

# 两阶段 pH 控制方式提高富硒产朊假丝酵母的性能

王大慧, 刘恩承, 王冬华, 卫功元

(苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

**摘要:** 为了提高富硒产朊假丝酵母的性能, 本文在摇瓶培养和分批培养的基础上, 考察了不同 pH 控制方式对流加培养条件下富硒产朊假丝酵母细胞生长、谷胱甘肽 (GSH) 合成和有机硒转化的影响, 结果发现: 在 12 h 将 pH 从 3.5 切换至 5.5 (pH 3.5→5.5) 的两阶段 pH 控制方式最有利于富硒产朊假丝酵母胞内 GSH 和有机硒含量的提高。在 pH 3.5→5.5 条件下, 富硒产朊假丝酵母胞内 GSH 含量、有机硒含量和有机硒转化率分别达到最大值 13.09 mg/g、1.88 mg/g 和 94.69%。通过对酵母胞内 GSH 合成关键酶活性、氧化还原酶活性和能量代谢物质 ATP 水平进行测定, 发现 pH 3.5→5.5 两阶段 pH 控制方式提高了富硒酵母胞内过氧化氢酶活性, 降低了丙二醛含量, 为酵母进行有机硒富集与转化以及 GSH 合成与积累提供了合适的氧化还原环境, 并最终提高了富硒酵母的性能。

**关键词:** 富硒酵母; 有机硒含量; 谷胱甘肽; 流加培养; 产朊假丝酵母

文章编号: 1673-9078(2020)09-34-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0180

## Improved Performance of Selenium-Enriched *Candida utilis* Using a Two-stage pH Control Strategy

WANG Da-hui, LIU En-cheng, WANG Dong-hua, WEI Gong-yuan

(School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Effects of different pH control modes on yeast cell growth, glutathione biosynthesis and organic selenium (Se) transformation during fed-batch culture of Se-enriched *Candida utilis* were investigated. Based on the results derived from both flask culture and batch culture, the fed-batch culture was carried out to improve the performance of Se-enriched *C. utilis*. A two-stage pH control strategy of shifting pH from 3.5 to 5.5 at 12 h (pH 3.5→5.5) was found to be the optimum condition for the increase in intracellular GSH and organic Se contents of Se-enriched *C. utilis*. The maximal intracellular glutathione, organic selenium content and organic selenium bioconversion rate of 13.09 mg/g, 1.88 mg/g and 94.69% were achieved, respectively, under pH 3.5→5.5. According to the assay of key enzyme activity involved in glutathione biosynthesis, the measurement of intracellular oxidoreductases, and the determination of energy metabolism substance ATP, the two-stage pH control strategy of pH 3.5→5.5 was found to favor the increase in catalase activity and the decrease in malondialdehyde content of Se-enriched *C. utilis*. Results indicated that pH 3.5→5.5 provided appropriate intracellular redox environment for selenium assimilation and transformation, as well as glutathione biosynthesis and accumulation, all of which ultimately improved the performance of Se-enriched yeast.

**Key words:** selenium-enriched yeast; organic selenium content; glutathione; fed-batch culture; *Candida utilis*

引文格式:

王大慧,刘恩承,王冬华,等.两阶段 pH 控制方式提高富硒产朊假丝酵母的性能[J].现代食品科技,2020,36(9):34-40

WANG Da-hui, LIU En-cheng, WANG Dong-hua, et al. Improved performance of selenium-enriched *Candida utilis* using a two-stage pH control strategy [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 34-40

硒是维持人体正常生理代谢必不可少的一种微量元素, 硒缺乏可引发多种疾病<sup>[1,2]</sup>, 而富硒食品可有效补充人体所缺乏的硒。富硒酵母因其富含 B 族维生素、食用安全及生物利用率高等优点已成为最佳补硒载体

收稿日期: 2020-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21506136); 苏州市应用基础研究计划项目 (SNG201606)

作者简介: 王大慧 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 卫功元 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程

<sup>[3,4]</sup>。富硒酵母是细胞通过自身代谢活动, 将无机硒 (如亚硒酸钠等) 与胞内蛋白质等大分子物质结合, 从而转化为有机硒<sup>[5]</sup>。一直以来, 酿酒酵母作为富硒的主要微生物, 在富硒研究和富硒酵母生产中扮演着重要角色<sup>[3,6]</sup>。近年来, 利用产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 进行富硒研究逐渐引起关注, 该种酵母比酿酒酵母具有更为宽广的营养谱以及更强的胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成能力, 因而在富硒酵母制备中将更具开发潜力<sup>[7-9]</sup>。

酵母胞内有机硒和 GSH 含量是体现富硒酵母性能高低的两个重要技术指标<sup>[4,10]</sup>。硒是细胞内谷胱甘肽过氧化物酶的重要组成部分, 酵母富硒提高了谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 同时也更多地消耗了该酶的直接底物 GSH<sup>[11]</sup>。此外, 亚硒酸钠容易与 GSH 发生氧化还原反应而形成红色单质硒<sup>[12]</sup>, 且亚硒酸钠也会影响细胞膜的结构和功能, 导致 GSH 向胞外泄漏<sup>[13]</sup>。因此, 在富硒酵母的制备过程中, 胞内有机硒含量和 GSH 含量很难同时维持在较高水平。为此, 作者所在研究团队已经在菌种选育、培养基优化、培养条件调控及前体物质添加等方面开展研究<sup>[14-16]</sup>, 较好地解决了上述矛盾, 制备得到的富硒产朊假丝酵母具有较高性能。

然而, 已有富硒酵母制备的研究均是建立在分批培养的基础上, 酵母细胞的生物量还处于较低水平 (<15 g/L)。截止目前, 对于产朊假丝酵母在较高细胞密度下如何富硒、是否还能保持较高性能等问题仍然缺乏深入理解和掌握。为此, 本文在前期研究弱酸胁迫 (pH 3.5) 提升富硒产朊假丝酵母性能的基础上<sup>[16,17]</sup>, 考察流加培养条件下, 不同 pH 控制方式对富硒酵母性能的影响, 并对相关生理机制进行解析, 为进一步提高富硒产朊假丝酵母性能提供可行的技术参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株与培养基

*C. utilis* CCTCC M 209298, 由苏州大学微生物生理与代谢调控研究室保藏。

种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 10 g/L, pH 6.0。

发酵培养基: 葡萄糖 30 g/L, 硫酸铵 8 g/L, 磷酸二氢钾 3 g/L, 无水硫酸镁 0.25 g/L, pH 5.5。

流加培养基: 葡萄糖 600 g/L, 硫酸铵 80 g/L, 磷酸二氢钾 30 g/L, 无水硫酸镁 2.5 g/L。葡萄糖单独灭菌, 室温下与其他成分混合使用。

### 1.2 材料与试剂

$\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -GCS) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 测定试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所有限公司; 所有试剂均为国产分析纯, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

### 1.3 仪器与设备

BIOTECH-5BGZ 全自动搅拌式发酵罐, 上海保兴生物工程设备有限公司; Waters1525 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; LD5-2A 离心机, 北京京立离心机有限公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; SW-CJ-2A 超净工作台, 吴江市龙宏净化设备有限公司; HZ-2010K 恒温摇瓶柜, 太仓市华利达实验仪器设备有限公司; LDZX-50KB 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; X0-150D 超声波信号发生器, 南京先欧仪器制造有限公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 种子培养

斜面种子活化 4 h 后, 接种至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 摇床中培养 20 h, 温度 30  $^{\circ}$ C, 转速 200 r/min。

#### 1.4.2 摇瓶培养

将种子按体积分数 10% 的接种量接入到装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下摇床培养 30 h。接种前, 向发酵培养基中加入灭菌后的亚硒酸钠至 15 mg/L, 并将初始 pH 调节至 2.5、3.5、4.5、5.5 和 6.5。

#### 1.4.3 分批培养

按体积分数 10% 的接种量将培养好的种子接种至装有 3 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中, 在温度 30  $^{\circ}$ C, 转速 400 r/min 和通气量 3 L/min 的条件下培养 30 h。pH 值采用梅特勒电极在位监测, 并通过自动流加 3 mol/L  $H_2SO_4$  或 3 mol/L NaOH 溶液将 pH 控制在 3.5 或 5.5。发酵培养基中亚硒酸钠的初始浓度为 15 mg/L。

#### 1.4.4 流加培养

在总葡萄糖质量浓度为 100 g/L 的前提下, 以多项式流加的方式对富硒产朊假丝酵母进行培养, 具体操作方法见文献<sup>[18]</sup>。考虑到培养过程一直需要有葡萄糖的供给, 结合分批培养中葡萄糖的消耗情况, 确定流加发酵开始时间为 12 h<sup>[8]</sup>。流加培养基中亚硒酸钠浓度为 60 mg/L。流加培养过程中, 将溶氧控制在不低于 10% 的水平。根据实验需要, 将 pH 恒定控制在 3.5 或 5.5, 或采取两阶段 pH 控制方式 (即在 12 h 切换 pH 3.5 $\rightarrow$ 5.5 或 pH 5.5 $\rightarrow$ 3.5)。

#### 1.4.5 无细胞提取物的制备

取 5 mL 发酵液, 于 4  $^{\circ}$ C、8000 r/min 下离心 10 min, 生理盐水洗涤两次后, 将湿细胞重新悬浮在 5 mL 磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 中, 超声波破碎 10 min, 在 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 下离心 20 min 后得到

的上清液即为无细胞提取物，用于测定胞内物质含量和关键酶活性。

### 1.4.6 指标测定

酵母细胞干质量测定、葡萄糖浓度测定、胞内 GSH 提取和测定方法、胞内 GSH 含量计算方法、细胞和 GSH 得率与生产强度的计算方法见文献<sup>[18]</sup>。

无机硒浓度、胞内总硒的测定、胞内有机硒含量及有机硒转化率的计算方法见文献<sup>[8]</sup>。

富硒产朊假丝酵母胞内  $\gamma$ -GCS、SOD、CAT 活性以及 MDA 含量均采用试剂盒进行测定，操作方法和步骤按照试剂盒说明书进行。

胞内 ATP 含量测定采用高效液相色谱法，具体方法和操作步骤见文献<sup>[17]</sup>。

### 1.5 数据统计分析

所有摇瓶实验数据均为 3 组独立实验样品的平均值，所有分批培养和流加培养实验数据均为 3 次检测结果的平均值。数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，结果以  $X \pm SD$  表示，组内、组间比较均采用  $t$  检验进行分析，当  $p < 0.05$  时认为有显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同初始 pH 对富硒产朊假丝酵母摇瓶培

养的影响

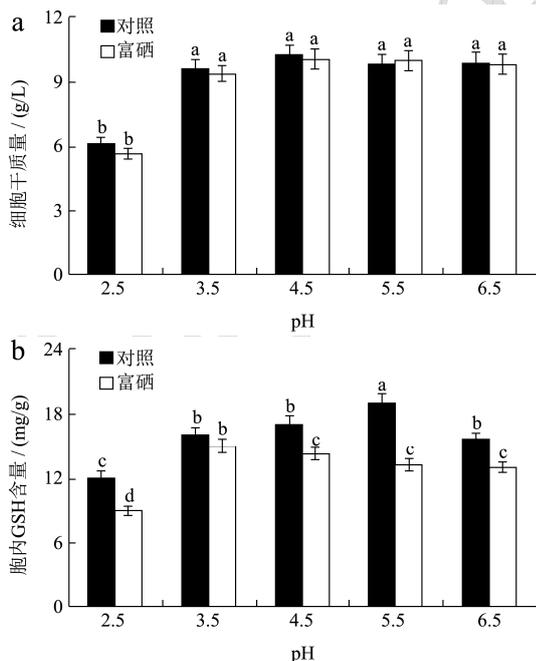


图 1 不同初始 pH 对富硒产朊假丝酵母摇瓶培养的影响  
Fig.1 Effect of different initial pHs on Se-enriched *C. utilis* preparation in flasks

注：不同小写字母表示显著性差异 ( $p < 0.05$ )，图 4~7 同。

在摇瓶中考察不同初始 pH 对富硒产朊假丝酵母细胞生长和 GSH 合成的影响，结果如图 1 所示。可以看出，除了 pH 2.5 以外，富硒酵母细胞在 pH 3.5~6.5 范围内均可以正常生长，不同 pH 条件下的细胞干质量没有明显差异（均在 10 g/L 左右）；并且与不富硒组（对照）相比，富硒环境下的酵母细胞干质量也没有显著变化。然而，酵母在不同 pH 条件下的胞内 GSH 含量却有所不同。对照组中，胞内 GSH 含量在 pH 5.5 时达到最大值 18.85 mg/g，而富硒酵母的胞内 GSH 含量在 pH 3.5 时达到最大值 14.99 mg/g。以上结果表明，酵母细胞在富硒过程中影响了 GSH 的积累并降低了胞内 GSH 含量。为此，后续研究将重点对产朊假丝酵母在 pH 3.5 和 5.5 时的富硒过程进行考察和分析。

### 2.2 富硒产朊假丝酵母分批培养过程分析

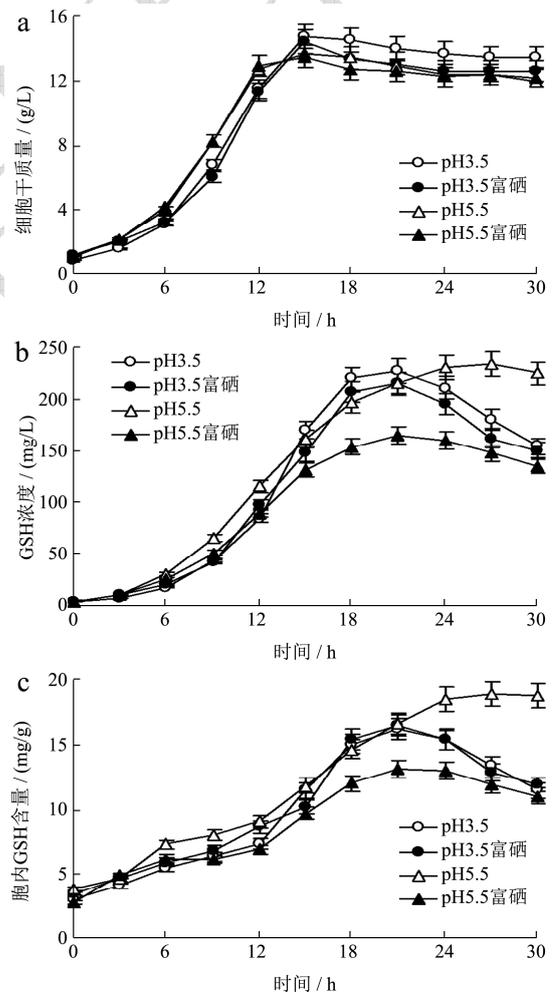


图 2 不同 pH 条件下的富硒产朊假丝酵母分批培养过程  
Fig.2 Time-course of batch culture of Se-enriched *C. utilis* under different pHs

在 pH 3.5 和 5.5 条件下对富硒产朊假丝酵母进行分批培养，结果如图 2 所示。为了便于比较，分别将

pH 3.5 和 5.5 条件下不富硒的分批培养过程设为对照组。可以看出, pH 5.5 时的富硒产朊假丝酵母生长速率(12 h 前)高于 pH 3.5 时的结果, 但是最终细胞干质量没有明显差异。对于 GSH 合成, pH 3.5 条件下的富硒酵母能将胞内 GSH 含量保持在与对照组相当的水平(16.48 mg/g), 而 pH 5.5 条件下的富硒酵母最大胞内 GSH 含量(13.13 mg/g)比对照组低 30.65%。进一步地, 对产朊假丝酵母胞内 GSH 含量处于最大值时(21 h)的有机硒进行检测, 结果表明, pH 3.5 条件下的胞内有机硒含量和有机硒转化率分别为 0.99 mg/g 和 85.94%, 而 pH 5.5 时两项指标的水平分别为 1.13 mg/g 和 91.81%。由此可见, pH 3.5 有利于富硒产朊假丝酵母胞内 GSH 积累, 而 pH 5.5 则有利于胞内有机硒含量的提高。

### 2.3 不同 pH 控制方式下富硒产朊假丝酵母流加培养过程分析

#### 加培养过程分析

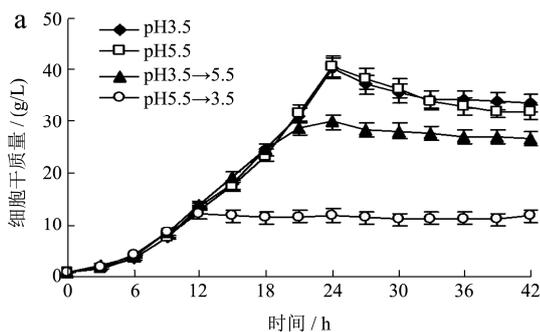


表 1 不同 pH 控制方式下的富硒产朊假丝酵母流加培养过程参数

Table 1 Kinetic parameters involved in fed-batch culture of Se-enriched *C. utilis* under different pH control modes

过程参数*	pH 控制方式			
	pH 3.5	pH 5.5	pH 3.5→5.5**	pH 5.5→3.5**
总葡萄糖质量浓度/(g/L)	97.90±0.23 <sup>a</sup>	98.70±0.17 <sup>a</sup>	97.80±0.25 <sup>a</sup>	99.60±0.31 <sup>a</sup>
最大细胞干质量/(g/L)	40.20±1.12 <sup>a</sup>	40.66±0.97 <sup>a</sup>	29.96±1.09 <sup>b</sup>	12.42±0.67 <sup>c</sup>
最大 GSH 质量浓度/(mg/L)	337.01±6.33 <sup>a</sup>	331.92±12.71 <sup>a</sup>	355.37±15.44 <sup>a</sup>	89.87±10.68 <sup>b</sup>
最大胞内 GSH 含量/(mg/g)	9.82±0.14 <sup>b</sup>	10.06±0.22 <sup>b</sup>	13.09±0.08 <sup>a</sup>	8.63±0.28 <sup>c</sup>
细胞得率/(g/g)	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.31±0.01 <sup>b</sup>	0.13±0.01 <sup>c</sup>
GSH 得率/(mg/g)	3.44±0.06 <sup>a</sup>	3.36±0.13 <sup>a</sup>	3.63±0.16 <sup>a</sup>	0.90±0.11 <sup>b</sup>
细胞生产强度/[g/(L·h)]	1.68±0.05 <sup>a</sup>	1.70±0.04 <sup>a</sup>	1.25±0.05 <sup>b</sup>	1.04±0.06 <sup>c</sup>
GSH 生产强度/[mg/(L·h)]	9.36±0.18 <sup>a</sup>	10.06±0.38 <sup>a</sup>	9.87±0.43 <sup>a</sup>	7.49±0.89 <sup>b</sup>
有机硒含量/(mg/g)	1.50±0.06 <sup>b</sup>	1.56±0.04 <sup>b</sup>	1.88±0.04 <sup>a</sup>	1.14±0.02 <sup>c</sup>
有机硒转化率/%	86.02±0.61 <sup>b</sup>	85.69±0.54 <sup>b</sup>	94.69±0.42 <sup>a</sup>	21.67±0.24 <sup>c</sup>

注: \*有机硒含量和有机硒转化率计算数据取自 36 h; \*\*pH 切换时间为 12 h; 同一行中不同小写字母表示显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

可以看出, 富硒产朊假丝酵母在恒定 pH 3.5 和 5.5 时的生长情况基本一致, 细胞干质量均在 24 h 时达到最大值(约 40 g/L); 同时, GSH 合成、胞内 GSH 含量、有机硒含量以及有机硒转化率均没有显著差异(表

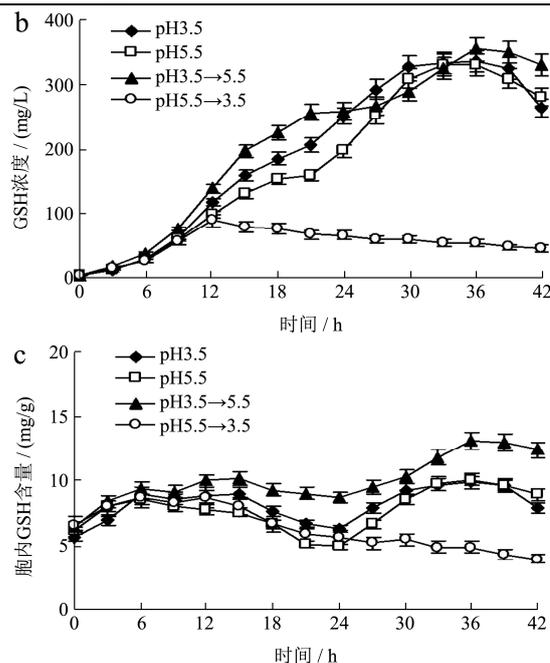


图 3 不同 pH 控制方式下的富硒产朊假丝酵母流加培养过程

Fig.3 Time-course of cell growth of Se-enriched *C. utilis* and GSH biosynthesis during fed-batch culture under different pH control modes

为了提高细胞密度, 采用流加发酵法对富硒酵母进行培养。将 pH 分别控制在恒定水平(pH 3.5 和 5.5)或两阶段方式(pH 3.5→5.5 和 pH 5.5→3.5), 不同 pH 控制方式下的富硒产朊假丝酵母流加培养过程如图 3 所示, 流加培养过程参数总结列于表 1。

1)。然而, pH 切换后的细胞生长、GSH 合成以及有机硒转化等过程均发生较大变化。在 pH 3.5→5.5 时, 富硒酵母细胞生长受到部分影响, 最大细胞干质量只有 29.96 g/L, 比恒定 pH 条件下的结果低了约 25%。

尽管如此,该 pH 控制方式并没有对 GSH 合成产生不利影响, GSH 浓度和胞内 GSH 含量在 36 h 时分别达到最大值 355.37 mg/L 和 13.09 mg/g。此外, pH 3.5→5.5 两阶段 pH 控制方式也有利于酵母细胞对硒的富集, 36 h 时胞内有机硒含量和有机硒转化率分别为 1.88 mg/g 和 94.69%。值得注意的是,在 pH 5.5→3.5 情况下,酵母细胞难以适应弱酸胁迫带来的冲击, 12 h 后细胞干质量几乎不变, GSH 浓度和胞内 GSH 含量均逐渐下降, 细胞对硒的富集能力也显著下降。

以上研究结果表明,将弱酸胁迫环境下 (pH 3.5) 培养得到的富硒酵母切换至 pH 5.5 环境中继续进行流加培养时, 细胞体现出更高的有机硒转化能力以及将胞内 GSH 含量维持在更高水平的能力。相反,若将在 pH 5.5 条件下培养得到的富硒酵母细胞置于 pH 3.5 环境中进行流加培养, 细胞对硒的吸收和转化以及 GSH 的积累均处于较低水平。为了揭示不同 pH 控制方式影响富硒产朊假丝酵母性能的生理机制, 后续研究将分别从胞内酶活和能量物质水平入手进行分析。

## 2.4 不同 pH 控制方式影响富硒产朊假丝酵母性能的生理机制

### 2.4.1 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶活性

$\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ( $\gamma$ -GCS) 是 GSH 生物合成途径中的关键限速酶, 其活性高低与 GSH 合成速率密切相关<sup>[19]</sup>。对不同培养时间(如 15、24 和 36 h)、不同 pH 控制方式下富硒产朊假丝酵母胞内  $\gamma$ -GCS 活性进行测定, 结果如图 4。

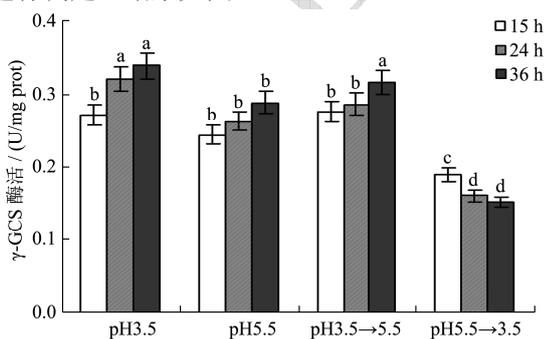


图4 富硒产朊假丝酵母胞内  $\gamma$ -GCS 活性

Fig.4 Activities of  $\gamma$ -GCS in Se-enriched *C. utilis*

可以看出, 恒定 pH 3.5 和 5.5 以及 pH 3.5→5.5 条件下的  $\gamma$ -GCS 均处于较高活性 (平均值 0.29 U/mg prot), 而在相同培养时间下, 这三种 pH 控制方式下的  $\gamma$ -GCS 活性差异不明显。此外,  $\gamma$ -GCS 活性在流加培养进程中呈现出逐渐增加的趋势, 但增幅不大。值得注意的是, 在 pH 5.5→3.5 情况下, 各个培养阶段的  $\gamma$ -GCS 活性均处于较低水平 (平均值 0.16 U/mg prot),

显示出  $\gamma$ -GCS 的活性受到了部分抑制。事实上, 弱酸胁迫 (pH 3.5) 有利于分批培养富硒产朊假丝酵母胞内  $\gamma$ -GCS 活性的提高<sup>[17]</sup>, 而 pH 5.5→3.5 显著降低了  $\gamma$ -GCS 活性, 则可能与 pH 切换的冲击极大地影响了富硒酵母细胞生长有关。

### 2.4.2 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性

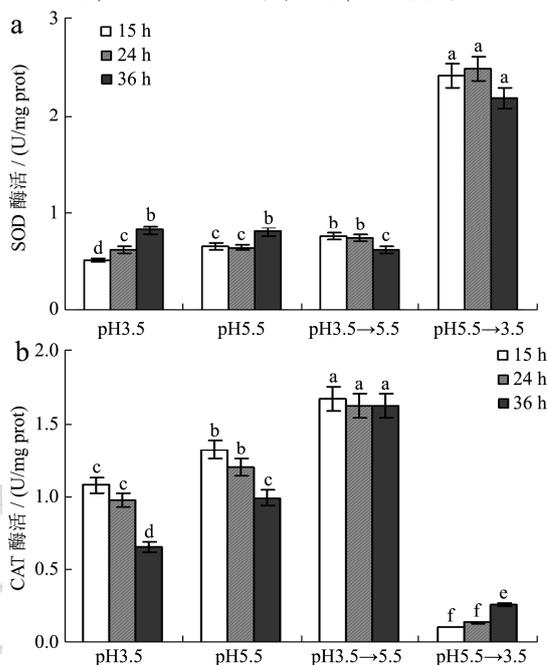


图5 富硒产朊假丝酵母胞内 SOD 和 CAT 活性

Fig.5 Activities of SOD and CAT in Se-enriched *C. utilis*

超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 参与胞内自由基的消除, 是维持胞内氧化还原环境的两个重要酶<sup>[20]</sup>。不同培养时间、不同 pH 控制方式下的 SOD 和 CAT 活性大小如图 5 所示。在恒定 pH 3.5 和 5.5 以及 pH 3.5→5.5 条件下, SOD 活性的平均值为 0.69 U/mg prot, 而 pH 5.5→3.5 条件下的 SOD 活性则显著提高 3.53~4.72 倍。与此相反, CAT 在恒定 pH 和 pH 3.5→5.5 时具有更高的活性, 而在 pH 5.5→3.5 时处于极低的水平 (平均值 0.17 U/mg prot)。特别地, 与恒定 pH 相比, pH 3.5→5.5 下的 CAT 在 15~36 h 范围内均保持更高的活性 (1.64 U/mg prot)。由此可见, SOD 和 CAT 在消除富硒产朊假丝酵母胞内自由基的过程中起着互补的作用。

酸胁迫处理和亚硒酸钠摄入均容易导致自由基的形成<sup>[15,16]</sup>, 而酵母胞内自由基的消除主要依赖于 GSH 等还原性物质以及 SOD 和 CAT 等氧化还原酶类的协同作用<sup>[21]</sup>。如果参与自由基消除反应的酶具有较高活性, 则更加有利于提高酵母胞内 GSH 含量。综合图 3 和图 5 的结果可以得出, 与 SOD 相比, CAT 在富硒酵母提高胞内 GSH 含量方面起着更加重要的作用, 与 GSH 一起共同维持酵母胞内适宜的氧化还原环境。

## 2.4.3 丙二醛含量

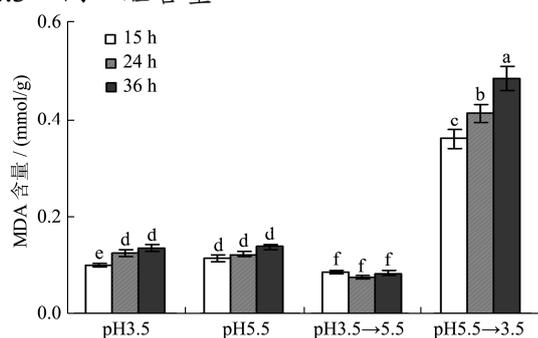


图6 富硒产朊假丝酵母胞内MDA含量

Fig.6 Intracellular MDA contents of Se-enriched *C. utilis*

丙二醛(MDA)是生物体内脂质与自由基发生氧化反应的终产物之一,通过测定MDA含量可以了解胞内氧化性环境的强弱以及细胞膜的损伤程度<sup>[22]</sup>。如图6,恒定pH 3.5和5.5条件下的MDA含量均处于较低水平(平均值0.12 nmol/g),且相互之间没有显著差异。pH 3.5→5.5时的MDA含量比恒定pH时的水平还要低(平均值0.08 nmol/g),表明将pH从3.5切换至5.5条件下的富硒酵母在培养过程中具有较强的抗氧化能力,细胞膜没有发生明显的损伤,这可能与该条件下具有更高的CAT活性和胞内GSH含量有关。然而,pH 5.5→3.5条件下的富硒酵母胞内MDA含量显著高于其他三种pH控制方式下的水平,表明在将pH从5.5切换至3.5的过程中富硒酵母胞内产生了大量的自由基。虽然此pH控制条件下的SOD活性较高,但CAT活性较低,不能有效解除自由基的影响,最终细胞膜的完整性受到破坏,影响了富硒酵母细胞的正常生长和代谢。

## 2.4.4 胞内ATP含量

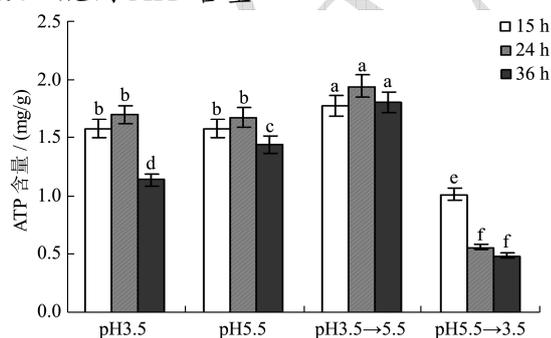


图7 富硒产朊假丝酵母胞内ATP水平

Fig.7 Intracellular ATP levels of Se-enriched *C. utilis*

ATP是GSH合成和有机硒吸收和转化不可或缺的能量物质,充足的ATP供给将有利于GSH在胞内的合成和积累,也有助于实现富硒酵母性能的提高<sup>[16]</sup>。对不同培养时间下的富硒酵母胞内ATP含量进行测定,结果如图7。可以看出,与恒定pH 3.5和5.5时的结果相比,pH 3.5→5.5条件下的富硒酵母具有更

高的胞内ATP含量(平均值1.84 mg/g)。特别地,在细胞干质量达到最大值之后(如24和36h),GSH生物合成持续进行,而此时更高的胞内ATP含量将为胞内GSH的进一步合成提供更加充足的能量保障<sup>[19]</sup>。

## 3 结论

本研究分别通过摇瓶培养、分批培养和流加培养考察了不同pH控制方式对富硒产朊假丝酵母制备的影响,结果发现,与恒定pH控制相比,在流加培养过程中采用pH 3.5→5.5两阶段pH控制方式更有利于GSH合成和有机硒富集。制备得到的富硒产朊假丝酵母具有更高的性能,胞内GSH含量达13.09 mg/g,胞内有机硒含量和有机硒转化率分别为1.88 mg/g和94.69%。在此基础上,结合胞内酶活水平和能量物质含量,部分解析了不同pH控制方式影响富硒酵母性能的生理机制。研究结果不仅为高性能富硒酵母的制备提供一种可行的方法,同时也为深入理解产朊假丝酵母生理特性开拓新的思路。

## 参考文献

- [1] Kieliszek M, Błażej S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review [J]. *Molecules*, 2016, 21(5): e609
- [2] Fairweather-Tait S J, BAO Yong-ping, Broadley M R, et al. Selenium in human health and disease [J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011, 14: 1337-1383
- [3] 吴宝强,梁海秋,杨辉,等.高生物量富硒酵母的选育和培养条件的初步研究[J].*现代食品科技*,2005,21(2):35-36
- [4] WU Bao-qiang, LIANG Hai-qiu, YANG Hui, et al. The breeding and culture condition optimization of a high-biomass, selenium-enriched yeast strain [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2005, 21(2): 35-36
- [5] Schrauzer G N. Selenium yeast: composition, quality, analysis, and safety [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2006, 78: 105-109
- [6] ZHANG Gao-chuan, YAO Xing-yun, WANG Chong-long, et al. Transcriptome analysis reveals the mechanism underlying improved glutathione biosynthesis and secretion in *Candida utilis* during selenium enrichment [J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 304: 89-96
- [7] WU Guo-jie, LIU Fei, SUN Xiao-wen, et al. Preparation of selenium-enriched yeast by re-using discarded *Saccharomyces cerevisiae* from the beer industry for se-supplemented fodder applications [J]. *Applied Sciences-Basel*, 2019, 9(18): 3777

- [7] 牛海涛,汤燕花.利用产朊假丝酵母转化无机硒为有机硒的研究[J].饲料工业,2006,27(20):16-18  
NIU Hai-tao, TANG Yan-hua. Study on the bioconversion of inorganic selenium to organic selenium by *Candida utilis* [J]. Feed Industry, 2006, 27(20): 16-18
- [8] 葛晓光,卫功元,聂敏,等.富硒产朊假丝酵母的制备条件研究[J].粮食与饲料工业,2009,10:31-33  
GE Xiao-guang, WEI Gong-yuan, NIE Min, et al. Studies on the conditions for preparation of selenium enriched with *Candida utilis* [J]. Cereal and Feed Industry, 2009, 10: 31-33
- [9] Kieliszek M, Blazejak S, Kurek E. Binding and conversion of selenium in *Candida utilis* ATCC 9950 yeasts in bioreactor culture [J]. Molecules, 2017, 22(3): e352
- [10] YANG Bo, WANG Da-hui, WEI Gong-yuan, et al. Selenium-enriched *Candida utilis*: efficient preparation with L-methionine and antioxidant capacity in rats [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2013, 27: 7-11
- [11] Rotruck J T, Pope A I, Ganther H E, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase [J]. Science, 1973, 179: 588-590
- [12] Kieliszek M, Błażej S, Gientka I, et al. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99: 5373-5382
- [13] Iizuka M, Murata K, Kimura A. Induction of glutathione leakage from *Saccharomyces cerevisiae* cells by selenite [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(2): 613-614
- [14] 杨波,刘志奎,卫功元,等.培养方式对富硒产朊假丝酵母性能的影响[J].生物加工过程,2012,10(4):7-11  
YANG Bo, LIU Zhi-kui, WEI Gong-yuan, et al. Effects of cultivation modes on performance of selenium-enriched *Candida utilis* [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2012, 10(4): 7-11
- [15] 王大慧,许宏庆,汪成富,等.酸胁迫在提升富硒/GSH 产朊假丝酵母性能中的作用[J].中国生物工程杂志,2013,33(11): 81-85  
WANG Da-hui, XU Hong-qing, WANG Cheng-fu, et al. The role of acid stress on improved performance of selenium/glutathione-enriched *Candida utilis* [J]. China Biotechnology, 2013, 33(11): 81-85
- [16] 王冬华,王大慧,卫功元.弱酸胁迫提升富硒产朊假丝酵母性能及其作用机理[J].食品工业科技,2016,37(8):191-195  
WANG Dong-hua, WANG Da-hui, WEI Gong-yuan. Moderate acid stress improves the performance of selenium-enriched *Candida utilis* and its related mechanism [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(8): 191-195
- [17] ZHANG Gao-chuan, WANG Da-hui, WANG Dong-hua, et al. The mechanism of improved intracellular organic selenium and glutathione contents in selenium-enriched *Candida utilis* by acid stress [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(5): 2131-2141
- [18] 王大慧,聂敏,卫功元.基于两阶段氨基酸添加的谷胱甘肽发酵高产方法[J].食品科学,2017,38(22):22-27  
WANG Da-hui, NIE Min, WEI Gong-yuan. Improved glutathione production in *Candida utilis* by two-stage amino acid addition [J]. Food Science, 2017, 38(22): 22-27
- [19] LI Yin, WEI Gong-yuan, CHEN Jian. Glutathione: a review on biotechnological production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 66(3): 233-242
- [20] Das A B, Sadowska-Bartosz I, Königstorfer A, et al. Superoxide dismutase protects ribonucleotide reductase from inactivation in yeast [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 116: 114-122
- [21] Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 95: 27-42
- [22] ZHANG Zi-yang, GAO Shang, SHAN Chang-juan. Effects of sodium selenite on the antioxidant capacity and the fruit yield and quality of strawberry under cadmium stress [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 260: 108876

---

(上接第 155 页)

- [24] Carlos Rojas, Mara Cea, Alfredo Iriarte, et al. Thermal insulation materials based on agricultural residual wheat straw and corn husk biomass, for application in sustainable buildings [J]. Sustainable Materials and Technologies, 2019, 20: 221-232
- [25] 王福军.计算流体力学分析-CFD 软件原理与应用[M].北京:清华大学出版社,2004  
WANG Fu-jun. Computational Fluid Dynamics Analysis-CFD Software Principle and Application [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2004