

高耐受性酿酒酵母的适应性驯化选育与发酵

刘安¹, 王丹阳¹, 王振², 武小芬¹, 齐慧¹, 邓明¹, 王克勤^{*1}, 陈亮^{*1}

1 湖南农业科学院 湖南省核农学与航天育种研究所, 湖南 长沙 410125

2 湖南农业科学院 湖南省农业环境生态研究所, 湖南 长沙 410125

刘安, 王丹阳, 王振, 武小芬, 齐慧, 邓明, 王克勤, 陈亮. 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(3): 1018-1032.

LIU An, WANG Danyang, WANG Zhen, WU Xiaofen, QI Hui, DENG Ming, WANG Keqin, CHEN Liang. A *Saccharomyces cerevisiae* strain with high tolerance: breeding by gradual acclimation and fermentation performance[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 1018-1032.

摘要:【背景】酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是葡萄糖发酵产乙醇的重要菌株,然而在生物乙醇发酵过程中,常会出现高乙醇浓度、高糖、高温和低 pH 等胁迫环境,从而影响酿酒酵母菌株的发酵效果。【目的】获得乙醇耐受性及高温、高糖等相关耐受性能提高的优良菌株,并讨论驯化菌株和出发菌株的高糖发酵乙醇性能。【方法】采用高浓度乙醇胁迫环境逐步驯化实验室保存的酿酒酵母菌株(CICC 33068),通过对比驯化菌株和出发菌株在高浓度乙醇、高糖、高温和低 pH 环境中的生长曲线及高糖发酵乙醇性能,探讨驯化菌株的高耐受特性。【结果】相较于出发菌株,获得的驯化菌株可在含 13%乙醇的液体培养基中生长,并保持完整的细胞生长周期和细胞形态,能耐受葡萄糖浓度 450 g/L、温度 45 °C和 pH 3.5。该驯化菌株能够在糖浓度 450 g/L、45 °C和 pH 3.5 的环境下生长,糖醇转化率可达 79.22%,较出发菌株提高 7.72%,通过检测相关基因表达发现,该菌株耐受性能提高与胞内海藻糖合成代谢上调相关。【结论】获得了具有耐受高浓度乙醇、高糖、高温和低 pH 特性的优良酿酒酵母菌株,该菌株通过上调菌株胞内海藻糖合成代谢提高耐受性能,使其发酵高浓度葡萄糖的能力显著高于出发菌株,可为后续其他菌株的驯化筛选提供研究基础。

关键词: 酿酒酵母; 适应性驯化; 高胁迫环境; 耐受性; 糖醇转化率

资助项目: 湖南省自然科学基金青年基金(2022JJ40210); 湖南省农业科技创新项目(2022CX119)

This work was supported by the Youth Project of Hunan Provincial Natural Science Foundation (2022JJ40210) and the Agricultural Science and Technology Innovation Project of Hunan Province (2022CX119).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Liang, chenliang912@163.com; WANG Keqin, wq6412@163.com

Received: 2023-08-30; Accepted: 2023-10-03; Published online: 2023-12-12

A *Saccharomyces cerevisiae* strain with high tolerance: breeding by gradual acclimation and fermentation performance

LIU An¹, WANG Danyang¹, WANG Zhen², WU Xiaofen¹, QI Hui¹, DENG Ming¹, WANG Keqin^{*1}, CHEN Liang^{*1}

1 Hunan Institute of Nuclear Agricultural Science and Space Breeding, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

2 Hunan Institute of Agricultural Environment and Ecology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

Abstract: [Background] *Saccharomyces cerevisiae* is an important microorganism in the fermentation of glucose to yield ethanol. However, high concentrations of ethanol and sugar, high temperature, low pH, and other highly stressful conditions often occur during the fermentation, which affect the fermentation efficiency of *S. cerevisiae*. [Objective] To obtain a *S. cerevisiae* strain with improved tolerance to high concentrations of ethanol and sugar and high temperatures and evaluate the fermentation performance of the domesticated strain in the case of high sugar levels. [Methods] A laboratory-preserved strain (CICC 33068) of *S. cerevisiae* was gradually acclimated to an environment of highly concentrated ethanol. The domesticated strain was compared with the original strain in terms of the growth curves and fermentation performance under high concentrations of ethanol and sugar, high temperature, and low pH for the evaluation of its tolerance. [Results] Compared with the original strain, the domesticated strain displayed a complete growth cycle and normal morphology in the broth medium with 13% ethanol. The domesticated strain was capable of growing in the presence of 450 g/L glucose and at 45 °C and pH 3.5, with the glucose-to-ethanol conversion rate of 79.22%, which was 7.72% higher than that of the original strain. The gene expression levels indicated that the improved tolerance was associated with the up-regulation of intracellular trehalose synthesis pathway. [Conclusion] A *S. cerevisiae* strain with improved tolerance to high concentrations of ethanol and sugar and high temperatures and low pH was obtained by environmental acclimation to high levels of ethanol. The domesticated strain outperformed the original strain in the fermentation with high glucose for ethanol production. The results demonstrate that adaptive acclimation could enhance the strain tolerance by upregulating intracellular trehalose synthesis. The findings provide fundamental data for subsequent domestication and screening of other strains.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; adaptive acclimation; high-stressed conditions; tolerance; glucose-to-ethanol conversion rate

酵母菌株因其繁殖能力强、发酵时间短和糖醇转化率高等特点被广泛应用于乙醇工业生产^[1]。在生物乙醇发酵过程中，常常会出现高

乙醇浓度、高糖、高温和低 pH 等高胁迫环境，酵母菌株处于高胁迫环境时，细胞渗透压增加，进而导致生长活力降低、细胞周期阻滞、发酵

性能减弱,严重时可能会破坏酵母菌株骨架结构,导致酵母菌株细胞死亡^[2]。因此,获得对高胁迫环境具有耐受性的酵母菌株对于提高生物乙醇发酵效率至关重要。目前酿酒酵母菌株的选育主要有自然选育、适应性驯化、诱变育种及基因工程等方法。其中,适应性驯化通过在选择性培养基中不断培养并选择高活力菌株、增加菌株对特定环境的耐受性,最终获得目标耐受性的微生物^[3-4],该方法具有定向获得优良目标性状且不引入外源基因的优点,是筛选耐受性菌株的重要途径。

已有研究表明酿酒酵母菌株在胁迫环境中胞内的海藻糖能够稳定细胞膜和细胞结构,从而保护细胞不受外界伤害,并且酿酒酵母菌株对高浓度乙醇^[5-7]、高糖^[8]及高温^[9]等单种或多种耐受性能的提高都伴随着胞内海藻糖含量的提升。因此,提高海藻糖的含量可能提高酿酒菌株的多种耐受性能。文献调研发现,通过非基因编辑的方法获得酵母菌株的乙醇最高耐受性为11%^[10],在发酵后期仍会由于乙醇胁迫影响发酵效率,因此,本研究拟通过高浓度乙醇胁迫环境改变菌株胞内海藻糖的相关代谢,逐步驯化实验室保存的酿酒酵母菌株,获得乙醇耐受性及高温、高糖等相关耐受性能提高的优良菌株,并讨论驯化菌株和出发菌株的高糖发酵性能,为生物乙醇的生产提供优质菌株资源。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

出发菌株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) CICC 33068 为实验室保藏菌株, -80 °C保藏在以葡萄糖为单一碳源的甘油冻存液中。

1.1.2 培养基

生长培养基(yeast extract peptone dextrose

medium, YPD) (g/L): 葡萄糖 20.0, 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取粉 10.0, 磷酸二氢钾 1.0, 七水硫酸镁 0.5, 115 °C蒸汽灭菌 20 min。

含乙醇培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取粉 10.0, 磷酸二氢钾 1.0, 七水硫酸镁 0.5, 115 °C蒸汽灭菌 20 min, 待培养基冷却后于超净工作台中加入一定体积的无菌无水乙醇。

高糖培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取粉 10.0, 磷酸二氢钾 1.0, 七水硫酸镁 0.5, 分别添加相应的葡萄糖制成 300.0、350.0、400.0、450.0 和 500.0 g/L 的高糖培养基, 115 °C蒸汽灭菌 20 min。

活化培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, 酵母提取粉 5.0, 磷酸二氢钾 5.0, 硫酸铵 2.0, 无水硫酸镁 1.0, 无水氯化钙 0.2, 115 °C蒸汽灭菌 20 min。

葡萄糖发酵培养基(g/L): 酵母提取粉 5.0, 磷酸二氢钾 5.0, 硫酸铵 2.0, 无水硫酸镁 1.0, 无水氯化钙 0.2, 分别添加相应的葡萄糖制成 160.0、240.0 和 320.0 g/L 的葡萄糖发酵培养基。115 °C蒸汽灭菌 30 min。

发酵培养基(g/L): 南荻纤维素 100.0, 酵母提取粉 5.0, 磷酸二氢钾 5.0, 硫酸铵 2.0, 无水硫酸镁 1.0, 无水氯化钙 0.2, 115 °C蒸汽灭菌 30 min。

固体培养基配制时加入 20 g/L 琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器

三氯甲烷、异丙醇、配制培养基相关试剂, 国药集团化学试剂有限公司; TriQuick Reagent 和 1×TAE, 北京索莱宝科技有限公司; RTIII All-in-One Mix、MonScript™ dsDNase 和 qPCR 试剂盒, 莫纳生物科技有限公司; 琼脂糖和 StarStain Red Plus 核酸染料, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

恒温恒湿培养箱, 上海森信实验仪器有限

公司; 恒温摇床, 常州诺基仪器有限公司; 冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器开发有限公司; 光吸收全波长酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; 基因扩增仪, 耶拿分析仪器股份公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; 凝胶成像仪, 伯乐公司; 场发射扫描电镜, 株式会社日立制作所。

1.2 方法

1.2.1 菌株适应性驯化方法

将出发菌株单菌落接种于 YPD 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 12 h 后将菌液稀释至 $(1-5) \times 10^2$ CFU/mL 并涂布于 YPD 固体培养基中, 28 °C 恒温培养 2-3 d 后, 挑取单菌落接种于 2% 含乙醇培养基中, 于 28 °C、160 r/min 进行摇瓶培养, 待菌液浑浊后稀释涂布于 2% 含乙醇固体培养基中, 待菌落生长后即获得耐 2% 乙醇菌株。根据以上流程, 逐步提高液体培养基中所含乙醇的浓度, 当培养基中乙醇浓度低于 12% 时, 每进行一次驯化乙醇浓度提高 2%; 当培养基中乙醇浓度为 12%-13% 时, 每进行一次驯化乙醇浓度提高 0.5%, 最终获得耐乙醇浓度达 13% 的驯化菌株。驯化流程见图 1。

1.2.2 菌株 26S rRNA 基因 D1/D2 区测序分析

将驯化菌株及出发菌株单菌落分别接种于 YPD 液体培养基中, 于 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 12 h 后进行梯度稀释并涂布于 YPD 固体

培养基, 选取平板中菌落无粘连且均为单菌落的样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 26S rRNA 基因 D1/D2 区测序并分析鉴定菌株种属。使用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA。使用酵母菌通用引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 基因组 DNA (20-50 ng/ μ L) 0.5 μ L、10 \times Buffer (with Mg^{2+}) 2.5 μ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L、酶 0.2 μ L、forward primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L、reverse primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L、ddH₂O 19.8 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。菌株测序鉴定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 将获得的序列使用 BLAST 程序将测序数据与数据库中已有的真菌 26S rRNA 基因序列进行相似性比较分析, 采用 MEGA 11 软件计算序列相似性并构建系统发育树。

1.2.3 细胞形态的电镜观察

将驯化菌株及出发菌株分别接种于 YPD 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 12 h 后, 将菌液以 10% 的接种量转接于 13% 乙醇的培养基中, 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 24 h 后, 将菌液于 8 000 r/min、4 °C 离心 10 min 后弃上清, 菌体用磷酸缓冲液洗涤 3 次, 8 000 r/min、

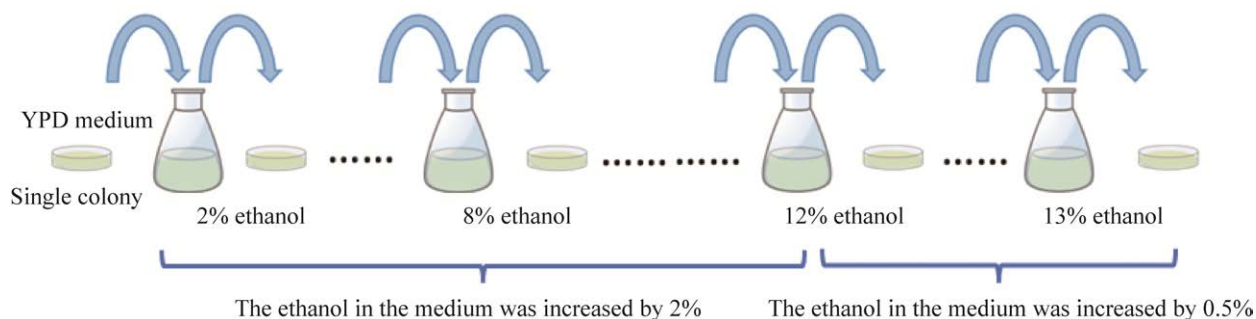


图 1 菌株适应性驯化流程

Figure 1 Process of adaptive domestication of strains.

4 °C离心 10 min 后弃上清, 加入 2.5%戊二醛 4 °C过夜固定, 离心弃上清, 临界点干燥, 真空镀金, 场发射扫描电镜观察^[11]。试验中以无乙醇胁迫的样品为对照。

1.2.4 驯化菌株与出发菌株在高糖、低 pH 或高温环境中的生长曲线检测

驯化菌株及出发菌株分别接种于 YPD 液体培养基中, 于 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 12 h 后, 将菌液稀释至 OD_{600} 值约 0.7, 按 3% 接种量接种于不同葡萄糖浓度(300、350、400、450 和 500 g/L)或不同 pH (3.5、4.5、5.5、6.5 和 7.5)的生长培养基中, 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养, 每隔 2 h 取一次样, 测量其 OD_{600} 值, 并绘制生长曲线。

将驯化菌株及出发菌株分别接种于 YPD 液体培养基中, 于 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 12 h 后, 将菌液稀释至 OD_{600} 值约 0.7, 按 3%接种量接种于生长培养基中, 置于 25、30、35、40 和 45 °C恒温振荡培养, 每隔 2 h 取一次样, 测量其 OD_{600} 值, 并绘制生长曲线。

1.2.5 驯化菌株及出发菌株的高浓度糖发酵性能检测

将驯化菌株及出发菌株分别接种于活化培养基中, 于 28 °C、160 r/min 恒温振荡培养 12 h 后, 以 10%接种量接入活化培养基中再次培养, 获得菌株种子液, 将其稀释至 OD_{600} 值 0.7 左右进行后续的发酵试验。

向三角瓶中加入 20 mL 葡萄糖发酵培养基, 115 °C蒸汽灭菌 30min, 以 7%接种量加入上述菌株种子液, 28 °C、160 r/min 条件下发酵 144 h, 分别在 6、12、24、48、72、96、120 和 144 h 时取上清液 0.2 mL, 6 000 r/min 离心 5 min, 将发酵液过 0.45 μ m 水系滤膜后, 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定发酵液中的葡萄糖和乙醇浓度, 检测条件为: 示差折光检测器(RI), 检测器温度 45 °C; 色谱

柱 Bio Rad Aminex HPX-87H (7.8 mm×300 mm), 柱温 55 °C, 柱后冷却温度 30 °C; 流动相为 0.005 mol/L 的硫酸, 流速 0.6 mL/min; 进样体积 10 μ L^[7]。

1.2.6 功能基因 qPCR 检测

吸取 1 mL 酵母菌液于 1.5 mL 离心管中, 10 000 r/min、4 °C离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mL TriQuick Reagent 吹打均匀, 静置 5 min 后加入 0.2 mL 三氯甲烷, 剧烈振荡混匀, 静置 5 min 后 10 000 r/min、4 °C离心 15 min。吸取上清液约 500 μ L 转入到新的 1.5 mL 离心管后加入 500 μ L 异丙醇, 静置 10 min, 12 000 r/min、4 °C离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 75%乙醇, 摇匀, 12 000 r/min、4 °C离心 5 min, 弃上清液, 等待剩余乙醇挥发后得到菌株 RNA。

将上述获得的菌株 RNA 稀释至 0.1 mg/mL。在八连排管中依次加入 4 μ L 的 5×RTIII All-in-One Mix, 1 μ L 的 MonScript™ dsDNAswe, 15 μ L 样品, 最终体系为 20 μ L。反应程序为: 37 °C 2 min; 55 °C 15 min; 85 °C 5 min。获得 cDNA。

将逆转录后的 cDNA 和引物各稀释 10 倍, 使其最终浓度均为 10 μ mol/L。以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参基因, RT-qPCR 中使用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 其序列如表 1 所示。RT-qPCR 反应体系: forward primer

表 1 实时荧光定量 PCR 过程中使用的引物

Table 1 The primers used in real-time fluorescence quantitative PCR

引物名称 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
TPS1-F	CAACGAGGCCTTGZCTTTGC	152
TPS1-R	TGGCAGAGGAGCTTGTTGAG	
TPS2-F	CTGCAGCTATTCATCGGCA	158
TPS2-R	TCCATGATCCGCACTTAGAC	
GAPDH-F	AGCTGTTGTCGTCCAAGGAG	148
GAPDH-R	CTTGAGCGGCATTTTCGTGAG	

(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 、reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 、2 \times qPCR Mix 10 μL 、RNase-free water 7 μL ，cDNA 溶液(0.5–10.0 ng/ μL) 2 μL ，最终反应体系为 20 μL 。RT-qPCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，40 个循环。

1.2.7 琼脂糖凝胶电泳

称取 1 g 琼脂糖加入 100 mL 1 \times TAE，电热炉加热煮沸至溶液清澈，冷却至 50–60 $^{\circ}\text{C}$ 加入 5 μL 的核酸染料，倒入制胶模中并在胶中插入梳子，冷却获得琼脂糖凝胶，将琼脂糖凝胶放入电泳槽中，用移液枪吸取 5 μL 的 Marker 和样品分别加入凝胶样品泳道。电压设置为 160 V，时间为 50 min。

1.2.8 数据分析

采用 SPSS 19 对数据进行统计分析，使用 GraphPad prism 9 软件进行图形绘制，基因表达相对定量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

2 结果与讨论

2.1 适应性驯化获得酿酒酵母菌的形态特征

观察适应性驯化获得菌株的形态特征，并

与出发菌株进行对比。驯化菌株及出发菌株在 YPD 固体培养基中的形态如图 2 所示，培养相同时间后驯化菌株的单个菌落直径较出发菌株大，表明驯化菌株的生长速度更快，生长能力更强。驯化菌株呈圆形高凸、乳白色、光泽度较好、不透明、质地均匀、表面光滑、边缘整齐；出发菌株呈圆形隆起、乳白色、光泽度一般、半透明、质地均匀、表面光滑、边缘整齐。

扫描电镜观察结果如图 3 所示，驯化菌株及出发菌株在无乙醇胁迫下(图 3A、3B)，其细胞表面较光滑，形态均呈规则的椭圆形，个体形态比较饱满，与出发菌株相比驯化菌株有较多出芽痕迹。在 13%乙醇胁迫环境下，出发菌株细胞结构破碎，视野内不可见完整细胞结构(图 3C)，原因是酵母菌株在高乙醇胁迫环境下，细胞骨架变得疏松进而使细胞大小发生变化、致使细胞表面出现褶皱，甚至破坏细胞结构，细胞内容物泄漏^[12]。驯化菌株芽痕数量较无乙醇胁迫下无明显差异(图 3D)，虽然出现表面皱缩、细胞壁塌陷、细胞彼此之间粘连的现象，但仍具有完整的细胞结构和出芽功能，表明驯

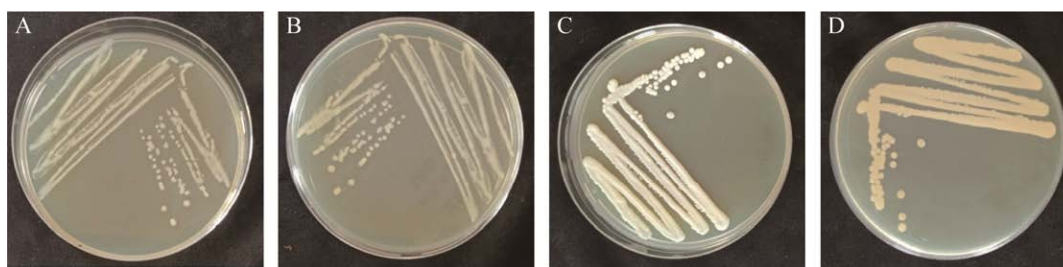


图 2 出发菌株和驯化菌株的菌落形态 A: 出发菌株从平板培养皿正面观察，菌株呈圆形隆起、乳白色、光泽度一般、半透明。B: 出发菌株从平板培养皿背面观察。C: 驯化菌株从平板培养皿正面观察，菌株呈圆形高凸、乳白色、光泽度较好、不透明。D: 驯化菌株从平板培养皿背面观察

Figure 2 Colony morphology of original strains and domesticated strains. A: The front of original strain plate culture, the strain exhibits a rounded and elevated morphology, with a milky-white color and a moderate level of glossiness and semi-transparent. B: The back of original strain plate culture. C: The front of domesticated strain plate culture, the strain exhibits a circular and highly convex morphology, with a creamy-white color, displaying a good level of glossiness and opaqueness. D: The back of domesticated strain plate culture.

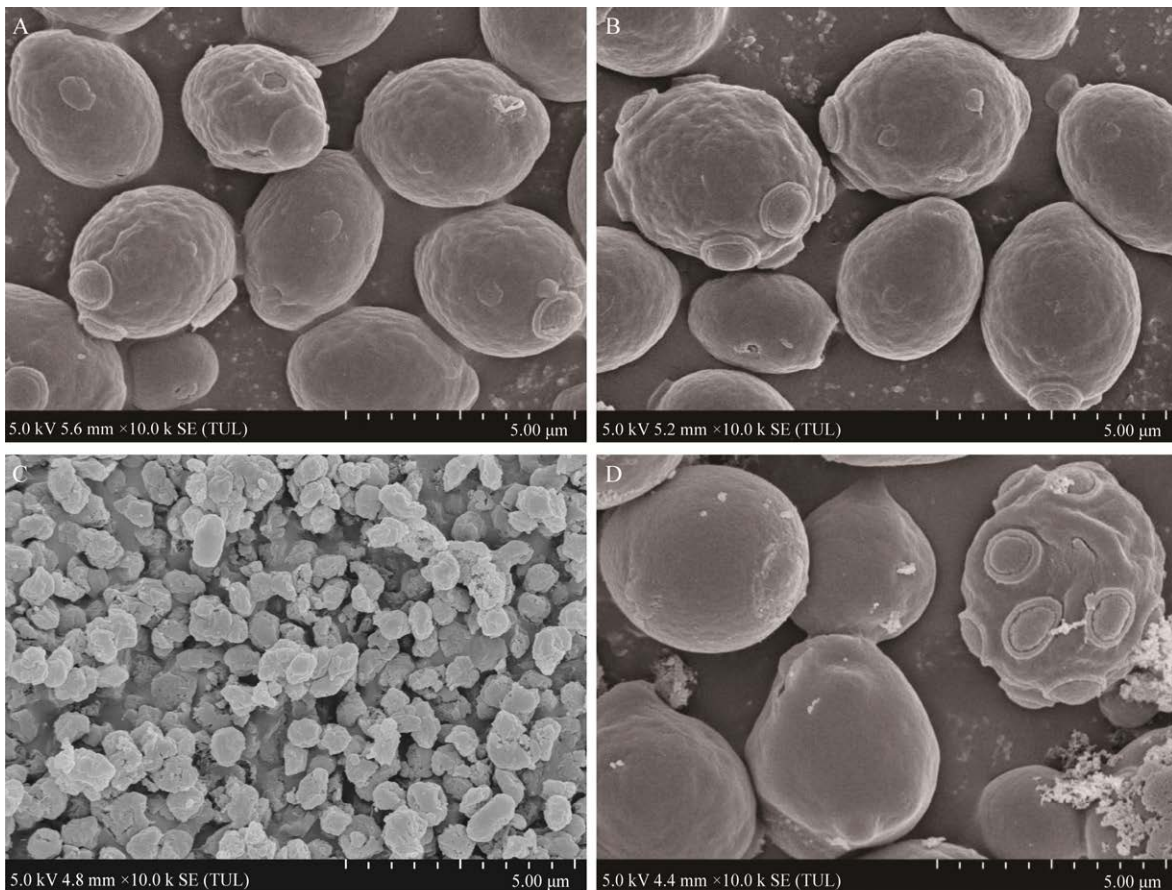


图 3 出发菌株和驯化菌株在扫描电镜下的形态特征 A: 出发菌株在乙醇含量 0% 的液体培养基中的形态. B: 驯化菌株在乙醇含量 0% 的液体培养基中的形态. C: 出发菌株在乙醇含量 13% 的液体培养基中的形态. D: 驯化菌株在乙醇含量 13% 的液体培养基中的形态

Figure 3 Morphological characteristics of original and domesticated strains by scanning electron microscopy. A: The original strain with 0% ethanol content medium. B: The domesticated strain with 0% ethanol content medium. C: The original strain with 13% ethanol content medium. D: The domesticated strain was with 13% ethanol content medium.

化菌株在 13% 乙醇胁迫环境下的细胞功能和生长性能仍然正常。

2.2 出发菌株和驯化菌株的鉴定

对出发菌株和驯化菌株进行 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列测序, 并构建了包括驯化菌株、出发菌株及相关菌种在内的 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列系统发育树, 见图 4。驯化菌株与出发菌株的遗传距离最近, 表明驯化菌株与出发菌株属于同一种属, 且与酿酒酵母菌株的相似性

均为 100%。据此确定驯化菌株和出发菌株均属于酿酒酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*), 说明驯化菌株为出发菌株驯化所得。

2.3 驯化菌株的耐受性

2.3.1 乙醇耐受性

如图 5A 所示, 在无胁迫环境下, 驯化菌株与出发菌株的生长期相似, 在 0–2 h 处于延滞期, 2–12 h 处于对数生长期, 12 h 后进入稳定期, 但驯化菌株在对数期的生长速率明显高

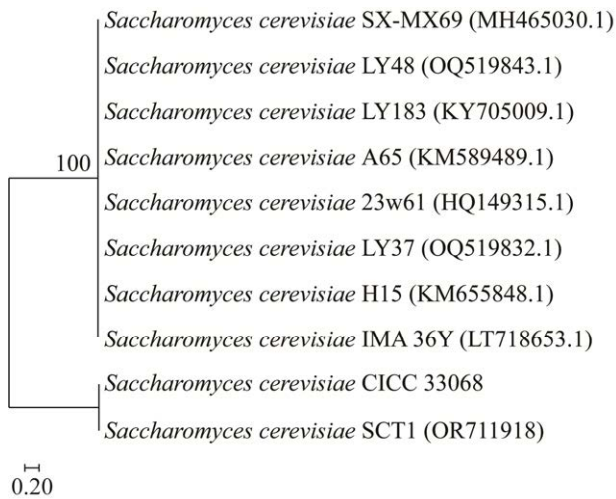


图4 基于酵母菌的26S rRNA基因D1/D2序列构建的系统发育树 括号中的序号为该菌株的GenBank登录号,分支点上数字代表该节点亲缘关系置信度,标尺下部的数字指该长度的分支代表基因组的遗传变异度

Figure 4 Phylogenetic tree based on 26S rRNA gene (domain D1/D2) gene sequence of yeast. The sequence number in parentheses is the GenBank accession number of the strain, the number on the branch point represents the credibility of the genetic relationship, the number 0.20 at the bottom of the scale indicates that the length of the branch represents a genetic variation of 0.20 in the genome.

于出发菌株的生长速率,并且稳定期驯化菌株的 OD_{600} 值明显高于出发菌株,表明驯化菌株的生长能力强于出发菌株,原因是乙醇适应性驯化过程改变了驯化菌株的能量代谢通路进而提高了菌株的生长速率。

如图5B所示,驯化菌株在13%乙醇培养基中生长有所延缓,经过一段时间后,其生长速率稳定增长,菌株的生长状态良好,而出发菌株在13%乙醇培养基中无法生长,表明本研究中驯化菌株的乙醇耐受性较出发菌株增强,最高可耐受13%乙醇浓度。由已有研究报道可知,在不引入外源基因的条件下,对纯乙醇耐受性较高的菌株为张士双^[10]通过诱变选育获得

的高耐受性突变菌株YN81,该菌株在11%乙醇培养基中培养36h后 OD_{600} 值仍处于0.15–0.20,表明该菌株最高耐受乙醇浓度为11%,低于本研究所选育的菌株。本研究选育的驯化菌株在13%乙醇培养基中生长状态良好,在培养28h后 OD_{600} 值最高达1.06,其乙醇耐受性高于目前已有酿酒酵母菌株。

2.3.2 葡萄糖耐受性

如图6所示,随着培养基中葡萄糖初始浓度的不断提高,驯化菌株与出发菌株的生长都有所延缓,且进入稳定期后的 OD_{600} 值均出现下降,但驯化菌株在稳定期的 OD_{600} 值仍明显高于出发菌株,表明体系中糖浓度过高时会影响的菌株的生长,但对出发菌株的影响程度高于驯化菌株。出发菌株在糖浓度为300–350g/L时生长期无明显变化,当糖浓度高于400g/L时出发菌株无法生长,表明出发菌株最高耐糖浓度为350g/L。驯化菌株在糖浓度为300–400g/L仍处于良好的生长状态,但随着糖浓度的增加,其延滞期逐渐从6h增长到12h,对数期逐渐从20h减少到14h,稳定期的 OD_{600} 值随着糖浓度的增加有所降低;在糖浓度为450g/L时驯化菌株生长较困难,但在20h后仍表现出生长能力;当糖浓度增加到500g/L时驯化菌株无法观测到生长,表明驯化菌株最高耐糖浓度可达到450g/L。由此认为驯化菌株的耐高糖能力比出发菌株提高28.6%,说明菌株在经过耐乙醇性能驯化的同时其耐糖能力也得到了提高,驯化菌株在耐高浓度乙醇的同时还具备发酵高糖底物生产生物乙醇的潜力。

Yi等^[13]研究发现酵母菌株对高糖的耐受性与乙醇耐受性息息相关,可能由于酵母菌株对乙醇和葡萄糖的耐受性均与细胞内海藻糖的含量有关。Zhang等^[14]采用耐乙醇及耐高糖的酿酒酵母菌株YF10-5在35%(质量体积分数)葡萄糖条

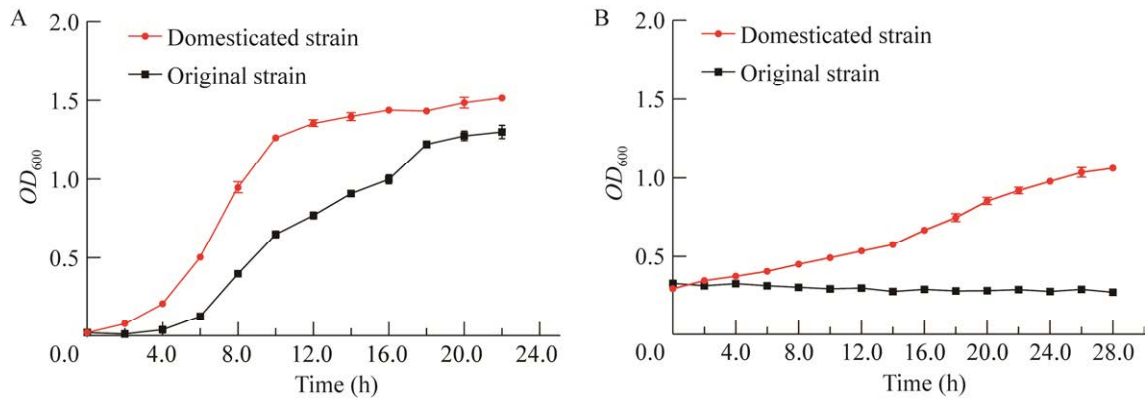


图 5 两株酵母菌株在不同乙醇含量液体培养基中的生长曲线 A: 驯化菌株和出发菌株培养于乙醇含量 0% 的液体培养基中. B: 驯化菌株和出发菌株培养于乙醇含量 13% 的液体培养基中

Figure 5 Growth curves of original and domesticated strains in liquid medium with different ethanol content. A: The domesticated strain and original strain were cultured in liquid medium with 0% ethanol content. B: The domesticated strain and original strain were cultured in liquid medium with 13% ethanol content.

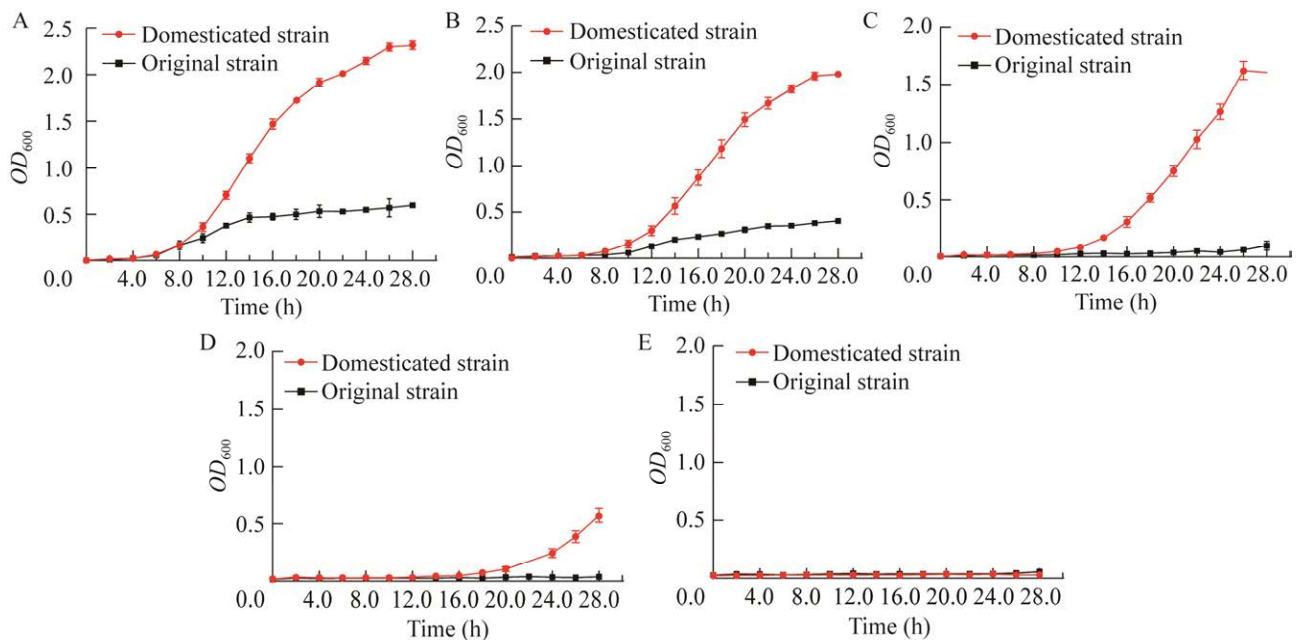


图 6 两株酵母菌株在不同葡萄糖含量液体培养基中的生长曲线 A: 驯化菌株和出发菌株培养于 300 g/L 葡萄糖浓度的液体培养基中. B: 驯化菌株和出发菌株培养于 350 g/L 葡萄糖浓度的液体培养基中. C: 驯化菌株和出发菌株培养于 400 g/L 葡萄糖浓度的液体培养基中. D: 驯化菌株和出发菌株培养于 450 g/L 葡萄糖浓度的液体培养基中. E: 驯化菌株和出发菌株培养于 500 g/L 葡萄糖浓度的液体培养基中

Figure 6 Growth curves of original and domesticated strains in liquid medium with different glucose concentrations. A: The domesticated strain and original strain were cultured in 300 g/L glucose medium. B: The domesticated strain and original strain were cultured in 350 g/L glucose medium. C: The domesticated strain and original strain were cultured in 400 g/L glucose medium. D: The domesticated strain and original strain were cultured in 450 g/L glucose medium. E: The domesticated strain and original strain were cultured in 500 g/L glucose medium.

件下进行发酵, 其结果表明菌株 YF10-5 的乙醇产量比出发菌株高 16%, 并且参与海藻糖合成的 *TPS1* 基因表达上调使细胞内海藻糖积累, 促使菌株 YF10-5 酵母菌株细胞抗应激能力和发酵能力增强。海藻糖作为一种潜在的保护剂, 当酵母菌株在生长过程中受到环境胁迫时, 海藻糖的积累可保持质膜的完整性并稳定细胞中的蛋白质, 增强酵母菌株对环境因子的耐受能力^[15]。

2.3.3 高温耐受性

如图 7 所示, 培养温度为 25–45 °C 时, 驯化菌株及出发菌株均能生长, 并且具有完整的生长周期, 但驯化菌株在稳定期的 OD_{600} 值始终高于出发菌株, 表明驯化菌株在不同温度环

境中都具有较强的生长能力。

分析出发菌株在不同培养温度下的生长曲线可知, 当培养温度低于 30 °C 时, 出发菌株在对数生长期的生长速率随着温度的升高而加快, 当培养温度高于 30 °C 时, 由于出发菌株的对数生长期随温度的升高有所缩短, 致使出发菌株在稳定期的 OD_{600} 值略微下降, 因此认为出发菌株的最适生长温度为 30 °C。

分析驯化菌株在不同培养温度下的生长曲线可知, 驯化菌株在不同培养温度下的生长期相似; 当培养温度为 30–45 °C 时, 驯化菌株在培养 8 h 后均进入稳定期且 OD_{600} 值无明显差异, 表明在培养温度为 30–45 °C 时均适合驯

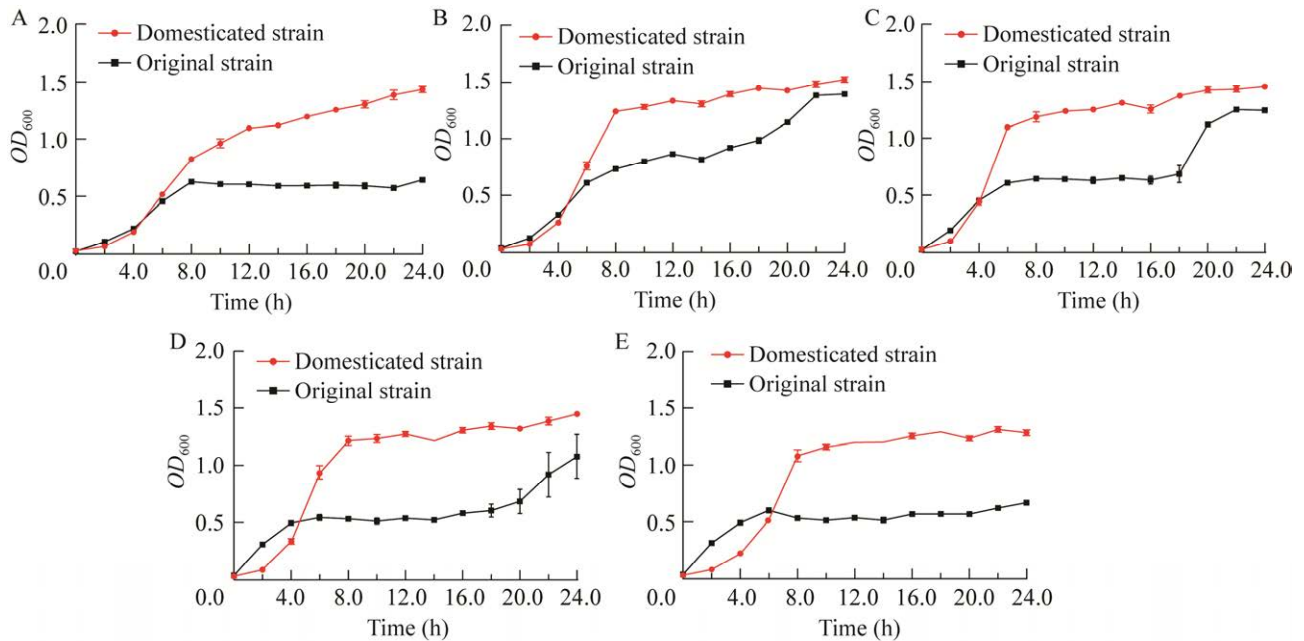


图 7 两株酵母菌株在不同温度环境下的生长曲线 A: 驯化菌株和出发菌株在 25 °C 环境中培养. B: 驯化菌株和出发菌株在 30 °C 环境中培养. C: 驯化菌株和出发菌株在 35 °C 环境中培养. D: 驯化菌株和出发菌株在 40 °C 环境中培养. E: 驯化菌株和出发菌株在 45 °C 环境中培养

Figure 7 Growth curves of original and domesticated strains with different temperature environments. A: The domesticated strain and original strain were cultured at 25 °C. B: The domesticated strain and original strain were cultured at 30 °C. C: The domesticated strain and original strain were cultured at 35 °C. D: The domesticated strain and original strain were cultured at 40 °C. E: The domesticated strain and original strain were cultured at 45 °C.

化菌株生长。由此可知驯化菌株适宜生长的温度范围比出发菌株广，耐高温能力较出发菌株强，表明驯化菌株耐乙醇性能提高的同时耐高温性能也有所提高。

2.3.4 低 pH 耐受性

如图 8 所示，当培养基中 pH 6.5–7.5 时，驯化菌株及出发菌株的生长期均无明显变化，但在培养基 pH 3.5–5.5 时，驯化菌株的生长情况明显优于出发菌株，并且驯化菌株在对数生长期始终保持着较高的生长速度，因此到达稳定期时驯化菌株的 OD_{600} 值均高于出发菌株。

相较于在 pH 6.5–7.5 才表现出完整生长周期的出发菌株，驯化菌株在 pH 3.5–7.5 时均具

有良好的生长能力。出发菌株的延滞期随着 pH 值的降低明显延长，且在对数生长期的生长速率逐渐减慢，在 pH 4.5 时生长较困难，无法表现出完整的生长周期，在 pH 3.5 时几乎无法生长。驯化菌株在 pH 值低于 6.5 培养基中，延滞期虽有略微延长，但其在对数生长期仍保持着较高的生长速率，因此到达平稳期时 OD_{600} 值无明显变化，耐酸 pH 值可达 3.5。徐伟等^[16]在 pH 2.3 和 4.8 的条件下培养获得的低 pH 耐受性酵母菌株，通过透射电子显微镜观察发现低 pH 破坏了细胞膜对多种物质的通透性，降低细胞膜的流动性，致使细胞膜完整性受损。本研究中的酵母菌株在耐乙醇驯化的过程中可能通

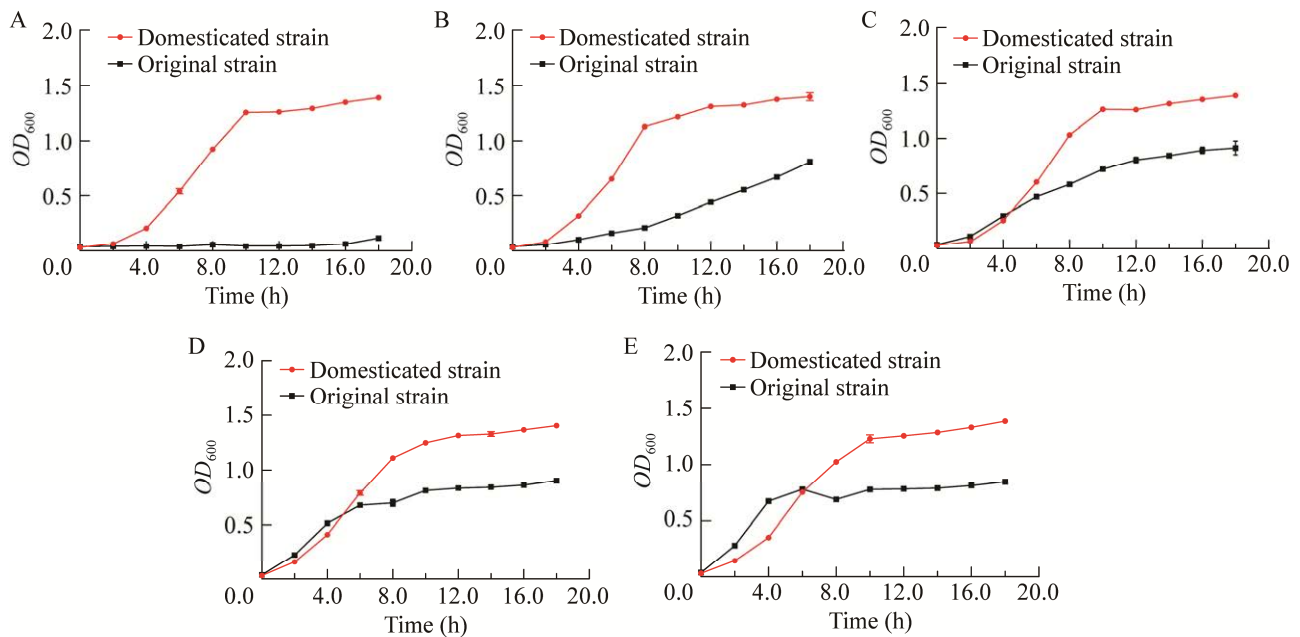


图 8 两株酵母菌株在不同 pH 液体培养基中的生长曲线 A: 驯化菌株和出发菌株在 pH 3.5 环境中培养. B: 驯化菌株和出发菌株在 pH 4.5 环境中培养. C: 驯化菌株和出发菌株在 pH 5.5 环境中培养. D: 驯化菌株和出发菌株在 pH 6.5 环境中培养. E: 驯化菌株和出发菌株在 pH 7.5 环境中培养

Figure 8 Growth curves of original and domesticated strains in liquid medium with different pH values. A: The domesticated strain and original strain were cultured in pH 3.5. B: The domesticated strain and original strain were cultured in pH 4.5. C: The domesticated strain and original strain were cultured in pH 5.5. D: The domesticated strain and original strain were cultured in pH 6.5. E: The domesticated strain and original strain were cultured in pH 7.5.

过调节自身细胞膜的构成成分来维持物质正常的运输功能,因此酵母菌株在获得耐乙醇性能的同时增强了对低 pH 环境的耐受性。

2.4 驯化菌株葡萄糖发酵乙醇性能

酿酒酵母菌可利用葡萄糖发酵乙醇,因此通过高效液相色谱检测不同质量浓度葡萄糖发酵培养基中葡萄糖和乙醇的含量,从而判断出发菌株和驯化菌株发酵性能的强弱。

如图 9A-9D 所示,在葡萄糖初始质量浓度为 160 g/L 和 240 g/L 时,出发菌株和驯化菌株均在 48 h 左右将葡萄糖消耗完全且产乙醇量达到最高值,并且生产的乙醇浓度随着发酵底物葡萄糖初始含量的增加而增加。在葡萄糖初始质量浓度为 320 g/L 时(图 9E、9F),驯化菌株对葡萄糖的消耗量和乙醇的产量始终高于出发菌株,发酵 144 h 时,驯化菌株剩余的糖浓度为 105.6 g/L,出发菌株剩余的糖浓度为 119.64 g/L,驯化菌株发酵后最终的乙醇浓度为 86.67 g/L,较出发菌株的乙醇浓度 75.09 g/L 提高 15.42%。

在葡萄糖质量浓度为 160 g/L 和 240 g/L 时,出发菌株和驯化菌株的乙醇产量和糖醇转化率无显著差异,并且两株菌株均将底物葡萄糖消耗完全,推测原因是底物不足,因此驯化菌株无法展现良好的菌株发酵能力。当葡萄糖初始质量浓度提高至 320 g/L 时,底物处于过量状态,驯化菌株的最终乙醇产量高于出发菌株,体现出优良的发醇性能。

2.5 驯化菌株耐受性提高机制

有研究报道^[13,15,17-18],酵母菌株对高糖的耐受性与乙醇耐受性息息相关,菌株对乙醇、葡萄糖的耐受性均与细胞内海藻糖的含量有关。海藻糖作为一种保护剂,当酵母菌株在生长过程中受到环境胁迫时,海藻糖的积累可保持质膜的完整性并稳定细胞中的蛋白质等生物大分

子结构来提高酵母菌株对乙醇的耐受性,海藻糖含量的增加可以提高酵母菌株在乙醇胁迫下的存活率。因此本研究检测了出发菌株和驯化菌株中海藻糖合成基因 *TPS1* 和 *TPS2* 的表达水平,阐述适应性驯化提高酿酒酵母菌株乙醇耐受性的相关途径。

如图 10A 所示,本研究所用的引物可扩增出单一目标产物,152 bp cDNA 片段是由 *TPS1* 引物扩增获得,158 bp cDNA 片段是由 *TPS2* 引物扩增获得。对比出发菌株和驯化菌株中海藻糖合成基因 *TPS1* 和 *TPS2* 相对表达水平发现(图 10B),驯化菌株的海藻糖合成基因 *TPS1* 和 *TPS2* 的表达水平均显著高于出发菌株。驯化菌株中 *TPS1* 及 *TPS2* 表达水平的提高说明酵母菌株经过乙醇驯化后胞内海藻糖合成代谢上调。这与 Divate 等^[18]通过上调 *TPS1* 和缺失 *NTH1*,增加了酵母菌株内的海藻糖积累,增强了重组菌株的乙醇耐受能力的研究一致。表明本研究驯化获得的耐乙醇菌株在高胁迫环境下可能提高了细胞内海藻糖的合成代谢,进而通过海藻糖的特性增强菌株对多种高胁迫条件的耐受性。

3 结论

本研究通过高浓度乙醇胁迫环境适应性驯化获得一株性状优良的高耐受性酿酒酵母菌株,并讨论了其发酵性能和耐受性提高机制。本研究获得的驯化菌株可在体积分数为 13% 乙醇的液体培养基中生长,并保持完整的细胞生长周期和细胞形态,能耐受质量浓度 450 g/L 的葡萄糖溶液、温度 45 °C 和 pH 3.5。该驯化菌株在糖浓度 450 g/L、45 °C 和 pH 3.5 的环境下依然体现出了良好的生长特性和发酵性能,并且糖醇转化率可达 79.22%,较出发菌株提高 7.72%。此外,本研究还初步探究了该菌株提高

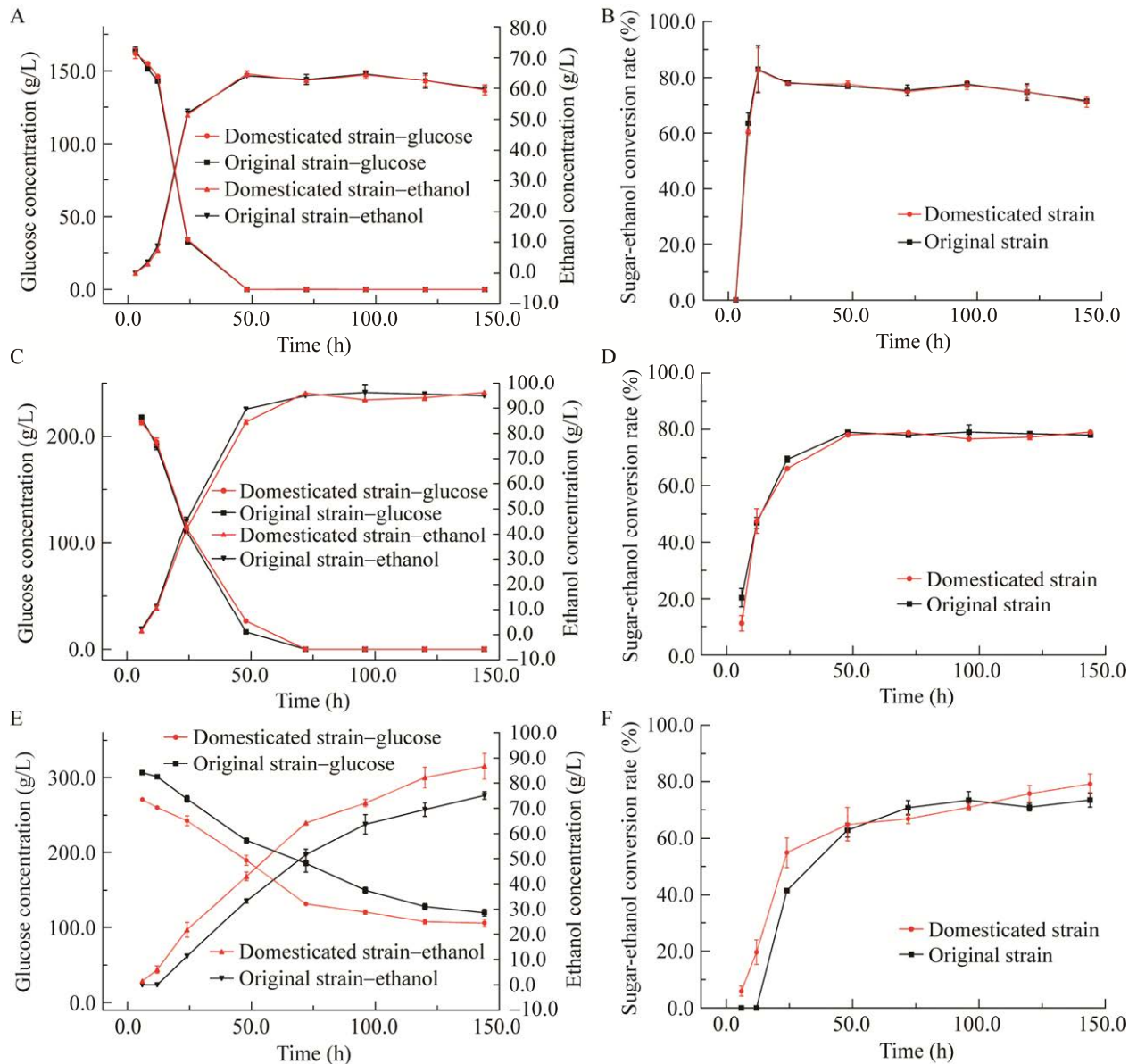


图 9 两株酵母菌发酵不同葡萄糖浓度的性能 A: 两株酵母菌株发酵 160 g/L 葡萄糖过程中糖和乙醇浓度的变化. B: 两株酵母菌株发酵 160 g/L 葡萄糖过程中糖醇转化率的变化. C: 两株酵母菌株发酵 240 g/L 葡萄糖过程中糖和乙醇浓度的变化. D: 两株酵母菌株发酵 240 g/L 葡萄糖过程中糖醇转化率的变化. E: 两株酵母菌株发酵 320 g/L 葡萄糖过程中糖和乙醇浓度的变化. F: 两株酵母菌株发酵 320 g/L 葡萄糖过程中糖醇转化率的变化

Figure 9 Fermentation performance of original and domesticated strains with different glucose concentrations. A: Sugar and ethanol concentration of 160 g/L glucose fermented by domesticated strain and original strain. B: Sugar-ethanol conversion rate of 160 g/L glucose fermented by domesticated strain and original strain. C: Sugar and ethanol concentration of 240 g/L glucose fermented by domesticated strain and original strain. D: Sugar-ethanol conversion rate of 240 g/L glucose fermented by domesticated strain and original strain. E: Sugar and ethanol concentration of 320 g/L glucose fermented by domesticated strain and original strain. F: Sugar-ethanol conversion rate of 320 g/L glucose fermented by domesticated strain and original strain.

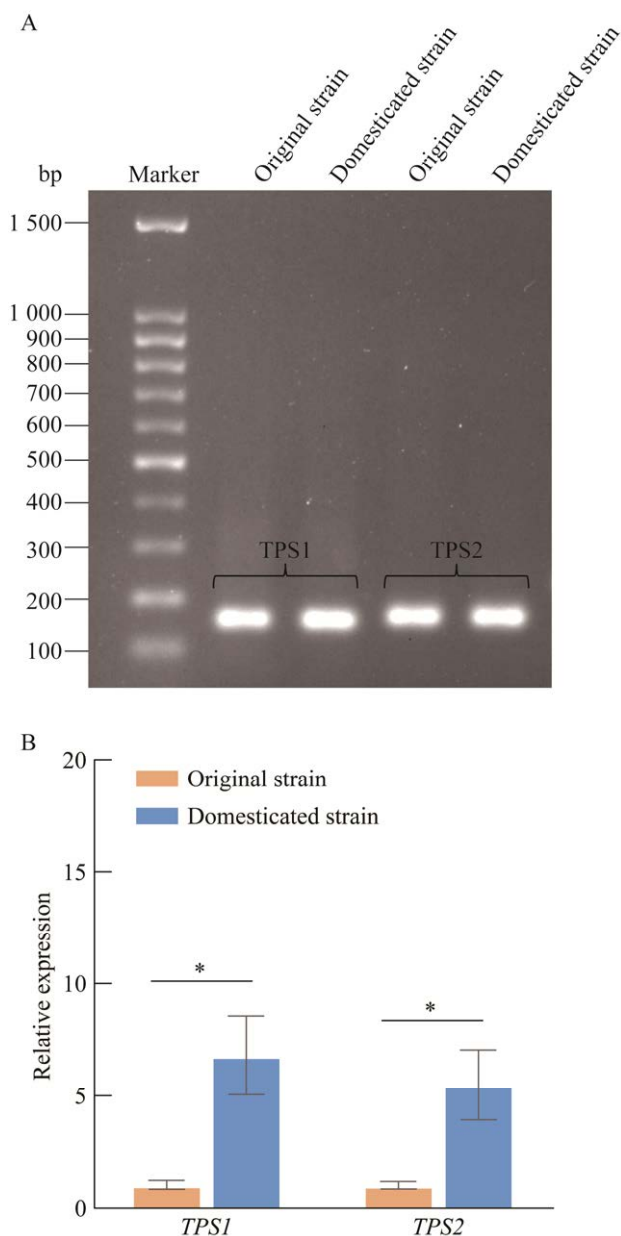


图 10 出发菌株和驯化菌株中海藻糖合成基因 *TPS1* 和 *TPS2* 表达水平检测 A: *TPS1* 和 *TPS2* 引物 qPCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图。B: *TPS1* 和 *TPS2* 在出发菌株和驯化菌株的相对表达水平。*: $P < 0.05$

Figure 10 Relative gene expression level of *TPS1* and *TPS2* in original and domesticated strains. A: Agarose gel electrophoresis of qPCR amplified products with *TPS1* and *TPS2* primers. B: Relative expression of *TPS1* and *TPS2*. *: $P < 0.05$.

耐受性能的机制,发现适应性驯化通过上调菌株胞内海藻糖合成代谢提高耐受性能,可为后续其他菌株驯化筛选提供研究基础。

REFERENCES

- [1] 刘胜. 稻谷发酵产乙醇中酵母抗逆性的研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2023.
LIU S. Yeast resistance in ethanol fermentation using rice with husk[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [2] SHEN DX, HE XL, WENG PF, LIU YN, WU ZF. A review of yeast: high cell-density culture, molecular mechanisms of stress response and tolerance during fermentation[J]. FEMS Yeast Research, 2022, 22(1): foac050.
- [3] QURESHI SA, ZHANG J, BAO J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Bioresource Technology, 2015, 189: 399-404.
- [4] GALLONE B, MERTENS S, GORDON JL, MAERE S, VERSTREPEN KJ, STEENSELS J. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 148-155.
- [5] CAO TS, CHI Z, LIU GL, CHI ZM. Expression of *TPS1* gene from *Saccharomycopsis fibuligera* A11 in *Saccharomyces* sp. W0 enhances trehalose accumulation, ethanol tolerance, and ethanol production[J]. Molecular Biotechnology, 2014, 56(1): 72-78.
- [6] DIVATE NR, HUANG PJ, CHEN GH, CHUNG YC. Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with ethanol and aldehydes tolerance via overexpression of aldehyde reductase[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 850.
- [7] WANG PM, ZHENG DQ, CHI XQ, LI O, QIAN CD, LIU TZ, ZHANG XY, DU FG, SUN PY, QU AM, WU XC. Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains[J]. Bioresource Technology, 2014, 152: 371-376.
- [8] TECHAPARIN A, THANONKEO P, KLANRIT P. Gene expression profiles of the thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KKU-VN₈ during high-temperature ethanol fermentation using sweet

- sorghum juice[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(10): 1521-1527.
- [9] MATSUMOTO I, ARAI T, NISHIMOTO Y, LEELAVATCHARAMAS V, FURUTA M, KISHIDA M. Thermo tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* reveals more tolerance to heat shock than the brewery yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biocontrol Science*, 2018, 23(3): 133-138.
- [10] 张士双. 乙醇耐受性啤酒酵母突变体 YN81 的选育及其耐受机制研究[D]. 新乡: 河南科技学院硕士学位论文, 2022.
- ZHANG SS. Breeding of ethanol-tolerant mutant YN81 of beer yeast and its tolerance mechanism[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Institute of Science and Technology, 2022 (in Chinese).
- [11] 金海炎. 猕猴桃酒优良酿酒菌株的选育及混菌发酵工艺优化研究[D]. 南阳: 南阳师范学院硕士学位论文, 2022.
- JIN HY. Breeding of excellent brewing strains for kiwifruit wine and optimization of mixed fermentation technology[D]. Nanyang: Master's Thesis of Nanyang Normal University, 2022 (in Chinese).
- [12] 方佩佩, 王世清, 李静, 熊旭波, 谭海刚, 刘晓莉. 耐酒精酿酒酵母大气压等离子体诱变条件的建立及选育[J]. *酿酒科技*, 2016(9): 31-37.
- FANG PP, WANG SQ, LI J, XIONG XB, TAN HG, LIU XL. Establishment of the conditions of atmospheric plasma-inducing mutation of *S. cerevisiae* and breeding of an ethanol-tolerant strain[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2016(9): 31-37 (in Chinese).
- [13] YI S, ZHANG X, LI HX, DU XX, LIANG SW, ZHAO XH. Screening and mutation of *Saccharomyces cerevisiae* UV-20 with a high yield of second generation bioethanol and high tolerance of temperature, glucose and ethanol[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2018, 58(4): 440-447.
- [14] ZHANG Q, JIN YL, FANG Y, ZHAO H. Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high-gravity bioethanol fermentation[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2019, 41: 88-94.
- [15] 何迎粉, 何荣荣, 刘敦华, 孙悦. 海藻糖与酿酒酵母乙醇耐受性相关性的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(11): 1-4.
- HE YF, HE RR, LIU DH, SUN Y. Correlation between trehalose and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *China Brewing*, 2020, 39(11): 1-4 (in Chinese).
- [16] 徐伟, 柴丽娜, 傅徐阳, 马婷婷, 付大伟, 王薇. 耐低 pH 酵母菌的分离及其对酸胁迫环境的适应性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16): 112-117.
- XU W, CHAI LN, FU XY, MA TT, FU DW, WANG W. Isolation of low pH resistant yeast and its adaptability to acid stress environment[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(16): 112-117 (in Chinese).
- [17] 刘延波, 宋艳洁, 李海登, 沈祥坤, 张立新, 孙西玉, 韩素娜, 潘春梅. 复合诱变选育耐高温产乙醇酵母菌的研究[J]. *中国酿造*, 2022, 41(10): 55-61.
- LIU YB, SONG YJ, LI HD, SHEN XK, ZHANG LX, SUN XY, HAN SN, PAN CM. Breeding of high temperature resistant with ethanol yield yeast by compound mutagenesis[J]. *China Brewing*, 2022, 41(10): 55-61 (in Chinese).
- [18] DIVATE NR, CHEN GH, WANG PM, OU BR, CHUNG YC. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in ethanol tolerance by accumulation of trehalose[J]. *Bioengineered*, 2016, 7(6): 445-458.