

谷胱甘肽(GSH)高产酵母菌株的初筛及营养条件优化

袁宏丽, 蔡俊, 邱雁临

(湖北工业大学生物工程学院, 工业微生物省重点实验室, 湖北 武汉 430068)

摘要: 对实验室保藏的 14 株不同种属的酵母菌株的谷胱甘肽(GSH)产量进行了比较, 发现其中 log 酵母菌株的 GSH 产量最高, 达 127.785 mg/L。对其营养条件进行了研究, 发现其最佳碳源为葡萄糖; 硝酸盐会抑制其生长, 而有机氮源对其生长有利; 考虑到磷和钾对酵母细胞生长及发酵代谢的作用, 选择 KH_2PO_4 为培养基中的基本成分。采用正交试验对培养基的基本成分进行优化, 在最佳培养条件下 log 酵母的 GSH 产量有较大幅度的提高, 达到 148.547 mg/L。

关键词: 谷胱甘肽; log 酵母菌株; 筛选; 培养基; 优化

中图分类号: TQ920; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)01-0012-04

Initial Screening of High-yield Yeast Strain and Optimization of Nutritional Conditions for Glutathione(GSH)

YUAN Hong-li, CAI Jun, QIU Yan-lin

(Key Laboratory of Hubei Industrial Microbiology, School of Biotechnology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: Comparing the yield of glutathione from 14 different species of yeast strains kept in the Key Lab of Hubei Industrial Microbiology, it was found that the highest glutathione yield was 127.785 mg/L achieved by *Saccharomyces ludwigii* log. The nutritional conditions were further investigated. Results showed that the optimum carbon source was glucose. Nitrate could inhibit the growth of yeasts, and organic nitrogen sources could benefit the growth. For the growth of yeast cell and the metabolism in fermentation, KH_2PO_4 was selected as one of the basic ingredients of culture medium. The basic medium ingredients were also optimized with orthogonal test. The yield of GSH by *Saccharomyces ludwigii* log could be greatly improved and up to 148.547 mg/L.

Key words: glutathione; yeast strain of *Saccharomyces ludwigii* log; screening; culture medium; optimization

谷胱甘肽(Glutathione)是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的一种同时含有 γ -谷氨酰基和巯基的生物活性三肽化合物。主要有还原型(GSH)和氧化型(GSSH)两种形态, 在机体中大量存在并起主要作用的是 GSH。GSH 存在于所有生物细胞中, 以酵母、小麦胚芽和动物肝脏中的含量最高^[1]。目前, 工业上使用的发酵法生产 GSH, 就是采用廉价的糖类原料, 利用微生物自身的物质代谢来进行 GSH 生物合成的方法。通常, 主要的碳源为葡萄糖、蔗糖、糖蜜及玉米浆等, 氮源为蛋白胨、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等^[2]。GSH 是胞内产物, 一般情况下, 微生物细胞中 GSH 含量不高, 会加大提取过程中的生产成本, 因此, 发酵法生产 GSH 的关键问题在于如何提高细胞密度以及微生物体内的 GSH 含量, 二者

收稿日期: 2007-05-09

作者简介: 袁宏丽(1978-), 女, 硕士研究生, 主要从事发酵工艺及代谢调控研究; 通讯作者: 蔡俊

的有机结合将有利于 GSH 产量的大幅度提高^[2-3]。我国对 GSH 的研究尚处于起步阶段, 近 30 年来直接发酵法生产 GSH 的研究, 一直以酵母菌作为首选, 其中以酿酒酵母最为常见^[3]。但酵母细胞的 GSH 含量较低, 存在酵母用量大、收率低等缺点^[5], 故一直未能实现工业化生产。尽管如此, 有关 GSH 生物合成的研究依然是生化工程领域的一个热点, 因此选育高产 GSH 的优良酵母菌株十分重要。

本实验室保藏的 14 株酵母菌株, 在生产过程中经过了自然选育, 可能具有较高的 GSH 合成能力。同时这些菌株具有一些有利性状, 如生长速度快, 生物量高, 营养要求低等^[4]。本文以 GSH 产量为筛选指标, 筛选出 GSH 产量高的酵母菌株, 对其的营养条件进行研究后, 将培养基基本成分进行了优化, 为以后的诱变育种及原生质体融合育种选育高产谷胱甘肽的菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌株

啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*; 假丝酵母 *Candida tropicalis*; AS2399 *Saccharomyces cerevisiae*; 科 M2.558 *Saccharomyces cerevisiae*; Log 酵母 *Saccharomyces ludwigii*; ω 酵母 *Candida tropicalis*; Xf2.406 *Saccharomyces cerevisiae*; K 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*; DAB-2 *Saccharomyces cerevisiae*; Xf *Saccharomyces cerevisiae*; 产酯酵母 *Saccharomyces torulopsis*; 科 M2.406 *Saccharomyces cerevisiae*; Rasse12 *Saccharomyces cerevisiae*; 葡萄酒酵母 *Saccharomyces uvarum*, 共 14 株菌株均为湖北工业大学生物工程学院实验室保藏。

1.1.2 培养基

(1) YEPD 培养基(斜面培养及平板分离用)(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, 琼脂 20, pH 6.0, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

(2) 摇瓶培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0.5, pH 6.0, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

(3) 无碳基础培养基(用于最适碳源的确定)^[7](g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, KH_2PO_4 1, NaCl 0.1, CaCl_2 0.1, 酵母膏 0.2, 水洗琼脂 20, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

(4) 硝酸盐的同化试验培养基^[7](g/L): 葡萄糖 20, KH_2PO_4 1, NH_4NO_3 5, MgSO_4 0.5, 酵母膏 0.1, 水洗琼脂 20, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.1.3 试剂

2%偏磷酸: 称取偏磷酸 2 g, 加蒸馏水溶解, 定容至 100 mL; 0.001 mol/L 碘酸钾: 准确称取 0.2140 g 碘酸钾, 用蒸馏水溶解, 并定容到 1 L; 5%碘化钾: 称取碘化钾 5 g, 加蒸馏水溶解定容至 10 mL; 0.5% 淀粉指示剂: 称 0.5 g 可溶性淀粉, 用少量水调匀, 加入到 80 mL 沸水中, 煮沸至透明, 冷却后用蒸馏水定容至 100 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件的选择

由于菌株种类不同, 为了能较快地筛选出目的菌株, 在菌种初筛时将培养条件进行统一。培养基采用 YEPD 培养基, 培养温度为 30 °C, 摇床转速 150 r/min^[6], 培养时间 48 h。

1.2.2 培养方法

(1) 菌株活化

从保藏斜面将菌株接入 YEPD 培养基斜面培养,

待斜面上有菌体生长后再转接 1 次, 进行第 2 次活化, 30 °C, 培养 24 h。

(2) 种子培养: 从第 2 次活化的斜面上用 2 mL 无菌水刮洗菌体, 接入摇瓶培养基, 30 °C, 150 r/min 培养 1 h。(250 mL 三角瓶中盛 50 mL 培养基)

(3) 细胞培养: 种子培养好后以 10% 的接种量, 接入摇瓶培养基中, 30 °C, 150 r/min 培养 24 h。

1.2.3 菌种筛选方法

离心收集摇瓶中的菌体, 测各菌株的 GSH 产量。挑选 GSH 产量高的菌株。

1.2.4 碳源的选择试验

在无碳基础培养基中分别添加 2% 的不同碳源, 将菌株分别接入到添加了不同碳源的摇瓶中, 30 °C 下, 150 r/min 培养 24 h, 观察菌体的生长情况。

1.2.5 硝酸盐的同化试验

分别取未加 NH_4NO_3 及加了 NH_4NO_3 的液体培养基于 5 mL 大试管中, 接入菌体, 以未加 NH_4NO_3 的试管作为对照, 30 °C, 培养 72 h 后, 观察试管中液体是否有混浊现象。

1.2.6 log 酵母培养基基本成分分配比的正交试验

log 酵母培养基基本成分分配比正交试验的考察因素及水平, 见于表 1。通过正交试验可确定 log 酵母培养基基本成分的优化配比, 采用 3 因素 3 水平的正交实验设计表(表 1)设计实验。正交试验结果进行极差分析。

表 1 正交实验设计表

Table 1 Orthogonal design table

水平	A 葡萄糖/(g/L)	B 蛋白胨/(g/L)	C KH_2PO_4 /(g/L)
1	10	10	1
2	20	20	2
3	30	30	3

1.3 谷胱甘肽产量的测定—碘量法

收集菌体后, 以冻融法对细胞进行破壁处理后, 用碘量法来测定 GSH 的产量。碘量法: 取离心管中的溶液 1 mL 于比色管中, 加入 2%偏磷酸 1 mL。5% 碘化钾 0.2 mL, 1 滴淀粉指示剂, 用 0.001 mol/L 的碘酸钾溶液滴定至溶液刚好变蓝为止。记录碘酸钾溶液的用量, 查标准曲线可计算出 GSH 产量。

2 结果与讨论

2.1 14 株酵母菌的 GSH 产量

按照实验方法, 对这 14 株酵母菌株进行摇瓶培养, 测定 GSH 含量, 其结果见表 2。

表 2 酵母菌的 GSH 产量
Table 2 Output of glutathione

菌株	GSH 产量/(mg/L)	菌株	GSH 产量/(mg/L)
AS2399	23.979	Xf2.406	41.280
科 M 2.558	58.581	DAB-2	41.282
ω 酵母	75.882	Xf	58.581
Rase12	77.612	科 M 2.406	41.270
Log 酵母	127.785	假丝酵母	41.280
K 酵母	58.581	产酯酵母	38.579
啤酒酵母	23.979	葡萄酒酵母	23.979

由表 2 可知,在这 14 株酵母菌株中,log 酵母 GSH 的产量最高,可达 127.785 mg/L。

2.2 log 酵母的培养基优化

2.2.1 碳源的选择

以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、糖蜜和可溶性淀粉等常用碳源作为 log 酵母的唯一碳源,经过摇瓶发酵,测定 GSH 含量,其结果见表 3。

表 3 各种碳源对 log 酵母 GSH 合成的影响

Table 3 Effect of carbon source on the glutathione yield for *Saccharomyces ludwigii* log

碳源	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	糖蜜	乳糖	可溶性
						淀粉
GSH 产量/(mg/L)	93.183	79.343	89.723	82.803	-	-

由表 3 可知,以葡萄糖作唯一碳源时,log 酵母的 GSH 产量最高。

2.2.2 氮源的选择

GSH 是一种含氮量(13.68%)较高的物质,因此在生物合成 GSH 的过程中,合适的氮源供给是非常必要的。Khan 等认为硫酸铵是细胞产生 GSH 的适宜氮源、但铵盐的消耗容易刺激酒精的产生,所以利用 *S.cerevisiae* 合成 GSH 时大都采用有机氮源^[3]。

2.2.2.1 硝酸盐同化试验

表 4 log 酵母的硝酸盐同化试验结果

Table 4 Experimental data of nitrate assimilation for *Saccharomyces ludwigii* log

菌株	不添加硝酸盐	添加硝酸盐
Log 酵母	生长	不生长

表 4 为 log 酵母的硝酸盐同化试验,结果表明,硝酸盐对 log 酵母生长负影响较大,能够抑制其生长。

2.2.2.2 不同氮源对 log 酵母 GSH 合成的影响

结合上述几个试验的营养条件分析知,在以葡萄

糖作为碳源且在培养基中配比相同的条件下,不同的氮源对 log 酵母 GSH 的产量有影响,以单一的无机氮源作为唯一氮源时,对 log 酵母合成 GSH 不利,而有机氮源有利于 GSH 的合成。

综上所述,氮源采用有机氮源。

2.2.3 磷酸盐的选择

磷是构成菌体中核酸的重要元素,也是辅酶的组成成分之一,在能量转换过程中起着关键作用。而 K^+ 是细胞中许多酶的激活剂^[3],因此在上述试验所使用的培养基中均将 KH_2PO_4 作为基本成分的一种。

2.2.4 log 酵母培养基基本成分配比正交试验结果分析

确定了培养基中的基本成分后,进一步利用正交试验确定这些基本成分的合适配比。

表 5 实验结果及极差分析表

Table 5 Calculation of data of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	GSH/(mg/L)
1	1	1	1	107.024
2	1	2	2	117.405
3	1	3	3	120.865
4	2	1	2	127.785
5	2	2	3	120.865
6	2	3	1	113.945
7	3	1	3	110.484
8	3	2	1	113.945
9	3	3	2	110.484
K1	115.098	115.098	111.638	
K2	120.865	117.405	118.558	
K3	111.638	115.098	117.405	
R	9.227	2.307	6.920	

正交试验结果及极差分析见于表 5。由表 5 可知,各因素对 log 酵母合成 GSH 的影响力为 $R(A) > R(C) > R(B)$, 实验选取的最优组合是 $A_2B_2C_2$, 即培养基的基本成分配比(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 20, KH_2PO_4 2, 经实验验证, GSH 产量为 148.547 mg/L, 比优化前提高 16.2%。

3 结论

对实验室保存的 14 种酵母菌株 GSH 产量的测定发现,log 酵母的 GSH 产量最高,达到 127.785 mg/L。研究了其营养条件,发现它的最佳碳源为葡萄糖,适宜其生长及 GSH 合成的为有机氮源,对磷酸盐与醇

(下转第 11 页)