

# 产谷胱甘肽重组巴斯德毕赤氏酵母发酵条件的研究\*

饶志明<sup>1</sup>, 艾丽静<sup>1,2</sup>, 沈微<sup>1</sup>, 方慧英<sup>1</sup>, 诸葛健<sup>1</sup>

1(江南大学工业微生物中心和工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡, 214036)

2(齐鲁制药有限公司, 山东 济南, 250100)

**摘要** 考察了培养基组成及培养条件对重组巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) x-33 (pGAPZA-*gsh* 1)合成谷胱甘肽(GSH)的影响。优化后的培养基组成为: 甘油 30 g/L、蛋白胨 40 g/L、酵母膏 9 g/L、半胱氨酸 0.36 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L; 培养条件为: 自然 pH、摇床转速 200 r/min、装液量为 30 mL/250 mL、接种量为 10%。在此优化条件下重组酵母的 GSH 产量是 98.5 mg/L, 为优化前的 2.33 倍, 生物量最大值达到 19.6 g/L。在 5 L 发酵罐上进行放大实验, 发酵结束后 GSH 产量、重组菌的生物量分别为 97.9 mg/L, 18.7 g/L 与摇瓶发酵结果基本吻合。

**关键词** 重组酵母, 谷胱甘肽, 摇瓶, 发酵罐

谷胱甘肽(GSH)是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的一种含有  $\gamma$ -谷氨酰基和巯基的生物活性三肽, 具有多种重要的生理功能。微生物发酵法是目前生产 GSH 最常用的方法, 选用的菌种多为酵母。

1980 年代以来, 随着基因工程技术的发展, 在利用基因工程技术构建高产 GSH 的重组菌株方面的研究受到越来越多的重视, 主要是采用基因重组技术将 GSH 合成的 2 个关键酶基因 *gsh* 1 和(或)*gsh* II 克隆到微生物细胞中进行高效表达, 以达到提高 GSH 产量的目的<sup>[1~5]</sup>。

研究室前期曾对产 GSH 的酵母菌进行了筛选和初步的鉴定<sup>[6]</sup>, 克隆了来源于酿酒酵母的 GSH 合成关键酶基因 *gsh* 1, 并构建了重组巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) x-33 (pGAPZA-*gsh* 1)。本研究即在此基础上对该重组菌进行了发酵条件优化。在摇瓶条件下, 考察重组毕赤氏酵母的培养基及培养条件, 选择理想的培养基和培养条件, 以期通过提高重组菌的生物量达到提高 GSH 积累量的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

巴斯德毕赤氏酵母 *Pichia pastoris* x-33 购自 Invitrogen 公司, 重组酵母 *Pichia pastoris* x-33

(pGAPZA-*gsh* 1)为研究室构建。

#### 1.1.2 培养基

YEPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, 自然 pH。固态培养基加入琼脂 20 g/L。

平板保存及活化培养基: 采用 YEPD 培养基。

种子培养基及初始发酵培养基: 采用 YEPD 培养基。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 种子活化

从保存于 4℃ 冰箱的斜面上取 1 环重组酵母 *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh* 1), 在 YEPD 平板上划线培养 2 d, 培养温度为 30℃。

### 1.2.2 种子培养

从活化 2 d 的平板上挑一单菌落, 接入装有 20 mL YEPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶, 30℃、200 r/min 培养 24 h, 作为种子液。

### 1.2.3 发酵

将种子液按 10% 接种量接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃、200 r/min 培养 56 h, 测细胞干重(DCW)及 GSH 含量。

### 1.2.4 分析方法

#### 1.2.4.1 酵母菌体生物量的测定

取一定体积发酵液 3 500 r/min 离心 5 min, 水洗 2 次, 收集菌体, 85℃烘干至恒重, 称量。

#### 1.2.4.2 胞内谷胱甘肽含量的测定

利用 ALLOXAN 试剂衍生化法测定胞内 GSH 的含量, 测定方法参考文献[7]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组酵母 *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh*

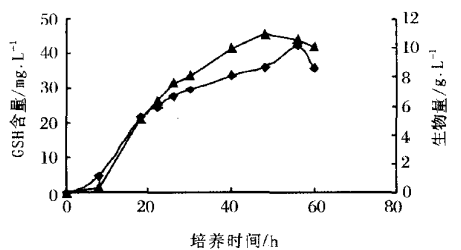
第一作者: 博士, 副教授。

\* 国家自然科学基金(30570142)及江苏省青年科技创新人才(学术带头人)基金(BK2006504)资助项目

收稿日期: 2006-11-17, 改回日期: 2006-02-12

## 1) 初步发酵实验

按上述方法挑取新鲜平板上的单菌落接种到 YEPD 种子培养基培养 24 h 后,在液体 YEPD 发酵液中发酵。重组酵母 GSH 产量及生长曲线如图 1 所示,在发酵 48 h 时,细胞生物量达到最大积累,但是 GSH 积累还未停止。发酵 56 h 时,GSH 含量达到最大的积累为 42.2 mg/L,约是宿主菌的 1.6 倍。因此选择发酵时间为 56 h。



●—基因工程菌 GSH 含量, ▲—基因工程菌生长曲线

图 1 重组酵母发酵 GSH 产量及生长曲线

## 2.2 发酵培养基的优化

### 2.2.1 碳源的选择

分别选择 20 g/L 葡萄糖、甘油、蔗糖、可溶性淀粉、玉米粉作为碳源,其余成分采用 YEPD 培养基配方,发酵 56 h 后测定生物量及 GSH 含量,结果表明,在以甘油为碳源的培养基上,重组毕赤氏酵母的生物量及 GSH 含量均达最高值。

实验中进一步研究了甘油浓度对重组毕赤氏酵母合成 GSH 的影响。分别配制 10 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L 的甘油,其他成分同 YEPD 培养基配方,以 10% 接种量、30℃、200 r/min 进行发酵培养,56 h 后测定重组毕赤氏酵母生物量及 GSH 的含量,结果发现,当甘油浓度达 30 g/L 时,生物量及 GSH 含量均达最高值分别为 18.16 g/L 和 71.2 mg/L。

### 2.2.2 氮源对重组酵母发酵的影响

#### 2.2.2.1 蛋白胨浓度的影响

在以上试验的基础上,考察了不同浓度的蛋白胨(5~50 g/L)对重组毕赤氏酵母生物量及 GSH 合成的影响。结果发现,蛋白胨浓度为 25 g/L 时生物量达到最大值为 20.1 g/L,而 GSH 积累量在蛋白胨浓度为 40 g/L 时达到最大,为 77.2 mg/L。

#### 2.2.2.2 无机氮源的影响

随后考察了不同浓度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素对重组毕赤氏酵母合成 GSH 的影响。实验结果表明,这 3 种无机氮源的添加对 GSH 的合成没有

明显的促进作用,因此不在发酵培养基中添加额外的无机氮源。

#### 2.2.2.3 酵母膏的影响

以上述试验为基础,考察了不同浓度的酵母膏对重组毕赤氏酵母发酵生产 GSH 的影响。结果表明,在 0~12 g/L 浓度范围内随着酵母膏浓度的提高,生物量呈上升趋势,超过 9 g/L, GSH 含量逐渐趋于稳定,达到 77.3 mg/L。

#### 2.2.3 前体氨基酸对重组酵母发酵的影响

酵母细胞中 GSH 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸 3 种前体物质在 GSH 合成酶的作用下合成的。因此在上述实验的基础上,在培养基中分别添加 2 mmol/L 的 GSH 前体氨基酸:谷氨酸(0.29 g/L)、半胱氨酸(0.24 g/L)、甘氨酸(0.15 g/L)。结果发现,3 种前体氨基酸对重组毕赤氏酵母的生物量都有一定的抑制作用,但同时发现,添加半胱氨酸对 GSH 的合成有明显促进作用,GSH 的终浓度最高可达 88 mg/L。因此,以后的试验在发酵培养基中添加终浓度为 0.24 g/L 半胱氨酸。

#### 2.2.4 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度对重组酵母发酵的影响

磷是蛋白质和核酸组成的必要成分,磷的浓度对菌体的生长和外源蛋白的表达也有很大的影响。在上述实验基础上,考察了不同浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对重组毕赤氏酵母的生物量及 GSH 合成量的影响。结果表明,当  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 5 g/L 时,重组毕赤氏酵母的生物量和 GSH 的积累量均达到峰值,分别为 19.2 g/L 和 95.1 mg/L。

#### 2.2.5 正交试验优化培养基组成

在单因素实验基础上,通过  $L_9(3^3)$  正交试验,选择甘油浓度、半胱氨酸浓度、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度 3 种培养基组分作为考察对象,进一步优化培养基组成。其因素水平的选择见表 1,实验设计方案参考文献[8],结果见表 2。

表 1 正交实验因素水平

水平	因 素		
	(A) 甘油/g·L <sup>-1</sup>	(B) 半胱氨酸/g·L <sup>-1</sup>	(C) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /g·L <sup>-1</sup>
1	25	0.18	3
2	30	0.24	5
3	35	0.36	7

从表 2 中 GSH 含量的极差可以看出,甘油、半胱氨酸和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  三个因素对 GSH 产量的影响程度大小依次为:甘油浓度>半胱氨酸浓度> $\text{KH}_2\text{PO}_4$

浓度,最优组合为  $A_2B_3C_1$ ,即甘油 30 g/L,半胱氨酸 0.36 g/L,  $KH_2PO_4$  3 g/L。此条件下,重组酵母 GSH 产量为 98.5 mg/L,生物量为 19.4 g/L。

表 2  $L_9(3^3)$  正交设计方案与试验结果

试验编号	A	B	C	GSH 含量 /mg · L <sup>-1</sup>
1	1	1	1	82.6
2	1	2	2	83.6
3	1	3	3	81.8
4	2	1	2	85.4
5	2	2	3	95.6
6	2	3	1	98.5
7	3	1	3	85.7
8	3	2	1	88.6
9	3	3	2	93.2
I = 水平 1 三次 GSH 含量之和				
II = 水平 2 三次 GSH 含量之和				
III = 水平 3 三次 GSH 含量之和				
GSH 含量极差				
	248.0	253.7	270.7	
	279.5	267.8	262.2	
	267.5	273.5	263.1	
	31.5	19.8	8.5	

### 2.3 发酵条件的优化

在上述优化后的培养基的基础上,考察培养条件对重组毕赤氏酵母 GSH 含量及生物量的影响。

#### 2.3.1 初始 pH 的影响

首先考察初始 pH 的影响,结果发现,当初始 pH 6.0 时,生物量和 GSH 含量都能保持在较高的水平。由于培养基的原始 pH 6.2 左右,因此在实验中对培养基的初始 pH 不作调整。

#### 2.3.2 摇床转速的影响

在以上实验的基础上,研究了摇床转速分别为 160 r/min、180 r/min、200 r/min 和 220 r/min 对菌体产 GSH 的影响,发酵结束后测定 GSH 含量,结果表明最佳转速为 200 r/min。

#### 2.3.3 装液量的影响

将培养好的种子液分别接入装有 20 mL、30 mL 和 50 mL 的发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,其他条件不变,结果表明最佳摇瓶装液量为 30 mL /250 mL。

#### 2.3.4 接种量的影响

将培养好的种子液分别按 3%,5%,10%,15% 和 20% 的接种量接入发酵培养基中,其他条件不变,结果表明 10% 接种量条件下菌体生物量和 GSH 产量均达到最高。

### 2.4 优化后重组菌的发酵过程曲线

以优化的培养基和培养条件接种发酵,每隔 8 h 取样,测定其生物量、残留甘油及 GSH 积累量,64 h

发酵结束,发酵过程曲线如图 2 所示。

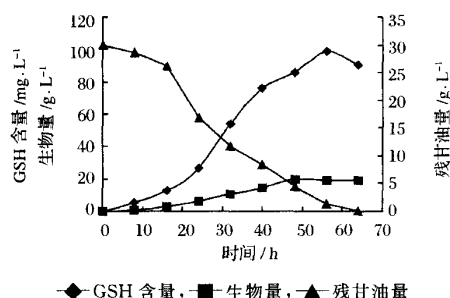


图 2 重组毕赤氏酵母优化后发酵过程曲线

从图 2 中可以看出,在发酵 48 h 时,生物量达到最大值 19.6 g/L,而此时 GSH 含量并未达到峰值,继续呈增长趋势。在发酵 56 h 时,残甘油量几乎为 0,此时, GSH 含量达到了最大积累 98.5 mg/L。

### 2.5 5 L 发酵罐上重组菌的发酵特性

根据正交实验优化结果,确定在 5 L 发酵罐上的发酵培养基组成为:甘油 30 g/L、蛋白胨 40 g/L、酵母膏 9 g/L、半胱氨酸 0.36 g/L、 $KH_2PO_4$  3 g/L。结果表明,在 5 L 发酵罐上的发酵过程与摇瓶中发酵过程曲线基本吻合, GSH 产量最大值达到了 97.9 mg/L,生物量达到最大值为 18.7 g/L。

## 3 结 论

目前以发酵法生产 GSH 存在出发菌株 GSH 产量不够高等问题,利用基因工程技术将微生物细胞中 GSH 合成的关键酶基因在合适的宿主细胞进行高表达获得高产 GSH 工程菌是解决该问题的主要策略之一。Fan 等曾将来源于酿酒酵母 GSH 合成途径的限速酶  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的编码基因 *gsh 1* 克隆到载体 pGMF 中,并成功转化到酿酒酵母 YSF-31 中,重组菌的 GSH 含量是宿主细胞的 1.5 倍,达到 13.1 mg /g(干细胞重)<sup>[5]</sup>。实验在摇瓶水平上,考察了碳源、氮源、磷酸盐和前体氨基酸等对重组巴斯德毕赤氏酵母 *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh 1*) 合成 GSH 的影响,优化了培养基成分和培养条件,并在此基础上进行了 5 L 发酵罐研究。发酵结束后,重组菌 GSH 产量、生物量分别为 97.9 mg/L, 18.7 g/L,与摇瓶发酵结果基本吻合,为进一步利用工程菌生产 GSH 提供了新途径。

## 参 考 文 献

- 1 Murata K, Kimura A. Cloning of a gene responsible for

- the biosynthesis of glutathione in *Escherichia coli* B [J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 44: 1 444~1 448
- 2 Gushima H, Miya T, Mutara K, et al. Construction of glutathione-producing strains of *Escherichia coli* B by recombinant DNA techniques [J]. J Appl Biochem, 1983, 5 (1): 43~52
- 3 沈立新, 魏东芝, 赵哲峰, 等. 谷胱甘肽合成酶系的克隆、测序及表达[J]. 生物工程学报, 2001, 17 (1): 98~100
- 4 傅瑞燕, 陈 坚, 李 寅. 构建重组乳酸乳球菌生产谷胱甘肽[J]. 生物加工过程, 2004, 2 (2): 30~35
- 5 Fan X Y, He X P, Guo X N, et al. Increasing glutathione formation by functional expressing of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26 (5): 415~417
- 6 艾丽静, 饶志明, 沈 微, 等. 产还原型谷胱甘肽酵母菌的筛选与初步鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32 (3): 18~21
- 7 王荣民, 曹新志, 萧 刚, 等. 谷胱甘肽测定方法初探 [J]. 食品与发酵工业, 1992, 18 (6): 34~38
- 8 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002

## Optimization of Fermentation Conditions for Production of Glutathione in Recombinant *Pichia pastoris*

Rao Zhiming<sup>1</sup>, Ai Lijing<sup>1, 2</sup>, Shen Wei<sup>1</sup>, Fang Huiying<sup>1</sup>, Zhuge Jian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Research Centre of Industrial Microorganisms and the Key Lab of Industrial Biotechnology,

Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

<sup>2</sup>( Qilu Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250100, China)

**ABSTRACT** The medium composition and fermentation conditions for GSH producing in recombinant *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh* 1) were optimized in the research. The maximal yield of GSH (98.5 mg/L) and the biomass (19.6 g/L) could be obtained when the recombinant strain was cultivated in the medium with concentrations of glycerol, yeast extract, tryptone,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and cysteine set at 30 g/L, 9 g/L, 40 g/L, 3 g/L and 0.36 g/L, respectively, under the optimized cultivation conditions of natural pH, rotation speed 200 r/min and inoculation size 10 % in shake flask. The GSH production of the recombinant *Pichia pastoris* x-33 (pGAPZA-*gsh* 1) was 2.3 times that of the control. Meanwhile, the GSH yield (97.9 mg/L) and the biomass (18.7 g/L) were achieved when the recombinant strain was cultivated in a 5L fermenter using the above optimized fermentation conditions, which were similar with those of flask shake.

**Key words** recombinant strain, glutathione, shake flask, fermenter

### 天冠集团发酵醇分离项目试车成功

天冠集团建成的1 500t/a 发酵醇分离项目试车成功,从杂醇油中分离出的异戊醇、3-甲基丁醇的纯度均达到99.5%以上,达国际标准。

2006年8月,天冠集团投资300万元,筹建1 500t的发酵醇分离生产线,2007年2月建成投产。杂醇油是燃料乙醇生产过程中产生的副产品,过去作为一种混合醇出售,每吨售价只有4 000元。如果把杂醇油分离后,其中产量较大的异戊醇吨售价在13 000元左右,2-甲基丁醇就卖60元/kg,具有显著的经济效益。

目前,国内的生产厂家大多采用杂醇油先脱水再提取的生产工艺,投资大,生产成本低。天冠集团经过几年的努力,研制一种分离设备及填料,不经脱水就可直接将各种醇分离。该设备效率高,操作费用低,产品纯度高,质量好,形成了一套成熟的分离技术和填料技术。其中《一种高效精馏填料塔》、《集成型毛细管气液分配器》、《从异戊醇中分离2-甲基丁醇、3-甲基丁醇的装置及应用方法》还获得了国家专利,天冠集团拥有自主知识产权(天冠集团李瑞 陈铁供稿)。