

用酵母生产麦角固醇发酵工艺的研究

谭天伟 戚以政 郭文彦

(北京化工大学化工系, 北京 100029)

张博润 刘玉方

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 研究了培养基中氮源、盐、温度、pH 对酵母合成麦角固醇的影响。当选择复合氮源, 蔗糖浓度为 10%~12%, 温度为 30℃, pH 为 5.5 时, 麦角固醇合成量相对于初始培养基提高了 3 倍。在 2L 发酵罐中探讨了蔗糖浓度、通气量对麦角固醇合成的影响, 结果表明, 高浓度蔗糖及大通气量对麦角固醇合成有一定抑制作用。通过流加蔗糖可显著地提高酵母麦角固醇合成量。

关键词 麦角固醇, 酵母

麦角固醇是一种重要的医药化工原料, 如用于“可的松”、“激素黄体酮”的生产。麦角固醇还是维生素 D₂ 前体, 维生素 D₂ 在调节生命代谢功能上有重要作用。国外麦角固醇生产主要采用微生物发酵法, Wenck 采用曲霉菌生产麦角固醇, 麦角固醇含量占细胞干重 2.23%^[1]。Savard 采用青霉菌生产麦角固醇, 产量达细胞干重 1.8%^[2]。Eugene 选育了不同酵母菌生产麦角固醇, 麦角固醇产量最高可达 2%~3% (细胞干重)^[3]。张博润等人对产麦角固醇酵母进行了原生质体融合, 得到了高产麦角固醇菌种, 产量达细胞干重的 2.7%^[4,5]。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

产麦角固醇酵母 D-G-39 (*Saccharomyces servisiae*) 由中科院微生物所提供。斜面培养基(%): 酵母膏 2, 鱼粉蛋白胨 2, 葡萄糖 2, 琼脂粉 2。发酵初始培养基(%): 蔗糖 4, 鱼粉蛋白胨 2, 酵母膏 1, 自然 pH。28℃ 培养。

1.2 分析方法

麦角固醇分析方法见参考文献[6]。麦角固醇量(%) = 总麦角固醇量(%) - 24(28)脱氢

麦角固醇(%)。

$$\text{总麦角固醇量}(\%) = \frac{\text{OD}_{280}}{K_1} \times \frac{\text{稀释倍数}}{\text{生物量}}$$

24(28) - 脱氢麦角固醇(%)

$$= \frac{\text{OD}_{230}}{K_2} \times \frac{\text{稀释倍数}}{\text{生物量}}$$

K₁ 为 1% 时在 280nm 下的吸光系数, 由标准总麦角固醇(国产)作标准曲线确定, K₂ 是 24-(28)-脱氢麦角固醇浓度为 1% 时在 230nm 下的吸光系数, 根据文献[6]取为 518。

发酵生物量为经过离心 (4000r/min, 30min) 的湿菌体量(g)。

2 结果与讨论

2.1 培养基的组成

2.1.1 氮源、无机盐的影响: 用摇瓶进行实验确定培养基组成。在初始培养基中加入不同氮源, 其结果如表 1。

当氮源为 NaNO₃ 或牛肉膏时, 菌体中麦角固醇量(%)较高, 但生物量较低, 而采用蛋白胨或 (NH₄)₂SO₄ 时, 生物量较大, 但麦角固

醇量(%)较低,将牛肉膏、NaNO₃、蔗糖、K₂HPO₄四个因子进行正交实验,最后得到最佳培养基:蔗糖 10%~12%,牛肉膏 1.58%,NaNO₃ 0.75%,鱼粉蛋白胨 0.75%。生物量(湿重) 3.22%,麦角固醇产量 0.807×10⁻²g/100ml。无机盐(NaCl)对麦角固醇产量没有太大影响,MgSO₄对麦角固醇合成有利,CaCO₃对麦角固醇合成有抑制作用。

2.1.2 温度的影响:试验结果表明(表 2),30℃下麦角固醇含量最高。

表 1 不同氮源对麦角固醇的影响

氮源浓度 (%)	生物量 (g/100ml)	麦角固醇量 (%细胞湿重)	麦角固醇产量 (×10 ² g/ 100ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	1.073	0.18	0.194
NaNO ₃ 1	0.481	0.44	0.212
尿素 0.5	1.83	0.044	0.080
牛肉膏 1	0.437	0.511	0.223
蛋白胨 1	1.152	0.082	0.095
牛肉膏 1, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	1.38	0.13	0.186
牛肉膏 1, NaNO ₃ 1	1.52	0.263	0.401
蛋白胨 1, NaNO ₃ 1	1.62	0.073	0.122
牛肉膏 1, NaNO ₃ 0.5,	2.51	0.23	0.585
蛋白胨 0.5			

表 2 温度对麦角固醇产生的影响

温度 (℃)	生物量 (湿菌体 g/100ml)	麦角固醇含量 (%湿重)	麦角固醇总量 (×10 ² g/100ml)
28	3.22	0.25	0.807
30	2.95	0.37	1.102
32	2.85	0.28	0.795

2.1.3 pH 的影响:试验 pH4.0, 5.5, 7.0 三种 pH 对麦角固醇合成的影响,结果表明,pH 对麦角固醇合成影响不大,因而一般可采用自然 pH(pH5.5)。

2.2 发酵条件的确定

2.2.1 糖的影响:生物量与蔗糖消耗量有对应关系,糖消耗最快时,生物量增加最大。但菌体中麦角固醇含量与菌体生长量没有直接关系。

底物蔗糖对麦角固醇发酵的影响见图 1。糖浓度增加,生物量增加,但菌体中麦角固醇含量(g/100g 湿菌体)并不随糖浓度增加而加大,当糖浓度>12%,菌体中麦角固醇含量反而下降,这表明糖浓度过高对麦角固醇合成有抑制作用。以发酵液中麦角固醇总量为选择依据时,糖浓度选为 12%,与摇瓶正交试验结果类似。

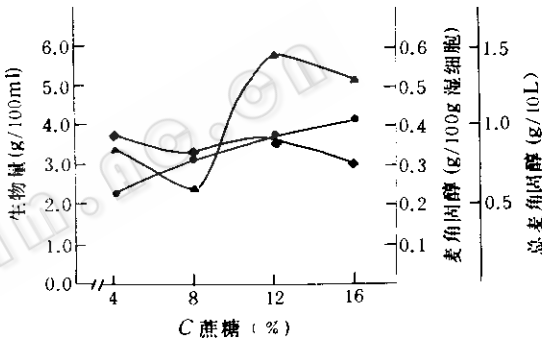


图 1 蔗糖浓度对麦角固醇合成的影响

▲ 麦角固醇总量, ◇ 麦角固醇, ● 生物量
V=80 l/h, 温度 30℃, pH5.5

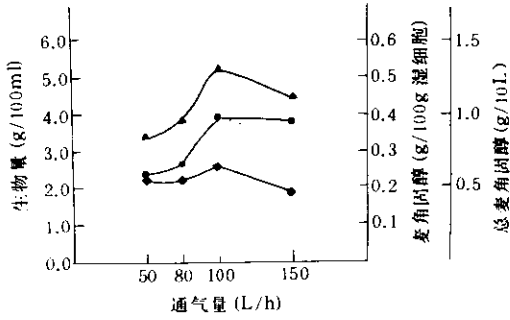


图 2 通气量对麦角固醇合成的影响

▲ 麦角固醇总量, ● 生物量, ◇ 麦角固醇
蔗糖 12%, pH5.5, 温度 30℃

2.2.2 通气量的影响:通气量对生物量影响较大,如图 2 所示,即溶氧量加大可明显提高生物量,但对菌体中麦角固醇含量影响不大,溶氧量

太人对菌体中麦角固醇的合成有抑制作用。杨新华研究了酵母合成麦角固醇机理,认为糖首先转化为乙醇,然后经过需氧发酵将乙醇转化为麦角固醇^[7],因而通氧量过大,会抑制乙醇的代谢,从而降低麦角固醇的合成。生物量的加大会使发酵液中麦角固醇总量增加,当通气量 $> 100 \text{ l/h}$ 时,麦角固醇总量已相差不大,因而选用 100 l/h 。

2.2.3 糖流加实验:底物糖对麦角固醇合成有一定抑制作用,可用底物流加来消除这种抑制。在发酵罐中,先加入 1 L 培养液,培养到 20 h 时再加入 1 L 培养基,流加技术可明显提高生物

量,由 $4.2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 提高到 $5.0 \text{ g}/100 \text{ ml}$,而且菌体中麦角固醇量由 $0.31 \text{ g}/100 \text{ g}$ 湿菌体提高到 $0.50 \text{ g}/100 \text{ g}$ 湿菌体(图3)。这一点证实,麦角固醇的胞内合成与菌龄有关^[8],菌龄越新,麦角固醇合成量越大。

综上所述,采用复合氮源、选择适温(30°C)及 $\text{pH}5.5$,可将酵母产麦角固醇的总量提高3倍以上。生物量越大酵母麦角固醇含量越低,但选择合适的糖浓度 12% ,通气比 $1:0.83 \text{ vvm}$,麦角固醇的产量可达 0.25 g/l 。酵母麦角固醇合成与菌有关,通过糖的流加可显著地增加酵母麦角固醇含量($0.5 \text{ g}/100 \text{ g}$ 湿菌体)。

参 考 文 献

- [1] Wenck P R, Peterson W, Fred E B. Z Bakteriell Parasitenk. 1935, 92: 330~338.
- [2] Savard K, Grant G A. Science, 1946, 104: 459~460.
- [3] Eugene L D, Stapley E O, Katherine S. App Microbiol. 1954, 2: 371~379.
- [4] 张博润,蔡金科,刘永成. 微生物学通报,1993,20(6): 335~3383.
- [5] 张博润. 微生物学通报,1995,22(3): 9~12.
- [6] Breivik O N. Agr Food Chem. 1957, 5(5): 360~363.
- [7] 杨新华. 淀粉与淀粉糖,1995,1: 25~28.
- [8] Pichova A, Beran K, Behalova B, et al. Folia Microbiol. 1985, 30: 134~140.

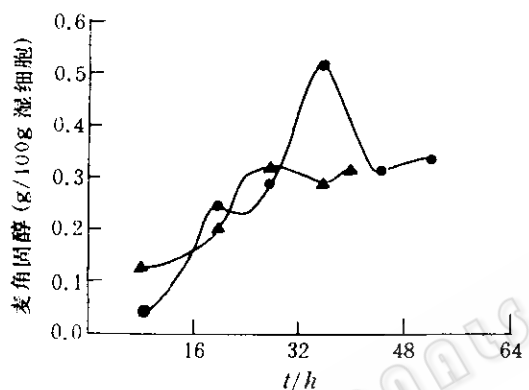


图3 糖流加对麦角固醇合成的影响

● 流加; ▲ 非流加

温度 30°C , 通气量 $V = 150 \text{ l/h}$, 蔗糖 12%

STUDY ON ERGOSTEROL PRODUCTION BY *SACCHAROMYCES SERVISIAE*

Tan Tianwei Qi Yizheng Guo Wenyan

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

Zhang Borun Liu Yufang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The production of ergosterol by *Saccharomyces servisiae* was studied in this paper the nitrogen sources salts, the temperature and the pH of the culture medium were firstly discussed with flask. When the synthetic nitrogen sources, 12% sucrose, 30°C and $\text{pH}5.5$ were used, the ergosterol produced enhanced 3 times compared to the initial medium. The influences of sucrose concentration and the air input were also studied in a 2 L fermenter. The results indicated that the high sucrose con-

centration and high air input inhibited the synthesis of ergosterol in *Saccharomyces servisiae*. The feed batch of sucrose could release the inhibition of sucrose, therefore increased the ergosterol production.

Key words Ergosterol, *Saccharomyces servisiae*