

硒对根霉和酵母菌生长的影响

李勤, 湛永前, 徐道贵, 黄平, 陈雪, 曾荣妹, 安万芬, 马宗杰

(贵州省轻工业科学研究所, 贵州 贵阳 550007)

摘要: 选出最适合根霉与酵母生长的硒酸浓度, 为含硒酸根霉及酵母的生产提供基础理论依据。分别用 K₄ 酵母和 Q303 根霉, 在不同硒酸浓度培养基中培养, 观测其菌落的生长情况并将其生物量进行分析。得出了低浓度的硒酸能促进根霉与酵母的生长, 高浓度的硒酸抑制其生长的结果。

关键词: 微生物; 硒; 根霉; 酵母

中图分类号: Q93-3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)11-0040-02

Effects of Se on the Growth of Rhizopus and Yeast

LI Qin, CHEN Yong-qian, XU Dao-gui, HUANG Ping, CHEN Xue, ZENG Rong-mei, AN Wan-fen and MA Zong-jie

(Guizhou Provincial Light Industry Scientific Research Institute, Guiyang, Guizhou 550007, China)

Abstract: Selenite radical concentration suitable for the growth of Rhizopus and yeast was determined, which provided theoretical evidence for the production of Rhizopus and yeast containing selenite radical. K₄ yeast and Q303 Rhizopus were cultured respectively in culture medium of different selenite radical concentration, and their colonies growth status were observed and their biomass were analyzed. It was concluded that low-concentration selenite radical could promote the growth of Rhizopus and yeast and high-concentration selenite radical would inhibit their growth. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; Se; Rhizopus; yeast

硒是人体不可缺少的重要微量元素, 是人体谷胱甘肽过氧化物酶合成的必需组成成分, 主要参与辅酶 A、Q 的合成, 与人体视力及神经传导有密切关系, 对人体蛋白的合成、糖代谢功能、生物氧化都有较大影响, 还可保持心肌的正常结构和功能, 调节人体维生素 A、C、E、K 代谢, 同时具有预防和抵抗某些疾病作用^[1], 如克山病、心肌缺血、癌、肌营养不良等^[2]。不仅如此, 硒还能促进动物生长、发育, 提高繁殖能力和各种营养物质的消化率、蛋鸡产蛋率, 特别是对增强免疫力方面尤显重要。

酵母是人类应用最为广泛的微生物, 可用于制造各种发酵食品和酿酒。根霉用途广泛, 其淀粉酶活性很强, 是酿造工业中重要的糖化菌。硒作为一种人体重要的微量元素已被医药界所公认。由于传统的人体补硒大多为无机硒, 虽然有较高生物活性, 但在体内也存在较大的生物毒性^[3]。笔者研究根霉与酵母在不同硒浓度的培养基中的生长状况, 不仅要选出最适合根霉与酵母生长的硒浓度, 更主要的是为含硒根霉和酵母的应用以及无机硒转化为有机硒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 贵州省科技年度计划 黔科合 GY 字(2008)3037。

收稿日期: 2009-09-24

作者简介: 李勤(1960-), 女, 贵州贵阳市人, 工程师, 主要从事食品发酵研究工作。

试验用菌种: 酵母 K₄, 根霉 Q303。

培养基: 马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA)、液体培养基、豆芽汁蔗糖琼脂培养基及液体培养基。

1.2 仪器与试剂

仪器: 高压蒸汽灭菌锅、冰箱、烘箱、恒温摇床、三角瓶、试管、漏斗分装装置、血球计数板、称量瓶、超净台、离心机、冷冻干燥机、显微镜、电子天平。

试剂: 亚硒酸钠、乳酸-石碳酸液, 试剂均为分析纯。

1.3 测定方法

通过肉眼和显微镜观察, 菌落在不同硒浓度培养基上的生长情况, 并对孢子、出芽细胞进行计数, 用离心方式收集菌体、冷冻干燥机, 对不同含硒酸浓度下菌体质量进行称重。

1.4 试验方法

1.4.1 培养基制备

马铃薯蔗糖和豆芽法汁蔗糖琼脂培养基各做成斜面 and 液体培养基, 参考 GB4789、GB28—84 方法制作, 经 121 °C 高压灭菌 30 min 备用。

1.4.2 菌种制备

酵母菌种、根霉菌种活化: 将酵母 K₄、根霉 Q303 分

别接种在豆芽汁和马铃薯蔗糖琼脂斜面培养基上,置于30℃恒温培养24h,重复2次,活化后分别转接到两种液体培养基上,于30℃恒温培养备用。

1.4.3 不同硒酸根浓度培养液制备

250 mL三角瓶中分装两种液体培养基,100 mL各装7瓶,高压灭菌后在无菌操作下,添加亚硒酸钠,制成含硒酸浓度分别为0、1 mg/L、3 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L和20 mg/L的培养基。

1.4.4 恒温培养

分别取两种制备好的菌种液2 mL,接入含硒酸的液体培养基中,在30℃、200 r/min条件下摇床恒温培养24 h后,进行菌落形态观察及根霉孢子和酵母出芽细胞计数,并离心、冷冻干燥机称重。

2 结果与分析

2.1 不同含硒酸浓度培养基中菌体生长情况

对不同含硒酸浓度培养基中的菌种培养24 h进行肉眼观察,结果见表1、表2。表1、表2结果表明,不同硒酸浓度对根霉和酵母的生长影响有明显的差异。

表1 根霉在不同含硒酸浓度培养基中的生长情况

硒浓度 (mg/L)	液体培养基中的生长特征		
	葡萄枝、假根	孢子囊梗	菌丝颜色
0	粗细一般	粗细一般	白色,形成菌膜,液清,菌丝较短
1	较粗	较粗	白色,菌丝相互缠绕
3	粗	坚硬	白色微深,菌丝缠绕成球状
5	一般	较短细	白色,形成菌膜菌丝较少
10	一般	短细	白色,形成菌膜菌丝少
15	细	短细	白色,形成菌膜菌丝少
20	细	短细	白色,形成菌膜菌丝少

表2 酵母在不同含硒酸浓度培养基中的生长情况

硒浓度 (mg/L)	液体培养基中的生长特征		
	颜色	生长情况	菌膜厚薄
0	乳白色有光泽	生长均匀	有菌膜,厚度一般
1	乳白色有光泽	生长均匀	有菌膜,较厚
3	乳白色光泽较暗	生长较均匀	有菌膜,较薄
5	乳白色光泽较暗	培养基有沉淀	有菌膜,较薄
10	乳白色光泽较暗	培养基有沉淀	有菌膜,较薄
15	乳白色、干皱	培养基有沉淀	有菌膜,较薄
20	乳白色、干皱	培养基有沉淀	有菌膜,较薄

2.2 不同含硒酸浓度对根霉孢子和酵母出芽细胞的影响

对不同含硒酸浓度培养基中,根霉孢子和酵母出芽细胞数的变化进行计数,结果见表3、表4。

三角瓶液体摇床培养,对Q303根霉来讲菌丝较多、孢子很少,通常在气生菌丝端才较容易形成发达的孢囊孢子,产生较多的孢子。三角瓶液体摇床培养中,瓶中的

表3 不同含硒酸浓度培养基中根霉孢子数的变化

位置	硒酸浓度 (mg/L)						
	0	1	3	5	10	15	20
左上	268	541	573	160	78	28	16
左下	282	563	568	145	58	27	12
中间	275	572	560	110	56	21	9
右上	271	561	491	133	62	22	10
右下	266	545	580	125	46	19	13

表4 不同含硒酸浓度培养基中酵母出芽细胞数

位置	硒酸浓度 (mg/L)						
	0	1	3	5	10	15	20
左上	253	461	148	144	58	50	16
左下	246	470	139	121	61	42	19
中间	221	512	182	153	49	34	11
右上	290	565	176	140	67	30	9
右下	257	482	127	111	42	21	12

孢子数应该是一致的,基本不存在上、中、下的区别。对丝状菌来讲,比较科学的方法是采用液体培养后进行菌丝称量法。或者采用平板培育后再将孢子洗脱后进行计数。

三角瓶液体摇床培养中,瓶中的孢子数应该是一致的,基本不存在上、中、下的区别,同样存在取样点不科学的问题。

表3、表4说明根霉在硒酸浓度为0~3 mg/L范围内,生长较好,孢子数增加一倍以上,当硒酸浓度达到5 mg/L时就出现下降,且硒酸浓度越高,孢子数越少。酵母在0~1 mg/L范围内,生长较好,同样出芽细胞数成倍增长,当硒酸超过5 mg/L时,出芽细胞明显下降,且随硒酸浓度升高而下降。由此可推断,低浓度硒酸有助于促进根霉和酵母的生长,而高浓度则抑制其生长。试验中所选硒酸浓度为根霉3 mg/L,酵母为1 mg/L,为最适生长量。

2.3 细胞称量

用重量法,通过离心方式对不同含硒酸浓度培养基中细胞进行收集,冷冻干燥后,用电子天平称量,结果见表5。

表5 不同含硒酸浓度培养基中根霉、酵母重量(以mg计)

菌株	硒酸浓度 (mg/L)						
	0	1	3	5	10	15	20
根霉	18.1	27.5	48	15.7	11	10.1	8.3
酵母	23.3	40.3	16.5	14.2	13	12.6	9.8

根据表5所示,根霉在0~3 mg/L范围内菌落生长旺盛,3 mg/L浓度生长菌落重量约是0 mg/L浓度的2.5倍,但随着硒酸浓度的不断增加,菌落重量呈相反趋势,到20 mg/L时就基本不生长,酵母也同样,只是酵母生长

(下转第45页)

表6 化学诱变前后 2-苯乙醇含量及总高级醇含量比较

菌株	2-苯乙醇含量 (mg/L)	总高级醇含量 (mg/L)
原菌 H	36.1	289.36
H9	40.3	265.24
H9-1	41.3	251.21
H9-5	41.8	255.68
H9-10	43.5	249.89
H9-18	48.9	148.86
H9-24	52.7	200.65
H9-32	42.9	243.21
H9-33	46.7	247
H9-40	44.4	250.32
H9-48	42.7	233.17

从表6可看出,H9-24发酵葡萄汁产2-苯乙醇量较菌株H9提高了30.8%,较原始菌株H提高了46.0%,高级醇总量较菌株H9降低了24.4%,较原始菌株H降低了30.7%。

2.3.2 诱变株遗传稳定性实验

对H9-24进行反复纯化,并进行10余次传代试验,测定发酵液2-苯乙醇及高级醇含量,结果显示该菌株经过传代后仍具有相对稳定的遗传特性,结果见表7。

3 结论

采用紫外诱变和化学诱变相结合的复合诱变方法可选育出适量高产2-苯乙醇的菌株。突变株H9-24与本菌株H比较,2-苯乙醇产量提高了46.0%,高级醇总量降低了30.7%,有利于改善葡萄酒风味和突出玫瑰香

表7 诱变株 H9-24 传代试验结果 (mg/L)

传代数	2-苯乙醇含量	高级醇含量	传代数	2-苯乙醇含量	高级醇含量
1	52.7	200.65	6	51.1	198.60
2	52.0	208.17	7	51.3	200.34
3	52.9	195.23	8	50.9	196.61
4	51.8	205.56	9	51.2	203.30
5	52.1	190.83	10	51.0	200.90

葡萄酒的特色。

参考文献:

- [1] 顾国贤. 酿造酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 355-453.
- [2] Linas, Alonso, G. Development of the major aroma compounds during manufacture of wine[J]. Am. J. Enol. Vitic, 1993.
- [3] M. M. W. Etschmann, D. Sell & J. Schrader. Biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2002, 59: 1-8.
- [4] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1988.
- [5] 苏畅, 肖冬光, 许葵. 几种进口葡萄酒活性干酵母发酵性能比较[J]. 酿酒科技, 2004, 121(1): 31-32.
- [6] 梅建凤, 闵航. 生物转化法合成2-苯乙醇菌株的紫外选育[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 22-24.
- [7] STARKD, ZALAD, MUNCH T, et al. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32: 212-223.

(上接第41页)

范围更小。该结果与根霉孢子、酵母出芽细胞计数相一致,进一步证明了根霉在3 mg/L时最宜生长,酵母的最适生长量为1 mg/L。

3 结论与讨论

试验得出,低浓度的硒是能够促进2株菌生长的,反之,高浓度硒抑制2株菌株生长。

硒是人体重要微量元素,在体内参与多种酶合成并能调节多种维生素代谢,维持机体正常生长、发育,特别是对肿瘤防治起到重要作用。而传统补硒采用多是无机硒,其营养保健剂量和毒性之间范围比较窄,而硒的有益生理作用又往往依赖于较高的摄入量,造成其使用量很难控制,因此我们利用微生物在硒基质中生长时,可将无

机硒有机化,便于人体的吸收,从而防止了在补硒时造成对人体的伤害,让科学补硒成为现实。硒在其他工业中应用很广,但在微生物中应用甚少,该试验是为硒在微生物上应用提供一点理论依据,更多的还有待于进一步的研究探索。

参考文献:

- [1] 侯振江,张宗英,阎瑞霞. 硒的生物学特性及其在肿瘤诊疗中的应用[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(4): 13-15.
- [2] 徐兵河,孙燕. 微量元素硒的防癌抗癌作用[J]. 中国新药杂志, 1998, (3): 18-21.
- [3] 姚敏,赵振东,佟霁云,刘兴华. 利用灵芝合成生态有机硒的研究[J]. 微量元素与健康研究, 1997, 17(2): 21-22.