

# 富铬酵母发酵条件的研究

柴丽红,李积胜,车红荣

(长安大学 环境科学与工程学院,陕西 西安 710064)

**[摘要]** 为了对富铬酵母的工业化生产提供参考依据,用活性干酵母为菌种制备富铬酵母,通过单因素试验和正交试验,以富铬酵母中有机铬总量为指标,确定了富铬酵母的优化发酵条件为:Cr<sup>3+</sup>质量浓度 300 μg/mL,接种量 120 mL/L,pH 6.5,培养时间 28 h,装液量 280 mL/L,发酵温度 28 ℃。

**[关键词]** 活性干酵母;无机铬;有机铬;发酵条件

**[中图分类号]** TQ926.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)09-0195-05

## Study on the fermentation conditions of chromium-enriched yeast

CHAI Li-hong, LI Ji-sheng, CHE Hong-rong

(College of Environmental Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an, Shaanxi 710064, China)

**Abstract:** In order to provide reference for the industrial production of chromium-enriched yeast by active yeast, by using single factor tests and a L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>) orthogonal design, and analysed by the total organic Cr of chromium-enriched yeast, the fermentation conditions were optimized as: culture volume was 280 mL/L, 300 μg/mL Cr<sup>3+</sup> and 120 mL/L inoculation at 28 ℃ for 28 h at 200 r/min, with the initial pH adjusted to 6.5.

**Key words:** active dry yeast; inorganic chromium; organic chromium; fermentation conditions

铬是人体及动物体内必不可少的一种微量元素。机体中的铬以葡萄糖耐量因子(GTF)的形式存在,是 GTF 中的功能元素,具有重要的生物学功能<sup>[1-2]</sup>。然而,天然食物中的铬远不能满足人体的正常需要。目前,对铬的补充有无机铬和有机铬两种形式,有机铬因其安全性高,易被吸收而更有效,其中尤以酵母铬最佳<sup>[3-4]</sup>。酵母能有效富集和转化无机铬,转化率在 84%以上<sup>[5]</sup>,且其本身富含蛋白质和 B 族维生素,发酵工艺成熟,生产周期短,是微量元素理想的载体<sup>[6-7]</sup>。目前,对于富铬酵母的报道主要集中于富铬条件的优化,以及铬盐添加工艺的研究<sup>[8-11]</sup>,还未见以活性干酵母为菌种的相关研究报道。本试验以安琪活性干酵母为菌种,进行富铬酵母的研制,对其发酵条件进行了初步优化,以期富铬酵母的工业化生产提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 安琪活性干酵母,由湖北安琪酵母股份有限公司生产。

1.1.2 培养基 (1)活化培养基:蔗糖 1 g,蒸馏水 80 mL。于 0.1 MPa、121 ℃ 下灭菌 20 min。

(2)发酵培养基:蔗糖 40 g/L,酵母浸出粉 10 g/L,蛋白胨 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/L,微量元素溶液 3 mL/L,pH 值自然。于 0.1 MPa、121 ℃ 下灭菌 20 min。

微量元素溶液配方:NaCl 100 mg/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 117 mg/L, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 14.6 mg/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.28 mg/L,对氨基苯甲酸 0.5 mg/L。

1.1.3 试剂 CrCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O,分析纯,天津市福

收稿日期] 2006-08-23

[作者简介] 柴丽红(1975-),女,山西襄汾人,讲师,硕士,主要从事微生物学研究。

晨化学试剂厂生产;二苯胺基脲,分析纯,北京化学试剂公司生产;酵母浸出粉,生化试剂,北京奥博星生物技术责任有限公司生产;蛋白胨,生化试剂,北京奥博星生物技术责任有限公司生产;蔗糖,分析纯,天津市登峰化学试剂厂生产;对氨基苯甲酸,分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产。

1.1.4 仪器 752 型棱光紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产;SRJ X-4-9 箱型马弗炉,陕西省秦岭电炉厂生产;HY-2 调速多用振荡器,国华仪器有限公司生产。

## 1.2 方法

1.2.1 干酵母的活化 称取 2 g 活性干酵母,加入到预先灭菌过的活化培养基中,摇匀后于 30 ℃ 恒温静置活化 2 h。

1.2.2 发酵条件优化 分析  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度、接种量、装液量、培养时间、pH 值和温度 6 个因素对酵母铬含量的影响。

(1)  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度对酵母铬含量的影响。发酵培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度分别为 100, 150, 200, 250, 300, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 装液量为 200 mL/L, 接种量 100 mL/L, 培养基初始 pH 值 6.0, 于 30 ℃、200 r/min 摇床培养 30 h。

(2) 接种量对酵母铬含量的影响。发酵培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 装液量为 200 mL/L, 接种量分别为 40, 60, 80, 100, 120 和 140 mL/L, 培养基初始 pH 值 6.0, 于 30 ℃、200 r/min 摇床培养 30 h。

(3) 初始 pH 值对酵母铬含量的影响。装液量 200 mL/L, 发酵培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 接种量 120 mL/L, 调节培养基初始 pH 值分别为 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 于 30 ℃、200 r/min 摇床培养 30 h。

(4) 培养时间对酵母铬含量的影响。装液量为

200 mL/L,  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 接种量 120 mL/L, 培养基初始 pH 值 6.0, 于 30 ℃、200 r/min 摇床分别培养 18, 24, 30, 36, 42, 48 h。

(5) 装液量对酵母铬含量的影响。装液量分别为 120, 200, 280, 360, 440, 520 mL/L, 发酵培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 接种量 120 mL/L, 培养基初始 pH 值 6.0, 于 30 ℃、200 r/min 摇床培养 30 h。

(6) 温度对酵母铬含量的影响。装液量 280 mL/L,  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 接种量 120 mL/L, 培养基初始 pH 值 6.0, 分别于 26, 28, 30, 32, 34 ℃ 及 200 r/min 摇床培养 30 h。

1.2.3 酵母生物量的测定 将摇瓶发酵培养的发酵液于 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 蒸馏水洗涤 2 次, 收集新鲜酵母, 60 ~ 70 ℃ 烘干至恒重即可得酵母生物量。

## 1.3 测定项目及方法

采用二苯胺基脲法测定酵母中铬含量<sup>[12-13]</sup>。铬酵母经干法灰化后进行测定, 即为铬酵母中的总铬含量; 采用静置浸出离心分离法测定铬酵母中无机铬的含量<sup>[15, 14]</sup>。

总铬量/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  = 总铬含量 $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$  × 生物量 $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ ;

有机铬含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$  = 总铬含量 $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$  - 无机铬含量 $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ ;

有机铬总量/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  = 有机铬含量 $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$  × 生物量 $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ ;

有机化程度/ % = 有机铬总量 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  / 总铬量 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$  × 100 %。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{Cr}^{3+}$ 质量浓度对酵母铬含量的影响

$\text{Cr}^{3+}$  质量浓度对酵母铬含量的影响见表 1。

表 1 不同质量浓度  $\text{Cr}^{3+}$  对酵母铬含量的影响

Table 1 Effects of  $\text{Cr}^{3+}$  concentrations on the Cr content of yeast

$\text{Cr}^{3+}$ 质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ $\text{Cr}^{3+}$ concentration	总铬量/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ Total Cr	有机铬总量/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ Total organic Cr	有机化程度/ % Organizing degree
100	18.065	16.442	91.0
150	21.511	20.453	95.1
200	22.599	20.951	92.7
250	50.277	48.599	96.7
300	31.042	29.730	95.8
400	22.243	18.644	83.0

由表 1 可见, 当培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度为 100 ~ 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 随培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度的增大, 酵母中的总铬量和有机铬总量均呈递增趋势;

当  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 二者均达到最高值; 当  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度大于 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 随着  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度增加, 酵母中的总铬量和有机铬总量均迅

速下降。这主要是由于  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度较高时 (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 进入酵母细胞中的无机铬不能被充分转化为有机铬, 从而对酵母生长产生强烈的抑制作用, 使酵母生物量大幅下降, 最终表现为总铬量和有机铬总量的下降。表明酵母对无机铬的生物转化能

力是有限的。当  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 酵母铬的有机化程度最高, 为 96.7 %。因此, 培养基中  $\text{Cr}^{3+}$  质量浓度以 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  为宜。

2.2 接种量对酵母铬含量的影响

接种量对酵母铬含量的影响见表 2。

表 2 接种量对酵母铬含量的影响

Table 2 Effects of inoculations on the Cr content of yeast

接种量/(mL · L <sup>-1</sup> ) Inoculation	总铬量/(mg · L <sup>-1</sup> ) Total Cr	有机铬总量/(mg · L <sup>-1</sup> ) Total organic Cr	有机化程度/% Organizing degree
40	19.343	17.682	91.4
60	19.710	18.310	92.9
80	58.393	55.735	95.4
100	61.913	58.624	94.7
120	88.753	86.529	97.5
140	36.677	34.485	94.0

由表 2 可见, 当接种量为 40 ~ 60 mL/L 时, 酵母中的总铬量和有机铬总量变化较小; 当接种量为 60 ~ 120 mL/L 时, 随接种量的增加, 酵母中的总铬量和有机铬总量均呈逐渐增大的趋势; 且当接种量为 120 mL/L 时, 总铬量和有机铬总量均达到最大,

之后, 随接种量的继续增大, 二者均迅速下降。接种量为 120 mL/L 时, 酵母铬的有机化程度最高, 为 97.5 %。因此, 接种量以 120 mL/L 为宜。

2.3 初始 pH 对酵母铬含量的影响

初始 pH 值对酵母铬含量的影响见表 3。

表 3 初始 pH 值对酵母铬含量的影响

Table 3 Effects of initial pH on the Cr content of yeast

初始 pH Initial pH	总铬量/(mg · L <sup>-1</sup> ) Total Cr	有机铬总量/(mg · L <sup>-1</sup> ) Total organic Cr	有机化程度/% Organizing degree
5.0	25.657	23.816	92.8
5.5	36.069	34.182	94.8
6.0	41.498	39.643	95.5
6.5	33.412	31.172	93.3
7.0	37.972	35.590	93.7

由表 3 可以看出, 在所选的 pH 值范围内, 当培养基中的 pH 值为 6.0 时, 酵母中的总铬量和有机铬总量均达到最高, 有机化程度也最高; 当 pH 值在 6.0 以上时, 酵母中的总铬量和有机铬总量有一定

的波动, 可能是试验误差所造成。在以后的试验中控制培养基初始 pH 值为 6.0。

2.4 培养时间对酵母铬含量的影响

培养时间对酵母铬含量的影响见表 4。

表 4 培养时间对酵母铬含量的影响

Table 4 Effects of incubation time on the Cr content of yeast

培养时间/h Incubation time	总铬量/(mg · L <sup>-1</sup> ) Total Cr	有机铬总量/(mg · L <sup>-1</sup> ) Total organic Cr	有机化程度/% Organizing degree
18	16.647	14.542	87.4
24	23.386	21.003	89.8
30	40.367	36.786	91.1
36	35.438	32.531	91.8
42	33.102	30.378	91.8
48	31.488	28.029	89.1

由表 4 可知, 随着发酵时间的延长, 酵母中总铬量和有机铬总量开始呈递增关系, 当培养时间为 30 h 时, 酵母中总铬量和有机铬总量均达到最高, 之后随培养时间的延长, 二者均逐渐下降。酵母的有机化程度在培养时间为 36 和 42 h 时均最高, 为 91.8 %; 培养 30 h 时, 酵母铬的有机化程度也较高,

为 91.1 %。综合考虑, 选择发酵时间为 30 h 较好。

2.5 装液量对酵母铬含量的影响

装液量对酵母铬含量的影响实际上反映的是溶氧对酵母铬含量的影响。装液量对酵母铬含量的影响见表 5。由表 5 可知, 当装液量为 120 ~ 280 mL/L 时, 随装液量的增加, 酵母总铬量和有机铬总

量均随之增加,当装液量为 280 mL/L 时,酵母总铬量和有机铬总量均达最大;之后随装液量的继续增大,二者均逐渐下降,说明溶解氧质量浓度过低或过高均不利于酵母中有机铬的富集。不同装液量下酵

母铬的有机化程度变化较小,为 91%~92%。因此,装液量以 280 mL/L 为宜。

## 2.6 发酵温度对酵母铬含量的影响

发酵温度对酵母铬含量的影响见表 6。

表 5 装液量对酵母铬含量的影响

Table 5 Effects of volumes on the Cr content of yeast

装液量/(mL·L <sup>-1</sup> ) Volumes	总铬量/(mg·L <sup>-1</sup> ) Total Cr	有机铬总量/(mg·L <sup>-1</sup> ) Total organic Cr	有机化程度/% Organizing degree
120	24.998	22.799	91.2
200	28.030	25.478	90.9
280	33.064	30.574	92.5
360	24.910	22.983	92.3
440	23.708	21.694	91.5
520	23.739	21.951	92.5

表 6 发酵温度对酵母铬含量的影响

Table 6 Effects of fermentation temperatures on the Cr content of yeast

发酵温度/ Fermentation temperature	总铬量/(mg·L <sup>-1</sup> ) Total Cr	有机铬总量/(mg·L <sup>-1</sup> ) Total organic Cr	有机化程度/% Organizing degree
26	15.121	13.436	88.9
28	34.226	31.550	92.2
30	51.290	47.804	93.2
32	23.413	21.387	91.3
34	22.081	20.254	91.7

从表 6 可以看出,较低的温度(26~28)或较高的温度(32~34)均不利于酵母对铬的吸收转化,当酵母于 30 下发酵时,总铬量、有机铬总量及有机化程度均最高,表明 30 是酵母对铬进行吸收转化的最佳温度。

## 2.7 发酵条件优化试验结果

在以上单因素试验的基础上,考虑各发酵条件对酵母富铬性能影响的综合效应,为了得出初步优化的发酵条件,以有机铬总量为指标,进行 L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>) 正交试验,因素及水平见表 7,正交试验结果见表 8。

表 7 富铬酵母发酵条件优化 L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>) 正交试验的因素及水平表

Table 7 Factors and levels of L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>) orthogonal experiment for optimizing the fermentation conditions of chromium-enriched yeast

水平 Level	因素 Factors					
	Cr <sup>3+</sup> 质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> ) Cr <sup>3+</sup> concentration	接种量/ (mL·L <sup>-1</sup> ) Inoculation	初始 pH Initial pH C	培养时间/h Incubation time D	装液量/ (mL·L <sup>-1</sup> ) Volumes E	发酵温度/ Fermentation temperature F
	A	B				
1	200	80	6.0	28	240	28
2	250	100	6.5	30	280	30
3	300	120	7.0	32	320	32

由表 8 可知,在试验取值范围内,影响酵母有机铬总量的主次因素依次为:装液量>发酵温度>Cr<sup>3+</sup>质量浓度>接种量>培养时间>初始 pH,即装液量为影响酵母有机铬总量的最主要因素,其次是发酵温度,Cr<sup>3+</sup>质量浓度和接种量,而培养基初始 pH 的影响最小。富铬酵母发酵条件的最佳组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 为,即 Cr<sup>3+</sup>质量浓度 300 μg/mL,接种量 120 mL/L,初始 pH 6.5,培养时间 28 h,装液量 280 mL/L,发酵温度 28。

## 3 结 论

本试验利用高活性干酵母作为菌种进行富铬酵母的制备,菌种来源易得,活化过程简单,工艺流程缩短,具有实际推广价值;通过单因素和正交试验分析了接种量、装液量、Cr<sup>3+</sup>质量浓度、发酵温度、初始 pH 值及培养时间 6 个因素对富铬酵母中铬含量的影响,可知富铬酵母的最佳发酵条件为:培养基中 Cr<sup>3+</sup>质量浓度为 300 μg/mL,初始 pH 为 6.5,接种

量 120 mL/L,装液量 280 mL/L,于 28 发酵培养 28 h。

表 8 富铬酵母发酵条件优化 L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>) 正交试验的结果

Table 8 Result and analysis of L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>) orthogonal experiment for optimizing the fermentation conditions of chromium - enriched yeast

序号 No.	Cr <sup>3+</sup> 质量浓度/ (μg · mL <sup>-1</sup> ) Cr <sup>3+</sup> concentration A	接种量/ (mL · L <sup>-1</sup> ) Inoculation B	初始 pH Initial pH C	培养时间/h Incubation time D	装液量/ (mL · L <sup>-1</sup> ) Volumes E	空白 Blank	发酵温度/ Fermentation temperature F	有机铬总量/ (mg · L <sup>-1</sup> ) Total organic Cr
1	1(200)	1(80)	1(6.0)	1(28)	1(240)	1	1(28)	10.5
2	1(200)	2(100)	2(6.5)	2(30)	2(280)	2	2(30)	12.7
3	1(200)	3(120)	3(7.0)	3(32)	3(320)	3	3(32)	8.5
4	2(250)	1(80)	1(6.0)	2(30)	2(280)	3	3(32)	11.8
5	2(250)	2(100)	2(6.5)	3(32)	3(320)	1	1(28)	20.0
6	2(250)	3(120)	3(7.0)	1(28)	1(240)	2	2(30)	16.7
7	3(300)	1(80)	2(6.5)	1(28)	3(320)	2	3(32)	22.7
8	3(300)	2(100)	3(7.0)	2(30)	1(240)	3	1(28)	14.3
9	3(300)	3(120)	1(6.0)	3(32)	2(280)	1	2(30)	25.7
10	1(200)	1(80)	3(7.0)	3(32)	2(280)	2	1(28)	24.1
11	1(200)	2(100)	1(6.0)	1(28)	3(320)	3	2(30)	15.4
12	1(200)	3(120)	2(6.5)	2(30)	1(240)	1	3(32)	16.0
13	2(250)	1(80)	2(6.5)	3(32)	1(240)	3	2(30)	15.9
14	2(250)	2(100)	3(7.0)	1(28)	2(280)	1	3(32)	19.0
15	2(250)	3(120)	1(6.0)	2(30)	3(320)	2	1(28)	24.1
16	3(300)	1(80)	3(7.0)	2(30)	3(320)	1	2(30)	13.0
17	3(300)	2(100)	1(6.0)	3(32)	1(240)	2	3(32)	10.6
18	3(300)	3(120)	2(6.5)	1(28)	2(280)	3	1(28)	21.4
T <sub>1</sub>	87.2	98.0	98.1	105.7	84.0		114.4	
T <sub>2</sub>	107.5	92.0	108.7	91.9	114.7		99.4	T = 302.4
T <sub>3</sub>	107.7	112.4	95.6	104.8	103.7		88.6	
X <sub>1</sub>	14.53	16.33	16.35	17.62	14.00		19.07	
X <sub>2</sub>	17.92	15.33	18.12	15.32	19.12		16.57	
X <sub>3</sub>	17.95	18.73	15.93	17.47	17.28		14.77	
R	3.42	3.40	2.19	2.30	5.12		4.30	

[参考文献]

[1] 郑林,周侃,翁本德,等. 铬与人体健康研究[J]. 广东微量元素科学,2003,10(5):11-14.

[2] 王振来,钟艳玲. 微量元素铬的研究进展[J]. 中国饲料,2001(4):16-17.

[3] 郝素娥,陈庆峰,刘旭,等. 制备有机铬添加剂——铬酵母的研究[J]. 粮食与饲料工业,1999(10):32-33.

[4] 肖方正,刘曲滨. 富铬酵母的生产工艺研究[J]. 食品科学,2001,22(10):61-63.

[5] 丁文军,钱琴芳,柴之芳,等. 富铬酵母中铬的化学种态及结合形态研究[J]. 分析化学,1999,27(9):1061-1064.

[6] 张彦,朱娅敏,夏长虹. 食用酵母的营养价值[J]. 食品科技,2004(10):94-96.

[7] 李淑敏. 酵母作为微量元素载体的研究及应用前景[J]. 微生物学通报,1999,26(3):220-223.

[8] 薛冬桦,张恒真,金花,等. 糖蜜发酵培养富铬酵母[J]. 中国生物工程杂志,2003(5):98-100.

[9] 张彦. 酵母菌富集硒、铬能力的研究[J]. 酿酒科技,2005(1):38-40.

[10] 朱靖环,沈秋泉,杨建明,等. 啤酒酵母富铬条件的初步研究[J]. 食品研究与开发,2004,25(4):49-52.

[11] 李爱芬,孙祖莉,陈敏,等. 微量元素铬载体酵母摇瓶发酵研究[J]. 微生物学通报,2003,30(3):18-21.

[12] 石秀侠,程茂基,赵彩艳,等. 氧化-光度法测定饲料铬酵母的铬含量[J]. 广东饲料,2005,14(6):42-43.

[13] 刘曲滨,肖方正,陈子健,等. 铬酵母中铬含量的测定[J]. 饲料工业,2000,21(6):34-35.

[14] 张帅. 富铬酵母制备新工艺的研究[J]. 食品工业科技,2005,26(2):145-147.