

一株耐受低 pH、高浓度乳酸及琥珀酸菌株的筛选与鉴定

冯文婧^{1,2} 杜宇辉^{1,2} 刘家亨^{1,2} 乔建军^{1,2*}

(1. 天津大学 化工学院 天津 300072)

(2. 教育部系统生物工程重点实验室 天津 300072)

摘要:【目的】通过构建的人工耐酸系统, 筛选耐受低 pH 值、乳酸及琥珀酸的菌株。【方法】构建人工耐酸系统长期驯化菌株, 利用不同 pH 的酸性平板进行筛选, 从环境中筛选出一株对低 pH 值、高浓度乳酸以及琥珀酸有很好耐受性的菌株。通过形态学特征、生理生化特征研究, 并结合 18S rDNA 基因序列分析及分子系统发育树的构建结果, 确定菌株的种类。【结果】经过酸性人工系统的长期驯化, 筛选分离出一株耐受低 pH 值、高浓度乳酸以及琥珀酸的菌株 WJ-2, 经鉴定该菌株为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 其最适生长温度为 30 °C。酸性平板实验显示该菌株能够耐受 pH 2.5 的酸性环境, 同时对 9%的乳酸及 8%的琥珀酸也有很好的耐受性。另外, 耐酸菌株 WJ-2 在 pH 2.5、9%乳酸和 8%琥珀酸的培养环境中仍能保持相对中性的细胞内 pH 值。【结论】通过构建人工酸性系统, 成功筛选出一株对低 pH 值、高浓度乳酸以及琥珀酸具有耐受性的菌株——酿酒酵母菌 WJ-2, 该方法可为筛选具有特定耐受能力菌株提供一个新思路。

关键词: 酿酒酵母, 筛选与分离, 酸耐受, 乳酸耐受, 琥珀酸耐受

Isolation and identification of a low-pH, lactic acid and succinic acid tolerant strain

FENG Wen-Jing^{1,2} DU Yu-Hui^{1,2} LIU Jia-Heng^{1,2} QIAO Jian-Jun^{1,2*}

(1. School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(2. Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin 300072, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen a low pH, lactic acid and succinic acid tolerant strain from the artificial acidic ecosystem. [Methods] A strain resistant to low pH, lactic acid and succinic acid was isolated from the artificial acidic ecosystem by acidic plates. We identified the strain by morphological and physiological traits, combined with 18S rDNA gene sequence and phylogenetic trees. [Results] A strain named WJ-2 with low pH, lactic acid and succinic acid tolerance was obtained and identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Its optimal growth temperature was 30 °C, and it could survive in acidic plate at pH 2.5 and grow in the plate with a lactic acid concentration of 9% (W/V). WJ-2 also showed a succinic acid tolerance (8% succinic acid, W/V). WJ-2 also displayed a relative neutral intracellular pH when being challenged at pH 2.5, 9% lactic acid and 8%

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270142)

*通讯作者: Tel: 86-22-27405836; Fax: 86-22-27890645; ✉: jianjunq@tju.edu.cn

收稿日期: 2014-01-22; 接受日期: 2014-02-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-04

succinic acid. **[Conclusion]** Artificial ecosystem is a good alternative to screen strain with specific characteristics.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Screening and isolation, Acid tolerance, Lactic acid tolerance, Succinic acid tolerance

在微生物发酵过程中,不适宜的培养环境会抑制微生物的生长,进而限制目标产品的产量,或者影响菌株对环境的处理能力^[1-2]。例如,在维生素C生产过程中,2-酮基-L-古龙酸的积累限制了 *Bacillus megaterium* 菌株的生长,降低了维生素C的产量^[3];在乳糖酸生产过程中,乳糖酸的积累反馈抑制 *Pseudomonas taetrolens* 的生长,进而限制了乳糖酸产量的提高^[4]。同样,利用微生物进行碱性含氮污水^[5-6]与碱性烟道气体处理^[7]也由于过于碱性的发酵环境使得菌株的处理能力下降。因此提高菌株在极端环境的耐受性成为研究热点。

采用驯化的方式提高菌株的耐受性已经较为常见。曹月婷等^[8]通过对长双歧杆菌进行连续的耐酸、耐氧以及耐胆盐驯化,最后得到一株对3种因素耐受性提高的菌株。孙军德等^[9]通过不断降低培养基的pH值驯化出一株耐酸能力较原始菌株提高52%的酵母菌。Hong等^[10]通过不断降低培养基中半乳糖的含量筛选出一株半乳糖利用能力提高的酵母菌。但是,通过构建人工极端环境来筛选具有目标性状的菌株还较为少见,本研究旨在通过收集中国天津、河北、山东、河南等不同省市的酸性土壤、不同品牌的酸菜以及酸奶近30种酸性样本,并在培养基中添加乳酸和琥珀酸(必要时添加盐酸以得到较低pH值)创造出一种极端的人工酸性环境,目标为筛选出一株具有耐受高浓度酸的菌株,并对其生长特性以及耐受性进行探究。构建人工耐受系统为筛选具有特殊性状的菌株提供了一种新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:菌株WJ-2为本实验室筛选分离得到;参照菌株为酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* YSG50。

1.1.2 主要试剂和仪器:核酸Marker、真菌提取试剂盒和PCR产物纯化试剂盒,天根生化科技有限公司;dNTPs、Fast *Pfu* DNA聚合酶,北京全式金生物技术公司;其余试剂均为国产分析纯。

SW-CL-1G型单人净化工作台,苏州净化设备有限公司;YXQ-LLS-50S11立式压力蒸气灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;Eppendorf 22331 PCR仪,德国Eppendorf;Vortex-5漩涡振荡器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;AL204电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;L5-紫外可见分光光度计,上海精学科学仪器有限公司;Q5000超微量分光光度计,美国Quawell公司;F-2700荧光分光光度计,日立高新技术公司;S-4800场发射扫描电子显微镜,日本日立公司。

1.2 培养基的制备

1.2.1 PDA培养基(g/L):马铃薯(去皮)300.0,葡萄糖20.0,固体培养基加琼脂15.0,蒸馏水定容至1L,pH6.0,1×10⁵Pa灭菌30min。

1.2.2 LB培养基(g/L):胰蛋白胨10.0,酵母浸粉5.0,氯化钠10.0,固体培养基加琼脂15.0,蒸馏水定容至1L,pH7.0,1×10⁵Pa灭菌30min。

1.2.3 YEPD培养基(g/L):酵母粉10.0,蛋白胨20.0,葡萄糖20.0,蒸馏水定容至1L,pH6.0,1×10⁵Pa灭菌30min。

1.2.4 磷酸钾缓冲溶液(PPB,g/L):KH₂PO₄12.52,K₂HPO₄1.39,蒸馏水定容至1L,pH2.5,1×10⁵Pa灭菌30min。

1.3 人工酸性系统的构建及维护

将收集的样品分别取适量置于以下不同pH值、不同浓度乳酸和琥珀酸的500mL广口瓶中,如表1所示。广口瓶瓶塞未拧紧,允许空气中的耐酸菌株进入瓶内。每2周从人工系统中筛选耐受较低pH值、较高浓度乳酸和琥珀酸的菌株。

表 1 酸性系统的构建方案
Table 1 The construction of artificial acidic ecosystem

编号 The number of bottle	pH	乳酸含量 Lactic acid content (%)	琥珀酸含量 Succinic acid content (%)	编号 The number of bottle	pH	乳酸含量 Lactic acid content (%)	琥珀酸含量 Succinic acid content (%)
1	5.0	4	4	49	3.0	4	4
2			6	50			6
3			8	51			8
4			10	52			10
5		6	4	53		6	4
6			6	54			6
7			8	55			8
8			10	56			10
9		8	4	57		8	4
10			6	58			6
11			8	59			8
12			10	60			10
13		10	4	61		10	4
14			6	62			6
15			8	63			8
16			10	64			10
17	4.0	4	4	65	2.5	4	4
18			6	66			6
19			8	67			8
20			10	68			10
21		6	4	69		6	4
22			6	70			6
23			8	71			8
24			10	72			10
25		8	4	73		8	4
26			6	74			6
27			8	75			8
28			10	76			10
29		10	4	77		10	4
30			6	78			6
31			8	79			8
32			10	80			10
33	3.5	4	4	81	2.0	4	4
34			6	82			6
35			8	83			8
36			10	84			10
37		6	4	85		6	4
38			6	86			6
39			8	87			8
40			10	88			10
41		8	4	89		8	4
42			6	90			6
43			8	91			8
44			10	92			10
45		10	4	93		10	4
46			6	94			6
47			8	95			8
48			10	96			10

注: 添加酸性土壤、市售酸菜和市售酸奶作为菌源。每 2 天调节 pH 值、每周补充营养物质、每周进行瓶间液体交换(从低压到高压)。

Note: Add acidic soil, pickled Chinese cabbage and yogurt in market to the artificial acidic system. Keep constant the pH value of every bottle broth, add nutrients to bottles every week, exchange strains from low challenged environments to higher challenged ones.

1.4 耐受菌株的筛选

1.4.1 酸性固体培养基的制备: 按需要配制不同 pH、乳酸(琥珀酸)浓度的 100 mL PDA (LB)培养基,并装于 250 mL 锥形瓶中,再取 3 g 琼脂放入另一个 250 mL 锥形瓶中。封好后均 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。在无菌条件下,将 PDA (LB)培养基加入琼脂瓶中,封好。将混合好的培养基置于沸水浴中 10 min,期间摇动锥形瓶几次,将琼脂混均。最后,将固体培养基放入微波炉加热,沸腾即取出。适当冷却后,倒入灭菌过的平板中即可制成固体培养基。

1.4.2 耐酸、耐乳酸和耐琥珀酸菌株的筛选: 从不同条件的人工系统中吸取 100 μ L 菌液分别涂布在 pH 3.0、2.5 和 2.0 的酸性 PDA 和 LB 固体培养基上。30 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d,观察菌落生长情况。

从不同条件的人工系统中吸取 100 μ L 菌液分别涂布在乳酸浓度为 6%、8%和 10%的 pH 6.0 的 PDA 和 LB 固体培养基上。30 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d,观察菌落生长情况。

从不同条件的人工系统中吸取 100 μ L 菌液涂布在琥珀酸浓度为 4%、6%、8%和 10%的 pH 6.0 的 PDA 和 LB 固体培养基中。30 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d,观察菌落生长情况。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 菌株的菌落形态观察: (1) 在 pH 2.5 的固体 YEPD 培养基上稀释菌落涂布平板,30 $^{\circ}$ C 培养 48 h,观察菌株生长情况及菌落特征。

(2) 菌株在扫描电镜中形态:取 5 mL 菌悬液在 5 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min,并用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液清洗 2 次。将收集到的菌体用 3% (质量体积比)磷酸盐缓冲液-戊二醛固定细胞 2 h,再在 5 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min,用蒸馏水清洗 2 次。将浓缩的细胞分别用 30%、50%、70%、90%和 100%的乙醇溶液脱水处理 10 min。把脱水后的细胞置于真空离心蒸发浓缩器干燥 20 min,即得测试菌粉。将获得的菌粉在场发射扫描电镜中观察形态。

1.5.2 菌株的 18S rDNA 基因序列测定以及分子系统发育树的构建: 提取真菌 DNA,并针对真菌

的特异性 ITS 基因序列设计引物^[11]。上游引物 Forward: 5'-TCCGTAGGTGAACCT-3'和下游引物 Reverse: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',PCR 反应体系:DNA 模板 1 μ L (<1 μ g)、10 μ mol/L 上游引物、下游引物各 1 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 5 μ L、5 \times PCR Buffer 10 μ L、2.5 U/ μ L *Pfu* 酶 1 μ L、ddH₂O 补足至 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

将 PCR 产物中的目的片段用试剂盒纯化后送金唯智公司测序,将测序得到的基因序列应用 BLASTn 程序与 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 等数据库中已知的序列进行相似性比较分析,再用 MEGA 5,使用 Neighbor-Joining 方法,构建系统发育树^[12]。

1.6 耐酸菌株与对照菌株 YSG-50 生长曲线的比较

将耐酸菌株与对照菌株 YSG-50 均以 2%的接种量接种于 pH 6.0 和 pH 3.0 的 YEPD 培养基中,置于 30 $^{\circ}$ C、转速为 200 r/min 的恒温摇床培养箱中培养 50 h。每隔 10 h 用 L5-紫外可见分光光度计在 600 nm 的条件下测量菌体的生长密度 OD 值。

1.7 耐酸菌株最适生长温度的确定

用 NaOH 调节 YEPD 培养基至 pH 6.0,菌株接种量为 2%,置于 25、30、35、40 和 45 $^{\circ}$ C 的转速为 200 r/min 的恒温摇床培养箱中培养 50 h。每隔 10 h 用 L5-紫外可见分光光度计在 600 nm 的条件下测量菌体的生长密度 OD 值。

1.8 菌株耐受能力实验

1.8.1 耐酸菌株盐酸耐受性实验: 将用 HCl 或者 NaOH 调节 YEPD 培养基的 pH 分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0,接种量 2%,在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 的恒温摇床培养箱中培养 50 h,每隔 10 h 用 L5-紫外可见分光光度计在 600 nm 的条件下测量菌体的 OD 值。

1.8.2 菌株对于乳酸的耐受性实验: 配制不同乳酸浓度的 YEPD 培养基,在培养基中分别加入 2%、4%、6%、8%、9%和 10% (体积比)的乳酸,再用 NaOH 调节 pH 至 6.0。一瓶不加乳酸,以 HCl 调

节至 pH 6.0 的 YEPD 培养基作对照。接种量 2%，在 30 °C、200 r/min 的恒温摇床培养箱中培养 50 h，每隔 10 h 用 L5-紫外可见分光光度计在 600 nm 的条件下测量菌体的 OD 值。

1.8.3 菌株对于琥珀酸的耐受性实验: 配制不同琥珀酸浓度的 YEPD 培养基，在培养基中分别加入 2%、4%、6%、8%和 9% (质量体积比)的琥珀酸，再用 NaOH 调节 pH 至 6.0。一瓶不加琥珀酸，由 HCl 调节至 pH 6.0 的 YEPD 培养基作对照。接种量 2%，在 30 °C、200 r/min 的恒温摇床培养箱中培养 50 h，每隔 10 h 用 L5-紫外可见分光光度计在 600 nm 条件下测量菌体的 OD 值。

1.9 耐酸菌株及参照菌株细胞内 pH 的测定

1.9.1 耐酸菌株及参照菌株细胞内 pH 值的校正曲线绘制: 取对数期菌株 1 mL，8 000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集菌体，用 3 mL 磷酸钾缓冲溶液 4 °C 清洗 3 遍。加入 5-(6-)二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFDASE)至终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ ，振荡均匀后 40 °C 培养 20 min。随后在 8 000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集菌体，去除上清。用 3 mL 70%的乙醇溶液重悬菌体，30 °C 培养 30 min。8 000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集菌体。配制不同 pH 的 PPB 溶液，从 pH 2.0 到 pH 10.0，分别用不同 pH 的 3 mL PPB 缓冲液漂洗菌株 3 次。最后用不同 pH 值 PPB 溶液定容至 3 mL。室温培养 5 min 之后置于荧光分光光度计中，在激发波长为 490 nm 和 435 nm，吸收波长为 525 nm 的条件下分别测量数值，进而求得 490 nm 激发条件下的吸收数值与 435 nm 激发条件下吸收数值的比值与细胞内 pH 值之间的关系^[13-14]。

1.9.2 耐酸菌株及参照菌株在 pH 2.5 条件下细胞内 pH 值的测定: 耐酸菌株及参照菌株在 pH 2.5 的 YEPD 培养基中培养。每隔 10 h 取 1 mL 菌体在 8 000 r/min、4 °C 离心 5 min 得菌体；用 3 mL 的磷酸钾缓冲溶液在 4 °C 清洗 3 遍。加入 5-(6-)二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFDASE)至终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ ，振荡均匀后 40 °C 培养 20 min。随后在 8 000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集菌体，用 3 mL 的 PPB 缓冲液清洗 3 遍，最后定容至 3 mL，室温培养 5 min 后

置于荧光分光光度计中，在激发波长为 490 nm 和 435 nm，吸收波长为 525 nm 的条件下分别测量数值，求得 490 nm 激发条件下吸收数值与 435 nm 激发条件下吸收数值的比值，最后利用标准方程求得细胞内 pH 值^[13-14]。

1.9.3 耐酸菌株及参照菌株在 9%乳酸 pH 2.5 条件下细胞内 pH 值的测定: 耐酸菌株以及参照菌株在 9%乳酸 pH 2.5 的 YEPD 培养基中培养。其余步骤同 1.9.2。

1.9.4 耐酸菌株及参照菌株在 8%琥珀酸 pH 2.5 条件下细胞内 pH 值的测定: 耐酸菌株以及参照菌株在 8%琥珀酸 pH 2.5 的 YEPD 培养基中培养。其余步骤同 1.9.2。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

经过 7 个月的驯化培养，pH 3.0 和 pH 2.5 的酸性固体培养基上经涂布有菌落生长，pH 2.0 的固体培养基上没有观察到菌落，乳酸浓度为 6%和 8% 固体培养基上有菌落生长，浓度为 10%乳酸的平板上没有生长菌落；琥珀酸浓度为 4%、6%和 8% 的固体培养基上有菌落生长，琥珀酸浓度为 10% 的固体培养基上没有菌落生长。经显微镜观察，初步确定出 6 株耐酸菌株。为了更确定地比较 6 株菌的耐酸性能，将这 6 株菌株分别涂布在 pH 3.0、6% 乳酸和 6%琥珀酸的酸性平板上，结果如图 1 所示。编号为 WJ-2 的菌株在这 3 种条件下的菌落数最多，因此选其作为目的菌株并对其进行下一步研究。

2.2 菌株鉴定结果

耐受低 pH 值、高浓度乳酸和琥珀酸的菌株 WJ-2 在 pH 3.0 的 YEPD 固体培养基上培养 2 d 后形成的菌落呈椭圆形或卵圆形，乳白色，表面隆起，边缘整齐，表面光滑，无光泽，质粒粘稠(图 2)。经扫描电镜观察，10 000 倍放大倍数电镜结果显示菌体呈现卵圆形或者椭圆形(图 3A)，经测量其长×宽平均为 3.00 μm ×1.75 μm ，参照酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* YSG50 电镜结果平均为长×宽为 4.5 μm ×3.5 μm (图 3B)。耐受菌株 WJ-2 比 YSG-50 的尺寸小。

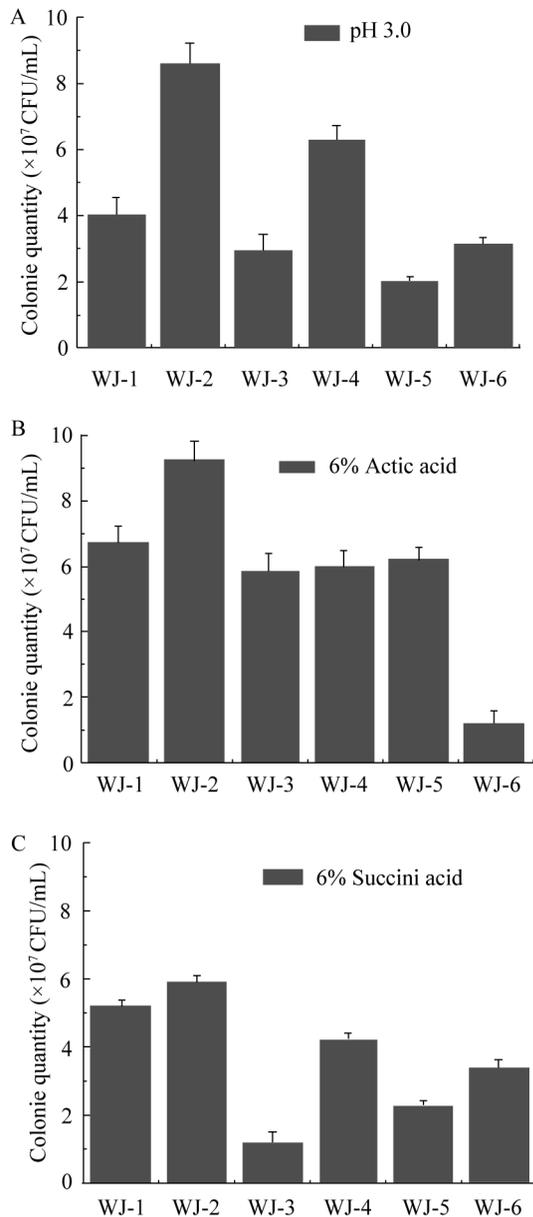


图1 6株菌株在 pH 3.0 (A), 6%乳酸(B)和 6%琥珀酸 (C)条件下的生长情况

Figure 1 Effects of pH 3.0 (A), 6% lactic acid (B) and 6% succinic acid (C) on the growth of six strains

18S rDNA 鉴定结果分析显示, WJ-2 的 18S rDNA 共 1 450 bp, 与 *Saccharomyces cerevisiae* 的相似度达到 99%以上, 使用 MEGA 5 软件, 采用 Neighbor-Joining 方法, 构建系统发育树, 分支左侧的数值为聚类的置信度(%), 如图 4 所示。该发育树的构建表明耐酸菌株与酿酒酵母



图2 耐酸菌的菌落形态

Figure 2 The morphology of WJ-2 on the acidic plate

(*Saccharomyces cerevisiae*)的亲缘关系最近, 分支置信度 63%, 且由于菌株与菌株 *Saccharomyces cerevisiae* (JQ585703.1)具有最高的相似性 85%, 结合菌落形态观察结果可认为所得菌株为一株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

2.3 耐酸菌株WJ-2与对照菌株YSG-50生长曲线的比较

如图 5 所示, 耐酸菌株 WJ-2 与对照菌株 YSG-50 在 pH 6.0 的培养条件下其生长曲线基本重合, 表明两株菌株在 pH 6.0 的条件下生长速率差别不大。pH 3.0 的培养条件对于耐酸菌株 WJ-2 的生长速率影响较小, 但是对于 YSG-50 表现出明显的抑制作用, 表明耐酸菌株 WJ-2 的耐酸能力明显高于 YSG-50。

2.4 耐酸菌株最适生长温度

如图6所示, 耐酸菌株WJ-2在培养温度为30 °C时菌体的生长速率最快且生物量最大。在其他温度下菌株的生长温度都有不同程度的下降。尤其在温度达到40 °C时, 菌株生长受到了强烈的抑制, 可能由于维持菌株生长必需的关键酶活性在该温度下受到了抑制, 进而导致菌株生长缓慢。

2.5 耐酸菌株对盐酸的耐受性实验结果

如图 7 所示, 耐受菌株 WJ-2 生存适应的 pH 范围较广, 从 pH 2.5 至 pH 9.0 都有较高的生长速

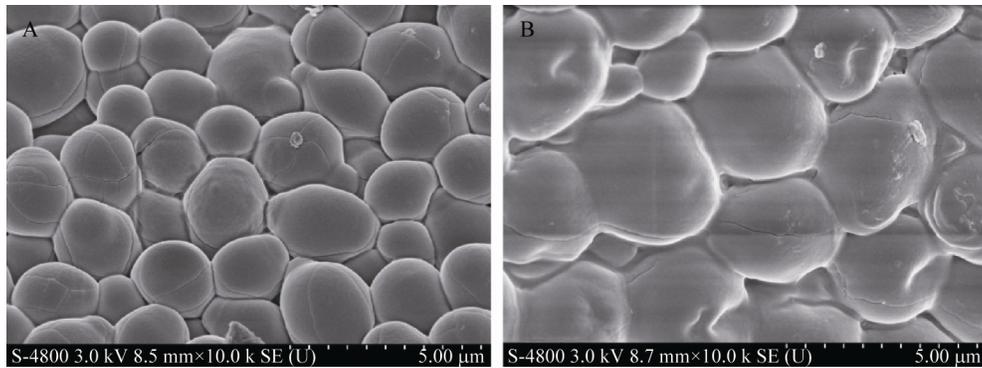


图3 WJ-2 与 YSG-50 菌株在扫描电镜下的形态对比(10 000×)

Figure 3 The comparison of morphology of WJ-2 and YSG-50 (10 000×)

Note: A: The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* WJ-2; B: The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* YSG-50.

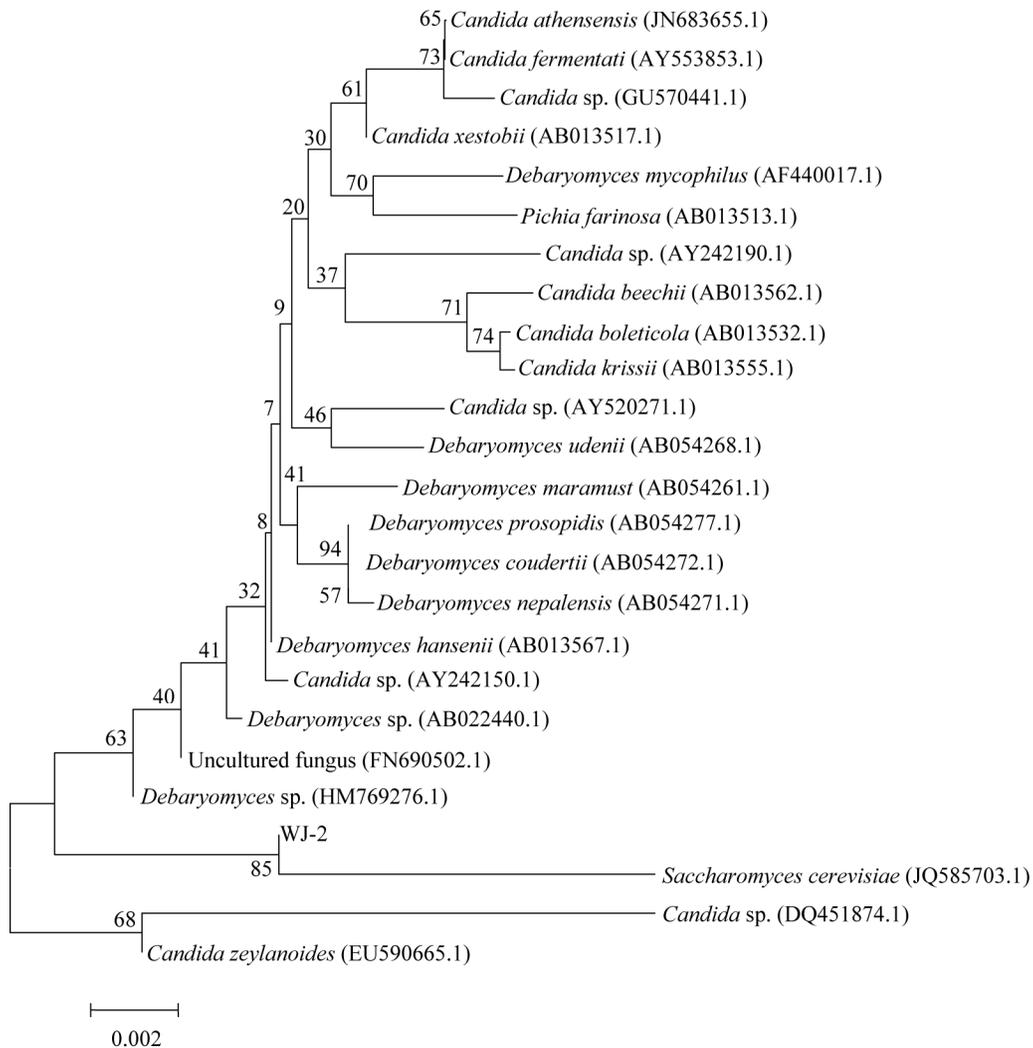


图4 根据菌株的 ITS 区序列同源性建立的系统发育进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of the strain WJ-2 based on 18S rDNA sequences

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 中的登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Number in parentheses represents the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.002 represents sequences divergence.

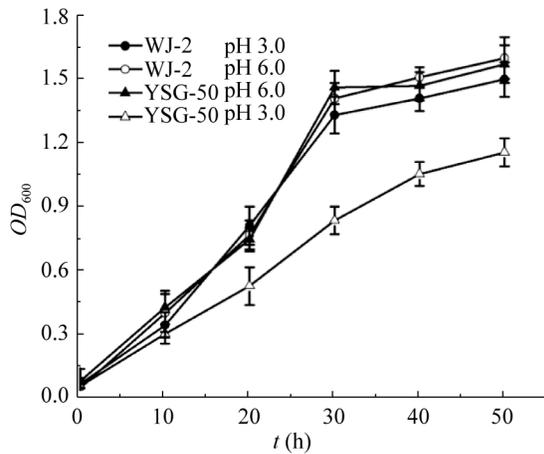


图5 耐酸菌株 WJ-2 与对照菌株 YSG-50 生长曲线的比较

Figure 5 The comparison between WJ-2 and YSG-50 in different pH conditions

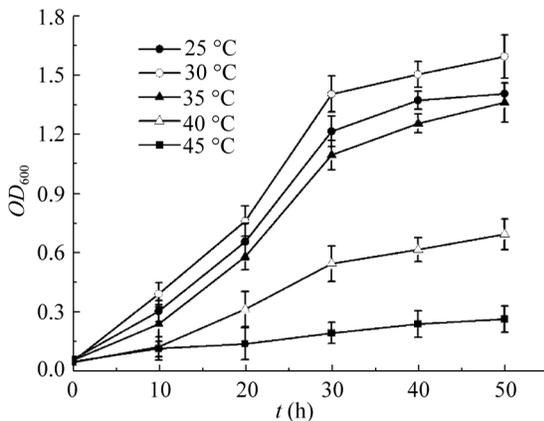


图6 温度对耐酸菌株 WJ-2 生长的影响

Figure 6 The effect of temperature on WJ-2 growth

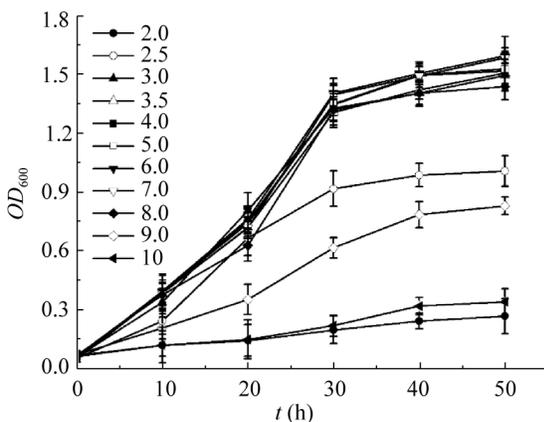


图7 发酵液 pH 值对耐酸菌株 WJ-2 生长的影响

Figure 7 Effects of pH value of fermentation broth on WJ-2 growth

率。其中在 pH 6.0 的条件下, WJ-2 呈现出生长的最大生物量, 表明菌株最适生长 pH 值为 6.0。当环境中 pH 值降低到 2.0 时或者大于 pH 9.0 时, 菌株的生长受到了明显的抑制, 表明菌株的耐酸极限是 pH 2.5。

2.6 耐酸菌株对于乳酸的耐受性实验结果

如图 8 所示, 随着发酵时间的增长, 耐酸菌的生物量不断的增加。随着乳酸浓度的升高, 耐酸菌株的生长速率不断的降低, 当乳酸浓度达到 9% 时, 耐酸菌株的生长速率开始有明显的下降趋势。在乳酸浓度为 10% 时, 耐酸菌株的生长速率几乎为零, 这时菌株的生长受到了严重的抑制。由该实验得知, 耐酸菌株对于乳酸浓度的耐受极限是 9%。

2.7 耐酸菌株对于琥珀酸的耐受性实验结果

如图 9 所示, 随着发酵时间的增长, 耐酸菌的生物量不断的增加。随着琥珀酸浓度的增加, 耐酸菌株的生长速率不断降低, 当琥珀酸浓度达到 8%, 耐酸菌株的生长速率受到了抑制。当其浓度为 9% 时, 耐酸菌株的生长速率几乎为零, 这时菌株的生长受到了严重的抑制。由该实验可以得知, 耐酸菌株对于琥珀酸浓度的耐受极限是 8%。

2.8 耐酸菌株与参照菌株细胞内 pH 值测量结果

2.8.1 耐酸菌株 WJ-2 及参照菌株 YSG-50 细胞内 pH 值标准曲线的绘制: 如图 10 所示, 随着细胞内 pH 的升高, 激发波长 490 nm 与 435 nm 的比值不断增大, 于 pH 10 之后达到平衡。采用 Henderson-Hasselbalch 方程拟合^[15-16], 得出菌株 WJ-2 的拟合方程为 $Y=10.515 2+ \{-9.217 2/[1+\exp(X-7.212 4)/0.715 07]\}$; 其中 X 代表细胞内 pH 值, Y 代表激发波长 490 nm 与 435 nm 的比值 ($R_{490/435}$); YSG-50 的拟合方程为 $Y=11.242 74+ \{-9.927 06/[1+\exp(X-7.117 07)/0.745 94]\}$ 。其中 X 代表细胞内 pH 值, Y 代表激发波长 490 nm 与 435 nm 的比值 ($R_{490/435}$)。

2.8.2 耐酸菌株 WJ-2 及参照菌株 YSG-50 在 3 种酸刺激条件下细胞内 pH 值的变化趋势: 如图 11 所示, 随着发酵的进行, 耐酸菌株 WJ-2 与参照

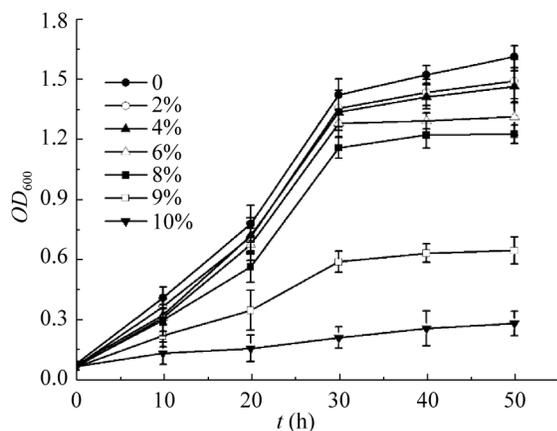


图 8 乳酸对耐酸菌株 WJ-2 生长的影响

Figure 8 The effect of lactic acid on WJ-2 growth

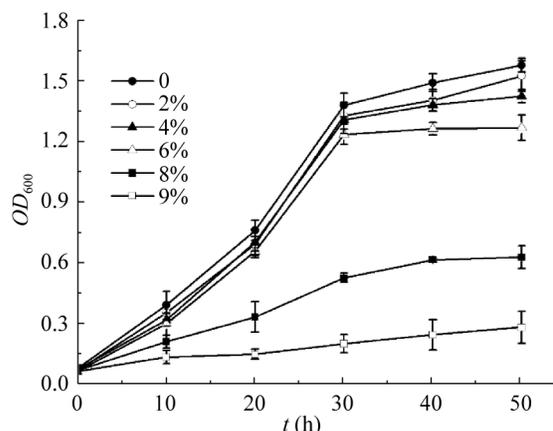


图 9 琥珀酸对耐酸菌株 WJ-2 生长的影响

Figure 9 The effect of succinic acid on WJ-2 growth

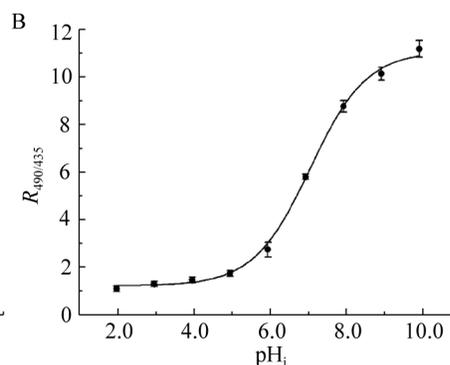
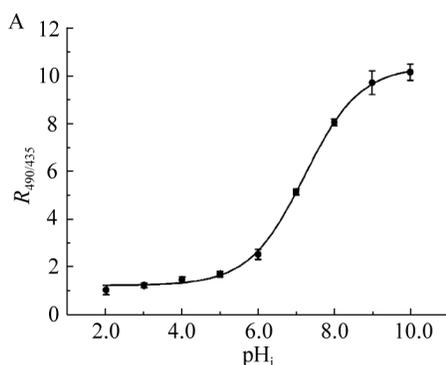
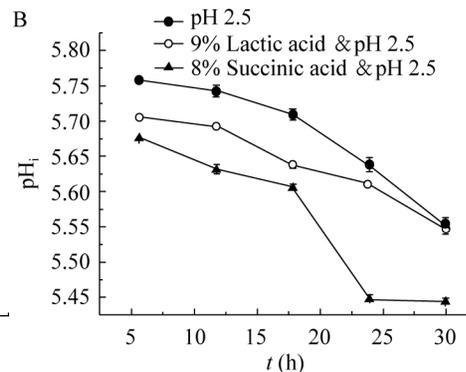
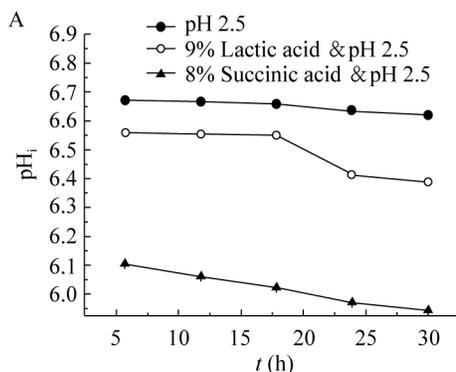
图 10 激发波长 490 nm 与 435 nm 比值($R_{490/435}$)与细胞内 pH 值之间的关系Figure 10 Correlation between excitation ratio 490 nm/435 nm ($R_{490/435}$) and pH_i of pH-equilibrated cells in buffers with pH ranging from 2.0 to 10.0Note: A: *Saccharomyces cerevisiae* WJ-2; B: *Saccharomyces cerevisiae* YSG-50.

图 11 耐酸菌株 WJ-2 与参照菌株 YSG-50 分别在 pH 2.5, 9%乳酸和 8%琥珀酸的 YEPD 培养基中细胞内 pH 值随时间的变化曲线

Figure 11 Correlation between intracellular pH of strain and time in the YEPD medium with a pH 2.5 value, 9% lactic acid and 8% succinic acid, respectively

Note: A: *Saccharomyces cerevisiae* WJ-2; B: *Saccharomyces cerevisiae* YSG-50.

菌株 YSG-50 细胞内 pH 值不断降低。WJ-2 菌株在发酵过程中始终保持细胞内 pH 值大于 6；而对于参照菌株 YSG-50，在 3 种酸刺激下其细胞内 pH 均较 WJ-2 低，由此可见，耐酸菌株 WJ-2 比参照菌株 YSG-50 在酸性环境中具有更好的维持细胞内的 pH 值稳定的能力。这种性质可能与 WJ-2 的耐酸性相关。不同浓度的 3 种酸对于 WJ-2 的影响是不同的，其影响从大到小依次为 8%琥珀酸和 pH 2.5、9%乳酸和 pH 2.5、pH 2.5。琥珀酸对于菌株的影响大于同浓度的乳酸。

3 讨论

近年来，利用微生物生产药物以及处理环境得到了人们的广泛关注^[6,17]，但是不适宜的发酵环境以及处理环境限制了微生物的生长，进而导致发酵或者处理效率的降低。具有特定耐受能力菌株的获得是提高生产以及处理能力的关键，故需要建立一种能够高效筛选具有特定耐受能力的菌株的方法。

本实验通过采集中国不同地方的酸性土壤、不同品牌的酸奶和酸菜，加入盐酸、乳酸以及琥珀酸成功构建了不同梯度的酸性系统。经过长时间驯化培养，并采用酸性固体培养基成功地从构建的酸性系统中筛选出来一株能够耐受低 pH 值、高浓度乳酸和琥珀酸的菌株。经形态学观察以及 18S rDNA 基因序列分析，该菌株属于酿酒酵母菌属 (*Saccharomyces cerevisiae*)。通过对该耐酸菌株生理生化特性分析可知其最适生长温度为 30 °C，可以耐受 pH 2.5 的酸性环境，对于乳酸以及琥珀酸的耐受性分别达到 9%和 8%，该菌株对于有机酸的耐受性使其应用前景更为宽广。经扫描电子显微镜观察其尺寸平均长×宽为 3 μm×1.75 μm，比对照菌株 *Saccharomyces cerevisiae* YSG-50 平均尺寸长×宽为 4.5 μm×3.5 μm 要偏小，相对小的尺寸可能是 WJ-2 具有较高耐酸性的原因。

为了探究酸性环境对于细胞的影响，还进行了耐酸菌株 WJ-2 与参考菌株 YSG-50 在 pH 2.5、9%乳酸和 8%琥珀酸环境下细胞内 pH 值的测定。结

果表明耐酸菌株 WJ-2 在 3 种酸的培养环境下，细胞内 pH 值都维持在 6.0 以上且倾向于维持相对中性的胞内 pH 值；而参照菌株细胞内 pH 值较耐酸菌株偏低，耐酸菌株 WJ-2 较强耐酸性或许与细胞具有很好的酸阻挡以及酸外排能力有关。耐酸菌株对于盐酸以及乳酸的耐受性要明显高于琥珀酸，可能是由于琥珀酸的积累对菌株 TCA 循环和乙醛酸循环造成了抑制作用^[18]。故采用构建人工耐酸系统定向筛选具有耐酸能力的菌株是可行的。

在极端环境中筛选极端耐受微生物^[19-20]或者采用适应性进化(Adapted evolution)的方法定向驯化菌株，使得菌株具有我们所期望的性质已经有所报道^[10,21]，但是通过构建人工酸性系统来定向筛选大量耐酸菌株的方法还较为少见。本实验成功构建了人工酸性系统，并且从中筛选出一株具有低 pH 耐受性、高浓度乳酸和琥珀酸的菌株。表明该方法在定向筛选具有特定耐受能力的菌株方面具有明显的优势，为以后获得极端耐受能力的菌株提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] Nicolaou SA, Gaida SM, Papoutsakis ET. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(4): 307-331.
- [2] Patnaik R. Engineering complex phenotypes in industrial strains[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 24(1): 38-47.
- [3] Zou W, Liu L, Chen J. Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2012, 39(3): 247-255.
- [4] Alonso S, Rendueles M, Diaz M. Selection method of pH conditions to establish *Pseudomonas taetrolens* physiological states and lactobionic acid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(9): 3843-3854.
- [5] 石小彤, 李彦芹, 邢国伟, 等. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离筛选及鉴定[J]. *生物技术通报*, 2013, 3: 175-180.
- [6] 王茹, 郑平, 厉巍, 等. 耐碱反硝化菌株的分离鉴定与功能检测[J]. *微生物学报*, 2013, 54(4): 372-378.
- [7] 郭岩, 周雪媚, 杨茂华, 等. 高效嗜碱好氧反硝化细菌的筛选及其脱硝特性[J]. *过程工程学报*, 2013, 13(4): 687-692.
- [8] 曹月婷, 李玉, 李江, 等. 长双歧杆菌多因素连续驯化

- 的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 104-107.
- [9] 孙军德, 康婷婷, 高林, 等. 饲用益生酵母菌的耐酸驯化研究[J]. 农业科技与装备, 2013(228): 15-16.
- [10] Hong KK, Vongsangnak W, Vemuri GN, et al. Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(29): 12179-12184.
- [11] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi[J]. Letters in Applied Microbiology, 1985, 1(1): 17-20.
- [12] Eickmeyer K, Huggins P, Pachter L, et al. On the optimality of the neighbor-joining algorithm[J]. Algorithms for Molecular Biology, 2008, 3: 5.
- [13] Halm M, Hornbaek T, Arneborg N, et al. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(1): 97-103.
- [14] Breeuwer P, Drocourt J, Rombouts FM, et al. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-) -carboxyfluorescein succinimidyl ester[J]. Applied and Environment Microbiology, 1996, 62(1): 178-183.
- [15] Graber ML, DiLillo DC, Friedman BL, et al. Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH[J]. Analytical Biochemistry, 1986, 156(1): 202-212.
- [16] James-Kracke MR. Quick and accurate method to convert BCECF fluorescence to pH_i: calibration in three different types of cell preparations[J]. Journal of Cell Physiology, 1992, 151(3): 596-603.
- [17] Leonard E, Ajikumar PK, Thayer K, et al. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(31): 13654-13659.
- [18] Raab AM, Lang C. Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioengineered Bugs, 2011, 2(2): 120-123.
- [19] Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, et al. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate-and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. Nov.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5): 2959-2965.
- [20] Kim JW, Peeples TL. Screening extremophiles for bioconversion potentials[J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(6): 1720-1724.
- [21] Wu C, Zhang J, Chen W, et al. A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 707-722.