

酶法合成谷胱甘肽的工艺研究

李从撑 颜雨薇 应晨滔 鲍杰林

浙江海正药业股份有限公司 浙江台州 318000

摘要: 通过两步酶法合成谷胱甘肽, 构建两株 (pET24a-EcBDgshA-L-EcBDgshB-L-EcBDackA) 重组菌。L-谷氨酸、L-半胱氨酸在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSHI) 的作用下合成 γ -谷氨酰半胱氨酸, 然后 γ -谷氨酰半胱氨酸在谷胱甘肽合成酶 (GSHII) 的作用下, 与甘氨酸反应生成谷胱甘肽。再对重组菌进行诱导表达和酶促反应条件优化, 确定最适温度 (25°C) 和 pH (7.0)。最终得到重组菌在转化时间 6hr 时, 其生产转化单位可达 10.8g/L。

关键词: 还原型谷胱甘肽; 酶法合成; 表达; 催化转化

Study on the Technology of Enzymatic Synthesis of Glutathione

Li Congzhang, Yan Yuwei, Ying Chentao, Bao Jielin

Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd. Zhejiang Taizhou 318000

Abstract: Two-step enzymatic synthesis of glutathione was used to construct two recombinant strains (pET24a-EcBDgshA-L-EcBDgshB-L-EcBDackA). L-glutamic acid and L-cysteine synthesize γ -glutamyl cysteine under the action of γ -glutamyl cysteine synthase (GSHI), and then γ -glutamyl cysteine Under the action of glutathione synthase (GSHII), the acid reacts with glycine to generate glutathione. Then, the recombinant bacteria were induced and expressed and the enzymatic reaction conditions were optimized to determine the optimum temperature (25°C) and pH (7.0). Finally, when the transformation time of the recombinant bacteria is 6hr, its production transformation unit can reach 10.8g/L.

Keywords: reduced glutathione; enzymatic synthesis; expression; catalytic transformation

谷胱甘肽 (GSH), 又名媚力肽, 由三个氨基酸组成的小分子肽, 是生物体内重要的低分子活性巯基化合物。还原型谷胱甘肽具有抗氧化和清除自由基能力, 它与重金属离子、自由基等结合, 可转化生物体内有害物质为无害物质, 最终排出体外。临床主要用于治疗各类肝脏、内分泌等疾病, 对生物体中毒、肿瘤、衰老等方面也有显著疗效。本实验通过两步酶法催化合成谷胱甘肽, 构建了两株重组菌, 并通过优化诱导表达和酶促反应条件, 从而提高生产转化单位。

1 材料与方法

1.1 宿主菌株: 大肠埃希菌。

1.2 摇瓶培养

1.2.1 GSHI 菌株摇瓶种子培养基及培养条件

培养基组成: 酵母抽提物 15g/l, 大豆蛋白胨 10g/l, 葡萄糖 5g/l, NaCl 5g/l, K_2HPO_4 10g/l, PH7.0-7.5。

培养条件: 温度: 35°C, 旋转式摇床: 220rpm, 培养周期: 16hr

1.2.2 GSHI 菌株摇瓶发酵培养基及培养条件

培养基组成: 甘油 5g/l, 蛋白胨 12g/l, 酵母抽提物 24g/l, K_2HPO_4 12.54g/l, KH_2PO_4 2.31g/l。

1.2.3 GSHII 菌株摇瓶种子培养基及培养条件

培养基组成: 酵母抽提物 15g/l, 大豆蛋白胨 10g/l, 葡萄糖 5g/l, NaCl 5g/l, K_2HPO_4 0.1g/l, PH7.0-7.5。

培养条件: 温度: 35°C, 旋转式摇床: 220rpm, 培养周期: 16hr

1.2.4 GSHII 菌株摇瓶发酵培养基及培养条件

培养基组成: 甘油 0.7g/l; 蛋白胨 20g/l; 酵母膏 40g/l; 味精 10g/l; K_2HPO_4 5g/l; KH_2PO_4 2g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g/l, 微量元素 3ml/L (其中微量元素配方为, 复合微量元素成份: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.162g/l; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

通讯作者简介: 李从撑, 出生年月: 1983.08, 民族: 汉族, 性别: 男, 籍贯: 台州三门, 单位: 浙江海正药业股份有限公司, 职位: 车间主任, 职称: 工程师, 学历: 本科, 研究方向: 主要从事微生物药物研与应用, 邮箱: ccli@hisunpharm.com。

0.012g/l; CaCl₂·2H₂O 0.006g/l; ZnCl₂·4H₂O 0.0144g/l; Na₂MoO₄·2H₂O 0.012g/l; CuSO₄·5H₂O 1.9g/l; H₃BO₃ 0.5g/l. 微量元素添加量为3ml/L.)

1.3 小试发酵培养

1.3.1 GSHI 菌株小试种子培养基及培养条件

培养基组成: 酵母抽提物 15g/l, 大豆蛋白胨 10g/l, 葡萄糖 5g/l, 氯化钠 10g/l, 磷酸氢二钾 1g/l, PH7.0-7.5

培养条件: 温度 28 ± 1 °C, 通气压力 0.03-0.05MPa, 搅拌转速 200rpm, 通气量 1VVM, 培养时间 20-24h。

1.3.2 GSHI 菌株小试发酵培养基及培养条件

培养基组成: 甘油 5g/l, 蛋白胨 12g/l, 酵母抽提物 24g/l, K₂HPO₄ 12.54g/l, KH₂PO₄ 2.31g/l, PH7.0-7.5

培养条件: 温度 35 ± 2 °C, 通气压力 0.03-0.05MPa, 搅拌转速 200rpm, 通气量 1VVM, DO ≥ 20%, 接种量 2%; 培养 2h 后, 加入 1.0% 灭菌后乳糖溶液, 并降温至 30 ± 2 °C 继续培养 20-24h。

1.3.3 GSHII 菌株小试种子培养基及培养条件

培养基组成: 酵母抽提物 15g/l, 大豆蛋白胨 10g/l, 葡萄糖 5g/l, 氯化钠 10g/l, 磷酸氢二钾 1g/l, PH7.0-7.5

培养条件: 温度 28 ± 1 °C, 通气压力 0.03-0.05MPa, 搅拌转速 200rpm, 通气量 1VVM, 培养时间 20-24h。

1.3.4 GSHII 菌株小试发酵培养基及培养条件

培养基组成: 甘油 7g/l, 蛋白胨 20g/l, 酵母膏 40g/l, 味精 10g/l, K₂HPO₄ 5g/l, KH₂PO₄ 2g/l, MgSO₄·7H₂O 0.4g/l, 微量元素 3ml/L, PH7.0-7.5

培养条件: 温度 35 ± 2 °C, 通气压力 0.03-0.05MPa, 搅拌转速 200rpm, 通气量 1VVM, DO ≥ 20%, 接种量 2%; 培养 2h 后, 加入 1.0% 灭菌后乳糖溶液, 并降温至 30 ± 2 °C 继续培养 20-24h。

2 实验过程与分析

2.1 重组表达载体的构建

采用目前应用最为广泛的原核表达宿主 -E.coli, 结合 pET 表达质粒, 构建工程菌。针对谷胱甘肽菌株的克隆, 一共进行 6 组, 见表 2-1

表 2-1 谷胱甘肽的克隆

| 质粒编号 | 表达质粒 | 重组表达质粒 |
|--------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| pEL511 | pEL507/NdeI+BamHI+pEL343/NdeI+BamHI | pEL507-EcBDgshB |
| pEL512 | pEL508/NdeI+BamHI+pEL343/NdeI+BamHI | pEL508-EcBDgshB |
| pEL513 | pEL507/NdeI+BamHI+pEL348/NdeI+BamHI | pEL507-EcBDackA |
| pEL514 | pEL508/NdeI+BamHI+pEL348/NdeI+BamHI | pEL508-EcBDackA |
| pEL520 | pEL517/BamHI-ciap+pEL513/BamHI+BglII | pET24a-EcBDgshA-L-EcBDgshB-S-EcBDackA |
| pEL521 | pEL517/BamHI-ciap+pEL514/BamHI+BglII | pET24a-EcBDgshA-L-EcBDgshB-L-EcBDackA |

2.2 重组菌株的筛选

根据表 2-1 中 pEL511、pEL512、pEL513、pEL514、pEL520、pEL521 表达载体的构建进行 SDS-PAGE 分析, 分析结果如下:

M511512513514

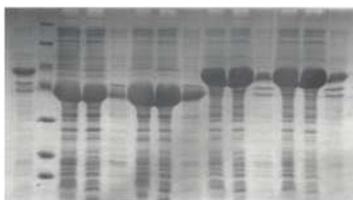


图 2-1 蛋白表达

M520521



图 2-2 蛋白表达

图 2-1 所示, pEL511、pEL512 为 B 蛋白, 后者较前者表达效果更好; pEL513、pEL514 为 A 蛋白, 后者较前者表达效果更好, 表明 rbs 序列较长表达效果较好。pEL513、pEL514 为单启动子双酶表达, pEL511、pEL512 为双启动子双酶表达, 从电泳图中可明显看出单启动子双酶表达中 A 蛋白的表达效果明显优于双启动子双酶表达; A 蛋白在反应过程中更为重要, 因此选用 A 蛋白表达效果更好的重组质粒 pEL514。构建得到一株 (pEL508-EcBDackA) 重组菌, 确定为 GSHI 菌株。

图 2-2 可以得到 pEL521 比 pEL520A 蛋白的表达效果更好, 同时为了验证诱导温度对酶的蛋白表达的影响, 选取 521 菌株进行 25 °C, 30 °C, 35 °C 诱导培养, 培养结束后收集菌株分别进行细胞破壁处理, 进行电泳分析, 确定 25 °C 的诱导效果最好, 因此选择重组质粒 pEL521。构建得到一株 (pET24a-EcBDgshA-L-EcBDgshB-L-EcBDackA) 重组菌, 确定为 GSHII 菌株。

2.3 转化工艺的优化

2.3.1 转化反应体系设计

综合: GSHI菌株和GSHII菌株的特性, 我们进行理论分析, 以及综合以往经验, 谷胱甘肽转化体系严格设计, 转化体系: KPB (PH7.0) 0.05M, Glu40mM, Cys40mM, Mg²⁺20mM, ATP0.05mM, GSHI菌株菌体 20g/L, GSHII菌株菌体 10g/L。

2.3.2 转化工艺优化

根据GSHI、GSHII菌株的设计转化体系, 经过试验和工艺改进优化, 发现当转化过程中控制转化温度25℃、PH=7.0时, 产物谷胱甘肽生成量有大幅度的提高。由此在原有不变的前体下, 改进反应体系, 增加温度、PH自动控制系统, 在转化过程自动控制温度25℃、PH=7.0。其最佳生成量见图2-3。可以得到GSH生成量随反应时间加长而逐渐增加, 在5hr以后就开始趋于平衡, 由此确定最佳转化时间为6hr。此时GSH生成量达10.8g/L。

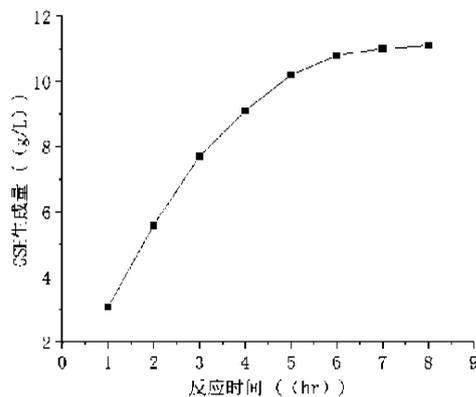


图2-3 重组菌GSH表达曲线

3 讨论

本实验通过双酶法合成谷胱甘肽, 成功构建了(pEL508-EcBDackA、pET24a-EcBDgshA-L-EcBDgshB-L-EcBDackA)重组菌。并经过诱导表达和酶促反应条件优化, 得到最优表达条件: 温度25℃, PH=7.0培养6h, 谷胱甘肽生成量最高可达10.8g/L, 大幅度提高转化效率。另外, 酶法催化转化应用于发酵培养基中, 表明该工艺生产能力潜力很大, 这为今后源于微生物药物的发酵替代研究, 挖掘最佳生产水平, 提高产量, 降低成本, 奠定基础。

参考文献:

- [1]王玮玮, 唐亮, 周文龙, 等.谷胱甘肽生物合成及代谢相关酶的研究进展[J].中国生物工程杂志, 2014, 34(007): 89-95.
- [2]肖开芳, 李薇等, 谷胱甘肽生物合成途径及发酵条件研究, 中国生化药物杂志, 2008, 29