[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12P 13/04
//(C12P13/04,C12
R1: 01)

# [12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 01140778.6

[43]公开日 2002年5月8日

[11]公开号 CN 1348009A

[22]申请日 2001.8.24 [21]申请号 01140778.6
[30]优先权
[32]2000.8.24 [33]JP [31]253692/00
[71]申请人 味之素株式会社
地址 日本东京都
[72]发明人 小林正树 糸山刚
三谷幸生 臼井直规

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 杨九昌

权利要求书1页 说明书12页 附图页数1页

[54]发明名称 碱性氨基酸的制备方法

[57]摘要

当将具有产生碱性氨基酸能力的微生物在液体培养基中,在需氧的条件下培养,用以在培养基中产生和积聚碱性氨基酸而制备碱性氨基酸时,在培养期间培养基的pH值被控制在6.5至9.0,而培养结束时则为7.2-9.0,且一个培养期,其中在培养期间,通过控制发酵罐中的压强,使其在发酵期间为正压力,或向培养基中提供二氧化碳气或含二氧化碳气的混合气体,保证在培养基中有2g/L或更多的碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的存在,使得碳酸氢根离子和/或碳酸根离子起主要由碱性氨基酸组成的阳离子的平衡离子作用。

ISSN1008-4274

# 权 利 要 求 书

1.一种通过发酵制备碱性氨基酸、或含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品的方法，包括以下步骤：将具有产生碱性氨基酸能力的微生物在液体培养基中，在需氧的条件下培养，用以在培养基中产生和积聚碱性氨基酸，其中：

在培养期间培养基的pH值被控制在6.5至9.0，而培养结束时则为7.2—9.0，和

一个培养期，其中在培养期间，通过控制发酵罐中的压强，使其在发酵期间为正压力，或向培养基中提供二氧化碳气或含二氧化碳气的混合气体，保证在培养基中有2g/L或更多的碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的存在，使得碳酸氢根离子和/或碳酸根离子起主要由碱性氨基酸组成的阳离子的平衡离子作用。

2.根据权利要求1的制备碱性氨基酸、或含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品的方法，其中发酵罐中的压强是0.03—0.2Mpa。

3.根据权利要求1或2的制备碱性氨基酸、或含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品的方法，其中碱性氨基酸由选自L—赖氨酸、L—精氨酸和L—组氨酸的一种或多种氨基酸组成。

4.一种通过将具有产生碱性氨基酸能力的微生物在需氧条件下，在液体培养基中培养而获得的含碱性氨基酸的发酵培养液，或由该培养液产生的发酵产品，其中含有碳酸氢根离子和/或碳酸根离子作为主要由碱性氨基酸构成的阳离子的平衡离子，当量浓度比是5—80%，该比值根据以下等式计算：

当量浓度比＝[碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的当量浓度]/[主要由碱性氨基酸构成的阳离子的当量浓度]×100

5.根据权利要求4的含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品，其中碱性氨基酸由选自L—赖氨酸、L—精氨酸和L—组氨酸的一种或多种氨基酸组成。

6.一种含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品，它是通过将根据权利要求4的含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品排出二氧化碳气而获得的。

# 说　　明　　书

## 碱性氨基酸的制备方法

### 发明背景

发明领域

本发明涉及一种通过发酵作用制备碱性氨基酸的方法，并且涉及一种碱性氨基酸的发酵产品。碱性氨基酸是有用的，例如，L—赖氨酸用作动物饲料的添加剂，而L—精氨酸和L—组氨酸用于如浸剂药物备中。

在通过发酵作用制备碱性氨基酸的方法中，具有产生碱性氨基酸能力的微生物在培养液中培养以产生和积聚碱性氨基酸，并将碱性氨基酸从培养液中收集起来。在该方法中，以分批培养、流加培养或连续培养的方式进行培养。

在这样的通过发酵作用的碱性氨基酸制备方法中，将硫酸根离子或氯离子添加进培养基中作为平衡阴离子，以便于保持电中性。对于硫酸根离子源，主要以硫酸铵的形式提供（JP 未审公开 5—30985 和 JP 未审公开 5—244969）。

在大多数情况下，当需要提纯时，从培养液中收集碱性氨基酸是通过离子交换法进行的。例如在L—赖氨酸的情况下，在发酵培养液每周一次的酸化之后，L—赖氨酸被吸附到离子交换树脂上，且接着从具有铵离子的树脂上脱附。该脱附的L—赖氨酸以赖氨酸碱的形式使用或以具有盐酸的L—赖氨酸盐酸盐的形式结晶。

另一方面，当其没有提纯时，该发酵培养液被浓缩成其本身，或在其用盐酸或硫酸进行每周的酸化之后，进行喷雾制粒。在该情况下，因为在获得的发酵产品中的碱性氨基酸的含量被培养基中所含的残余成分所限制，所以添加到培养基中的平衡阴离子不能被忽略。因此，考虑到制造成本和产品质量，将要被使用的平衡阴离子的数量的减少是有重要意义的。

顺便说一下，在发酵期间通过生理代谢例如呼吸作用，微生物排出许多二氧化碳气。JP 未审公开 11—243985 公开了一种对在L—谷氨酸发酵中产生的二氧化碳气进行收集的方法，其特征在于让碳酸氢钠和/或碳酸钠作用于从水性培养基中的L—谷氨酸发酵培养液中分离并获得的L—谷氨酸，以产生谷氨酸一钠，并且在同时，收集产生的二氧化碳气作为副产品。然而，在发酵期间没有有效地利用二

氧化碳气。

## 发明概述

本发明的一个目的是提供一种用于在通过发酵生产碱性氨基酸期间减少添加到培养基中的平衡阴离子源数量的技术。

本发明的发明人发现通过使用二氧化碳气代替平衡阴离子，例如硫酸根离子，则可以降低平衡阴离子源数量，并可以有效地利用发酵期间产生的二氧化碳气，从而完成了本发明。

即本发明提供以下内容：

（1）一种制备碱性氨基酸、或含通过发酵产生的碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品的方法，包括以下步骤：将具有产生碱性氨基酸能力的微生物在液体培养基中，在需氧的条件下培养，用以在培养基中产生和积聚碱性氨基酸，其中：

在培养期间培养基的pH值被控制在6.5至9.0，而培养结束时则为7.2—9.0，和

一个培养期，其中在培养期间，通过控制发酵罐中的压强，使其在发酵期间为正压力，或向培养基中提供二氧化碳气或含二氧化碳气的混合气体，保证在培养基中有2g/L或更多的碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的存在，使得碳酸氢根离子和/或碳酸根离子起阳离子的平衡离子作用，而阳离子主要由碱性氨基酸组成。

（2）根据（1）的制备碱性氨基酸、或含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品的方法，其中发酵罐中的压强是0.03—0.2Mpa。

（3）根据（1）或（2）的制备碱性氨基酸、或含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品的方法，其中碱性氨基酸由选自L—赖氨酸、L—精氨酸和L—组氨酸的一种或多种氨基酸组成。

（4）一种通过将具有产生碱性氨基酸能力的微生物在需氧条件下，在液体培养基中培养而获得的含碱性氨基酸的发酵培养液，或由该培养液产生的发酵产品，其中含有碳酸氢根离子和/或碳酸根离子作为主要由碱性氨基酸组成的阳离子的平衡离子，当量浓度比是5—80%，该比值根据以下等式计算：

当量浓度比＝[碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的当量浓度]/[主要由碱性氨基酸组成的阳离子的当量浓度]×100

（5）根据（4）的含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品，其中碱性氨基酸由选自L—赖氨酸、L—精氨酸和L—组氨酸的一种或多种氨基酸组成。

（6）一种含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品，它是通过将根据（4）的含碱性氨基酸的发酵培养液或发酵产品排出二氧化碳气而获得的。

根据本发明，可以降低工业原料，例如硫酸铵的量，且因此可以低成本制备碱性氨基酸。而且，虽然获得的发酵培养液含碳酸根离子和/或碳酸氢根离子，但它们通过加热可以轻易地被排放进大气中。因此，可以获得具有高氨基酸浓度固体含量的发酵培养液或发酵产品。

## 附图简述

附图1显示的是实施例1和对比实施例1中硫酸根离子以及碳酸根离子和碳酸氢根离子相对于主要由培养培养液中赖氨酸构成的阳离子的当量浓度比的时程和所得到的发酵罐中的压强。

附图2显示的是实施例2和对比实施例2中硫酸根离子以及碳酸根离子和碳酸氢根离子相对于主要由培养培养液中赖氨酸构成的阳离子的当量浓度比的时程和所得到的发酵罐中的压强。

## 发明详述

在下文将对本发明进行详细解释。

本发明的方法其特征在于，在通过发酵制备碱性氨基酸的方法中，使用碳酸根离子和/或碳酸氢根离子作为碱性氨基酸的主要平衡离子，该方法包括将具有在液体培养基中、在需氧条件下产生碱性氨基酸能力的微生物进行培养，用以在培养基中产生并积累碱性氨基酸。

通过本发明方法制备的碱性氨基酸可以由例如选自L—赖氨酸、L—精氨酸和L—组氨酸的一种或多种氨基酸组成。

对用于本发明方法具有产生碱性氨基酸能力的微生物没有特别的限制，且可以使用任何微生物只要它们通过发酵可以产生碱性氨基酸。这样的微生物的例子包括，例如，棒状杆菌，属于埃希氏杆菌属、沙雷氏菌属、芽胞杆菌属等的细菌。棒状杆菌和埃希氏杆菌将会在下面解释，但用于本发明方法的微生物并不限于这些微生物。

棒状杆菌包括迄今为止被归类为短杆菌属的那些细菌，但目前合并成棒状杆菌属（Int. J. Syst. Bacteriol.，41255（1981）），并包括相当接近棒状杆菌属的属于短杆菌属的细菌。这样的棒状杆菌的实例将在下文提及。

嗜乙酰乙酸棒状杆菌

醋谷棒状杆菌

Corynebacterium alkanolyticum

美棒状杆菌

谷氨酸棒状杆菌

百合棒状杆菌（谷氨酸棒状杆菌）

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes

力士棒状杆菌

扩展短杆菌（谷氨酸棒状杆菌）

黄色短杆菌（谷氨酸棒状杆菌）

Brevibacterium immariophilum

乳发酵短杆菌（谷氨酸棒状杆菌）

玫瑰色短杆菌

解糖短杆菌

生硫短杆菌

白色短杆菌

蜡状短杆菌

嗜氨短杆菌

作为属于埃希氏杆菌属的细菌的一个实例，可提及大肠埃希氏杆菌。

具有产生L—赖氨酸能力的棒状杆菌的实例包括耐S—（2—氨基乙基）—半胱氨酸（下文简写为“AEC”）的突变体菌株，需要氨基酸例如L—高丝氨酸用于其生长的突变体菌株（日本专利公开48—28078和56—6499），耐AEC并且还需要氨基酸例如，L—亮氨酸、L—高丝氨酸、L—脯氨酸、L—丝氨酸、L—精氨酸、L—丙氨酸和L—缬氨酸的突变体菌株（US3,708,395和US3,825,472），耐DL—á—氨基—å—己内酰胺、DL—α—氨基—月桂基内酰胺、天门冬氨酸类似物、磺胺药物、醌型化合物和N—月桂酰亮氨酸的产生L—赖氨酸的突变体菌株，耐草酰乙酸酯脱羧酶或呼吸系统酶抑制剂的产生L—赖氨酸的突变体菌株（JP未审公开50—53588、50—31093、52—102498、53—9394、53—86089、55—9783、55—9759、56—32995、56—39778，日本专利公开53—43591和53—1833），需要肌醇或醋酸酯的产生L—赖氨酸的突变体菌株（JP未审公开55—9784和56—

8692），对氟乙酰甲酸或34℃或更高温度敏感的产生L—赖氨酸的突变体菌株（JP未审公开55—9783和53—86090），耐乙二醇的短杆菌属或棒状杆菌属的产生L—赖氨酸的突变体菌株（US专利申请333455）等。

具体的实例是乳发酵短杆菌ATCC31269、黄色短杆菌ATCC21475和醋谷棒状杆菌ATCC21491。

作为属于埃希氏杆菌属的产生L—赖氨酸的细菌，耐L—赖氨酸类似物的突变体菌株可以作为例证。该L—赖氨酸类似物是一种抑制埃希氏杆菌属细菌生长的物质，但如果培养基中存在有L—赖氨酸，则这种抑制被全部或部分钝化。例如，可以是噁溶菌素、赖氨酸异羟肟酸盐、（S）—2—氨基乙基—半胱氨酸（AEC）、γ—甲基赖氨酸、α—氯己内酰胺等。通过常规的人工突变体技术可以从埃希氏杆菌属细菌获得耐这些赖氨酸类似物的突变体菌株。用于产生L—赖氨酸的细菌菌株的具体实例包括大肠埃希氏杆菌AJ11442（FERM BP—1543、NRRL B—12185；参见JP未审公开56—18596和US4346170）和大肠埃希氏杆菌VL611。AJ11442菌株保藏在National Institute of Bioscience and Human—Technology，Agency of Industrial Science and Technology，Ministry of International Trade and Industry（目前为独立的管理公司，National Institute of Advanced Industrial Science and Technology，International Patent Organism Depositary）（Chuo Dai—6，1—1Higashi 1—Chome，Tsukuba—shi，Ibaraki—ken，Japan，邮编：305—5466），1981年5月1日，登记号为FERM P—5084。接着在1987年10月29日它从上述原始保藏处转为布达佩斯条约所规定的国际保藏，登记号为FERM BP—1543。在前述微生物中，通过L—赖氨酸天冬氨酸激酶的反馈抑制被钝化。

具有产生L—赖氨酸能力的大肠埃希氏杆菌菌株的具体实例包括大肠埃希氏杆菌W3110（tyrA）/pCABD2（国际专利公开WO95/16042）等。该大肠埃希氏杆菌W3110（tyrA）/pCABD2是通过将含L—赖氨酸生物合成系统酶基因的质粒pCABD2引入W3110（tyrA）而获得的菌株，是大肠埃希氏杆菌的tyrA缺陷菌株。该菌株W3110（tyrA）指定为AJ12604，保藏在National Institute of Bioscience and Human—Technology，Agency of Industrial Science and Technology，Ministry of International Trade and Industry（目前为独立的管理公司，National Institute of Advanced Industrial Science and Technology，International Patent Organism Depositary）（Chuo Dai—6，1—1Higashi 1—Chome，Tsukuba—shi，Ibaraki—ken，

Japan，邮编：305－5466），1991年1月28日，登记号为FERM P－11975，接着在1987年10月29日转为布达佩斯条约所规定的国际保藏，登记号为FERM BP－3579。

该质粒pCABD2含用于编码突变型二氢吡啶二羧酸盐合酶的基因，所述的合酶的第118组氨酸残基被酪氨酸残基所替代，且通过L－赖氨酸的反馈抑制被钝化，还包含用于编码突变型天冬氨酸激酶Ⅲ的基因，其第352苏氨酸残基被异亮氨酸残基所取代，且通过L－赖氨酸的反馈抑制被钝化，以及用于编码二氢吡啶二羧酸盐还原酶和二氨基庚二酸脱氢酶的基因。

而且，该大肠埃希氏杆菌W3110（tyrA）菌株可以如下述获得。即，许多菌株通过将质粒引入W3110（tyrA）菌株而获得，其公开于欧洲专利未审公开488424/1992中。例如，将引入质粒pHATerm而获得的菌株指定为大肠埃希氏杆菌W3110(tyrA)/pHATerm菌株，且保藏在National Institute of Bioscience and Human－Technology， Agency of Industrial Science and Technology（目前为独立的管理公司，National Institute of Advanced Industrial Science and Technology，International Patent Organism Depositary）登记号为FERM BP－3653。通过例如从大肠埃希氏杆菌W3110（tyrA）/pHATerm菌株除去质粒pHATerm可获得W3110（tyrA）菌株。质粒的去除可以常规方式进行。

属于沙雷氏菌属的产生L－赖氨酸细菌的实例包括通过将用于编码突变的二氢吡啶二羧酸盐合酶的DNA引入其细胞而转化的沙雷氏菌，所述的突变使通过L－赖氨酸反馈的抑制钝化，和含天冬氨酸激酶的沙雷氏菌，所述的天冬氨酸激酶通过L－赖氨酸反馈的抑制被钝化（WO96/41871）。

具有产生L－精氨酸能力的棒状杆菌的实例包括棒状杆菌的野生型菌株；耐某些试剂的棒状杆菌，这些试剂包括磺胺药物、2－噻唑丙氨酸、α－氨基－β－羟基戊酸等；除了耐2－噻唑丙氨酸以外，显示出对于L－组氨酸、L－脯氨酸、L－苏氨酸、L－异亮氨酸、L－蛋氨酸或L－色氨酸营养缺陷的棒状杆菌（JP未审公开54－44096）；耐酮丙二酸、氟丙二酸或一氟乙酸的棒状杆菌（JP未审公开57－18989）；耐精氨醇的棒状杆菌（JP未审公开62－24075）；耐X－胍的棒状杆菌（X表示脂肪酸或脂肪族链的衍生物，JP未审公开2－186995）等。

具体地说，可以是黄色短杆菌AJ11169（FERM BP－6892），谷氨酸棒状杆菌AJ12092（FERM BP－6906），黄色短杆菌AJ11336（FERM BP－6893）、黄

色短杆菌 AJ11345（FERM BP—6894）和乳发酵短杆菌 AJ12430（FERM BP—2228）。AJ11169 菌株和 AJ12092 菌株是耐 2—噻唑丙氨酸菌株，公开于 JP 未审公开 54—44096 中，AJ11336 菌株是耐受精氨醇和磺胺嘧啶的菌株，公开于日本专利公开 62—24075 中，AJ11345 菌株是耐精氨醇、2—噻唑丙氨酸、磺胺胍的菌株，并显示出组氨酸营养缺陷，公开于日本专利公开 62—24075 中，而 AJ12430 菌株是耐辛基胍和 2—噻唑丙氨酸的菌株，公开于 JP 未审公开 2—186995 中。

具有产生 L—精氨酸能力的埃希氏杆菌的实例包括引入 argA 基因的大肠埃希氏杆菌（见 JP 未审公开 57—5693），且具有产生 L—精氨酸能力的沙雷氏菌属的细菌实例包括粘质沙雷氏菌，该细菌代谢精氨酸能力缺陷，且显示出耐精氨酸拮抗物和刀豆氨酸，并对赖氨酸有营养缺陷（参见 JP 未审公开 52—8729）。

具有产生 L—组氨酸能力的棒状杆菌的实例包括属于短杆菌属，且耐维生素 B1 拮抗物的微生物。具体地说，乳发酵短杆菌 FERM P—2170、FERM P—2316、FERM P—6478、FERM P—6479、FERM P—6480 和 FERM P—6481（JP 未审公开 59—63194）。而且也可以是属于短杆菌属或棒状杆菌属，且耐多聚乙酰和具有产生 L—组氨酸能力的突变体菌株，具体说是 FERM P—4161、FERM P—7273、FERM P—8371、FERM P—8372 和 ATCC14067。

具有产生 L—组氨酸能力的属于埃希氏杆菌属的细菌实例包括属于埃希氏杆菌属，且耐组氨酸类似物的突变体菌株，例如，大肠埃希氏杆菌 R—344 菌株，和属于埃希氏杆菌属并引入了 L—组氨酸合成系统酶基因的细菌，所述的基因从前述菌株提取的。具体地说，可以是大肠埃希氏杆菌 NRRL—12116、NRRL—12118、NRRL—12119、NRRL—12120 和 NRRL—12121（JP 未审公开 56—5099）。

具有产生 L—组氨酸能力的属于芽胞杆菌属的细菌实例包括属于芽胞杆菌属，且耐组氨酸类似物的突变体菌株，和属于芽胞杆菌属并引入了从前述突变体菌株获得的与耐组氨酸拮抗物有关的基因。具体地说，可以是 FERM BP—218、FERM BP—224 和 FERM BP—219（JP 未审公开 58—107192）。

在本发明中，具有产生碱性氨基酸能力的微生物可以在需氧条件下，在液体培养基中被培养，例如，以下述方式，优选采用碳酸根离子和/或碳酸氢根离子作为碱性氨基酸的主要平衡离子。

在培养期间培养基的 pH 值被控制在 6.5 至 9.0，优选 6.5 至 8.0，而培养结束时则为 7.2—9.0。而且，一个培养期，其中在培养期间，通过控制发酵罐中的压强，

使其在发酵期间为正压力，或向培养基中提供二氧化碳气或含二氧化碳气的混合气体，保证在培养基中有2g/L或更多的碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的存在。本文所用的“一个培养期，其中在培养期间，保证在培养基中有2g/L或更多的碳酸氢根离子和/或碳酸根离子的存在”的描述，并不意味着在整个培养期必须有2 g/L或更多的离子存在，而是意味着培养期的任何一段时期里，有2 g/L或更多的离子存在即已足够。优选地，从对数生长期至静止期有2 g/L或更多的离子存在。

在本发明中，提高控制的pH使平衡由一价阴离子$HCO_3^-$占支配地位转变成作为平衡离子更有效的二价阴离子$CO_3^{2-}$占支配地位。而且，当用氨控制pH时，提高pH提供氨，且其可以成为碱性氨基酸的氮源。除了碱性氨基酸，作为阳离子的可以是来源于培养基成分的K、Na、Mg、Ca等。这些阳离子占阳离子总量的50%或更少。

为了在发酵罐中获得正压，例如，可以采用进气压高于排气压。通过在发酵罐中使用正压，通过发酵产生的二氧化碳气被溶解于培养液中以形成碳酸氢根离子或碳酸根离子，且它们作为碱性氨基酸的平衡离子。具体地说，发酵罐中的压强可以是0.03－0.2Mpa，优选0.05－0.15Mpa。而且，二氧化碳气可以通过向培养液中通入二氧化碳气或含有二氧化碳气的混合气体而溶于培养液中。而且，可以控制发酵罐中的压强成为正压，同时向培养液中提供二氧化碳气或含有二氧化碳气的混合气体。

为了在发酵罐中获得正压，例如，可以采用进气压高于排气压。当将二氧化碳气提供给培养液时，可以向培养液中通以纯二氧化碳气或含5体积%或更多二氧化碳气的混合气体。

对用于培养的液体培养基没有特别的限制，依据所采用的微生物，含有机或无机营养源例如碳源和氮源以及其它痕量营养素的任何常规的公知培养基可以被使用。可以使用任何碳源只要微生物可以将其使用即可以。例如，可以是糖，例如，蔗糖、葡萄糖、果糖、糖蜜和淀粉水解产物，有机酸例如，乙酸，醇例如，乙醇等。作为氮源，可以是无机物质，例如铵离子，蛋白质水解产物、酵母抽提物等。作为痕量营养素，可以是氨基酸、维生素、痕量金属元素等。

对于发酵方案也没有特别的限制，可以以任何的分批培养、流加培养或连续培养的形式进行，所述的分批培养其中的培养基不需要重新进料，所述的流加培养其中当初始添加的糖被消耗时，培养基需加料，而所述的连续培养，当培养基

的体积超过发酵罐可接受的体积时，取出其中的培养基。

而依据所采用的微生物选择合适的培养温度，通常是25—45℃，优选30—40℃。而且，在发酵期间，要进行充分的搅拌和提供充足的氧气。

在常规方法中，将用硫酸或盐酸获得的足够量的硫酸铵、氯化铵或蛋白质降解产物添加到培养基中，以便于将其用作产生的碱性氨基酸的平衡阴离子源，由此，该培养基含来源于这些原料的硫酸根离子和氯离子。因此，显示弱酸性的碳酸根离子的浓度在培养期间非常低，它们以ppm级存在。本发明其特征在于，降低这些硫酸根离子和氯离子，并在发酵环境中，将发酵期间由微生物排放出的二氧化碳气溶解在培养基中，利用这些二氧化碳作为平衡离子源。因此，根据本发明不需要添加超过其微生物生长所必须量的硫酸根离子或氯离子。优选地，在培养的早期阶段，向培养基中添加合适量的硫酸铵等，且在培养期间停止进料。或者，可以将硫酸铵等添加进培养基，并保持培养基中其与碳酸根离子或碳酸氢根离子的良好平衡。进一步地，可以将氨水添加进培养基作为L—赖氨酸的氮源。

通常，如果将硫酸铵添加进培养基作为碱性氨基酸的平衡离子源，则在培养液中二氧化碳通过硫酸根离子排放。而根据本发明，由于不需要向培养基中添加过量的硫酸铵，二氧化碳可以轻易地溶于发酵培养液中。

通过本发明获得的含碱性氨基酸的发酵培养液，相对于通过发酵产生的碱性氨基酸的当量浓度含5至80%浓度的碳酸根离子或碳酸氢根离子。这些碳酸根离子或碳酸氢根离子通过加热释放出二氧化碳气。因此，可以提高在发酵培养液中的固体成分中的碱性氨基酸含量。进一步地，如果向发酵培养液添加比碳酸更强的酸，它可以轻易地代替碳酸，且因此可以选择多种类型的盐。在本发明中，该“发酵产品”包括浓缩的和干燥的由前述发酵培养液获得的产品，该发酵培养液本身和其干燥的产品。

通过将诸如离子交换树脂技术、沉淀技术和其它技术这样的公知技术组合使用可以从发酵培养液收集碱性氨基酸。

## 实施例

下面，本发明将参照下述实施例进行更具体的说明。

### 实施例1

（1）产生L—赖氨酸的细菌种子培养物

将含45g/L的葡萄糖、15g/L的糖蜜、2 g/L（作为氮源）的大豆蛋白水解产物、

2 g/L 的 $KH_2PO_4$、5 .6g/L 的 NaOH、10 g/L 的硫酸铵、0.8 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$、20mg/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、20mg/L 的 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、0.8 mg/L 的盐酸硫胺和 0.2 mg/L 的生物素（pH6.0）的培养基 300mL 加入到 1L 容量的小玻璃发酵罐中，在 120℃下加热消毒 20 分钟。在发酵罐被冷却至 31.5℃之后，用 5 铂环已在 LB 平板上生长 24 小时的乳发酵短杆菌 ATCC31269 接种于培养基中，且在充分通气并搅拌的条件下，在 31.5℃和 pH7.0 下培养 30 小时。

（2）主培养

将含 30g/L 的葡萄糖、45g/L 的糖蜜、2 g/L（作为氮源）的大豆蛋白水解产物、1.4g/L 的磷酸、1.2g/L 的 NaOH、30 g/L 的硫酸铵、1.5 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$、15mg/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、15mg/L 的 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、5 mg/L 的盐酸硫胺素和 0.75 mg/L 的生物素（pH5.0）的培养基以 300mL 的量引入 1L 容量的小玻璃发酵罐中，在 120℃下加热消毒 20 分钟。在发酵罐被冷却至 31.5℃之后，将 45mL 的上述种子培养物接种于培养基中，且在 1/2vvm 通气并充分搅拌的条件下，在 34℃下培养。

当培养液中的糖浓度变为 5g/L 或更少时，含下列成分的培养基通过 JP 未审公开 5—30985 中所述的方法进行添加。具体地说，测定 pH 和溶解的氧的浓度，基于测定值的改变来探测碳源的消耗状态，并添加培养基以保持培养液中碳源的浓度是 5g/L 或更少。

[进料培养基]

含 530g/L 的葡萄糖、1.4 g/L（作为氮源）的大豆蛋白水解产物、1.0g/L 的 KOH、44 g/L 的氯化铵、0.3 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.35 mg/L 的盐酸硫胺素和 0.35 mg/L 的生物素（pH5.5）的培养基。

在预定量的进料培养基添加之后，当培养液中的糖被完全消耗之后，结束培养。该培养在 pH7.0 时开始培养，且 pH 逐渐改变至 8.0。同时，罐中的压强从 0 改变至 0.12Mpa。

作为对比实施例 1，添加硫酸铵以代替 pH 和罐中压强的增加。

在培养期间主要阴离子浓度的改变如图 1 中所示。在对比实施例 1 中的培养期间硫酸根离子得到提高，但在实施例 1 中该浓度低而碳酸氢根离子浓度提高。

在完成培养之后，相对于主要由赖氨酸构成的阳离子，碳酸根离子和碳酸氢根离子的当量浓度比是 33%，所述的 L—赖氨酸是一种发酵培养液中的碱性氨基酸。进一步地，在发酵培养液的总干产品中 L—赖氨酸的含量是 46%。在另一方

面，在对比实施例 1 中，相对于主要由赖氨酸构成的阳离子，碳酸根离子和碳酸氢根离子的当量浓度比是 0%，因此硫酸根离子和氯离子过量。进一步地，在发酵培养液的总干产品中 L—赖氨酸含量是 43%。

实施例 2

（1）产生 L—赖氨酸的细菌种子培养物

将含 40g/L 的葡萄糖、0.6 g/L（作为氮源）的大豆蛋白水解产物、1 g/L 的 $KH_2PO_4$、5 .6g/L 的 NaOH、8g/L 的硫酸铵、1.0 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$、10mg/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、10mg/L 的 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$（pH6.0）的培养基以 300mL 的量引入 1L 容量的小玻璃发酵罐中，在 120℃下加热消毒 20 分钟。在发酵罐被冷却至 37℃之后，用 5 铂环已在 LB 平板上生长 24 小时的大肠埃希氏杆菌 W3110（tyrA）/pCABD2（WO95/16042）接种于培养基中，且在充分通气并搅拌的条件下，在 37℃和 pH6.7 下培养 24 小时。

（2）主培养

将含 30g/L 的葡萄糖、0.4 g/L（作为氮源）的大豆蛋白水解产物、0.5g/L 的 $KH_2PO_4$、20 g/L 的硫酸铵、1.0g/L 的 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$、30mg/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 30mg/L 的 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$（pH5.0）的培养基以 300mL 的量引入 1L 容量的小玻璃发酵罐中，在 120℃下加热消毒 20 分钟。在发酵罐被冷却至 37℃之后，将 50mL 的上述种子培养物接种于培养基中，且在 1/2vvm 通气并充分搅拌的条件下，在 37℃下培养。

当培养液中的糖浓度变为 5g/L 或更少时，含 760g/L 葡萄糖的溶液通过 JP 未审公开 5—30985 中所述的方法，以实施例 1 中同样的方式进行添加。

在预定量的进料培养基添加之后，当培养液中的糖被完全消耗时，结束培养。该培养在 pH6.7 时开始培养，且 pH 逐渐改变至 8.0。同时，罐中的压强从 0 改变至 0.1Mpa。

作为对比实施例 2，添加硫酸铵以代替 pH 和罐中压强的增加。

在培养期间主要阴离子浓度的改变如图 2 中所示。在对比实施例 2 中的培养期间硫酸根离子浓度得到提高，但在实施例 2 中该浓度低而碳酸氢根离子浓度提高。

在完成培养之后，相对于主要由赖氨酸构成的阳离子，碳酸根离子和碳酸氢根离子的当量浓度比是 25%，所述的 L—赖氨酸是一种发酵培养液中的碱性氨基

酸。而且，在发酵培养液的总干产品中L—赖氨酸的含量是64%。

在另一方面，在对比实施例2中，相对于主要由赖氨酸构成的阳离子，碳酸根离子和碳酸氢根离子的当量浓度比是0%，因此硫酸根离子和氯离子过量。而且，在发酵培养液的总干产品中L—赖氨酸含量是61%。

# 说　明　书　附　图

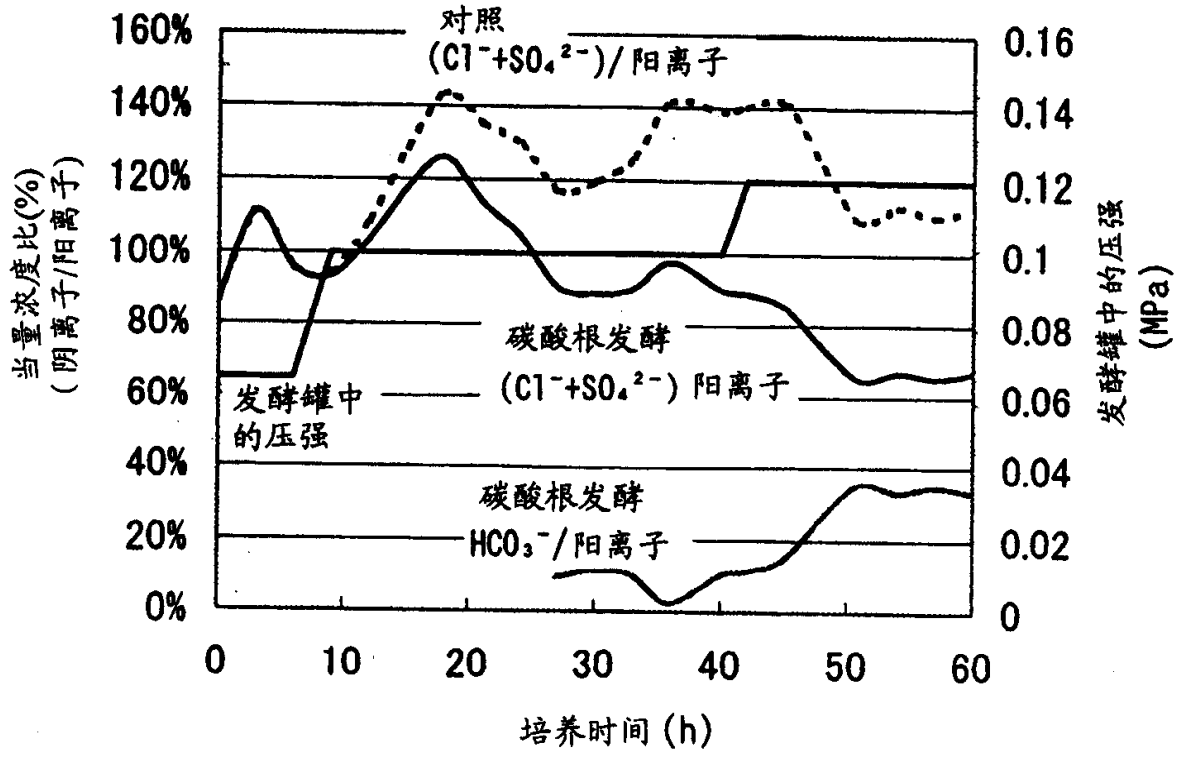

对照
(Cl⁻+SO₄²⁻)/阳离子
碳酸根发酵
(Cl⁻+SO₄²⁻) 阳离子
发酵罐中
的压强
碳酸根发酵
HCO₃⁻/阳离子
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
10
20
30
40
50
60
当量浓度比(%)
(阴离子/阳离子)
发酵罐中的压强
(MPa)
培养时间 (h)

图　1

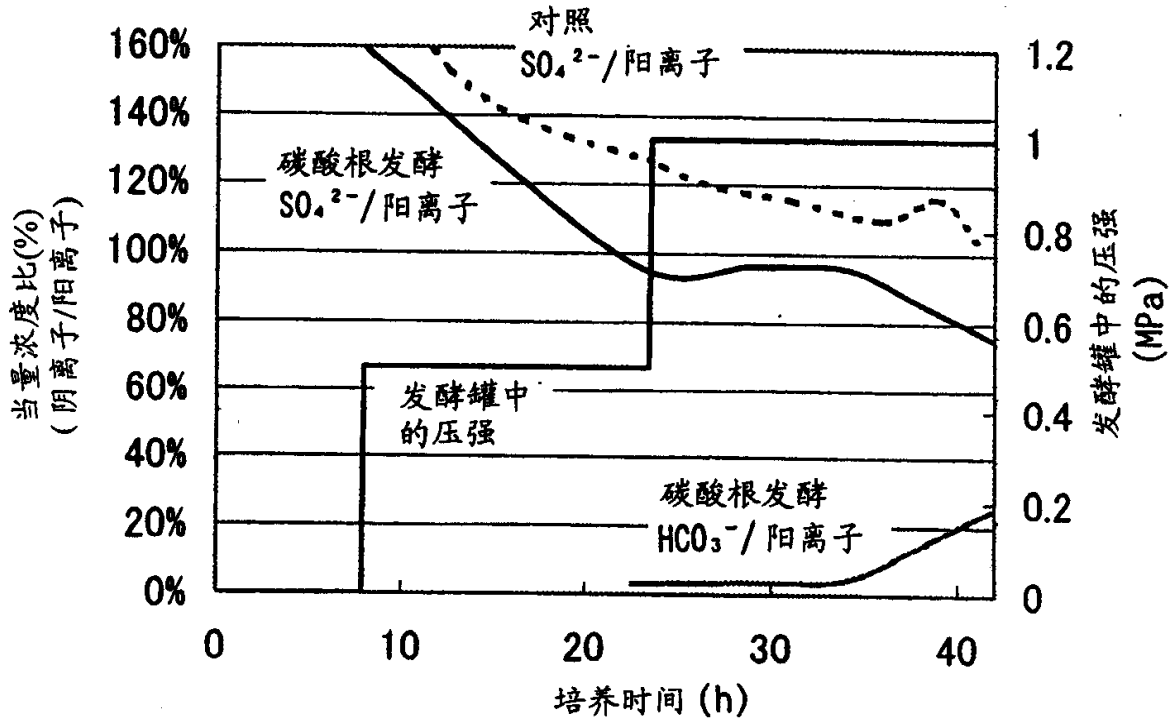

对照
SO₄²⁻/阳离子
碳酸根发酵
SO₄²⁻/阳离子
发酵罐中
的压强
碳酸根发酵
HCO₃⁻/阳离子
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
10
20
30
40
当量浓度比(%)
(阴离子/阳离子)
发酵罐中的压强
(MPa)
培养时间 (h)

图　2