

## 丝孢酵母高甲硫氨酸

### 突变株的选育及营养调控\*

张玉臻 孔 健 马桂荣

(山东大学微生物研究所、山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 以丝孢酵母 (*Trichosporon* Behr) ST851 为原始菌株,经紫外线诱变,在含乙硫氨酸的双层平板上筛选到多株抗乙硫氨酸突变株。其中 ST851-10 株抗乙硫氨酸浓度达到  $350\mu\text{g}/\text{ml}$ ,其菌体蛋白质含量由 40.5% 提高到 44.3%,菌体甲硫氨酸含量由  $20.45\text{mg}/\text{g-DCW}$  增加到  $29.32\text{mg}/\text{g-DCW}$ 。在以苹果渣为碳源、尿素为氮源、硫酸镁作硫源的最适培养条件下,固态发酵 24h 后,蛋白质和甲硫氨酸含量较原始菌株分别提高了 15.8% 和 44.9%。培养基中 C/N 值低有利于甲硫氨酸的合成,C/N 值高则适合于菌体生长。在苹果渣固态发酵过程中,适当补加氮源既有利于菌体生长和甲硫氨酸的合成,又可起到调节培养基 pH 值的作用。

**关键词** L-甲硫氨酸,丝孢酵母,调节突变株

由于世界性的动植物蛋白质供应匮乏,酵母菌以其生长繁殖快、蛋白质含量高,成为开辟蛋白质新来源的首选目标。然而,酵母菌体中一般含硫氨基酸特别是甲硫氨酸的含量低,限制了其应用范围与价值<sup>[1,2]</sup>。

甲硫氨酸通常以其活化形式参与肽链的起始合成,是 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 的合成前体,而 SAM 作为甲基供体参与多种生物代谢,故甲硫氨酸有动物体第一限制性必需氨基酸之称。食物中缺乏时,将引起蛋白质的合成障碍及其他疾病。

在正常的生理条件下,酵母菌体合成的甲硫氨酸只能维持菌体自身的需要,以保证合成的经济性<sup>[3]</sup>。要使甲硫氨酸在菌体中过量积累,必须人为地打破原有的代谢调控系统,获得代谢调节突变株<sup>[4,5]</sup>。

自 Aldberg 发现结构类似物抗性株可以积累相应的氨基酸以来,筛选抗结构类似物突变株以获得氨基酸高产菌株的方法已得到广泛应用<sup>[6~8]</sup>。本研究以分离于苹果渣的丝孢酵母 ST851 菌株为原始菌株,经 UV 多次诱变及在含乙硫氨酸(甲硫氨酸的结构类似物)双层平板及缺硫、限硫梯度平板上有效筛选,获得了菌体甲硫氨酸含量能大幅度提高的抗乙硫氨酸突变株 ST851-10。此外,还研究了苹果渣固态发酵中营养条件对其蛋白质、甲硫氨酸合成的影响。

\* 国家“八五”攻关项目。

本文于 1995 年 5 月 15 日收到。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

丝孢酵母 (*Trichosporon* Behr.) ST851 株由本室自苹果渣分离、筛选并进行鉴定。  
*Escherichia coli* 8654 (Met<sup>-</sup>) 株, 本室保存。

### 1.2 苹果渣

取自山东省栖霞市果脯加工厂, 主要成分见另文<sup>[9]</sup>。

### 1.3 培养基

1.3.1 合成培养基(%): EP(苹果渣, 其浸出液的还原糖以葡萄糖计) 3.0, 尿素 0.2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.04, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, 复合维生素母液 0.05ml, 微量元素母液 0.05ml<sup>[10]</sup>。

1.3.2 缺硫培养基: 合成培养基中等摩尔尿素代替 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 去掉 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O。

### 1.4 方法

1.4.1 紫外线诱变和抗乙硫氨酸突变株的筛选: 取 1ml 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 细胞/ml 的菌悬液置于 30W 紫外灯下 40cm 处照射, 将致死率为 99% 的菌悬液涂布在含乙硫氨酸的双层平板上, 35℃ 培养 3d, 选取抗性菌落。

1.4.2 复筛: 把抗乙硫氨酸突变株涂在缺硫平板上, 选取生长慢、菌落小的菌株, 再在限硫梯度平板上进一步验证。

1.4.3 乙硫氨酸双层平板的制作: 按照高培基等人的方法<sup>[11]</sup>, 稍加改进。培养皿中先倒入 3mm 厚的含 2% 琼脂的营养盐液, 制成平坦的底层, 冷凝后倒入含适量乙硫氨酸与 1.5% 琼脂的基本培养基, 使成 1mm 厚的上层。均在水准尺校正的平板玻璃上进行, 以使厚度均匀。

1.4.4 甲硫氨酸抽提及分析: 取 20ml 发酵液离心收集菌体, 蒸馏水洗涤 3 次, 菌体中再加入 10ml 蒸馏水于沸水浴中抽提 30min, 5000r/min 离心 15min, 取上清液, 液体培养 *E. coli* 8654 (Met<sup>-</sup>) 24h, 在 610nm 测 OD 值, 按常规计算甲硫氨酸含量。

1.4.5 菌丝体干重测定: 取一定量发酵液离心收集菌体, 于 80℃ 烘至恒重。

1.4.6 菌体蛋白含量测定: 凯氏定氮法<sup>[12]</sup>。

1.4.7 氨基酸含量分析: 日立 835-10 型氨基酸自动分析仪。样品经 6mol/L 盐酸 110℃ 水解 24h。

1.4.8 突变株 ST851-10 固态发酵方法: ST851-10 株固态发酵培养基、固态发酵方法另文发表。

## 2 结果和讨论

### 2.1 乙硫氨酸抑制剂量的选择

将菌株 ST851 分别接种于含不同浓度乙硫氨酸的合成培养基中, 常规培养。图 1 结果表明, 乙硫氨酸能抑制菌株 ST851 的生长, 其抑制程度随乙硫氨酸浓度的增加而增强。在 150μg/ml 剂量时, 菌株 ST851 的生长完全被抑制, 但该抑制又能被甲硫氨酸回复, 由此表明乙硫氨酸能提供乙基代替甲基参与甲硫氨酸代谢, 可以通过获得调节突变株

提高甲硫氨酸产量。

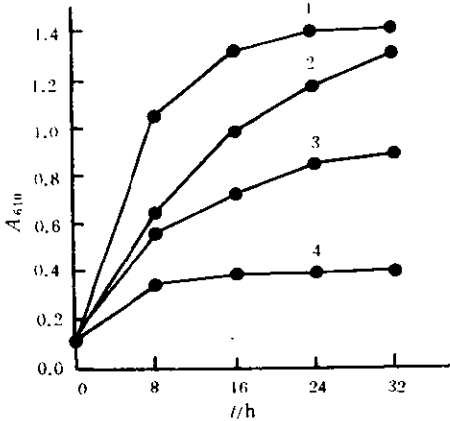


图1 乙硫氨酸对菌株 ST851 生长的影响

Fig. 1 The effect of the concentration of Ethionine on the growth of ST851

1. 不加乙硫氨酸 No Eth;
2. 150 µg / ml Eth +10 µg / ml L-methionine;
3. 80 µg / ml Eth;
4. 150 µg / ml Eth.

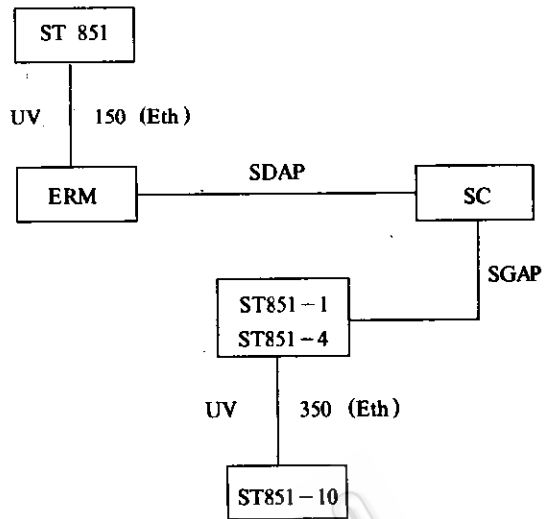


图2 菌株选育流程

Fig. 2 Genealogy of the mutants

- UV: 紫外线诱变 Ultraviolet irradiation;  
 (Eth): 乙硫氨酸浓度 The concentration of the ethionine (µg / ml);  
 ERM: 抗乙硫氨酸突变株 Ethionine-resistance mutants;  
 SDAP: 缺硫平板 Sulfate-deficient agar plate;  
 SC: 小菌落 Small colony;  
 SGAP: 限硫梯度平板 Sulfate-gradient agar plate.

### 2.2 高甲硫氨酸突变株的选育

以 ST851 为原始菌株,先后用不同剂量的紫外线进行处理,并将细胞悬液涂布在含 150µg / ml 乙硫氨酸的双层平板上,35℃ 培养 3d。原始菌株不能在其上生长,只有发生了突变而对结构类似物产生抗性的菌株才能正常生长。对得到的一系列抗乙硫氨酸突变株,在缺硫平板上进行复筛,选取生长慢、菌落小的菌株,再用含硫梯度平板反复验证,紫外线照射并逐渐加大培养基中乙硫氨酸的浓度直至 350µg / ml。先后挑出多株甲硫氨酸含量较高的突变株,对其中 ST851-1 菌株和 ST851-10 菌株进一步研究。筛选诱变过程见图 2。

### 2.3 突变株与原始菌株抗性比较

经复筛后得到的一系列突变株与原始菌株比较,大部分均为乙硫氨酸抗性菌株,而且随着诱变次数的增加,对乙硫氨酸的抗性也逐渐增加,直至 350µg / ml(表 1)。菌体甲硫氨酸含量增加 8.87mg / g-DCW,菌体蛋白质含量提高 9.4%(表 2)。

表 1 突变株与原始菌株 ST851 乙硫氨酸抗性的比较<sup>\*</sup>

Table 1 The comparison of ethionine-resistance between mutants and ST851

菌 株 Strains	Eth / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$				
	75	150	225	300	375
ST851	+	-	-	-	-
ST851-1	++	+	-	-	-
ST851-10	++	++	++	++	+

\* 35℃ 培养 3d 后的生长结果  
After incubation at 35℃ for 3d.

表 2 突变株与原始菌株甲硫氨酸含量的比较

Table 2 Comparison of protein and L-methionine content between mutants and ST851

菌 株 Strains	蛋白质含量	甲硫氨酸含量 <sup>*</sup>
	c(Protein) / (%)	c(L-Met) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
ST851	40.5	20.45
ST851-1	39.3	22.36
ST851-10	44.3	29.32

\* 干细胞重 Dry cell weight.

## 2.4 突变株 ST851-10 甲硫氨酸产生的营养调控

2.4.1 不同硫源对突变株 ST851-10 生长和甲硫氨酸合成的影响: 甲硫氨酸的生物合成需要无机硫, 在液体培养基中加入等摩尔的不同硫源, 30℃ 培养 24h, 比较菌体生长量和甲硫氨酸合成。由图 3 可见, 以硫酸镁为硫源时菌体生长最好, 也是甲硫氨酸合成的最适硫源。

2.4.2 不同碳源对菌体生长和甲硫氨酸合成的影响: 突变株 ST851-10 利用碳源广泛, 在合成培养基中加入不同碳源, 培养 24h 测其菌体生长量和甲硫氨酸含量, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 不管其菌体得率还是甲硫氨酸含量, 苹果渣浸出液均为最佳碳源。

表 3 碳源对菌株 ST851-10 生长和甲硫氨酸合成的影响

Table 3 The effects of various carbon compounds on the growth and L-methionine production of ST851-10

碳 源 Carbon compounds	生物量 <sup>*</sup>	甲硫氨酸含量 <sup>*</sup>
	Biomass / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	c(L-Met) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
蔗糖 Sucrose	8.4	0.52
葡萄糖 Glucose	8.0	1.40
木聚糖 Xylan	5.7	0.91
麦芽糖 Maltose	6.6	1.20
乳糖 Lactose	7.9	0.96
淀粉 Starch	3.2	0.75
EP	9.1	1.42

\* 干细胞重 Dry cell weight

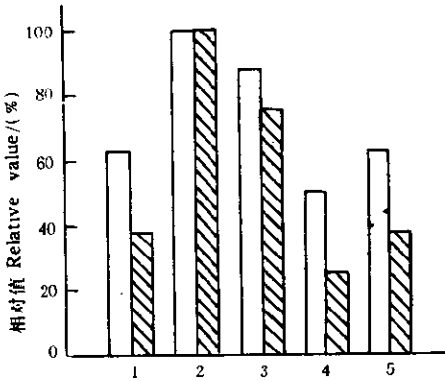


图3 硫源对菌株 ST851-10 生长和甲硫氨酸合成的影响

Fig. 3 The effects of various sulfate compounds on the growth and L-methionine production of ST851-10

□ 生物量 Biomass of ST851-10  
 ▨ 甲硫氨酸合成 Synthesis of L-methionine

1.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 2.  $\text{MgSO}_4$ ; 3.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 5.  $\text{NaHSO}_4$ .

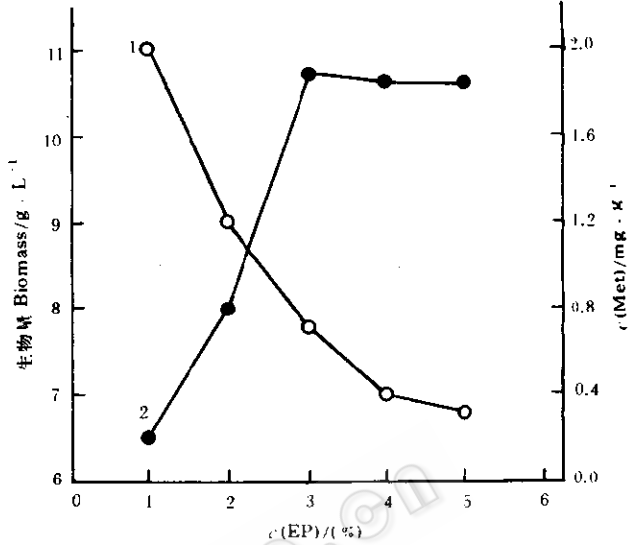


图4 碳源浓度对菌株 ST851-10 生长和甲硫氨酸合成的影响

Fig. 4 The effects of the concentration of carbon compounds on the growth and L-methionine production of ST851-10

1. 甲硫氨酸含量 Content of L-methionine;  
 2. 生物量 Biomass of ST851-10.

图4表明,以苹果渣浸出液为碳源进行培养时,其浓度对甲硫氨酸合成有较大影响。当培养基中含糖量降低时,单位体积的菌体生长量较低,而单位菌体的甲硫氨酸含量却最高。随着糖浓度的增加,两者呈现相反的变化趋势。这种现象可能是由于糖浓度的改变,培养基中C/N比例发生了变化,C/N值大,利于菌体生长;C/N值小,有利于甲硫氨酸的合成。要使甲硫氨酸大量合成须控制C/N值在适当的水平。

表4 氮源对菌株 ST851-10 生长和甲硫氨酸合成的影响

Table 4 The effects of various nitrogen compounds on the growth and L-methionine production of ST851-10

氮源 Nitrogen compounds	氮源含量 c/(%)	生物量* Biomass/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	甲硫氨酸含量* c(L-Met)/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	4.9	0.39
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.4	3.2	0.37
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.5	4.5	0.44
尿素 Urea	0.2	9.0	1.43
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.5	5.9	0.95
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.8	6.1	0.97

\* 干细胞重 Dry cell weight

**2.4.3 氮源对菌株 ST851-10 生长和甲硫氨酸合成的影响:** 在合成培养基中加入等摩尔量氮的不同氮源, 表 4 结果以尿素为最好, 磷酸二氢氨次之。

**2.4.4 较佳条件下菌株 ST851-10 生长及甲硫氨酸的合成情况:** 设计了用苹果渣作碳源, 以尿素作氮源, 加入适量  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $80\mu g/g$  培养基) 的苹果渣固态发酵培养基, 研究了突变株 ST851-10 在较佳条件下蛋白质及甲硫氨酸合成情况并与原始菌株 ST851 进行了比较。

表 5 指出了突变株 ST851-10 在苹果渣固态发酵培养基中蛋白质、甲硫氨酸含量都有明显提高, 分别为原始菌株的 1.2 倍和 1.4 倍, 甲硫氨酸含量较原始菌株提高了 44.9%。

**表 5 突变株 ST851-10 在苹果渣固态发酵培养基中蛋白质及甲硫氨酸合成情况**

Table 5 Comparison of protein content and L-methionine production between ST851-10 and ST851 in the pomace solid state fermentation medium

菌 株 Strains	蛋白质含量 c(Protein) / (%)	甲硫氨酸含量 c(L-Met) / (%)
ST851	25.96	0.49
ST851-10	30.01	0.71

ST851-10 株适宜生长 pH 为 6.0~6.5, 而苹果渣一般偏酸。在苹果渣固态发酵过程中, 分批适量补加尿素, 既有利于 ST851-10 株过量生长和甲硫氨酸的合成, 又可有效地控制培养基的 pH 变化幅度。

### 参 考 文 献

- [1] Shay L k, Wegner E H. *Adv in Ind Microbiol*, 1982, **24**: 305~311.
- [2] Samragy Y A, Chen J H, Zall R R. *Process Biochem*, 1988, **23**(1): 28~30.
- [3] Klaus M, Herrmgnn. Amino Acid Biosynthesis and Genetic Regulation. In: Krumphanzl V *et al.* Overproduction of Microbiol Products. New York: Academic Press, 1982. 463~473.
- [4] Sorsoli W A, Spence K D, Parks L K. *J Bacteriol*, 1964, **88**: 20~24.
- [5] Michael S, Kappy, Robert L, Matzenberg. *Biochem Biophys Acta*, 1965, **107**: 425~433.
- [6] 路志强, 龚建华, 丁久元, 等. 微生物学报, 1988, **28**(2): 131~135.
- [7] Saburo K S, Masahiko K, Ichiro C. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45**: 1437~1449.
- [8] Komatsu K, Yamada K, Kodaira R. *J Ferment Technol*, 1974, **52**: 93.
- [9] 张玉臻, 林学政, 刘 宏. 食品与发酵工业, 1996, 待刊.
- [10] Okanishi M. *Can J Microbiol*, 1970, **16**: 1139~1143.
- [11] 高培基, 张玉臻, 王祖农. 山大微生物, 1982, **2**: 1~15.
- [12] 奥斯本(罗明泉译). 食品营养成分分析. 北京: 中国食品出版社, 1987. 63~68.

## SCREENING OF L-METHIONINE-RICH MUTANT OF *TRICHOSPORON* AND NUTRITIONAL REGULATION

Zhang Yuzhen Kong Jian Ma Guirong

(Institute of Microbiology, Shandong University Jinan 250100)

**Abstract** The strain, *Trichosporon* Behr. ST851, was continually mutated by UV. A series of ethionine-resistance mutants were selected on the double layers agar plate in the presence of ethionine. The mutant ST851-10 had the capability of resistance to 350 $\mu$ g/ml DL-ethionine and the content of L-methionine was increased from 20.45mg/g-DCW to 29.32mg/g-DCW. Under the optimal culture conditions, there were 15.8% and 45.9% increase of protein and L-methionine content, respectively, as compared with those of ST851, in the solid state fermentation medium containing pomace, urea and MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O at 35 $^{\circ}$ C for 24 h. Further studies showed that L-methionine content of ST851-10 was increased as concentration of nitrogen source increased in the culture medium, but, the biomass of ST851-10 was decreased as concentration of carbon source decreased in the culture medium. Thus, in the process of solid state fermentation of pomace, it was suitable for growth and L-methionine synthesis of ST851-10, and also it can adjust the pH of medium with supplemented urea.

**Key words** L-methionine, *Trichosporon* Behr., Regulation mutant