

转鲑鱼生长激素基因酵母菌发酵特性的研究*

刘宗柱¹ 徐永立¹ 张培军¹ 王金宝²

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 莱阳农学院动物科学系 265200)

关键词 鱼生长激素, 转基因酵母菌, 发酵, 生物反应器

* 张培军、Ball 等研究表明, 外源性生长激素通过注射或浸泡的方法可加快鱼的生长^[1]。根据 Mclean 1987 年、Shunsuke 等 1993 年研究发现鱼类后肠具有吸收部分生长激素进入血液循环的特点, 本研究室将鲑鱼生长激素基因克隆进无毒无害的酵母菌中, 利用可控制的诱导条件, 培养出含鲑鱼生长激素的酵母菌, 直接掺入饵料, 使生长激素通过消化道吸收, 以促进鱼的生长。Jacqueline 等 1989 年指出, 由于携带外源基因的酵母菌与普通酵母菌的培养要求不同, 既要促使菌体快速生长又要保证外源基因的表达, 本研究的目的在于选择适宜的培养条件, 实现转基因酵母菌

的高密度培养及生长激素的高效表达。

1 材料与方法

酵母菌由本研究室与多伦多大学合作构建载体并转化、筛选获得。培养基为 MGY 培养和 MM 培养基。斜面保存的菌种先接种于 MGY 培养基中, 在 30℃, 摇床培养 18~20 h, 离心分离菌体, 转入 MM 培养

* 国家科委“九·五”攻关项目 96-L01-05-04 号。
中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3176 号。
实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 161 号。
收稿日期: 1997-01-31

基培养,以诱导其表达外源蛋白.培养装置为1 000 ml三角烧瓶、恒温摇床、Bioflo-300 生物反应器等。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶培养中转基因酵母的生长曲线

如图1所示,培养24 h之后,酵母生长进入对数期,培养60 h后才开始进入平台期.摇瓶培养时,其培养基pH值基本由YNB自身的缓冲系统决定,缓冲能力不强,易受其他因素影响;另一方面,摇瓶培养时,氧的供给也受到很大限制,酵母菌整个生长过程比较缓慢。

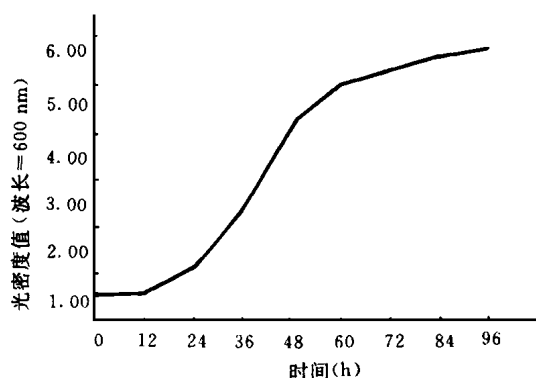


图1 MM培养基中酵母的生长曲线(摇瓶培养)

Fig.1 Growth curve of yeast in MM medium (in flask)

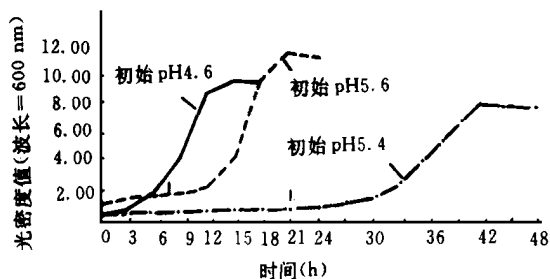


图2 不同pH条件下酵母的生长曲线

Fig.2 Growth curve of yeast in various pH

2.2 生物反应器中转基因酵母的生长曲线

2.2.1 酵母生长的最适pH值 培养液的pH值对于酵母的生长至关重要,由图2可见,该酵母菌在pH值4.6及5.6时生长缓慢,在pH值5.4时可以很快进入对数生长期.生物反应器对培养液的pH值可以自动控制,保持合适的pH值,维持酵母菌的快速生长。

2.2.2 培养液中主要营养成分的消耗 在MM培养基中,酵母菌主要利用其中的葡萄糖作为碳源和能源,氮作为氮源合成菌体蛋白和维持生长,为此考查了培养液中这两种营养成分的变化.如图3A所示,培养液中葡萄糖和氨氮浓度随酵母菌的生长迅速下降;当酵母菌的生长进入平台期后,其浓度已降低到很低的水平,并不再有明显变化.同时还发现,连续补充氨氮,使培养液中的氨氮维持较高的浓度,可以促进酵母菌对葡萄糖的利用(图3B)。

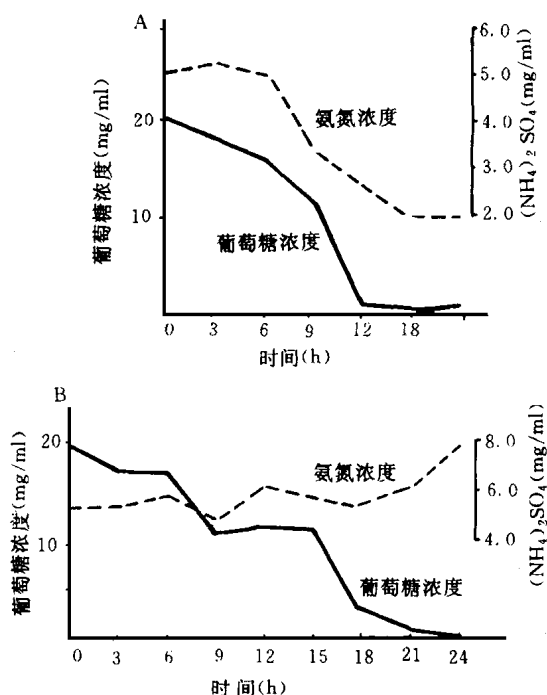


图3 培养液中葡萄糖及氨氮变化

Fig.3 Changes of glucose and ammonia in medium

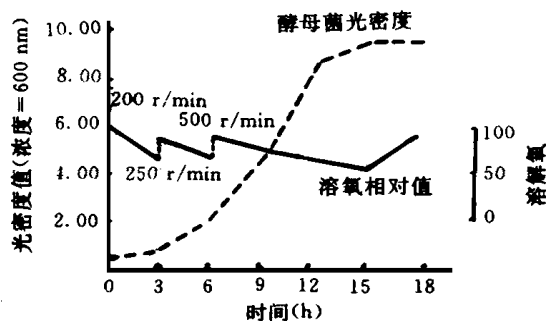


图4 培养液中溶解氧的变化

Fig.4 Changes of dissolved oxygen (DO) in medium

2.2.3 发酵过程中培养液溶解氧的变化 酵母

菌是耗氧微生物,代谢中需不断从培养液中摄取氧。在通气强度恒定的情况下,培养液中溶解氧的变化基本可以反映酵母菌的代谢强度和生长情况。提高搅拌速度,可以使溶氧值有所提高,当搅拌速度恒定在 500 r/min 时,随酵母菌的快速生长,溶氧值呈下降趋势,而当酵母菌的生长进入平台期后,溶氧值迅速上升(图 4)。

3 结语

转基因酵母用摇瓶培养时,超过 60 h 酵母菌的生长才能进入平台期,而反应器中在合适条件下,仅需 15 h 就可达到很高的光密度值,进入生长平台期。因此利用生物反应器,自动控制培养过程的温度、pH 值、搅拌速度(溶氧)等,维持酵母菌生长的最适条件,

可以大大提高发酵效率,缩短发酵时间。培养液 pH 值是影响其生长的重要因素,该酵母菌生长的最适 pH 值为 5.4,在发酵条件设定时要注意准确控制。发酵过程中溶氧值的变化,可以作为酵母菌生长代谢情况直观的指标,故在发酵过程中需密切关注溶解氧的变化,以便及时结束发酵,有利于外源蛋白的表达,获得最高的表达产物。随酵母菌的生长,培养液中的主要营养成分被很快消耗,成为制约酵母菌生长的主要因素,本研究的结果为进一步丰富培养基营养成分及采用流式发酵工艺提供了实验参考和技术资料。

主要参考文献

- 1 张培军、徐永立等。海洋科学。1995, 6: 1~2

STUDY ON FERMENTATION CHARACTER OF FISH GROWTH HORMONE RECOMBINANT YEAST

LIU Zong-zhu¹, XU Yong-li¹, ZHANG Pei-jun¹, WANG Jin-bao²

(¹Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(²Department of Animal Science Laiyang Agriculture College 265200)

Received: Jan. 31, 1997

Key Words: Fish growth hormone, Recombinant yeast, Fermentation, Bio-reacter

Abstract

In flask, the recombinant yeast grows slowly. With bio-reacter controlling the medium in a favourable condition, the yeast grows quickly. This study also shows that with the growth of yeast glucose and ammonia in medium are consumed quickly which constricting the growth of yeast and that the changes of dissolved oxygen and glucose in medium can be adequate parameters indicating the growth of yeast.