

谷胱甘肽的催化合成

内容简介

谷胱甘肽(GSH)在临床、保健品等行业有广泛用途,日本发酵法生产的谷胱甘肽基本垄断了中国市场,20世纪80年代日本开始构建具有高谷胱甘肽合成活性的工程菌。我国80年代对谷胱甘肽进行分离提取研究,但至今尚无谷胱甘肽生产的报道。

本书在构建重组菌 *E. coli* BL 21(pTrec-gsh) 的基础上,对谷胱甘肽合成酶系的表达、重组菌的高密度培养及谷胱甘肽的酶催化合成等方面进行了研究,为谷胱甘肽的工业化应用奠定了基础。主要研究工作有:

一、在成功构建表达谷胱甘肽合成酶系质粒(pTrec-gsh) 的基础上,筛选出高效、稳定表达该酶系的工程菌,并进行了酶的表达条件的优化,最终采用两步培养法使谷胱甘肽合成酶活达 114.9 u / mg。

二、对重组菌 *E. coli* BL 21(pTrec-gsh) 进行了高密度培养研究。乙酸严重抑制菌体生长,浓度低于 8 g / L 时对谷胱甘肽合成酶活性表达无影响。采用改造的 M9 培养基,通过“平衡 DO-STAT 策略进行补料培养,最终菌体浓度达到 33.1 g

DCW / L,单位重量菌体的谷胱甘肽合成活性基本保持不变,总表达量比分批培养提高 4 倍多。

三、对 GSH I 及 GSH II 的酶学特性进行了研究,确定了 GSH I 及 GSH II 的最适温度均为 37 ℃,最适 pH 分别为 7.4 和 6.7, Mg^{2+} 对谷胱甘肽合成必不可少;谷胱甘肽与谷氨酸竞争性抑制 GSH I 的活性;ATP 对 GSH I 及 GSH II 均存在抑制。

四、对重组 *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) 菌体催化合成谷胱甘肽进行了研究,确定了最适条件为: 60 mg / mL 的细胞用量、60 mmol / L L-Glu、20 mmol / L L-Cys、20 mmol / L Gly、20 mmol / L ATP、 Mg^{2+} / ATP 为 1 ~ 5,磷酸盐缓冲液浓度为 50 mmol / L。

五、针对利用酵母糖酵解途径生产 ATP 与工程菌 *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) 耦联生产谷胱甘肽的过程,首次通过降低初始磷酸缓冲液的浓度,缓解了两体系在磷酸缓冲液浓度方面的矛盾。在 0.25 mol / L、pH 7.0 的磷酸缓冲液中,优化反应条件,耦联体系合成的谷胱甘肽达 1.6 g / L,高于两体系在同样反应条件合成的谷胱甘肽的加和,并且首次采用延缓加入甘氨酸的手段减轻了谷胱甘肽对 GSH I 的反馈抑制,使合成的谷胱甘肽达 2.13 g / L,提高了 30.7%。

六、对重组菌 *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) 的固定化及其合成谷胱甘肽能力进行了研究,优化了反应条件。在此基础上,与酵母共固定化,在填充床反应器中,GSH 合成量达 1.24 g / L,比固定化重组菌 *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) 直接加入 ATP 效率提高 24.2%。

七、根据五的结论重新构建了两重组菌 *E. coli* BL 21

(pTrec-gsh I) 和 *E. coli* BL 21(pTrec-gsh II) , 分别与 *S. cerevisiae* 共固定化, 在串联填充床反应器中反应, 谷胱甘肽产量达 2.41 g / L, 首次实现了解除抑制条件下谷胱甘肽的连续合成, 为谷胱甘肽的酶催化合成提供了新的思路。

Abstract

Glutathione(GSH) is an antioxygen substance which has diverse applications in medicine, health care and etc. GSH via fermentation in Japan has taken almost all market of China. Rcombi-nant strain was constructed in Japan in 1980s. There are no reports about the production of GSH in China.

In this thesis, with the recombinant *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) , the expression of GSH synthetases, high density culture and enzymatic synthesis of GSH were studied. Following are the main aspects studied.

1. The screen of the recombinant strain for the expression of GSH synthetases was studied and the expression conditions were optimized. The specific activity of *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) reached to 114 u / mg via two-step cultivation.

2. The high cell density culture of *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) was researched. Acetic acide inhibited the growth of *E. coli* BL 21 (pTrc-gsh) but did not inhibit the expression of expected productions when the concentration of acetic acid was lower than 8

g / L. The fermentation was developed using the strategy called a balance DO-stat in fed batch cultivation of *E. coli* BL 21 (pTrc-gsh) . As the result, the cell concentration was increased to 33. 1 g DCW / L with almost invariable GSH synthesizing activity, 93. 6 u / mg.

3. The enzyme properties of GSH I and GSH II were studied. The optimum temprature of GSH I and GSH II was 37 °C , the optimum pH of GSH I and GSH II was 7. 4 and 6. 7 respectively. GSH inhibited the activity of GSH I competitively with glutamate. ATP inhibited the activity of both GSH I and GSH II .

4. The condition of GSH synthesis by acetone-permeated cells were optimized, which are 60 mmol / L L-glutamate、20 mmol / L L-cysteine、20 mmol / L glycine、20 mmol / L ATP、1 ~ 5 of Mg^{2+} / ATP in 50 mmol / L phosphate buffer(pH 7. 0) .

5. The synthesis of GSH by *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) coupled with production of ATP from adenosine was studied. The inconsistency of two systems in the concentration of phosphate buffer was solved by decreasing concentration to 250 mmol / L. The conditions in 250 mmol / L phosphate buffer was optimized and the yield of GSH was increased to 1. 6 g / L, which was higher than that from each system seperatedly under the same condations. Addation of glycine after glutamate and cystein decreased the inhibition of GSH to GSH I . The yield of GSH reached to 2. 13 g / L which was 30. 7% higher than the control.

6. GSH synthesis by immobilized *E. coli* BL 21(pTrc-gsh)

cells were studied. The yield of GSH was 1.24 g / L by co-immobilized *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) and *S. cerevisiae* in packed bed reactor, which was higher than that via *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) with ATP addition alone.

7. The recombinant strains of *E. coli* BL 21(pTrc-gsh I) and *E. coli* BL 21(pTrc-gsh II) which expressed GSH I and GSH II respectively were constructed respectively. The yield of GSH was increased when the ratio of the two strains was kept in 3:1. Coupled with *S. cerevisiae* respectively, the two co-immobilized systems could yield 2.41 g / L GSH in tandem packed bed reactors. That released the inhibition of GSH I from GSH completely. The strategy put forward a novel idea in the field of GSH synthesis.

目 录

内容简介	1
Abstract	1
第一章 绪论	1
1.1 谷胱甘肽的生理功能及应用	1
1.2 谷胱甘肽合成的研究概况	6
1.3 重组大肠杆菌的高密度培养	23
1.4 本课题的意义、预达到的目标及内容	29
第二章 重组菌 <i>E. coli</i> BL 21(pTrc-gsh) 的构建及表达	31
2.1 导言	31
2.2 材料及方法	32
2.3 参数检测	39
2.4 结果与讨论	42
2.5 小结	55
第三章 重组 <i>E. coli</i> BL 21(pTrc-gsh) 的高密度培养	57
3.1 导言	57

3.2	材料与方法	58
3.3	结果与讨论	64
3.4	小结	78
第四章	谷胱甘肽合成酶系酶学性质的研究	80
4.1	导言	80
4.2	材料与方法	81
4.3	参数检测	83
4.4	结果与讨论	85
4.5	小结	96
第五章	重组 <i>E. coli</i> BL 21(pTrc-gsh) 细胞催化合成谷 胱甘肽的研究	97
5.1	导言	97
5.2	材料与方法	98
5.3	结果与讨论	99
5.4	小结	109
第六章	<i>E. coli</i> BL 21(pTrc-gsh) 与 <i>S. cerevisiae</i> 耦联合 成谷胱甘肽的研究	110
6.1	导言	110
6.2	材料与方法	112
6.3	分析检测	113
6.4	结果与讨论	116
6.5	小结	129
第七章	固定化重组菌细胞催化合成谷胱甘肽的研究	131
7.1	导言	131

7.2	材料与方法	132
7.3	结果与讨论	134
7.4	小结	152
第八章 重组 <i>E. coli</i> BL 21(pTrc-gsh I) 及 <i>E. coli</i> BL 21		
	(pTrc-gsh II) 的构建及谷胱甘肽的合成	154
8.1	导言	154
8.2	材料及方法	155
8.3	结果与讨论	158
8.4	小结	166
第九章 结论		168
参考文献		176
后记		191

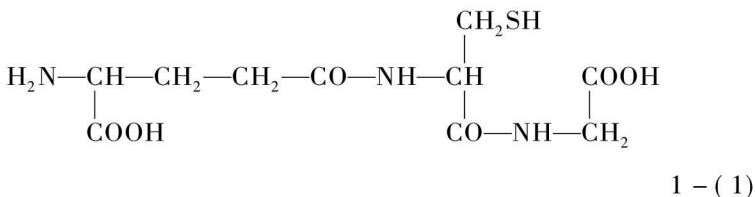
第一章

绪 论

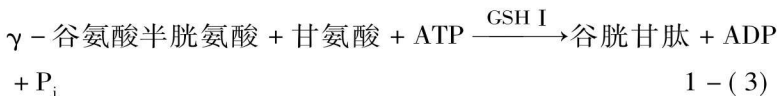
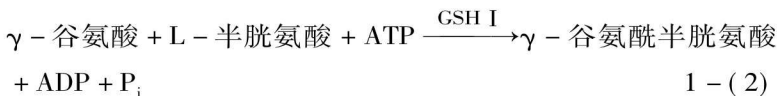
1.1 谷胱甘肽的生理功能及应用

谷胱甘肽 (GSH) 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过肽键形成的三肽化合物, 含有一个特殊的 δ -肽键, 分子式见式 1-(1), 全称为 L- γ -谷氨酰-半胱氨酰-甘氨酸 (L- γ -Glu-Cys-Gly)。1921^[1] 年 Hopkins F. G. 首先发现了谷胱甘肽, 1930 年谷胱甘肽的化学结构得以确证, 分子量为 307.33, 熔点 189~190℃。它分为还原型 (GSH) 和氧化型 (GSSG) 两类。谷胱甘肽在自然界中主要存在于酵母、动物肝脏、肌肉和血液中, 是细胞内最丰富的小分子巯基醇类化合物^[2]。人红细胞中谷胱甘肽含量甚多, 而且几乎全部是还原型。许多植物, 如: 蔬菜、豆类、谷物、薯类等也含有谷

胱甘肽。谷胱甘肽在体内有巯基缓冲剂的作用，它在还原型与氧化型之间循环。



生物体内的谷胱甘肽是由两个酶催化合成的，每步反应都需一个分子的 ATP，合成一分子谷胱甘肽需要二分子的 ATP。产物谷胱甘肽反馈抑制谷氨酰半胱氨酸合成酶（GSH I）的活性，使谷胱甘肽浓度仅保持在生理水平。



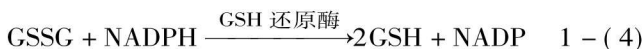
1.1.1 谷胱甘肽的生理功能

谷胱甘肽在生物体内主要以还原形式存在，具有多方面的生理功能。

1.1.1.1 维持细胞的正常氧化还原态

两分子含有巯基的还原型谷胱甘肽氧化结合为一分子含

有二巯基（-S-S-）的氧化型谷胱甘肽（GS-SG）。在动物细胞和肝脏中存在谷胱甘肽还原酶，可以利用还原型的辅酶 II 将 GSSG 还原为 GSH，大多数生物细胞中 GSH 与 GSSG 之比大于 500。



1. 1. 1. 2 保护并恢复需要巯基的酶的活性

谷胱甘肽可以在红血球内合成，含量甚多（70 mg / 100 mL，红血球），是体内的主要抗氧化剂，能抵抗氧化剂对巯基的破坏作用，保证红血球持续发挥其运输功能，保护细胞膜中含巯基的酶的活性，甚至能恢复被破坏的巯基，使酶的活性得以恢复，促进糖、脂肪与蛋白质的代谢。

1. 1. 1. 3 参与氨基酸的跨膜运输

γ -谷氨酰转移酶位于细胞膜上，它催化谷胱甘肽上的 γ -谷氨酰基转移至受体氨基酸如半胱氨酸或谷酰胺的 γ -氨基上的反应。谷胱甘肽在细胞膜该酶存在位点浓度较高，被该酶催化脱去 γ -谷氨酰基形成 γ -谷氨酰氨基酸后被别的器官的细胞吸收环化成 5-氧脯氨酸，被转运的氨基酸则被释放。谷胱甘肽脱去 γ -谷氨酰基的剩余部分分解为半胱氨酸和甘氨酸，这形成了 γ -谷氨酰循环^[2]。

1. 1. 1. 4 多种酶的辅酶或辅基

谷胱甘肽参与三羧酸循环和糖代谢，使机体获得能量，组织中有许多酶的活性也需要谷胱甘肽的存在才能发挥，其中有一些酶是以谷胱甘肽为辅酶的，如：甲醛脱氢酶。

1. 1. 1. 5 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH Px）和谷胱甘肽还原酶清除体内的过氧化脂质

正常人服用解热剂（如：阿司匹林）、磺胺制剂或抗疟剂后，在体内代谢过程中产生少量 H_2O_2 或过氧化脂等过氧化物，引起某些酶失活，引起细胞和组织的损伤。此时， H_2O_2 与谷胱甘肽作用生成 H_2O 和 GSSG，所生成的 GSSG 在谷胱甘肽还原酶的催化下重新又被 $NADPH_2$ 还原。由于正常人红细胞中 $NADPH_2$ 是充足的，所以谷胱甘肽几乎都是还原型的，巯基化合物得以保持在还原态。如果红细胞中 $NADPH_2$ 生成受阻，则还原型 GSH 减少，GSSG 增多，引起所谓的“蚕豆病”，该类病伴有黄疸的溶血性贫血^[3]。

1. 1. 1. 6 清除有害毒物和代谢物

谷胱甘肽具有与毒性物质结合排出体外的作用。许多化学致癌物大多为亲电子剂，而谷胱甘肽在谷胱甘肽 - 硫 - 转移酶的作用下很容易与这些亲电子剂结合，使亲电子剂灭活，然后在其他相关酶的作用下生成硫醇尿酸排出体外。

1. 1. 1. 7 谷胱甘肽还参与下列重要的代谢反应

药物在肝脏内通过含有细胞色素 P - 450 的代谢酶系 (混合功能氧化酶), 经氧化、羟基化等反应后, 与谷胱甘肽的巯基结合成水溶性化合物排除体外, 参与药物代谢。

与潜在致癌物在肝脏内的活性中间体结合成非致癌物。通过其巯基的自身氧化保护体内重要酶蛋白中的巯基, 防止由于溶血磷脂等的增加而导致的对肝脏、心肌等的损害。

1. 1. 2 谷胱甘肽的应用

由于谷胱甘肽是一种含有巯基的非常特殊的氨基酸衍生物, 因此有广泛的用途。

1. 1. 2. 1 谷胱甘肽作为试剂应用于生化、医学等的研究与测定

谷胱甘肽在医学及生化领域具有重要作用, 作为多种酶, 如过氧化物酶的底物, 广泛应用于生化和医学领域的测定、分析。

1. 1. 2. 2 作为生化药物在临床上已用于治疗多种疾病

谷胱甘肽作为解毒剂, 可用于丙烯晴、氟化物、一氧化碳及重金属等中毒的治疗; 减轻放射性化疗和肿瘤药物引起的白血球减少症状; 保护肝脏, 抑制脂肪肝的形成, 减轻肝炎症状; 纠正乙酰胆碱、胆碱酯酶的不平衡, 起到抗过敏的

作用；作为抗氧化剂保护细胞膜，防止细胞溶血及促进高铁血红蛋白的还原；防止皮肤色素沉积和黑色素的形成，改善皮肤光泽；抑制白内障、角膜及视网膜疾病的发展，是治疗眼病的常用药物。

近年来，对谷胱甘肽的研究发现：谷胱甘肽能改善性功能，具有抑制艾滋病病毒之功效。

1.1.2.3 与其他药物组成复合治疗和保健药品

如：与赖氨酸、鸟氨酸形成盐，用于治疗肝病；与维生素 C 一起制成口服胶囊，用于防止空气污染和紫外线照射诱发的肿瘤；制成谷胱甘肽亚铁盐，治疗缺铁性贫血症等。

1.1.2.4 谷胱甘肽在食品加工工业中也有广泛的用途

面制品加工中，加入谷胱甘肽能起还原作用，并起到强化氨基酸的作用；奶品及婴儿食品中加入谷胱甘肽起到抗氧化作用，增强婴儿食品及奶制品的营养价值；在罐头加工中加入谷胱甘肽可防止颜色变黑等。

1.2 谷胱甘肽合成的研究概况

1.2.1 国外关于谷胱甘肽的研究概况

自谷胱甘肽发现以来，随着对它的重要性的认识和日

益广泛的应用，人们不断探索高效的合成工艺。几十年来，谷胱甘肽的生产工艺不断改进，生产效率逐步提高，概括起来有以下几种：

1.2.1.1 化学合成法^[4]

谷胱甘肽是由三个氨基酸组成的多肽，随着多肽合成技术的日渐成熟，人们能够用化学合成法合成谷胱甘肽，其合成工艺相对简单，但由于活性产物分离不容易、需要化学拆分、手段繁琐、产品纯度不高等原因应用不广。

1.2.1.2 从谷物胚芽中提取^[5]

谷物胚芽特别是小麦胚芽中含有大量谷胱甘肽。早在20世纪40年代，人们就通过沉淀蛋白质从麦胚中粗提谷胱甘肽；50年代初，利用有机溶剂将谷胱甘肽从胚芽中抽提出来^[6]。随着分离技术的发展，谷胱甘肽的提取工艺有很大提高，如：淀粉酶、蛋白酶的应用，高效膜分离技术的应用等大大简化了操作工艺，提高了谷胱甘肽的收率。一般的工艺流程主要包括萃取→盐析→离子交换（或膜分离）→浓缩→结晶。但此法存在许多问题，如：谷胱甘肽得率低、成本高、有机溶剂污染严重、纯度不高等，而且消耗大量粮食，因此已很少使用。

1.2.1.3 生物酶催化合成谷胱甘肽

1. 谷胱甘肽合成酶的研究

采用生物酶合成法合成谷胱甘肽首先要对其生物合成酶