



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204768

(11)

(B₁)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

[22] Přihlášeno 16 08 79

[21] (PV 5602-79)

[40] Zveřejněno 31 07 80

[45] Vydáno

[75]
Autor vynálezu

KLJAVINJA SKAJDRITE JULJEVNA, RIGA, UDROVSKIJ GUNTIS
AUGUSTOVIČ, LĚVANE VELGA ALBERTOVNA, SEDVALD ATIS
KARLOVIČ, LIVANY, LUŽKOV ALEXANDR MICHAJLOVIČ, ŠEBEKINO,
BEKER MARTIN EKABOVIČ, KALNINŠ ARVID JANOVIČ,
BRAKŠ NIKOLAJ ANDREJEVIČ, DALBINJA MILDA JANOVNÁ, RIGA a
BIMBA BRUNO JANOVIČ, ELGAVA (SSSR)

[54] Živné prostředí k pěstování kmenů produkujících L-lysin

Vynález se týká směsí pro živná prostředí určená k pěstování kmenů produkujících L-lysin, kterých se používá v mikrobiologickém průmyslu. L-Lysin nachází uplatnění v zemědělství, například k obohacování krmiva pro dobytek. Kromě toho se L-lysinu používá v potravinářském průmyslu.

Je známo, že se k pěstování kmenů produkujících L-lysin používá živného prostředí, které obsahuje zdroje uhlíku a dusíku, fosforečnany, růstové látky, křídou a vodu. Jako růstové látky se ve zmíněném živném prostředí používá kyselého hydrolyzátu bílkovino-vitaminového koncentráту z kvasnic, které byly vypěstovány na ropném parafinu (viz monografii „Fermentation“, vydavatelství Sinatne, Riga, 1974, str. 86).

Nevýhodou shora popsaného živného prostředí je, že se v něm jako růstové látky používá kyselého hydrolyzátu bílkovino-vitaminového koncentráту z kvasnic. Uvedený bílkovino-vitaminový koncentrát z kvasnic je cenným krmivem pro dobytek a jeho výroba je drahá a náročná na práci.

Cílem předloženého vynálezu je odstranění zmíněných nevýhod a vyvinout takové živné prostředí pro pěstování kmenů produkujících L-lysin, které by jako růstovou látku obsahovalo přístupnější produkt. Neočekávaně bylo zjištěno, že vhodnou růstovou látkou pro uvedené účely je snadno přístupný hydrolyzát ze sápropelu.

Podle vynálezu se k pěstování kmenů produkujících L-lysin dá používat živného prostředí, které obsahuje zdroje uhlíku a dusíku, fosforečnany, růstovou látku a vodu, a které se vyznačuje tím, že se v něm jako růstové látky používá hydrolyzátu ze sápropelu a obsahuje jednotlivé složky v následujícím poměru (v hmotnostních %):

zdroje uhlíku	2,0—18,0
hydrolyzát ze sápropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5—4,0
fosforečnany	0,1—0,4
voda	zbytek do 100

K výrobě L-lysinu v krystalické formě nebo ve formě roztoku je podle vynálezu vhodná živná půda, která jako zdroj uhlíku obsahuje sacharózu nebo melasu (v množství vztaženém na sacharózu) a skládá se z jednotlivých složek v následujícím poměru (v hmotnostních %):

sacharóza nebo melasa (vztaženo na sacharózu)	8,0—18,0
hydrolyzát ze sápropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5—4,0
fosforečnany	0,1—0,4
voda	zbytek do 100

K výrobě L-lysinu ve formě suchého koncentráту je vhodná živná půda, která jako zdroj uhlíku obsahuje směs kyseliny octové s octanem amonným nebo ethylalkohol a skládá se z jednotlivých složek v následujícím poměru (v hmotnostních %):

směs kyseliny octové s octanem amonným nebo ethylalkohol	2,0— 3,5
hydrolyzát ze sapropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 2,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100

Za účelem stabilizování fermentačního procesu při přípravě L-lysinu lze k živnému prostředí vedle výše uvedených složek přidat křída a vhodné složení živné půdy je pak následující (v hmotnostních %):

zdroje uhlíku	2,0—18,0
hydrolyzát ze sapropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 4,0
křída	0,5— 5,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100

Podle předloženého vynálezu se postupuje následujícím způsobem.

Nejprve se připraví ze sapropelu hydrolyzát, který obsahuje aminokyseliny, vitaminy, stopové prvky a další biologicky účinné látky. Sapropel, který je tvořen usazeninami na dně vodních nádrží, se například hydrolyzuje 4 N kyselinou sírovou nebo chlorovodíkovou při teplotě 130 až 132 °C po dobu 3 hodin, pak se přebytečná kyselina zneutralizuje amoniakem a získaný hydrolyzát sapropelu se použije pro přípravu živného prostředí.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se přivede polovina potřebného množství vody. Pak se do nádrže za míchání vnesou zdroje uhlíku v množství 2 až 18 hmotnostních %. Použije-li se jako zdroj uhlíku sacharózy nebo melasy (v množství vztaženém na sacharózu), je účelné vnést tyto komponenty do nádrže v množství 8 až 18 hmotnostních %. V případě, že se jako zdroj uhlíku používá směs kyseliny octové s octanem amonným nebo ethylalkoholu, je účelné vnést tyto komponenty do nádrže v množství 2,0 až 3,5 hmotnostních %. Poté se do nádrže vnese hydrolyzát ze sapropelu v množství 0,5 až 12 hmotnostních %, zdroje dusíku, například síran amonný, chlorid amonný nebo močovina, v množství 0,5 až 4,0 hmotnostních % a fosforečnany v množství 0,1 až 0,4 hmotnostních %. Po promíchání se přidá zbývající množství vody a směs se znovu mechanicky promíchá.

Za účelem stabilizování fermentačního procesu při přípravě L-lysinu se k živnému prostředí připravenému shora popsaným způsobem přidává křída. V tomto případě je poměr jednotlivých složek živného prostředí následující (v hmotnostních %):

zdroje uhlíku	2,0—18,0
hydrolyzát ze sapropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 4,0
křída	0,5— 5,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100

Po promíchání všech složek živného prostředí se roztok o sobě známým způsobem sterilizuje.

Živné prostředí k pěstování kmenů produkujících L-lysin obsahuje podle vynálezu jako růstovou látku hydrolyzát ze sapropelu, který se dá získat technologicky jednoduchým postupem z málo používaného, snadno přístupného přírodního materiálu, sapropelu.

Hydrolyzát ze sapropelu obsahuje kromě růstových látek značné množství dusíkatých solí, které v živném prostředí vytvářejí zdroj dusíku.

Způsob podle vynálezu je blíže objasněn v následujících příkladech provedení.

Příklady provedení

Příklad 1

Nejprve se připraví hydrolyzát ze sapropelu následujícím způsobem. Do kyselinovzdorné nádoby opatřené mechanickým míchadlem se nalijí 4 m³ 4 N kyseliny sírové, která se zahřeje na teplotu 80 °C a za stálého míchání se do ní pak vnese 1 t (vztaheno na sušinu) sapropelu. Poté se směs zahřeje na teplotu 130 až 132 °C a při uvedené teplotě se nechá stát 3 hodiny. Získaný hydrolyzát sapropelu se ochladí a zneutralizuje amoniakem.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidá 12 hmotnostních % sacharózy, 12 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropelu, 2 hmotnostní % chloridu amonného a 0,4 hmotnostních % hydrogenfosforečnanu draselného. Po promíchání se přidá zbývající množství vody.

V získaném živném prostředí se pěstuje kmen *Brevibacterium* sp. 22 λ produkující L-lysin a nevhodný pro homoserin (kmen je uložen pod číslem 192 v muzeu kultur mikroorganismů Ústavu pro mikrobiologii Augusta Kirchsteina, Akademie věd Lotyšské SSR).

Po 72 hodinách fermentace při teplotě 30 $\pm$ 1 °C činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 40,0 g/litr.

Příklad 2

Živné prostředí se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1, ale místo sacharózy se použije melasy (v množství vztaženém na sacharózu) v množství 3 hmotnostní %.

V takto připraveném živném prostředí se pěstuje kmen *Brevibacterium* sp. 22 λ produkující L-lysin a nevhodný pro homoserin. Po 24 hodinách fermentace při teplotě 30 $\pm$ 1 °C činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 9,0 g/litr.

Příklad 3

Hydrolyzát ze sapropelu se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidá 14 hmotnostních % melasy (vztaženo na sacharózu), 3 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropele, 1,5 hmotnostních % síranu amonného, 0,1 hmotnostních % hydrogenfosforečnanu amonného a 1 hmotnostní % křídly. Po promíchání se ke směsi přidá zbývající množství vody. V získaném živném prostředí se pěstuje kmen *Micrococcus glutamicus* T-3 produkující L-lysin a nevhodný pro homoserin, isoleucin a valin (uvedený kmen je uložen pod číslem B-39 v ústředním museu pro průmyslové kultury ve Vsesvazovém výzkumném ústavu pro genetiku SSSR). Po 72 hodinách fermentace při teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 42,0 g/litr.

Příklad 4

Hydrolyzát ze sapropele se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidá 3,5 hmotnostních % směsi kyseliny octové s octanem amonným v molárním poměru 1:4, 8 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropele, 0,5 hmotnostních % chloridu amonného, 0,2 hmotnostních % hydrogenfosforečnanu draselného, a po promíchání se ke směsi přidá zbývající množství vody. V takto získaném živném prostředí se pěstuje kmen *Micrococcus glutamicus* 95, produkující L-lysin a nevhodný pro homoserin (uvedený kmen je uložen pod číslem B-38 v ústředním museu pro průmyslové kultury ve Vsesvazovém výzkumném ústavu pro genetiku SSSR). Po 24 hodinách fermentace při teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 7 g/litr.

Příklad 5

Hydrolyzát ze sapropele se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidá 2,0 hmotnostních % ethylalkoholu, 12 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropele, 1 hmotnostní % síranu amonného, 0,1 hmotnostních % hydrogenfosforečnanu draselného a 2 hmotnostní % křídly. Po promíchání se ke směsi přidá zbývající množství vody. V takto připraveném živném prostředí se pěstuje kmen *Brevibacterium* sp. 22, produkující L-lysin a nevhodný pro homoserin (uvedený kmen je uložen pod číslem 88 v museu kultur mikroorganismů Ústavu pro mikrobiologii Augusta Kirchensteina, Akademie věd Lotyšské SSR).

Po 24 hodinách fermentace při teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 5,5 g/litr.

Příklad 6

Hydrolyzát ze sapropele se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidá 18 hmotnostních % melasy (vztaženo na sacharózu), 0,5 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropele, 4 hmotnostní % síranu amonného a 0,4 hmotnostní % hydrogenfosforečnanu draselného. Po promíchání se ke směsi přidá zbývající množství vody.

V takto připraveném živném prostředí se pěstuje kmen *Micrococcus glutamicus* T-3 produkující L-lysin a nevhodný pro homoserin, isoleucin a valin. Po 72 hodinách fermentace při teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 48,0 g/litr.

Příklad 7

Hydrolyzát ze sapropele se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidá 8 hmotnostních % sacharózy, 3 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropele, 1,5 hmotnostních % močoviny, 0,2 hmotnostní % dihydrogenfosforečnanu amonného a 5 hmotnostních % křídly. Po promíchání se ke směsi přidá zbývající množství vody. V takto připraveném živném prostředí se pěstuje kmen *Brevibacterium* sp. 22 produkující L-lysin. Po 48 hodinách fermentace při teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 29 g/litr.

Příklad 8

Hydrolyzát ze sapropele se připraví analogickým způsobem jako v příkladu 1.

Do nádrže pro přípravu živného prostředí se napustí polovina potřebného množství vody a pak se za míchání přidají 3 hmotnostní % směsi kyseliny octové s octanem amonným v molárním poměru 2:9, 9 hmotnostních % hydrolyzátu ze sapropele, 0,5 hmotnostních % síranu amonného a 0,2 hmotnostních % dihydrogenfosforečnanu draselného. Po promíchání se ke směsi přidá zbývající množství vody. V takto připraveném živném prostředí se pěstuje kmen *Micrococcus glutamicus* 95 produkující L-lysin, nevhodný pro homoserin.

Po 24 hodinách fermentace při teplotě $30 \pm 1^\circ\text{C}$ činí koncentrace L-lysinu ve fermentační kapalině 6 g/litr.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Živné prostředí k pěstování kmenů produkujících L-lysin, obsahující zdroje uhlíku, zdroje dusíku, fosforečnany, růstovou látku a vodu, vyznačující se tím, že jako růstovou látku obsahuje hydrolyzát ze sápropelu a že má následující poměr jednotlivých složek v hmotnostních %:

zdroje uhlíku	2,0—18,0
hydrolyzát ze sápropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 4,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100

2. Živné prostředí k pěstování kmenů produkujících L-lysin podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako zdroje uhlíku použije sacharózy nebo melasy v množství vztaženém na sacharózu a že má následující poměr jednotlivých složek v hmotnostních %:

sacharóza nebo melasa (vztaženo na sacharózu)	8,0—18,0
hydrolyzát ze sápropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 4,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100

3. Živné prostředí k pěstování kmenů produkujících L-lysin podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako zdroje uhlíku používá směs kyseliny octové s octanem amonným nebo ethylalkoholu, a že má následující poměr jednotlivých složek v hmotnostních %:

směs kyseliny octové s octanem amonným nebo ethylalkohol	2,0— 3,5
hydrolyzát ze sápropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 4,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100

4. Živné prostředí k pěstování kmenů produkujících L-lysin podle kteréhokoliv z bodů 1, 2 a 3, vyznačující se tím, že vedle shora uvedených složek obsahuje křídou a že má následující složení v hmotnostních %:

zdroje uhlíku	2,0—18,0
hydrolyzát ze sápropelu	0,5—12,0
zdroje dusíku	0,5— 4,0
křída	0,5— 5,0
fosforečnany	0,1— 0,4
voda	zbytek do 100