

乳源酵母 *Pichia fermentans* 的抗氧化特性

陈历水¹, 马 莺¹, Jean-Louis MAUBOIS², 刘巧红¹

(1. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 哈尔滨 150090, chlishui@sina.com;

2. 法国农业科学研究院 雷恩乳品中心, 雷恩 法国 35042)

摘 要: 为得到新的天然抗氧化剂, 采用 DPPH 法和抑制脂质过氧化法对 11 株来源于牛乳的酵母菌抗氧化活性进行测定, 包括他们的完整细胞和无细胞提取物, 发现 *Pichia fermentans* BY5 有较好的抗氧化活性. 分析不同条件下 *P. fermentans* BY5 细胞提取物的抗氧化活性, 发现培养基的起始 pH 值、培养时间、培养基种类对酵母菌的抗氧化活性和蛋白质含量影响显著 ($P < 0.05$); 而抗氧化活性与蛋白质含量显著相关 ($P < 0.01$). 将酵母 BY5 在 pH6 的麦芽培养基中培养 2 d 后清除 DPPH 活性可达 60%; 在 pH6 的 YPD 培养基中培养 4 d 后抑制脂质过氧化能力达到 74%.

关键词: *Pichia fermentans*; 抗氧化活性; 蛋白质; 原料乳

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)02-0292-05

Antioxidant activity of *Pichia fermentans* isolated from raw milk

CHEN Li-shui¹, MA Ying¹, Jean-Louis MAUBOIS², LIU Qiao-hong¹

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, chlishui@sina.com;

2. Institut National de la Recherche Agronomique, Rennes 35042, France)

Abstract: To obtain new natural antioxidant, 11 yeast strains isolated from raw milk were screened by determining their capability to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and inhibit linoleic acid peroxidation, including their intact cell and cell-free extracts. It was found that *Pichia fermentans* BY5 showed excellent antioxidant activity. Then its antioxidant activity under different initial pH and incubation time as well as culture media of wort, YPD and PDA was analyzed. The results revealed that all these conditions significantly affected the antioxidant activity ($P < 0.05$), and the protein contents showed a remarkable correlation with antioxidant capability ($P < 0.01$). In addition, the capability of scavenging DPPH of BY5 extraction reached 60% when being cultured with initial pH 6 in wort for 2 d, and the inhibition of linoleic acid peroxidation reached 74% in YPD for 4 d.

Key words: *Pichia fermentans*; antioxidant activity; protein; raw milk

研究表明:氧化应激反应可以损害生物分子,氧化损伤还常常给人类带来疾病.通过补充抗氧化剂或含有抗氧化剂的食物可以帮助人体减少氧化损伤.随着人们安全意识的提高,越来越多的人反对在食品中添加合成的抗氧化剂.但是利用植物生产天然的化合物是有限的,因为植物生长需要较长的时间和大量的投资;而且提取与分离理想的化合物也需要相当长的时间和劳力.与此相

反,微生物的生长周期比较短,来源于微生物的抗氧化物质可以迅速生产,而且可以通过控制培养条件来加快其生长速度.所以,相对于植物源的抗氧化剂而言,利用微生物生产天然的抗氧化剂是一个较好的方法^[1].

Rashid(1992)^[2]曾经报道发酵鱼肉中有一些微生物能防止脂质过氧化.Yen^[3]曾建议利用细菌和霉菌产生的具有抗氧化特性的分泌物代替食物中添加的抗氧化剂;然而,令人担忧的是细菌,尤其是霉菌的分泌物中很有可能含有毒素,它的安全性难以得到保障.目前,虽然有关于含酵母乳

收稿日期: 2009-03-12.

作者简介: 陈历水(1974—),男,博士研究生;

马 莺(1961—),女,教授,博士生导师.

制品如 koumiss 与 kefir 中的抗氧化化合物及其抗氧化活性的研究,但鲜有单独研究从乳及乳制品中分离得到的酵母菌抗氧化活性的报道。*Pichia fermentans* 是发酵乳制品中普遍存在的一种酵母菌^[4],本文对 11 株来自原料乳的酵母菌进行初筛,得到了一株有较好抗氧化活性的 *P. fermentans* BY5,并对影响其活性的条件进行了研究,以期为该菌在工业中的应用提供理论依据。

1 实验

1.1 酵母菌株

共 12 株酵母菌用于抗氧化特性的筛选,其中 11 株分离于北京或哈尔滨的原料乳中,CICC 1850 购于中国工业微生物菌种中心,具体见表 1。

表 1 实验中所用酵母菌

菌株	NCBI 序号	菌株	NCBI 序号
<i>P. fermentans</i>		<i>Y. lipolytica</i>	
BY5	FJ219591	HY4	FJ357148
HJ15	FJ219598	HY15	FJ357147
<i>I. orientalis</i>		HJ6	FJ219597
BY10	FJ219593	HJ10	FJ357146
BY15	FJ357144	<i>R. mucilaginosa</i>	
<i>P. guilliermondii</i>		BY14	FJ357145
BY31	FJ219594	HJ22	FJ219600
<i>S. boulardii</i>			
CICC1850	标准菌株		

1.2 化学试剂

DPPH(1,1-二苯基-2-苦肟基)与亚油酸,分析纯,购于 Sigma 公司;吐温 20、丁基化羟基甲苯(BHT)、三氯乙酸(TCA)、硫代巴比妥酸(TBA)、过氧化氢(H₂O₂)、硫酸亚铁(FeSO₄)、PBS 缓冲液及其他试剂均为国产分析纯。

1.3 酵母菌的培养

将所有菌株接种于 5 mL YPD 培养基中(2% 葡萄糖、0.5% 酵母提取物、1% 蛋白胨),自然 pH 值,过夜培养后,接种物转接在 100 mL 中的培养基中,在 30 °C 的摇床中进行培养(摇床速度 125 r/min)。4 d 后将培养物离心(5 000 r/min, 20 min, 4 °C),沉淀物称重得生物量,同时测 pH 值;2 mL 上清液放 -20 °C 冷冻保藏用于实验测定。

1.4 无细胞培养物的制备

所有菌株经过 3 次传代。培养液 5 000 r/min 离心 20 min,收集菌体,用 PBS 洗涤 3 次,重悬浮于 PBS 溶液中,调整菌数到 10⁸ CFU/mL 左右,冰水浴中超声破碎 25 min 后,于 4 °C, 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液得无细胞提取物。

1.5 抗脂质过氧化能力的测定

参照文献[5]方法略加改动。0.5 mL 样品与

0.5 mL 的 PBS 溶液(0.02 mol/L, pH 7.4)、1 mL 亚油酸的乳化液(18.8 mL 水中添加 1 mL 亚油酸, 0.2 mL 吐温 20)混合,然后加入 0.2 mL FeSO₄ (0.01%) 和 0.2 mL H₂O₂ (20 mmol/L) 在 37 °C 水浴中反应 12 h。反应液加入 0.2 mL 的 TCA, 2 mL 的 TBA, 0.2 mL 的 BHT (质量分数 0.4%), 在 100 °C 反应 30 min,冷却后加入 2.5 mL 三氯甲烷抽提,离心收集上清液在 532 nm 下测吸光值。实验中以 PBS 作为空白对照,抗脂质过氧化率为: $[1 - A_{532}(\text{样品}) / A_{532}(\text{空白})] \times 100\%$ 。

以质量浓度为 10 μg/mL 的 Ascorbic acid 和 1 μg/mL 的 Gallic acid 作为标准品做标准曲线,最终的抗氧化活性换算成 μg 当量抗坏血酸与没食子酸。

1.6 清除 DPPH 自由基能力的测定

对 DPPH 自由基清除能力的测定见文献[6]。

1.7 提取物中蛋白质与总糖含量的测定

蛋白质含量的测定采用 Lowry 法^[7],其含量以 μg/100 μg 提取物计;总糖的含量采用硫酸苯酚法测定。

1.8 培养时间对抗氧化活性的影响

分别将酵母菌 *P. fermentans* BY5 接种在 YPD 中, pH 为 6,其他条件不变,培养 1, 2, 3, 4, 5, 6 d 后测定总蛋白含量和抗氧化活性。

1.9 培养基起始 pH 值对抗氧化活性的影响

将酵母菌 *P. fermentans* BY5 分别接种在 4 种不同起始 pH 的 YPD 培养基中,其他培养条件不变,4 d 后测定总蛋白含量和抗氧化活性。

1.10 培养基对抗氧化活性的影响

将酵母菌分别接种在 3 种不同的培养基中: 麦芽汁培养基(158 g/L 麦芽提取物)、YPG 培养基(酵母提取物 25 g/L, 蛋白胨 50 g/L 和葡萄糖 100 g/L) 和 PDA 培养基(马铃薯提取物中添加葡萄糖 20 g/L), pH 调为 6,其他条件不变,4 d 后测定总蛋白含量和抗氧化活性。

1.11 数据分析

所有实验数据均采用 SPSS 统计软件(12.0 版)分析,每组实验重复 3 次,数据结果以均值 ± 标准方差(SD)的方式表示。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化活性酵母菌的筛选

清除 DPPH 自由基活性及抑制脂质过氧化活性的测定是筛选具有抗氧化活性菌株常用的方法。当 DPPH 自由基遇到提供质子的物质如抗氧化剂时就会

被清除,表现为吸光值的降低.基于此原理,抗氧化物质的抗氧化能力可以用其清除 DPPH 自由基的能力来表示.本实验对 12 株乳及乳制品中常见的酵母菌清除 DPPH 的能力进行了测定.由表 2 可知,不同的酵母菌表现出不同的清除活性,而且其中酵母菌完整细胞

的活性要比相对应的提取物的活性高,完整细胞的活性从 4% ~ 46% 不等,而提取物的活性范围则在 0 ~ 27%. 活性最强的为 *P. guilliermondii* BY31,其次是 *P. fermentans* BY5, HY15, *I. orientalis* BY10 和 CICC 1850.

表 2 酵母菌的生物特性及抗氧化特性

菌株号	生物量 (湿重/g)	最终 pH	DPPH 活性/%		抗脂质过氧化/%	
			酵母完整细胞	提取物	酵母完整细胞	提取物
<i>P. fermentans</i>						
BY5	4.69	5.72	41.82 ± 0.27 ^{ef}	26.72 ± 0.68 ^g	68.64 ± 0.71 ^{de}	59.38 ± 3.12 ^f
HJ15	4.19	4.88	44.33 ± 2.19 ^{fg}	27.43 ± 0.40 ^g	67.19 ± 4.90 ^{de}	53.53 ± 7.84 ^{ef}
<i>I. orientalis</i>						
BY10	3.62	4.71	40.00 ± 4.29 ^h	12.33 ± 1.19 ^d	59.57 ± 3.56 ^{abcd}	49.87 ± 8.02 ^{ef}
BY15	3.31	4.43	29.57 ± 0.27 ^d	11.90 ± 0.22 ^d	75.44 ± 2.85 ^e	34.57 ± 1.34 ^{cd}
<i>P. guilliermondii</i>						
BY31	5.27	7.04	46.78 ± 0.55 ^{gh}	13.09 ± 1.33 ^d	43.76 ± 2.55 ^{bcd}	0 ^a
<i>Y. lipolytica</i>						
HY4	2.10	4.80	12.31 ± 0.10 ^b	0 ^a	58.25 ± 1.87 ^{abcd}	5.48 ± 3.12 ^a
HY15	2.64	5.86	38.79 ± 0.36 ^e	8.03 ± 0.36 ^c	68.32 ± 4.36 ^{de}	8.94 ± 3.92 ^a
HJ6	1.82	5.31	28.87 ± 0.55 ^d	15.25 ± 1.65 ^e	65.30 ± 3.65 ^{cde}	27.46 ± 1.65 ^{bc}
HJ10	1.92	5.27	19.97 ± 0.55 ^c	0 ^a	53.21 ± 0.80 ^{ab}	56.48 ± 5.79 ^f
<i>R. mucilaginosa</i>						
BY14	1.93	4.17	8.63 ± 0.55 ^b	4.27 ± 0.07 ^b	49.43 ± 8.99 ^a	31.55 ± 5.25 ^{bcd}
HJ22	4.31	4.38	4.25 ± 0.18 ^a	0 ^a	50.57 ± 5.25 ^a	42.69 ± 4.10 ^{de}
<i>S. boulardii</i>						
CICC1850	3.64	4.85	40.46 ± 1.82 ^{ef}	22.01 ± 0.14 ^f	58.94 ± 1.78 ^{abcd}	20.91 ± 4.45 ^b

注:结果以平均值 ± 方差(SD)表示;同一列中不同字母表示差异显著(P < 0.05).

由于不饱和脂肪酸(LH)在活性氧的引发下可以发生过氧化反应,在脂类过氧化过程中产生L·、LO·、LOO·等自由基与LOOH.其中LOOH可使I⁻释放,生成共轭二烯、乙烷等气体及丙二醛等中间产物,通过测定中间产物可以得到抑制过氧化反应的能力^[6].表2显示了12株不同酵母菌在亚油酸氧化体系中抑制脂肪过氧化的能力.其中酵母菌完整细胞活性(49% ~ 75%)高于相应的酵母菌提取物(0 ~ 59%),同长双歧杆菌 ATCC 15708 和乳酸菌 ATCC 4356 及其他乳酸菌正好相反^[8].造成这种现象的主要原因可能是酵母与乳酸菌完整细胞本身的抗氧化活性不同引起的,酵母完整细胞本身所含有的抗氧化物质(如SOD酶和CAT酶等)表现出的抗氧化能力比乳酸菌完整细胞要强;同时,酵母完整细胞除了分泌一些能抑制氧化的物质(如酶、多酚和其他酵母分泌物等)外,其细胞壁含有的多糖蛋白自身也具有较好的抗氧化活性^[9].但在提取物中只有一部分抑制氧化反应的物质如NADPH等在起作用,因为在一定的超声破碎条件下,酵母细胞壁比较厚,很大一部分抗氧化物质仍然还会保留在细胞内部;从而使得提取物的活性比完整细胞要低.对于乳酸菌而言,其完整细胞本身

的抗氧化活性比较低,而且细胞相对比酵母菌容易被破碎,超声处理后,细胞壁组成成分如胞外多糖和细胞质里面的抗氧化物质一起被提取出来,在抑制氧化反应的过程中,不仅有胞内的活性物质起作用,而且其胞外多糖也在起作用,所以提取物的活性比完整细胞要高.值得注意的是,*P. guilliermondii* BY31 提取物虽然有较强的清除 DPPH 自由基的能力,却没有抑制脂质过氧化的能力,所以,没有将该菌株做进一步研究,而是选择了清除活性和抑制能力都比较强的 *P. fermentans* BY5 进行研究.

2.2 培养时间对 *P. fermentans* BY5 抗氧化活性的影响

将 BY5 放入 YPD 中进行摇床培养,条件如上所述,每天测定其活性(如图1).随着时间延长,酵母菌抑制脂质过氧化的功能慢慢升高,到第4天达到最大;而清除 DPPH 氧自由基的能力则从第2天开始逐渐下降,与此相对应的是总蛋白的含量也是在第2天达到最高,然后逐渐下降.目前,多数人认为多糖是抑制氧化反应的主要物质,但 Jehrig(2007)^[10],等发现糖蛋白中蛋白才是主要的影响物质.为此,进一步采用 Pearson 法分析

了蛋白含量和多糖含量与清除 DPPH 活性及抑制脂质过氧化作用的相关性(如表 3),结果显示蛋白含量与清除 DPPH 活性及抑制脂质过氧化作用呈极显著($P < 0.01$)的正相关(相关系数分别为 0.993 与 0.997),而多糖的含量与抑制脂质过氧化作用呈显著($P < 0.05$)的负相关(相关系数为 -0.845),而与清除 DPPH 活性的相关性不显著(相关系数为 -0.807)($P > 0.05$).由此,可以认为蛋白质在酵母的抗氧化中发挥着主要作用,而不是通常所认为的多糖^[10],其相关的机理还需要进一步研究.

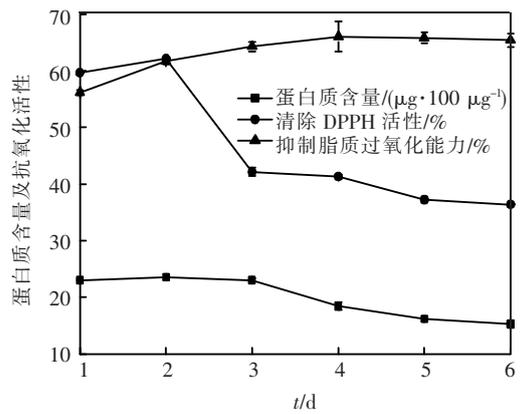


图 1 时间对抗氧化活性和总蛋白含量的影响

表 3 酵母抗氧化活性与蛋白质和多糖含量的线性相关系数

项目	蛋白质含量	多糖含量	抑制脂质过氧化活性	清除 DPPH 活性
蛋白质含量	1			
多糖含量	-0.847^*	1		
抑制脂质过氧化活性	0.997^{**}	-0.845^*	1	
清除 DPPH 活性	0.993^{**}	-0.807	0.990^{**}	1

* 代表在 $P < 0.05$ 水平上显著相关; ** 代表在 $P < 0.01$ 水平上极显著相关.

2.3 起始 pH 对 *P. fermentans* BY5 提取物中抗氧化活性的影响

在其他条件不变的情况下,改变起始 pH 值,4 d 后对酵母菌提取物的抗氧化活性进行测定,结果如表 4 所示,起始 pH 值对抗氧化活性影响显著($P < 0.05$),这主要是由于酵母菌中含抗氧化活性的物质较多,除了细胞壁中的 β -葡聚糖、 α -甘露聚糖、甘露糖蛋白、脂质、壳聚糖和一些蛋白质外^[9-10],还有 SOD 酶、CAT 酶等物质都有抗氧化活性,而起始 pH 值对酶有直接的影响,所以,导致抗氧化活性有显著差异($P < 0.05$).起始 pH 值为 4 与 6 培养的酵母抗氧化活性没有显著差异

($P > 0.05$),原因可能与酵母细胞生长过程中分泌的抗氧化物质相关,由表 4 可以看出,pH4 时酵母的生长速度最快,生物量最大;但是蛋白质的含量却明显低于 pH6 ($P < 0.05$).由此可知,酵母细胞的多少与其分泌的抗氧化物质共同影响了酵母的抗氧化活性.当起始 pH 为 4 与 6 时,该菌的抗氧化活性分别达到 46% 与 47%,通过与抗坏血酸和没食子酸的标准曲线换算(抗坏血酸标准曲线: $y = 0.0696x + 0.03$, $R^2 = 0.9986$;没食子酸: $y = 0.4788x + 0.0606$, $R^2 = 0.9966$),得到该提取物的活性相对于 6.32 μg 抗坏血酸或 0.85 μg 没食子酸的抗氧化活性.

表 4 起始 pH 对 *P. fermentans* BY5 提取物中蛋白质含量及抗氧化活性的影响

样品起始 pH	生物量 湿重 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	最终 pH	蛋白质含量 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$	DPPH 活性 %	抗脂质过氧化 %
3	396	2.61	99.6 ± 4.7^a	34.07 ± 0.47^a	23.71 ± 0.19^a
4	404	3.52	199.4 ± 1.5^b	46.04 ± 1.61^b	72.84 ± 1.51^b
5	397	3.84	142.4 ± 1.4^c	37.09 ± 0.75^c	61.88 ± 5.36^c
6	399	4.14	210.3 ± 6.2^d	47.41 ± 0.70^b	74.94 ± 4.91^b
Ascorbic acid				11.03	33.15
Gallic acid				53.20	46.78

1. 结果以平均值 \pm 方差(SD)表示;2. 生物量及最终 pH 为 3 次试验的平均值;3. ^{a, b, c, d}: 同一列中字母不同表示差异显著($P < 0.05$);4. Ascorbic acid 和 Gallic acid 的质量浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4 培养基对 *P. fermentans* BY5 抗氧化活性的影响

将 BY5 放入 3 种不同的培养基中,在以上设定的条件下进行摇床培养,4 d 测定 B5 的抗氧化活性和蛋白质含量,结果如图 2.可以看出,麦芽

培养基中的酵母提取物清除 DPPH 自由基的活性比其他 2 种显著提高($P > 0.05$);而且 3 种不同培养基中的酵母菌蛋白质含量存在显著差异($P < 0.05$),在麦芽汁培养基中的含量最高.造成这种结果的原因可能是不同培养基中的成分,如碳

和氮含量不同,使得酵母菌在生长过程中生成的代谢物质也有差别;还有一个直接原因是麦芽汁培养基中含有较多的多酚,酵母菌在代谢过程中吸收了多酚,而多酚是一种较好的抗氧化剂,所以,培养在麦芽汁中的酵母表现出更好的抗氧化特性^[9],由此也可以看出,酵母的抗氧化活性是多种物质共同作用的结果^[11]。此外,实验发现培养温度对酵母菌的抗氧化活性没有显著性影响。

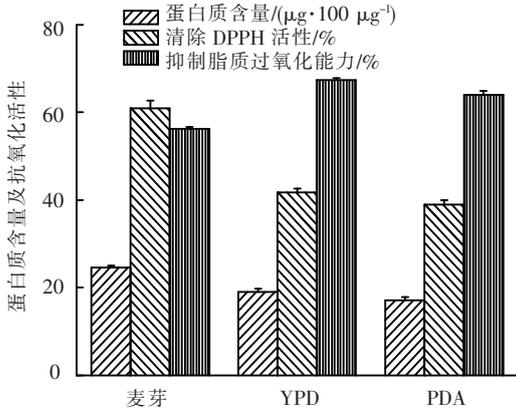


图 2 不同培养基对抗氧化活性和总蛋白含量的影响

3 结 论

1) 通过对 11 株乳源酵母菌清除 DPPH 自由基活性及抑制脂质过氧化能力的测定得到了一株抗氧化活性较好的酵母 *P. fermentans* BY5。

2) 培养基、培养时间和起始 pH 对酵母菌 *P. fermentans* BY5 的抗氧化活性都有显著的影响 ($P < 0.05$),但是 pH4 与 pH6 之间无显著差异 ($P > 0.05$),具体原因需进一步研究;蛋白质含量与抗氧化活性呈极显著的正相关 ($P < 0.01$),而多糖含量与清除 DPPH 活性呈负相关 ($P < 0.05$),与抑制脂质过氧化之间没有显著相关性。由此可以推测出蛋白质在提取物的抗氧化活性中起主导作用,但是具体的机理还有必要进行下一步研究。

3) *P. fermentans* BY5 在起始 pH6 的麦芽培养基中培养 2 d 后,1 mL 无细胞提取物清除 DPPH 自由基的活性可达 60% (相当于 8.2 μg 抗坏血酸或 1.13 μg 没食子酸的活性);而在起始 pH6 的 YPD 培养基中培养 4 d 后抑制脂质过氧化能力能达到 74% (相当于 2.73 μg 抗坏血酸或 1.28 μg

没食子酸的活性),值得进行深入研究。

参考文献:

- [1] NAYLIN N, TAING O, HASHINAGA F, *et al.* Antioxidant activity of sugar - tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. Food Biotech, 2005, 19:107 - 120.
- [2] RASHID M H, KATO F, MURATA A. Effect of microorganisms on the production of lipid and fatty acid composition of fermented fish meal [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56:1058 - 1062.
- [3] YEN G C, LEE C A. Antioxidant activity of extracts from molds [J]. J Food Prot, 1996, 59:1327 - 1330.
- [4] FREITAS de I, PINON N, BERDAGUE J L, *et al.* *Kluyveromyces lactis* but not *Pichia fermentans* used as adjunct culture modifies the olfactory profiles of Cantale cheese [J]. J Dairy Sci, 2008, 91:531 - 543.
- [5] KULLISAAR T, SONGISEPP E, MIKELSAAR M, *et al.* Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress - mediated atherogenicity in human subjects [J]. Br J Nutr, 2003, 90:449 - 456.
- [6] 范金波. 丝胶抗氧化肽的制备、分离及其活性研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2008: 53.
- [7] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, LEWIS F A, *et al.* Protein measurements with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193:265 - 275.
- [8] LIN M Y, CHANG F J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* TCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [J]. Dig Dis Sci, 2000, 45:1617 - 1622.
- [9] JEHRIG S C, ROHN S, KROH L W, *et al.* Antioxidative activity of (1 - 3), (1 - 6) - β - D - glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media [J]. LWT, 2008, 41:868 - 877.
- [10] JEHRIG S C, ROHN S, KROH L W, *et al.* In vitro potential antioxidant activity of (1 - 3), (1 - 6) - β - D - Glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55:4710 - 4716.
- [11] NAYLIN N, SUGANUMA T, TAING O. Antioxidant activities of compounds isolated from fermented broth of *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. Food Biotech, 2006, 20:131 - 141.

(编辑 刘 彤)