

杨雨晴, 王慕瑶, 叶佩良, 白龙, 范婷婷, 王雪晴, 马隽尧, 李俊, 蒋丹丹, 章漳, 赵心清. 西藏来源酵母菌株的鉴定与生理特性[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27 (6): 1471-1475

Yang YQ, Wang MY, Ye PL, Bai L, Fan TT, Wang XQ, Ma JR, Li J, Jiang DD, Zhang Z, Zhao XQ. Identification and physiological characteristics of yeast strains isolated from Tibet, China [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2021, 27 (6): 1471-1475

西藏来源酵母菌株的鉴定与生理特性

杨雨晴^{1#} 王慕瑶^{1#} 叶佩良¹ 白龙¹ 范婷婷¹ 王雪晴¹ 马隽尧¹ 李俊² 蒋丹丹²
章漳² 赵心清^{1✉}

¹上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240

²伽蓝(集团)股份有限公司 上海 200233

摘要 酵母菌在食品、化学品及生物能源生产中具有广泛的应用潜力。我国西藏自治区具有独特的地理环境,可能孕育着丰富的微生物多样性,在食品、化学品及生物能源生产中具有广泛的应用潜力。为开发利用西藏地区的酵母资源,对西藏土壤、地衣和植物等不同来源的10株酵母菌株进行研究。其中,5株非常规酵母1-5-2、B02、H1、SD32和SD29分别鉴定为*Occultifur kilbournensis*、*Coniochaeta mutabilis*、*Pichia pijperi*、*Debaryomyces fabryi*和*Candida fermentati*,这是首次报道从西藏来源的粗壮秦艽、茶树花朵和隔距兰匍匐根等植物样品中分离出这些酵母菌属种。鉴定了5株酿酒酵母2-2、4a1、5-1、SC2-1和SC12,分别来自松萝、青稞酒曲、冰川水和土壤。进一步比较这10株酵母的抗逆性和酿酒酵母菌株细胞壁多糖的抗氧化性,发现来自地衣的酿酒酵母菌株2-2和来自土壤的酿酒酵母菌株SC2-1对乙酸、过氧化氢和高温等环境胁迫耐受性较好。此外,来自土壤的酿酒酵母SC12和SC2-1细胞壁多糖抗氧化性较高,其Trolox当量分别可达55.24 mmol g⁻¹ L⁻¹和46.57 mmol g⁻¹ L⁻¹。本研究结果表明西藏来源酵母具有丰富的生物多样性,其中发现的对环境胁迫具有较好耐受性的酵母菌株可进一步开发利用。(图5表1参31)

关键词 土壤酵母菌多样性; 菌株鉴定; 抗逆性; 细胞壁多糖; 抗氧化性

Identification and physiological characteristics of yeast strains isolated from Tibet, China

YANG Yuqing^{1#}, WANG Muyao^{1#}, YE Peiliang¹, BAI Long¹, FAN Tingting¹, WANG Xueqing¹, MA Juanyao¹, LI Jun², JIANG Dandan², ZHANG Zhang² & ZHAO Xinqing^{1✉}

¹ School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² JALA (Group) Co. Ltd, Shanghai 200233, China

Abstract The Tibet Autonomous Region in China has a unique geographical environment and may harbor abundant microbial diversity. Therefore, studies on microbial strains from Tibet are important for the exploration of biodiversity in China. Yeast strains have widespread application potential in food, chemical, and bioenergy production, but so far, only a few studies have been conducted on yeast strains from Tibet. In this study, ten yeast strains from soil, lichen, and plant samples from Tibet were collected and characterized. Subsequently, the stress resistance of these yeasts and the antioxidant resistance of cell wall polysaccharides from the *Saccharomyces cerevisiae* strains were compared. Among these yeast strains, the isolates of 1-5-2, B02, H1, SD32, and SD29 are unconventional yeast strains belonging to five different genera. These yeast strains were identified as *Occultifur kilbournensis*, *Coniochaeta mutabilis*, *Pichia pijperi*, *Debaryomyces fabryi*, and *Candida fermentati*. This is the first report on the isolation of these species from plants of *Gentiana robusta*, *Camellia sinensis*, and stolon of *Cleisostoma sagittiforme* grown in Tibet. Five budding yeast *S. cerevisiae* strains were isolated from lichen, glacial water, highland barley wine starter, and soil. It was found that *S. cerevisiae* strain 2-2 from lichen and *S. cerevisiae* strain SC2-1 from the soil both had good tolerance to environmental stress conditions such as acetic acid, hydrogen peroxide, and high temperatures. In addition, the cell wall polysaccharides of *S. cerevisiae* strains SC12 and SC2-1 isolated from the soil sample showed relatively higher oxidation resistance than that of the other strains, with their Trolox equivalent being 55.24 mmol g⁻¹ L⁻¹ and 46.57 mmol g⁻¹ L⁻¹, respectively. Our studies revealed the rich biodiversity of yeast strains in Tibet, and the yeast strains that are tolerant to adverse environments provide a basis for the further development and utilization of natural yeast strains in China.

Keywords soil yeast diversity; strain identification; environmental stress tolerance; cell wall polysaccharide; oxidation resistance

收稿日期 Received: 2020-08-31 接受日期 Accepted: 2020-11-11

上海市自然科学基金面上项目(19ZR1427500)资助 Supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (19ZR1427500)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn)

酵母菌用途广泛,在发酵食品生产方面有悠久的历史,而且在化工、新能源开发、生物制药等多个领域也被广泛研究和应用^[1-3]。随着不同来源酵母菌种资源被不断开发,性能优良的酵母菌株被不断发现。例如,我国学者在吉林省长白山林区分离获得高效分解树皮的酵母菌群^[4];从河北昌黎葡萄园产区土壤样品中成功分离高产酶的酵母菌株等^[5]。此外,植物内生酵母菌能促进植物生长,保护植物免受病原微生物的侵袭^[6]。西藏位于我国青藏高原西南部,地形地貌多样,平均海拔高,气候环境独特,可能蕴藏了大量的独特微生物菌种资源。高海拔地区低温、缺氧、强紫外照射的独特环境可能导致该地区微生物的特殊生理特性,为微生物多样性提供了生态系统基础。此外,特色的藏药与食品特产也可能和一些功能酵母的作用有关。因此,西藏来源的酵母具有重要的理论研究价值和开发应用前景。

目前对西藏地区酵母的研究主要集中在对西藏极端生境中的嗜热、耐低温菌株进行分离鉴定,以及其在原生环境中的生态分布^[7]。对西藏特产的发酵食品中的酵母菌分布、特性和益生效用也展开了一定研究,比如对西藏开菲尔粒中酵母菌多样性的研究等^[8]。在从西藏各类样品分离获得的酵母中,本研究主要聚焦土壤酵母与植物内生酵母。前期研究报道表明,土壤来源的酿酒酵母能发酵生产葡萄酒并产生特有香气化合物^[9]。此外,土壤酵母在工业、农业、环境治理、新材料开发等多个领域也具有潜在的价值^[4]。对西藏植物内生酵母与西藏土壤酵母的多样性研究将推动西藏特有功能性酵母菌株筛选,为发酵产业提供更多优质菌种资源。现有报道包括拉鲁湿地土壤酵母菌和在西藏植物叶片表面分离到新的酵母等^[7,10-11],然而目前针对西藏土壤、地衣及植物来源酵母的研究报道还较少。

关于西藏酵母菌株细胞壁多糖的抗氧化活性和修复受损细胞能力的相关研究同样较为欠缺。酵母细胞壁多糖是从酵母细胞壁所提取的一系列大分子糖类聚合物的统称,其主要活性成分是 β -葡聚糖以及甘露聚糖^[12]。酵母细胞壁多糖在农业上应用广泛,此外有研究表明酵母细胞壁多糖能提高抗氧化酶活性和超氧阴离子清除活性^[13]。为探究高海拔、低温和高紫外线条件的西藏地区酵母菌株细胞壁多糖的抗氧化性,进一步探索细胞壁多糖在医药和轻工业领域的应用潜力,本研究在检测菌株对过氧化氢和乙酸等工业发酵常见代谢毒副产物的耐受性后,又对酿酒酵母细胞壁多糖的抗氧化性进行了检测。

我们对来自西藏的10株酵母菌株进行鉴定和系统发育分析,并检测酿酒酵母细胞壁多糖的抗氧化性和环境胁迫耐受性等性能,以期获得具有应用价值的酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 从西藏采集土壤、隔距兰匍匐根、粗壮秦艽、冰川水等样品,从当地藏民处获取青稞酒曲。

1.1.2 培养基 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) 液体培养基:酵母浸出粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,自然pH值,121℃高压灭菌20 min。

YPD固体培养基:YPD液体培养基加入琼脂粉2%,121℃高压灭菌20 min。

乙酸和过氧化氢耐性测试培养基:YPD固体培养基灭菌后,冷却至50℃,然后分别加入乙酸和过氧化氢,终浓度分别为3.5 g/L和5 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定 将单克隆纯化的菌株在YPD液体培养基

过夜培养,送菌液在擎科公司(上海)测定26S rDNA序列。对各菌株的26S rDNA的D1/D2区域进行测序,采用SnapGene软件对所测得的序列进行人工校对。登录NCBI利用BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将测序所得各菌株26S rDNA D1/D2区域与GenBank已知序列进行比对,查找相似性最高的模式菌株。

用MEGA-X.10.1.6软件按照邻接法(Neighbor Joining, NJ),选择自展数(bootstrap)为1 000,进行演化史推断,进化距离采用最大合成似然法进行计算,构建系统发育树^[14-16]。

1.2.2 细胞壁多糖提取 取30℃培养48 h的菌液10 mL用于细胞壁多糖提取,使用文献[17]的方法提取酵母菌的细胞壁多糖,将多糖含量与生物量作比值,得到单位生物量所含的细胞壁多糖的量。

1.2.3 细胞壁多糖抗氧化性测定 将1.2.2中获取的细胞壁多糖全部进行硫酸化,用于抗氧化性的测定。参考文献[18]方法制备硫酸化酵母细胞壁多糖。使用碧云天总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS法)检测细胞壁多糖的抗氧化能力,按照说明书进行。

1.2.4 酵母菌抗逆性评价 菌株活化至对数期之后,将OD₆₀₀调整至1.0,按照10⁻¹梯度稀释5个浓度。取2 μL菌液点在YPD培养基、乙酸培养基和过氧化氢培养基上,置于30℃培养箱中,另取无乙酸和过氧化氢添加的YPD培养基平板,点板并置于40℃培养箱中,观察并拍照记录,以YPD培养基中30℃培养的结果作为对照进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

从西藏样品中筛选出10个酵母菌株,随后对各菌株的26S rDNA的D1/D2区域进行测序,结合形态学特征,对这些菌株进行鉴定,其结果如表1所示。结果表明,这10个菌株分别包括5种非常规酵母和5种酿酒酵母菌株,其中非常规酵母的5个菌株分别属于5个不同的属,提示了来自西藏酵母植物的酵母具有丰富的多样性。此外,1-5-2和SD29都分离自植物样品的内部,提示西藏植物来源的样品孕育着丰富的内生酵母资源。

10株酵母菌株系统发育分析结果如图1所示,与表1结果一致,各个菌株与其相似度最高的模式菌株在系统发育树的同一个分支上,进化距离极小,同属于酿酒酵母的6个菌株皆在同一分支,10个实验菌株分属6个系统发育树分支,说明10个酵母分属6个酵母属,不同种属的菌株之间进化距离显著。其中SD29与SD32所属菌株同在一个分支上。从进化距离数

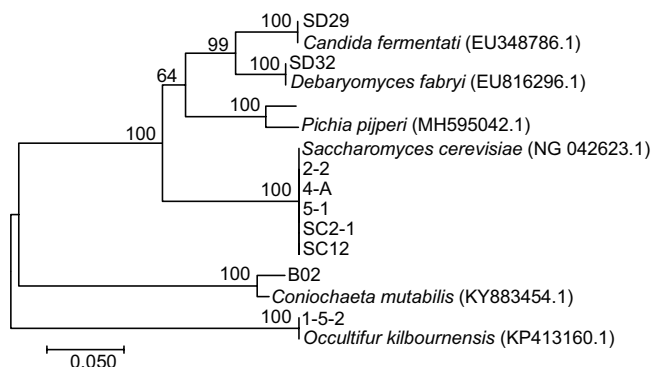


图1 基于26S rDNA D1/D2序列的西藏来源酵母系统发育分析。

Fig. 1 Phylogenetic analysis of yeast strains isolated from Tibet based on 26S rDNA D1/D2 sequence.

表1 实验酵母菌株的样品来源和鉴定结果
Table 1 Sources and identification of the sample strains

菌株编号 Strain code	来源 Source	最相似菌种 The most similar species	最大相似度 Maximum similarity
1-5-2	粗壮秦艽 <i>Gentiana robusta</i>	<i>Occultifur kilbournensis</i>	100.00%
B02	土壤 Soil	<i>Coniochaeta mutabilis</i>	96.97%
H1	土壤 Soil	<i>Pichia pipperi</i>	96.03%
SD32	茶树花朵 <i>Camellia sinensis</i> flower	<i>Debaryomyces fabryi</i>	100.00%
SD29	西藏隔距兰匍匐根 Tibetan <i>Cleisostoma sagittiforme</i> Garay creeping roots	<i>Candida fermentati</i>	100.00%
2-2	松萝 <i>Usnea diffracta</i> Vain.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.47%
4a1	青稞酒曲 <i>Hordeum vulgare</i> koji	<i>S. cerevisiae</i>	99.65%
5-1	冰川水 Glacier water	<i>S. cerevisiae</i>	99.64%
SC2-1	土壤 Soil	<i>S. cerevisiae</i>	99.82%
SC 12	土壤 Soil	<i>S. cerevisiae</i>	99.82%
S288C	实验室模式酵母 Type yeast strain	<i>S. cerevisiae</i>	—

值上看, SD29与SD32进化距离最短, 亲缘关系最近, B02与SD29、SD32进化距离最长, 亲缘关系最远。

2.2 酵母菌抗逆性评价

酵母菌作为工业发酵常用的菌种, 对高温、氧化、低pH值等发酵过程中可能产生的环境压力的耐受性在工业用菌株选育和改造中是非常重要的指标。乙酸是木质纤维素水解液中常见的抑制物, 乙酸耐性良好的酵母可作为木质纤维素资源生物转化的良好宿主^[1]。另外, 已知高温、乙醇等多种胁迫都对细胞产生氧化损伤, 因此常用过氧化氢作为氧化胁迫耐性检测的代表性化合物^[19-20]。基于本课题前期预实验的条件摸索(数据未显示), 分别取乙酸和过氧化氢有较好抑制作用的浓度为3.5 g/L和5 mmol/L, 并考察了40 ℃高温胁迫对菌株生长的影响。

对从西藏样品中筛选出的5种非常规酵母和5种酿酒酵母以及实验室模式酿酒酵母S288C、工业酿酒酵母EtOH Red和SPSC01^[21]共计13种酵母进行了基于点板实验的抗逆性检测, 其结果如图2、图3和图4所示。

对非常规酵母之间进行比较, 在5个菌株中, 1-5-2、B02、SD32和SD29有较好的乙酸耐受性, 1-5-2、B02和SD32具有较好的过氧化氢耐受性, 所有菌株在40 ℃都能较好地生长(图2), 整体来看, 1-5-2、SD29和SD32有较好的多重耐受性。

酿酒酵母中, 2-2、4a1和5-1有较好的乙酸耐受性, 2-2、5-1和SC2-1表现出了较好的过氧化氢耐受性。所有实验菌株的高温耐受性均优于标准对照的S288C。整体来看, 2-2和SC2-1表现出了较好的综合耐受性(图3)。该实验结果表明, 本研究使用的西藏来源的酵母菌株对逆境环境的适应能力显著

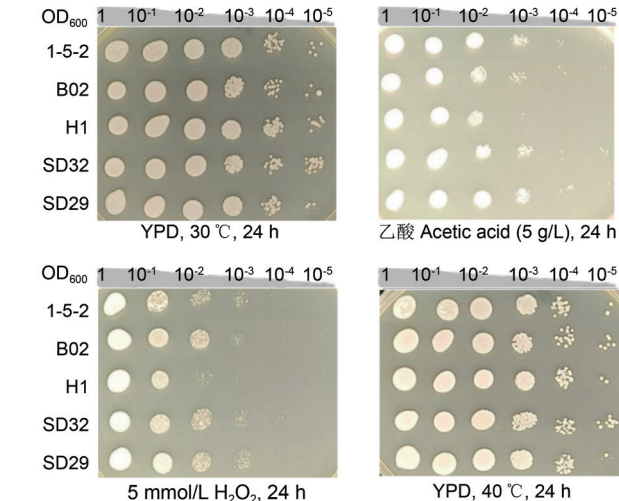


图2 各非常规酵母菌株抗逆性比较。
Fig. 2 Comparison in stress resistance of unconventional yeast strains.

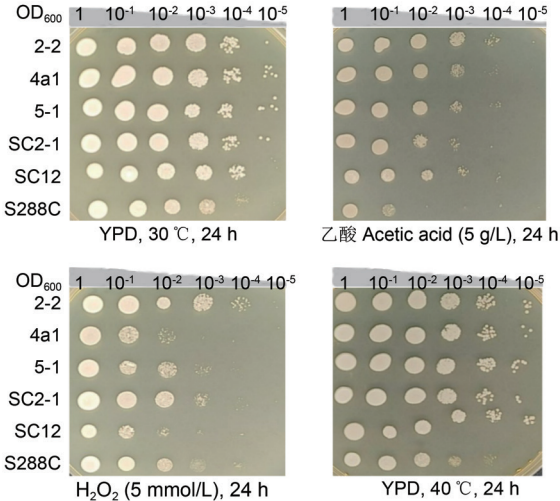


图3 各酿酒酵母菌株抗逆性比较。
Fig. 3 Comparison in stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains.

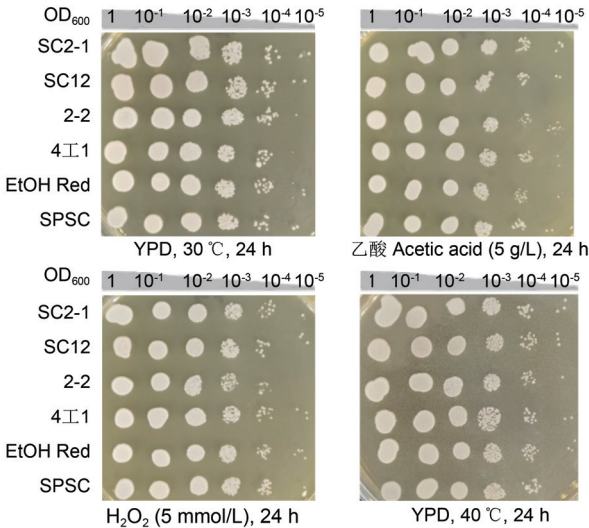


图4 部分酿酒酵母菌株与工业菌株的抗逆性比较。
Fig. 4 Comparison in stress resistance of certain industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains.

优于实验菌株, 因此可作为后续继续研究酵母菌抗逆机理, 以及抗逆工业菌株的宿主菌株。

挑选酿酒酵母中有较好抗逆性的菌株, 以工业酿酒酵母EtOH Red、SPSC01作为对照进行重复实验。在各胁迫条件下, 实验菌株均有较好的抗性, 其生长状况与工业用的对照菌株无显著区别, 说明这些天然分离的菌株具有较好的抗逆性,

提示在自然界有可能分离抗逆性良好的菌株,作为后续工业生产菌株改造的出发菌株。

2.3 酵母细胞壁多糖抗氧化性能

此前已有报道指出酵母细胞壁多糖有提高抗氧化酶活性和清除超氧阴离子的生物活性。为探究酵母细胞壁多糖可能的工业应用,本研究对涉及的5个酿酒酵母菌株的细胞壁多糖抗氧化性能进行了定量检测,同时作为这些菌株优良抗逆性的可能解释。

ABTS在存在过氧化物酶和过氧化物的体系中被氧化为ABTS⁺·自由基。抗氧化剂可以使ABTS⁺·自由基的光吸收值下降,在同一条件下,生物样品的抗氧化活性强弱和反应溶液吸光度值下降程度成正比^[22]。不同样品细胞壁多糖的自由基清除能力Trolox当量如图5所示。各样品多糖均呈现出一定的ABTS⁺·自由基清除能力,Trolox抗氧化当量均呈现出量效关系。当处理手法相同时,来自土壤酿酒酵母SC12的细胞壁多糖清除ABTS⁺·自由基能力最强,其次是来自SC2-1的细胞壁多糖样品。此外,来自4a1、5-1和2-2的样品亦表现出了一定的抗氧化性。SC12菌株具有较好的乙酸耐性和高温耐性,但是过氧化氢耐受性相对比较弱,研究表明细胞壁多糖的抗氧化性和菌株的抗氧化性不存在一对应的关系。

3 讨论

本研究对西藏样品分离筛选的10个酵母菌株进行了鉴定,根据分子生物学鉴定结果,10个酵母菌株从属于6个属,其中有5株菌株为酿酒酵母菌株,这提示西藏土壤、地衣和植物可能孕育着丰富的酵母多样性。以往的研究表明,部分非常规酵母胁迫条件下发酵效率能优于常规酵母^[23],后续可进一步研究本文得到的6株非常规酵母菌株的特性和应用价值。在从不同地点土壤分得的非常规酵母中,H1菌株属于*Pichia pijperi*,据报道*P. pijperi*可用于改善咖啡豆等食材的风味、降低腌制鱼肉中真菌毒素的含量、高效生产酶制剂,此外通过基因工程技术,*P. pijperi*还可用于直接发酵生产异戊醇,是常用的工业微生物^[24-27]。H1菌株与*P. pijperi*模式酵母的26S rDNA D1/D2序列相似度仅为96.03%,后续可进一步进行新种鉴定以及应用开发。B02土壤酵母菌株属于*Coniochaeta mutabilis*,该类酵母现仅有分离记录,暂无应用实例^[28]。B02酵母与*C. mutabilis*模式酵母的最高相似度为96.97%,提示西藏菌株可能具有丰富的新种资源。从系统发育树可以观察到,不同种属的酵母菌株间亲缘关系最近的是SD29和SD32,亲缘关系最远的是B02与SD29、SD32。但由于比对用序列为26S rDNA D1/D2分析鉴定所得,各个菌株序列长度仅为558-569 bp,要进一步验证不同菌株之前的进化关系与功能差异,还需要进一步鉴定分析。

隔距兰作为观赏与药用兼备的属种,近年来越来越受到

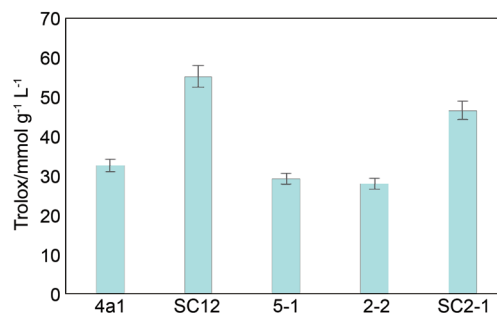


图5 各酿酒酵母样品菌株细胞壁多糖抗氧化能力相对值(Trolox当量)。
Fig. 5 Relative values (Trolox equivalent) of antioxidant capacity of cell wall polysaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* strains.

药学研究者的重视^[29-30]。本研究鉴定了来源于西藏隔距兰匍匐根样品的内生菌SD29,目前还不清楚该酵母在西藏隔距兰中是否有促进生长或者抵抗病原菌入侵的作用,有待进一步分析研究。相应地,从粗壮秦艽样品中分离的*Occultifur kilbournensis*菌株1-5-2,以及从茶树花朵样品中获得的*Debaryomyces fabryi*菌株SD32也值得进行相关的深入研究。

环境胁迫耐受性分析结果显示,虽然5株酿酒酵母与模式酵母的相似度都在99.00%以上,但5株酵母的耐受性表现各有差异,体现了菌株内生理特征的多样性。在非常规酵母中,1-5-2、SD29和SD32有较好的乙酸、过氧化氢及高温耐受性。这些结果说明了西藏来源菌株对极端环境适应能力的生理多样性。本研究则发现,所有实验酵母菌株都具有良好的高温耐受性,在40℃高温下的生长状况显著优于模式酵母S288C,体现了这些菌株对广泛温度的适应能力。

本研究发现5株酿酒酵母的细胞壁多糖均显示出了一定的抗氧化性,其中以来自土壤的SC12和SC2-1的细胞壁多糖抗氧化性最佳,但是SC12菌株过氧化氢耐性没有比其他菌株更强,所以该菌株的耐性可能和细胞壁之外的其他因素有关。氧化性自由基能够在生物体内引发各种生物大分子氧化性损伤和引起核酸突变,进而诱导炎症、癌症、神经系统疾病等的发生^[31],因此具有抗氧化活性的酵母细胞壁多糖具有一定的开发应用前景。

西藏地区地理条件独特,其中所蕴含的酵母菌种可能具有独特的生理特征。但是,由于目前对西藏地区来源的酵母研究比较有限,因此无法得到与其他地区酵母特点比较的准确结论。本研究仅选取了部分具有工业应用潜力的西藏来源酵母进行分析,未来随着研究的不断深入和全面,将能更清晰认识西藏地区菌株资源的特性。本研究筛选出的10个西藏来源的酵母菌株表现出不同程度较好的环境胁迫耐受性,对其耐受性机制进一步研究,有望揭示新的作用机理,后续将进一步探究其应用开发价值。

参考文献 [References]

- Zhao XQ, Xiong L, Zhang MM, Bai FW. Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering [J]. *Bioresour Technol*, 2016, **215**: 84-91
- 刘海霞, 曹曦跃, 吴海珍, 陈国成, 张倩, 曾杰, 王雨昊, 徐辉, 乔代蓉, 曹毅. 隐球酵母 (*Cryptococcus podzolicus*) Zwy-2-3循环利用油脂发酵废弃细胞产油[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, **23** (6): 979-983 [Liu HX, Cao XY, Wu HZ, Chen GC, Zhang Q, Zeng J, Wang YH, Xu H, Qiao DR, Cao Y. *Cryptococcus podzolicus* Zwy-2-3 recycling fermentation waste for the microbial lipid production [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (6): 979-983]
- 郭抗萧, 谭周进, 谢梦洲, 余颜, 王学红. 超微七味白术散与酵母菌协同治疗小鼠菌群失调腹泻[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, **21** (1): 61-67 [Guo KX, Tan ZJ, Xie MZ, Tu Y, Wang XH. The synergic effect of ultra-micro powder Qiweibaizhusan combined with yeast on dysbacteriotic diarrhea mice [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (1): 61-67]
- 孙广仁. 长白山主要林型土壤酵母菌功能多样性的研究[D]. 长

- 春: 东北师范大学, 2015 [Sun GR. Study on functional diversity of soil yeast in the main forests of the Changbai Mountain [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2015]
- 5 何曼, 刘畅, 朱凤妹, 葛超, 李军, 阎贺静. 昌黎产区产酶酵母多样性及其应用潜力分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, **46** (5): 59-67 [He M, Liu C, Zhu FM, Ge C, Li J, Yan HJ. Diversity and application potential of enzyme producing yeasts in Changli [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, **46** (5): 59-67]
- 6 Ling L, Tu Y, Ma W, Feng S, Yang C, Zhao Y, Wang N, Li Z, Lu L, Zhang J. A potentially important resource: endophytic yeasts [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, **36** (8): 110
- 7 郭小芳, 德吉, 龙琦炜, 白斌锦, 王豪杰, 曹亚璞. 西藏拉鲁湿地水体酵母菌多样性及其与理化因子相关性[J]. 微生物学报, 2018, **58** (7): 1167-1181 [Guo XF, De J, Long QW, Bai BJ, Wang HJ, Cao YP. Spatial dynamics of yeast community and its relationship with environmental factors in Lhalu Wetland, Tibet [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2018, **58** (7): 1167-1181]
- 8 卢曼, 陈小兵, 王兴兴, 潘迎捷, 王永杰. 西藏开菲尔粒中酵母菌的分离与初步鉴定[J]. 上海海洋大学学报, 2015, **24** (1): 138-145 [Lu M, Chen XB, Wang XX, Pan YJ, Wang YJ. Isolation and preliminary identification of yeast from Tibet Kefir [J]. *J Shanghai Ocean Univ*, 2015, **24** (1): 138-145]
- 9 冯涛, 王旭增, 王一非, 孙敏, 姚凌云, 徐志民. 葡萄园土壤中酿酒酵母的分离鉴定及其发酵葡萄酒香气成分分析[J]. 食品科学, 2018, **39** (14): 213-220 [Feng T, Wang XZ, Wang YF, Sun M, Yao LY, Xu ZM. Isolation and identification of yeast strains from vineyard soils and aroma compounds of wines fermented by them [J]. *Food Sci*, 2018, **39** (14): 213-220]
- 10 Wang Q, Boekhout T, Bai F. *Bensingtonia rectispora* sp. nov. and *Bensingtonia bomiensis* sp. nov., ballistoconidium-forming yeast species from Tibetan plant leaves [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, **62**: 2039-2044
- 11 郭小芳, 德吉, 刘洋. 我国土壤及淡水酵母菌多样性研究进展[J]. 西藏科技, 2017 (5): 12-21 [Guo XF, De J, Liu Y. Research progress of soil and freshwater yeast diversity in my country [J]. *Tibet Sci Technol*, 2017 (5): 12-21]
- 12 Zhaomin Z, Qilin H, Xiaogang L, Yidong X, Wenfei C, Huiyu M. Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast β -glucan [J]. *Bioresour Technol*, 2019, **273**: 394-403
- 13 Yang L, Gangliang H, Meijiao L. Extraction, characterization and antioxidant activities of mannan from yeast cell wall [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, **118**: 952-956
- 14 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, **4** (4): 406-425
- 15 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, **39** (4): 783-791
- 16 Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. *PNAS*, 2004, **101** (30): 11030-11035
- 17 Heng YX, Jing RL, Yan GL, Qi G, Xiao WW, Jun WZ, Masaru T, You L X. Optimization of the ultrafiltration-assisted extraction of Chinese yam polysaccharide using response surface methodology and its biological activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **121** (121): 1186-1193
- 18 王米, 王霄旻, 张丽芳, 雷娜, 杨锐乐, 费陈忠, 张可煜, 郑文丽, 王春梅, 薛飞群. 硫酸化酵母葡聚糖体外抗氧化及抗菌活性研究[J]. 畜牧与兽医, 2016, **48** (8): 8-11 [Wang M, Wang XY, Zhang LF, Lei N, Yang RL, Fei CZ, Zhang KY, Zheng WL, Wang CM, Jiang FQ. In vitro study on antioxidant and antibacterial activities of the sulfated yeast glucan [J]. *Anim Husb Vet Med*, 2016, **48** (8): 8-11]
- 19 Cheng C, Tang RQ, Xiong L, Hector RE, Bai FW, Zhao XQ. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, **11**: 28
- 20 Qi L, Wu XC, Zheng DQ. Hydrogen peroxide, a potent inducer of global genomic instability [J]. *Curr Genet*, 2019, **65** (4): 913-917
- 21 程诚, 赵心清, 白凤武. 细胞絮凝及硫酸锌对酿酒酵母乙酸胁迫耐性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22** (1): 116-119 [Cheng C, Zhao XQ, Bai FW. Effects of cell flocculation and zinc sulfate addition on acetic acid stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chin J App Environ Biol*, 2016, **22** (1): 116-119]
- 22 赵国群, 申崇宇, 季小莉, 孙旭. 低分子量酵母甘露聚糖的制备及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2020, **41** (13): 202-206 [Zhao GQ, Shen CY, Ji XL, Sun X. Study on preparation and its antioxidant activity of yeast mannan with low molecular weight [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, **41** (13): 202-206]
- 23 Vaskar M, Dorota R, Guido A, Kevin J V, Bart L, Johan M T. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2017, **10** (1): 216
- 24 Chenhui W, Jingcan S, Benjamin L, Bin Y, Shao Q L. Coffee flavour modification through controlled fermentation of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*: Part II. Mixed cultures with or without lactic acid bacteria [J]. *Food Res Int*, 2020, **136**: 109452
- 25 叶林, 张玮芸, 王雅玲, 陶森, 黄文妍, 孙力军. 季也蒙毕赤酵母对红鱼干中黄曲霉毒素B₁/T-2毒素的脱毒作用[J]. 卫生研究, 2020, **49** (4): 564-568 [Ye L, Zhang WY, Wang YL, Tao S, Huang WY, Sun LJ. Toxic effects of AFB₁ /T-2 toxin and intervention effects of *Meyerozyma guilliermondii* in dried *Lutjanus erythropterus* on mice [J]. *J Hyg Res*, 2020, **49** (4): 564-568]
- 26 Huang JJ, Zhao QY, Chen LX, Zhang CM, Bu W, Zhang X, Zhang KN, Yang Z. Improved production of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase by coexpressing protein folding chaperones in *Pichia pastoris*, which triggered ER stress [J]. *Bioengineered*, 2020, **11** (1): 375-385
- 27 Siripong W, Angela C, Tanapongpipat S, Runguphan W. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isopentanol (3-methyl-1-butanol) [J]. *Enzyme Microb*, 2020, **138**: 109557
- 28 Tienaho J, Karonen M, Muilu-Mäkelä R, Wähälä K, Leon D E, Franzén R, Karp M, Santala V, Sarjala T. Metabolic profiling of water-soluble compounds from the extracts of dark septate endophytic fungi (DSE) isolated from Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings using UPLC-Orbitrap-MS [J]. *Molecules*, 2019, **24** (12): 2330
- 29 Chuang YK, Yang IC, Lo YM, Tsai CY, Chen S. Integration of independent component analysis with near-infrared spectroscopy for analysis of bioactive components in the medicinal plant *Gentiana scabra Bunge* [J]. *J Food Drug Anal*, 2014, **22** (3): 336-344
- 30 Cheng Z, Song H, Zhang Y, Han D, Yu X, Shen Q, Zhong F. Concurrent extraction and purification of gentiopicroside from *Gentiana scabra Bunge* using microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase systems [J]. *J. Chromatogr Sci*, 2019, **58** (1): 60-74
- 31 Pham HLA, He H, Pham HC. Free radicals, antioxidants in disease and health [J]. *Int J Biomed Sci*, 2008, **4** (2): 89-96