

文章编号:1673-1689(2006)06-0097-05

富锌酵母的选育及其培养工艺

孔林, 郝勃, 喻子牛*

(华中农业大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:以紫外诱变配合驯化的方法获得富锌酵母 HB524,并在单因素研究的基础上通过正交实验确定了该菌株富锌培养的最佳条件为:麦芽汁 4 Bx,葡萄糖 25 g/L,尿素 1.0 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,不加豆芽汁,接种体积分数 10%,6 mmol/L 锌在接种后 4 h 内加入,48 h 摇瓶培养后富锌总量可达到 130 mg/L。球磨法破壁及锌的浸出结果表明,至少 47.84%的锌是有机态形式结合的,其余锌松散结合在细胞壁或游离于细胞内部。

关键词:富锌酵母;紫外线诱变;培养

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Screening of Zinc-Enriched Yeast and Studies on the Cultivation Condition

KONG Lin, HAO Bo, YU Zi-niu*

(College of Life Science and Technology Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A zinc-enriched yeast strain, namely HB54, was isolated from UV mutation and domestication. Then the nutritional and environmental conditions were optimized with single factor experiment and orthogonal design. A total zinc of 130 mg/L was achieved at 48 h in flask culture with the optimum conditions: 4 Bx malt, 25 g/L glucose, 1.0 g/L urea, 0.5 g/L KH_2PO_4 , 10% inoculum size and 6 mmol/L Zn^{2+} was added at 4 h after inoculation. The results from the mechanical ball milled yeast cells and the leaching of zinc illustrated that more 47.84% zinc in organic and the rest zinc was adhered to the cell wall or dissociated in the cell.

Key words: zinc-enriched yeast; UV mutation; cultivation

锌广泛存在于生命体内,其含量过低会造成人和动物免疫力的降低,诱发腹泻,并影响机体正常的生长发育。目前我国儿童缺锌现象仍较突出,另外苏琪等^[1]调查后指出我国饲料需锌量的 1/3 以上要人为添加。无机锌在人工补锌的历史上发挥了不可磨灭的功绩,但吸收率低且易刺激胃黏膜引起呕吐等许多弊端使人们对有机态的氨基酸及糖

类络合微量元素产生了兴趣。而富含多种营养物质的微生物特别是酵母因其制造成本低廉又能富集硒、铬、锌等多种微量元素引起人们更加广泛的关注。

目前,硒、铬、锌等酵母已有产品问世,其中国内生产用的锌酵母富锌水平为 4.5~5 mg/g^[2],但微量元素酵母的质量鉴定还存在较大困难。

收稿日期:2006-03-22; 修回日期:2006-04-29.

作者简介:孔林(1981-),男,安徽巢湖人,微生物工程硕士研究生;*为通讯作者。

Demirci 和 Pometto^[3]详细报道了判断有机铬含量的乙醇浸提法;Ponce^[4]等尝试了细胞壁酶解后用 ICP-MS 的方法鉴定有机硒的含量。而有机锌的鉴定还少有报道,这与酵母富锌的机制没有完全阐明有一定关系。作者用紫外线诱变并通过高浓度锌正向诱导获得富锌效果良好的菌株;重点对其培养工艺进行了优化并探讨了酵母中有机态锌的检测,希望为富锌酵母的生产与质量评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)HB52,作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 ZnSO₄贮备液(1 mol/L,浓硫酸调 pH 4,于 115 ℃灭菌 20 min);金属锌粒(纯度 99.8%)。

1.1.3 主要仪器 北京普析通用 TAS-990 原子吸收分光光度计、武汉科学仪器厂生产的 HQL150B 大振幅恒温冷冻摇床、南京大学仪器厂生产的 QM 行星式球磨机。

1.1.4 培养基 麦氏培养基、豆芽汁葡萄糖培养基、麦芽汁培养基按文献[5]配制。

1.2 实验方法

1.2.1 富锌酵母的诱变选育 以酿酒酵母 HB52 为出发菌株,采用涂平板的方法确定锌离子耐受性后进行紫外线诱变。用两倍耐受浓度的锌筛选,挑取较大的菌落转接更高浓度的锌平板进行传代驯化,最终获得抗高浓度锌的菌株。

1.2.2 酵母培养 斜面菌种一环接入 50 mL 麦芽汁中,28 ℃、180 r/min 摇瓶 24 h,按 10%接种量转接于发酵培养基(三角瓶装液量 20%),加入 ZnSO₄贮备液至规定的浓度,28 ℃,180 r/min 培养 48 h。4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,等体积去离子水洗涤 3 次,转移至洁净平皿,60 ℃烘干至恒重后计算生物量。

1.2.3 酵母含锌量的测定 浓 HNO₃-70% HClO₄(4:1)湿法消化^[6],0.5% HNO₃定容,原子火焰吸收法测定。

1.2.4 细胞中锌的浸出 酵母干样 0.1000 g 于 50 mL 离心管中,分别加去离子水和过量 EDTA 溶液 10 mL,28 ℃摇床中 180 r/min 振荡 16 h,取出后 4 000 r/min 离心 5 min,沉淀加 10 mL 去离子水混匀后同法离心,合并上清液。上清液和沉淀分别消化定容测锌含量。

1.2.5 酵母细胞破碎 中性磷酸盐缓冲液(含

10%甘油,20 mmol/L MgCl₂)中星式球磨机 400 r/min连续破碎 24 h,血球板法^[5]统计完整细胞计算破碎率。细胞碎片等的分离测定参照文献[7]进行。

1.2.6 发酵条件的优化 在单因素研究的基础上,采用表 1 正交设计 L₁₈(2¹×3⁷)观察 A:10%豆芽汁、B:葡萄糖(g/L)、C:尿素(g/L)、D:麦芽汁(Bx)、E:磷酸二氢钾(g/L)、F:加锌时间(h)对酵母生物量及富锌能力的影响,进而确定最优的培养条件。

表 1 正交试验因素、水平表 L₁₈(2¹×3⁷)

Tab. 1 Factors and levels in orthogonal design

水平	A	B	C	D	E	F
1	0	25	0	6	0	0
2	10	50	1	4	1	4
3	0	75	2	2	2	8

2 结果与分析

2.1 酵母对锌的耐受性及细胞锌含量

出发酵母 HB52 能耐较高浓度的锌,培养时间足够长几乎都能生长,因此耐受性测定的时间限定为 72 h。72 h 内能观察到菌落的最高锌浓度记为耐受浓度。麦氏培养基上 HB52 的耐锌浓度为 5 mmol/L。经多次诱变筛选后提高浓度反复驯化,最终得到几株在 25 mmol/L 锌浓度环境中生长良好,3 次转接无锌斜面后抗锌性能稳定的突变株,编号 HB521、HB522、HB523、HB524、HB525 后与 HB52 分别接种于 50 mL 麦氏培养基中,28 ℃,180 r/min 培养 24 h 后,加入 ZnSO₄贮备液,使终浓度为 4 mmol/L,继续培养 48 h 后测定生物量和含锌量,结果见表 2。

表 2 突变株培养的生物量和含锌量

Tab. 2 Biomass and zinc content of mutant strains

酵母 编号	生物量/ mg	相对 干重/%	富锌总 量/mg	相对富 锌量/%
HB521	65.9	260.5	2.59	45.4
HB522	76.2	301.2	3.43	60.2
HB523	63.8	252.2	3.02	53.0
HB524	72.6	287.0	3.57	62.6
HB525	56.4	222.9	1.67	29.3
HB52	25.3	100.0	0.057	1.0

表 2 数据表明,抗性菌株在高锌环境下表现出

较强的耐受性,生物量是出发菌株的 2~3 倍,并且富锌总量是出发菌株的 30~60 倍,表现出很强的富集能力。后续研究采用富锌能力最强的 HB524 为供试菌株。研究发现,用麦氏培养基培养时生物量很低,并且随着酵母的增殖,发酵液的 pH 值不断升高,可达 9.0 以上,添加 KH_2PO_4 仍不能有效降低 pH 值。如此高的含锌量是不是由 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 或碱式醋酸锌等沉淀引起的,目前还没有公认的方法来验证。

2.2 不同培养基的富锌效果

豆芽汁和麦芽汁都是酵母的优良培养基,且发酵过程中的 pH 值均小于 6。表 3 所示的是豆芽汁葡萄糖培养基中 HB524 在不同锌离子浓度下发酵 48 h 的结果。

表 3 突变株 HB524 在不同锌浓度中的富锌效果
Tab. 3 Effect of zinc concentration on zinc uptake of mutant strain HB524

锌浓度/ (mmol/L)	生物量/ (g/L)	富锌率/ (mg/g)	富锌总量/ (mg/L)
1.0	8.72	1.08	9.42
2.0	6.62	7.33	48.52
4.0	4.93	11.58	57.09
6.0	1.36	12.14	16.51
8.0	2.79 [#]	15.30	42.68

注: # 表示 48 h 看不到生长,延长培养时间为 6 d。

表 3 的数据表明,HB524 在酸性条件下仍有很好的富锌能力。应当指出的是,当豆芽汁中添加 5.0 g/L 尿素时发酵终点 pH 值为 8.5,但加锌 1 mmol/L 时酵母含锌也只有 1 mg/g 左右;而同样锌浓度的麦氏培养基在发酵后调至 pH 3 再洗涤,细胞含锌仍有 7.17 mg/g。以上现象初步排除了碱性沉淀物的可能,但不清楚富集机理,发酵中仍避免使用麦氏培养基。HB524 在麦芽汁中富锌率有所下降,但抗性增强,6 mmol/L 锌环境中仍有较高的生物量,并且锌的转化率在 20% 以上,因此后续研究采用麦芽汁作为培养基,加锌浓度为 6 mmol/L。

2.3 接种体积分数和加锌时间对富锌效果的影响

用 6 Bx 麦芽汁 10% 接种体积分数,分别在接种 0,4,8,12 h 以及梯度的方式(前 3 个时间点分别加入 1,2,3 mmol/L 的锌)加入 6 mmol/L 的锌离子培养 48 h,测定生物量和含锌量,结果见图 1。图 2 显示的是相同条件下不同接种体积分数对 HB524 生物量和富锌量的影响。

由图 1 可知,加锌时间的延后减少了锌对酵母

生长的抑制,但对锌的富集并没有益处,与生物量微弱增加对应的是细胞含锌率的急剧下降。即使采用梯度加锌或相应延长发酵时间的方式也未能达到生物量和富锌率双丰收的愿望。这说明锌在 HB524 中的富集不是锌化合物在细胞表面的简单堆积,而是与菌体生长密切相关的。很可能是高浓度的锌对 HB524 的高效富锌产生了某种诱导作用。

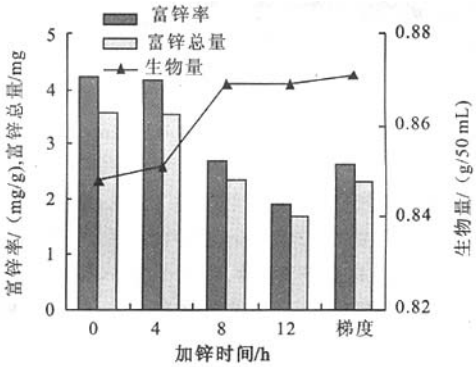


图 1 加锌时间对酵母富锌的影响
Fig. 1 Effect of the zinc feeding time on zinc uptake

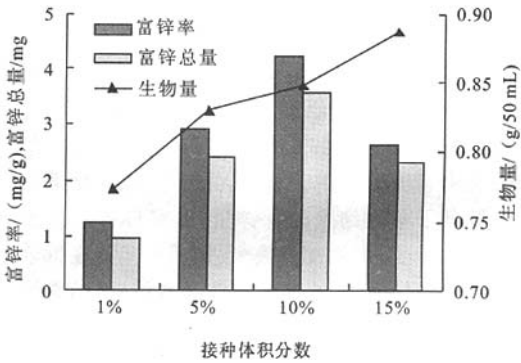


图 2 接种量对酵母富锌的影响
Fig. 2 Effect of the inoculum size on zinc uptake

由图 2 可知,接种量对生物量和富锌率都有较大影响,这与文献[6]的报道有所不同。随着接种量的增加,菌体收获量也随之增加,但富锌总量在接种量 10% 时达到峰值。综合加锌时间的结果,可以看出 HB524 的富锌量与生物量并不成正比关系,说明细胞表面的配位结合不是酵母富锌的主要机制。

2.4 麦芽汁糖度对富锌效果的影响

为获得更多的酵母锌,适应现代高密度生物发酵的需要,拟采用营养更丰富的高糖度麦芽汁研究,但事与愿违,于是将麦芽汁稀释成不同浓度后进行培养,结果见图 3。

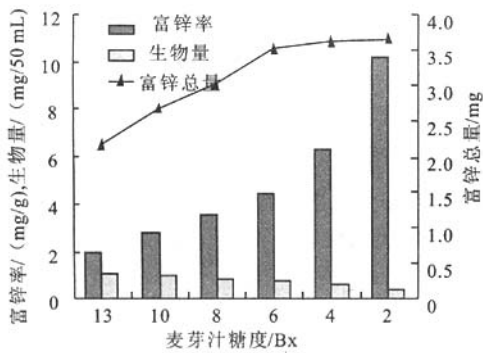


图 3 麦芽汁糖度对酵母富锌培养的影响

Fig. 3 Effect of the Brix of malt on zinc uptake

由图 3 可知,随着麦芽汁稀释度的加大,HB524 生物量逐渐下降,而细胞富锌的能力却不断增加;总的趋势是低糖度的麦芽汁有利于获得更多的酵母锌,只是当麦芽汁糖度低于 6 Bx 后增加不明显。朱靖环等^[8]报道,麦芽汁中添加一定营养成分对酵母富铬有促进作用;因此将低糖度麦芽汁作为培养基的一个组分,再添加其他营养物可能是酵母富锌的最佳选择。

2.5 葡萄糖、尿素、磷酸盐对富锌的影响

考察了 6 Bx 麦芽汁中分别添加葡萄糖(0,25,50,75,100 g/L)、尿素和磷酸氢二钾(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 g/L)对富锌的影响,结果见图 4~6。

随着葡萄糖的添加,HB524 生物量持续下降,而细胞含锌率和含锌总量都在 50 g/L 时达到最大值;与葡萄糖的作用正相反,尿素提高生物量的同时,降低了单位细胞的含锌量,以酵母锌总量为指标时,2.0 g/L 的添加量最为适宜;磷酸盐在低浓度时能同时促进酵母的生长和锌的富集,而随着量的继续增加富锌效果反而变差。

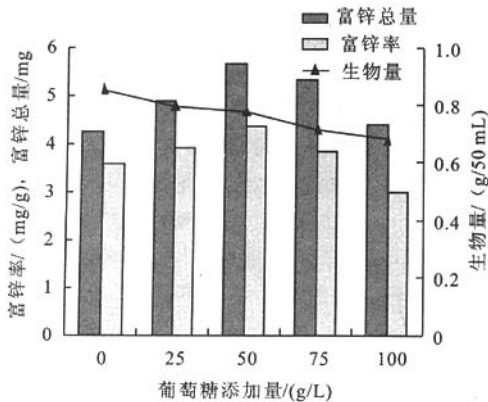


图 4 葡萄糖对酵母富锌的影响

Fig. 4 Effect of glucose concentration on zinc uptake

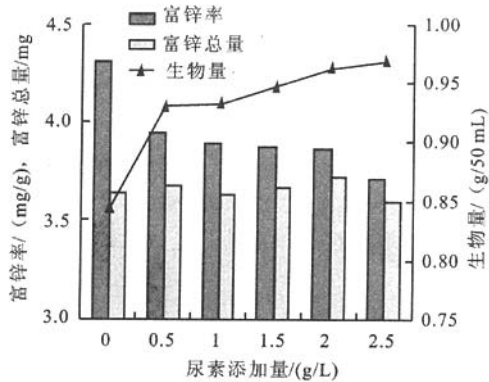


图 5 尿素对酵母富锌的影响

Fig. 5 Effect of urea concentration on zinc uptake

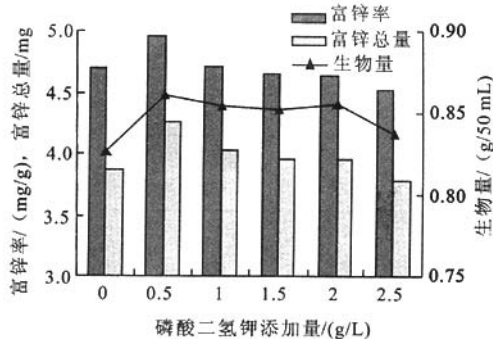


图 6 磷酸盐对酵母富锌的影响

Fig. 6 Effect of KH_2PO_4 concentration on zinc uptake

2.6 酵母富锌条件的优化

考虑到 HB524 在豆芽葡萄糖培养基中的低生物量和高富锌率,在正交设计时将豆芽汁作为一个因素,实验安排及结果见表 4。

表 4 酵母富锌培养的正交实验

Tab. 4 Orthogonal experiment for culturing of HB524

序号	A	B	C	D	E	F	生物量/ (g/50mL)	富锌率/ (mg/g)	富锌总 量/mg
1	1	1	1	1	1	1	0.79	5.56	4.39
2	1	1	2	2	2	2	0.81	6.23	5.05
3	1	1	3	3	3	3	0.67	5.61	3.76
4	1	2	1	1	2	3	0.68	3.54	2.41
5	1	2	2	2	3	1	0.86	6.80	5.85
6	1	2	3	3	1	2	0.53	7.49	3.97
7	1	3	1	2	1	3	0.55	5.94	3.27
8	1	3	2	3	2	2	0.56	7.66	4.29
9	1	3	3	1	3	1	0.66	4.67	3.08
10	2	1	1	3	3	2	0.60	7.92	4.75
11	2	1	2	1	1	3	0.73	8.93	6.52

续表 4

序号	A	B	C	D	E	F	生物量/ (g/50mL)	富锌率/ (mg/g)	富锌总 量/mg
12	2	1	3	2	2	1	0.83	5.52	4.58
13	2	2	1	2	3	3	0.75	4.21	3.16
14	2	2	2	3	1	1	0.52	6.35	3.30
15	2	2	3	1	2	2	0.74	3.66	2.71
16	2	3	1	3	3	1	0.49	3.83	1.88
17	2	3	2	1	1	2	1.04	3.81	3.96
18	2	3	3	2	2	3	0.91	2.77	2.52

运用 SPSS 软件的 Univariate 过程对表 4 进行方差分析和直观性统计分析。从分析结果看,葡萄糖对富锌总量的影响具有显著性($p<0.05$),尿素的影响次之($p<0.1$);豆芽汁的影响不显著,其作用是增加生物量,降低富锌率,总的结果是降低了锌的富集。磷酸盐和加锌时间对实验各指标的影响均不显著。

以富锌总量为指标时,选择最佳配比为 $A_1B_1C_2D_2E_1F_2$,再综合单因素研究结果,可以确定酵母 HB524 富锌的培养条件为:麦芽汁 4 Bx,葡萄糖 25 g/L,尿素 1.0 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,不加豆芽汁,接种量 10%,6 mmol/L 锌宜在接种后 0~4 h 内加入,富锌总量可达 130 mg/L,与文献[9]报道的 133 mg/L 相当。

2.7 细胞破壁及酵母结合锌的分析

生物有机态微量元素含量的测定通常采用静置浸出法^[7],该法简便但难以排除微量元素沉淀的干扰。作者对该法稍加改进并引入 EDTA 对 HB524 中的锌进行分析,结果见表 5。

表 5 EDTA 和水对锌浸出的影响

Tab. 5 Leaching of zinc with EDTA and water

处理方式	上清液富锌率/ (mg/g)	细胞富锌率/ (mg/g)	细胞残 留锌/%
EDTA 短时	3.86	1.82	31.97
EDTA 振荡	5.36	0.25	4.51
水短时	2.54	2.92	53.50
水振荡	2.92	2.68	47.84

由表 5 知,锌酵母与 EDTA 混匀后洗涤两次,锌总量的 31.97% 存留在细胞中;而振荡 16 h 后绝大部分锌被洗涤除去。说明振荡后大量锌从细胞内部释放出来,或者由于螯合在细胞壁上的锌元素被 EDTA 竞争结合后洗涤到上清液中。同法用水研究,短时作用后,50% 以上的锌留在细胞中;震荡 16 h 后,细胞残留锌仍占到一半左右。在酵母干燥

前的多次洗涤中,细胞表面的游离锌已基本被洗净,而 50% 左右的锌仍能被水洗涤出来,这只能来源于细胞内部。这部分锌很可能是液泡破碎或细胞质中的游离锌或含锌小分子由于干燥引起的细胞通透性增加而释放出来的^[2]。

为进一步研究细胞中锌的结合状态,作者尝试了研磨、微波加热、超声波、化学试剂处理等来破碎细胞壁,但效果不明显。其中超声波破碎率可达 80%,但菌体炭化严重。行星球磨机破壁,镜检结果较为理想,见图 7。

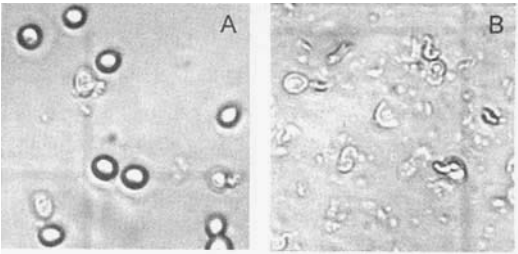


图 7 酵母球磨破碎的显微镜观察结果(40×16,A 作用 1 h,B 作用 48 h)

Fig. 7 Micrographs of mechanical ball milled yeast (40×16,A for one hour,B for 48 hours)

湿酵母于 500 r/min 作用 1 h,破碎率为 14%,24 h 时破碎率达 95%;48 h 后只剩下个别空细胞和许多细胞壁碎片,但离心后有黑色沉淀,可能是部分细胞被炭化。干酵母用缓冲液 400 r/min 球磨 24 h,破碎率也能达到 90% 以上。HB524 经该法破碎后,细胞碎片含锌量占到酵母含锌总量的 81.45%。White 和 Gadd^[10]认为,在微量锌的条件下,60% 的锌贮存于液泡中;张之申等^[11]认为,高浓度情况下酵母富锌主要是细胞壁中的多糖和蛋白质起络合作用的结果。仅以上数据还难以判断细胞壁或液泡在 HB524 富锌中的作用,其富锌的机理还有待进一步研究。

3 讨 论

1) 稀释后的麦芽汁适当添加其他营养成分更有利于酵母对锌的富集;而添加葡萄糖改变麦芽汁的糖度和麦芽汁自然糖度对锌的富集规律并不相同,可能是麦芽汁中其他成分协同作用的结果。

2) 球磨法可以破碎酵母细胞壁,但用来研究锌的状态时与浸出法的结果似有矛盾,可能是细胞破碎后暴露出更多的配位基团将部分释放出的锌重新螯合的结果。该方法是否适用于细胞中微量元素分布的研究有待更多的实践检验。

(下转第 123 页)

参考文献:

- [1] Hass G M, Ryan C A. Carboxypeptidase inhibitor from potatoes[J]. *Methods in Enzymology*, 1982, 80:788—791.
- [2] Bajzar L, Manuel R, Nesheim M E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:14477—14484.
- [3] Bouma B N, Marx P F, Mosnier L O, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor(TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U)[J]. *Thromb Res*, 2001, 101(5): 329—354.
- [4] Molina M A, Aviles F X, Querol E. Expression of a synthetic gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor using a bacterial secretion vector[J]. *Gene*, 1992, 116:129—138.
- [5] 陈永发,孙钧铭,唐瑜菁,等. 马铃薯中羧肽酶抑制剂的放射免疫分析[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 402—404.
- [6] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] 石继红,赵永同,张英起,等. 应用 SDS-PAGE 显示小分子多肽技术的探讨[J]. 生物工程进展, 2001, 21(1):38—40.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein Utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248—254.
- [9] 朱丽平. 常用免疫学实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 2000.
- [10] Leurs J, Nerme V, Sim Y, et al. Carboxypeptidase U (TAFIa) prevents lysis from proceeding into the propagation phase through a threshold-dependent mechanism[J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2:416—423.

(责任编辑:朱明)

(上接第101页)

3) 锌的浸出研究表明, HB524 中的锌可以缓慢释放, 并且 95.5% 的锌可以被 EDTA 洗涤置换出来。采用细菌鉴定中产 H_2S 的实验^[12]后, 排除

了 ZnS 沉淀的可能, 加上发酵中酸性条件的保证, 可以认为用去离子水充分震荡后, 细胞中接近 50% 的锌是以有机态形式存在的。

参考文献:

- [1] 苏琪,段玉琴,刘金旭,等. 我国畜禽饲料重微量元素锌含量的调查研究[J]. 中国农业科学, 1994, 27(2):83—88.
- [2] 于景芝. 酵母生产与应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005. 243—463.
- [3] Demirci A, Pometto A L. Enhanced organically bound chromium yeast production[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:531—536.
- [4] Ponce C A, Bayon M M, Paquin C, et al. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods[J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 92:602—610.
- [5] 李卓棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 1996. 45—46.
- [6] 陈佩林,詹文毅,叶辉. 含锌酵母的培养研究[J]. 动物医学进展, 2003, 24(3):62—64.
- [7] 丁文军,钱琴芳,柴之芳,等. 富铬酵母中铬的化学种态及结合形态研究[J]. 分析化学, 1999, 27(9):1061—1064.
- [8] 朱靖环,沈秋泉,杨建明,等. 啤酒酵母富铬条件的初步研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(2):49—52.
- [9] 郭雪娜,傅秀辉,何秀萍,等. 富锌酵母的选育及培养条件研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(2):240—243.
- [10] White C, Gadd G M. The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Gen Microbiol*, 1987, 133:727—737.
- [11] 张之申,郭锡勇,李向东,等. 锌酵母中酵母多糖组分的分离纯化和分析[J]. 微量元素与健康研究, 1995, 12(1):48—49.
- [12] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社, 2002. 154—155.

(责任编辑:李春丽)