

2 株酒用酵母的分子鉴定及耐受性研究*

张玉然¹ 李文平¹ 郭兰英² 张海林²

(¹ 济宁医学院生物科学学院,日照 276826;² 山东徐旭酒曲有限公司,济宁 272000)

摘要 目的 对 2 株酒用酵母进行分子鉴定并研究菌株耐受性。方法 扩增 2 株酒用酵母的 26S rDNA D1/D2 区域序列,比对分析并构建系统发育进化树进行鉴定;将 2 株酒用酵母分别于不同酸度、温度及酒精度条件下进行培养,测定菌体长势。结果 通过分子鉴定,将菌株 2-r-9 命名为异常威克汉逊酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)2-r-9,将菌株 6-y-r 命名为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)6-y-r。耐受性方面,菌株 *W. anomalus* 2-r-9 在高酸度条件下仍保持良好的菌体长势,酸耐受性优于菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r;在 42 °C 高温下,菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 仍可生长,而菌株 *W. anomalus* 2-r-9 的生长则受到较强抑制;菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 在 10% 的酒精度下仍可正常生长,而菌株 *W. anomalus* 2-r-9 在 8% 的酒精度下即受到较强抑制。结论 成功对 2 株酒用酵母进行了分子鉴定并了解其耐受性,为后续应用性研究奠定基础。

关键词 酒用酵母;分子鉴定;耐受性

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)12-387-04

Study on molecular identification and tolerance of two wine yeasts

ZHANG Yuran, LI Wenping, GUO Lanying, ZHANG Hailin

(¹ School of Biological Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China;

² Shandong Xuxu Jiuqu Co. Ltd., Jining 272000, China)

Abstract: Objective To identify the species and study the tolerance of two wine yeasts. **Methods** Sequence of D1/D2 domain of 26S rDNA was amplified. The species of two wine yeasts was identified based on sequence alignment and phylogenetic tree. These two wine yeasts were cultured under different acidity, temperature and alcoholic strength to study the tolerance. **Results** Strain 2-r-9 and 6-y-r were identified and named as *Wickerhamomyces anomalus* 2-r-9 and *Saccharomyces cerevisiae* 6-y-r, respectively. The growth of *W. anomalus* 2-r-9 was better than that of *S. cerevisiae* 6-y-r under higher acidity. *S. cerevisiae* 6-y-r could grow well at 42 °C but the growth of *W. anomalus* 2-r-9 was obviously restrained. *S. cerevisiae* 6-y-r could grow well at alcoholic strength of 10%. However, the growth of *W. anomalus* 2-r-9 was restrained significantly at alcoholic strength of 8%. **Conclusion** The molecular identification and tolerance of two wine yeasts were carried out successfully, which could lay the foundation for further applied research.

Keywords: Wine Yeasts; Molecular identification; Tolerance

酒用酵母从功能上可分为产酒精酵母和生香酵母。产酒精酵母主要用于酒精的产生,多为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);生香酵母主要用于香味物质的合成,多为异常威克汉逊酵母

(*Wickerhamomyces anomalus*)^[1-4]。近年来,酒用酵母的选育鉴定及发酵条件优化已逐渐成为研究的热点。一方面因为利用分子手段对菌株进行分类鉴定后有助于酒用酵母数据库的建立;另一方面因为酒用酵母在工业酿酒过程中不可避免地受到发酵条件(酸度、酒精度及温度)的影响。了解菌株对这些胁迫条件的耐受性直接关系到发酵工艺的确定,进而影响经济效益^[5-8]。

* [基金项目] 济宁医学院博士科研启动基金项目(JY2015BS12);山东省医药卫生科技发展计划项目(2015WS0416);国家级大学生创新创业训练计划项目(201510443008)

本文以芝麻香型白酒酒醅中筛选获得的 2 株酵母为研究对象,扩增分析其 26S rDNA D1/D2 区域序列,使用 NCBI 数据库及 MEGA 7.0 软件进行同源比对,构建系统发育进化树;研究 2 株酒用酵母对酸、温度及酒精的耐受性,以期酒用酵母数据库的建立奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 生香酵母菌株 2-r-9 及产酒精酵母菌株 6-y-r 由山东徐旭酒曲有限公司提供。

1.1.2 培养基 1) YPD 液体培养基 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 自然 pH 值。2) YPD 固体培养基 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 自然 pH 值。

1.1.3 仪器与试剂 恒温培养摇床(太仓市实验设备厂); PCR 扩增仪(英国 Fedbio 公司); WD-9413B 凝胶成像分析仪(北京市六一仪器厂); 真菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司); 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司); 蛋白胨(国药集团化学试剂有限公司)

1.2 方法

1.2.1 酒用酵母的分子鉴定 1) 26S rDNA D1/D2 区域序列的 PCR 扩增 酒用酵母菌基因组 DNA 提取物 6 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, dNTP Mixture 4 μ l, 20 μ mol/L 的 26S rDNA D1/D2 序列上下游通用引物 NL1 和 NL4 各 1 μ l, TapDNA 聚合酶 0.5 μ l, 补无菌水至 50 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环扩增 35 次。取 4 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 扩增产物的测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。2) 系统发育树的构建使用 NCBI 数据库对测序菌株的 26S rDNA D1/D2 区域序列进行比对分析, 同时利用 MEGA 7.0 软件同源比对并构建系统进化树^[9-10]。

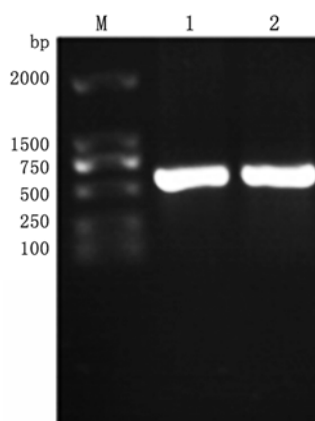
1.2.2 菌株耐受性分析 1) 酸耐受性 将 2 株酒用酵母分别于不同初始 pH (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0) 的发酵液中培养, 30 $^{\circ}$ C, 120 r/min, 测定菌体浓度。2) 温度耐受性 将 2 株酒用酵母分别于不同温度(36、38、42 $^{\circ}$ C) 下培养, 120 r/min, 测定菌体浓度。3) 酒精耐受性 将 2 株酒用酵母分别于含不同浓度酒精(0%、6%、8%、10%、12%) 的发酵液

中培养, 30 $^{\circ}$ C, 120 r/min, 测定菌体浓度。

2 结果和讨论

2.1 酒用酵母的分子鉴定

2.1.1 26S rDNA D1/D2 区域序列的扩增 利用通用引物 NL1 和 NL4 扩增 26S rDNA D1/D2 区域序列, 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。将扩增产物进行测序, 确定菌株 2-r-9 及 6-y-r 的 26S rDNA D1/D2 区域序列的片段分别为 590bp 和 587 bp。



注: M. 核酸标准分子量; 1. 菌株 6-y-r; 2. 菌株 2-r-9

图 1 2 株酒用酵母 26S rDNA D1/D2 区域序列 PCR 扩增产物电泳图

2.1.2 酒用酵母菌系统发育进化树的构建 对 2 株酒用酵母的 26S rDNA D1/D2 区域序列进行分析, 构建系统发育进化树, 结果如图 2 所示。发现菌株 2-r-9 与 *W. anomalus* ATCC 16763 亲缘关系较近而聚成 1 支, 菌株 6-y-r 与 *S. cerevisiae* ATCC 18824 亲缘关系较近而聚成一支。利用 NCBI 数据库中的 BLAST 程序进一步比对, 由表 1 可知, 菌株 2-r-9 与 *W. anomalus* MA-Y9、*W. anomalus* H9Y15 和 *W. anomalus* H9Y1 的同源性最高, 亲缘关系最近, 相似度达 100%; 由表 2 可知, 菌株 6-y-r 与 *S. cerevisiae* S2-39、*S. cerevisiae* CTBRL87 和 *S. cerevisiae* QWC_09 的同源性较高, 亲缘关系最近, 相似度达 100%。结合构建的系统发育进化树, 将菌株 2-r-9 命名为 *W. anomalus* 2-r-9, 将菌株 6-y-r 命名为 *S. cerevisiae* 6-y-r。

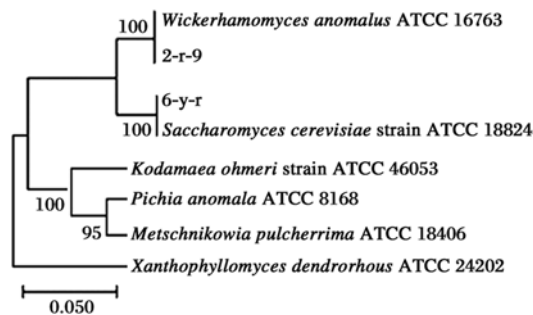


图 2 基于 26S rDNA D1/D2 区域序列分析构建的系统发育进化树

表 1 菌株 2-r-9 26S rDNA D1/D2 区域序列比对分析

菌株名称	相似度/%
2-r-9	100
W. anomalus strain MA-Y9	100
W. anomalus strain H9Y15	100
W. anomalus strain H9Y1	100
W. anomalus strain cs24	99
W. anomalus strain QDRP-4	99
W. anomalus strain ZPM11	99

表 2 菌株 6-y-r 26S rDNA D1/D2 区域序列比对分析

菌株名称	相似度/%
6-y-r	100
S. cerevisiae strain S2-39	100
S. cerevisiae strain CTBRL87	100
S. cerevisiae strain QWC_09	100
S. cerevisiae isolate 0B12	99
S. cerevisiae strain NL27	99

2.2 酒用酵母的耐受性分析

2.2.1 酸耐受性 在芝麻香型白酒生产过程中,随着发酵的进行酒醅酸度逐渐增加,而 *S. cerevisiae* 6-y-r 及 *W. anomalus* 2-r-9 在发酵中后期开始大量繁殖,这要求二者必须具备一定的耐酸能力。对 2 株酵母菌的酸耐受性进行分析,结果如图 3 所示。*W. anomalus* 2-r-9 的酸耐受性优于 *S. cerevisiae* 6-y-r,尤其是 *W. anomalus* 2-r-9 在高酸度条件下仍保持良好的菌体长势,有利于其在发酵后期良好的合成香味物质。

2.2.2 温度耐受性 高温发酵是芝麻香型白酒生产的特殊需求,最高发酵温度可达 45℃^[11-12]。2 株酒用酵母的温度耐受性如图 4 所示。高温条件下,菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 的长势优于菌株 *W. anomalus* 2-r-9,其在 42℃ 高温下仍可较好生长。

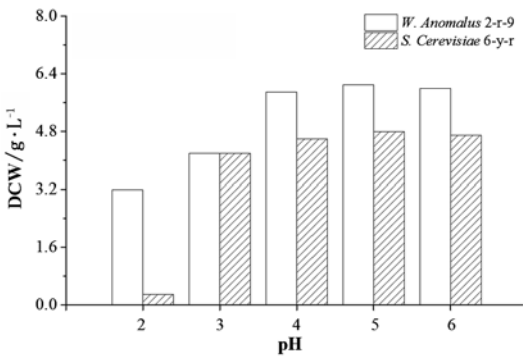


图 3 酸度对 2 株酒用酵母长势的影响

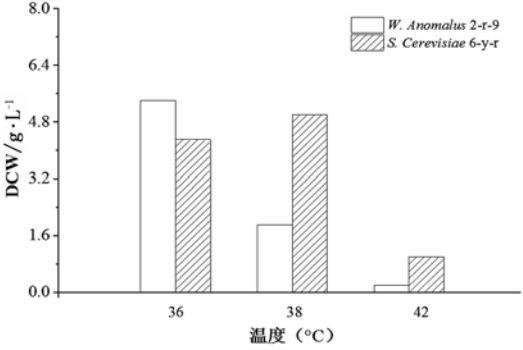


图 4 温度对 2 株酒用酵母长势的影响

2.2.3 酒精耐受性 随着芝麻香型白酒发酵的进行,发酵中后期酒醅的酒精度逐渐增加,2 株酒用酵母需具备一定的耐酒精能力^[11-12]。对 2 株酵母菌的酒精耐受性进行分析,结果如图 5 所示。*S. cerevisiae* 6-y-r 的酒精耐受性优于 *W. anomalus* 2-r-9,在 10% 的酒精度下菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 仍可正常生长。

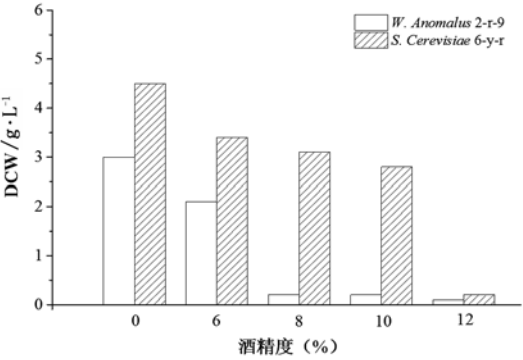


图 5 酒精度对 2 株酒用酵母长势的影响

3 结论

对 2 株酒用酵母菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列进行扩增,确定菌株 2-r-9 及 6-y-r 的 26S rDNA D1/D2 区域序列的片段大小分别为 590bp 和

587 bp。序列比对并构建系统发育进化树,确定菌株 2-r-9 与 *W. Anomalous* ATCC 16763 亲缘关系比较近,将菌株 2-r-9 命名为 *W. anomalous* 2-r-9;确定菌株 6-y-r 与 *S. Cerevisiae* ATCC 18824 亲缘关系比较近,将菌株 6-y-r 命名为 *S. cerevisiae* 6-y-r。菌株 *W. anomalous* 2-r-9 在高酸度条件下仍保持良好的菌体长势,酸耐受性优于菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r。高温条件下,菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 的长势优于菌株 *W. anomalous* 2-r-9,在 42 °C 高温下仍可生长。菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 的酒精耐受性优于菌株 *W. anomalous* 2-r-9,菌株 *S. cerevisiae* 6-y-r 在 10% 的酒精精度下仍可正常生长,而菌株 *W. anomalous* 2-r-9 在 8% 的酒精精度下即受到较强抑制。因此,这 2 株酒用酵母品质良好,具有相当的利用潜力,这为后续的应用性研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王国良,宋俊梅,曲静然. 生香酵母及其应用[J]. 食品工业,2004(3):16-17.
- [2] 关阳,王国良,王金枝,等. 产酯酵母的应用研究现状[J]. 酿酒科技,2013(1):101-103.
- [3] 王卫国,张仟伟,赵永亮,等. 酿酒酵母的选育及其应用研究进展[J]. 河南工业大学学报自然科学版,2015,36(6):104-112.
- [4] Pires EJ,Teixeira JA,Brúnyik T,et al. Yeast:the soul of beer's aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast[J]. Appl Microbiol Biot, 2014, 98 (5) : 1937-1949. DOI: 10. 1007/s00253-013-5470-0.
- [5] Shi S Z,Cheng D Y,Ma F M,et al. Technological optimization of ethanol fermentation on energy beet with tolerance high temperature yeast strain [J]. Adv Mater Res,2012 (433-440) : 1245-1252. DOI:10. 4028/www. scientific. net/amr. 433-440. 1245.
- [6] 罗惠波,王毅,王大地,等. 小曲中产香霉菌的优选及培养条件优化[J]. 食品与机械,2014,30(2):32-34.
- [7] 尤亮,丁东栋,崔志峰. 乙醇耐受性酿酒酵母菌株选育的研究进展[J]. 工业微生物,2016(3):51-55.
- [8] 陆振群. 产酯类酵母菌的选育[D]. 芜湖:安徽工程大学生物与化学工程学院,2012.
- [9] Maheswaran S,Sumanasinghe V A,Samaraweera P. A comparative phylogenetic analysis of *Exacum* spp. of Sri Lanka with *Osbeckia octandra* (L.) DC [J]. Trop Agric Res,2014,25 (4) : 402-411. DOI:10. 4038/tar. v25i4. 8056.
- [10] Saitou N,Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol,1987,4 (4) : 406-425. DOI:10. 1016/j. ympev. 2008. 01. 019.
- [11] 袁超. 芝麻香型白酒生产关键微生物的功能分析[D]. 济南:山东轻工业学院食品与生物工程学院,2011.
- [12] 王洪芹,白祝清. 芝麻香型白酒生产工艺总结[J]. 酿酒科技,2000(2):81-82.

(收稿日期 2016-10-23)

(上接第 386 页)

- [46] Wu J,Zhou LQ,Yu W,et al. PML4 facilitates erythroid differentiation by enhancing the transcriptional activity of GATA-1 [J]. Blood,2014,123 (2) : 261-270. DOI:10. 1182/blood-2013-02-483289.
- [47] Hsu KS,Guan BJ,Cheng X,et al. Translational control of PML contributes to TNF α -induced apoptosis of MCF7 breast cancer cells and decreased angiogenesis in HU-VECs [J]. Cell Death Differ,2016,23 (3) : 469-483. DOI:10. 1038/cdd. 2015. 114.
- [48] Ho A,Wilson FR,Peragine SL,et al. TRF1 phosphorylation on T271 modulates telomerase-dependent telomere length maintenance as well as the formation of ALT-associated PML bodies [J]. Sci Rep,2016,6:36913. DOI:10. 1038/srep36913.
- [49] Jamiruddin MR,Kaitsuka T,Hakim F,et al. HDAC9 regulates the alternative lengthening of telomere (ALT) pathway via the formation of ALT-associated PML bodies [J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,481 (1-2) : 25-30. DOI:10. 1016/j. bbrc. 2016. 11. 026.
- [50] Tessier S,Martin-Martin N,de Thé H,et al. PML,a protein at the cross road of oxidative stress and metabolism [J]. Antioxid Redox Signal,2016. DOI:10. 1089/ars. 2016. 6898.
- [51] Chen ZH,Wang WT,Huang W,et al. The lncRNA HO-TAIRM1 regulates the degradation of PML-RARA oncoprotein and myeloid cell differentiation by enhancing the autophagy pathway [J]. Cell Death and Differentiation,2016. DOI:10. 1038/cdd. 2016. 111.

(收稿日期 2016-11-04)