

基因工程酶法结合酵母能量耦联高效合成 L-谷氨酰胺的研究

陈群英¹ 陈国安² 薛 彬³ 张显久² 殷志敏^{1*}

¹(南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

²(无锡江南大学科技园,无锡 214000)

³(南京大学生命科学院,南京 210092)

摘 要 通过 PCR 方法从 *Bacillus subtilis* 基因组 DNA 中扩增出谷氨酰胺合成酶基因(*glnA*),克隆至表达载体 pET28b,经测序鉴定后转化大肠杆菌 BL21(DE3),用 IPTG 及乳糖诱导表达。SDS-PAGE 分析表明,所表达的谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase,简称 GS)为可溶性蛋白,约占总菌蛋白的 80%。利用表达的 GS 蛋白 N 端的 6×His-Tag 对 GS 进行亲和层析,将获得的纯蛋白进行酶活性测定。结果表明,纯化的 GS 合成反应的最适温度为 60℃,最适 pH 为 6.5, Mn^{2+} 能明显提高 GS 的活性和稳定性。工程菌 BL21(DE3)pET28b-*glnA* 粗提物中 GS 的比活是宿主菌本身的 84 倍。以谷氨酸、 NH_4Cl 和 ATP 为底物的转化实验表明谷氨酸的转化率达 95% 以上。经筛选获得一株高效能量耦联酵母菌株,命名为 YC001,通过能量耦联表明,该系统对谷氨酸的转化率高达 80%,平均谷氨酰胺产量为 22g/L。

关键词 谷氨酰胺合成酶,诱导表达,能量耦联,高效转化

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0456-05

L-谷氨酰胺是人体内普遍存在的、不可缺少的条件性必需氨基酸,也是构成蛋白质的重要氨基酸之一。L-谷氨酰胺在生命活动中起着关键作用,对保持肌肉新陈代谢、细胞分化和生长、组织创伤的修复、体内毒素的中和有重要影响。因此,L-谷氨酰胺已广泛应用于营养补给、抗疲劳、胃肠道功能修复和提高人体免疫等方面^[1,2],其市场需求量日渐增长。

在国外,目前 L-谷氨酰胺主要以发酵法生产。而我国目前只有极少数厂家以发酵法生产,药品级 L-谷氨酰胺主要依赖进口。近年来,酶法合成 L-谷氨酰胺在国内外已开始有少量研究^[3,4]。在杨春玉等^[3]报道的酶法转化 L-谷氨酰胺的研究中,所用的谷氨酰胺合成酶(GS)为提取酶,成本高,且没有解决昂贵的 ATP 的问题,这是制约酶法合成 L-谷氨酰胺的关键问题。在 Wakisaka^[4]的研究中,虽然也利用酵母使 ATP 再生,但所用的 GS 依然为提取酶。虽然早在 1984 年,来源于 *Bacillus subtilis* 的 GS 就已经在大肠杆菌中表达^[5],但是该研究属理论性研究而非应用研究,从表达载体到研究目的和侧重点均与本研究不相同。本研究利用基因工程的方法,通过基因重组,在大肠杆菌中获得大量表达的重组 GS,由于表达水平很高,因此在反应中采用粗酶结合新鲜酿酒酵母发酵的 ATP 再生体系,从而使酶法合成 L-谷氨酰胺的两

个问题得到解决,且成本低廉,为工业化酶法合成 L-谷氨酰胺奠定了很好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:大肠杆菌 DH5 α ,BL21(DE3),表达质粒 pET28b,多种酿酒酵母、面包酵母均为本实验室所保存。

1.1.2 试剂:Taq 酶,限制性内切酶 *Nde* I, *Bam*H I, T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司,小提质粒试剂盒及胶回收试剂盒购于 Promega 公司。IPTG,ATP,卡那霉素购于 Amersco 公司。 Ni^{2+} -IDA-resin 购于 Novagen 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体 pET28b-*glnA* 的构建:根据枯草杆菌谷氨酰胺合成酶基因(*glnA*)序列设计两条引物:Sense:5'-TTAC-CATATGGCAAAGTACACT-3',Antisense 5'-GGATTGGATCCTTA-ATATTGAGACAT-3',其中 Sense 含有 *Nde* I 酶切位点,Antisense 含有 *Bam*H I 酶切位点。酚-氯仿方法提取枯草杆菌基因组 DNA,以其为模板进行 PCR 反应,扩增产物以常规分子克隆手段连入 pET28b 载体中。重组子经上海晶泰生物工程有限公司测序证明其 DNA 序列与 EMBL 数据库中完全一致。

收稿日期 2003-10-28,修回日期 2004-01-02。

基金项目:南京师范大学高学历人才启动基金(No.2001SWXXQB914)和江苏省教委重点项目基金资助(No.2001SWXTSJBI13)。

* 通讯作者。Tel 86-25-83598216;Fax 86-25-86314554;E-mail Zhiminy_2000@yahoo.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2.2 重组蛋白的诱导表达、鉴定及纯化 :将工程菌 BL21 (DE3) pET28b-glnA 37℃培养至 OD_{600} 值为 0.4 左右,加入终浓度分别为 0.2mmol/L 的 IPTG 或 1g/L 的乳糖诱导 5h,收集菌体经超声破碎后取上清以 10% SDS-PAGE 鉴定。利用重组蛋白 N 端的 6× His-Tag,进行 Ni^{2+} 亲和层析纯化(具体操作参考 Novagen 公司 pET System Manual)。

1.2.3 GS 的活性测定 :GS 通常具有两种活性 :合成酶活性和 γ -谷氨酰转移酶活性。A 合成酶活性 : $Glu + ATP + NH_4^+ \rightarrow Gln + ADP + Pi$,参照 Bender 方法^[6]测定无机磷 ;B 转移酶活性 : $Gln + NH_2OH \rightarrow \gamma$ -glutamyl hydroxamate + NH_4^+ ,测定 γ -glutamyl hydroxamate,用南京建成公司的谷氨酰胺合成酶试剂盒测定活性。

1.2.4 酵母能量耦联反应体系的建立 :将培养的湿酵母在含 2% 甲苯的溶液中 37℃摇床振荡处理 2 h,进行通透性处理。处理过的酵母加入 20 mL 能量耦联反应体系中(0.2 mol/L 谷氨酸,0.3 mol/L NH_4Cl ,0.25mol/L 葡萄糖,10 mmol/L $MgSO_4$,10 mmol/L $MnCl_2$,0.2 mol/L 磷酸钾及 10u GS, pH 6.5),2 h 后再加入 GS,120 r/min 37℃振荡反应 12 h。

1.2.5 谷氨酰胺、葡萄糖和磷酸盐含量的测定 :耦联反应体系取样 400 μ L,离心后取上清测定谷氨酰胺、葡萄糖和磷酸盐含量。

谷氨酰胺的测定 :上清点样 1 μ L,进行氨基酸纸层析,层析溶液(正丁醇:乙酸:乙醇:水 = 4:1:1:2),茚三酮显色后,定量时采用洗脱溶液(0.1% 硫酸铜 :75% 乙醇 = 2 :38)洗脱,间歇振荡,10 min 后测 OD_{510} 值。根据同样方法得到的标准曲线计算出具体值。具体参考李建武等^[7]。

葡萄糖含量的测定 :上清 50 μ L,用蒸馏水定容至 1.0 mL,再加 1.0 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂于各管中,混匀,沸水浴加热 5 min 后用流水冷却,再加 4.0 mL 水,摇匀后测 OD_{540} 值。根据同样方法得到的标准曲线计算出具体值。具体参考黄洁等^[8]。

磷酸盐的测定 :上清稀释 10 倍,取 10 μ L,加去离子水 3 mL,再加定磷试剂 3 mL,45℃ 恒温水浴 25 min,测 OD_{660} 值。根据同样方法得到的标准曲线计算出具体值。具体参考李建武等^[7]。

2 结果与分析

2.1 GS-HIS 的诱导表达及纯化

工程菌 BL21(DE3) pET28b-glnA 经终浓度为 0.2mmol/L 的 IPTG 诱导 5h 后可得到大量的可溶性 GS。但 IPTG 价格昂贵且对宿主菌有一定的毒性。考虑到后续工业化生产的需要,我们尝试用终浓度为 1g/L 的乳糖取代 IPTG 作为诱导剂。结果表明,乳糖诱导效果与 IPTG 相差不大,可溶性 GS 约占总蛋白的 80%,且乳糖诱导的总蛋白量比 IPTG 高,总体的诱导效果优于 IPTG。随后利用 GS 重组蛋白 N 端的 6× His-Tag,进行 Ni^{2+} 亲和层析,获得纯度达 95% 以上的 GS(图 1)。

在后续研究中,为了避免杂蛋白的干扰,在研究 GS 的性质时使用了纯酶,但在面向工业生产的研究中(如酶活测定,

与酵母能量耦联的转化反应等),考虑到实际成本问题而采用了粗酶(超声破菌的上清)。

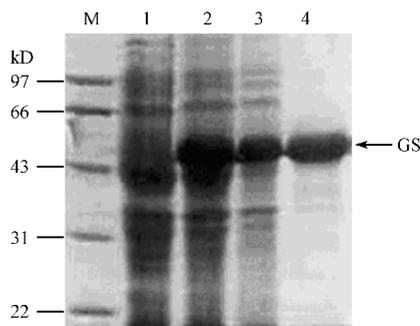


图 1 重组 GS 表达及纯化的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant GS expression and purification
1 : host BL21(DE3) ; 2 : lactose induced ; 3 : IPTG induced ;
4 : purified GS ; M : protein marker

由于合成酶活性和转移酶活性的一致性以及转移酶活性的易操作性,采用测定重组 GS 的转移酶活性来进行酶活性测定,结果表明含重组蛋白的粗提物酶比活为 12.18u/mg 蛋白,而空宿主菌的粗提物 GS 酶比活为 0.15 u/mg 蛋白,经重组诱导表达后酶活性提高了 84 倍。

2.2 温度和 pH 对 GS 合成酶活性的影响

在不同的温度和 pH 值下测定纯化的 GS 的合成酶的活性,实验结果(图 2)表明:温度和 pH 值均可明显影响 GS 的活性,不同的温度和 pH 下酶活性呈抛物线形变化,GS 合成反应的最适温度为 60℃,最适 pH 为 6.5。其中,最适 pH 与文献^[9]报道的基本一致,而最适温度 60℃为首次报道,具有一定的新意。

2.3 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对 GS 合成酶活性的影响

Bacillus subtilis GS 有两个不同的二价金属离子结合位点。对于很多不同生物来源的 GS 而言,二价金属离子是其发挥酶催化活性所必需的,其中 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 是两个常见的 GS 激活剂^[9]。通过谷氨酸转化试验结合纸层析分析表明:在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的终浓度均为 15 mmol/L 时,所得到的重组 GS 的合成酶活性最高;定磷法测定显示,在此浓度下 Mn^{2+} 的激活效应大大优于 Mg^{2+} ,约为后者的 12 倍,与文献^[9]报道基本一致。

2.4 酵母能量耦联体系的建立

能量耦联是一个提供 ATP 和利用 ATP 进行生物合成的耦联共反应体系,它包括自耦合 ATP 再生系统和种间耦合 ATP 再生系统。国外早在 80 年代就有研究,如日本千烟一郎等利用酿酒酵母细胞糖酵解过程中生成的 ATP,供给 GSH 合成的需要。国内目前在这方面的研究并不多见,且应用于工业化生产极少。

两个反应体系成功的耦联,除了双方都必须具有高活性和高稳定性的特点外,酵母细胞良好的通透性是必不可少的条件,即 ATP 和 ADP 或 AMP 能够自由出入细胞^[9]。细胞通透性的改变有很多种方法,如有机溶剂或超声波处理、空气干燥等。结合本室以往经验及有关文献^[10-12],我们用 2% 甲

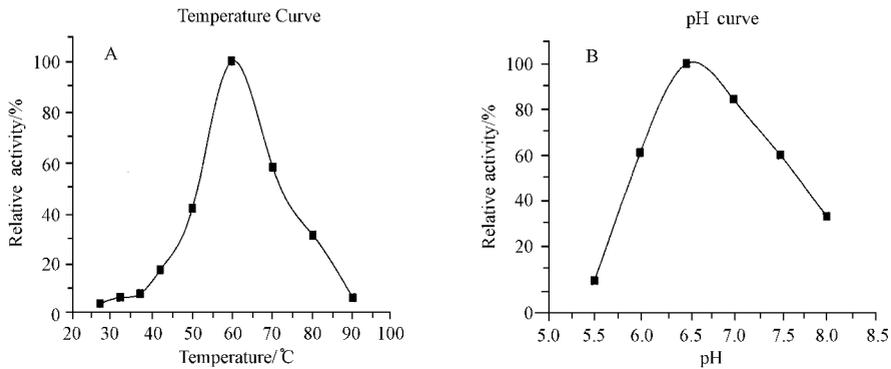


图2 温度和 pH 对 GS 合成酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature and pH on GS biosynthetic activity

A : temperature curve ; B : pH curve

苯对 10 株酵母菌株(编号为 Ye1 ~ Ye10)处理后进行耦联反应,筛选到一株能够与 GS 耦联高效合成 L-谷氨酰胺的菌株,命名为 YC001。

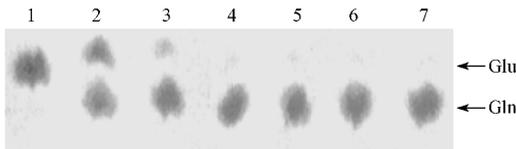


图3 重组 GS 对谷氨酸的高效转化纸层析

Fig. 3 Filter-paper chromatography of glutamine and glutamate

- 1 : no GS additional ; 2 : Mg^{2+} (15mmol/L) ; 3 : Mn^{2+} (10mmol/L) ;
 4 : Mn^{2+} (15mmol/L) ; 5 : Mn^{2+} (20mmol/L) ;
 6 : Mn^{2+} (25mmol/L) ; 7 : glutamine criterion

2.5 葡萄糖和磷酸盐浓度对耦联体系产谷氨酰胺的影响

葡萄糖经酵解产生 ATP 是能量耦联的重要环节,有效利用葡萄糖是成功耦联的必要条件,而合成 ATP 所必需的磷酸盐亦至关重要。研究了葡萄糖浓度和磷酸盐浓度对耦联体系中 L-谷氨酰胺产量的影响,葡萄糖及磷酸盐的正交实验表明,葡萄糖及磷酸盐对合成 L-谷氨酰胺均有一定的影响,浓度过高和过低结果都不理想(结果未显示)。因此,选择了恒定磷酸盐浓度(200mmol/L)进行葡萄糖浓度的优化及恒定葡萄糖浓度(250mmol/L)进行磷酸盐浓度的优化(图 4)。

2.6 能量耦联过程中葡萄糖、磷酸盐和谷氨酰胺的变化

在能量耦联体系中,酵母以葡萄糖提供能源,酵解产生 ATP,而 GS 则利用生成的 ATP 将谷氨酸转化成谷氨酰胺,同时产物 ADP 又作为糖酵解产 ATP 的必需底物再次合成 ATP,如此周而复始。进而研究了在此过程中原料葡萄糖、磷酸盐和产物谷氨酰胺的变化趋势(图 5)。从图 5 可以看出,在反应初期,葡萄糖浓度和磷酸盐浓度迅速下降,这是 1,6-二磷酸果糖(FDP)的积累阶段^[4,12]。当反应加入 GS,积累的 FDP 分解产生 ATP,谷氨酰胺即迅速产生,与此同时磷酸盐浓度又逐渐升高。

理论上 1mol 的葡萄糖可以产生 1mol 的 FDP 和 2mol 的 ATP,200 mmol/L 的谷氨酸底物只需要 100 mmol/L 的葡萄糖。

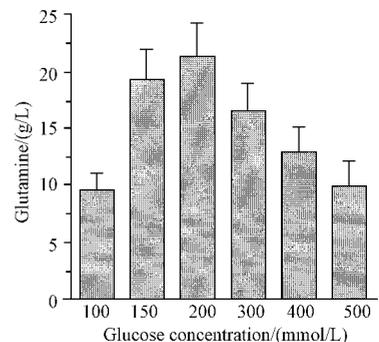
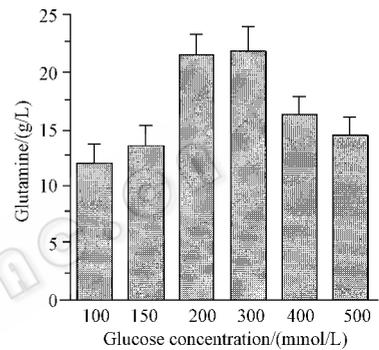


图4 葡萄糖和磷酸盐浓度对产 Gln 的影响

Fig. 4 Effect of glucose and phosphate concentration on glutamine production

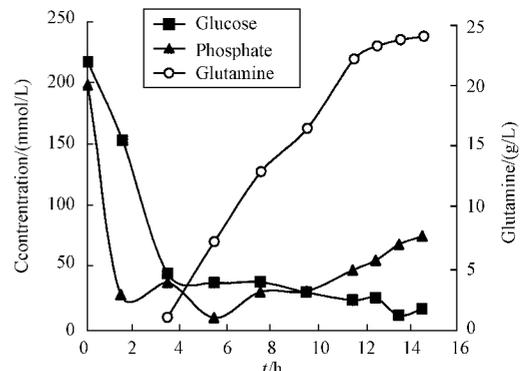


图5 耦联体系中葡萄糖、磷酸盐和谷氨酰胺的变化

Fig. 5 Changes of glucose, phosphate and glutamine in coupling assay
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

但图 5 实验结果表明需要至少 200 mmol/L 的葡萄糖。由图 5 可见,磷酸盐虽然在最初被大量消耗,但最后并没有随着 FDP 的分解而完全释放。

2.7 能量耦联反应中甲苯浓度的确定

实验中发现,不同浓度的甲苯处理酵母(处理方法见实验方法 1.2.4)对能量耦联体系合成谷氨酰胺的产量有较大影响。通过氨基酸纸层析分析并按照 1.2.5 方法定量,表明最适甲苯浓度为 2%,此时谷氨酰胺的产量最高,约为 22.5g/L。

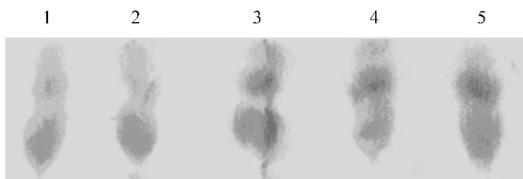


图 6 能量耦联体系中甲苯对合成 Gln 的影响

Fig. 6 Analysis of glutamine production by energy coupling with treated yeast

1: 1% Toluence; 2: 2% Toluence; 3: 3% Toluence;

4: 4% Toluence; 5: 5% Toluence

3 讨论

本研究成功构建了 *Bacillus subtilis* 谷氨酰胺合成酶基因(*glnA*)的原核表达载体 pET28b-glnA,将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)后成功地进行了诱导表达,表达产物具有明显的 GS 活性。利用位于重组蛋白氨基端的 His-Tag 进行亲和层析纯化,研究了纯酶的一些性质及酵母能量耦联系统合成谷氨酰胺的部分条件与参数。

IPTG 是经典的 lac 启动子诱导物,但由于 IPTG 的高成本及其对细菌的毒害作用,对获得大量 GS 重组蛋白及后续药用生产将产生诸多不利影响。本实验中用乳糖诱导,整体诱导效果较 IPTG 好,诱导的目的蛋白约占总菌蛋白的 80% 左右,实现了高表达和低成本,同时表达的重组 GS 具有良好的水溶性和较高活性,这些为利用酶法工业化生产谷氨酰胺奠定了很好的基础。

能量的有效利用一直是酶法合成谷氨酰胺需要解决的问题,低成本的能量耦联是工业化生产 L-谷氨酰胺的关键。本研究确立了与酵母耦联产生 ATP 的反应体系,即利用酵母使葡萄糖酵解产生 ATP,GS 利用生成的 ATP 将谷氨酸转化成谷氨酰胺,副产物 ADP 又作为糖酵解产生 ATP 的必需底物,再次合成 ATP。这一反应体系的建立首次成功地将与酵母耦联产生 ATP 的技术应用于酶法生产 L-谷氨酰胺,这也是国内成功利用酵母耦联产生 ATP 合成生物活性物质的极少数实例之一。利用 GS 和酵母耦联后对谷氨酸的转化率达到 80%,与传统的发酵法生产 L-谷氨酰胺相比,此方法提高了

生产效率、缩短了生产时程,并且大大降低了生产成本。本研究为利用酶法生产 L-谷氨酰胺的大规模工业化应用奠定了坚实的实验基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang LH(张利华). Glutamine and immunity. *Parenteral & Enteral Nutrition* (肠与肠营养),1994, **1**(1):82-84
- [2] Tu WF(屠伟峰). Current state of study of glutamine. *Parenteral & Enteral Nutrition* (肠与肠营养),1997, **5**(1):176-182
- [3] Yang CY(杨春玉), Ma CQ(马翠卿), Xu P(许平). Glutamine production by the enzyme method. *The Chinese Journal of Process Engineering* (过程工程学报),2002, **2**(6):529-533
- [4] Wakisaka S, Ohshima Y, Ogawa M *et al.* Characteristics and efficiency of glutamine production by coupling of a bacterial glutamine synthetase reaction with the alcoholic fermentation system of Baker's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(8):2952-2957
- [5] Gardner AL, Aronson AL. Expression of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1984, **158**(3):967-971
- [6] Bender RA, Janseen K, Resnick A *et al.* Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol*, 1977, **129**:1001-1009
- [7] Li JW(李建武), Yu RY(余瑞元), Yuan MX(袁明秀) *et al.* Principles and methods for biochemical experiments(生物化学实验原理与方法). Beijing:Beijing University Press(北京大学出版社),1997
- [8] Huang J(黄洁), Song JR(宋纪蓉), Shi HB(史红兵) *et al.* Comparative study on the determination of reducing sugar in cider broth. *Industrial microbiology*(工业微生物),2001, **31**(3):38-40
- [9] Thmos FD, Stadtman ER. Some kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *J Biol Chem*, 1970, **245**(20):5206-5213
- [10] Li Y(李寅), Li HZ(李华钟), Lin JF(林金萍) *et al.* Biosynthesis of glutathione: construction of ATP regeneration system between recombinant *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报),2001, **41**(2):191-197
- [11] Duan XH(段学辉), Ye Q(叶勤), Zhang SI(张嗣良) *et al.* Effects of cell permeability on the activity of Brewer's yeast of ATP production. *Journal of Nanchang University(Engineering &Technology)* [南昌大学学报(工程技术版)],2001, **23**(3):86-91
- [12] Tang XY(唐学友), Ding QB(丁庆豹), Qiu WR(邱蔚然). Study on production of ATP by immobilized beer yeast cells. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术),2000, **7**(4):204-208

High Efficiency of L-Glutamine Production by Coupling Genetic Engineered Bacterial Glutamine Synthetase with Yeast Alcoholic Fermentation System

CHEN Qun-Ying¹ CHEN Guo-An² XUE Bin³ ZHANG Xian-Jiu² YIN Zhi-Min^{1*}

¹(College of Life Science , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China)

²(Wuxi Science Park of Universities , Wuxi 214000 , China)

³(College of Life Science , Nanjing University , Nanjing 210092 , China)

Abstract Glutamine is an important conditionally necessary amino acid in human body. The effort is to establish a new and high efficient L-glutamine production system instead of traditional fermentation. In this paper, high efficiency of L-glutamine production is obtained by coupling genetic engineered bacterial glutamine synthetase (GS) with yeast alcoholic fermentation system. Glutamine Synthetase gene (*glnA*) was amplified from *Bacillus subtilis* genomic DNA with primers designed according to sequences reported in EMBL data bank, then it was inserted into expression vector PET28b, the sequence of *glnA* was proved to be the same as that reported in the data bank by DNA sequencing. After transformation of this recombinant plasmid PET28b-*glnA* into BL-21(DE3) strain, Lactose and IPTG were used to induce GS expression at 37°C separately. Both of them can induce GS expression efficiently. The induced protein is proved to be soluble and occupies about 80% of the total proteins by SDS-PAGE analysis. The soluble GS was purified by Ni²⁺ chelating sepharose column. After purification, the purified enzyme was proved active. Results reveal that the optimum temperature of this enzyme is 60°C and optimum pH is 6.5 in biosynthetic reaction by using glutamate, ammonium chloride and ATP as substrates. After induction, the enzyme activity in crude extract of BL-21/PET28b-*glnA* is 83 times higher than that of original BL-21 extract. Mn²⁺ can obviously increase the activity and stability of this enzyme. Experiments show that the transformation efficiency of glutamate to glutamine is more than 95%. Because of the high cost from ATP, a system coupling GS with yeast for ATP regeneration was established. In this system, GS utilizes ATP released by yeast fermentation to synthesize L-glutamine. Yeast was treated by 2% tolerance to increase its permeability and a yeast named YC001 with high yield of glutamine by coupling with recombinant GS was obtained. The good efficiency was achieved with the presence of 250 mmol/L glucose and 200 mmol/L phosphate, the transformation efficiency of glutamate to glutamine in this system is more than 80%, the average yield of glutamine is about 22g/L. This provides the basis for future large scale production of L-glutamine.

Key words glutamine synthetase, induction and expression, energy coupling, high efficiency of transformation

Received: 10-28-2003

This work was supported by Grants from Nanjing Normal University Start Funding (No. 2001SWXXQB914) and Key Program of Jiangsu Education Committee (No. 2001SWXTSJB113).

* Corresponding author. Tel: 86-25-83598216 Fax: 86-25-86314554; E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com