

富锌酵母的选育及培养条件研究

郭雪娜 傅秀辉 何秀萍 张博润*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 对 402 株不同种属的酵母菌株进行了出筛、复筛、单倍体分离、诱变,从亲株 Y-6-16-18(α met⁻) *Saccharomyces cerevisiae* 和 Y-378-4-15(α leu⁻) *Sacharomyces kluyveri* 的杂交菌株中选育到一株富锌酵母菌株(编号为 ZGH-374)。并初步优化了发酵条件:培养基为 80g/L 糖浓度的麦芽汁、10g/L 蛋白胨、锌添加量 400 μ g/mL, pH 6.0, 装液量 40mL/250mL 三角瓶, 接种量 10%(V/V), 培养起始添加锌盐, 培养时间 30h。在优化的条件下, 杂交菌株 ZGH-374 的生物量(细胞干重)达到 14.3g/L, 细胞锌含量可达到 9.3mg/g, 锌总含量达到了 133mg/L。

关键词 富锌酵母, 育种, 发酵条件

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)02-0240-04

锌是人体必须的微量元素之一, 与很多基础性生理活动密切相关, 以维持机体正常代谢, 促进身体、智力发育、增强免疫力最为重要^[1, 2]。生物体对无机锌盐吸收利用较难, 常有肠胃不适甚而胃出血的现象, 有机锌的吸收和生物利用能力都高于无机锌。酵母菌对锌离子有一定的富集能力, 可以将无机锌转化为有机锌。然而如果培养基中锌的浓度过高会对酵母菌有毒性, 抑制酵母菌的生长。因此, 选育高细胞锌含量的富锌酵母至关重要。国内外有关富锌酵母的研究主要侧重于酵母细胞对锌离子的传递和调控^[1-5], 尚未见有关富锌酵母选育的报道。本文报道了富锌酵母的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

402 株不同种、属的酵母菌为实验初筛菌株, 统一编号为 Y-1 ~ Y-402, 标准交配型菌株 ZF-5-8(α) 和 ZW-21(α) 均由本研究组保存。

1.2 培养基

YEPD: 每升含酵母粉 10g、蛋白胨 10g、葡萄糖 40g, 固体培养基添加 10g 琼脂粉, 自然 pH。YEPS: 每升含酵母粉 10g、蛋白胨 10g、蔗糖 40g、自然 pH。YEPM: 每升含酵母粉 10g、蛋白胨 10g、麦芽糖 40g、自然 pH。麦芽汁培养基: 每升含总糖 40g, 自然 pH。蔗糖糖蜜培养基: 每升含糖蜜 8.3g(糖浓度约 48%) ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g、 H_3PO_4 1g)。

1.3 菌种选育

对硫酸锌的抗性和生物量测定进行初筛和复筛、单倍体分离、亚硝基胍(NTG)诱变等参照文献[6, 7]。

1.4 培养条件初步优化

实验不同的培养基条件、装液量、接种量、培养时间及锌添加时间对菌株的生物量、细胞锌含量的影响, 28℃摇床(220r/min)培养, 通过比较实验结果, 确定合适的发酵条件。

1.5 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。

1.6 锌含量的测定

参照文献[8]方法进行。

1.7 锌总含量的计算

锌总含量(mg/L) = 生物量(g/L) × 锌含量(mg/g 干细胞)

2 结果和讨论

2.1 锌抗性菌株及生物量高的菌株的筛选

2.1.1 初筛结果 根据酵母菌对锌抗性能力的不同, 即有的酵母菌能在含有较高浓度锌离子的条件下生长, 有的酵母菌即使在含有较低浓度锌离子的条件下也生长缓慢。采用酵母菌对硫酸锌的抗性测定进行初筛, 测定了 402 株不同种属的酵母菌对硫酸锌的抗性, 结果表明不同酵母菌株对硫酸锌的抗性差异较大, 部分结果见图 1。从中选出 21 株在含

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62637679, E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

作者简介: 郭雪娜(1976-), 女(回族), 河北人, 硕士, 研究方向为酵母菌分子遗传与育种。E-mail: guo-xuena@hotmail.com

收稿日期: 2003-06-02, 修回日期: 2003-10-16

有 Zn^{2+} 500 ~ 2000 $\mu\text{g/mL}$ 的 YEPD 培养基平皿上生长良好的菌株。

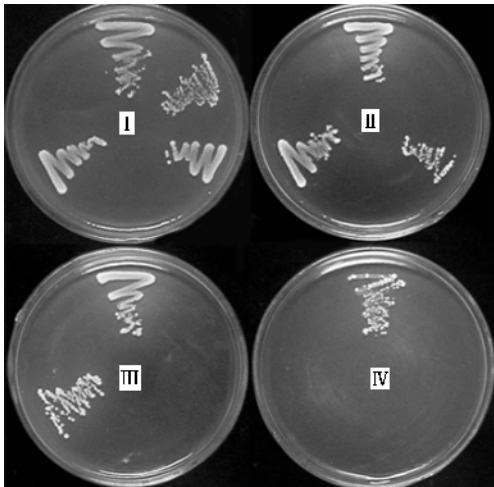


图 1 不同酵母菌株在含有不同锌离子浓度的 YEPD 平皿上生长情况

Fig.1 The growth of strains on YEPD containing the different concentration of zinc

A :Y-6(*Saccharomyces cerevisiae*); B :Y-4(*Hansenula anomala*);
C :Y-6(*Sporobolomyces roseus*); D :Y-18(*Trigonopsis variabilis*);
E :Y-37(*Kluyveromyces polysporus*); F :Y-36(*Saccharomyces kluyveri*).
I . 500 $\mu\text{g/mL}$; II . 1000 $\mu\text{g/mL}$; III . 1500 $\mu\text{g/mL}$; IV . 2000 $\mu\text{g/mL}$.

2.1.2 复筛结果 :测定初筛得到的 21 株菌株在含有 400 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} 的 YEPD 培养基中培养 24h 后的细胞生物量和锌含量。通过筛选 ,获得 5 株细胞生物量较高的菌株和 9 株锌含量较高的菌株 ,部分结果列于表 1。

表 1 不同酵母菌株的生物量及锌含量的比较

Table 1 Comparison of the biomass and Zn content of different strains						
Strains	Y-6	Y-75	Y-195	Y-266	Y-359	Y-378
Biomass(g/L)	8.6	8.2	8.5	5.0	5.1	5.1
Zn content(mg/g)	3.1	3.2	3.0	6.0	5.9	6.0
Total Zn content(mg/L)	26.3	25.9	25.2	29.8	29.9	30.7

Each trial was conducted in triplicate.

2.1.3 富锌酵母的构建 通过生孢测定 ,从复筛得到的酵母菌中选出一株细胞生物量较高的二倍体菌株 Y-6(*Saccharomyces cerevisiae*)和细胞锌含量较高的二倍体菌株 Y-378(*Saccharomyces kluyveri*),按文献 [6] 进行生孢培养和单倍体分离 ,通过对单倍体交配型、细胞生物量和细胞锌含量的测定 ,选出细胞生物量较高的单倍体菌株 Y-6-1(α)和细胞锌含量较高的单倍体菌株 Y-378-4(α)。经亚硝基胍诱变 ,获得带有不同氨基酸缺陷标记的单倍体菌株 Y-6-16-18 (α met)和 Y-378-4-15(α leu)。采用群体杂交法进行

杂交 ,两次杂交共获得 469 株杂交菌株 ,测定其在含有 400 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} 的 YEPD 培养基中培养的细胞生物量和锌含量 ,从中选出细胞生物量和锌含量高于亲株 Y-6 和 Y-378 的 20 株杂交菌株 ,其中杂交菌株 ZGH-374 具有双亲株的优良性状 ,锌总含量明显高于亲株。遗传稳定性分析表明 ,杂交菌株 ZGH-374 是遗传稳定的。进一步对杂交菌株 ZGH-374 的发酵条件进行了研究。

2.2 杂交菌株 ZGH-374 的发酵条件优化

2.2.1 不同培养基的影响 :配制不同的培养基 ,糖浓度为 40g/L ,锌添加量 400 $\mu\text{g/mL}$,自然 pH ,装液量 30mL/250mL ,接种量 5% ,培养时间 24h。测定结果 (表 2)表明不同培养基对杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量和锌含量有一定的影响 ,在麦芽汁培养基中培养 ,杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量、锌含量和锌总含量均较高。故选用麦芽汁培养基进行以下实验。

表 2 不同培养基对杂交菌株 ZGH-374 细胞生物量和锌含量的影响

Table 2 Effect of different media on the biomass and Zn content of hybrid strain ZGH-374

Culture medium	YEPD	YEPS	YEPM	Wort	Molasses
Biomass(g/L)	7.4	9.0	7.7	8.5	9.3
Zn content(mg/g)	5.4	4.7	5.7	6.0	3.6
Total Zn content(mg/L)	40.2	42.0	43.6	51.2	33.0

2.2.2 不同氮源的影响 :配制不同氮源的麦芽汁培养基 ,糖浓度为 40g/L ,氮源浓度为 10g/L ,锌添加量 400 $\mu\text{g/mL}$,自然 pH ,装液量 30mL/250mL ,接种量 5% ,培养时间 24h。实验结果 (表 3)表明在麦芽汁培养基中添加不同的氮源 ,对杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量和锌含量均有一定的影响。添加蛋白胍比添加其它氮源好。故以下的实验中添加 10g/L 的蛋白胍作为氮源。

2.2.3 糖浓度的影响 :配制不同糖浓度的麦芽汁培养基 ,锌添加量 400 $\mu\text{g/mL}$,蛋白胍添加量 10g/L ,自然 pH ,装液量 30mL/250mL 三角瓶 ,接种量 5% ,培养时间 24h。当糖浓度低于 80g/L 时 ,随着糖浓度的增大 ,杂交菌株 ZGH-374 的生物量和细胞锌含量呈上升趋势。当糖浓度高于 80g/L 时 ,随着糖浓度的增大 ,对菌体的生长会产生一定的抑制作用 ,细胞锌含量也呈递减趋势。在 80g/L 糖浓度时 ,锌总含量达到最高。因此 ,以下实验的麦芽汁培养基糖浓度定为 80g/L (图 2)。

表 3 不同氮源对杂交菌株 ZGH-374 细胞生物量和锌含量的影响

Table 3 The effect of different nitrogen sources on the biomass and Zn content of hybrid strain ZGH-374

Nitrogen source	(NH ₄) ₂ SO ₄	CH ₃ COONH ₄	NH ₄ Cl	Urea	YE	Peptone
Biomass(g/L)	8.8	9.0	7.2	8.7	10.7	10.3
Zn content(mg/g)	4.1	6.2	5.4	6.0	6.1	7.1
Total Zn content(mg/L)	36.4	55.6	39.2	51.4	65.4	73.2

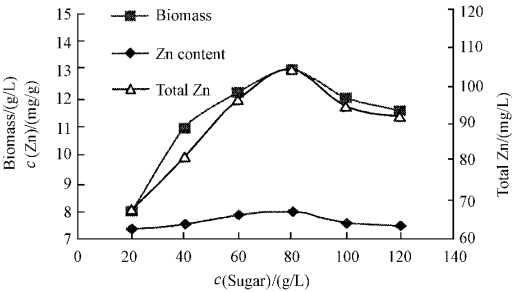


图 2 不同糖浓度对杂交菌株 ZGH-374 细胞生物量和锌含量的影响

Fig.2 Effect of the sugar concentration on the biomass and Zn content of hybrid strain ZGH-374

2.2.4 锌浓度的影响 :实验结果表明 ,当培养基中的锌浓度低于 400μg/mL 时 ,随着锌浓度的增大 ,菌株 ZGH-374 的生物量和锌含量呈上升趋势 ;总锌含量在 400μg/mL 锌浓度时达到最大 ,故发酵培养基的锌浓度定为 400μg/mL。

2.2.5 起始 pH 的影响 :实验结果表明 ,pH 对生长有明显影响 ,但对细胞锌含量影响不大。当培养基初始 pH 为 6.0 时 ,杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量和锌总含量出现峰值 ,达 13.8g/L 和 118mg/L。因此 ,培养基的初始 pH 定为 6.0 比较适宜。

2.2.6 装液量的影响 :实验结果表明 ,随着装液量的增加 ,细胞生物量逐渐降低 ;当装液量大于 40mL 时 ,装液量对于锌含量的影响不显著 ,但是对细胞生物量有影响。当装液量为 40mL 时 ,锌总含量最高。

2.2.7 接种量的影响 :实验结果表明接种量对杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量和锌含量的影响差异不大。但接种量为 10% 时 ,杂交菌株 ZGH-374 的锌总含量相对较高。故接种量定为 10%。

2.2.8 培养时间的影响 :不同培养时间对杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量、锌含量及锌总含量的影响 (图 3)。

从图 3 可以看出当培养时间为 30h ,杂交菌株 ZGH-374 的生物量达到最大值。当培养时间达 15h 以后 ,细胞锌含量变化不大 ,均在 8.4 ~ 8.8mg/g 左

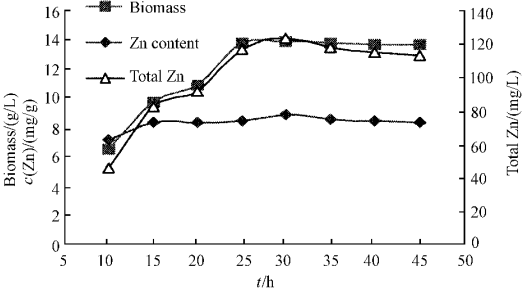


图 3 发酵时间对杂交菌株 ZGH-374 细胞生物量和锌含量的影响

Fig.3 Effect of incubation time on the biomass and Zn content of hybrid strain ZGH-374

右。故将培养时间定为 30h。

2.2.9 加锌时间的影响 :不同时间添加锌盐对杂交菌株 ZGH-374 的细胞生物量和锌含量的影响的实验结果表明 ,培养起始时添加锌盐 ,杂交菌株 ZGH-374 的锌总含量达到最大值 ,达 128mg/L。故在培养起始阶段添加锌盐。

2.3 菌株 ZGH-374 在优化培养条件下细胞有机锌含量和无机锌含量分析

以上的实验确定了菌株 ZGH-374 的培养优化条件 :80g/L 糖浓度的麦芽汁培养基 ,10g/L 蛋白胨、锌添加量 400μg/mL ,pH 为 6.0 ,装液量 40mL/250mL 三角瓶 ,接种量 10%(V/V) ,培养起始时添加锌盐 ,培养时间 30h。在此优化培养条件下 ,杂交菌株 ZGH-374 的生物量(细胞干重)可达到 14.3g/L ,细胞锌含量可达 9.3mg/g ,锌总含量达到了 133mg/L。其中 84% 为有机锌 ,无机锌含量占细胞锌含量的 16%。

3 讨论

由于锌是与人体新陈代谢关系密切的重要微量元素金属元素之一^[1 2] ,有关锌的研究一直受到广泛的关注 ,但通过育种技术选育富锌酵母 ,目前在国内外尚未见相关报道。我们运用杂交育种技术成功构建了一株富锌酵母。杂交菌株 ZGH-374 具有双亲的优良性状 ,遗传性状稳定。这在国内外尚属首次。

对菌株 ZGH-374 的生物量、细胞锌含量的影响。结果表明培养条件对其生物量和细胞锌含量有一定影响。本研究得到的富锌酵母菌株 ZGH-374 的富锌能力和抗锌能力均达到了较高水平。薛冬桦等人^[9]作了锌盐浓度对细胞生物量的比较研究,当培养基中添加 100 $\mu\text{g/mL}$ 锌盐时,获得的酵母生物量较高。在本实验中,菌株 ZGH-374 可耐受 400 $\mu\text{g/mL}$ 的锌浓度,细胞锌含量可达 9.3mg/g。当培养基中锌浓度高于 800 $\mu\text{g/mL}$ 时,才对菌株 ZGH-374 的生长有明显抑制。未通过育种技术选育的“富锌酵母”菌株,由于抗锌能力弱,其生物量和细胞锌含量常存在矛盾。本研究得到的杂交菌株 ZGH-374 抗锌能力强,细胞生物量和细胞锌含量均较高。

参 考 文 献

[1] Gaither L, Eide D. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals*, 2001, **14**: 251 – 270.

[2] Incharoensakdi A, Kitjatham P. Zinc biosorption from aqueous solution by a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Curr Microbiol*, 2002, **45**: 261 – 264.

[3] Guerinet M, Eide D. Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, **2**(3): 244 – 249.

[4] 李淑敏. 酵母作为微量元素载体的研究及前景. *微生物学通报*, 1999, **26**(3): 220 – 249.

[5] MacDiarmid C, Milanick M, Eide D. Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002, **277**(42): 39187 – 39194.

[6] 贾盘兴, 蔡金科, 马德钦, 等. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992.

[7] Sato M, Kishimoto M, Watari J, *et al.* Breeding of brewer's yeast by hybridization between a top-fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a cryophilic yeast *Saccharomyces bayanus*. *J Biosci Bioeng*, 2002, **93**(5): 509 – 511.

[8] 刘福岭, 戴行钧. 食品物理与化学分析方法. 北京: 轻工业出版社, 1987.

[9] 薛冬桦, 金花, 肖毅. 药用锌酵母培养吸收应用研究. *中国生物工程杂志*, 2003, **23**(6): 72 – 75.

The Screening of A Zinc-enriched Yeast Strain and Primary Optimization of Cultivation Conditions

GUO Xue-Na FU Xiu-Hui HE Xiu-Ping ZHANG Bo-Run*
(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : High-biomass, zinc-enriched yeast strain (No ZGH-374) was constructed by primary screening, isolation of haploid, mutagenesis and hybridization between the parental strains Y-6-16-18 (a met)(*Saccharomyces cerevisiae*) and Y-378-4-15 (α leu)(*Sacharomyces kluyveri*). The primary optimization of cultivation conditions was selected through fermentation tests. The highest biomass and Zn content of the strain was obtained 30h at 28 $^{\circ}\text{C}$ and 220r/min, when 40mL of the culture in 250-mL shake flasks was grown in wort containing 80g/L sugar, 10g/L peptone and 400 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} . The initial pH was adjusted to 6.0. The inoculums volume was 10% (V/V). Under the optimized cultivation conditions, the biomass (dry weight) reached 14.3g/L, the Zn^{2+} content reached 9.3mg/g and the total Zn^{2+} reached 133mg/L.

Key words Zinc-enriched yeast, Breeding, Cultivation condition

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

Received date :10-16-2003