

谷胱甘肽高产菌株的选育

贾建萍 裘娟萍

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014)

摘要:以编号为346的酿酒酵母为出发菌株,通过紫外线和 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线诱变处理,运用推理育种技术,选育到一株抗氯化锌和乙硫氨酸的突变株0.5Eh400-5。该菌株经摇瓶发酵谷胱甘肽产量为165.96mg/L,较出发株提高350%,每克干细胞含谷胱甘肽19.76mg,较出发株提高318.6%。菌株经10次传代培养,谷胱甘肽产量下降10.7%,是一株性状较稳定可深入开发研究的优良菌株。

关键词:谷胱甘肽,酿酒酵母,菌种选育,辐照,突变株

中图分类号:Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)04-0024-06

BREEDING OF A GLUTATHIONE OVERPRODUCING STRAIN

JIA Jian-Ping QIU Juan-Ping

(College of Biology and Environment Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract: A zinc chloride- and ethionine - resistant mutant 0.5Eh400-5 was obtained from its parent strain *Saccharomyces cerevisiae* 346 by UV and $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray treatment and rational screening. The glutathione productivity of the mutant reached 165.96mg/L by flask culture, which was 350% higher than the parent strain, and the glutathione content in the dried cells reached 19.76mg/g, which was 318.6% higher than the parent strain. A descent of only 10.7% in the glutathione yield of the mutant was observed after ten times of subculture. Therefore, the obtained mutant is stable strain that is worthwhile to be studied further.

Key words: Glutathione, *Saccharomyces cerevisiae*, Strain breeding, Irradiation, Mutant

谷胱甘肽(Glutathione, 简称GSH)是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的活性三肽。它广泛存在于动植物和微生物细胞中,是最主要的非蛋白巯基化合物,具有重要的生理功能。它可作为某些酶的辅酶,并对一些巯基酶有激活作用,是保护酶和其它蛋白质巯基的一种抗氧化剂,并且在氨基酸转运、维持红细胞膜的完整性、保护血红蛋白及解除毒物等方面具有重要的作用^[1]。在临床上,谷胱甘肽是一种治疗肝脏疾病、肿瘤、中毒、白内障、衰老及变态反应的重要生化药物。近年来,随着谷胱甘肽更多的生理功能被发现,它在食品添加剂、临床医学和运动营养学上倍受关注,需求量不断增加。

自谷胱甘肽首先由Hopkin^[2]从酵母中提取出来以后,人们对它进行了广泛深入的研究。目前获得高纯度谷胱甘肽比较成熟的方法主要有溶剂萃取法和化学合成法。但这两种方法存在着工艺繁琐、成本高、易造成污染等问题。因此,具有反应条件温和、成本低、反应步骤简单等优点的生物法将是今后生产谷胱甘肽最有前景的方法,获得性能优良的高产菌株是该法生产谷胱甘肽的关键。目前已报道^[3-5]能较多地积累谷胱甘肽的菌株主要有酵母和大多数革兰氏阴性菌,采用的菌种选育方法主要是传统的化学

诱变法(亚硝基胍、硫酸二乙酯、甲基磺酸乙酯等)和物理诱变法(紫外线和X射线)相结合,得到的突变株以1,2,4-三唑和叠氮化钠抗性株、乙硫氨酸抗性株、甲硫氨酸敏感株、丙酮酸抗性株、二硫化四甲基秋蓝姆抗性株为主。但是利用 γ 射线对谷胱甘肽生产菌株进行诱变,同时获得氯化锌抗性标记的高产菌在国内尚未见报道。

作者从实验室收集和保藏的200余株酵母中筛选到了一株具有一定谷胱甘肽生产能力的酿酒酵母,通过进一步紫外线和 γ 射线诱变,得到了抗氯化锌和乙硫氨酸的谷胱甘肽高产菌。本文报道该菌种的筛选与选育,拟为工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

酿酒酵母(*S. cerevisiae*),浙江工业大学微生物实验室收集和保藏。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面培养基(完全培养基)及培养条件:培养基:酵母膏3g,麦芽汁3g,蛋白胨5g,葡萄糖10g,琼脂20g,定容至1L水中,pH自然, 1×10^5 Pa灭菌20min。培养条件:28℃,培养1~2d。

1.2.2 平板选择培养基及培养条件:培养基:(1) ZnCl_2 选择培养基:斜面培养基+1,360mg/L ZnCl_2 , pH自然, 1×10^5 Pa灭菌20min;(2) 乙硫氨酸选择培养基:斜面培养基+600mg/L 乙硫氨酸, pH自然, 1×10^5 Pa灭菌20min。培养条件:28℃,培养5~7d。

1.2.3 种子培养基及培养条件:培养基:葡萄糖18g,蔗糖12g,蛋白胨30g,酵母膏1g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.55g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12g, $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g,肌醇75mg,生物素24 μg ,维生素 B_1 0.8mg,麦芽汁10g,定容至1L水中,pH 4.5~5.5, 0.70×10^5 Pa灭菌30min。培养条件:250mL三角瓶装30mL培养基,28℃,培养2~3d,摇床转速为200r/min。

1.2.4 发酵培养基及培养条件:培养基:种子培养基+200mg/L L-半胱氨酸盐酸盐,pH 4.5~5.5, 0.7×10^5 Pa灭菌30min。培养条件:250mL三角瓶装30mL培养基,接种量为10%,28℃,培养3d,摇床转速为200r/min。

1.3 主要仪器

LS-B50L立式压力蒸汽灭菌器,上海医用核子仪器厂;751-CW分光光度计,上海分析仪器厂;Labofuge 400R台式高速冷冻离心机,德国产。

1.4 诱变处理

1.4.1 紫外线处理:取培养1~2d的新鲜斜面,用无菌生理盐水洗下菌体制成菌悬液,经玻璃珠振荡打散和脱脂棉过滤后得单细胞悬浮液,调整菌悬液菌数 10^8 个/mL左右,吸取3mL菌悬液至无菌的小平皿中,在15W紫外灯(距离30cm)照射下,磁力搅拌30s,菌悬液在无菌室红灯下适当稀释涂平板,平板倒置于28℃恒温培养箱中培养5~7d。

1.4.2 ^{60}Co γ 射线辐照处理:采用培养好的新鲜试管斜面直接进行辐照。分别以0.5kGy、2.0kGy剂量对试管中菌体进行 ^{60}Co γ 射线辐照,用无菌生理盐水将经辐照处理后的斜面制成菌悬液,并经适当稀释后涂平板,平板倒置于28℃恒温箱中培养5~7d。

1.5 菌种诱变程序

出发株→紫外线辐照→自然分离→⁶⁰Co γ射线辐照→谷胱甘肽高产菌。

1.6 分析方法

1.6.1 胞内谷胱甘肽含量测定: ALLOXAN 试剂衍生法, 见文献 [6]。

1.6.2 生物量测定: 取 10mL 发酵液, 于 4,500 r/min 离心 4min, 收集菌体, 经蒸馏水洗涤菌体两次, 弃去上清液, 湿菌体经 105℃ 烘干至恒重后称重。

2 结果

2.1 诱变出发株的确定

经对本实验室收集和保藏的 200 余株酵母进行摇瓶初筛和复筛, 其中 346 号酿酒酵母谷胱甘肽产量和谷胱甘肽含量最高, 其谷胱甘肽产量为 36.88mg/L, 每克干细胞内含谷胱甘肽 4.72mg, 确定以 346 号菌株作为诱变育种的出发菌株。

2.2 筛选平板中 ZnCl₂ 浓度的选择

Zn²⁺ 是多种脱氢酶、脱羧酶和肽酶的辅因子^[7], 是酵母生长所需的微量元素。在低

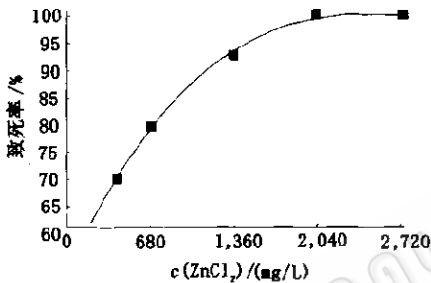


图 1 ZnCl₂ 浓度与致死率的关系

浓度时有促进酵母生长的作用^[8], 但高浓度的 Zn²⁺ 对酵母有杀菌和抑菌作用。ZnCl₂ 浓度与致死率的关系如图 1 所示, 由图可见, 培养基中 ZnCl₂ 的浓度与实验菌株的致死率之间存在着明显的剂量效应关系, 随着 ZnCl₂ 浓度的提高, 致死率逐渐提高。当 ZnCl₂ 浓度为 680mg/L 时致死率为 80%, ZnCl₂ 浓度超过 2,040 mg/L 时致死率 100%, 本文选取致死率为 93.5% 的 ZnCl₂ 浓度 1,360 mg/L 作为选择性平板所用剂量。

2.3 紫外线诱变处理

对 346 号菌株采用紫外线诱变处理, 将经诱变处理后的菌悬液涂布于完全培养基和 ZnCl₂ 选择培养基上, 培养后从平板上挑选生长快、菌落大的单菌落接种斜面, 将各突变株与出发株分别接种至种子培养基和发酵培养基, 发酵结束后测定谷胱甘肽生物量和产量, 结果见表 1, 表 2。

表 1 各菌株发酵结果

菌株	GSH 含量 (mgGSH/g 干细胞)		GSH 产量 (mg/L)		正变率 (%)	致死率 (%)
	平均	最高	平均	最高		
346 号	4.72	4.72	36.88	36.88	-	-
抗紫外线突变株	6.03	9.57	45.10	78.09	52.3	78.6
抗紫外线和 ZnCl ₂ 突变株	7.14	11.38	53.40	92.20	63.8	92.5

表 1 结果表明, 抗紫外线和 ZnCl₂ 突变株的谷胱甘肽平均含量、平均产量均高于出发株和抗紫外线突变株, 同时其正变率亦高于抗紫外线突变株, 证明应用 ZnCl₂ 作高产突变株的筛选剂筛选效果明显好于传统的随机筛选。

由表 2 可见:

(1) UVZn10-3 抗紫外线和 ZnCl₂ 突变株谷胱甘肽含量和产量最高, 每克干细胞内谷胱甘肽含量达 11.38mg, 较出发株提高 141.1%, 谷胱甘肽产量为 92.2mg/L, 较出发株

提高 150%; (2) 谷胱甘肽是胞内产物, 一定的生物量是高产的前提。UVZn10-3 菌株谷胱甘肽产量达 92.2mg/L, 其生物量只有 8.2g/L, 而 UVZn10-5 菌株生物量达 11.9g/L, 但谷胱甘肽产量只有 35.96 mg/L, 可见生物量与产量并不完全成正比。因此在菌种筛选时应选择谷胱甘肽含量高的突变株, 再通过培养条件优化提高其生物量, 从而达到提高产量的目的。

为避免表型延迟现象引起的菌种不纯, 进一步将 ZnCl₂ 抗性突变株 UVZn10-3 进行自然分离, 获得了谷胱甘肽产量比 UVZn10-3 菌株提高 41.83% 的纯化菌株 H8。

2.4 ⁶⁰Co γ 射线诱变处理

以 H8 为出发菌株, 经剂量 2.0kGy、0.5kGy 的 ⁶⁰Co γ 射线辐照处理后, 将诱变后菌悬液涂布于完全培养基、氯化锌选择培养基、乙硫氨酸选择培养基上, 挑选生长快、菌落大的单菌落各 20 个接种斜面, 经摇瓶二级发酵后测定生物量和谷胱甘肽产量, 结果如图 2 所示。

由图 2 可见, 辐照剂量 0.5kGy 比 2.0kGy 诱变效果好, 这与许多文献报道的低剂量有利于选育正突变株的观点是一致的。在 6 组试验中, 以 0.5kGy γ 射线辐照后涂布于乙硫氨酸平板上筛选出来的菌株结果最好, 不光正变幅度大, 正变幅度也高。这是由于乙硫氨酸是谷胱甘肽的代谢类似物, 抗乙硫氨酸突变株能有效解除菌体自身的反馈调节, 因此, 该筛选模式有利于选育正向突变株。经 γ 射线辐照后的突变株中, 编号为 0.5Eh400-5 乙硫氨酸抗性突变株最优, 该菌株谷胱甘肽产量为 165.96mg/L, 较原始菌株提高 350%, 每克干细胞内含谷胱甘肽 19.76mg, 较原始菌株提高 318.6%。

2.5 突变株稳定性考察

用群体连续传代及低温保藏定期传代的方法考察了谷胱甘肽高产菌高产基因的稳定性。结果如表 3 所示。结果表明, 菌

表 2 部分突变株摇瓶发酵结果

菌种编号	生物量 (g/L)	GSH 产量 (mg/L)	GSH 产量 提高率 (%)	GSH 含量 (mgGSH/g 干细胞)	GSH 含量 提高率 (%)
346	7.8	36.88	-	4.72	-
UVZn10-3	8.1	92.20	150.00	11.38	141.11
UVZn10-5	11.9	35.96	-2.49	3.02	-36.02
UVZn10-11	7.4	61.93	66.30	8.37	77.33
UVZn10-17	9.3	44.75	21.34	4.81	1.91
UVZn10-22	8.2	43.95	19.17	5.36	22.37
UVZn10-25	6.0	56.33	52.74	9.39	98.94
UVZn10-29	7.4	67.92	84.16	9.18	94.49

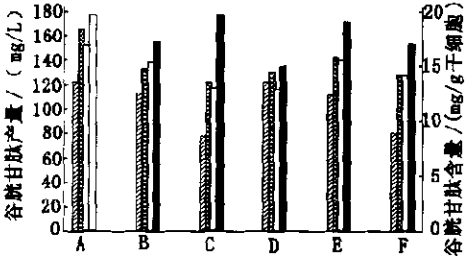


图 2 ⁶⁰Co γ 射线剂量和筛选平板对实验结果的影响

▨ 平均谷胱甘肽产量, □ 平均谷胱甘肽含量,
▤ 最高谷胱甘肽产量, ■ 最高谷胱甘肽含量

- A 0.5kGy⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 乙硫氨酸选择培养基,
- B 0.5kGy⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 完全培养基,
- C 0.5kGy⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 氯化锌选择培养基,
- D 2.0kGy⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 氯化锌选择培养基,
- E 2.0kGy⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 完全培养基,
- F 2.0kGy⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 乙硫氨酸选择培养基

表3 突变株稳定性考察结果

传代数	生物量 (g/L)	生物量 下降率(%)	GSH产量 (mg/L)	GSH产量 下降率(%)
0	8.4	-	165.96	-
1	8.4	0.00	163.51	1.48
2	8.3	1.19	161.29	2.81
3	8.3	1.19	160.01	3.59
4	8.3	1.19	155.99	6.00
5	8.3	1.19	152.78	7.94
6	8.3	1.19	151.43	8.76
7	8.3	1.19	150.25	9.45
8	8.2	2.38	148.96	10.24
9	8.2	2.38	148.60	10.46
10	8.2	2.38	148.20	10.70

株 0.5Etb400-5 斜面连续传 10 代, 谷胱甘肽产量下降 10.7%。同时将该菌株低温保藏于 4℃ 冰箱中, 每月传 1 代, 共传 4 代, 谷胱甘肽产量仅下降 6%, 说明该突变株具有良好的稳定性, 但是对该菌株进行定期复壮也是很有必要的。

3 讨论

3.1 抗氯化锌突变株的筛选

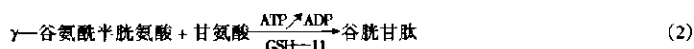
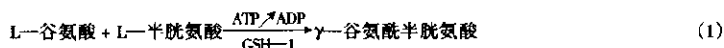
在细胞内, 谷胱甘肽由于参与体内抗氧化作用(如清除红细胞在代谢中产生的 H_2O_2) 在谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)催化作用下被氧化成氧化态谷胱甘肽(GSSG), GSSG 又在谷胱甘肽还原酶的作用下成为有活性的还原型谷胱甘肽。机理如下:



反应(2)中谷胱甘肽还原酶是个调节酶, 受细胞内 Zn^{2+} 的抑制。当胞内 Zn^{2+} 达到一定量时, 谷胱甘肽还原酶活性中心变构失活, 停止 GSH 的生成^[9], 菌体细胞不能分解有毒强氧化物而死亡。氯化锌抗性突变株 UVZn10-3, 能够在含量较高的 $ZnCl_2$ 平板上生长, 解除了谷胱甘肽还原酶受 Zn^{2+} 的抑制。因此, 培养基中添加适量的 $ZnCl_2$ 既可促进酵母的生长, 提高生物量, 又不抑制 GSSG 的还原, 从而提高谷胱甘肽的产量。

3.2 抗乙硫氨酸突变株的筛选

谷胱甘肽生物合成是直接由合成酶来控制, 机理如下:



反应(1)是谷胱甘肽生物合成的控制步骤, 它是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I)所催化, 该酶是调节酶, 受终产物谷胱甘肽反馈抑制。谷胱甘肽在胞内积累达一定量时, 谷胱甘肽与酶分子中的调节部位结合使酶活性中心变构失活, 从而抑制谷胱甘肽继续合成^[4]。乙硫氨酸是谷胱甘肽的代谢类似物, 它同样能与 GSH-I 调节部位结合。由于乙硫氨酸不参与蛋白质的合成, 其在胞内的浓度不会下降, 因此结合后难以恢复 GSH-I 的酶活, 菌体不能继续合成 GSH, 同时胞内由于积累过多的有毒物质而死亡。以氯化锌抗性突变株为出发株, 通过⁶⁰Co γ 射线筛选到抗谷胱甘肽代谢类似物—乙硫氨酸的突变株, 能有效解除谷胱甘肽对 GSH-I 的反馈抑制, 从而可提高菌体内谷胱甘肽的含量。

3.3 结论

通过紫外线和⁶⁰Co γ 射线对出发株进行诱变处理, 运用推理育种技术获得了一株抗

氯化锌和乙硫氨酸突变株 0.5Eth400-5, 该突变株经摇瓶发酵, 谷胱甘肽产量达 165.96mg/L, 每克干细胞含谷胱甘肽 19.26mg。本实验证明, 运用抗氯化锌和乙硫氨酸为筛选模型可选育谷胱甘肽高产菌。

参 考 文 献

- [1] 郑云郎. 生物学通报, 1995, 30 (5): 22 ~ 24.
- [2] Hopkins F G. J Biochem, 1921, 15: 286 ~ 305.
- [3] Murata K, Kimura A. Biotechnol Adv, 1990, 8 (1): 59 ~ 96.
- [4] 詹谷宇, 田 萍, 刘卫东, 等. 药理学报, 1990, 25 (7): 494 ~ 499.
- [5] Kimura A, Murata K. United States Patent 4,598,046,1986-07-01.
- [6] 沈蓓英, 江志炜. 粮食与油脂, 1993, 2: 27 ~ 32.
- [7] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. 104 ~ 105.
- [8] 陈思斌, 萧熙佩. 酵母生物化学. 济南: 山东科学技术出版社, 1990. 61.
- [9] Walther U I, Wilhelm B, Walther S. In Vitro Mol Toxicol, 2000, 13 (2): 145 ~ 151.