

# 微生物麦角固醇的研究进展

何秀萍 张博润

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**关键词** 麦角固醇, 生物合成, 微生物发酵

**分类号** Q939-93

麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成成分,它在确保膜结构的完整性、与膜结合酶的活性、膜的流动性、细胞活力以及物质运输等方面起着重要作用。麦角固醇生物合成途径中的几个关键环节还是抗真菌药物的作用靶位,对其生物合成的研究将为抗真菌药物的筛选及其作用机制的研究提供重要的理论基础<sup>[1]</sup>。麦角

固醇经 UV 照射可转化为维生素  $VD_2$ ,  $VD_2$  是一种重要的药品。自从 Tanret 首次从麦角中分离得到麦角固醇以来,随后便开展了对其来源、性质、分离、测定、高产

---

“九五”国家重点攻关课题

1997-04-21 收稿

株的选育及其发酵条件等的研究<sup>[2~6]</sup>。近年来一些研究者对麦角固醇生物合成途径进行了探讨,对其中几个关键酶进行了比较详细的研究<sup>[7]</sup>。本文简要综述微生物麦角固醇的研究进展。

## 1 提高麦角固醇产量的途径

**1.1 高产菌株的选育** 菌种是决定麦角固醇产量的根本因素,不少人致力于麦角固醇高产菌株的选育,主要方法如下:

**1.1.1 自然筛选:**由于不同微生物细胞中麦角固醇含量差异较大,从现有菌株中筛选高产菌株是优良菌株选育的基本方法。Pruess 等对五个酵母属的 13 种菌株麦角固醇含量的测定,发现除酿酒酵母外,其它四个属的含量均在 0.2%~0.3%,麦角固醇含量最高的为葡萄汁酵母,可达 2.4%<sup>[8]</sup>。Eugene 等对 558 株不同属酵母菌的研究也得到类似的结果。随后酿酒酵母便成为主要的研究对象。莫湘筠等测定了 33 株酵母菌的麦角固醇含量,其中两株酿酒酵母的麦角固醇含量高达 4.33% 和 3.3%<sup>[3]</sup>。本研究组分析了 167 株不同种、属酵母菌的麦角固醇含量,发现不同种、属间差异很大,最高可达细胞干重的 6%,最低的只有 0.3%<sup>[4]</sup>。

**1.1.2 杂交:**利用杂交选育麦角固醇高产菌株的报道不多,莫斯科大学的研究者采用杂交方法选育到麦角固醇含量达 2.7% 的酵母高产菌。

**1.1.3 原生质体融合:**单位体积发酵液中的麦角固醇含量除与细胞内含量有关外,还与细胞的生物量有关。但对同一菌株而言,两者之间常存在矛盾。为了提高麦角固醇的绝对含量,可利用原生质体融合技术,使具有不同优良性状的单倍体菌株进行融合,获得优于亲株的融合子。本研究组曾通过属间原生质体融合技术,成功地构建了高产麦角固醇的酵母菌优良品系 F-II-37 和 F-III-102,它们具有双亲株的优良性状<sup>[5]</sup>。Avram 等用电融合技术获得酿酒酵母属的种间融合子及种内融合子<sup>[9]</sup>,种内融合子的麦角固醇含量比亲株提高 119% 和 105%;种间融合子的含量比亲株提高 82%,而且在没有选择压力的条件下,能稳定保持高的麦角固醇含量。

## 1.2 发酵条件的优化

**1.2.1 碳源:**Eugene 等曾用九种其它碳源代替葡萄糖,发现果糖可使细胞干重有所增加,但麦角固醇含量基本不变。对细胞生长及麦角固醇含量综合考虑,麦芽糖是较好的碳源。他们还研究了葡萄糖浓度的影响,没有

发现明显的作用。而 Starr 的研究表明,甾醇的生物合成与葡萄糖的浓度成正比<sup>[10]</sup>。由此可见,对不同的菌种来说,都有其最适的碳源及浓度。

**1.2.2 氮源:**氮源对菌体生物量及麦角固醇含量的影响,因微生物种类而异。Wenck 等的研究表明氮源及 C:N 对费希尔曲霉麦角固醇的合成影响很大。而 Eugene 等分别用  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、尿素及酪蛋白水解物作为氮源,发现对酿酒酵母麦角固醇含量没有明显的影响。国内此方面的研究结果也不尽相同,有的认为氯化铵有利于奇异酵母麦角固醇的合成;有的认为添加氮源可提高红曲霉菌体生物量,而单位细胞麦角固醇含量则没有明显变化<sup>[6]</sup>;莫湘君等的研究则认为氮源添加量对酵母菌麦角固醇含量及生物量均有影响<sup>[3]</sup>。因此,对不同的菌种而言,氮源的影响也是不同的。

**1.2.3 通气条件:**Maguigan 等在研究面包酵母时得出结论,麦角固醇的合成是有氧代谢的特征<sup>[11]</sup>。酵母在通气良好的条件下生长,能合成大量的麦角固醇,而在厌氧条件下,细胞不能合成甾醇环,抑制了其合成。当将酵母细胞从厌氧条件转移至有氧生长条件,则促进麦角固醇的合成,同时伴随着其合成早期的 HMG-coA 还原酶活性的提高。Lusuk 等的研究也表明氧有助于麦角固醇的合成<sup>[12]</sup>。

**1.2.4 发酵时间:**酵母细胞麦角固醇的含量与培养时间的关系受多种因素的影响。Brevik 的研究认为酵母细胞麦角固醇含量与培养时间成正相关。然而 Eugene 等的研究则指出,酵母细胞麦角固醇含量与发酵时间的关系受菌种、培养基成分的影响。本研究组及陈松生的研究表明,不同菌株产麦角固醇最高峰时间不同<sup>[4,6]</sup>。

此外,培养基的 pH、磷酸盐浓度等因素对细胞的麦角固醇含量也有影响<sup>[4,13]</sup>。

## 2 微生物麦角固醇生物合成的研究

### 2.1 微生物麦角固醇生物合成途径

麦角固醇的合成是一个多酶参与的复杂代谢过程,已有不少学者对此进行了系统研究<sup>[7,14,15]</sup>。归纳起来,可分为四个步骤:甲羟戊酸的生物合成;甲羟戊酸转化为角鲨烯;角鲨烯环化形成羊毛甾醇;羊毛甾醇转化为麦角固醇。在此代谢过程中,由羊毛甾醇向麦角固醇的转化存在多条途径,参与此过程的酶的作用顺序还不清楚。研究比较透彻的是转化的第一步,即由羊毛

甾醇 14 $\alpha$  脱甲基酶 ( $P_{450}$ 14DM) 催化的羊毛甾醇的氧化脱甲基作用。缺乏此酶的酿酒酵母 SGI 不能形成麦角固醇, 而积累羊毛甾醇, 成为麦角固醇营养缺陷型菌株。所以  $P_{450}$ 14DM 是酵母细胞生长所必需的。Kalb 等利用麦角固醇营养缺陷型突变株及制霉菌素抗性突变株, 通过麦角固醇合成前体物的积累, 确定了部分酶与基因之间的对应关系。

## 2.2 有关麦角固醇生物合成的几个主要基因的研究

### 2.2.1 ERG10: ERG10 编码的蛋白产物为乙酰乙酰 coA

硫解酶, 它是催化麦角固醇生物合成的第一个酶。在酵母中乙酰乙酰 coA 的合成可能是调节麦角固醇合成的重要一步。Kornblatt 等指出, 酵母中存在两种形式的乙酰乙酰 coA 硫解酶<sup>[16]</sup>, 一种是 65ku 的线粒体酶, 另一种为 140ku 的胞液酶。目前还不清楚二者的功能区别。Dequin 等通过与酿酒酵母 *erg10* 突变体互补, 克隆了葡萄汁酵母的 ERG10<sup>[17]</sup>。该酵母含有两个不同的 ERG10, 其中一个与酿酒酵母的 ERG10 相似, 另一个则是葡萄汁酵母所特有的, 这两个基因结构不同, 但功能相似。酵母细胞中存在的两种形式的乙酰乙酰 coA 硫解酶是否由此两个基因分别编码, 目前还没定论。Dequin 等克隆的 ERG10 为葡萄汁酵母所特有, 它编码胞液酶, 其开读框架为 1196bp, 编码 48.8ku 蛋白, 在起始密码子前 324bp 及 133bp 处存在一致的 TATA 框, 转录终止区富含 A-T。该基因位于第 XVI 条染色体上。Northern blot 及序列分析表明 ERG10 是高效表达的。其它酵母细胞中的 ERG10 还未见报道。

2.2.2 ERG11 (CYP51): 有人将 CYP51 称为 ERG11, 有的称为 ERG16, 为了使文章前后一致, 此处用 CYP51 表示该基因。CYP51 编码羊毛甾醇 14 $\alpha$  脱甲基酶-细胞色素  $P_{450}$ 14DM, 它在麦角固醇生物合成中, 催化羊毛甾醇的 14 $\alpha$ -氧化脱甲基作用。缺乏此酶的酿酒酵母 SGI 不能合成麦角固醇, 而积累 14-甲基化甾醇<sup>[14]</sup>。 $P_{450}$ 14DM 是细胞色素  $P_{450}$  家族成员之一, 目前从原核及真核生物中至少已发现了 221 个  $P_{450}$  基因 (CYP)<sup>[18]</sup>。Kalb 等首次从酿酒酵母分离获得 CYP51, 并证明其编码蛋白产物为羊毛甾醇 14 $\alpha$  脱甲基酶<sup>[19]</sup>。随后又分析了它的核苷酸序列<sup>[15]</sup>, 该基因编码区内及周围没有酵母内含子基因所特有的 TAC TAAC 框, 表明 CYP51 没有内含子, 它含有单一的开读框架 (ORF), 编码 530 个氨基酸的蛋白质, 该基因被破坏的菌株需补充麦角固醇及无

氧生长条件。Chen 等用酿酒酵母的 CYP51 作探针, 从热带假丝酵母获得相应基因, 它能弥补酿酒酵母 14DM 的缺失突变。对其序列分析表明, 它的 ORF 为 1584bp, 含有  $P_{450}$  蛋白所共有的血红素结合区域, 它与酿酒酵母 CYP51 的 ORF 具有 65% 的同源性<sup>[20]</sup>。CYP51 的表达受多种因素的影响, 葡萄糖, 血红素及限氧生长条件均可提高 CYP51 的表达水平<sup>[21]</sup>。Tainaka 等的研究表明, 不论在好氧还是半厌氧生长条件下, 提高酿酒酵母 CYP51 的表达, 可以加速羊毛甾醇的代谢, 但并没有增加细胞麦角固醇的含量, 而是积累了中间体<sup>[22]</sup>, 这是由于在麦角固醇合成时, 还需要另外一个调节酶  $P_{450}$ 22DS-麦角甾二烯醇去饱和酶, 催化麦角甾二烯醇向麦角固醇的转化, 它是调节麦角固醇合成的最后一步<sup>[23]</sup>, 只有两种  $P_{450}$  酶的协同提高才能最终增加酵母细胞中麦角固醇的含量。 $P_{450}$ 14DM 除在麦角固醇合成中起重要的调节作用外, 它还是许多抗真菌剂的作用靶位。对  $P_{450}$  基因及其蛋白质产物的详细研究将为抗真菌药物作用机制的研究和新药的开发提供理论依据。Nistelrooy 等首次从白边青霉分离到 CYP51, 并对其特征进行了研究<sup>[24]</sup>。白边青霉是柑桔类致病菌, 其 CYP51 的 ORF 为 1545bp, 被 60、72、62bp 三个内含子中断。其蛋白的 C-端含有  $P_{450}$  基因共有的血红素结合区域 HR2, 它的氨基酸序列与啤酒酵母、白色假丝酵母及热带假丝酵母序列分别有 45.8%、47.2% 及 45.8% 的同源性, 表明它们均属于 CYP51 家族, 将该基因引入黑曲霉, 可以明显提高该菌对抗真菌剂的抗性。近年来, 此方面的研究愈加受到重视。

2.2.3 ERG12: ERG12 编码的蛋白产物是甲羟戊酸激酶<sup>[21]</sup>, 它在麦角固醇合成代谢中催化甲羟戊酸与 ATP 反应, 产生 5-磷酸甲羟戊酸, 该产物同时还是细胞内许多其它异戊二烯骨架化合物的前体。该酶是胞液酶, 其生物活性受焦磷酸法尼酯 (FPP) 和焦磷酸牦牛儿酯 (GPP) 的抑制。甲羟戊酸激酶不是限速酶, 但它对 FPP 的敏感性可能对麦角固醇的合成起着关键的调节作用。Karst 等将编码该酶的基因称为 ERG12。他们通过与 *erg12-1* 突变互补, 从酿酒酵母中克隆了 ERG12<sup>[25]</sup>, 基因破坏研究表明, ERG12 是酵母细胞保持生活力 (出芽繁殖及营养生长) 所必需的。该基因最长的开读框架为 1329bp, 编码 443 个氨基酸的多肽, 其转录子为 1.45bp。Tanaka 等曾报道鼠肝甲羟戊酸激酶的氨基酸

序列与一种由酵母 RAR1 基因编码的功能未知蛋白具有同源性<sup>[26]</sup>。对 ERG12 核苷酸序列与 RAR1 基因序列的比较发现,2723 个核苷酸中,除 5 区域两个核苷酸不同外,其它序列完全相同,因此证明,ERG12 与 RAR1 是同一基因。ERG12 的过量表达能提高酶的活性,但不能使麦角固醇含量明显提高。

**2.2.4 ERG20:** 该基因编码蛋白为 FPP 合成酶。FPP 是麦角固醇生物合成过程中的一个中间产物,它在角鲨烯合成酶催化下,转化为角鲨烯,也可以通过长链异戊二烯转移酶催化而形成辅酶 Q 和多萜醇。在 FPP 合成酶催化下,FPP 由 GPP 而来。正常情况下,FPP 合成酶与 GPP 有很高的亲和力,将其转化为 FPP,最后形成终产物主要是麦角固醇,因此没有游离的法呢醇和牻牛儿醇分泌至培养液中。牻牛儿醇对酵母细胞会产生毒性。该酶是麦角固醇或异戊二烯类化合物生物合成的限速步骤。Anderson 等<sup>[27]</sup>根据纯化的 FPP 合成酶的 N-末端氨基酸顺序,合成寡核苷酸探针,分离得到酵母 FPP 合成酶基因,该基因的破坏对细胞来说是致死性的。Chambon 等<sup>[28]</sup>通过与 erg20-2 突变体互补,从酵母中分离获得有功能的 ERG20,酶切图谱表明,该 DNA 片断与 Aderson 获得的基因相同,被外切酶 III 及核酸酶 S1 处理后成为 3kb,而没有丧失酶活性。对其序列分析还未见报道。

### 3 展望

综上所述,有关麦角固醇生物合成方面的研究取得了很大进展,但关于其生物合成代谢途径的研究还很不透彻,尤其是羊毛甾醇到麦角固醇之间的中间体及作用酶目前还很不清楚,这方面的研究及其分子生物学的突破,将为通过基因工程手段获得高产菌株提供理论指导。同时,有关其关键基因表达调控机制的研究进展还不小,这方面的深入研究,可以将培养条件的优化与基因表达的调控联系起来,从而可以通过改善培养条件,有目的的调节关键基因的表达,以便获得高产菌株与培养条件的双重优化,进一步提高麦角固醇产量。

### 参 考 文 献

- [1] 王端礼. 国外医学-皮肤病学分册, 1992, 18(2): 67~70.
- [2] Dulaney E L. Preparation of Ergosterol Containing Yeast, US Patent 2817624, 1957.
- [3] 莫湘君, 黄玲, 万宁. 食品与发酵工业, 1990, 6: 20~23.
- [4] 张博润, 蔡金科. 微生物学通报, 1993, 20(6): 335~338.
- [5] 张博润. 微生物学通报, 1995, 22(3): 139~142.
- [6] 陈松生, 毛宁, 陈哲超等. 食品与发酵工业, 1995, 6: 18~23.
- [7] Tomas Kuchta, Katarina Bartkova, Robert Kubinec. Biochem Biophys Res Commu, 1992, 189: 85~91.
- [8] Pruess L M, Peterson W H, Steenhock H *et al.* J Biol Chem, 1931, 90: 369~384.
- [9] Avram D, Petcu I, Radu M *et al.* Romania J Basic Microbiol, 1992, 32(6): 369~372.
- [10] Starr P R, Parks L W. J Bacteriol, 1962, 83: 1041~1046.
- [11] Maguigan W H, Walker E. Biochem J, 1940, 34: 804~813.
- [12] Lusuk G M, Permyakova L V, Prikl. Biokhim Mikrobiol, 1988, 24(5): 660~664.
- [13] Arnezeder C, Hampel W A. Biotechnol Lett, 1991, 13(2): 97~100.
- [14] Aoyama Y, Yoshida Y, Nishino T *et al.* J Biol Chem, 1987, 262: 14260~14264.
- [15] Kalb V F, Woods C W, Turi T G *et al.* DNA, 1987, 6(6): 529~537.
- [16] Kornblatt J A, Rudney H. J Biol Chem, 1971, 246: 4417~4423.
- [17] Sylvie Dequin, Remi Gloeckler, Christopher J *et al.* Curr Genet, 1988, 13: 471~478.
- [18] Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J *et al.* DNA Cell Biol, 1993, 12: 1~51.
- [19] Kalb V F, Loper J C, Dey C R *et al.* Gene, 1986, 45: 237~245.
- [20] Chen C, Kalb V F, Turi T G *et al.* DNA, 1987, 7(9): 617~626.
- [21] Thomas G Turi, John C Loper. J Biological Chemistry, 1992, 267: 2046~2056.
- [22] Hitoshi Tainaka, Hioeaki Hashimoto, Yuri Aoyama *et al.* J Fermen Bioeng, 1995, 79(1): 64~66.
- [23] Hata S, Nishino T, Katsuki H *et al.* Agric Biol Chem, 1987, 51: 1349~1354.
- [24] J G M Van Nistelrooy, J M Van den Brink, J A L Van Kan *et al.* Mol Gen Genet, 1996, 250: 725~733.
- [25] Oulmouden A, Karst F. Gene, 1990, 88: 253~257.
- [26] Tanaka R D, Lee L Y, Schafer B L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 2872~2876.
- [27] Matt S Anderson, James G Yarger, Carol L Burck *et al.* J Biol Chem, 1989: 264: 19176~19184.
- [28] C Chambon, V Ladeveze, A Oulmouden *et al.* Curr Genet, 1990, 18: 41~46.