(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111057727 B
(45)授权公告日 2021.10.08

(21)申请号 201911293777.0

(22)申请日 2019.12.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111057727 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(73)专利权人 新疆阜丰生物科技有限公司
地址 830026 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市经济技术开发区(头屯河区)甘泉堡工业区

(72)发明人 包鑫 边恩来 崔小红 冯世红 李江雷 李江涛 史静东

(51)Int.Cl.
C12P 13/02(2006.01)
C07C 231/24(2006.01)
C07C 237/06(2006.01)
C12R 1/15(2006.01)

(56)对比文件
CN 109628518 A,2019.04.16
CN 109628518 A,2019.04.16
CN 108285913 A,2018.07.17
CN 101085748 A,2007.12.12
CN 101631849 A,2010.01.20
US 2005255567 A1,2005.11.17
刘春辉 等.L -谷氨酰胺产生菌的选育和代谢流量分析.《生物技术》.2009,第19卷(第4期),
郭春前 等.响应面法优化L-谷氨酰胺发酵培养基的研究.《生物技术通讯》.2013,第24卷(第4期),
Thompson.The Effect of Inositol and Nucleic Acid Bases on the Fermentation Rate of an Ale Yeast.《Annual meeting - American Society of Brewing Chemists》.2018,第31卷(第1期),

审查员 郝攀

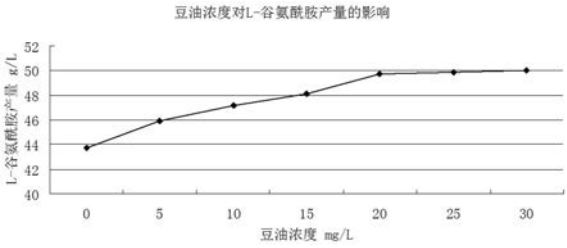
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法

(57)摘要

本发明属于L-谷氨酰胺的生产领域,公开了一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法,其包括如下步骤:1)发酵,2)陶瓷膜过滤,3)浓缩重溶,4)模拟移动床色谱,5)活性炭脱色,6)精制浓缩、结晶和离心,7)流化床烘干。本发明提高了L-谷氨酰胺的产量、纯度、提取收率、产品质量以及生产效率,同时,减少了酸碱的用量,降低了废水、废物的排放量,减轻了环保压力。



CN 111057727 B

1.一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法，所述方法包括如下步骤：1)发酵，2)陶瓷膜过滤，3)浓缩重溶，4)模拟移动床色谱，5)活性炭脱色，6)精制浓缩、结晶和离心，7)流化床烘干；

所述方法包括如下步骤：

步骤1)发酵：将谷氨酸棒杆菌种子液以5-15％接种量接种到含有发酵培养基的发酵罐中，发酵时间为48h；发酵时间分为两个阶段，第一阶段为0-24h，发酵温度为32℃，通过流加氨水控制pH在5.0；第二阶段为24-48h，发酵温度为32℃，通过流加氨水控制pH在7.0，第二阶段完成后，得到L-谷氨酰胺发酵液；整个发酵过程中，搅拌速度控制在200rpm，溶氧量控制在20%，通过流加葡萄糖溶液，控制发酵罐中葡萄糖浓度不低于0.4%；

步骤2)陶瓷膜过滤：将步骤1)所得L-谷氨酰胺发酵液调pH至5.0，然后通过孔径为0.05-0.1um的陶瓷膜过滤，除去菌体蛋白和其它颗粒杂质，收集陶瓷膜清液；

步骤3)浓缩重溶：将步骤2)所得陶瓷膜清液经四效蒸发器进行浓缩，收集浓缩液，然后将浓缩液进行一次结晶，离心收集所得母液和粗品，往粗品中加入纯水进行溶解，收集所得溶液；

步骤4)模拟移动床色谱：将步骤3)所得溶液经模拟移动床色谱进行L-谷氨酰胺和其他杂质的分离；将L-谷氨酰胺进行洗脱，得到L-谷氨酰胺提取液；

步骤5) 活性炭脱色：将步骤4)所得L-谷氨酰胺提取液添加活性炭进行脱色，温度控制在55℃，脱色时间为30min，过滤得脱色液；

步骤6)精制浓缩、结晶和离心：将步骤5)所得脱色液温度控制在45℃，经蒸发器进行精制浓缩，使L-谷氨酰胺料液浓度浓缩至25％，再将浓缩后的料液进行冷却结晶，养晶15小时后，离心，得L-谷氨酰胺晶体；

步骤7)流化床烘干：将步骤6)所得L-谷氨酰胺晶体投入流化床进行烘干，控制流化床内温度60-65℃，粉碎得L-谷氨酰胺成品；

所述步骤1)中，发酵至24h时，向发酵培养基中流加促进液；所述促进液包括磷酸二氢钾、琥珀酸以及壳聚糖任意二者以上的组分；

按照0.05ml/min.L，即每升发酵液中每分钟流加0.05ml的速度向发酵培养基中添加促进液，直至发酵结束；

所述促进液的组分为：磷酸二氢钾20g/L，琥珀酸15g/L，壳聚糖200mg/L。

2.根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述发酵罐培养基包含豆油。

3.根据权利要求2所述的方法，其特征在于，所述发酵罐培养基的组分为：硫酸二氢钾1.5g/L，葡萄糖100g/L，一水硫酸锰 0.01g/L，七水硫酸亚铁 0.01g/L，七水硫酸锌 0.01g/L，七水硫酸镁0.4g/L，硫酸铵37.2g/L，VB_1 0.01g/L，玉米浆5g/L，豆油15-25ml/L。

4.根据权利要求1-3任其一所述的方法，其特征在于，所述陶瓷膜为无机微滤膜，微滤温度为40℃，工作压力：进压为3.3bar，出压为1bar。

一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法

技术领域

[0001] 本发明属于L-谷氨酰胺生产技术领域，具体涉及一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法。

背景技术

[0002] L-谷氨酰胺(L-Glutamine)又称α-氨基戊酰胺酸、谷氨酸-5-酰胺，是白色结晶或晶性粉末，能溶于水，无臭，无毒，几乎不溶于甲醇、乙醇、乙醚、苯、丙酮、醋酸乙酯，氯仿和乙醇乙酯等，在中性溶液中不稳定，在醇、碱或热水中易分解成谷氨醇或丙酯化为吡咯羧醇，无臭，稍有甜味。

[0003] L-谷氨酰胺是人体中最为丰富的氨基酸，是一种非必须氨基酸。在正常的情况下，人体内合成的谷氨酰胺能够满足代谢需要，但是在剧烈运动、创伤、感染等应急和高代谢状态下，体内谷氨酰胺的含量降低，必须从外界补充。它在维持肠道功能、提高机体免疫功能、改善酸碱平衡失调、解毒等方面有很大的作用，在临床上是一种用途广泛的氨基酸，在医药上用于治疗多种疾病。同时，谷氨酰胺用于氨基酸输液、医药中间体，也可用作食品添加剂，除此之外，还可以用作重要的生化试剂。

[0004] 但国内药用L-谷氨酰胺主要依赖于进口，国际市场需求旺盛，由于现有提取工艺所产出的谷氨酰胺成品很难达到某些客户的要求，如何提高发酵效率，降低发酵成本，以及采用模拟移动床色谱的方法提取L-谷氨酰胺从而满足客户的需求，提高产品产量和质量，是现有技术需要解决的关键问题。

发明内容

[0005] 为解决上述问题，克服现有技术的不足之处，本发明提供了一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法，该工艺简单易操作，达到提高发酵产量，减少污水的产生，降低生产成本，减少劳动强度以及提高产品的质量、纯度等目的。

[0006] 本发明的目的是通过下述技术方案实现的。

[0007] 一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法，所述方法包括如下步骤：1)发酵，2)陶瓷膜过滤，3)浓缩重溶，4)模拟移动床色谱，5)活性炭脱色，6)精制浓缩、结晶和离心，7)流化床烘干。

[0008] 具体地，所述方法包括如下步骤：

[0009] 步骤1)发酵：将谷氨酸棒杆菌种子液以5-15％接种量接种到含有发酵培养基的发酵罐中，发酵时间为48h；发酵时间分为两个阶段，第一阶段为0-24h，发酵温度为32℃，通过流加氨水控制pH在5.0；第二阶段为24-48h，发酵温度为32℃，通过流加氨水控制pH在7.0，第二阶段完成后，得到L-谷氨酰胺发酵液；整个发酵过程中，搅拌速度控制在200rpm，溶氧量控制在20%，通过流加葡萄糖溶液，控制发酵罐中葡萄糖浓度不低于0.4%；

[0010] 步骤2)陶瓷膜过滤：将步骤1)所得L-谷氨酰胺发酵液调pH至5.0，然后通过孔径为0.05-0.1um的陶瓷膜过滤，除去菌体蛋白和其它颗粒杂质，收集陶瓷膜清液；

[0011] 步骤3)浓缩重溶:将步骤2)所得陶瓷膜清液经四效蒸发器进行浓缩,收集浓缩液,然后将浓缩液进行一次结晶,离心收集所得母液和粗品,往粗品中加入纯水进行溶解,收集所得溶液;

[0012] 步骤4)模拟移动床色谱:将步骤3)所得溶液经模拟移动床色谱进行L-谷氨酰胺和其他杂质的分离;将L-谷氨酰胺进行洗脱,得到L-谷氨酰胺提取液;

[0013] 步骤5) 活性炭脱色:将步骤4)所得L-谷氨酰胺提取液添加活性炭进行脱色,温度控制在55℃,脱色时间为30min,过滤得脱色液;

[0014] 步骤6)精制浓缩、结晶和离心:将步骤5)所得脱色液温度控制在45℃,经蒸发器进行精制浓缩,使L-谷氨酰胺料液浓度浓缩至25%,再将浓缩后的料液进行冷却结晶,养晶15小时后,离心,得L-谷氨酰胺晶体;

[0015] 步骤7)流化床烘干:将步骤6)所得L-谷氨酰胺晶体投入流化床进行烘干,控制流化床内温度60-65℃,粉碎得L-谷氨酰胺成品。

[0016] 进一步地,所述步骤1)中,发酵至24h时,向发酵培养基中流加促进液,直至发酵结束。

[0017] 进一步地,所述促进液包括磷酸二氢钾、琥珀酸以及壳聚糖任意二者以上的组分

[0018] 进一步地,所述发酵罐培养基包含豆油。

[0019] 优选地,所述发酵罐培养基的组分为:硫酸二氢钾1.5g/L,葡萄糖100g/L,一水硫酸锰 0.01g/L,七水硫酸亚铁 0.01g/L,七水硫酸锌 0.01g/L,七水硫酸镁0.4g/L,硫酸铵37.2g/L,VB_1 0.01g/L,玉米浆5g/L,豆油15-25ml/L。

[0020] 优选地,所述促进液包含磷酸二氢钾,琥珀酸以及壳聚糖。

[0021] 优选地,所述促进液的组分为:磷酸二氢钾20g/L,琥珀酸15g/L,壳聚糖200mg/L。

[0022] 优选地,所述陶瓷膜为无机微滤膜,微滤温度为40℃,工作压力:进压为3.3bar,出压为1bar。

[0023] 与现有技术相比,本发明的技术方案具有以下突出优点及独特性:

[0024] 谷氨酸棒杆菌好氧发酵产L-谷氨酰胺过程中,从气相到液相的氧传递是影响菌株生长和L-谷氨酰胺生成的重要因素;氧气在培养基中的可溶性非常低,采用豆油作为在水相中不混溶的辅助液体氧载体,比水具有更高的氧气溶解性,从而能够提高L-谷氨酰胺的发酵产量。

[0025] 本发明通过对促进液进行组分优化,提高了L-谷氨酰胺产量。发酵中期,菌株增殖速度放缓,以合成代谢产物为主,壳聚糖上的氨基与细菌细胞壁中带负电荷的磷壁酸或脂多糖结合,并螯合金属阳离子,从而改变细胞壁的通透性,有利于促进谷氨酰胺分泌到胞外。琥珀酸对三羧酸循环有一定促进作用,而对乙醛酸循环途径具有抑制作用,从而导致中间代谢物更多地流向三羧酸循环途径,从提高了L-谷氨酰胺的发酵转化效率。磷酸盐是L-谷氨酰胺发酵过程中必需的,但浓度不能过高,否则会转向缬氨酸发酵,通过发酵中期缓慢流加磷酸盐,从而控制磷酸盐的浓度不宜过高,达到提高转化率效果。

[0026] 本发明采用模拟移动床色谱分离技术替代离子交换系统分离和提取L-谷氨酰胺,进行物理吸附的原理,对谷氨酰胺发酵液中产生的其他杂质进行分离,从而提高谷氨酰胺的纯度。本发明采用四效蒸发器,蒸发过程在真空作用下,既保证了物料的卫生要求,同时保证了环保要求,同时大大降低了蒸发温度,节约了生蒸汽。本发明通过物理吸附可有效的

去除杂质,提高产品质量,同时,减少了酸碱的用量,降低了废水排放量。

附图说明

[0027] 图1:豆油浓度对L-谷氨酰胺产量的影响;

[0028] 图2:豆油浓度对菌体浓度的影响;

[0029] 图3:不同组分的促进液对L-谷氨酰胺产量的影响。

具体实施方式

[0030] 为了使本技术领域的人员更好地理解本申请中的技术方案,下面将结合本申请具体实施例,对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

[0031] 实施例1

[0032] 一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法,其包括如下步骤:

[0033] 步骤1)发酵:菌株选用谷氨酸棒杆菌GM34,可参见“响应面法优化L-谷氨酰胺发酵培养基的研究,生物技术通讯2013年”。

[0034] 将谷氨酸棒杆菌种子液(OD_{600nm}为13.1)以10%接种量接种到含有50L发酵培养基的100L发酵罐中,发酵时间为48h;发酵时间分为两个阶段,第一阶段为0-24h,发酵温度为32℃,通过流加氨水控制pH在5.0;第二阶段为24-48h,发酵温度为32℃,通过流加氨水控制pH在7.0,第二阶段完成后,得到L-谷氨酰胺发酵液;

[0035] 发酵至24h时,按照0.05ml/min.L(每升发酵液中每分钟流加0.05ml)的速度向发酵培养基中添加促进液,直至发酵结束;

[0036] 整个发酵过程中,搅拌速度控制在200rpm,溶氧量控制在20%,通过流加质量分数为60%的葡萄糖溶液,控制发酵罐中葡萄糖浓度不低于0.4%;

[0037] 所述发酵罐培养基的组分为:硫酸二氢钾1.5g/L,葡萄糖100g/L,一水硫酸锰0.01g/L,七水硫酸亚铁 0.01g/L,七水硫酸锌 0.01g/L,七水硫酸镁0.4g/L,硫酸铵37.2g/L,VB_1 0.01g/L,玉米浆5g/L,豆油20ml/L。

[0038] 促进液:磷酸二氢钾20g/L,琥珀酸15g/L,壳聚糖200mg/L。

[0039] 步骤2)陶瓷膜过滤:将步骤1)所得L-谷氨酰胺发酵液调pH至5.0,然后通过孔径为0.05-0.1um的陶瓷膜过滤,除去菌体蛋白和其它颗粒杂质,收集陶瓷膜清液。

[0040] 步骤3)浓缩重溶:将步骤2)所得陶瓷膜清液经四效蒸发器进行浓缩,收集浓缩液,然后将浓缩液进行一次结晶,离心收集所得母液和粗品,往粗品中加入纯水进行溶解,收集所得溶液。

[0041] 步骤4)模拟移动床色谱:将步骤3)所得溶液经模拟移动床色谱进行L-谷氨酰胺和其他杂质的分离;将L-谷氨酰胺进行解脱,得到高纯度的L-谷氨酰胺提取液。

[0042] 步骤5) 活性炭脱色:将步骤4)所得L-谷氨酰胺提取液添加适量的活性炭进行脱色,调pH,温度控制在55℃,脱色时间为30min,过滤得脱色液。

[0043] 步骤6)精制浓缩、结晶和离心:将步骤5)所得脱色液温度控制在45℃,经蒸发器进行精制浓缩,使L-谷氨酰胺料液浓度浓缩至25%,再将浓缩后的料液进行冷却结晶,开启冷

冻水降温,速度8℃/h,料液温度降至5℃之后,停止搅拌,养晶15小时后,启动离心机离心,得L-谷氨酰胺晶体。

[0044] 步骤7)流化床烘干:将步骤6)所得晶体投入流化床进行烘干,控制流化床内温度65℃,粉碎得L-谷氨酰胺成品。经测定L-谷氨酰胺指标:L-谷氨酰胺收率为87.3%;纯度大于99%。

[0045] 本发明分离技术可改善产品的质量,进一步提高收率,增加产量,为谷氨酰胺市场提供高性价比的产品;与现有分离提取工艺相比较,本发明产品收率提高2-5%,同时减少污水的排放,减少对环境的污染,增加了社会效益,该技术具有很大的市场推广前景。

[0046] 实施例2

[0047] 一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法,其包括如下步骤:

[0048] 将谷氨酸棒杆菌种子液(OD_{600nm}为13.4)以9%接种量接种到含有50L发酵培养基的100L发酵罐中,发酵时间为48h;发酵时间分为两个阶段,第一阶段为0-24h,发酵温度为32℃,通过流加氨水控制pH在5.0;第二阶段为24-48h,发酵温度为32℃,通过流加氨水控制pH在7.0,第二阶段完成后,收集发酵液;

[0049] 发酵至24h时,按照0.07ml/min.L(每升发酵液中每分钟流加0.07ml)的速度向发酵培养基中添加促进液,直至发酵结束;

[0050] 整个发酵过程中,搅拌速度控制在200rpm,溶氧量控制在25%,通过流加质量分数为65%的葡萄糖溶液,控制发酵罐中葡萄糖浓度不低于0.4%,

[0051] 所述发酵罐培养基的组分为:硫酸二氢钾1.5g/L,葡萄糖100g/L,一水硫酸锰0.01g/L,七水硫酸亚铁 0.01g/L,七水硫酸锌 0.01g/L,七水硫酸镁0.4g/L,硫酸铵37.2g/L,VB_1 0.01g/L,玉米浆5g/L,豆油15ml/L。

[0052] 促进液:磷酸二氢钾20g/L,琥珀酸20g/L,壳聚糖150mg/L。

[0053] 分离提取方法同实施例1。

[0054] 对比例1

[0055] 一种生产、分离和提取L-谷氨酰胺的方法,其包括如下步骤:

[0056] 将谷氨酸棒杆菌种子液(OD_{600nm}为13.1)以10%接种量接种到含有50L发酵培养基的100L发酵罐中,发酵时间为48h;发酵时间分为两个阶段,第一阶段为0-24h,发酵温度为32℃,通过流加氨水控制pH在5.0;第二阶段为24-48h,发酵温度为32℃,通过流加氨水控制pH在7.0,第二阶段完成后,得到L-谷氨酰胺发酵液;

[0057] 整个发酵过程中,搅拌速度控制在200rpm,溶氧量控制在20%,通过流加质量分数为60%的葡萄糖溶液,控制发酵罐中葡萄糖浓度不低于0.4%;

[0058] 所述发酵罐培养基的组分为:硫酸二氢钾1.5g/L,葡萄糖100g/L,一水硫酸锰0.01g/L,七水硫酸亚铁 0.01g/L,七水硫酸锌 0.01g/L,七水硫酸镁0.4g/L,硫酸铵37.2g/L,VB_1 0.01g/L,玉米浆5g/L。

[0059] 分离提取方法同实施例1。

[0060] 实施例3

[0061] 1、在对比例1的基础上,研究发酵培养基中豆油添加量对L-谷氨酰胺产量的影响。设置豆油的浓度分别为0,5,10,15,20,25,30,单位ml/L,如图1-2所示,随着豆油浓度的增加,菌体浓度和L-谷氨酰胺发酵产量也随之提高,增大到15ml/L时,L-谷氨酰胺增幅开始放

缓，豆油浓度达到20ml/L，L-谷氨酰胺产量接近峰值，较不添加豆油时，L-谷氨酰胺产量提高了13.7%，菌体浓度增加了6.5%；继续增加豆油浓度，对L-谷氨酰胺的影响较小；谷氨酸棒杆菌好氧发酵产L-谷氨酰胺过程中，从气相到液相的氧传递是影响菌株生长和L-谷氨酰胺生成的重要因素，而氧气在培养基中的可溶性非常低，采用豆油作为在水相中不混溶的辅助液体氧载体，比水具有更高的氧气溶解性，从而能够提高L-谷氨酰胺的发酵产量。

[0062] 2、发酵培养基中选择添加豆油添加量为20ml/L，研究促进液组分对L-谷氨酰胺产量的影响。考虑到发酵体积的增加会对产物造成稀释作用，选择促进液添加总量5-10%之间较为合适，设置试验流速为0.05ml/min.L时，流加完成后，增加的总量为7.2%，较为合适。设定不同原料的促进液；其中，组1：磷酸二氢钾+琥珀酸；组2：磷酸二氢钾+壳聚糖；组3：琥珀酸+壳聚糖；组4：本发明实施例1；各组促进液原料的浓度同实施例1。如图3所示，通过比较组1-4，组4对L-谷氨酰胺产量的影响最大，能够显著提高L-谷氨酰胺产量，较未使用促进液相比较，提高了19.8%，组2增幅为7.8%，组3增幅为13.4%，组4增幅为11.4%。可见，磷酸二氢钾+琥珀酸+壳聚糖三种组分组合对L-谷氨酰胺产量具有一定的正向促进作用，协同性能好。

[0063] 上述虽然结合实施例对本发明的具体实施方式进行了介绍，但并非对本发明保护范围的限制，所属领域技术人员应该明白，这对本领域技术人员而言应该很明确，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明保护的范围。

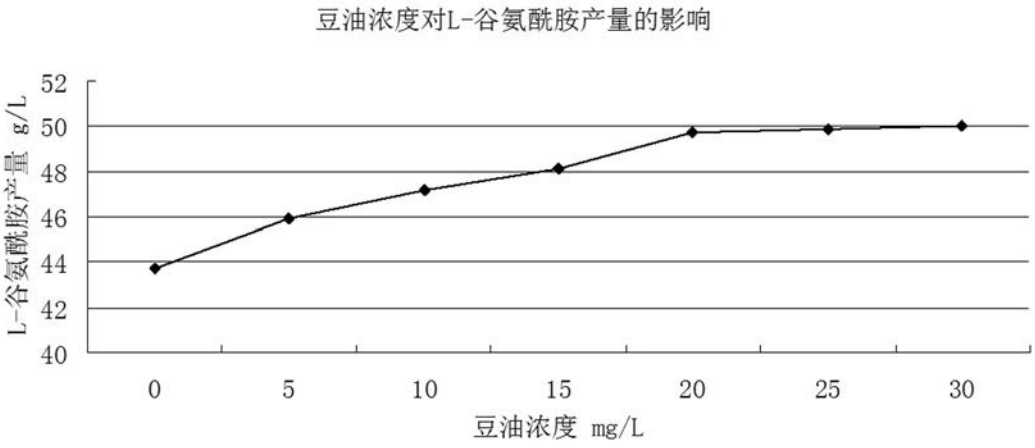

豆油浓度对L-谷氨酰胺产量的影响
L-谷氨酰胺产量 g/L
52
50
48
46
44
42
40
0
5
10
15
20
25
30
豆油浓度 mg/L

图1

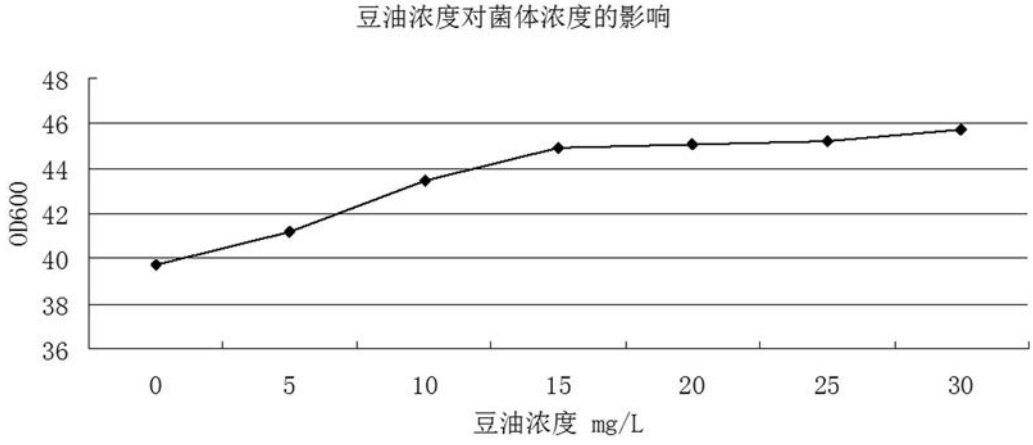

豆油浓度对菌体浓度的影响
OD600
48
46
44
42
40
38
36
0
5
10
15
20
25
30
豆油浓度 mg/L

图2

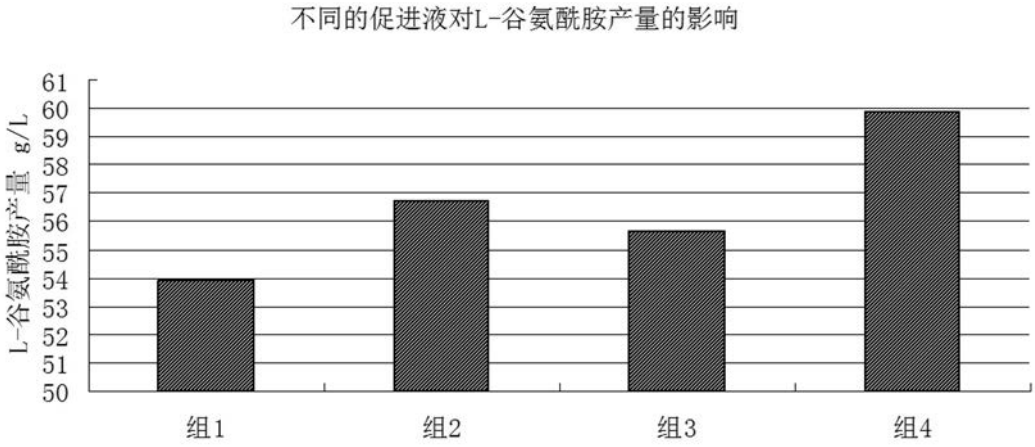

不同的促进液对L-谷氨酰胺产量的影响
L-谷氨酰胺产量 g/L
61
60
59
58
57
56
55
54
53
52
51
50
组1
组2
组3
组4

图3