

酵母线粒体 ATP 合酶活性对谷胱甘肽合成的影响

李 莉^{1,2}, 陈庆富², 曾 坤², 席令勇², 王华芳¹

(1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2 贵州师范大学生物技术与工程学院, 贵州 贵阳 550001)

摘 要: 以酿酒酵母为菌种, 采用 PDA 基本培养基, 研究在不同的培养温度、时间和初始 pH 值条件下线粒体 ATP 合酶活性对谷胱甘肽 (GSH) 合成的影响。结果表明: 初始 pH6.0 时, 30 °C 培养 24 h, 线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量均达到了最高, 分别为 15.73 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{h}$ 和 1.27 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{FW}$; 在最适温度 30 °C、pH6.0 条件下培养, 线粒体 ATP 合酶活性在培养 48 h 达到最大, GSH 含量在培养 60 h 达到最大; 初始 pH 6.0 时, 在 24 °C 条件下, 线粒体 ATP 合酶活性保持稳定, GSH 含量随时间增加而增加。在 34 °C 时, 线粒体 ATP 合酶活性在 24 h 最大, GSH 含量在 36 h 达到最高; 初始 pH 6.0 时线粒体 ATP 合酶活性达到最大, GSH 含量最高。实验结果表明, 酵母线粒体 ATP 合酶在不同培养条件下活性是不同的, 同时也说明了 ATP 合酶活性与 GSH 的合成有密切的关系。

关键词: 酿酒酵母; 线粒体; ATP 合酶活性; GSH

中图分类号: TS261.1; Q93- 3 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 08- 0024- 05

Effects of ATP Synthase of Mitochondrion on the Synthesis of Glutathione in *Saccharomyce Cerevisiae*

LI Li^{1,2}, CHEN Qing-fu², ZENG Kun², XI Ling-yong² and WANG Hua-fang¹

(1. College of Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083; 2. School of Biological Technology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: By using PDA as basic medium and *Saccharomyce cerevisiae* as species, the effects of ATP synthase activity on GSH synthesis in *S. cerevisiae* were studied under different culture temperature, time and initial pH values. The results indicated as follows: 1. as the initial pH value was 6.0 and 24 h culture at 30 °C, both ATP synthase activity and GSH content could reach the maximum values as 15.73 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{h}$ and 1.27 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{FW}$. 2. as the temperature was at 30 °C and the initial pH was 6.0, ATP synthase activity reached the highest after 48 h culture and GSH content reached the highest after 60 h culture. 3. as the initial pH was 6.0 and temperature at 24 °C, ATP synthase activity maintained stable and GSH content increased as culture time passed. If the temperature was at 34 °C and pH was 6.0, ATP synthase activity and GSH content reached the highest at 24 h and at 36 h respectively. 4. both ATP synthase activity and GSH content could reach the maximum as initial pH was 6.0. The experimental results suggested that ATP synthase activity changed under different culture conditions and there was close relations between ATP synthase activity and GSH synthesis.

Key words: *Saccharomyce cerevisiae*; mitochondrion; ATP synthase activity; GSH

谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是一种广泛存在于动物、植物及微生物细胞内的含有巯基的三肽化合物, 它不但能降低生物体内的还原态, 防止氧化伤害, 同时也能够对细胞内和细胞外的毒性起到解毒的作用^[1]。还原型 GSH 作为重要的抗氧化物质, 在生物体内具有极其重要的生理功能^[2,3]。Aline 的研究表明, 缺失 GSH 的酵

母突变体菌株, 在脱水的胁迫条件下, 更易受氧化胁迫, MDA 含量大量增加^[4]。在临床上, 谷胱甘肽是一种治疗肝脏疾病、肿瘤、中毒、白内障、衰老及变态反应的重要生化药物^[5]。近年来, 随着谷胱甘肽更多的生理功能被发现, 它在食品添加剂、临床医学和运动营养学上倍受关注, 需求量不断增加。

基金项目: 贵州省教育厅自然科学基金资助项目 项目编号: 黔教科 2005206。

收稿日期: 2007- 05- 09

作者简介: 李莉 (1975-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物技术, 发表论文数篇。

通讯作者: 王华芳, hfwang@bjfu.edu.cn。

GSH 由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成。L-谷氨酸和 L-半胱氨酸在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS: EC6.3.2.2)的催化下生成 γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -GC), 随后在谷胱甘肽合成酶(GC: EC6.3.2.3)的催化下, γ -GC 与甘氨酸缩合形成 GSH。两个合成步骤都需要 ATP 的参与^[6]。在酵母细胞中, ATP 合成是在线粒体内由 ATP 合酶催化而成。

目前 GSH 商品主要来自酵母生物合成。前人在利用酵母发酵法生产 GSH 和提高 GSH 含量上做了很多的研究, 主要是酵母 GSH 高产突变育种^[7,8], 培养条件优化^[9]和利用分子生物学技术^[9]等研究 GSH 的合成及生理作用^[10-12]等。但在酵母线粒体 ATP 合酶活性对 GSH 合成的影响方面报道极少。本研究设置不同的培养条件对酵母线粒体 ATP 合酶活性和谷胱甘肽含量的关系进行探讨, 旨在弄清酵母谷胱甘肽合成的生理机制, 为提高酵母发酵法生产 GSH 的产量提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验菌种和培养基

实验菌种: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* LL5), 从安琪酵母股份有限公司提供的高活性干酵母中分离, 本实验室保藏。

保藏培养基: 10%麦芽汁斜面。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g; 葡萄糖 20 g; 1000 mL 水。马铃薯去皮, 切成小块煮沸 30 min, 纱布过滤, 再加糖, 补水至 1000 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min。

培养条件: 旋转式摇床 (200 r/min), 从斜面种子接种后, 在 100 mL PDA 液体培养基中培养。

1.2 不同培养条件对 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

1.2.1 温度梯度实验

分别设置 24、26、28、30、32 和 34 6 个培养温度, 在初始 pH6.0 培养 24 h, 测定 ATP 合酶活性和 GSH 含量。

1.2.2 时间梯度实验

分别设置 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 5 个培养时间, 在初始 pH6.0, 温度分别为 24、30 和 34 °C 条件下培养不同时间, 然后测定 ATP 合酶活性和 GSH 含量, 以寻找不同温度下的最佳培养时间。

1.2.3 pH 梯度实验

设置 pH4.0、pH5.0、pH6.0、pH7.0 和 pH8.0 5 个初始 pH 值, 在实验 1.2.2 所得的不同温度与时间最佳组合条件, 即 24、24 h, 30、60 h, 34、36 h 下培养, 再测定 ATP 合酶活性和 GSH 含量。

1.3 酵母 GSH 的提取和测定

GSH 的提取: 培养好的酵母细胞于 3000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加生理盐水洗涤 2~3 次。再加 40% 酒精 (1 g 湿酵母加 5 mL), 30、200 r/min 萃取 3 h, 离

心取上清液即可作为还原型 GSH 含量测定样品。

还原型 GSH 的测定: 按 Ellman 的方法略加改进^[13]。取 GSH 待测液 (样品液) 0.25 mL, 加入 150 mmol/L 的 NaH_2PO_4 2.6 mL, 混合均匀后, 向各管中加入 5,5'-二硫-双硝基苯甲酸 (DTNB) 试剂 0.18 mL, 混匀后 30 °C 保温 5 min, 412 nm 波长处测定吸光值, 根据标准曲线算出 GSH 的含量。

1.4 酵母线粒体 ATP 合酶的活性测定

按卞留贯的方法略加改进^[14]。

酵母线粒体的分离提取: 取一定量的酵母菌体, 用提取液 (0.32 M 蔗糖、10 mM EGTA、50 mM Tris-HCl pH7.4) 研磨后, 在超速冷冻离心机上 (SIGMA 2-16K) 于 4200 r/min 离心 3 min, 取上清液, 再用 9200 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 再用适量提取液, 小心悬浮沉淀, 再 9200 r/min 离心 10 min, 弃去上清液取沉淀。用 1~2 mL 悬浮液 (0.32 M 蔗糖、50 mM Tris-HCl pH7.4) 使线粒体悬浮好, 备用。整个提取过程在 4 °C 低温下进行。

线粒体 ATP 合酶活性测定: 0.1 mL ATP (30 mM) + 0.4 mL 反应液 (3.75 mM MgCl_2 、100 mM KCl、100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH7.2) 置于试管中, 30 °C 保温 5 min, 加入线粒体悬浮液 0.5 mL, 再保温 30 min, 加入 0.2 mL (20% TCA) 中止反应, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液 0.5 mL 加入 2.5 mL 硫酸亚铁-钼酸铵试剂, 反应 10 min, 颜色变蓝后, 在 660 nm 测吸光值。根据标准曲线求出 Pi 的含量, 以释放的无机 Pi 的量表示酶活性的大小, 用 $\mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{h}$ 来表示。参照《植物生理学实验手册》^[15], 用考马斯亮兰法测定蛋白质含量, 用牛血清蛋白作标准曲线。

2 结果与分析

2.1 培养温度对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

在 24~34 °C 之间设计的 6 个温度条件对 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响结果见图 1。

从图 1 可知, 在 30 °C 以下, 随着酶反应温度的升高, 线粒体 ATP 合酶的活性和 GSH 含量均有所上升。在 30 °C 条件下, 线粒体 ATP 合酶的活性最高, 可达到 $15.73 \mu\text{mol/mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{h}$, GSH 含量也最高, 达到了 $1.27 \mu\text{mol/g} \cdot \text{FW}$ 。当培养温度超过 30 °C 时, 则随着温度升高, 线粒体 ATP 合酶和 GSH 含量的活性均有所下降。因此, 30 °C 的培养温度可能是酵母细胞合成 GSH 的最佳温度。

2.2 培养时间对 GSH 含量、线粒体 ATP 合酶活性的影响

2.2.1 24 h 不同培养时间对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

在较低培养温度 (24 °C) 条件下, 在 24~72 h 的 5 个时间点对 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响结果见

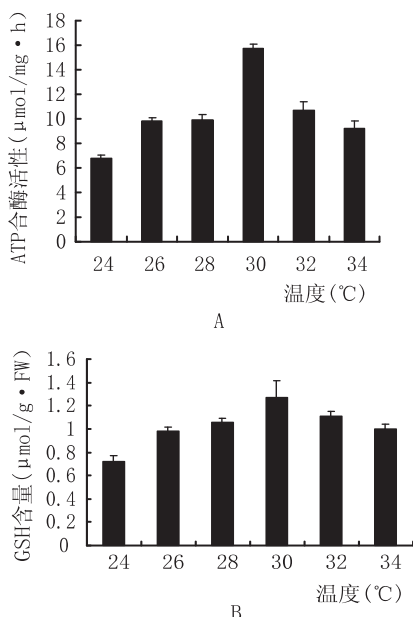


图 1 不同培养温度对线粒体 ATP 合酶活性 A) 和 GSH 含量(B)的影响

图 2。从图 2 可知, 线粒体 ATP 合酶活性能基本保持在 $6.50 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{h}$ 左右, 而 GSH 含量随培养时间的增加而增加。

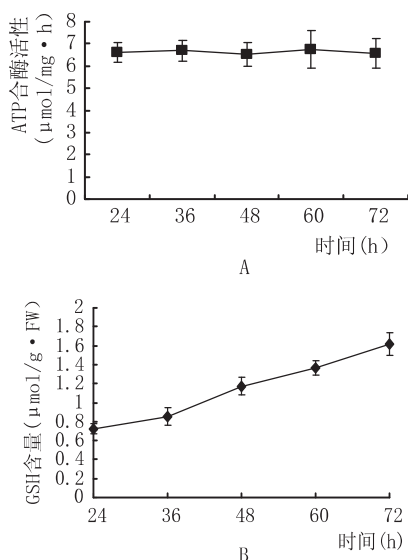


图 2 24 时不同培养时间对线粒体 ATP 合酶活性 A) 和 GSH 含量(B)的影响

2.2.2 30 下不同培养时间对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

在 30 条件下, 于 24~72 h 的 5 个培养时间点对 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响结果见图 3。

图 3 表明, 线粒体 ATP 合酶活性在培养 48 h 达到最大, 达 $21.922 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{h}$, 而 GSH 含量在培养 60 h 才达到最大, 含量为 $1.923 \mu\text{mol}/\text{g} \cdot \text{FW}$ 。随着培养时间的延长, 线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量都在下降。

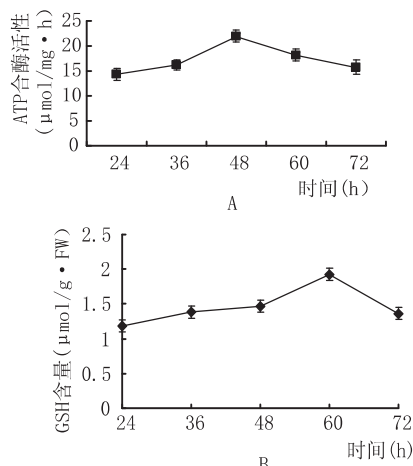


图 3 30 下不同培养时间对线粒体 ATP 合酶活性 A) 和 GSH 含量(B)的影响

2.2.3 34 时不同培养时间对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

为了考察较高培养温度 34 条件下, 培养时间对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响, 在 34 条件下进行培养 24 h 后, 并且每隔 12 h 测一次线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量, 结果见图 4。

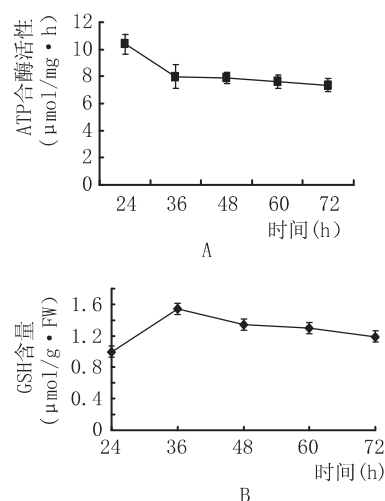


图 4 34 条件下不同培养时间对线粒体 ATP 合酶活性 (A) 和 GSH 含量(B)的影响

从图 4 可知, 线粒体 ATP 合酶活性在培养 24 h 时就已达最大, 为 $10.369 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{h}$, GSH 含量在培养 36 h 后达到最大, 为 $1.545 \mu\text{mol}/\text{g} \cdot \text{FW}$ 。

2.3 不同初始 pH 对线粒体 ATP 合酶的活性和 GSH 含量的影响

为了探讨酵母生产 GSH 所需的最适的 pH 条件, 设定了 pH4.0~8.0, 共 5 个 pH 梯度, 分别在 24 、30 、34 培养温度条件下进行培养, 分别测定 ATP 合酶的活性与 GSH 的含量。

2.3.1 24 时不同 pH 对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

设置培养温度 24 ℃、培养时间 24 h, 将 PDA 培养基的初始 pH 值分别调到 pH4.0、pH5.0、pH6.0 (自然)、pH7.0 和 pH8.0 进行培养, 所得结果见图 5。

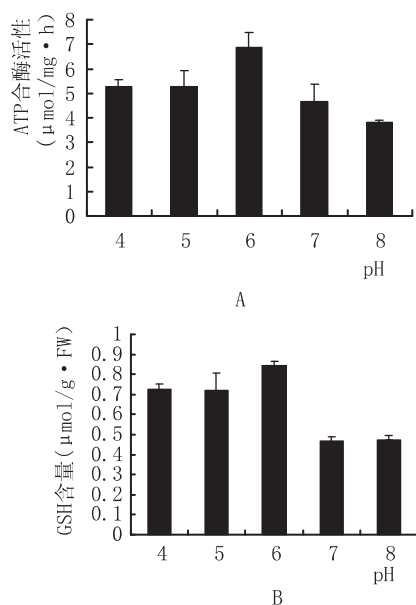


图 5 24 ℃时不同 pH 对线粒体 ATP 合酶活性 (A) 和 GSH 含量(B)的影响

图 5 结果表明, PDA 培养基的初始 pH 值在 6.0 (自然) 条件下, GSH 含量、线粒体 ATP 合酶活性达到最高。

2.3.2 30 ℃条件下不同 pH 对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

将 PDA 培养基的初始 pH 值设定为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0, 在 30 ℃下培养 60 h, 测定结果见图 6。

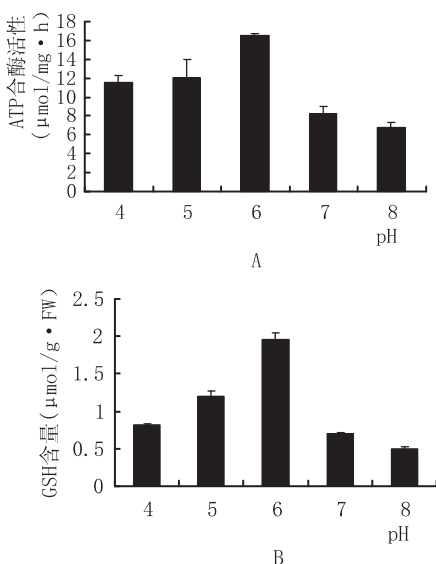


图 6 30 ℃时不同 pH 对线粒体 ATP 合酶活性 (A) 和 GSH 含量(B)的影响

图 6 结果表明, 在 30 ℃的培养条件下, PDA 培养基的初始 pH6.0 时线粒体 ATP 合酶活性最高, 为 16.538 μmol/mg·protein·h, GSH 含量达最大, 为

1.955 μmol/g·FW。

2.3.3 34 ℃条件下不同 pH 对线粒体 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

将 PDA 培养基的初始 pH 值调整为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0, 在 34 ℃下培养 24 h, 结果见图 7。

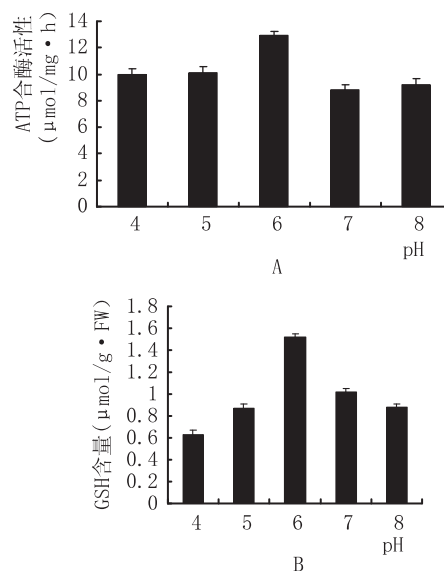


图 7 34 ℃时不同 pH 对线粒体 ATP 合酶活性 (A) 和 GSH 含量(B)的影响

从图 7 结果中可看出, 在 34 ℃条件下培养, PDA 培养基的初始 pH 值在 6.0 时, 线粒体 ATP 合酶活性最高, 达到了 12.923 μmol/mg·protein·h, GSH 含量最大, 达到 1.52 μmol/g·FW。

上述结果表明, PDA 培养基的初始 pH 值在 6.0 时 ATP 合酶活性和 GSH 含量均最高, 暗示该 pH6.0 是酵母生长的最佳 pH 值。

3 讨论

3.1 培养温度对 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

酵母细胞内的 ATP 主要是通过线粒体 ATP 合酶通过氧化磷酸化耦联产生的, 通常认为线粒体 ATP 合酶有双重的功能, 一方面利用 ADP 和 P_i 能合成 ATP, 另一方面能水解 ATP 释放能量, 以供细胞所需, 因此它的活性大小, 直接影响到细胞内多种生理功能。酵母细胞的 GSH 合成需要 ATP 提供能量, 只有充足的 ATP 供应才能保证 GSH 合成能顺利进行。因此, 保持高的 ATP 合酶活性是极为必要的, 刘立明等认为酵母突变株胞内 ATPase 活性的降低可能是导致胞内 ATP 含量降低的原因之一 [16]。培养温度的改变对 ATP 合酶的活性和 GSH 含量产生很大的影响, 虽然酵母细胞的培养温度通常在 26~28 ℃, 通过实验, 我们测得酵母细胞合成 GSH 的最佳温度是 30 ℃, 而此温度下 ATP 合酶的活性最高, 可能与这时的呼吸强度有关, 马超颖用活性酵母细胞衍生物 (Live Yeast Cell Derivative, LYCD) 处理酵母细胞时, 发现呼吸强度和 GSH 含量存在着明显的相关

性^[17],这可能与线粒体的 ATP 产生的量有关。因为呼吸强度加大,相应提供给 GSH 合成的 ATP 量也高,因而合成的 GSH 量最高。

我们在实验中发现,培养温度在 30 和 34 时,ATP 合酶的最大活性分别于 48 h 和 24 h 时达到最大,而 GSH 合成量分别在 60 h 和 36 h 出现峰值,这说明了 ATP 合酶活性峰值出现在 GSH 最大含量之前,这可能是 GSH 合成之前要有 ATP 含量的积累,以供 GSH 合成所需。但是童群义等研究表明,在 ATP 的浓度较低时,GSH 的产量随 ATP 浓度的增加而增加,当 ATP 浓度达 20 mmol/L 时,过多的 ATP 反而使 GSH 含量降低,这可能是反应过程中产生的 ADP 对 GSH 有抑制作用^[18]。因此在不同的培养条件下,最适宜的 ATP 浓度还有待于进一步研究。

3.2 培养 pH 对 ATP 合酶活性和 GSH 含量的影响

pH 是影响细胞生长、GSH 合成的主要环境因素之一,决定营养物的解离状态,制约着微生物细胞对营养物质的吸收和利用速率^[19],GSH 还能保护细胞在外界胁迫作用下和极端环境下(尤其是酸性环境)生存^[20,21]。

在 PDA 培养基中,自然初始 pH 值是 6.0,实验中将初始 pH 值分别上下各调两个单位。并在 24、30 和 34 下培养,都发现在自然初始 pH 值下,ATP 合酶活性的最大值和 GSH 含量都出现在 pH 6.0 的初始培养条件下,pH 稍偏酸对 GSH 合成比偏碱的影响要小的多。因此,在 PDA 培养基中,酵母的 GSH 含量在 pH6.0 的条件下是最好的。

聂薇等^[22]对低 pH 环境下产朊假丝酵母生产谷胱甘肽情况进行了研究。发现产朊假丝酵母受到低 pH 胁迫时,可以促使胞内的 GSH 向胞外分泌,并以增加 GSH 合成、向胞外释放 GSH 的方式来响应和抵御外界 pH 的不断降低,从而导致胞内 GSH 产量较低。在控制恒定 pH 条件下,细胞在生长阶段所合成的 GSH 基本上都集中在胞内。

4 结论

通过我们的实验结果发现,酵母的 ATP 合酶活性对 GSH 含量有着重要的影响。在不同培养温度和培养基的初始 pH 条件下,GSH 的最大含量和 ATP 合酶的最大活性的出现是一致的。而更有趣的是培养时间上,ATP 合酶的活性峰值出现在 GSH 含量峰值前的 12 h,这可能是在 GSH 合成前期必需要有 ATP 的大量合成才能提供充足的 ATP 供给 GSH 合成的需要,说明了 GSH 合成量与 ATP 合酶活性是有密切关系的。

致谢:本研究是在贵州师范大学生物技术与工程学院植物遗传育种研究所完成的,特此致谢!

参考文献:

[1] Penninckx M.J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts[J]. *FEMS Yeast Research*.

2002, 2: 295- 305.

- [2] 袁尔东,郑建仙. 功能性食品基料- 谷胱甘肽的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(5): 52- 57.
- [3] Anderson M. E. Glutathione:an overview of biosynthesis and modulation[J]. *Chemico-Biological Interactions*.1998,(111-112): 1- 4.
- [4] Aline de Souza Espindola, D e bora Silva Gomes, Anita Dolly Panek, et al. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance[J]. *Cryobiology*, 2003,(47): 236- 241.
- [5] 廖国清,戴海峰,王红梅,等. 还原型谷胱甘肽改善化疗药物性肝脏损害的临床研究[J].*临床药学*, 2005, 14(9): 82- 83.
- [6] Meister A, ME Anderson. Glutathione[J]. *Annu Rev Biochem*. 1983, (52): 711- 760.
- [7] 贾建萍,袁娟萍. 谷胱甘肽高产菌株的选育[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 24- 29.
- [8] 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.
- [9] 李华钟,李寅,林金萍,等. 具有高谷胱甘肽合成活性重组大肠杆菌的构建及合成反应过程[J].*微生物学报*, 2001, 41(1): 16- 23.
- [10] 童群义,陈坚. 重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系的摇瓶发酵条件[J].*无锡轻工大学学报*,2001,20(3): 228- 232.
- [11] 李寅,李华钟,林金萍,等.生物合成谷胱甘肽种间耦合 ATP 再生系统的构建[J].*微生物学报*, 2001,41(2): 191- 197.
- [12] Lei Zhang, Kouki Onda, Ryoza Imai, et al. Growth temperature down shift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*[J].*Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003,(307): 308- 314.
- [13] Ellman,G.L.Tissue sulfhydryl groups[J].*Arch Biochem Biophys*,1959,(82): 70.
- [14] 卞留贵,张天锡,赵卫国,等. 局灶脑缺血后线粒体 ATP 酶的活性变化[J].*中华神经外科杂志*, 1995, 11(6): 348- 350.
- [15] 上海植物生理学会.植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.84- 86.
- [16] 刘立明,陈坚,李华钟,等. 降低光滑球拟酵母电子传递链活性加速丙酮酸合成[J].*微生物学报*, 2004, 44(6): 800- 803.
- [17] 马超颖,戚薇,路福平,等. 活性酵母细胞衍生物的初步研究[J].*微生物学通报*, 2003, 30(3): 26- 28.
- [18] 童群义,陈坚,堵国成,等. 面包酵母和耐高温酵母在谷胱甘肽合成过程中作为 ATP 再生菌株的比较[J].*无锡轻工大学学报*, 2000, 19(6): 537- 541.
- [19] 陈坚,卫功元,李寅,等. 微生物发酵法生产谷胱甘肽[J].*无锡轻工大学学报*, 2004, 23(5): 104- 110.
- [20] Duwat P, Cesselin B, Sourice S, et al. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int*[J]. *Journal of Food Microbiology*, 2000, (55): 83- 86.
- [21] Riccillo P,Muglia C, de Bruijn F J, et al. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*,including acid tolerance[J].*Journal of Bacteriology*, 2000,182(6): 1748- 1753.
- [22] 聂薇,卫功元,李寅,等. 利用低 pH 胁迫作用促进产朊假丝酵母生产谷胱甘肽[J].*化工学报*, 2005, 56(9): 1750- 1756.