

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年7月9日 (09.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/140388 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 13/18 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/090180
- (22) 国际申请日: 2019年6月5日 (05.06.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910002154.7 2019年1月2日 (02.01.2019) CN
- (71) 申请人: 呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司 (HULUNBEIER NORTHEAST FUFENG BIOTECHNOLOGIES CO. LTD) [CN/CN]; 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。天津科技大学 (TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国天津市河西区大沽南路 1038 号, Tianjin 300222 (CN)。中国科学院天津工业生物技术研究所 (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国天津市空港经济区西七道 32 号, Tianjin 300308 (CN)。
- (72) 发明人: 李德衡 (LI, Deheng); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大

街, Inner Mongolia 162650 (CN)。赵兰坤 (ZHAO, Lankun); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。徐庆阳 (XU, Qingyang); 中国天津市河西区大沽南路 1038 号, Tianjin 300222 (CN)。马延和 (MA, Yanhe); 中国天津市空港经济区西七道 32 号, Tianjin 300308 (CN)。孙际宾 (SUN, Jibin); 中国天津市空港经济区西七道 32 号, Tianjin 300308 (CN)。刘元涛 (LIU, Yuantao); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。户红通 (HU, Hongtong); 中国天津市河西区大沽南路 1038 号, Tianjin 300222 (CN)。郑平 (ZHENG, Ping); 中国天津市空港经济区西七道 32 号, Tianjin 300308 (CN)。高翠娟 (GAO, Cuijuan); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。赵凤良 (ZHAO, Fengliang); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。孙钦波 (SUN, Qinbo); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。范婷婷 (FAN, Tingting); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区 (扎兰屯) 开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。李树标 (LI, Shubiao); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东

(54) Title: GLUTAMIC ACID GREEN CLEAN FERMENTATION PROCESS

(54) 发明名称: 谷氨酸的绿色清洁发酵工艺

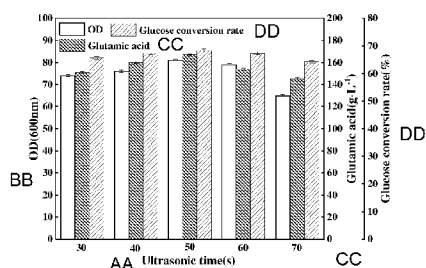


图 1

AA Ultrasonic time(s)
BB OD
CC Glutamic acid
DD Glucose conversion rate

(57) Abstract: A glutamic acid fermentation process, comprising the following steps: introducing *Corynebacterium glutamicum* into a fermentation tank filled with a clean fermentation medium for fermentation culture, performing ultrasonic treatment, and adjusting the pH value of the fermentation broth.

(57) 摘要: 一种谷氨酸发酵工艺, 包括下列步骤: 将谷氨酸棒杆菌接入装有清洁发酵培养基的发酵罐中进行发酵培养, 超声波处理, 并调节发酵液的 pH 值。



WO 2020/140388 A1

工业开发区（扎兰屯）开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。 王小平(WANG, Xiaoping); 中国内蒙古自治区呼伦贝尔市岭东工业开发区（扎兰屯）开创大街, Inner Mongolia 162650 (CN)。

(74) 代理人: 北京领科知识产权代理事务所（特殊普通合伙）(BEIJING LINKTEC IP LAW FIRM (SPECIAL GENERAL PARTNERSHIP)); 中国北京市海淀区清华东路16号宝源大厦1705室, Beijing 100083 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

谷氨酸的绿色清洁发酵工艺

技术领域

本发明属于氨基酸生产技术领域，具体涉及谷氨酸的绿色清洁发酵工艺。

背景技术

谷氨酸，是一种酸性氨基酸。分子内含两个羧基，化学名称为 α -氨基戊二酸。谷氨酸是里索逊 1856 年发现的，为无色晶体，有鲜味，微溶于水，而溶于盐酸溶液，等电点 3.22。大量存在于谷类蛋白质中，动物脑中含量也较多。谷氨酸在生物体内的蛋白质代谢过程中占重要地位，参与动物、植物和微生物中的许多重要化学反应。谷氨酸钠俗称味精，是重要的鲜味剂，对香味具有增强作用。谷氨酸钠广泛用于食品调味剂，既可单独使用，又能与其它氨基酸等并用。用于食品内，有增香作用。在食品中浓度为 0.2%-0.5%，每人每天允许摄入量为 0—120 微克/千克(以谷氨酸计)。在食品加工中一般用量为 0.2—1.5 克/公斤。

谷氨酸作为氨基酸生产中产量最大的氨基酸，目前，制备谷氨酸最常用的方法是微生物发酵法。谷氨酸棒杆菌是谷氨酸发酵的常规菌株。影响谷氨酸棒杆菌发酵产酸效率的因素较多，本领域对其改进主要包括以下几个方面：1、微生物在不同的环境条件下、利用不同底物代谢途径是不同的，有目的地对细胞代谢途径进行修饰和改造，改变细胞原有的代谢特征，可以提高目标产物的产量和得率；2、通过提高菌体的细胞膜通透性，增加谷氨酸分泌，进而解除菌体内高浓度谷氨酸的反馈调节作用，提高谷氨酸的产量；3、优化发酵培养基、发酵参数，使得菌体增殖速率提高，从而提高氨基酸的产量。申请人对谷氨酸的发酵作了长足的研究，例如中国发明专利“CN106148445A”公开了一种新的谷氨酸提取工艺，其中对发酵培养以及发酵参数进行了改进，降低了发酵成本，解决现有技术发酵培养基成本高，转化率低、硫酸和液氨消耗较高等缺陷；中国发明专利“CN107227324A”公开了一种谷氨酸生物素亚适量发酵工艺，利用发酵罐和膜偶联技术在发酵过程进行过滤透析，将发酵液中的谷氨酸及时分离，解除了发酵液中高浓度谷氨酸产生反馈调节；通过采用特定的透析发酵培养基配方进行再次发酵，提高菌体利用效率和糖酸转化率；另外，在发酵一定阶段后进行过滤透析可及时分离发酵液中的有毒害副产物，减小了对菌体产酸抑制；本发明所述发酵工艺通过透析发酵实现了菌体的再发酵技术，延长了谷氨酸发酵产酸周期，提高了菌体利用率，提高了糖酸转化率；中国发明专利“CN104099382A”公开了一种利用棉籽饼粉水解液发酵 L-谷氨酸的方法，其在于：在 L-谷氨酸发酵培养基中添加棉籽饼粉水解液，该棉籽饼粉水解液的氨基氮浓度为 0.5-3.0%，所述的 L-谷氨酸发酵培养基为温度敏感 L-谷氨酸发酵培养基，所述棉籽

饼粉水解液的添加量为 15-25ml/l，它通过控制棉籽饼粉水解液的添加量，有效保证 L-谷氨酸发酵顺利进行，棉籽饼粉水解液的利用不但拓宽了有机氮源资源而且降低了发酵成本，在发酵行业中有广阔的应用前景。

现有技术的发酵生产中大量用玉米浆、豆粕水解液和糖蜜等色泽深、粘度大以及杂质多的发酵氮源物质，使得发酵过程难以控制，极易造成发酵的不稳定性及分离提取的困难。因此，可以通过对发酵培养基进行调整，采用杂质较少的营养成分，实现发酵的稳定性和分离提取的成本。清洁发酵技术主要是指发酵培养基的相对清洁，通过对发酵培养基的成分进行调整替代，使用成分简单、杂质少的营养物来代替成分复杂、杂质相对较多的营养物质，使得发酵液中杂质含量降低，传质和溶解氧效率得到提升，发酵过程更加稳定。L-谷氨酸发酵培养基中常添加玉米浆、豆粕水解液等作为发酵氮源并提供少量维生素，能够加快菌体生长速度。但是这类氮源含有大量蛋白质、色素和不溶性杂质等物质，使得发酵过程中容易起泡、溶氧效率低以及传质阻力大等问题，另外，由于玉米浆中的生物素含量不稳定，容易造成发酵产酸的波动。同时杂质较多的发酵液为后续的分离提取增加了困难。因此，以对照发酵培养基为根据，通过对发酵氮源的替代优化，最终确定了杂质含量少的清洁发酵培养基，使得发酵过程易于控制，发酵产酸更加稳定。

氨基酸合成代谢途径中，当四碳二羧酸全部由 CO_2 固定反应供给时，最高理论糖酸转化率为 81%；而当 CO_2 固定反应完全不起作用，四碳二羧酸只能通过乙醛酸供给，最高理论转化率为 54%。谷氨酸生产工艺已经发展相对成熟，主要技术指标为谷氨酸浓度 10%-12%，糖酸转化率 55%-60%。但是，与国外先进发酵工艺相比较，仍有较大的提升空间。有效地提高转化率，将可以节省原料成本、提升谷氨酸发酵的经济效益。利用谷氨酸棒杆菌进行谷氨酸发酵时的代谢副产物并不多，最主要的副产物是 CO_2 。因此，强化谷氨酸棒杆菌代谢途径中的 CO_2 固定反应，并为此让谷氨酸合成关键酶系有效地、相互协同作用，将有望提高 CO_2 的回用率和糖酸转化率，节省原料成本、增加企业利润。

谷氨酸发酵的一个重点在于发酵培养期间谷氨酸生产菌细胞膜结构与功能上的特异性变化，使细胞膜转变成有利于谷氨酸向膜外渗透，即完成由谷氨酸非积累型细胞向谷氨酸积累型细胞的转变。这样，由于终产物谷氨酸不断地排出细胞外，使细胞内的谷氨酸不能积累到引起反馈调节的浓度，谷氨酸就会在细胞内继续不断地被优先合成，又不断地透过细胞膜，分泌到发酵培养基中，从而得以大量积累。调整细胞膜通透性的物质较多，不同的菌株之间细胞膜结构差异较大，因此并没有规律可循，选择合适的方法来调整细胞膜的通透性也是谷氨酸发酵工艺中需要解决的技术问题。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于提供谷氨酸的绿色清洁发酵工艺，有效解决了谷氨酸发酵过程中的多种问题，包括谷氨酸合成的效率、细胞通透性以及发酵清液培养基优化，提高了发酵效率，降低了谷氨酸分离纯化的难度。

本发明是通过如下技术方案来实现的。

谷氨酸的绿色清洁发酵工艺，其包括如下步骤：将谷氨酸棒杆菌接入装有清洁发酵培养基的发酵罐中进行发酵培养，总发酵时间为30-40h，其中，发酵培养0-8h，进行超声处理，并且通过流加氨水调节发酵液pH值至7.0-7.2；8h以后，往发酵罐中添加发酵调节剂，同时流加液氨调节发酵液的pH值至7.0-7.2。

进一步地，所述超声处理的条件为：超声波功率500W，频率20kHz，超声时间50s，振幅65%，间隔时间5min。

进一步地，所述清洁发酵培养基为：葡萄糖80g/L， $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3mg/L， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3mg/L， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L， $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4g/L，KCl 2g/L， V_{B1} 10mg/L，黄腐酸1mg/L，生物素7 μ g/L，菌体酶解液80ml/L。

进一步地，所述发酵调节剂为包含肌醇和甘油的水溶液。

进一步地，所述发酵调节剂为：肌醇1-2g/L，甘油10-20g/L。

进一步地，所述菌体酶解液的制备方法为：取谷氨酸发酵液中的谷氨酸棒杆菌菌体，干燥至水分含量小于5wt%的干菌体，用水稀释至干菌体浓度为50g/L，置于高速剪切机中以10000rpm的速度剪切120s，搅拌均匀得到菌悬液，往菌悬液中添加相同体积的浓度为1mol/L的盐酸溶液，混匀，在95℃下处理1h，之后添加胰蛋白酶进行水解，然后陶瓷膜过滤，收集滤液，即为菌体酶解液。

进一步地，所述胰蛋白酶的水解条件为：pH为8、温度为37℃、水解时间为6h；所述的胰蛋白酶的酶活力为4000U/g，添加量为：酶与底物干质量比为4%。

进一步地，所述陶瓷膜的截留分子量为5000-10000Da。

进一步地，所述高速剪切机的剪切速度为10000rpm，剪切时间为120s。

进一步地，所述工艺包括如下步骤：

将谷氨酸棒杆菌按照10-15%接种量将种子液接入装有清洁发酵培养基的发酵罐中进行发酵培养，发酵温度35-38℃，通风比1:0.5-2，搅拌转速300-700r/min，溶氧维持在10%-30%，流加质量百分比浓度为80%的葡萄糖维持残糖为1%-2%，流加消泡剂消泡，发酵总时间33-34h；其中，发酵培养0-8h，在发酵开始后，打开超声波控制器，进行超声处理，超声处理的条件为：超声波功率500W，频率20kHz，超声时间50s，振幅65%，间隔时间5min，并且通过流加25%的氨水调节发酵液pH值至7.0-7.2；8h以后，往发酵罐中一次性

添加发酵调节剂,添加量占发酵液体积的 1-5%,同时流加液氨调节发酵液的 pH 值至 7.0-7.2。

与现有技术相比,本发明取得的有益效果主要包括但是并不限于以下几个方面:

通过添加菌体蛋白酶解液来替代玉米浆,研究数据发现,随着菌体蛋白酶解液的添加,菌体浓度和谷氨酸含量均有所提升,但是添加过多的菌体蛋白酶解液不但造成浪费,而且使得发酵过程中容易起泡、溶氧效率低以及传质阻力大等问题,造成发酵效率下降。而对于清洁发酵的发酵上清液,影响其透光率的物质主要来自菌体的代谢,随着菌体产生杂质的增多而不断下降,但是其总体透光率远远高于玉米浆发酵,对后续的谷氨酸分离提取而言,可以大幅度降低生产成本。黄腐酸中含有大量酚羟基、羰基等基团,电解程度较高,促进谷氨酸合成过程中利用 O_2 作为氢受体,进而减少丙酮酸作为氢受体,因此副产物乳酸和丙氨酸的生成量减少,进而提高谷氨酸的产量。本发明培养基的优化不但使得谷氨酸发酵过程更加稳定,易于控制,而且提高了谷氨酸产量和糖酸转化率,提高了发酵液的质量,降低了谷氨酸提取的成本,综合效益得到了提高。

实现各营养元素的合理配比,最大发挥菌体的产酸能力,以提高发酵转化率和产酸;谷氨酸产生菌增殖到较大值,谷氨酸生成酶系形成完全时,加入适量的肌醇,既可以强化 CO_2 固定反应,削弱乙醛酸循环,保证三羧酸循环不被中断和源源不断供给 α -酮戊二酸,通过还原氨基化反应,大量积累谷氨酸,提高发酵转化率;甘油提供碳骨架,促进谷氨酸的合成,并且能够提高细胞膜通透性,促进谷氨酸分泌到发酵液中。

本发明通过单因素和正交试验,确定了最佳的超声波参数,包括强度、时间、振幅等,能够提高细胞膜的通透性,促进菌体活力、谷氨酸产量以及溶氧效率的提高,糖酵解所产生的丙酮酸不会过量积累,更多的进入三羧酸循环,相应地,丙酮酸所产生的代谢副产物乳酸和丙氨酸也有所降低。通过本研究可知,超声波辅助谷氨酸发酵,在适当的超声环境中,其能够有效提高菌体细胞膜的通透性,增加谷氨酸分泌,提高了谷氨酸的产量,也降低了发酵副产物,实现了谷氨酸发酵效益的提升。

附图说明

图 1: 超声时间对谷氨酸发酵的影响;

图 2: 超声振幅对谷氨酸发酵的影响;

图 3: 间隔时间对谷氨酸发酵的影响;

图 4: 最佳超声条件发酵与对照发酵的对比;

图 5: 最佳超声条件对菌体转型时间和副产物的影响。

具体实施方式

为了使本技术领域的人员更好地理解本申请中的技术方案,下面将结合本申请具体实施

例，对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

实施例 1

本实验选用的菌株为谷氨酸棒杆菌 GDK-9(又名黄色短杆菌 GDK-9, 来源于天津科技大学, 菌株出处也可参见“L-谷氨酸发酵的变温控制工艺研究, 天津化工 2010 年”)。

谷氨酸的绿色清洁发酵工艺, 其包括如下步骤: 将谷氨酸棒杆菌 GDK-9 按 15% 接种量将种子液 (OD_{600nm} 为 10) 接入装有 30L 清洁发酵培养基的 50L 全自动发酵罐中进行发酵培养, 发酵温度 38°C, 通风比 1:0.7, 搅拌转速 500r/min, 溶氧维持在 20%, 流加质量百分比浓度为 80% 的葡萄糖维持残糖为 1.5%, 流加消泡剂消泡, 发酵总时间 33h; 其中, 发酵培养 0-8h (第一阶段), 在发酵罐中插入耐高温超声波探头, 在发酵开始后, 打开超声波控制器, 在一定的条件下进行超声处理, 超声处理的条件为: 超声波功率 500 W, 频率 20kHz, 超声时间 50s, 振幅 65%, 间隔时间 5min, 并且通过流加 25% 的氨水调节发酵液 pH 值至 7.0-7.2; 8h 以后 (第二阶段, 选择第二阶段起始时添加发酵调节剂), 往发酵罐中一次性添加发酵调节剂, 添加量占发酵液体积的 2%, 同时流加液氨调节发酵液的 pH 值至 7.0-7.2。

所述清洁发酵培养基为: 葡萄糖 80g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4g/L, KCl 2g/L, V_{B1} 10mg/L, 黄腐酸 1mg/L, 生物素 7 μ g/L, 菌体酶解液 80ml/L; 在 115°C 下灭菌 15min。

所述清洁发酵培养基对常规培养基进行了改进, 其中:

使用菌体酶解液替代玉米浆作为发酵氮源;

定量添加生物素替代玉米浆中的生物素;

在发酵培养基中添加黄腐酸;

所述菌体酶解液的制备方法为: 取谷氨酸发酵液中的谷氨酸棒杆菌菌体, 干燥至水分含量小于 5wt% 的干菌体, 用水稀释至干菌体浓度为 50g/L, 置于高速剪切机中以 10000rpm 的速度剪切 120s, 得到菌悬液, 往菌悬液中添加相同体积的浓度为 1mol/L 的盐酸溶液, 混匀, 在 95°C 下处理 1h, 之后添加胰蛋白酶进行水解, 然后陶瓷膜过滤, 收集滤液; 陶瓷膜的截留分子量为 10000Da; 过滤去除难以被菌株利用的大分子物质, 包括细胞壁组分、大分子蛋白等。

即得到蛋白质含量为 231mg/g (干菌体)、总游离氨基酸含量为 367 mg/g (干菌体) 的菌体蛋白酶解液。

所述的胰蛋白酶的水解条件为: pH 为 8、温度为 37°C、水解时间为 6h; 所述的胰蛋白酶

的酶活力为 4000U/g，添加量为：酶与底物干质量比为 4%。

实施例 2

谷氨酸的绿色清洁发酵工艺，其包括如下步骤：将谷氨酸棒杆菌 GDK-9 按 10% 接种量将种子液（OD_{600nm} 为 14）接入装有 30L 清洁发酵培养基的 50L 全自动发酵罐中进行发酵培养，发酵温度 37℃，通风比 1:0.8，搅拌转速 300-700r/min，溶氧维持在 25%，流加质量百分比浓度为 80% 的葡萄糖维持残糖为 1%，流加消泡剂消泡，发酵总时间 34h；其中，发酵培养 0-8h，在发酵罐中插入耐高温超声波探头，在发酵开始后，打开超声波控制器，在一定的条件下进行超声处理，超声处理的条件为：超声波功率 500 W，频率 20kHz，超声时间 50 s，振幅 65%，间隔时间 5min，并且通过流加 25% 的氨水调节发酵液 pH 值至 7.0-7.2；8h 以后，往发酵罐中一次性添加发酵调节剂，添加量占发酵液体积的 3%，同时流加液氨调节发酵液的 pH 值至 7.0-7.2。

所述清洁发酵培养基为：葡萄糖 80g/L，MnSO₄·H₂O 3mg/L，FeSO₄·7H₂O 3 mg/L，MgSO₄·7H₂O 2g/L，Na₂HPO₄·12H₂O 4g/L，KCl 2g/L，V_{B1}10mg/L，黄腐酸 1mg/L，生物素 7 μg/L，菌体酶解液 80ml/L。

所述清洁发酵培养基对常规培养基进行了改进，其中：

使用菌体酶解液替代玉米浆作为发酵氮源；

定量添加生物素替代玉米浆中的生物素；

在发酵培养基中添加黄腐酸；

所述发酵调节剂为：肌醇 1.5g/L，甘油 15g/L。

实施例 3

谷氨酸发酵培养基的优化。

1、菌体蛋白酶解液的添加量对发酵液中菌体浓度以及谷氨酸产量的影响，选择添加量为 20, 40, 60, 80, 100, 120 (ml/L) 五个浓度梯度，结果发现，随着添加量的增加发酵液中菌体

表 1

添加量 ml/L	发酵液中菌体 OD _{600nm}	谷氨酸产量 g/L
20	60.7	143.6
40	68.9	152.1
60	75.3	159.8
80	81.8	167.0
100	80.1	163.5

120	76.9	156.9
-----	------	-------

通过添加菌体蛋白酶解液来替代玉米浆（10g/L，发酵液中 OD_{600nm} 为 65.8，谷氨酸产量 151g/L，透光率 (T_{430}) 为 0.98)，数据发现，随着菌体蛋白酶解液的添加，菌体浓度和谷氨酸含量均有所提升，当添加到 10mg/L 时，菌体浓度和谷氨酸含量达到峰值，添加过多的菌体蛋白酶解液不但造成浪费，而且使得发酵过程中容易起泡、溶氧效率低以及传质阻力大等问题，造成发酵效率下降。而对于清洁发酵的发酵上清液，影响其透光率的物质主要来自菌体的代谢，随着菌体产生杂质的增多而不断下降，结束发酵时透光率为 6.1，但是其总体透光率远远高于玉米浆发酵，对后续的谷氨酸分离提取而言，可以大幅度降低生产成本。

2、黄腐酸的添加量对发酵液中谷氨酸和丙氨酸产量的影响，选择添加量为 0, 0.5, 1, 2, 4(mg/L) 五个浓度梯度，具体见表 2：

表 2

添加量 mg/L	丙氨酸产量 g/L	谷氨酸产量 g/L
0	3.3	160.5
0.5	2.4	163.8
1	1.8	167.0
1.5	1.7	166.8
2	1.7	167.1

黄腐酸中含有大量酚羟基、羰基等基团，电解程度较高，促进谷氨酸合成过程中利用 O_2 作为氢受体，进而减少丙酮酸作为氢受体，因此副产物乳酸和丙氨酸的生成量减少，进而提高谷氨酸的产量。随着黄腐酸添加量的增加，丙氨酸的含量逐步降低，伴随着谷氨酸产量的增加，当增加到 1mg/L 后，丙氨酸和谷氨酸的变化量不大，考虑到成本因素，选择 1mg/L 的添加量最为合适。

总之，本发明培养基的优化不但使得谷氨酸发酵过程更加稳定，易于控制，而且提高了谷氨酸产量和糖酸转化率，提高了发酵液的质量，降低了谷氨酸提取的成本，综合效益得到了提高。

实施例 4

发酵调节剂对转化率和谷氨酸产量的影响。

设置对照组，其中：

对照组 1：不添加发酵调节剂，其余同实施例 1；

对照组 2: 发酵调节剂只包含肌醇, 其余同实施例 1;

对照组 3: 发酵调节剂只包含甘油, 其余同实施例 1;

实验组为实施例 1。

各组转化率和谷氨酸浓度见表 3。

表 3

组别	糖酸转化率%	谷氨酸产量 g/L
对照组 1	60.4	151.7
对照组 2	64.7	159.6
对照组 3	62.8	162.9
实验组	68.5	169.2

结论: 设置对照组, 研究发酵调节剂中肌醇和甘油两种组分对转化率和谷氨酸产量的影响, 由表 3 可见, 二者具备一定的协同效果, 能够明显提高转化率和谷氨酸产量。

实施例 5

超声对谷氨酸发酵的影响。

1、超声时间对谷氨酸发酵的影响

在超声振幅为 70%, 间隔时间为 10 min 的条件下, 不同超声时间对谷氨酸发酵的影响如图 1。从图 1 中可以看出, 随着超声时间的增加, 菌体 OD_{600nm} 值、谷氨酸产量和糖酸转化率也不断上升, 在连续超声时间为 50s 时达到最大值, 之后随着超声时间的延长, 三者开始下降, 尤其以菌体 OD_{600nm} 值和谷氨酸产量下降较快。分析可知, 适当时长的超声处理可以提高细胞膜的通透性, 提高菌体的酶活力, 加快菌体生长速度, 进而能够提高谷氨酸的分泌和糖酸转化率。但是当连续超声时间过长, 势必会对菌体细胞膜造成一定程度的损伤, 也会扰乱正常的菌体代谢活动, 降低菌体的生长能力和产酸量。选择最佳的超声时间才能达到较好的效果, 因此选取 50s 作为连续超声时间。

2、超声振幅对谷氨酸发酵的影响

在最佳超声时间为 50s, 间隔时间为 10 min 的条件下, 不同超声振幅对谷氨酸发酵的影响如图 2 所示。可以明显的看出, 在超声振幅为 55-65% 范围内时, OD_{600nm} 值、谷氨酸产量和糖酸转化率不断增加, 尤其是菌体量和谷氨酸产量增加十分明显; 当超声振幅高于 65% 后, 三者出现明显的下降, 尤其是菌体量的降低。其主要原因是, 适当强度的超声振幅能够提高菌体生长速度和产酸速率, 而过高的超声振幅会对菌体的正常生长产生较大的损害, 降低菌体活力, 不利于菌体生长和谷氨酸合成。因此选择 65% 作为最佳超声振幅。

3、间隔时间对谷氨酸发酵的影响

在最佳超声时间为 50s，最佳超声振幅为 65%的条件下，不同超声间隔时间对谷氨酸发酵的影响如图 3 所示。从图中可以看出，超声时间间隔对菌体 OD_{600nm} 值、谷氨酸产量和糖酸转化率的影响是很明显的。间隔时间（4 min）太短，也就是超声频率高，超声强度较大，对菌体的损害比较严重，不但不能促进菌体生长和谷氨酸分泌，反而对菌体有一定程度的抑制作用。随着间隔时间（6min）的增加，超声强度刚好适宜，菌体 OD_{600nm} 值、谷氨酸产量和糖酸转化率都得到了提升。而当间隔时间过长时，虽然 OD_{600nm} 值的生长不太明显，但是对细胞膜的损伤效果太低，又由于菌体自身的细胞膜修复功能，因此细胞膜的通透性并未得到提高，并未对菌体产生实质性的效果，因此谷氨酸产量和糖酸转化率开始往普通发酵水平靠近。故选择 6 min 作为最佳超声间隔时间。

4、正交试验结果分析

在上述单因素试验结果的基础上，进行正交试验设计，其试验结果见表 4，方差分析见表 5。

表 4 超声波辅助谷氨酸发酵正交试验设计及结果

试验号	因素				考察指标		
	A	B	C	空列	OD _{600nm} 值	谷氨酸/ (g · L ⁻¹)	糖酸转化 率/ (%)
1	40	60	5	1	73	154	65.5
2	40	65	6	2	82	168	68.2
3	40	67	7	3	69	149	64.7
4	50	60	6	3	72	154	66.3
5	50	65	7	1	83	168	68.4
6	50	67	5	2	66	156	65.9
7	60	60	7	2	72	145	64.7
8	60	65	5	3	79	167	68.3
9	60	67	6	1	63	143	65.1

OD_{600nm} 值

K ₁	74.333	73.667	74.000	73.000
K ₂	81.000	75.667	72.667	73.333

K ₃	66.667	72.667	75.333	75.667
R	14.333	3.000	2.666	2.667
谷氨酸				
K ₁	157.00	151.00	159.00	155.00
	0	0	0	0
K ₂	159.33	167.66	155.00	156.33
	3	7	0	3
K ₃	151.66	149.33	154.00	156.66
	7	3	0	7
R	7.666	18.334	5.000	1.667
糖酸转化				
率				
K ₁	66.133	65.500	66.567	66.333
K ₂	66.867	68.300	66.533	66.267
K ₃	66.033	65.233	65.933	66.433
R	0.834	3.067	0.634	0.166

表 5 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
OD _{600nm} 值					
A	17.556	2	79.081	19.000	显著
B	356.222	2	1604.604	19.000	显著
C	9.556	2	43.045	19.000	显著
误差	0.220	2			
谷氨酸					
A	92.667	2	19.856	19.000	显著
B	616.667	2	132.133	19.000	显著
C	42.000	2	8.999	19.000	
误差	4.670	2			
糖酸转化					

率					
A	1.242	2	29.571	19.000	显著
B	17.316	2	412.286	19.000	显著
C	0.762	2	18.143	19.000	
误差	0.040	2			

一方面，由正交试验结果和极差（R）分析可知，对于菌体 OD_{600nm} 值的影响次序为 A>B>C，即超声时间>振幅>间隔时间，最佳条件为 A₂B₂C₃，即超声时间 50 s、振幅 65%、间隔时间 7 min；对谷氨酸产量的影响次序为 B>A>C，即振幅>超声时间>间隔时间，最佳条件为 A₂B₂C₁，即超声时间 50s、振幅 65%、间隔时间 5 min；对糖酸转化率的影响次序为 B>A>C，即振幅>超声时间>间隔时间，最佳条件为 A₂B₂C₁，即超声时间 50s、振幅 65%、间隔时间 5 min。另一方面，由方差分析可知，超声时间和振幅对 OD_{600nm} 值、谷氨酸产量都有显著影响，间隔时间对 OD_{600nm} 值影响显著。综合考虑以上试验结果，在既能够达到一定量 OD_{600nm} 值的同时，又能够提高谷氨酸产量和糖酸转化率，因此最佳超声条件选择 A₂B₂C₁，即超声时间 50s、振幅 65%、间隔时间 5min。

5、验证实验结果分析

依据正交试验所得最佳超声条件，进行 3 批次平行发酵验证，所得试验结果如图 4 所示。由图 4 分析可知，无论是菌体 OD_{600nm} 值，还是谷氨酸产量和糖酸转化率，超声发酵都比对照发酵有一定程度的提升。对照发酵的开始产酸时间（即谷氨酸菌体开始完成由谷氨酸非积累型菌体向谷氨酸积累型菌体的转变）一般为 4 h 左右，而超声发酵开始能够检测到谷氨酸的时间为发酵 2 h，并且产酸速率迅速上升。同时结合镜检发现，2 h 时超声发酵的部分谷氨酸菌体已经拉长、膨大成为了产酸型菌体，开始菌体的转型。因此，对比对照发酵，超声发酵开始产酸的时间提前了 2 h。超声结束时间之所以选在发酵 8 h，一方面是因为谷氨酸棒状杆菌的细胞壁较厚，对细胞膜有一定的保护作用，超声时间太短，并不能起到损伤细胞膜以提高其通透性的作用；另一方面，菌体自身也有一定的细胞膜修复能力，因此要有足够的超声时长才能够维持细胞膜通透性的提高。8h 时对超声发酵进行镜检发现，几乎所有菌体已完成谷氨酸菌体的转型，不需要对细胞膜进行更多的损伤，同时菌体的 OD_{600nm} 值也即将达到最大值（14h 左右），菌体的活力即将达到最高，如果继续进行超声处理，可能会对菌体造成严重损害，并会降低菌体活力，因此选择 8 h 结束超声处理。总的来看，超声发酵的 OD_{600nm} 值为 82.5，较对照发酵的 72.5，提高了 13.8%；谷氨酸产量为 168g/L，较对照发酵的 151 g/L，提高了 11.3%；糖酸转化率为 68.2%，较对照发酵的 65.4%，提高了 4.3%。图 4 中，A、C、E 分别为对照发酵的 OD_{600nm} 值、谷氨酸产量和糖酸转化率；B、D、F 分别为最佳超声条件发酵的 OD_{600nm}

值、谷氨酸产量和糖酸转化率。

此外，由于菌体活力、谷氨酸产量的提高，溶氧效率的提高，可知 TCA 循环的速率和通量也得到了提升，而由糖酵解所产生的丙酮酸并不会过量积累，反而会更多的进入三羧酸循环，因此由丙酮酸所产生的代谢副产物乳酸和丙氨酸也有所降低。如图 5 所示，分别由对照发酵（不采用超声）的 3.6 g/L、2.54 g/L 降低至超声发酵的 2.3 g/L、1.75 g/L，分别降低了 36.11%、31.10%。

通过以上研究可知，超声波辅助谷氨酸发酵，在适当的超声环境中，其能够有效提高菌体细胞膜的通透性，增加谷氨酸分泌，提高了谷氨酸的产量，也降低了发酵副产物，实现了谷氨酸发酵效益的提升。

以上列举的仅是本发明的最佳具体实施例。显然，本发明不限于以上实施例，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

权利要求书

1、谷氨酸的绿色清洁发酵工艺，其特征在于，所述工艺包括如下步骤：将谷氨酸棒杆菌接入装有清洁发酵培养基的发酵罐中进行发酵培养，总发酵时间为 30-40h；其中，发酵培养 0-8h，进行超声处理，并且通过流加氨水调节发酵液 pH 值至 7.0-7.2；8h 以后，往发酵罐中添加发酵调节剂，同时流加液氨调节发酵液的 pH 值至 7.0-7.2。

2、根据权利要求 1 所述的工艺，其特征在于，所述超声处理的条件为：超声波功率 500 W，频率 20kHz，超声时间 50s，振幅 60-65%，间隔时间 5-6min，超声总时间为 8h；优选地，振幅 65%，间隔时间 5min。

3、根据权利要求 1-2 任其一所述的工艺，其特征在于，所述清洁发酵培养基为：葡萄糖 80g/L， $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3mg/L， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3mg/L， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L， $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4g/L，KCl 2g/L， V_{B1} 10mg/L，黄腐酸 1mg/L，生物素 $7 \mu g/L$ ，菌体酶解液 80ml/L。

4、根据权利要求 1-3 任其一所述的工艺，其特征在于，所述发酵调节剂为包含肌醇和甘油的水溶液。

5、根据权利要求 1-4 任其一所述的工艺，其特征在于，所述发酵调节剂为：肌醇 1-2g/L，甘油 10-20g/L。

6、根据权利要求 3 所述的工艺，其特征在于，所述菌体酶解液的制备方法为：取谷氨酸发酵液中的谷氨酸棒杆菌菌体，干燥至水分含量小于 5wt% 的干菌体，用水稀释至干菌体浓度为 50g/L，置于高速剪切机中剪切，得到菌悬液，往菌悬液中添加相同体积的浓度为 1mol/L 的盐酸溶液，混匀，在 95℃ 下处理 1h，之后添加胰蛋白酶进行水解，然后陶瓷膜过滤，收集滤液，即为菌体酶解液。

7、根据权利要求 6 所述的工艺，其特征在于，所述胰蛋白酶的水解条件为：pH 为 8、温度为 37℃、水解时间为 6h。

8、根据权利要求 6 所述的工艺，其特征在于，所述陶瓷膜的截留分子量为 5000-10000Da。

9、根据权利要求 6 所述的工艺，其特征在于，所述高速剪切机的剪切速度为 10000rpm，剪切时间为 120s。

10、根据权利要求 1-9 任其一所述的工艺，其特征在于，所述工艺包括如下步骤：

将谷氨酸棒杆菌按照 10-15% 接种量将种子液接入装有清洁发酵培养基的发酵罐中进行发酵培养，发酵温度 35-38℃，通风比 1:0.5-2，搅拌转速 300-700r/min，溶氧维持在 10%-30%，流加质量百分比浓度为 80% 的葡萄糖维持残糖为 1%-2%，流加消泡剂消泡，发酵总时间 33-34h；其中，发酵培养 0-8h，在发酵开始后，打开超声波控制器，进行超声处理，

超声处理的条件为：超声波功率 500 W，频率 20kHz，超声时间 50 s，振幅 65%，间隔时间 5min，并且通过流加 25%的氨水调节发酵液 pH 值至 7.0-7.2；8h 以后，往发酵罐中一次性添加发酵调节剂，添加量占发酵液体积的 1-5%，同时流加液氨调节发酵液的 pH 值至 7.0-7.2。

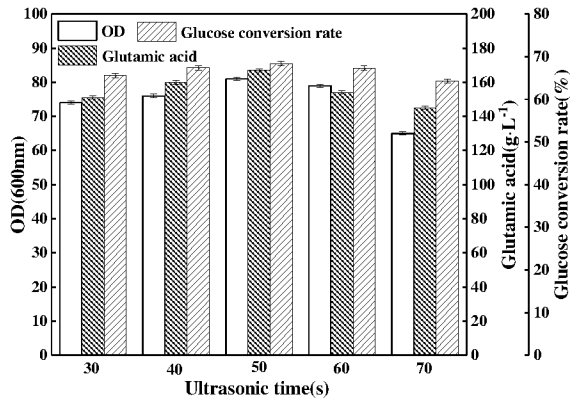


图 1

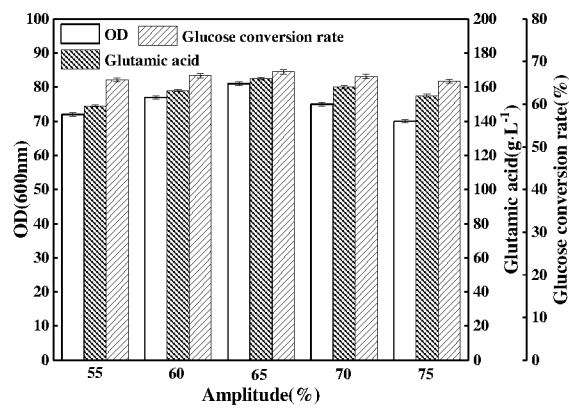


图 2

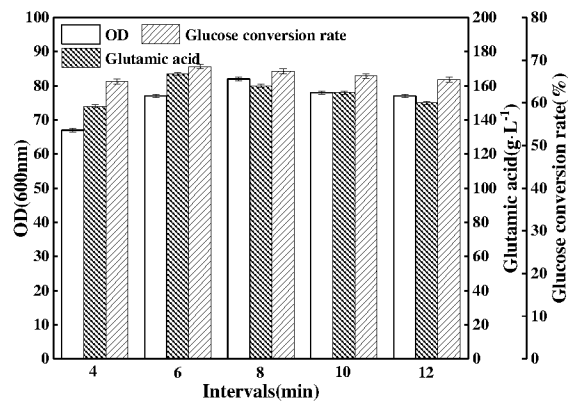


图 3

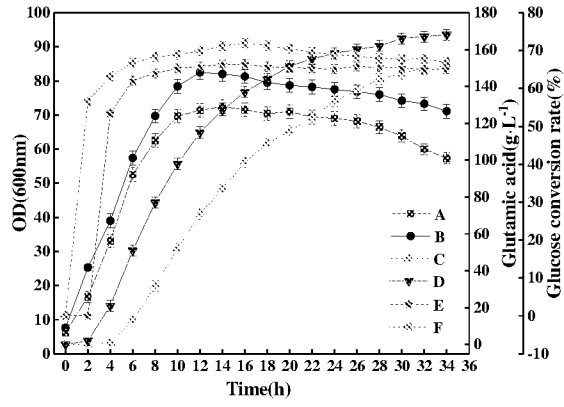


图 4

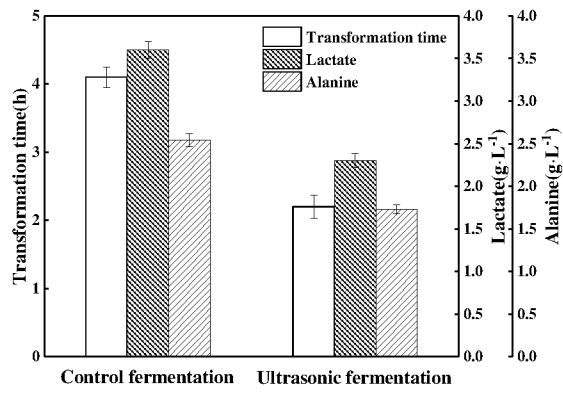


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/090180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P 13/18(2006.01)i; C12R 1/15(2006.01)j According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P, C12R Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, 中国药物专利数据库, CTCMPD, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU XUESHU SEARCH, (谷氨酸, 氨基戊二酸, 发酵, 超声, 氨水, 液氨, 培养基, 葡萄糖, 生物素, 黄腐酸, 酶解, 肌醇, 甘油, 胰蛋白酶, glutamic acid, amino glutaric acid, ferment, zymolysis, ultrasonic, ammonia, liquid ammonia, culture medium, media, glucose, biotin, bioepiderm, fulvic acid, zymolye, enzymolysis, inositol, glycerin, glycerol, parenzyme, trypsase, trypsin)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102703537 A (HULUN BUIR NORTHEAST FUFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 October 2012 (2012-10-03) claims 1 and 2	1, 3
Y	CN 101979627 A (TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) 23 February 2011 (2011-02-23) description, paragraphs [0004]-[0011]	1, 3
A	CN 102703537 A (HULUN BUIR NORTHEAST FUFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 October 2012 (2012-10-03) claims 1 and 2	2, 4-10
A	CN 101979627 A (TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) 23 February 2011 (2011-02-23) description, paragraphs [0004]-[0011]	2, 4-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 29 September 2019		Date of mailing of the international search report 10 October 2019
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109652478 A (HULUN BUIR NORTHEAST FUFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY; TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 19 April 2019 (2019-04-19) claims 1-10	1-10
Y	戴传云, 等 (DAI, Chuanyun et al.). "低功率超声波对微生物发酵的影响 (Effect of Low Energy Ultrasonic on the Microorganism Fermentation)" <i>重庆大学学报 (Journal of Chongqing University)</i> , Vol. 26, No. 02, 28 February 2003 (2003-02-28), p. 15, the abstract	1, 3
A	戴传云, 等 (DAI, Chuanyun et al.). "低功率超声波对微生物发酵的影响 (Effect of Low Energy Ultrasonic on the Microorganism Fermentation)" <i>重庆大学学报 (Journal of Chongqing University)</i> , Vol. 26, No. 02, 28 February 2003 (2003-02-28), p. 15, the abstract	2, 4-10
A	孙连魁等 (SUN, Liankui et al.). "超声波处理“谷氨酸发酵液”的初步探讨 (Non-official translation: Preliminary Investigation and Discussion on Ultrasonic Technologies in Processing Glutamic Acid Fermentation)" <i>发酵科技通讯 (Bulletin of Fermentation Science and Technology)</i> , Vol. 13, No. 01, 31 December 1984 (1984-12-31), p. 20, discussion section	1-10
A	陆志冲 (LU, Zhichong). "海藻糖酶在谷氨酸发酵中的应用 (Application of Trehalase in Glutamic Acid Fermentation)" <i>发酵科技通讯 (Bulletin of Fermentation Science and Technology)</i> , Vol. 18, No. 02, 31 December 1989 (1989-12-31), p. 34, left column, paragraph 2	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/090180

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102703537	A	03 October 2012	CN	102703537	B	07 August 2013
CN	101979627	A	23 February 2011	None			
CN	109652478	A	19 April 2019	None			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12P 13/18 (2006.01)i; C12R 1/15 (2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12P, C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, 中国药物专利数据库, CNKI, 百度学术搜索; (谷氨酸, 氨基戊二酸, 发酵, 超声, 氨水, 液氨, 培养基, 葡萄糖, 生物素, 黄腐酸, 酶解, 肌醇, 甘油, 胰蛋白酶, glutamic acid, amino glutaric acid, ferment, zymolysis, ultrasonic, ammonia, liquid ammonia, culture medium, media, glucose, biotin, bioepiderm, fulvic acid, zymolye, enzymolysis, inositol, glycerin, glycerol, parenzyme, trypsase, trypsin)</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102703537 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司) 2012年 10月 3日 (2012 - 10 - 03) 权利要求1, 2</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101979627 A (天津科技大学) 2011年 2月 23日 (2011 - 02 - 23) 说明书第4-11段</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102703537 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司) 2012年 10月 3日 (2012 - 10 - 03) 权利要求1, 2</td> <td>2, 4-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101979627 A (天津科技大学) 2011年 2月 23日 (2011 - 02 - 23) 说明书第4-11段</td> <td>2, 4-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109652478 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司 天津科技大学 中国科学院天津工业生物技术研究所) 2019年 4月 19日 (2019 - 04 - 19) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 102703537 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司) 2012年 10月 3日 (2012 - 10 - 03) 权利要求1, 2	1, 3	Y	CN 101979627 A (天津科技大学) 2011年 2月 23日 (2011 - 02 - 23) 说明书第4-11段	1, 3	A	CN 102703537 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司) 2012年 10月 3日 (2012 - 10 - 03) 权利要求1, 2	2, 4-10	A	CN 101979627 A (天津科技大学) 2011年 2月 23日 (2011 - 02 - 23) 说明书第4-11段	2, 4-10	PX	CN 109652478 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司 天津科技大学 中国科学院天津工业生物技术研究所) 2019年 4月 19日 (2019 - 04 - 19) 权利要求1-10	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	CN 102703537 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司) 2012年 10月 3日 (2012 - 10 - 03) 权利要求1, 2	1, 3																		
Y	CN 101979627 A (天津科技大学) 2011年 2月 23日 (2011 - 02 - 23) 说明书第4-11段	1, 3																		
A	CN 102703537 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司) 2012年 10月 3日 (2012 - 10 - 03) 权利要求1, 2	2, 4-10																		
A	CN 101979627 A (天津科技大学) 2011年 2月 23日 (2011 - 02 - 23) 说明书第4-11段	2, 4-10																		
PX	CN 109652478 A (呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司 天津科技大学 中国科学院天津工业生物技术研究所) 2019年 4月 19日 (2019 - 04 - 19) 权利要求1-10	1-10																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 9月 29日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 10月 10日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>张倩</p> <p>电话号码 010-62080000</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	戴传云, 等. “低功率超声波对微生物发酵的影响” 重庆大学学报, 第26卷, 第02期, 2003年 2月 28日 (2003 - 02 - 28), 第15页摘要	1, 3
A	戴传云, 等. “低功率超声波对微生物发酵的影响” 重庆大学学报, 第26卷, 第02期, 2003年 2月 28日 (2003 - 02 - 28), 第15页摘要	2, 4-10
A	孙连魁等. “超声波处理“谷氨酸发酵液”的初步探讨” 发酵科技通讯, 第13卷, 第01期, 1984年 12月 31日 (1984 - 12 - 31), 第20页讨论部分	1-10
A	陆志冲. “液氨在谷氨酸发酵中的应用” 发酵科技通讯, 第18卷, 第02期, 1989年 12月 31日 (1989 - 12 - 31), 第34页左栏第2段	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/090180

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	102703537	A	2012年 10月 3日	CN 102703537 B	2013年 8月 7日
CN	101979627	A	2011年 2月 23日	无	
CN	109652478	A	2019年 4月 19日	无	