

## 影响酵母细胞麦角固醇的发酵控制参数的分析

高 桦 谭天伟\*

(北京化工大学生物化工系,北京 100029)

**摘 要** 研究了麦角固醇发酵过程中的参数。比较了溶氧、OUR、pH 和残糖浓度与酿酒酵母的生物量和麦角固醇含量的关系,并研究了这些参数之间的内在联系。研究表明,溶氧能比较准确地反映酵母的生长状况,是发酵过程中的一个较好的控制参数。将溶氧控制在 12% 左右能有效提高单位体积发酵液中的麦角固醇的产量。

**关键词** 酿酒酵母, 麦角固醇, 发酵, 流加

**中图分类号** Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0693-05

麦角固醇是维生素 D<sub>2</sub> 的前体,还可用于生产可的松和激素黄酮体<sup>[1]</sup>。因此,寻找有效的控制参数,改善发酵工艺,对于提高维生素 D<sub>2</sub> 生产水平有重要的意义。

目前,麦角固醇发酵工艺的改善主要从优化培养基、改良菌种和优化控制参数等方面入手。不同的碳源、氮源及其它营养物质对发酵有不同影响,优化培养基配方可使发酵中麦角固醇含量提高到 2% 左右<sup>[2-4]</sup>。利用原生质体融合技术得到的高产麦角固醇菌种,生物量达 2.45%,麦角固醇含量达细胞干重的 3.07%<sup>[5]</sup>;有研究表明麦角固醇的合成是氧利用率的函数,而不依赖于细胞的生长;乙醇对酵母发酵有明显的影响<sup>[6,7]</sup>。

酵母菌所处的环境不同,其形态、生理生长及繁殖也有所不同。发酵过程中环境参数和细胞的生理参数都对产量有直接或间接的影响。这些参数之间往往有着内在的联系,对这些参数的研究,有助于寻找最优发酵条件<sup>[8,9]</sup>。在发酵过程中,酵母菌优先利用葡萄糖作为碳源。当葡萄糖被耗尽时(或糖浓度达到较低点),酵母的生长受到限制,经短暂的迟滞适应期后,转而利用第一阶段生成的乙醇作为碳源。整个过程表现为二阶段生长曲线<sup>[1]</sup>。而麦角固醇的合成是氧利用率的函数,并不依赖于细胞生长,含量随着比生长速率的减小而提高<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

中科院微生物所提供的酿酒酵母 AS 2.605,经涂布、稀释、划线选择重新编号为:A-3。

### 1.2 实验方法

将冷藏于冰箱内的菌种活化后转接至平皿,30 ± 0.1℃ 下培养 20 ~ 24h,再转接入摇瓶中,30℃ ± 0.1℃,170r/min 培养 20 ~ 24h,镜检无杂菌且生长良好,即可上罐。发酵罐采用英国 LH 公司 20L 发酵罐系统。初始发酵液体积为 6L,115℃ ~ 121℃ 灭菌 20min。接种密度为 18% ~ 20%,发酵温度为 30℃,搅拌转速 400r/min,空气流量 15L/min,罐压 0.3 ~ 0.4Mpa。从发酵开始,每 0.5h 记录状态参数,包括温度、pH、搅拌转速、溶氧、罐压、空气流量、尾气氧浓度等,每 2h 或 3h 取 1 次样,离心(5000r/min, 20min)分离。

### 1.3 分析方法

采用分光光度计(752G 型紫外分光光度计)与液相色谱(硅胶柱,流动相:石油醚和乙酸乙酯的混合物,流速 1mL/min,紫外检测波长 254nm)对应的方法,利用二元线性回归,拟和求得如下公式计算酵母菌中的麦角固醇含量。(拟合常数  $K_{280} = 97.40\mu\text{g/mL}$ ,拟合常数  $K_{230} = 9.17\mu\text{g/mL}$ )麦角固醇溶液浓度  $C_e = K_{280} OD_{280} - K_{230} OD_{230}$ ,麦角固醇含量(%) =  $C_e$

收稿日期:2001-04-18,修回日期:2001-09-05。

基金项目:国家“九五”科技攻关项目(96-C02-03-03)。

\* 通讯作者。 Tel:86-10-64434778; Fax:86-10-64715443

$\cdot V \cdot a / (\text{mass} \cdot 10^4)$  ( $OD_{230,280}$ —230, 280nm 时的吸光度;  $V$ —样品体积, mL;  $a$ —稀释倍数)

发酵尾气中氧含量采用磁氧分析仪(北京分析仪器厂, BF-OXYGOR6N 型)分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物量

本论文中的生物量均指的是单位体积发酵液中的酵母菌烘干后的干菌重(单位: g/100mL)。

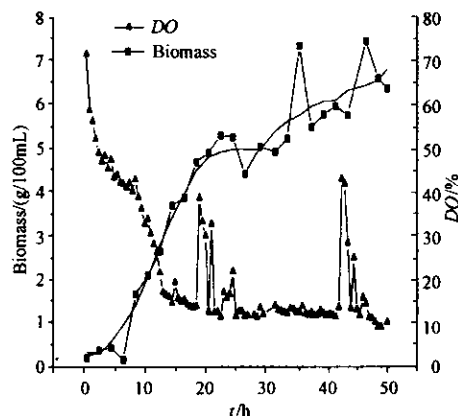


图1 生物量与 DO 的关系  
Fig.1 Effect of DO on biomass

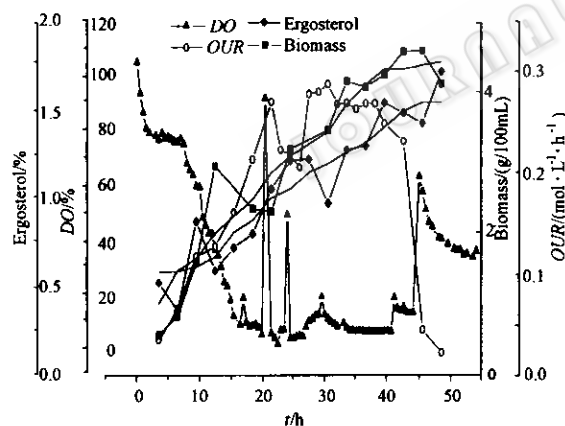


图2 生物量、麦角固醇含量与 DO、OUR 的关系  
Fig.2 Effect of DO and OUR on biomass and ergosterol

**2.1.1 生物量与溶氧(DO):**酿酒酵母可分别在有氧和无氧的条件下进行糖的分解代谢。在有氧条件下,通过呼吸作用,将糖分解为二氧化碳和水,并获得能量;在厌氧条件下,则将糖降解成分子量比较小的中间代谢产物,并由此生成乙醇、甘油和其它糖醇。因此,溶氧值是发酵过程中的相当重要的参数。由图1可以看出,在发酵初期,生物量基本保持不变,细胞处于延迟期合成新的酶系以适应环境,溶氧值迅速下降,但下降的总趋势是逐渐趋缓的;当到了

指数生长期,酵母生长迅速,生物量呈指数上升,这种迅速的生长依赖于对氧的大量消耗,所以溶氧在此期间迅速下降,同时由于初始糖浓度较高,细胞主要进行厌氧代谢,产生大量的乙醇,当糖被消耗至较低的浓度时,酵母就会由于缺乏碳源而生长停滞,溶氧会迅速升高;此时如不及时补糖,酵母就会逐渐合成新的酶系以利用乙醇进行二次生长;如及时补糖,则溶氧值会随着糖的消耗而逐渐下降。这样,可以根据溶氧值来控制菌体的生长。

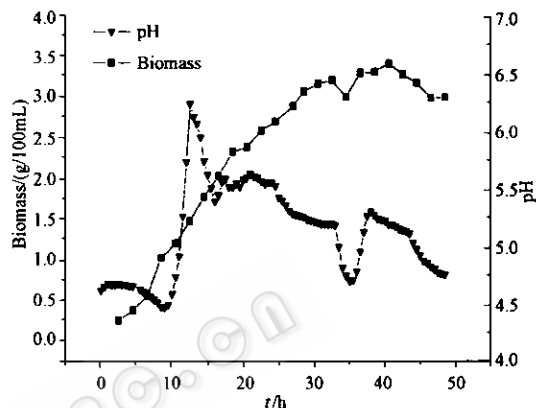


图3 生物量与 pH 的关系  
Fig.3 Effect of pH on biomass

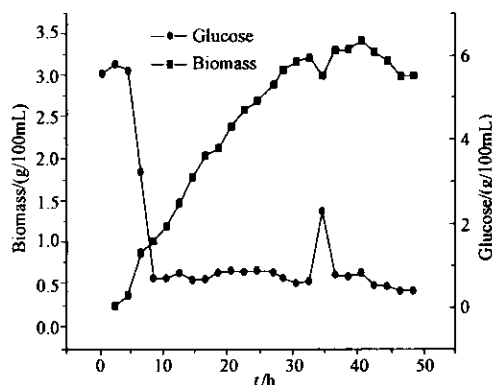


图4 生物量与残糖浓度的关系

Fig.4 Effect of glucose concentration on biomass

在发酵后期,酵母菌的生物量可达到 5 ~ 6g/100mL。

**2.1.2 生物量与摄氧率(OUR):**发酵过程中细胞的摄氧率直接关系到酵母菌的正常生长。从图2可以看出,在发酵前期,生物量与 OUR 基本保持线性关系,尤其是在流加之前的指数生长期内的生物量与 OUR 的线性相关系数达 0.9。发酵后期酵母的活力已经大大降低,细胞逐渐衰老,甚至自溶,尾气中氧含量迅速回升,OUR 迅速降低接近 0。因此,OUR 是一种较好的反映酵母生长的参数。

**2.1.3 生物量与 pH:**发酵初期,酵母利用葡萄糖作为碳源,此过程中会生成一些有机酸,从而导致了 pH 的持续降低;同时,也由于发酵过程中产生了二氧化碳,在一定的罐压下,二氧化碳部分溶于水,增加了发酵液的酸性;到了大约 10h 之后,糖浓度降低到较低点之后不久(与此同时,溶氧值也降低到了控制范围左右),pH 开始迅速升高,在短短的 2~3h 之内绝对变化为 2。这可能是由于代谢中产生了碱性物质或是大量消耗有机酸;或者,在厌氧条件下丙酮酸经脱羧酶的催化,由 NADH 还原形成乙醇(与此对应,尾气中的二氧化碳含量也呈增长趋势),此过程是个消耗  $H^+$  的过程。这个过程只有约 3~4h,之后又逐渐降低。据推测,可能又产生了耗碱反应或是酸性物质。到 17~18h 之后,开始流加补糖,此后发酵液的 pH 主要受流加培养基的影响。pH 缓慢下降,而生物量在指数生长期之后就缓慢上升。pH 的波动也会对生物量造成一定的影响,如图 3,发酵至 35h, pH 由于补糖不合适而有明显的降低,与之对应,生物量也向下波动。这说明酸性太大的环境,对酵母细胞的生长有抑制,这种抑制,可能体现在对某种酶的作用上。

**2.1.4 生物量与残糖浓度:**残糖浓度体现了发酵过程碳源的供应情况。糖的供应充足,可以保持较快的比生长速率。但这样造成糖的利用率较低,所以应将之控制在适当的范围。糖的在线测量不易实现,所以常采用控制溶氧范围来控制糖浓度在 5g/L 左右。如图 4,在合适的糖浓度下,酵母生长良好,如果一次补糖太多,会加大需氧量,导致溶氧值降低至临界溶氧值之下,在厌氧条件下,生成乙醇,降低了生物量和基质利用率(如图 4 中 35h 处),并且不利于麦角固醇的合成。

**2.2 麦角固醇(Ergosterol)含量**

本论文中的麦角固醇含量指的是麦角固醇对于酵母菌的百分含量。

**2.2.1 麦角固醇含量与 DO:**DO 对麦角固醇的合成具有重要作用。如图 5,发酵进行到第 18~19h,由于流加的开始,溶氧值有较大的下降,与之对应,麦角固醇含量随后也有所降低;发酵到第 30h,也出现了类似的情况。而 22h 和 36h 的溶氧突然上升都伴随着随后几个小时内的麦角固醇含量的持续上升。这说明了麦角固醇的合成依赖于供氧。因此在发酵过程中应该注意控制溶氧值,不可过低,但也要与酵母的生长相适应。

**2.2.2 麦角固醇含量与 OUR:**OUR 对麦角固醇的合

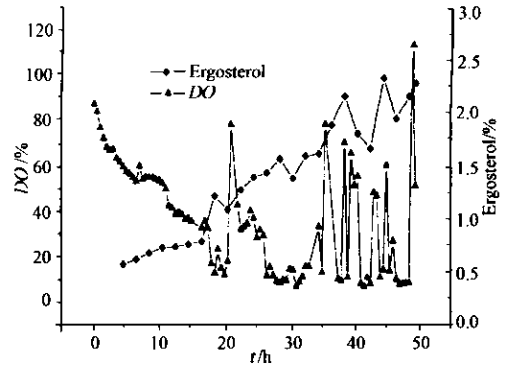


图 5 麦角固醇含量与 DO 的关系  
Fig.5 Effect of glucose concentration on ergosterol content

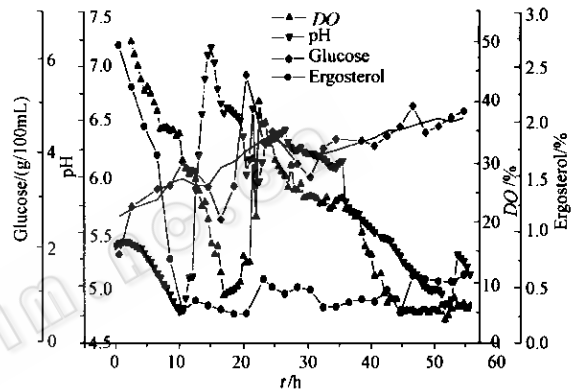


图 6 麦角固醇含量与残糖浓度、DO、pH 的关系  
Fig.6 Effects of glucose concentration, DO and pH on ergosterol content

成的影响与搅拌转速、通气量等都有关系。如图 2 所示,单一的 OUR 对麦角固醇的含量并没有明显的关系,这两个值都是随着时间增加的函数,但在发酵快要结束时,OUR 会大幅度降低。在发酵后期,尾气氧含量迅速回升,摄氧率降低并没有使得麦角固醇含量也随之降低。这说明,此时合成麦角固醇的前体未受明显的抑制作用。由于麦角固醇是由乙酰辅酶 A 合成二羟甲基戊酸,进而转变成鲨烯,环化成酵母甾醇,直至生成麦角固醇的过程。所以,可以推断出,这个过程酶系受溶氧的影响较小。

**2.2.3 麦角固醇含量与 pH:**pH 在发酵中受流加培养基的影响比较大,上面已经分析过 pH 的大致变化。从图 6 中发现, pH 的突然上升不利于麦角固醇的合成,这可能是由于酵母在生长过程中生成了某种物质,这种物质对麦角固醇的合成有一定的抑制作用。在 20~25h 之间, pH 回落,可以明显发现麦角固醇含量随之提高,之后的两次 pH 和麦角固醇的相应变化,也同样说明了 pH 与麦角固醇含量有

密切的关系,这种关系可能与酵母的代谢和麦角固醇的合成机理相关。因为动物体内羟甲基戊二酰辅酶 A 被还原成二羟甲基戊酸的反应受胆酸控制,可据此推测酵母合成麦角固醇的过程中亦有类似的控制。酶的活性可能与麦角固醇的某些酸性衍生物有关。

**2.2.4 麦角固醇含量与残糖浓度:**由于碳源的补加对发酵液的 pH 值有较大的影响,而 pH 又和麦角固醇的含量密切相关,所以,残糖浓度是麦角固醇含量比较重要的影响因素之一。由图 7 可以看出,发酵初期,糖浓度下降很快,与此相应,麦角固醇也积累较快,而中后期,糖的浓度基本保持稳定,麦角固醇也缓慢上升。这可能是由于此时受溶氧和糖浓度的综合作用,生物量已经增长趋缓,OUR 比较稳定,利于麦角固醇的逐渐积累。由图 7 可明显看出,麦角固醇的合成有一定的振荡趋势,这种振荡的趋势可能是由于间歇性的酶抑制造成的,具体机理有待研究。

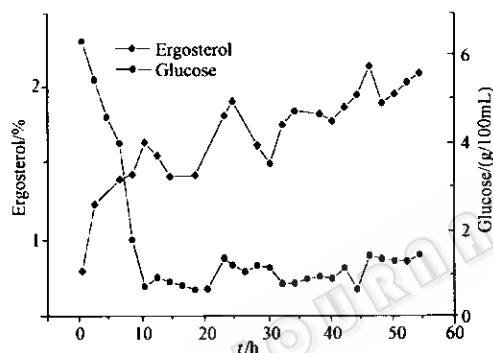


图 7 麦角固醇含量与残糖浓度的关系

Fig.7 Effect of glucose concentration on ergosterol content

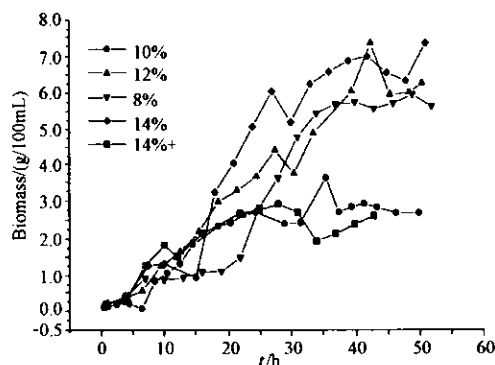


图 8 不同溶氧条件下生物量的比较

Fig.8 Comparison of biomass under different DO conditions

## 2.3 溶氧(DO)

如前所述,溶氧在发酵过程中有比较重要的控

制作用,可以通过它来调节糖浓度,从而有效控制生物量和麦角固醇含量朝着所希望的方向生长。

**2.3.1 DO 与 OUR:**发酵过程中,应尽可能将溶氧维持在临界值以上,以利于糖的充分利用以及氧充足时麦角固醇的合成。OUR 在流加前逐渐增大,流加后受溶氧的限制而保持得较为稳定,在 30h 左右,溶氧的增加对应了 OUR 的增加。在发酵的初期和后期,OUR 基本与溶氧增减趋势相反,其倒数与 DO 相对应。因此,可以由较易检测和控制的溶氧值来反映 OUR 的变化情况。DO 与 OUR 的这种密切关系,可能与酵母的呼吸作用有关。在发酵的对数生长初期,氧刺激酵母生长,这是由于与呼吸作用相关联的代谢途径可提供细胞组成的前体物。

**2.3.2 DO 与残糖浓度:**溶氧可以在发酵过程中与残糖浓度互相影响(图 6)。如果实验中流加不及时,溶氧会迅速升高,补入糖之后,溶氧的下降稍有滞后。残糖浓度较高会降低溶氧,细胞生长较快;但太高的糖浓度则会限制细胞呼吸,使之转入厌氧发酵;低糖浓度会使溶氧增加,因此溶氧的变化体现了菌体对糖的需求,可以通过控制补糖来控制溶氧,从而实现发酵的优化操作。

**2.3.3 DO 与 pH:**根据上面的分析,糖浓度影响着溶氧值,而糖浓度在开始流加后又直接影响 pH。所以由图 6 可以看出在开始流加(即发酵的第 18h)之后,溶氧值与 pH 变化趋势基本相同,保持同增同减,但由于酵母菌生长特性,有一定的滞后。溶氧与生物量和麦角固醇含量的关系见图 1 和图 5,从图可以看出,溶氧确实可以反映出酵母菌当时的生长状况。

**2.3.4 最佳溶氧范围:**由以上分析可知,溶氧值必须处于一个合适的范围才能最大程度地提高基质的利用率,并且使生物量和麦角固醇含量都相对较高,最终达到提高生物量和麦角固醇含量的乘积-总麦角固醇含量(单位:mg/L 发酵液)的目的。实验研究了不同的溶氧值范围对生物量和麦角固醇含量的影响,比较如图 8、9、10。由图可以看出,对于生物量,14%的溶氧显然优于其它几种范围(此范围指的是如图所标的值上下浮动 1%);对于麦角固醇含量,10%和 12%比其它的范围含量要高;综合考虑,在发酵过程中,溶氧值应控制在 12%左右,此时的总麦角固醇含量最高。(注:以上实验数据分别为不同发酵批次所得)

## 2.4 结论

在酵母发酵的过程中,溶氧、OUR、pH、残糖浓

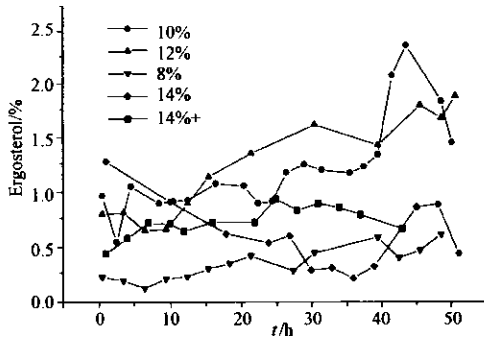


图 9 不同溶氧条件下麦角固醇含量的比较

Fig.9 Ergosterol content under different DO conditions

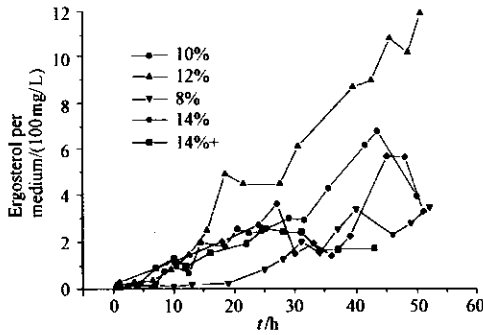


图 10 不同溶氧条件下总麦角固醇含量的比较

Fig.10 Total yield under different DO conditions

度等参数都分别对生物量和麦角固醇含量有一定的影响,研究这些参数之间的关系,从而准确地检测和控制这些参数可以有效控制整个发酵体系,使得体系朝着希望的方向生长。溶氧简单易测,且能有效反映糖浓度、OUR、pH 等参数的变化,是比较理想的控制参数。通过比较可以确定,对于本实验中的酿酒酵母的发酵体系,维持溶氧在 12% 左右可以获得较多的麦角固醇含量。

(注:本论文中发酵方式采用指数流加或脉冲式

流加,因此在某些图中糖浓度及溶氧值波动较大。)

## REFERENCES(参考文献)

- [1] CHEN S Y(陈思斌),XIAO P X(萧佩熙). Biochemistry of yeast Cell(酵母生物化学), Ji'nan: Shandong Science and Technology Press(山东科学技术出版社),1990
- [2] LIU Y D(刘永东). Research on Ergosterol Fed-batch Fermentation (麦角固醇流加发酵过程的研究), Dissertation (MS) of Beijing University of Chemical Technology (北京化工大学硕士学位论文),1998
- [3] QIAN S G(钱寿根) et al. Ergosterol production-5L bottle shaken-flask experiments, *Industrial microorganism* (工业微生物), 1988, 18(5):18
- [4] YANG X H(杨新华) et al. Research on the production of ergosterol by glucose medium, *Starch and Starch carbohydrate* (淀粉与淀粉糖), 1995, 1:25 ~ 30
- [5] ZHANG B R(张博润), HE X P(何秀萍), TIE C J(铁翠娟) et al. The construction of high ergosterol-production strains and study of the optimal conditions for culture. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, 15(1):46 ~ 51
- [6] Lamacka M, Sajbidor J. Ergosterol determination in *Saccharomyces cerevisiae* comparison of different methods. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(10):723 ~ 725
- [7] Salmon, Jean-Michel et al. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86(2):154 ~ 163
- [8] Chi Z, Arneborg N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 86:1047 ~ 1052
- [9] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Initiation of anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* by amina acids or nucleic acids bases:ergosterol and unsaturated fatty acids cannot replace oxygen in minimal media. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*, 1998, 21:247 ~ 253

## Analysis of Parameters for Optimum of Ergosterol Fermentation

GAO Hua TAN Tian-Wei\*

(Department of Biochemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract** Parameters in the process of ergoterol fermentation are studied. The relationship between biomass, ergosterol content in *Saccharomyces cerevisiae* and parameters such as DO, pH, OUR, glucose concentration, are discussed. Because of its good manipulation in yeast fermentation process, DO can thus serve as an effective control parameter. DO at about 12% ( $\pm 1\%$ ) can enhance the total yield of ergosterol considerably.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, ergosterol, fermentation, fed-batch

Received: April 18, 2001

This work was supported by Project of Chinese National Ninth-five Programs for Science and Technology Development (96-C02-03-03).

\* Corresponding author. Tel:86-10-64434778; Fax:86-10-64715443