

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 13/14

C12P 13/18

C12N 1/20

//C12P13/14 C12R1 : 07

C12P13/14 C12N1 : 15



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 97119887. X

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1218043C

[22] 申请日 1997. 11. 21 [21] 申请号 97119887. X

[30] 优先权

[32] 1996. 11. 21 [33] JP [31] 310845/1996

[71] 专利权人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 吉冈达哉 石井俊昌 河原义雄

小山洋介 清水荣厚

审查员 谢 妍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 5 页

[54] 发明名称 连续发酵生产 L-谷氨酸的方法

[57] 摘要

生产 L-谷氨酸的方法, 包括在液体培养基中接种具有生产 L-谷氨酸能力的微生物, 所述液体培养基含有碳源和氮源, 在以具有促进细菌生长作用的碳源和氮源加入的条件下进行连续 L-谷氨酸发酵, 以便使微生物生长, 然后收集在培养液中产生和积累的 L-谷氨酸。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 在单个发酵罐中连续发酵生产 L-谷氨酸的方法，包括在液体培养基中接种具有生产 L-谷氨酸能力的短杆菌属 (*Brevibacterium*) 或棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 微生物，所述液体培养基含有碳源、氮源和 5—5000 $\mu\text{g}/\text{升}$ 的生物素，在 (1) 给予具有促进细菌生长作用的碳源和营养物使微生物生长且同时产生 L-谷氨酸；和 (2) 连续从发酵罐中抽出培养液的情况下连续 L-谷氨酸发酵，然后收集在培养液中产生和积累的 L-谷氨酸，其中所述微生物是当在液体培养基中培养时，具有产生 L-谷氨酸的特性的微生物，所述培养基含有上述连续 L-谷氨酸发酵用培养基中所述浓度的生物素且没有加入抑制生物素作用的物质。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述微生物具有降低的 α -酮戊二酸脱氢酶活性或具有对抑制生物素作用的物质的温度敏感突变。

连续发酵生产 L - 谷氨酸的方法

- 5 本发明涉及采用连续发酵方法有效地生产 L - 谷氨酸的方法。L - 谷氨酸被广泛地用作为食品原料例如调味品和各种化学产品的原料。

由于近几年对 L - 谷氨酸的需求增加, 人们期望着研制工业生产上有优势的方法, 因此, 发明了下文描述的生产方法。

(1)分批培养方法, 分批补料培养方法

- 10 与连续培养方法相比, 这些培养方法的优点在于其设备简单, 培养过程在短期内结束以及由于细菌污染导致的损失最小。但是, 培养液中 L - 谷氨酸的浓度随着时间增加, 由于渗透压的影响或产物的抑制作用其生产力和产量下降。因此, 在长时间内稳定地保持高产量和高生产力是困难的。

(2)连续培养方法

- 15 连续培养方法的特征在于通过避免在发酵罐中积累高浓度的目的产物, 可以在长时间内保持高产量和高生产力。

最简单和常规模式的连续培养方法是单个发酵罐的连续培养方法, 对于用于氨基酸发酵, 已经有大量的报道公开了包括 L - 赖氨酸发酵和 L - 天冬氨酸发酵的单个发酵罐的连续培养方法(Lys: Toshihiko Hirao 等人, Appl.

- 20 Microbiol. Biotechnol., 32, 269 - 273(1989), Arg: Tomoki Azuma 等人, 发酵技术杂志, 66(3), 285 - 290(1988)). 在所述的 L - 赖氨酸和 L - 天冬氨酸发酵期间, 通常, 细菌的生长和目的氨基酸的产生同时出现, 因此, 单个发酵罐连续培养方法应用到这些发酵方法是便利的。

- 另一方面, 已经认识到在 L - 谷氨酸发酵中应用单个发酵罐的连续培养方
25 法是困难的。换句话说, 已经认识到采用 L - 谷氨酸发酵不能积累较高水平的 L - 谷氨酸, 除非, 采用包括对作为细菌生长必要因子的生物素进行限制, 加入抗生素例如青霉素, 加入表面活性剂和改变温度的方法终止细菌生长(1. 日本发酵工程协会杂志, Vol. 41, No. 12, 645 - 651(1963); 2. 最新的日本工业化学, Vol. 23, 121 - 142, Asakura Shoten)。为了采用分批培养方法
30 和分批补料培养方法产生较大量的 L - 谷氨酸, 应该设置终止细菌生长的培养

条件。因此，已经认识到采用连续培养方法发酵 L - 谷氨酸是不合适的，因为在常规培养条件下简单地洗涤细菌以终止细菌生长，因而细菌不能保持于发酵罐中。对于用于 L - 谷氨酸发酵的连续培养方法的研究工作而言，在早期，已经实施了多个发酵罐连续培养方法包括在第一发酵罐中促进细菌生长和在第二发酵罐中抑制细菌生长以产生 L - 谷氨酸的研究工作例如由 Mr. Ueda 等人，(日本发酵工程协会杂志， Vol. 41， No. 9， 450 - 458， 1964)和 Mr. Mimura 等人，(日本发酵工程协会杂志， Vol. 42， No.2， 70 - 78， 1964)公开的。

后来，研制了称为细胞再循环培养方法和固定化细菌培养方法的两种方法，如基于细菌生长过程和产生 L - 谷氨酸的过程应该单独实施的概念的培养方法。

首先，细胞再循环培养方法包括提取其中积累 L - 谷氨酸，但是细菌生长终止的培养液，和从细菌中分离 L - 谷氨酸以便仅使细菌再循环(未审查的日本公开专利申请 No. 52 - 136985; 未审查的日本公开专利申请 No. 60 - 133891 或 No. 62 - 48394)，并且该方法能在相对长时间内保持高产量和高生产力。但是，不利的是该方法需要从培养液分离细菌的系统，因此，该培养系统是复杂的。此外，由于通过细胞再循环培养方法是终止细菌生长的细菌再循环，细菌本身产生 L - 谷氨酸的能力随时间降低，这限制了培养时间。

虽然，固定化细菌培养方法也能以该产量和高生产力回收 L - 谷氨酸(H. S. KIM 等人，生物技术和生物工程， Vol. 26， 2167 - 2174(1982))，相反，生产 L - 谷氨酸的实际应用而言固定细菌的载体是昂贵的，另外，该方法有大量的问题需要克服，例如载体交换技术。因此，该方法基本上不是工业应用合适的。

如上所述，采用分批培养方法和分批补料培养方法高产量生产 L - 谷氨酸的培养条件需要完全终止细菌生长，因此，在培养的后期阶段，细菌产生 L - 谷氨酸的能力下降，导致难于提高生产力。另外，对于常规连续培养方法，要求该系统进一步将细菌加入到发酵罐或使细菌再循环，因此，该方法要在工业上应用有如下所述的许多问题：整个系统是复杂的，细菌污染的可能增加，由于在终止细菌生长的条件下进行培养，保持高生产力有许多困难。

为了满足对 L - 谷氨酸的需求和以低成本生产 L - 谷氨酸，应该将 L -

谷氨酸发酵的生产力提高到高于常规发酵的水平。

本发明解决的问题是研制在简单的系统中以高生产力发酵L-谷氨酸的连续培养方法，包括在一个发酵罐中同时促进细菌生长和L-谷氨酸生产。

本发明已经对采用常规发酵方法生产L-谷氨酸的方法的修饰进行调查，
5 因此，发明人已经发现通过在液体培养基中接种属于短杆菌或棒状杆菌属的具有生产L-谷氨酸能力的微生物，所述液体培养基含有碳源和氮源，在以具有促进细菌生长作用的碳源和营养物补料的条件下连续培养，可以在连续培养期间以高生产力和高产量生产L-谷氨酸，而借助于温度，表面活性剂，抗生素，生物素浓度等等控制细菌生长，不终止细菌生长。换句话说，基于下列发现发
10 明人已经完成了本发明：当在非常规的终止细菌生长的条件下以较高生产力生长新鲜细胞时，可高效地生产L-谷氨酸；由于细菌生长甚至在提取培养液之后发酵罐中保持细菌细胞重量，因此在长时期连续培养期间保持高生产力。

在本发明的一个方面，提供了用于生产L-谷氨酸的方法，包括在含有碳源和氮源的液体培养基中接种具有产生L-谷氨酸能力的微生物，进行连续的
15 L-谷氨酸发酵，所述发酵过程供应碳源和具有促进细菌生长作用的营养物以便使微生物生长，然后收集在培养液中产生和积累的L-谷氨酸。

优选的微生物是，当所述微生物在生物素浓度为10微克/升或更多，但没有加入抑制生物素作用的物质的液体培养液中培养时，所述微生物具有产生L-谷氨酸特性的微生物。

20 附图简述

附图1显示采用本发明培养方法和细胞再循环培养方法培养期间产生L-谷氨酸的活性的变化。

附图2显示在本发明的方法中使用的发酵罐的例子(单个发酵罐)。

附图3显示如在实施例1的连续培养方法和可比较的分批补料培养方法
25 中观察到的特定的生长速率随时间的变化。

附图4显示如在实施例2的连续培养方法和可比较的分批补料培养方法中观察到的整个培养期间特定的生长速率的变化。

附图5显示如在实施例3的连续培养方法中观察到的整个培养期间产生的L-谷氨酸活性的变化。

30

根据本发明,使用了具有积累 L - 谷氨酸能力的微生物,对此没有特定的限制。例如,可以包括下列细菌菌株。

- 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869
- 谷氨酸棒杆菌 FERM BP - 4172(AJ 12821)
- 5 谷氨酸棒杆菌 FERM BP - 1363(AJ 12300)
- 谷氨酸棒杆菌 FERM BP - 5189(AJ 13029)
- 黄色短杆菌 ATCC 14067
- 黄色短杆菌 FERM BP - 4173(AJ 12822)
- 谷氨酸棒杆菌 ATCC 14020
- 10 解糖短杆菌 ATCC 14066
- 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032
- 谷氨酸棒杆菌 FERM BP - 4174(AJ 12823)
- 嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC 13870

- 15 通常已知在积累 L - 谷氨酸的细菌中,某些细菌在含有过量生物素的培养基中在抑制生物素作用的物质存在下积累 L - 谷氨酸,而某些细菌菌株在没有抑制生物素作用的物质存在下积累 L - 谷氨酸。在这些细菌中,根据本发明优选的是在没有抑制生物素作用的物质存在下积累 L - 谷氨酸的细菌。更具体地说,根据本发明,具有积累 L - 谷氨酸能力的微生物优选的是当在液体培养基中培养时具有产生和积累 L - 谷氨酸的特性的微生物,所述培养基含有浓度为
- 20 10 微克/升或更多例如 10 - 1000 微克/升的生物素,没有加入抑制生物素作用的物质。

- 此外,如果使用当在含有生物素浓度为 10 微克/升或更多例如 10 - 1000 微克/升的液体培养基中培养时具有产生和积累 L - 谷氨酸特性的细菌菌株例
- 25 如具有降低的 α - 酮戊二酸脱氢酶活性和产生 L - 谷氨酸能力的突变菌株例如 FERM BP - 4172(AJ 12821), FERM BP - 4173(AJ 12822), FERM BP - 4174(AJ 12823)(未审查的公开日本专利申请 No. 6 - 23779),所述细菌菌株不需要加入抑制生物素作用的物质,例如表面活性剂和抗生素,从而在长时间内易于实施控制 L - 谷氨酸发酵的培养,并且就成本而言,可廉价地生产 L -
- 30 谷氨酸。此外,用具有对抑制生物素作用的物质 的温度敏感突变 和在含有过

量生物素, 没有抑制生物素作用的物质的培养基中具有积累 L - 谷氨酸能力的突变菌株例如 FERMBP - 5189(AJ 13029)也是同样可行的(国际公开 No. WO 96/06180)。

如用于本发明的培养基, 适当含有碳源, 氮源, 无机盐和有机微量营养例
5 如氨基酸和维生素的常规液体培养基是满意的。就碳源而言, 可以利用糖, 例如葡萄糖, 蔗糖, 果糖, 半乳糖和乳糖; 含有这些糖的糖化的淀粉溶液; 白薯糖蜜, 甜菜糖蜜, 甘蔗糖蜜; 另外, 有机酸例如乙酸, 醇例如乙醇和甘油等等。就氮源而言, 可以加入氨气, 液体氨, 铵盐, 尿, 硝酸盐, 用作为添加剂的有机氮源例如油饼, 大豆蛋白水解溶液(水解产物), 酪蛋白水解产物, 其它氨基
10 酸, 玉米抽提液, 酵母抽提液, 肉汁抽提液, 和肽例如胨, 用于发酵的各种细菌的提取物和其水解产物。就无机酸而言, 可适当地加入磷酸, 镁盐, 钙盐, 铁盐, 锰盐等等。

当用于本发明的微生物其生长需要特定的营养时, 可加入含有所述营养物的制剂或天然产物。另外, 如果需要, 可使用消泡剂。

15 根据本发明, 优选的是培养基中碳源浓度保持在 5 克/升或更低。理由是由于提取培养液丢失的糖含量保持在最小程度。

通常微生物的培养是在好气条件下, 在 pH5 - 8 和 25 - 40 °C 的温度范围内进行的。利用无机或有机酸和碱性物质, 另外可以利用尿, 碳酸钙和氨气调整培养液的 pH 值到预定的范围内。如果应该提高供氧速率, 可以使用例如将
20 氧加入到空气中以保持氧浓度在 21 % 或更多的装置; 在加压下培养或提高搅拌速率; 和提高通气速率。

如果通过在某种程度上以合适的温度(25 - 40 °C), 合适的表面活性剂浓度(聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯; 100 - 5000 毫克/升), 合适浓度的
25 抗生素(青霉素; 0.1 - 50U/毫升), 和合适浓度的生物素(5 - 5000 微克/升)控制和保持细菌生长, 将有利于积累 L - 谷氨酸的细菌菌株在抑制生物素作用的物质存在下进行连续培养, 则随着细菌生长, 以较高产量和高生产力产生 L - 谷氨酸。

例如, 对于谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 的情况, 如果用聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯控制和保持细菌生长, 那么优选的是使用浓度为 100 -
30 1000 毫克/升的聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯。

为了有效地积累 L - 谷氨酸, 如果需要可以在培养基中加入生物素或其衍生物。另外, 优选的是可以加入脂肪酸或其酯, 或青霉素或其衍生物。加入生物素或其衍生物可有效地帮助细菌在长时间内保留产生 L - 谷氨酸的能力。令人满意的是将加入所述物质的量调节到培养液中终浓度为 5 - 5000 微克/升。

- 5 对于脂肪酸, 优选的是 12 - 18 碳原子的饱和高级脂肪酸; 其酯选自于甘油酯, 山梨糖酯, 蔗糖酯, 聚乙二醇酯, 和聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯。当将加入脂肪酸或其酯和青霉素或其衍生物时, 加入到总浓度为低于所述浓度即低于其正常浓度, 以便在不停止生长的情况下保持生长。例如, 当加入脂肪酸或其酯时, 其合适的浓度大约是 100 - 1000 毫克/升; 当加入青霉素或其衍生物时, 其在培养基中浓度大约为 0.2 - 10U/毫升。

对于 L - 谷氨酸连续发酵, 以具有促进细菌生长的碳源和营养物(促生长营养物)补料。碳源的例子包括在上文中提到的碳源。对促生长营养物没有具体限定, 只要所述营养物促进细菌生长。术语“细菌生长”是指细胞数量增加。促生长营养物的例子包括氮源, 无机盐和有机微营养例如氨基酸和维生素。

- 15 所补料的碳源和促生长营养物的量既可有效地保持细菌生长又可生产 L - 谷氨酸。优选的是加入溶液形式的碳源和促生长营养物。含有这两种物质的溶液或分别含有这两种物质的溶液可以以一种或几种补料溶液形式加入。

根据本发明令人满意的是在连续发酵的起始阶段进行分批培养或分批补料培养, 以便提高 L - 谷氨酸的浓度和细菌细胞的浓度, 此后开始连续培养(和提取); 或接种高浓度的细菌并且一旦开始培养即进行连续培养。

应该在合适的阶段开始供给补料溶液和提取。供给补料溶液的时间不是必需调整到提取的时间。令人满意的是连续或分批地进行供给补料溶液和提取。向补料溶液中加入如上所述的细菌生长必需的营养物, 以便促进细菌连续生长。

- 25 采用下列通式计算生产力:

$$\text{生产力} = \frac{\text{在抽出溶液中谷氨酸的浓度} \times \text{抽出溶液中的流速}}{\text{发酵罐的工作体积(升)}} \quad \left(\frac{\text{克/升/小时}}{\text{升/小时}} \right)$$

30

根据本发明的方法，L-谷氨酸的生产力提高到约分批补料培养方法生产力的2倍(40小时培养时间)。

与细胞再循环培养方法相比，显然，优选的是采用本发明培养方法在长时间内保持产生L-谷氨酸的活性。这一点根据采用连续培养方法和细胞再循环方法在整个培养期间产生L-谷氨酸活性的改变的结果是显而易见的。附图1显示了在未审查的日本专利公开申请 No.62-48394 描述的本发明方法的培养条件。但是对于本发明的连续培养方法，加入500毫克/升聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯，随后连续供给含有葡萄糖， KH_2PO_4 ， MgSO_4 ，大豆蛋白水解液和聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯的补料溶液，并且提取培养液。因此，本发明的方法与细胞再循环连续培养相比可以稳定地保持高水平的L-谷氨酸的生产力。

由本发明方法使用的发酵系统的代表性的例子显示于附图2。优选的是，通常在单个发酵罐中进行实际的培养控制，生产具有高生产力的新鲜细菌细胞的同时完成生产L-谷氨酸的连续培养程序。但是，令人满意的是不论发酵罐的数量，在生长细菌的同时生产L-谷氨酸的连续培养方法。有时使用几个发酵罐，因为发酵罐的体积小。在这种情况下，将发酵罐线性或平行连接在一起进行连续培养，以便可以获得L-谷氨酸的高生产力，只要将每个发酵罐的培养条件调节到在细菌生长条件下生产L-谷氨酸。

采用本发明的方法，以高生产速率连续地生产L-谷氨酸。利用连续的生产过程，导致实验室工作降低，延长了培养期。此外，与细胞再循环连续培养方法和多步骤连续培养方法等等相比，该系统是简单的，以致于本发明方法可有效地降低固定成本和细菌污染。

实施例

在下面的实施例中对本发明进行详细描述。

25

实施例1

将含有30克/升葡萄糖，1克/升 KH_2PO_4 ，0.4克/升 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，4克/升尿，20毫克/升 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，20毫克/升 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，15毫升/升大豆蛋白水解液和300微克/升生物素的培养基(30毫升)倾倒到500毫升培养瓶中，随后在115℃加热灭菌10分钟。将其冷却到室温，随后接种谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 进行种子培养，在30℃培养24小时。

将含有 60 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(270 毫升)倾倒入 1 升预先灭菌的发酵罐中, 随后加入上面所述的种子培养液(30 毫升), 获得的培养液在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养。通气速率是 300 毫升/分钟, 用氨气保持 pH 在 7.5。

- 5 在开始培养 5 小时之后, 加入聚氧乙烯脱水三梨醇甘油 一棕榈酸酯至总浓度为 500 毫克/升。向发酵罐中以 30 毫升/小时的速率连续加入含有 180 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 500 毫克/升聚氧乙烯脱水三梨醇甘油 一棕榈酸酯的补料溶液, 提取同样体积的培养液, 将反应器中工作体积保持在不变的体积。

- 10 在所有提取培养液中糖浓度是 5 克/升或更低。

附图 3 显示在整个培养期间比生长速率的变化。这里术语“比生长速率”是指比例不变, 只要非常短的时间 dT 内细菌生长浓度 dX 与该时间内存在的细菌的浓度 X 成比例, 该常数以升/小时的单位表示(升/小时)。浓度 X 是包含于单位体积的培养液中的细胞的干重(以“克/升”表示)。另外, 比生长速率的相对值是指当指数生长起始降低的比生长速率定义为 1 时的相对值。与分批补料培养方法不同, 通过本发明连续培养方法整个培养期间进行连续的细菌生长。

- 连续培养 40 小时的结果是 L - 谷氨酸的产量是 56 %, 其生产力是 5 克/升/小时。通过将培养过程获得的 L - 谷氨酸的总量除以培养过程使用的糖的总量计算出产量, 其中所述量是重量比。根据本文前面提到的通式计算出生产力。

为了进行比较, 也检测分批补料培养方法。

- 特别是, 将含有 60 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(270 毫升)倾倒入 1 升预先灭菌的发酵罐中, 随后加入上面所述的种子培养液(30 毫升), 在相同条件下培养。

- 开始培养 5 小时之后, 加入大量的聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯至终浓度为 2000 毫克/升。以 6 毫升/小时的速率连续加入含有 400 克/升葡萄糖, 和 2000 毫克/升聚氧乙烯脱水三梨醇甘油一棕榈酸酯的补料溶液。但是, 不提取同样体积的培养液, 以便发酵罐中工作体积提高。如附图 3 所示, 在这

些条件下, 在 20 小时之前终止细菌生长。因此, 继续培养直到 40 小时, 结果获得 56 % 产量的 L - 谷氨酸和其生产力是 2.6 克/升/小时。如上所述, 以相同的方式计算产量。通过将每单位体积的最终培养液中培养过程产生的 L - 谷氨酸的量(克/升)除以培养时间(小时)计算出生产力。

- 5 与分批补料培养方法相比, 采用本发明连续培养方法生产的 L - 谷氨酸是 2 倍/单位时间, 其生产力显著提高。

实施例 2

- 将含有 30 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 0.4 克/升 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 克/升尿, 20 毫克/升 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 毫克/升 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(30 毫升)倾倒到 500 毫升培养瓶中, 随后在 115 °C 加热灭菌 10 分钟。将其冷却到室温, 随后接种谷氨酸棒杆菌 FERM BP - 4172(AJ 12821) 进行种子培养, 在 30 °C 培养 24 小时。

- 将含有 60 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(270 毫升)倾倒到 1 升预先灭菌的发酵罐中, 随后加入上面所述的种子培养液(30 毫升), 获得的培养液在 30 °C 培养。通气速率是 300 毫升/分钟, 用氨气保持 pH 在 7.5。向培养液中以 25 毫升/小时的速率连续加入含有 300 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液的补料溶液, 提取同样体积的培养液, 将发酵罐中工作体积保持在不变的体积。

- 20 在所有提取培养液中糖浓度是 5 克/升或更低。

附图 4 显示在整个培养期间比生长速率的变化。它表明整个培养期间细菌生长是连续的。

连续培养 40 小时的结果是 L - 谷氨酸的产量是 56 %, 其生产力是 6.6 克/升/小时。

- 25 为了进行比较, 也检测分批补料培养方法。

- 具体地说, 将含有 60 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(270 毫升)倾倒到 1 升预先灭菌的发酵罐中, 随后加入上面所述的种子培养液(30 毫升), 在相同条件下培养。以 7 毫升/小时的速率向培养液中连续加入含有 500 克/升葡萄糖的补料溶液, 直到 40 小时。结果获得 54 % 产量的 L - 谷氨酸和其生产力是 3.2 克
- 30

/升/小时。

按照实施例 1 所述方式计算产量和生产力。

与分批补料培养方法相比,采用本发明连续培养方法生产的 L - 谷氨酸是 2 倍/单位时间,其生产力显著提高。

5

实施例 3

将含有 30 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 0.4 克/升 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 克/升尿, 20 毫克/升 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 毫克/升 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(30 毫升)倾倒入 500 毫升培养瓶中,随后在 115 °C 加热灭菌 10 分钟。将其冷却到室温,随后接种谷氨酸棒杆菌 FERM
10 BP - 4172(AJ 12821) 进行种子培养,在 30 °C 培养 24 小时。

将含有 60 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液和 300 微克/升生物素的培养基(270 毫升)倾倒入 1 升预先灭菌的发酵罐中,随后加入上面所述的种子培养液,获得的培养液在 30 °C 培养。通气速率是 300 毫升/分钟,用氨气保持 pH 在 7.5。以 40 毫升/小时的速率向
15 培养液中连续加入含有 180 克/升葡萄糖, 1 克/升 KH_2PO_4 , 1 克/升 MgSO_4 , 15 毫升/升大豆蛋白水解液的补料溶液,随后提取同样体积的培养液,将发酵罐中工作体积保持在不变的体积。

在所有提取培养液中糖浓度是 5 克/升或更低。

连续培养 100 小时的结果是 L - 谷氨酸的产量是 55 %,其生产力是 8.3
20 克/升/小时。按照实施例 1 所述方式计算产量和生产力。

附图 5 显示在整个培养期间生产 L - 谷氨酸的活性的变化。它表明在长时间的培养期间保持高水平的活性。以细胞重量(干重: 克)为基础,单位时间(小时内)产生的 L - 谷氨酸的量(克)表示产生 L - 谷氨酸的活性。

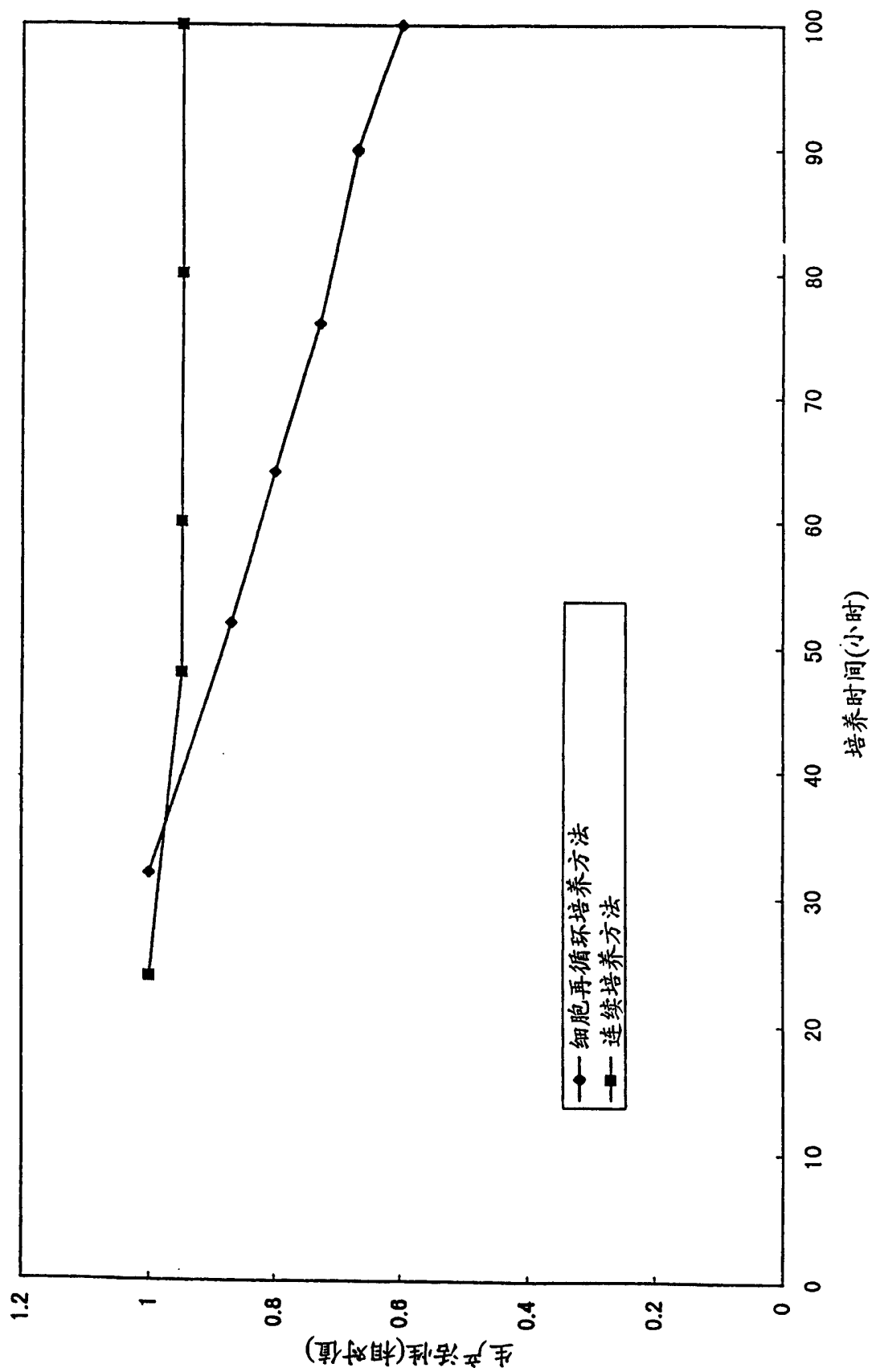


图 1

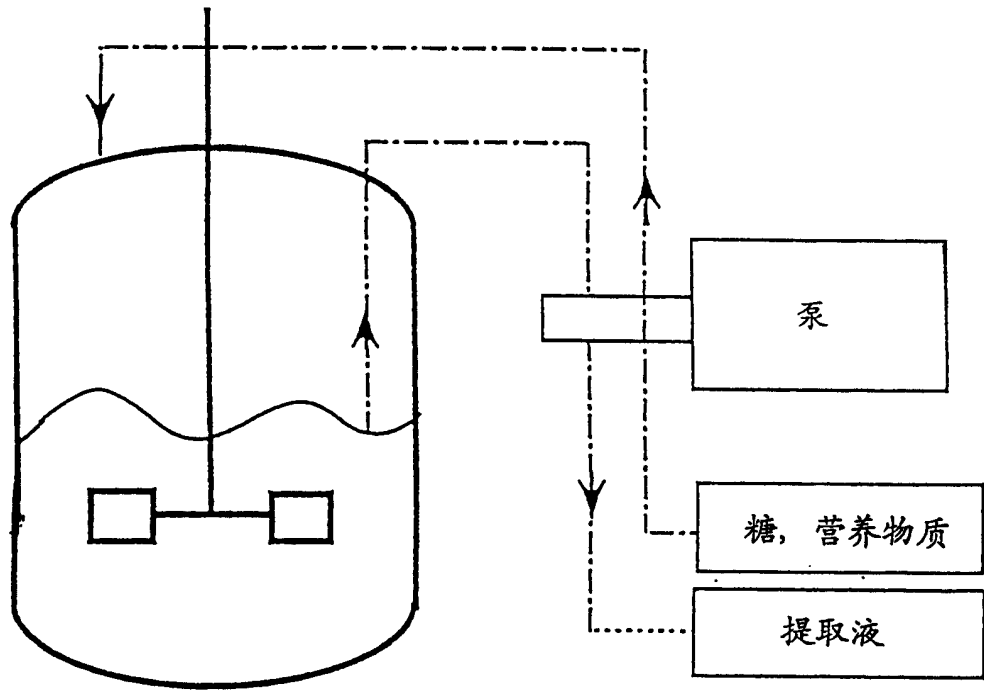


图 2

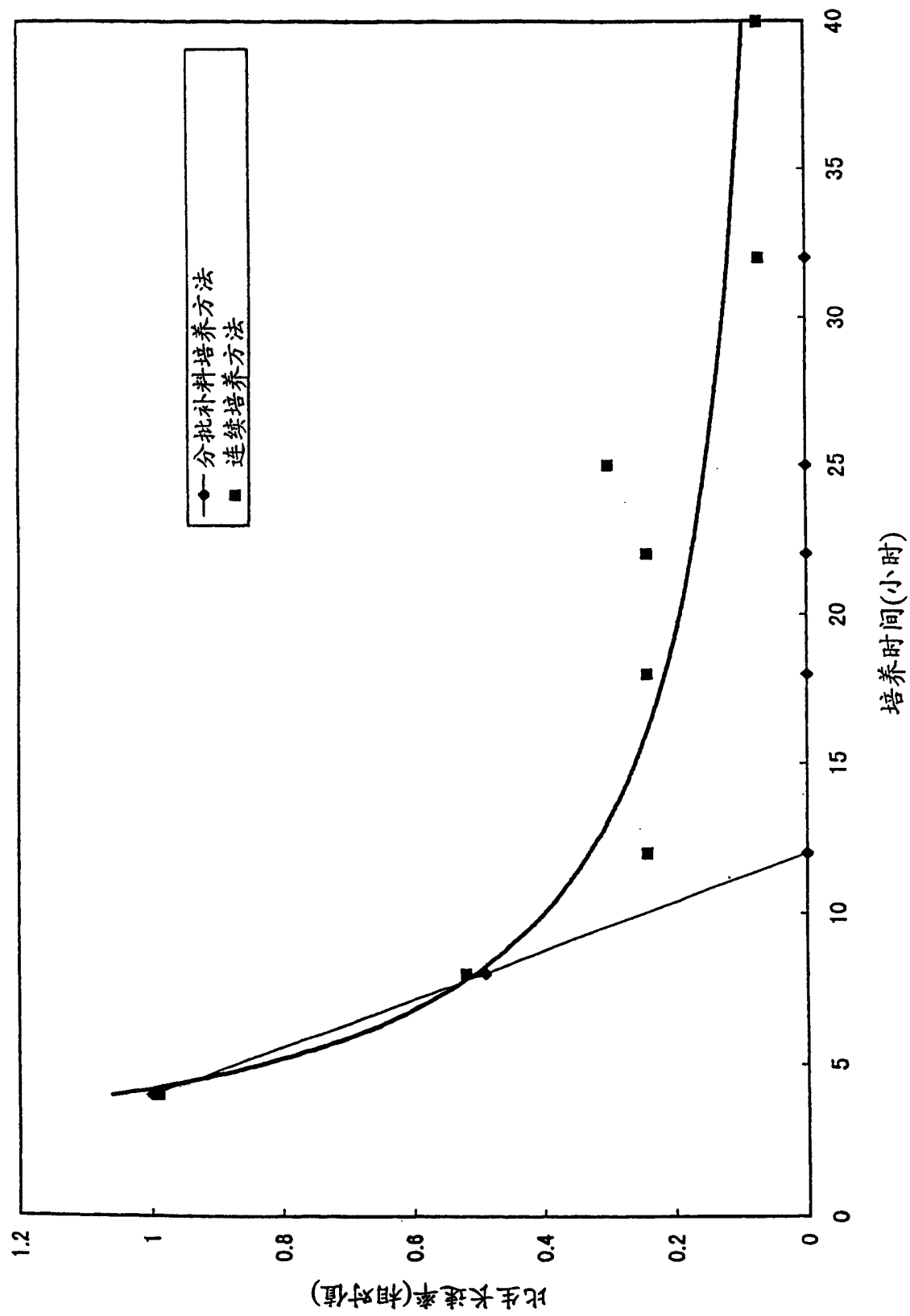


图 3

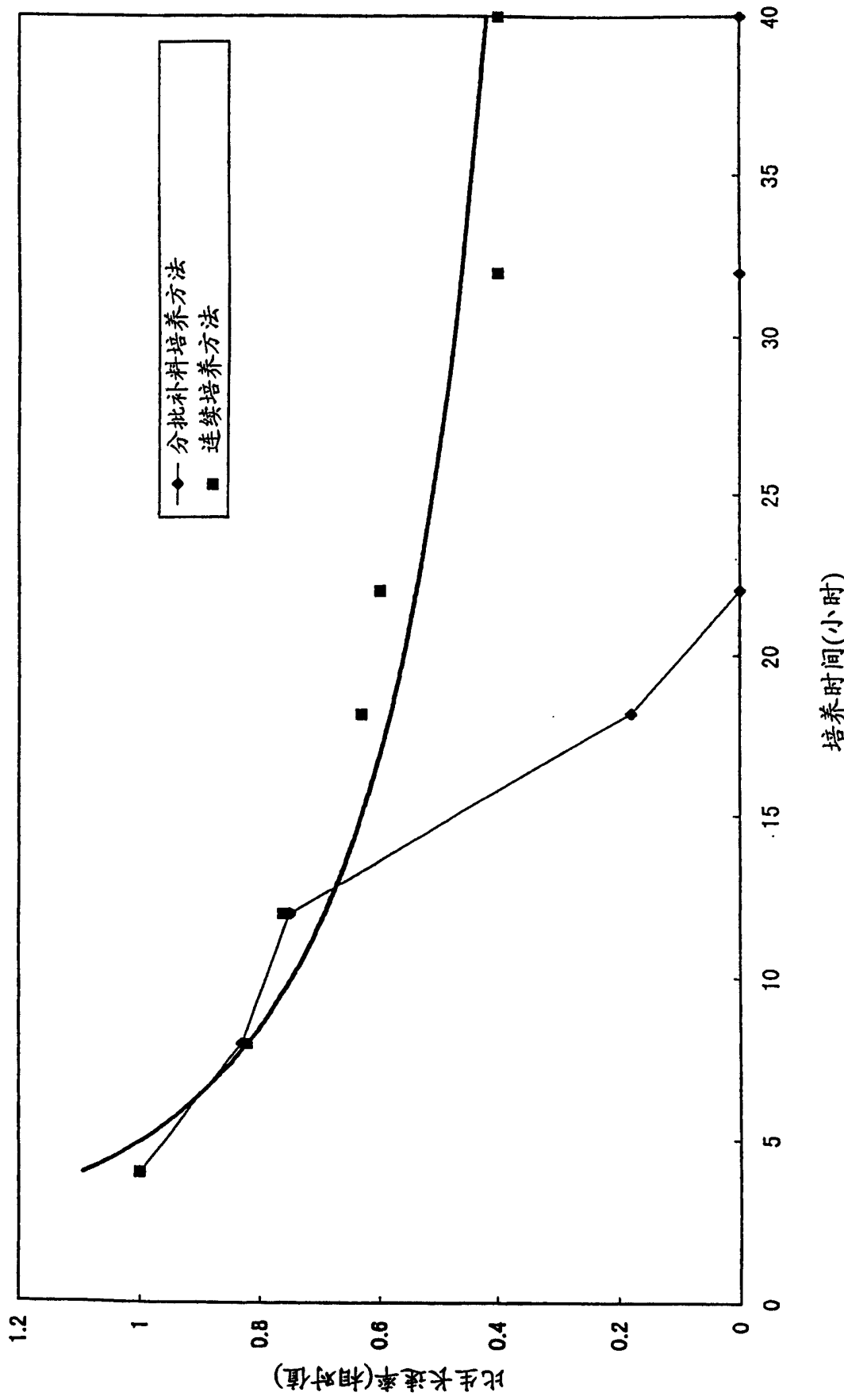


图 4

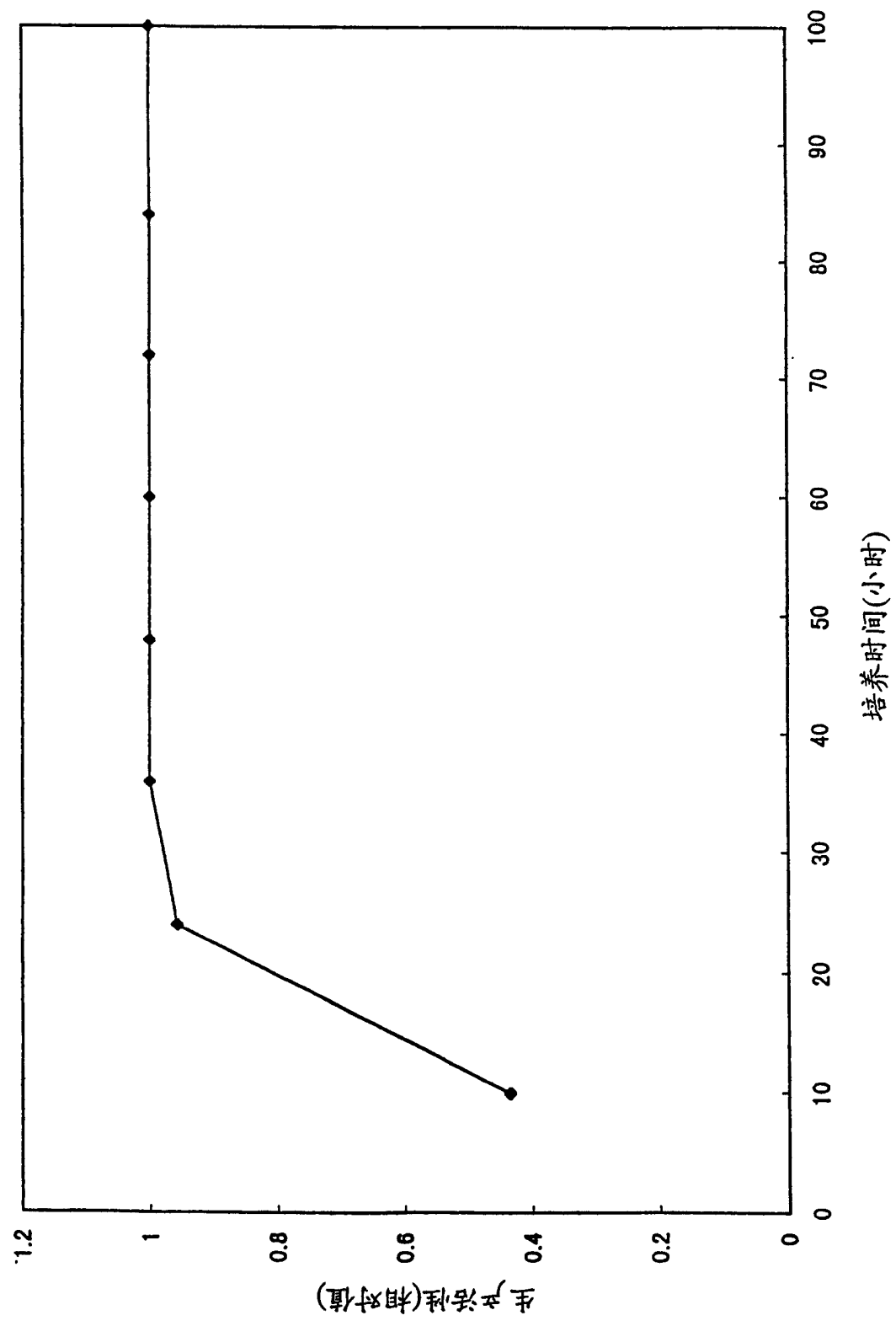


图 5