

6 株酵母菌产营养活性物质能力的比较分析

卢春芳^{1,2} 刘国娟^{1,2} 刘大程^{1,2*} 胡红莲³ 高民³

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 农业部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018; 3. 内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010031)

摘要: 本试验旨在为后期反刍动物微生态制剂研制筛选出高活性酵母菌株。试验测定了 6 株酵母菌 [产朊假丝酵母 (*Candida atilis*) BY、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) BR、热带假丝酵母 B2、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YR、酿酒酵母 YC 和酿酒酵母 BC] 产营养活性物质 (β -葡聚糖、甘露聚糖、有机酸、氨基酸和多肽) 的能力, 并使用 DPS 14.10 软件运用 Topsis 法对试验数据进行了多指标综合分析。结果表明: 热带假丝酵母 BR 产 β -葡聚糖、甘露聚糖能力最强, 其细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖含量分别为 80.2、60.5 mg/g; 产朊假丝酵母 BY 产有机酸能力最强, 其培养液中总有机酸含量为 344.46 μ g/mL; 酿酒酵母 BC 产多肽能力最强, 其培养液中多肽含量为 14.08 mg/dL。多指标综合分析结果表明最优菌株为热带假丝酵母 BR, 其产 β -葡聚糖、甘露聚糖、丁二酸、谷氨酸和半胱氨酸的能力均最强, 其细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖含量分别为 80.2、60.5 mg/g, 培养液中总有机酸、总氨基酸含量分别达到 312.11 μ g/mL、4.705 mg/g。通过 6 株酵母菌产营养活性物质能力综合比较分析得出最优菌株为热带假丝酵母 BR。

关键词: 酵母菌; 营养活性物质; 反刍动物微生态制剂

中图分类号: S132

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2014)02-0533-08

我国微生态制剂的研究工作多集中在单胃动物上, 而有关专门针对反刍动物研制的微生态制剂的研究报道较少。近年来, 研究者们开始了利用微生态制剂来调控瘤胃功能, 从而提高反刍动物生产性能的研究^[1], 其中针对酵母菌及其培养物的研究尤其突出。大量研究表明, 添加酵母菌及其培养物可以提高瘤胃中性洗涤纤维 (neutral detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维 (acid detergent fiber, ADF) 消化率及瘤胃乙酸、丙酸、丁酸、总挥发性脂肪酸 (total volatile fatty acid, TVFA) 浓度及乙酸与丙酸比^[2-3], 还可增加奶牛产奶量, 提高乳脂率^[4], 减轻环境应激对家畜造成的危害^[5-6]。同时, 酵母菌及其培养物在稳定瘤胃液 pH 及预防亚急性瘤胃酸中毒方面也起着积极的

作用^[7-8]。

酵母菌培养物属于动物微生态制剂领域的范畴, 是一种由少量活菌细胞、大量细胞代谢产物 (cell metabolites) 和发酵培养基 (fermentation medium) 组成的混合物, 其核心价值在于它含有的发酵代谢物 (fermentation metabolites), 主要包括营养活性物质 (nutricines)、增味剂 (taste-enhancer)、芳香物质 (aromatic substance) 及一些促进畜禽生长的未知因子等。本课题组前期研究表明复合酵母菌在特殊发酵工艺下产生的营养活性物质主要有 5 种, 分别为 β -葡聚糖 (β -glucan)、甘露聚糖 (mannan)、多肽 (polypeptides)、有机酸 (organic acids) 和氨基酸 (amino acids)^[9]。这些营养活性物质在改善动物消化道菌群结构、保持肠道微生

收稿日期: 2013-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260560); 现代农业 (奶牛) 产业技术体系建设专项 (CARS-37)

作者简介: 卢春芳 (1989—), 女, 内蒙古阿拉善右旗人, 硕士研究生, 从事反刍动物瘤胃微生态研究。E-mail: wellimau0483@126.com

* 通讯作者: 刘大程, 教授, 硕士生导师, E-mail: nmglc@163.com

态平衡及提高瘤胃功能等方面均起着重要作用。在营养活性物质功效方面,研究者们越来越重视营养活性物质之间的组合效应。基于“营养活性物质组学理论”^[10],本课题组在研究复合酵母菌培养物过程中更强调5种营养活性物质间相互作用的整体效果。酵母菌产品作用效果的差异很大程度上源于所用菌株的差异^[11],用作饲料添加剂的酵母菌株数量很多,但是不同菌株对瘤胃微生物的作用效果不同,进而对瘤胃发酵及动物机体产生不同的效应^[12],可见优良的酵母菌株是反刍动物微生态制剂研究与应用的基础^[13]。本试验通过对6株酵母菌代谢产生营养活性物质的能力进行比较与分析,从而筛选出优良菌株,为后期反刍动物微生态制剂的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

产阮假丝酵母(*Candida atilis*)BY、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)BR、热带假丝酵母B2、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YR、酿酒酵母YC和酿酒酵母BC,均来源于内蒙古农业大学兽医学院反刍动物微生态制剂课题组菌种库。

1.2 菌株培养

6株酵母菌分别接种到麦芽汁培养基中,180 r/min、30℃培养48 h;以不接菌的麦芽汁培养基作为空白对照,每个样品3个平行。

1.3 酵母菌细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖含量的测定

酵母菌破壁:采用涡流微珠破壁法^[14]。

硫酸水解:用72%的硫酸溶液处理^[15]。分别称取 β -葡聚糖、甘露聚糖各5.00、6.25、7.50、8.75、10.00、12.50、15.00 mg,硫酸水解后使多糖终浓度为0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.50、0.60 mg/mL。

单糖含量测定:采用液相色谱-示差折光检测器测定7个样品及校正多糖中甘露糖和葡萄糖含量^[16]。

结果计算:以校正多糖的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制校正曲线,得出回归方程。样品的峰面积代入回归方程中计算得到酵母菌细胞壁中 β -葡聚糖及甘露聚糖含量。

1.4 酵母菌培养液中有机酸含量的测定

采用安捷伦LC1100液相色谱仪测定有机酸

含量^[17]。

1.5 酵母菌培养液中氨基酸含量的测定

采用日立L-8900型全自动氨基酸分析仪测定氨基酸含量^[18]。

1.6 酵母菌培养液中多肽含量的测定

标准曲线制作:以牛血清白蛋白的含量为横坐标,其在595 nm处的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线^[19]。

多肽提取:量取酵母菌培养液5.00 mL于50 mL离心管中,加入10 mL 75%的乙醇和5 mL、pH 4.8的柠檬酸,充分混匀,用4 000 r/min离心10 min,取上清液。

多肽含量测定:取3支试管,各吸取样品上清液1 mL,各加入考马斯亮蓝G250溶液5.0 mL,充分振荡混匀,静置5 min后,测定595 nm处的吸光度值,代入标准曲线求出样品中多肽的含量。

1.7 统计与分析

试验数据用平均值 \pm 标准差表示,采用SAS 9.0统计软件中的ANOVA对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为差异不显著;使用DPS 14.10软件运用Topsis法对数据进行多试验、多指标综合分析^[20]。

2 结 果

2.1 β -葡聚糖及甘露聚糖含量测定结果

β -葡聚糖的校正方程为 $y = 603.391x - 3.997.7$ ($R^2 = 99.12$),说明 β -葡聚糖含量在0.2~0.6 mg/mL范围内多糖浓度与单糖峰面积具有良好的线性相关。甘露聚糖的校正方程为 $y = 82.792x - 11.326$ ($R^2 = 99.25$),说明0.2~0.6 mg/mL范围内的多糖浓度与单糖峰面积呈良好线性相关。

由表1可知,产 β -葡聚糖能力最强的菌株为热带假丝酵母BR,其细胞壁中 β -葡聚糖含量高达80.2 mg/g,显著高于其他5株酵母菌($P < 0.05$),产阮假丝酵母BY和热带假丝酵母B2次之,其细胞壁中 β -葡聚糖含量分别为62.8和59.1 mg/g,酿酒酵母YR、酿酒酵母YC、热带假丝酵母B2三者差异不显著($P > 0.05$)。同时,热带假丝酵母BR产甘露聚糖能力也最强,其细胞壁中甘露聚糖含量达60.5 mg/g,显著高于产阮假丝酵母BY、酿酒酵母BC、酿酒酵母YC($P < 0.05$),其次是热带假丝酵母B2和酿酒酵母YR,其细胞壁

中甘露聚糖含量分别为 51.9 和 48.1 mg/g。综合母菌。上述 2 个指标,热带假丝酵母 BR 优于其他 5 株酵

表 1 不同酵母菌细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖的含量

Table 1 The contents of β -glucan and mannan in cell walls of different yeasts

mg/g

菌株 Bacterial strains	β -葡聚糖 β -glucan	甘露聚糖 Mannan
YR	53.6 \pm 6.6 ^{bc}	48.1 \pm 5.3 ^{ab}
YC	48.5 \pm 5.5 ^{bc}	40.3 \pm 5.7 ^b
BY	62.8 \pm 3.8 ^b	43.0 \pm 3.4 ^b
B2	59.1 \pm 11.8 ^{bc}	51.9 \pm 12.6 ^{ab}
BC	47.4 \pm 11.0 ^c	41.6 \pm 10.7 ^b
BR	80.2 \pm 3.0 ^a	60.5 \pm 4.1 ^a

YR:酿酒酵母 YR *Saccharomyces cerevisiae* YR;YC:酿酒酵母 YC *Saccharomyces cerevisiae* YC;BY:产阮假丝酵母 BY *Candida utilis* BY;B2:热带假丝酵母 B2 *Candida tropicalis* B2;BC:酿酒酵母 BC *Saccharomyces cerevisiae* BC;BR:热带假丝酵母 BR *Candida tropicalis* BR。下表同 The same as below。

同列数据肩标相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$),不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 2 同。

In the same column, values with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as Table 2.

2.2 有机酸含量测定结果

由表 2 可知,6 株不同酵母菌培养液中有机酸含量均显著高于空白对照 ($P < 0.05$),但不同酵母菌之间产有机酸的能力有较大差异。其中,产酒石酸能力较强的菌株是热带假丝酵母 BR 和产阮假丝酵母 BY,其培养液中酒石酸含量分别为 85.61 和 83.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$),其次是酿酒酵母 YR、酿酒酵母 YC 及酿酒酵母 BC,其培养液中酒石酸含量分别为 63.53、60.46 和 56.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于热带假丝酵母 B2 ($P < 0.05$);产阮假丝酵母 BY 产苹果酸能力最强,其培养液中苹果酸含量为 92.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$),酿酒酵母 YC 和酿酒酵母 YR 稍次之,其培养液中苹果酸含量分别为 76.55 和 71.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$;产柠檬酸能力较强的菌株是热带假丝酵母 B2 和产阮假丝酵母 BY,其培养液中柠檬酸含量分别高达 111.05 和 94.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$),其次是酿酒酵母 YR、酿酒酵母 YC 及酿酒酵母 BC,其培养液中柠檬酸含量分别为 76.52、68.71 和 61.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$;热带假丝酵母 BR 产丁二酸能力最强,其培养液中丁二酸含量为 119.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$),其次是酿酒酵母 BC、酿酒酵母 YC、产阮假丝酵母 BY、酿酒酵母 YR,其培养液中丁二酸含量分别为 88.90、76.69、73.61 和 71.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$,热带假丝酵母 B2 培养液中丁二

酸含量相比最低。6 株酵母菌中产阮假丝酵母 BY 产酒石酸和苹果酸能力均最强,并且其培养液中总有机酸含量也显著高于其他菌株 ($P < 0.05$),达到 344.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于其他 5 株酵母菌 ($P < 0.05$);热带假丝酵母 BR 产丁二酸能力最强,同时其培养液中总有机酸含量达到 312.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$,位列第 2,显著高于其他 4 株酵母菌 ($P < 0.05$)。

2.3 氨基酸含量测定结果

由表 3 可知,6 株酵母菌培养液中总氨基酸的含量无显著差异 ($P < 0.05$);热带假丝酵母 BR、产阮假丝酵母 BY、热带假丝酵母 B2 产谷氨酸能力较高,其培养液中谷氨酸含量分别为 0.915、0.910 和 0.910 mg/g,显著高于酿酒酵母 YR、酿酒酵母 YC 和酿酒酵母 BC ($P < 0.05$);酿酒酵母 YR、酿酒酵母 YC、产阮假丝酵母 BY 和酿酒酵母 BC 产甘氨酸能力较高,其培养液中谷氨酸含量显著高于其余 2 株酵母菌 ($P < 0.05$);产阮假丝酵母 BY 产丙氨酸能力最高,其培养液中丙氨酸含量高达 0.325 mg/g,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$);热带假丝酵母 BR 和热带假丝酵母 B2 产半胱氨酸能力较高,其培养液中半胱氨酸含量分别为 0.115、0.120 mg/g,显著高于其他菌株 ($P < 0.05$);酿酒酵母 YR、产阮假丝酵母 BY、酿酒酵母 BC 产缬氨酸能力较高,其培养液中缬氨酸含量均为 0.305 mg/g,显著高于热带假丝酵母 BR 和热带假丝酵母 B2 ($P < 0.05$);酿酒酵母 YR 产蛋氨酸能

力最高,其培养液中蛋氨酸含量显著高于其他菌株($P < 0.05$);产朊假丝酵母 BY 产酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸能力最高,其培养液中酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸含量分别为 0.085、0.235、

0.365 mg/g,酪氨酸、苯丙氨酸含量显著高于其他菌株($P < 0.05$),脯氨酸含量显著高于热带假丝酵母 B2 和热带假丝酵母 BR($P < 0.05$)。

表 2 不同酵母菌培养液中有机酸含量

Table 2 The contents of organic acids in cultures of different yeasts

μg/mL

菌株 Bacterial strains	酒石酸 Tartaric acid	苹果酸 Malic acid	柠檬酸 Citric acid	丁二酸 Succinic acid	总有机酸 Total organic acids
YR	63.53 ± 11.21 ^b	71.63 ± 13.05 ^{bc}	76.52 ± 2.09 ^b	71.61 ± 11.99 ^b	283.28 ± 12.24 ^c
YC	60.46 ± 3.66 ^b	76.55 ± 5.76 ^{ab}	68.71 ± 1.43 ^{bc}	76.69 ± 4.46 ^b	282.40 ± 15.31 ^c
BY	83.84 ± 7.75 ^a	92.53 ± 9.53 ^a	94.49 ± 5.30 ^a	73.61 ± 11.01 ^b	344.46 ± 3.93 ^a
B2	47.05 ± 1.68 ^c	48.75 ± 1.69 ^d	111.05 ± 0.35 ^a	35.66 ± 9.38 ^c	242.50 ± 9.72 ^d
BC	56.73 ± 0.28 ^{bc}	57.55 ± 7.43 ^{cd}	61.85 ± 17.76 ^{bcd}	88.90 ± 11.89 ^b	265.01 ± 13.58 ^{cd}
BR	85.61 ± 0.05 ^a	50.52 ± 0.45 ^d	56.29 ± 2.91 ^{cd}	119.70 ± 17.11 ^a	312.11 ± 14.70 ^b
空白对照 Blank control	4.34 ± 2.35 ^d	14.02 ± 0.11 ^e	47.60 ± 3.11 ^d	2.36 ± 0.32 ^d	68.32 ± 5.67 ^e

表 3 不同酵母菌培养液中氨基酸含量

Table 3 The contents of amino acids in cultures of different yeasts

mg/g

氨基酸 Amino acids	菌株 Bacterial strains					
	YR	YC	BY	B2	BC	BR
天冬氨酸 Asp	0.465 ± 0.021	0.475 ± 0.007	0.455 ± 0.007	0.475 ± 0.007	0.475 ± 0.021	0.470 ± 0.014
苏氨酸 Thr	0.230 ± 0.014	0.230 ± 0.000	0.210 ± 0.000	0.220 ± 0.000	0.230 ± 0.014	0.225 ± 0.007
丝氨酸 Ser	0.240 ± 0.014	0.240 ± 0.000	0.230 ± 0.000	0.235 ± 0.007	0.240 ± 0.014	0.235 ± 0.007
谷氨酸 Glu	0.760 ± 0.028 ^b	0.760 ± 0.014 ^b	0.910 ± 0.014 ^a	0.910 ± 0.000 ^a	0.765 ± 0.035 ^b	0.915 ± 0.021 ^a
甘氨酸 Gly	0.325 ± 0.007 ^a	0.330 ± 0.000 ^a	0.325 ± 0.007 ^a	0.310 ± 0.000 ^b	0.325 ± 0.007 ^a	0.305 ± 0.007 ^b
丙氨酸 Ala	0.285 ± 0.007 ^b	0.280 ± 0.000 ^{bc}	0.325 ± 0.007 ^a	0.270 ± 0.000 ^c	0.280 ± 0.000 ^{bc}	0.275 ± 0.000 ^{bc}
半胱氨酸 Cys	0.100 ± 0.000 ^b	0.100 ± 0.000 ^b	0.090 ± 0.000 ^c	0.120 ± 0.000 ^a	0.100 ± 0.000 ^b	0.115 ± 0.007 ^a
缬氨酸 Val	0.305 ± 0.007 ^a	0.295 ± 0.007 ^{ab}	0.305 ± 0.007 ^a	0.280 ± 0.000 ^b	0.305 ± 0.007 ^a	0.280 ± 0.014 ^b
蛋氨酸 Met	0.070 ± 0.000 ^a	0.060 ± 0.000 ^{ab}	0.060 ± 0.000 ^{ab}	0.055 ± 0.007 ^b	0.065 ± 0.007 ^{ab}	0.055 ± 0.007 ^b
异亮氨酸 Ile	0.185 ± 0.007	0.185 ± 0.007	0.185 ± 0.007	0.180 ± 0.000	0.185 ± 0.007	0.185 ± 0.007
亮氨酸 Leu	0.280 ± 0.014	0.280 ± 0.000	0.275 ± 0.007	0.280 ± 0.000	0.280 ± 0.014	0.275 ± 0.007
酪氨酸 Tyr	0.500 ± 0.000 ^b	0.050 ± 0.000 ^b	0.085 ± 0.007 ^a	0.050 ± 0.000 ^b	0.045 ± 0.007 ^b	0.055 ± 0.007 ^b
苯丙氨酸 Phe	0.205 ± 0.007 ^b	0.195 ± 0.007 ^b	0.235 ± 0.007 ^a	0.205 ± 0.007 ^b	0.205 ± 0.021 ^b	0.195 ± 0.007 ^b
赖氨酸 Lys	0.380 ± 0.014 ^a	0.380 ± 0.000 ^a	0.340 ± 0.000 ^b	0.380 ± 0.000 ^a	0.380 ± 0.014 ^a	0.375 ± 0.007 ^a
组氨酸 His	0.120 ± 0.000	0.120 ± 0.000	0.115 ± 0.007	0.120 ± 0.000	0.125 ± 0.007	0.125 ± 0.007
精氨酸 Arg	0.215 ± 0.007 ^a	0.210 ± 0.000 ^a	0.195 ± 0.007 ^b	0.220 ± 0.000 ^a	0.215 ± 0.007 ^a	0.215 ± 0.007 ^a
脯氨酸 Pro	0.360 ± 0.028 ^{ab}	0.340 ± 0.000 ^{abc}	0.365 ± 0.007 ^a	0.320 ± 0.000 ^c	0.355 ± 0.021 ^{abc}	0.325 ± 0.007 ^{bc}
总氨基酸 Total amino acids	4.890 ± 0.325	4.300 ± 0.042	4.705 ± 0.092	4.630 ± 0.028	4.575 ± 0.163	4.625 ± 0.134

同行数据肩标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 4 同。

In the same row, values with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as Table 4.

2.4 多肽含量测定结果

由表 4 可知,6 株酵母菌培养液中多肽含量均显著高于空白对照($P < 0.05$)。其中,酿酒酵母

BC 产多肽能力最高,其培养液中多肽含量达到 14.08 mg/dL,显著高于其他菌株($P < 0.05$)。酿酒酵母 YR、酿酒酵母 YC、热带假丝酵母 B2 产多

肽能力次之,其培养液中多肽含量分别为 12.33、12.41、12.79 mg/dL,三者之间差异不显著($P > 0.05$),但显著高于热带假丝酵母 BR 和产朊假丝酵母 BY($P < 0.05$)。

表 4 不同酵母菌培养液中多肽含量

Table 4 The content of polypeptide in cultures of different yeasts

mg/dL

指标 Index	菌株 Bacterial strains						
	YR	YC	BY	B2	BC	BR	空白对照 Blank control
多肽 Polypeptides	12.33 ± 0.35 ^b	12.41 ± 0.23 ^b	10.05 ± 0.35 ^d	12.79 ± 0.35 ^b	14.08 ± 0.47 ^a	11.42 ± 0.35 ^c	9.00 ± 0.23 ^e

2.5 酵母菌产活性物质能力的综合评定

依据以上试验结果使用 DPS 14.10 软件运用 Topsis 法对数据进行多试验、多指标综合分析,得出结论见表 5。可知,最优的菌株为热带假丝酵母 BR,其细胞壁中 β -葡聚糖和甘露聚糖含量分别为 80.2 和 60.5 mg/g,优于其他菌株,其培养液中

多肽含量为 114.2 $\mu\text{g/L}$,氨基酸和有机酸含量分别为 4.625 mg/g 和 312.11 $\mu\text{g/mL}$;其次为产朊假丝酵母 BY,其产有机酸能力较强,培养液中酒石酸、苹果酸、总有机酸含量分别为 83.84、92.53、344.46 $\mu\text{g/mL}$,优于其他 5 株酵母菌。

表 5 6 株酵母菌 Topsis 法排序指标值

Table 5 The ranking index values of 6 yeasts by Topsis method

菌株 Bacterial strains	D +	D -	C	名次 Ranking
YR	0.412 0	0.290 8	0.413 8	3
YC	0.453 1	0.294 5	0.393 9	4
BY	0.339 1	0.451 4	0.571 0	2
B2	0.573 2	0.319 0	0.357 6	6
BC	0.487 2	0.310 1	0.388 9	5
BR	0.386 2	0.559 5	0.591 7	1

3 讨论

3.1 不同酵母菌其生物活性差异

近年来,酵母菌类产品在反刍动物上的应用已有较多报道,大量试验表明添加酵母菌对反刍动物的瘤胃发酵、饲料消化率及生产性能等方面都有积极的影响^[12]。但由于所用的发酵菌种类不同、发酵工艺各异,致使产品的作用效果参差不齐。这种作用效果的差异与酵母菌菌种的结构及生物活性密切相关^[21]。本课题组致力于反刍动物微生态制剂的研究,从 30 余株酵母菌中初筛出 6 株菌株,本试验对这 6 株酵母菌产生 5 种营养活性物质的能力进行分析,得到了 2 株高活性菌株,分别为热带假丝酵母 BR 和产朊假丝酵母 BY,这 2 株酵母菌在产 β -葡聚糖、甘露聚糖及有机酸能力等方面具有明显优势。酵母菌细胞壁中的 β -葡

聚糖[由 D-葡聚糖通过 β -(1→3) 键的方式相结合]不同于植物细胞壁中的 β -(1→4) 葡聚糖,它在消化道中不可溶、不被吸收,同时不产生黏性,更重要的是它是一种免疫促进剂,能够增强机体的非特异性免疫能力,改善动物消化道的菌群结构;甘露聚糖是一种免疫功能很强的细胞壁多糖,它不仅能增强动物的免疫能力,还能吸附外源性毒素(heterotoxin)和病原菌(pathogens),在保持肠道微生态平衡方面起重要作用;酵母菌培养物中的多肽能够直接被动物吸收,参与机体生理活动和代谢调节,从而促进动物生长、提高生产性能、改善产品品质和动物健康状态;复合酵母菌培养物产生的有机酸主要有苹果酸、柠檬酸、琥珀酸和酒石酸,不同的有机酸均表现出较好的瘤胃调控功能。另外,反刍动物对特定氨基酸的需求比对特定蛋白质的需求更重要,增加动物某种限制

性氨基酸会使其氨基酸的利用率提高。

优良菌株是决定微生态制剂品质的关键因素之一,本试验筛选出的优良菌株为研制反刍动物微生态制剂奠定了良好的基础,从而从根本上避免了生产中常见的盲目使用菌株的不科学现象。

3.2 营养活性物质对瘤胃发酵的影响

近几年,饲料中营养活性物质的功效越来越受到研究者的重视。营养活性物质是饲料中天然存在的有特殊营养作用的微量组分,具有刺激机体对营养物质的消化、吸收,与基因组互动,增强免疫系统功能,调节消化道菌群平衡,保持饲料品质等作用^[22],在改善动物健康和调节新陈代谢方面也发挥着很大功效^[23]。营养活性物质是将健康和营养联系起来的饲料组分,并在全方位营养中起着越来越重要的作用。目前研究的营养活性物质主要包括抗氧化剂、乳化剂、酶、不可消化的低聚糖和有机酸等。酵母菌自身含有多量的营养物质并可以通过发酵过程而产生多种营养活性物质,如 β -葡聚糖、甘露聚糖、有机酸等。当给奶牛饲喂酵母菌培养物后,一方面, β -葡聚糖、有机酸等营养活性物质能为瘤胃内某些细菌的生长提供特殊的发酵底物,通过刺激瘤胃细菌的生长来提高饲料转化率;另一方面,酵母菌培养物中的 β -葡聚糖和甘露聚糖是2种免疫活性多糖,二者均有激活机体免疫系统和增强机体免疫能力的功效^[24-25],达到了增强奶牛免疫功能、减少乳汁体细胞数的效果,从而使奶牛的乳房更加健康,产奶量也随之相应增加。本试验通过多指标综合分析得到最优菌株为热带假丝酵母BR,其细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖含量分别为80.2和60.5 mg/g,分别是酿酒酵母BC的1.5倍以上;产丁二酸和酒石酸的能力最强,其培养液中丁二酸和酒石酸含量分别为119.70和85.61 $\mu\text{g/mL}$,分别约是热带假丝酵母B2的3和2倍,且其培养液中总有机酸含量达到312.11 $\mu\text{g/mL}$ 。这些营养活性物质在调控瘤胃发酵功能和提高动物免疫机能方面将发挥积极的功效。

3.3 酵母菌细胞破壁方法

酵母菌细胞壁厚且坚韧,所以破壁效果成为制约酵母菌胞内营养活性物质测定准确与否的主要瓶颈。本研究选用涡流微珠破壁法,利用微珠和物料之间的研磨、粉碎、剪切、挤压等机械力来打碎细胞壁^[26]。该方法破壁率高,能有效测定胞

内及细胞壁上的营养活性物质含量,为本试验的酵母菌细胞壁中多糖含量的测定奠定了基础。又因为多糖结构复杂,难以直接准确测定,所以本试验将多糖酸解为葡萄糖和甘露糖后采用液相色谱-示差折光检测器测定,使结果更加精准可靠。基于葡萄糖和甘露糖的分子式均为 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,相对分子质量为180.16,多糖酸解后残基分子式为 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$,相对分子质量是162.16,也就是说残基相对分子质量与单糖的相对分子质量之比为0.9。所以,大部分研究都是简单地以测试样品的单糖含量乘以0.9来作为多糖含量。但是,该计算结果受多糖水解程度的影响,水解不彻底会使测定结果偏小。本文运用外标法,将高纯度的2种多糖试剂进行硫酸水解后,测定单糖含量,并做成梯度绘制校正曲线。只要样品浓度在曲线范围内就表示多糖水解程度与校正曲线走向一致,将其峰面积代入校正曲线,得出样品 β -葡聚糖和甘露聚糖含量,使测定结果更精准可靠。

4 结论

① 热带假丝酵母BR产 β -葡聚糖、甘露聚糖能力最强,其细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖含量分别为80.2、60.5 mg/g;产阮假丝酵母BY产有机酸能力最强,其培养液中总有机酸含量为344.46 $\mu\text{g/mL}$;酿酒酵母BC产多肽能力最强,其培养液中多肽含量为14.08 mg/dL。

② 多指标综合分析得出最优菌株为热带假丝酵母BR,其产 β -葡聚糖、甘露聚糖能力最强,细胞壁中 β -葡聚糖、甘露聚糖含量分别为80.2、60.5 mg/g;产丁二酸的能力最强,培养液中丁二酸含量为119.70 $\mu\text{g/mL}$,且总有机酸含量达到312.11 $\mu\text{g/mL}$;产生谷氨酸和半胱氨酸能力最强,培养液中谷氨酸和半胱氨酸含量分别为0.915和0.115 mg/g,且总氨基酸含量达到4.705 mg/g。

参考文献:

- [1] 帅丽芳,段铭,张光圣.微生态制剂对反刍动物消化系统的调控作用[J].中国饲料,2002(9):16-17.
- [2] PIVA G, BELLADONNA S, FUSCONI G, et al. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(9):2717-2722.

- [3] 唐海翠, 庞学东, 庄苏, 等. 酵母培养物对山羊瘤胃纤维素酶活及挥发性脂肪酸的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(15): 35-38.
- [4] 王聪, 任金, 刘强, 等. 酵母对奶牛泌乳性能及健康状况影响的研究[J]. 兽药与饲料添加剂, 2005, 10(1): 7-9.
- [5] 苑文珠, 刘建新, 吴月明. 日粮中直接添加微生物制剂(DFM)对反刍动物的影响[J]. 饲料研究, 2001(2): 1-3.
- [6] SCHINGOETHE D J, LINKE K N, KALSCHUR K F, et al. Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(12): 4178-4181.
- [7] LILA Z A, MOHAMMED N, YASUI T, et al. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro* [J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(6): 1847-1854.
- [8] CHAUCHERYRAS F, FONTY G, BERTIN G, et al. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3466-3467.
- [9] 孙鸽. 奶牛微生态制剂酵母菌优良特性的研究及其对瘤胃发酵的影响[D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [10] 卢德勋. 系统动物营养学导论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [11] CHAUCHEYRAS-DURAND F, WALKER N D, BACH A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future[J]. Animal Feed Science and Technology, 2008, 145(1/2/3/4): 5-26.
- [12] NEWBOLD C J, WALLACE R J, CHEN X B, et al. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep [J]. Animal Science, 1995, 73(6): 1811-1818.
- [13] DAWSON K A, HOPKINS D M. Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria[J]. Journal of Animal and Science, 1991, 69(Suppl. 1): 531.
- [14] 刘晓永. 酿酒酵母 β -D-葡聚糖制备、构象及免疫功效研究[D]. 博士学位论文. 无锡: 江南大学, 2007: 22-27.
- [15] DALLIES N, FRANÇOIS J, PAQUET V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 1998, 14(14): 1297-1306.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22221—2008 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [17] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009. 157—2003 食品中有机酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [18] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009. 124—2003 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [19] BOHLE B, ZWÖLFER B, HERATIZADEH A, et al. Cooking birch pollen-related food; divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 118(1): 242-249.
- [20] 唐启义. DPS® 数据处理系统: 实验设计, 统计分析及数据挖掘[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2010.
- [21] 李声永, 王加启, 龚月生, 等. 酵母培养物在反刍动物日粮中的应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2002, 29(5): 18-22.
- [22] 卢德勋. 国际动物营养学的发展趋势与我们对策的思考[C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006: 8-17.
- [23] ADAMS C A. The role of nutraceuticals in health and total nutrition[J]. Proceedings of Australian Poultry Science Symposium, 2000, 12: 17-24.
- [24] JAWHARA S, MOGENSEN E, MAGGIOTTO F, et al. Murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis reveals *Candida glabrata* virulence and contribution of β -mannosyltransferases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287: 11313-11324.
- [25] LAMKANFI M, MALIREDDI R K, KANNEGANTI T D. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284: 20574-20581.
- [26] 孙海翔, 尹卓容, 马美范. 高压均质破碎啤酒酵母细胞壁的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(2): 66-67.

Comparative Analysis on the Capacities of Producing Nutricines for Six Yeasts

LU Chunfang^{1,2} LIU Guojuan^{1,2} LIU Dacheng^{1,2*} HU Honglian³ GAO Min³

(1. College of Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, Ministry of Agriculture, Hohhot 010018, China; 3. Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China)

Abstract: This experiment was conducted to find out the high activity strains for the development of ruminant microecological agents in latter. The capacities of producing nutricines (β -glucan, mannan, organic acids, amino acids and polypeptides) for 6 yeasts (*Candida utilis* BY, *Candida tropicalis* BR, *Candida tropicalis* B2, *Saccharomyces cerevisiae* YR, *Saccharomyces cerevisiae* YC and *Saccharomyces cerevisiae* BC) were determined and the multi-indices synthetical analysis was used to analyze experimental data by Topsis method in DPS 14.10 software. The results showed as follows: the capacities of producing β -glucan and mannan of *Candida tropicalis* BR were the strongest, and the contents of β -glucan and mannan in cell wall of *Candida tropicalis* BR were 80.2 and 60.5 mg/g, respectively; the capacity of producing organic acids of *Candida utilis* BY was the strongest, and the content of total organic acids in culture of *Candida utilis* BY reached 344.46 $\mu\text{g/mL}$; the capacity of producing polypeptides of *Saccharomyces cerevisiae* BC was the strongest, and the content of polypeptides was 14.08 mg/dL. Multi-indices synthetical analysis results showed that the optimal strain was *Candida tropicalis* BR, and it had the strongest capacities of producing β -glucan and mannan, succinic acid, glutamic acid and cysteine. The contents of β -glucan and mannan in cell wall of *Candida tropicalis* BR were 80.2 and 60.5 mg/g, respectively, and the contents of total organic acids and total amino acids in culture of *Candida tropicalis* BR were up to 312.11 $\mu\text{g/mL}$ and 4.705 mg/g, respectively. The optimal strain with the highest capacities of producing nutricines is *Candida tropicalis* BR among 6 yeasts by comprehensive comparative analysis. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(2):533-540]

Key words: yeast; nutricines; ruminant microecological agent