

DOI:10.7522/j.issn.1000-0240.2020.0104

XUE Mei, ZHANG Rui, ZHANG Yan, et al. Diversity and extracellular enzyme activities of *Rhodotorula* strains isolated from surface ice core of the Glacier No. 1 at headwaters of Urumqi River, Tianshan Mountains[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2020, 42(4):1308-1320.
[薛梅, 张瑞蕊, 张艳, 等. 天山乌鲁木齐河源1号冰川浅冰芯中红酵母菌多样性及种系的产酶特性分析[J]. 冰川冻土, 2020, 42(4):1308-1320.]

天山乌鲁木齐河源1号冰川浅冰芯中红酵母菌 多样性及种系的产酶特性分析

薛梅¹, 张瑞蕊², 张艳¹, 关波¹, 靳亚梅¹, 倪永清¹

(1. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000; 2. 石河子大学生命科学院, 新疆石河子 832000)

摘要: 采用4种分离培养基分离可培养酵母菌, 通过分析ITS区序列确定菌株的分类地位。利用多点接触法筛选产酶菌株, 并对菌株的生理生化特征进行比较分析。结果显示: 从乌鲁木齐河源1号冰川(简称乌源1号冰川)浅冰芯中一共分离得到317株酵母菌, 通过ITS rRNA基因序列的NCBI比对和MSP-PCR指纹分型分析发现其中45株为原红酵母菌(*Rhodotorula*), 分为5个种 *R. glutinis*、*R. araucariae*、*R. mucilaginosa*、*R. kratochvilovae* 和 *R. diobovata*。通过方差分析和聚类分析对45株红酵母进行产酶差异分析, 揭示红酵母菌的各个种群与胞外酶活性的关系。所有菌株至少产两种胞外酶, 其中产纤维素酶菌株占98%, 产果胶酶菌株占100%, 产淀粉酶和脲酶的菌株各47%, 产蛋白酶和脂肪酶的菌株分别占20%和9%, 而菌株YHB-9、YHB-15、YHB-39和YHB-45可以产5种酶, 所有菌株都不产几丁质酶。19株菌的最适生长温度在21℃左右, 26株菌的最适生长温度在24℃左右, 属于耐冷酵母菌。此外, 乌源1号冰川浅冰芯中分离出的红酵母的产酶性状没有表现出物种特异性, 即种间差异不显著, 但产低温酶性能良好, 在生物技术应用方面具有良好的开发潜力。

关键词: 乌源1号冰川; 浅冰芯; 红酵母菌; 低温酶

中图分类号: P343.6; Q938 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-0240(2020)04-1308-13

0 引言

冰川占地球陆地面积的10%~11%, 对维持地球生态系统的平衡、全球气候的稳定发挥着极其重要的作用^[1-2]。近几十年来的研究发现, 冰川表面的冰尘、积雪、冰芯及冰川底部生境同常温生态系统类似, 也是由细菌、真菌、微藻、原生动物等各种生物介导和促进的生物地球化学过程, 低温环境中的微生物对维持冰川的生态平衡、碳氮等元素的循环有重要作用^[3]。随着全球气候变暖趋势的加剧, 地球上绝大多数冰原及冰川处于持续退缩中, 预计到2050年冰川面积将会比1980年减少一半(54%)^[4]。全球气候变暖在加剧由微生物介导的生物地球化学过程的同时, 也显著影响了冰川的退缩

及其前沿生境、下游融水流域体系的生态学过程, 进而影响到局域的气候变化和生态系统生物多样性^[5]。而冰川微生物在基因资源的挖掘利用、低温酶的开发以及生物修复等方面的应用潜力巨大^[6]。因此, 保护冰川环境中的生物资源刻不容缓。

酵母菌是发酵工业和生物技术方面与人类关系最为密切的一类真核微生物。目前发现冰川生境中也广泛分布酵母菌^[7]。研究显示, 冰川来源的酵母菌能够产各种低温酶, 最常见酶包括淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、几丁质酶、蛋白酶和脂肪酶等。这些酶在食品、生物燃料以及洗涤剂行业中有很大的应用价值, 譬如低温蛋白酶在食品工业中, 可用于加速奶酪成熟、保持冷藏肉制品的鲜嫩、防止葡

收稿日期: 2018-12-28; 修订日期: 2020-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(41971070; 41271268)资助

作者简介: 薛梅(1995-), 女, 山东日照人, 2017年在泰山学院获学士学位, 现为石河子大学在读硕士研究生, 从事低温微生物研究。
E-mail: 1259402720@qq.com

通信作者: 倪永清, 教授, 从事冰川微生物生态及低温微生物生物技术研究。E-mail: niyqlzu@sina.com.

萄酒酿造中由蛋白质产生的浑浊^[8]。在纺织工业中,蛋白酶可用于“冷洗”工艺和常温洗涤纺织品的污垢去除。耐低温果胶酶可应用在果汁澄清,低温条件下防止食品的微生物污染和保护热敏性物质^[9]。此外,有研究表明,部分低温酵母菌可以生产在商业中有重要价值的类胡萝卜素,如 β -胡萝卜素、圆酵母素(torulene)、红酵母红素(torularhodin)和虾青素^[10],这些类胡萝卜素可以作为维生素 A 的前体物质被添加到食品和饲料中。

前期研究资料显示,在冰川中分布最广泛、抗逆性极强、产类胡萝卜素一类担子菌酵母是红酵母属(*Rhodotorula*)。这些酵母菌在南极、北极、高山冰川以及海冰等低温环境被频繁分离^[11]。传统的 *Rhodotorula* 酵母是一个多系起源的分类单元(poly-phyletic taxa),隶属于其中的成员生理生化特性多样复杂,系统发育甚至横跨了不同的纲(Class)^[12]。根据最新的基于分子系统学方法的酵母菌分类系统,原 *Rhodotorula* 属的分类进行了修订,只有一些种被保留,其他成员被划分到不同的属,包括 *Symmetrospora*、*Buckleyzyma*、*Microsporomyces*、*Sakaguchia*、*Cystobasidium*、*Colacogloea*、*Pseudohyphozyma*、*Phenoliferia* 和 *Rhodospiridiobolus* 等^[13]。

乌鲁木齐河源 1 号冰川(简称乌源 1 号冰川)位于天山中段天格尔峰北坡,属于大陆型冰川,是我国监测时间最长、研究最为系统的冰川,也是世界冰川监测服务处(WGMS)设立的全球 10 个重点观测的参照冰川之一^[14]。作者团队前期对乌源 1 号冰川表面积雪、表面冰尘和底部沉积层等生境中的真菌和酵母菌多样性分别做了报道^[15-16],同时对乌源 1 号冰川细菌产酶特征进行了研究。考虑到目前为止低温酶生物技术并不成熟,尤其对我国冰川酵母菌资源和低温酶的研究报道很少,需要相关研究填补空白。本文从乌源 1 号冰川浅冰芯中分离到产色素的菌株 45 株,隶属于新修订后的红酵母属(*Rhodotorula*),重点比较了菌株胞外酶谱的种间和种内差异,以及生长温度的种属差异性,以期为高效产低温酶和色素菌株的开发与应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

DNA 分子量 marker 及其他 PCR 扩增所需试剂均购自天根生化科技(北京)有限公司;其余试剂均

为进口或国产分析纯;PCR 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司;光学显微镜,德国生产 Leica DM3000;MiniBeadbeater-16 珠磨式组织研磨器,美国 Biospec 公司;PCR 仪,德国 Biometra 公司 Tprofessional;凝胶成像系统,法国 Vilber 多功能成像系统;水平电泳仪,美国 BioRad 公司 PowerPac Universal;电泳槽 SUBCEILGT(20 cm×25 cm)。

1.1.2 样品采集

于 2017 年 7 月在乌源 1 号冰川(43°06' N, 86°49' E)表面共设置 3 个取样点,取样点间隔 5 m,每个取样点设置 2 个平行样点,用酒精灼烧灭菌的冰镐剔除表层冰样,采用取样器钻取表层 15~40 cm 的冰层,样品采集后迅速装入已灭菌的保温桶中,置于车载冰箱中当天运回实验室。部分样品保存在-80℃超低温冰箱,用于菌株分离的样品暂置于-20℃冰箱中保存。

1.2 酵母菌的分离纯化

将用于菌种分离的样品在室温下融化,用孔径 0.45 μm 、直径 47 mm 的无菌硝化纤维膜过滤冰芯融水^[17]。将过滤后的膜分别置于四种培养基表面,RDBC 培养基、DG 培养基、MYP 培养基、MYP5 培养基^[18]。培养皿分别置于 4℃和 16℃下培养 14 d 后挑取酵母菌单菌落。挑取的单菌落经划线分离纯化后分别用于菌种保藏和提取 DNA。

1.2.1 分离培养基

RDBC 培养基:蛋白胨 10 g·L⁻¹,葡萄糖 20 g·L⁻¹,KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹,琼脂粉 16 g·L⁻¹,Rose Bengal 0.03 g·L⁻¹,氯硝胺 0.002 g·L⁻¹,pH 6.5;DG 培养基:甘油 18 g·L⁻¹,蛋白胨 5 g·L⁻¹,葡萄糖 10 g·L⁻¹,KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹,琼脂 16 g·L⁻¹,氯硝胺 0.002 g·L⁻¹,pH 5.6;MYP 培养基:麦芽浸粉 7 g·L⁻¹,酵母浸粉 0.5 g·L⁻¹,大豆蛋白胨 2.5 g·L⁻¹,琼脂 15 g·L⁻¹;MYP5 培养基:麦芽浸粉 7 g·L⁻¹,葡萄糖 1 g·L⁻¹,酵母浸粉 5 g·L⁻¹,大豆蛋白胨 2.5 g·L⁻¹,氯化钠 50 g·L⁻¹,琼脂 15 g·L⁻¹。

1.2.2 富集培养基

YM 培养基:麦芽浸粉 2.5 g·L⁻¹,葡萄糖 1 g·L⁻¹,酵母浸粉 2.5 g·L⁻¹,大豆蛋白胨 5 g·L⁻¹。

1.3 菌株 DNA 的提取

DNA 提取参考 Almeida 等^[19]的方法,略有改动。在 1.5 mL 无菌保藏管中加入 500 μL 1×TE 缓冲液,于超净工作台中将在培养皿中已划线纯化的

单菌落用无菌接种环挑入无菌保藏管中,并加入 200 μL 424~600 μm 的玻璃珠。将无菌保藏管置于 MiniBeadbeater-16 珠磨式组织研磨器上剧烈震荡 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。吸取上层含有 DNA 的上清液转移到 1.5 mL 的无菌离心管中并保藏于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.4 基于 MSP-PCR 对酵母菌株的指纹分型

以 M13 (5' -GAGGGTGGCGGTTCT-3') 为单引物对纯培养物通过 MSP-PCR 进行基因分型,所有 PCR 反应均在 25 μL 反应体系(预混液: 12.5 μL ; ddH₂O: 9.5 μL ; DNA 模板: 2 μL ; 引物: 1 μL) 中进行。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 cycles, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶电泳中检测。具有相同 DNA 带型的菌株被认为是同一物种。

1.5 ITS 基因间隔序列的扩增及菌株系统发育分析

将扩增后 MSP-PCR 条带对比去重后,挑取同一基因型中的代表菌株以 ITS1f (5' -CTTGGT-CATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5' -TCCT-CCGCTTATTGATATGC-3') 为引物进行 PCR 扩增 rRNA 基因的 ITS 序列。PCR 反应在 25 μL 的反应体系(预混液: 12.5 μL ; ddH₂O: 9.5 μL ; DNA 模板: 2 μL ; 引物: 各 0.5 μL) 中进行。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; 40 cycles, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min。PCR 产物由上海生工生物科技有限公司测序。

将获得的序列在 NCBI (National Center of Biotechnology Information) -GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLASTN 搜索获得的其他酵母序列进行比较。在 CLUSTALX1.8 程序比对序列。使用 neighbor-joining method 计算进化距离,在 MEGA6.0 软件中用 p-distances 和 Kimura-2parameter 双参数法构建系统发育树,并用 bootstrap 检验进化树分支聚类的置信度,重复 1 000 次^[20]。

1.6 酵母菌最适生长温度与耐盐度测定

菌株最适生长温度的测定: 将产酶菌株的液体培养液按 2% 的接种量接入装有 5 mL YM 液体富集培养基的试管中,分别置于 4、10、15、18、21、24、30、37 $^{\circ}\text{C}$ 八个温度梯度下培养,培养 96 h 后 420 nm 测 OD 值。

菌株的耐盐性测定: 在 YM 液体培养基中分别

加入 2%、4%、6%、8% 浓度的氯化钠溶液,按 2% 的接种量接入产酶菌株,15 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 96 h 后,420 nm 测 OD 值。

1.7 菌株的产酶特性检测

1.7.1 淀粉酶活性

在补充有 2% 可溶性淀粉、pH 6.0 的 YM 培养基上筛选产淀粉酶菌株^[17]。阳性结果表现为当平板上充满 1 mL 碘液时,在紫色背景下菌落周围显现透明水解圈。

1.7.2 脂肪酶活性

在含有蛋白胨 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钠 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、CaCl₂·2H₂O 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、吐温 80 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 6.8 的培养基上筛选脂肪酶活性菌株^[21]。菌落周围有清晰地水解圈代表产脂肪酶。

1.7.3 纤维素酶活性

YNB 6.7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、纤维素 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的刚果红溶液淹没平板,15 min 后倒出。然后将板用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 浸没 15 min。阳性纤维素酶活性定义为红色背景上菌落周围的清晰水解圈^[22]。

1.7.4 蛋白酶活性

在补充有 2% 酪蛋白和 1.5% 琼脂的培养基(pH 6.6)中筛选产蛋白酶的菌株。在菌落周围有透明圈的为阳性^[20]。

1.7.5 果胶酶活性

在以果胶为底物的培养基上筛选有果胶酶活性的菌株(果胶 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; YNB 6.7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 琼脂 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7.0)。平板上充满 1% 十六烷基三甲基溴化铵,菌落周围产生的清晰地透明圈为阳性结果^[23]。

1.7.6 几丁质酶活性

酵母提取物 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(NH₄)₂SO₄ 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KH₂PO₄ 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Na₂HPO₄ 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、FeSO₄·7H₂O 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、纯化几丁质 25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、CaCl₂ 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硼酸 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硫酸锰 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硫酸锌 0.07 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硫酸铜 0.05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、三氧化钼 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0^[24]。菌落周围有水解圈的为阳性结果。

1.7.7 脲酶活性

在补充有 0.5% 尿素的 YM 培养基中检测脲酶活性,阳性结果为添加 1% 的溴百里香酚蓝染色后菌落周围显现蓝色晕圈^[20]。

1.8 酶活性半定量及数据分析

将所有菌株按 2% 的接种量接种于 MYP^[20] 培养

基中, 15 ℃静置培养 48 h 后, 用相差显微镜镜检浓度统一校准为 1×10^6 CFU·mL⁻¹ 的酵母菌悬液接种在特定底物的琼脂平板上, 15 ℃下培养 96 h 后测量菌落大小及水解圈、透明圈、显色圈半径, 半定量评估菌株的胞外酶活性^[25]。试验数据用 Excel2003 进行初步处理后, 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)程序进行方差分析^[22], 结果以“平均值±标准差表示”, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 冰芯酵母菌的分离及红酵母属酵母菌的系统发育分析

从乌源 1 号冰川浅冰芯中共分离出 317 株酵母菌, 扩增酵母菌株的 rRNA 基因的 ITS 序列并测序。将代表菌株的 ITSrRNA 基因序列提交到 NCBI, 通过 Blast 工具在 GenBank 数据库中与已发表的 ITSrRNA 基因序列进行相似性比较, 结果显示 317 株酵母菌可以归类于 9 个属, 18 个种, 每种占总菌数的比例为: *Glaciozyma watsonii* (6.62%), *Mrakia gelida* (5.68%), *Mrakiella aquatica* (6.31%), *Naganishia albidus* (6.31%)、*Naganishia adeliensis*

(6.94%)、*Vishniacozyma carnescens* (1.58%)、*Cystofilobasidium macerans* (4.73%)、*Filobasidium magnum* (8.52%)、*Candida glabrata* (14.51%)、*Vishniacozyma tephrensensis* (3.15%)、*Naganishia albi-da* (4.42%)、*Naganishia adeliensis* (15.14%)、*Rhodotorula glutinis* (5.68%)、*Rhodotorula diobovata* (0.63%)、*Rhodotorula araucariae* (1.89%)、*Rhodotorula kratochvilovae* (1.58%)、*Rhodotorula mucilaginosa* (4.73%)。

将 45 株红酵母菌进行 MSP-PCR 指纹图谱对比, 并根据指纹图谱对 45 株菌进行归类划分(表 1)。并对红酵母进行 ITS 序列分析, 选取相似性在 99% 以上的代表菌株构建系统发育树(图 1), 其中 8 株菌的 ITS 区基因序列与 *R. glutinis* 的相似性达到 100%。YHB-13、YHB-16、YHB-34 与 *R. kratochvilovae* 的亲缘关系最近, 同源性高达 100%。*R. kratochvilovae* 和 *R. glutinis* 两个种群之间的亲缘关系非常近, 位于同一个进化枝。菌株 YHB-22 与 *R. diobovata* 亲缘关系最近, 相似性 100%。YHB-3、YHB-53、YHB-21、YHB-44 聚为一类, 与 *R. mucilaginosa* 的同源性最高, 相似性达到 99%。YHB-8 与 *R. araucariae* 的 ITS 区基因序列相似性在 99%

表 1 乌源 1 号冰川浅冰芯中低温红酵母菌的特征
Table 1 Characteristics of cold-adapted *Rhodotorula* in ice core on the surface of the Urumqi Glacier No. 1, Tianshan Mountains

菌株 ^a	亲缘关系		代表菌株 登录号	生长特性	
	BLAST 最匹配种	相似性/%		最适生长温度/℃ ^b	耐盐度/% ^c
YHB-34	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	100	MH802003	4~24~37	0~6
YHB-13, YHB-24	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	100	MH801993	4~24~30	0~6
YHB-16	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	100	MH801995	4~24~30	0~6
YHB-4, YHB-14, YHB-15	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH801994	4~21~37	0~6
YHB-6, YHB-1, YHB-2, YHB-7	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH801991	4~24~30	0~8
YHB-20, YHB-38, YHB-23, YHB-26	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH801997	4~21~30	0~6
YHB-31, YHB-27	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH802001	4~24~37	0~8
YHB-29	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH802000	4~24~37	0~8
YHB-33	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH802002	4~24~37	0~4
YHB-35, YHB-39	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH802004	4~21~30	0~8
YHB-47	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100	MH802006	4~24~30	0~8
YHB-48	<i>Rhodotorula araucariae</i>	99	MH802007	4~24~37	0~8
YHB-8, YHB-46, YHB-49	<i>Rhodotorula araucariae</i>	99	MH801992	4~24~30	0~6
YHB-18, YHB-25	<i>Rhodotorula araucariae</i>	99	MH801996	4~24~30	0~8
YHB-22, YHB-9	<i>Rhodotorula diobovata</i>	100	MH801999	4~24~30	0~8
YHB-44	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99	MH802005	4~24~37	0~8
YHB-53, YHB-42, YHB-45, YHB-50	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99	MH802008	4~24~37	0~8
YHB-3, YHB-1, YHB-52, YHB-54, YHB-37	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99	MH801990	4~21~37	0~8
YHB-21, YHB-17, YHB-28, YHB-32, YHB-40	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99	MH801998	4~21~37	0~8

注: a, 此列数据第一个菌株为该酵母菌种的代表菌株; b, 此列数据为酵母菌最低~最适~最高生长温度; c, 此列数据为酵母菌生长的耐盐度范围。

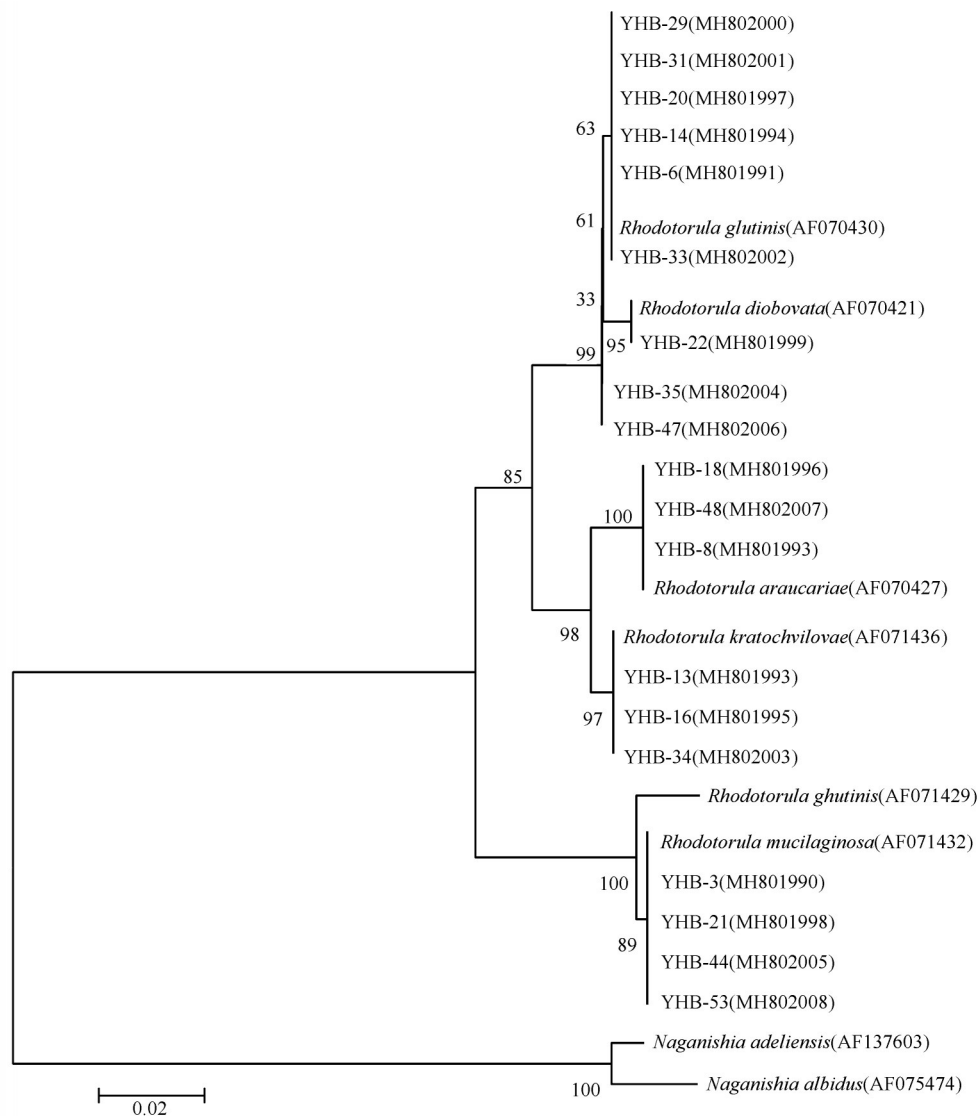


图1 基于ITS基因序列的代表酵母菌菌株的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among representative yeast strains. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled datasets

以上。

2.2 红酵母属内菌株的菌落和细胞形态特征

乌源1号冰川浅冰芯中分离纯化的红酵母菌的菌落颜色多为粉色或橘红色(图3),同一种的菌株的菌落颜色也会不同(表2),例如YHB-4和YHB-6同属于*R. glutinis*,颜色分别为橙色和粉红色,YHB-3和YHB-21都属于*R. mucilaginoso*,菌落颜色分别为粉色和橙色。红酵母菌的菌落直径约为1~2 mm,采用光学显微镜观察其细胞形态,发现其细胞形态主要分为球形和椭圆形(表2)。

表2 乌源1号冰川浅冰芯红酵母菌的形态特征及产酶谱

菌株	形态特征			胞外酶活性						
	菌落大小/mm	细胞形态	菌落颜色	蛋白酶	淀粉酶	果胶酶	脂肪酶	纤维素酶	脲酶	几丁质酶
Rhodotorula glutinis										
YHB-1	2	球形	橙色	-	-	++	-	++	+	-
YHB-2	2	球形	橙色	-	-	++	-	+++	+	-
YHB-4	2	球形	橙色	-	+++	++	-	+	-	-

续表2										
菌株	形态特征			胞外酶活性						
	菌落大小/mm	细胞形态	菌落颜色	蛋白酶	淀粉酶	果胶酶	脂肪酶	纤维素酶	脲酶	几丁质酶
YHB-6	2	球形	粉色	-	-	+	-	++	+	-
YHB-7	2	球形	橙色	-	+++	++	-	+++	+	-
YHB-14	2	椭球形	橙色	-	+	+	-	+++	+++	-
YHB-15	2	椭球形	粉色	++	+	++	-	++	+++	-
YHB-20	1-2	椭球形	橙色	-	-	+	-	+++	++	-
YHB-23	2	椭球形	橙色	-	++	+++	-	+++	+++	-
YHB-26	2	球形	橙色	-	-	+	-	+	++	-
YHB-27	1	球形	橙色	+	-	+	-	+	+	-
YHB-29	2	球形	橙色	+	-	+	-	++	-	-
YHB-31	2	球形	粉色	+	-	+	-	++	-	-
YHB-33	1	椭球形	橙色	-	-	+	-	++	++	-
YHB-35	1	球形	粉色	-	+	+	-	++	+	-
YHB-38	1	球形	粉色	-	+	++	-	++	-	-
YHB-39	1	球形	粉色	-	+	++	+	++	-	-
YHB-47	1	球形	粉色	-	+	+	-	+++	++	-
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>										
YHB-24	1	球形	橙色	-	++	+	-	+++	+++	-
YHB-13	2	椭球形	橙色	-	-	+	-	-	-	-
YHB-16	2	椭球形	橙色	-	+	++	-	++	+++	-
YHB-34	1	球形	橙色	-	+	+	-	++	++	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>										
YHB-3	2	椭球形	粉色	+	-	++	-	++	-	-
YHB-17	2	椭球形	粉色	-	-	+	-	++	++	-
YHB-21	2	椭球形	橙色	-	-	++	-	++	+	-
YHB-28	1	球形	粉色	-	-	+	-	++	-	-
YHB-32	1	球形	粉色	+	-	+	-	++	-	-
YHB-37	1	球形	粉色	-	-	+	-	+++	+	-
YHB-40	1	球形	粉色	-	-	++	-	++	-	-
YHB-42	1	椭球形	粉色	+	-	++	-	++	+	-
YHB-44	2	椭球形	粉色	+	-	++	-	++	-	-
YHB-45	1	椭球形	粉色	+	+	+	-	+	-	-
YHB-50	3	椭球形	橙色	-	-	++	-	++	-	-
YHB-51	1	椭球形	粉色	-	-	++	-	++	-	-
YHB-52	1	椭球形	粉色	-	-	++	-	++	-	-
YHB-53	3	椭球形	粉色	-	-	++	-	+++	-	-
YHB-54	2	椭球形	粉色	-	-	++	-	++	+	-
<i>Rhodotorula araucariae</i>										
YHB-8	2	椭球形	橙色	-	+	+	-	++	+++	-
YHB-18	2	球形	橙色	-	-	++	-	++	+++	-
YHB-25	1	椭球形	橙色	-	-	+	++	++	-	-
YHB-46	3	球形	粉色	-	+	+	-	+	+	-
YHB-48	3	球形	粉色	-	-	+	-	+	-	-
YHB-49	2	球形	橙色	-	+	+	-	++	-	-
<i>Rhodotorula diobovata</i>										
YHB-9	3	球形	粉色	-	+++	+	+	+++	+++	-
YHB-22	3	球形	粉色	-	-	+	+	+++	-	-
总菌数				45						
阳性菌株数				11	18	45	4	44	25	0
阳性菌株占总菌数的百分比(%)				24. 4	40	100	8. 9	97. 8	55. 6	0

注：+为直径 2. 0~6. 5 mm；++为直径 7. 0~10. 5 mm；+++为直径 11~15 mm；-为没有酶活性。

2.3 基于 MSP-PCR 指纹的红酵母属内菌株的遗传差异

采用 GelCompar II 5.10 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) 凝胶分析软件对红酵母属内菌株的 MSP-PCR 扩增产物进行分析, 相似性分析采用 Pearson 系数, 使用 UPGMA 输出树状图, 结果如图 2 所示。从聚类图可以看出, 菌株明显分为 5 个亚群, 每个菌株产生的条带数在 4~14 之间。YHB-15、YHB-23 同为 *R. glutinis*, 因为基因带型与其他同

种菌株差别较大, 成为一个单独的亚群。*R. diobovata*、*R. glutinis*、*R. araucariae* 和 *R. kratochvilovae* 四个种的基因带型显示它们的亲缘关系相近, 聚类为一个亚群。10 株 *R. glutinis* 聚类为第三个亚群。YHB-48、YHB-49、YHB-28 对应于两个不同的种, 但指纹图谱显示两个种的亲缘关系较近, 聚类为第四个亚群。*R. mucilaginosa* 具有相同或相似的基因带型, 聚集为第五个亚群, YHB-29 属于 *R. glutinis* 但与 *R. mucilaginosa* 的基因带型更相近, 归类于同一个亚群。

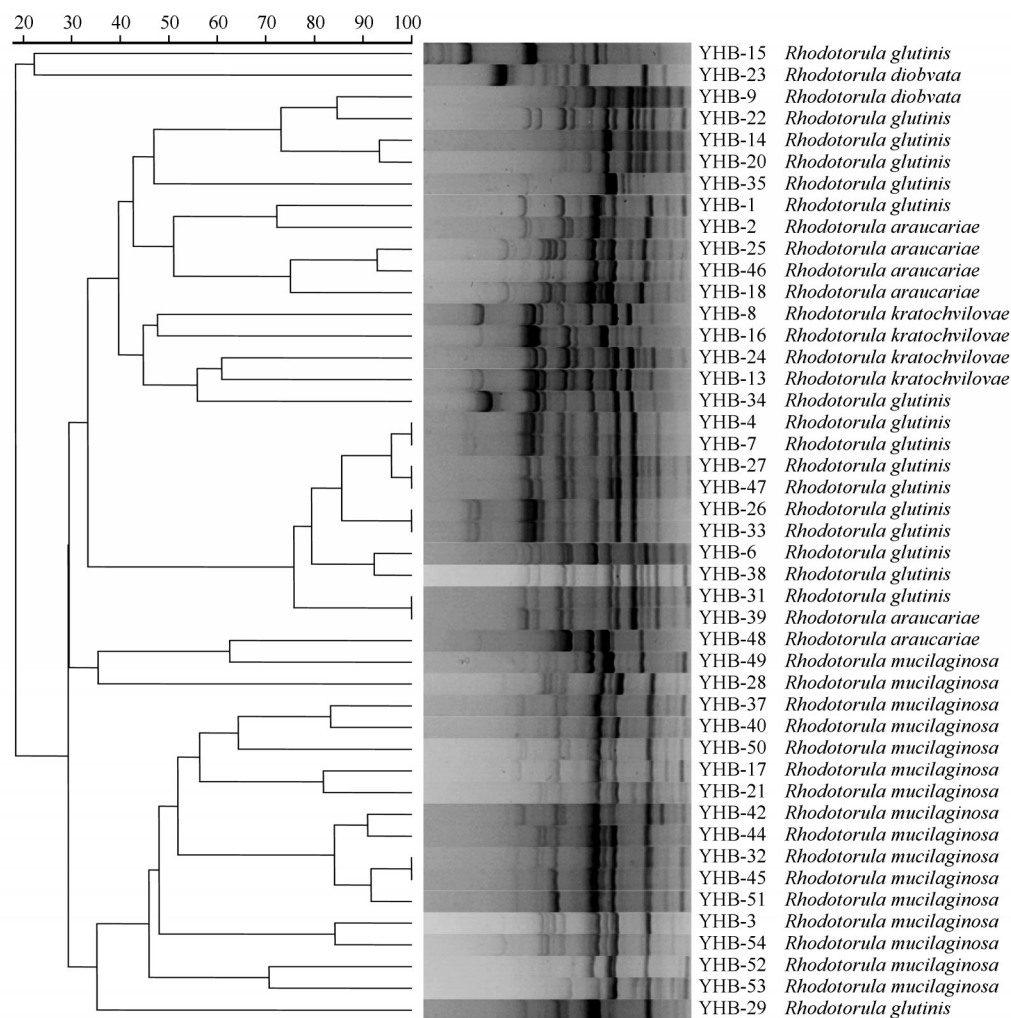


图2 红酵母菌的 MSP-PCR 指纹图谱及聚类分析树状图

Fig. 2 MSP-PCR fingerprint and cluster analysis tree diagram of *Rhodotorula*

2.4 红酵母属内菌株的最适生长温度和耐盐度

实验结果表明(表1), 26 株菌的最高生长温度为 37 °C, 19 株菌的最高生长温度为 30 °C。26 株菌的最适生长温度在 24 °C 左右, 生长温度范围在 4~37 °C, 19 株菌的最适生长温度为 21 °C 左右, 在 30 °C 时停止生长, 所有菌株都属于耐冷菌的范围。在耐盐性的研究中, 大多数菌株在 8% NaCl 浓度下

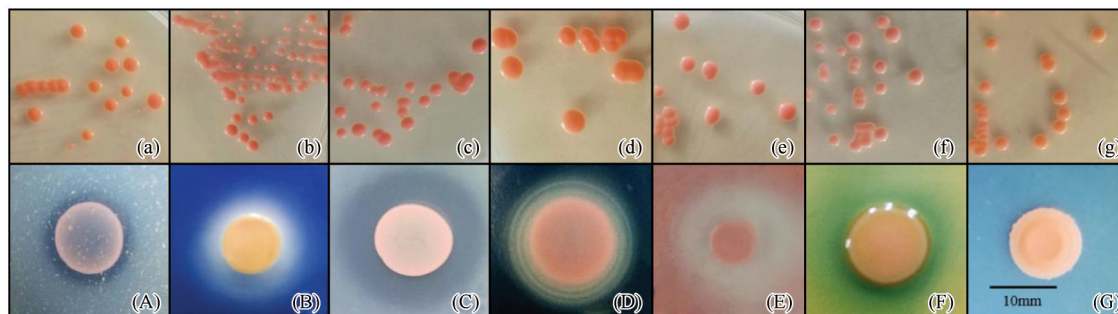
才停止生长。14 株菌的耐盐度为 6%, 耐盐度最低的是 YHB-33, NaCl 浓度高于 4% 停止生长。

2.5 红酵母属内菌株产胞外酶的种系差异

一共测定了 45 株菌的 7 种胞外酶活性, 用培养基中透明圈或水解圈的大小半定量一系列酶的活性, 图 3 为 15 °C 培养 96 h 后酵母菌在 7 种培养基上产生的水解圈的典型图像。如表 2 所示, 15 °C 时所

有酵母菌至少具有 2 种胞外酶活性。45 株菌中, 有 8. 89% 的株菌显示出 5 种酶活性, 分别为 *R. diobo-*

vata YHB-9、*R. glutinis* (YHB-39、YHB-15)、*R. mucilaginosa* YHB-45。



注: a: *R. glutinis* (YHB-4); b: *R. glutinis* (YHB-6); c: *R. diobovata* (YHB-22); d: *R. kratochvilovae* (YHB-24); e: *R. araucariae* (YHB-46); f: *R. mucilaginosa* (YHB-21); g: *R. mucilaginosa* (YHB-3); A: 蛋白酶活性 (YHB-27); B: 淀粉酶活性 (YHB-24); C: 果胶酶活性 (YHB-23); D: 脂肪酶活性 (YHB-25); E: 纤维素酶活性 (YHB-22); F: 脲酶活性 (YHB-27); G: 几丁质酶活性 (YHB-33)

图3 乌源 1 号冰川浅冰芯中产酶酵母的菌落形态特征

Fig. 3 Morphological features of enzyme-producing yeast in ice core on the surface of the Urumqi Glacier No. 1, Tianshan Mountains

纤维素酶活性普遍很高, 只有 *R. kratochvilovae* YHB-31 没有纤维素酶活性, 活性最高的是菌株 YHB-14 和 YHB-20。所有菌株都具有果胶酶活性, 可以在果胶酶筛选平板上产生清晰的透明圈, *R. glutinis* YHB-23 的活性最高。所有菌株都不能产生几丁质酶。具有淀粉酶活性和脲酶活性的菌株各占总菌数的 46. 67%, 15 株 *R. mucilaginosa* 中, 只有 YHB-44 一株菌产淀粉酶, 其余 14 株菌都没有淀粉酶活性。YHB-9 和 YHB-22 同属于 *R. diobovata*, 但只有 YHB-22 可以分解尿素。脂肪酶活性发现的较少, 只有 8. 89% 的株菌具有脂肪酶活性, 分别为 YHB-9、YHB-22、YHB-25、YHB-39, 没有筛选到可以产生脂肪酶的 *R. mucilaginosa* 和 *R. kratochvilovae*。显示蛋白酶活性的株菌占总菌数的 20%, 但可以水解酪蛋白的只有 *R. glutinis* 和 *R. mucilaginosa* 两个种群的酵母菌, 其他三个种的红酵母菌都不具有产胞外蛋白酶的活性。

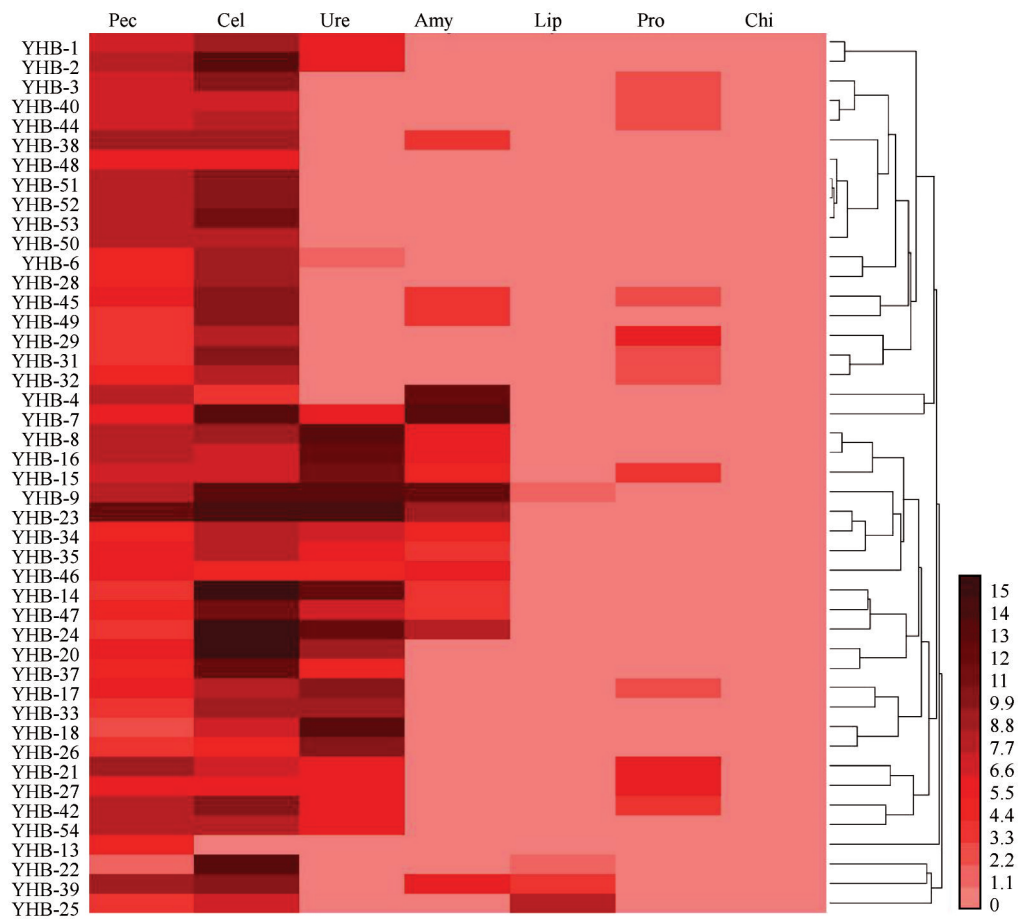
2.6 产酶菌株的表型聚类分析

产酶菌株的聚类分析显示 (图 4), 具有相同或相似产酶多样性的菌株聚为一簇, 聚类结果与分子鉴定结果比较发现红酵母的产酶特性在种水平上的差异性不明显。种间的产酶多样性及酶活性基本类似。YHB-1、YHB-2 同属于 *R. glutinis* 聚为一簇。YHB-51、YHB-52、YHB-53 同属于 *R. mucilaginosa* 聚为一簇。YHB-4、YHB-22、YHB-25、YHB-46 分别属于 4 个不同的种, 表现出最大的种间差异和产酶差异性。而 YHB-8 和 YHB-16 分别属于 *R.*

araucariae 和 *R. kratochvilovae* 两个不同的种, 因产酶结果相同聚成一簇。同一个种群的酵母菌的酶活性也存在差异性, 图 4 颜色越深的区域代表酶活性越高, 反之酶活性越低。方差分析结果如表 3 所示, 各个种群与产酶种类、活性之间差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

根据文献报道, 南极、北极及环北极地区、中低纬度山岳冰川环境中最常见的可培养酵母菌有 *Cryptococcus*、*Rhodotorula* 和 *Mrakia*^[26] 等担子菌纲酵母菌, 而 *Rhodotorula* 和 *Cryptococcus* 在低温环境中是绝对优势的属^[27]。其中南极、北极、欧洲冰川、南美洲冰川和深海中常见的红酵母种包括 *R. aurantiaca*、*Phenoliferia glacialis* (以前称 *Rhodotorula glacialis*)、*Cystobasidium minuta* (以前称 *Rhodotorula minuta*)、*R. glutinis*、*R. mucilaginosa*、*R. diobovata* (以前称 *Rhodosporidium diobovatum*) 和 *R. kratochvilovae*。在欧洲冰川生境中特有的种有 *Phenoliferia psychrophenolica* (以前称 *Rhodotorula psychrophenolica*) 和 *Phenoliferia psychrophila* (以前称 *Rhodotorula psychrophila*), 而在南极地区土壤分布的特有种包括 *Colacogloea diffluens* (以前称 *Rhodotorula diffluens*)、*Sampaiozyma ingeniose* (以前称 *Rhodotorula ingeniose*)、*R. auriculariae* 和 *Cystobasidium pallidas* (以前称 *Rhodotorula pallidas*)。 *R. araucariae* 大多分离自腐烂的植物体



注: Pec: 果胶酶活性; Cel: 纤维素酶活性; Ure: 脲酶活性; Amy: 淀粉酶活性; Lip (Tween80): 脂肪酶活性; Pro: 蛋白酶活性; Chi: 几丁质酶活性

图4 菌株酶活性(透明圈直径, 单位: mm)的热图及聚类分析图

Fig. 4 Heat map and clustering tree of yeast species enzyme activity (diameter of transparent zone, unit: mm)

表3 红酵母菌不同种之间酶活性的差异

Table 3 Differences in enzyme activities between different species of *Rhodotorula*

种属	胞外酶活性(透明圈直径)/mm						
	蛋白酶	淀粉酶	果胶酶	脂肪酶	纤维素酶	脲酶	几丁质酶
<i>R. glutinis</i>	0.69±1.61	3.65±4.49	6.38±2.38	0.24±0.97	10.48±3.53	5.92±4.81	0.00±0.00
<i>R. mucilaginosa</i>	1.78±1.89	0.23±0.90	7.03±1.65	0.00±0.00	9.33±1.42	2.17±3.36	0.00±0.00
<i>R. araucariae</i>	0.00±0.00	2.56±2.96	5.00±2.14	1.33±3.27	7.50±1.90	5.37±6.67	0.00±0.00
<i>R. diobovata</i>	1.83±3.17	4.17±7.21	5.33±3.25	1.33±1.54	10.50±4.33	6.57±6.87	0.00±0.00
<i>R. kratochvilovae</i>	0.00±0.00	4.75±3.52	5.50±2.04	0.00±0.00	7.63±6.13	8.05±5.84	0.00±0.00

注: 经方差分析, 种间酶活性无显著性差异 ($P>0.05$), “±”后的数字表示标准差。

表^[12], 在冰川浅冰芯中很少报道, 从乌源1号冰川冰芯中分离出的该菌种很可能是由风等外力作用将其带到冰川表面, 并被沉降到冰芯中。一般认为, 0℃以下水被冻结生命无法利用, 因此冰川中的酵母菌面临着最主要生存压力也是水分的获取。研究发现由于受冰晶周围存在的盐分的影响, 冰晶之间的液态水在-30℃的仍可保持液态, 并且不容易受到大气升华或蒸发的影响, 是冰川内部包括酵

母菌在内的各种生命可以存活的主要原因^[28]。因此, 来自冰川冰芯的微生物往往具有一定的耐盐性。本研究显示, 分离红酵母菌的最高耐盐度为8%, 这与北极冰川酵母基本一致^[29]。此外, 生存于冰川中的微生物为了适应低温环境, 最适生长温度相对较低, 依据对温度的生长敏感性, 可将其分为宽温型和窄温型。已经报道的酵母菌中, *Cryptococcus*、*Rhodotorula* 和 *Mrakia* 属的一些种被发现是

专性嗜冷菌,属于窄温型。一些报道的冰川红酵母其最适生长温度一般在20℃左右^[30]。本研究分离的所有菌株其最适生长温度在21℃或24℃左右,在30℃、甚至37℃能够缓慢生长,应该属于宽温型的兼性耐冷微生物。

报道显示,低温条件下的酵母菌相比细菌具有更强的降解惰性有机大分子(纤维素、木质素等)的能力^[31],很可能是因为酵母菌具有更独特的产酶谱,使它们可以利用细菌难以降解的碳源在特殊环境中生存。由于这个原因,酵母菌在冰川生境的碳素营养循环中发挥重要的作用^[32]。本研究中的大多数菌株能在低温下产生一种或几种胞外酶,其中产纤维素酶和果胶酶的菌株最多。文献报道显示,纤维素酶是高山冰川酵母菌中最常见的胞外酶之一(仅次于脂肪酶),譬如巴塔哥尼亚安第斯山脉有63%的冰川酵母菌可以产生纤维素酶^[25-33]。此外,低温酵母菌分泌果胶酶的频率也很高,阿尔卑斯冰川中的19株红酵母菌有60%可以产生果胶酶^[33]。本研究分离的45株菌,均可以产生果胶酶,除一株外均产纤维素酶。相对而言,冰川环境中能够产几丁质酶的温酵母菌报道很少^[33]。本研究分离的45株同样没发现产胞外几丁质酶的菌株,很可能与冰川环境中几丁质本身缺乏有关,而在同样低温的海洋低温酵母中,产几丁质酶菌株的分离频率极高。这种现象支持一个观点,生境过滤是微生物地理分布更强的决定因子^[34-35]。此外,文献报道南极、亚南极和高山冰川中分离出的酵母菌中只有少部分菌株具有淀粉酶活性,主要集中在*Mrakia*和*Rhodotorula*这两个属^[36]。脂肪酶是低温酵母菌产生的最常见的一种酶^[25],已经在*Cryptococcus*、*Dioszegia*、*Leuconospora*、*Rhodotorula*和*Wickerhamomyces*等属菌株广泛报道^[37]。有研究发现来自北极Midre Lovénbreen冰川附近水坑中的红酵母菌都不能产生脂肪酶^[21],这与本文研究结果相似,本文中产脂肪酶红酵母菌株只占9%,因此我们推测产脂肪酶酵母菌的地理分布可能会受到生长环境的影响。Duarte等^[26]研究表明,有14%的南极酵母能够在固体或者液体介质中生产蛋白酶,对蛋白酶描述最多的几个种属分别为*Cryptococcus*、*Mrakia*、*Leucosporidium*、*Pichia*和*Rhodotorula*^[37]。本实验有20%的菌株可以产生蛋白酶,但活性稍低。

一般认为,温度是冷环境中的微生物群落分布的最关键因子,但是高山冰川生境中紫外线辐射也

是最关键因子之一。只有具有光保护机制的微生物才能在高紫外线辐射的环境中定植,譬如类胡萝卜素是微生物中最常见的光保护剂。迄今为止,已经在多个酵母属中检测到类胡萝卜素,譬如*Cryptococcus*、*Cystofilobasidium*、*Dioszegia*、*Phaffia*、*Sporidiobolus*、*Sporobolomyces*、*Taphrina*和*Rhodotorula*等^[23-38]。报道发现,巴塔哥尼亚淡水体系中有50%左右的酵母菌含有类胡萝卜素^[39],而在酵母菌中最常见的几种类胡萝卜素主要有圆酵母素、 β -胡萝卜素和 γ -胡萝卜素^[40]。酵母菌产生类胡萝卜素的类型和比例主要取决于它们系统发育地位和培养基,如类胡萝卜素之一的圆酵母素通常由*R. minuta*菌株产生,*R. mucilaginosa*和*R. glutinis*菌株主要产生另外一类胡萝卜素——红酵母红素,而*R. babjevae*即产圆酵母素和又能产红酵母红素;此外,*R. sphaerocarpum*、*R. graminis*主要产生 β -胡萝卜素^[41]。据文献报道,结合在微生物细胞膜上的色素还具有调节细胞膜的流动性的特点^[42-43],可使微生物更好地适应低温环境。因此,对低温红酵母产类胡萝卜素的性能及其遗传背景差异进行深入研究具有重要意义,本文将对分离菌株进一步研究,并另撰文报道。此外,耐低温酵母菌不仅能产生胞外酶和类胡萝卜素,还可以产生具有工业应用价值的胞外多糖,被广泛用于食品、化妆品、制药等工业中,其应用前景非常广阔。近年来,由于 β -葡聚糖具有抗肿瘤、抗氧化等特性而被广泛研究,研究表明*Candida*、*Cryptococcus*、*Lipomyces*、*Pichia*、*Rhodotorula*和*Sporobolomyces*可以合成甘露聚糖、葡聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖、磷酸甘露聚糖和葡糖醛酸甘露聚糖^[44]。微生物产生的胞外多糖的结构、数量和性质主要取决于菌株的遗传特性、培养基组成和生长条件,实现胞多糖的大规模生产具有重要的工业意义。

4 结论

(1) 乌鲁木齐河源1号冰川浅冰芯中红酵母菌(*Rhodotorula*)菌株至少包括5个可培养物种*R. glutinis*、*R. araucariae*、*R. mucilaginosa*、*R. kratochvilovae*和*R. diobovata*,隶属于同一种的菌株之间存在明显的遗传差异。

(2) 冰芯中所有红酵母菌(*Rhodotorula*)菌株菌株至少产两种胞外酶,其中少部分产五种酶,绝大部分产纤维素酶和果胶酶菌,产蛋白酶和脂肪酶的

菌株相对较少,但所有菌株都不产几丁质酶。菌株的最适生长温度在 21~24 ℃左右,属于耐冷酵母菌。此外,冰川分离出的红酵母的产酶性状没有表现出物种特异性,即产酶特性物种间的差异没有明显的规律性;产低温酶性能良好,在生物技术应用方面具有良好的开发潜力。

参考文献(References):

- [1] Zang Lin, Liu Yongqin, Liu Xiaobo. Advance in researches of virus in cryoconite on glacier surface[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2019, 41(6): 1496 – 1504. [臧琳, 刘勇勤, 刘晓波. 冰川表面冰尘洞内病毒研究进展[J]. 冰川冻土, 2019, 41(6): 1496 – 1504.]
- [2] Jia Yufeng, Li Zhongqin, Jin Shuang, et al. Changes of the runoff and its components in Urumqi Glacier No. 1 catchment, Tianshan Mountains, 1959 – 2017 [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2019, 41(6): 1302 – 1312. [贾玉峰, 李忠勤, 金爽, 等. 1959 – 2017 年天山乌鲁木齐河源 1 号冰川流域径流及其组分变化[J]. 冰川冻土, 2019, 41(6): 1302 – 1312.]
- [3] Chen Jun, Lian Bin, Wang Bin, et al. The occurrence and biogeochemistry of microbes in extreme environments [J] Earth Science Frontiers, 2006, 13(6): 199 – 207. [陈骏, 连宾, 王斌, 等. 极端环境下的微生物及其生物地球化学作用[J]. 地学前缘, 2006, 13(6): 199 – 207.]
- [4] Gao H, Li H, Duan Z, et al. Modelling glacier variation and its impact on water resource in the Urumqi Glacier No. 1 in Central Asia [J]. The Science of The Total Environment, 2018, 644: 1160 – 1170.
- [5] Granados H D, Miranda P J, Huggel C, et al. Chronicle of a death foretold: Extinction of the small-size tropical glaciers of Popocatepetl volcano (Mexico) [J]. Global & Planetary Change, 2007, 56(1): 13 – 22.
- [6] Buzzini P, Branda E, Goretti M, et al. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82(2): 217 – 241.
- [7] Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, et al. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 69(3): 363 – 372.
- [8] Cavicchioli R, Siddiqui K S, Andrews D, et al. Low-temperature extremophiles and their applications [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 253 – 261.
- [9] Tomoyuki N, Kaichiro Y, Tatsuro M, et al. Cold-active pectinolytic activity of psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1 [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2002, 94(2): 175 – 177.
- [10] Amaretti A, Simone M, Quartieri A, et al. Isolation of carotenoid-producing yeasts from an alpine glacier [J]. Chemical Engineering Transactions, 2014, 38: 217 – 222.
- [11] Godinho V M, Furbino L E, Santiago I F, et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica [J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1434 – 1451.
- [12] Kurtzman C P, Fell J W. The yeasts, a taxonomic study [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1953, 19(1): 275 – 276.
- [13] Wang Q M, Yurkov A M, Göker M, et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina* [J]. Studies in Mycology, 2015, 81(81): 149 – 189.
- [14] Li Kaiming, Chen Shifeng, Kang Lingfen, et al. Variation of continental glacier and temperate glacier in China: a case study of Glacier No. 1 at the headwaters of the Urumqi River and Baisui Glacier No. 1 [J]. Arid Zone Research, 2018, 35(1): 12 – 19. [李开明, 陈世峰, 康玲芬, 等. 中国大陆型冰川和海洋性冰川变化比较分析——以天山乌鲁木齐河源 1 号冰川和玉龙雪山白水河 1 号冰川为例[J]. 干旱区研究, 2018, 35(1): 12 – 19.]
- [15] Luo B L, Sun H L, Zhang Y, et al. Habitat-specificity and diversity of culturable cold-adapted yeasts of a cold-based glacier in the Tianshan Mountains, northwestern China [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(5): 2311 – 2327.
- [16] Wang Shuxian, Gu Yanlin, Ni Xuejiao, et al. Composition and phylogeny of fungal community in supraglacial cryoconite and subglacial sediments of the Glacier No. 1 at headwaters of the Urumqi River in Tianshan Mountains [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2017, 39(4): 781 – 791. [王叙贤, 顾燕玲, 倪雪皎, 等. 天山乌源 1 号冰川表面冰尘及底部沉积层真菌群落结构比较及其系统发育分析[J]. 冰川冻土, 2017, 39(4): 781 – 791.]
- [17] Aline B M Vaz, Luiz H R, Mariana L A Vieira, et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in antarctica [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(3): 937 – 947.
- [18] Butinar L, Strmole T, Gunde-Cimerman N. Relative incidence of ascomycetous yeasts in arctic coastal environments [J]. Microbial Ecology, 2011, 61(4): 832 – 843.
- [19] de Almeida J M. Yeast community survey in the Tagus estuary [J]. FEMS microbiology ecology, 2005, 53(2): 295 – 303.
- [20] Barahona S, Yuivar Y, Socias G, et al. Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica [J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2016, 20(4): 1 – 13.
- [21] Pathan A A K, Bhadra B, Begum Z, et al. Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids [J]. Current Microbiology, 2009, 60(4): 307 – 314.
- [22] Brizzio S, Turchetti B, de Garcia V, et al. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(4): 519 – 525.
- [23] Cavello I, Albanesi A, Fratebianchi D, et al. Pectinolytic yeasts from cold environments: novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases [J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2017, 21(2): 319 – 329.
- [24] Zhang L, Wang Y, Liang J, et al. Degradation properties of various macromolecules of cultivable psychrophilic bacteria from the deep-sea water of the South Pacific Gyre [J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2016, 20(5): 663 – 671.
- [25] de Garcia V, Brizzio S, van Broock M R. Yeasts from glacial ice of Patagonian Andes, Argentina [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82(2): 540 – 550.
- [26] Duarte A W F, Dos Santos J A, Vianna M V, et al. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(4): 600 – 619.
- [27] Buzzini P, Branda E, Goretti M, et al. Psychrophilic yeasts

- from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(2): 217 – 241.
- [28] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1(3): 200 – 208.
- [29] Butinar L, Spencer-Martins I, Gunde-Cimerman N. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 91(3): 277 – 289.
- [30] Margesin R, Fonteyne P F, Sampaio J P. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(9): 2179 – 2184.
- [31] Margesin R, Gander S, Zacke G, et al. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts [J]. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2003, 7(6): 451 – 458.
- [32] Margesin R, Neuner G, Storey K B. Cold-loving microbes, plants, and animals: fundamental and applied aspects [J]. *Die Naturwissenschaften*, 2007, 94(2): 77.
- [33] Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, et al. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(1): 73 – 83.
- [34] Ni Yingqing, Gu Yanling, Shi Xuewei, et al. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the Glacier No. 1 in the Tianshan Mountains [J]. *Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 164 – 172. [倪永清, 顾燕玲, 史学伟, 等. 天山一号冰川底部沉积层产蛋白酶耐低温菌株的筛选及其系统发育 [J]. *微生物学报*, 2013, 53(2): 164 – 172.]
- [35] Carrasco M, Villarreal P, Barahona S, et al. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts[J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 1 – 21.
- [36] de Garcia V, Brizzio S, Libkind D, et al. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(2): 331 – 341.
- [37] Carrasco M, Rozas J M, Barahona S, et al. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region [J]. *Bmc Microbiology*, 2012, 12(1): 1 – 9.
- [38] Pollmann H, Breitenbach J, Wolff H, et al. Combinatorial biosynthesis of novel multi-hydroxy carotenoids in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *Journal of Fungi*, 2017, 3(1): 1 – 9.
- [39] Libkind D, Diéguez M C, Moliné M, et al. Occurrence of photoprotective compounds in yeasts from freshwater ecosystems of Northwestern Patagonia (Argentina) [J]. *Photochemistry & Photobiology*, 2010, 82(4): 972 – 980.
- [40] Moliné M, Libkind D, Garcia V D, et al. Production of pigments and photo-protective compounds by cold-adapted yeasts [M]//Cold-adapted Yeasts. Berlin: Springer, 2014.
- [41] Mannazzu I, Landolfo S, Lopes da Silva T, et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 31(11): 1665 – 1673.
- [42] Jagannadham M V, Chattopadhyay M K, Subbalakshmi C, et al. Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum* [J]. *Archives of Microbiology*, 2000, 173(5/6): 418 – 424.
- [43] Fong N J C, Burgess M L, Barrow K D, et al. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(5/6): 750 – 756.
- [44] Buzzini P, Margesin R. Cold-adapted yeasts [M]. Berlin: Springer, 2014.

Diversity and extracellular enzyme activities of *Rhodotorula* strains isolated from surface ice core of the Glacier No.1 at headwaters of Urumqi River, Tianshan Mountains

XUE Mei¹, ZHANG Ruirui², ZHANG Yan¹, GUAN Bo¹, JIN Yamei¹, NI Yongqing¹

(1. School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China; 2. School of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China)

Abstract: Culturable yeast was recovered by using RDBC, DG, MYP and MYP5 media, and the taxonomic position of the strains was determined by Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence analysis. Enzyme producing strains were screened by a multi-point contact method, and the physiological and biochemical characteristics of the strains were comparatively analyzed. A total of 317 culturable yeasts were isolated from the surface ice core of Urumqi Glacier No. 1. The results of NCBI blast of ITS rRNA gene sequence and MSP-PCR fingerprinting showed that 45 *Rhodotorula* strains isolated phylogenetically belonged to five recognized species: *R. glutinis*, *R. araucariae*, *R. mucilaginosa*, *R. kratochvilovae* and *R. diobovata*. The relationship between *Rhodotorula* species and their extracellular enzyme activity was revealed by ANOVA and cluster analysis. All strains produced at least two extracellular enzymes. Particularly, strains YHB-9, YHB-15, YHB-39, and YHB-45 can produce 5 kinds of enzymes. Among all 45 *Rhodotorula* strains, 100%, 98%, 47%, 20% and 9% strains produced pectinase, cellulase, amylase and urease, protease and lipase, respectively. By contrast, no strains produced chitinase. Physiological assay showed that the optimum growth temperature of 19 strains of yeast strains was around 21 °C, whereas that of the other 26 strains was 24 °C, indicating they belonged to psychrotolerant yeasts. Also, *Rhodotorula* yeast of the supraglacial habitats of the Glacier No. 1 at headwater of Urumqi river in the Tianshan Mountains did not exhibit species-specificity of enzyme-producing properties (no significantly differences between species). However, the enzyme-producing flexibility of *Rhodotorula* species indicates that strains of part cryotolerant yeast has a great potential in biotechnology applications.

Key words: Urumqi Glacier No. 1; surface ice core; *Rhodotorula*; cold-adapted enzyme

(责任编辑: 刘勇勤; 编辑: 周成林)