

ARTP诱变筛选增香、高产酒精的富硒酵母菌

王国琴, 任怡卓, 张捷, 马献, 郑蕊, 苏建宇, 余君伟, 岳思君

Screening of Selenium-enriched Yeasts with Enhanced Aroma and High Alcohol Production by ARTP Mutagenesis

WANG Guoqin, REN Yizhuo, ZHANG Jie, MA Xian, ZHENG Rui, SU Jianyu, YU Junwei, and YUE Sijun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110161>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

递推式ARTP-UV复合诱变筛选高产 β -葡萄糖苷酶菌株

Iterative Mutagenesis Breeding of High-yielding β -Glucosidase Strains with ARTP-UV

食品工业科技. 2020, 41(15): 129-134,142 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.021>

海洋源富硒酵母的分离鉴定及其发酵工艺优化

Isolation and Identification of Selenium-enriched Yeast from Marine Sources and Optimization of Fermentation Process

食品工业科技. 2024, 45(5): 118-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030278>

常压室温等离子体诱变选育淀粉酶菌株及其酶学特性研究

Selection of Amylase Producing Strain by Atmospheric and Room Temperature Plasmas and Its Enzymological Properties

食品工业科技. 2022, 43(20): 137-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021120194>

ARTP诱变联合抗生素抗性选育纳豆激酶高产菌株

Breeding of Nattokinase High-producing Strains by ARTP Mutagenesis Combined with Antibiotic Resistance

食品工业科技. 2019, 40(23): 93-97 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.016>

高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的诱变选育及对刺梨果酒香气特性的影响

Breeding of High Yield β -glucosidase Yeast by Mutagenesis and Its Effect on the Aroma Characteristics of *Rosa roxburghii* Tratt Wine

食品工业科技. 2021, 42(19): 118-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120115>

空气等离子体技术对面包酵母的诱变选育研究

Mutation Breeding of Bread Yeast By Air Plasma Technology

食品工业科技. 2019, 40(24): 94-98 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.24.016>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王国琴, 任怡卓, 张捷, 等. ARTP 诱变筛选增香、高产酒精的富硒酵母菌 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(18): 146–156. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110161

WANG Guoqin, REN Yizhuo, ZHANG Jie, et al. Screening of Selenium-enriched Yeasts with Enhanced Aroma and High Alcohol Production by ARTP Mutagenesis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(18): 146–156. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110161

· 生物工程 ·

ARTP 诱变筛选增香、高产酒精的 富硒酵母菌

王国琴¹, 任怡卓¹, 张捷¹, 马献¹, 郑蕊¹, 苏建宇¹, 余君伟², 岳思君^{1,*}

(1. 宁夏大学生命科学学院, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏银川 750021;

2. 宁夏中宁枸杞产业创新研究院有限公司, 宁夏银川 755100)

摘要: 为了得到产酒精和产香能力较强的枸杞内生富硒酵母菌, 进而促进富硒发酵产品的开发和风味的提升, 本研究以实验室保藏的枸杞内生酵母菌为实验材料, 通过耐硒法和红硒法初筛得到富硒能力较强的酵母菌, 采用常压室温等离子体 (Atmospheric room temperature plasma, ARTP) 诱变技术, 经 TTC 培养基、杜氏小管发酵法、产酒精、产酯产酸、耐受性等实验筛选出增香和高产酒精的目标菌株, 并用氢化物发生原子荧光光谱法测定酵母胞内和发酵液中硒含量。结果表明, 富硒初筛得到了 M1 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和 M16 葡萄孢酵母 (*Clavispora lusitaniae*), 经 ARTP 诱变分别筛选出产酒精能力较高的 *S. cerevisiae* 诱变菌株 M1-5 和产香能力较高的 *C. lusitaniae* 诱变菌株 M16-28, M1-5 的产酒精能力比 M1 提高了 38.07%, M16-28 的产酯能力比 M16 提升了 107.62%, 遗传稳定性均良好。经测定 M1-5 菌株胞内和发酵液中的硒含量分别为 204.8 和 1158 $\mu\text{g/L}$, M16-28 胞内和发酵液中的硒含量分别为 666.45 和 1830 $\mu\text{g/L}$, 因此, 菌株 M16-28 比 M1-5 的富硒能力强, 且发酵液硒含量极显著高于酵母细胞硒含量 ($P < 0.001$)。本研究筛选出诱变菌株 M1-5 产酒精和 M16-28 产香能力强的富硒酵母具有优良的发酵特性, 在发酵食品和富硒功能性产品的挖掘和开发方面具有潜在的应用前景。

关键词: 枸杞, 内生酵母菌, 富硒, 常压室温等离子体诱变, 高产酒精, 产香, 发酵特性

中图分类号: TQ926.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)18-0146-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110161

本文网刊:



Screening of Selenium-enriched Yeasts with Enhanced Aroma and High Alcohol Production by ARTP Mutagenesis

WANG Guoqin¹, REN Yizhuo¹, ZHANG Jie¹, MA Xian¹, ZHENG Rui¹, SU Jianyu¹, YU Junwei², YUE Sijun^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Ningxia University, Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Eastern China, Yinchuan 750021, China;

2. Ningxia Zhongning Wolfberry Industry Innovation Research Institute Co., Ltd., Yinchuan 755100, China)

Abstract: In order to obtain endophytic selenium-rich yeast from *Lycium barbarum* with strong ability producing alcohol and aroma, and then promote the selenium-rich fermentation products and improve the flavor, this study took the endophytic yeast of *L. barbarum* stored in the laboratory as experimental materials, and the yeast with strong selenium-rich ability was obtained through the initial screening of selenium-resistant method and red selenium methods. Atmospheric room temperature plasma (ARTP) technology was used to obtain mutant strains and through TTC medium, Duchenne tubule fermentation, alcohol production, ester and acid production, tolerance and other experiments to screen out the target strains of aroma enhancement and high alcohol production. The content of selenium in yeast cell and fermentation liquid was determined by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. The results showed that M1 *Saccharomyces*

收稿日期: 2023-11-16

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划 (2022BBF02010); 中央引导地方科技发展资金项目 (2023FRD05032)。

作者简介: 王国琴 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: 2446023139@qq.com。

* 通信作者: 岳思君 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学研究, E-mail: yue_sj@nxu.edu.cn。

cerevisiae and M16 *Clavispora lusitaniae* were obtained by primary selenium screening, the mutagenic strain M1-5 of *S. cerevisiae* with higher alcohol production capacity and the mutagenic strain M16-28 of *C. lusitaniae* with higher aroma production capacity were obtained through ARTP mutagenesis. The alcohol production capacity of M1-5 increased by 38.07% compared with M1, and the ester production capacity of M16-28 increased by 107.62% compared with M16, and the genetic stability was good. The selenium contents in the intracellular and fermentation broth of the M1-5 strains were 204.8 and 1158 $\mu\text{g/L}$, respectively, and in M16-28 were 666.45 $\mu\text{g/L}$ and 1830 $\mu\text{g/L}$, respectively. Therefore, the selenium enrichment capacity of M16-28 was higher than that of M1-5, and the selenium content of fermentation liquid was extremely significantly higher than that of yeast cells ($P<0.001$). In conclusion, the selenium-rich yeast with mutagenic strain M1-5 producing alcohol and M16-28 producing aroma were screened out, which had excellent fermentation characteristics and potential application prospects in the development and mining of fermented food and selenium-rich functional products.

Key words: *Lycium barbarum*; endophytic yeast; selenium-rich; ARTP; high alcohol production; aroma enhancement; fermentation characteristics.

硒(Se)是人体必需微量元素,具有抗氧化、抗衰老、抗癌症、提高机体的细胞免疫及体液免疫水平,降低细胞炎症反应和预防心血管疾病的发生等生物学功能,对于人体的新陈代谢及心脏、肝脏等重要器官起着至关重要的作用^[1-2]。但是硒元素在人体中无法自身合成,需要从食物中摄取,包括一些天然富硒产品,比如富硒大蒜、富硒水稻、富硒茶叶、富硒食用菌等,以及一些人工转化富硒食品,比如富硒猪肉等^[3]。传统的补硒方法是使用亚硒酸钠,但其毒性较大、生物利用度较低,对人体有着潜在的危害^[4]。因此,从食物中获取有机硒是人们追求健康的趋势所需。目前,富硒产品在发酵工业中被广泛用作理想的富硒补充剂,其中,酵母菌起着至关重要的作用,富硒酵母能利用富硒培养基将无机硒转化为有机硒,其生物活性和安全性更高,以促进人体健康^[5]。同时,酵母菌是一类具有产酒精、产酯能力的微生物,是传统发酵食品中产酒精、产酯类物质主要产生菌株。目前用于产酒精的酵母菌主要是酿酒酵母,产酯的非酿酒酵母有克鲁维毕赤酵母、葡萄汁有孢汉逊酵母^[6]、异常汉逊酵母^[7]、戴尔有孢圆酵母^[8]、葡萄牙棒孢酵母^[9]等。这些产酯酵母在酒的风味中起重要作用,所产生的酯类物质能增强并丰富酒的香气,而已酸乙酯是其中的特色风味物质,但其在天然的产酯酵母中研究较少,且产量低^[9]。

选育优良的酵母菌种对于改善发酵特性和品质意义重大。国内外对于酵母菌种的选育方式有自然选育、杂交育种、诱变育种和基因工程等,均具有一定的优缺点。近些年,常压室温等离子体(ARTP)诱变作为诱变育种的一种新型育种方式之一,基于氦射频大气压放电等离子体的新开发的工具,ARTP产生的活性颗粒可以穿透细胞壁和细胞膜,诱导 DNA 损伤,导致突变率增加,但不产生有毒有害物质,与传统的紫外线辐射或化学诱变剂相比,显示出低成本和环境友好性,且具有操作简便、突变率高等优点,适用于各类微生物菌种选育^[10-11]。汪锡武等^[12]以啤酒酵母 WX-01 为出发菌,通过高浓度亚硒酸钠初筛,再

经过 ARTP 诱变处理以及亚硒酸钠抗性平板筛选出一株富硒优势啤酒酵母。林仙菊等^[13]用 ARTP 对雪白白僵菌 FIM-1809 菌株进行诱变,得到一株遗传稳定性较高的突变高产菌 FIM-1809-7,其产环孢菌素 A 能力较初始菌株提高约 39%。Hong 等^[14]通过三轮 ARTP 诱变和高盐筛选获得了耐盐酿酒酵母菌株 HF-130,且该突变体 HF-130 的乙醇产量提高了 98.8%。此外,ATF1 基因在菌株 HF-130 中过表达,生成产酯菌株 HF-130-ATF1。目前,研究者对于枸杞内生酵母的选育大多集中于自然选育,基于 ARTP 诱变选育的研究少之甚少,并且对于富硒酵母的筛选,有从桑葚^[15]、茯砖茶^[16]等中进行筛选的,但从枸杞内生酵母菌进行富硒增香酵母菌株的筛选鲜有报道,利用 ARTP 诱变筛选突出枸杞风味和地域典型性的富硒增香酵母菌株对于开发枸杞相关富硒发酵食品的具有重要意义。

因此,本研究以枸杞内生酵母菌株为出发菌,通过耐硒法和红硒法进行初筛,得到富硒能力较强的菌株 M1 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和 M16 葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*),进而通过 ARTP 诱变技术对这两株酵母菌进行诱变,以期选育出产酒精和产香能力强的富硒酵母菌株,从而为后续研究富硒酵母的性能优化以及食品发酵提供实验数据支撑,并在枸杞酒生产中,有望突出枸杞品种的典型性和产区的地域性,对枸杞酒风味多样化以及混菌发酵等方面提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

14 株枸杞内生酵母菌包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)M1、葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)M16 菌株。课题组前期筛选鉴定, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保藏菌种(各保藏 3 株),均是从新鲜枸杞内部经表面消毒后富集培养分离出的内生酵母;酵母浸粉、亚硒酸钠(Na_2SeO_3) 化学纯,纯度 99%,山东高泰化工科技有限公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC) 纯度 98%,Amresco 公司;浓盐酸、葡萄糖

均为分析纯,天津致远化学试剂有限公司;酚酞分析纯,天津津北精细化工有限公司;氢氧化钠分析纯,徐州天鸿化工有限公司。

ARTP-C1-18ARTP 诱变仪 天木生物;SW-CJ-1FD 超净工作台 上海析牛科技公司;N4 紫外分光光度计、HPS-250 恒温恒湿培养箱、KG-SX-500 全自动高压灭菌锅、TGL16 高速离心机 上海仪电分析仪器有限公司;CP224C 电子天平 常州市幸运电子设备有限公司;BPG-9240A 烘干箱 上海一恒科技有限公司;PHS-3C pH 计 雷磁分析仪器厂;VDRTEX Point-2 振荡器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液及培养基配制 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的硒标准溶液的配制^[17]:准确称取 2.1902 g 亚硒酸钠(Na_2SeO_3)溶解于 1000 mL 无菌水中(只计算硒元素的量),并在无菌操作台内用 0.22 μm 孔径的水系滤膜过滤;富硒酵母筛选培养基:10 g/L 酵母浸粉、20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min,将在无菌操作下配制的 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的硒标准液,分别吸取不同体积按比例配制不同浓度的富硒酵母培养基。

1.2.2 富硒酵母菌的初筛 将 14 株内生酵母接种到含有 20.00 $\mu\text{g/mL}$ 硒的 YPD 培养基上,分别观察 14 株内生酵母的生长状况以及颜色变化情况,得到生长良好的酵母菌。分别按 5% 的接种量接种于含有硒质量浓度为 0.00、5.00、10.00、20.00、30.00、40.00、50.00 $\mu\text{g/mL}$ 的 YPD 液体培养基的试管中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,观察并记录试管颜色的变化和菌体在试管底部的沉积量,通过耐硒法和红硒法对比筛选出富硒能力较强的酵母菌^[15]。

1.2.3 富硒酵母硒含量的测定 将所测菌株按 5% 接种于 100 mL/250 mL 锥形瓶中进行摇瓶培养至 6 h 时,在无菌操作下加入 2 mL 的 20 $\mu\text{g/mL}$ 硒标准溶液,培养至 48 h。将培养好的待测菌液取 4 mL 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 8000 r/min 下离心 10 min,无菌水洗涤离心 2~3 次,加入 4 mL 无菌水悬浮,测得酵母菌胞内富硒含量,将离心得到的上清液用 0.22 μm 除菌过滤器过滤,测得酵母菌胞外硒含量。采用 GB 5009.93-2017《食品安全国家标准 食品中硒的测定》中的第一法:氢化物原子荧光光谱法,测定酵母菌液硒含量,重复三次取均值^[18]。

1.2.4 菌株 M1 和 M16 生长曲线的绘制 按 5% 接种量于 100 mL/250 mL 锥形瓶中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下连续培养 40 h,每 4 h 取菌液于比色皿中,并用 YPD 液体培养基作为对照,通过用分光光度计测定 OD600 nm 值,每个菌株做 3 个重复,绘制酵母菌生长曲线。

1.2.5 ARTP 诱变试验 试验参数:诱变仪紫外杀菌 30 min,气体为高纯度氦气(99.999%),诱变功率

120 W,温度 20 $^{\circ}\text{C}$,载片距发射源 2 mm,诱变时间设置为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 s。将灭好菌的载片在火焰上方烤 5 s,晾至室温,备用。

诱变试验:将原始菌株 M1 和 M16 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养,分别取对数时期(16 h)原始菌液,测量 OD600 nm 下菌液浓度,稀释菌液浓度于 0.6~0.8,吸取 10 μL 菌液于载片上,置于诱变室凹槽中,按上述试验参数设置后即可开始试验,将处理好的载片分别装在有 1 mL 0.9% 无菌生理盐水的 EP 管中。诱变处理结束,将上述 EP 管中的诱变菌株用涡旋振荡器振荡 1 min 进行洗脱,并将菌液稀释 10^{-1} ~ 10^{-6} ,分别吸取 100 μL 涂布在 YPD 固体培养基上(三个平行),28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,记录菌落数,按以下公式计算致死率:

$$\text{致死率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{诱变处理后存活菌落数}}{\text{对照组存活菌落数}}\right) \times 100$$

1.2.6 TTC 培养基筛选 将诱变出的单菌落接种于 YPD 固体培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,将 TTC 上层培养基用一次性接种环取下倒扣在 TTC 下层培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h,观察显色情况,对诱变菌株进行筛选,将产酒精能力强的菌株进行下一步筛选。

1.2.7 菌株发酵性能 杜氏小管发酵法:将筛选得到的 TTC 显色明显变红的突变菌株,按 5% 的接种于 5 mL YPD 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,定时观察菌株产气情况,筛选出发酵性能优良的菌株。

1.2.8 菌株耐受性筛选 将筛选得到的发酵性能优良的突变菌株进行耐受性实验,分别按 5% 接种量接种于不同浓度的乙醇(4%vol、8%vol、12%vol、16%vol、20%vol)、氯化钠盐溶液(2.5%、5%、10%、15%、20%)、葡萄糖质量浓度(5%、10%、15%、20%、25%)、pH(1.5、2、2.5、3.0、3.5、4.0)的 YPD 液体培养基内,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,测量 OD600 nm 的吸光度,以不接种菌株的 YPD 液体培养基作对照,分别做三个平行^[19]。

1.2.9 总酯、总酸测定 总酯: M16 菌株及上述筛选的诱变菌株进行摇瓶培养 3 d 后,用移液枪吸取 4 mL 菌液,加入 40 mL/250 mL 的去离子水,滴 2 滴酚酞指示剂,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定,滴至红色且 0.5 min 不变色后再加入 25 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液。沸水浴中 45 min 后,冷却 1 h 至室温,随即用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液滴定至无色,0.5 min 不变色,记录 HCl 溶液的消耗量^[20]。总酯含量按以下公式计算:

$$\text{总酸(乙酸乙酯)}(\text{g}/100 \text{ mL}) = \frac{25C_1 - C_2 \cdot V_1}{1000} \times 88.12 \times 25$$

式中, C_1 为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液浓度, mol/L; C_2 为 0.1 mol/L 的 HCl 溶液浓度, mol/L; V_1 为滴定 0.1 mol/L HCl 的消耗量, mL。

总酸: 采用标准滴定法, 用移液枪吸取 2 mL 待测样品, 并加入 150 mL 的去离子水于 250 mL 的锥形瓶中, 滴加 3 滴酚酞指示剂, 随即用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定至微红色, 0.5 min 不变色, 另做空白组滴定, 总酸按以下公式计算。

总酸(乳酸)(g/L) =
$$\frac{(V_1 - V_2) \times 0.1 \times 90}{2}$$

式中, V_1 为滴定 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液消耗量, mL; V_2 为空白组滴定 NaOH 消耗的体积, mL。

1.2.10 遗传稳定性试验 将最终得到的诱变菌株 M1-5 和 M16-28 分别连续传代培养 5 次, 分别对诱变菌株的遗传稳定性进行验证。M1-5 菌株每一代菌株以 5% 接种量接种于 YPD 液体培养基培养 8 d, 测量其酒精度的含量, M16-28 以 5% 的接种量接种于 YPD 液体培养基培养 3 d, 测定产酯产酸能力。

1.2.11 发酵能力验证 酒精度的测定^[21]: 参照 GB 5009.225-2016《食品安全国家标准 酒中乙醇浓度的测定》方法测定。蒸馏后用密度瓶法测出馏出液 20 ℃ 时的密度, 查询酒精水溶液密度与酒精度(乙醇含量)对照表, 得到乙醇体积分数, 即为酒精度。

1.3 数据处理

每组实验重复测定三次, 结果均用平均值±标准差表示。采用 SPSS 23.0 软件对试验数据进行显著性检验, $P>0.05$ 为差异不显著, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.001$ 为差异极显著, 其余数据采用 Excel 2016 软件进行统计分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 富硒酵母菌的初筛

经富硒酵母筛选固体培养基培养, 筛选出 9 株长势较好的酵母菌, 为 JY-1、M、G2、M16、M19、G1、M1、M17、B7, 进行液体培养筛选。耐硒法是基于微生物对无机硒的抗性与其对无机硒的生物转化能力成正相关, 即当菌体沉淀量变化较小, 菌株对无机硒亚硒酸钠的耐受性较强; 红硒法是基于微生物对硒的生物转化能力与红硒的形成呈负相关, 即菌体沉淀颜色变化越浅, 则酵母菌对亚硒酸钠的转化能力强^[15]。由表 1 可知, 当加入的硒质量浓度增加时, 各株菌的菌体的沉淀量逐渐减少, 在 20.00 μg/mL 的硒浓度下, 菌株 M、G2、M16 和 M1 的菌体沉淀量与自身初始未加硒母液沉淀量变化较小, 则说明菌株 M、G2、M16 和 M1 对无机硒亚硒酸钠的耐受性较强。由表 2 可知, 随着加入的硒质量浓度增加, 菌体沉淀量的颜色也发生了明显逐渐加深的现象, 在 20.00 μg/mL 的硒浓度下, 菌株 JY-1、M16、G1 和 M1 显示为粉红色, 菌株 B7 无沉淀, 其他菌体显示为红色, 表明菌株 JY-1、M16、G1 和 M1 对亚硒酸钠的转化能力强。结合耐硒法和红硒法, 最终选择 M16 和 M1 作为后续试验菌株。

表 1 不同酵母菌在富硒培养液中的菌体沉淀量
Table 1 Precipitation amount of different yeasts in selenium-rich medium

菌株编号	硒质量浓度(μg/mL)						
	0.00	5.00	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00
JY-1	****	****	***	**	*	*	*
M	****	****	****	****	****	****	****
G2	****	****	****	****	****	****	****
M16	****	****	****	****	****	****	*
M19	****	****	**	**	**	**	*
G1	****	****	****	*	*	*	*
M1	****	****	****	****	****	****	**
M17	****	****	****	**	*	*	*
B7	****	****	****	—	—	—	—

注: “****”表示6/6(每株菌在加硒后菌体沉淀量与初始未加硒菌体沉淀量的比值, 以下以此类推); “****”表示5/6, “****”表示4/6; “*”表示3/6, “—”表示无沉淀。

表 2 不同酵母菌在富硒培养液中的颜色比较
Table 2 Color comparison of different yeasts in selenium-rich medium

菌株编号	硒质量浓度(μg/mL)						
	0.00	5.00	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00
JY-1	—	*	**	**	***	***	***
M	—	*	**	***	***	***	***
G2	—	*	**	***	***	***	***
M16	—	*	**	**	***	***	***
M19	—	*	**	***	***	***	***
G1	—	*	**	**	***	***	***
M1	—	—	*	**	***	***	***
M17	—	*	**	***	***	***	***
B7	—	*	**	—	—	—	—

注: “—”代表正常; “*”微红色; “**”粉红色; “***”红色; “****”深红色。

2.2 菌株 M1 和 M16 生长曲线的绘制

对原始菌株进行生长曲线绘制, 以便更好确定其对数生长期, 利于后续诱变筛选。2 株酵母生长曲线如图 1 所示。在 0~8 h, 菌株 M1 处于延滞期, 而菌株 M16 的延滞期大致处于 4 h 前, 之后各进入对数期, 菌株快速生长, 此时期菌株对环境敏感, 易受培养基组分及物理化学条件影响, 20~32 h 两株菌都进入了稳定期。32 h 后均缓慢下降, 进入衰亡期。

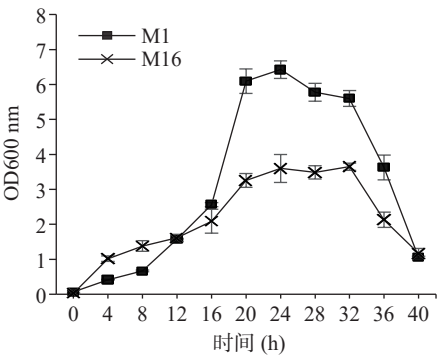


图 1 2 株内生酵母菌的生长曲线
Fig.1 Growth curves of 2 endophytic yeast strain

2.3 ARTP 诱变时间的确定

在诱变时, 突变率会随着诱变处理时间的延长

而逐渐增加,但时间过长,会导致死亡率过高、诱变效果变差。ARTP 诱变的时间致死率在 80%~95%,更有利于后续的筛选工作。如果致死率高于 95%时,会导致菌株整体的生长性能受损,对成品酒的风味会产生不利的影响;如果突变率过于低的话,会导致菌株突变效率不高^[22]。原始菌株 M1 和 M16 分别在对数时期 16 h 时经 ARTP 诱变后致死率曲线如图 2 所示。当诱变时间延长时,致死率增大。当诱变时间达到 40 s 时, M1 的致死率为 90.31%, 在 50 s 时, M16 的致死率为 90.26%, 110 s 时, 两株菌的致死率均达到 100%, 未发现有活菌存活。当致死率 80%~95% 时, 菌株突变概率较高, 突变幅度较

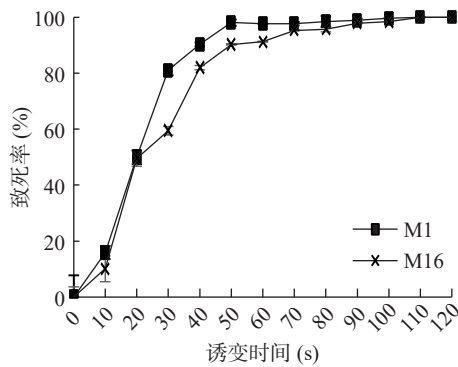


图 2 不同诱变时间下菌株 M1 和 M16 的致死率
Fig.2 Mortality of strains M1 and M16 under different mutagenesis times

大。因此, M1 和 M16 各选 40 s 和 50 s 作为 ARTP 诱变最佳时间。

2.4 诱变酵母菌株初筛

2.4.1 TTC 培养基筛选 TTC 显色剂用于培养菌株时观察颜色的深浅, 颜色越深时, 说明菌株呼吸酶的活力越旺盛, 产酒精能力越强。经 ARTP 诱变后, 将原始菌株 M1 及其诱变获得的 44 株诱变菌株分别重新接种划线于 TTC 下层培养基上, 经筛选得到的 9 株产酒精能力较强的诱变菌株, 显色情况如表 3 所示。原始菌株 M1 呈浅粉色, 菌株 M1-5、M1-11、M1-13、M1-19、M1-24、M1-30、M1-34、M1-36 和 M1-40 显示为红色。

经 ARTP 诱变后, 将原始菌株 M16 及其诱变获得的 58 株诱变菌株分别重新接种划线于 TTC 下层培养基上, 经筛选得到的 9 株产酒精能力较强的诱变菌株, 显色情况如表 4 所示。原始菌株 M16 显红色, 菌株 M16-14、M16-17、M16-28、M16-40、M16-41、M16-42、M16-44、M16-47 和 M16-48 呈深红色, 将筛选得到的 9 株诱变菌株进行发酵能力筛选试验。

2.4.2 杜氏小管发酵能力筛选 对 M1 的诱变得到的 9 株诱变菌株进行杜氏小管发酵产气实验, 结果如表 5 所示。2 h 时观察到诱变菌株 M1-5、M1-13、M1-40 有气体产生, 说明其起酵速度快, 且 M1-

表 3 M1 菌株产酒精能力测定结果

Table 3 Determination results of alcohol production capacity of M1 strains

菌株编号	显色结果	菌株编号	显色结果	菌株编号	显色结果	菌株编号	显色情况	菌株编号	显色情况
M1	+	M1-9	+	M1-18	+	M1-27	+	M1-36	+++
M1-1	++	M1-10	+	M1-19	+++	M1-28	+	M1-37	+
M1-2	+	M1-11	+++	M1-20	++	M1-29	+	M1-38	++
M1-3	++	M1-12	++	M1-21	++	M1-30	+++	M1-39	++
M1-4	++	M1-13	+++	M1-22	++	M1-31	++	M1-40	+++
M1-5	+++	M1-14	++	M1-23	++	M1-32	++	M1-41	+
M1-6	++	M1-15	++	M1-24	+++	M1-33	++	M1-42	++
M1-7	+	M1-16	++	M1-25	++	M1-34	+++	M1-43	++
M1-8	++	M1-17	+	M1-26	++	M1-35	+	M1-44	++

注: “+++”呈红色; “++”呈粉红色; “+”呈浅粉色。

表 4 M16 菌株产酒精能力测定结果

Table 4 Determination results of alcohol production capacity of M16 strains

菌株编号	显色结果	菌株编号	显色结果	菌株编号	显色结果	菌株编号	显色情况	菌株编号	显色情况
M16	+++	M16-12	+++	M16-24	+++	M16-36	+++	M16-48	++++
M16-1	+++	M16-13	+++	M16-25	+++	M16-37	+++	M16-49	+++
M16-2	+++	M16-14	++++	M16-26	+++	M16-38	+++	M16-50	+++
M16-3	+++	M16-15	+++	M16-27	+++	M16-39	+++	M16-51	+++
M16-4	+++	M16-16	+++	M16-28	++++	M16-40	++++	M16-52	+++
M16-5	+++	M16-17	++++	M16-29	+++	M16-41	++++	M16-53	+++
M16-6	+++	M16-18	+++	M16-30	+++	M16-42	++++	M16-54	+++
M16-7	+++	M16-19	+++	M16-31	+++	M16-43	+++	M16-55	+++
M16-8	+++	M16-20	+++	M16-32	+++	M16-44	++++	M16-56	+++
M16-9	+++	M16-21	+++	M16-33	+++	M16-45	+++	M16-57	++
M16-10	+++	M16-22	+++	M16-34	+++	M16-46	+++	M16-58	+++
M16-11	+++	M16-23	+++	M16-35	+++	M16-47	++++		

注: “++++”呈深红色; “+++”呈红色。

13 和 M1-40 比 M1-5 起酵能力好; 在 3 h 时观察到诱变菌株除 M1-36、M1-19 外, 其余菌株均有气体产生且 M1-13 和 M1-40 发酵能力强, 杜氏小管中气体生成量为 2/5; 在 4 h 时, 诱变菌株 M1-5、和 M1-11 杜氏小管中气体生成量为 2/5, M1-13、M1-40 气体生成量为 3/5; 当培养至 5 h 后诱变菌株 M1-5、M1-13、M1-30、M1-40 的气体充满了杜氏小管; 培养 6 h 原始菌株 M1 产生的气体也充满小管, M1-19、M1-24、M1-34、M1-36 已产生 4/5 气体; 7 h 后所有菌株均能将杜氏小管中充满气体; 菌株 M1-11 的起酵速度和产气情况与原始菌株 M1 一致。综合考虑, 选择起酵能力快, 发酵能力强的诱变菌株 M1-5、M1-13、M1-30、M1-40 作为乙醇耐受性、氯化钠盐溶液耐受性、高糖耐受性、pH 耐受性试验的出发菌株。

表 5 M1 菌株杜氏小管产气结果
Table 5 Du's tubule gas production result of M1 strain

菌株编号	培养时间(h)						
	1	2	3	4	5	6	7
M1	-	-	+	++	++++	+++++	+++++
M1-5	-	+	+	++	+++++	+++++	+++++
M1-11	-	-	+	++	++++	+++++	+++++
M1-13	++	+	++	+++	+++++	+++++	+++++
M1-19	-	-	-	+	+++	++++	+++++
M1-24	-	-	+	+	+++	+++++	+++++
M1-30	-	-	++	+	+++++	+++++	+++++
M1-34	-	-	+	+	+++	++++	+++++
M1-36	-	-	-	+	+++	++++	+++++
M1-40	++	+	++	+++	+++++	+++++	+++++

注: 杜氏小管中气体充斥量: “+++++”表示 5/5; “++++”表示 4/5; “+++”表示 3/5; “++”表示 2/5; “+”表示 1/5; “-”表示小于 1/5; “-”表示无气体产生。

对 M16 的诱变得到的 9 株诱变菌株进行杜氏小管发酵产气实验, 结果如表 6 所示。诱变菌株 M16-41、M16-42、M16-44 培养 2 h 就观察到有气体产生, 说明诱变菌株起酵能力迅速; 培养 4 h 后诱变菌株除 M16-17、M16-47 外, 其余菌株均有气体产生; 培养 6 h 后诱变菌株 M16-42、M16-44、M16-48 菌株产生较其他菌株较多, 培养 8 h 后诱变菌株

表 6 M16 菌株杜氏小管产气结果
Table 6 Du's tubule gas production result of M16 strain

菌株编号	培养时间(h)					
	2	4	6	8	10	12
M16	-	++	+	++	+++++	+++++
M16-14	-	++	+	++	+++++	+++++
M16-17	-	-	+	+	++++	+++++
M16-28	-	++	+	+++	+++++	+++++
M16-40	-	++	+	+++	+++++	+++++
M16-41	++	++	+	++	+++++	+++++
M16-42	++	++	++	+++	+++++	+++++
M16-44	++	++	+++	++++	+++++	+++++
M16-47	-	-	+	+++	+++++	+++++
M16-48	-	++	++	++++	+++++	+++++

注: 杜氏小管中气体充斥量: “+++++”表示 5/5; “++++”表示 4/5; “+++”表示 3/5; “++”表示 2/5; “+”表示 1/5; “-”表示小于 1/5; “-”表示无气体产生。

M16-28、M16-40、M16-42、M16-47 已在杜氏小管中产生 3/5 气体, M16-44、M16-48 已在杜氏小管中产生 4/5 气体; 培养 10 h 后所有菌株均能将杜氏小管中充满气体; 菌株 M16-14 的起酵速度和产气情况与原始菌株 M16 一致。综合考虑, 选择起酵能力快, 发酵能力强的诱变菌株 M16-28、M16-40、M16-42、M16-44、M16-48 作为乙醇耐受性、氯化钠盐溶液耐受性、高糖耐受性、pH 耐受性试验的出发菌株。

2.5 诱变菌株耐受性筛选

2.5.1 乙醇耐受性 传统的非酿酒酵母对乙醇的耐受性较低, 发酵周期较短。因此, 筛选高酒精耐受性非酿酒酵母, 能进一步提高其存活率, 使后续发酵产品风味物质增加。不同酒精度对菌株活性影响如图 3 所示。随着乙醇添加量增多, 菌株的生长代谢抑制变强。对于 M1 菌株, 酒精度在 8%vol 以内, 诱变菌株 M1-30 的生长状况要优于其他菌株, 酒精度在 8%vol~16%vol, 诱变菌株 M1-30 表现出较低的乙醇耐受性, 当酒精度高于 16%vol 时, 所有菌株几乎不生长。M16 菌株酒精度在 8%vol 以内, 原始菌株 M16 以及诱变菌株 M16-28、M16-40、M16-44、M16-48 对乙醇的耐受性整体优于诱变菌株 M16-42; 酒精度在 8%vol~16%vol, 诱变菌株 M16-48 表现出较高的乙醇耐受性, 当酒精度高于 20%vol 时, 所有菌株几乎不生长。

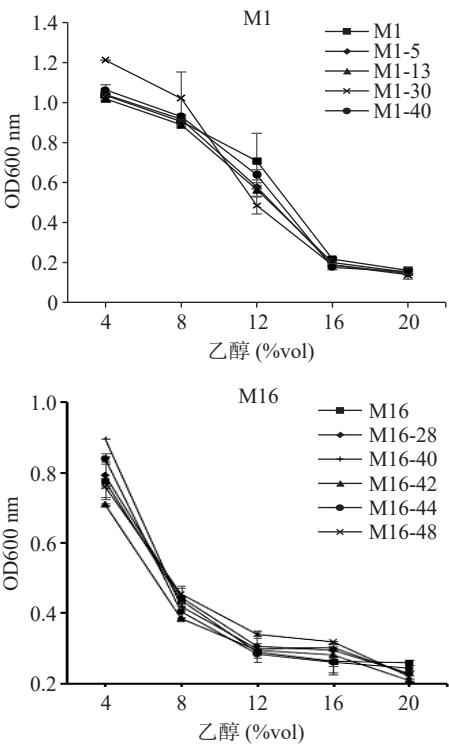


图 3 不同酒精度对菌株生长的影响
Fig.3 Effects of different alcohol content on the growth of strains

2.5.2 高盐耐受性 高渗透压胁迫主要发生在刚开始发酵时, 使酵母细胞形态改变, 发生失水现象, 使

其生长缓慢;也会使有害溶质进入细胞内,进而改变酵母存活率^[23]。由图4可知,高渗透压对酵母生长具有明显的抑制作用。对于M1菌株而言,氯化钠浓度为2.5%时,各菌株均呈现出良好的生长状况;在氯化钠浓度在5%~15%范围内,高渗透压对原始菌株M1以及M1的诱变菌株的抑制作用逐级增加,M1-30的抑制作用尤为明显,当氯化钠浓度为15%以上时,所有菌株几乎不生长,对此渗透压条件耐受性差异不大;对于M16菌株而言,所有诱变菌株均比原始菌株M16耐受性好,且诱变菌株M16-40的耐受性优于其他菌株;氯化钠浓度为2.5%~5%时,各菌株均呈现出良好的生长状况,且诱变菌株M16-40和M16-44优于其他菌株;在氯化钠浓度在5%~20%范围内,高渗透压对原始菌株M16以及M16的诱变菌株的抑制作用逐级增加;当氯化钠浓度为20%以上时,所有菌株几乎不生长。

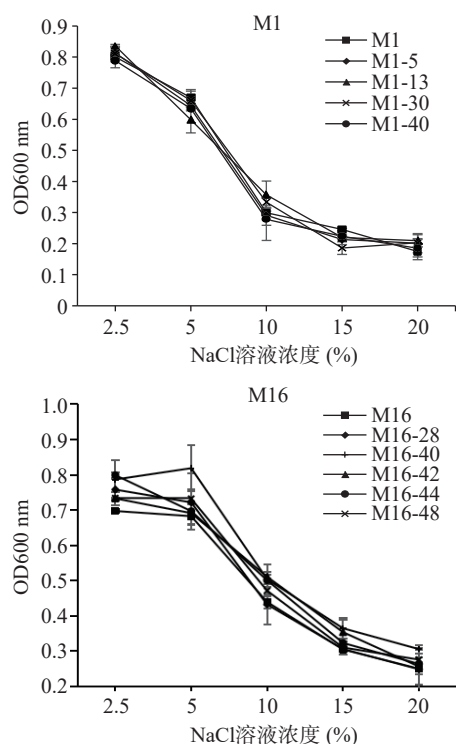


图4 不同NaCl溶液浓度对菌株生长的影响

Fig.4 Effect of different NaCl solution concentration on the growth of strain

2.5.3 糖度耐受性 发酵时,糖浓度太高会胁迫酵母细胞的生长和繁殖。菌株对葡萄糖的耐受性如图5所示。对于M1菌株,随着糖浓度的增加,酵母菌体浓度先增加后减少,在培养基糖浓度为20%时,诱变菌株M1-40的OD600 nm值达到最大为1.774,表现出最好的生长状况,当浓度为25%时,原始菌株M1、M1-5、M1-13和M1-30的OD600 nm值达到最大。整体来看,M1-30对高糖的耐受能力较差。对于原始M16菌株以及M16的诱变菌株均随着糖浓度的增加,菌体浓度逐渐降低,细胞生长受糖浓度的抑制程度逐渐增加,在糖浓度为5%时,生长

状况最好,在糖浓度为25%时,生长繁殖明显减弱,对高糖的耐受性较差,且M16-48菌株的整体耐受性较差。

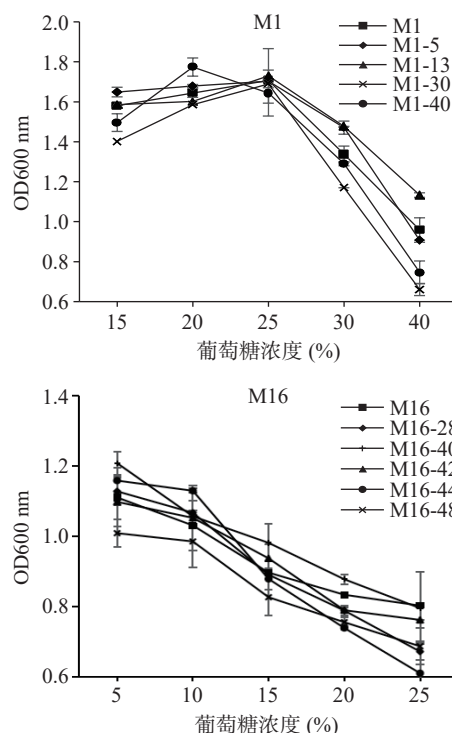


图5 不同葡萄糖质量浓度对菌株生长的影响

Fig.5 Effect of different glucose mass concentration on the growth of strain

2.5.4 低pH耐受性试验 发酵时,酸度过高会抑制酵母菌代谢生长甚至使得酵母菌死亡。因此,筛选出有一定的耐酸能力的酵母是有必要的。不同pH下

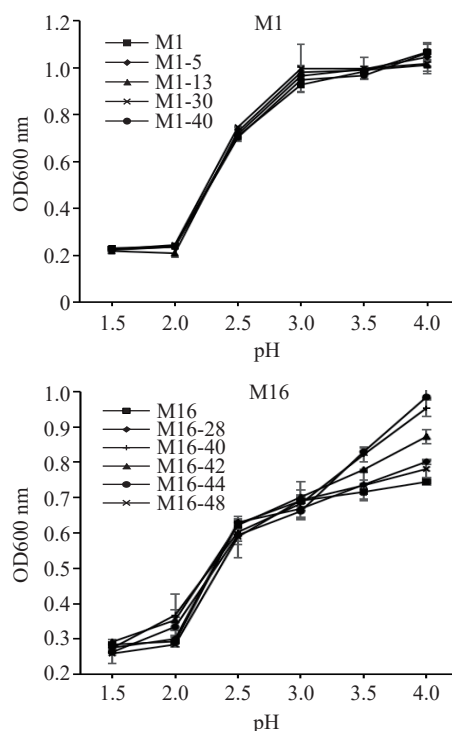


图6 不同pH对菌株生长的影响

Fig.6 Effect of different pH on the growth of strain

菌株的生长状况如图 6 所示。原始菌株 M1 和 M16 以及所有诱变菌株均在 pH 为 2 下抑制严重; 当 pH 增大, 所有菌株生长代谢均有了增强的趋势; pH 在 3~3.5 此范围内发酵时会抑制杂菌生长, 利于酒的品质。因此, 原始菌株 M1 和 M16 及其所有诱变菌株在此酸度范围内能较好生长。随着 pH 的增大, OD 值增大。所有 M1 菌株在 pH 为 2 以下基本不生长, 所有 M16 菌株在 pH 为 2 以下生长缓慢, 在 pH 为 2 以上, 所有菌株均开始快速的生长。在 pH 为 3~4 之间, 原始菌株 M1、M16 以及所有的诱变菌株均生长良好。

综上所述, 结合菌株耐受性分析, 选择诱变菌株 M1-5、M1-13、M1-40 进行高产酒精的复筛实验, 选择诱变菌株 M16-28、M16-40、M16-44 进行下一步产香复筛。

2.6 诱变酵母菌株复筛

2.6.1 M1 酿酒酵母的复筛 将 M1 及其耐受性强的 3 株诱变菌株在发酵 8 d 后, 测定产酒精含量, 如表 7 所示。发酵结束后, 诱变菌株 M1-5 中总酒精含量显著增强($P<0.05$), 为 0.907%vol, 产酒精能力相比于原始菌株 M1 提升了 38.071%; 诱变菌株 M1-40 中总酒精含量虽然也显著增强($P<0.05$), 但产酒精能力仅比于 M1 提升了 7.107%; M1-13 与原始菌株 M1 无显著差异($P>0.05$)。根据产酒精能力测试, 综合分析筛选出产酒精能力最优的诱变菌株 M1-5。

表 7 酿酒酵母菌株的酒精含量
Table 7 Alcohol content of the *Saccharomyces cerevisiae* strains

菌株	酒精(%vol)	提升百分比(%)
M1	0.657±0.0153 ^c	—
M1-5	0.907±0.0252 ^a	38.071
M1-13	0.673±0.0306 ^{bc}	2.838
M1-40	0.703±0.0208 ^b	7.107

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.6.2 M16 产香非酿酒酵母复筛 酯类化合物在很大程度上影响发酵酒浓郁的水果香和花香, 生成不同风味和特点的酒香。对 M16 及其耐受性强的 3 株诱变菌株的总酯、总酸含量测定, 如表 8 所示。培养 3 d 后, 诱变菌株 M16-28 发酵液中总酯和总酸

表 8 产香非酿酒酵母菌株总酯、总酸含量

Table 8 Total ester and total acid content of non*Saccharomyces cerevisiae* strains

菌株	总酯(g/100 mL)	总酸(g/L)
M16	0.98±0.007 ^b	1.125±0.031 ^b
M16-28	2.0347±0.041 ^a	1.575±0.045 ^a
M16-40	1.05±0.073 ^b	1.575±0.009 ^a
M16-44	1.06±0.058 ^b	1.125±0.021 ^b

注: 同列数据不同字母表示差异显著($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

均显著高于原始菌株 M16($P<0.05$), 分别为 2.0347 g/100mL、1.575 g/L。诱变菌株 M16-40、M16-44 与原始菌株 M16 产酯能力差异不显著($P>0.05$), 但菌株 M16-40 的产酸要显著高于原始菌株 M16($P<0.05$)。综合根据产酯、产酸能力测定, 分析筛选出产香能力最优的诱变菌株 M16-28。

2.7 诱变菌株遗传稳定性测试

2.7.1 诱变菌株 M1-5 产酒精能力稳定性 将诱变菌株 M1-5 连续传代 5 次, 对产酒精能力进行测定, 如图 7 所示。诱变菌株 M1-5 产酒精能力稳定在 0.877%vol~0.913%vol 之间, 各代菌株总酒精含量无显著差异($P>0.05$)。因此, 可以证明诱变菌株 M1-5 产酒精能力可以稳定遗传。

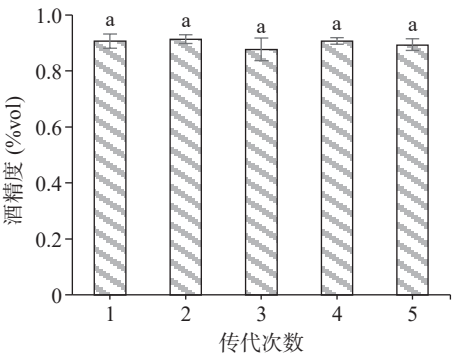


图 7 M1-5 菌株遗传稳定性测试结果

Fig.7 Genetic stableility test results of the M1-5 strain
注: 相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

2.7.2 诱变菌株 M16-28 产香能力稳定性 将诱变菌株 M16-28 连续传代 5 次, 对产酯产酸能力进行测定, 如图 8 所示, 各代菌株总酯、总酸含量变化范围小, 诱变菌株 M16-28 产酯能力之间无显著差异($P>0.05$); 产酸能力之间也无显著差异($P>0.05$)。因此, 可以证明诱变菌株 M16-28 产酯、产酸能力可以稳定遗传。

2.8 酵母菌硒含量测定

对上述诱变产酒精和产香能力高得菌株及其原

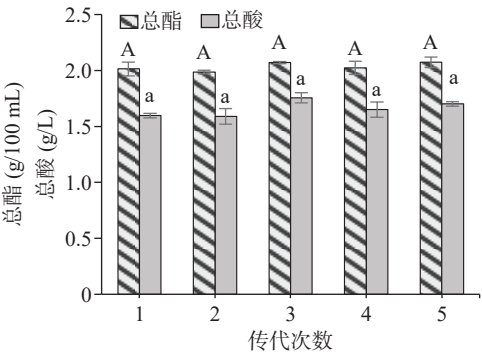


图 8 M16-28 菌株遗传稳定性测试结果

Fig.8 Genetic stableility test results of the M16-28 strain
注: 相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同大小写的字母用以区分不同组间差异。

始菌株进行了硒含量的测定,如图9所示。在硒质量浓度为 20.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,酿酒酵母 M1 及其诱变菌株 M1-5,葡萄牙棒孢酵母 M16 及其诱变菌株 M16-28 的酵母细胞内的硒含量分别为 294.9、204.8、622.45、666.45 $\mu\text{g/L}$,发酵液中的硒含量分别为: 1459.5、1158、1780、1830 $\mu\text{g/L}$ 。由此可见,发酵液中的硒含量要极显著高于酵母细胞内的硒含量 ($P<0.001$),并且菌株 M16 和 M16-28 酵母菌无论是在细胞内的硒含量,还是在发酵液中所测得的硒含量与 M1、M1-5 均存在极显著差异 ($P<0.001$)。因此,菌株 M16 和 M16-28 比 M1 和 M1-5 的富硒能力强,其中诱变菌株 M16-28 比原始菌株 M16 的硒含量高,但诱变菌株 M1-5 比原始菌株 M1 的硒含量低,可能是 ARTP 诱变时等离子束照射改变了富硒酵母菌对硒的富集能力。以上酵母菌有望用于后续富硒产品发酵应用中。

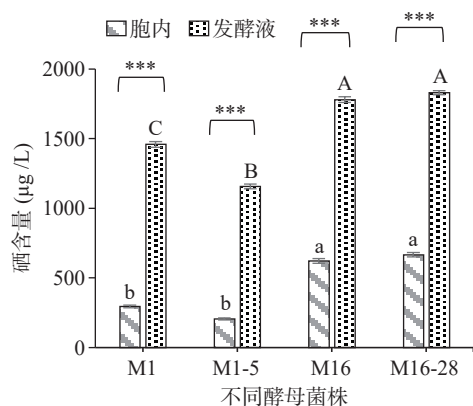


图9 原始菌及诱变菌株胞内和发酵液的硒含量

Fig.9 Selenium content of intracellular and fermentation broth of primitive bacteria and mutagenic strains

注:不同字母表示差异极显著 ($P<0.001$),不同大小写的字母用以区分不同组间差异,***表示各自组内之间差异极显著 ($P<0.001$)。

3 讨论

本研究以实验室保藏本土枸杞内生酵母 M1 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和 M16 葡萄牙棒孢酵母 (*Clavispora lusitaniae*) 为原始菌株,经 ARTP 诱变筛选 M1-5 的产酒精能力比 M1 提高了 38.07%,M16-28 的产酯产酸能力均有了提高,产酯能力比 M16 提升了 107.62%。ARTP 技术为酵母菌株的改良和筛选做出了重大贡献。它已被证明可有效生产具有特定性状的各种酵母突变体,例如高产酵母,耐盐酵母和耐酸酵母等^[11,24-25]。Liu 等^[26]通过 ARTP 突变和驯化,突变菌株 LAL-8a 的乙醛比 M88 少 14%。此外,LAL-8a 的酯与高级醇的比率 (0.28) 高于 M14 (0.16)。Wei 等^[27]经 ARTP 诱变酿酒酵母 LF1,诱变菌株 LF1-6 表现出显著增强的耐受性,LF6-6 通过 ARTP 诱变迭代突变,6M-15 的发酵时间最短,乙醇产率最高,分别为 28 h 和 0.525 g/g/h。王伟雄^[20]对新疆本土非酿酒酵母马克斯克鲁

维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) YK 诱变,诱变菌株 YK-29 发酵液中总酯、总酸含量 (2.15 g/100mL、0.135%) 增加,产香能力得到了提升。王犁桦等^[28]从葡萄表面筛选的 Y6 菌株进行 ARTP 诱变,诱变菌株 Y6-8 的产酒精、产酸能力分别提高了 28.13% 和 214.93%,对新疆葡萄酒的品质有了很大提升。本研究中,诱变菌株 M1-5 和 M16-28 的产酒精和产香能力分别有了显著提升 ($P<0.05$),且两株菌均是枸杞内生酵母菌,目前有关枸杞内生菌的相关研究较少,后续可以用于枸杞发酵的相关产品中,以期提高宁夏枸杞相关发酵产品品质,进一步提升枸杞地域典型性和产品风味多样化。

本研究对实验室现有的枸杞内生酵母通过耐硒法和红硒法进行初筛得到富硒能力较强的酵母菌,并在选育高产酒精和产香的基础上定量测定 M1、M1-5、M16、M16-28 的胞内和发酵液中硒含量,发现 M16 及诱变菌株 M16-28 的硒含量均极显著高于 M1 及 M1-5 ($P<0.001$),且发酵液中的硒含量要极显著高于酵母胞内的硒含量 ($P<0.001$),但本研究没有通过 ARTP 诱变提升酵母硒含量,由于 ARTP 诱变具有突变不确定性等特点,所以得到的诱变菌株 M16-28 硒含量并没有得到很大提升,而且 M1-5 菌株的硒含量减少。汪锡武等^[12]人以啤酒酵母 WX-01 为出发菌,通过高浓度亚硒酸钠初筛,再经过 ARTP 诱变处理以及亚硒酸钠抗性平板筛选,选育出一株富硒优势啤酒酵母,硒含量达到 1475 $\mu\text{g/g}$ 。蔡飞等^[29]以分离鉴定得到菌株 Z5 库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 通过单因素实验和正交试验,探究各影响因素对菌株 Z5 富硒能力的影响,在最佳优化条件下,总硒含量可达到 862 $\mu\text{g/g}$ 。凡敏等^[30]将泡菜汁样品筛选出一株耐硒菌株光滑假丝酵母 FXY-4,当 Na_2SeO_3 的浓度为 0.5 g/L 时,菌株富硒能力达 0.54 mg/g,添加在鱼饲料中,可以增强鱼免疫和促进鱼生长的活性,营养价值提高。目前,许多研究者对硒含量的测定是不区分胞内和发酵液的硒含量的,本研究中通过将两者分开测定,也明确了富硒酵母菌的硒含量主要存在于发酵液。虽经诱变得到的酵母 M1-5 和 M16-28 菌株富硒能力较强,但没有进一步的进行优化,在后续的研究中,可对其硒含量进行优化,有望对枸杞富硒产品进行开发和挖掘,提升产品中有机硒含量,强化其营养价值。

4 结论

本研究以实验室保藏枸杞内生酵母菌株为实验菌,利用耐硒法和红硒法进行初筛得到富硒能力较强的 M1 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和 M16 葡萄牙棒孢酵母 (*Clavispora lusitaniae*),经 ARTP 诱变后对菌株进行耐受性筛选、M1 的产酒精能力和 M16 的产香能力复筛,分别获得产酒精能力提升了 38.07% 的 M1 诱变菌株 M1-5 和产酯能力提升了 107.62% 的 M16 诱变菌株 M16-28。并测定

M1、M1-5、M16 和 M16-28 酵母菌的胞内和发酵液中的硒含量,胞内的硒含量分别为 294.9、204.8、622.45、666.45 $\mu\text{g/L}$,发酵液中的硒含量分别为: 1459.5、1158、1780、1830 $\mu\text{g/L}$ 。发现 M16 及 M16-28 菌株的硒含量均极显著高于 M1 及 M1-5 菌株 ($P<0.001$),且发酵液中的硒含量要极显著高于酵母胞内的硒含量 ($P<0.001$)。筛选出的诱变菌株 M1-5 产酒精和 M16-28 产香能力强的富硒酵母,不仅丰富了菌株资源,也可在后续实验研究中可作为混合发酵菌种用在枸杞酒生产中,对酒发酵缩短发酵时间、提高原料利用率、提高风味物质等方面提供理论参考,对富硒功能性产品的开发和挖掘具有潜在的应用前景。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] ZHU H Q, CHEN S Q, LI R B, et al. Selenium-rich yeast counteracts the inhibitory effect of nanoaluminum on the formation of porcine neutrophil extracellular traps[J]. *Research in Veterinary Science*, 2023, 161: 138–144.
- [2] CAO C Y, LI X W, QIN L, et al. High Selenium Yeast mitigates aluminum-induced cerebral inflammation by increasing oxidative stress and blocking NO production[J]. *Biometals*, 2018, 31(5): 835–843.
- [3] 涂青, 杨双全, 章之柱, 等. 富硒酵母发酵工艺的优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(10): 140–145. [TU Q, YANG S Q, ZHANG Z Z, et al. Optimization of fermentation process of selenium-rich yeast[J]. *China Brewing*, 2022, 41(10): 140–145.]
- [4] SUN N, DANG H, ZHANG Y Y, et al. Inorganic Selenium Transformation into Organic Selenium by *Monascus purpureus*[J]. *Foods*, 2023, 12(18): 3375.
- [5] LIAO X L, RAO S, YU T, et al. Selenium yeast promoted the Se accumulation, nutrient quality and antioxidant system of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)[J]. *Plant Signal Behav*, 2021, 16(6): 1907042.
- [6] 王凤梅, 张邦建, 岳泰新. 内蒙古西部地区野生葡萄酒相关酵母发酵及产酯能力分析[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(4): 825–830. [WANG F M, ZHANG B J, YUE T X. The ability of fermentation and esters production of wild winemaking yeasts isolated from the western district of Inner Mongolia[J]. *Acta Agriculturae Sinica of Southern China*, 2019, 50(4): 825–830.]
- [7] 郑超群. 基于酿酒酵母和异常汉逊酵母混合发酵技术的黄酒生产工艺及风味成分研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023. [ZHENG C Q. Research on the production process and flavor components of rice wine based on the mixed fermentation technology of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomalous*[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2023.]
- [8] 王静尧. 高产酯非酿酒酵母筛选及在混菌发酵中的发酵特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2023. [WANG J Y. Screening of non-*Saccharomyces cerevisiae* with high ester yield and its fermentation characteristics in mixed fermentation[D]. Alai: Tarim University, 2023.]
- [9] 李秀婷, 范光森, 孙宝国, 等. 产己酸乙酯的葡萄牙棒孢酵母菌株及其培养方法与应用: 中国, 111909861A[P]. 2020-11-10. [LI X T, FAN G S, SUN B G, et al. Strain of *Clavispora lusitanae* producing ethyl caproate and its culture method and application: China, 111909861A[P]. 2020-11-10.]
- [10] LIU Y, CHEN X, WEI D, et al. Breeding a novel chlorophyll-deficient mutant of *Auxenochlorella pyrenoidosa* for high-quality protein production by atmospheric room temperature plasma mutagenesis[J]. *Bioresour Technol*, 2023, 390: 129907.
- [11] ZHANG Q, MIAO R Y, FENG R C, et al. Application of Atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) to microbial breeding[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(8): 6466–6484.
- [12] 汪锡武, 冯婉婷, 方旭娟, 等. 富硒啤酒酵母的选育及有机硒含量的测定[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(10): 48–54. [WANG X W, FENG W T, FANG X J, et al. Breeding of selenium-rich beer yeast and determination of organic selenium content[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2024, 50(10): 48–54.]
- [13] 林仙菊, 张祝兰, 严凌斌, 等. ARTP 诱变选育环孢菌素 A 高产菌株及发酵工艺优化[J]. *工业微生物*, 2023, 53(4): 158–163. [LIN X J, ZHANG Z L, YAN L B, et al. Study on screening of high-yield cyclosporin A producing strain by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and optimization of fermentation conditions[J]. *Industrial Microbiology*, 2023, 53(4): 158–163.]
- [14] HONG K Q, FU X M, LEI F F, et al. Selection of salt-tolerance and ester-producing mutant *Saccharomyces cerevisiae* to improve flavour formation of soy sauce during co-fermentation with *torulopsis globosa*[J]. *Foods*, 2023, 12(18): 3449.
- [15] 杨新, 陈莉, 杨双全, 等. 开阳地区桑葚果园富硒酵母菌的分离、筛选及鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(24): 66–73. [YANG X, CHEN L, YANG S Q, et al. Isolation, screening and identification of selenium-enriched yeast from mulberry orchard of Kaiyang[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(24): 66–73.]
- [16] 刘程, 梁静一美, 王周利, 等. 茯砖茶中冠突散囊菌的分离鉴定及富硒菌株筛选[J]. *西北农业学报*, 2022, 31(10): 1344–1356. [LIU C, LIANG JING Y M, WANG Z L, et al. Isolation and identification of *euromium cristatum* in Fucha tea and screening of selenium-rich strains[J]. *Journal of Northwest Agriculture*, 2022, 31(10): 1344–1356.]
- [17] 胡惠影. 乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)JZ07 富集转化硒的特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2018. [HU H Y. Characteristics of Selenium accumulation and transformation by *Lactobacillus* sp. JZ07[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2018.]
- [18] 中华人民共和国国家监督检验检疫总局. GB/T 5009.93-2017 食品安全国家标准 食品中硒的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [General Administration of Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Determination of selenium in GB/T 5009.93-2017 National standard for food safety. Determination of selenium in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.]
- [19] 金海炎. 猕猴桃酒优良酿酒菌株的选育及混菌发酵工艺优化研究[D]. 南阳: 南阳师范学院, 2023. [JIN H Y. Study on yeast screening of kiwifruit wine and optimization of its fermentation conditions for compound barm[D]. Nanyang: Nanyang Normal University, 2023.]
- [20] 王伟雄. 基于 *Kluyveromyces marxianus* 与酿酒酵母混合发酵葡萄酒动力学分析及质量提升研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022. [WANG W X. Dynamic Analysis and Quality Improve-

ment of Mixed Fermentation Wine Based on *Kluyveromyces Marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.]

[21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 5009.225-2016 食品安全国家标准 酒中乙醇浓度的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [General Administration of Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 5009.225-2016 National standard for food safety. Determination of ethanol concentration in alcohol[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[22] 凌思雨, 王洲, 张会敏, 等. 常压室温等离子体诱变与微生物微液滴培养选育谷胱甘肽高产菌株[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 200-208. [LING S Y, WANG Z, ZHANG H M, et al. Breeding of a high-yield glutathione-producing strain by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and microbial microdroplet culture system[J]. Food Science, 2023, 44(4): 200-208.]

[23] 杨映津, 俞剑燊, 夏永军, 等. 优良黄酒酵母的筛选及其抗逆性能分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 261-267. [YANG Y J, YU J S, XIA Y J, et al. Screening for Quality Strains of Yeast from Yellow Rice Wine and Stress Resistance Analysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(8): 261-267.]

[24] LI Y C, RAO J W, MENG F B, et al. Combination of mutagenesis and adaptive evolution to engineer salt-tolerant and aroma-producing yeast for soy sauce fermentation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(10): 4288-4297.

[25] TIAN T T, WU D H, CHAN-TAT NG, et al. A multiple-step

strategy for screening *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved acid tolerance and aroma profiles[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 3097-3107.

[26] LIU C F, LI Q, NIU C D, et al. The use of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis to create a brewing yeast with reduced acetaldehyde production[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2018, 124: 236-243.

[27] WEI F Q, LI M L, WANG M, et al. A C6/C5 co-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain with the alleviation of antagonism between xylose utilization and robustness[J]. *GCB Bioenergy*, 2020, 13: 83-97.

[28] 王犁辉, 王浩臣, 马珊, 等. 常压室温等离子体选育高产酒精及酸的酿酒酵母[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 26-31. [WANG L Y, WANG H C, MA S, et al. Breeding of acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by ARTP mutation[J]. Food and Machinery, 2019, 35(5): 26-31.]

[29] 蔡飞, 高飞飞, 王斌, 等. 富硒酵母的分离鉴定及富硒条件的优化[J]. 中国酿造, 2018, 37(6): 103-108. [CAI F, GAO F F, WANG B, et al. Isolation and identification of selenium-enriched yeast and optimization of selenium-enriched conditions[J]. China Brewing, 2018, 37(6): 103-108.]

[30] 凡敏, 黄珍, 李欣, 等. 富硒酵母的筛选鉴定及其作为鱼饲料的应用研究[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(8): 1416-1419. [FAN M, HUANG Z, LI X, et al. Isolation, identification and application research of fish feed of Selenium-rich yeast[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(8): 1416-1419.]