

南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成酶法生产谷胱甘肽

丁燊¹, 缪锦来², 唐啸尘¹, 李光友², 简纪常¹, 吴灶和¹

(1. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要:以南极微藻中的南极硅藻 GJ01 (*Berkeleya rutilans* GJ01) 为材料, 采用分光光度法研究谷胱甘肽的前体氨基酸等因子对谷胱甘肽合成酶的影响, 并在少量可供应 ATP 的南极硅藻 GJ01 细胞存在的情况下, 对其游离谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽的条件进行优化。结果表明, 南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成酶的最适温度为 10~25 ℃, 最适 pH 值为 7.0; Glu、Cys、Gly 的最适浓度分别为 24 mmol·L⁻¹、12 mmol·L⁻¹、8 mmol·L⁻¹。此外 Met 对谷胱甘肽的合成也有影响, 而且南极硅藻 GJ01 的谷胱甘肽合成酶还具有 Mg²⁺ 依赖性。正交实验表明, 南极硅藻 GJ01 游离谷胱甘肽合成酶, 产生谷胱甘肽的最理想条件为, 温度 30 ℃、Cys 浓度 10 mmol·L⁻¹、Mg²⁺ 浓度 30 mmol·L⁻¹、pH 7.5。该方法用于工业化生产谷胱甘肽是可行的。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 829–835]

关键词: 南极硅藻 GJ01; 谷胱甘肽; 谷胱甘肽合成酶法; 优化条件

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)05–0829–07

谷胱甘肽 (GSH) 是生物细胞中最丰富的巯基化合物, 由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶两种酶 (一般合称为谷胱甘肽合成酶系) 依次催化合成。其合成受多种因素调节, 其中以谷氨酰半胱氨酸合成酶的调节为主。前体氨基酸如半胱氨酸的可利用性对谷胱甘肽的合成具有较重要的调节作用^[1]。目前工业上谷胱甘肽的规模化生产方法主要有化学合成法、酶法和发酵法。发酵法中最常用的是酵母发酵法, 近年来已从菌株的改良、发酵工艺的优化等角度进行了较多的研究。Alfara 等^[2]优化了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 生产谷胱甘肽的发酵过程, 其产量提高了 56%; Alfara 等^[3]还研究了前体氨基酸与酿酒酵母产谷胱甘肽的关系, 发现半胱氨酸是其合成的关键氨基酸; 刘娟等^[4]将生物量高的酵母菌与谷胱甘肽含量高的酵母菌进行融合, 构建了高产谷胱甘肽的融合菌株; 王正刚等^[5]研究也表明, 在含有氨基酸前体物的情况下, 酵母可以合成积累谷胱甘肽。童群义等^[6]经诱变处理可以筛选具有较高谷胱甘肽产量的酵母菌株。酶法合成谷胱甘肽具有产率高、分离提取简单、容易控制等优点, 因此酶法合成谷胱甘肽也备受关注, 如经通透处理的酵母与高产谷胱甘肽的大肠杆菌

(*Escherichia coli*) 耦联, 可以有效地生产谷胱甘肽^[7]; 将大肠杆菌谷胱甘肽合成酶系和 ATP 再生系统固定化, 可以有效地产生谷胱甘肽^[8]; 重组大肠杆菌 WSH-KEI 经过细胞通透性处理后能够积累谷胱甘肽^[9]。但是酵母菌和大肠杆菌的产量难以继续提高, 不能最大限度地满足谷胱甘肽生产的需求, 因此客观上要求我们努力寻找其他更有效的材料和方法。

本课题组经研究发现, 南极硅藻 GJ01 含有较高水平的谷胱甘肽, 同时其谷胱甘肽合成能力 (GPA) 也较高, 故它们极可能成为谷胱甘肽新的来源。南极硅藻低温活性的谷胱甘肽合成酶系, 应用在实际生产中可以减少能量供应, 以最大限度地降低成本。本研究将探讨谷胱甘肽前体氨基酸等因素对其谷胱甘肽合成酶系的影响, 并对酶法合成谷胱甘肽的条件进行了优化, 以期南极硅藻合成酶系在谷胱甘肽生产领域的应用提供理论基础和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

藻种: 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室分离纯化的南极硅藻 GJ01 (*Berkeleya rutilans* GJ01), 保存于 4 ℃ 冰箱, 实验前进行复活和纯化;

收稿日期: 2006–11–22; 修订日期: 2007–03–29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40206022; 40406003).

作者简介: 丁燊 (1971–), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为海洋微生物学. E-mail: dingy@gdou.edu.cn

通讯作者: 缪锦来. E-mail: miaojinlai@fio.org.cn

培养基:f/2培养基^[10];试剂:腺苷三磷酸(ATP),腺苷单磷酸(AMP),Amresco分装;GSH,日本产;邻苯二甲醛(OPT),Cys, Glu, Gly, Sigma;二硫苏糖醇(DTT),Biomol;聚乙烯吡咯烷酮(PVP),Sigma;牛血清白蛋白(BSA),上海生工;其他普通试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 谷胱甘肽合成能力的性质测定 先以对数生长初期的南极硅藻为藻种,以20%的比例接种至f/2培养基^[10],在可控温光照培养箱中培养,温度为6~8℃,光强为20~30 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照周期为12 h光/12 h暗,每天摇动4~5次,共培养10 d。然后以6 000 r/min转速离心8 min收获南极硅藻GJ01,再用50 mmol·L⁻¹磷酸钾盐缓冲液(pH 7.3, PBS)清洗数次,然后液氮研磨,加入5~10倍同样的PBS缓冲液,反复冻融3次,以12 000 r/min离心10 min,取上清作为粗酶液,用于测定GPA的各种性质。

(1)GPA测定:反应体系为1 mL南极硅藻提取上清液,含50 mmol/L磷酸钾盐缓冲液(pH 7.3)、L-Glu 60 mmol·L⁻¹, L-Cys 20 mmol·L⁻¹, Gly 20 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol·L⁻¹, ATP 50 mmol·L⁻¹,于37℃反应30 min。冰浴终止反应后,按邻苯二甲醛(OPT)荧光法^[11]测定谷胱甘肽浓度,定义每mg蛋白每h生成1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的谷胱甘肽为1个合成活力单位。采用Bradford法^[12]测定蛋白质浓度。

(2)不同温度下南极硅藻GJ01 GPA的测定 温度梯度设为2℃、6℃、10℃、18℃、25℃、37℃(梯度经预实验确定,下同),各实验组除温度外,其他条件同(1)中GPA的测定,并按其方法测定GPA。每组实验重复3次,结果取平均求值,下同。

(3)不同pH下南极硅藻GJ01 GPA的测定 设pH梯度为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,各实验组除pH外,其他条件同(1)中GPA的测定,并按其方法测定GPA。

(4)不同浓度前体氨基酸下南极硅藻GJ01 GPA的测定 分别改变其中一种前体氨基酸的浓

度,其他条件同(1)中GPA的测定,并按其方法测定GPA。每种氨基酸设5个实验组,即Glu浓度梯度设为:8 mmol·L⁻¹、16 mmol·L⁻¹、24 mmol·L⁻¹、32 mmol·L⁻¹和40 mmol·L⁻¹;Cys和Met浓度梯度设为:3 mmol·L⁻¹、6 mmol·L⁻¹、9 mmol·L⁻¹、12 mmol·L⁻¹、15 mmol·L⁻¹,加入Met时不加Cys;Gly浓度梯度设为:4 mmol·L⁻¹、8 mmol·L⁻¹、12 mmol·L⁻¹、16 mmol·L⁻¹、20 mmol·L⁻¹。每种氨基酸的实验组均按浓度升高的次序分别定义为第1组~第5组。每种氨基酸实验分别设立空白对照组,均定义为第0组。

(5)不同镁离子浓度下南极硅藻GJ01 GPA的测定 设镁离子浓度梯度为2.5 mmol·L⁻¹、5.0 mmol·L⁻¹、7.5 mmol·L⁻¹、10.0 mmol·L⁻¹、12.5 mmol·L⁻¹,其他条件同(1)中GPA的测定,并按其方法测定GPA。

1.2.2 酶法产谷胱甘肽的条件优化 在少量硅藻GJ01存在的情况下,探讨谷胱甘肽合成酶系合成谷胱甘肽的特点,并将其条件进行优化。合成系统总体积设为100 mL,其中含:0.1 mol·L⁻¹磷酸钾盐缓冲液(pH随正交方案变动);10 mL提取的酶液;10 mmol·L⁻¹ AMP;24 mmol·L⁻¹ Glu;8 mmol·L⁻¹ Gly;MgCl₂、Cys按正交方案分别加入。然后加入经丙酮通透处理过的硅藻GJ01^[7],使其终浓度达到 6×10^7 cell/mL,温度和体系的pH值随正交方案变动,光照10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,25℃恒温反应240 min,每30 min摇动1次。按正交方案实验分为9组,每组各设3个重复,最后按1.2.1中谷胱甘肽的测定方法分别测定胞内和胞外谷胱甘肽浓度,计算谷胱甘肽的总产量。硅藻GJ01的通透处理,即将冰藻用冰冻的90%丙酮处理5 min后抽滤,低温保存备用^[8]。正交水平表及正交方案分别见表1和表2。最后根据其结果进行放大验证实验,即采用5 L体系,MgCl₂、Cys、pH和温度按最优方案设定,其他条件相同,按1.2.1的方法测定谷胱甘肽浓度,并统计其总产量。设定3个重复。

表1 正交实验因子水平表

Tab.1 L₉(3⁴) orthogonal test designed for optimization of enzyme method with *B. rutilans* GJ01

水平	因素 Factor			
Level	温度(A) /℃ Temperature	Cys(B) /(mmol·L ⁻¹)	Mg ²⁺ (C) /(mmol·L ⁻¹)	pH(D)
1	30	20	10	8.0
2	18	30	20	7.0
3	25	10	30	7.5

1.2.3 数据处理 采用统计分析软件包 SPSS11.0 进行数据分析与处理, 并计算标准误。

2 结果与分析

2.1 不同温度对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

不同温度对南极硅藻 GJ01 GPA 的影响如图 1 所示。在 10~25℃ 谷胱甘肽合成能力较高, 接近或超过 $20.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$, 是 GPA 的最适温度。温度为 37℃ 时 GPA 开始下降, 约为 $15.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 。在低温 2℃ 和 6℃ 时, 也具有谷胱甘肽的合成能力, 大小在 $7.5 \sim 10.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 之间。

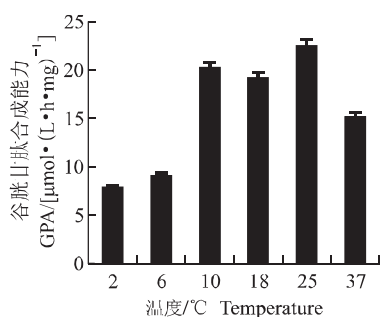


图1 温度对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

Fig.1 Influence of temperature on GPA of *B. rutilans* GJ01

2.2 不同 pH 值对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

不同 pH 值对南极硅藻 GJ01 GPA 的影响如图 2 所示。pH 为 7.0 时, 是硅藻 GJ01 GPA 的最适值, 高达 $35.7 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$; 高于或低于 7.0 时, GPA 都显著下降, pH 为 6.0 时, 最低为 $12.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 。

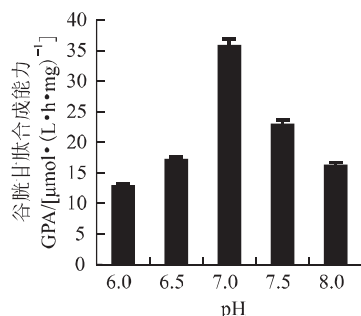


图2 pH对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

Fig.2 Influence of pH on GPA of *B. rutilans* GJ01

2.3 不同前体氨基酸浓度对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

前体氨基酸对南极硅藻 GJ01 GPA 的影响见图 3。可见, Cys 的浓度低于 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (第 4 组) 时, GPA 随其浓度增大而增大, 最高达到 $34.9 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$; 超过该浓度时, GPA 则下降。Glu 浓度为 $24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (第 3 组) 时, GPA 最大, 为 $18.9 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 。Gly 最适浓度在 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (第 2 组), GPA 达 $29.4 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$; 当其浓度进一步上升时, GPA 则开始下降。Met 浓度小于 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (第 4 组) 时, GPA 与其浓度呈正相关, 最高为 $30.3 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$; 但超过 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 开始出现下降趋势。在每一种氨基酸反应系统里, 不加相应前体氨基酸的条件下, GPA 在 $2.0 \sim 5.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 之间, 远远低于各相应的实验组。

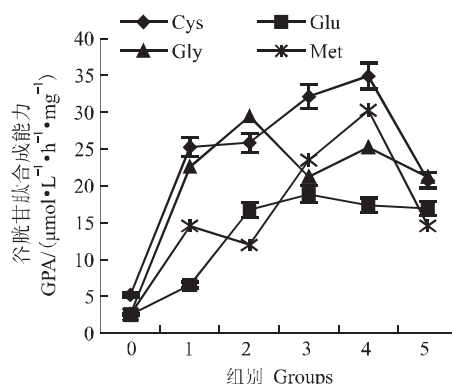


图3 前体氨基酸对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

Fig.3 Influence of substrate amino acid on GPA of *B. rutilans* GJ01

2.4 不同镁离子浓度对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

Mg^{2+} 对南极硅藻 GJ01 GPA 的影响见图 4。可明显地发现, 当 Mg^{2+} 浓度在 $10 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, GPA 最高, 说明是最适的镁离子浓度; 其中在 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, GPA 达到最大, 为 $34.5 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 。值得注意的是对照组的活力并非特别低, 为 $15.2 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{mg})^{-1}$ 。

2.5 酶法生产谷胱甘肽条件优化的结果

在少量南极硅藻 GJ01 存在的情况下, 谷胱甘肽合成酶法生产谷胱甘肽条件优化的结果见表 2。可以看出, A、B、C、D 4 个因素对谷胱甘肽产量影响

的顺序由大到小依次为 B、C、D、A, 即 Cys 和 Mg^{2+} 浓度的影响要大于温度和 pH 值, 特别是 Cys 的影响非常显著。表观分析得出, 4 因素最佳组合为 $A_1B_3C_3D_3$, 即温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、Cys 为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 Mg^{2+} 为 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 为 7.5。通过 5 L 体系放大培养, 谷胱甘肽的产量可达到 $0.702\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 3), 略高于条件优化中的最高结果。

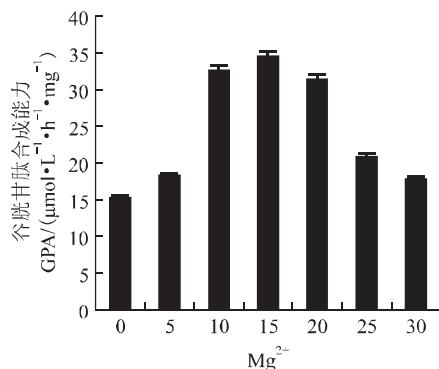


图4 Mg^{2+} 浓度对南极硅藻 GJ01 谷胱甘肽合成能力的影响

Fig.4 Influence of Mg^{2+} concentration on GPA of *B. rutilans* GJ01

3 讨论

本实验表明, 南极硅藻 GJ01 GPA 的最适温度

为 $10\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 且在低温 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时也具有一定的活力 (图 1), 说明南极硅藻 GJ01 的谷胱甘肽的合成酶属于低温酶, 在低温条件下也能合成生命活动所需的谷胱甘肽, 如果将其应用于谷胱甘肽的生产将大大减少能量的消耗。同时其 GPA 的最适温度要高于硅藻 GJ01 的最适生长温度 ($6\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[13], 表明在其生存的环境中 GPA 并未达到最大值, 但这种谷胱甘肽的合成酶同其他低温酶一样, 对南极硅藻的低温适应性是有利的。大肠杆菌 GPA 的最适温度为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[14], 可见嗜温微生物与南极硅藻 GJ01 的最适温度显然是不同的。该谷胱甘肽的合成酶较高的低温活性, 可能与它的低活化能和高效表达等因素有关, 其机理也应成为低温酶研究的一个重要方向。

pH 值是影响生物代谢和各种酶活力的另一重要因子。本实验结果表明, 南极硅藻 GJ01 的 GPA 最适 pH 值为 7.0 (图 2), 而 Watanabe 等^[14]报道大肠杆菌的 GPA 的最适 pH 为 8.5, 可见南极硅藻 GJ01 与嗜温微生物对 pH 的要求有较大的差异, 这个机制值得进一步探讨。而南极硅藻生长的最适 pH 值为 $8.0\sim 9.0$ ^[13], 可见其 GPA 的最适 pH 值低于生长的最适 pH 值, 说明南极硅藻 GJ01 能够维持胞内合适的酸碱度来有效地合成谷胱甘肽, 但其胞内的实际 pH 值需要深入研究。

表 2 酶法产谷胱甘肽的条件优化正交方案及结果

Tab.2 Orthogonal test scheme and results of optimization for GSH produce using enzyme method

试验组 Experimental group	因素 Factor				谷胱甘肽产量 / ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) GSH product
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.469
2	1	2	2	2	0.595
3	1	3	3	3	0.666
4	2	1	2	3	0.519
5	2	2	3	1	0.593
6	2	3	1	2	0.544
7	3	1	3	2	0.545
8	3	2	1	3	0.559
9	3	3	2	1	0.576
$\sum 1$	0.577	0.511	0.524	0.546	
$\sum 2$	0.552	0.582	0.563	0.561	
$\sum 3$	0.560	0.595	0.601	0.581	
优化水平 Optimal level	1	3	3	3	
极差 Range	0.025	0.084	0.077	0.035	
主次分析 Primary and secondary order	B>C>D>A				

表 3 验证实验结果

Tab.3 Results of verification experiment

试验组 Experimental group	谷胱甘肽产量 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) GSH product	平均产量 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Average GSH product
1	0.679	0.702
2	0.720	
3	0.708	

谷胱甘肽由 Cys、Glu、Gly 3 种前体氨基酸构成, 它们对谷胱甘肽产生的影响是可以预测的。南极硅藻 GJ01 在谷胱甘肽合成过程中, Glu、Cys、Gly 的最适浓度分别为 $24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此外 Met 对谷胱甘肽的合成也有影响, 在 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时谷胱甘肽合成速度最大 (图 3)。胞内 Cys 水平是谷胱甘肽合成的限制性因素, Cys 可以从转录和翻译后 (蛋白活性) 两种水平上调节谷胱甘肽的合成酶, 如乳清蛋白中含有丰富的 Cys, 能够促进谷胱甘肽合成^[15]。但 Cys 超过一定浓度, 却对谷胱甘肽的合成酶具有毒性^[16], 这与 Cys 转运系统有关, 南极硅藻 GJ01 在 Cys 超过 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 谷胱甘肽合成反而下降, 也说明了这一点。本研究进一步证实了 Cys 对谷胱甘肽合成的重要性。Met 与 Cys, 在代谢过程中具有部分相同的路径, 故 Met 能够间接地提供 Cys^[17]。本实验研究表明, Met 同 Cys 一样, 不同浓度能影响谷胱甘肽的合成, 说明在一定程度上 Met 可以代替 Cys 的作用。

从本实验结果看出, 当补充 Glu 浓度到 $24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 谷胱甘肽合成速度最快。说明维持较高的 Glu 水平对提高谷胱甘肽合成是有利的, 这是提高谷胱甘肽合成的有效方法。结果也表明, 前体氨基酸 Gly 浓度在 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 最有利于谷胱甘肽的产生。Gly 在一般情况下, 不决定谷胱甘肽的合成速度, 但当谷胱甘肽的合成酶过度表达时, Gly 对谷胱甘肽的合成也会起到调节作用^[18]。可见南极硅藻 GJ01 在本实验条件下, 谷胱甘肽的合成酶的表达量应该较高。但每种氨基酸前体物的调节机制还需深入探讨。

本实验结果表明, 硅藻 GJ01 的 GPA 是 Mg^{2+} 浓度依赖性的, 但并不是必需的。 Mg^{2+} 对谷胱甘肽的合成酶具有激活作用, 对 ATP 的产生也有影响^[7]。大肠杆菌谷胱甘肽的合成酶 Mg^{2+} 的最适浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[7]; 陶锐等^[19] 也确定 Mg^{2+} 浓度

为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酵母谷胱甘肽合成能力最高。本结果进一步证实了 Mg^{2+} 在谷胱甘肽合成过程中的作用, 提供适量的 Mg^{2+} 可以有效地促进谷胱甘肽的产生。

酶法生产谷胱甘肽具有高活性、无副产物等特点, 因此受到青睐。特别是对南极硅藻而言更为有利, 因为它比常温藻生长慢, 不利于发酵培养法生产谷胱甘肽。况且南极硅藻谷胱甘肽的合成酶具有低温活性, 可以利用低温减少能量消耗。本研究在少量硅藻 GJ01 细胞存在的情况下, 谷胱甘肽的合成酶可以高效地合成谷胱甘肽。表明在该合成系统里, 少量硅藻 GJ01 细胞可以有效地为谷胱甘肽的合成酶提供足够的 ATP, 对谷胱甘肽的合成具有启动和促进作用, 比单纯的酶法合成更为有效。从合成体系优化结果可见, Cys 和 Mg^{2+} 的影响要大于温度和 pH 值的。Cys 浓度和 pH 的最优条件与单因素实验结果一致, 但 Mg^{2+} 最佳浓度比本实验单因素影响和有关报道的结果要大。同时, 温度也明显高于单因素作用。对酶来讲, 温度越高催化能力越大, 条件允许的情况下可以采用这个优化方案。但是如果要充分利用南极硅藻的低温酶性质, 则可以适当降低温度, 使成本下降。正交实验得出的最佳方案通过验证实验得到了证实 (表 3), 说明最佳方案通过适当的放大培养是可行的, 但更进一步的放大培养还需要继续进行优化与证实。

酶法合成谷胱甘肽已作了多种尝试。如 Murata 等^[8] 将大肠杆菌谷胱甘肽合成相关酶和 ATP 再生系统固定化, 可以有效地产生谷胱甘肽。在本研究中, 以南极硅藻 GJ01 无细胞抽提液为谷胱甘肽的合成酶源, 以少量经通透处理的南极硅藻 GJ01 细胞作为 ATP 的补充来源, 并且 GJ01 细胞还具有启动谷胱甘肽合成的功能, 这样可以保证胞外游离酶和胞内酶都可以合成谷胱甘肽, 并且能够协调一致, 提高效率。这种合成体系的建立, 对南极硅藻在谷胱甘肽生产领域的推广应用有着积极的作用。但

是,为了进一步提高南极硅藻 GJ01 的谷胱甘肽产量,以及实行大规模的生产,还需要综合考虑众多的其他的相关因素。

参考文献:

- [1] Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and cultured astrocytes[J]. J Neurochem, 1990, 55: 2 091-2 097.
- [2] Alfafara C G, Miura K, Shimizu H, et al. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37: 141-146.
- [3] Alfafara C G, Kanda A, Shioi T, et al. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36: 538-540.
- [4] 刘娟,何秀萍,王雅琴,等.高产谷胱甘肽的酵母融合菌株的选育及其培养条件的研究[J].微生物学报,2003,43(1):99-103.
- [5] 王正刚,蔡正森,丁贵平.废弃啤酒酵母天然酶系生物合成谷胱甘肽[J].生物技术,2001,11(1):12-15.
- [6] 童群义,陈坚,李华钟.高产谷胱甘肽的酵母菌选育及其培养条件研究[J].工业微生物,2002,32(2):13-17.
- [7] 沈立新,魏东芝,张嗣良,等.大肠杆菌 BL21 (PTC-glh) 与酵母耦联合成谷胱甘肽的研究[J].生物工程学报,2001,17(4):452-455.
- [8] Murata K, Tani K, Kato J, et al. Glutathione production coupled with an ATP regeneration system [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1980, 10(1/2):11-21.
- [9] 李寅,陈坚,毛英鹰.前体氨基酸和三磷酸腺苷对重组大肠杆菌生产谷胱甘肽的影响[J].无锡轻工大学学报,1998,17(2):11-15.
- [10] Guillard R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) [J]. Can J Microbiol, 1962, 8: 229-239.
- [11] 郭黎平,刘国良,张卓勇.荧光光度法测定大豆提取液中还原型谷胱甘肽[J].东北师大学报:自然科学版,2001,33(1):34-38.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [13] 缪锦来,阚光锋,张波涛.南极冰藻 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 的优化培养[J].中国水产科学,2004,11(3):244-252.
- [14] Watanabe K, Yamata Y, Murata K. Glutathione production by *E. coli* cells with hybrid plasmid containing tandemly polymerized genes for glutathione synthetase [J]. Appl Microbiol, 1986, 24: 375-378.
- [15] Micke P, Beeh K M, Buhl R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients [J]. Eur J Nutr, 2002, 41: 12-18.
- [16] Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, et al. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus [J]. Biol Reprod, 1993, 49: 89-94.
- [17] Herschbach C, van der Zalm E, Schneider A. Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H₂S [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 461-473.
- [18] Noctor G, Arisi A C M, Jouanin L. The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implications for glutathione production during stress [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100: 255-263.
- [19] 陶锐,吴梧桐,许激扬.酶法制备谷胱甘肽工艺的研究[J].药物生物技术,1999,6(4):203-207.

GSH produce by GSH synthesis enzymes with Antarctic diatom *Berkeleya rutilans* GJ01

DING Yu¹, MIAO Jin-lai², TANG Xiao-chen¹, LI Guang-you², JIAN Ji-chang¹, WU Zao-he¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals; Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, State of Ocean Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: GSH is an essential component of the Asc-glutathione cycle, and its role in the protection of tissues from toxicants and keeping normal redox state of cells has been verified. It is synthesized from its constituent amino acids (Glu, Cys and Gly) by the consecutive actions of γ -blutamylcysteine synthetase and GSH synthetase, both of which are generally named GSH synthesis enzymes. Antarctic microalgae, one of the extreme microorganisms with special characters, is one of the main producers of primary production in marine ecology system of Antarctic pole region. Our former results showed that GSH content and GSH produce ability (GPA) of Antarctic microalgae were higher than those of control (mesophile microalgae). They have the potential to become new resources of GSH. In this paper, effects of amino acid contributed to GSH on GSH product activity of Antarctic diatom *B. rutilans* GJ01, isolated from five different phylum growing in Antarctic seawater and Antarctic ice, were studied, as well as the optimization of synthesis condition through free-cell GSH synthesis enzymes and a few *B. rutilans* GJ01 cells. GSH content, GSH produce ability and protein concentration were assessed using the spectrophotometer methods. It showed that the optimum temperature of GSH synthesis enzymes was 10 – 25 °C, and optimum pH of that was 7.0. The results also showed that optimum concentrations of amino acid such as Glu, Cys, and Gly were 24 mmol·L⁻¹, 12 mmol·L⁻¹ and 8 mmol·L⁻¹, respectively with only factor test. GPA of *B. rutilans* GJ01 was dependent on Mg²⁺, optimum concentration of which was 10 – 20 mmol·L⁻¹. It was disclosed through the orthogonal test that the primary and second order was respectively Cys, Mg²⁺, pH and temperature from high to low, and the optimum condition of GSH product was 30 °C, 10 mmol·L⁻¹ Cys, 30 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ and pH 7.5 using the method of free-cell GSH synthesis enzymes of *B. rutilans* GJ01. These results were also verified by the experiment with higher volume cultural system (5 L). It was concluded that the optimization of GSH synthesis condition using GSH synthesis enzymes method with the microalga, containing higher GSH, made it possible produce GSH as an industry. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 829 – 835]

Key words: Antarctic diatom GJ01; glutathione; glutathione synthesis enzymes method; optimized condition

Corresponding author: MIAO Jin-lai. E-mail: miaojinlai@fio.org.cn