

发酵法生产 L-精氨酸放大过程的工艺研究*

龚建华 丁久元 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

郑翠凤 刘增强

(湖南省株洲市制药厂, 株洲)

本文报道了 L-精氨酸产生菌株钝齿棒状杆菌突变株 971.1 继摇瓶发酵条件研究后所进行的 2.6L 台式发酵罐、200L 和 2000L 通用发酵罐放大试验及其工艺条件研究的结果。试验表明, 发酵 pH 值及供氧强度的合理控制对提高 L-精氨酸的积累量非常重要。在所获得的工艺条件下, 2000L 发酵罐稳产试验的产酸率平均可达 29.0mg/ml, 最高 32.0mg/ml。发酵液中 L-精氨酸的提取收率平均为 55.9%, 最高可达 66.04%。产品的质量符合药典标准。本文也对试验结果进行了分析与讨论。

关键词 发酵过程的放大; pH 值控制; 供氧的控制; 稳定试验

前两报已分别报道了 L-精氨酸高产菌株——钝齿棒状杆菌突变株 (*Corynebacterium crenatum*) 971.1 (SG⁺, His⁻) 的选育及其营养特性、摇瓶发酵条件研究结果^[1-2]。在此基础上, 我们用 2.6L 台式自控发酵罐、200L 和 2000L 通用型发酵罐进行了发酵法生产 L-精氨酸的放大试验, 考察了发酵工艺条件, 并在 2000L 发酵罐上进行了稳产试验, 又完成了发酵液提取工作。从而为 L-精氨酸发酵工业性生产提供了基础。现将主要研究结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

L-精氨酸产生菌: 钝齿棒状杆菌突变株 (*Corynebacterium crenatum*) 971.1 (SG⁺, His⁻)^[3]。

(二) 培养基

1. 液体种子培养基:

(1) 2.6L 台式发酵罐发酵试验用 (%) : 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, pH6.5。

(2) 200L、2000L 发酵罐发酵试验用 (%) : 葡萄糖 3.0, 豆饼水解物 1.5, 尿素 0.15, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, 豆油 0.2(或甘油聚醚 0.025), pH6.8。

2. 发酵培养基:

(1) 2.6L 台式发酵罐发酵试验用 (%) : 工业葡萄糖 12.0, 玉米浆 2.0, 豆饼水解物 0.6, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.04, 甘油聚醚 0.02, pH 依试验而定。

(2) 200L、2000L 发酵罐发酵试验用 (%) : 工业葡萄糖 15.0, 玉米浆 2.5, 豆饼水解物 0.6, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 尿素 0.1, KH₂PO₄ 0.01, MgSO₄·7H₂O 0.04, 甘油聚醚 0.015, pH 依试验选定。

(三) 发酵设备

1. 日本 MARUBISHI Co. Ltd. MD-

本文于 1990 年 2 月 16 日收到。

* 本工作得到湖南省株洲市制药厂中试车间有关同志的大力支持和密切配合, 深表感谢。

250 2.6L 台式自控发酵罐(溶解氧浓度连续显示,温度及 pH 自控)。

2. 通用型发酵罐: 容积 20L (一组六平叶涡轮式搅拌器); 容积 200L (两组六平叶涡轮式搅拌器); 容积 2000L (两组六弯叶涡轮式搅拌器)。

(四) 培养方法

1. 2.6L 台式发酵罐发酵试验: 以合适的摇瓶培养种液接入 2.6L 台式自控发酵罐, 30℃ 条件下进行发酵培养, 自控补加氨水以维持发酵 pH 在选定值。

2. 200L、2000L 发酵罐发酵试验: 用 20L 发酵罐作为 200L 罐发酵的种子培养。分别用 20L、200L 罐作为 2000L 罐的一级、二级种子培养。发酵培养温度都为 30℃, 并用间歇补加尿素方法控制发酵液 pH 在选定范围内。发酵中期补入一定量的含糖培养基。

(五) 分析方法

1. pH 测定: 国产精密试纸及 pH S-2 型酸度计。

2. 菌体生长的测定: 见前文^[2] (发酵液稀释 25 倍)。

3. 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法^[3]或改良斐林氏法^[4]。

4. L-精氨酸含量测定: 改良坂口法^[5]。

结 果

通过在 2.6L 台式发酵罐以及 200L、2000L 发酵罐上所进行的对 971.1 菌株精氨酸发酵过程的 pH 值、供氧强度等控制的研究, 获得了在放大规模上较佳的工艺条件。

(一) 发酵 pH 值的控制

在以 CaCO₃ 作为 pH 调节剂的摇瓶发酵试验中难以较好地探讨发酵 pH 值对发酵产物生成的影响。我们在 2.6L 台式小罐上用氨水控制 pH 值, 比较分析了

发酵 pH 值分别为 6.0、6.5 和 7.0 的发酵结果。试验结果表明(表 1), pH 控制在 6.5 或 7.0 时, 产酸率可有较多的提高。

表 1 pH 值对 L-精氨酸发酵的影响
(2.6L 发酵罐)

Table 1 The effects of the pH on the L-arginine fermentation in the 2.6L fermenter

	pH		
	6.0	6.5	7.0
L-精氨酸产率 L-arg yield (mg/ml)	14.5	18.9	18.2
菌体生长 Growth (×25,OD)	0.625	0.578	0.500
周期 Period (h)	64	72	79.5

* 每批发酵的总糖量相等。
The total glucose conc.in the medium for any test above is same.

图 1 表明在发酵中后期, pH6.5 或 7.0 时的菌体生长速率较 pH6.0 时明显降低, 而精氨酸合成速率较 pH6.0 时有较多增

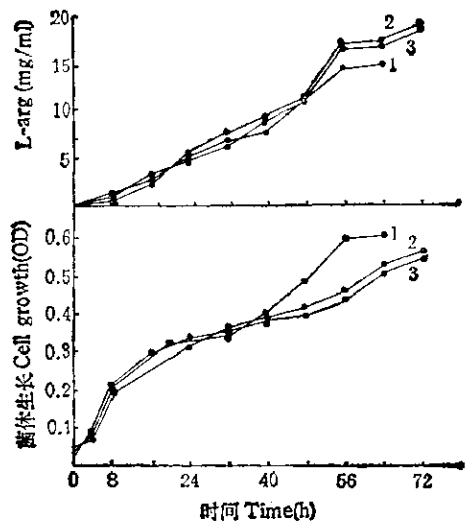


图 1 发酵 pH 对菌体生长和 L-精氨酸生成的影响

Fig. 1 The effects of the fermentative pH on the cell-growth and the L-arg production

1. pH6.0; 2. pH 6.5; 3. pH7.0

加。图 2 显示了不同 pH 控制值时耗糖量与精氨酸合成的相互关系（曲线任一点切线斜率的大小即该点的葡萄糖对精氨酸合成得率的大小，它是发酵过程的变量）。它表明 pH6.5 或 7.0 时，发酵中后期葡萄糖对精氨酸合成的得率都高于 pH6.0 时的相应值。这说明了发酵中后期时精氨酸合成速率、菌体生长速率与葡萄糖对精氨酸的转化效率是密切相关的。这给我们一个启示：在某些条件下，“速率”可以影响

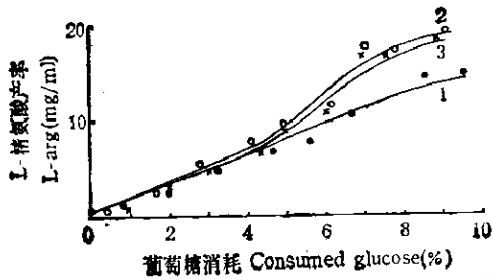


图 2 不同发酵 pH 条件下 L-精氨酸生成与葡萄糖消耗的相互关系

Fig. 2 The relationship of the L-arginine production and the consumed glucose under the conditions of the different fermentative pH

1. pH6.0; 2. pH6.5; 3. pH7.0

“转化率”，以转化率为工艺控制目标时，调正某些有关的代谢速率可以改善转化率。

我们进一步在 200L 发酵罐上用尿素溶液作为 pH 调节剂。试验结果同样反映了 2.6L 罐上类似的规律性，pH 控制值 6.0 时的产酸率为 26.2mg/ml，pH 为 6.5 和 7.0 时的最高产酸率可达 31.7 mg/ml。所以，在放大规模上，pH 值调整在 6.5—7.0 是可行的。

(二) 供氧强度的控制

摇瓶发酵结果已表明 L-精氨酸发酵过程中供氧强度与产物积累是密切相关的^[2]。我们在 2.6L 台式发酵罐上比较了不同搅拌速率、通风量的发酵结果。在相同的通风比 1:1.0vvm 时，试验了不同的搅拌转速的发酵结果。在搅拌转速 800r/min 时，试验了通风比 1:0.75vvm、1:1.0 vvm 和 1:1.5vvm（结果见表 2）。试验结果表明增大搅拌转速或提高通风比来加强供氧可使精氨酸的生成量增加。我们用溶氧系数 K_{La} 值综合表示发酵体系的供氧强度，即当 K_{La} 值从 $222h^{-1}$ 较大幅度地提高到 $2130h^{-1}$ 时，产酸值可明显地由 17.0 mg/ml 增加到 24.0mg/ml（表 3）。所以，

表 2 搅拌转速及通风量对 L-精氨酸发酵的影响(2.6L 发酵罐)

Table 2 The effects of theagitation and the aeration on the L-arginine fermentation in the 2.6L fermenter

	搅拌转速 Agitation (r/min) * aeration=1:1 vvm			通 风 量 Aeration (vvm) * agitation=800(r/min)		
	500	800	1000	1:0.75	1:1.0	1:1.5
L-精氨酸产率 L-arg (mg/ml)	17.0	21.0	21.6	18.0	19.9	24.0
菌体生长 Growth ($\times 25, OD$)	0.523	0.553	0.590	0.560	0.518	0.642
周期 Period (h)	84	80	84	78	78	88

* 每批发酵的总糖量相等。

The total glucose conc. in the medium for any test above is same.

表 3 溶氧系数 K_{La} 对 L-精氨酸积累的影响 (2.6L 发酵罐)

Table 3 The relationship of the oxygen transfer coefficient K_{La} and the L-arginine production in the 2.6L fermenter

溶氧系数 Oxygen transfer coefficient (h^{-1})	搅拌转速 Agitation (r/min)	通风量 Aeration (vvm)	L-精氨酸产率 L-arg (mg/ml)
222	500	1:1.0	17.0
1920/1980	800	1:1.0/1:0.75	21.0, 19.9/18.0
2130	800	1:1.5	24.0
3870	1000	1:1.0	21.6

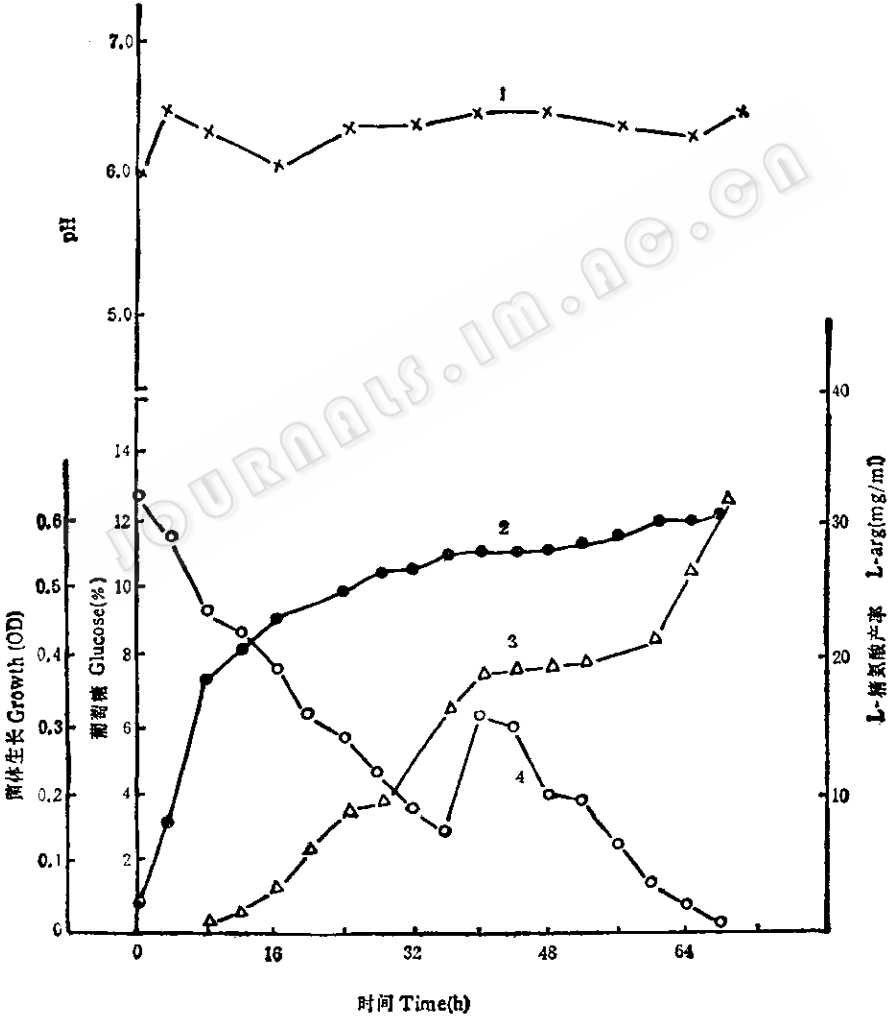


图 3 L-精氨酸发酵过程(2000L 发酵罐)

Fig. 3 The time course of L-arginine fermentation by the strain 971.1 in the 2000 L fermenter

1. 发酵 pH Fermentative pH; 2. 菌体生长 Growth of the cell; 3. L-精氨酸产率 L-arg conc.; 4. 葡萄糖浓度 Glucose conc.

精氨酸发酵是一较强烈的需氧发酵过程(摇瓶试验也反映了这一结果^[2])。在 200 L 罐上适当地提高通风比(由 1:0.8vvm 增至 1:1.0vvm 与 1:1.2vvm)也可使产酸值从 24.5mg/ml 增加到 31.7mg/ml。在 2000 L 罐上的结果还进一步表明过高的供氧将使精氨酸的积累量从 36.6mg/ml 下降到 29.4mg/ml (在较大容积的罐上通过提高通风比较容易达到过高的供氧强度)。

从代谢机理不难知道,耗氧微生物所摄取的氧主要用于代谢过程中所形成的 NADH_2 、 FADH_2 的再氧化以及 ATP 的生成。在 L-精氨酸发酵过程中,1 克分子葡萄糖转化为 2/3 克分子精氨酸,同时又生成 $(4 + 2/3)$ 克分子的 ATP,这些克分子数决定了它较其他许多种氨基酸(例如: Lysine 和 Valine 等)需要更多的氧。Akashi 等人曾把 L-精氨酸发酵列入有关氨基酸发酵分类中需氧量最大的一类^[6-7]。而过于强烈的供氧使精氨酸的积累量下降与发酵液中过高氧浓度的抑制作用有关^[6-7]。国外所报道的乳酸短杆菌变异株的 L-精氨酸发酵过程也有上述的供氧规律^[6]。所以,在精氨酸发酵过程中控制较高而又适度的供氧强度是必要的。

(三) 在 2000L 发酵罐上的稳定试验

在以上试验基础上,我们用 2000L 发酵罐连续进行了五批试验,平均产酸 29.0 mg/ml,最高产酸可达 32mg/ml。2000L 罐上的发酵过程见图 3。稳定试验结果表明,所采用的发酵工艺是可行的。

(四) 发酵液中 L-精氨酸的提取试验

我们在与 200L 发酵罐配套的提取设备上,结合生产条件进一步改进并完善了提取工艺。发酵液经预处理后,用强酸性阳离子交换树脂吸附 L-精氨酸,洗脱液经浓缩、脱色、酸化后精制得到 L-精氨酸盐

酸盐的结晶纯品,质量符合 1985 年美国 21 版药典规定的标准。连续四批发酵液提取试验的平均收率为 55.9%,最高可达 66.04%。提取中间试验的完成为生产的提取设备工艺设计及其工艺条件制定提供了基本数据。

讨 论

1. 在 200L、2000L 发酵罐上中间放大试验的完成为工业性生产提供了可行性依据和技术数据。

2. 试验结果反映了当发酵体系内已积累一定菌体量后,通过控制 pH,提高精氨酸合成速率,同时又避免过高的菌体生成速率,有利于葡萄糖转化为精氨酸。因为这两个速率的调正直接反映了细胞内精氨酸合成酶系及菌体生成酶系竞争葡萄糖及其中间代谢产物能力的改变、或所涉及的代谢途径的调正,而这种变化恰恰也影响了精氨酸合成的葡萄糖利用率,有关文献对此已有讨论^[8]。

3. L-精氨酸发酵工艺控制所涉及的供氧和 pH 的调节是至关重要的。数据分析还表明 971.1 菌株的 L-精氨酸发酵过程属于动力学分类的第 II 型^[9-10],前期以生长为主,中后期以产酸为主。而精氨酸积累比菌体生长需更多的氧量^[7](这在前面所报道的摇瓶试验中种子培养需氧量低于发酵培养需氧量的结果也有所反映^[2]),所以,若在发酵前期及中后期控制不同的供氧强度,发酵结果可能会有进一步的改善。另外,补料工艺的继续完善对发酵转化率提高也会有一定的帮助。

4. 在本文所报道的发酵放大工艺性研究的基础上,进一步在生化工程学范畴内探讨 L-精氨酸发酵的放大理论,这在放大研究及其应用上都有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 路志强等: 微生物学报, 28(2): 131—135, 1988。
[2] 龚建华等: 微生物学报, 28(3): 257—264, 1988。
[3] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 第 9—11 页, 人民教育出版社, 北京, 1981 年。
[4] 北京大学生物系生物化学教研室编: 生物化学实验指导, 第 1 版, 第 24 页, 人民教育出版社, 北京, 1971 年。
[5] Roserberg, H. et al.: *Biochem. J.*, 63: 153, 1956.
[6] Akashi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57(4): 321, 1979.
[7] Akashi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57(4): 317, 1979.
[8] 龚建华等: 生物工程学报, 4(4): 281—289, 1987。
[9] Aiba, S. et al.: *Biochemical Engineering, Second Edition*, p. 110—115, ACADEMIC PRESS, 1973.
[10] Gaden, E. L.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 1: 413, 1959.

STUDIES ON THE SCALING-UP OF THE L-ARGININE
FERMENTATION PROCESS

Gong Jianhua Ding Jiuyuan Chen Qi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Zheng Cuifeng Liu Zengqian

(Zhuzhou Pharmaceutical Factory, Zhuzhou)

The previous papers reported the results of the works on the breeding of the L-arginine-producing strain 971.1 and on the L-arginine fermentation in shaking flasks. Then the further study of the fermentation by the strain was carried out in a 2.6L-bench fermenter, a 200L-, and a 2000L- fermenters step by step. The above experiments mainly showed that it was essential controlling the pH value and the aeration at the optima in the scaling-up of the L-arginine fermentation process in order to accumulate the more L-arginine in the broth. Finally, in the 2000L-fermenter the accumulated conc. of the L-arginine in the broth was 32.0 mg/ml (the

average 29.0 mg/ml). Meanwhile, the extraction rate of the L-arginine, 66.04% (the average 55.90%), from the harvested broth in the 200L-fermenter was obtained with the extraction equipments on the scale corresponding to the 200L-fermenters. Furthermore, the discussion about the results of the above experiments was mathematically made.

Key words

Scaling-up of L-arginine fermentation process; Control over the pH; Control over the aeration; Repeat-tests