

文章编号: 1007-4627(2013)02-0201-05

## 重离子诱变酵母培养基的优化与研究

马良, 王菊芳, 陆栋, 李文建, 肖国青

(中国科学院近代物理研究所, 甘肃兰州 730000)

**摘要:** 利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子诱变技术对面包酵母菌种进行诱变, 得到一株粗蛋白含量达到55%以上的菌株, 借助Minitab16.0, 采用Plackett-Burman实验设计法及响应面分析法, 对诱变后面包酵母菌发酵培养基的成分进行了优化, 得到3个最为显著的主要影响因子: 葡萄糖、酵母抽提物和硫酸镁。利用最陡爬坡实验逼近最大响应区域后, 利用Box-Behnken实验设计及响应面分析法进行回归分析。通过求解回归方程, 得到优化发酵的条件为, 葡萄糖: 11.03 g/L、酵母抽提物: 6.53 g/L、硫酸镁: 5.59 g/L。面包酵母生物量为4.84 g/L, 相比未进行优化时的生物量提高了15%。

**关键词:** 重离子诱变; 面包酵母; 响应面法; Plackett-Burman

**中图分类号:** Q961      **文献标志码:** A      **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.02.201

### 1 引言

酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种单细胞真核微生物, 很久以前人们就已经开始利用酵母生产各种产品, 酵母菌在食品工业中占有极其重要的地位, 人们几乎每天都会使用到酵母菌生产的酒类, 食品和保健品, 如: 白酒、红酒、酵母抽提物、酵母葡聚糖、谷胱甘肽等高附加值产品<sup>[1-5]</sup>。酵母蛋白作为一种新型的营养产品, 越来越受到消费者的青睐, 酵母蛋白含量的高低, 直接决定着酵母产品的品质。因此, 若得到一株粗蛋白含量高的菌株, 在工业化生产中将有较高的经济价值和广阔的应用前景。

大量的研究表明, 在荷能离子被注入生物体后所表现的生物效应具有局部性、双重性和不易修复性等特点<sup>[6]</sup>, 使得重离子辐照诱变技术在微生物领域愈来愈受到国内外科科研工作者的重视。本实验以诱变后的酵母菌为初发菌株, 以单因素实验为基础, 运用Plackett-Burman设计法, 通过爬坡试验及Box-Behnken实验设计对3个因子的相互作用进行回归分析<sup>[7]</sup>, 得到培养基的最优配比, 以期获得生物量最大化。

### 2 材料与方法

#### 2.1 实验菌种

面包酵母菌株(YB): 中国科学院近代物理研究所生物物理研究室提供。

#### 2.2 培养基的组成及菌悬液的制备

液体培养基(g/L): 葡萄糖10、蛋白胨5、酵母抽提物5、硫酸镁2、硫酸铵2、磷酸二氢钾4, pH为5。

固体斜面(g/L): 葡萄糖10、蛋白胨5、酵母抽提物5、硫酸镁2、硫酸铵2、磷酸二氢钾4, 琼脂15。

将菌种接入到已灭好菌的250 mL三角瓶液体培养基中, 30 °C、150 r/min培养12~16 h, 取悬浮液1 mL加入到直径35 mm无菌皿中备用。

#### 2.3 试验方法

重离子束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 能量为80 MeV/u, 穿过菌液的平均LET为35.5 keV/ $\mu\text{m}$ , 辐照剂量为20, 40, 80, 100, 120和200 Gy, 未辐照菌种作为对照。对无菌皿中的酵母悬浮液进行辐照处理。

##### (1) 斜面培养及发酵培养

将不同剂量辐照处理后的菌悬液涂平板后, 挑取

收稿日期: 2012-07-22; 修改日期: 2012-09-03

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KJXC2-EW-N05); 中国科学院科技支甘项目(KJZG-2011-Y106200YD0)

作者简介: 马良(1981-), 男, 甘肃天水人, 硕士研究生, 从事辐射微生物研究; E-mail:maliang@impcas.ac.cn

通信作者: 李文建, E-mail:wjli@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

单菌落，接入斜面，在 30 °C 恒温培养箱中培养 18~24 h 后，4 °C 冰箱保存。

挑取不同剂量下斜面上的菌落于已灭好菌的液体培养三角瓶中，30 °C，150 r/min 培养 20 h。三角瓶体积为 250 mL，装液量为 100 mL。

(2) 酵母生物量测定

将菌悬液在 4 500 r/min 条件下离心 10 min，弃去上清液，放入 105 °C 烘箱内，烘至恒重，用恒重干燥法测定其重量。

(3) 酵母蛋白含量初筛

分别选取不同剂量辐照后的菌株，液体培养，离心后收集菌体按照相同比例调配成菌悬液后超声破壁，过滤后收集上清液，采用考马斯亮蓝 G-250 染料染色法，初步测定蛋白含量<sup>[8]</sup>。

(4) 酵母蛋白含量复筛

按照 (2) 中的发酵培养条件培养后的菌悬液，在 4 500 r/min 条件下离心 10 min，弃去上清液，用蒸馏水离心、洗涤 3 次，放入 105 °C 烘箱内，烘至恒重，冷却后利用 GB/T 5009.5-2003 规定测定蛋白含量方法对酵母菌体测定粗蛋白含量<sup>[9]</sup>。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 重离子诱变后菌种的筛选

分别选取 ck, 20, 40, 80, 100, 120 和 200 Gy 剂量下的 3 株初筛后的酵母菌株进行液体培养，收集菌体后，测定蛋白含量，得到结果如图 1 所示。

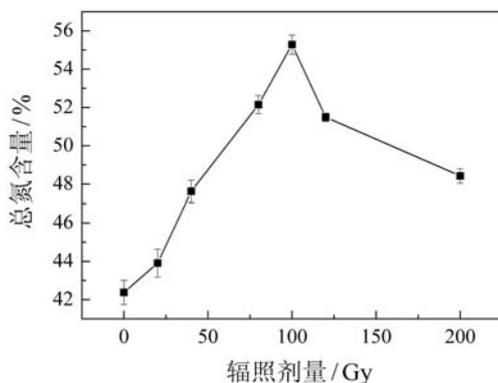


图 1 不同剂量下测定粗蛋白含量

按上述方法，在 80~100 Gy 剂量范围内，筛选得到一株粗蛋白含量为 55% 的酵母菌株。较之前未辐照蛋白含量 42% 提高了 13%。离子束作为一种先进的可精确定向定量控制的辐射源，在生物质能源作物、植

物和微生物育种等新的交叉学科领域中发挥着越来越重要的作用，尤其是在微生物领域内，选育高产及特异性菌种的方法已趋成熟<sup>[10-13]</sup>。辐照结果显示，在选取不同剂量的酵母进行蛋白含量测定的过程中，当辐照剂量在 80~100 Gy 时，酵母粗蛋白含量较其它辐照剂量变化较大；当增加辐照剂量或者降低辐照剂量时，粗蛋白含量未发生明显变化，其原因需要做更深入的研究，需要对积累蛋白的基因进行分析。

#### 3.2 Plackett-Burman 设计确定的主要因素

确定影响生物量的 6 个因素：葡萄糖 (A)、酵母抽提物 (B)、蛋白胨 (D)、硫酸镁 (E)、硫酸铵 (H) 和磷酸二氢钾 (J)，并进行试验次数  $N = 12$  的 Plackett-Burman 实验，实验菌株为 (3) 中所述的菌株。每个因素取低水平 -1 和高水平 1，另外设置 (C, F 和 G) 3 个虚拟列用来考察实验存在的误差。以面包酵母生物量为响应值，对实验结果进行分析，得到各因素的  $t$  值和显著性。一般选取置信区间大于 90% 的因素作为显著因子，实验结果见表 1，各个因素主效应的分析见表 2。

表 1  $N = 12$  的 Plackett-Burman 实验设计

序号	A	B	C	D	E	F	G	H	J	生物量 / (g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	4.183
2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	3.540
3	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	4.432
4	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	4.187
5	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	6.311
6	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	3.491
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.653
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	3.995
9	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	5.107
10	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	3.238
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	5.427
12	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	4.608

表 2 各因素主要效应分析

项	效应	系数	系数标准误差	T	P	重要性
A	0.149 40	0.074 70	0.005 178	14.43	0.005	1
B	0.050 93	0.025 47	0.005 178	4.92	0.032	3
D	0.032 53	0.016 27	0.005 178	3.14	0.088	5
E	0.076 87	0.038 43	0.005 178	7.42	0.018	2
H	0.056 27	0.028 13	0.005 178	5.43	0.039	4
J	-0.029 97	-0.014 98	0.005 178	-2.89	0.102	6

#### 3.3 主效应因子分析

由表 2 主要效应分析因子可知，在 PB 设计的两

水平范围内, 选择可信度均在 90% 以上的因素作为影响实验的显著因子。因此, 影响面包酵母生物量的重要因素为葡萄糖(A)、硫酸镁(E)、酵母抽提物(B), 进行更进一步的响应面实验。

### 3.4 最陡爬坡实验及结果

响应面拟合方程仅在考察紧接邻域里才能充分近似地表达真实情形。因此, 首先需逼近最佳值区域后才能建立有效的响应面拟合方程。可通过最陡爬坡法以实验值的变化梯度方向作为爬坡方向, 根据各因素效应值的大小来确定变化的步长, 可快速地逼近最佳值区域。根据 Plackett-Burman 实验设计所筛选出的 3 个显著因子设计它们的步长及变化方向, 实验设计结果见表 3。由表 3 可知, 最优条件在实验 2 附近, 故以实验 2 的条件为响应面的实验中心点<sup>[14]</sup>。葡萄糖为 8, 10, 12 和 14 g/L, 酵母抽提物为 2, 4, 6 和 8 g/L, 硫酸镁为 8, 6, 4 和 2 g/L, 如表 4 所列。

表 3 最陡爬坡实验结果

序号	葡萄糖 / (g/L)	酵母抽提物 / (g/L)	硫酸镁 / (g/L)	生物量 / (g/L)
1	14	8	8	3.961
2	12	6	6	4.799
3	10	4	4	4.693
4	8	2	2	4.604

表 4 响应面因素水平分析表

因素	水平		
	-1	0	1
葡萄糖 / (g/L)	10	12	14
酵母抽提物 / (g/L)	4	6	8
硫酸镁 / (g/L)	4	6	8

### 3.5 显著因子最佳值的确定

由最陡爬坡确定的实验因素中心点, 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 设计了三因素三水平运行次数为 15 次的响应面分析实验。葡萄糖浓度为 A、酵母抽提物浓度为 B、硫酸镁浓度为 C, 实验设计结果见表 5。

表 5 Box-Behnken 设计矩阵和实验结果

A	B	C	生物量 / (g/L)
0	-1	1	4.942
-1	0	-1	4.767
0	1	-1	5.124
0	0	0	5.078
0	-1	-1	4.824
-1	1	0	4.853
1	1	0	5.989
1	0	1	5.923
0	0	0	4.935
0	0	0	5.134
1	-1	0	5.747
0	1	1	5.132
-1	-1	0	4.721
1	0	-1	5.825
-1	0	1	4.829

对实验数据进行二次多项回归拟合, 得到回归模型为

$$Y = 0.505 + 0.054A + 0.011B + 0.004C + 0.030A^2 - 0.003B^2 - 0.002C^2 + 0.003AB + 0.001AC - 0.003BC$$

其中: Y 为响应值生物量; A, B 和 C 分别代表葡萄糖、酵母抽提物和硫酸镁。对结果进行方差分析(表 6)后

表 6 回归模型方差分析

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
回归	9	0.027 929	0.027 929	0.003 103	67.75	0.000
线性	3	0.024 299	0.024 299	0.008 100	176.84	0.000
平方	3	0.003 566	0.003 566	0.001 189	25.96	0.002
交互作用	3	0.000 064	0.000 064	0.000 021	0.46	0.720
残差误差	5	0.000 229	0.000 229	0.000 046		
失拟	3	0.000 018	0.000 018	0.000 003	0.06	0.977
纯误差	2	0.000 211	0.000 211	0.000 105		
合计	14	0.028 158				

可知，方程显著统计程度高，失拟项为 0.977，模型决定系数  $R^2=97.72\%$ ，表明回归方程有较好的拟合度，因此可利用此回归方程进行分析和预测。由于线性和平方的平方是显著的，对回归方程求一阶偏导数可得模型的极值点， $Y$  的最大估计值为 4.865 g/L，各因素取值分别为葡萄糖 11.03 g/L、酵母抽提物 6.53 g/L 和硫酸镁 5.59 g/L。在上述条件下，对模型预测值进行实验验证，做 3 次平行实验，平均值为 4.823 g/L。能够很好地预测酵母生物量的最大化。

根据上述回归方程作出响应面分析图，见图 2~图 4。由图 2 可知，生物量随酵母抽提物增长而缓慢增长，而随葡萄糖增加呈现较快增长趋势。由图 3 可知，硫酸镁对酵母生物量增加曲线表现较为平缓，酵母抽提物的曲线增长相对于硫酸镁较为明显。

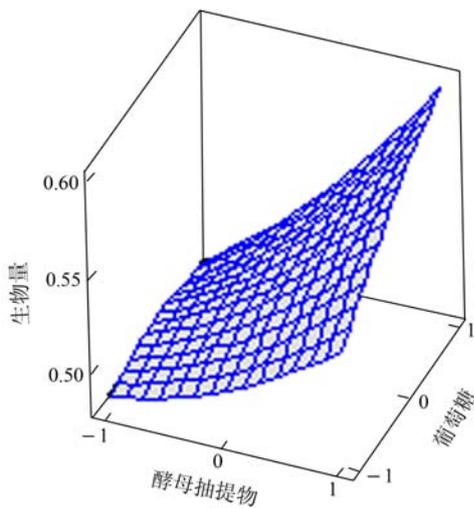


图 2 (在线彩图)生物量与酵母抽提物, 葡萄糖的曲面图

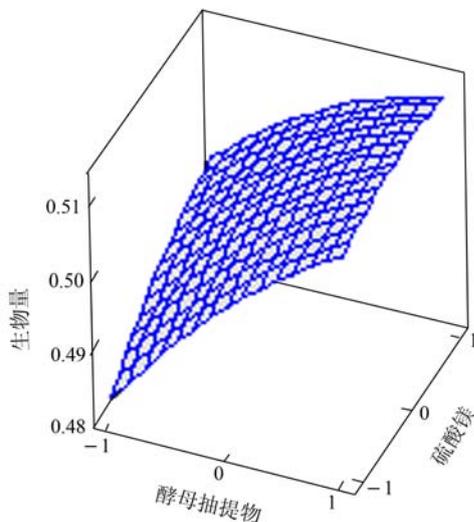


图 3 (在线彩图)生物量与硫酸镁, 酵母抽提物的曲面图

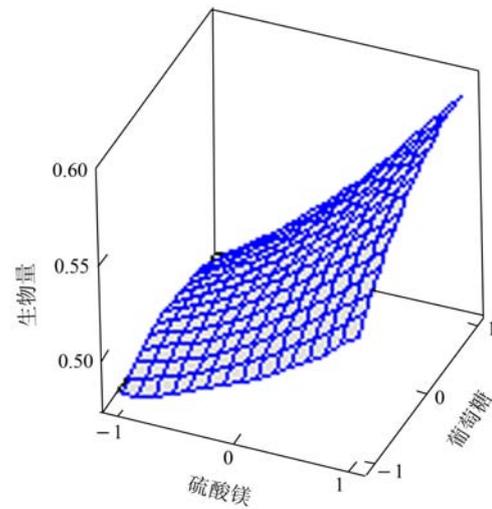


图 4 (在线彩图)生物量与硫酸镁, 葡萄糖的曲面图

由图 4 可知，葡萄糖对生物量影响的曲线较硫酸镁的曲线更加陡峭，可知葡萄糖是影响酵母生物量的最主要因素。

将不同剂量的  $^{12}C^{6+}$  离子束注入到粗蛋白含量为 42% 的酵母菌悬液中，经过辐照后培养、筛选和测定蛋白含量，得到一株粗蛋白含量为 55% 的酵母菌株。为了使诱变后酵母得到生物量的最大化，通过 Plackett-Burman 实验设计法及响应面分析法优化发酵条件，得到最优液体发酵培养基，葡萄糖含量 11.03 g/L、酵母抽提物 6.53 g/L 和硫酸镁 5.59 g/L。生物量可达到 4.84 g/L，未进行优化的培养基生物量仅为 4.10 g/L，较原来未进行优化的培养基生物量提高了 15%。图 2 中碳源还未达到最高点，但考虑到成本及优化配置等的因素，并未继续增大碳源的含量。本实验仅以葡萄糖作为碳源，还需要探索较为低廉的碳源进行研究，以及对酵母蛋白积累效应吉利的研究，以期达到指导工业化生产的目的。

参考文献(References):

[1] YU Jingzhi, YU Xuefeng, WANG Dingchang, *et al.* Handbook of The Yeast's Production and Application[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 1-5.(in Chinese)  
 (于景芝, 俞学峰, 王定昌, 等. 酵母生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业应用出版社, 2005: 1-5.)  
 [2] GERALD R, TILAK W N, SPENCER J F T, *et al.* Yeast Technology[M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991: 5-10.  
 [3] YU Juntang, TANG Xiaoxuan, WU Xingyan, *et al.* New Biotechnology[M]. Beijing, Chemical Industry Press, 2003: 15-20.(in Chinese)

- (俞俊棠, 唐孝宣, 邬行彦, 等. 新编生物工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 15-20.)
- [4] CEN Peilin, CAI jing, LIN Jianping, *et al.* Industrial Microbiology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 357.  
(岑沛霖, 蔡谨, 林建平, 等. 工业微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 357.)
- [5] WANG Jufang, LU Dong, WU Xin, *et al.* Interaction with Materials and Atoms, 2010, **268**: 12719.
- [6] ZHOU Guangming, LI Wenjian, WANG Jufang, *et al.* J Radiat Res Radiat Proess, 2001, **19**(4): 289.(in Chinese)  
(周光明, 李文建, 王菊芳, 等. 辐射研究与工艺学报. 2001, **19**(4): 289.)
- [7] HAO Caixue, YU Xiaobin, LIU Zhiyu, *et al.* Food Research and Development, 2006, **27**(8): 69.(in Chinese)  
(郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 食品研究与开发, 2006, **27**(8): 69.)
- [8] SUN Shiqing, WANG Shaojie, LI Qiushun, *et al.* Shandong Science, 2011, **24**(6): 14.(in Chinese)  
(孙世清, 王少杰, 李秋顺, 等. 山东科技, 2011, **24**(6): 14.)
- [9] GB/T 5009.5-2003. 食品中蛋白质的测定[EB/OL].[2012-4-10].  
<http://down.foodmate.net/standard/index.html>.
- [10] LI C, BAI J H, CAI Z L, *et al.* Journal of Biotechnology, 2002, **93**: 27.
- [11] KALIL S J, MAUGERI F, RODRIGUES M I. Process Biochemistry, 2000, **35**(6): 539.
- [12] MILLER A, SITTER R R. Technometrics, 2001, **43**: 44.
- [13] XIAO Guoqing, SONG Mingtao, LI Wenjian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 163.(in Chinese)  
(肖国青, 宋明涛, 李文建, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 163.)
- [14] LÜ Guoying, ZHANG Zuofa, PAN Huijuan, *et al.* Mycosystema, 2010, **29**(1): 106.(in Chinese)  
(吕国英, 张作法, 潘慧娟, 等. 菌物学报, 2010, **29**(1): 106.)

## Optimization of Culture Medium for Heavy-ion Irradiation Bread Yeast Design

MA Liang, WANG Jufang, LU Dong, LI Wenjian, XIAO Guoqing

(*Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*)

**Abstract:** A mutant bread yeast strain with high protein content of 55% was gained by use of  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions. The MINITAB 16.0 software, Plackett-Burman experimental design and response surface methodology were applied to optimize the culture medium for the irradiated yeast. The most important three factors which influenced the culture results were identified as glucose, magnesium sulphate and yeast extract. The path of the steepest ascent was undertaken to approach the optimal region of the three significant factors. Box-Behnken design and response surface methodology were used for the regression analysis. Finally, the optimal fermentation conditions were identified as glucose 11.03 g/L, yeast extract 6.53 g/L and magnesium sulphate 5.59 g/L by the regression analysis. It was found that the biomass of the bread yeasts reached 4.84 g/L and increased by 15% compared to original conditions.

**Key words:** heavy ion irradiation; bread yeast; response surface methodology; Plackett-Burman

**Received date:** 22 Jul. 2012; **Revised date:** 3 Sep. 2012

**Foundation item:** Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences(KJ CX2-EW-N05); Science and Technology Programme of Chinese Academy of Sciences Supported GanSu(KJZG-2011-Y106200YD0)

**Corresponding author:** LI Wenjian, E-mail:wjli@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>