

酵母菌利用糖蜜发酵产麦角甾醇的工艺条件优化

王绍杰^{1,2}, 郭雪娜¹, 何秀萍¹, 张博润¹

1 中国科学院微生物研究所 酵母菌分子遗传与育种实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

王绍杰, 郭雪娜, 何秀萍, 等. 酵母菌利用糖蜜发酵产麦角甾醇的工艺条件优化. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1676-1680.

Wang SJ, Guo XN, He XP, et al. Improving ergosterol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1676-1680.

摘要: 麦角甾醇是由酵母菌产生的具有重要经济价值的代谢产物。为了提高酵母菌利用糖蜜发酵生产麦角甾醇的产量, 通过响应面分析法优化了发酵培养基配方, 并在 5 L 发酵罐对发酵过程 pH 控制和底物流加补料方式进行了优化。结果表明, 利用优化后的发酵培养基, 即糖蜜总糖 40 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 1.86 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 17.5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.3 mg/L, 玉米浆 10 mL/L, 麦角甾醇产量比优化前提高了 29.5%; 利用恒定 pH 控制策略, 在 5 L 发酵罐进行分批发酵, 使麦角甾醇产量提高了 62.1%; 进一步采用底物流加补料策略, 使麦角甾醇产量达到 1 953.85 mg/L, 是分批发酵的 3.2 倍, 而且麦角甾醇产率比分批发酵提高了 42.7%。为酵母菌发酵糖蜜产麦角甾醇的产业化应用奠定了基础。

关键词: 酿酒酵母, 糖蜜, 麦角甾醇, 响应面分析法, 底物流加补料

Improving ergosterol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*

Shaojie Wang^{1,2}, Xuena Guo¹, Xiuping He¹, and Borun Zhang¹

1 Laboratory of Molecular Genetics and Breeding of Yeast, Institute of Microbiology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Ergosterol is an economically important metabolite produced by yeast. To improve the production of ergosterol by *Saccharomyces cerevisiae* YEH56 (pHXA42) from molasses, a cheap and regenerative material, different strategies were applied. First, Plackett-Burman design and central composite design were applied to screen the significant factors in fermentation medium using ergosterol yield (g/L) as the response value. Ergosterol yield reached 371.56 mg/L by using the optimal fermentation medium in shake-flask culture (total sugar in molasses 40 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 1.86 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 17.5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.3 mg/L, corn steep liquor 10 mL/L), which was increased by 29.5% compared with the initial culture. Second, ergosterol yield was increased by 62.1% using a pH-control strategy in a 5-L bioreactor. Third, ergosterol production was improved further by using molasses feeding strategy. After 38 h fermentation, ergosterol yield reached 1 953.85 mg/L, which was 3.2 times of that in batch fermentation. Meanwhile,

Received: April 28, 2013; **Accepted:** May 15, 2013

Supported by: Foundation of Technology Transfer of Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Xiuping He. Tel: +86-10-64807356; E-mail: hexp@im.ac.cn

中国科学院微生物研究所科技成果转化基金资助。

ergosterol production rate was increased by 42.7% compared with that in the batch culture.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, molasses, ergosterol, response surface methodology, fed-batch fermentation

麦角甾醇是真菌细胞各种膜结构的重要组成部分,它在确保膜结构的完整性、流动性、通透性、与膜结合酶的活性、细胞活力等方面具有重要的生理功能^[1-3]。麦角甾醇还是一种具有重要经济价值的代谢产物,是合成维生素 D₂的前体和生产可的松、黄体酮、芸苔素内酯和抗癌药物等甾醇类药物的重要原料^[4-5]。酵母菌发酵法是国内外麦角甾醇生产的主要方式。在众多的酵母菌中,以酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 麦角甾醇的含量最高,因而成为发酵法生产麦角甾醇的优选菌种^[6]。

酵母菌麦角甾醇产量同时受到细胞生长速率和细胞麦角甾醇合成能力的影响,但野生型酵母菌细胞生长和麦角甾醇合成之间常表现出一种相互制约的关系^[7-9]。利用传统的微生物育种技术,并结合代谢途径的定向优化,可以在一定程度上从菌种层面突破细胞生长和麦角甾醇合成之间的相互制约,提高麦角甾醇产量^[9-11]。同时通过发酵条件的优化也可以适当协调细胞生长和麦角甾醇合成之间的制约关系,实现麦角甾醇产量的提高。以葡萄糖和酵母粉等为主要原料的发酵条件优化已有较多报道^[8-10,12-13]。但通常情况下,发酵培养基约占发酵成本的 50%,实现廉价、可再生原料的替代是新型发酵工业的发展趋势^[14]。糖蜜作为制糖工业的副产物,富含蔗糖、葡萄糖和果糖等碳源,以及维生素和无机盐,是发酵工业中一种经济易得的原料^[15-16]。在我们前期研究中,对甘蔗糖蜜为主要原料的酵母菌发酵法生产麦角甾醇发酵条件进行了初步分析^[11]。

响应面分析法(Response surface methodology, RSM)作为解决多变量问题的一种统计方法,已应用于多种发酵过程和生物反应过程的优化^[16-18]。本研究将以甘蔗糖蜜为主要原料,通过响应面分析获得优化培养基;在此基础上进行 5 L 发酵罐的发酵实验及发酵条件的进一步优化,以期以糖蜜为主要原料的酵母菌发酵法生产麦角甾醇工业化应

用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 发酵菌种

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YEH56 (pHXA42)由本实验室构建和保存^[11]。

1.1.2 实验试剂

甘蔗糖蜜(含糖量为 48%,总氮 4.6%,总磷 0.6%,Mg²⁺ 0.02%,Cu²⁺ 0.03%,Zn²⁺ 0.008%,Fe²⁺ 0.06%,W/W)购自北京市海昌鑫霖有限公司;玉米浆购自北京保乐吉生物科技有限公司;麦角甾醇标准品购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基

酵母菌常规培养、保存及发酵用种子培养基 YEPD 参照文献^[11]。

初始发酵培养基:糖蜜 83.3 g,磷酸 1.68 g,尿素 2.0 g,溶于蒸馏水中,用氢氧化钠调 pH 至 5.4,定容至 1 000 mL。

优化后的发酵培养基:糖蜜 83.3 g,KH₂PO₄ 1 g,K₂HPO₄ 1.86 g,CuSO₄·5H₂O 17.5 mg,FeSO₄·7H₂O 13.9 mg,MgSO₄·5H₂O 12.3 mg,玉米浆 10 mL,溶于蒸馏水中,调 pH 至 6.5,定容至 1 000 mL。

糖蜜流加补料发酵基础培养基是将糖蜜浓度降低到 41.6 g/L,KH₂PO₄ 1 g,其他组分和 pH 与优化后的发酵培养基完全相同。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶发酵培养

从保存的菌种斜面上挑一环菌,转接到 50 mL YEPD 中,30 °C、200 r/min 培养 18 h;按 10% (V/V) 接种量将种子液转接到装 45 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C、200 r/min 培养 36 h。

1.2.2 发酵罐发酵培养

从保存的菌种斜面上挑一环菌,转接到 5 mL

YEPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 16 h, 然后转接到 200 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 18 h, 按 10% (V/V)接种量转接至装有 2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐(上海保兴生物工程设备有限公司)中进行发酵, 温度为 30 °C, 转速 400 r/min, 通气量 4 L/min, pH 控制在 6.50 左右。

进行流加补料分批发酵时, 发酵罐初始装液量为 1.8 L 基础培养基。补料液为含糖量为 300 g/L 的糖蜜, 在发酵开始后 5 h 以 10 mL/h 的速度流加, 从 10 h 开始流加速度增加到 20 mL/h, 直到发酵结束为止。发酵 12 h 前发酵条件控制同上; 发酵 12~30 h, 转速 550 r/min, 通气量 6 L/min, 发酵末期恢复到初期转速和通气量。

1.2.3 分析方法

细胞生物量的测定和麦角甾醇的提取参照文献[9]进行。细胞麦角甾醇含量测定参照文献[11]进行。麦角甾醇产量指每升发酵液收获的细胞所含的麦角甾醇的量(mg/L), 转化率为每消耗 1 克糖蜜产生麦角甾醇的毫克数(mg/g), 麦角甾醇产率指每小时每消耗 1 克糖蜜产生的麦角甾醇毫克数(mg/(g·h))。

2 结果与分析

2.1 影响麦角甾醇产量的显著因素的筛选

依据单因子实验结果及影响酵母菌生长代谢的

一般因素, 本研究选取糖蜜浓度(X_1)、 CuSO_4 (X_2)、 FeSO_4 (X_3)、 MgSO_4 (X_4)、玉米浆(X_5)、 K_2HPO_4 (X_6)、 KH_2PO_4 (X_7)、和 pH (X_8)为考察因素, 并余留 3 个空白项以估计实验误差; 每个因素设 2 个水平, 以麦角甾醇产量(mg/L)为响应值, 进行试验次数为 $N=12$ 的 Plackett-Burman 设计, 具体试验设计及结果见表 1, 利用 Design Expert 7.1.3 软件对表 1 中试验数据进行分析, 发现本试验获得的模型的“Prob (P)> F ”为 0.0024, 说明本试验模型显著。该模型的决定系数和校正决定系数分别为 0.9948 和 0.9811, 说明相关性良好。其中影响酵母菌麦角甾醇产量的显著因素为 CuSO_4 ($P=0.0002$)、 K_2HPO_4 ($P=0.0301$)和 pH ($P=0.0066$), 其他被考察因素影响不显著。

2.2 中心组合设计与响应面分析

依据 Plackett-Burman 试验结果和 Box-Behnken 中心组合设计原理, 对筛选出的显著影响麦角甾醇产量的 CuSO_4 (X_1)、 K_2HPO_4 (X_2)和初始 pH (X_3)三个关键因素进行中心组合设计, 3 因素取 3 水平共设计 17 组试验, 每组试验重复 3 次。各因素水平及试验结果见表 2。

利用 Design-Expert 7.1.3 软件对中心组合试验结果进行分析, 得到以麦角甾醇产量为响应值 (Y)的拟合二次多项式回归方程: $Y=343.64+13.20X_1-1.39X_2+3.85X_3+2.67X_1X_2-1.04X_1X_3+9.11X_2X_3-29.02X_1^2-6.64X_2^2-2.98X_3^2$ 。对回归方程进行分析,

表 1 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 1 Experimental design of Plackett-Burman and corresponding results

Run	X_1 (%)	X_2 (mmol/L)	X_3 (mmol/L)	X_4 (mmol/L)	X_5 (ml/L)	X_6 (g/L)	X_7 (g/L)	X_8	Ergosterol yield (mg/L)
1	4	0.05	0.00	0.05	10	2	1	5.4	316.28
2	3	0.00	0.00	0.00	5	1	1	5.4	143.57
3	4	0.00	0.00	0.00	10	1	2	6.4	206.11
4	4	0.00	0.05	0.05	5	2	2	6.4	242.29
5	4	0.05	0.05	0.00	5	1	2	5.4	303.69
6	4	0.05	0.00	0.00	5	2	1	6.4	320.50
7	4	0.00	0.05	0.05	10	1	1	5.4	171.45
8	3	0.05	0.05	0.05	5	1	1	6.4	334.24
9	3	0.00	0.00	0.05	5	2	2	5.4	190.59
10	3	0.00	0.05	0.05	10	2	1	6.4	233.76
11	3	0.05	0.05	0.00	10	2	2	5.4	322.17
12	3	0.05	0.00	0.05	10	1	2	6.4	336.56

表 2 中心组合试验设计及结果

Table 2 Results of central composite design

Run	Variables/levels			Ergosterol yield (mg/L)	
	X ₁ (mmol/L)	X ₂ (g/L)	X ₃	Actual value	Predictive value
1	0.02	1.00	6.00	298.41	298.83
2	0.06	1.00	6.50	330.83	330.14
3	0.10	1.00	6.00	317.70	319.89
4	0.06	1.50	6.00	345.40	343.64
5	0.10	2.00	6.00	322.89	322.46
6	0.06	1.50	6.00	348.44	343.63
7	0.06	2.00	5.50	318.99	319.68
8	0.06	2.00	6.50	343.66	345.60
9	0.10	1.50	6.50	329.15	327.65
10	0.10	1.50	5.50	322.28	322.03
11	0.06	1.50	6.00	346.69	343.64
12	0.02	1.50	5.50	292.04	293.55
13	0.02	2.00	6.00	292.91	290.72
14	0.06	1.50	6.00	341.17	343.64
15	0.02	1.50	6.50	303.07	303.33
16	0.06	1.50	6.00	336.49	343.64
17	0.06	1.00	5.50	342.61	340.67

发现该模型极显著($P < 0.0001$), 多元相关系数 $R^2=0.9805$, 说明模型与实际情况拟合很好; 在模型参数中, $X_1(\text{CuSO}_4)$ 对麦角甾醇产量的线性效应极显著($P < 0.0001$), X_3 (发酵起始 pH)对麦角甾醇产量的线性效应显著($P=0.0316$), 而 $X_2(\text{K}_2\text{HPO}_4)$ 对麦角甾醇产量的线性效应不显著($P=0.3668$)。

对回归方程求解, 得到各因素的最适水平, 即硫酸铜 0.07 mmol/L、磷酸氢二钾 1.82 g/L 和 pH 为 6.50, 其他因素取 Plackett-Burman 试验中的高水平, 在此条件下利用模型预测麦角甾醇产量为 348.40 mg/L。

2.3 优化结果验证

为了验证模型的准确性和有效性, 在预测的最佳培养条件下进行发酵试验, 试验重复 3 次, 3 次试验麦角甾醇产量平均值为 371.56 mg/L, 预测精确度达到 93.8%, 说明模型可靠。酵母菌麦角甾醇产量比优化前(286.89 mg/L)提高了 29.5%。

2.4 发酵罐发酵试验

利用优化后的发酵培养基在 5 L 发酵罐中进行分批发酵试验, 比较了发酵过程 pH 变化对麦角甾醇产量的影响, 发现 pH 控制在 6.5 左右, 麦角甾醇产量达最高, 发酵 38 h, 细胞生物量为 13.33 g/L、细胞麦角甾醇含量为 45.15 mg/g、麦角甾醇产量为 601.85 mg/L(图 1A)。与摇瓶试验相比, 麦角甾醇产量和转化率均提高了 62.1%。

在分批发酵试验基础上, 进行了底物糖蜜流加补料发酵试验, 发酵 38 h, 麦角甾醇产量为 1 953.85 mg/L, 是分批发酵的 3.2 倍(图 1B)。其中流加补料发酵试验中糖蜜到麦角甾醇的转化率为 10.32 mg/g、麦角甾醇产率为 0.28 mg/(g·h), 均比分批发酵提高了 42.7%。

3 结论

培养基组成是影响发酵成本和发酵效率的重要因素, 利用廉价可再生的原料是发酵工业未来发展的重要趋势, 本研究以制糖工业副产物-糖蜜为主原料, 综合采用培养基配方优化、发酵过程

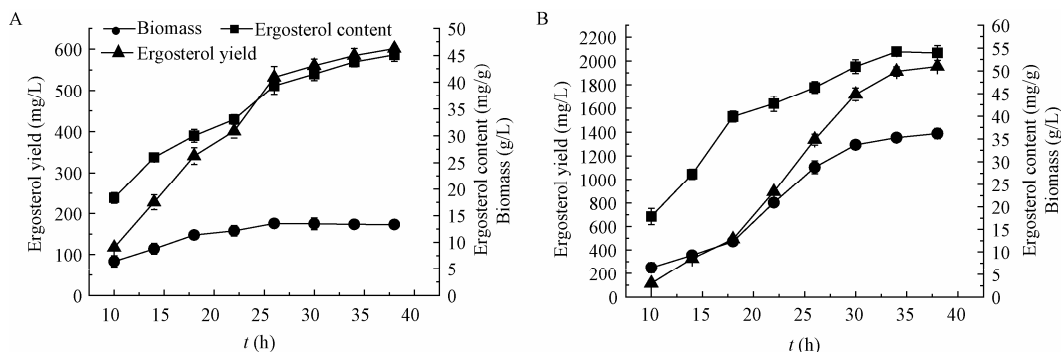


图 1 酵母菌在 5-L 发酵罐中批次发酵和底物流加发酵时间曲线

Fig. 1 Fermentation profiles of *Saccharomyces cerevisiae* in 5 L bioreactor. (A) Batch fermentation. (B) Fed-batch fermentation.

pH 恒定控制及底物流加补料策略,不但使麦角甾醇产量比前期报道提高了 14.5%,而且生产效率提高了 20.5%^[11]。与以葡萄糖为主要发酵原料的研究报道^[13]相比,麦角甾醇产量提高了 20.2%。本研究为酵母菌发酵糖蜜生产麦角甾醇的产业化应用提供了重要的参考依据。

REFERENCES

- [1] Dupont S, Lemetals G, Ferreira T, et al. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution*, 2012, 66(9): 2961–2968.
- [2] Krumpe K, Frumkin I, Herzig Y, et al. Ergosterol content specifies targeting of tail-anchored proteins to mitochondrial outer membranes. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(20): 3927–3935.
- [3] Lees ND, Bard M, Kirsch DR. Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(1): 33–47.
- [4] Subbiah MT, Abplanalp W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells *in vitro* and the potential role of its oxidation products. *Int J Vitam Nutr Res*, 2003, 73(1): 19–23.
- [5] Kalaras MD, Beelman RB, Holick MF, et al. Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Chem*, 2012, 135(2): 396–401.
- [6] Veen M, Lang C. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63(6): 635–646.
- [7] Arnezeder C, Hampel WA. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast cells. *Biotechnol Lett*, 1990, 12(4): 277–282.
- [8] Arnezeder C, Hampel WA. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast cells in a phosphate limited continuous culture. *Biotechnol Lett*, 1991, 13(2): 97–100.
- [9] He XP, Huai WH, Tie CJ, et al. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 25(1): 39–44.
- [10] He XP, Zhang BR, Tan HR. Overexpression of a sterol C-24(28)-reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(6): 773–778.
- [11] He XP, Guo XN, Liu N, et al. Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(1): 55–60.
- [12] Shang F, Wen S, Wang X, et al. High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(1): 38–41.
- [13] Shang F, Wang Z, Tan TW. High-cell-density cultivation for co-production of ergosterol and reduced glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 77(6): 1233–1240.
- [14] Van Hoek P, Aristidou A, Hahn JJ, et al. Fermentation goes large scale. *Chem Eng Prog*, 2003, 99(1): 37–42.
- [15] Vedyashkina TA, Revin VV, Gogotov IN. Optimizing the conditions of dextran synthesis by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grown in a molasses-containing medium. *Appl Biochem Microbiol*, 2005, 41(4): 361–364.
- [16] Banik RM, Santhiagu A, Upadhyay SN. Optimization of nutrients for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. *Bioresour Technol*, 2007, 98(4): 792–797.
- [17] Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 5th Ed. New York: John Wiley and Sons, 2001: 451–463.
- [18] Khan MA, Hamid R, Ahmad M, et al. Optimization of culture media for enhanced chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(11): 1597–1602.

(本文责编 陈宏宇)