



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

215 202

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 28 12 79
(21) (PV 9518-79)
(89) 778 256, SU

(51) Int. Cl.³ C 12 P 13/08

(40) Zveřejněno 15 09 81
(45) Vydáno 01 05 84

(75)
Autor vynálezu

SAKSE AUSMA KARLOVNA,
RUKLIŠA MAJA PAVLOVNA,
SELGA SIGISMUND EDGAROVICH,
VIJESTUR ULDIS ERNESTOVICH,
LEJTE MARA PAVLOVNA,
KLJAVINJA SKAJDRITE JULJEVNA,
ŠVINKA JURIS EVALDOVIC,
BEKER MARTIN EKABOVICH,

RIGA (SU)

(54)

Způsob získávání α -lyzinu

Vynález se týká mikrobiologického průmyslu, zejména způsobu získávání α -lyzinu mikrobiologickou cestou.

Způsob spočívá v tom, že při submerzní kultivaci producentů α -lyzinu v aerobních podmínkách v živné půdě, obsahující zdroje uhlíku, vitamíny a aminokyseliny deficítní u producenta, při periodickém doplňování živné půdy se stanoví aktivita dekarboxylázy diaminopimelové kyseliny v buňkách producentu, živná půda se doplňuje při dosažení úrovně aktivity dekarboxylázy diaminopimelové kyseliny, kritické pro danou kulturu,

převážně $12-9 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu
s mg bílkoviny
do snížení úrovně aktivity dekarboxylázy diaminopimelové kyseliny na

$8-6 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu s mg bílkoviny a později při aktivitě dekarboxylázy diaminopimelové kyseliny $5-4 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu s mg bílkoviny se zavádějí zdroje uhlíku a vitamíny do snížení aktivity dekarboxylázy diaminopimelové kyseliny na $2,5-2$ mol lyzinu s mg bílkoviny.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

Заявлено 12.12.78 г.

Заявка 2696186/28-13

Авторы изобретения: А.К.Саксе, М.П.Руклиша, С.Э.Селга,
У.Э.Виестур, М.П.Лейте, С.Ю.Клявина,
Ю.Э.Швинка и М.Е.Бекер

Заявитель: Институт микробиологии им.Августа Кирхенштейна
Академии Наук Латвийской ССР

Название изобретения: Способ получения χ -лизина

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способу получения одной из незаменимых аминокислот χ -лизина.

В процессе ферментации в результате изменения состава питательной среды уменьшается темп роста клеток, а также изменяется их морфология. Биомасса стареет, в ней идут процессы автолиза и физиолого-биохимическая активность клеток падает. Это приводит к снижению выхода χ -лизина.

Известен способ получения χ -лизина, согласно которому для повышения выхода целевого продукта в процессе ферментации, начиная с 16 до 30 час определяют концентрацию молочной кислоты или активность лактатдегидрогеназы, либо определяют активность изоцитратдегидрогеназы в клетках продуцента и с учетом этого ведут весь процесс культивирования (1).

Известен также способ получения χ -лизина путем глубинного культивирования его продуцентов в аэробных условиях на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, необходимые минеральные соли, аминокислоты и витамины при периодическом добавлении свежей питательной среды с последующим выделением лизина (2).

Выращивание продуцента проводят при периодическом добавлении стерильного раствора одного из компонентов питательной среды мелассы, обеспечивающей поддержание редуци-

рующих веществ в культуральной жидкости в пределах 2,5-3%. Этот способ позволяет повысить выход λ -лизина до 30 г/л, а экономический коэффициент выхода λ -лизина - до 40,2%.

Однако при многократном периодическом добавлении мелассы в среде растет концентрация треонина, который содержит меласса. Треонин совместно с лизином вызывают мультивалентное ингибирование активности β -аспартаткиназы, что в свою очередь резко уменьшается лизинсинтезирующую активность культуры и снижает выход целевого продукта. Мультивалентное ингибирование активности β -аспартаткиназы наступает при определенных пределах активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты.

Эффект особенно выражен при переработке концентрированных питательных сред; концентрация редуцирующих веществ - 12-15%.

Целью настоящего изобретения является увеличение выхода целевого продукта.

Согласно изобретению поставленная цель достигается тем, что в процессе культивирования, начиная с 16-18 часов, в клетках продуцента определяют активность декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты и при достижении критического, для данной культуры, уровня ее равной $12-9 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка вводят свежую питательную среду до снижения уровня активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты до $8-6 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка, после чего продолжают процесс культивирования и начиная с 30-36 часов с начала процесса культивирования при достижении активности $5 \cdot 10^{-11}-4 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка вводят источник углерода и витамины до снижения активности до $2,5 \cdot 10^{-11}-2 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка.

В процессе культивирования определяют концентрацию λ -лизина и по ней судят об активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты.

Способ осуществляется следующим образом.

В качестве продуцента λ -лизина используют микроорганизмы рода *Brevibacterium* или *Micrococcus*.

После выращивания культуры в посевном ферментаторе дальнейшее культивирование проводят в производственных ферментаторах на углеводной питательной среде, например, мелассной. При ферментации во время роста продуцента pO_2 поддерживают на уровне 20-25% от насыщения. В состав питательной среды входят, кроме источников углерода, дефицитные для продуцента аминокислоты и витамины, а также источники азота и фосфора.

Начиная с 16-18 часа определяют активность декарбоксилазы диаминапимелиновой кислоты (ДАП-ДК), уровень аэрации снижают до 10-12% насыщения, сохраняя интенсивность перемешивания системы. При достижении уровня активности ДАП-ДК преимущественно $12 \cdot 10^{-11}$ - $9 \cdot 10^{-11}$ моль лизина /сек мг белка в ферментатор добавляют свежую стерильную питательную среду до достижения критической для данной культуры активности ДАП-ДК $8 \cdot 10^{-11}$ - $6 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка. Питательную среду вводят непрерывно или отдельными порциями с интервалами в 1-2 часа. При достижении уровня ДАП-ДК $8 \cdot 10^{-11}$ - $6 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка ввод питательной среды прекращают. Во время культивирования температуру поддерживают на уровне $31 \pm 1^\circ C$, pH среды 7,4-7,8. При достижении уровня активности ДАП-ДК $5 \cdot 10^{-11}$ - $4 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка, что происходит на 30-36 часу культивирования, начинают вводить источники углерода и витамины до снижения активности ДАП-ДК до $2,5 \cdot 10^{-11}$ - $2 \cdot 10^{-11}$ моль лизина /сек мг белка. В качестве источников углерода используют глюкозу, сахарозу, фруктозу. После последней подпитки при активности ДАП-ДК равной $2 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка процесс ведут еще несколько часов до концентрации редуцирующих веществ равной 1-1,2%. После окончания культивирования из культуральной жидкости выделяют γ -лизин одним из известных методов, или получают кормовой концентрат лизина.

Активность ДАП-ДК определялась манометрически по количеству образующегося углекислого газа при использовании в качестве субстрата диаминополимелиновой кислоты.

Активность ДАП-ДК также определялась по концентрации лизина в культуральной жидкости. На чертеже представлена

зависимость для культуры *Brevibacterium flavum* 22 D активности ДАП-ДК от концентрации $\mathcal{L}$ -лизина, где по оси абсцисс отложена концентрация $\mathcal{L}$ -лизина в г/л, а по оси ординат активность ДАП-ДК в $\frac{\text{моль } 10^{-11} \text{ лизина}}{\text{сек мг белка}}$

Такая калибровочная кривая строится для каждой культуры.

Ниже приведены примеры осуществления способа.

Пример I.

В качестве продуцента используют культуру *Brevibacterium flavum* 221D. Исходную культуру размножают вначале на агаровых косяках, затем в колбах на качалке, а затем в посевном ферментаторе емкостью 400 л на мелассной питательной среде. Культивирование продолжают 14 часов при температуре $31 \pm 1^\circ\text{C}$, аэрации 60 мг O_2 /л мин, pH среды поддерживают в пределах 7,4-7,8. Посевной материал передавливают в ферментер емкостью 3000 л со средой следующего состава

меласса - 470 кг (при содержании сахара 46% вес.)

кукурузный экстракт - 50 кг

(NH_4)₂SO₄ - 37 кг

(NH_4)₂HPO₄ - 0,75 кг

KH₂PO₄ - 0,75 кг

подсолнечное масло - 3 л

вода - до 1300 л

Начальная концентрация РВ = 14%, содержание $\mathcal{L}$ -лизина - 2,8 г/л после добавления посевного материала.

Во время роста продуцента pO_2 поддерживают на уровне 20-25% насыщения, на 8-10 часу pH увеличивается до 7,4-7,8 и поддерживают на этом уровне. На 18 часу культивирования активность ДАП-ДК составляет $9 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка, содержание $\mathcal{L}$ -лизина 18 г/л, концентрация РВ - 8,8%. В ферментатор непрерывно вводят в течение трех часов стерильную свежую среду со скоростью 1% РВ в час до снижения активности ДАП-ДК до $6,8 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка. В дальнейшем активность ДАП-ДК определяют каждые 2-3 часа.

После подпитки уровень аэрации уменьшают до 10% насыщения. На 37 часу культивирования активность ДАП-ДК составляет $5 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка, в среду вводят источники углерода и витамины. В качестве источника углерода вводят сахарозу двумя порциями с периодом в 2 часа до снижения активности ДАП-ДК до $3,4 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка, концентрация лизина на 48 часу после подпитки составляет 48 г/л. Затем продолжают культивирование, а на 52 часу вновь вводят сахарозу и витамины: биотин и тиамин до снижения активности ДАП-ДК - $2,2 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка, концентрация лизина при этом составляет 58 г/л. После чего продолжают культивирование до концентрации редуцирующих веществ 1,4%. На 63 часу ферментации культуральная жидкость содержит 65 г/л лизина, биомассы продуцента - 24 г/л. Культуральную жидкость обрабатывают одним из известных способов, например, с помощью ионообменных смол для выделения α -лизина или получают кормовой концентрат лизина.

Выход лизина из использованных РВ составляет 43,6%.

Пример 2.

В качестве продуцента используют культуру *Brevibacterium flavum* RC - II5. Посевной материал готовят по примеру I. Затем ферментацию продолжают в пилотном ферментаторе на среде следующего состава

меласса - 1,65 кг (при содержании сахаров 46%)

кукурузный экстракт 0,52 кг (при содержании сухих веществ 50%)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 150 г

KH_2PO_4 - 2,5 г

K_2HPO_4 - 2,5 г

- 1 г

CaCO_3 - 25 г

подсолнечное масло - 30 г

вода - до 4,6 л

Количество посевного материала 8%.

Во время роста продуцента pO_2 поддерживают на уровне

20-25% насыщения. Интенсивность перемешивания 600 об/мин. На 8-10 часу ферментации pH увеличиваются до величины 7,6-7,8 и поддерживают на этом уровне.

На 14 часу культивирования при активности ДАП-ДЖ $12 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка в среду вводят с периодом в два часа свежую питательную среду из расчета использования РВ-1% в два часа. При этом между каждой подпиткой измеряют активность ДАП-ДЖ. Подпитку ведут до снижения активности ДАП-ДЖ до $7,5 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка. Эта активность достигнута на 22 часу культивирования, концентрация лизина при этом составляет 26 г/л. На 24 часу уровень аэрации снижают до 12% насыщения. На 30 часу культивирования активность ДАП-ДЖ составляет $5 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка. Концентрация лизина 35 г/л, в среду непрерывно вводят сахарозу и смесь витаминов В₁ и биотина. При содержании лизина 60 г/л и активности ДАП-ДЖ $2,1 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка подпитку прекращают. К 58 часу ферментации содержание лизина 80,5 г/л, биомассы продуцента 24 г/л, остаточные РВ-1,4%. Выход лизина от использованных РВ составляет 43,5%.

Пример 3.

В качестве продуцента *L*-лизина используют культуру *Micrococcus glutamicus* Т-3.

Культивирование ведут на среде, аналогичной примеру 1. В качестве источника стимуляторов роста используют гидролизат белково-витаминного концентрата.

На 22 часу ферментации активность ДАП-ДЖ составляет $9,2 \cdot 10^{-11}$ моль/лизина/сек мг белка, концентрация лизина 17 г/л. В среду непрерывно вводят свежую питательную среду до активности ДАП-ДЖ $6,6 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка. Такая активность достигается к 32 часу культивирования, концентрация лизина в культуральной жидкости - 28 г/л. Затем уменьшают уровень аэрации с начального 18-25% насыщения до 10-12% насыщения. На 48 часу культивирования активность ДАП-ДЖ составляет $4 \cdot 10^{-11}$ моль лизина сек мг белка, в среду порциями вводят глюкозу и витамины до снижения

ДАП-ДК до уровня $2,5 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка. Затем продолжают ферментацию до концентрации РВ - 1,4%. На 65 часу ферментации культуральная жидкость содержит α -лизина 48,5 г/л, биомассы продуцента - 23 г/л. Выход α -лизина от РВ составляет 43,1%.

В указанных примерах реализации рН среды поддерживают изменением аэрации в зависимости от активности лактатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы. В конце процесса рН регулируют добавлением аммиачной воды.

Таким образом, за счет устранения эффекта мультивалентного ингибирования активности β -аспартаткиназы увеличен выход целевого продукта до 80,5 г/л и соответственно увеличен выход лизина от введенных редуцирующих веществ до 43,5%.

"Способ получения λ -лизина путем глубинного культивирования его продуцентов в аэробных условиях на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, необходимые минеральные соли, аминокислоты и витамины при периодическом добавлении свежей питательной среды с последующим выделением лизина, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода лизина, в процессе культивирования, начиная с 16-18 часов, в клетках продуцента определяют активность декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты и при достижении критического для данной культуры уровня ее равной $12-9 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка вводят свежую питательную среду до снижения уровня активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты до $8-6 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек.мг белка, после чего продолжают процесс культивирования и начиная с 30-36 часов с начала процесса культивирования при достижении активности $5 \cdot 10^{-11} - 4 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка вводят источник углерода и витамины до снижения активности до $2,5 \cdot 10^{-11} - 2 \cdot 10^{-11}$ моль лизина/сек мг белка".

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе:

1. Авторское свидетельство СССР № ... по заявке № 2429702/13 кл. С 12 Д 13/06, 1976.

2. Авторское свидетельство СССР № 498940 кл. А 23 К 1/00, 1973.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ $\mathcal{L}$ - ЛИЗИНА
АННОТАЦИЯ

215 202

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к способу получения $\mathcal{L}$ - лизина микробиологическим путем.

Способ заключается в том, что при глубинном культивировании продуцентов $\mathcal{L}$ - лизина в аэробных условиях на питательной среде, содержащей источники углерода, дефицитные для продуцента аминокислоты и витамины, при периодическом добавлении питательной среды определяют активность декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты в клетках продуцента, питательную среду добавляют при достижении критического для данной культуры уровня активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты, преимущественно $12-9 \cdot 10^{-11}$

моль лизина до снижения уровня активности декарбоксилазы сек мг белка

диаминопимелиновой кислоты до $8-6 \cdot 10^{-11}$ моль лизина , а сек мг белка

затем при активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты $5-4 \cdot 10^{-11}$ моль лизина вводят источники углерода и сек мг белка

витамины до снижения активности декарбоксилазы диаминопимелиновой кислоты до $2,5-2$ моль лизина .

сек мг белка

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

215 202

Způsob získávání *L* - lyzinu submerzní kultivací jeho producentů v serobních podmínkách v živné půdě, obsahující zdroje uhlíku, dusíku, nutné minerální soli, aminokyseliny a vitaminy při periodickém doplňování čerstvé živné půdy s následným vyloučením lyzinu, vyznačující se tím, že za účelem zvýšení výtěžku lyzinu v procesu kultivace od 16 až 18 hodin se v buňkách producentu stanoví aktivita dekarboxyláze diaminopimelové kyseliny a při dosažení úrovně kritické pro danou kulturu $12-9 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu/s mg bílkoviny se zavádí čerstvá živná půda do snížení aktivity dekarboxylázy diaminopymelinové kyseliny na $8-6 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu/s mg bílkoviny, potom pokračuje proces kultivace a od 30 až 36 hodin od začátku kultivace při dosažení aktivity $5 \cdot 10^{-11} - 4 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu/s mg bílkoviny se zavádí zdroj uhlíku a vitaminy do snížení aktivity na $2,5 \cdot 10^{-11} - 2 \cdot 10^{-11}$ mol lyzinu/s mg bílkoviny.

Uznáno vynálezem na základě výsledků expertízy, provedené Státním výborem pro vynálezy a objevy SSSR, Moskva, SU.

1 výkres

