



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107429283 B

(45) 授权公告日 2021.09.07

(21) 申请号 201680015118.9

(22) 申请日 2016.01.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107429283 A

(43) 申请公布日 2017.12.01

(30) 优先权数据
10-2015-0008174 2015.01.16 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2016/000433 2016.01.15

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2016/114618 KO 2016.07.21

(73) 专利权人 西江大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72) 发明人 李正国 金铉俊 吴恩琼

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224
代理人 胡杰 王雯雯

(51) Int.Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102071171 A, 2011.05.25

CN 102220400 A, 2011.10.19

CN 103627691 A, 2014.03.12

CN 102978267 A, 2013.03.20

Yoshihiro Sawa等. Photosynthetic Glutathione Production Using Intact Cyanobacterial Cells.《AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY》.1986, 第50卷(第5期),
Kiyotaka Y Hara等. ATP Photosynthetic vesicles for light-driven bioprocesses.《BIOTECHNOLOGY LETTERS》.2011, 第33卷(第6期),

审查员 王康

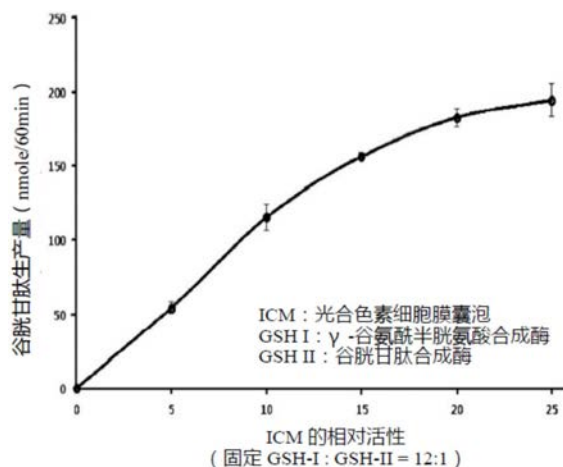
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图9页

(54) 发明名称

利用光合膜囊泡连续生产谷胱甘肽的方法

(57) 摘要

本发明涉及利用光合膜囊泡和催化谷胱甘肽合成的酶,利用谷氨酸盐、半胱氨酸和甘氨酸作为反应底物生产谷胱甘肽的方法。使用催化谷胱甘肽合成的酶的方法包括一起使用 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶的方法,或使用双功能谷胱甘肽合成酶的方法。谷胱甘肽的合成中存在需要持续供给昂贵的三磷酸腺苷的问题,本发明利用光合膜囊泡作为三磷酸腺苷的供给源,不需要额外投入三磷酸腺苷也可以连续生产谷胱甘肽,从而可以大大节省谷胱甘肽的生产单价。



1. 一种谷胱甘肽的生产方法,包括以下步骤:

a) 通过向分离的光合膜囊泡照射光,由二磷酸腺苷 (ADP) 和无机磷酸盐生成三磷酸腺苷 (ATP) 的步骤;和

b) 利用在步骤a) 中生成的三磷酸腺苷,通过催化谷胱甘肽合成的酶来合成谷胱甘肽,并生成二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤,

其中所述分离的光合膜囊泡选自由紫色非硫细菌中分离的色素细胞膜囊泡和藻类中分离的类囊体膜囊泡。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述藻类为蓝细菌。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,还包括步骤c): 将在步骤b) 中生成的二磷酸腺苷和无机磷酸盐再次用于生成光合膜囊泡的三磷酸腺苷的步骤。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述方法包括添加谷氨酸盐、半胱氨酸和甘氨酸用作生产谷胱甘肽的底物的步骤。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述步骤b) 包括: 由谷氨酸和半胱氨酸通过 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶生成 γ -谷氨酰半胱氨酸,同时令步骤a) 中生成的三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤;和,由所述生成的 γ -谷氨酰半胱氨酸和甘氨酸通过谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽,同时令步骤a) 中生成的三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述步骤b) 包括: 由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过双功能谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽,同时令步骤a) 中生成的三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶: 谷胱甘肽合成酶的相对活性比在4:1-20:1之间。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述分离的光合膜囊泡: γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶: 谷胱甘肽合成酶的相对活性比在1:12:1至50:12:1之间。

9. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述分离的光合膜囊泡: 双功能谷胱甘肽合成酶的相对活性比在10:1至500:1之间。

10. 一种谷胱甘肽生产用组合物,包括: i) 分离的光合膜囊泡; 和 ii) 催化谷胱甘肽合成的酶,其选自 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH-I)、谷胱甘肽合成酶 (GSH-II) 和双功能谷胱甘肽合成酶 (双功能 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶/谷胱甘肽合成酶 GshF), 其中所述分离的光合膜囊泡选自由紫色非硫细菌中分离的色素细胞膜囊泡和藻类中分离的类囊体膜囊泡。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其特征在于,所述藻类为蓝细菌。

利用光合膜囊泡连续生产谷胱甘肽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用光合膜囊泡连续生产谷胱甘肽的方法。

背景技术

[0002] 谷胱甘肽 (GSH) 是由L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸结合而成的物质,由大部分的真核细胞和一部分的原核生物合成而成。谷胱甘肽以L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸为起始物质,通过利用 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH-I, EC6.3.2.2) 和谷胱甘肽合成酶 (GSH-II, EC 6.3.2.3) 为催化剂的两步酶促反应进行生物合成。除上述以两种酶介导的此前已知的谷胱甘肽合成途径之外,近年来的研究揭示了一种利用一种酶介导的新生物合成途径,还发现催化所述新生物合成途径的酶是双功能谷胱甘肽合成酶(双功能 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶/谷胱甘肽合成酶, GshF) (参见Janowiak and Griffith.2005.J.Biol.Chem.280:11829-11839, Vergauwen et al.2006.J.Biol.Chem.281:4380-4394)。

[0003] 谷胱甘肽包含具有强还原能力的硫醇基,可以在生物体内与谷胱甘肽过氧化酶、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽S-转移酶协同作用起到抗氧化剂的功能。其参与免疫刺激作用和生物异源物质的去毒作用(Pastore et al.2003.Clinica Chimica Acta 333:19-39)。一般来讲,已知谷胱甘肽合成基因是生存所必须的,缺失这些基因的生物体对氧化应激和各种有害物质的抵抗力降低。此外,有报道公开人类的多种疾病与体内谷胱甘肽浓度的减少有关(Wu et al.2004.J.Nutr.134:489-492)。因此,由于谷胱甘肽具有抗氧化活性,谷胱甘肽广泛作为食品、医药和化妆品的添加剂使用,以起到防老化和增进健康的目的。

[0004] 到目前为止,已知的谷胱甘肽的制备方法包括有机合成法酶催化法和发酵(fermentative)法。有机合成法指的是化学合成谷胱甘肽的方法,在1935年开发并在1950年商业化(Harington and Mead.1935.Biochem.J.29:1602-1611, Li et al.2004.Appl.Microbiol.Biotechnol.66:233-242)。通过有机合成法合成的谷胱甘肽无光学活性(外消旋)。但是,由于生物体只选择性地使用L-谷胱甘肽,为了利用以有机合成法合成的谷胱甘肽,需要增加L-谷胱甘肽的分离步骤。

[0005] 谷胱甘肽的生物合成路径在20世纪50年代一经发现,用生物学方法生产谷胱甘肽的尝试即告开始(Bloch.1949.J.Biol.Chem.179:1245-1254)。这些方法中,一种利用大肠杆菌或酵母(*Saccharomyces cerevisiae*和*Candida* sp.)发酵生产谷胱甘肽的方法是目前商业上使用最多的方法。在发酵法中,利用葡萄糖或糖蜜作为碳源。一般而言,在发酵条件下以碳源将大肠杆菌或酵母培养20-30小时后,提取谷胱甘肽。当使用发酵法来生产谷胱甘肽时,可以附加实施多种方法以增加谷胱甘肽的生产量。例如,可以在培养基中添加L-半胱氨酸以增进谷胱甘肽生产率(Alfafara et al.1992.Appl.Microbiol.Biotechnol.37:141-146)。另外,还尝试过使负责合成谷胱甘肽的两种基因(GSH-I, GSH-II)在发酵菌株内过表达,以增加谷胱甘肽的生产量,然而并没有观察到生产量的显著增加。

[0006] 通过生物学方法生产谷胱甘肽的另一种方法是利用酶。常用的生物学方法中,利用表面活性剂处理大肠杆菌或酵母以提高物质透过性,然后向表面活性剂处理后的细胞添

加L-谷氨酸、L-半胱氨酸、甘氨酸和三磷酸腺苷。在随后的培养后,细胞中生产出L-谷胱甘肽。作为又一示例,还有一种方法,利用提纯的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶生产谷胱甘肽,然而此方法并未广泛使用。所述酶促方法的优点是反应具有选择性,且产出率高于发酵法。但是,在所述方法的情形中,由于反应所必须的三磷酸腺苷单价太高,酶促法难以商业化。为了克服这一缺点,可以使用可再生三磷酸腺苷的酶或利用细胞自身的糖酵解过程来供应三磷酸腺苷,但是成本问题无法通过该方法得到彻底解决。因此,如果提供可以以低成本持续供应三磷酸腺苷的系统,则利用酶生产谷胱甘肽的方法就可能实现商业化。

[0007] 上述背景技术中说明的内容仅仅是为了增加对本发明背景的理解,不应当被理解为属于本领域技术人员已知的现有技术。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 谷胱甘肽作为食品、医药和化妆品的添加剂非常有用。利用酶合成谷胱甘肽的方法具有反应步骤简单的优点,但是问题在于,反应过程利用的辅酶单价高。基于此,本发明的发明人研究了一种以相对低的成本生产谷胱甘肽的方法。作为结果,分离了存在于光合细菌或藻类的细胞膜中的囊泡,所述囊泡中包含用于执行光合作用光反应的结构。当向囊泡添加催化谷胱甘肽合成的酶,然后施加光照辐射时,可以证实谷胱甘肽得到连续合成,情形中而不需要添加单价昂贵的三磷酸腺苷等,从而完成了本发明。

[0010] 因此,本发明的目的是提供一种用于利用光合膜囊泡以及 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶生产谷胱甘肽的方法。

[0011] 本发明的另一目的是提供一种用于利用光合膜囊泡以及双功能谷胱甘肽合成酶生产谷胱甘肽的方法。

[0012] 本发明的另一目的是提供一种用于生产谷胱甘肽的组合物,该组合物包含光合膜囊泡。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种用于连续生产谷胱甘肽的系统,该系统包含用于供给三磷酸腺苷的光合膜囊泡。

[0014] 本发明的另一目的是提供一种连续生产谷胱甘肽的方法,该方法包括向所述系统添加用于生产谷胱甘肽的底物的步骤。

[0015] 本发明的其他目的和优点将通过下述发明内容、权利要求书和附图进行更清楚的说明。

[0016] 技术方案

[0017] 根据本发明的一方面,本发明提供一种谷胱甘肽的生产方法,该方法利用光合膜囊泡(photosynthetic membrane vesicle)以及 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I)和谷胱甘肽合成酶(GSH-II)。

[0018] 根据本发明的另一方面,本发明提供一种谷胱甘肽的生产方法,该方法利用光合膜囊泡以及双功能 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶/谷胱甘肽合成酶(GshF)。

[0019] 本发明的发明人研究了一种可以连续生产谷胱甘肽的方法,所述谷胱甘肽可用作食品、医药和化妆品的添加剂。作为结果,分离了光合细菌或藻类的细胞膜中存在的囊泡

(光合膜囊泡)。当向含有囊泡的反应混合物中添加催化谷胱甘肽合成反应的酶,然后施加光照辐射时,谷胱甘肽得到连续合成情形中而不需要添加投入单价昂贵的三磷酸腺苷。

[0020] 本说明书中使用的“光合膜囊泡”可以从利用光能进行光合作用的光合细菌或藻类中以囊泡形态分离,且指的是在合适波长的光照射下能够进行光合反应的细胞膜-蛋白质复合物。

[0021] 形成上述光合膜囊泡的光合膜可以包括不产氧光合细菌中存在的色素细胞膜(也称为胞质内膜(ICM)),和产氧光合细菌或藻类中存在的类囊体膜(TM)。

[0022] 色素细胞膜囊泡来源于色素细胞膜,指的是包括反应中心、捕光复合物、三磷酸腺苷合成酶和电子传递链蛋白的细胞膜-蛋白质复合物。色素细胞膜中,利用循环电子传递形成的质子动力势,由二磷酸腺苷和无机磷酸盐生成三磷酸腺苷。此外,可以利用色素细胞膜中存在的复合物I和复合物II介导的反向电子传递(reverse electron flow),由氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。这样生成的NADH可以通过吡啶核苷酸转氢酶转变为NADPH。

[0023] 可以用于分离得到上述色素细胞膜囊泡的不产氧光合细菌优选为紫色非硫细菌,更优选为选自红杆菌(*Rhodobacter* sp.)、红螺菌(*Rhodospirillum* sp.)、红假单胞菌(*Rhodopseudomonas* sp.)、海洋玫瑰杆菌(*Roseobacter* sp.)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp.)和红长命菌(*Rubrivivax* sp.)中的紫色非硫细菌,但不限于此。

[0024] 类囊体膜囊泡来源于类囊体膜,指的是包含两种光合系统(光合系统I/II)、三磷酸腺苷合成酶和电子传递链蛋白的细胞膜-蛋白质复合物。类囊体膜中使用水作为电子供体进行电子传递,由此得到还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)并形成质子动力。这样形成的质子动力用于由二磷酸腺苷和无机磷酸盐并利用三磷酸腺苷合成酶来合成三磷酸腺苷。

[0025] 可以用于分离类囊体膜囊泡的产氧光合细菌或藻类优选为蓝细菌,更优选为选自集胞藻(*Synechocystis* sp.)、聚球藻(*Synechococcus* sp.)、念珠藻(*Nostoc* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)、无类囊体蓝藻(*Gloeobacter* sp.)和藻青菌(*Cyanobacterium* sp.)中的蓝细菌,但不限于此。

[0026] 根据本发明的一个优选实施例,,本发明的方法包括,通过向光合膜囊泡照射光,由二磷酸腺苷(ADP)和无机磷酸盐生成三磷酸腺苷(ATP)的步骤。

[0027] 本发明利用光合膜囊泡作为三磷酸腺苷的来源,并且,在生成谷胱甘肽的过程中,催化谷胱甘肽合成的酶消耗三磷酸腺苷生成二磷酸腺苷和无机磷酸盐(图1a和图1b)。二磷酸腺苷和无机磷酸盐可以在光合作用条件下,通过光合膜囊泡中进行的光反应,转化为三磷酸腺苷,且所述三磷酸腺苷可以再次被参与谷胱甘肽合成的酶所利用。

[0028] 本说明书中的术语“光合作用条件”指的是用于诱导光合膜囊泡的光反应的条件。例如,在色素细胞膜囊泡的情形中,优选地,可以在20-37℃的温度、3-300Watts/m²的照明强度、350-1000nm波长的光照射条件下进行。可以利用白炽灯实现上述波长光。此外,在类囊体膜囊泡的情形中,优选地,可以在20-37℃的温度、5-500μEinstein/m²·s(μmole光子/m²·s)的照明强度、400-700nm波长的光照射条件下进行。可以利用荧光灯实现上述波长。

[0029] 根据本发明的另一方面,提供一种谷胱甘肽的生产方法,包括以下步骤:a)通过向光合膜囊泡照射光,由二磷酸腺苷(ADP)和无机磷酸盐生成三磷酸腺苷(ATP)的步骤;b)通

过催化谷胱甘肽合成的酶,利用在上述步骤a)中生成的ATP,合成谷胱甘肽,并生成二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤;和c)将在上述步骤b)中生成的ADP和无机磷酸盐再次用于生成光合膜囊泡的ATP。

[0030] 本说明书中的术语“催化谷胱甘肽合成的酶”,指的是消耗三磷酸腺苷生成二磷酸腺苷和无机磷酸盐,从而催化生成谷胱甘肽的反应的酶,优选地,其包括选自 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-I)、谷胱甘肽合成酶(GSH-II)和双功能谷胱甘肽合成酶(双功能 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶/谷胱甘肽合成酶,GshF)中的一种或多种酶。

[0031] 用于催化谷胱甘肽合成的酶,使用用于生成谷胱甘肽的底物,优选地,利用谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸作为底物。考虑到生物体仅选择性地生成和使用L-谷胱甘肽,使用的谷氨酸盐和半胱氨酸为L-谷氨酸盐和L-半胱氨酸会更有效。

[0032] 根据本发明的一个优选实施例,催化谷胱甘肽合成的酶中, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶,在将三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的同时,催化谷氨酸盐和半胱氨酸合成 γ -谷氨酰半胱氨酸,而谷胱甘肽合成酶在将三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的同时,催化 γ -谷氨酰半胱氨酸和甘氨酸合成谷胱甘肽。

[0033] 即,上述方法中的步骤b)可以包括:在将步骤a)中生成的三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的同时,将谷氨酸盐和半胱氨酸通过 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶生成 γ -谷氨酰半胱氨酸的步骤;和在上述生成的 γ -谷氨酰半胱氨酸和甘氨酸通过谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽的同时,将步骤a)中生成的三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤(参考图1a中的整体反应A)。

[0034] 根据本发明的一个优选实施例,上述催化谷胱甘肽合成的酶中,双功能谷胱甘肽合成酶能够催化 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化的反应和谷胱甘肽合成酶催化的反应。

[0035] 即,上述方法中的步骤b)可以包括:将谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过双功能谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽的同时,将步骤a)中生成的三磷酸腺苷转变为二磷酸腺苷和无机磷酸盐的步骤(参考图1b中的整体反应B)。

[0036] 本发明利用酶活性来表达光合膜囊泡和每种酶之间的相对量。本说明书中的术语“酶活性”(下文称为活性),指的是特定量的酶在单位时间内可以生成的产物的量(μmole 产物/min),反映的是实际具有活性的酶的量。术语“相对活性”指的是将色素细胞膜囊泡和酶之间的实际活性比以简单的整数比表示时,对应的酶或色素细胞膜囊泡的比例。在整体反应A中, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶:谷胱甘肽合成酶的相对活性比优选为1:1至100:1,更优选地是4:1至20:1,最优选地是8:1至16:1,但不限于此。另外,光合膜囊泡: γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶:谷胱甘肽合成酶的相对活性比优选是1:12:1至100:12:1,更优选地是1:12:1至50:12:1,最优选地是1:12:1至25:12:1,但不限于此。最后,光合膜囊泡:双功能谷胱甘肽合成酶的相对活性比优选是1:1至1000:1,更优选地是10:1至500:1,最优选地是40:1至200:1,但不限于此。虽然偏离上述相对活性比时也可能生成谷胱甘肽,但考虑谷胱甘肽的整体产出率和生产成本时,上述比例更为高效。

[0037] 根据本发明的一个优选实施例,上述整体反应A或整体反应B在无氧条件下进行,所述无氧条件可以使光合膜囊泡的活性最大化,并防止产物谷胱甘肽的氧化。

[0038] 根据本发明的另一方面,本发明提供一种用于生产谷胱甘肽的组合物,所述组合物包括:i)光合膜囊泡;和ii)谷胱甘肽合成催化酶,选自 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH-

I、谷胱甘肽合成酶 (GSH- II) 和双功能谷胱甘肽合成酶 (γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶/谷胱甘肽合成酶GshF)。

[0039] 本发明的物质可以生产为组合物形式,且本发明的组合物可以装入合适的容器(例如玻璃瓶、塑料容器等)中流通。因此,本发明的组合物可以用于生产谷胱甘肽。想要生产谷胱甘肽的人,可以通过用光照射本发明的含有光合膜囊泡和催化谷胱甘肽合成的酶的组合物,来连续生产谷胱甘肽。

[0040] 根据本发明的另一方面,提供一种连续生产谷胱甘肽的系统,所述系统包括:i) 用于供给三磷酸腺苷的光合膜囊泡和ii) 谷胱甘肽合成催化酶,选自 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH- I)、谷胱甘肽合成酶 (GSH- II) 和双功能谷胱甘肽合成酶 (γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶/谷胱甘肽合成酶,GshF)。

[0041] 本说明书中的术语“连续生产谷胱甘肽的系统”,指的是除了最初投入的三磷酸腺苷或最初投入的二磷酸腺苷和无机磷酸盐以外,不需要额外投入的系统,以及即使只添加谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸,也可以连续生产谷胱甘肽的系统,且该系统包括反应器、试剂盒、装置、设备等。

[0042] 根据本发明的另一方面,本发明提供一种连续生产谷胱甘肽的方法,所述方法包括向本发明所述系统添加用于生产谷胱甘肽的底物的步骤,所述底物是谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸。

[0043] 技术效果

[0044] 本发明的特征和优点总结如下:

[0045] (i) 本发明提供一种利用光合膜囊泡、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶生产谷胱甘肽的方法。

[0046] (ii) 此外,本发明提供一种利用光合膜囊泡和双功能谷胱甘肽合成酶生产谷胱甘肽的方法。

[0047] (iii) 根据本发明,利用光合膜囊泡提供在以 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽合成酶、双功能谷胱甘肽合成酶催化合谷胱甘肽时消耗的三磷酸腺苷。也就是说,在光照的条件下持续供给三磷酸腺苷,因此无需追加投入三磷酸腺苷,由此能够节省成分。

附图说明

[0048] 图1a展示了整体反应A的示意图,如图所示为利用素细胞膜囊泡、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽的方法。图1b展示了整体反应B的示意图,如图所示为利用色素细胞膜囊泡和双功能谷胱甘肽合成酶合成谷胱甘肽的方法。

[0049] 图2为示出了本发明的纯化蛋白通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的结果图。图中的每条带代表提纯的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽合成酶和双功能谷胱甘肽合成酶。

[0050] 图3为示出了利用检测二磷酸腺苷生成的方法测定 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的活性的图表。

[0051] 图4为示出了利用检测二磷酸腺苷生成的方法测定谷胱甘肽合成酶的活性的图表。

[0052] 图5为示出了将谷胱甘肽合成酶的相对活性固定为1后,基于 γ -谷氨酰半胱氨酸

合成酶的相对活性显示的谷胱甘肽生产量的图表。

[0053] 图6为示出了将 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的相对活性:谷胱甘肽合成酶的相对活性的比固定为12:1后,基于色素细胞膜囊泡的相对活性的谷胱甘肽生产量的图表。

[0054] 图7为示出了用于在包含L-谷氨酸、L-半胱氨酸、甘氨酸、三磷酸腺苷的反应液中生产谷胱甘肽的双功能谷胱甘肽合成酶活性的图表。

[0055] 图8为示出了将双功能谷胱甘肽合成酶的相对活性固定为1后,基于色素细胞膜囊泡的相对活性的谷胱甘肽生产量的图表。

具体实施方式

[0056] 下文将通过实施例更为详细地说明本发明。这些实施例只是为了更为具体地说明本发明,本领域的普通技术人员应当明白本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0057] 实施例

[0058] 实施例1:色素细胞膜囊泡的分离

[0059] 根据韩国专利申请号10-2014-0151907公开的方法分离色素细胞膜囊泡。用于分离色素细胞膜囊泡的菌株是紫色非硫细菌的一种,即类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, ATCC BAA-808, Cohen-Bazire et al.1956.J.Cell.Comp.Physiol.49:25-68)。使用Sistrom最小培养基培养上述菌株(Sistrom.1962.J.Gen.Microbiol.28:607-616,表1)。培养方法如下。首先,在包含5ml培养基的试管里接种菌株,然后在30℃,250rpm下进行振荡培养。当在660nm处的培养物吸光度为2.0左右时,将培养基在18ml容量的旋盖培养试管(screw cap)中进行继代培养使初期吸光度为0.05,然后用新鲜培养基充满该旋盖培养试管并密封,以防与氧气接触。培养是在光合作用条件下进行的。具体而言,在培养箱中培养18小时,其中培养条件如下设置:温度保持在30℃,并利用白炽灯照射15Watts/m²光度的光。培养后,取260ml的透明瓶,添加在18ml的旋盖培养试管中培养的菌株8ml,并用新鲜培养基充满剩下的体积后密封。培养基如上所述地在15Watts/m²光度下无氧培养18小时无氧。之后,在无氧培养室(无氧培养室型号10, Coy laboratory产品)中进行色素细胞膜的分离。无氧培养室内的气体组成为氮气90%、二氧化碳5%、氢气5%。将260ml透明瓶中培养的一类球红细菌菌株在7000g,4℃下离心10分钟后,弃去上清液,得到细胞团块。用磷酸缓冲液(10mM Na₂HPO₄,2mM KH₂PO₄,pH 7.6)4ml再悬浮菌体后,根据厂商说明向其中添加蛋白酶抑制剂混合物(蛋白酶抑制剂混合物,Roche)。之后的过程中,所有的样品都放置在冰上。接下来,利用超声波细胞粉碎机(型号VCX130,Sonics&Materials)在以下条件下进行细胞裂解:以100%的增幅照射超声波2分钟后,在冰水中冷却2分钟,反复进行上述过程3次。为了防止过热,在照射超声波的同时用冰水冷却细胞团块。将裂解的细胞在6000g,4℃下离心10分钟后,获得上清液,随后利用超高速离心分离机(Optima XE-90,Beckman Coulter)在4℃,200000g下离心上清液1小时。离心后,除去上清液,用1ml磷酸缓冲液溶解含有色素细胞膜囊泡的沉淀物,以进行蔗糖密度梯度离心。蔗糖密度梯度如下依序形成:从13.5ml容量的超高速离心分离用容器的最底层开始,60%(w/v,用磷酸缓冲液溶解)蔗糖溶液8ml,40%蔗糖溶液1ml和20%蔗糖溶液1ml。在最上层放置1ml含色素细胞膜囊泡的沉淀物后,200000g超高速离心分离4小时。含有色素细胞膜囊泡的红棕色层位于20%蔗糖溶液层和40%蔗糖溶液层之间。分离该红棕色层后,添

加相同体积的磷酸缓冲液进行稀释。此外,为了防止普通污染菌的增殖,添加100 μ g/ml浓度的卡那霉素,并按照厂商说明添加蛋白酶抑制剂混合液。混合物以无氧状态密封,在4 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 【表1】用于培养类球红细菌的Sistrom最小培养基的组成成分

添加剂	最终浓度
KH ₂ PO ₄	20mM
NaCl	8.5mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.78mM
L-谷氨酸	0.67mM
L-天冬氨酸	0.25mM
琥珀酸	34mM
次氨基三乙酸	1.05mM
MgCl ₂ • 6H ₂ O	1.2mM
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.23mM
FeSO ₄ • 7H ₂ O	7 μ M
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.16 μ M
EDTA	4.7 μ M
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	38 μ M
MnSO ₄ • H ₂ O	9.1 μ M
CuSO ₄ • 5H ₂ O	1.6 μ M
Co(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O	0.85 μ M
H ₃ BO ₃	1.8 μ M
烟酸	8.1 μ M
盐酸硫胺素	1.5 μ M
生物素	41nM

[0062] 实施例2:参与谷胱甘肽合成的酶的编码基因的制备

[0063] 进行多聚酶链式反应(PCR),以分别克隆编码整体反应A(图1a)中的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶的基因,和克隆编码整体反应B(图1b)中的双功能谷胱甘肽合成酶的基因。在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的情形中,分别使用SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2作为正向引物和反向引物。在谷胱甘肽合成酶的情形中,分别使用SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4作为正向引物和反向引物。在两种情形中,均用大肠杆菌(*Escherichia coli* str.K-12 substr.MG1655)的染色体DNA用作PCR模板。在双功能谷胱甘肽合成酶的情形中,分别使用SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6作为正向引物和反向引物,用无乳链球菌(*Streptococcus Agalactiae* str.2603V/R,ATCC BAA-611)的染色体DNA用作PCR模板。在通过PCR反应扩增的基因片段的两侧,插入限制性酶BsaI的识别序列和IBA Co.推荐的附加序列,然后将所得序列连接到IBA Co.提供的表达载体pASK-IBA7plus(对于 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶,双功能谷胱甘肽合成酶的情形)和pASK-IBA3plus(对于谷胱甘肽合成酶的情形)。作为结果,分别得到N端带有Strep-标签的编码 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和双功能谷胱甘肽合成酶的基因构建物,其,和C端带有Strep-标签的编码谷胱甘肽合成酶的基因构建

物。

[0064] 【表2】用于扩增 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶编码基因的引物

	SEQ ID NO.	方向	序列
[0065]	1	gshA-F	5'-AAAAAAGGTCTCTGCGCTTGATCCCGGACGTATCA CA-3'
	2	gshA-R	5'-AAAAAAGGTCTCTTATCATCAGGCGTGTTTTTCCAG CC-3'

[0066] 【表3】用于扩增谷胱甘肽合成酶编码基因的引物

	SEQ ID NO.	方向	序列
[0067]	3	gshB-F	5'-AAAAAAGGTCTCTAATGATCAAGCTCGGCATCGT-3'
	4	gshB-R	5'-AAAAAAGGTCTCTGCGCTCTGCTGCTGTAAACGTG CTT-3'

[0068] 【表4】用于扩增双功能谷胱甘肽合成酶编码基因的引物

	SEQ ID NO.	方向	序列
[0069]	5	gshF-F	5'-AAAAAAGGTCTCAGCGCATGATTATCGATCGACTG TTAC -3'
	6	gshF-R	5'-AAAAAAGGTCTCGTATCATTATAATTCTGGGAACA GTTTAG-3'

[0070] 实施例3:谷胱甘肽合成反应催化酶的纯化

[0071] 利用实施例2中制备的表达载体转化大肠杆菌菌株BL21 (DE3), 并获得分别过表达 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽合成酶以及双功能谷胱甘肽合成酶的转化菌株。通过相同的方法提纯上述三种酶。首先, 向试管中添加含有50 μ g/ml的氨苄青霉素的LB (Luria-Bertani) 培养基5ml, 并在试管中接种转化的菌株, 然后在250rpm, 37 $^{\circ}$ C的条件下振荡培养12小时。然后, 将细胞接种到装有含50 μ g/ml氨苄青霉素的500ml LB培养基的1L烧瓶中。接种时, 将600nm的最初吸光度调整为0.05, 之后在250rpm, 37 $^{\circ}$ C的条件下振荡培养, 直到吸光度达到0.4时, 添加浓度为0.2 μ g/ml的无水四环素, 并在250rpm, 30 $^{\circ}$ C的条件下再继续振荡培养约12小时。培养后, 在4000g离心10分钟, 获得细胞团块, 然后重悬浮在10ml的缓冲液W (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA) 中。按生产商的推荐量添加蛋白酶抑制剂混合液 (Roche), 并用超声波细胞粉碎机 (Branson sonifier 250) 裂解细胞团块。以输出强度3超声处理5分钟后, 在冰水中冷却5分钟。反复进行上述过程3次。细胞裂解后, 在6000g离心10分钟, 以分离含有水溶性酶的上清液, 并利用Strep-标签的亲色谱法提纯酶。Strep-标签亲和色谱法使用生产商 (IBA) 推荐的方法进行。通过10%的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳验证提纯的酶 (图2)。 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的预期的分子量是约58kDa (Watanabe et al.1986.Nucleic Acids Res.14:4393), 谷胱甘肽合成酶为约35kDa (Gushima et al.1984.Nucleic Acids Res.12:9299), 双功能谷胱甘肽合成酶为约85kDa (Janowiak and Griffith.2005.J.Biol.Chem.280:11829-11839)。

[0072] 实施例4:测定光照下色素细胞膜囊泡的三磷酸腺苷生产活性

[0073] 根据韩国专利申请号10-2014-0151907中公开的方法进行色素细胞膜囊泡的定量和活性测定。利用细菌叶绿素a (bch a) 浓度来定量测定色素细胞膜囊泡。利用浓度为0.25-

0.5 μ g bch a/ml的色素细胞膜囊泡测定三磷酸腺苷(ATP)生产活性。向由10mM磷酸钠(Na_2HPO_4)、2mM磷酸钾(KH_2PO_4)、10mM氯化镁(MgCl_2)和0.4mM二磷酸腺苷组成的缓冲液中,添加适量的色素细胞膜囊泡后,允许反应物在温度保持为30 $^{\circ}\text{C}$ 和白炽灯照射的15Watts/ m^2 光度的无氧条件下进行反应。利用三磷酸腺苷检测试剂盒(Sigma-Aldrich)测定三磷酸腺苷随时间的生产量。色素细胞膜囊泡的活性通过单位时间生成的三磷酸腺苷的量(nmole ATP/min)表示。

[0074] 实施例5:测定 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶的酶活性

[0075] 利用测定二磷酸腺苷生成的方法(Seelig and Meister.1985.Methods in Enzymol.113:379-390)测定实施例3中提纯的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶的酶活性。测定活性时使用的反应缓冲液,由0.1mM Tris(Tris-Cl,pH 7.6),10mM氯化镁(MgCl_2),0.8mM三磷酸腺苷(ATP),2mM磷酸烯醇丙酮酸,0.2mM还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),14.3单位/ml丙酮酸激酶,和14.3单位/ml乳酸脱氢酶组成。测定 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的活性时,在反应缓冲液中添加10mM的L-谷氨酸和10mM的L-半胱氨酸。测定10mM L-半胱氨酸时,在上述反应缓冲液中添加10mM甘氨酸、1mM γ -谷氨酰半胱氨酸。反应温度为30 $^{\circ}\text{C}$ 。当 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶进行酶反应时,生成二磷酸腺苷,同时,与二磷酸腺苷相同当量的还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)转变为氧化状态(NAD^+)。由于NADH在340nm有吸光性,而 NAD^+ 在340nm没有吸光性,可以通过测定340nm下的吸光度随时间的降低来测定两种酶的活性。图3示出了测定 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的活性的图表,且图4示出了测定谷胱甘肽合成酶的活性的结果的图表。计算酶活性时,利用340nm的摩尔消光系数($6220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),计算NADH的浓度变化量,且假设消耗1当量的NADH时各酶产生的产物为1当量。将这样计算的每单位时间生成的产物数(nmole产物/min)称为酶活性。

[0076] 实施例6:利用 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶生成谷胱甘肽的确认

[0077] 在本实施例中,确认利用 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶,由L-谷氨酸、L-半胱氨酸、甘氨酸和三磷酸腺苷生成了谷胱甘肽。使用的反应缓冲液含有10mM磷酸钠(Na_2HPO_4),2mM磷酸钾(KH_2PO_4),10mM氯化镁(MgCl_2),0.8mM三磷酸腺苷(ATP),10mM L-谷氨酸,10mM L-半胱氨酸,10mM甘氨酸,为了防止生成的谷胱甘肽氧化,在30 $^{\circ}\text{C}$ 的无氧条件下进行反应。利用谷胱甘肽检测试剂盒(GSH-GloTM Glutathione Assay,Promega)检测谷胱甘肽。利用实施例5所述的方法测定各酶的活性后,基于测得的活性调整各酶的相对活性。图5示出了基于谷胱甘肽合成酶的相对活性所生产的谷胱甘肽的量。此时,将谷胱甘肽合成酶的相对活性固定为1,且 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的相对活性基于谷胱甘肽合成酶的相对活性而变化。由此,确认了两种酶生成了谷胱甘肽,且谷胱甘肽产量最大时的两种酶的最小活性比(图5的GSH-I:GSH-II)约为12:1。因此,在以下实施例中,所用的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶与谷胱甘肽合成酶的比例为12:1。

[0078] 实施例7:光照条件下利用色素细胞膜囊泡、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶生产谷胱甘肽的确认

[0079] 在本实施例中,确认了利用色素细胞膜囊泡、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶,在不供应三磷酸腺苷(ATP)但有光照的条件下生成谷胱甘肽。使用的反应缓冲液含有10mM磷酸钠(Na_2HPO_4),2mM磷酸钾(KH_2PO_4),10mM氯化镁(MgCl_2),0.4mM二磷酸腺苷(ADP),10mM L-谷氨酸,10mM L-半胱氨酸,10mM甘氨酸,且在30 $^{\circ}\text{C}$,无氧条件下进行反应。使

用 15Watts/m^2 光度的白炽灯作为光源。图6示出了基于 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶:谷胱甘肽合成酶的相对活性的比的谷胱甘肽的生产量。此时, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶与谷胱甘肽合成酶的比例固定为12:1。由此,确认了谷胱甘肽的生产量(或生产率)与色素细胞膜囊泡量成比例。此外,当色素细胞膜囊泡的相对活性在25或以上时,谷胱甘肽的生产量接近最大。

[0080] 实施例8:测定双功能谷胱甘肽合成酶的谷胱甘肽生产活性

[0081] 在本实施例中,确认了在包含L-谷氨酸、L-半胱氨酸、甘氨酸和三磷酸腺苷的反应液中,双功能谷胱甘肽合成酶生成了谷胱甘肽。反应液由 10mM 磷酸钠(Na_2HPO_4), 2mM 磷酸钾(KH_2PO_4), 10mM 氯化镁(MgCl_2), 100mM L-谷氨酸, 10mM L-半胱氨酸, 25mM 甘氨酸, 0.8mM 三磷酸腺苷(ATP)组成。在 30°C 进行反应。图7示出了用于生产谷胱甘肽的双功能谷胱甘肽合成酶的活性的图表(nmole 谷胱甘肽/ min),其中在每种包含不同量的双功能谷胱甘肽合成酶的反应液中,测定随时间变化的谷胱甘肽生产量。因双功能谷胱甘肽合成酶的反应在初期存在迟缓期,因此基于线性区域的反应速率来计算活性。

[0082] 实施例9:确认光照条件下色素细胞膜囊泡和双功能谷胱甘肽合成酶生成谷胱甘肽

[0083] 在本实施例中,确认了添加二磷酸腺苷来替代三磷酸腺苷且有光照的条件下,共同利用色素细胞膜囊泡和双功能谷胱甘肽合成酶,由L-谷氨酸,L-半胱氨酸,甘氨酸生成谷胱甘肽。在实施例8的反应液中,添加 0.4mM 的二磷酸腺苷来替代 0.8mM 的三磷酸腺苷。反应是在温度保持在 30°C 且 15Watts/m^2 光度的白炽灯照射的无氧条件下进行。图8所示为将双功能谷胱甘肽合成酶的相对活性固定为1后,基于与色素细胞膜囊泡的相对活性的谷胱甘肽的生产量的图表。确认了谷胱甘肽的生产量与色素细胞膜囊泡量成比例。

[0084] 以上是对本发明的特定部分进行的详细说明,本领域的普通技术人员应明白这些具体的说明只是优选的实施例,本发明的范围并不局限于此。因此,本发明的实质范围将由随附的权利要求书及其等价物定义。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 西江大学校产学协力团
- [0003] <120> 利用光合细胞膜囊泡连续生产谷胱甘肽的方法
- [0004] <130> G17U10D0391P/CN
- [0005] <150> KR 10-2015-0008174
- [0006] <151> 2015-01-16
- [0007] <160> 6
- [0008] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 37
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> Artificial Sequence
- [0013] <220>
- [0014] <223> gamma-glutamylcysteine synthetase forward primer (gshA-F)
- [0015] <400> 1
- [0016] aaaaaaggtc tctgcgcttg atcccggacg tatcaca 37
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 38
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> Artificial Sequence
- [0021] <220>
- [0022] <223> gamma-glutamylcysteine synthetase reverse primer (gshA-R)
- [0023] <400> 2
- [0024] aaaaaaggtc tcttatcatc aggcgtgttt ttccagcc 38
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 34
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <220>
- [0030] <223> glutathione synthetase forward primer (gshB-F)
- [0031] <400> 3
- [0032] aaaaaaggtc tctaattgatc aagctcggca tcgt 34
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 38
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> Artificial Sequence
- [0037] <220>
- [0038] <223> glutathione synthetase reverse primer (gshB-R)

- [0039] <400> 4
- [0040] aaaaaagggtc tctgcgctct gctgctgtaa acgtgctt 38
- [0041] <210> 5
- [0042] <211> 39
- [0043] <212> DNA
- [0044] <213> Artificial Sequence
- [0045] <220>
- [0046] <223> bifunctional gamma-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase forward primer (gshF-F)
- [0047] <400> 5
- [0048] aaaaaagggtc tcagcgcatg attatcgatc gactgttac 39
- [0049] <210> 6
- [0050] <211> 41
- [0051] <212> DNA
- [0052] <213> Artificial Sequence
- [0053] <220>
- [0054] <223> bifunctional gamma-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase reverse primer (gshF-R)
- [0055] <400> 6
- [0056] aaaaaagggtc tcgtatcatt ataattctgg gaacagttta g 41

整体反应 A

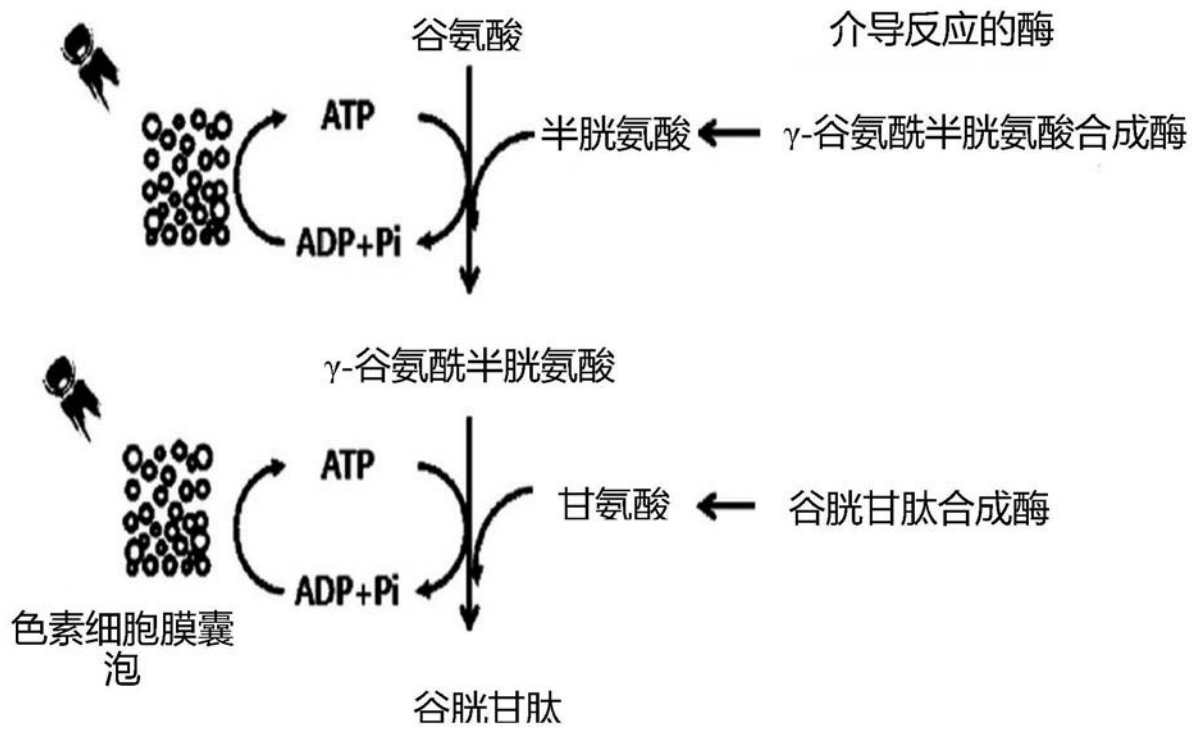


图1a

整体反应 B

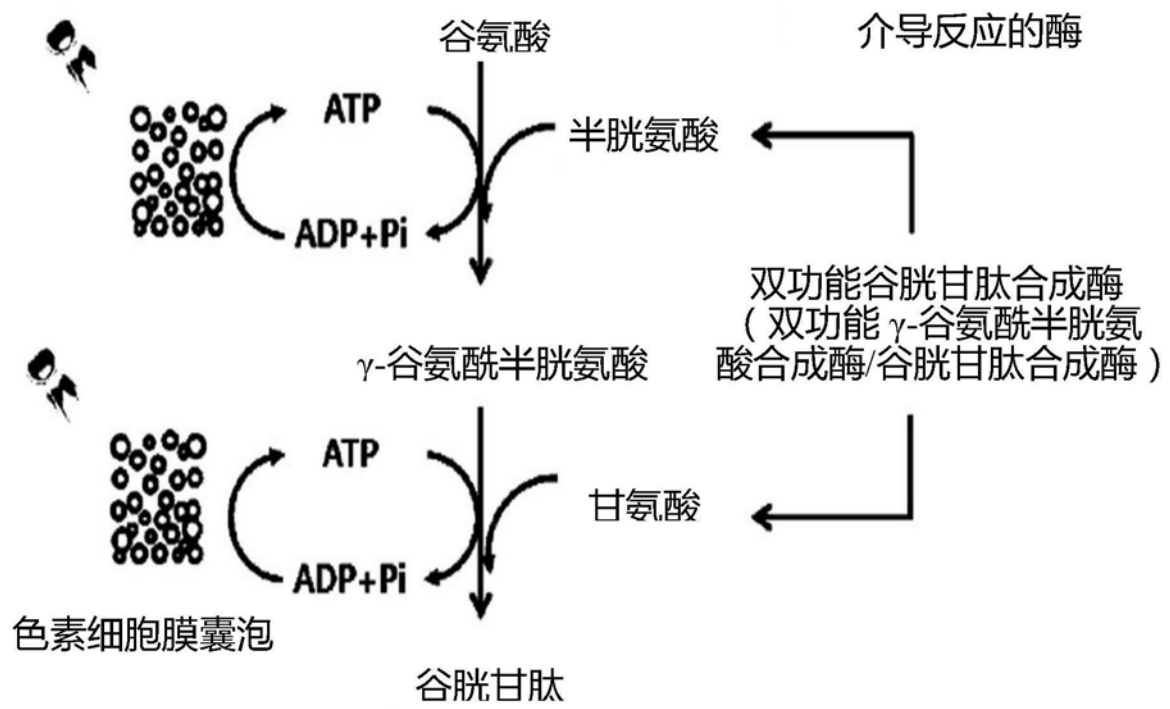


图1b

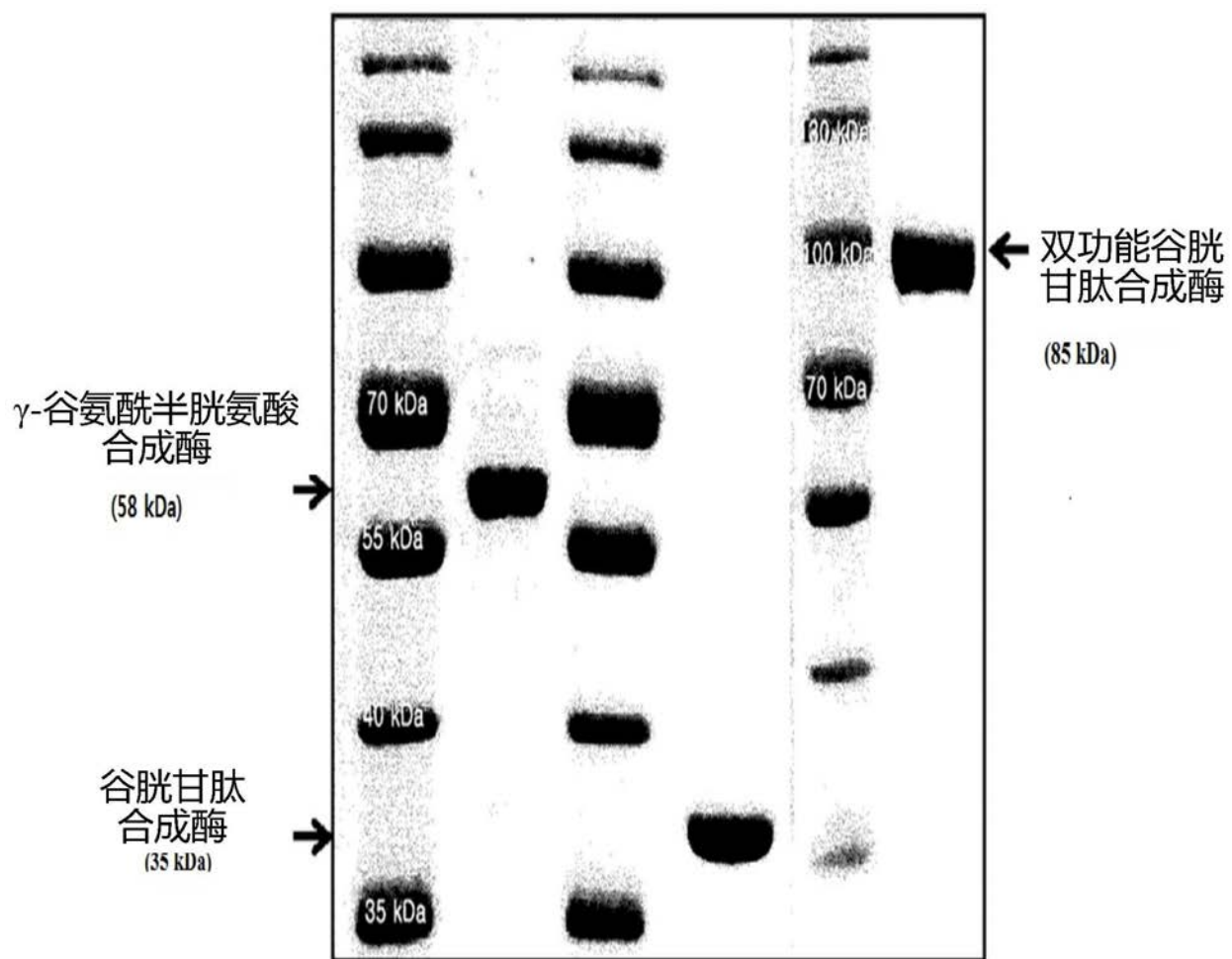


图2

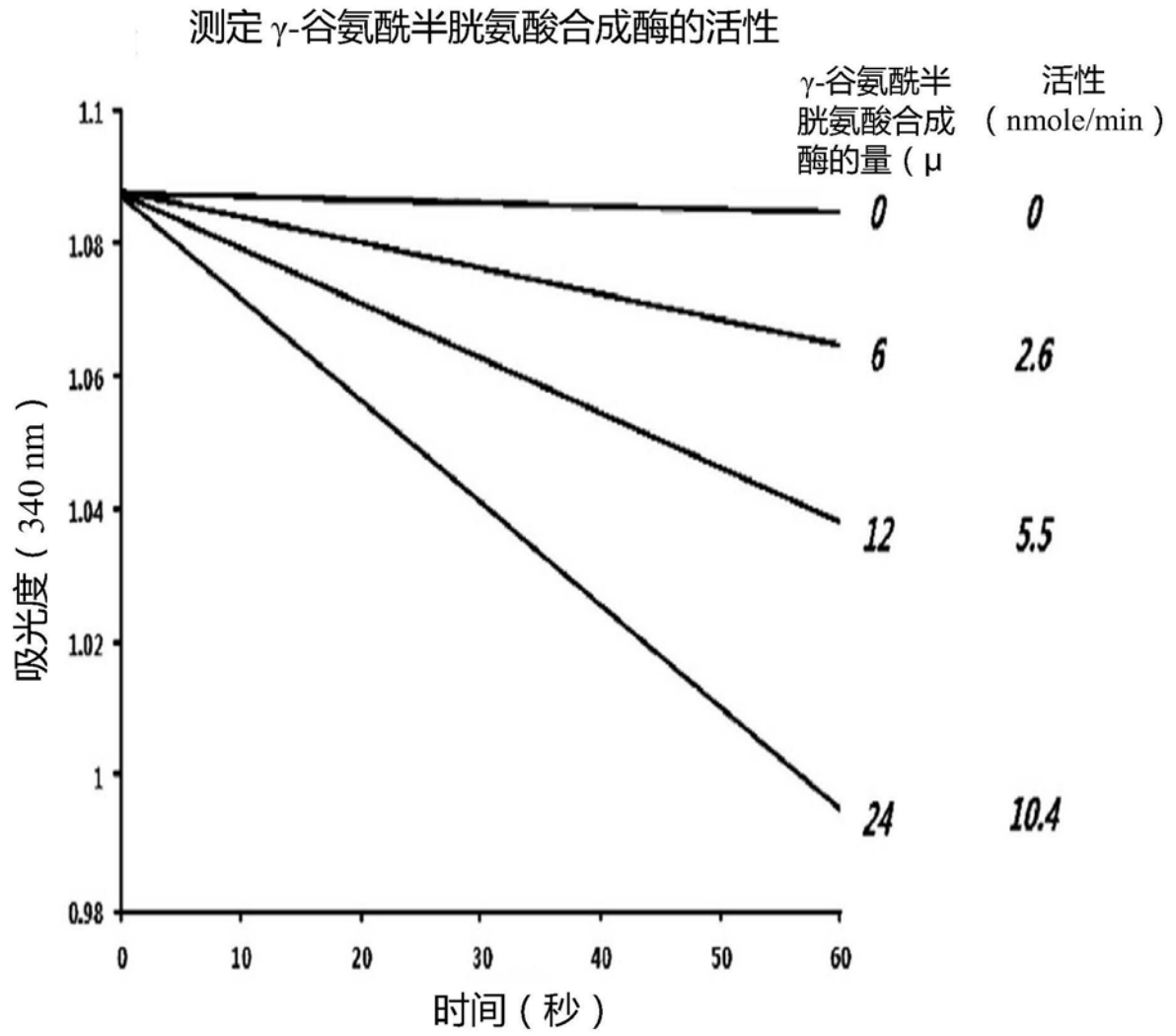


图3

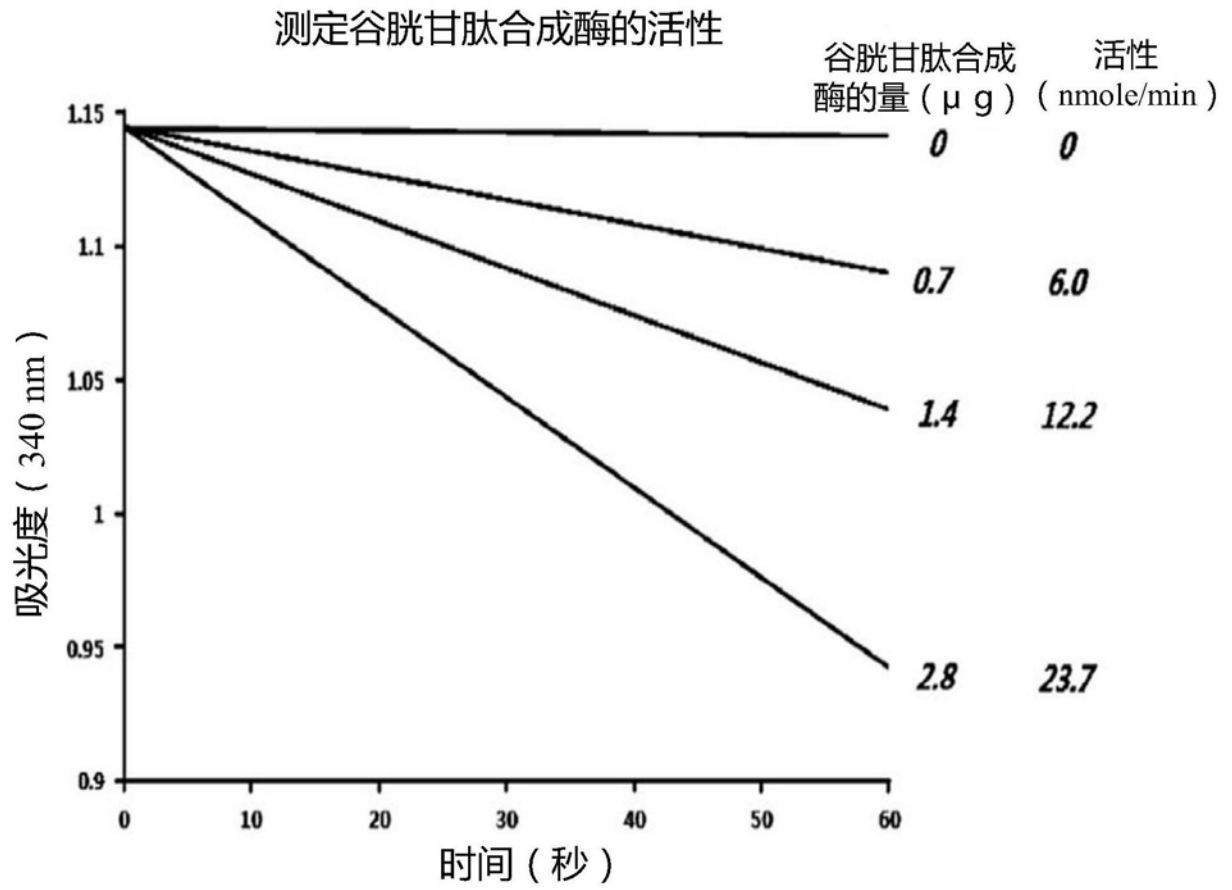


图4

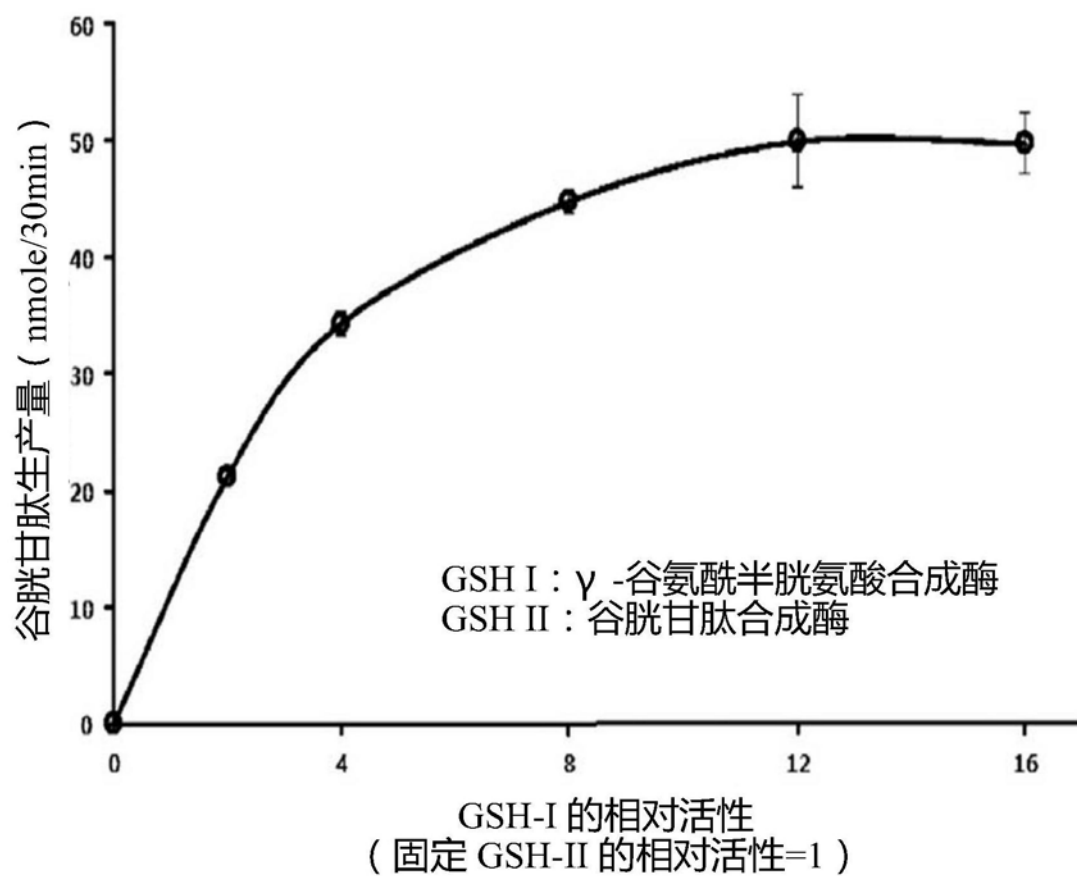


图5

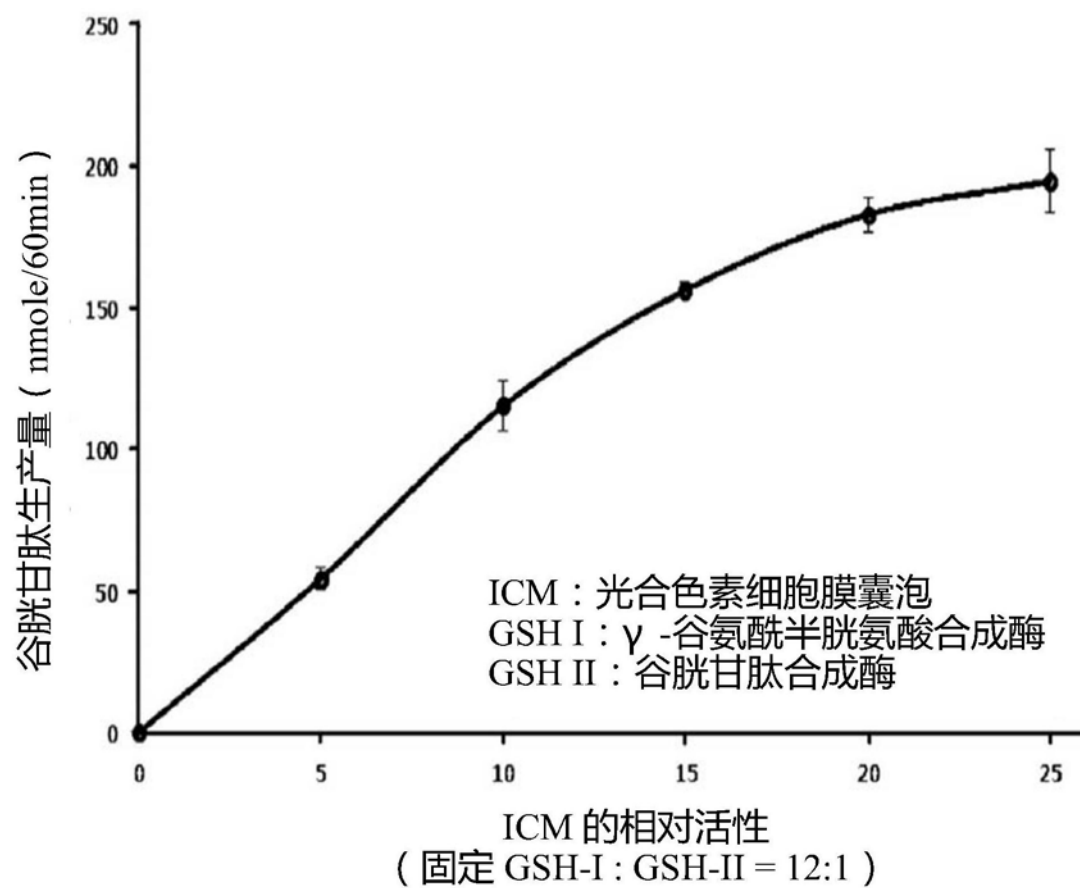


图6

测定双功能谷胱甘肽合成酶的活性

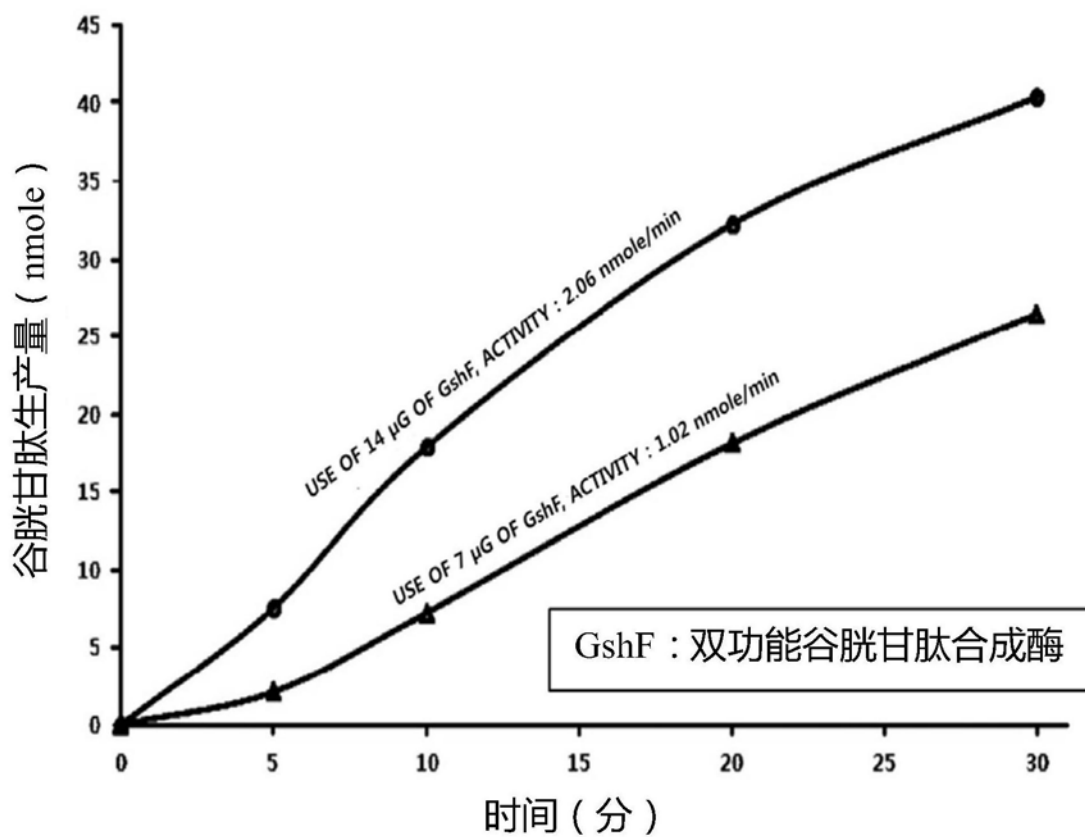


图7

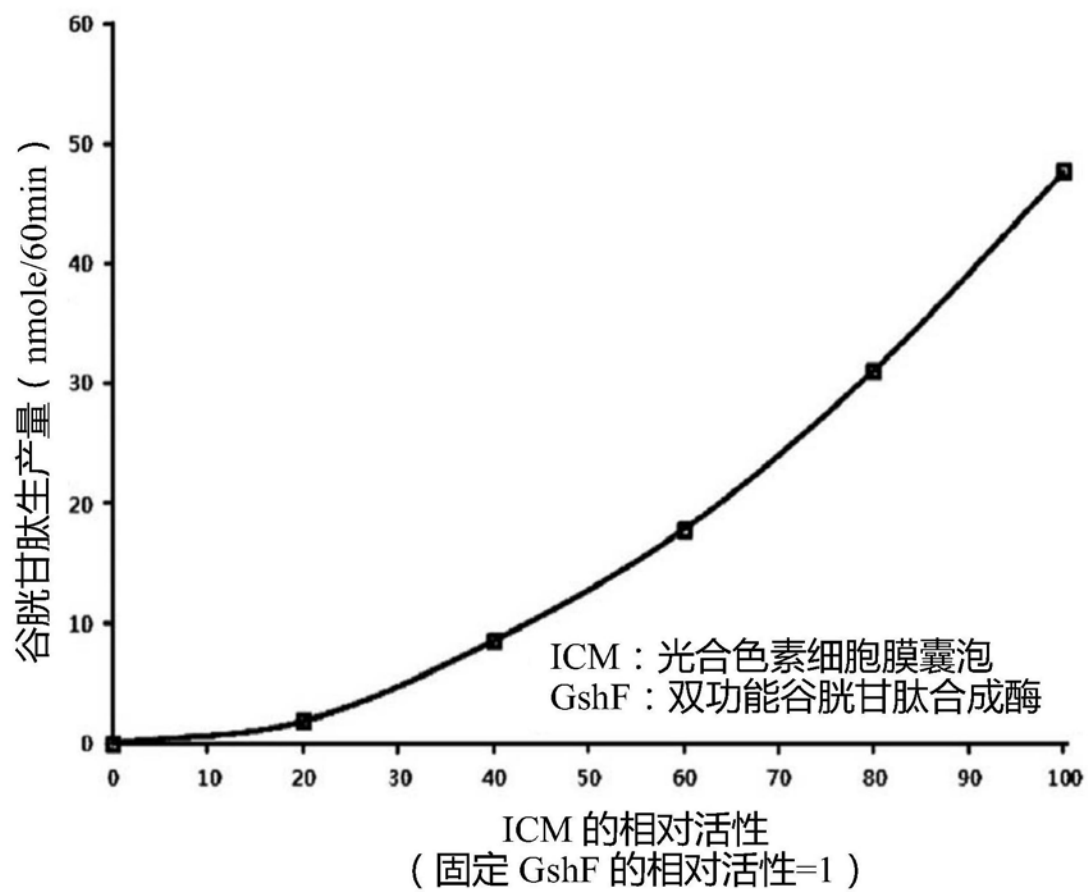


图8