

# 高产谷胱甘肽的酵母融合菌株的选育及其培养条件的研究

刘 娟<sup>1</sup> 何秀萍<sup>2</sup> 王雅琴<sup>1</sup> 刘春秀<sup>2</sup> 孔英俊<sup>1</sup> 张博润<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 北京化工大学 北京 100029) (<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 通过初筛、单倍体分离、诱变及原生质体融合技术选育到一株谷胱甘肽产量明显提高的融合菌株 ZJF-71, 其谷胱甘肽产量分别为亲株的 1.59 和 1.42 倍。并对其培养条件进行了研究, 结果表明碳源、装液量和培养时间对融合菌株 ZJF-71 生产谷胱甘肽的影响较为显著。在优化的培养条件下, 发酵液中谷胱甘肽总量达到 185.3mg/L, 为初始培养条件下的 2.8 倍。经遗传稳定性分析, 证明融合菌株 ZJF-71 是遗传稳定的。

**关键词** 酵母菌, 谷胱甘肽, 育种, 培养条件

中图分类号: Q933 文献标识码: B 文章编号: 0001-6209(2003)01-0099-05

谷胱甘肽(Glutathione, 简称 GSH)是生物体内一种重要的活性三肽, 由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过肽键缩合而成。GSH 广泛分布于有机体中, 在蛋白质和 DNA 的合成、氨基酸的转运、细胞的保护等重要的生物学现象中起着直接或间接的作用, 临床上可用于治疗肝脏疾病、解除重金属的中毒等<sup>[1,2]</sup>。GSH 最突出的功能体现在它的抗氧化作用上, 被称为“三倍效能的抗衰老氨基酸”<sup>[3]</sup>。GSH 的生产方法有萃取法、化学合成法、发酵法和酶法。其中发酵法生产 GSH 的工艺及方法不断得到改进, 目前已经成为生产 GSH 最普遍的方法。发酵法所用的菌种一般为酵母菌, 但普通酵母 GSH 含量较低, 因此必须对其进行改良。所采用的方法主要有: 用诱变剂进行菌种诱变提高产量<sup>[4]</sup>, 利用基因重组技术构建高产菌<sup>[5,6]</sup>。本文利用原生质体融合技术, 将生物量高的酵母菌单倍体与细胞 GSH 含量高的单倍体融合, 构建 GSH 的高产菌株, 并对其发酵条件进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株** 295 株不同种属的酵母菌为实验的初筛菌株, 统一编号为 Y1 ~ Y295, 标准交配型菌株 ZF-5-8(a) 和 ZW-21( $\alpha$ ) 均由中国科学院微生物研究所酵母菌分子遗传与育种研究组保存。

**1.1.2 培养基**: YEPD 培养基, 麦芽汁培养基, McClary 生孢培养基, YNB 培养基, YNBS 培养基及 YNB 选择培养基<sup>[7]</sup>; 三角瓶发酵培养基由发酵实验具体而定。

**1.1.3 培养条件**: 菌种筛选培养条件: 从新鲜斜面接种于 2mL 麦芽汁培养基中, 摇床(30℃, 200r/min)培养 16 h, 接种于 5mL 麦芽汁培养基中, 摇床(30℃, 200r/min)培养 24 h。

\* 通讯作者

作者简介: 刘 娟(1977 - )女, 山东青岛人, 北京化工大学硕士研究生, 研究方向: 生物化学及分子生物学。

收稿日期: 2002-06-07, 修回日期: 2002-09-16

三角瓶发酵培养条件:从新鲜斜面接种于 10mL YEPD 培养基中,摇床(30℃,200r/min)培养 16 h,以 5%的接种量接到发酵培养基中,其他条件由发酵实验具体确定。

**1.1.4 试剂:** GSH 标准品购自华美生物工程公司,5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(简称 DTNB)购自 Sigma 公司,其余均为国产分析纯试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 单倍体的分离、诱变及原生质体融合:** 参照文献 [7]。

**1.2.2 生物量的测定:** 取一定体积发酵液 3 500r/min 离心 5min,水洗两次,收集菌体,85℃烘干至恒重,称量。

**1.2.3 细胞 GSH 含量的分析:** 因为 GSH 为胞内产物,采用冻溶法及在沸水浴中煮沸 10min 破碎细胞,离心获得上清液,参照文献 [8] 测定 GSH 含量。

## 2 结果和讨论

### 2.1 初筛结果

对 295 株不同种属的酵母菌的生物量和 GSH 含量进行了测定,结果发现不同菌株生物量和 GSH 含量有较大的差异。通过初筛获得 16 株 GSH 含量较高的菌株和 12 株生物量较高的菌株,部分结果列于表 1。

表 1 不同酵母菌株生物量及 GSH 含量的比较

Table 1 Comparison of biomass and GSH content among different yeast strains

Strains	Y7	Y23	Y52	Y64	Y72	Y217	Y59	Y247
Biomass( g/L )	15.4	14.7	14.5	15.0	7.1	7.2	5.3	6.0
GSH content( mg/g )	3.3	2.8	4.1	3.2	7.5	8.1	7.1	9.1

注:Y7. 发酵假丝酵母(*Candida fermentati*);Y23. 麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*);Y52. 异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*);Y64. 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);Y72. 发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*);Y217. 鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*);Y59. 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);Y247. 葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)

### 2.2 GSH 高产菌的选育

从初筛菌株中挑选出一株生物量较高的酿酒酵母二倍体 Y64 和一株 GSH 含量较高的葡萄汁酵母二倍体 Y247,按常规方法对其进行单倍体分离。分别测定单倍体菌株的生物量和 GSH 含量,从中选出生物量较高的单倍体 Y64-32(a)和 GSH 含量较高的单倍体 Y247-6-21(a<sub>met</sub>),用 DES 对其进行诱变,从突变株中选出带有不同氨基酸缺陷标记的 Y64-32-76(a<sub>lys</sub>)和 Y247-6-21(a<sub>met</sub>)作为融合亲株。按文献 [7] 进行原生质体融合,共获得 228 个融合子,从中选出生物量和 GSH 含量明显优于亲株的融合菌株 ZJF-71。亲株及融合菌株的生物量和 GSH 含量的比较如图 1 所示。融合菌株 ZJF-71 具有双亲株的优良性状,其 GSH 总量明显高于亲株,分别是原始亲株 Y64 和 Y247 的 1.59 倍和 1.42 倍。融合菌株 ZJF-71 经传代 30 代培养后,分离单菌落进行遗传稳定性分析,未发现核标记基因的分离现象,而且生物量和 GSH 含量没有显著的变化,证明融合菌株 ZJF-71 是遗传稳定的。

### 2.3 融合菌株 ZJF-71 的培养条件优化

**2.3.1 碳源的影响:** 采用 YEPD 培养基配方,分别选择葡萄糖、蔗糖(食用白糖)、麦芽糖

和糖蜜作为碳源,发酵 24 h 后测定生物量及 GSH 含量。结果表明,碳源的种类对融合菌株 ZJF-71 的生长及 GSH 的合成有一定的影响。同以往报道<sup>[9]</sup>有所不同的是,在以上几种碳源中,以蔗糖的效果最好,其次为麦芽糖、葡萄糖,而用糖蜜作碳源时,生物量和 GSH 的含量都很低。进一步研究不同蔗糖浓度对融合菌株 ZJF-71 合成 GSH 的影响(图 2)。在 16% 的糖浓度时生物量达到最高,糖浓度再提高时,细胞的生长受到明显的抑制,表明融合菌株 ZJF-71 不耐高糖。GSH 含量随糖浓度的升高也逐渐降低,尤其当糖浓度超过 6% 时,对 GSH 合成的抑制作用更加明显。因此选择 6% 的糖浓度进行后续试验。

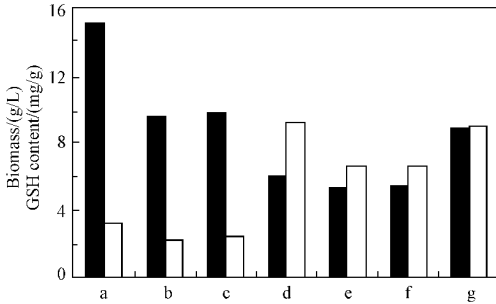


图 1 亲株及融合菌株 ZJF-71 的生物量及 GSH 含量的比较

Fig.1 Comparison of the biomass and GSH content among parental strains and fusant strain

a. Y64; b. Y64-32; c. Y64-32-76; d. Y247; e. Y247-6; f. Y247-6-21; g. Fusant strain ZJF-71; ■. Biomass; □. GSH content.

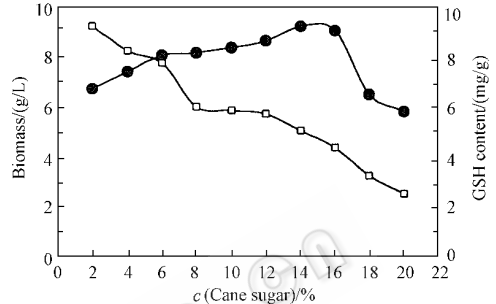


图 2 蔗糖浓度对融合菌株 ZJF-71 生物量及 GSH 含量的影响

Fig.2 Effect of sucrose concentration on the biomass and GSH content by fusant strain ZJF-71

●. Biomass □. GSH content.

**2.3.2 氮源的影响** 研究了不同浓度的蛋白胨(0.5%~5.0%)对融合菌株 ZJF-71 生物量及 GSH 合成的影响,发现生物量随着蛋白胨浓度的提高而提高,而 GSH 含量呈下降趋势,蛋白胨浓度为 1% 时,GSH 总量最高。以上述确定的培养基为基础,研究不同浓度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素对融合菌株 ZJF-71 合成 GSH 的影响。结果表明  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的添加对细胞的生长有一定的抑制作用,这三种无机氮源的添加对 GSH 的总量并无多大影响,因此确定发酵培养基中不添加额外的无机氮源。

**2.3.3 氨基酸的影响** 培养基中分别添加终浓度为 2mmol/L 的谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、蛋氨酸和丝氨酸。结果如图 3 所示,除蛋氨酸外,其余几种氨基酸均会抑制细胞的生长,半胱氨酸和谷氨酸能够促进胞内 GSH 的合成,尤以半胱氨酸的促进作用最明显,因此尽管这两种氨基酸对细胞生长有一定的抑制作用,但仍能够提高发酵液中 GSH 的总量。后续实验中,发酵培养基中添加终浓度为 2mmol/L 的半胱氨酸。

**2.3.4 初始 pH 的影响** 培养基的初始 pH 分别调到 3.0~8.0 培养 24h 后,测定融合菌株 ZJF-71 的生物量及胞内 GSH 的含量。当初始 pH 值在 5.0~8.0 时,生物量和胞内 GSH 含量都能保持在较高的水平。说明在发酵过程中,融合菌株 ZJF-71 对 pH 的要求并不苛刻,我们选择初始 pH 为 7.0 进行后续实验。

**2.3.5 装液量的影响** :研究了在 250mL 三角瓶内不同装液量对融合菌株 ZJF-71 发酵生产 GSH 的影响。结果表明(图 4)随着装液量的增加,生物量和 GSH 含量均呈逐渐下降的趋势。由于细胞内 GSH 合成是一个耗氧过程,装液量少时,供氧充足,菌体生长旺盛,细胞内 GSH 含量也较高。考虑到设备利用率,确定装液量为 30mL。

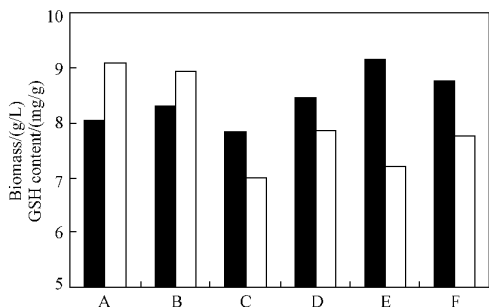


图 3 不同氨基酸对融合菌株 ZJF-71 生物量及 GSH 含量的影响

Fig.3 Effect of amino acids on the biomass and GSH content of fusant strain ZJF-71

A. Cys ; B. Glu ; C. Gly ; D. Ser ; E. Met ; F. Control ;  
 ■ . Biomass ; □ . GSH content .

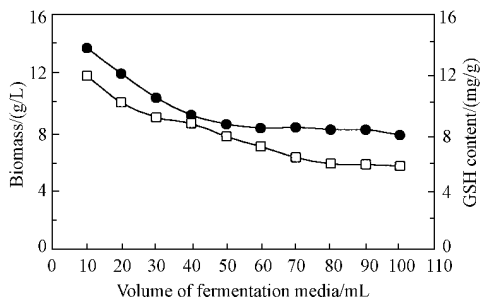


图 4 通气量对融合菌株 ZJF-71 生物量及 GSH 含量的影响

Fig.4 Effect of aeration on the biomass and glutathione content by fusant ZJF-71

● . Biomass ; □ . GSH content .

**2.3.6 培养时间的影响** 培养时间对融合菌株 ZJF-71 的生物量和 GSH 含量的影响如图 5 所示。整个发酵过程可以分为两个阶段 (1)细胞的生长阶段 (2)GSH 的大量累积阶段。发酵时间为 16h 时,生物量已经达到较高的水平,此后随着发酵时间的延长,生物量逐渐增加,在 34h 左右达到最高值,38h 以后开始缓慢下降。对于 GSH 而言,在前 22h 内细胞内并未大量合成 GSH,22h 以后胞内 GSH 含量开始大幅度提高,在 32h 时 GSH 含量达到最高值,说明这一阶段细胞内在大量累积 GSH。

确定优化后的发酵条件为:培养基组成为 6%蔗糖,1%蛋白胨,1%酵母粉,2mmol/L 半胱氨酸,初始 pH 7.0,装液量 30mL,在 30℃下发酵 32h。从表 2 可以看出,优化的发酵条件下获得的 GSH 的总量是初始培养条件下的 2.8 倍。

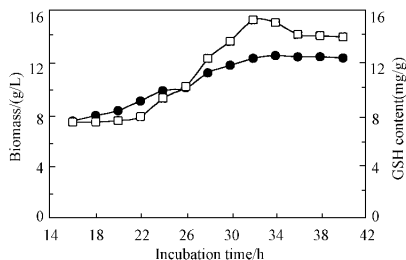


图 5 培养时间对 ZJF-71 生物量及 GSH 含量的影响

Fig.5 Effect of incubation time on the biomass and glutathione content by fusant ZHF-71

● . Biomass ; □ . GSH content .

表 2 优化前后融合菌株 ZJF-71 生物量及 GSH 含量的比较

Table 2 Comparison of the biomass and GSH content by fusant strain ZJF-71 under initial and optimal condition

Parameter	Culture condition	
	Initial	Optimal
Biomass( g/L )	8.2	11.8
GSH content( mg/g )	8.1	15.7
GSH yield( mg/L )	66.4	185.3

国内关于高产 GSH 酵母菌株选育的工作开展的较少,而且一般是通过诱变提高细胞内 GSH 含量。我们通过单倍体分离、DES 诱变、原生质体融合技术成功构建了高产 GSH 的融合菌株 ZJF-71。这是利用原生质体融合技术获得 GSH 高产菌株的首次尝试。融合菌株 ZJF-71 具有双亲的优良性状,遗传性状稳定。在此基础上,研究了培养条件对其生长和 GSH 合成的影响,融合菌株 ZJF-71 能够较好的利用蔗糖,而且对发酵初始 pH 要求不苛刻。在优化培养条件下,GSH 总量可以达到 185.3mg/L。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Spector D, Labarre J, Toledano M, *et al.* A genetic investigation of the essential role of glutathione. *J Biol Chem*, 2001, **276**:7011 ~ 7016.
- [ 2 ] Udeh K O, Achremowicz B. High-glutathione containing yeast *Saccharomyces cerevisiae*: optimization of production. *Acta Microbiol Pol*, 1997, **46**:105 ~ 114.
- [ 3 ] 徐汉生, 奚农葆. “抗氧化物之王”谷胱甘肽的研究与开发. *湖北化工*, 2000, **5**:1 ~ 3.
- [ 4 ] 詹谷宇, 田 萍, 刘卫东, 等. 酵母菌生物合成谷胱甘肽. *药学报*, 1990, **25**(7):494 ~ 499.
- [ 5 ] 李华钟, 李 寅, 林金萍, 等. 有谷胱甘肽合成活性重组大肠杆菌的构建及合成反应过程. *微生物学报*, 2001, **41**(1):16 ~ 23.
- [ 6 ] Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, *et al.* Expression of the glutathione-synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*, 1989, **68**:390 ~ 394.
- [ 7 ] 贾盘兴, 蔡金科, 马德钦, 等. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 8 ] 赵旭东, 魏东芝, 万 群, 等. 谷胱甘肽的简便测定法. *药物分析杂志*, 2000, **20**(1):34 ~ 37.
- [ 9 ] Liu C H, Hwang C F, Liao C C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*, 1999, **34**:17 ~ 23.

## The Breeding of High Glutathione-producing Strain and Optimization of Culture Condition

Liu Juan<sup>1</sup> He Xiuping<sup>2</sup> Wang Yaqin<sup>1</sup> Liu Chunxiu<sup>2</sup> Kong Yingjun<sup>1</sup> Zhang Borun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Beijing University of Chemical Technology Beijing 100029, China)

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Academia Sinica Beijing 100080, China)

**Abstract**: High glutathione-producing strain ZJF-71 was constructed by primary screening, isolation of haploid, mutagenesis and protoplasts fusion. The yield of glutathione of the fusant ZJF-71 is 1.59 and 1.42 times that of the parental strains Y64 and Y247, respectively. The factors that affected the biomass and glutathione content of the fusant ZJF-71 were also tested. The highest level of glutathione was obtained in 32 h at 30°C and 200 r/min, when 30 mL of culture in 250-mL shake flasks was incubated in fermentation medium which contained (w/v): 6% cane sugar, 1% peptone, 1% yeast extract, and 2mmol/L cysteine. Glutathione yield under the optimal fermentation condition showed a 2.8-fold improvement over that of the initial condition. The fusant ZJF-71 is stable in genetic by analysis of genetic stability.

**Key words**: Yeast, Glutathione, Breeding, Culture condition