

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

李寅 陈坚 毛英鹰 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

Yoon-Mo Koo

(韩国仁荷大学工学院, 仁川 402-751)

摘要 在摇瓶培养中考察了谷胱甘肽的前体氨基酸及三磷酸腺苷对重组大肠杆菌生产谷胱甘肽的影响, 发现两者均能显著促进胞内谷胱甘肽的积累。利用正交试验得出了谷胱甘肽产量最大的较优发酵条件组合: 初始 pH 6.7; 酵母膏 8 g/L; 混合前体氨基酸 5 mmol/L 和三磷酸腺苷 2.0 g/L, 并进行了实验验证。初步考察了在重组大肠杆菌流加培养中连续流加前体氨基酸、三磷酸腺苷和氨基青霉素的影响, 发现胞内谷胱甘肽含量虽有所提高, 但菌体生长却受到明显抑制。

关键词 重组大肠杆菌; 谷胱甘肽; 前体氨基酸; 三磷酸腺苷

中图分类号 TQ 464.7

0 前 言

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是生物体内最主要的非蛋白巯基化合物,具有多种重要的生理功能,如清除自由基、解毒、保护含巯基酶的活性和延缓衰老等。GSH还可作为多种酶的辅酶,参与糖代谢与三羧酸循环,使机体获得能量。由于GSH在生化防御体系中起着重要的作用,故人们在研究酶作用机理、蛋白质与核酸的生物合成、物质运输、中间代谢、药物代谢、内分泌、免疫及抗辐射、癌症、氧中毒和衰老等课题时对其的兴趣日益增长^[1]。

酵母具有生长速度快、GSH含量高的特点,因而是工业化生产GSH的首选菌株。作者已对酵母生产GSH进行了较为深入的研究^[2,3]。近年来,构建具有高GSH合成活性的重组大肠杆菌(*E. coli*)开始成为各国科学家所瞩目的研究热点,因为利用重组*E. coli*来生产GSH具有生长速率快、易实现高密度培养和提取容易等优点。这一技术的关键在于将分别编码合成GSH和GSH的基因 gsh 和 gsh 在宿主菌中高效表达。Murata等^[4,5]通过在细胞中扩增 gsh 和 gsh 成功地获得了具有较强GSH合成能力的重组*E. coli*,对培养技术则没有进行深入研究。由于GSH是由L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸所构成,且GSH合成过程中需要三磷酸腺苷(ATP)提供能量,故作者采用一株能以葡萄糖为底物合成

GSH 的重组 *E. coli* ,首先在摇瓶中研究了前体氨基酸和 ATP 对 GSH 发酵的影响,然后利用正交试验获得了前体氨基酸、ATP 与 pH 值和酵母膏的较优组合并进行了实验验证,最后在容积 2.5 L 的发酵罐上考察了添加氨基青霉素、前体氨基酸和 ATP 对重组 *E. coli* 高密度培养的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) WSH-KE1, *gsh* 和 *gsh* 基因的拷贝数为 2¹,由韩国仁荷大学生物工程系提供。

1.2 试剂、培养基、培养方法和分析方法

见文献 [6]。

2 结果与讨论

2.1 前体氨基酸对发酵的影响

谷胱甘肽的化学全称是 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸,根据其肽链组成可以预测,在培养基中添加谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸可能促进 *E. coli* 胞内积累 GSH。由于确定 GSH 前体氨基酸对发酵的影响是优化 WSH-KE1 菌株产 GSH 发酵条件的一项基础性工作,为此,作者考察了在发酵液中加入 1:1:1 等浓度的前体氨基酸混合液(L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸)的影响。由表 1 可知,氨基酸在发酵初始时加入对菌体生长和 GSH 合成均表现出抑制作用,而若氨基酸在发酵 12 h 时加入,则反之。若发酵 12 h 加入浓度为 5 mmol/L 的前体氨基酸,最大细胞干重(6.18 g/L)可比对照提高 40%。胞内 GSH 含量和发酵液中 GSH 总量则随着氨基酸浓度的增加而增大,若发酵 12h 加入初始浓度为 9 mmol/L 的混合前体氨基酸则两指标均达到最大,其中,胞内 GSH 含量(21.14 mg/g)比对照提高了 2 倍;GSH 总量(118.38 mg/L)则比对照提高了近 3 倍。

表 1 前体氨基酸对 GSH 合成的影响

| 发酵初始时加入 AA/mmol·L ⁻¹ | DCW /g·L ⁻¹ | GSH /mg·g ⁻¹ | TG /mg·L ⁻¹ | 发酵 12 h 时加入 AA/mmol·L ⁻¹ | DCW /g·L ⁻¹ | GSH /mg·g ⁻¹ | TG /mg·L ⁻¹ |
|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 不加 | 4.45 | 11.68 | 51.98 | 1 | 5.70 | 11.22 | 63.95 |
| 1 | 4.13 | 11.76 | 48.57 | 3 | 5.55 | 15.63 | 86.75 |
| 3 | 4.23 | 12.04 | 50.93 | 5 | 6.18 | 15.10 | 93.32 |
| 5 | 4.28 | 11.54 | 49.39 | 7 | 6.02 | 15.58 | 93.79 |
| 7 | 4.35 | 10.36 | 45.07 | 9 | 5.60 | 21.14 | 118.38 |
| 9 | 4.23 | 10.56 | 44.67 | 11 | 5.53 | 19.89 | 109.99 |
| 11 | 3.98 | 10.78 | 42.90 | | | | |

注 AA—前体氨基酸;DCW—细胞干重;GSH—胞内 GSH 含量;TG—发酵液内 GSH 总量。

2.2 ATP 对发酵的影响

GSH 生物合成受两步酶反应影响。第一步是由 L-谷氨酸和 L-半胱氨酸在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH₁, EC 6.3.2.2)作用下合成 γ -谷氨酰半胱氨酸;第二步由 γ -谷氨酰半胱氨酸和甘氨酸在谷胱甘肽合成酶(GSH₂, EC6.3.2.3)作用下合成 GSH。这两步酶反应均需要 ATP 参与,若 ATP 不足则酶反应会受到极大抑制。为了考察 WSH-KE1 菌株酵解

途径产生的 ATP 能否满足 GSH 合成的需要, 作者分别在发酵开始时和 12 h 向发酵液中加入不同浓度的 ATP, 结果见表 2。在氨基酸混合液加入量同样为 9 mmol/L 的前提下, 添加 ATP 后细胞干重、胞内 GSH 含量均有提高; 若发酵一开始就加入 2.0 g/L 的 ATP, 则菌体干重和胞内 GSH 含量均可达到最大, 分别为 5.90 g/L 和 28.84 mg/g; 比较在发酵开始时和 12 h 时分别加入 ATP 的结果发现, 前者对菌体生长和 GSH 合成更为有利。

表 2 ATP 的影响

| 发酵初始时加 ATP/g · L ⁻¹ | DCW /g · L ⁻¹ | GSH /mg · g ⁻¹ | TG /mg · L ⁻¹ | 发酵 12 h 加 ATP/g · L ⁻¹ | DCW /g · L ⁻¹ | GSH /mg · g ⁻¹ | TG /mg · L ⁻¹ |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 0/ 不加 AA | 4.75 | 11.68 | 55.48 | 0/ 加 AA | 5.60 | 21.14 | 118.38 |
| 0.67 | 5.62 | 26.31 | 147.86 | 0.67 | 5.54 | 19.83 | 109.86 |
| 1.33 | 5.75 | 28.24 | 162.38 | 1.33 | 5.54 | 18.55 | 102.77 |
| 2.00 | 5.90 | 28.48 | 168.03 | 2.00 | 5.37 | 18.09 | 97.14 |
| 2.67 | 5.78 | 25.26 | 146.00 | 2.67 | 4.84 | 17.36 | 84.02 |
| 3.33 | 5.50 | 22.64 | 124.52 | 3.33 | 4.81 | 18.95 | 91.15 |

注: 等摩尔比的前体氨基酸混合液(9 mmol · L⁻¹) 在发酵 12 h 加入。

2.3 摇瓶发酵条件的正交试验优化

表 3 L₁₆(4⁵) 正交试验因子水平表

研究发现, 除前体氨基酸和 ATP 外, pH 和酵母膏对 WSH-KE1 菌株产 GSH 也有较大影响, 故作者采用正交试验来确定这些因素的较优组合。按 L₁₆(4⁵) 正交表安排正交实验, 具体实验方案和结果见表 3 和表 4。

| 因子 | 水 平 | | | |
|--------------------------------|-----|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| A: 氨基酸/mm ol · L ⁻¹ | 0 | 5 | 10 | 15 |
| B: ATP/g · L ⁻¹ | 0 | 0.67 | 1.33 | 2.00 |
| C: 空列 | | | | |
| D: 酵母膏/g · L ⁻¹ | 0 | 4 | 8 | 12 |
| E: pH | 6.2 | 6.7 | 7.2 | 7.7 |

注: 发酵开始时加入 ATP; 发酵 12 h 时加入前体氨基酸。

表 4 L₁₆(4⁵) 正交实验表

| 实验号 | 因 素 | | | | | DCW/g · L ⁻¹ | GSH/mg · g ⁻¹ | TG/mg · L ⁻¹ |
|-----|-----|---|---|---|---|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | A | B | C | D | E | | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.775 | 10.02 | 7.77 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3.80 | 14.31 | 54.37 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 6.25 | 7.79 | 48.68 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6.75 | 7.48 | 50.46 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6.88 | 14.53 | 99.90 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 3 | 7.90 | 11.48 | 90.66 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2.90 | 26.23 | 76.07 |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 3.33 | 4.80 | 15.95 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 2 | 4.28 | 6.48 | 27.69 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 1 | 4.65 | 5.11 | 23.78 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 4 | 4.85 | 11.06 | 53.66 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 4.20 | 11.76 | 49.39 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3 | 3.78 | 15.72 | 59.35 |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 4.38 | 10.48 | 45.83 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 5.48 | 1.48 | 8.12 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2 | 6.75 | 18.54 | 125.16 |

实验结果的极差分析表明: 1) 各因素对细胞干重的影响为: 酵母膏 > pH > ATP > 氨基酸, 其最佳组合为: 初始 pH 7.2; 酵母膏质量浓度 8 g/L; 氨基酸浓度 9 mmol/L; ATP 加入量 2.0 g/L。2) 各因素对发酵液中 GSH 总量的影响为: pH > 氨基酸 > 酵母膏 > ATP, 最佳组合为: 初始发酵液 pH 6.7; 酵母膏质量浓度 8 g/L; 氨基酸加入量 5 mmol/L; ATP 加入量

2.0 g/L。各因素对发酵液中 GSH 总量的影响可能有交互作用。

正交试验结果的方差分析表明: 1) 对细胞干重的影响, 酵母膏高度显著, 初始 pH 较显著, 而氨基酸和 ATP 不显著; 2) 对发酵液中 GSH 总量的影响, 初始 pH 最为显著, 氨基酸和 ATP 高度显著, 酵母膏不显著。这些结果与极差分析结果一致。

为提高统计分析的可靠性, 表 5 给出了对正交试验得出的较优组合进行验证的两组平行实验结果。与正交试验中得出的最大细胞干重(7.8 g/L)和最大 GSH 总量(125.16 mg/L)相比, 采用两种较优组合后, 最大细胞干重和最大 GSH 总量分别提高了 10% 和 26%。

表 5 较优组合的实验验证

| 目 标 | 细胞干重最大 | | GSH 总量最大 | |
|------------------------|--------|-------|----------|--------|
| | 实验 1 | 实验 2 | 实验 1 | 实验 2 |
| 初始 pH | 7.20 | 7.20 | 6.70 | 6.70 |
| 终了 pH | 8.03 | 8.19 | 7.21 | 7.10 |
| DCW/ $g \cdot L^{-1}$ | 8.33 | 8.83 | 7.40 | 7.10 |
| GSH/ $mg \cdot g^{-1}$ | 11.51 | 13.08 | 20.70 | 22.87 |
| TG/ $mg \cdot L^{-1}$ | 95.89 | 89.26 | 153.18 | 162.38 |

2.4 流加前体氨基酸、氨苄青霉素和 ATP 对发酵的影响

在摇瓶研究中发现, 若制作斜面时温度控制不当或斜面保存时间太长, 均会导致氨苄青霉素失效, 结果表现为 GSH 产量的明显下降。作者比较了分别采用含氨苄青霉素和不含氨苄青霉素的斜面接种然后进行流加培养的结果。发现在同样条件下, 两者最大菌体干重均可超过 60 g/L, 前者 GSH 含量在 12 ~ 15 mg/g 波动, 而后的 GSH 含量平均不超过 5 mg/g (详细结果另文报道)。为此作者认为, 由于高细胞密度培养中细胞通常要繁殖上百代, 在细胞增殖过程中, 添加一定量的氨苄青霉素将有利于重组 *E. coli* 的稳定从而促进胞内 GSH 的积累。另据摇瓶实验结果可知, 混合氨基酸和 ATP 的加入能够显著促进胞内 GSH 的积累。基于以上考虑, 作者在流加培养中先流加一定量的糖, 待细胞浓度达到一定值时, 流加含有

2 g ATP, 100 mg 氨苄青霉素和 9 mmol 的 3 种氨基酸混合液的糖液。它们的加入量是根据以下原则确定的: 即在含 ATP, 氨基酸和氨苄青霉素的糖液流加完后发酵液中 ATP, 氨基酸和氨苄青霉素的总浓度分别为 2 g/L, 9 mmol/L 和 100 mg/L。实验中从第 23 h 开始流加含 ATP, 氨基酸和氨苄青霉素的糖液, 过程变化曲线见图 1。

从图 1 可见, 加入这 3 种物质后, 胞内 GSH 含量虽有提高, 但促进效果不如摇瓶中明显。此外, 奇怪的是, 糖液不断流加但细胞量却未见增长, 而发酵液中又并无糖的累积, 显然所加入的糖可能转化成其它未知物质。故在今后研究

中, 一方面要考察分别流加 ATP, 氨基酸和氨苄青霉素后体系的响应情况, 另一方面应比较相同浓度的 ATP, 氨基酸和氨苄青霉素连续加入与瞬间加入发酵罐的不同影响, 此外, 还应对本研究中发现的“耗糖细胞却并不生长”的现象作进一步的实验分析。

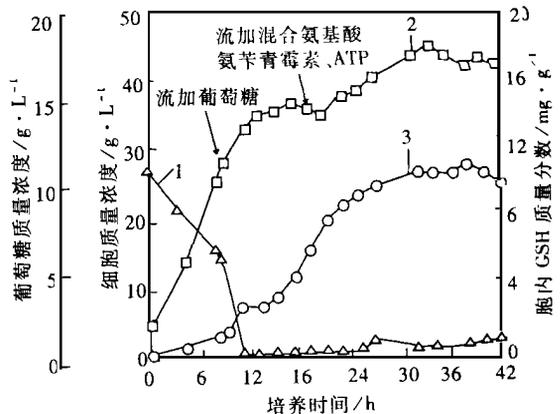


图 1 流加 ATP, 混合氨基酸和氨苄青霉素的发酵过程曲线
1—葡萄糖浓度; 2—胞内 GSH 含量; 3—细胞干重

参 考 文 献

- 1 卓肇文. 还原型谷胱甘肽(GSH)的功能与应用. 氨基酸杂志, 1989, 11: 41
- 2 李寅, 陈坚, 周楠迪等. 环境条件和摇瓶补糖策略对谷胱甘肽发酵的影响. 生物工程学报, 1998, 14(2): 149 ~ 154
- 3 周楠迪, 李寅, 陈坚等. 从面包酵母中提取谷胱甘肽的研究. 生物技术, 1997, 7(4): 30 ~ 33
- 4 Murata K, Kimura A. Cloning of a gene responsible for the biosynthesis of glutathione in *Escherichia coli* B. Appl Environ Microbiol. 1982, 44: 1444 ~ 1448
- 5 Murata K, Miya T, Gushima H, et al. Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *Escherichia coli* B. Agric Biol Chem. 1983, 47: 1381 ~ 1383
- 6 Li Y, Chen J, Mao Y Y et al. Fermentation conditions and high-cell density culture of recombinant *E. coli* for enhancement of glutathione production. Biochemical Engineering: Marching Toward the Century of Biotechnology, Proceeding of 4th Asia-Pacific Biochemistry Engineering Conference. Ed by Shen Z Y. Published by Tsinghua University, 1997, 1: 431 ~ 434

Effect of Precursor Amino acids and ATP on the Production of Glutathione by Recombinant *Escherichia coli*

Li Yin Chen Jian Mao Yingying Lun Shi yi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Yoon-Mo Koo

(Department of Biological Engineering, Inha University, 402-751, Korea)

Abstract The positive effect of precursor amino acids and ATP on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*, namely enhancement of the intracellular GSH accumulation, was determined in shaking-flask culture. The optimal fermentation conditions for maximal productivity of GSH, that is initial pH 6.7, yeast extract 8 g/L, mixed precursor amino acids 5 mmol/L and ATP 2.0 g/L, was obtained by using orthogonal experiment method. The fed-batch culture process of recombinant *E. coli* with continuously feeding precursor amino acids, ATP and ampicillin was also examined, it was found in the process that intracellular GSH content could be slightly increased and cell growth rate was inhibited.

Key words glutathione; recombinant *Escherichia coli*; precursor amino acids; ATP

(责任编辑: 秦和平)