

大肠杆菌 BL21(pTrc-gsh)与酵母耦联合成谷胱甘肽的研究

沈立新 魏东芝* 张嗣良 王二力

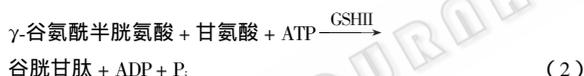
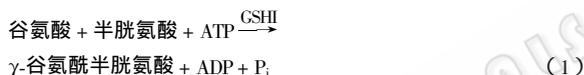
(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,生物化学研究所,上海 200237)

关键词 谷胱甘肽, ATP, 工程菌, 酵母, 耦联

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0452-04

谷胱甘肽(GSH)广泛存在于动、植物和微生物细胞内,有参与氨基酸的跨膜运输、维持细胞的还原状态等重要生理功能,在临床、保健品、食品等行业有广泛用途,如:重金属解毒、抗氧化延缓衰老等,我国基本靠进口。开发高效、低成本的 GSH 生产工艺势在必行。

谷胱甘肽的制备有化学合成法^[1]、提取法^[2]、微生物发酵法^[3]、酶法^[4]等。由于酶法合成 GSH 的产率高、后续的分离提取较简单而倍受关注。它是以 ATP 为能量供体、由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSHI)和谷胱甘肽合成酶(GSHII)连续催化合成的:



为了提高 GSH 产率、降低成本,人们从提高菌株的活力^[5]及降低能量供体成本方面进行了研究。Murata^[6-7]对两种 ATP 供给系统进行了研究:利用大肠杆菌的乙酰磷酸以乙酰磷酸为底物生产 ATP,与自身 GSH 合成酶耦联效果较好,但乙酰磷酸价格昂贵且不稳定;利用酵母的糖酵解途径生产 ATP 的体系与大肠杆菌的 GSH 合成体系耦联效果不理想。酵母生产 ATP 体系和工程菌合成 GSH 体系在磷酸缓冲液浓度方面不协调,耦联体系 GSH 的产量仅为酵母及工程菌在同样反应条件下分别合成的 GSH 的加和。本研究在先期构建的具有较高 GSH 合成活力的工程菌 *E. coli* BL21 (pTrc-gsh)的基础上,将经通透处理的酵母及工程菌耦联,首先从 ATP 生成体系及 GSH 合成体系在磷酸缓冲液浓度协调性方面入手,较为有效地解决了这两个体系在磷酸缓冲液浓度方面的矛盾。其次,优化工艺条件,并首次在 GSH 合成过程中采用延缓加入甘氨酸的手段有效降低了 GSH 对 GSHI 的反馈抑制,大大提高了 GSH 的合成效率,对后续酶法或固定化细胞催化合成 GSH,推进 GSH 的工业化生产进程有重

要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:工程菌 *E. coli* BL21 (pTrc-gsh)本实验室构建,酵母:上海民乐啤酒饮料有限公司提供。

1.1.2 试剂:三磷酸腺苷(ATP)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)为 Sigma 公司分装产品,谷氨酸、甘氨酸、GSH 由华美生物工程公司购得,半胱氨酸由丽珠东风生物工程公司购得,酵母膏为英国产,其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养及通透:工程菌 *E. coli* BL21 (pTrc-gsh)培养:将 LB 培养基(含氨苄青霉素 100u/mL)中 37°C 培养 6h 的种子以 1% 接种量接种至 LB 培养基,200r/min 培养至 $OD_{550} = 0.5$ 左右,以 IPTG (0.1mmol/L)在 34°C、pH6.4 诱导 3h,12 000 \times g 冷冻离心 15min,所得菌体以 0.8% NaCl 洗涤,离心后冰箱保存。

通透处理:菌体以冰冻丙酮处理后抽滤,冷冻保存。

1.2.2 酶反应:酵母生产 ATP 体系:0.1g 丙酮处理的酵母细胞加至 5mL ATP 反应液(葡萄糖 400mmol/L, $MgSO_4$ 10mmol/L,腺苷 10mmol/L,AMP 2mmol/L 溶于 pH7.0 的磷酸盐缓冲液)中,34°C 恒温反应, HPLC 测定 ATP 浓度随时间的变化。工程菌合成 GSH 体系:0.3g 工程菌细胞加至 5mL GSH 前体反应液(谷氨酸 80mmol/L,半胱氨酸、甘氨酸均为 20mmol/L, ATP 10mmol/L, $MgSO_4$ 10mmol/L 溶于 pH7.0 的磷酸盐缓冲液)中,37°C 恒温反应,测定 GSH 随时间的变化。耦联体系生产 GSH:0.1g 丙酮处理的酵母与 0.3g 工程菌细胞加至 5mL 反应液(葡萄糖、 $MgSO_4$ 、腺苷、AMP、谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸浓度及缓冲液同上)中,在优化的温度 34°C 反应,测定 GSH 浓度。

1.2.3 分析方法:GSH 检测见参考文献[8],ATP 检测采用高

效液相色谱法,系统为 Shimadzu HPLC,流动组:溶剂 A:0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)溶剂 B:甲醇。梯度洗脱:2% 溶剂 B(0~6min),10% 溶剂 A(6~20min),流速:1mL/min,紫外 260nm 检测。

2 结果与讨论

2.1 细胞通透处理

利用酵母的糖酵解途径生产 ATP 与工程菌 *E. coli* BL21 (pTrc-gsh)耦联进行 GSH 的合成反应,不但可以解决工程菌合成 GSH 的能量供体 ATP 的来源,而且可以转化 GSH 合成过程中生成的 ADP,降低 ADP 对 GSH I 及 GSH II 的抑制^[9]。但首先必须对酵母及工程菌进行通透处理以保证底物及产物在细胞内外的扩散传递,尤其是确保酵母生成的 ATP 顺利转移至工程菌进行 GSH 的合成。不同溶剂对工程菌合成 GSH、酵母生成 ATP 及耦联体系合成 GSH 的影响见表 1。为减少所使用的溶剂的种类、方便溶剂的回收及操作的简单性,本文采用同一种溶剂处理酵母及工程菌。由表可见:甲苯及月桂酸通透工程菌效果较好,丙酮处理酵母对 ATP 生成较为有利,而对耦联体系合成 GSH 而言丙酮是较为有效的溶剂。对不同丙酮浓度对通透效果的实验结果表明:丙酮浓度降低,处理后的细胞含水量较多,通透效果较差;但 100% 浓度丙酮处理过程中细胞易结块,通透处理不均匀,90% 浓度较为合适。90% 丙酮对工程菌通透处理 2 次,每次 10min 较为合适,第 3 次处理工程菌 GSH 合成能力降低,而酵母只需通透处理 1 次。

表 1 不同溶剂对细胞通透处理的影响

Table 1 Effect of various agents on permeability of membrane of cells

Agent	ATP (mmol/L)	GSH(g/L)	
		E	E+S
None	0	0.21	0
Toluence	4.4	1.90	0.98
Acetone	7.8	1.16	1.33
Methanol	3.1	0.88	0.56
SDS	0.7	0.34	0.18
Lauric acid	0.81	1.61	0.24

注:本文的结果是三次平行实验的平均值。

2.2 磷酸盐缓冲液浓度的确定

Murata^[7]等研究发现 ATP 生产体系的高磷酸缓冲液浓度严重抑制 GSH 的合成。兼顾酵母生产 ATP 及工程菌合成 GSH 的体系对磷酸缓冲液浓度的不同要求,优化耦联体系的磷酸缓冲液的浓度,使耦联体系既能生成适量的 ATP,又不致严重抑制 GSH 的合成。图 1 显示磷酸缓冲液浓度对酵母生产 ATP、工程菌合成 GSH 及耦联体系生产 GSH 的影响:ATP 生产的最适浓度为 450mmol/L;工程菌合成 GSH 的最适浓度为 50mmol/L,在高浓度条件下受到强烈抑制;耦联体系的最适浓度为 250mmol/L,在 450mmol/L 时 GSH 的合成明显降低。因此适当降低磷酸缓冲液浓度,可提高耦联效率。

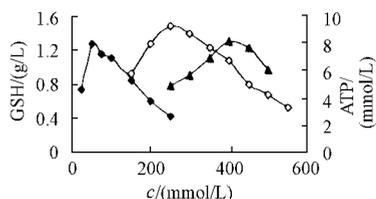


图 1 磷酸缓冲液浓度对 ATP、GSH 合成的影响

Fig.1 Effect of conc. of phosphate buffer on synthesis of ATP and GSH

—■— E; —□— E+S; —▲— S

在 ATP 生产的过程中,随葡萄糖的消耗,ATP 的生成,磷酸根离子浓度有所降低。图 2 显示:磷酸缓冲液浓度分别为 250、450mmol/L 时,ATP 生产过程中磷酸根浓度分别降至 100mmol/L 和 250mmol/L,这两种浓度下工程菌合成 GSH 的活力由图 1 知分别为最高活力的 86.9% 和 31.3%,250mmol/L 浓度下 ATP 生产体系的活力为最大活力的 61.3%,说明 250mmol/L 浓度条件下酵母 ATP 再生体系及工程菌合成 GSH 体系效率均较高,可较为协调地进行耦联合成 GSH。

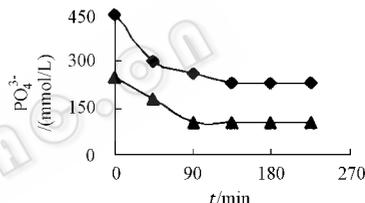


图 2 ATP 生产过程中 PO_4^{3-} 浓度变化

Fig.2 Changes of PO_4^{3-} during reaction of producing ATP

—▲— 250mmol/L; —●— 450mmol/L

2.3 葡萄糖浓度的影响

影响 ATP 生成的因素直接影响耦联体系 GSH 的合成。酵母通过糖酵解途径消耗葡萄糖从而转化腺苷为 ATP,供给工程菌合成 GSH。因此葡萄糖浓度影响耦联体系 GSH 的合成量。在 250mmol/L 磷酸缓冲液浓度下,不同葡萄糖浓度对耦联体系合成 GSH 的影响见图 3。由图可见:葡萄糖浓度由 50mmol/L 增加至 400mmol/L 时 GSH 合成量随之增加,浓度超过 400mmol/L 合成量降低。经测定生成 ATP 的量,发现葡萄糖浓度低于 400mmol/L 时,随浓度的增加生成的 ATP 量增加,浓度超过 400mmol/L,生成的 ATP 减少,影响 GSH 的合成。因此耦联体系的最适葡萄糖浓度为 400mmol/L。

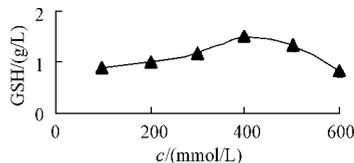


图 3 葡萄糖浓度对 GSH 合成的影响

Fig.3 Effect of conc. of glucose on GSH synthesis in coupled system

2.4 腺苷浓度的影响

酵母消耗葡萄糖转化腺苷为 ATP,腺苷浓度是一个影响耦联体系 GSH 合成的重要因素。腺苷浓度过低,ATP 生成量减少,耦联体系合成的 GSH 减少;浓度过高,ATP 转化率降低,

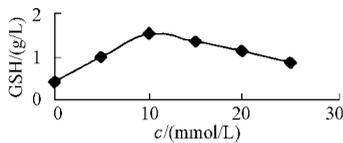


图4 腺苷浓度对 GSH 合成的影响

Fig.4 Effect of conc. of adenosin on GSH synthesis in coupled system

而且大量未转化的中间体 ADP 等抑制 GSH 的合成^[9]。合适的腺苷浓度既可保证适量的 ATP 的生成,满足 GSH 合成的需要,又可降低腺苷的消耗。腺苷浓度对耦联体系 GSH 合成的影响见图 4。由图 4 可见,腺苷的最适浓度为 10mmol/L。

2.5 Mg^{2+} 对耦联体系 GSH 合成的影响

在工程菌 GSH 的合成体系中 Mg^{2+} 首先与 ATP 形成复合物,结合于酶上 ATP 的作用位点将酶激活,然后进行 GSH 的催化合成^[10],同时在糖酵解途径中 Mg^{2+} 对糖酵解酶系及腺苷激酶等具有活化作用^[11],因此适宜的 Mg^{2+} 浓度对耦联体系 GSH 的合成十分重要。测定不同 Mg^{2+} 浓度时耦联体系合成的 GSH,结果表明 Mg^{2+} 的最适浓度为 10mmol/L,高于该浓度将抑制耦联体系 GSH 的合成。

2.6 *E. coli*BL21(pTrc-gsh)与酵母细胞量的配比

寻找合适的 *E. coli*BL21(pTrc-gsh)与酵母细胞用量的配比,使耦联体系中 ATP 的生成与 GSH 的合成协调作用是提高 GSH 生产效率的重要因素。不同配比情况下 GSH 的合成见表 2。*E. coli*BL21(pTrc-gsh)与酵母细胞量的配比从 1 增加至 3,GSH 的合成量增加,说明该情况下 GSH 的合成能力是耦联体系的限制因素;配比超过 3,由于酵母用量相对减少导致生成的 ATP 不能满足 GSH 合成的需要,合成的 GSH 降低。因此确定 *E. coli*BL21(pTrc-gsh)与酵母细胞量的最佳配比为 3:1。

表 2 工程菌与酵母细胞量之比对 GSH 合成的影响

Table 2 Effect of ratio of engineered strain of *E. coli* to *S. cerevisiae* on synthesis of GSH

E:S	1	2	3	4	5
GSH(g/L)	0.71	1.18	1.56	0.93	0.78

2.7 优化条件下耦联体系与两体系合成 GSH 的比较

在上述优化条件下分别以酵母、*E. coli*BL21(pTrc-gsh)及酵母与 *E. coli*BL21(pTrc-gsh)的耦联体系生产 GSH,结果见图 5。由图可见,耦联体系生产的 GSH 达 1.6g/L,高于酵母和工程菌在同样条件下分别合成的 GSH 之和 0.97g/L,说明降低磷酸缓冲液浓度并进一步优化条件可以提高耦联体系合成 GSH 的产量。

2.8 GSH 反馈抑制的降低

GSH 对 GSHI 存在反馈抑制^[12],解除或减轻该抑制可提高 GSH 的合成。酶法合成 GSH 的过程中,GSH 最终是由 GSHII 催化甘氨酸和反应中间体 γ -谷氨酰半胱氨酸形成的,延缓甘氨酸的加入可延缓 GSH 的生成,使 GSHI 在无 GSH 抑制的情况下合成较大量 γ -谷氨酰半胱氨酸,最终增加 GSH 的

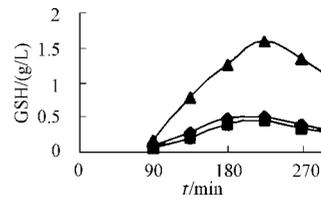


图5 优化条件下 GSH 的合成

Fig.5 GSH synthesis on the optimized conditions

—●— E; —■— S; —▲— E+S

合成。反应中首先加入谷氨酸和半胱氨酸,70min 后加入甘氨酸,以 3 种氨基酸同时加入做对照,结果见图 6。可见甘氨酸的延缓加入使 GSH 的合成量达 2.13g/L,比对照提高 30.7%。

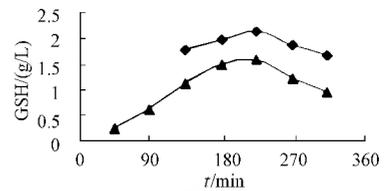


图6 延缓加入甘氨酸 GSH 的合成

Fig.6 GSH synthesis of delayed addition of glycine after glutamate and cysteine

—▲— Control; —◆— Delayed addition

3 讨论

综合考虑酵母生产 ATP 体系及工程菌合成 GSH 体系对磷酸缓冲液浓度的不同要求,在优化耦联体系的磷酸缓冲液浓度的基础上,进一步优化条件,耦联体系生产的 GSH 高于酵母和工程菌在同样条件下生产的 GSH 之和,说明利用酵母糖酵解途径生产 ATP 与工程菌耦联生产 GSH 是可行的。

延缓加入甘氨酸从而延缓 GSH 的生成某种程度上降低了 GSH 对 GSHI 的反馈抑制,提高了 GSH 的合成量。

随反应时间的延长 GSH 的合成达一最大值,随后反应液中的 GSH 含量降低,这主要是因为存在 γ 谷氨酰转肽酶对 GSH 的降解作用^[13],适当控制反应时间并抑制该酶的活性可进一步提高 GSH 的合成量。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Douglas K T. Chemical synthesis of glutathione and analogs. *Coenzyme cofactors*. 1989, 12: 243 ~ 279
- [2] Perrara P J, Dalby G. Extracting glutathione from wheat and soybean. *U S Patent* 3396033
- [3] Koji N, Sanji S, Kan H *et al.* Glutathione by fermentation. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP* 60244299
- [4] Murata K, Kato J, Chilbata L. Enzymatic preparation of glutathione. *Fermentation and industry*, 1981, 39: 900 ~ 910
- [5] Murata K, Miya T, Gushima H *et al.* Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *E. coli*. *Agric Biol Chem*, 1983, 47: 1381 ~ 1383
- [6] Murata K, Tani K, Kato J *et al.* Glutathione production coupled with an ATP regeneration system. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- 1980, **10**:11~21
- [7] Murata K, Tani K, Kato J *et al.* Glycolytic pathway as an ATP generation system and its application to the production of glutathione and NADP. *Enzyme Microb Technol*, 1981, **3**(7):233~241
- [8] ZHAO X D(赵旭东), WEI D Z(魏东芝), YU J T(俞俊棠) *et al.* A method for rapid determination of reduced glutathione in presence of cysteine. *Huadong Ligong Daxue Xuebao*(华东理工大学学报), 1999, **5**:474~476
- [9] Apontowell P, Berends W. Glutathione biosynthesis in *Escherichia coli* K12 properties of the enzyme and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, **399**:1~9.
- [10] Gushima H, Miya T, Murata A *et al.* Purification and characterization of glutathione synthetase from *Escherichia coli* B. *J Appl Biochem*, 1983, **5**:210~218.
- [11] Yasuzo I, Alfredo G T, Lafayette H N. ATP:AMP phosphotransferase from baker's yeast purification and properties. *Eur J Biochem*, 1980, **105**:85~92.
- [12] Chin-shiou Huang, Moore W R, Meister A. On the active site thiol of γ -glutamylcysteine synthetase: Relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1988, **85**:2464~2468
- [13] Milbauer R, Grossowitz N. γ -Glutamyl transfer reactions in bacteria. *J Gen Microbiol*, 1965, **41**:185~194.

Studies on Synthesis of Glutathione by *E. coli* BL21 (pTrc-gsh) Coupled with *Saccharomyces cerevisiae*

SHEN Li-Xin WEI Dong-Zhi* ZHANG Si-Liang WANG Er-Li

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, ECUST, Shanghai 200237, China)

Abstract During synthesis of GSH by the engineered strain *E. coli* BL21(pTrc-gsh) coupled with *Saccharomyces cerevisiae* producing ATP from adenosin, the inconsistency of two systems in the concentration of phosphate buffer was solved by decreasing concentration to 250mmol/L. The conditions under 250mmol/L phosphate buffer were optimized and the yield of GSH was 1.6g/L, which was higher than that of summation by two systems under the same conditions respectively. Addition of glycine later after glutamate and cysteine weakened the inhibition of GSH to GSHI. It made the yield of GSH reach to 2.13g/L which was 30.7% higher than the control.

Key words glutathione synthesis, engineered strain, *S. cerevisiae*, coupled

Received: December 16, 2000

* Corresponding author. Tel: 86-21-64252981; Fax: 86-21-64250068; E-mail: dzhwei@ecust.edu.cn

更 正

本刊 2001 年 17 卷第 3 期刊出的赵存友等人的文章“转双抗虫基因烟草的研究”第 274 页 1.2.1 中“与 *Hind*III/*Bam*HI 酶解 pSKPP2-P 产生的 SPP2 启动子片段(1bp).....”应改为“.....(1.1kb)”。图 5“接虫 5 天后单株测试虫死亡率”的纵坐标应为:“0 20 40 60 80 100”,正确图如下:

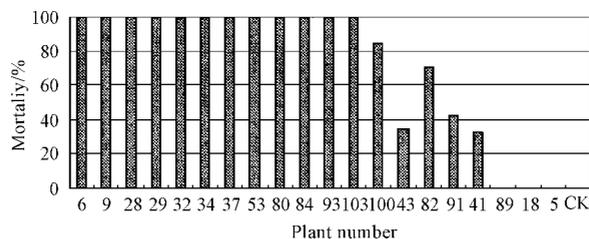


图 5 接虫 5 天后单株测试虫死亡率

Fig.5 Mortality of insects on transformed plants at 5 days after infestation

另 p.236 肖化忠、p.246 陈凤菊两同志的收稿日期均应为 2000 年,特此更正。并向以上作者表示深深的歉意!

《生物工程学报》编辑部