

南极硅藻 GJ01(*Berkeleya rutilans*) 产谷胱甘肽条件的优化*

丁 焯^{1,2①} 缪锦来³ 李光友³ 简纪常^{1,2} 吴焯和^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524025; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524025;
3. 国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

提要 以南极硅藻 GJ01(*Berkeleya rutilans*)为对象,分别采用紫外、可见和荧光分光光度法,研究了营养条件等因子对 GJ01 生长和胞内谷胱甘肽含量的影响,并对培养的 GJ01 细胞合成谷胱甘肽的条件进行了优化。结果表明,在单因子影响条件下,1.2g/L 的碳酸氢钠对南极硅藻 GJ01 的生长最好,且最有利于谷胱甘肽的积累;0.8mmol/L 氯化钙对 GJ01 的生长最为有利,而 0.2mmol/L 氯化钙对谷胱甘肽的产生是适宜的;维生素 B₁₂ 和生物素对 GJ01 胞内谷胱甘肽的产生影响较小。正交试验表明,GJ01 细胞产生谷胱甘肽的最优条件是:光照周期为 16h/8h、NaHCO₃ 为 1.6g/L、Ca²⁺ 为 0.4mmol/L、Cys 为 10mmol/L。该结果为利用南极硅藻 GJ01 生产谷胱甘肽提供了参考和依据。

关键词 南极硅藻, 谷胱甘肽, GJ01, 培养法, 优化

中图分类号 Q94

谷胱甘肽(GSH)是生物细胞最丰富的巯基化合物,由谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶催化合成。它的合成受多方位的调节,特别是对谷氨酰半胱氨酸合成酶的调节尤为重要,底物对该酶具有调节作用,如半胱氨酸可以提高胞内谷胱甘肽浓度(Yoshida *et al.*, 1993)。但过多的谷胱甘肽产物将作用于谷氨酰半胱氨酸合成酶进行反馈抑制。

工业上谷胱甘肽的规模生产法主要有化学合成法、酶法和发酵法。化学法最早用于谷胱甘肽生产,但操作复杂且费时、副产物多、纯化困难。酶法必须提供成品 ATP 或 ATP 再生系统,成本偏高(Murata *et al.*, 1981)。最常用的是发酵法,酵母菌是大家首选的材料。酵母菌是工业上常用的菌种,它生长快,发酵容易控制,并可以将其他工业废弃的酵母进行回收利用。谷胱甘肽生产利用的最新技术主要是通过诱变、基因工程和细胞融合技术,以获得谷胱甘肽高产菌株,此外优化控制发酵条件和改善纯化方法,可以

最大限度地提高谷胱甘肽得率(Gushima *et al.*, 1983; Sakato *et al.*, 1992; 刘娟等, 2003; 童群义等, 2002)。由于酵母菌越来越供不应求,常温酵母菌发酵成本也较高,同时其产谷胱甘肽的能力几乎无法再进一步提高,这就要求人们努力去寻找更有效的材料,以开拓谷胱甘肽生产的新思路。

南极冰藻是极地海洋生态系统中重要的初级生产者,作者在对南极冰藻谷胱甘肽筛选的基础上,发现大多数南极冰藻含有较高的谷胱甘肽,同时谷胱甘肽合成能力也较高,因此南极冰藻极可能成为谷胱甘肽新的来源。南极冰藻长期生活在低温环境,胞内的组成和酶的性质已发生了适应性的变化,谷胱甘肽系统也是与之相适应的(丁焯等, 2006)。更为重要的是冰藻的低温生长,可以减少能量供应,降低成本,特别是在低温的北方可以大规模培养。作者拟探讨营养物等因素对硅藻 GJ01 生长和谷胱甘肽积累的影响,并进行培养条件优化,以期在南极冰藻在谷胱甘肽生产领域的应用提供基础数据。

*国家自然科学基金资助项目,40206022 号、40406003 号。

① 通讯作者: 丁 焯, 博士, 副教授, E-mail: dingy@gdou.edu.cn

收稿日期: 2006-10-25, 收修改稿日期: 2007-02-23

1 材料与方法

1.1 材料

藻种: 硅藻 GJ01(*Berkeleya rutilans*), 由国家海洋局活性物质重点实验室提供, 保存于 4℃ 冰箱, 实验前进行复活和纯化。培养基为 *f/2* 培养基; 试剂: ATP(Amresco 分装)、GSH(日本产)、邻苯二甲醛(OPT)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)(Sigma)、二硫苏糖醇(DTT)(Biomol); 主要仪器: 岛津紫外可见分光光度计、高速冷冻离心机、低温光照培养箱、960CRT 荧光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 各单因子对 GJ01 的影响测定 NaHCO₃ 梯度设为 0.4、0.8、1.2、1.6 和 2.0g/L; CaCl₂ 浓度梯度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0mmol/L; 维生素 B₁₂ 浓度梯度分别为 0.25、0.38、0.50、0.63 和 0.75μg/L; 生物素浓度梯度为 0.4375、0.5000、0.5625、0.6350 和 0.6975μg/L。各实验组以基础培养基为基础配成不同因子的梯度, 并设空白对照组, 分别设 3 个重复。培养基 *f/2*(300ml/瓶)经煮沸灭菌, 预冷后按 25% 的比例接种南极硅藻 GJ01, 在温度为 6—8℃、光强为 1300—1900 lx、光照周期为 12h/12h 的条件下培养。培养 12 天至生长对数后期, 先测定在 410nm 处的吸光值, 然后以 6000r/min、4℃ 离心 20min, 取藻体称重, 待测定其谷胱甘肽含量。

1.2.2 GSH 和蛋白质含量测定 分别将收获的藻体用 50mmol/L 磷酸钾盐缓冲液(pH 7.3)清洗数次, 然后液氮研磨, 加入 5—10 倍同样的缓冲液, 反复冻融 3 次, 以 12000r/min 离心 10min, 取上清用于测定。按邻苯二甲醛(OPT)荧光法(郭黎平等, 2001)测定谷胱甘肽浓度, Bradford 法(Bradford, 1976)测定蛋白质浓度。数据分析采用统计软件 SPSS11.5 进行。

1.2.3 培养条件的优化 根据 1.2.1 各单因子对硅藻 GJ01 生长、谷胱甘肽含量的影响结果, 设计正交方案, 探讨硅藻 GJ01 的最佳培养条件, 并优化谷胱甘肽的产生条件。正交水平表及正交方案分别见表 1、

表 1 培养优化正交水平表

Tab.1 L₉(3⁴) orthogonal test design for optimization of culture of *B. rutilans* GJ01

水平	因 素			
	光照(A) (光/暗)	NaHCO ₃ (B) (g/L)	Ca ²⁺ (C) (mmol/L)	Cys (D) (mmol/L)
1	12h / 12h	0.8	0.4	20
2	16h / 8h	1.2	0.6	10
3	8h / 16h	1.6	0.2	30

注: Cys 为半胱氨酸(Cysteine)

表 2。实验分为 9 组, 各设 3 个重复, 每个体系为 500ml, 接种培养 12 天后以 6000r/min 的转速离心收获藻, 按 1.2.2 测定谷胱甘肽含量, 统计藻的生物量和谷胱甘肽的百分含量。

2 结果

2.1 不同碳酸氢钠浓度下南极硅藻 GJ01 的生长与谷胱甘肽含量

不同 NaHCO₃ 浓度下硅藻 GJ01 生长、谷胱甘肽含量和蛋白浓度的测定结果分别见图 1 和图 2。由图 1 可以看出, 碳酸氢钠对南极硅藻 GJ01 的生长影响显著, 浓度为 1.2g/L 时生长最好, OD_{410nm} 达 0.71; 其浓度为 0.8g/L 和 1.6g/L 时生长也较好, 与对照组具有极显著差异($P < 0.01$)。由图 2 可见, 1.2g/L NaHCO₃ 最有利于谷胱甘肽的积累, 其含量达 13.22 μmol/L; 1.6g/L 时高于对照组的, 且具有显著差异($P < 0.01$)。蛋白质浓度在不同培养基中变化很大, 0.8g/L 时为最高, 当进一步增加其浓度时, 蛋白质反而下降。

2.2 不同氯化钙浓度下南极硅藻 GJ01 的生长与谷胱甘肽含量

不同 CaCl₂ 浓度下南极硅藻 GJ01 生长及 GSH 含量的测定结果, 分别见图 3 和图 4。由图 3 可见, 其浓度为 0.8mmol/L 时, 对硅藻 GJ01 的生长最为有利, OD_{410nm} 达 0.72; 当浓度再增大时, 生长反而减慢; 对照组生长最慢, OD_{410nm} 仅为 0.16。从图 4 可以看出, 谷胱甘肽含量随钙离子浓度的变化不太大。0.2mmol/L 的钙对谷胱甘肽的产生是有利的, 谷胱甘肽含量达 13.27μmol/L, 对照组仅为 10.07μmol/L ($P < 0.01$); 蛋白质受钙离子浓度的影响非常显著。

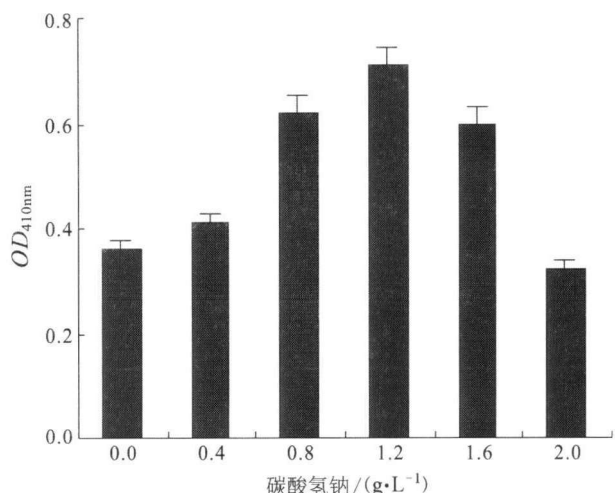


图 1 NaHCO₃ 对南极硅藻 GJ01 生长的影响

Fig.1 Influence of NaHCO₃ on growth of *B. rutilans* GJ01

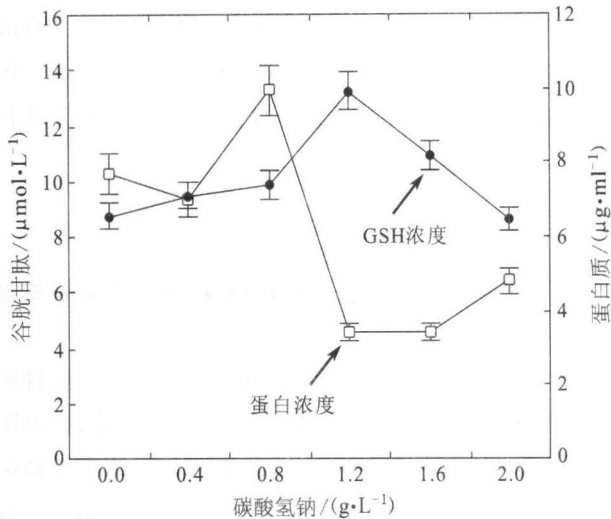


图2 NaHCO₃对南极硅藻 GJ01 GSH 含量和蛋白质浓度的影响

Fig. 2 Influence of NaHCO₃ on GSH and protein of *B. rutilans* GJ01

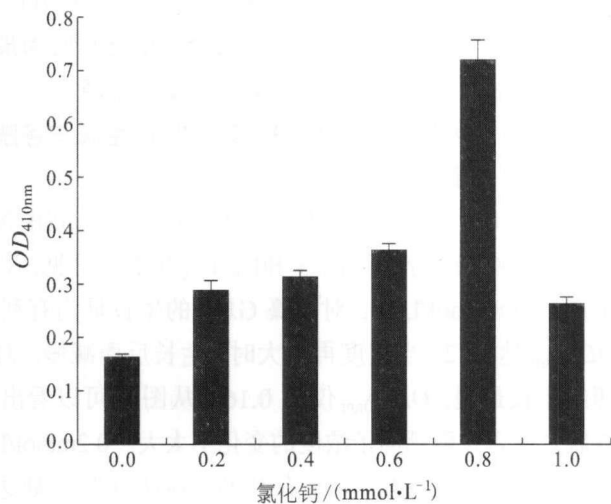


图3 CaCl₂对南极硅藻 GJ01 生长的影响

Fig. 3 Influence of CaCl₂ on growth of *B. rutilans* GJ01

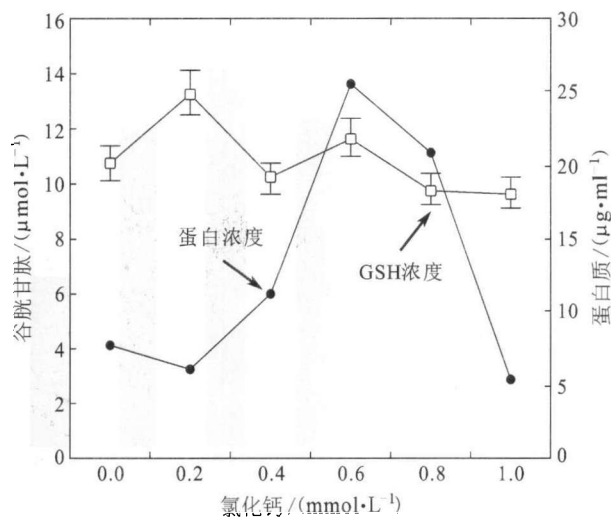


图4 CaCl₂对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽含量和蛋白质的影响

Fig. 4 Influence of CaCl₂ on GSH and protein of *B. rutilans* GJ01

2.3 不同维生素 B₁₂ 浓度下南极硅藻 GJ01 生长与谷胱甘肽含量

维生素 B₁₂ 对硅藻 GJ01 生长及谷胱甘肽含量的影响, 见图 5。可见, 维生素 B₁₂ 对硅藻 GJ01 的生长有很大的影响, 当培养基中 B₁₂ 的含量为 0.38 μg/L 时最适合硅藻 GJ01 的生长。但维生素 B₁₂ 对谷胱甘肽的产生影响较小。在各种浓度的 B₁₂ 下, 谷胱甘肽的含量较一致, 在 12.5—14.0 μmol/L 之间。

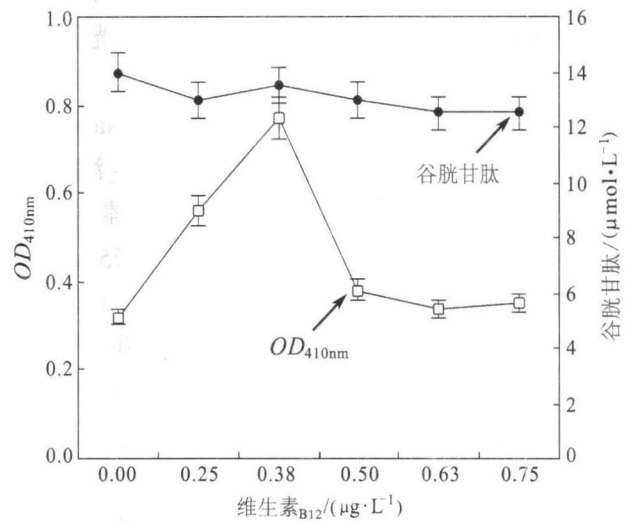


图5 维生素 B₁₂ 对南极硅藻 GJ01 生长及 GSH 含量的影响
Fig. 5 Influence of B₁₂ on growth and GSH of *B. rutilans* GJ01

2.4 不同生物素浓度下南极硅藻 GJ01 生长与谷胱甘肽含量

生物素对硅藻 GJ01 生长及谷胱甘肽含量的影响, 见图 6。可以明显看出, 生物素浓度的改变对硅藻 GJ01 的生长影响显著, 对照组生长最慢, 浓度为 0.5 μg/L 时生长最快, 其 OD_{410nm} 值超过 0.6。而生物

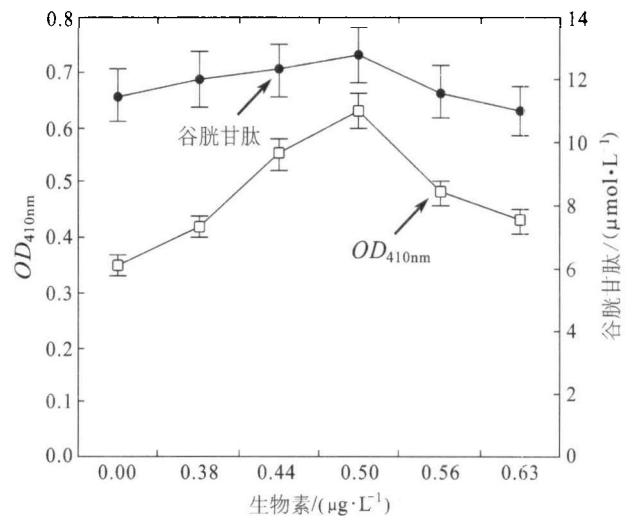


图6 生物素对南极硅藻 GJ01 生长及 GSH 含量的影响
Fig. 6 Influence of biotin on growth and GSH of *B. rutilans* GJ01

素对谷胱甘肽积累的影响不是特别明显。当浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 时, 谷胱甘肽含量最大; 随生物素浓度的升高, 谷胱甘肽含量下降。

2.5 条件优化结果

南极硅藻 GJ01 产谷胱甘肽条件优化的结果见表 2。可以看出, 对谷胱甘肽百分含量影响的顺序为 Cys>光照>碳酸氢钠>钙离子, Cys 和光照的影响显著。根据表观分析, 产 GSH 的最适条件应为: 光照 16h/8h、 NaHCO_3 1.6g/L、 Ca^{2+} 0.4mmol/L、Cys 10mmol/L, 并经反复培养测定得以证实。但对硅藻 GJ01 的生物量影响的主次顺序却不同, 为 A>C>D>B, 最适生长的各因素水平为 $A_2B_2C_1D_2$ 。

表 2 培养条件优化正交方案及结果

Tab.2 The scheme of the orthogonal test and the results of optimal condition of *B. rutilans* GJ01 culture

试验	因素				谷胱甘肽含量 (%)	生物量 (g)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	0.238	0.584
2	1	2	2	2	0.349	0.635
3	1	3	3	3	0.233	0.544
4	2	1	2	3	0.258	0.650
5	2	2	3	1	0.349	0.586
6	2	3	1	2	0.468	0.720
7	3	1	3	2	0.324	0.390
8	3	2	1	3	0.333	0.552
9	3	3	2	1	0.343	0.412
GSH						
K_1	0.273	0.273	0.346	0.310		
K_2	0.358	0.344	0.317	0.380		
K_3	0.333	0.348	0.302	0.275		
优水平	2	3	1	2		
极差 R	0.085	0.075	0.044	0.105		
主次分析	D>A>B>C					
生物量						
K_1	0.588	0.541	0.619	0.527		
K_2	0.652	0.591	0.566	0.582		
K_3	0.451	0.559	0.507	0.582		
优水平	2	2	1	2		
极差 R	0.201	0.050	0.112	0.055		
主次分析	A>C>D>B					

3 讨论

在培养液中加入适量的 NaHCO_3 , 可以为微藻提

供光合作用所需要的碳源, 加速其生长。梁英等(2001)研究发现 NaHCO_3 对塔胞藻(*Pyramimona* spp.)、小球藻(*Chlorella* spp.)、新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、等鞭藻 3011(*Isochrysis galbana* 3011)和绿色巴夫藻(*Pavlova viridisai*)等的生长具有显著的影响。本研究结果与上述研究基本相似, 0.8—1.6g/L 的 NaHCO_3 对南极硅藻 GJ01 的生长具有明显的促进作用, 浓度继续加大时对藻的生长反而有抑制作用(图 1)。1.2g/L 的 NaHCO_3 浓度是最适的, 但由于碳酸根会与钙离子等形成沉淀, 这样将影响培养和藻细胞的收获, 因此推荐使用 0.8g/L 的 NaHCO_3 来培养南极硅藻 GJ01。关于 NaHCO_3 对微藻谷胱甘肽含量影响的研究, 尚未见文献报道。作者对南极硅藻 GJ01 研究表明, 当 NaHCO_3 浓度为 1.2g/L 时谷胱甘肽含量最高(图 2), 可能是因为能量的高速产生, 加速了谷胱甘肽的合成。

本实验结果表明, Ca^{2+} 对硅藻 GJ01 的生长具有重要的作用, 浓度在 0.8mmol/L 以内, 均能有效地促进硅藻 GJ01 的生长(图 3); Ca^{2+} 对谷胱甘肽的产生也非常重要, 0.2—0.6mmol/L 的 Ca^{2+} 促进谷胱甘肽的合成, 并在浓度为 0.2mmol/L 时达到最大值(图 4)。可见 Ca^{2+} 在谷胱甘肽的产生上具有重要的调节作用。另外谷胱甘肽作为信使分子调节其他生理功能也与 Ca^{2+} 有关(Gomez *et al*, 2004)。本实验结果表明胞外的 Ca^{2+} 进入到胞内, 可能作为信使而引发了与谷胱甘肽合成有关或再生有关酶类的表达, 或者是通过对酶活的调节及其他方式发挥作用。

微藻细胞内维生素 B_{12} 的含量非常丰富, 如螺旋藻中维生素 B_{12} 是现在已知生物体中含量最高的一种。维生素 B_{12} 是 *f/2* 培养基中的一种成分, 对硅藻 GJ01 的生长具有重要作用(图 5), 并对其在其胞内的积累也有积极作用。维生素 B_{12} 对谷胱甘肽的产生似乎没有明显关联, 它不是谷胱甘肽合成的决定因子。

生物素也是一种常见的生长因子, 在各种细胞中具有重要功能, 常温微藻对生物素有一定的需求。本实验结果表明, 生物素对硅藻 GJ01 的生长具有促进作用(图 6)。可见, 天然海水中生物素的浓度, 不能满足微藻生长的最高需求。生物素的加入对谷胱甘肽的合成无明显的影响, 也不是谷胱甘肽合成的决定因子。

从优化结果可以看出, Cys 和光照是影响硅藻 GJ01 产谷胱甘肽的主要因素, 在光照周期为 16h/8h、 NaHCO_3 为 1.6g/L、 Ca^{2+} 为 0.4mmol/L、Cys 为 10mmol/L 的条件下最有利于谷胱甘肽的合成(表 2)。

其中对 Cys 的要求与酵母发酵结果基本一致(Wen *et al.*, 2004)。尽管各因素对硅藻 GJ01 生长影响的主次顺序不同,但生长与谷胱甘肽产生的最适条件很相近,只是 NaHCO_3 的浓度要稍低一些。可以选择稍低一点的 NaHCO_3 浓度,这样可以保证硅藻 GJ01 快速生长和大量合成谷胱甘肽,也能够避免沉淀的产生。

钙盐对谷胱甘肽产生的影响很少见报道,它与谷胱甘肽的合成和信号功能有着直接的联系,优化培养时考虑它的影响是很有必要的。光照和碳酸氢钠是藻类不同于酵母的影响因素,因此它们对谷胱甘肽合成的影响也是可以预见的。发酵是生产谷胱甘肽较常用的方法,硅藻 GJ01 尚不能像酵母菌一样通过发酵培养,两者的生活习性也不完全相同,但本研究结果对南极冰藻资源的开发利用是非常有价值的。硅藻 GJ01 产谷胱甘肽条件的优化,还与培养体系、产物和藻细胞的处理等因素有关,因此还需要深入研究。

参 考 文 献

- 丁燊, 缪锦来, 王全富等, 2006. 温度对南极衣藻 ICE-L (*Chlamydomonas* sp. ICE-L)谷胱甘肽含量及其相关酶活性的影响. 海洋与湖沼, 37(2): 154—161
- 刘娟, 何秀萍, 王雅琴等, 2003. 高产谷胱甘肽的酵母融合菌株的选育及其培养条件的研究. 微生物学报, 43(1): 99—103
- 郭黎平, 刘国良, 张卓勇, 2001. 荧光光度法测定大豆提取液中还原型谷胱甘肽. 东北师范大学学报(自然科学版), 33(1): 34—38
- 梁英, 麦康森, 孙世春, 2001. NaHCO_3 浓度对等鞭藻 3011、等鞭藻塔溪堤品系和绿色巴夫藻生长的影响. 中国水产科学, 8(1): 37—40
- 童群义, 陈坚, 李华钟, 2002. 高产谷胱甘肽的酵母菌选育及其培养条件研究. 工业微生物, 32(2): 13—17
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Gomez L D, Noctor G, Knight M R *et al.*, 2004. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *Journal of Experimental Botany. Sulphur Metabolism in Plants Special Issue*, 55(404): 1851—1859
- Gushima H, Miya T, Murata K, 1983. Construction of glutathione producing strains of *E. coli* by recombinant DNA techniques. *J Appl Biochem*, 5: 43—52
- Murata K, Kato J, Chibata L, 1981. Enzymatic preparation of glutathione. *Fermentation and Industry*, 39: 900—910
- Sakato K, Tanaka H, 1992. Advanced control of glutathione fermentation process. *Biotechnol Bioeng*, 40(8): 904—912
- Wen S, Tao Zhang, Tianwei Tan, 2004. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 501—507
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T *et al.*, 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod*, 49: 89—94

THE OPTIMAL CONDITION FOR GSH PRODUCTION FROM ANTARCTIC ICE MICROALGAE *BERKELEYA RUTILANS* GJ01

DING Yu^{1,2}, MIAO Jin-Lai³, LI Guang-You³, JIAN Ji-Chang^{1,2}, WU Zao-He^{1,2}

(1. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025; 2. Guangdong Provincial Key Lab of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang, 524025; 3. Key Lab of Marine Bioactive Substances, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

Abstract GSH, as a key component of Asc-glutathione cycle, plays important roles in protecting tissues from toxicant damage and keeping cells in normal redox state, on which this paper studied. *Berkeleya rutilans* GJ01, one of so-called Antarctic ice microalgae, an extreme microorganism in the cryosphere, is one of major producers of primary production in marine ecology system of Antarctic polar region. They have become a promising resource of GSH. In this paper, effect of nutrition factor on GSH production level was studied for GJ01 with spectrophotometer in searching for the optimization of synthesis condition for GSH. It was showed that 1.2g/L NaHCO_3 and 0.2mmol/L Ca^{2+} is ideal to the production of GSH. Vitamin B₁₂ and biotin impacted slightly on GSH production. Orthogonal test revealed that the optimal condition for GSH production of GJ01 is 16h light/8h dark, 1.6g/L NaHCO_3 , 0.4mmol/L Ca^{2+} , and 10mmol/L Cys. The results should be informative to the application of GJ01 for GSH production.

Key words *Berkeleya rutilans*, Glutathione, GJ01, Cultural method, Optimization