

高生物量富硒酵母的选育及培养条件初步优化

范秀英^{1,2} 郭雪娜¹ 傅秀辉¹ 何秀萍¹ 王昌禄² 张博润^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所,北京 100080; ²天津科技大学,天津 300222)

摘要 通过筛选、单倍体分离、诱变和原生质体融合,从融合子中选育了一株高生物量富硒酵母菌株(编号为 ZFF-28)其细胞硒总含量分别是原始亲株 ZY-67 和 ZY-198 的 2.8 倍和 2.0 倍。通过单因素实验和正交试验设计,确定了优化培养条件:6%糖浓度的蔗糖糖蜜,添加 0.5% (NH₄)₂SO₄、0.1% H₃PO₄、60μg/mL Se, pH6.0~6.5,装液量 50mL/250mL 三角瓶,接种量 10%,培养时间 25h。在优化培养条件下,菌株 ZFF-28 的生物量可达 8.2g/L,细胞中硒的含量达 2050μg/g,硒总含量达到了 16810μg/L,是培养条件优化前的 1.3 倍。细胞硒含量的 91%为有机硒。

关键词 富硒酵母,原生质体融合,发酵条件

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0720-05

生物体内,硒(Selenium, Se)是谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)的活性中心元素,而 GPx 具有清除对机体有害的自由基,防止细胞膜氧化受损的作用^[1]。缺硒可能导致癌症、心肌梗塞等多种疾病的发生,通过膳食摄取足够的硒可起到预防有关疾病的作用^[2,3]。但无机硒毒性高,所以硒的生物转化是一条安全有效的途径^[4]。

酵母具有较高的富硒能力并能将无机硒转化为有机硒^[5]。硒酵母作为一种安全有效的食品硒源,受到国内外研究者的重视,并对硒酵母中硒的有机结合形态、生物学作用机制等进行了研究^[6,7]。硒酵母在一些国家已成为一种商业化产品^[8],目前国外报道的富硒酵母硒含量达 1400 μg/g^[9]。国内报道的富硒酵母一般是将普通的酿酒酵母或稍作筛选的酵母在添加有适量亚硒酸钠的发酵培养基中,于一定的培养条件下获得,细胞硒含量在 300~1200μg/g 之间^[10]。本文报道了高生物量富硒酵母菌的选育及其发酵条件初步优化的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 300 株不同种属的酵母菌为实验的初筛菌株,统一编号为 ZY-1~ZY-300;标准交配型菌

株 ZF-5-8(a)和 ZW-21(α)均由本研究组保存。

1.1.2 培养基 :YEPD:酵母粉(YE)1%,蛋白胨(P)1%,葡萄糖(D)4%。固体培养基添加 1.2%琼脂粉。YEPS:酵母粉(YE)1%,蛋白胨(P)1%,蔗糖(S)4%。YEPM:酵母粉(YE)1%,蛋白胨(P)1%,麦芽糖(M)4%。麦芽汁培养基:糖浓度为 4°Brix。蔗糖糖蜜培养基:糖浓度 4% (NH₄)₂SO₄ 0.5%,H₃PO₄ 0.1%。McClary 生孢培养基:参考文献[11]。三角瓶发酵培养基:蔗糖糖蜜培养基添加 (NH₄)₂SO₄ 0.5%,H₃PO₄ 0.1%,其它条件由发酵实验具体而定。

1.1.3 试剂 :所用试剂为分析纯或化学纯。

1.2 方法

1.2.1 菌种选育 :参考文献[11]。

1.2.2 培养条件初步优化 :比较不同培养条件的实验结果,确定合适的发酵条件。

1.2.3 正交试验设计 :选取 L¹⁶(4³ × 2⁶)正交试验表^[12],进一步确认影响因素的显著性。

1.2.4 生物量的测定 :6000r/min 离心 8min 收集菌体,蒸馏水洗涤 3 次,收集菌体,65℃烘干至恒重后称重。

1.2.5 硒含量的测定 :参考文献[13、14]。硒总含量(μg/L) = 生物量(g/L) × 硒含量(μg/g 干细胞)

2 结果与讨论

2.1 高生物量及细胞硒含量高的菌株的筛选

采用酵母菌对亚硒酸钠的抗性测定进行筛选,测定了 300 株酵母菌对亚硒酸钠的抗性,结果发现不同酵母菌株对亚硒酸钠的抗性差异较大。从中选出对亚硒酸钠抗性较高的菌株,测定其在含有 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硒的 YEPD 培养基中培养的细胞生物量和硒含量。通过筛选,获得 10 株生物量较高的菌株和 8 株硒含量较高的菌株,部分结果列于表 1。

2.2 高生物量富硒酵母菌的选育

从上述菌株中挑选出一株生物量较高的二倍体 ZY-67(*Saccharomyces cerevisiae*)和一株硒含量较高的二倍体 ZY-198(*Saccharomyces kluyveri*),按常规方法对其进行生孢培养和单倍体分离。分别测定单倍体菌株的生物量和硒含量,从中选出生物量较高的单倍体 ZY-67-18(α)和硒含量较高的单倍体 ZY-198-21

(α),用亚硝基胍(NTG)对其进行诱变,从突变株中选出带有不同氨基酸缺陷标记的 ZY-67-18-34(α , leu)和 ZY-198-21-6(α , trp)作为融合亲株。按文献[11]进行原生质体融合,共获得 420 个融合子,测定其在含有 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硒的 YEPD 培养基中培养的生物量和硒含量。从中选出生物量和硒含量明显优于亲株的融合菌株 ZFF-28。融合菌株及亲株的生物量和硒含量的比较如表 2 所示。融合菌株 ZFF-28 具有双亲株的优良性状,其硒总含量明显高于亲株,分别是原始亲株 ZY-67 和 ZY-198 的 2.8 倍和 2.0 倍。通过遗传稳定性分析,证明融合菌株 ZFF-28 是遗传稳定的。

2.3 融合菌株 ZFF-28 的发酵条件优化

2.3.1 不同培养基的影响 配制不同的培养基,硒添加量 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 5~6,接种量 10%,装液量 50 mL/250 mL 三角瓶,培养 24 h。结果见表 3。不同培养基对菌株 ZFF-28 的生物量和硒含量有一定的影响。

表 1 不同酵母菌株的生物量及硒含量的比较

Table 1 Biomass and selenium content in different yeast strains

Strains	ZY-12	ZY-67	ZY-124	ZY-235	ZY-44	ZY-90	ZY-198	ZY-265
Biomass (g/L)	7.4 ± 0.1	8.2 ± 0.1	7.4 ± 0.2	7.6 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.4 ± 0.1
Se ($\mu\text{g}/\text{g}$)	676 ± 10	586 ± 6	594 ± 5	579 ± 6	1882 ± 9	1928 ± 8	2215 ± 7	2092 ± 7
Total Se ($\mu\text{g}/\text{L}$)	5002 ± 135	4805 ± 113	4396 ± 136	4400 ± 102	5834 ± 129	6362 ± 113	6424 ± 132	5021 ± 127

Note: The values shown are the average of triplicates.

表 2 亲株及融合菌株 ZFF-28 的生物量及硒含量的比较

Table 2 Biomass and selenium content of the parental strains and fusant ZFF-28

Strains	ZY-67	ZY-67-18	ZY-67-18-34	ZY-198	ZY-198-21	ZY-198-21-6	ZFF-28
Biomass (g/L)	8.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.2	3.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	5.9 ± 0.2
Se ($\mu\text{g}/\text{g}$)	589 ± 8	398 ± 7	412 ± 7	2212 ± 5	1450 ± 8	1574 ± 9	2300 ± 7
Total Se ($\mu\text{g}/\text{L}$)	4771 ± 121	1831 ± 79	1936 ± 81	6636 ± 135	2610 ± 112	3148 ± 124	13570 ± 133

表 3 不同培养基对菌株 ZFF-28 生物量和硒含量的影响

Table 3 Effects of media on the biomass and selenium content of ZFF-28

Media	YEPD	YEPS	YEPM	Molasses	Malt
Biomass (g/L)	5.7 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.0 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.4 ± 0.1
Se ($\mu\text{g}/\text{g}$)	2238 ± 8	1980 ± 7	1956 ± 8	2237 ± 6	2159 ± 8
Total Se ($\mu\text{g}/\text{L}$)	12757 ± 225	10692 ± 320	9780 ± 221	12230 ± 339	11659 ± 232

在 YEPD 培养基和糖蜜培养基中培养的菌株 ZFF-28 生物量、硒含量及硒总含量均较高。与 YEPD 和麦芽汁培养基比较,糖蜜培养基具有价格便宜、使用方便的优点。以下实验选取糖蜜为发酵培养基。

2.3.2 糖浓度的影响 配制不同糖浓度的糖蜜培养基,硒添加量 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 5~6,接种量 10%,装液量 50 mL/250 mL 三角瓶,培养 24 h。结果见图 1。由

图 1 可见,在培养基糖浓度低于 12% 时,随着糖浓度的增大,菌株 ZFF-28 的生物量呈上升趋势,但糖浓度达 14% 时,对其生长产生一定的抑制。细胞硒含量则随着培养基糖浓度的增加呈下降趋势。综合考虑生物量和硒含量,在 6% 糖浓度时达到最高的硒总含量。因此,以下实验的糖浓度定为 6%。

2.3.3 硒浓度的影响 采用糖浓度 6%, pH 5~6,接种量 10%,装液量 50 mL/250 mL 三角瓶,培养 24 h。结果见图 2。由

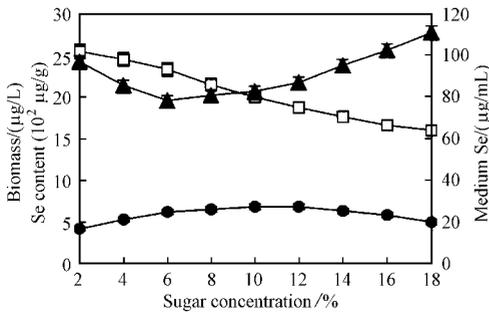


图1 不同糖蜜浓度对菌株 ZFF-28 生物量和硒含量的影响

Fig.1 Effects of sugar concentrations on the biomass and selenium content of ZFF-28

Biomass (●); Se content (□); Medium Se (▲)

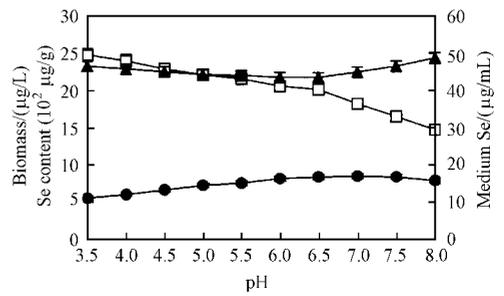


图3 初始 pH 对菌株 ZFF-28 生物量和硒含量的影响

Fig.3 Effects of initial pH on the biomass and selenium content of ZFF-28

Biomass (●); Se content (□); Medium Se (▲)

硒添加量不同的糖蜜培养基,接种量 10%,装液量 50mL/250mL 三角瓶,培养 24h。结果见图 2。

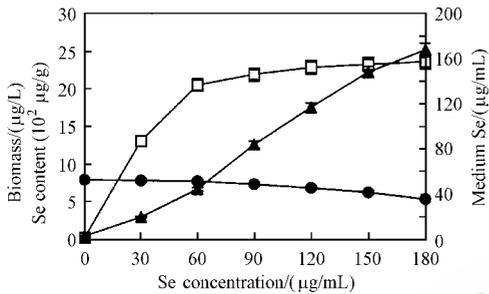


图2 不同硒添加量对菌株 ZFF-28 生物量和硒含量的影响

Fig.2 Effects of selenium concentrations on the biomass and selenium content of ZFF-28

Biomass (●); Se content (□); Medium Se (▲)

硒浓度低于 90μg/mL 时,对菌株 ZFF-28 的生物量没有显著影响;当培养基中的硒浓度在 90μg/mL 以上时,随着硒浓度的升高,生物量呈下降趋势。当培养基中硒浓度为 60μg/mL 时,菌株 ZFF-28 的生物量、硒含量达到较高水平。因此,培养基中添加 60μg/mL 硒为佳。

2.3.4 初始 pH 的影响 糖浓度 6% 的糖蜜培养基, 硒添加量 60μg/mL, pH 在 3.5 ~ 8.0 之间,装液量 50mL/250mL 三角瓶,接种量 10%,培养 24h。结果见图 3。由图 3 可见,初始 pH 对菌株 ZFF-28 的生长和富硒能力有一定影响。低 pH 有利于菌株 ZFF-28 对硒的吸收。当初始 pH 为 6.0 ~ 6.5 时,菌株 ZFF-28 的生物量较高,其硒总含量最高。因此,初始 pH 应控制在 6.0 ~ 6.5 为宜。

2.3.5 装液量的影响 糖浓度 6% 的糖蜜培养基, 硒添加量 60μg/mL, pH 为 6.0 ~ 6.5,装液量不同,培养 24 h,结果见图 4。实验证明,装液量大(低溶氧)

有利于菌株 ZFF-28 对硒吸收,但影响不显著;而装液量小(高溶氧)对菌株 ZFF-28 生物量的提高比较明显。装液量为 50mL/250mL 三角瓶时细胞硒总含量达到最高。在进一步的试验采用 50mL/250mL 三角瓶的装液量。

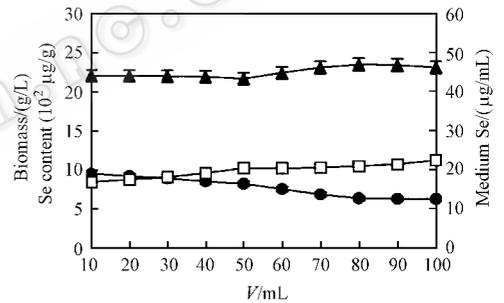


图4 装液量对菌株 ZFF-28 生物量和硒含量的影响

Fig.4 Effects of volumes on the biomass and selenium content of ZFF-28

Biomass (●); Se content (□); Medium Se (▲)

2.3.6 培养时间的影响 糖浓度 6% 的糖蜜培养基, 硒添加量 60μg/mL, pH 为 6.0 ~ 6.5,装液量 50 mL/250 mL 三角瓶,实验不同培养时间对菌株 ZFF-28 的生物量和硒含量的影响。结果见图 5。培养 25 h 硒总含量最高。培养时间延长,富硒量略有升高,但生物量却呈下降趋势。因此,培养 25 h 较合适。

2.4 正交试验设计

以上实验表明,培养基的 pH、糖浓度、硒浓度对菌株 ZFF-28 的生物量和硒含量有影响。选取以上几个因素的不同水平,同时增加氮源 (NH₄)₂SO₄ 的不同水平,利用 L₁₆(4³ × 2¹) 正交试验表,以确定各因素对菌株 ZFF-278 的硒总含量影响的显著性。

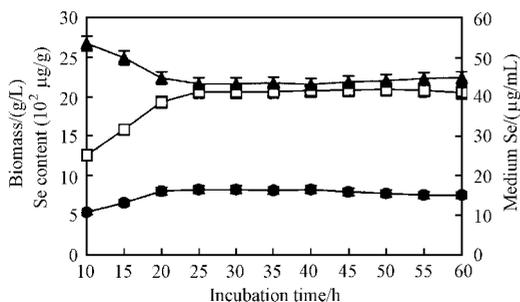


图5 不同培养时间对菌株 ZFF-28 生物量和硒含量的影响

Fig.5 Effects of incubation times on the biomass and selenium content of ZFF-28

Biomass(●); Se content(□); Medium Se(▲)

表4 正交试验 L₁₆(4³ × 2¹)表头设计Table 4 L₁₆(4³ × 2¹) orthogonal experiment

Level	Factor			
	A	B	C	D
	pH	Sugar concentration 1%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1%	Se (μg/mL)
1	4.5	2	0.2	30
2	5.5	4	0.4	60
3	6.5	6	0.6	
4	7.5	8	0.8	

表5 正交试验结果

Table 5 Total selenium content from the orthogonal experiments L₁₆(4³ × 2¹)

Factors				Total Se (μg/L)
A	B	C	D	
1	1	1	1	10396.48
1	2	2	2	16555.99
1	3	3	2	15185.04
1	4	4	1	13354.11
2	1	2	2	13563.62
2	2	1	1	9609.38
2	3	4	1	10729.29
2	4	3	2	16707.20
3	1	3	1	9575.06
3	2	4	2	16401.28
3	3	1	2	15957.99
3	4	2	1	13407.75
4	1	4	2	14095.6
4	2	3	1	94013.00
4	3	2	1	9157.39
4	4	1	2	17711.00

表6 正交试验的方差分析表

Table 6 Variance analysis of the total selenium content on the orthogonal experiments

Source	SS ^a	df ^b	MS ^c	F	Significance level
A	6.0855	3(f ₁)	2.0285	0.43	
B	25.170	3(f ₁)	8.3901	1.77	
C	1.8968	3(f ₁)	0.6323	0.40	**
D	102.7550	1(f ₁)	102.7550	21.72	
Error	23.6516	3(f ₂)	4.7303		
Total	159.5591	15			

The total selenium figures from the experiments were diluted 1000 times.

^aSum of square; ^bDegree of freedoms; ^cMean square

** Significance level (F > F_{0.01})

由 F 检验可以看出因素 D 对菌株 ZFF-28 的硒总含量影响非常显著。以上的单因素实验表明, pH、糖浓度对菌株 ZFF-28 的生物量和硒含量都有影响, 但影响趋势是相反的, 正交试验结果表明, 这两个因素对硒总含量的影响不显著。在选取的氮源水平范围内, 对硒总含量的影响不显著。

2.5 菌株 ZFF-28 有机硒含量和无机硒含量分析

在以上实验的基础上, 确定了菌株 ZFF-28 的培养优化条件: 6% 糖浓度的蔗糖糖蜜, 添加 0.5% (NH₄)₂SO₄、0.1% H₃PO₄、60 μg/mL Se, 调节 pH 6.0 ~ 6.5 装液量 50 mL/250 mL 三角瓶, 接种量 10%, 培养 25 h。在此优化培养条件下, 菌株 ZFF-28 的生物量达 8.2 g/L, 细胞硒含量达 2050 μg/g, 硒总含量达 16810 μg/L, 其中 91% 为有机硒, 无机硒含量占细胞硒含量的 9%。结果表明在培养过程中, 细胞吸收的大部分无机硒已被转化为有机硒。

3 讨论

自从确认硒是谷胱甘肽过氧化物酶的重要组份以来^[15], 有关硒的研究受到广泛的重视, 但采用育种技术选育高生物量的富硒酵母, 目前国内外尚未见报道。我们运用原生质体融合育种技术成功构建了高生物量的富硒酵母融合菌株 ZFF-28, 这在国内外尚属首次。

通过培养条件实验, 分析了不同培养条件对菌株 ZFF-28 的生物量、硒含量的影响。结果表明, 培养条件对其有一定影响。富硒酵母 ZFF-28 的富硒能力和抗硒能力均达到了较高水平。Suhajda A 等^[9]在培养基中添加 30 μg/mL 硒时, 获得的富硒酵母硒含量为 1200 ~ 1400 μg/g。在本实验中, 培养基中添加 60 μg/mL 硒, 菌株 ZFF-28 的硒含量可达

2000 $\mu\text{g/g}$ 。当培养基中硒浓度高于 90 $\mu\text{g/mL}$ 时,才对菌株 ZFF-28 生物量有明显抑制。融合菌株 ZFF-28 抗硒能力强,生物量和硒含量均较高。

在优化培养条件下,高硒酵母 ZFF-28 生物量可达 8.2g/L,硒含量达 2050 $\mu\text{g/g}$,硒总含量达到 16810 $\mu\text{g/mL}$ 。有机硒含量占细胞硒含量的 91% 以上,与 Suhajda A 等^[9]的结果基本一致。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Marinho S H , Antunes F , Pinto R E . Role of Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Rad Biol & Med* , 1997 , **22** : 871 – 883
- [2] Finley J W , Davis C D , Feng Y . Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J Nutr* , 2000 , **130**(9) : 2384 – 2389
- [3] Wright G S , Gruidl M E . Early detection and prevention of lung cancer. *Curr Opin Oncology* , 2000 , **12**(2) : 143 – 148
- [4] Ip C , Birringer M , Block E *et al.* Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *J Agr Food Chem* , 2000 , **48**(6) : 2062 – 2070
- [5] Janz B , Suhajda , Pais I . In : Yeasts enriched with microelements , Food Technology International Europe , 1993 , pp. 173 – 177
- [6] Knowles S O , Grace N D , Wurms K *et al.* Significance of amount and form of dietary selenium on blood , milk , and casein selenium

- concentrations in grazing cows. *J Dairy Sci* , 1999 , **82**(2) : 429 – 437
- [7] Bronzetti G , Cini M , Andreoli E *et al.* Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mutat Res* , 2001 , **496**(1/2) : 105 – 115
- [8] LI S M (李淑敏) . A study and prospect trace element enriched yeast. *Microbiology* (微生物学通报) , 1999 , **26**(3) : 220 – 222
- [9] Suhajda A , Hegóczy J , Janzós B *et al.* Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Trace Elem Med Bio* , 2000 , **14**(1) : 43 – 47
- [10] XIAO F Z (肖方正) , LIU Q K (刘曲滨) . Studies on development of selenium yeast and its application. *Chinese Journal of Guangdong Trace Element Science* (广东微量元素科学) , 2001 , **8** : 7 – 9
- [11] JIA P X (贾盘兴) , CAI J K (蔡金科) , MA D Q (马德钦) *et al.* The Experimental Techniques of Microbial Genetics. Beijing , Science Press , 1992
- [12] ZHUGE J (诸葛健) , WANG Z X (王正祥) . Experiment handbook of Industrial Microbiology (工业微生物实验技术手册) . Light Industry Press , 1997
- [13] Laurence M C , John L M . An improved method for determination of Selenium in biological material. *Anal Chem* , 1965 , **3** : 137
- [14] XIE L Q (谢丽琪) , OUYANG Z (欧阳政) , XIE X Z (谢秀桢) . Studies on assimilation of inorganic selenium by yeast. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) , 1990 , **31**(1) : 36 – 40
- [15] Rotruck J T , Pope A L , Ganther H E *et al.* Selenium : Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* , 1973 , **179** : 588 – 590

The Breeding and Culture Condition Optimization of a High-biomass , Selenium-enriched Yeast Strain

FAN Xiu-Ying^{1,2} GUO Xue-Na¹ FU Xiu-Hui¹ HE Xiu-Ping¹ WANG Chang-Lu² ZHANG Bo-Run^{1*}

(¹ Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Tianjin University of Science and Technology , Tianjin 300222 , China)

Abstract The yeast fusant ZFF-28 , which is high in biomass production and rich in selenium , was constructed after mutagenesis and protoplasts fusion between yeast strains . The total selenium content of ZFF-28 is 1.8 and 1.0 times higher than that of the parental strains *Saccharomyces cerevisiae* ZY-67 and *Saccharomyces kluyveri* SZY-198 respectively . Using single factor tests and a $L_{16}(4^3 \times 2^1)$ orthogonal design , the cultivation conditions was optimized as : 50mL culture in 250mL shake flasks in molasses containing 6% sugar and 60 $\mu\text{g/mL}$ Se at 28 $^\circ\text{C}$ for 25h at 220 r/min , with the initial pH adjusted to 6.0 ~ 6.5 . Under the optimized conditions , the biomass (dry weight) reached 8.2g/L and the Se content of the cells reached 2050 $\mu\text{g/g}$, with organic and inorganic Se contents being 91% and 9% respectively .

Key words selenium-enriched yeast , breeding , cultivation condition

Received : 06-20-2003

This work was supported by a grant from the " Knowledge Innovation Project (KIP)" of the Chinese Academy of Sciences (No. C0306) .

* Corresponding author . Tel : 86-10-62637679 ; Fax : 86-10-62637679 ; E-mail : zhangbr@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>