



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

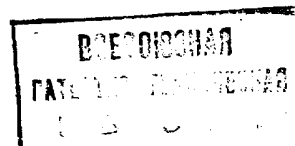
(19) **SU** (11) **1435159** **A3**

(51)4 C 12 P 23/00, C 12 N 1/20 //
(C 12 N 1/20, C 12 R 1:01)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ОССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ



- (21) 3874110/28-13
- (22) 28.03.85
- (31) 1600/84
- (32) 29.03.84
- (33) СН
- (46) 30.10.88. Бюл. № 40
- (71) Лонца АГ (СН)
- (72) Ханс Кулла (DE) и Павел Лехки (СН)
- (53) 663.1(088.8)
- (56) Hindstedt at al The Farmation and Degradation of Caruitin in Pseudomonas. - J. Biochemistry, 1967, 6, 1262-1270.
- (54) СПОСОВ ПОЛУЧЕНИЯ L-КАРНИТИНА
- (57) Изобретение относится к биотехнологии и касается получения L-карни-

тина. Цель изобретения - повышение выхода L-карнитина. Это достигается тем, что бактериальный штамм продуцента выращивают на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода и азота γ -бутиробетанин или кротонобетанин, факторы роста в условиях аэрации до максимального накопления целевого продукта с последующим его выделением, в качестве бактериального штамма продуцента используют Agrobacterium НК 4, или Agrobacterium НК 13, или Agrobacterium НК 1331, при этом γ -бутиробетанин или кротонобетанин вводят в количестве 0,1-10,0%.

(19) **SU** (11) **1435159** **A3**

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения L-карнитина.

Целью изобретения является повышение выхода L-карнитина.

Способ заключается в следующем.

Предлагаемые микроорганизмы способны вырабатывать из кротонобетанина или γ -бутиробетанина L-карнитин, не разлагая последнего. Все эти микроорганизмы могут быть продуцентами при том условии, что они мутированы по следующему двухстадийному методу селекции:

а) микроорганизмы, выращиваемые на бетанине, γ -бутиробетанине, кротонобетанине и L-карнитине в качестве источника углерода и азота, мутируют известными приемами;

б) из культуры мутированных микроорганизмов, полученной в результате процесса культивирования, селекционируют устойчивые микроорганизмы, не разлагающие L-карнитин и выращиваемые на бетанине, кротонобетанине, γ -бутиробетанине. Выращивание штаммов, растущих на бетанине, кротонобетанине,

γ -бутиробетанине в качестве источника углерода и азота, осуществляют путем посева смеси бактерий на кротонобетановые питательные растворы, готовят таким образом смешанные культуры, а затем по традиционным микробиологическим приемам получают чистые культуры разлагающих кротонобетанин микроорганизмы. Мутацию культур, растущих на γ -бутиробетанине, кротонобетанине в качестве источника азота и углерода, осуществляют известными методами. Мутированные таким образом микроорганизмы подвергают селекционированию.

Микроорганизмом, растущим на γ -бутиробетанине или кротонобетанине в качестве источника углерода и азота, является штамм НК 4 (DSM № 2938) и его десценденты и мутанты. Этот штамм 03.03.84 за № DSM 2938 был депонирован при Немецкой коллекции микроорганизмов (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM) при обществе Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Griesbachstrabe, 8 4300 Gottingen, ФРГ).

Описание штамма Agrobacterium НК 4 (DSM № 2938):

Форма клеток	палочки, частично плеоморфны	Образование фенилаланина	-
		деаминазы	-
		орнитиндекарбоксилазы	-
Длина, мкм	1-2	H_2S	-
Ширина, мкм	0,5-0,8	Реакция Фогес-Проскауера	-
Подвижность	+	Образование индола	-
Жгутикование	перитрихальное	нитрата из нитрата	+
Реакция по Граму	-	Денитрификация	+
Споры	-	Образование левана	-
Образование поли- β -оксибутирата	-	лецитиназы	-
оксидазы	-	уреазы	-
каталазы	-	Деградация крахмала	-
Рост в анаэробных условиях	-	желатина	-
37°C	+	казеина	-
41°C	-	тирозина	-
pH 5,6	-	твина 80	-
на агаре Mac-Corkey	+	ДНК	+
на агаре SS	-	эскулина	+
на цетримидном агаре	-	Использование субстрата ацетата	-

Пигменты		цитрата	-
не диффундирующие	-	малоната	-
диффундирующие	-	глицина	-
флуоресцирующие	-	норлейцина	-
Образование кислоты		ксилозы	+
(тест "OF") из		фруктозы	+
глюкозы аэробно	-	глюкозы	+
анаэробно			
фруктозы аэробно	-		
ASS глюкозы	+	Автотрофный рост	-
ксилозы	-	на H ₂	
трегалозы	+	3-кетолактоза	-
этанола	-	Рост на	
Образование газа из		бетаине	+
глюкозы	-	L-карнитине	+
ONPG	+	γ-бутиробетанине	+
Образование		кротонобетанине	+
аргининдигидролазы	-		
лизиндекарбоксилазы	-		

Микроорганизмом, полученным в результате мутации и селекционирования из указанного микроорганизма, который обладает устойчивостью, не разлагает L-карнитина, а выделяет его и растет на кротонобетанине или γ-бутиробетанине, является штамм *Agrobacterium* HK 13. Этот

штамм 23.01.84 был передан обществу Gesellschaft für Biotechnologische Torsehung mbH, briesebachstrabe 8, 4300 Göttingen, ФРГ, на хранение за № DSM 2903 в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM).

Описание штамма *Agrobacterium* HK 13 (DSM № 2903)

Форма клеток	палочки	Образование	
	частично	фенилаланиндеаминазы	-
	плеоморфны	орнитиндекарбоксилазы	-
Длина, мкм	1-2		
Ширина, мкм	0,5-0,8		
Подвижность	+	H ₂ S	
Жгутиковые	перитрихальное	Реакция Фогес-Проскауера	-
Реакция по Граму	-	Образование	
Споры	-	индола	-
Образование		нитрита из нитрата	+
поли-β-оксибутирата	-	Денитрификация	+
оксидазы	+	Образование	
каталазы	+	левана	-
		лецитиназы	-
		уреазы	+
Рост			
в анаэробных условиях	-	Деградация	
37°C	+	крахмала	-
41°C	-	желатина	-
pH 5,6		казеина	-
на агаре Mac-Coukey	+	тирозина	-
на агаре SS	-	твина 80	-
на цетримидном агаре		ДНК	+
		эскулина	

Продолжение колонки 1

Продолжение колонки 2

Пигменты	
не диффундирующие	-
диффундирующие	-
флуоресцирующие	-
Образование кислоты	
(тест "OF") из	
глюкозы аэробно	-
анаэробно	-
фруктозы аэробно	-
ASS глюкозы	+
ксилозы	+
трегалозы	+
этанола	-
Образование газа из	
глюкозы	-
ONPG	+
Образование	
аргининдигидролазы	-
лизиндекарбоксилазы	-

Использование субстрата

ацетата	-
цитрата	-
малоната	-
глицина	-
норлейцина	-
ксилозы	+
фруктозы	+
глюкозы	+
Автотрофный рост	-
на H ₂	-
3-кетолактоза	-
Рост на	
бетаине	+
L-карнитине	-
γ-бутиробетаине	-
кротонобетаине	-
L-глутамате и	
кротонобетаине	±
L-глутамате и	
бутиробетаине	±
L-глутамате и	
L-карнитине	±

Примером устойчивого десцендента микроорганизма НК 13, не разлагающего, а выделяющего L-карнитин и растущего на бетаине, L-глутамате и кротонобетаине, L-глутамате и бутиробетаине, глутамате и L-карнитине является штамм НК 1331. Его выделяли в виде спонтанно и хорошо растущей колонии мутантов с поверхности плотной

агаровой питательной среды, содержащей L-глутамат и γ-бутиробетанин.

Указанный штамм 08.02.85 был передан обществу besellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, briesenbachstrabe 8, 4300, Göttingen, ФРГ, на хранение за № DSM 3225 в коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM).

Описание штамма Agrobacterium НК 1331 (DSM № 3225):

Форма клеток	палочки	Образование	
	частично	фенилаланинде-	
	плеоморфны	аминазы	-
Длина, мкм	1-2	орнитиндекарбокси-	
Ширина, мкм	0,5-0,8	лазы	-
Подвижность	+	H ₂ S	
Жгутикование	перитрихаль-	Реакция Фогес-Проскуера	-
	ное	Образование	
Реакция по Граму	-	индола	-
Споры	-	нитрита из нитрата	+
Образование		Денитрификация	+
поли-β-	-		
оксибутирата		Образование	
оксидазы	+	левана	
каталазы	+	лецитиназы	-
Рост в анаэробных		уреазы	+
условиях		Деградация	
37°C	+	крахмала	-
41°C	-	желатина	-
pH 5,6	-	казеина	-

Продолжение колонки 1

на агаре Мас-	
Coukey	
на агаре SS	-
на центримидном агаре	-
Пигменты	
не диффундирующие	-
диффундирующие	
флуоресцирующие	-
Образование кислоты	
(тест "OF") из	
глюкозы аэробно	-
анаэробно	-
фруктозы аэробно	-
ASS глюкозы	+
ксилозы	+
трегалозы	+
этанола	-
Образование газа из	
глюкозы	-
ONPG	+
Образование	
аргининдигидролазы	-
лизиндекарбоксилазы	-

Продолжение колонки 2

тирозина	-
твина 80	-
ДНК	+
эскулина	+
Использование субстрата	
ацетата	-
цитрата	-
малоната	-
глицина	-
норлейцина	-
ксилозы	+
фруктозы	+
глюкозы	+
Автотрофный рост	-
на H ₂	
3-кетолактоза	
Рост на	
бетаине	+
L-карнитине	-
γ-бутиробетаине	-
кротонобетаине	-
L-глутамате и	+
кротонобетаине	
L-глутамате и бу-	+
тиробетаине	
L-глутамате и L-кар-	+
нитине	

В целях осуществления предлагаемого способа получения L-карнитина целесообразно сначала выращивать предварительную культуру микроорганизма на стерилизованной среде при 20-40°C при pH 6-8 в течение 20-50 ч. Эта предварительная культура должна содержать в качестве субстрата роста 0,1-10 мас.% γ-бутиробетаина и кротонобетаина, считая на реакционную среду. γ-Бутиробетанин или кротонобетанин можно использовать в виде гидрохлоридной соли, свободной внутренней соли или их производных. С помощью приготовленных по данному способу предварительных культур можно засеивать питательные среды. Последние должны иметь такой же состав, что и предварительные культуры посевного материала. Концентрация подвергаемых реакции кротонобетаина, γ-бутиробетаина или смесей этих соединений в питательной среде 0,1-10 мас.%. Субстраты роста - холин, глутамат, ацетат, диметилглицин и бетаин - целесообразно применять тоже в концент-

рациях, соответствующих концентрациям в предварительной культуре.

35 Клетки можно отделять центрифугированием или фильтрованием и использовать в качестве посевного материала для приготовления новой культуры. Образовавшийся L-карнитин путем катионообменной хроматографии выделяют из всплывающей жидкости и очищают перекристаллизацией.

40 П р и м е р 1. Выделение разлагающего кротонобетаин микроорганизма.

45 Из почвы нейтральным раствором фосфатного буфера с перемешиванием извлекают микроорганизмы с последующим отделением крупных компонентов через фильтровальную бумагу. С помощью полученной таким образом смеси бактерий засеивают питательный кротонобетаиновый раствор до легкого помутнения. Через 9 сут помутнение, являющееся мерой концентрации клеток, 50 увеличилось в 90 раз. В результате кротонобетаин в растворе уже не обнаруживался и в нем в качестве про-

дукта деградации доказывались аммониевые ионы. Из указанной смешанной культуры, прибегая к традиционным микробиологическим приемам с использованием плотной агаровой питательной среды, готовят чистые культуры разлагающих кротонобетанин микроорганизмов. Для проведения дальнейших работ из них выбирают культуру, обозначаемую *Agrobacterium* НК 4. Этот штамм растет на γ -бутиробетанине, L-карнитине и бетанине.

Пример 2. Выделение устойчивого не содержащего дегидрогеназу карнитина мутанта.

Культуру штамма *Agrobacterium* НК 4 с помощью мутагена Acridin Mutagen ICR191 (5 мкг/мл) в сукцинатной среде подвергают стабильной мутагенизации, после чего клетки в целых экспрессии мутации выращивают на питательном бульоне, затем переводят в бетаниновую среду. Промытую культуру вносят в L-карнитинную среду. Уже через несколько часов культура вступала в логарифмическую фазу роста. В это время добавляют пенициллин G (15 мг/мл) и D-циклосерин (0,5 мг/мл), которые в качестве противоселекционирующих агентов умерщвляют только растущих бактерий. В результате выживания накапливались мутанты, которые не могли расти на L-карнитине. Через 30 ч число живых клеток сокращалось в 100 раз. После отмывки антибиотиков культуру переводят в бетаниновую среду. Выросшую культуру разбавляют и распределяют на плотной питательной среде. Отдельные клетки вырастали с образованием колоний и в отдельности подвергались испытанию. В результате выбирают мутант *Agrobacterium* НК 13. Последний устойчив, не содержит дегидрогеназы карнитина и растет на бетанине. Прорастая на бетанине, диметилглицине, холине, глутамате или ацетате, этот штамм превращает кротонобетанин или γ -бутиробетанин в L-карнитин и выделяет его.

Пример 3. Предварительную культуру штамма *Agrobacterium* НК 13 объемом 5 мл культивируют в течение 32 ч при 30°C и pH 7,0 в витаминсодержащей минеральной среде, содержащей 1 мас.% бетанина и 0,5 мас.% кротонобетанин-хлорида. Эту культуру засеивают в культуру того же состава

объемом 15 л, которую потом выращивают в течение 24 ч в условиях, указанных для предварительной культуры. По прекращении получения L-карнитина удаляют клетки центрифугированием и применяют их затем в качестве посевного материала для приготовления новой культуры. Энзиматическим анализом определяют концентрацию L-карнитина во всплывшей жидкости (19,8 л).

Содержание L-карнитина во всплывшей жидкости 4,26 мг/мл, что составляло по выходу 95,0%. Путем катионообменной хроматографии выделяют L-карнитин из всплывшей жидкости и очищают его перекристаллизацией.

Пример 4. Предварительную культуру штамма *Agrobacterium* НК 13 объемом 5 л культивируют в течение 32 ч при 30°C и значении pH 7,0 в витаминсодержащей минеральной среде (по примеру 1), содержащей 1% холина и 0,6% γ -бутиробетанин-хлорида. Эту культуру засеивают в культуру со средой того же состава объемом 15 л, которую потом выращивают в условиях примера 1. По прекращении получения L-карнитина (примерно через 30 ч) отделяют клетки методом микрофилтрации. Клеточную массу используют для дальнейшего получения L-карнитина. Концентрацию L-карнитина в фильтрате (19,6 л) определяют энзиматическим анализом. Содержание L-карнитина в фильтрате 5,3 мг/мл. Это соответствовало аналитическому выходу в 97,6%, считая на использованное количество γ -бутиробетанин-хлорида.

Пример 5. Предназначенный для приготовления непрерывной культуры ферментер, содержащий 1,5 л витаминсодержащей минеральной среды (по примеру 1) с 1,5% бетанина и 1,0% γ -бутиробетанин-хлорида, загружают 150 мл предварительной культуры *Agrobacterium* НК 13 на той же среде. После аэробного выращивания в течение 20 ч при 30°C и pH 7,0 культура достигала полного роста. Потом клетки отделяют путем центрифугирования. Согласно энзиматическому анализу всплывшая жидкость содержала 8,8 г L-карнитина на литр культуры.

Следует отметить, что количество 0,1-10% является существенным, так как только в этом случае достигается повышение выхода. При количествах

выше 10% будет иметь место осмотическое давление клеток.

Данный способ позволяет повысить выход L-карнитина на 15%.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения L-карнитина, предусматривающий выращивание бактериального штамма-продуцента на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода и азота γ -бути-

робетанин или кротонобетанин, факторы роста в условиях аэрации до максимального накопления целевого продукта с последующим его выделением, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода L-карнитина, в качестве бактериального штамма-продуцента используют Agrobacterium НК 4, или Agrobacterium НК 13, или Agrobacterium НК 1331, при этом γ -бутиробетанин или кротонобетанин вводят в количестве от 0,1 до 10,0%.

5

10

Редактор О.Спесивых

Составитель Е.Буданцева

Техред М.Моргентал

Корректор С.Шекмар

Заказ 5569/59

Тираж 520

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4