

# 高产谷胱甘肽酵母的诱变筛选及发酵条件的优化

龙倩\*, 包浩东\*, 宁雪萍, 梁家毓, 凌敏<sup>#</sup>

广西医科大学基础医学院生物技术教研室, 广西 南宁

Email: lq20200813@163.com, 939835434@qq.com, #lingmin1970@outlook.com

收稿日期: 2021年2月3日; 录用日期: 2021年2月19日; 发布日期: 2021年3月4日

## 摘要

为了更好的利用微生物发酵合成谷胱甘肽(glutathione, GSH), 本研究通过对产朊假丝酵母菌株进行紫外诱变, 并选取抗性筛选物乙硫氨酸对出发菌株进行致死率实验, 筛选到一株高产谷胱甘肽突变菌株。采用5因素5水平的正交设计实验对发酵合成GSH的培养条件中培养温度、摇床转速、蛋白胨和硫酸铵浓度之比、初始pH值及接种量的组成进行优化。结果表明: 发酵条件为培养温度26℃、200 r/min、蛋白胨和硫酸铵浓度之比5:2、初始pH值5.0及接种量10%时突变菌株的谷胱甘肽产量最高, 达到了187.31 mg/L, 即有利于菌体合成GSH。

## 关键词

谷胱甘肽, 诱变育种, 抗性筛选, 培养条件优化

# Mutagenesis Screening of High-Yielding Glutathione Yeast and Optimization of Fermentation Conditions

Qian Long\*, Haodong Bao\*, Xueping Ning, Jiayu Liang, Min Ling<sup>#</sup>

Department of Biotechnology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi

Email: lq20200813@163.com, 939835434@qq.com, #lingmin1970@outlook.com

Received: Feb. 3<sup>rd</sup>, 2021; accepted: Feb. 19<sup>th</sup>, 2021; published: Mar. 4<sup>th</sup>, 2021

\*共第一作者。

<sup>#</sup>通讯作者。

文章引用: 龙倩, 包浩东, 宁雪萍, 梁家毓, 凌敏. 高产谷胱甘肽酵母的诱变筛选及发酵条件的优化[J]. 微生物前沿, 2021, 10(1): 7-13. DOI: 10.12677/amb.2021.101002

## Abstract

In order to synthesize glutathione (GSH) by microbial fermentation, a mutant strain with high glutathione yield was screened in this study through UV mutagenesis of *Candida utilis* and lethality test on the original strain by selecting ethionine as resistant screening material. The orthogonal design experiment with 5 factors and 5 levels was used to optimize the fermentation conditions of glutathione synthesis, including the culture temperature, the rotation speed of the shaking table, the ratio of peptone and ammonium sulfate concentration, the initial pH value and the composition of inoculation amount. The results showed that when the fermentation temperature was 26°C, 200 r/min, the ratio of tone and ammonium sulfate was 5:2, the initial pH value was 5.0 and the inoculation amount was 10%, the glutathione yield of the mutant strain was the highest, which reached 187.31 mg/L, which was conducive to the synthesis of GSH.

## Keywords

Glutathione, Mutation Breeding, Resistance Screening, Culture Conditions Optimization

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

谷胱甘肽(GSH)是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽化合物,是最丰富的非蛋白质硫醇,且存在于所有哺乳动物组织中[1]。GSH在氧化剂防御,细胞增殖和凋亡,信号转导和免疫反应调节中发挥着关键作用[2] [3] [4]。GSH的合成失调会导致许多疾病的发生,包括心血管疾病[5]、神经退行性疾病[6] [7]、; 艾滋病[8] [9]; 酒精性肝病[10] [11] [12]、肺部疾病[13]、糖尿病[14]与癌症[15]等。谷胱甘肽一般通过酶法、溶剂萃取法、化学合成法[16]和微生物发酵法来生产[17],其中微生物发酵法是目前生产谷胱甘肽的主要方法,因此,要提高谷胱甘肽的生物合成水平,必须进行菌种选育及对培养条件进行优化。

本文通过对本实验室保存的产朊假丝酵母菌株进行紫外诱变及致死率实验,筛选到高产GSH的突变菌株,同时对高产谷胱甘肽突变菌株进行培养条件的优化,以期提高GSH在菌体中的含量。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 菌株

产朊假丝酵母菌(*Candida utilis*),由本实验室保存。

#### 2.1.2. 试剂与仪器

5'-双硫代对硝基苯甲酸(DTNB)采购自索莱宝生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

SPX-0128型生化培养箱,宁波江南仪器厂;THZ-98恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司;YJ-1340双人单面净化工作台,苏州市苏信净化设备厂;HVE-50高压蒸汽灭菌锅,日本HIRAYMA公司;PB-10酸度计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;UNIVERSAL 320R冷冻离心机,德国Hettich公司;UV-550PC

紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 移液器, Eppendorf 公司。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 培养基

斜面种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L。

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

发酵培养基: 葡萄糖 30 g/L, 磷酸氢二钾 3 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 蛋白胨 15 g/L, 葡萄糖单独灭菌后再与其他成分混合。

### 2.2.2. 菌株活化及种子悬液的制备

将保藏菌株接入 YEPD 斜面培养基上, 30℃ 培养 2 d, 二次转接至斜面上, 待菌体活化后, 再用接种环从活化的斜面上挑取一环菌体, 接种到含 20 ml YEPD 种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 30℃, 200 r/min 摇瓶振荡培养一段时间以制备种子液。

### 2.2.3. 紫外诱变

将制备的新鲜菌体悬液, 分别取 5 ml 的菌悬液置于直径为 90 mm 的无菌平皿中, 调整紫外灯高度约 30 cm, 磁力搅拌器和灭菌的转子放入无菌操作台, 将培养箱中存放的培养皿放至磁力搅拌器上, 使用紫外灯对菌悬液进行不同时间的照射(0~120 s) [18], 每隔 10 s 取样, 每个平皿吸出 200  $\mu$ l。紫外诱变后的菌体在稀释后平行涂布 3 个平板培养基, 倒置平板于 30℃ 恒温箱避光培养 2~3 d 后, 同时以未经 UV 诱变的菌液涂布到 YEPD 平板作为对照。每个诱变平板和对照组平板进行活菌数计数, 比较 UV 诱变时间对菌株的致死率的影响。

### 2.2.4. 抗性筛选物乙硫氨酸对出发菌株致死率的检测

将适量的菌体悬液涂布到含不同浓度乙硫氨酸(0 g/L、0.3 g/L、0.6 g/L、0.9 g/L、1.2 g/L、1.5 g/L)的平板培养基上, 在 30℃ 培养箱中培养 2~3 d, 观察菌落生长情况, 对平板活菌计数, 计算各浓度乙硫氨酸对菌体的致死率, 从而选择合适的浓度, 抗性筛选物乙硫氨酸对出发菌株的致死率计算参考文献[19]。当致死率在 60%~70%时, 则选此条件下乙硫氨酸的浓度进行筛选。

### 2.2.5. GSH 高产菌株的筛选及遗传稳定性实验

将筛选后的菌株连续传代 10 次培养, 摇瓶发酵后测定谷胱甘肽产量, 以检测出产量较高, 且遗传稳定的高产菌株进行后续实验。

### 2.2.6. 正交实验设计

参考文献[20]及结合单因素实验设计正交实验方案, 即对培养温度、摇床转速、初始 pH 值、含有机氮的蛋白胨与无机氮的硫酸铵的浓度比和接种量 5 因素 5 水平组成, 分别在含 50 mL 培养液的 500 mL 摇瓶中按照实验方案进行试验, 通过测定 GSH 的含量来进行优化。

### 2.2.7. 提取与谷胱甘肽含量的测定

酵母生物量的测定(DCW): 用去离子水将离心后得到的菌体洗涤 2 次, 离心收集菌体, 于 60℃ 烘干至恒重称量, 计算出细胞干质量(g/L)。

抽提方法参考文献[21]进行提取, 之后采用 DTNB [22]法测定细胞内 GSH 的含量。

### 2.2.8. 数据统计分析

图形绘制用 Origin2018, 采用 SPSS17.0 软件进行正交试验设计与显著性分析, 不同处理间比较用单因素方差分析, 当  $P < 0.05$  时认为差异显著, 每组试验重复三次。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 紫外诱变结果

在紫外灯功率和照射距离保持不变情况下,照射时间越长,致死率越高,结果如图 1 所示。一般认为,对于工业生产用菌种,致死率在 75%~80%之间时,诱变效果最好,即正突变率最高,基于此,确定在紫外线功率为 20 W 照射距离约 30 cm 处,时间为 80 s 时达到诱变效果。

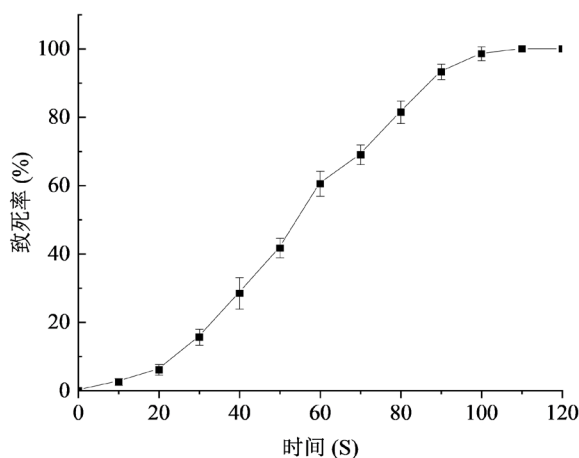


Figure 1. Bacterial lethality curve under different UV irradiation time

图 1. 不同紫外照射时间条件下的菌体致死率曲线

#### 3.2. 抗性物乙硫氨酸剂量选择结果

乙硫氨酸浓度与致死率的关系如图 2 所示,培养基中乙硫氨酸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,随着乙硫氨酸浓度的提高,致死率也逐渐提高。当乙硫氨酸浓度为 900 mg/L 时致死率为 73%,本文选取该浓度作为平板筛选剂量,经平板筛选到一株突变菌株,GSH 产量达到 113.02 mg/L,比出发菌株提高了 23%。

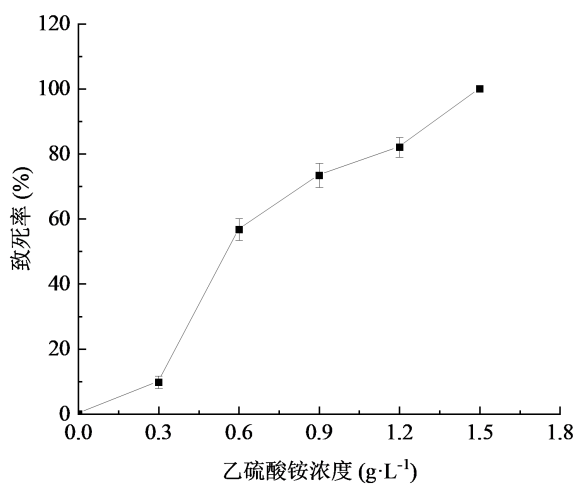


Figure 2. Bacterial lethality curve under different ethionine concentrations

图 2. 不同乙硫氨酸浓度条件下的菌体致死率曲线

### 3.3. 发酵工艺的优化分析

本研究设计采用 L25 ( $5^5$ ) 正交设计考察培养基中蛋白胨和硫酸铵浓度之比、初始 pH 值、接种量、发酵温度及摇床转速组成的五个因素五水平试验(表 1)。将制备好的种子悬液按方案加入培养基, 培养基总量为 50 mL, 测定胞内 GSH 的含量。正交设计试验结果如表 2 所示, 从正交试验结果分析得出, 摇床转速的各水平极差最大, 其为最主要影响因素, 各因素对胞内谷胱甘肽合成的影响顺序为摇床转速 > 培养温度 > 蛋白胨和硫酸铵浓度之比 > 初始 pH 值 > 接种量, 理论的最佳组合为 E5D3A3B5C3, 摇床转速方差分析结果见表 3, 从正交试验方差分析结果得出, 摇床转速对 GSH 的产量影响显著、其次为培养温度、蛋白胨和硫酸铵浓度之比, 其他因素对 GSH 的产量影响不显著, 确定了培养基优化条件为: 200 r/min、培养温度 26℃、蛋白胨和硫酸铵浓度之比 5:2、初始 pH 值 5.0、接种量 10%。

**Table 1.** Factors and levels

**表 1.** 因素水平表

水平	A C 蛋白胨/C 硫酸铵	B 初始 pH 值	C 接种量(%)	D 温度/(℃)	E 转速(r/min)
1	15:2	4.0	2	22	120
2	15:4	4.5	4	24	140
3	5:2	5.0	6	26	160
4	15:8	5.5	8	28	180
5	3:2	6.0	10	30	200

**Table 2.** Results and analysis of orthogonal test design

**表 2.** 正交试验设计结果与分析

实验号	A	B	C	D	E	GSH 含量 (mg/L)
1	2	1	2	5	2	165.26
2	5	1	5	2	5	177.18
3	3	2	4	5	1	164.18
4	5	3	2	4	1	161.68
5	1	5	5	5	3	178.13
6	5	4	3	5	4	178.72
7	2	5	1	4	4	172.33
8	3	5	2	3	5	187.31
9	3	4	1	2	2	168.46
10	1	1	1	1	1	160.36
11	4	3	1	5	5	179.23
12	4	4	2	1	3	163.36
13	2	4	5	3	1	165.66
14	1	4	4	4	5	183.72
15	5	2	1	3	3	175.36
16	3	1	3	4	3	177.89
17	4	1	4	3	4	172.89
18	1	3	3	3	2	176.27

## Continued

19	3	3	5	1	4	175.44
20	1	2	2	2	4	171.79
21	2	3	4	2	3	169.63
22	4	5	3	2	1	162.69
23	2	2	3	1	5	170.42
24	5	5	4	1	2	165.55
25	4	2	5	4	2	167.12
k <sub>1</sub>	174.054	170.716	171.148	167.026	162.914	
k <sub>2</sub>	168.660	169.774	169.88	169.950	168.532	
k <sub>3</sub>	174.656	172.450	173.198	175.498	172.874	
k <sub>4</sub>	169.058	171.984	171.194	172.548	174.234	
k <sub>5</sub>	171.698	173.202	172.706	173.104	179.572	
R	6.00	3.43	3.32	8.47	16.66	

**Table 3.** Various analysis of orthogonal test result  
**表 3.** 正交试验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	P
A	152.365	4	6.687	0.046
B	37.745	4	1.656	0.318
C	35.506	4	1.558	0.339
D	209.980	4	9.215	0.027
E	784.849	4	34.443	0.002
误差	22.787	4		

#### 4. 结论

本文采用紫外诱变、乙硫氨酸为筛选模型选育到一株高产谷胱甘肽的产朊假丝酵母菌株。通过正交实验设计进行优化培养条件, 实现了细胞内谷胱甘肽浓度达到 187 mg/L, 超过黎明等报告[23]的谷胱甘肽的含量, 下一步我们将利用常压室温等离子体诱变的方法, 对产朊假丝酵母进行诱变, 力争提高其生产 GSH 的能力, 以达到工业化生产的目的。

#### 基金项目

广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281023)。

#### 参考文献

- [1] Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., *et al.* (2003) Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification. *International Journal of Clinical Chemistry*, **333**, 19-39. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00200-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00200-6)
- [2] Lu, S.C. (2013) Glutathione Synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3143-3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- [3] Homma, T. and Fujii, J. (2015) Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Current Drug Metabolism*, **16**, 560-571. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151015114515>
- [4] Haddad, J.J. and Harb, H.L. (2004) L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine (Glutathione; GSH) and GSH-Related Enzymes in the Regulation of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Signaling Transcriptional Scenario for Redox(y) Immu-

- nologic Sensor(s)? *Molecular Immunology*, **42**, 987-1014. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.09.029>
- [5] Lu, S.C. (2009) Regulation of Glutathione Synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, **30**, 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
- [6] Maher, P. (2018) Potentiation of Glutathione Loss and Nerve Cell Death by the Transition Metals Iron and Copper: Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, **115**, 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.015>
- [7] Paula, A., Pabla, A., Pablo, M., *et al.* (2006) Iron and Glutathione at the Crossroad of Redox Metabolism in Neurons. *Biological Research*, **39**, 157-165. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000100017>
- [8] Dröge, W. (1993) Cysteine and Glutathione Deficiency in AIDS Patients: A Rationale for the Treatment with N-Acetyl-Cysteine. *Pharmacology*, **46**, 61-65. <https://doi.org/10.1159/000139029>
- [9] Dröge, W., *et al.* (1994) Functions of Glutathione and Glutathione Disulfide in Immunology and Immunopathology. *FASEB Journal*, **8**, 96. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.14.7958618>
- [10] Honda, Y., Kessoku, T., Sumida, Y., *et al.* (2017) Efficacy of Glutathione for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Open-Label, Single-Arm, Multicenter, Pilot Study. *BMC Gastroenterology*, **17**, 96. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0652-3>
- [11] Sanabria, J.R., *et al.* (2016) Glutathione Species and Metabolomic Prints in Subjects with Liver Disease as Biological Markers for the Detection of Hepatocellular Carcinoma. *HPB*, **18**, 979-990. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2016.09.007>
- [12] Rodolfo, S., Roberto, E. and Luca, G. (2016) Glutathione in the Treatment of Liver Diseases: Insights from Clinical Practice. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, **62**, 316-324.
- [13] Morris, P.E. and Bernard, G.R. (1994) Significance of Glutathione in Lung Disease and Implications for Therapy. *The American Journal of the Medical Sciences*, **307**, 119-127. <https://doi.org/10.1097/00000441-199402000-00010>
- [14] Lutchmansingh, F., Hsu, J.W., Bennett, F.I., *et al.* (2018) Glutathione Metabolism in Type 2 Diabetes and Its Relationship with Microvascular Complications and Glycemia. *PLoS ONE*, **13**, e0198626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198626>
- [15] Ankita, B. and Celeste, S.M. (2018) Glutathione Metabolism in Cancer Progression and Treatment Resistance. *The Journal of Cell Biology*, **217**, 2291-2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>
- [16] Ehrlich, K., Ehrlich, K., Auml, *et al.* (2007) Design, Synthesis and Properties of Novel Powerful Antioxidants, Glutathione Analogues. *Free Radical Research*, **41**, 779-787. <https://doi.org/10.1080/10715760701348611>
- [17] Ankita, B. and Celeste, S.M. (2018) Glutathione Metabolism in Cancer Progression and Treatment Resistance. *The Journal of Cell Biology*, **217**, 2291-2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>
- [18] 刘莉君, 程茂基, 杜波, 等. 紫外线诱变选育高产富硒酵母的研究[J]. 饲料博览(技术版), 2007(6): 29-30.
- [19] 江洁, 单立峰, 吴耘红, 等. 高产谷胱甘肽酵母菌株的筛选和抗乙硫氨酸突变株的选育[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 227-229.
- [20] Tang, C.H. and Cai, S.X. (2006) Application of the Combined Use of Uniform Experimental Design and Orthogonal Experimental Design in Biomedical Engineering. *Journal of Biomedical Engineering*, **23**, 1228-1231.
- [21] 李利军, 马英辉, 卢美欢, 等. 一株假丝酵母合成 GSH 的发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 41-47.
- [22] Rahman, I., Kode, A. and Biswas, S.K. (2006) Assay for Quantitative Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method. *Nature Protocols: Recipes for Researchers*, **1**, 3159-3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- [23] 黎明, 池娇, 张波, 等. 高产谷胱甘肽酵母菌株筛选及发酵条件研究[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(2): 9-12+73.