

文章编号: 1009-038X(2000)06-0537-05

面包酵母和耐高温酵母在谷胱甘肽合成过程中 作为 ATP 再生菌株的比较

童群义, 陈坚, 堵国成, 李华钟
(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 分别考察了面包酵母、耐高温酵母合成 ATP 的最适条件和重组大肠杆菌合成谷胱甘肽的最适条件, 比较了面包酵母和耐高温酵母作为 ATP 再生菌株对谷胱甘肽合成的影响. 结果表明: 由耐高温酵母构建的 ATP 再生-谷胱甘肽合成耦合体系, 与用面包酵母构建的耦合体系相比, 其谷胱甘肽产量提高 43.6% 以上; 与直接添加 ATP 相比, 其谷胱甘肽产量提高 14.5% 以上.

关键词: 面包酵母; 耐高温酵母; 重组大肠杆菌; 谷胱甘肽; ATP 再生

中图分类号: Q516

文献标识码: A

The Compared Study of Baker's Yeast and Thermotolerant Yeast as the Strain of ATP Regeneration in Glutathione Synthesis

TONG Qun-yi, CHEN Jian, DU Guo-cheng, LI Hua-zhong
(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: The optimal conditions synthesized for ATP by baker's yeast (*S. cerevisiae* for WSH J7) and thermotolerant yeast (*S. cerevisiae* NGW45) and the optimal conditions synthesized GSH by recombined *E. coli* were separately investigated. The influence of baker's yeast and thermotolerant yeast on GSH synthesis was compared. The result showed that the GSH yield in the coupling system constructed by *S. cerevisiae* NGW45 was 43.6% higher than that constructed by *S. cerevisiae* WSHJ7 and 14.5% higher than that at the addition of pure ATP.

Key words: baker's yeast; thermotolerant yeast; *E. coli* II-1; glutathione; ATP regeneration

谷胱甘肽(GSH)在生物体内是 L-Glu、L-Cys 和 Gly 在 ATP 存在下由 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(GSH II, EC6.3.2.3)催化合成的. 在这个反应体系中, 需要 ATP 提供能量. 但直接添加 ATP 不仅价格昂贵, 而且反应产生的 ADP 对 GSH I 有一定的抑制作用. 因此, 构建高效的 ATP 再生系统对反应的经济性

和效率均具有重要的意义. Gardner^[1] 和 Whitesides 等^[2] 利用乙酸激酶反应构建了 ATP 再生系统, 但反应的底物(乙酰磷酸)昂贵且不稳定, 因而这一系统难以实际应用. Tochikura^[3] 和 Murata 等^[4] 利用面包酵母的糖酵解途径构建了 ATP 再生系统, 这一系统使用价格低廉的葡萄糖作为底物, 因而具有一定的应用前景. 李华钟等^[5] 也利用面包酵母的糖

收稿日期: 2000-02-19; 修订日期: 2000-09-15.

基金项目: 霍英东青年教师基金项目资助课题.

作者简介: 童群义(1963-), 男, 湖南桃源人, 工学博士, 博士后研究人员, 副教授.

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

酵解途径构建了 ATP 再生系统,与具有高活力的重组大肠杆菌混合培养进行 GSH 的合成,但该系统的 GSH 产率低于直接添加 ATP 的系统.作者对该系统活力不高的原因进行了仔细的研究,发现酵母产生 ATP 的最佳条件与重组大肠杆菌产生 GSH 的最佳条件有较大的差异.特别是面包酵母的最适酵解温度为 37 ℃,而 GSH I 和 GSH II 的最适温度均为 45 ℃左右^[9].为了构建高效的 ATP 再生-GSH 合成种间耦合系统,应尽可能筛选最适温度一致的菌种.为此,作者比较了面包酵母和耐高温酵母的 ATP 再生能力,为构建高效的 ATP 再生-GSH 合成种间耦合系统提供了理论基础.

1 材料与方法

1.1 菌种

耐 高 温 酵 母 (*Saccharomyces cerevisiae* NGW45) 从湖北安琪生物集团提供的耐高温型酿酒高活性干酵母中分离、选育;面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae* WSH J7) 作者所在学院微生物实验室保藏菌种;菌种重组大肠杆菌(*E. coli* WSH-KE1, 带有质粒 pGH501) 韩国仁荷大学生物工程系提供;大肠杆菌(*E. coli* II) 作者所在学院微生物实验室保藏菌株.

1.2 培养基

1.2.1 大肠杆菌斜面培养基 见文献[7].

1.2.2 大肠杆菌摇瓶培养基 见文献[5].

1.2.3 酵母斜面培养基 见文献[8].

1.2.4 酵母摇瓶培养基 见文献[5].

1.3 重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 的构建

首先从 *E. coli* WSH-KE1 中提取质粒 pGH501, 然后以 *E. coli* II 为宿主进行转化, 以 Amp^r 为选择性标记挑选转化子. 挑取生长良好的单菌落, 检测其合成 GSH 的能力. 结果获得一株高活力的转化子 *E. coli* II-1, 其 GSH 的合成能力和质粒 pGH501 的稳定性均明显优于原有菌株 *E. coli* WSH-KE1, 详见文献[9].

1.4 培养方法

重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 在大肠杆菌摇瓶培养基中于 37 ℃摇瓶培养 24 h.

面包酵母在酵母摇瓶培养基中于 30 ℃下培养 12 h, 然后每隔 4 h 加入 40% 的葡萄糖溶液 5 mL, 3 次共加入 15 mL, 继续培养至总培养时间为 30 h.

耐高温酵母在酵母摇瓶培养基中于 32 ℃下培养 12 h, 然后每隔 4 h 加入 40% 的葡萄糖溶液 5 mL, 3 次共加入 15 mL, 并逐步升温至 37 ℃, 继续

培养至总培养时间为 30 h.

1.5 分析方法

1.5.1 ATP 的测定 纸电泳法^[10].

1.5.2 谷胱甘肽的测定 见文献[5].

1.6 ATP 再生系统的构建

1.6.1 ATP 再生系统产生的 ATP 含量测定 将 250 mg AMP 加入到 6 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液中, 在一定温度下保温备用. 然后加入在一定温度下保温解冻的冰冻酵母 10 g, 加 MgCl₂ 25.4 mg, 加葡萄糖 1.24 g, 加 pH 7.0 的磷酸缓冲液至 25 mL, 混匀, 在一定温度下(面包酵母为 37 ℃, 耐高温酵母为 41 ℃)保温 2 h. 反应结束后 10 000 r/min 离心 10 min. 上清液用纸电泳法测 ATP 含量.

1.6.2 ATP 再生系统的最适温度和最适 pH 测定 按 1.6.1 的条件, 根据测定实验的要求, 分别改变温度或 pH, 测定不同温度或不同 pH 下产生的 ATP 含量.

1.7 GSH 合成的反应系统

1.7.1 反应液的配制 配制方法详见文献[5], 各组分浓度如下: L-Glu 60 mmol/L; L-Cys 20 mmol/L; Gly 20 mmol/L; MgCl₂ 5 mmol/L; 磷酸钾缓冲液(pH 7.3) 50 mmol/L.

1.7.2 大肠杆菌的处理 见文献[5].

1.7.3 GSH 合成的最适温度和最适 pH 测定 吸取反应液 5 mL→加入用甲苯处理过的大肠杆菌 1 g, ATP 20 mg→根据测定实验的要求, 在不同温度或不同的 pH 下反应 2 h→离心→吸取 0.4 mL 上清液, 测 GSH 含量.

1.8 ATP 再生-GSH 合成耦合系统的构建

吸取反应液 5 mL(pH 7.3), 加入葡萄糖 0.25 g→在 42 ℃下保温备用, 然后加入 AMP 10 mg→混匀后立即加入用甲苯处理过的大肠杆菌 1 g, 冰冻耐高温酵母 1 g→在 42 ℃下反应 2 h→离心→吸取 0.4 mL 上清液, 测 GSH 含量.

2 结果与讨论

2.1 反应条件对重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 合成谷胱甘肽的影响

GSH 的合成反应需要 ATP 提供能量, 由图 1 可以看出, 在 ATP 的浓度较低时, GSH 的产量随 ATP 浓度的增加而增加, 在 ATP 浓度为 20 mmol/L 时达到最大值. 由于反应过程中产生的 ADP 对 GSH I 有抑制作用^[11], 因此, 进一步增加 ATP 的浓度反而降低 GSH 的产量.

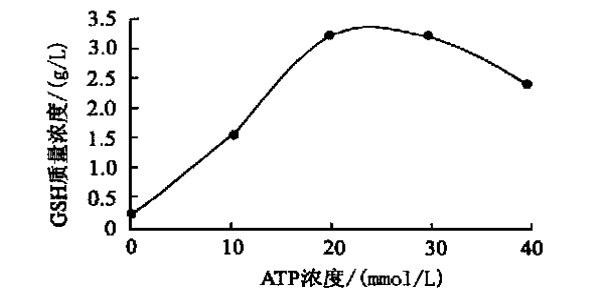


图 1 ATP 浓度对 GSH 合成的影响

Fig. 1 The influence of ATP concentration on GSH synthesis

笔者在 GSH 的合成反应中添加少量的 ADP, 证实了 ADP 对 GSH 合成反应的抑制作用, 结果见表 1.

表 1 ADP 对 GSH 合成反应的抑制作用

Tab. 1 The inhibition of ADP on GSH synthesis

ADP 浓度/(mmol/L)	GSH 质量浓度/(mg/L)
0	3218.5
0.1	2856.7
0.2	2226.4
0.5	1756.7

注: ATP 浓度为 20 mmol/L.

由于 ADP 在较低的浓度下即能抑制 GSH 的合成反应, 因此, 为了大量生产 GSH, 必须消除反应过程中产生的 ADP. 笔者将具有糖酵解途径的微生物所构成的 ATP 再生系统与重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 的 GSH 合成系统耦合起来, 形成 ATP 再生-GSH 合成耦合系统. 从表 2 的数据可以看出, 面包酵母与重组大肠杆菌所构成的耦合系统具有较高的 GSH 产量, 但仍低于添加纯 ATP 时所获得的 GSH 产量. 结果见表 2.

表 2 不同来源的 ATP 对重组大肠杆菌合成 GSH 产量的影响

Tab. 2 The influence of different ATP resource on the GSH synthesis by recombined *E. coli*

ATP 浓度/(mmol/L)	面包酵母质量浓度/(g/L)	大肠杆菌质量浓度/(g/L)	GSH 质量浓度/(mg/L)
0	0	100	238.2
20	0	100	3218.5
0	100	100	1163.6

李华钟等⁹考察了底物浓度对重组大肠杆菌合成 GSH 的影响, 在此基础上, 笔者重点考察了温度、pH、磷酸缓冲液浓度等因素对 GSH 合成反应的影响, 见图 2~4.

由图 2~4 可以看出, 重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 形成 GSH 的最佳条件为: 最适温度 43 ℃、最适 pH

7.6、最适磷酸缓冲液浓度 50 mmol/L.

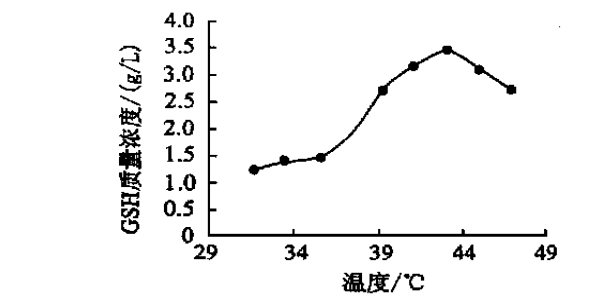


图 2 温度对 GHS 合成反应的影响

Fig. 2 The influence of temperature on the GSH synthesis by recombined *E. coli*

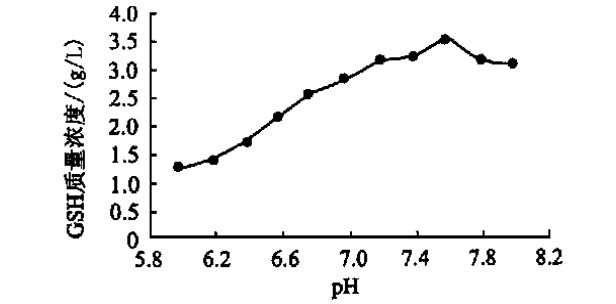


图 3 pH 对 GSH 合成反应的影响

Fig. 3 The influence of pH on the GSH synthesis by recombined *E. coli*

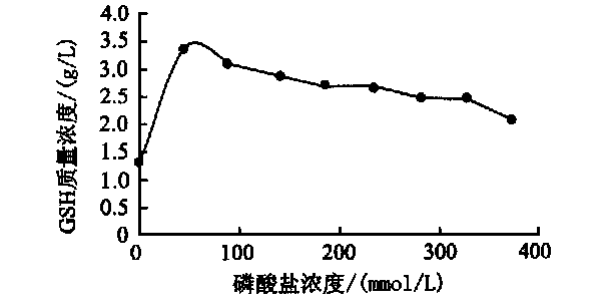


图 4 磷酸盐浓度对 GHS 合成反应的影响

Fig. 4 The influence of phosphate on the GSH synthesis by recombined *E. coli*

2.2 反应条件对酵母菌再生 ATP 的影响

影响酵母菌再生 ATP 的因素包括温度、pH、磷酸缓冲液浓度等^{12-14]}, 其中温度是最重要的因素, 它对反应速度有较大的影响; 磷酸盐的浓度对酵母形成 ATP 的方向和速度也有较大的影响, 若磷酸缓冲溶液的浓度太低, 则 AMP 向分解为腺苷和磷酸的方向进行.

经过分析, 发现面包酵母再生 ATP 的条件与重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 形成 GSH 的条件相差较大. 面包酵母形成 ATP 的最适温度为 37 ℃, 而重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 产生 GSH 的最适温度为 43 ℃(见图 2). 为了使 ATP 再生-GSH 合成耦合体系

能协调地工作,ATP 再生系统的最适温度应尽可能地与 GSH 合成反应的最适温度接近.因此,作者筛选了耐高温酵母作为 ATP 再生菌株,并比较了面包酵母和耐高温酵母形成 ATP 的条件,见图 5~7.(为便于测定,所有实验均添加了 10 mg/mL 的 AMP 作为底物).

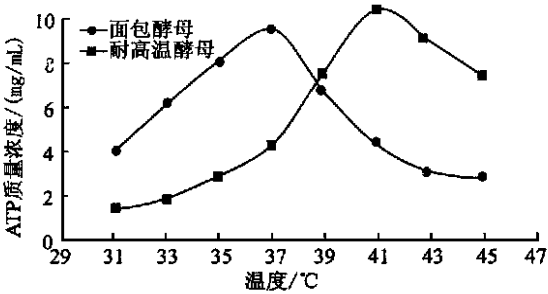


图 5 温度对 ATP 再生的影响

Fig. 5 The influence of temperature on the ATP regeneration by yeast

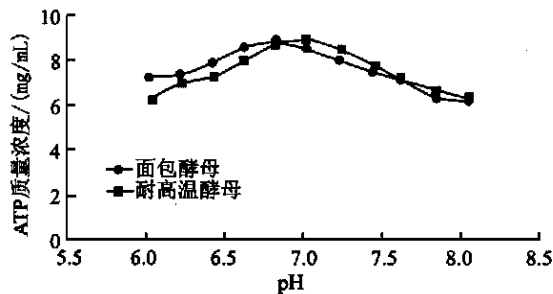


图 6 pH 对 ATP 再生的影响

Fig. 6 The influence of pH on the ATP regeneration by yeast

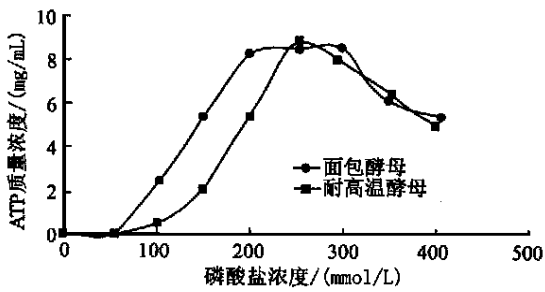


图 7 磷酸盐浓度对 ATP 再生的影响

Fig. 7 The influence of phosphate on the ATP recombinated by yeast *E. coli*

从图 5~7 可以看出,耐高温酵母再生 ATP 所需要的最适温度与面包酵母相差较大,经与图 2 比较,发现耐高温酵母形成 ATP 的最适温度(41 °C)与重组大肠杆菌形成 GSH 的最适温度(43 °C)接近;但耐高温酵母再生 ATP 所需要的 pH 和磷酸缓冲液浓度与面包酵母的相差不大(图 6, 7),两种酵母形成 ATP 的最适磷酸缓冲溶液浓度均为 250

mmol/L;面包酵母的最适 pH 为 6.8,耐高温酵母的最适 pH 为 7.0.

2.3 面包酵母和耐高温酵母在 GSH 合成过程中作为 ATP 再生体系的效果比较

由于面包酵母、耐高温酵母形成 ATP 的最适 pH 和最适磷酸缓冲液浓度(图 6, 7)与重组大肠杆菌形成 GSH 的最适 pH 和最适磷酸缓冲液浓度(图 3, 4)有一定的差别.经过比较、平衡,作者选择耦合系统的操作 pH 和磷酸缓冲液浓度为:pH 7.3、磷酸缓冲液浓度为 250 mmol/L(因磷酸缓冲溶液的浓度对 ATP 再生反应的速度和方向有决定性的影响,因此,在耦合系统中,磷酸缓冲溶液的浓度按 ATP 再生反应的最适条件取 250 mmol/L).操作温度选择为:面包酵母构建的耦合系统 37 °C,耐高温酵母构建的耦合系统 42 °C,因 AMP 太高对 *E. coli* II-1 产生 GSH 有一定的抑制作用,故选择耦合系统中的 AMP 质量浓度为 2 mg/mL(实验数据另文报道).其余条件按 1.8 进行.反应一定时间之后测定 GSH 含量,结果见图 8.

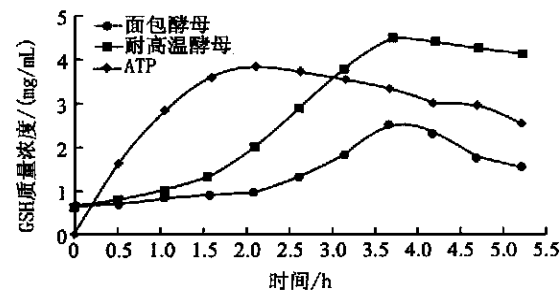


图 8 用耐高温酵母、面包酵母 ATP 再生体系或添加纯 ATP 时 GSH 产量随时间的变化

Fig. 8 The time course of GSH production at different energy resources

由图 8 可以看出,耐高温酵母构建的耦合反应与面包酵母构建的耦合反应相比,其 GSH 产量提高 43.6 % 以上;而耐高温酵母所构建的耦合反应与直接添加 ATP 的相比,其 GSH 产量则提高 14.5 % 以上.

3 结 论

1) GSH 的生物合成需要 ATP 作为能源,但由于 ATP 价格昂贵,因此构建高效的 ATP 再生-GSH 合成耦合系统是 GSH 生物合成的关键.利用酵解能力强的酵母菌可以构建高效的 ATP 再生系统.本实验中对面包酵母和耐高温酵母进行了比较,分别确定了面包酵母和耐高温酵母再生 ATP 的最适条件.面包酵母:温度 37 °C, pH 6.8, 葡萄糖浓度

250 mmol/L, AMP 质量浓度 10 mg/mL, 磷酸缓冲溶液浓度 250 mmol/L; 耐高温酵母: 温度 41 °C, pH 7.0, 葡萄糖浓度 250 mmol/L, AMP 质量浓度 10 mg/mL, 磷酸缓冲溶液浓度 250 mmol/L.

2) 在添加纯 ATP 的条件下, 确定了重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 形成 GSH 的最适条件: 温度 43 °C, pH 7.6, 磷酸缓冲溶液浓度 50 mmol/L, L-Glu 浓度 60 mmol/L, L-Cys 浓度 20 mmol/L, Gly 浓度 20 mmol/L, MgCl₂ 浓度 5 mmol/L.

3) 由于酵母菌和大肠杆菌所需要的反应条件

有一定的差别, 因此, 要构建高效的 ATP 再生-GSH 合成耦合系统必须兼顾两菌种的反应条件, 使得在同一反应系统中的酵母菌和重组大肠杆菌都能高效地运作. 根据 ATP 再生反应和 GSH 合成反应的最适条件进行选择 and 平衡, 最后确定耦合系统的高效运行条件: 使用耐高温酵母作为 ATP 再生系统, 温度 42 °C, pH 7.3, 磷酸缓冲溶液浓度 250 mmol/L, 葡萄糖浓度 250 mmol/L, AMP 浓度 2 mg/mL, L-Glu 浓度 60 mmol/L, L-Cys 浓度 20 mmol/L, Gly 浓度 20 mmol/L, MgCl₂ 浓度 5 mmol/L.

参考文献

- [1] GARDNER C R, COLTON C K, LANGER R S, et al. "Enzymatic regeneration of ATP from AMP and ADP: Part I, Thermodynamics kinetics and process development" in Enzyme Engineering[C]. In: PYE E K, WINGARD L B (Eds); New York: Plenum Press 1974. 209~222.
- [2] WHITESIDES G M, CHUMURNY A, GARRETT P. "Enzymatic regeneration of ATP and ADP: Part II, Enzyme immobilization and reactor development" in Enzyme Engineering[C]. In: PYE E K, WINGARD L B JR. (Eds). New York: Plenum Press 1974. 217~222.
- [3] TOCHIKURU T, KUWAHARA M, YAGIS. Fermentation and metabolism of nucleic acid related compounds in yeast[J]. **J Ferment Technol** 1967, 45: 511~529.
- [4] MURUTA K, TANI K, KATO J. Continuous production of glutathione by immobilized *saccharomyces cerevisiae* cells[J]. **J Appl Microbiol Biotechnol** 1978 (6): 23~27.
- [5] 李华钟, 林金萍, 李寅等. 利用大肠杆菌-酵母混合培养构建 ATP 再生系统生物合成谷胱甘肽[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(4): 1~5.
- [6] GUSHIMA H, MIYA T, MURUTA K. purification and characterization of glutathione synthetase from *Escherichia coli*[J]. **J Appl Biochem** 1983 (5): 210~218.
- [7] 李寅, 陈坚, 周楠迪等. 环境条件和摇瓶补料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] 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.
- [9] 李华钟, 林金萍, 方芳等. 高谷胱甘肽合成活性的重组大肠杆菌的构建及反应条件[J]. 无锡轻工大学学报, 1999(6): 56~59.
- [10] 顾觉奋, 吴明, 王高峰等. 微生物药品化学与分析[M]. 北京: 军事医学科学出版社. 1995. 347~349.
- [11] 平健坤, 吕慧梅. 一步自溶法生产 ATP 的新工艺[J]. 南京大学学报, 1989, 25(2): 361~364.
- [12] 金新根, 王丽影, 姜云龙. 藻酸内凝胶-戊二醛法固定酵母细胞生产 ATP 的研究[J]. 中国医药工业杂志, 1990, 21(7): 292~295.
- [13] 邱尉然, 徐茜, 张玉岭等. 利用固定化酵母细胞生产 ATP[J]. 华东化工学院学报, 1991, 17(4): 421~425.

(责任编辑: 秦和平 李春丽)