

研究报告

过氧化氢胁迫促进产朊假丝酵母合成谷胱甘肽

廖鲜艳^{1,2}, 张文燕², 朱至^{1,2}, 陈坚^{1,2}, 堵国成^{1,2}

1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院生物系统与生物加工工程研究室, 无锡 214122

摘要: 谷胱甘肽(GSH)在生物细胞抵御外界环境条件的刺激和胁迫时起到非常重要的作用。考察了不同时间不同浓度过氧化氢胁迫和过氧化氢连续胁迫对产朊假丝酵母合成 GSH 的影响, 发现低浓度过氧化氢的连续胁迫对 GSH 的合成有明显促进作用。进一步在发酵罐上应用了低浓度过氧化氢(36 mmol/L)持续胁迫策略, 最终 GSH 产量为 922 mg/L, 胞内 GSH 含量为 1.64%, 比对照分别提高了 7%和 35%。

关键词: 过氧化氢, 胁迫, 产朊假丝酵母, 谷胱甘肽

Effect of H₂O₂ Stress on Glutathione Production by *Candida utilis*

Xianyan Liao^{1,2}, Wenyan Zhang^{1,2}, Zhi Zhu^{1,2}, Jian Chen^{1,2}, and Guocheng Du^{1,2}

1 Key Laboratory Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 Laboratory Biosystem & Bioprocess Engineering, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Glutathione (GSH) plays an important role in the responses of microorganisms to the environmental stimulation and stress. The effect of H₂O₂ stress under different fermentation time and H₂O₂ concentration as well as continuous stress on GSH fermentation of *Candida utilis* were investigated in this paper. It was found that low concentration of H₂O₂ accelerated GSH production. When treated by low concentration of H₂O₂ (36 mmol/L), the final concentration of GSH reached 922 mg/L and the intracellular GSH content reached 1.64%, which increased by 7% and 35% than the controls, respectively.

Keywords: H₂O₂, stress, *Candida utilis*, glutathione

谷胱甘肽(Glutathione, GSH)是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸通过肽键缩合而成的三肽化合物。GSH 在生物体内具有多种重要生理功能, 特别是对于维持细胞正常的氧化还原状态具有十分重要的意义^[1]。它还可以消除自由基, 缓解由于放射线、放射性药物或抗肿瘤药物所引起的白细胞减少等症, 此外, GSH 作为一种多功能的生物活性添加剂

在食品加工业中应用愈来愈广^[2], 因此其市场需求量和市场价格日趋见涨, GSH 的高产量、高得率和高生产强度将成为目前工作的重点。

GSH 作为一种能保护细胞抵御外界环境条件的刺激和胁迫的重要活性三肽, 其发酵生产方法得到不断改进, 因而其作用机理和应用方面的研究也越来越引起研究者的重视, Mehdi^[3]指出 GSH 在酵母

Received: February 26, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z313).

Corresponding author: Guocheng Du. Tel: +86-510-85918309; E-mail: gcd@jiangnan.edu.cn

国家 863 项目(No. 2006AA10Z31)资助。

细胞抵御恶劣环境条件、以及过氧化氢胁迫作用下有显著作用。Mehdi^[4]和 Izawa^[5]分别阐述了 GSH 在 *S. cerevisiae* 缺乏氮源条件下参与维持细胞生命和遭受过氧化氢胁迫作用时能继续存活方面起到了非常重要的作用。Nie 等^[6]研究发现 *Candida utilis* 在受到低 pH 胁迫时,能以增加 GSH 合成并向胞外释放 GSH 的方式来响应和抵御外界 pH 的不断降低。Ricciolo^[7]明确指出了 GSH 对 *Rhizobium tropici* 在极端环境下的生存起了至关重要的作用。Duwat^[8]也说明了在乳酸菌中 GSH 对于保护细胞在外界胁迫作用下生存具有重要意义。这些说明了 GSH 在微生物细胞面临外界环境条件的刺激和胁迫时,起着至关重要的抵御和响应机制,是细胞抗损伤及代谢调节的关键物质之一。

氧自由基,尤其是高度活泼的·OH,可导致脂质过氧化或是细胞的某些酶活丧失活性,引起细胞和组织的损伤。作为一种抗氧化剂,GSH 在生物体内的一个重要生理作用是清除体内自由基,抑制脂质过氧化,保护细胞膜。过氧化氢(H₂O₂)是一种可以产生自由基的物质。已有研究表明,利用 H₂O₂ 刺激植物细胞,可以促进其体内 GSH 的合成^[9]。在动物细胞中,Pinkus 等^[10]发现活性氧能提高γ-GCS(γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶)活性,从而促进 GSH 的合成。然而对 *Candida utilis* 细胞,活性氧的刺激能否提高 GSH 的产量,却鲜见报道。

本研究在考察不同时间不同浓度过氧化氢胁迫和过氧化氢连续胁迫对产朊假丝酵母合成 GSH 影响的基础上,提出并在 7 L 发酵罐应用了过氧化氢连续胁迫控制策略,强化了 *C. utilis* 合成 GSH 的能力。

1 材料与方法

1.1 菌种

产朊假丝酵母(*C. utilis* WSH02-08),江南大学生物系统与生物加工工程研究室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母膏 10,琼脂 20,pH 6.0。

种子培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母膏 10,pH 6.0。

摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖 30,硫酸铵 4,尿素 4,磷酸二氢钾 2.5,硫酸镁 0.5,pH 5.5。

流加培养基(g/L):葡萄糖 500,硫酸铵 36,磷酸二氢钾 5,硫酸镁 0.5。其中葡萄糖单独灭菌后与其它成分混合。

1.3 培养方法

摇瓶培养:将培养好的种子培养液按照 10%(V/V)的接种量,接种至装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中进行发酵培养,发酵时间 24 h,发酵温度 30°C,摇床转速 200 r/min。每批实验设计安排有 3 组平行对照样,取实验结果的平均值进行分析和计算。

发酵培养:全自动发酵罐 KFT-7 L(KoBio Tech co., Ltd, 韩国)装液量 3.5 L,接种量 10%(V/V),搅拌转速 400 r/min,通气量 1.2 vvm,温度范围 29°C~30°C,采用 pH 电极进行在线检测,通过自动加料泵流加 3 mol/L H₂SO₄ 和 3 mol/L NaOH 溶液进行调节以维持 pH 为 5.5。每隔 2~3 h 取样一次进行检测。

过氧化氢的添加浓度和时间由实验要求确定,以不添加过氧化氢为空白对照。

1.4 分析方法

1.4.1 胞内谷胱甘肽的提取

将发酵液在 3000 r/min 下离心 10 min 后,上清液用于培养基中营养成分的测定,沉淀的新鲜湿酵母用蒸馏水洗涤 3 次后,在浓度为 40%(V/V)的稀乙醇溶液中振荡处理 2 h,温度 30°C,3000 r/min 下离心得到的上清液中富含 GSH^[11],经稀释后用作 GSH 的分析检测。

1.4.2 细胞干重的测定

取 25 mL 发酵液,经 3000 r/min 下离心后再用蒸馏水洗涤 2 次,得到的湿酵母细胞在 60°C 下烘至恒重,计算出细胞干重(Dry cell weight, DCW)。

1.4.3 葡萄糖浓度的测定

3,5-二硝基水杨酸法^[12]。

1.4.4 GSH 浓度的测定

DTNB [5, 5'-二硫双-(2-硝基苯甲酸)]-谷胱甘肽还原酶循环法^[13]。在 2 mL 石英比色皿中顺序加入 100 μL 6 mmol/L DTNB,700 μL 0.3 mmol/L NADPH 和 200 μL 稀释至适当浓度的样品,室温下加入 100 μL 5.0 u/mL 谷胱甘肽还原酶启动反应,测定 412 nm 处反应体系的起始 OD 值以及 1.5 min 后的 OD 值,根据 OD 值的变化速率与 GSH 浓度的关系计算出样品

中 GSH 的含量。

1.4.5 胞内 GSH 含量的定义

GSH 浓度对细胞干重的百分比即为胞内 GSH 含量(GSH content)。

$$\text{Content}(\%) = \frac{\text{GSH}(\text{mg/L})}{10 \times \text{DCW}(\text{g/L})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 不同时期不同浓度过氧化氢胁迫对谷胱甘肽发酵的影响

H₂O₂ 具有强氧化性, 过量的 H₂O₂ 导致细胞生长停滞, 无法合成 GSH。根据 GSH 的摇瓶发酵曲线, GSH 的整个摇瓶发酵过程可以分成几个阶段, 分别是细胞生长延迟期(0~4 h)、对数生长前中期(4~12 h)、对数生长后期(12~16 h)和稳定期(16~28 h)。由于细胞在生长的不同时期对 H₂O₂ 的敏感程度是不同的, 因此分别考察了不同细胞生长时期添加不同浓度的 H₂O₂ 对 *C. utilis* WSH02-08 合成 GSH 的影响。

从表 1 可以看出, 不同时期添加不同浓度的 H₂O₂ 对细胞合成 GSH 的影响不同。在细胞生长的不同时期, 添加所考察浓度范围的 H₂O₂ 对细胞量并没有太大影响。发酵 4 h, 当 H₂O₂ 添加浓度超过 2 mmol/L, 胞内 GSH 含量和 GSH 产量随着过氧化氢浓度的增加而降低。发酵 12 h, 不同浓度 H₂O₂ 对细胞合成 GSH 的影响不大。发酵 16 h, 随着 H₂O₂ 添加浓度的增加, GSH 胞内含量和 GSH 产量也随之增加, 这说明此时 H₂O₂ 的添加对细胞产生了一定的胁迫作用, 迫使细胞做出了应激反应。

表 1 发酵不同时期添加不同浓度的 H₂O₂ 对细胞生长和合成 GSH 的影响

	H ₂ O ₂ (mmol/L)	DCW (g/L)	GSH (mg/L)	Intracellular GSH content (%)
Control	—	11.50	128.1	1.11
4 h	1	11.40	124.2	1.09
	2	11.70	138.0	1.17
	3	11.50	114.1	0.99
	5	11.70	78.9	0.68
12 h	1	11.13	120.4	1.08
	2	11.55	125.9	1.09
	3	11.24	124.8	1.11
	5	11.51	116.3	1.01
16 h	1	11.70	120.4	1.03
	2	11.40	129.7	1.14
	3	11.40	131.7	1.15
	5	11.40	138.9	1.22

2.2 过氧化氢连续胁迫控制策略对谷胱甘肽发酵的影响

为进一步研究 H₂O₂ 对细胞合成 GSH 的作用, 考察了 H₂O₂ 连续胁迫对细胞合成 GSH 的影响。

发酵不同时期添加 H₂O₂ 对细胞生长和 GSH 合成的影响如表 2, 可以看出, 不同时期添加 H₂O₂ 对细胞生长仍然没有太大影响, 因此细胞量没有太大的变化。而对 GSH 合成的影响结果不尽相同, 其中发酵 16 h 添加 3 mmol/L 的 H₂O₂, GSH 胞内含量达到 1.29%, 比空白对照提高了 20%; 发酵 4 h 加入 2 mmol/L 的 H₂O₂, 12 h 补加 3 mmol/L 的 H₂O₂, GSH 产量达到 141.5 mg/L, GSH 胞内含量为 1.23%, 比对照也有较大提高; 特别是当发酵 12 h 加入 3 mmol/L 的 H₂O₂, 16 h 补加 3 mmol/L 的 H₂O₂ 时, GSH 产量达到 195.1 mg/L, GSH 胞内含量为 1.61%, 分别比对照提高了 56%和 51.9%。这一结果表明, 在细胞生长的对数中后期, H₂O₂ 对细胞的连续刺激可促使细胞作出氧化应激反应, 表现为胞内 GSH 含量和 GSH 总产量的提高。

表 2 发酵不同时期添加 H₂O₂ 对细胞生长和 GSH 合成的影响

	H ₂ O ₂ (mmol/L)	DCW (g/L)	GSH (mg/L)	Intracellular GSH content (%)
Control	—	11.52	124.9	1.08
4 h	2	11.48	131.5	1.15
12 h	3	11.56	129.3	1.12
16 h	3	11.72	150.7	1.29
4 h/12 h	5	11.48	141.5	1.23
4 h/16 h	5	11.52	135.6	1.18
12 h/16 h	6	11.84	195.1	1.64
4 h/12 h /16 h	8	11.56	116.7	1.01
16 h	8	10.80	124.5	1.15

2.3 7 L 罐上考察过氧化氢对谷胱甘肽发酵的影响

综合上述研究结果可知, 通过发酵过程中添加 H₂O₂, 在不影响细胞生长的前提下, 可促使 GSH 的合成。另一方面, 由摇瓶实验可知, 持续低浓度的刺激可以提高 GSH 的胞内含量和 GSH 的总产量。因此, 在 7 L 罐上进一步考察了低浓度 H₂O₂ 持续胁迫策略对 GSH 合成的影响。

控制策略具体为: 发酵 12 h 后, 向发酵体系中

以 5.0 g/(L·h)的速率恒速流加葡萄糖至发酵 42 h, 而在发酵 36 h 后以 6 mmol/(L·h)的流速流加 H₂O₂ 至发酵 42 h。流加 H₂O₂ 的总浓度是 36 mmol/L, 结果如图 1C 和图 1D。对照为发酵 12 h 后以

5.0 g/(L·h)的速率恒速流加葡萄糖至发酵 42 h(不添加 H₂O₂)的 GSH 发酵过程(图 1A 和图 1B)。表 3 为低浓度 H₂O₂ 持续胁迫条件下 GSH 发酵过程主要参数情况。

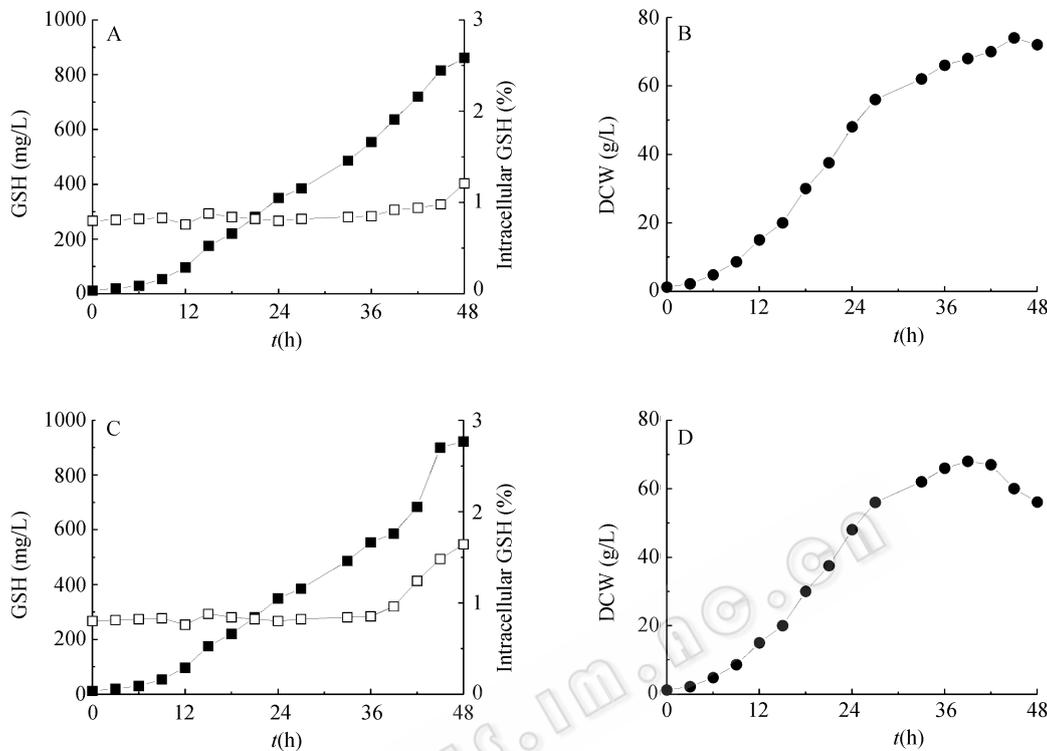


图 1 低浓度 H₂O₂ 持续胁迫对 GSH 发酵的影响

Fig. 1 Time-course of GSH fermentation under H₂O₂-stress

■ GSH concentration; □ intracellular GSH content; ● DCW

表 3 低浓度 H₂O₂ 持续胁迫条件下 GSH 发酵过程主要参数

Table 3 Main parameters of glutathione fermentation undergoing continuous stress of low H₂O₂ concentration

Parameters	Control	H ₂ O ₂ -stress
Glucose concentration (g/L)	177.10	176.80
Fed-batch time (h)	30.00	30.00
Culture time (h)	48.00	48.00
Maximum dry cell weight (g/L)	71.20	60.10
Maximum GSH concentration (mg/L)	857.00	922.00
Maximum intracellular GSH(%)	1.21	1.64
Cell yield on glucose(g/g)	0.40	0.34
GSH yield on glucose (mg/g)	4.84	5.21
Cell productivity [g/(L·h)]	1.48	1.25
GSH productivity [mg/(L·h)]	17.90	19.20

Control: glucose feeding to 42 h at constant rate of 5.0 g/ (L·h) after 12 h fermentation;

H₂O₂-stress: glucose feeding to 36 h at constant rate of 5.0 g/(L·h) after 12 h fermentation, then H₂O₂ feeding to 42 h at constant rate at 6 mmol/(L·h)

从图 1 和表 3 可以看出, 在发酵进行到 36 h 流加 H₂O₂ 后, 细胞生长基本停滞, H₂O₂ 的持续加入对细胞生长有一定程度的抑制, 发酵结束时细胞干重为 56.1 g/L。但 H₂O₂ 的添加明显促进了胞内 GSH 含量的提高, 此时胞内 GSH 含量为 1.64%, 比对照提高 35%, GSH 最终产量为 922 mg/L, 比对照提高 7%。

3 结论

(1) H₂O₂ 的添加可以使细胞作出氧化应激反应, 特别是在细胞的对数生长中后期, H₂O₂ 对细胞的连续胁迫提高了 GSH 胞内含量以及 GSH 的总产量。当发酵 12 h 后加入 3 mmol/L 的 H₂O₂, 16 h 后又补加 3 mmol/L 的 H₂O₂ 时, GSH 产量达到 195.1 mg/L, GSH 胞内含量为 1.61%, 分别比对照提高了 56%和 51.9%。

(2) 低浓度 H_2O_2 连续胁迫控制策略在 7 L 发酵罐上得到应用。最终 GSH 产量为 922 mg/L, 胞内 GSH 含量为 1.64%, 比对照分别提高 7% 和 35%。说明此策略可行有效。

(3) H_2O_2 对细胞产生一定的胁迫作用, 进而影响了细胞的生长和 GSH 的合成。较适宜的 H_2O_2 添加模式将进一步提高 GSH 的胞内含量和 GSH 的产量。根据微生物细胞的生理特性设计的胁迫发酵策略, 能够促进 GSH 的合成, 这一结论对研究胁迫条件下 *C. utilis* 合成 GSH 的生理学机制具有一定的借鉴意义, 同时为基于微生物细胞生理学特性以提高工业发酵产品效率的发酵策略研究提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review Biochemistry*, 1983, **52**: 711–760.
- [2] Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, **27**: 916–921.
- [3] Mehdi K, Penninckx M. A short review on the role of Glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microbial Technology*, 2000, **26**(9-10): 737–742.
- [4] Mehdi K, Penninckx M. An important role for glutathione and glutamyl transpeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 1997, **143**: 1885–1889.
- [5] Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 1995, **368**: 73–76.
- [6] Nie W, Wei GY, Du GC, *et al.* Enhanced intracellular glutathione synthesis and excretion capability of *Candida utilis* by using a low pH-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, **40**(5): 378–384.
- [7] Riccillo P, Muglia C, de Bruijn FJ, *et al.* Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(6): 1748–1753.
- [8] Duwat P, Cesselin B, Sourice S, *et al.* *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, **55**: 83–86.
- [9] May MJ, Leaver CJ. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Plant Physiology*, 1993, **103**, 621–627.
- [10] Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione-S-transferase. *Gene Expression Biochemistry*, 1995, **34**: 81–88.
- [11] Alfafara CG, Kanda A, Shioi T, *et al.* Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, **36**(4): 538–540.
- [12] Wei GY, Li Y, Du GC, *et al.* Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(11): 887–890.
- [13] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 1969, **27**: 502–522.

发展生物能源确保粮食安全

以粮食为原料发酵生产生物燃料如醇类燃料等仅是生物能源开发的一个方面。有的发达国家如美国领导人鼓励大规模生产生物能源, 可是消耗的是粮食, 而且若作为一种法案实行, 同时使得某些国家效法的话。这样虽发展了生物能源, 却不可避免地导致粮食安全问题的发生。若因此又不分“青红皂白”笼统地反对“生物能源”的生产, 则又违背了开发新能源的初衷。其实, 发展生物能源的途径不单是利用粮食为原料生产醇类燃料这一渠道, 应该把思路拓宽做到既发展生物能源同时不与人争粮。也就是说, 必须思考其他许多非粮食原料的途径生产生物能源。举两方面例子。(1) 利用一切有机废弃物为原料(如农业上的秸秆等)发酵生产生物能源如醇类产品等。这一问题的关键在于: ① 原料有效预处理, 更有利于发酵微生物的代谢、发酵生产; ② 选育或重组高效“能源微生物”生产菌及其酶的高活力; ③ 把握最适的发酵生产条件, 以满足最适的生态环境。另外, 发酵后的副产物也可以得到有效利用, 如用作肥料, 生产沼气能源, 服务循环经济, 大有可为。在我国四川有今年新建的 50 万口沼气池, 年产沼气 15.4 亿 m^3 , 满足农村沼气用户达 446 万; 同时减少温室气体排放 970 万 t 以上。(2) 用非粮食作物为原料生产燃料乙醇或丁醇。我国宁夏与香港和宝国际有关公司合作用甜菜为原料生产乙醇, 即将实现产业化。在国外, 如英国同样利用甜菜为原料发展生物丁醇, 将其配制“丁醇汽油”混合燃料, 比燃料乙醇有更大的优势, 因为是高级醇类, 作为燃料, 其能量密度更高, 吸水性更低, 凡是“支链”醇类比直链醇有更高的辛烷值。英政府计划加速丁醇等生物能源的生产, 到 2010 年使生物燃料销售额占有所有燃料的 5%, 到 2015 年将为 10%。

总之, 发展生物能源是必需的, 而且是未来能源建设的希望, 关键在于用什么为基料生产所需要的生物能源, 是用粮食还是非粮食为基料来生产生物能源呢? 这是当前国际社会必须思考的焦点, 不能因粮食出现高价位而过分怪罪生物能源的研发, 应具体问题具体分析, 多途径发展生物能源是未来必须坚持的方向之一。

(柯为)