

文章编号 :1009-038X(2004)05-0104-07

微生物发酵法生产谷胱甘肽

陈 坚 , 卫功元 * , 李 寅 , 堵国成

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 ,江苏 无锡 214036)

摘 要 :谷胱甘肽是一种重要的生理活性肽类物质 ,对于维持生物体内合适的氧化还原环境起着关键作用 ,在临床医药、食品工业和体育运动领域具有广阔的应用前景。微生物发酵法是目前谷胱甘肽生产的主要方法。本文综述了直接发酵法生产谷胱甘肽中高产菌株选育、发酵过程优化与控制以及基因工程菌在谷胱甘肽生产中的应用潜力 ,最后对发酵法合成谷胱甘肽需要解决的问题进行了简单展望。

关键词 :谷胱甘肽 ;发酵 ;生产 ;进展

中图分类号 :TQ 464.7

文献标识码 :A

Progress in Glutathione Production by Microbial Fermentation

CHEN Jian , WEI Gong-yuan * , LI Yin , DU Guo-cheng

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology , Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : Glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine , GSH is the reduced form) , the most ubiquitous low molecular weight non-protein thiol compound , is widely distributed in almost all the aerobic organisms. Being one of the important physiological active peptides , GSH plays many physiological functions in the cells , for instance , maintenance of normal redox potential in the cells , radical scavenger , detoxification of various cytotoxic compounds , antioxidant , and so on. As glutathione has wide application potential in medicine , food , athletic sports and so on , the commercial demand for GSH has been expanding. The main technique for GSH preparation at present is by biotechnological method , which comprises enzymatic transformation and microbial fermentation. In this article , GSH production by fermentative approach within the recent 30 years was reviewed. The screening of strains for high GSH production , optimization and control of the bioprocess , and the application potential of genetic bacterium for GSH overproduction by fermentation were described in detail. In the end , the problems to be solved and the foreground for biotechnological production of GSH were briefly prospected.

Key words : glutathione ; fermentation ; production ; progress

谷胱甘肽是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的一种同时含有 γ -谷氨酰基和巯基的生物活性三肽化合物。GSH 在生物体内具有多种

重要的生理功能 ,特别是对于维持生物体内适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用^[1] ,在临床医药、食品工业、体育运动及有关生物研究领域有

收稿日期 2003-12-24 ; 修回日期 2004-05-18.

基金项目 江苏省高校高新技术产业发展项目(编号 JH02-101) ; 高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助课题。

作者简介 : 陈坚 (1962 -) , 男 , 江苏无锡人 , 教授 , 博士生导师 ; * 现在工作单位 苏州大学生命科学学院。

着广泛的用途. GSH 可以在短期内迅速提高机体的免疫力 ,因此其需求量和市场价格日趋见涨.

自 20 世纪 60 年代起 ,日本学者就在生物法生产 GSH 方面进行了大量研究 ,申请并公布了一系列相关的专利^[2]. 生物法现已成为 GSH 生产的主要方法 ,包括酶法和发酵法 ,二者最主要的区别在于酶法需要提供 3 种底物氨基酸和价格昂贵的 ATP ,而发酵法只要供给微生物生长代谢所需的营养物质(碳源、氮源和无机盐等)即可实现 GSH 在胞内的积累. 国内已有学者对 GSH 的性质、应用及生产方法作过简单综述^[3~5] ,但对微生物直接发酵法生产 GSH 过程中的关键技术还缺乏系统分析 ,特别是对专利文献中实践方法的论述还不够深入 ,而这些正是全面了解和把握 GSH 发酵过程的基础和出发点. 本文主要综述了近 30 年来国内外在微生物发酵法生产 GSH 方面的研究进展.

1 概 述

发酵法生产 GSH 就是采用廉价的糖类原料 ,

利用微生物自身的物质代谢来进行 GSH 生物合成的方法. 一般情况下 ,微生物细胞中 GSH 的含量不高(仅为干重质量分数的 0. 5% ~ 1. 0%) ,这无疑大大提高了实际生产中 GSH 的提取成本. 因此 ,发酵法生产 GSH 的最关键问题在于提高微生物体内的 GSH 含量 ,通常是通过菌种选育来实现 ,主要有两种方法 :一是采用常规诱变育种选育高产菌株 ,二是利用遗传工程技术构建具有 GSH 合成活性的基因工程菌. 由于发酵法所使用的细菌或酵母容易培养 ,加之生产方法及工艺的不断改进和完善 ,因此采用微生物发酵法已成为目前 GSH 工业化生产的最普遍方法.

表 1 中对近 30 年来直接发酵法生产 GSH 的研究成果中所采用的微生物及其生产工艺条件进行了总结. 可以看出 ,酵母一直是研究的首选 ,其中以酿酒酵母最为常见 ,相关的文献报道也最多. 酿酒酵母细胞中 GSH 的合成及分解代谢过程已被研究清楚 ,主要是通过细胞内的 γ -谷氨酰循环进行代谢的 ,具体过程见图 1^[6].

表 1 微生物直接发酵生产谷胱甘肽及其工艺条件

Tab. 1 An overview of the fermentative conditions of glutathione production by microorganisms

	菌 种	碳 源	氮 源	温度/℃	时间/h	GSH*	规 格	参考文献
酵	<i>Candida tropicalis</i>	glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	96	60 mg/L	摇瓶	[7]
		molasses	urea , NH ₄ H ₂ PO ₄	30	14	0. 733%	100 mL	[8]
	<i>Candida utilis</i>	glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	24	4. 0%	200 L	[9]
		glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	24	28	5. 0%	200 L	[10]
		glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	30	15	3. 0%	70 L	[11]
		glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	32	—	510 mg/L	15 L	[12]
		glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	39	2. 4%	摇瓶	[13]
		glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	30	24	74 mg/L	摇瓶	[14]
		glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	26	30	366 mg/L	7 L	[15]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	48	3. 5%	摇瓶	[16]
		glucose	urea	30	40	432 mg/L	125 L	[17]
		molasses	urea ,(NH ₄) ₂ SO ₄	33	14	4. 0%	摇瓶	[18]
		molasses	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄	30	24	2. 47%	2 L	[19]
		molasses	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄	30	24	475 mg/L	2 L	[20]
		molasses	urea ,(NH ₄) ₂ SO ₄	33	24	2. 7 g/L	—	[21]
		molasses	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄	30	60	3. 7%	120 m ³	[22]
		glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	7. 6	300 mg/L	3 L	[23]
		glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	12	119 mg/L	摇瓶	[24]
母	<i>Saccharomyces cystinovolens</i>	玉米浆	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	32	116 mg/L	摇瓶	[25]
	<i>Saccharomyces sp.</i>	sucrose	peptone	30	32	185 mg/L	摇瓶	[26]
细 菌	<i>Methylomonas methanolvorens</i>	methanol	(NH ₄) ₂ SO ₄	30	48	1. 82%	25 L	[27]
	<i>Proteus mirabilis</i>	glucose	peptone	31	36	180 mg/L	2 L	[28]
	<i>E. coli</i>	glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	30	25	880 mg/L	1 L	[29]

注 : * GSH 的合成以产量(mg/L)或质量分数(对细胞干重的百分比 , %)表示.

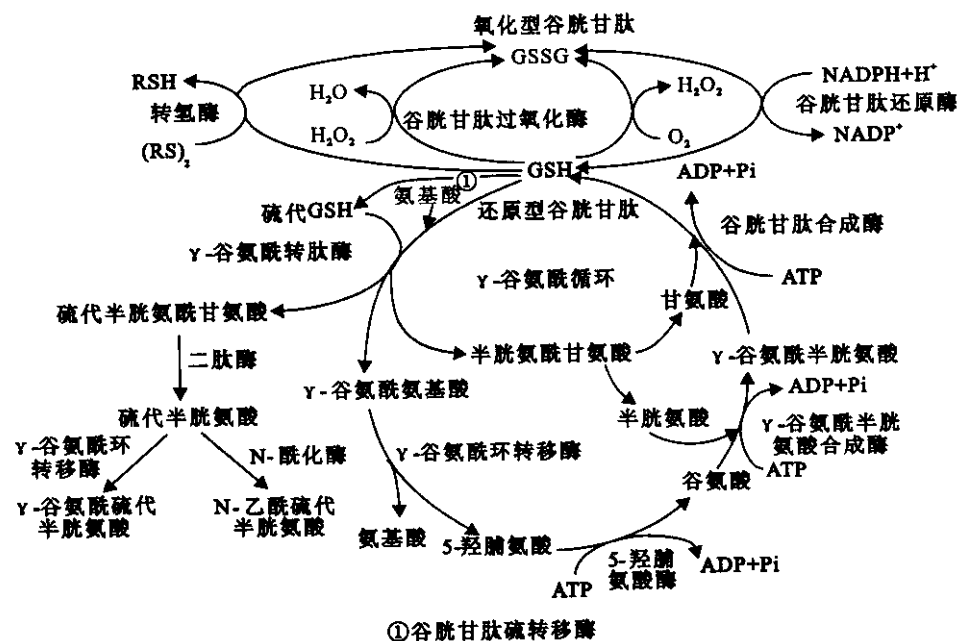


图1 酿酒酵母细胞中谷胱甘肽的代谢途径

Fig.1 Metabolism pathway of glutathione in cells of *Saccharomyces cerevisiae*

2 高产菌株的选育

虽然有些菌株如 *S. cystinovolens* , *C. tropicalis* 等本身有较高的 GSH 含量且可以长时间保持合成 GSH 的能力 ,但是它们并非工业化常用菌种 ,研究成果也只局限于摇瓶中的结果 . 普通的野生型酵母细胞中 GSH 的含量并不高 ,只有采用物理的或化学的方法使出发菌株发生变异 ,再在特定的培养基中进行筛选培养 ,使 GSH 在这种变异菌株的细胞内大量积累 ,以此实现 GSH 的高产 . 到目前为止 ,针对 GSH 生产的酵母菌株而进行的物理或化学的处理方法大致有紫外线、 X 射线、 γ 射线以及亚硝基胍等 ,而培养基中的特定筛选物质(筛子)主要包括蛋氨酸、L-乙硫氨酸、DL-乙硫氨酸、1,2,4-三唑

氰化钠、亚硫酸盐、酰胺和靛酚等. 通过一系列对菌株的改良及选育工作, 获得了很多 GSH 高产菌株.

C. utilis 和 *S. cerevisiae* 是工业生产常用的菌种,因此针对这两种酵母进行的菌种选育研究工作也最为广泛。国内外已有许多相关的文献报道,其中对诱变效果较为显著的方法和结果进行了简单总结(见图2)。除此之外,细胞原生质体融合技术的运用也可以获得 GSH 的高产菌株。刘娟等利用该技术,将生物量高的酵母菌单倍体与细胞 GSH 含量高的单倍体进行融合,构建获得了高产 GSH 的融合菌株 ZJF-71,在优化的发酵条件下进行摇瓶培养,发酵液中 GSH 质量浓度总量可以达到 $185 \text{ mg/L}^{[26]}$ 。这一方法的成功实施,为常规诱变育种拓展了新的思路。

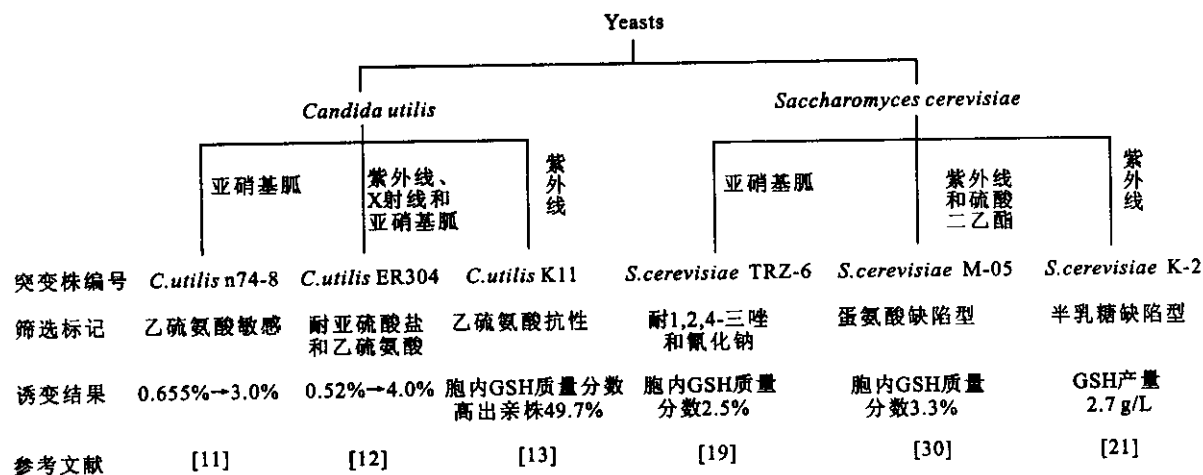


图2 高产 GSH 酵母菌株的选育方法和结果

Fig.2 Approaches and results of yeast strains screening for high GSH production

3 发酵过程的优化及控制

在实际的发酵生产中,性能优良的菌种仅仅是一个开始,获得较高的产物质量浓度(便于下游处理)、较高的底物转化率(降低原料成本)和较高的生产强度(缩短发酵周期),同样是实现 GSH 工业化生产所需要解决的关键问题^[31],因此对 GSH 发酵过程进行优化控制就显得尤为重要。这方面的研究大都是从 20 世纪 90 年代以后开始的,主要包括营养与环境条件优化、发酵过程控制以及前体物质的添加等内容。

3.1 发酵条件优化

生产 GSH 所用的酵母大都是工业常用菌株,能在很宽的培养条件下生长并积累 GSH,但产量往往很低。因此,要想进一步提高 GSH 的合成能力,必须对培养基中的各种营养成分以及培养条件进行优化,在最佳的工艺条件下进行生产,为最终的工业化生产奠定基础。运用一些实验设计(如正交试验设计、因次分析设计、中心复合试验设计等)及数据处理方法(响应面分析、神经网络模型等)可以减少工作量并且使实验结果具有更高的可信度和实际应用价值。Udeh 等采用中心复合试验设计方法对发酵培养基中的主要成分进行优化,结果与优化前的情况相比提高近一倍^[32]。Liu 等采用 Box-Behnken 设计方案和响应面模型研究了葡萄糖、蛋白胨和 MgSO_4 质量浓度对 *S. cerevisiae* 生产 GSH 的影响,也取得了令人满意的结果^[33]。作者根据正交试验获得的实验数据,通过神经网络模型进行分析预测,对 *C. utilis* 发酵生产 GSH 的培养基进行了优化,摇瓶条件下 GSH 胞内质量分数达 2.35%,GSH 产量和细胞干重也有较大幅度的提高^[34]。

另外,发酵培养的环境条件也是不可忽视的重要因素,影响细胞生长以及合成 GSH 的环境因素主要有温度、pH、溶解氧和接种量等。温度直接影响着代谢中各种酶的活性和生化反应速率;pH 决定着营养物的解离状态,制约着微生物细胞对营养物质的吸收利用速率;溶氧的大小控制着细胞对氧的需求;而接种量的大小则影响迟滞期的长短以及细胞倍增繁殖的速度。因此,在营养条件确定的基础上,对环境因素的优化也是必不可少的。研究结果表明,较佳的环境条件对 GSH 合成都有较明显的促进作用^[35~37]。

3.2 发酵过程控制

由于 GSH 是胞内产物,所以在提高生产菌株

胞内合成 GSH 能力的同时,还需要在发酵过程中设法提高细胞数,以提高 GSH 的总产量。为了实现这一目标,必须加大底物(如葡萄糖)的质量浓度。但是过高的葡萄糖质量浓度会产生 Crabtree 效应,抑制细胞的生长并且目标产物得率会大大下降,因此需要采用流加培养方式,应用比较普遍的通常有恒速流加、指数流加和反馈控制流加等模式。采用流加发酵实现 GSH 生产菌株的高密度培养以进一步提高 GSH 产量,国内外已有相关的报道。Shimizu 等^[38]以葡萄糖作为限制性底物,研究了 *S. cerevisiae* 培养中比生长速率 μ 和 GSH 生产强度 ρ_G 之间的关系,确定了在细胞生长阶段,通过指数流加葡萄糖以控制在最大比生长速率处;在 GSH 合成阶段,通过反馈控制系统将葡萄糖的流加速率与乙醇体积分数相耦联,从而控制比生长速率处在临界水平。按照以上方案对细胞生长进行控制,结果发现,最终 GSH 总量比对照提高了 41%,胞内 GSH 含量也有很大提高。Sakato 等^[22]通过在线监测发酵液中溶解氧和乙醇的体积分数,运用前馈/反馈控制系统确定葡萄糖的流加速率,使葡萄糖和乙醇同时被利用。发酵结束时 GSH 产量为 2360 mg/L,比指数流加方式提高了 40%,胞内 GSH 质量分数达到 3.7%。Alfajara 等^[22]通过对发酵过程中乙醇产生的速度进行模糊逻辑控制,进而优化了 *S. cerevisiae* 生产 GSH 的流加发酵过程,GSH 的比生产速率达到 6.2 (mg/g)/h,最终发酵水平提高了 56%。陈坚等^[39]和李寅等^[40]比较了恒速流加、人工反馈控制流加和指数流加等 3 种补糖策略对重组大肠杆菌高密度培养合成 GSH 的影响,发现指数流加的方式最为理想。

3.3 前体物质的添加

在 GSH 发酵过程中,可以向培养基中添加除营养物之外的物质,以提高 GSH 在胞内的积累量。研究结果显示,添加 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸及其混合物能提高细胞内 GSH 的含量,其中以添加 L-半胱氨酸的效果最为显著。Alfajara 等考察了 *S. cerevisiae* 摇瓶发酵生产 GSH 过程中 3 种组成氨基酸对 GSH 合成的影响,结果表明 L-半胱氨酸是提高 GSH 比合成速率及 GSH 产量的关键氨基酸,但超过一定的量范围会对细胞生长有部分抑制作用^[41]。原因可能是由于糖代谢过程中一些酶的活性中心离子与过量的 L-半胱氨酸发生螯合作用而使这些关键酶降低或失去了活性。因此,在发酵过程中应采用 L-半胱氨酸的补加策略以尽可能减少其对细胞生长的抑制。为此,Alfajara 等进一

步研究了流加培养中用以提高 GSH 比合成速率的一种快速添加半胱氨酸的策略,并利用此策略来最大限度提高 GSH 的总产量^[42]。李寅等在摇瓶培养中考察了前体氨基酸和 ATP 的添加对重组 *E. coli* 生产 GSH 的影响,发现二者均能明显促进 GSH 在细胞内的积累^[43]。当 9 mmol/L 的前体氨基酸在发酵进行到 12 h 时加入,可以获得比对照实验多 40% 的 GSH 总量,胞内 GSH 含量也提高了将近 1 倍^[35]。

4 基因工程菌在谷胱甘肽生产中的应用

在 GSH 的生物合成中,GSH 合成酶系的活性普遍较低,并且 *GSH I* 是一个限速酶,其活性受到 GSH 的反馈抑制。因此,为了减轻 GSH 对 *GSH I* 的反馈抑制,需要提高酶系的活力或降低酶系对 GSH 的敏感性^[44]。Murata 等人早期成功构建了具有较强 GSH 合成能力的重组 *E. coli* 并从 *E. coli* B 中筛选得到一株 *GSH I* 脱敏突变株,克隆了其 *gsh I* 基因并在 *E. coli* B RC912 中得以表达,获得的菌株合成 GSH 的能力大大提高^[45]。*GSH I* 的活性提高以后,*GSH II* 就成了 GSH 生物合成的限速酶。Gushima 等构建了含 *gsh I* 或 *gsh II* 的重组质粒并转化入 *E. coli* 细胞,结果表明只有同时带有 *gsh I* 和 *gsh II* 基因的重组细胞才表现出最高的 GSH 合成活性^[46]。

由于酵母菌中的糖降解酶活性较高,因此可以将 *gsh I* 和(或)*gsh II* 基因转化进入酵母细胞内以获得高产 GSH 的重组菌株。Ohtake 等尝试在酵母中表达 *E. coli* B 的 *gsh I* 基因,将 *gsh I* 基因的全部编码片段与 *S. cerevisiae* 98 的一个启动子融合,结果转化体的 *GSH I* 活性和 GSH 的胞内含量分别提高了 100 多倍和 3 倍多^[47]。Christine 和 Ulf 将含有 *E. coli* 中 *gsh I* 和 *gsh II* 基因的质粒 pINE III 转化到 *S. cerevisiae* 中,明显提高了酵母合成 GSH 的能力,GSH 在胞内的积累质量分数达到 1.8%^[48]。

参考文献工程菌生产目的产物的过程中,必须

考虑菌株所带质粒的稳定性问题,而质粒的稳定性受到宿主细胞遗传特性、质粒拷贝数以及质粒上基因的表达等多种因素的影响。为此,李华钟等以野生型 *E. coli* 为宿主细胞,转化带有编码 GSH 合成酶系的基因 *gsh I* 和 *gsh II* 的质粒 pGH501,获得了一株 GSH 合成活性、质粒稳定性和传代稳定性俱佳,并且能够重复使用的重组大肠杆菌 *E. coli* II-1,经过甲苯处理后的菌株可以在胞外积累 4 g/L 左右的 GSH,通过 L-丝氨酸-硼酸钾混合物的添加防止了 GSH 的进一步降解,GSH 最终产量可高达 7.1 g/L^[49]。即使如此,这些菌株还无法达到工业化生产的要求,目前只能停留在实验室研究阶段。

5 小结与展望

有关 GSH 的研究报道非常多,但绝大部分都是 GSH 在生物体内生理功能的体现及其在疾病治疗过程中的应用等内容。如何提高 GSH 的产量并且在最大程度上发挥出发菌株生产 GSH 的潜力,相关的文献资料则寥寥无几,而这些研究成果正是保证 GSH 工业化生产持续、稳定、高效运行的理论依据和技术支持。虽然目前日本已经实现了酵母发酵法制备 GSH 的产业化,并且也将研究结果以专利的形式公布于众,但是总体来说,对整个 GSH 发酵过程的把握和分析还相对肤浅,对 GSH 产量、生产效率和生产强度等主要技术指标的影响因素的探讨还不够透彻。因此,至少有以下几个方面的问题值得我们去进行更为深入地研究。(1)性能良好的 GSH 高产菌株的选育及其培养条件的优化(2)环境条件(温度、pH、溶氧等)对 GSH 生产的影响及其发酵动力学规律(3)*C. utilis* 生产 GSH 发酵机理的分析及基于代谢工程理论的合理解释(4)GSH 生产菌株高密度培养过程中各种关键因素(如 CO₂ 抑制和 O₂ 供给等)的解决(5)如何将胞内合成的 GSH 分泌至胞外,解决胞内 GSH 高积累产生的反馈抑制,也是值得深入研究的热点课题之一。

[1] Meister A. Antioxidant functions of glutathione[J]. *Life Chem Rep*, 1994, 12(1): 23-27.
[2] 矶和义员. グルタチオン[J]. *发酵と工业*, 1982, 40(7): 631-637.
[3] 李华钟,林金萍,李寅,等. 谷胱甘肽的生物合成[J]. *中国医药工业杂志*, 2000, 31(5): 236-239.
[4] 沈亚锁,李寅,迟莉丽,等. 谷胱甘肽的应用与生产[J]. *工业微生物*, 2000, 30(2): 41-45.

- [5] 吴坚平,林建平,岑沛霖. 谷胱甘肽的生物合成[J]. 化工进展,1999 (1):38 – 41.
- [6] 李崎. 啤酒及其风味稳定性的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学,1998.
- [7] Nippon Zeon Co. , Ltd. Glutathione production[P]. 日本专利 58146294 ,1983.
- [8] Suzuki Y , Matsubayashi T. Glutathione[P]. 日本专利 55000019 ,1980.
- [9] Hino T , Harada M , Maekawa H , *et al.* Glutathione by fermentation[P]. 日本专利 59151894 ,1984.
- [10] Hino T , Harada M , Maekawa H , *et al.* Production of high – glutathione – containing yeast cell[P]. 日本专利 60156379 ,1985.
- [11] Ikeno Y , Tanno K , Omori I , *et al.* Glutathione[P]. 日本专利 52087296 ,1977.
- [12] Kono G , Harada M , Sugisaki K , *et al.* High glutathione – containing yeast[P]. 日本专利 :52125687 ,1977.
- [13] 詹谷宇,田萍,刘卫东,等. 酵母菌生物合成谷胱甘肽[J]. 药学报,1990 ,25(7):494 – 499.
- [14] 吴坚平,林建平,刘慧敏,等. 培养条件对产朊假丝酵母合成谷胱甘肽的影响[J]. 化学反应工程与工艺,2001 ,17(1):89 – 93.
- [15] 卫功元,李寅,堵国成,等. 温度对谷胱甘肽分批发酵的影响及动力学模型[J]. 生物工程学报,2003 ,19(3):358 – 363.
- [16] Watanabe K , Kato N , Yoshida N. Glutathione , its manufacture with yeast , and the effects of complex amino acids in medium [P]. 日本专利 01148181 ,1989.
- [17] Ishii S , Miyajima R. Glutathione manufacture by cultivation of *Saccharomyces* in a synthetic medium[P]. 日本专利 :01141591 ,1989.
- [18] Hirakawa K , Nomura K , Kato M. Lactic acid for high yield glutathione production by yeasts[P]. 日本专利 60244284 ,1985.
- [19] Hamada S , Tanaka H , Sakato K. Glutathione[P]. 欧洲专利 79241 A2 ,1983.
- [20] Kawamura M , Hamada S , Sakado K. Glutathione by fermentation[P]. 日本专利 60248199 ,1985.
- [21] Nomura K , Sakaguchi S , Hirakawa K , *et al.* Glutathione by fermentation[P]. 日本专利 60244299 ,1985.
- [22] Sakato K , Tanaka H. Advanced control of glutathione fermentation process[J]. **Biotechnol Bioeng** ,1992 ,40(8):904 – 912.
- [23] Alfafara C G , Miura K , Shimizu H , *et al.* Fuzzy control of ethanol concentration and its application to maximum glutathione production in yeast fed batch culture[J]. **Biotechnol Bioeng** ,1993 ,41(4):493 – 501.
- [24] 李寅,陈坚,周楠迪,等. 环境条件及摇瓶补糖策略对谷胱甘肽发酵的影响[J]. 生物工程学报,1998 ,14(2):147 – 152.
- [25] Miwa N , Tajima S. Production of glutathione by fermentation[P]. 日本专利 53094089 ,1978.
- [26] 刘娟,何秀萍,王雅琴,等. 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[J]. 微生物学报,2003 ,43(1):99 – 103.
- [27] Miyamoto T , Miwa N , Takemoto T. Glutathione[P]. 日本专利 53009393 ,1978.
- [28] Ajinomoto Co. , Inc. Microbial production of glutathione[P]. 日本专利 58016694 ,1983.
- [29] 李寅,陈坚,毛英鹰,等. 重组大肠杆菌生产谷胱甘肽发酵条件的研究[J]. 微生物学报,1999 ,9(4):355 – 361.
- [30] 施碧红,黄建忠,施巧琴,等. 啤酒酵母突变株 M – 05 合成谷胱甘肽的研究:发酵条件的研究[J]. 福建师范大学学报,2000 ,16(4):74 – 78.
- [31] 陈坚,李寅. 发酵过程优化原理与实践[M]. 北京:化学工业出版社,2002. 1 – 11.
- [32] Udeh K O , Achremowicz B. High – glutathione containing yeast : optimization of production[J]. **Acta Microbiol Pol** ,1997 ,46(1):105 – 114.
- [33] Liu C , Hwang C , Liao C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Process Biochem** ,1999 ,34 :17 – 23.
- [34] 卫功元,李寅,堵国成,等. *Candida utilis* 生物合成谷胱甘肽的营养及环境条件[J]. 应用与环境生物学报,2003 ,9(6):642 – 646.

- [35] Li Y , Chen J , Mao Y Y , *et al.* Effect of additives and fed – batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*[J]. **Process Biochem** , 1998 , 33(7) : 709 – 714.
- [36] 卫功元 , 李寅 , 堵国成 , 等. 溶氧及 pH 对产朊假丝酵母分批发酵生产谷胱甘肽的影响[J]. 生物工程学报 , 2003 , 19(6) : 734 – 739.
- [37] Wei G Y , Li Y , Du G C , *et al.* Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*[J]. **Biotechnology Letters** , 2003 , 25(11) : 887 – 890.
- [38] Shimizu H , Araki K , Shioya S , *et al.* Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture[J]. **Biotechnol Bioeng** , 1991 , 38(2) : 196 – 205.
- [39] 陈坚 , 李寅 , 毛英鹰 , 等. 培养模式对重组大肠杆菌高密度培养生产谷胱甘肽的影响[J]. 生物工程学报 , 1998 , 14(4) : 452 – 455.
- [40] 李寅 , 陈坚 , 伦世仪. 高密度培养工程菌生产谷胱甘肽[J]. 中国医药工业杂志 , 1999 , 30(1) : 1 – 4.
- [41] Alfafara C G , Kanda A , Shioi T , *et al.* Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Appl Microbiol Biotech** , 1992 , 36(4) : 538 – 540.
- [42] Alfafara C G , Miura K , Shimizu H , *et al.* Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1992 , 37 : 141 – 146.
- [43] 李寅 , 陈坚 , 毛英鹰 , 等. 前体氨基酸和三磷酸腺苷对重组大肠杆菌生产谷胱甘肽的影响[J]. 无锡轻工大学学报 , 1998 , 17(2) : 11 – 15.
- [44] Murata K , Kimura A. Overproduction of glutathione and its derivatives by genetically engineered microbial cells[J]. **Biotech Adv** , 1990 , 8 : 59 – 96.
- [45] Murata K , Kimura A. Some properties of glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli* B[J]. **J Gen Microbiol** , 1982 , 128 : 1047 – 1052.
- [46] Gushima H , Miya T , Murata K , *et al.* Construction of glutathione – producing strains of *Escherichia coli* B by recombinant DNA techniques[J]. **J Appl Biochem** , 1983 , 5 : 43 – 52.
- [47] Ohtake Y , Watanabe K , Tezuka H , *et al.* The expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Agric Biol Chem** , 1988 , 52(11) : 2753 – 2762.
- [48] Christine L H , Ulf S. Recombinant yeast for manufacture of glutathione[P]. 欧洲专利 : 300168 , 1989.
- [49] 李华钟 , 李寅 , 林金萍 , 等. 具有高谷胱甘肽合成活性重组大肠杆菌的构建及合成反应过程[J]. 微生物学报 , 2001 , 41(1) : 16 – 24.

(责任编辑 杨 勇)