

## L-赖氨酸分批发酵连续补糖的研究

龚建华 陈琦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用L-赖氨酸产生株钝齿棒状杆菌PI-3-2(Hse<sup>-</sup>, AEC<sup>r</sup>) 在8L自控发酵小罐上, 用恒稀释率指数递增方式连续补加葡萄糖液进行L-赖氨酸分批发酵的研究。结果表明, 一次投糖分批发酵时, 较高糖浓度使比产酸速率 $q_p$ 值下降, 不能有效地提高产酸水平。采用连续补糖方式可以改变菌体竞争底物的能力或改善代谢途径, 增大耗底物分数 $\alpha$ , 或真正产酸率 $y_p$ , 从而增加表观产酸率 $Y_p$ 值, 提高葡萄糖转化率。此方式的发酵属 Gaden 动力学分类第 I 型, 在发酵的中后期控制 pH 等条件, 可增加比产酸速率 $q_p$ 值, 提高发酵水平。PI-3-2 菌株的产酸水平可由47mg/ml提高到64.2mg/ml (总糖浓度18.18%时), 最高可达73.3mg/ml (总糖浓度22.73mg/ml时)。

**关键词** L-赖氨酸; 补料分批发酵; 指数方程; Gaden 第 I 型发酵

L-赖氨酸是人体和动物的必需氨基酸, 可用于食品、饲料和医药等方面。L-赖氨酸发酵生产在国内外深受重视。世界上赖氨酸生产规模已仅次于谷氨酸而居氨基酸生产工业的第二位<sup>[1]</sup>。在国内, 自1966年选获赖氨酸生产菌株 AS1.563 (Hse<sup>-</sup>) 以来<sup>[2]</sup>, 发酵法生产赖氨酸的研究工作进展很快。钝齿棒状杆菌 AS1.542 经过诱变产生的L-赖氨酸产生菌株 PI-3-2 (Hse<sup>-</sup>, AEC<sup>r</sup>), 一次投糖分批发酵的产酸水平47mg/ml, 对葡萄糖转化率为33%<sup>[3]</sup>。为了进一步提高该菌株的产酸水平, 我们进行了补糖分批发酵的研究。

补料分批培养 (Fed batch culture) 在国外已被广泛研究, 并应用于许多发酵产品的生产中<sup>[4-14]</sup>, 我们按指数递增方式控制连续补糖的流速 (糖液中还含有适量其他营养物), 维持发酵液恒定的低糖浓度, 使 PI-3-2 菌株的产酸水平明显提高。本文报道了上述研究结果, 着重分析并讨论了不同加糖方式及发酵 pH 对 PI-3-2

菌株发酵代谢变量及产酸水平的影响。

### 材料与方 法

#### (一) 菌种

L-赖氨酸产生株钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) PI-3-2 (Hse<sup>-</sup>, AEC<sup>r</sup>)<sup>[3]</sup>。

#### (二) 培养基

1. 斜面培养基 (%) : 葡萄糖0.5, 牛肉膏1.0, 蛋白胨1.0, NaCl 0.5, 琼脂2.0, pH 7.0。

2. 种液培养基 (%) : 葡萄糖2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.35, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, 糖蜜2.0, 玉米浆2.0, 毛发水解物 1.0, CaCO<sub>3</sub> 0.5, pH 7.2。

3. 发酵培养基 (%) : 配方 A; 葡萄糖量由试验要求定, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

本文于1986年12月19日收到。

0.05, 糖蜜4.0, 毛发水解物1.5, 泡敌0.03, pH7.2; 配方B: 葡萄糖量由试验要求定,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, 糖蜜6.0, 玉米浆2.0, 毛发水解物1.5, 泡敌0.03, pH7.2。

### (三) 摇瓶种液培养

每瓶接入24h的斜面培养物2环, 30°C振荡培养20h。

### (四) 发酵设备

瑞典LKB公司ULTROFERM 1601-012型8L实验室用自控发酵罐: 发酵液溶解氧饱和度自动指示、温度自动控制, 发酵过程用氨水自动流加控制所需pH值, 糖液由蠕动泵控制不同流速补入罐内。

### (五) 分析方法

1. 菌体生长: 发酵液稀释至合适倍数, 用721型分光光度计测定菌体生长光密度(波长620nm, 光程10mm), 并换算成菌体干重浓度。

2. 还原糖: 3, 5-二硝基水杨酸法<sup>[15]</sup>。

3. L-赖氨酸: 纸上电泳分离发酵液中的L-赖氨酸, 用茚三酮显色反应进行定量测定<sup>[16]</sup>。

## 结 果 与 讨 论

### (一) L-赖氨酸分批发酵中连续补糖的稀释率及流速方程

补料分批发酵是一变体积培养过程。它与通常的一次投料的分批发酵不同, 在培养过程中, 按一定要求及模式控制稀释率及补料速率, 往发酵体系补入新鲜的培养基<sup>[4-9]</sup>, 培养体积按一定规律增加。我们所研究的L-赖氨酸分批发酵连续补糖过程的主要特征是:

1. 连续补加糖液的控制指标: 按合适的稀释率及流速, 连续补加葡萄糖溶

液, 使发酵液的糖浓度始终被控制在一恒定的较低值。

2. 稀释率 $D$  ( $\text{h}^{-1}$ ): 稀释率是变体积发酵过程的一个重要特征变量, 它表示发酵液体积变化的程度, 写成 $D = \frac{F}{V}$ , 即发酵过程某时刻的流加速率 $F$  ( $\text{L/h}$ ) 与该时的发酵液体积 $V$  ( $\text{L}$ ) 的比值。我们的研究表明, 在最佳发酵条件下, 要维持恒定的低糖浓度, 使糖浓度变化接近“0”, PI-3-2菌株赖氨酸分批发酵连续补糖体系的稀释率应控制一恒定值, 等于 $0.01\text{h}^{-1}$ 。

3. 流速方程: 在控制稀释率为恒定值的条件下, 推导流速方程如下

$$F = D \cdot V \quad (1)$$

$F$ 是流加速率(简称流速),  $D$ 是稀释率, 在我们的试验中 $D$ 为常数,  $V$ 是发酵液体积。对式(1)微分, 得

$$dF = D \cdot dV \quad (2)$$

另有等式

$$dV = F \cdot dt \quad (3)$$

$t$  ( $\text{h}$ ) 是流加进行的时间。式(3)代入式(2), 得微分方程

$$\frac{dF}{dt} - D \cdot F = 0 \quad (4)$$

解微分方程(4), 得方程解

$$F = C \cdot e^{D \cdot t} \quad (5)$$

式(5)为指数方程,  $C$ 是方程常数。该式即是我们所研究的PI-3-2菌株发酵过程中连续补糖的流速控制模式(即流速方程)在试验条件下, 求得 $D = 0.01\text{h}^{-1}$ ,  $C = 17.2$ , 该模式呈指数递增型。按该模式控制连续补糖速率, 可以维持我们的变体积发酵体系的糖浓度始终为一恒定的较低值。

## (二) 初糖浓度对比产酸速率 $q_p$ 的影响

初糖浓度分别为10.90、13.64与18.18%的一次投糖分批发酵试验表明,在较高初糖浓度时,增加初糖浓度并不能有效地提高产酸水平(表1)。为了研究初糖浓度对菌体产酸能力的影响,经过数

据处理求得上述不同情况下,表征菌体产酸活性的变量-菌体的“比产酸速率” $q_p$ 值,即发酵某时间的单位菌体产酸速率。 $q_p$ 是

$P$ 对 $t$ 一阶导数与 $X$ 的比值, $q_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$  (g/h·g),  $X$  (g):培养时间 $t$ (h)时的菌体总量;  $P$  (g):培养时间 $t$ 时的产酸总量。

表1 不同初糖浓度分批发酵的产酸水平

Table 1 Effect of initial glucose conc. on L-lysine fermentation

初糖浓度 Initial glucose conc. (%)	赖氨酸生成 L-lysine production (Lys·HCl mg/ml)	对葡萄糖转化率 Conversion rate of glucose to L-lysine (%)	周期 Fermentation period (h)	残糖浓度 Residual glucose conc. (%)
10.90	36.5	36.2	52	0.35
13.64	52.3	37.5	52	0.50
18.18	55.1	32.9	72	0.43

发酵培养基配方 Medium composition A, pH6.5, 30°C, 850rpm 通风比 Aeration rate 1:1 vvm

计算结果表明(图1),初糖浓度从10.90%增加到13.64%,发酵过程每一时间的菌体比产酸速率 $q_p$ 值都相应提高,最高值可增加0.37倍。说明初糖浓度在较低值表现为比产酸速率的限制因素,糖浓度的增加可以促进菌体的产酸活性。这是由于适度提高糖浓度有利于葡萄糖渗入胞内,提高代谢池的糖浓度,加速酶反应,而有利于产物的生成。但是,当糖浓度从13.64%增加到18.18%,相应培养时间的比产酸速率 $q_p$ 值普遍下降。这就说明,初糖浓度较高时,成为比产酸速率的抑制因素,抑制了菌体生成产物的活性。因为较高浓度的糖代谢中间产物可能引起产物合成酶系的抑制作用,在许多微生物发酵过程对此已有讨论<sup>[18]</sup>。而且高浓度底物又会增加培养基的渗透压,降低水活度,而影响膜透性<sup>[19]</sup>。加之,较高糖浓度的培养基在灭菌时,糖易被破坏并生成不利菌体生长或产酸的物质。因此,在一次投糖

的分批发酵中,企图通过增加初糖浓度来提高产酸水平,是有限度的,而连续补糖分批发酵方式则可以体现出一定的优越性。

## (三) 一次投糖与连续补糖的赖氨酸分批发酵表现产酸率 $y_p$ 的比较

为了避免高糖浓度对发酵的不利影响,我们采用了连续补糖分批培养方式:发酵总糖浓度18.18%,其中13.68%的糖量按指数递增型的流速连续补入罐内,补加的糖液中还含有与罐内初始培养基相同配比的其他营养物质,发酵体系稀释率为 $0.01h^{-1}$ ,以保持培养液中恒定的较低糖浓度。其结果与一次投糖的分批发酵比较,葡萄糖的批转化率得到明显提高,产酸水平相应增加(表2)。为了研究并比较高糖浓度发酵和补糖条件下低糖浓度发酵与葡萄糖批转化率的相互关系,有必要进行数据处理以求得表征菌体转化葡萄糖成赖氨酸能力的“表现产酸率” $Y_p$ 值,

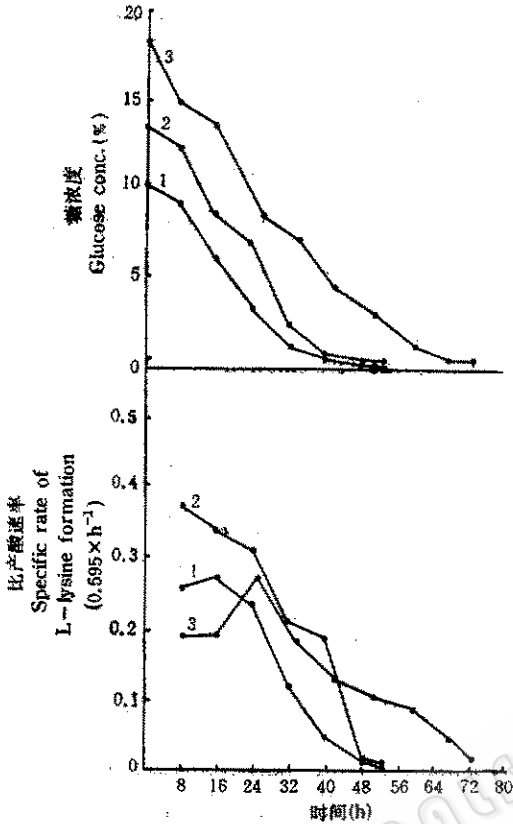


图1 不同初糖浓度发酵比产酸速率  $q_P$  的比较及糖浓度变化过程

Fig. 1 Effect of initial glucose conc. on specific rate of L-lysine formation,  $q_P$ , and the time course about glucose conc.

初糖浓度 Initial glucose conc. (%): 1. 10.90  
2. 13.64 3. 18.18

$Y_P$ 即发酵过程某时间, 菌体实际消耗的葡萄糖 $dS(g)$ 与菌体对外表现出的赖氨酸积累量 $dP(g)$ 之比值。 $Y_P$ 是 $P$ 对 $S$ 的一阶导数,

$$Y_P = \frac{dP}{dS}(g/g), S(g); \text{发酵时间 } t(h)$$

时, 发酵体系已消耗的总糖量;  $P(g)$ ; 发酵时间 $t(h)$ 时, 发酵体系所积累的赖氨酸总量; 而发酵的“批转化率”正是表观产酸率 $Y_P$ 对耗糖量 $S$ 积分值与耗糖总量的比值:

$$\text{批转化率}(\%) = \left( \int_{S_1}^{S_{11}} Y_P(S) \cdot dS \right) / (S_{11} - S_1) \quad (6)$$

式(6)中,  $S_1(g)$ : 发酵起始时的耗糖量;  $S_{11}(g)$ : 发酵终点时的耗糖量。

$Y_P$ 的计算结果表明了耗糖总量的前半部分的明显差异(图2)。前半部分糖发酵时, 连续补糖方式的表观产酸率值明显地高于一次投糖方式的值, 而后半部分糖发酵, 两种方式的表观产酸率值基本接近。这是由于连续补糖方式发酵, 所有的糖都是在低糖浓度状态下被菌体所消耗的, 而在一次投糖方式发酵中, 前半部分糖是在糖浓度为较高值状态下被菌体所消耗的。这说明了发酵体系的较高糖浓度会降

表2 一次投糖与连续补糖对产酸的影响

Table 2 Results of batch and fed-batch cultures

加糖方式 Addition of glucose	总糖浓度 Total glucose conc. (%)	赖氨酸生成 L-lysine production (Lys·HCl mg/ml)	对葡萄糖转化率 Conversion rate of glucose to L-lysine (%)	残糖浓度 Residual glucose conc. (%)	周期 Fermentation period (h)
一次投糖 batch	18.18	52.1	29.1	0.40	54
连续补糖 fed-batch	18.18	64.2	36.4	0.31	53.5
	22.73	73.3	34.06	0.35	73

发酵培养基配方 Medium composition B, 发酵前期pH Fermentation pH in the early part of the period 6.5, 发酵中后期pH Fermentation pH in the latter part of the period 7.2, 通风比 Aeration rate 1:1.75vvm, 30°C, 850rpm

低菌体积累赖氨酸的能力,使 $Y_P$ 值下降。

为了深入一步分析与讨论上述变量“表观产酸率” $Y_P$ 的意义,我们通过以下有关推导,提出并定义了“耗底物分数”和“底物消耗流”概念,来描述和度量菌体对底物的利用状况。在赖氨酸发酵中,主要底物葡萄糖是能量、碳源物质,它的消耗提供菌体、赖氨酸及其他物质的碳组分,同时也提供了菌体生长、赖氨酸生成,菌体“维持”的能量消耗<sup>[17,20]</sup>。在发酵过程的任何时间 $t$ (h),对于时间增量 $dt$ (h),相应葡萄糖消耗的增量 $dS$ (g) $dS$ 实际上分成三个途径被消耗,其中 $dS_1$ (g)部分消耗于菌体生长增量 $dX$ (g)的生成, $dS_2$ (g)部分耗于赖氨酸积累增量 $dP$ (g)的合成, $dS_3$ (g)部分是耗于菌体维持的需要。这里,菌体的维持以假设菌体生长、赖氨酸积累都停止时葡萄糖的消耗值来度量。我们由平衡式

$$dS = dS_1 + dS_2 + dS_3 \quad (7)$$

可得

$$1 = \frac{dS_1}{dS} + \frac{dS_2}{dS} + \frac{dS_3}{dS} \quad (8)$$

把式(8)写成

$$1 = a_1 + a_2 + a_3 \quad (9)$$

这样,我们定义“耗底物分数” $a$ ( $0 \leq a \leq 1$ ),分别有:

$$\text{“菌体生长耗底物分数 } a_1 \text{” } a_1 = \frac{dS_1}{dS} \quad (10)$$

$$\text{“产物积累耗底物分数 } a_2 \text{” } a_2 = \frac{dS_2}{dS} \quad (11)$$

$$\text{“维持需要耗底物分数 } a_3 \text{” } a_3 = \frac{dS_3}{dS} \quad (12)$$

“耗底物分数”描述了底物消耗的分配情况,反映并度量生成菌体的酶系统与生成产物的酶系统竞争底物能力的大小。

我们可进一步推导

$$a_1 = \frac{dS_1}{dS} = \left( \frac{dX}{y_X} \right) \cdot \frac{1}{dS} = \frac{dX}{dS} \cdot \frac{1}{y_X} = Y_X \cdot \frac{1}{y_X} \quad (13)$$

$$a_2 = \frac{dS_2}{dS} = \left( \frac{dP}{y_P} \right) \cdot \frac{1}{dS} = \frac{dP}{dS} \cdot \frac{1}{y_P} = Y_P \cdot \frac{1}{y_P} \quad (14)$$

$$Y_P = \frac{1}{y_P} \quad (14)$$

其中 $Y_X$ (g/g), $Y_P$ (g/g),分别为“表观菌体得率”与“表观产酸率”,分别为菌体生长总量 $X$ (g),产物积累总量 $P$ (g)分别对耗于菌体生成的葡萄糖量 $S_1$ (g)、耗于产物积累的葡萄糖量 $S_2$ (g)的一阶导数,写为

$$Y_X = \frac{dX}{dS} \quad (15)$$

$$Y_P = \frac{dP}{dS} \quad (16)$$

而 $y_X$ (g/g), $y_P$ (g/g)则分别为“真正菌体得率”与“真正产酸率”,它们是菌体生成总量 $X$ (g)、产物积累总量 $P$ (g)分别对耗于菌体生成的葡萄糖量 $S_1$ (g)、耗于产物积累的葡萄糖量 $S_2$ (g)的一阶导数,写为

$$y_X = \frac{dX}{dS_1} \quad (17)$$

$$y_P = \frac{dP}{dS_2} \quad (18)$$

“真正菌体得率” $y_X$ 主要描述了在发酵某时间,菌体转化底物成菌体时所遵循的某生化反应途径及过程的反应效率,其值等于所涉及的各项反应或过程效率的乘积,而“真正产酸率” $y_P$ 则相应地描述了发酵某时间,菌体转化底物成产物所遵循的某生化反应途径及过程的反应效率,其值等于

所涉及的各步反应或过程效率的乘积。它们都是发酵的时间变量。把式(13)

(14) 写成

$$y_x = a_1 \cdot y_P \quad (19)$$

$$Y_P = a_2 \cdot y_P \quad (20)$$

所得式(19)、(20)进一步表明“表观得率” $Y$  ( $Y_x$ 或 $Y_P$ )是由两个因子构成:一是竞争因子,即“耗底物分数” $a$  ( $a_1$ 或 $a_2$ ),二是效率因子,即“真正得率” $y$  ( $y_x$ 或 $y_P$ ), $Y$ 是这两个因子的乘积。所以,菌体生成或产物生成的“表观得率”高低既要依赖于该酶系统竞争底物的能力(反映在 $a$ 值),又要取决于该酶系统生物合成途径的反应效率(反映在 $y$ 值)。

由上述概念,我们把底物消耗的相互关系表示为“底物消耗流”,见图3。它定量反映菌体对底物消耗的分配及流向。

所以,可以推测采用连续补糖方式使赖氨酸发酵始终在较低糖浓度下进行,可以提高赖氨酸合成酶系统竞争底物的能力,使耗底物分数 $a_2$ 值增大,有更多量的葡萄糖被转化为赖氨酸;或进一步可能导致合成途径合理地改变使反应效率提高,真正得率 $y_P$ 值得以增大,同样量的葡萄糖可转化成更多量的赖氨酸。综合结果就表现为图2所示的表观产酸率 $Y_P$ 值的提高。根据积分式(6),批转化率也就因 $Y_P$ 的增加而相应提高。我们的试验结果还进一步表明,采用同样的连续补糖方法进行总糖浓度为22.73%的发酵,产酸水平可继续提高达73.3mg/ml(表2)。

在以上分析与讨论的基础上,可以对pI-3-2菌株合成赖氨酸的酶反应途径及其调控方式进行相应的研究,这将有助于对上述分析进行详尽的生物化学与细胞生物学的阐述。

#### (四) 发酵过程中控制不同 pH 值对比产酸速率 $g_t$ 的影响

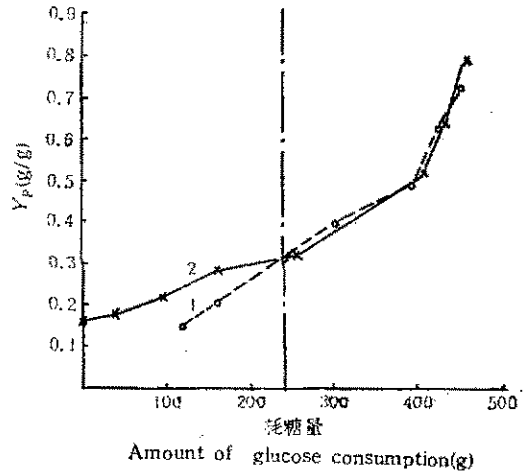


图2 一次投糖和连续补糖分批发酵的表观产酸率 $Y_P$

Fig. 2 Comparison of apparent conversion rate of glucose to L-lysine in batch and fed-batch cultures

- 1. 一次投糖分批发酵 Batch
  - 2. 连续补糖分批发酵 Fed-batch
- $Y_P$ : 表观产酸率

Apparent conversion rate of glucose to L-lysine

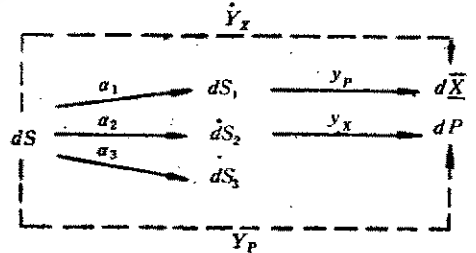


图3 底物消耗流图示

Fig. 3 Substrate consumption stream

竞争因子 Competition factor  $a_1, a_2, a_3$

效率因子 Efficiency factor  $y_x, y_P$

为了研究连续补糖的赖氨酸分批发酵过程中菌体生长及赖氨酸积累能力的变化特征,控制更佳发酵条件,我们求得并分析了发酵过程不同时间的比生长速率 $\mu$ ,比产酸速率 $q_P$ 值。 $\mu$ 与 $q_P$ 分别是发酵过程某时间 $t$ (h),菌体的增长速率 $\frac{dX}{dt}$ (g/h)、

赖氨酸积累的增长速率 $\frac{dP}{dt}$ (g/h)与该时的菌体总量 $X$ (g)之比值,都是对时间的一

阶导数,为 $\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} (h^{-1})$ ,  $q_p = \frac{1}{X} \cdot$

$\frac{dP}{dt} (h^{-1})$ , 分别表征了单位菌体在该时的生长活性及积累赖氨酸的活性。分析结果表明,比生长速率 $\mu$ 值在培养 8h 前有高峰区,随后明显下降;而比产酸速率 $q_p$ 值在 18—40h 出现高峰区(图 4)。所以该发酵属于发酵动力学分类<sup>[21-24]</sup>的 Gaden 第 II 型,它在发酵前期具有较高的生长活力,以生长为主,在中后期具有较高的产物生成活力,以产物积累为主。这反映出 PI-3-2 菌株群体的生长和产酸的两个酶系统达到最大活性时的先后顺序,两个峰

值区的时间位差程度又显示该发酵的产物积累过程与菌体生长过程仅有一定程度的相关性,它不同于 Gaden 第 I 型发酵,两个过程直接相关,也不同于 Gaden 第 III 型发酵,两个过程不相关。对这一类型发酵,应该在中后期控制对产酸有利的外部条件,发挥菌体在中后期积累赖氨酸的潜在优势,同时所控制的条件又不能严重影响菌体的生长。

为此,我们控制该发酵的 pH 值,前期为 6.5,中后期提高到 7.2(提高时发酵体系已积累有一定量的菌体),产酸水平可从 58.5mg/ml 提高到 64.2mg/ml,菌体生长量、发酵周期相近(表 3)。

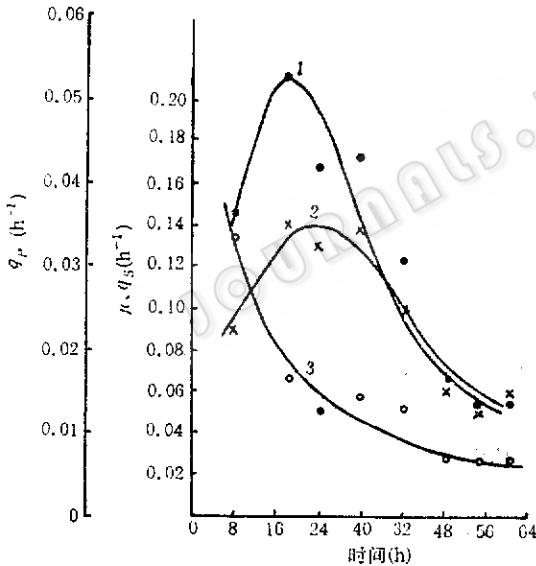


图 4 连续补糖的赖氨酸分批发酵动力学类型分析

Fig. 4 The kinetic kind of L-lysine fermentation in fed-batch culture

- 1.  $q_p$ : 比产酸速率 Specific rate of L-lysine formation
- 2.  $q_s$ : 比耗糖速率 Specific rate of glucose consumption
- 3.  $\mu$ : 比生长速率 Specific rate of growth

计算并比较了这两种条件下菌体比产酸速率 $q_p$ 值,数据表明 pH7.2 的比产酸速率 $g_p$ 值高于 pH6.5 的 $q_p$ 值(图 5),证实了菌体在中后期产酸的潜在优势已被调动而表

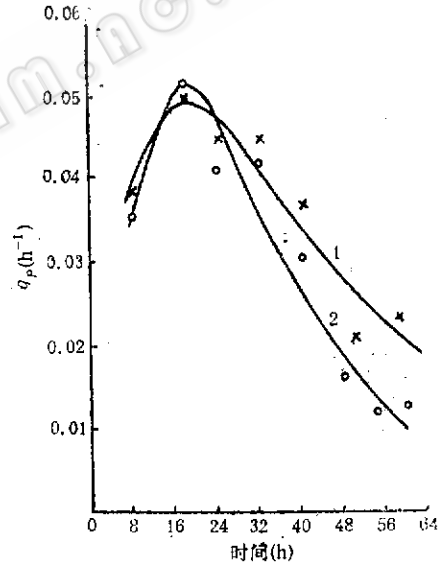


图 5 发酵中后期控制不同 pH 值对比产酸速率的影响

Fig. 5 Effect of fermentation pH in the latter part of the period on specific rate of L-lysine formation

- 1. pH7.2 2. pH6.5  $q_p$ : 比产酸速率 Specific rate of L-lysine formation

现出较高的产酸活性,也说明 pH7.2 较 pH 6.5 更接近于 PI-3-2 菌株赖氨酸合成酶系的最适 pH 值。

表3 在发酵中后期控制不同pH值对产酸的影响

Table 3 Effect of fermentation pH in the latter part of the period on L-lysine formation

发酵中后期pH pH in the latter part of the period	赖氨酸生成 L-lysine production (Lys·HCl mg/ml)	对葡萄糖转化率 Conversion rate of glucose to L-lysine (%)	发酵终点菌体生长量 Growth at the end of fermentation period ( $A_{250} \times 25$ )	残糖浓度 Residual glucose conc. (%)	周期 Fermentation period (h)
6.5	58.5	34.75	1.21	0.38	60
7.2	64.2	36.40	1.20	0.31	58.5

发酵培养基配方 Medium composition B, 发酵前期pH Fermentation pH in the early part of the period 6.5, 通风比 Aeration rate 1:1.75vvm, 30°C, 850rpm

### ● 考 文 献

- (1) Yamada, K., *Biotech. Bioeng.*, 16:1563, 1977.
- (2) 中国科学院微生物研究所, *微生物学通报*, 7:(1)26, 1980.
- (3) 陈琦等, *微生物学通报*, 9:(2)61, 1982.
- (4) Nishio, N. et. al.: *J. Ferment. Technol.*, 55:(2)151, 1977.
- (5) Yamane, T. et. al.: *ibid.*, 55:(2)156, 1977.
- (6) Yamane, T. et. al.: *ibid.*, 55:(3)233, 1977.
- (7) Yamane, T., et. al.: *ibid.*, 55:380, 1977.
- (8) Ohno, T. et. al.: *Biotech. Bioeng.*, 18:847, 1976.
- (9) Yano, T. et. al.: *J. Ferment. Technol.* 56:416, 1978.
- (10) 广东省科技情报所, 与日本东丽公司进行L-Lys技术座谈资料, 1971, 内部资料.
- (11) Matelova, V. et. al.: *Appl. Microbiol.*, 23:669, 1972.
- (12) Whiteker, A.: *Process Biochem.*, 15:10, 1980.
- (13) Макаревич, В.Г.: *Ангиохики*, 21:205, 1976
- (14) Yamamoto, M.: *J. Ferm. Tech.*, 50:876, 1972.
- (15) Sumner, J.B.: *J. Biol. Chem.*, 63:393, 1925.
- (16) Kono, T. et. al.: *Biotech. Bioeng.* 11:293, 1969.
- (17) Pirt, S.J.: *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, pp.66—68, p.221, pp.217—218 1975.
- (18) Andrews, J.F.: *Biotech. Bioeng.*, 10:707, 1968.
- (19) 沈阳味精厂: 提高谷氨酸发酵产酸率的研究, 1979, 内部资料.
- (20) Abbott, B.J. et. al.: *Biotech. Bioeng.*, 15:(1)117, 1973.
- (21) Maxon, N.D.: *Appl. Microbiol.*, 3:110, 1955.
- (22) Deindorfer, F.H.: *Advances in Applied Microbiology*.
- (23) Aiba, S. et. al.: *Biochemical Engineering*, Second Edition, pp.110—115, 1973.
- (24) Gaden, E.L. Jr.: *Chem. and Ind.*, p. 154, 1955.



# STUDY ON THE FED-BATCH CULTURE FOR L-LYSINE PRODUCTION

Gong Jianhua Chen Qi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The fed-batch culture for L-lysine production by *Corynebacterium crenatum* L-lysine-producing mutant PI-3-2(Hse<sup>-</sup>, AEC') was studied in an auto-controlled 8L. laboratory fermentor. It was continuously fed with glucose solution according to an exponential equation with a constant dilution rate to supply carbon-source.

The results of the batch culture with the media containing 10.90, 13.64 and 18.18% glucose indicated that higher glucose conc. in culture broth inhibited the ability of the mutant for L-lysine formation and decreased the specific rate of L-lysine formation,  $q_p$ , and also, in turn, the productivity of the fermentation. Whereas it was found that in the fed-batch culture with continuous glucose feed the competitive ability of the mutant for substrate was enhanced or the metabolism pathway of the mutant might be reasonably changed, thus the fraction of substrate consumption for L-lysine formation,  $\alpha_2$ , or the true conversion rate of glucose to L-lysine,  $y_p$ , was increased, as a result the apparent conversion rate of glucose to L-lysine increased.

It was also showed that the culture pH in the latter part of the fermentation period in this fed-batch culture, which belonged to Gaden II fermentation, being controlled at a certain value facilitating the formation of L-lysine, the specific rate of L-lysine formation,  $q_p$ , increased, so more L-lysine was accumulated in the broth.

Under the controlled conditions the conc. of L-lysine accumulated in the culture broth increased from 47 mg/ml to 64.2 mg/ml with 18.18% total glucose conc., and to 73.3 mg/ml with 22.73% total glucose conc.

## Key words

L-lysine, fed-batch culture, an exponential equation, Gaden II fermentation