

# 耐低温酵母 *Curvibasidium rogersii* 菌株在松萝样品中的首次分离鉴定及基于基因组分析的生物特性探究

白龙<sup>1</sup>, 张安琪<sup>1</sup>, 朱熠婷<sup>1</sup>, 王雪晴<sup>1</sup>, 王慕瑶<sup>1</sup>, 李俊<sup>2</sup>, 章漳<sup>2</sup>, 赵心清<sup>1\*</sup>

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

白龙, 张安琪, 朱熠婷, 王雪晴, 王慕瑶, 李俊, 章漳, 赵心清. 耐低温酵母 *Curvibasidium rogersii* 菌株在松萝样品中的首次分离鉴定及基于基因组分析的生物特性探究. 微生物学报, 2022, 62(2): 567–578.

Bai Long, Chong Anjoe, Zhu Yiting, Wang Xueqing, Wang Muyao, Li Jun, Zhang Zhang, Zhao Xinqing. First isolation and identification of cold adaptive yeast *Curvibasidium rogersii* from *Usnea* lichen and genome-based studies of its biological properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 567–578.

**摘要:** 【目的】对西藏松萝地衣来源的两株非常规酵母进行分离鉴定, 并通过基因组序列分析探究其生物学特性和应用潜力。【方法】从西藏来源的松萝地衣样品内部分离得到 2 株耐低温酵母菌株, 通过 26S D1/D2 和 ITS 序列比对分析以及生理生化实验进行菌种鉴定; 通过全基因组序列分析和验证探究菌株的生物特性。【结果】两株酵母菌株经鉴定均为 *Curvibasidium rogersii*, 可以在 10 °C 低温良好生长, 在 20 °C 生长最佳, 25 °C 及以上温度生长缓慢或不生长。对其进行基因组测序和基因组挖掘, 测序结果发现, 其基因组注释出功能的部分与产油脂的低温酵母白冬孢酵母 *Leucosporidium creatinivorum* 具有最高相似性, 尼罗红染色发现两株酵母都能够生产油脂, 另外在基因组序列中还发现了可能参与木糖代谢的相关蛋白编码基因, 实验证明两个酵母菌株可以利用木糖生长。【结论】首次分离鉴定了来自西藏松萝的酵母 *C. rogersii*, 为充分开发利用松萝和其他地衣来源微生物, 以及利用可代谢木糖的新资源酵母生产微生物油脂提供了基础。

**关键词:** 耐低温酵母; *Curvibasidium rogersii*; 西藏松萝地衣; 基因组挖掘; 木糖利用; 微生物油脂

基金项目: 国家自然科学基金(21536006)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21536006)

\*Corresponding author. E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

Received: 6 April 2021; Revised: 31 May 2021; Published online: 6 January 2022

# First isolation and identification of cold adaptive yeast *Curvibasidium rogersii* from *Usnea* lichen and genome-based studies of its biological properties

BAI Long<sup>1</sup>, CHONG Anjoe<sup>1</sup>, ZHU Yiting<sup>1</sup>, WANG Xueqing<sup>1</sup>, WANG Muyao<sup>1</sup>, LI Jun<sup>2</sup>, ZHANG Zhang<sup>2</sup>, ZHAO Xinqing<sup>1\*</sup>

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

2 R&D Center, JALA Group Co, Shanghai, Shanghai 200233, China

**Abstract:** [Objective] To isolate and identify two endophytic nonconventional yeast strains from *Usnea* lichen samples collected in Tibet, and investigate their biological characteristics and application potential through genome mining, which was further experimentally validated. [Methods] We isolated two cold-tolerant yeast strains from the *Usnea* samples under 15 °C culture condition. These two strains were further identified by physiological tests, biochemical tests, 26S D1/D2 sequence analysis, and ITS sequence analysis. Then we performed genome sequencing and analysis, and further tested lipid production capability by Nile red dye staining. [Results] We identified two strains of cold-tolerant yeast as *Curvibasidium rogersii*, which grow well at 10 °C, and the optimum temperature for growth was determined to be 20 °C. The growth was poor or not observed at 25 °C and the above temperature. Sequencing and analysis of the genome revealed that the genome is the most similar to that of *Leucosporidium creatinivorum*, which has been reported as a microbial lipid producer. We found that these two strains can accumulate lipid. Moreover, a putative xylose reductase protein encoded gene was also identified in the genome, and we also confirmed growth of the two strains using xylose. [Conclusion] We isolated two cold-adaptive *C. rogersii* strains which were identified for the first time from *Usnea* lichen. Our results provide a basis for further exploration of microbial resources from *Usnea* species and other lichens, as well as using novel xylose-utilizing yeast strains for single cell lipid production.

**Keywords:** cold-tolerant yeast; *Curvibasidium rogersii*; *Usnea* lichen from Tibet; genome mining; xylose utilization; microbial lipid production

近年来,非常规酵母(nonconventional yeast)的应用和菌株选育引起了国内外研究者的普遍关注<sup>[1-2]</sup>。非常规酵母包括除了酿酒酵母和裂殖酵母外的所有酵母,已知在不同生态环境中存在多种多样的非常规酵母,对其生物学特性进行分析,有利于进一步探究其在不同生物技术领域的应用潜力。

地衣为藻类(或蓝细菌)和真菌的共生生命系统,近年来研究发现,地衣可形成复杂的生态系统,除了特有的真菌和藻类外,还存在多

样的细菌、内生真菌和外生真菌。这些微生物有的稳定存在于特定的地衣,有的分别和不同的地衣相关联<sup>[3-4]</sup>。例如,近期对瑞士和爱沙尼亚地衣的研究发现了地衣非固有的囊担子菌纲酵母(*Cystobasidiomycetes*)<sup>[5]</sup>,提示地衣存在包括非常规酵母在内的多种真菌资源,但是地衣来源微生物的多样性和应用研究还非常有限。

我国西藏自治区具有复杂多样和独特的环境条件,也孕育着丰富的微生物资源<sup>[6-13]</sup>。例如,我国学者在西藏地区的植物样品中分离鉴

定了两个酵母新种 *Candida tibetensis* sp. nov. 和 *Candida linzhiensis* sp. nov.<sup>[10]</sup>; 在西藏地区的植物叶片中鉴定了西藏酵母新种 *Cryptococcus tibetensis* sp. nov.<sup>[11]</sup>, 提示西藏地区可能具有丰富的酵母菌资源。对西藏地区真贝酵母(*Saccharomyces eubayanus*) 菌株的遗传多样性研究证明该种的一个西藏谱系是拉格酵母的野生亲本<sup>[12]</sup>。西藏土壤和植物叶面存在大量新酵母资源<sup>[13]</sup>, 西藏拉鲁湿地水体酵母多样性<sup>[7]</sup>和青稞酒曲酵母的分离和酿造性能<sup>[8]</sup>等也有报道。本课题组对西藏来源酵母资源进行了研究, 报道了来自西藏冰川水、土壤和植物等不同环境的酵母菌株<sup>[9]</sup>, 但是, 目前对西藏地衣来源酵母的研究还未见报道。

松萝为枝状地衣, 是藻类和真菌共生的复合体, 是西藏地区比较常见的一种生物。不同松萝可合成不同的活性物质, 相关活性包括抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等<sup>[14]</sup>。松萝中分离到包括曲霉和黑孢属等真菌, 但是对于松萝和其他地衣来源内生真菌的研究还非常有限<sup>[15-17]</sup>。本文报道了来自西藏松萝的 2 株非常规酵母的分离鉴定, 以及该酵母菌种的基因组序列分析, 首次在国内分离并鉴定了松萝来源的非常规酵母 *Curvibasidium rogersii* 菌株, 并通过基因组挖掘和实验研究, 证明其具有油脂积累能力, 为研究地衣来源微生物的多样性和其生物技术应用提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 松萝来源耐低温酵母分离和保存

文中所用松萝样品采自西藏自治区林芝市。首先利用无菌水冲洗松萝样品表面, 然后浸入 75%乙醇中消毒 30 s, 无菌水冲洗 1 次, 再利用 3.75%次氯酸钠消毒 1 min, 无菌水冲洗 2 次, 研磨后涂布于 YPD 固体培养基上, 15 °C

培养箱中倒置培养。所使用 YPD 培养基配方为: 10 g/L 酵母粉、20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 葡萄糖, 固体培养基中加入 20 g/L 琼脂粉, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。菌落长出后, 将分离得到的单菌落进行至少 3 次划线纯化, 挑取单菌落于 YPD 液体培养基中培养, 所获得的菌体使用 25%甘油于-80 °C 下保藏。

### 1.2 酵母菌种鉴定

#### 1.2.1 菌株形态鉴定

在 YPD 平板观察菌落形态, 在光学显微镜下观察细胞的显微形态。

#### 1.2.2 菌株的分类学鉴定及系统发育树的构建

参考文献<sup>[18]</sup>提取酵母基因组 DNA, 然后使用酵母 D1/D2 区域通用引物 26S-F (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 26S-R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 以及真菌 ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增, 产物由擎科生物技术有限公司(中国, 上海)进行测序。测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库(<http://blast-t.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列相似性比对, 并使用软件 MEGA-X 构建系统发育进化树。

### 1.3 菌株碳源同化实验

碳源同化实验参照文献<sup>[19]</sup>进行, 选择包括双糖、三糖、五碳糖、六碳糖、多糖、醇类、有机酸和糖苷在内的 20 余种碳源。碳源同化基础培养基为 16.5 g/L Yeast Nitrogen Base, 挑取酵母单菌落接入碳源饥饿培养基(在碳源同化基础培养基中加入 0.1%葡萄糖, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min)中, 培养 2-3 d, 消耗细胞内剩余碳源; 向碳源同化基础培养基中加入含有 2 g 碳的碳源溶液(过滤除菌), 接入饥饿培养菌液, 25 °C、200 r/min 摇床培养, 连续观察 28 d。

## 1.4 菌株生物学特性

### 1.4.1 耐低温能力的检测

将在 YPD 液体培养基活化的酵母菌液调整起始  $OD_{600}$  为 1.0, 并进行梯度稀释, 取 2  $\mu\text{L}$  于 YPD 固体培养基上进行点板, 将平板分别放置于 4、10、15、20 和 25  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中倒置培养, 检测菌株的低温耐性。

### 1.4.2 基因组测序及分析

取生长到对数中期的酵母细胞交由北京诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组测序, 测序结果使用 NR (Non-Redundant Protein Sequence Database)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、GO (Gene Ontology)、SwissProt 等数据库进行注释。

### 1.4.3 胞内脂质的染色观察

挑取酵母单菌落并稀释于无菌水中, 以 1/1 000 的比例加入 0.5 mg/mL 的尼罗红染料, 避光环境下染色 5 min; 使用激光共聚焦显微镜以激发波长 488 nm、发射波长 570 nm 的荧光强度观察细胞内的荧光信号<sup>[20]</sup>。

### 1.4.4 木糖利用能力的检测

将在 YPD 液体培养基活化的酵母菌液进行梯度稀释, 取 2  $\mu\text{L}$  于 YPX 固体培养基(10 g/L 酵母粉、20 g/L 蛋白胨、20 g/L 木糖和 20 g/L 琼脂粉,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min)上进行点板, 20  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中倒置培养, 检测菌株木糖利用能力。

### 1.4.5 木糖还原酶氨基酸序列同源性比对

使用 NCBI 对 A3623 蛋白序列进行比对, 找到与之最相似的是来自胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)的木糖还原酶(xylose reductase, XR)氨基酸序列(GenBank: ADF57216), 并在 NCBI 上查找已知具有木糖还原酶活性的相关酶氨基酸序列, 选择来自毕赤酵母(*Pichia stipites*)的 XR 序列(GenBank: XP\_001385181)和来自马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)

的 XR 序列(GenBank: ADV91498), 使用 DNAMAN 软件对 A3623 和 3 种不同来源的木糖还原酶的蛋白序列进行序列比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定

#### 2.1.1 菌株的菌落形态

本课题组采用 15  $^{\circ}\text{C}$  低温条件从西藏来源的松萝样品中分离纯化得到了多株酵母, 经过鉴定, 有两株酵母菌株具有和已知模式酵母相似性最低的 26S D1/D2 序列, 为可能的新种, 分别编号为 JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231, 并保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC), 保藏号分别为 CGMCC No. 21347 和 CGMCC No. 21346。将两株酵母菌株在 YPD 固体培养基上 15  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d 后观察, 菌株 JBA-MBY-JT230 的单菌落呈奶油色到淡黄色, 菌株 JBA-MBY-JT231 的单菌落呈奶油色; 两株菌的单菌落状态相似, 边缘光滑, 轻微反光, 菌落隆起, 易挑起。

#### 2.1.2 系统生物学鉴定

将测序得到两株菌的 26S D1/D2 和 ITS 部分序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 并根据比对的结果找到同源序列进行系统发育树的构建。从图 1 中可以看出, JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 与美国学者在葡萄表面分离的菌株 *C. rogersii* NRRL Y-48849<sup>[21]</sup> (GenBank: JX188232.1)的亲缘关系最近, JBA-MBY- JT230 与 *C. rogersii* NRRL Y-48849 的 D1/D2 (GenBank: MWMW881374) 和 ITS 序列 (GenBank: MW879463)相似度分别为 100%和 99.81%; JBA-MBY-JT231 与 *C. rogersii* NRRL Y-48849 的 D1/D2 (GenBank: MW881373)和 ITS 序列 (GenBank: MW879462)相似度分别为 99.81%和 99.43%。

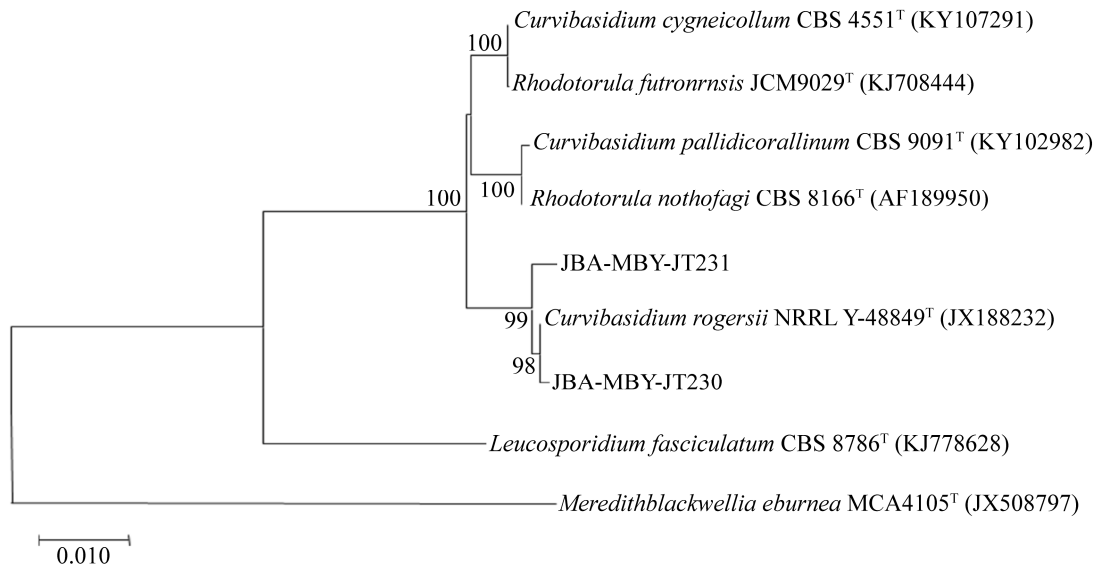


图 1 菌株 JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 基于 ITS 和 D1/D2 区域序列构建的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree of strains JBA-MBY-JT230 and JBA-MBY-JT231 based on ITS and D1/D2 sequence. The superscript T stands for type strain. The accession numbers of the sequences in GenBank were shown in parentheses.

因此，将从松萝内部分离到的两个酵母菌株鉴定为 *C. rogersii*，这是该物种首次在松萝样品中得到分离鉴定。

## 2.2 菌株碳源同化实验

检测菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 的碳源同化能力，并与 *C. rogersii* 模式菌株 *C. rogersii* NRRL Y-48849 和其在系统发育树中亲缘关系最近的 *C. cygneicollum*、*R. nothofagi* 和 *C. pallidicorallinum* 模式菌株做比较，实验结果见表 1。两个菌株都可以同化木糖、葡萄糖、甘露醇、甘油、鼠李糖、蔗糖、棉籽糖、N-乙酰氨基葡萄糖、松三糖、水杨苷和葡萄糖酸内酯；而不能同化乳糖、海藻糖、核糖、葡萄糖酸酯、纤维二糖、乳酸、甲醇、肌醇和十六烷。同时也发现两菌株生理生化特征有差异，*C. rogersii* JBA-MBY-JT230 与 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 相比，D-阿拉伯糖、柠檬酸、半乳糖、蜜二糖

的同化能力更强，但不能同化菊粉。与亲缘关系最近的 *C. rogersii* 的碳源同化能力进行比较后发现，菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 与该菌株在蔗糖、纤维二糖和柠檬酸上的同化特性上有显著区别。此外，鼠李糖、棉籽糖、木糖和 D-阿拉伯糖等碳源的利用也存在着一定差别。

## 2.3 两个酵母菌株的低温生长特性

菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 最初在 15 °C 低温培养获得，而且都可以在 4 °C 生长，进一步对其在不同温度条件下的生长进行了评估，实验结果如图 2 所示。和模式酿酒酵母菌株 S288c 比较，两个酵母菌株都展示出了更好的耐低温性能。在 10 °C 条件下，两个菌株的生长速度要明显快于酿酒酵母菌株。不同温度条件下生长比较，两株酵母都在 20 °C 生长最好；但在 25 °C 时有差异，*C. rogersii* JBA-MBY-JT230 在该温度生长减慢，

表 1 菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 的碳源同化实验结果Table 1 Results of carbon source assimilation experiments for *C. rogersii* strains JBA-MBY-JT230 and JBA-MBY-JT231

Characteristic	JBA-MBY-JT230	JBA-MBY-JT231	<i>C. rogersii</i> NRRL Y-48849 <sup>[21]</sup>	<i>C. cygneicollum</i> CBS 4551 <sup>[22]</sup>	<i>R. nothofagi</i> CBS 8166 <sup>[22]</sup>	<i>C. pallidicorallinum</i> CBS 9091 <sup>[22]</sup>
N-acetyl-D-glucosamine	W	W	N	N	N	N
D-arabinose	L	L	S	+	+	+
L-arabinose	+	S	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	+	+	+	+
Citrate	+	W	-	+	+	V
Galactose	+	S	+	+	-	+
2-keto-D-gluconate	-	-	V	N	N	N
D-glucosamine	-	W/-	-	-	-	-
Gluconolactone	+	+	+	N	N	N
Glucose	+	+	+	+	+	+
Glycerol	S	S	N	V	+	+
Hexadecane	-	-	N	N	N	N
myo-inositol	-	-	-	-	-	V
Inulin	-	+	N	-	-	V
DL-lactate	-	-	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	V
D-mannitol	+	+	+	+	+	+
Melezitose	W	W	N	-	-	V
Melibiose	W	-	-	-	-	V
Methanol	-	-	N	-	-	-
Raffinose	W	W	-	-	-	+
D-ribose	-	-	-	V	+	V
Rhamnose	W/-	W/-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	-	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+
Succinate	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	V	-	-
D-xylose	S	S	+	+	+	+

+: strong assimilation; -: no assimilation; S: slow assimilation; L: delay assimilation; W: weak assimilation; V: various assimilation; N: no data.

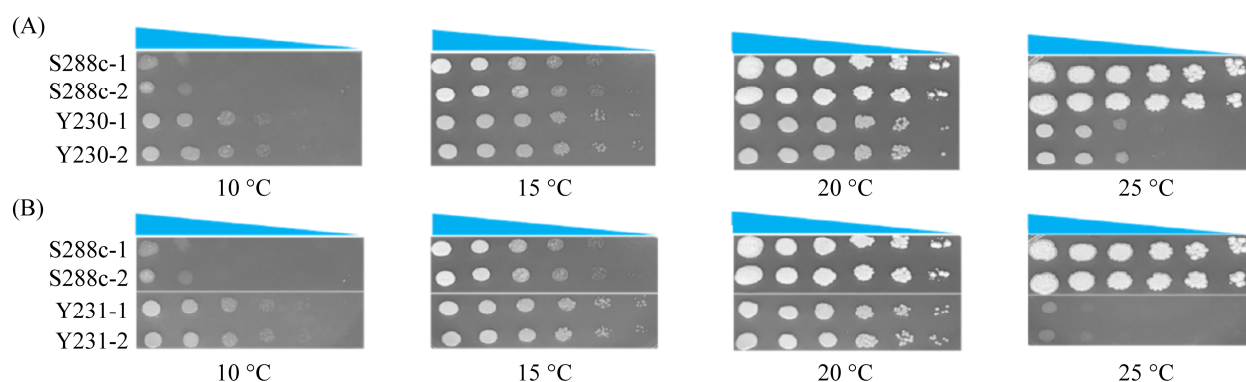


图 2 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 (A)和 JBA-MBY-JT231 (B)的低温生长

Figure 2 Growth of *C. rogersii* strains at low temperature. A: JBA-MBY-JT230; B: JBA-MBY-JT231, the yeast strains were incubated for 72 h in YPD agar plates before being photographed. Y230 and Y231 indicate replicates of JBA-MBY-JT230 and JBA-MBY-JT231, respectively.

但是可以生长，而 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 在 25 °C 未观察到明显生长。*C. rogersii* 模式菌株 NRRL Y-48849 可以在 20–25 °C 生长，在 30 °C 不生长，但美国学者的结果未探究模式菌株在 4–10 °C 等低温条件下的生长能力<sup>[21]</sup>，因此本文为首次报道 *C. rogersii* 的耐低温菌株。

## 2.4 菌株的全基因组分析及功能探究

### 2.4.1 菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的全基因组分析

目前唯一研究 *C. rogersii* 的报道是美国学者的结果<sup>[21]</sup>，但是，目前对该菌种的生物学特性和应用潜力的研究没有报道。本文对该菌株进行了基因组测序和基因组挖掘。由于菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的 26S D1/D2 序列和模式菌株比较差异更大一些，因此对该菌株进行了全基因组测序。分析结果显示，该菌株基因组总长度为 21 279 898 bp (21 Mbp)；GC 含量较高，约为 63.09%；菌株共编码 6 382 个基因，所编码基因的平均长度约为 1 410 bp；编码基因总长度为 9 000 428 bp，约占整个基因组大小的 42.3%。使用 NR 数据库对编码基因进行注释，发现有 4 927 个基因的功能被注释，约占总

基因数的 77.2%；还有 1 455 个基因未被注释出功能，因此，菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的基因组具有很强的新颖性。对基因注释结果进行分析，发现存在 15 个氨基酸序列相似性和相关蛋白介于 40%–69% 之间的纤维素酶、4 个相似性介于 43%–74% 之间的淀粉酶、5 个相似性介于 40%–48% 之间的几丁质酶、8 个相似性介于 45%–76% 之间的脂肪酶及 10 个相似性介于 40%–58% 之间蛋白酶，但是这些酶是否具有相关活性，以及是否为低温酶还需要进一步实验验证。

### 2.4.2 木糖利用酶和木糖利用性能

对基因组注释结果进一步分析，发现了可能的蛋白编码基因 A3623，其编码蛋白和胶红酵母的木糖还原酶相似度为 53.58%。该蛋白与已知毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母和胶红酵母的 XYL1 序列比对结果见图 3，A3623 的蛋白序列与比对蛋白的保守序列相似<sup>[23]</sup>，3 个已报道的底物结合残基中有 2 个氨基酸一致<sup>[24]</sup>，4 个已报道的活性位点全部一致<sup>[24]</sup>，因此推测 A3623 可能是菌株 JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 木糖利用的关键酶木糖还原酶。

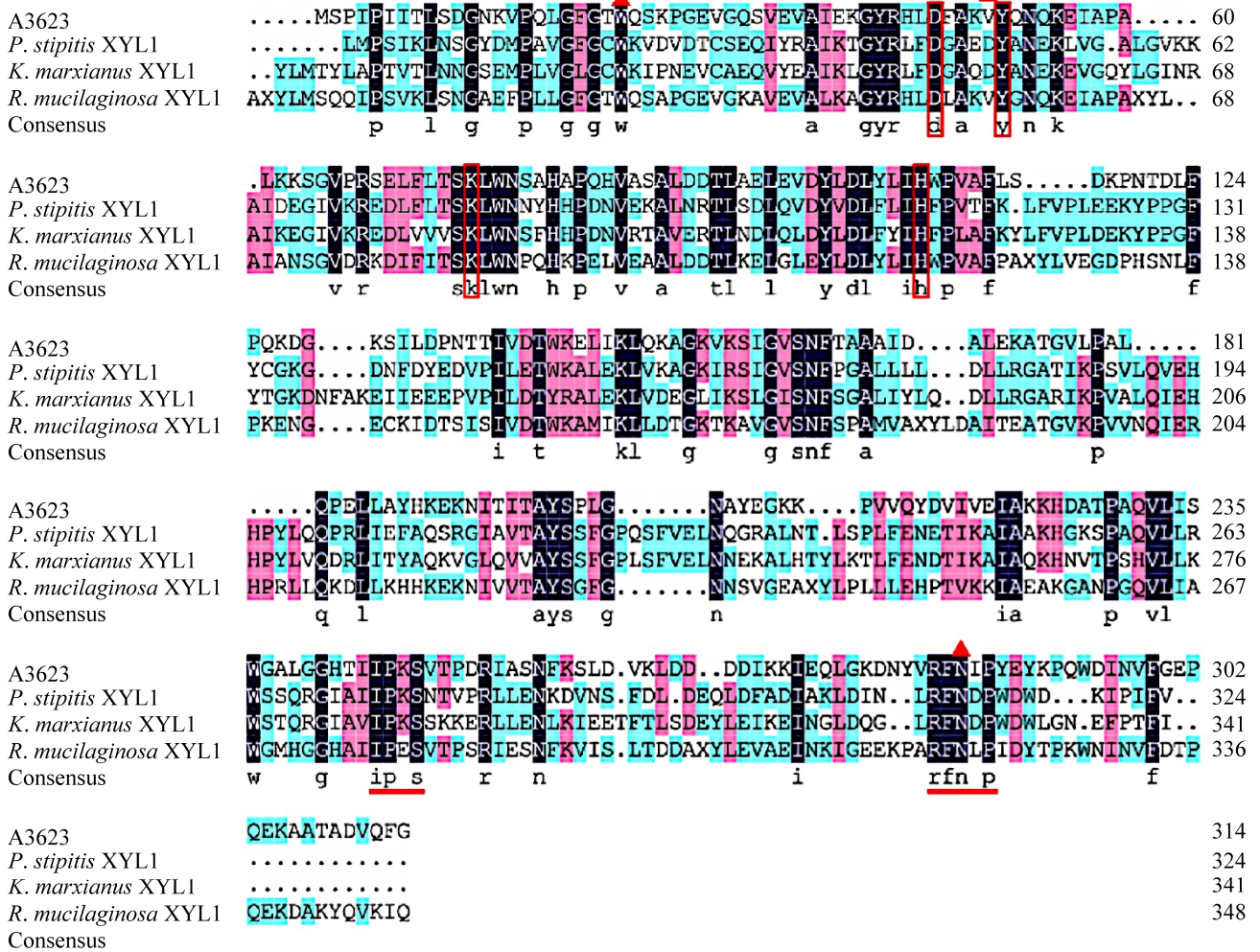


图3 菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的 A3623 蛋白与已知木糖还原酶蛋白序列对比图

Figure 3 Protein sequence comparison of *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 A3623 and known xylose reductase protein. *P. stipites* XYL1 denotes xylose reductase from *Pichia stipites* (GenBank: XP\_001385181), *K. marxianus* XYL1 denotes xylose reductase from *Kluyveromyces marxianus* (GenBank: ADV91498), *R. mucilaginosa* XYL1 denotes xylose reductase from *Rhodotorula mucilaginosa* (GenBank: ADF57216). The red underlines indicate conserved sequences, the red triangles indicate substrate binding residues, and the red boxes indicate active sites.

继续探究了两个菌株的木糖利用能力，在木糖为唯一碳源的平板上培养，使用不能利用木糖的模式酿酒酵母菌株 S288c 作为对照菌株，发现两个菌株都可以利用木糖进行生长，而对照酵母 S288c 生长很微弱(图 4)。

### 2.4.3 菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的产油脂潜力

根据基因组注释结果，*L. creatinivorum* 是

与菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的蛋白序列最为相似的物种，其中有 2 479 个蛋白序列相似，占 NR 数据库注释蛋白总数的 50.31%。在 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 的基因组序列也注释到了多个脂肪酸合成的酶基因，和最相似的酶在蛋白水平的相似度为 50%以上，其中，*C. rogersii* 油脂合成的关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC1) A6346、脂肪酸合成酶 1 (FAS1)



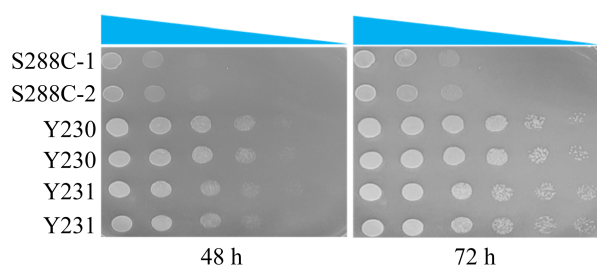


图 4 菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 的木糖利用性能

Figure 4 Growth of *C. rogersii* strains on YPX medium. Strains were cultured at 20 °C for 48 and 72 h in YPX agar plates before being photographed. Y230 and Y231 are strains of JBA-MBY-JT230 and JBA-MBY-JT231, respectively.

A0436 和脂肪酸合成酶 2 (FAS2) A0355 与 *L. creatinivorum* 的酶蛋白相似性最高, 分别为 84.4%、75.6%和 86.1%。而且, 目前有研究表明, *L. creatinivorum* DBVPG 4794 (GenBank: EF643737.1)菌株是意大利学者在高山冰河低温环境中分离得到的, 该菌株能够生产油脂, 在 20 °C 可以积累超过其细胞干重 70%的油脂<sup>[25]</sup>。推测本实验两个低温酵母菌株可能也具有生产油脂的潜力, 由此对其进行进一步的功能探究。

对两株 *C. rogersii* 进行了尼罗红染色, 结果如图 5 所示。可以清楚地观察到两株 *C. rogersii* 的细胞内均发出了明显的荧光, 证明了菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 JBA-MBY-JT231 可以在低温环境下生产油脂。

### 3 讨论

本研究从西藏来源的松萝样品中分离得到了两株 *C. rogersii* 酵母, 这是国内首次分离鉴定并报道 *C. rogersii* 菌株, 也是首次从松萝中分离到该酵母。从菌株的分子水平的鉴定和碳源同化实验的结果来看, 这两株 *C. rogersii* 酵母与国外报道的 *C. rogersii* NRRL Y-48849 生理生化指标也有所差别, 表明了本研究报道的

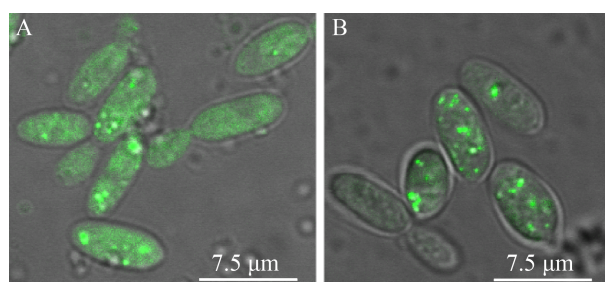


图 5 菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 (A)和 JBA-MBY-JT231 (B)尼罗红染色后细胞形态和油脂积累

Figure 5 Cell morphology and lipid accumulation of *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 (A) and *C. rogersii* JBA-MBY-JT 231 (B), respectively, after staining with Nile red.

*C. rogersii* 菌株具有一定的新颖性。我国学者在吉林长白山、宁夏贺兰山、云南紫溪山和西藏波密县等采集的叶片样品分离到同属的另外一个菌种 *C. cygneicollum*<sup>[13]</sup>, 但未报道发现 *C. rogersii*。本文报道的两株 *C. rogersii* 酵母是在两个不同的松萝样品中分离得到的, 并且这两株松萝的 26S D1/D2、ITS 部分序列和生理生化指标不完全一样, 体现了松萝来源 *C. rogersii* 酵母的多样性。目前松萝中分离到的内生和附生真菌未报道有 *C. rogersii*, 本文的研究也为探究该种的新来源和多样性提供了信息。

本文首次对 *C. rogersii* 进行了基因组测序和基因组挖掘, 发现该菌种的基因组序列可注释功能的基因部分和产油酵母 *L. creatinivorum* 最为相似, 并且证明了 *C. rogersii* 也可合成油脂, 类似的思路也可用来挖掘其他酵母的多种应用。微生物油脂可生产生物燃料、润滑剂、粘合剂、溶剂、生物表面活性剂和可降解聚合物等, 受到人们的广泛关注<sup>[26]</sup>。序列分析表明, *C. rogersii* 的油脂合成关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC1) 和脂肪酸合成酶 (FAS1 和 FAS2) 与 *L. creatinivorum* 的酶蛋白有较高的相似性, 但

是 *L. creatinivorum* 油脂合成调控机制和酶基因功能目前没有研究报道, 后续可以深入探究两个酵母油脂合成的相关基因, 以及和其他产油酵母的比较。本研究也为微生物油脂的生产提供了新的来源微生物。

维持细胞壁的完整性和细胞膜的流动性是确保酵母能在低温环境下维持其正常生长活动的关键<sup>[27]</sup>, 因此与这两类功能相关的基因可作为后续深入研究 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 低温耐性机制的关注重点。不饱和脂肪酸被认为是维持生长在低温环境酵母细胞膜通透性的重要生物物质之一<sup>[27]</sup>, *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 基因功能注释结果中发现了 3 个与低温酵母 *L. creatinivorum* 脂肪酸去饱和酶相似性介于 65%–75% 之间的蛋白编码基因。此外, 基因组注释还发现了多个和已知水解酶具有较低相似性的基因, 后续可进一步挖掘该菌株新的水解酶, 因此本文报道的菌株是非常具有研究开发价值的新颖菌株。

木糖是自然界中含量仅次于葡萄糖的单糖, 来源于半纤维素的水解, 占木质纤维素水解糖的 18%–30%<sup>[28]</sup>。一些非常规酵母可以天然利用木糖进行发酵, 例如毕赤酵母<sup>[29]</sup>、假丝酵母<sup>[30]</sup>、马克斯克鲁维酵母<sup>[31]</sup>等, 这些非常规酵母含有很多良好的木糖利用遗传元件, 可进一步挖掘用于改造工业酵母, 赋予其充分利用木质纤维素水解液中全糖发酵的能力。木糖还原酶-木糖醇脱氢酶途径是非常规酵母利用木糖的主要途径, 其中木糖还原酶可以将木糖转变为木糖醇, 常被用于构建重组木糖利用酵母<sup>[32]</sup>。本文通过基因组分析鉴定了 *C. rogersii* 一个新的可能的木糖还原酶基因, 同时证明菌株 *C. rogersii* JBA-MBY-JT230 和 *C. rogersii* JBA-MBY-JT231 能够有效利用木糖进行生长, 后续可进一步深入研究 A3623 的功能, 并在其

他酵母中进行表达, 为选育更好的菌株利用木糖生产多种化学品提供基础。

本文利用基于基因组的分析探究了 *C. rogersii* 两个菌株的木糖利用和油脂生产, 类似的思路也可以用于其他微生物的研究, 通过基因组挖掘发现其代谢特征和应用潜力。目前不同环境的多种酵母菌株不断被发现, 但只有很少的酵母得到实际应用。基因组挖掘有利于快速了解酵母的代谢潜力, 未来相关生物信息技术的不断完善, 将有利于更准确预测基因功能, 结合实验验证, 更充分拓展微生物在不同领域的应用。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所白逢彦研究员对菌种分类鉴定的指导。

## 参考文献

- [1] 范婷婷, 王慕瑶, 李俊, 王凤楼, 章漳, 赵心清. 酵母生物多样性开发及工业应用. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 806–815.  
Fan TT, Wang MY, Li J, Wang FL, Zhang Z, Zhao XQ. Exploration of yeast biodiversity and development of industrial applications. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 806–815. (in Chinese)
- [2] Sun LC, Alper HS. Non-conventional hosts for the production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 59: 15–22.
- [3] Spribille T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabenheimer E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, McCutcheon JP. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 2016, 353(6298): 488–492.
- [4] Tuovinen V, Ekman S, Thor G, Vanderpool D, Spribille T, Johannesson H. Two basidiomycete fungi in the cortex of wolf lichens. *Current Biology*, 2019, 29(3): 476–483.e5.
- [5] Mark K, Laanisto L, Bueno CG, Niinemets Ü, Keller C, Scheidegger C. Contrasting co-occurrence patterns of photobiont and cystobasidiomycete yeast associated with common epiphytic lichen species. *New Phytologist*, 2020, 227(5): 1362–1375.
- [6] 普布次仁, 旺姆, 刘小勇. 西藏真菌资源调查概况. *菌物学报*, 2016, 35(9): 1025–1047.

- Pubu C, Wang M, Liu XY. A review of investigation of fungi in Tibet. *Mycosystema*, 2016, 35(9): 1025–1047. (in Chinese)
- [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. *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. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(7): 1167–1181. (in Chinese)
- [8] 黄昊, 哈祖德, 顾京赛, 杨兴华, 王兆基, 陈双, 徐岩. 西藏传统青稞酒酿造用藏曲中主要酵母菌的分离及酿造特性研究. *食品与发酵工业*, 2021, 47(2): 8–14.
- Huang H, Ha ZD, Gu JS, Yang XH, Wang ZJ, Chen S, Xu Y. Isolation of yeast strains from Zanguo of traditional Tibetan Qingke (highland barley) wine brewing and the oenological properties. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 8–14. (in Chinese)
- [9] 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. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(5): 1–10.
- Yang YQ, Wang MY, Ye PL, Bai L, Fan TT, Wang XQ, Ma JY, Li J, Jiang DD, Zhang Z, Zhao XQ. Identification and physiological characteristics of yeast strains isolated from Tibet. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2021, 27(5): 1–10. (in Chinese)
- [10] Wu ZW, Bai FY. *Candida tibetensis* sp. nov. and *Candida linzhiensis* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species from Tibet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(5): 1153–1156.
- [11] Wang QM, Wang SA, Jia JH, Bai FY. *Cryptococcus tibetensis* sp. nov., a novel basidiomycetous anamorphic yeast species isolated from plant leaves. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2007, 53(5): 281–285.
- [12] Bing J, Han PJ, Liu WQ, Wang QM, Bai FY. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Current Biology*, 2014, 24(10): R380–R381.
- [13] Li AH, Yuan FX, Groenewald M, Bensch K, Yurkov AM, Li K, Han PJ, Guo LD, Aime MC, Sampaio JP, Jindamorakot S, Turchetti B, Inacio J, Fungsin B, Wang QM, Bai FY. Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. *Studies in Mycology*, 2020, 96: 17–140.
- [14] 彭锋, 边静, 彭湃, 任德智, 苏印泉, 孙润仓. 松萝属地衣植物的研究进展. *林产化学与工业*, 2012, 32(1): 111–118.
- Peng F, Bian J, Peng P, Ren DZ, Su YQ, Sun RC. Research progress of genus *Usnea*. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2012, 32(1): 111–118. (in Chinese)
- [15] Prateeksha, Bajpai R, Yusuf MA, Upreti DK, Gupta VK, Singh BN. Endolichenic fungus, *Aspergillus quadrinctus* of *Usnea longissima* inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 140: 103933.
- [16] Kannagara BTSDP, Rajapaksha RSCG, Paranagama PA. Nature and bioactivities of endolichenic fungi in *Pseudocyphellaria* sp., *Parmotrema* sp. and *Usnea* sp. at Hakgala montane forest in Sri Lanka. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(2): 203–209.
- [17] Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N. Endolichenic fungi: the lesser known fungal associates of lichens. *Mycology*, 2017, 8(3): 189–196.
- [18] 周小玲, 沈微, 饶志明, 王正祥, 诸葛健. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法. *微生物学通报*, 2004, 31(4): 89–92.
- Zhou XL, Shen W, Rao ZM, Wang ZX, Zhuge J. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA. *Microbiology China*, 2004, 31(4): 89–92. (in Chinese)
- [19] Pincus DH, Orenge S, Chatellier S. Yeast identification—past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 2007, 45(2): 97–121.
- [20] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 1985, 100(3): 965–973.
- [21] Bourret TB, Edwards CG, Henick-Kling T, Glawe DA. *Curvibasidium rogersii*, a new yeast species in the *Microbotryomycetes*. *North American Fungi*, 2012, 7(12): 1–8.
- [22] Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The Yeasts*. Amsterdam: Elsevier, 2011: 87–110.
- [23] Chu BCH, Lee H. Investigation of the role of a conserved *Glycine* motif in the *Saccharomyces cerevisiae* xylose reductase. *Current Microbiology*, 2006, 53(2): 118–123

- [24] Zhang B, Zhang L, Wang DM, Gao XL, Hong J. Identification of a xylose reductase gene in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(12): 2001–2010.
- [25] Filippucci S, Tasselli G, Scardua A, Mauro S, Cramarossa MR, Perini D, Turchetti B, Onofri A, Forti L, Buzzini P. Study of *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia adeliensis*, *Solicoccozyma aerea*, and *Solicoccozyma terricola* for their lipogenic aptitude from different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 1–14.
- [26] 孙美莉, 刘虎虎, 邬文嘉, 任路静, 黄和, 纪晓俊. 代谢工程改造酵母生产多不饱和脂肪酸的研究进展. *化工进展*, 2016, 35(3): 872–878.  
Sun ML, Liu HH, Wu WJ, Ren LJ, Huang H, Ji XJ. Metabolic engineering of yeast to produce polyunsaturated fatty acids. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(3): 872–878. (in Chinese)
- [27] Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M. Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 66.
- [28] Zhao Z, Xian M, Liu M, Zhao G. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 21.
- [29] Su YK, Willis LB, Jeffries TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitidis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(3): 457–469.
- [30] Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, 2007, 98(10): 1947–1950.
- [31] Zhang B, Zhu YL, Zhang J, Wang DM, Sun LH, Hong J. Engineered *Kluyveromyces marxianus* for pyruvate production at elevated temperature with simultaneous consumption of xylose and glucose. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 553–562.
- [32] Kwak S, Jo JH, Yun EJ, Jin YS, Seo JH. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(2): 271–283.

(本文责编 张晓丽)