

微量元素铬载体酵母摇瓶发酵研究

李爱芬^{1*} 孙祖莉² 陈敏² 翟惠君² 陆江涛²

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)¹ (烟台大学生物化学系 烟台 264005)²

摘要: 实验选择了啤酒酵母 2016 菌株为铬载体酵母生产菌株, 通过摇瓶发酵实验, 对三氯化铬的添加工艺进行了研究探索。确定了铬酵母发酵培养的适宜加铬条件: 在发酵开始的 8h 内分批流加三氯化铬, 总加入量为 5×10^{-4} mol/L, 经过 12 h 摇瓶发酵可得铬酵母的生物量为 1.55 g/100 mL, 酵母含铬量为 1,100 $\mu\text{g/g}$ 以上, 酵母细胞对铬离子利用效率是 60% 以上。

关键词: 微量元素, 铬酵母, 摇瓶发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0018-04

STUDIES ON FLASK FERMENTATION OF TRACE ELEMENT CR-RICH YEAST

LI Ai-Fen

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632)

SUN Zu-Li CHEN Min ZHAI Hui-Jun LU Jiang-Tao

(Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, 264005)

Abstract: From 6 stains of yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* 2016 which was suitable for Cr-rich yeasts fermentation was selected. Concentration and additive method of CrCl_3 were investigated by liquid culture and the optimum conditions of Cr-rich yeasts were obtained. The optimum concentration of CrCl_3 were 5×10^{-4} mol/L that were added to liquid medium at the initial 8 h of culture time. At this condition, the biomass of Cr-rich yeasts was 1.55 g dry weight per 100 milliliter, Cr content in yeast cells was above 1100 $\mu\text{g/g}$, the utilizable rate of Cr ion was about 60%.

Key words: Trace element, Cr-rich yeast, Flask fermentation

铬 (chromium) 是人类及动物体所必需的微量元素, 它具有重要的生物学功能^[1]。人体铬缺乏可导致葡萄糖不耐性与生长受损等一系列病症^[2]。目前, 微量元素铬的补充形式有三氯化铬和醋酸铬, 尽管三价铬的毒性较小, 但因很少被人体和动物胃肠吸收利用, 而限制了它的使用^[3]。有机铬的来源有两种, 一种为含铬较高的天然食物, 如: 猪肾粉、黑胡椒、肝、牛肉、蘑菇等^[4]; 另一种为含铬酵母, 它是将酵母细胞培养在含铬的培养基中所得, 这是目前国际上广泛采用的动物和人理想的补铬形式。为此, 我们在实验室条件下, 进行了铬载体酵母的研究, 旨在为铬酵母的工业化生产做准备。

1 材料与方法

1.1 菌种

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 2016), 面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 2003), 酒精酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 2006), 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis* 2008), 硒酵

* 联系人 E-mail: tlaf@jnu.edu.cn

收稿日期: 2002-07-05, 修回日期: 2002-09-30

母 (*Saccharomyces cerevisiae* 2010), 锌酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 2017), 以上菌种由烟台大学生物化学系微生物实验室保存并提供。

1.2 培养基

斜面培养基: 10-12 Be 麦芽汁 100 mL, 琼脂 2g, 自然 pH。液体种子培养基: 10-12 Be 麦芽汁, 自然 pH。发酵培养基: 10-12 Be 糖蜜 100 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25g, MgSO_4 0.05 g, ZnSO_4 0.1 g, pH6.0。

1.3 培养条件

活化的斜面菌种用 5 mL 无菌水洗下, 转入种子培养基 (25 mL/250 mL 三角瓶), 30°C 190r/min 培养 24 h, 以 10% 的接种量转接到发酵培养基 (50 mL/500mL 三角瓶), 30°C 190r/min 培养 12 h, 发酵液 3,000 r/min 离心 10 min, 分析测定。

1.4 分析方法

1.4.1 生长测定干重法^[5]: 取一定量的培养液经 3,000 r/min 离心, 蒸馏水洗涤 2 次, 85°C 烘干至恒重, 称量其菌体重量。比色法: 将发酵结束的培养液适当稀释, 在 570 nm 处测光密度值。细胞计数法^[6]: 将适量发酵液进行一定稀释, 用血球计数板于显微镜下计数。

1.4.2 还原糖含量测定: 斐林试剂热滴定法。

1.4.3 菌体铬含量测定: 将发酵结束后的发酵液 3,000 r/min 离心, 收集菌体, 再用蒸馏水洗涤并离心 3 次, 85°C 烘干至恒重后, 采用电感耦合等离子体 (ICP) 法测定^[7]。

1.4.4 铬利用率的计算:

$$\text{铬利用率 (\%)} = \frac{\text{酵母含铬量} (\mu\text{g/g}) \times 10^{-6} \times \text{菌体干重} (\text{g})}{\text{发酵液中铬加入量} (\text{g})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 菌种的选择

利用烟台大学微生物实验室提供的 6 个酵母菌种, 在发酵培养基中添加浓度为 10^{-4} mol/L 的 CrCl_3 , 30°C 摇瓶发酵 12h, 观察测定酵母的生长情况, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 啤酒酵母 2016 菌株在含有铬离子的发酵液中生长最好, 570 nm 处的光密度、单位体积的菌体个数和生物量都较高, 其中生物量为每 100 mL 发酵液 1.9 g 干酵母 (图 1)。啤酒酵母 2016 菌株对发酵液中糖的利用率也较高, 为 60.5 %。根据以上实验结果, 铬载体酵母的研制选用啤酒酵母 2016 为实验菌种。

表 1 三氯化铬对不同酵母菌株生长的影响

菌株编号	糖利用率 (%)	$OD_{570\text{nm}}$	菌体个数 (细胞个数/mL)	干重 (g/100mL)
2003	36.7	0.47	4.4×10^7	1.15
2006	42.2	0.52	9.5×10^7	1.38
2008	48.6	0.59	1.1×10^8	1.46
2010	40.4	0.53	9.4×10^7	1.38
2016	60.5	0.79	3.3×10^8	1.90
2017	42.3	0.57	9.5×10^7	1.40

2.2 不同浓度 Cr^{3+} 对啤酒酵母生长及含铬量的影响

以啤酒酵母 2016 为菌种, 在发酵液中添加不同浓度的三氯化铬 ($10^{-6} \sim 10^{-2}$ mol/L),

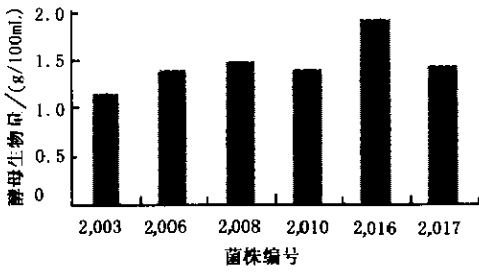


图1 三氯化铬对不同酵母生物量的影响

观察不同浓度的铬离子对酵母生物量、含铬量的影响，其结果见表2。从表2可知，铬离子浓度在 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ mol/L 范围内，对酵母细胞的生长没有表现出明显的抑制作用。当发酵液中铬离子的浓度超过 10^{-3} mol/L 时，酵母细胞的生长受到明显抑制，表现为细胞体积变小，细胞分裂迟缓，生物量下降。随着发酵液中铬离子浓度的提高，酵母细胞含铬量随之升高。但是在较

表2 不同浓度 Cr^{3+} 对啤酒酵母生长及含铬量的影响

$CrCl_3$ 浓度 (mol/L)	折合 Cr^{3+} 量 (g)	酵母干重 (g/100mL)	酵母含铬量 ($\mu\text{g/g}$)	Cr 利用率 (%)
0	0	1.55	11.25	—
10^{-6}	5.2×10^{-6}	1.55	34.75	100
5×10^{-6}	2.6×10^{-5}	1.55	78.75	100
10^{-5}	5.2×10^{-5}	1.63	100.60	100
5×10^{-5}	2.6×10^{-4}	1.56	197.43	100
10^{-4}	5.2×10^{-4}	1.55	375.00	100
5×10^{-4}	2.6×10^{-3}	1.55	879.60	54
10^{-3}	5.2×10^{-3}	1.50	1062.50	30
10^{-2}	5.2×10^{-2}	1.33	1787.50	4.5

高的浓度下，酵母细胞对铬的利用效率明显下降。如发酵液中铬离子的浓度为 10^{-2} mol/L 时，酵母细胞的含铬量为 $1,787.5 \mu\text{g/g}$ ，而对铬的利用率只有 4.5%，铬离子的浓度为 10^{-3} mol/L 时，酵母细胞的含铬量为 $1,062.5 \mu\text{g/g}$ ，铬的利用率为 30%。从铬酵母生产的经济效益、社会效益和疗效综合考虑，我们认为发酵液中适宜的三氯化铬的加入量是 5×10^{-4} mol/L，在此浓度下，酵母的生物量较高，100 mL 发酵液为 1.55g，酵母干粉的含铬量在 $800 \mu\text{g/g}$ 以上，酵母细胞对铬的利用率是 54% (图2)。

2.3 Cr^{3+} 加入方式对啤酒酵母生长及含铬量的影响

2.3.1 不同发酵时间一次性加入：选择发酵液中三氯化铬的浓度是 5×10^{-4} mol/L，分别在发酵 0、2、4、6 h 一次性加入，酵母细胞的生长及含铬量见表3。由表3可以看出，在相同浓度的铬离子条件下，一次性加入三氯化铬的适宜时间是在发酵第4 h，此时在发酵培养基中的酵母细胞已经渡过了

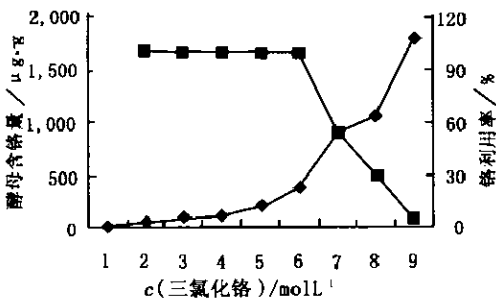


图2 不同浓度的铬离子对啤酒酵母含铬量和铬利用率的影响

生长比较迟缓的适应期，进入了对数生长期，镜检结果同样也看出酵母细胞出芽率高，生长和分裂旺盛，因此吸收和利用铬离子的能力就较强，最终获得酵母细胞生物量和含铬量都较高，分别是 1.58 g/100mL 和 $986 \mu\text{g/g}$ 。与发酵开始时加入三氯化铬相比，酵母细胞的含铬量提高了 19.6%。

2.3.2 在发酵过程中分批流加：在发酵开始 8 h 内分批流加三氯化铬，其最终加入量是 5×10^{-4} mol/L，发酵结束测定酵母细胞的生物量和含铬量分别是 1.56 g/100mL

- 1 对照, 2 1×10^{-6} mol/L, 3 5×10^{-6} mol/L,
- 4 1×10^{-5} mol/L, 5 5×10^{-5} mol/L, 6 1×10^{-4} mol/L,
- 7 5×10^{-4} mol/L, 8 1×10^{-3} mol/L, 9 1×10^{-2} mol/L

和1,156 $\mu\text{g/g}$, 酵母细胞对铬的利用率为65%。与一次性加入三氯化铬相比较, 酵母细胞的含铬量提高了27%, 酵母细胞对铬离子的利用率也有明显提高。这说明将一定量的铬离子分批加入发酵液, 使酵母细胞在较低的铬离子浓度下得到适应, 并以良好的生长状态将发酵液中的铬离子进行吸收和同化, 使其在酵母细胞内得到积累。

表3 不同时间加入铬对酵母细胞的生长及含铬量的影响

组别	加铬时间	菌体干重 (g/100mL)	含铬量 ($\mu\text{g/g}$)	铬利用率 (%)
对照组	-	1.55	11.25	-
1	0	1.50	825	47.6
2	2	1.55	827	49
3	4	1.58	986	55
4	6	1.55	734	52

根据以上摇瓶发酵实验结果, 铬载体酵母的适宜发酵条件是: 采用啤酒酵母2016菌种, 在发酵开始的8 h内流加三氯化铬, 使其在发酵液中最终浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $28^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 发酵12 h, 酵母生长正常, 含铬量较高。以上实验数据可提供铬酵母中试工艺参考。

有文献报道, 三价铬离子是动物体内葡萄糖耐量因子 (Glucose Tolerance Factor, 简称GTF) 的必需组分^[4], 在体内主要参与糖和脂类的代谢过程。临床上, 铬缺乏时, 出现血脂、胆固醇和血糖升高, 容易使人患心脑血管疾病和糖尿病, 严重危害人类健康^[8]。啤酒酵母是一种营养平衡的SCP, 以其为载体进行三价铬的膳食补充, 对预防心脑血管疾病及糖尿病具有很好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 翟桂玉. 饲料, 1991, 18~19.
- [2] 吴晴斋. 微量元素与人体健康. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 173~183.
- [3] 程义勇. 生物科学进展, 1990, 21(4): 349~352.
- [4] 孔祥和, 尹洪臣. 微量元素与小儿疾病. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [5] 张峻, 邢来君, 王红梅. 微生物学通报, 1993, 20(3): 140~142.
- [6] 林雅兰, 钱存柔. 微生物学实验指导. 北京: 北京大学出版社, 1992.
- [7] 陈震阳, 许金生. 现代分析技术在环境与卫生检测中的应用. 北京: 环境科学出版社, 1995. 208.
- [8] 迟锡增. 微量元素与人体健康. 北京: 化学工业出版社, 1997. 236.