

文章编号: 1009-038X(1999)04-0001-05

大肠杆菌—面包酵母种间耦合 ATP再生系统中生物合成谷胱甘肽

李华钟, 林金萍, 李 寅, 陈 坚

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 利用混合悬浮培养的方法, 构建了一个由重组大肠杆菌的谷胱甘肽生物合成酶系与面包酵母的糖酵解途径组成的 ATP再生系统, 验证了该系统用于谷胱甘肽 (GSH) 生物合成的可行性. 研究了葡萄糖浓度、细胞量对耦合系统合成 GSH能力的影响, 讨论了所构建的 ATP再生系统中 GSH合成能力较低的可能原因.

关键词: ATP再生系统; 谷胱甘肽; 生物合成; 重组大肠杆菌; 面包酵母

中图分类号: Q516 **文献标识码:** A

谷胱甘肽 (GSH) 是一种重要的生理活性物质, 它是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH I, EC6. 3. 2. 2) 和谷胱甘肽合成酶 (GSHII, E. C. 6. 3. 2. 3) 在 ATP存在的条件下催化 L-谷氨酸 (L- Glu)、L- 半胱氨酸 (L- Cys) 和甘氨酸 (Gly) 合成的. 影响合成过程的重要因素包括: 1) GSH I 和 GSHII 的活性; 2) ATP的供给. 前者主要影响生物合成的效率, 而后者则与过程的经济性紧密相关. 由于在反应过程中直接添加 ATP是经济上所不合适的, 因此, 对于这类需要 ATP的生物合成过程, 能否引入一个有效的 ATP合成系统, 并与 GSH合成系统相协调构成一个耦合系统, 即 ATP再生系统^[1], 直接影响反应过程的经济性和效率.

Langer^[2]利用同时存在于大肠杆菌中的乙酸激酶反应系统 (负责 ADP的磷酸化) 与 GSH生物合成酶系构建了一个 ATP再生系统, 其优点是 ATP的输送方便, 但由于乙酰磷酸盐作为高能磷酸基供体, 昂贵且不稳定, 因而这一系统并不实用. 酵母中的糖酵解途径可以用作 ATP的合成系统^[3], Murata^[4, 5]研究了固定化酿酒酵母以葡萄糖为原料再生 ATP并用于 GSH生物合成的过程. 作者在前期研究^[6~10]的基础上, 利用 GSH合成酶系活性高的重组大肠杆菌和酵解途径酶活性较强的面包酵母, 经对细胞处理提高其通透性后, 不进行固定化操作而直接将两种菌体混合, 由其完整的酶系构建一个 ATP再生系统, 并对该系统合成 GSH的性能进行了初步研究和讨论.

收稿日期: 1999-03-09; 修订日期: 1999-09-22

基金项目: 霍英东教育基金会第 6届高等院校青年教师基金项目

作者简介: 李华钟 (1958年 11月生), 男, 山东龙口人, 工学硕士, 副教授

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

重组大肠杆菌 *Escherichia coli* WSH- KE1^[6],由韩国仁荷大学生物工程系提供,用于谷胱甘肽的生物合成;面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) WSH- J7^[11],作者所在研究室保藏的一株高发酵活力面包酵母,用作 ATP的合成系统.

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 *E. coli*和 *S. cerevisiae*的斜面培养基分别见文献 [6 和 [11].

1.2.2 摇瓶生长培养基

1) VB培养基 (g/L): 葡萄糖 5, 蛋白胨 5, 酵母膏 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 柠檬酸 2, 无水 K_2HPO_4 10, $\text{NaNH}_2\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.5, pH 7.0.

2) YEPD培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, pH6.0.

1.3 培养方法

E. coli 细胞在 VB培养基中于 37℃摇瓶培养 20 h, *S. cerevisiae* 细胞在 YEPD培养基中于 30℃培养 24 h,而后分别于 10 000 r/min和 3 000 r/min下离心,收获细胞并用蒸馏水充分洗涤,离心后备用.

1.4 谷胱甘肽的生物合成

1.4.1 细胞的处理 为了改进底物和产物的输送,必须用有机溶剂对细胞进行处理.大肠杆菌细胞悬浮在 100 mL含有 10% 甲苯和 0.5 mmol/L L- Cys的 5.0 mmol/L磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)中,37℃下振荡培养 30 min后离心收集细胞,用同一缓冲液洗涤两次.酵母细胞悬浮在 10 mL 0.85% 的 NaCl溶液中,再加入 90 mL冰冻的丙酮,搅拌 5 min后离心收集细胞,用含有 0.5 mmol/L L- Cys的 5.0 mmol/L磷酸钾缓冲液洗涤两次.

1.4.2 伴有 ATP再生反应的 GSH的生产 GSH生物合成的一般混合反应体系组成 (mmol/L)为: L- Glu 60, L- Cys 20, Gly 20, MgCl_2 20,葡萄糖 400,磷酸钾缓冲液 50, pH 7.5.反应体系总体积为 5 mL,甲苯处理过的 *E. coli* 细胞和丙酮处理过的 *S. cerevisiae* 细胞的用量根据实验要求确定.

1.5 分析方法

转化反应结束后,将反应液离心取上清液,根据文献 [12],用荧光法检测反应液中的 GSH含量.菌体用 40% 乙醇于 30℃处理 2 h(使胞内 GSH释放),再离心取上清液测定 GSH含量,用以衡量胞内 GSH的水平.

2 实验结果

2.1 不同浓度 ATP对重组大肠杆菌合成 GSH的影响

在发酵过程中直接添加一定量的 ATP可促进重组大肠杆菌 WSH- KE1胞内积累 GSH^[10],因此首先考察了外加不同浓度 ATP对用甲苯处理过的 WSH- KE1细胞合成 GSH的影响,见图 1.可知,缺乏 ATP时 WSH- KE1几乎不能合成 GSH,在一定范围内提高 ATP浓度可显著促进 GSH的合成,但 ATP浓度过高时,GSH的合成量反而降低,这种现象从未见报导.此外,细胞用甲苯处理后,胞内 GSH水平很低,表明细胞通透性明显改善.

2.2 利用 *S. cerevisiae* 的糖酵解途径构建 ATP再生系统用于合成 GSH

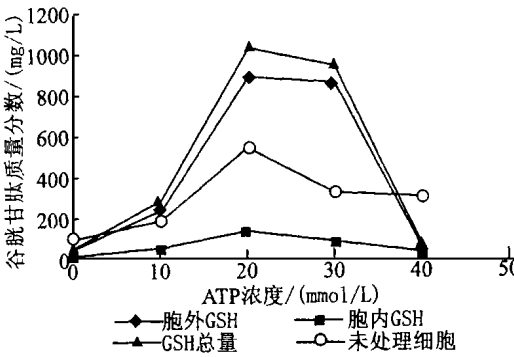
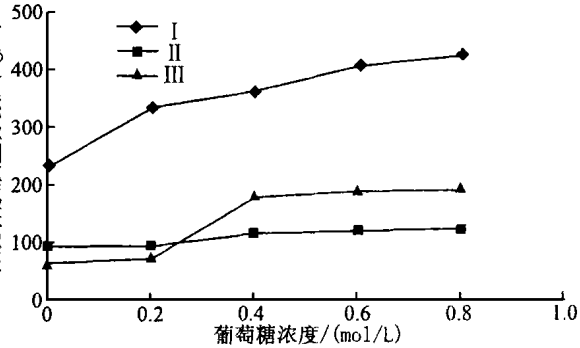


图 1 外加 ATP对甲苯处理过的 *E. coli* 细胞生产 GSH的影响

葡萄糖为能源混合培养大肠杆菌和酵母,构建一个 ATP再生系统,并对其合成 GSH的可行性进行了考察.

2.2.1 葡萄糖浓度的影响 由于葡萄糖的浓度是影响 ATP产生能力的重要因素,因此,研究了不同葡萄糖浓度对各种反应系统合成 GSH的影响,见图 2

可见,改变葡萄糖浓度对耦合系统(系统I)合成 GSH能力的影响较为显著. WSH- KE1细胞中 GSH合成酶系活性较强,但自身无法利用葡萄糖产生足够的 $ATP^{[10]}$,所以葡萄糖浓度的变化对 GSH的合成几乎没有影响;而 WSH- J7细胞虽然能够合成较多的 ATP,但GSH合成酶系相对较弱.因此,单独培养大肠杆菌或酵母时 GSH产量均很低.将两种菌进行混合培养后,同样条件下 GSH的合成能力显著提高,表明利用大肠杆菌-酵母混合培养确实构成了一个 ATP再生系统,并且在 GSH的生物合成中发挥了重要作用.



I —— 由 *Saccharomyces cerevisiae*和 *E. coli* 构成的耦合系统
II —— 反应系统中只加 *E. coli*
III —— 反应系统中只加 *Saccharomyces cerevisiae*

图 2 葡萄糖浓度对耦合系统生物合成 GSH的影响

2.2.2 反应体系中细胞量的影响 在确证了所构建的 ATP再生系统合成 GSH的可行性之后,考察了系统内大肠杆菌和酵母菌的细胞量对耦合系统合成 GSH的影响,分别如图 3、4所示.虽然 GSH的产量均随着大肠杆菌和酵母细胞量的增加而增加,但两者还是有区别的.固定酵母细胞量时,大肠杆菌细胞量增大到一定程度后 GSH不再继续合成;而固定大肠杆菌细胞量时,增大酵母细胞量却一直能够促进 GSH的合成,表明 ATP的供给仍是限制耦合系统合成能力的最大瓶颈因素,因此,选择合适的大肠杆菌与酵母细胞的比例对提高耦合系统合成 GSH能力至关重要.

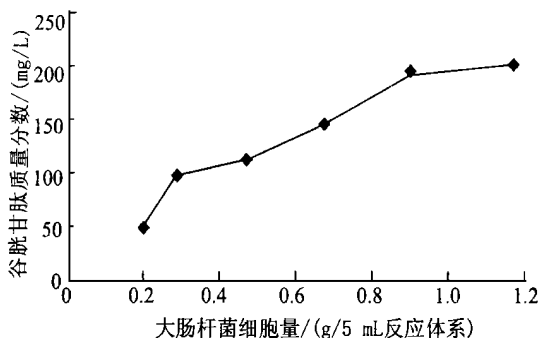


图 3 耦合系统中甲苯处理过的 *E. coli* 细胞量对 GSH 产量的影响

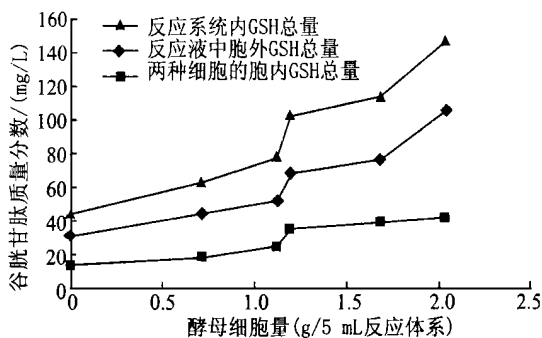


图 4 耦合系统中丙酮处理过的 *S. cerevisiae* 细胞量对 GSH 产量的影响

3 讨 论

谷胱甘肽的生物合成需要 ATP.向反应体系中直接添加 ATP,虽然 GSH 的产量很高 (1 000 mg/L 左右),但不适宜 GSH 的实际生产.用葡萄糖作为能量来源,以 *S. cerevisiae* 的糖酵解途径合成 ATP,从系统的经济性来讲要比外加 ATP 更为合理,但反应体系中累积的 GSH 的量比外加 ATP 情况下低得多.分析 ATP 使用的低效率,可能有 3 点原因: 1) ATP 被存在于细胞中的 ATP 水解酶,如 ATPase 或磷酸脂酶降解; 2) 谷胱甘肽合成酶系对 ATP 的低亲和性; 3) 糖酵解途径的酶反应与 GSH 合成反应间存在位点间隔,阻碍了 ATP 的有效转移.因此,提高两种微生物间 ATP 的转移效率及 ATP 在反应体系中的稳定性,是 ATP 再生系统高效运行的关键.

本研究利用大肠杆菌—酵母混合培养构建了一个 ATP 再生系统.反应系统各项性能的优化,包括最佳细胞浓度与比例关系的选择.不影响酶活条件下提高细胞膜通透性的方法以及 ATP 的有效传递方式等,还有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] 李寅,陈坚,伦世仪. ATP 再生系统及其应用 [J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(3): 60~ 65
- [2] LANGER R S, HAMILTON B K, GARDNER C R, et al. Enzymatic regeneration of ATP, I. Alternative routes[J]. AIChE J, 1976, 22 1079~ 1090
- [3] TOCKIKURA T, KUSAHARA M, TAGI H, et al. Fermentation and metabolism of nucleic acid related compounds in yeast[J]. J Ferment Technol, 1967, 45 511~ 529
- [4] MURATA K, TANI K, KATO J, et al. Glycolytic pathway as an ATP generating system and its application to the production of glutathione and NADP[J]. Enz Microb Technol, 1980, 3 233~ 242
- [5] MURATA K, TANI K, KATO J, et al. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system[J]. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1981, 11: 72~ 77
- [6] 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 Biochemistry, 1998, 33(7): 709 ~ 714
- [7] 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 [J]. 生物工程学报, 1998, 14

(2): 149~ 154

- [8] 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
- [9] 李寅,陈坚,周楠迪等.氨基酸和酵母膏对谷胱甘肽发酵的影响[J].中国医药工业杂志,1998,29(12): 535~ 540
- [10] 李寅,陈坚,毛英鹰等.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
- [11] 李寅,陈坚,宋祺等.高发酵活力面包酵母的高产率流加培养策略研究[J].生物工程学报,1997,13(2): 160~ 167
- [12] VICTOR H C, JERRY L. A fluorometric assay of glutathione[J]. Anal Biochem, 1966, 14 434~ 440

Biosynthesis of Glutathione in the ATP Regeneration System Established by the Mixed Culture of *Escherichia coli* and *Sacharomyces cerevisiae*

LI Hua-zhong, LIN Jin-ping, LI Yin, CHEN Jian

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

Abstract An ATP regeneration system composed of the glutathione- synthetase in the recombinant *Escherichia coli* WSH-KE1 and the EMP pathway in the *Sacharomyces cerevisiae* WSH-J7 was established by the mixed culture of the two kinds of microorganisms in suspension. The feasibility of the system used in the biosynthesis of glutathione was verified. The effect of the glucose concentration and the biomass of the two kinds of microorganisms on the biosynthesis of glutathione was studied. The possible reason of the weaker ability of glutathione synthesis in the established ATP regeneration system was discussed.

Key words ATP regeneration system; glutathione; biosynthesis; recombinant *Escherichia coli*; *Sacharomyces cerevisiae*