[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12P 13/06
//(C12P13/06,C12
R1： 15,1： 185)

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96104294.X

[45]授权公告日 2001 年 10 月 10 日

[11]授权公告号 CN 1072721C

[22]申请日 1996.3.29
[21]申请号 96104294.X
[30]优先权
[32]1995.3.30 [33]JP [31]072937/1995
[73]专利权人 味之素株式会社
地址 日本东京都
[72]发明人 小野由纪子 佐藤胜明
[56]参考文献

JP1031093A	1986. 2.13	C12P13/06
JP6324839A	1988.10.14	C12N1/20

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 姜建成 田舍人

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 L－亮氨酸的生产方法

[57]摘要

本发明涉及一种生产 L－亮氨酸的方法,该方法包括在含有糖作主要碳源的培 养基中培养属于 Corynebacterium 属或 Escherichia 属的具有 L－亮氨酸产生能 力的微生物,使所产生的细胞在反应液中同糖和醋酸或其盐反应生成并累积 L －亮氨酸,和收集 L－亮氨酸。本发明方法可以提高用微生物生产 L－亮氨酸 时 L－亮氨酸的累积量并能降低作为副产物的氨基酸的形成,从而可以低成本 工业化生产 L－亮氨酸。

ISSN1008-4274

01.01.31

权 利 要 求 书

1. 一种生产L-亮氨酸的方法，该方法包括下述步骤:

在第一培养基中培养能产生L-亮氨酸的微生物，所述微生物属于棒杆菌属、埃希氏菌属、短杆菌属或微杆菌属;

将所述微生物在第二培养基中孵化，以在第二培养基中产生L-亮氨酸，所述培养基含有0.1-300g/l的一种或多种糖和，按醋酸计，0.1-300g/l的醋酸或其盐，其中醋酸或其盐与糖的重量比在0.01-10之间，

将L-亮氨酸由所述第二培养基中分离。

2. 根据权利要求1的方法，其中所述第二培养基包含1-150g/l的一种或多种糖和1-50g/l的醋酸或其盐。

3. 根据权利要求2的方法，其中醋酸或其盐与糖的重量比在0.05-3之间。

4. 根据权利要求1的方法，其中在所述第二培养基中醋酸或其盐与糖的重量比在0.05-3之间

5. 根据权利要求1的方法，其中在所述第二培养基中醋酸或其盐与糖的重量比在0.1-3之间。

6. 根据权利要求1的方法，其中所述第一培养基包含一种或多种糖做为主要碳源。

7. 根据权利要求1的方法，其中所述微生物属于棒杆菌属。

8. 根据权利要求1的方法，其中所述微生物是*Corynebacterium glutamicum*、嗜乙酰乙酸棒杆菌、醋谷棒杆菌、*Corynebacterium lilium*或*Corynebacterium melassecola*。

9. 根据权利要求1的方法，其中所述微生物是*Corynebacterium*

glutamicum。

10. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物属于埃希氏菌属。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物是 *Escherichia coli*。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物属于短杆菌属。

13. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物是 *Brevibacterium lactofermentum*、解糖短杆菌或黄色短杆菌。

14. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物是 *Brevibacterium lactofermentum*。

15. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物属于微杆菌属。

16. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物是嗜氨微杆菌。

17. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物属于棒杆菌属或埃希氏菌属或是 *Brevibacterium lactofermentum* 或黄色短杆菌。

18. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物是 *Corynebacterium glutamicum* AJ3453、*Escherichia coli* AJ11478 或 *Brevibacterium lactofermentum* AJ3718。

19. 根据权利要求 1 的方法，其中所述微生物是 *Corynebacterium glutamicum* AJ3453 或 *Escherichia coli* AJ11478。

20. 根据权利要求 1 的方法，其中所述培养步骤在有氧条件下于 pH 5－10 及 20－45℃的温度进行 10－170 小时。

21. 根据权利要求 1 的方法，其中所述孵化步骤在有氧条件下于 pH 5－10 及 20－45℃的温度进行 1－72 小时。

22. 根据权利要求 1 的方法，它还包括，在培养步骤后，将所述一种或多种糖和所述乙酸或其盐加至所述第一培养基中以产生所述第二培养基。

23. 根据权利要求 1 的方法，它还包括，在培养步骤后，由所述第一培养基中分离和回收所述微生物，然后将所述微生物加至第二培养基中。

说　明　书

L－亮氨酸的生产方法

本发明涉及一种生产L－亮氨酸的生产方法。L－亮氨酸在许多领域得到广泛应用，如医药、食品、饲料添加剂等。

通过发酵生产L－亮氨酸的已知方法之一为对短杆菌属（*Brevibacterium*）或棒杆菌属（*Corynebacterium*）菌株进行培养，该过程需要异亮氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸其中之一或多种以利于菌株生长，并可对抗L－亮氨酸的反馈抑制或（和）阻遏（日本公开专利申请(Kokai)第123,877/1975号）。另一已知方法为对埃希氏菌属*Escherichia coli*微生物进行培养，它可以抵抗β－噻吩丙氨酸（日本公开专利申请(Kokai)第72,695/1981号）。

然而，这些方法都存在一些问题，其中，L－亮氨酸的累积量不够，而且形成一些氨基酸类如L－亮氨酸等的副产物。

本发明的目的是提供使用微生物生产L－亮氨酸的方法，其中，通过提高L－亮氨酸的累积量和降低氨基酸类副产物的形成，从而使L－亮氨酸能够在低成本下工业化生产。

本发明人对用微生物生产L－亮氨酸时提高L－亮氨酸的累积量和降低氨基酸类副产物的生成量作了大量的实验。结果，他们发现当将一种已知具有L－亮氨酸产生能力的菌株置于一个含有糖类做为主要碳源的培养基中培养并使所产生的细胞同糖和醋酸或其盐反应时，与同糖单独反应相比，作为副产物的L－亮氨酸的形成减少，而L－缬氨酸的累积量显著增加。这个发现导致了本发明的完成。

所以，本发明提供一种生产L－亮氨酸的方法，它包括将一种属于棒杆菌属或者埃希氏菌属(*Escherichia*)的具有产生L－亮氨酸能

力的微生物置于含有糖类做为主要碳源的培养基中培养，使所产生的细胞株同糖和醋酸或其盐反应，在反应液中生成并累积L－亮氨酸，和收集L－亮氨酸。

本发明所用的微生物可以是一种属于棒杆菌属的或者是埃希氏菌属的微生物，并且具有产生L－亮氨酸的能力。这种微生物可以是野生株、变异株或者是通过细胞融合或基团操作诱导的重组株 。

本发明中所指的棒杆菌属微生物是一组根据Bargey的细菌鉴定手册(Bargey's Manual of Determinative Bacteriology)(1974年，第8版，599页)所定义的微生物，上述微生物是一些需氧、革兰氏阳性、非嗜酸性和非孢子形成的细菌。这些菌曾被划归为短杆菌属，但现在划归为棒杆菌属，棒杆菌属也包括短杆菌属的细菌[Int. J. Syst. Bactercil., 41, 255, (1981)]。所以，棒杆菌属的微生物包括短杆菌属和微杆菌属*(Microbacterium)*的细菌，这两属的细菌和棒杆菌属的细菌非常接近。在这些棒杆菌属细菌中，以下所述由已知具有L－谷氨酸产生能力的菌所诱导的可产生L－亮氨酸的菌株尤为本发明所优选:

嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*)

醋谷棒杆菌(*Corynebacterium acetoglutamicum*)

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium (Corynebacterium glutamicum)

Corynebacterium melassecola

Brevibacterium divaricatum (Corynebacterium glutamicum)

Brevibacterium lactofermentum (Corynebacterium glutamicum)

解糖短杆菌（*Brevibacterium saccharolyticum*）

黄色短杆菌*(Brevibacterium flavum)(Corynebacterium glutamicum)*

嗜氨微杆菌（*Microbacterium ammoniaphilum*）。

具有L－亮氨酸产生能力的菌株的具体实例为：*Brevibacterium lactofermentum* AJ 3718(FERM P-2516；对2－噻唑丙氨酸和β－羟基亮氨酸有抗性，但需要异亮氨酸和甲硫氨酸)，*Corynebacterium glutamicum* AJ3453 (FERM BP-5360;对2－噻唑丙氨酸和β－羟基亮氨酸有抗性，需要异亮氨酸)，和*Escherichia coli* AJ 11478(FERM BP-5361；对β－2－噻吩丙氨酸和β－羟基亮氨酸有抗性)。

作为培养上述微生物的培养基，常用发酵生产氨基酸的培养基。也就是说使用含有能够被微生物同化的养分，如碳源，氮源及无机盐等的培养基。

所述碳源的实例包括葡萄糖、果糖、蔗糖、糖蜜和淀粉水解产物。氮源的实例包括氨、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、磷酸铵、脲、有机酸铵盐、胺、其它含氮化合物、酵母提取物、胨、大豆水解产物、发酵菌株及其消化产物。以上所述可以单独使用也可组合使用。无机盐的实例包括磷酸二氢钾、硫酸锰、硫酸铁和硫酸镁。

其它营养物质如氨基酸、维生素、胨、酵母提取物，酪蛋白氨基酸等可根据菌株生长和L－亮氨酸生成的需要而加入培养基中。

培养在有氧条件下进行，如通气搅拌、振荡等，培养温度为20至45℃，优选26－40℃。培养过程中，根据需要通过加酸或加碱将pH调至5－10，优选pH6－8。培养时间在10－170小时之间，优选在16－72小时之间。

在如此获得的培养基中L－亮氨酸得以生成并累积。在本发明方法中， 培养基中含有的细胞进一步同糖类和醋酸或其盐反应，由此，L－亮氨酸进一步生成并累积。

上述同细胞反应的糖类包括葡萄糖、果糖、蔗糖、糖蜜和淀粉水解产物。

细胞同糖和酯酸或其盐反应的方法之一为：直接使用含有细胞的

培养物并向其中加入糖和醋酸或其盐以使其反应。另一方法为：从培养液中将细胞分离并回收，将其加入到含有糖和醋酸或其盐的水溶液(反应液)中以使其反应。

在上述直接使用含有细胞的培养物并向其中加入糖和醋酸或其盐以使其反应的方法中，加入糖的量在0.1－300g/l之间，优选在1－150g/l之间，加入醋酸或其盐的量，以醋酸计，在0.1－300g/l之间，优选在1－50g/l之间，醋酸与糖的重量比在0.01－10之间，优选在0.1－3之间。

在上述将细胞从培养液中分离、回收并将其加入到含有糖和醋酸或其盐的水溶液(反应液)中使其反应的方法中，反应液中除含有上面提及的糖和醋酸或其盐外，还有氮源、无机盐和其它微生物可以利用的营养成份，该溶液被用作同分离的细胞反应的反应液。为了避免引起反应液中细胞的繁殖，可以除去微生物生长所需的氨基酸。

上述糖的用量在0.1－300g/l之间，优选在5－150g/l之间，醋酸或其盐用量，以醋酸计，在0.1－300g/l之间，优选在0.5－50g/l之间，醋酸/糖的重量比为0.01－10，优选0.05-3。

所述氮源的实例包括氨、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、磷酸铵、脲、有机酸铵盐、胺、其它含氮化合物、酵母提取物、胨、大豆水解产物、发酵菌株及其消化产物，以上这些物质可单独使用或者组合使用。

无机盐的实例包括磷酸二氢钾、硫酸锰、 硫酸铁和硫酸镁。其它营养源如氨基酸、维生素、胨、酵母提取物，酪蛋白氨基酸等可根据L－亮氨酸生成的需要而加入。

当如此培养的细胞同糖和醋酸或其盐反应生成L－亮氨酸时，反应在需氧条件下进行如通气搅拌、振荡等，反应温度为20－45℃，优选25－40℃。根据需要通过加入酸或碱将反应过程中的pH调至5－10，pH调至6－8为优选。反应时间在1－72小时之间，优选在6－

40 小时之间。

反应完毕后，除去反应液中的沉淀物如细胞等，然后根据需要通过浓缩、盐析、等电点沉淀或其它手段收集 L－亮氨酸。

本发明将通过借助下列实施例得到更加具体的阐明。通过使用氨基酸分析仪分析细胞已用离心的方法除去的反应液的上清液测定 L－亮氨酸和 L－缬氨酸的量。

实施例 1

Corynebacterium glutamicum AJ 3453(FERM BP-5360)生长于贮备的琼脂培养基中，培养基的组成见表 1。随后，将一接种环量的培养物接种于 20ml 具有 L－亮氨酸产生能力已置于 500ml 的烧瓶中的培养基中，该培养基的组成见表 2，在振荡下于 31.5℃培养 40 小时，得到含有细胞的培养物。向该培养物中加入 2g/l 的葡萄糖和 4g/l 的醋酸钠，并在振荡下于 31.5℃使该混合物反应 32 小时。测定反应开始时(培养完毕时)和反应完毕时 L－亮氨酸和 L－缬氨酸的含量。另外，作为对照，向培养物中只加入 2g/l 的葡萄糖，并以同样的方式使混合物进行反应。

表 1

成份	含量
葡萄糖	5 g/ 升
NaCl	5 g/ 升
酵母提取物	10 g/ 升
多胨	10 g/ 升
Dl-甲硫氨酸	0.1 g/ 升
琼脂	15 g/ 升
pH 7.2	

表 2

成份	含量
葡萄糖	100 g/ 升
硫酸铵	45 g/ 升
KH_2PO_4	1 g/ 升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/ 升
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g/ 升
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01 g/ 升
生物素	100 μg/ 升
维生素 B_1	1000 μg/ 升
Dl-甲硫氨酸	300 mg/ 升
L-异亮氨酸	100 mg/ 升
大豆水解产物（以总氮量计）	150 mg/ 升
碳酸钙	50 g/ 升
pH 7.0	

结果表明，如表3所示，当只加入葡萄糖进行反应时，随着L-亮氨酸的生成和累积，作为副产物的氨基酸L-缬氨酸的量也增加。而当加入葡萄糖和醋酸钠进行反应时，反应中只生成和累积L-亮氨酸。最终产品中L-缬氨酸的比例降低了。

表 3

	加入葡萄糖和醋酸		只加葡萄糖	
	L-亮氨酸累积量 (g/l)	L-缬氨酸累积量 (g/l)	L-亮氨酸累积量 (g/l)	L-缬氨酸累积量 (g/l)
反应开始时	18.3	1.9	18.6	1.8
反应结束时	27.0	1.9	24.9	3.0

实施例 2

使 *Escherichia coli* AJ 11478(FERM BP-5361)在贮备的琼脂培养基中生长，培养基的组成见表 4。然后将一接种环量的培养物接种于 20ml 的具有产生 L－亮氨酸能力已置于 500ml 烧瓶中的培养基中，该培养基的组成见表 5，在振荡下于 37℃培养 24 小时，获得含细胞的培养物。向该培养物中加入 2g/l 葡萄糖和 4g/l 醋酸钠，并使混合物在振荡下于 37℃反应 16 小时，反应开始时(即培养完毕时)和反应结束时测定 L－亮氨酸和 L－缬氨酸的量。另外，作为对照，向培养物中只加入葡萄糖，并使混合物以上述方式反应。

表 4

成份	含量
细菌用胰蛋白胨	10 g/升
酵母提取物	5 g/升
NaCl	5 g/升
pH 7.2	

表 5

成份	含量
葡萄糖	50 g/升
硫酸铵	25 g/升
KH_2PO_4	2 g/升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/升
酵母提取物	0.5 g/升
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g/升
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01 g/升
碳酸钙	25 g/升
维生素 B_1	300 μg/升
pH 7.0	

结果如表6所示，表明：当只加入葡萄糖进行反应时，随着L－亮氨酸的生成和累积，作为副产物的氨基酸L－缬氨酸的量也增加，而当加入葡萄糖和醋酸钠反应时，反应中只有L－亮氨酸生成和累积，而且最终产物中L－缬氨酸的比例下降。

表 6

	加入葡萄糖和醋酸		只加葡萄糖	
	L－亮氨酸累积量 (g/l)	L－缬氨酸累积量 (g/l)	L－亮氨酸累积量 (g/l)	L－缬氨酸累积量 (g/l)
反应开始时	1.2	0.12	1.2	0.13
反应结束时	1.9	0.09	1.4	0.23

实施例3

在与实施例1相同的条件下，将 *Corynebacterium glutamicum* AJ 3453(FERM BP－5360)培养48小时，从相当于一个烧瓶的培养物中离心回收细胞。将细胞用0.2－%的KCl洗涤，悬浮于75ml的反应液中，该反应液通过向如表7所示组合物中加入醋酸纳获得。在振荡下使该悬浮液反应16小时，反应结束后，测定反应液中L－亮氨酸和L－缬氨酸的生成和累积量。另外，作为对照，不加醋酸钠，以上述方法进行反应。

表 7

成份	含量
葡萄糖	10 g/ 升
KH_2PO_4	4.5 g/ 升
Na_2HPO_4	23.9 g/ 升
硫酸铵	6 g/ 升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g/ 升
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g/ 升
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01 g/ 升
生物素	50 μg/ 升
维生素 B_1	300 μg/ 升
pH 7.0	

结果如表 8 所示，与不加醋酸的情况相比，当以 2－32g/l 的量加入醋酸钠时，L－缬氨酸累积量与 L－亮氨酸累积量之比降低，而 L－亮氨酸的累积量增加。

表 8

加入醋酸钠的量(g/l)	醋酸与葡萄糖之比	L-亮氨酸累积量(g/l)	L-缬氨酸累积量/L-亮氨酸累积量(%)
0	0	3.2	7.0
2	0.14	3.7	5.8
4	0.3	4.4	4.0
8	0.6	4.6	1.9
16	1.2	5.1	1.3
32	2.3	4.9	1.5

本发明方法在用微生物生产L－亮氨酸时，能提高L－亮氨酸的累积量，降低作为副产物的氨基酸的生成，从而可以低成本工业化生产L－亮氨酸。