

# 离子交换法在 L-精氨酸发酵生产提取工艺中的应用研究

张伟民 沈 铭 鄢春红\* 童绚霞

(湖南省株洲制药厂科研所, 株洲 412000)

丁久元 龚建华

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 在发酵生产 L-精氨酸的提取工艺中, 对提取总收率影响较大的离子交换工艺进行了研究。结果表明, 用国产强酸性 001×7 树脂对发酵液中的 L-精氨酸进行动态交换吸附, 当上柱流速控制在 1/50vvm 条件下, 其交换量为 1.135 meq/ml 湿树脂。用 2.5 mol/L 氨水洗脱, 流速控制在 1/50vvm 时, 其洗脱效果最好。用国产 201×4 树脂进行脱色, 每 10 ml 树脂可脱色 160 ml 以上的洗脱液, 透光度大于 90%, 几乎不发生交换吸附 L-精氨酸的现象。离子交换工序收率大于 95%。

**关键词** L-精氨酸; 树脂; 离子交换

\* 鄢春红同志主持全部化验工作, 刘增强总工程师关心试验工作, 张怡同志参加了部份试验, 一并致谢。

L-精氨酸是合成蛋白质和肌酸的重要原料,是人和动物体中的半必需氨基酸,在医药和食品工业上具有广泛用途。国内目前仍用天然蛋白水解法生产少量的L-精氨酸,此法操作费时,收率低,不适合大规模生产<sup>[1]</sup>。我厂自引进中国科学院微生物研究所L-精氨酸产生菌进行发酵生产试验,在所引进离子交换工艺的基础上,结合生产实践,对树脂的离子交换单元操作进行了研究,现将结果报道如下。

## 材料与方 法

### (一) 菌株

L-精氨酸产生菌 (*Corynebacterium creatum*) 971.1 (SG<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>)。

### (二) 发酵条件

1. 液体种子培养基(%): 葡萄糖 3.0, 尿素 0.15, 玉米浆 2.0, 豆饼水解物 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, pH 7.0—7.5, 经 50 L 和 500 L 罐二级种子扩大。培养温度 30 ± 0.5℃, 培养时间为一级种子液 15 小时, 二级种子液 8 小时。

2. 发酵培养基(%): 葡萄糖 12.0, 尿素 0.1, 玉米浆 2.5, 豆饼水解物 0.4, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04, 泡敌 0.014, pH 7.0—7.5, 5000 L 罐发酵培养, 接种量 15%, 氨水流加控制 pH 不低于 6.8, 培养温度 30 ± 0.5℃, 搅拌转速 300 r/min, 培养周期 85 小时。

### (三) 离子交换试验条件

1. 发酵液预处理: 放罐发酵液用浓硫酸调 pH 2.5—3.0, 加入 0.2% 草酸搅拌 15 分钟。加入 2.0 mol/L 氨水回调至 pH 4.0, 搅拌 30 分钟, 加压过滤, 滤液作为试验材料至低温中贮存。

2. 树脂: 强酸性 001 × 7 树脂, 强碱性 201 × 4 树脂(上海树脂厂生产)。

3. 试验用离子交换柱: 柱 I: φ60 × 360 mm; 柱 II: φ600 × 2400 mm。

### (四) 分析方法

1. L-精氨酸含量测定: 坂口改良法<sup>[2]</sup>。

2. 透光度: 721 型分光光度计, 波长 480

nm, 光程 3 cm。用蒸馏水作空白对照。

3. 成品检验: USPXXII 版标准, 湘卫药标字(91)-07-021 标准。

## 结果与讨论

### (一) 001 × 7 对 L-精氨酸的交换吸附能力

1. 树脂的离子交换效果: 取经预处理的 L-精氨酸含量为 29.7 mg/ml 的发酵滤液, 在处理好 的 001 × 7 H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型树脂各 300 ml 的柱 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 中, 采用动态正交换方式<sup>[3]</sup>, 控制流速为 1/50 vvm。试验结果表明(表 1), H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001 × 7 树脂在交换量<sup>[4,5]</sup>为 1.135 meq/ml 时 L-精氨酸损失为 0; 当达到 1.700 meq/ml 时, 损失都在 10% 以上; 二者表现出相似的交换能力, 其中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型树脂交换吸附的效果略好。当上柱流速控制为 1/50 vvm 时, H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001 × 7 树脂的交换量为 1.135 meq/ml, 可以避免提取中 L-精氨酸的损失。考虑到树脂再次利用时工艺上的方便, 采用 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001 × 7 树脂为宜。

2. 发酵液中其他因素对提取效果的影响: 为了考察发酵液中其它离子和分子对离子交换法提取 L-精氨酸的干扰, 分别用发酵滤液和无离子水溶解 L-精氨酸成品, 参照发酵滤液 L-精氨酸浓度配制成相应浓度的两份溶液, 同等工艺条件上柱进行对比试验。从表 2 可看出, 发酵滤液上柱所得到的交换量明显小于成品 L-精氨酸所配溶液上柱的交换量。这说明的确存在着发酵滤液中其它离子和分子对离子交换提取 L-精氨酸的干扰现象。从数据上分析, 约有 60% 的交换量用于交换吸附发酵滤液中的其它离子和分子, 可见其在提取 L-精氨酸时对交换容量影响较大。

### (二) 洗脱情况的考察

1. 洗脱剂浓度及其流速对洗脱效果的影响: 离子交换工序是离子交换法提取 L-精氨酸的关键工序, 饱和树脂的洗脱效果对总收率的影响很大。取同批号 L-精氨酸浓度为 29.7 mg/ml 的发酵滤液做为上柱液, 选用柱 I 001 × 7 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型树脂装量为 300 ml, 上柱后所得饱和

表1 001×7树脂对L-精氨酸交换吸附效果

交换量 (meq/ml 湿树脂)	上柱 L-精氨酸总量 (g)	柱 I <sub>1</sub> : H <sup>+</sup> 型 001×7 树脂柱		柱 I <sub>2</sub> : NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 型 001×7 树脂柱	
		废液损失 (g)	损失百分率* (%)	废液损失 (g)	损失百分率 (%)
0.795	20.79	0	0	0	0
1.135	29.70	0	0	0	0
1.700	44.55	7.25	16.27	5.40	12.12
2.270	59.40	12.96	34.02	11.70	28.79

\* 以收集废液体积为准,每隔一相应体积取废液收集样测 L-精氨酸含量,以计算出废液损失 L-精氨酸克数,并由累加损失值除以相应上柱液中 L-精氨酸的总量计算出损失百分率。

表2 发酵滤液中其它离子和分子对 001×7 树脂吸附 L-精氨酸的干扰

交换量 (meq/ml 湿树脂)	上柱 L-精氨酸总量 (g)	柱 I <sub>1</sub> : 成品 L-精氨酸所配上柱液		柱 I <sub>2</sub> : 发酵滤液	
		废液损失 (g)	损失百分率 (%)	废液损失 (g)	损失百分率 (%)
1.135	29.70	0	0	0	0
1.700	44.55	0	0	5.70	12.79
2.270	59.40	0	0	12.10	29.96
2.838	74.25	0.80	1.08	—	—
3.401	89.10	12.20	14.59	—	—

① 上柱液 L-精氨酸浓度均为 29.7mg/ml,柱 I<sub>1</sub> 和柱 I<sub>2</sub> 树脂装量均为 300ml,试验所用树脂为同批号处理的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂。

② 柱 I<sub>1</sub> 和柱 I<sub>2</sub> 均采用动态正交换方式,上柱流速取 1/50vvm。

③ 废液损失克数和损失百分率计算方法同表 1 注。

树脂经处理后,分别用 1.0、2.0、2.5 和 3.0mol/L 的氨水洗脱,流速分别控制为 1/25、1/50 和 1% vvm。从所得结果(图 1)看:洗脱高峰主要集中在前部 1.5—2 倍树脂体积之内。流速由 1/25 vvm 降至 1% vvm,洗脱高峰逐渐集

中。峰高逐渐增大,且差值逐渐缩小。流速 1/25 vvm 时,用各浓度氨水洗脱都存在不同程度的拖尾现象。比较 1/50 和 1% vvm 流速的洗脱效果相似。且随着洗脱用氨水浓度的增大,洗脱效果更为接近。3.0mol/L 和 2.5mol/L 氨水洗脱效果类似。综合洗脱曲线的收敛程度,洗脱周期以及与后工序的连接等多方面因素,洗脱用氨水浓度以 2.5mol/L,流速控制以 1/50 vvm 为好,在此工艺条件下,可控制洗脱液体积为树脂体积的 3.5 倍量,洗脱终点小于 2.0 mg/ml,收率大于 98%。

2. H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 饱和树脂洗脱效果的比较:分别用预处理好的 H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂装入柱 I<sub>1</sub> 和柱 I<sub>2</sub> 内,装量为 300ml,上柱流速控制为 1/50vvm,所得饱和树脂用无离子水洗净后,用 2.5mol/L 氨水洗脱,流速控制为 1/50vvm。由图 2 可见,二者洗脱效果类似,洗脱高峰都位于树脂 2 倍体积之内,都可在 3.5 倍量树脂体积之内洗脱完毕,收率大

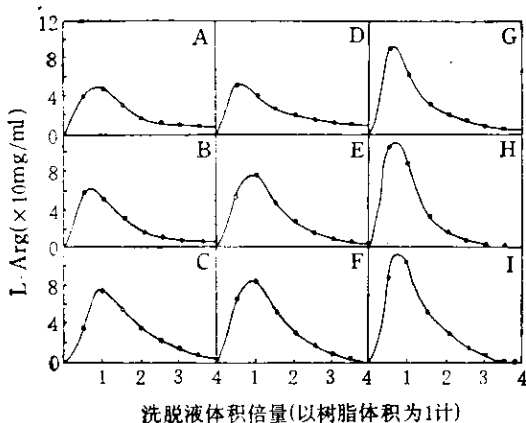


图1 不同浓度氨水及其流速所得的洗脱曲线  
洗脱液氨水浓度 (mol/L): A、B、C 为 1.0, D、E、F 为 2.0, G、H、I 为 2.5; 洗脱流速 (vvm): A、D、G 为 1/25, B、E、H 为 1/50, C、F、I 为 1%

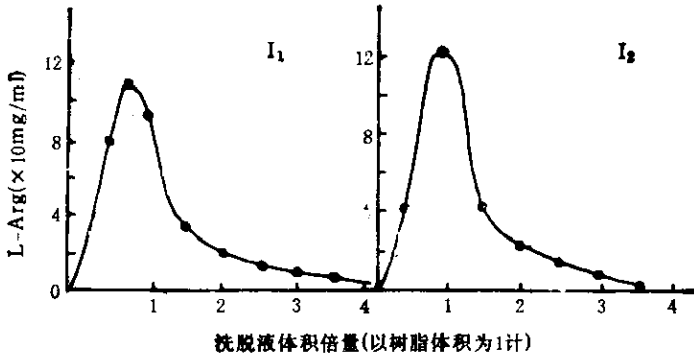


图2 H<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型001×7树脂所得的饱和树脂的洗脱曲线  
上柱发酵滤液L-精氨酸浓度为29.7mg/ml; I<sub>1</sub>为H<sup>+</sup>型, I<sub>2</sub>为NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型

表3 脱色液体积与透光度的关系

脱色液体积 ml (按顺序)		200	200	200	200	200	200	200	200
透光度 (%)	柱 I <sub>1</sub>	96.0	96.7	95.3	93.0	91.4	93.7	93.0	92.7
	柱 I <sub>2</sub>	97.3	97.3	96.5	94.7	92.3	92.1	91.4	92.2

柱 I<sub>1</sub> 为 H<sup>+</sup> 型 001×7 树脂经上柱饱和, 洗脱后得到的洗脱液流经的脱色柱; 柱 I<sub>2</sub> 为 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂经上述过程后得到的洗脱液流经的脱色柱。柱 I<sub>1</sub> 和柱 I<sub>2</sub> 中分别装入预处理好的 201×4 树脂各 100ml。流速控制为 1/25vvm, 脱色液体积以出口体积为准, 每 200ml 为一份, 测定其透光度。

于 98%。值得注意的是, 当分别收集二者的洗脱液, 从其透光度上看, 由 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型树脂所得到的洗脱液为 22.3%; H<sup>+</sup> 型树脂洗脱液为 14.5%。这说明 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂用于 L-精氨酸交换吸附所得的饱和树脂, 在洗脱时洗下的色素物质较少。从树脂脱色的意义上讲, 洗脱液的透光度高, 势必对树脂脱色效果产生积极的意义。

从以上试验可看出, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型较 H<sup>+</sup> 型 001×7 树脂提取 L-精氨酸过程中, 具有明显的优势: ① 简化了工艺, 缩短了提取周期。② 使提取物更加纯净, 保证了产品质量。③ 无需花费大量的酸碱对树脂进行再生处理, 大大降低了提取成本。

### (三) 树脂脱色

L-精氨酸和其它氨基酸一样在水溶液状态下呈偶极离子的形式存在, 环境中的 pH 值和离子的存在形式与树脂的脱色效果有密切的关系。选用常规 201×4 树脂做为脱色树脂, 对用 2.5mol/L 氨水洗脱所得的洗脱液进行树脂

脱色试验。取处理好的 201×4 树脂 100ml 装入柱 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 中, 通入由 H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂所得到的洗脱液, 透光度分别为 20.3% 和 41.0%。从表 3 可见, 脱色液体积为树脂体积 16 倍时, 二者的透光度都大于 90%, 收率计算大于 99%。这说明 201×4 树脂对 H<sup>+</sup> 型和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂交换吸附、洗脱等步骤所得到的洗脱液脱色, 其效果没有区别; 从收率上看, 201×4 树脂脱色效果理想, 几乎不存在碱性树脂对 L-精氨酸的交换吸附现象。

### (四) L-精氨酸离子交换工艺

放罐发酵液经预处理后得到的发酵滤液, 采用动态正交换方式上 001×7 树脂柱, 得到的饱和树脂经无离子水漂洗后, 用 2.5mol/L 氨水洗脱, 所得到的洗脱液串柱通入 201×4 树脂柱脱色, 其脱色液透光度大于 90%。所得脱色液转入下部提取工序。

按此提取工艺, 其试验用柱为柱 II, 交换吸附柱的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型 001×7 树脂装量 500L, 脱色柱 201×4 树脂装量为 150L。连续 5 批扩大

试验, 离子交换单元操作的平均收率由原来的79% 提高到95.4%, 透光度大于90%。转入后工序提取得到的5批成品, 其质量全部达到USPXXII 版标准和日本味之素标准及湘卫药标字(91)-07-021标准。

采用001 × 7树脂作为L-精氨酸的交换吸附树脂, 其中有60%的树脂交换量受到其它离子和分子的干扰, 应对L-精氨酸交换吸附树

脂的选型做进一步的工作。

### 参 考 文 献

1. 路志强、龚建华等: 微生物学报, 28(2): 131—135, 1988。
2. Rosenberg H et al.: *Biochem. J.*, 63: 153, 1956。
3. 天津轻工业学院等著: 氨基酸工艺学, 第293页, 轻工业出版社, 1986年。
4. 钱庭宝: 离子交换剂应用技术, 天津科学技术出版社, 1984年。
5. 夏笃林: 离子交换树脂, 化学工业出版社, 北京, 1983年。

## EXTRACTION OF L-ARGININE FROM FERMENTATION BROTH BY ION-EXCHANGE PROCESS

Zhang Weimin Shen Ming Yan Chunhong Tong Xuanxia

(Institute of Zhuzhou Pharmaceutical Factory, Hunan 412000)

Ding Jiuyuan Gong Jianhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The study showed that the L-arginine-adsorbing capacity of strong-acidic resin 001 × 7 was 1.135 meq per ml of wet resin by controlling the flow rate of the broth at 1/52 vvm, and the efficiency of the elution was higher by using ammonia water as an eluent at the flow rate of 1/50 vvm. About 160 ml of the above eluant was decolorized with 10 ml of 201 × 4 resin, the transparance of the decolorized eluant was over 90%, and no adsorption of L-arginine by the 201 × 4 resin was observed. Under the controlled conditions, the extraction yield of L-arginine reached over 95%.

**Key words** L-arginine; Ion-exchange process