

重组大肠杆菌生产谷胱甘肽发酵条件的研究*

李 寅 陈 坚 毛英鹰** 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

Yoon-Mo Koo

(韩国仁荷大学工学院生物工程系 仁川 402-751)

摘 要 研究了重组 *E. coli* 产 GSH 的发酵条件,重点考察了添加酵母膏、前体氨基酸和 ATP 的影响。结果发现,前体氨基酸和 ATP 均能促进胞内 GSH 的积累,若在发酵 0h 和 12h 分别加入 2.0 g/L ATP 和 9mmol/L 前体氨基酸,则细胞干重和胞内 GSH 含量可分别比对照提高 24% 和 1.4 倍。应用正交试验得出的针对细胞干重和 GSH 总量的最佳组合,最大细胞干重和 GSH 总量比原试验中的最好结果分别提高了 10% 和 26%。在分析了该菌对葡萄糖利用情况的基础上,对该菌进行了指数流加培养,25h 细胞干重与发酵液内 GSH 总量分别达到 80 g/L 和 880 mg/L,比摇瓶最好结果分别提高了 8.3 和 4.6 倍。

关键词 谷胱甘肽, 重组大肠杆菌, 发酵条件

分类号 TQ464.7 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)04-0355-61

谷胱甘肽(GSH)是生物体内一种重要的非蛋白巯基化合物,由于其具有多种重要的生理功能,故人们在研究物质运输、内分泌、免疫、抗辐射、癌症和衰老等课题时对它的兴趣日益增长^[1]。日本最早采用面包酵母来生产 GSH,而国内除 80 年代末卓肇文等^[2]曾开展过从酵母中提取 GSH 的研究以及詹谷宇等^[3]曾选育出高 GSH 假丝酵母外,对发酵法生产 GSH 的研究甚少,利用面包酵母发酵生产 GSH 的研究也鲜有报道。作者^[4~6]近来深入研究了影响面包酵母生产 GSH 的各种重要因素,有关高 GSH 菌种选育、发酵过程优化和产物提取的工作仍在进行中。

构建具有高 GSH 合成活性的重组 *E. coli* 是近十年来 GSH 生物合成研究中的一个新方向,其关键在于将分别编码 GSH I 和 GSH II 的基因 *gsh I* 和 *gsh II* 在宿主菌中高效表达。Murata 等^[7,8]通过在细胞中扩增 *gsh I* 和 *gsh II* 成功地获得了具有较强 GSH 合成能力的重组 *E. coli*,但对培养技术并没有进行深入研究。实际上,由于 GSH 是胞内产物,其体积生产率通常随着发酵液中的细胞密度增大而增加,因此,优化培养条件对实现高细胞密度、从而提高 GSH 生产率来说十分必要。本文对一株能利用葡萄糖合成 GSH 的重组大肠杆菌进行了发酵条件的研究。

1 材料和方法

1.1 试剂

谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase)、还原型辅酶 II (NADPH)、5'-三磷酸腺苷

*江苏省跨世纪学科带头人科研基金资助项目

**现在广州宝洁有限公司

收稿日期:1997-09-01,修回日期:1997-11-24

(ATP)和DTNB(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))均为Sigma公司产品。还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)购自华美生物工程公司。酵母膏为Oxoid产品。葡萄糖购自无锡润生淀粉油脂公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种

重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)WSH-KE1, *gsh* I 和 *gsh* II 基因的拷贝数为2:1,由韩国仁荷大学生物工程系提供。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基:蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 10g, 琼脂 20g, 氨苄青霉素 50mg, 定容至 1L, pH7.2。

1.3.2 种子培养基:蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 10g, 葡萄糖 30g 定容至 1L, pH7.2。

1.3.3 发酵培养基:葡萄糖 10.0g, KH_2PO_4 13.3g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 8.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2g, 柠檬酸 1.7g, EDTA 8.4mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15.0mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg, H_3BO_3 3.0mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.0mg, $\text{Fe}(\text{III})$ Citrate 100.0mg, 盐酸硫胺素 4.5mg, 消泡剂 0.5mL(摇瓶不加)定容至 1L, pH7.2。

1.3.4 流加培养基:葡萄糖 600g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20.0g, EDTA 13.0mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.0mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 23.5mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, H_3BO_3 5.0mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.0mg, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 16.0mg, $\text{Fe}(\text{III})$ Citrate 40.0mg, 消泡剂 1.0mL 定容至 1L, pH7.2。

1.3.5 灭菌:按文献[9]进行。

1.4 主要发酵设备

上海 HYG-II 回转式恒温调速摇瓶柜。美国 VIRTIS 2.5L 实验用台式玻璃发酵罐, 配备温度和 pH 自动控制系统, 溶氧自动显示。

1.5 培养方法

1.5.1 摇瓶培养:菌种在斜面培养基上 30℃ 培养 24h 后, 接一环入种子培养基(装液量 25mL/250mL 锥形瓶), 30℃ 振荡培养 24h 后以 10% 接种量接入发酵培养基(装液量 50mL/500mL 锥形瓶), 发酵时间和初糖浓度如无特别注明则分别为 24h 和 10 g/L。

1.5.2 流加培养:25L 发酵罐中装液量 1.0L, 接种量 20%, 发酵温度 30℃, 通过调节搅拌转速和空气流速使溶氧百分数保持不低于 30%, 当通空气无法满足溶氧要求时通纯氧。pH 通过流加氨水控制在 7.2 左右。分批培养 8h 后, 按指数流加方式进行流加培养。

1.6 分析方法

1.6.1 葡萄糖浓度:3,5-二硝基水杨酸法。

1.6.2 细胞干重:一定量发酵液离心后倾去上清液, 菌体在 90℃ 下烘 24h 后称重。

1.6.3 胞内 GSH 含量:按 Murata 等^[10]报道的方法从大肠杆菌细胞内提取 GSH, 采用 Tietze^[11]报道的改良 DTNB-GSSG 循环分析法分析提取液中 GSH 含量。

2 结果和讨论

2.1 摇瓶发酵的主要条件对 WSH-KE1 产 GSH 的影响

2.1.1 初始 pH 的影响:初始 pH 为 7.2 和 6.7 时该重组菌的细胞干重和胞内 GSH 含量

2.2 摇瓶发酵条件的正交试验优化

由以上单因素实验发现,前体氨基酸浓度、ATP 加入量、初始 pH 和酵母膏浓度对 WSH-KE1 产 GSH 均有影响,故采用正交试验法以确定这些因素的较优组合。

按 $L_{16}(4^5)$ 正交表安排正交试验(表 3)。

表 2 添加三磷酸腺苷的影响*

Table 2 The effect of ATP addition*

发酵 0 h 加入 ATP	细胞干重	谷胱甘肽含量	谷胱甘肽总量	发酵 0 h 加入 ATP	细胞干重	谷胱甘肽含量	谷胱甘肽总量
ATP added at 0 h/ (g/L)	DCW/ (g/L)	GSH content/ (mg/g)	Total GSH/ (mg/L)	ATP aded at 0 h/ (g/L)	DCW/ (g/L)	GSH content/ (mg/g)	Total GSH/ (mg/L)
0/No amino acids	4.75	11.68	55.48	0/Add amino acids	5.60	21.14	118.38
0.67	5.62	26.31	147.86	0.67	5.54	19.83	109.86
1.33	5.75	28.24	162.38	1.33	5.54	18.55	102.77
2.00	5.90	28.48	168.03	2.00	5.37	18.09	97.14
2.67	5.78	25.26	146.00	2.67	4.84	17.36	84.02
3.33	5.50	22.64	124.52	3.33	4.81	18.95	91.15

* :等摩尔比的谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸混合液(9mmol/L)在发酵 12 h 时加入。
* :Mixture of glutamate, cysteine and glycine (9mmol/L) with equivalent molar ratio was added at 12h of fermentation.

表 3 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素水平表*

Table 3 Level table of factors in $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment*

因素 Factor \ 水平 Level	1	2	3	4
A:氨基酸 amino acids/(mmol/L)	0	5	10	15
B:三磷酸腺苷 ATP/(g/L)	0	0.67	1.33	2.00
C:空列 Nothing				
D:酵母膏 Yeast extract/ %	0	0.4	0.8	1.2
E:初始 pH Initial pH	6.2	6.7	7.2	7.7

* :ATP 和氨基酸分别在发酵 0 h 和 12 h 时加入。
* :ATP and mixture of amino acids was added at 0 h and 12 h, respectively.

液中 GSH 总量的影响可能有交互作用存在。

实验结果的极差分析表明:(1)各因素对细胞干重的影响为:酵母膏>pH>ATP>氨基酸,其最佳组合为:初始 pH7.2;酵母膏浓度 0.8%;氨基酸浓度 9mmol/L;ATP 为 2.0g/L。(2)各因素对发酵液中 GSH 总量的影响为:pH>氨基酸>酵母膏>ATP,最佳组合为:初始发酵液 pH6.7;酵母膏浓度 0.8%;加入氨基酸 5mmol/L;ATP 加入量 2.0g/L。各因素对发酵

表 4 各因素优化组合后的验证实验结果

Table 4 Experimental results by using the optimized combination of factors

指标 Objective	针对最大细胞干重组合 Combination aimed at maximal DCW		针对最大 GSH 总量组合 Combination aimed at maximal total GSH	
	实验 1 Experiment1	实验 2 Experiment2	实验 1 Experiment1	实验 2 Experiment2
初始 pH Initial pH	7.20	7.20	6.70	6.70
终了 pH Final pH	8.03	8.19	7.21	7.10
细胞干重 DCW/(g/L)	8.33	8.83	7.40	7.10
残糖浓度 RSC/(g/L)	0.43	0.33	0.33	0.34
谷胱甘肽含量 GSH content/(mg/g)	11.51	13.08	20.70	22.87
谷胱甘肽总量 Total GSH/(mg/L)	95.89	89.26	153.18	162.38

正交试验结果的方差分析表明:(1)对细胞干重的影响酵母膏高度显著,初始 pH 较显著,而氨基酸和 ATP 不显著;(2)对发酵液中 GSH 总量的影响初始 pH 最为显著,氨基酸和 ATP 高度显著而酵母膏不显著。这些结果与极差分析结果一致。

为提高统计分析的可靠性,表 4 给出了对正交试验得出的较优组合进行验证的两组平行实验结果。与正交试验中得出的最大细胞干重(7.8g/L)和最大 GSH 总量(125.16mg/L)相比,采用两种较优组合后,最大细胞干重和最大 GSH 总量分别提高了 10% 和 26%。

2.3 WSH-KE1 对葡萄糖的利用情况

2.3.1 初糖浓度的影响:*E. coli* 培养基中高浓度糖的存在会导致乙酸的形成,Riesenberg^[12]曾报道当糖浓度超过 50g/L 后 *E. coli* 的生长受到抑制。对于 WSH-KE1,初糖浓度超过 20g/L 即对细胞生长和 GSH 合成产生抑制作用,其分批培养的适宜初糖浓度为 10g/L(数据略)。

2.3.2 WSH-KE1 摇瓶发酵过程分析:工程菌分批发酵过程中各参数的变化情况(尤其是葡萄糖浓度的变化曲线),对于确定 2L 发酵罐中合理的流加策略(尤其是浓缩葡萄糖液的流加时间)十分重要。10g/L 初糖浓度下 WSH-KE1 的发酵过程曲线(图 1)显示,8 h 时糖已耗尽,此后细胞量仍能增加,很可能是细胞利用所产生的酸性物质作为碳源,故而 8 h 后随着细胞量的增长,pH 有所回升。从图 1 还可知 WSH-KE1 中 GSH 的合成属于生长偶联型,14 h 时胞内 GSH 含量达到最大(16.64mg/g)。此外,由图 1 可确定若要补糖,应从第 8 h 左右开始。

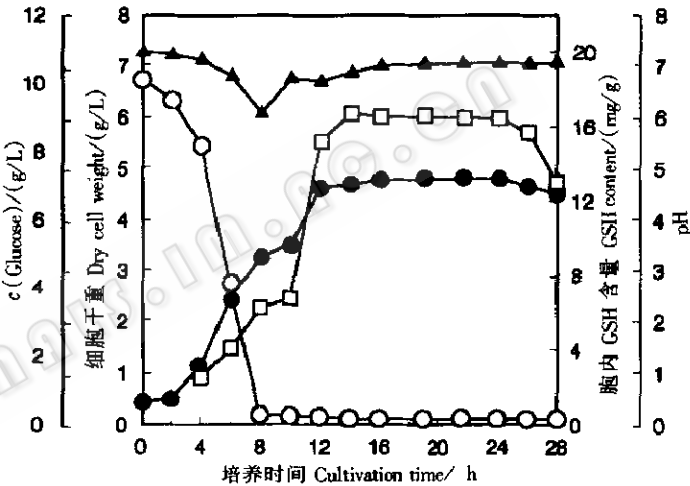


图 1 WSH-KE1 摇瓶发酵过程曲线

●细胞干重;□胞内谷胱甘肽含量;○葡萄糖浓度;▲pH。
Fig. 1 Time-course of WSH-KE1 in shaking-flask culture.
●Dry cell weight; □Intracellular GSH content; ○Glucose concentration; ▲pH.

表 5 不同摇瓶补糖方法对 GSH 发酵的影响

Table 5 Effects of different glucose feeding methods of shaking-flask on GSH fermentation

补糖方法			残糖浓度	细胞干重	谷胱甘肽含量	谷胱甘肽总量
Feeding methods/(g/L)			RSC/(g/L)	DCW/(g/L)	GSH content/(mg/g)	Total GSH/(mg/L)
0 h	8 h	12 h				
20			0.388	3.88	7.46	28.94
10	10		0.295	6.43	16.89	108.60
10		10	0.288	7.53	19.22	144.73
10	5	5	0.288	6.60	17.51	115.57

2.3.3 摇瓶补糖的影响:在进行 2L 发酵罐流加培养之前,有必要研究补糖对重组菌 GSH 合成能力的影响。总糖浓度 20g/L

下四种不同补糖方式的影响(表 2)表明,各种补糖方式均能显著提高细胞量和胞内 GSH 含量,其中又以初糖浓度 10g/L、12 h 补加 10g/L 的补糖方式为最佳,GSH 总量比不补糖提高了 5 倍(表 5)。

2.4 WSH-KE1 高密度培养的研究

由于 WSH-KE1 只在胞内积累 GSH,为获得较高的生产率,就必须在提高细胞密度的同时保证胞内目的产物也以较高水平积累,以利于后提取和纯化的进行。由 WSH-KE1 对葡萄糖的利用情况可知:(1)该菌株培养的适宜初糖浓度为 10g/L,在此糖浓度下培养 8 h 左右葡萄糖基本耗尽;(2)补糖对提高发酵液中 GSH 总量是很有效的措施。因此,在 2L 发酵罐中采用初糖浓度 10g/L、培养 7 h 后按以前报道^[13]的指数进料方式对 WSH-KE1 进行指数流加培养,发酵过程曲线如图 2 所示。

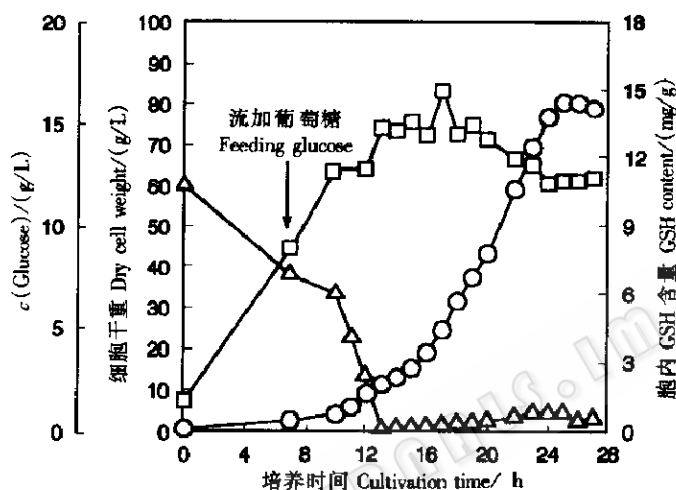


图 2 WSH-KE1 指数流加培养过程曲线

○细胞干重;□胞内谷胱甘肽含量;△葡萄糖浓度。

Fig. 2 Time-course of exponential feeding culture of WSH-KE1

○Dry cell weight; □ Intracellular GSH content; △ Glucose concentration.

由图 2 可见,采用指数流加方式,不用添加酵母膏、ATP 和三种混合氨基酸,WSH-KE1 的细胞干重与发酵液内 GSH 总量在 25 h 就达到了 80g/L 和 880mg/L,比摇瓶最好结果分别提高了 8.3 和 4.6 倍。由结果计算可知,细胞生产强度达到 3.2g/(L·h),细胞对糖产率在 0.4g/g 上下波动,整个过程中细胞平均产率为 0.37g/g。但胞内 GSH 含量低于摇瓶最好结果,而且在培养后期略有下降,这一方面是因为未添加混合氨基酸和 ATP,另一方面可能是在高细胞密度环境下, *gsh I* 和 *gsh II* 基因的表达量有所减少,造成 GSH I 和 GSH II 的活性降低。

由于指数流加比较简单,不需要复杂的设备,采用这一方式培养 *E. coli* 可以将细胞比生长速率控制在产生副产物(如乙酸)的范围之内,因而颇受重视。国外已有采用指数流加方式获得超过 100g (DCW)/L 的报道^[9]。指数流加培养还可以作为独特的动力学研究手段,代替连续培养来考察培养过程中重要动力学参数的特性。有关指数流加培养过程模型化及最优控制的研究结果作者将另文报道。目前的焦点是,如何在指数流加方式的基础上建立更为合理、有效的流加培养策略,以保证 WSH-KE1 在高细胞密度环境下保持较强的 GSH 合成能力。

致谢 感谢本院中心实验室姚克明老师和本室堵国成博士在研究过程中所给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] 卓肇文. 氨基酸杂志, 1989, 11: 41~42.
- [2] 卓肇文, 周金鑫, 张孝慈等. 氨基酸杂志, 1988, 10: 6~9.
- [3] 詹谷宇, 田 萍, 刘卫东等. 药学报, 1990, 25: 494~499.
- [4] 李 寅, 陈 坚, 周楠迪等. 生物工程学报, 14(2): 147~152.
- [5] 李 寅, 陈 坚, 周楠迪等. 中国医药工业杂志, 1998, 29(12): 535~540.
- [6] 周楠迪, 李 寅, 陈 坚等. 生物技术, 1997, 7(4): 30~33.
- [7] Murata K, Kimura A. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44: 1444~1448.
- [8] Murata K, Miya T, Gushima H *et al.* *Agric Biol Chem*, 1983, 47: 1381~1383.
- [9] Korz D J, Rinas U, Hellmuth K *et al.* *J Biotechnol*, 1995, 39: 59~65.
- [10] Murata K, Kimura A. *J Gen Microbiol*, 1982, 128: 1047~1052.
- [11] Tietze F. *Anal Biochem*, 1969, 29: 502~522.
- [12] Riesenber D. *Curr Opin Biotechnol*, 1991, 2: 380~385.
- [13] 李 寅, 陈 坚, 宋 棋等. 生物工程学报, 1997, 13: 160~167.

FERMENTATION CONDITIONS FOR PRODUCTION OF GLUTATHIONE BY RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* *

Li Yin Chen Jian Mao Yingying Lun Shiyi

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

Yoon-Mo Koo

(Department of Biotechnology, Inha University, Incon 402 - 751 Korea)

Abstract The fermentation conditions for production of glutathione by recombinant *E. coli* were investigated, the addition of certain materials, such as yeast extract, precursor amino acids and ATP were mainly focused on. The results showed that the addition of precursor amino acids and ATP could promote intracellular GSH accumulation. DCW and intracellular GSH content would be 24% and 1.4 times higher than that of fermentation without additions when 2.0g/L ATP and 9mmol/L precursor amino acids were added at the beginning and 12 h of fermentation, respectively. By using the optimized combination of additives obtained from orthogonal experiments, the maximal DCW and total GSH in broth could be improved 10% and 26% higher than the best results in orthogonal experiments, respectively. Based on the analysis of glucose utilizing ability of this strain, an exponential fed-batch culture process was conducted. DCW and total GSH in broth could be 8.3 and 4.6 times higher than that of shaking flask culture and finally reached 80g/L and 880mg/L, respectively.

Key words Glutathione, Recombinant *Escherichia coli*, Fermentation conditions

* Project granted by Over-century Academic Leader Fund of Jiangsu Province Educational Committee