

具有高谷胱甘肽合成活性重组大肠杆菌 的构建及合成反应过程^{*}

李华钟¹ 李 寅¹ 林金萍² 陈 坚^{1* * *}

(¹ 无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036) (² 华东理工大学生物工程学院 上海 200371)

摘 要 :以野生型大肠杆菌 *E. coli* II 为宿主细胞 ,转化带有编码谷胱甘肽合成酶系的基因 *gsh* I 和 *gsh* II 的质粒 pGH501 获得了一株谷胱甘肽合成活性、质粒稳定性和传代稳定性俱佳 ,并且能够重复使用的重组大肠杆菌 *E. coli* II-1。该菌株经过甲苯处理后 ,能够在胞外积累 4g/L 左右的谷胱甘肽(GSH)。在合成反应体系中 ,提高 L-谷氨酸浓度可促进 GSH 合成 ,但 L-半胱氨酸浓度增大到 20mmol/L 后会抑制 GSH 的合成。根据 GSH 合成反应中能量辅因子的变化情况 ,提出 *E. coli* II-1 细胞控制的 GSH 合成反应机理 :由谷胱甘肽合成酶(GSH-II)控制的第二步反应的能量供体是 ADP 而非 ATP ,该反应是整个 GSH 合成反应的限速步骤 ,高浓度 ADP 可能会抑制 GSH-II 的活性。在 GSH 合成反应体系中添加 100mmol/L 的 L-丝氨酸-硼酸钾混合物 ,可以有效地防止 GSH 的进一步降解 ,反应 3 h 后 ,GSH 产量达到 23.0mmol/L(约 7.1g/L)。

关键词 :谷胱甘肽 ,重组大肠杆菌 ,构建 ,生物合成 ,反应机理

中图分类号 :TQ464.7 **文献标识码** :A **文章编号** :1001-6209(2001)01-0016-09

谷胱甘肽(GSH)由于具有解毒、抗衰老和抗氧化等重要的生理功能 ,故而在医药和食品工业中的应用前景十分广阔^[1-3]。

Bloch^[4]最早证实细胞内的 GSH 是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I ,EC 6.3.2.2)与谷胱甘肽合成酶(GSH-II ,EC 6.3.2.3)在 ATP 存在下催化 L-谷氨酸(Glu)、L-半胱氨酸(Cys)和甘氨酸(Gly)的一个序贯反应合成的。因此 ,要实现 GSH 的高效合成 ,GSH 合成酶系的高活性和 ATP 的有效供给是两个必须满足的条件。作者曾经报道过重组大肠杆菌 WSH-KE1 以葡萄糖为底物在胞内积累 GSH 的研究结果^[5]。虽然可以实现该菌株的高密度培养^[6] ,但由于质粒的不稳定性 ,使该菌株在高密度培养过程中胞内 GSH 合成能力明显下降^[7]。

在经过细胞通透性处理之后 ,重组大肠杆菌 WSH-KE1 能够以 L-Glu、L-Cys 和 Gly 为底物 ,在胞外积累 1 g/L 左右的 GSH^[8]。然而 ,在该菌株中 ,质粒稳定性极差^[9]。考虑到工程菌中外来基因的表达既受基因本身的影响 ,也受宿主细胞遗传及生理特性的影响 ,为此 ,作者改变宿主细胞 ,试图构建一株 GSH 合成活性和质粒稳定性俱佳的重组大肠杆菌。在此基础上 ,本文对新构建菌株生物合成 GSH 的反应过程进行了研究。

^{*} 霍英东教育基金会第六届高等院校青年教师基金项目

^{**} 本文责任作者 ;本院生物工程专业 95 级本科生方芳参加部分研究工作

作者简介 李华钟(1958~)男 ,山东省龙口市人 ,无锡轻工大学生物工程学院副教授 ,硕士 ,1987~1988 年赴英国 Strathclyde 大学研修 ,主要从事工业微生物菌种选育研究。

收稿日期 2000-02-25 ,**修回日期** 2000-08-12 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料和方法

1.1 菌种

重组大肠杆菌 *E. coli* WSH-KE1 携带质粒 pGh501,由韩国仁荷大学生物工程系提供^[7]。质粒 pGH501 中基因 *gsh I* 和 *gsh II* (分别编码 GSH I 和 GSH II) 的拷贝数之比为 2:1。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* JM109 由本院工业微生物育种中心提供。大肠杆菌 *E. coli* I 和 *E. coli* II 为本研究室保藏的野生型菌株。

1.2 培养基

1.2.1 大肠杆菌种子及摇瓶培养基(VB 培养基):葡萄糖 5g,蛋白胨 5g,酵母膏 2.5g, 20mL 50 \times VB 盐,用蒸馏水定容至 1L, pH7.0。50 \times VB 盐:MgSO₄·7H₂O 10g,柠檬酸·H₂O 100g, K₂HPO₄ 500g, NaNH₄HPO₄·4H₂O 17g,蒸馏水定容至 1L。

1.2.2 细菌转化用培养基:LB 培养基:蛋白胨 10g,酵母膏 5g,NaCl 10g,蒸馏水定容至 1L, pH7.2。LAmp 培养基:在 LB 培养基中补加 100 μ g/mL 的氨苄青霉素。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养和通透性处理:*E. coli* 菌种在 VB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、200r/min 下摇瓶培养 20 h 后,7 000 r/min 下离心收集细胞,再按照 Murata 等^[10]描述的方法用甲苯(或其它有机溶剂)处理细胞。

1.3.2 GSH 的生物合成:除另有说明,谷胱甘肽生物合成应在 2.0 mL 的含有 L-Glu 60mmol/L, L-Cys 20 mmol/L, Gly 20 mol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, ATP 20 mmol/L, 磷酸钾缓冲液(pH7.0) 50mmol/L 和甲苯处理过的 *E. coli* 湿细胞 100 mg/mL 的体系中(KOH 调初始 pH7.0),37 $^{\circ}$ C 下轻微振荡 2 h。所有结果均以两个平行样品的平均值表示。

1.3.3 质粒的提取及大肠杆菌转化:参见文献[11]。

1.3.4 质粒稳定性试验:分别将各转化子接种至不含 Amp 的 VB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 20h,用 LAmp 和 LB 培养基分别进行菌落计数,计算质粒丢失率。

1.3.5 细胞内 GSH 合成酶系的稳定性试验:待 GSH 合成反应进行 2 h 后,离心收集细胞,再将这些细胞用于下一批合成反应,考察重复使用次数对细胞合成 GSH 活性的影响。

1.4 测定方法

反应体系中 GSH 含量用改良的荧光法^[12]测定(本文中 GSH 含量分别用 g/L 和 mmol/L 表示,1 mmol/L 相当于 0.307 g/L)。氨基酸用氨基酸自动分析仪测定。ATP、AMP 和 ADP 用 HPLC 测定^[13]。色谱条件为:HEWLETT ZORBAX SB-C18 柱(4.6mm \times 250mm),流动相为 0.2 mol/L pH6.0 的磷酸钾缓冲液(溶剂 A)和甲醇(溶剂 B),组成梯度为 0~6 min :A:B=98:2,6~20 min :A:B=90:10。流速 1.0 mL/min,进样量 5 μ L,UV260 nm 检测。

2 结果和讨论

2.1 具有高谷胱甘肽合成活性重组大肠杆菌的构建

2.1.1 质粒 pGH501 的提取和大肠杆菌转化:携带质粒 pGH501 的重组 *E. coli* WSH-KE1 能够以葡萄糖为底物胞内积累 GSH,然而在高密度培养条件下质粒容易丢失^[7]。

Aiba 等^[14]和 Skogman 等^[15]认为,质粒的稳定性会受到宿主细胞遗传特性、质粒的拷贝数以及质粒上基因的表达等诸多因素的影响。因此,更换质粒 pGH501 的宿主细胞,有可能构建出一株 GSH 合成活性和质粒稳定性俱佳的重组大肠杆菌。

首先从重组 *E. coli* WSH-KE1 中提取质粒 pGH501,然后分别以 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109、*E. coli* I 和 *E. coli* II 为宿主进行转化,以 Amp^r 为选择性标记挑取转化子。在所得到的不同宿主的转化子中,各选取 10 个生长情况良好的单菌落,考察其 GSH 合成能力。结果发现,新构建的转化子中,80% 以上其 GSH 合成能力较出发菌株有所提高,表 1 给出了部分转化子的 GSH 合成活性比较。根据初筛结果,从不同宿主细胞中分别选取 GSH 合成能力最强的 4 株菌进行复筛(表 1),结果以 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* JM109 为宿主细胞获得的转化子,其 GSH 合成能力明显下降(甚至低于出发菌株),而以野生型大肠杆菌为宿主细胞获得的转化子 *E. coli* I -2 和 *E. coli* II -1,却仍能保持很强的 GSH 合成活性。分别从这两个转化子中提取质粒,琼脂糖凝胶电泳证实质粒 pGH501 已成功转入(电泳图谱见图 1)。

表 1 部分新构建的转化子 GSH 合成活性比较*

Table 1 Comparison of GSH biosynthetic activity of partial transformants newly constructed

Transformant	First screening		Second screening	
	GSH concentration/(g/L)	Increment/%	GSH concentration/(g/L)	Increment/%
WSH-KE1	1.03		1.03	
<i>E. coli</i> I -2	3.98	288	3.84	273
<i>E. coli</i> I -4	2.63	156		
<i>E. coli</i> I -8	1.86	81		
<i>E. coli</i> I -9	1.22	19		
<i>E. coli</i> II -1	4.25	313	4.17	306
<i>E. coli</i> II -5	2.73	166		
<i>E. coli</i> II -6	2.54	147		
<i>E. coli</i> II -10	2.45	138		
DH5 α -1	1.54	50	0.76	-26
DH5 α -2	1.28	25		
DH5 α -6	0.68	-34		
DH5 α -9	0.63	-39		
JM109-3	3.31	222	0.64	-38
JM109-4	2.94	186		
JM109-9	1.46	42		
JM109-10	1.23	20		

* The GSH biosynthetic activity of *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109, *E. coli* I and *E. coli* II were all below 0.2g/L.

2.1.2 新构建菌株的质粒稳定性:出发菌株 *E. coli* WSH-KE1 的最大缺陷即为质粒稳定性差。表 2 显示,新构建的转化子 *E. coli* I -2 和 *E. coli* II -1,其质粒稳定性比 *E. coli* WSH-KE1 明显提高。综合考虑 GSH 合成活性与质粒稳定性这两个因素,作者选取 *E. coli* II -1 为进一步研究的对象。

2.1.3 *E. coli* II -1 的遗传稳定性:将 *E. coli* II -1 用 LAMP 斜面连续转接 5 代,测定每一代的 GSH 合成能力。结果发现 *E. coli* II -1 连续转接 5 代后 GSH 合成能力并无明显下降(图 2)。

表 2 不同转化子质粒稳定性的比较*

Table 2 Comparison of plasmid stability of different tranformants			
Strain	Colonies in LAmp plate/mL	Colonies in LB plate/mL	Ratio of plasmid reduction/%
<i>E. coli</i> I-2	5.0×10^7	1.0×10^8	50
<i>E. coli</i> II-1	9.1×10^8	1.9×10^9	52
<i>E. coli</i> WSH-KE1	3.3×10^6	4.6×10^8	99

* Ratio of plasmid reduction =(colonies in LB plate- colonies in LAmp plate)/colonies in LB plate×100%

2.1.4 *E. coli* II-1 中 GSH 合成酶系的稳定性 :如图 3 所示 ,*E. coli* WSH-KE1 细胞重复使用 4 次后 ,GSH 合成活性就已降至初始活性的 20% ;而 *E. coli* II-1 细胞重复使用 4 次后 ,GSH 的合成活性仍能保持初始活性的 90% 以上。

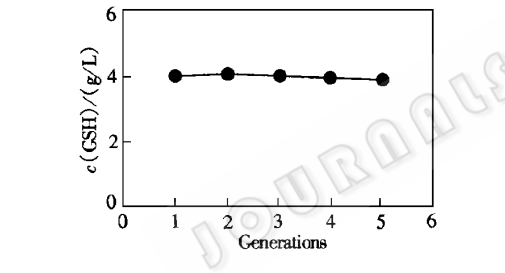


图 2 传代数对 *E. coli* II-1 合成 GSH 的影响

Fig.2 Effect of generations on the biosynthesis of GSH by *E. coli* II-1

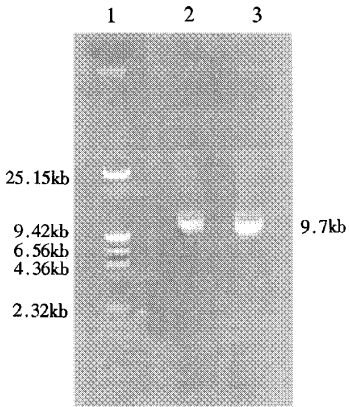


图 1 重组质粒 pGH501 的电泳图

Fig.1 Agrose gel electrophoresis of pGH501

Lane 1 , molecular mass standard ;
lane 2 , cell extraxts of the *E. coli* I-2 harboring pGH501 ;
lane 3 , cell extraxts of the *E. coli* II-1 harboring pGH501 .

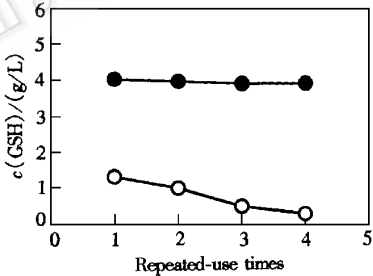


图 3 重复使用次数对不同菌株 GSH 合成活性的影响

Fig.3 Effect of repeated-use times on the GSH biosynthetic activity by different strains
—●— *E. coli* II-1 ; —○— *E. coli* WSH-KE1 .

以上实现结果表明 ,以野生型大肠杆菌为宿主细胞 ,作者成功地构建得到了一株既有很高的 GSH 合成活性 ,又有很强的质粒稳定性和传代稳定性 ,并且能够重复使用的重组大肠杆菌 *E. coli* II-1 ,该菌株具有潜在的工业应用价值。

2.2 *E. coli* II-1 合成 GSH 的反应过程

2.2.1 有机溶剂处理对 *E. coli* II-1 合成 GSH 的影响 :如表 3 所示 ,若细胞未经有机溶剂处理 ,则几乎不能在胞外积累 GSH。而经过甲苯、苯乙醇和甲醇处理后 ,胞外 GSH 浓

表 3 有机溶剂处理对 *E. coli* II-1 合成 GSH 的影响

Table 3 Effect of organic solvent treatment on the production of GSH by <i>E. coli</i> II-1						
Organic solvent	None	10% Toluene	Acetone	10% Phenyl ethano	7% Butanol	10% Methanol
α (GSH)(g/L)	0.14	4.1	0	2.56	0	1.37

度明显提高,其中又以甲苯的效果最好。这些有机溶剂的作用在于提高了细胞膜的通透性,使 ATP、其它底物及产物能够自由出入细胞,从而促进了 GSH 合成反应的进行。

2.2.2 前体氨基酸对 *E. coli* II-1 合成 GSH 的影响 如图 4 所示。L-Gys 浓度增大到 20 mmol/L 就会使 GSH 产量降低,可能是因为 L-Gys 对 GSH-I 的抑制作用。业已发现^[16],当反应体系中 L-Gys 浓度达到 60mmol/L 时,GSH-I 的活性降低到最高活性的 50%。而 L-Glu 浓度增大到 120mmol/L 时 GSH 的合成量仍在增加,很可能是因为 L-Glu 对 GSH-I 的活性有促进作用^[17]。只有在 L-Glu 过量存在的情况下,L-Gys 才会尽可能地转化为 γ -L-谷氨酸-L-半胱氨酸。

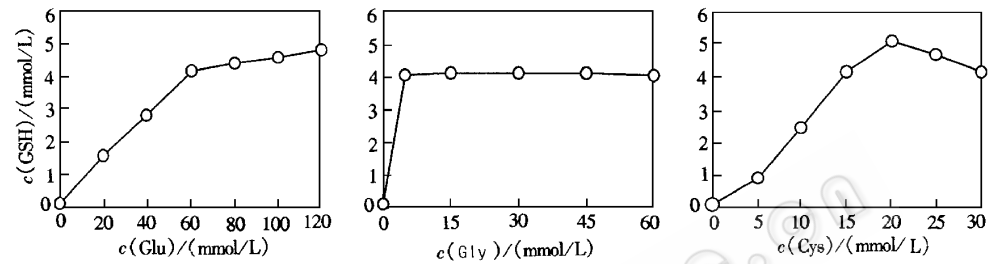


图 4 前体氨基酸对 *E. coli* II-1 合成 GSH 的影响

Fig. 4 Effect of precursor amino acids on the biosynthesis of GSH by *E. coli* II-1

Note :The concentrations of Gly and Cys were 20 and 15 mmol/L when Glu concentration was changed ; the concentrations of Glu and Cys were 60 and 15 mmol/L when Gly concentration was changed ; the concentrations of Glu and Gly were 60 and 20 mmol/L when Cys concentration was changed , respectively.

L-Glu、L-Gys 和 Gly 浓度固定时 GSH 合成反应的过程曲线示于图 5。理论上,每生成 1 mol GSH 需要各消耗 1 mol 的三种前体氨基酸。然而,由图 4 可知,当反应体系中合成了 18.3 mmol/L 的 GSH 时,L-Gys 消耗了 18mmol/L,但 L-Glu 和 Gly 却只分别消耗了 8.9 mmol/L 和 7 mmol/L。从图 4 也可看出,在反应体系中加入 5mmol/L 的 Gly,就能够合成 4g/L(约为 13mmol/L)的 GSH,即底物的消耗和产物的生成不平衡。

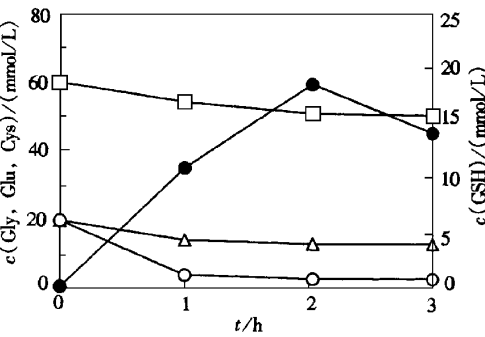


图 5 GSH 合成过程曲线

Fig. 5 Time-course of GSH biosynthesis

—●—GSH ; —□—L-Glu ; —△—Gly ; —○—L-Cys.

11.8 mmol/L。这些数据充分说明,*E. coli* II-1 细胞内确实含有较高浓度的 L-Glu 和

作者认为,这一现象的产生,可能是因为 *E. coli* II-1 细胞含有较高浓度的 L-Gly 和 Gly。为了证实这种推测,作者将 *E. coli* II-1 反复用于 GSH 合成反应,每次反应中均测定 GSH 的净增加量以及 L-Glu 和 Gly 的净减少量。结果发现(表 4),*E. coli* II-1 细胞重复使用 5 次后,底物氨基酸的消耗量与产物的合成量才基本达到平衡。此外,在第一次的 GSH 合成反应进行 5 min 时,作者测定出反应液中的 L-Glu 和 Gly 的量分别为 84.3mmol/L 和 31.8mmol/L,比 L-Glu 和 Gly 的实际添加量分别高出了 24.3 mmol/L 和

Gly ,也可能含有少量的 L-Cys。

表 4 细胞回用过程中 L-Glu 和 Gly 的消耗情况

Table 4 Consumption of L-Glu and Gly within cell repeated-use process

Repeated number of times	Increment of GSH/(mmol/L)	Consumption of L-Glu/(mmol/L)	Consumption of Gly/(mmol/L)
1	16.9	9.2	8.7
3	16.8	10.8	12.6
5	16.7	18.1	15.8
6	16.7	18.5	17.5

Note :The concentrations of L-Glu ,Gly and Cys were 60 20 and 20 mmol/L in each reaction system , respectively.

2.2.3 能量辅因子在 GSH 合成反应中的作用 :Meister 认为^[18] ,在 GSH 的生物合成反应中 ,GSH- I 和 GSH- II 催化的反应都需要 ATP 的参与。因此 ,每合成 1 mol GSH ,需要消耗 2 mol ATP ,生成 2 mol ADP ,如 (1) 式所示。



然而 ,图 6 的结果却显示 ,当 ATP 浓度低于 20 mmol/L 时 ,GSH 对 ATP 的摩尔产率系数在 85~90% 之间 ,即 GSH 合成与 ATP 消耗的比例接近 1:1。为了更深入地对这一实验现象进行分析 ,在 ATP 初始浓度为 20 mmol/L 的条件下 ,测定了 GSH 合成过程中 ATP、ADP 和 AMP 的变化 ,结果示于图 7。

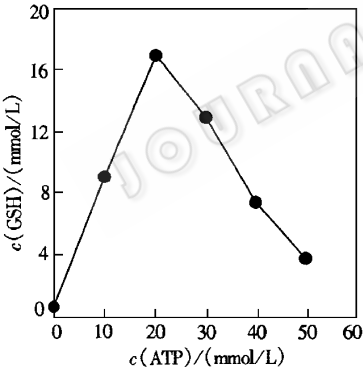


图 6 ATP 浓度对 GSH 合成的影响
Fig.6 Effect of ATP concentration on the biosynthesis of GSH
Note :The reaction time was 2h.

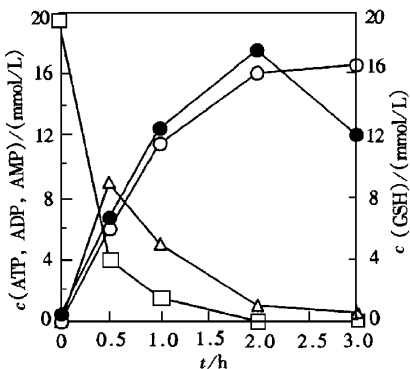


图 7 GSH 合成反应过程中能量辅因子的变化
Fig.7 Change of energy cofactor in the GSH biosynthesis process
—●— GSH ; —□— ATP ; —△— ADP ; —○— AMP.

根据图 7 的结果 ,作者认为 ,由 *E. coli* II -1 细胞控制的 GSH 合成反应机理应当如 (2) 式所示 ,其中 GSH- II 控制的第二步反应为整个反应的限速步骤。



提出这一反应机理是基于以下实验现象

(1) GSH 合成反应中 ATP 降解的终产物为 AMP ,AMP 和 GSH 的浓度之比接近 1:1 (2)反应中 ATP 消耗与 GSH 生成之比接近 1:1 (3)由于质粒 pGH501 中 *gsh I* 与 *gsh II* 的拷贝数之比为 2:1 ,因此 GSH- I 的活性更高。在反应的第一阶段(0~0.5h) ,ATP 消耗了 15.5 mmol/L 而 GSH 仅生成 6.8 mmol/L ,表明 GSH- I 催化生成的 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸 ,由于 GSH- II 活性的限制 ,来不及转化为 GSH (4) 0.5h 后 ,ADP 成为反应的主要能量供体 ,将第一步反应生成的 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸逐渐转化为 GSH (5)分析图 5 亦可以发现 ,反应进行 1 h 后 ,L-Cys 消耗了 18 mmol/L 而 GSH 仅生成 10 mmol/L ,表明 GSH- I 控制的反应速度比 GSH- II 控制的反应速度快。

至于 ATP 浓度高于 20mmol/L 时 ,GSH 产量反而下降(图 6) ,很可能是因为 GSH 合成过程第一步反应产生的 ADP 对 GSH- I 和 GSH- II 均产生抑制作用。由于 GSH- I 被 ATP 激活^[19] ,因此 ,当反应体系中 ATP 浓度不断升高时 ,ADP 浓度也不断升高。已证实^[16] 10mmol/L ADP 会对 GSH- I 产生 50% 的抑制作用 ,但 ADP 对 GSH- II 的抑制作用尚未见报道。若 ADP 对 GSH- II 没有抑制作用 ,则 ADP 在 GSH 合成的第二步反应中会不断降解 ,GSH 的产量会不断增加 ,对 GSH- I 的抑制作用也会被解除 ,不可能出现图 6 所示的实验结果。当然 ,ADP 是否确实对 GSH- II 产生抑制 ,抑制程度如何 ,尚需更多的酶学实验数据。

2.2.4 反应体系中 GSH 降解的抑制 :如图 6 和图 7 所示 ,在一个适宜的 GSH 合成反应体系中 ,反应时间超过 2 h ,GSH 产量就开始下降。这可能是由于 *E. coli* 细胞中固有的 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GTP)活性引起的 ,该酶可将 GSH 的 γ -谷氨酰基团转移到某些氨基酸和肽上^[20]。Nakayama 等^[19]发现 ,一定浓度的 L-Ser 和硼酸盐的混合物可以抑制 γ -GTP 的活性 ,为此 ,作者考察了在反应体系中添加 L-Ser 和硼酸钾对 GSH 合成的影响 ,如表 5 所示。实验中采用了较优的 L-Cys 添加方式 ,即反应开始时(0 h)加入 15 mmol/L ,反应进行 0.5 h 时再加入 5 mmol/L。

由表 5 可知 ,若反应体系中不添加物质 ,反应 2~3 h ,GSH 产量下降了 31.3% ;而若加入 100 mmol/L 的 L-Ser—硼酸钾混合物 ,则 GSH 的产量不仅没有下降 ,反而略有增加 ,表明 L-Ser—硼酸钾混合物的添加有可能对 γ -GTP 产生了抑制。然而 ,单独添加硼酸钾和 L-Ser ,却会抑制 GSH 的合成。表 5 的数据还显示 , γ -GTP 的抑制可能是 L-Ser 引起的。

表 5 添加硼酸钾和/或 L-Ser 对 GSH 合成的影响

Table 5 Effect of the addition of L-Serine and/or potassium borate on the biosynthesis of GSH

Addition	GSH concentration/(mmol/L)	
	2 h	3 h
Control	22.4	15.4
Potassium borate	12.8	9.3
L-Serine	13.8	14.8
Potassium borate and L-Serine	21.6	23.0

Note : The addition of potassium borate and L-Serine were 100 mmol/L , respectively.

由于 *E. coli* 胞内的 γ -GTP 是 GSH 积累到一定浓度后诱导产生的^[20] ,因此 ,从反应器的观点考虑 ,若要进一步提高 GSH 的合成效率 ,可以将甲苯处理过的 *E. coli* J-1 进行

固定化,连续合成 GSH。这样,既可以减少 ADP 的抑制,又可以防止 γ -GTP 对 GSH 的进一步降解。这方面的研究正在进行中。

致谢 研究过程中,承蒙韩国仁荷大学生物工程系 KOO Yoon-mo 教授提供出发菌株和大量研究资料,本院工业微生物育种中心王正祥教授提供大肠杆菌宿主细胞并提出了建设性的讨论,测试中心王树英老师、本院专业实验室陈 蕴、卢 晨老师在氨基酸和核苷酸分析方面提供了大力帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 李 寅 陈 坚 周楠迪,等. 生物工程学报,1998,14(2):147~152.
- [2] 李 寅 陈 坚 周楠迪,等. 中国医药工业杂志,1998,28(12):535~540.
- [3] 李华钟 林金萍 李 寅,等. 中国医药工业杂志,2000,31(5):236~239.
- [4] Bloch K C. *J Biol Chem*,1949,179:1245~1255.
- [5] 李 寅 陈 坚 毛英鹰,等. 微生物学报,1999,39(4):355~361.
- [6] 陈 坚 李 寅 毛英鹰,等. 生物工程学报,1998,14(4):452~455.
- [7] Li Y, Chen J, Mao Y Y, et al. *Process Biochem*,1998,33:709~714.
- [8] 李华钟 林金萍 李 寅,等. 无锡轻工大学学报,1999,18(4):1~4.
- [9] 李华钟 林金萍 方 芳,等. 无锡轻工大学学报,1999,18(6):56~59.
- [10] Murata K, Tani K, Kato J, et al. *Enzyme Microbiol Technol*,1980,3:233~242.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 曼尼阿蒂斯 T. (金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社,1995.
- [12] Victor H C, Terry L. *Anal Biochem*,1966,14:434~440.
- [13] Yonehara T, Tani Y. *Agric Biol Chem*,1986,50:899~905.
- [14] Aiba S, Immanaka K, Tsunedawa H. *Biotechnol Lett*,1980,2:525~530.
- [15] Skogman G, Nilsson J, Gustaffson P. *Gene*,1983,23:105~112.
- [16] Gushima H, Miya T, Murata A, et al. *J Appl Biochem*,1983,5:210~218.
- [17] Sekura R, Meister A. *J Biol Chem*,1977,252:2599~2603.
- [18] Meister A, Anderson M E. *Annu Rev Biochem*,1983,52:711~760.
- [19] Nakayama R, Kumagai H, Tochikura T. *Appl Environ Microbiol*,1984,47:653~670.
- [20] Milbauer R, Grossowitz N. *J Gen Microbiol*,1965,41:185~192.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT *E. COLI* WITH HIGH GLUTATHIONE BIOSYNTHETIC ACTIVITY AND THE BIOSYNTHETIC PROCESS*

Li Huazhong¹ Li Yin¹ Lin Jinping² Chen Jian¹

(¹ School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

(² School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200371, China)

Abstract: A recombinant strain *E. coli* II-1, which exhibited high glutathione(GSH) biosynthetic activity and high stability, was constructed by transforming plasmid pGH501

which contains gene *gsh* I and *gsh* II into a wild type strain *E. coli* II. 4 g/L GSH accumulated extracellularly by using toluene-treated cell. In GSH biosynthetic system, GSH production was improved by increasing the concentration of L-glutamate, while inhibited by L-cysteine if it's concentration was beyond 20mmol/L. In GSH biosynthetic reaction, the apparent little consumption of L-glutamate and glycine was concluded experimentally to be that toluene-treated *E. coli* II-1 cells still contained high concentration of L-glutamate and glycine. According to the change of energy cofactor in the GSH biosynthetic process, a possible GSH biosynthetic mechanism controlled by *E. coli* II-1, was proposed: the energy donor of reaction catalyzed by glutathione synthetase (GSH- II) was ADP but not ATP, the reaction was rate-limited step within the whole GSH biosynthetic process, high concentration of ADP might inhibit the activity of GSH- II. Further degradation of GSH was prevented by the addition of 100mmol/L L-serine and potassium borate mixture. In such case, 23.0 mmol/L (about 7.1 g/L) GSH accumulated at 3h.

Key words : Glutathione, Recombinant *E. coli*, Construction, Biosynthesis, Reaction mechanism

* Project Granted by Huo Yindong Educational Committee College Youth Teacher Fund

国家“九五”攻关项目—— 乳链菌肽的工业化生产通过专家鉴定

国家“九五”科技攻关项目《特种保鲜剂—乳链菌肽》于 2000 年 10 月 25 日通过了中国科学院组织的专家鉴定。

乳链菌肽(Nisin)又称之为乳酸链球菌素,是由乳酸乳球菌产生的一种小肽,对梭菌、金黄色葡萄球菌、利斯特氏菌、嗜热脂肪芽孢杆菌等引起食品腐败的革兰氏阳性菌有强烈抑杀作用,并对人体安全无毒,已被包括我国在内的世界许多国家广泛应用于乳制品、植物蛋白食品、罐头食品、肉制品和乙醇饮料的防腐保鲜。

由中国科学院微生物研究所还连栋研究员主持的该攻关项目,经中国科学院微生物研究所和浙江省天台银象生物化工厂全体参加人员的共同努力,在浙江天台建成了我国第一条乳链菌肽工业化生产线,将中试结果在此生产线上进行工业化规模的生产试验并获得成功,圆满完成了国家“九五”科技攻关项目专题合同所规定的各项技术经济指标,其产品已销往国内外市场。以中国食品添加剂生产应用工业协会理事长尤新教授为鉴定委员会主任委员的全体专家一致认为:乳链菌肽是乳酸乳球菌产生的一种天然食品防腐剂和食品品质改良剂。该项目的完成,填补了我国不能工业化生产乳链菌肽的空白,将为我国现代食品工业的发展带来良好的经济效益。

(刘玉方)