



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252 925

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 19 03 86
(21) PV 1925-86.H

(51) Int. Cl.³⁴

C 12 N 9/88

(40) Zveřejněno 12 02 87
(45) Vydáno 1.6.1989

(75)
Autor vynálezu

PŠENIČKA IVAN RNDr., OPOLANY,
MALANÍK VIKTOR RNDr. CSc., KOUŘIM,
MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc., PRAHA

(54)

Způsob kultivace mikroorganismů rodu *Escherichia*,
vykazujících L-aspartat: amoniak lyasovou aktivitu

Způsob kultivace mikroorganismů rodu *Escherichia* vykazujících L-aspartat: amoniak lyasovou aktivitu, v kultivačním mediu obsahujícím kvasničný autolyzát spočívá v tom, že kultivační medium obsahuje kvasničný autolyzát připravený bezprostředně před kultivací mikrobiálních buněk rodu *Escherichia* nebo stabilizovaný sterilizací při max. 120 °C po dobu max. 1 hodiny v koncentraci 0,2 až 1 % hmot. sušiny s výhodou 0,5 % hmot. sušiny ve formě supernatantu nebo filtrátu.

Vynález se týká způsobu kultivace mikroorganismu rodu *Escherichia*, jež zaručuje co nejvyšší L-aspartat : amoniak lyasovou aktivitu tohoto mikroorganismu. Nakultivované buňky je možno použít přímo k průmyslové biotransformaci fumaranu amonného na L-aspartan amonný nebo s výhodou k přípravě heterogenního biokatalyzátoru pro uvedenou biotransformaci prováděnou kontinuálním kolonovým způsobem.

Pro ekonomickou výrobu kyseliny L-asparagové je důležitou podmínkou použití bakteriálního kmene obsahujícího co nejvyšší hladinu enzymu aspartasy /L-aspartat : amoniak lyasy; E.C.

4.3.1.1./. Tento požadavek je možno splnit jednak použitím vhodného kmenového materiálu /tzv. vysokoprodukčních mutant/ a jednak způsobem kultivace těchto mikrobiálních buněk.

Postupné zvyšování specifické enzymové aktivity způsobené použitím vysokoprodukčních mutant kmene *Escherichia coli* s aspartasovou aktivitou a zároveň výběrem optimálních kultivačních podmínek demonstruje následující příklad. V roce 1974 byla specifická enzymová aktivita mikrobiálních buněk používaných k průmyslové výrobě kyseliny L-asparagové v Japonsku okolo 0,5 ukat na gram vlhkých buněk /Chibata I., Tosa T., Sato T.: *Applied Microbiology* 27, 878 /1974//, zatímco v roce 1979 byly používány mikrobiální buňky se specifickou enzymovou aktivitou přesahující 28 ukat na gram vlhkých buněk /Sato T., Nishida Y., Tosa T., Chibata I.: *Biochim. Biophys. Acta* 570, 179 /1979//. Při logickém pokračování tohoto vývoje je možno očekávat, že tyto hodnoty aktivit již jsou a nadále budou překonávány. Prudký vzrůst enzymové aktivity používaných mikrobiálních buněk dosahovaný jednak výběrem vhodného kmenového materiálu, jednak optimalizací kultivačních podmínek, se pozitivně odráží i v nezaned-

bateľném prodloužení poločasu enzymové aktivity vytvořených heterogenních biokatalyzátorů, v důsledku čehož jsou i značné ekonomické úspory při kontinuální kolonové výrobě kyseliny L-asparagové.

Vzhledem k tomu, že příprava heterogenních biokatalyzátorů vylučuje možnost použití mikrobiálních buněk kultivovaných za přítomnosti pekařských kvasnic či jiných kvasinek, je nutno používat kvasničných autolyzátů. Nevýhodou komerčně vyráběných kvasničných autolyzátů je kromě vyšších nákladů na kultivaci též skutečnost, že je při jejich použití získána biomasa buněk s nižší aspartasovou aktivitou ve srovnání s buňkami kultivovanými za přítomnosti kvasničné suspence.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob kultivace mikroorganismu rodu *Escherichia* v médiu obsahujícím autolyzát připravený autolýzou kvasinek při pH 5 až 7,5 a teplotě 45 až 50 °C během 48 až 72 hodin za nepřístupu vzduchu s následnou centrifugací na separátoru a stanovením sušiny v supernatantu, který spočívá podle vynálezu v tom, že se použije supernatant nebo filtrát s 0,2 až 1 % hmot. sušiny připraveným bezprostředně před kultivací mikrobiálních buněk nebo stabilizovaným sterilizací při max. 120 °C po dobu max. 1 hodiny. Buňky rodu *Escherichia* se kultivují v kultivačním médiu o složení: pepton 0,1 až 2 % hmot., hovězí extrakt 0,25 až 3 % obj., kvasničný autolyzát připravený podle vynálezu 0,2 až 1 % hmot. ve formě příslušného množství supernatantu. Před zaočkováním se k vysterilizovanému roztoku přidá 7,15 % obj. sterilního roztoku fumaranu amonného o koncentraci 1 mol/litr a pH 7,0.

Výhodou způsobu kultivace podle vynálezu je náhrada komerčně vyráběných kvasničných autolyzátů z hlediska kultivace kvalitnějším a přitom levnějším, snadno připravitelným autolyzátem vlastní provenience při současném snížení jeho optimální koncentrace v kultivačním médiu z 1 % hmot. na 0,5 % hmot. Z ekonomického hlediska je atraktivní též úspora energie, kdy je používán přímo roztok autolyzátu po separaci /supernatant/ bez nutnosti následného sušení či lyofilisace. Získané buňky mikro-

organismu rodu *Escherichia* připravené způsobem podle vynálezu přitom vykazují přibližně trojnásobnou aspartasovou aktivitu ve srovnání s buňkami připravenými dosud používanou kultivací za přítomnosti komerčně vyráběných kvasničných autolyzátů při zachování stejného nebo i vyššího nárůstu biomasy.

Vyšší ekonomika celého procesu výroby kyseliny L-asparagové se promítá nejen z hlediska nižších nákladů na kultivační medium, ale výrazně též z hlediska využití z nakultivovaných buněk s vysokou aspartasovou aktivitou připraveného biokatalyzátoru, který má při shodném obsahu buněk 2 až 3krát delší operační poločas.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Jeden hmot. díl pekařských kvasnic byl suspendován v přibližně pětinasobném množství vody, pH suspenze bylo upraveno na hodnotu 6,5 a směs byla ponechána za nepřístupu vzduchu při teplotě 50 °C po dobu 48 h. Potom byla suspenze odstředěna na separátoru a potřebné množství supernatantu /po stanovení sušiny/ bylo použito pro přípravu kultivačního média.

Mikroorganismus *Escherichia alcalescens* byl zaočkován kličkou ze šikmého agaru do 500 ml varné baňky s plochým dnem obsahující 75 ml média následujícího složení: 0,5 % hmot. kvasničního autolyzátu /vztaženo na sušinu/, připraveného výše popsáním postupem, 0,5 % hmot. peptonu, 0,75 % obj. hovězího vývaru a 0,9 % hmot. fumaranu amonného. Acidita kultivačního média po sterilizaci byla v rozmezí pH 5 až 8, s výhodou 6,5. Kultivace probíhala na rotační třepačce za intenzivního vzdušnění po dobu 6 až 24 h, s výhodou 16 h při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou při 34 °C. Získané inokulum bylo použito k zaočkování vlastních produkčních baněk.

Varné 500 ml baňky s plochým dnem obsahující 25 až 150 ml, s výhodou 75 ml kultivačního média o složení totožném s médiem použitým k přípravě inokula byly zaočkovány vždy 1 ml inokula. Po kultivaci za podmínek popsanych při kultivaci inokula byly

buněčné suspenze slity a stanovena průměrná specifická enzymová aktivita L-aspartat : amoniak lyasy, která činila 93 μ kat na gram vlhkých buněk.

Příklad 2

Buňky mikroorganismu *Escherichia alcalescens* byly kultivovány shodným postupem jako v příkladu 1 v kultivačním médiu následujícího složení: 1 % hmot. kvasničného autolyzátu /viz příklad 1/ stabilizovaného sterilizací při 120 °C po dobu 1 h, 2 % hmot. peptonu, 0,25 % obj. hovězího vývaru a 1 % hmot. fumaranu amonného. Získané buňky vykazovaly aspartasovou aktivitu 78 μ kat na gram vlhké biomasy.

Příklad 3

Kultivací mikroorganismu *Escherichia coli* v kultivačním médiu o složení 0,2 % hmot. kvasničného autolyzátu /viz příklad 1/, 0,1 % hmot. peptonu, 3 % obj. hovězího extraktu a 0,8 % fumaranu amonného za shodných podmínek jako v příkladu 1 byla připravena suspenze mikrobiálních buněk *Escherichia coli* o aspartasové aktivitě 12 μ kat na 1 gram vlhké biomasy.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob kultivace mikroorganismů rodu *Escherichia*, vykazujících L-aspartat : amoniak lyasovou aktivitu, za intenzivního vzdušnění, v médiu obsahujícím kvasničný autolyzát připravený autolýzou kvasinek při pH 5 až 7,5, vyznačující se tím, že kultivační médium obsahuje kvasničný autolyzát připravený bezprostředně před kultivací mikrobiálních buněk rodu *Escherichia* nebo stabilizovaný sterilizací při max. 120 °C po dobu max. 1 hodiny v koncentraci 0,2 až 1 % hmot. sušiny, s výhodou 0,5 % hmot. sušiny ve formě supernatantu nebo filtrátu.