

空间搭载高产葡萄糖耐量因子(GTF)酵母的选育

刘 鹭¹ 吕加平^{1*} 高艳红²

(1. 中国农业科学院农产品加工所 北京 100193)

(2. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 以从本试验室收藏的 7 株酵母菌种及其 7 株经空间搭载(实践八号)诱变后的酵母菌株为研究对象, 通过梯度含铬 YEPD 平板培养和液体 YPD 培养基发酵试验, 利用氨水提取菌体中的 GTF 和火焰原子吸收光谱法检测其有机铬含量, 从中筛选出一株葡萄糖耐量因子的高产酵母 (YS-3), 有机铬含量达 1296 $\mu\text{g/g}$, 总铬含量达 1926 $\mu\text{g/g}$, 生物量为 40 g/L。同时分析了菌体发酵过程中, 菌体有机铬富集量与其它发酵参数的动态关系。

关键词: 空间搭载, 葡萄糖耐量因子, GTF, 有机铬

Selection of a High Yield Yeast Strain of Glucose Tolerance Factor After Space Piggyback Experiment

LIU Lu¹ LV Jia-Ping^{1*} GAO Yan-Hong²

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: A strain of high-biomass, producing glucose tolerance factor yeast strain was screened from seven yeast strains and seven strains mutated by spaceflight-induced mutagenesis through gradient concentration of chromium plates cultivation and liquid fermentation cultivation. The biomass of it was 40 g/L. Extracting GTF with ammonia and determining the content of Cr with flame atomic absorption spectrometry, the content of organic Cr was 1287 $\mu\text{g/g}$ and that of total Cr was 1917 $\mu\text{g/g}$. At the same time, dynamic relationship between other parameters and the amount of organic chromium was analyzed during fermentation.

Keywords: Space piggyback experiment, Glucose tolerance factor, GTF, Organic chromium

据报道, 酵母葡萄糖耐量因子(Glucose Tolerance Factor, GTF)是铬和小分子蛋白(肽)的复合物, 三价有机铬是其重要活性成分或活性中心, 具有增强胰岛素活性促进糖代谢和脂代谢的功能, 对糖尿病、肥胖等有明显防治效果。习惯上, GTF 缩写专指酵母有机铬提取物。

Hegoczki J^[1]等人对比研究 3 种酵母(*Sacch.*

cerevisiae、*Candida utilis* 及 *Schizosacch pombe*)产 GTF 能力及发酵条件。发现啤酒酵母富集生产 GTF 能力最高, 菌体富铬量达至 1600 $\mu\text{g/g}$ 。Ali Demirci 和 Anthony L^[2]研究了啤酒酵母连续发酵和分批补料发酵两种方式生产 GTF 的条件。结果显示分批补料发酵工艺的富铬效果较好。铬酸钠以在线方式连续添加, 当发酵液中浓度为 7.1 g/L 时, 酵母生物量达

基金项目: 国家航天育种工程(No. 2006HT00013)

* 通讯作者: Tel: 86-10-62815542; 信箱: lvjp586@vip.sina.com

收稿日期: 2008-07-02; 接受日期: 2008-09-18

42 g/L 左右, 富集总铬 3113 $\mu\text{g/g}$, 有机铬 795 $\mu\text{g/g}$, 有机铬的转化率不高。Vlatka^[3]等人研究了静止状态和微氧状态下啤酒酵母富集铬生产 GTF 的能力。发现静止培养条件下酵母对铬离子的吸收略多于通氧培养条件的吸收, 酵母细胞在对数生长期大量富集铬离子 30 $\mu\text{g/g}$ ~40 $\mu\text{g/g}$ 。郝素娥^[4]报道在富铬酵母制备过程中加入稀土化合物 La_2O_3 , 显著提高富铬酵母中有机铬和总铬含量(639.0 $\mu\text{g/g}$ 和 708.33 $\mu\text{g/g}$) 和葡萄糖耐量因子含量。肖浩平^[5]以酿酒酵母为研究对象, 采用紫外线和 Co60 进行诱变筛选, 经过发酵培养, 酵母的生物量为 11.372 g/L, 有机铬含量达 1848 $\mu\text{g/g}$, 但此时酵母生物量较低, 产量不高。需指出 GTF 为蛋白(肽)和铬的有机复合物, 富集到菌体内的铬并不都是 GTF, 只有通过生物转化, 铬与蛋白(肽)结合, 将无机铬转化为有机铬后, 才能成为 GTF^[5,6]。利用 GTF 溶于氨水这一特性从菌体中提取 GTF, 测定其中铬的含量, 即有机铬的含量, 来评价 GTF 含量。但目前, 很多文献报道中在检测、评价酵母中 GTF 含量时, 大多未将有机铬和无机铬分开, 将总铬计为有机铬或未将有机铬有效提取, 不能真实反映菌体内 GTF 的含量^[7-9]。这也是不同文献中, 酵母 GTF 产量差别较大而无法横向对比的原因之一。

尽管国外有学者从谷物、黑胡椒、苜蓿等提取出了类似 GTF 的物质, Yamamoto^[10]等从牛初乳中分离纯化得到铬调素(低分子量铬蛋白复合物); Davis^[11]等从牛肝脏中纯化得到同样类似 GTF 的物质。但从其功能活性及含量来看, 酵母仍然是 GTF 最丰富和最有潜力的来源。这主要是因为酵母具有生长快、富集效率高、便于获得和大批量生产。

航天育种是通过卫星搭载微生物等生物体样品, 利用独特的空间环境条件(如强宇宙射线、微重力、高真空等), 引起生物染色体畸变, 进而导致生物体遗传变异^[12,13]。为了获得葡萄糖耐量因子和生物量高产菌株, 本文从本实验室收藏的 7 株酵母出发, 通过搭载实践八号卫星, 利用太空的微重力、交变磁场、强辐射等因素对菌株处理, 借助添加铬的固体平板、液体培养和筛选, 利用实验室已建立的 GTF 提取及测定方法检测 GTF 产量, 对比研究了这 14 株菌的 GTF 产量, 以期筛选出高产 GTF 和生物量的优良菌株, 同时还研究和分析了菌体在发酵过程中富集有机铬和其他发酵参数的动态变化关系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌种与试剂: Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、YS-1、YS-2、YS-3、YS-4、YS-5、YS-6、YS-7 实验室收藏酵母菌种(都为酿酒酵母; YS 系列为 Y 系列经太空搭载育种的菌株, 编号相对应); 斜面培养基为 YEPD 培养基; 种子液体培养基为 YPD 培养基; 初筛平板为含不同铬浓度水平的 YEPD 培养基(铬液单独灭菌, 用时混合); 发酵液体培养基为含一定铬浓度的 YPD 培养基; 三氯化铬、氨水均为分析纯。

1.1.2 仪器设备: SL-N 电子天平(上海民桥精密仪器有限公司)、HZQ-F160 摇床培养箱(哈尔滨市东联公司)、DL-CJ-IN 高性能无菌试验台(哈尔滨市东联公司)、TSAO HSIN TH-3560 高压灭菌锅(造鑫企业有限公司)、pH 计(Hanna)、TGL-16G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)、UV3010 日立紫外可见分光光度计(日本东京 Hitachi High-Technologies Corporation)、MDS-6 微波消解/萃取仪(上海新仪)、AA6300 火焰原子吸收分光光度计(日本岛津)。

1.2 实验方法

1.2.1 太空搭载飞行参数: 实践八号卫星于 2006 年 9 月 9 日 15 时升空, 经过 15 d 的绕地在轨运行, 于 2006 年 9 月 24 日 10 时分返回地面。卫星运行的近地点高度为 180 km, 远地点高度为 469 km, 轨道倾角为 63°。卫星运行期间回收舱内温度在 20.72°C ~7.21°C 之间。

1.2.2 富铬酵母筛选: ①耐铬性酵母平板初筛^[14]。将分别灭菌后的三氯化铬溶液和 YEPD 培养基按铬浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 的要求混匀两液并倾倒入平板。将 14 株菌分别从斜面培养基上接种到无铬液体培养基于 28°C、200 r/min 摇床培养 24 h, 吸取 1 mL 培养液稀释到 10^{-2} , 然后再吸取 0.1 mL 稀释液均匀涂布于不同铬浓度的平板上, 于 28°C 培养, 观察菌株生长情况。

液体发酵复筛。1) 种子液培养: 将菌种接种至种子培养基内, 于 28°C、200 r/min 摇床培养 15 h, 制成种子液。

2) 工作发酵液培养: 将单独灭菌三氯化铬溶液按一定浓度无菌操作加入到已灭菌的培养基中, 种子液按 10% 的接种量接种到发酵培养基, 于 28°C、

200 r/min 摇床培养, 5000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 去离子水洗 3 次, 去除游离无机铬, 冷冻干燥。

1.2.3 菌体内有机铬的测定: GTF 提取: 称取 0.1 g 左右的酵母粉, 悬浮于 10 mL 的 0.1 mol/L 氨水溶液, 在 37°C 摇箱内以 200 r/min 提取 3 h, 然后以 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。

微波消化: 将 GTF 提取液置于溶样杯内, 加入 6 mL 硝酸和 0.5 mL 高氯酸, 按表 1 所示参数进行消化。

表 1 微波消化参数表
Table 1 Parameters of microwave digesting

压力 Pressure (MPa)	时间 Time (min)	功率 Power (kW)
0.3	4	800
0.6	3	800
1.0	3	800
1.5	6	800

氧化: 消化液+5%过硫酸铵溶液 5 mL, 160°C, 30 min。

火焰原子吸收光谱法测定: 消化液氧化后(三价铬离子氧化为六价铬离子), 加入 10%氯化铵溶液 5 mL, 定容至 50 mL, 参照 GB/T15555.6-1995 火焰原子吸收光谱法测定铬含量方法。

1.2.4 菌体内总铬的测定: 称取 0.1 g 左右的酵母粉于溶样杯中, 加入 6 mL 硝酸和 0.5 mL 高氯酸进行消化、氧化及铬含量的测定。方法同有机铬测定。

1.2.5 菌体生物量测定: 取一定的发酵液, 于 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。然后以去离子水洗 3 次, 去除游离无机铬, 离心后, 测其湿重。于 80°C 烘干至恒重, 测其干重。

1.2.6 发酵液 pH 测定: 取一定量的发酵液, 用 pH 计测定其 pH 值

1.2.7 发酵液葡萄糖测定: 硫酸-苯酚法。取 1 mL 发酵液, 加入 1 mL 6% 苯酚溶液和 1 mL 蒸馏水, 混匀后, 迅速加入 5 mL 浓硫酸。室温静置 15 min 后摇匀, 于波长 490 处测定吸光值。以 2 mL 蒸馏水和 1 mL 苯酚溶液为空白对照。通过标准曲线得出发酵液中葡萄糖含量。

2 结果与分析

2.1 耐铬性酵母平板初筛

将出发菌株包括 7 株酵母(Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7)和相对应的 7 株经过航天诱变的酵母

(YS-1、YS-2、YS-3、YS-4、YS-5、YS-5、YS-6、YS-7)接种于不同铬离子浓度平板上于 28°C 培养观察。其中 Y1、YS-1、Y2、YS-2 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上没有生长; Y6、YS-6、Y7、YS-7 在 800 $\mu\text{g/mL}$ 长势显弱; Y3、YS-3、Y4、YS-4、Y5、YS-5 在 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的平板长势仍较好, 但出现生长差异, 其中经过航天诱变的菌种比相对应的地面保留菌种耐铬性更强, 长势更好。下图为 Y3、YS-3、Y4、YS-4、Y5、YS-5 在 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上生长对比图。由此初步筛选出耐铬性强的出发菌株并在液体发酵中进一步筛选。

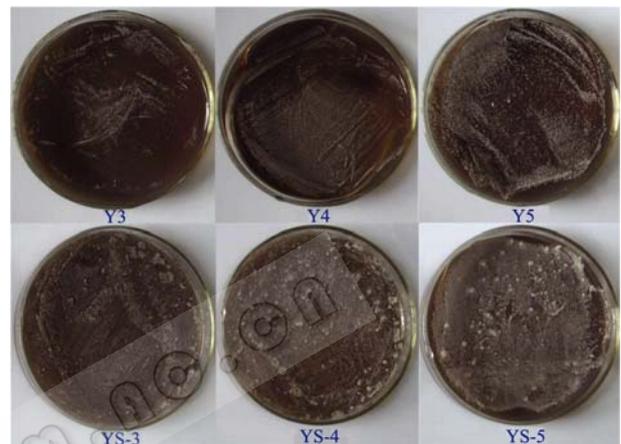


图 1 不同菌株在铬浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 平板上的生长比较
Fig. 1 Comparison of growth of different strains on the plate containing 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cr^{3+}

2.2 液体发酵复筛

在平板筛选的基础上, 将 6 株菌接种于铬离子浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 YPD 液体培养基, 于 28°C、200 r/min 摇瓶培养, 测定其生物量和有机铬含量。

从表 2 可以看出: 太空搭载对菌株的生物量和干重影响不大, 但对菌株的 GTF 产量有较大影响。其中 Y4 和 YS-4、Y5 和 YS-5 两组菌株诱变前后生物量和有机铬都没有显著性差异, 诱变后有机铬产量升高幅度不明显。Y3 和 YS-3 诱变前后菌株的生物量无显著性差异, 有机铬和总铬量上升幅度较大, 有机铬变化差异显著。其中 YS-3 有机铬含量达 1260 $\mu\text{g/g}$, 提高 53.3%; 总铬含量为 1926 $\mu\text{g/g}$, 提高 53.9%。

2.3 菌种遗传稳定性试验结果

从表 3 可以看出, 经太空搭载选育的 YS-3, 连续 5 次传代, 其发酵产生有机铬量变化幅度不超过 10%, 遗传性能稳定。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 不同菌株诱变前后液体培养发酵 GTF 产量及生物量方差分析表($P < 0.05$)Table 2 Analysis of variance of biomass and production of GTF of different strains before and after mutation($P < 0.05$)

菌株 Yeast strains	生物量 Biomass (g/100 mL)	有机铬 Organic chromium ($\mu\text{g/g}$ dry cell)	总铬 Total chromium ($\mu\text{g/g}$ dry cell)	残余铬 Residual chromium ($\mu\text{g/g}$ dry cell)
YS-3	4.08 ± 0.07^a	1296 ± 26.16^a	1926 ± 41.01	669 ± 41.01
Y3	4.07 ± 0.13^a	810 ± 17.68^b	1251 ± 50.91	403.5 ± 23.33
YS-4	4.14 ± 0.05^a	295 ± 8.49^a	523 ± 52.33	195 ± 21.21
Y4	4.07 ± 0.06^a	353 ± 18.38^a	510 ± 28.28	178.5 ± 13.44
YS-5	4.11 ± 0.08^a	133.5 ± 19.09^a	273 ± 35.36	101.5 ± 16.25
Y5	4.18 ± 0.03^a	97.5 ± 3.54^a	306.5 ± 33.23	176 ± 16.97

表 3 菌种遗传稳定性结果

Table 3 The result of hereditary stability of YS-3

Yeast strain	有机铬($\mu\text{g/g}$ 干菌体) Organic chromium ($\mu\text{g/g}$ dry cell)				
	一代 The first generation	二代 The second generation	三代 The third generation	四代 The fourth generation	五代 The fifth generation
YS-3	1296 ± 26.16	1176 ± 48.08	1173 ± 36.06	1215 ± 39.60	1205 ± 35.36

表 4 不同铬离子浓度对 YS-3 富铬量的影响

Table 4 Effect of the Cr^{3+} concentration of media on the biomass and Cr content of strain YS-3

铬浓度 Chromium concentration ($\mu\text{g/mL}$)	生物量 Biomass (g/100 mL)	有机铬 Organic chromium ($\mu\text{g/g}$ dry cell)	总铬 Total chromium ($\mu\text{g/g}$ dry cell)	有机铬率 Organic chromium ratio (%)
200	3.89 ± 0.05	21.5 ± 7.78	122.5 ± 13.44	17.55
400	4.08 ± 0.07	1258 ± 28.28	1926 ± 41.01	65.31
800	1.44 ± 0.05	3316.5 ± 27.58	12087.5 ± 44.55	27.44

2.4 发酵液中铬离子的不同浓度对菌体铬富集量的影响

如表 4 所示, 发酵液中铬离子含量较高(800 $\mu\text{g/mL}$)时, 严重抑制菌体生长, 生物量较低, 菌体内有机铬的比率也较低; 铬离子浓度低(200 $\mu\text{g/mL}$)时, 对菌体生长无影响, 但铬富集率较低; 当发酵液中铬含量为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对菌体的生长有轻微刺激作用, 同时有机铬和总铬含量较高, 体内总铬达 1926 $\mu\text{g/g}$, 有机铬量达至 1258 $\mu\text{g/g}$, 体内有机铬比率达 65%。

对于固体平板培养, YS-3 最高耐铬程度可达 1000 $\mu\text{g/mL}$; 当在液体发酵培养时, 由于菌体在液体中更易受到铬离子的影响, 铬离子为 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, 即对菌体生长有严重抑制作用, 生物量降低; 而铬离子为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时对铬离子对菌体生长有轻微刺激作用。

2.5 YS-3 在含铬和无铬条件下的生长特性比较

2.5.1 发酵液 pH 值动态变化: 在含铬条件下, 发酵

液 pH 在前 40 h 内可从 4.7 降到 3.8, 此后一直维持在 3.8 左右; 而无铬条件下, 发酵液 pH 在前 4 h 内从 4.9 降至 4.65, 6 h~38 h 期间的 pH 逐渐升至 5.9, 此后一直维持在 5.9 附近。

2.5.2 菌体生物量变化:

由图 3 可见, 无铬离子存在时, 发酵初期的菌体生长迅速, 几乎没有延迟期, 发酵前 8 h 为对数生长期; 8 h 以后, 菌体生长进入稳定期。当发酵液中存在 400 $\mu\text{g/mL}$ 铬离子, 发酵的前 6 h, 菌体需要适应培养液中的金属离子而生长缓慢; 发酵 6 h~36 h 期间菌体生长迅速, 为对数生长期, 且菌体生长超过了无铬培养的菌体生长; 36 h 后进入稳定期。同时, 菌体干重大于无铬离子条件下的生长量。实验结果显示, 培养基中 400 $\mu\text{g/mL}$ 的铬离子的存在可促进菌体的生长, 但会致使发酵初期菌体生长缓慢, 经历 6 h 左右的适应期。这与文献中报道微量的铬离子可以刺激菌体生长的结果相一致。

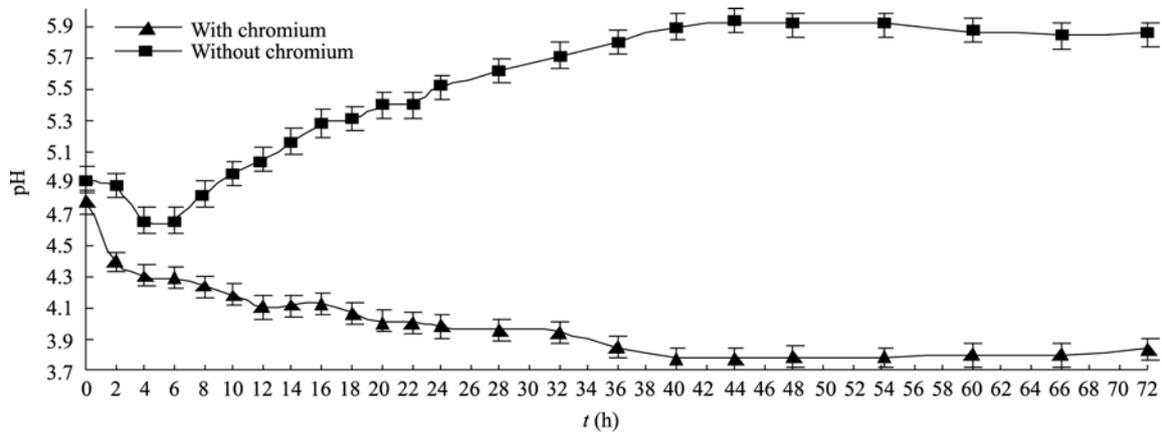


图2 含铬和无铬条件下YS-3发酵过程中pH的变化

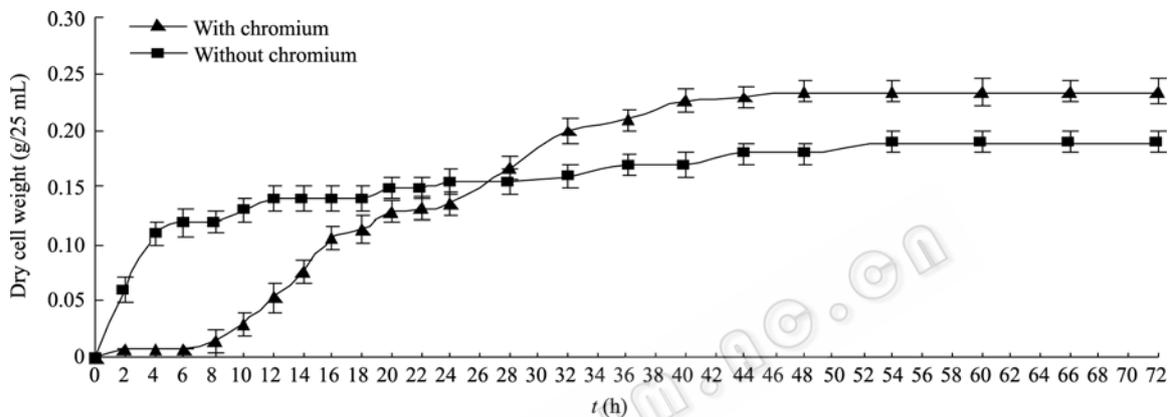
Fig. 2 Dynamics of pH of media during fermentation cultivated with Cr^{3+} and without Cr^{3+} 

图3 含铬和无铬条件下YS-3菌体干重变化

Fig. 3 Dynamics of dry cell weight of strain YS-3 cultivated with Cr^{3+} and without Cr^{3+}

2.5.3 铬离子存在下发酵液中葡萄糖消耗动态变化: 图4显示作为发酵液中碳源的葡萄糖变化有3个阶段,第1阶段为开始至6h左右,此时菌体处于延迟期,碳源有明显消耗;第2阶段为6h至16h,此时菌体处于对数生长期,碳源消耗速率明显增大,可降至2 mg/mL左右;第3阶段,16h以后,葡萄糖含量保持在2 mg/mL左右,维持不变,葡萄糖消耗减慢。葡萄糖的消耗主要发生在酵母延迟期和对数生长期前期。发酵16h后,葡萄糖浓度降至低限,此时酵母无法再继续利用碳源,菌体增长速度变慢。基于此,可考虑开展对补充碳源物质种类、数量、方式的研究,延长菌体对数生长期,增加菌体生物量产率。

2.6 菌体富铬动态变化

如图5所示,发酵过程中,菌体富集的总有机铬量(33 mL发酵液所培养的菌富集的有机铬的总量)随着菌体的生长呈直线增长,到44h左右增长缓慢,

此时菌体生长已经进入稳定期,菌体量不再增长,富集有机铬能力达到饱和。而单位菌体富集有机铬量($\mu\text{g/g}$ 干菌体)是在发酵初期6h内菌体富集有机铬速度较高,达到9300 $\mu\text{g/g}$ 干菌体。随着菌体继续生长,富集有机铬速度随之下降,大约10h后,菌体内有机铬含量基本维持不变。

发酵初的6h,菌体处于生长延迟期,生长较慢,菌量较少,菌体富集产生有机铬速度大于菌体生长速度;6h后,进入对数生长期,生长速度变快,而富集有机铬速度下降。根据发酵液中富集总有机铬($\mu\text{g}/33\text{ mL}$ 发酵液)的趋势,菌体富集铬离子过程主要发生在对数生长期(6h~44h),因为这段时间内菌体生长迅速,总富集量较大。如果此时通过补充营养物质等而延长对数生长期,可显著提高酵母富集有机铬产量,同时提高菌体生物量产率。而根据有机铬($\mu\text{g/g}$ 干菌体)变化趋势分析,菌体富集铬离子最快速度主要发生在延迟期,6h后,富集铬速度

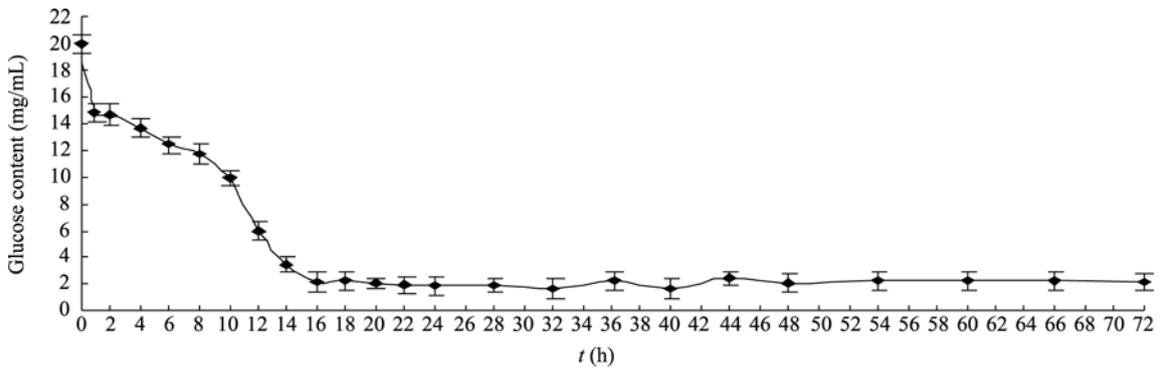


图 4 铬离子存在下发酵过程中葡萄糖消减动态变化
 Fig. 4 Dynamics of glucose during fermentation with Cr³⁺

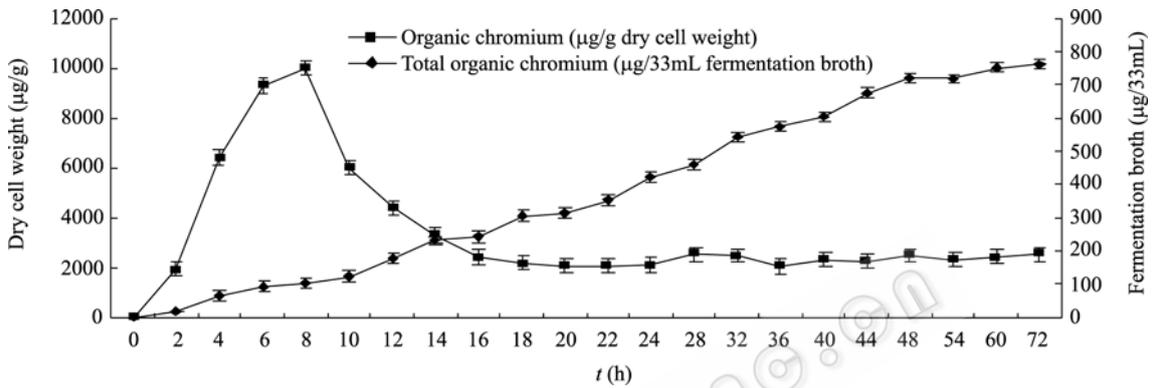


图 5 YS-3 发酵过程中富铬动态变化
 Fig. 5 Dynamics of Cr content of strain YS-3 during fermentation

下降。如果此时处于延迟期时的菌体浓度较高，如增大接种量、缩短延迟期的时间，使菌体及早进入对数生长期，较有利于单位菌体富铬量的增加。

2.7 不同加铬方式对 GTF 产量的影响

尽管有文献及本文前述实验结果皆显示微量铬离子(400 µg/mL)可促进菌体的生长。但作为一种重金属离子，铬离子还有抑制菌体生长的作用。为了消除铬离子的抑制作用，可先让菌体在无铬培养基生长一定时间，并达到对数生长期时(菌体健壮、活力较高)再添加铬离子进行富集铬培养；同时，发酵过程中，发酵液中铬离子处于动态递减的过程，本试验设计了五种 2 次补铬方式，考查其富集有机铬效果和菌体生长情况。图 6、7 中、 、 、 、 、 、 、 为不同的加铬方式。 为发酵初始加铬 400 µg/mL 培养，作为对照； 为发酵 15 h 后加铬培养； 、 、 、 、 、 为发酵初始加铬 400 µg/mL 培养，24 h 后再补铬 100 µg/mL、200 µg/mL、300 µg/mL、400 µg/mL、500 µg/mL，此 7 种方式皆

培养 40 h。

图 6 为不同加铬生物量的变化：与对照 相比， 、 的生物量无显著性降低， 、 、 、 的生物量依次降低，与 有显著性差异， 和 、 和 、 和 之间无显著性差异。

图 7 为不同加铬菌体富集有机铬的变化：与对照 相比， 的有机铬含量显著性降低， 、 和 、 的有机铬含量依次增加，有显著性差异，其中 、 之间无显著性差异， 、 之间无显著性差异。

为菌体生长至对数生长期中期加铬培养。此时菌体生长健壮，活力较高，能很快适应不良环境的影响。图 6、7 显示此时添加的轻微铬离子对菌体的生长无刺激作用，同时菌体内的有机铬含量有显著性降低； 与 相比，生物量无显著性降低， 与 有显著性差异； 与 的有机铬含量与 相比有显著提高。尽管 、 、 的有机铬含量也有有机显著性提高，但生物量下降较明显。综

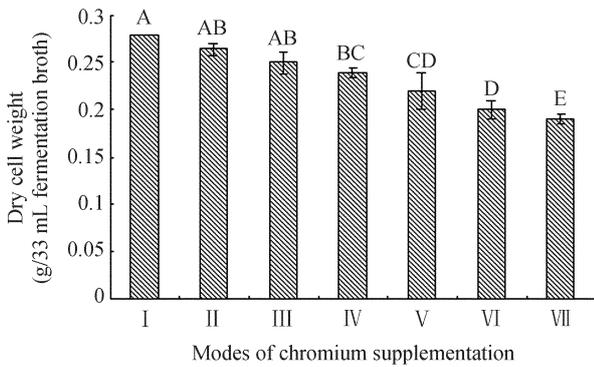


图 6 不同加铬方式对菌体生物量的影响($P<0.01$)
Fig. 6 Effect of different modes of chromium supplementation on biomass of YS-3 ($P<0.01$)

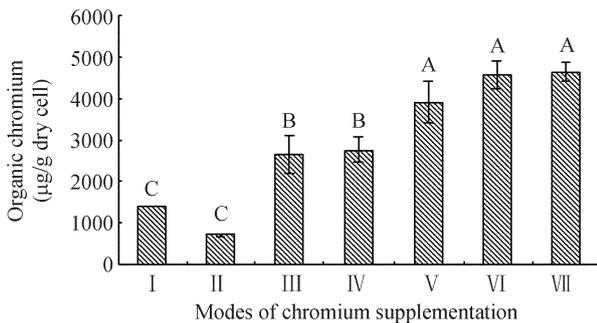


图 7 不同加铬方式对 GTF 产量的影响($P<0.01$)
Fig. 7 Effect of different modes of chromium supplementation on the production of GTF ($P<0.01$)

合考虑生物量和有机铬高产的要求,第 2 次添加铬量在 $100 \mu\text{g/mL}$ ~ $200 \mu\text{g/mL}$ 比较合适,菌体富集有机铬量可达至 $2644 \mu\text{g/g}$ 干菌体~ $2759 \mu\text{g/g}$ 干菌体,相比单次添加量提高一倍。

3 结论

1) 通过梯度含铬平板和含铬液体发酵筛选试验,从本实验室收藏的 14 株供试酵母菌株(包括 7 株经空间搭载诱变育种)中筛选得到一株高产葡萄糖耐量因子、遗传性能稳定的酵母菌株—YS-3,其有机铬产量为 $1258 \mu\text{g/g}$ 干菌体,总铬含量为 $1926 \mu\text{g/g}$ 干菌体,有机铬率达 65.31%;生物量 40 g/L 。通过二次加铬培养,YS-3 富集有机铬量可提高一倍,为 $2644 \mu\text{g/g}$ 干菌体左右,菌体生物量无显著性降低。

2) 发酵液中添加浓度为 $800 \mu\text{g/mL}$ 的铬离子可严重抑制菌体的生长;而 $400 \mu\text{g/mL}$ 的铬离子对菌体有刺激生长作用。与无铬离子培养相比,

$400 \mu\text{g/mL}$ 的铬离子延长了菌体延迟期,发酵 6 h 后进入对数生长期,但菌体生长迅速,生物量增长超过无铬离子培养。发酵结束后,菌体干重显著大于无铬离子培养条件下的生长。

3) 有铬培养时,发酵液中葡萄糖的消耗基本与菌体生长情况一致。发酵液中葡萄糖的消耗分为 3 个阶段,第 1 阶段为发酵前 6 h,出现一个消耗斜率,与此同时,菌体生长处于延迟期,适应环境,缓慢生长;第 2 阶段为 7 h~16 h,斜率变大,葡萄糖消耗速度增大,此时菌体处于对数生长期;第 3 阶段 16 h 至发酵结束,葡萄糖维持在 2 mg/mL ,菌体不能继续利用碳源,此时菌体处于对数生长期后期和稳定期。总体来看,微生物消耗碳源主要发生在菌体延迟期和对数生长期前期。可以考虑在发酵 16 h 后,补充碳源,延长对数生长期,增加菌体生物量产率,提高有机铬富集率。

4) YS-3 在发酵过程中,有机铬富集主要发生在对数生长期(6 h~44 h);菌体最快的有机铬富集速度主要出现在延迟期(0 h~6 h),此时单位菌体的富铬量最大。

参考文献

- [1] Hegoczki J, Suhajda A, Janzso B, et al. Preparation of chromium enriched yeasts. *Acta Alimentaria*, 1997, 26(4): 345-358.
- [2] Ali Demirci, Anthony L Pometto. Enhanced organically bound chromium yeast production. *Agric Food Chem*, 2000, 48: 531-536.
- [3] Vlatka Gulan Zetic, Vesna Stehlik-Tomas, Slobodan Grba, et al. Chromium uptake by *Sacchaomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *Biosci*, 2001, 26(2): 217-223.
- [4] 郝素娥,金 蝉,张巨生. La_2O_3 对富铬酵母中铬含量影响的研究. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 35(6): 674-678.
- [5] 王 翀. 啤酒酵母对重金属 Cr()生物转化及生物吸附的研究. 西北大学硕士毕业论文, 2005.
- [6] Walter Mertz MD. Chromium research from a distance: from 1959 to 1980. *The American College of Nutrition*, 1998, 17(6): 544-547.
- [7] 肖浩平. 富铬酵母发酵工艺的研究. 江南大学硕士毕业论文, 2004.
- [8] 刘曲滨,肖方正,陈子健,等. 铬酵母中铬含量的测定. 饲料工业, 2000, 21(6): 34-35.

- [9] 金花. 微生物发酵法研制富铬酵母. 吉林大学硕士毕业论文, 2002.
- [10] Yamamoto A, Wada O, Suzuki H. Purification and properties of biologically active chromium complex from bovine colostrums. *Nutrition*, 1987, **118**: 39–45.
- [11] John BV. Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of Nutrition Society*, 2004, **63**: 41–47.
- [12] 田兴山, 张玲华, 郭勇, 等. 空间诱变在微生物菌种选育上的研究进展. *生物技术通讯*, 2005, **16**(1): 105–108.
- [13] 魏丽勤, 方晓梅, 李宁梅, 等. 太空搭载泰乐菌素高产菌株的选育. *工业微生物*, 2007, **37**(1): 1–7.
- [14] J Liu, B Zhang, X He, *et al.* Selection of a high-biomass, chromium-rich yeast strain and optimization of cultivation conditions. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, **27**: 195–198.

征订启事

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白组学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 更换了彩色封面, 纸张改用铜版纸, 由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297), 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2009 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: (010)64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; Http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413