

麦角固醇高产菌株的构建及其培养优化条件的研究

张博润 何秀萍 铁翠娟 刘玉方

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 通过初筛、单倍体分离、诱变及酵母菌种间原生质体融合技术构建了 2 株麦角固醇产量明显提高的优良菌株 YEF-21 和 YEF-29。并对 YEF-21 的培养优化条件进行了研究。结果表明在优化的实验条件下 YEF-21 的生物量及麦角固醇含量的综合值分别为原始亲株 YE227 和 YE180 的 1.54 和 1.55 倍。经遗传稳定性分析, 没有发现标记基因的分离现象, 从而证明获得的融合菌株是遗传稳定的, 是具有一定实际应用价值的麦角固醇高产菌株。

关键词 酵母菌, 原生质体融合, 麦角固醇, 生物量

分类号 TQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0046-51

目前麦角固醇的生产菌种主要是酵母菌, 国外对麦角固醇产生菌及其合成代谢途径等进行了比较深入的研究^[1-3]。国内从五、六十年代开始研究从酵母菌中提取麦角固醇, 但普遍存在的问题是菌种麦角固醇含量低, 提取率也较低。近年来有关单位对麦角固醇高产菌株选育及其发酵条件进行了研究^[4-8]。本文是在原有工作基础上利用原生质体融合技术, 将细胞生物量高的酵母菌单倍体与麦角固醇含量高的单倍体融合构建麦角固醇产量和细胞生物量均有所提高的高产菌株, 并对其发酵条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

以本实验室收集保藏的 231 株不同种属的酵母菌为试验出发菌株, 统一编号为 YE1 至 YE231。A364(α)及 ZW-21(α)为本实验室保藏的标准交配型菌株。

1.2 培养基及培养条件

YEPD 培养基, McClary 生孢培养基, YNB 培养基及 YNB 选择培养基^[9]。发酵培养基组成由摇瓶试验确定。将待测菌株在 YEPD 斜面上活化, 接一环于 YEPD 液体培养基 28℃、200r/min 培养 16h 作为种子, 以 10% 接种量接于发酵培养基 28℃ 摇床培养, 转速为 200r/min 培养 30h。

1.3 原生质体融合

按常规方法分离单倍体, DES 诱变, 原生质体的制备、融合、再生及融合子的鉴定^[9]。

1.4 麦角固醇含量标准曲线的绘制

用上海制药二厂的麦角固醇样品精确配制浓度为 100 μ g/mL, 稀释成系列溶液, 在

UV-754 分光光度计上测定 280nm 吸收值 ,绘制吸收值对麦角固醇含量标准曲线。

1.5 细胞生物量的测定

培养至一定时间的菌液 4000r/min 离心 5min ,收集菌体 ,蒸馏水洗一次 ,离心 ,控干水分后 ,称重 ,换算成 100mL 菌液的菌体量 ,即为细胞生物量(湿重 ,含水量约为 80%)。

1.6 细胞麦角固醇含量的测定

在 100mL 磨口三角瓶中 ,按 1g 湿菌体加 10mL 醇碱溶液(50% KOH :无水乙醇 = 2 : 3) ,在 85~90℃ 水浴中皂化 3h ,室温下冷却 ,加入等体积正庚烷进行萃取 ,静置 30min 分层后 ,取上层萃取液进行稀释 ,分别测定 230nm、280nm 吸收值 ,并按下述公式计算 100g 干菌体细胞中的麦角固醇含量。

麦角固醇含量(%)= $\frac{c \times v \times \text{稀释倍数}}{W} \times 100\%$

c 根据样品 280nm 的吸收值 ,从标准曲线获得萃取样品中麦角固醇的浓度(μg/mL)

v 萃取液的体积(mL) W 菌体干重(g)

1.7 生物量及麦角固醇含量综合值的计算

100mL 培养液中所含的细胞生物量(g)× 100g 干菌体细胞中的麦角固醇含量(g)即为生物量及麦角固醇含量综合值。

1.8 融合子的遗传稳定性测定

参考文献 [10]。

2 结果与讨论

2.1 麦角固醇含量标准曲线

鉴于麦角固醇在 280nm 处的吸收值与在 281.5nm 处的吸收值很接近 ,为了简便可行 ,我们在本研究中均在 280nm 处测定吸收值 ,麦角固醇含量标准曲线见图 1。

2.2 初筛结果

对 231 株不同种属酵母菌进行初筛 ,分别测定细胞生物量和细胞麦角固醇含量 ,初筛获得 15 株细胞生物量较高的菌株和 6 株麦角固醇含量较高的菌株。部分结果见表 1。

表 1 不同菌株细胞生物量及麦角固醇含量的比较

Table 1 Comparison of biomass and content of ergosterol among different yeast strains

Strains	YE179	YE180	YE191	YE193	YE219	YE224	YE226	YE227
Biomass/%	8.36	6.82	6.73	7.48	2.23	1.80	1.63	1.84
Ergosterol/%	0.70	1.04	0.70	1.45	2.31	2.11	2.32	3.07

2.3 原生质体融合构建高产菌

从测定的酵母菌中选出生物量较高的二倍体菌株 YE180(*S. cerevisiae*)及麦角固醇含量较高的二倍体菌株 YE227(*S. kluyveri*) ,按常规方法进行单孢分离 ,获得相应的单倍体菌株 ,通过对单倍体交配型、细胞生物量及麦角固醇含量的测定 ,选出生物量较高的单倍体 YE180-26(a)及麦角固醇含量较高的单倍体 YE227-41(a) ;DES 诱变上述 a 单倍体菌株 ,筛选出带有不同氨基酸缺陷标记的融合亲株 YE180-26-10(lys^{-})及 YE227-41-8

(*a leu⁻*)。按文献 9 所述进行原生质体融合,共获得 56 个融合子,通过细胞生物量及麦固醇含量的测定,从中选出 2 株产量性状优于亲株的融合菌株 YEF-21 及 YEF-29。结果见表 2,YEF-21 及 YEF-29 具有双亲株的优良性状,2 菌株的生物量及麦角固醇含量的综合值分别是原始亲株 YE227 的 1.8 倍和 1.7 倍,是 YE180 的 1.4 倍和 1.3 倍。对融合菌株的遗传稳定性进行分析,没有发现标记基因的分离现象,也没有发现产量性状的明显差异,从而证明获得的融合菌株是遗传稳定的。进一步对融合菌株 YEF-21 的发酵条件进行了研究。

表 2 亲株及融合菌株的遗传特性、营养要求及产量性状的比较

Table 2 Comparison of genetic characteristics, auxotroph and yield among fusant and parent strain						
Strains	Ploidy	Mating-type	Sporulation	Auxotroph	Biomass/%	Ergosterol/%
YE227	2n		+		1.67	2.98
YE180	2n		+		6.20	1.04
YE227-41	n	a	—		1.32	2.06
YE180-26	n	a	—		5.70	0.87
YE227-41-8	n	a	—	leu	1.72	1.54
YE180-26-10	n	a	—	lys	4.64	0.98
YEF-21	2n	an	—		2.46	3.06
YEF-29	2n	aa	—		2.76	2.52

2.4 发酵培养条件的优化

鉴于微生物发酵培养受多种因素影响,获得的试验数据有所变化,本研究在进行发酵培养条件的优化试验时,均重复试验 3 次,计算平均值。

2.4.1 不同碳源及浓度的确定：采用 YEPD 培养基配方,碳源分别为食糖、蔗糖及葡萄糖,发酵 24h,分别测定细胞生物量及麦角固醇含量。从实验结果可以看出,不同碳源对细胞生物量没有明显的影响,但麦角固醇含量差异则较大,以葡萄糖为最佳碳源。进一步测定了葡萄糖浓度对 YEF-21 产量性状的影响,结果(图 2)表明,不同葡萄糖浓度下,细胞生物量及麦角固醇含量有一定差异,8% 浓度时,细胞生物量达最高,以后随着糖浓度的提高,细胞生长受到一定的抑制,而麦角固醇含量则在 16% 糖浓度时最高,在一定程度上与生物量的降低有关。综合考虑细胞生物量及麦角固醇含量,8% 葡萄糖应为最适糖浓度,因为此时生物量及麦角固醇含量的综合值最高,达 7.6%。

2.4.2 不同氮源及浓度对麦角固醇含量的影响：以 YEPD 培养基为基础,采用 8% 葡萄糖为碳源,添加不同浓度的硫酸铵或尿素进行发酵培养,图 3 表明,不同氮源的添加对菌体产量性状有很大的影响,随着氮源的添加及浓度的提高,细胞生物量和麦角固醇含量均明显降低,尤其尿素的影响更加突出。因此本实验确定 YEF-21 的发酵培养基不添加任何额外氮源。

2.4.3 接种量的确定：在上述研究基础上,进行了不同接种量(种量和发酵液体积比)下

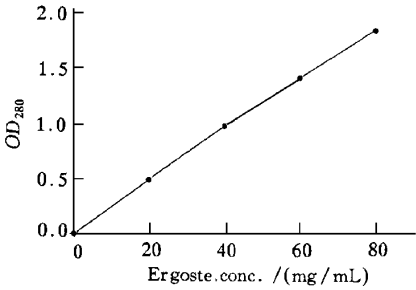


图 1 麦角固醇含量标准曲线

Fig.1 The standard curve of ergosterol

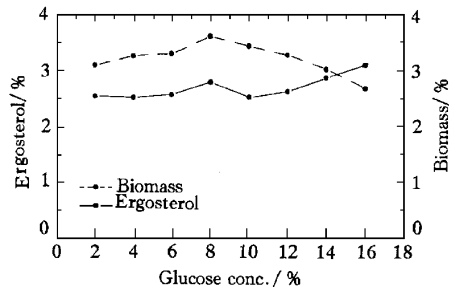


图 2 葡萄糖浓度对细胞生物量及麦角固醇含量的影响

Fig.2 Effect of glucose concentration on the biomass and ergosterol contents

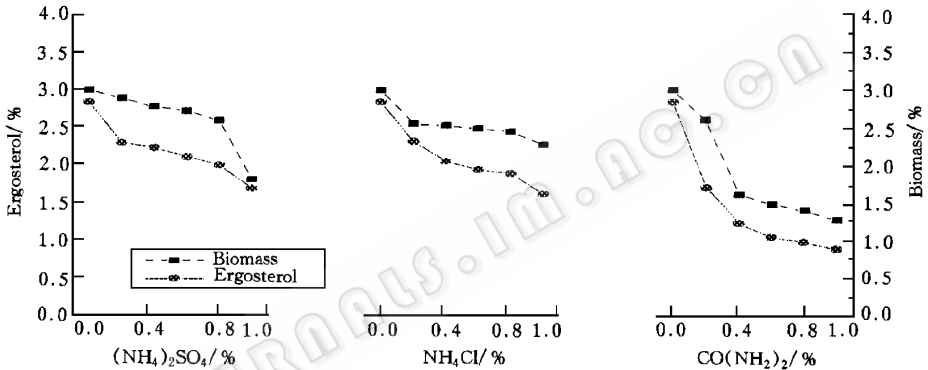


图 3 不同氮源对细胞生物量及麦角固醇含量的影响

Fig.3 Effect of the different sources of nitrogen on the biomass and ergosterol contents

YEF-21 的发酵实验 ,发现在 24h 内 ,随接种量的增大 ,细胞生物量略有增加 ,在 10 % 接种量时麦角固醇含量达最高 ,以后随接种量的增加略有降低 ,与生物量的变化呈相反的趋势 (图 4A) 。因此 ,确定 YEF-21 的最适接种量为 10 % 。

2.4.4 初始 pH 的影响 :采用不同初始 pH 的发酵培养基进行研究 ,发现当培养基初始 pH 为 6.0 时 ,YEF-21 的麦角固醇含量最高 (图 4B) ,虽然细胞生物量在 pH 为 6.5 时达最高 ,但综合考虑 ,确定 6.0 为最佳发酵液起始 pH。

2.4.5 摇瓶装液量 :在 250mL 的摇瓶中 ,测定不同装液量对 YEF-21 发酵生产麦角固醇的影响。研究发现 ,随着装液量的增加 ,细胞生物量呈现逐渐降低的趋势 ,麦角固醇含量在装液量为 12 % 时为最高 ,以后略有降低。尽管生物量及麦角固醇含量的综合值在 12 % 装液量时最高 ,但考虑到设备利用率 ,确定适宜的装液量为 24 % 。

2.4.6 培养时间 :采用前述的适宜发酵条件 ,分别测定 YEF-21 在不同时间的细胞生物量和麦角固醇含量 ,发现生物量和麦角固醇含量随时间的延长 ,呈现基本相似的变化趋势 ,所不同的是细胞生物量在 65h 达最高 ,而麦角固醇含量在发酵 30h 时为最高 (图 4C) ,在研究中优先考虑麦角固醇含量 ,同时兼顾设备的利用率 ,因此选择的发酵时间为 30h。

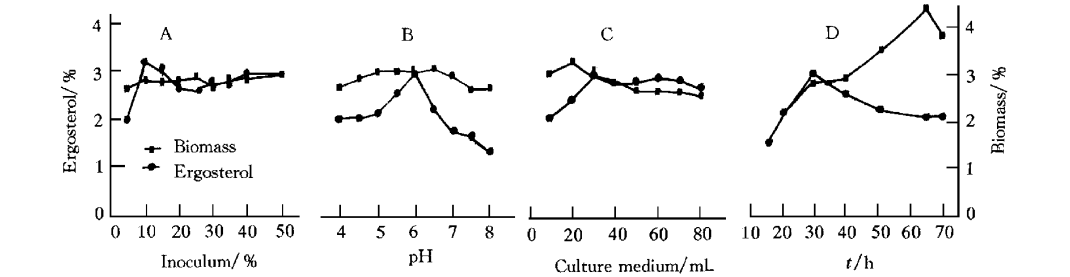


图 4 不同发酵条件对细胞生物量及麦角固醇含量的影响

Fig. 4 Effect of the fermentation conditions on the biomass and ergosterol contents

2.4.7 亲株及融合菌株在优化发酵条件下的产量比较：在上述确定的优化发酵条件下，分别测定了亲株及融合菌株 YEF-21 的细胞生物量及麦角固醇含量。结果(表 3)表明，在优化条件下，融合菌株 YEF-21 的生物量及麦角固醇含量的综合值分别是亲株 YE227 及 YE180 的 1.54 倍和 1.55 倍。

表 3 优化条件下亲株及融合菌株的产量比较

Table 3 Comparison of yield among fusant and parent strains under the optimal condition							
Strains	YE227	YE227-41	YE227-41-8	YE180	YE180-26	YE180-26-10	YEF-21
Biomass/%	1.62	1.15	1.35	4.01	3.34	2.95	2.45
Ergosterol/%	3.01	2.24	2.63	1.21	1.03	1.06	3.07

3 讨 论

在野生型菌株中，细胞生物量和细胞麦角固醇含量常存在矛盾。原生质体融合技术则可以将亲株的优良性状结合在一起。本文利用原生质体融合技术，成功地构建了具有双亲株 YE227 和 YE180 优良性状的融合菌株，并对其中的 YEF-21 融合株进行了发酵条件的优化。研究结果表明，获得的融合株 YEF-21 遗传性状稳定，是具有实际应用价值的麦角固醇高产菌。

参 考 文 献

[1] S. Hata, T. Nishino, M. Komori *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **103** 272~277.
[2] K. Tomas, B. Katarina, K. Robert. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **189** 85~91.
[3] T. Hitoshi, H. Hideaki, A. Yuri *et al.* *Fermen. and Bioeng.*, 1995, **79**(1) 64~66.
[4] 莫湘君, 黄玲, 万宁. *食品与发酵工业*, 1990, **6** 20~23.
[5] 张博润, 蔡金科, 刘永成. *微生物学通报*, 1993, **20**(6) 335~338.
[6] 刘海滨, 车文伟, 王强. *烟台大学学报*, 1995, **3** 31~34.
[7] 陈松生, 毛宁, 陈哲超等. *食品与发酵工业*, 1995, **6** 18~23.
[8] 张博润. *微生物学通报*, 1995, **22**(3) 139~142.
[9] 贾盘兴, 蔡金科, 马德钦等. *微生物遗传学实验技术*. 北京: 科学出版社, 1992.
[10] 张博润, 姜书勤, 徐婉学等. *生物工程学报*, 1986, **2**(4) 29~34.

The Construction of High Ergosterol-production Strains
and Study of the Optimal Conditions for Culture*

Zhang Borun He Xiuping Tie Cuijuan Liu Yufang

(Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of sciences , Beijing 100080)

Abstract High ergosterol-production strains were constructed by primary screening、 isolation of haploid、 mutagenesis and protoplasts fusion. The fermentation conditions of fused strain YEF-21 were studied. Under the optimal conditions , that is , the medium for fermentation consisted of 8 % glucose、 1 % polypeptone、 1 % yeast extract ; initial pH nature ; 60mL broth/250mL flask ; inoculum volume 10 % ; fermentation time 30h at 28℃ and 200r/min ; the comprehensive ergosterol content of YEF-21 is 1.54 and 1.55 times of the parental strains YE227 and YE180 , respectively. The fused strain YEF-21 is stable in genetic by the analysis of genetic stability , and it is a high ergosterol-production strain which has actual useful value.

Key words Yeast , protoplast fusion , biomass , ergosterol

* Supported by Project of Chinese National Program for Science and Technology Development (No. 96-C03-01-02).