同载酒，终不似，少年游。行文至此，落笔为终。凡是过往皆序章始于金秋，终于盛夏，三年时光，如白驹过隙，已经接近尾声。但这是结束亦是开始。回首三年研究生时光，百感交集。我曾看到过很多热泪盈眶的致谢，内心也反复构想过致谢的时刻，然而当真正到了此刻，却不知如何言表。值得记录的美好太多，需感谢之人不胜枚举。致谢篇章是此论文的收尾，也标志着我大学生涯的结束。这段旅程始于 2021 年秋季，终于 2024 年夏日。每一个故事都有它的终章，无论是悲伤还是喜悦，无论是黑或白。拂袖而去，与过往时光，与旧时自我作别。

一朝沐杏雨，一朝念师恩。我由衷的感谢我的导师，王洲老师。从课题的选取到写作、论文的修改润色过程中，老师提供了许多宝贵的建议。正是得到老师无私的帮助和鼓励，我的论文得以顺利完成。在此，我向老师表示深深的感谢和崇高的敬意，愿恩师桃李芬芳，教泽绵长。同时也要感谢在大学中遇到的所有老师，感谢你们一直以来的关心与教诲，让我完成了青春的蜕变，成为了更好的自己。

树高千尺不忘根深沃土。感谢我的父母在过去二十多年里对我的培养和学业上的支持与鼓励，每一步的脚印都沉浸在他们无私的爱和谆谆教诲之中。每当我遇到困难时，他们总是第一个给予我鼓励的人，他们的爱永远是最无私且最包容的。感恩我的父母和家人，他们是我学业道路上最坚实的后盾，他们对我的充分信任让我能够勇敢且自由地做出人生中的每一个选择。家庭给予我心理上的安全感，生活上的温暖，学业上的支持，使我一直坚信这个世界充满美好。感谢我成长道路上的伙伴们，你们的温暖和陪伴照亮了我前进的道路，我倍感幸运。

山水一程，三生有幸。我深感幸运，生命中有这样一群亲朋好友，倾注着热情与真诚的爱意于我。在我情绪低落之时，他们始终给予我陪伴和柔情。他们使我从内向悲观转变为自信、坚强、豁达，感受到无限温暖。感谢室友们，

丰富多彩的大学生活得以拥有，寝室成为温馨的家，校园充满温暖。愿我们追随各自的热爱，实现各自期许，各自成就。

以梦为马，不负韶华。最后要感谢的是我自己。感谢你没有在舒适的生活里迷失自我，感谢你在面对困难时的勇气，感谢你始终保持热情和善良，去探索每一处山河。在此机会，我想对自己说一句，你很出色，实际上一直以来你都做得很好。

去阅读，去结识人，去欣赏世界的美景，让一切逐渐发生，慢慢地相遇。人生难免遇到挫折，但是前途广阔、光明。

凡是过往，皆为序章。道路曲折蜿蜒，前途充满光明。时间从不亏待那些努力奋斗的人，当辛苦终将迎来甘美时，山河星月皆将共同庆贺。风起风落，人聚人散，珍惜生活，不负相遇。

谢谢大家！

汪锡武

2024年04月于安徽工程大学