

透明颤菌血红蛋白的表达对酵母中麦角固醇合成的影响

范楠¹ 李炎¹ 周全² 陈国强^{2*}

(¹ 暨南大学食品研究与开发中心, 广州 510632; ² 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘 要 构建了含透明颤菌(*Vitreoscilla*)血红蛋白基因 *vgb* 和酵母遗传霉素(G418)抗性基因的重组质粒 pVgb-kan-MX4, 转化至酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 1190 中, 经过分析, 基因 *vgb* 在酵母细胞中得到表达。对重组菌和野生菌进行了摇瓶培养及 5 L 发酵罐培养的研究。在摇瓶实验中, 重组菌的麦角固醇产量比野生菌有显著提高, 在野生菌中的含量为 0.573%, 而在重组菌中的产量为 1.07%。经过 30 h 发酵罐培养的试验, 野生菌中麦角固醇含量为 0.9%, 重组菌中其含量为 1.38%, 验证了摇瓶实验的结果。结果证明 *vgb* 基因有利于酵母中麦角固醇的合成。

关键词 透明颤菌血红蛋白基因, 麦角固醇, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0441-04

麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成成分, 化学名称为 24 β -甲基胆固醇-5,7 烯-3 β -羟基, 又称麦角甾醇。它是脂溶性维生素 D₂ 的前体, 受紫外线照射时转化为维生素 D₂, 后者是维生素 D 的主要成分之一^[1]。

生产麦角固醇的方法有两种, 一是采用酵母发酵法; 另一种是从青霉菌丝体中提取麦角固醇。国内外多采用酵母发酵法生产麦角固醇^[2], 因为发酵法生产出的麦角固醇产量高; 但由于国内工艺落后, 相比提取法, 发酵法的成本较高^[3]。而改善发酵工艺主要是从优化培养基、改良菌种和优化控制参数等方面入手。有研究表明, 麦角固醇的合成具有氧化代谢的特征, 具有氧有助于麦角固醇的合成^[4]。因此, 加强菌体的氧化代谢水平会对麦角固醇的生成具有促进作用。但传统的改善发酵液中的氧传递的方法对设备要求高, 能量消耗大, 增加了发酵成本^[5]。

细菌血红蛋白是透明颤菌(*Vitreoscilla*)在贫氧环境下诱导产生的原核细胞中的血红蛋白, 结构基因长 438bp, 编码 146 个氨基酸, 相对分子量 15775。透明颤菌血红蛋白是以氧合态参与和氧有关的代谢, 通过将氧传递给呼吸链, 而调节末端氧化酶的活性, 改变氧化磷酸化的效率, 进而改变低氧条件下的代谢途径, 以至影响到某些基因的表达。它能够从分子水平上提高基因 *vgb* (*Vitreoscilla* hemoglobin gene)克隆菌对氧气的利用能力。其应用不仅可以降低氧气及能量的消耗, 还不需要附加的设备投资, 因此可大大降低发酵成本^[6-9]。

本文首次尝试将透明颤菌血红蛋白的结构基因 *vgb* 转入酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 1190 中, 使其在受体菌中表达,

考察其对菌体氧化代谢水平及麦角固醇产量的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

实验中所用的酿酒酵母 1190 号菌来源于清华大学生物系微生物实验室。

pYES2-kanMX4 是一种大肠杆菌和酵母菌的穿梭质粒, 它在大肠杆菌中对卡那霉素有抗性, 而在酵母菌中对遗传霉素有抗性^[10]。

pVgb-EX1 由中科院微生物所江宁教授惠赠。

1.2 重组菌株的构建

将质粒 pVgb-EX1 经 *Kpn* I 和 *Pvu* II 酶切后, 得到 1.7kb 的插入片段(含 *vgb* 结构基因), 将该片段连接到质粒 pYES2-kanMX4 的 *Kpn* I 和 *Pvu* II 的位点上, 构建了质粒 pVgb-kanMX4 通过化学转化的方法转入到 *Saccharomyces cerevisiae* 1190 中。质粒构建过程如图 1。

1.3 摇瓶培养基及培养条件

本实验中所使用的培养基有:

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10, pH 7.0。

YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, pH 5.5。

所有微生物的培养条件均为 30℃, 24 h, 摇床转速 200 r/min (NBS Series 25D, New Brunswick, NJ, 美国)。

1.4 发酵罐培养基及培养条件

发酵罐培养基(g/L): 酵母提取物 10, 葡萄糖 40, 蛋白胨

20. 补料中含 40 g 葡萄糖 ,与发酵 10 h 后每隔 6 h 补料一次。为了保持重组菌中质粒 pVgb-kanMX4 的稳定性 ,在重组均的发酵罐培养基中加入了遗传霉素(200 mg/L)。

发酵罐培养条件 :发酵有效体积 3 L 30℃ ,pH 5.5 ,通气量 2 L/min 过滤空气 ,溶氧 D.O. 通过搅拌自动控制在 15% ,搅拌转速控制范围为 200 ~ 800 r/min ;分批补料培养 30 h ,接种量 :10% (V/V)。种子用 YPD 培养基(10 g/L 酵母粉) 20 g/

L 蛋白胨 40 g/L 葡萄糖)加入遗传霉素 200 mg/L)在 30℃ 、转速 200 r/min 摇床 (NBS Series 25D , New Brunswick , 美国) 中培养 12 h。所用发酵罐为自动控制的 NBS 3000 (NBS ,New Brunswick , 美国)。

1.5 分析方法

VHb 基因表达的分析参照文献 [11] ,细胞干重(Cell Dry Weight)CDW、麦角固醇的提取及定量分析参照文献 [12]。

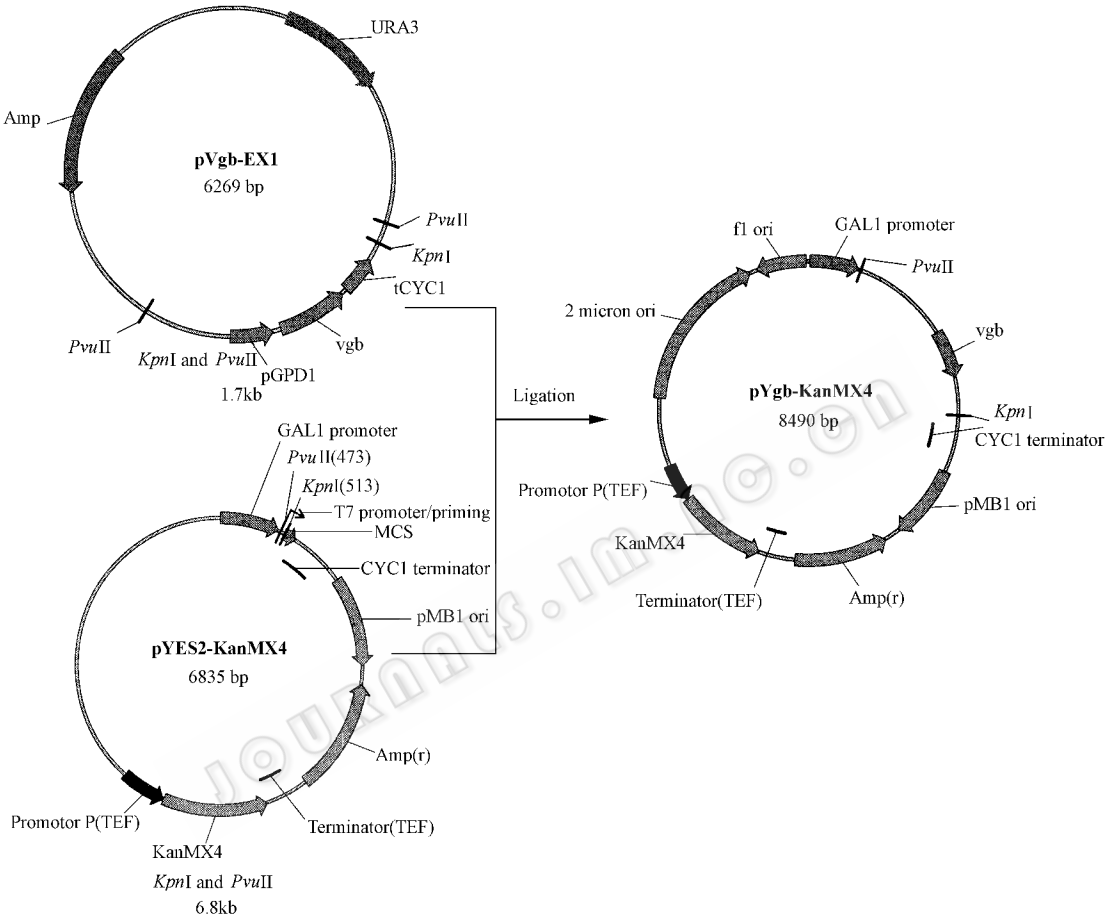


图 1 质粒 pVgb-kanMX4 的构建过程
Fig. 1 Construction of plasmid pVgb-kanMX4

2 结果及讨论

2.1 构建含透明颤菌血红蛋白基因(*Vitreoscilla Hemoglobin Gene*)的 *Saccharomyces cerevisiae* 1190 重组菌 *S. cerevisiae* 1190(pVgb-kanMX4)

将经测序证实的质粒 pYES2-kanMX4 及质粒 pVgb-EX1 经 Kpn I 和 Pvu II 酶切后 ,分别回收所需片段 ,连接后转化至大肠杆菌中 ,用含卡那霉素的 YPD 平板筛选重组菌。将经过验证的质粒 pVgb-kanMX4 转化至酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 1190 用含 C418 的 YPD 平板筛选重组菌。提取重组质粒酶切验证 (图 2)。

2.2 透明颤菌血红蛋白基因(*Vitreoscilla Hemoglobin Gene*)表达产物的测定

在 YPD 培养基中培养重组菌 ,好氧培养条件为 30℃ 、

200 r/min 摇床 ,限氧培养条件为密封摇瓶于 30℃ 培养箱中。收集细胞后定量分析 VHb ,结果如表 1 所示。实验结果表明

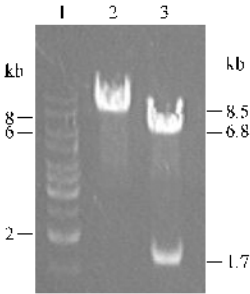


图 2 酵母菌中质粒 pVgb-kanMX4 的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of plasmid pVgb-kanMX4 from *S. cerevisiae* 1190
1 : DNA Marker 2 : pVgb-kanMX4/ Kpn I ;
3 : pVgb-kanMX4/ Kpn I + Pvu II

vgb 在酵母 *S. cerevisiae* 1190 中已得到表达。在限氧条件下表达量没有好氧条件下高,可能的原因是细胞培养的条件可能无法最大限度发挥启动子启动转录的能力,导致外源基因无法高效表达。

表 1 重组菌细胞中细菌血红蛋白含量的测定

Table 1 Vhb activity in recombinant strains

Strains	Vhb activity under rich oxygen (nmol/g wet cell)	Vhb activity under limited oxygen (nmol/g wet cell)
Recombinant	7.60	1.97

Annotation :The strains were inoculated on a rotary shaker (NBS Series 25D)
at 30 ℃ and 200 r/min for 24 h.

2.3 摇瓶培养时氧气供应对麦角固醇合成量的影响

在摇瓶中以同样的培养条件培养重组菌和野生菌,分别把发酵培养基装成 50、100、150、200 mL 不同装液量与 500 mL 培养基中,按 10% 接种量接种。以 1.5 所描述的方法测定麦角固醇含量。测定结果如图 3 所示。发现重组菌麦角固醇含量明显比野生菌中的高,从结果看来, *vgb* 的表达对菌体产生麦角固醇的代谢存在影响,有利于麦角固醇的合成。在装液量为 50 mL 时,重组菌中麦角固醇的含量为 1.07% ,野生菌麦角固醇的含量为 0.573% ,装液量为 100 mL 时,在野生菌和重组菌中,麦角固醇的含量都与 50 mL 装液量时相比变化不大;当装液量超过 100 mL 时,随装液量的增多,麦角固醇合成量逐渐减少的,在装液量为 200 mL 时,重组菌中麦角固醇的含量为 0.956% ,而野生菌中麦角固醇的含量为 0.5% 。同时比较有挡板的摇瓶和无挡板摇瓶的培养结果发现,使用有挡板的摇瓶麦角固醇的产量都比用无挡板摇瓶培养的高,说明麦角固醇的合成需要良好的通气条件,这可能与麦角固醇合成机理有关,酵母菌首先将糖转化为乙醇,然后经过需氧发酵将乙醇转化为麦角固醇^[13]。

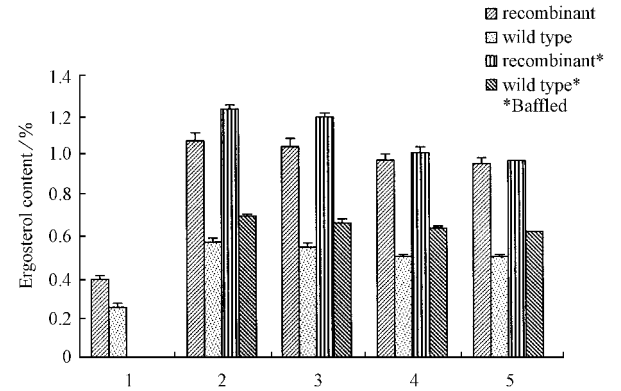


图 3 氧气供应对麦角固醇合成的影响

Fig.3 Influence of aeration intensity on ergosterol production by wild type and recombinant *S. cerevisiae* strain 1190

Column 1 indicated a still stand process ; Column 2 ~ 5 showed that the experiment was carried out in 500 mL shake flasks containing 50 , 100 , 150 and 200 mL culture media , respectively. They were inoculated on a rotary shaker (NBS Series 25D) at 30 ℃ and 200 r/min for 24 h

从图 3 可以看出,在限氧培养条件下, *vgb* 对菌体产生麦角固醇代谢的影响没有好氧培养条件下的影响明显。原因可能是与 *vgb* 的表达量有关^[6]。

2.4 麦角固醇在野生酿酒酵母和重组酿酒酵母中的合成动力学

在 30 h 的发酵罐发酵培养中,野生菌获得了 14.48 g/L 的细胞干重 (CDW) ,0.9% 的麦角固醇含量;重组菌获得了 15.1 g/L 的细胞干重 (CDW) 1.38% 的麦角固醇。在整个发酵过程中,DO 值控制在 15% ,发酵 12 h 后重组菌的细胞积累高于野生菌,说明 *vgb* 基因影响了细胞内的代谢途径,但效果不太明显,原因可能是 (1) 表达 *vgb* 的载体是酵母 YCp 的质粒,该质粒在细胞中的拷贝数很低,致使外源基因表达水平不高 (2) *vgb* 结构基因中所用的密码子与酵母细胞中的密码子的使用频率可能存在差异,如果使用了低频率的密码子,会导致翻译水平下降^[14]。

发酵罐发酵培养的结果验证了摇瓶实验的结果, *vgb* 基因的表达有利于麦角固醇的合成 (图 4)。

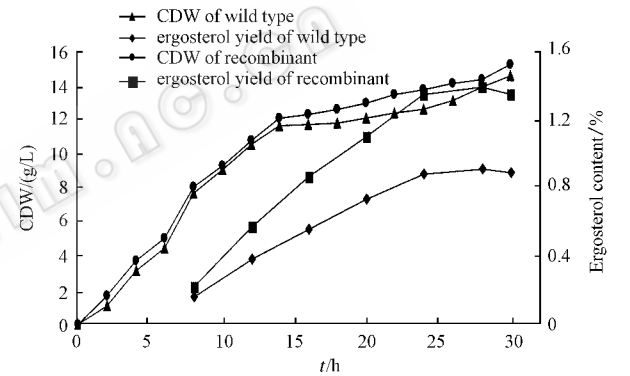


图 4 麦角固醇在野生酿酒酵母和重组酿酒酵母中的合成动力学

Fig.4 Ergosterol production by wild type *S. cerevisiae* and recombinant *S. cerevisiae* , respectively

3 结论

本研究首次把 *vgb* 基因用于增强麦角固醇在酿酒酵母中的合成。在 *S. cerevisiae* 1190 中构建含 *vgb* 基因的质粒,利用其可提高氧利用率的功能进而提高麦角固醇的产量。在摇瓶实验中,重组菌的麦角固醇产量比野生菌有显著提高。好氧培养时在野生菌中的产量为 0.573%、而在重组菌中的产量为 1.07%。在限氧的环境下,由于酵母细胞不能合成甾醇环,会抑制麦角固醇的合成,野生菌中麦角固醇的产量仅为 0.25% ,而重组菌中由于 *vgb* 基因的表达,提高了氧在呼吸链上的流动性,降低了细胞内的氧浓度,提高了菌体自身的摄氧能力^[9] ,所以麦角固醇的产量较野生菌中的有所提高为 0.39%。通过装液量梯度实验可以考察出氧气供应对麦角固醇合成的影响,同时进一步说明了基因 *vgb* 对麦角固醇产量的影响。经过 30 h 发酵罐培养的实验,野生菌中麦角固醇含量为 0.9% ,重组菌中其含量为 1.38% ,也验证了摇瓶实验的结果。结果证明 *vgb* 基因有利于酵母中麦角固醇的合成。

由于 *vgb* 基因的作用效果与其表达量有关^[6],为了最大的限度发挥其作用,在以后的研究中将 *vgb* 基因重组到酵母染色体上可能会解决这一问题。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shen T(沈同), Wang JY(王镜岩). Biochemistry. Beijing :High Education Press(高等教育出版社), 1999 , pp. 64 – 65
- [2] Shi XY(史新元), Qi YZ(戚以政), Tan TW(谭天伟). The study on optimal control of yeast fed-batch fermentation for ergosterol production. *J Beijing Univ Chem Technol* , 2001 , **28**(2): 1 – 3
- [3] Zhang ZM(张照明), Tan TW(谭天伟). Market prospects of ergosterol. *Fine and Special Chemical* (精细与专用化学品), 2002 , **22** : 9 – 10
- [4] He XP(何秀萍), Zhang BR(张博润). Research advance on the study of ergosterol. *Microbiol* (微生物学通报), 1998 **25** (3): 166 – 169
- [5] Tan TW(谭天伟), Zhang M(张明), Gao H(高宏). Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Micro Technol* , 2003 , **33** (4): 366 – 370
- [6] Zhou Y(周煜), Liu DX(刘涤), Hu ZB(胡之璧). Advances in the research and Utilization of *Vitreoscilla* hemoglobin. *Pharm Biotechnol* , 2000 , **7** (4): 251 – 253
- [7] Yu HM(于慧敏), Shen ZY(沈忠耀). Progress in research of *Vitreoscilla* hemoglobin and *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Acta Microbio-*

logica Sinica (微生物学报), 1999 , **39** (5): 478 – 482

- [8] Zheng R(郑荣), Zhu BQ(朱宝泉). Advances in research and application of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Chinese J Pharm* , 1994 , **25** (10): 472 – 478
- [9] Guo HQ(郭宏秋), Yang SL(杨胜利). Summarize of application of *Vitreoscilla* hemoglobin in fermentation industry. *Microbiol* (微生物学通报), 1996 , **23** (4): 227 – 230
- [10] Lin HJ(林会兰), Zhang Q(张广), Zhou Q(周全) *et al.* Construction of yeast vectors with resistance to geneticin. *Tsinghua Sci Technol* , 2002 , **7** (4): 384 – 386
- [11] Yu HM(于慧敏), Shi Y(史悦), Shen ZY(沈忠耀), Yang SL(杨胜利). Carbon monoxide difference spectrum analysis of *Vitreoscilla* hemoglobin in recombinant *E. coli*. *Tsinghua Sci Technol* , 2002 , **42** (5): 615 – 618
- [12] Xu XF(许旭萍), Li HZ(李惠珍), She CX(余晨兴) *et al.* Study on the optimal fermentation conditions for the ergosterol-production from *Torulopsis farnata*. *J Biology* , 2002 , **19** (2): 15 – 17
- [13] Yang XH(杨新华). Research on the production of ergosterol by glucose medium. *Starch and Starch carbohydrate* (淀粉与淀粉糖), 1995 , **1** : 25 – 30
- [14] He R(贺鹏), Lu DJ(卢大军), Wang QH(王钦宏) *et al.* Cloning and expression of Vhb gene in D-arabitol producing yeast. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2001 , **41** (3): 315 – 319

Enhanced Ergosterol Production by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 1190 Harboring *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene (*vgb*)

FAN Nan¹ LI Yan¹ ZHOU Quan² CHEN Guo-Qiang^{2*}

¹(Department of Food Science and Engineering , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

²(Department of Biological Sciences and Biotechnology , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract Ergosterol is a principal sterol of fungi. It is a raw material for production of vitamin D₂, hydrocortisone, progesterone and brassinolide. Synthesis of ergosterol requires molecular oxygen, and low oxygen tensions was reported to dramatically reduce ergosterol concentration. *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene (*vgb*), a homodimeric hemoglobin gene from Gram-negative obligate aerobic bacterium *Vitreoscilla*, enables a higher specific cellular oxygen uptake rate, it also improves the oxygen transportation. In this study, recombinant plasmid pVgb-kanMX4 containing *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene (*vgb*) and geneticin (G418) was constructed and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* 1190 for enhanced ergosterol production. With sufficient oxygen supply, the ergosterol contents of recombinant and wild type strains grown in shake flasks were 1.07% and 0.573%, respectively. Under oxygen limitation condition, ergosterol contents in recombinant and wild type strains were reduced to 0.39% and 0.25%, respectively. In a 30 hours fermentation study conducted in a 5 liter fermentor, 15.1 g/L Cell Dry Weight (CDW) containing 1.38% ergosterol was obtained from growth of the recombinant strains; Only 14.8 g/L CDW containing 0.9% ergosterol was produced by the wild type strain. These results demonstrated that *vgb* played a role in enhancing ergosterol production.

Key words *Vitreoscilla* hemoglobin gene, ergosterol, *Saccharomyces cerevisiae*