

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248896

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 31 10 85
/21/ PV 7782-85

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 13/08

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 15 01 88

(75)

Autor vynálezu

SMÉKAL FRANTIŠEK dr. CSc., ULBERT STANISLAV ing., BÁRTA MIROSLAV dr.,
PÍRKO JAROMÍR ing., PRAHA

(54) Způsob fermentační přípravy L-lysinu

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu kultivací mikroorganismů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium glutamicum* v tekutém živném médiu, obsahujícím kromě běžných složek přísad sloučenin tiokyanatanů v množství 1 až 50 ug/ml jako stimulatoru. Tímto opatřením se zvýší produkce L-lysinu o 10 až 12 %.

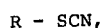
Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních mikro-organismů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium glutamicum* v tekutém živném médiu, obsahujícím zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální soli a/nebo růstové faktory a/nebo stimulanty, za aerobních podmínek kultivace.

Jak je známo, závisí výše produkce při fermentačních výrobcích jednak na druhu, kvalitě a množství základních živin /sacharóza, arašídová mouka, bílkovinné hydrolyzátory, kukuřičný extrakt aj./, jednak na kvalitě produkčního kmene a konečně na vedení a řízení fermentačního procesu.

Určitou technologií lze při nalezení optimálních parametrů dosáhnout nejvyššího možného výsledku, další zvýšení se již nedaří ani zvyšováním množství jednotlivých základních živin ani prodlužováním doby kultivace.

Ve snaze zvýšit produkci L-lysinu bez mimořádných zásahů do běžné technologie, vycházely autoři ze známé skutečnosti, že některé látky /stimulanty/, přidají-li se do živné půdy i v nepatrném množství, jsou schopny ovlivňovat proces utilizace sacharidů, a tím působit na zvýšení produkce žádaného metabolitu. Velmi účinné stimulanty byly nalezeny ve skupině látek jako jsou tiokyanatany/rhodanidy/.

Na základě těchto poznatků byl vypracován způsob fermentační přípravy L-lysinu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se do živného média jako stimulant produkce přidává alespoň jedna sloučenina obecného vzorce



ve kterém R značí atom alkalického kovu, amonný iont, acetyl- nebo benzyl-skupinu aj. v množství 1 až 50 $\mu\text{g/ml}$, s výhodou 5 až 10 $\mu\text{g/ml}$ média v jedné nebo více dávkách, nejpozději do poloviny celkové doby kultivace. Pozitivní efekt látek uvedeného obecného vzorce se zřejmě realizuje na úrovni katabolické regulace při zabezpečení dostatečného množství uhlíkatých intermediátů, které se mohou přímo zapojovat do biosyntetické dráhy L-lysinu.

Stimulační efekt tiokyanatanů se projevuje již ve velmi nízkých koncentracích, zvýšení produkce činí 10 až 12 % při stejné době kultivace. Účinek tiokyanatanů na biosyntézu aminokyselin a jejich fermentační přípravu nebyl dosud popsán. Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuují.

P ř í k l a d 1

Produkčním kmenem *Brevibacterium flavum* se zaočkuje 50 ml inokulačního média ve 500 ml varné baňce; médium má toto složení: sacharóza technická 30 g, octan sodný krystalický 20 g, kukuřičný extrakt 30 g, voda destilovaná do 1 000 ml; pH média 6,8 až 7,0.

Po zaočkování se kultivuje na rotační třepačce při teplotě 29 °C po dobu 18 až 24 hod., vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 20 ml fermentačního média tohoto složení: sacharóza technická 180 g, hydrolyzát arašídové mouky 200 ml, kukuřičný extrakt 10 g, síran amonný krystalický 10 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý krystalický 0,1 g, uhličitán vápenatý mletý 30 g, voda destilovaná do 1 000 ml; pH média 6,8 až 7,0.

Kultivace probíhá v 500 ml varných baňkách na rotační třepačce při 29 °C po dobu 72 hod. Na počátku kultivace /nejpozději do 26 hodiny kultivace/ se přidá benzyltiokyanatan v množství 10 $\mu\text{g/ml}$ média ve formě vodného roztoku. Za těchto podmínek fermentace se dosáhne produkce 51,9 až 54,7 g L-lysinu/litr fermentačního média, zatímco kontrolní postup poskytuje produkci 46,3 g L-lysinu/litr média za stejnou dobu kultivace.

P ř í k l a d 2

Produkčním kmenem *Brevibacterium flavum* se očkuje fermentační médium stejného složení jako v příkladu 1. Mezi počátkem a 36. hodinou kultivace se do fermentačního média přidá ve 3 až 4 dávkách tiokyanatan amonný v množství 5 $\mu\text{g/ml}$ média ve formě vodného roztoku. Po 72 hod. kultivace se dosáhne produkce 54,1 g L-lysinu/litr média, zatímco kontrolní postup poskytuje za stejných podmínek produkci 45,2 g L-lysinu/litr média.

P ř í k l a d 3

Produkčním kmenem *Corynebacterium glutamicum* se zaočkuje 50 ml inokulačního média, které má stejné složení jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že se sacharóza nahradí stejným množstvím maltózy; fermentační médium obsahuje 10 % hmot. glukózy a další složky v množství jako v příkladu 1.

Nejpozději do 24 hod kultivace se přidá jednorázově benzyl-tiokyanatan v množství 8 až 10 $\mu\text{g/ml}$ média ve formě vodného roztoku. Po 72 hod. fermentace se dosáhne produkce 42,9 až 45,6 g L-lysinu/litr média, při kontrolním postupu produkce činí 39,0 g L-lysinu/litr média.

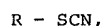
P ř í k l a d 4

Produkčním kmenem *Brevibacterium flavum* se zaočkuje 50 ml inokulačního média popsaného v příkladu 1. Vyrostlou kulturou se zaočkuje 800 ml fermentačního média jako v příkladu 1, umístěného do dvoulitrového fermentačního tanku. Fermentace probíhá za míchání a vzdušnění při teplotě 29 °C.

Ve 24 hod kultivaci se do média přidá vodný roztok tiokyanatanu amonného v množství 10 $\mu\text{g/ml}$ média. Za těchto podmínek se dosáhne produkce 69,2 g L-lysinu/litr média po 72 hod. kultivaci; při kontrolním postupu činí produkce L-lysinu 56,6 g/litr média za stejnou dobu kultivace.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob fermentační přípravy L-lysinu kulturací produkčních mikroorganismů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium glutamicum* v tekutém živném médiu, obsahujícím zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a/nebo stimulanty, za aerobních podmínek, vyznačující se tím, že se do živného média jako stimulant produkce přidává alespoň jedna sloučenina obecného vzorce



ve kterém R značí atom alkalického kovu, amonný iont, acetyl- nebo benzyl-skupinu v množství 1 až 50 $\mu\text{g/ml}$, s výhodou 5 až 10 $\mu\text{g/ml}$ média, jedné nebo více dávkách, nejpozději do poloviny celkové doby kultivace.