

文章编号 :1009 - 038X(2001)03 - 0228 - 05

重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系的 摇瓶发酵条件

童群义, 陈坚

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要:研究了重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 摇瓶发酵生产谷胱甘肽合成酶系的工艺条件,确定了 *E. coli* II-1 的最适产酶条件. 最佳发酵培养基组成(g/L)为:葡萄糖 10, 蛋白胨 5, 酵母膏 2.5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4.0, KH_2PO_4 1.0, $FeCl_3$ 0.2, $MnCl_2$ 0.1, $CoCl_2$ 0.1, $CaCl_2$ 0.1, $ZnCl_2$ 0.02, H_3BO_3 0.01, $NaMoO_4$ 0.01, $NaCl$ 1.0, Na_2SeO_3 0.02; 发酵起始 pH 7.2; 灭菌后加入无菌氨苄青霉素至 100 $\mu g/mL$; 每个三角瓶装液量为 100 mL; 培养前期的温度控制在 37 $^{\circ}C$, 后期将温度降为 35 $^{\circ}C$; 摇床转速 200 r/min, 发酵周期 16 h. 在此条件下, 重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 的谷胱甘肽合成酶系的活性为 862.3 U/L.

关键词:重组大肠杆菌, 谷胱甘肽合成酶系; 摇瓶发酵

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

Production Conditions of Glutathione Synthetases with Shaking Flask Fermentation by Recombinant *E. coli*

TONG Qun-yi, CHEN Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: The production conditions of Glutathione synthetases with shaking flask fermentation by *E. coli* II-1 were studied, and the optimal conditions of enzymes production were determined. Medium composition (g/L) was that, glucose 10, peptone 5, yeast extract 2.5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4.0, KH_2PO_4 1.0, $FeCl_3$ 0.2, $MnCl_2$ 0.1, $CoCl_2$ 0.1, $CaCl_2$ 0.1, $ZnCl_2$ 0.02, H_3BO_3 0.01, $NaMoO_4$ 0.01, $NaCl$ 1.0, Na_2SeO_3 0.02; initial pH 7.2; Ampicillin 100 $\mu g/L$; broth volume 100 ml; temperature 35 ~ 37 $^{\circ}C$; rotational speed 200 r/min; culture time 16 h. Under these conditions, the activity of glutathione synthetases produced by *E. coli* II-1 was 862.3 U/L (average volume of three tests).

Key words: recombinant *E. coli*; Glutathione synthetases; shaking flask fermentation

谷胱甘肽(GSH)是一种重要的生理活性物质,在癌症、肝炎等疾病的治疗中有一定的效果,在医药领域有着较为广泛的用途,此外,还具有一定的

抗辐射、抗衰老等功能,可作为一种多功能的生物活性添加剂应用于食品加工业. GSH 是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I)和谷胱甘肽合成酶

收稿日期 2000-12-5; 修订日期 2001-03-19.

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,副教授.

(GSH-II)在ATP存在下催化L-Glu、L-Cys和Gly的一个序贯反应合成的,反应如下:



许多研究者对GSH-I和GSH-II的性质和这些酶基因的结构进行了深入研究,发现不同来源的GSH-I和GSH-II,其性质、分子结构和相对分子质量均不相同^[1-7]。Wantanabe K^[8]等从大肠杆菌*E. coli* B的细胞提取液中纯化得到 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I),纯化倍数为1400倍,酶活回收率为34.6%。从*E. coli* B中提取的GSH-I,其相对分子质量分别用Sephadex G-150凝胶过滤法测定和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,结果均为55000,表明从*E. coli* B中提取的GSH-I是由一条单一肽链组成。该酶的最适pH值和温度分别为8.5和45℃。Gushima H^[9]等从大肠杆菌*E. coli* B中纯化了谷胱甘肽合成酶(GSH-II),纯化倍数为120倍,酶活回收率为8.4%。纯酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳上为一条带,用Sephadex G-200柱凝胶过滤法测定其相对分子质量为152000,该酶在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上为一条带,相对分子质量为38000。这表明来自*E. coli* B的谷胱甘肽合成酶(GSH-II)由4个相对分子质量为38000的相同亚基组成。该酶的最适pH值和温度分别为8.0和45℃,该酶在pH5.0~7.0的范围内是稳定的,而超过这一温度范围其活力将明显降低。在大肠杆菌细胞中, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I)和谷胱甘肽合成酶(GSH-II)共同组成了谷胱甘肽合成酶系。

谷胱甘肽合成酶系(GSH-I和GSH-II)的活性对细胞中谷胱甘肽的产量有决定性的影响。但是,正常大肠杆菌细胞中的谷胱甘肽合成酶系活性较低。为提高谷胱甘肽产量,Murat^[10]首先将编码GSH-I和GSH-II的基因gsh-I和gsh-II克隆入大肠杆菌中,构建了一株具有高GSH合成活性的重组大肠杆菌,GSH的产量比出发菌提高了10倍。韩国高丽大学^[11]也构建了包含基因gsh-I和gsh-II的杂合质粒pGH501,然后将pGH501克隆到*E. coli*中,构建了重组大肠杆菌*E. coli* WSH-KE1。在此基础上,李华钟等^[12]将pGH501从*E. coli* WSH-KE1中抽提出来,然后转化到野生型大肠杆菌*E. coli* II中,获得了转化子*E. coli* II-1,反应液中的GSH产量可达到5.04 g/L。

尽管许多研究者^[10-14]对重组大肠杆菌生产谷胱甘肽进行了比较深入的研究,但大多数都是集中于基因工程方面的研究,而对有关基因工程菌生产

谷胱甘肽合成酶系的培养条件和产酶条件鲜有报道。作者以重组大肠杆菌*E. coli* II-1为出发菌株,以提高谷胱甘肽合成酶系的活性为研究目标,对*E. coli* II-1的培养条件进行了研究,确定了高产谷胱甘肽合成酶系的摇瓶培养条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

E. coli II-1 无锡轻工大学微生物教研室选育^[12]。

1.2 培养基

1.2.1 大肠杆菌种子培养基(g/L) 葡萄糖5,蛋白胨5,酵母膏2.5, K₂HPO₄·3H₂O 4.0, KH₂PO₄ 1.0, FeCl₃ 0.2, MnCl₂ 0.1, CoCl₂ 0.1, CaCl₂ 0.1, ZnCl₂ 0.02, H₃BO₃ 0.01, NaMoO₄ 0.01, NaCl 1.0, Na₂SeO₃ 0.02, pH 7.2,接种前加氨苄青霉素(Amp)至最终浓度为100 μg/mL。

1.2.2 大肠杆菌摇瓶基本培养基(g/L) 葡萄糖10,蛋白胨5,酵母膏2.5, K₂HPO₄·3H₂O 4.0, KH₂PO₄ 1.0, FeCl₃ 0.2, MnCl₂ 0.1, CoCl₂ 0.1, CaCl₂ 0.1, ZnCl₂ 0.02, H₃BO₃ 0.01, NaMoO₄ 0.01, NaCl 1.0, Na₂SeO₃ 0.02, pH 7.2,接种前加氨苄青霉素(Amp)至最终浓度为100 μg/mL。

1.3 细胞的培养和处理

取一环活化好的斜面种子接入摇瓶基本培养基,在30~40℃恒温培养10~20 h,取4 mL培养液于离心管中,以10000 r/min离心,蒸馏水洗涤,离心,沉淀用10%的甲苯处理30 min,离心,蒸馏水洗涤,离心,沉淀保存于4℃冰箱中备用。

1.4 谷胱甘肽合成酶系活性的测定

谷胱甘肽合成反应的反应液为:L-Glu 60 mmol/L, L-Cys 20 mmol/L, Gly 40 mmol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, ATP 15 mmol/L,磷酸钾缓冲液(pH 7.5)50 mmol/L。将4 mL谷胱甘肽反应液加到经甲苯处理过的大肠杆菌中,40℃反应1 h。将反应液离心取上清液,依据Victor和Jerry^[15]的方法荧光法检测反应液中的GSH。谷胱甘肽合成酶系的活性以该酶系的谷胱甘肽产生活性来表示,其活力单位定义为:在上述反应条件下,每小时生成1 μmol/L GSH的酶量为一个活力单位。

1.5 菌体干重的测定

取发酵液5 mL,以10000 r/min离心10 min,蒸馏水洗涤2次,95℃干燥至恒重后称重。

2 结果与分析

2.1 温度的影响

微生物生长是一系列复杂化学反应的结果,温度会影响菌体的生长速率、生化反应速率、扩散速率、酶系的活性与稳定性、基质的吸收与利用等.选定温度为 27、29、31、33、35、37、39、41 °C 进行试验,结果如图 1 所示,可见发酵温度在 37 °C 时菌体干重较高,为 4.17 g/L;而在 35 °C 时谷胱甘肽合成酶系的活性较高,为 584.8 U/L.

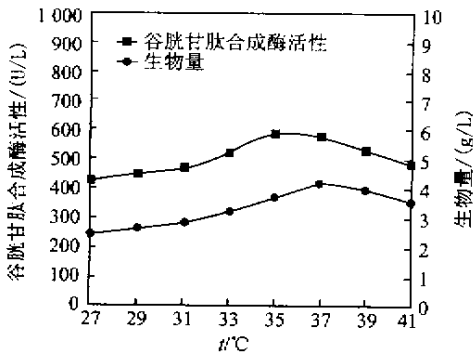


图 1 温度对重组大肠杆菌产酶的影响

Fig.1 Effects of temperature on enzymes production by recombinant *E. coli*

因此,该菌的培养温度可以分为两个阶段,在发酵的前期(培养 0~8h)在 37 °C 培养菌体,而在后期可适当降低温度以增加酶的合成.

2.2 pH 的影响

采用不同初始 pH 值的发酵培养基,比较其对细胞生长和谷胱甘肽合成酶系合成的影响,结果见图 2,发现 pH 对细胞干重和谷胱甘肽合成酶系的影响基本一致,当 pH 为 7.2 时,细胞干重和谷胱甘肽合成酶系的活性达到最大,分别达到 4.32 g/L 和 536.2 U/L.

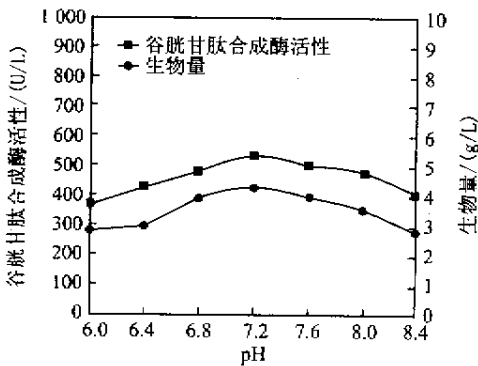


图 2 培养基起始 pH 对重组大肠杆菌产酶的影响

Fig.2 Effects of initial pH of the medium on enzymes production by recombinant *E. coli*

培养基的 pH 将影响培养基中某些营养物的解离和中间代谢产物的解离,从而影响微生物对营养物质的吸收、利用和代谢产物的分泌;培养基的 pH 还将影响酶分子和底物分子的带电状况,从而影响酶的合成,使代谢和细胞膜透性发生变化.因此,培养基的 pH 值太高、太低都不利于菌体生长和产酶.但是,由于在培养过程中不能对摇瓶进行 pH 调节,因此,在培养基中加入了较高浓度的 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 等成份,这些培养基成份的缓冲能力较强,可避免在培养过程中摇瓶内培养基 pH 值的剧烈变化.从图 2 的结果可以看出,培养基的初始 pH 值控制在 7.2 较好.

2.3 溶氧的影响

发酵液中溶氧的高低直接关系到微生物的产酶水平的高低.摇瓶的溶氧与摇瓶装液量和摇床转速有关,因此,作者研究了摇瓶装液量和摇床转速对重组大肠杆菌产酶的影响.结果见图 3、图 4.试验表明,较适的装液量为在 500 mL 的三角瓶中装液 100 mL,摇床转速为 200 r/min.

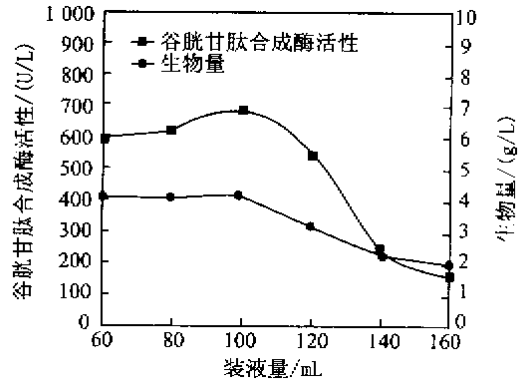


图 3 摇瓶装液量对重组大肠杆菌产酶的影响

Fig.3 Effects of medium volume in shaking flask on enzymes production by recombinant *E. coli*

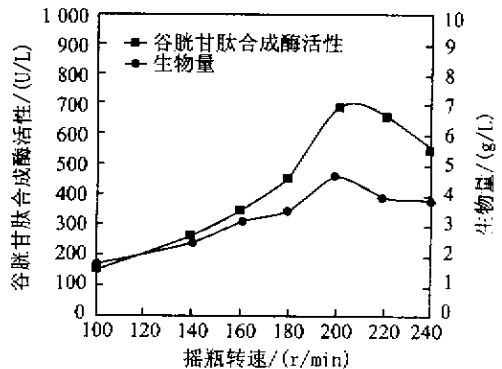


图 4 摇床转速对重组大肠杆菌产酶的影响

Fig.4 Effects of rotational speed on enzymes production by recombinant *E. coli*

2.4 接种量的影响

在其它条件相同的情况下,接种量分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 培养 16 h 之后测定菌体干重和酶活力,结果见图 5。在培养重组大肠杆菌时,在一定范围内,接种量越大,菌体生长越快,酶系的活性也越高。但当接种量为 5%, 6% 和 7% 时,培养 16 h 之后,培养液中的菌体浓度差别不大,酶系的活性甚至有所降低。

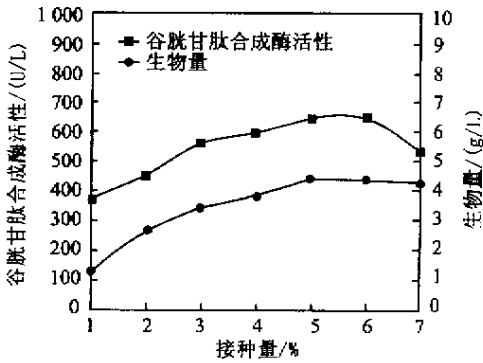


图 5 接种量对重组大肠杆菌产酶的影响

Fig.5 Effects of inoculum size on enzymes production by recombinant *E. coli*

采用稍大的接种量可以缩短菌体生长的迟滞期,明显缩短发酵时间,但太大的接种量会因为带入过多的代谢废物,反而影响菌体的生长。因此,接种量选 5% 即可。

2.5 最佳培养基配方的选择

碳源、氮源和无机盐是大肠杆菌培养过程中最重要的培养基成份,为考察各种培养基成份对谷胱甘肽合成酶系的影响,选出最佳的培养基配方,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验^[16],各个因素水平选取见表 1。

表 1 最佳配方选择试验的因素水平

Tab.1 Factors' level of the experiment of screening the optimal mixture

水平	葡萄糖质量浓度	蛋白胨质量浓度	酵母膏质量浓度
	A(g/L)	B(g/L)	C(g/L)
1	5	2.5	2.5
2	10	5	5
3	15	7.5	7.5

由表 2 可见,因素 A 是高度显著的,因素 B 是显著的。因此,从方差分析的结果来说,只须考虑因

素 A 和因素 B 的水平即可。因此,谷胱甘肽合成酶系摇瓶发酵的最佳配方确定为 $A_2B_2C_1$,即葡萄糖质量浓度为 10 g/L、蛋白胨 5 g/L、酵母膏 2.5 g/L。

表 2 最佳配方选择试验的测定结果

Tab.2 The results of the experiment of screening the optimal mixture

试验号	A	B	C	D	酶系活性/(U/L)
1	1	1	1	1	567.3
2	1	2	2	2	784.7
3	1	3	3	3	483.9
4	2	1	2	3	845.6
5	2	2	3	1	876.5
6	2	3	1	2	784.2
7	3	1	3	2	568.5
8	3	2	1	3	687.7
9	3	3	2	1	698.7
K_1	1835.9	1981.4	2039.2	2142.5	$T = 6297.1$
K_2	2506.3	2348.9	2329	2137.4	$\bar{Y} = 699.7$
K_3	1954.9	1966.8	1928.9	2017.2	
极差	670.4	382.1	400.1	125.3	
偏差平方和	85293.2	31252.2	28470	3352.7	
自由度	2	2	2	2	
均方和	42646.6	15626.1	14235	1676.4	
F	25.439	9.321	8.491		
显著性	*	*	*		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ $F_{0.1}(2, 2) = 9.0$

2.6 摇瓶培养的最佳工艺条件

综合上述实验结果,确定了重组大肠杆菌摇瓶培养的最佳工艺条件为:发酵培养基(g/L) 葡萄糖 10, 蛋白胨 5, 酵母膏 2.5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4.0, KH_2PO_4 1.0, $FeCl_3$ 0.2, $MnCl_2$ 0.1, $CoCl_2$ 0.1, $CaCl_2$ 0.1, $ZnCl_2$ 0.02, H_3BO_3 0.01, $NaMoO_4$ 0.01, $NaCl$ 1.0, Na_2SeO_3 0.02; 发酵起始 pH 值 7.2; 灭菌后加入无菌苄苄青霉素至 100 $\mu g/mL$, 每个三角瓶装液量为 100 mL, 培养前期的温度控制在 37 $^{\circ}C$, 后期将温度降为 35 $^{\circ}C$, 摇床转速 200 r/min; 发酵周期 16 h。在此条件下,重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 的谷胱甘肽合成酶系的活性为 862.3 U/L (3 次验证试验的平均值)。

参考文献：

- [1] ORLOWSKI M , MEISTER A. The γ -glutamyltranspeptidase from rat kidney[J]. **J Biol Chem** , 1974 ,240 :338 ~ 347.
- [2] SEKURA R , MEISTER A. γ -glutamylcysteine synthetase[J]. **J Biol Chem** ,1977 ,252 :2599 ~ 2605.
- [3] JOHNSTONE R B , BLOCH K. The synthesis of glutathione in cell-free pegen liver extract[J]. **J Biol Chem** ,1949 ,179 :493 ~ 494.
- [4] NAKAYAMA R , Studies on glutathione metabolizing enzymes in bacteria[D]. kyoto :Kyoto university ,1984.
- [5] SNOKE J E. Isolation and properties of yeast glutathione synthetase[J]. **J Biol Chem** ,1955 ,213 :813 ~ 824.
- [6] SAMUELS P J. The assimilation of amino acids by bacteria[J]. **Biochem J** ,1953 ,55 :441 ~ 444.
- [7] MOOZ E D. MEISTER ,A. Tripeptid(glutathione) synthetase purification , properties and mechanism of action[J]. **Biochemistry** ,1967 ,6 :1722 ~ 1734.
- [8] WATANABE K , MURATA K , KIMURA A. Purification and characterization of γ -glutamylcysteine synthetase of *Escherichia coli* B[J]. **Agric Biol Chem** , 1986 ,50 :1925 ~ 1930.
- [9] GUSHIMA H , MIYA T , MURATA A. Purification and characterization of glutathione synthetase from *Escherichia coli* B [J]. **J Appl Biochem** ,1983 ,5 :210 ~ 218.
- [10] MURATA K , KIMURA A. Cloning of a gene responsible for the biosynthesis of glutathione in *Escherichia coli* B[J]. **Appl Environ Microbiol** ,1982 ,44 :1444 ~ 1448.
- [11] 南容硕. Molecular Breeding of Glutathione Producing Bacterial Strains[D]. 汉城 :高丽大学 ,1990.
- [12] 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 :18 (6) :56 ~ 59.
- [13] WATANABE K , YAMATA Y , MURATA K , *et al.* Glutathione production by *Escherichia coli* cells with hybrid plasmid containing tandemly polymerized genes for glutathione synthetase[J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1986 ,24 :375 ~ 378.
- [14] GUSHIMA H , MIYA T , MURATA K. Construction of glutathione-producing strains of *Escherichia coli* B by recombinant DNA techniques. **J Appl Biochem** ,1983 ,5 :43 ~ 52.
- [15] VICTOR H C , JERRY L. A fluorometric assay of glutathione[J]. **Analytical Biochemistry** . 1966 ,14 :434 ~ 440.
- [16] 庄楚强 , 吴亚森. 应用数理统计基础[M]. 华南理工大学出版社 , 1991.

(责任编辑 朱明)