

两株耐碱酵母的 pH 耐受实验观察*

苏俊 冯新忠 古丽斯玛依·艾拜都拉 艾尔肯·热合曼 木合塔尔·阿布都克里木**

(新疆大学生命科学与技术学院 乌鲁木齐 830046)

摘要 对分离鉴定的两株酵母菌用比浊法和 Bradford 法进行 pH 耐受范围检测。*Trichosporon asahii* XJU-1 的 pH 耐受范围为 2.0~13.0, 最适 pH 值为 8.0。*Rhodotorula mucilaginosa* XJU-1 的 pH 耐受范围为 3.0~12.0, 最适 pH 值为 8.5。比浊法在 pH4.0~10.0 测出数值比较可靠, 而在 pH<4.0 和 pH≥10.0 产生了较大误差。在最适 pH 时, Bradford 法间接测定两酵母的生长量, *T. asahii* 总溶解蛋白为 290μg/mL, *Rh. mucilaginosa* 总溶解蛋白为 164μg/mL。Bradford 法在 pH2.0~13.0 范围均能较准确地反映出菌株生长状况, 数据表明两株酵母有广阔的 pH 耐受性, 它们是耐碱酵母菌的新成员。

关键词 酵母, *T. asahii* XJU-1, *Rh. mucilaginosa* XJU-1, Bradford 法

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1114-04

Examination of pH Tolerance Test of Two Alkalitolerant Yeasts*

SU Jun FENG Xin-Zhong ABAYDULLA Gulsimay RAHMAN Erkin ABDUKERIM Muhtar**

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046)

Abstract The purpose of this paper is to examine the pH adaptability range of two yeasts from our laboratory, and applied turbidimetry and Bradford methods to examine growth of *Trichosporon asahii* XJU-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* XJU-1. It is shown that *Trichosporon asahii* XJU-1 grown between pH2.0 and pH13.0 and optimum pH is 8.0, whereas *Rhodotorula mucilaginosa* XJU-1 grown between pH3.0 and 12.0, optimum pH is 8.5. When turbidimetry was applied, it produced consensus results between pH4.0 and 10.0 with Bradford method. At the same time, produced senior distorted at pH<4.0 and pH≥10.0. Bradford method indirect determined total soluble protein of *Trichosporon asahii* XJU-1 is 290μg/mL at optimum pH8.0, *Rhodotorula mucilaginosa* XJU-1 is 164μg/mL at optimum pH8.5, respectively. Compared with turbidimetry, Bradford method embodied its accuracy in whole pH ranges. It is concluded that both two tested yeasts have wider pH tolerant ranges and can be two new members of alkali-tolerant yeast family.

Key words: Yeast, *T. asahii* XJU-1, *Rh. mucilaginosa* XJU-1, Bradford method

长期以来耐碱性和嗜碱性一直被认为是原核生物的特性^[1], 近年来, 大量耐碱及嗜碱细菌、古细菌已从各种土壤和水体中分离得到, 但对耐碱酵母菌的研究报道很少^[2]。到目前为止, 对耐碱菌和嗜碱菌还没有确切的定义, 国内外学者根据细菌和酵母耐受碱的程度不同作如下的区分^[3,4]: 耐碱菌(alkalitolerant), 最适生长 pH 在 7~9, 在中性或酸性环境中也能生长; 嗜碱菌(alkaliphile), 在 pH9 以上最适或生长良好, 但在 pH6.5 左右不能生长或仅能缓慢生长; 极端嗜碱菌(extreme alkaliphile), 最适生长在 pH10 或者大于 10, 包括专性和兼性嗜碱菌。

专性嗜碱菌的最适生长 pH≥10.0, 并且在中性环境中也能生长。Kroll 对耐碱菌的限定为: 嗜碱菌(alkaliphile)是指最适生长在 pH8.0 以上, 通常在 pH9~10 之间生长的微生物; 而最适值并不在碱性 pH 范围的微生物称为耐碱微生物^[5]。由于对耐碱和嗜碱菌的性质和机理尚没有充分的研究, 其分类工作尚待进一步发展^[6]。而在国际国内关于耐碱酵母的报道很少, 文献检索表明, 2003 年俄罗斯科学家 G A Lisichkina 等人首次报道发现和分离到耐碱酵母菌, 他们从俄罗斯的 Kungur 草原和亚美尼亚山区分离到 *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *C. roseus*

* 教育部教学实验用微生物菌种资源子项目和新疆特殊环境微生物重点实验室课题资助(No. 2005DKA21208-9, XJYS0203-2005-02)

** 通讯作者 Tel: 0991-8583450, Fax: 0991-8582554, E-mail: muhtar97@xju.edu.cn

收稿日期: 2007-03-21, 修回日期: 2007-06-01

和 *Rh. glutinis*, *Rh. Mucilaginoso* 及 *Sporobolomyces roseus*, *Aureobasidium pullulans* 耐碱酵母菌种^[7]; 而在国内 2006 年杨艳艳等人首次报道在新疆温泉县分离到一株酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)^[8]。本实验所用供试菌株粘性红圆酵母 *Rh. mucilaginoso* XJU-1 是从乌鲁木齐近郊的一块盐碱土壤 ($\text{pH} \geq 9.0$) 中分离得到, 阿萨希丝孢酵母 *T. asahii* XJU-1 是从山西偏关县的酸性稷米汁 ($\text{pH} 3.0 \sim 3.2$) 中分离, 这两种菌株分别是俄罗斯科学家已报道的耐碱酵母(隐球酵母科和红酵母科)的近缘种群^[9]。基于这些信息而开展本项工作, 对两种不同分离来源的两酵母进行耐碱实验研究, 以期获得一些酵母耐碱机理、代谢活性物质方面有用的信息。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株: *T. asahii* XJU-1(分离自天然发酵的酸性稷米汁, 毛孢子酵母属)和 *Rh. mucilaginoso* XJU-1(分离自盐碱性土壤, 红酵母属)来自新疆大学生命科学与技术学院资源微生物研究室, GenBank 提交检索号分别是 DQ871599 和 DQ132885、DQ132886。中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心的保藏号分别为: CGMCC AS 2.3199 和 CGMCC No. 1536。

1.1.2 试剂: 缓冲溶液 1: KCl-HCl 缓冲液 (0.2mol/L) ($\text{pH} 1.0 \sim 2.2$); 缓冲溶液 2: 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液 ($\text{pH} 2.2 \sim 8.0$); 缓冲溶液 3: Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L) ($\text{pH} 7.6 \sim 9.4$); 缓冲溶液 4: 硼酸盐-NaOH 缓冲液 ($\text{pH} 9.5 \sim 11.5$); 缓冲溶液 5: 磷酸二氢钠-NaOH 缓冲液 (0.05mol/L) ($\text{pH} 10.9 \sim 12.0$); 缓冲溶液 6: KCl-NaOH 缓冲液 (0.2mol/L) ($\text{pH} 12.0 \sim 13.0$); 1M 的 NaOH 溶液, 依据 GB/T 601-2002 配制; Bradford 试剂: 将 100 mg 考马斯亮蓝 G-25(分析纯, 上海化学试剂站进口分装)溶解在 50 mL 95% 的乙醇中, 再加 100 mL 85% (W/V) 的浓磷酸, 用蒸馏水混合定容到 1L, 过滤, 4℃ 贮存备用。1 mg/mL 的牛血清白蛋白 (BSA) (上海普博欣分装): 溶解牛血清白蛋白在盐溶液中, 分装 1mL 小管贮存在 -20℃。

1.1.3 培养基: YPD 培养基(葡萄糖 20g/L, 蛋白胨 20g/L, 酵母膏 10g/L, 蒸馏水 1000mL, 琼脂 18g/L)。

1.2 方 法

1.2.1 缓冲溶液的配制: 参照俞建瑛等人编著的生物化学实验技术^[10]。

1.2.2 液体培养基的配制: 配制一定量的液体培养基, 用缓冲溶液代替蒸馏水。灭菌后, 用 pH 酸度计校正^[11]。

1.2.3 固体平板的制作: 琼脂培养基琼脂溶解温度在 45℃ 以上溶解后进行 pH 的调整。测定时, 手动校准 pH 酸度计的温度补偿, 保证培养基在熔化状态和凝固状态的 pH 一致^[10, 11]。

1.2.4 牛血清白蛋白 (BSA) 标准工作曲线的绘制: 精密称取 10mg 牛血清白蛋白 (BSA), 加水溶解并定容到 100mL, 制得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 标准溶液。取具塞试管 6 支, 用加样枪移取 BSA 标准溶液 0.00mL, 0.05mL, 0.10mL, 0.20mL, 0.40mL, 0.60mL, 补水至 1mL, 得到含 BSA 为 0 μg , 5 μg , 10 μg , 20 μg , 40 μg , 60 μg 的系列标液。然后再分别加入 Bradford 试剂 4mL, 立即混匀, 5min 后在 595nm 波长下测定吸收值, 以牛血清白蛋白 (BSA) 的质量 μg 对吸收值作图, 得到工作曲线并计算回归方程。结果如图 1 所示。

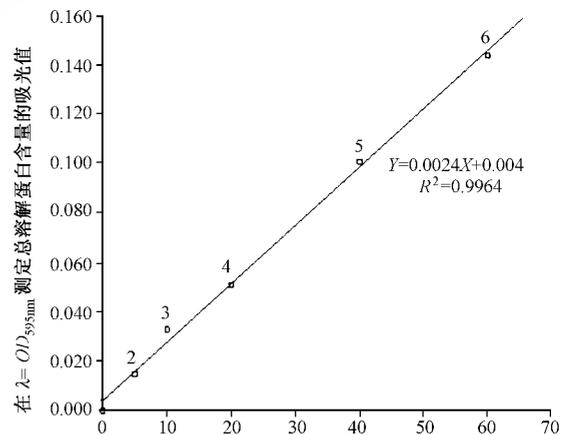


图 1 牛血清白蛋白标准溶液工作曲线 (BSA $\mu\text{g}/\text{mL}$)

1.2.5 细胞生长量的测定: 1) 酵母菌的培养和比浊法测定参照沈萍等的微生物学实验^[12]: 取 5mL 液体培养基中的 1mL 来稀释成 25% 的菌悬液测定 $\lambda = 560\text{nm}$ 的吸光值。2) 采用 Bradford 蛋白浓度测定法^[13-15]。使用 Bradford 试剂测定总溶解蛋白来间接估算酵母的生长速率。15mL 的 1mol/L NaOH 加到 5mL 培养到对数期结束时的液体培养基中, 混合煮沸 20min, 然后 8000r/min 4℃ 离心 10min, 测定总溶解蛋白。每个反应准备 3 个平行测定并取平均值。

2 结果与分析

利用不同 pH 固体平板培养,测定出两种酵母菌的生长范围并找出最适 pH 值。阿萨希丝孢酵母 *T. asahii* XJU-1 和粘性红圆酵母 *Rh. mucilaginosa* XJU-1 分别在 pH8.0 的液体培养基中生长曲线如图 2 所示:*T. asahii* XJU-1 达到其对数生长期所用时间为 31h;*Rh. mucilaginosa* XJU-1 达到其对数生长期所用时间为 25h。将两种酵母接种到不同 pH 值的 YPD 液体培养基上,28℃,180r/min 摇菌,使其在各自的对数生长期内培养后,Bradford 法间接测定不同 pH 培养条件下菌体的生物增长量,结果如图 3 所示。

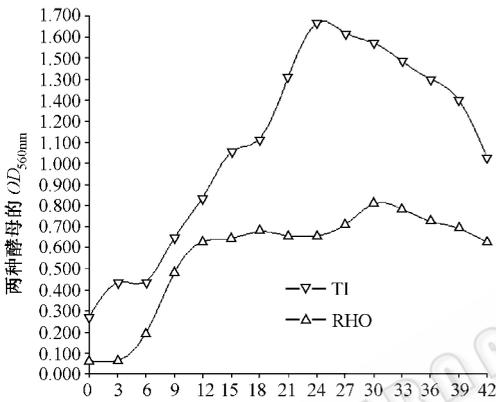


图 2 *T. asahii* XJU-1 和 *Rh. mucilaginosa* XJU-1 的生长曲线

(TRI 代表 *T. asahii* XJU-1, RHO 代表 *Rh. mucilaginosa* XJU-1)

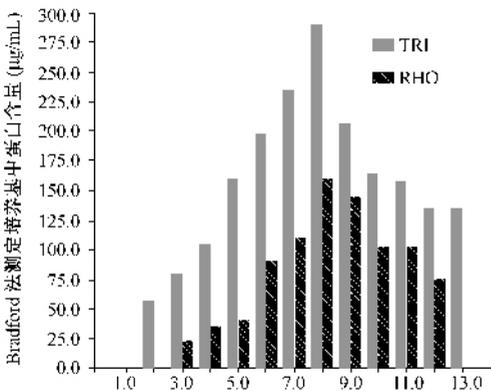


图 3 Bradford 法测定 pH 梯度下两酵母的可溶性总蛋白含量图

(TRI 代表 *T. asahii* XJU-1, RHO 代表 *Rh. mucilaginosa* XJU-1)

T. asahii XJU-1 在最适 pH8.0 时的总溶解蛋白含量最大,浓度为 290 μ g/mL;在 pH2.0~8.0 之间增幅较大,为 20%~50%;在 pH8.0~13.0,减幅 39%

~16%,说明在偏酸性环境中该菌生长旺盛,它的耐碱特性属兼性嗜碱。*Rh. mucilaginosa* XJU-1 在最适 pH8.5 时,总溶解蛋白含量最大,浓度为 164 μ g/mL;在 pH3.0~8.5 之间增幅为 22%~55%,在 pH8.5~13.0,减幅 26%~42%,生长环境偏碱性,也属于兼性耐碱菌。图 4 为用比浊法测定上述两株酵母菌在 pH1.0~13.0 之间生长曲线,培养条件跟 Bradford 法测定两酵母生长量前的条件相同。

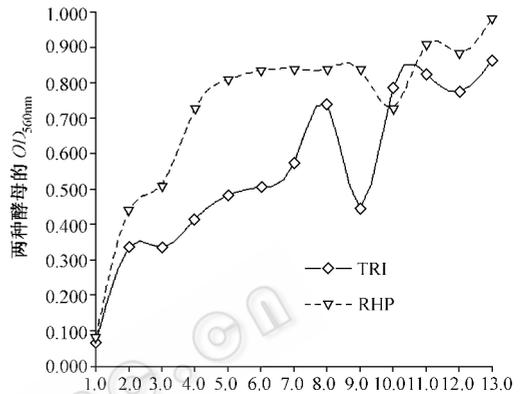


图 4 比浊法测定 pH 梯度下两酵母的生长曲线图

(TRI 代表 *T. asahii* XJU-1, RHO 代表 *Rh. mucilaginosa* XJU-1)

比浊法在 pH4.0~10.0 时与 Bradford 方法测得的菌体生长率相吻合。而在较低 pH 和较高 pH 时,由于缓冲液与培养基的相互作用产生颜色,菌体悬浊液在 < pH4.0 和 \geq pH10.0 产生了偏大的吸收值,这一结果说明比浊法只适用于 pH4.0~10.0 范围菌株生长状况的测定。

3 讨论

(1)俄罗斯科学家 G A Lisichkina^[7]等人在俄罗斯的 Kungur 草原和亚美尼亚山区发现耐碱酵母仅阐述了上述酵母菌在 pH10.0 固体培养基上长出菌落的时间,而没有对 pH 适应范围进行测试。本研究中的 *T. asahii* XJU-1 和 *Rh. mucilaginosa* XJU-1 分别属于毛孢子酵母属和红酵母属,是与上述酵母在进化分支上的近缘种群^[9]。*T. asahii* XJU-1 的 pH 耐受范围为 2.0~13.0, *Rh. mucilaginosa* XJU-1 的 pH 耐受范围为 3.0~12.0,二者均具有极强的耐碱性能和广阔的 pH 适应范围。

(2)俄罗斯的 Kungur 草原和亚美尼亚山区与我们的采样地点都处于亚洲北部盐碱化土壤较多的大陆腹地,在全球范围内耐碱酵母集中分布在这一地区的现象,表明该区域可能在历史上发生过较为频

繁的地质演变,使该区微生物种获得了多向进化与适应能力。

(3)1990年Christa M Stoscheck在Bradford法基础上,对Bradford法(1976)进行改进,增加使用NaOH试剂,改酸性环境测定为中性或者偏碱性,极大地降低了不同蛋白在分析中的变化和干扰^[14]。在本实验中应用改进的Bradford法对酵母菌生长状况在广泛的pH范围(pH 1.0~13.0)内进行检测,检测结果充分体现了该方法简单、稳定、灵敏、快速、抑制其他化学试剂干扰分析的特点。室温下该方法测定的蛋白质浓度范围 $10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而常规测定微生物生长量的比浊法具有操作简单、快速的优点,在pH4.0~10.0范围内仍然是一个快捷、经济、适用的好方法。在 $\text{pH} < 4.0$ 和 $\text{pH} \geq 10.0$ 的强酸强碱范围内,由于pH缓冲液和培养基在灭菌过程中的相互作用而产生较深的颜色,产生强烈吸收,影响最终结果判断。

参考文献

- [1] Krulwich T A , Guffanti A . Annual Review of Microbiology ,1989 **43** : 435 ~ 463 .
- [2] Gerasimenko L M , Dubinin A V , Mityushina L L , *et al.* Mikrobiologiya ,1999 , **68** :696 ~ 700 .
- [3] 张永光 ,李文均 ,张忠泽 ,等 . 微生物学通报 ,2003 **30** :73 ~ 76 .
- [4] 裴凌鹏 ,骆海朋 . 首都师范大学学报(自然科学版) ,2003 **24** :49 ~ 54 .
- [5] Kroll R G . Microbiology of Extreme Environments ,McGraw-Hill ,New York ,1990 pp.55 ~ 92 .
- [6] Koki Horikoshi . Microbiology and Molecular Biology Review ,1999 **63** : 735 ~ 750 .
- [7] G A Lisichkina , I P Bab 'eva , D Yu Sorokin . Microbiology ,2003 **72** : 618 ~ 620 .
- [8] Yang Yanyan , Yi Xia , Muhtar Abdukerim . *et al.* 生物技术 ,2006 , **16**(4) :25 ~ 27 .
- [9] 魏景超著 . 真菌鉴定手册 .上海 :上海科学技术出版社 ,1979 , pp.114 ~ 117 .
- [10] 俞建瑛 ,蒋宇 ,王善利 . 生物化学实验技术 .北京 :化学工业出版社 ,2005 , pp.291 ~ 298 .
- [11] 李卫华 ,方红 ,廉慧锋 ,等 . 食品微生物实验室手册(第三版) ,中国轻工业出版社 ,2004 pp.53 ~ 54 .
- [12] 沈萍 ,范秀容 ,李广武 . 微生物学实验(第三版) .北京 :高等教育出版社 ,1999 pp.95 ~ 98 .
- [13] Marion M Bradford . Analytical Biochemistry ,1976 **72** :248 ~ 254 .
- [14] Christa M Stoscheck . Analytical Biochemistry ,1990 **184** :111 ~ 116 .
- [15] Charin Techapun , Thanakorn Charoenrat , Naiyatat Pooasaran , *et al.* Journal of Bioscience and Bioengineering ,2002 **93** :431 ~ 433 .