

L-精氨酸发酵条件的研究

龚建华 丁久元 路志强* 陈 琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道了产 L-精氨酸突变株 (*Corynebacterium crenatum*) 971.1 (SG⁺, His⁻) 摇瓶发酵条件的研究结果。试验结果表明, 培养基中组氨酸与生物素的适宜用量有助于产物的生成, 组氨酸或豆饼水解物用量分别为 50 μg/ml 和 0.4%、生物素或玉米浆用量分别为 75—125 μg/L 和 2.0% 时, 可得到较高产酸率。为获得较高的精氨酸积累量, 培养基中初糖浓度为 12%, 硫酸铵用量应高达 6.5% 为适宜, 如减少摇瓶装液量以改善通风状况可明显提高产酸率。在适宜的发酸条件下, 971.1 菌株经发酵培养 96 小时, 产酸最高可达到 34 mg/ml。

发酵液经 732 型离子交换树脂提取后, 获得纯品结晶。该结晶经生物鉴定、比旋度测定以及 C、H、N 元素含量分析, 其结果均与文献值相符; 红外光谱分析与标准样品一致; 纸层析图谱表明, 50 μg 样品层析显色后为单斑点, 其 R_f 值与标准品相同; 从而证明所得纯品结晶是 L-精氨酸。

关键词 L-精氨酸; 发酵

前文^[1]报道了 L-精氨酸高产菌株, 即钝齿棒状杆菌突变株 (*Corynebacterium crenatum*) 971.1 (SG⁺, His⁻) 选育结果。本文报道该突变株发酵条件的研究及发酵产物的鉴定。

材料和方法

(一) 菌株

1. L-精氨酸产生菌 *Corynebacterium crenatum* 971.1 (SG⁺, His⁻)。

2. L-精氨酸生物鉴定指示菌 *Corynebacterium* sp. 95 (Arg⁻), *Corynebacterium* sp. 125 (Arg⁻), *Corynebacterium* sp. 364 (Arg⁻)。

(二) 培养基

1. 液体种子培养基(%)：葡萄糖 3.0, 玉米浆 0.5, 豆饼水解物 1.0, 尿素 0.25, K₂HPO₄·3H₂O 0.15, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.04, MnSO₄·H₂O 0.002, FeSO₄·7H₂O 0.002, pH 6.5, 装液量 30 ml/250 ml 三角瓶, 每瓶接入 2 环培养 24 小时的斜面培养物。

2. 基础发酵培养基(%)：葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 5.5, K₂HPO₄·3H₂O 0.1, KH₂PO₄

0.05, MgSO₄·7H₂O 0.04, VB₁ 200 μg/L, FeSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.002, CaCO₃ 3.0, L-组氨酸及生物素用量由试验选定, pH 7.0, 用蒸馏水定容。装液量 10 ml/250 ml 三角瓶。每瓶接入种液 1 ml。

3. 发酵培养基(%)：葡萄糖 12.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.1, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.04, CaCO₃ 3.0, 玉米浆、豆饼水解物及硫酸铵用量由试验选定, pH 7.0。装液量 10 ml/500 ml 三角瓶, 每瓶接入 2 环 24 小时培养的斜面培养物。

4. 生物鉴定用平板培养基(%)：葡萄糖 1.0, (NH₄)₂SO₄ 0.3, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, FeSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.002, 生物素 30 μg/L, 硫酸素 200 μg/L, 水洗琼脂 2.0, pH 6.8, 蒸馏水定容。

5. 完全培养基斜面(%)：葡萄糖 1.0, 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH 7.0。

(三) 发酵试验

摇瓶发酵试验在回旋式摇床上进行, 转速

本文于 1986 年 12 月 20 日收到。

* 现在地址：中国科技大学生物学系, 合肥。

200r/min, 偏心距 2.5cm, 于 30℃ 振荡培养。在摇瓶发酵条件研究的基础上, 用 2.6 升自控发酵罐(日本 Marubishi Co. Ltd. MD-250) 对该菌株进行发酵过程的研究。

(四) 分析方法

1. 菌体生长测定: 一定体积的培养液用适量盐酸溶解所含碳酸钙, 用蒸馏水稀释到一定浓度, 在 620nm 下用 721 型分光光度计测定培养液中菌体的光密度, 光程 0.5cm, 用蒸馏水做空白对照。

2. 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法^[13]。

3. L-精氨酸定性测定: 使用新华 1 号滤纸。层析溶剂系统为 77% 乙醇: 二乙胺 = 100:1^[13], 层析后用茚三酮-丙酮试剂或吲哚醌试剂显色^[13]。

4. L-精氨酸含量测定: 坂口改良法^[13]。

结 果

(一) 971.1 菌株 L-精氨酸发酵的营养要求

1. L-组氨酸对 971.1 菌株产精氨酸的影响: 由于 971.1 菌株是组氨酸缺陷型^[1], 因此试验了基础发酵培养基中组氨酸对该菌株的生长和产精氨酸的影响。结果见图 1。缺少组氨酸, 菌体不能生长, 添加量超过 100μg/ml 可以获得菌体最高生长量。而且, 当添加组氨酸量为 50μg/ml 时, 对精氨酸的积累最为有利, 若添加量低于或高于此值, 精氨酸的生成量明显下降。从而可知, 组氨酸的添加必须控制在最高生长所需的“亚适量”, 对精氨酸积累最为有利。

由于豆饼水解物提供给 971.1 菌株必需的组氨酸及其它氨基酸, 所以, 该菌株对组氨酸的营养要求也应该表现在发酵培养基中豆饼水解物的用量上。试验结果表明, 添加适量豆饼水解物才能获得较高的产酸率(图 2)。

2. 生物素对 971.1 菌株产精氨酸的影响: 突变株 971.1 的出发菌株是谷氨酸产

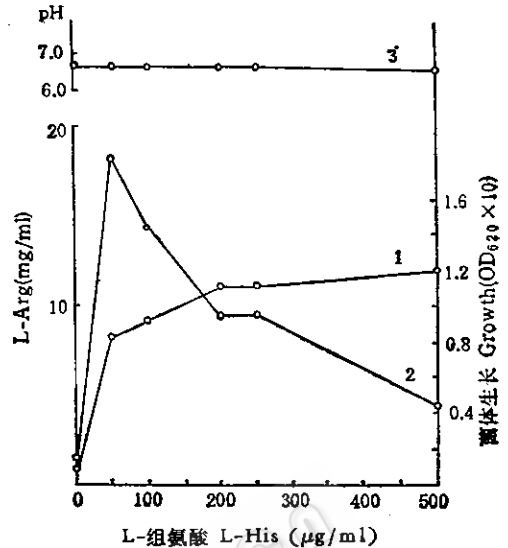


图 1 L-组氨酸对产 L-精氨酸的影响

Fig. 1 Effect of concentration of L-histidine on the fermentation of L-arginine

1. 菌体生长 Growth

2. L-精氨酸产量 Yield of L-Arg

3. 发酵液 pH

培养基中生物素为 250 μg/L, 其余同基础发酵培养基, 培养 96 小时。

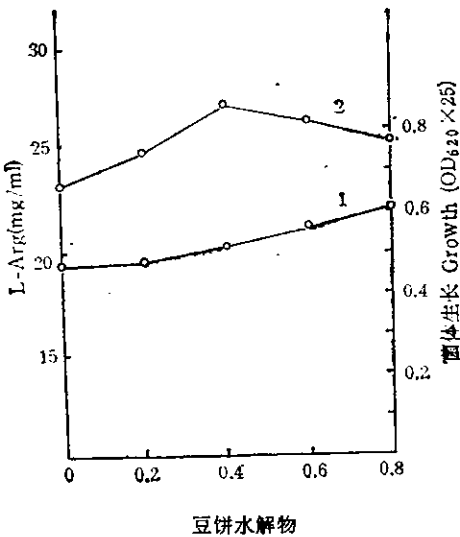
Medium 2 added biotin 250μg/l was used. incubated for 96 h.

注: 凡是发酵终体积有所浓缩时, 均用蒸馏水回复到相应初始体积后, 再进行发酵产物含量的测定。以下所有试验结果均用相同方法处理。

Note: The assay was carried out after decrement of culture volume resulted from evaporation was made up with distilled water. This operation was also done in other experiments.

生菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS 1.542^[6], 它要求生物素作为必需的生长因子。用基础培养基进行发酵试验的结果表明, 当缺少生物素时, 971.1 菌株生长明显受到影响, 生物素添加量为 25—75 μg/L 时, 菌体生长量最高, 添加量控制在 75—125μg/L 时, 则可获得较高的精氨酸积累量(图 3)。

该菌株对生物素的营养要求, 也应该同样表现在发酵培养基中给菌体提供丰富



豆饼水解物

Soybean protein hydrolysate (%)

图2 豆饼水解物对产 L-精氨酸的影响

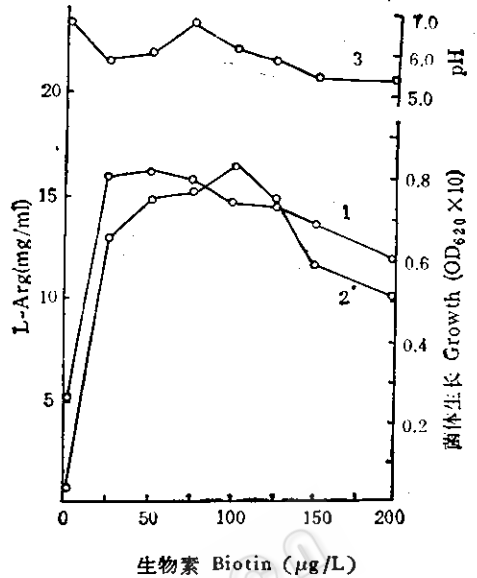
Fig. 2 Effect of concentration of soybean hydrolysate on the fermentation of L-arginine

1. 菌体生长 Growth

2. L-精氨酸产量 Yield of L-Arg

培养基中 (NH₄)₂SO₄ 5.5% 玉米浆 1.5%, 其余同发酵培养基, 培养 96 小时。

Medium 3 added (NH₄)₂SO₄ 5.5% and corn steep liquor 1.5% was used, incubated for 96h.



生物素 Biotin (μg/L)

图3 生物素对产 L-精氨酸的影响

Fig. 3 Effect of concentration of biotin on the fermentation of L-arginine

1. 菌体生长 Growth

2. L-精氨酸产量 Yield of L-Arg

3. 发酵液 pH

培养基中 L-组氨酸 50 μg/ml, 其余同基础发酵培养基, 培养 96 小时。

Medium 2 added L-His 50 μg/ml was used, incubated for 96h.

生物素的玉米浆用量上(图4)。试验结果表明, 适量的玉米浆有助于提高精氨酸的生成。

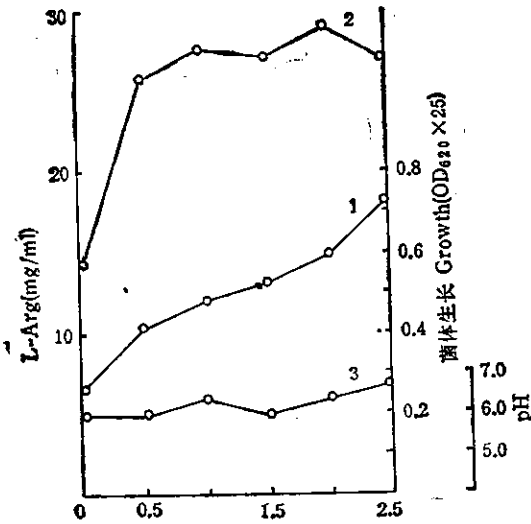
(二) 氮源对 971.1 菌株发酵产精氨酸的影响

由于发酵产物 L-精氨酸 (C₆H₁₄N₄O₂) 分子中氮元素的含量高达 32.15%, 所以发酵培养基中必须含有较高浓度的氮源以满足菌体生长及精氨酸的合成, 氮源不足势必导致精氨酸生成量的下降。对于氮源 (NH₄)₂SO₄, 因其消耗而引起的发酵液生理酸性又必须有相应量的 CaCO₃ 中和, 以维持发酵过程中一定的 pH 值。所以, 我们试验了完全发酵培养基中 (NH₄)₂SO₄ 及

CaCO₃ 用量对产酸的影响(表1)。结果表明, (NH₄)₂SO₄ 用量应高达 6.5%。与其它氨基酸发酵相比较, 高氮含量的精氨酸发酵的一个重要营养特征是需要丰富量的氮源。

(三) 葡萄糖浓度对 971.1 菌株发酵产精氨酸的影响

由于培养基灭菌时葡萄糖的破坏, 有害物质的生成, 以及高浓度葡萄糖底物对菌体代谢的抑制作用, 通常较高浓度葡萄糖的一次投糖发酵不能获得较高的转化率。试验结果表明, 971.1 菌株在一次投糖的摇瓶发酵中, 糖浓度由 12% 提高到 15%, 精氨酸生成量对纯葡萄糖的转化率由 21.8% 下降至 18.7% (图5)。所以, 对于



玉米浆 Corn steep liquor(%)

图 4 玉米浆对产 L-精氨酸的影响

Fig. 4 Effect of concentration of corn steep liquor on the fermentation of L-arginine

- 1. 菌体生长 Growth
- 2. L-精氨酸产量 Yield of L-Arg
- 3. 发酵液 pH

培养基中 (NH₄)₂SO₄ 5.5%, 豆饼水解物 0.4% 其余同发酵培养基, 培养 96 小时。

Medium 3 added (NH₄)₂SO₄ 5.5% and soybean hydrolysate 0.4% was used. incubated for 96h.

971.1 菌株的高糖浓度发酵,若采用糖底物流加的培养方式,则可期望获得更高的产酸水平。

(四) 摇瓶通风状况对 971.1 菌株发酵产精氨酸的影响

1. 发酵培养过程的通风要求: L-精氨酸在菌体细胞内的合成是一个较强的氧化过程,足够供氧可以保证菌体生长所需,还有利于积累多量的精氨酸。我们试验了在 250ml 和 500ml 三角瓶中装入不同体积的完全培养基进行发酵,观察通风状况对产精氨酸的影响。结果(表 2)表明,装液量为 10ml/500ml 三角瓶时可得到较高的精氨酸产量,这说明较强的通风可以改善该菌株对底物葡萄糖生物氧化的效率,从而提高精氨酸的产率。

2. 种液培养过程的通风要求: 种子培养以菌体生长为主,所以种子培养对通风的要求通常不同于发酵培养过程。我们试验了不同通风状况下的摇瓶种液培养及其种龄、发酵接种量对摇瓶发酵产酸的影响。通风量较小(即种瓶装液量较大, 30 ml/250ml 三角瓶)的种液培养,在相同发酵条

表 1 培养基中 (NH₄)₂SO₄ 和 CaCO₃ 用量对 L-精氨酸发酵的影响

Table 1 Effects of concentration of (NH₄)₂SO₄ and CaCO₃ on the fermentation of L-arginine

(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	4.5		5.5		6.5		7.5	
CaCO ₃ (%)	2.0	3.0	3.0	4.0	3.0	4.0	4.0	5.0
pH	6.0	6.5	6.5	6.8	6.5	6.8	6.7	6.8
菌体生长 Growth OD ₆₂₀ (×25)	0.464	0.540	0.541	0.525	0.490	0.468	0.450	0.447
L-精氨酸产量 yield of L-Arg (mg/ml)	16.4	24.3	25.5	25.8	27.1	26.2	26.3	25.3

培养基中玉米浆 2.0%, 豆饼水解物 0.4%, 其余同发酵培养基, 培养 96 小时。

Medium 3 added corn steep liquor 2.0% and soybean protein hydrolysate 0.4% was used, incubated for 96h.

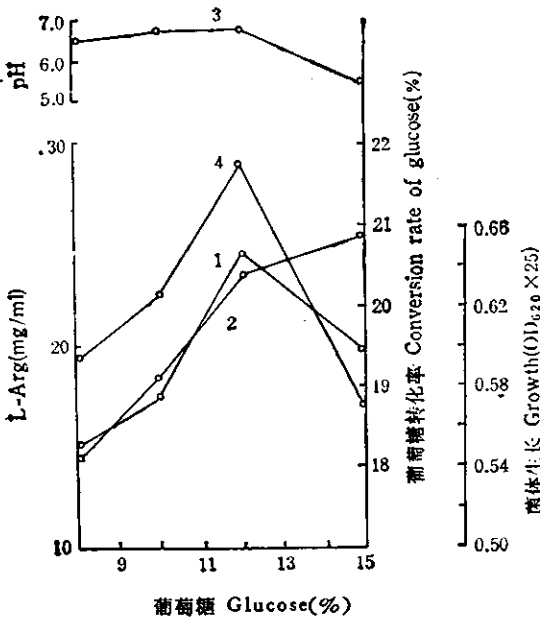


图5 葡萄糖浓度对产L-精氨酸的影响
Fig. 5. Effect of concentration of glucose on the fermentation of L-arginine

1. 菌体生长 Growth
2. L-精氨酸产量 Yield of L-Arg
3. 发酵液 pH
4. 对纯葡萄糖转化率 Conversion rate of glucose

培养基中 (NH₄)₂SO₄ 5.5%, 玉米浆 1.5%, 豆饼水解物 0.8%, 其余同发酵培养基, 培养 96 小时。

Medium 3 added (NH₄)₂SO₄ 5.5%, corn steep liquor 1.5% and soybeen hydrolysate 0.8% was used, incubated for 96h.

件下可以获得较高产酸率,说明种子培养不宜强烈供氧。Akashi, K. 等人^[7]曾报道培养液中高浓度的氧对精氨酸产生菌在生长期有明显的毒害作用,影响菌体酶体系的正常形成及其功能,并导致后期产酸能力下降。另外,当用生长适宜的液体种子(种瓶装液量为 30ml/250ml 三角瓶,种龄 18 小时),接种量在较大允许范围内变动(0.5—2.0ml),都可以获得较高的发酵产酸率;液体种子种龄为 22 小时,接种量可适当减少,而不影响产酸(表 3)。

(五) L-精氨酸发酵过程

在 2.6 升自控发酵小罐上对 971.1 菌株产 L-精氨酸的发酵过程进行了初步观察。罐内装发酵培养基 1 升,接种量 6%。用氨水自动流加控制 pH6.5,发酵培养温度为 30±0.5℃。搅拌速度 800r/min,通风比 1:1.5 (v. v. m.), 结果见图 6。89 小时产酸率可达 24.0 mg/ml,残糖 0.27%,对纯葡萄糖的转化率为 22%,菌体生长最高光密度为 0.64 (× 25),发酵终期 pH 值稍有回升。由于未进行自控小罐发酵条件的系统研究,所以图上标出的产酸量还未达到摇瓶发酵的水平。

(六) 发酵产物的鉴定

表 2 摇瓶发酵时通风状况对产 L-精氨酸的影响

Table 2 Effect of aeration of shaking flask on the fermentation of L-arginine

摇瓶容积 Size of flask (ml)	250				500			
	10	15	20	25	10	15	20	25
装液量 Culture volume (ml)								
发酵液 pH	5.5	5.9	5.9	5.7	6.0	6.5	6.0	6.0
菌体生长 Growth (OD ₆₂₀ ×25)	0.565	0.605	0.565	0.505	0.685	0.550	0.595	0.620
L-精氨酸产量 Yield of L-Arg (mg/ml)	22.0	22.6	15.6	12.4	26.4	23.3	23.7	23.0

培养基中 (NH₄)₂SO₄ 5.5%, 玉米浆 1.5%, 豆饼水解物 0.8%, 其余同发酵培养基, 培养 96 小时。

Medium 3 added corn steep liquor 1.5%, soybean protein hydrolysate 0.8% and (NH₄)₂SO₄ 5.5% was used, incubated for 96h.

表 3 种液培养通风状况、种龄及接种量对 L-精氨酸发酵的影响

Table 3 Effect of aeration of seed culture and seed age and inoculation size for main culture on the fermentation of L-arginine

L-精氨酸 Yield of L-Arg (mg/ml)		装液量 Culture volume (ml/250ml flask)								
		10			20			30		
		接种量 Inoculation size (ml)								
		0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
种龄 Seed age (h)										
15	25.5	27.7	25.5	28.4	28.4	29.6	26.4	34.0	26.6	
18	22.5	24.4	26.7	25.3	29.3	31.8	32.2	31.8	31.8	
22	27.4	26.7	28.9	28.1	26.8	31.4	33.3	29.2	28.6	

培养基中 (NH₄)₂SO₄ 6.5%，玉米浆 2.0%，豆饼水解物 0.4%，其余同发酵培养基。培养 96 小时。

Medium 3 added (NH₄)₂SO₄ 6.5%, corn steep liquor 2.0% and soybean hydrolysate 0.4% was used. incubated for 96h.

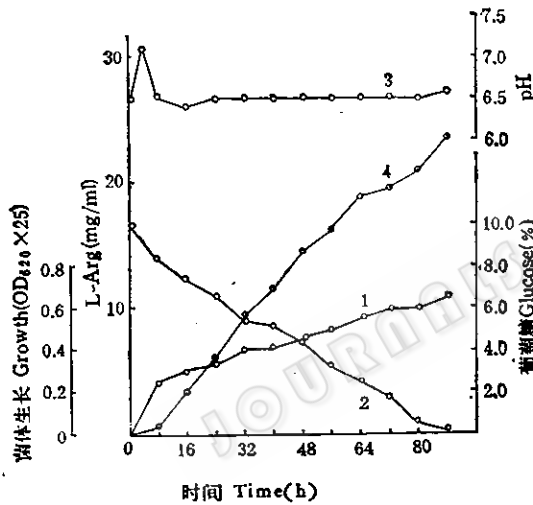


图 6 L-精氨酸发酵过程

Fig. 6 Time course of fermentation of L-arginine

- 1. 菌体生长 Growth
- 2. L-精氨酸产量 Yield of L-Arg
- 3. 发酵液 pH
- 4. 还原糖浓度 Conc. of reducing sugar

用 732 型阳离子交换树脂提取发酵液中的 L-精氨酸，洗脱液经浓缩与精制，获得 L-精氨酸盐酸盐的结晶纯品。经生物鉴定、比旋光度测定、红外吸收光谱分析、元素分析和纸层析图谱分析，可以确定系为 L-精氨酸盐酸盐。

1. 生物鉴定：以 *Corynebacterium* sp.

95(Arg⁻) *Corynebacterium* sp. 125(Arg⁻) *Corynebacterium* sp. 364 (Arg⁻) 为指示菌，用生长图谱法鉴定，提纯结晶周围出现指示菌株的生长谱。

2. 比旋光度测定：提纯的结晶样品的比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = +21.95 - +22.06$ (6mol/L HCl, C = 8)，文献值为 $[\alpha]_D^{20} = +21.40 - +23.60$ (6mol/L HCl, C = 8)^[9]。

3. 红外吸收光谱：提纯的结晶样品的红外吸收光谱与美国 J. T. Baker 公司产品相符合(图 7)。

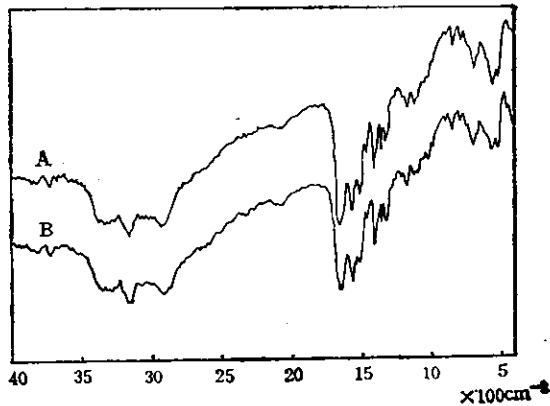


图 7 L-精氨酸的红外光谱图

Fig. 7 Infrared absorption spectrum of L-arginine

- A. 提纯样品 Purified product
- B. 标准品 Standard

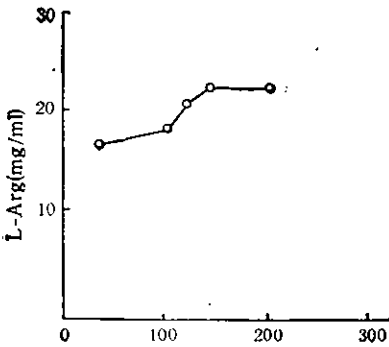
溶氧系数 k_{La} ($\times A$)图 8 溶氧系数 k_{La} 值与 L-精氨酸产量的关系

Fig. 8 Relationship of oxygen transfer coefficient k_{La} and the fermentation of L-arginine

A 为常数 Const.

4. 元素分析: 经 CHN-Rapid R-Aorp 72 元素分析测定, 提纯结晶样品的 C、H、N 元素含量与理论值相符合, 并与美国 J. T. Baker 公司产品分析结果相接近。

5. 纸层析: 50 μ g 提纯的结晶样品的纸层析图谱为单斑点, 与美国 J. T. Baker 公司产品的 R_f 值相同。溶剂系统为 77% 乙醇: 二乙胺 = 100:1^[3]。

讨 论

1. L-精氨酸产生菌 971.1 (SG⁺, His⁻) 需要 L-组氨酸作为菌体生长的必需因子, 并且具有磺胺胍抗性, 这种产 L-精氨酸菌株在国内外还没有报道。组氨酸营养缺陷与对磺胺胍的抗性使该菌株代谢途径中的产物反馈抑制得以部份解除, 能积累大量精氨酸^[1]。摇瓶发酵条件研究的结果已经表明, 在合适的营养及通风条件下, 971.1 菌株摇瓶发酵产酸率可超过 30mg/ml, 最高达 34mg/ml, 接近国外所报道的产酸水平^[7,10-13]。所以, 971.1 菌是一株优良的精氨酸产生菌。在自控发酵小罐上对该菌株进行发酵条件的进一步研究, 可期望获得

更理想的产酸水平。

2. 为了进一步揭示精氨酸发酵供氧的规律, 在摇瓶发酵试验的基础上, 我们用 2.6 升自控发酵小罐对“溶氧系数” k_{La} 值与产酸率的定量关系进行了初步探讨。试验在相同条件下进行, 而通过改变搅拌转速及通气量来调整不同的溶氧系数 k_{La} 值。所有试验都在培养液还未被氧完全饱和的情况下进行。利用 Richard 溶氧系数公式^[8]进行有关数学推导后, 不同供氧强度可用 k_{La} 的相对值来进行比较。Kunihiko Akashi 等人曾用乳酸短杆菌的变异株作为试验菌株在自控发酵小罐做了精氨酸发酵与供氧量关系的研究^[7]。他们改变小罐的通风空气中氧分压以控制不同的供氧强度。结果表明, 满足必需的供氧可以获得较高的精氨酸产量, 而且当供氧剧烈时, 产酸率反而下降。971.1 菌株的发酵小罐试验结果也反映了类似的规律性: 当 k_{La} 值从 40.7 A(h⁻¹) 逐渐增加到 134.4 A(h⁻¹) 时 (A 是 k_{La} 相对值的常数), 产酸率可以逐步增加到原产酸量的 30%, 而当 k_{La} 值继续增加到 200 A(h⁻¹) 时, 产酸率不能随之增加 (图 8)。这前半部份的相互关系与本文报告的发酵摇瓶装液量的试验结果相同; 而摇瓶装液量试验受到装液量范围的限制, 就较难反映出这后半部份的相互关系。同时, 我们也注意到图 8 中的产酸率低于本文所报告的摇瓶发酵的最高产酸率, 这说明该实验中, 除供氧以外的其它发酵条件还有待于改进。

参 考 文 献

- [1] 路志强等: 微生物学报, 28(2): 131—135, 1988。
- [2] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 北京, 第 9—11 页, 1981 年。
- [3] Block, R. J. et al.: Amino Acid Handbook—Methods and Results of Protein Analysis, Charles C Thomas Publisher, Sp-

- ringfield, Illinois. U. S. A., p. 91; p. 98, 1956.
- [4] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, 北京, 16—19 页, 1973 年。
- [5] Rosenberg, H. et al.: *Biochem. J.*, **63**: 153, 1956.
- [6] 陈 琦等: 微生物学报, **15**: 119—124, 1975。
- [7] Akashi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57** (4): 321, 1979.
- [8] «微生物工程»编写组: 微生物工程(上册), 上海人民出版社, 上海, 第 101 页, 1976 年。
- [9] 陆鼎雯译: 氨基酸杂志, **3**: 50—58, 1985。
- [10] Kato, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* **34** (6): 689, 1977.
- [11] 中山清: 公开特许公报, 12491, 1978。
- [12] 久保田浩二等: 特许公报, 37235, 1979。
- [13] Yoshida, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **43** (1): 105, 1979.

STUDIES ON THE FERMENTATION OF L-ARGININE

Gong Jianhua Ding Jiuyuan Lu Zhiqiang* Chen Qi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Studies on the fermentation of L-arginine were carried out by using a L-arginine-producing strain *Corynebacterium crenatum* 971.1 (SG⁺, His⁻) with shaking flask. The results showed that L-histidine and biotin were required, but their concentration required were different with respect to cell growth and production of L-arginine. High concentration of (NH₄)₂SO₄ used as nitrogen source was necessary for the production of L-arginine. And a certain amount of oxygen-supplying was a important factor for the accumulation of L-arginine. A maximum value

of 34 mg/ml was obtained under optimum condition on shaking flask incubated for 96 h.

The product was isolated and purified from culture broth with ion exchange chromatography and identified as L-arginine by means of bioassay, specific rotation, infrared absorption spectrum, elements analysis and paper chromatography.

Key words

L-arginine; Fermentation

* Present address: Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei.