



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209684

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

/22/ Přihlášeno 26 07 79
/21/ /PV 5220-79/

(40) Zveřejněno 31 03 81

(45) Vydáno 15 07 82

(75)
Autor vynálezu

ULBERT STANISLAV ing., PRAHA, HANO ALEXANDR, BUČKO MICHAL ing. CSc.,
BANSKÁ BYSTRICA, ČULÍK KAREL dr., PRAHA, PLACHÝ JIŘÍ dr. CSc.,
ROZTOKY u Prahy, CHROMÍK JINDŘICH ing., PRAHA, SYNOVEC PETER ing.,
MIKLÁŠ EMIL ing., IVANOV LEONID a SÁLKA JÁN ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Způsob fermentační výroby L-lysinu

1

Vynález se týká způsobu fermentační výroby L-lysinu pomocí vyšlechtěných mutant bakterií, který ekonomizuje výrobní proces lysinu tím, že umožňuje ve velkoobjemovém výrobním zařízení dosáhnout vysokého stupně využití uhlíkatého substrátu při biosyntéze lysinu a poskytuje vyfermentovanou půdu s vysokým obsahem L-lysinu takové kvality, že při izolaci krystalického a zejména pak technického preparátu lysinu je dosaženo vysoké výtěžnosti a zlepšené kvality preparátu.

Lysin je jednou z aminokyselin, jejíž biosyntetická výroba v průmyslovém měřítku je v současné době nejvíce zvládnuta.

Ve světě se nyní vyrábí několik desítek tisíc tun lysinu ve formě lysin-hydrochlorid-dihydrátu, anebo technického preparátu, který se získá usušením fermentované půdy. Je známa celá řada postupů využívajících k biosyntetické přípravě L-lysinu různých vyšlechtěných mutant bakterií produkujících lysin při kultivaci na uhlohydrátech či jiných uhlíkatých zdrojích, jak je popisují např. US pat. č. 2 979 439, US pat. č. 3 707 441, franc. pat. č. 1 533 688 a franc. pat. č. 2 033 199.

Ve všech postupech je vždy hlavní surovinou ve složení živné půdy uhlíkatý zdroj, takže jeho spotřeba výrazně ovlivňuje celkové náklady na vyrábění preparát lysinu. Celkové náklady jsou také silně závislé na výtěžku při izolaci lysinu z fermentované půdy, který je ovlivňován složením fermentační kapaliny po ukončení biosyntézy. Za hlavní ekonomizační faktory při zvyšování efektivity biosyntézy L-lysinu je nutno proto

2

považovat zvyšování stupně využití uhlíkatého zdroje, to znamená konverze, a zvyšování výtěžku při izolaci krystalického nebo technického preparátu L-lysinu.

Limity zvyšování konverze jsou dány předně fyziologií produkčního kmene, ale jsou výrazně ovlivňovány též technickými a technologickými parametry. Výše výtěžků při izolaci lysinu z fermentované půdy je určena v prvé řadě vlastním izolačním postupem. Z tohoto hlediska je nejvýhodnější izolační postup, při kterém je získáván technický preparát lysinu dehydratací vyfermentované půdy. Výtěžky při použití tohoto postupu jsou však silně ovlivňovány složením fermentační kapaliny po ukončení biosyntézy.

Proto při fermentaci je nutno volit takový postup, který zajišťuje vyfermentovanou půdu takové kvality, aby se její dehydratací získal technický preparát L-lysinu nelepivý a nehygroskopický, ve vysokém výtěžku. Při řešení problematiky ekonomizace biosyntetické výroby L-lysinu se proto hledalo komplexní řešení optimalizace fermentačního postupu s ohledem na oba výše uvedené aspekty.

Vycházelo se z těchto poznatků:

hlavní produkční fáze fermentace, tj. po ukončení růstu produkčního mikroorganismu, se vyznačuje tím, že spotřeba kyslíku je výrazně nižší než při růstu mikroorganismu, jak uvádějí např. sovětsí autoři Bekker M. E., a spol. v práci: Lysin-polučenije i primeneniye v životnovodstve, Nauka, Moskva 1973,

nadbytek kyslíku v půdě v hlavní produkční fázi způsobuje, že dochází k neekonomickému

prodýchávání uhlikatého zdroje na CO₂, a tím k jeho nevratným ztrátám,

mírná limitace biosyntetického procesu kyslíkem v hlavní produkční fázi je z hlediska rychlosti biosyntézy lysinu příznivá, ale je při ní rovněž dosahováno nižší konverze a dochází při ní k rychlejšímu zastavení biosyntetického procesu,

silná limitace biosyntetického procesu kyslíkem, obzvláště ve spojení s mechanickým namáháním buněk způsobeným intenzivním mícháním, tj. shear-efektem, vede k předčasnému ukončení biosyntézy lysinu v důsledku silné destrukce biomasy.

Z uvedeného vyplývá, že vysokého stupně konverze lze dosáhnout při optimálním zásobení buněk kyslíkem. To je však v praxi velmi obtížné zabezpečit, zejména proto, že dynamika metabolismu, a tím i potřeba kyslíku, se v závislosti na stádiu buněk mění.

Nyní bylo zjištěno, že nízký výtěžek lysinu z C-zdroje při vedení procesu za nedostatek kyslíku je způsoben tím, že za těchto podmínek dochází k disbalanci mezi spotřebou uhlikatého zdroje a tvorbou lysinu, což se projevuje hromaděním uhlikatých intermediátů ve fermentované půdě. Zjistilo se též, že horší zpracovatelnost vyfermentované půdy na krystalický lysin a především na technický preparát lysinu je způsobena právě uhlikatými intermediáty nahromaděnými ve fermentované půdě v průběhu biosyntézy.

Při dehydrataci vyfermentované půdy za zvýšené teploty reagují totiž intermediáty s L-lysinem a ztěžují tak průběh sušení a snižují celkový výtěžek lysinu. Dochází při tom k nalepování produktu na sušící zařízení. Kvalita technického preparátu je zhoršena v důsledku jeho lepivosti a hygroskopičnosti.

Na základě těchto poznatků se podařilo vyřešit optimální režim řízení biosyntézy, při kterém je v hlavní produkční fázi fermentace biosyntetický proces záměrně limitován kyslíkem za účelem dosažení vysoké produkční rychlosti a zároveň jsou odstraněny negativní důsledky této limitace, způsobené hromaděním uhlikatých intermediátů v půdě. Docílí se toho tím, že v hlavní produkční fázi je metabolismus uhlikatého zdroje aktivně regulován tak, aby disbalance mezi spotřebou C-zdroje a tvorbou L-lysinu byla periodicky korigována, to znamená, aby docházelo k periodické utilizaci intermediátů produkčním mikroorganismem a k jejich využití pro tvorbu L-lysinu.

Tím se dosáhne vysoké konverze C-zdroje na lysin, a to i v podmínkách velkoobjemových fermentorů, zvýšení celkového výtěžku lysinu udržením vysoké produkční rychlosti až do konce fermentace, výrazného zlepšení vlastností fermentované půdy z hlediska zpracovatelnosti při přípravě pevného produktu L-lysinu a úspor na spotřebě tlakového vzduchu.

Postup podle vynálezu spočívá v tom, že po ukončení růstové fáze se režim vzdušnění změní tak, aby biosyntéza probíhala při mírné limitaci kyslíkem. Vhodné vzdušnění se nastaví podle materiálové bilance CO₂ v odcházejících plynech snížením průtoku vzduchu na hodnotu, při které kvantita CO₂ vznikajícího při biosyntéze za časovou jednotku poklesne o 5-25 %, s výhodou o 15-20 procent oproti množství CO₂, které bylo produkováno za časovou jednotku na konci růstové fáze.

V průběhu hlavní produkční fáze fermentace se utilizace základního C-zdroje a utilizace uhlikatých intermediátů periodicky reguluje tak, že vždy po spotřebování 0,5-10, s výhodou 1-3 hmotnostních procent základního C-zdroje vzhledem k objemu půdy, se přeruší dávkování C-zdroje. Koncentrace

základního C-zdroje ve fermentované půdě se ponechá klesnout na nulovou hodnotu, což je doprovázeno prudkým poklesem koncentrace CO₂ v odcházejících plynech, a sice o 40-60 procent.

V následující fázi fermentace jsou utlizovány uhlikaté intermediáty nahromaděné v půdě, koncentrace CO₂ při tom dále pozvolna klesá v závislosti na snižování koncentrace intermediátů v půdě. Obnovení dávkování základního C-zdroje se provede tehdy, když koncentrace CO₂ v odcházejících plynech poklesne na 30-15 %, s výhodou na 25-20 % vztaheno ke koncentraci CO₂ naměřené při utilizaci C-zdroje před poklesem jeho koncentrace na nulovou hodnotu. Poslední periody utilizace uhlikatých intermediátů se prodlouží tak, aby koncentrace CO₂ v odcházejících plynech poklesla až na 10-5 % předchozího maxima.

Tím se zajistí, že zbytková koncentrace uhlikatých intermediátů, která negativně ovlivňuje zpracování vyfermentované půdy dehydratací na technický preparát lysinu i přípravu krystalického lysinu, se maximálně sníží.

Vhodná limitace kyslíkem se v průběhu hlavní produkční fáze během časových úseků utilizace základního C-zdroje zajišťuje korigováním vzdušnění. Vzdušnění se postupně snižuje tak, aby původní hodnota koncentrace CO₂, která byla nastavena na začátku hlavní produkční fáze, byla v první třetině hlavní produkční fáze konstantní a pak postupně klesala až na 70-50 % hodnoty CO₂ na začátku hlavní produkční fáze.

Následující příklady blíže objasňují způsob biosyntézy L-lysinu podle vynálezu, aniž jej omezují pouze na uvedená provedení. V příkladech pod bodem A uvádíme 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 2 očkovacích tancích.

Složení inokulační půdy:

sacharóza	110 kg
melasa /50% sach./	60 kg
corn-steep /60%/	90 kg
tech. biotin /1%/	15 g
thiamin	0,6 g
sójový olej	6 kg
voda	ad 3 000 l
pH 6,9	

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

Do 2 fermentorů o obsahu 50 m³ byla připravena živná půda tohoto složení:

sacharóza	4 300 kg
melasa /50% sach./	540 kg
hydrolyzáta araš. mouky	
/5,4 g NH ₂ -N/l/	7 200 l
corn-steep /60%/	300 kg
kys. 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 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 míchání a vzdušnění způsobem, jak je blíže specifikován v tabulkách č. 1 a 2, při tlaku 198 kPa. Růst mikroorganismu probíhal

v obou pokusech do 20. hod. kultivace. Během fermentace bylo pH udržováno dávkováním čpavku v rozmezí hodnot 6,0-7,0 a podle potřeby bylo prováděno odpěňování sójovým olejem.

V tanku A, kde nebyl fermentační proces regulován podle postupu vynálezu, bylo konstantní vzdušnění /20 m³/min./ po celou dobu fermentace. Přidávky sacharózy do fermentované kapaliny byly aplikovány běžně používaným způsobem tak, aby koncentrace sacharózy v půdě neklesla před koncem fermentace na nulu. Celkem bylo provedeno 5 příkrmů à 1000 litrů 70%ního roztoku sacharózy.

V tanku B byl podle našeho vynálezu

T a b u l k a 1 Kontrolní fermentace

hod. kult.	sacharóza		příkrm sachar. kg	CO ₂ %	vzdušnění m ³ /min.
	před příkrm. mg/ml	po příkrm. mg/ml			
0	136,8	-	-	0	20
24	41,0	60,3	700	12	20
30	35,2	55,0	700	12	20
38	27,3	46,0	700	12	20
45	18,2	35,3	700	11	20
54	8,0	25,0	700	10	20
65	0	-	-	8	20

T a b u l k a 2 Fermentace podle vynálezu

hod. kult.	sacharóza		příkrm sachar. kg	CO ₂ %	vzdušnění m ³ /min.
	před příkrm. mg/ml	po příkrm. mg/ml			
0	137,3	-	-	0	20
20	 před korekcí vzdušnění			12	20
20	 po korekci vzdušnění			14,6	13
24	42,3	61,7	700	14,7	13
30	32,0	51,0	700	14,5	13
36	23,3	-	-	14,6	13
39,5	3,0	-	-	14,2	13
40	0	-	-	11,1	13
40,5	0	-	-	8,0	13
41	0	-	-	7,1	13
42	0	-	-	6,2	13
43	0	-	-	5,5	13
44	0	-	-	4,6	13
45	0	18,3	700	2,9	13
45,5	-	-	-	13,5	11
46	-	-	-	14	11
50	0	-	-	13,3	11
50,5	0	-	-	6,5	11
51	0	-	-	4,9	11

v hlavní produkční fázi regulován metabolismus sacharózy a uhlikatých intermediátů a byl měněn režim vzdušnění podle koncentrace CO₂ v odcházejících plynech. Bylo provedeno 5 příkrmů 70%ního roztoku sacharózy a sice 3x à 1000 l a 2x à 500 l. Příkrmy byly aplikovány tak, že celkem 14,75 hod. byly využívány intermediáty.

Vyfermentované půdy z obou fermentorů byly zpracovány na technický preparát L-lysinu dehydratací.

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

pokračování tab. č. 2.

hod. kult.	sacharóza		přikrm sachar. kg	CO ₂ %	vzdušnění m ³ /min.
	před přikrm. mg/ml	po přikrm. mg/ml			
52	0	-	-	3,8	11
52,5	0	-	-	3,4	11
53	0	10,0	350	2,8	11
53,5	-	-	-	6,5	8
54	-	-	-	11	8
55	-	-	-	11	8
55,5	0	-	-	10	8
56	0	-	-	4	8
57	0	-	-	3,2	8
58	0	9,2	350	2,0	8
59	-	-	-	7,5	6
60	-	-	-	7,5	6
60,75	0	-	-	4,5	6
62	0	-	-	2,5	6
63	0	-	-	2,0	6
64	0	-	-	1,7	6
65	0	-	-	0,7	6

T a b u l k a 3 Dosažené výsledky.

F e r m e n t a c e		
	A	B
doba kultivace /hod./	65	65
objem půdy /m ³ /	39	38
L-lysin /g/l/	46,9	59,7
výtěžek lysinu /kg/	1829,1	2268,6
spotřebovaná sacharóza /kg/	8210	7510
konverze %/	22,3	30,21
spotřeba sacharózy na 1 kg lysinu	4,49	3,31
technický preparát lysinu /kg/	6378,8	6790,4
obsah L-lysinu v tech. prepar. /kg/šarže/	1505,4	1982,8
obsah L-lysinu v tech. prepar. /%/	23,6	29,2
výtěžek L-lysinu na ferm. půdu /%/	82,3	87,4
hygroskopičnost konečného produktu při 65% relat. vlhkosti a teplotě 25 °C		
/přírůstek váhy v %/24 hod./	10,2	0

P ř í k l a d 2

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum*
AEC/100 byla inokulována živná půda ve 2
očkovacích tancích.

Složení inokulační půdy:
sacharóza
corn.steep /60%/

90 kg
90 kg

hydrolyzáta araš. mouky
/5,4 g NH₂-N/l/
tech. biotin /1%/
sójový olej
voda
pH 6,85

240 l
15 g
6 kg
ad 3000 l

Kultivace inokula probíhala při 29 °C po
dobu 26 hodin za stálého míchání a vzdušnění.

Do 2 fermentorů o objemu 50 m³ byla připravena půda tohoto složení:

sacharóza	5000 kg
melasa /50% sach./	250 kg
hydrolyzát araš. mouky	
/5,4 g NH ₂ -N/1/	6500 l
corn-steep /60%/	300 kg
kys. fosforečná /83%/	30 kg
síran hořečnatý kryst.	9 kg
tech. biotin /1%/	0,15 kg
sójový olej	30 kg
voda	ad 30 000 l
pH 6,9	

Po sterilizaci byla živná půda v obou fermentorech inokulována kulturou z očkovačích tanků. Kultivace probíhala při teplotě 29 °C za míchání a vzdušnění způsobem, jak je blíže specifikováno v tabulkách č. 1 a 2, při tlaku 198 kPa. Během fermentace bylo pH udržováno dávkováním čpavku z rozmezí hodnot 6,0-7,0 a podle potřeby bylo prováděno odpeňování sójovým olejem. Růst mikroorganismu probíhal v obou pokusech do 20 hod. kultivace.

T a b u l k a 4 Kontrolní fermentace.

hod. kult.	sacharóza		příkrmy sachar. kg	CO ₂ %	vzdušnění m ³ /min
	před příkrm. mg/ml	po příkrm. mg/ml			
0	153,2	-	-	0	20
16	146,2	-	-	8,5	20
20	118,0	-	-	10,0	20
24	100,3	-	-	10,0	20
36	28,7	-	-	9,7	20
42	10,2	22,1	400	9,5	20
46	0,8	12,0	400	9,3	20
49	0,2	11,8	400	9,1	20
54	0	11,2	400	7,5	20
60	0,2	10,8	400	8,0	20
65	0	-	-	6,5	20

T a b u l k a 5 Fermentace dle vynálezu

hod. kult.	sacharóza		příkrm sachar. kg	CO ₂ %	vzdušnění m ³ /min
	před příkrm. mg/ml	po příkrm. mg/ml			
0	152,8	-	-	0	20
16	144,0	-	-	8,7	20
20	 před korekcí vzdušnění			10,2	20
20	 po korekci vzdušnění			12,5	13
21	113,0	-	-	12,4	13
30	75,4	-	-	12,4	13
36	31,2	-	-	12,5	13
39	5,2	-	-	12,3	13
39,5	2,0	-	-	12,0	13
40	0	-	-	9,6	13
40,5	0	-	-	6,0	13
44	0	-	-	1,9	13
45	0	11,5	400	1,5	13

V tanku A, kde nebyl fermentační proces regulován podle vynálezu, bylo konstantní vzdušnění /20 m³/min./ po celou dobu fermentace. Během fermentace bylo aplikováno 5 příkrmů zředěného roztoku melasy o sacharizaci 40 %, tak aby fermentační proces neprobíhal bez měřitelné koncentrace sacharózy v půdě.

V tanku B byl podle našeho vynálezu v hlavní produkční fázi regulován metabolismus uhlíkového zdroje a uhlíkatých intermediátů a byl měněn režim vzdušnění podle koncentrace CO₂ v odcházejících plynech. Během fermentace byly provedeny 4 příkrmy roztoku melasy o sacharizaci 40 %. Příkrmy byly aplikovány tak, že celkem 17 hodin byly využívány uhlíkaté intermediáty.

Vyfermentované půdy z obou fermentorů byly zpracovány na technický preparát L-lysinu dehydratací.

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

pokračování tab. č. 5.

hod. kult.	sacharóza		příkrmy sachar. kg	CO ₂ %	vzdušnění m ³ /min
	před příkrm. mg/ml	po příkrm. mg/ml			
45,5	-	-	-	11,0	10
46	-	-	-	11,5	10
47	0	-	-	9,0	10
50	0	-	-	2,5	10
50,5	0	10,7	400	1,8	10
51	-	-	-	9,6	8
52,5	0	-	-	8,5	8
53	0	-	-	4,5	8
54	0	-	-	2,8	8
55	0	10,3	400	2,0	8
56	-	-	-	8,5	7
57	0	-	-	7,5	7
58	0	-	-	2,5	7
59	0	9,6	400	1,6	7
60	-	-	-	7,0	6
61	0	-	-	5,0	6
62	0	-	-	1,8	6
63	0	-	-	1,3	6
65	0	-	-	0,5	6

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 /	39	38
L-lysin /g/l/	44,2	50,0
spotřebovaná sacharóza /kg/	7115	6715
výtěžek lysinu /kg/	1723,8	1900,0
konverze /%/	24,2	28,3
spotřebá sacharózy na 1 kg lysinu	4,13	3,53
technický preparát lysinu /kg/	6085,6	6259,7
obsah L-lysinu v techn. prep. /kg/šarže/	1399,7	1615,0
obsah L-lysinu v techn. prepar. /%/	23,0	25,8
výtěžek L-lysinu na ferm. půdu /%/	81,2	85,0
hygroskopičnost konečného produktu při 65% relat. vlhkosti a teplotě 25 °C		
/přírůstek váhy v %/24 hod./	12,0	0

P R Ě D M Ě T V Ý N Ā L E Z U

Způsob fermentační výroby L-lysinu pomocí vyšlechtěných mutant bakterií vyznačující se tím, že po ukončení růstové fáze mikroorganismu se snaží průtok vzduchu na

hodnotu, při které množství kyslíčnicku uhlíčitého, vznikajícího při biosyntéze, za časovou jednotku poklesne o 5 až 25 % objemových, s výhodou o 15 až 20 % objemových

oproti množství, produkovanému za časovou jednotku na konci růstové fáze, načež se v průběhu hlavní produkční fáze reguluje utilizace základního uhlikatého zdroje a uhlikatých intermediátů tak, že se vždy po spotřebování 0,5 až 10 % hmotnostních, s výhodou 1 až 3 % hmotnostních, základního uhlikatého zdroje jeho dávkování přeruší, až jeho hodnota klesne na nulovou hodnotu za současného poklesu koncentrace kyslíčnicku uhličitého v odcházejících plynech o 40 až 60 % objemových, v následující fázi se nechají utilizovat uhlikaté interme-

diáty, načež se dávkování základního uhlikatého zdroje obnoví, když koncentrace CO_2 v odpadních plynech poklesne na 30 až 15 % objemových, s výhodou 25 až 20 % objemových, vztaženo na koncentraci kyslíčnicku uhličitého, zjištěnou při utilizaci uhlikatého zdroje před poklesem jeho koncentrace na nulovou hodnotu, přičemž poslední periodická utilizace uhlikatých intermediátů se nechá probíhat tak dlouho, dokud koncentrace kyslíčnicku uhličitého v odcházejících plynech neklesne na 10 až 5 % objemových oproti předcházejícímu maximu.