

尼罗红染色法筛选产油酵母及定量检测胞内 油脂含量的研究

林义^{1,2} 钟添华^{1*} 骆祝华¹ 黄翔玲¹ 叶德赞¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 福建 厦门 361005)

(2. 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361005)

摘要: 【目的】建立产油酵母筛选以及胞内油脂含量测定的简便方法。【方法】利用尼罗红与胞内油脂成分结合后在紫外光照射下发出荧光且荧光强弱与油脂含量相关的原理。通过在添加尼罗红的培养基中培养酵母,并观察菌落荧光的方法对 385 株深海酵母进行产油脂菌株筛选,利用 26S rDNA D1/D2 区序列分析方法对筛选获得的产油酵母菌株进行鉴定,并以其中的一株高产油脂酵母(2A00015)为试验菌株,建立了一套尼罗红染色快速测定油脂含量的方法。【结果】获得 22 株产油酵母,其中油脂含量最高可达 62.9%,经分子鉴定后显示这 22 株酵母分别属于(*Candida viswanathii*)、近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)、粘质红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、季也蒙毕赤酵母(*Pichia guilliermondii*)以及 *Rhodospiridium paludigenum* 酵母。尼罗红染色快速测定油脂含量方法的最佳检测条件为:菌悬液 OD_{600} 小于 1.2,尼罗红浓度 0.5 mg/L,染色时间 5 min,激发波长 488 nm,发射波长 570 nm。该测定方法得到相对荧光强度与称重法得到油脂含量呈正相关性, $R^2=0.9637$ 。

关键词: 尼罗红染色法, 产油酵母, 26S rDNA D1/D2, 荧光, 油脂含量

Study on screening of oleaginous yeast and determination of intracellular lipid content by Nile red dyeing

LIN Yi^{1,2} ZHONG Tian-Hua^{1*} LUO Zhu-Hua¹ HUANG Xiang-Ling¹ YE De-Zan¹

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金项目(No. 海三科 2010009)

*通讯作者: Tel: 86-592-2195679; ✉: zth23-1980@163.com

收稿日期: 2011-07-05; 接受日期: 2011-10-09

- (1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005, China)
(2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: [Objective] To establish a simple method to screen oleaginous yeast and determine the intracellular lipid content. **[Methods]** The study is based on the theory that the combination of Nile red and intracellular oil will emit fluorescence when induced by UV light and the fluorescence intensity is associated with the lipid content. We cultivate yeast in the culture medium added with Nile red, and screen the oleaginous yeast strains from the 385 deep-sea yeasts by means of observing the fluorescence of the yeast colony. We have identified the screened oleaginous yeast strains by the 26S rDNA D1/D2 series analysis method. Designating one of the oleaginous yeasts (2A00015) as the test strain, the lipid content rapid determination method by Nile red dyeing was established. **[Results]** 22 oleaginous yeasts were obtained with the lipid content reaching up to 62.9%. Based on the molecular identification, it showed that the 22 yeasts are separately belong to *Candida viswanathii*, *Candida parapilosis*, *Rhodotorla mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii* and *Rhodospiridium paludigenum*. The optimum condition for lipid content determination by Nile red dyeing is: bacterium suspension OD_{600} lower than 1.2, Nile red concentration 0.5 mg/L, dyeing time 5 min, exciting wavelength 488 nm, emission wavelength 570 nm. The relative fluorescence intensity obtained by this method exhibits a positive association with the lipid content obtained by weighing method, which can be explained as $R^2=0.9637$.

Keywords: Nile red dyeing, Oleaginous yeast, 26S rDNA D1/D2, Fluorescence, Lipid content

在适宜条件下, 某些微生物产生并储存的油脂占其生物总量的 20% 以上, 具有这样表型的菌株称为产油微生物, 包括细菌、酵母、霉菌、藻类^[1-2]。其生产的油脂与植物油脂相似, 多以 C16、C18 为主, 如棕榈油、硬脂酸、油酸、亚油酸等^[3]。传统产油微生物筛选主要通过染色观察、提取油脂、测定含量等一系列步骤, 过程十分繁琐, 不利于大量筛选。

尼罗红是一类苯吩啉酮类化合物, 能够与脂类物质结合发出很强荧光, 不溶于水且易溶于有机溶剂^[4-5]。由于尼罗红在水中很快发生荧光淬灭, 多余的染料无需清除, 与苏丹黑、尼罗蓝-A 等染料比较, 尼罗红能够准确地将细胞内脂类物质与其他贮藏物区分开来^[6], 因此经常被用于检测动物以及微生物细胞内油脂情况。脂溶性染料

(尼罗红、苏丹黑、尼罗蓝-A)对菌落染色方法, 可以通过简单观察菌落颜色变化就能准确判断微生物是否产油, 该方法具有较强的灵敏度。由于染料需要借助丙酮、乙醇等有机溶剂, 菌体在染色过程中会被杀死, 因此不利于微生物油脂积累过程监测。Spiekermann 等改进了这种筛选方法, 选择二甲亚砜(DMSO)作为尼罗红染料的有机溶剂^[7], 并且将染料直接添加到琼脂培养基中去, 微生物在这种含有尼罗红染料的平板中能够正常生长, 通过观察荧光情况可以有效监测微生物是否含有油脂。

尼罗红染色荧光定量检测胞内油脂含量由 Greenspan 等第一次提出^[8], 其准确性已在多种生物中被证明过^[9-11], 可替代传统称重法。由于溶剂疏水性能不同, 尼罗红最大激发波长和发射波长

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

变化范围可超过 60 nm, 荧光颜色可由金黄色变化至深红色, 另外样品及样品含量的不同在染色时间及尼罗红浓度上均存在着一定的差异, 因此想建立一套适合大多数微生物检测条件较为困难。

本文利用尼罗红与油脂成分结合后在紫外光照射下发出荧光特性, 采用平板筛选的方法对 385 株海洋酵母进行筛选, 并以其中一株具有产油能力的近平滑假丝酵母 2A00015 作为研究对象, 获取尼罗红染色荧光检测胞内油脂含量的最佳检测条件, 为后续产油条件优化、寻找廉价底物生产微生物油脂以及生物柴油制备等方面打好坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

荧光显微镜(Nikon Eclipse 50i), Nikon 公司; 多功能酶标仪(SpectraMax M5), Molecular Devices 公司; 高速冷冻离心机(J2-MI), Beckman; 高压灭菌器, ZEALWAY 公司; 培养摇床, 江苏太仓医疗仪器厂; 电热恒温培养箱, 江苏太仓医疗仪器厂; 索氏提取器, 北京中西泰安技术服务有限公司。

1.2 菌种与试剂

本文所用酵母菌分离自 DY115-19 航次、DY115-20 航次采集的海水、生物及沉积物样品。指示菌选择皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*) 2.571 (含油量 65%)^[12], 购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。尼罗红(Sigma 公司)、二甲基亚砷 DMSO (上海凌峰化学试剂有限公司)、乙醚(国药集团化学试剂有限公司)、石油醚(西陇化工股份有限公司)、盐酸(国药集团化学试剂有限公司)等均为分析纯。

1.3 培养基

斜面培养基(PDA 培养基): 去皮马铃薯 200 g,

切成小块, 加人工海水 1 000 mL, 煮沸 1 h, 双层纱布过滤成清液后添加 10 g 葡萄糖, 加人工海水补足至 1 000 mL, 琼脂粉 2%, pH 自然。

PYG 培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、酵母膏 5.0 g、琼脂粉 15 g, 人工海水 1 000 mL, pH 自然。

种子培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、人工海水 1 000 mL, pH 自然。

基础产脂培养基: 葡萄糖 70 g、(NH₄)₂SO₄ 1 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 1 g、酵母粉 0.5 g, 人工海水 1 000 mL, pH 5.8-6.0。

1.4 产油酵母的筛选及鉴定

1.4.1 平板培养基添加尼罗红筛选产油酵母: PYG 培养基灭菌后冷却至 60 °C 左右后添加尼罗红贮存液 1.0 g/L (Nile/DMSO)^[13], 使其最终浓度达到 0.5 mg/L, 混合均匀后倒入一次性平板, 待平板完全冷却凝固后将所要筛选的酵母接种到平板, 并在各平板上接入指示菌——皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* 2.571。避光 28 °C 培养 3-4 d 后置于波长为 280-300 nm 紫外灯下观察^[14], 若有橙色荧光出现则为产油脂菌株, 对比指示菌的荧光强度可粗略获知油脂含量高低^[15]。

1.4.2 产油酵母分子鉴定: 酵母基因组 DNA 提取方法参见参考文献[3]。使用引物 NL1 (5'-TATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')进行 26S rDNA D1/D2 区的扩增。PCR 循环: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min 20 s, 循环 36 次; 72 °C 8 min^[16-18]。PCR 产物经试剂盒纯化后(纯化步骤根据 OMEGA 公司 PCR 产物纯化试剂盒说明书), 送交上海博亚生物技术有限公司测序。

1.4.3 产脂摇瓶培养: 将筛选好的斜面保藏产脂酵母接种到 PYG 培养基上培养 3 d, 用接种环取活化好的菌体于液体种子培养基中, 27 °C、160 r/min 摇床培养 24 h; 取种子液以 10% 的接

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

种量(V/V)接种于基础产脂培养基中(100 mL/500 mL), 27 °C、150 r/min 发酵 72 h。

1.4.4 菌体生物量测定: 量取一定体积的菌液加入到已称重的 250 mL 离心管中, 在 5 000 r/min 下离心 5 min, 沉淀用蒸馏水清洗 2 遍, 弃上清液。取沉淀菌体放入烘箱, 80 °C 烘干至恒重, 自然冷却至室温后称菌体和离心管的总重。

$$\text{菌体干重 (g/L)} = \frac{\text{带菌体管重} - \text{空管管重}}{\text{样品体积}} \times 1000$$

1.4.5 油脂提取方法(索氏提取法): 将离心后收集的菌体于 100 °C–105 °C 烘箱中烘干并磨碎, 准确称取 5 g 干菌体于滤纸筒内, 封好上口。将滤纸筒放入脂肪提取器的抽提筒内, 连接已干燥至恒量的接受瓶, 由抽提器冷凝管上端加入 1:1 无水乙醚及石油醚至瓶内溶剂的 2/3 处, 于电炉上加热, 使乙醚、石油醚不断回流提取, 抽提时间大概为 6–12 h。抽提结束后取下接受瓶置于旋转蒸发仪, 回收乙醚、石油醚, 所得油脂放于 80 °C 干燥 2 h, 放干燥器内冷却 0.5 h 后称量^[19]。

油脂含量计算公式:

$$\text{油脂含量(\%)} = \frac{\text{油脂重量}}{\text{菌体干重}} \times 100\%$$

1.4.6 残糖测定: 残糖的测定采用蒽酮法^[20]。

1.5 荧光检测酵母油脂相对含量方法的建立

1.5.1 酵母 2A00015 培养及处理: 菌体培养方法见 1.4.3, 准确量取 10 mL 发酵液, 5 000×g 离心 5 min, 弃上清液, 加入等量的无菌水清洗菌体, 再次以 5 000×g 离心 5 min, 重复 2 次, 保存菌悬液以备待用。

1.5.2 酵母 2A00015 细胞密度检测: 以 600 nm 下的光密度值代表细胞密度, 细胞数量测定采用血球板计数法。

1.5.3 尼罗红染色后荧光特性检测: 将处理过的 2A00015 酵母菌悬液用无菌水稀释至合适浓度, 添加尼罗红贮存液(浓度 0.1 g/L Nile red/DMSO),

快速混匀, 用移液枪吸取 200 μL 准确加入到黑色 96 微孔板中, 每个样品做 3 个平行。选用 SpectraMax M5 多功能酶标仪(Molecular Devices 公司)荧光检测功能, 对 96 微孔板中的样品进行荧光特性测定, 相对荧光强度为添加尼罗红样品的荧光强度减去未添加尼罗红样品荧光强度。

2 结果

2.1 产油酵母简便初筛结果

由于培养基中的尼罗红染料在酵母生长过程中能够较好地穿透细胞膜进入细胞质, 最终与脂类物质结合, 而这种直接添加尼罗红至平板的方法对酵母生长并未产生负面影响, 见图 1。

图 1 显示不管平板是否添加尼罗红, 酵母菌落生长情况一致, 紫外光照射下, A 组尼罗红添加平板上的 07Y76、07Y144、07Y147、07Y162 以及 B 组尼罗红添加平板上的 07Y74、2A00011、2A00015 酵母菌落均能产生橙色荧光, 而未添加尼罗红的平板内所有菌落均无橙色荧光。对比指示酵母 *Trichosporon cutaneum* 2.571, 07Y162、07Y147、2A00015 三株酵母菌落荧光较强, 初步判断为高产油脂酵母。由于 07Y15 菌落本身颜色为红色, 紫外光下无法辨别荧光情况, 因此需在荧光显微镜下做进一步观察。

将上述方法初筛获得的部分产油酵母及非产油酵母经尼罗红工作液(0.5 mg/L Nile/DMSO)染色后置于荧光显微镜 420–490 nm 蓝光下观察, 所得结果见图 2。由于细胞膜脂的存在, 细胞在蓝光下观察均显示为红色, 与非产油酵母 07Y126 相比, 产油酵母 07Y162、07Y147、07Y15 细胞内明显含金黄色的油脂粒, 其大小数目随酵母种类的不同而有所差异。镜检结果与平板筛选结果较为一致, 一般情况下尼罗红平板上菌落荧光越强烈, 其观察到的细胞油脂含量也相对较多。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

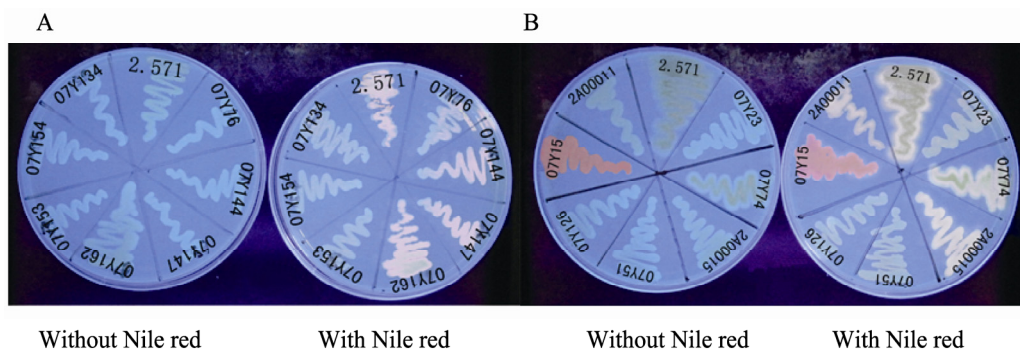


图 1 紫外光下菌落荧光情况
Fig. 1 The fluorescence of yeast colony in the UV light

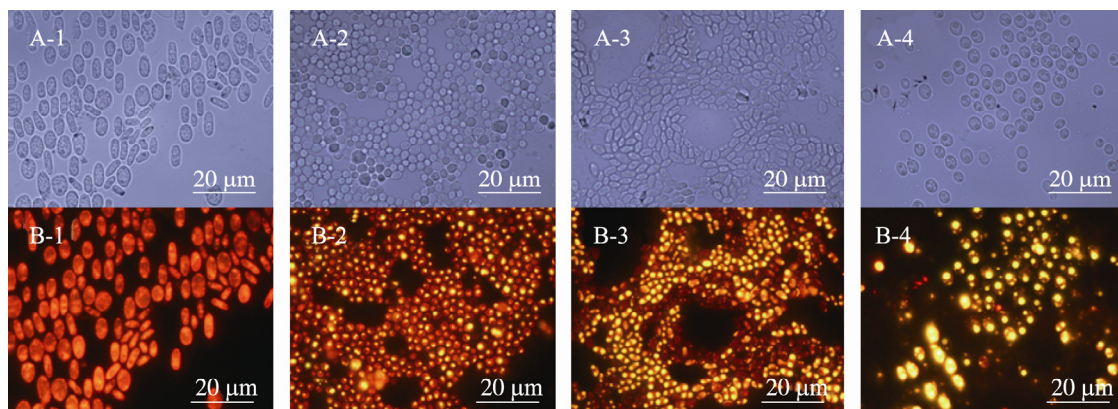


图 2 荧光显微镜下酵母细胞

Fig. 2 Yeast cells under the fluorescence microscope

Note: A: Yeasts cells under the ordinary light; B: Yeasts cells under the blue light (Wavelength 420–490 nm); 1, 2, 3, 4: Respectively represent yeasts of 07Y126, 07Y162, 07Y147, 07Y15. The microscope magnification $\times 1\ 000$.

采用尼罗红平板筛选方法对本实验室分离纯化的 385 株酵母进行产油菌株筛选, 总共获得产油酵母 22 株, 主要分布在西太平洋暖池区(20 株)以及东太平洋多金属结合区(2 株), 见表 1。以酸热法提取酵母中的油脂, 结果显示, 酵母 07Y162 产油能力最强, 油脂含量达到 62.92%, 生物量 11.50 g/L, 脂肪得率系数 10.32, 酵母 07Y147 次之, 油脂含量达到 50.81%, 生物量 11.09 g/L, 脂肪得率系数 7.98。另外 07Y12、07Y15、07Y144、2A00015、2A00011 五株酵母油脂含量也都高于 40%, 属高产油脂性能菌株, 而剩余酵母中有 6

株油脂含量较低, 仅在 20%左右, 刚满足产油菌株的定义。

镜检及油脂含量测定结果表明, 尼罗红平板筛选不仅可以区分出产油酵母, 而且还能根据菌落荧光强弱初步判断油脂含量高低, 结果非常准确, 且相对传统筛选方法更加简便快速。

2.2 产油酵母分子鉴定

相关文献记载显示常见产油酵母主要包括丝孢酵母属、油脂酵母属、红酵母属等^[21]。本文利用 26S rDNA D1/D2 区的序列分析方法对 22 株产油酵母进行分子鉴定, 并按照 Kuttzman 和 Robnett

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表1 产油酵母筛选结果
Table 1 The result of oleaginous yeasts screening

菌株编号 Strain serial number	样品来源 Sample source	生物量 Biomass (g/L)	油脂含量 Lipid content (%)	脂肪得率系数(g 油/100g) Lipid coefficient (g lipid/100g substrate utilized)
07Y12	WPA 底质泥样 9-12 cm (水深 5 000 m)	6.75	47.11	7.10
07Y15	WPA 底质泥样 12-15 cm (水深 5 000 m)	7.38	48.74	9.15
07Y29	WPA 水样 200 m	7.72	30.77	6.01
07Y30	WPA 水样 200 m	5.30	23.92	4.21
07Y31	WPA 水样 800 m	8.70	20.11	5.37
07Y35	WPA 水样 3 000 m	7.48	22.19	3.66
07Y42	WPA 离底 500 m 水样(水深 5 021 m)	7.16	19.89	2.03
07Y43	WPA 离底 200 m 水样(水深 5 021 m)	6.98	25.36	4.50
07Y46	WPA 离底 50 m 水样(水深 5 021 m)	8.00	22.78	2.60
07Y52	WPA 水样 3 000 m	6.09	30.71	4.24
07Y53	WPA 水样 3 000 m	6.11	20.21	2.17
07Y74	WPA 水样 800 m	9.92	31.09	5.31
07Y76	WPA 离底 500 m 水样(水深 2 596 m)	6.06	38.01	5.75
07Y87	WPA 表层水	10.04	33.87	4.70
07Y116	WPA 水样 1 500 m	7.27	20.15	2.47
07Y141	WPA 水样 150 m	9.79	23.33	3.70
07Y144	WPA 表层水	11.80	43.62	7.93
07Y147	WPA 水样 15 m	11.09	50.81	7.98
07Y152	WPA 水样 500 m	5.23	20.71	9.08
07Y162	WPA 水样 500 m	11.50	62.92	10.32
2A00011	EPA 底泥 1.6 m (水深 3 086 m)	6.83	40.33	5.49
2A00015	EPA 鲑鱼腮	10.93	47.16	8.58

注: EPA: 东太平洋; WPA: 西太平洋.

Note: EPA: Eastern Pacific Ocean; WPA: West Pacific Ocean.

所定的同种内不同菌株间差异一般不超过 1% 的标准^[18], 将所有产油酵母鉴定到种, 各供试菌株与已知酵母的模式菌株之间的亲缘关系及系统地位见图 3。由结果可知, 22 株产油酵母分属于 4 个属, 6 个种(近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis*、维斯假丝酵母 *Candida viswanathii*、季也蒙

毕赤酵母 *Pichia guilliermondii*、汉逊德巴利酵母 *Debaryomyces hansenii*、粘质红酵母 *Rhodotorula mucilaginosa*、海洋拮抗酵母 *Rhodospiridium paludigenum*), 其中油脂含量较高的菌株主要集中在假丝酵母属及红酵母属, 与相关文献记载较为一致。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

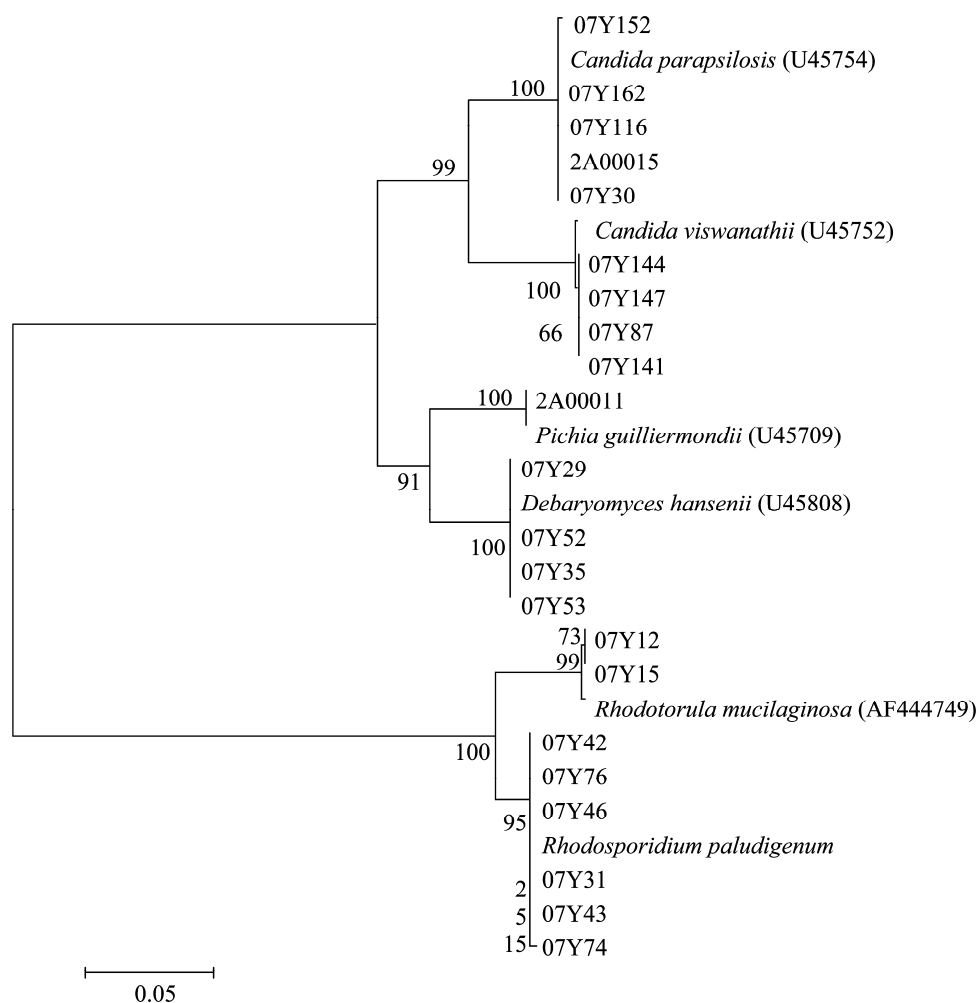


图3 基于26S rDNA D1/D2区域序列和Neighbor-Joining分析绘制的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence alignment

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 5% sequence divergence.

2.3 尼罗红染色检测酵母油脂相对含量

传统油脂提取方法主要是有机溶剂提取法, 例如, 氯仿-甲醇方法、乙醚-石油醚法^[22]等, 通过萃取后挥发有机溶剂来计算油脂含量, 这些方法不仅费时费力、污染环境, 而且对菌体的量具有一定要求。本文利用尼罗红作为染色剂, 以近平滑假丝酵母 2A00015 作为试验菌株, 得到适合酵母油脂含量测定的简便方法。

2.3.1 波长选择: 酵母所含油脂多为极性油脂, 而尼罗红检测细胞内极性油脂激发波长通常选

择 480–490 nm。本文使用酶标仪荧光测定功能, 激发波长 488 nm, 对 420–700 nm 范围内的发射波长进行扫描, 所得结果见图 4。

尼罗红染料只有与脂类物质结合时才能发出荧光, 在水中极易淬灭, 因此检测时尼罗红染料本身荧光值可忽略不计^[23]。由图 4A、B 两组波长扫描结果可知, 488 nm 激发波长下, 不管酵母菌悬液是否含有尼罗红染料, 在发射波长为 440–520 nm 范围内都具有一个极大的峰, 除此之外, 添加尼罗红染料酵母菌悬液在 540–670 nm

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

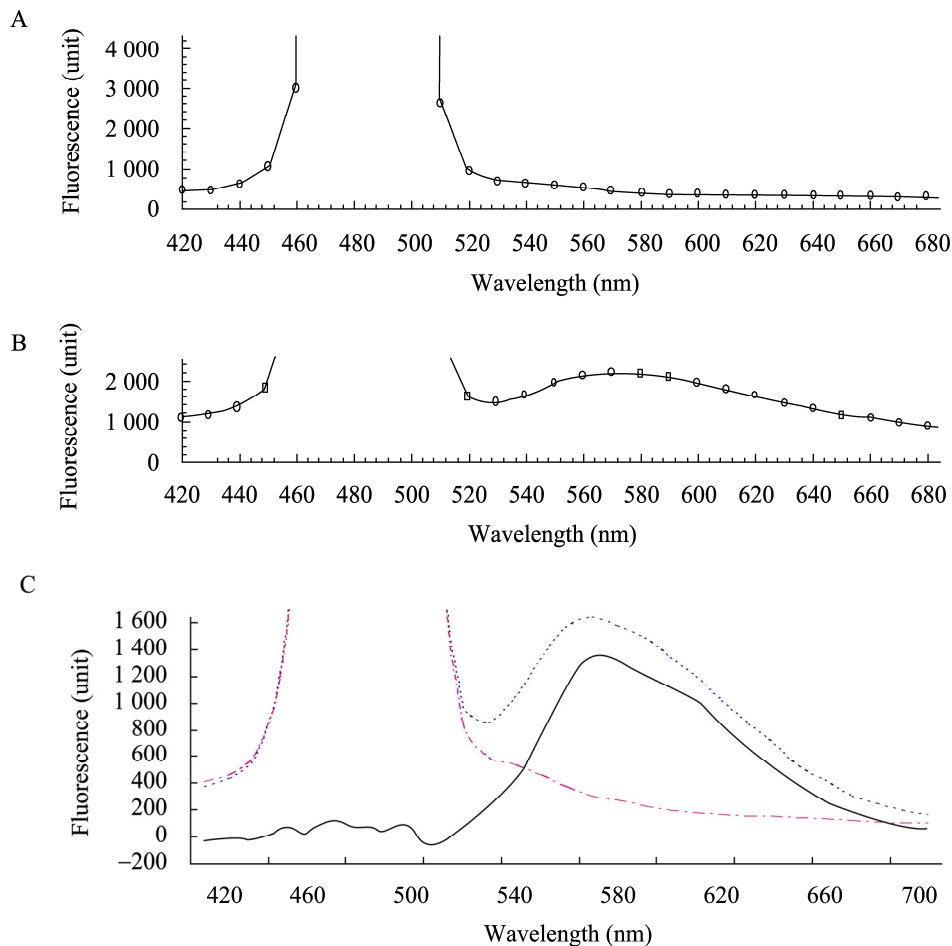


图 4 488 nm 激发波长下发射光光谱扫描

Fig. 4 Emission spectrum light scanning with excitation wavelength at 488 nm

Note: A: Emission spectra of cell suspension; B: Emission spectra of Nile red-stained cell suspension; C: The corrected spectra.

还具有一个相对较低的峰。通过 A、B 两组荧光差值计算显示，尼罗红染料与脂类结合仅在 540–670 nm 范围内具有真实荧光值，其峰值在发射波长为 570 nm 处，见图 4C。

基于上述结果，我们得到尼罗红检测酵母油脂的最佳检测波长为激发波长 488 nm，发射波长 570 nm，在该处波长下具有最高的真实荧光检测值。

2.3.2 染色时间：添加尼罗红染料至光密度值为 1.67 的两组酵母菌悬液，使其尼罗红最终浓度分别为 0.5 mg/L、2.0 mg/L，将样品快速放入酶标仪中按时间扫描方式进行荧光强度检测，扫描时间间隔为 1 min，所得结果见图 5。

图 5 显示酵母菌悬液经两种不同浓度尼罗红染色后，所得脂荧光强度随时间变化规律较为一致，两者脂荧光强度峰值均在染色后 3 min 内达到，之后荧光强度快速下降到一个稳定值，其大小约为峰值的 80%–90%，持续时间约为 5 min。经尼罗红染色 10 min 后检测样品荧光衰较为明显，其中高浓度尼罗红染料荧光衰减速率要快于低浓度尼罗红染料，两者荧光衰减速率分别为每分钟荧光下降 1.59% 及 0.86%。由上述可知，选择尼罗红染色后 4–9 min 作为荧光检测时间既可以保证检测稳定性，又可以最大程度减少因荧光衰退而产生的误差，因此本文染色时间统一选择 5 min。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

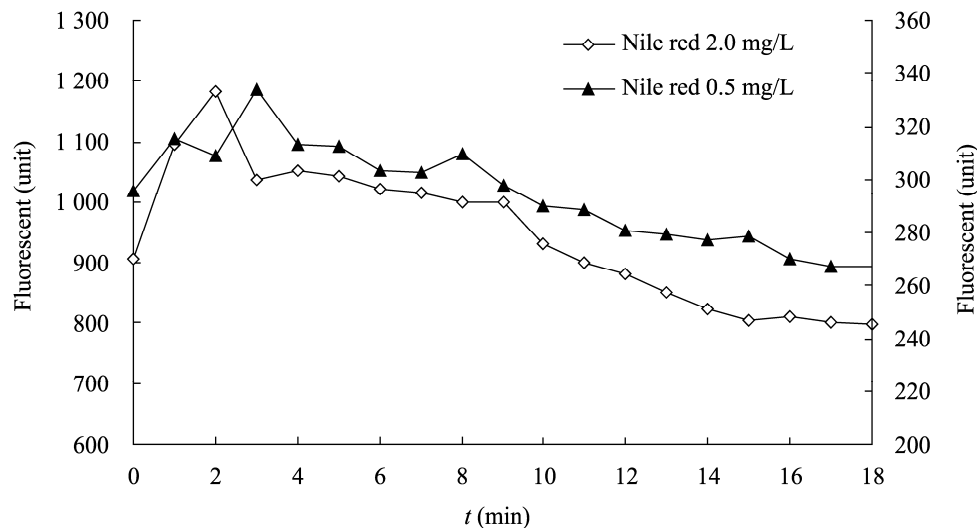


图5 尼罗红染料与胞内脂类结合后荧光强度随时间的变化

Fig. 5 The changes of fluorescence intensity with time

2.3.3 细胞密度: 取近平滑假丝酵母 2A00015 菌悬液 10 mL, 按照一定比例逐级稀释, 得到一系列细胞密度不同的酵母菌悬液。测定 600 nm 处的光密度值及相应酵母细胞密度(图 6A)。相关性分析显示, 菌悬液 OD_{600} 在 0–1.2 范围与细胞密度存在显著相关性($R^2=0.9927$), 见图 6B, 因此可以用该范围内的光密度值代替细胞密度。

图 7 显示, 不同稀释度下的酵母菌悬液经尼罗红染色后, 相对荧光强度随光密度值的升高而逐渐增大, 由于样品来源相同, 其不同稀释度细胞的油脂含量一致, 理论上说相对荧光强度与光密度值应该存在线性相关, 实际测定结果显示两者在光密度值 0–1.2 范围内具有较高的相关性, 不同尼罗红浓度得到的 R^2 范围在 0.9793–0.9946。由此可知, 采用尼罗红染色检测细胞内油脂含量时, 细胞密度存在一定的范围, 即待测菌悬液在 600 nm 波长下的光密度值不应高于 1.2, 否则会大大降低检测精确度, 因此对于细胞密度较大的样品检测之前必须先稀释。

2.3.4 尼罗红浓度: 取 3 组不同细胞密度的酵

母菌悬液(OD_{600} 分别为 0.64、1.21、1.97), 分别添加尼罗红染料, 配制成一系列不同尼罗红浓度的酵母菌悬液, 检测其荧光强度, 所得结果见图 8。

相对荧光强度不仅与细胞密度有关, 而且还与尼罗红的浓度有关。图 8 显示, 细胞密度一定的情况下, 增加尼罗红浓度可以放大荧光强度, 但是这种放大不会呈线性增长关系。 OD_{600} 为 0.64 酵母菌悬液添加尼罗红浓度至 0.2 mg/L 即可达到最大相对荧光强度, 继续增加尼罗红染料浓度并不能相应提高其相对荧光强度; 同样, OD_{600} 为 1.21 和 1.97 时, 尼罗红浓度分别在 0.5 mg/L、1.5 mg/L 处具有最高相对荧光强度。因此尼罗红染色荧光定量检测细胞内油脂时, 尼罗红浓度选择对检测的精确度产生较大影响, 尼罗红浓度过低, 细胞内脂类物质未完全染色, 相对荧光强度就会偏低, 而染料浓度过高会使荧光衰减更加显著, 增加实验的误差。结合细胞密度要求(OD_{600} 小于 1.2), 选择尼罗红浓度 0.5 mg/L 是合适的。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

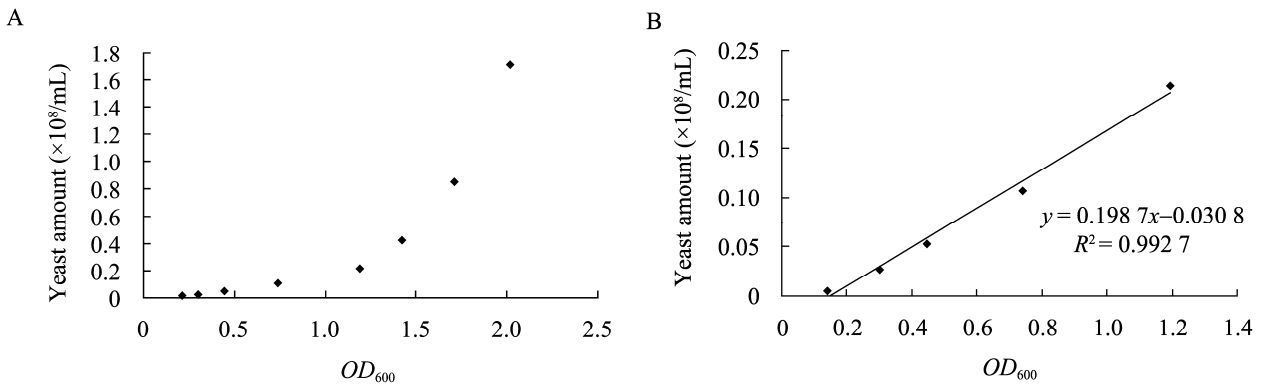


图 6 细胞密度与 600 nm 波长下光密度值的关系
Fig. 6 The relationship between cell density and OD_{600}

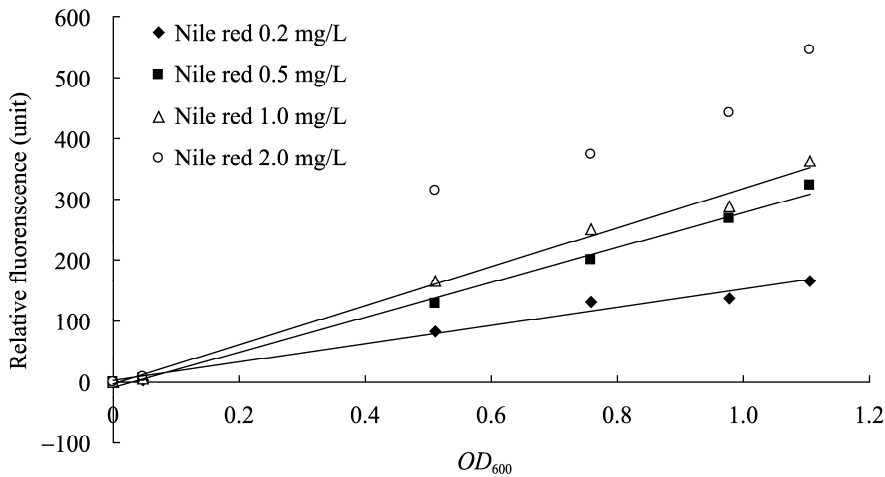


图 7 相对荧光强度与 600 nm 波长下光密度值的关系
Fig. 7 The relationship between relative fluorescence and OD_{600}

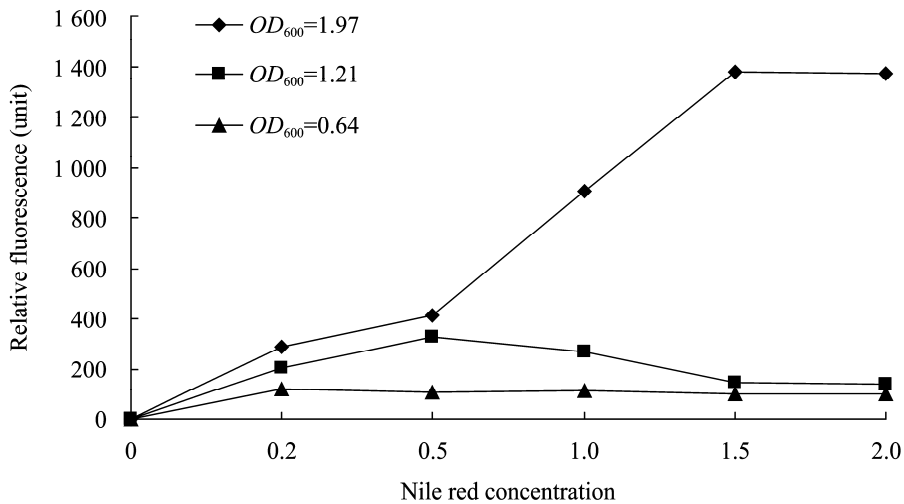


图 8 尼罗红浓度与相对荧光强度关系
Fig. 8 The relationship between relative fluorescence and nile red concentration

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.3.5 荧光检测油脂含量方法的可行性分析: 为了验证荧光检测细胞内油脂含量的准确性, 通过不同的培养条件得到油脂含量不一致的近平滑假丝酵母 2A00015 菌悬液, 将菌悬液光密度值控制在 1.20 以内, 尼罗红浓度为 0.5 mg/L, 染色时间 5 min。计算相同细胞密度下激发波长 488 nm、发射波长 570 nm 处的相对荧光强度与油脂含量之间的相关性, 结果见图 9。图 9 显示, 荧光检测细胞内油脂相对含量与称重法得到的油脂含量具有较高的相关性($R^2=0.9637$), 因此完全可以采用荧光检测方法替代称重法。

3 讨论

以大洋中分离得到的 385 株酵母作为筛选对象, 采用尼罗红平板筛选方法筛选产油酵母, 共获得 22 油脂酵母, 26S rDNA 分子鉴定结果显示本次筛选得到油脂酵母大多数为丝孢酵母属、红酵母属, 这与相关文献记载较为一致。镜检复筛及油脂提取含量测定结果表明尼罗红平板筛选具有灵敏度高、操作简便、可动态观察细胞内油脂积累情况等优点, 因此该方法适用大批量筛

选。由于该筛选方法是以能否发出橙色荧光作为判断依据, 实验过程中我们发现其存在一定的局限性, 红色、浅红色等菌体颜色较深的酵母会干扰到荧光观察进而无法做出准确判断, 因此需通过细胞染色、显微镜观察等传统方法加以辅助筛选。

产油酵母应用到生产实践, 往往还需要菌体诱变, 优化产油条件等方法提高油脂产率, 另外考虑成本问题, 选择廉价底物^[24-25]替代葡萄糖也是不可或缺, 如果采用传统称重法来检验优化后的油脂含量, 显然工作量是巨大的, 本文以 2A00015 酵母为试验菌株, 利用尼罗红染料建立了一套适合该菌株油脂定量检测方法, 其测定结果与称重法产油率具有较高的相关性($R^2=0.9608$)。由于红染色荧光定量检测胞内油脂含量采用酶标仪 96 微孔板进行测定, 以 3 个孔作为平行样, 一次最多可以测定 32 个样品, 这无疑大大减少测定次数。此外, 平行样之间误差极小, 保证了检测的准确性。总而言之, 尼罗红染色荧光定量检测酵母油脂的方法不仅可以提高检测效率, 而且还具有相当高的准确性, 为后续酵母油脂生产打下基础。

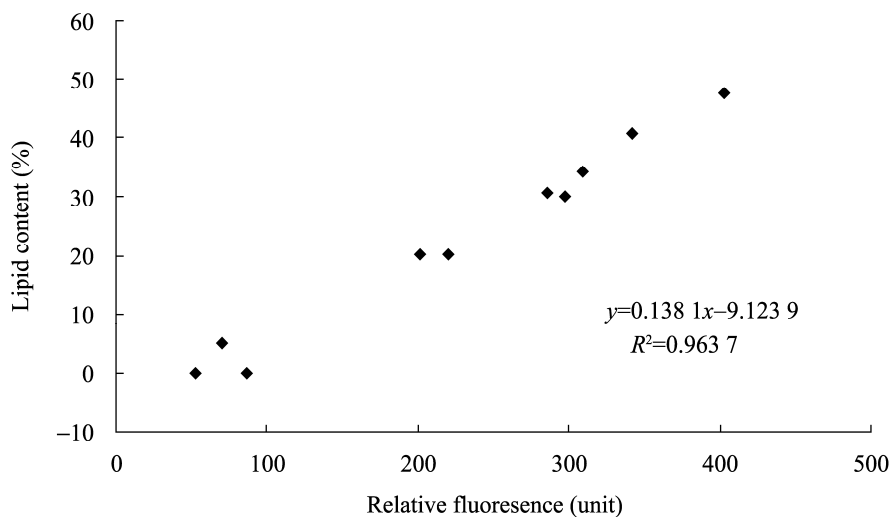


图 9 产油率与相对荧光强度关系

Fig. 9 The relationship between relative fluorescence and lipid content

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

参 考 文 献

- [1] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2002, 51: 1-51.
- [2] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 95(3): 287-291.
- [3] 易绍金, 郑义平. 产油微生物的研究及其应用[J]. *中外能源*, 2006, 11(2): 90-94.
- [4] Lambert MA, Moss CW. Comparison of the effects of acid and base hydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1983, 18(6): 1370-1377.
- [5] Diaz G, Melis M, Batetta B, et al. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio[J]. *Micron*, 2008, 39(7): 819-824.
- [6] Kranz RG, Gabbert KK, Madigan MT. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3010-3013.
- [7] Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds[J]. *Archives of Microbiology*, 1999, 171(2): 73-80.
- [8] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1985, 100(3): 965-973.
- [9] Genicot G, Leroy JLMR, van Soom A, et al. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 1181-1194.
- [10] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(3): 331-338.
- [11] Huang GH, Chen G, Chen F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33(10): 1386-1392.
- [12] 李永红, 刘波, 孙艳, 等. 广谱碳源产油酵母菌的筛选[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(12): 39-44.
- [13] 秦艳红, 叶德赞. 海洋产油真菌的简便初筛[J]. *台湾海峡*, 2010, 29(1): 128-134.
- [14] 王敬国. 尼罗红在测定细菌细胞中聚- β -羟基丁酸和其他脂类贮藏物质中的应用[J]. *微生物学报*, 1994, 34(1): 71-75.
- [15] Berlanga M, Montero MT, Fernández-Borrel J, et al. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats[J]. *International Microbiology*, 2006, 9(2): 95-102.
- [16] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义[J]. *菌物系统*, 2002, 21(1): 27-32.
- [17] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1986, 73(4): 331-371.
- [18] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(5): 1216-1223.
- [19] 曹健, 汪晨辉, 曾实, 等. 卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 3.2208 油脂几种提取方法的比较[J]. *中国油脂*, 2004, 27(4): 38-40.
- [20] 唐丽琴, 李矗, 刘圣, 等. 蒽酮-硫酸比色法测定麦冬多糖的含量[J]. *安徽医药*, 2003, 7(1): 39-40.
- [21] Certik M. Fermentation physiology and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid biosynthesis[J]. *Research in Advanced Bioscience and Bioengineering*, 2000(1): 45-64.
- [22] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917.
- [23] Sackett DL, Wolff J. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 167(2): 228-234.
- [24] 李楠, 邓智年, 覃拥灵, 等. 甘蔗糖蜜发酵生产多不饱和脂肪酸的菌种筛选[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 552-556.
- [25] 潘丽霞, 杨登峰, 邵利, 等. 利用蔗渣半纤维素水解液产油酵母的筛选、鉴定及发酵实验[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1176-1181.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>