

利用中子活化分析法研究高生物量 富铬酵母的培养条件

刘 静¹ 章佩群¹ 张博润² 钱琴芳¹ 陈春英¹ 柴之芳¹ 丁文军¹

1. 中国科学院高能物理研究所核分析技术开放实验室 北京 100039)

2. 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 利用中子活化分析法对富铬酵母中的铬进行了测定。以啤酒酵母菌株 LZ-53 为出发菌株对培养基的种类、糖度、铬浓度、pH 值、装液量、接种量和培养时间等培养条件进行了优化, 确定了最佳培养条件为: 麦芽汁作培养基, 培养基中糖浓度为 10°Brix, 铬浓度为 1200 $\mu\text{g/mL}$, pH 6.0, 装液量为 8%, 接种量为 10%, 培养时间为 30 h。在此条件下干菌体铬含量可达 3248 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词 中子活化分析, 啤酒酵母, 铬, 培养条件

中图分类号 O657.4, Q581

铬是人和动物必需的微量元素, 无机或有机三价铬均可作为人和动物体内胰岛素的协同作用元素。体内铬的不足会导致糖尿病样的症状, 如葡萄糖耐量的降低, 从而需要更高的胰岛素浓度。摄入含铬的添加物能够减轻这类症状^[1,2], 但是机体对铬的反应不仅取决于铬数量, 亦取决于其化学种态^[3]。

许多研究表明人体和动物对有机铬的吸收率比无机铬高^[4]。所以, 有必要寻找一种高生物利用度铬作为对缺铬的人群和动物补充铬的良好来源。实验发现葡萄糖耐量受损大鼠食用啤酒酵母后可使其糖耐量恢复, 并发现啤酒酵母中含有三价铬配合物, 其生物活性较无机铬大, 对糖耐量产生明显的生理反应。啤酒酵母对微量元素铬有一定的富集能力, 可以作为载体将无机铬转化成有机铬, 从而提高铬在机体内的吸收率, 对改善糖尿病患者的糖耐量、降低血脂和胆固醇有明显的辅助治疗作用; 从营养学角度上来说, 啤酒酵母含有理想的蛋白质、维生素、麦角醇、核酸、谷胱甘肽、膳食纤维, 其中还含有人体必需的 14 种微量元素, 对人体健康有益, 因此通过啤酒酵母来补充铬是一种有效途径^[3,5]。另一方面, 啤酒酵母对于铬的吸收有一定的限度, 培养基中铬浓度过高时会抑制酵母菌生长, 在高铬浓度培养条件下, 酵母的收率往往较低。合适的培养条件对富铬酵母的生产有较大的影响。国内外对富铬酵母的研究大多围绕其理化性质或元素分析^[6,7]。本文报道了利用微生物学方法结合核分析技术, 进行高生物量富铬酵母培养条件的优化,

进行高生物量富铬酵母培养条件的优化, 确定最优培养条件, 得到总富铬能力 (包括生物量和铬含量) 最佳的酵母菌体。采用中子活化分析法^[8]测定富铬酵母中的铬具有灵敏度高、准确度高、基体效应小、不破坏样品、系统误差小等特点, 对于研究啤酒酵母这样组分复杂的微生物细胞中的微量元素具有独特优点。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

以中国科学院微生物研究所酵母菌与分子遗传育种研究组提供的啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) LZ-53 为试验出发菌株。

1.2 试剂

醋酸铬、酵母粉、蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖均为分析纯。麦芽汁由北京双合盛啤酒厂提供。糖蜜由江西赣南制药厂提供。

1.3 培养基及培养条件

分别选用 YEPD、YEPS、YEPM、糖蜜和麦芽汁作为培养基^[9]。YEPD 培养基: 1% 酵母粉,

国家自然科学基金(编号 19975054 和 19935020)和中国科学院重要方向性项目

第一作者: 刘静, 女, 1975 年 5 月出生, 中国科学院高能物理所粒子物理与原子核物理专业博士研究生

收稿日期: 2001-07-06, 修回日期: 2001-12-04

1%蛋白胨, 2%葡萄糖。YEPS 培养基: 1% 酵母粉, 1%蛋白胨, 2%蔗糖。YEPM 培养基: 1% 酵母粉, 1%蛋白胨, 2%麦芽糖。发酵培养基组成由摇瓶试验确定。将待测菌株在麦芽汁斜面上活化后, 接一环于麦芽汁液体培养基, 28℃、200 r/min 培养 16 h 作为种子, 以 10%接种量接于发酵培养基, 28℃摇床培养, 转速为 200 r/min, 培养 30 h。

1.4 细胞生物量的测定

取培养好的菌液, 4000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 蒸馏水洗一次, 离心, 控干水分后, 称重, 换算成 100 mL 菌液的菌体量, 即为细胞生物量 (湿

重, 含水量约为 80%)。

1.5 细胞铬含量的测定

取培养好的菌液, 4000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 蒸馏水洗 3 次, 离心, 80℃烘至恒重, 粉碎。采用中子活化分析法^[8]测定酵母细胞中的铬含量。酵母样品在中国原子能研究院的重水反应堆中照射, 中子注量率为 $5.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 照射时间 4 h, 冷却 12 d 后, 用高纯 Ge γ 谱仪测量。为检验分析方法的准确性, 用灌木枝叶 (GBW-07603) 和杨树叶 (GBW-07604) 作为分析质量控制, 测定值与鉴定值对比情况见表 1。

表 1 测定值与鉴定值的比较

Table 1 Comparison of measurement and certified value

样品 Sample	测定值 Measurement / $\mu\text{g g}^{-1}$	鉴定值 Certified value / $\mu\text{g g}^{-1}$
灌木枝叶 GBW-07603	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.1
杨树叶 GBW-07604	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.05

1.6 总富铬能力 (生物量及铬含量综合值) 计算

总富铬能力 ($\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 培养液) = 细胞生物量 ($\text{g}/100 \text{ mL}$ 培养液) $\times$ 铬含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 干菌体) $\times 0.23$ 其中, 0.23 系指每 1 g 湿菌体可得到 0.23 g 干菌体。

2 结果与讨论

鉴于微生物发酵培养受多种因素影响, 获得的实验数据有所变化, 本工作在发酵培养条件的优化试验时, 均重复试验 3 次, 计算平均值。

2.1 培养基的确定

分别以铬浓度为 $1000 \mu\text{g}/\text{g}$ 的 YEPD、YEPS、YEPM、麦芽汁、糖蜜为培养基, 进行 LZ-53 菌株的培养, 其生物量、铬含量见表 2。

由表 2 可以看出, 酵母菌 LZ-53 在不同培养基中的生长状况存在差异, 相比较而言, 在天然培养基麦芽汁中生长得较好。LZ-53 的铬含量在不同培养基中差异不大。LZ-53 在麦芽汁和 YEPD 中的总富铬能力高于在其他培养基中。根据生物量及总富铬能力, 确定麦芽汁为 LZ-53 的最佳培养基。

表 2 啤酒酵母 LZ-53 在不同培养基 (铬浓度 $1000 \text{ mg}/\text{mL}$) 中富铬能力的比较

Table 2 Comparison of the total chromium content of strain LZ-53 in different media containing $1000 \text{ mg}/\text{mL}$ of Cr

培养基 Culture medium	生物量 Biomass / $\text{mg} (100\text{mL})^{-1}$	铬含量 (干菌体) Cr content (Dry cells) / $\mu\text{g g}^{-1}$	综合值 Total Cr / $\mu\text{g} (100\text{mL})^{-1}$
YEPD	2220 ± 92	1994 ± 88	1018 ± 62
YEPS	1860 ± 86	1998 ± 90	855 ± 55
YEPM	1980 ± 75	2026 ± 91	923 ± 54
Wort	2400 ± 90	2090 ± 107	1154 ± 73
Molasses	1770 ± 82	2045 ± 90	833 ± 53

2.2 培养基糖度的确定

在一系列不同糖度, 铬含量为 $1000 \mu\text{g}/\text{g}$ 的麦芽汁培养基中对酵母菌 LZ-53 进行发酵培养, 收获菌体后测定铬含量和生物量, 结果如图 1 所示。

由图 1 可见, 糖度对 LZ-53 的生物量有显著影响, 对铬含量影响不大, 选择麦芽汁培养基的糖度为 10° Brix 。

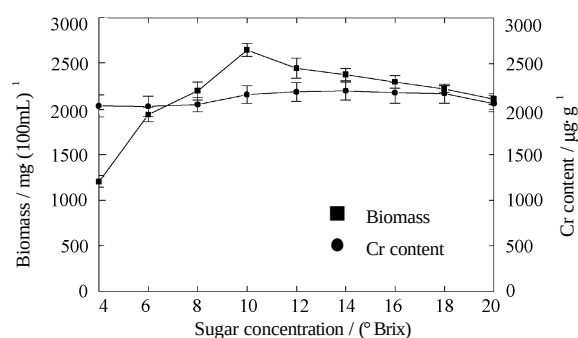


图 1 糖浓度对 LZ-53 生物量和铬含量的影响

Fig.1 Effect of sugar concentration of wort on the biomass and chromium content of strain LZ-53

2.3 铬浓度的确定

分别选用铬浓度为 0、400、800、1200、1600、2000 $\mu\text{g/mL}$ 的 10° Brix 麦芽汁培养基培养 LZ-53, 收获菌体后测定生物量和铬含量, 结果如图 2 所示。

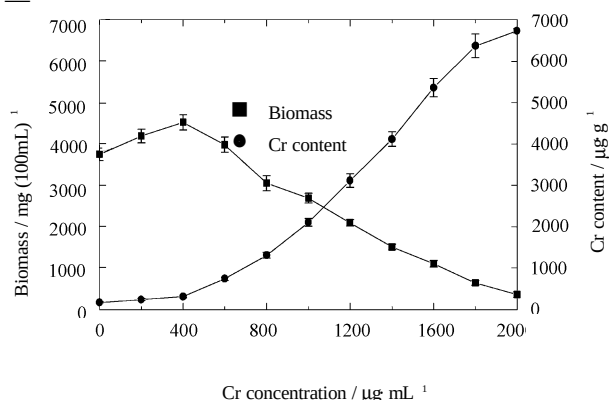


图 2 培养基铬浓度对 LZ-53 生物量和铬含量的影响

Fig.2 Effect of chromium concentration of the media on the biomass and chromium content of strain LZ-53

图 2 显示, LZ-53 在不同铬浓度培养基中生物量不同。当培养基中铬浓度在 0—400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内时, 随着铬浓度的增加, 生物量亦缓慢增加; 当培养基中铬浓度高于 400 $\mu\text{g/mL}$ 时, 生物量随铬浓度的增加迅速下降。LZ-53 的最大生物量不是出现在铬浓度最低的培养基中, 而是在铬浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基中。其原因可能是低浓度的铬刺激了酵母的生长, 其机制尚待进一步研究。

当菌体铬含量高时, 菌体量很低; 相反, 当菌体量较高时, 铬含量很低。根据生物量及铬含量综合值衡量, 选择培养基中铬浓度为 1200 $\mu\text{g/mL}$, 此时 LZ-53 总富铬能力达到最大值。

2.4 pH 的影响

选择 10° Brix 麦芽汁培养基中铬浓度为 1200 $\mu\text{g/mL}$, 调整培养基的初始 pH 依次为 4.0—8.0 (梯度为 0.5 pH 单位), 测定 pH 对 LZ-53 生长和铬富集的影响, 结果如图 3 所示。从图 3 可以看出, 培养基的 pH 对酵母的生长和铬含量有一定影响。初始 pH 6.0 时, LZ-53 生物量达到最大。初始 pH 4.0 时, 菌体铬含量最高, 随着 pH 增高, 菌体铬含量下降。以总富铬能力作为衡量指标, 确定培养基 pH 6.0 作为最优值。

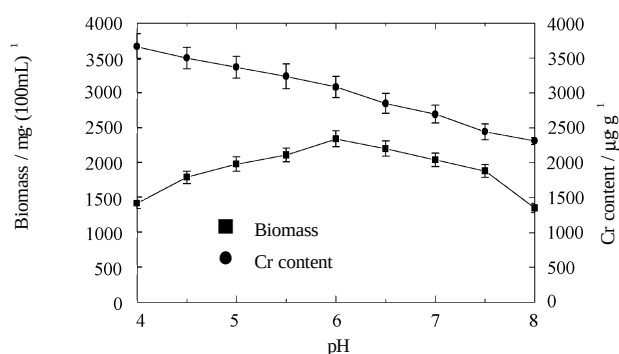


图 3 培养基 pH 对 LZ-53 生物量和铬含量的影响

Fig.3 Effect of pH of the media on the biomass and chromium content of strain LZ-53

2.5 装液量的确定

采用前述的适宜发酵条件, 使用 250 mL 的三角瓶, 旋转式摇床振荡(200 r/min) 培养 30 h, 测定不同装液量对 LZ-53 生物量和铬含量的影响, 结果如图 4 所示。图 4 显示, 装液量对生物量和细胞

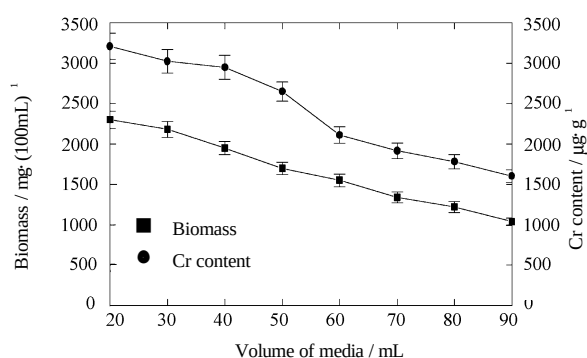


图 4 装液量对 LZ-53 生物量和铬含量的影响

Fig.4 Effect of volume of the medium on the biomass and chromium content of strain LZ-53

铬含量都有显著影响, 随着装液量的增加, 生物量和铬含量都明显下降。因此, 确定 250 mL 三角瓶

中培养基体积为 20 mL, 即装液量 8%。

2.6 接种量的确定

在上述研究的基础上, 进行了不同接种量、种子培养液体积和发酵液体积比()下 LZ-53 的发酵实验, 培养 30 h, 测定生物量和铬含量, 结果如图 5 所示。图 5 显示, 接种量对 LZ-53 的生物量和铬含量的影响不大, 所以选择常规接种量 10%。

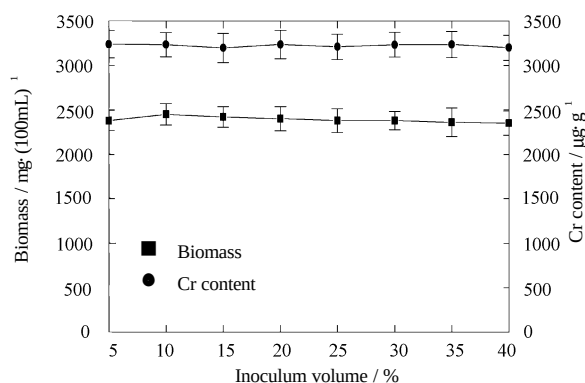


图 5 接种量对 LZ-53 生物量和铬含量的影响

Fig.5 Effect of the inoculum volume on the biomass and chromium content of strain LZ-53

2.7 培养时间的确定

采用前述的适宜发酵条件, 进行了培养时间对 LZ-53 的影响, 测定生物量和铬含量, 结果如图 6

所示。结果显示, 30 h 时生物量达到最大, 铬含量在 25—60 h 之间无显著差异。因此, 培养时间确定为 30 h。

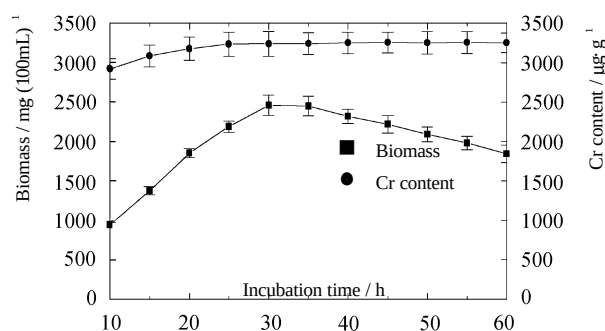


Fig.6 Effect of incubation time on the biomass and chromium content of strain LZ-53

2.8 优化条件与初始条件下的生物量与铬含量的比较

经过上述研究, 确定啤酒酵母 LZ-53 的最佳培养条件为: 糖浓度为 10° Brix 的麦芽汁作培养基, 培养基中铬浓度 1200 μg/mL, 初始 pH 6.0, 装液量为 8%, 接种量为 10%, 培养时间为 30 h。表 3 中列出菌体在此优化条件下和初始条件下的生物量和铬含量。结果显示, 经过培养条件的优化, LZ-53 的铬含量和总富铬能力都有近 50% 的提高。

表 3 最佳条件与初始条件下 LZ-53 总富铬能力的比较

Table 3 Comparison of the total chromium enrichment of strain LZ-53 under initial and optimal conditions

培养条件 Culture condition	生物量 Biomass / mg (100mL) ⁻¹	铬含量 (干菌体) Cr content (Dry cells) / μg g ⁻¹	综合值 Total Cr / μg (100mL) ⁻¹
初始 Initial	2420 ± 105	2085 ± 96	1161 ± 73
优化 Optimal	2340 ± 97	3248 ± 133	1748 ± 102

3 结论

综合以上各项研究结果, 可以得到 LZ-53 的最佳培养条件: 以麦芽汁为培养基, 糖度为 10° Brix, 培养基中铬浓度为 1200 μg/mL, 初始 pH 6.0, 装液量为 8%, 接种量为 10%, 培养时间为 30 h。在最优培养条件下收获的酵母, 采用中子活化分析方法测定其干菌体铬含量为 3248 μg/g。

参考文献

- Mertz W. Biol Trace Elem Res, 1992, 32: 3—8
- Anderson R A. Biol Trace Elem Res, 1992, 32: 19—24
- Anderson R A. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1997, 26: 35—41
- 丰伟悦, 钱琴芳, 丁文军, 等. 核化学与发射化学, 1999, 21(3): 147—152
FENG Weiyue, QIAN Qinfang, DING Wenjun, et al. J Nucl Radio Chem, 1999, 21(3): 147—152
- 丁文军, 钱琴芳, 侯小琳, 等. 核技术, 2000, 23(4): 231—235

- DING Wenjun, QIAN Qinfang, HOU Xiaolin, *et al.* Nucl Tech, 2000, 23(4): 231—235
- 6 丁文军, 钱琴芳, 侯小琳, 等. 微生物学通报, 1999, 26(1): 30—33
- DING Wenjun, QIAN Qinfang, HOU Xiaolin, *et al.* Microbiology, 1999, 26(1): 30—33
- 7 丁文军, 钱琴芳, 侯小琳, 等. 营养学报, 1999, 21(1): 95—99
- DING Wenjun, QIAN Qinfang, HOU Xiaolin, *et al.* Acta Nutr Sinica, 1999, 21(1): 95—99
- 8 柴之芳. 活化分析基础. 北京:原子能出版社, 1982. 11—112
- CHAI Zhifang. Principle of neutron activation analysis. Beijing: Atomic Energy Press, 1982. 11—112
- 9 贾盘兴, 蔡金科. 微生物遗传学实验技术. 北京:科学出版社, 1992. 405—426
- JIA Panxing, CAI Jinke. Techniques in microbiological genetic experiments. Beijing: Science Press, 1992. 405—426

Neutron activation study of cultivation conditions for high biomass chromium-rich yeast

LIU Jing¹ ZHANG Peiqun¹ ZHANG Borun² QIAN Qinfang¹
CHEN Chunying¹ CHAI Zhifang¹ DING Wenjun¹

1 (Institute of High Energy Physics and Laboratory of Nuclear Analytical Techniques, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

2 (Institute of Microbiology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The instrumental neutron activation analysis was used to determine Cr content in chromium-rich yeast cells. Through a series of tests, the optimized cultivation parameters of *Saccharomyces cerevisiae* LZ-53 were obtained as follows: wort as medium, 10° Brix sugar concentration; Cr 1200 µg/mL in wort; the initial pH 6.0; 8 % culture medium; inoculum volume 10 % (V/V), and yeast cells harvested in 30 h. Under the optimized cultivation conditions, the chromium content of strain LZ-53 reached 3248 µg/g.

Key words NAA, *Saccharomyces cerevisiae*, Cr, Cultivation conditions

CLC O657.4, Q581