

硒酸精氨酸对酿酒酵母生长和硒含量的影响

刘安军, 王燕, 张国蓉, 陈彦彦

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 以硒酸精氨酸 (ASe) 为有机硒源培养富硒酵母, 并添加维生素 E (VE) 观察其对富硒的协同作用。分别以不同添加量和时间在培养基中添加 ASe, 在添加硒浓度为 120 mg/L 时补加不同浓度维生素 E, 用称重法测定生长曲线, 原子荧光光度计测硒含量。结果可见与二氧化硒 (SeO₂) 相比, 添加 ASe 对酵母生长没有抑制作用, 培养酵母 4 h 后添加 120 mg/L 硒, 8 h 收获, 酵母硒含量达到 87.0051 μg/g 干酵母。维生素 E 能促进酵母生长, 但对硒含量无明显影响。因此 ASe 能被酿酒酵母富集。

关键词: 硒酸精氨酸; 维生素 E; 酿酒酵母

中图分类号: TS261.1⁺1; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)08-0001-04

Effect of Selenoarginine on the Growth and Selenium Content Of Yeast

LIU An-jun, WANG Yan, ZHANG Guo-rong, CHEN Yan-yan

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: to investigate the coordinated effect of vitamin E(VE) on the selenium enrichment of a rich selenium yeast using selenoarginine as the organic selenium resource. Selenoarginine was added into the medium at different concentration and in different fermentation time and Vitamin E was also added with different concentration into the medium containing 120 mg/L selenium. Weighing method and atomy fluorescent photometer were accepted to determine the growth curve and selenium content, respectively. Unlike with SeO₂, selenoarginine had little inhibition effect on the growth of the yeast. Selenoarginine (120 mg/L) was added after 4 hour-fermentation of yeast and the selenium content could reach 87.0055 μg/g dry yeast after fermentated for 8 hours. It was also found that VE stimulated the growth of the yeast, but had little effect on the enrichment of selenium.

Key words: Selenoarginine; Vitamin E; *Sacharomyces cerevisia*

硒 (Selenium, Se) 是谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 的活性中心, 具有清除自由基, 防止细胞膜氧化的作用^[1]。缺硒可导致癌症、心肌梗塞等多种疾病的发生, 通过膳食摄取可起到预防的作用^[2,3]。酵母具有较高的富硒能力^[4], 作为一种安全有效的食品硒源受到国内外研究者的重视^[5]。已证明维生素 E (VE) 和硒在动物体内具有生物协同作用^[6], 故添加 VE 有可能促进酵母对硒的富集。本文报道了添加 ASe 和 VE 以获得富硒酵母的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisia*), 由天津科技大学食品工程与生物技术学院菌种室提供。

1.1.2 试剂

收稿日期: 2007-05-14

作者简介: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 研究方向为食品功能因子与保健机理

硒酸精氨酸为本实验室合成产品; 葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨和琼脂粉均为分析纯; VE 胶丸购自天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂 (国药准字 H12020730); 高氯酸、硝酸、盐酸均为优级纯。

1.1.3 培养基

斜面活化培养基: 10 Bx° 麦芽汁培养基; 液体种子培养基: 葡萄糖 2%、蛋白胨 2%、酵母浸粉 1%、pH 6.0; 液体发酵培养基: YEPD。

1.1.4 主要仪器

HYG-IIa 回转式恒温调速摇瓶柜 (上海新蕊自动化控制设备有限公司); YXQ-SG46-280S 压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); GHX-9160B-1 隔水式恒温培养箱 (上海福玛实验有限公司); TCG-16B 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); AFS-830 型双道原子荧光光度计 (北京吉天仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵培养方法

种子培养: 将菌种从保藏斜面接到活化斜面培养

基上, 30 °C 培养 48 h 后接到种子培养基中, 30 °C 100 r/min 震荡(下同)培养 36 h; 发酵培养: 接种量 10%, 250 mL 三角瓶, 装液量 100 mL, 添加 ASe 或 VE, 30 °C 震荡发酵培养至收获。

1.2.2 细胞生物量的测定

将发酵液在 4500 r/min 下离心 5 min, 弃上清液, 沉淀蒸馏水洗涤后再次离心, 所得酵母泥于 80 °C 烘干至恒重并称重。

1.2.3 硒含量的测定

1.2.3.1 样品处理:

精密称取一定量的酵母样品, 加 10 mL 硝酸冷消化过夜, 于第二天在电热板加热驱酸。加热后期加入高氯酸 2 mL, 继续消化。最后加入 5 mL 盐酸, 定容至 50 mL, 为原子荧光光度计待测液。采用双道原子荧光光度计测定产物硒含量。

1.2.3.2 标准曲线的制作

配制浓度分别为 1.0000 μg/L, 2.0000 μg/L, 4.0000 μg/L, 8.0000 μg/L 和 10.0000 μg/L 的硒标准溶液, 按设置的仪器和测量条件测定各标准液的荧光强度。以浓度作横坐标, 荧光强度作纵坐标绘制标准曲线, 标准曲线见图 1。

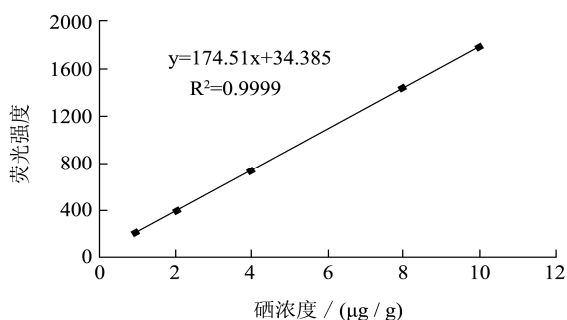


图 1 硒含量的标准曲线

Fig.1 Standard curve of selenium content

1.2.3.3 硒含量的测定与计算

将样品消化后的待测液以适当倍数稀释, 同样条件仪器和测量条件下测定其荧光强度。根据标准曲线得出测试液的硒浓度, 按下式计算样品硒含量:

$$\text{样品硒含量} = C \times V \times n / W$$

其中: 样品硒含量, μg/g; C: 测试液硒浓度, μg/L; V: 测试液体积, L; n: 测试液稀释倍数; W: 样品的干燥重量, g。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线的测定

2.1.1 添加不同浓度 ASe 对酵母生长的影响

将 ASe 的添加量换算成硒原子的添加量, 即添加

相当于 20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L 和 120 mg/L Se 的 ASe, 称重法测定生长曲线, 横坐标为发酵时间(h), 纵坐标为酵母菌干重(g)(下同), 结果见图 2。

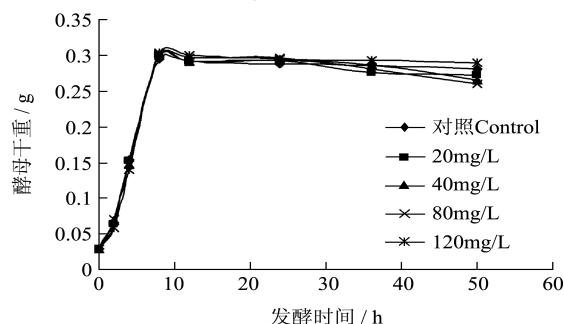


图 2 添加不同浓度 ASe 的生长曲线

Fig.2 Developing curve of adding ASe with different content

结果表明, 四个梯度的 ASe 在延迟期没有对酵母产生明显的抑制作用, 在稳定期后期添加 20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L Se 的酵母生物量与对照相比有所下降, 可能是由三角瓶误差随时间延长而显现的。实验期间酵母泥在颜色上与对照组一样均为乳白色。从实验结果看, 与文献报道的无机硒相比, ASe 虽然对酵母生长没有明显促进作用, 但显现出低毒的优势。

2.1.2 不同时间添加 ASe 对酵母生长的影响

由图 2 可知, 0~2 h 为酵母生长的延迟期, 2~8 h 为对数生长期, 8 h 后进入稳定期。据文献报道, 酵母菌在对数期对硒的吸收能力最强, 故选择 4 h 做为添加对比时间, Se 浓度为 120 mg/L, 结果见图 3。

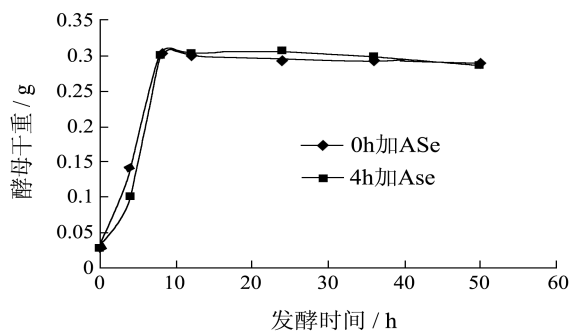


图 3 不同时间添加 ASe 的生长曲线

Fig.3 Developing curve of adding ASe at different time

由图 3 可知, 4 h 加 ASe 使酵母的延迟期略有延长, 在 4 h 加 ASe 后, 与酵母的 0 h 加硒的曲线无明显区别。

2.1.3 添加 ASe 和 VE 对酵母生长的影响

ASe 的添加量选择为 120 mg/L Se 浓度, VE 和 ASe 同时在 0 h 添加, 测得酵母生长曲线如图 4。

图 4 结果表明, VE 的添加对酵母的生长有促进作用, 这种影响在进入稳定期时显现出来, 可能是由于在酵母生长初期, 发酵液中酵母代谢产生的氧化物

质较少,对其影响很小。在稳定期,VE作为一种胞外抗氧化物质可以有效降低环境中不良因素对酵母的影响,使其生物量能够整体上升。在50h时,可能由于酵母对添加浓度为0.2 mL/100 mL VE的吸收更为有效,故此时酵母的生物量略高于添加0.4 mL/100 mL VE的酵母。

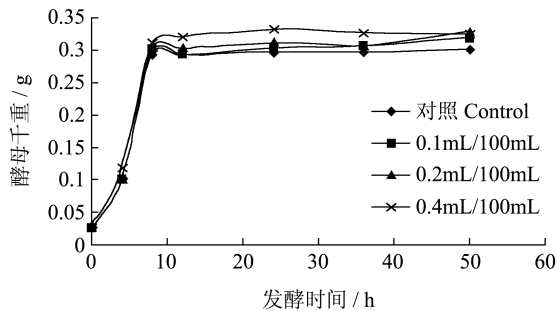


图4 添加Ase和VE的生长曲线

Fig.4 Developing curve of adding ASe and VE

2.2 酵母菌中硒含量的测定

2.2.1 添加不同浓度 ASe 酵母的硒含量

按方法 1.2.3 测得酵母中硒含量见表 1。

表 1 不同浓度 ASe 酵母的含硒量 ($\mu\text{g/g}$ 干酵母)

Table 1 Yeast selenium content with adding different ASe concentration ($\mu\text{g/g}$ dry yeast)

Se浓度 ($\mu\text{g/L}$)	发酵时间/h			
	8	24	36	50
对照	0.1217	0.1315	0.6886	0.8461
20	2.7778	16.2796	20.3476	20.6232
40	5.6449	16.7983	36.1841	32.5901
80	7.3975	22.5225	61.6817	59.5851
120	33.1631	43.0454	91.5029	88.6828

由表 1 知,酵母硒含量随 ASe 浓度的增加而递增;每个浓度梯度的硒含量随时间的延长而增加。从结果来看,添加 120 mg/L Se, 培养 36 h 可获得最高硒含量,即 91.5029 $\mu\text{g/g}$ 干酵母。

2.2.2 不同时间添加 ASe 酵母的硒含量

表 2 不同时间添加 ASe 酵母的含硒量 ($\mu\text{g/g}$ 干酵母)

Table 2 Yeast selenium content with adding ASe at different time ($\mu\text{g/g}$ dry yeast)

加ASe时间/h	发酵时间/h			
	8	24	36	50
0	33.1631	43.0454	91.5029	88.6828
4	87.0051	87.4841	87.7886	72.7547

在培养 4 h 后加硒对酵母富硒的影响是非常大的,此结果见表 2。培养 4 h 加硒可以在酵母刚进入生长稳

定期时就有较高的硒含量,且与 0 h 加硒培养 50 h 时硒含量相当,虽然比 0 h 加硒培养 36 h 时的硒含量略低,但综合来看,此时收获酵母性价比还是很高的。

2.2.3 添加 ASe 和 VE 酵母的硒含量

生物体内的抗氧化系统由抗氧化酶和抗氧化物质相互协同构成。前者主要由 GPx、SOD (超氧化物歧化酶)、CAT (过氧化氢酶) 等组成,在细胞内能够有效消除过氧化物;而后者主要由 VE、VC、GSH、类胡萝卜素等组成,在细胞外可以防止过氧化物生成。很多动物实验表明,在补硒的同时补充 VE,可以使二者具有很好的协同作用,能够有效增强抗氧化物酶 (主要是 GPx) 的活性,减少体内硒的消耗。在酵母培养过程中同时添加 ASe 和 VE,结果见表 3。

表 3 添加 ASe 和 VE 酵母的含硒量

Table 3 Yeast selenium content with adding ASe and VE

VE浓度 ($\text{mL}/100\text{mL}$)	发酵时间/h			
	8	24	36	50
对照	33.1631	43.0454	91.5029	88.6828
0.1	8.4607	62.8136	76.2193	69.4816
0.2	10.5568	68.2961	74.132	68.5235
0.4	3.4468	4.3033	5.8499	27.7248

由表 3 可知,当浓度为 0.4 mL/100 mL 时表现出低量硒富集的现象,可能是因为高浓度 VE 与酵母外环境中氧化物质相作用,使其能够减少抗氧化物酶 GPx 的合成,进而减少了对硒的代谢。在 VE 低浓度时对硒的富集是有益的,添加 0.2 mL/100 mL 培养 36 h 时可获得较高的硒含量,但与对照相比还有很大差距,虽然此时具有较高的生物量,综合考虑,只添加 ASe 时的性价比较高。

2.3 讨论

硒是生物体所必需的微量营养元素。研究表明,硒具有多方面的功能,突出的作用是能清除体内过多的活性氧自由基,在预防肿瘤、抗衰老和预防心血管等疾病方面起着非常重要的作用^[7-8]。同时,缺硒是克山病和大骨节病的主要原因,缺硒还可引起白内障、肝坏死、胰腺纤维化等疾病,最新研究表明,缺硒还可能与爱滋病有关^[9]。

一般情况下,天然食品中硒含量较低不能满足人体对硒的需求,亚硒酸钠等无机硒因其毒性高通常不适合于直接添加到食品中,因此通过生物富硒是生产富硒食品及其添加剂的最好方法^[10]。酵母具有较高的富硒能力,作为一种安全有效的食品硒源受到国内外研究者的重视,并对硒酵母中硒的有机结合形态、生

物学作用机制等进行了研究^[11-12]。由于高浓度的无机硒通常对酵母有明显的抑制作用,因此硒的添加量不能过高,微生物的富硒效果和富硒量也比较低。而本实验采用的有机硒ASe对酵母的生长没有明显的毒副作用,不降低酵母的生物量,是一种较适宜的富硒酵母硒添加剂。

维生素E与硒具有协同作用,共同发挥着抗氧化作用。维生素E是一种非特异性的生物抗氧化剂,维生素E结合在细胞膜上使细胞免受自由基的进攻和过氧化损坏,而硒通过GPx等阻断自由基对机体的损伤,而且硒又是GPx的必需成分,所以硒和维生素E在抗氧化中起着协同作用。维生素E可以看做是防止过氧化物生成的第一道防线,含硒的GPx起着第二道防线的作用。维生素E和硒在防止过氧化损害方面具有重要互补作用(Hoekstra, 1975)。共同保护细胞膜的质膜结构的完整性。有实验结果来看,在酵母细胞内,大量的VE会降低酵母细胞对ASe的利用,不利于富硒的进行;而适量的VE虽然可以增加酵母的生物量和硒含量,但对富硒的促进作用却低于对照组。可见,VE和硒的协同作用对增加酵母生物量和硒含量没有显著的效果。

3 结论

ASe作为一种新型低毒有机硒添加剂,能够较安全地应用于酵母的富硒过程中,综述实验结果,选择在发酵4h时添加120mg/L Se浓度,继续培养4h可获比较合适的富硒量87.0051 $\mu\text{g/g}$ 干酵母;VE在动物体内表现出增强含硒抗氧化酶活性和含量的作用,而在酵母胞内对硒的富集却没有类似结果。

本实验旨在验证一种新型有机硒添加剂对酵母生长和富硒的影响,实验结果表明,ASe能起到良好的富硒作用,作为一种对酵母无明显毒副作用的有机硒添加剂,具有良好的开发前景。

参考文献

- [1] Marinho S H, Antunes F, Pinto R E. Role of Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Rad Biol & Med*, 1997, 22: 871-883
- [2] Finley J W, Davis C D, Feng Y. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J Nutr*, 2000, 130(9): 2384-2389
- [3] Wright G S, Gruidl M E. Early detection and prevention of lung cancer. *Curr Opin Oncology*, 2000, 12(2): 143-148
- [4] Janz B, Suhajda, Pais I. In: Yeasts enriched with microelements. *Food Technology International Europe*, 1993: 173-177
- [5] LI S M (李淑敏). A study and prospect trace element enriched yeast. *Microbiology (微生物学通报)*, 1999, 26(3): 220-222
- [6] 曹伟新. 临床营养新概念与新技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002
- [7] Kohrl J, Brigelius-Flohe R, Bock A. et al. Selenium in biology: facts and medical perspective[J]. *Biological Chemistry*, 2000, 381(9-10): 849-864
- [8] Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review[J]. *Public Health Nutr*, 2001, (4): 593-599
- [9] 熊慧珊. 功能性食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- [10] 赫素娥, 滕冰. 硒酵母培养过程中亚硒酸钠添加量对硒酵母中硒含量分布的影响[J]. *精细化工*, 1997, 14(1): 27-29
- [11] Bronzetti G, Cini M, Andreoli E et al. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mutat Res*, 2001, 496(1/2): 105-115
- [12] Knowles S O, Grace N D, Wurms K et al. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. *J Dairy Sci*, 1999, 82(2): 429-437

勿信茅台酒“护肝”谬论

酒精对肝脏有损伤,这在国际学术界早有定论。但是贵州茅台酒竟然公开发表文章称“茅台酒不仅能‘护肝’,而且还具有‘抗肝纤维化、肝硬化’的作用。”目前酒精性肝病已成为仅次于病毒性肝病的第二大肝病病因,上海中医药大学王灵台教授甚至专门做了一个课题,让老鼠喝茅台酒进行观察,结果说明“一定量下茅台酒同样对肝脏有损害作用”。