

麦角固醇高产菌的选育

张博润 蔡金科

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

刘永成

(四川省内江酵母厂, 内江市 641000)

摘要 采用一种改进的测定麦角固醇的方法对 167 株不同种属的酵母菌细胞的麦角固醇含量进行了分析, 从中获得两株麦角固醇含量比生产菌高 2—3 倍的菌株。研究了培养条件等对细胞麦角固醇含量及细胞生物量的影响。

关键词 酵母菌; 麦角固醇; 生物量

麦角固醇经紫外线照射可得到维生素 D₂。维生素 D₂ 是一种重要的药品, 可用于防治婴幼儿佝偻病, 对促进孕妇和老年人钙、磷的吸收有明显生理作用, 对矿工和长期从事夜间工作人员的保健有重要作用。维生素 D₂ 还可作为饲料添加剂, 能明显增加家禽的孵化率和产蛋率。此外, 麦角固醇还是生产“考的松”、激素黄体酮

的原料。

自 Tanret (1899 年) 从麦角 (ergot) 中分离到麦角固醇 (ergosterol) 以来, 已对麦角固醇的来源、性质、提取及测定方法等进行了广泛的研究^[1-6]。目前用于生产麦角固醇的菌种主要是酵母菌。近年来, 一些研究者对麦角固醇的生物合成途径等也进行了探讨^[7-11]。

我们采用一种改进的测定酵母细胞麦角固醇含量的方法,进行了高产麦角固醇酵母菌的选育研究。

材料和方法

(一) 实验菌株

从不同种、属的酵母菌中随机挑出 167 株菌作为实验菌株,为方便起见,统一编号为 YG-1 至 YG-167。在整个实验中以国内麦角固醇生产菌为对照菌。

(二) 培养基及细胞培养

1. YEPD 培养基 (%)：酵母膏 1, 蛋白胨 2, 葡萄糖 2, 自然 pH; 固体加 2% 琼脂。

2. 种子培养基: 除不加琼脂外,成分同上。

3. 糖蜜培养基 (%)：蔗糖糖蜜 10 (四川内江蔗糖厂)。本实验用的是同一批次糖蜜,含糖量为 41.5%,经适当处理后,加 (NH₄)₂SO₄ 1, H₃PO₄ 1, 调 pH 至 5.0。以上培养基均为 0.55Kg/cm² 灭菌 30 分钟。

4. 细胞培养: 将待测菌在 YEPD 斜面上活化,接一环细胞于种子培养基中,28℃ 摇床 (220r/min) 培养 20 小时。以 10% 接种量接到糖蜜培养基中,28℃ 摇床培养。

(三) 麦角固醇紫外吸收标准曲线的绘制

精确配制麦角固醇无水乙醇溶液: 40μg/ml (内江酵母厂样品) 和 80μg/ml (上海制药二厂样品)。在 751 紫外分光光度计上测其紫外吸收值,绘制两者相似高低位置曲线图。

(四) 麦角固醇含量标准曲线的绘制

精确配制麦角固醇的系列溶液,在 751 紫外分光光度计上特定 nm 处测吸收值 (光密度)。以麦角固醇浓度为横坐标,测得的吸收值为纵坐标,绘制麦角固醇含量标准曲线。

(五) 细胞中麦角固醇含量的测定

对 Breivik 等人^[4,5]的方法进行了改进简化。具体操作如下:离心收集细胞,自来水洗两次,再用 pH4.0 的水洗一次。离心、压榨后,取压榨细胞 0.5g 放于 100ml 磨口三角瓶中,加醇-碱溶液 32ml,在 85-90℃ 水浴中皂化 1.5

小时。再加 95% 乙醇 4ml,皂化 1.5 小时,终止皂化。冷却后加蒸馏水 8ml、正庚烷 20ml,加瓶塞摇 30 秒钟。静置 30 分钟分层后,从上层取 0.5ml,加 95% 乙醇 4.5ml,分别在 230nm 和 280nm 处测吸收值。按下述公式计算细胞的麦角固醇含量:

$$\text{总麦角固醇类含量 (\%)} = \frac{280\text{nm 处吸收值}}{290} \times F$$

$$24(28)\text{-脱氢麦角固醇含量 (\%)} = \frac{230\text{nm 处吸收值}}{518} \times F$$

$$\text{麦角固醇含量 (\%)} = \text{总麦角固醇类含量 (\%)} - 24(28)\text{-脱氢麦角固醇含量 (\%)}$$

[式中,290、518 分别为结晶的麦角固醇及 24(28)-脱氢麦角固醇的 E (1%, 1cm) 值; F 为样品量 × 稀释倍数 × 百分数]

结果和讨论

(一) 麦角固醇的紫外吸收标准曲线

文献报道,麦角固醇的最大吸收值在 281.5nm 处,但国内有的厂家却在 286nm 处测

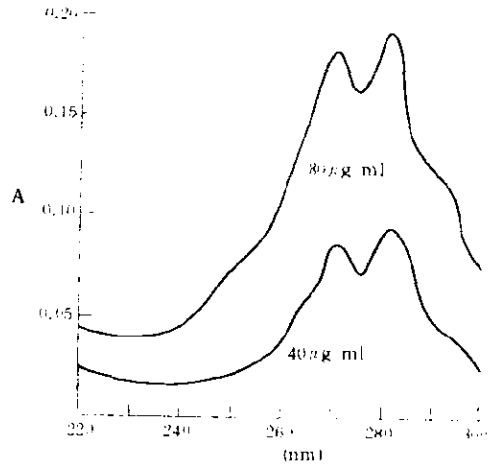


图 1 麦角固醇的紫外吸收标准曲线

定。我们用内江酵母厂和上海制药二厂的麦角固醇样品,测定并绘制了麦角固醇的紫外吸收标准曲线 (图 1)。结果与 Breivik 等人的报道一致,两种样品的最大吸收值均在 281.5nm 处。

(二) 麦角固醇含量标准曲线

按材料和方法中所述,测定绘制了麦角固醇含量的标准曲线。鉴于麦角固醇在280nm处的吸收值与在281.5nm处的吸收值很接近,为了简便可行,在我们的研究中均在280nm处测定吸收值,结果见图2。

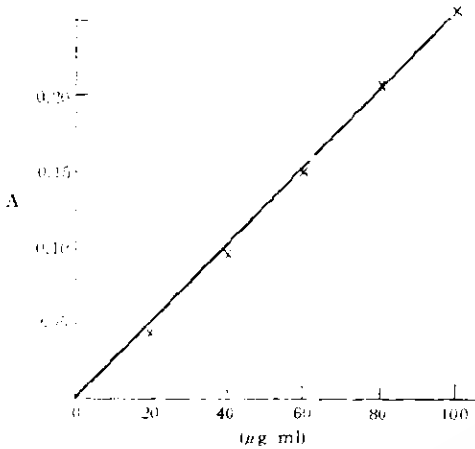


图2 麦角固醇含量标准曲线

(三) 不同酵母菌株细胞麦角固醇含量

我们测定分析了167株不同种、属的酵母菌细胞的麦角固醇含量,并同时分析了细胞生物量和细胞色泽,部分结果列于表1。从获得的结果看出,不同属的酵母细胞的麦角固醇含量变化很大,即使同一属的不同种间、种内不同菌株间的麦角固醇含量变化也较大,最高的可达细胞干物重的6%左右,最低的仅为细胞干物重的0.3%。据文献^[4,9]报道,酵母细胞含有麦角固醇、24(28)-脱氢麦角固醇、子囊甾醇、性甾醇、表类甾醇和次甾醇等。通常情况下,麦角固醇和24(28)-脱氢麦角固醇占细胞总固醇量的95%以上。国内有的厂家在测定酵母细胞的麦角固醇含量时,得出的结果是总固醇含量,因此不太准确。按我们改进的方法,则可得到细胞麦角固醇的真正含量。从表1还可清楚看到,即使在同一条件下培养,不同菌株的生物量差异也很大;细胞色泽也各异。

表1 不同酵母菌株细胞的麦角固醇含量、生物量及细胞色泽比较

菌号	对照菌	YG-1	YG-13	YG-28	YG-39	YG-44	YG-54	YG-74	YG-92	YG-109	YG-111	YG-115
麦角固醇含量 (g/100g干重细胞)	0.90	6.01	1.51	0.30	4.87	1.68	0.48	3.65	2.32	1.92	2.08	2.51
生物量 (g/100ml培养基)	2.15	0.63	1.64	5.82	0.85	1.75	4.68	1.08	0.70	1.35	1.40	0.60
细胞 色泽	浅白	白	白	白	白	白	棕	棕	棕	浅白	棕	白

(四) 不同培养时间对细胞麦角固醇含量的影响

鉴于酵母细胞麦角固醇含量与培养时间成正相关^[1],我们研究了不同培养时间对细胞麦角固醇含量的影响。从表2可以看出,所得结果与文献报道大致相同,但也有例外,如YG-1、YG-39和YG-44等菌株培养96小时的细胞

麦角固醇含量反而比培养72小时的低。其影响因素有待进一步研究。

(五) pH值对细胞麦角固醇含量的影响

我们选择YG-39号菌株为实验菌株,研究了培养基的起始pH值对细胞麦角固醇含量的影响。从表3明显看出,在实验的pH范围内,培养基的起始pH值与细胞麦角固醇含量

大致成反比,以 pH4.5 最佳;但细胞生物量却与 pH 值成正比。考虑到这种矛盾,以选用培养基的起始 pH 在 5.5 为宜,尽管在此 pH 值时细

胞的麦角固醇含量有所降低,但生物量却增加近一倍。

表 2 不同培养时间对细胞麦角固醇含量的影响

麦角固醇含量(g) / 100g 干重细胞 菌号	培养时间(h)			
	24	48	72	96
对照菌	0.71	1.01	1.16	1.28
YG-1	4.61	5.93	5.09	3.41
YG-13	1.08	1.47	1.85	1.90
YG-28	0.23	0.35	0.39	0.43
YG-39	2.97	4.78	3.97	3.08
YG-44	1.41	1.72	1.99	1.65
YG-74	1.54	3.49	3.63	3.65
YG-109	1.11	1.84	1.95	2.07
YG-146	1.29	2.47	2.51	2.58

表 3 pH 值对 YG-39 菌株细胞麦角固醇含量的影响

培养基起始 pH 值	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
生物量 g/100ml 培养基	0.45	0.55	0.97	1.17	1.40	1.42	1.43
麦角固醇含量 g/100g 干重细胞	5.89	5.87	4.97	3.30	2.36	2.29	2.18

此外,对 YG-1 和 YG-39 菌株进行了单孢分离,测定了部分单孢菌株麦角固醇含量。结果发现,有的单孢菌株麦角固醇含量接近亲株,但生物量偏低;有的单孢菌株的细胞生物量接近亲株,麦角固醇含量却只有亲株的 1/3。我们企图通过诱变、原生质体融合等手段进一步获得麦角固醇含量高、生物量亦高的优良菌株。该研究正在进行并已获得一些满意的结果。

综上所述,我们筛选到两株麦角固醇高产菌株,其中 YG-39 麦角固醇含量高达 5%,比生产菌高 5—6 倍,尽管其生物量不及生产菌。若综合这两个参数考虑, YG-39 菌株的麦角固醇含量可比生产菌株高 2—3 倍。对麦角固醇含量的测定方法作了改进,使之简便可行。

参 考 文 献

1. Bills C E et al. : *J. Biol. Chem.* , **87**: 259—264, 1930.
2. Stoudt T H et al. : *App. Microbiol.* , **2**: 385—387, 1954.
3. Eugene I. D et al. : *App. Microbiol.* , **2**: 371—379, 1954.
4. Breivik O N et al. : *Agr. Food Chem.* , **5** (5): 360—363, 1957.
5. 柳田淑朗: 麦角固醇的制造方法, 特开, 昭. 50-142787, 1975.
6. Kaost F et al. : *M. G. G.* , **154**: 269—273, 1977.
7. Hata S et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **103**: 272—277, 1981.
8. Pinto et al. : *Biochem. Biophys. Acta.* , **836**: 89—95, 1985.
9. Servouse M et al. : *J. Biochem.* , **240**: 541—547, 1986.
10. Newell S Y et al. : *App. Envir. Microbiol.* , **54** (7): 1876—1879, 1988.
11. Thomas K et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **189**: 85—91, 1992.

(1993-02-22 收稿)