

高产谷胱甘肽酵母菌株的选育

杜丽平,肖冬光,时丽萍

(工业微生物教育部重点实验室,天津市工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要:以BY-14面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为出发菌株,通过紫外线和氮离子注入复合诱变,氯化锌、乙硫氨酸耐性平板筛选,获得一株高产谷胱甘肽的面包酵母优良菌株(*S. cerevisiae*) BL-23。该菌株经摇瓶发酵谷胱甘肽产量为113.46 mg/L,较出发菌株提高62%,每1 g干细胞含谷胱甘肽20.86 mg,较出发菌株提高56%。传代培养结果表明,该菌株具有稳定的遗传性能。

关键词:微生物; 谷胱甘肽; 酿酒酵母; 诱变育种

中图分类号:TS261.1;Q93-3

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)02-0047-03

Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* Strains with High-yield of Glutathione

DU Li-ping, XIAO Dong-guang and SHI Li-ping

(Key Lab of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Industrial Microbiology Key Lab, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* BY-14 was used as parent strain and then mutagenized by ultraviolet radiation and ion implantation, and a mutant strain named as *S. cerevisiae* BL-23 with high-yield of glutathione was obtained through zinc chloride and ethionine tolerance flat screening. The yield of glutathione by BL-23 strain fermentation in shake-flask was 113.46 mg/L, 62 % higher than that by BY-14 strain fermentation, and the content of glutathione in per gram stem cells was 20.86 mg/g, 56 % higher than that by BY-14 strain fermentation. Subculture results showed that such strain had stable heritability.

Key words: microbe; glutathione; *Saccharomyces cerevisiae*; mutation breeding

谷胱甘肽(简称GSH)是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的具有多种重要生理功能的活性三肽,化学名称为 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸。GSH的相对分子质量为307.33,熔点189~193℃(分解),晶体呈无色透明细长柱状,等电点为5.93,溶于水、液氨和二甲基甲酰胺,而不溶于醇、醚和丙酮。

GSH广泛分布于动、植物和微生物中,在生物体内对维持机体适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用^[1]。在临床上,GSH是一种治疗肝病、肿瘤、中毒、白内障及衰老等疾病的重要生化药物,在食品添加剂和运动营养学上也倍受关注,其需求量也不断增加^[2]。GSH的生产方法主要有:萃取法、化学合成法、发酵法和酶法,其中发酵法生产GSH的工艺最为普遍,采用的菌种选育方法^[3-5]主要是传统的化学诱变方法(亚硝基胍、硫酸二乙酯、甲基磺酸乙酯等)或物理诱变方法(紫外线和X射线),利用氮离子注入对谷胱甘肽生产菌株进行诱变尚未见报道。常规的辐射诱变仅仅利用能量的交换,化学诱变也只是考虑分子基团的交换^[6],而离子注入同时具有

能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换联合作用的诱变优势,加之可根据不同的诱变育种需要,因而诱变谱更广、突变率更高^[7]。本研究以产GSH的啤酒酵母菌株BY-14为出发菌株,通过紫外线和氮离子注入复合诱变,筛选得到一株遗传性能稳定的高产谷胱甘肽菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菌株 *Saccharomyces cerevisiae* BY-14, 由天津科技大学工业微生物教育部重点实验室选育与保藏。

1.2 培养基

1.2.1 YEPD 培养基(斜面培养及平板纯化用)

组成(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, 琼脂 20, pH6.0, 0.1MPa 灭菌 15 min。

1.2.2 种子培养基

组成(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, pH 6.0, 0.1MPa 灭菌 15 min。

1.2.3 发酵基本培养基

收稿日期:2009-11-26

作者简介:杜丽平,女,博士生,副教授,发表论文数篇。

通讯作者:肖冬光,男,天津科技大学教授、博士生导师,xdg@tust.edu.cn。

组成为 (g/L): 葡萄糖 30, 酵母粉 7, KH_2PO_4 1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.5, MgSO_4 0.1, pH 自然, 于 0.1MPa 灭菌 15 min。

1.2.4 平板选择培养基

ZnCl₂ 选择培养基: 在 YEPD 培养基中加入 ZnCl₂, 其加量为 340~2720 mg/L, pH 自然, 于 0.1MPa 灭菌 20 min。

乙硫氨酸选择培养基: YEPD 培养基中加入乙硫氨酸, 其加量为 300~900 μg/mL, pH 自然, 0.1MPa 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂与仪器

L-谷胱甘肽, sigma; ALLOXAN 试剂 (四氧嘧啶), sigma; IB Be-Device 离子注入机, 中科院等离子体物理研究所; UVmini-1240 紫外分光光度计, 岛津仪器 (苏州)有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞生物量的测定

取一定体积发酵液离心(4000 r/min)5 min, 用去离子水洗涤 2 次, 收集菌体, 用干重法测定^[8]。

1.4.2 谷胱甘肽抽提

采用热水抽提法^[9]。

1.4.3 胞内谷胱甘肽含量的测定

采用 ALLOXAN 试剂衍生法^[10]。

1.4.4 诱变处理

1.4.4.1 UV 诱变处理

取对数生长期菌液 4 mL, 离心并以无菌生理盐水洗 2 次, 还原至原体积, 转入直径 75 mm 的培养皿中, 磁力搅拌、紫外灯 (功率 15 W, 照射距离 35 cm) 照射一定时间, 通过改变照射时间控制致死率。经诱变处理稀释后的菌液涂布于含一定浓度 ZnCl₂ 的选择培养基上培养 48 h。

1.4.4.2 离子注入诱变处理

每个无菌平板加入 0.1 mL 菌悬液, 涂布均匀, 无菌风吹干 (每一注入剂量做一个真空对照), 用 10 keV 的氮离子(N⁺)注入处理, 剂量分别为 15、30、60、90、120、150、180 (×10¹⁴ ions/cm²)。注入后用无菌水洗菌体, 适当稀释。将诱变菌悬液稀释分别涂布在含一定浓度的乙硫氨酸选择培养基上, 培养 48 h。

1.4.4.3 复合诱变程序

出发菌株→紫外线照射→氯化锌平板分离→氮离子注入→乙硫氨酸平板分离→谷胱甘肽高产菌

2 结果与分析

2.1 紫外诱变处理

对出发菌株 BY-14 进行紫外线诱变处理 60 s (此时

致死率为 85%), 将经诱变处理后的菌悬液梯度稀释, 然后涂布于 ZnCl₂ 选择平板上, 于 30 °C, 培养 48 h, 待菌落长出后, 挑选生长快、菌落大的点接于 YEPD 平板上, 分离得到 111 株抗性菌株, 通过摇瓶发酵试验分别检测其谷胱甘肽产量和含量, 其中有 4 株明显高于出发菌株, 试验结果见表 1。

表 1 菌株筛选试验结果

菌株号	生物量 (g/L)	GSH产量 (mg/L)	GSH含量 (mg/g)
BY-14	5.24	70.05	13.37
A-20	5.8	66.34	11.43
B-3	5.28	78.23	14.82
B-23	5.5	76.21	13.86
E-8	5.43	73.53	13.54

从表 1 中可以看出, 经过紫外诱变处理后, B-3 诱变效果最好, GSH 产量达到 78.23 mg/L, 比出发菌株提高了 12%; GSH 含量达到 14.82 mg/g, 比出发菌株提高了 11%。

2.2 离子注入诱变处理

2.2.1 氮离子(N⁺)注入对 B-3 菌株存活率的影响

以 B-3 为出发菌株, 按照 1.4.4.2 方法分别采用离子束分别为 15、30、60、90、120、150、180 (×10¹⁴ ions/cm²) 的剂量进行处理, 计算其各剂量下的存活率, 结果见图 1。

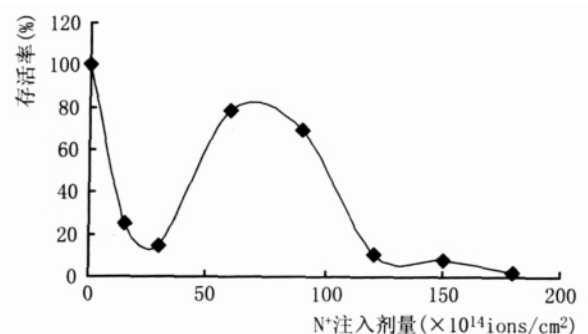


图 1 N⁺注入剂量对 B-3 菌株存活率的影响

由图 1 可以看出, 随氮离子注入剂量的增加, 菌株存活率曲线呈“马鞍型”变化: 即小剂量注入时存活率较高, 随剂量增加存活率下降, 当注入剂量增至 30×10¹⁴ ions/cm² 时, 存活率降为 14%, 但剂量继续增加至 60×10¹⁴ ions/cm² 时, 存活率回升到 78%, 然后又逐渐下降, 注入剂量超过 180×10¹⁴ ions/cm² 后存活率为零。出现这种现象的原因可能是由于低剂量时离子只对细胞表面进行损伤, 随剂量增加, 能量沉积, 产生大量自由基, 导致 DNA 和生物膜等生物大分子损伤, 存活率下降; 剂量继续增加, 大量连续注入电荷的堆积产生很强的库仑斥力, 对被注入细胞形成一个“保护屏障”, 而且大量堆积的电荷会形成一个弱电场, 这种电场的刺激效应可以激活菌体内的修复酶, 提高损伤修复的效率, 存活率又有所回

升;当剂量上升到一定程度,能量沉积和动量传递所造成的严重损伤超出生物大分子的修复能力,存活率再次下降。

2.2.2 高产菌株选育

离子注入诱变后经中间培养的菌液,适当稀释后涂布于乙硫氨酸选择平板上,于 30 °C 培养 2 d,挑取长出的菌落点接于 YEPD 平板上,共得到菌株 120 株。统一编号 BL-1~BL-120。通过摇瓶发酵试验分别检测其谷胱甘肽产量和含量,其中有 4 株明显高于出发菌株,试验结果见表 2。

表2 高产突变株筛选结果

菌株号	生物量 (g/L)	GSH产量 (mg/L)	GSH含量 (mg/g)
B-3	5.28	78.23	14.82
BL-14	5.1	100.79	19.76
BL-23	5.44	113.46	20.86
BL-36	5.51	104.84	19.03
BL-102	5.42	104.84	19.34
BL-43	5.93	102.82	17.34
BL-51	5.48	100.6	18.36
BL-53	5.42	100.13	18.47
BL-104	5.8	100.79	17.38

表 2 结果表明, BL-23 诱变效果最好, GSH 产量达到 113.46 mg/L, 比出发菌株提高了 17.3 %; GSH 含量达到 20.86 mg/g, 出发菌株提高了 10 %。

2.3 菌株诱变前后谷胱甘肽含量、产量的比较

在相同培养条件下,对出发菌株 BY-14、紫外诱变后的突变株 B-3、复合诱变后的突变株 BL-23 进行摇瓶发酵培养,分别测定细胞生物量和谷胱甘肽产量、含量,结果见表 3。

表3 出发菌株与突变株摇瓶实验结果

菌株	生物量 (g/L)	GSH产量 (mg/L)	GSH含量 (mg/g)
原菌BY-14	5.24	70.05	13.37
紫外诱变后B-3	5.28	78.23	14.82
复合诱变后BL-23	5.44	113.46	20.86

由表 3 可看出,复合诱变的诱变效果明显好于单纯的紫外诱变,其谷胱甘肽产量达 113.46 mg/L,比出发菌株 BY-14 提高了 62 %; 谷胱甘肽含量达到 20.86 mg/g,比出发菌株 BY-14 提高了 56 %。

2.4 突变株稳定性考察

选择高产突变株 BL-23 进行稳定性实验,对其进行反复传代 10 次,结果见表 4。

从表 4 可以看出,突变株经连续传代 10 代后,胞内谷胱甘肽含量略有波动,但考虑到生物试验的误差,可以

认为所得到的突变株遗传性状比较稳定,因此该突变株可以作为生产菌种。

表4 突变株稳定性考察结果

项目	生物量 (g/L)	GSH产量 (mg/L)	GSH含量 (mg/g)
第一代	5.44	113.46	20.86
第五代	5.42	110.61	20.40
第十代	5.37	108.72	20.24

3 结论

3.1 出发菌株 BY-14 经紫外诱变, ZnCl₂ 选择平板筛选获得的突变株 B-3。突变株 B-3 的 GSH 产量达到了 78.23 mg/L, 比出发菌株提高了 12 %; GSH 含量达到 14.82 mg/g, 比出发菌株提高了 11 %。

3.2 紫外诱变获得的突变株 B-3 经低能氮离子注入方法诱变,乙硫氨酸抗性平板筛选,获得突变株 BL-23。突变株 BL-23 的 GSH 产量达到 113.46 mg/L, 比出发菌株 BY-14 提高了 62 %; 其谷胱甘肽含量达到 20.86 mg/g, 比出发菌株 BY-14 提高了 56 %。

3.3 经过紫外和离子注入复合诱变获得的突变株 BL-23 遗传性能稳定。

参考文献:

- [1] Izawa S, Kimura A, Kimura A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 1995, 368: 73-76.
- [2] Meister A. Antioxidant functions of glutathione[J]. Life Chem Rep, 1994, 12 (1):23-27.
- [3] MURATA K, KIMURA A. Overproduction of glutathione and its derivatives by genetically engineered microbial cells[J]. Biotechnol Adv, 1990, 8(1):59-96.
- [4] KIMURA A, MURATA K. Mutant strain of *Escherichia coli* and its use for the reparation of glutathione [P]. US, 4598046, 1986-07-01.
- [5] 贾学杰,王雅琴,李亮. 复合诱变和抗性筛选高产谷胱甘肽酵母菌株[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(10):604-607.
- [6] 吴丽芳,李红. 离子束生物工程应用研究进展[J]. 物理, 1999, 28(12): 708-712.
- [7] 虞龙,张宁. 离子注入微生物诱变育种的研究与应用进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 80-83.
- [8] 于景芝,俞学锋. 酵母生产与应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005.65-66.
- [9] 周楠迪,李寅,陈坚,等. 从酵母细胞中提取谷胱甘肽的初步研究[J]. 生物技术, 1997, 7(4):30-33.
- [10] 陶汉州. 临床生化检验(上)[M]. 上海:上海科技出版社, 1979.