

# 溶氧及 pH 对产朊假丝酵母分批发酵生产谷胱甘肽的影响

卫功元<sup>1,2</sup> 李 寅<sup>1,2</sup> 堵国成<sup>2</sup> 陈 坚<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, <sup>2</sup> 生物工程学院环境生物技术研究室, 无锡 214036)

**摘 要** 在 7 L 发酵罐中研究了溶氧和 pH 对产朊假丝酵母分批发酵生产谷胱甘肽的影响。结果表明, 当葡萄糖浓度为 30 g/L 且通气量控制在 5 L/min 时, 搅拌转速达到 300 r/min 即可满足细胞生长和谷胱甘肽合成对溶解氧的需求。不同 pH 控制方式对谷胱甘肽分批发酵的影响有较大差异。不控制 pH 时, 细胞干重和谷胱甘肽产量比控制 pH 为 5.5 的发酵分别低 27% 和 95%, 且有 50% 的谷胱甘肽向胞外渗漏。研究了将 pH 控制在 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5 的谷胱甘肽分批发酵过程, 发现在 pH 5.5 时谷胱甘肽总产量最高。用前期研究建立的动力学模型模拟了不同 pH (4.0~6.5) 下的分批发酵过程, 并从动力学角度解释了 pH 对细胞生长和谷胱甘肽合成的影响。

**关键词** 谷胱甘肽, 分批发酵, 产朊假丝酵母, 溶氧, pH

中图分类号 TQ464.7; Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0734-06

谷胱甘肽(Glutathione, GSH)是一种自然界中广泛存在的且同时具有  $\gamma$ -谷氨酰基和巯基的生物活性三肽, 在生物体内有着多种重要的生理功能<sup>[1]</sup>, 特别是对于维持生物体内适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用。临床上<sup>[2]</sup>GSH 可以迅速提高机体免疫力, 在辐射、肿瘤、癌症、氧中毒、衰老和内分泌失调的治疗中效果明显且无副作用; 在食品加工领域<sup>[3]</sup>, GSH 具有增强食品营养价值和强化食品风味等功能; 在体育运动领域<sup>[4]</sup>, GSH 能够提高体内血红蛋白含量并保护红细胞免遭氧化性破坏。此外, GSH 还具有改善性功能和消除疲劳等作用, 近年来还发现 GSH 具有抑制艾滋病病毒的功效。

对于 GSH 的生物法制备, 国内外学者已开展了许多利用动植物细胞<sup>[5]</sup>、细菌<sup>[6]</sup>和酵母<sup>[7-8]</sup>进行生产的研究, 其中酵母由于具有容易培养、生长速度快和 GSH 含量高等优点, 已日渐成为 GSH 工业化生产的首选菌株。在 GSH 工业发酵的研究中, 出发菌株大多采用的是酿酒酵母, 但该菌种胞内 GSH 含量较低, 且在生产过程中不可避免产生大量的乙醇等副产物, 因此近年来研究者的兴趣纷纷投向产朊假丝酵母, 通过合理的筛选方法, 获得生产 GSH 的高产菌株。关于产朊假丝酵母的研究成果主要集中在菌株生产性能的改良和营养条件的优化上<sup>[9]</sup>, 有关环

境条件(温度、pH 和溶氧等)的影响很少报道, 而这恰恰又是关系到 GSH 发酵生产能否成功进行的重要因素之一。作者在前期研究中<sup>[10-11]</sup>, 系统考察了温度对产朊假丝酵母分批发酵生产 GSH 过程的影响, 提出并运用分阶段温度控制策略提高了 GSH 产量。本文在此基础上对溶氧和 pH 的影响进行研究, 首次报道低 pH 下 GSH 会向胞外分泌的现象, 并从发酵动力学的角度出发, 就不同 pH 对发酵过程的影响进行了深入分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

产朊假丝酵母(*Candida utilis*)WSH 02-08, 江南大学环境生物技术研究室保藏。

### 1.2 培养基

斜面、种子及发酵培养基: 见文献[10]。

### 1.3 种子培养

斜面种子活化 4 h 后接入种子培养基中, 30℃ 下培养 20 h, 摇床转速 200 r/min。

### 1.4 发酵罐培养

7 L 全自动控制发酵罐(KFT-7 L, 韩国)中装液量 4 L, 接种量 10%, 温度 30℃, 通气量 5.0 L/min, 培养时间 24 h。pH 通过自动流加 3 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和

3 mol/L NaOH 溶液进行调节。

1.5 细胞干重(DCW)测定

发酵液离心、洗涤后得到的细胞在 60℃ 下烘干后称重。

1.6 葡萄糖测定

3,5-二硝基水杨酸法测定<sup>[12]</sup>。

1.7 胞内谷胱甘肽提取

新鲜酵母经蒸馏水洗涤 3 次后,30℃ 下 40% 乙醇中处理 2 h,离心取上清液作为待测样品。

1.8 谷胱甘肽测定

DTNB-谷胱甘肽还原酶循环法<sup>[13]</sup>。其中谷胱甘肽还原酶、NADPH 和 DTNB 均为 Sigma 公司产品。

1.9 动力学参数计算与分析

采用 Statistica 软件,具体方法参见文献[10]。

2 结果与讨论

2.1 搅拌转速对谷胱甘肽分批发酵的影响

溶氧是好氧微生物生长必需的营养物质之一,更是影响其进行物质生产和能量代谢的关键环境因素之一,在发酵过程中受通气量和搅拌转速以及发酵液性质等诸多因素的限制。通常在空气流量一定的情况下,搅拌转速的变化直接影响氧在发酵液中的传质效率,进而影响正常的细胞生长和代谢产物的形成。对于酵母来说,由于细胞生长受剪切的影响相对较小,因此可以通过变化搅拌转速来研究溶氧对发酵过程的影响。图 1 显示在不同搅拌转速下 *C. utilis* WSH 02-08 分批发酵生产 GSH 过程中溶氧的变化趋势,可见细胞在进入对数生长期(6 h)之后对溶氧的需求明显增加。当搅拌转速低于 250 r/min 时,供氧速率不能满足细胞快速生长的需要,出现了

明显的溶氧下降现象;而当搅拌转速高于 300 r/min 时,供氧速率完全可以满足细胞正常生长代谢对氧的需求,因此溶氧一直保持在较高的水平。

搅拌转速对 GSH 发酵过程的具体影响如表 1 所示。可以看出,溶氧供给的不足会对细胞生长有负面影响:搅拌转速为 200 r/min 时的细胞干重比 300 r/min 时低 20%,GSH 产量也相应降低。但是,由不同搅拌转速导致的不同溶氧水平对胞内 GSH 含量(反映细胞合成 GSH 的能力)并没有显著影响。由此表明,在 *C. utilis* WSH 02-08 发酵生产 GSH 的过程中,只要将溶氧水平控制在不限细胞生长的水平之上(如 50%~60%),就能够获得较高的 GSH 产量。进一步提高搅拌转速,虽然可以提供更为充足的溶氧,但这样一方面增加了动力消耗,另一方面也提高了体系的剪切应力,对细胞生长不利。搅拌转速从 300 r/min 提高到 350 r/min 会导致细胞干重减少 8%。因此,在初始葡萄糖浓度为 30 g/L 的情况下,将搅拌转速恒定在 300 r/min 适于 *C. utilis* WSH 02-08 发酵生产 GSH,此时的溶氧传质状态可以作为对 GSH 发酵生产进行比拟放大的重要依据。

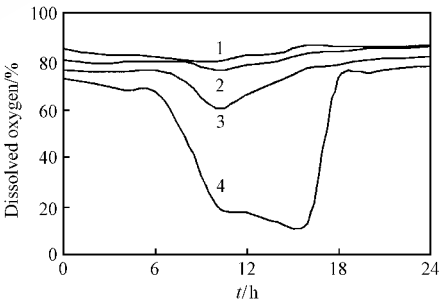


图 1 不同搅拌转速下发酵过程的溶氧变化趋势

Fig.1 Dissolved oxygen concentrations under different agitation rates

1. 350 r/min; 2. 300 r/min; 3. 250 r/min; 4. 200 r/min

表 1 不同搅拌转速下的各发酵过程参数比较

Table 1 Parameters of batch fermentation under different agitation rates

Parameters	Agitation rate/( r/min )			
	200	250	300	350
Initial glucose concentration/( g/L )	28.2	27.4	28.6	27.2
Residual glucose concentration/( g/L )	0.3	0.4	0.3	0.2
Dry cell weight/( g/L )	12.6	14.1	15.2	14.0
Glutathione production/( mg/L )	250	292	312	285
Intracellular glutathione content/ %	2.1	2.2	2.2	2.1
Average specific glucose consumption rate/( h <sup>-1</sup> )	0.34	0.33	0.32	0.32
Average specific growth rate/( h <sup>-1</sup> )	0.17	0.16	0.16	0.20
Average specific glutathione production rate/( mg/g h <sup>-1</sup> )	1.8	2.0	2.2	1.9
Biomass yield on glucose/( g/g )	0.45	0.53	0.54	0.52
Glutathione yield on glucose/( mg/g )	9.0	10.8	11.0	10.6

2.2 pH 对谷胱甘肽分批发酵的影响

2.2.1 不控制 pH 的谷胱甘肽发酵过程 :在研究确定了最适的温度控制<sup>[10-11]</sup>和溶氧条件之后 ,作者着重研究了不同 pH 对 GSH 分批发酵的影响。图 2(A-C)给出了不控制 pH 条件下 ,*C. utilis* WSH 02-08 分批发酵生产 GSH 的过程曲线。可见 随着底物的消耗 ,发酵液 pH 从 5.5 迅速下降 ,至 18 h 葡萄糖利用完毕时 ,pH 降至最低点 1.17 ,之后基本上维持在该水平。发酵液逐渐增强的酸性对细胞生长有一定的抑制作用 ,直至 18 h 时细胞量达最高值 12 g/L。实

验观察到一个有趣的现象 :在发酵前 10 h 内 ,细胞合成的 GSH 基本都分布在胞内 ;但是 10 h 后 (此时 pH 低于 1.5 ) ,GSH 在胞外积累 ,且积累量不断增加 ,至 18 h 达到最大值 86 mg/L(图 2B)。与此同时 ,胞内 GSH 含量很快由 1.27% 下降到 0.46%(图 2C)。细胞停止生长后 ,胞外 GSH 总量相对稳定 ,但胞内 GSH 总量仍在增加 (图 2B) ,表明胞内 GSH 仍在继续合成。在整个发酵过程中 ,GSH 的总量一直增加 ,至发酵结束时总 GSH 产量达到 165 mg/L。

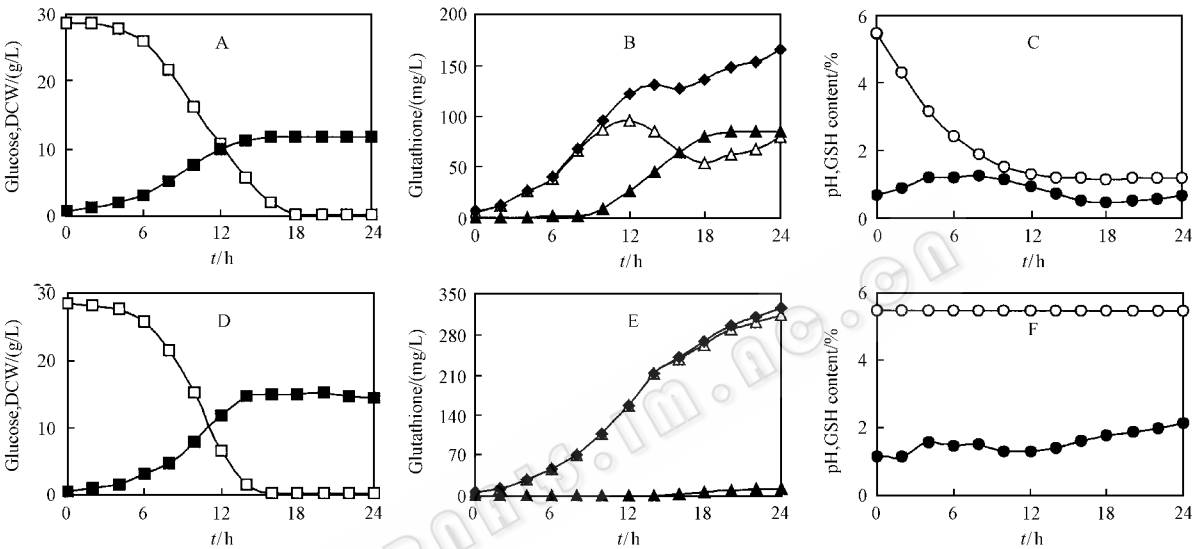


图 2 不同 pH 控制方式下 GSH 发酵过程曲线

Fig.2 Time-course of GSH fermentation under controlled pH

□ Glucose ; ■ DCW ; ◆ Total GSH concentration ; ▲ Extracellular GSH concentration ; △ Intracellular GSH concentration ;  
○ pH ; ● Intracellular GSH content . Panel A-C , no pH control ; Panel D-F , pH 5.5

自然 pH 条件下发酵液 pH 迅速下降 ,一方面是因为氮源硫酸铵为生理酸性盐 ;另一方面 ,葡萄糖被利用后生成了丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乙酸等酸性中间代谢产物 (数据未给出)。当 *C. utilis* WSH 02-08 细胞处于较强的酸性环境 (pH < 1.5) 时 ,胞外出现 GSH 的积累 ,可能是因为细胞在较低 pH 下产生应激机制导致细胞膜渗透性的改变 ,从而使胞内物质发生泄漏。这种泄漏不是由于细胞自溶引起的 ,因为即使在这样的酸性条件下 ,细胞仍然能够继续生长直至营养物质消耗完毕 ;再者 ,细胞停止生长后胞内仍然继续合成 GSH ,而胞外的 GSH 积累量并未增加。对 GSH 泄漏期间细胞形态的显微观察也表明 ,此时的细胞并未发生自溶。

GSH 是胞内产物 ,通常用来维持胞内正常的氧化还原环境<sup>[1]</sup> ,因此很少向胞外分泌。如果 GSH 能够在胞外积累 ,可降低下游分离纯化的难度。向发

酵液中添加丙酮酸<sup>[14]</sup>、表面活性剂<sup>[15]</sup>和抑制  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶活性<sup>[16]</sup>都是非常有效的办法 ,但至今并未见到有关在低 pH 下 GSH 可以向胞外发生泄漏的报道。至于其机理还有待进一步研究。

2.2.2 控制恒定 pH 时的谷胱甘肽发酵过程 :在不控制 pH 的条件下 ,虽然 GSH 可在胞外积累 ,但 GSH 总量较低。为此 ,作者研究了将发酵过程 pH 值控制在不同水平 (pH 4.0 ~ 6.5) 对 GSH 分批发酵的影响 ,其中 pH 5.5 下的 GSH 发酵过程曲线如图 2(D-F) 所示。与不控制 pH 的结果相比 ,细胞干重和 GSH 产量分别高出 27% 和 95%。另外 ,在恒定 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 ,胞外检测不到 GSH 存在 ,只有到细胞生长结束后才有极少量 GSH 积累在胞外。至发酵结束时 ,pH 5.5 下的胞内 GSH 含量更是高出 2 倍以上。

不同 pH 对 *C. utilis* WSH 02-08 发酵生产 GSH 的主要参数 ,包括细胞干重( DCW )、GSH 产量、胞内 GSH 含量、细胞比生长速率(  $\mu$  ) 及 GSH 比合成速率(  $q_p$  ) 及 GSH 生产强度(  $P_{GSH}$  ) 细胞对葡萄糖得率(  $Y_{X/S}$  )和 GSH 对葡萄糖得率(  $Y_{P/S}$  )的影响如图 3 所示。结果表明 ,细胞能够在较宽的 pH 范围内进行生长并合成 GSH ,表现出较强的 pH 适应能力。各过程参数在 pH 5.5 以下时 ,呈现上升趋势 ,而高于 pH 5.5 时又有所下降 ,在 pH 5.5 时各参数( 除了细胞干重 )均达到最大值。值得注意的是 ,当  $pH \geq 5.5$  时 ,胞内 GSH 含量均超过 2.0% ;而当  $pH \leq 5.0$  时 ,胞内 GSH 含量只有 1.8% 左右 ,表明弱酸性环境更有利于 GSH 的合成。

2.2.3 基于动力学模型解析 pH 对谷胱甘肽发酵的影响 :虽然实验结果表明 *C. utilis* WSH 02-08 分批发酵生产 GSH 的最适 pH 为 5.5 ,但作者更希望知道 ,为什么将 pH 控制在 5.5 能够使细胞的各项性能达到最优 ? 要回答这个问题 ,一般的做法是从生理学角度出发进行研究。而本文中则尝试从动力学角度来分析并解释 pH 的影响这一生理学现象。

作者在前期研究中已经建立了 *C. utilis* WSH

02-08 分批发酵生产 GSH 的动力学模型 ,并成功地模拟了温度变化对发酵过程的影响<sup>[10]</sup>。本文采用动力学模型式( 1 )和式( 2 )对不同 pH 条件下的细胞生长和谷胱甘肽生产情况进行模拟。式中 , $X$ 、 $P$ 、 $S$  分别表示细胞、GSH 和底物浓度 , $X_{max}$ 、 $\mu_{max}$  分别表示最大细胞浓度和最大比细胞生长速率 , $K_1$ 、 $\alpha$  和  $\beta$  为常数。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \left( \frac{1}{1 + S/K_1} \right) \tag{1}$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \tag{2}$$

根据实验数据 ,对模型中的各参数进行非线性估计 ,结果如表 2。对于细胞生长来说 , $X_{max}$  体现细胞生长的能力 ,而  $K_1$  则表示底物浓度对细胞生长的抑制程度 , $K_1$  值越高则抑制效应越低。分析不同 pH 下细胞生长动力学参数的估计结果可以发现 ,pH 为 5.5 时 , $X_{max}$  和  $\mu_{max}$  虽然比试验 pH 条件下的最大值分别低 3.0% 和 6.5% ,但  $K_1$  值却显著高于 pH 4.0~5.0 的情况 ,即在 pH 为 5.5 时底物浓度对细胞生长的抑制效应较小 ,由此可以理解为什么  $\mu$  在 pH 为 5.5 时达到最大( 图 3 )。

表 2 谷胱甘肽间歇发酵动力学参数模拟结果

Table 2 Kinetic parameters of glutathione batch fermentation under different pH

pH	Cell growth				GSH production		
	$X_{max}/(g/L)$	$\mu_{max}/(h^{-1})$	$K_1/(g/L)$	$R^2$	$\alpha/(mg/g)$	$\beta/(mg/g)$	$R^2$
4.0	14.07	0.518	17.09	0.998	10.18	0.383	0.901
4.5	14.47	0.519	19.24	0.996	12.04	0.119	0.888
5.0	15.70	0.490	14.97	0.998	11.47	0.106	0.946
5.5	15.22	0.485	31.40	0.998	9.98	0.716	0.975
6.0	14.69	0.474	33.77	0.998	9.99	0.659	0.920
6.5	15.10	0.409	17.73	0.998	7.77	0.772	0.875

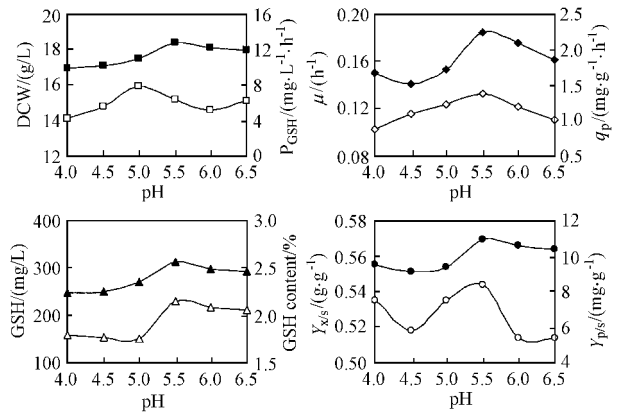


图 3 不同恒定 pH 条件下 GSH 发酵各过程参数比较

Fig.3 Parameters of GSH fermentation under different pH

□ DCW ; ■  $P_{GSH}$  ; ◇  $\mu$  ; ◆  $q_p$  ; △ GSH content ;

▲ GSH concentration ; ○  $Y_{X/S}$  ; ●  $Y_{P/S}$

对于 GSH 的合成 ,由式( 2 )可得 ,

$$q_p = \alpha \mu + \beta \tag{3}$$

式中  $q_p$  为比 GSH 合成速率。pH 对 GSH 合成能力的影响可以从基于式( 3 )的动力学分析中得到合理解释( 以 pH 为 4.5 和 5.5 时的动力学数据为例 )。

根据 pH 为 4.5 和 5.5 时  $\alpha$  和  $\beta$  的模拟结果 ,可以得到  $q_p$  与  $\mu$  之间的线性关系如图 4( A )所示。其中  $\alpha$  为直线斜率 ,表示在  $\mu$  相同的条件下 ,细胞合成 GSH 能力的强弱 ; $\beta$  为截距 ,反映生长停止后(  $\mu = 0$  )细胞继续合成 GSH 能力的高低。pH 为 5.5 时的  $\alpha$  值小于 pH 为 4.5 时的  $\alpha$  值( 表 2 和图 4A ) ,表明 pH 为 5.5 时的  $q_p$  对  $\mu$  变化的敏感程度较低 ,即

$\mu$  的降低所导致  $q_p$  降低的幅度要小于 pH 为 4.5 时的情况。由此表明  $\alpha$  值越低,越有利于细胞在生长过程中保持合成 GSH 的能力。

分析表 2 中与 GSH 合成有关的动力学数据,可以发现 pH $\geq 5.5$  时的  $\alpha$  值均低于 pH $\leq 5.0$  时的  $\alpha$  值,而 pH $\geq 5.5$  时的  $\beta$  值则均高于 pH $\leq 5.0$  时的  $\beta$  值。基于以上动力学分析,我们可以理解为什么 pH $\geq 5.5$  时的胞内 GSH 含量普遍高于 pH $\leq 5.0$  时的情况。pH 为 5.5 时 GSH 总量达到最大,从动力学角度分析,是因为在这一 pH 下兼具了  $K_1$  值高(底物对细胞生长的抑制效应小)、 $\alpha$  值低和  $\beta$  值高(细胞生长过程中和生长结束后均可保持较高的比 GSH 合成速率)的特点。

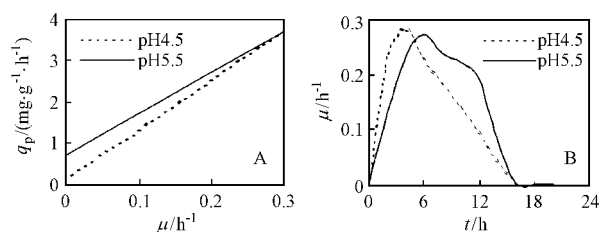


图 4 不同 pH 条件下 GSH 合成能力及细胞生长比较

Fig.4 GSH production and cell growth under different pH

### 3 结 论

在 7 L 搅拌式发酵罐中进行 *C. utilis* WSH 02-08 分批培养生产 GSH 时,葡萄糖浓度为 30 g/L 时,恒定通气量 5 L/min 的情况下,将搅拌转速稳定在 300 r/min 即可满足 GSH 发酵对氧的需求。不同 pH 控制方式对 GSH 分批发酵的影响有较大差异,在不控制 pH 条件下,细胞生长受到部分抑制,GSH 产量下降明显且出现在生长阶段 GSH 向胞外渗漏的现象。在 pH 4.0~6.5 范围内,通过对分批发酵过程参数进行比较,发现 pH 5.5 对细胞生长和 GSH 合成都是最佳的。在分批发酵动力学的基础上,通过对动力学参数进行分析,解释了细胞生长和 GSH 合成的最适 pH 都为 5.5。

### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Meister A , Anderson M E . Glutathione . *Ann Rev Biochem* , 1983 , 52 : 711 - 760

[ 2 ] Meister A . Antioxidant functions of glutathione . *Life Chem Rep* , 1994 , 12 ( 1 ) : 23 - 27

[ 3 ] YUAN E D ( 袁尔东 ) , ZHENG J X ( 郑建仙 ) . Improvement of study on the functional food material : glutathione . *Food and Fermentation Industry* ( 食品与发酵工业 ) , 1999 , 25 ( 5 ) : 52 - 56

[ 4 ] LIU Z Y ( 刘振玉 ) . Study and application of glutathione . *Life Chemistry* ( 生命的化学 ) , 1995 , 15 ( 1 ) : 19 - 21

[ 5 ] Sawa Y , Shindo H , Nishimura S *et al* . Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells . *Agric Biol Chem* , 1986 , 50 ( 5 ) : 1361 - 1363

[ 6 ] Li Y , Chen J , Mao Y Y *et al* . Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli* . *Process Biochem* , 1998 , 33 ( 7 ) : 709 - 714

[ 7 ] Alfara C G , Miura K , Shimizu H *et al* . Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1992 , 37 : 141 - 146

[ 8 ] LI Y ( 李寅 ) , CHEN J ( 陈坚 ) , ZHOU N D ( 周楠迪 ) *et al* . The effect of environmental conditions and glucose feeding strategy on glutathione production . *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) , 1998 , 14 ( 2 ) : 147 - 152

[ 9 ] WU J R ( 吴坚平 ) , LIN J R ( 林建平 ) , CEN P L ( 岑沛霖 ) . The effects of culture conditions on production of glutathione by *Candida utilis* . *Chemical Reaction Engineering and Technology* ( 化学反应工程与工艺 ) , 2001 , 17 ( 1 ) : 89 - 93

[ 10 ] WEI G Y ( 卫功元 ) , LI Y ( 李寅 ) , DU G C ( 堵国成 ) *et al* . Kinetic models for the effect of temperature on batch glutathione fermentation by *Candida utilis* . *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) , 2003 , 19 ( 3 ) : 358 - 363

[ 11 ] Wei G Y , Li Y , Du G C *et al* . Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis* . *Biotechnol Letters* , 2003 , 25 ( 11 ) : 887 - 890

[ 12 ] Miller G L . Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars . *Anal Chem* , 1959 , 31 : 426 - 428

[ 13 ] Tietze F . Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione : application to mammalian blood and other tissues . *Anal Biochem* , 1969 , 27 : 502 - 522

[ 14 ] Murata K , Tani K , Kato J *et al* . Excretion of glutathione by methylglyoxal-resistant *Escherichia coli* . *J Gen Microbiol* , 1980 , 120 : 545 - 547

[ 15 ] Takesue H , Fujii K , Miura Y . Glutathione . JP 54086691 , 1979

[ 16 ] Nakayama R , Kumagai H , Tochikura T . Leakage of glutathione from bacterial cells caused by inhibition of  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase . *Appl Environ Microbiol* , 1984 , 47 ( 4 ) : 653 - 657

## Effects of Dissolved Oxygen and pH on *Candida utilis* Batch Fermentation of Glutathione

WEI Gong-Yuan<sup>1 2</sup> LI Yin<sup>1 2</sup> DU Guo-Cheng<sup>2</sup> CHEN Jian<sup>1 2\*</sup>

<sup>1</sup>( Key Lab of Industrial Biotechnology , Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China )

<sup>2</sup>( Environmental Biotechnology Laboratory , School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China )

**Abstract** The effects of dissolved oxygen( DO ) and pH on glutathione batch fermentation by *Candida utilis* WSH-02-08 in a 7 liters stirred fermentor were investigated. It was shown that DO concentration is an important factor in glutathione production. With the initial glucose concentration of 30 g/L and a 5 L/min air flow rate , and the agitation rate less than 250 r/min , the DO concentration was not sufficient to satisfy the oxygen requirement during the fermentation. With an agitation rate of more than 300 r/min , the cell growth and glutathione production were enhanced significantly , with the dry cell mass and glutathione production were 20% and 25% higher than that at 200 r/min. When *C. utilis* WSH 02-08 was cultivated in a batch process without pH control , cell growth and glutathione production were inhibited , likely due to a dramatic decrease in the pH. Intracellular glutathione leakages were observed when the pH was 1.5 or less. To assess the effect of pH on glutathione production , six batch processes controlled at pH 4.0 , 4.5 , 5.0 , 5.5 , 6.0 and 6.5 were conducted. The yield was highest at pH 5.5 , when the dry cell mass and yield were 27% and 95% respectively higher than fermentation without pH control. The maximal intracellular glutathione content ( 2.15% ) was also achieved at the pH. To improve our understandings on the effect of pH on the batch glutathione production , a modified Logistic equation and Luedeking-Piret equation were used to simulate cell growth and glutathione production , respectively , under different pH. Based on the parameters obtained by the nonlinear estimation , kinetic analysis was performed to elucidate the effect of pH on the batch glutathione production. The process controlled at pH 5.5 was proven to be the best due to the higher value of  $K_i$  ( substrate inhibitory constant in the Logistic equation ) , lower value of  $\alpha$  and higher value of  $\beta$  ( slope and intercept in the Luedeking-Piret equation , respectively ).

**Key words** glutathione , batch fermentation , *Candida utilis* , dissolved oxygen , pH

Received : 05-30-2003

This project was financially supported by the High-Technology Industrial Development Program for Universities of Jiangsu Province ( No. JH02-101 ) and the Teaching and Research Award Program for Outstanding Young Professors in High Education Institute , MOE , P. R. China ( TRAPOYP ).

\* Corresponding author. Tel : 86-510-5868439 ; Fax : 86-510-5888301 ; E-mail : [weigongyuan@yzu.edu.cn](mailto:weigongyuan@yzu.edu.cn) ; <http://journals.im.ac.cn>