

高产谷胱甘肽酿酒酵母选育及保健功能苹果酒开发

Screening of *Saccharomyces cerevisiae* highly producing glutathione to brew cider with healthcare function

黄静涵¹ 徐菁苒^{2,3,4} 刘爱平⁵
HUANG Jing-han¹ XU Jing-ran^{2,3,4} LIU Ai-ping⁵
徐新彪^{2,3,4} 刘双平^{2,3,4} 毛 健^{2,3,4}
XU Xin-biao^{2,3,4} LIU Shuang-ping^{2,3,4} MAO Jian^{2,3,4}

(1. 中国医学科学院阜外医院心肺功能检测中心, 北京 100037; 2. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学(如皋)食品生物技术研究, 江苏 如皋 226500; 4. 国家黄酒工程技术研究中心, 浙江 绍兴 312000; 5. 江苏沐兰食品有限公司, 江苏 镇江 212125)

(1. *Fuwai Hospital and Cardiopulmonary Institute, Chinese Academy of Medicine Science, Beijing 100037, China*; 2. *National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China*; 3. *Institute of Food Biotechnology, Jiangnan University, Rugao, Jiangsu 226500, China*; 4. *National Engineering Research Center for Rice Wine, Shaoxing 312000, China*; 5. *Jiangsu MuLan International Co., Ltd., Zhenjiang, Jiangsu 212125, China*)

摘要:苹果酒在生产和储运过程中的褐变严重影响苹果酒品质,而酵母菌的代谢产物谷胱甘肽可以抑制苹果酒的褐变。选用实验室筛选出的一株高产谷胱甘肽(GSH)菌株 Y-18 为出发菌株,利用紫外诱变和硫酸二乙酯(DES)诱变,用 96 孔板高通量初筛产 GSH 菌株,用摇床发酵培养复筛,以发酵力及产 GSH 能力为指标,复筛出高产 GSH 的优良苹果酒酵母,并对诱变条件和酵母生产 GSH 的发酵条件进行研究。经过 96 孔板高通量筛选出的突变株 Y18-20 在模拟苹果酒发酵条件的培养基中 GSH 浓度高达 46.8 mg/L,单位细胞产 GSH 能力为 8.95 mg/g,是出发菌 Y-18 的 2.18 倍。96 孔板高通量筛选方法具有节约经济成本、提高筛选效率、缩短选育周期的优势,选育出的优良高产 GSH 的突变菌株 Y18-20,有比较好的发酵特性和遗传稳定性,对生产高谷胱甘肽苹果酒、抑制苹果酒褐变从而提高苹果酒品质具有现实意义。

基金项目:863 项目(编号:2013AA102203-06);国家自然科学基金面上项目(编号:31571823,31271839);中央高校基本科研业务专项资金项目(编号:JUSRP11509);北京市自然科学基金青年项目(编号:7154232)

作者简介:黄静涵,女,中国医学科学院阜外医院助理研究员,硕士。
通讯作者:毛健(1970—),男,江南大学教授,博士。

E-mail: maojian@jiangnan.edu.cn
收稿日期:2016-03-02

关键词:高通量筛选;谷胱甘肽;苹果酒;酵母

Abstract: The process of browning seriously influence the cider quality, but the glutathione producing by yeast can inhibit browning in the production and storage of cider. The glutathione (GSH) producing strain *Saccharomyces cerevisiae* Y18 was chosen as the starting strain, and after ultraviolet mutagenesis and diethyl sulfate mutagenesis, the strain highly producing GSH was screened by 96-well plates. Secondary screening was carried out by comparing fermenting power and GSH concentration after strain culture in shaker. The mutant strains Y18-20 GSH after screening by 96-well plates producing 46.8 mg/L GSH in the simulation of cider fermentation conditions, and it's cell capacity of producing GSH is 8.95 mg/g which is 2.18 times of Y-18. The 96-well plates high-throughput screening method has the advantages of saving the economic costs, improving the filtering efficiency, and shortening the breeding cycle. The mutant strain Y18-20 producing high yield of GSH has better fermentation characteristics and genetic stability, and has a realistic significance to produce high GSH cider, control the browning of cider, and improve the quality of apple wine.

Keywords: high-throughput screening; glutathione; cider; yeast

在全球范围内,苹果酒是葡萄酒之外全球贸易量最大的果酒,富含氨基酸、矿物质、维生素以及钙、磷、钾、铁等成分,

不仅可以补充人体必需营养物质,调节新陈代谢,还具有控制人体胆固醇含量,激发肝功能,预防疾病的保健功能。在苹果酒生产及贮存过程中,褐变是造成质量不稳定的一个重要问题,褐变既影响色泽,又影响酒质和风味,使酒体氧化感增强,感官特性降低,又会造成一些营养物质的损失^[1-3]。

目前,对果酒褐变的主要抑制方法添加是抗氧化剂,但化学抑制剂的安全性问题愈发成为消费者关注的重点。谷胱甘肽(GSH)是由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸经肽键缩合而成的一种活性三肽,具有抗氧化、清除自由基、解毒等生理功能。研究^[1-3]表明,谷胱甘肽在抑制葡萄酒褐变,保护酒中挥发性香气成分方面具有重要作用。

现代微生物试验技术手段的发展趋势是微型化、自动化、高效率和高通量,高通量筛选技术(HTS)是一种适合大规模筛选的快速高效的新型自动化筛选体系,将计算机控制、高灵敏度检测、自动化操作、结果自动采集及处理等技术有机结合。

发酵法生产 GSH 是通过利用微生物体内物质代谢,将糖类原料转化为 GSH 的方法^[4]。酵母是发酵法生产 GSH 最普遍的微生物,Murata 等^[5]发现,酵母菌中酵母属、假丝酵母属及汉逊氏酵母属胞内 GSH 含量较高,其中酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 GSH 合成活性显著高于其它菌株,因此,酿酒酵母也是发酵法生产 GSH 最常用的酵母。苹果酒在生产和储运过程中的褐变严重影响苹果酒品质,而酵母菌的代谢产物谷胱甘肽可以抑制苹果酒的褐变^[6-7]。本试验通过 96 孔板筛选出一株高产谷胱甘肽的苹果酒酵母,对生产出高谷胱甘肽苹果酒,抑制苹果酒褐变,提高苹果酒品质具有现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

诱变出发菌株:Y-18 菌株,实验室保藏;
还原型谷胱甘肽标准品:纯度 $\geq 99\%$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;
DPPH、2-辛醇、PVPP、异硫氰酸苯酯、三乙胺:色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;
甲醇、乙腈:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;
其它试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱系统(配有 2489 紫外检测器及 Empower2 色谱工作站):Waters e2695 型,美国沃特世(Waters)科技有限公司;

气相色谱质谱联用仪:Thermo Fisher Trace 型,美国 Thermo 公司;

萃取头:50/30 μm DVB/CAR/PDMS 型,美国 Supelco 公司;

台式高速冷冻离心机:5810R 型,德国 Eppendorf 公司;
低速大容量多管离心机:RJ-LDL-50G 型,无锡瑞江分析仪器有限公司;

电子天平:EL3002 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

超低温冰箱:thermo905 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

可见分光光度计:7230G 型,上海佑科仪器仪表有限公司;

超声波清洗器:KQ-700E 型,昆山市超声仪器有限公司;
恒温磁力搅拌器:85-2 型,上海司乐仪器有限公司;

自动菌落挑选仪:QPix 420 system 型,美国 Molecular Devices 公司;

多孔板恒温振荡器:Titramax 1000 型,德国 Heidolph 公司;

多功能酶标仪:Cytation 3 型,美国 Molecular Devices 公司。

1.2 方法

1.2.1 紫外诱变

(1) 取培养至对数生长期的酵母菌 5 mL,离心后用生理盐水洗涤两次,加入 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液,将细胞浓度稀释为 10^6 CFU/mL,转入到培养皿(直径 9 cm)中。

(2) 在无菌条件下磁力搅拌,紫外灯 35 cm 处照射一定时间,使酵母菌致死率在 $70\%\sim 80\%$ 。

(3) 将诱变后的菌液避光中间培养 24 h,按浓度梯度稀释,涂布于 ZnCl_2 的抗性培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,通过控制 ZnCl_2 的质量浓度,使酵母菌致死率在 $70\%\sim 80\%$ ^[8]。

1.2.2 硫酸二乙酯(DES)诱变

(1) 取培养至对数生长期的酵母菌 5 mL,离心后用 PBS 洗涤 2 次后,加入 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液,恢复至原体积 5 mL,转入三角瓶中。

(2) 加入 0.3 $\sim$ 0.8 mL/100 mL 浓度为 2%的 DES 溶液,振荡处理 40 min,按两倍体积的 DES 溶液加入 25%硫代硫酸钠溶液终止反应。通过控制 DES 溶液体积分数,使酵母细胞致死率在 $70\%\sim 80\%$ 。

(3) 将诱变后的菌液避光中间培养 24 h,按浓度梯度稀释,涂布于 ZnCl_2 的抗性培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。

1.2.3 诱变菌株的高通量筛选

(1) 诱变菌株的初筛^[9]:将诱变后的菌株转移到种子培养基的洁净 96 孔板中,摇床培养 24 h,向另一洁净的 96 孔板中加入 200 μL 液体培养基(含有 1.6 g/L ZnCl_2 和 5%乙醇),每孔中移取 20 μL 种子培养基加入其中,用酶标仪每隔 4 h 测定其光密度 OD_{600} 值来表征生物量。选取生物量较高的孔样制成 10^8 CFU/mL 的细胞悬液,涂布平板中培养,挑取生长状况良好、饱满的单菌落,进行划线纯化两次后于斜面中培养保藏。

(2) 诱变菌株的复筛:将初筛后得到的菌株进行发酵培养,考察其在发酵培养基中的发酵力及产 GSH 能力,选出发酵力及产 GSH 能力较强的酵母突变株,−80 $^{\circ}\text{C}$ 甘油保藏。

1.2.4 GSH 高产诱变菌株稳定性测定 将诱变菌株斜面传代培养 6 代,考察其生物量、产 GSH 能力及发酵力的状况。

1.2.5 高效液相色谱法(HPLC)测定发酵液中 GSH 的含量

(1) 样品处理^[10-12]:取 1 mL 发酵液,加入 1 mL 三氯乙酸(10%)沉淀蛋白,在转速 1×10^4 r/min 下离心 8 min,沉淀蛋白质。取 1 mL 上清液,加入 0.5 mL 500 μ mol/L pH 8.0 的 Tris—HCl 溶液,混合均匀,加入 20 μ L 纯水,再加入 0.5 mL 0.01 mol/L DTNB,振荡均匀,在室温下反应 5 min,再加入 0.1 mL 7.0 mol/L 磷酸溶液酸化, 1×10^4 r/min 离心 8 min,将上清液滤过 0.22 μ m 微孔滤膜后,进行 HPLC 分析。

(2) 色谱条件:色谱柱:Athena C18-WP(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:0.05 mol/L pH 5.6 醋酸钠缓冲液—甲醇体积比 90:10;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μ L;柱温:40 $^{\circ}$ C;运行时间:10 min;紫外检测波长:330 nm。

(3) 标准曲线绘制:分别取浓度为 0.5,10,20,40,60,80,100 mg/L 的 GSH 标准溶液 1 mL,加入 0.5 mL 500 μ mol/L pH 8.0 的 Tris—HCl 溶液,混合均匀,加入 20 μ L 纯水,再加入 0.5 mL 0.01 mol/L DTNB,振荡均匀,在室温下反应 5 min,再加入 0.1 mL 7.0 mol/L 磷酸溶液酸化, 1×10^4 r/min 离心 8 min,将上清液滤过 0.22 μ m 微孔滤膜后,进行 HPLC 分析,以峰面积 y 对浓度 x 绘制标准曲线,见图 1。根据回归方程求样品中的 GSH 浓度。

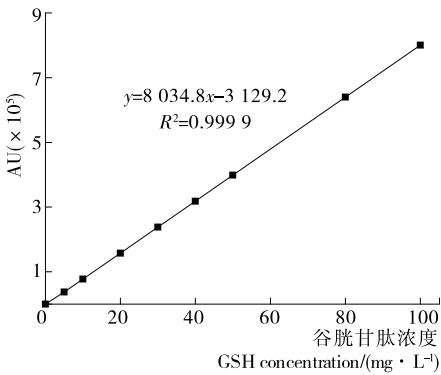


图 1 谷胱甘肽的标准曲线

Figure 1 Standard curve of GSH

1.2.6 统计分析方法 利用 Microsoft Office Excel 2013 软件及 Origin Pro 9.0 软件进行数据计算和图谱制作,采用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 初筛果酒酵母诱变条件的确定

2.1.1 Y-18 菌株生长曲线的测定 处于对数生长期的酵母菌群体生长状况较为一致,细胞成分较平衡,对诱变敏感,且变异重复性较好,同时对数生长期的酵母菌细胞浓度对增加变异细胞数较有利,所以,通常将酵母细胞培养至对数生长期后进行诱变处理。以培养时间为横坐标,光密度 OD_{600} 值为纵坐标(稀释一定倍数),Y-18 菌株的生长曲线见图 4。Y-18 菌株从 6 h 进入对数生长期,18 h 后开始缓慢生长进入静止期和衰亡期,故选择生长时间为 12 h 的酵母菌液进行诱变处理,此时酵母细胞较年轻,浓度易达到 10^7 CFU/mL 菌悬液。

2.1.2 紫外诱变时间的确定 诱变育种是一种应用广泛的育种手段,诱变过程是先通过理化因素诱发突变,提高突变

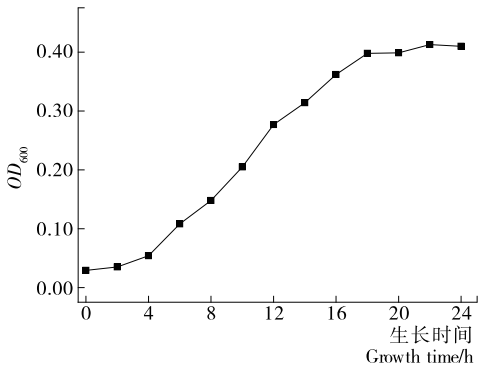


图 2 Y-18 菌株生长曲线

Figure 2 The growth curve of Y-18

几率,以创造更多筛选优良菌株的可能,之后在诱发变异的细胞中通过一定筛选条件得到需要的优良菌株^[13]。其中,紫外诱变是应用较广泛的一种方式,主要通过提高物质分子或原子的内层电子来提高能级,紫外诱变在 DNA 上产生的生物学效应是:使 DNA 链上的两个相邻的嘧啶形成二聚体,组织 DNA 双链解开和复制。在工业微生物中,提高生产性能(正突变)的突变多出现在较低处理剂量中,一般处理剂量的死亡率为 70%~80%^[14]。

将紫外诱变前后的菌液稀释一定倍数涂在 YEPD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d,以细胞数计算紫外照射时间与细胞致死率的关系,结果见表 1。

表 1 UV 照射时间与致死率关系

Table 1 Influence of mutagenesis time on the lethality rate

时间/s	平均菌落数/个	致死率/%
0	142.0	0.0
30	65.1	54.2
50	54.4	61.9
70	31.1	78.1
80	17.2	87.8
90	12.0	91.6

由表 1 可知,紫外照射时间对酵母细胞致死率有明显的剂量效应作用,紫外处理时间越长,细胞死亡数越高。当紫外照射 30 s 时,酵母致死率较低,平板上菌落过多,不易于挑菌。研究^[14]表明,正突变以 70%~80%致死率的照射时间为宜,故选择紫外照射时间为 70 s。

2.1.3 化学诱变剂量的确定 研究结果表明,通常复合诱变优于单一诱变,采用紫外诱变和硫酸二乙酯(DES)复合诱变的方法,筛选获得高产 GSH 突变株是一种有效的方式^[15]。化学诱变效率主要取决于诱变剂浓度和处理时间,试验将酵母细胞在不同体积分数的 DES 中振荡处理 30 min,涂布于平板中,以细胞数计算致死率,见表 2。致死率为 70%~80%对应的 DES 体积分数约为 0.7%,所以试验选取 DES 体积分数 0.7%作为化学诱变处理剂量。

2.1.4 筛选平板中 $ZnCl_2$ 浓度的确定 在生物体内,GSH 可在 GSH 过氧化物酶(GSH-Px)的作用下氧化生成氧化型谷

表 2 DES 体积分数与致死率关系

Table 2 The relationship between concentration of DES and lethality rate

体积分数/%	平均菌落数/个	致死率/%
0.0	186.2	0.0
0.4	105.3	43.5
0.5	77.0	58.6
0.6	55.6	70.2
0.7	42.4	77.3
0.8	29.1	84.4

胱甘肽(GSSG),又可被 GSH 还原酶还原为有活性的 GSH, GSH 还原酶是受 Zn^{2+} 抑制的调节酶,当细胞内 Zn^{2+} 达到一定浓度时,GSH 还原酶的活性中心会发生变构失活,阻止 GSH 的继续合成。若能减轻或解除 Zn^{2+} 对 GSH 还原酶的抑制作用,可以促进 GSH 的生成和积累^[16]。因此以 ZnCl_2 为抗性筛选剂,筛选抗 Zn^{2+} 的突变株对 GSH 的生产有重要意义。 ZnCl_2 质量浓度与致死率之间的关系如表 3 所示,筛选平板中 ZnCl_2 浓度与酵母致死率之间存在明显的剂效关系,致死率随 ZnCl_2 浓度增加而增大,当 ZnCl_2 浓度为 1.6 g/L 时,致死率达到 80% 以上,致死率为 70%~80% 对应的 ZnCl_2 浓度约为 1.5 g/L,所以试验选取 ZnCl_2 浓度 1.5 g/L 作为筛选平板所用剂量。

表 3 ZnCl_2 浓度与致死率的关系

Table 3 The relationship between concentration of Zine chloride and lethality

浓度/(g·L ⁻¹)	平均菌落数/个	致死率/%
0.0	204.1	0.0
0.6	173.3	15.1
1.0	134.1	34.3
1.2	103.7	49.1
1.4	78.8	61.4
1.6	40.0	80.4
2.0	29.6	85.5

2.2 高产 GSH 果酒酵母的高通量筛选

传统诱变选育通常采用摇瓶发酵,将突变株逐个培养后测定目标产量,这种方法不仅存在工作量大、耗材多、周期长的弊端,筛选效率也受到很大限制。因此,利用高效、快速、高通量的筛选方法是诱变选育菌种面临的重要问题^[17]。

在随机突变的过程中,建立一种高效灵敏的筛选方法,是从大容量随机突变库中得到良好正向突变体的重要手段。96 孔板发酵培养结合酶标仪检测的高通量筛选技术是一种筛选优良突变株的高效方法,试验将诱变后的 710 个菌株进行 96 孔板发酵培养,液体培养基中加入 1.6 g/L ZnCl_2 和 5%乙醇,每隔 4 h 通过酶标仪检测诱变菌株的生物量,筛选出在特定培养基中生长状况较好的 33 株酵母菌进行单独摇床培养,以发酵力及产 GSH 能力为指标,复筛出高产 GSH

的优良果酒酵母。初筛后得到的 33 株突变菌生物量及发酵液中 GSH 浓度见表 4。

由表 4 可知,诱变后的菌株产 GSH 能力有显著性差异。诱变出发菌株 Y-18 培养发酵液中 GSH 浓度为 28.83 mg/L,单位细胞产 GSH 能力为 4.11 mg/g,其余 33 株突变株中 27 株菌发酵液 GSH 浓度高于初始菌,其中,突变株 Y18-20

表 4 高通量初筛突变株的发酵结果[†]

Table 4 The fermentation result of mutants screened by HTS

编号	<i>OD</i> ₆₀₀	生物量/ (g·L ⁻¹)	GSH 浓度/ (mg·L ⁻¹)	GSH 产量/ (mg·g ⁻¹)
Y-18	0.368±0.02 ^b	5.56±0.35 ^{bc}	22.83±1.54 ^a	4.11±0.08 ^a
Y18-1	0.278±0.08 ^a	4.43±0.63 ^a	24.62±2.05 ^b	5.56±0.12 ^d
Y18-2	0.342±0.01 ^b	5.03±0.15 ^{ab}	26.96±1.36 ^{bc}	5.36±0.04 ^{cd}
Y18-3	0.331±0.10 ^b	5.91±0.38 ^c	27.28±3.28 ^{bc}	4.61±0.23 ^b
Y18-4	0.458±0.04 ^e	7.15±0.72 ^d	33.72±1.03 ^e	4.75±0.02 ^b
Y18-5	0.338±0.01 ^b	5.93±0.19 ^c	25.55±2.69 ^b	4.31±0.11 ^a
Y18-6	0.386±0.12 ^c	6.36±0.45 ^{cd}	28.98±4.32 ^{bc}	4.56±0.13 ^b
Y18-7	0.353±0.02 ^b	5.26±0.12 ^{ab}	34.95±2.16 ^e	6.64±0.08 ^g
Y18-8	0.377±0.07 ^{bc}	7.76±1.04 ^e	34.06±1.59 ^e	4.39±0.05 ^a
Y18-9	0.339±0.13 ^b	6.03±0.43 ^c	32.15±0.85 ^d	5.33±0.02 ^{cd}
Y18-10	0.362±0.09 ^{bc}	6.24±0.26 ^{cd}	40.70±2.64 ^b	5.56±0.09 ^d
Y18-11	0.330±0.11 ^b	6.03±0.14 ^c	28.64±4.23 ^{bc}	4.75±0.18 ^b
Y18-12	0.247±0.14 ^a	6.13±0.66 ^c	38.34±1.48 ^f	6.28±0.03 ^f
Y18-13	0.345±0.03 ^b	5.51±0.36 ^{bc}	31.35±1.83 ^d	5.70±0.04 ^{de}
Y18-14	0.341±0.06 ^b	6.43±0.29 ^{cd}	37.46±2.59 ^g	5.82±0.11 ^{de}
Y18-15	0.368±0.03 ^{bc}	6.06±0.54 ^c	35.28±1.04 ^f	5.82±0.04 ^{de}
Y18-16	0.343±0.06 ^b	5.90±0.29 ^c	43.86±3.20 ⁱ	7.43±0.14 ^b
Y18-17	0.347±0.09 ^b	6.93±0.81 ^d	34.03±0.84 ^e	4.91±0.05 ^b
Y18-18	0.644±0.07 ^g	9.63±0.30 ^f	41.61±2.63 ^b	4.32±0.08 ^a
Y18-19	0.510±0.06 ^f	6.93±0.12 ^d	36.01±1.62 ^f	5.20±0.12 ^c
Y18-20	0.381±0.01 ^c	5.23±0.46 ^{ab}	46.80±2.59 ^j	8.95±0.14 ^j
Y18-21	0.315±0.03 ^b	3.90±0.57 ^a	31.18±3.01 ^d	7.99±0.21 ^{hi}
Y18-22	0.348±0.02 ^b	5.04±0.28 ^{ab}	31.77±0.86 ^d	6.30±0.03 ^f
Y18-23	0.372±0.01 ^{bc}	5.83±0.32 ^c	33.59±1.45 ^e	5.76±0.07 ^{de}
Y18-24	0.451±0.15 ^d	4.26±1.41 ^a	29.03±4.24 ^c	6.82±0.15 ^g
Y18-25	0.333±0.03 ^b	4.03±0.85 ^a	27.25±2.45 ^{bc}	6.76±0.08 ^g
Y18-26	0.503±0.09 ^f	6.93±0.29 ^d	40.41±1.52 ^b	5.83±0.05 ^e
Y18-27	0.394±0.04 ^c	5.96±0.36 ^c	35.65±2.15 ^f	5.98±0.10 ^e
Y18-28	0.340±0.03 ^b	4.86±0.60 ^a	33.50±1.04 ^e	6.89±0.05 ^g
Y18-29	0.344±0.01 ^b	5.32±0.06 ^{ab}	33.69±3.13 ^e	6.36±0.17 ^f
Y18-30	0.361±0.02 ^{bc}	5.23±0.57 ^{ab}	37.45±2.05 ^g	7.16±0.11 ^b
Y18-31	0.391±0.10 ^c	6.33±1.03 ^{cd}	36.12±1.51 ^f	5.71±0.03 ^{de}
Y18-32	0.385±0.04 ^{bc}	5.03±0.48 ^{ab}	34.47±1.74 ^e	6.85±0.06 ^g
Y18-33	0.324±0.05 ^b	4.06±0.72 ^a	34.84±0.46 ^e	8.58±0.02 ⁱ

† 同行数据不同上标字母表示在 P<0.05 水平上进行 ANOVA 检验,差异显著。

在模拟苹果酒发酵条件的培养基中 GSH 浓度高达 46.80 mg/L,单位细胞产 GSH 能力为 8.95 mg/g,是出发菌 Y-18 的 2.18 倍。其次,Y18-33 菌株单位细胞产 GSH 含量分别为 8.58 mg/g,GSH 生产能力仅次于 Y18-20,这两株酵母菌在模拟苹果酒发酵 pH 及温度条件下产 GSH 能力显著高于其它菌株。

2.3 高产 GSH 酵母突变株的传代稳定性研究

诱变育种获得的菌株必须是具备遗传稳定性的突变株,才能应用到工业化实际生产中,菌种在保藏和应用时突变的频率较低。对突变菌株进行一段时间的培养和检测,连续传代考察 GSH 高产菌株基因的稳定性,结果见表 5。

表 5 突变株的遗传稳定性

Table 5 Stability experiment of Y18-20 mutant

传代数/代	生物量/(g · L ⁻¹)	GSH 浓度/(mg · L ⁻¹)
1	9.93	46.80
2	9.82	42.24
3	9.80	44.84
4	9.75	43.32
5	9.78	43.60
6	9.67	42.25

突变株 Y18-20 生物量及发酵液 GSH 浓度随传代代数变化幅度不大,平均值为 43.25 mg/L,仅下降了 7.58%,单位细胞产 GSH 能力均值为 8.39 mg/g,比第一代降低了 6.27%,说明该突变株具有较良好的遗传稳定性。

2.4 酵母生产 GSH 的发酵条件研究

GSH 在酵母细胞胞内生成,部分分泌到胞外,在苹果酒发酵过程中,接种的酵母菌分泌到胞外的 GSH 对苹果酒发酵及抗氧化能力影响较大。探讨发酵条件对酵母菌 Y18-20 生物量及 GSH 浓度的影响,优化 Y18-20 培养基及发酵条件,为其在苹果酒酿造中的应用提供参考。

2.4.1 pH 对菌体生物量和发酵液 GSH 浓度的影响 pH 对微生物生长和产物代谢的影响主要存在以下几个方面:① 改变细胞膜通透性,调控细胞膜电荷状态,影响微生物代谢产物的生成和排泄;② 改变酶的活性,影响菌体的新陈代谢;③ 影响培养基中某些组分的解离,影响菌体对基体的吸收和细胞的结构,影响产物的合成^[17]。由图 3 可知,菌株 Y18-20 在低 pH 条件下生长状况较好,抵御外界酸变化的能力较强,当酵母细胞遭遇低 pH 胁迫时,细胞能以增加 GSH 合成并向胞外分泌 GSH 的方式来响应和抵御外界 pH 的降低。所以该酵母在 pH 3.4~3.6 时,发酵液中 GSH 积累量较高,生物量最高达到 8.68 g/L,GSH 浓度为 38.79 mg/L。

2.4.2 糖度对菌体生物量和发酵液 GSH 浓度的影响 葡萄糖是酵母菌生长的速效碳源,初始糖度对酵母的生长和 GSH 的积累有重要影响。由图 4 可知,当糖度小于 12 °Brix 时,酵母生长受到碳源浓度的抑制,发酵液中 GSH 浓度较低,当糖度大于 12 °Brix,葡萄糖对于酵母菌生长的影响较小,GSH 浓度趋于平衡,浓度为 47.07 mg/L。

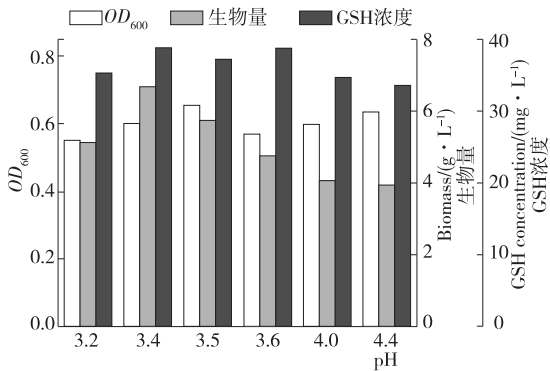


图 3 初始 pH 对酵母菌生物量和发酵液 GSH 浓度的影响
Figure 3 Effect of initial pH on the yeast biomass and GSH concentration

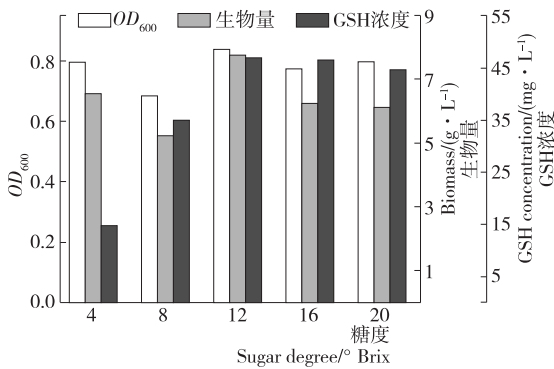


图 4 初始糖度对酵母菌生物量和发酵液 GSH 浓度的影响
Figure 4 Effect of initial sugar degree on the yeast biomass and GSH concentration

2.4.3 温度对菌体生物量和发酵液 GSH 浓度的影响 温度对微生物的生化反应和生长繁殖有重要影响,一般而言,生长速率随着温度的升高而增加,温度会影响细胞酶反应,改变代谢产物的合成和代谢调控机制,但温度提高会破坏机体重要组成成分如蛋白质、核酸等,最适发酵温度与最适产物积累温度往往存在差异^[18]。由图 5 可知,发酵温度对 Y18-20 生物量及发酵液中 GSH 浓度影响明显,发酵液中 GSH 浓度与菌体生物量的变化趋势较一致,随着培养温度的升高,GSH 浓度和生物量有明显的提高,在 30 °C 时达到最大值。当温度超过 30 °C 时,发酵液中 GSH 浓度略有下降,主要由于高温条件会导致积累的 GSH 发生氧化分解。试验确定最佳发酵温度为 30 °C,此时生物量为 8.02 g/L,发酵液中 GSH 浓度为 49.68 mg/L。

2.4.4 接种量对菌体生物量和发酵液 GSH 浓度的影响 接种量主要影响微生物的发酵周期,接种量较大的培养基中含有较多的微生物生长所需的胞外酶和代谢物,菌体较快达到对数生长期,因而缩短了微生物生长代谢的延滞期,缩短了发酵周期。但接种量超过一定范围时,带入了较多代谢废物,菌体生长会受到干扰,细胞浓度下降。由图 6 可知,接种量为 8% 时发酵液中 GSH 浓度最高,达到 52.83 mg/L,之后随着接种量的增加有所下降。

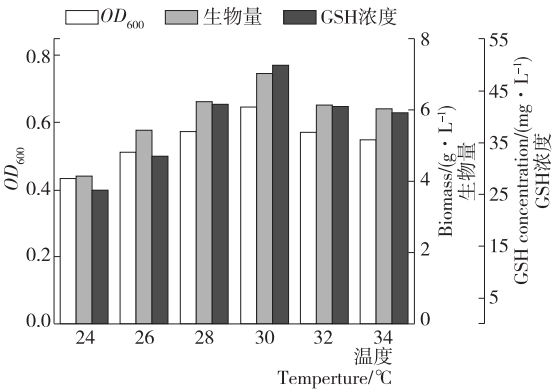


图 5 温度对酵母菌生物量和发酵液 GSH 浓度的影响
Figure 5 Effect of temperature on the yeast biomass and GSH concentration

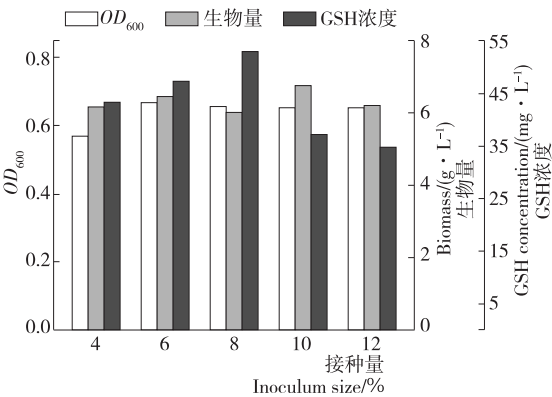


图 6 接种量对酵母菌生物量和发酵液 GSH 浓度的影响
Figure 6 Effect of inoculum size on the yeast biomass and GSH concentration

3 结论

本试验确定初筛苹果酒酵母诱变条件为:出发菌株生长时间 12 h、紫外照射时间 70 s、化学诱变处理剂 DES 体积分数 0.7%、筛选平板 ZnCl₂ 浓度所用剂量 1.5 g/L。

本试验经过高通量筛选出的突变株 Y18-20 在模拟苹果酒发酵条件的培养基中 GSH 浓度高达 46.8 mg/L,单位细胞产 GSH 能力为 8.95 mg/g,是出发菌 Y-18 的 2.18 倍。其次,Y18-33 菌株单位细胞产 GSH 含量分别为 8.58 mg/g, GSH 生产能力仅次于 Y18-20,这两株酵母菌在模拟苹果酒发酵 pH 及温度条件下产 GSH 能力显著高于其它菌株。从而得到了优良的高产 GSH 的突变菌株 Y18-20,且有比较好的发酵特性。经过高产 GSH 酵母突变株的传代稳定性研究,结果显示高产 GSH 的突变菌株 Y18-20 具有较好的遗传稳定性。

本试验确定了优良的高产 GSH 的突变菌株 Y18-20 生产 GSH 的发酵条件:pH 3.4~3.6、糖度 12 °Brix 左右、最佳发酵温度 30 °C、接种量 8%。

参考文献

[1] Pando R, Lastra A, Suarez B. Screening of enzymatic activities

innon-*Saccharomyces* cider yeasts[J]. Food Biochem., 2012 (36): 683-689.

[2] Aung, Lee Pin-rou, Yu Bin, et al. Cider fermentation with three *Williopsis saturnus* yeast strains and volatile changes[J]. Ann Microbiol., 2015, 65(2): 921-928.

[3] Li Xu, Chan Li-jie, Yu Bin, et al. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* var. mrakiion mango wine characteristics[J]. Acta Aliment., 2014, 43(3): 473-481.

[4] 陈坚, 卫功元, 李寅. 微生物发酵法生产谷胱甘肽[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(5): 104-110.

[5] Murata K, Tani K, Kato J. Glutathione production coupled with an ATP regeneration system[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1980, 10(1): 11-12.

[6] Kritzing E C, Bauer F F, Toit W J. Role of Glutathione in winemaking: a review[J]. J. Agr. Food Chem., 2013, 61(2): 269-277.

[7] Suarez B, Pando R, Fernandez N, et al. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider[J]. Food Microbiol., 2007, 24(1): 25-31.

[8] 贾学杰, 王雅琴, 李亮. 复合诱变和抗性筛选高产谷胱甘肽酵母菌株[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(10): 604-609.

[9] 江洁, 单立峰, 吴耘红, 等. 高产谷胱甘肽酵母菌株的筛选和抗乙硫氨酸突变株的选育[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 227-229.

[10] 王晓娜, 徐晓敏, 许波, 等. 高效液相色谱法测定 LO2 细胞中还原型及氧化型谷胱甘肽[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2013, 31(4): 484-488.

[11] Chen Wei, Zhao Yong, Seefeldt T, et al. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid[J]. J. Pharm. Biomed. Anal., 2008, 48(5): 1 375-1 380.

[12] Lucija Janes, Klemen Lisjak, Andreja Vanzo. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 674(2): 239-242.

[13] 贾学杰, 王雅琴, 李亮. 复合诱变和抗性筛选高产谷胱甘肽酵母菌株[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(10): 604-607.

[14] 张继琳, 张栩, 谭天伟. 96 孔板高通量选育产乙醇酵母[J]. 酿酒, 2007, 34(1): 71-73.

[15] 贺小贤. 谷胱甘肽生产菌种的选育及摇瓶发酵研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2008: 7-9.

[16] 诸葛健, 沈微. 工业微生物育种学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 88.

[17] 张继琳, 张栩, 谭天伟. 96 孔板高通量选育产乙醇酵母[J]. 酿酒, 2007, 34(1): 71-73.

[18] Dragone G, Mussatto S I, Almeida S, et al. Influence of temperature on continuous high gravity brewing with yeasts immobilized on spent grains[J]. Eur. Food Res. Technol., 2008, 228 (2): 257-264.