

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  $\gamma$ -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<sup>[1-7]</sup>. Wantanabe K<sup>[8]</sup>等从大肠杆菌 *E. coli* B 的细胞提取液中纯化得到  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I), 纯化倍数为 1 400 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 55 000. 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 °C. Gushima H<sup>[9]</sup>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 152 000, 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 38 000. 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 38 000 的相同亚基组成. 该酶的最适 pH 值和温度分别为 8.0 和 45 °C. 该酶在 pH 5.0~7.0 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,  $\gamma$ -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<sup>[10]</sup>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<sup>[11]</sup>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<sup>[12]</sup>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<sup>[10-14]</sup>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<sup>[12]</sup>.

### 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, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 4.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, FeCl<sub>3</sub> 0.2, MnCl<sub>2</sub> 0.1, CoCl<sub>2</sub> 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, ZnCl<sub>2</sub> 0.02, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01, NaMoO<sub>4</sub> 0.01, NaCl 1.0, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 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, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 4.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, FeCl<sub>3</sub> 0.2, MnCl<sub>2</sub> 0.1, CoCl<sub>2</sub> 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, ZnCl<sub>2</sub> 0.02, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01, NaMoO<sub>4</sub> 0.01, NaCl 1.0, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 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 °C 恒温培养 10~20 h, 取 4 mL 培养液于离心管中, 以 10 000 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 °C 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, MgCl<sub>2</sub> 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 °C 反应 1 h. 将反应液离心取上清液, 依据 Victor 和 Jerry<sup>[15]</sup>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 10 000 r/min 离心 10 min, 蒸馏水洗涤 2 次, 95 °C 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.

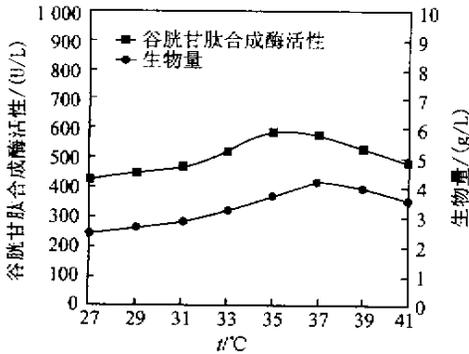


图 1 温度对重组大肠杆菌产酶的影响

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.

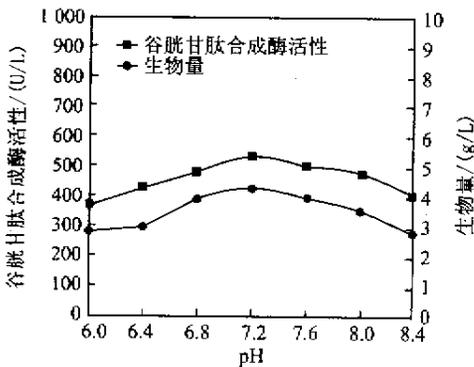


图 2 培养基起始 pH 对重组大肠杆菌产酶的影响

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.

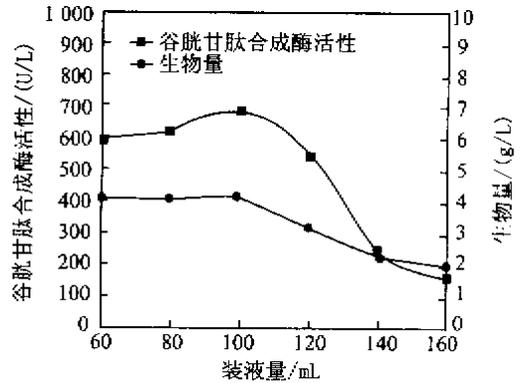


图 3 摇瓶装液量对重组大肠杆菌产酶的影响

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

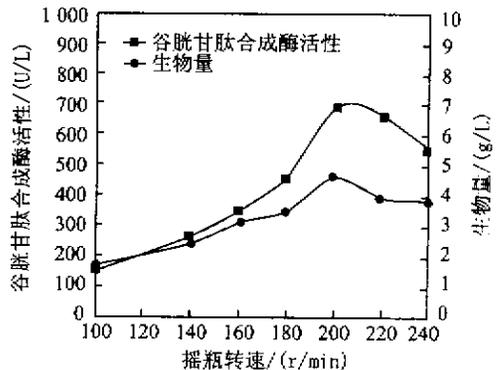


图 4 摇床转速对重组大肠杆菌产酶的影响

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。

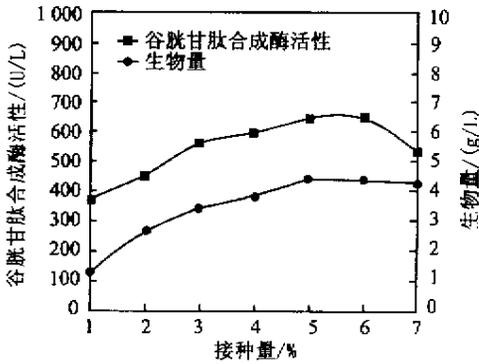


图 5 接种量对重组大肠杆菌产酶的影响

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<sup>[16]</sup>,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; 灭菌后加入无菌苈苈青霉素至 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  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from rat kidney[ J ]. **J Biol Chem** , 1974 ,240 :338 ~ 347.
- [ 2 ] SEKURA R , MEISTER A.  $\gamma$ -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. Tripeptide( 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  $\gamma$ -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)