

## 炼乳中耐高渗酵母菌的筛选、鉴定及转录组学分析

方若思<sup>1</sup>, 陈唐超<sup>1</sup>, 施川川<sup>2</sup>, 肖功年<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江科技大学生物与化学工程学院 杭州 310023

<sup>2</sup>熊猫乳品集团股份有限公司 浙江温州 325400)

**摘要** 目的:研究高糖胁迫条件下近平滑假丝酵母差异基因的表达水平及其应激响应机制。方法:以贮藏过程中的染菌炼乳为对象,通过平板筛选及 18s DNA 测序对其中的酵母进行分离、鉴定及特性研究,并提取菌株的总 RNA,构建 cDNA 文库。采用转录组测序,并通过实时荧光定量 PCR 验证分析差异表达基因。结果:该酵母为近平滑假丝酵母,其最适温度为 35 ℃,最适 pH 值为 8,当葡萄糖含量为 50%时,仍可以缓慢生长。发酵液中的主要产物为山梨糖醇,产量可达 41.06 g/L。通过转录组学分析共检测到 2 066 个显著性差异基因,其中显著上调 993 个,显著下调 1 073 个。与热激蛋白(Hsp70、Hsp90)、氨基酸转运、糖原转运、糖酵解和乙醇脱氢酶相关的基因显著下调,而与氨基酸透过酶、糖原合成以及某些具有渗透压保护作用的氨基酸合成(如谷氨酸、脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸等)相关的基因显著上调。结论:假丝酵母通过合成某些糖类或氨基酸(如脯氨酸、甘氨酸和谷氨酸等)来影响应激,提高逆境胁迫的性能。

**关键词** 炼乳; 近平滑假丝酵母; 分离和鉴定; 转录组学分析

**文章编号** 1009-7848(2026)01-0329-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.029

炼乳是一种浓缩乳制品,其贮存期长,经济效益高。随着人们生活水平的提高,炼乳的应用范围不断扩大,已从传统的甜味餐饮配料,扩展到应用于酸乳、巧克力、烘焙、糕点、冷饮、饮料等领域。炼乳属于高糖产品,其环境渗透压很高,然而,在炼乳贮藏过程中,有时也会出现染菌腐败的情况。大多数细菌都难以耐受高渗环境,而某一类酵母菌却通过代谢产生糖醇、甘油等物质在其中生长繁殖。如袁野等<sup>[1]</sup>发现某种耐高渗酵母菌可以产生糖醇。蔡莉等<sup>[2]</sup>将奥默柯达酵母菌分离出来,这种酵母菌可在代谢过程中生成阿拉伯糖醇。Krahulec 等<sup>[3]</sup>研究发现酿酒酵母可将木糖转化成木糖醇。Kobayashi 等<sup>[4]</sup>研究发现,在赤藓糖醇还原酶的调控下,类丝孢酵母可在高渗环境中生成赤藓糖醇。

转录组学是研究某一生理条件下微生物转录组的一种分析手段。将转录组学测序技术应用于微生物胁迫应激机制研究,可以探究环境的改变对微生物基因表达的影响。如杨利博<sup>[5]</sup>对高渗条件下解脂耶氏酵母的多个代谢途径的 17 个相关基

因的表达进行实时定量 PCR 分析,发现糖异生途径、三羧酸循环及糖酵解的关键基因出现明显差异。梅运军等<sup>[6]</sup>探究极端嗜盐古菌在不同盐浓度下基因表达量的变化,发现菌株主要通过调节与氨基酸代谢、能量代谢相关的基因表达来适应不同的高盐环境。柳晓东<sup>[7]</sup>对高盐条件下慢生根瘤菌的转录组数据进行分析,发现与脯氨酸和甘氨酸转运有关的操纵子表达量明显上调。陈英<sup>[8]</sup>对 40%葡萄糖压力下菌株的表达差异基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集,发现其差异表达基因主要集中在核糖体、氧化磷酸化、内质网蛋白加工过程、硫胺素代谢、吞噬体和胞吞作用、蛋白输出、糖代谢途径和丝裂原活化蛋白激酶途径。不难看出,在探讨高渗环境下微生物基因的表达中,转录组学测序是一种高效、快捷的研究方法。

目前,国内外对酵母菌耐高糖机制的研究较少,炼乳中耐高渗酵母菌的研究暂未见报道。本文对染菌炼乳中的耐高渗酵母菌进行分离、鉴定及特性研究,并采用转录组学手段研究其应激反应,从基因表达水平阐释耐高渗酵母的高糖耐受机制,为后期探讨其代谢途径及关键基因的调控机理提供参考。

收稿日期: 2025-01-05

基金项目: 温州市山区五县揭榜挂帅项目(ZNF2023009)

第一作者: 方若思,女,博士,副教授

通信作者: 肖功年 E-mail: xiaogongnian@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

完达山全脂乳粉,北大荒完达山乳业有限公司。葡萄糖、蔗糖、酵母粉、琼脂、酵母菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、总 RNA 提取试剂(Trizol)、cDNA 合成试剂盒(Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase,AMV RT)、real-time PCR 试剂盒(SYBR<sup>®</sup> Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit II),生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

SpectraMax iD3 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Waters 2695 高效液相色谱仪,美国 WATERS 公司;SPX-100B-D 振荡培养箱,上海博讯实业有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣仪器有限责任公司;Illumina HiSeq X Ten 测序仪,美国 Illumina 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 炼乳的制作 将乳粉与水(按质量比 1:2)在 55 °C 下溶解,蔗糖与水(按质量比 6.6:10)在 65 °C 下溶解,混合后使用均质机高速剪切 15 min;随后水浴加热至 80 °C,保持 30 min;采用旋转蒸发器真空浓缩。炼乳成品置于常温下避光保存。

1.3.2 耐高渗酵母的分离与筛选 将 3 个月贮藏期间染菌的炼乳样品用无菌水稀释至 10<sup>6</sup> 倍后,涂布于耐高糖培养基平板上,30 °C 下培养 2 d。

1.3.3 耐高渗酵母的分子学鉴定 采用酵母菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取 DNA,通用引物如下:ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',PCR 程序设定为 98 °C 预变性 5 min,98 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 40 s,反应 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,于安徽通用生物有限公司完成测序。

1.3.4 耐高渗酵母生长特性研究 分别在不同温度(25,30,35,40 °C)、不同 pH 值(3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0)、不同含糖量(2%,10%,20%,30%,40%,50%,60%)、不同含盐量(0%,2%,4%,6%,8%,10%,12%)下培养 36 h 后取样,检测 OD<sub>600nm</sub>,分析其生长特性。

1.3.5 耐高渗酵母发酵特性研究 取 5 mL 菌液接种于发酵培养基中,30 °C 150 r/min 摇瓶培养 7

d,收集上清液进行高效液相色谱分析检测。以 0.5 mmol/L 硫酸作为流动相,流速 0.6 mL/min,柱温 35 °C,上样量 10 μL,采用示差检测器检测。

1.3.6 转录组学分析 选取正常(YPD 培养基)和高糖条件(YPD 培养基+40%葡萄糖)下的酵母菌培养 24 h,4 °C 条件下 8 000×g 离心 5 min 去上清收取菌体,采用 Trizol 法提取总 RNA 进行转录组学对比分析。通过 fastp 进行原始数据过滤,采用 hisat2 将过滤后的数据比对到基因组序列上。基于负二项分布原理,采用 DEseq2 鉴定不同样品间的差异表达基因(Differentially expression genes, DEGs)<sup>[9]</sup>。随后对结合基因本体论(Gene ontology, GO)<sup>[10]</sup>、KEGG 通路<sup>[11]</sup>进行分析,明确其耐高渗的主要生物学过程和关键机制。

1.3.7 RT-qPCR 验证 DEGs 为了进一步验证 RNA-seq 试验结果的可靠性,选取 10 个 DEGs,引物序列见表 1。RT-qPCR 反应体系包括:2 μL cDNA,12.5 μL AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (High ROX Premixed),1 μL 10 mol/

表 1 RT-qPCR 使用的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the genes for RT-qPCR

基因	引物序列(5'-3')
CPAR2_701390	F:AGAGTGTGGTGCTAGAGTCCG R:CAGTTGTCCTTGACCAAGCC
CPAR2_805880	F:CGCCAACAAGGAGTTATCGG R:AATCGGGAGCACCAGGTAA
CPAR2_109550	F:TCCCACCTGTTCTTGCATCT R:GCATTTGCCAAAAGCGGTGTTT
CPAR2_103750	F:AACAAGAAGCAGCTCAAGCC R:CCTTCTTGTCTGTCACCGTTC
CPAR2_109190	F:AATGCGGAAGGCAACAACCTT R:TGGCTTCGAGCGATTTC AAG
CPAR2_405030	F:TGAGGCAACAGCAACAACAA R:GAGGATGACCCAGACACCAA
CPAR2_103340	F:GGTGTACCGGGACAACCATA R:CTCAATCCCAGCAAATGCCGA
CPAR2_700650	F:ACCAACTGCCACCACTACTT R:CGGCTACCGATGAAGAGCTA
CPAR2_108220	F:AACAGGGTAGATGGGAGCAG R:GTGACGGATTTGGCTTCCTC
CPAR2_206270	F:ATTGAAGTCGAAAGCGCCAA R:GGTGCGCCTTCAATTAACCA

L 引物, 8.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。运行条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 40 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。在荧光扩增结束后, 对 PCR 产物溶解曲线分析, 溶解曲线检测程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。

1.3.8 数据统计分析 每个试验重复 3 次, 采用 Origin 9.0 对数据进行处理及绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌的分子鉴定结果

从染菌的炼乳样品中分离到 1 株菌株, 在 NCBI 数据库中比对 DNA 测序后的基因片段序列, 发现其与近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) 的同源性为 99.6%。应用 MEGA4.0 软件通过 neighbor-joining 法构建系统进化树, 如图 1 所示。

### 2.2 不同条件对近平滑假丝酵母生长的影响

2.2.1 温度对近平滑假丝酵母生长的影响 如图 2a 所示, 近平滑假丝酵母在 6~14 h 之间为对数生长期, 24 h 后趋于稳定。可见适宜的温度对酵母菌的生长至关重要, 温度过高或过低都会阻遏酵母的生长繁殖。近平滑假丝酵母的最适温度为 35  $^{\circ}\text{C}$ , 甚至在 40  $^{\circ}\text{C}$  下生长状况依然良好。

2.2.2 pH 值对近平滑假丝酵母生长的影响 近平滑假丝酵母在不同 pH 值下生长情况存在差异 (图 2b), 当 pH 值过低时, 菌株的生长被显著抑制。随着 pH 值的增加, 菌株的生长出现先升高后保持平缓的趋势, 近平滑假丝酵母在 pH 5~8 之间均生长良好, 最适 pH 值为 8。

### 2.2.3 葡萄糖含量对近平滑假丝酵母生长的影响

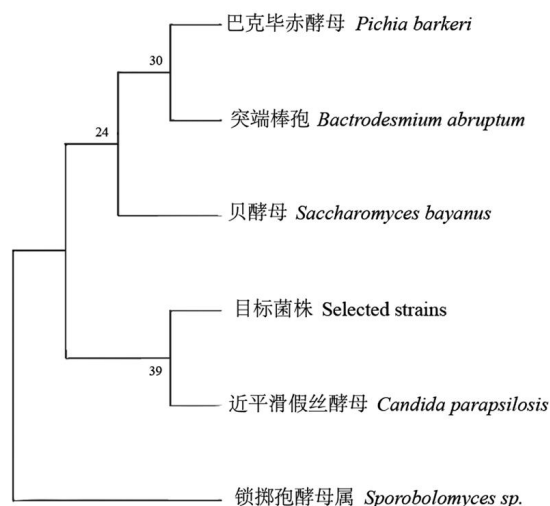
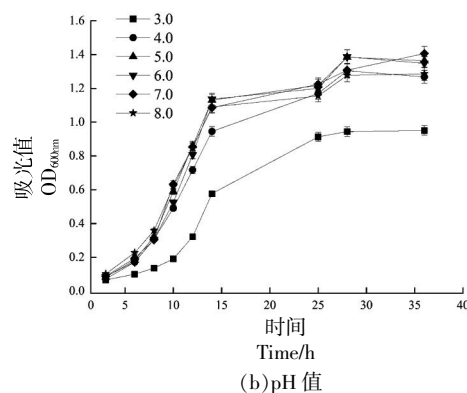
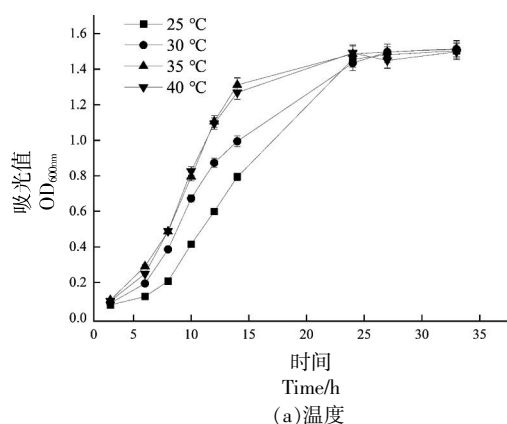


图 1 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree

近平滑假丝酵母在不同的糖浓度下耐受性不同 (图 2c), 随着葡萄糖含量的增加, OD<sub>600nm</sub> 值呈先升高后平稳乃至下降的趋势, 当葡萄糖含量为 10% 时, 为酵母的最适生长糖含量。然而即使在葡萄糖含量为 50% 时, 酵母菌依然可以缓慢生长, 由此可见, 其对葡萄糖的耐受性较好。

2.2.4 NaCl 对近平滑假丝酵母生长的影响 近平滑假丝酵母在不同的盐含量下耐受性不同 (图 2d), 随着 NaCl 含量的增加, OD<sub>600nm</sub> 值呈现先升高后平稳的趋势。当 NaCl 含量超过 12% 后, 酵母菌生长非常缓慢, 然而在 10% 以下时, 均可以稳定生长, 可见, 该近平滑假丝酵母对高渗环境具有较强的耐受性。



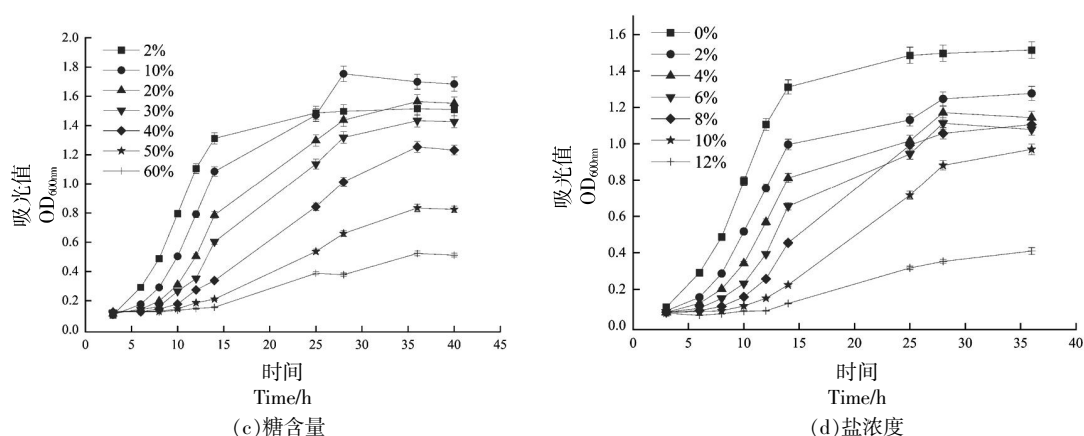


图2 不同条件下近平滑假丝酵母菌的生长情况

Fig.2 Growth of *Candida parapsilosis* under different conditions

### 2.3 近平滑假丝酵母发酵产物的鉴定

取近平滑假丝酵母摇瓶培养7 d后的上清液进行高效液相色谱分析检测。样品中糖醇的分离

效果如图3所示。根据标准品的线性回归方程可知,发酵液中山梨糖醇含量为41.06 g/L。

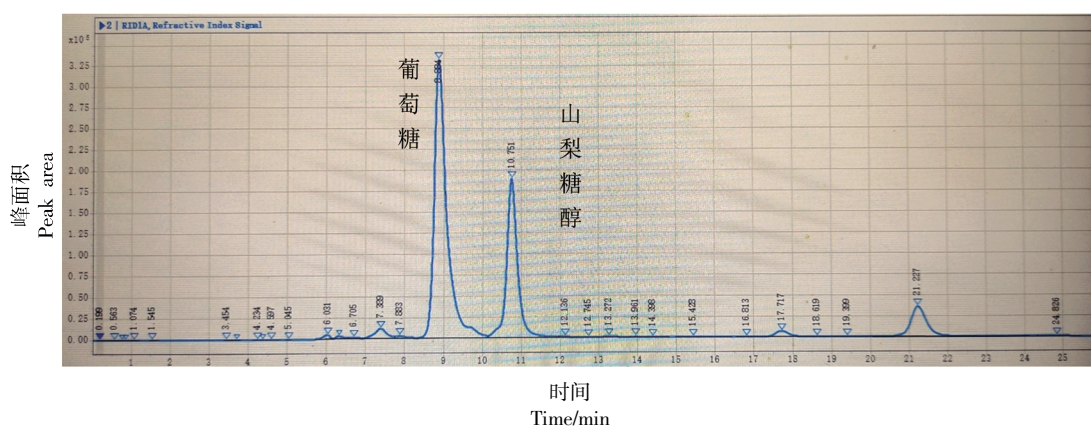


图3 糖醇分离色谱图

Fig.3 Separation chromatogram of sugar alcohols

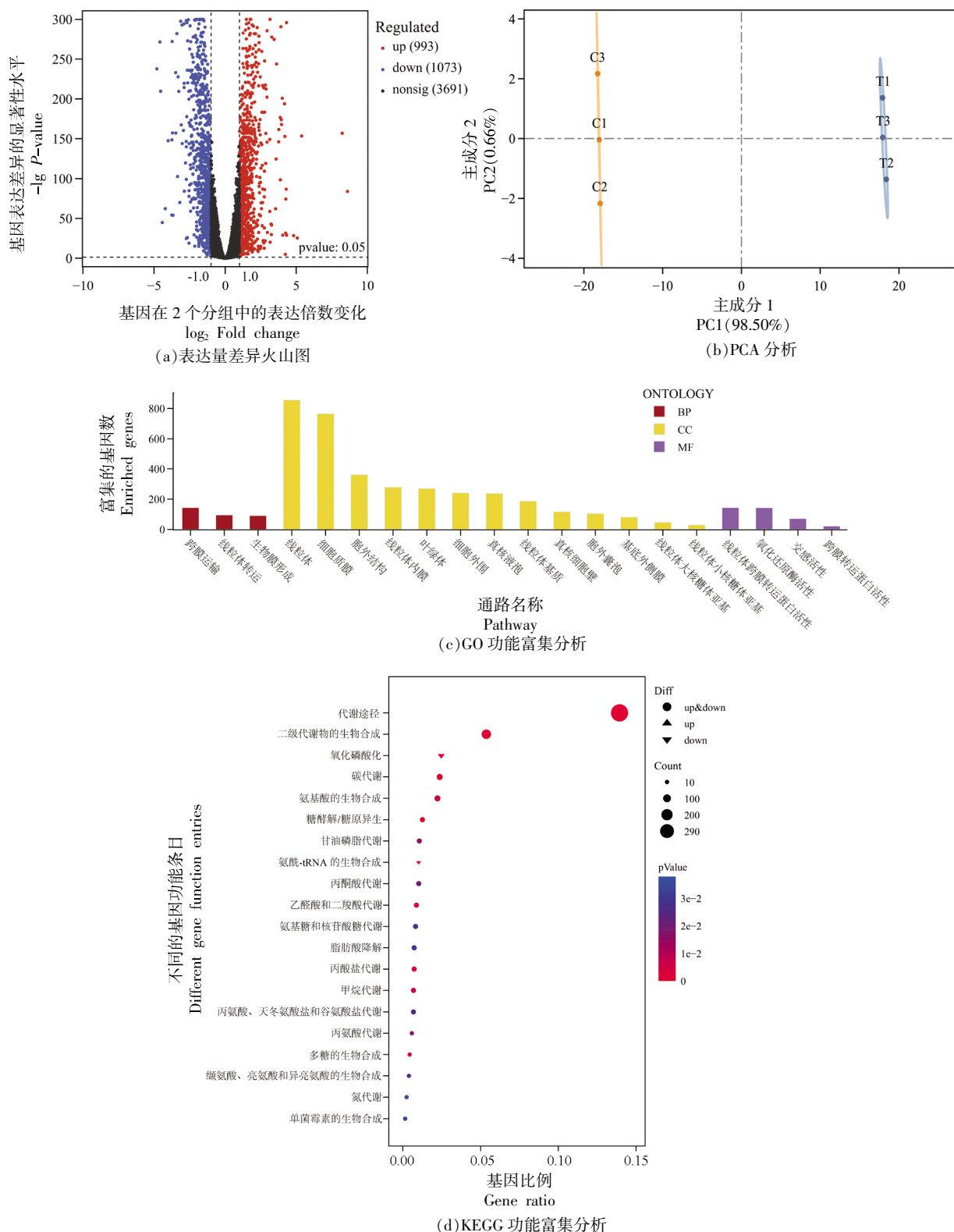
### 2.4 转录组学测定结果

2.4.1 转录组基因表达量分析 基于RNA-seq分析,对正常条件与高糖条件进行基因差异表达分析(以正常条件为对照)。图4a表达量差异火山图为不同组间转录组基因的差异表达情况。图中红色、绿色和黑色圆点分别表示显著上调、显著下调和非显著差异的基因。可知在高糖胁迫组,总共检测到5757个差异表达基因,其中3691个有差异而不显著,2066个有显著性差异;显著上调993个,显著下调1073个。表明在面对高糖胁迫时,假丝酵母的细胞会出现一定的应激反应。

通过PCA分析发现,图4b中PC1的贡献度

为98.5%,PC2的贡献度为0.66%,组间差异明显的3组样本能够较好地聚集到一起。表明在高糖胁迫环境中,假丝酵母的基因表达谱会发生变化以应对应激环境。

从2066个DEGs中挑选出几个具有代表性的差异基因,如表2所示。结果表明,与热激蛋白(Hsp70、Hsp90)、氨基酸转运、糖原转运、糖酵解和乙醇脱氢酶相关的基因显著下调,而与氨基酸透过酶、糖原合成、某些具有渗透压保护作用的氨基酸合成(如谷氨酸、脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸等)相关的基因显著上调。



注:分图 c 中,BP 表示生物学过程;MF 表示分子功能;CC 表示细胞成分。

图 4 转录组基因表达量及功能富集分析

Fig.4 Transcriptome gene expression and functional enrichment analysis

表2 高糖条件下假丝酵母显著表达的差异表达基因

Table 2 Significantly expressed DEGs in *Candida parapsilosis* under high sugar conditions

基因 ID	上调/下调	倍数	功能
CPAR2_701390	下调	-5.99	氨基酸转运活性氮渗透酶调节因子
CPAR2_805880	下调	-2.52	天冬酰胺合成酶
CPAR2_109550	下调	-2.45	乙醇磷脂酰转移酶
CPAR2_103750	下调	-2.34	热激蛋白 Hsp70
CPAR2_109190	下调	-2.32	糖酵解酶转录激活因子
CPAR2_402000	下调	-2.20	多糖生物合成/输出蛋白
CPAR2_103840	下调	-1.84	乙醇脱氢酶
CPAR2_703150	下调	-1.75	热激蛋白 Hsp90
CPAR2_405030	上调	3.37	转录因子 PAP1
CPAR2_103340	上调	3.19	氨基酸渗透酶
CPAR2_700650	上调	3.18	富含半胱氨酸分泌蛋白
CPAR2_108280	上调	2.48	AMP 活化蛋白激酶糖原识别位点
CPAR2_108220	上调	2.48	糖类(及其他)转运蛋白
CPAR2_206270	上调	2.0	糖原合成酶
CPAR2_806130	上调	1.92	乙醇乙酰转移酶
CPAR2_601520	上调	1.82	天冬氨酸/鸟氨酸氨甲酰转移酶结合结构域
CPAR2_203350	上调	1.79	谷氨酰胺合成酶催化结构域

2.4.2 功能富集分析 对差异表达基因集中的基因进行 GO 富集和 KEGG 富集分析。从图 4c 可以看出,高糖胁迫的差异表达基因主要富集于线粒体和细胞质膜等细胞成分中,原因可能是在高渗胁迫的环境下需要改变细胞成分,才能维持基础的生理活性。图 4d 展示了 KEGG 功能富集分析结果,在高糖胁迫组中代谢途径、二级代谢物的合成、碳代谢、氨基酸合成及糖酵解等代谢通路富集的基因相对较多。尤其是糖元运输及氨基酸透过酶相关基因全部上调,说明在高糖条件下,假丝酵母通过合成某些糖类或氨基酸(如脯氨酸、甘氨酸和谷氨酸等)来影响应激,提高逆境胁迫的性能。微生物通过在细胞内积累糖类、醇类、氨基酸及其衍生物等小分子极性物质来调节细胞内外渗透压平衡,逐渐形成了适应高渗环境的多种生理机制<sup>[12-13]</sup>。

## 2.5 DEGs qRT-PCR 验证

qRT-PCR 的结果如图 5 所示,符合 RNA-seq 的基因表达趋势,验证了 RNA-seq 结果的可靠性。分别选取了氨基酸和糖原转运相关基因:CPAR2\_701390、CPAR2\_206270、CPAR2\_108220;某些氨基酸和糖原合成相关基因:CPAR2\_805880、

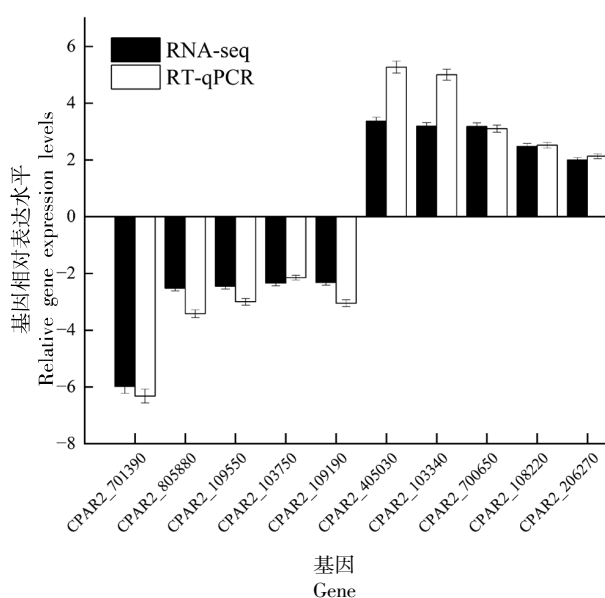


图5 RT-qPCR 验证关键 DEGs 的表达量

Fig.5 RT-qPCR verification expression results of key DEGs

CPAR2\_700650、CPAR2\_206270;糖酵解过程相关基因:CPAR2\_109190;热激蛋白 Hsp70 等。各组基因表达量呈现出不同程度的上、下调,表明近平滑假丝酵母均的耐渗能力受到多个基因多条通路的调节。

### 3 讨论

本研究自染菌的高糖炼乳样品中筛选获得了耐高渗的近平滑假丝酵母。对其进行发酵特性研究发现,当葡萄糖质量浓度为200 g/L时,其发酵液含有较高浓度的山梨糖醇,发酵7 d后,质量浓度可达41.06 g/L。山梨糖醇作为一种新型的食品添加剂,近年来多作为生物保鲜剂、水分保持剂、抗冻剂等应用于肉制品研究中,如将其添加到发酵香肠<sup>[14-15]</sup>、肉脯<sup>[16-17]</sup>中,不仅可以提高肉制品的持水性能,降低水分活度,还能改善产品品质。前人研究发现,运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)可以将葡萄糖和果糖转化为山梨糖醇,当葡萄糖质量浓度为300 g/L时,可代谢产生38.68 g/L的山梨糖醇<sup>[18]</sup>;通过对集胞藻属PCC 6803的HAD基因进行改造,从而提高原始菌株产山梨糖醇的产量,结果发现改造后当培养时间为450 h时,山梨糖醇产量达到最高,为2.5 g/L<sup>[19]</sup>;干酪乳杆菌BL300也被报道可以迅速降解乳糖产山梨糖醇,通过对其进行代谢途径改造发现,改造菌在发酵40 h后,山梨糖醇产量为0.14 mmol/L<sup>[20]</sup>,以上均低于本研究中近平滑假丝酵母的山梨糖醇产量。下一步可通过工艺优化和代谢改造更进一步提升产量,为今后糖醇产品的工业化研究开发提供思路。

同时,运用转录组学对不同生长阶段耐高糖酵母菌进行测序来探究其耐受机制也日益普及。如吴静等<sup>[21]</sup>研究发现,光滑球拟酵母(*Candida glabrata*)的基因*CgASG1*缺失,会使氧化胁迫能力下降,同时高渗胁迫的抵御能力也会降低。叶美玲<sup>[22]</sup>通过转录组对是否采用铜离子处理的两株南极酵母菌进行测序,发现在铜离子胁迫下,基因*GST*和*WD*重复蛋白的表达量上调,推测可能与酵母菌耐受机制有关。陈英<sup>[8]</sup>对突变菌株的耐高糖性研究发现分子伴侣基因*SSA1*(+2.4)、*SSA3*(+3.7)、*SSA4*(+2.3)、*SSB2*(+1.8)、*SCJ1*(+2.4)、*HSP42*(+2.3)、*CNE1*(+1.8)和*PDH1*(+2.0)全部上调,这些基因在细胞质和内质网中负责蛋白折叠,作为分子伴侣参与细胞多种压力的应激<sup>[23]</sup>。然而目前并未有研究从炼乳中分离、筛选出耐高渗的近平滑假丝酵母,并对其转录组学进行分析,因此本研究具有一定的创新性。

### 4 结论

本研究从染菌的炼乳样品中分离得到1株耐高糖的酵母菌,经分子学鉴定后为近平滑假丝酵母,对其发酵特性进行研究,结果发现该株近平滑假丝酵母的最适生长温度为35℃,最适pH值为8,当葡萄糖含量为50%时,依然可以缓慢生长,发酵液中的主要产物为山梨糖醇,产量为41.06 g/L。转录组学分析共检测到2 066个显著性差异基因,其中显著上调993个,显著下调1 073个,表明在面对高糖胁迫时,假丝酵母的细胞会做出一定的应激反应。其中与热激蛋白(Hsp70、Hsp90)、氨基酸转运、糖原转运、糖酵解和乙醇脱氢酶相关的基因显著下调,而与氨基酸透过酶、糖原合成、某些具有渗透压保护作用的氨基酸合成(如谷氨酸、脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸等)相关的基因显著上调。表明假丝酵母通过合成某些糖类或氨基酸(如脯氨酸、甘氨酸和谷氨酸等)来影响应激,提高逆境胁迫的性能。

### 参 考 文 献

- [1] 袁野,王正祥,诸葛健. 产多元醇酵母的耐高渗生长特征[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 43-46.  
YUAN Y, WANG Z X, ZHUGE J. Characterization of hyperosmotic-tolerant growth of polyol-producing yeasts[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 1999, 18(3): 43-46.
- [2] 蔡莉,张杨,朱宏阳,等. 一株产D-阿拉伯糖醇的菌株的分离筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 23-26.  
CAI L, ZHANG Y, ZHU H Y, et al. Isolation and identification of a novel D-arabitol-producing strain [J]. Food and Fermentation Industry, 2009, 35(1): 23-26.
- [3] KRAHULEC S S, KLIMACEK M, NIDETZKY B. Analysis and prediction of the physiological effects of altered coenzyme specificity in xylose reductase and xylitol dehydrogenase during xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 158(4): 192-202.
- [4] KOBAYASHI Y, YOSHIDA J, IWATA H, et al. Gene expression and function involved in polyol

- biosynthesis of *Trichosporonoides megachiliensis* under hyper-osmotic stress [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 645-650.
- [5] 杨利博. *Yarrowia lipolytica* 高渗发酵生产赤藓糖醇及高渗响应机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.  
YANG L B. Study on the hyperosmotic fermentation of erythritol by *Yarrowia lipolytica* and mechanisms of high osmotic pressure response[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [6] 梅运军, 邓威, 张顺喜, 等. 极端嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-2 的转录组学研究[J]. *生物技术*, 2016(5): 463-468.  
MEI Y J, DENG W, ZHANG S X, et al. Transcriptome characteristics of *Natrinema* sp. J7-2 analyzed with RNA-sequencing technology [J]. *Biotechnology*, 2016(5): 463-466.
- [7] 柳晓东. 骆驼刺中慢生根瘤菌 CCNWXJ12-2<sup>T</sup> 盐胁迫转录组分析及与耐盐相关基因功能研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.  
LIU X D. Transcriptome analysis of *Mesorhizobium Alhagi* CCNWXJ12-2<sup>T</sup> under salt stress and functional study of genes related to salt tolerance [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2016.
- [8] 陈英. 耐高糖酿酒酵母菌株的筛选及性状诱发基因的功能研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018.  
CHEN Y. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strain with high glucose tolerance and study on the function of character driven gene [D]. Nanning: Guangxi University, 2018.
- [9] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 1-21.
- [10] KLOPFENSTEIN D, ZHANG L, PEDERSEN B S, et al. GOATOOLS: A python library for gene ontology analyses [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1-17.
- [11] XIE C, MAO X Z, HUANG J J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(suppl\_2): W316-W322.
- [12] 翟立公, 李港回, 周紫洁, 等. 高渗适应德尔卑沙门氏菌对交叉环境胁迫抗性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(15): 69-77.  
ZHAI L G, LI G H, ZHOU Z J, et al. Tolerance of hypertonic adapted *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby to overlapping various environmental stresses [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(15): 69-77.
- [13] SHI X M, ZHU X N. Biofilm formation and food safety in food industries [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(9): 407-413.
- [14] 闫晓蕾, 郇延军, 孙冬梅, 等. 四种无磷持水物质对低温熏煮香肠持水性的影响[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(4): 360-364.  
YAN X L, XUN Y J, SUN D M, et al. Effects of four phosphorus-free water holding agents on water holding capacity of low smoked sausage [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(4): 360-364.
- [15] 史春娟, 郇延军, 李凌峰. 多羟基醇对发酵香肠加工过程中理化性质及感官品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(12): 330-335.  
SHI C J, XUN Y J, LI L F. Effect of sorbitol on physicochemical characteristics and quality of fermented sausages during processing [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(12): 330-335.
- [16] 高可蒙, 梅林, 薛秀恒, 等. 无磷保水剂对冷冻调理猪肉的影响[J]. *食品科学*, 2015, 36(6): 257-261.  
GAO K M, MEI L, XUE X H, et al. Influence of non-phosphate additive on water-holding capacity of frozen prepared pork [J]. *Food Science*, 2015, 36(6): 257-261.
- [17] 陈宇飞, 杨柳. 山梨糖醇添加量对猪肉糜脯品质的影响[J]. *中国调味品*, 2014, 39(7): 47-50.  
CHEN Y F, YANG L. Effect of additive amount of sorbitol on quality of pork jerky [J]. *China Condiment*, 2014, 39(7): 47-50.
- [18] JOSIANE A V, MARCIA L C, RUI S S S, et al. Influence of high osmotic pressure on sorbitol production by *Zymomonas mobilis* [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2010, 53(5): 1169-1175.
- [19] TAEJUN C, YUKIKO O, MASAHIKO I. Improved sorbitol production and growth in cyanobacteria using promiscuous haloacid dehalogenase-like hydrolase [J]. *Journal of Biotechnology*: X, 2019, 306(S): 100002.
- [20] REINOUT D B, LUZ A S R, INMACULADA N, et al. Sorbitol production from lactose by engineered *Lactobacillus casei* deficient in sorbitol transport sys-

- tem and mannitol-1-phosphate dehydrogenase[J]. *Applied Microbiol Biotechnology*, 2010, 85(6): 1915-1922.
- [21] 吴静, 唐蕾, 刘立明. 光滑球拟酵母转录因子 Asg1p 调控鲁棒性的生理机制[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(2): 156-163.
- WU J, TANG L, LIU L M. Physiological mechanism of transcription factor Asg1p for the regulation of robustness of *Candida glabrata*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(2): 156-163.
- [22] 叶美玲. 南极酵母 AN5 重金属 Cu<sup>2+</sup>胁迫的转录组学研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015.
- YE M L. Transcriptomics of antarctic yeast AN5 under heavy metal Cu<sup>2+</sup> stress. Haerbin: Harbin Institute of Technology, 2015.
- [23] JARNUCZAK A F, EYERS C E, SCHWARTZ J M, et al. Quantitative proteomics and network analysis of SSAL and SSBL deletion mutants reveals robustness of chaperone HSP70 network in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proteomics*, 2015, 15(18): 3126-3139.

### Screening, Identification and Transcriptomic Analysis of Hyperosmotic-tolerant Yeast in Sweetened Condensed Milk

FANG Ruosi<sup>1</sup>, CHEN Tangchao<sup>1</sup>, SHI Chuanchuan<sup>2</sup>, XIAO Gongnian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023

<sup>2</sup>Panda Dairy Corporation, Wenzhou 325400, Zhejiang)

**Abstract** Objective: To study the expression levels of differentially expressed genes in *Candida parapsilosis* under high glucose stress and to investigate its stress response mechanism. Methods: The yeast presented in the contaminated condensed milk during storage were isolated and characterized by plate screening and 18s DNA sequencing, and the total RNA of the strains was extracted to construct cDNA libraries. Differentially expressed genes were analyzed by transcriptome analysis and verified by real-time fluorescence quantitative PCR. Results: The yeast was identified as *Candida parapsilosis*, its optimal temperature and pH value were 35 °C and 8, respectively. It could still grow slowly when the glucose concentration reached 50%. The main product in the fermentation broth was sorbitol, with a yield of up to 41.06 g/L. A total of 2 066 significant differential genes were detected in the transcriptomic analysis, of which 993 were significantly up-regulated and 1 073 were significantly down-regulated. The genes related to heat stress proteins (Hsp70, Hsp90), amino acid transport, glycogen transport, glycolysis and ethanol dehydrogenase were significantly down-regulated, while the genes related to amino acid permease, glycogen synthesis, and synthesis of certain amino acids (e.g., glutamate, proline, arginine, cysteine, etc.) with osmotic stress-protecting effects were significantly up-regulated. Conclusion: *Candida parapsilosis* could improve performance under hyperosmotic stress by synthesizing certain sugars or amino acids (e.g., proline, glycine, and glutamate).

**Keywords** sweetened condensed milk; *Candida parapsilosis*; isolation and identification; transcriptomic analysis