

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

**214582**

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 13/08

(22) Přihlášeno 09 03 81

(21) (PV 1714-81)

(40) Zveřejněno 15 09 81

(45) Vydáno 30 03 84

(75)

Autor vynálezu

SMÉKAL FRANTIŠEK RNDr. CSc., PÍRKO JAROMÍR ing., NOVÁK LUDVÍK  
RNDr. PhMr. CSc., PRAHA

(54) Způsob zvyšování produkce L-lysinu

Vynález se týká způsobu zvyšování produkce L-lysinu při kultivaci mikroorganismů *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum*, za submerzních podmínek v půdě běžného složení. Jeho podstata spočívá v tom, že se do živné půdy na počátku produkční fáze přidává antibiotikum polypeptidového typu nebo jeho polosyntetický derivát, v množství 5 až 50  $\mu\text{g/ml}$ , například oxacilin, amoxycilin, azlocilin nebo cefalexin.

Vynález se týká způsobu zvyšování produkce L-lysinu při kultivaci produkčních mutant mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum* v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitamíny a jiné biofaktory, za submerzních podmínek.

Fermentační příprava L-lysinu je velmi dobře známa z mnoha literárních údajů, s použitím fermentačních médií, která se většinou liší pouze koncentracemi obou základních zdrojů živin, s různými poměry uhlíku a dusíku. Je například popsán způsob fermentační přípravy L-lysinu produkčními kmeny *Corynebacterium glutamicum*, které jsou rezistentní vůči některým antibiotikům (např. penicilínu, bacitracinu aj.) a které se vyznačují vysokou produkcí v médiích obsahujících melasu (americký pat. spis č. 3 687 810). Pozitivní účinek některých antibiotik (např. penicilínu, cefalosporinu aj.) na produkci kyseliny L-glutamové byl popsán u kmene *Corynebacterium hydrocarboclastus*. Zvýšení produkce kyseliny u kmene *Brevibacterium flavum* po přidání penicilínu popisuje japonský pat. spis č. 7 917 183.

Výše uvedená antibiotika umožňují zvýšenou akumulaci aminokyseliny ve fermentačním médiu, optimální konverzi uhlíkatého zdroje a tím zvyšují ekonomické parametry fermentační technologie. Bylo zjištěno, že při fermentaci L-lysinu produkčními kmeny *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium flavum* dochází po přidání limitovaného množství polosyntetického derivátu penicilínu nebo cefalosporinu do média ke zvýšení produkce sekundárního metabolitu. Stimulační efekt těchto biologicky aktivních látek je pochopitelně závislý na řadě faktorů; zejména na množství použité látky, na časovém úseku jejího dávkování, na produkčním mikroorganismu, složení fermentačního média atd.

Na základě uvedených zjištění byl vypracován způsob zvyšování produkce L-lysinu při kultivaci produkčních mutant mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum* v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitamíny a jiné biofaktory, za submerzních podmínek, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se do živné půdy po ukončení růstu produkčního mikroorganismu, na počátku produkční fáze, přidává antibiotikum peptidového typu nebo jeho polosyntetický derivát, v množství 5 až 50 g/ml, s výhodou 5 až 25  $\mu\text{g/ml}$  živé půdy, například oxacilin, amoxycilin, azlocilin nebo cefalexin.

Z produkčních mikroorganismů jsou pro praktické provedení způsobu podle vynálezu vhodné mutanty *Brevibacterium flavum*, vyžadující k růstu homoserin a další aminokyseliny, dále kmeny, které jsou rezistentní vůči analogu L-lysinu (S-aminoethyl-L-cysteinu). Podobně je možno použít při fermentaci mutanty kmene *Corynebacterium glutamicum*.

Pokud jde o použití polosyntetických antibiotik z řady penicilínů nebo cefalosporinů, přicházejí

v úvahu množství minimální, například v rozmezí 1 až 50  $\mu\text{g/ml}$  fermentačního média, výhodně 10 až 25  $\mu\text{g/ml}$ . Zmíněná antibiotika se přidávají do média po ukončení růstové fáze produkčních mikroorganismů; tato fáze je závislá na typu mutanty produkčního kmene, složení fermentačního média, zásobu kultivace atd.

Při způsobu fermentační výroby L-lysinu podle vynálezu se současně uplatňuje antimikrobiální účinek přísady antibiotik, který zabraňuje sekundární kontaminaci produkční kultury. Způsob podle vynálezu vykazuje tedy efekt stimulační a ochranný.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou obsaženy v následujících příkladech provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

#### Příklad 1

Auxotrofní nebo regulační mutantou kmene *Corynebacterium glutamicum* se zaočkuje 50 ml inokulačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, jež má toto složení: sacharosa techn. 30 g, octan sodný kryst. 20 g, kukuřičný extrakt (60 % hmotn. sušiny) 30 g, destilovaná voda do 1000 ml; pH média po sterilizaci 7,0 až 7,2. Zaočkovaná půda se dále kultivuje na rotační třepačce (240 ot/min) při teplotě 29 °C po dobu 18 h. pH kultury se pohybuje kolem 7,5. Vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 20 ml fermentačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, tohoto složení: sacharosa techn. 180 g, hydrolyzát arašidové mouky 300 ml, kukuřičný extrakt (60 % hmotn. sušiny) 10 g, síran amonný kryst. 10 g, fosforečnan draselný sek. 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitán vápenatý mletý 30 g, voda do 1000 ml; pH média po sterilizaci 6,8 až 7,0. Kultivace probíhá dále za výše uvedených podmínek. Po ukončení růstové fáze produkčního kmene, zpravidla mezi 24. až 30. hodinou kultivace, se do fermentačního média přidá roztok oxacilinu, aby jeho koncentrace dosahovala 5 až 50  $\mu\text{g/ml}$ , s výhodou 5 až 25  $\mu\text{g/ml}$  média. V kontrolních pokusech (bez přísady antibiotika) se dosáhne produkce L-lysinu kolem 33 g/l média, s přísadkou optimálního množství oxacilinu se produkce pohybuje kolem 42 g/l média za 72 h kultivace.

#### Příklad 2

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, jen s tím, rozdíl, že se do fermentačního média na počátku produkční fáze, tj. ve 24. až 30. hodině kultivace přidá amoxycilin v množství 5 až 25  $\mu\text{g/ml}$ . V kontrolních pokusech se dosáhne produkce L-lysinu kolem 34 g/l média, s přísadkou amoxycilinu se dosáhne produkce kolem 45 g/l média za 72 h kultivace.

#### Příklad 3

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, jen s tím, rozdíl, že se do fermentačního média na počátku

produkční fáze, tj. mezi 24. až 48. hodinou kultivace, přidá azlocilin v množství 5 až 50  $\mu\text{g/ml}$ , s výhodou 10  $\mu\text{g/ml}$ . V kontrolních pokusech se dosáhne produkce L-lysinu kolem 24 g/l média, s přidavkem optimálního množství azlocilinu se dosáhne produkce kolem 30 g/l média za 72 h kultivace.

#### Příklad 4

Postupuje se stejně jako v příkladu 1, jen s tím

rozdílem, že se do fermentačního média na počátku produkční fáze, tj. mezi 30. až 48. hodinou kultivace, přidá cefalexin v množství 5 až 50  $\mu\text{g/ml}$ , s výhodou 10  $\mu\text{g/ml}$ . V kontrolních pokusech se dosáhne produkce L-lysinu kolem 26 g/l média s přidavkem cefalexinu se produkce L-lysinu pohybuje kolem 33 g/l média za 72 h kultivace.

### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob zvyšování produkce L-lysinu při kultivaci produkčních mutant mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum* v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitamíny a jiné biofaktory, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se to živné půdy

po ukončení růstu produkčního mikroorganismu, na počátku produkční fáze, přidává antibiotikum peptidového typu nebo jeho polosyntetický derivát, v množství 5 až 50  $\mu\text{g/ml}$ , s výhodou 10 až 25  $\mu\text{g/ml}$  živné půdy, například oxacilin, amoxycilin, azlocilin nebo cefalexin.