

乳铁蛋白对酿酒酵母和毕赤酵母底盘的抑制效应及差异化分子响应机制

梁晓琳^{1,2}, 罗彩青^{1,2}, 沈冰^{1,2}, 黄国宏^{1,2}, 彭东海^{1,2}, 周景文^{3*}

(1. 广西职业技术大学农业工程学院, 广西南宁 530226) (2. 广西壮族自治区健康茶饮工程研究中心, 广西南宁 530226) (3. 江南大学未来食品科学中心, 江苏无锡 214122)

摘要: 乳铁蛋白因广谱生物活性被广泛应用于食品与医药领域, 但其对微生物宿主的潜在毒性限制了细胞工厂的高效构建。为解析乳铁蛋白对酵母的胁迫响应机制, 本研究以酿酒酵母 C800、毕赤酵母 GS115 及对应重组菌株为模型, 结合表型检测与转录组学开展系统评价。外源添加实验表明, 牛乳铁蛋白呈剂量依赖性抑制酵母生长, 0.60 g L⁻¹ 处理下两菌株存活率分别降至 82.58% 和 78.28%, 代谢活性荧光值由 6.38×10⁶ 和 7.07×10⁶ 分别降至 2.58×10⁶ 和 3.99×10⁶, 提示乳铁蛋白不仅降低活菌数量, 还造成活细胞的亚致死代谢损伤; 扫描电镜观察到酿酒酵母细胞膜结构破损, 毕赤酵母表面粗糙化, 印证了膜系统损伤效应。外源添加 10 mmol L⁻¹ FeCl₃ 可显著拮抗上述抑制, 两菌株 OD₆₀₀ 分别回升至对照水平的 138.44% 和 108.76%, 提示铁代谢扰动是核心胁迫来源之一。转录组学分析揭示两菌株响应存在本质差异: 酿酒酵母呈全局转录抑制, 诱导 8 h 差异基因达 567 个 (下调占比 81.7%), 核糖体 RNA 加工基因 *UTP15*、*NOP15* 及能量代谢通路同步下调, 通过生长停滞应对代谢负荷; 毕赤酵母响应更剧烈, 诱导 8 h 差异基因增至 761 个, 铁转运蛋白基因 *FTR1* (log₂FC=+2.47)、黄素血红蛋白基因 *YHB1* (log₂FC=+1.49) 极显著上调, 提示铁稳态紊乱诱发氧化应激, 同时分子伴侣与应急碳代谢通路激活, 体现深度代谢重塑特征。本研究系统揭示了两种酵母应对乳铁蛋白胁迫的差异化转录组特征, 为靶向优化酵母底盘、提升乳铁蛋白表达水平提供了关键理论依据。

关键词: 乳铁蛋白; 酿酒酵母; 毕赤酵母; 自我毒性; 转录组学; 铁稳态

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0785

Inhibitory Effects of Lactoferrin on *Saccharomyces Cerevisiae* and *Pichia Pastoris* Chassis and The Differential Molecular Response Mechanisms

LIANG Xiaolin^{1,2}, LUO Caiqing^{1,2}, SHEN Bing^{1,2}, HUANG Guohong^{1,2}, PENG Donghai^{1,2}, ZHOU Jingwen^{3*}

(1.College of Agricultural Engineering, Guangxi Polytechnic University, Nanning 530226, China) (2.Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center for Healthy Tea Beverages, Nanning 530226, China) (3.Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lactoferrin is extensively utilized in the food and pharmaceutical industries owing to its broad-spectrum bioactivities; however, its potential cytotoxicity to microbial hosts severely restricts the efficient construction of cell factories. To elucidate the stress response mechanisms of yeast to lactoferrin, *Saccharomyces cerevisiae* C800, *Pichia pastoris* GS115, and their corresponding recombinant strains were employed as models, and a systematic evaluation combining phenotypic detection with transcriptomic analysis was conducted. Exogenous addition assays demonstrated that bovine lactoferrin suppressed yeast growth in a dose-dependent manner. At a concentration of 0.60 g L⁻¹, the survival rates of the two strains were reduced to 82.58% and 78.28%, respectively, and the fluorescence values reflecting metabolic activity were decreased from 6.38×10⁶ and 7.07×10⁶ to 2.58×10⁶ and 3.99×10⁶, respectively, indicating that not only was the viable cell count reduced, but sublethal metabolic damage was also induced in surviving cells. Scanning electron microscopy revealed severe cell membrane damage in *S. cerevisiae*, whereas only surface roughening was observed in *P. pastoris*, corroborating the membrane-disrupting effects. The aforementioned

收稿日期: 2026-05-22; 修回日期: 2026-07-27; 接受日期: 2026-07-28

基金项目: 广西自然科学基金青年基金项目 (2023GXNSFBA026312); 广西自然科学基金青年科学基金项目 (2023GXNSFBA026312); 非粮生物质能技术国家重点实验室开放基金项目 (SKL-NFBET-2025-26); 食品绿色加工与营养调控研究中心 (广西壮族自治区健康茶饮工程研究中心) 开放课题 (桂职院 (2025) 154 号 251103PT)

作者简介: 梁晓琳 (1986-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与食品微生物, E-mail: 515869972@qq.com

通讯作者: 周景文 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品合成生物学, E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

inhibition was significantly antagonized by the supplementation of 10 mmol L⁻¹ FeCl₃, with the OD₆₀₀ values being restored to 138.44% and 108.76% of the control levels, respectively, suggesting that iron metabolic disturbance serves as one of the core stressors. Transcriptomic analysis revealed essential differences in the responses of the two strains. Global transcriptional repression was detected in *S. cerevisiae*, with 567 differentially expressed genes being identified at 8 h post-induction (81.7% downregulated). Ribosomal RNA processing genes (*UTP15* and *NOP15*) and energy metabolism pathways were synchronously downregulated, suggesting that growth arrest was triggered to cope with the metabolic burden. In contrast, a more intense stress response was exhibited by *P. pastoris*, with the number of differentially expressed genes increasing to 761. The iron transporter gene *FTR1* (log₂FC=+2.47) and the flavohemoglobin gene *YHB1* (log₂FC=+1.49) were markedly upregulated, implying that disrupted iron homeostasis resulted in intracellular oxidative stress. Concurrently, chaperone genes and emergency carbon metabolism pathways were activated, reflecting extensive metabolic remodeling. In this study, the differential transcriptomic profiles of the two yeast species under lactoferrin stress were systematically characterized, providing crucial theoretical references for the targeted optimization of yeast chassis to enhance lactoferrin production.

Key words: lactoferrin; *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia pastoris*; self-toxicity; transcriptomics; iron homeostasis

乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 是普遍存在于哺乳动物乳汁中的一种非血红素铁结合糖蛋白, 作为先天免疫系统的关键效应分子, 除参与铁离子转运外, 还具有广谱的抑菌、抗病毒及抗炎等生物活性, 被广泛应用于婴幼儿配方奶粉及功能性食品领域^[1-3]。然而, 目前商品化乳铁蛋白主要依赖从牛乳中物理提取, 受限于原料来源稀缺及纯化工艺复杂, 生产成本居高不下, 严重制约了其规模化应用^[4]。在我国, 这一矛盾尤为突出: 2025 年我国乳铁蛋白产量仅约 4.5 吨, 而需求量却高达 205.2 吨, 供需严重失衡^[5]; 加之国内乳原料资源相对匮乏, 产能不足导致市场高度依赖进口, 对外依存度高达 98%^[6]。因此, 利用微生物细胞工厂进行重组乳铁蛋白的异源表达, 被视为突破资源瓶颈、实现降本增效的理想途径。

近年来, 研究人员在细菌、真菌等多种宿主中开展了乳铁蛋白的表达尝试。在原核系统中, Li 等^[7]在解淀粉芽孢杆菌中实现了牛乳铁蛋白的表达, 产量达 110 mg L⁻¹; 张予婷等^[8]在枯草芽孢杆菌中表达了人源乳铁蛋白, 产量约为 1 mg L⁻¹; Chen 等^[9]和于慧等^[10]分别在乳酸菌中表达了人和猪源乳铁蛋白, 产量维持在约 10 mg L⁻¹ 水平。然而, 乳铁蛋白作为一种活性糖蛋白, 其生物学功能高度依赖于真核特异的二硫键折叠及糖基化修饰, 原核系统难以满足其翻译后修饰需求, 导致重组蛋白生物活性普遍偏低。相比之下, 酿酒酵母、毕赤酵母及曲霉等真核微生物因具备蛋白折叠、分泌与修饰能力, 成为乳铁蛋白表达的首选平台, 报道产量跨度可达 1 mg L⁻¹ 至 2 000 mg L⁻¹^[11-15]。即便如此, 现有真核体系的产量距离工业化吨级需求仍有数量级差距, 表明单纯更换宿主并未触及限制产量的根本瓶颈。

这一瓶颈很可能源于乳铁蛋白自身的生物学特性。乳铁蛋白本质上是一种具有强效抗菌活性的天然防御蛋白, 其在酵母细胞内的合成、折叠及向胞外的分泌过程, 极可能对宿主产生“自我毒性” (Self-toxicity)。特别是在分泌型表达模式下, 宿主不仅要承受胞内蛋白折叠负荷, 还需耐受高浓度乳铁蛋白穿过细胞膜及细胞壁时引发的膜系统损伤与铁离子螯合胁迫。这种由产物诱导的细胞生理损伤, 极可能是导致重组菌株生长受限、蛋白产量难以提升的关键制约因素。然而, 目前关于乳铁蛋白对酵母底盘的毒性机制, 特别是两种经典底盘在应对此类活性蛋白时的差异化分子响应尚缺乏系统解析。

作为真核异源蛋白表达的经典底盘, 酿酒酵母与毕赤酵母在生理代谢与胁迫响应策略上存在本质差异。酿酒酵母偏好利用葡萄糖进行糖酵解快速增殖, 但其抗氧化系统对活性氧较为敏感, 且分泌能力相对有限^[16]。相比之下, 毕赤酵母作为甲基营养型酵母, 拥有强大的甲醇代谢通路与庞大的内质网系统, 具备卓越的蛋白质折叠缓冲能力与分泌潜能, 更适于乳铁蛋白等复杂蛋白的高水平合成^[17]。这些固有的宿主特性差异, 决定了二者在应对乳铁蛋白自我毒性时的耐受阈值与适应策略必然存在显著差异。

鉴于此, 本研究以酿酒酵母 C800 与毕赤酵母 GS115 及其重组菌株为模型, 构建了“外源添加模拟急性胞外胁迫、内源表达解析持续胞内响应”的联合研究策略。通过整合表型分析、铁离子拮抗实验与比较转录组学技术, 系统阐明乳铁蛋白对酵母细胞膜、铁代谢及能量稳态的损伤效应, 揭示两种底盘在核糖体生物合成、铁离子转运及蛋白分泌等关键通路的差异化适应机制。研究结果旨在为理解活性防御蛋白对微生物宿主的毒性效应提供新视角, 并为定向改造耐受性底盘、实现乳铁蛋白的高效绿色制造提供精准的工程靶点。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验菌株

酿酒酵母 C800 菌株 (CEN.PK2-1D 背景, MAT α , ura3-52, leu2-3,112, trp1-289, his3 Δ 1, MAL2-8 $^{\circ}$, SUC2, gal80 Δ ::KanMX) 为本实验室保存。以该菌株为底盘, 构建重组酿酒酵母 C800-BLF: 以 pY26 质粒为表达载体, 将牛乳铁蛋白 (Bovine lactoferrin, BLF) 编码基因克隆至 pY26 的 PGAL1 下游, 利用 URA3 筛选标记筛选阳性转化子, 半乳糖诱导表达 BLF。

毕赤酵母 GS115 (基因型: his4) 为本实验室前期购买并保存的商业化菌株。以其为宿主底盘, 构建重组毕赤酵母 GS115-BLF: 通过电转化将牛乳铁蛋白编码基因整合至 GS115 基因组的 AOX1 位点, 所用整合质粒为 pPIC9K-BLF, 利用 G418 加压筛选多拷贝转化子, 由甲醇诱导型 AOX1 强启动子驱动 BLF 的分泌表达。

1.1.2 试剂

酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉, 英国 Oxoid 公司; 酵母氮源碱、生物素、半乳糖、甘油、甲醇, 色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 牛乳铁蛋白标准品 (纯度 $\geq$ 95%), 美国 Sigma-Aldrich 公司; Alamar Blue 细胞活性检测试剂, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 和 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II, 日本 TaKaRa 公司; qRT-PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。其他化学试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.1.3 设备

SW-CJ-1F 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; ZQZY-CF 恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 5427R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; M200 Pro 全波长多功能酶标仪, 瑞士帝肯集团; UV-6000 紫外-可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; SU8100 冷场发射扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; LightCycler[®] 480 II 荧光定量 PCR 仪, 瑞士罗氏公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基与主要溶液配制

酵母浸粉-蛋白胨-葡萄糖培养基 (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, YPD): 酵母提取物 10 g L⁻¹, 蛋白胨 20 g L⁻¹, 葡萄糖 20 g L⁻¹。配制固体培养基时, 另加琼脂粉 20 g L⁻¹。121 °C 高压灭菌 20 min。

YPD-半乳糖诱导培养基: 酵母提取物 10 g L⁻¹, 蛋白胨 20 g L⁻¹, 半乳糖 20 g L⁻¹。其中半乳糖配制成 400 g L⁻¹ 储存液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。将不含糖的 YPD 基础培养基灭菌后, 待冷却至约 50 °C 时, 无菌操作加入半乳糖储存液至所需浓度。

磷酸盐缓冲液 (Phosphate-Buffered Saline, PBS): NaCl 8.0 g L⁻¹, KCl 0.2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 1.44 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0.24 g L⁻¹, pH 7.4。121 °C 高压灭菌 20 min。

酵母浸粉-蛋白胨-甘油缓冲培养基 (Buffered Yeast Extract Peptone Glycerol Medium, BMGY): 酵母提取物 10 g L⁻¹, 蛋白胨 20 g L⁻¹, 甘油 10 mL L⁻¹, 酵母氮源碱 13.4 g L⁻¹, 生物素 4 $\times$ 10⁻⁴ g L⁻¹, 溶于 100 mmol L⁻¹ 磷酸钾缓冲液。115 °C 高压灭菌 20 min。

酵母浸粉-蛋白胨-甲醇缓冲培养基 (Buffered Methanol-complex Medium with Methanol, BMMY): 组成同 BMGY, 但不含甘油。使用前, 向无菌培养基中无菌添加甲醇至终浓度为 0.5% (V/V)。甲醇经 0.22 μ m 有机系滤膜过滤除菌。

牛乳铁蛋白溶液: 用无菌 PBS 缓冲液溶解牛乳铁蛋白标准品, 配制成 10 mg mL⁻¹ 的储存液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装后 -20 °C 避光保存。临用前稀释至所需浓度。

FeCl₃ 溶液: 用去离子水溶解 FeCl₃ 6H₂O, 配制成 1 mol L⁻¹ 的储存液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 避光保存于 4 °C。临用前稀释。

1.2.2 细胞活性与形态学分析

1.2.2.1 菌体存活率测定

外源乳铁蛋白处理浓度参考已有报道^[18], 选用 0.12、0.24、0.36、0.48 及 0.60 g L⁻¹ 的梯度。将细胞从甘油管中划线至 YPD 固体平板上, 于 30 °C 培养 2~4 d 待单菌落长出。挑取单菌落接种至 10 mL 新鲜的 YPD 培养基中,

30 ℃、220 r min⁻¹ 培养至对数中期 (OD₆₀₀~0.8) 作为种子液。将种子液以 1% (V/V) 接种量转接至含不同终浓度牛乳铁蛋白 (0.00, 0.12, 0.24, 0.36, 0.48, 0.60 g L⁻¹) 的 YPD 培养基中。相同条件培养 12 h 后, 取 1 mL 菌液进行梯度稀释 (10⁻¹~10⁻⁷) 后取 100 μL 适当稀释度的菌液涂布于 YPD 平板, 每个浓度设 3 个生物学重复。30 ℃ 倒置培养 48 h 后, 对菌落数在 30~300 之间的平板进行计数, 计算单位体积菌落形成单位。以未添加乳铁蛋白的对照组 CFU 为基准 (存活率设定为 100%), 计算各处理组的相对存活率。

1.2.2.2 菌体代谢活性测定

按照 1.2.2.1 方法用乳铁蛋白处理细胞后, 取菌液于 4 ℃、4 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 收集菌体。用预冷的 PBS 缓冲液洗涤菌体 2 次, 随后用 PBS 重悬并调整细胞密度至 1×10⁷ CFU/mL。随后按照试剂盒使用说明进行测定: 取 200 μL 菌悬液加入 96 孔板, 每孔加入 10 μL Alamar Blue 活性检测试剂。30 ℃ 避光孵育至溶液呈粉红色, 使用荧光酶标仪检测荧光强度 (激发波长 560 nm, 发射波长 590 nm)。每组设 3 个复孔。

1.2.2.3 菌体细胞损伤观测

参考安佳星等^[19]方法, 观察酵母菌在乳铁蛋白胁迫下的细胞形态变化: 分别收集经 0 g L⁻¹ 和 0.6 g L⁻¹ 外源乳铁蛋白处理过的酵母细胞, 4 000 r min⁻¹ 离心 5 min 弃去上清。沉淀物用 1 mL 2.5% (V/V) 戊二醛溶液重悬, 并于 4 ℃ 条件下固定过夜。随后再次离心收集菌体, 依次使用 20% (V/V) 至 100% (V/V) 浓度梯度的乙醇进行脱水处理, 处理后样品经真空冷冻干燥、喷金镀膜后, 利用扫描电子显微镜观察其表面形貌变化。

1.2.3 外源铁离子对乳铁蛋白抑菌效应的拮抗作用

按照 1.2.2.1 获得种子液后。取种子液按 1% (V/V) 接种量转接至新鲜 YPD 液体培养基, 同时添加外源乳铁蛋白溶液至终浓度为 0.60 g L⁻¹, 再加入 FeCl₃ 溶液, 使其终浓度分别为 0、10、20、30、40、50 mmol L⁻¹。30 ℃、220 r min⁻¹ 培养 24 h 后, 在 600 nm 波长下测定其吸光度值。

在初步测定基础上, 设置更精细的 FeCl₃ 浓度梯度 (0、10、12、14、16、18、20、22 mmol L⁻¹)。其余步骤同上。

1.2.4 转录组测序样品制备

1.2.4.1 酿酒酵母菌株测序样品制备

挑取酿酒酵母 C800-BLF 重组菌株单菌落, 接种于 5 mL YPD (2% 葡萄糖) 培养基, 30 ℃、220 r min⁻¹ 过夜培养。以 1:100 比例转接至 50 mL 新鲜 YPD (2% 葡萄糖) 培养基, 培养至 OD₆₀₀~0.6。4 ℃、4 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 用等体积无菌 PBS 洗涤两次。将细胞重悬于等体积预热至 30 ℃ 的 YPD-半乳糖 (2%) 培养基中, 此时记为诱导 0 h。分别于诱导后 4 h 和 8 h, 快速吸取适量菌液, 液氮速冻后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 进行转录组测序分析。每个时间点设 3 个生物学重复。

1.2.4.2 毕赤酵母菌株测序样品制备

挑取毕赤酵母 GS115-BLF 重组菌株单菌落, 接种于 10 mL BMGY 培养基, 30 ℃、220 r min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀~4.0。4 ℃、4 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞, 用等体积无菌 PBS 洗涤两次。用 BMMY 培养基 (以 0.5% 甲醇为碳源) 重悬至起始 OD₆₀₀ 为 1.0, 进行诱导表达。基于文献报道的酵母胁迫转录响应动力学, 本研究选取差异表达基因变化最为显著的诱导 4 h 和 8 h 作为关键采样点, 以解析宿主早期胁迫响应特征^[20,21]。分别于诱导后 4 h 和 8 h 取样, 液氮速冻后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 进行转录组测序分析。每个时间点设 3 个生物学重复。

1.2.5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为验证转录组测序分析的准确性, 选择了几个关键差异基因采用实时荧光定量 PCR 方法进行验证。各基因引物序列如表 1 所示。采用 TRIzol 法提取酵母总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 去除基因组 DNA 并反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 在 LightCycler® 480 II 系统进行扩增。反应体系为 20 μL: TB Green Premix 10 μL, 上下游引物 (10 μM) 各 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 6.4 μL。反应条件: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 共 40 个循环; 熔解曲线阶段: 95 ℃ 5 s, 65 ℃ 1 min, 97 ℃ 连续升温。以酿酒酵母 *ACT1*、毕赤酵母 *TUB1* 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCt} 法估算目的基因的相对表达水平。每个样本设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR			
菌株名称	基因名称	上游引物	下游引物
酿酒酵母 C800-BLF	<i>ACT1</i> (内参)	GGTGTCTTGGTCTACCGACG	TGTGTAAAGCCGGTTTTGCC
	<i>UTP15</i>	CATTTATCCCAGCAGCCCA	AAATTGGCGTGATCCGCTA
	<i>NOP15</i>	TGGCTCTAGAAACATCGTCTAGC	GTGTGTACCGCTCTGCTCAT
	<i>CUP1-2</i>	ATCATGTAGCTGCCCAACGG	TTCCCAGAGCAGCATGACTT
	<i>VTI1</i>	ACTGAAGCACGTAGAACAGCA	CGTTCTGAGGCATCGCCTAT
毕赤酵母 GS115-BLF	<i>TUB1</i> (内参)	GGGCACTTGGAGGATGAGAAA	ACTTTCGGGTACGGACTTCG
	<i>FTR1</i>	TGGCTCAGAAGACCCTAAGACT	AGCAATCATCGCACCTCCAA
	<i>YHB1</i>	AGGACGCTGGAGAAACTTTG	TAGCGGGCTCAAATCGTCAA
	<i>HSP70</i>	TTCCGACGATTTCGGAGTTGG	CGTCTTTGAACAACCTGGCCC
	<i>UTP15</i>	ACAATGCAGCTGAACGAGGA	CCACAACCTAAGGACACCGCT

1.3 数据分析

通过 SPSS 19.0 软件进行数据差异分析，用 Graphpad Prism 11 软件进行图片处理。所有实验均设置 3 个独立生物学重复，表型实验每个生物学重复设 3 个技术重复，数据以平均值±标准差（Mean±SD）表示，采用单因素方差分析（One-way ANOVA）进行组间差异比较，多组与对照组的比较采用 Dunnett 法，图中*表示与对照组相比 $P<0.05$ 。采用 edgeR 软件对菌株的基因表达数据进行差异分析，在表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}|>1$ 和且 $\text{FDR}<0.05$ 条件下筛选差异表达基因。利用 GO（Gene Ontologydatabase, GO）数据库和 KEGG（The database of KyotoEncyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）代谢通路对筛选的所有差异表达基因进行功能富集分析。

2 结果与讨论

2.1 乳铁蛋白对酵母的自我毒性表型确证

2.1.1 外源乳铁蛋白对酵母菌株代谢活性的影响

外源乳铁蛋白对两株酵母菌生长状态及代谢活性的作用结果见图 1。结果表明，外源乳铁蛋白对两种酵母菌的生长增殖与细胞代谢活性均呈现显著浓度依赖性抑制作用。在 $0.12\sim0.60\text{ g L}^{-1}$ 浓度范围内，随着乳铁蛋白处理浓度升高，两株酵母的细胞相对存活率与代谢活性均同步降低，且在 0.48 和 0.60 g L^{-1} 高浓度条件下抑制尤为显著。当乳铁蛋白浓度达到 0.60 g L^{-1} 时，C800 菌株与 GS115 菌株细胞存活率分别降至 82.58% 与 78.28% 。

存活率表征细胞数量变化，代谢活性则反映亚致死损伤。本研究采用 Alamar Blue 法，基于活细胞内还原酶介导的氧化态染料转化反应，以荧光强度评估细胞代谢水平。结果显示（图 1c、d），两株菌荧光强度随乳铁蛋白浓度升高持续降低，趋势与存活率高度一致。对照组（ 0.00 g L^{-1} ）荧光强度分别为 6.38×10^6 （C800）和 7.07×10^6 （GS115）， 0.60 g L^{-1} 时降至 2.58×10^6 （C800）和 3.99×10^6 （GS115），表明乳铁蛋白不仅通过致死效应减少活菌数，亦显著抑制细胞能量代谢与还原力生成。

值得注意的是，毕赤酵母 GS115 代谢活性降幅略小于酿酒酵母 C800，提示其对乳铁蛋白胁迫的耐受性更强。该差异可能源于菌株固有特性：毕赤酵母为甲醇营养型酵母，其代谢网络与酿酒酵母存在结构差异。已有研究表明，乳铁蛋白可通过破坏膜完整性、诱导活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）积累、抑制关键酶活性（如 $\text{Pma1p H}^+\text{-ATPase}$ ）等机制抑制酵母生长^[22,23]。此外，乳铁蛋白的阳离子特性易与带负电的膜成分结合，改变膜通透性，导致胞内物质外流与能量代谢受阻^[23]。除膜损伤与氧化应激外，两株菌代谢响应差异亦可能与抗氧化能力相关：酿酒酵母虽具完善应激系统，但对 ROS 更敏感^[24]；而毕赤酵母在长期进化中可能形成更强的 ROS 清除能力与更稳定的内质网稳态，从而在乳铁蛋白诱导的氧化压力下维持更高代谢活性。

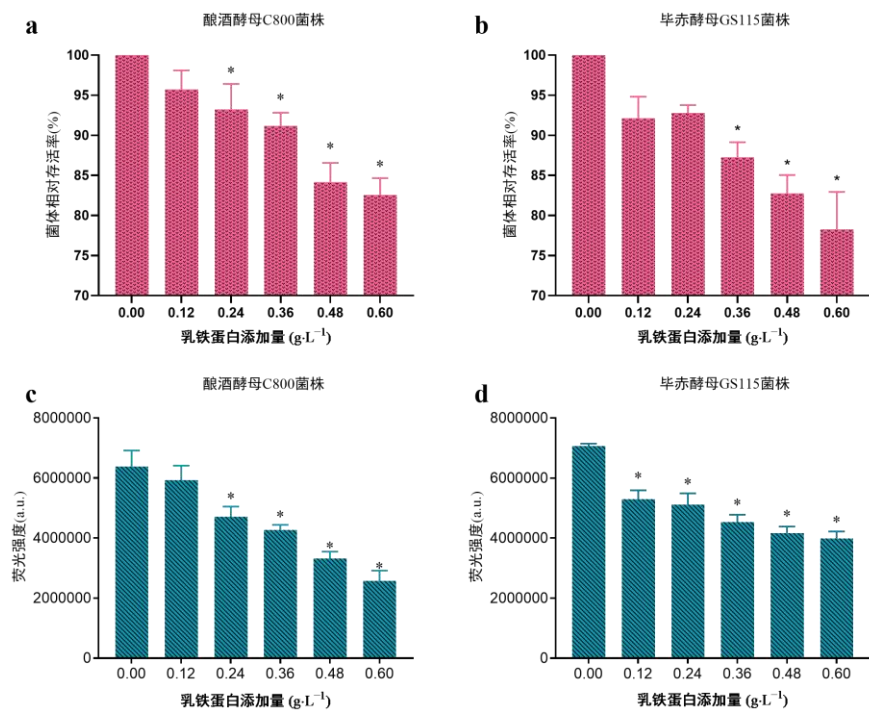


图 1 外源乳铁蛋白对酵母菌株活性的影响

Fig.1 Effect of exogenous lactoferrin on the activity of yeast strains

注：a、b 分别为酿酒酵母 C800 和毕赤酵母 GS115 的相对存活率；c、d 分别为两菌株的荧光强度。数据以 3 次独立实验的平均值±标准差表示；上标*表示与 0 g L⁻¹ 对照组相比差异显著 (P<0.05, 单因素方差分析, Dunnett 法)。

2.1.2 外源乳铁蛋白对酵母菌株细胞形态的影响

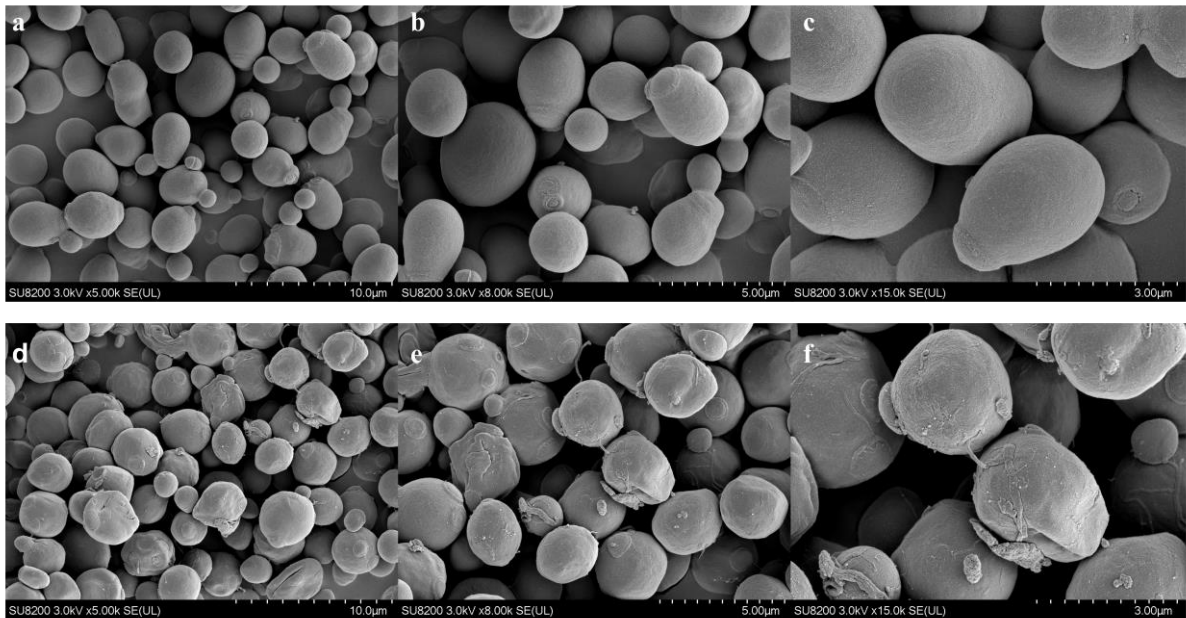


图 2 外源乳铁蛋白对酿酒酵母菌株表面形态的影响

Fig.2 Effects of exogenous lactoferrin on the surface morphology of *Saccharomyces cerevisiae*

注：a、b、c 为未经乳铁蛋白处理的不同放大倍数的酿酒酵母 C800 细胞；d、e、f 为经 0.60 g L⁻¹ 乳铁蛋白处理的不同放大倍数的酿酒酵母 C800 细胞。

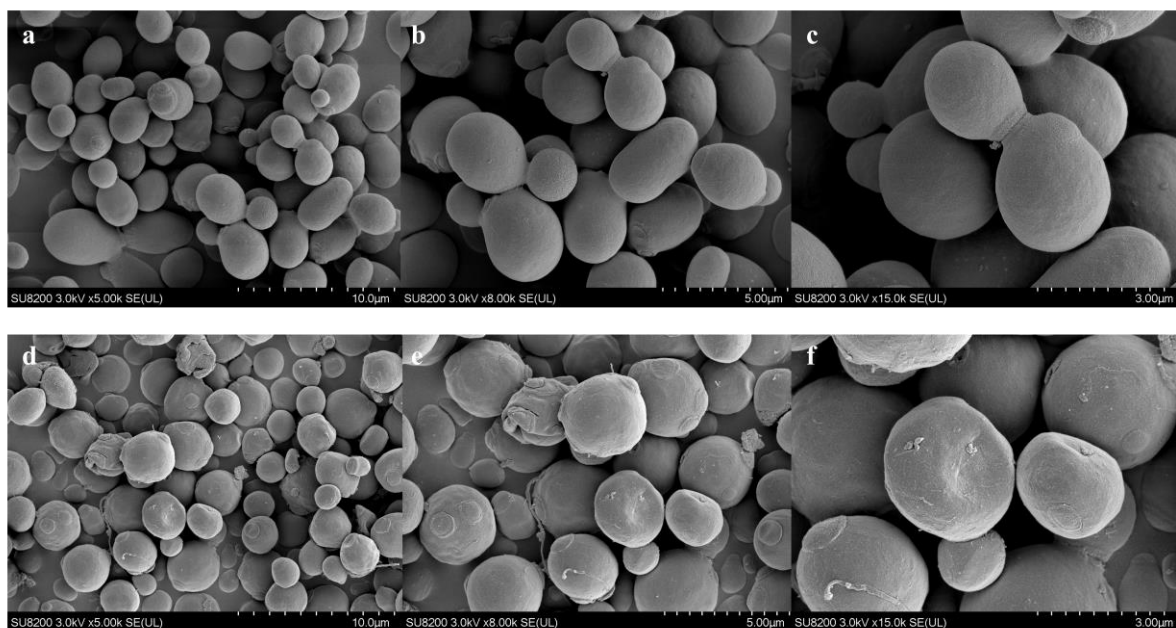


图3 外源乳铁蛋白对毕赤酵母菌株表面形态的影响

Fig.3 Effects of exogenous lactoferrin on the surface morphology of *Pichia pastoris*

注：a、b、c 为未经乳铁蛋白处理的不同放大倍数的毕赤酵母 GS115 细胞；d、e、f 为经 0.60 g L^{-1} 乳铁蛋白处理的不同放大倍数的毕赤酵母 GS115 细胞。

扫描电子显微镜观察结果显示，乳铁蛋白对酿酒酵母 C800 和毕赤酵母 GS115 的细胞表面形态均产生显著破坏，但两者在损伤模式上存在差异（图 2、3）。未经处理的酿酒酵母细胞形态饱满、表面光滑，而乳铁蛋白处理后的细胞则出现明显的凹陷、孔洞和膜结构剥离，并伴有胞内物质外泄（图 2）。相比之下，毕赤酵母在相同处理下未发生剧烈破裂，主要表现为表面粗糙化、泡状突起及局部融合变形（图 3）。

进一步结合分子机制分析，该形态学差异可能与乳铁蛋白对细胞膜结构及膜功能蛋白的调控作用相关。已有研究表明，乳铁蛋白可通过结合质膜 H^+ -ATP 酶（Pma1p）并破坏富含麦角固醇的脂筏微区，导致膜功能紊乱^[18]。在白色念珠菌中，乳铁蛋白处理同样诱导了细胞表面出现不规则肿胀和粗糙化^[23]，这表明其细胞膜结构遭受了广泛的物理损伤，本研究中酿酒酵母的膜完整性丧失也具有相似的超微结构损伤特征。此外，细胞表面的严重受损会导致胞内渗透压失衡和活性氧爆发，进而诱发前文所述的凋亡样细胞死亡程序。文献报道也指出乳铁蛋白可诱导酿酒酵母发生核染色质凝集及线粒体功能障碍^[25]。因此，结果揭示了乳铁蛋白对两种酵母的广谱膜损伤效应，以及不同酵母物种间存在的细微作用差异，但其具体的凋亡信号通路尚待结合流式细胞术及线粒体膜电位检测等手段进一步确证。

2.2 外源 FeCl_3 对乳铁蛋白抑菌效应的调控

外源 FeCl_3 对乳铁蛋白抑菌作用的调控效果及铁离子自身毒性结果见图 4。外源 FeCl_3 可缓解乳铁蛋白对酿酒酵母 C800 与毕赤酵母 GS115 的生长抑制，菌株生长响应呈现低浓度促进、高浓度抑制的剂量依赖性变化。由图 4a、c 可知，在含乳铁蛋白体系中，随 FeCl_3 浓度由 0 mmol L^{-1} 升至 10 mmol L^{-1} ，两株酵母 OD_{600} 值均出现上升：C800 由 4.37 升至 6.05，GS115 由 6.05 升至 6.58。表明低浓度铁离子可缓解乳铁蛋白诱导的铁匮乏胁迫，恢复酵母生长能力。当 FeCl_3 浓度升高至 20 mmol L^{-1} 及以上时，两株菌株生物量均快速下降，至 50 mmol L^{-1} 时，C800 由 6.05 降至 0.52，GS115 由 6.58 降至 0.52，提示高浓度铁离子对酵母具有显著毒性，这可能与过量游离铁通过芬顿反应产生活性氧引发的氧化损伤有关^[26,27]。

图 4b、4d 进一步细化了中等浓度区间（ $0 \sim 22 \text{ mmol L}^{-1}$ ）的生长响应：C800 在 $0 \sim 16 \text{ mmol L}^{-1}$ 范围内维持较高生长水平（ $\text{OD}_{600} \sim 5.0 \sim 6.0$ ）， 18 mmol L^{-1} 后显著下降；GS115 则在 $0 \sim 14 \text{ mmol L}^{-1}$ 区间逐步上升（ OD_{600} 由 3.19 升至 5.02）， $16 \sim 22 \text{ mmol L}^{-1}$ 持续下降。揭示了外源铁离子在低浓度下可能通过补充铁源逆转乳铁蛋白引发的铁缺乏胁迫，而在高浓度下则因诱导氧化应激或离子毒性抑制生长。

低浓度 FeCl_3 对生长抑制的缓解效应, 暗示铁竞争(铁剥夺)可能是乳铁蛋白致毒的重要机制之一, 这与脱铁乳铁蛋白通过整合胞外铁抑制真菌生长的经典报道相符^[28]。细胞膜系统的完整性高度依赖于铁依赖的核糖体合成与能量代谢过程, 外源补铁在恢复生长的同时, 理论上亦能缓解乳铁蛋白诱导的膜结构损伤, 表明细胞壁膜干扰可能是铁剥夺效应的下游次生结果, 二者存在紧密关联。然而, 本研究未设置仅添加 FeCl_3 (无乳铁蛋白) 的平行对照, 因此尚无法完全排除高浓度 FeCl_3 本身对细胞生长的促进或抑制作用, 也无法绝对界定铁剥夺在致毒机制中的独立贡献权重。两株酵母对铁补充的响应模式相似但耐受阈值存在差异, 推测与菌株铁稳态调控通路的物种差异性有关。鉴于高浓度 FeCl_3 的细胞毒性, 后续发酵工艺优化需严格控制铁离子浓度, 以平衡乳铁蛋白的铁剥夺效应与铁离子自身的氧化损伤风险。需说明的是, 外源添加模型主要捕捉乳铁蛋白的急性胞外毒性, 而内源表达模型则反映其持续分泌过程中的胞内应激响应, 二者为互补性研究策略, 下文将结合转录组数据进一步解析其共同机制。

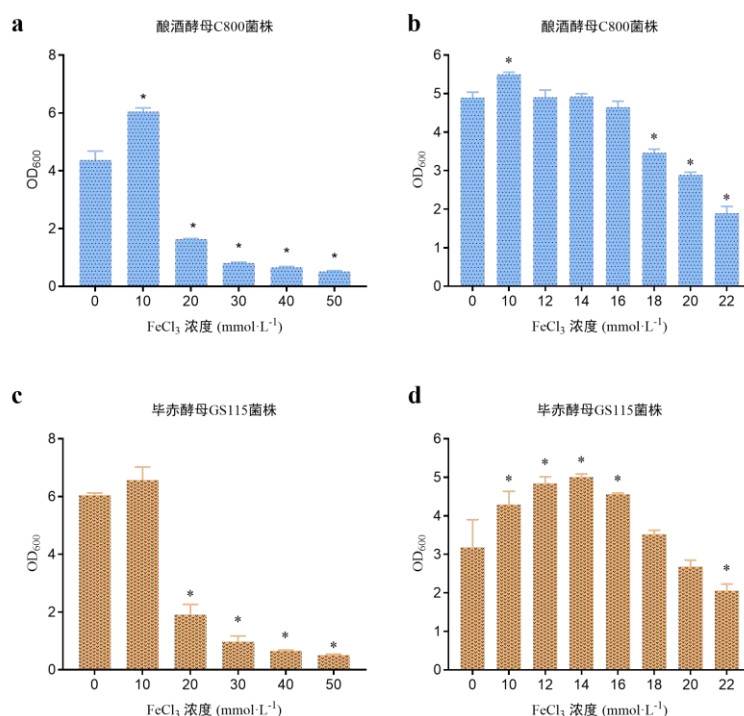


图 4 外源 FeCl_3 对乳铁蛋白诱导的酵母细胞生长抑制的缓解效应及剂量依赖性

Fig.4 Dose-dependent rescue of lactoferrin-induced growth inhibition in yeast by exogenous FeCl_3

注: a、b 分别为酿酒酵母 C800 在 0~50 mmol L⁻¹ 和 0~22 mmol L⁻¹ FeCl_3 浓度下的 OD₆₀₀ 值; c、d 分别为毕赤酵母 GS115 在相同浓度范围内的 OD₆₀₀ 值。数据以 3 次独立实验的平均值±标准差表示; 上标*表示与 0 mmol L⁻¹ 对照组相比差异显著 ($P < 0.05$, 单因素方差分析, Dunnett 法)。

2.3 转录组学揭示乳铁蛋白胁迫下的分子响应机制

为系统解析乳铁蛋白对酵母底盘的毒性机制, 基于文献报道的酵母胁迫转录响应动力学, 酿酒酵母在胁迫后 2~4 h 即出现显著差异表达^[20], 毕赤酵母 AOX1 系统在诱导 4~8 h 进入转录重编程高峰期, 而 24、48 h 细胞趋于适应, 转录扰动显著减弱, 不适宜作为转录组取样节点^[21]。本研究选取诱导后 4 h (早期宿主响应) 和 8 h (转录差异最大时段) 采集样品进行转录组测序, 以全面捕获乳铁蛋白胁迫下的分子适应机制。

2.3.1 酿酒酵母菌株对乳铁蛋白胁迫的响应机制

2.3.1.1 差异表达基因筛选

基于外源乳铁蛋白的毒性表型结果, 本研究采用转录组测序技术, 解析酿酒酵母对内源重组乳铁蛋白表达胁迫的分子响应特征。利用 edgeR 软件完成差异表达基因统计学分析, 并通过火山图展示基因表达变化规律(图 5)。

诱导表达 4 h 后, 共筛选出 447 个显著差异表达基因, 其中 74 个基因显著上调, 373 个基因显著下调(图 5a)。

诱导表达 8 h 后, 差异基因总数增至 567 个, 其中 104 个上调, 463 个下调 (图 5b)。随着诱导时间延长, 下调基因比例显著增加, 提示细胞在持续表达压力下转录组发生广泛且偏向性的抑制。表明内源表达乳铁蛋白对酿酒酵母造成了显著的转录组重构, 尤其表现为基因表达的全局性下调。这与前期外源添加实验中观察到的代谢活性降低、生长受抑等表型高度一致, 进一步支持重组蛋白在胞内积累或分泌过程对细胞构成实质性代谢负担的推断。该发现也为后续优化表达系统、缓解细胞应激提供了潜在的分子靶点。

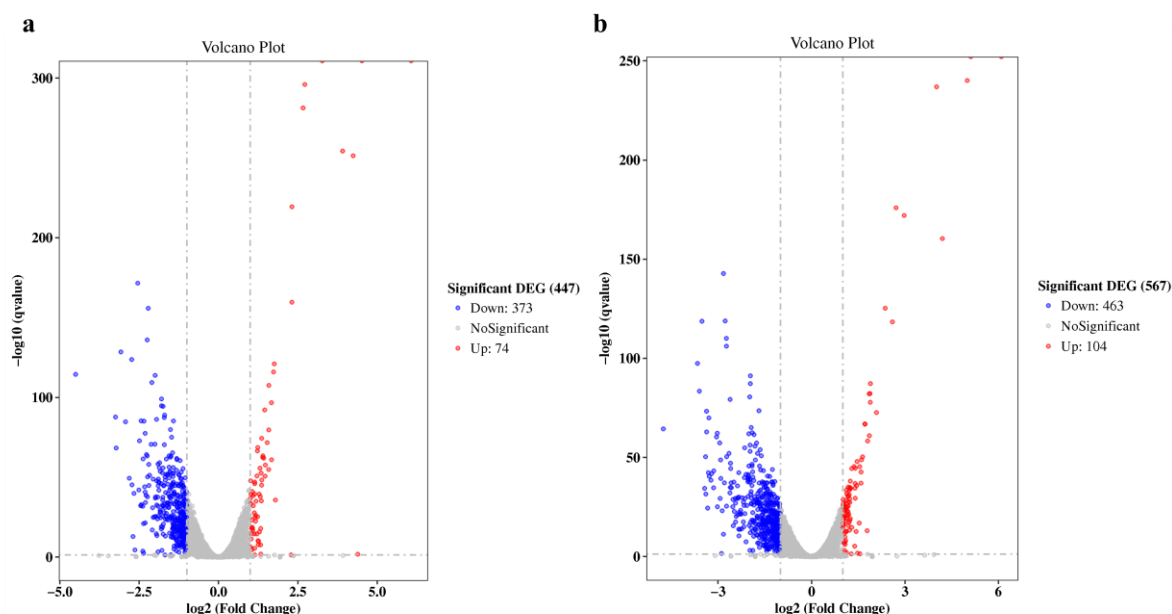


图 5 C800-BLF 菌株差异表达基因火山图

Fig.5 Volcano plot of differentially expressed genes in strain C800-BLF

注: 图 a 为诱导表达 4 h, 图 b 为诱导表达 8 h。横坐标表示差异倍数 $\log_2$ 值, 正值表示基因表达量上调, 负值表示基因表达量下调; 纵坐标表示 Q 值的负 $\log_{10}$ 值。左侧的蓝点表示下调表达的基因, 右侧的红点表示上调表达的基因, 而中间灰黑色点则表示未满足筛选条件的基因。

2.3.1.2 GO 富集分析

为了深入阐明酿酒酵母 C800-BLF 转录组重构的功能学意义, 本研究对差异表达基因进行了 GO 功能富集分析 (图 6)。对比诱导 4 h (图 6a) 与 8 h (图 6b) 的结果, 揭示了细胞响应胁迫的动态演变过程。在诱导初期 (4 h, 图 6a), 差异基因主要富集于分子功能层面的核酸结合和序列特异性 DNA 结合转录因子活性, 以及生物学过程层面的转录调控。蛋白表达胁迫初期, 酵母主要通过调控转录相关因子维持胞内稳态, 该变化与前述早期转录组波动特征相吻合。随着诱导时间延长至 8 h (图 6b), GO 富集谱发生了显著偏移, 细胞组分层面出现了显著变化, 差异基因大量富集于前肽体、核仁及核糖体等与核糖体生物合成相关的结构, 生物学过程亦出现核糖体生物合成通路富集。其中, 核糖体 RNA 加工与组装关键基因 *UTP15*、*NOP15* 均呈极显著下调 ($\log_2FC < -1.20$, $FDR < 0.001$), 提示核糖体生物合成过程受到明显抑制。

GO 富集分析显示, 酿酒酵母的应答具有明显时序性: 早期以转录调控紊乱为主要特征, 后期表现为核糖体合成功能受抑。这种从转录调控向蛋白合成抑制的时序演变, 可能是酵母应对异源蛋白表达负荷的典型策略。结合前期代谢活性下降的表型推测, 核糖体生物合成进程的大幅扰动叠加胞内重组蛋白的持续累积, 可能导致胞内代谢资源的严重竞争, 引发全局性能量危机。已有研究证实, 异源蛋白过量表达会干扰酵母核糖体合成与能量代谢通路, 诱发细胞代谢负荷过载^[29]。这提示乳铁蛋白的内源表达不仅干扰了转录起始, 还通过破坏蛋白质合成稳态对底盘细胞造成了持续性代谢胁迫。

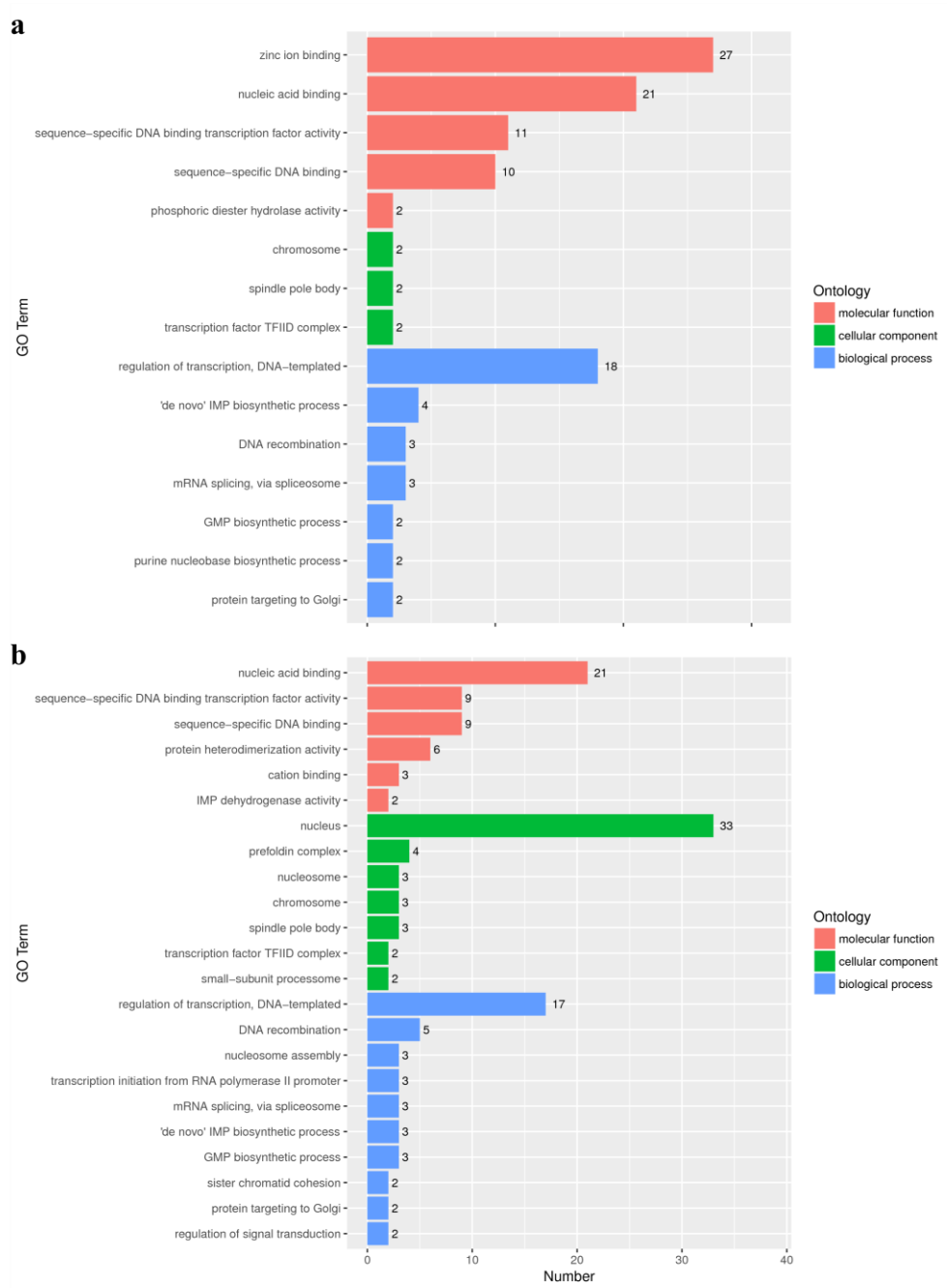


图 6 C800-BLF 菌株的差异表达基因 GO 功能分析结果

Fig.6 GO functional enrichment analysis of differentially expressed genes in strain C800-BLF

注：图 a 为诱导表达 4 h，图 b 为诱导表达 8 h。

2.3.1.3 KEGG 富集分析

在前文 GO 功能富集证实酵母胁迫应答存在转录紊乱—蛋白合成重塑时序演变的基础上，本研究进一步通过 KEGG 通路富集分析，解析差异基因在代谢网络中的调控特征（图 7）。结果表明，酿酒酵母对乳铁蛋白内源表达胁迫的通路响应具有明显的时间依赖性。诱导 4 h 时（图 7a），差异基因主要富集于信号转导、翻译及碳水化合物代谢等基础通路。其中，信号转导通路的显著富集与 GO 分析中早期转录因子活性的变化特征相互印证，说明酵母可通过重编程基础信号通路，感知并适配异源蛋白表达引发的初始胞内胁迫。诱导时间延长至 8 h 后（图 7b），菌株通路富集特征发生明显改变，差异基因大量聚集于碳水化合物代谢与能量代谢通路，且富集基因数量显著增加。结合 GO 分析结果可知，酵母在胁迫后期虽可调控核糖体生物合成以维持基础翻译水平，但 KEGG 通路结果证实，胞内核心碳代谢与能量代谢通路已受到广泛抑制，提示重组乳铁蛋白的持续累积引发了胞内代谢底物竞争

与能量供应不足。已有研究表明,酵母异源蛋白高效表达过程中,中心碳代谢通路易被竞争性抑制,是菌株适配外源基因表达负荷的典型代谢调控特征^[30]。与此相呼应,胁迫响应通路中的关键基因 *CUP1-2* (编码金属硫蛋白) 表达显著上调 ($\log_2FC=+1.11$, $FDR<0.05$), 这为能量代谢紊乱可能进一步导致的氧化还原失衡及金属离子稳态扰动提供了具体的基因标志。同时,囊泡转运基因 *VTI1* ($\log_2FC=-1.88$, $FDR<0.001$) 的下调,提示重组蛋白大量累积可造成酵母分泌转运系统功能异常,该结果与异源蛋白过表达易导致酵母囊泡转运饱和、形成分泌瓶颈的研究结论相符^[31]。这些关键差异表达基因共同构成了酿酒酵母应对乳铁蛋白表达压力的核心分子响应网络。

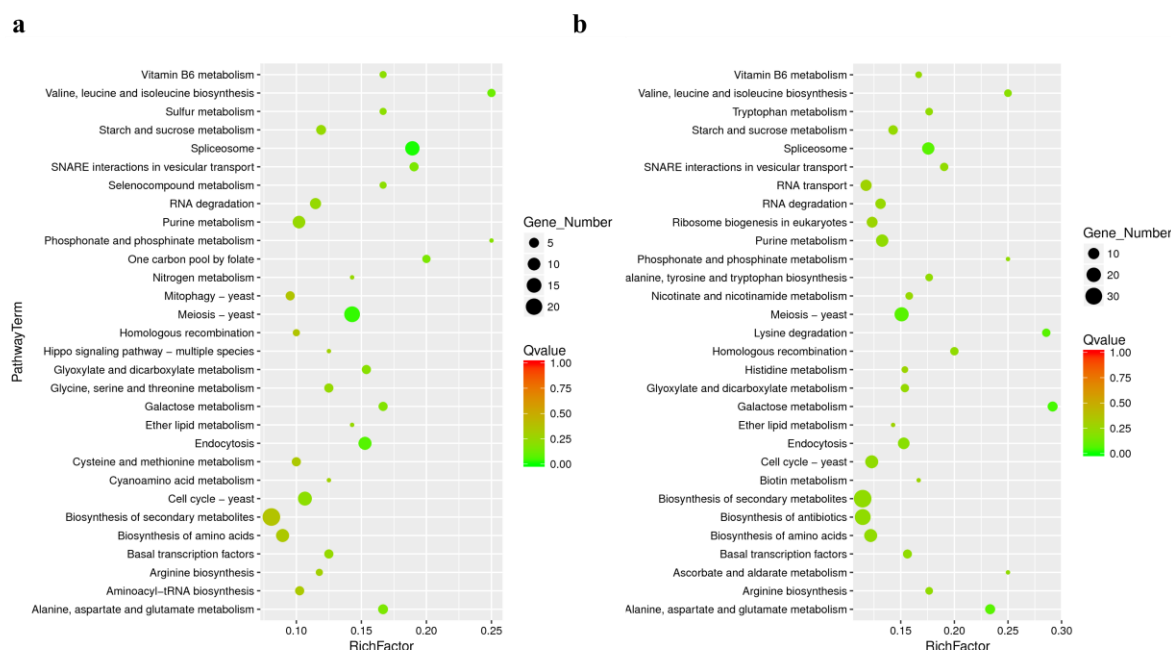


图7 C800-BLF 菌株的差异表达基因 KEGG 功能分析结果

Fig.7 KEGG functional enrichment analysis of differentially expressed genes in strain C800-BLF

注: 图 a 为诱导表达 4 h, 图 b 为诱导表达 8 h。

这一结果与前期细胞代谢活性下降的表型高度吻合。结合前文 GO 分析中观察到的核糖体生物合成激活, 我们推测: 尽管细胞试图通过增强核糖体合成来代偿乳铁蛋白表达压力, 但这一过程消耗了大量能量, 导致核心的碳源与能量代谢通路不堪重负。KEGG 分析从代谢网络层面证实, 重组乳铁蛋白的内源表达引发了严重的代谢资源竞争, 这是造成底盘细胞生理性能衰退的关键原因。

2.3.2 毕赤酵母菌株对乳铁蛋白胁迫的响应机制

2.3.2.1 差异表达基因筛选

同样, 为深入解析毕赤酵母 GS115-BLF 应对乳铁蛋白表达压力的响应机制, 本研究对其在诱导表达 4 h 与 8 h 后的转录组进行了测序分析。结果显示 (图 8), 毕赤酵母在异源表达乳铁蛋白过程中呈现出高强度、广覆盖的转录重编程特征。诱导 4 h 共筛选出 562 个差异表达基因, 其中上调 64 个、下调 498 个; 至诱导 8 h, 差异表达基因总数激增至 761 个 (上调 220 个、下调 541 个)。与酿酒酵母 C800 的横向对比揭示了显著的宿主特异性差异: 首先, 在扰动强度上, GS115 的差异表达基因总数显著高于 C800 同期水平, 表明毕赤酵母对乳铁蛋白表达的转录应激敏感性更强。其次, 在调控趋向上, GS115 的上调基因增幅远超 C800, 显示出其更倾向于通过大规模激活辅助分泌与应激响应通路来克服外源蛋白的折叠与分泌压力; 同时, 其下调基因始终维持在高位, 反映出菌体被迫进行深刻的代谢资源重分配, 即通过抑制自身生长代谢以优先保障乳铁蛋白的合成。

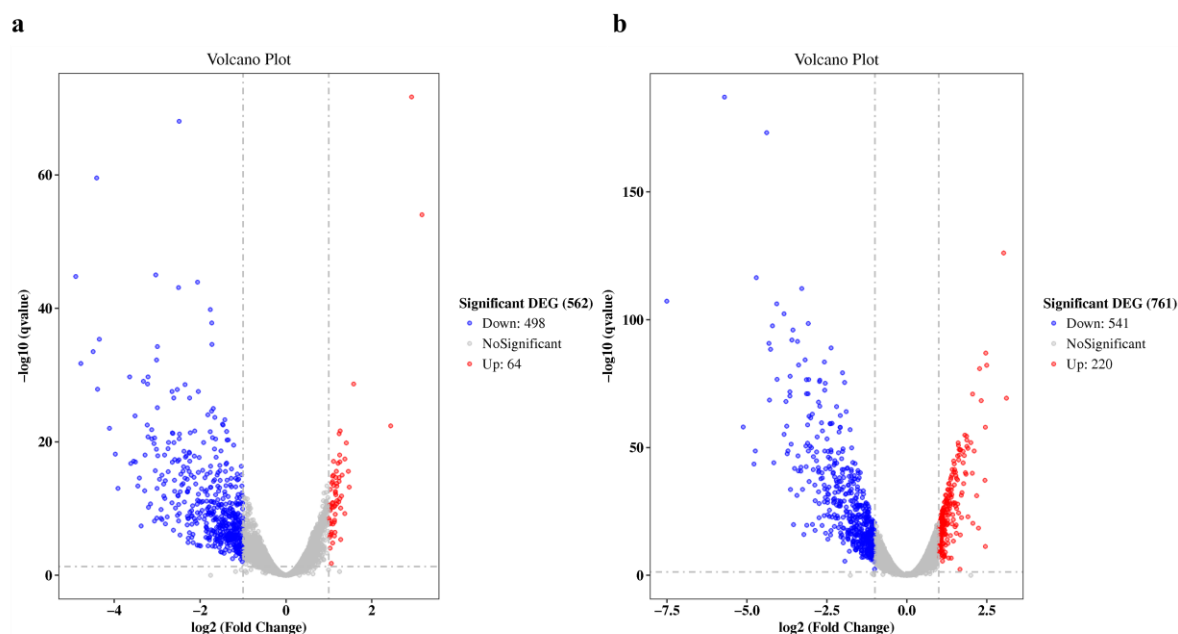


图8 GS115-BLF 菌株差异表达基因火山图

Fig.8 Volcano plot of differentially expressed genes in strain GS115-BLF

注：图 a 为诱导表达 4 h，图 b 为诱导表达 8 h。横坐标表示差异倍数 $\log_2$ 值，正值表示基因表达量上调，负值表示基因表达量下调；纵坐标表示 Q 值的负 $\log_{10}$ 值。左侧的蓝点表示下调表达的基因，右侧的红点表示上调表达的基因，而中间灰黑色点则表示未满足筛选条件的基因。

2.3.2.2 GO 富集分析

为了深入阐明毕赤酵母 GS115-BLF 转录组重构的功能学意义，并对比其与酿酒酵母应激策略的根本差异，本研究进一步对差异表达基因进行了 GO 功能富集分析（图 9）。结果显示，两株酵母响应乳铁蛋白异源表达胁迫的时序调控模式存在显著差异。诱导 4 h 时（图 9a），差异基因主要富集于核酸结合与转录调控等核内过程，这与酿酒酵母早期的响应类似，表明细胞初期均通过广泛的转录重编程以适应压力。然而，至诱导 8 h（图 9b），两株酵母的应答通路出现明显分化：毕赤酵母的响应重心并未像酿酒酵母那样转向核糖体生物合成，而是演变为铁离子/血红素结合及 DNA 复制/细胞分裂。这一独特的富集谱暗示，随着胁迫持续，毕赤酵母被迫动用深层能量代谢（铁/血红素关联线粒体呼吸链）与基因组稳定性维持机制来应对危机。

铁离子结合通路的富集提示乳铁蛋白的表达可能深度干扰了宿主的铁稳态，转录组数据为此提供了基因证据。一方面，编码低亲和力铁转运蛋白的基因 *FTR1*（毕赤酵母同源基因， $\log_2\text{FC}=+2.47$ ）表达被极显著上调，而另一个同家族铁转运调控基因 *CCC1* 则被抑制。该差异化调控模式反映了细胞在应对乳铁蛋白表达导致的潜在铁剥夺压力时，其铁稳态反馈系统已发生紊乱。更关键的是，编码黄素血红蛋白（清除活性氮物质）的基因 *YHB1* 被同步显著诱导（ $\log_2\text{FC}=+1.49$ ），证实乳铁蛋白异源表达可诱发毕赤酵母胞内氧化还原失衡。

此外，核糖体组装核心基因 *UTP15*（编码 66S 核糖体前体组分， $\log_2\text{FC}=-5.70$ ）呈极显著下调，从分子层面说明毕赤酵母可通过抑制自身核糖体生物合成，重分配胞内翻译资源，优先保障异源乳铁蛋白的合成与折叠。这种策略并非被动损伤，而是宿主通过抑制核糖体合成来重分配翻译资源，以优先保障外源蛋白折叠的主动适应过程^[32]。这种从表观转录调控向核心代谢与遗传稳态防御升级的动态演变，反映了毕赤酵母虽然能够承受比酿酒酵母更剧烈的代谢重塑，但其代价是透支宿主的铁代谢平衡、引发氧化应激并扰乱细胞周期。这种强激活、深抑制的双向调节机制，解释了毕赤酵母在乳铁蛋白表达上通常能获得更高产量的原因，同时也揭示了其宿主细胞需承担更显著的生理代谢损伤。

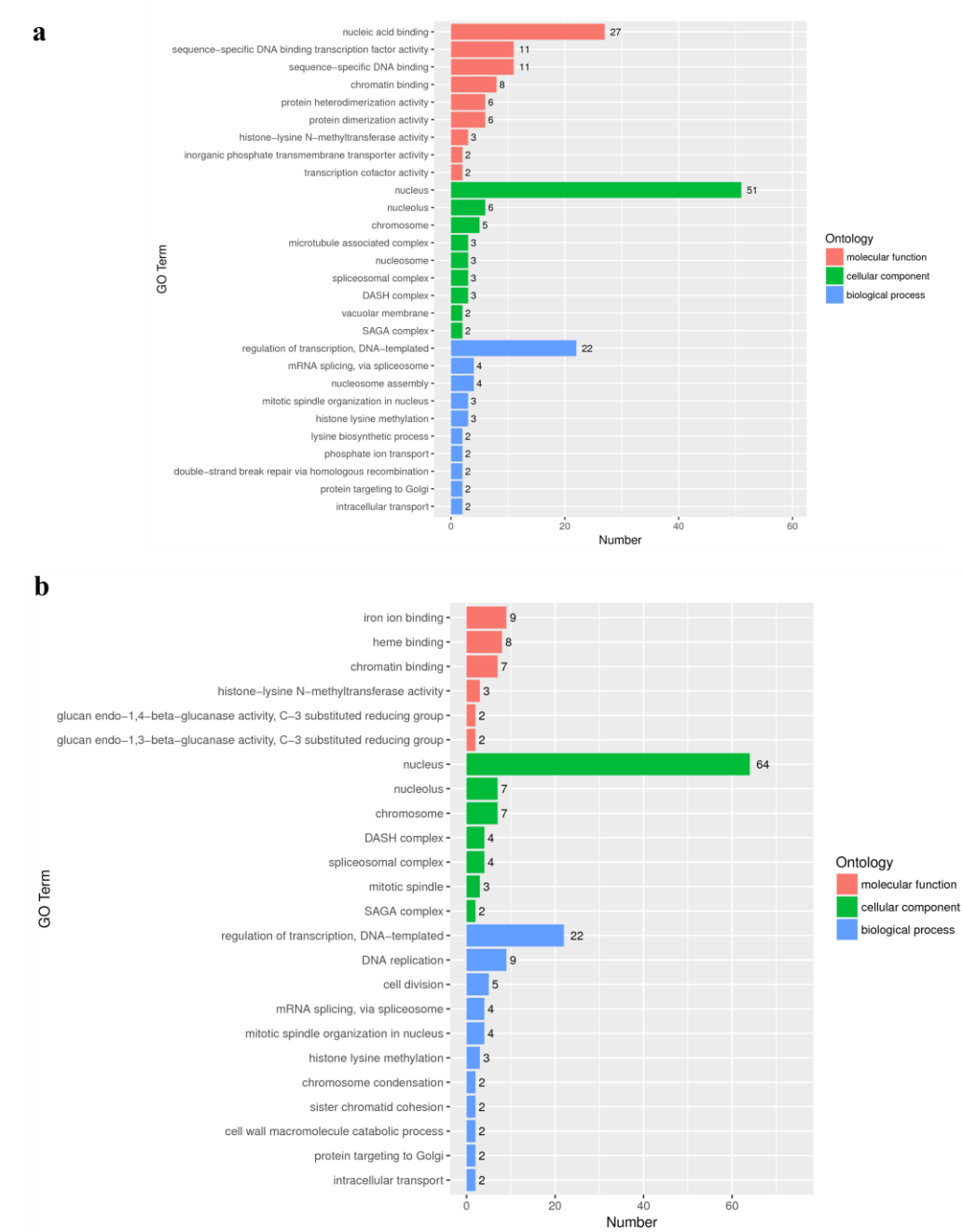


图9 GS115-BLF 菌株的差异表达基因 GO 功能分析结果

Fig.9 GO functional enrichment analysis of differentially expressed genes in strain GS115-BLF

注：图 a 为诱导表达 4 h，图 b 为诱导表达 8 h。

2.3.2.3 KEGG 富集分析

基于 KEGG 通路富集分析（图 10），毕赤酵母 GS115-BLF 在异源表达乳铁蛋白过程中呈现出与酿酒酵母不同的时序性代谢重塑策略。诱导 4 h（图 10a）时，剪接体与核糖体通路的富集，以及 Hsp40/Hsp70（ $\log_2FC=+2.06$ ）等分子伴侣的显著诱导，表明细胞迅速启动了内质网质量控制机制以应对新生肽链的折叠压力。至诱导 8 h（图 10b），代谢重心向 MAPK 信号通路及戊糖代谢迁移，这一现象与近期在高产乳铁蛋白工程菌中的报道一致，被认为是细胞在持续能量压力下被迫进行的代谢网络重塑^[12,33]。在此阶段，负责动员储备碳源的酸型海藻糖酶基因（ $\log_2FC=+1.83$ ）被特异性上调，这表明细胞为应对持续的能量危机，已启动应急的碳代谢支路。这种从“翻译质量控制”向“生存防御”的时序性演变，反映了异源乳铁蛋白高产表达过程中宿主细胞承担的代谢负荷。这一“高产高耗”的生理代价在近期利用强启动子与高拷贝策略实现乳铁蛋白克级表达的研究中得到了印证^[34]。

值得注意的是，尽管两菌株均启动了上述应激响应，但其基础表达水平仍然较低：诱导 8 h 时 C800-BLF 与 GS115-BLF 的胞外乳铁蛋白产量分别仅约 1 mg L⁻¹ 与 3 mg L⁻¹，与宿主胁迫响应特征一致。为直观呈现两种底盘在胁迫响应模式上的本质差异，并明确其各自的关键限制环节，特将核心转录特征归纳如表 2 所示。

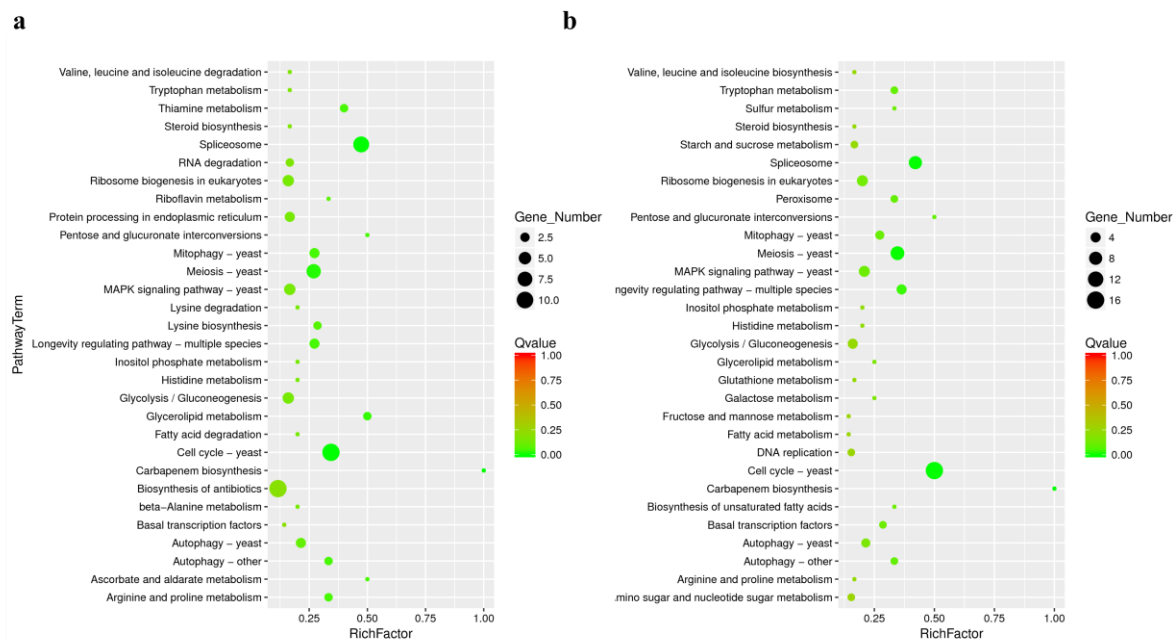


图 10 GS115-BLF 菌株的差异表达基因 KEGG 功能分析结果

Fig.10 KEGG functional enrichment analysis of differentially expressed genes in strain GS115-BLF

注：图 a 为诱导表达 4 h，图 b 为诱导表达 8 h。

表 2 酿酒酵母与毕赤酵母响应乳铁蛋白胁迫的转录特征比较及工程启示

Table 2 Comparative transcriptional profiles of *S. cerevisiae* and *P. pastoris* under lactoferrin stress and implications for chassis engineering

特征维度	酿酒酵母 C800-BLF	毕赤酵母 GS115-BLF	工程启示
整体响应强度	中等（567 DEGs）	剧烈（761 DEGs）	诱导强度需差异化设计
调控策略	全局抑制（↓81.7%）	双向调节（应激↑，生长↓）	酵母选择应匹配工艺目标
铁稳态	温和	<i>FTR1</i> ↑, <i>YHB1</i> ↑	毕赤酵母需重点优化铁/氧化平衡
翻译资源	<i>UTP15</i> , <i>NOP15</i> ↓	<i>UTP15</i> ↓	均需缓解核糖体装配压力
蛋白分泌	<i>VTI1</i> ↓（转运受限）	<i>Hsp40</i> / <i>Hsp70</i> ↑（折叠激活）	酿酒酵母重点疏通分泌，毕赤酵母强化折叠
碳代谢	能量代谢受抑	应急碳代谢激活	毕赤酵母可开发动态碳源调控策略

注：↓表示下调，↑表示上调。

2.4 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为进一步验证转录组测序结果的可靠性，选取两类酵母中的几种差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。如图 11 所示，qRT-PCR 检测所得基因表达变化趋势与转录组测序结果总体一致。在酿酒酵母 C800-BLF 中，核糖体组装相关基因 *UTP15* 与 *NOP15* 的表达水平在诱导 4 h 分别下调至对照（0 h）的 0.72±0.06 和 0.68±0.05 倍，至诱导 8 h 进一步降至 0.41±0.03 和 0.39±0.04 倍；可能参与金属离子稳态调控的 *CUP1-2* 在诱导 8 h 上调至 2.21±0.12 倍；囊泡转运相关基因 *VTI1* 在诱导 8 h 的表达水平降至 0.25±0.03 倍，与上述转录组分析中分泌系统功能变化相呼应。毕赤酵母 GS115-BLF 的基因表达响应更为显著：铁转运蛋白编码基因 *FTR1* 在诱导 4 h 上调至 3.12±0.15 倍，诱导 8 h 进一步升至 5.62±0.28 倍，支持乳铁蛋白可能诱发铁剥夺胁迫的推测；黄素血红蛋白编码基因 *YHB1* 在诱导 8 h 上调至 2.78±0.14 倍，分子伴侣基因 *HSP70* 在诱导 4 h 即显著上调至 4.08±0.21 倍，提示宿主启动了针对氧化应激与蛋白折叠压力的防御机制；而核糖体组装基因 *UTP15* 在诱导 8 h 的表达量仅为 0 h 的 0.021±0.003 倍，其显著下

调趋势与转录组数据高度吻合，可能反映毕赤酵母在胁迫条件下的代谢重塑特征。相关性分析表明，qRT-PCR 所得基因表达 $\log_2FC$ 值与转录组数据的决定系数 R^2 分别为 0.93(酿酒酵母 C800-BLF)和 0.91(毕赤酵母 GS115-BLF)，表明本次转录组测序数据具有较高的可靠性。

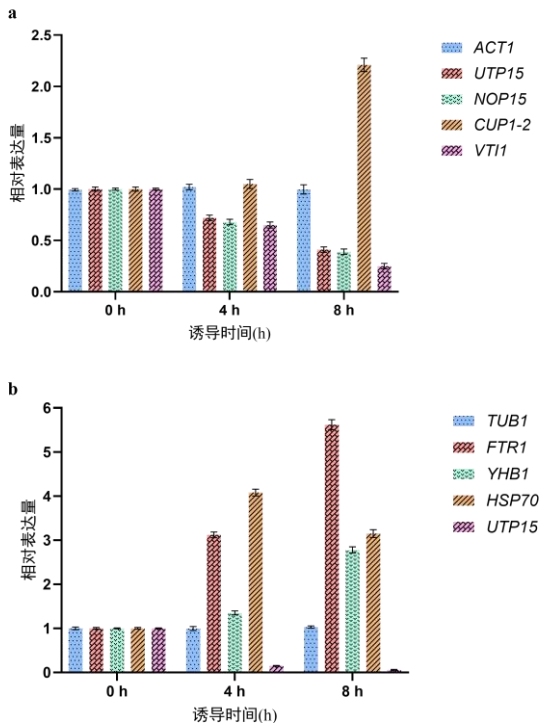


图 11 关键差异基因的 qRT-PCR 验证结果

Fig.11 Validation of key differentially expressed genes by qRT-PCR

注：a 为酿酒酵母 C800-BLF 在诱导 0 h、4 h、8 h 的相对表达量；b 为毕赤酵母 GS115-BLF 在诱导 0 h、4 h、8 h 的相对表达量。内参基因分别为 *ACT1*（酿酒酵母）和 *TUB1*（毕赤酵母），数据为 3 个生物学重复的均值±标准差。

3 结论

外源乳铁蛋白对酿酒酵母和毕赤酵母呈剂量依赖性抑制，可致细胞膜结构损伤及代谢活性下降；低浓度外源 $FeCl_3$ 可显著拮抗该抑制效应，提示铁代谢扰动是乳铁蛋白致毒的重要胁迫来源之一。

内源表达乳铁蛋白诱导酿酒酵母呈全局转录抑制，诱导 8 h 差异基因下调占比达 81.7%，核糖体 RNA 加工基因 *UTP15*、*NOP15* 及能量代谢通路同步下调，细胞通过生长停滞策略应对代谢负荷。

毕赤酵母对乳铁蛋白胁迫的转录响应更为剧烈，诱导 8 h 差异基因达 761 个，铁转运蛋白基因 *FTR1* ($\log_2FC=+2.47$) 与黄素血红蛋白基因 *YHB1* ($\log_2FC=+1.49$) 显著上调，同时分子伴侣与应急碳代谢通路激活，呈现深度代谢重塑特征。

参考文献

[1] 周雯婧,张丽娜,彭小雨,等.不同乳源乳铁蛋白抗氧化与抗菌活性比较研究[J].中国乳品工业,2025,53(11):14-21.

[2] 陈卫.我国婴幼儿配方乳品新型核心配料的现状与发展趋势[J].中国农业科技导报(中英文),2025,27(12):123-133.

[3] CUTONE A, MUSCI, G, BONACCORSI DI PATTI M.C. Lactoferrin, the moonlighting protein of innate immunity [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24: 15888.

[4] KROLITZKI E, SCHWAMINGER S P, PAGEL M, et al. Current practices with commercial scale bovine lactoferrin production and alternative approaches [J]. International Dairy Journal, 2022, 126: 105263.

[5] 智研咨询.2025 年中国乳铁蛋白行业整体发展形势分析 [EB/OL]. 北京:智研咨询集团,2025[2025-09-16]. <https://www.chyxx.com/lindustry/1226629.html>

- [6] 刘龙.功能食品蛋白生物制造的发展现状与挑战[J].食品科学技术学报,2025,43(4):1-14.
- [7] LI Y, LI Z, MAO S Y, et al. Systematic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* for efficient bovine lactoferrin production [J]. Food Bioscience, 2026, 78: 108534.
- [8] 张予婷,李洋,武耀康,等.枯草芽孢杆菌中人乳铁蛋白的表达与分泌[J].生物工程学报,2024,40(6):1895-1908.
- [9] CHEN HL, LAI YW, CHEN CS, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* expressing human lactoferrin elevates antibacterial activity in the gastrointestinal tract [J]. Biometals, 2010, 23(3): 543-554.
- [10] 于慧,姜艳平,崔文,等.猪乳铁蛋白在 4 种重组乳杆菌中的表达及抑菌活性比较[J].生物工程学报,2014,30(9):1372-1380.
- [11] 张嘉欣,梁书利.人乳铁蛋白在毕赤酵母中的高效分泌表达[J].现代食品科技,2025,41(5):79-88.
- [12] LV X Q, CUI S X, CHEN J, et al. Cascaded de novo biosynthesis of lacto-proteins from CO₂ by engineered *Pichia pastoris* [J]. Green Chemistry, 2023, 25(14): 5460-5469.
- [13] 李佳佳,吴晓文,韩蓓,等.重组人乳铁蛋白在酵母中的异源表达及其制备方法:中国,CN119776401A[P].2025-04-08.
- [14] LIU K, TONG Z, ZHANG X Q, et al. A Review: development of a synthetic lactoferrin biological system [J]. BioDesign Research, 2024, 6: 0040.
- [15] TANG Y T, ZENG W Z, CHEN J, et al. Multi-strategy engineering of *Aspergillus niger* for high-level production of recombinant human lactoferrin [J]. Food Bioscience, 2026, 78: 108491.
- [16] MORADAS-FERREIRA P, COSTA V. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death [J]. Redox Report, 2000, 5(5): 277-285.
- [17] KARBALAEI M, REZAEI S A, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 235: 5867-5881.
- [18] CÁTIA S T, ANDRÉS M T, CHAVES S R, et al. Lactoferrin perturbs lipid rafts and requires integrity of Pma1p-lipid rafts association to exert its antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 171: 343-357.
- [19] 安佳星,龙秀锋,伍时华,等.对羟基苯甲醛和阿魏酸对酿酒酵母理化特性的影响[J].食品科学,2021,42(22):125-130.
- [20] GASCH A P, SPELLMAN P T, KAO C M, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes [J]. Molecular Biology of the Cell, 2000, 11(12): 4241-4257.
- [21] WRIESSNEGGER T, LEITNER E, MÜLLER M, et al. Transcriptome analysis of *Pichia pastoris* during recombinant protein production reveals a 'hibernation' response and global repression of carbon catabolic genes [J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 147.
- [22] ANDRÉS M T, ZALDIVAR M A, FIERRO J F. Antifungal mechanism of action of lactoferrin: identification of H⁺-ATPase (P_{3A}-Type) as a new apoptotic-cell membrane receptor [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(7): 4206-4216.
- [23] FERNANDES K E, WEEKS K, CARTER D A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(5): e02284-19.
- [24] FENG T T, YU H W, YE L D. Mechanisms and strategies for engineering oxidative stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chem & Bio Engineering, 2025, 2: 409-422.
- [25] ZALDÍVAR A, ANDRÉS, M.T., REGO, A, et al. Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Apoptosis, 2015, 21(2): 163-173.
- [26] 魏波,考桂兰,张素青,等.铁离子对果酒酵母菌生长影响的初步研究[J].畜牧与饲料科学,2008,5:28-29.
- [27] 刘欢,杨宇纯,刘超,等.酿酒酵母氧化胁迫应答反应机制[J].生物资源,2019,41(4):298-304.
- [28] DŁUGOSZ A, WRÓBLEWSKA J, KOŁACZYK P, et al. The role of lactoferrin in combating *Candida* spp. infections through regulation of oxidative stress, immune response, and nutritional support in women and newborns [J]. Molecules, 2025, 30: 2416.
- [29] LI F R, CHEN Y, WANG Y Y, et al. Improving recombinant protein production by yeast through genome-scale modeling using proteome constraints [J]. Nature Communications, 2022, 13: 2969.
- [30] CHEN X, LI F R, OTTO M, et al. Model-assisted CRISPRi/a library screening reveals central carbon metabolic targets for enhanced recombinant protein production in yeast [J]. Metabolic Engineering, 2025, 88: 1-13.
- [31] ZHAO M R, MA J F, ZHANG L, et al. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*. [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23: 32.

- [32] STAUDACHER J, REBNEGGER C, DOHNAL T, et al. Going beyond the limit: Increasing global translation activity leads to increased productivity of recombinant secreted proteins in *Pichia pastoris* [J]. Metabolic Engineering, 2022, 70: 181-195.
- [33] 刘启,钱芷兰,宋丽丽,等.巴斯德毕赤酵母底盘细胞的工程化改造及应用[J].合成生物学,2022,3(6):1150-1173.
- [34] YEN C C, WU P Y, YANG H O, et al. Production of bioactive porcine lactoferrin through a novel glucose-Inducible expression system in *Pichia pastoris* unveiling antimicrobial and anticancer functionalities [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25: 1818.