



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103992964 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201410106950. 2

*C12R 1/15*(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 21

(83) 生物保藏信息

CGMCC No8184 2013. 09. 13

(71) 申请人 山东寿光巨能金玉米开发有限公司

地址 262700 山东省潍坊市寿光市新兴东街  
150 号

(72) 发明人 吴泽华 李刚 冯雨 罗明刚

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公  
司 37205

代理人 李树祥

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20*(2006. 01)

*C12P 13/08*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种耐高 PH 值菌种及新型发酵法生产赖氨酸方法

(57) 摘要

本发明公开了一种耐高 PH 值菌种及新型发酵法生产赖氨酸方法,耐高 PH 值菌种,发酵过程不使用硫酸氨作为无机氮源,用氨水或液氨补充发酵液中氮源来合成赖氨酸,在发酵生产赖氨酸的过程中不添加硫酸铵,采用补入氨水或液氨作为氮源,使发酵液中硫酸根离子的浓度大大降低,方便了后续发酵液的处理,不需要离子交换去除硫酸根等离子进行提纯,进从而简化了生产饲料级赖氨酸盐酸盐的工艺,降低生产成本。补入氨水或液氨的方式采用调整发酵液中 PH 来控制发酵液中无机氮含量,保证培养罐中无机氮含量在合理范围内,同时不再流加硫酸铵,减少发酵液中硫酸根离子等杂质含量,便于提取。

1. 一种耐高 PH 值菌种, 该菌株为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*, 保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC No. 8184, 保藏时间为 2013 年 9 月 13 日。

2. 一种新型发酵法生产赖氨酸方法, 具体包括以下步骤:

(1) 将生产赖氨酸的菌种, 既权利要求 1 所述的耐高 PH 值谷氨酸棒杆菌接入生产赖氨酸的种子培养基中, 摇床培养到对数生长期, 得到生产赖氨酸的种子培养液;

(2) 连续发酵: 将步骤(1) 制得的生产赖氨酸的种液接入灭菌的发酵培养基中, 其中, 生产赖氨酸的培养基接种量为初始体积的 10% ~ 20%, 发酵培养基中初始糖浓度为 20 克/升 ~ 60 克/升, 通过向发酵液中通入无菌空气维持罐压 0.04 ~ 0.08MP, 并开动搅拌, 使发酵液中溶氧维持在 15% ~ 25%; 发酵过程使用氨水或液氨将发酵液 PH 控制在 7.2 ~ 7.6 内的任意一个值附近; 在连续发酵过程中通过流加浓度为 500 ~ 800 克/升的葡萄糖溶液, 使发酵液中葡萄糖浓度维持在 5 克/升 ~ 20 克/升; 同时向发酵液中添加营养物质, 连续发酵时间为 45 ~ 60hr;

(3) 连续发酵结束的培养液, 膜过滤后浓缩结晶生产赖氨酸。

3. 根据权利要求 2 所述的一种新型发酵法生产赖氨酸方法, 其特征在于: 所述步骤(1) 中的温度为 28 ~ 37°C, 优选 35°C。

4. 根据权利要求 2 所述的一种新型发酵法生产赖氨酸方法, 其特征在于: 所述步骤(2) 中连续发酵过程中温度控制在 28 ~ 37°C 下, 优选 35°C。

5. 根据权利要求 2 所述的一种新型发酵法生产赖氨酸方法, 其特征在于: 所述步骤(2) 中营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐和维生素;

根据权利要求 5 所述的一种新型发酵法生产赖氨酸方法, 其特征在于: 所述有机氮源为玉米浆、酵母粉和蛋白胨; 无机盐为氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁和硫酸锰; 维生素为维生素 B<sub>1</sub>、维生素 H 和维生素 B<sub>3</sub>。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的一种新型发酵法生产赖氨酸方法, 其特征在于: 所述营养物质配方为下述成分, 余量为水,

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10g/L

MgSO<sub>4</sub> 10g/L

KCL 5g/L

FeSO<sub>4</sub> 0.25g/L

MnSO<sub>4</sub> 0.25g/L

酵母粉 100g/L

玉米浆 20g/L

维生素 B<sub>1</sub> 100mg/L

维生素 H 80mg/L

维生素 B<sub>3</sub> 70mg/L。

## 一种耐高 PH 值菌种及新型发酵法生产赖氨酸方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于发酵法生产赖氨酸的方法,尤其涉及一种耐高 PH 值菌种及新型发酵法生产赖氨酸方法。

### 背景技术

[0002] 由于在食品或饲料中 L- 赖氨酸含量不足时,会限制其它氨基酸的利用,因此赖氨酸广泛用于食品的强化、动物饲料的添加剂和药用, L- 赖氨酸是当前国内外全价配合饲料的主要添加剂,具有提高饲料利用率,促进动物生长和改进肉质的功效。

[0003] 目前,生产饲料级 L- 赖氨酸盐酸盐过程中,发酵较多的采用连续发酵培养,在连续发酵培养中主要采用流加硫酸铵的方式提供氮源,保证赖氨酸的合成。硫酸铵中的氮被逐步消耗掉,而硫酸根离子则滞留在发酵液中,随发酵时间的延长,发酵液中硫酸根离子逐渐增加,发酵结束后,发酵液中存在大量硫酸根离子,为提取工段造成一定难度。

[0004] 传统工艺采用发酵液膜过滤、经强酸性阳离子交换树脂吸附解脱赖氨酸、浓缩、调酸结晶、离心分离干燥等工序生产饲料级赖氨酸盐酸盐。在离交工艺中用硫酸调节物料 PH,用氨水进行解脱,同时需要大量纯水用于清洗、洗脱,而且在此过程中产生大量低浓废水、高浓废水,其中,高浓废水中含有大量硫酸铵需要提取回用,生产硫酸铵的过程中产生大量冷凝水,增加了水处理成本;增加了治理负担。

[0005] 传统赖氨酸发酵过程 PH 一般控制小于 7.2,不低于 6.5,优先 PH 在 7.0,此时赖氨酸生产和菌体生长均正常;过高或过低的 PH,均会影响或抑制发酵过程赖氨酸生产和菌体生长,使发酵结束过程菌体偏低,发酵赖氨酸产率偏低。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于,克服现有技术的不足,提供了一种耐高 PH 值菌种及新型发酵法生产赖氨酸方法,本发明提供了一种耐高 PH 值菌种,发酵过程不使用硫酸氨作为无机氮源,用氨水或液氨补充发酵液中氮源来合成赖氨酸,在发酵生产赖氨酸的过程中不添加硫酸铵,采用补入氨水或液氨作为氮源,使发酵液中硫酸根离子的浓度大大降低,方便了后续发酵液的处理,不需要离子交换去除硫酸根等离子进行提纯,进而简化了生产饲料级赖氨酸盐酸盐的工艺,降低生产成本。补入氨水或液氨的方式采用调整发酵液中 PH 来控制发酵液中无机氮含量,保证培养罐中无机氮含量在合理范围内,同时不再流加硫酸铵,减少发酵液中硫酸根离子等杂质含量,便于提取。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案为:一种耐高 PH 值菌种,该菌株为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 8184,保藏时间为 2013 年 9 月 13 日。

[0008] 一种新型发酵法生产赖氨酸方法,具体包括以下步骤

(1) 按常规方法配置生产赖氨酸的种子培养基,按 120℃ 灭菌 15-20 分钟;将生产赖氨酸的菌种,即耐高 PH 值菌种接入生产赖氨酸的种子培养基中,在 28 ~ 37℃ 下,优选 35℃ 下

摇床培养到对数生长期,得到生产赖氨酸的种液;

(2) 连续发酵:将步骤(1)制得的生产赖氨酸的种液接入经常规方法灭菌的发酵培养基中,其中,生产赖氨酸的培养基接种量为初始体积的 10%~20%,发酵液中初始糖浓度为 20 克/升~80 克/升,连续发酵过程中温度控制在 28~37℃下,优选 35℃,通过向发酵液中通入无菌空气维持压力在 0.02~0.08MP,并开动搅拌维持转速在 500~800rpm,使发酵液中溶氧维持在 15%~25%,在连续发酵过程中通过流加浓度为 500~800 克/升的葡萄糖溶液,使发酵液中葡萄糖浓度在 5 克/升~20 克/升,同时向发酵液中添加营养物质,营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐、维生素等;发酵液 PH 控制在 7.2~7.6 内的任意一个值附近。连续发酵时间为 45~60hr。

[0009] (3) 连续发酵结束的培养液,膜过滤后不需要经过树脂进行提纯,直接浓缩、调酸、结晶生产赖氨酸。过滤后发酵液硫酸根离子等阴阳离子杂质较少,可以用超滤膜、脱色等方式去除发酵液中杂质,使发酵液赖氨酸纯度提高到 95% 以上,然后经过四效浓缩把高纯度赖氨酸浓缩至干物在 60~80% 左右、用盐酸将浓缩液调节 PH 至 5.0-5.5、结晶直接生产赖氨酸盐酸盐。

[0010] 所述的 PH 控制在 7.2~7.6 内的任意一个值附近波动是 7.4。

[0011] PH 值控制方法:

(1) 按照赖氨酸连续发酵中葡萄糖消耗速率和无机氮消耗速率,向培养基中添加浓度为 500~800 克/升的葡萄糖溶液和氨水或液氨,通过 PH 在一定范围内波动,使氨水或液氨补入,维持一定的无机氮浓度,维持一定的 PH 范围;中间过程维持发酵液中葡萄糖浓度在 5 克/升~20 克/升;葡萄糖的消耗降低发酵液 PH 值,补充氨水或液氨提高发酵液 PH 值。

[0012] (2) 向培养基中添加一量的营养物质,营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐、维生素等,通过 PH 在一定范围内波动,使氨水或液氨补入,维持一定的无机氮浓度,维持一定的 PH 范围;营养物质的流加比例为葡萄糖补入量的 1/8-1/3;营养物补加降低发酵液 PH 值,补充氨水或液氨提高发酵液 PH 值。

[0013] (3) 将上述(1)、(2)所述的两种控制方式使培养基 PH 在 7.2~7.6 内的任意一个值附近波动。

[0014] 所述步骤(2)中营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐和维生素;

所述有机氮源为玉米浆、酵母粉和蛋白胨;无机盐为氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁和硫酸锰;维生素为维生素 B<sub>1</sub>、维生素 H 和维生素 B<sub>3</sub>。

[0015] 所述营养物质配方为下述成分,余量为水,

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10g/L

MgSO<sub>4</sub> 10g/L

KCL 5g/L

FeSO<sub>4</sub> 0.25g/L

MnSO<sub>4</sub> 0.25g/L

酵母粉 100g/L

玉米浆 20g/L

维生素 B<sub>1</sub> 100mg/L

维生素 H 80mg/L

维生素 B<sub>3</sub> 70mg/L。

[0016] 赖氨酸发酵过程由于葡萄糖消耗产酸酸性物质, PH 会降低;另一方面通过流加一定量的营养物质,营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐和维生素,也可使 PH 降低;为维持一定的 PH,会使氨水或液氨自动补入,来提高发酵液 PH。这几种方式使发酵液中无机氮维持在一定范围内,使赖氨酸菌种维持正常的代谢。

[0017] 本发明中的 PH 值控制可通过市售的 PH 电极、传感器、及其他相关仪表来完成。

[0018] 本发明中所述的生产赖氨酸的种子培养基和发酵培养基,可根据现有技术按照生产赖氨酸的不同时期所需种子培养基和发酵培养基,采用常规方法配置。

[0019] 所述的菌种为一种耐高 PH 值菌种,该菌株为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所;保藏号为 CGMCC No. 8184,保藏时间为 2013 年 9 月 13 日。

[0020] 本发明提供的生产赖氨酸的方法是基于这样的构思:目前在赖氨酸提取工艺中都采用离交树脂处理,在离交工艺中用硫酸调节物料 PH,用氨水进行解吸,同时需要大量纯水用于清洗、洗脱,而且在此过程中产生大量低浓废水、高浓废水,其中,高浓废水中含有大量硫酸铵需要重新提取回收,生产硫酸铵的过程中产生大量冷凝水,增加了水处理成本;这就考虑能否不再经过离交工艺,这就要求尽量减少发酵液中的硫酸根离子,在连续发酵中采用氨水或液氨代替硫酸铵作为氮源,能大幅减少硫酸根离子的浓度;考虑到如何自动添加氨水或液氨,一方面赖氨酸发酵过程中 PH 会下降,会使氨水或液氨自动补入,另一方面可以添加适当的营养物,使 PH 降低,氨水或液氨补入,另外提高 PH 也可使氨水或液氨补入;这几个方面结合可以使发酵液中无机氮浓度维持在一定水平,保证了赖氨酸菌种的正常代谢。

[0021] 本发明的有益效果是:本发明通过筛选得到一种耐高 PH 值菌种,发酵过程 PH 控制在 7.2 ~ 7.6,远高传统赖氨酸发酵 PH;传统赖氨酸发酵过程 PH 一般控制小于 7.2,不低于 6.5,优先 PH 在 7.0 本发明发酵过程不使用硫酸铵作为无机氮源,只使用氨水或液氨作为无机氮源,同时氨水或液氨作为 PH 调节剂;因为氨水或液氨即要作为无机氮源维持菌体生长需求,同时也要作为 PH 调节剂,维持 PH 值;所以过程中必须保证高 PH 值,来保证无机氮源充足,保证菌体及赖氨酸生产过程无机氮源充足,才能得到高的赖氨酸产率。

[0022] 同现有技术相比,本发明提供的是在连续发酵过程中补加氨水或液氨,不流加硫酸铵,而使发酵液中不含有硫酸根离子,进而简化赖氨酸提取工艺的方法;本发明是在连续发酵过程中通过改变 PH 来控制氨水或液氨的补入,维持一定的无机氮浓度,进而保证赖氨酸菌种正常代谢;本发明的优势在于对赖氨酸提取工艺进行了简化。本发明通过在连续发酵中补入氨水或液氨提供氮源,发酵结束后由于发酵液中硫酸根离子较少,可以不用经过离交树脂,经过使用氨水或液氨作为氮源的发酵液经过膜过滤去除菌体、大分子蛋白等杂质,过滤后发酵液不经过离交树脂吸附解吸,直接通过脱色过滤及其他方法去除发酵液中其他离子等杂质,直接经过脱色过滤及其他方法去除发酵液中其他离子等杂质,然后直接通过浓缩、调酸、结晶、重结晶、离心分离、干燥等工艺生成赖氨酸盐酸盐。

## 具体实施方式

**[0023] 实施例一**

菌种使用谷氨酸棒杆菌进行赖氨酸连续发酵生产赖氨酸,所用的培养基如下:

**(1) 斜面培养基:**

蛋白胨 12 g/L、酵母粉 7 g/L、氯化钠 5 g/L、蔗糖 20g/L、琼脂 20 g/L,培养基用 30% 氢氧化钾溶液调 PH 到 7.5-8.0,在 115℃ 灭菌 20min,制备出高 PH 斜面培养基。

**[0024] (2) 种子摇瓶培养基:**

蛋白胨 10 g/L  
酵母粉 5 g/L  
氯化钠 5 g/L  
葡萄糖 40g/L  
硫酸氨 5g/L  
尿素 3g/L  
磷酸二氢钾 3g/L  
FeSO<sub>4</sub> 0.1g/L  
MnSO<sub>4</sub> 0.1g/L  
维生素 B<sub>1</sub> 10mg/L  
维生素 H 10mg/L  
维生素 B<sub>3</sub> 20mg/L

用 30% 氢氧化钾溶液调 PH 到 7.5-8.0,培养基在 120℃ 灭菌 15 分钟。

**[0025] (3) 产 L- 赖氨酸的培养基:**作为培养基可用含有碳源、氮源、无机盐离子及其他有机成分的普通培养基。碳源可以使用糖如葡萄糖、果糖、乳糖、半乳糖或淀粉水解物;氮源可以使用无机铵盐如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、尿素等,有机氮源如酵母浸膏、蛋白胨、玉米浆、大豆水解液等,氨水或液氨及是可以的;无机盐离子如硫酸镁、氯化钾、铁离子、锰离子等;有机成分可以引入如酵母粉、蛋白胨等;当使用需特殊物质培养的菌株如营养缺陷性时,可直接将这些物质加入培养基中,或者使用含有这些物质的蛋白水解物、蛋白胨、玉米浆、酵母抽提物等培养基。

**[0026]** 培养条件优选在有氧条件下连续发酵培养时间为 45 ~ 60hr 最佳。培养温度优选控在 28 ~ 37℃ 下,优选 35℃。培养过程 PH 优选控在 6.0 ~ 8.0。有机或无机、酸性或碱性物质控制 PH。

**[0027] 该发酵培养基通过溶解下述成分(1L)**

葡萄糖 50g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10g  
MgSO<sub>4</sub> 1g  
FeSO<sub>4</sub> 0.1g  
MnSO<sub>4</sub> 0.1g  
酵母粉 100g  
玉米浆 6g  
维生素 B<sub>1</sub> 30mg  
维生素 H 40mg

维生素 B<sub>3</sub> 30mg

用氨水或液氨调整 PH 到 6.0, 120℃ 灭菌 30 分钟。

#### [0028] 实施例二

将菌株划线接入斜面培养基, 在 31.5℃ 下培养 24-32hr。收集平板上菌株并进行扩大培养, 筛选出生长较好的菌株作为实验菌株。从生长好的活化斜面上刮取 1/4-1 环种子, 接入 500ml 液体培养基中, 放入摇床培养。在温度 35℃、转速 180-220r 培养条件下培养 18-24 小时。使摇瓶种子达到对数生长期。取摇瓶种子液按 10% 的接种量接入含有 1L 发酵培养基的 3L 自动发酵罐 BIO-110 (美国 NBS 公司) 中, 发酵罐带有温度、PH、溶氧等自动控制功能。

[0029] 在发酵过程中发酵温度控制在 35℃, 罐压控制在 0.03Mpa, 通过调节通气量和转速控制溶氧在 15%~25%。开始阶段 PH 设定为 7.0, 发酵过程比较稳定, 到 6hr 开始补加浓度为 500~800 克/升的葡萄糖溶液, 同时检测无机氮指标, 发现为 0.30g/dl, 仍很高, 到 12hr 时, 发现无机氮指标为 (以铵态氮计) 0.22g/dl, 开始频繁的调高 PH 到 7.2, 并开始添加营养物质, 营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐、维生素等, 到 24hr 时 PH 调高到 7.6, 并进一步提高营养物质的比例; 到 30hr 之后消耗较慢, 将 PH 降到 7.3, 直到发酵结束。培养 45hr, 消耗葡萄糖 270g, 产酸率为 80.5g/L, 产酸总量为 121.5g, 糖酸转化率为 45.0%。停罐发酵液用盐酸调节 PH 到 5.6 左右, 再加热到 80 度左右经过膜过滤, 将浓菌体去除掉, 清液赖氨酸在 78.9g/l, 然后用氨基酸脱色树脂进行脱色, 发酵液纯度达到 95.2%, 脱色过滤后的发酵液用蒸发器蒸发, 蒸发到物料中赖氨酸浓度达到 69.6%, 然后将温度降低到 45 度左右结晶 (上下波动不超过 2 度), 物料再通过离心机进行离心分离并用去离子水进行水洗, 吸水量为物料体积 10% 左右, 离心后物料通过烘干检测相关指标, 赖氨酸主含量为 98.61%, 水分 0.7%, 完全达到相关产品指标要求。母液需要重结晶进行提纯。

#### [0030] 实施例三

菌种、种子准备及发酵条件同实例二。其中: 连续发酵过程中用流加稀盐酸的方法控制 PH, 初始 PH 控在 7.0, 前期无机氮降低先用提高 PH 的方法, PH 最高提到 7.3。若耗无机氮消耗较快, PH 在 7.3 时仍不能满足氨氮需要, 再流加适量的浓盐酸控制。3hr 开始流加营养物质, 营养物质 (营养物质为有机氮源、磷酸、无机盐和和维生素) 的流加比例为葡萄糖补入量的 1/8-1/3。

#### [0031] 该营养物质配方通过溶解下述成分 (1L)

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10g

MgSO<sub>4</sub> 10g

KCL 5 g

FeSO<sub>4</sub> 0.25g

MnSO<sub>4</sub> 0.25g

酵母粉 100g

玉米浆 20g

维生素 B<sub>1</sub> 100mg

维生素 H 80mg

维生素 B<sub>3</sub> 70mg

培养过程中初始利用调高 PH 来控制,12hr 之后用流加洗盐酸来控制,添加稀盐酸能使 PH 稳定在 7.3,且使无机氮维持在 0.06g/dl 的水平。培养 45hr,消耗葡萄糖 330g,产酸率为 92.5g/L,产酸总量为 161.8g,糖酸转化率为 49.03%。停罐发酵液用盐酸调节 PH 到 5.6 左右,再加热到 80 度左右经过膜过滤,将浓菌体去除掉,清液赖氨酸在 91.2g/l,然后用氨基酸脱色树脂进行脱色,发酵液纯度达到 94.9%,脱色过滤后的发酵液用蒸发器蒸发,蒸发到物料中赖氨酸浓度达到 71.10%,然后将温度降低到 45 度左右结晶(上下波动不超过 2 度),物料通过离心机进行离心分离并用去离子水进行水洗,吸水量为物料体积 10% 左右,离心后物料通过烘干检测相关指标,赖氨酸主含量为 98.53%,水分 0.58%,完全达到相关产品指标要求。母液需要重结晶进行提纯。

[0032] 发酵结束后,发酵液经过膜过滤去除菌体、大分子蛋白等杂质,过滤后发酵液不经过离交树脂吸附解脱,直接通过脱色过滤及其他方法去除发酵液中其他离子等杂质,然后直接通过浓缩、调酸、结晶、重结晶(母液)、离心分离、干燥等工艺生成赖氨酸盐酸盐。

[0033] 本发明的发酵液膜过滤后不需要经过树脂直接浓缩结晶生产赖氨酸。过滤后发酵液硫酸根离子等阴阳离子杂质较少,可以实验用超滤膜、脱色等方式去除发酵液中杂质,使发酵液赖氨酸纯度提高到 95% 以上,然后经过浓缩、调酸、结晶等工艺直接生产赖氨酸。

[0034] 本发明提取工艺中不需要离交工艺,传统工艺经强酸性阳离子交换树脂吸附解脱赖氨酸,在离交工艺中用硫酸调节物料 PH,用 5% 氨水或液氨进行解脱,同时需要大量纯水用于清洗、洗脱,而且在此过程中产生大量低浓废水、高浓废水,其中,高浓废水中含有大量硫酸铵需要提取回用,生产硫酸铵的过程中产生大量冷凝水,增加了水处理成本;而新工艺中发酵液中硫酸离子较少,提取车间接受发酵液后不用硫酸调节 PH 值,新方法发酵液提取不经过树脂吸附解脱,节省了大量硫酸、氨水或液氨等生产原料,同时节省大量纯水,但需要用活性炭等原料进行脱色,因此其他原料有所增加。从两种工艺对比看新工艺节省大量硫酸及硫酸铵消耗,减少了树脂及设备投入,增加了活性炭过滤等成本,总之,不经离交直接结晶法生产赖氨酸比离交吸附解脱法生产成本下降较多。