

利用原生质体诱变育种选育富硒能力强的酵母菌株*

高玉荣 李大鹏

(黑龙江八一农垦大学食品学院 大庆 163319)

摘要: 利用原生质体诱变育种技术选育富硒能力强的酵母菌株, 从 13 株啤酒酵母中筛选出一株富硒量高的诱变出发菌株, 采用溶壁酶进行破壁, 确定了原生质体制备的最适条件为酶浓度 1 g/100 mL, 酶解处理时间为 120 min, 原生质体形成率为 95.2%, 再生率为 21.8%, 诱变后筛选出富硒量为 821 mg/kg, 酵母干菌体收获量为 0.88 g/100 mL 的酵母菌 A1。

关键词: 原生质体, 诱变, 育种, 富硒

中图分类号: TQ926.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0010-05

Breeding Selenium-Enriched Yeast by Protoplast Mutagenesis.

GAO Yu-Rong LI Da-Peng

(Food College of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract: This paper studied on breeding selenium-enriched yeast by protoplast mutagenesis. A strain which the content of selenium is the highest is selected from thirteen strains yeast. The optimum conditions to form protoplast are lysed by 1 g/100 mL lywallzyme for 120 min, the formation and regeneration being 95.2% and 21.8% respectively. By mutating breed a strain of A1 which the content of selenium is 821 mg/kg and the amount of dry cell of 0.84 g/100 mL is obtained.

Key words: Protoplast, Mutate, Breed, Selenium-enriched

随着医学技术的发展, 微量元素硒对人体的重要性已逐渐被证实, 硒是人体必需的微量元素, 是人体内谷胱甘肽过氧化酶的重要组成部分, 此酶能防止体内脂质过氧化酶对细胞和亚细胞膜系统的破坏作用, 保持生物膜系的完整性, 从而具有增强机体免疫力和抗衰老的作用^[1]。研究发现硒营养强化剂具有防癌、对甲状腺疾病的治疗作用、抗氧化、防治心脑血管疾病等作用。硒营养强化剂主要有 3 种即无机态亚硒酸钠、有机态硒及富硒酵母, 其中富硒酵母中所含的硒具有吸收性好、性质稳定, 在缺硒人体上生物反应较好, 无毒副作用的优点^[2]。这种富硒形式由于借助对人体有益的微生物作为载体, 其本身富含蛋白质、糖类、维生素及其它有益的营养物质, 除了可以作为有机微量元素来源使用外, 还同时提供人体其它有益的营养及促生长物质。国外于 70 年代开始研究富硒酵母, 90 年代后期, 美国、日本、德国已有硒酵母出售, 含硒量为 1,000 mg/kg。我国对硒酵母的研究较晚, 目前, 我国也有硒酵母, 但含硒量较低, 生产成本较高。

诱变育种一直是工业育种中常用的手段, 原生质体诱变育种克服了细胞壁对诱变剂的障碍, 显著提高诱变率。本文以亚硒酸钠为无机硒源, 利用原生质体诱变育种的

* 黑龙江省教育厅科学研究项目 (No. 9553017)

收稿日期: 2004-05-17, 修回日期: 2004-06-30

方法选育富硒能力强的酵母菌株，以期用于工业化生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：AS2.440，AS2.11，AS2.15，AS2.145，AS2.161，AS2.412，AS2.417，AS2.420，AS2.595，AS2.365，AS2.180，AS2.430，AS2.240。

1.1.2 培养基：固体斜面培养基：10°Brix 麦芽汁中加入 2% 琼脂。液体培养基：10°Brix 麦芽汁培养基。

1.2 方法

1.2.1 洗脱曲线的绘制：将 AS2.440 菌在 500 mg/kg 硒培养液中 25℃，120 r/min 条件下恒温振荡培养 24 h 后的发酵液，3,500 r/min 离心 10 min，分别收集上清液和菌体。菌体采用蒸馏水离心洗涤 8~10 次，洗脱液依次收集，测定其中的硒浓度。以洗脱次数为横坐标，以上清液中的硒浓度为纵坐标绘制洗脱曲线。

1.2.2 富硒能力强的出发菌株的筛选：将 13 株酵母菌活化，转接 1 环至装有 20 mL 麦芽汁液体培养基的 150 mL 小三角瓶中进行扩大培养，然后再转接入装有 200 mL 麦芽汁液体培养基的 500 mL 大三角瓶中进行培养（在 500 mL 大三角瓶中加入 500 mg/kg 的经烘干并灭菌的亚硒酸钠）。25℃，120 r/min 恒温振荡培养 24 h，收集 100 mL 菌悬液，离心、洗涤并烘干测定菌体产量和菌体富硒量。

1.2.3 菌株原生质体的制备及诱变育种实验：（1）菌体生长曲线的绘制^[3]；（2）原生质体的制备^[4]；（3）诱变预备实验：将 AS2.161 菌原生质体悬浮液在 15 W 紫外灯距离为 30 cm 的条件下诱变，以诱变时间为横坐标，以致死率为纵坐标绘图。（4）初筛、复筛及生产性能的测定：初筛：将诱变后的菌悬液培养在加有一定浓度硒的麦芽汁琼脂固体平板上，培养 3 d，观察其生长情况。复筛：提高平板上硒的浓度，进行培养，挑出能生长的菌株。菌体收获量及富硒量的测定：菌培养在含硒 1,400 mg/kg 的麦芽汁液体培养基中 25℃，120 r/min 培养 24 h，用无菌水离心洗涤 8 次后烘干，测酵母的收获量和酵母的富硒量。

2 结果与讨论

2.1 洗脱曲线的测定

在实验中采用振荡浸出离心分离法，对收获的酵母进行多次洗涤，尽可能去除吸附于细胞表面的无机硒。在实验中收集洗脱液，测定其中硒浓度，绘制洗脱曲线，以确定适宜的洗脱次数。洗脱曲线如图 1 所示。从图 1 可以看出，随着洗脱次数的增加，洗脱液中的硒浓度越来越低，在洗脱过程中，1~7 次洗脱液中都有硒被洗脱，洗脱 8 次后基本不能检出，因此，确定菌体的洗脱次数为 8 次。

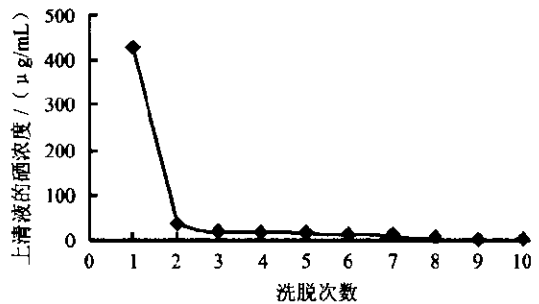


图 1 洗脱曲线

表 1 不同酵母菌株富硒能力的比较

菌株	菌体干重 (g/100mL)	菌体富硒量 (mg/kg)
AS2. 440	0. 8620	45. 6
AS2. 11	0. 8960	87. 2
AS2. 15	0. 7132	66. 5
AS2. 145	0. 8214	42. 4
AS2. 161	0. 9420	85. 9
AS2. 412	0. 8815	58. 7
AS2. 417	0. 6211	42. 4
AS2. 420	0. 6616	72. 8
AS2. 595	0. 8464	65. 2
AS2. 365	0. 7622	53. 6
AS2. 180	0. 8974	68. 8
AS2. 430	0. 9120	79. 5
AS2. 240	0. 7811	69. 8

2. 2 富硒能力强的出发菌株的筛选

据文献报道, 啤酒酵母具有很好的富硒能力^[5], 因此, 本实验采用本室保藏的啤酒酵母作为最初的筛选对象, 以期从中筛选出初始富硒能力相对较高的酵母菌株, 作为出发菌株。实验结果见表 1。

由表 1 可以看出: AS2. 161 的菌体产量最高, 菌体的富硒量略低于 AS2. 11。但菌体产量明显高于 AS2. 11, 可以选用 AS2. 161 作为诱变的出发菌株。

2. 3 AS2. 161 菌株原生质体的制备

2. 3. 1 AS2. 161 菌体生长曲线的绘制: 生长曲线见图 2。由图 2 可见, AS2. 161 菌在 6h 进入对数生长期, 在菌培养到 8h 对菌体进行破壁处理。

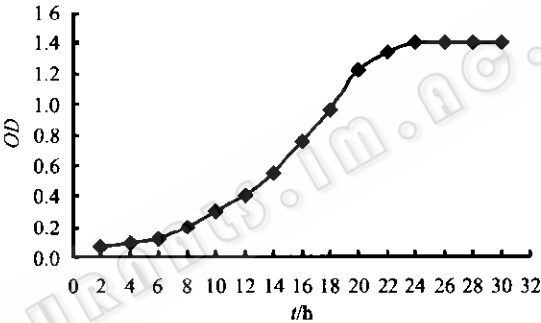


图 2 AS2. 161 菌体生长曲线

2. 3. 2 溶壁酶浓度的确定: 分别取不同浓度的溶壁酶对经预处理的 AS2. 161 进行破壁处理 150 min, 在其它条件相同的情况下, 观察原生质体的形成和再生 (表 2)。

表 2 酶浓度与原生质体形成率和再生率的关系

酶浓度 (g/100mL)	原生质体形成率 (%)	原生质体再生率 (%)
0. 5	80. 2	35. 6
1. 0	91. 5	31. 8
1. 5	92. 8	26. 2
2. 0	93. 1	21. 8
2. 5	93. 3	16. 4

由表 2 可以看出, 随着溶壁酶浓度的增加, AS2. 161 菌的原生质体形成率相应提高。当酶浓度达到 1 g/100 mL 后, 原生质体形成率的提高程度较小, 而再生率的降低幅度较大。因此选择最适的酶解浓度为 1 g/100 mL。

2. 3. 3 酶解时间的确定: 用 1 g/100 mL 的溶壁酶对 AS2. 161 菌酶解破壁, 酶解温度为 25℃ 观察酶解不同时间原生质体的形成率和再生率。实验结果见表 3。

由表 3 可以看出,随着酶处理时间的增加,菌体原生质体的形成率逐渐上升,而原生质体的再生率却逐渐下降。当酶解处理 120 min 时,菌体原生质体的形成率为 95.2%,再生率为 21.8%。随着酶解时间的延长,菌体原生质体形成率增加程度不大,而再生率急剧下降。因此选取 120 min 作为酶解的时间。

2.4 AS2.161 菌原生质体的诱变育种

原生质体的诱变育种可按照以下程序进行:原生质体悬浮液→诱变预备实验→诱变剂处理→中间培养→初筛→复筛→生产性能的测定。

2.4.1 诱变预备实验:一切诱变剂都有杀菌和诱变双重效应。近年来的研究认为,杀菌率在 70%~80% 的诱变剂量,诱变效果好^[6],因此,本实验选择在这个范围内的诱变剂量。将 AS2.161 菌原生质体悬浮液在 15 W 紫外灯距离为 30 cm 的条件下诱变,以诱变时间为横坐标,以致死率为纵坐标绘图,实验结果见图 3。

由表 4 可以看出,当诱变处理时间为 60 s 时,致死率为 70%~80%,因此选择诱变处理的时间为 60 s。

2.4.2 初筛(抗硒突变株的筛选):在初筛前,应确定在平板上亚硒酸钠对 AS2.161 生长的最低抑制浓度,将 AS2.161 菌株分别培养在加有不同浓度硒的麦芽汁琼脂固体平板上,培养 3 d,观察其生长情况。实验结果见表 4。

表 4 临界抗硒浓度的确定

浓度 (mg/kg)	500	600	700	800	900	1000	1100
生长情况	+	+	+	+	+	+	-

注: + 有菌生长, - 无菌生长

由表 4 可以看出,在含硒的培养基平板上,菌体 AS2.161 生长和不生长之间有明显的界限,作为硒抗性的培养基,硒的临界浓度为 1,100 mg/kg。将能够生长的 24 株菌进行复筛。

2.4.3 复筛:在含硒较高的平板上进行复筛。实验结果见表 5。

表 5 不同亚硒酸钠浓度平板上能生长的菌株数

亚硒酸钠浓度 (mg/kg)	1100	1200	1300	1400	1500
能生长的菌株数	24	18	10	3	0

由表 5 可以看出,当麦芽汁固体平板中的硒的浓度达到 1,400 mg/kg 时,只有 3 株酵母菌能够生长,可以对这 3 株菌进行菌体收获量和菌体富硒量的测定。将这 3 株菌命名为 A1, A2, A3。

2.4.4 复筛菌株菌体收获量及富硒量的测定:富硒性能强的酵母菌应该菌体的收获量

表 3 酶解时间与原生质体形成率和再生率的关系

酶解时间 (min)	形成率 (%)	再生率 (%)
30	30.5	30.1
60	49.6	26.7
90	80.1	22.6
120	95.2	21.8
150	95.8	10.5
180	95.9	6.1

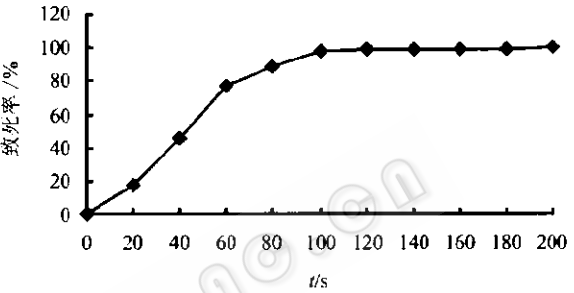


图 3 诱变时间与致死率关系曲线

大,同时单位干菌体的富硒量高,按照这个标准对复筛出的 3 株酵母菌 A1, A2, A3 进行培养并测定。实验结果见表 6。

表 6 3 株菌菌体收获量和富硒量的测定

菌株	菌体收获量 (g/100mL 干菌体)	菌体富硒量 (mg/kg)
A1	0.87	825
A2	0.72	830
A3	0.85	661

由表 6 可以看出 A2 的菌体富硒量大,但菌体收获量小,A1 菌体收获量和菌体富硒量的乘积大,说明单位培养液最后的生物富硒量最大。A1 为 697.85, A2 为 597.6, A3 为 581.68,因此,选择 A1 菌株进行遗传稳定性实验。

2.5 A1 菌株遗传稳定性测定

传代培养时,诱变菌株的性状常不稳定,为验证得到的诱变菌株遗传性状是否稳定,须将菌株进行继代培养,将 A1 菌株每传代两次进行菌体收获量和菌体富硒量的测定,共转接 10 代,实验结果见表 7。

表 7 A1 菌株遗传稳定性实验

遗传代数	2	4	6	8	10	平均值
菌体收获量 (g/100mL 干菌体)	0.86	0.90	0.89	0.96	0.85	0.88
菌体富硒量/mg/kg	828	820	819	823	815	821

由表 7 可以看出,在传代中 A1 菌株的干菌体收获量和富硒量稳定,表明菌株具有遗传稳定性。

3 结论

- (1) 以啤酒酵母作为最初的筛选对象,从中筛选出初始富硒能力相对较高的酵母菌株 AS2.161 作为出发菌株。
- (2) 用溶壁酶对 AS2.161 菌进行酶解破壁,酶的最适添加量为 1 g/100 mL,最适酶解时间为 120 min,菌体原生质体的形成率为 95.2%,再生率为 21.8%。
- (3) 用紫外线进行原生质体诱变育种,并进行初筛和复筛,最终获得一株菌体富硒量为 821 mg/kg,菌体收获量为 0.88 g/100 mL。
- (4) 以 A1 菌为出发菌株,对富硒酵母进行最适发酵条件的讨论,包括接种量、加硒浓度、加硒时间,可进一步提高酵母的富硒量。

参考文献

[1] 中国营养学会. 营养学报, 1989, 11 (1): 93.
[2] 刘曲滨, 刘 康, 包惠艳, 等. 广州食品工业科技, 1999, 16 (3): 33.
[3] 杜连祥. 工业微生物学实验技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 229.
[4] 陈海昌, 唐 屹, 张岭花, 等. 微生物学通报, 1994, 21 (4): 213~217.
[5] 郑建仙. 中国食品工业, 1995, 2 (7): 24~26.
[6] 陶金莉, 沈亚领, 魏东芝, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 45~48.