

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 209/20 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710059347.3

[43] 公开日 2009 年 3 月 4 日

[11] 公开号 CN 101376646A

[22] 申请日 2007.8.29

[21] 申请号 200710059347.3

[71] 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市泰达开发区十三大街 29 号

[72] 发明人 陈 宁 谢希贤 黄 磊 刘淑云
徐庆阳

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

从发酵液中提取 L-色氨酸的新方法

[57] 摘要

本发明公开了一种利用直接发酵法生产 L-色氨酸的离子交换提取工艺。该方法包括采用不锈钢管式膜分离系统过滤发酵液，应用离子交换法提取 L-色氨酸以及产品的浓缩和结晶。本发明采用金属膜过滤菌体，改变了常规发酵液处理采用的离心、压滤机压滤等方法，降低了维修费用，降低了工人的劳动强度，除去菌体彻底，节省操作时间；且金属膜使用寿命长，耐高温、耐酸碱、易于清洗且装置维护方便。该方法可以大大提高 L-色氨酸的提取收率，提取总收率为 63.4%，精制产品纯度达 98% 以上。

- 1、一种从发酵液中提取 L-色氨酸的工艺，包括：采用金属膜过滤除菌体和蛋白，滤液通过阳离子交换法提取 L-色氨酸，离子交换过程中的上柱料液的 pH 范围 1~14，操作温度为 0~40℃，流速为 1~6 倍床体积/h。对离子交换洗脱液进行等点结晶，操作温度为 0~20℃。结晶后的母液用离子交换树脂浓缩回流至等点液中。等点后粗结晶用去离子水溶解，加入一倍体积 50%~95%乙醇，冷藏过夜，进行重结晶，烘干后得 L-色氨酸结晶。
- 2、根据权利要求 1 所述的生产工艺，其特征在于金属膜采用不锈钢管式膜分离系统，其孔径为 50nm~100nm，截留分子量 2000~50000MW，pH 范围 1~14，操作温度为 0~40℃，操作压差为 0.2~1.0MPa。
- 3、根据权利要求 1 所述的生产工艺，其特征在于洗脱液为 0.1~1mol/L 氨水，氯化铵溶液，硫酸铵溶液，醋酸铵溶液，乙醇溶液。
- 4、根据权利要求 1 所述的生产工艺，其特征在于的离子交换树脂采用强酸性阳离子交换树脂 D061、D001-CC、732、HD-8、JK006、HZ014；离子交换柱采用串联方式。
- 5、根据权利要求 1 所述的生产工艺，其特征在于过滤前，发酵液进行预处理，将发酵液 pH 调至 1~14，搅拌并加热到 80℃，加入发酵液 0.1%~0.5%硅藻土后注入不锈钢管式膜分离系统，操作温度控制在 50~60℃，进膜压力与出膜压力差 0.3~0.8kg/cm²，滤速控制在 200~300ml/min。

从发酵液中提取 L-色氨酸的新方法

【技术领域】：本发明属于生化工程领域，涉及一种从发酵液中提取 L-色氨酸的方法。

【背景技术】：L-色氨酸学名 β -吲哚基丙氨酸，化学名 L-2-氨基-3-吲哚基丙酸，别名 L-胰化蛋白氨基酸、L-氨基吲哚丙酸，分子式 $C_{11}H_{12}O_2N_2$ ，相对分子质量 204.21。L-色氨酸是人体和动物生命活动中八种必需的氨基酸之一，以游离态或结合态存在于生物体中。世界市场 L-色氨酸年需求量约为 120 万吨以上，而目前全世界只有一千多吨的生产能力，且主要集中在日本、美国等少数国家，仅日本 1989 年的销售额就达到 25 亿日元，因而 L-色氨酸的市场前景巨大。目前具有 L-色氨酸生产能力的只有日、德、美等少数发达国家，我国因技术水平限制尚未进行工业化生产，市场全部依赖进口。

L-色氨酸的生产最早主要依靠蛋白质水解法和化学合成法，但是随着对微生物法生产 L-色氨酸研究的不断深入，微生物法已经走向实用并且处于主导地位。微生物法大体上可以分为直接发酵法、微生物转化法和酶法。以微生物直接发酵法生产 L-色氨酸，在国外已形成一定规模的工业生产能力。该法具有原料成本低，来源广泛，产品纯度高，反应条件温和等优点，具有工业化生产的潜力。

近年来，L-色氨酸作为必需氨基酸，在输液、健康食品、饲料添加剂等方面应用日益广泛，随着蛋氨酸、赖氨酸的大量应用，价格一直较高的 L-色氨酸更希望有廉价高效的生产及提取方法，以便推进 L-色氨酸的应用。和其他生物工程产品一样，色氨酸工业生产也

常常会受到生产成本的制约，而在生产成本的构成中，分离提取等下游工程的成本占有相当的比例。因此，研究 L-色氨酸的提取方法具有重要的理论意义和实用价值。

要真正实现发酵法生产 L-色氨酸的工业化，就必须对发酵液中 L-色氨酸的提取工艺进行研究。国内外多采用沉淀法提取 L-色氨酸，且已有相关专利报道。本发明采用金属膜过滤发酵液，然后用离子交换法分离提取发酵液中 L-色氨酸。

【发明内容】：本发明的目的是解决现有发酵法生产 L-色氨酸的提取收率低，无法实现产业化生产的问题，提供从发酵液中提取 L-色氨酸的方法。

一种从发酵液中提取 L-色氨酸的工艺，包括：采用金属膜过滤除菌体和蛋白，滤液通过离子交换法提取 L-色氨酸，离子交换过程中的上柱料液的 pH 范围 1~14，操作温度为 0~40℃，流速为 1~6 倍床体积/h。对离子交换洗脱液进行等点结晶，操作温度为 0~20℃。结晶后的母液用离子交换树脂浓缩回流至等点液中。等点后粗结晶用去离子水溶解，加入一倍体积 50%~95%乙醇，冷藏过夜，进行重结晶，烘干后得 L-色氨酸结晶。

金属膜采用不锈钢管式膜分离系统，其孔径为 50nm~100nm，截留分子量 2000~50000MW，pH 范围 1~14，操作温度为 0~40℃，操作压差为 0.2~1.0MPa。

洗脱液为 0.1~1mol/L 氨水，氯化铵溶液，硫酸铵溶液，醋酸铵溶液，乙醇溶液。

离子交换树脂采用强酸型阳离子交换树脂 D061、D001-CC、732、HD-8、JK006、HZ014；离子交换柱采用串联方式。

金属膜过滤除菌体和蛋白前，发酵液进行预处理，用碱将发酵液 pH 调至 9~12，搅拌并加热到 80℃，加入发酵液 0.1%~0.5% 硅藻土后注入不锈钢管式膜分离系统，操作温度控制在 50~60℃，进膜压力与出膜压力差 0.3~0.8kg/cm²，滤速控制在 200~300ml/min。

本发明的优点和积极效果：本发明利用金属膜过滤法预处理发酵液，并以离子交换法提取 L-色氨酸，可以大大提高 L-色氨酸的收率，缩短操作周期。产品纯度可达 98% 以上，提取率 63.4%。

本发明采用金属膜过滤菌体，改变了常规发酵液处理采用的离心、压滤机压滤等方法，降低了维修费用，降低了工人的劳动强度，除去菌体彻底，节省操作时间；且金属膜使用寿命长，耐高温、耐酸碱、易于清洗且装置维护方便。

利用金属膜过滤预处理可以快速有效地除去发酵液中的菌体、杂蛋白和色素等，有利于 L-色氨酸的离子交换吸附。另外离子交换法可以进一步起到脱色作用，去除滤液的色素，从而省略采用活性炭等的脱色操作，缩短了操作周期。

【提取工艺流程】：

见说明书附图。

【具体实施方式】：

实施例 1：膜过滤法除蛋白和色素

用硫酸将 L-色氨酸发酵液 pH 调至 3，搅拌并 80℃ 水浴加热 10min，加入 0.1% 硅藻土，将发酵液倒入金属膜过滤器，控制温度 50℃~60℃，进膜压力与出膜压力差 0.7kg/cm²，当进出膜压差明显降低时，补入适量去离子水，滤速控制在 200~300ml/min。蛋白和色素去除率分别为 94.5% 和 50.0%。L-色氨酸损失率为 3.2%。

实施例 2： 离子交换树脂的筛选

对于离子交换法提取发酵液中的L-色氨酸，交换容量是衡量离子交换树脂好坏的最重要的指标。实验选用了6种强酸性阳离子交换树脂D061、D001-CC、732、HD-8、JK006、HZ014进行静态实验，测定各种树脂对L-色氨酸的静态吸附量Q，结果如表1所示。

表1 不同型号树脂对L-色氨酸的静态吸附量

Type	D061	D001-CC	732	HD-8	JK006	HZ014
Q/mg/g	99.7	102.5	153.8	124	153.8	145.4

由表 1 可知，树脂 732、HD-8、JK006、HZ014 四种树脂吸附量较大。

实施例 3： 离子交换法提取 L-色氨酸

将处理成 H 型的 JK006 树脂装入直径 2.5cm 的离子交换柱中，装柱高 16cm，操作温度为室温，滤液或等点结晶后的母液上柱速度为 1BV/h，上柱量为两倍床体积。上柱后，用 1 倍体积水洗涤树脂，流速为 1BV/h，将洗涤液收集准备再次上柱。用 1mol/L 氨水 1BV/h 洗脱，收集 2~7 倍树脂体积的分离液。离子交换法提取收率为 90.7%。

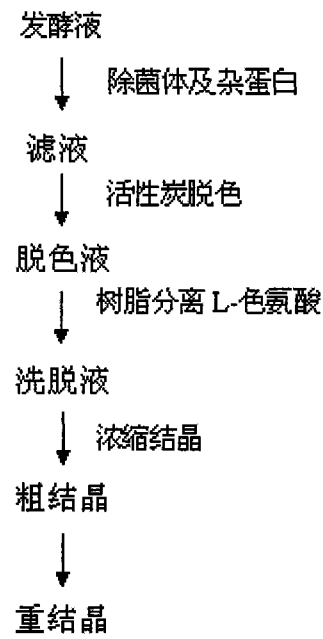
实施例 4： L-色氨酸等点结晶

将离子交换洗脱液先减压浓缩将部分水蒸发，得到一定浓度的色氨酸溶液，再将过饱和溶液冷却，在溶液中加入 30%的乙醇溶液，用浓硫酸缓慢调节 pH 至 6.5，温度 4℃，添加 0.1%的晶种，然后将 pH 调至 5.88，4℃等点结晶 24h。等点结晶收率为 91.8%。

实施例 5： L-色氨酸精制

用一定量的去离子水溶解粗结晶，再加入等体积的95%乙醇，冷

藏过夜，过滤晶体，烘干后得L-色氨酸结晶，纯度可达98%以上，精制收率为93.6%。



L-色氨酸提取工艺流程