



F10000970678

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGNINGSSKRIFT

97067

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 10 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.c1.6

C 12N 1/16, C 12P 25/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	895762
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	01.12.89
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	02.06.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	01.12.89
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.06.96
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/US88/01876
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
05.06.87 US 057948 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Archer Daniels Midland Company, 4666 Faries Parkway, Decatur, IL 62526, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Heefner, Donald L., 1120 Mountain View, Apt. 5, Longmont, CO 80501, USA, (US)
2. Weaver, Craig A., 1020A Milo Circle, Lafayette, CO 80026, USA, (US)
3. Yarus, Michael J., 2231 16th Street, Boulder, CO 80300, USA, (US)
4. Burdzinski, Linda A., 5120 Williams Fork Trail #204, Boulder, CO 80301, USA, (US)
5. Gyure, Dale C., 1513 9th Avenue, Longmont, CO 80501, USA, (US)
6. Foster, Edward W., 1400 Sheridan Road, North Chicago, IL 60064, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Riboflaviinia tuottavia mikro-organismikantoja, valikointimenetelmiä ja fermentointimenetelmä
Riboflavin producerande mikroorganismstammar, selektionsförfaranden och fermenteringsförfarande

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 20849 ATCC
20850 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Julkistetaan lajin Candida flareri -hiiva-kantoja, jotka kykenevät tuottamaan 10 grammaa riboflaviinia litraa kohden 6 päivässä, ja erityisesti kannat, jotka identifioivat ATCC-hakunumerot 20849 ja 20850. On päästy riboflaviinisaantoihin, jotka ovat > 20 grammaa litraa kohden 200 tunnissa. Kyseisen keksinnön mukaisten kantojen herkkyys flavinogeneesin inhiboitumiselle raudan vaikutuksesta on kasvanut ja niiden riboflaviinituotanto solua kohden lisääntyy rautapitoisuuksien fermentointialustassa kasvaessa. Keksintö koskee myös menetelmää aiempaa parempien mikro-organismien valitsemiseksi, jotka omaavat vastustuskykyä kasvun inhiboitumiselle tyhjennetyin kasvualustan vaikutuksesta. Sitten tällaisia valittuja mikro-organismeja testataan riboflaviinin runsaan tuo-

tannon suhteen. Kyseinen keksintö koskee myös valikointimenettelyä, jossa mutatoituja mikro-organismeja viljellään tubersidiinin, eräs puriinianalogi, läsnäollessa. Sitten tubersidiiniresistenttejä mutanttikantoja testataan runsaan riboflaviinituotannon suhteen. Kyseiseen keksintöön sisältyy myös menetelmä riboflaviinin tuottamiseksi viljelemällä riboflaviinia runsaasti tuottavia mikro-organismikantoja fermentointialustassa. Lisääntyneeseen riboflaviinituotantoon voidaan päästä ravinnekasvualustan kohonneissa rautapitoisuuksissa. Fermentointi suoritetaan ja solukasvun tasaannuttua riboflaviini otetaan talteen fermentointialustasta.

Uppfinningen avser jäststammar av arten Candida flareri, vilka kan producera 10 gram riboflavin per liter på 6 dagar, speciellt stammar som identifieras genom ATCC-åtkomstnumrorna 20849 och 20850. Riboflavinavkastningar på mer än 20 gram per liter under en tid av 200 timmar har uppnåtts. Stammar en föreliggande uppfinning har ökad sensitivitet för med järn hämmad flavinogenes och även ökad riboflavinproduktion per cell vid ökade järnkonzentrationer i fermentationsmediet. Uppfinningen avser även ett förfarande för väljande av bättre mikroorganismer, vilka är resistent mot hämmad tillväxt genom utarmat medium. Dylka, utvalda mikroorganismer testas sedan med avseende på riboflavinöverproduktion. Föreliggande uppfinning avser även ett selektionsförfarande, enligt vilket muterade mikroorganismer odlas i närvaro av tubercidin, dvs. en purinanalogue. Mutanta stammar, vilka är resistent mot tubercidin, testas sedan med avseende på riboflavinöverproduktion. Föreliggande uppfinning inkluderar även ett förfarande för framställning av riboflavin genom odling av mikroorganismstammar med riboflavinöverproduktion i ett fermentationsmedium. Ökad riboflavinproduktion kan uppnås med förhöjda järnkonzentrationer i näringsmediet. Fermenteringen utförs och efter att cellväxten utjämnats tillvaratages riboflavinet från fermentationsmediet.

Riboflaviinia tuottavia mikro-organismikantoja, valikointimenetelmiä ja fermentointimenetelmä

Keksinnön aihepiiri

5 Kyseinen keksintö koskee mikro-organismeja, jotka pystyvät tuottamaan suuria määriä riboflaviinia, ja erityisesti hiivan Candida flareri eli Candida famata kantoja, jotka tuottavat kasvaneita riboflaviinimääriä, sekä menetelmiä kyseisten mikro-organismien fermentoimiseksi.

10 Keksintö koskee edelleen menetelmiä riboflaviinia runsaasti tuottavien kantojen valikoimiseksi.

Keksinnön tausta

Hyvin monet erilaiset mikro-organismit syntetisoivat riboflaviinia määriä, jotka ylittävät reippaasti organismien aineenvaihdunnalliset tarpeet. Ascomycetes-organismien, kuten Ashbya gossypii ja Eremothecium ashbyii, tiedetään tuottavan riboflaviinia niitä fermentoitaessa. Tyypillisesti näiden organismien tuottamaa riboflaviinia käytetään ravinnelisinä.

15

20 Myös muiden mikro-organismien tiedetään tuottavan riboflaviinia. Esimerkiksi sukuihin Clostridium ja Bacillus kuuluvien bakteerien sekä erilaisten hiivasukujen, mukaanlukien Candida, Saccharomyces, Hansenula ja Pichia, tiedetään tuottavan riboflaviinia. Spesifisemmin esimerkiksi US-patenttijulkaisussa 3 433 707 (1969), jonka omistavat Matsubayashi et al., kuvataan riboflaviinituotantoa kolmen Pichia-hiivalajin toimesta. Ilmoitettiin riboflaviinisaantoja, jotka olivat 10,5 mg/litra - 51 mg/litra 12 päivässä. Szczesniak et al. (1973) ilmoittivat riboflaviinin runsaasta tuotosta, joka oli 6,42 g/litra, Ashbya gossypiilla, mitä on käsitelty lähteessä Perlman, Primary Products of Metabolism, 2 Econ. Microbiology, 1978, s. 312.

25

30

35 Yhteisesti omistetussa US-patenttihakemuksessa julkaisu sarjan:o 811 234, joka jätettiin 20. joulukuuta

1985, ilmoitetaan sellaisten Candida flareri -kantojen kehittämistä, joiden riboflaviinituotanto on kohonnut. Julkaisussa sarjan:o 811 234 kuvatut C. flareri -kannat tuottivat 5 grammaa riboflaviinia litraa kohden kuuden päivän fermentoinnissa.

Riboflaviinia tuottavan hiivan aineenvaihdunnallisia vaatimuksia koskeneiden tutkimusten perusteella on ilmoitettu riboflaviinin tuotannon olevan herkkää raudan pitoisuudelle. Esimerkiksi Straube et al., The Influence of Iron Concentration and Temperature on Growth and Riboflavin Overproduction of Candida Guilliermondii, Biotechnology and Bioengineering Symposium n:o 4, 1973, ss. 225-231, ilmoittavat, että rautapitoisuus 10^{-5} M inhiboi lähes täydellisesti riboflaviinin tuotannon ja että riboflaviinituotanto on likipitään kääntäen verrannollinen rautapitoisuuteen. Straube et al. totesivat niinkään, että koboltin läsnäolo voi takauttaa raudan inhiboivan vaikutuksen riboflaviinituotantoon. Kobolttipitoisuuksissa 10^{-4} M ja raudan pitoisuudessa 10^{-5} M muodostui sama määrä riboflaviinia kuin silloin, kun kobolttia ei ollut läsnä ja rautapitoisuus oli rajoitettu pitoisuuteen 10^{-7} M.

Muissa lähteissä käsitellään riboflaviinia tuottavien mikro-organismien herkkyyttä raudalle ja erityisesti sitä, että herkkyys raudalle voidaan osittain välttää lisäämällä kobolttia, sinkkiä tai kelatoivia aineita fermentointialustaan. Chopde et al., Factors Influencing Riboflavin Synthesis by Cytophaga Hutchinsonii, Indian J. of Microbiology 20:2 (1980); Schlee et al., Physiology and Biochemistry of Riboflavin Formation, Die Pharmazie 12 (1984).

Vaikka rauta inhiboi riboflaviinin tuotantoa, on esitetty niinkään, että korkeammat rautamäärät stimuloivat solukasvua. Tämän vuoksi hiivan, jonka herkkyys flavinogeneesi-inhibitiolle raudan toimesta on alentunut, tuli-

si tuottaa suuria määriä riboflaviinia, koska rautapitoisuuksia nostamalla voidaan päästä korkeampiin solutiheyksiin.

5 Riboflaviinia tuottavien mikro-organismien sellaisista kannoista, joiden riboflaviinituotannon herkkyys raudan läsnäololle on alentunut, on ilmoitettu. SU-patenttijulkaisu n:o 330189 (tiivistelmä); DE-patenttijulkaisu n:o 108767 (tiivistelmä).

10 Täten tarvitaan mikro-organismeja, joiden riboflaviinituotannon taso on noussut. Tarvitaan edelleen sellaisia flavinogeenisten mikro-organismien kantoja, jotka omaavat vastustuskykyä riboflaviinituotannon inhibitiolle raudan toimesta. Lisäksi tarvitaan aiempaa parempia menetelmiä riboflaviinia runsaasti tuottavien mikro-organismien valikoimiseksi. Tarvitaan myös fermentointialusta, 15 joka ylläpitää lisääntyntä solukasvua ja flavinogeneesiä. Kyseisen keksinnön mukaiset mikro-organismit tuottavat riboflaviinia määrinä, jotka ylittävät huomattavasti flavinogeenisten mikro-organismien villityyppikantojen 20 tuottamat määrät ja jotka ovat aiempaa huomattavasti parempia tunnettujen kehitettyjen kantojen tuottamiin saantoihin verrattuna.

Keksinnön yhteenveto

25 Kyseinen keksintö koskee hiivan Candida flareri kantoja, jotka pystyvät tuottamaan 10 grammaa riboflaviinia litraa kohden kuudessa päivässä. On päästy riboflavinisaantoihin, jotka ovat yli 20 grammaa litraa kohden 200 tunnissa. Kyseisen keksinnön flavinogeenisimmät kannat ovat C. flareri -kannat A ja B, jotka identifioivat vastaavasti ATCC-hakunumerot 20849 ja 20850. Toisessa suoritusmuodossa kyseinen keksintö koskee C. flareri -kantoja, 30 joiden flavinogeneesin herkkyys inhibitiolle raudan toimesta on alentunut. Tällaisille kannoille on tunnusomaista riboflaviinin solua kohden tehostunut tuotanto fermentoin-

tialustan kasvaneissa rautapitoisuuksissa. Kehitettyjä C. flareri -kantoja on myös valikoitu kasvun inhibition vastustuskyvyn suhteen kasvualustan tyhjentämisen vaikutuksesta ja deoksiglukoosin vaikutuksesta.

5 Seuraavassa suoritusmuodossa kyseinen keksintö käsittää menetelmän aiempaa parempien sellaisten mikro-organismien valikoimiseksi, jotka omaavat vastustuskykyä kasvun inhibitiolle tyhjennetyn kasvualustan vaikutuksesta. Tällaiset mikro-organismit kykenevät kasvamaan korkeammiksi solutiheyksiksi tuottaen suurempia määriä aineenvaihduntatuotteita. Tässä menetelmässä tuotetaan ensin tyhjennetty kasvualusta kasvattamalla mikro-organismipopulaatiota kunnes solukasvu pysähtyy. Sitten mikro-organismit poistetaan kasvualustasta tyhjennetyn kasvualustan
10 muodostamiseksi. Sitten muodostetaan tyhjennetyn kasvualustan käsittävä valikointikasvualusta. Sen jälkeen toista mikro-organismipopulaatiota mutatoidaan, minkä jälkeen se viedään kyseiseen valikointialustaan. Valikoidaan mutatoituneen populaation kannat, jotka kykenevät kasvamaan tyhjennetyllä kasvualustalla. Edullisesti jälkimmäinen mikro-organismipopulaatio edustaa samaa lajia kuin tyhjennetyn kasvualustan muodostanut ensimmäinen populaatio, ja edullisemmin samaa kantaa.

Edelleen seuraavassa suoritusmuodossa kyseinen keksintö käsittää menetelmän suuria määriä riboflaviinia tuottavien mikro-organismien valikoimiseksi. Tässä menetelmässä mikro-organismilähtöpopulaatio mutatoidaan. Sitten mutatoitua populaatiota viljellään ravinnekasvualustalla, joka sisältää antibioottia tubersidiiniä, joka oletettavasti inhiboi puriiniaineenvaihduntaa. Ravinnekasvualusta sisältää tubersidiinia pitoisuuksina, jotka kykenevät estämään pesäkemuodostuksen joidenkin mutatoituneen populaation käsittämien mikro-organismien toimesta. Sitten valikoidaan mikro-organismit, jotka kykenevät muodostamaan
25
30

pesäkkeitä tubersidiinia sisältävälle kasvualustalle. Näitä mikro-organismeja voidaan sitten testata riboflaviinin runsaan tuotannon suhteen. Tämän valikointimenetelmän on todettu valikoivan riboflaviinia runsaasti tuottavat mikro-organismit.

Kyseisen keksinnön seuraava suoritusmuoto käsittää menetelmän riboflaviinin tuottamiseksi viljelemällä kyseisen keksinnön mukaisia mikro-organismikantoja fermentointialustassa. Kohonneeseen riboflaviinituotantoon voidaan päästä kasvualustan rautapitoisuuksissa, jotka ovat noin 5,4 μM - noin 15 μM . Fermentointialusta sisältää myös glysiiniä korkeintaan noin 7 g:n/litra pitoisuuksiin asti. Fermentointi suoritetaan ylläpitäen kasvualustan ravinnepitoisuuksia ja muita fermentointiolosuhteita solukasvun ja riboflaviinituotannon tukemiseksi. Sitten kun solukasvu on tasaantunut, riboflaviini otetaan talteen fermentointialustasta.

Yksityiskohtainen kuvaus

On kehitetty C. flareri -hiivalajin riboflaviinia tuottavia kantoja, jotka tuottavat aiempaa korkeampia riboflaviinitasoja. Rutiininomaisesti saadaan saantoja, jotka ovat yli 10 grammaa riboflaviinia litraa kasvualustaa kohden 144 tunnissa, ja on päästy saantoihin, jotka ovat yli 20 grammaa riboflaviinia litraa kohden 200 tunnissa. Kyseisen keksinnön mukaiset kannat ovat 30 - 40 -kertainen flavinogeenisempiä kuin villityypin C. flareri ja 3½-kertaa flavinogeenisempiä kuin tehokkain aiemmin tunnetuista riboflaviinituottajista.

Erityisesti kanta A, ATCC-hakunumero 20849, kykenee tuottamaan yli 20 grammaa riboflaviinia 200 tunnin fermentointiajossa. Kannasta A on kehitetty erilaisia sitä flavinogeenisempiä kantoja mitattuna 2 ml:n rullaputkiriboflaviinimäärityksellä. Tätä määrittystä, jota kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkkiosuudessa, ei ole suunniteltu

riboflaviinisaannon maksimoimiseksi, vaan sitä käytetään flavinogeenin vertaamiseksi eri organismikantojen välillä samanlaisissa olosuhteissa. Kanta B, ATCC-hakunumero 20850, kehitettiin kannasta A ja se on 50 % flavinogeenisempi kuin kanta A rullaputkimäärityksessä.

5 Kyseisen keksinnön mukaisten C. flareri -kantojen riboflaviinisynteesin herkkyys inhibitiolle raudan toimesta on alentunut. Kuten edellä esitetty on ilmoitettu, että rauta on riboflaviinisynteesin inhibiittori monissa mikro-
10 organismeissa, ja erityisesti Candida-hiivalajeissa. Raudan lisääntyneen pitoisuuden fermentointialustassa on todettu ei ainoastaan lisäävän kyseisen keksinnön mukaisten C. flareri -kantojen solukasvua, vaan myös riboflaviini-
15 tuotantoa solumassaa kohden. Vaikka riboflaviinin voitaisiin odottaa lisääntyvän korkeiden rautapitoisuuksien ansiosta lisääntyvän solukasvun myötä, todetut riboflaviinilisäykset ovat suurempia kuin mitä olisi odotettavissa pelkästään lisääntyneen solukasvun perusteella. Täten kyseisen keksinnön mukaisissa raudalle vastustuskykyä omaavissa kannoissa flavinogeeni ei ainoastaan ole epäherkkä
20 rautainhibitiolle, vaan solua kohden laskettuna korkeammat rautapitoisuudet stimuloivat sitä.

Riboflaviinituotannon stimuloitumista kyseisen keksinnön mukaisilla raudalle vastustuskykyä omaavilla C. flareri -kannoilla on todettu rautapitoisuuksissa noin 3,6
25 mikromolaarinen pitoisuus (μM). Pitoisuuksissa, jotka ylittävät noin 16,1 μM , raudalla on kuitenkin taipumus inhiboida riboflaviinisynteesiä myös näissä kannoissa. Fermentoinnin aikana raudan moolipitoisuudet ovat edullisesti
30 noin 5,40 μM - noin 15 μM , edullisemmin noin 6,12 μM - noin 12 μM , ja edullisimmin noin 9,8 μM - noin 10,8 μM .

Kannan A ja sen jälkeläisten toinen tärkeä aineenvaihdunnallinen ominaispiirre on vastustuskyky kasvun inhibitiolle sekä riboflaviinin tuotanto fermentointialus-

tassa, jossa on kasvatettu viljelmä päätössolutiheyteen. Tällaista kasvualustaa kutsutaan "tyhjennetyksi kasvualustaksi". Tällainen vastustuskyky mahdollistaa korkeampien riboflaviinisaantojen tuoton, koska päästään korkeampiin solutiheyksiin. Näiden kantojen on samoin todettu tuottavan kasvaneita riboflaviinisaantoja solua kohden lasketuna.

Kyseistä keksintöä käsitellään tässä hiivan C. flareri yhteydessä. C. flareri tunnetaan myös nimellä Torulopsis candida. Kyseisen keksinnön mukaiset menetelmät ja menettelyt soveltuvat kuitenkin yhtä hyvin muille Candida-lajeille ja muulle riboflaviinia runsaasti tuotavalle hiivalle ja muille riboflaviinia runsaasti tuotaville mikro-organismeille. Täten spesifisen viittauksen C. flareeriin tarkoituksena ei ole rajata keksinnön kattamaa aluetta tähän nimenomaiseen lajiin.

Kyseisen keksinnön mukaan aiempaa parempia riboflaviinia tuottavia mikro-organismikantoja valikoidaan menetelmillä, joiden mukaan mikro-organismiviljelmä mutatoidaan ja valitaan kantoja, joiden riboflaviinituotannon ominaispiirteet ovat aiempaa parempia. Tyypillisesti mutatoituja mikro-organismeja viljellään kiintällä kasvualustalla, joka sisältää jotain inhiboivaa yhdistettä. Inhibiittorin läsnäollessa muodostuneita pesäkkeitä viljellään ja niiden riboflaviinituottokykyä testataan. Sitten valitaan mikro-organismikannat, joiden riboflaviinituotto on korkea.

Mikro-organismiviljelmiä voidaan mutatoida millä tahansa alalla tunnetuista erilaisista keinoista, ja se voi käsittää joko kemiallisen tai fysikaalisen mutatoon. Esimerkiksi kyseiseen keksintöön soveliaita kemiallisia mutageeneja ovat mainittuihin rajoittumatta N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanadiini, diepoksibutaani, etyyli-metaanisulfonaatti, sinappiyhdisteet, hydratsiini ja typ-

pihapoke. Fysikaalisia mutageenejä voivat olla mainittuihin rajoittumatta ultravioletti- ja gamma-säteily. Lähtöviljelmää käsitellään mutatoivalla aineella riittävän tehokkaasti sitä silmälläpitäen, että eloon jää tietyn koinen populaatio. Tämä koko vaihtelee mutageenistoi-
5 seen ja on riippuvainen mutaatiomäärästä, jonka mutageeni aikaansaa eloon jääneessä populaatiossa tietyllä tappotiheydellä. Esimerkiksi NTG:n toivottavan tappotiheyden tulisi jättää eloon noin 10 % - 50 % lähtöpopulaatiosta.
10 Typpihipokemutatoonin tulisi jättää noin 0,01 % - 0,1 % lähtöpopulaatiosta ja ultraviolettimutatoonin tulisi jättää noin 1,0 %. Tällä tavoin käsitellyt solut otetaan talteen, pestään ja lietetään kasvua ei-ylläpitävään kasvualustaan, kuten fysiologiseen suolaliuokseen. Tällaisiin
15 soluihin voidaan sitten kohdistaa yksi tai useampi valikointimenettely.

Kantoja A ja B kehitettäessä valittiin riboflaviinia runsaasti tuottavista C. flareri -kannoista joukko välikantoja alla kuvattuja valikointimenettelyitä käyttäen. Kanta C, ATCC-hakunumero 20755, kehitettiin lukuisia valikointimenettelyitä käyttäen villityypin C. flare-
20 rista ja sitä kuvataan julkaisussa sarjan:o 811 234. Kanta C on alla kuvattujen kantojen, mukaanlukien A ja B, edeltäjä. Kanta C voi tuottaa 1,1 g/litra riboflaviinia 7 päivässä 2 ml:n rullaputkimäärityksessä. Kanta C lähtöpopulaationa käyttäen suoritettiin glukoosianalogivalikointimenettely riboflaviinia runsaasti tuottavien organismien
25 valitsemiseksi.

Kyseisen keksinnön mukaan riboflaviinia runsaasti
30 tuottavat organismit voidaan valikoida esiin valitsemalla mikro-organismeja, jotka omaavat vastustuskykyä glukoosianalogeille. Tällaiset mikro-organismikannat todennäköisesti keräävät tehokkaammin glukoosia, muuttavat glukoosin tehokkaammin riboflaviiniksi tai voittavat tehokkaammin

glukoosirepression. Täten riboflaviinia tuottavien mikro-
organismien muodostamaa lähtöviljelmää mutatoidaan edellä
kuvattuun tapaan. Sitten mutatoitu populaatio maljoitetaan
kasvualustalle, joka sisältää inhiboivia pitoisuuksia glu-
5 koosianalogeja tai niiden seoksia. Maljoitetuista mutatoi-
duista soluista valikoidaan elinkelpoiset pesäkkeet vas-
tustuskyvyn suhteen glukoosianalogi-inhibitiolle. Näitä
pesäkkeitä testataan sitten riboflaviinituotannon suhteen.

Glukoosianalogin pitoisuus on riippuvainen useista
10 seikoista, mukaanlukien analogin inhibiatiovaikutus sekä
viljelmän lähtöherkkyys riboflaviinituotannon inhibitiolle
analogin toimesta. Tyypillisesti suoritetaan minimi-inhi-
bitiopitoisuuskoe sen minimipitoisuuden määrittämiseksi,
jossa analogi inhiboi kasvun ei-mutatoidussa lähtöpopulaa-
15 tiossa. Juuri tätä minimipitoisuutta käytetään yleensä
valikointimenettelyssä; tulisi kuitenkin huomata, että
korkeampiakin pitoisuuksia voidaan käyttää aina pitoisuu-
teen, jossa jopa vastustuskykyä omaavien mutanttien kasvu
estyy. Kun glukoosianalogina on 2-deoksiglukoosi, sopivia
20 ovat pitoisuudet noin 700 µg/ml - noin 1500 µg/ml, edul-
lisemmin noin 700 µg/ml - noin 1000 µg/ml, ja edullisimmin
noin 700 µg/ml - noin 800 µg/ml.

Kanta D valittiin glukoosianalogivalikointimenet-
telyssä, jossa kanta C muodosti mutatoitavan ja valikoi-
25 tavan lähtöpopulaation. Kanta D kykenee tuottamaan 1,58
g/litra riboflaviinia 7 päivässä 2 ml:n rullaputkimääri-
tyksessä. Tätä kantaa käytettiin lähtöpopulaationa rauta-
herkkyysvalikointimenettelyssä silmälläpitäen riboflavii-
nia runsaasti tuottavien organismien valitsemista.

30 Kuten edellä esitetty on ilmoitettu, että pienet
määrät rautaa inhiboivat riboflaviinituotantoa. Nyt on
todettu, että toivottavaa olisi kehittää riboflaviinia
tuottava mikro-organismikanta, jonka herkkyys rautainhibi-
tiolle on alentunut, koska kyseistä kantaa voitaisiin vil-

jellä korkean rautapitoisuuden käsittävässä kasvualustassa, joka ylläpitäisi lisääntyntä solukasvua.

Riboflaviinituottajien valitsemiseksi, joiden herkkyys raudalle on alentunut, mikro-organismiviljelmää mutatoidaan edellä esitettyyn tapaan. Saatu viljelmä levitetään kiinteälle kasvualustalle, joka sisältää assimiloituvia hiili-, typpilähteitä sekä epäorgaanisia aineksia korkeiden rautapitoisuuksien läsnäollessa. Esimerkiksi sopiva kasvualusta on YMG-kasvualusta (katso taulukko 1), jota on täydennetty 2,23 %:lla glysiiniä. Mutatoituja soluja kasvatetaan tällä kasvualustalla riboflaviinituotantoon soveliaassa lämpötilassa. Mutantit, joiden vastustuskyky riboflaviinituotannon inhibitiolle raudan toimesta ei ole kasvanut, muodostavat valkeita tai kerman värisiä pesäkkeitä, koska riboflaviinia ei muodostu runsaasti. Mutanttipesäkkeet, joiden vastustuskyky riboflaviinituotannon rautainhibitiolle on kasvanut, ovat kuitenkin keltaisia riboflaviinin läsnäolon johdosta. Tällaisia keltaisia pesäkkeitä voidaan testata riboflaviinia ylenmäärin tuotavina organismeina.

TAULUKKO 1

YMG-kasvualusta

25	Hiivauute	3 g/litra
	Mallasuute	3 g/litra
	Peptoni	5 g/litra
	Hiililähde (2 %)	20 g/litra

Raudan pitoisuus valikointimenettelyssä riippuu muun muassa lähtöpopulaation herkkyydestä raudan. Esimerkiksi jos rautaherkkyysoperaatio suoritettaisiin villityypin C. flarerita edustavalle lähtöpopulaatiolle, valikointinissa käytettävä rautapitoisuus olisi alhaisempi kuin jos lähtöpopulaationa olisi C. flareri -kanta, joka jo olisi valikoitu riboflaviinituotannon rautainhibitiolle alentu-

neen herkkyyden suhteen. Kuten edellä esitetty glukoosi-analogivalikoinnin yhteydessä, rautapitoisuus valitaan tyypillisesti käyttäen minimi-inhibitiopitoisuuskoetta. Kyseisen keksinnön mukaan tehokkaita alentuneen rautaherkkyden suhteen valikoimiseksi ovat raudan moolipitoisuudet noin 5 μM - noin 50 μM , ja edullisemmin noin 10 μM - noin 30 μM , ja edullisimmin noin 16 μM - noin 20 μM .

Kanta E valittiin käyttäen rautaherkkyysoperaatiota, jossa lähtöpopulaationa oli kanta D. Kanta E kykenee tuottamaan 1,70 g/litra riboflaviinia 7 päivässä 2 ml:n rullaputkimäärityksessä. Tätä kantaa käytettiin lähtöpopulaationa tyhjennetty kasvualusta -valikointimenettelyssä riboflaviinia runsaasti tuottavien organismien valitsemiseksi.

Riboflaviinia runsaasti tuottavat organismit voidaan valita esiin vastustuskyvyn perusteella kasvun inhibitiolle tyhjennetyllä kasvualustalla. Tiedetään, että suljetuissa biologisissa järjestelmissä, kuten laboratoriohiivaviljelmät, solukasvu ja biologisten tuotteiden tuotanto lopulta pysähtyvät, jopa vaikka läsnä on ylenmäärin ravinteita. Vaikka syitä solukasvun ja riboflaviinituotannon pysähtymiseen C. flarerissa ei tunneta, arvelaan kolmen seikan ainakin osittain olevan vastuussa tästä ilmiöstä. Arvellaan, että useimmat organismit käyttävät tehottomasti hyväkseen hivenravinteita näiden tietyn pitoisuuden alapuolella. Tämän vuoksi tällaisten hivenravinteiden tyhjetessä tiettyyn pitoisuuteen kasvu inhiboituu. Toinen mahdollinen syy on, että kasvu- ja riboflaviinituottovaiheissa sivutuotteina muodostuu aineita, jotka inhiboivat lisäkasvua ja riboflaviinituotantoa. Kolmas mahdollinen syy on, että kasvualusta-ainesosien syötetyt tai ei-käytetyt korkeat pitoisuudet saattavat repressoida kasvua. Tämä valikointimenettely kohdistuu mikro-organismien valintaan, jotka kykenevät kasvamaan ja tuottamaan riboflaviinia tyhjennetyllä kasvualustalla. Arvellaan,

että tällaiset mikro-organismit kykenevät tehokkaammin käyttämään hyväkseen hivenravinteita näiden alhaisissa tasoissa ja/tai ne omaavat vastustuskykyä inhiboiville tai repressoiville yhdisteille, joita muodostuu kasvu- ja riboflaviinituottovaiheissa. Tällaiset valikoidut organismit ovat arvokkaita, koska tietyllä lähtökasvualustalla ja tietyissä fermentointiolosuhteissa solukasvu ja riboflaviinin tuotanto jatkuvat pidempään, jolloin riboflaviinituotannosta saadaan korkeampia saantoja.

10 Tyhjennetty kasvualusta -valikointimenettelyn mukaan tyhjennetty kasvualusta valmistetaan kasvattamalla mikro-organismilähtöviljelmää, kunnes solukasvu pysähtyy tai tasaantuu, ja edullisemmin stationäärivaiheen loppupuolelle. Tyhjennetty kasvualusta valmistetaan edullisesti viljelemällä samaa mikro-organismilajia, ja edullisesti 15 samaa -kantaa, kuin joka on määrä valikoida valikointivaiheessa. Vaikka mikä tahansa mikro-organismi käyttää loppuun hivenravinteet ja tuottaa inhiboivia yhdisteitä, valikointi on tehokkain, jos valikoitavaan mutatoituun populaatioon kohdistetaan samat tyhjennetyin kasvualustan ympäristölliset paineet, kuin jotka saivat lähtöpopulaation lopettamaan kasvunsa. Jos lähtöpopulaatio poikkeaa mutatoidusta populaatiosta, lähtöpopulaation kasvua voivat rajoittaa hivenmineraalien loppuun kulumisen tai inhiboivien tai repressoivien yhdisteiden muodostuminen, jotka 25 mahdollisesti eivät aiheuta painetta mutatoidussa populaatiossa.

Kun kasvu ja tuotteiden muodostus lähtöviljelmässä pysähtyvät, solut poistetaan viljelmästä tyhjennetyin kasvualustan muodostamiseksi. Erotus voidaan suorittaa alan ammattilaisten tuntemin eri keinoin. Esimerkiksi solut voidaan poistaa kasvualustasta sentrifugoimalla. Vaihtoehtoisesti solut voidaan poistaa ultrasuodattamalla.

35 Valikointikasvualusta valmistetaan käyttäen edellä kuvatun mukaista tyhjennettyä kasvualustaa. Tyhjennettyyn

kasvualustaan voidaan lisätä hiili-, typpilähteitä ja epä-
 orgaanisia ravinteita valikointikasvualustan muodostami-
 seksi tyhjennetylle kasvualustalle vastustuskykyä omaavien
 kantojen valikointia silmälläpitäen. Tyhjennettyyn kasvu-
 5 alustaan lisättävien ravinteiden määrä ja tyyppi voivat
 vaihdella. Esimerkiksi tyhjennettyyn kasvualustaan voidaan
 lisätä hiililähde ja typpilähde, kuten sakkaroosia ja gly-
 siiniä. Vaihtoehtoisesti tyhjennetty kasvualusta voidaan
 sekoittaa vaihtelevissa sekoitussuhteissa ravinnekasvu-
 10 alustaan kuten 4B-kasvualustaan (katso taulukko 2). Tyh-
 jennetyyn kasvualustan ja ravinnekasvualustan suhteelliset
 osuudet voidaan määrittää suorittamalla minimi-inhibitio-
 pitoisuuskoe ja käyttäen tyhjennetyyn kasvualustan alhai-
 sinta tasoa, joka inhiboi kasvun ei-mutatoidussa populaa-
 15 tiossa.

TAULUKKO 2
4B-kasvualusta

20	KH_2PO_4	0,5 g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
	urea	1,84 g/l
	sakkaroosi	60 g/l
	D-biotiini	1 $\mu\text{g/l}$
25	H_3BO_4	20 $\mu\text{g/l}$
	MnSO_4	20 $\mu\text{g/l}$
	ZnSO_4	140 $\mu\text{g/l}$
	CuSO_4	20 $\mu\text{g/l}$
	Na_2MoO_4	20 $\mu\text{g/l}$

30 Valikointimenettely suoritetaan mutatoimalla ribo-
 flaviinia tuottavien mikro-organismien lähtöpopulaatiota
 edellä kuvattuun tapaan mutatoidun populaation muodostami-
 seksi. Mutatoitu populaatio viedään tyhjennetty kasvualus-
 35 ta -valikointialustaan. Tyypillisesti mikro-organismit,

joiden vastustuskyky inhibitiolle tyhjennetyn kasvualustan toimesta ei ole kasvanut, eivät kykene elämään valikointikasvualustalla. Tyhjennetty kasvualusta -valikointialustalle muodostuneet pesäkkeet ovat valikoituneet kasvaneen vastustuskyvyn tyhjennetylle kasvualustalle omaavina. Tämän jälkeen valikoituja pesäkkeitä testataan riboflaviinituottokyvyn suhteen.

Kanta A valikoitiin tyhjennetty kasvualusta -valikointimenettelyllä käyttäen kantaa E lähtöpopulaationa. Lähtöviljelmästä poistettiin sentrifugoimalla solut tyhjennetyn kasvualustan muodostamiseksi. Tyhjennetty kasvualusta steriloidtiin ja mahdolliset jäljelle jääneet solut poistettiin suodattamalla 0,5 mikronin membraanisudattimella. Valikointialusta muodostettiin lisäämällä sakkaroosia ja glysiiniä supernatanttiin. Kanta A kykenee tuottamaan 2,5 g/litra riboflaviinia rullaputkimäärityksessä. Suoritettiin tyhjennetty kasvualusta -lisävalikointimenettely käyttäen kantaa A lähtöpopulaationa.

Tästä toisesta tyhjennetty kasvualusta -valikointimenettelystä saatiin kanta F, joka kykenee tuottamaan 3,4 g/litra riboflaviinia 7 päivässä 2 ml:n rullaputkimäärityksessä. Tässä valikointimenettelyssä solut poistettiin tyhjennetystä kasvualustasta suodattamalla 0,5 mikronin membraanisudattimella ja valikointialusta muodostettiin 50 %:ista tyhjennettyä kasvualustaa ja 50 %:ista 4B-kasvualustaa. Kantaa F käytettiin lähtöpopulaationa valikointimenettelyssä, jossa käytettiin tubersidiinia valikoivana aineena.

Toinen riboflaviinia runsaasti tuottavia mikro-organismeja valikoiva menettely valitsee mikro-organismit, jotka omaavat vastustuskykyä kasvuinhibitiolle puriiniaanalogiin toimesta, ja erityisesti tubersidiinin toimesta. Tällaiset yhdisteet oletettavasti inhiboivat puriini-ainenvaihduntaa, ja koska puriinit ovat riboflaviinin prekursoreita, nämä yhdisteet häiritsevät riboflaviinituotantoa.

toa. Monia tunnettuja puriinianalogeja on käytetty puriini-aineenvaihdunnan tutkimiseksi, jolloin kuitenkin missään tunnetuista lähteistä ei ole ilmoitettu puriinianalogien menestyksekkäästä käytöstä riboflaviinia runsaasti tuottavien mikro-organismien valikoinnissa. Edelleen missään tunnetuista lähteistä ei ilmoiteta käytetyn tubersidiinia puriini-aineenvaihdunnan tutkimiseksi tai riboflaviinia runsaasti tuottavien mikro-organismien valikoimiseksi.

10 On määritetty, että sellaiset riboflaviinia tuottavat mikro-organismikannat, jotka kasvavat ja tuottavat riboflaviinia tubersidiinin läsnäollessa, voivat omata aiempaa paremman riboflaviinin tuottokyvyn. Tällaiset tubersidiiniresistentit kannat joko kykenevät valmistamaan korkeampia puriinitasoja tai kykenevät valmistamaan puriineja tehokkaammin. Tämän valikointimenettelyn mukaan riboflaviinia tuottavien mikro-organismien viljelmä mutatoidaan kuten edellä kuvattu. Eloonjäänyt populaatio maljoitetaan kasvualustalle, joka sisältää assimiloituvia hiili-, typpilähteitä sekä epäorgaanisia ainesosia tubersidiinin läsnäollessa. Maljoitetuista populaatioista valikoidaan elinkelpoiset pesäkkeet. Näitä pesäkkeitä testataan sitten riboflaviinituottokyvyn suhteen.

25 Kyseisessä valikointimenettelyssä käytettävä tubersidiinin pitoisuus riippuu eri seikoista, mukaanlukien lähtöpopulaation inhibitioherkkyys. Kuten edellä esitetty, sopiva pitoisuus voidaan määrittää suorittamalla minimi-inhibitio-pitoisuuskoe, jossa määritetään alhaisin tubersidiinipitoisuus, joka inhiboi kasvun ei-mutatoidussa populaatiossa. Tulee huomata, että korkeampia tubersidiinipitoisuuksia voidaan käyttää aina pitoisuuteen, joka inhiboi jopa resistenttien mutanttien kasvun. Vaikka tubersidiinin pitoisuus voi vaihdella, se on valikointimenettelyssä tyypillisesti noin 85 µg/ml tubersidiinia - noin 35 200 µg/ml tubersidiinia, edullisemmin noin 85 µg/ml tuber-

sidiinia - noin 150 µg/ml tubersidiinia, ja edullisimmin noin 85 µg/ml tubersidiinia - noin 115 µg/ml tubersidiinia.

5 Kanta B valikoitiin käyttäen tubersidiinivalikointimenettelyä ja kantaa F lähtöpopulaationa. Kanta B kykenee tuottamaan 3,8 g/litra riboflaviinia 7 päivässä 2 ml:n rullaputkimäärityksessä. Myös kanta G valittiin tubersidiinivalikointimenettelyllä käyttäen kantaa A lähtöpopulaationa. Kannan G riboflaviinituottokyky on 2,9 g/litra 10 päivässä 2 ml:n rullaputkimäärityksessä. Kantaa G käytettiin lähtöpopulaationa herkkyyteen ultravioletivalolle perustuvassa valikointimenettelyssä.

Edellä kuvatuissa eri valikointimenetelmissä valitaan riboflaviinia runsaasti tuottavia mikro-organismeja 15 viemällä riboflaviinia tuottavien mikro-organismien mutaatio populaatio kasvualustaan, joka inhiboi riboflaviinin tuotantoa tavalla tai toisella. Mikro-organismien valitsemisen lisäksi, joiden riboflaviinin tuottonopeudet ovat korkeita, on toivottavaa saada riboflaviinia runsaasti 20 tuottava mikro-organismi, jonka riboflaviinin tuottonopeudet ovat stabiileja. Kyseisen keksinnön mukaiset spesifiset C. flareri -kannat on saatu solu-solufuusiomenettelyn tuotteesta, joka menettely suoritettiin ennen kannan C kehittämistä kuten kuvattu julkaisussa sarjan:o 811 234. 25 Solufuusiotuotteet omaavat kromosomien monikertakopioita, jolloin osia kromosomeista todennäköisesti menetetään ajan myötä geenien uudelleenjärjestäytymisen seurauksena niiden runsaslukuisuudesta johtuen. Riboflaviinin runsaan tuotannon suhteen valikoidut solufuusiotuotteet omaavat 30 erittäin todennäköisesti monikertakopioita riboflaviini-tuotantogeneistä. Kyky runsaaseen tuotantoon voidaan helposti menettää, jos tällaiset organismit ovat geneettisesti epästabiileja. Tämän vuoksi on toivottavaa valikoida riboflaviinia runsaasti tuottavia mikro-organismeja, joi-

den kyky kromosomaaliseen uudelleenjärjestäytymiseen on alentunut.

Bakteereissa ja Saccharomyces cerevisiaessa on saatu mutantteja, joilta puuttuu kyky DNA:nsa uudelleenjärjestämiseen. Clark et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 53 (1965) 451; Mazza et.al., Microbiologica 1 (1978) 111; Haynes et.al., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, s. 371. Joitain näitä mutanttityyppejä voidaan saada valikoimalla kasvaneen herkkyyden mutageeneille, kuten ultraviolettivalolle, suhteen. Riboflaviinia runsaasti tuottavien mikroorganismikantojen, ja erityisesti herkkyyden ultraviolettivalolle suhteen valikoitujen solufuusiotuotteiden, riboflaviinituotannon stabiilisuusasteen arvellaan kasvaneen.

Herkkyyks ultraviolettivalolle -valikointimenettely suoritetaan mutatoimalla mikro-organismilähtöpopulaatiota edellä kuvatun mukaisesti. Solulietteet maljoitetaan kasvualustalle, esimerkiksi YMG-alustalle, sellaisena laimenoksena, että maljaa kohden saadaan noin 100 - noin 400 pesäkettä, ja edullisemmin noin 150 - noin 200 pesäkettä maljaa kohden. Kun pesäkkeistä on tullut näkyviä, pesäkekuviot siirtokopioidaan kahdesti tuoreille agar-maljapinoille. Näkyviä ovat pesäkkeet, joiden halkaisija on noin 0,5 mm - noin 1,0 mm. Ensimmäinen siirtokopio altistetaan avoinpintaisena ultraviolettivalolle, jonka intensiteetti on tappavan alapuolella ei-mutatoiduille soluille. Sopiva ultraviolettivalotasoa voidaan määrittää altistamalla ei-mutatoituja soluja käsittäviä pesäkkeitä vaihteleville ultraviolettivalo-annoksille ja määrittämällä taso, jolla solut eivät kuole. Ei-mutatoidulle C. flareri -viljelmälle ultraviolettivalon tappavan alapuolella oleva taso on noin 5 joulesta neliömetrille (J/m^2) noin 20:een J/m^2 , ja edullisemmin noin 10 J/m^2 - noin 15 J/m^2 . Säteilystettyä siirtokopiota ja ei-säteilystettyä siirtokopiota inkuboidaan pesäkkeiden muodostamiseksi. Säteilystettyä maljaa on pi-

dettävä pimeässä, jotta näkyvä valo ei takauta ultraviolettilähtövalon vaikutusta. On selvitetty, että näkyvä valo kykenee korjaamaan säteilytyksen aiheuttamia geneettisiä vaurioita. Kun pesäkkeistä on tullut näkyviä, säteilytetyä siirtokopiota verrataan ei-säteilytettyyn maljaan, etsien ei-säteilytetyistä maljasta pesäkkeet, joita ei esiinny säteilytetyllä maljapinnalla. Tällä tavalla tunnistetaan pesäkkeet, joiden herkkyys ultraviolettilähtövalolle on kasvanut.

10 Kanta H valikoitiin herkkyys ultraviolettilähtövalolle -valikointimenettelyllä käyttäen kantaa G lähtöpopulaationa. Kanta H kykenee tuottamaan riboflaviinia 3,1 g/litra 7 päivässä 2 ml:n rullaputkimäärityksessä.

15 Riboflaviinia voidaan tuottaa fermentoimalla kantoja A ja B ja muita mikro-organismeja, jotka on valittu edellä kuvatuilla menettelyillä. Alan ammattilaisille lie-
nee ilmeistä, että tietyn kannan viljelmällä voidaan päästä korkeampiin riboflaviinisaantoihin, jos viljelämä on oleellisesti vapaa kontaminaatiosta mikro-organismeilla, jotka ovat riboflaviinia vähemmän tuottavasta kannasta. Tällaisia biologisesti puhtaita viljelmiä voidaan valmistaa muodostamalla viljelämä halutun kannan yhdestä mikro-organismista.

25 Kantojen A ja B ja edellä kuvatuilla menettelyillä valikoitujen mikro-organismien riboflaviinituotanto voi vaihdella käytettäessä erilaisia fermentointialustoja ja -menettelyitä. Vaikka alalla toimivat tuntevat monia fermentointimenettelyitä, on kehitetty fermentointialusta ja -menettely, joilla tuotetaan tasaisesti korkeita kasvunopeuksia ja runsasta riboflaviinin tuotantoa. Edullinen fermentointialusta riboflaviinin tuottamiseksi kannoilla A ja B on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3

	Yhdiste	Pitoisuus (g/l)
5	glukoosi	60,0
	glysiini	4,60
	urea	3,68
	KH ₂ PO ₄	1,00
	MgSO ₄	0,72
10		(mg/l)
	CoSO ₄ · 7H ₂ O	11,8
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,020
	H ₃ BO ₃	0,020
	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄	0,140
15	MNSO ₄	0,020
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	17,0
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2,0
	biotiini	0,0118

20 Kaikki kasvualusta-ainesosat glukoosia lukuunottamatta suodatussteriloidaan astiaan. Glukoosia (630 g/litra) autoklavoidaan 30 minuutin ajan 121°C:ssa 1 kg:n/cm² paineessa. Lähtöfermentointitilavuus 14 litran fermentorissa on 10,5 litraa. Kasvualustan pH säädetään arvoon 6,9 - 7,0 ennen siirrostusta.

25

30 Yleensä kasvualusta sisältää hiili-, typpilähteitä, fosfaatteja, sulfaatteja, magnesiumia, kaliumia, rautaa ja muita hivenmetalleja. Taulukossa 3 esitetyt pitoisuudet edustavat ainesosien lähtöpitoisuuksia, eivätkä minimipitoisuuksia, joita on ylläpidettävä fermentoinnin kestäessä. Huomattakoon, että joitakin ainesosia ei voida aluksi tarjota riittävän korkeina määrinä, jotta ne riittäisivät koko fermentoinnin ajaksi. Tällaisten ainesosien osalta

35 fermentointialustaa on tarkkailtava ja minimipitoisuuksia ylläpidettävä.

Vaikka glukoosi on mainittu edulliseksi hiililähteeksi kyseisessä fermentointialustassa, muutkin hiililähteet voivat soveltua aivan yhtä hyvin. Esimerkiksi kasvu-
alustaan sopivat sakkaroosi ja fruktoosi. Lisäksi muut ei-
5 sokerihiililähteet, kuten jotkut alkoholit, ovat soveliaita. Glukoosin lähtöpitoisuuden fermentointialustassa tulisi olla noin 45 g/litra - noin 60 g/litra, edullisemmin noin 50 g/litra - noin 60 g/litra, ja edullisimmin noin 55 g/litra - noin 60 g/litra.

10 Fermentointialusta sisältää myös glysiiniä. Glysiini on fermentointialustan kriittinen ainesosa tehokasta riboflaviinin tuotantoa silmälläpitäen. Vaikka glysiini on riboflaviinituotannolle välttämätön, liialliset glysiinimäärät inhiboivat C. flarerin kasvua. Korkeammassa pitoisuuksissa kuin noin 7 g/litra solukasvu pysähtyy. Hyvin alhaisissa glysiinipitoisuuksissa, suuruusluokkaa noin 0,5 g/litra, glysiini tulee nopeasti käytetyksi loppuun fermentointialustasta. Glysiini hyväksyttävät lähtöpitoisuudet ovat noin 2 g/litra - noin 6 g/litra, edullisemmin
15 noin 4 g/litra - noin 6 g/litra, ja edullisimmin noin 4 g/litra - noin 5 g/litra.

Fermentointialustaan viedään typpeä kasvun tukemiseksi ureaa lisäämällä. Urean lähtöpitoisuuden fermentointialustassa tulisi olla noin 2 g/litra - noin 9 g/litra,
25 edullisemmin noin 3 g/litra - noin 7 g/litra, ja edullisimmin noin 3 g/litra - noin 5 g/litra. Muutkin typpilähteet soveltuvat käytettäväksi kyseisessä fermentointialustassa. Tällaisten muiden lähteiden optimipitoisuudet voidaan määrittää suorittamalla koefermentointeja käyttäen typpilähteen vaihtelevia pitoisuuksia pitäen samalla muut
30 muuttujat vakioina ja määrittäen korkein riboflaviinin tuotto.

Fosfaattia viedään fermentointialustaan lisäämällä yksiemäksistä kaliumfosfaattia (KH_2PO_4). KH_2PO_4 :ää lisätään
35 aluksi fermentointialustaan pitoisuuksina noin 0,5 g/litra

- noin 2,0 g/litra, edullisemmin noin 0,75 g/litra - noin 1,5 g/litra, ja edullisimmin noin 0,85 g/litra - noin 1,15 g/litra. Fosfaatin ohella KH_2PO_4 tuottaa fermentointialustaan kaliumia. Kalium on välttämätön kasvulle, jolloin
5 kuitenkin pitoisuuksina, jotka tuovat riittävästi fosfaattia, lisätty kalium ylittää huomattavasti viljelmän ravintotarpeet. Vaikka fosfaatti voidaan lisätä muissa muodoissa, kuten natriumfosfaattina, kaliumfosfaatti on edullinen, koska kaliumravintotarve tulee tyydytetyksi.

10 Fermentointialusta sisältää myös magnesiumsulfaattia (MgSO_4) sulfaattilähteenä. Lähtöfermentointialusta sisältää tätä yhdistettä pitoisuuksina noin 0,5 g/litra - noin 1,0 g/litra, edullisemmin noin 0,6 g/litra - noin 0,8 g/litra, ja edullisimmin noin 0,65 g/litra - noin 0,75
15 g/litra. Vaikka fermentoitava viljelmä tarvitsee ravinnokseen magnesiumia, näissä pitoisuuksissa lisätty magnesium ylittää huomattavasti kyseisen tarpeen. Sulfaatti voidaan niinkään lisätä muissa yhdisteissä kuin magnesiumsulfaatti.

20 Fermentointialustaan sisältyy myös lukuisia hivenmineraalilähteitä, mukaanlukien koboltti-, kupari-, boori-, molybdeenin-, mangaani-, sinkki- ja rautalähteitä. Fermentointialusta tarvitsee ravinnokseen kutakin näistä aineksista, ja hivenmineraalin sisältävien yhdisteiden
25 lähtöpitoisuuksissa nämä tarpeet tulevat vaikeuksitta tyydytetyiksi, jolloin kyseisiä aineita ei tarvitse lisätä fermentoinnin kestäessä. Vaikka monet hivenmineraalit lisätään sulfaatteina, näissä yhdisteissä lisätyn sulfaatin määrä ei ole merkitsevä fermentoinnin kaikenkaikkisille
30 sulfaattivaatimuksille.

Kobolttia lisätään fermentointialustaan kobolttisulfaatin heptahydraatin ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) muodossa. Tämän yhdisteen lähtöpitoisuus on noin 10 mg/litra - noin 13 mg/litra, edullisemmin noin 11 mg/litra - noin 12 mg/litra,
35 ja edullisimmin noin 11,5 mg/litra - noin 12 mg/litra.

Koboltilla on niinikään edullinen vaikutus sen kilpaillessa raudan kanssa raudan mahdollisen inhiboivan vaikutuksen riboflaviinisynteesiin vähentämiseksi.

5 Kuparia lisätään fermentointialustaan kuparisulfaatin pentahydraatin ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) muodossa. Tätä yhdistettä viedään aluksi fermentointialustaan pitoisuuksina noin 0,015 mg/litra - noin 0,025 mg/litra, edullisemmin noin 0,017 mg/litra - noin 0,023 mg/litra, ja edullisimmin noin 0,018 mg/litra - noin 0,022 mg/litra. Kupari vaikuttaa
10 myös kilpailemalla raudan kanssa raudan mahdollisen inhiboivan vaikutuksen riboflaviinisynteesiin vähentämiseksi.

Sinkkiä lisätään fermentointialustaan sinkkisulfaatin heptahydraatin ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) muodossa. Tätä yhdistettä viedään aluksi fermentointialustaan pitoisuuksina noin 15
15 mg/litra - noin 20 mg/litra, edullisemmin noin 16 mg/litra - noin 19 mg/litra, ja edullisimmin noin 16 mg/litra - noin 18 mg/litra. Sinkki on myös raudan kilpailija vähentäen raudan mahdollista inhiboivaa vaikutusta riboflaviinisynteesiin.

20 Fermentointialusta käsittää myös rautalähteen, rautasulfaatin heptahydraattia ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fermentoinnin ravintovaatimuksien raudalle täyttämiseksi. Tämän yhdisteen lähtöpitoisuus fermentointialustassa on noin 1,5 mg/litra - noin 4,0 mg/litra, edullisemmin noin 1,7 mg/litra
25 - noin 3,0 mg/litra, ja edullisimmin noin 1,9 mg/litra - noin 2,3 mg/litra.

Booria lisätään fermentointialustaan boorihapon (H_3BO_3) muodossa. Boorihappoa viedään fermentointilähtöalustaan pitoisuuksina noin 0,015 mg/litra - noin 0,025
30 mg/litra, edullisemmin noin 0,017 mg/litra - noin 0,023 mg/litra, ja edullisimmin noin 0,019 mg/litra - noin 0,021 mg/litra. Booria voidaan lisätä fermentointialustaan muissa muodoissa edellyttäen, että boori on muodossa, joka on biologisesti solujen käytettävissä, sekä ei-myrkyllisessä muodossa.
35

Molybdeenia lisätään alustaan ammoniummolybdaatin (VI) $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24})$ muodossa. Tätä yhdistettä lisätään pitoisuuksina noin 0,12 mg/litra - noin 0,16 mg/litra, edullisemmin noin 0,13 mg/litra - noin 0,15 mg/litra, ja edullisimmin noin 0,135 mg/litra - noin 0,145 mg/litra.

Mangaania lisätään fermentointialustaan mangaani-sulfaatin (MnSO_4) muodossa. Tätä yhdistettä lisätään pitoisuutena noin 0,015 mg/litra - noin 0,025 mg/litra, edullisemmin noin 0,017 mg/litra - noin 0,023 mg/litra, ja edullisimmin noin 0,019 mg/litra - noin 0,021 mg/litra.

Fermentointialusta sisältää myös biotiinia, joka on hiivan yleensä ottaen tarvitsema vitamiini. Tätä vitamiinia lisätään pitoisuuksina, jotka ylittävät noin 0,005 mg/litra, edullisesti $>$ noin 0,009 mg/litra, ja edullisimmin $>$ noin 0,0118 mg/litra.

Kuten edellä esitetty, fermentoinnin kestäessä jotkut kasvualustan ainesosista tulevat käytetyiksi loppuun. Edullisesti fermentointia aloitettaessa tällaisten ainesosien pitoisuudet ovat suhteellisen korkeat, jolloin kasvu on tuettu tietyn pituiseksi ajaksi ennen kuin lisäykset ovat tarpeellisia. Näiden ainesosien edullisia pitoisuuksia ylläpidetään koko fermentoinnin ajan suorittamalla lisäyksiä sitä mukaa kun tasot laskevat fermentoinnin edistyessä. Ainesosien pitoisuustasoja fermentointialustassa voidaan tarkkailla esimerkiksi ottamalla fermentointialustasta ajoittain näytteitä, joista määritetään kyseiset pitoisuudet. Vaihtoehtoisesti sitten kun vakiofermentointimenettely on kehitetty, lisäykset voidaan suorittaa määräväliajoin, jotka vastaavat tunnettuja tasoja tiettyinä ajankohtina koko fermentoinnin kattaen. Kuten alalla toimivat huomannevat, ravinteiden kulutusnopeus kasvaa fermentoinnin aikana solutiheyden kasvualustassa kohotesa.

Fermentoinnin aikana tarkkaillaan glukoosin, glysiinin, urean ja fosfaatin pitoisuuksia. Kasvualustan glukoosipitoisuutta tarkkaillaan ja se pidetään lukemassa noin 20 g/litra - noin 60 g/litra, edullisemmin noin 20
5 g/litra - noin 40 g/litra, ja edullisimmin noin 30 g/litra. Nämä glukoosipitoisuudet saadaan säilymään fermentointialustassa syöttämällä konsentroitua glukoosiliuosta, jossa pitoisuus on noin 600 g/litra.

Samoin glysiinin pitoisuutta fermentointialustassa tarkkaillaan ja se pidetään arvossa noin 1 g/litra - noin
10 7 g/litra, edullisemmin noin 2 g/litra - noin 5 g/litra, ja edullisimmin noin 3 g/litra. Glysiinipitoisuutta voidaan säätää syöttämällä konsentroitua glysiiniliuosta, jossa pitoisuus on noin 200 g/litra.

Myös urean pitoisuutta fermentointialustassa tarkkaillaan ja se pidetään pitoisuuksissa noin 1 g/litra -
15 noin 9 g/litra, edullisemmin noin 2 g/litra - noin 5 g/litra, ja edullisimmin pitoisuudessa noin 3 g/litra. Fermentointialustan ureapitoisuudet pidetään näissä rajoissa syöttämällä konsentroitua urealiuosta, jossa pitoisuus on
20 noin 100 g/litra.

Fosfaatti- (PO_4^-) pitoisuus fermentointialustassa pidetään arvossa noin 0,03 g/litra - noin 0,3 g/litra, edullisemmin noin 0,05 g/litra - noin 0,2 g/litra, ja
25 edullisimmin noin 0,1 g/litra. Nämä pitoisuudet säilytetään syöttämällä konsentroitua kaliumfosfaattiliuosta, jossa pitoisuus on noin 15,75 g/litra. Sen lisäksi, että fosfaattipitoisuutta ylläpidetään lisäämällä kaliumfosfaattia, myös sulfaattipitoisuuksia ylläpidetään lisäämällä
30 magnesiumsulfaattia fermentointialustaan, jolloin kaliumfosfaattisyöttöliuokseen sisällytetään magnesiumsulfaattia. Magnesiumsulfaatin pitoisuus syöttöliuoksessa on noin 11,37 g/litra.

Huomattakoon, että glukoosi-, glysiini-, urea-,
35 fosfaatti- ja sulfaattisyöttöliuoksia lisätään fermentoin-

tialustaan tiettyihin näiden yhdisteiden pitoisuuksiin pääsemiseksi fermentointialustassa tai kyseisten pitoisuuksien ylläpitämiseksi. Täten edellä esitetyt lisättävien syöttöliuoksien pitoisuudet eivät ole kyseiselle keksinnölle kriittisiä tai sitä rajoittavia.

Kyseisen keksinnön mukaisessa fermentointimenetelyssä valmistetaan fermentointialusta edellä kuvatun mukaisesti. Tähän kasvualustaan siirrostetaan viljelmänä riboflaviinia tuottavia mikro-organismeja, ja erityisesti C. flareri -kantoja. Onnistuneeseen fermentointiin pääsemiseksi siirrosteen tulee muodostaa minimisiirrosteitiheys. Ollaan hyvin perillä siitä, että fermentointioperaatiot edellyttävät tiettyä lähtöminimisiirrosteitiheyttä, jotta solukasvu käynnistyisi. Vaikkakaan minimisiirrosteitiheyttä kyseiselle menetelmälle ei ole määrätty, on määrätty, että menestyksekkäisiin fermentointeihin voidaan päästä lähtösiirrosteen tuottaessa optisen tiheyden noin 0,06 620 nm:n aallonpituudella (1 cm:n kyveti). Korkeampia lähtötiheyksiä tuottavat siirrosteet ovat hyväksyttäviä ja lyhentävät solukasvua edeltävää lag-vaihetta. Lähtösiirrosteitiheyksissä < noin 0,06 solukasvun käynnistymistä edeltävä lag-aika pitenee, jolloin lopulta joudutaan minimisiirrosteitiheyteen, joka ei ylläpidä kasvua.

Sitten kun siirrostus fermentointialustaan on suoritettu, fermentoinnin annetaan edetä ja glukoosin, glysiinin, urean, fosfaatin ja sulfaatin pitoisuuksia tarkkaillaan pitäen ne edellä esitetun mukaisissa pitoisuuksissa. Koko fermentoinnin ajan kasvualustan lämpötilan tulisi olla noin 29° - noin 31°C, edullisemmin noin 29,5° - noin 30,5°C, ja edullisimmin noin 29,9° - noin 30,1°C.

Liunneen hapen määrä fermentointialustassa tulee pitää mikro-organismien käyttöön riittävästi happea tuotavien tasojen yläpuolella. Kasvualustan sisältämää liunneen hapen määrää voidaan säätää ilmastamalla ja sekoittamalla. Kasvualustan liunneen hapen määrä pidetään edul-

lisesti > noin 20 %:n kyllästysasteessa, ja edullisemmin > noin 40 %:n kyllästysasteessa.

Kasvualustan pH säädetään ennen siirrostusta. Kasvualustan pH:ta voidaan säätää lisäämällä erilaisia alalla tunnettuja yhdisteitä, kuten KOH, NaOH. Tämä lähtö-pH voi olla noin 6 - noin 8, edullisemmin noin 6,5 - noin 7,5, ja edullisimmin noin 6,9 - 7,0. On todettu, että fermentoinnin aikana kasvualustan pH laskee näyttävästi suunnilleen samaan aikaan kuin tapahtuu voimakas lisääntyminen solukasvussa ja riboflaviinituotannossa. Nämä muutokset ajoittuvat niinkään samanaikaisiksi ensimmäisen lisäystarpeen fosfaatille, glukoosille, urealle ja glysiinille kanssa. Tyypillisesti tämä kasvualustan muuttuminen happamaksi todetaan ajankohtana noin 35 tuntia - noin 55 tuntia, tyypillisemmin noin 40 tuntia - noin 50 tuntia, ja tyypillisimmin noin 42 tuntia - noin 48 tuntia.

Tyypillisesti kasvualustan pH laskee niinkin alas kuin 3,5, ja tyypillisemmin noin 3,9. Fermentointiopeeraation jäljellä olevana aikana pH pysyy tyypillisesti arvossa noin 3,9 - noin 6,0, tyypillisemmin noin 3,9 - noin 5,5, ja tyypillisimmin noin 3,9 - noin 5,1. Sitten kasvualustan pH tyypillisesti kohoaa takaisin arvoon noin 5,0 - noin 7,0, ja tyypillisemmin arvoon noin 6,0 - noin 7,0. Tämän pH-arvon kohoamisen tapahtuessa solukasvu yleensä pysähtyy.

Seuraavat kokeelliset tulokset tarjotaan havainnollistamismielessä, eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa keksinnön kattamaa aluetta.

Esimerkki I

30 Rullaputkiriboflaviinimääritys

Kanta B -pesäke siirrostettiin koeputkeen, jossa oli 2,5 ml täydennettyä määriteltyä kasvualustaa (katso taulukko I-A), ja sen annettiin kasvaa 30°C:ssa kohtalaisesti sekoittaen 4 päivän ajan. Koeputkiin, joissa oli 2 ml täydennettyä määriteltyä kasvualustaa, siirrostettiin

0,02 ml kasvanutta viljelmää ja inkuboitiin 30°C:ssa koh-
 talaisesti sekoittaen 7 päivän ajan. Viljelmiä laimennet-
 tiin tekijällä 500 ja kuumennettiin 60° - 70°C:ssa 40 mi-
 nuutin ajan riboflaviinikiteiden liuottamiseksi. Liuenneen
 5 liuoksen absorbanssi 445 nm:n aallonpituudella oli 0,245.
 Tämä arvo kerrottiin 500:lla laimennoksen korjaamiseksi ja
 kerrottiin 31,3:lla, jolloin saatiin riboflaviinipitoisuu-
 deksi $3,8 \times 10^3$ mg/litra eli 3,8 g/litra.

10

TAULUKKO I-A

Täydennetty määritelty kasvualusta

	4B	-
	glysiini 0,23 %	
	CoCl ₂	1 µg/ml
15	ZnCl ₂	10 µg/ml
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,2 µg/ml
	YMG-kasvualusta	10 %
	sakkarooosi	6 %

20

Esimerkki II

Kannan valinta

Kantaa C mutatoitiin NTG:llä NTG-pitoisuuden olles-
 sa 0,10 mg/ml 60 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Nämä
 mutatoituneet solut otettiin talteen, pestiin ja lietettiin
 25 fysiologiseen suolaliuokseen. Mutatoituneet solut maljoitet-
 tiin täydennetylle määritellylle kasvualustalle, joka si-
 sälsi 750 µg/ml 2-deoksiglukoosia. 10 päivän kuluttua
 identifioitiin 125 resistenttien mutanttien muodostamaa
 pesäkettä, ja niiden riboflaviinituottoa testattiin edellä
 30 kuvatulla rullaputkiriboflaviinimäärityksellä. Kanta D oli
 tuotteliain mutantti, ja sen riboflaviinituottokyky oli
 1,58 g/litra/7 päivää.

35

Kantaa D mutatoitiin NTG:llä edellä kuvattuun ta-
 paan NTG-pitoisuuden ollessa 0,10 mg/ml 60 minuutin ajan
 huoneen lämpötilassa. Käsitellyt solut otettiin talteen,

pestiin ja lietettiin vastaaviin tilavuuksiin fysiologista suolaliuosta. Tätä viljelmää maljoitettiin täydennetylle määritellylle kasvualustalle, joka sisälsi 2,23 % glysiiniä riittäväksi substraatiksi riboflaviinisynteesille sekä
5 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:ta pitoisuuden 5 $\mu\text{g/ml}$. 10 päivän inkuboinnin 30°C :ssa jälkeen identifioitiin 25 resistenttien mutanttien muodostamaa pesäkettä ja niiden riboflaviinisynteesiä testattiin edellä kuvatulla rullaputkiriboflaviinimäärityksellä. Eniten riboflaviinia tuottava kanta oli mutanttikanta E, ja sen riboflaviinin tuottokyky oli 1,70 g/litra/7 päivää.
10

Kantaa E mutatoitiin NTG:llä NTG-pitoisuuden ollessa 0,10 mg/ml 60 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Käsitellyt solut otettiin talteen, pestiin ja lietettiin
15 vastaaviin tilavuuksiin fysiologista suolaliuosta. Valmistettiin tyhjennetty kasvualusta kasvattamalla kantaa E täydennetyssä määritellyssä kasvualustassa 30°C :n lämpötilassa samalla sekoittaen 3 viikon ajan. Solut poistettiin tästä viljelmästä sentrifugoimalla ja suodattamalla 0,5
20 mikronin membraanisuodattimella. Supernatanttiin lisättiin sakkaroosia (6 %), glysiiniä (0,23 %) ja agar-agaria (2 %). Mutanttikanta E -viljelämä maljoitettiin tälle kasvualustalle ja inkuboitiin 30°C :ssa 10 päivän ajan. Väriltään keltaisiksi identifioitiin 35 pesäkettä ja niiden
25 riboflaviinituottoa testattiin rullaputkiriboflaviinimäärityksellä. Tällä valikointimenettelyllä saatiin kanta A ja sen riboflaviinituottokyky on 2,5 g/litra/7 päivää.

Kantaa A mutatoitiin NTG:llä tämän pitoisuuden ollessa 0,10 mg/ml 60 minuutin inkuboinnissa huoneen lämpötilassa. Käsitellyt solut otettiin talteen, pestiin ja
30 lietettiin vastaaviin tilavuuksiin fysiologista suolaliuosta.

Valmistettiin tyhjennetty kasvualusta kasvattamalla ei-mutatoitoidun kannan A soluja taulukossa 3 kuvatun mukaisessa kasvualustassa 10 päivän ajan 450 litran fermento-
35

rissa 30°C:ssa samalla sekoittaen. Solut poistettiin tästä viljelmästä ultrasuodattamalla. Valmistettiin kiinteä valikointikasvualusta, jossa 50 % nestetilavuudesta muodosti tyhjennetty kasvualusta, josta solut oli poistettu, ja
5 toiset 50 % nestetilavuudesta oli vettä. Mutatoidut kannan A solut maljoitettiin tälle kasvualustalle ja inkuboitiin 10 päivän ajan 30°C:ssa. Identifioitiin 60 resistenttien mutanttien muodostamaa pesäkettä ja niiden riboflaviini-
10 tuotto testattiin. Tämän menettelyn mukaan eniten riboflaviinia tuotti kanta F, jonka riboflaviinituottokyky oli 3,4 g/litra/7 päivää rullaputkiriboflaviinimäärityksessä.

Kantaa F mutatoitiin NTG:llä tämän pitoisuuden ollessa 0,10 mg/ml 60 minuutin inkuboinnissa huoneen lämpötilassa. Käsitellyt solut otettiin talteen, pestiin ja
15 lietettiin fysiologiseen suolaliuokseen. Näitä soluja valikoitiin täydennetyllä määritellyllä kasvualustalla, joka sisälsi 100 µg/ml tubersidiinia. 10 päivän inkuboinnin 30°C:ssa jälkeen identifioitiin 25 elinkelpoisten kantojen muodostamaa pesäkettä, joiden riboflaviinituotto testat-
20 tiin. Flavinogeenisin oli kanta B, ja sen riboflaviinituottokyky oli 3,8 g/litra/7 päivää.

Kantaa A käytettiin lähtöpopulaationa myös toisessa valikointioperaatiossa. Kannan A viljelmää mutatoitiin NTG:llä tämän pitoisuuden ollessa 0,10 mg/ml 60 minuutin
25 inkuboinnissa huoneen lämpötilassa. Käsitellyt solut otettiin talteen, pestiin ja lietettiin fysiologiseen suolaliuokseen. Tähän viljelmään kohdistettiin tubersidiinivalinta maljoittamalla mutatoidut solut täydennetylle määritellylle kasvualustalle, joka sisälsi 100 µg/ml tubersidiinia. 10 päivän inkuboinnin 30°C:ssa jälkeen valittiin 20
30 elinkelpoista pesäkettä, joiden riboflaviinituotto testattiin. Flavinogeenisin oli kanta G, joka tuotti 2,9 g/litra/7 päivää.

Kantaa G käytettiin lähtöpopulaationa herkkyyssult-
35 raviolettivalolle -valikointioperaatiossa. Kantaa G muta-

toitiin NTG:llä tämän pitoisuuden ollessa 0,10 mg/ml 60 minuutin inkuboinnissa huoneen lämpötilassa. Käsitellyt solut otettiin talteen, pestiin ja lietettiin fysiologiseen suolaliuokseen. Tätä solulietettä laimennettiin tekijällä 1:10⁴, jolloin solupitoisuudeksi tuli 1000 solua/ml. 5 0,1 ml solulietettä maljoitettiin YMG-kasvualustalle ja inkuboitiin 3 päivän ajan 30°C:ssa. Tässä vaiheessa pesäkkeet olivat näkyviä ja ne siirtokopioitiin kahdesti tuoreille agar-maljapinnoille. Ensimmäinen siirtokopio altistettiin pinnaltaan avoimena 17 J:lle/m² ultraviolettivaloa. 10 Säteilystettyä maljaa inkuboitiin pimeässä ei-säteilystetyn siirtokopiomaljan ohella 30°C:ssa 4 päivän ajan pesäkkeiden muodostamiseksi. Säteilystettyjä ja ei-säteilystettyjä maljoja verrattiin ei-elinkelpoisten pesäkkeiden tunnistamiseksi, jotka osoittaisivat ultraviolettivalolle herkät 15 mutantit. Nämä mutantit identifioitiin ei-säteilystetyltä maljapinnalta ja määritettiin niiden riboflaviinituotto. Tällä menetelmällä identifioitiin 14 pesäkettä ja tuoteliain mutantti oli kanta H, joka kykenee tuottamaan 3,1 20 g/litra riboflaviinia 7 päivässä.

Esimerkki III

Riboflaviinituotannon koeajo n:o 1 suoritettiin 14 litran fermentorissa. Tässä ajossa käytetyn fermentointialustan koostumus on esitetty taulukossa 3. Kaikki kasvualusta-ainesosat glukoosia lukuunottamatta suodatussteriloitiin fermentointitankkiin ennen lisäämistä kasvualustan loppuosaan. Glukoosia autoklavoitiin 30 minuutin ajan 25 121°C:ssa 1 kg:n/cm² paineessa. Kasvualustan pH säädettiin arvoon 6,9 - 7,0 ennen siirrostuksen suorittamista. Fermentointitankkiin siirrostettiin kannan A viljelmää optiseen lähtötiheyteen 0,06 620 nm:n aallonpituudella (1 cm:n kyvetti). 30

Koeajo n:o 1 kesti 240 tuntia. Tänä aikana tarkkailtiin optista tiheyttä 620 nm:n aallonpituudella, riboflaviinia, pH:ta, lämpötilaa, glysiiniä, ureaa, fosfaattia 35

ja glukoosia. Tulokset tästä fermentoinnista on esitetty taulukoissa III-A ja III-B. Riboflaviinin loppupitoisuuden 15,93 g/litra päästiin 240 tunnissa.

5

TAULUKKO III-A

Aika (tuntia)	Optinen tiheys (620 nm)	Ribofla- viini (g/l)	pH	Lämpö- tila (°C)	
0	0,06	0,000	6,92	30	
10	26,5	1,41	0,018	6,01	30
	45,5	25,25	0,465	3,97	29,7
	75,5	105,0	3,25	4,4	29,7
	103,0	129,0	6,4	4,7	29,6
	127,0	121,0	8,01	5,06	29,6
15	143,5	122,0	9,17	5,02	29,5
	174,5	109,0	10,94	4,74	29,7
	190,5	142,0	12,96	4,35	29,6
	204,0	152,0	13,62	4,25	29,7
	240,0	169	15,93	3,92	29,4

20

TAULUKKO III-B

Aika (tuntia)	Glysiini (620 nm)	Urea (g/l)	Fosfaatti (g/l)	Glukoosi (g/l)	
0	4,43	4,52	0,650	74,8	
25	32	4,40	4,99	0,587	80,3
	45,5	4,13	3,84	0,358	57,2
	56	3,06	3,30	0,087	29,9
	70	4,00	3,62	0,298	32,1
	85	4,44	3,48	0,276	31,2
30	103	4,09	2,96	0,268	40,3
	127,5	4,00	3,77	0,330	41,9
	143,5	4,32	1,31	0,183	46,7
	167,5	3,15	5,14	0,337	50,9
	190,5	2,70	5,93	0,128	33,4
35	215,5	2,40	5,86	0,101	35,3
	240,0	2,0	6,51	0,175	34,3

Esimerkki IV

Riboflaviinituotannon koeajo n:o 2 suoritettiin 450 litran fermentointitankissa ja se kesti 200 tuntia. Fermentointialusta ja siirrostevä valmistettiin samalla tavalla kuin esimerkissä III. Tulokset tästä koeajosta on esitetty taulukossa IV-A. Riboflaviinin loppupitoisuuteen 21,0 g/litra päästiin 200 tunnissa koeajossa n:o 2.

TAULUKKO IV-A

10

Aika (tuntia)	Optinen tiheys (620 nm)	Riboflaviini (g/l)	pH	Lämpötila (°C)	Glysiini (g/l)	Urea (g/l)	Gluukoosi (g/l)	
0	0,0	0,0	6,95	30	5,2	4,2	68,8	
15	40	25,0	0,0	4,60	30	4,0	2,4	47,8
	60	50,0	2,5	5,40	30	6,8	3,4	32,2
	80	150	6,0	5,2	30	6,7	4,4	43,0
	100	175	9,0	5,9	30	7,5	6,5	47,9
	140	225	15,0	5,0	30	7,0	7,7	44,5
20	200	210	21,0	5,3	30	7,0	6,3	47,2

Esimerkki V

Riboflaviinituotannon koeajo n:o 3 suoritettiin 450 litran fermentointitankissa ja se kesti 200 tuntia. Fermentointialusta ja siirrostevä valmistettiin samalla tavalla kuin esimerkissä III. Tulokset tästä koeajosta on esitetty taulukossa V-A. Riboflaviinin loppupitoisuuteen 16,0 g/litra päästiin 200 tunnissa tässä koeajossa.

25

TAULUKKO V-A

	Aika (tuntia)	Optinen tiheys (620 nm)	Ribo- flaviini (g/l)	pH	Lämpö- tila (°C)
5	0	0,06	0,0	6,95	30
	40	10,0	0,0	5,00	30
	60	25,0	1,0	4,1	30
	80	75,0	3,0	4,7	30
10	100	110	6,0	5,2	30
	140	150	10,0	5,0	30
	200	180	16,0	4,4	30

TAULUKKO V-A (jatkuu)

	Aika (tun- tia)	Gly- siini (g/l)	Urea (g/l)	Fos- faati (g/l)	Glu- koosi (g/l)
	0	-	4,2	0,630	47,6
20	40	-	4,3	0,620	42,4
	60	-	3,7	0,400	56,6
	80	4,5	2,8	0,070	35,4
	100	5,0	1,7	0,180	41,8
	140	7,4	3,3	0,050	34,8
25	200	0,7	5,7	0,100	44,2

Esimerkki VI

Suoritettiin sarja koeajoja pitäen kaikki olosuhteet vakiona lukuunottamatta $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -pitoisuutta, jota vaihdeltiin pitoisuuksissa 0 mg/litra, 1 mg/litra, 2 mg/litra ja 3 mg/litra. Fermentoinnit suoritettiin 150 litran pilot-mittakaavatankeissa käyttäen taulukon 3 mukaista fermentointialustaa. Lisäksi fermentointialustaan lisättiin seuraavia koostumuksia.

Koostumus	Pitoisuus (g/litra)
Hiivauute	1,04
Mallasuute	1,04
Peptoni	1,73

5

Fermentointiajoissa käytettiin kantaa A. Solukasvua ja riboflaviinituotantoa tarkkailtiin fermentoinnin aikana. Taulukossa VI-A on esitetty tulokset solukasvusta kyseisissä neljässä fermentoinnissa. Taulukossa VI-B esitetään tulokset riboflaviinituotannolle kyseisissä neljässä fermentoinnissa. Taulukossa VI-C esitetään riboflaviinituotannon ja solukasvun väliset päätösuhteet kullekin näistä neljästä fermentoinnista. Kuten nähdään taulukosta VI-C, korkeammassa $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -pitoisuuksissa solua kohden muodostuneen riboflaviinin määrä kasvaa. Kun huomattaviin lisäyksiin tässä suhteessa päästään pitoisuuksissa 1 mg/litra ja 2 mg/litra, kasvu pitoisuudesta 2 mg/litra pitoisuuteen 3 mg/litra on häviävän pieni.

20

TAULUKKO VI-A

	Solu- massa (g/l)	Solu- massa (g/l)	Solu- massa (g/l)	Solu- massa (g/l)
25	Aika (tun- tia) 38	($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 0)	($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 1 mg/l)	($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 2 mg/l)
	62	-	-	5,3
30	86	4,8	9,6	10,1
	110	9,9	14,0	14,8
	134	11,2	21,9	20,7
	164	15,9	23,2	23,3
				26
				26,5
				28,3

35

TAULUKKO VI-B

	Ribo- flaviini (g/l)	Ribo- flaviini (g/l)	Ribo- flaviini (g/l)	Ribo- flaviini (g/l)
5	(FeSO ₄ · 7H ₂ O) = 0)	(FeSO ₄ · 7H ₂ O) = 1 mg/l)	(FeSO ₄ · 7H ₂ O) = 2 mg/l)	(FeSO ₄ · 7H ₂ O) = 3 mg/l)
	86	2,54	4,12	5,26
	110	4,05	5,72	7,13
10	134	5,03	8,10	9,32
	164	6,52	9,34	10,20

TAULUKKO VI-C

15 Kannan A yksikkökasvua kohden muodostunut riboflaviini

FeSO ₄ ·7H ₂ O (mg/litra)	0	1	2	3
<u>riboflaviini (g/litra)</u>				
solupaino (g/litra)	0,20	0,28	0,35	0,36

20

Esimerkki VII

25 Suoritettiin sarja koeajoja tyhjennetyn kasvualustan vaikutuksen kantaan A määrittämiseksi. Fermentoinnit suoritettiin 90 tuntia kestävinä 14 litran fermentoreissa käyttäen taulukon 3 mukaista fermentointialustaa. Kaikki olosuhteet olivat identtiset lukuunottamatta, että kussakin koeajoista tyhjennetty kasvualusta muodosti eri osuuden fermentointialustanesteestä. Ensimmäinen koeajo ei käsittänyt lainkaan tyhjennettyä kasvualustaa, toinen käsitti 20 %, kolmas 40 %, neljäs 50 % ja viides 80 %. Riboflaviinituotanto kussakin koeajossa eri ajankohtina fermentointiajon aikana on esitetty alla taulukossa VII-A.

30

TAULUKKO VII-A

Tyhjennetyin kasvialustan vaikutus riboflaviinituotantoon (g/litra)

	0 %	20 %	40 %	60 %	80 %
5	t.k.a:aa	t.k.a:aa	t.k.a:aa	t.k.a:aa	t.k.a:aa
Tuntia					
42	0,5	1,1	0,6	0,3	0,0
58	1,3	2,4	1,4	0,6	0,4
74	3,1	4,5	2,6	1,2	0,7
89	4,9	6,1	4,6	2,6	1,9
10					

Pitoisuudessa 20 % tyhjennettyä kasvialustaa havaitaan aluksi riboflaviinituotannon stimuloituminen. Kuitenkin tyhjennetyin kasvialustan pitoisuuden kasvaessa riboflaviinituotanto inhiboituu yhä enemmän.

15 Vaikka kyseisen keksinnön eri suoritusmuotoja on kuvattu yksityiskohtaisesti, on ilmeistä, että alan ammattilaisten mieleen juolahtaa näiden suoritusmuotojen modifikaatioita ja adaptaatioita. Halutaan kuitenkin yksikäs-

20 adaptaatiot kuuluvat kyseisen keksinnön kattamaan alueeseen sellaisena, kuin se esitetään seuraavissa patenttivaatimuksissa.

Patenttivaatimukset

1. Candida famata -kanta, t u n n e t t u siitä, että sen ATCC-talletusnumero on 20849, ja sen jälkeläiset.

5 2. Candida famata -kanta, t u n n e t t u siitä, että sen ATCC-talletusnumero on 20850, ja sen jälkeläiset.

3. Menetelmä mikro-organismien valikoimiseksi, joka pystyy tuottamaan suuria määriä riboflaviinia ja joka on Candida famata -kanta, kuten patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen kanta, t u n n e t t u siitä, että:

10 a) ensimmäisten mikro-organismien muodostamaa populaatiota kasvatetaan vesipitoisessa ravinnekasvualustassa, kunnes solukasvu pysähtyy;

15 b) ensimmäiset mikro-organismit poistetaan vesipitoisesta ravinnekasvualustasta tyhjennetyin kasvualustan muodostamiseksi;

c) muodostetaan valikointikasvualusta, joka sisältää tyhjennettyä kasvualustaa;

20 d) jälkimmäisten mikro-organismien muodostama populaatiota mutatoidaan;

e) jälkimmäisten mikro-organismien muodostama mutaatio viedään valikointialustaan; ja

25 f) valitaan jälkimmäisten mikro-organismien muodostamasta mutatoidusta populaatiosta aiempaa parempi mikro-organismi, joka kykenee kasvamaan valikointialustalla.

4. Menetelmä riboflaviinin tuottamiseksi viljelemällä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisia riboflaviinia tuottavia lajin Candida famata -hiivakantoja fermentointialustassa, t u n n e t t u siitä, että:

30 a) hiivakantoja siirrostetaan fermentointialustaan, joka käsittää rautalähteen, joka tuottaa rautapitoisuuden noin 5,4 µM - 15 µM, sekä assimiloituvia hiili-, typpilähteitä sekä hivenravinteita, jolloin käytetään hiivakantoja, joiden ATCC-talletusnumerot ovat 20849 tai 20850, tai
35 näiden jälkeläisiä ja jolloin mikro-organismit tuottavat

ainakin noin 10 grammaa riboflaviinia litraa kohden fermentointialustaa kuudessa (6) päivässä;

b) fermentointialustassa ylläpidetään ravinnepitoisuuksia, jotka riittävät tukemaan solukasvua ja riboflaviinin tuotantoa; ja

c) riboflaviini otetaan talteen fermentointialustasta.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että fermentointialusta käsittää edelleen glysiiniä pitoisuutena noin 1 - 7 g/litra.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että ylläpitovaihetta jatketaan ainakin noin kuuden (6) päivän ajan ja että muodostuu ainakin noin 10 g/litra riboflaviinia.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että fermentointialusta käsittää lisäksi:

a) glysiiniä pitoisuutena noin 1 - 7 g/litra;

b) fosfaattilähteen;

c) sulfaattilähteen; ja

d) koboltti-, kupari-, boori-, molybdeeni-, mangaani-, sinkki-, kalium- ja magnesiumlähteen.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että hiililähde käsittää glukoosia, typpilähde käsittää ureaa, fosfaatti- ja kaliumlähteet käsittävät KH_2PO_4 :a, magnesium- ja sulfaattilähteet käsittävät MgSO_4 :a, kobolttilähde käsittää CoSO_4 :a ja kuparilähde käsittää CuSO_4 :a.

9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä riboflaviinia tuottavan mikro-organismien valitsemiseksi, tunnetaan siitä, että

a) ensimmäisen mikro-organismilajin muodostamaa populaatiota kasvatetaan vesipitoisessa ravinnekasvualustassa, kunnes solukasvu pysähtyy;

b) ensimmäinen mikro-organismilaji poistetaan vesipitoisesta ravinnekasvualustasta tyhjennetyin kasvualustan muodostamiseksi;

c) muodostetaan valikointikasvualusta, joka valikointialusta käsittää tyhjennettyä kasvualustaa minimi-inhibitiopitoisuuden toiselle mikro-organismilajille, joka kykenee tuottamaan riboflaviinia;

5 d) toisen mikro-organismilajin muodostamaa populaatiota mutatoidaan ensimmäisen mutatoidun populaation saamiseksi;

e) ensimmäinen mutatoitu populaatio viedään valikointialustaan;

10 f) valitaan ensimmäisestä mutatoidusta populaatiosta ensimmäinen valittu mikro-organismikanta, joka ensimmäinen valittu mikro-organismikanta on resistentti tyhjentyn kasvualustan aiheuttamalle inhibitiolle;

15 g) ensimmäisen valitun mikro-organismikannan muodostamaa populaatiota mutatoidaan jälkimmäisen mutatoidun populaation saamiseksi;

20 h) jälkimmäistä mutatoitua populaatiota viljellään ravinnekasvualustalla, joka sisältää tubersidiinia minimi-inhibitiopitoisuuden ensimmäiselle valitulle mikro-organismikannalle; ja

i) valikoidaan jälkimmäisestä mutatoidusta populaatiosta toinen valittu mikro-organismikanta, joka kykenee muodostamaan pesäkkeitä ravinnekasvualustalle.

Patentkrav

1. Candida famata-stam, k ä n n e t e c k n a d
av, att den har ett ATCC-depositionsnummer 20849, och dess
5 avkomma.

2. Candida famata-stam, k ä n n e t e c k n a d
av, att den har ett ATCC-depositionsnummer 20850, och dess
avkomma.

3. Förfarande för att välja en mikroorganism, som
10 förmår att producera stora mängder riboflavin och som är
en Candida famata -stam, såsom en stam enligt patentkrav
1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av, att man

a) odlar en population av första mikroorganismer i
ett vattenhaltigt näringsmedium tills cellväxten upphör;

15 b) avlägsnar de första mikroorganismerna från det
vattenhaltiga näringsmediet för erhållande av ett utarmat
medium;

c) bildar ett selektionsmedium, vilken omfattar det
utarmade mediet;

20 d) muterar en population av andra mikroorganismer;

e) inför den andra, muterade populationen i selek-
tionsmediet; och

f) väljer från den andra muterade populationen en
mikroorganism, som är bättre än den tidigare och förmår
25 växa på selektionsmediet.

4. Förfarande för framställning av riboflavin genom
odling av riboflavinproducerande jäststammar av arten Can-
dida famata i ett fermentationsmedium, k ä n n e t e c k -
n a t av, att man

30 a) ympar ett fermentationsmedium med jäststammar,
vilket fermentationsmedium omfattar en järnkälla, vilken
åstadkommer en järnkonzentration av ca 5,4 μM - 15 μM , och
assimilerbara källor av kol, kväve och närande spårämnen,
varvid jäststammar med ATCC-depositionsnumren 20849 och
35 20850 eller deras avkomma används och varvid mikroorganis-

merna producerar åtminstone ca 10 gram riboflavin per liter fermentationsmedium på sex (6) dagar;

b) i fermentationsmediet upprätthåller näringskoncentrationer som är tillräckliga för befrämjande av celltillväxt och riboflavinproduktion; och

c) tillvaratager riboflavin från fermentationsmediet.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e - t e c k n a t av, att fermentationsmediet ytterligare omfattar glycin i en koncentration av ca 1 - 7 g/l.

6. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e - t e c k n a t av, att upprätthållningssteget utföres i åtminstone sex (6) dagar och att åtminstone ca 10 g/l riboflavin produceras.

7. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e - t e c k n a t av, att fermentationsmediet ytterligare omfattar:

a) glycin i en koncentration av ca 1 g/l - 7 g/l;

b) en fosfatkälla;

c) en sulfatkälla; och

d) källor av kobolt, koppar, bor, molybden, mangan, zink, kalium och magnesium.

8. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e - t e c k n a t av, att kolkällan omfattar glukos, att kvävekällan omfattar karbamid, att fosfat- och kaliumkällorna omfattar KH_2PO_4 , att magnesium- och sulfatkällorna omfattar MgSO_4 , att koboltkällan omfattar CoSO_4 och att kopparkällan omfattar CuSO_4 .

9. Förfarande för att välja en riboflavinproducerande mikroorganism, k ä n n e t e c k n a t av, att man

a) odlar en population av en första mikroorganismart i ett vattenhaltigt näringsmedium tills cellväxten upphör;

b) avlägsnar den första mikroorganismarten från det vattenhaltiga näringsmediet för erhållande av ett utarmat medium;

c) bildar ett selektionsmedium, som omfattar det utarmade mediet i en hämmande minimikoncentration för en andra mikroorganismart med förmåga att producera riboflavin;

5 d) muterar en population av den andra mikro-organismarten för erhållande av en första muterad population;

e) inför den första muterade populationen i selektionsmediet;

10 f) väljer en första, utvald mikroorganismstam från den första muterade populationen, varvid den första utvalda mikroorganismstammen motstår inhibition genom det utarmade mediet;

15 g) muterar en population av den första utvalda mikroorganismstammen för erhållande av en andra, muterad population;

h) odlar den andra, muterade populationen på ett näringsmedium, som innehåller tubercidin i en hämmande minimikoncentration för den första, utvalda mikroorganismstammen; och

20 i) väljer en andra, utvald mikroorganismstam från den andra, muterade populationen, varvid den andra utvalda mikroorganismstammen har förmåga att bilda kolonier på näringsmediet.