



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103601647 B

(45) 授权公告日 2015.06.10

(21) 申请号 201310611576.7

审查员 张旋

(22) 申请日 2013.11.27

(73) 专利权人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市新模范马路5号

(72) 发明人 洪厚胜 闵兆升 郭会明

(74) 专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公司 32102

代理人 郭百涛

(51) Int. Cl.

C07C 229/08(2006.01)

C07C 227/40(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1099268 A, 1995.03.01, 权利要求1、3.

US 2012/0010429 A1, 2012.01.12, 全文.

CN 101275149 A, 2008.10.01, 全文.

CN 103387502 A, 2013.11.13, 权利要求1.

罗悠等. 金银花叶茎藤中黄酮与绿原酸同时提取分离工艺. 《吉首大学学报(自然科学版)》. 2011, 第32卷(第5期), 第91-94页.

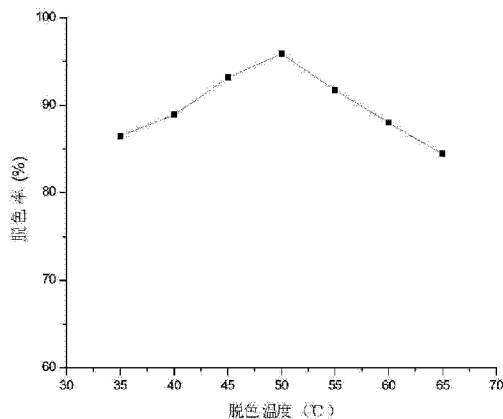
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种基因工程菌产L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基因工程菌产L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,该方法简单方便,可节约下游分离纯化的成本。本发明的基因工程菌产L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,其主要是使用D101大孔树脂对基因工程菌产L-丙氨酸发酵液进行脱盐脱色处理。



1. 一种基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法, 其特征在于使用 D101 大孔树脂对基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液进行脱盐脱色处理; 所述的使用 D101 大孔树脂对基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液进行脱盐脱色处理包括以下步骤:

基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液预处理: 将基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液在高速低温离心机下离心以去除包含菌体在内的杂质, 收集得到上清液; 将上清液中丙氨酸浓度调整至 70 ~ 80mg/mL, pH 值调整至 2.0 ~ 3.0 待用;

D101 大孔树脂预处理: 将 D101 大孔树脂装柱, 并进行乙醇浸泡 24h 后水洗至流出液澄清后, 再经过 4% HCl 流洗、水洗至中性、4% NaOH 流洗、水洗至中性后的过程得到预处理 D101 大孔树脂待用;

脱盐脱色处理: 将基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液预处理步骤中已处理好的 L- 丙氨酸发酵液以流速为 0.5 ~ 2.5mL/min, 温度为 35 ~ 65°C 条件下进入经过预处理的 D101 大孔树脂进行脱盐脱色, 收集分离后的 L- 丙氨酸发酵液。

2. 根据权利要求 1 所述的基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法, 其特征在于所述的高速低温离心机的转速为 10000 ~ 12000r/min, 离心时间为 5min。

3. 根据权利要求 1 所述的基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法, 其特征在于所述的 D101 大孔树脂预处理时在装柱前先于柱中装入 1/3 ~ 1/4 体积的水, 然后加入 D101 树脂, 树脂装柱量为树脂膨胀后柱体积的 80%。

4. 根据权利要求 1 所述的基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法, 其特征在于脱盐脱色处理过程中, 在 D101 大孔树脂吸附饱和后, 用 50 ~ 99% 乙醇、0.5 ~ 2.0mL/min 的流速进行树脂的洗脱使 D101 大孔树脂再生。

## 一种基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种发酵液脱盐脱色的方法,更具体地说涉及一种基因工程菌产 L- 丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法。

### 背景技术

[0002] L- 丙氨酸又称  $\alpha$ - 氨基丙酸,分子式为  $C_3H_7NO_2$ ,易溶于水,微溶于乙醇,不溶于乙醚或丙酮,含有较高的甜味,具有旋光性,是组成蛋白质的 20 种 L 型  $\alpha$  氨基酸之一。L- 丙氨酸虽然为人体非必需氨基酸,但却为人体血液中含最高氨基酸,有重要的生理作用。L- 丙氨酸在生物体内转氨反应中为最重要的氨基供体,也可作为血液中氮的优良运输工具。与糖代谢有密切关联,在葡萄糖 - 丙氨酸循环中,保持低血氨水平,同时还有产糖作用。L- 丙氨酸在食品与医药行业有着极广的应用。在食品工业中,L- 丙氨酸可用于食品饮料的防腐剂、风味调味料,加入少量的丙氨酸便可明显提高食品及饮料中的蛋白质利用率以及食品的营养价值,并且由于丙氨酸具有能够被生物体直接消化吸收的特点,饮用后能迅速恢复疲劳,振奋精神;L- 丙氨酸具有较强的甜度,可作为食品甜味剂使用,在复配甜味剂中加入少量 L- 丙氨酸能使得甜度提高、甜味柔和如同天然甜味剂,是合成高甜度阿力甜原料之一;L- 丙氨酸还可改善后味,作酸味矫正剂,改善有机酸的酸味,使其更接近天然物质的酸味;L- 丙氨酸还用于营养增补剂,制备氨基酸功能性保健酒等;L- 丙氨酸在医药行业,广泛用于在临床输液,为患者提供能量和营养;L- 丙氨酸还是生产维生素 B6、合成泛酸钙及其它有机化合物的重要原料。

[0003] 目前,国内 L- 丙氨酸的生产绝大多数是采用生物发酵的方式。其除了对优良菌种选育、发酵工艺改进这些上游技术的探索,L- 丙氨酸的下游分离提纯方式也是生物发酵生产 L- 丙氨酸的重要研究内容和关键技术之一。微生物发酵液中存在大量色素分子和高盐成分,色素乃是本身有颜色并能使其它物质着色的高分子有机化合物。它是在发酵过程中所产生的代谢产物,与菌种和发酵条件有关。在发酵液预处理及提炼过程中,大部分的杂质及色素已被去除,但仍有少量色素存在,如果在提炼中使用质量较差的原材料,也会带进一些色素。各种色素中生色基团和助基团一般都含有数量较多的各种极性基团(如  $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$  等)。如若不能有效去除这些色素分子和高盐成分,就会增加后续下游过程中产品的分离、提纯、结晶的难度,进而影响产品的纯度和品质。L- 丙氨酸的生产成本主要由上游发酵过程和下游分离提纯过程费用组成,其中,下游过程所占费用的比例高达 60% ~ 70%。通常 L- 丙氨酸脱色普遍采用的脱色方式是活性炭脱色。这是因为活性炭比表面积大,吸附力强。但是其也存在着不足与问题,其对溶液的黏度有一定的要求,黏度较高时需要使样液体升温到一定的温度才利于吸附和过滤,另外活性炭不可回收利用,且容易吸附产品,造成产品损失较大。而且活性炭脱色方式不能有效减少母液中高盐成分。因此如何在节约成本的基础上改进分离提纯的方式,提高成品的品质已成为微生物发酵生产丙氨酸的关键问题之一。

[0004] D101 大孔吸附树脂则是苯乙烯型非极性共聚体,适用范围比较广谱,对于不带极

性或弱极性的有机化合物,普遍吸附能力强,目前,广泛应用于医药行业,特别对皂甙、黄酮这类中草药的分离提纯效果尤佳,例如:人参皂甙、三七皂甙、薯蓣皂甙、银杏黄酮等。但是,目前还没有关于将 D101 大孔吸附树脂用于类似 L-丙氨酸发酵液这类生物制品的脱盐脱色的相关专利和报道。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是解决上述现有技术中存在的问题与不足,提供一种基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,该方法简单方便,可节约下游分离纯化的成本。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 本发明的基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,其主要是使用 D101 大孔树脂对基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液进行脱盐脱色处理。

[0008] 本发明的基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,其进一步的方案是所述的使用 D101 大孔树脂对基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液进行脱盐脱色处理包括以下步骤:

[0009] 基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液预处理:将基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液在高速低温离心机下离心以去除包含菌体在内的杂质,收集得到上清液;将上清液中丙氨酸浓度调整至 70 ~ 80mg/mL, pH 值调整至 2.0 ~ 3.0 待用;

[0010] D101 大孔树脂预处理:将 D101 大孔树脂装柱,并进行乙醇浸泡 24h 后水洗至流出液澄清后,再经过 4% HCl 流洗、水洗至中性、4% NaOH 流洗、水洗至中性后的过程得到预处理 D101 大孔树脂待用;

[0011] 脱盐脱色处理:将基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液预处理步骤中已处理好的 L-丙氨酸发酵液以流速为 0.5 ~ 2.5 mL/min,温度为 35 ~ 65°C 条件下进入经过预处理的 D101 大孔树脂进行脱盐脱色,色素有机大分子及含高盐类杂质吸附在大孔树脂上,收集分离后的 L-丙氨酸发酵液。

[0012] 本发明的基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,其更进一步的技术方案是所述的高速低温离心机的转速为 10000 ~ 12000 r/min,离心时间为 5 min。

[0013] 本发明的基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,其更进一步的技术方案还可以是所述的 D101 大孔树脂预处理时在装柱前先于柱中装入 1/3 ~ 1/4 体积的水,然后加入 D101 树脂,树脂装柱量为树脂膨胀后柱体积的 80%。

[0014] 本发明的基因工程菌产 L-丙氨酸发酵液脱盐脱色的方法,其更进一步的技术方案是脱盐脱色处理过程中,在 D101 大孔树脂吸附饱和后,用 50 ~ 99% 乙醇、0.5 ~ 2.0 mL/min 的流速进行树脂的洗脱使 D101 大孔树脂再生。

[0015] 与现有技术相比本发明具有以下有益效果:

[0016] 利用 D101 大孔吸附树脂进行脱盐脱色,所吸附的色素和杂质容易洗脱,80% 乙醇洗脱即可,酸碱重复处理可实现树脂的再生。D101 大孔树脂对 L-丙氨酸吸附量极少甚至没有吸附,产品保留率达到 94% 以上,不会造成产品损失。D101 大孔树脂较其它普通树脂在进行发酵液脱色的同时,还能脱盐,降低发酵液电导率。D101 大孔树脂的再生率较高,达到 95% 以上,可以重复使用数十次。使用 D101 大孔树脂对 L-丙氨酸进行脱盐脱色,效果优于活性炭脱色,可节约下游分离纯化的成本,适合工业化规模生产用。

## 附图说明

[0017] 图 1 为本发明实施例 1 中 D101 大孔树脂对 L- 丙氨酸脱色的脱色率随温度变化示意图。

[0018] 图 2 为本发明实施例 2 中 D101 大孔树脂对 L- 丙氨酸脱色的脱色率随上样流速变化示意图。

[0019] 图 3 为本发明实施例 3 中 D101 大孔树脂对 L- 丙氨酸脱色的解析率随乙醇浓度变化示意图。

## 具体实施方式

[0020] 在实施例中 D101 大孔吸附树脂均为市售产品。

[0021] 实施例 1

[0022] (1) 将 L- 丙氨酸发酵液进行预处理, 在高速低温离心机下离心以去除菌体等杂质, 收集上清液;

[0023] (2) 将上述上清液中 L- 丙氨酸浓度调整至 75mg/mL, pH 值调整至 3.0;

[0024] (3) 将 D101 大孔树脂装柱, 并进行乙醇浸泡 24h 后水洗至流出液澄清后, 依次用 4%HCl 流洗, 水洗至中性, 4%NaOH 流洗, 水洗至中性的预处理过程;

[0025] (4) 控制处理后的发酵液流速为 1.5mL/min, 温度分别为 35、40、45、50、55、60℃、65℃下, 进入 D101 大孔树脂进行脱盐脱色, 得丙氨酸发酵液, 计算脱色率。图 1 是 D101 大孔树脂动态脱色试验得到的温度对脱色率变化曲线图, 可以看出, 温度对 D101 大孔树脂的吸附性能的影响比较大, 温度在 50℃左右脱色性能卓越。

[0026] (5) 树脂吸附饱和后, 用 80% 乙醇、1.0mL/min 的流速进行树脂的洗脱。

[0027] 上述方法中, 离心机转速为 11000r/min, 离心时间为 5min。

[0028] 实施例 2

[0029] (1) 将 L- 丙氨酸发酵液进行预处理, 在高速低温离心机下, 以 12000r/min 离心 5min, 以去除菌体等杂质, 收集上清液;

[0030] (2) 将上述上清液中 L- 丙氨酸浓度调整至 75mg/mL, pH 值调整至 3.0;

[0031] (3) 将 D101 大孔树脂装柱, 并进行乙醇浸泡 24h 后水洗至流出液澄清后, 依次用 4%HCl 流洗, 水洗至中性, 4%NaOH 流洗, 水洗至中性的预处理过程;

[0032] (4) 控制温度在 30℃下, 以 0.5mL/min、1mL/min、1.5mL/min、2mL/min、2.5mL/min 的流速进入 D101 大孔树脂进行脱盐脱色, 得丙氨酸发酵液, 计算脱色率。图 2 是 D101 大孔树脂动态脱色试验得到的上样流速对脱色率变化曲线图, 可以看出, 流速在 1.5mL/min 左右脱色性能卓越。

[0033] (5) 树脂吸附饱和后, 用 80% 乙醇、1.0mL/min 的流速进行树脂的洗脱。

[0034] 上述方法中, 离心机转速为 12000r/min, 离心时间为 5min。

[0035] 实施例 3

[0036] (1) 将 L- 丙氨酸发酵液进行预处理, 在高速低温离心机下, 以 12000r/min 离心 5min, 以去除菌体等杂质, 收集上清液;

[0037] (2) 将上述上清液中 L- 丙氨酸浓度调整至 75mg/mL, pH 值调整至 3.0;

[0038] (3) 将 D101 大孔树脂装柱, 并进行乙醇浸泡 24h 后水洗至流出液澄清后, 依次用 4%HCl 流洗, 水洗至中性, 4%NaOH 流洗, 水洗至中性的预处理过程;

[0039] (4) 控制温度在 30℃ 下, 以 1.5mL/min 的流速进入 D101 大孔树脂进行脱盐脱色, 得丙氨酸发酵液;

[0040] (5) 树脂吸附饱和后, 用浓度分别为 50%、60%、70%、80%、99% 乙醇、1.0mL/min 的流速进行树脂的洗脱, 计算解析率。图 3 是 D101 大孔树脂动态脱色试验得到的乙醇浓度对解析率变化曲线图, 可以看出, 乙醇浓度在 80% 左右解析性能卓越。

[0041] 上述方法中, 离心机转速为 10000r/min, 离心时间为 5min。

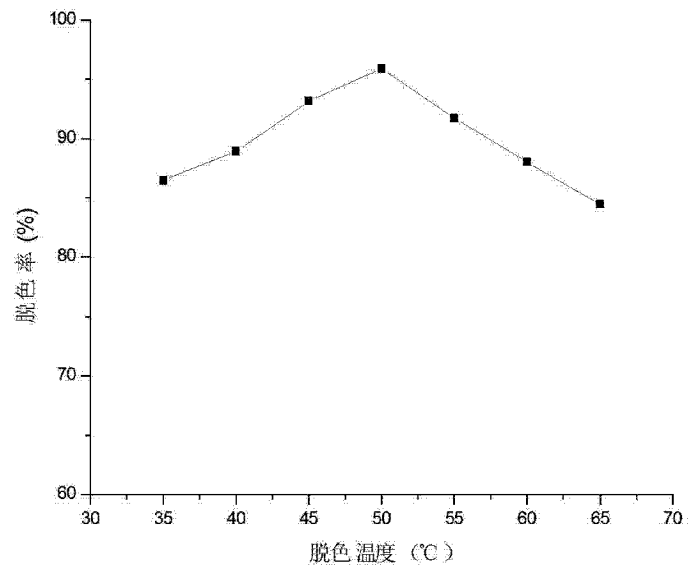


图 1

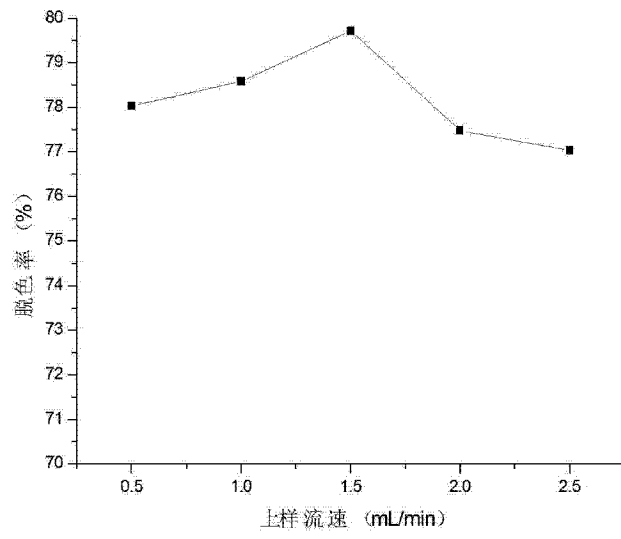


图 2

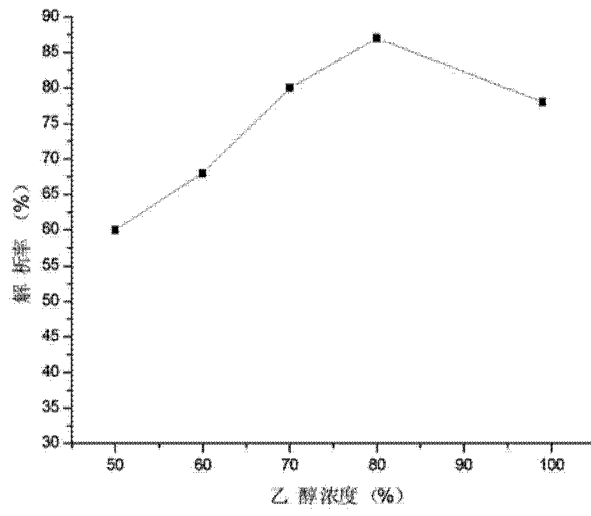


图 3