

〔19〕中华人民共和国专利局

〔51〕Int.Cl.⁴



〔12〕发明专利申请公开说明书

C12P 19/02
/C12P 19/02
C12R 1:01

〔11〕CN 86 1 02773 A

CN 86 1 02773 A

43〕公开日 1986年11月12日

〔21〕申请号 86 1 02773

〔22〕申请日 86.4.22

〔30〕优先权

〔32〕85.4.22 〔33〕日本 〔31〕86747/1985

〔71〕申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪府大阪市东区道修町2丁目
27番地

〔72〕发明人 金高一彦 义永洋之 山口高正

〔74〕专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 罗 宏 卢新华

〔54〕发明名称 生产L-山梨糖的方法

〔57〕摘要

在微生物氧化D-山梨糖醇生产L-山梨糖的方法中,是将一种适宜的微生物在下述培养基内培养,即在该微生物整个生长期中,溶解氧浓度控制在大约1-4 ppm的范围。这样,L-山梨糖的产率较通常的方法有很大的增加。

权 利 要 求 书

1、应用 D—山梨糖醇的微生物氧化生产 L—山梨糖的方法,它包括在培养基内培养适宜的微生物,在该微生物整个生长期內,将培养基内溶解氧浓度控制在大约 1—4 P P m。

2、根据权利要求 1 的方法,其中溶解氧浓度在 1—4 P P m 的选定值时,其偏差应控制在约 ± 0.3 P P m 的范围以内。

3、根据权利要求 1 的方法,其中培养过程是以合成培养基作为主要培养基进行的。

4、根据权利要求 3 的方法,其中合成培养基内含有作为氮源的醋酸铵。

5、根据权利要求 1 的方法,其中微生物属于葡萄糖杆菌属。

6、根据权利要求 1 的方法,其中微生物属于弱氧化葡萄糖杆菌种。

7、根据权利要求 1 的方法,其中微生物为氧化葡萄糖杆菌种。

生产 L—山梨糖的方法

本发明是关于用微生物的方法生产 L—山梨糖。

L—山梨糖作为维生素 C 合成时的起始原料是很有价值的。在此以前，L—山梨糖已经用微生物（如葡萄糖杆菌属）氧化 D—山梨糖醇来生产。

在用传统的发酵法生产 L—山梨糖时，从 D—山梨糖醇转换成 L—山梨糖最大的产率为 93%，此外，还有较大量的 5—果酮糖，D—果糖及 / 和 2—葡萄糖酮酸副产品产生。为了降低维生素 C 生产中原料的成本，则需要增加从 D—山梨糖醇到 L—山梨糖的转化率，以及尽可能地抑制以上所提到的一些副产物的形成。

鉴于以上情况，本发明者对发展一个生产 L—山梨糖的有效方法作了深入研究，并已经完成了本发明。

本发明是针对用微生物氧化 D—山梨糖醇来生产 L—山梨糖的一个改进方法，它包括将适宜的微生物在下述培养基内培养，即在该微生物整个生长期控制培养基内的溶解氧浓度在约 1—4 ppm 范围内。

按照本发明的生产方法凡能将 D—山梨糖醇氧化成 L—山梨糖的任何微生物都可被应用。这些细菌的例子包括葡萄糖杆菌属的各种细菌，例如：弱氧化葡萄糖杆菌即氧化葡萄糖杆菌。以下是这些适宜的菌株的部分目录。弱氧化葡萄糖杆菌 I F O 3 2 5 4，I F O 3 2 5 7，I F O 1 2 5 2 8，I F O 3 2 5 5，I F O 3 2 5 6，

IFO 3258 及 IFO 3291 以及氧化葡萄糖杆菌 IFO 3189。

以上所例示的菌株以列入 Osaka 发酵研究所 (IFO) 发行, 1984, 第7版的培养目录中, 并存放于该研究所。

所谓“适宜微生物的生长期”即指具体所培养的微生物的培养时间, 包括诱导期或迟缓期到对数生长期。这一时期随不同微生物及所使用的培养条件而异, 但可按照传统的方法作出其生长曲线图就很容易看出来。一般讲培养时间指在培养基内从存在这可利用的氮源到氮源完全消耗为止, 从许多实例看, 它相当于在培养开始后约9小时。

本发明中培养基内溶解氧浓度在整个生长期中被控制在约 1—4 ppm。在这一时期中, 减少溶解氧浓度的偏差是有利的。一般讲, 偏差应控制在由上述浓度范围中所选定值的 ± 0.5 ppm 范围内, 偏差范围最好在约 0.3 ppm 以内。

发酵过程中要随时控制溶解氧的浓度, 方法是连续检测培养基内浓度和调节通气流量, 内压、搅拌条件和其它培养参数。检测最好用对溶解氧敏感的元件作为氧电极溶解氧的浓度可通过如将通气速率调节到大约 0.1—1.0 V.V.m 范围内, 把内压调在 0—2.0 公斤/厘米² 范围内, 逐步地把它们调节到一合适的配比, 控制在一个特定水平。如果需要, 调节搅拌速度也是有益的。

在生长期之后, 培养基内的溶解氧浓度并不需要控制在特定水平。一般讲, 在生长期終了所得到的吹气及搅拌条件下培养过程可在溶解氧浓度约为 0.5—4 ppm 水平继续进行。

本发明的特点是在适宜微生物的整个生长期内, 控制培养基的溶解氧浓度范围在约 1—4 ppm 内。其它条件的应用如下述。

培养基内的碳源, 可采用 D—山梨糖醇作为主要的物质。另外可

以加入 D—葡萄糖，D—果糖，D—甘露醇糖，乙醇等。一般在 D—山梨糖醇浓度约为 10—50 W/V % 时开始培养，最好是在 30—50 W/V %。

培养基内氮源，可用玉米浆、棉子粉、酵母膏、干酵母、鱼粉、肉膏、蛋白胨、酪蛋白的酸水解物，其它含氮有机物，硫酸铵、硝酸铵、醋酸铵、磷酸铵、氯化铵、氨水、氨气和其它无机氮化合物，氨基酸如谷氨酸钠、丙氨酸等等，尿素以及其它有机氮化合物。

本发明内，把合成培养基作为主要培养基是更为有利的。在这种情况下，D—山梨糖醇可用作合成培养基内碳源的主要物质，同时可加入 D—葡萄糖，D—果糖，D—甘露醇糖或乙醇。作为氮的来源，可采用如已提到过的硫酸铵、硝酸铵、醋酸铵、磷酸铵或谷氨酸钠。特别是利用醋酸铵更为有利。除以上所提的碳源和氮源外，为了微生物生长的需要可适量加入不同的金属、维生素、氨基酸及核酸。

本发明内所用的合成培养基的成分例示如下：%（重量/体积）

D—山梨糖醇	10~40 %
磷酸二氢钾	0.005~0.1 %
硫酸镁（七水合物）	0.005~0.05 %
碳酸钙	0.005~0.05 %
醋酸铵	0.02~0.05 %
谷氨酸钠	0.05~0.2 %
硫酸亚铁（七水合物）	0.00005~0.0005 %
硫酸锰	0.0000005~0.00005 %
尼克酰胺	0.0001~0.01 %
泛酸钙	0.00001~0.001 %

对氨基苯甲酸 0.000001 ~ 0.0001 %

维生素 B₂ 0.00001 ~ 0.001 %

本发明中除溶解氧浓度外，其它一些培养条件都不是严格的，可以与那些传统使用的相同。因此，培养温度约为 15—45℃，最好为 25—45℃，而培养基的 pH 一般约为 3.0—8.0，最好为 3.5—6.5。培养时间一般约为 10—100 小时，最好为 15—40 小时。

培养后，可用传统的方法从发酵液中回收 L—山梨糖，例如，将发酵液过滤，用活性碳脱色，经减压浓缩以及用甲醇，乙醇，丙酮等结晶而得 L—山梨糖。

根据本发明，用微生物氧化 D—山梨糖醇的生产方法，与传统方法相比 L—山梨糖的产率有所增加。尽管在传统方法中 L—山梨糖的产率按 D—山梨糖醇算最多可达到约 93%，而根据本发明的方法比传统方法至少可增加 2—3%，而且可以减少如 D—果糖，2—葡萄糖酮酸以及 5—果酮糖等副产品的形成结果与传统方法相比在维生素 C 生产中原料成本百分数很高的 L—山梨糖，可以较低的成本提供，因之在药物及食品工业以及其它方面有广泛用途的维生素 C 的生产成本也就降低。

实验例 1

使用后面实施例 1 中所描述的相同的微生物及培养基，在与实施例 1 相同的条件下进行培养，只是在生长期内培养基中溶解氧的浓度不同。经培养后，L—山梨糖，D—果糖，2—葡萄糖酮酸以及 5—果酮糖按 D—山梨糖醇算所测定的产率如表 1 所示。

表 1

编号	溶解氧浓度 (ppm)	L—山梨糖 (%)	D—果糖 (%)	2—葡萄糖酮酸 (%)	5—果酮糖 (%)
1	1.5 ± 0.5	96.1	1.32	0.25	0.03
2	2.5 ± 0.5	95.8	1.32	0.25	0.03
3	3.5 ± 0.5	95.9	1.33	0.20	0.04
4	5.5 ± 0.5	93.7	1.42	0.44	0.10
5	6.5 ± 0.5	93.4	1.39	0.51	0.12
6	≥ 7 (未被控制)	93.0	1.40	0.54	0.13

表1中，L—山梨糖，D—果糖，5—果酮糖及2—葡萄糖酮酸均是用高效液相色谱测定的。对于L—山梨糖，使用Waters Sugar Pack1 (Waters公司) 柱子，以10⁻⁴ MEDTA钙盐水溶液为流动相，和以一个高灵敏度的示差折光计作为检测器。D—果糖和5—果酮糖是采用精氨酸显色反应方法测定的，使用一个ISA—07/S2504柱(日本Shimadzu公司)，3%硼酸(pH 8.0流动相)和荧光分光光度计。2—葡萄糖酮酸是采用紫外吸收法(210nm)测定的，使用Shodex Ion Pack C—811柱(日本Showa Denko公司)，以0.85%磷酸作流动相。

当按照本发明控制生长期培养基内溶解氧浓度于特定范围(参看所举编号1, 2和3)进行培养时与较高溶解氧浓度下培养(参看所举编号4, 5和6)相比降低了如5—果酮糖，D—果糖以及2—葡萄糖酮酸等副产品的产生，并且增加了所需要的L—山梨糖的产率。结果如表1所示。

实验例2

利用与实验例1所述相同的微生物和培养基，在与实验例1相同的条件下进行培养，除只是在生长期内培养基中的溶解氧浓度有变动，如表2所示。

表2

编号	溶解氧浓度 (ppm)	L—山梨糖产率 (%)
1	2 ± 0.3	97.0
2	2 ± 0.6	95.0 ← 95.0
3	2 ± 1.0	94.0

从表2结果看出溶解氧浓度的偏差控制在0.3 ppm以内时，

L—山梨糖的产率较偏差在 ± 0.6 或 ± 1.0 ppm时为高。

实施例 1

将弱氧化葡萄糖杆菌 I F O 3 2 5 4 被接种到含有下列物质的 10 升培养基内：20% D—山梨糖醇、0.2% 谷氨酸钠、0.018% 碳酸钙、0.003% 尼克酰胺、0.0003% 泛酸钙、0.0001% 维生素 B₂、0.0001% 对氨基苯甲酸、0.047% 磷酸二氢钾、0.03% 酵母膏、0.01% 硫酸镁、0.00015% 硫酸亚铁、0.00001% 硫酸锰以及 Actocol 0.0005 (日本 Takeda 化学工业公司)，经 30℃，培养 24 小时。将此种子培养液转接到含有下列物质的 100 升培养基内：30% D—山梨糖醇、0.039% 醋酸铵、0.018% 碳酸钙、0.003% 尼克酰胺、0.00025% 泛酸钙、0.0001% 维生素 B₂、0.00001% 对氨基苯甲酸、0.02% 磷酸二氢甲、0.01% 硫酸镁、0.00015% 硫酸亚铁以及 0.00001% 硫酸锰。在 30℃ 下培养，通气流量及内压分别被调节在 0.1—0.6 v.v.m 及表压 0.1—0.5 公斤/厘米² 以内。从而在开始培养后的九个小时内可保持其溶解氧浓度在 2.5 ± 0.5 ppm 的水平。然后，在生长期及其后空气流量为 0.6 v.v.m 和内压为 1.5 公斤/厘米² 表压条件下进行培养，总的培养时间为 20 小时。在培养过程中一方面，溶解氧浓度 (DO)，D—山梨糖醇浓度与 L—山梨糖浓度之间的关系以及另一方面，与培养时间之间的关系可在图 1 中看出。图 1 中，—○—表示溶 氧浓度，—·—表示 D—山梨糖醇浓度，以及—○—表示 L—山梨糖浓度。以这种培养方式，L—山梨糖的累积产率按山梨糖醇计算为 96.1%。

实施例 2

把弱氧化葡萄糖杆菌 I F O 3 2 5 7 接种在含有以下物质的 1 0 升培养基中：2 0 % D—山梨糖醇，0. 2 % 谷氨酸钠，0. 0 1 8 % 碳酸钙，0. 0 0 3 % 尼克酰胺，0. 0 0 0 3 % 泛酸钙，0. 0 0 0 1 % 维生素 B₂，0. 0 0 0 1 % 对氨基苯甲酸，0. 0 4 7 % 磷酸二氢钾，0. 0 3 % 酵母膏，0. 0 1 % 硫酸镁，0. 0 0 0 1 5 % 硫酸亚铁，0. 0 0 0 0 1 % 硫酸锰，以及 0. 0 0 0 5 % Actoccol，于 3 0 °C 培养 2 4 小时。将此种子培养液在转接到含有以下物质的 1 0 0 升培养基中：3 0 % D—山梨糖醇，0. 0 2 9 % 醋酸铵，0. 0 1 8 % 碳酸钙，0. 0 0 3 % 尼克酰胺，0. 0 0 0 2 5 % 泛酸钙，0. 0 0 0 1 % 维生素 B₂，0. 0 0 0 0 1 % 对氨基苯甲酸，0. 0 2 % 磷酸二氢钾，0. 0 1 % 硫酸镁，0. 0 0 0 1 5 % 硫酸亚铁以及 0. 0 0 0 0 1 % 硫酸锰。于 3 0 °C 培养 2 0 小时。在培养期间，通气流量，内压以及搅拌速度分别被调节为 0. 2—0. 6 v.v.m，0. 2—1. 5 公斤/厘米表压以及 2 3 0—3 0 0 转/分。从而自开始培养后的九小时内可保持溶解氧浓度在 3.5 ± 0.5 p.p.m 水平。然后，在生长期及其后则在通气流量为 0. 6 v.v.m，内压为 1. 5 公斤/厘米² 表压以及搅拌速率为 3 0 0 转/分的条件下继续培养。L—山梨糖的累积产率按山梨糖醇计算为 9 5. 7 %。

实施例 3

把弱氧化葡萄糖杆菌 I F O 1 2 5 2 8 接种于含有下列物质的 1 0 0 升培养基中：2 0 % D—山梨糖醇，0. 2 % 谷氨酸钠，0. 0 1 8 % 碳酸钙，0. 0 0 3 % 尼克酰胺，0. 0 0 0 3 % 泛酸钙，0. 0 0 0 1 % 维生素 B₂，0. 0 0 0 1 % 对氨基苯甲酸，0. 0 4 7 % 磷酸二氢钾，

0.03%酵母膏, 0.01%硫酸镁, 0.00015%硫酸亚铁, 0.00001%硫酸锰以及0.0005% Actocol。于30°C培养24小时。该种子培养液被转接到含有下列物质的1000升培养基内: 30%D-山梨糖醇, 0.039%醋酸铵, 0.018%碳酸钙, 0.003%尼克酰胺, 0.00025%泛酸钙, 0.0001%维生素B₂, 0.00001%对氨基苯甲酸, 0.02%磷酸二氢钾, 0.01%硫酸镁, 0.00015%硫酸亚铁以及0.00001%硫酸锰。于30°C培养20小时。通气流量及内压分别调节在0.1—0.5 v.v.m及0—1.5公斤/厘米²表压范围以内。从而在开始培养后的九个小时内可保持溶解氧浓度的水平在1.5±0.5 p.p.m。然后, 在生长期以及而后在通气流量为0.5 v.v.m以及内压为1.5公斤/厘米²表压下继续培养。L-山梨糖的累积产率按山梨糖醇计算为96.3%。

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	2	2	以列入	已列入
	6	3	10 ⁻⁴ MEDTA	10 ⁻⁴ M EDTA
	7	15	0.1—0.5公斤/厘米 ²	0.1—1.5公斤/厘米 ²
		21	溶氧浓度	溶解氧浓度

图 1

