

一、产朊假丝酵母生产谷胱甘肽过程控制与优化



主要内容

1

产朊假丝酵母高密度培养合成谷胱甘肽

2

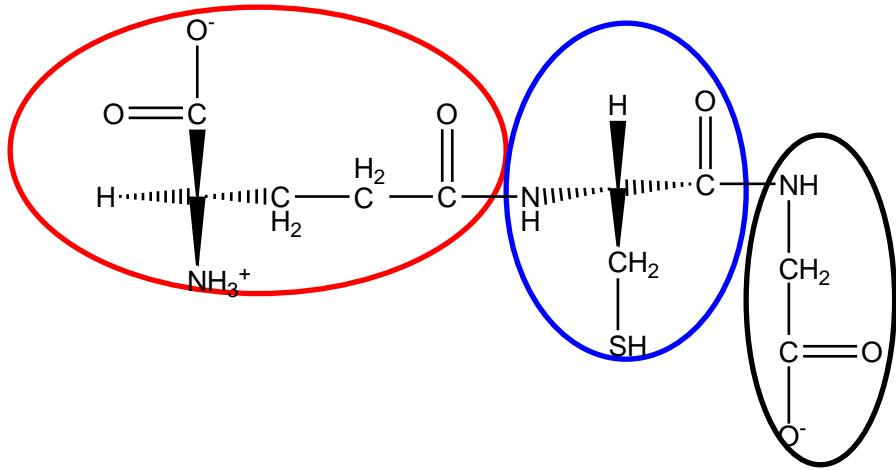
半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成

3

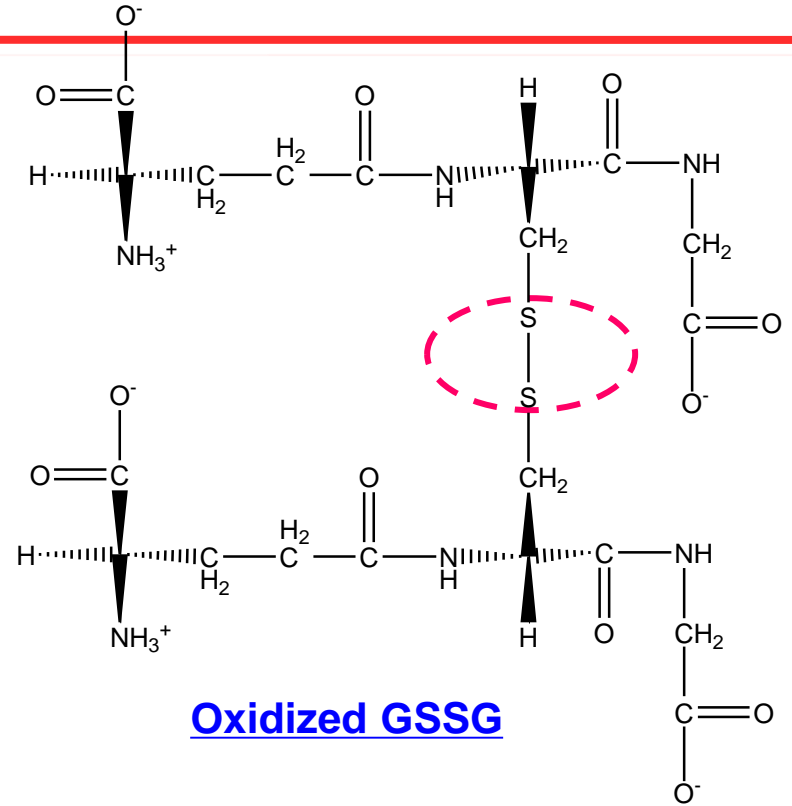
前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响



前言



Reduced GSH



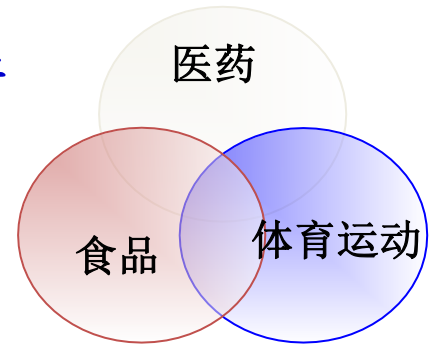
Oxidized GSSG

- GSH 主要分布在动植物活性组织以及微生物（酵母）细胞中，有还原型（GSH）和氧化型（GSSG）两种，通常GSH与GSSG的比例约为100 : 1，起主要作用是还原型GSH；
- 还原型GSH为生物活性三肽化合物，含有 γ -肽键和一个起关键作用的巯基



前言

- ※ GSH作为一种抗氧化剂可维持生物体内适宜的氧化还原环境
- ※ 广泛用于生物化学、医学、生物学和化学的研究测定
- ※ GSH可以迅速增强机体的免疫力
- ※ 对消化系统、呼吸系统和新陈代谢等都有很大帮助
- ※ GSH具有消除疲劳的作用
- ※ 近年来还发现GSH具有抑制艾滋病病毒的功效



商业需求量越来越大



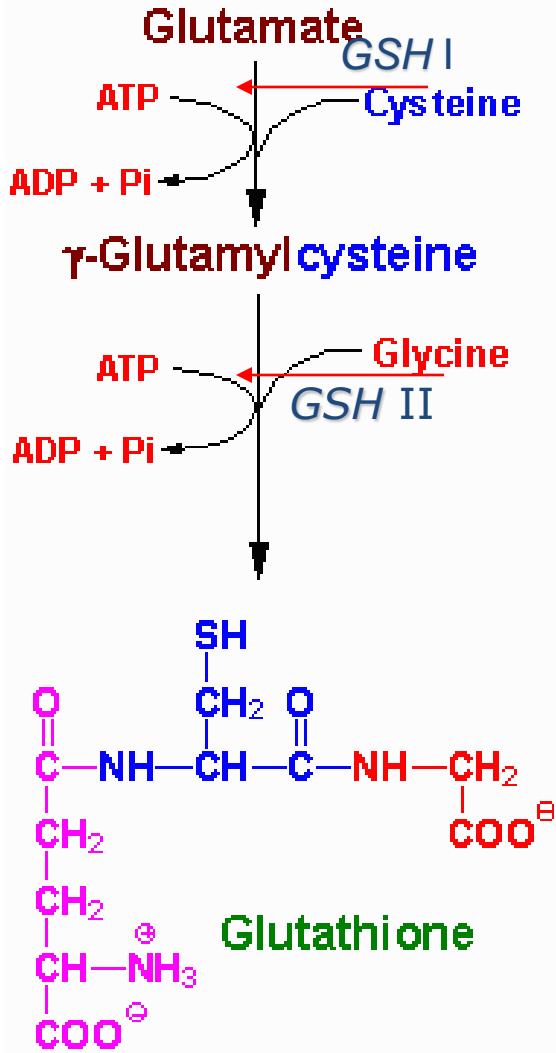
前言

- ◆ **有机溶剂萃取法**：通过萃取和沉淀的方法从含有GSH的动植物组织中进行GSH的分离提取，由于原料不易获得且GSH在组织中的含量极低，制取的GSH纯度和收率不高，因此该法的实际应用价值不大。
- ◆ **化学合成法**：将L-Glu、L-Cys和Gly经过经过基团保护、缩合和脱保护生成GSH，得到的GSH消旋体(左旋体和右旋体的混合物)需要进行光学拆分，分离十分困难且易造成环境污染，因此，获得的GSH产品纯度不高，生物效价很难保持一致。
- ◆ **生物技术法**：微生物细胞中L-Glu、L-Cys和Gly在ATP的存在下，经过 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSHI)和谷胱甘肽合成酶(GSHII)催化而合成。

生物合成法包括酶转化法和发酵法，二者的共同点是首先要有性能良好的微生物，然后再利用细胞中的高活性酶系较为温和的条件下合成GSH；二者区别在于酶法需要提供三种底物氨基酸和ATP，而发酵法只要供给微生物生长代谢所需的营养物质（碳源、氮源和无机盐等）即可实现GSH在胞内的积累。



前言



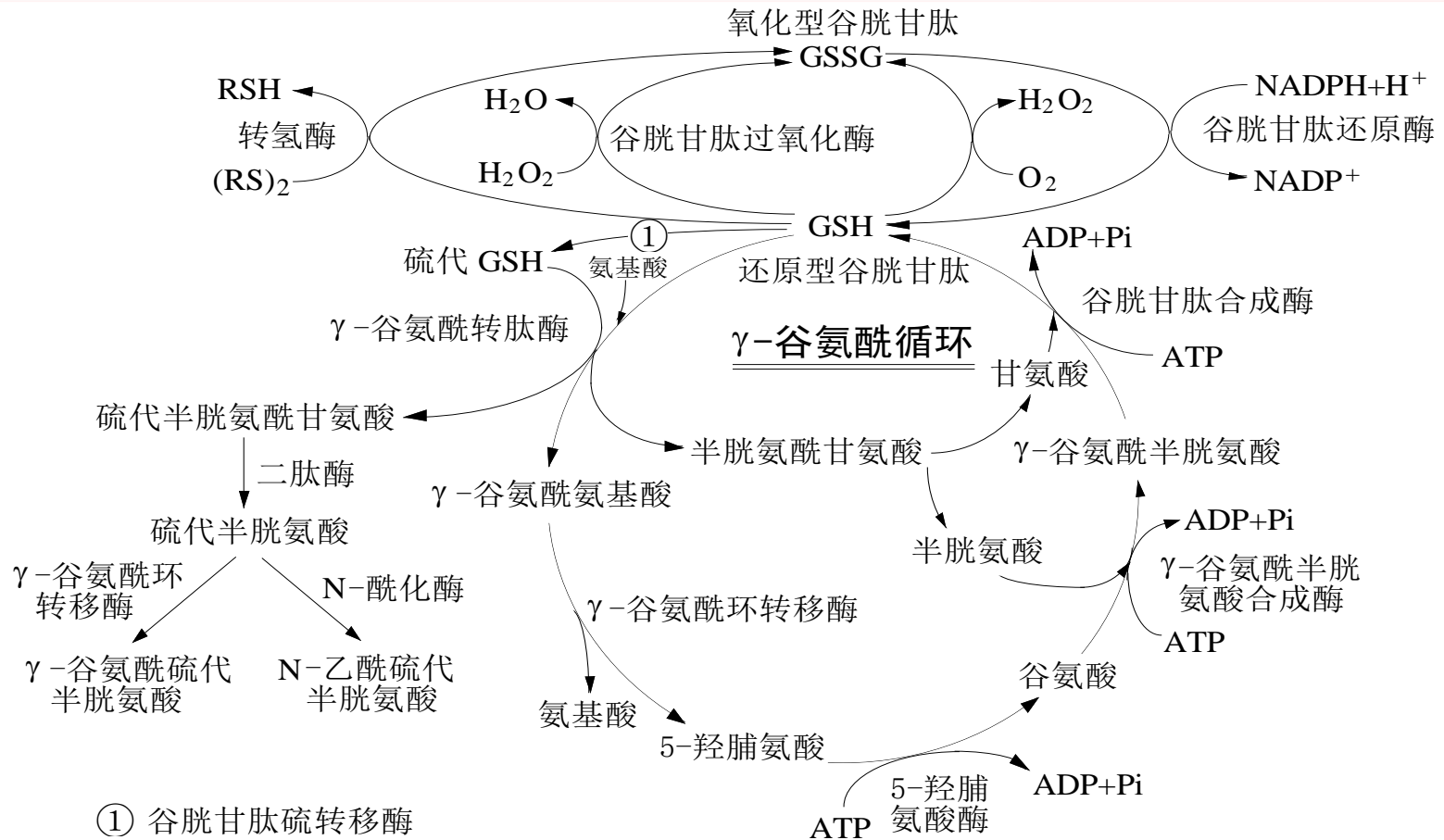
◆ GSH是由GSH I和GSH II在ATP存在下催化L-Glu, L-Cys和Gly的一个序贯酶反应合成

◆ 酶法高效合成GSH:

- 1) GSH合成酶系酶活的提高;
- 2) ATP有效供给;



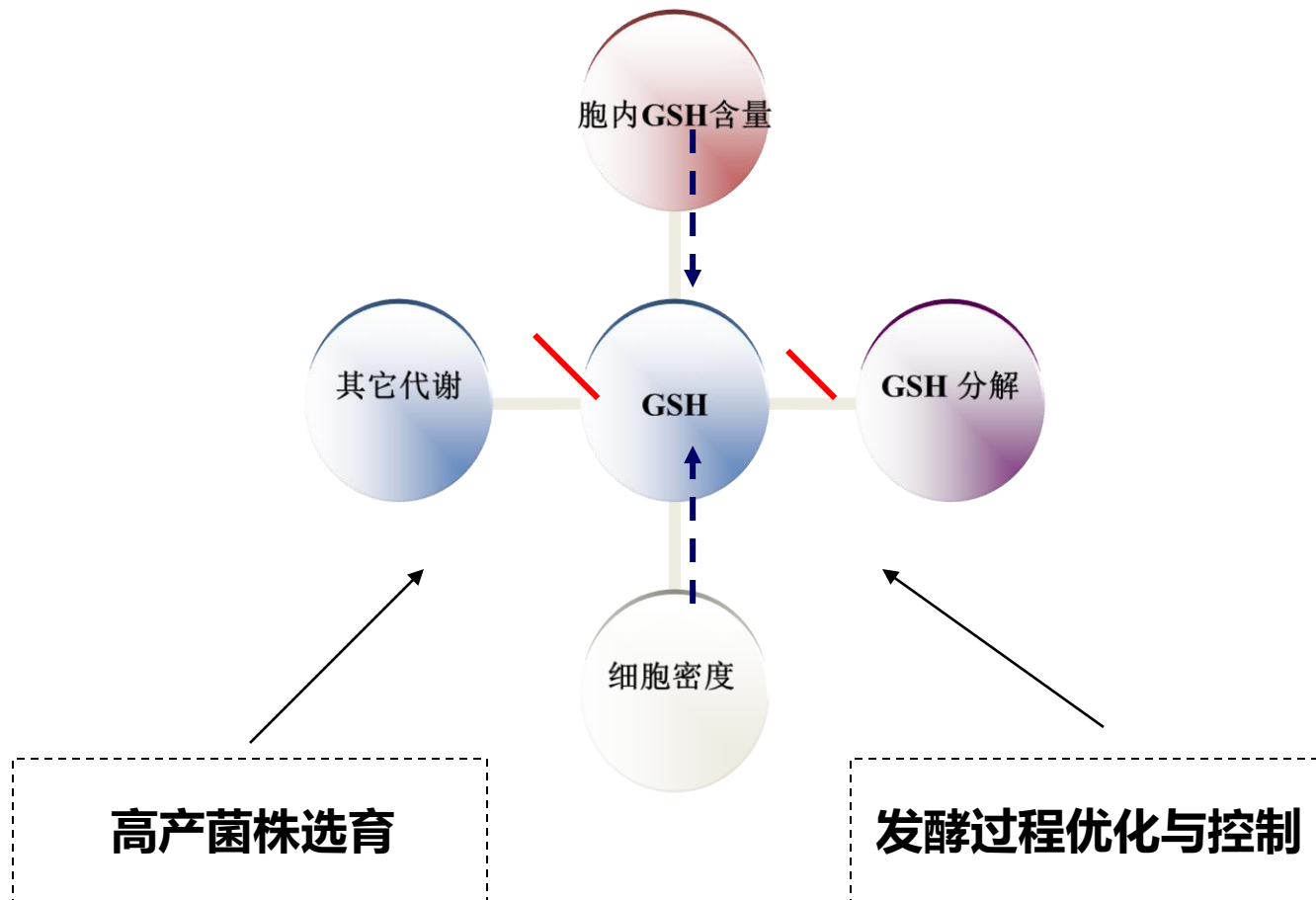
前言



发酵法合成GSH: 以糖等营养物质为原料，利用微生物体内物质的代谢途径来进行GSH生物合成，与酶法合成GSH相似，在GSHI和GSHII催化下，每合成一分子GSH需要一分子 L-Glu, L-Cys 和Gly 以及2分子的ATP



前言



厚德達理

勵志勤工



前言

◆ 发酵条件优化

培养基中营养成分的选择和培养环境条件（温度和pH等）的优化

◆ 发酵过程控制

通过不同方式优化流加发酵技术实现细胞高密度培养

◆ 前体氨基酸的添加

优化前体氨基酸添加策略

◆ ATP 添加与再生

直接添加ATP 或通过流加葡萄糖 产生ATP促进GSH合成

◆ GSH合成关键酶（GSH1）活性控制

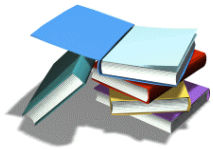
通过释放胞内GSH到胞外解除GSH对GSH1酶活性的反馈抑制



前言

- 采用怎样的控制策略在获得细胞高密度同时又保持细胞具有较高的合成GSH能力？
- 对整个GSH发酵过程中胞内前体氨基酸变化动态以及如何添加还缺乏系统研究？
- 通过细胞自身代谢所产生的ATP是否能同时满足细胞生长和GSH合成？
- 确保细胞正常生理代谢基础上，如何将胞内GSH分泌至胞外以解除GSH对GSHI的反馈抑制？
- 细胞在环境胁迫下可合成GSH，是否可以人为提供适当的环境胁迫，促进细胞大量合成GSH？

存在问题？



1

产朊假丝酵母高密度培养合成谷胱甘肽



产肌假丝酵母高密度培养合成谷胱甘肽

表1-1 不同初糖浓度对细胞生长和GSH合成的影响

Parameters	Results				
Initial glucose concentration (g/L)	5	10	15	20	30
Residual glucose concentration (g/L)	0.32	0.25	0.31	0.24	0.23
Time of glucose exhaust (/h)	6	8	9	10	12
Culture time (/h)	30	30	30	30	30
Maximum dry cell weight (g/L)	2.80	5.40	10.60	13.30	15.88
Maximum GSH production (mg/L)	56.8	98.5	150.6	161.3	206.4
Maximum intracellular GSH content (%)	2.28	1.82	1.42	1.21	1.29
Glucose consumption rate (g/L/ h)	0.99	1.62	1.83	2.18	2.71
Average specific growth rate (/h)	0.220	0.213	0.212	0.201	0.179
Average specific GSH production rate (mg/g /h)	3.38	2.28	1.57	1.21	1.08
Biomass yield on glucose (g /g)	0.56	0.54	0.71	0.67	0.54
GSH yield on glucose (mg /g)	11.30	9.71	10.20	8.14	6.90
Biomass productivity (g/L /h)	0.56	0.90	1.35	1.54	1.42
GSH productivity (mg/L/ h)	9.46	12.31	16.73	16.13	17.2

- 1) 确保细胞进入对数期;
 - 2) 避免由于高糖浓度而导致副产物积累;
- ◆ 初糖为15g/L时, 可获得较高细胞和GSH对葡萄糖的得率.



产肌假丝酵母高密度培养合成谷胱甘肽

表1-2 不同比生长速率对细胞生长和GSH合成的影响

Parameters	Results			
Nominal specific growth rate (h/)	0.10	0.15	0.20	0.25
Feeding times (h)	12	12	12	12
Maximum Dry cell weight(g/L)	39.4	55.4	81.2	64.7
Maximum GSH production(mg/L)	358.7	509.7	763.2	580.3
Maximum Intracellular GSH content (%)	0.81	0.92	0.94	0.90
Actual average specific growth rate(h/)	0.102	0.132	0.198	0.143
Biomass yield on glucose(g/g)	0.61	0.56	0.63	0.17
GSH yield on glucose (mg/g)	7.41	6.45	6.74	2.84
Total glucose addition (g)	144	316	472	1257
Residue glucose concentration(g/L)	0.22	0.32	0.95	124.32

◆ 比生长速率 μ 设为 0.20 h^{-1} 时，经过12h指数速率流加，细胞密度和GSH产量均可得到明显地提高。



产肌假丝酵母高密度培养合成谷胱甘肽

表1-3 不同恒速流加速率对细胞生长和GSH合成的影响

Parameters	Mode of cultivation			
	Fed-batch I	Fed-batch II	Fed-batch III	Fed-batch IV
Glucose feeding rate (g /L/ h)	2.5	4	5.5	7
Culture time (h)	24	24	24	24
Maximum DCW (g/L)	86.2	93.3	102.1	96.1
Maximum GSH (mg/L)	838	891	981	908
GSH content (%)	0.97	0.95	0.96	0.91
Glucose consumption rate(g /L/ h)	2.38	3.82	5.31	6.72
Average specific growth rate (/h)	0.052	0.071	0.084	0.077
Cell yield on glucose (g /g)	0.083	0.13	0.15	0.08
GSH yield on glucose (mg /g)	1.25	1.31	1.60	0.85
Cell productivity (g/ L/ h)	0.21	0.49	0.84	0.60
GSH productivity (mg /L/ h)	3.1	5.2	8.8	5.9
Residue glucose (g/L)	0.23	0.41	0.82	4.45

◆指速速率流加结束后，进一步通过恒数流加补糖，当流加速率为5.5g/L/h，经过24h培养，细胞密度和GSH产量可达102g/L 和981mg/L。



一 产肌假丝酵母高密度培养合成谷胱甘肽

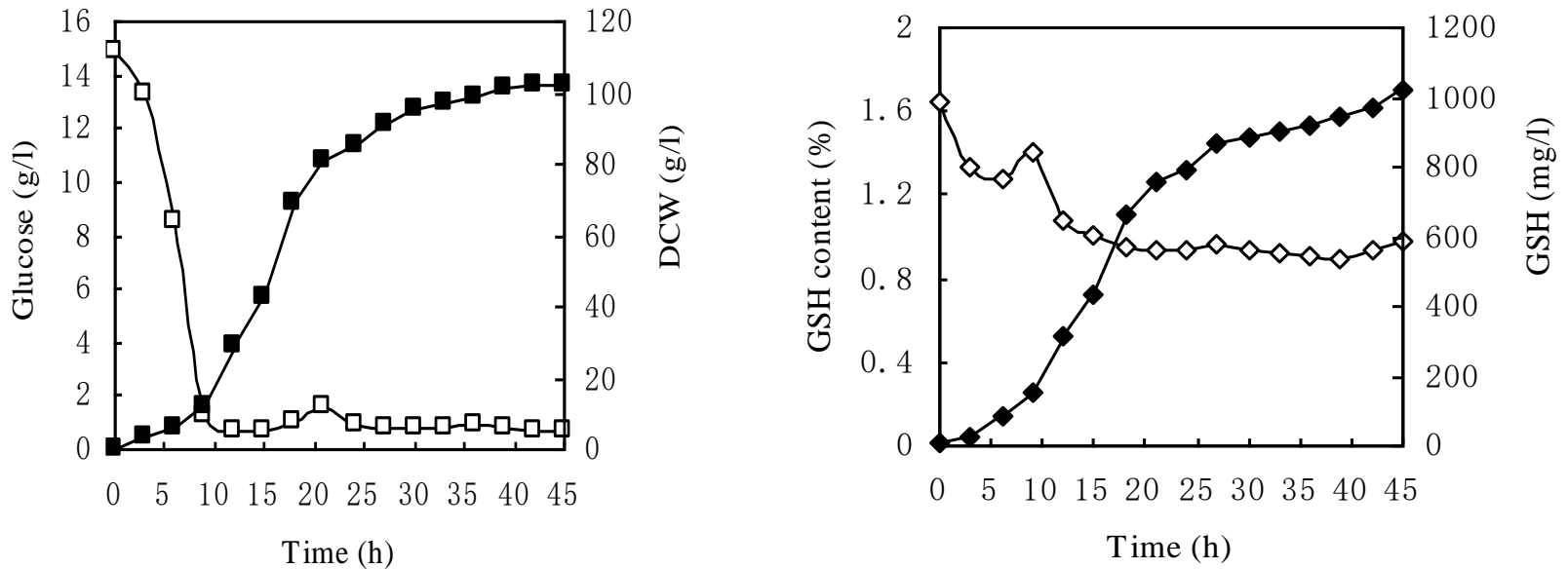


图1-1高密度培养细胞生长、葡萄糖消耗及GSH合成过程曲线

□,葡萄糖; ■,细胞干重; ◇,胞内 GSH含量; ◆,GSH浓度

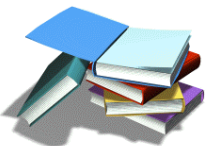
◆ 对 *C. utilis* WSH02-08 三阶段 (9h 分批培养、12h 指数速率流加和24h 恒速流加补糖) 高密度培养, 菌体量可达到 **102 g/L**, GSH 产量为 **981 mg/L**, 胞内含量为 **0.96%**。



本章小结

- ◆ 通过对GSH分批发酵过程进行考察，确定较适初糖浓度为15 g/L左右；
- ◆ 进一步确定当比生长速率 μ 为 0.2 h^{-1} 以及恒数流加补糖速度为 5.5 g/L/h 时，通过指数速率流加与恒速流加结合可实现细胞高密度培养；
- ◆ 确定了分批培养、指数速率和恒速流加相结合的三阶段细胞高密度培养策略，经过45 h发酵培养，菌体密度达 102 g/L ，此时GSH浓度为 981 mg/L 。

尽管细胞密度得到显著提高，但胞内含量仍很低，因而GSH产量并没有大幅度提高！



2

半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成



二 半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成

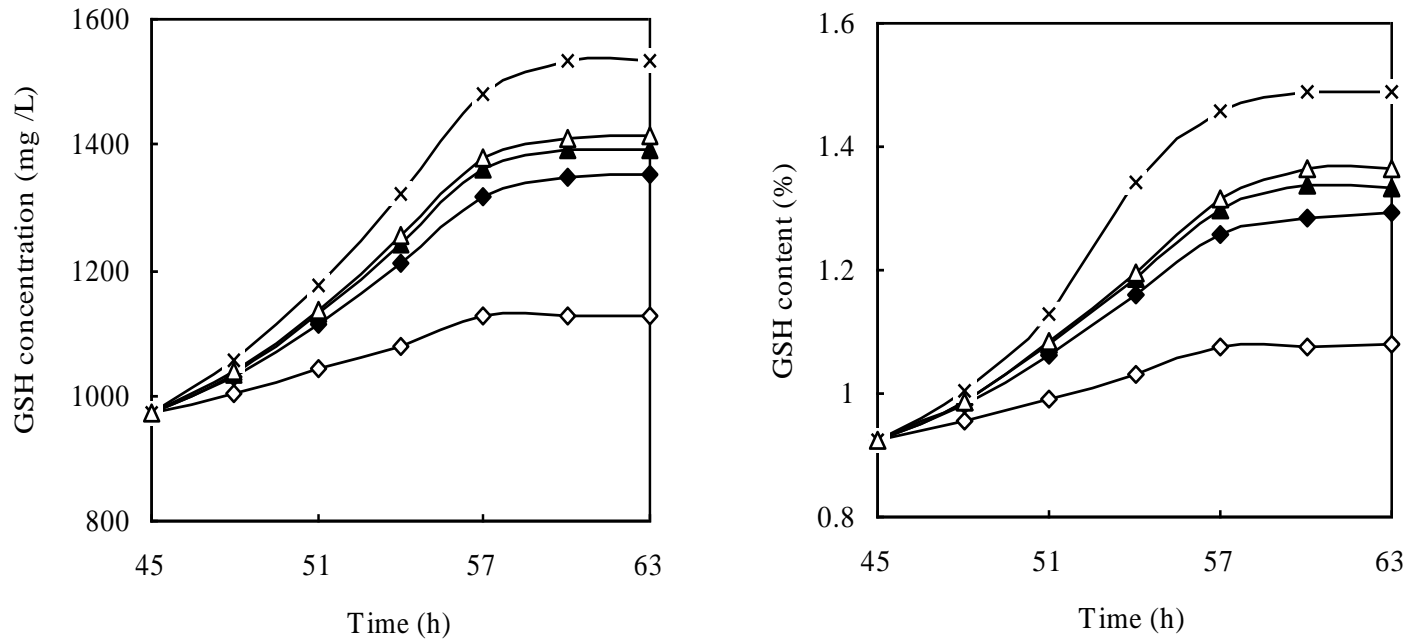


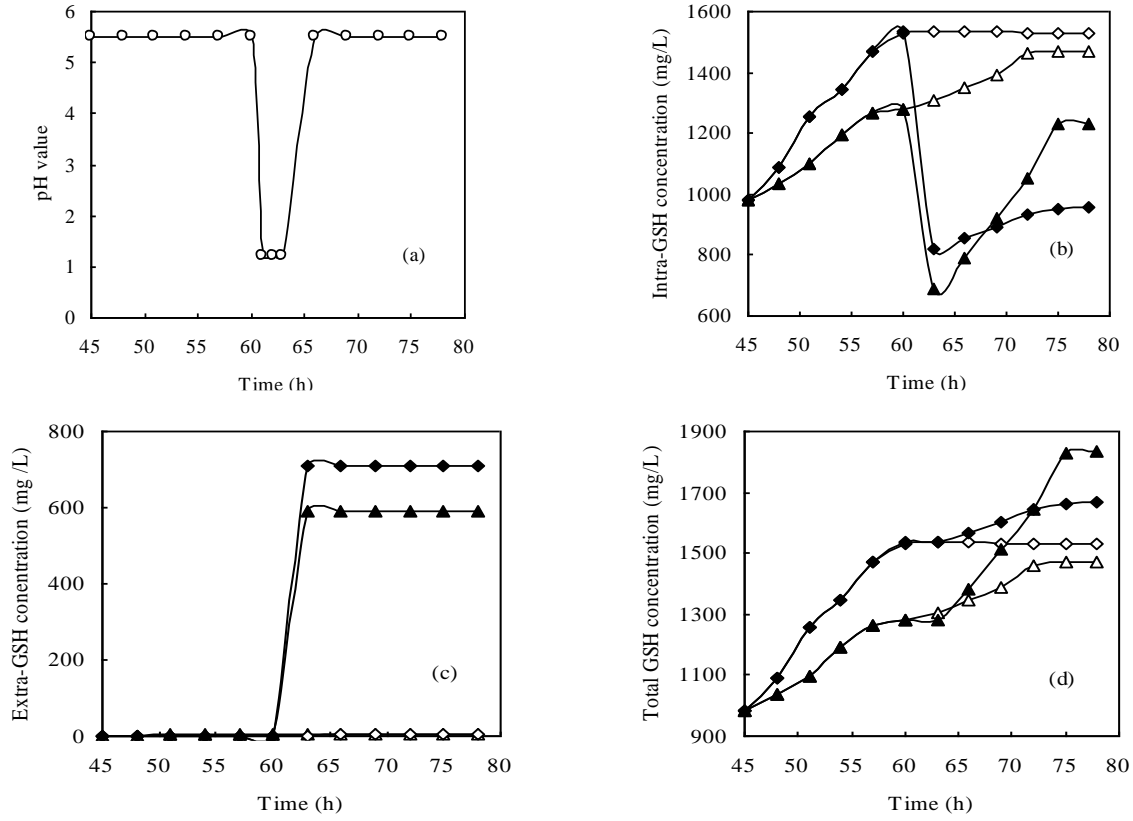
图2-1 半胱氨酸添加对GSH合成的影响

◇, 0 mmol/L (control); ◆, 30 mmol/L; ▲, 40 mmol/L; ×, 50 mmol/L; △, 60 mmol/L

◆ 一次性半胱氨酸加入浓度为50 mmol/L, GSH产量达到最大值1534 mg/L, 胞内GSH含量为1.50%。



二 半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成



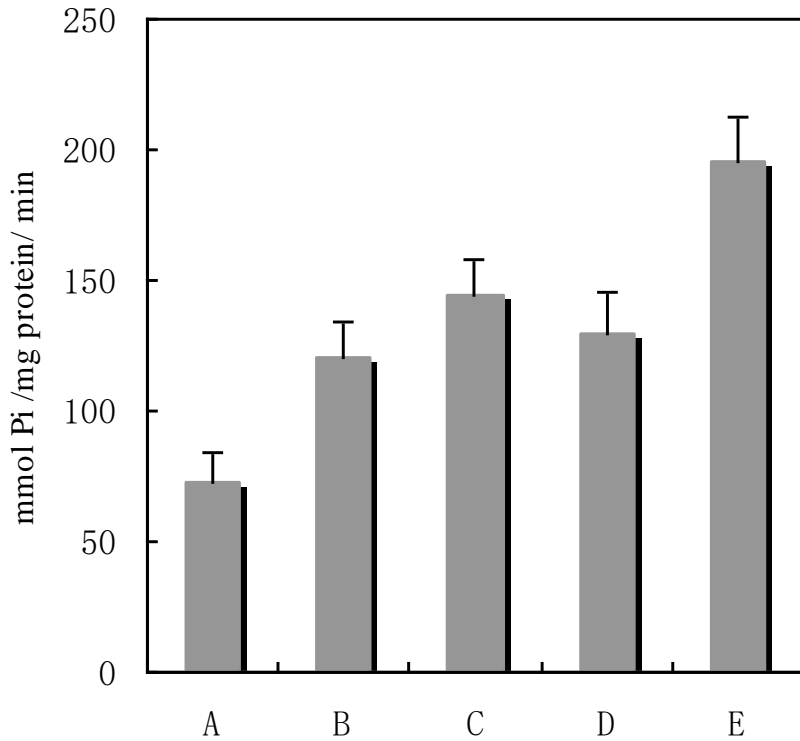
○, pH change; ◇, 一次性cys添加未pH胁迫; ◆ 一次性添加及pH胁迫, △两次性cys添加未pH胁迫; ▲两次性添加及pH胁迫

图2-2 pH胁迫与半胱氨酸添加相结合对GSH合成的影响

◆ 低pH胁迫后，一次和两次半胱氨酸添加的总GSH产量分别为**1675 mg/L**和**1825 mg/L**，与未经低pH胁迫时总GSH产量1534 mg/L相比，分别提高了9%和19%



二 半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成



A, 对照;

B, 未经低pH胁迫时一次性加入 (50 mmol/L) 半胱氨酸

C, 低pH胁迫时一次性添加 (50mmol/L) 半胱氨酸;

D, 未经低pH胁迫时两次加入 (每次25 mmol/L) 半胱氨酸;

E, 低pH胁迫时两次加入 (每次25 mmol/L) 半胱氨酸

图2-3 pH 胁迫对GSHI酶活性的影响

◆ 经低pH胁迫后, 胞内GSH I 活性显著提高!



半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成

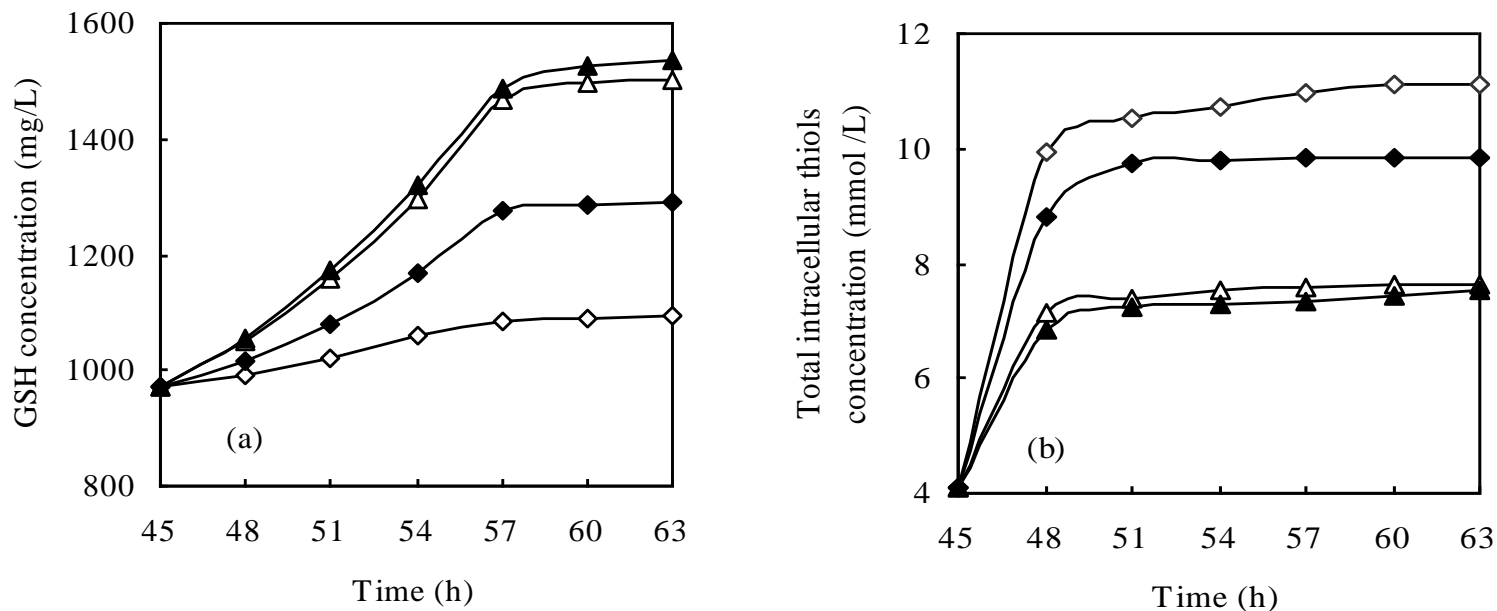


图2-4 溶氧水平对GSH合成及半胱氨酸吸收的影响

◇, 5% DO; ◆, 10% DO; △, 20% DO; ▲, 40% DO

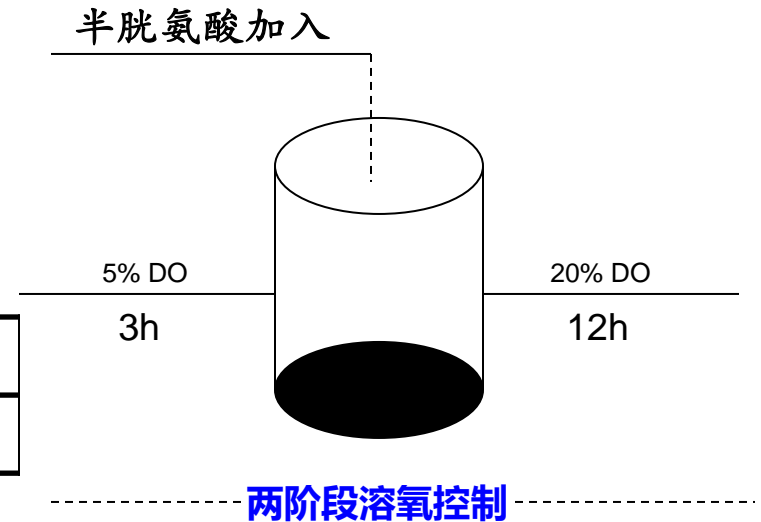
◆ 低溶氧有利于半胱氨酸吸收，大部分半胱氨酸在加入**3 h**后被吸收；高溶氧有利于GSH合成，溶氧为20%时，GSH产量可达**1534mg/L**与不控制溶氧相同，说明溶氧控制在**20%**时可满足GSH合成，此时胞内总还原性巯基浓度为**7.52mmol/L**。



半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成

表2-1 不同浓度半胱氨酸添加对5% DO 胞内总巯基含量的影响

Cysteine(mmol/L)	20	25	30	35	40
Total thiols (mmol/L)	6.52	7.12	7.43	7.96	8.91



◆半胱氨酸浓度为30 mmol/L，加入3 h后胞内总巯基含量达 **7.43 mmol/L**，接近溶氧为20%半胱氨酸添加量为50 mmol/L时胞内总巯基浓度值（7.52 mmol/L），即只需加入30mmol/L半胱氨酸，就可达到不控制溶氧时半胱氨酸添加量为50mmol/L的效果。



二 半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成

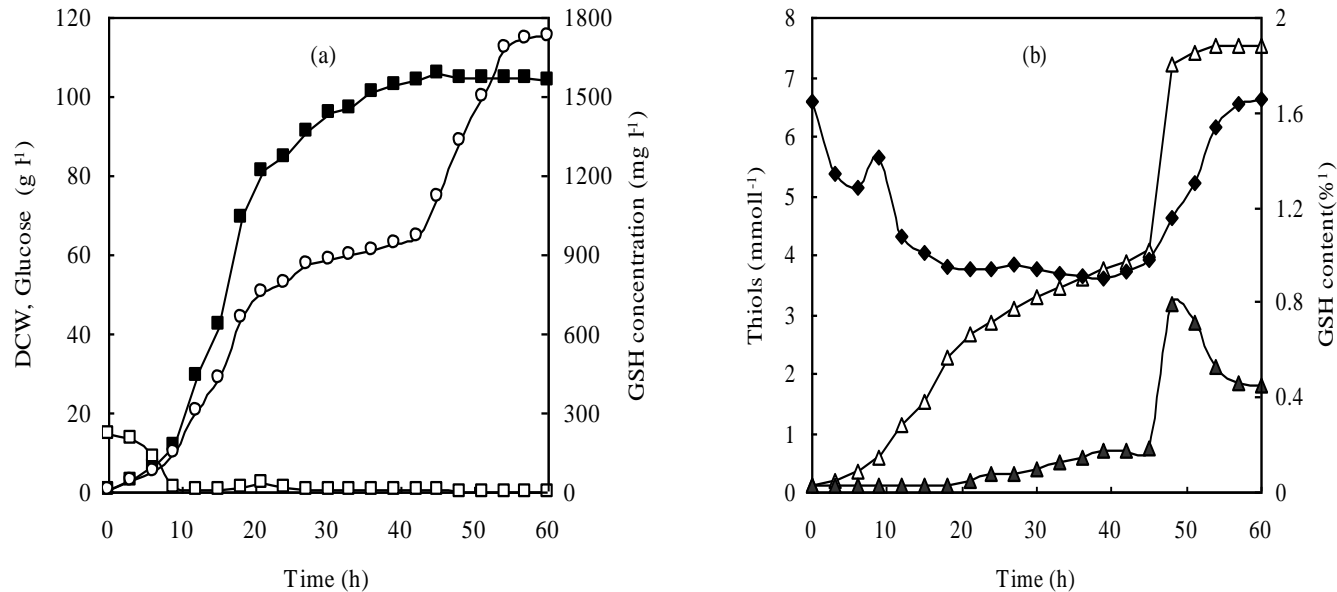


图2-5两阶段溶氧控制与半胱氨酸添加相结合对GSH合成的影响

□,葡萄糖; ■,细胞干重; ○,胞内GSH浓度; ◆,胞内GSH含量; ▲,其他巯基; △,总还原性巯基

◆通过两阶段溶氧控制，到60 h时发酵结束，GSH产量达1734mg/L，与半胱氨酸添加量50 mmol/L而未进行溶氧控制相比较，GSH产量提高了13%，同时半胱氨酸添加量却减少了40%。



二 半胱氨酸添加与pH和溶氧控制相结合促进谷胱甘肽合成

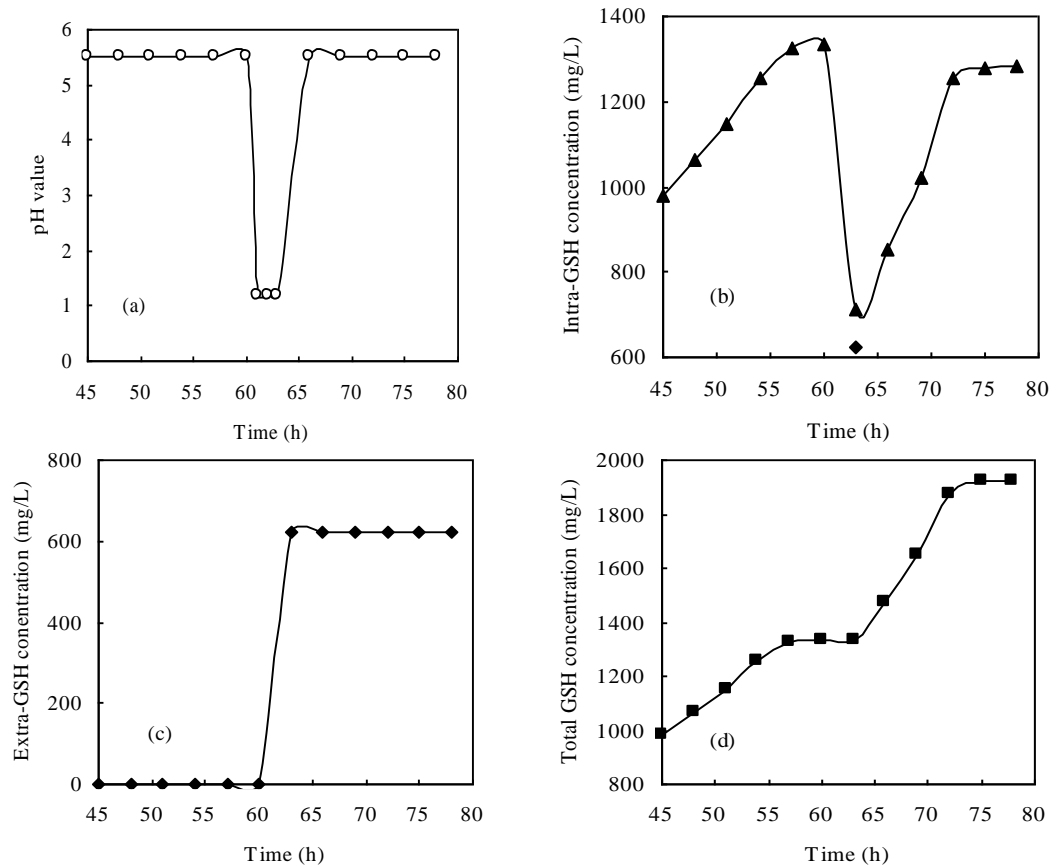


图2-6 pH胁迫及溶氧控制与半胱氨酸添加相结合对GSH合成的影响

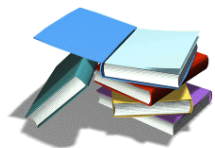
◆ 半胱氨酸30 mmol/L，两次添加（每次15 mmol/L），添加时间45 h和63 h，添加时通过两阶段溶氧控制，60 h经3 h低pH胁迫使部分胞内GSH释放到胞内，到78 h时GSH总产量高达 **1936 mg/L**，此时胞内含量为1.9%



本章小结

- ◆ 一次性半胱氨酸添加为50 mmol/L时，GSH产量达最大值1534 mg/L，但用于GSH合成的半胱氨酸只为其添加量的4%左右，即大部分半胱氨酸没有被利用
- ◆ 将50 mmol/L半胱氨酸分两次添加并与低pH胁迫结合促进GSH合成，最终GSH总产量达1825 mg/L。
- ◆ 溶氧对半胱氨酸吸收和GSH合成影响显著，为此提出了两阶段溶氧控制与半胱氨酸添加相结合策略来提高GSH产量，结果半胱氨酸添加由50 mmol/L减少到30 mmol/L，即降低了40%，而GSH产量却达到1734mg/L，提高了13%
- ◆ 进一步将pH胁迫和溶氧控制与半胱氨酸添加相组合，半胱氨酸浓度为30 mmol/L，通过低pH胁迫和两阶段溶氧控制，GSH终产量达1936 mg/L

半胱氨酸为GSH合成的关键性氨基酸，谷氨酸和甘氨酸添加是否可以进一步促进GSH合成呢？



3

前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响



三 前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

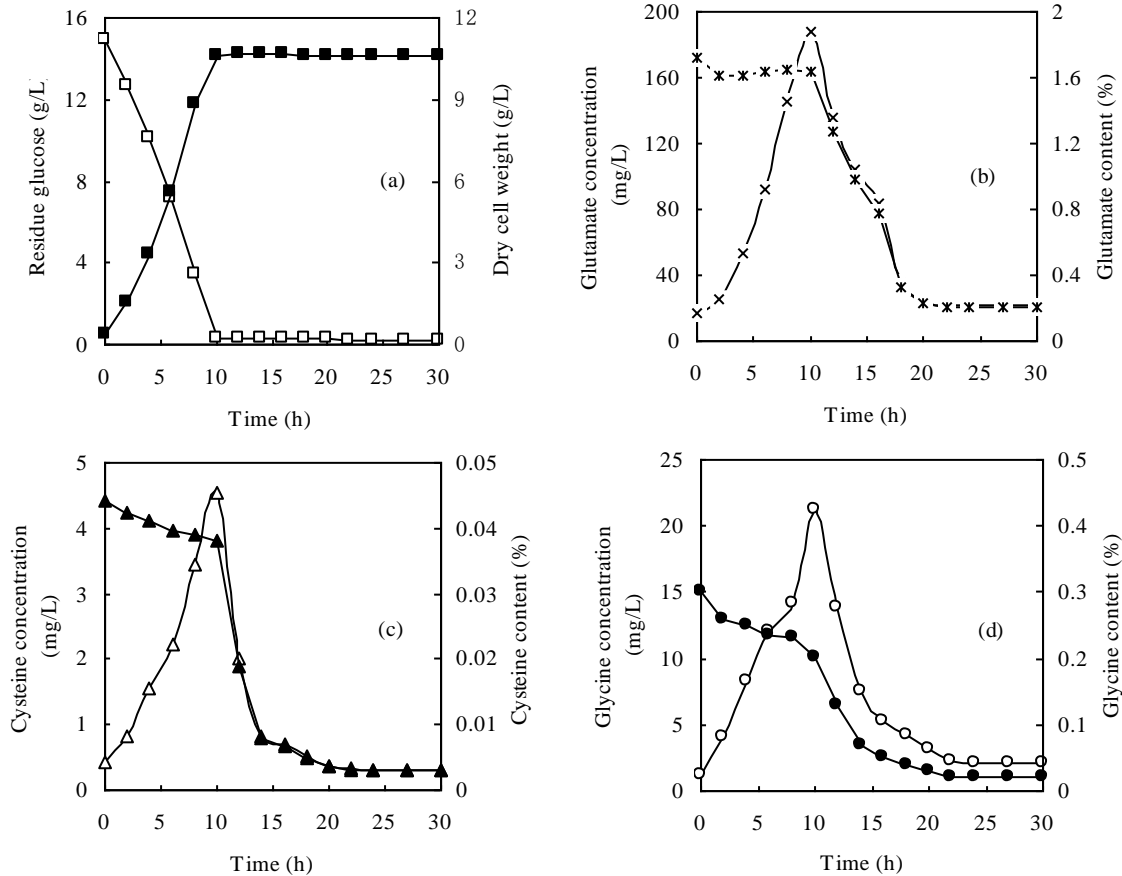


图3-1 谷氨酸、半胱氨酸以及甘氨酸浓度变化

×, 谷氨酸浓度; *, 谷氨酸含量 (%); △, 半胱氨酸浓度; ▲, 半胱氨酸含量 (%); ○, 甘氨酸浓度; ●, 甘氨酸含量 (%)

◆ 整个GSH发酵过程中, 胞内三种氨基酸浓度都很低, 尤其是当细胞停止生长时, 三种氨基酸浓度迅速下降, 说明胞内氨基酸不能满足GSH合成的需要。与半胱氨酸和甘氨酸相比, 谷氨酸含量则相对较高。



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

表3-1 谷氨酸添加对细胞生长和GSH合成的影响

Concentration of glutamic acid (mmol/L)	Addition time (h)	DCW (g/L)	GSH yield (mg/L)	GSH content (%)
Control		9.46	93.2	0.98
	0	9.52	96.3	1.01
	2	10.01	100.3	1.02
2	4	9.94	101.2	1.02
	6	9.81	98.8	1.01
	8	9.51	96.5	1.02
	0	9.83	101.4	1.03
	2	10.06	104.3	1.04
4	4	10.04	102.5	1.02
	6	9.88	100.3	1.01
	8	9.61	97.2	1.01
	0	9.12	90.3	0.99
	2	9.41	92.1	0.98
6	4	9.66	97.3	1.01
	6	9.72	100.6	1.03
	8	9.64	98.3	1.02
	0	9.03	88.2	0.97
	2	9.28	90.4	0.97
8	4	9.52	93.3	0.98
	6	9.61	98.6	1.03
	8	9.53	96.4	1.01



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

表3-2 甘氨酸添加浓度和时间对细胞生长和GSH合成的影响

Concentration of glycine (mmol/L)	Addition time(h)	DCW (g/L)	GSH yield (mg/L)	GSH content (%)
Control		9.46	93.2	0.98
	0	10.12	107.4	1.06
	2	10.21	115.3	1.13
2	4	10.14	113.2	1.11
	6	9.89	107.8	1.08
	8	9.63	102.5	1.06
	0	10.18	110.6	1.08
	2	10.31	118.3	1.15
4	4	10.27	115.5	1.12
	6	10.08	110.3	1.09
	8	9.72	106.2	1.09
	0	10.24	114.5	1.12
	2	10.41	125.1	1.21
6	4	10.36	119.3	1.15
	6	10.12	114.6	1.13
	8	9.94	108.3	1.09
	0	9.20	109.8	1.18
	2	9.38	115.4	1.23
8	4	9.42	110.3	1.17
	6	9.63	107.6	1.11
	8	9.54	105.4	1.10



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

表3-3 半胱氨酸添加浓度和时间对细胞生长和GSH合成的影响

Concentration of cysteine (mmol/)	Addition time(h)	Dry cell weight (g/L)	GSH yield (mg/L)	GSH content (%)
Control		9.46	93.2	0.98
2	0	8.86	104.3	1.17
	2	9.01	108.6	1.21
	4	9.18	110.2	1.20
	6	9.25	114.5	1.23
	8	9.38	120.4	1.28
4	0	8.32	98.4	1.18
	2	8.41	102.2	1.21
	4	8.83	106.8	1.22
	6	9.12	115.3	1.26
	8	9.22	117.4	1.27
6	0	7.88	91.5	1.16
	2	8.01	96.6	1.2
	4	8.12	103.4	1.27
	6	8.83	110.3	1.25
	8	9.11	114.4	1.25
8	0	7.26	86.3	1.19
	2	7.42	90.5	1.21
	4	7.84	95.2	1.21
	6	8.34	105.4	1.26
	8	8.85	112.6	1.27



三 前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

表3-4 氨基酸添加对细胞生长和GSH合成的影响的比较

Amino acids types	Addition times (h)	Addition amount (mmol/L)	Cell concentration (g/L)	GSH yield (mg/L)	GSH content (%)
Glutamic acid	2	4	10.06	104.3	1.04
Glycine	2	6	10.41	125.1	1.21
Cysteine	8	2	9.38	120.4	1.28

细胞生长阶段，与添加半胱氨酸和谷氨酸相比，甘氨酸可显著促进细胞生长和GSH合成，为此，提出细胞生长期添加甘氨酸以及静止期添加三种混合氨基酸的**两阶段氨基酸添加策略！**



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

表3-5 中心组成实验变量的编码和水平

Variables	Symbols	Coding				
		-1.682	-1	0	1	1.682
Glutamic acid (mmol/L)	X_1	2	4.4	6	8.4	10
Glycine (mmol/L)	X_2	2	4.4	6	8.4	10
	X_3	2	4.4	6	8.4	10
Cysteine (mmol/L)						

◆谷氨酸、半胱氨酸与甘氨酸3个因素，三种前体氨基酸添加浓度分别设定为2-10 mmol/L，以GSH产量为响应值，通过Central-Composite响应面分析方法在3因素3水平上对GSH合成的三种氨基酸添加浓度进行优化！



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

表3-6 Central-Composite实验设计合成GSH

No.	X_1	X_2	X_3	Y
	Glutamic acid	glycine	cysteine	GSH yield (mg/L)
1	-1.000	1.000	-1.000	246.1
2	0.000	0.000	0.000	273.5
3	1.000	1.000	1.000	232.6
4	-1.000	-1.000	-1.000	243.1
5	0.000	0.000	-1.682	231.1
6	1.000	-1.000	-1.000	249.2
7	-1.682	0.000	0.000	263.1
8	0.000	0.000	0.000	273.5
9	0.000	0.000	0.000	273.5
10	0.000	0.000	0.000	273.5
11	-1.000	-1.000	1.000	245.0
12	1.000	1.000	-1.000	234.2
13	1.682	0.000	0.000	272.1
14	-1.000	1.000	1.000	256.4
15	1.000	-1.000	1.000	241.4
16	0.000	0.000	0.000	273.5
17	0.000	0.000	0.000	273.5
18	0.000	0.000	1.682	255.4
19	0.000	-1.682	0.000	259.2
20	0.000	1.682	0.000	231.3

◆ 实验分别获得GSH产量的最大值和最小值分别为**273.5mg/L**和**231.1 mg/L**。



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

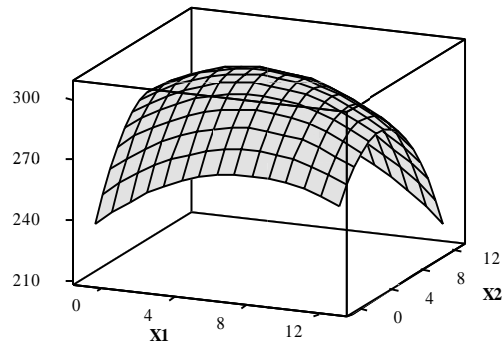
表3-7 Central-Composite实验设计下影响GSH合成的回归方程系数及其显著性检验

Term	Coefficient	SE Coef.	T	P
Constant	189.844	13.761	15.250	0.000
X ₁	7.112	2.209	3.502	0.006
X ₂	10.166	2.209	5.099	0.000
X ₃	11.249	2.209	5.816	0.000
X ₁ *X ₁	-0.419	0.130	-3.385	0.007
X ₂ *X ₂	-0.903	0.130	-7.196	0.000
X ₃ *X ₃	-0.917	0.130	-7.537	0.000
X ₁ *X ₂	-0.298	0.174	-1.716	0.117
X ₁ *X ₃	-0.169	0.174	0.970	0.355
X ₂ *X ₃	0.114	0.274	0.656	0.627
R-Sq	91.9%			

◆对Central-Composite实验设计进行方差分析，经F值检验显示总模型方程高度显著($p < 0.005$)，R-Sq值为0.919，说明91.9%的生物合成GSH变异分布在所考察的3个因子中，总变异中仅有8.01%不能由该模型来解释

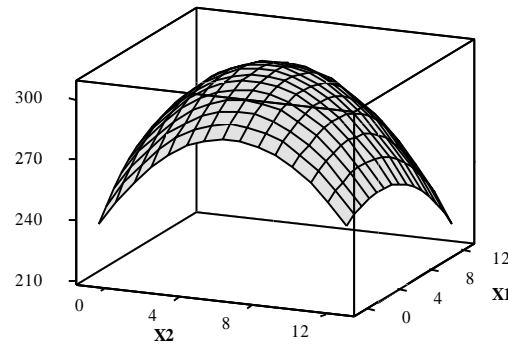


三 前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响



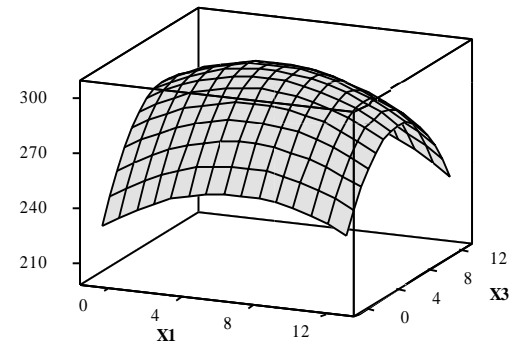
Surface Plot of Y vs X2, X1

Hold Values
X3 = 6



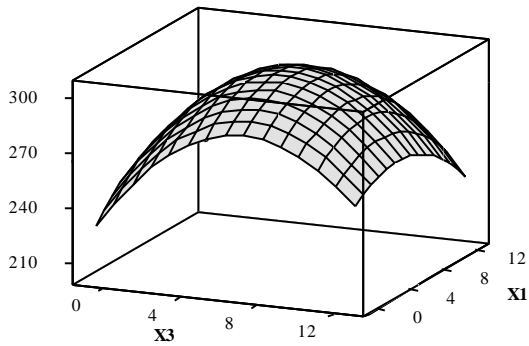
Surface Plot of Y vs X1, X2

Hold Values
X3 = 6



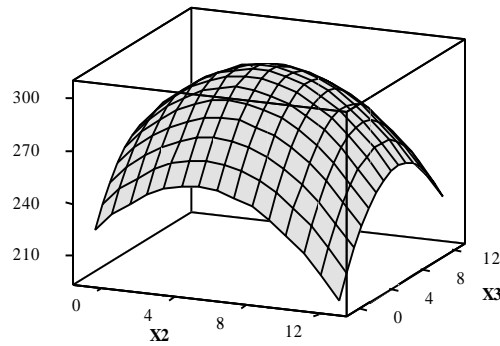
Surface Plot of Y vs X3, X1

Hold Values
X2 = 6



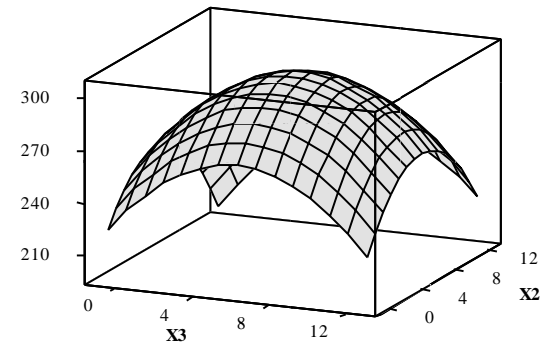
Surface Plot of Y vs X1, X3

Hold Values
X2 = 6



Surface Plot of Y vs X3, X2

Hold Values
X1 = 6



Surface Plot of Y vs X2, X3

Hold Values
X1 = 6

图3-4 前体氨基酸添加影响GSH合成的响应面图

◆甘氨酸与半胱氨酸对GSH合成影响显著，谷氨酸的影响作用不明显！



前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

- ◆ 氨甘酸最佳配比确定：谷氨酸6 mmol/L，甘氨酸5.5 mmol/L，半胱氨酸6.5 mmol/L，在此条件下，GSH产量理论值可达278.3 mg/L；
- ◆ RSM模型准确性预测：采用上述最优工艺条件进行实验，3次平行最优条件下的重复性实验，GSH产量分别为：279.45 mg/L，276.21 mg/L，278.15 mg/L，平均值为277.9 mg/L，验证实验结果与理论预测值误差在1%以内，模型方程真实可行，能够很好的预测实验结果，具有实用价值。



三 前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

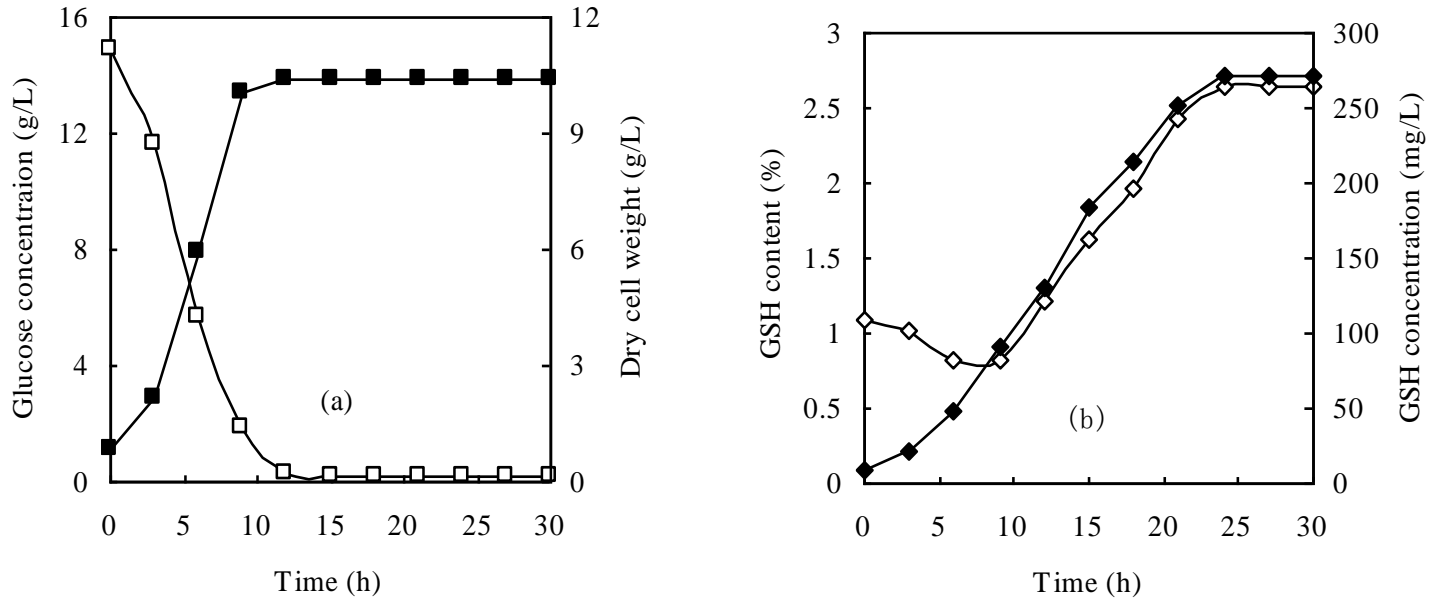


图3-5 摇瓶上两阶段氨基酸添加对GSH合成的影响

□,葡萄糖; ■,细胞干重; ◇,胞内GSH浓度; ◆,GSH浓度

◆ 2 h添加**6 mmol/L**甘氨酸, 到第10 h, 细胞浓度和GSH产量分别为**10.41 g/L**和**125.2 mg/L**, 此时, 添加三种前体混合氨基酸(谷氨酸 **6 mmol/L**、甘氨酸 **5.5 mmol/L**和半胱氨酸 **6.5 mmol/L**), 经过30 h培养后, 胞内GSH 产量为**277.9 mg/L**, 胞内GSH含量为**2.61%**。



三 前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

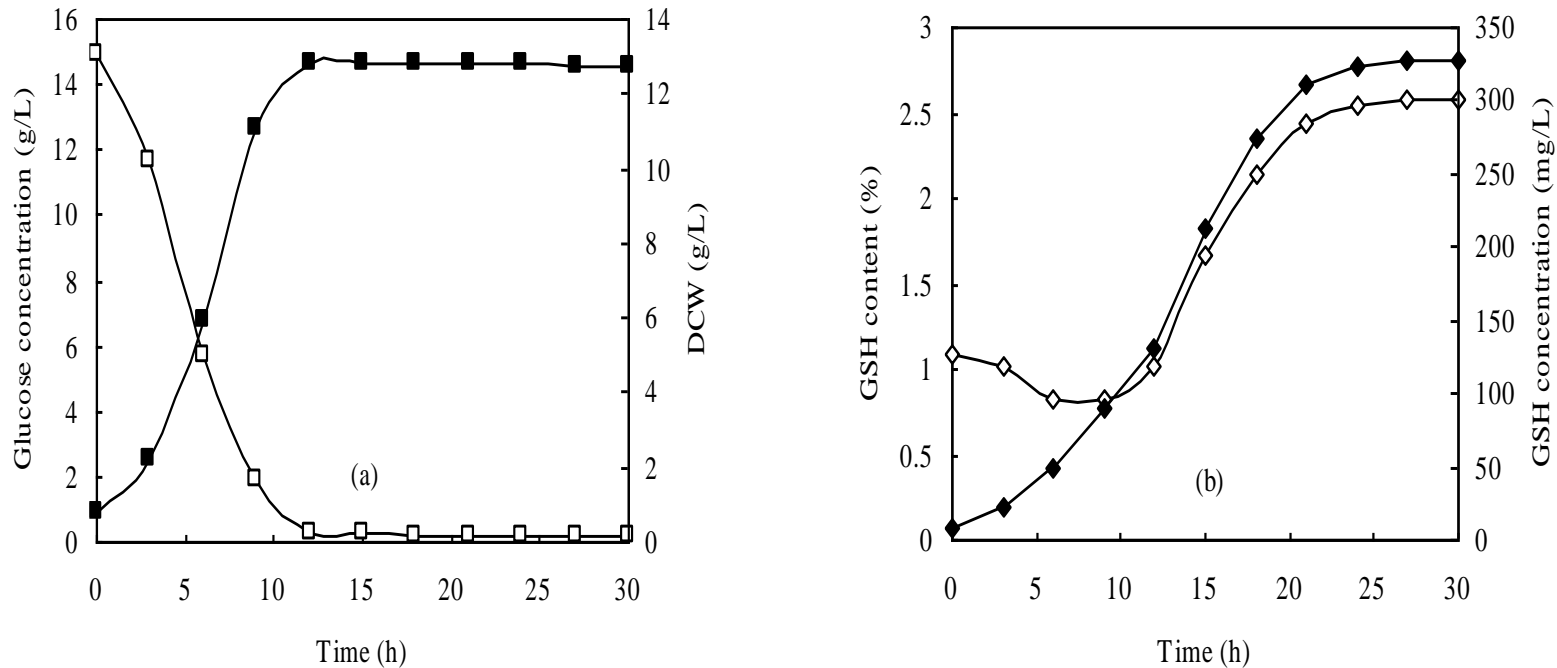


图3-6 7L 两阶段氨基酸添加对GSH的影响

□,葡萄糖; ■,细胞干重); ◇,胞内GSH浓度; ◆,GSH浓度

◆将两阶段氨基酸添加应用于7 L罐上，发酵培养30h后，GSH产量为328.1 mg/L，GSH胞内含量为2.56%



三 前体氨基酸添加对谷胱甘肽合成的影响

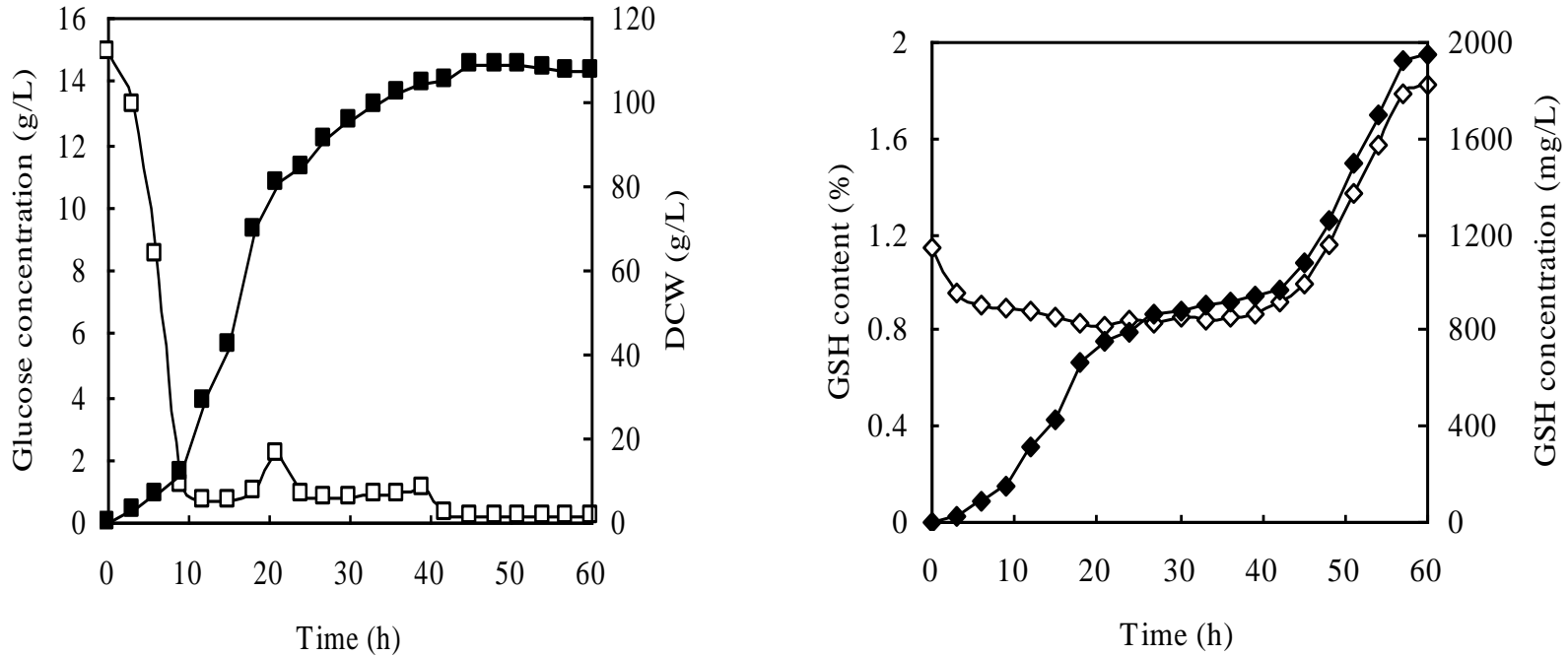


图3-7 高密度培养两阶段氨基酸添加对GSH合成的影响

□,葡萄糖; ■,细胞干重); ◇,胞内GSH浓度; ◆,GSH浓度

◆ 36 h添加36 mmol/L甘氨酸, 45 h添加三种混合氨基酸(谷氨酸36 mmol/L、甘氨酸33 mmol/L和半胱氨酸39 mmol/L), 发酵到第60 h时, 细胞干重为**108g/L**, GSH产量为**1952mg/L**.



本章小结

- 考察了分批培养时胞内三种氨基酸浓度变化，与谷氨酸相比，甘氨酸和半胱氨酸含量相对较低，细胞生长阶段（2 h）添加6 mmol/L甘氨酸，10 h时，细胞浓度和GSH产量分别为10.41 g/L和125 mg/L，分别比对照提高了10.1%和34.4%；
- 细胞停止生长后，加入三种混合氨基酸，并通过Central-Composite实验优化得到最佳混合氨基酸浓度配比(谷氨酸 6 mmol/L、甘氨酸 5.5 mmol/L和半胱氨酸 6.5 mmol/L)，GSH总产量达278mg/L；
- 在摇瓶实验条件下，两阶段氨基酸添使细胞干重和GSH产量达到10.41g/L和278 mg/L；将此策略应用于7 L罐上，发酵30 h后，细胞干重和GSH产量分别为12.81 g/L和328 mg/L；进一步应用于7 L罐上细胞高密度培养，最终GSH产量可高达1952 mg/L，胞内GSH含量为1.81%