

发酵法生产谷胱甘肽的研究进展

刘娟¹ 刘春秀² 王雅琴¹ 张博润^{2*}

(北京化工大学生物化学系 北京 100029)¹

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要: 谷胱甘肽是一种含巯基活性三肽。简要综述发酵法生产谷胱甘肽中的菌种选育、发酵调控策略、提取及分离纯化等方面的研究进展。

关键词: 谷胱甘肽, 菌种选育, 发酵调控, 分离纯化

中图分类号: TQ920.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0072-04

谷胱甘肽 (Glutathione, 简称 GSH) 是一种具有重要生理功能的活性三肽, 它由谷氨酸, 半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成, 化学名称为 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸。其分子中有一特殊肽键 γ -谷氨酰胺键, GSH 的许多特殊性质与此肽键有关。GSH 分子中含有一个活泼的巯基-SH, 易被氧化脱氢, 两分子 GSH 失氢后转变为一分子氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。在生物体内起重要生理作用的是还原型谷胱甘肽。

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作用。

GSH 的生产方法有萃取法、化学合成法、发酵法和酶法。GSH 的早期生产都采用萃取法, 原料多为酵母, 这是生产 GSH 的经典方法, 也是发酵法生产流程中的下游过程基础。化学合成法生产工艺已较成熟, 但化学合成的 GSH 是消旋体, 需要进行光学拆分, 且工艺过程存在成本高、操作复杂和环境污染等问题。酶法就是利用生物中含有的 GSH 合成酶, 通过添加底物和少量 ATP 来合成 GSH, 由于原料较贵, 目前还不适于工业化生产。由于发酵法生产 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。本文简要综述了发酵法生产 GSH 的研究进展。

1 谷胱甘肽的性质及其生理功能

GSH 的分子量是 307.33, 熔点 $189^{\circ}\text{C} \sim 193^{\circ}\text{C}$, 等电点为 5.93, 晶体呈无色透明细长柱状。它溶于水、稀醇溶液、液氨, 不溶于醇、醚和丙酮。

GSH 的生理功能主要有以下几方面: (1) 抗自由基对细胞的损伤: 机体代谢产生的过多自由基会损伤生物膜、侵袭生命大分子、加快机体衰老、诱发肿瘤或动脉硬化的产生。GSH 可以通过巯基与体内的自由基结合转化成易代谢的酸性物质, 加速自由基的排泄, 对细胞起到强有力的保护作用。(2) 除外源有毒物质的毒性: GSH 能与进入机体的有毒化合物、重金属离子等直接结合, 并促其排出体外, 起到中和解毒的作用。

* 联系人

收稿日期: 2001-10-22, 修回日期: 2001-11-12

临床上已应用 GSH 来解除丙烯腈、氟化物、CO、重金属、有机溶剂的中毒现象。(3) 促进细胞合成蛋白质: GSH 可通过 γ -谷氨酰基转运酶直接进入细胞内, 并通过 γ -谷氨酰基循环参与众多氨基酸的转运, 进而促进蛋白质的合成。(4) 是多种酶的辅基或辅酶: GSH 参与三羧酸循环与糖代谢, 组织中有许多酶是以 GSH 为辅酶, 其活性需要 GSH 的存在才能表现出来。另外, GSH 对于需要巯基的酶有保护或恢复活性的作用。(5) 参与转甲基、转丙氨基反应, 维持肝细胞正常功能。

2 发酵法生产谷胱甘肽

目前对发酵法生产谷胱甘肽的研究主要包括选育(或构建)优良的生产菌株、优化发酵工艺、建立和优化发酵调控策略、改进分离纯化技术等。

2.1 生产菌株的选育 发酵生产 GSH 所用菌种中最为常见的是酵母菌, 但酵母细胞的 GSH 含量较低, 存在酵母用量大、收率低等缺点, 因此选育高产 GSH 的优良菌株是十分重要的。但有关这方面的研究较少。詹谷宇等在酵母菌的诱变育种中用 GSH 的代谢类似物乙硫氨酸作为抗性筛选物, 筛得抗代谢类似物突变株 K11UE126, 其胞内累计 GSH 的量较出发菌株高出 49.7%, 达到 2.4%, 这是我国目前通过诱变方法进行 GSH 菌种选育的报道中含量最高的^[1]。Kimura 等人采用亚硝基胍和紫外线诱变大肠杆菌 B355, 获得高产 GSH 的优良突变株, 每克湿细胞含 2.43mg GSH。

80 年代以来, 随着基因工程技术的发展, 利用基因工程技术构建具有高 GSH 合成活性菌株成为可能。Murata 等人对编码大肠杆菌 B 中 GSH-I 和 GSH-II 的基因进行了克隆和测序研究, 通过修饰其代谢途径来提高 GSH-I 和 GSH-II 的活力, 成功构建了具有较强 GSH 合成能力的重组大肠杆菌工程菌。Hinrichs 等人将大肠杆菌的 *gsh-I* 和 *gsh-II* 基因克隆到酵母菌中, 从而提高了酵母菌的 GSH 合成能力。李华钟等人^[2]针对质粒的不稳定性, 将从重组大肠杆菌中提取能编码 GSH-I 和 GSH-II 的重组质粒转入新的宿主中, 使重组转化子的遗传稳定性有了很大的提高。沈立新等^[3]成功构建了同时表达 GSH 合成酶系的两个酶的质粒 pTrc-*gsh*, 并在 *E. coli* BL21 中得到表达, 具有较高的 GSH 合成活性。

2.2 培养基优化 培养基中添加 L-半胱氨酸或与谷氨酸、甘氨酸的混合物能提高细胞内 GSH 的含量。以添加半胱氨酸的效果最显著, 但对细胞生长有一定抑制作用^[4,5]。此外添加蛋氨酸也能够提高细胞的 GSH 含量。

Kenneth 等^[6]以培养基中的葡萄糖、蛋白胨、 KH_2PO_4 、生物素、半胱氨酸等作为优化参数, 采用 CCD (central composite experimental design) 优化方案对 *S. cerevisiae* (S-8H) 的发酵培养基进行了优化, 使细胞内的 GSH 含量提高近 1 倍, 达 17mg/g。Chi-Hsien Liu 等^[7]采用 Box-Behnken 方案和 RSM (Response surface methodology) 模型研究了葡萄糖、蛋白胨、 MgSO_4 浓度对 *S. cerevisiae* CCRC 21727 积累 GSH 的影响, 也取得了令人满意的结果。

2.3 发酵工艺的优化 (1) 环境条件的控制: 影响细胞的 GSH 含量的环境参数主要有温度、pH、溶解氧等。温度对菌体生长、酶活性都有直接的影响。pH 影响细胞对营养成分的吸收及代谢途径, 从而影响细胞生长及 GSH 积累。GSH 发酵过程中氧的供应是个关键因素, 溶氧浓度是微生物生长和 GSH 形成率的重要参数之一。国内对发酵过

程中的温度、pH、摇瓶装液量等环境条件对细胞 GSH 含量的影响已有一些研究^[8,9]。

(2) 葡萄糖的流加策略: GSH 的生成与发酵液中葡萄糖的消耗密切相关。研究发现只有在葡萄糖几乎耗尽, 生长停止时, 细胞内才开始大量合成 GSH。为提高细胞 GSH 的含量, 一般采用后期限量流加葡萄糖的方法, 可以消除底物抑制、达到高密度细胞培养、延长 GSH 的生产时间。

若葡萄糖浓度超过某一值时, 会发生 Crabtree 效应, 因此发酵过程中葡萄糖的供给模式至关重要。有 3 种葡萄糖流加策略: 一是恒速流加: 将葡萄糖以恒定的速率加入发酵罐, 这种流加策略比较简单, 便于操作和控制。二是指数流加: 指数流加方式可以将比生长速率控制在一个不产生副产物的范围之内。三是反馈控制流加: 将葡萄糖的流加速率与不同的物理参数如溶氧、pH、CO₂ 的释放速率、乙醇浓度等相偶合组成间接反馈控制系统。Sakato 等人^[10]通过在线监测发酵液中氧气和乙醇的浓度, 运用前馈/反馈控制系统控制葡萄糖的流加速率, 发酵完毕后 GSH 产量为 2700mg/L, 比指数流加方式提高了 40%, 细胞内 GSH 含量达 37mg/g。Shimizu 等人^[11]以葡萄糖作为限制性底物因子, 研究 *S. cerevisiae* 培养中比生长速率 μ 和 GSH 的生产强度 ρ_c 之间的关系。当 μ 控制在临界比生长速率 (即 $\mu = \mu_c$) 时, ρ_c 可获得最大值。当 $\mu > \mu_c$ 时, 发酵液中有乙醇产生, ρ_c 开始下降。确定优化方案为: 在细胞生长阶段, 通过指数流加葡萄糖控制 $\mu = \mu_{\max}$; 在 GSH 合成阶段, 通过 PF (programmed-controller/feedback-compensator) 控制系统, 将葡萄糖的流加速率与乙醇浓度相偶联, 从而控制 $\mu = \mu_c$ 。在 GSH 的发酵过程中按以上要求对 μ 进行 bang-bang 控制, 结果与在整个发酵过程中维持 $\mu = \mu_c$ 相比, 最终 GSH 的总量要提高 41%, 细胞内 GSH 含量有很大提高。李寅等人^[12]比较了恒速流加、人工反馈控制流加、指数流加 3 种补糖策略对重组大肠杆菌高密度培养合成 GSH 的影响, 也取得令人满意的结果。

(3) 前体氨基酸的补加策略: 3 种前体氨基酸中, 半胱氨酸为 GSH 合成的关键氨基酸, 它的存在能明显提高细胞内 GSH 含量及 GSH 的比生产速率, 但阻碍细胞量的增加。在发酵过程中半胱氨酸的补加策略应以尽量减少对生长的抑制为原则。一般有两种补加方式:

(1) 连续流加, 保持发酵液中半胱氨酸的浓度恒定。数学方程描述如下:

$$\text{Cysteine 流加速率: } F_c = (C/C_F) [k_d V + F_0 \exp(\mu^* t)]$$

$$F_0 = \mu^* V_0 X_0 / (Y_{N/S} S_F)$$

其中, C 和 C_F 分别表示发酵液和补加液中半胱氨酸的浓度 (g/L); S_F 是流加葡萄糖浓度 (g/L)

(2) 定时补充, 当发酵进行到比生长速率基本稳定时, 加入小体积高浓度的半胱氨酸溶液。加入时间选择在发酵的第二阶段刚开始时。

Alfafara 等人^[13]研究了半胱氨酸的补加策略, 比较上述两种补加策略, 发现连续流加后期比生长速率和 GSH 的比生产速率皆下降。整个发酵过程中细胞 GSH 含量与不添加半胱氨酸相比, 无显著提高。而一次性补加半胱氨酸可以很大程度上提高 GSH 的比生产速率。

有关发酵法生产谷胱甘肽的相关研究结果下见表 1。

3 谷胱甘肽的提取及分离纯化

表 1 发酵法生产谷胱甘肽的相关研究结果

菌种	研究方法	GSH 总量 (mg/L)	GSH 胞内含量 (mg/g)	最大菌体浓度 (g/L)	文献
假丝酵母 K11 UE126	诱变育种	—	24 左右	—	1
酿酒酵母 CCRC 21727	发酵工艺	124	—	9	7
酿酒酵母 (S-8H)	发酵工艺	160.1	17.4	—	6
重组大肠杆菌 WSH-KEI	发酵工艺	880	—	80	12
酿酒酵母 KY6186	发酵调控	2700	37	—	10
酿酒酵母 KY5711	发酵调控	421	8.19	—	11

种方法:热水抽提、甲酸抽提、乙醇抽提、硫酸抽提、三氯乙酸抽提、有机酸混合抽提、低温抽提等。

目前报道的分离提纯 GSH 的方法主要有 3 种:(1)铜盐法,具有使用价值,但污染较大。(2)离子交换树脂法,经济效益较高,已有多篇专利和文献报道。主要根据巯基化合物与汞有很强的亲和作用,用含汞树脂提取含巯基化合物能取得很好的效果,王辉等人^[14]将氨基苯汞乙酸连接到聚苯乙烯-二乙烯苯载体上,制得含汞树脂,用于分离酵母提取液中的 GSH,取得很好的分离效果。(3)双水相分配结合温度诱导相分离,双水相分配技术是一种新型生物分离技术,利用双水相技术可以省去细胞破碎后的固液分离操作,并且利用温度诱导相分离能实现聚合物的循环利用。梅乐和等人^[15]选用环氧乙烷-环氧丙烷无规共聚物 (EOPO)/羟丙基淀粉 (PES) 双水相系统,结合温度诱导相分离技术从酵母细胞中提取 GSH, GSH 的总萃取率达 80% 以上。但因双水相组成系统一般比较昂贵,此法目前还处于实验室研究阶段。

4 结束语

鉴于谷胱甘肽具有广泛的应用前景,对其相关研究还在深入开展。一是采用常规育种方法及分子育种技术选育细胞内 GSH 含量高的优良菌株。二是建立和优化发酵调控策略,如建立数学模型实现 GSH 生产过程的优化控制,利用自动控制技术实现对发酵过程的监控。三是进一步建立分离纯化工艺,提高 GSH 得率。

参考文献

[1] 詹谷宇,田 萍,刘卫东,等.药学报,1990,25 (7): 494~499.
[2] 李华钟,李 寅,林金萍,等.微生物学报,2001,41 (1): 16~23.
[3] 沈立新,魏东芝,赵哲峰,等.华东理工大学学报,2000,26 (4): 342~345.
[4] Catalino A, Akihisa K, Toru S, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36: 538~540.
[5] 李 寅,陈 坚,毛英鹰,等.无锡轻工大学学报,1998,17 (2): 11~15.
[6] Kenneth O, Bohdan A. Acta Microbiologica Polonica, 1997, 46 (1): 105~114.
[7] Chi H L, Chin F H, Chii C L, et al. Process Biochemistry, 1999, 34: 17~23.
[8] 李 寅,陈 坚,毛英鹰,等.微生物学报,1999,39 (4): 355~361.
[9] Yin L, Jian C, Ying Y M, et al. Process Biochemistry, 1998, 33 (7): 709~714.
[10] Sakato K, Tanaka H. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40 (8): 904~912.
[11] Hiroshi S, Katsuhiko A, Suteaki S, et al. Biotechnology and Bioengineering, 1991, 38 (6): 196~205.
[12] 李 寅,陈 坚,伦世仪.中国医药工业杂志,1999,30 (1): 1~4.
[13] Catalino A, Keigo M, Hiroshi S. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37 (2): 141~146.
[14] 王 辉,冯万祥.华东理工大学学报,1996,22 (6): 717~721.
[15] 梅乐和,林东强.化工学报,1998,49 (4): 470~475.