

## 环境条件及摇瓶补糖策略对谷胱甘肽发酵的影响

李 寅 陈 坚 周楠迪 傅为民 阮文权 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室 无锡 214036)

**摘 要** 研究了酵母摇瓶发酵中 pH、装液量、初糖浓度、碳氮磷比和补糖方式对谷胱甘肽(GSH)发酵的影响。结果表明,GSH 发酵适宜的初始 pH 和装液量分别为 6.0 和 500ml 锥形瓶内装液量 60ml。初糖浓度对 GSH 发酵有较大的影响,超过 12g/L 的初糖浓度将减少胞内 GSH 含量。应用计算得出的一种以控制比生长速率为目的的摇瓶补糖策略,在总糖浓度为 26.2g/L 下发酵 12h,最终细胞浓度和胞内 GSH 含量分别达到 8.78g/L 和 13.6mg/g,发酵液内 GSH 总量达到 119.4mg/L,细胞对糖产率达到 0.335g/g。

**关键词** 谷胱甘肽,面包酵母,发酵

学科分类号 Q939.97

谷胱甘肽(Glutathione, GSH)是存在于大多数动物、植物和微生物中的最主要的非蛋白巯基化合物。它是一种重要的生化药物,在生物化学等基础研究领域中也一直受到人们的关注。随着 GSH 更多的功能和性质被发现,人们在食品添加剂、临床医学和运动营养学上对它的兴趣在日益增长,其需求量不断增加。

自 1921 年 Hopkins 确证了 GSH 的结构以来<sup>[1]</sup>,人们对 GSH 的生产和应用进行了广泛深入的研究。由于化学合成法生产的 GSH 需进行光学拆分,因此,利用能生物合成 GSH 的细胞或酶进行高纯度 GSH 的生产是到目前为止最具潜力的方法。大多数酵母和革兰氏阴性菌能积累 GSH,国外已有学者考察过影响动物细胞<sup>[2]</sup>和细菌<sup>[3,4]</sup>生产 GSH 的因素,Takata<sup>[5]</sup>和 Murata<sup>[6]</sup>分别对固定化 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 生产 GSH 进行了系统研究,Shimizu<sup>[7]</sup>和 Alfafara<sup>[8]</sup>则分别报道了 *S. cerevisiae* 流加发酵系统生产 GSH 的优化控制结果。国内除卓肇文等<sup>[9]</sup>在 80 年代末曾开展过从酵母中提取 GSH 的研究以及詹谷宇等<sup>[10]</sup>曾选育出高 GSH 含量的假丝酵母以外,对发酵法生产 GSH 的研究甚少,利用面包酵母发酵生产 GSH 的研究至今未见报道。由于面包酵母(*S. cerevisiae*)具有高 GSH 含量和生长速度快的优点而成为 GSH 的工业化生产的首选菌株<sup>[5]</sup>。本文在前文研究的基础上<sup>[11]</sup>,考察了 pH、摇瓶装液量及碳氮磷比及重点研究了补糖方式对 GSH 摇瓶发酵的影响,再结合前人的研究经验,计算得出了较优的摇瓶补糖策略,并对这一策略进行了实验验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) WSH-J701(本研究室保藏号),GSH 积累株。

江苏省跨世纪学科带头人科研基金资助项目。

收稿日期:1997-02-28,修回日期:1997-06-23。

## 1.2 培养基和培养方法

见文献[11]。

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 葡萄糖浓度测定：3,5-二硝基水杨酸法<sup>[12]</sup>

1.4.2 细胞干重：发酵液在 5 000r/min 下离心 10min 后倾去上清液，菌体在 -20℃ 冷冻 2h 后，真空干燥至恒重称重。

1.4.3 胞内 GSH 含量测定：按文献[11]报道的方法测定 GSH 的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 环境和营养条件对 WSH-J701 菌发酵生产 GSH 的影响

2.1.1 初始 pH 对 GSH 发酵的影响：考察了初始 pH 对 WSH-J701 生长和 GSH 产量的影响，结果发现初始 pH 为 5.0 时胞内 GSH 含量最高(12.15mg/g)，初始 pH 为 6.0 时，发酵液中 GSH 总量最大(43.58mg/L)。

2.1.2 摇瓶装液量对 GSH 发酵的影响：测定了 500ml 锥形瓶中装液量对 GSH 发酵的影响。装液量从 40ml 提高到 140ml 后，酵母细胞浓度下降了 18%；装液量为 60ml 时胞内 GSH 含量最高，为 11.8mg/g，此时 GSH 总量为最大(45.7mg/L)，比装液量为 140ml 时高出 55%。

2.1.3 适宜接种量：对 WSH-J701 菌产 GSH 的适宜接种量为 10%~15%，接种量再增加，胞内 GSH 含量反而有所下降。

2.1.4 初糖浓度、碳氮比和碳氮磷比对 GSH 产量的影响：根据研究确定的较优 pH、摇瓶装液量和接种量，在改变初糖浓度的同时改变碳氮比及碳氮磷比(碳源为葡萄糖，氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，磷源为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )，考察这些因素对发酵生产 GSH 单独和交互作用，结果发现(数据略)：(1)细胞干重随初糖浓度增加而增加，但产率则随着糖浓度的增加而显著下降。(2)初糖浓度相同的情况下，氮源和磷源的浓度越低，胞内 GSH 含量越高。(3)在提高初糖浓度的同时按比例提高氮源和磷源的浓度，虽然能够提高细胞干重和产率，但高于 1% 的糖浓度却会导致胞内 GSH 含量大幅度下降。

2.1.5 改变初糖浓度下 WSH-J701 菌株的发酵过程分析：采用不同初糖浓度的发酵培养基，测定了 34h 发酵过程中细胞生长、产物形成、底物消耗的变化曲线，如图 1 的 A、B、C 所示。

如图 1 所示，初糖浓度为  $12.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时，虽然 4h 后糖即耗尽，但细胞量却一直在增长，胞内 GSH 含量则在 12h 时达到最大，之后胞内 GSH 含量有所下降，但保持在  $10\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  以上。而在另外 2 个初糖浓度下，8h 后糖均耗尽。糖耗尽前细胞能以较大的比生长速率生长(尤其是在 0~4h 内)，但 12h 后细胞量就开始缓慢下降，表明部分细胞开始自溶。初糖浓度为  $26.3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $44.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  下的细胞对糖产率远低于初糖浓度为  $12.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时的细胞产率。此外，在这 2 个糖浓度下，GSH 含量最高不超过  $7\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，并且在整个过程中，胞内 GSH 含量呈现出下降的趋势，培养进行到 16h 后胞内 GSH 含量水平下降的速度明显加快，表明细胞的生长状况和胞内 GSH 的水平有着密切的关系。

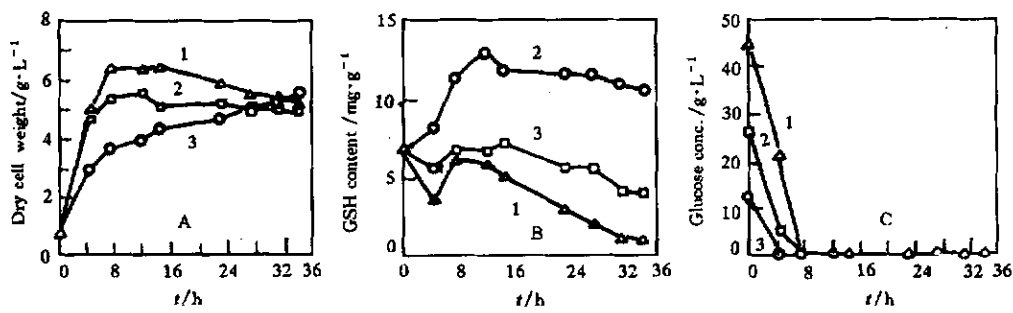


图1 不同初糖浓度 WSH-J701 的发酵过程曲线

Fig.1 Time-course of WSH-J701 in different

Initial glucose concentration/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ :1.44,5.2,12.5

A. Change of cell concentration, B. Change of GSH content, C. Change of glucose concentration

2.2 较优摇瓶补糖策略的确定与实施

2.2.1 摇瓶补糖方式对 WSH-J701 生长及产 GSH 的影响: 对于只在胞内积累 GSH 的酵母而言,要实现 GSH 的最大生产,必须在保证胞内 GSH 含量较高的前提下,尽可能地提高细胞密度,以提高过程的生产强度并有利于后提取和纯化的进行。为此,作者采用了补料操作技术以减轻底物的抑制作用并提高细胞密度。首先根据经验设计了不同的补糖方式,然后在总糖浓度一定( $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的条件下考察了不同补糖方式对 GSH 摇瓶发酵过程的影响(表 1)。

表 1 摇瓶补料方式对 GSH 发酵的影响

Table 1 The effect of different feeding methods of shaking flask on GSH fermentation

ISC / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Feeding methods				Experimental results		
	2h / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4h / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6h / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	8h / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	DCW / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	GSH content / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSC / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
10	20	20			8.78	8.19	0.506
10	20		20		8.65	6.92	0.447
10	20			20	8.85	7.41	0.865
10	10	10	10	10	9.25	7.11	0.533
10		20	20		8.88	7.29	0.511
10		20		20	9.00	7.41	1.656
10		10	20	10	9.13	6.93	0.522
50					8.26	6.05	0.470
20			30		8.63	7.11	0.723
20		15		15	8.88	7.48	0.320
30			20		8.52	8.01	0.421
30		10		10	8.71	7.11	0.301

从表 1 可知,补糖对提高 WSH-J701 的细胞干重是一个较为有效的措施,并且以“少量多次”为佳。例如,将  $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的葡萄糖分 5 次在不同时间加入,得到的细胞浓度

( $9.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )要比  $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖一次加入高 12%。但在实验所采用的各种补糖方式下,胞内 GSH 含量最高不超过  $8.2\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。这表明,糖浓度对 GSH 发酵的影响并不只是简单的底物抑制,若要提高 GSH 的生产率,必须就补糖方式对 GSH 发酵的影响作进一步的研究。

**2.2.2 补糖方式下 WSH-J701 发酵过程分析:** 前已述及,当初糖浓度低于  $12\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,细胞在持续增长同时可以长时间保持合成 GSH 的能力。但令人奇怪的是,不管是否补糖,只要总糖浓度超过  $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,GSH 含量都将下降。为了深入研究糖浓度对 GSH 发酵的影响,作者选择了 4 种补糖方式并对这 4 种方式控制下的 WSH-J701 的摇瓶发酵过程进行了反复研究,其中具有典型意义的过程曲线如图 2 的 A、B、C、D 所示。各批发酵中的初糖浓度均为  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

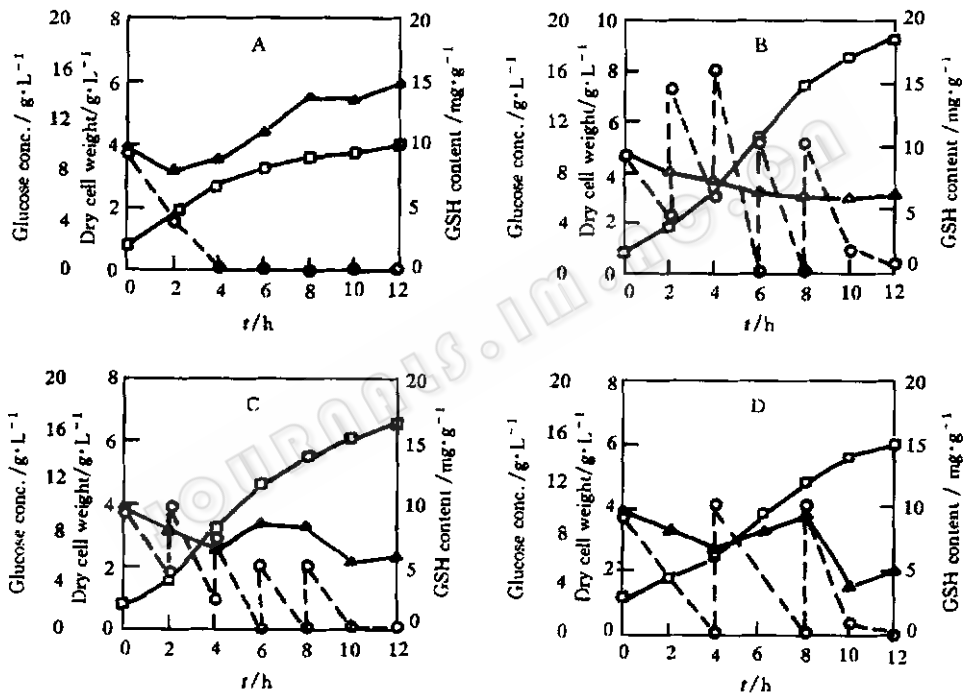


图 2 不同补糖方式下的发酵过程曲线

Fig.2 Time-course of WSH-J701 in different glucose feeding strategy

A. No glucose feeding, B.  $40\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose feed four times averagely,  
C.  $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose feed four times averagely, D.  $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose feed two times averagely  
...○...glucose concentration, —□—DCW, —▲—GSH content

从图 2A~D 可以看出:(1)若不补糖,则在整个过程中 GSH 含量总体上呈上升趋势,12h GSH 含量可达到  $14.95\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ;而若补糖,反之,如图 4B 中胞内 GSH 含量一直下降。(3) $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的糖 4h 后便耗尽,若在 4h 和 6h 分别补入  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  糖,6h 和 8h 又都降为零,表明在 4~6h 和 6~8h 这两个阶段内糖降速度非常快。与之相应,在 4~8h 内细胞的比生长速率非常高,超过  $0.5\text{h}^{-1}$ 。

**2.2.3 较优摇瓶补糖策略的确定和实验验证:** Shimizu<sup>[7]</sup>和 Alfafara<sup>[13]</sup>等人在研究面包酵母流加发酵生产 GSH 中发现,酵母的比生长速率超过  $0.3\text{h}^{-1}$  时即产生乙醇,同时胞内 GSH 含量下降。据此,Shimizu 等人通过控制酵母的比生长速率低于临界比生长速率(以避免产生乙醇)实现了 GSH 的最优化生产。在摇瓶发酵实验中,尽管葡萄糖是发酵进行到一定阶段后补加的,但总糖浓度超过  $12\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的发酵瓶中均有乙醇的产生,表明这一过程中酵母的比生长速率仍然超过了临界比生长速率,使胞内 GSH 含量降低。这一点在图 2 的 B、C、D 中看得尤其清楚。按照比生长速率不能超过  $0.3\text{h}^{-1}$  的原则,可以根据流加培养基本理论来计算得到在摇瓶中应采取的补糖策略:

假设  $Y_{x/s}$ (细胞对糖产率)为  $0.4\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,摇瓶培养时细胞的平均比生长速率为  $0.2\text{h}^{-1}$ ,初糖浓度  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,发酵 4h 后开始补糖,4h 时的细胞浓度为  $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,根据文献[14]中报道的流加培养模式,可以计算得出摇瓶补糖策略如表 2 所示。

表 2 根据理论计算得到的摇瓶补糖策略  
Table 2 The glucose feeding strategy of shaking flask calculated theoretically

Stage/h	0~4	4~5	5~6	6~7	7~8	8~9	9~10	10~11	11~12
Glucose feeding/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	none	1.3	1.5	1.8	2.2	2.6	3.1	3.7	none
DCW desired value/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2.5	3.0	3.6	4.32	5.18	6.22	7.46	8.96	

作者按照表 2 给出的摇瓶补料策略进行了实验验证,发酵过程曲线如图 3 所示。

如图 3 所示,胞内 GSH 含量的下降得到了有效的防止,最终细胞浓度和胞内 GSH 含量分别达到  $8.78\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $13.6\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,发酵液内 GSH 总量达到  $119.4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,细胞对糖转化率达到  $0.335\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,各项指标较之以往均有显著提高,表明所采用的以控制比生长速率为目标的摇瓶补糖策略有着较大的应用价值。由于实际转化率低于所设定的转化率  $0.4\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,故而实际发酵液中细胞浓度的增长曲线偏离了理论计算值。这一问题在台式发酵罐中可得以解决,因为通过改善发酵罐的溶氧条件、控制 pH 值及控制流加速率,可以使面包酵母培养过程中的实际细胞浓度和转化率与理论计算值非常接近<sup>[14]</sup>。因此,本文研究的摇瓶补糖策略对 GSH 发酵的影响,为下一步发酵罐上进行 GSH 的生产优化研究打下了坚实的基础。此外,由本文还可知氮源和磷源浓度对胞内 GSH 含量也有着较大的影响,故而在补糖策略中考虑碳氮磷比也是本研究下一步要做的工作。

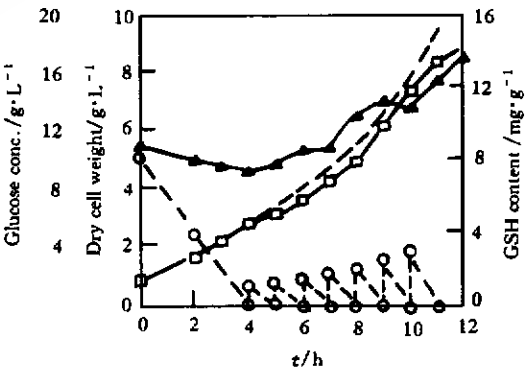


图 3 控制比生长速率的补料发酵过程曲线  
Fig.3 Time-course of fed batch culture with specific growth rate controlled  
○ glucose concentration, □DCW, ..... DCW desired alue, ▲GSH content

## 符 号 说 明

DCW 细胞干重/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TG 发酵液中 GSH 的浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
GSH 细胞中 GSH 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	$Y_{x/y}$ 得率系数/ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
ISC 初始葡萄糖浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\mu$ 比生长速率/ $\text{h}^{-1}$
RSC 残糖浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	

## 参 考 文 献

- 1 Hopkins F G, J Biochem. 1921, 15:286
- 2 Meister A. J Biol Chem, 1987, 263:17205~17208
- 3 Nakayama R, Kumagai H, Tochikura T. Appl Environ Microbiol, 1984, 47:653~657
- 4 Ohwada T, Sagisaka S. Agric Biol Chem, 1990, 54:3371~3372
- 5 Takata I, Tosa T, Chibata I. Solid Phase Biochem. 1977, 2:225~236
- 6 Murata K, Tani K, Kato J *et al.* Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1981, 11:72~77
- 7 Shimizu H, Araki K, Shioya S *et al.* Biotechnol Bioeng, 1991, 38:196~205
- 8 Alfafara C G, Kanda A, Shioi T *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36:538~540
- 9 卓肇文, 周金鑫, 张孝慈等. 氨基酸杂志. 1988, 10:6~9
- 10 詹谷宇, 田 萍, 刘卫东等. 药学报. 1990, 25(7):494~499
- 11 李 寅, 陈 坚, 阮文权等. 第八届全国化学工程报告会论文集. 1996, pp. 1332~1335
- 12 蔡武城. 生物物质常用化学分析方法. 北京:科学出版社, 1982:56~58
- 13 Alfafara C, Miura K, Shimizu H *et al.* Appl Microbiol Biotechnol. 1992, 37:141~146
- 14 李 寅, 陈 坚, 宋 祺等. 生物工程学报. 1997, 13(2):160~167

## The Effect of Environmental Conditions and Glucose Feeding Strategy on Glutathione (GSH) Production

Li Yin Chen Jian Zhou Nandi Fu Weimin Ruan Wenquan Lun Shiyi

(Lab. of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology,  
Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** The effects of pH, broth content, initial sugar concentration, ratio of carbon and nitrogen and phosphorus and glucose feeding method on GSH production of shaking flask were investigated. The results showed that the proper pH and broth content for GSH production were 6.0 and 60ml broth per 500ml flask, respectively. The initial glucose concentration greatly affected the GSH production, intracellular GSH content of yeast would decrease when the initial glucose concentration was beyond  $12\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . A glucose feeding strategy with the purpose of controlling the specific growth rate at a specific value was developed and applied in a 12h fermentation with the total glucose concentration  $26.2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the final cell concentration (DCW) and the intracellular GSH content could reach  $8.78\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $13.6\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively, while the total GSH in broth was  $119.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and the yield of cell to glucose was  $0.335\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .

**Key words** Glutathione, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation