



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

MKP C12d 13/06

Zgłoszono: 04.08.75 (P. 182530)

Pierwszeństwo: _____

Int. Cl.² C12D 13/06

Zgłoszenie ogłoszono: 28.02.77

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1978

Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokio (Japonia)

Sposób wytwarzania L-lizyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania L-lizyny na drodze fermentacji ze zwiększonymi wydajnościami, który polega na hodowaniu mikroorganizmu wytwarzającego L-lizynę w środowisku odżywczym z dodatkiem płynu hodowlanego zawierającego mikroorganizm wytwarzający L-leucynę.

L-lizyna jest dobrze znana jako jeden z podstawowych aminokwasów odżywczych dla ludzi i zwierząt, i istnieje duże zapotrzebowanie na nią jako na pożywienie i dodatek do pokarmu zwierzęcego.

Dotychczas, znano dużo różnych sposobów fermentacyjnego wytwarzania L-lizyny. Typowy proces obejmuje stosowanie wytwarzających L-lizynę mutantów bakterii maczugowych wytwarzających kwas glutaminowy, których przedstawicielem jest *Corynebacterium glutamicum*.

Bakterie maczugowe, wytwarzające kwas glutaminowy, są dokładnie omówione w literaturze. Ogólnie charakteryzują się one kształtem od elipsoidalnego do krótkich pałeczek, są gramododatnie, nie wytwarzają zarodników, są nieruchliwe, potrzebują biotyny i gromadzą duże ilości kwasu L-glutaminowego.

Liczne bakterie maczugowe, wytwarzające kwas glutaminowy, były już opisywane. Sklasyfikowane są przez taksonomistów, którzy prowadzili badania nad tymi bakteriami, na następujące gatunki:

2

Corynebacterium glutamicum, *Brevibacterium aminogenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium callunae*, *Microbacterium ammoniaphilum* i *Arthrobacter*. Jednakże taksonomicznie są one bardzo zbliżone do wszystkich innych opisanych przez Abe i innych w J. General and Applied Microbiology, Vol. 13, 279—301 (1967). Bakterie maczugowe, wytwarzające kwas glutaminowy, reprezentowane są przez *Corynebacterium glutamicum*.

Mutanty bakterii maczugowych, wytwarzających kwas glutaminowy, wytwarzające L-lizynę, charakteryzują się ogólnie tym, że mają przynajmniej jedną z dwóch własności wynikającą z mutacji genowej.

Jedną z dwóch własności jest całkowita lub niecałkowita blokada drogi biosyntetycznej dla produkcji odpowiednich aminokwasów. Własność ta uznawana jest jako wymóg dla aminokwasów takich, jak L-homoseryna, L-treonina, L-metionina, L-leucyna, L-izoleucyna itd. lub jako wrażliwość na L-treoninę lub L-metioninę. Inną cechą jest całkowite lub niecałkowite odchylenie sprzężenia zwrotnego przez aminokwasy. Własność ta jest traktowana jako odporność na aminokwasy

takie, jak L-lizyna, L-treonina itd. lub ich analogii takie, jak S-/2-aminoetylo/-L-cysteina itd.

Wydajność L-lizyny, uzyskanej z mutantów wytwarzających L-lizynę o powyższych własnościach, jest polepszona przez kombinacje dalszych genetycznych mutacji innych niż opisane wyżej, na przykład, wymaganych dla takich aminokwasów jak L-walina, L-tyrozyna itd., witaminy takie, jak tiamina, witamina B₁₂ itd., i zasady purynowe takie, jak adenina, guanina itd. Ponadto, wydajność L-lizyny polepsza się także przez kombinację genetycznych mutacji innych niż te, które opisano wyżej, na przykład, odpornych na aminokwasy takie, jak L-izoleucyna, ich analogii takie, jak kwas 2-amino-3-metylotio-masłowy itd. i antybiotyki takie, jak penicylina G, polimiksyna B itd. Do preferowanych mutantów wytwarzających L-lizynę należą:

Micrococcus glutamicum ATCC 13286, ATCC 13287, *Brevibacterium flavum* ATCC 21475, ATCC 21127, ATCC 21128, ATCC 21517, ATCC 21518, ATCC 21528, ATCC 21529 i *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21299, ATCC 21300, ATCC 21513, ATCC 21514, ATCC 21515, ATCC 21516, ATCC 21527, ATCC 21544 KY 10403, KY 10031.

Większość wyżej omówionych specyficznych mutantów opisano w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki Nr 2.979.439, 3.616.218, 3.687.810, 3.707.441, 3.708.395 i opisie patentowym brytyjskim Nr 1.186.988.

Przy wytwarzaniu L-lizyny przez hodowanie szczepów produkujących L-lizynę, jak to opisano wyżej, szczepy te hoduje się w warunkach tlenowych w środowisku zawierającym przyswajalne źródło węgla, źródło azotu, substancje nieorganiczne i inne pożywki. O ile badania nad produkcją L-lizyny przy użyciu szczepów produkujących L-lizynę wykazywały, że muszą być spełnione warunki takie, jak dla L-leucyny, to obecnie stwierdzono, że trzeba stosować płyn hodowlany mutantu wytwarzającego L-leucynę jako dodatek do środowiska hodowlanego odpowiadającego L-leucynie.

W rezultacie, nieoczekiwanie stwierdzono, że wydajność L-lizyny, otrzymywanej przez szczepy wytwarzające L-lizynę, znacznie wzrosła. Ponadto stwierdzono, że efekt jest dużo większy w stosunku do tego, jaki osiąga się gdy dodaje się wolną L-leucynę do środowiska w ilości odpowiadającej ilości, jaka znajduje się w płynie hodowlanym mutantu wytwarzającego L-leucynę. Stwierdzono także, że efekt dodania płynu hodowlanego mutantu wytwarzającego L-leucynę uzyskuje się nie tylko wtedy, gdy szczep produkujący L-lizynę spełnia wymogi dla L-leucyny ale także wtedy, gdy stosuje się szczep wytwarzający L-lizynę o różnych własnościach.

Wytwarzanie L-leucyny na drodze fermentacji jest także dobrze znane. Tak jak w przypadku z mutantami wytwarzającymi L-lizynę, mutanty wytwarzające L-leucynę mają przeważnie co najmniej jedną własność z tych, jakie wymagane są przez odpowiednie aminokwasy takie, jak L-izoleucyna, L-metionina i L-walina oraz odporność

na aminokwasy, włączając L-leucynę i inne analogii takie, jak kwas alfa — amino-masłowy itd., wynikające z całkowitej lub niecałkowitej blokady drogi biosyntetycznej i całkowitego lub niecałkowitego odchylenia sprzężenia zwrotnego. Wydajność L-leucyny polepsza się przez kombinowanie własności innych niż opisano wyżej, na przykład, wymogów dla aminokwasów takich, jak L-fenylalanina itd. Poza tym, wydajność zwiększa się także przez kombinację odporności na aminokwasy takie, jak L-lizyna, L-histydyna itd. oraz ich analogii takie, jak S-/2-aminoetylo/-L-cysteina, 2-tiazoloalanina itd.

Preferowane mutanty wytwarzające L-leucynę obejmują: *Brevibacterium flavum* (FERM —P No. 1838) ATCC 21889, *Brevibacterium lactofermentum* (FERM—P No. 1837) ATCC 21888, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21301—21308, ATCC 21885, ATCC 21886 (FERM—P No. 1835), oraz *Corynebacterium acetacidophilum* (FERM—P No. 1836) ATCC 21887.

Niektóre z wyżej wymienionych specyficznych szczepów opisano w japońskim zgłoszeniu patentowym nr 101589/74.

Dzięki stosowaniu sposobu według wynalazku uzyskuje się znacznie polepszone wydajności L-lizyny. Uzyskuje się to przez hodowanie mutantów wytwarzających L-lizynę w środowisku, wzbogaconym dodatkiem płynu hodowlanego mutantów wytwarzających L-leucynę. Mechanizm ten nie jest dotychczas jeszcze wyjaśniony. Dobrze znane jest zwiększenie wydajności L-lizyny przez dodatek różnych aminokwasów. Jak stwierdzono wyżej, wpływ dodania płynu hodowlanego mutantów wytwarzających L-leucynę nie wynika tylko z powodu L-leucyny, zawartej w cieczy kulturowej. Chociaż płyn hodowlany mutantów wytwarzających L-leucynę zawiera różne aminokwasy, inne niż L-leucyna, to stwierdzono także wpływ dodatku płynu hodowlanego, nie przypisując tego takim aminokwasom, jak poprzednio szczegółowo opisano. Ponadto, wpływ dodania płynu hodowlanego mutantów wytwarzających L-leucynę jest bardzo charakterystyczny, ale nie znaleziono takiego wpływu wówczas, gdy stosowano płyn hodowlany mikroorganizmów wytwarzających kwas L-glutaminowy.

Zgodnie ze sposobem według wynalazku, L-lizynę wytwarza się ze zwiększonymi wydajnościami przez hodowanie mutantu, wytwarzającego L-lizynę, bakterii maczugowych, produkujących kwas glutaminowy, w środowisku odżywczym z dodatkiem płynu hodowlanego, otrzymanego przez hodowanie mutantu, wytwarzającego L-leucynę, bakterii maczugowych, produkujących kwas glutaminowy.

W sposobie według wynalazku do produkcji L-lizyny można stosować dowolny mutant, wytwarzający L-lizynę, bakterii maczugowych, wytwarzających kwas glutaminowy, o wyżej opisanych własnościach.

W sposobie według wynalazku do hodowli mutantu, wytwarzającego L-lizynę, można stosować środowisko syntetyczne albo naturalne tak długo, jak długo zawiera ono źródło przyswajalnego wę-

gla, źródło azotu, substancje nieorganiczne i inne składniki przyspieszające wzrost, wymagane przez stosowane tu określone szczepy.

Jako źródło węgla w zależności od stosowanych mikroorganizmów można stosować węglowodany takie, jak glukoza, fruktoza, sorbitol, mannitol, gliceryna, krochmal, hydrolizat krochmalu, itd., melasa, końcowa melasa z dna itd., i alkohole takie, jak metanol, etanol, itd., kwasy organiczne takie, jak kwas octowy, kwas fumarowy, kwas mlekowy itd. W praktyce, jako źródło węgla preferowane są melasa, końcowa melasa z dna, kwas octowy i glukoza.

Jako źródło azotu można stosować amoniak, organiczne i nieorganiczne sole amoniowe takie, jak chlorek amonu, siarczan amonu, węglan amonu, octan amonu, fosforan amonu itd., związki zawierające azot takie, jak mocznik itd., peptony, ekstrakt mięsny, ekstrakt drożdżowy, ciecz z moczowej kukurydzy, hydrolizat kazeinowy, mięso rybne, wyciąg z mięsa rybnego, odtłuszczone soję, wyciąg z odtłuszczonej soi, hydrolizat kwasowy proteiny sojowej itd. Poza tym, można stosować substancje nieorganiczne, takie jak dwuwodortleno fosforan potasu, kwaśny fosforan potasowy, siarczan magnezu, chlorek sodu, siarczan żelazawy, siarczan magnezowy, węglan wapniowy itd.

Ponadto, gdy mutanty wytwarzające L-lizynę mają pożywkę, wymaganą przez aminokwasy, witaminy, zasady purynowe itd., to oczywiście odpowiednie ilości takich pożywek muszą być dodane do środowiska. Na przykład, bakteria mączugowa wytwarza kwas glutaminowy i dlatego jej mutanty wytwarzające L-lizynę wymagają do wzrostu biotyny. Zgodnie z tym konieczne jest, aby w środowisku odżywczym znajdowała się odpowiednia ilość biotyny. To jest zrozumiałe, że jeśli pożądane pożywki znajdują się w innych składnikach środowiska, to nie jest konieczne specjalne dodawanie źródeł tych pożywek do środowiska.

Zgodnie ze sposobem według wynalazku, dodatek płynu hodowlanego, otrzymanego przez hodowanie mutantu, wytwarzającego L-leucynę, do środowiska fermentacyjnego L-lizyny efektywnie zwiększa wydajność L-lizyny. Taki płyn hodowlany, dodawany do środowiska fermentacyjnego L-lizyny, może być użyty jako taki lub po usunięciu komórek mikrobowych. W każdym przypadku konieczna jest oczywiście sterylizacja płynu hodowlanego lub przesączu hodowlanego przed jego użyciem.

Ilość płynu hodowlanego mutantu, wytwarzającego L-leucynę, stosowanego jako dodatek do środowiska odżywczego dla wytworzenia L-lizyny, zależy od mikroorganizmów oraz składu środowiska, stosowanego zarówno przy wytwarzaniu L-lizyny, jak i L-leucyny. Preferowane jest jednak, aby środowisko fermentacyjne L-lizyny zawierało płyn hodowlany w stężeniu od 2 do 150 ml/l, licząc na objętość środowiska odżywczego dla fermentacji L-lizyny; optymalną ilość łatwo jest określić dla każdego szczególnego przypadku.

Po dodaniu płynu hodowlanego mutantu, wytwarzającego L-leucynę, całą ilość cieczy, jaka

ma być dodana, może znajdować się w środowisku początkowym. Możliwe jest także dodanie części tego płynu do środowiska początkowego, a pozostałą część podczas prowadzenia hodowli. Alternatywnie, całą ilość, jaka ma być dodana, można dodać dopiero podczas hodowli.

Jeśli płyn hodowlany dodaje się do środowiska fermentacyjnego L-lizyny podczas hodowli, to można go dodawać w całości od razu, z przerwami lub w sposób ciągły. W tym przypadku, celem uzyskania pożądanego efektu, wywołanego dodaniem płynu hodowlanego mutantu, wytwarzającego L-leucynę, pożądane jest, aby dodawanie zakończyć do końca etapu logarytmicznego rozmnażania się mikroorganizmu. Przeważnie logarytmiczny etap rozmnażania wynosi od 10 do 24 godzin od momentu rozpoczęcia hodowli.

Fermentację mutantu, wytwarzającego L-leucynę, prowadzi się w warunkach normalnie stosowanych przy fermentacji L-lizyny, to jest w warunkach tlenowych, na przykład, z napowietrzaniem i mieszaniem lub wytrząsaniem w temperaturze 25–40° i przy pH=6–8,5. Zwykle po 30 do 150 godzinach hodowania w płynie hodowlanym gromadzi się znaczna ilość L-lizyny. Po zakończeniu hodowli L-lizynę oddziela się i oczyszcza jednym z dobrze znanych sposobów, takim jak traktowanie żywicą jonowymienną, krystalizacja przez zateżnienie itd.

Płyn hodowlany mutantu, wytwarzającego L-leucynę, pozwalający na uzyskanie większych wydajności L-lizyny zgodnie ze sposobem według wynalazku, można przygotować metodami konwencjonalnymi dla produkcji L-leucyny. Do produkcji płynu hodowlanego można stosować dowolny mutant, wytwarzający L-leucynę, bakterii mączugowych, wytwarzających kwas glutaminowy, posiadający wyżej opisane własności.

Podobnie przy fermentacji L-lizyny można tak długo stosować albo medium syntetyczne, albo naturalne do fermentacji L-leucyny, jak długo zawiera ono odpowiednie źródła przyswajalnego węgla, źródło azotu, substancje nieorganiczne i inne pożywki, konieczne do wzrostu stosowanych mikroorganizmów. Co do specyficznych źródeł węgla, źródeł azotu i substancji nieorganicznych, wspomnianych przy fermentacji L-lizyny, to są one także użyteczne przy fermentacji L-leucyny. Melasa, końcowa melasa z dna, kwas octowy i glukoza, wspomniane poprzednio, są polecane z praktycznego punktu widzenia. Przy stosowaniu specyficznych szczepów, wymagających specyficznych pożywek, pożywki takie muszą oczywiście znajdować się w środowisku odżywczym.

Hodowlę mutantu, wytwarzającego L-leucynę, prowadzi się w konwencjonalnych warunkach hodowlanych. Przeważnie hodowlę prowadzi się w warunkach tlenowych, na przykład z napowietrzaniem i mieszaniem lub z wstrząsaniem w temperaturze 25°–40°C i przy pH=6–9 przez 48–120 godzin.

Następujące przykłady doświadczalne ilustrują preferowany zakres ilości płynu hodowlanego mutantu, wytwarzającego L-leucynę, jaka ma być dodana do środowiska fermentacyjnego L-lizyny.

Przykład doświadczalny 1

Przygotowuje się środowisko podstawowe o następującym składzie:

glukoza	150	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	40	g/l
KH ₂ PO ₄	1	g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	g/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	6	mg/l
biotyna	300	γ/l
Chlorowodorek tiaminy	200	γ/l
Ajeki ¹	1	g/l
CaCO ₃	5	g/l
L-treonina	600	γ/l
DL-metionina	200	γ/l

(pH przed sterylizacją wynosi 7,4)

¹ Nazwa handlowa dla kwaśnego hydrolizatu proteiny sojowej, otrzymywanego z firmy Ajinomoto Inc., Japan.

6 rodzajów środowiska przygotowywano, dodając płyn hodowlany szczepu, wytwarzającego L-leucynę, zawierający 15,6 g/l L-leucyny, do podstawowego środowiska w różnych ilościach, podanych w Tabelicy 1.

Brevibacterium flavum ATCC 21518 zaszczenia się w 10 ml porcjach środowiska podstawowego, otrzymując w ten sposób 6 rodzajów odżywek w 250 ml-kolbach Erlenmeyer'a i hoduje w temperaturze 28°C przez 110 godzin, stosując wstrząsanie. Po zakończeniu okresu hodowania, oznacza się wydajności L-lizyny oraz wzrost komórek. Wyniki podano w Tabelicy 1.

Tabelica 1

Stężenie dodawanego płynu hodowlanego szczepu, wytwarzającego L-leucynę (ml/l)	Wydajność L-lizyny (g/l)	Wzrost komórek (g/l) suchych komórek
0	32	9,8
2	40	10,9
5	48	12,5
10	55	13,8
20	60	15,3
40	59	14,7
60	56	13,5

Płyn hodowlany szczepu, wytwarzającego L-leucynę, otrzymuje się w sposób następujący:

Corynebacterium glutamicum (FERM—P No. 1834) ATCC 21685 zaszczenia się w 5 litrowym naczyniu fermentacyjnym w 3 litrach pożywki zarodowej o następującym składzie:

D-glukoza	50	g/l
pepton	10	g/l
ekstrakt drożdżowy	10	g/l
ciecz po rozmoczeniu ziaren kukurydzy	5	g/l
chlorek sodowy	2,5	g/l
mocznik	3	g/l
biotyna	50	γ/l

(pH=7,2 przed sterylizacją)

Hodowlę prowadzi się w temperaturze 30°C przez 18 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 3 l/min i mieszanie z szybkością 600 obr./min.

5 1 l tej kultury zarodowej zaszczenia się w 30 litrowym naczyniu fermentacyjnym w 10 l głównego środowiska fermentacyjnego o następującym składzie:

octan amonowy	5,0	g/l
KH ₂ PO ₄	2,0	g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	g/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,01	g/l
biotyna	50	γ/l
chlorowodorek tiaminy	100	mg/l

(pH=7,4 przed sterylizacją)

Hodowlę prowadzi się w temperaturze 30°C przez 60 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 10 l/min i mieszanie z szybkością 400 obr./min.

20 Po 3 godzinach od rozpoczęcia hodowania 10 l mieszaniny, zawierającej 71 g/l octanu amonowego i 380 g/l kwasu octowego, wprowadza się w sposób ciągły do środowiska odżywczego przez okres 56 godzin w taki sposób, aby pH środowiska utrzymać na poziomie 6,8 i aby stężenie kwasu octowego w środowisku wynosiło 1,2—19 g/l. Po zakończeniu hodowli, w płynie hodowlanym gromadzi się 15,6 g/l L-leucyny.

30 Przykład doświadczalny 2

Jako szczep wytwarzający L-lizynę stosuje się Corynebacterium glutamicum ATCC 21516, który hoduje się w taki sam sposób, jak opisano w przykładzie doświadczalnym 1, z tym wyjątkiem, że stosuje się różne ilości płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę, jak pokazano w Tabelicy 2.

Tabelica 2

Stężenie dodanego płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę (ml/l)	Wydajność L-lizyny (g/l)	Wzrost komórek (g/l) suchych komórek
0	30	9,0
2	37	10,1
5	48	12,6
10	56	13,5
20	62	14,9
40	58	14,4
60	55	14,0
80	53	13,8
100	54	13,3
150	52	13,5

Niżej podane przykłady ilustrują sposób według wynalazku.

60 Przykład I. Corynebacterium glutamicum ATCC 21513 (szczep wytwarzający L-lizynę) zaszczenia się w 330 ml pożywki zarodowej, którą hoduje się w 2 l kolbie Erlenmeyer'a w temperaturze 28°C przez 24 godziny, stosując wstrząsanie.

65 Skład pożywki zarodowej

D-glukoza	40 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	1,5 g/l
mocznik	3 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
pepton	20 g/l
ekstrakt mięśny	5 g/l
biotyna	50 γ/l
(pH=7,2 przed sterylizacją)	

Przygotowuje się odpowiednio 5 rodzajów środowisk o następujących składach:

Środowisko A—1:

końcowa melasa z dna	150 g/l (jako glukoza)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g/l
KH ₂ PO ₄	0,7 g/l
mocznik	3 g/l
Ajeki	20 g/l

(pH=7,4 przed sterylizacją)

Środowisko A—2:

środowisko A—1

+

13 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę (zawierającego 15,0 g/l L-leucyny)

Środowisko A—3:

Środowisko A—1

+

200 mg/l L-leucyny

Środowisko A—4:

Środowisko A—1

+

13 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego kwas L-glutaminowy (zawierającego 60 g/l kwasu L-glutaminowego)

Środowisko A—5:

Środowisko A—1

+

13 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego kwas L-glutaminowy, stosowanego do otrzymania środowiska A—4

+

200 mg/l L-leucyny

1 l otrzymanej wyżej kultury nasiennej zaszczepia się w 10 l porcjach podanych wyżej 5 rodzajów środowisk w 30 litrowych naczyniach fermentacyjnych. Hodowanie prowadzi się w temperaturze 28° do 48 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 10 l/min. i mieszanie z szybkością 400 obr./min. Podczas hodowania pH środowiska utrzymuje się na poziomie 6,8 za pomocą 22% roztworu wodnego amoniaku.

Po zakończeniu hodowania, płyn hodowlany zawiera L-lizynę, jak pokazano w Tablicy 3.

Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę i szczepu wytwarzającego kwas L-glutaminowy, jakie stosowano wyżej, otrzymuje się w następujący sposób, odpowiednio:

Otrzymywanie płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę

Tablica 3

Środowisko	Dodatek	Wydajność L-lizyny (g/l)
A-1	Zaden	40
A-2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	55
A-3	L-leucyna	44
A-4	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego kwas L-glutaminowy	40
A-5	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego kwas L-glutaminowy + L-leucyna	46

Brevibacterium lactofermentum (FERM-P No. 1837) ATCC 21888) ród wytwarzający L-leucynę (zaszczepia się w 5 litrowym naczyniu fermentacyjnym w 3 l pożywki zarodowej i hoduje w temperaturze 30°C przez 18 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 3 l/min i mieszanie z szybkością 600 obr./min.

Skład pożywki zarodowej:

D-glukoza	50 g/l
pepton	10 g/l
ekstrakt drożdżowy	10 g/l
ciecz po rozmoczeniu ziaren kukurydzy	5 g/l
NaCl	2,5 g/l
mocznik	3 g/l
biotyna	50 γ/l
(pH przed sterylizacją 7,2)	

1 l przygotowanej w ten sposób pożywki zarodowej zaszczepia się w 30 litrowym naczyniu fermentacyjnym w 10 l głównego medium fermentacyjnego o następującym składzie:

Skład głównego medium fermentacyjnego:

octan amonowy	15 g/l
KH ₂ PO ₄	2,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,01 g/l
biotyna	50 γ/l
chlorowodorek tiaminy	100 mg/l
(pH=7,4 przed sterylizacją)	

Hodowlę prowadzi się w temperaturze 30°C przez 60 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 10 l/min i mieszanie z szybkością 400 obr./min., utrzymując pH środowiska około 6,8 za pomocą 60% wodnego kwasu octowego. Po 7 godzinach od rozpoczęcia hodowania, 70 ml porcje wodnego roztworu, zawierającego 11 g octanu amonowego, wprowadza się do środowiska co 1 godzinę przez 50 razy. Podczas hodowania stężenie kwasu octowego w środowisku utrzymuje się na poziomie 1,2—18 g/l. Po zakończeniu hodowania w płynie hodowlanym gromadzi się 15,0 g/l L-leucyny.

Otrzymywanie płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego kwas L-glutaminowy

Arthrobacter paraffineus ATCC 15591 (szczep wytwarzający kwas L-glutaminowy) zaszczenia się w 2 litrowej kolbie Erlenmeyer'a w 300 ml pożywki zarodowej i hoduje w 30° przez 24 godziny stosując wstrząsanie.

Skład pożywki zarodowej:

octan sodu	10 g/l
pepton	10 g/l
ekstrakt mienny	5 g/l
NaCl	2,5 g/l
(pH=7,0 przed sterylizacją)	

300 ml w ten sposób otrzymanej kultury zarodowej zaszczenia się w 5 litrowym naczyniu fermentacyjnym w 3 l głównego medium fermentacyjnego o następującym składzie:

Skład głównego medium fermentacyjnego:

octan amonu	20 g/l (jako kwas octowy)
KH ₂ PO ₄	1 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l
chlorowodorek tiaminy	5 γ/l
(pH=7,0 przed sterylizacją)	

Tablica 4

Amino- kwas	Ilości aminokwasów (mg/l)		
	Pochodzący z płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę	Pochodzący z Ajieki	Pochodzący z końcowej melasy z dna
Alanina	6,37	176	99,0
Kwas asparaginowy	—	967	278
Arginina	—	546	7,5
			(jako chlorowodorek)
Cystyna	—	—	3,0
Glicyna	4,81	332	7,5
kwas glutaminowy	12,6	1570	9,0
Histydyna	—	242	13,5
			(jako chlorowodorek)
Izoleucyna	5,85	284	—
Leucyna	195	586	—
Lizyna	5,2	550	—
Metionina	—	98	—
Fenylalanina	—	340	12,0
Prolina	—	460	—
Seryna	—	376	52,5
Treonina	—	362	52,5
Tryptofan	—	—	7,5
Tyrozyna	—	208	13,5
Walina	—	310	48

Hodowlę prowadzi się w temperaturze 30°C przez 3 dni, stosując napowietrzanie z szybkością 3 l/min i mieszanie z szybkością 600 obr./min. Podczas hodowania 1 l wodnego roztworu, otrzymanego przez dodanie 3 części wagowych wody do mieszaniny 70 części wagowych lodowatego kwasu octowego i 27 części wagowych 22% wodnego roztworu amoniaku, wprowadza się do środowiska, utrzymując pH środowiska 4—9. Dodawanie kończy się na 2 godziny przed zakończeniem hodowania. Po zakończeniu hodowania 60 g/l kwasu L-glutaminowego gromadzi się w płynie hodowlanym.

Środowisko A—2 stosowane wyżej, zawierające środowisko A—1 i płyn hodowlany, otrzymany przez hodowanie szczepu wytwarzającego L-leucynę, zawiera aminokwasy pochodzące z płynu hodowlanego, Ajieki i końcowej melasy z dna w ilościach podanych w tablicy 4.

Z tablicy wynika, że ilości aminokwasów, pochodzące z płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę, są bardzo małe w porównaniu do aminokwasów, pochodzących z Ajieki lub końcowej melasy z dna. Wynika z tego, że aminokwasy, pochodzące z płynu hodowlanego mutantu wytwarzającego L-leucynę, nie wywierają dodatkowego wpływu na produkcję L-lizyny. Na tej podstawie dochodzi się do wniosku, że wpływu dodatku płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę nie można przypisać aminokwasom, zawartym w płynie hodowlanym.

Przykład II. Przygotowuje się 4 rodzaje środowisk o następującym składzie, odpowiednio:

Środowisko B—1

D-glukoza	150 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	6 mg/l
biotyna	300 γ/l
chlorowodorek tiaminy	200 γ/l
Ajieki	1 g/l
CaCO ₃	5 g/l
L-treonina	600 γ/ml
DL-metionina	200 γ/ml

Środowisko B—2:

Środowisko B—1

+

20 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę (zawierającego 15,6 g/l L-leucyny), otrzymanego w Przykładzie doświadczalnym 1

Środowisko B—3:

Środowisko B—1

+

320 mg/l L-leucyny

Środowisko B—4:

Środowisko B—1

+

1 g/l Ajieki

Brevibacterium flavum ATCC 21518 (szczep wy-

tworzący L-lizynę (zaszczepia się w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a w 10 ml porcji wyżej opisanych czterech rodzajów medium i hoduje się w 80°C przez 110 godzin, stosując wstrząsanie.

Po zakończeniu hodowania otrzymany płyn hodowlany zawiera L-lizynę, jak pokazano w Tabelicy 5.

Tabelica 5

Środowisko	Dodatek	Wydajność L-lizyny (mg/l)
B—1	Nie ma	32
B—2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	60
B—3	L-leucyna	35
B—4	Ajeki	46

Przykład III. Stosuje się *Corynebacterium glutamicum* 21516, *Brevibacterium flavum* ATCC 21528, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21544 i *Corynebacterium glutamicum* KY 10013 (z których wszystkie są szczepami wytwarzającymi L-lizynę).

Szczepy te zaszczepia się oddzielnie w 250 ml kolbie Erlenmeyer'a w 40 ml pożywki zarodowej i hoduje w 28°C przez 24 godziny, stosując wstrząsanie.

Skład pożywki zarodowej:

D-glukoza	50 g/l
NaCl	2,5 g/l
mocznik	3 g/l
pepton	10 g/l
ekstrakt drożdżowy	10 g/l
ciecz z namoczenia ziaren kukurydzy	5 g/l
biotyna	50 γ/l
(pH=7,2 przed sterylizacją)	

Przygotowuje się 3 rodzaje środowisk o następujących składach:

Środowisko C—1:

końcowa melasa z dna	100 g/l (jako glukoza)
KH_2PO_4	0,5 g/l
MgSO_4 (bezwodny)	0,5 g/l
$/\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,3 g/l
Ajeki	20 g/l

(pH=7,4 przed sterylizacją)

Środowisko C—2:

Środowisko C—1

+

20 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę, otrzymanego w przykładzie 1 (zawierającego 15,0 g/l L-leucyny)

Środowisko C—3:

Środowisko C—1

+

300 mg/l L-leucyny

Płyny po hodowli z zastosowaniem powyższych

mediów zawierają L-lizynę w ilościach, jak pokazano w tabelicy 6.

Tabelica 6

Szczep	Środowisko	Dodatek	Wydajność L-lizyny (g/l)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21516	C—1	Nie ma	27,0
	C—2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	32,0
	C—3	L-leucyna	27,2
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 21528	C—1	Nie ma	26,1
	C—2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	28,7
	C—3	L-leucyna	26,0
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21544	C—1	Nie ma	27,8
	C—2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	30,5
	C—3	L-leucyna	26,8
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KY 10013	C—1	Nie ma	23,0
	C—2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	25,0
	C—3	L-leucyna	22,9

Przykład IV. W przykładzie tym *Corynebacterium glutamicum* KY 10403 (szczep wytwarzający L-lizynę) jest hodowany zarodowo w taki sam sposób, jak opisano w Przykładzie I.

Przygotowano 3 rodzaje środowisk o następującym składzie:

Środowisko D-1:

Końcowa melasa z dna	150 g/l (jako glukoza)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
KH_2PO_4	0,7 g/l
mocznik	3 g/l
Ajeki	10 g/l
(pH = 7,4 przed sterylizacją)	

Środowisko D-2:

Środowisko D-1

+

20 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leu-

cyne, otrzymanego w Przykładzie I (zawierającego 15,0 g/l L-leucyny)

Środowisko D-3:

Środowisko D-1

+

300 mg/l L-leucyny

1 l kultury zarodowej zaszczepia się w 30 litrowych naczyniach fermentacyjnych w 10 l porcjach powyżej wspomnianych 3 rodzajów medium i hoduje w taki sam sposób, jak opisano w Przykładzie I.

Po zakończeniu hodowania otrzymane płyny hodowlane zawierają L-lizynę w ilościach, jak pokazano w Tablicy 7.

Tablica 7

Środowisko	Dodatek	Wydajność L-lizyny g/l
D-1	Nie ma	41
D-2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	52
D-3	L-leucyna	45

Przykład V. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 (szczep wytwarzający L-lizynę) jest hodowany zarodowo w taki sam sposób, jak opisano w Przykładzie I.

Przygotowano trzy rodzaje środowisk o następujących składach:

Środowisko E-1:

Taki sam skład, jak Środowisko A-1, opisane w przykładzie I.

Środowisko E-2:

Środowisko E-1

+

13 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę (zawierającego 15,8 g/l L-leucyny)

Środowisko E-3:

Środowisko E-1

+

200 mg/l L-leucyny

1 litr płynu hodowlanego zaszczepia się w 30 litrowych naczyniach fermentacyjnych do 10 litrowych porcji wyżej wspomnianych 3 rodzajów środowisk. Hodowanie prowadzi się w temperaturze 28°C przez 48 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 10 l/min i mieszanie z szybkością 400 obr./min.

Podczas hodowania pH środowiska utrzymuje się 6,8 za pomocą 22% wodnego roztworu amoniaku.

Po zakończeniu hodowania otrzymany płyn hodowlany zawiera L-lizynę, jak pokazano w Tablicy 8.

Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę, stosowany wyżej przygotowuje się w sposób następujący.

Brevibacterium lactofermentum (FERM—P. No. 1837) ATCC 21888 (ród wytwarzający L-leucynę)

Tablica 8

Środowisko	Dodatek	Wydajność L-lizyny (g/l)
E-1	Nie ma	41
E-2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	57
E-3	L-leucyna	46

hoduje się zarodowo w taki sam sposób, jak opisano w Przykładzie 1. 1 litr kultury zarodowej zaszczepia się w 30 litrowym naczyniu fermentacyjnym w 10 litrach głównego środowiska fermentacyjnego o następującym składzie.

Skład głównego medium fermentacyjnego:

końcowa melasa z dna 150 g/l

(jako glukoza)

MgSO₄ · 7H₂O 0,3 g/l

KH₂PO₄ 0,7 g/l

(NH₄)₂SO₄ 20 g/l

Hodowanie prowadzi się w temperaturze 30°C przez 30 godzin, stosując napowietrzanie z szybkością 10 l/min i mieszanie z szybkością 400 obr./min, utrzymując pH środowiska 6,8 za pomocą 22% wodnego roztworu amoniaku. Po zakończeniu hodowania w cieczy kulturowej gromadzi się 15,8 g/l L-leucyny.

Przykład VI *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 (ród wytwarzający L-lizynę) jest hodowany zarodowo w taki sam sposób, jak opisano w przykładzie I.

Przygotowano 3 rodzaje środowisk o następujących składach:

Środowisko F-1:

octan amonu 15 g/l

KH₂PO₄ 2,0 g/l

MgSO₄ · 7H₂O 0,5 g/l

FeSO₄ · 7H₂O 0,1 g/l

MnSO₄ · 4H₂O 0,01 g/l

biotyna 50 γ/l

chlorowodorek tiaminy 100 mg/l

Ajeki 20 g/l

(pH=7,4 przed sterylizacją)

Środowisko F-2:

Środowisko F-1

+

13 ml/l płynu hodowlanego szczepu wytwarzającego L-leucynę (zawierającego 15,8 g/l L-leucyny) otrzymanego w przykładzie V.

Środowisko F-3:

Środowisko F-1

+

200 mg/l L-leucyny

1 litr kultury zarodowej zaszczepia się w 30 litrowych naczyniach fermentacyjnych do 10 litrowych porcji powyżej wspomnianych 3 rodzajów środowisk. Hodowanie prowadzi się w temperaturze 28°C przez 62 godziny, stosując napowietrzanie z szybkością 10 litrów/min. i mieszanie z szybkością 400 obr./min., utrzymując pH środowiska

6,8 za pomocą 60%-owego wodnego roztworu kwasu octowego. Po 10 godzinach od rozpoczęcia hodowania co godzinę, do środowiska wprowadza się 70 ml porcji wodnego roztworu, zawierającego 13 g octanu amonu, 50 razy. Podczas hodowania stężenie kwasu octowego w środowisku utrzymuje się w granicach 0,5–15 g/l.

Po zakończeniu hodowania otrzymane płyny hodowlane zawierają L-lizynę, jak pokazano w Tabelicy 9.

Tabelica 9

Środowisko	Dodatek	Wydajność L-lizyny (g/l)
F—1	Nie ma	32
F—2	Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	48
F—3	L-leucyna	35

Przykład VII. Powtórzono procedurę, opisaną w przykładzie I z tym wyjątkiem, że zastosowano płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę, otrzymany w przykładzie I. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabelicy 10.

Tabelica 10

Dodatek	Wydajność L-lizyny (g/l)
Nie ma	30
Płyn hodowlany szczepu wytwarzającego L-leucynę	49
L-leucyna	34

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania L-lizyny na drodze hodowania mutantu, wytwarzającego L-lizynę, bakterii maczugowych, wytwarzających kwas glutaminowy w środowisku odżywczym, **znamienny tym**,

że mutant hoduje się w pierwszym środowisku odżywczym, zawierającym źródło przyswajalnego węgla i azotu oraz 2–150 ml/l płynu hodowlanego, otrzymanego w wyniku hodowania mutantu, wytwarzającego L-leucynę, bakterii maczugowych, wytwarzających kwas glutaminowy, w drugim środowisku odżywczym, a następnie odzyskuje L-lizynę.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że płyn hodowlany mutantu, wytwarzającego L-leucynę, dodaje się do pierwszego środowiska w ilościach wzrastających, a całą ilość płynu hodowlanego mutantu, wytwarzającego L-leucynę, wprowadza się aż do zakończenia logarytmicznego etapu wzrastania.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako źródło węgla stosuje się przynajmniej jeden ze składników, takich jak melasa, końcowa melasa z dna, glukoza lub kwas octowy.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako mutant, wytwarzający L-lizynę, stosuje się szczep taki, jak *Brevibacterium aminogenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium sacchorylyticum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Corynebacterium acetacidophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium calluane*, *Microbacterium ammoniophilum* lub *Arthrobacter*.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako mutant, wytwarzający L-leucynę, stosuje się szczep, taki jak *Brevibacterium aminogenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium sacchorylyticum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Corynebacterium acetacidophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium calluane*, *Microbacterium ammoniophilum* lub *Arthrobacter*.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę mutantu, wytwarzającego L-lizynę, prowadzi się w temperaturze 25–40°C i przy pH=6–8,5.