

研究论文

不同溶氧控制方式下的谷胱甘肽 分批发酵过程分析

卫功元¹, 王大慧¹, 陈 坚²

(¹ 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215123; ² 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 分析了产脲假丝酵母生产谷胱甘肽 (GSH) 的摇瓶发酵过程, 发现溶氧浓度的大小成为影响细胞生长和 GSH 产量的重要因素。在此基础上, 研究了恒溶氧和恒转速条件下的 GSH 分批发酵过程, 与恒转速发酵相比, 恒溶氧控制发酵可以明显提高细胞干重和 GSH 产量, 当恒溶氧浓度为 35% 时, 二者的提高幅度最多可分别达到 22% 和 30%。最后分别采用发酵动力学模型和代谢网络中各代谢物通量的分布情况对该结果产生的原因进行了定量解释。

关键词: 谷胱甘肽; 分批发酵; 溶解氧; 动力学; 代谢通量分析

中图分类号: TQ 464.7; Q 939.97

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 09-2329-07

Analysis of batch fermentation process of glutathione under different control modes of dissolved oxygen

WEI Gongyuan¹, WANG Dahui¹, CHEN Jian²

(¹ School of Life Science, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; ² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu, China)

Abstract: The fermentation process of glutathione production in flasks by *Candida utilis* WSH 02-08 under different agitation rates and diverse media volumes were studied. It was concluded that dissolved oxygen (DO) was one of the most important factors in the cultivation of the strain by influencing cell growth and glutathione production. Based on this result, batch fermentation of glutathione under constant agitation rate of 300 r · min⁻¹ and constant DO concentrations of 20%, 35%, 50%, 65% and 80% were investigated. Dry cell weight (DCW) and glutathione production both increased evidently under constant DO concentrations rather than those obtained under constant agitation rate of 300 r · min⁻¹. As a result, DCW and glutathione production increased under constant DO concentration of 35% by 22% and 30%, respectively. Then the reason for the increase of DCW and glutathione production was quantitatively described in detail by the comparison of parameters obtained from fermentation kinetic models, together with the distribution of flux for metabolites in metabolic network of glutathione production by *Candida utilis* WSH 02-08.

Key words: glutathione; batch fermentation; dissolved oxygen; kinetics; metabolic flux analysis

2006-09-29 收到初稿, 2007-02-13 收到修改稿。

联系人: 陈坚。第一作者: 卫功元 (1975—), 男, 博士, 副教授。

基金项目: 工业生物技术教育部重点实验室开放课题基金 (KLIB0405); 苏州大学青年教师研究基金。

Received date: 2006-09-29.

Corresponding author: Prof. CHEN Jian. E-mail: jchen@sytu.edu.cn

Foundation item: supported by the Open Project Program of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, China (KLIB0405) and the Grant from Soochow University for Outstanding Young Teachers.

引 言

微生物发酵过程优化的主要目标在于通过一系列调控措施实现生产菌株和/或产物的高产量、高产率和高生产效率^[1]。在此过程中,需要对影响发酵过程的各种因素进行系统分析,包括外因(基于微生物反应原理的培养环境优化技术)、内因(基于代谢特性的分阶段培养技术)、外因定量化(基于动力学模型分析的优化和控制技术)和内因定量化(基于代谢通量分析的过程优化技术)等,其中动力学模型和代谢通量分析还可以在优化的基础上对发酵过程进行预测和验证^[2]。

谷胱甘肽(还原型为 GSH)是一种广泛存在于生物体内的小分子巯基化合物,在活细胞中具有多种重要的生理功能,特别是对于维持体内适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用^[3]。由于其特定的化学组成和还原性,GSH 在临床医药、食品、化妆品以及有关生物研究领域用途广泛,对其需求量正不断增加^[4]。酵母发酵法是目前 GSH 商业化生产比较有效和经济的方法,同时也是研究的热点,国内外对此均有相关报道^[5-8]。

溶解氧(DO)对于好氧发酵来说,通常既是营养因素,又是环境因素。特别是对于具有一定氧化还原性质的代谢产品的生产来说,DO 的改变势必会影响到出发菌株培养体系的氧化还原电位,同时也会对细胞生长和产物形成产生影响。然而到目前为止,除了作者前期的部分研究结果^[9]之外,DO 特别是恒 DO 条件如何对 GSH 发酵过程产生影响却鲜有报道。本文研究不同 DO 控制条件下的 GSH 分批发酵过程,同时采用发酵动力学模型和代谢网络中各代谢物通量的分布定量解释为何存在最佳的恒 DO 环境。

1 材料与方法

1.1 菌种

C. utilis WSH 02-08,江南大学环境生物技术研究室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基、种子培养基和发酵培养基参见文献 [10]。

1.3 培养条件和方法

种子培养:斜面种子活化 4 h 后接入种子培养基中培养 20 h,摇床转速 200 r·min⁻¹,温

度 30℃。

摇瓶发酵:500 ml 三角瓶中装有 50 ml 发酵培养基,按照 10% (体积) 的接种量接入种子,培养温度 30℃,摇床转速 200 r·min⁻¹,培养时间 30 h。

发酵罐培养:全自动发酵罐 BIOTECH-5BGZ (上海保兴生物工程设备有限公司) 中装液量 4 L,接种量 10% (体积),通气量 5.0 L·min⁻¹,温度 30℃,pH 值采用 pH 电极在线测量,通过流加 3 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 和 3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液自动调节在 5.5 左右,搅拌转速通过人工实时控制以维持一定的恒溶氧浓度,初始转速 300 r·min⁻¹,调节幅度 10 r·min⁻¹。

1.4 分析方法

胞内 GSH 的提取、葡萄糖、细胞干重(DCW)以及 GSH 浓度的测定参见文献 [9]。

1.5 动力学参数估算

细胞比生长速率(μ)、底物比消耗速率(q_s)和产物比形成速率(q_p)的估算方法参见文献 [10]。

1.6 代谢通量计算

GSH 代谢网络及代谢通量分析方法参见文献 [11]。

2 结果与讨论

2.1 溶氧浓度对细胞生长和 GSH 合成的影响

为了系统地了解 DO 与 GSH 发酵过程之间的关系,首先在摇瓶条件下考察不同装液量和不同摇床转速对 *C. utilis* WSH 02-08 细胞生长和 GSH 合成的影响,结果如图 1 所示。可以看出,一方面随着装液量的增加,单位细胞的摄氧量减少,DO 供给不足导致细胞生长受到抑制,GSH 合成量降低,其中装液量 150 ml 时的 DCW 和 GSH 产量分别只有 35 ml 时的 53% 和 60%;另一方面,随着摇床转速的增加,氧在培养液中的传质速率提高,对细胞生长和 GSH 合成均明显有利,其中 250 r·min⁻¹ 时的 DCW 和 GSH 产量比 100 r·min⁻¹ 时的分别提高 86% 和 127%。因此,在 GSH 的发酵生产过程中,DO 的大小已经成为影响细胞生长和 GSH 产量的重要因素。

2.2 不同溶氧控制方式下的 GSH 分批发酵过程

在 *C. utilis* WSH 02-08 细胞培养过程中,可以通过控制恒定的搅拌转速以满足细胞生长和产物

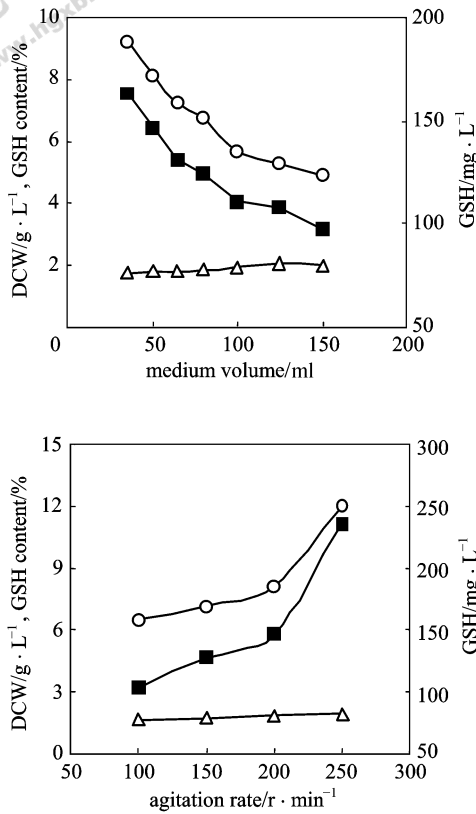


图 1 装液量和摇床转速对细胞生长和 GSH 合成的影响

Fig. 1 Effect of different medium volumes and agitation rates on cell growth and GSH production

○ DCW; ■ GSH; △ intracellular GSH content

合成对氧的需求^[9]。然而，在细胞培养的不同阶段，由于代谢对氧的需求量不同，恒定转速容易造成 DO 的不足或过剩，这样将发生厌氧代谢或氧中毒^[12]，对正常的发酵过程十分不利，因此，有必要研究恒 DO 条件对整个发酵过程的影响。以下考察不同恒 DO 浓度（20%、35%、50%、65% 和 80%）以及恒定转速（300 r · min⁻¹）条件下的 GSH 分批发酵生产情况，结果如图 2。

由图 2 可知，当 DO 浓度恒定控制在 35% 和 50% 时，比较有利于细胞生长和 GSH 合成，此时糖耗速率较快，DCW 和 GSH 产量也有明显提高。不同 DO 控制方式下的 GSH 发酵过程参数列于表 1。与对照相比，控制恒定的 DO 浓度可以明显提高 DCW 和 GSH 产量。其中，当恒 DO 浓度为 35% 时，二者提高幅度最多，可分别达到 22% 和 30%。与此同时，细胞平均比生长速率、GSH 平均比合成速率、细胞和 GSH 对葡萄糖的得率以及细胞和 GSH 的生产效率也有一定幅度的提高。然

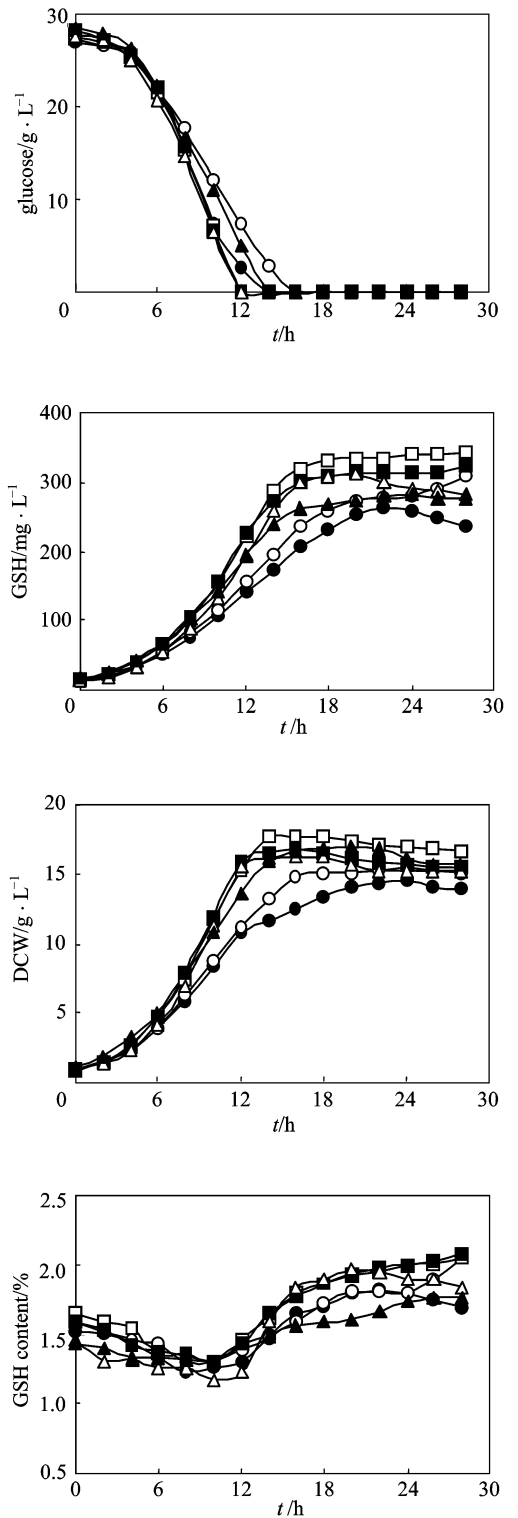


图 2 不同溶氧控制方式下的 GSH 分批发酵过程
Fig. 2 Time-course of GSH fermentation process under diverse DO control modes

● constant agitation rate of 300 r · min⁻¹; ○ constant DO of 20%; □ constant DO of 35%; ■ constant DO of 50%; △ constant DO of 65%; ▲ constant DO of 80%

表 1 不同溶氧控制方式下 GSH 分批发酵过程参数比较

Table 1 Comparison of parameters with batch GSH production under different DO control modes

| Parameters | Constant DO concentration | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Control ^① | 20% | 35% | 50% | 65% | 80% |
| initial glucose concentration/g · L ⁻¹ | 27.1 | 27.2 | 27.4 | 28.3 | 27.6 | 28.6 |
| maximum DCW/g · L ⁻¹ | 14.52 | 15.52 | 17.72 | 16.8 | 16.28 | 16.96 |
| maximum GSH production/mg · L ⁻¹ | 262.2 | 308.9 | 341.7 | 321.9 | 309.6 | 280.6 |
| maximum intracellular GSH content/% | 1.82 | 2.05 | 2.05 | 2.08 | 1.97 | 1.76 |
| glucose consumption rate/g · L ⁻¹ · h ⁻¹ | 1.93 | 1.70 | 2.29 | 2.36 | 2.30 | 2.04 |
| average specific glucose consumption rate/h ⁻¹ | 0.370 | 0.313 | 0.388 | 0.416 | 0.434 | 0.314 |
| average specific growth rate/h ⁻¹ | 0.110 | 0.114 | 0.181 | 0.175 | 0.169 | 0.132 |
| average specific GSH production rate/mg · g ⁻¹ · h ⁻¹ | 1.67 | 1.56 | 1.89 | 1.67 | 1.74 | 1.60 |
| biomass yield on glucose/g · g ⁻¹ | 0.54 | 0.57 | 0.65 | 0.59 | 0.59 | 0.59 |
| GSH yield on glucose/mg · g ⁻¹ | 9.69 | 11.36 | 12.46 | 11.37 | 11.23 | 9.82 |
| biomass productivity/g · L ⁻¹ · h ⁻¹ | 0.61 | 0.65 | 1.11 | 1.05 | 1.02 | 0.85 |
| GSH productivity/mg · L ⁻¹ · h ⁻¹ | 11.92 | 11.03 | 12.20 | 11.50 | 11.91 | 11.69 |

① The control is representative of GSH fermentation under constant agitation rate of 300 r · min⁻¹.

而，当恒定 DO 浓度过低或过高时，各发酵过程参数均较低，只有将 DO 浓度恒定控制在 35% 时，各项发酵指标均较为理想。那么为什么会出现如此结果？以下将分别从 GSH 分批发酵动力学和代谢通量分析的角度进行定量解释。

2.3 不同溶氧控制方式下的 GSH 分批发酵动力学

分批发酵过程定量描述除了可以通过简单的质量守恒定律之外，还可以通过对发酵过程中基质消耗、细胞生长和产物合成等动力学进行数学模拟和验证^[13]。大多数发酵动力学参数都能反映细胞在这三方面能力（分别以 q_s 、 μ 和 q_p 表示）的大小，据此可以对发酵过程中出现的现象和结果进行定量分析。

分别从葡萄糖消耗和细胞生长两个方面将整个发酵过程分成两个阶段，考察在不同 DO 控制方式下特别是恒 DO 情况下，葡萄糖消耗前后的细胞生长能力和 GSH 合成能力、细胞生长前后的 GSH 合成能力，结果如表 2。通过对不同培养阶段下的

细胞平均比生长速率和 GSH 平均比合成速率进行比较可以发现，当 DO 恒定控制在 35% 时，细胞在各阶段所表现出来的生长能力和 GSH 合成能力均高于其他 DO 控制方式。因此，最终可以获得较高的 DCW 和 GSH 产量（表 1）。

由产物合成动力学可知， q_p 和 μ 之间存在如下关系： $q_p = \alpha\mu + \beta$ ，其中 α 表示在细胞生长能力一定的情况下产物合成能力的大小，而 β 则表示在细胞停止生长时（如稳定期）产物合成能力的大小^[14]。根据各 DO 控制方式下的实验结果，对上式中的 α 和 β 参数进行非线性估计，结果如表 3。可以看出，DO 恒定控制在 35% 时具有较高的 α 和 β 值。进一步对其中较典型的三组（DO 分别恒定控制在 20%、35% 和 65%）动力学结果进行分析（如图 3），结果发现由于各发酵过程中的实际最大 μ 均不高于 0.3 h⁻¹，因此在该 μ 范围内，DO 为 35% 时细胞可以获得较高的 GSH 合成能力（ q_p ），由此可以解释为什么 DO 在 35% 时的 GSH 产量最高。

表 2 不同培养时期下的 GSH 分批发酵动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of GSH production within different culture phases

| Constant DO concentration | Average specific growth rate/h ⁻¹ | | Average specific GSH production rate/mg · g ⁻¹ · h ⁻¹ | | | |
|---------------------------|----------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|
| | During glucose consumption | After glucose consumption | During glucose consumption | After glucose consumption | During cell growth | After cell growth |
| control ^① | 0.173 | 0.025 | 2.37 | 0.82 | 1.82 | 0.17 |
| 20% | 0.169 | 0.016 | 2.43 | 0.54 | 1.74 | 0.21 |
| 35% | 0.229 | 0.068 | 3.19 | 0.85 | 2.76 | 0.30 |
| 50% | 0.229 | 0.057 | 3.13 | 0.68 | 2.62 | 0.25 |
| 65% | 0.221 | 0.059 | 2.63 | 0.67 | 2.39 | 0.15 |
| 80% | 0.184 | 0.028 | 2.56 | 0.45 | 1.90 | 0.12 |

① The control is representative of GSH fermentation under constant agitation rate of 300 r · min⁻¹.

表 3 不同溶氧浓度下 GSH 合成动力学参数的估计结果

Table 3 Kinetic parameters of GSH production estimated under different DO concentrations

| Constant DO concentration | α /mg · g ⁻¹ | β /mg · g ⁻¹ · h ⁻¹ | R ² value |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|
| control ^① | 10.28 | 0.54 | 0.935 |
| 20% | 11.53 | 0.42 | 0.969 |
| 35% | 9.56 | 1.14 | 0.945 |
| 50% | 8.92 | 0.94 | 0.977 |
| 65% | 6.30 | 1.33 | 0.967 |
| 80% | 11.69 | 0.35 | 0.981 |

① The control is representative of GSH fermentation under constant agitation rate of 300 r · min⁻¹.

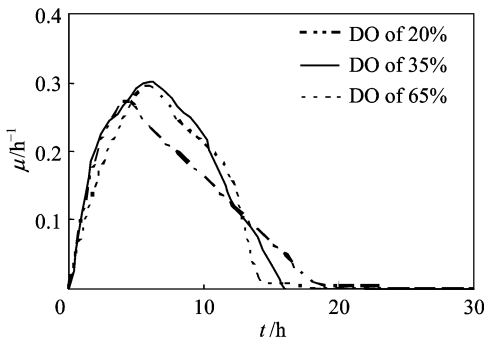
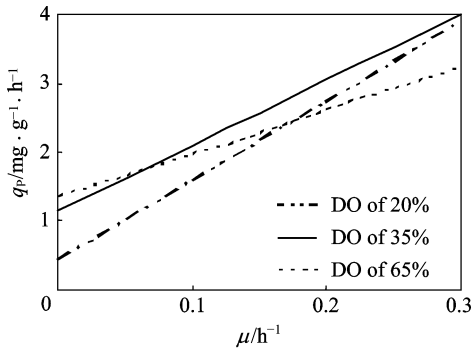


图 3 不同恒溶氧条件下 GSH 合成和细胞生长能力比较

Fig. 3 Comparison of ability of GSH production and cell growth under different constant DO

2.4 不同溶氧控制方式下的 GSH 分批发酵代谢通量分析

为了描述 GSH 合成过程中各代谢物通量的分布情况，也将 GSH 分批发酵过程分为两个阶段，第一阶段（前 10 h）主要为细胞的生长阶段，第二阶段（10 h 后）主要为 GSH 的生物合成阶段。表 4 是在不同的 DO 控制方式下，GSH 生物合成代谢网络中各主要结点处代谢物的通量分布，可以看出，当 DO 恒定控制在 35% 时， r_{17} 值明显高于其他 DO 时的值，说明有更多的代谢通量进入 HMP 途径，并因此产生更多的 NADPH，为 GSH 的生物合成提供了必要的还原性环境；与此同时， r_2 和 r_3 的通量较小，因此进入 TCA 循环的 C 通量 (r_{10}) 减少，最终通过 TCA 循环产生的 ATP 量降低，用于细胞维持的 ATP 消耗 (r_{60}) 随之降低；从 r_{24} 和 r_{35} 的大小可以发现，在 DO 为 35% 时，细胞在代谢过程中有更多的 C 通量流向 GSH 生物合成的前体物质（包括 L-Glu、L-Cys、L-Gly 等），最终可以合成更多的 GSH (r_{63})；另一方面，对流向细胞合成物质的 C 通量进行比较，发现 r_4 、 r_{27} 、 r_{31} 、 r_{40} 、 r_{55} 、 r_{56} 、 r_{57} 等 C 通量在 35% DO 时均较高，由此不难理解为何在此 DO 条件下可以获得更多的 DCW (r_{61})。

3 结 论

溶氧是微生物好氧发酵的重要营养和环境因素，在发酵过程中，可以通过控制搅拌转速和通气量进行控制。恒 DO 发酵是常用的好氧发酵工艺，具有易于控制、操作简便等特点，同时也比较符合微生物对氧的需求规律。在本文中，与恒转速发酵相比，恒 DO 控制发酵可以明显提高 DCW 和 GSH 产量，当恒 DO 为 35% 时，二者的提高幅度最多可分别达到 22% 和 30%。最后，分别通过分批发

表 4 不同溶氧控制方式下主要代谢物的代谢通量分布

Table 4 Metabolic flux distribution for typical metabolites under different DO control modes

| Metabolite | Vectors | Metabolic flux | | | | | | | | | | | |
|------------|----------|----------------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | A-I | B-I | A-II | B-II | A-III | B-III | A-IV | B-IV | A-V | B-V | A-VI | B-VI |
| G6P | r_1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | r_{17} | 19.6 | 20.5 | 25.0 | 36.1 | 53.3 | 46.1 | 34.9 | 39.8 | 30.2 | 44.3 | 32.5 | 36.7 |
| | r_{55} | 4.3 | 4.3 | 4.5 | 4.8 | 5.4 | 5.0 | 4.8 | 4.8 | 4.6 | 5.0 | 4.7 | 4.8 |
| | r_2 | 76.1 | 75.2 | 70.5 | 59.1 | 41.3 | 48.9 | 60.3 | 55.4 | 65.2 | 50.7 | 62.8 | 58.5 |

Table 4 (continued)

| Metabolite | Vectors | Metabolic flux | | | | | | | | | | | |
|------------|----------|----------------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | A-I | B-I | A-II | B-II | A-III | B-III | A-IV | B-IV | A-V | B-V | A-VI | B-VI |
| GA3P | r_3 | 81.5 | 81.3 | 79.1 | 74.5 | 66.8 | 70.3 | 74.8 | 73.0 | 76.9 | 71.1 | 75.9 | 74.1 |
| | r_{21} | 2.0 | 2.4 | 4.1 | 8.5 | 15.0 | 12.4 | 7.9 | 10.0 | 6.1 | 11.7 | 7.0 | 8.6 |
| | r_4 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.1 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.0 | 1.1 |
| | r_5 | 80.6 | 80.5 | 78.9 | 75.6 | 69.9 | 72.6 | 75.7 | 74.7 | 77.2 | 73.2 | 76.5 | 75.3 |
| PG | r_5 | 80.6 | 80.5 | 78.9 | 75.6 | 69.9 | 72.6 | 75.7 | 74.7 | 77.2 | 73.2 | 76.5 | 75.3 |
| | r_{24} | 5.3 | 5.5 | 5.6 | 6.2 | 6.6 | 6.7 | 5.9 | 6.5 | 5.7 | 6.6 | 5.8 | 6.1 |
| | r_6 | 75.3 | 75.0 | 73.3 | 69.4 | 63.3 | 65.9 | 69.8 | 68.2 | 71.5 | 66.6 | 70.7 | 69.2 |
| PEP | r_6 | 75.3 | 75.0 | 73.3 | 69.4 | 63.3 | 65.9 | 69.8 | 68.2 | 71.5 | 66.6 | 70.7 | 69.2 |
| | r_{27} | 3.0 | 3.0 | 3.1 | 3.3 | 3.7 | 3.4 | 3.3 | 3.3 | 3.2 | 3.4 | 3.3 | 3.3 |
| | r_7 | 72.3 | 72.0 | 70.2 | 66.1 | 59.6 | 62.5 | 66.5 | 64.9 | 68.3 | 63.2 | 67.4 | 65.9 |
| PYR | r_7 | 72.3 | 72.0 | 70.2 | 66.1 | 59.6 | 62.5 | 66.5 | 64.9 | 68.3 | 63.2 | 67.4 | 65.9 |
| | r_9 | 22.0 | 22.1 | 22.8 | 24.4 | 27.0 | 25.8 | 24.3 | 24.9 | 23.6 | 25.6 | 23.9 | 24.5 |
| | r_{31} | 4.2 | 4.2 | 4.3 | 4.6 | 5.2 | 4.9 | 4.6 | 4.7 | 4.5 | 4.8 | 4.6 | 4.7 |
| | r_{32} | 1.8 | 1.8 | 1.9 | 2.0 | 2.2 | 2.1 | 2.0 | 2.0 | 1.9 | 2.1 | 2.0 | 2.0 |
| | r_8 | 53.5 | 53.1 | 50.7 | 45.2 | 36.5 | 40.3 | 45.7 | 43.5 | 48.1 | 41.2 | 47.0 | 44.9 |
| AcCoA | r_8 | 53.5 | 53.1 | 50.7 | 45.2 | 36.5 | 40.3 | 45.7 | 43.5 | 48.1 | 41.2 | 47.0 | 44.9 |
| | r_{10} | 86.2 | 85.3 | 79.9 | 67.3 | 47.4 | 56.0 | 68.5 | 63.2 | 74.0 | 58.0 | 71.4 | 66.6 |
| | r_{56} | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| | r_{57} | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| KG | r_{11} | 85.4 | 84.5 | 79.1 | 66.4 | 46.5 | 55.0 | 67.7 | 62.3 | 73.1 | 57.1 | 70.5 | 65.7 |
| | r_{12} | 60.9 | 59.9 | 55.3 | 43.6 | 26.1 | 33.2 | 45.1 | 39.7 | 50.0 | 35.1 | 47.6 | 43.1 |
| | r_{35} | 40.8 | 41.2 | 42.3 | 45.6 | 50.2 | 48.4 | 45.1 | 46.7 | 43.8 | 47.9 | 44.4 | 45.7 |
| OAA | r_9 | 22.0 | 22.1 | 22.8 | 24.4 | 27.0 | 25.8 | 24.3 | 24.9 | 23.6 | 25.6 | 23.9 | 24.5 |
| | r_{16} | 47.4 | 46.5 | 42.8 | 33.4 | 19.2 | 24.9 | 34.5 | 30.2 | 38.5 | 26.5 | 36.6 | 33.0 |
| | r_{10} | 86.2 | 85.3 | 79.9 | 67.3 | 47.4 | 56.0 | 68.5 | 63.2 | 74.0 | 58.0 | 71.4 | 66.6 |
| | r_{40} | 25.0 | 24.6 | 25.9 | 27.1 | 30.7 | 28.2 | 27.7 | 27.1 | 26.8 | 27.9 | 27.1 | 27.5 |
| GSH | r_{25} | 1.6 | 1.4 | 1.6 | 1.5 | 2.0 | 1.5 | 1.8 | 1.4 | 1.7 | 1.4 | 1.7 | 1.6 |
| | r_{26} | 3.3 | 3.4 | 3.4 | 3.7 | 4.0 | 4.0 | 3.6 | 3.9 | 3.5 | 4.0 | 3.6 | 3.7 |
| | r_{62} | 0.6 | 1.3 | 0.7 | 1.6 | 0.7 | 2.3 | 0.6 | 2.4 | 0.6 | 2.3 | 0.7 | 1.2 |
| | r_{63} | 0.6 | 1.3 | 0.7 | 1.6 | 0.7 | 2.3 | 0.6 | 2.4 | 0.6 | 2.3 | 0.7 | 1.2 |
| BIOM | r_{61} | 58.7 | 58.3 | 61.0 | 64.9 | 73.4 | 69.0 | 65.4 | 66.1 | 63.4 | 68.0 | 64.3 | 65.6 |
| ATP | r_{58} | 69.2 | 68.8 | 65.5 | 58.1 | 46.0 | 51.4 | 58.6 | 55.8 | 61.9 | 52.7 | 60.3 | 57.6 |
| | r_{59} | 11.8 | 11.6 | 10.6 | 8.3 | 4.7 | 6.2 | 8.6 | 7.5 | 9.6 | 6.6 | 9.1 | 8.2 |
| | r_{60} | 44.3 | 43.5 | 35.0 | 16.8 | 13.7 | 0.2 | 17.9 | 11.1 | 26.0 | 3.4 | 22.2 | 15.4 |

Note: A—culture phase before 10 h; B—culture phase after 10 h; I—constant agitation rate of 300 r · min⁻¹; II—constant DO of 20%; III—constant DO of 35%; IV—constant DO of 50%; V—constant DO of 65%; VI—constant DO of 80%.

酵动力学和代谢通量分析模型及参数对产生此种现象的原因进行了定量解释。然而，当恒 DO 较高时（如 80%）却导致细胞生长和 GSH 合成能力的下降，其原因还有待于进一步的研究。

References

[1] Chen Jian (陈坚), Li Yin (李寅). Principles and Practice for Fermentation Process Optimization (发酵过程优化原理与实践). Beijing: Chemical Industry Press, 2002

[2] Chen Jian (陈坚), Du Guocheng (堵国成), Wei Gongyuan (卫功元), Hua Zhaozhe (华兆哲). Important Microbial Products: Fermentative Production and Process Analysis (微生物重要代谢产物——发酵生产与过程解

析). Beijing: Chemical Industry Press, 2005

[3] Penninckx M J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.*, 2002, **2**: 295

[4] Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol. Med.*, 1999, **27**: 916

[5] Sakato K, Tanaka H. Advanced control of glutathione fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, 1992, **40** (8): 904

[6] Liu C H, Hwang C, Liao C C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.*, 1999, **34**: 17

[7] Liu Juan (刘娟), He Xiuping (何秀萍), Wang Yaqin (王雅琴), Liu Chunxiu (刘春秀), Kong Yingjun (孔英俊), Zhang Borun (张博润). The breeding of high

- glutathione-producing strain and optimization of culture condition. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2003, **43** (1): 99
- [8] Wen S H, Zhang T, Tan T W. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial. Technol.*, 2004, **35**: 501
- [9] Wei Gongyuan (卫功元), Li Yin (李寅), Du Guocheng (堵国成), Chen Jian (陈坚). Effect of dissolved oxygen and pH on *Candida utilis* batch fermentation of glutathione. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19** (6): 734
- [10] Wei Gongyuan (卫功元), Li Yin (李寅), Du Guocheng (堵国成), Chen Jian (陈坚). 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
- [11] Wei Gongyuan (卫功元), Li Yin (李寅), Du Guocheng (堵国成), Chen Jian (陈坚). Metabolic flux analysis of glutathione biosynthesis with batch culture of *Candida utilis*. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2006, **57** (6): 1410
- [12] Bai Z, Harvey L M, McNeil B. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2003, **23** (4): 267
- [13] Qi Yizheng (戚以政), Wang Shuxiong (汪叔雄). *Bioreaction Kinetics and Bioreactor* (生化反应动力学与反应器). Beijing: Chemical Industry Press, 1996
- [14] Gaden E L Jr. Fermentation process kinetics. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 1960, **2**: 413