



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1977048 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200580021620.2

(22) 申请日 2005.07.05

(30) 优先权数据

10-2004-0051945 2004.07.05 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.12.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2005/002140 2005.07.05

(87) PCT申请的公布数据

W02006/004371 EN 2006.01.12

(73) 专利权人 CJ 第一制糖株式会社

地址 韩国首尔

(72) 发明人 李在元 李秉汉 辛铉哲 金得会

许英涉 徐海昌

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 章社杲 张英

(51) Int. Cl.

C12P 13/08 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5179010 A, 1993.01.12, 全文.

US 5302521 A, 1994.04.12, 全文.

EKWEALOR I.A.. Preliminary study of L-lysine production by Bacillus species using various agricultural by-products. Nahrung 47 4. 2003, 47(4), 全文.

审查员 杨振宇

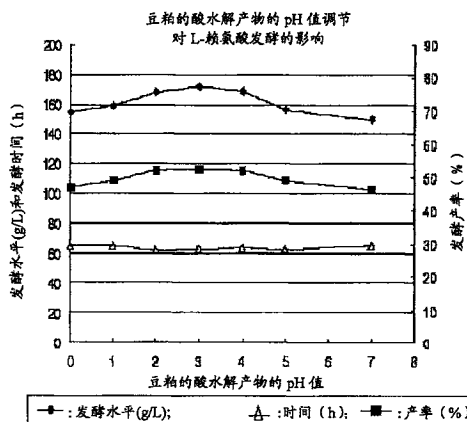
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

利用豆粕的酸处理产物的 L-赖氨酸发酵法

(57) 摘要

本申请公开了一种利用豆粕的酸水解产物作为有机氮源的 L-赖氨酸的发酵方法。所述方法包括在制备培养基之前,将豆粕的酸水解产物的 pH 值调节到 2~4。与其它 pH 值相比,这种经调节的 pH 值分别使 L-赖氨酸的发酵水平和每糖产率增加至少 8% 和至少 7%。



1. 一种利用豆粕的酸水解产物作为有机氮源的 L- 赖氨酸的发酵方法, 其特征在于, 当利用产生 L- 赖氨酸的微生物菌株 KFCC 11043 制备培养基时, 将豆粕水解产物的 pH 值调节到 2 ~ 4。
2. 一种用于生产 L- 赖氨酸的方法, 所述 L- 赖氨酸是由根据权利要求 1 所述的方法而获得的培养产物。

利用豆粕的酸处理产物的 L- 赖氨酸发酵法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于 L- 赖氨酸的发酵方法,其使用谷氨酸棒状杆菌作为发酵的微生物和豆粕的酸水解产物作为有机氮源,其特征在于当制备培养基时,将豆粕的酸水解产物的 pH 值调节至预定水平,以便改善 L- 赖氨酸发酵的生产率。

背景技术

[0002] L- 赖氨酸是一种基本氨基酸并用作家畜饲料、食品添加剂和制药原料。尤其是,在 2004 年 L- 赖氨酸保持了家畜饲料添加剂多达约 700,000 吨的市场总量。因此,可以理解,L- 赖氨酸是大规模的生物工艺学产物。最近,作为家畜饲料添加剂的 L- 赖氨酸每年以 8 ~ 10% 的需求增加。此外,由于中国正经历经济的迅速增长并且对家畜排泄物的限制变得越来越严格,预期 L- 赖氨酸的市场会经历迅速的扩张。因此,需要通过技术研究和开发发酵方法以及在其中所使用的菌株来改善 L- 赖氨酸产品的国际竞争能力。

[0003] 目前,L- 赖氨酸是利用碳源、氮源和矿物作为培养基的原料通过直接发酵方法工业生产的。在培养基的组成元素中,氮源(例如,酵母膏、胨、玉米浆和豆粕水解产物)已经被集中用于它们的种类和加工的研究,以便节约成本。此外,已知氮源具有大量的空间用于下文中的改进。

[0004] 同时,豆粕是指从大豆回收大豆油后而剩余的便宜副产品。这种豆粕在用蛋白酶或酸例如盐酸或硫酸水解后而用于培养基中。存在用于这种酸解的两种类型的工艺。

[0005] 韩国专利公开第 1996-0017840 号披露了通过用蛋白酶处理豆粕而获得的豆粕水解产物的应用。用于豆粕酸解的方法也是已知的。这些方法的一个实例包括以下步骤:将酸加入到豆粕中,使该混合物在 110 ~ 120℃ 的高温下反应 10 ~ 24h;冷却反应混合物;以及提供合成产物作为在滤出固体后的培养基原料。

[0006] 上述使用酶用于豆粕水解的方法是相对稳定的方法。然而,其显著的限制在于用于 L- 赖氨酸工业生产的实际应用中。例如,大多数工业发酵工厂使用连续消毒器,用于对培养基消毒,并需要多个用于完成基本步骤的管道。然而,通过含有多种缩氨酸或非水解蛋白固体的酶而获得豆粕水解产物,其可以发生鳞状(scale)沉积,从而引起严重的问题。

[0007] 同时,虽然由于硫酸或盐酸的处理,上述酸解方法需要耐酸设备,但其确保了由于豆粕完全水解而带来的工艺稳定性。因此,一部分氨基酸产品公司,包括 Ajinomoto Co., 使用这种豆粕的水解产物。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 因此,作出了本发明以解决现有技术中出现的上述问题。本发明的一个目的是提供一种用于制备 L- 赖氨酸的方法,其通过谷氨酸棒状杆菌或埃希氏大肠杆菌(E. coli)产生 L- 赖氨酸和豆粕的酸水解产物,以便获得更高的发酵生产率。

[0010] 在研究了豆粕酸水解产物的优点后,本申请人发现当制备培养基时,通过将豆粕

预形成的酸水解产物的 pH 值调节至预定水平可以改善发酵生产率,使得微生物更有效地利用豆粕的水解产物、其它养分和矿物。这是一个在现有技术中尚未知晓的新技术方案。

[0011] 技术方案

[0012] 根据本发明的一个方面,提供了一种通过谷氨酸棒状杆菌或埃希氏大肠杆菌产生 L- 赖氨酸和豆粕的酸水解产物而改善 L- 赖氨酸的发酵生产率的方法。根据本发明的另一个方面,提供了一种由上述增加发酵生产率的方法获得的培养产物而生产 L- 赖氨酸的方法。

[0013] 在下文中,将通过参照所附的实施例而更加详细地解释本发明的特征和优点。

[0014] 有益效果

[0015] 如上所述,本发明涉及一种利用豆粕的酸水解产物作为有机氮源而用于 L- 赖氨酸发酵的方法。根据本发明,当制备培养基时,与其它 pH 值相比,将豆粕水解产物的 pH 值调节到 pH 值为 2 ~ 4,可以分别将 L- 赖氨酸的发酵水平和每糖产率增加至少 8% 和至少 7%。

附图说明

[0016] 图 1 示例性说明了用于制备豆粕的酸水解产物的流程;以及

[0017] 图 2 是示出豆粕水解产物的 pH 值对 L- 赖氨酸发酵的影响图。

具体实施方式

[0018] 实施例 1 :豆粕的酸水解产物的制备

[0019] 在 40 ~ 50℃ 下通过将 8% 或更多的总含氮量以及 50% 或更多的非纯化蛋白含量的脱脂豆粕溶解在作为溶剂的工艺水中而制备 10 ~ 20% (w/v) 浓度的豆粕溶液。用调节到最终浓度的 20 ~ 30% 的硫酸处理豆粕溶液,然后通过将其加热到 110 ~ 120℃ 而使混合物进一步热处理 5 ~ 10min。接着,将经硫酸处理和热处理的豆粕溶液冷却到 50 ~ 60℃,并用具有 150 ~ 200 目的滤网过滤。将所得滤液用作在以下发酵试验中所使用的培养基的原料(参见图 1)。

[0020] 这里, L- 赖氨酸的浓度通过 HPLC(高效液相色谱法)测定,在培养基中的细胞数量通过在 3,000rpm 下离心分离 15min 而加以确定。必要时,通过 Bertrand 方法定量确定当量数。

[0021] 实施例 2 :根据豆粕的酸水解产物的 pH 值比较 L- 赖氨酸的发酵生产率

[0022] 由实施例 1 获得的豆粕的酸水解产物在振荡培养箱中用产 L- 赖氨酸的微生物进行种子培养(烧瓶),其是由申请人以 KFCC11043 的序列号保藏的菌株,并在 5L 的小发酵罐中进行种子培养。然后,在 30L 发酵罐中进行发酵试验。以补料分批发酵方式完成以下试验,其中在培养期间加入额外的糖和添加剂。

[0023] 1) 用于种子培养的培养基:成分和条件(烧瓶)

[0024] 将糖 50g/L、胨 10g/L、酵母膏 10g/L、 KH_2PO_4 1.5g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L、尿素 5g/L 和生物素 50 $\mu\text{g/L}$ (在消毒之前,pH 值为 7.0)在 30 ~ 32℃、220rpm 下培育 20 ~ 25 小时。

[0025] 2) 用于种子培养的培养基:成分和条件(5L 发酵罐)

[0026] 将糖 70g/L、酵母膏 5g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g/L、 KH_2PO_4 1.0g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L、生物素 300 $\mu\text{g/L}$ 、硫胺 $\cdot\text{HCl}$ 1,000 $\mu\text{g/L}$ 、烟酰胺 2,000 $\mu\text{g/L}$ 、泛酸 500 $\mu\text{g/L}$ 、以及消泡剂 3ml/

L 在 30 ~ 32℃、pH 值为 7.0 ~ 7.3 下（通过气态氮调节）用 450 ~ 600rpm 的搅拌速度和 0.5 ~ 1vvm（空气体积 / 培养基体积 / 分钟）的通气速度培育 20 ~ 25 小时。

[0027] 3) 用于发酵试验的培养基：成分和条件（30L 发酵罐）

[0028] 将糖 165g/L、糖蜜（作为还原糖）165g/L、豆粕的酸水解产物 30g/L（用 NaOH 溶液制备成不同的 pH 值）、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50g/L、 KH_2PO_4 2.0g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50mg/L、生物素 300 $\mu\text{g/L}$ 、硫胺 $\cdot \text{HCl}$ 1,000 $\mu\text{g/L}$ 、烟酰胺 2,000 $\mu\text{g/L}$ 、泛酸 500 $\mu\text{g/L}$ 、以及消泡剂 3ml/L 在 30 ~ 33℃、pH 值为 7.0 ~ 7.3 下（通过气态氮调节）用 450 ~ 600rpm 的搅拌速度和 0.5 ~ 1vvm 的通气速度培育。

[0029] 用下面表 1 所示的不同 pH 值制备豆粕的酸水解产物，然后用作在上面描述的条件下的培养基的原料。

[0030] 结果，与传统的方法在将 pH 值调节至 7.0 或其它值下进行的试验相比，当将豆粕的水解产物的 pH 值调节至 2 ~ 4 时，其可以分别使 L- 赖氨酸的发酵水平和每糖产率增加至少 8% 和至少 7%（参见图 2）。

[0031] 表 1

[0032] 豆粕的酸水解产物的 pH 值对发酵的影响

[0033]

豆粕的酸水解产物的 pH 值	发 酵 水 平 (g/L)	发 酵 产 率 (%)	发 酵 时 间 (h)	备注
0 (未调节 pH 值)	155	47.0	65	用 NaOH 溶液制备 不同 pH 值的酸水 解产物， 然后消毒
1.0	159	49.0	65	
2.0	168	52.0	62	
3.0	172	52.5	63	
4.0	169	52.0	64	
5.0	157	49.0	63	
7.0	155	46.5	65	

[0034] 工业实用性

[0035] 如上所述，本发明对于食品工业是非常有用的，与其它 pH 值相比，由于将豆粕的酸水解产物的 pH 值调节到 2 ~ 4 使得其可以分别将 L- 赖氨酸的发酵水平和每糖产率增加至少 8% 和至少 7%。

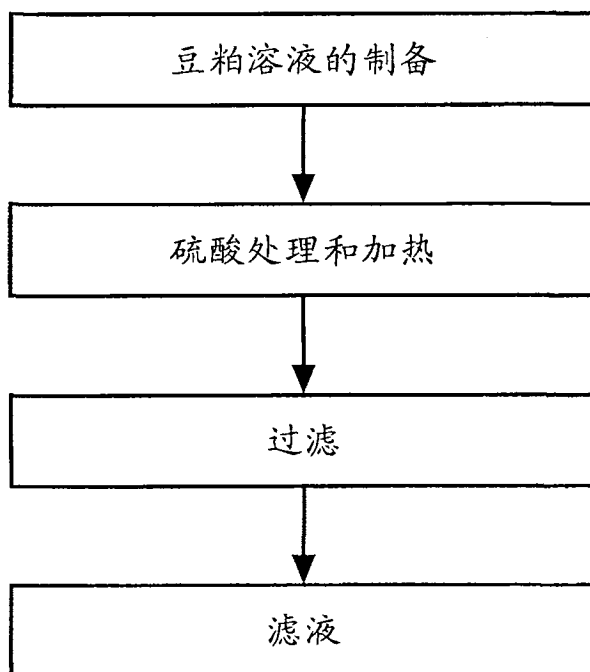


图 1

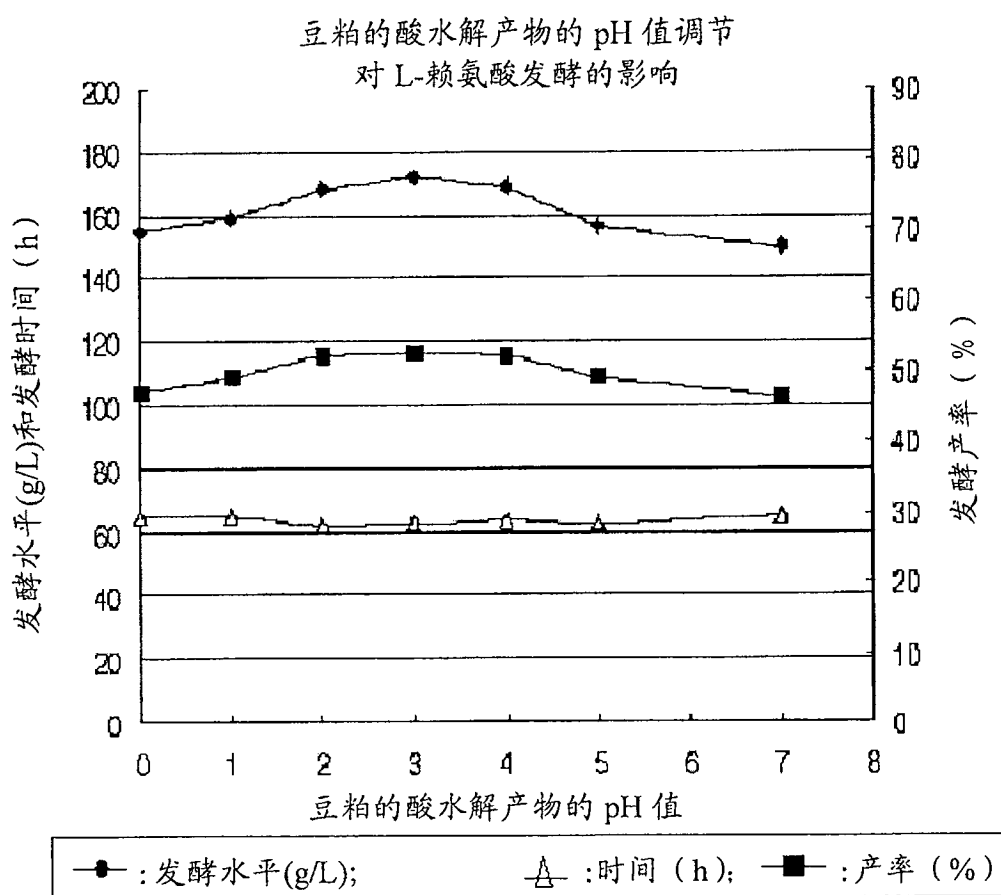


图 2