

高含量赖氨酸酵母的选育和培养条件的研究

刘玉方 蔡金科

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文报道一株能积累赖氨酸的酿酒酵母 S1 为原始菌株,经 10^{-3} mol/L 的 S-(β -氨基乙基) L-半胱氨酸 (SAEC) 处理,选得 SAEC 抗性突变株。再经二次紫外诱变,选得 7 株 SAEC^r 突变株,其中 3 株具有较高积累赖氨酸能力,并对其培养条件进行了研究。突变株 MSU1 的游离赖氨酸含量为菌体干重的 7.83%,而突变株 MSU5 平均赖氨酸含量可达 8.91%。

关键词 SAEC 抗性突变株;赖氨酸含量

近年来赖氨酸生产在我国得到迅速发展,由于动物本身不能合成赖氨酸,饲料中必需添加以满足其生长需要。作为高蛋白和维生素来源的高赖氨酸酵母是近代合成饲料必不可少的组份之一。同时,由于人们食用植物蛋白缺乏赖氨酸,赖氨酸酵母又可作为强化食品的添加剂。它的优点在于若动物直接利用赖氨酸,血液中赖氨酸含量会出现暂时高峰,随后很快消失。而添加赖氨酸酵母时,酵母不断被消化,释放出的赖氨酸不断被吸收,从而使血液中的赖氨酸较

长时间维持在一定水平上,利用率得到提高。

本文报道获得抗赖氨酸结构类似物酵母突变株的选育和培养条件。

材料和方法

(一) 菌株

酿酒酵母 S1 (*Saccharomyces cerevisiae*) 本组保藏。经单胞分离后,选择其中含赖氨酸较高单胞菌株为原始菌株。

(二) 培养基

1. YEPD 培养基(%): 酵母粉 1, 多肽 2, 葡萄糖 2, 用于酵母的选育。

2. 蔗糖糖蜜培养基(%): 蔗糖糖蜜 10 (含糖 4), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.35, MgSO_4 0.25, 玉米浆 2, H_3PO_4 0.05, pH5.5, 酵母生长培养基。

3. YNB 培养基: 其组成见文献[1], 为酵母基本培养基。

(三) 茚三酮试剂

称取茚三酮 5.0g, 氯化铜 6.7g, 加入柠檬酸缓冲液(0.1mol/L 柠檬酸, 0.2mol/L NaOH, 用 HCl 调 pH 为 1.3) 125ml 溶解, 加入重蒸乙二醇独甲醚至 375ml, 加水至 500ml。棕色瓶贮存备用。

(四) 菌株培养和生物量测定

从斜面取培养物一环, 接种于种子瓶中, 于 28℃ 摇床培养 20 小时, 按 10% 接种量加入糖蜜生长培养基中 (500ml 三角瓶装液 90ml), 置旋转摇床, 250r/min, 28℃ 培养 24 小时。

将上述培养液经 5000r/min 离心 5 分钟, 收集菌体, 用蒸馏水洗一次, 将细胞压干, 称重, 为湿重。

(五) 抗 SAEC 菌株筛选和紫外诱变

1. 抗 SAEC 菌株筛选参照 Gray^[2] 方法进行。接一环种子到含有 10^{-3}mol/L SAEC 的 YNB 液体培养基中, 30℃ 摇床培养 6 天后, 收集菌体, 稀释后涂于含有 10^{-3}mol/L SAEC 的 YNB 平板上。30℃ 培养 24 小时后生长的菌落, 再复测一次, 选出 SAEC^r 突变株。

2. 紫外诱变按 Takenouchi^[3] 等人方法进行。

(六) 赖氨酸的抽提和测定

赖氨酸的抽提基本按 Gaillardin^[4] 方法: 精确称取 0.2g 压干酵母菌体, 溶于 5ml 热水中, 沸水浴中加热 20 分钟后, 冷却、离心, 上清液即为游离赖氨酸溶液, 供测定用。

赖氨酸测定按石渡昭男^[5] 等人方法进行。

(七) 培养条件实验

对影响赖氨酸积累及生物量主要因素糖浓度、氮源、pH 值, 培养时间及通气量等进行了试验。

结果和讨论

(一) SAEC^r 株生物量和赖氨酸含量测定

按上述方法共筛选到 SAEC^r 株 500 株, 并对其生物量和游离赖氨酸进行测定。其生物量大部分低于原始菌株 S1, 只有 MS30 和 MS59 二株菌与原始菌株 S1 相差不大, 而赖氨酸的含量却远高于对照株(表 1)。

表 1 MS30 与 S1 生物量与赖氨酸含量比较

菌株	生物量 (g/100ml)	细胞干重的赖氨酸含量 (%)
S1	2.30	3.80
MS30	2.15	5.76

(二) SAEC^r 株经 UV 处理后菌株的生物量和赖氨酸含量

MS30 经二次 UV 诱变处理后, 选得 7 株菌, 分别编号为 MSU1-7。其中 MSU1 和 MSU5 较 MS30 又有提高(表 2)。

表 2 MS30 与 MSU1、MSU5 生物量与赖氨酸含量*

菌株	生物量 (g/100ml)	细胞干重的赖氨酸含量 (%)
MS30	2.17	5.54
MSU1	1.87	7.83
MSU5	1.35	8.91

* 五次平均值

(三) 培养条件实验

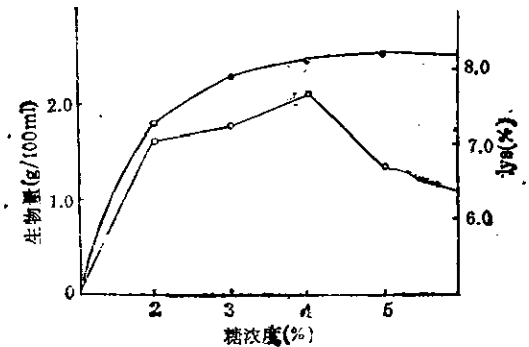


图 1 糖浓度对生物量和赖氨酸积累影响

—●—●—表示生物量 —○—○—表示 lys%

1. 糖浓度与菌株生物量和赖氨酸积累的关系

系密切(图1)。选择合适的糖浓度可以充分利用糖源防止浪费,又可获得较高的生物量和赖氨酸,结果以4%糖为佳。

2. 硫酸铵、尿素、氯化铵等不同氮源对生物量和赖氨酸的积累没有明显差别,而不同浓度的氮源对赖氨酸积累影响极大(图2)。以硫酸铵为代表,含量为0.35%为最好。

3. pH值影响。pH5—8对MSU1和MSU5的生长和赖氨酸积累影响不大,这是因为酵母菌本身具有一定耐酸性,因此pH值适应范围较广,易于工业化生产。

4. 培养时间和通气量。培养时间20—22小时最好(图3),超过24小时赖氨酸的积累明显下降。此外,此系列菌株要求较大通气量,发酵过程中,400r/min 摇床赖氨酸的积累明显高于210r/min 摇床。不同装液量的实验也获得相同的结果。

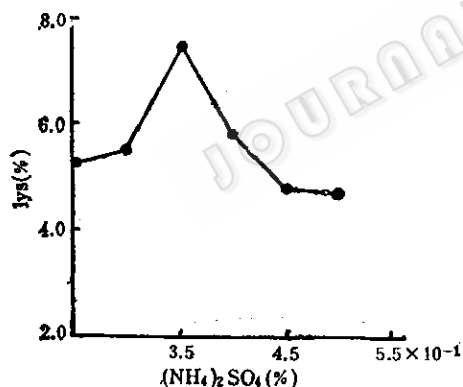


图2 硫酸浓度与赖氨酸积累关系

酵母菌赖氨酸代谢途径与细菌不同^[6],因此不能用诱变方法获得营养缺陷型来增加赖氨酸的积累,而采用添加 α -氨基己二酸、 α -酮基己二酸等前体,可使赖氨酸含量达16—20%^[7,8],而选择抗赖氨酸结构类似物突变株来提高赖氨酸的积累量是简单可行的^[9]。

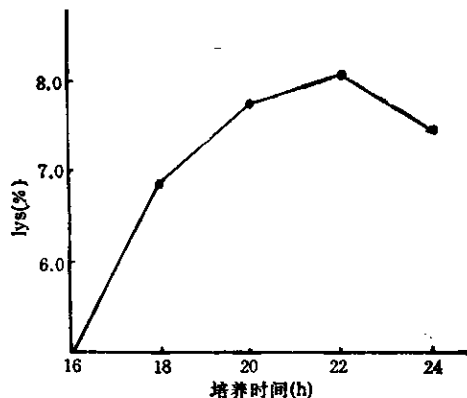


图3 发酵时间与赖氨酸积累

用酵母菌发酵生产赖氨酸还有一定困难,首先是由于酵母菌细胞膜渗透性差,经物理或化学方法处理后,使赖氨酸分泌到体外,目前还没有理想的方法。此外酵母菌积累赖氨酸能力较细菌低,对提取造成困难。如果对现有抽提方法进一步完善,使之即可得到赖氨酸,又可获得完整菌体作为饲料蛋白或提取其它生物活性物质值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Phaff, H. J. et al.: The life of yeasts, Harvard university, p. 166—167, 1978.
- [2] Gray, G. S. and J. K. Bhattacharjee: *Journal of General Microbiology*, 97: 117—120, 1976.
- [3] Takenouchi, E. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41 (3): 615—616, 1977.
- [4] Gaillardin, C-M. et al.: *Arch. Microbiol.*, 104(1): 89—94, 1975.
- [5] 石渡昭男等: 特许可报, 昭 50-20874, 1975.
- [6] 福本寿一郎等编: 近代工业化学, 23 卷: p.178—180, 1969.
- [7] Broquist, H. P. et al.: *Appl. Microbiol.* 9(1): 1—5, 1961.
- [8] Jensen, A. L. and P. Shu: *Appl. Microbiol.*, 9 (1): 12—16, 1961.
- [9] Haidaris, C. G. and J. K. Bhattacharjee: *J. Fe-*