

产朊假丝酵母富硒 及产谷胱甘肽的培养工艺

项骅文¹, 郑 蕾², 朱龙宝¹, 葛 飞¹, 陶玉贵¹, 堵国成³

(1. 安徽工程大学生化学院, 安徽芜湖 241000;

2. 芜湖职业技术学院, 安徽芜湖 241003;

3. 江南大学生工学院教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:为生产高生物活性(高谷胱甘肽、高有机硒含量)的富硒产朊假丝酵母,在100 L发酵罐规模水平研究了菌体培养、无机硒的添加工艺,结果表明指数连续流加是富硒酵母最佳的培养方法,在补料的同时添加125 mg/L的无机硒(Na_2SeO_3)和3 mmol/L的半胱氨酸,菌体浓度、胞内谷胱甘肽浓度及无机硒转化率分别达到72 g/L、1080 mg/L和86%,胞内有机硒含量达到1493 $\mu\text{g/g}$,研究结果对富硒酵母大规模工业化生产具有一定的实践指导意义。

关键词:产朊假丝酵母,培养策略,谷胱甘肽,富硒工艺

Fermentation process of *Candida utilis* for selenium-enriched and production of glutathione

XIANG Si-wen¹, ZHENG Lei², ZHU Long-bao¹, GE Fei¹, TAO Yu-gui¹, DU Guo-cheng³

(1. School of Biochemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China;

2. Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241003, China;

3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The main purpose of this study was to prepare high bioactive selenium/glutathione-enriched yeast, the *Candida utilis* was used as the parent strain. The culture process and selenite addition mode were investigated in a 100 L stirred fermentor. The result showed that exponential feeding was the most suitable approach to attain high concentrations of cell (72 g/L), intracellular GSH (1080 mg/L) and selenium organic transformation rate (86%) with feeding of 125 mg/L Na_2SeO_3 and 3 mmol/L L-cys, the intracellular selenium reached 1493 $\mu\text{g/g}$.

Key words: *Candida utilis*; culture strategy; glutathione; selenium-enriched process

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)01-0165-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.01.024

硒是人和动物的必需微量元素之一,谷胱甘肽对维持体内适宜的氧化还原环境起着重要的作用,两者都具有清除体内自由基和提高机体免疫力的生物学功能,在补硒的同时补充谷胱甘肽可进一步提高其生理功能作用^[1]。将无机硒转化为有机硒的同时能积累谷胱甘肽的微生物菌种主要有酿酒酵母(*S. cerevisiae*)和产朊假丝酵母(*Candida utilis*)。*Candida utilis*是Crabtree阴性和Kluyver阳性酵母^[2],在严格好气的条件下不积累乙醇,与酿酒酵母相比具有生长速度快、发酵密度高的优点,菌体密度可以达92 g/L^[3],而且其细胞内含有丰富蛋白质和维生素B。产朊假丝酵母作为GRAS(Generally Regarded As Safe)微生物,已被美国FDA认证可用于

食品添加剂和制药行业,显示出比酿酒酵母更大的应用前景^[4]。而目前关于产朊假丝酵母的研究主要集中在如何提高无机硒的转化和GSH的合成能力,如优化培养条件及培养基成分^[5-6]、前体物质的补加^[7-9]和环境胁迫^[10-11]等。除了提高细胞GSH的合成能力外,在发酵过程中提高细胞密度,对提高有机硒和GSH产量非常重要,补料发酵可以克服高底物浓度产生的菌体生长抑制,是目前最为有效的提高细胞密度、目标产物得率的方法。目前关于产朊假丝酵母的补料工艺主要是在5 L发酵罐中进行^[12-13],而在更大规模的生产报道较少,为给大规模生产实践提供指导,本文以产朊假丝酵母为出发菌株,在100 L的发酵罐中研究其培养工艺、无机硒的添加方式及添加前体

收稿日期: 2016-04-25

作者简介: 项骅文(1965-),男,硕士,讲师,主要从事发酵工程研究, E-mail: xiangsw@ahpu.edu.cn。

基金项目: 芜湖市科技计划重点项目(2013cx09)。

物,以提高硒的转化率、GSH 的含量和菌体密度,在小试规模水平上生产高生物活性的富硒酵母。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

产阮假丝酵母 (*Candida utilis*), 实验室保藏。

谷胱甘肽标准品、亚硒酸钠标准品; 盐酸苯肼; EDTA-2Na、变色酸; 氯酸钾; 高氯酸 sigma 公司; L-半胱氨酸、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、亚硒酸钠、磺基水杨酸、葡萄糖等 国药集团化学试剂有限公司; 蛋白胨、酵母浸膏等 北京奥博星生物技术有限公司。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母浸膏 10, pH6.0。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 硫酸铵 10, 磷酸氢二钾 3.0, 硫酸镁 0.25, pH6.0。

流加培养基 (g/L): 葡萄糖 500, 硫酸铵 10, 磷酸氢二钾 3, 硫酸镁 0.25, 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 0.4, pH6.0。

发酵罐 (100BSA) 上海保兴生物工程设备有限公司; 灭菌锅 (TM50) 上海申安医疗器械厂; 超净工作台 (SW-QJ-2FD) 苏州净化设备有限公司; 离心机 (Allegra 25R) 美国 bekmann; 分析天平 (JA5003B) 上海天平仪器有限公司; 分光光度计 (T6-1650E) 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养 斜面种子培养: 将斜面种子活化 12 h 后接入 50 mL 种子培养基中, 于 30 °C 震荡培养 24 h, 摇床转速为 300 r/min。

一级种子摇瓶培养: 往 1000 mL 三角瓶中装入发酵培养基 150 mL, 接入 10% (v/v) 的种子液, 于 30 °C 培养 24 h, 摇床转速 200 r/min。

二级种子培养: 往 10 L 发酵罐中装入发酵培养基 7 L, 接入 10% (v/v) 的一级种子液, 搅拌转速 400 r/min, 温度 30 °C, 通气量 2.0 L/min, 自动流加 1 mol/L H_2SO_4 和 1 mol/L NaOH 溶液调节发酵液的 pH, 并维持在 pH6.0, 培养 24 h。

1.2.2 100 L 发酵罐培养

1.2.2.1 分批培养 100 L 机械搅拌式发酵罐中装入发酵培养基 70 L, 接种量 10% (v/v), 搅拌转速 400 r/min, 通气量 4.0 L/min, 发酵温度控制在 27~29 °C, 流加 1 mol/L H_2SO_4 和 1 mol/L NaOH 以维持 pH 在 6.0, 每隔 4~6 h 取样分析。

1.2.2.2 间歇流加培养 100 L 发酵罐中装入发酵培养基 50 L, 接种量 10% (v/v), 搅拌转速 400 r/min, 溶氧控制在 40% 以上, 发酵温度 27~29 °C 和 pH6.0, 菌体进入对数生长期后, 糖浓度降低至 10 g/L 以下时, 泵入流加培养基至糖浓度 30 g/L, 每隔 15 h 补料一次, 间歇补料共 4 次。

1.2.2.3 指数连续流加培养 100 L 发酵罐中装入发酵培养基 50 L, 接入 10% 的种子液, 温度、pH 控制同分批培养, 溶氧控制在 35% 以上, 菌体进入对数生长期后, 底物的流加速率 F 按下式计算:

$$F = \frac{\mu \times V \times X_0}{Y_{X/S} (S_F - S)} \exp(\mu t)$$

式中: X, S 分别为菌体和底物浓度 V, S_F, μ 分别为发酵液体积、为补料底物浓度、比生长速率, $Y_{X/S}$ 为细胞对底物的得率系数, X_0 为初始菌体量。参考 Min^[14] 和 Cheng^[15] 的研究结果, 比生长速率控制在 0.1 h^{-1} 。

1.3 硒的添加方式

1.3.1 无机硒的添加量对菌体浓度和 GSH 合成的影响 在指数连续流加培养开始时, 加入终浓度为 10~60 mg/L 的无机硒 (Na_2SeO_3), 研究无机硒的添加量对菌体浓度及 GSH 合成的影响, 确定合适的添加量。

1.3.2 无机硒的添加时间对菌体浓度和 GSH 合成的影响 指数流连续加培养过程中分别间隔 8 h 添加终浓度为 30 mg/L 的无机硒, 研究其添加时间低菌体浓度和 GSH 合成的影响, 确定合适的添加时间。

1.3.3 无机硒的添加方式 分别采用一次性添加 30 mg/L 无机硒 (添加方式 1), 分次添加的方式 (即在 8、16、24 h 各添加 20 mg/L 的 Na_2SeO_3 , 终浓度达 60 mg/L, 添加方式 2) 和在补料液中添加 400 mg/L 的无机硒 (即流加培养基的同时补硒, 共流加 25 L 的培养基, 无机硒的终浓度达到 125 mg/L, 添加方式 3) 三种方式添加无机硒, 研究其对菌体浓度和 GSH 合成的影响, 从而确定最佳的添加方式。

1.4 前体物 L-半胱氨酸的添加

在指数连续培养至 12 h 时向发酵罐中加入终浓度为 3 mmol/L 的半胱氨酸, 研究其对 GSH 和合成的影响。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度 (DCW) 测定 以细胞干重 (DCW) 表示酵母生物量。取 20 mL 发酵液, 4000 r/min 离心 10 min, 蒸馏水离心洗涤 3 次, 收集菌体, 105 °C 烘干至恒重。

1.5.2 GSH 测定 胞内谷胱甘肽的提取及测定参见文献^[16]。

1.5.3 葡萄糖浓度的测定 3,5-二硝基水杨酸法, 具体测定方法参考文献[3]。

1.5.4 胞内总硒、无机硒、有机硒的测定 测定方法参见参考文献[3], 胞内有机硒含量的测定, 有机硒含量 = 总硒含量 ($\mu\text{g/g}$) - 无机硒含量 ($\mu\text{g/g}$)。

2 结果与分析

2.1 初始糖浓度对菌体浓度的影响

为了获得较高的细胞产率, 培养基中的葡萄糖浓度需适合菌体的快速生长, 为此研究了初始糖浓度对菌体浓度的影响。实验结果如图 1 所示, 从图中可知, 随着糖浓度的升高, 菌体浓度也随之增加 (图 1a), 但细胞得率随着糖浓度增加而呈现下降的趋势, 在糖浓度达到 30 g/L 时葡萄糖对菌体得率 ($Y_{X/S}$) 达到最大 0.51 g/g (图 1b), 因而确定上罐发酵的初始糖浓度为 30 g/L。

2.2 培养方式对菌体浓度的影响

在 100 L 发酵罐中研究了三种培养方法, 即分批培养、间歇流加、指数连续流加培养, 结果如图 2 所示, 从图中可知, 分批培养时, 在发酵 10 h 后进入对

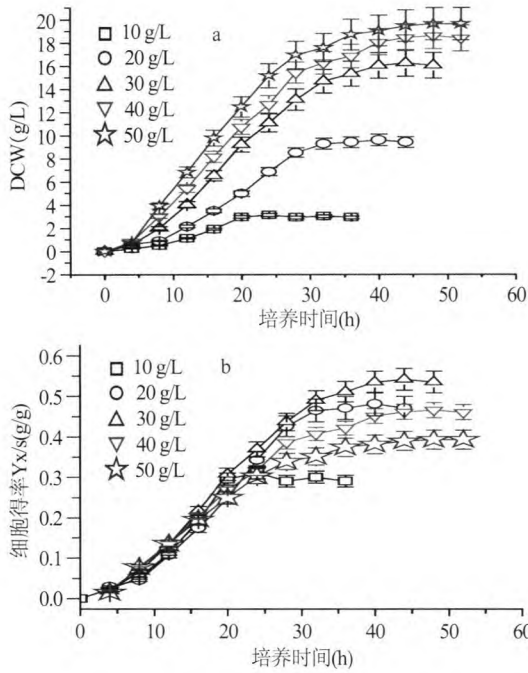


图1 初始糖浓度对细胞生长的影响

Fig.1 Effect of initial glucose concentrations on batch fermentation of *Candida utilis*

数生长期,葡萄糖浓度迅速下降,在对数生长后期,糖浓度降到为4 g/L以下,发酵结束后菌体浓度为14.3 g/L。由于分批培养时提供的糖量有限,限制了菌体的进一步生长,难以获得高密度的菌体,而高的初始糖浓度又会抑制菌体的生长,菌体得率较低。流加发酵工艺可有效解除高糖浓度对菌体生长的抑制,同时可补充菌体生长所需的碳氮源,实现高密度的发酵,获得大量的菌体。从图中可知,在菌体进入对数生长期,糖度降到8 g/L时开始间歇补料,每隔12 h补糖至30 g/L,经过74 h的发酵,菌体浓度达到59 g/L,较分批培养提高了近4倍。为进一步提高菌体浓度,使菌体在长时间内以最大的比生长速率生长,采用指数连续流加培养,当比生长速率控制在 0.1 h^{-1} 时获得菌体浓度达到83 g/L,较间歇补料培养提高了1.4倍,结果表明指数连续流加是一种最佳培养方法。

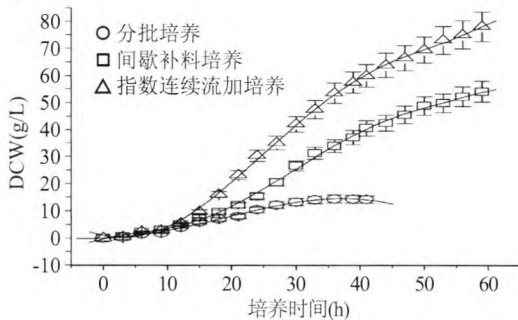


图2 *Candida utilis* 不同培养方式的菌体生长过程

Fig.2 Time courses of *Candida utilis* at different culture mode

2.3 无机硒添加量对菌体浓度、胞内 GSH 合成及无机硒转化率的影响

在指数连续流加培养开始时,一次性添加终浓度为5~30 mg/L的无机硒,对菌体浓度、细胞内 GSH

积累及无机硒转化率的影响结果如图3所示,从图中可知,随着亚硒酸钠浓度的增高,对菌体浓度、GSH 细胞内积累有明显的抑制作用,对无机硒的转化率影响相对较小。当添加浓度达到15 mg/L时,菌体浓度为53 g/L,胞内 GSH 的含量为460 mg/L,分别为对照的63%和69%,硒转化率为80%。当无机硒的添加浓度达到30 mg/L时,菌体浓度和胞内 GSH 的含量分别为32.8 g/L和210 mg/L,无机硒的转化率仅68%,表明无机硒添加浓度低于15 mg/L时有利于菌体浓度及 GSH 胞内的积累,高于15 mg/L时抑制菌体的生长,但要获得大量的有机硒,需要继续提高无机硒的添加浓度,为此进一步分析硒的添加工艺。

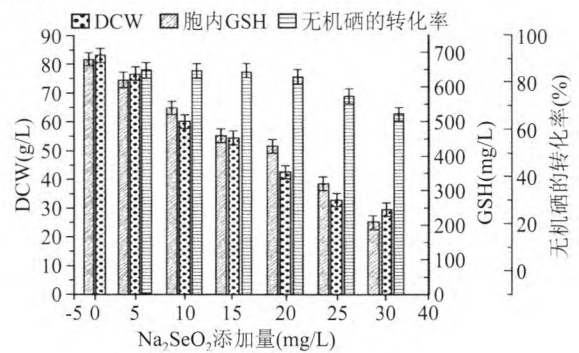


图3 无机硒添加量对菌体浓度、胞内 GSH 和无机硒转化率的影响

Fig.3 Effects of selenium concentrations on the biomass, intracellular GSH and selenium transformation rate

2.4 无机硒的添加时间对菌体浓度、胞内 GSH 合成及无机硒化率的影响

为确定合适的无机硒添加时间,在发酵过程中间隔8 h添加30 mg/L无机硒,实验结果如图4所示,从图中可知,在培养至24 h时添加30 mg/L无机硒,细胞内 GSH 含量达到最大(633 mg/L),同时细胞浓度达到64 g/L,在生长后期添加无机硒对菌体浓度影响相对较小,菌体浓度几乎没有下降,但是超过24 h后,细胞内积累的 GSH 迅速降低,培养56 h细胞内 GSH 的含量降低至346 mg/L,这是在培养后期添加无机硒促进了 GSH 分泌到细胞外,导致细胞内的浓度下降。

2.5 无机硒的添加方式

根据2.3和2.4的结果,添加低浓度的无机硒有利于细胞的生长和 GSH 的积累,但难以获得高浓度的有机硒,为此分别采用一次性添加、分次添加的方式和在补料液中添加400 mg/L无机硒的三种添加方式,结果如图5所示。分次添加和补料时同时流加无机硒的两种添加方式对菌体浓度和胞内 GSH 的积累的影响结果相近,其菌体浓度和胞内 GSH 量均分别达到72 g/L和762 mg/L,硒的转化率均超过80%,但是分次添加硒的总量仅为60 mg/L,菌体内的有机硒含量仅692 $\mu\text{g/g}$ 菌体。而流加补硒可以克服一次性补充高浓度的无机硒对菌体浓度和 GSH 合成的不利影响,在无机硒的终浓度达到125 mg/L时获得较高的转化率,发酵结束后硒的转化率达到

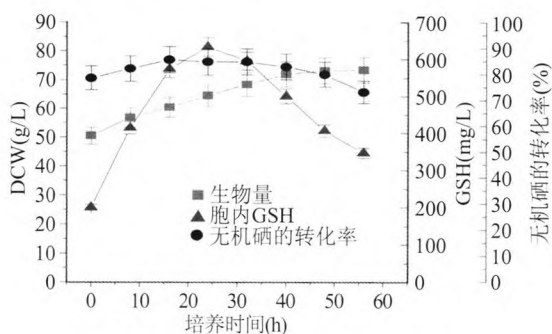


图4 无机硒添加时间对菌体浓度、胞内GSH积累及转化率的影响

Fig.4 Effects of addition time of Na_2SeO_3 on the biomass, intracellular GSH and selenium transformation rate

86%,有机硒含量达到 1493 $\mu\text{g/g}$,是分次添加的2.1倍。

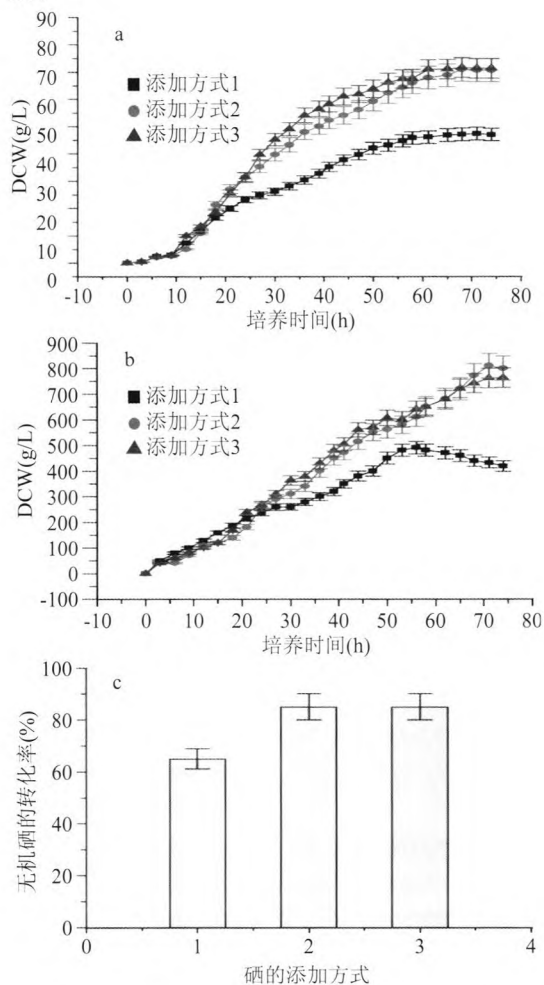


图5 无机硒添加方式对对菌体浓度(a)、胞内GSH(b)、无机硒转化率(c)的影响

Fig.5 Effect of sodium selenite addition mode on the biomass (a), intracellular GSH (b) and selenium transformation rate (c)

2.6 GSH前体物L-蛋氨酸的添加对GSH合成的影响

不管是采用分次添加还是补料时添加硒,无机硒的添加促进GSH向胞外分泌,而且无机硒转化成

有机硒的同时需要消耗一部分GSH,导致GSH胞内的积累较难。为制备高性能的富硒酵母,需进一步提高胞内的GSH含量。根据实验结果发现随菌体浓度的增加,胞内GSH含量呈下降趋势,可能是胞内合成GSH的前体氨基酸相对缺乏,通过外部添加前体氨基酸(尤其L-半胱氨酸)可能提高胞内GSH含量^[17],而且GSH合成量的增加可以修复因无机硒添加而受损的细胞膜,减少GSH向胞外的分泌,有利于细胞内的积累^[18]。本研究在指数连续流加培养的基础上,当发酵至12h时向发酵罐中加入3mmol/L的半胱氨酸,结果表明添加GSH的前体物半胱氨酸对GSH的合成有明显的促进作用(图6),培养56h后细胞内的积累量达到1080mg/L。

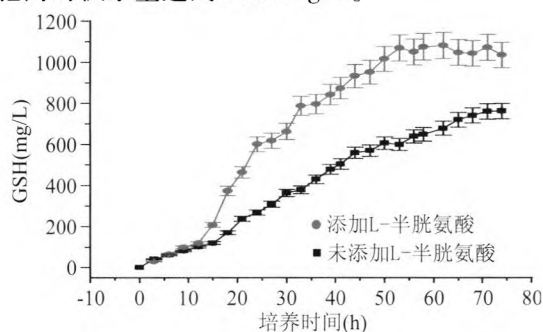


图6 添加半胱氨酸对胞内GSH积累的影响

Fig.6 Effect of L-cysteine addition on intracellular GSH

3 结论

以能够在胞内积累谷胱甘肽的产朊假丝酵母为出发菌株,在100L发酵罐上考察了菌体高密度培养,无机硒的添加工艺,获得高生物活性的富硒产朊假丝酵母的生产工艺参数,指数连续流加是产朊假丝酵母最佳的培养工艺,同时流加125mg/L的亚硒酸钠,菌体浓度达到72g/L,无机硒转化率达到86%,有机硒的浓度达到1493 $\mu\text{g/g}$ 菌体,在培养过程添加3mmol/L的半胱氨酸能有效促进GSH在细胞内的积累,胞内GSH含量达到1080mg/L,对富硒酵母大规模工业化生产具有一定的实践意义。

参考文献

- [1] Chasteen TG, Bentley R. Biomethylation of selenium and tellurium; Microorganisms and plants [J]. Chem Rev, 2003, 103 (1): 1-25.
- [2] Wang DH, Zhang JL, Dong YY, et al. Glutathione is involved in physiological response of *Candida utilis* to acid stress [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(24): 10669-10679.
- [3] Ge X, Wang D, Wei G, et al. Improvement of physiological characteristic of selenium-enriched *Candida utilis* with amino acids addition [J]. Biotech Res Int, 2010, 20(11): 1-7.
- [4] Wang D, Yang B, Wei G, et al. Efficient preparation of selenium/glutathione-enriched *Candida utilis* and its biological effects on rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 150 (1-3): 249-257.
- [5] 朱虹, 许激扬, 卞筱泓, 等. 响应面法优化谷胱甘肽发酵培养基 [J]. 药物生物技术, 2014, 21(3): 242-245.

(下转第174页)

