



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

212558

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
G 12 P 13/08

(22) Přihlášeno 26 07 79
(21) (PV 5221-79)

(40) Zveřejněno 31 08 81

(45) Vydáno 15 08 84

(75)
Autor vynálezu

BUČKO MICHAL ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA, ULBERT STANISLAV ing., PRAHA,
HANO ALEXANDER, BANSKÁ BYSTRICA, ČULÍK KAREL dr.,
CHROMÍK JINDŘICH ing., PRAHA, MIKLÁŠ EMIL ing.,
HOFFBAUER HEINRICH ing., IVANOV LEONID, PAPAY JULIUS ing.,
BANSKÁ BYSTRICA, PIPICH LADISLAV ing., MEDZIBROD

(54) Způsob optimalizace a regulace procesu biosyntézy L-lysinu

Vynález obecně chrání výrobní postup biosyntézy L-lysinu pomocí mikrobiálních kmenů majících schopnost hromadit do živného média L-lysin ve vysoké koncentraci a velkou produkční rychlostí za využití nového způsobu regulace rychlosti metabolismu produkčního mikroorganismu vedoucího k optimalizaci vztahu mezi aerační kapacitou fermentační aparatury a požadavky mikroorganismu na kyslík během růstu i v průběhu produkční fáze fermentačního procesu. Principem je regulace intenzity metabolismu během růstu produkčního mikroorganismu pomocí změn pH podle koncentrace CO₂ v odcházejících plynech, nebo podle koncentrace rozpuštěného kyslíku v půdě, event. podle průběhu křivky samotného pH.

Vynález se týká výrobního postupu biosyntézy L-lysinu pomocí mikrobiálních kmenů majících schopnost hromadit do živného média L-lysin ve vysoké koncentraci a velkou produkční rychlostí za využití nového způsobu regulace rychlosti metabolismu produkčního mikroorganismu vedoucího k optimalizaci vztahu mezi aerační kapacitou fermentační aparatury a požadavky mikroorganismu na kyslík během růstu i v průběhu produkční fáze fermentačního procesu. Cílem vynálezu je zajistit vysoké výtěžky lysinu ve velkoobjemovém výrobním zařízení při relativně nízkých nákladech na suroviny a spotřebovanou energii.

Je známo, že L-lysin je základní aminokyselinou, která v krystalické formě nebo jako technický preparát získaný usušením fermentované pády nachází stále širší uplatnění jako přísada do krmiv hospodářských zvířat a drůbeže. Uplatňuje se však též v humánní medicíně a perspektivně se počítá, že najde využití i při výživě člověka jako doplněk rostlinných bílkovin.

Biosyntetická příprava L-lysinu je již dlouho široce studována. V patentové literatuře je popsána řada typů bakterií a zároveň řada fermentačních postupů, pomocí nichž je dosaženo na různých substrátech vysokých výtěžků lysinu. Z hlavních patentů vymezujících genetické vlastnosti kmenů, způsob jejich přípravy i fermentační postupy je možno uvést: US pat. č. 2 979 439, franc. pat. č. 1 533 686, US pat. č. 3 707 441 a západoněmecký patent číslo 2 321 461. Poslední dva patenty představují nejnovější etapu vývoje ve výzkumu biosyntézy lysinu, kdy lysin je v obzvláště vysokých výtěžcích produkován bakteriálními kmeny resistentními vůči analogům lysinu nebo threoninu, resp. mutanty zároveň resistentními i auxotrofními. Nejvyšší výtěžky uváděné v patentové literatuře se pohybují od 60 až do 90 g/l lysinu v pádě.

Popisované výsledky jsou však dosahovány, jak vyplývá z uváděných příkladů, jen v laboratoři nebo laboratorních fermentorech. Pokud jsou v literatuře (např. SSSR pat. číslo 1 906 624) uváděny v příkladech výsledky dosažené v provozních zařízeních, jsou publikované výtěžky značně nižší (25 až 40 g/l). Tato okolnost je způsobena tím, že přenos výsledků z laboratorního měřítka do výrobního zařízení (scale-up) představuje samostatný komplex problémů, který v dosud známých patentech není řešen.

Hlavní problém, který se uplatňuje nejvýrazněji při biosyntéze lysinu vysokoprodukčními kmeny, je zajištění dostatečného přenosu kyslíku v provozním fermentačním zařízení během růstu organismu. Jak uvádějí někteří sovětsští autoři (např. Bekker M., E., Viestur U. E., Liepin G. K., Lacars A. K.: Lysin-polučeniye i primeneniye v životnovodstve, Nauka, Moskva 1973), je totiž charakteristickým fyziologickým znakem mikrobiálních kmenů produkujících L-lysin vysoká potřeba kyslíku během růstu a naopak nízká potřeba kyslíku v produkční fázi biosyntetického procesu, kdy biomasa již nepřirůstá, ale pouze produkuje L-lysin. Z uvedeného vyplývá, že růstová fáze představuje při biosyntetickém procesu úzký profil z hlediska zajištění přenosu potřebného množství kyslíku do pády. Obzvlášť je to patrné při fermentacích, při nichž má být dosaženo vysoké produkce a velké produkční rychlosti, kdy je třeba, aby živná páda obsahovala organický dusík - ve formě volných aminokyselin - ve vysoké koncentraci, aby došlo k dostatečnému a rychlému nárůstu biomasy. Naše pokusy potvrdily, že když probíhá růst za limity kyslíkem, naroste biomasa s nízkou produkční aktivitou, s kterou nelze dosáhnout vysoké produkce a rovněž stupeň konverze uhlíkového zdroje na lysin je velmi nízký.

Z publikovaných údajů citovaných sovětských autorů i z výsledků našich pokusů vyplývá, že pro nelimitovaný nárůst cca 1 % sušiny biomasy (10 g/l such. váhy) je zapotřebí zajistit přenos kyslíku do živné pády rychlostí 2,0 až 3,2 g O₂/l/hod, zatímco pro optimální tvorbu lysinu tímto množstvím biomasy v produkční fázi fermentačního procesu stačí rychlost přestupu kyslíku 1,1 až 1,8 g O₂/l/hod. Protože pro dosažení produkční rychlosti 0,85 až 1,5 g lysinu/l/hod, která je u špičkových fermentací dosahována v laboratorních fermentorech při použití vyšlechtěných vysokoprodukčních kmenů, je zapotřebí, aby nárůst kultury produkčního mikroorganismu dosáhl výše odpovídající 20 až 35 g sušiny biomasy/l, vyplývá z toho,

že pro nelimitovaný růst tohoto množství biomasy je nutno zajistit přenos kyslíku rychlostí 6,4 až 11,2 g O₂/l/hod a pro produkční fázi rychlostí 3,5 až 6,3 g O₂/l/hod.

Za těchto podmínek je velice obtížné v běžné provozní fermentační aparatuře dosáhnout v růstové fázi biosyntetického procesu dostatečného přenosu kyslíku pro nárůst biomasy v požadovaném množství. Vysoký přenos kyslíku do živné půdy je možno sice zajistit do jisté míry zvýšenou intenzitou míchání, konstrukcí a vnitřním vybavením fermentačních tanků nebo přetlakem v tanku apod., avšak limity těchto možností v provozním měřítku jsou úzké a dány jak ekonomii, tak fyziologií produkčních organismů. Poměrně vysoká citlivost produkčních organismů na smykové namáhání pohybem míchadla limituje možnost využít vysokých obvodových rychlostí míchadla ke zvýšení přenosu kyslíku. Rovněž z ekonomického hlediska je nevýhodné, zajišťovat kyslíkem nelimitovaný růst mikroorganismu pomocí vyšších parametrů fermentoru, a to hlavně proto, že zvýšená potřeba kyslíku je jen v růstové fázi, která představuje asi 20 až 25 % času z celkové kultivační doby. V produkční fázi je naopak výhodné, když kultivace probíhá při mírné limitaci kyslíkem, což se příznivě odráží ve specifické spotřebě sacharózy a spotřebě energie a chladicí vody.

Zjistili jsme nyní, že dostatečné zásobování kyslíkem vysokoprodukčních mutantů bakteriálních kmenů ve velkoobjemových fermentorech s aerační kapacitou 3 až 7 g O₂/l/hod je možno zajistit pro vysoký nárůst biomasy odpovídající 15 až 35 g suš./l, který je daný přítomností 1,1 až 2,5 g/l alfa-aminodusíku v živné půdě. Podle našeho vynálezu se kyslíkem nelimitovaný růst tohoto množství biomasy zajišťuje cílenými změnami pH živné půdy, kterými se účelně reguluje intenzita metabolismu, zvláště dýchání v růstové fázi, a tím se příznivě ovlivňuje produkční aktivita buněk pro celou dobu fermentace. Po ukončení růstu se v dalším průběhu biosyntézy pH půdy již udržuje automatickým dávkováním roztoku alkálie na konstantní, fyziologicky optimální hodnotě, což vede v této fázi fermentačního procesu i při mírné limitaci dýchání kyslíkem k maximální intenzitě biosyntézy L-lysinu. Popsaný princip vynálezu zajišťující kyslíkem nelimitovaný nárůst velkého množství biomasy umožňuje maximální využití aerační kapacity fermentoru a v důsledku toho dosažení vysoké produkce L-lysinu.

Postupem podle vynálezu se využívá maximálně aerační kapacita fermentoru k zajištění vysokých výtěžků L-lysinu tím, že podle aerační kapacity se dávkuje množství aminodusíku do živné půdy, a to tak, aby množství narostlé biomasy, které je obsahem aminokyselin v půdě určeno, bylo takové, aby jeho potřeba kyslíku v produkční fázi fermentačního procesu, tj. při snížených nárocích na kyslík, odpovídala možností přenosu kyslíku v daném fermentoru. Toho se docílí tím, že k přípravě živné půdy se použije takového množství aminokyselin, aby na každý 1 g přeneseného kyslíku na 1 l půdy/hod připadlo 0,2 až 0,6 g, s výhodou 0,3 až 0,4 g alfa-aminodusíku.

K regulaci metabolismu pomocí pH dle našeho vynálezu se s výhodou využívá samovolného poklesu pH živné půdy a periodických úprav pH v průběhu růstu mikroorganismu. K samovolnému poklesu pH živné půdy dochází vlivem metabolické činnosti produkčního mikroorganismu, kdy pH klesá k hodnotám 5,0, případně až 4,0. Klesání pH má za následek postupně zpomalování metabolismu, zvláště dýchání, což se projevuje zmenšenou spotřebou kyslíku. Hladina rozpuštěného O₂ v půdě proto nejdříve v důsledku růstu mikroorganismu a intenzivního dýchání klesá, v dalším časovém úseku pak úměrně s poklesem pH, kdy se metabolismus zpomaluje, opět stoupá. Aby se zabránilo přílišnému zpomalení metabolismu, je nutno v určité fázi poklesu pH upravit jeho hodnotu na 6,5 až 8,0, s výhodou na 6,9 až 7,2, čímž se metabolismus znovu oživí a spotřeba kyslíku se zvýší, to znamená, že hladina rozpuštěného O₂ opět začne klesat až do doby, kdy v důsledku opětového zpomalení metabolismu nízkým pH se živná půda začne kyslíkem dosycovat. Tyto cykly se periodicky opakují po celou dobu růstu mikroorganismu a projevují se charakteristickým průběhem křivek na zápisu měřených hodnot CO₂ ve výstupu vzduchu, resp. kyslíku v půdě i samotného pH půdy. Volbou délky cyklů, tj. časových intervalů mezi jednotlivými úpravami pH, je možno udržovat hladinu rozp. O₂ tak, aby se pohybovala v rozmezí 10 až 100 %, s výhodou 20 až 60 % nasycení. Pro dosažení ekonomicky optimálního efektu je však nutné, aby délka cyklu byla volena nejen z hlediska zajištění vyšší hladiny

rozp. O_2 v půdě, ale též s ohledem na to, aby metabolismus nebyl zpomalen příliš, neboť v tom případě dochází též ke zpomalení, event. zastavení biosyntézy L-lysinu.

Podle našeho vynálezu se v růstové fázi metabolismus optimálně reguluje pomocí pH tím, že první úprava pH a délky časových úseků mezi dalšími úpravami pH se určují podle průběhu křivky CO_2 ve výstupu vzduchu. Na této křivce je možno velmi dobře sledovat zvyšující se obsah CO_2 v důsledku růstu biomasy, i pokles vývoje CO_2 vlivem zpomalení dýchání při nízkém pH. Právě poklesu koncentrace CO_2 ve výstupu vzduchu se dle našeho postupu využívá ke kvantitativní indikaci útlumu metabolismu a k určení vhodného okamžiku pro úpravu pH. Při konstantním vzdušnění se úpravy pH roztokem alkálie provádějí vždy, když koncentrace CO_2 ve výstupu vzduchu poklesne na 80 až 30 %, s výhodou na 70 až 50 % předchozího maxima.

Regulaci metabolismu pomocí pH je možno též provádět podle průběhu křivky rozp. O_2 . Na této křivce je útlum metabolismu indikován zastavením poklesu a naopak stoupáním koncentrace rozp. O_2 v půdě. První úprava pH se provede, když pokles koncentrace rozp. O_2 , ke kterému dochází v důsledku růstu mikroorganismu, se zastaví nebo koncentrace rozp. O_2 začne mírně stoupat, další úpravy se provádějí vždy tehdy, když útlum metabolismu, při kterém koncentrace rozp. O_2 stoupá, trvá minimálně jednu polovinu, maximálně trojnásobek doby, po kterou metabolismus na začátku daného cyklu nebyl výrazněji brzděn a koncentrace rozp. O_2 v půdě klesala. S výhodou se volí doba úpravy tak, aby časové úseky poklesu a vzestupu koncentrace O_2 v půdě byly stejné.

Postupem dle vynálezu lze provádět regulaci metabolismu pomocí pH též podle průběhu vlastní křivky pH. Samovolný pokles pH, způsobený metabolickou činností mikroorganismu, není rovnoměrný, ale úměrně s klesající hodnotou pH a útlumem metabolismu se zpomaluje. Toho se využívá při našem postupu k řízení periodických úprav pH v růstové fázi biosyntetického procesu tak, že pH se upravuje vždy, když gradient poklesu křivky pH se zmenší na 20 až 5 %, s výhodou na 10 % své předchozí maximální hodnoty.

Popsaná regulace metabolismu a tím i rozpuštěného kyslíku v půdě se provádí podle jedné ze tří uvedených křivek, podle toho, jaká veličina je při fermentaci měřena, po celou dobu růstové fáze, která v závislosti na daném fermentačním zařízení trvá 18 až 30 hodin, obvykle 20 až 24 hodin. V následující produkční fázi není nutné již vzhledem k menší spotřebě kyslíku intenzitu metabolismu brzdit, a proto se pH udržuje kontinuálními nebo semikontinuálními úpravami pH roztokem alkálie na úrovni v rozmezí fyziologicky optimálních hodnot 6,5 až 8,0, s výhodou 6,9 až 7,2. Při netlumené intenzitě metabolismu klesne hladina rozp. O_2 na hodnotu 1 až 10 % nasycení, která je dostačující pro docílení vysoké produkční rychlosti.

Postupem podle vynálezu se dosáhne v konvenčních provozních fermentorech velkých produkčních rychlostí a vysokých výtěžků, které odpovídají výsledkům dosahovaným v laboratorních fermentorech s velmi vysokým přenosem kyslíku.

Následující příklady blíže objasňují způsob biosyntézy L-lysinu podle vynálezu, aniž jej omezují pouze na uvedená provedení. V příkladech pod bodem A. uvádíme též kontrolní fermentace, při kterých nebyl využíván postup podle vynálezu.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Kulturou kmene *Brevibacterium flavum* CB byla inokulována živná půda ve dvou očkovacích tancích.

Složení inokulační půdy:

sacharóza	75 kg
melasa	60 kg
corn-steep (60 %)	90 kg
tech. biotin (1 %)	15 g
thyamin	0,6 g
sójový olej	6 kg
voda	ad 3 000 litrů
pH 7,0	

Kultivace inokula probíhala při 29 °C po dobu 20 hodin za stálého míchání a vzdušnění.

Do 2 fermentorů o obsahu 50 m³ s aerační kapacitou 5,2 g O₂/l/hod byla připravena živná půda tohoto složení:

sacharóza	6 300 kg
melasa (50 % sach.)	1 080 kg
hydrolyzát araš. m. (5,2 g NH ₂ -N/l)	9 000 l
corn-steep (60 %)	300 kg
kyselina fosforečná (83 %)	30 kg
síran hořečnatý kryst.	9 kg
tech. biotik (1 %)	0,15 kg
thiamin	0,006 kg
sójový olej	30 kg
voda	ad 30 000 l
pH 6,9	

Po sterilizaci byla živná půda v obou fermentorech inokulována kulturou z očkovacích tanků. Kultivace probíhala při 29 °C za stálého míchání a vzdušnění 20 m³ vzduchu/min při tlaku 198 kPa. Během fermentace bylo prováděno podle potřeby odpěňování sójovým olejem.

V tanku A, kde nebyl fermentační proces regulován podle našeho vynálezu, bylo pH po celou dobu fermentace automaticky udržováno v rozmezí hodnot 7,1 až 7,2 dávkováním 25% roztoku čpavku. V průběhu kultivace byly přidány 2 příkrmy à 1 000 litrů 70% roztoku sacharózy. Fermentace trvala 65 hodin a na konci byl zbytkový cukr ve vyfermentované půdě 3 mg/ml.

V tanku B, kde byl aplikován postup dle našeho vynálezu, byla od 0. do 24. hodiny kultivace prováděna diskontinuální úprava pH 25% roztokem čpavku podle hodnot CO₂ v odcházejících plynech a po 24. hodině kultivace bylo pH až do konce fermentace udržováno automaticky dávkováním čpavku v rozmezí hodnot 7,1 až 7,2. V průběhu kultivace byly přidány 4 příkrmy à 1 000 litrů 70% roztoku sacharózy. V 63. hodině kultivace, kdy hladina sacharózy v půdě klesla na nulovou hodnotu, byl fermentační proces ukončen.

Hodnoty sledovaných veličin u kontrolní fermentace a fermentace postupem podle vynálezu jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 1
Kontrolní fermentace

hodina kultivace	CO ₂ %	pH	sušina biomasy g/l
0	0	7,2	2,0
8	3,0	7,2	4,6
12	7,2	7,2	13,2
16	11,6	7,2	22,0
20	12,4	7,2	29,8
24	12,3	7,2	31,0
48	8,7	7,2	26,0
65	5,8	7,2	23,2

Tabulka 2
Fermentace podle vynálezu

hodina kultivace	CO ₂ %	pH	úprava pH	sušina biomasy g/l
0	0	6,8	-	2,0
6	1,0	7,1		2,3
8	3,1	6,7		4,2
9	4,0	6,4		-
10	4,5 (max.)	6,1		-
11	3,5	6,0	7,2	8,5
12	5,8	6,5		-
13	7,5	6,0		-
14,25	8,0 (max.)	5,7		-
15	6,3	5,5	7,2	16,6
16	8,6	6,1		-
16,50	9,5 (max.)	5,75		-
17,75	5,8	5,3	7,2	22,0
18,50	9,0	6,75		-
19,50	10,5 (max.)	5,55		-
20,25	5,8	5,1	7,2	26,2
21	10,0	6,0		-
21,50	11,4 (max.)	5,25		-
22,50	5,8	5,0	7,2	30,0
23	10,5	5,9		-
23,50	12,0 (max.)	5,5		-
24	8,2	5,6	7,2	31,0
25	12,1	7,2	aut. úprava	-
48	10,6	7,2		29,8
63	7,8	7,3		27,2

T a b u l k a 3

Dosažené výsledky

	F e r m e n t a c e	
	A	B
dobu kultivace (hod)	65	63
objem pŕdy (m ³)	36	38
L-lysin (g/l)	48,7	66,2
výtŕžek L-lysinu (kg)	1 753,2	2 515,6
spotřebovaná sacharóza (kg)	8 345,0	9 745,0
konverze (%)	21,01	25,81
spotřeba sach. na 1 kg lysinu	4,76	3,87

P ř í k l a d 2

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC/100 byla inokulována živná pŕda ve 2 oŕkovacích tancích.

Složení inokulační pŕdy:

sacharóza	90 kg
corn-steep (60 %)	90 kg
hydrolyzát araš. mouky (5,2 g NH ₂ -N/l)	240 l
tech. biotin (1 %)	15 g
sójeový olej	6 kg
voda	ad 3 000 l
pH 6,9	

Kultivace inokula probíhala při 29 °C po dobu 24 hodin za stálého míchání a vzdušnění.

Do 2 fermentorŕ o obsahu 50 m³ s aerační kapacitou 3,9 g O₂/l/hod byla připravena živná pŕda tohoto složení:

sacharóza	5 000 kg
melasa	540 kg
hydrolyzát araš. mouky (5,2 g NH ₂ -N/l)	6 750 l
corn-steep (60 %)	300 kg
kyselina fosforečná (83 %)	30 kg
síran hořečnatý kryst.	9 kg
tech. biotin (1 %)	0,15 kg
sójeový olej	30 kg
voda	ad 30 000 l
pH 6,8	

Po sterilizaci byla živná pŕda v obou fermentorech inokulována kulturou z oŕkovacích tankŕ. Kultivace probíhala při 29 °C za stálého míchání a vzdušnění 20 m³ vzduchu/min při tlaku 198 kPa. Během fermentace bylo prováděno podle potřeby odpěňování sójeovým olejem.

V tanku A, kde nebyl fermentační proces regulován podle našeho vynálezu, bylo pH po celou dobu fermentace automaticky udržováno v rozmezí 6,9 až 7,0 dávkováním 25% ŕpavku. V průběhu kultivace byly přidány 3 příkrmy à 1 000 litrŕ 70% roztoku sacharózy. Fermentace trvale

65 hodin a na konci byl zbytkový cukr ve vyfermentované půdě 2,5 mg/ml. V tanku B byl podle našeho vynálezu aplikován způsob regulace metabolismu dle průběhu křivky rozpuštěného kyslíku. Od 0. do 24. hodiny kultivace byla prováděna úprava pH 25% roztokem čpavku v několika-hodinových intervalech. První úprava byla provedena v 9. hodině kultivace, kdy se zastavil pokles hladiny rozp. O_2 . Délky časových intervalů mezi jednotlivými úpravami pH v dalším průběhu růstové fáze byly voleny tak, aby tvořily vždy dvojnásobek doby, po kterou koncentrace rozp. O_2 v půdě v daném intervalu měla klesající trend. Od 24. hodiny kultivace bylo pH upravováno automaticky v rozmezí hodnot 6,9 až 7,0. V průběhu kultivace byly přidány 4 příkrmy à 1 000 litrů 70% roztoku sacharózy. V 65. hodině kultivace, kdy hladina sacharózy v půdě klesla na nulu, byl fermentační proces ukončen.

Hodnoty sledovaných veličin u kontrolní fermentace a fermentace postupem podle vynálezu jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5. Dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 4

Kontrolní fermentace

hodina kultivace	rozp. O_2 % nasyc.	pH	sušina biomasy g/l
0	100	6,8	2,1
8	58	6,9	4,0
12	3	6,9	7,3
16	2	6,9	20,1
20	2	6,9	25,8
24	2	6,9	26,8
48	14	6,9	23,4
65	28	7,0	20,7

Tabulka 5

Fermentace podle vynálezu

hodina kultivace	rozp. O_2 % nasyc.	pH	úprava pH	sušina biomasy g/l
0	100	6,8		2,1
4	98	7,0		-
6	87	6,8		-
8	62	6,2		4,1
10	51	5,6		-
11,5	41	5,3		-
12,0	40	5,3	7,0	6,9
13	16	6,2		-
13,75	14 (min.)	5,75		-
14,5	21	5,4		-
15,5	58	5,2	7,0	17,2
16	30	6,0		-
16,5	21 (min.)	5,75		-
16,75	21 (min.)	5,6		-
17,75	54	5,3	7,0	20,4

pokračování tabulky 5

hodina kultivace	rosp. O ₂ % nasyc.	pH	úprava pH	sušina biomasy g/l
18	28	6,5		-
18,75	21 (min.)	5,6		-
19,5	32	5,4		-
19,75	43	5,4	7,0	23,4
20	28	6,5		-
20,75	15 (min.)	5,5		-
21	15 (min.)	5,4		-
21,5	20	5,25		-
22	34	5,2	7,0	26,0
22,5	15	6,0		-
23	10 (min.)	5,5		-
23,5	18	5,3		-
24	31	5,25	7,0	27,0
25	3	7,0	aut. úprava	-
65	10	7,2		25,2

T a b u l k a 6

Dosažené výsledky

	F e r m e n t a c e	
	A	B
dobu kultivace (hod)	65	65
objem půdy (m ³)	37	38
L-lysin (g/l)	44,9	55,3
výtěžek lysinu (kg)	1 661,3	2 101,4
spotřebovaná sacharóza (kg)	7 445,0	8 145,0
konverze (%)	22,31	25,79
spotřeba sacharózy na 1 kg lysinu	4,48	3,88

P ř í k l a d 3

Kulturou kmene *Brevibacterium flavum* CB/2 byla inokulována živná půda ve 2 oškovacích tancích.

Složení inokulační půdy:

sacharóza	75 kg
corn-steep (60 %)	75 kg
melasa (50 % sach.)	50 kg
tech. biotin (1 %)	12,5 g
thiamin	0,5 g
sójový olej	5 kg
voda	ad 2 500 l
pH 6,9	

Kultivace inokula probíhala při 29 °C po dobu 22 hod za stálého míchání a vzdušnění.

Do 2 fermentorů o obsahu 50 m³ s aerační kapacitou 6,1 g O₂/l/hod byla připravena živná půda tohoto složení:

sacharóza	4 000 kg
hydrolyzát araš. mouky (5,2 g NH ₂ -N/l)	8 100 l
corn-steep (60 %)	300 kg
kyselina fosforečná (83 %)	30 kg
síran hořečnatý kryst.	9 kg
tech. biotin (1 %)	0,15 kg
thiamin	0,006 kg
sójový olej	30 kg
voda	ad 23 000 l
pH 6,7	

Po sterilizaci byla živná půda v obou fermentorech inokulována kulturou z očkovacích tanků. Kultivace probíhala při 29 °C za stálého míchání a vzdušnění 20 m³ vzduchu/min při tlaku 198 kPa. Během fermentace bylo prováděno podle potřeby odpěňování sójovým olejem.

V tanku A, kde nebyl fermentační proces regulován podle našeho vynálezu, bylo pH po celou dobu fermentace automaticky udržováno v rozmezí 6,9 až 7,0 dávkováním 25% čpavku. V průběhu kultivace po spotřebování základního uhlíkového zdroje obsaženého v půdě bylo zahájeno semikontinuální dávkování zředěného roztoku malasy o sacharizaci 45 %. Celkem bylo přidáno 7 příkrmů à 1 500 l. Fermentace trvala 70 hodin a na konci byl zbytkový cukr ve vyfermentované půdě 7,3 mg/ml.

V tanku B byl podle našeho vynálezu aplikován způsob regulace metabolismu podle průběhu křivky pH. Od 0. do 24. hodiny kultivace byla prováděna úprava pH 25% roztokem čpavku v několikahodinových intervalech. Hodiny kultivace, v kterých se prováděly úpravy pH, byly určovány podle gradientu poklesu křivky pH. Podrobný popis průběhu křivek pH a úprava pH je v tabulce 8. Od 24. hodiny kultivace bylo pH upravováno automaticky v rozmezí hodnot 6,9 až 7,0. V průběhu kultivace bylo přidáno 9 příkrmů à 1 500 litrů zředěné malasy o sacharizaci 45 %. V 70. hodině kultivace, kdy hladina cukru v půdě klesla na nulu, byl fermentační proces ukončen.

Hodnoty sledovaných veličin u kontrolní fermentace a fermentace postupem podle vynálezu jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8. Dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce 9.

T a b u l k a 7

Kontrolní fermentace

hodina kultivace	pH	sušina biomasy g/l
0	6,7	2,3
8	6,9	5,6
12	6,9	14,8
16	6,9	24,3
20	6,9	34,0
24	6,9	34,4
48	6,9	29,4
70	6,9	24,7

T a b u l k a 8

Fermentace podle vynálezu

hodina kultivace	pH	delta pH	úprava pH	sušina biomasy g/l
0	6,7	-		2,4
4	7,0	-		-
6	6,85	0,037		-
8	6,25	0,15		4,6
9	5,75	0,25 (max.)		-
10	5,3	0,225		-
11	5,1	0,10		-
11,5	5,05	0,05 (min.)	7,0	11,0
12	6,35	0,55		-
12,5	6,0	0,35		-
13	5,7	0,30		-
13,5	5,45	0,25		-
14	5,25	0,20		-
14,5	5,1	0,15		-
15	5,0	0,10	7,0	18,4
15,5	6,25	0,75		-
16	5,75	0,50		-
16,5	5,45	0,30		-
17	5,2	0,25		-
17,5	5,0	0,20		-
18	4,9	0,10	7,0	23,8
18,5	6,2	0,90		-
19	6,7	0,50		-
19,5	5,4	0,30		-
20	5,25	0,15	7,0	28,6
20,5	6,25	0,65		-
21	5,8	0,45		-
21,5	5,6	0,20		-
22	5,5	0,10		-
22,5	5,45	0,05	7,0	33,0
23	6,3	0,70		-
23,5	5,95	0,35		-
24	5,7	0,25		-
24,5	5,55	0,15		-
25	5,50	0,05	7,0	35,0
48	6,95	-	aut. úprava	32,3
70	7,2	-		28,8

T a b u l k a 9

Dosažené výsledky

	F e r m e n t a c e	
	A	B
doba kultivace (hod)	70	70
objem pŕdy (m ³)	37	40
L-lysin (g/l)	50,6	65,0
výtŕžek L-lysinu (kg)	1 872,2	2 600,0
spotřebovaná sacharóza (kg)	8 825,0	10 175,0
konverze (%)	21,21	25,55
spotřeba sacharózy na 1 kg lysinu	4,71	3,91

P Ŕ E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

1. Zpŕsob optimalizace a regulace procesu biosyntŕzy L-lysinu ve velkoobjemovŕm fermentačním zařídění s aerační kapacitou 3 až 7 g O₂/l/hod při kultivaci vyšlechtŕných mikrobiálních kmenŕ schopných produkovat L-lysin velkou rychlostí a ve vysoké koncentraci na pŕdŕch obsahujících zdroj uhlíku, amonnŕ soli nebo močovinu, fosfor, hořčík, stimulatory biosyntŕzy a aminokyseliny potřebné pro růst, vyznačenŕ tím, ŕe při připravŕ živné pŕdy se pouŕije s ohledem na aerační kapacitu danŕho fermentoru vysokŕho množství aminokyselin, a to takovŕho, aby na kaŕdŕý 1 g přenášŕného kyslíku na 1 l pŕdy za hodinu připadlo 0,2 až 0,6 g, s vŕhodou 0,3 až 0,4 g alfa-aminodusíku, bŕhem růstu mikroorganismu se reguluje intenzita metabolismu podle koncentrace CO₂ ve vŕstupu vzduchu nebo podle prŕběhu křivky rozpŕštěného kyslíku v pŕdŕ nebo podle prŕběhu křivky pH, pomocí cyklicky se opakujících zmŕn pH živné pŕdy v rozmezí hodnot 4,0 až 8,0, a tím se udržuje hladina rozp. O₂ v rozmezí 10 až 100 %, s vŕhodou 20 až 60 % nasycení, a po ukončení růstu mikroorganismu v prŕběhu produkční fáze je intenzita biosyntŕzy L-lysinu udržována na maximální úrovni kontinuálními nebo semikontinuálními úpravami pH v rozmezí fyziologicky optimálních hodnot pH 6,5 až 8,0, s vŕhodou 6,9 až 7,2, a tím je dosaŕeno pro danŕ množství biomasy limitujících hladiny kyslíku v rozmezí 1 až 10 % nasycení.

2. Zpŕsob podle bodu 1, vyznačenŕ tím, ŕe cyklicky se opakujících zmŕn pH se dosáhne tím, ŕe se vyuŕívá samovolného poklesu pH pŕdy vlivem metabolické činnosti produkčního mikroorganismu na hodnoty pH 6,0 až 4,0, s vŕhodou na 5,7 až 5,2, a periodicky provádŕných úprav pH alkálií na hodnoty 6,5 až 8,0, s vŕhodou na 6,9 až 7,2.

3. Zpŕsob podle bodŕ 1 a 2, vyznačenŕ tím, ŕe první úprava pH a délky časovŕch ŕsekŕ mezi dalšími úpravami pH v růstové fázi se určí podle prŕběhu křivky CO₂ ve vŕstupu vzduchu, a to tak, ŕe pH se upraví alkálií vŕdy, kdŕž při konstantním vzdušném koncentraci CO₂ ve vzduchu odcházejících z tanku poklesne na 80 až 30 %, s vŕhodou na 70 až 50 % předchozího maxima.

4. Zpŕsob podle bodŕ 1 a 2, vyznačenŕ tím, ŕe první úprava pH a délky časovŕch ŕsekŕ mezi dalšími úpravami pH v růstové fázi se určí podle prŕběhu křivky rozp. O₂ v pŕdŕ, a to tak, ŕe první úprava pH se provede, kdŕž pokles koncentrace rozp. O₂ se zastaví nebo koncentrace rozp. O₂ začne mírnŕ stoupat, a kaŕdá další úprava vŕdy tehdy, kdŕž délka časovŕho ŕseku, po kterŕ křivka rozp. O₂ po projití minimem stoupá, se rovná 0,5 až 3,0 násobku časovŕho ŕseku, po kterŕ křivka rozp. O₂ v tomtŕž cyklu klesala, s vŕhodou se volí doba úpravy tak, aby časové ŕseky poklesu a vzestupu koncentrace rozp. O₂ byly stejné.

5. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že první úprava pH a délky časových úseků mezi dalšími úpravami pH v růstové fázi se určují podle průběhu křivky pH, a to tak, že hodnota pH se upraví alkálií vždy, když gradient poklesu křivky pH se zmenší na 20 až 5 %, s výhodou na 10 % své předchozí maximální hodnoty.