

文章编号: 1673-1689(2010)02-0258-07

提高耦合系统 TP 再生效率促进 谷胱甘肽合成的研究

林 军^{1,2}, 廖鲜艳^{* 1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈 坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 利用重组 *Escherichia coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 和 *Saccharomyces cerevisiae* WSH2 构建了一个生物合成谷胱甘肽(GSH)的种间耦合系统。在该耦合系统中,一方面,大肠杆菌腺苷脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶的缺失完全切断了 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 中不可逆转化腺苷(Ado)生成次黄嘌呤(Hx)的途径;另一方面,利用脯氨酸限制性培养降低了酿酒酵母 WSH2 中 DE 的活性,进一步降低了耦合系统中从 Ado 到 Hx 的不可逆转化。以上两方面大大降低了耦合系统中从 Ado 到 Hx 的不可逆转化,从而保证更多的底物 Ado 被 *S. cerevisiae* WSH2 用于再生 TP,最终耦合系统中 TP 再生的效率大大提高。反应 6 h 后,该耦合系统 GSH 的合成量达到 13.68 mmol/L,为对照的 5.14 倍。

关键词: 谷胱甘肽;生物合成;耦合系统;大肠杆菌;酿酒酵母

中图分类号: Q 493.8

文献标识码:

Enhancement of Glutathione Synthesis by Improving ATP-Regenerating Efficiency in the Coupled System

LIN Jun^{1,2}, LI O Xian-yan^{* 1,2}, DU Guo-cheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: coupled system used for the biosynthesis of glutathione (GSH) was constructed with *Escherichia coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) and *Saccharomyces cerevisiae* WSH2. On one hand, the irreversible transformation from adenosine (Ado) to hypoxanthine (Hx) in *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) was completely blocked by the disruption of adenosine deaminase (AdoD) and adenine deaminase (DE). On the other hand, the activity of DE in *S. cerevisiae* WSH2 decreased greatly when it was cultured in proline minimal medium. Therefore, the transformation from Ado into Hx decreased significantly, and more Ado was used to regenerate TP by *S. cerevisiae* WSH2. At last, TP-regenerating efficiency was improved, and GSH production reached 13.68

收稿日期: 2009-04-21

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006 ZD102313); 国家自然科学基金项目 (30800008); 江苏省自然科学基金项目 (BK2008096)。

作者简介: 林军 (1979-), 男, 山东荣成人, 发酵工程博士研究生。

* 通信作者: 廖鲜艳 (1975-), 女, 湖南衡阳人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵工程和生化工程方面的研究。

Email: xy.liao@jiangnan.edu.cn

mmol/L, which was 5.14 fold of the control.

Key words: glutathione, biosynthesis, coupled system, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

谷胱甘肽 (GSH) 是广泛存在于动、植物及微生物细胞内的一种小分子巯基化合物,具有保护细胞免受重金属侵害、维持胞内氧化还原平衡和辅助蛋白质复性等重要的生理功能^[1-2]。近年来, GSH 广泛应用于医药、食品和化妆品等工业,需求量日益增加,我国 GSH 工业化生产呈空白状态^[3-4]。

谷胱甘肽在生物体内是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (EC 6.3.2.2, GSH I) 和 GSH 合成酶 (EC 6.3.2.3, GSH II) 在 TP 存在的条件下,催化 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸进行序贯反应而形成的^[5]。因此,满足 TP 的有效供给是实现酶法合成 GSH 的一个必需条件。由于 TP 价格昂贵,直接添加 TP 大大增加了酶法合成 GSH 的成本;同时,高浓度的 TP 及其代谢产物 DP 也抑制 GSH 合成酶的活性,由此导致 GSH 的酶法生产至今未能实现商业化。但是,这些问题可以通过在酶法合成 GSH 的过程中构建一个 TP 再生的系统来解决^[6]。TP 再生系统可定义为一个消耗 TP 的酶催化体系和一个生物合成 TP 的体系所构成的耦合系统^[7]。

在前期的研究中,构建了一系列由重组大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 组成的 TP 再生系统用于生物合成 GSH^[8-10]。一方面,酿酒酵母中的糖酵解途径以腺苷 (do) 为底物合成 TP, do 在腺苷激酶和腺苷酸激酶的催化下生成 DP, DP 进一步通过底物磷酸化转化为 TP,此过程需要消耗葡萄糖^[11]。另一方面,消耗酿酒酵母合成的 TP,高效表达 GSH 合成酶系的重组大肠杆菌利用 3 种前体氨基酸合成 GSH,此过程中 TP 的代谢产物 DP 和 do 可再次被酿酒酵母用来合成 TP。然而,对耦合系统中嘌呤核苷酸代谢分析结果表明,重组大肠杆菌中腺苷脱氨酶 (EC 3.5.4.4, D) 和腺嘌呤脱氨酶 (EC 3.5.4.2, DE) 迅速将底物 do 不可逆转化为次黄嘌呤 (Hx),导致酿酒酵母不能获得合成 TP 的前体腺嘌呤核苷 (酸),从而无法实现耦合系统的 TP 再生,这是耦合系统 TP 再生效率低下的根本原因^[8-9]。此外,酿酒酵母中存在的 DE 加剧了从 do 到 Hx 的不可逆转化,见图 1。因此,如果能采取合适的手段消除大肠杆菌中的

D 和 DE 以及酿酒酵母中的 DE,那么耦合系统中从 do 向 Hx 的不可逆转化途径将被切断,从而保证更多的底物 do 被酿酒酵母用来再生 TP,那么耦合系统的 TP 再生效率将明显提高, GSH 的合成量也将相应增加。

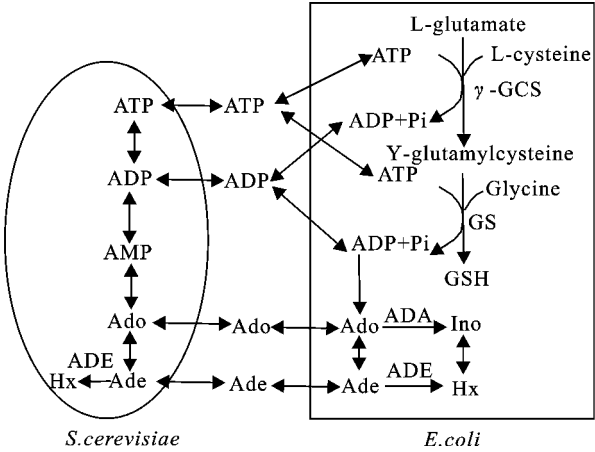


图 1 用于 GSH 合成的重组大肠杆菌和酿酒酵母耦合 ATP 再生系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of GSH production and ATP regeneration by the coupled system

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 酿酒酵母 *S. cerevisiae* WSH2: 作者所在研究室保存菌株; 质粒 pBV03 (包含两拷贝的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因和单拷贝的 GSH 合成酶基因): 由作者所在实验室廖鲜艳博士构建^[12]; 大肠杆菌 *E. coli* BW25113、*E. coli* JW1615、*E. coli* JW3640 和质粒 pKD46: 购自美国耶鲁大学大肠杆菌保藏中心^[13]; 重组大肠杆菌 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03): 作者构建。

1.1.2 试剂 三磷酸腺苷 (TP)、二磷酸腺苷 (DP)、单磷酸腺苷 (MP)、腺苷 (do)、腺嘌呤 (de)、肌苷 (Ino)、和次黄嘌呤 (Hx): Sigma-lldrich 上海公司产品; GSH 还原酶、N DPH 和 5, 5'-二硫双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 等: Sigma-lldrich 上海公司产品; 脯氨酸 (Proline)、Taq DN 聚合酶、卡那霉素、氨苄青霉素、引物、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒: Sangon 上海公司产品; 酵母粉和胰蛋白胨: Oxoid 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 构建腺苷脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶双基因突变株 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 参照 Datsenko 和 Wanner^[14] 的方法, 敲除腺苷脱氨酶 (D) 突变株 (*E. coli* JW1615) 中的腺嘌呤脱氨酶 (DE) 基因以构建 *add/ade* 双基因缺失菌株 (*E. coli* $\Delta add/ade$)。首先将表达 Red 重组酶的质粒 pKD46 导入 *E. coli* JW1615, 在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB (酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L) 固体平板上筛选转化子 (培养温度为 30 °C)。然后制备用于电转化的感受态细胞, 当菌体 OD₆₀₀ 达到 0.2 时, 加入 1 mmol/L L-阿拉伯糖诱导表达 Red 重组酶, 诱导时间不少于 1 h, OD₆₀₀ 约为 0.6 时收获菌体, 制备感受态细胞。利用电转化法将用于同源重组的片段导入感受态细胞内。用于同源重组的片段是以 1 (5'-G GG TTT-GCGGGTTC C -3') 和 2 (5'-TGGCG T-TC GGGCTTT C-3') 为引物, 以大肠杆菌 DE 突变株 *E. coli* JW3640 的染色体基因为模板, 获得含有卡那霉素抗性的 PCR 片段。然后, 迅速向电转后的感受态细胞中加入 1 mL LB (酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0) 培养基, 30 °C 培养 1 h 后升温至 42 °C 培养 1 h。最后, 取适量培养后的菌液涂布于含有 25 mg/L 卡那霉素的 LB 固体平板。次日, 通过点种试验选择具有卡那霉素抗性但不具有氨苄青霉素抗性的转化子, 以 1 和 2 为引物, 通过 PCR 片段的大小验证腺嘌呤脱氨酶基因的缺失。最后, 通过电转化将质粒 pBV03 导入重组大肠杆菌 $\Delta add/ade$ 中用于 GSH 的生物合成。

1.2.2 重组大肠杆菌的培养 从固体 LB (酵母粉 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂 2 g/dL, pH 7.0) 培养基上挑取单菌落接种至装有 20 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 下培养 10~14 h。将培养好的种子液按体积分数 1% 的接种量接种至装有 100 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中进行发酵培养, 发酵温度 30 °C, 摇床转速 200 r/min, 当菌体培养至对数生长中后期时, 迅速转至 42 °C 摇床, 诱导培养 3~5 h。发酵液经 4800 g 离心后, 再用冰冷的 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液洗涤 2 次, 得到的湿菌体在 -80 °C 下保存, 以用于后续生物合成 GSH 的研究。各培养基中根据需要添加 100 mg/L 氨苄青霉素。

1.2.3 酿酒酵母 WSH2 的培养 接种后的斜面 (8°P 麦汁, 琼脂 2 g/dL, pH 5.5) 置于 30 °C 恒温培养箱中培养 2 d, 冰箱冷藏室中保藏, 每月至少转

接一次。将斜面种子于 30 °C 活化 3~4 h, 取一环菌体接种至装有 50 mL 种子培养基 (葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, pH 5.5) 的 500 mL 三角瓶中培养, 摇床转速 200 r/min, 温度 30 °C, 培养时间 20 h。将培养好的种子培养液按照体积分数 10% 的接种量接种至装有 50 mL 发酵培养基 (葡萄糖 25 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, pH 5.5) 的 500 mL 三角瓶中进行发酵培养, 发酵 18 h, 发酵温度 30 °C, 摇床转速 200 r/min。发酵液经 3 000 g 离心后再用 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液洗涤 2 次, 得到的湿酵母细胞在 -80 °C 下保藏, 备用。脯氨酸基本培养基参照文献[15], 脯氨酸的添加量为 2 g/L。

1.2.4 重组大肠杆菌对外加 do 和 TP 的代谢实验 称取 200 mg 新鲜培养的大肠杆菌菌体, 加入 2 mL 含有 5 mmol/L do (或 TP) 的磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 加入体积分数 0.5% 的甲苯进行通透性处理, 37 °C、150 r/min 振荡反应 20 min (TP 代谢实验时间为 2 h)。反应完成后, 将反应液置于沸水浴中加热 10 min 终止反应, 10 000 r/min 离心, 得到的上清液稀释后用作腺嘌呤核苷酸类物质的分析检测。

1.2.5 酿酒酵母 WSH2 对外加 do 和 de 的代谢实验 称取 400 mg 新鲜培养的酿酒酵母菌体, 加入 2 mL 含有 10 mmol/L do (或 de), 400 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L do, 1 mmol/L MP, 0.1 mmol/L N D, 30 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O 的 150 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 加入体积分数 0.5% 的甲苯进行通透性处理, 37 °C、150 r/min 振荡反应 2 h。反应完成后将反应液置于沸水浴中加热 10 min 终止反应, 10 000 r/min 离心, 上清液经稀释后用作腺嘌呤核苷酸类物质的分析检测。

1.2.6 耦合系统合成 GSH 的反应体系 耦合系统基础反应液组成 (mmol/L): 葡萄糖 400, do 10, MP 1, N D 0.1, MgCl₂ · 6H₂O 30, L-Glu 60, L-Cys 25, Gly 25, 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 150, 用 2 mol/L KOH 溶液调节 pH 7.0。称取解冻的重组大肠杆菌湿菌体 (反应体系中湿菌体质量浓度为 200 mg/mL) 和解冻的酵母湿菌体 (反应体系中湿菌体质量浓度为 200 mg/mL), 加入耦合系统基础反应液, 加入体积分数 0.5% 的甲苯, 37 °C、150 r/min 下振荡反应 6 h, 样品于沸水浴中加热终止反应, 离心收集上清液, 将上清液稀释一定的倍数, 测定上清液中 GSH 和 TP 及其相关物质。

1.2.7 谷胱甘肽测定 采用 DTNB (5, 5'-二硫双(2-硝基苯甲酸))-GSH 还原酶循环法^[16]。在 2 mL 比色皿中顺序加入 100 μ L、6 mmol/L DTNB, 700 μ L、0.3 mmol/L N DPH 和 200 μ L 适当浓度的样品, 室温下加入 100 μ L、50 U/mL 谷胱甘肽还原酶用以启动测定反应, 在 412 nm 下, 测定反应体系的起始 OD 值以及 90 s 后的 OD 值, 根据 OD 值的变化速率与 GSH 标样质量浓度关系计算出样品中的 GSH 质量浓度。

1.2.8 TP 及其相关物质测定 采用高效液相色谱测定 (HPLC)^[17]。色谱条件如下: 柱子为 Hypersil ODS, 4.6 mm $\times$ 200 mm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测器 UV 254 nm; 流动相 为 0.1 mmol/L KH_2PO_4 , 2 mol/L KOH 调 pH 7.0。流动相 B 为 100% CH_3OH , 梯度洗脱为: 0~5 min, 100% , 流速 1 mL/min; 5~25 min, 90% , 10% B, 流速 1.5 mL/min。

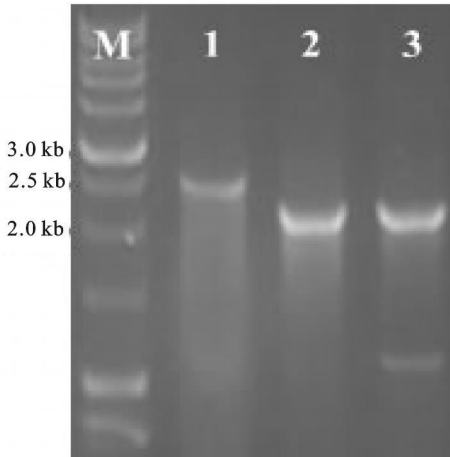
2 结果与讨论

2.1 构建重组大肠杆菌 $\Delta add/ade$ (pBV03)

将用于同源重组的片段导入含有质粒 pKD46 的 *E. coli* JW1615 感受态细胞中, 在 L-阿拉伯糖诱导产生的 Red 重组酶的作用下, *E. coli* JW1615 染色体中的 *ade* 基因与重组片段发生同源重组, 从而被卡那霉素抗性基因替代。以 1 和 2 为引物对, 以 *E. coli* JW1615 (*add*⁻)、*E. coli* JW3640 (*ade*⁻) 和 *E. coli* $\Delta add/ade$ 的染色体基因为模板进行 PCR 时, 它们的 PCR 片段长度依次为 2.6、2.2、2.2 kb。电泳结果表明, *E. coli* JW1615 染色体中的 *ade* 基因已成功被用于同源重组的卡那霉素抗性基因取代。同时, PCR 产物经 Sangon (上海) 测序后表明, 其序列与设计的一致, 由此确证重组 *E. coli* $\Delta add/ade$ 构建成功, 见图 2。

2.2 重组大肠杆菌 $\Delta add/ade$ (pBV03) 对外加 Ado 和 ATP 的代谢

作者前期的研究^[9]表明, 腺苷脱氨酶 (D) 的缺失可以切断大肠杆菌将腺苷 (do) 经肌苷 (Ino) 向次黄嘌呤 (Hx) 不可逆转化的途径, 但是由于从 do 经腺嘌呤 (de) 向 Hx 转化途径的存在, 导致 do 依然可以转化为 Hx。腺苷脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶 (DE) 的同时缺失将有可能完全切断大肠杆菌中从 do 到 Hx 的转化途径。为此检测了 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 对 5 mmol/L 外加 do 的代谢产物。从图 3 可以看出, 当以 do 为底物时, 反应 20 min 后, 仍有 48.6% 的 do 未被转



M. GeneRuler™ 1 kb DN ladder; 1. *E. coli* JW1615 (*add*⁻); 2. *E. coli* JW3640 (*ade*⁻); 3. *E. coli* $\Delta add/ade$

图 2 大肠杆菌 $\Delta add/ade$ 双突变株的 PCR 验证

Fig. 2 PCR verification of *E. coli* $\Delta add/ade$

化, Ado 的主要转化产物为 ADP 和 Ade, 反应体系中未检测到肌苷 (Ino) 和 Hx 的生成。与之相比, 大肠杆菌 BW25113 在 20 min 内可以将 62.9% 的 do 不可逆转化为 Hx^[9]。在用于生物合成 GSH 的种间耦合系统中, 大肠杆菌的主要功能为消耗酿酒酵母合成的 TP, 并利用其自身表达的 GSH 合成酶催化 3 种前体氨基酸来生物合成 GSH。因此, 进一步检测了 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 对 5 mmol/L 外加 TP 的代谢情况。从图 3 可以看出, 反应 2 h 后, TP 的主要代谢产物为 DP、MP、de 和 do, 未生成 Ino 和 Hx。以上结果表明, 在 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 中, 从 do 到 Hx 的不可逆转化完全被切断, 大肠杆菌利用 TP 后的代谢产物均为可被酿酒酵母用来再生 TP 的底物。因此, 以此菌株构建种间耦合系统, 其 TP 的再生效率将明显提高。

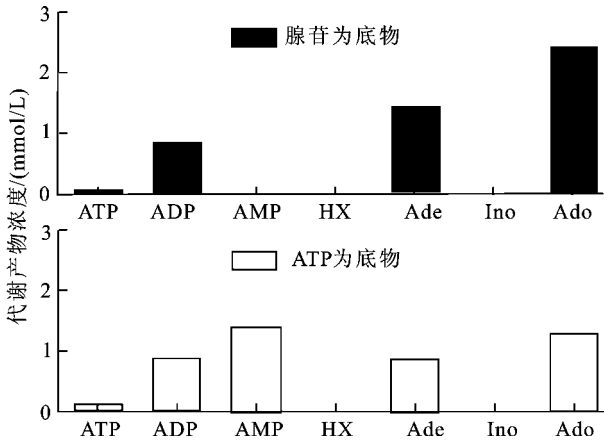


图 3 重组大肠杆菌 $\Delta add/ade$ (pBV03) 对 Ado 和 ATP 的代谢

Fig. 3 Ado and ATP metabolisms by *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03)

2 3 酿酒酵母 WSH2 对外加 Ado 和 Ade 的代谢

大肠杆菌 D 和 DE 的缺失完全消除了其自身将 do (或 TP) 不可逆转化为 Hx 的能力, *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 利用 TP 后的主要代谢产物为 de 和 do。在此基础上,进一步研究了作为种间耦合系统组成之一的 *S. cerevisiae* WSH2 对 do 和 de 的代谢情况。从图 4 可以看出,反应 2 h 后,约 88% 的底物 do 被 *S. cerevisiae* WSH 利用并转化为 MP、DP 和 TP,反应体系中检测不到 Ino 和 Hx 的生成。由此可知,虽然有少量关于 *S. cerevisiae* WSH2 中存在 D 的报道^[18],但是本研究所构建的反应体系中 D 的活性极低,其对 do 的降解作用可以忽略,这一点与 Deeley^[19] 的研究结果一致。此外,在反应过程中也未检测到 de 的生成,这说明 *S. cerevisiae* WSH2 并不具备将底物 do 转化为 de 的代谢途径。然而,当以 de 为底物反应 2 h 后,反应体系中除了检测到 TP、DP 和 MP 外,还检测到 Hx (1.97 mmol/L) 和 Ino (0.67 mmol/L),约 20% 的 de 不可逆转化为 Hx,由此确证了酿酒酵母中存在 DE。综上所述,与大肠杆菌类似,酿酒酵母中也存在 DE,其催化 de 不可逆转化为 Hx,但是,酿酒酵母中 D 的活性极低,其对 do 的降解可以忽略。

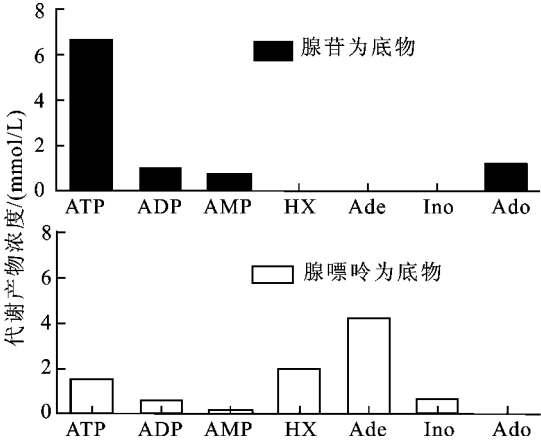


图 4 酿酒酵母 WSH2 对 Ado 和 Ade 的代谢

Fig. 4 Ado and Ade metabolisms by *S. cerevisiae* WSH2

尽管 *S. cerevisiae* WSH2 不具备将 do 转化为 de 的能力,但是重组 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 可以催化 do 生成 de,此时,酿酒酵母中的 DE 便可催化 de 不可逆转化为 Hx,从而减少了可以用于再生 TP 的底物 do 和 de。因此,在重组 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 和 *S. cerevisiae* WSH2 构建的生物合成 GSH 的耦合系统中,如果可以消除或抑制酿酒酵母中 DE 对 de 的降解作用,那么将有更多的 do 和 de 可用

来再生 TP,耦合系统的 TP 再生效率将进一步提高,GSH 的产量也会相应增加。Deeley^[19] 的研究表明,生长在脯氨酸为惟一氮源的基本培养基中的酿酒酵母,其 D 的活性比生长于完全培养基中的酿酒酵母降低了约 7 倍。据此,作者采用培养于脯氨酸基本培养基中的 *S. cerevisiae* WSH2 和重组 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 构建新的耦合系统,并考察了该耦合系统中的 TP 代谢情况。从图 5 可以看出,反应 6 h 后,其 Hx 的生成量比对照 (生长于完全培养基中的 *S. cerevisiae* WSH2 组成的耦合系统) 低 46.7%,而 de 的量要高 162.1%。结果表明,抑制酿酒酵母中腺嘌呤脱氨酶活性可以明显降低耦合系统中从 de 到 Hx 的不可逆转化。

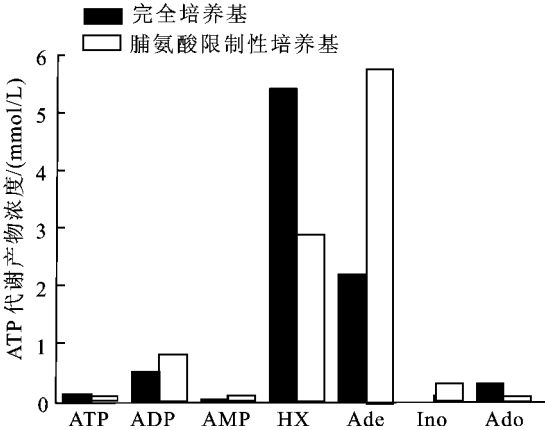


图 5 生长于完全培养基和脯氨酸基本培养基的 *S. cerevisiae* WSH2 中 ATP 代谢的比较

Fig. 5 Comparison of ATP metabolism of *S. cerevisiae* WSH2 cultured in the complete medium and the proline minimal medium

2 4 耦合系统合成 GSH 能力的比较

从图 6 可以看出,反应 6 h 后,由 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 和 *S. cerevisiae* WSH2 组成的耦合系统合成 GSH 的量为 10.95 mmol/L,与 *E. coli* BW25113 (pBV03) 和 *S. cerevisiae* WSH2 组成的耦合系统相比,提高了 3.12 倍。众所周知,每合成 1 mol/L GSH 需要消耗 2 mol/L TP,因此要合成 10.95 mmol/L GSH 至少需要消耗 21.90 mmol/L TP,这远高于起始添加的 10 mmol/L do 可合成的 TP。由此可知,在 *E. coli* $\Delta add/ade$ (pBV03) 和 *S. cerevisiae* WSH2 组成的耦合系统中,TP 再生反应得以建立。该耦合系统中 TP 再生效率和 GSH 产量的提高是由于大肠杆菌 D 和 DE 的缺失切断了从 do 到 Hx 的不可逆转化途径,从而保证有更多的底物 do 和 de 用于再生 TP。在此基础上,利用脯氨酸限制性培养来降低 *S. cerevisiae* WSH2 中腺嘌呤脱氨酶活

性,从而进一步降低了底物 do 经 de 到 Hx 的降解,进而增强了耦合系统中 TP 再生的效率,由此低 DE 活性的酿酒酵母和 *E. coli* Δ add/ade (pBV03) 组成的耦合系统在 6 h 内合成 13.68 mmol/L GSH, 相比于完全培养基培养的 *S. cerevisiae* WSH2 构建的耦合系统提高了 24.9%, 为初始耦合系统的 5.14 倍。

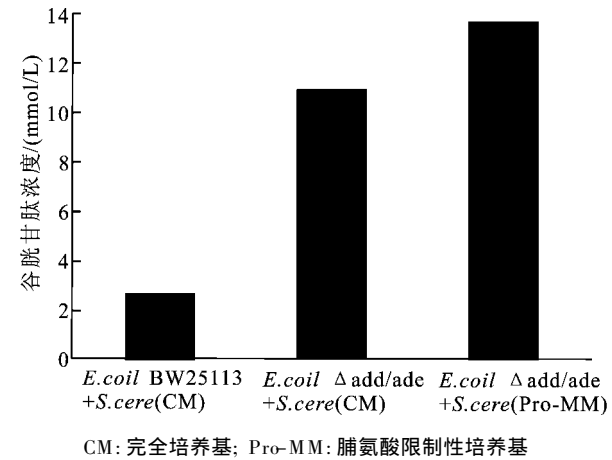


图 6 耦合系统合成 GSH 的能力比较

Fig. 6 Comparison of GSH production by the coupled system

3 结 语

TP 的有效供给是实现酶法合成 GSH 的必要条件之一。在由重组大肠杆菌和酿酒酵母组成的耦合系统中,底物 do 被不可逆转化为 Hx, 从而导致酿酒酵母缺乏可用来合成 TP 的底物, 这是耦合系统无法高效运行的根本原因。作者通过基因工程的手段敲除了大肠杆菌中腺苷脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶的基因, 并且利用脯氨酸限制性培养来降低酿酒酵母中的腺嘌呤脱氨酶活性, 从而大大降低了耦合系统中从 do 到 Hx 的不可逆转化, 进而促使更多的底物 do 被用于再生 TP, 最终耦合系统中 TP 再生的效率大大提高, GSH 合成量也相应增加。

参考文献(References):

[1] Carme Harel O, Storz G. Roles of the glutathione and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress [J]. **Annual Review of Microbiology**, 2000, 54: 439- 461.

[2] Pastore , Federici G, Bertini E, et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification[J]. **Clinica Chimica Acta**, 2003, 333(1): 19- 39.

[3] Li Y, Wei GY, Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004, 66(3): 233- 242.

[4] 陈坚, 卫功元, 李寅, 等. 微生物发酵法生产谷胱甘肽[J]. 食品与生物技术学报, 2004, 23(5): 104- 110.

CHEN Jian, WEI Gong-yuan, LI Yin, et al. Progress in glutathione production by microbial fermentation [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2004, 23(5): 104- 110. (in Chinese)

[5] Bloch K. The synthesis of glutathione in isolated liver [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1949, 179(3): 1245- 1254.

[6] Iwamoto S, Motomura K, Shinoda Y, et al. Use of an *Escherichia coli* recombinant producing thermostable polyphosphate kinase as an TP regenerator to produce fructose 1, 6-diphosphate[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(17): 5676- 5678.

[7] Murata K, Tani K, Kato J, et al. Glutathione production coupled with an TP regeneration system [J]. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 1980, 10(1- 2): 11- 21.

[8] Liao X Y, Deng T N, Zhu Y, et al. Enhancement of glutathione production by altering adenosine metabolism of *Escherichia coli* in a coupled TP regeneration system with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2008, 104(2): 345- 352.

[9] Lin J, Liao X Y, Du G C, et al. Enhancement of glutathione production in a coupled system of adenosine deaminase-deficient recombinant *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 44(5): 269- 273.

[10] 李寅, 李华钟, 林金萍, 等. 生物合成谷胱甘肽种间耦合 TP 再生系统的构建[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 191-

197.

LI Yin, LI Hua-zhong, LIN Ji-ping, et al. Biosynthesis of glutathione: construction of TP regeneration system between *E. coli* and *S. cerevisiae*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2001, 41(2): 191- 197. (in Chinese)

[11] 廖鲜艳, 王芸, 朱至, 等. 面包酵母生物合成 TP 的影响因素及机理初探[J]. **食品与生物技术学报**, 2007, 26(6): 52 - 57.

LI O Xian-yan, W NG Yun, ZHU Zhi, et al. Factors and mechanism of TP biosynthesis by the cells of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(6): 52- 57. (in Chinese)

[12] Liao X Y, Shen W, Chen J, et al. Improved glutathione production by gene expression in *Escherichia coli*[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2006, 43(2): 211- 214.

[13] Baba T, Ira T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. **Molecular Systems Biology**, 2006, 2: 8- 9.

[14] Datsenko K , Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000, 97(12): 6640- 6645.

[15] Sherman F, Fink G R, Hicks J B. Methods in yeast genetics: laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor, 1982.

[16] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues [J]. **Analytical Biochemistry**, 1969, 27: 502- 522.

[17] Veciana-Nogues M T, Izquierdo-Pulido M, Vida-Carou M C. Determination of TP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC[J]. **Food Chemistry**, 1997, 59(3): 467- 472.

[18] Marmocchi F, Lupidi G, Venardi G, et al. Adenosine-deaminase from *Saccharomyces cerevisiae* purification and characterization[J]. **Biochemistry International**, 1987, 14(3): 569- 580.

[19] Deeley M C. Adenine deaminase and adenine utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1992, 174(10): 3102- 3110.

(责任编辑: 李春丽)

《江南大学学报 (自然科学版) 》 征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版) 》(双月刊) 是由教育部主管、江南大学(国家“211 工程”重点建设高校) 主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品系统设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告, 以及反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文, 同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的专家、学者, 在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为 4 开本, 128 页, 每册订价 8. 00 元; 全年共 6 期, 48. 00 元; 本刊邮发代号: 28- 189, 全国各地邮局均可订阅, 亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

邮编: 214122
电子邮箱: xbzrkx@ jiangnan. edu. cn
地址: 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
电话: 0510- 85913519

《江南大学学报 (自然科学版) 》编辑部