文章编号:1673-1689(2008)05-0033-06

填充床反应器中固定化假单胞菌细胞连续制备 L-瓜氨酸

郑 璞[1,2], 倪 晔[1,2], 张 文[1,2], 钱嘉南[1,2], 孙志浩*[1,2]
(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 对实验室筛选的产精氨酸脱亚胺酶的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)进行了固定化,以及对固定化细胞转化 L-精氨酸生产 L-瓜氨酸进行了研究。比较 4 种不同固定化方法,确定卡拉胶包埋结合戊二醛后处理为假单胞菌的细胞固定化方法。固定化反应的最适 pH 值为 6.5,细胞固定化后细胞精氨酸脱亚胺酶的热稳定性增加。在 50 mm×240 mm 固定填充床反应器中,底物浓度为 0.5 mol/L L-精氨酸盐酸盐,pH 值 6.5,温度 37 ℃,稀释速率为 0.147/h 的条件下,连续运转 54 d,固定化细胞对底物的摩尔转化率在 95%以上,平均生产强度 0.010 8 g/(h·g)(每单位质量的固定化细胞每小时生产的瓜氨酸质量)。转化液经 732 阳离子树脂吸附,氨水洗脱,及浓缩、结晶,得到纯度为 99%的 L-瓜氨酸晶体,提取总收率约为 87%。

关键词: L-瓜氨酸; 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.); 固定化细胞; 填充床反应器
中图分类号:Q 815; Q 939.9 **文献标识码**: A

Continuous Production of L-Citrulline by Immobilized *Pseudomonas* sp. Cells in Packed Bed Reactor

ZHENG Pu[1,2], NI Ye[1,2], ZHANG Wen[1,2], QIAN Jia-nan[1,2], SUN Zhi-hao*[1,2]
(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Preparation of L-citrulline from L-arginine by the immobilization of *Pseudomonas sp*, which was isolated by our laboratory, was studied in this manuscript. Entrapment with L-carrageenan followed by glutaraldehyde treatment was the best among four of immobilization methods. The optimal pH for conversion reaction with immobilized cells was 6.5. The thermostability of L-arginine deiminase was improved after immobilization. Using a column (50×240) packed with the immobilized cells and 0.5mol/L L-arginine hydrochloride (pH6.5) at dilution rate of 0.147/h and 37 ℃, the conversion was continuously operated for 54 days. The mol conversion yields were above 95%, and the average productivity of the immobilized cells was 0.0108 g/(h·g). Then the effluent was adsorbed by resin 732, eluted with 5% $NH_3 \cdot H_2O$,

收稿日期:2008-08-25.
基金项目:国家 973 计划项目(2003CB716008);长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0532).
作者简介: 郑璞(1966-),女,浙江金华人,工学硕士,副研究员.
*通讯作者: 孙志浩(1941-),男,江苏无锡人,教授,博士生导师,主要从事发酵工程和生物催化.
Email:sunw@public1.wx.js.cn

万方数据

and concentrated by crystallization. Finally the L-citulline crystal with purity of 99% was obtained. The recovery rate of entire extraction process was about 87%.

Key words: L-citulline; *Pseudomonas* sp.; Immobilized cells; Packed bed reactor (PBR)

L-瓜氨酸为一种非蛋白质氨基酸，是人体尿素循环的一个重要中间代谢物，具有多种生理功能。在体内L-瓜氨酸可以转化成鸟氨酸，后者有助于促进成长激素的分泌，增强肌肉合成和提高基础代谢及预防肥胖。在肝脏中瓜氨酸，鸟氨酸可促进鸟氨酸循环而将体内由氨基酸代谢所产生的氨转化为尿素而从肾脏派出，具有护肝，预防老年痴呆，治疗肝昏迷等作用。在人体肠道中L-瓜氨酸通过谷氨酸-鸟氨酸途径代谢合成，因此可作为检验小肠移植时异体排斥效应程度的指示剂。瓜氨酸还与体内一氧化氮的合成相关，有助于扩张血管，抑制动脉硬化，帮助改善脑细胞记忆和增加流入阴茎海绵体内的血液量，帮助改善男性性功能的作用。L-瓜氨酸与精氨酸有着相似的结构，对体内自由基，例如羟基表现出高度的活性，可以保护DNA免受羟自由基的氧化，可作为一种天然高效的新抗氧化剂。此外，瓜氨酸的衍生物抗环瓜氨酸肽(cycli citrullinated peptide CCP)是关节炎诊断因子的高特异性抗体，可作为检测关节炎的重要指标[1-4]。因此，L-瓜氨酸在保健食品、化妆品和医药品中具有广泛的应用前景。

L-瓜氨酸最早由右贺太郎等从西瓜榨汁中分离得到。目前的生产方法有化学合成法，发酵法与酶法。化学法虽然存在产品光学纯度与环境污染的问题，但仍是目前工业化生产的主要方法[5,6]。发酵法生产L-瓜氨酸水平目前还较低，日本味之素公司的Okumura等[7]用枯草芽孢杆菌Bacillus subtilis ATCC 15563，以葡萄糖为原料发酵72 h积累瓜氨酸1.2 g/L。日本协和发酵工业公司用石蜡节杆菌*Arthrobacter paraffineus*精氨酸的突变株，以10～25碳的直链或支链烃类作为主要碳源，发酵72 h产瓜氨酸25.9g/L。酶法是利用微生物产生的精氨酸分解酶或酶系(如精氨酸脱亚氨基酶等)，以破碎、游离或固定化细胞的形式，以精氨酸或其盐类为底物生产瓜氨酸，产量较高。采用的微生物有：粪链球菌*Streptococcus faecalis*，产气荚膜梭菌*Clostridium perfringens*，嗜血微球菌*Micrococcus pygenes*，绿脓杆菌*Bacillus pyocyaneus*，恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida*，面包酵母*Bakers yeast*等[8-10]。

1971年Kakimoto首次用产精氨酸脱亚氨基酶的恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida*游离菌体转化L-精氨酸盐酸盐生产L-瓜氨酸。1973年Yamamoto等采用聚丙烯酰胺凝胶对上述恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida* ATCC4359细胞进行固定化，并在填充柱中进行转化反应，连续稳定生产可以达3周，固定化细胞的热稳定性比游离细胞明显提高[11]。国内曹瑜等[4]利用粪链球菌*Streptococcus faecalis* NJ402游离细胞的精氨酸脱亚胺酶，进行了酶转化L-精氨酸制备L-瓜氨酸的工艺条件研究。张鹏等[12]运用海藻酸钠包埋法固定化粪链球菌*Streptococcus faecalis* CGMCC1866细胞生产L-瓜氨酸，每升反应液产112-165 g/L L-瓜氨酸，固定化细胞使用寿命960 h。本研究室筛选到产精氨酸脱亚胺酶酶菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp. 901)，该菌株能以精氨酸为底物，产生L-瓜氨酸和NH_3(图1)。本文对*Pseudomonas* sp. 901细胞固定化方法及固定化细胞转化生产L-瓜氨酸进行了研究。

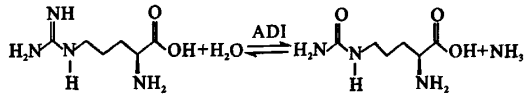

图1 精氨酸脱亚胺酶水解精氨酸生产瓜氨酸

Fig. 1 Hydrolyzation of L-Arg to L-Cit by ADI

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 假单胞菌*Pseudomonas* sp. 901，由江南大学实验室保藏。

1.1.2 试剂与仪器 卡拉胶：汕头市捷成食品添加剂有限公司产品；L-精氨酸盐酸盐：上海耕奔生物技术有限公司生产；L-瓜氨酸：BR，上海化学试剂公司生产；海藻酸钠、明胶等其他试剂与原材料均为市售。

隔水式电热恒温培养箱：上海跃进医疗器械厂制造；HYG-Ⅱ回转式恒温调速摇瓶柜：上海欣蕊自动化设备有限公司生产；721分光光度计：上海精密科学仪器有限公司生产；SCR20BC型冷冻高速离心机：日本Hitachi公司产品。

1.1.3 培养基 斜面培养基：蛋白胨2.5 g/L，酵

万方数据

母膏 2.5 g/L,牛肉膏 2.5 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂 20 g/L; pH 值 7.0,121 ℃,20 min 灭菌。

种子和发酵培养基:葡萄糖 10 g/L,酵母膏 2 g/L,蛋白胨 2 g/L,精氨酸盐酸盐 5 g/L,NH_4Cl 0.6 g/L,K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L,NaCl 0.002 g/L; pH 值 7.0,121 ℃,20 min 灭菌。

1.2 方法

1.2.1 *Pseudomonas* sp. 901 培养　斜面在 30 ℃恒温培养箱内培养 24 h,接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 的三角瓶中,30 ℃、180 r/min 摇床培养 24 h。按体积分数 5%接种量接入装有 300 mL 发酵培养基的 2 000 mL 的三角瓶中,30 ℃、180 r/min 摇床培养 18～24 h 至 pH 值为 7.5 后停止。

将发酵液在 8 000 r/min 下离心 15 min,获得的湿菌体用生理盐水洗涤备用。

1.2.2 卡拉胶包埋法　将卡拉胶配制成一定浓度的生理盐水溶液,煮沸溶解,冷却至 48 ℃左右,与生理盐水调制的菌悬浮液在不低于 45 ℃下混合搅匀,倾入浅盘并加入 0.3 mol/L 的 KCl 溶液浸泡硬化 4 h,切块水洗后滤干备用。

1.2.3 海藻酸钠包埋法　将海藻酸钠配制成一定浓度的生理盐水溶液,煮沸溶解,冷却后与生理盐水调制的菌悬浮液混合,用针筒注入 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液中,同时慢速搅拌成型,然后将得到的固定化细胞颗粒用 0.01 mol/L $CaCl_2$ 溶液浸泡硬化 4 h,水洗后滤干备用。

1.2.4 明胶包埋法　将明胶配制成一定浓度的生理盐水溶液,煮沸溶解,冷却后与生理盐水调制的菌悬浮液混合均匀,倾入浅盘并加入体积分数 1%戊二醛浸泡 2 h,滤出切块,水洗后滤干备用。

1.2.5 聚乙烯醇包埋法　取一定量聚乙烯醇(PVA),加入适量蒸馏水浸泡一定时间后煮沸溶解,冷却至室温,与生理盐水调制的菌悬浮液混合均匀,用针筒注入硼酸成型剂(硼酸饱和溶液,用 K_2CO_3 调 pH 值 5.0～7.0)中,静置 4 h 以上,水洗后滤干备用。

1.2.6 固定化细胞转化方法　将卡拉胶包埋固定化细胞装入 50 mm×240 mm 的反应柱中,置于 37℃恒温箱进行转化反应(见图 2),0.5 mol/L L-精氨酸盐(pH 值 6.5)的底物溶液以一定的流速从柱体底部泵入反应柱,含 L-瓜氨酸反应液从上部流出。

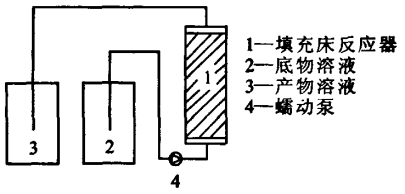

图 2　PBR 反应器示意图

Fig. 2　Schematic diagram of PBR

1.2.7 L-瓜氨酸检测　采用改进的二乙酰一肟-硫氨脲比色法测定稀释液中的 L-瓜氨酸的含量,见文献[13]。

1.2.8 固定化细胞和游离细胞酶活力的测定　取 5 g 固定化细胞或 0.5 g 的单胞菌湿细胞,与 50 mL 0.5 mol/L 的 L-精氨酸盐酸盐(0.5 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.5)在 37 ℃水浴缓慢搅拌反应 1 h。取上清液(游离细胞反应液需先用三氯醋酸终止反应,离心获得)测定 L-瓜氨酸含量。

每克固定化细胞每小时转化 1 g 精氨酸所生成的 L-瓜氨酸的物质的量(μmol)定义为一个固定化细胞酶活单位。1U = 1 μmol/(g · h)。

每克湿菌体每小时转化 1 g 精氨酸所生成的 L-瓜氨酸的物质的量(μmol)定义为一个游离细胞酶活单位。1U = 1 μmol/(g · h)

2　结果与讨论

2.1 *Pseudomonas* sp. 901 细胞固定化方法的确定

2.1.1 固定化方法的比较　以菌体包埋终浓为 10%,比较 4 种常规固定化细胞包埋方法的效果,重复转化反应 4 个批次,每次测定酶活。

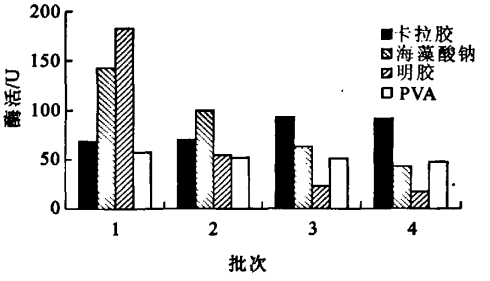

图 3　4 种固定化方法的比较

Fig. 3　Comparison of four methods for the preparation of immobilized *Pseudomonas* sp. 901 cells

图 3 表明初次反应时明胶和海藻酸钙包埋细胞的酶活较高,但随着重复次数的增加而迅速降低。明胶包埋的固定化细胞最易破裂,重复几批次后细胞大量流失,酶活降至最低。海藻酸钙固定化细胞在含磷酸盐等能与 Ca^{2+} 结合产生沉淀的缓冲体系中使用,固定化细胞强度差,易解体。聚乙烯

万方数据

醇包埋和卡拉胶包埋，虽然初次反应活力较低，但随着重复次数的增加固定化细胞酶活逐渐上升并趋稳定。但聚乙烯醇包埋的固定化细胞在磷酸缓冲体系中出现粘连现象，且其转化能力要弱于卡拉胶，所以本实验选用卡拉胶作为固定化细胞的包埋剂。

2.1.2 卡拉胶包埋固定化的条件 在固定化细胞过程中，通过表面活性剂CTAB处理游离菌体，可以加强细胞的通透力，促进底物产物的传质。采用戊二醛对固定化细胞进行处理后，可以增加固定化细胞稳定性。根据单因素试验结果，采用以下四因素三水平（表1）正交试验，确定固定化细胞制备过程中的卡拉胶浓度、菌体的浓度、CTAB（细胞固定前处理）浓度、戊二醛（细胞固定后处理）浓度。结果见表2、表3。

表1 因素和水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 卡拉胶质量分数/%	B 菌体的质量分数/%	C CTAB处理体积分数/%	D 戊二醛处理体积分数/%
1	2	10	0	0.02
2	3	20	0.1	0.1
3	4	30	0.2	0.5

表2 $L_9(3^4)$正交实验设计及结果

Tab. 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

实验号	A	B	C	D	固定化细胞的酶活/U
1	1	1	1	1	29.96
2	1	2	2	2	83.27
3	1	3	3	3	18.09
4	2	1	2	3	14.51
5	2	2	3	1	41.64
6	2	3	1	2	78.19
7	3	1	3	2	58.40
8	3	2	1	3	23.55
9	3	3	2	1	67.64
均值1	43.773	34.287	43.897	46.413	
均值2	44.773	49.487	55.137	73.283	
均值3	49.863	54.637	39.377	18.713	
极差	6.090	20.350	15.760	54.570	

表3 转化的方差分析

Tab. 3 Variance analysis of the conversion reaction

方差来源	SS	f	F值	显著性
A	63.996	2	1.000	
B	671.685	2	10.496	$P<0.1$ **
C	395.146	2	6.175	
D	4 467.172	2	69.804	$P<0.05$ *
误差	64.00	2		

* $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ** $F_{0.10}(2,2) = 9.00$

虽然从表2中获得的较佳组合质量分数分别是4%卡拉胶，30%菌体；体积分数0.1% CTAB，0.1%戊二醛，但实际操作并不理想。卡拉胶质量分数增加后对操作温度的控制要求提高，菌体量的增加，使固定化细胞反复转化中细胞流失加大。而从表3中可知戊二醛体积分数对获得较高的酶活有显著的影响，其次是菌体质量分数，CTAB体积分数有一定作用，而卡拉胶质量分数却影响较小。因此，综合考虑，采用质量分数3%卡拉胶，质量分数10%菌体，体积分数0.1% CTAB，体积分数0.1%戊二醛的实验条件。在此条件下制备的固定化细胞酶活从69 U提高到95 U。

2.2 *Pseudomonas* sp. 901固定化细胞的性质

2.2.1 pH值对卡拉胶包埋固定化细胞酶活的影响 由于从精氨酸转化为L-瓜氨酸反应的过程中有氨产生，转化液的pH值会有上升，从而影响细胞转化反应。用0.5 mol/L醋酸与0.5 mol/L醋酸钠、0.5 mol/L醋酸与0.5 mol/L醋酸钾，0.5 mol/L磷酸二氢钠与0.5 mol/L磷酸氢二钠，0.5 mol/L磷酸二氢钾与0.5 mol/L磷酸氢二钾调制不同pH的缓冲液体系[14]，比较pH对固定化细胞水解精氨酸生产瓜氨酸的影响。图4表明在pH值6.5的磷酸钠缓冲体系中固定化细胞的精氨酸脱亚胺酶活力最高。

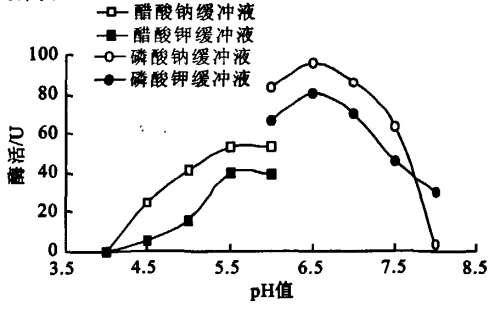

图4 pH和缓冲液对固定化细胞酶活的影响

Fig. 4 Effects of pH and buffer on enzymatic activity of immobilized *Pseudomonas* sp. 901 cells

万方数据

2.2.2 *反应温度对卡拉胶包埋固定化细胞酶活的影响*　酶的催化活性和温度有着较大的关系。在一定的温度范围内,温度升高,反应速率增加,但温度过高将导致酶蛋白变性失活,图 5 比较了温度对固定化细胞与游离细胞酶活的影响。固定化细胞的最适反应温度为 45～50 ℃,而游离细胞为 37～45 ℃。说明固定化后细胞中精氨酸脱亚胺酶的热稳定性有所提高。但进一步热稳定性实验表明(如图 6 所示),在 45 ℃时反应 1 h 重复利用 3 次后固定化细胞酶活降低到一半,因此,为了能够长时间稳定的转化生产,固定化细胞的转化反应体系温度控制为 37 ℃。

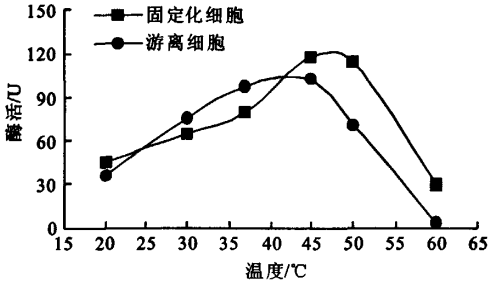

图 5　温度对固定化细胞酶活的影响

Fig. 5　Effect of temperature on enzymatic activity of immobilized *Pseudomonas* sp. 901 cells

注:按照 1.2.8 中固定化细胞与游离细胞酶活单位定义,10%菌体包埋量的固定化细胞的酶活要比相同菌体量游离细胞的酶活小。图中游离细胞的酶活数值已除以 10,换算成相同菌体量比较。

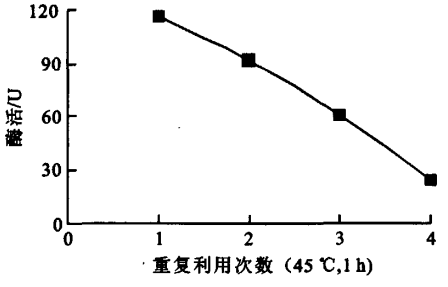

图 6　固定化细胞的热稳定性

Fig. 6　Thermo-stability of immobilized *Pseudomonas* sp. 901 cells

2.3　*Pseudomonas* sp. 901 固定化细胞在填充柱中的连续转化

2.3.1 *固定化细胞的批式转化时间曲线*　固定化细胞在等体积的 0.5 mol/L 底物溶液中,37 ℃下转化,测定生成 L-瓜氨酸的反应时间曲线。如图 7 所示,固定化细胞反应 12 h,物质的量转化率接近 98%,延长反应时间,产物瓜氨酸减少。故一般控制批式反应时间为 8～15 h。

2.3.2 *固定化细胞填充柱中的连续转化*　固定床

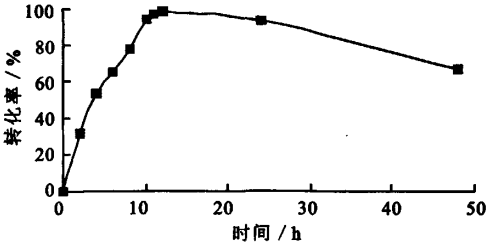

图 7　转化时间曲线

Fig. 7　Time course of batch transformation by immobilized *Pseudomonas* sp. 901 cells

反应器柱尺寸:50 mm×240 mm,装填体积为 50 mm×200 mm,总容积 380 mL,装固定化细胞 200 g,清洗后装柱,使恒流泵流加 0.5 mol/L (105 g/L)L-精氨酸盐酸盐(pH 值 6.5),每天取样,稀释测定摩尔转化率。控制流速 600 mL/d (即 25 mL/h)时,运转稳定,反应器有效体积 170 mL,稀释速率 D 为 0.147/h。

结果如图 8,固定床反应器能够连续稳定运行 54 d,摩尔转化率稳定在 95%以上,54 d 平均每天产含瓜氨酸 86.3 g/L 的转化液 600 mL,即平均每天产瓜氨酸 51.8 g,固定床反应器生产效率 5.68 g/(L·h)(每体积反应器每小时生产的瓜氨酸质量数),固定化细胞生产强度 0.010 8 g/(h·g)。说明采用卡拉胶固定化细胞操作稳定性良好。

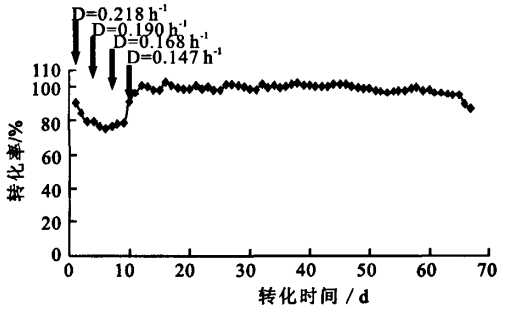

图 8　连续转化曲线

Fig. 8　Time course of continuous transformation by immobilized *Pseudomonas* sp. 901 cells

2.4　转化液中 L-瓜氨酸的提取

固定化细胞转化液调 pH 值为 4.0 后,以 1.5 mL/min 体积流量上 732 阳离子柱(ø30 mm×400 mm)吸附,待树脂吸附饱和后,用去离子水洗涤至接近中性,用体积分数 5%的氨水洗脱被吸附在树脂上的 L-瓜氨酸,洗脱速度 2 mL/min。洗脱液经过 60 ℃真空浓缩、结晶、乙醇洗涤、重结晶,得到纯度为 99.1%的 L-瓜氨酸晶体,整个提取过程收率为 87.3%(表 4)。

万方数据

表4 L-瓜氨酸提取收率的计算

Tab.4 Recovery rate of L-Citrulline

操作步骤	体积/mL	L-瓜氨酸含量/g	回收率/%
转化液	182	16.3	100
吸附洗脱	360	15.3	94.1
浓缩结晶	——	14.2	92.8
总过程			87.3

3 结 语

采用体积分数0.1% CTAB处理游离菌体，质量分数3%卡拉胶包埋游离细胞，体积分数0.1%戊二醛后处理包埋细胞的方法制备固定化恶臭假单胞菌(*Pseudomonas* sp. 901)细胞。固定化细胞转化反应为pH值6.5的磷酸钠缓冲体系，较佳温度为37 ℃。在填充柱(50 mm×240 mm)中，37 ℃下连续转化0.5 mol/L底物生产L-瓜氨酸，稀释速率调整稳定后，在稀释速率0.147/h固定化细胞运行54 d对底物的物质的量转化率在95%以上，平均固定化细胞生产强度为0.010 8 g/h，固定床反应器生产效率6.34 g/L·h，显示了较好的操作稳定性。从填充柱流出的转化液经732阳离子树脂吸附，氨水洗脱，浓缩、结晶，得到纯度为99%的L-瓜氨酸晶体，提取总收率约为87%。展现了工业化应用的前景。

参考文献(References)：

[1] 胡学智. 日本功能性食品研发信息[J]. 山东食品发酵，2007(3)：14－15.
HU Xue-zhi. Information for research and development of functional food in Japan[J]. **Shandong Food Ferment**, 2007(3): 14－15(in Chinese)

[2] Ludy, Lutgens, Philippe Lambin. Biomarkers for radiation-induced small bowel epithelial damage: An emerging role for plasma Citrulline[J]. **World Journal of Gastroenterology**, 2007, 13(22):3033－3042.

[3] 胡勇，王娟，王群兴. 抗环瓜氨酸肽抗体和RF对类风湿性关节炎的诊断价值[J]. 华中医学杂志，2008，32(1)：31－32.
HU Yong，WANG Juan，WANG Qunxing. The diagnostic value of anti-cyclic citruilinated peptide antibody and rheumatoid factor for the rheumatoid arthritis[J]. **Central China Medical Journal**, 2008, 32(1):31－32. (in Chinese)

[4] 王冰梅. 一氧化氮合成与尿素循环酶的关系："瓜氨酸—氧化氮循环"[J]. 中国体育科技，2005，41(5)：130－131.
WANG Bing-mei, The relation of nitric oxide synthesis and urea cycle enzymes[J]. **China Sport Science and Technology**, 2005, 41(5):130－131. (in Chinese)

[5] 丁威，李爱平，张征林，等. L-瓜氨酸和L-高瓜氨酸的制备[J]. 化工时刊，2006，20 (2)：16－17.
DING Wei, LI Ai-ping, Zhang Zhen-glin, et al. Synthesis of L - citrulline and L-homocitrulline[J]. **Chemical Industry Times**, 2006, 20 (2):16－17. (in Chinese)

[6] 曹瑜，李加友，焦庆才. 酶法转化制备L-瓜氨酸[J]. 精细化工，2005，22 (10)：759－761.
CAO Yu, LI Jia-you, JIAO Qing-cai. Enzymatic conversion of L -citrulline[J]. **Fine Chemicals**, 2005, 22 (10): 759－761. (in Chinese)

[7] Shinji O, Yokohama S, Masao S. Method of production citrulline by bacterial fermentation. US Patent: 3,282,794[P]. 1966-07-16.

[8] Evelyn L Oginsky, Robert F. The arginine dihydrolase system of *Streptococcus faecalis*[J]. **Biological Chemistry**, 1952, 198: 791－797.

[9] Gilbert C Schmidt, Milan A L. The degradation of arginine by *Clostridium perfringens*[J]. **Biological Chemistry**, 1952, 198: 771－783.

[10] Chibata I, Suita S, Kakimoto T, et al. Enzymatic preparation of L-citrulline. US: 3 730 838[P]. 1973-05-13.

[11] Yamamoto I, Sato T, Tosa Tetsuya, et al, Continuous production of L-citrulline by immobilized *Pseudomonas putida* Cells[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1974, 16: 1589－1599.

[12] 张鹏，张淑荣，刘春巧，等. 固定化细胞连续生产L-瓜氨酸的方法. 中国专利：CN1948464A[P]. 2006-11-24.

[13] 钱嘉南，孙志浩，刘宇鹏，等. 二乙酰一肟-氨基硫脲比色法测定酶转化液中的L-瓜氨酸[J]. 中国医药工业杂志，2007，38(7)：519－521.
QIAN Jia-nan, SUN Zhi-hao, LIU Yu-peng, et al. Determination of L-citrulline in enzymatic conversion solution by diacetylmonoxime-thiosemicarbazide colorimetry[J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, 2007, 38(7): 519－521. (in Chinese)

[14] 诸葛健，王正祥. 工业微生物实验术手册[M]. 北京：中国轻工出版社，1994.

(责任编辑：杨萌)

万方数据